

## 豚に感染するウイルスの検出法に関する研究

分担研究者 池田 秀利 日本獣医生命科学大学 教授

研究要旨：食肉・食鳥処理場で食肉中のウイルスを検査するには簡便で迅速な方法が望ましい。一般的なウイルス検査は病原体である感染性ウイルスの検出と分析が重要であるが、感染性ウイルスの検出分離には長時間かかるため、本研究ではPCR法を用いてウイルス遺伝子を検出する手技を工夫し、マニュアル作成などを通して多くの担当者が作業しやすくすることを目指している。昨年度までに条件検討してきた、臓器材料からウイルス核酸を抽出し、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頭分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た。結果はHEV遺伝子が0%(0/120)、ブタサーコウイルスが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。

### A. 研究目的

食肉・食鳥処理場では現在望診、触診等を基本とした食肉検査を行っているが、さらに色々な病原体について精密な検査の実施を考える必要がある。本研究の目的は全国の食肉・食鳥処理場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。

食肉用動物のウイルス感染症は、必ずしも肉眼的な病変を伴わない場合も多い。よって、解体処理された食肉の中にウイルス病原体の存在を証明する検査法が必要である。一般的なウイルス学検査法で感染性ウイルス検出を行うには、煩雑な手技と幾つかの設備機器が必要で、時間もかかる。従って、我々は食肉・食鳥処理場で実行可能なウイルス学的検査としてPCR検査法を用いることにした。これまで安定したPCR検査結果を得るために、市販の機器を利用した検査システムの構築を考え、臓器を乳剤

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てきた。今年度は過去の条件検討を踏まえ、実際に食肉処理場で得られた臓器材料について、日本の養豚に常在しているRNAウイルスであるE型肝炎ウイルスとDNAウイルスであるサーコウイルスの遺伝子検出を試みた。

### B. 研究方法

#### 1) 臓器材料の採取

某県の協力によって、ある食肉処理場でブタ臓器の採材を3回行った。

採材は肝臓廃棄となった個体の肝臓、血液（凝固血液）、扁桃を採取し、約24時間氷冷保存して運搬した後、乳剤化し、-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の条件検討データを基に、小遠心管にブタ肝臓100mgと

細胞培養用培地1mlと細胞破碎用ビーズを加え、Tomy社の臓器破碎装置で激しく振盪する方法を採った。ビーズは今回はジルコニアビーズを用いた。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、核酸抽出はGC series Magtration-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、通常の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以前確認してある。

## 3) ウイルス核酸の検出

今回の食肉処理場のサンプルについては、RNAウイルスであるE型肝炎ウイルス(HEV)、DNAウイルスのブタサーコウイルス(PCV)について検出を試みた。両ウイルスとも一般的な養豚農場に広く蔓延していることが知られている。

RNAウイルスについては、invitrogenのSuperscript 1<sup>st</sup>-strand Synthesis kitを用いてランダムプライマーでcDNAを合成した。

ウイルス核酸の検出にはPCR法を用いたが、DNAウイルスとRNAウイルスとも、上述kitでcDNAにした同一サンプルを鋳型DNAとして反応を行った。

HEVのPCRプライマーは、多様なHEV株を検出するmixed primers (Nakai et al. 2006)を用いた。PCVのPCRプライマーは、1型と2型共に増幅できるプライマーを用いた(Hamel et al. 1998)。

## C. 研究結果

採材は3回に分けて行い、第一回目はそ

の食肉処理場の総解体個体298頭中34頭、第2回目は402頭中42頭、第3回目は394頭中44頭から採材し、合計1094頭から120頭分のサンプルを採取した(表1)。

120頭の肝臓が廃棄になった理由は、寄生虫肝炎(47)、肝炎(31)、間質性肝炎(16)、肝包膜炎(13)、その他(12)、肝硬変(1)、退色肝(1)であった(表2)。

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に至る実験手技の流れは図1に示した。

### 1) E型肝炎ウイルス遺伝子の検出率

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(表1)。

自動核酸抽出機を用いずにフェノール系核酸抽出法でも同サンプルについて試験を行ったが、同様に120頭全頭からHEV遺伝子は検出できなかった。

### 2) ブタサーコウイルス遺伝子の検出率

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、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(表1)。

肝臓廃棄理由とPCV遺伝子陽性との関係を見てみると、寄生虫肝炎(36%[17/47])と肝炎(42%[13/31])で廃棄された肝臓からPCV遺伝子検出率が高い傾向があったが(表2)、統計的な解析では廃棄理由とPCV遺伝子の存在は関係していないと考えられた。

## D. 考察

昨年度までに迅速で簡便なPCR法の条件設定を行い、その手技の妥当性を検証する意味で、今年度は実際に食肉処理場でサンプリングして検査した。

E型肝炎ウイルスとブタサーコウウイルスの検出を試みた。この2ウイルスはいずれも日本の一般養豚場に常在するウイルスであり、RT-PCR法の妥当性を検証するには適切だと考えたからであるが、E型肝炎ウイルスは120頭すべてが陰性であった。岡本らは日本の肉屋で売られているブタレバーについてE型肝炎ウイルスを検査し、1.9% (7/363)が陽性だったと報告している。一般養豚場では2-3ヶ月令でウイルス血症になり、出荷時期である6ヶ月令ではウイルス血症のブタが少なくなると考えられている。従って、我々の検査結果が検査手法の不具合によるとは言えないと考える。

ブタサーコウウイルスのうち、2型が世界的に蔓延し、それは豚皮膚炎腎症症候群、豚呼吸器複合感染症、繁殖障害など複合感染症の主要病原体と考えられている。最近PCV2が関与する疾病や症候群を総称して豚サーコウウイルス病と呼ばれ、莫大な被害をもたらしていると考えられている。今回の検査で得られた32%(38/120)の陽性率は妥当な値であると思われる。

今後はさらに種々のウイルスを検出するPCR系を加えて、使いやすいマニュアルなど作成する計画である。

#### E. 結論

昨年ま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、今年度は食

肉処理場で採材した120頭分の肝臓について、E型肝炎ウイルスとブタサーコウウイルスの検出を試みた。HEV遺伝子は120頭全頭から検出できなかったが、ブタサーコウウイルスは32%(38/120)陽性であった。この野外材料の検査から、今までの手法の妥当性をほぼ確認できた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 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.

##### 2. 学会発表

1) 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

#### 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 某食肉処理場におけるブタ肝臓中のE型肝炎ウイルス遺伝子とブタサーコウイルス遺伝子の検出率。

採材	総解体頭数	採材頭数	HEV遺伝子検出率	PCV遺伝子検出率
第1回	298	34	0% (0/34)	26% (9/34)
第2回	402	42	0% (0/42)	48% (20/42)
第3回	394	44	0% (0/44)	20% (9/44)
合計	1094	120	0% (0/120)	32% (38/120)

表2 廃棄理由別集計 (120頭中)

廃棄理由	PCV1+2(+)陽性率
寄生虫肝炎	17/47=36%
肝炎	13/31=42%
間質性肝炎	3/16=19%
肝包膜炎	2/13=15%
その他	3/12=25%
肝硬変	0/1
退色肝	1/1
合計	38/120=32%

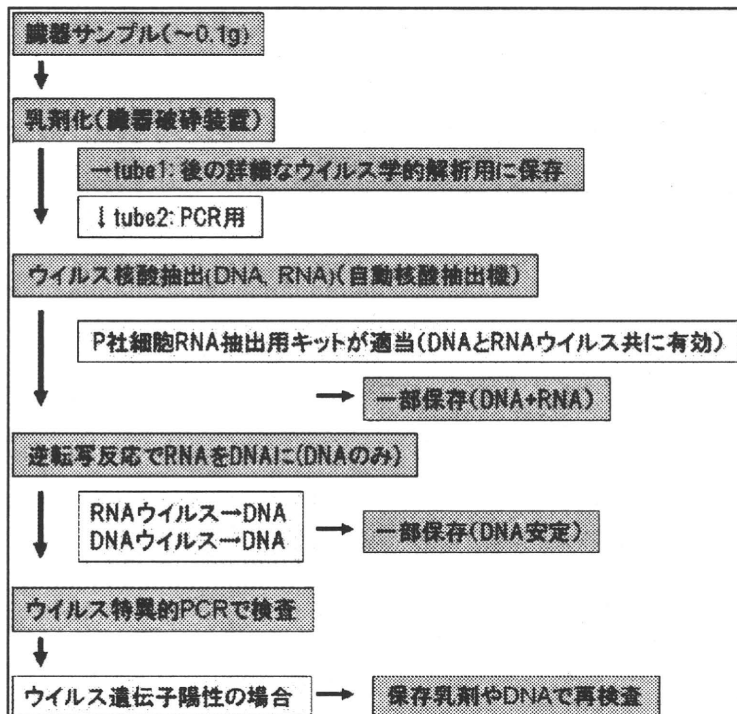


表3 肝臓廃棄された理由とその肝臓中PCV遺伝子の存在との関係

		PCV-PCR		計	$\chi^2$ 値	P値 <sup>a</sup>	
		+	-				
寄生虫肝炎	+	17	30	47	0.724	0.395	有意差なし
	-	21	52	73			
肝炎	+	13	18	31	2.037	0.154	有意差なし
	-	25	64	89			
間質性肝炎	+	3	13	16	1.423	0.185	有意差なし
	-	35	69	104			
肝包膜炎	+	2	11	13	1.786	0.153	有意差なし
	-	36	71	107			
その他	+	3	9	12	0.274	0.435	有意差なし
	-	35	73	108			

<sup>a</sup>イエーツの補正P値、又はフィッシャーの直接確率P値(\*)

図1 臓器サンプルからウイルス遺伝子検出までの流れ。



## 牛白血病あるいは腫瘍により廃棄された検体からの 牛白血病ウイルス遺伝子の検出

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：全身性の腫瘍を呈するウシでは、牛白血病が疑われる。1998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正確な病因診断が必要である。そこで本研究では、食肉衛生検査所において廃棄された牛白血病検体あるいは牛白血病を疑われる検体から PCR を用いて BLV 遺伝子を検出することを試みた。その結果、茨城県、神奈川県、群馬県、静岡県および栃木県で得られた 43 検体のうち 41 検体 (95.3%) において BLV 遺伝子が検出された。

### 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型および散发型に分類されている。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、ヒト成人型 T 細胞白血病ウイルスに近縁であるが、ヒトへの感染はない。しかしながら、発症牛の腫瘍は全身に及び、食肉検査においては全廃棄処分となることから、経済的損失が大きい感染症の一つとされる。そこで本研究では、食肉衛生検査におけるウイルス検査のモデル疾病として本疾病の実況を把握するために、食

肉衛生検査所において牛白血病により、あるいは牛白血病が疑われ廃棄された検体から PCR を用いて BLV 遺伝子を検出することを試みた。

### B. 研究方法

1 腫瘍組織：2008 年 4～2009 年 1 月、本研究への材料提供協力食肉衛生検査所（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、静岡県東部食肉衛生検査所、栃木県県北食肉衛生検査所ならびに横浜市食肉衛生検査所）において牛白血病により、あるいは牛白血病が疑われ廃棄された腫瘍組織 43 検体を用いた（表 1）。

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  $\mu$ L の添付 buffer を用いて溶出し、20-300 ng/ $\mu$ L の DNA 溶液を得た。

3. PCR : OIE の診断マニュアルに準じ、gp51 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  $\mu$ L、5 X GoTaq Flexi buffer (Promega) 10 $\mu$ L、10 mM dNTPs mix 4  $\mu$ L、10 pmol/ $\mu$ L プライマー-OBLV1A (5'-CTTTGTGTGCCAAGTCTCCCAGATAC A-3') および OBLV6A (5'-CCAACATATAGC ACAGTCTGGGAAGGC-3') 各 2  $\mu$ L、DNA 溶液 5 $\mu$ L を混和し、最後に 25 mM MgCl<sub>2</sub> 4 $\mu$ L および 5 units/ $\mu$ L GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega) 0.25 $\mu$ 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. RFLP 解析 : PCR 産物を *Bam*HI で消化し、198 塩基および 242 塩基に切断されることを確認した。

5. 塩基配列の決定 : PCR 産物を OBLV1A、OBLV6A、OBLV3 (5'-CTGTAAATGGC TATCCTAAGATCTACT GGC-3') および OBLV5 (5'-GACAGAGGGAACCCAGTC ACTGTTCAACTG-3') プライマーを用いたダイレクトシーケンシングに供し、塩基配列を決定した。

### C. 研究結果

1. 腫瘍材料からの BLV 遺伝子の検出 : 調べた腫瘍計 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 (表 1)。大部分の国内分離株は標的とする 440 塩基内に *Bam*HI 切断部位を有することから、各々の増幅産物を *Bam*HI で消化した。その結果、いずれも 200 および 250 塩基付近にバンドを生じたことから、増幅産物は BLV 遺伝子に由来するものと考えられた (図 1)。

2. gp51 遺伝子塩基配列の比較 : 栃木県の検体から得られた TO-29 の塩基配列を決定し、プライマー部分を除いた 386 塩基を 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。図 2 に示すように、JPEH-1 および 2 とは 1 塩基、JPMI-1、JPAI-1 および JPKA-2 とは 2 塩基、JPMI-3、JPKA-1 および JPAI-2 とは 3 塩基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。

### D. 考察

牛白血病により、あるいは牛白血病が疑われ廃棄されたウシの腫瘍組織 43 検体中 41 検体 (95.3%) に BLV 遺伝子が認められた。内訳は、ホルスタイン種 37 検体中 36 検体、肉用 (黒毛和種、交雑種) 6 検体中 5 検体であった。また、遺伝子が検出された部位は、リンパ節 13 検体、心臓 12 検体、胃 7 検体、腎臓 3 検体、その他が 6 検体であった。地方病性牛白血病による腫瘍はリンパ節に最も好発し、次いで、心臓、胃、子宮とされている。今回の遺伝子検出部位は、腫瘍好発部位とよく一致していた。

すべての PCR 産物は *Bam*HI で約 200/250 塩基の断片に切断された。TO-29 の

塩基配列を決定したところ、*Bam*HI 認識配列が確認された。この配列は国内分離株ではよく保存されていることから、簡易同定として *Bam*HI による RFLP 解析が有用と考えられる。一方、国内分離株間には塩基多型性も認められた。今後、系統進化解析を行って BLV の浸潤経過を明らかにする予定である。

今回供試した検体の 95%以上から BLV 遺伝子が検出されたことから、ウシの全身性腫瘍の原因の大部分は BLV 感染に起因するものと考えられた。ウイルス遺伝子が検出されなかった 2 検体については、異なる部位の腫瘍を検査する必要がある。また、OIE の診断マニュアルでは OBLV3/OBLV5 プライマー対を用いた nested PCR が記載されており、これも実施する必要がある。

今回、核酸の抽出には FUJIFILM のキットを使用した。より一般的な抽出キットでは、出発材料を多くする必要があるかもしれない。

## E. 結論

牛白血病により、あるいは牛白血病が疑われ廃棄されたウシの腫瘍組織 43 検体中 41 検体 (95.3%)において BLV 遺伝子が検出された。したがって、ウシの全身性腫瘍の大部分は BLV 感染による地方病性牛白血病に起因するということが病因学的に証明された。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Tomiyama, D., Inoue, E., Osawa, Y., and Okazaki, K: Serological evidence of infection with hepatitis E virus among wild Yezo-deer, *Cervus nippon yezoensis*, in Hokkaido, Japan J. Viral Hepat. (in press)

### 2. 学会発表

1) 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 岡山市 2008 年 10 月

2) 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

## 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. 牛白血病と診断あるいは牛白血病が疑われ廃棄された  
腫瘍組織からの BLV 遺伝子の検出

食肉衛生検査所	総検体数	供試検体数	BLV 遺伝子陽性数 (%)
茨城県県西	18	13	13 (100)
県北	7	5	5 (100)
群馬県	3	3	2 (66.7)
静岡県東部	5	5	5 (100)
栃木県県北	36	14	13 (92.9)
横浜市	3	3	3 (100)
計	72	43	41 (95.3)

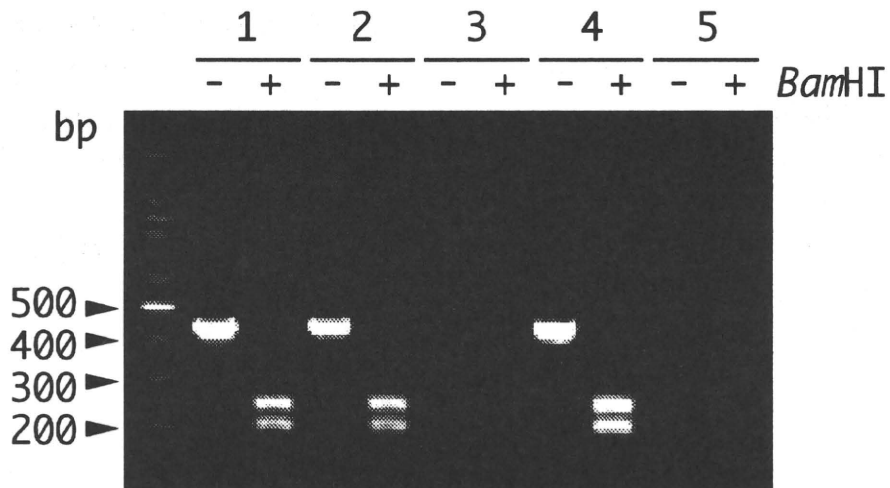


図 1. PCR による BLV 遺伝子の増幅と RFLP 解析. 腫瘍組織由来 DNA を BLVgp51 遺伝子を標的とする PCR に供した。その産物をそのまま (-) あるいは *Bam*HI 処理後 (+) 2%アガロースゲル電気泳動に供した。レーン 1, IB-1; 2, SH-10; 3, GU-19; 4, TO-29; 5, 精製水。左端は DNA サイズマーカー。

```

TO-29 1 CCTGGACTCTGAAATGGCTATCCTAAGATCTACTGGCCCCCCCCACAAGGGGGGGCCGGTTTGAGCCAGGGCCATGGTCACATATGATTGCGAGCCCCGATGCCCTTATGTTTTGGG 120
JPEH-2 .....
JPEH-1 .....
JPMI-1 .....
JPMI-3 .....
JPKA-2 .....
JPKA-1 .....
JPAI-1 .....
JPAI-2 ..C...T.....
Uru33 .....

TO-29 121 CAGATCGCTTCGACTGCCCCACTGGGACAATGCCTCCAGGCCGATCAAGGATCCCTTTATGTCAATCATCAGATTTTATTCCTGCATCTCAACAATGTCATGGAATTTTCACTTTAA 240
JPEH-2 .....
JPEH-1 .....
JPMI-1 .....
JPMI-3 .....
JPKA-2 .....
JPKA-1 .....
JPAI-1 .....
JPAI-2 ..G.....G.....
Uru33 .....

TO-29 241 CCTGGGAGATATGGGATATGATCCCTGATCACCTTTCTTTACATAAAGTCCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTCCCAAGTTGAACAGTGAAGTGGTCCCTCTGTGATCATGGG 360
JPEH-2 .....
JPEH-1 .....
JPMI-1 .....
JPMI-3 .....
JPKA-2 .....
JPKA-1 .....
JPAI-1 .....
JPAI-2 .....
Uru33 .....

O-29 361 CCCTGCTTTTAAATCAAACAGCACGG 386
JPEH-2 .....
JPEH-1 .....
JPMI-1 .....
JPMI-3 .....
JPKA-2 .....
JPKA-1 .....
JPAI-1 .....
JPAI-2 .....
Uru33 .....

```

図2. PCR産物の塩基配列と国内分離株ならびにウルグアイ分離株との比較。上段はTO-29の塩基配列を示す。JPEHは愛媛県分離株、JPMIは宮城県分離株、JPKAは北海道分離株、JPAIは愛知県分離株、Uruはウルグアイ分離株を示す。□は*Bam*HI認識配列を示す。

## 鳥インフルエンザの検査に関する研究

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：鳥インフルエンザの検査について食鳥衛生検査所でも実施可能な鳥類由来ウイルスも検出できる市販ヒト用簡易診断キットでの有用性の評価、これまでに開発された LAMP 法や RT-PCR 法が検査所で実施可能かを検査所の協力を得て検証するとともに改良を行い、具体的な検査マニュアルの作成を目標として、今年度は検査の第一段階である検体採取について実地での検討を行い、検体採取マニュアル案を作成した。

### A. 研究目的

本研究では鳥インフルエンザの検査について食肉衛生検査所でも実施可能な検査マニュアルを作成することを目的として、2004 年高病原性鳥インフルエンザ発生時に作成された暫定的検査マニュアルの、検査所で利用可能な検査マニュアルの改正を検査所との協議しつつ作成する。材料採取法や市販キットの取り扱い等の評価を実施するとともに、これまでの研究で開発された LAMP 法や RT-PCR 法が検査所で実施可能かを検証する。今年度は材料採取法について検討する。

### B. 研究方法

鳥インフルエンザの検査について食肉検査所検査所でも実施可能な鳥類由来ウイルスも検出できる市販ヒト用簡易診断キットでの取り扱い等に関する評価を行うために、

協力が得られた食鳥処理場の現地視察を行うとともに、検査所担当の協力を得て実際のニワトリを用いての検体採取法の検討を行なった。

### C. 研究結果

平成 16 年 3 月 12 日付けで厚生労働省から各都道府県及び保健所設置市に対して、鶏が食鳥処理場へ搬入された後に、高率に死亡する等、鳥インフルエンザが疑われる場合は、現場で簡易検査キットによるスクリーニング検査を実施するよう通知がされている。そのスクリーニング検査の流れは別紙 1 のごとくであるが、実際の簡易検査に際して具体的なマニュアルは存在せず、現場ではその必要性が高まっている。とくに簡易キットでの検査及びその後のウイルス分離、PCR 検査のための検体採取法は検査結果の信頼性に直接影響することから、

食鳥処理場における実施に即したマニュアルを作成することは極めて重要と考えられる。そこで本年度は、茨城県の食鳥処理場を訪問し、食肉衛生検査所の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、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(別紙2)。

#### D. 考察

作成した鳥インフルエンザ検査のための検体採取法マニュアル案の中で、とくに気管スワブ採取に関しては自治体によって異なる手法が用いられている可能性が考えられた。すなわち、気管を切開し、直接綿棒を気管下部に挿入して拭い液を採取する方法や、口腔から直接気管口に綿棒を挿入し、気管上部の拭い液を採取する方法などである。前者は簡易キット用検体とウイルス分離もしくはPCR検査用検体を異なる場所からそれぞれ採取が可能であるという利点があるが、後者は気管上部の同一部分から複数回採取することになる。一方、前者は1個体ごとに頸部の解剖が必要であり、後者はその必要はなく、周囲の汚染の程度を最小限に抑えられる利点がある。ウイルス分離やPCR検査の検出感度を考慮して、マニュアル案では後者を採用することとした。

しかし、気管口に直接綿棒を挿入する手技には多少の経験を要することから、写真付きのわかりやすいマニュアルが必要と判断された。

検体採取用鶏の安楽殺の方法、あるいは検体採取後の周囲の消毒、滅菌に関しても具体的には自治体によって様々な方法が用いられている可能性がある。しかし、各々の現場の状況、事情に即した最善の方法があると考えられることから、今後多くの情報を収集し、マニュアル案の中に組み込んでいく必要があると考えられた。

今後の方針として、まず土台となるマニュアル案を早急に作成し、それをさらに各地方自治体に送付等して出来得る限り多くの意見を求め、より具体的かつ有用な検査マニュアルの完成を目指していきたい。

#### E. 結論

鳥インフルエンザの検査について、本年度はまず食肉衛生検査所における材料採取に関する暫定的な検査マニュアル案を作成した。さらに実際に食肉衛生検査所の協力を得て、材料採取のデモンストレーションを実施し、現場サイドとの意見交換を行った。今後はさらに多くの意見、要望等を集約し、実際に利用可能な検査マニュアルの改正を行っていく計画である。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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

藤本 佳万、新矢 恭子、伊藤 啓史、伊藤 壽啓 (2008) H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する陸生野鳥の感受性。3月28-30日。第145回日本獣医学会学術集会 (麻布大)

シバコティ・サカル、藤本 佳万、伊藤 啓

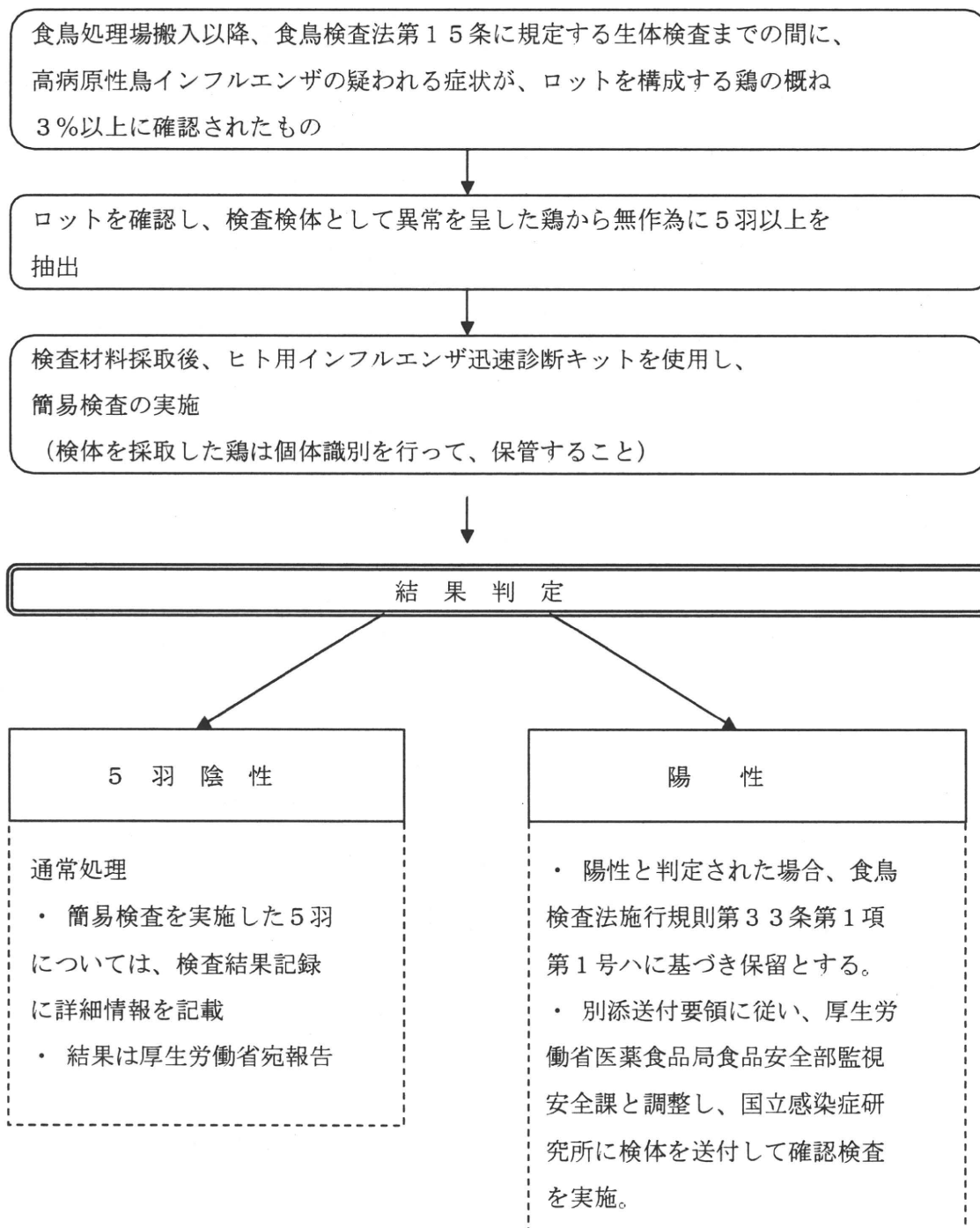
史、伊藤 壽啓(2008) Characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus isolated from a mountain hawk eagle in Japan. 3月28-30日。第145回日本獣医学会学術集会 (麻布大)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
該当無し
2. 実用新案登録  
該当無し

別紙1

スクリーニング検査の流れ



## 別紙 2

### (案)

#### 高病原性鳥インフルエンザ検査マニュアル（食鳥処理場）

##### （検体採取編）

##### （1）検査に必要な物品等

N95マスク

ラテックス手袋

前掛け

防護服

ゴーグル

長靴

厚手ビニール袋（厚さ0.1mm 以上のものが望ましい）

ドライアイス

消毒用アルコール（70%エタノール）、その他消毒薬

消石灰 床面消毒用

滅菌綿棒（大きさの異なるものを2種類程度用意しておく）

サンプル管（滅菌試験管、スクリーキャップ、2～5ml 程度）綿棒が入る太さであれば良い。ハサミ（紙製の綿棒の柄は切って入れる）

検体輸送用培地

簡易検査キット

輸送用容器（国連規格輸送容器）

蓄冷材

感染性廃棄物処理容器 死亡個体やその他の廃棄物処理にあると良い。

##### （2）検査試料の採取

- ・ 検査試料として異常を呈した鶏から無作為に5羽を抽出し、それらから個別に気管スワブと総排泄腔（クロアカ）スワブを採取する。
- ・ 試料の採取や簡易検査は、日頃から手法や検査結果の判定に習熟しておくことが望ましい。
- ・ 試料採取の際には周囲へのウイルス拡散を防ぐよう、消毒準備等十分な配慮が必要である。

1 鶏を保定したまま、1羽ずつ厚手のビニール袋（ドライアイス入り）にいれ、二酸化炭素による安楽殺を行う（図1）。

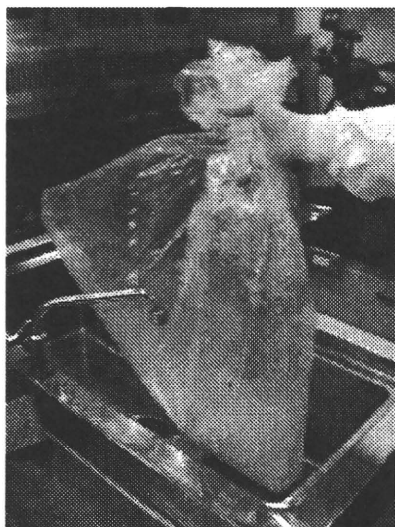
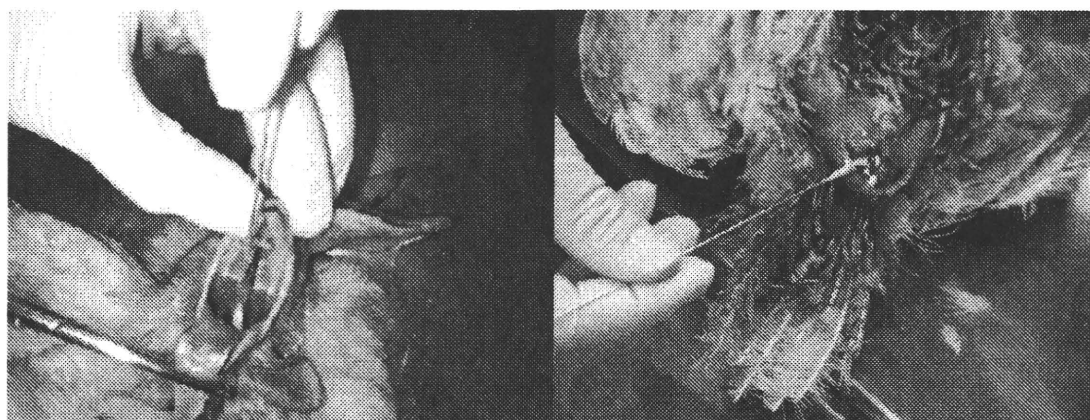


図1 鶏の安楽殺

2 綿棒の先に触れないよう注意し、鶏の気管内（図2A）または総排泄腔内（図2B）に挿入する。とくに気管スワブは口腔から綿棒を気管口に直接挿入するが、その際、舌をピンセット等で引き出すことで気管口の確認がしやすくなる（図3）。挿入した綿棒で気管内腔表面の粘膜を数回強めに擦るようにして採取する。



A 気管スワブの採取

B クロアカスワブの採取

図2 検体（スワブ）採取の方法

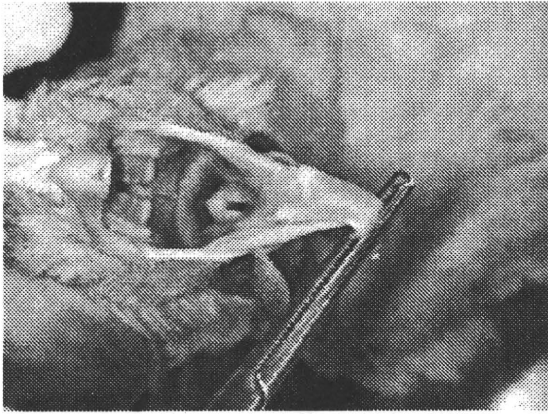


図3 鶏の気管口

3 最初に採取したスワブは簡易キット診断用として、抽出液の入ったチューブに直接入れる（図4）。

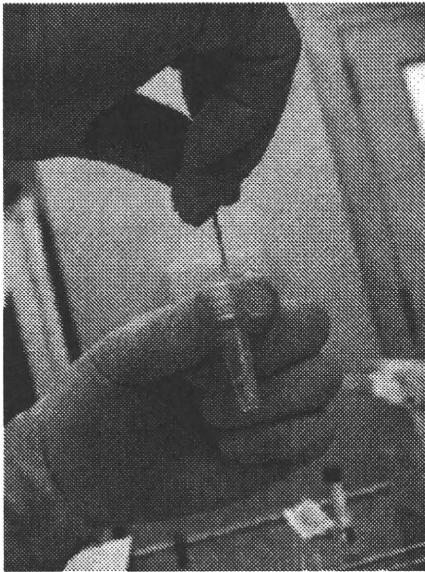


図4 簡易診断キット用検体

4 さらに確認検査用に再び各スワブを採取し、それらは個別にサンプル管（輸送用培地を含む）に入れ、蓋を密閉する（図5）。長い綿棒の場合は柄を折るか切るかして、確実に蓋が閉まるようにする。サンプル管に記録番号、スワブの区分を油性マジックで記入する。



図5 ウイルス分離用検体

### (3) 簡易検査の実施

1 スワブを検体として、各検査キット（迅速診断キット）の取り扱い説明書に従って、操作する（図6）。担当者はあらかじめ検査手法や検査結果の判定に習熟しておくことが望ましい。



図6 簡易診断キット

2 簡易検査で陽性と判定された場合は、厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課と調整し、国立感染症研究所へ速やかに検体を送付する（図7）。

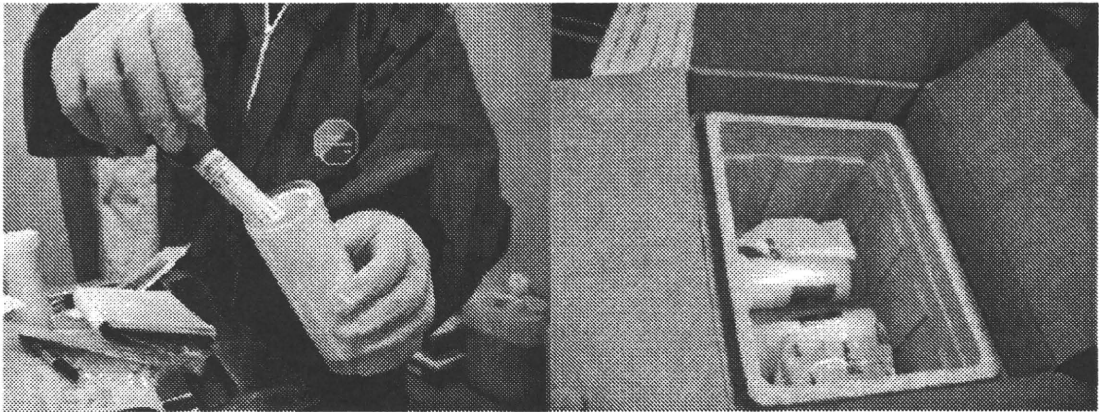


図7 検体の輸送

3 検体（スワブ）の送付は輸送中に破損しないように国連規格容器またはそれに準ずる容器を用い、適切な方法で行う。

4 5羽全て陰性と判定された場合もその旨、厚生労働省宛報告する。

5 検査に使用したスワブや簡易検査キットの廃棄にあたっては、感染性廃棄物として処分するか、密閉して完全に焼却処分する。

#### （4）個体の保管

検体採取後の鶏個体は再検査等の可能性もあるため、二重のビニール袋等に密閉して汚染が広がらないように配慮し、冷凍保存（ $-20^{\circ}\text{C}$ 以下）することが望ましい。

#### （5）検体の送付など

検体の検査機関への送付には国際規格の専用容器に準じた密閉できる容器を使用する。

#### （参考）国連規格輸送用容器について

感染性物質の輸送のために外部の圧力に耐える構造の特製容器。国連規格容器は試料送付後、検査機関等で消毒し、再利用に耐えないと判断したものは廃棄。製品については、インターネット上で情報を取得することが可能。

以上

## リアルタイム RT-PCR による鳥類由来インフルエンザウイルス

### 検出法の検討

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:食鳥検査において高病原性鳥インフルエンザが疑われインフルエンザ簡易診断キットを用いた検査を実施し疑いが強くなった場合は、ウイルス分離により確認する必要がある。しかしこれは時間を要することからウイルスゲノム RNA を検出する手法として RT-PCR 法があるがさらに高感度・迅速な方法としてリアルタイム RT-PCR 法が有用と考えられることから、WHO 推奨プロトコールのうちどの方法が有用かを検討したところ、インフルエンザ A ウイルス共通、H5 亜型、N1 亜型を検出するプロトコール 2 が感度良く検出することができることが分かった。

#### 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。食鳥検査においてウイルス疾病が疑われた場合はウイルス学的精密検査が必要となる。一般にウイルス学的検査は煩雑で時間を要する事から簡易な迅速かつ高感度な診断法が必要である。

本研究では食鳥検査の過程で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とともに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 RT-PCR 法やリアルタイム RT-PCR を検討することにした。今年度は 5 種類のプロトコールが示されている WHO 推奨プロトコールで鳥類由来 H5N1 亜型を含むインフルエンザ A ウイルスの検出を比較検討した。

#### B.研究方法

##### 1. ゲノム増幅プロトコール

Recommendations and laboratory procedures for detection of avian influenza A (H5N1) virus in specimens from suspected human cases (Revised August 2007) WHO に示されている 2 種類の RT-PCR と 3 種類のリアルタイム RT-PCR のプロトコールに従ってプライマーおよびプローブを作製した(表 1)。一部については改良されたプライマーを用いた。また、反応液には RNase 阻害剤を加えた以外は反応液調整及び反応条件はそれぞれのプロトコールに従った(表 2)。

##### 2. 供試ウイルス

A/WSN/33 (H1N1) 【WSN】、A/ Pueruto-Rico /8/34 (H1N1) 【PR8】、A/Mallard/ Miyazaki/MZ5/2007 (H1N3) 【MZ5】、A/duck/Hyo