

20083705/A

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

食肉食鳥衛生検査における家禽・家畜等の ウイルス性疾病検査に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 棚 林 清

平成21（2009）年3月

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

食肉食鳥衛生検査における家禽・家畜等の ウイルス性疾病検査に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 棚 林 清

平成21（2009）年3月

目 次

I. 総括研究報告

- 食肉食鳥衛生検査における家禽・家畜等の
ウイルス性疾病検査に関する研究 ----- 1
棚林 清

II. 分担研究報告

1. 豚に感染するウイルスの検出法に関する研究 ----- 7
池田 秀利
2. 牛白血病あるいは腫瘍により廃棄された検体からの牛白血病
ウイルス遺伝子の検出 ----- 13
岡崎 克則
3. 鳥インフルエンザの検査に関する研究 ----- 19
伊藤 壽啓
4. リアルタイムRT-PCRによる鳥由来インフルエンザウイルス
検出法の検討 ----- 29
棚林 清
5. マイクロアレイ技術を用いた廃棄牛および豚臓器に含まれる
病原体検出の試み ----- 37
棚林 清
6. 簡便なA群ロタウイルス全遺伝子解析法の確立とその応用 ----- 55
杉山 誠
7. エゾシカにおけるE型肝炎ウイルスの疫学調査 ----- 67
岡崎 克則

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 71

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 73

I. 総括研究報告書

食肉食鳥衛生検査における家禽・家畜等のウイルス性疾病検査に関する研究

研究代表者：棚林 清 国立感染症研究所獣医科学部 第三室長

研究要旨：食用に供される家禽や家畜などの食鳥・食肉検査でウイルス性疾病についてはその手技の煩雑性などからほとんど実施されていない。本研究では検査所の協力を得ながら実施可能な検査方法の開発・改良・検証を行いウイルス学的検査体制整備のためのマニュアル案や技術的基盤を提供すること、また、食用に供される野生動物を含めて実態調査を実施することも目的として平成 19 年度は以下のような成果が得られた。

豚のウイルス性疾病の検査として、検体の臓器材料からウイルス核酸を抽出し、PCR（または RT-PCR）法でウイルス特異的遺伝子を検出する検査系の妥当性を検証するため、食肉処理場で得られた 120 頭の肝臓サンプルについて E 型肝炎ウイルスとブタサーコウイルスの遺伝子検出を試みそれぞれ 0% (0/120)、32% (38/120) の陽性率であった。これは既報の状況から想定される頻度であり、検査手法はほぼ妥当であると考えられた。

牛のウイルス性疾病の検査として国内発生報告がある牛白血病を検査所で実施可能な検査のモデルとして実施して行くにあたり、今年度は、PCR 法で協力検査所から提供された牛白血病または牛白血病疑い腫瘍について牛白血病ウイルスゲノムの検出を行ったところ、43 検体のうち 41 検体 (95.3%) でウイルスゲノムが検出された。

鳥インフルエンザの検査について簡易診断キットを用いたスクリーニング検査、確定検査のための検体送付、ウイルスゲノム検出とウイルス分離に至る一連の検査についての具体的マニュアル作成にあたり、まず検体採取と簡易キットの使用の段階のマニュアル案を実地検討し作成した。さらに、ウイルスゲノム検出のリアルタイム PCR について 5 種類の WHO 推奨プロトコールを比較検討し M、HA(H5)、NA(N1) 遺伝子を検出するプロトコール 2 が良好であることが分かった。

試作病原体検出用マイクロアレイを用いて牛および豚臓器に含まれる病原体を網羅的に検出同定するために、試験あたりの検査試料増量とハイブリ溶液の改良を行い、従来に比して約 3 倍の検出感度が得られるようになった。この方法で、廃棄された臓器 32 検体について検索した結果、一部の検体から放線菌ゲノムや化膿連鎖球菌 *speC* が検出され、放線菌ゲノムについては PCR でも増幅が認められた。

人を含め動物に広く胃腸炎を起こす A 群ロタウイルスの多様性を把握するため、RCWG 遺伝子型決定法をもとに、簡便な全遺伝子解析法の開発を行い、本法を応用して、同時期、同地区で肉用牛から分離された未知ロタウイルス 2 株の全遺伝子を解析し、両株は起源が同じであるが VP7 遺伝子分節にリアソートメントが起きたと推測され、1 株については NSP5/6 遺伝子にリアレンジメントが起きていることも確認された。

2007 年 4 月～2008 年 1 月、北海道日高地区で捕獲されたエゾシカ 320 頭の血清から RT-PCR により HEV 遺伝子の断片が 1 検体 (0.3%) で認められ、その塩基配列は北海道で分離されたブタの HEV に近縁であり、Genotype 3 に属するものと考えられた。

分担研究者

岡崎 克則	北海道医療大学薬学部・教授
池田 秀利	日本生命科学大学獣医学部・教授
伊藤 壽啓	鳥取大学農学部・教授
杉山 誠	岐阜大学応用生物科学部・教授

A. 研究目的

と畜検査及び食鳥検査は、望診、触診等を基本とした検査実施要領に基づき行われている。異常を発見した場合には、必要に応じてさらに精密な検査を行うこととしているがウイルスの分離同定などのウイルス学的検査は煩雑で時間を要することから検査所での実施は困難でありほとんど実施されていない。本研究ではウイルスゲノムをPCRやRT-PCR法などで検出する簡易で迅速な診断法の開発改良や、検査所での実施可能性の検証を行いマニュアル等の作成を目指す。

国内で高病原性鳥インフルエンザが発生し、り患した食鳥が搬入された食鳥処理場における食鳥検査によって疾病を確認することができなかったという事例が発生した。本疾患が疑われた場合は簡易診断キットによる検査を実施することとなっているが、各検査所での経験は少なく検体採取や検査実施の具体的な手法を示すマニュアルの作成が必要と考えられ、食鳥検査所現地での検査手法の検証を行う。また、確定診断に至る手法についても検討する。

さらに、多種類病原体を一括して検出するマイクロアレイ法の開発改良や食用とされる動物におけるE型肝炎ウイルスやヒトを含め多種類の動物に胃腸炎を起こすA群ロタウイルスについての分子疫学的調査を実施し、食肉などの更なる安全性確保のために検査体制整備のための技術的基盤を提供することを目的とした。

B. 研究方法

1. 豚に感染するウイルスの検査法の検討：これまで検討した臓器の乳化剤、ウイルス核酸の抽出、

PCRによるウイルス遺伝子の検出の各過程の至適実験条件について、食肉処理場及び食肉衛生検査所の協力を得て、豚の廃棄された肝臓材料120頭分を用いて、実験条件の適性を調べた。検査対象としたウイルスはDNAウイルスであるブタサーコウイルス2型とRNAウイルスであるE型肝炎ウイルスとした。

2. 牛に感染するウイルスの検査法の検討：現在国内においてヒトに健康被害を起こす牛のウイルス性疾患はないが、と畜検査の対象となっている牛白血病をモデルとして、PCRによるウシ白血病ウイルスのゲノム検出を、食肉衛生検査所の協力で牛白血病また牛白血病疑いの腫瘍を提供いただき実施した。

3. 鳥インフルエンザの検査手法の検討：鳥インフルエンザが疑われた場合に食鳥検査所にて実施される簡易診断キットの使用に至る採材手技（気管スワブやクロアカスワブの採取）について協力検査所で模擬的に実施し問題点等を検討した。また、疑い検体発見後のウイルス検査のうちリアルタイムPCR法の各種プロトコールを比較検討した。

4. 病原体検出マイクロアレイ法による牛や豚の廃棄臓器からの病原体ゲノム検出：これまでに開発し、病原体そのものから抽出したゲノムの検出に使用できることが確認された試作病原体検出マイクロアレイ法を用いて、食肉処理場や食肉衛生検査所の協力で廃棄された豚や牛の臓器中からの病原体ゲノムの検出を試みた。

5. 簡便なA群ロタウイルス全遺伝子解析法開発応用：ロタウイルスの11本のゲノム分節遺伝子各Open Reading Frame全長を解析対象とした遺伝子型決定法(RCWG法)をもとに、各遺伝子分節の部分的遺伝子配列解析による簡便な全遺伝子解析法の開発を行った。さらに本法を応用して、同時期、同地区で肉用牛から分離された未知のロタウイルス2株の全遺伝子を解析した。

6. エゾシカにおける疫学調査：2007年4月～

2008年1月、北海道日高地区で捕獲されたエゾシカ320頭の血清からRNAを抽出し、E型肝炎ウイルス(HEV)ORF2領域を標的としたRT-PCRによりHEV遺伝子の検出を試みた。

C. 研究結果

1. 豚に感染するウイルスの検査法の検討: 食肉処理場の総解体個体合計1094頭から120頭分のサンプルを採取した。120頭の肝臓が廃棄になった理由は、寄生虫肝炎、肝炎、間質性肝炎、肝包膜炎などであった。

臓器サンプルの乳剤化から、PCRによるウイルス遺伝子検出を行ったところE型肝炎ウイルス(HEV)遺伝子は120頭全頭から検出できなかった。RT-PCR反応を何回かに分けて行い、毎回陽性コントロールとなる組換えHEV-RNAを用いて、実験手技の検証を行っているが、反応自身に問題はなかった。自動核酸抽出機で抽出した、HEV遺伝子の検出に用いたサンプルと同一の“cDNA”について、ブタサーコウイルス(PCV1とPCV2)の両方を検出するプライマーを用いてPCR反応を行った。結果は全体で32%(38/120)陽性であった。肝臓廃棄理由とPCV遺伝子陽性との有意な関係はなかった。

2. 牛に感染するウイルスの検査法の検討: 廃棄腫瘍43検体中41検体(95.3%)で約450塩基の増幅産物が認められた。1検体から得られた塩基配列を決定し、Blast解析で上位に挙げられた日本分離株およびウルクアイ分離株と比較したところ日本分離株と1から3か所の相違が認められた。日本分離株ではBamHI切断部位がよく保存されていたが、ウルクアイ分離株には変異が認められた。

3. 鳥インフルエンザの検査手法の検討: 食鳥処理場を訪問し、担当者や採材の仕方、簡易キットでの検査の仕方などについてまず意見交換を行った。また、実際に鶏の生体を用いて検体採取ならびに簡易キットのデモンストレーションを実

施しながら、段階ごとの確認を行った。それらに基づいて、一連の検体採取の流れをとりまとめ、鳥インフルエンザ検査の第一段階である検体採取法マニュアル案を作成した。鳥インフルエンザの確認検査のうちウイルスゲノム検出のためのRT-PCR及びリアルタイムRT-PCR法でWHOの推奨する5種のプロトコールについてH5N1亜型ウイルスを含む5株を用いて感度特異性を比較したところWHOプロトコール2がA型共通、H5亜型、N1亜型を良好に検出できることがわかった。

5. 簡便なA群ロタウイルス全遺伝子解析法開発応用: 全遺伝子型を網羅するORF全長塩基配列データから全11ゲノム分節について部分的ORFに基づく解析においても遺伝子型の判別を可能となった。これを応用して同時期、同地区で肉用牛から分離された未知ロタウイルス2株の全遺伝子を解析し、両株は起源が同じであるがVP7遺伝子分節にリアソートメントが起きたと推測され、1株についてはNSP5/6遺伝子にレアレンジメントが起きていることも確認された。

6. エゾシカにおける疫学調査: 捕獲したエゾシカ320頭中1頭(0.3%)の血清から陽性対照と同位置に泳動されるDNA断片が検出された。サザンハイブリダイゼーションで陽性シグナルを示したことからHEV遺伝子と考えられた。北海道のブタから分離されたHEVswJB-M8株とは320塩基中2塩基の置換が認められ塩基ホモロジーは99.4%であり、アミノ酸の置換は予想されなかった。系統進化解析の結果、エゾシカ由来HEVはGenotype 3に属するものと考えられた。

D. 考察

豚に感染するウイルスの例としてHEVとPCVゲノム検出する際のDNA抽出に至る過程やPCR条件が

適当かを、実際に廃棄された豚の肝臓材料について調べたところ HEV は検出されず、PCV は 32%(38/120)で検出された。HEV の検出率は養豚場で大きく異なることや陽性コントロールを置いた試験であること、PCV の陽性率はこれまでの報告と同等であることから、実施した検体処理や PCR または RT-PCR 手法は妥当と考えられた。本手法ははじめに逆転写により cDNA を作成することから RNA ゲノムまたは DNA ゲノムを有するウイルスいずれにも応用可能であり、検査所等で利用するさい有用と思われる。

牛白血病については人へ感染はないがと畜検査の対象となっていること、近年発生数が増加しており家畜衛生でも問題である。食肉衛生検査でウイルス疾病の検査に PCR 手法を導入する場合のモデル疾患として実施するのに適当と考えられた。BLV ゲノムは白血病または疑いの腫瘍組織 43 検体中 41 検体に検出され、その PCR 法は nested PCR を必要としないことから、検査所における牛白血病的ウイルス学的検査手法として有用と考えられ、次年度以降、検査所で試行し検証する必要がある。

鳥インフルエンザの検査については食鳥検査のスクリーニングとして人用簡易診断キットが使用されるが、実際の使用機会がなく、検体採取方法についても検査所ごとに異なる方法がとられる可能性が考えられた。この手法を具体的に示すマニュアル作成が必要であるが、今年度は検体採取段階のマニュアル案を作成できた。続けて確定検査のための材料送付以降のマニュアル案も作成する必要がある。インフルエンザゲノムを検出するリアルタイム RT-PCR 法で WHO 推奨プロトコル 2 が良好であることが分かったが、インフルエンザウイルスは変異が起こることから常に最新情報によりプライマーやプローブ設計が必要である。また、鳥インフルエンザの鑑別としてニューカッスル病ウイルスの検査法も確立していく必要がある。

試作病原体アレイにより実際に廃棄された臓器からの病原検出を実施したがウイルスゲノム

は検出されなかった。今後も改良を加えより低価格簡易な方法に改良していく必要がある。

ヒトを含めた他種類の動物から分離される A 群ロタウイルスの簡易遺伝子解析ができる方法ができたことでリアソートメントやリアレンジメントが広範囲に起きているか調べていくことも可能となった。捕獲エゾシカが HEV を保有している可能性がありリスクのあることがわかった。

E. 結論

豚における PCR 検査で条件検討を行ってきた簡便で安定した検査システムを用いて、食肉処理場で採材した 120 頭分の肝臓で、HEV 遺伝子は 120 頭全頭から検出できなかったが、PCV は 32%(38/120)陽性であった。この実際の材料の検査から、手法の妥当性をほぼ確認できた。食肉衛生検査所でも実施可能なウイルス学的検査としての PCR 検査法の開発においては、牛の腫瘍材料について BLV の PCR 法で実施して、43 検体中 41 検体で BLV 遺伝子が研修され、牛白血病的検査は、検査所での PCR 検査のモデルとして試行するめどが立った。

原虫、細菌、ウイルスなどの 38,986 プローブを搭載した試作病原体検出マイクロアレイで牛や豚の破棄臓器を調べたところウイルスゲノムは検出されなかったが放線菌ゲノムや化膿連鎖球菌 *speC* が検出され、さらに改良を必要と考えられた。

鳥インフルエンザ検査においては実際の検査現場では簡易診断キットを用いた検査における検体採取が異なる手順で実施されている可能性があることがわかり、マニュアル等でより容易安全かつ均一的にできるようにする必要があることがわかり検体採材マニュアル案の作成ができた。また、確認検査に用いるリアルタイム RT-PCR 法のプロトコルの中から良好なものを選択できた。

牛の A 群ロタウイルスの簡易遺伝子解析法を開発でき、これらのウイルスでリアソートメントや

リアレンジメントが起きていることが分かった。また、捕獲エゾシカ血清に HEV ゲノムが存在することが分かった。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

1. 論文発表

Genetic polymorphism of the nsp2 gene in North American type porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Yoshii M, Okinaga T, Miyazaki A, Kato K, Ikeda H, Tsunemitsu H. Arch Virol. 2008;153 (7):1323-34.

Tomiyama, D., Inoue, E., Osawa, Y., and Okazaki, K: Serological evidence of infection with hepatitis E virus among wild Yezo-deer. *Cervus nippon yesoensis* in Hokkaido, Japan. J. Viral Hepat. (in press)

Ito, T. (2008) Outbreaks of highly pathogenic avian influenza in Japan. Glob. Env. Res.12 (1):15-20.

Motoike, K., Hirano, S., Yamana, H., Onda, T., Maeda, T., Ito, T., and Hayakawa, M.(2008) Antiviral activities of heated dolomite powder. Biocontrol Sci. 13 (4): 131-138.

2. 学会発表

Antibody to hepatitis E virus in Japanese wild boar populations. K. Kato, S. Sato, J. Nakatani,

H. Tsunemitsu and H. Ikeda. XIVth International Congress of Virology. 10-15 August 2008, Istanbul.

川口絳史、井上恵美、大澤宜明、岡崎克則 エゾシカ血清からの E 型肝炎ウイルス RNA の検出 第 56 回日本ウイルス学会 岡山 2008 年 10 月

井上恵美、浅野逸郎、川口絳史、松村佳子、室内友恵、大澤宜明、岡崎克則 A 型インフルエンザウイルス共通プライマーを用いた HA および NA 亜型遺伝子型別法の開発 第 56 回日本ウイルス学会 岡山市 2008 年 10 月

石上暁代、安部昌子、伊藤直人、高須正規、村瀬哲磨、岡田伸隆、杉山 誠: A 群ロタウイルスの遺伝的多様性とその獲得メカニズム, 第 146 回日本獣医学会学術集会 (2008 年 9 月、宮崎)

安部昌子、伊藤直人、高須正規、村瀬哲磨、杉山 誠: 岐阜県内の牛における A 群ロタウイルスの動態調査・新型ロタウイルスの検出, 第 146 回日本獣医学会学術集会 (2008 年 9 月、宮崎)

安部昌子、伊藤直人、高須正規、杉山 誠: 牛の正常便からの A 群ロタウイルスの検出とその分布, 第 56 回日本ウイルス学会学術集会 (2008 年 10 月、岡山)

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

II. 分担研究報告書

豚に感染するウイルスの検出法に関する研究

分担研究者 池田 秀利 日本獣医生命科学大学 教授

研究要旨：食肉・食鳥処理場で食肉中のウイルスを検査するには簡便で迅速な方法が望ましい。一般的なウイルス検査は病原体である感染性ウイルスの検出と分析が重要であるが、感染性ウイルスの検出分離には長時間かかるため、本研究ではPCR法を用いてウイルス遺伝子を検出する手技を工夫し、マニュアル作成などを通して多くの担当者が作業しやすくすることを目指している。昨年度までに条件検討してきた、臓器材料からウイルス核酸を抽出し、PCR法でウイルス特異的遺伝子を検出する検査系の妥当性を検証するため、食肉処理場で得られた120頭分の肝臓サンプルについてE型肝炎ウイルスとブタサーコウイルスの遺伝子検出を試みた。結果はHEV遺伝子が0% (0/120)、ブタサーコウイルスが32% (38/120)の陽性率であった。これは既報の状況から想定される頻度であり、検査手法はほぼ妥当であると考えられた。

A. 研究目的

食肉・食鳥処理場では現在望診、触診等を基本とした食肉検査を行っているが、さらに色々な病原体について精密な検査の実施を考える必要がある。本研究の目的は全国の食肉・食鳥処理場で実施可能な簡便で安定した結果が得られる病原体検査法を探ることである。

食肉用動物のウイルス感染症は、必ずしも肉眼的な病変を伴わない場合も多い。よって、解体処理された食肉の中にウイルス病原体の存在を証明する検査法が必要である。一般的なウイルス学検査法で感染性ウイルス検出を行うには、煩雑な手技と幾つかの設備機器が必要で、時間もかかる。従って、我々は食肉・食鳥処理場で実行可能なウイルス学的検査としてPCR検査法を用いることにした。これまで安定したPCR検査結果を得るために、市販の機器を利用した検査システムの構築を考え、臓器を乳剤

化、ウイルス核酸の抽出、PCR法によるウイルス遺伝子の検出、の各過程の至適実験条件を検討してきた。今年度は過去の条件検討を踏まえ、実際に食肉処理場で得られた臓器材料について、日本の養豚に常在しているRNAウイルスであるE型肝炎ウイルスとDNAウイルスであるサーコウイルスの遺伝子検出を試みた。

B. 研究方法

1) 臓器材料の採取

某県の協力によって、ある食肉処理場でブタ臓器の採材を3回行った。

採材は肝臓廃棄となった個体の肝臓、血液（凝固血液）、扁桃を採取し、約2-4時間氷冷保存して運搬した後、乳剤化し、-80℃に保存した。

2) 動物臓器の乳剤化

臓器の乳剤化は昨年度までの条件検討データを基に、小遠心管にブタ肝臓100mgと

細胞培養用培地1mlと細胞破砕用ビーズを加え、Tomy社の臓器破砕装置で激しく振盪する方法を採った。ビーズは今回はジルコニアビーズを用いた。臓器乳剤を8,000xgで5分間遠心し、上清をウイルス検査材料とした。

2) ウイルス核酸の抽出

ウイルス核酸の抽出には、Precision社製自動核酸抽出機を使用し、核酸抽出はGC series Magstration-MagaZorb RNA Common Kitを用いた。手法はキットに添付されているプロトコールに従った。なお、このキットは組織RNA抽出用に作られているが、通常のDNAウイルスやRNAウイルスの核酸がともに抽出されることは以前確認してある。

3) ウイルス核酸の検出

今回の食肉処理場のサンプルについては、RNAウイルスであるE型肝炎ウイルス(HEV)、DNAウイルスのブタサーコウイルス(PCV)について検出を試みた。両ウイルスとも一般的な養豚農場に広く蔓延していることが知られている。

RNAウイルスについては、invitrogenのSuperscript 1st-strand Synthesis kitを用いてランダムプライマーでcDNAを合成した。

ウイルス核酸の検出にはPCR法を用いたが、DNAウイルスとRNAウイルスとも、上述kitでcDNAにした同一サンプルを鋳型DNAとして反応を行った。

HEVのPCRプライマーは、多様なHEV株を検出するmixed primers (Nakai et al. 2006)を用いた。PCVのPCRプライマーは、1型と2型共に増幅できるプライマーを用いた(Hamel et al. 1998)。

C. 研究結果

採材は3回に分けて行い、第一回目はそ

の食肉処理場の総解体個体298頭中34頭、第2回目は402頭中42頭、第3回目は394頭中44頭から採材し、合計1094頭から120頭分のサンプルを採取した(表1)。

120頭の肝臓が廃棄になった理由は、寄生虫肝炎(47)、肝炎(31)、間質性肝炎(16)、肝包膜炎(13)、その他(12)、肝硬変(1)、退色肝(1)であった(表2)。

臓器サンプルの乳剤化から、PCRによるウイルス遺伝子検出に至る実験手技の流れは図1に示した。

1) E型肝炎ウイルス遺伝子の検出率

HEV遺伝子は120頭全頭から検出できなかった。RT-PCR反応を何回かに分けて行い、毎回陽性コントロールとなる組換えHEV-RNAを用いて、実験手技の検証を行っているが、反応自身に問題はなかった(表1)。

自動核酸抽出機を用いずにフェノール系核酸抽出法でも同サンプルについて試験を行ったが、同様に120頭全頭からHEV遺伝子は検出できなかった。

2) ブタサーコウイルス遺伝子の検出率

自動核酸抽出機で抽出した、HEV遺伝子の検出に用いたサンプルと同一の“cDNA”について、PCV1とPCV2の両方を検出するプライマーを用いてPCR反応を行った。

結果は全体で32%(38/120)陽性であった(表1)。

肝臓廃棄理由とPCV遺伝子陽性との関係を見てみると、寄生虫肝炎(36%[17/47])と肝炎(42%[13/31])で廃棄された肝臓からPCV遺伝子検出率が高い傾向があったが(表2)、統計的な解析では廃棄理由とPCV遺伝子の存在は関係していないと考えられた。

D. 考察

昨年度までに迅速で簡便なPCR法の条件設定を行い、その手技の妥当性を検証する意味で、今年度は実際に食肉処理場でサンプリングして検査した。

E型肝炎ウイルスとブタサーコウイルスの検出を試みた。この2ウイルスはいずれも日本の一般養豚場に常在するウイルスであり、RT-PCR法の妥当性を検証するには適切だと考えたからであるが、E型肝炎ウイルスは120頭すべてが陰性であった。岡本らは日本の肉屋で売られているブタレバーについてE型肝炎ウイルスを検査し、1.9% (7/363) が陽性だったと報告している。一般養豚場では2-3ヶ月令でウイルス血症になり、出荷時期である6ヶ月令ではウイルス血症のブタが少なくなると考えられている。従って、我々の検査結果が検査手法の不具合によるとは言えないと考える。

ブタサーコウイルスのうち、2型が世界的に蔓延し、それは豚皮膚炎腎症候群、豚呼吸器複合感染症、繁殖障害など複合感染症の主要病原体と考えられている。最近PCV2が関与する疾病や症候群を総称して豚サーコウイルス病と呼ばれ、莫大な被害をもたらしていると考えられている。今回の検査で得られた32% (38/120) の陽性率は妥当な値であると思われる。

今後はさらに種々のウイルスを検出するPCR系を加えて、使いやすいマニュアルなど作成する計画である。

E. 結論

昨年まで条件検討を行ってきた簡便で安定した検査システムを用いて、今年度は食

肉処理場で採材した120頭分の肝臓について、E型肝炎ウイルスとブタサーコウイルスの検出を試みた。HEV遺伝子は120頭全頭から検出できなかったが、ブタサーコウイルスは32% (38/120) 陽性であった。この野外材料の検査から、今までの手法の妥当性をほぼ確認できた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Genetic polymorphism of the nsp2 gene in North American type--porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Yoshii M, Okinaga T, Miyazaki A, Kato K, Ikeda H, Tsunemitsu H. Arch Virol. 2008;153(7):1323-34.

2. 学会発表

1) Antibody to hepatitis E virus in Japanese wild boar populations. K. Kato, S. Sato, J. Nakatani, H. Tsunemitsu and H. Ikeda. XIVth International Congress of Virology, 10-15 August 2008, Istanbul

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 某食肉処理場におけるブタ肝臓中のE型肝炎ウイルス遺伝子とブタサーコウイルス遺伝子の検出率。

採材	総解体頭数	採材頭数	HEV遺伝子検出率	PCV遺伝子検出率
第1回	298	34	0% (0/34)	26% (9/34)
第2回	402	42	0% (0/42)	48% (20/42)
第3回	394	44	0% (0/44)	20% (9/44)
合計	1094	120	0% (0/120)	32% (38/120)

表2 廃棄理由別集計 (120頭中)

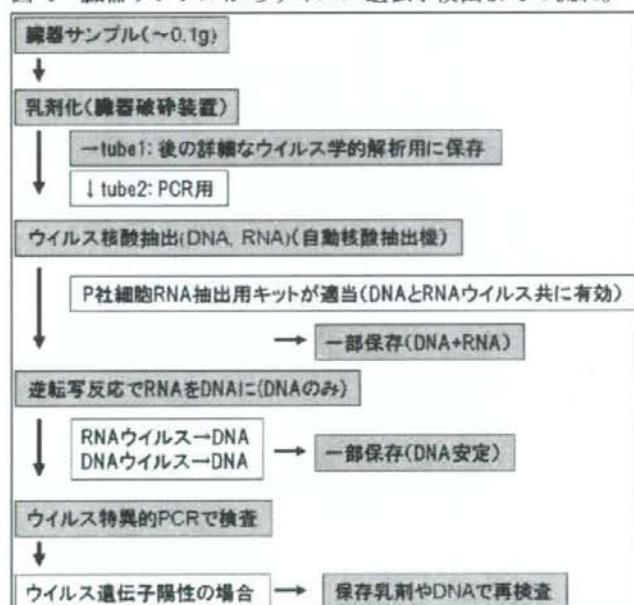
廃棄理由	PCV1+2(+)陽性率
寄生虫肝炎	17/47=36%
肝炎	13/31=42%
間質性肝炎	3/16=19%
肝包膜炎	2/13=15%
その他	3/12=25%
肝硬変	0/1
退色肝	1/1
合計	38/120=32%

表3 肝臓廃棄された理由とその肝臓中PCV遺伝子の存在との関係

		PCV-PCR		計	χ^2 値	P値*	
		+	-				
寄生虫肝炎	+	17	30	47	0.724	0.395	有意差なし
	-	21	52	73			
肝炎	+	13	18	31	2.037	0.154	有意差なし
	-	25	64	89			
間質性肝炎	+	3	13	16	1.423	0.185	有意差なし
	-	35	69	104			
肝包膜炎	+	2	11	13	1.786	0.153	有意差なし
	-	36	71	107			
その他	+	3	9	12	0.274	0.435	有意差なし
	-	35	73	108			

イエーツの補正P値、又はフィッシャーの直接確率P値()

図1 臓器サンプルからウイルス遺伝子検出までの流れ。



牛白血病あるいは腫瘍により廃棄された検体からの 牛白血病ウイルス遺伝子の検出

研究分担者：岡崎克則（北海道医療大学薬学部）

研究協力者：大澤宜明、井上恵美（北海道医療大学薬学部）

研究要旨：全身性の腫瘍を呈するウシでは、牛白血病が疑われる。1998年に牛白血病の届出が義務化されて以来、その報告数は増加し続け、と畜場における発見も増加の傾向にある。症例の大部分を占める地方病性牛白血病は、牛白血病ウイルス(BLV)による感染症であり、その拡散を防ぐためには正確な病因診断が必要である。そこで本研究では、食肉衛生検査所において廃棄された牛白血病検体あるいは牛白血病を疑われる検体から PCR を用いて BLV 遺伝子を検出することを試みた。その結果、茨城県、神奈川県、群馬県、静岡県および栃木県で得られた 43 検体のうち 41 検体 (95.3%) において BLV 遺伝子が検出された。

A. 研究目的

ウシの白血病は、疫学および臨床病理学的所見から地方病型および散发型に分類されている。後者の病因は不明であるが、地方病性牛白血病は牛白血病ウイルス(BLV)による感染症で、全国的に増加の傾向にある。BLVはレトロウイルス科、デルタレトロウイルス属に分類され、ヒト成人型T細胞白血病ウイルスに近縁であるが、ヒトへの感染はない。しかしながら、発症牛の腫瘍は全身に及び、食肉検査においては全廃棄処分となることから、経済的損失が大きい感染症の一つとされる。そこで本研究では、食肉衛生検査におけるウイルス検査のモデル疾病として本疾病の実況を把握するために、食

肉衛生検査所において牛白血病により、あるいは牛白血病が疑われ廃棄された検体から PCR を用いて BLV 遺伝子を検出することを試みた。

B. 研究方法

1 腫瘍組織：2008年4～2009年1月、本研究への材料提供協力食肉衛生検査所（茨城県県西および県北食肉衛生検査所、群馬県食肉衛生検査所、静岡県東部食肉衛生検査所、栃木県県北食肉衛生検査所ならびに横浜市食肉衛生検査所）において牛白血病により、あるいは牛白血病が疑われ廃棄された腫瘍組織 43 検体を用いた（表1）。

2. 核酸抽出: QuickGene DNA tissue kit S (FUJIFILM)を用い、添付のマニュアルに従って3・10 mgの組織片から抽出した。最終的に200 µLの添付bufferを用いて溶出し、20・300 ng/µLのDNA溶液を得た。

3. PCR: OIEの診断マニュアルに準じ、gp51遺伝子を標的としたPCRを行い、440塩基を増幅した。即ち、精製水22.75 µl、5 X GoTaq Flexi buffer (Promega) 10µl、10 mM dNTPs mix 4 µl、10 pmol/µl プライマーOBLV1A (5'-CTTTGTGTGCCAAGTCTCCCAGATAC A-3')および OBLV6A(5'-CCAACATATAGC ACAGTCTGGGAAGGC-3')各2 µl、DNA溶液5µlを混和し、最後に25 mM MgCl₂ 4µlおよび5 units/µl GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega) 0.25µlを加えた。反応は、94°C/45秒、60°C/60秒、72°C/90秒を5回、次いで、94°C/45秒、55°C/60秒、72°C/90秒を30回繰り返した後、72°Cに7分間放置した。

4. RFLP解析: PCR産物をBamHIで消化し、198塩基および242塩基に切断されることを確認した。

5. 塩基配列の決定: PCR産物をOBLV1A、OBLV6A、OBLV3 (5'-CTGTAAATGGC TATCCTAAGATCTACT GGC-3')およびOBLV5 (5'-GACAGAGGAACCCAGTC ACTGTTCAACTG-3')プライマーを用いたダイレクトシーケンスに供し、塩基配列を決定した。

C. 研究結果

1. 腫瘍材料からのBLV遺伝子の検出: 調べた腫瘍計43検体中41検体(95.3%)で約450

塩基の増幅産物が認められた(表1)。大部分の国内分離株は標的とする440塩基内にBamHI切断部位を有することから、各々の増幅産物をBamHIで消化した。その結果、いずれも200および250塩基付近にバンドを生じたことから、増幅産物はBLV遺伝子に由来するものと考えられた(図1)。

2. gp51遺伝子塩基配列の比較: 栃木県の検体から得られたTO-29の塩基配列を決定し、プライマー部分を除いた386塩基をBlast解析で上位に挙げられた日本分離株およびウルグアイ分離株と比較した。図2に示すように、JPEH-1および2とは1塩基、JPMI-1、JPAI-1およびJPKA-2とは2塩基、JPMI-3、JPKA-1およびJPAI-2とは3塩基の相違が認められた。日本分離株ではBamHI切断部位がよく保存されていたが、ウルグアイ分離株には変異が認められた。

D. 考察

牛白血病により、あるいは牛白血病が疑われ廃棄されたウシの腫瘍組織43検体中41検体(95.3%)にBLV遺伝子が認められた。内訳は、ホルスタイン種37検体中36検体、肉用(黒毛和種、交雑種)6検体中5検体であった。また、遺伝子が検出された部位は、リンパ節13検体、心臓12検体、胃7検体、腎臓3検体、その他が6検体であった。地方病性牛白血病による腫瘍はリンパ節に最も好発し、次いで、心臓、胃、子宮とされている。今回の遺伝子検出部位は、腫瘍好発部位とよく一致していた。

すべてのPCR産物はBamHIで約200/250塩基の断片に切断された。TO-29の

塩基配列を決定したところ、*Bam*HI 認識配列が確認された。この配列は国内分離株ではよく保存されていることから、簡易同定として *Bam*HI による RFLP 解析が有用と考えられる。一方、国内分離株間には塩基多型性も認められた。今後、系統進化解析を行って BLV の浸潤経過を明らかにする予定である。

今回供試した検体の 95% 以上から BLV 遺伝子が検出されたことから、ウシの全身性腫瘍の原因の大部分は BLV 感染に起因するものと考えられた。ウイルス遺伝子が検出されなかった 2 検体については、異なる部位の腫瘍を検査する必要がある。また、OIE の診断マニュアルでは OBLV3/OBLV5 プライマー対を用いた nested PCR が記載されており、これも実施する必要がある。

今回、核酸の抽出には FUJIFILM のキットを使用した。より一般的な抽出キットでは、出発材料を多くする必要があるかもしれない。

E. 結論

牛白血病により、あるいは牛白血病が疑われ廃棄されたウシの腫瘍組織 43 検体中 41 検体 (95.3%) において BLV 遺伝子が検出された。したがって、ウシの全身性腫瘍の大部分は BLV 感染による地方病性牛白血病に起因するということが病因学的に証明された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tomiyama, D., Inoue, E., Osawa, Y., and Okazaki, K: Serological evidence of infection with hepatitis E virus among wild Yezo-deer, *Cervus nippon yezoensis*, in Hokkaido, Japan *J. Viral Hepat.* (in press)

2. 学会発表

1) 川口紘史、井上恵美、大澤宜明、岡崎克則: エゾシカ血清からの E 型肝炎ウイルス RNA の検出 第 56 回日本ウイルス学会 岡山市 2008 年 10 月

2) 井上恵美、浅野逸郎、川口紘史、松村佳子、室内友恵、大澤宜明、岡崎克則: A 型インフルエンザウイルス共通プライマーを用いた HA および NA 亜型遺伝子型別法の開発 第 56 回日本ウイルス学会 岡山市 2008 年 10 月

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. 牛白血病と診断あるいは牛白血病が疑われ廃棄された
腫瘍組織からの BLV 遺伝子の検出

食肉衛生検査所	総検体数	供試検体数	BLV 遺伝子陽性数 (%)
茨城県西	18	13	13 (100)
県北	7	5	5 (100)
群馬県	3	3	2 (66.7)
静岡県東部	5	5	5 (100)
栃木県北	36	14	13 (92.9)
横浜市	3	3	3 (100)
計	72	43	41 (95.3)

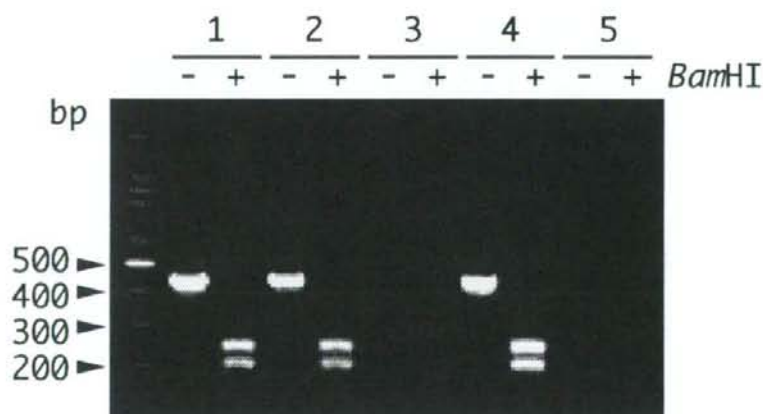


図 1. PCR による BLV 遺伝子の増幅と RFLP 解析. 腫瘍組織由来 DNA を BLVgp51 遺伝子を標的とする PCR に供した。その産物をそのまま (-) あるいは *Bam*HI 処理後 (+) 2%アガロースゲル電気泳動に供した。レーン 1, IB-1; 2, SH-10; 3, GU-19; 4, TO-29; 5, 精製水。左端は DNA サイズマーカー。

```

TO-29      1  CCTTGGACTCTGTAAATGGCTATCTAAGATCTACTGGCCCCCCCCACAGGGCGGGCGGTTGGAGCAGGGCCATGGTCACATATGATTGGAGCCCTGATCCCTTATGTGGGG 120
JPEH-2
JPEH-1
JPMI-1
JPMI-3
JPKA-2
JPKA-1
JPAI-1
JPAI-2
Uru33

TO-29      121 LAGATCGCTTCGACTGCCCCACTGGGACAATGCTCCAGGCCGATCAGGATCTTTTATGCAATCATCAGATTTTATCTCGCATCTGAACAATGTCTGGAAATTTCACTTTAA 240
JPEH-2
JPEH-1
JPMI-1
JPMI-3
JPKA-2
JPKA-1
JPAI-1
JPAI-2
Uru33

TO-29      241 CCTGGGAGATATGGGATATGATCCCTGATCACCTTTCTTTACATAAGATCCCTGATCCCTCCAACCCGACTTCCAGTTGAACAGTGACTGGTCCCTCTGTGAGATCATGGG 360
JPEH-2
JPEH-1
JPMI-1
JPMI-3
JPKA-2
JPKA-1
JPAI-1
JPAI-2
Uru33

O-29      361 CCTGCTTTTAAATCAACAGCACGG 386
JPEH-2
JPEH-1
JPMI-1
JPMI-3
JPKA-2
JPKA-1
JPAI-1
JPAI-2
Uru33

```

図2. PCR産物の塩基配列と国内分離株ならびにウルグアイ分離株との比較。上段はTO-29の塩基配列を示す。JPEHは愛媛県分離株、JPMIは宮城県分離株、JPKAは北海道分離株、JPAIは愛知県分離株、Uruはウルグアイ分離株を示す。□は*Bam*HI認識配列を示す。