

図 1. 供試牛の飼養地. 供試牛の飼養地を都道府県単位で示す。ただし、#38 は生後約 2 年間北海道で飼養された後、約 2 年半栃木県で飼養された。同様に、#60 は 3 年間北海道の後 2 年半栃木県、#81 は 1 年間宮崎県の後 5 年間栃木県で飼養された。

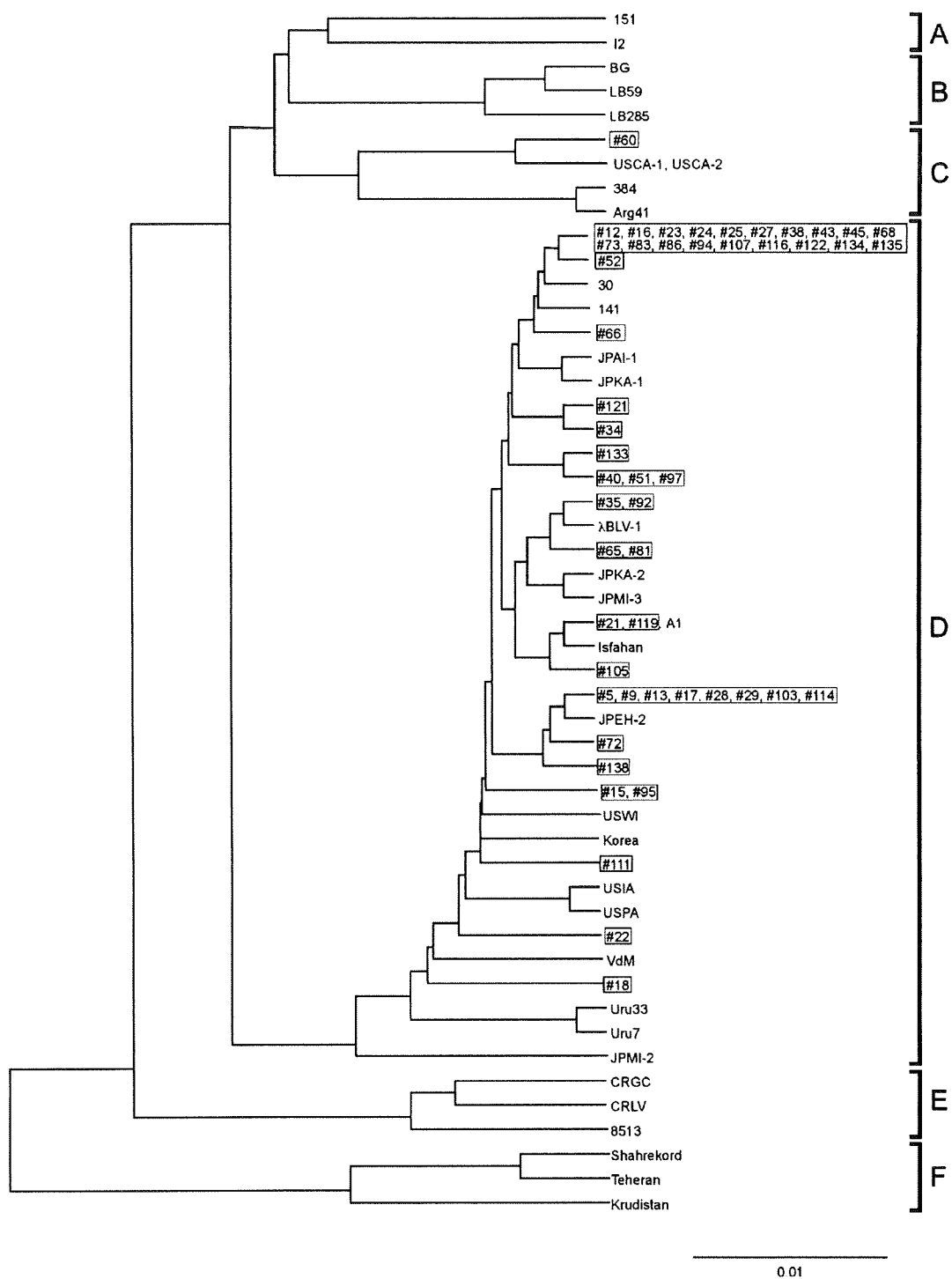


図 2. *env* 遺伝子に基づく BLV の進化系統樹. *env* 遺伝子内の 346 塩基長の配列を国内外の BLV 遺伝子とともに UPGMA 法に供した。本研究で検出された *env* 遺伝子を□で囲った。

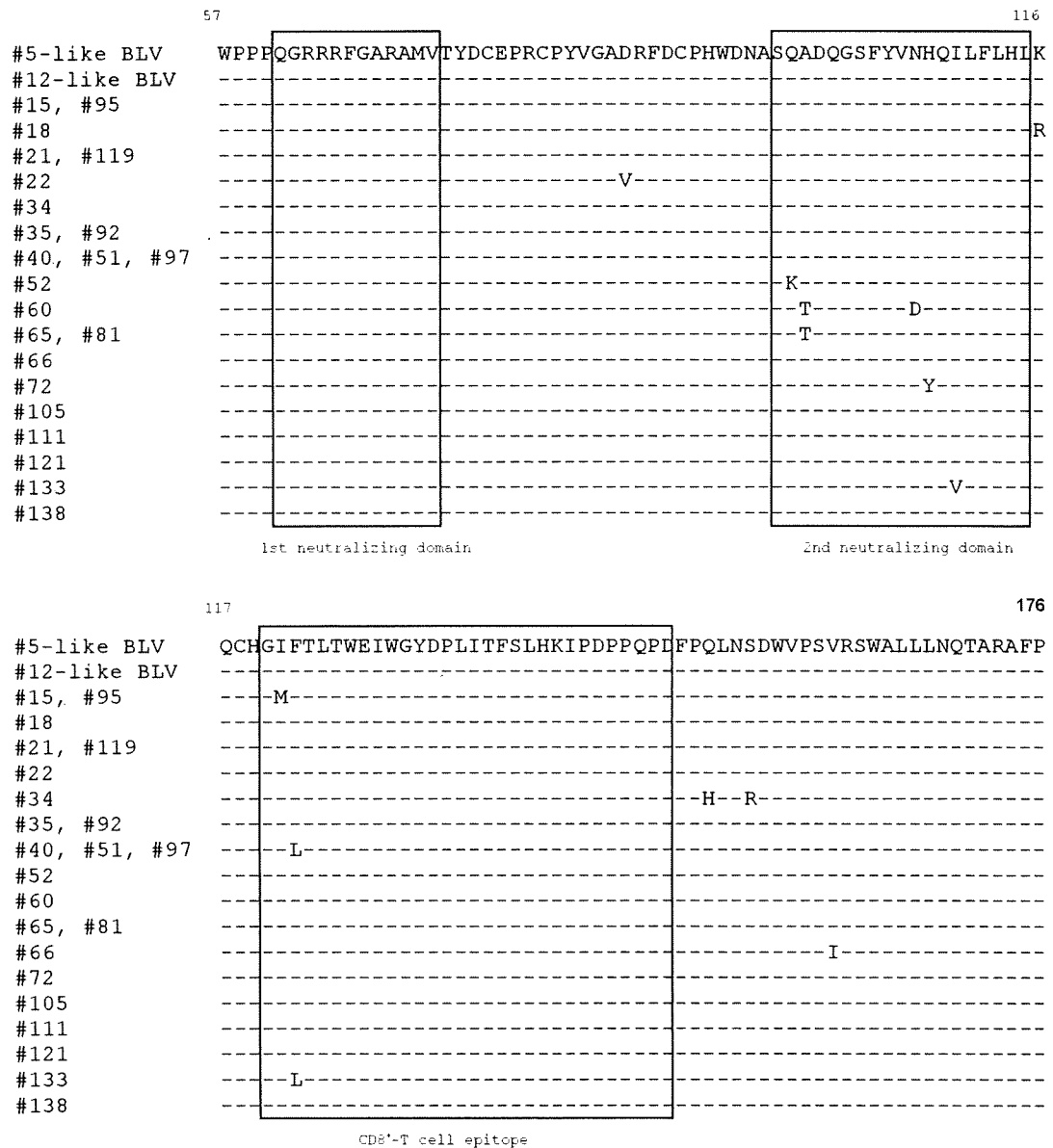


図3. *env*遺伝子の塩基配列から予想される gp51 のアミノ酸配列の比較. BLVgp51 のアミノ酸番号 53~176 領域を示す。中和抗体結合部位ならびに T 細胞エピトープ部位を□で囲った。

牛白血病ウイルスの RFLP 型と発症年齢との関係

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： 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、感染動物の数%が白血病を発症し、その平均年齢は5～8歳である。本研究では、BLV感染牛の予後診断法の開発を目指してBLVのRFLP型別を行い、白血病発症年齢との関連を調べた。ウシの腫瘍組織からPCRで増幅したenv遺伝子をRFLP解析に供したところ、我が国のBLVはI～VI型の6群に分類できた。env遺伝子陽性129検体中II型が最も多く92検体（71.3%）、I型が20検体（15.5%）、III型が12検体（9.3%）であった。IV～VI型はいずれも1～2検体（0.8～1.6%）であった。各々の型のウイルスが検出されたウシの白血病発症年齢を比較したところ、III型ウイルスに感染したウシでは発症年齢が他の型あるいはenv遺伝子陽性全検体の発症年齢に比べ有意に高いことがわかった。したがって、env遺伝子のRFLP解析によってBLV感染牛の予後診断が可能になるかもしれない。

A. 研究目的

牛白血病ウイルス(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、成人T細胞白血病の原因であるヒトTリンパ球向性ウイルス(HTLV-1)に最も近縁なウイルスである。BLV感染牛の多くは不顕性であるが、約1/3がリンパ球増多症を示し、数%が白血病を発症して全身にリンパ肉腫を形成する。発症牛の平均年齢は5～8歳であり、食肉衛生検査所において腫瘍が発見された個体は全廃棄処分となる。本研究では、BLV感染牛の予後診断法の開発を

目指してBLVのRFLP型別を行い白血病発症年齢との関連を調べた。

B. 研究方法

1. 腫瘍組織: 2008年4月～2009年8月、茨城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、牛白血病あるいは全身性腫瘍によって廃棄された腫瘍組織138検体を用いた。
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 mLの添付 buffer を用いて溶出し、20・300 ng/mLのDNA溶液を得た。

3. PCR : OIE の診断マニュアルに準じ、*env* 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 mL、5 X GoTaq Flexi buffer (Promega) 10 mL、10 mM dNTPs mix 4 mL、10 pmol/mL プライマー-OBLV1A (5'-CTTTGTGTGCCAAGTCTCCCAGATACA-3') および OBLV6A (5'-CCAACATATAGCACAGTCTGGGAAGGC-3')各 2 mL、DNA 溶液 5 mL を混和し、最後に 25 mM MgCl₂ 4 mL および 5 units/mL GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega) 0.25 mL 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 産物を制限酵素 *Hae*III、*Mse*I、*Mwo*I、および *Taq*I で消化し、アガロースゲル電気泳動に供した。各々の酵素による切断パターンを組み合わせ、型別を行った。

C. 研究結果

1. ウシ腫瘍組織からの *env* 遺伝子の検出 : 2008 年 4 月～2009 年 8 月、各地の食肉衛生検査所において牛白血病あるいは全身性腫瘍によって廃棄された腫瘍組織 138 検体から、PCR によって *env* 遺伝子断片の増幅を試みた。その結果、129 検体 (93.5%) で約 450 塩基の増幅産物が得られた。いずれも制限酵素 *Bam*HI 処理によって約 200 および 250 塩基長に切断ことから、これらは *env* 遺伝子断片と考えられた。*env* 遺伝子陽性検体と陰性検体の平均月齢を調べたところ、それぞれ 77.71±2.77 ヶ月と

31.22±2.06 ヶ月であった (表 1)。

2. 制限酵素切断パターン : 腫瘍検体から増幅された約 450 塩基の *env* 遺伝子断片を制限酵素 *Hae*III、*Mwo*I、*Mse*I、および *Taq*I で消化した結果を図 1 に示す。*Hae*III では (300 塩基)+(100 塩基未満)あるいは(200 塩基) + (100 塩基未満) の 2 パターン、*Mse*I では (400 塩基) + (100 塩基未満)、(370 塩基)+(100 塩基未満)あるいは(280 塩基) + (150 塩基) + (100 塩基未満) の 3 パターンに、*Mwo*I では (300 塩基)+(150 塩基) + (100 塩基未満) あるいは (280 塩基) + (150 塩基) + (100 塩基未満) の 2 パターンに、*Taq*I では (300 塩基) + (150 塩基) + (100 塩基未満) あるいは (250 塩基) + (150 塩基) + (100 塩基未満) の 2 パターンに切断された。

2. RFLP 型と白血病発症年齢の関係 : *env* 遺伝子断片を 4 種の制限酵素で切断し、それぞれの切断パターンを組み合わせることによって、国内の BLV は 6 群の RFLP 型に分類できた。表 2 に示すように、II 型が最も多く 129 検体中 92 検体 (71.3%)、I 型が 20 検体 (15.5%)、III 型が 12 検体 (9.3%) であった。IV～VI 型はいずれも 1～2 検体 (0.8～1.6%) であった。各々の型のウイルスが検出されたウシの発症年齢を比較したところ、I 型およびウイルスに感染したウシの平均月齢 II 型ウイルスに感染したウシの平均月齢は各々 74.2±7.23 ヶ月および 76.1±3.05 ヶ月であったのに対し、III 型ウイルスに感染したウシでは 99.0±12.06 ヶ月と有意に高いことがわかった。

D. 考察

食肉衛生検査所において廃棄された腫瘍組織 138 検体中 129 検体 (93.5%) から *env* 遺伝子が検出されたことから、ウシの全身性腫瘍の大部分が BLV 感染による地方病

性牛白血病であることが確認された。発症個体の平均年齢は約 6.4 歳と、既報の値とよく一致していた。*env* 遺伝子が検出されなかった個体の平均年齢は約 2.6 歳であったことから、胸腺型あるいは皮膚型牛白血病が含まれているものと考えられる。

国内の BLV は *env* 遺伝子の RFLP 解析によって 6 種に分類できた。II 型が 71.3% と最も多く、I 型が 15.5%、III 型が 9.3% であった。IV~VI 型はいずれも 0.8~1.6% であった。III 型ウイルスが検出された個体の平均月齢は 99.0 ± 12.06 ヶ月と他の型が検出された個体あるいは BLV 遺伝子陽性全体の平均月齢に比べ有意に高かったことから、III 型ウイルス感染牛では白血病の発症が遅い可能性が示された。*env* 遺伝子の RFLP 解析によって BLV 感染牛の予後診断が可能になるかもしれない。今後、細胞の増殖能や不死化に関わると考えられる LTR あるいは Tax などと発症年齢の関係を調べる予定である。

E. 結論

我が国で流行している BLV は *env* 遺伝子の RFLP 解析によって 6 群に分類できた。全体の 9.1% を占める型のウイルスに感染した個体では白血病の発症が遅れる可能性が示されたことから、本法を用いて BLV 感染牛の予後診断が可能になるかもしれない。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Inoue, E., Wang, Xi., Osawa, Y., and Okazaki, K: Full genomic amplification and subtyping of influenza A virus using a single set of universal primers. *Microbiol. Immunol.* (in press)

2. 学会発表

- 1) 井上恵美、浅野逸郎、王笑峰、大澤宜明、岡崎克則：単一のプライマー対による A 型インフルエンザウイルス亜型型別法の開発 第 129 回日本薬学会 2009 年 3 月（京都）
- 2) 松村佳子、井上恵美、室内友恵、大澤宜明、岡崎克則：ウシの全身性腫瘍検体からの牛白血病ウイルス遺伝子の検出とその系統進化解析 第 148 回日本獣医学会 2009 年 10 月（鳥取市）
- 3) 松村佳子、室内友恵、井上恵美、大澤宜明、岡崎克則 ウシ腫瘍組織からの牛白血病ウイルス DNA の検出と系統進化解析 第 57 回日本ウイルス学会 2009 年 10 月（東京都）
- 4) 井上恵美、前河耕平、大澤宜明、岡崎克則 単一のプライマー対による A 型インフルエンザウイルスゲノム全長増幅法の開発と DI 遺伝子の検出 第 57 回日本ウイルス学会 2009 年 10 月（東京都）

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. ウシ腫瘍組織からの BLV 遺伝子の検出と供試牛の月齢

<i>env</i> gene	No. of sample (%)	Mean age (months)
+	129 (93.5)	78.28±3.24
-	9 (6.5)	32.22±9.06
Total	138 (100)	77.71±2.77

]

*

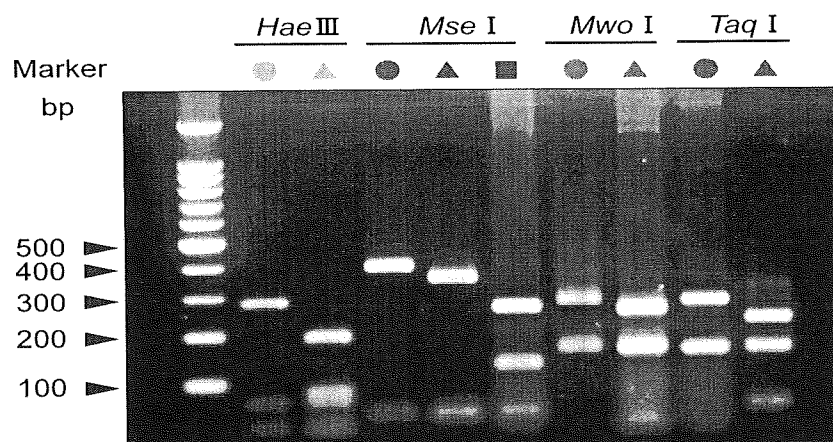


図 1. *env* 遺伝子断片の制限酵素 *HaeIII*、*MseI*、*MwoI*、*TaqI* による切断パターン

表 2. BLV の RFLP 型と供試牛の月齢

RFLP type	<i>HaeIII</i>	<i>MseI</i>	<i>MwoI</i>	<i>TaqI</i>	No. of sample (%)	Mean age (months)	
I	b	c	b	a	20 (15.5)	74.23±7.23	*]
II	b	a	b	a	92 (71.3)	76.14±3.05	
III	a	a	b	a	12 (9.3)	99.02±12.06	*]
IV	b	b	b	a	2 (1.6)	87.00	
V	a	a	a	a	2 (1.6)	54.50	
VI	a	a	a	b	1 (0.8)	69.00	
Total					129 (100)	75.07±0.24	

* P<0.05

鳥インフルエンザの検査に関する研究

・ 食鳥検査所において鳥インフルエンザとの鑑別が必要な
ニューカッスル病の迅速検査法(RT-LAMP)の検討 ・

研究分担者	伊藤壽啓	鳥取大学農学部	教授
研究協力者	伊藤啓史	鳥取大学農学部	准教授

研究要旨 ニューカッスル病は高病原性鳥インフルエンザに症状が類似する家禽のウイルス性疾病である。そのため食鳥検査所における高病原性鳥インフルエンザ検査ではニューカッスル病との鑑別を的確、迅速且つ簡便に行う必要がある。そこで本研究では、食鳥検査所においても実施可能なニューカッスル病に対する迅速検査法として RT-LAMP 法を検討し、短時間（60 分以内）に多種のニューカッスル病ウイルスを検出することが可能な RT-LAMP プライマーセットの開発に成功した。

A. 研究目的

高病原性鳥インフルエンザに症状が類似する家禽のウイルス性疾病にニューカッスル病がある。食鳥検査所では搬入された家禽に高病原性鳥インフルエンザが疑われる場合、迅速診断キットを用いたスクリーニング検査を実施する必要があるが、この診断キットは本来ヒトのインフルエンザに対して開発されたものであり、鳥インフルエンザに対しては感度や信頼性が問題となることがある。したがって、食鳥検査所において高病原性鳥インフルエンザ様の症状を呈した家禽が認められた際には、高病原性鳥インフルエンザだけではなくニューカッスル病についても検査を

行い、二重の確認を行うことにより、より確実な判断が下せる。そこで我々は食鳥検査所においても実施可能なニューカッスル病の迅速検査法として RT-LAMP 法の開発を目的として本研究を実施した。

B. 研究方法

1. プライマーの設計

ニューカッスル病ウイルス株間における遺伝子配列保存性が高い NP 遺伝子および M 遺伝子をターゲットとした。遺伝子データベースに登録されているニューカッスル病ウイルスの NP 遺伝子 (99 株) および M 遺伝子 (106 株) の全長塩基配列を全て取得した。各遺伝子についてマル

チプルアライメントから塩基配列保存領域を同定し、これらの領域内でプライマー設計支援ソフト「PrimerExplorerVer.4」を用いてプライマーを設計した。

2. ウイルス

研究室に保存している以下のニューカッスル病ウイルス 11 株を用いた。

Class I

Goose/Alaska/418/91

Duck/Siberia/1036/99

Class II

TCND、Ishii、Herts、HitchnerB1、Komarov、ck/HK/3/76、Italy、Quail、Queensland

ウイルス RNA は QIAamp Viral RNA Mini Kit (キアゲン) を用いて、ウイルス感染漿尿液から抽出した。

3. RT-LAMP

Loopamp RNA 増幅試薬キット (栄研化学) を用い、添付のプロトコールにしたがって反応液を調製した。反応は Loopamp リアルタイム濁度測定装置 RT-160C (栄研化学) を用いて、62°C、120 分間行った。検出の成否は Loopamp リアルタイム濁度測定装置による機械的な判定および反応液のアガロースゲル電気泳動による増幅産物の目視により行った。

C. 研究結果

1. プライマーの設計

ニューカッスル病ウイルスは遺伝子配列に基づいて Class I と Class II の 2 つのグループに分類され、Class II のウイルスはさらに 8 つの genotype (genotype I-VIII) に分類される (Czgleđi *et al.*, 2006) (図 1)。このような遺伝子配列の多様性から NP 遺伝子、M 遺伝子とも全てのニューカッスル病ウイルスが検出可能なプライマーの設計は不可能であった。そこで、NP 遺伝子、M 遺伝子とも Class I と Class II のウイルスを別々に検出可能なプライマーを設計することとし、合計 4 セットのプライマーを得た (表 1)。

2. RT-LAMP によるニューカッスル病ウイルスの検出

i) NP 遺伝子をターゲットとした RT-LAMP

リアルタイム濁度測定装置による判定では、Class I のニューカッスル病ウイルスは 2 株とも 30 分以内で検出が可能であった (図 2a)。Class II のウイルスは全ての株が 30-50 分の範囲で検出可能であった (図 2b、9 株中 7 株のみ表示)。また、いずれのウイルス株でもアガロースゲル電気泳動により LAMP 増幅産物に特徴的なラダー状のバンドが確認された (図 2c および d)。

ii) M 遺伝子をターゲットとした RT-LAMP

Class I のウイルスは 2 株ともおよそ 15 分で検出が可能であった (図 3a)。

一方、Class II ウイルスは Herts と Italy の 2 株のみが検出可能で、残りの 7 株では陰性と判定された (図 3b、9 株中 7 株のみ表)。アガロースゲル電気泳動においてはいずれのウイルス株においてもラダー状の LAMP 増幅産物が確認された (図 3c および d)。

D. 考察

食鳥検査所においてニューカッスル病を的確、迅速且つ簡便に検出するために、ニューカッスル病ウイルスの NP 遺伝子および M 遺伝子をターゲットとする RT-LAMP 法の開発を試みた。LAMP に用いるプライマーはニューカッスル病ウイルスのゲノム遺伝子の多様性 (図 1) を考慮し、NP 遺伝子および M 遺伝子とも Class I および Class II のウイルスを別々に検出するようなプライマーを設計し (表 1)、研究室に保有するニューカッスル病ウイルス (Class I 2 株および Class II 9 株) について RT-LAMP を実施した。

NP 遺伝子をターゲットとした場合、Class I、Class II のウイルスともリアルタイム濁度測定装置を用いて 1 時間以内に試験に用いた全てのウイルスの検出が可能で、その有用性が確認された。一方、M 遺伝子をターゲットとした場合、Class II のウイルスの 9 株中 7 株の検出が不可能であった。これらの 7 株では濁度の上昇、すなわち LAMP 反応による遺伝子の増幅 (リアルタイム濁度計による濁度

上昇の検出) あるいは電気泳動により LAMP の増幅産物のバンドが確認されていることから、反応が全く起こっていないのではなく、プライマーと鋳型 DNA の配列のミスマッチがあり増幅効率があまり良くない可能性が考えられた。この点を明らかにするためには、ウイルスゲノムのプライマー結合部位の塩基配列を決定し、プライマー配列との相補性を確認する必要があるであろう。

本研究では発育鶏卵で増殖させたウイルスを材料としたが、食鳥検査所における検査を考えた場合、材料は気管や総排泄腔から調製することとなり、糞便等の反応阻害物質が混入することが考えられる。次年度には実験的にウイルスを感染させた鶏から材料を採取し、RT-LAMP による検出の有用性を確認する必要がある。

E. 結論

ニューカッスル病ウイルスを検出する RT-LAMP 法の開発を試みた。NP 遺伝子をターゲットとした場合は Class I、Class II のウイルスとも効率よくニューカッスル病ウイルスの検出が可能であった。一方、M 遺伝子をターゲットとした場合、Class I のウイルスは効率よく検出できるものの、Class II のウイルスの検出効率は悪かった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Usui T, Yamaguchi T, Ito H, Ozaki H, Murase T, Ito T. Evolutionary genetics of highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses isolated from whooper swans in northern Japan in 2008. *Virus Genes*, 2009, 39: 319-323.

2) Tsunekuni R, Ito H, Otsuki K, Kida H, Ito T. Genetic comparisons between lentogenic Newcastle disease virus isolated from waterfowl and velogenic variants. *Virus Genes*, 2009, 40: 252-255

3) Tsunekuni R, Ito H, Kida H, Otsuki K, Ito T. Increase in the Neuraminidase Activity of a Nonpathogenic Newcastle Disease Virus Isolate during Passaging in Chickens. *J Vet Med Sci.*, in press.

4) Shivakoti S, Ito H, Otsuki K, Ito T. Characterization of H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Isolated from a Mountain Hawk Eagle in Japan. *J Vet Med Sci.*, in press.

5) Shivakoti S, Ito H, Murase T, Ono E, Takakuwa H, Yamashiro T, Otsuki K, Ito T. Development of Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP)

Assay for Detection of Avian Influenza Viruses in Field Specimens.

J Vet Med Sci., in press.

2. 学会発表

1) 高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) オオハクチョウ分離株の起源に関する分子系統解析. 笛吹達史、山口剛士、伊藤啓史、尾崎弘一、村瀬敏之、伊藤壽啓. 第 147 回日本獣医学会学術集会 栃木県宇都宮市 栃木県総合文化センター 2009 年 4 月

2) ベトナム北部の野鳥から分離された H9N2 亜型鳥インフルエンザウイルスの性状解析. 中村保紀、大槻公一、常國良太、村瀬敏之、小野悦郎、伊藤壽啓、山口剛士、伊藤啓史、尾崎弘一、笛吹達史、中森純也、Lien Phuong Song、Quynh Mai Le Thi、山城哲、森田公一、高桑弘樹. 第 147 回日本獣医学会学術集会 栃木県宇都宮市 栃木県総合文化センター 2009 年 4 月

3) ベトナム北部から分離されたニューカッスル病ウイルスの性状解析. 常國良太、大槻公一、村瀬敏之、小野悦郎、伊藤壽啓、山口剛士、伊藤啓史、尾崎弘一、笛吹達史、中森純也、Lien Phuong Song、Quynh Mai Le Thi、山城哲、森田公一、高桑弘樹. 第 147 回日本獣医学会学術集会 栃木県宇都宮市 栃木県総合文化センター 2009 年 4 月

4) 高病原性トリインフルエンザウイルスの病原性と M2 蛋白の関わり. 藤本佳万、冨田めぐみ、伊藤啓史、伊藤壽啓. 第 147

回日本獣医学会学術集会 栃木県宇都宮
市 栃木県総合文化センター 2009年4
月

5) 野生水禽由来鳥インフルエンザウイル
スの鶏雛気嚢継代による病原性の獲得. 富

田めぐみ、藤本佳万、伊藤啓史、伊藤壽啓.
第147回日本獣医学会学術集会 栃木県
宇都宮市 栃木県総合文化センター
2009年4月

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当無し

表1 ニューカッスル病ウイルス検出用 LAMP プライマー

ターゲット	プライマー	塩基配列
Class I NDV NP 遺伝子	F3	CCTTCGGATTGCAGTCAGT
	B3	AGATACGCCACTCCTGTTGT
	FIP	CACTTGGAGTGAGAGCACAGT-AGGATGCAAACAAGCTCTG
	BIP	TGTGGCACTGGCTGAAAAGC-TGCGGCATACCATTTGAGAA
Class II NDV NP 遺伝子	F3	CGGATGAAAGGTGAAAATGC
	B3	CTTCCCTGAGCCTGAGCA
	FIP	ATGCCATGCCCATGGCAAAGA-GGTGACAGTGACCAGATGAG
	BIP	ACTGGCAAGTACCAATTCGCCA-TCTACTCCAAGTCTCCAGAA
Class I NDV M 遺伝子	F3	ACAGCGCTTGGATTCTG
	B3	ACAAGATCTCCCGCATTGG
	FIP	TCCTCACTCCCGACCTGAAAGA-GACAGACAGCAAGGAGGAC
	BIP	TGATAAATGACAACCCGCGGCG-GACTGCCCAGACACAAC
Class II NDV M 遺伝子	F3	GGACTTATGACCACCGTAGA
	B3	CTGTCCCCTGCTAGAGAA
	FIP	AGCCCGACAGATAGATCAAGGCT-TAGGAAGGGGAAGAAAGTGA
	BIP	AGTGATGTGCTCGGGCCTTC-TGCCAAAAGCTTAGTCCGT

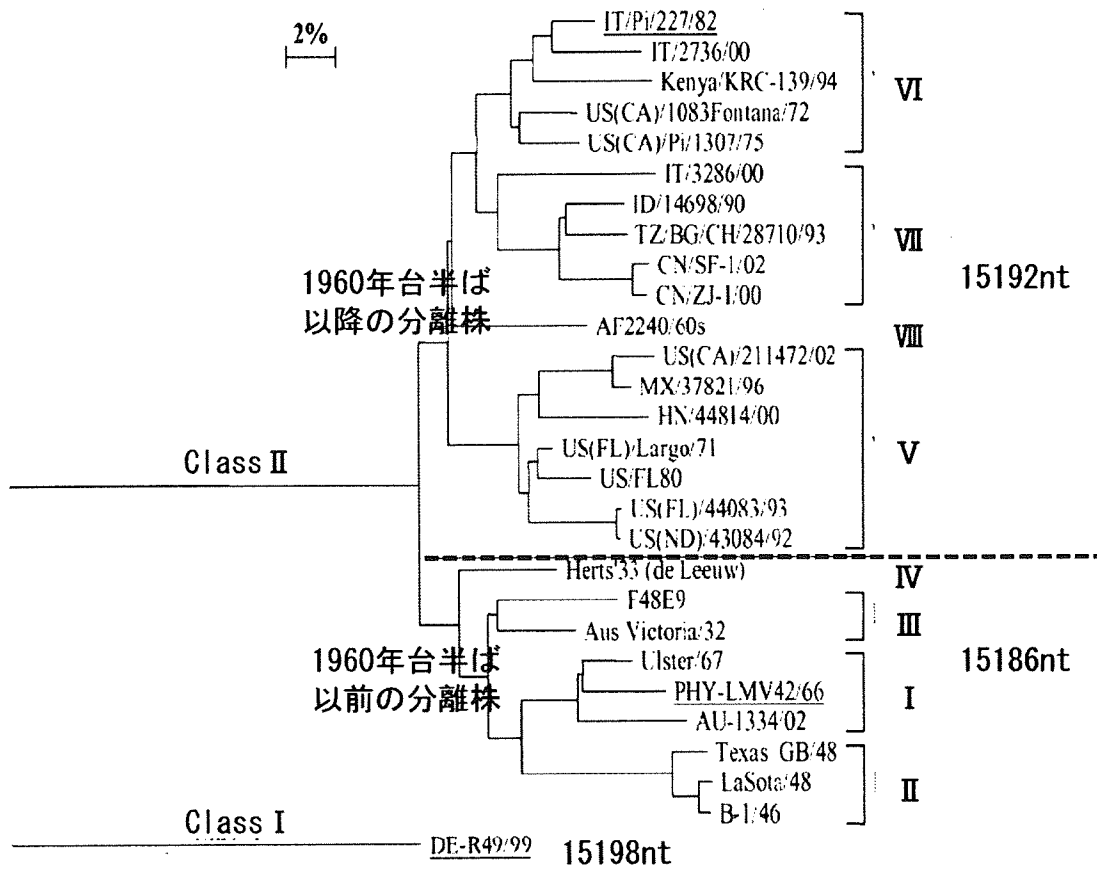
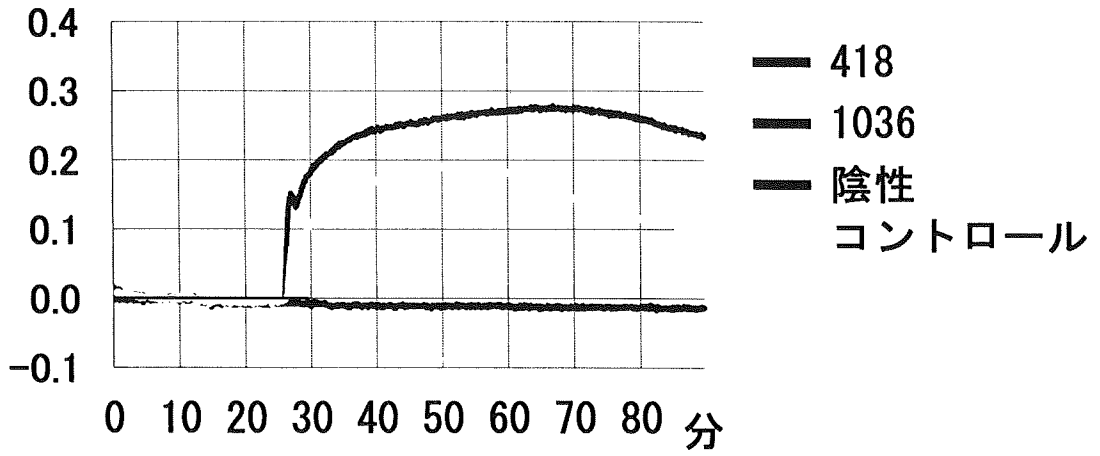


図1 NDVの分類

Czgliedi *et al.*, 2006、一部改変

a



b

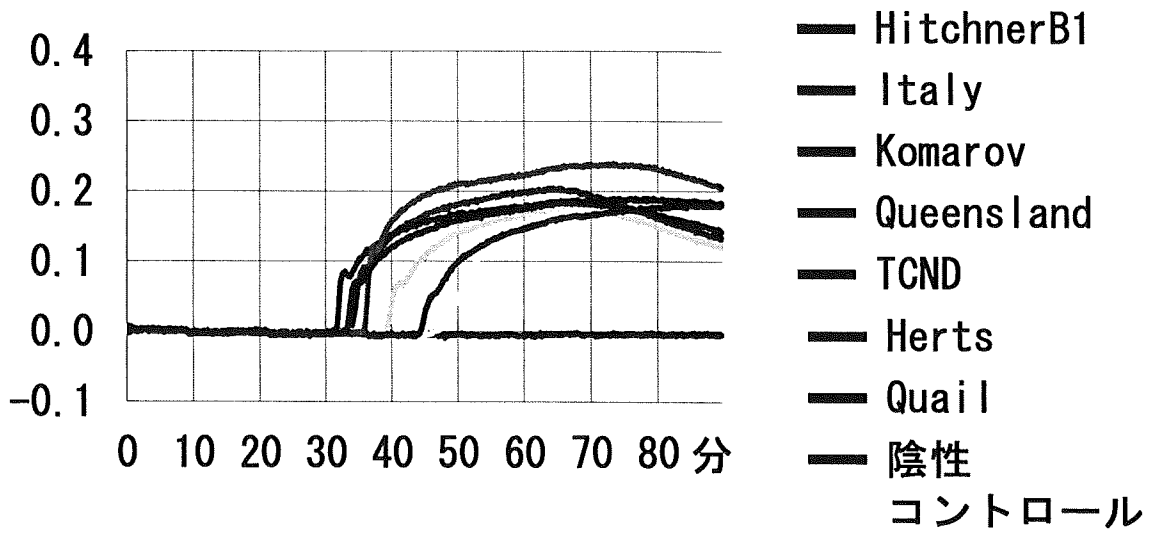
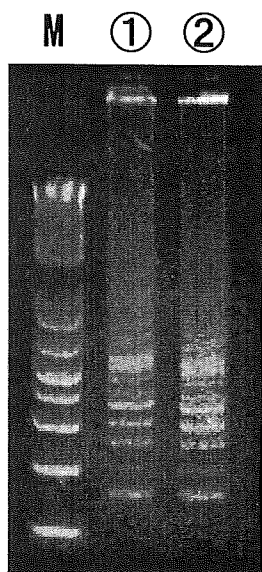


図2

c

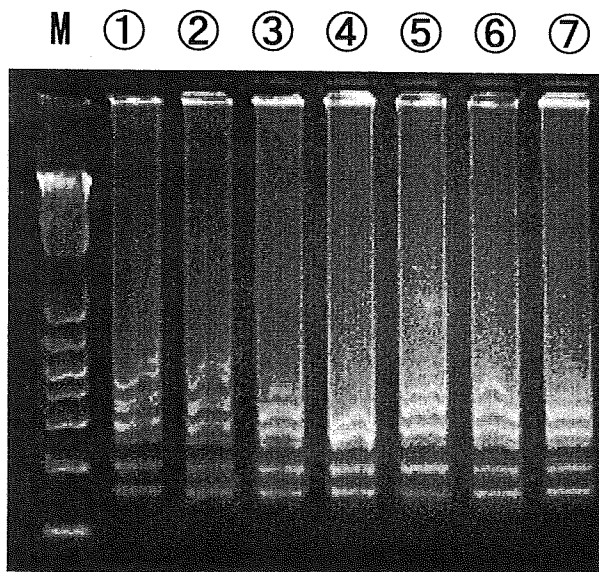


① 418

② 1036

M 分子量マーカー

d



① HitchnerB1

② Italy

③ Komarov

④ Queensland

⑤ TCND

⑥ Herts

⑦ Quail

M 分子量マーカー

図2

鳥インフルエンザ検査のための検体輸送用培地の検討

分担研究者 棚林 清 国立感染症研究所 獣医科学部 第三室長
研究協力者 山本美江 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官

研究要旨:食鳥衛生検査所で高病原性鳥インフルエンザが疑われた場合には、簡易キットによる検査に続いて確定検査のために検体を採取し、検査可能な検査所(施設)へ輸送する必要がある。本研究ではウイルスが安定して保持されるための検体輸送用培地の検討を行った。組織培養用培地、生理食塩水および市販のユニバーサルバイラルトランスポートにH5N1亜型インフルエンザウイルスを添加しその生残性を調べたところ、4℃では7日間感染価の低下はほとんどなく、ウイルス核酸もよく保存され有用であることがわかった。しかし、家禽の咽頭スワブやクロアカスワブなどの実際の検体に含まれる体液や糞便等の影響についてはさらに検討が必要である。

A 研究目的

2004年、2007年と本邦においても養鶏場で高病原性鳥インフルエンザが発生し、2004年の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。食鳥検査において本ウイルス疾病が疑われた場合はインフルエンザ簡易キットでの一次的な検査に続き、さらに精密な検査のために検査可能な検査所または施設に速やかに輸送することが必要となる。

本研究では食鳥検査の過程で高病原性鳥インフルエンザが疑われ、確認検査を要した場合にウイルス分離や速やかに結果を得ることが期待されるウイルスゲノム RNA を検出するための検査に適した輸送用培地について検討した。

B.研究方法

1. 検体輸送用培地:病原体検出マニュアル(国立感染症研究所)に準じ作成した輸送用培地と市

販(BD ユニバーサル バイラルトランスポート BD UVT、日本 BD 社) されているものについて比較を行った。これら培地の組成を以下の表に示した。

E-MEM	penicilin500u/ml, storptomy- cin500 μ g/ml・ファンギゾン 2.0 μ g/ml・ゲンタマイシン 100 μ g/ml : BSA0.5%
生食	penicilin500u/ml, storptomy- cin500 μ g/ml・ファンギゾン 2.0 μ g/ml・ゲンタマイシン 100 μ g/ml : BSA0.5%
UVT (BD)	ハンクス緩衝塩類、L システイン、ショ 糖、HEPES 緩衝液、ファンギゾン、 BSA、ゼラチン、L-グルタミン酸、パン コマイシン、コリスチン

細胞培養用液体培地(E-MEM、和光純薬社)または生理食塩水(生理食塩液、大塚生食注、大

塚製薬社)には抗生物質、抗真菌剤、牛血清アルブミン(BSA、シグマ社)を添加して用いた。

2. ウイルス生残性試験:各検体輸送用培地 18ml に対しストックウイルス液(しょう尿液)を 600 μ l 加え混和後、200 μ l ずつをマイクロチューブに分注し 4°C または 20°C で 0~7 日間保存した。0, 1, 3, 5, 7 日目に -80°C に凍結し、ウイルス感染価測定と RNA 抽出まで保管した。感染価については 0, 1, 3, 5 と 7 日目のサンプルについて測定した。ウイルスゲノムについては 0 日と 7 日目のサンプルについて測定した。

2. 感染価の測定:MDCK 細胞(感染研インフルエンザウイルス研究センターより分与)単層細胞に 10 倍段階希釈した試験材料を 96 穴マイクロプレートの 4 穴ずつに添加し 4 日後に細胞変性を確認して 50%感染価を測定した。

3. ウイルスゲノムの検出:各輸送用培地で 4°C または 20°C で 0~7 日間保存したウイルス液の 100 μ l から Viral DNA/RNA Isolation キット (Nucleo Spin® 8 Virus Kit MACHE-REY-NAGEL) を用いて RNA を抽出した。リアルタイム RT-PCR プロトコールは前年度に検討した条件の中で最も良いと思われたプロトコールを用いて real time RT-PCR (M gene)を行い、threshold cycle (Ct)を比較した。

4. 供試ウイルス:A/duck/Hyogo/35/01 (H5N1) (兵庫株、神戸市環境保健研究所より分与)のインフルエンザ A ウイルス(弱毒株)を 10 日令発育鶏卵に接種して増殖させ、その漿尿液をウイルスストックとした。

C. 研究結果

1. 感染性ウイルスの生残性:ウイルスストック液を

3 種の輸送用培地に添加し 4°C または 20°C で保管した後の残存感染価を測定した。

試験前の感染価(0 日)は E-MEM 培地では $10^{4.8}$ TCID₅₀/0.1ml、生食では $10^{4.4}$ TCID₅₀/0.1 ml、UVT では $10^{4.8}$ TCID₅₀/0.1mlであった。4°C で 7 日間保存した場合には、どの培地においても感染価は同程度だった。20°C で保存した場合にはどの培地においてもやや低下傾向がみられた(図 1)。

2. ウイルスゲノムの検出:各輸送用培地で保存したウイルス液から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法によりウイルスゲノムの残存量を検出比較した。4°C 保管した場合にはいずれの輸送用培地を用いた場合にもリアルタイム RT-PCR における Ct 値の有意な上昇は見られずウイルスゲノムは安定して保存されていた。20°C で 1 週間保存したものでは生理食塩水および市販培地では Ct 値の変化はなかったが、E-MEM では Ct 値の上昇がみられた(図 2)。

D. 考察

高病原性鳥インフルエンザが疑われる家禽が食鳥処理場に搬入された場合は簡易インフルエンザ診断キットにより検査を行い、疑いがある場合はさらにウイルス分離やゲノム検出同定がなされる。その際、検体は含まれるウイルスが安定した状態で輸送する必要がある。本研究では、検体輸送用培地として組織培養用培地、生理食塩水に牛血清アルブミンと抗生物質などを添加したものおよび市販の輸送用培地についてウイルスの生残性およびウイルスゲノムの残存性を確認した。

感染性ウイルスはいずれの培地においても冷蔵(4°C)では 17 日間有意な減少は見られなかったが室温(20°C)ではやや減少傾向にあった。これらの結果は、一般的にウイルス検

体の輸送が冷蔵して行われることや国内の輸送においては数日内に配送が可能であることからしてその輸送用培地はいずれでも可能と考えられた。しかしながら、本実験では、実際の検体となる家禽の咽頭スワブやクロアカスワブに含まれる生体成分の混入は再現されておらず、これらの混入によるウイルスの生残性に及ぼす影響は不明で更なる検討が必要となると考えられた。特に、生理食塩水を基礎とした培地では pH の緩衝能は期待できず、生体成分の混入の影響を受ける可能性が推定される。

また、本試験に用いたウイルス株は弱毒型の野鳥由来 H5N1 亜型株であったが、その他のウイルス株（強毒型のウイルス株、H5N1 亜型以外のウイルス株など）についても比較検討し、最良の輸送用培地の検討が必要とも考えられる。

ウイルスゲノムの残存については、各輸送用培地で 7 日間保管したサンプルからの抽出 RNA についてリアルタイム RT-PCR 法によりウイルスゲノム量を比較した結果、冷蔵ではいずれの培地でも検出量に低下は見られなかったが、組織培養用培地で室温保管した場合に若干の低下がみられた。この原因は不明であるが再試験を行い検証する必要があると考えられる。

本研究では検体中の RNA の安定性を向上させるとされる RNA later などの試薬の追加添加が必要となるほどのウイルス RNA の減少は認められなかったが、常温輸送の可能性や凍結されて

おり融解が必要な検体等の場合には有効に作用する可能性があり今後検討の余地があると考えられる。

E. 結論

家禽における高病原性鳥インフルエンザの起因となるインフルエンザ A ウイルスを検体から効率良く検出するために、その検体輸送用培地の検討を行った。組織培養用培地、生理食塩水および市販の輸送用培地に野鳥由来弱毒型の H5N1 亜型ウイルスを添加しその生残性を調べたところ、4℃では 7 日間感染価の低下はほとんどなく、ウイルス核酸もよく保存され有用であることがわかった。しかし、家禽の咽頭スワブやクロアカスワブなどの実際の検体に含まれる体液や糞便等の影響についてはさらに検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

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