

牛白血病ウイルス Tax タンパク質の多型と白血病発症年齢との関係

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)による感染症である。ウイルス感染動物の多くは不顕性であるが、数%が白血病を発症し、その好発年齢は5～8歳である。本研究ではBLV感染によるウシの白血病発症機構を解明するため、ウイルスの転写活性化因子 Tax をコードする遺伝子を解析した。46 検体のウシ腫瘍組織から増幅した *tax* 遺伝子の塩基配列を決定して Tax の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 番アミノ酸と白血病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 ($p=0.00035$)。したがって、Pro233 型 Tax を有する変異型の BLV に感染したウシでは白血病の発症が遅くなるものと考えられた。

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B細胞性の白血病を発症して全身にリンパ肉腫を形成する。成人T細胞白血病では50～60年の潜伏期を経て発病するのに対し、BLV感染による白血病の好発年齢は5～8歳である。したがって、BLVによる白血病発症機構の解析はHTLV-1感染のモデルとして重要と考えられる。本研究では、BLV感染によるウシの白血病発症

機構を解明するため、ウイルスの転写活性化因子 Tax をコードする遺伝子を解析し、白血病の発症年齢との関連を調べた。

B. 研究方法

1. 腫瘍組織：2008年6月～2010年3月、北海道帯広食肉衛生検査所、岩手県食肉衛生検査所、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、栃木県県北食肉衛生検査所、静岡県東部食肉衛生検査所、奈良県食品衛生検査所、岡山県食肉衛生検査所、熊本市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、当研究室でBLV *env* 遺伝子が検出された腫瘍組織 46 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 μ L の添付 buffer を用いて溶出し、20-300 ng/ μ L の DNA 溶液を得た。
3. PCR: BLV *tax* 遺伝子第 2 エクソン部分を含む領域を増幅するプライマー対 BLVtaxFW および BLVtaxRV(5'-AGCC CCAGCAGAGACATTCC-3' および 5'-TTCTCTGGCAGCTGACGTYT-3') 10 μ M 各 1.5 μ L、10X AccuPrime Pfx DNA polymerase buffer (Invitrogen) 5 μ L、精製水 37 μ L、鋳型 DNA 4 μ L をマイクロチューブに取り、2.5 U/ μ L AccuPrime Pfx DNA polymerase (Invitrogen) 1 μ L を加えた。反応は 95°C で 2 分加熱後、95°C/15 秒、60°C/30 秒、68°C/1 分の反応を 35 回繰り返した後、68°C に 3 分間放置した。
4. 塩基配列の決定および解析: PCR 産物を 5'-CGGGATCCATTACCTGATAA CGA-3'、5'-CCGAGGGCAATTGGCA TTGGTA-3'、5'-CCCGACGACTCTG GATCAACT-3'、5'-GGAAAGCGGCAT ATGGGGACAT-3'、5'-GCCCAGTTAC TTGTATTCTACCC-3'、3'-GCGCCT AGGCCTGCATGATCTTTC-3' をプライマーとして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。得られた配列を国内外の BLV 遺伝子とともに UPGMA 法に供し、系統樹を作成した。塩基配列に基づいて Tax のアミノ酸配列を予想し、DNASIS V3.0 (HITACHI SOFTWARE)を用いて二次構造を予測した。

C. 研究結果

1. BLV Tax アミノ酸配列の比較: 2008 年 6 月～2010 年 3 月、各地の食肉衛生検査所において廃棄された腫瘍組織 46 検体から、PCR によって *tax* 遺伝子第 2 エクソン領域を含むおよそ 1200 塩基を増幅した。本領域は Tax N 末端の 2 アミノ酸残基を除く 307 残基をコードする。ダイレクトシーケンスによって決定した塩基配列に基づき、Tax のアミノ酸配列を予想した。図 1 に示すように、233 番アミノ酸によって調べた 46 検体は 2 群に分けられた。すなわち、#4 を含む 14 検体(30.4%)では 233 番アミノ酸は Pro (Pro233)であったのに対し、#5 を含む 32 検体(69.6%)は Leu (Leu233)であった。また、N 末端付近にはアミノ酸置換の多い領域が認められた。
2. Tax の表現型と白血病の発症年齢: Tax の 233 番アミノ酸と白血病発症年齢との関係を調べるため、腫瘍発見 (と殺) 時のウシの月齢を比較した。その結果、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 ヶ月であった。両者間で t 検定を行ったところ、Pro233 型 BLV 感染牛では有意に ($p=0.00035$) 月齢が高いことがわかった(表 1)。一般に、幼弱期に感染した動物のみが白血病を発症するとされる。したがって、Pro233 型 BLV 感染牛では白血病の発症が遅いものと考えられる。
3. BLV *tax* 遺伝子の系統進化解析: 本研究で明らかにした 46 検体を含む国内外の BLV *tax* 遺伝子を UPGMA 法に供し、

進化系統樹を作成した。図 2 に示すように、今回 Pro233 型と同定された 14 株の BLV は全て 1 つのクラスターに属することが分かった。

D. 考察

Pro233 型 Tax をコードする BLV に感染したウシでは白血病の発症が遅いことが分かった。HTLV-1 の Tax は CREB や NF- κ B を介して自身の LTR や宿主細胞の様々な遺伝子を活性化する。また、p53 の機能を直接抑制することが知られている。そのため、BLV の Tax も白血病の発症に重要な役割を果たすことが予想される。そこで 233 番アミノ酸の置換が Tax の立体構造に及ぼす影響を調べたところ、Leu233 型 Tax では 233 番アミノ酸部位が α ヘリックス構造をとることが予想されたのに対し、Pro 型では β シート構造が予想された(図 3)。この構造変化が Tax の機能に何らかの影響を及ぼしている可能性がある。これまでのところ、Pro233/Leu233 型 Tax 間で BLV LTR に対する活性化能に差は認められていない(成績示さず)。今後、他の機能について調べる必要がある。

Pro233 型と同定された 14 株の BLV は全て 1 つのクラスターに属したことから、BLV Tax の野生型は 233 番アミノ酸に Leu を有するものと考えられた。いずれの株も、塩基の変化が CTT $\rightarrow$ CCC であった点が興味深い。一塩基置換を容易に検出する方法としてリガーゼ連鎖反応(LCR)が報告されている。LCR によって CTT $\rightarrow$ CCC 変異が検出できれば、BLV 感染牛の予後診断が容易に行えるものと期待される。

昨年度、BLV *env* 遺伝子の RFLP 型別と白血病発症年齢との関連を調べ、RFLP III 型の BLV に感染したウシでは有意に白血病の発病が遅いことを明らかにした。

Pro233 型 Tax と *env* 遺伝子の RFLP III 型との相関を調べたところ、Pro233 型の 78.6%(11/14)が RFLP III 型であった。一方、Leu233 型では 3.1%(1/32)のみが RFLP III 型であった。*env* 遺伝子産物である Env 糖タンパク質はウイルス感染初期に重要な役割を果たす。本糖タンパク質上には CD8⁺T 細胞エピトープが存在し、腫瘍免疫への関与も想定されるが、RFLP III 型ウイルス感染牛の遅い白血病発症年齢は Tax に起因するものと考えられる。

E. 結論

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 $\rightarrow$ 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。

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

	1		120
Consensus	--SVVGGPHSLHACPALVLSNDVTIDAMCPLCGPHERLQFERIDTTLTCETHRINWTADGRPCGLNGTLFPRLHVSETRPQGPRLWINCPLPAVRAQPGPVLSLSPFERSPPFPYQCQL		
#4	-----K-----I-----		
#5			
#7, #35			
#8 & other 5			
#11			
#12			
#18			
#20			Q
#27		K	I
#29			
#32			
#34		R	Q
#35			
#40			
#45			
#61			
#66			
#69		R	
#72			
#81		K	
#92		A	
#105			
#110		G	
#111, #137			
#114			
#129, #185, #208			
#134			
#135		K	Y
#142			M
#156			
#158		R	
#159			M
#166			
#168			
#184			T
#186			
#187			
#188			
#191			
#194		R	
#206			
#207			V
#209	S	K	T F
	121		240
Consensus	PSASSDGCPIIGHGLLEPWNVLVTHFVLGKVLILNQMANFSLLPSTDTLLVDPLRLSVFAPDTRGAIRYLSLTLLTLCPATCILPLGEPFSPNVPICRFPDRDSNEPPLSEFELPLIQTPLGLS		
#4			P
#5			
#7, #35			P
#8 & other 5			P
#11	A		
#12			
#18			
#20			
#27			
#29			
#32			P
#34			
#35			P
#40			
#45			
#61			P
#66			
#69		A	
#72			
#81			P
#92		R	P
#105			T
#110			P
#111, #137			
#114			
#129, #185, #208			
#134			
#135			
#142			
#156			
#158	G		
#159			
#166			
#168			
#184			
#186			
#187			
#188			
#191			
#194			
#206			
#207	I		
#209		P	T

図 1. BLV Tax のアミノ酸配列。 共通配列を最上段に示し、同じ配列は-で表した。

241 309

Consensus WSVPAIDLFLTGPPSPCDRLHVMSSPQALQRFLHDPDTLTWSELVASRKIRLDSPLKQLLENEWLSRLF

#4 -----

#5 -----

#7, #35 -----

#8 & other 5 -----

#11 -----

#12 -----

#18 -----

#20 -----

#27 -----

#29 -----

#32 -----

#34 -----

#35 -----

#40 -----

#45 -----H-----

#61 -----R-----

#66 -----R-----

#69 -----

#72 -----

#81 -----

#92 -----

#105 -----

#110 -----

#111, #137 -----

#114 -----

#129, #185, #208 -----

#134 -----

#135 -----

#142 -----H-----

#156 -----

#158 -----

#159 -----

#166 -----

#168 -----

#184 -----

#186 -----

#187 -----

#188 -----

#191 -----

#194 -----

#206 -----

#207 -----

#209 -----Y-----L-----I-----

図 1. 続き

表 1. Tax 233 番アミノ酸と白血病発症月齢の関係

Amino acid at residue 233	No. of cattle (%)	Mean age (months)	P=0.00035
Leu	32 (69.6)	55.3 ± 5.2	
Pro	14 (30.4)	97.1 ± 11.3	
Total	46 (100)	68.0 ± 5.7	

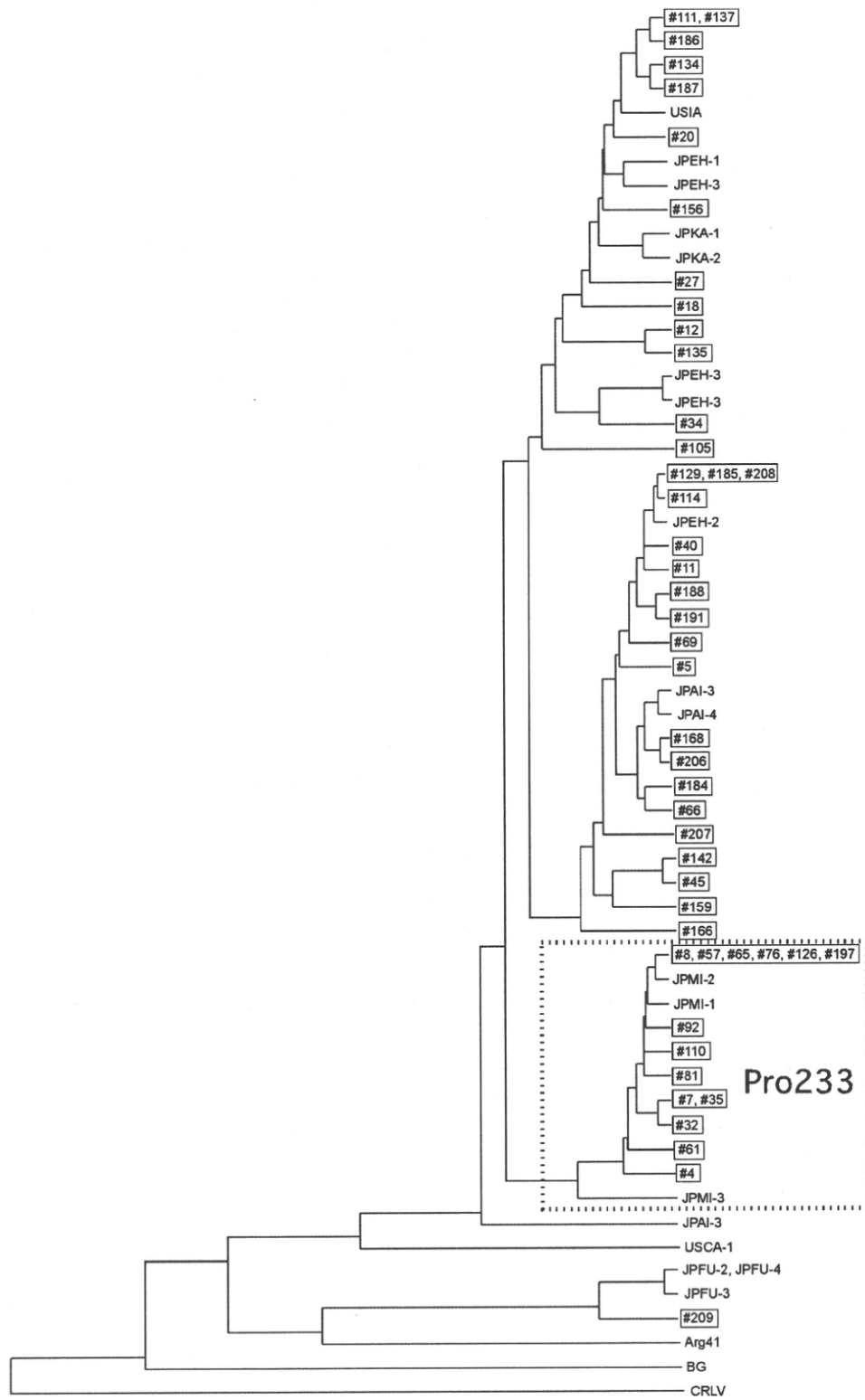


図 2. *tax* 遺伝子に基づく BLV の進化系統樹. 本研究で得られた配列は で囲った。

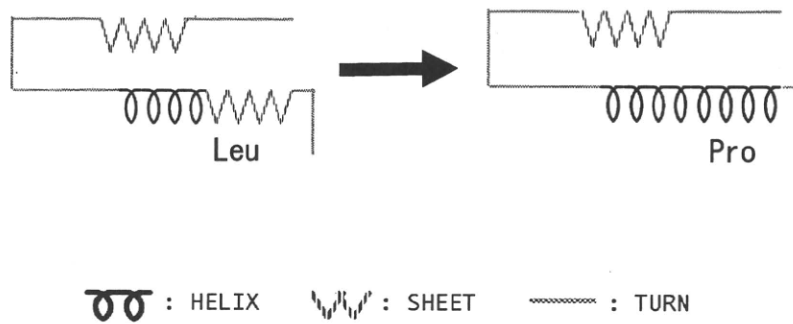


図 3. Leu233→Pro233 変異で予想される Tax の二次構造の変化

鳥インフルエンザの検査に関する研究

・ ニューカッスル病ウイルスの迅速検査法(RT-LAMP)の有用性検証 ・

研究分担者	伊藤壽啓	鳥取大学農学部附属鳥由来人獣共通感染症 疫学研究センター センター長
研究協力者	伊藤啓史	鳥取大学農学部附属鳥由来人獣共通感染症 疫学研究センター 准教授

研究要旨 昨年度の研究で、家禽において鳥インフルエンザと臨床症状が類似するウイルス性感染症であるニューカッスル病の迅速且つ簡便な遺伝子検査法（RT-LAMP 法）のプライマーを作製し、種々の class および genotype に属するニューカッスル病ウイルスに対する反応性を検討した。今年度の研究では、① 新たに異なる genotype のウイルス株に対する反応性を調べてプライマーの反応性、② 実験的にニューカッスル病ウイルスに感染した鶏からの RT-LAMP 法によるウイルス遺伝子の検出、③ 迅速簡便な方法により抽出したウイルスゲノム RNA が RT-LAMP 法の鋳型と成り得るか、の 3 点について検討した。その結果、本研究で作製した RT-LAMP プライマーは class および genotype に関わらず幅広いニューカッスル病ウイルスの遺伝子が検出可能であること、ニューカッスル病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、迅速簡便 RNA 抽出法はさらなる条件検討が必要ではあるものの、RT-LAMP 法の鋳型調整法として利用可能である可能性が示された。

A. 研究目的

高病原性鳥インフルエンザ(HPAI)に症状が類似する家禽のウイルス感染症にニューカッスル病(ND)がある。食鳥検査の現場となる食鳥処理場では HPAI の検査に迅速診断キットを用いるが、感度や信頼性が問題となる場合がある。したがって、食鳥処理場における HPAI および ND の迅速且つ正確な鑑別診断法の開発は両疾病防疫上非常に重要である。HPAI については RT-PCR 法や RT-LAMP 法等。種々の迅速遺伝子検査法が報告されているが、ND にはない。そこで我々は検査機器の整わない食鳥処理場で実施可能な ND 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

昨年度の研究により開発した ND ウイルス NP 遺伝子をターゲットとする RT-LAMP 法について、

①新たに 2 つの genotype の ND ウイルス 3 株に対する反応性を確認した。

②強毒型 ND ウイルスを実験的に感染させた鶏から採取した気管およびクロアカスワブから ND ウイルス遺伝子の検出を検討した。

③遺伝子検出の鋳型となるゲノム 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。

C. 研究結果

①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。

②ウイルス感染後 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。

③スピнкаラム (Viral RNA Mini Kit, キアゲン社) を使った従来法に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。

D. 考察

昨年度に試験したウイルス株に加え、本年度は新たに 2 つの genotype の 3 株について RT-LAMP 反応を実施し、ウイルス遺伝子の検出に成功した。これは、本研究で開発した RT-LAMP プライマーが幅広い遺伝子型のニューカッスル病ウイルスの検出に有効であることを示している。

動物実験により実際にニューカッスル病ウイルスに感染した鶏からのウイルス遺伝子検出も可能であることが証明された。ただし、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、反応が不安定であった。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た。したがって、家禽からの材料採取には反応の安定している気管を選択するべきであると考えられた。

カラムを使わない、すなわち遠心操作を必要としない迅速簡便 RNA 抽出法でも RT-LAMP 法によるニューカッスル病ウイルス遺伝子の検出は可能であった。しかし、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。迅速簡便 RNA

抽出法はキットの抽出液とウイルスを混ぜるだけの簡単な操作のため、試験機器の揃わない診断現場でも利用可能で、且つ迅速である。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。

E. 結論

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。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 RT-LAMP法によるNDV遺伝子の検出

ウイルス株	Class (Genotype)	検出に要した 時間(分)	ウイルス感染価 (logEID ₅₀ /0.1 mL)
goose/Alaska/418/91	I	25	7.75
duck/Siberia/1036/99	I	25	7.50
Queensland/66	II (I)	44	5.16
Japan/Ishii/62	II (I)	36	7.50
Hitchner B1/48	II (II)	33	7.50
Komarov/40	II (II)	39	7.75
TCND	II (II)	30	8.50
Italy/45	II (IV)	49	5.75
Herts/33	II (IV)	35	6.75
Hong Kong/3/76	II (VI)	24	7.50
Quail	II (VI)	32	7.50
Japan/Miyadera/51	II (II)	51	7.50
Japan/Okinawa/91	II (VIII)	40	6.16
1S5	II (VII)	25	NT
NYF3	II (VII)	25	NT

NT：試験実施せず

表2 RT-LAMP法によるNDV感染鶏からの
ウイルス遺伝子の検出

鶏 No.	スワブ	ウイルス接種後の日数					
		1	2	3	4	5	6
1	気管	+ / 2.8 ^a	+ / 3.2	+ / 4.2	+ / 3.5	+ / 4.5	NT ^b
	クロアカ	+ / <1.0	- / <1.0	- / <1.0	+ / <1.0	- / 3.5	NT
2	気管	+ / 4.2	+ / 2.5	+ / 3.8	+ / 1.5	+ / 3.5	+ / 2.8
	クロアカ	- / <1.0	- / <1.0	+ / 2.8	- / <1.0	+ / 4.5	+ / 5.8
3	気管	+ / 2.2	+ / 4.0	+ / 3.8	+ / 3.5	+ / 2.5	+ / 3.2
	クロアカ	- / <1.0	- / <1.0	- / <1.0	- / <1.0	- / <1.0	+ / 3.8
4	気管	+ / 3.8	+ / 4.5	+ / 5.8	+ / 5.5	+ / 5.5	NT
	クロアカ	- / <1.0	+ / <1.0	- / 3.8	+ / 5.8	+ / <1.0	NT

^a ウイルス遺伝子検出/ウイルス感染価、^b 鶏死亡のため試験実施せず

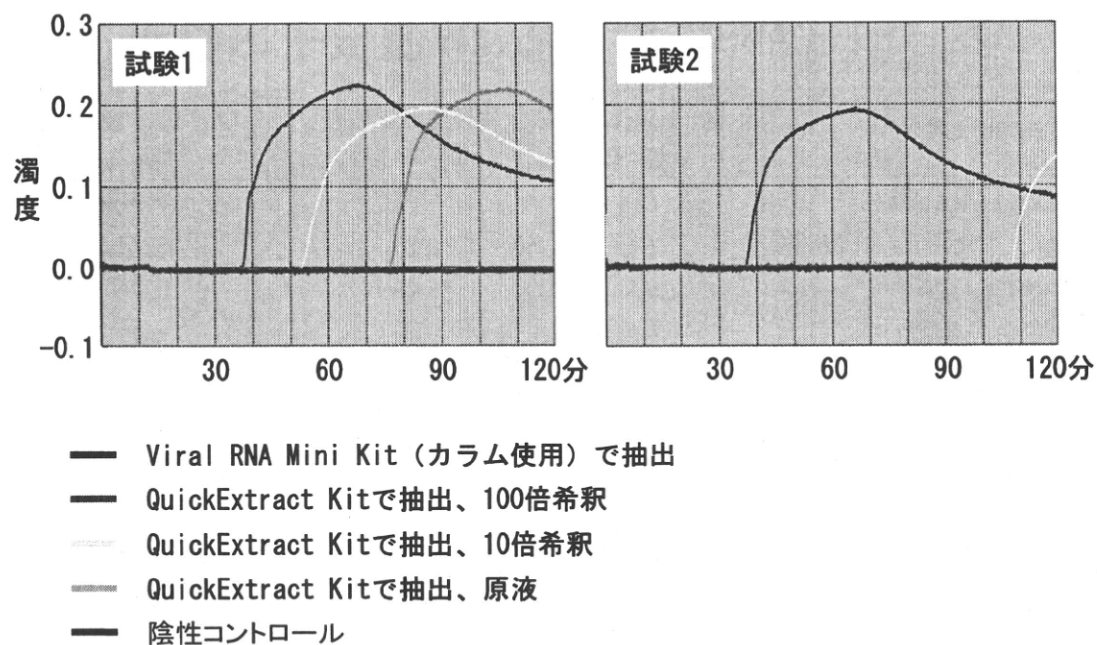


図1 簡便なウイルスRNA抽出法の検討

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

研究分担者 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：食鳥処理場で高病原性鳥インフルエンザ(HPAI)が疑われた場合、簡易迅速キットによる検査に続いて確定検査のための検体採取と検査可能な施設への輸送が必要である。本研究ではウイルスを安定して輸送するための検体輸送用培地の検討を引き続き行った。組織培養用培地、生理食塩水および市販の検体輸送用培地に H5N1 亜型インフルエンザウイルスおよび他の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 21 日間でも感染価の低下は小さかったが 20℃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、採取された検体は輸送中の温度管理が重要である。

A 研究目的

2004 年と 2007 年には H5N1 亜型インフルエンザウイルスによる国内での高病原性鳥インフルエンザ(HPAI)の発生があったが、東南アジアなどではその後も継続して発生している。また、2010 年から 2011 年にかけて再び本邦においても養鶏場での HPAI が発生し、食鳥処理場に出荷された事例も起きた。

食鳥検査において本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。

本研究では確認検査を要した場合にウイルス分離や RT-PCR 等のウイルスゲノム RNA を検出するための検査に適した輸送用培地について、昨年度に続きさらに、ウイルス株を追加して実施するとともに実際の検体、特にクロアカスワブに混入する糞便の影響についても検討した。

B.研究方法

1. 検体輸送用培地：細胞培養用液体培地 (E-MEM, 和光純薬社)または生理食塩水(生食水、大塚製薬社)にペニシリン 500u/ml, ストレプトマイシン 500µg/ml, ファンギゾン 2.0µg/ml, ゲンタマイシン 100µg/ml, 0.5%の牛血清アルブミンを添加して用いた。また、市販の輸送培地として 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 (UVT、日本 BD 社) [成分：ハンクス緩衝塩類、ウシ血清アルブミン、L-システイン、ゼラチン、ショ糖、L-グルタミン酸、HEPES 緩衝液、バンコマイシン、アンフォテリシン B、コリスチン、フェノールレッド、pH7.3±0.2 (25℃)]を用いた。

2. 供試ウイルス：A/duck/Hyogo/35/01 (H5N1; Hyogo 株、神戸市環境保健研究所より分与)、A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/WSN/33 (H1N1; 国立感染症研究所インフルエンザウ

イルス研究センターより分与)、A/Blowfly/Kyoto/I93/2004 (H5N1;Kyoto株)、A/Mallard/Miyazaki/MZ5/2007 (H1N3 ; MZ 株) (当室で分離)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。

3. ウイルス生残性試験:各検体輸送用培地 9ml にストックウイルス液を1ml加え混和後、0.2ml ずつを1.5ml マイクロチューブに分注し4℃または20℃で保管した。0, 1, 3, 5, 7, 14, 21 日目に-80℃に凍結し、ウイルス感染価測定とRNA抽出まで保管した。クロアカスワブを検体とした場合を想定し、正常ニワトリの糞便を生理食塩水で10%乳剤とし、これをウイルス液に1/10量(最終濃度1%)添加し、上記同様に保存した。

4. 感染価の測定:MDCK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。

C. 研究結果

1. H5亜型ウイルスの生残性:ウイルス液を3種の輸送用培地に添加し4℃または20℃で保管した後の残存感染価を測定した。

H5N1 亜型 Kyoto 株及び Hyogo 株を三種類の輸送用培地に添加して4℃保管した場合ではいずれのウイルス株や培地で21日までほとんど感染価の低下が見られないか 10^1 程度の低下であった(図1、4℃ ●□●)。一方、20℃保管では Kyoto 株において UVT、生食水、E-MEM で 10^1 、 10^2 、 10^3 低下した。また、Hyogo 株では UVT と生食水で 10^1 の低下であったが E-MEM では検出限界以下まで低下した(図1、20℃ ●□●)。

糞便が混入した場合(最終濃度1%)においては4℃ではほとんど糞便混入の影響はなかったが、20℃保管では Kyoto 株で UVT(▲) 14 日目、

E-MEM(▲)21 日目で検出限界以下、生食(▽)21 日目で 10^2 低下した(図1 20℃左)。Hyogo 株では UVT(▲) 7 日目、E-MEM(▲)21 日目で検出限界以下となり、生食(△)21 日目で 10^1 低下した(図1 20℃右)

2. 他の亜型ウイルス株の生残性:野生カモ由来 H1 亜型株(MZ 株)及びヒト由来株(Brisbane 及び WSN 株)について3種の輸送用培地で20℃保管した場合の感染価を測定した。MZ 株は低い感染価のストック液であったが UVT、生食で21日目まで感染性が確認できた(図2 ▲)。またヒト由来 Brisbane 株は M-MEM を除き21日間感染性が保たれた(図2 ◇)。WSN 株は安定性が低く M-MEM では14日までに検出限界以下となった(図2 ▼)。

なお、RT-PCR によるウイルスゲノムの検出は感染価が確認できなくなった20℃ 21 日間保存検体でも検出可能であった。

D. 考察

食鳥処理場において高病原性鳥インフルエンザが疑われ簡易迅速インフルエンザ診断キットにより検査により陽性疑いとなった場合には、さらにウイルス分離やゲノム検出を行うために各処理場または検査所から検査可能な施設へ検体を輸送することとなる。その際、ウイルスができるだけ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市販品を含めて3種類の輸送用培地について 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。

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℃)で保存した場合には明らかな感染価の減少が見られた。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

いては数日以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使用可能と考えられた。

採取する検体がクロアカスワブの場合には糞便が混入するが、その時のウイルス感染価は使用する輸送培地と温度条件により著しくウイルスの安定性が低下する場合があった。特に、Hyogo 株では糞便が混入することで直ちに感染価が 10^1 程度低下した (図 1 20℃ 右)。UVT や M-MEM において糞便混入の影響が強く認められ、UVT の pH は 7.4 から 4.3 へと低下し、M-MEM では pH 7.3 から 8.1 へと上昇していた。これらの pH の変化がウイルスの安定性に影響したものと考えられた。

また、ウイルス株によっても安定性が異なっていたが、糞便混入検体においても 4℃では著しいウイルスの生残性の低下は見られないことから、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。

E. 結論

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℃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℃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。

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

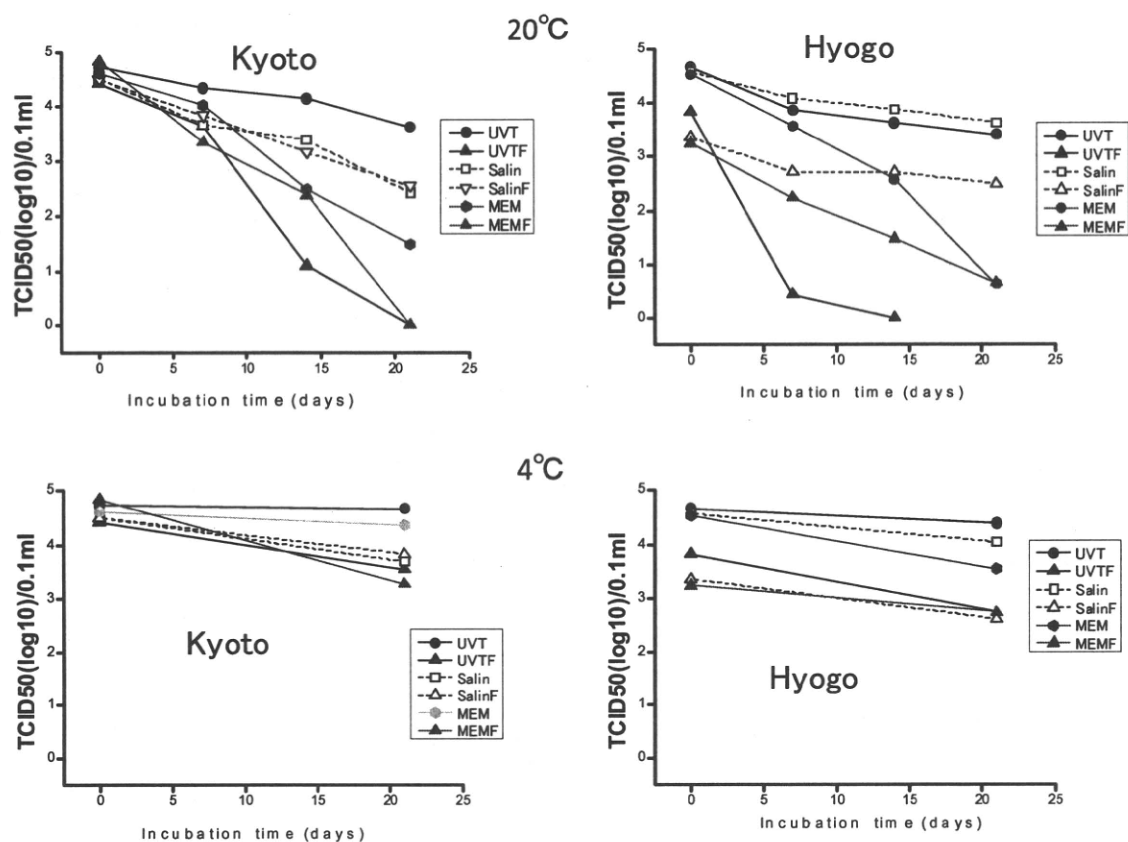


図1 H5 亜型インフルエンザウイルス (Kyoto 株と Hyogo 株) の輸送用培地及び保存温度、糞便混入の生残性への影響

UVT (日本BD ユニバーサルバイラルトランスポート)。UVT+F (糞を添加)、Salin (生理食塩水)。Salin+F (糞を添加)、MEM (組織培養用培地)。MEM+F (糞を添加)。
 TCID₅₀ : 50% tissue culture infectious dose。検出限界は 10^{1.5}TCID₅₀/0.1ml。

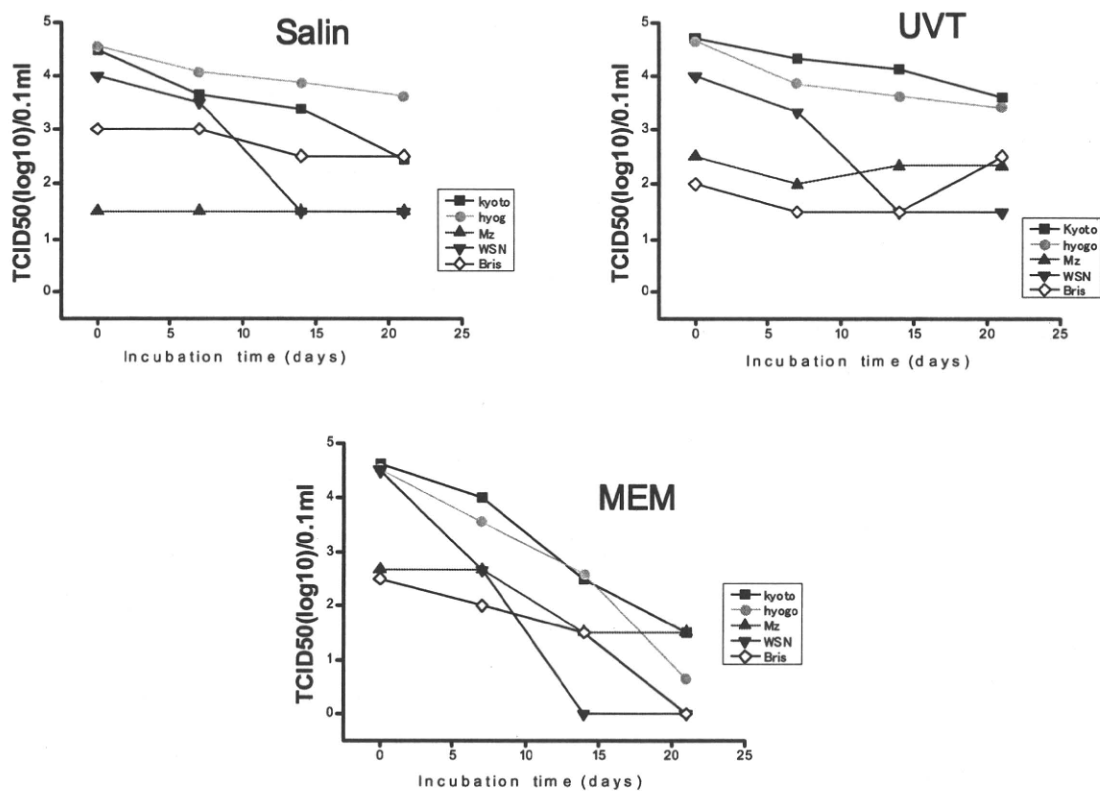


図 2 H5 亜型インフルエンザウイルス及び H1 亜型ウイルスの各種輸送培地での安定性

Kiyoto: A/Blowfly /Kyoto/I93/2004 (H5N1)、Hyogo: A/duck/Hyogo/35/01(H5N1), Mz:

A/Mallard/ Miyazaki/MZ5/2007 (H1N3), WSN: A/WSN/33(H1N1), Bris: A/Brisbane

/59/2007(H1N1)

UVT (日本BD ユニバーサルバイラルトランスポート)。(生理食塩水)。MEM (組織培養用培地)。TCID₅₀ : 50% tissue culture infectious dose。検出限界は $10^{1.5}$ TCID₅₀/0.1ml。

DNAプローブを用いた簡便ウイルス検出法の検討

研究研究者 棚林 清 国立感染症研究所獣医科学部第3室 室長
研究協力者 宇田晶彦 国立感染症研究所獣医科学部 主任研究官

研究要旨 我々は病原体核酸網羅的検出用マイクロアレイを開発してきたが、高価であるためにその利用は制限されていた。そこで本研究では、安価で網羅的な病原体核酸検出系の開発を目的とし、インフルエンザウイルス RNA をモデルとして用いた RT-PCR/マイクロプレートハイブリダイゼーション (MPH) 法の基礎的条件検討を行った。この検討の結果、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 5x SSC 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、 10^4 コピーの H1 Narita 株でも検出することができた。以上の結果より、安価な網羅的検出システムに RT-PCR/マイクロプレートハイブリダイゼーション法が最適である可能性が示唆された。

A. 研究目的

ヒトや家畜に感染し被害をもたらすウイルス、細菌、真菌は枚挙に暇がない。我々は、これらの病原体を一括網羅的に検出するマイクロアレイの構築を行ってきた。しかし、マイクロアレイを用いた検出システムは非常に高価でその利用は制限されている。そこで本研究ではこれまでの研究成果を応用し、安価で簡易な網羅的病原体システムである RT-PCR/マイクロプレートハイブリダイゼーション (Microplate Hybridization, MPH) 法の検討を行った。特に、ハイブリダイゼーションに用いるプローブ、反応液等の諸条件の基礎データ取得するために、インフルエンザウイルス RNA を用いて検証を行った。

B. 研究方法

1. オリゴ DNA プローブ

インフルエンザウイルスを標的としたプローブは、ArrayDesigner 4 を用いて設計した。

設計したオリゴ DNA プローブは、北海道システムサイエンスに合成委託した。

2. プローブ固相化プレート

オリゴ DNA プローブ固相化マイクロプレートを作製するために、スミロン ELISA 製品・カルボタイプ (住友ベークライト) を使用した。20 mg/ml 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDAC ; 別名 WSC 和光社製) および 1 pmol のオリゴ DNA プローブを含む 100 μ l の 10 mM リン酸緩衝液 (pH 5.8) を各 well に分注し、50°C で一晚固相化反応させた。0.1% Tween20 を含む 5x SSC で 3 回洗浄した後、Blocking One (ナカライテスク社製) を用いて室温 1 時間でブロッキングした。その後 0.1% Tween20 を含む 5x SSC で 3 回洗浄した。

3. インフルエンザウイルス RNA サンプル

本研究では、H1N1 Narita 株、H1N1

Brisbane 株、H3N1 Uruguay 株、H5N1 Hyogo 株、H5N1 Kyoto 株を用いた。これらのウイルス RNA は、QIAamp UltraSens Virus Kit (Qiagen 社製) を用いて精製した。

4. RTPCR

インフルエンザウイルス RNA は TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV) (Takara 社製) を用いて増幅した。増幅に使用したビオチン修飾センス (AAGCAAAAGCAGGGG) およびアンチセンス (GGATGGTGAATGCCCCA) プライマーは、H1 から H16 までで比較的保存されていた領域を選択し、設計した。1 ng のサンプル RNA はキット付属の説明書に従い反応液を調製し、50°C30 分で逆転写反応させた後、94°C2 分で逆転写酵素を不活化した。続く PCR 反応は 94°C30 秒、55°C30 秒、72°C30 秒で 30 サイクル増幅させた。

5. マイクロプレートハイブリダイゼーション (MPH)

RTPCR で増幅した 0.5 µl のインフルエンザウイルスサンプルは、指定しない限り 5x SSC と 40%ホルムアミドを含むハイブリ溶液と混合し、プローブ固相化プレートと 37°C一晩反応させた。0.1% Tween20 を含む 5x SSC で 3 回洗浄し、アビジン HRP と 37°C1 時間反応させた。更に、0.1% Tween20 を含む 5x SSC で 3 回洗浄し、TMB で発色させ 1 N 硫酸で反応を停止させた。モデル 680 マイクロプレートリーダー (Biorad 社製) を用い、450 nm (参照波長: 650 nm) の吸光度を測定した。

C. 研究結果

1. 至適反応条件の検索

マイクロプレートハイブリダイゼーション (MPH) 法に用いるオリゴ DNA プローブの最適な鎖長を検証するために、H1 Narita 株を標的とした様々な鎖長 (25、40、50、および

60 塩基) のオリゴ DNA プローブを各 2 種類ずつ設計し、プレートに固相化した。反応の特異性を検証するために、H1 または H5 全般を検出するためのプローブも固相化した (図 2A)。一方、ハイブリダイゼーションに用いる 5x SSC に添加するホルムアミドの濃度を検証するために、0%から 50%ホルムアミドを用意しプローブと反応させた (図 2A)。

H1 Narita 株の RTPCR 産物を種々のプローブとハイブリさせた結果、50 塩基のプローブかつ、40%ホルムアミドの反応液の時に最も高い吸光度を示すことが明らかとなった (図 2B)。H5 Hyogo 株の RTPCR 産物を反応させた場合でも 40%ホルムアミドを含む 5x SSC 反応液が最適であることが明らかとなった (図 2C)。

2. プローブ特異性検証

RTPCR/マイクロプレートハイブリダイゼーション法の検出感度と特異性の検討を行った。10³から 10⁸コピーの H1 Narita 株 (nH1)、H1 Brisbane 株 (H1)、H5 Hyogo 株 (H5) RNA を鋳型とし RTPCR で増幅後、50mer の H1 Narita 株プローブと反応させ、吸光度を測定した (図 3)。H1 Narita 株 (nH1) の RTPCR 産物をハイブリさせた場合、10⁴ コピーのサンプルでもバックグラウンドよりもはるかに高い吸光度を示し、特異的に検出可能であった。一方で、H1 Brisbane 株 (H1)、H5 Hyogo 株 (H5) の RTPCR 産物をハイブリさせてもバックグラウンドレベルの吸光度しか得られなかった、このことから本研究で開発したオリゴ DNA プローブは、高感度・高特異性を有している可能性が示唆された。

D. 考察

本研究では、インフルエンザウイルス RNA をモデルとして、RTPCR 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た。H1 Narita 株の RTPCR 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。

E. 結論

安価な病原体網羅的検出システムに RTPCR/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。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし