

201033013A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 棚 林 清

平成23 (2011) 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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 棚 林 清

平成23（2011）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	19
池田 秀利	
2. 牛リンパ肉腫からの牛白血病ウイルス <i>env</i> 遺伝子検出法の改良	33
岡崎 克則	
3. 牛白血病ウイルスの <i>Tax</i> タンパク質の多型と白血病発症年齢との関係	39
岡崎 克則	
4. 鳥インフルエンザの検査に関する研究	47
伊藤 壽啓	
5. 高病原性鳥インフルエンザ検査のための検体輸送用培地の検討	51
棚林 清	
6. DNAプローブを用いた簡易ウイルス検出法の検討	57
棚林 清	
7. と畜場に搬入された豚における A 群ロタウイルスの感染状況及び簡便な ウイルス全遺伝子解析法の確立とその応用	63
杉山 誠	
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、ウイルス疾病の実態調査を実施することも目的として平成 22 年度は以下の成果が得られた。

家畜のウイルス性疾病の検査として、動物臓器の乳剤化から PCR 法でのウイルス核酸を検出するまでのマニュアルを策定・改良し、食肉処理場で採材した 120 頭分の豚扁桃サンプルで 10 種類のウイルスを調査した。その結果、ブタサーコウイルス 2 型が 78%(93/120)、ブタパルボウイルスが 54%(65/120)検出されたが、E 型肝炎ウイルスを含む他の 8 種のウイルス遺伝子は全く検出されず、以前の結果と類似し、本マニュアルで安定した検査結果が得られると考えられた。

牛のウイルス性疾病検査のモデルとした牛白血病ウイルス (BLV) ゲノムの PCR による検出法の簡略化と標準化を目指し、新たな耐熱性 DNA ポリメラーゼを試用するとともに陽性対照 DNA を調製した。その結果、検査時間の大幅な短縮ならびに高感度化に成功し、本改良法を基に 4 か所の協力食肉衛生検査所で試行を実施した。また、BLV の Tax 遺伝子を解析し国内の腫瘍由来 BLV は Pro233 型と Leu233 型の 2 系統に分けられ、系統進化解析で野生型の BLV は Leu233 型であると考えられた。さらに白血病診断時のウシの年齢との関連を調べたところ、Pro233 型 Tax を有する変異型 BLV 感染牛では発症が遅くなるものと考えられた。

高病原性鳥インフルエンザ(HPAI)と症状が類似するニューカッスル病(ND)迅速検査法として開発した RT-LAMP 法は class および genotype に関わらず幅広い NDV 遺伝子が検出可能であること、ND 罹患鶏からのウイルス遺伝子検出が可能であることが明らかとなった。また、HPAI 確定検査のための検体輸送培地、温度、糞便混入の影響を調べたところ市販品を含め輸送の際の冷蔵管理が重要であることがわかった。

開発改良中の網羅的病原体検出マイクロアレイのプロブを応用して、病原体ゲノム検出法として安価で汎用的なマイクロプレートハイブリダイゼーション法の開発を試みインフルエンザウイルスゲノムの 10^4 コピーを検出できた。

家畜における A 群ロタウイルスのリスクを把握するために、と畜場に搬入された健康豚 177 例を調査し 9.6%から人や豚に病原性を示すタイプを含めたウイルス遺伝子の排泄を確認した。さらに、混合感染や分節遺伝子交換 (リアソートメント) も観察され、直接的なリスクだけでなく、遺伝子の供給源としての間接的なリスクも示唆された。野外サンプルに直接適応できるロタウイルスの全分節遺伝子を解析する簡便法に改良を加え、前年度の検出率 54.5%から 81.8%と改善に成功し疫学的調査への応用が期待される。

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、食肉などの更なる安全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最終目的としている。

22年度はウイルスゲノムをPCRやRT-PCR法などで検出する検査法のさらなる改良や食肉衛生検査所での試行や策定マニュアルに沿った検査の検証を目的に、豚においては多数の検体で10種類のウイルス検査を実施した。また、牛については牛白血病ウイルス (BLV) 検査 PCR 法の簡便化と標準化のための陽性対照 DNA の作出を実施するとともに、改良した PCR 法を用いて協力食肉衛生検査所で発見された牛白血病疑い検体への応用を試みることにした。さらに国内 BLV の詳細な分子疫学的解析と白血病発症機構の解明のための BLV Tax 遺伝子の詳細な解析を実施した。

食鳥処理場で高病原性鳥インフルエンザ (HPAI) が疑われた場合は簡易迅速診断キットによる検査を実施することとなっており、希望地方自治体への簡易キットの配布と試用を依頼した。また、確定診断のための市販品を含めた検体輸送用培地の種類、輸送温度、検体混入糞便の各種インフルエンザウイルスの安定性に及ぼす影響を調べた。また、開発した鑑別診断が必要になるニューカッスル病ウイルス (NDV) の RT-LAMP 法についての各種 NDV 株での反応性

を検証することを目的とした。

さらに、これまで開発改良してきた網羅的病原体マイクロアレイ法に使用されているプローブを利用した安価で汎用性のあるマイクロプレートハイブリダイゼーション法の開発を試みた。

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健康豚における感染状況調査並びに検出ウイルスゲノムの分子疫学的解析および簡便な全分節遺伝子解析法の改良を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1. 豚に感染するウイルスの検査法の検討：昨年度まで検討した臓器の乳剤化、ウイルス核酸の抽出、PCR によるウイルス遺伝子の検出に至るまでのマニュアルを策定するとともに、食肉処理場及び食肉衛生検査所の協力により新たに得られた豚 120 頭分の扁桃材料について 7 種の RNA ウイルス (豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス (PRRSV)、日本脳炎ウイルス (JEV)、豚流行性下痢ウイルス (PEDV)、豚ロタウイルス (PoRV-A)、伝染性胃腸炎ウイルス (TGEV)、ゲタウイルス (GETV)、E 型肝炎ウイルス (HEV)) と、3 種の DNA ウイルス (豚サーコウイルス 2 型 (PCV2)、オーエウキーウイルス (SuHV-1)、豚パルボウイルス (PPV)) について検出を試み 2 年前に同一地域での検体を調べた結果と比較検討し、マニュアルの有効性を確認した。また、検出された PCV2 や PPV 遺伝子の解析を行った。

2. 牛に感染するウイルスの検査法の検討：OIE のマニュアルに準拠した PCR 法によって腫瘍検体からの BLV-*env* 遺伝子検出法の簡略化ならびに標準化を目指し、新たな耐熱性 DNA ポリメラーゼ Phire Animal Tissue Direct PCR kit (FINNZYMES) を試用するとともに陽性対照 DNA を調製した。本改良法を用いて協力食肉衛生検査所 4 か所で牛白血病 (疑い) の腫瘍検体での BLV-*env* 遺伝子 PCR 検査を試行した。

さらに、国内各地の食肉衛生検査所の協力によ

り提供された腫瘍組織から得られた BLV の Tax 遺伝子の塩基配列を解読し系統進化解析を行うとともに、白血病診断時の年齢と Tax 遺伝子型との関連性を調べた。

3. 鳥インフルエンザの検査手法の検討：昨年度までに開発した HPAI との鑑別診断が必要となる ND 検査のための RT-LAMP 法について、新たに 2 つの genotype の NDV3 株に対する反応性の確認、強毒型 NDV を実験感染させた鶏の気管およびクローカスワブからの検出、およびゲノム RNA の抽出法として迅速簡便法(Quick Extract RNA Extraction Kit, EPICENTER Biotechnologies 社)を検討した。

また、HPAI 疑い検体のウイルス分離や RT-PCR 検査のために必要な輸送培地、温度、糞便混入の影響について H5 亜型ウイルスおよびヒト由来ウイルス株や野生カモ由来 H1 亜型株を用いて安定性を調べた。

簡易検査キットを自治体担当部局経由で食鳥検査所に配布し試用してもらった。

4. DNA プローブを用いた簡便ウイルス検出法の検討：これまでに開発した網羅的病原体検出マイクロアレイ用プローブを応用してより安価で汎用性のあるマイクロプレートハイブリダイゼーション法の基礎条件の検討を行い、インフルエンザウイルスゲノムの検出を試みた。

5. 食用に供される豚における A 群ロタウイルスの感染状況調査と遺伝子解析法の確立：2009 年 5 月に群馬県及び 2010 年 2 月に名古屋市食肉衛生検査所に搬入された健康豚それぞれ 87 例及び 90 例の計 177 例より採材された豚糞便サンプルについて、RT-PCR 法により A 群ロタウイルス VP4 遺伝子の検出を行った。陽性検体については VP4 及び VP7 遺伝子の塩基配列解析により P 及び G 遺伝子型を決定した。さらに、簡便な分節遺伝子解析法である RT-PCR 法に改良を加え、RT^{semi-nested}

PCR 法の確立を行い、ロタウイルス遺伝子陽性の牛糞便 20%乳剤 11 例を用いて、VP4、VP7、NSP2、NSP3、NSP4 及び NSP5 の 6 つの分節を対象に簡便法を試みた。

C. 研究結果

1. 豚に感染するウイルスの検査法の検討：

2008 年及び 2010 年に採材された各 120 頭の扁桃サンプルについて、10 種の主要な豚ウイルスの存在を調査した。2008 年は PCV2 が 84%(101/120)、PPV が 57%(68/120)検出され、2010 年はそれぞれ 78%(93/120)、54%(65/120)の検出率であり、他の 8 種のウイルス遺伝子は両年とも全く検出されなかった。両年の検査結果はよく似ていた。

PCV2 は遺伝子多型が多いことが知られているが、今回も多様な配列が見られ、最も多く (16/22) 検出されたのは、Takahagi ら(JSVS 70:603-606, 2008)の遺伝子型分類による PCV2-2E 型に近縁なウイルス遺伝子であった。簡便な遺伝子型特異的な PCR 法で解析した結果 PCV2a 型だけが陽性個体は 63%、PCV2b 型 12%、両方陽性は 3% と PCV2a 型が圧倒的に多かった。一方、PPV は全く遺伝子多型が見られなかった。

2. 牛に感染するウイルスの検査法の検討：新たなインヒビター耐熱性 DNA ポリメラーゼ Phire Animal Tissue Direct PCR kit (FINNZYMES) を用いることで、従来の 1 晩を要した精製 DNA 抽出のステップを簡略でき、検出感度も出発材料換算で少なくとも 5 倍の感度を有していた。また、使用する PCR 用プライマーとよく反応し PCR 産物が本来の目的サイズ(440bp)と区別できる陽性対照 DNA(986bp)を作出することができた。

栃木県県北、茨城県県西、群馬県、静岡県東部各食肉衛生検査所の協力で添付資料に示すプロトコールに従い改良 BLV-env 検出 PCR を試行した。牛白血病 (疑い) の腫瘍が認められた 93 頭中 85 頭 (91.4%) が PCR 陽性であった。また、腫瘍以外の検体で PCR を実施したところ 5 頭中 15

頭、判定不能が4頭みられた。腫瘍検体の陽性率はこれまでの93.5%との結果とほぼ同等であった。

さらに国内各地の食肉衛生検査所の協力により提供された腫瘍組織46検体から得られたBLVのTax遺伝子の塩基配列を解読しアミノ酸配列を比較したところ、233番アミノ酸の違いによって国内の腫瘍由来BLVはPro233型あるいはLeu233型の2系統に分けられた。系統進化解析の結果、Pro233型BLVは全て一つのクラスターに属していたことから、野生型のBLVはLeu233型であると考えられた。Taxの233番アミノ酸と白血球診断時のウシの年齢との関連を調べたところ、Leu233型ウイルス感染牛32頭の平均月齢は 55.3 ± 5.2 ヶ月であったのに対し、Pro233型ウイルス感染牛14頭のそれは 97.1 ± 11.3 ヶ月と有意に高かった($p=0.00035$)。

3. 鳥インフルエンザの検査手法の検討：昨年までに開発したNDV-RT-LAMP法について、新たにGenotype VIIおよびVIIIのNDウイルスの検出が可能であることが確認された。さらに、実験的な感染ニワトリで感染後1日目から死亡(感染後5~6日)まで、全ての気管スワブからウイルス遺伝子が検出可能であった。一方、クロアカスワブからの遺伝子検出は不安定であった。また、迅速簡便なゲノムRNA抽出法を用いた場合は、従来のスピнкаラム(Viral RNA Mini Kit, キアゲン社)比べ不安定且つ感度は劣るものの、迅速簡便法でもNDウイルス遺伝子の検出は可能であった。

検査所でのHPAI疑い簡易検査後の確認検査のための検体輸送用培地(生理食塩水、組織培養用培地(M-MEM)および市販のBDユニバーサルバイラルトランスポート検体輸送用培地)でのH5亜型ウイルスおよびヒト及び野鳥由来H1亜型ウイルスの安定性を調べたところ4°Cでは21日間でも感染価の低下は小さかったが20°C保存やクロアカスワブなどの実際の検体に含まれる糞便の添加により生残性の低下がみられた。

インフルエンザ簡易キットを16自治体で274

検体に試用したところ特段の問題点はなかった。

4. DNAプローブを用いた簡便ウイルス検出法の検討：これまでに開発した網羅的病原体検出マイクロアレイ用プローブを応用してマイクロプレートハイブリダイゼーション法の条件を検討したところオリゴDNAプローブが50merで、ハイブリに用いる反応液は40%ホルムアミドを含む5xSSCが最適であることが明らかとなった。また、オリゴDNAプローブの検出感度の検討をおこなった結果、インフルエンザウイルスゲノム(Narita株)10⁴コピーでも検出することができた。

5. 食用に供される豚におけるA群ロタウイルスの感染状況調査と遺伝子解析法の確立：と畜場に搬入された177例中17例(9.6%)の豚糞便からVP4遺伝子が検出でき、地域に関係なく健常な豚で感染量として十分なA群ロタウイルスを排泄していることが確認された。VP4及びVP7遺伝子の解析から、G及びP遺伝子型の組み合わせが9通りあった。また、牛で検出されるG6遺伝子型に極めて近縁な同遺伝子型、人ロタウイルスに近縁なG1遺伝子型のA群ロタウイルスも健常豚より検出された。また、異なった遺伝子型ウイルスの混合感染が確認でき遺伝子分節の組換え(リアソートメント)を示すサンプルも複数株見出された。

全分節遺伝子の簡便解析法について改良を行った結果、従来RT-PCR法で延べ66遺伝子中36(54.5%)が増幅でき、6つの全ての遺伝子が増幅できたのは11例中4例であったのに対し、改良法では66遺伝子中56(84.5%)の増幅が可能で、11例中5例で6つの遺伝子セットを増幅することができ、これらの塩基配列から遺伝子型を決定することができた。VP7遺伝子分節は、全てのサンプルで増幅可能となり、少なくとも主要な遺伝子型であるP及びG遺伝子型の決定は可能となった。

D. 考察

家畜に感染するウイルスの検査法については、食肉処理場や食肉衛生検査所でも実施可能なウイルス遺伝子検出法をマニュアル化し改良してきた。今年度は作成したマニュアルに従って実際に豚材料について 10 種類のウイルスについて (RT) -PCR 検査を実施し、2008 年の調査結果を比較すると、この地域の養豚場で常在している豚ウイルスに 2 年間で大きな変化がないと推定され、策定したマニュアルで安定した結果が得られると考えられる。今回のマニュアルは (RT-) PCR による豚の主要ウイルスを簡便に特定する手法であるが、PCR プライマーの変更による PCV2 の遺伝型の判別に今年度利用可能であったことから他のウイルスの検査にも容易に応用可能であると考えられる。

今年度調査したウイルスの中で、人獣共通感染症病原体は E 型肝炎ウイルスだけであるが過去報告では、豚レバーの 1.9% (7/363) でウイルス遺伝子が検出されているが、今年度と 2008 年の計 240 頭の調査で陽性はなく検査対象組織や技術的な検出感度を精査する必要がある。今後、家畜からヒトに感染する新興感染症の新たなチェック体制の強化が必要となる場合には本研究で作成した、簡便なウイルス検査法マニュアルが参考になると考えられる。

牛に感染するウイルスの検査法開発として牛白血病ウイルス(BLV)検出 PCR 法をモデルとして改良を行ってきた。今年度はインヒビター耐性の耐熱性 DNA ポリメラーゼ Phire Animal Tissue Direct PCR kit (FINNZYMES) を使用することによりこれまでの核酸抽出ステップを大幅に簡略化でき、さらに検出の感度も良くなることができた。さらに、陽性検体での DNA バンドと異なるサイズの陽性対照 DNA を作出したことで交差汚染をモニターでき検査精度の向上に有用と考えられた。

本改良法で食肉衛生検査所での検査も可能と考えられたことより協力検査所で牛白血病 (疑い) 腫瘍検体の PCR を試行した。使用する器具

の違いなどがあつたが過去の検出率とほぼ同等の検出率であり、牛腫瘍検体の BLV 確認には検査所レベルでも可能と考えられた。しかし、目視検査で腫瘍が見られない検体で本 PCR を行うと 36% 程度で PCR 陽性または判定不能の結果となつた。これらの中には他の BLV-PCR 検査法で陽性となつたものや抗体陽性となつたものが多くあり、現在の BLV 高感染率の状況で腫瘍が見られない牛の発病判定には適用できないものと考えられる。

さらに BLV 感染と発症機構の解明のために BLV の転写活性因子である Tax の遺伝子を解析し、233 番アミノ酸の違い (Leu と Pro) があることが分かり 233Pro のウイルスでは発症が遅れることと関連していた。Env の RFLPIII 型で発症が遅れるとの昨年度の結果との関連はさらに解析が必要と考えられる。これらの変異部位を容易に検出できれば BLV 感染牛の予後診断に有効かも知れない。

高病原性鳥インフルエンザの検査においては同様の症状を示すニューカッスル病を鑑別する必要がある。本研究で開発した RT-LAMP は新たに 2 つの genotype の 3 株でも検出可能で、幅広い遺伝子型の NDV 検出に有効であることを示している。また、NDV を実験感染した鶏からのウイルス遺伝子検出も可能であつたが、クロアカスワブを材料とした場合、ウイルス感染価が高くても遺伝子検出が陰性となることもあり、反応が不安定であつた。これはクロアカスワブ中に RT-LAMP の反応を阻害する物質が含まれているためと考えられ気管ぬぐいを選択するべきであると考えられた。さらに、核酸精製カラムを使わない、迅速簡便 RNA 抽出法は試験機器の揃わない診断現場でも利用可能で、且つ迅速であり NDV 遺伝子の検出は可能であつたが、反応が安定しない、反応液に RNA 抽出液の原液を添加すると反応が阻害される等の問題が認められた。今後、反応の安定性に関してより良い条件検討を行い、診断現場で実際に使用できるようにする必要がある。

食鳥処理場において高病原性鳥インフルエンザ (HPAI)が疑われた場合、ウイルス分離やゲノム検出を行うために検査可能な施設へ検体を輸送する必要がある。その輸送用培地として市販品を含めて3種類の培地中でのH5亜型ウイルスおよびH1亜型ウイルスの生残性を調べた結果、冷蔵(4℃)ではいずれの培地においても21日間保存しても減少はわずかであったが、室温(20℃)では明らかな感染価の減少が見られた。また、採取する検体がクオアカスワブの場合には糞便が混入ウイルスの安定性が低下する場合があった。その場合も4℃では比較的安定でありいずれの輸送培地の使用の際も4℃での温度管理が重要であると考えられる。なお、簡易検出キットを自治体検査所で試用したところ特段の問題はなかった。

マイクロアレイ技術による網羅的病原体ゲノム検出では高額機器が必要で試薬等のコスト、手技の煩雑さがあるためインフルエンザウイルスRNAをモデルとして、RT-PCRとマイクロプレートハイブリダイゼーション法を組み合わせた病原体検出システムの構築を試み、H1Narita株のRT-PCR産物とそれと相補するオリゴDNAプローブは、高い検出感度および特異性を有している事が明らかとなった。今後、様々な病原体を補足するオリゴDNAプローブを設計し、特異性と検出感度の検討を重ね野外サンプルの適用を試みる必要があると考えられた。

A群ロタウイルスの豚における排泄状況を知るために前年度、Nested RT-PCR法により健康な豚169例からA群ロタウイルスのVP4遺伝子を検出したところ、84例(49.7%)が陽性となり、豚では、本ウイルスが常在している可能性が考えられた。そこで、実際の食肉を介しての感染リスクを解析するために、これまで、本ウイルスの感染環を解明するために採用していた、感度の高いsemi-nested RT-PCR法(計算上0.5~1粒子のウイルス遺伝子の検出が可能)から、食肉でのリスクを過剰に評価しないためにも $10^2\sim^3$ のウイルス粒子(本ウイルスの感染には100粒子程度が必要と考えられている)の遺伝子が検出可能な

RT-PCR法を採用しウイルス遺伝子の検出を行った結果、前年度の検出率40.2%には及ばないものの、約1割の豚より本ウイルス遺伝子が検出され、食肉でのリスクが示唆された。さらに、遺伝子解析により人や牛で下痢を起こすタイプの遺伝子型が検出され、混合感染やリアソートメントが活発に起きている様相も明らかとなったことから、ロタウイルス感染症の感染源あるいは遺伝子の供給源として豚がヒトへのリスクとなると考えられた。

A群ロタウイルスの疫学的研究には、全11ゲノム分節を解析する必要と考えられている。しかしその作業は煩雑であり、簡便な方法が求められている。昨年度は、開発した簡便法を直接糞便サンプルに応用したが、54.5%と低い検出率であった。今年度はsemi-nested RT-PCR法を採用することにより80%以上の検出率となり、大幅に改善することができた。完全ではないものの高率で各分節遺伝子型の同定が可能になったことから、本法の疫学的調査への応用が期待できる。

E. 結論

食肉処理場や食肉衛生検査所で使用することを想定して作成した「PCR法を用いた簡便なウイルス遺伝子検出マニュアル」に従って、食肉処理場で豚扁桃120サンプルを採材し、10種の主要な豚ウイルスの存在を調査し、マニュアルの有効性を検証した。その結果、ブタサーコウイルス2型が78%(93/120)、ブタパルボウイルスが54%(65/120)検出され、他の8種のウイルス遺伝子は検出されなかった。この結果は、2008年同食肉処理場で行った時の結果とほぼ同じでありこのマニュアルは安定した成績を得ることができると判断され、プライマーを変更することにより他のウイルス検査にも応用できると考えられた。

2008年のサンプルで検出されたブタサーコウイルス2型の核酸配列を決定したところ、多様性が見られたのに対し、ブタパルボウイルスには多

様性が見られなかった。ブタサーコウイルス 2 型については遺伝子型特異的な PCR プライマーを用いることによって遺伝子型を知ることも可能であった。

PCR 法による牛白血病ウイルス検出法の改良法を検討した。インヒビター耐性の耐熱性 DNA ポリメラーゼを用いたキットを使用することによって、BLV 感染の遺伝子検査が迅速かつ高感度に行えるようになった。操作も簡素化されたため、試料間交差汚染の防止も期待できる。さらに陽性対照 DNA を導入することによって、一般的な食肉衛生検査所においても検査が可能となることが期待された。実際に協力食肉衛生検査所で疑い検体の検査を実施したところ過去の検出率と同等の成績が得られたが、検査機器等が異なることから各検査室では微調整やさらなる手技の習熟も必要と考えられた。

BLV 感染と発病の機構を解析するために BLV の転写活性化因子 Tax の 233 番アミノ酸は Leu が野生型と考えられた。この部位が Pro の変異型 Tax を有する BLV に感染したウシは、白血病の発症が有意に遅くなることが分かった。本変異によって Tax の二次構造に変化が予想されたことから、何らかの機能的な変化が生じたものと考えられる。また、この Leu→Pro 変異を検出することによって BLV 感染牛の予後診断が可能になるかもしれない。

鳥インフルエンザとの類症鑑別が必要となるニューカッスル病を迅速且つ簡便に検査する RT-LAMP 法を開発し、ニューカッスル病ウイルス感染鶏からの遺伝子検出も可能であることを確認した。また、高病原性鳥インフルエンザ疑い例の確定検査のための適切な検体輸送条件を明らかにするために、H5 亜型ウイルスまたは他の亜型ウイルスを 3 種類の検体輸送用培地 (M-MEM、生食、UVT) に添加して冷蔵または室温での安定性を調べた。また、クロアカスワブ検体を想定して糞便混入の影響を調べた。4°C 保管ではいずれのウイルス株、培地、糞便混入による感染価の低下は限られていたが、20°C では保存

日数の経過に伴い、培地の種類やウイルス株により感染価の低下が認められた。これらの結果から採取された検体はいずれの輸送培地でも使用可能であるが冷蔵で速やかに検査室へ搬入することが重要である。

マイクロアレイ病原体網羅的検出システムに用いたプローブは安価簡便な RT-PCR/マイクロプレートハイブリダイゼーション法に最適である可能性が示唆された。

食肉に供される健康な豚の約 1 割から感染量として十分な A 群ロタウイルス遺伝子の排泄を確認した。これらの遺伝子には人や豚に病原性を示すタイプも含まれており、感染源として直接的なリスクを示唆する結果となった。さらに、混合感染や分節遺伝子交換 (リアソートメント) も観察され、直接的なリスクだけでなく、遺伝子の供給源としての間接的なリスクも示唆された。野外サンプルに直接適応できるロタウイルスの全分節遺伝子を解析する簡便法に改良を加え、検出率の改善に成功した。今後、本法の疫学的調査への応用が期待できる。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 処理場で採材した豚扁桃に対する各種ウイルス遺伝子調査。三井寛子、赤崎 創、久保田智江、池田秀利。家畜衛生学雑誌 36、10-11、2010
- 2) Inoue, E., Wang, X., Osawa, Y., Okazaki, K. (2010) Full genomic amplification and subtyping of influenza A virus using a single set of universal primers. *Microbiol. Immunol.* 54, 129-134.
- 3) Matsumura, K., Inoue, E., Osawa, Y., Okazaki, K. (2011) Molecular epidemiology of bovine leukemia virus associated with enzootic bovine leukosis in Japan. *Virus*

Res. 155, 343-348.

- 4) Inoue, E., Matsumura, K., Maekawa, K., Nagatsuka, K., Nobuta, M., Hirata, M., Minagawa, A., Osawa, Y., Okazaki, K. Genetic heterogeneity among bovine leukemia viruses in Japan and its relationship to leukemogenicity. Arch. Virol. (印刷中)
- 5) Abe, M., Ito, N., Masatani, T., Nakagawa, K., Yamaoka, S., Kanamaru, Y., Suzuki, H., Shibano, K., Arashi, Y. and Sugiyama, M. Whole genome characterization of new bovine rotavirus G21P[29] and G24P[33] strains provides evidence for interspecies transmission. J. Gen. Virol. (in press).

2. 学会発表

- 1) 井上恵美、新垣淑大、真井雄規、大澤宜明、岡崎克則；牛白血病ウイルス Tax の Pro235→Leu235 変異は白血病の発症を早めるのか？ 第 150 回日本獣医学会 2011 年 9 月（帯広市）
- 2) 井上恵美、前川耕平、大澤宜明、岡崎克則；北海道医療大学における新型インフルエンザの分子疫学 第 58 回日本ウイルス学会 2010 年 11 月（徳島市）
- 3) 大澤宜明、井上恵美、岡崎克則；牛白血病ウイルス(BLV) Tax のアミノ酸置換と転写活性可能の関連 第 58 回日本ウイルス学会 2010 年 11 月（徳島市）
- 4) 岡崎克則、井上恵美、大澤宜明；牛白血病ウイルス Tax の Pro235→Leu235 変異は白血病の発症を早めるのか？ 第 58 回日本ウイルス学会 2010 年 11 月（徳島市）
- 5) 井上恵美、室内友恵、大澤宜明、岡崎克則；蒼耳子抽出物によるインフルエンザウイルスの増殖阻害 日本薬学会第 131 回年会 2011 年 3 月（静岡市）

ニューカッスル病ウイルスを検出する LAMP 法の開発 松村一輝、伊藤啓史、伊藤壽啓 第 25 回中国四国ウイルス研究会 平成 22 年 6 月 26、

27 日 岡山大学

ニューカッスル病ウイルスを検出する LAMP 法の開発 松村一輝、伊藤啓史、伊藤壽啓 第 44 回鳥取県獣医学会 平成 22 年 7 月 17 日 鳥取県立福祉人材研修センター

ニューカッスル病ウイルスを検出する LAMP 法の開発 伊藤啓史、松村一輝、伊藤壽啓 平成 22 年度日本獣医三学会（中国地区）平成 22 年 10 月 9、10 日 岡山コンベンションセンター

- 1) 安部昌子、伊藤直人、杉山 誠：ウシ正常個体由来 A 群ロタウイルスの全ゲノムを対象とした分子系統学的解析. 第 150 回日本獣医学会学術集会（2010 年 9 月、帯広）
- 2) 岡寺康太、安部昌子、伊藤直人、杉山 誠：と畜場に搬入された豚における A 群ロタウイルスの検出およびその遺伝学的解析. 第 150 回日本獣医学会学術集会（2010 年 9 月、帯広）
- 3) 安部昌子、伊藤直人、正谷達膳、中川敬介、山岡理子、杉山 誠：A 群ロタウイルスの感染環における野生イノシシの関与. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会（2010 年 11 月、徳島）

H. 知的財産権の出願・登録状況

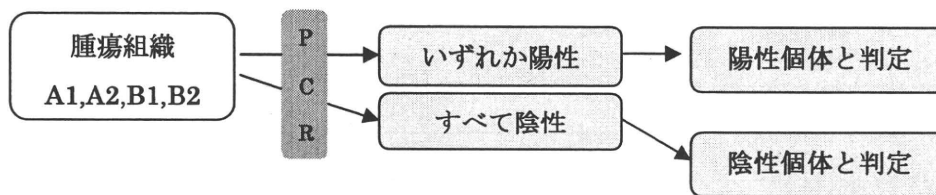
1. 特許取得
病原体を検出するためのマイクロアレイ又はそれを含むキット（2010 年 8 月 19 日公開番号：2010178687）
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

牛白血病疑い腫瘍組織からの牛白血病ウイルスゲノム検出
 BLVenv-PCR プロトコール
 ver. 4 (2010.9.9)

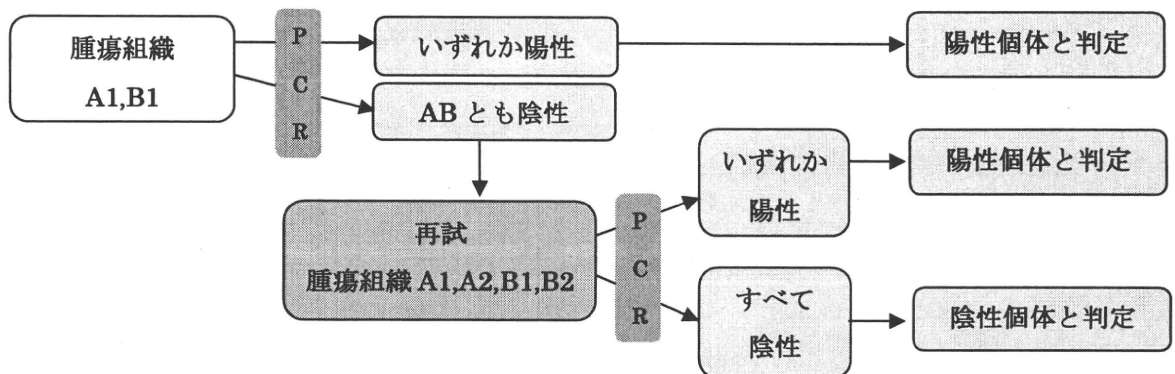
検査と判定手順（各検査室の都合で処理検体数は適宜変更ください）

（例）

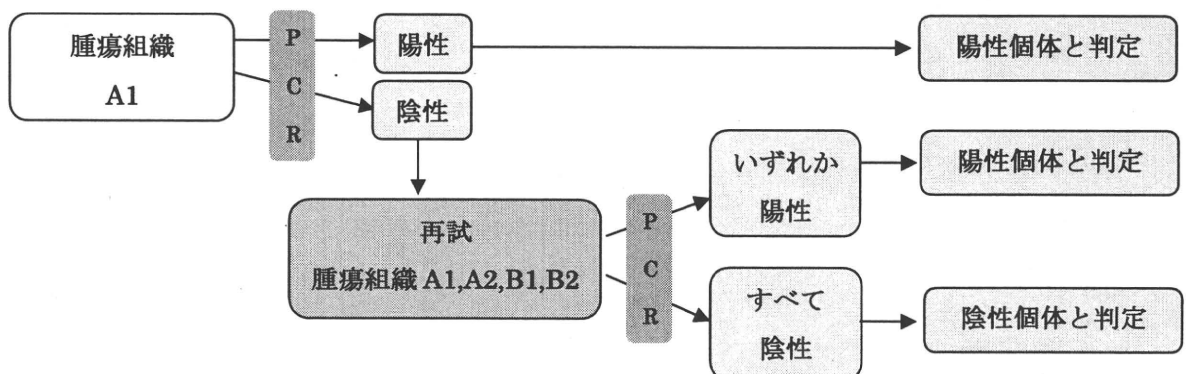
◇ 1回の検査が3頭未満のとき（最少4検体、最大12検体）



◇ 1回の検査が4から7頭の場合（最少8検体、最大14検体）



◇ 1回の検査が8頭以上の場合（最少8検体）



牛白血病疑い腫瘍組織からの牛白血病ウイルスゲノム検出

BLVenv-PCR プロトコール ver. 4

記録用紙付

【Phire Animal Tissue Direct PCR kit (FINNZYMES)を用いた PCR】

17 コームアガロースゲル電気泳動層の使用に合わせて 14 検体を検査する場合

(14 検体+陽性対照 DNA+陰性対照+マーカー=17 レーン)

実施日 _____ 実施者 _____

検体	結果
1	_____
2	_____
3	_____
4	_____
5	_____
6	_____
7	_____
8	_____
9	_____
10	_____
11	_____
12	_____
13	_____
14	_____
15 DW	_____
	陽性対照 _____

適当な位置にサイズマーカーを泳動する。

1. 検体処理

開始時刻 _____ :

- ブロックヒーターを 98℃ に設定。
1.5ml マイクロチューブ (15 本) に 20 μ l の Dilution Buffer [Finzymes # F-132, Lot _____, _____ 開封] を入れる。
 - 組織 2 - 5mg を入れる。1 本には DW 5 μ l
【大きすぎないように注意】 (写真 1、写真 2)
 - 0.5 μ l の DNA Release Additive [Finzymes # F-132, Lot _____, _____ 開封] を加える。【多検体処理の場合は Dilution Buffer に先に加えても可】
 - Vortex
 - 軽くスピンドウン
 - 室温 2 - 5 分間静置
 - 98℃ 2 分間加熱【通常のエッペンドルフチューブは蓋が開くので注意】
 - 軽くスピンドウン
 - 上清を新しいマイクロチューブ (15 本) に移す。
 - 使用時まで氷上
- 終了時刻 _____ :

- (PCR に使用した残りは -20℃ 保管)

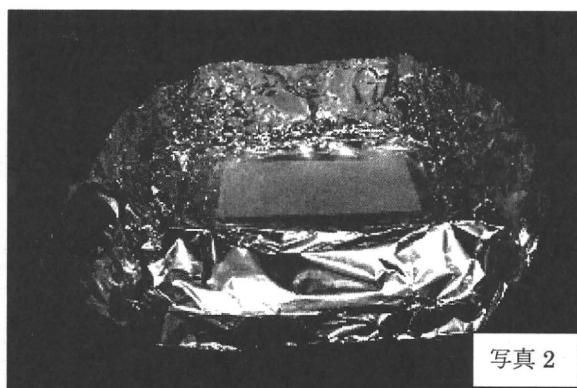
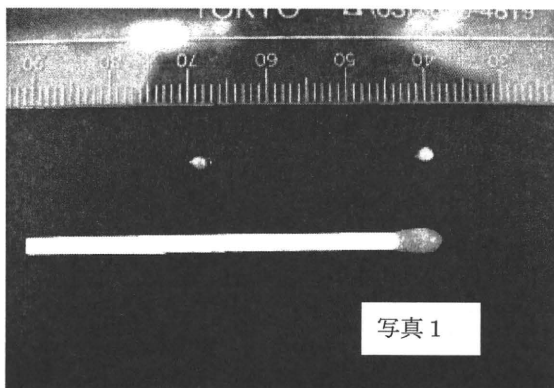
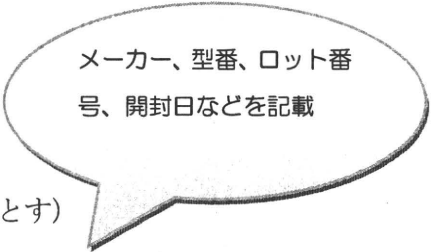


写真 1. サンプルの大きさはマッシュ棒の先よりさらに小さい。写真 2. 組織切り出し用台：凍結試料が融けるのを防ぐため、冷却したアルミブロック上にアルミホイル、パラフィルム (2~3 枚) を敷く。試料毎にパラフィルムを交換する。

2. PCR

(1) プライマーDNAの調製

作成日 _____ 調製者 _____



メーカー、型番、ロット番号、開封日などを記載

- 合成オリゴDNAのチューブを軽く遠心する（乾燥DNAを落とす）
- ゆっくり蓋をとり、TE [_____]を指定量（供給されるチューブに記載された量）を添加。
【2010年7月配布分については OBLV1A:72.9 μ l、OBLV6A:65.9 μ l】
- ボルテックス後、軽く遠心する（100pmol/ μ l=100 μ Mの液）
【ストック液として-20 $^{\circ}$ C保管、20 μ l ずつくらいに分注しておくこと凍結融解回数が減らせる】
- 10 μ lの100 μ M DNAと90 μ lのDEPC-DW [_____]を混合する（10 μ M=10pmol/ μ l液）
【ワーキング液として-20 $^{\circ}$ C保管】
【使用量が少ない場合は5 μ lの100 μ M DNAと45 μ lのDEPC-DWでもよい】

(2) PCR 液の混合 (50 μ l での反応)

(0.5ml PCR チューブ使用の場合は 50 μ l の反応系で実施)

17 コームアガロースゲル電気泳動層の使用に合わせて検体数を調整して実施する場合
(14 検体+陰性対照+陽性対照 DNA+マーカーのレーン=17 レーン)

開始時刻 _____ :

- ・ 1.5ml マイクロチューブに以下を混合する。(上から順番)

	1 検体分	x17
DEPC-DW	16.5 μ l	280.5 μ l <input type="checkbox"/>
[_____]		
2 \times Phire Animal Tissue PCR Buffer*	25.0 μ l	425.0 μ l <input type="checkbox"/>
[Finzymes #F-141, Lot _____, 開封]		
Forward primer (10 μ M OBLV1A)	2.5 μ l	42.5 μ l <input type="checkbox"/>
[_____ 調製]		
Reverse primer (10 μ M OBLV6A)	2.5 μ l	42.5 μ l <input type="checkbox"/>
[_____ 調製]		
Phire Hot Start II DNA polymerase	1.0 μ l	17.0 μ l <input type="checkbox"/>
[Finzymes #F-122S, Lot _____, 開封]		
Total	47.5μl	807.5μl <input type="checkbox"/>

- 軽く vortex、軽く遠心
- 47.5 μ l ずつ PCR チューブに分注 (16 本)
- 陰性対照を 2.5 μ l 添加
- 検体 DNA 2.5 μ l を添加 (14 検体分)
- 陽性対照 DNA 2.5 μ l を添加

終了時刻 _____ :

PCR

サーマルサイクラー [機種 _____]

プログラム名 [_____]

開始時刻 _____ :

終了時刻 _____ :

98 $^{\circ}$ C 5分



98 $^{\circ}$ C 5秒

60 $^{\circ}$ C 5秒

72 $^{\circ}$ C 20秒



72 $^{\circ}$ C 1分



4 $^{\circ}$ C 保管

40サイクル

(2) PCR 液の混合 (25 μ l での反応)

開始時刻 _____ :

- ・ 1.5ml マイクロチューブに以下を混合する。(上から順番)

	1 検体分	x17
DEPC-DW [_____]	8.25 μ l	140.25 μ l <input type="checkbox"/>
2 \times Phire Animal Tissue PCR Buffer* [Finzymes #F-141, Lot _____, 開封]	12.50 μ l	212.50 μ l <input type="checkbox"/>
Forward primer (10 μ M OBLV1A) [_____ 調製]	1.25 μ l	21.25 μ l <input type="checkbox"/>
Reverse primer (10 μ M OBLV6A) [_____ 調製]	1.25 μ l	21.25 μ l <input type="checkbox"/>
Phire HotStart II DNA polymerase* [Finzymes #F-122S, Lot _____, 開封]	0.50 μ l	8.50 μ l <input type="checkbox"/>
Total	23.75μl	403.75μl <input type="checkbox"/>

- 軽く vortex、軽く遠心
- 23.75 μ l ずつ PCR チューブに分注 (16 本)
- 陰性対照を 1.25 μ l 添加
- 検体 DNA 1.25 μ l を添加 (14 検体分)
- 陽性対照 DNA 1.25 μ l を添加

終了時刻 _____ :

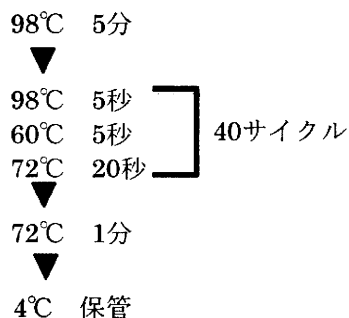
PCR

サーマルサイクラー [機種 _____]

プログラム名 [_____]

開始時刻 _____ :

終了時刻 _____ :



(2) PCR 液の混合 (20 μ l での反応)

開始時刻 _____ :

・ 1.5ml マイクロチューブに以下を混合する。(上から順番)

	1 検体分	x17
DEPC-DW [_____]	6.6 μ l	112.2 μ l <input type="checkbox"/>
2 \times Phire Animal Tissue PCR Buffer* [Finzymes #F-141, Lot _____, 開封]	10 μ l	170.0 μ l <input type="checkbox"/>
Forward primer (10 μ M OBLV1A) [_____ 調製]	1 μ l	17.0 μ l <input type="checkbox"/>
Reverse primer (10 μ M OBLV6A) [_____ 調製]	1 μ l	17.0 μ l <input type="checkbox"/>
Phire HotStart II DNA polymerase* [Finzymes #F-122S, Lot _____, 開封]	0.4 μ l	6.8 μ l <input type="checkbox"/>
Total	19μl	323.0μl <input type="checkbox"/>

- 軽く vortex、軽く遠心
- 19 μ l ずつ PCR チューブに分注 (16 本)
- 陰性対照を 1 μ l 添加
- 検体 DNA 1 μ l を添加 (14 検体分)
- 陽性対照 DNA(新) 1 μ l を添加

終了時刻 _____ :

PCR

サーマルサイクラー [機種 _____]

プログラム名 [_____]

開始時刻 _____ :

終了時刻 _____ :

98 $^{\circ}$ C 5分
 ▼
 98 $^{\circ}$ C 5秒
 60 $^{\circ}$ C 5秒
 72 $^{\circ}$ C 20秒 } 40サイクル
 ▼
 72 $^{\circ}$ C 1分
 ▼
 4 $^{\circ}$ C 保管

(3) アガロース電気泳動 (ミューピッドミニゲル電気泳動装置)

*ゲルの作製

開始時刻 _____ :

アガロース [Agarose S 日ジ#312-01193 Lot _____ 開封]0.5g

1 x TAE with EtBr [_____ 調製] 50ml

電子レンジで融解

■ 1xTAE with EtBr の調製[_____]

DW [_____] 1960m

50x TAE [_____] 40ml

10mg/ml エチジウムブロミド液 [_____] 100 μ l

ゲル作製プレートに添加 (17 レーンコム : 30ml)

室温で固化【急ぐ時は冷蔵庫で】

終了時刻 _____ :

【複数のゲルを一度に作っておけば、PCR 終了サンプルの電気泳動をすぐに実施できる。

乾かないようにして冷蔵 1 週間は OK】