

表6 鳥インフルエンザウイルスのNAに対するマイクロアレイプローブの評価

NA型	プローブ数	データベース登録株数*	検出可能株数**	検出不可能株数
N1	7	715	699 (97%)	16 (3%)
N2	8	445	440 (99%)	5 (1%)
N3	4	86	83 (97%)	3 (3%)
N4	2	17	11 (65%)	6 (35%)
N5	3	6	6 (100%)	0 (0%)
N6	4	108	108 (100%)	0 (0%)
N7	5	37	37 (100%)	0 (0%)
N8	5	82	82 (100%)	0 (0%)
N9	2	48	48 (100%)	0 (0%)
合計	40	1544	1514 (98%)	30 (2%)

\* The Influenza Sequence Database <http://www.flu.lanl.gov/> (2006年10月時点)

\*\* 各型を標的とした複数のマイクロアレイプローブ内のBLAST検索でE-Valueが $10^{-15}$ 以下(ホモロジー約95%以上)を示した株数。

食肉における家畜・家禽のウイルス疾病に関する研究  
家禽のウイルス疾病に関する研究

分担研究者 伊藤壽啓 鳥取大学農学部教授

研究要旨:本研究では、高病原性鳥インフルエンザに対して応用可能な現存の検査キットや方法の有用性を検証すること、ならびに新たな簡易迅速高感度検査法の開発を試みる。これらの研究結果に基づき、食鳥処理場等における鳥インフルエンザの検査体制の構築を最終目標とする。

#### A. 研究目的

2004年1月、我が国において79年ぶりに高病原性鳥インフルエンザが西日本の3府県4箇所発生し、総計27万5千羽の鶏が死亡あるいは殺処分された他、移動制限区域内の鶏卵生産農場あるいは肉用鶏生産農場など合計178戸（約420万羽）が生産物の移動を制限され、莫大な経済的損害を被った。さらにこの頃、ベトナムやタイで本ウイルスが人にも感染し、死亡例が次々と報告されていたことから、一般消費者による鶏肉・鶏卵離れが深刻化し、所謂風評被害が拡大して直接的被害よりもはるかに大きな間接的被害が生じた。3月までの約4ヵ月間で、その生産者らが被った被害総額は約138億円と試算されている。さらに2004年の国内発生のうち、京都の事例では感染鶏が食鳥処理場に搬入され、それを通常の検査では認知できなかったという事実も判明した。本病のように明確な臨床症状を呈しない疾病については、通常検査の上に精密なウイルス学的検査が必要となる。しかし一般にウイルス学的検査は煩雑で時間を要することから、それに代わる迅速高感度かつ簡便な診断法の開発が切望されている。

そこで本研究では鶏肉鶏卵等の安全確保ならびにそのための施策立案に有用な基礎的資料を提供することを目的として、鳥インフルエンザに対する迅速高感度診断法の確立を目指す。

#### B. 研究方法

1. 人インフルエンザ迅速診断キットによる鶏肉中の鳥インフルエンザウイルス検出への応用

##### (1) ウイルス株

用いたウイルス株は野生水禽由来 A/whistling swan/Shimane/499/83 (H5N3) 株である。本ウイルスは鳥取大学農学部獣医公衆衛生学研究室に保存されているものを10日齢発育鶏卵で増殖培養したものである。本ウイルスの50%感染量 (EID<sub>50</sub>/ml) は発育鶏卵を用いて Reed & Munch の方法で求めた。また、それぞれのウイルスは実験に供するまで、-80℃の超低温フリーザーに保管した。

(2) インフルエンザ迅速診断キットを用いた鶏肉中の鳥インフルエンザウイルスの検出

鳥インフルエンザ感染鶏肉を想定し、市販の

鶏肉を用いて作成した10%乳剤に既知の感染価のウイルスを混合し、人用インフルエンザ診断キットによる検出限界を測定した。人用インフルエンザ迅速診断キットによる鳥インフルエンザウイルスの検出はエスプライン「インフルエンザA&B-N」（富士レビオ株式会社）を用い、添付のプロトコールに準じて行った。

## 2. AMP法の検出感度の検討

### (1) RNA抽出

ウイルス液からviral RNA kit(Qiagen社)を用い、製品に添付のプロトコールに従ってRNAを抽出した。

### (2) プライマー

昨年度設計したA型インフルエンザウイルスに共通のMプライマーを用いた。各プライマーの配列は以下の通りである。

F1 TTTATGCCAAACTTTTCTCCCGG

F2 TTGCACTTGATATTGTGGATT

F3 TGATCCTCTCGTTGTTGC

B1 AGTGCCTGAGTCTATGAGGG

B2 TGCTACCAGTAAAAACAGTTG

B3 ATCTCGACTCATTTTTTGATGGAA

### (3) LAMP法

上記のプライマーセットおよびLoopamp DNA増幅試薬キット（栄研化学株式会社）を用いて、各ウイルスの抽出RNAを検体とし、ウイルス遺伝子の検出を行った。方法は添付のプロトコールに準じて行った。

## 3. RT-PCR法

### (1) プライマー

A型インフルエンザウイルスに共通のプライマーとして以下のプライマーペアを用いた。

Forward primer NP-1192 1192~

AGCAGATACTGGGCCATAAAG

Reverse primer NPR-1501 ~1501

TTGTCTCCGAAGAAATAAGA

### (2) 反応条件

RT-PCRは添付のプロトコールに準じ、以下の

反応条件で実施した。まず、逆転写反応はRandom Primer $5\mu\text{l}$ 、DDW $1\mu\text{l}$ 、RNA試料 $5\mu\text{l}$ を混合し、 $95^{\circ}\text{C}$ 、5分間加熱後、氷上で急冷した。その後、 $5\times\text{buffer}$  $5\mu\text{l}$ 、 $10\text{mM dNTP mix}$  $2\mu\text{l}$ 、RNase inhibitor $0.5\mu\text{l}$ 、Reverse transcriptase $0.5\mu\text{l}$ 、DDW $6\mu\text{l}$ を混合し、 $42^{\circ}\text{C}$ で1時間反応を行った。PCR反応は試料 $0.3\mu\text{l}$ 、 $10\times\text{buffer}$ (MgCl<sub>2</sub>添加) $1\mu\text{l}$ 、 $10\text{mM dNTP mix}$  $1\mu\text{l}$ 、Forward primer $1\mu\text{l}$ 、Reverse primer $1\mu\text{l}$ 、ポリメラーゼ (Kod-Dash)  $0.1\mu\text{l}$ 、DDW $5.6\mu\text{l}$ を混合し、PCR cycleは $95^{\circ}\text{C}$  2分反応後、 $95^{\circ}\text{C}$ 30秒、 $57^{\circ}\text{C}$ 30秒、 $72^{\circ}\text{C}$ 40秒の条件で35サイクル反応を行い、最後に $72^{\circ}\text{C}$ 5分の伸長反応を行った。

常法に従ってアガロースゲル電気泳動を行い、PCR産物の定量と非特異的バンドの有無を調べた。

## C. 研究結果

### 1. 現行の人用インフルエンザ診断キットの鶏肉中の鳥インフルエンザウイルス検出への応用

本年度はまず鳥インフルエンザ感染鶏肉を想定し、市販の鶏肉を用いて作成した10%乳剤に既知の感染価のH5ウイルスを混合し、人用インフルエンザ診断キットによる検出限界を測定した。その結果、鶏肉乳剤中のウイルスの検出限界は $10^6\text{EID}_{50}/\text{ml}$ で、PBS希釈ウイルス液の場合とほぼ同程度であった。一方、鶏肉乳剤のみによる非特異陽性反応は認められなかった。この成績から鶏肉には診断キットの反応を阻害する因子は含まれていないと考えられた。

### 2. LAMP法による検出感度の検討

昨年度に引き続き、より高感度な遺伝子診断法について検討した。RT-PCR法およびRT-LAMP法についてそれぞれ検出感度を調べた結果、RT-PCR法では $10^2\text{EID}_{50}/0.1\text{ml}$ 、RT-LAMP法では市販のH5プライマーを用いたとき $10^3\text{EID}_{50}/0.1\text{ml}$ 、昨年度本研究で設計したA型

インフルエンザウイルスに共通のMPプライマーを用いたときは $10^2$ EID<sub>50</sub>/0.1mlであった。

#### D. 考察

市販の鶏肉を用いて作成した10%乳剤に既知の感染価のH5ウイルスを混合し、人用インフルエンザ診断キットによる検出限界を測定したところ、 $10^6$ EID<sub>50</sub>/mlで、その検出限界値(HAU換算で約13HAU)は人インフルエンザウイルスに対するそれ(0.16HAU)に比べて明らかに低く、人用インフルエンザ診断キットが鳥インフルエンザウイルスに対して検出感度が著しく低い可能性が示唆された。

LAMP法によるウイルス検出感度の検討を行ったところ、開発した方法が高感度であることがわかり、反応温度管理にサーマルサイクラー、検出にUVイルミネーター等が必要であるRT-PCR法に比べ、RT-LAMP法は等温で反応が進み、検出も黙視で行えることから、現段階ではこのRT-LAMP法がもっとも有効な迅速診断法であると考えられた。

次年度はこれまで我が国で発生した異なるH5ウイルス(山口株、茨城株および宮崎株)について、本診断法の有効性をさらに検討する計画である。

#### E. 結論

10%鶏肉乳剤中のH5ウイルスを人用インフルエンザ診断キットによる検出限界を測定した結果、 $10^6$ EID<sub>50</sub>/mlで、PBS希釈ウイルス液の場合とほぼ同程度であった。一方、鶏肉乳剤のみによる非特異陽性反応は認められなかった。

本研究で設計したA型インフルエンザウイルスに共通のMPプライマーを用いたLAMP法で $10^2$ EID<sub>50</sub>/0.1mlのウイルスを検出できた。

#### F. 健康危機情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kogure, T., Suzuki, T., Takahashi, T., Miyamoto, D., Hidari, K. I. P. J., Chao-Tan, G., Ito, T., Kawaoka Y., and Suzuki, Y. (2006) Human trachea primary epithelial cells express both sialyl-2-3-Gal receptor for human parainfluenza virus type 1 and avian influenza viruses, and sialyl-2-6-Gal receptor for human influenza viruses. *Glycoconjugate J.* 23:99-104.

Ito H., Ito T., Hikida, M., Yashiro, J., Otsuka, A., Kida, H., and Otsuki K. (2006) Outbreak of highly pathogenic avian influenza in Japan and anti-influenza virus activity of povidone-iodine products. *Dermatology*, 212 (suppl 1) 109-112.

Horimoto, T., Takada, A., Fujii, K., Goto, H., Hatta, M., Watanabe, S., Iwatsuki-Horimoto, K., Ito, M., Tagawa-Sakai, Y., Yamada, S., Ito, H., Ito, T., Imai, M., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Lim, W., Guan, Y., Peiris, M., and Kawaoka, Y. (2006) The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate. *Vaccine*, 24 (17) 3669-3676.

Yamana, H., Ito, H., Ito, T., Murase, T., Motoike, K., Miyoshi, N., Wakabayashi, K., and Otsuki, K. (2007) Strong Antiviral Activity of Heated and Hydrated Dolomite - Preliminary Investigation. *J. Vet. Med. Sci.*, (in press)

伊藤壽啓(2006): 高病原性鳥インフルエンザの現状。感染症。36(1), 1-6.

伊藤啓史、伊藤壽啓(2006): インフルエンザウ

イルスの種間伝播。獣医畜産新報。58(10) 861-864.

伊藤壽啓(2006):高病原性鳥インフルエンザ。カレントセラピー24(12), 17-20

伊藤壽啓(2006):第1章「人獣共通感染症」高病原性鳥インフルエンザ-病原性と生態。生物の科学遺伝。別冊No.19、45-49

伊藤壽啓(2007):高病原性鳥インフルエンザ。生物の科学遺伝。別冊No.20「進化でどこまでわかるか?」(印刷中)

## 2. 学会発表

Ito, T. : DIFFERING POTENTIAL OF AVIRULENT WATERFOWL ISOLATES FOR BECOMING HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA VIRUSES BY PASSAGING IN CHICKENS. 第1回国際人獣共通感染症学会総会, ソウル, 2006.1.19

Ito, T. : Different potential of avirulent waterfowl isolates to become highly pathogenic avian influenza virus by passaging in chickens. Second Japan-China Bilateral Symposium on Avian Influenza, Tokyo. 2007.2.6-7

Ito, T., Ito, H., and Otsuki, K. : DIFFERING POTENTIAL OF AVIRULENT WATERFOWL ISOLATES FOR BECOMING HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA VIRUSES BY PASSAGING IN CHICKENS, Asian Research Forum on Emerging and Reemerging Infections - 2006, Tokyo. 2006.2.19-20

伊藤 啓史、野村 文恵、大槻 公一、伊藤 壽啓: ニューカッスル病ウイルスのアヒルにおける病原性の獲得。第22回中国四国ウイルス研究

会。鳥取。2007.6.10-11

藤本 佳万、小島 三奈、伊藤 啓史、河岡 義裕、大槻 公一、伊藤 壽啓: インフルエンザウイルスの腸管増殖能に関わるNA蛋白のlow-pH抵抗性。第22回中国四国ウイルス研究会。鳥取。2007.6.10-11

伊藤壽啓:我が国の鳥インフルエンザ・モニタリングの最新情報紹介,日本採卵養鶏産業研究会第四回研究セミナー,福島県二本松市,2006.6.22-23

伊藤壽啓:高病原性鳥インフルエンザの国内発生とその感染経路。第28回家畜衛生講習会。熊本。2006.8.8-10

伊藤壽啓:高病原性鳥インフルエンザと新型ウイルス出現の可能性。日本進化学会シンポジウム17「保全進化地球環境の今後」。東京代々木オリンピックセンター。2006.8.30-31

Ito, T. : Pathogenesis of avian influenza virus. Regional workshop for the control of avian influenza, Sapporo, 2006.9.12

伊藤壽啓:鳥インフルエンザ。日本遺伝学会第78回大会。つくば。2006.9.25-27

伊藤壽啓:異なる宿主(ヒトも含む)におけるAIVの感染と病態。平成18年度全国秋季鶏病技術研修会。山形。2006.10.20

伊藤壽啓:鳥インフルエンザウイルスの感染と病態。西日本感染症学会。岡山。2006.11.24

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

該当なし

市販の人用インフルエンザ検査キットの  
高病原性鳥インフルエンザウイルスでの評価

分担研究者 棚林 清 国立感染症研究所獣医科学部 室長  
協力研究者 山本美江 国立感染症研究所獣医科学部 研究員  
堀田明豊 国立感染症研究所獣医科学部 研究員

研究要旨：各種市販の人用インフルエンザ検査キットを用いて H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの検出を試みたところ  $10^{3.3}$  から  $10^{4.3}$ TCID<sub>50</sub> のウイルスを検出できるキットもあったが、 $10^{6.3}$ でも検出できないキットもあり、感度に差があることがわかった。先に調べた低病原性の H5N1 亜型ウイルス株を用いた場合とは検出感度に差があることが明らかになった。人用インフルエンザ検査キットを鳥類由来インフルエンザウイルスの検査に応用する場合は感度や操作が容易性を考慮して使用する必要性があると考えられた。

#### A. 研究目的

2004年本邦においても高病原性鳥インフルエンザが発生し、京都の事例では感染鶏が食鳥処理場に搬入された事例があった。また、その後も海外では本病が家禽でも発生が続いており、さらに2007年には再び日本国内で4例の高病原性鳥インフルエンザの発生があり国民の関心も高い。食鳥検査において通常の検査では感知できないようなウイルス疾病ではウイルス学的検査が必要となる。一般にウイルス学的検査は煩雑で時間を要することから、迅速高感度かつ簡便な診断法の開発が必要である。本研究では食鳥検査所で鳥インフルエンザを簡易に検査する方法として既に人用に開発市販されている各種インフルエンザ検査キットの鳥インフルエンザウイルスでの検出感度や操

作性について検討することを目的とした。昨年度に続き今年度は H5N1 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスを用いて比較検討した。

#### B. 研究方法

1. 供試ウイルス：高病原性鳥インフルエンザの発生があった養鶏場近くで採取されたオオクロバエより発育鶏卵にて分離された高病原性鳥インフルエンザウイルス (A/Blowfly/Kyoto/93/2004 H5N1)で、発育鶏卵で増殖させ、使用まで  $-80^{\circ}\text{C}$  に分注保存した。50%感染価は MDCK 細胞および発育鶏卵を用いて Reed & Munch の方法で求めた。

2. インフルエンザ検査キットでの反

応：購入供試した 12 キットを表 1 に示した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で希釈したウイルス液 100 $\mu$ l を各キットに同梱されている各規定量の検体処理液に加え攪拌後、テストプレートにろ過フィルターを通し各キットの指示に従い滴下した。また、ストリップタイプのもは攪拌後ろ過フィルターを通さずに抽出液に投入した。各ウイルス希釈液あたり 3 キットを用いた。標準の判定時間まで静置し、目視判定した。明らかな発色ができたものを++、やや薄いものを+、また、シグナルはあるが判定しにくい場合を±、シグナルが見えないものを-とした。確認のため複数人で判定した。

### C. 研究結果

#### 1. 各種インフルエンザウイルス抗原検出キットでの検出

ウイルス液を PBS にて 10 倍段階希釈し、その 0.1ml を各キットの規定量の検体処理液に添加後各キットに滴下もしくはストリップを浸漬させ判定した。結果の一覧を表 2 に示した。

10<sup>6.3</sup> TCID<sub>50</sub> のウイルスを各キット同梱の検体処理液に添加後反応させた場合は供試した 8 種のキットで検出可能であった。しかし 3 種のキットではシグナルが観察されなかった。

6 種のキットでは 10<sup>3.3</sup>TCID<sub>50</sub> の、2 種は 10<sup>4.3</sup> のウイルスを検出できた。いずれのキットでも 10<sup>2.3</sup>TCID<sub>50</sub> のウイルスは検出できなかった。

同じ H5N1 亜型ウイルスの A/duck/Hyogo/35/2001 では 10<sup>4.5</sup>TCID<sub>50</sub> が検出限界であったが今回用いた A/blowfly/Kyoto/93/2004 では約 10 倍ほど感度よく検出されたキットもあった一方、10<sup>6.3</sup> TCID<sub>50</sub> のウイルスで陽性シグナ

ルを示さないキットもあった。2 つのウイルス株を用いた結果では検出感度で逆転した感度を示すものは無かったものの感度に差があった。

### D. 考察

人用のインフルエンザ診断のために開発された簡易インフルエンザウイルス抗原検出キットを鳥インフルエンザウイルス株で検出感度や食鳥検査所での一時スクリーニング検査として用いる場合の感度について今回高病原性の H5N1 亜型ウイルスを用いて検出感度を調べ、昨年実施した同じ亜型ウイルスと比較した。

A/duck/Hyogo/35/2001 株よりも約 10 倍感度が良いキットもあったが 3 キットについては 10<sup>6.3</sup> TCID<sub>50</sub> のウイルスを添加しても反応せず、ウイルス株によってキットの検出感度に差があることがわかり、鳥類由来インフルエンザウイルスの検査のスクリーニングテストではキットの選択も考慮しなければならにと考えられた。また、今後さらに多種類のウイルス株についての検討も必要とも考えられた。

さらに、これまで報告されている人由来ウイルスでの必要量より多く、鳥類由来ウイルスを効率よく検出できる簡易なキットの開発製品化が期待される。

### E. 結論

各種市販の人用インフルエンザ検査キットを用いて H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの検出を試みたところ 10<sup>3.3</sup> から 10<sup>4.3</sup>TCID<sub>50</sub> のウイルスを検出できるキットもあったが、10<sup>6.3</sup> でも検出できないキットもあり、感度に差があることがわかった。また、ウイルスの株により検出感度に差があることが明らかになった。人用インフルエンザキッ

トを鳥インフルエンザウイルスの検査に応用する場合は感度や操作が容易性も考慮して使用する必要性があると考えられた。さらに多数の鳥類由来ウイルス株での検討やより高感度で簡易な検査法の開発が必要であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

特に無し

#### G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし



表1-1 試験に供したインフルエンザウイルス簡易検出キット


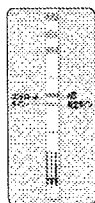




商品名 (メーカー)	形状	試料添加法 操作ステップ	判定までの 所要時間	有効期間
BD Fluエグザマン (日本ベクトン・ディッ キンソン)		滴下 1ステップ	15分	9ヶ月
QuickVueラピッドSP influ (住友製薬バイオ メデカル)		ステイック	10分	24ヶ月
エスプラインインフルエ ンザA&B-N (富士レビオ)		滴下 1ステップ	15分	15ヶ月
ダイレクテイジエン FluA+B (日本ベクトン・ ディキンソン)		滴下 7ステップ	15分	6ヶ月
クイックーインフルA・B 「生研」(デンカ生研)		滴下 1ステップ	15分	16ヶ月
ポクテムインフルエンザ A/B(シスメックス=大塚)		滴下 1ステップ	15分	12ヶ月

表1-2 試験に供したインフルエンザウイルス簡易検出キット


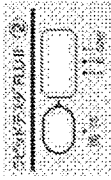
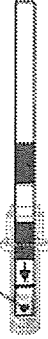

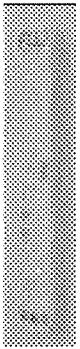

商品名 (メーカー)	形状	試料添加法 操作ステップ	判定までの 所要時間	有効期間
スタットマークインフル エンザA/B (カイノス)		滴下 1ステップ	15分	12ヶ月
ラピッドテストFLU II (第一化学薬品)		滴下 1ステップ	15分	14ヶ月
ラピッドテストFLUS ティック (第一化学薬品)		スティック	15分	10ヶ月
キャピリアFluA+B (日本ベクトン・ディキ ンソン)		滴下 1ステップ	15分	21ヶ月
チェックFluA・B (アルフレックスファーマ)		滴下 1ステップ	15分	21ヶ月
クイックチェイサー FluA, B (ミズホメデイ)		滴下 1ステップ	15分	21ヶ月

表2：各種キットのH5N1亜型インフルエンザウイルスでの検出感度

Virus	Virus titer	BD Flu エグザマン	QuickVeu ラピッド SP influenza	エスプライ インフルエンザ A& B-N	ディレクテ イジェン Flua+B	クイック イーフル A・B「生研」	ポクテムイ ンフルエン ザ A/B	スタットマ ークエンザ A/B	ラピッドラ スタFLUII	ラピッドラ スタFLU ス ティック	キャピリア Flua+B	クイック チェイサ -Flua, B
A/duck/Hyog o/35/2001	3.5	-	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	4.5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	5.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A/blowfly/ Kyoto/93/ 2004	2.3	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT	NT	NT
	3.3	+	+	+	+	+	+	-	-	NT	NT	NT
	4.3	+	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT	-
	5.3	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+	NT	-**	-**
6.3	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-**	-**	

+

反応がやや弱かった

-\*\*

再テスト確認済み

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）  
分担研究報告書

食肉に供される動物における A 群ロタウイルスの感染状況調査

分担研究者：杉山 誠 岐阜大学・院・連合獣医学研究科 教授

協力研究者：安部昌子、川口まり子、長谷部文子、伊藤直人、宮澤清志、  
村瀬哲磨、坪田敏男、石黒直隆、浅野 玄（岐阜大学応用生物科学部）  
伊藤 雅、山下照夫、榮 賢司（愛知県衛生研究所）

研究要旨：最近、食品由来の感染性胃腸炎が社会問題となり、問題となる病原体にノロウイルスとロタウイルスが挙げられている。従って、食肉に供される動物でのロタウイルスの動態は、公衆衛生上、極めて重要であると考えられる。そこで、ウシとイノシシについて、A 群ウイルスの感染状況についての調査を行った。野生のイノシシにおける本ウイルスの感染状況を把握することを目的に、愛知県および四国 4 県で捕獲されたイノシシ 182 例について、P 遺伝子型特異抗体検出法により血清疫学調査を実施した。その結果、23.6%のイノシシが P[17] 遺伝子型のトリロタウイルスの、40.7%が P[4] あるいは [8] 遺伝子型のヒトロタウイルスの、56.0%が P[2] あるいは [3] 遺伝子型のロタウイルスの感染を受けたと考えられた。抗体価の分布から、野生のイノシシでは様々なロタウイルスさらに未知の本ウイルスが流行していることが推測された。そこで、2003-06 に愛知、岐阜、群馬県で捕獲されたイノシシの腸管内容物 135 例からロタウイルス VP4 遺伝子の検出を試みたところ、岐阜県のサンプルの 1 例が陽性となった。塩基配列を解読した結果、韓国においてヤギから分離された GRV 株に最も近縁で、P 遺伝子型は P[3] と考えられた。血清疫学調査から P[3] 遺伝子型ロタウイルスの流行が推測されており、本遺伝子の検出はそれを裏付ける結果となった。昨年度実施した全国のウシにおけるロタウイルスに対する血清疫学調査（昨年度報告書）から、ウシでは様々なロタウイルスが流行していることが推測されている。さらに、ウシでのロタウイルスの感染実態を調査するため、ウシの糞便より本ウイルスの検出を試みた。2006 年に岐阜県で採取されたウシの糞便 587 例のうち子牛の正常便 1 例からロタウイルス VP4 遺伝子が検出された。その塩基配列を解読した結果、米国においてウシから分離された B223 株に最も近縁で、P 遺伝子型は P[11] と考えられた。以上、食肉に供される動物における下痢症を引き起こすロタウイルスの生態が一部明らかとなった。

A. 研究目的

A 群ロタウイルスは、ヒトを含めた幼若動物の下痢症の主な病因の一つである。特に本ウ

イルスは、ヒトの冬期乳幼児下痢症を引き起こすウイルスとして知られている。ヒトでは食品が原因と考えられる集団発生例も報告されて

いる。これまでに、A 群ロタウイルスとして、哺乳類から鳥類まで 15 の G 血清型と 26 の P 遺伝子型のウイルスが分離されている。また、インフルエンザウイルスと同様に分節タイプのウイルスであるため、遺伝子交雑が起こりやすいとされている。このように、さまざまなタイプのロタウイルスが各種動物から分離されているものの、その感染の実態や異種動物間での感染・流行については、ほとんど明らかにされていない。そこで、今回、食肉に供される野生動物の代表であるイノシシを対象に、P 遺伝子型に特異的な抗体を検出することができるラテックス凝集 (LA) 試験を用いて、血清疫学調査を実施した。さらに、実際のウイルスの存在を調査するため、イノシシの腸管内容物からの本ウイルス VP4 遺伝子の検出を行った。

昨年度、本研究において、ウシを対象に、前述の LA 試験を用いた全国的な血清疫学的調査を実施した。その結果、ウシでは、P[2]あるいは P[3] 遺伝子型のロタウイルスが高頻度で感染を起こしており、同時に P[17] 遺伝子型ロタウイルスおよび P[4] あるいは P[8] 遺伝子型ロタウイルスの感染も頻繁に起こるといって非常に複雑な感染環の存在が示唆された。また、このようにウシにおいて多様なロタウイルスによる複雑な重感染が起きている状況から、リアソートメントによる新型ロタウイルス出現の可能性も指摘した。そこで、今回、健康なウシの糞便を被検材料として本ウイルスの VP4 遺伝子を検出し、非流行時におけるロタウイルスの感染実態の解明を試みた。

## B. 研究方法

### 1. A 群ロタウイルスに対する血清疫学的調査

2003-04 年にかけて、愛知県および四国 4 県で捕獲されたイノシシの血清 182 例が LA 試験

に供された (表 1)。大腸菌で発現させ、精製されたトリロタウイルス P0-13 株、ヒトロタウイルス Wa 株及びサルロタウイルス SA-11 株の GST 融合 VP8 蛋白質を抗原とした LA (各 P0-、Wa- 及び SA-LA) 試験を用いて各抗体価を測定した。血清はカオリンと抗原非感作ラテックスによる吸収処理を各 1 回行った。処理血清を 8 倍から 2 倍段階希釈し、V 字型 96 穴マイクロプレート上で各感作ラテックスを加え、1 晩放置した後、凝集像を判定した。凝集を起こす一番高い希釈倍数を各 LA 抗体価とした。8 倍以上の抗体価を有する個体を陽性とした。

### 2. A 群ロタウイルス VP4 遺伝子の検出と解析

臨床的に健康なウシから採取された糞便 587 例と野生イノシシの腸管内容物 135 例が供試された (表 2)。各サンプルから RT-nested PCR 法により増幅された A 群ロタウイルス VP4 遺伝子の解析を行った。

今回使用したプライマーの配列を表 3 に示した。1st step PCR に使用したプライマーは VP4-HeadF および VP4-1094R、2nd step PCR に使用したプライマーは VP4-HeadF および VP4-887R である。増幅産物の塩基配列の決定のためにプライマー VP4-8F および VP4-9R を用いた。

各サンプルの 20% 乳剤上清から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて、RNA を抽出した。SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) を用い、RNA から cDNA を合成した。この cDNA を鋳型に Ex Taq (TaKaRa) を用いて Nested PCR を行った。RT-nested PCR によって得られた VP4 遺伝子産物についてダイレクトシーケンシングにより塩基配列の決定を行った。遺伝子解析のために GENETYX-MAC 9.0 および Clustal X

を用いた。

### C. 研究結果

#### 1. 野生イノシシにおける A 群ロタウイルスに対する血清疫学的調査

イノシシにおける各 LA 試験陽性率を捕獲県別に表 1 に示した。イノシシ血清 182 例中、PO-、Wa-、SA-LA 試験においてそれぞれ 43 例 (23.6%)、74 例 (40.7%)、102 例 (56.0%) が抗体陽性であった。Wa-LA 試験陽性率は PO-LA 試験陽性率よりも有意に高く ( $p < 0.001$ )、SA-LA 試験陽性率は PO-LA および Wa-LA 試験陽性率よりも有意に高かった (それぞれ  $p < 0.001$  および  $p < 0.01$ )。愛知県で採取された血清のみでの抗体陽性数 (率) は、PO-、Wa-、SA-LA 試験においてそれぞれ 24 例 (27.6%)、35 例 (40.2%)、47 例 (54.0%) であった。また、四国 4 県で採取された血清のみでの抗体陽性数 (率) は、PO-、Wa-、SA-LA 試験においてそれぞれ 19 例 (20.0%)、39 例 (41.1%)、55 例 (57.9%) であり、捕獲地域ごとの抗体陽性率に有意差は認められなかった。

各 LA 試験により得られたイノシシ血清の抗体価について解析を行った。Wa- および SA-LA 両試験で陽性と判定された血清 68 例では、その両抗体価間に相関係数 0.76 という強い相関関係が認められた (図 1A)。同様に、PO- および Wa-LA 両試験の抗体価間および PO- および SA-LA 両試験の抗体価間の相関関係を調べたところ、それぞれ相関係数 0.53 および 0.55 であり、中程度の相関関係は認められたが、Wa- および SA-LA 両抗体価間の相関係数には及ばなかった。さらに、イノシシ血清の採取県別に同様の解析を行った結果、愛媛県のイノシシ血清において、Wa- および SA-LA 抗体価間に相関係数 0.85 という非常に強い相関関係が認められた (図 1B)。

#### 2. 野生イノシシからの A 群ロタウイルス VP4 遺伝子の検出と解析

イノシシの腸管内容物 135 例について、A 群ロタウイルス VP4 遺伝子を対象に RT-nested PCR を行った結果、2006 年に岐阜県で採取された 1 例からロタウイルス VP4 遺伝子と予想されるシグナル (B0-5 株) が確認された (表 2)。RT-nested PCR により得られた VP4 遺伝子産物についてダイレクトシーケンシングを行い、835 ベースの塩基配列を決定した。得られた塩基配列および推定アミノ酸配列について NCBI の BLAST を用いてさまざまなウイルスとの相同率検索を行ったところ、最も高い相同性を示したのは、韓国でヤギから分離されたロタウイルス GRV 株 (P[3] 遺伝子型) であった。

解読された B0-5 株の塩基配列から得られた推定アミノ酸配列 278aa (aa7-284) について進化系統学的解析を行った結果、B0-5 株は P[3] 遺伝子ロタウイルスのクラスタに位置した (図 2)。塩基配列による解析でも同様の結果が得られた。B0-5 株と他のロタウイルス 27 株の推定アミノ酸相同率を算定したところ、96.0% (GRV 株) ~ 43.8% (KK3 株) の相同性が確認された。P[3] 遺伝子ロタウイルス GRV および RRV との相同率は、アミノ酸配列でそれぞれ 96.0% および 89.9% であった。以上の結果から、今回検出された B0-5 株は RRV 株 および GRV 株 と同じ P[3] 遺伝子型に属していることが確認された。

#### 3. ウシからの A 群ロタウイルス VP4 遺伝子の検出と解析

2006 年に岐阜県で採取されたウシ糞便 587 例について、A 群ロタウイルス VP4 遺伝子を対象に RT-nested PCR を行った結果、1 ヶ月齢の子牛の正常便 1 例からロタウイルス遺伝子と考え

られるシグナル(GB76株)が確認された(表2)。RT-nested PCRにより得られたVP4遺伝子産物についてダイレクトシーケンシングを行い、741bの塩基配列を決定した。得られた塩基配列および推定アミノ酸配列についてNCBIのBLASTを用いてさまざまなウイルスとの相同率検索を行ったところ、最も高い相同性を示したのは、米国でウシから分離されたロタウイルス B223株(P[11]遺伝子型)であった。

解読されたGB76株の塩基配列から得られた推定アミノ酸配列246aa(aa24-269)について進化系統学的解析を行った結果、GB76株はP[11]遺伝子ロタウイルスのクラスタに位置した(図3)。塩基配列による解析でも同様の結果が得られた。GB76株と他のロタウイルス26株の推定アミノ酸相同率を算定したところ、96.7%(B223株)～35.3%(P0-13株)の相同性が確認された。ウシ由来のP[11]遺伝子ロタウイルスB223およびA44株とのアミノ酸相同率は、それぞれ96.7%および93.5%であり、ヒト由来のP[11]遺伝子ロタウイルスI321および116E株とのアミノ酸相同率は、それぞれ88.6%および88.2%であった。以上の結果から、今回検出されたGB76株はB223株と同じP[11]遺伝子型に属していることが確認された。

#### D. 考察

##### 1. 野生イノシシにおけるA群ロタウイルスに対する血清疫学的調査

今回血清が採取された愛知および四国4県のイノシシには、P[4]あるいは[8]、およびP[2]あるいは[3]遺伝子のロタウイルスが高頻度に感染していることが示唆された(表1)。P[17]遺伝子のロタウイルスの感染も、中程度の頻度で起きていることが示唆された。今回の血清疫学調査から、イノシシと同様の環境に生息する

ニホンザル、ニホンジカおよびタヌキと比較して、イノシシは各LA試験の陽性率が高い傾向にあることが示された(表4)。イノシシにおける各LA試験結果を血清採取地域別に比較したところ、愛知県および四国4県のイノシシの間には、各LA試験陽性率に有意差は認められなかった(表1)。遠隔の両県の間で陽性率に差がみられなかったことから、イノシシではロタウイルスの浸潤が、局地的ではなく、広い範囲において起きている可能性が考えられた。

また、Wa-およびSA-LA両試験で抗体陽性を示したイノシシにおいて、その両抗体価には相関係数0.76という強い相関が認められた(図1A)。この現象は愛媛県のイノシシにおいて顕著で、同県で採取されたイノシシでは、Wa-およびSA-LA両抗体価間に相関係数0.85という非常に強い相関が認められた(図1B)。以上のことから、P[4]あるいは[8]およびP[2]あるいは[3]遺伝子のVP4と80%以上のアミノ酸相同率をもつ未知のロタウイルスがイノシシの間で、特に一部地域で流行している可能性が考えられた。

以上のイノシシにおける血清疫学調査から、広範囲のイノシシにさまざまなP遺伝子型のロタウイルスが高率に感染していること、さらにイノシシにおいて新しいP遺伝子型のロタウイルスが流行している可能性が示唆された。

##### 2. 野生イノシシからのA群ロタウイルスVP4遺伝子の検出と解析

2006年に岐阜県において採取された健康なイノシシ1例よりからロタウイルス遺伝子(B0-5株)が検出された。現在までに野生イノシシからロタウイルスを検出した報告はなく、これはイノシシのロタウイルス感染を確認した初めての例である。このB0-5株遺伝子につ

いて、解析を行った結果、塩基配列およびアミノ酸配列ともに P[3] 遺伝子のロタウイルスのクラスタに位置した (図 2)。さらに、B0-5 株と様々なロタウイルス株の VP4 アミノ酸相同率を算定した結果、P[3] 遺伝子ロタウイルス GRV 株および RRV 株と 89%以上の相同率を示すことが明らかとなった。P 遺伝子型の型別は、同一の P 血清型の間で VP4 の推定アミノ酸配列が 89%以上の相同率であることを基準に区別されている。以上のことから、B0-5 株は P[3] 遺伝子型に属するロタウイルスであることが明らかとなった。P[3] 遺伝子型ロタウイルスはヒトおよび多くの哺乳動物に分布しており、幅広い宿主域を持つことが知られている。実際に、B0-5 株に対して GRV 株に次いでアミノ酸相同率が高いウイルスは、タイで小児から分離された P[3] ロタウイルス CMH222 株 (95.7%) であった。

今回、野生のイノシシにおいて P[3] 遺伝子型ロタウイルスの感染が起きていることが確認された。本研究の血清疫学調査の結果から、イノシシに P[2] あるいは [3] 遺伝子ロタウイルスの流行とともにヒトで主に流行している P[4] あるいは [8] 遺伝子ロタウイルスも 40.7% と高率に感染していることが示唆されている。今回、イノシシにおける P[3] 遺伝子ロタウイルスの存在が証明され、血清疫学調査の結果が裏付けられることとなった。このことは、ヒトの主な流行ウイルスとなっている P[4] あるいは [8] 遺伝子ロタウイルスもまた実際にイノシシに感染しているという可能性が否定できないことを示唆している。また、イノシシにさまざまな P 遺伝子型のロタウイルスが重感染し、新たなリアソータントウイルスを発生させる可能性も依然として存在する。以上のことから、イノシシに感染しているロタウイルス、あるいはリアソートメントにより新たに出現したウイル

スを監視することは、公衆衛生学上および家畜衛生学上、大変重要と考えられる。このため、より多くの個体数、および広い地域でのイノシシからのロタウイルスの検出および抗原的・遺伝学的解析を行うことが必要である。

## 2. ウシからの A 群ロタウイルス VP4 遺伝子の検出と解析

臨床的に健康な子牛 1 例よりからロタウイルス遺伝子 (GB76 株) が検出された。この GB76 株遺伝子について進化系統学的解析を行った結果、P[11] 遺伝子型のロタウイルスのクラスタに位置した (図 3)。さらに、GB76 株と様々なロタウイルス株の VP4 アミノ酸相同率を算定した結果、P[11] 遺伝子ロタウイルス B223 株および A44 株と 89%以上の相同率を示すことが明らかとなった。以上のことから、GB76 株は P[11] 遺伝子型に属するロタウイルスであることが明らかとなった。P[11] 遺伝子型ロタウイルスは、ウシを中心に世界的に流行しているウイルスである。これまでに日本においても全国的にウシの下痢便から分離されている。今回のサンプルは 1 ヶ月齢の健康な子牛より分離されていることから、これまでの分離ウイルスとの病原性の違いに興味をもたれる。この観点から、GB76 株について、ウイルスの分離および他の遺伝子の解析を進める計画である。

一方、ウシがヒトの生活圏に深く入り込んでいくインドにおいて、下痢を発症していないヒトから P[11] 遺伝子型ロタウイルス (I16E 株および I321 株) が分離されている。このことは、このタイプのウイルスがヒトへの感染性を有している可能性を示唆するものである。前述のように、本ウイルスはインフルエンザウイルスと同様に遺伝子が分節に分かれており、交雑による組換えウイルスの出現に注意しなければ



ならないとされている。このことは、ロタウイルスの直接的な病原性だけでなく、感染したロタウイルスが新しい遺伝子の供給源として機能する可能性も考慮しなければならないことを意味する。

今回、血清疫学的に主な流行ウイルスと考えられている P[2]あるいは[3]遺伝子型のウイルスあるいは予想された遺伝子型のウイルスは検出されなかった。さらに調査を進め、ウシにおける本ウイルスの感染実態を明らかにする必要がある。

## E. 結論

1. 広い地域のイノシシにおいて、さまざまな P 遺伝子型のロタウイルスが高率に感染していることが示唆された。また、新しい P 遺伝子型のロタウイルスがイノシシの間で流行している可能性も考えられた。
2. 野生のイノシシからロタウイルスを検出し、野生のイノシシにおけるロタウイルスの感染を初めて確認した。今回検出された P[3]遺伝子型ロタウイルスは、これまでの血清疫学調査から推測されていたイノシシにおける同遺伝子型ロタウイルスの流行を裏付けるものであった。
3. 健康な子牛の糞便より、P[11]遺伝子型ロタウイルスを検出した。今後、本ウイルスの病原性、遺伝学的性状について更なる解析が必要である。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Shimizu, K., Ito, N., Sugiyama, M., Minamoto, N. 2006. Sensitivity of rabies virus to type I interferon is determined by the phosphoprotein gene. *Microbiol. Immunol.* 50 (12), 975-978, 2006.
- 2) Shimizu, K., Ito, N., Mita, T., Yamada, K., Hosokawa-Muto, J., Sugiyama, M. & Minamoto, N. Involvement of nucleoprotein, phosphoprotein, and matrix protein genes of rabies virus in virulence for adult mice. *Virus. Res.* 123,154-160, 2007.
- 3) Borghan, M. A., Mori, Y., El-Mahmoudy, A-B., Ito, N., Sugiyama, M., Takewaki, T. & Minamoto, N. Induction of Nitric Oxide Synthase by Rotavirus Enterotoxin NSP4: Implication for Rotavirus Pathogenicity. *J. Gen. Virol.* (印刷中)

### 2. 学会発表

川口まり子、伊藤直人、石黒直隆、山下照夫、杉山 誠：野生イノシシにおける血清疫学調査より推測される新型 A 群ロタウイルス流行の可能性、第 142 回日本獣医学会学術集会、2006年 9 月（山口）

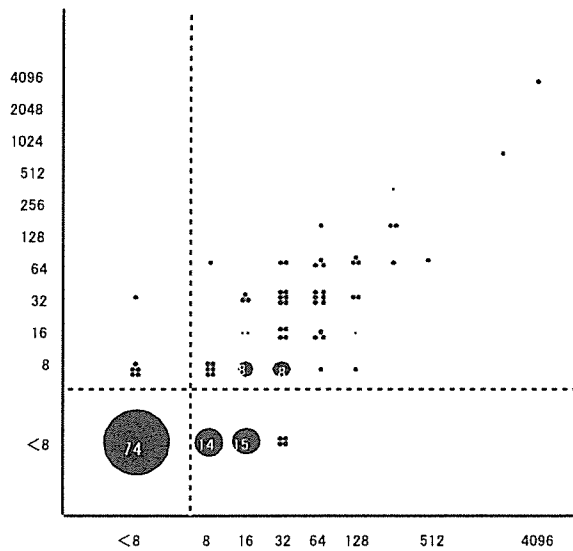
## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表1. 野生イノシシにおける各LA試験の陽性率

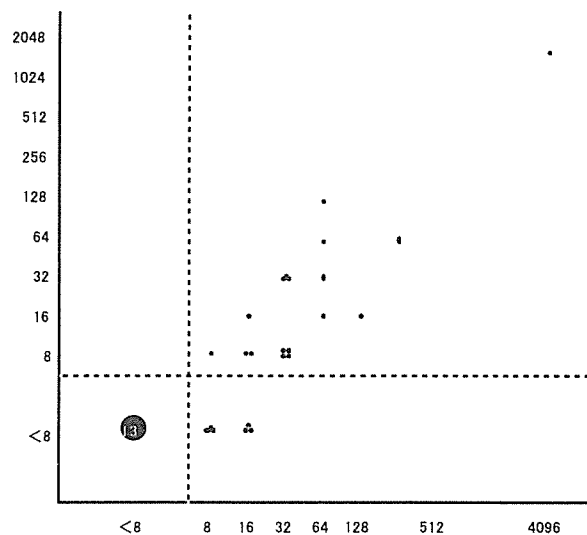
捕獲県	捕獲年	例数	LA試験(%)		
			PO-	Wa-	SA-
愛知県	2003-04	87	27.6	40.2	54.0
徳島県	2003-04	22	13.6	22.7	40.9
香川県	2003	29	27.6	48.3	58.6
愛媛県	2003-04	37	13.5	48.6	64.9
高知県	2003-04	7	42.9	28.6	71.4
全体		182	23.6	40.7	56.0

A. 愛知県および四国4県



SA-LA 抗体価  
両抗体陽性検体 n=68  
r=0.76  
p<0.001

B. 愛媛県



SA-LA 抗体価  
両抗体陽性検体 n=18  
r=0.85  
p<0.001

図1 Wa-およびSA-LA試験陽性イノシシ血清における両抗体価の相関

表2. ウシおよび野生イノシシからのロタウイルス遺伝子の検出

動物種	採取県	捕獲年	例数	陽性数(株名)
ウシ	岐阜県	2006	587	1 (GB76)
イノシシ	愛知県	2003-04	69	0
	岐阜県	2003-06	14	1 (BO-5)
	群馬県	2005-06	52	0

表3. VP4遺伝子検出のためのPCRおよびダイレクトシーケンシングに使用したプライマー

プライマー名 (nt位置 <sup>*</sup> )	配列
VP4-HeadF (1-26)	5'-GGCTATAAAATGGCTTCGCTCATTTA-3'
VP4-1094R (1069-1094)	5'-AATGCTTGTGARTCRTCCARTAATC-3'
VP4-887R (861-887)	5'-TCWGACCATTTATAWCCYARCCCWCC-3'
VP4-8F (22-47)	5'-ATTTATAGACARYTGCTHACAAATTC-3'
VP4-9R (794-818)	5'-TCTCTATTGTA CTGCATCTCTTTCCA-3'

※塩基配列番号はNCDV株のVP4遺伝子に基づいた。

R : A+G W : A+T Y : C+T H : A+C+T

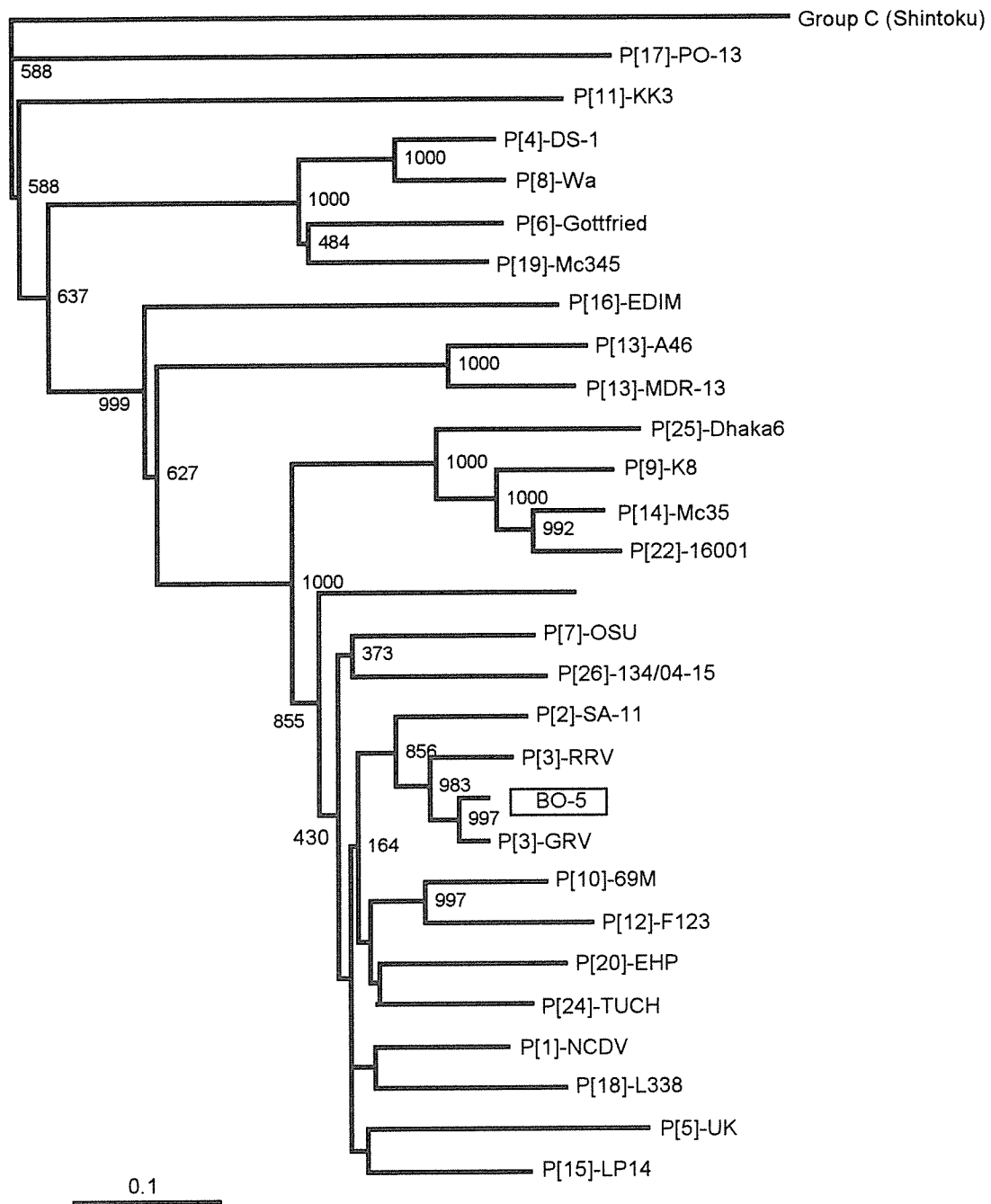


図2. イノシシから検出されたロタウイルスBO-5株のアミノ酸配列による系統解析

※VP4遺伝子aa7-284(278aa)の近隣接合法での1000回反復による確率(ブートストラップ値)  
Group C rotavirus(Shintoku株)をoutgroupとした。