

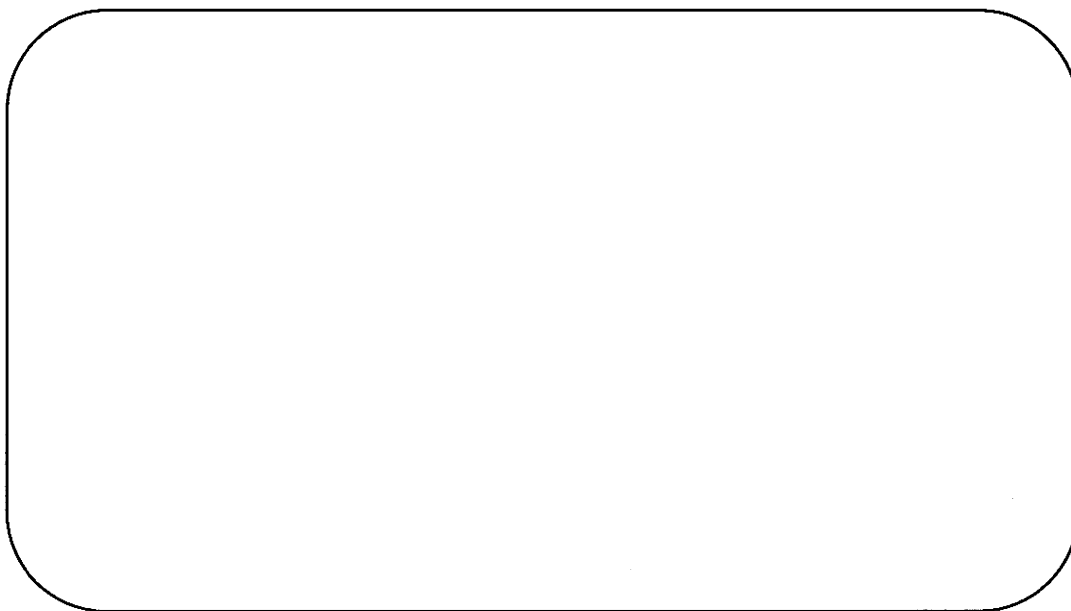
*** 電気泳動と写真撮影**

開始時刻 _____ :

- PCR 終了液 (20 μ l)
- Gel Loading Dye [Finzymes #F-350, Lot _____ , _____ 開封] 5 μ l
- 5 μ l をゲルの各ウェルに添加*
- DNA サイズマーカー[_____ , _____ 開封] _____ μ l/lane
- 100V で約 30 分間泳動 (BPB 色素のラインが約 500bp)
*【50 μ l の反応の場合は PCR 終了液 5 μ l をとりわけ Dye 1 μ l 添加後全量泳動】
【検体のバンドが大きすぎた場合は 10 分の 1 量を泳動 (例えば: PCR 終了液 2 μ l + TE 18 μ l + Dye 5 μ l \cdot \cdot 5 μ l を泳動)】

終了時刻 _____ :

写真撮影



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

研究分担者 池田 秀利 日本獣医生命科学大学 教授

研究要旨：安全な食肉を市場に提供するには食肉・食鳥処理場における検査が重要である。本研究は、現在は行われていないが、食肉・食鳥処理場や食肉検査所で実行できる簡便で迅速なウイルス検査方法のモデルを提供することを目的としている。これまで本研究で、動物臓器の乳剤化からPCR法でウイルス核酸を検出するまでの条件検討を行い、マニュアルを策定し改良してきた。今年度はこのマニュアルに基づいて、食肉処理場で採材した120頭分の扁桃サンプルを10種類のウイルス遺伝子について調査した。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9種のウイルス遺伝子は全く検出されなかった。これは2008年に同食肉処理場で行った結果と類似し、この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。

A. 研究目的

本研究の目的は全国の食肉・食鳥処理場や食肉検査所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。

現在、食肉処理場では動物生体の検査に続き、屠殺後の臓器検査では望診、触診等を中心に行い、必要に応じて細菌学的な精密検査を行うこととなっている。しかし、養豚に広く感染しているE型肝炎ウイルスなどの例でもわかるように、人獣共通感染症病原体が家畜に感染していても必ずしも肉眼的な病変を伴わないこともあり、更に精度の高い病原体検査法を組み入れることも考慮する必要がある。

一般的なウイルス学的検査法では感染性ウイルスを検出するには、時間もかかり、煩雑な手技と幾つかの設備機器が必要で、食肉処理場や食肉検査所では不向きである。

従って、我々は食肉・食鳥処理場でも実行可能なウイルス学的検査としてPCR検査法を採用することにした。更に、その検査法は全国的に安定したPCR検査結果が得られることが重要であると考え、汎用される市販の機器を利用した検査システムの構築をし、臓器の乳剤化、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、なるべく簡便な方法を選択してきた。

今年度はこれまで改良してきた検査マニュアルを踏まえて、ある食肉処理場で得られた120頭分の豚扁桃材料について、ウイルス遺伝子検出を試み、今までの検査マニュアルの適合性を調べた。同食肉処理場では2年前に同様に採材していたため、データを比較することで、手技の安定性、畜産農場での常在ウイルスの変化などの情報が得られることを期待した。

B. 研究方法

1) 臓器材料

2010年某県の協力によって某食肉処理場において120頭分の豚扁桃を無作為に採材した。一農場当たりの採材頭数は10頭以下とした。採材したあと、氷冷保存して大学研究室に運搬し、約24時間以内に臓器を乳剤化して、上清を-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行った条件検討データを基に、小遠心管に豚扁桃約0.1gと生理食塩水又は細胞培養用培地0.9mlと細胞破碎用ビーズを加え、Tomy社臓器破碎装置で激しく振盪する方法を採った。ビーズは直径5mmジルコニアビーズ2個を用いた。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て保存した。

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、核酸抽出キットは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確認済である。

抽出されたウイルスDNAとRNAを含む混合核酸液の一部をinvitrogenのSuperscript 1st-strand Synthesis kitを用いてランダムプライマーでcDNAを合成反応処理した。この抽出液はDNAウイルスのDNAとRNAウイルスのcDNAが混在しているため、これを鋳型DNAとしてPCRを行った。

3) ウイルス核酸の検出

ブタ臓器サンプルについては、4種のR

NA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た。

ウイルス核酸の検出にはウイルス特異的なPCRプライマーを用いたPCR法を行った。HEVを除く、6種のDNAウイルスと3種のRNAウイルスについては、Ogawaらが発表したmultiplex PCR法（J Virol Methods. 160:210-4. 2009）を採用し、2本の反応チューブでDNAウイルス用PCRとRNAウイルス用PCR反応を行った。HEVについては多様なHEV株を検出するmixed primers（Nakai et al. 2006）を用いたRT-PCR法を採用し、別に単独の反応チューブで行った。

C. 研究結果

1. 2010年採材サンプル中のウイルス遺伝子検出率

2008年晩夏に豚120頭の扁桃サンプル採材し、10種の主要な豚ウイルスの存在を調査した。2010年晩夏、再度豚120頭の扁桃サンプルを採材し、我々が作成したマニュアルに従ってほぼ同様の手技で解析し、2008年と2010年を比較した。

両年の検査結果は非常に似ていた（表1）。2008年は、ブタサーコウイルス2型が84%(101/120)のサンプルから、ブタパルボウイルスは57%(68/120)のサンプルから検出された（表1）。2010年もそれぞれ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も全く検出されなかった（表1）。

2. 2008年サンプルの遺伝子解析

2008年のサンプルで高率に検出されたブタサーコウイルス2型とブタパルボウイルスの遺伝子解析を、PCRで増幅されたバンドをダイレクトシーエンスして得られた塩基配列をもとに行った。

ブタサーコウイルス2型は遺伝子多型が多いことが知られているが、我々の22サンプルの解析でも多様な配列が見られた(図1)。最も多く検出されたのは、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ることがわかった(16/22)。

一方、ブタパルボウイルスは11サンプル139塩基を解析したが全く遺伝子多型が見られなかった。ブタパルボウイルスの遺伝子配列情報については、日本のワクチン株でも野外株でも報告されていない。

3. PCRによるブタサーコウイルス2型の遺伝子型判別

2008年サンプルでブタサーコウイルス2型の核酸配列に多型性が認められたが、より簡便な遺伝子型特異的なPCR法が報告されたため(Hesse et. al. 2008)、そのPCRプライマーで2008年の全サンプル120頭分を解析した。

Multiplex PCR法では陽性率が84%であったが、この遺伝子型別PCR法ではPCV2a型とPCV2b型のどちらかが陽性だった個体が78%であり、ほぼ同等の検出率であった。PCV2a型だけが陽性であった個体は63%、PCV2a型とPCV2b型の両方が陽性となった個体は3%、合わせて66%となり、PCV2b型陽性個体12%に比べ、PCV2a型が圧倒的に多かった(表2)。

ブタサーコウイルス2型の遺伝子型命名法は国際的にまだ確定されていないが、我々が遺伝子配列を基にした分子系統樹解析とPCRによる遺伝子型別法を両方行った個体を比較してみると、Takahagiらの言

うPCV2-1abクラスターのウイルスが、PCV2b型を検出するPCRプライマーで陽性に出ていることがわかった(図1)。

D. 考察

これまで食肉処理場や食肉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。今年度はそれに従って実際に食肉処理場で豚臓器を採材しウイルス遺伝子の検出を試みた。採材は同じ食肉処理場で2年前にも行い、ほぼ同様のマニュアルで検査を実施したので、検査結果を比較する目的もあった。

2年前と今年度では日本の養豚界における疾病発生傾向に大きな変化があった。2年前は豚の複数の複合感染症が増加し死亡率が激増したにも拘わらず、原因が特定できない状態であったが、ブタサーコウイルス2型の組換え蛋白ワクチンないし不活化ワクチンが市販されるとそれらの複合感染症による死亡率が激減したことから、それらの複合感染症の主役となっている病原体がブタサーコウイルス2型であると認識された。現在では幾つかの複合感染症をまとめて、豚サーコウイルス関連疾病(Porcine Circovirus Associated Diseases; PCVAD)と呼ばれている。ブタサーコウイルス2型は日本のほとんどの養豚農家に常在していると考えられるが、このウイルス単独の感染では顕著な病変を起こさない。しかし、他のマイコプラズマや細菌やウイルスと混合感染した時に様々な症状を呈すると考えられている。

従って、2年前に同じ食肉処理場で高率に検出されたブタサーコウイルス2型が今年度は検出頻度に変化があるのかについても興味をもたれていた。検査結果は、ブタサーコウイルス2型の検出率において2008年も2010年も変化がないことを示していた(表1)。

さらに2008年と2010年の調査結果を比較すると、①ブタサーコウイルス2型とブタパルボウイルスが高率に検出される、②それ以外のウイルス8種類は検出できなかった、という点で両年は同じ傾向を示していた。多数の農場から搬入される食肉処理施設で2年の期間が開いても同様の豚ウイルス感染プロファイルが得られたことは、次のことを示している。①調査した10種の豚ウイルスに関しては、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、②我々が策定したマニュアルで一応安定した結果が得られている。

マニュアル化したのは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は工夫すればさらに多様な目的に用いることができる。例えば、今年度実施した例では、単純にPCRのプライマー配列を変えることによりブタサーコウイルス2型の遺伝型の判別することである。他に、鶏高病原性インフルエンザウイルスは家畜伝染病予防法ではH5とH7亜型に限定されているが、他の亜型と区別するには血清反応ないし遺伝子検査を行わなければならない。亜型判定用のPCRプライマーは多数開発されて、適切なものを選択すれば、このマニュアルに組み入れることも可能であろう。

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。以前の日本の報告では、小売店で売られている豚レバーの1.9% (7/363) からE型肝炎ウイルス遺伝子が検出されているが、我々の調査では今年度と2年前を合わせて計240頭の調査で全く陽性は出なかった。E型肝炎ウイルスは日本の養豚に広く浸潤していると考えられ、感染率は大きな変化がないと思われるので、技術的な検出感度の問題である可能性が高い。

我々の食肉処理場サンプルの調査で高頻度に検出されたブタサーコウイルス2型とブタパルボウイルスは共にヒトへの感染性はなく市場に供給されても安全性に問題ない。しかし、プリオンやE型肝炎ウイルスの様に食肉用家畜からヒトに感染する新興人獣共通感染症が近年になっても発見されることから、新たなチェック体制の強化が必要となる可能性もある。その時には、食肉処理場で使用することを想定して本研究で作成した、簡便なウイルス検査法マニュアルが活用・応用されることを望んでいる。

E. 結論

我々が食肉処理場や食肉検査所で使用することを想定して作製した「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全く検出されなかった(表1)。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った。よって、このマニュアルは安定した結果を生むと判断した。

2008年のサンプルで検出されたウイルス遺伝子の一部について核酸配列を決定したところ、ブタサーコウイルス2型には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でも可能であった。

F. 健康危険情報

なし

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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. 学会発表

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 2008年と2010年の豚ウイルス検出率の比較

	2008採材	2010採材
	陽性頭数/検査頭数(%)	陽性頭数/検査頭数(%)
DNAウイルス		
PCV2 : porcine circovirus type 2 豚サーコウイルス2型	101/120 ^r (84)	93/120 ^r (78)
SuHV-1 : suid herpesvirus 1 オーエスキーウイルス(届)	0/120 ^r (0)	0/120 ^r (0)
PPV : porcine parvovirus 豚パルボウイルス	68/120 ^r (57)	65/120 ^r (54)
RNAウイルス		
PRRSV : porcine reproductive and respiratory syndrome virus 豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス(届)	0/120 ^r (0)	0/120 ^r (0)
JEV : Japanese encephalitis virus 日本脳炎ウイルス(法)(人獣)	0/120 ^r (0)	0/120 ^r (0)
PEDV : porcine epidemic diarrhea virus 豚流行性下痢ウイルス(届)	0/120 ^r (0)	0/120 ^r (0)
PoRV-A : porcine rotavirus A 豚ロタウイルス	0/120 ^r (0)	0/120 ^r (0)
TGEV : transmissible gastroenteritis virus 伝染性胃腸炎ウイルス(届)	0/120 ^r (0)	0/120 ^r (0)
GETV : Getah virus ゲタウイルス	0/120 ^r (0)	0/120 ^r (0)
HEV : hepatitis E virus E型肝炎ウイルス	0/34 ^r (0)	0/120 ^r (0)

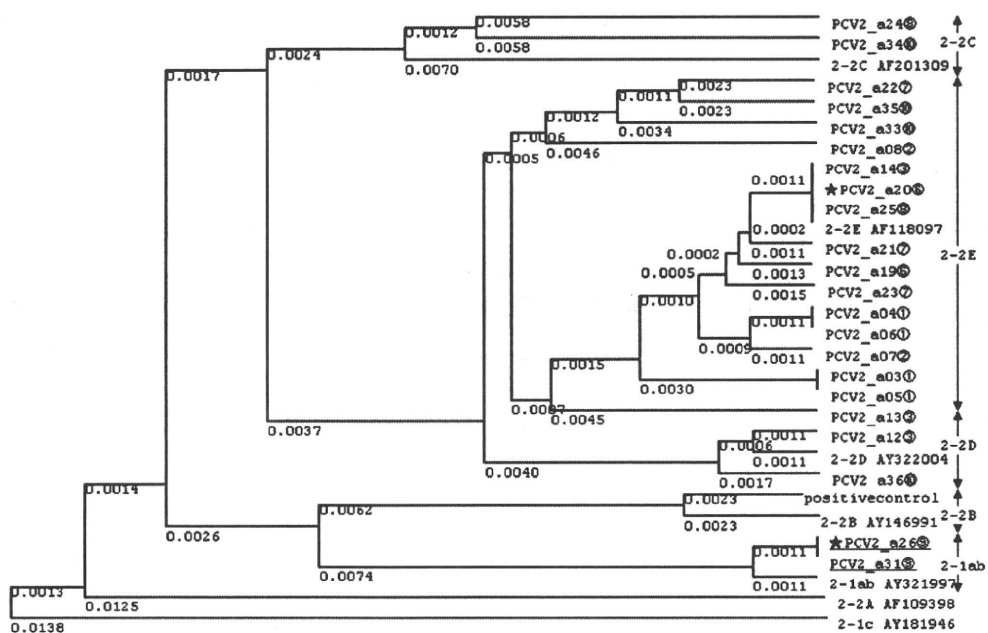
表2 PCV2遺伝子型特異的なPCRプライマー (PCV2a、PCV2b) を用いたブタサーコウイルス2型遺伝子の検出

PCR反応結果	個体数 (n = 120) (%)
PCV2aのみ陽性	75(63%)
PCV2bのみ陽性	14(12%)
PCV2aとPCV2b共に陽性	4(3%)
いずれも陰性	27(23%)

表3 22サンプルのPCV2の遺伝子型の分類

Accession number	Gene cluster	Farm										No. of pigs	No. of farms
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J		
AF201309	2-2C								a24		a34	2	2
AF118097	2-2E	a3, a4, a5, a6	a7, a8	a13, a14			a19, a20	a21	a25		a34, a35	16	7
AY322004	2-2D			a12				a22, a23			a36	2	2
AY321997	2-1A/B									a26, a31		2	1
Y146991	2-2B											0	0

図1 PCV2 ORF1領域における遺伝子系統樹



※下線はPCV2b特異的プライマーでPCR陽性にでた個体
 ※★はPCV2aとPCV2b特異的プライマーでPCR陽性にでた個体
 ※①～⑨は農場番号

動物臓器中ウイルス遺伝子検出マニュアル ver.2

このプロトコールは、サンプリングした動物臓器から乳剤を作り、疑われる感染性ウイルスを後日の再検査のために保存しつつ、DNA ウィルスと RNA ウィルスの両方の遺伝子を PCR で検出する目的で作られたプロトコールである。簡単な検査室でも実施できる簡便で迅速な手技である。

以下に簡単な検査の流れを図解する。

<動物臓器中ウイルス遺伝子検出法の概要>

臓器サンプル (~0.1g)
↓
1mL 乳剤化 (臓器破碎装置)
↓
遠心、上清回収
↓ →上清 (~500uL) を感染性ウイルス解析用に予備保存 (-80°C)
20uL ウィルス核酸抽出 (自動核酸抽出機)
↓
50uL 溶出 (ウィルス DNA+RNA)
↓ →49uL エタノール沈殿保存 (-20°C)
1uL 逆転写反応
↓
20uL (ウィルス DNA+cDNA)
↓ →18uL 保存 (-20°C)
① 1uL DNA ウィルス用 PCR
② 1uL RNA ウィルス用 PCR
↓
アガロースゲル電気泳動

1. 必要な機器

1. 臓器乳剤作成装置
多検体細胞破碎機 (YASUI Multi-beads shocker (引用文献1)) または
ビーズ式細胞破碎装置 (TOMY 精工 Micro Smash (引用2)) など。web
では臓器破碎機や組織・細胞破碎装置またはサンプル破碎装置と書
かれている。
2. 自動核酸抽出装置 (Precision System Science Co., Ltd.
Magtration System 6GC (引用3)) など。web では RNA/DNA
抽出機や自動核酸抽出装置と書かれている。
3. 微量高速冷却遠心機
4. 遺伝子増幅装置
5. アガロースゲル電気泳動装置



TOMY精工 Micro Smash



YASUI Multi-beads shocker

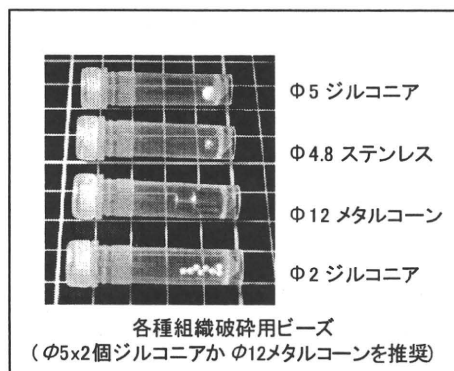
臓器乳剤作成装置



自動核酸抽出装置
(Precision System Science Co., Ltd.)

2. 準備する試薬と器具

1. 臓器破碎用ビーズ(メタルコーン(YASUI 製)、またはジルコニアビーズ(TOMY 製)Φ5 とΦ2 の2種類)。
2. 臓器破碎用チューブ(臓器破碎機指定のもの)(注1)。
3. 細胞培養用培地(血清無添加)または生理食塩水。
4. RNA/DNA 抽出キット(GC series Magratration-MagaZorb RNA Common Kit)(注2)。(5. DNaseI。RNA 除去用。キットに含まれていない)
5. ピペットマンとチップ。
6. エッペンドルフチューブ。
7. cDNA 合成キット(例: SuperScript First-Strand Synthesis system for RT-PCR)。
8. PCR 用チューブ。
9. PCR 用試薬(Taq polymerase と反応液)。
10. PCR primer(遺伝子特異的核酸配列)。
11. アガロース(2%アガロースゲル用)。



注1): 準備の2. 臓器破碎用チューブについては臓器破碎機に形状が合うものを選ぶ。形状が合わないとチューブの破損につながるおそれがある。臓器破碎器販売メーカーに問い合わせること。(TOMY 精工 Micro Smash にはアシストチューブの 72.693S を使用)(YASUI の Multi-beads shocker には図のアシストチューブの 72.693 が合うタイプと 72.694 (自立型) が合うタイプのものがある) また、メタルコーンを使用する場合はメタルコーンの形状にも合ったものを選ぶ。(メタルコーンにはアシストチューブの 72.693S を使用)。



注2): RNA 抽出キットを用いた場合 DNase I を使わなければ、ウイルス RNA とウイルス DNA は同時に抽出される。

3. 臓器乳剤(10%乳剤)の作製 <TOMY 精工社製 Micro Smash を使用した場合の例>

1. 0.1g の臓器を臓器破碎用チューブに入れる。
2. (ジルコニアビーズを使用する時は先にΦ5 を 2 粒(これにΦ2 を 8 粒追加しても可)、オートクレーブで滅菌しておく)。
3. メタルコーンを入れ、次に培地(または、生理食塩水) 0.9ml を加える。(メタルコーンを後から入れると培地がはねる)
4. チューブを 臓器破碎機にセットし、2,500rpm で 15 秒間破碎を 2~4 回繰り返す(注3)。
5. 乳剤をピペットマンで新しいエッペンドルフチューブに移し、200xg で 3 分間(4°C) 遠心する。
6. 上清を新しいエッペンドルフチューブに移し、18,000xg 15 分間遠心する(4°C)。
7. 上清を核酸抽出用チューブ 1 本に 20ul 取り、残りを感染性ウイルス解析用としてチューブ

ブ1-3本に小分けして保存する(-80°C. なければ-20°C)。

注3):多くの軟組織は2回破碎で十分乳剤化するが、動物種によっては、膵臓、腸管、脾臓、リンパ節などは破碎しづらいことがある。よって、乳剤化の具合を目視で判断し、破碎回数を調節すること。15秒×10回程度の破碎では乳剤の温度はそれほど上がらない。温度の上昇がある時は数回破碎後、一時氷中で冷やし、再度破碎操作をする。

4. ウイルス RNA/DNA の抽出 (1%乳剤から抽出する手順)

<Precision 社製自動核酸抽出装置を使用した例>

1. 培地(又は生理食塩水)を180ul入れたRNA/DNA抽出キットの付属チューブに10%乳剤20ulを加える。
2. RNA/DNA抽出キット(GC series Magtration-MagaZorb RNA Common Kit)を用いてRNA/DNAを抽出する。
※ RNA/DNA抽出機の抽出条件を設定する(オペレーションフロー図 参照)
 1. DNase処理 「処理しない」を選ぶ(RNAウイルスだけを目的とする時DNase処理をする)(注4)。
 2. 溶出量(elution volume) 50ulとする。
3. 溶出されたRNA(約50ul)から1ulをとりcDNA合成へ。
4. 残りのRNAは-20°Cで保存。更に、長期保存したい場合はエタノール沈殿状態で保存すると良い。100ul RNA溶液(RNAを50ulでelutionした場合はDEPC H₂O 50ulを加える)に4M NaOAc 8ul, H₂O 81ul, 100% EtOH 300ul加えて-80°C(又は-20°C)保存。

注4) DNase処理をする時のDNase調製(40 units/sample使用)の仕方。

DNaseI (RNase-free) Takara(Code. 2215A)をキット付属のチューブにbuffer 80ul、DNaseI 8ul (5U/ul)を入れ、RNA/DNA抽出機のチップラックの指定位置にセットする。

5. cDNA の合成

random hexamers をプライマーとしてcDNAを合成する。

<InvitrogenのSuperscript 1st-strand Synthesis kitを使用した例>

酵素類の安定のために全て氷上にて行う。

1. PCR用チューブに

RNA	1ul
random hexamers	1ul
10mM dNTP mix	1ul
DEPC-treated water	7ul / total 10ul

を加え、65°Cで5分インキュベーションする。複数サンプルを同時に行う場合はRNA以外の試薬をサンプル数本分まとめて混ぜて作り、PCRチューブに分注し、最後にRNAを加える。このとき実際のサンプル数より2本分ほど多く作ると後で不足せずに済む。

2. 氷上で1分以上冷却する。

3. 10×RT buffer 2ul
- 25mM MgCl₂ 4ul
- 0.1M DTT 2ul
- RNaseOUT Recombinant

Ribonuclease Inhibitor 1ul / total 9ul

を混ぜておいたものを PCR チューブに 9ul 加え、チューブの壁に着いた試薬を軽く遠心しておとす。複数サンプルを同時に行う場合は上記混合液をサンプル数分まとめて作成し、9ul を PCR チューブに加える。総容量 19ul になる。

4. 25°Cで2分間インキュベーションする。
5. Superscript II RT を 1ul ずつ加え 25°Cで 10 分間インキュベーションする。総容量 20ul。
6. 42°Cで 50 分間インキュベーションする。
7. 70°Cで 15 分間インキュベーションする。
8. 氷上で冷却する。
9. チューブの壁に着いた試薬を軽く遠心しておとす。
10. RNaseH を 1ul ずつ加え 37°Cで 20 分間インキュベーションする。
11. PCR に使用するまで -20°Cで保存する。

6. PCR

合成した cDNA 溶液 20ul から 1ul をとり PCR の反応液に加え、サーマルサイクラーで増幅し、2% アガロースゲルで電気泳動してバンドを確認する。

後述「7. 備考-3)multiplex PCR 法の例」を参考のこと。

7. 備考

1) 使用済みメタルコーンの洗浄方法

1. 使用後、1N-NaOH 溶液に漬けておく。
2. 水道水でメタルコーンについた臓器片などを洗い流す。
3. 120°C 20min autoclave。
4. MilliQ 水で7回水洗。
5. アセトン洗浄1回（乾燥が早くなる）。
6. 乾燥 60°C 1時間。
7. ガラス容器に入れ（シャーレなど）アルミホイルで包み乾熱滅菌（180°C~200°C 3時間）。

2) 保存したエタノール沈殿 DNA/RNA から核酸を抽出する方法

1. 手順4-4でDNA/RNAをエタノール沈殿したサンプルを取りだし、軽くボルテックスした後、必要量を新しいチューブに分ける。
2. 15,000rpm, 10min 遠心する。
3. 上清をすてる。（RNAのペレットが見えないことが多いので慎重に）
4. 70% エタノール (DEPC H₂O) を 1ml 加える。
5. 15,000rpm, 5min 遠心する。
6. 上清をすて、RNAを風乾する。（ペレットが見えないことが多い。乾かしすぎるとDNA/RNAがH₂Oに溶けにくくなる）
7. 適当量の DEPC 処理 H₂O に溶解する。

3) multiplex PCR 法の例

上記の方法で作成されたウイルス DNA/cDNA を鋳型にした様々な PCR 法が可能である。豚の DNA 及び RNA ウイルスの検出を目的とした multiplex PCR 法が報告され (Ogawa ら, J. Virol. Method. 160: 210-214, 2009)、3 種類のブタ DNA ウイルスと 6 種類のブタ RNA ウイルスがそれぞれ 1 つの PCR 反応で検出できるようになった。以下はその PCR プライマーを利用した方法の概要である。

A. multiplex PCR (Ogawa ら, J. Virol. Method. 160: 210-214, 2009 による)

a. DNA ウイルス 3 種 (PCV2, PPV, SuHV)

PCR 用チューブに PCR 反応溶液を調整する。(1 サンプルあたり)

	Quick Tag HS DyeMix (東洋紡)	10 μ l
	H ₂ O	8.6 μ l
プライマー	PCV2-F(10 μ M)	0.2 μ l
	PCV2-R(10 μ M)	0.2 μ l
	PRV-gB-F(10 μ M)	0.2 μ l
	PRV-gB-R(10 μ M)	0.2 μ l
	PPV-F(10 μ M)	0.2 μ l
	PPV-R(10 μ M)	0.2 μ l
	cDNA	1 μ l / total 20 μ l

スピンドウンを行った後、以下の条件で PCR 反応を行う。

94°C	1 分	} 35 サイクル
94°C	30 秒	
53°C	90 秒	
72°C	90 秒	
72°C	2 分	

b. RNA ウイルス 6 種 (JEV, PEDV, PoRV-A, TGEV, PRRSV, GETV)

PCR 用チューブに PCR 反応溶液を調整する。(1 サンプルあたり)

	Quick Tag HS DyeMix (東洋紡)	10 μ l
	H ₂ O	6.6 μ l
	PRRS-Fb(10 μ M)	0.2 μ l
プライマー	PRRS-Fb(10 μ M)	0.2 μ l
	JEV-F(10 μ M)	0.2 μ l
	JEV-R(10 μ M)	0.2 μ l
	PEDV-F(10 μ M)	0.2 μ l
	PEDV-R(10 μ M)	0.2 μ l
	PoRV-GAPPV-NSP4-F(10 μ M)	0.2 μ l
	PoRV-GAPPV-NSP4-R(10 μ M)	0.2 μ l
	TGEV-F(10 μ M)	0.2 μ l
	TGEV-R(10 μ M)	0.2 μ l
	GETV-F(10 μ M)	0.2 μ l
GETV-R(10 μ M)	0.2 μ l	
	cDNA	1 μ l / total 20 μ l

スピンドウンを行った後、以下の条件で PCR 反応を行う。

94°C	1 分
------	-----

94°C	30 秒	} 35 サイクル
53°C	30 秒	
72°C	60 秒	
72°C	2 分	

Ogawa ら (J. Virol. Method. 160 (2009) 210-214) の使用した multiplex PCR プライマーの組み合わせと配列。

ウイルス	プライマー名	プライマー配列(5' -3')	PCR産物分子量	
DNA型	PCV2	PCV2-F	CAGCAACATGCCAGCAAGAAGAAT	703bp
		PCV2-R	TCGATCACACAGTCTCAGTAG	
	PPV	PPV-F	CACAGAAGCAACAGCAATTAGG	203bp
		PPV-R	CTAGCTCTTGTGAAGATGTGG	
	SuHV1	gB-F	CCTCGTAGTACACGTACCCG	368bp
		gB-R	CTGGTGCGAGCTGCAGAACAAAG	
RNA型	JEV	JEV-F	TGATGACCATYAACAACACGG	605bp
		JEV-R	CATGCGGACGTCCAATGTTG	
	PEDV	PEDV-F	GATATGTTTGAATGGTAACTC	503bp
		PEDV-R	AGCATAGCTAAAAGGCAATGC	
	PoRV-A	GAPRV-NSP-F	TTTACTCTACATAAGCATCAAT	416bp
		GAPRV-NSP-R	GACGGCAACTCAACCTCTCACAT	
	TGEV	TGEV-F	GATATGTTTGAATGGTAAACC	299bp
		TGEV-R	CTCTATAGCTGAACGATACTTAC	
	PRRSV	PRRSV -Fb	TTGACGCTATGTGATCTGAATG	809bp
		PRRSV -Rb	ACTTTCRACGTGGTGGGC	
	GETV	GETV-F	GGTGTGAAAAGCGAGAAGC	160bp
		GETV-R	TGCCTGGAACCTCACTCACTG	

※DNAウイルス

PCV2 : porcine circovirus type 2 豚サーコウイルス2型

PPV : porcine parvovirus 豚パルボウイルス

SuHV-1 : suid herpesvirus 1 オーエスキーウイルス(届)

※RNAウイルス

JEV : Japanese encephalitis virus 日本脳炎ウイルス(法)(人獣)

PEDV : porcine epidemic diarrhea virus 豚流行性下痢ウイルス(届)

PoRV-A : porcine rotavirus A 豚ロタウイルス

TGEV : transmissible gastroenteritis virus 伝染性胃腸炎ウイルス(届)

PRRSV : porcine reproductive and respiratory syndrome virus 豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス

GETV : Getah virus ゲタウイルス

8. 使用品のリスト

機器、キット、試薬 など	製品名	メーカー 名	価格	備考
臓器破碎機	Multi-beads shocker	YASUI	定価 ¥ 2,100,000 ~	
	ビーズ式細胞破碎装 置(非冷却型MS-100)	TOMY	定価 ¥ 698,000	
Φ12メタルコーン	MC-0215	YASUI	¥64,000/100個	
Φ5 ジルコニア	ZB-50	TOMY	¥10,000/300g	
Φ2 ジルコニア	ZB-20	TOMY	¥10,000/300g	
臓器破碎用チューブ	臓器破碎機に合った もの			
RNA/DNA抽出機	Magtration System 6GC	Precision System Science Co., Ltd.	定価 ¥2,400,000	
同ICカード	Magtration- MagaZorb RNA/Common code. I6054	Precision System Science Co., Ltd.	¥120,000	
RNA/DNA抽出キット	GC series Magtration- MagaZorb RNA Common Kit code. No. E2004	Precision System Science Co., Ltd.	¥42,000/48tests	¥875/test
DNaseI (RNase- free)	code. 2215A	Takara	¥12,000/5000U	
cDNA合成キット	SuperScript™First- Strand Synthesis system for RT-PCR 11904-018	Invitroge n	¥54,100/50反応	¥1,082/sample
Taqポリメラーゼ	Takara EXTaq RR001A	タカラバ イオ (株)	¥27,000/ 250 U	1sample 20ul (0.5U) で行う と ¥54/sample
PCR用primer				
アガロース	(アガロースS 312- 01193)	(和光純 薬)	(¥13,200/100g)	
電気泳動装置	ミュービッド2 plus	アドバン ス	¥42,800	
				試薬のみの合計 ¥2,011/sample

9. 参考Webサイトおよび引用文献

1. 安井器械株式会社 <http://www.yasuikikai.co.jp/>
2. 株式会社トミー精工 <http://bio.tomys.co.jp/>
3. プレシジョン・システム・サイエンス株式会社 <http://www.pss.co.jp/>
4. Ogawa H, et. al. Multiplex PCR and multiplex RT-PCR for inclusive detection of major swine DNA and RNA viruses in pigs with multiple infections. J Virol Methods. 160:210-4. 2009

牛リンパ肉腫からの牛白血病ウイルス *env* 遺伝子検出法の改良

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：1999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ウイルスの疫学調査が重要である。従来、検査対象牛の BLV 感染を証明するためには、OIE のマニュアルに準拠した PCR 法によって腫瘍検体から *env* 遺伝子を検出していた。本研究では検査法の簡略化ならびに標準化を目指し、新たな耐熱性 DNA ポリメラーゼを試用するとともに陽性対照 DNA を調整した。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、食肉衛生検査所での検査が容易となった。

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性および散発性に分類される。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、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に近縁であるが、ヒトへの感染はない。ウイルス感染牛の多くは不顕性であり、約 1/3 がリンパ球増多症を呈する。さらに、全体の数%が B 細胞性の白血病を発症して全身性のリンパ肉腫を認めるようになる。感染牛は終生抗体を産生するためゲル内沈降反応や ELISA などによる血清診断が行われ、欧州諸国では抗体陽性牛の摘発・淘汰によって清浄化に成功している。病原診断では、ウイルス分離と PCR 法によるリンパ球ゲ

ノム中のプロウイルス検出が行われる。OIE のマニュアルでは *env* 遺伝子領域内の 440 塩基、あるいは nested PCR によって 341 塩基を検出するが、その操作は煩雑であった。そこで本研究では、一般的な食肉衛生検査所においても実施可能な方法確立するために OIE マニュアルの簡略化を試みた。また、反応の特異性を担保するために陽性対照を新たに調整した。

B. 研究方法

1. 腫瘍組織：10 歳 6 ヶ月齢雌黒毛和種の第三胃に認められた肉腫を用いた。採材後約 5 ヶ月間 -20℃ に保存された後、凍結下北海道医療大学に輸送された。その後、使用時まで -80℃ に保存された。
2. 核酸抽出：約 5 mg の組織片を 1.5 mL のマイクロチューブに取り、Quick Gene

DNA tissue kit S (FUJIFILM) 同梱の Tissue Lysis Buffer 180 μ L および 1.5 mg/mL Proteinase K 20 μ L を加え、55°C 中で 1 晩振とう混和した。その後キット添付のマニュアルに従って 200 μ L の Elution buffer を用いて溶出して肉腫細胞ゲノム精製 DNA を得た。

3. PCR-1 : OIE の診断マニュアルに準じ、gp51 領域をコードする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 28.25 μ L、5 X GoTaq Flexi buffer (Promega) 10 μ L、10 mM dNTPs mix 1 μ L、10 μ M プライマー OBLV1A (5'-CTTTGTGTGCCAAGTCTCCCAG ATACA-3') および OBLV6A (5'-CCAACA TATAGCACAGTCTGGGAAGGC-3') 各 2 μ L、精製 DNA 溶液 2.5 μ L を混和し、最後に 25 mM MgCl₂ 4 μ L および 5 U/ μ L GoTaq Flexi DNA polymerase (Pro-mega) 0.25 μ L 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. PCR-2 : Phire Animal Tissue Direct PCR kit (FINNZYMES) 同梱の Dilution Buffer 20 μ L を 1.5 mL のマイクロチューブに取り、約 5 mg の組織片を入れた。これに 0.5 μ L の DNA Release Additive を加え、攪拌後、室温に 5 分間静置した。98°C、2 分間加熱後、遠心して得た上清に精製水 180 μ L を加え鋳型 DNA 液とした。精製水 16.5 μ L、2 X Phire Animal Tissue PCR Buffer 25 μ L、10 μ M プライマー OBLV1A および OBLV6A 各 2.5 μ L、Phire Hot Start II DNA poly- merase 1 μ L に鋳型 DNA 溶液 2.5 μ L を加え、混合した。98°C に 5 分間保持した後、98°C/5 秒、60°C/5 秒、72°C/20

秒を 40 回繰り返す、最後に 72°C、1 分間反応させた。

5. 陽性対照 DNA の調整 : インフルエンザ A ウイルス NS 遺伝子 cDNA を Inoue et al. (2010) の方法で増幅した。これを鋳型に 5'-CTTTGTGTGCCAAGTCTCCCAGATA CACTGATCTAGACCTGCAGGCTCAGC AAAAGCAGG-3' および 5'-CCAACATAT AGCACAGTCTGGGAAGGCCGTGGTAC CATGGTCTAGAGT-3' (下線部は各々 OBLV1A および OBLV6A の配列と同じ) プライマー対を用いて PCR を行ない、986 塩基の DNA 断片を増幅した。これをアガロース電気泳動に供し、1000 塩基付近のバンドを切り出した。Wizard SV and PCR Clean-Up system (Promega) を用いて DNA を精製し、陽性対照 DNA とした。

C. 研究結果

1. 陽性対照 DNA の検定 : 陽性対照 DNA を精製水で 0.2ng/ μ L に調整した。これを 4 倍階段希釈し、各々の 2.5 μ L を PCR1 に供した。陰性対照としては精製水を用いた。図 1 に示すように、4⁻¹³ 希釈においても 1000 塩基付近にバンドが認められた。

ついで、陽性対照 4⁻¹² 希釈、肉腫細胞ゲノム精製 DNA および精製水を鋳型として PCR1 を実施した。図 2 に示すように、陽性対照と検体のバンドは明確な区別が可能であった。また、全ての反応において非特異的な増幅産物は認められなかった。

2. PCR-1 と PCR-2 の感度比較 : 精製 DNA を鋳型として用いる PCR-1 と粗抽出 DNA を用いる PCR-2 の感度を比較するため、ほぼ同じ重量の腫瘍組織から各々 200 μ L の鋳型 DNA を調整した。これを 1 : 40 希釈し

たものを原液として 5 倍階段希釈を用意し、2.5 μ L ずつを各々の反応に供した。図 3 に示すように、精製 DNA を鋳型として用いる PCR1 では 5⁴ 希釈が検出限界であった。一方、粗抽出 DNA を用いる PCR-2 では 5⁵ 希釈まで特異的なバンドが検出された。即ち、PCR-2 は出発材料換算で少なくとも 5 倍の感度を有していた。

D. 考察

本研究で用いるプライマー対では、440 塩基の *env* 遺伝子断片を検出する。一方、対照 DNA では 986 塩基のバンドが増幅される。この断片長の差は通常のアガロース電気泳動で容易に判別が可能であった。また、PCR-1 のみならず PCR-2 においても非特異産物を増幅させることはなかった（結果示さず）。したがって、本対照 DNA は BLV *env* 遺伝子検出における陽性対照として極めて有用と考えられる。しかしながら、OIE マニュアルの nested PCR に対応するためには、2nd PCR のプライマーに相補的な内部配列を導入する必要がある。

OIE マニュアルに基づいた PCR1 では鋳型 DNA を高度に精製する必要があった。そのため、検査に 1 晩以上を要するのみならず、DNA の抽出・精製に特定の機器、試薬あるいはキットが必要であった。また多段階の操作が必要なため、多くの検体を並列処理する際には試料間の交差汚染が危惧された。そこで本研究では、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 DNA の精製操作を省くことを試みた。その結果、検査時間を大幅に短縮することに成功したのみならず、出発材料換算で少なくとも 5 倍の検出感度が得られた。PCR 産物の量で比

較した場合、PCR1 では 5² 希釈で明らかな減少が認められたのに対し、PCR-2 では 5⁵ 希釈でも十分な蛍光が観察された。したがって、実際に検査を実施するうえでは 100 倍程度の感度が得られるものと考えられる。PCR-2 を適用することによって、一般的な食肉衛生検査所においても BLV 感染の遺伝子検査が可能になると考えられる。

E. 結論

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る。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.

- 3) 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)

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）

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

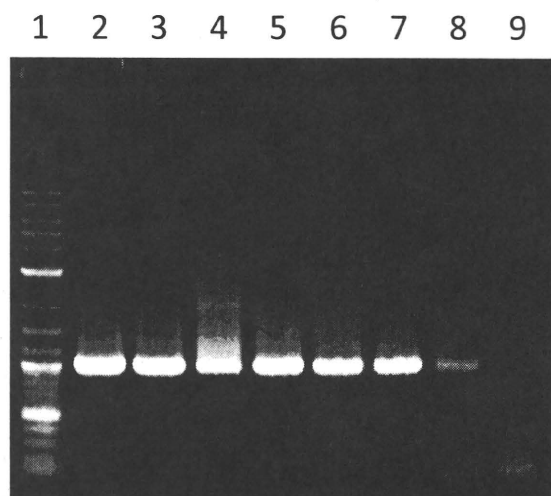


図 1. 陽性対照 DNA を鋳型とした PCR. レーン 1, 100-bp DNA ラダー； レーン 2~8, 陽性対照 DNA 4⁷ ~ 4¹³; レーン 9, 精製水

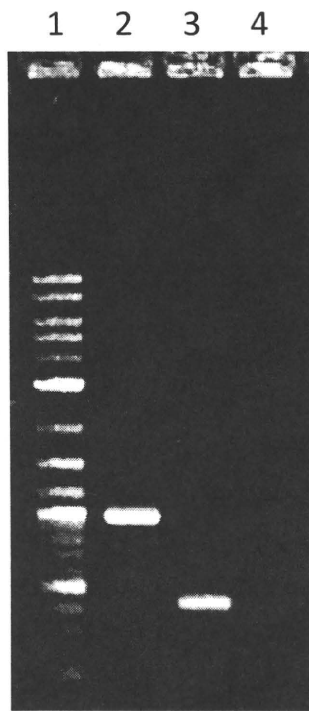


図 2. *env*遺伝子の検出. レーン 1, 100-bp DNA ラダー; レーン 2, 陽性対照 DNA; レーン 3, ウシリンパ肉腫 DNA; レーン 4, 精製水

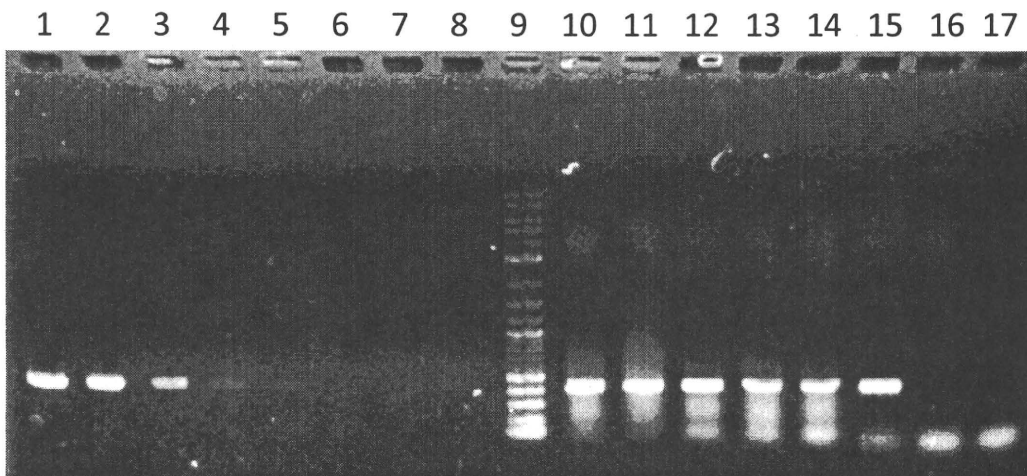


図 3. PCR1 と PCR2 の比較. レーン 1~8, PCR1 ウシリンパ肉腫 DNA $5^0 \sim 5^7$; レーン 8, 100-bp DNA ラダー; レーン 9~17, PCR2 ウシリンパ肉腫 DNA $5^0 \sim 5^7$