

201033013B

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～平成22年度 総合研究報告書

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20年度～平成22年度 総合研究報告書

研究代表者 棚 林 清

平成23（2011）年3月

目 次

I. 総合研究報告書	
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----- 棚林 清	1
II. 平成 20 年度総括・分担研究報告書 -----	11
III. 平成 21 年度総括・分担研究報告書 -----	89
IV. 平成 22 年度総括・分担研究報告書 -----	163

I. 総合研究報告書

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、食用に供される野生動物を含めてウイルス疾病の実態調査を実施することも目的として以下の成果が得られた。

1. 家畜のウイルス性疾病の検査として、特に豚のウイルス性疾病につい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 20 年度と 22 年度に採材した 240 頭の豚肝臓や扁桃について 10 種類のウイルスを調査した。ブタサーコウイルス 2 型とブタパルボウイルスが検出されたが、E 型肝炎ウイルスを含む他の 8 種のウイルス遺伝子は検出されなかった。過去の報告や 2 年間の結果は類似し、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る。また、本マニュアルでは RNA および DNA ウイルスに適用可能でかつ、多数サンプルを処理でき今後ウイルス検査が必要になった場合は活用可能と考えられる。

2. 牛のウイルス性疾病検査のモデルとして牛白血病ウイルス (BLV) ゲノムの PCR による検出法の確立・簡略化と標準化を行うとともに、検出されたゲノムの解析を行いゲノム型と発症との関連性を解析した。検査所で発見された牛の腫瘍 214 検体中 204 検体(95.3%)で BLV 遺伝子が検出された。新たな耐熱性 DNA ポリメラーゼを用いた方法への改良と陽性対照 DNA を作出したことにより検査時間の大幅な短縮ならびに高感度化に成功した。本改良法が食肉衛生検査所で実施可能か試行したところ良好の成績であった。BLV *env* 遺伝子の RFLP 解析で国内 BLV は 7 群に分けられ II 型が多く (75%)、III 型では発症が遅れる可能性が分かった。また、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。

3. 高病原性鳥インフルエンザの検査について簡易キットを用いたスクリーニング検査のマニュアル案を実地検討し作成した。簡易キットを希望検査所にて試用し特段の非特異的反応等の問題はないことが分かった。さらに、リアルタイム PCR 法によるゲノム検出について 5 種類の WHO 推奨プロトコルを比較検討し M、HA(H5)、NA(N1)遺伝子を検出するプロトコル 2 が良好であることが分かった。ウイルス分離やゲノム検出のための検体輸送用培地の種類やそれらの培地におけるウイルスの安定性を調べ、市販品も含め冷蔵管理が重要であることが分かった。分離されたウイルスの詳細解析のための汎用性の高い全分節増幅可能なプライマー設計と方法を確立した。さらに症状が類似するニューカッスル病(ND)迅速検査法として RT-LAMP 法を開発し、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、実験感染鶏からのウイルス遺伝子検出も可能であることが明らかとなった。

4. 病原体を網羅的に検出・同定する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* が検出された。また、インフルエンザ各種亜型ウイルス株ゲノムとの反応性を検証し、亜型の型別もほぼ可能であることが分かった。さらに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。

5. 食肉に供される家畜におけるA群ロタウイルスのリスクを把握するために、家畜における本ウイルスの生態の解明と実際にと畜場に搬入された家畜における本ウイルスの感染状況を調査解析した。健康な牛及び豚より採取した糞便サンプル2146例及び169例について、A群ロタウイルスのVP4遺伝子検出をsemi-nested RT-PCR法で行い、それぞれ44例(2.1%)と84例(49.7%)から検出された。また、多様なタイプの遺伝子をもつ本ウイルスが常在化していることが明らかとなった。さらに頻りに遺伝子分節の組換え(リアソートメント)や遺伝子内組換え(リアレンジメント)を起こしていることも示された。さらに、2カ所のと畜場に搬入された健康な豚177例を対象にRT-PCR法で調査した結果、感染するのに十分な量を排泄している豚が9.6%で見出され、自然界で起きている感染と同様にウイルスの多様性と頻りにリアソートメントが明らかとなった。家畜で検出されたA群ロタウイルスには人や他の動物に病原性を示す遺伝子タイプも含まれており、感染源として直接的な人や動物へのリスクを示唆するとともに、多様性を広げるリアソートメントが頻りに起きていることから、病原ウイルス遺伝子の供給源として間接的なリスクも示唆された。A群ロタウイルスの多様性を把握するため、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)が確立されている。本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、野外サンプルに直接適応できるよう簡便法に改良を加え、検出率54.5%から81.8%と改善に成功した。今後、本法の疫学的調査への応用が期待できる。

6. 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。しかしながら、細菌

感染についての検査や病理組織学的検査は比較的良好に検査所等で実施されているが、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や経済的制約等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。今日我が国においては食肉衛生にかかわる特段のヒトに健康被害を起こすウイルス疾病はほとんど認められないものの、2004年には高病原性鳥インフルエンザ(HPAI)の養鶏場での発生に続き罹患鶏が食鳥処理場に搬入された事例が起こった。しかし、今後国内で食鳥食肉衛生検査が強化しなければならないようなウイルス疾病が発生した場合に備え、食鳥食肉衛生検査所等で実施

可能なウイルス検査について基盤的技術を向上させておく必要があると考えられる。本研究では、食肉食鳥検査とくにウイルス疾病の検査手法について現存の手法の利用可能なマニュアル作成や PCR 法等を用いるウイルスゲノム検出法の改良開発、新規手法の開発、検査所での試行による検証、さらには家畜や家畜以外の食用に供される動物のウイルス感染の実態調査等を通してさらなる食肉食鳥の安全確保のための検査体制整備のための技術的基盤や基礎的情報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検査法の検討：【20年度】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、豚の廃棄肝臓材料（120頭分）で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（PCV）と RNA ウイルスである E 型肝炎ウイルス（HEV）とした。【21年度】前年度に得られた豚の扁桃材料 120 頭分を用いて、実験条件の適性を 3 種の DNA ウイルスと 7 種の RNA ウイルスで調べ、他の調査報告と比較検討した。【22年度】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、新たに得られた豚 120 頭分の扁桃材料について 7 種の RNA ウイルスと、3 種の DNA ウイルスについて検出を試み一昨年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：【20年度】現在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（BLV）のゲノム検出を、食肉衛生検査所の協力で牛白血病（疑い）の腫瘍の提供を受け実

施した。【21年度】継続して検体収集を行い検体から PCR による BLV-*env* 遺伝子検出と分子疫学的解析ならびに遺伝子型と発症年齢との関係を解析した。【22年度】OIE のマニュアルに準拠した PCR 法による 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. 高病原性鳥インフルエンザの検査手法の検討：【20年度】HPAI 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、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。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を実施した。【21年度】検体輸送のための輸送用培地の検討を行った。また、ウイルスが分離された場合の詳細解析のための簡易ゲノム増幅法および亜型型別法の開発を行った。さらに、鑑別診断が必要となるニューカッスル病ウイルス（NDV）の RT-LAMP 法による検出方法を検討した。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を継続して実施した。【22年度】NDV 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、実験感染鶏の気管およびクロア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を検討した。また、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を継続して実施した。

4. 網羅的病原体検出手法の応用と改良：【20年度】 試作病原体検出マイクロアレイ法を用いて、食肉処理場および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。**【21年度】** 開発した病原体検出マイクロアレイでのH5N1亜型HPAI起因ウイルスをはじめとする野鳥由来株、ヒト由来株等の各種亜型インフルエンザ A ウイルス亜型の型別が可能か検証した。**【22年度】** 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. A群ロタウイルスの感染状況調査と遺伝子解析法の開発：【20年度】 牛の正常便で、VP4 遺伝子を対象とした semi-nested RT-PCR 法を行い、陽性例については、G 及び P 遺伝子型を決定した。さらに、陽性サンプルについては分離を行い、11 分節遺伝子 ORF の塩基配列を解読し進化系統学的解析を行い、関連性について解析を行った。

【21年度】 と畜場及び肥育農家より、健康豚の糞便 169 例でロタウイルス VP4 遺伝子を対象に Nested RT-PCR 法を行った。陽性例については、P、G 遺伝子型を決定した。**【22年度】** 食肉衛生検査所に搬入された健康豚の糞便について RT-PCR 法による、A 群ロタウイルス VP4 遺伝子の検出と P 及び G 遺伝子型を決定した。

【20-22年度】 部分的領域を用いた解析法（簡便法）を確立するために、各種ロタウイルスの 9 分節（VP1~4、6、7 および NSP1~3 遺伝子）の ORF から、RCWG 法とその解析結果が一致し、かつ一度の PCR 法で増幅可能な領域を選定した。残りの 2 遺伝子分節（NSP4 および NSP5/6）については、RCWG 法に従い全 ORF を解析対象とした。これらの領域を用いた簡便法と RCWG 法

による相同性および系統学的解析結果を比較し、簡便法による解析の精度を検証した。本法の実用化を図るため、保存されていたロタウイルス遺伝子陽性の牛糞便乳剤 11 例に直接的に応用と感度の改善を図った。

6. 家畜以外の食用に供される動物のウイルス感染の実態調査：【20年度】 食用として利用が試みられているエゾシカについて 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：【20年度】 食肉処理場の 120 頭分のサンプルを採取した。これらの廃棄理由は、寄生虫肝炎、肝炎、間質性肝炎、肝包膜炎などであった。HEV 遺伝子は検出できなかったが、同一乳剤抽出核酸の“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。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。

【21年度】 各種の理由で肝臓廃棄された個体 120 頭の扁桃検体について multiplex PCR 法で調査した結果、9 種のウイルス遺伝子のうち、PCV は 84%(101/120)から、ブタパルボウイルス(PSV)は 57%(68/120)から検出された。他の 7 種は検出されなかった。また、単独で行った HEV 遺伝子も検出されなかった。PCV と PPV 遺伝子は、同個体から検出される頻度が高かった。また、廃棄理由とウイルス遺伝子の検出との関係を統計的に解析した結果、PCV 陽性個体は寄生虫肝炎として廃棄された個体が有意に多かったがその他の肝臓廃棄理由との関連は認められなかった。PPV 遺伝子はどの肝臓廃棄理由とも関連性は認められなかった。**【22年度】** 2008 年及び 2010 年両年に採材された各 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 は過去の報告同様に多様な配列が見られ、Takahagi らの遺伝子型分類による PCV2-2E 型に近縁なものが多く (16/22) 認められた。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:【20 年度】牛白血病 (疑い) の廃棄腫瘍 43 検体中 41 検体 (95.3%) で BLV-*env* の PCR 陽性が認められた。1 検体で塩基配列を決定し、Blast 解析で上位に挙げられた日本分離株およびウルグ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。また、日本分離株では *Bam*HI 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ることが分かった。【21 年度】廃棄された腫瘍組織 50 検体から得られた BLV-*env* 遺伝子 PCR 増幅 DNA 断片の系統進化解析の結果、国内外の BLV は大きく 6 群に分けられ、大部分 (49/50) は、D 群に分類され、このうち 2 系統のウイルスが我が国で流行していることがわかった。1 検体は C 群に属しており新たなウイルス株の侵入も引き続き起きている可能性が示された。廃棄された腫瘍組織 138 検体から、*env* 遺伝子 PCR が 129 検体 (93.5%) で陽性となり 4 種の制限酵素による RFLP 解析によって 6 群に分類され、発症年齢との関連を解析した結果、全体の 9.1% を占める型のウイルスに感染した個体では発症が遅れる可能性が示された。【22 年度】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、DNA 抽出ステップを簡略でき、検出感度を 5 倍にできた。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。4 か所の食肉衛生検査所の協力で改良 BLV-*env* 検出 PCR を試行し、牛白血病 (疑い) 腫瘍の 93 頭中 85 頭 (91.4%) が PCR 陽性となり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 遺伝子を解読しアミノ酸配列を比較したところ、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、野生型 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 ($p=0.00035$)。

3. 高病原性鳥インフルエンザの検査手法の検討:【20 年度】食鳥処理場および検査所の協力で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、食鳥検査所での HPAI 検査のマニュアル案を作成した。確認検査のうち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 種のプロトコールの感度と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。

【21 年度】HPAI に症状が類似するニューカッスル病の迅速検査法として RT-RAMP 法の開発を試みた。NP と M 遺伝子をターゲットとするプライマーを設計した。NP 遺伝子では NDV の Class I、Class II とともに効率よくゲノムの検出が可能であったが、M 遺伝子では、Class II ウイルスの検出効率が悪かった。また、検体輸送用培地について生理食塩水、組織培養用培地および市販のウイルス検査用輸送培地に H5N1 亜型ウイルスを加えその安定性を調べたところ 4°C で 7 日まで

は感染価の低下は認められなかったが、20℃ではやや低下した。ゲノム検出では差がなかった。

さらに、A型インフルエンザウイルス8分節の全長を増幅できる1組のプライマー対を作成することができ、HAおよびNA遺伝子DNA断片を直接塩基配列決定し簡便に亜型を決定することができた。

【22年度】NDVゲノム検出RT-LAMP法について継続して検証し、新たにGenotype VIIおよびVIIIのNDVの検出が可能であることが確認された。さらに、実験感染鶏で感染後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NDV遺伝子の検出は可能であった。

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℃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た。

インフルエンザ簡易キットを全国の自治体検査所で試用したところ非特異反応等の問題点はなかった。

4. 網羅的病原体検出手法の応用と改良：【20年度】食肉処理場で廃棄された肝臓、脾臓、その他臓器から核酸を抽出し、断片化、蛍光標識後病原体検出用マイクロアレイと反応させたところ放線菌(*Streptomyces coelicolor*)と化膿連鎖球菌のexotoxin type C(*S. pyogenes* streptococcal pyrogenic exotoxin type C (*speC*) gene)が一部の検体から検出され、放線菌については通常PCR法でも確認された。【21年度】A型インフルエンザウイルスのヒト由来株や鳥類由来株およびB型株

9株についてゲノム核酸を抽出し、標識後これまでに開発したマイクロアレイに反応させたところ、すべてインフルエンザAまたはBウイルスと判定された。野生カモ由来(H1N3)株を除いてそれぞれの亜型特異的にシグナルが検出同定できた。【22年度】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5x SSCが最適であることが明らかとなりインフルエンザウイルスゲノム(Narita株)の10⁴コピーでも検出することができた。

5. A群ロタウイルスの感染状況調査と遺伝子解析法の開発：【20年度】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。【21年度】健康牛から分離されたロタウイルス7株の全分節遺伝子を解析した結果、各分節が頻繁に組換えを起こし、多様性を獲得していることが明らかとなった。Nested RT-PCR法により健康な豚169例から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。また、前年度、分離ウイルスを使って開発した簡便な全遺伝子解析法を牛糞便中に存在するウイルスに応用したところ、11例中4例のみで解析が可能であった。【22年度】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、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。

6. 家畜以外の食用に供される動物のウイルス感染の実態調査：【20年度】捕獲されたエゾシカ 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 HEV_{swJB-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

食肉衛生検査において異常が認められた場合は必要に応じて精密検査が行われるがそのうち微生物検査で細菌学的検査はや病理組織学的検査は比較的实施されているがウイルス学的検査特にウイルス分離・同定の手技は煩雑で時間を要することから検査所での実施はほとんど行われていない。病原体のゲノムを増幅検出する PCR 法は短時間に病原体の存在を感度良く検出するのに有効である。本研究で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

をとって PCR による検出法の検体の乳剤化、核酸抽出、cDNA 合成、PCR 反応に至る条件を検討しマニュアル化して改良してきた（平成 22 年度分担研究報告書に添付）。作成したマニュアルの有効性を検証するために実際の豚材料について 10 種類のウイルスの (RT)・PCR 検査を実施し 2008 年と 2010 年の検体の検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である PCV2 や PPV の感染状況に両検体群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。本マニュアルは (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 の遺伝型の判別にも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。しかしながら、調査したウイルスの中で、人獣共通感染症病原体である E 型肝炎ウイルスについては過去報告では、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、240 頭の本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 PCR 法による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。PCR 検査においてはまず検体からのウイルス核酸抽出を行い、精製核酸を鋳型に反応をする必要があるが、本研究で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することができた。さらに、反応が正常に行われたかをモニターするための陽性対照が必要となる。本研究では陽性検体での 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、現在 BLV 感染は非常に効率であり、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、病変のない対象牛での BLV の PCR 検査結果と発症との関係の判定は慎重にしなければならないと考えられる。

本研究ではさらに、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 番アミノ酸に違い (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ることが示唆された。env 遺伝子の RFLP 解析については 21 年度の結果を精査し直し I～VII 型に分類されることが分かつた。そのうち II 型が最も多かつた。また、III 型で発症が遅れる傾向にあると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 (HPAI) は、2003 年以降アジアを中心に発生が拡大し国内での発生も起きており、食鳥処理場にも感染鶏が搬入された事例がある。そのような場合は、インフルエンザ簡易検査キットによる一次検査が行われる。本研究において気管スワブ等の採取法、キットによる検査法に至る一連の手法について写真等を加えたマニュアル案を作成できたことは検査所において有用と考えられる (平成 20 年度分担報告書)。HPAI が疑われた場合は、さらに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。その検体輸送用培地として市販品を含めて 3 種類の培地中でのウイル

スの生残性を調べた結果、冷蔵 (4℃) ではな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つたが、室温 (20℃) では明らかな感染価の減少が見られた。また、採取する検体がクロ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つた。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温度管理が重要であると考えられる。なお、インフルエンザ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つたが、本研究とは別に有効期限を過ぎたキットを誤用し擬陽性反応が見られた事例があつたことは適切なキットの使用が重要である。

HPAI と同様の症状を示すニューカッスル病を鑑別するために本研究で新たに RT-LAMP を開発した。幅広い遺伝子型の NDV 検出に有効である。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。しかし、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ると考えられ検体は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と考えられるが、反応が安定しないことなどから診断現場で実際に使用できるようさらに改良する必要があると考えられた。

マイクロアレイ技術を応用した網羅的病原体ゲノム検出を開発し、実際の廃棄臓器に試用したが特段の病原体は検出されなかつた。しかし、本マイクロアレイではインフルエンザウイルスの型、亜型を判別でき有用性も証明された。さらに検出感度等を含め改良が必要と思われる。本法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設計した同一のプローブを用いた簡易廉価のマイクロプレートハイブリダイゼーション法による病原体検出システムの構築を試み、インフルエンザウイルスゲノムを検出できた。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。

食用に供される健康な牛及び豚において、下痢の主な原因の一つであるA群ロタウイルスの糞便からのゲノム検出を実施したところ常在性が明らかとなった。特に豚では49.7%と半数から本ウイルスが検出された。さらに、これら遺伝子の解析により、頻繁に11分節遺伝子のリアソートメントを起こしており、このような機構を通じて自然界で多様性を広げていることが示唆された。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、と畜場に搬入された豚における本ウイルスの調査を実施した。その結果、9.6%と約1割の豚が感染量として十分なロタウイルスを排泄していることが明らかとなった。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ことも確認された。以上より、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人へのリスクとなることが示唆された。

近年、A群ロタウイルスの疫学的研究には、全11分節のゲノムを解析する必要があると考えられているが、全ゲノムを解析することは煩雑であり、簡便な方法が求められている。初年度に開発した簡便法を2年目に直接糞便サンプルに応用し、さらに3年目に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、大幅に改善した結果を得ることが出来た。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。本研究で開発した簡便法により、自然界におけるロタウイルスの遺伝的多様性について明らかにすることができると考えられる。

近年家畜以外の動物を食用にする試みが行われていることから、捕獲されたエゾシカにおけるE型肝炎ウイルスゲノムの検出を試み320頭中1頭の血清でGenotype 3に属するウイルスゲノムが検出された。このことは今後、食用に供されるとなる家畜以外の衛生検査についても考慮する

必要があると考えられる。

E. 結論

1. 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」を策定し有効性を検証した。2年間にわたり食肉処理場で豚の検体を採材し、10種の主要な豚ウイルスの存在を調査した結果、PCV2とPPVが検出され、他の8種のウイルス遺伝子は検出されなかった。2年間の結果は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た。本マニュアルではRNAおよびDNAウイルスに適用可能でかつ、多数サンプルを処理でき今後ウイルス検査が必要になった場合は活用可能と考えられる。また、検出ウイルス遺伝子の解析によりPCV2には多様性が見られたのに対し、PPVには多様性が見られないことも明らかとなった。PCV2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が可能であった。

2. 牛におけるPCR検査のモデルとして、牛白血病ウイルス(BLV)検出法の改良を検討した。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した改良法で、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、検査機器等が異なることなど各検査室での微調整は必要と考えられるが、過去の検出率と同等の成績が得られ有用であることがわかった。

また、検出されたBLV *env*遺伝子のRFLP解析では21年度の結果を精査したところ、国内BLVは7群に分けられII型が多く(75%)、III型では発症が遅れる可能性がわかった。また、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示唆された。

3. 高病原性鳥インフルエンザの検査について簡易キットを用いたスクリーニング検査のマニュアル案を実地検討し作成した。簡易キットを希望検査所にて試用し特段の非特異的反応等の問題はなかった。さらに、リアルタイム PCR 法によるゲノム検出について 5 種類の WHO 推奨プロトコルを比較検討し M、HA(H5)、NA(N1) 遺伝子を検出するプロトコル 2 が良好であることがわかった。検体輸送用培地の種類や輸送温度におけるウイルスの安定性を調べ、市販品も含め冷蔵管理が重要であることがわかった。さらに、分離されたウイルスの詳細解析のための汎用性の高い全分節増幅可能なプライマー設計と方法を確立した。症状が類似するニューカッスル病の迅速検査法として RT-LAMP 法を開発し、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、実験感染鶏からのウイルス遺伝子検出も可能であることが明らかとなった。

4. 病原体を網羅的に検出同定する試作病原体検出用マイクロアレイを用いて牛および豚廃棄臓器を検索した結果、一部の検体から放線菌ゲノムや化膿連鎖球菌 *speC* が検出された。また、インフルエンザ各種亜型ウイルス株ゲノムとの反応性を検証し、亜型の型別もほぼ可能であることが分かった。さらに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。

5. 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。

6. 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。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

各年度の研究成果の刊行に関する一覧表参照

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

Ⅱ. 平成20年度研究報告書

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推奨プロトコルを比較検討しM、HA(H5)、NA(N1)遺伝子を検出するプロトコル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を開発を行い、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によるウシ白血球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グ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*Bam*HI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。

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、担当者と採材の仕方、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实

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HEV_{sw}JB-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妥当と考えられた。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の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 推奨プロトコール 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にから分離される 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、牛白血病の検査は、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 法のプロトコー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 2008 年 10 月

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

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