

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可能と考えられた。しかしながら、本実験では、実際の検体となる家禽の咽頭スワブやクロアカスワブに含まれる生体成分の混入は再現されおらず、これらの混入によるウイルスの生残性に及ぼす影響は不明で更なる検討が必要となると考えられた。特に、生理食塩水を基礎とした培地では pH の緩衝能は期待できず、生体成分の混入の影響を受ける可能性が推定される。

また、本試験に用いたウイルス株は弱毒型の野鳥由来 H5N1 亜型株であったが、その他のウイルス株（強毒型のウイルス株、H5N1 亜型以外のウイルス株など）についても比較検討し、最良の輸送用培地の検討が必要とも考えられる。

ウイルスゲノムの残存については、各輸送用培地で 7 日間保管したサンプルからの抽出 RNA についてリアルタイム RT-PCR 法によりウイルスゲノム量を比較した結果、冷蔵ではいずれの培地でも検出量に低下は見られなかったが、組織培養用培地で室温保管した場合に若干の低下がみられた。この原因は不明であるが再試験を行い検証する必要があると考えられる。

本研究では検体中の RNA の安定性を向上させるとされる RNA later などの試薬の追加添加が必要となるほどのウイルス RNA の減少は認められなかったが、常温輸送の可能性や凍結されて

おり融解が必要な検体等の場合には有効に作用する可能性があり今後検討の余地があると考えられる。

## E. 結論

家禽における高病原性鳥インフルエンザの起因となるインフルエンザ A ウイルスを検体から効率良く検出するために、その検体輸送用培地の検討を行った。組織培養用培地、生理食塩水および市販の輸送用培地に野鳥由来弱毒型の H5N1 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 7 日間感染価の低下はほとんどなく、ウイルス核酸もよく保存され有用であることがわかった。しかし、家禽の咽頭スワブやクロアカスワブなどの実際の検体に含まれる体液や糞便等の影響についてはさらに検討が必要である。

## 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

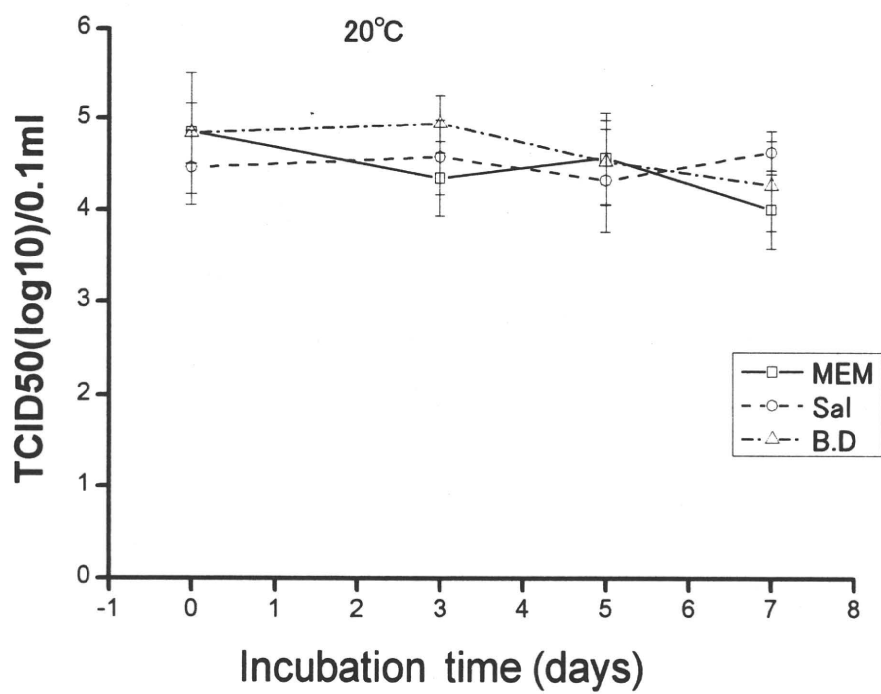
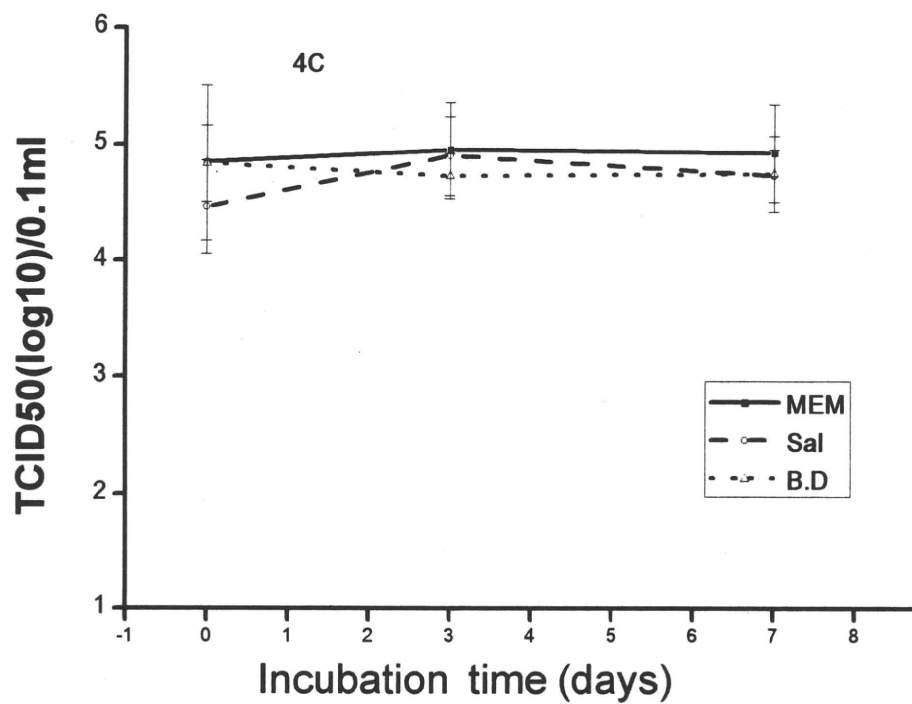


図1 感染価(20°Cと4°Cの比較)

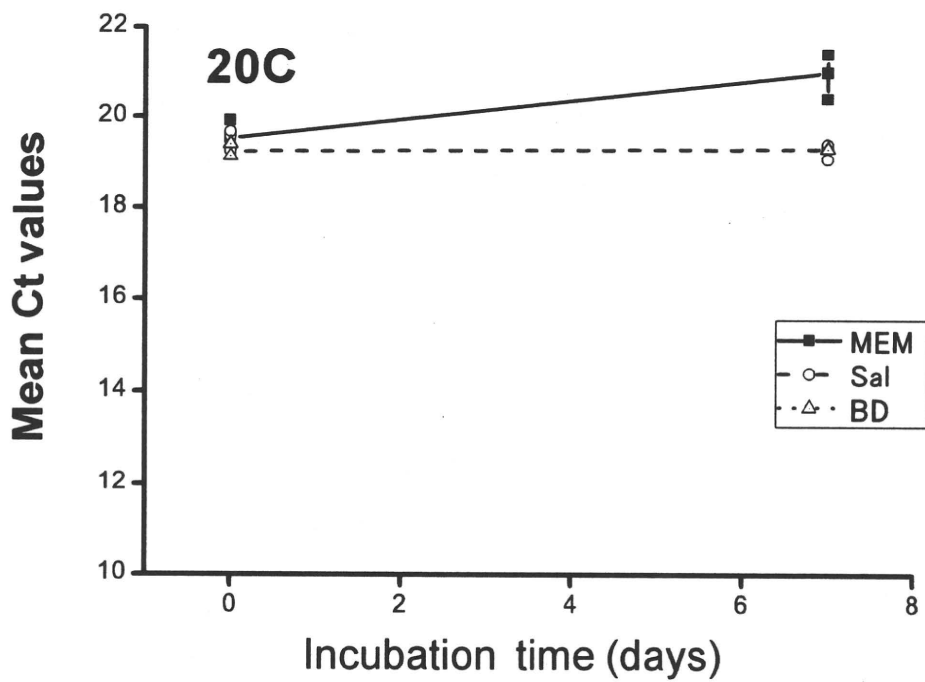
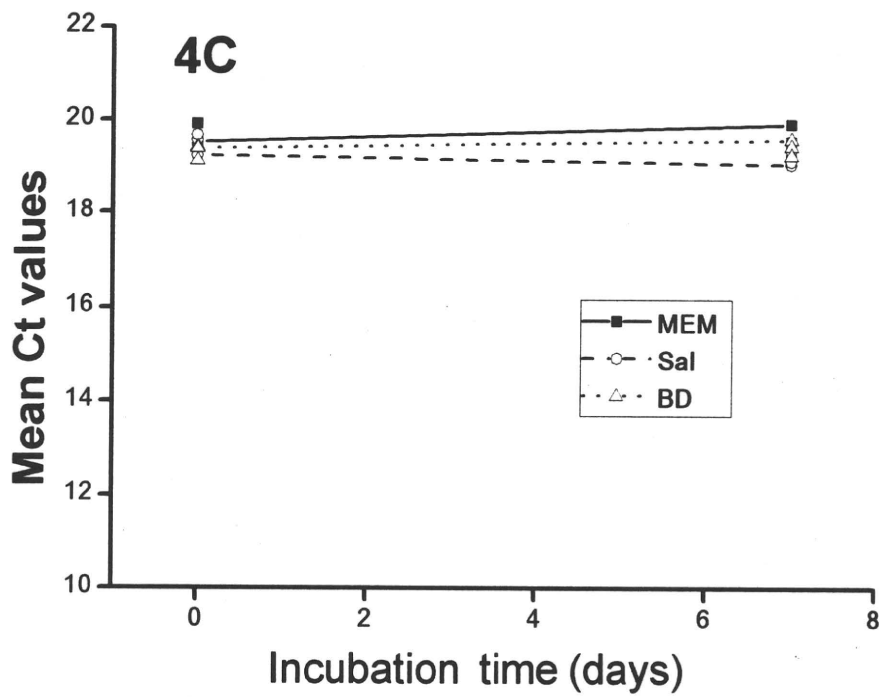


図2 ウイルスゲノムの検出

単一プライマー対を用いた A 型インフルエンザウイルスの  
ゲノム増幅と亜型型別法の開発

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：2009 年、ブタ由来の新型インフルエンザウイルスがヒトの間に出現して大流行を引き起こした。本研究では簡便な HA および NA 亜型型別法の開発を目指し、単一のプライマー対を用いて A 型インフルエンザウイルスの全ゲノムを増幅して塩基配列を決定する方法を確立した。本法は従来法とは異なり未知の亜型にも適応できることから、インフルエンザの疫学調査には極めて有効である。

#### A. 研究目的

A 型インフルエンザウイルスは 8 分節の(-)鎖 RNA をゲノムとする。各 RNA 分節の両端の 12 および 13 塩基は共通であり、全ての株間で保存されている。一方、HA および NA には各々 16 および 9 の亜型が存在し、様々な組み合わせを有するウイルス株が鳥類およびブタを始めとする動物に広く分類している。これら HA および NA の亜型解析はインフルエンザの疫学上極めて重要である。一般に、亜型同定には特異抗血清を用いた HI および NI 試験が行われるが、全ての亜型に対応する抗血清パネルを用意することは難しい。また、遺伝子型別においても亜型特異的な多数のプライマーが必要であった。そこで本研究では、A 型インフルエンザウイルスゲノムの両端に保存される共通配列を利用して全分節を増幅し、HA および NA 亜型型別を含む簡便な遺伝子解析法を開発することを目的とした。

#### B. 研究方法

1. ウイルス：A/Aichi/2/68(H3N2)、A/swan/Shimane/499/83(H5N3)、A/duck/Czechoslovakia/56(H4N6)、A/chicken/Germany/N/49(H10N7)および A/NWS/33 x A/tern/Australia/G70c/75(H1N9)株を 10 日齢発育鶏卵の尿膜腔内に接種して増殖させた。
2. RNA 抽出：FUJIFILM の QuickGene RNA tissue kit S II および QuickGene-Mini 80 を用いてウイルス感染尿膜腔液から vRNA を抽出した。
3. RT-PCR：vRNA を鋳型として、AMV RT およびゲノム 3'端共通配列の上流に 21 塩基を付加したプライマー FWuni12 (5'-CTGATC TAGACCTGCAGGCTCAGCAAAAGCAGG-3')を用いて 42°C 60 分の反応により 1st 鎖 cDNA を合成した。RNaseH 処理後、DNA ポリメラーゼ I およびゲノム 5'端共通配列の上

流に 21 塩基を付加したプライマーRVuni13 (5'-CGTGGTACCATGGTCTAGAGTAGTAGAA ACAAGG-3')を加え、14°C 180 分の反応で 2nd 鎖 cDNA を合成した。この 2 本鎖 cDNA を鋳型としてFWuni12/RVuni13プライマー対を用いて PCR を行った。反応条件は、94°C で 1 分間加熱後、94°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 3 分を 35 サイクル行った後、72°C に 5 分間放置とした。

4. 塩基配列の決定 : PCR 産物をアガロースゲルで分画して精製し、FWuni12 および RVuni13 プライマーを用いたダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。RNA ポリメラーゼ遺伝子については、pBluescript II KS(+)ベクターに挿入後シーケンスに供した。

### C. 研究結果

1. A/Aichi/2/68(H3N2) 全ゲノムの増幅 : A/Aichi/2/68(H3N2)vRNA を鋳型として RT-PCR を行い、得られた増幅産物をアガロースゲル電気泳動に供した。その結果、6 本のバンドが確認され、これらは RNA ポリメラーゼ(PB1、PB2、PA)、HA、NP、NA、M および NS 遺伝子のサイズとよく一致していた (図 1)。1.8kb 以下の増幅産物を切り出して精製し、ダイレクトシーケンスによって各々の遺伝子の既報の塩基配列と一致することを確認した。また、2.3kb の断片は pBluescript II KS(+)にクローニングして塩基配列を決定し、PB1、PB2、PA 遺伝子の配列を検出した。

2. HA および NA 亜型の遺伝子型別 : 亜型の異なる 4 種のウイルスについて同様に RT-PCR を行ったところ、調べた全ての株で 6 本のバンドが確認された (図 2)。HA および NA 遺伝子に相当する断片の塩基配列を決定した結果、用いたウイルス株の HA または NA 遺伝子の塩基配列とそれぞれ一致した。

### D. 考察

単一のプライマー対を用いて A 型インフルエンザウイルスゲノムの全長を増幅することに成功した。同じプライマーを用いて増幅産物の両端の塩基配列を解析することによって HA および NA 亜型の同定が可能であった。また、本法では全分節の塩基配列を容易に比較できることから遺伝子交雑の検出に有用である。

従来の遺伝子型別法では HA の型別に 1 組、NA の型別に 5 組のプライマー対が必要であった (Hoffman et al. 表 1)。また、NA 遺伝子に対しては亜型特異的な配列を含むため、未知の亜型には適合しない可能性があった。本法では完全なユニバーサルプライマーを用いるため、未知の亜型のウイルスに対しても有効である。したがって、新型インフルエンザの出現に備えた動物インフルエンザの疫学調査には極めて有効と考えられる。また、ゲノム全長が一度にクローニング可能であることからインフルエンザウイルスの基礎研究にも汎用されることが期待される。

### E. 結論

共通配列を含んだ 1 組のプライマー対を用いて A 型インフルエンザウイルス 8 分節の全長を増幅し、簡便な HA および NA 亜型型別法の開発に成功した。本法は、インフルエンザウイルスの疫学調査への応用が期待できる。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

1. 論文発表

Inoue, E., Wang, X., Osawa, Y., and Okazaki, K:  
Full genomic amplification and subtyping of  
influenza A virus using a single set of universal  
primers. Microbiol. Immunol. (in press)

2. 学会発表

- 1) 井上恵美、王笑峰、大澤宜明、岡崎克則 単一のプライマー対によるA型インフルエンザウイルス亜型型別法の開発 第129回日本薬学会 京都市 2009年3月
- 2) 松村佳子、井上恵美、室内友恵、大澤宜明、岡崎克則 ウシ全身性腫瘍検体からの牛白血病ウイルス遺伝子の検出とその系統進化解析 第148回日本獣医学会 鳥取市 2009年9月
- 3) 松村佳子、室内友恵、井上恵美、大澤宜明、岡崎克則 ウシ腫瘍組織からの牛白血病ウイルス

スDNAの検出と系統進化解析 第57回日本ウイルス学会 東京都 2009年10月

- 4) 井上恵美、前河耕平、大澤宜明、岡崎克則 単一のプライマー対によるA型インフルエンザウイルスゲノム全長増幅法の開発とDI遺伝子の検出 第57回日本ウイルス学会 東京都 2009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

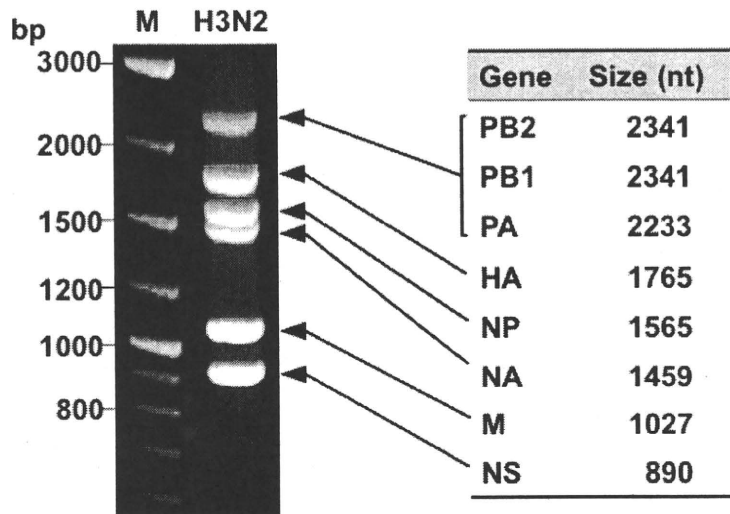


図1. RT-PCRによるA/Aichi/2/68(H3N2)全ゲノムの増幅. 増幅産物を1.5%アガロースゲルで100V、30分間電気泳動した。MはDNAサイズマーカーを示す。

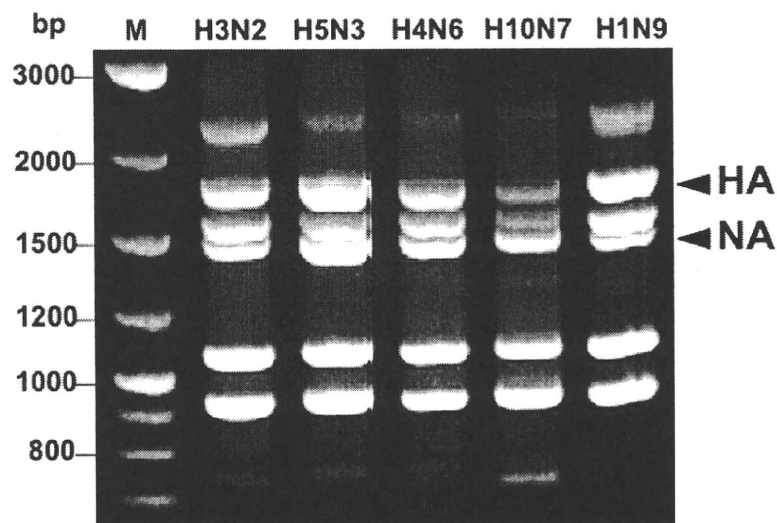


図2. 亜型の異なるウイルス株を用いたRT-PCRによるゲノムの増幅. 異なる亜型のウイルス株を用いてRT-PCRを行い、増幅産物を1.5%アガロースゲルで100V、30分間電気泳動した。Mはサイズマーカーを示す。

表 1. 従来法で亜型型別に必要としたプライマー (Hoffman et al.)

Gene	Forward and reverse primers	
H1-H16	Bm-HA-1	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGG
	Bm-NS-890R	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT
N1,2,4,5,8	Ba-NA-1	TATTGGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGAGT
	Ba-NA-1413R	ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGAGTTTTTT
N3	Bm-N3-1	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGTGC
	Bm-N3-1420R	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTGCTTTTT
N6	Bm-N6-1	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGTGAAAATG
	Bm-NS-890R	
N7	Bm-N7-1	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGTGATTGAGAATG
	Bm-NS-890R	
N9	Bm-N9-1	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGTC
	Bm-N9-1473R	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTCTT



## DNA プローブを用いたウイルス検出法の検討

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
	藤田 修	国立感染症研究所獣医科学部 主任研究官

研究要旨 本研究では、網羅的に病原体を同定する病原体検出用マイクロアレイおよび付随する技術開発を行ってきた。これらの技術を踏襲し、病原体検出用マイクロアレイにおけるインフルエンザAウイルスの同定精度の検証を行う事を目的とした。インフルエンザウイルスの成田 (pdm2009 H1N1) 株、プリズベン (H1N1) 株、WSN (H1N1) 株、PR8 (H1N1) 株、ウルグアイ (H3N1) 株、京都 (H5N1) 株 (強毒)、兵庫 (H5N1) 株 (弱毒)、Miya5 (H1N3) 株、Miya7 (H1N3) 株、及びフロリダ (B型) 株のRNAをAlexa 546標識後、病原体検出用マイクロアレイとハイブリダイズさせた。マイクロアレイはアジレントDNAスキャナーで画像を取得後、FeatureExtractionおよびGeneArrayUtilitiesでインフルエンザウイルスの亜型解析を行った。その結果、全ての株がインフルエンザウイルスと判定され種レベルの同定には問題は無かった。亜型タイピングでは、野生カモ由来株 (Miya5とMiya7)を除き、同定解析に用いた各株の亜型とマイクロアレイで同定された亜型は一致した。これらの事から、問題は残されているものの、病原体検出用マイクロアレイはインフルエンザウイルスの亜型同定にも利用可能であることが示された。また、病原体検出用マイクロアレイは病原体の種同定に有効である可能性が示唆された。

### A. 研究目的

ヒトに感染し健康被害をもたらす病原体の多くは、全ゲノム配列の解読が完了している。本研究では、これらの情報に基づいてDNAプローブを設計し、1回の解析で網羅的に病原体を同定できる「病原体検出用マイクロアレイ」の開発を進めてきた。この病原体検出用マイクロアレイは、ウイルス147種、細菌276種、真菌49種、古細菌30種、その他7種、および毒素遺伝子74種類を同定する為のプローブを38,986種類搭載している。これまでに、培養した病原体のDNAあるいはRNAを用いて病原体検出用マイクロアレイ同定試験を行ってきた。本年度は、世界的流行が起こった新型インフルエンザウイルスを含め鳥類由来株等を本方法で解析し、検証する事を目的とした。また、対照コントロールとして様々なインフルエンザウイルス株を同解析に付し、特異性の検証も行った。

### B. 研究方法

#### 1. インフルエンザウイルスRNA

インフルエンザAウイルスの成田 (A型pdm2009 H1N1) 株、プリズベン (A型H1N1) 株、WSN (A型H1N1) 株、PR8 (A型H1N1) 株、ウルグアイ (A型H3N1) 株、京都 (A型H5N1) 株、兵庫 (A型H5N1) 株、Miya5 (A型H1N3) 株、Miya7 (A型H1N3) 株、及びフロリダ (B型) 株を供した。これらは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、神戸市環境保健研究所より分与されたものおよび独自に野生カモより分離したものである。ウイルスゲノムRNAは、QIAamp UltraSens Virus Kit (Qiagen) を用いて精製した。

#### 2. 病原体検出用マイクロアレイ

本研究では、2種類のバージョン (MMDPA ver. 1.0およびver. 1.1) の病原体検出用マイクロアレイを使用した。新型および季節性インフルエンザウイルスH1株には、新型インフルエンザインフルエンザウイルスのHA遺伝子を同定

する為のプローブを搭載したver.1.1を、それ以外の株にはver.1.0を使用して同定試験を行った。これらのマイクロアレイはアジレント社 (Agilent) に製造委託した。

### 3. 核酸蛍光標識とハイブリダイゼーション

解析に使用したRNA溶液は、超音波破碎機 (Bioraptor UCD-250) で断片化处理 (4°C冷却水循環下、30秒・30秒オン・オフ インターバル設定) を5分間行った。断片化处理済サンプルは、ULYSIS® Alexa Fluor® 546 Nucleic Acid Labeling Kit (Molecular Probes) で蛍光標識後、エタノール沈澱処理を行い、水に溶解しNanoDropを用いて核酸濃度を測定した。蛍光標識済核酸は、100 µlのハイブリ緩衝液(6× SSC, 5× Denhardt's solution, 50 mM sodium phosphate, 0.5% SDS, 20% formamide, 5% Skim milk, 50 µg/ml Yeast tRNA)に溶解した。これらのサンプルは、病原体検出用マイクロアレイと50°C 18時間ハイブリさせ、50°C 0.5% SDSを含む 5× SSC中5分間を2回、50°C 1× SSC中で5分間を1回、室温 ミリQ水で10秒間洗浄した。マイクロアレイは、DNA Microarray Scanner (Agilent) でスキャンし、各病原体スポットの蛍光強度はFeature Extraction Software Version 9.5.1で取得した。蛍光強度情報はテキストファイルにて保管した。

### 4. 病原体検出用マイクロアレイ解析

各病原体の蛍光強度が記されたテキストファイルは、Gene Array Utilityソフトウェア (Symplus) で読み込んだ後、同ソフトで病原体検出解析を行った。本研究において、GenBank アクセション毎の蛍光強度中央値が、3条件 (①マイクロアレイ全体のバックグラウンド蛍光強度の 2.5倍以上、②p値が0.001以下、③z値が3.5以上) を満たした場合、該当するGenBank アクセションの病原体が陽性と判定した。なお、非特異反応が確認されているPlasmodium falciparum由来のプローブは解析から除外した。

### C. 研究結果

新型インフルエンザウイルス成田株 (pdm2009 H1N1) のRNAを病原体検出用マイクロアレイにて解析を行った場合、A/California/04/2009(pdm2009 H1N1)および A/Texas/05/2009 (pdm2009 H1N1)が有意に高いシグナルを発しており、他のインフルエンザウイルスの亜型またはその他の病原体に対するシグナルは検出されなかった (図1)。この結果より、病原体検出用マイクロアレイの新型インフルエンザウイルスに対する特異性は確認された。

H1N1 亜型株であるブリスベン株、WSN株、PR8株を解析した場合、A/Marton/43(H1N1) NA 遺伝子、A/Marton/43(H1N1)NA 遺伝子、A/Ibaraki/90/1998(H1N1)HA 遺伝子の全て又は一部が検出され、新型インフルエンザウイルスと非特異反応を起こす事無く H1N1 株として同定された。

H3N1 亜型株のウルグアイ株を解析に付した場合は、A/Hanoi/190/2002(H3N2)または A/Oregon/1/2006(H3)株として判定され、特異性が確認されていた (図2)。

H5N1 亜型株である京都株または兵庫株を解析した場合、A/chicken/Yamaguchi/7/2004(H5N1)、A/chicken/Viet Nam/17/2005(H5N1)、A/crow/Kyoto/53/2004(H5N1)が有意に強いシグナルを発していたが、若干弱いながらも A/black-headed gull/Netherlands/1/00(H13N8)も検出された。

カモの糞から得られた H1N3 亜型株の Miya 5 および Miya 7 株を解析した場合、A/swine/Hong Kong/168/1993(H1N1)と A/chicken/Viet Nam/17/2005(H5N1)が有意に高いシグナルを発していた。

B型インフルエンザウイルスのフロリダ株を解析した場合、B/Taiwan/01026/05 のみ有意に高いシグナルが検出され、A型インフルエンザウイルスや他の病原体のシグナルは見られなかった (図3)。

これらの事から、病原体種の特定には問題なかったが、H5 亜型株および野生カモ由来 H1N3 亜型株の亜型同定には問題が残った (図4)。

#### D. 考察

本研究で開発を続けている病原体検出用マイクロアレイは、ウイルス 147 種、細菌 276 種、真菌 49 種、古細菌 30 種、その他 7 種、および毒素遺伝子 74 種類を検出できるように設計されている。これまでに様々な細菌やウイルスに対するプローブの特異性を確保しているデータが得られている。

この病原体検出用マイクロアレイは、インフルエンザウイルス、ノロウイルス、ロタウイルスやその他の亜型タイピングシステムも搭載されている。本年度は亜型タイピングシステムの精度を検証する為に、インフルエンザウイルスの様々な亜型をモデルとして使用した。その結果、新型インフルエンザウイルスをはじめとする H1N1 または H3 の亜型や B 型インフルエンザウイルスを同定するシステムは十分機能している可能性が示唆された。ただし、野生カモ由来 H1N3 株や H5 株では非特異反応と思われるシグナルも強く検出された。病原体検出マイクロアレイに搭載されている亜型タイピングシステムは、今までにシーケンス解析が終了している塩基配列を標的としているので、塩基配列解析がなされていないインフルエンザウイルスの同定には若干不安を与える結果となった。この問題を回避するためには、亜型タイピングシステムを搭載する標的株数の増大とそれに伴うプローブ数を増大させる事が必要と考えられる。これらの改善により、特異的シグナルが増大し、また検出病原体候補として表示される株数が増加し、情報の取捨選択が容易となる。マイクロアレイの細密化が現在も進行中で、来年度中には 1 アレイに 6 万超プローブを搭載することも可能となることから対応可能と考えられる。

これまでの結果から、PCR や培養検査で同定不能な培養病原体の核酸の病原体種を同定できる可能性が十分に示され、開発当初からの目的は既に達したと考えられる。しかし、検出感度を考慮すれば、病原体核酸の含有比率が低いサンプル、例えば食品等に含まれる病原体を検出する手法としては不十分である可能性がある。今後さらなる汎用性の向上を目指して、検出感度改善に焦点を据えて検討を行う必要がある。また、これらの成果を踏襲した安価な核酸検出システム構築にも必要である。

#### E. 結論

本研究で開発してきた病原体検出用マイクロアレイは病原体の種同定に有効である可能性が示唆され、開発当初の目的は達せられた。今後、汎用性向上の為に搭載プローブ数の増大と検出感度向上が必要と考えられる。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

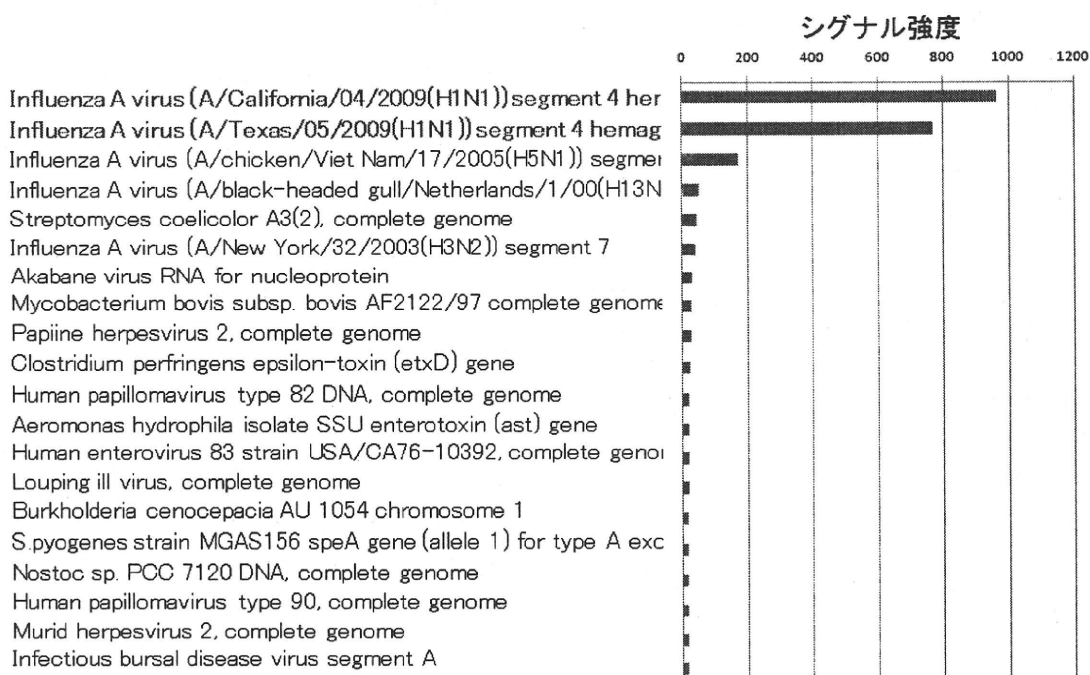
なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特願 2009-25818 「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」宇田晶彦他

図1

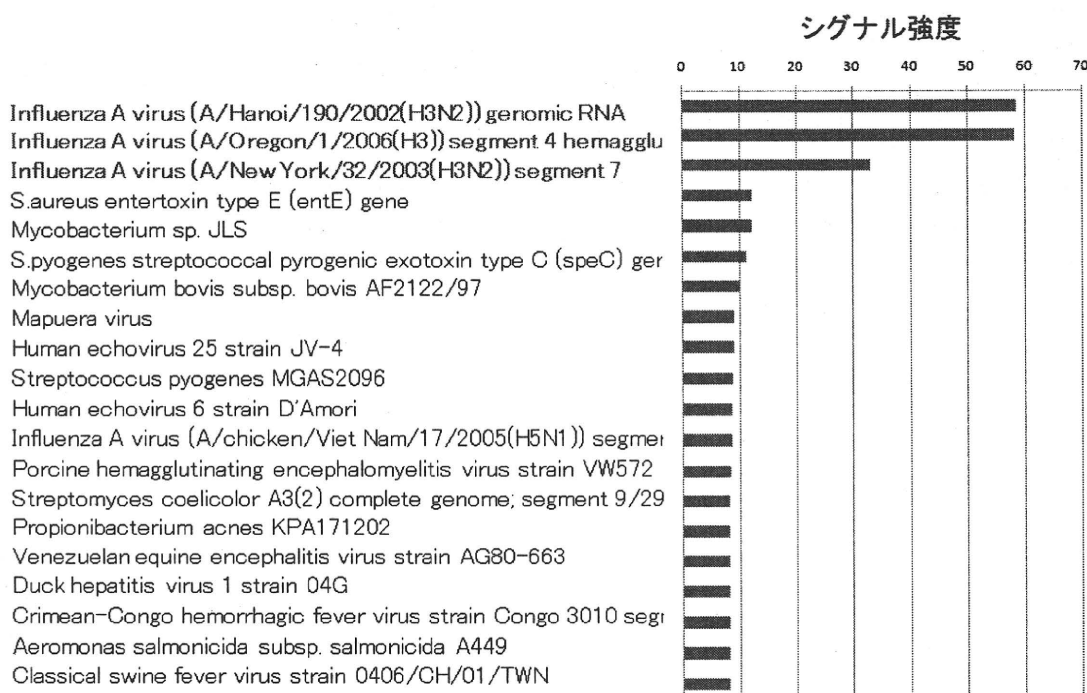
A型インフルエンザウイルスH1N1/ナリタ株(新型インフル)



青字は有意にシグナルが高かった病原体

図2

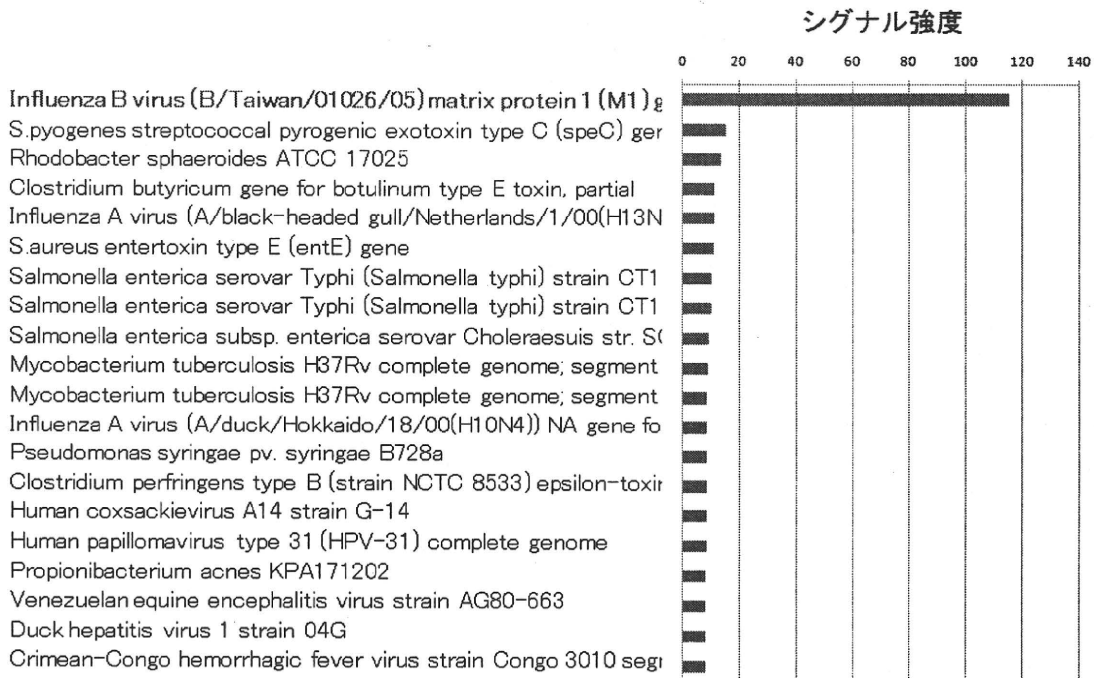
A型インフルエンザウイルスH3N1/ウルグアイ株



青字は有意にシグナルが高かった病原体

図3

B型インフルエンザウイルス/フロリダ株



青字は有意にシグナルが高かった病原体

図4. 病原体検出用マイクロアレイのバリデーション まとめ

ウイルス	病原体検出用マイクロアレイ解析で判定された病原体
<u>pdm 2009 (H1N1) ナリタ株</u>	Influenza A virus (A/California/04/2009(pdm 2009 H1N1)) HA gene Influenza A virus (A/Texas/05/2009(pdm2009 H1N1)) HA gene
<u>H1N1 プリスベン株、WSN株、PR8株</u>	Influenza A virus (A/Marton/43(H1N1)) neuraminidase gene Influenza A virus (A/Marton/43(H1N1)) neuraminidase gene Influenza A virus (A/Ibaraki/90/1998(H1N1)) HA gene
<u>H3N1 ウルグアイ株</u>	Influenza A virus (A/Hanoi/190/2002(H3N2)) Influenza A virus (A/Oregon/1/2006(H3))
<u>H5N1 キョウト株、ヒョウゴ株</u>	Influenza A virus (A/chicken/Yamaguchi/7/2004(H5N1)) Influenza A virus (A/chicken/Viet Nam/17/2005(H5N1)) Influenza A virus (A/crow/Kyoto/53/2004(H5N1)) Influenza A virus (A/black-headed gull/Netherlands/1/00(H13N8))
<u>H1N3 Miya5、Miya7</u>	Influenza A virus (A/chicken/Viet Nam/17/2005(H5N1)) Influenza A virus (A/swine/Hong Kong/168/1993(H1N1))
<u>B型フロリダ株</u>	Influenza B virus (B/Taiwan/01026/05)

## 簡便な A 群ロタウイルス全遺伝子解析法の確立とその応用

分担研究者 杉山 誠 岐阜大学 応用生物科学部 教授

研究協力者 安部昌子 岐阜大学 大学院連合獣医学研究科 4年生

伊藤直人 岐阜大学 応用生物科学部 准教授

研究要旨: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感染環の解析と簡便な遺伝子解析法の開発を行った。これまでの研究で分離された健康牛から分離された本ウイルス 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 例から本ウイルスの 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。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。

### A 研究目的

A 群ロタウイルスは、人を含め哺乳類および鳥類に感染し急性胃腸炎を起こし、種を越えての感染が報告されている。食用に供される家畜におけるロタウイルスの感染は人の健康障害のリスクと考えることが出来る。一方、多くの家畜から本ウイルスは分離・検出されているが、その自然界での生態は明らかにされていない。そこで、本研究では、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、牛における本ウイルスの感染環の詳細な解析を行った。同様に豚における本ウイルスの感染状況を把握するため、健康な豚の糞便を用いて Nested RT-PCR 法により VP4 及び VP7 遺伝子を検出し、その部分的配列を解読した。さらに、解析を容易にするため、前年度に開発した簡便な全分節遺伝子の解析法を実際の牛の糞

便サンプルに応用し、実用性について検証を行った。

### B.研究方法

- 2006～2007 年に岐阜県で健康な牛より分離された 7 株の A 群ロタウイルス (GB1-76、GB15-8、GB12-22、GB20-25、GB14-45、MB7-20、AzuK-1) について、11 分節遺伝子 ORF を RT-PCR 法で増幅し、ダイレクトシーケンスにより各 ORF 遺伝子の塩基配列を解読した。塩基配列の相同性から、各遺伝子型を決定した。さらに各遺伝子の進化系統学的解析を行い、関連性について解析を行った。
- 2009 年、A 県のと畜場及び肥育農家より、健康な豚の糞便サンプルそれぞれ 87 例及び 82 例の計 169 例が採集された。これら糞便を用いて、ロタウイルス VP4 遺伝子を対象に Nested

RT-PCR法を行った。検出した遺伝子について、ダイレクトシーケンスにより部分的配列を解析し、P遺伝子の推定を行った。VP4遺伝子が検出されたサンプルについては、VP7遺伝子の増幅も行い、同様にG遺伝子型を決定した。

3. 前年度に分離ウイルスを用いて開発した簡便な全分節遺伝子解析法を実際の糞便サンプルに応用した。2006～2007年にロタウイルスVP4遺伝子がRT-PCR法により検出され、-80℃で保存されていた牛糞便20%乳剤11例が供試された。開発した簡便解析法のうち、Rotavirus Classification Working Group (RCWG)による遺伝子型別の基準(500bp以上、ORFの50%以上)に合致するVP7、NSP2、NSP3、NSP4及びNSP5の5つの分節を対象とした。各分節遺伝子をRT-PCR法により増幅し、部分配列を決定することにより遺伝子型別を行った。

### C. 研究結果

#### 1. 牛におけるロタウイルスの感染環の解明

健康な牛より分離された7株のA群ロタウイルスについて、全11分節遺伝子を解析し、遺伝子型を決定した(表1)。これらウイルスのVP7とVP4遺伝子以外のコア蛋白質をコードする分節の遺伝子型は、基本的にI2-R2-C2-M2-A13-N2-T6-E2-H3(VP6-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6)であった。例外的にGB14-45株及びMB7-20株のNSP1遺伝子はA13ではなくA3であった。また、NSP3遺伝子においてもAzuk-1株のみがT9遺伝子型であった。これに対しVP7遺伝子には、G6、G8、G10及びG21遺伝子型がみられ、多様な遺伝子型が存在した。一方、同じ外殻蛋白質を構成するVP4遺伝子は、7株中5株がP[11]遺伝子型となり、残りの2株はP[14]及びP[29]であった。

各遺伝子の塩基配列から進化系統樹を作成し、各株の遺伝的関連性について解析した。VP1及びVP2遺伝子の遺伝的関係を図1に示す。VP1遺伝子では、栃木県で牛より分離されたSun9株と本研究で解析されたMB-20株は近縁な遺伝的関係にあった。一方、VP2遺伝子においては、両者は遺伝的に離れていることが示された。他の遺伝子についても同様な結果が観察された。

#### 2. 豚におけるロタウイルスの感染状況

と畜場と肥育農家で採材された糞便サンプルから、Nested RT-PCR法によりロタウイルスVP4遺伝子の検出を行った。と畜場で採材された87例中35例(40.2%)、肥育農家82例中49例(59.8%)、合計169例中84例(49.7%)と半数が陽性となった。VP4遺伝子が検出されたサンプルについて、VP7遺伝子を同様に増幅し、両遺伝子の解析を進めた。その結果、55例のサンプルについて検出ウイルスのP及びG遺伝子タイピングをすることができた(表2)。P遺伝子型として既知のP1、P6、P7、P13、P23及びP27以外に、これまで報告がみられない2つの遺伝子型(P?, P??)も認められた。55例中34例(61.8%)とP13遺伝子型が最も多く観察された。G遺伝子については、G1、G2、G3、G4、G5、G9及びG11の7つの型が存在していた。

#### 3. 全分節遺伝子の簡便解析法の糞便サンプルへの応用

RT-PCR法によりVP4遺伝子が検出された11例の糞便サンプルを用いて、前年度開発した簡便法によるVP7、NSP2、NSP3、NSP4及びNSP5の5つの分節遺伝子の増幅を試みた(表3)。その結果、5つの全ての遺伝子が増幅できたのは、11

例中4例 (36.4%) のみであった。増幅した遺伝子については、遺伝子型別が可能であった。NSP3遺伝子が増幅できたサンプルについては、5つ全ての遺伝子の増幅が可能であった。

#### D. 考察

ほぼ同時期に同地域で健康な牛より分離されたロタウイルス7株について、全分節遺伝子ORFを詳細に解析した。外殻蛋白質をコードするVP4とVP7で遺伝的多様性が顕著であった。特にVP7遺伝子に多様性が認められた。VP7蛋白質は主な中和抗原であり、抗体による選択が関連している可能性が考えられた。

内部蛋白質をコードする遺伝子についての解析を進めるために、進化系統樹から各ウイルス間及び遺伝子間の遺伝的関連性を検討した。分節が組み換わることなくウイルスが進化した場合、それぞれのウイルス株の遺伝子間の近縁性はほぼ一定になると考えられる。図1で示したように、VP1とVP2遺伝子の間で遺伝的関係が大きく異なるウイルスの存在が明らかとなった。他の遺伝子についても同様の現象が観察された。このことは、下痢の非流行期に健康な牛において、ウイルスの感染と遺伝子分節の組換えが頻繁に起きていることを示唆している。すなわち、外殻蛋白質をコードする遺伝子は多様性が高いため、組換えの結果が遺伝子型の変化となって現れる。一方、内殻蛋白質をコードする遺伝子は多様性が低いため、遺伝子型の変化として捉えることができない可能性が考えられる。外殻蛋白質をコードする遺伝子に多様性が認められる理由としては、前述の免疫の影響があるのかもしれない。今回の研究からロタウイルスの多様性獲得の機構を解明することができた。これは、本ウイルスのリスクを考える上で重要な知見と考えられる。

食肉として重要な家畜である豚について、ロタウイルスの感染状況について調査を行った。スロベニアにおいて健康の豚の18%からロタウイルスが検出されることが報告されている (Steyerら, J. Gen. Virol. 89, 1690-1698, 2008)。今回の研究では、感度を上げるためにNested RT-PCR法を採用した。その結果、検査したサンプルの約半数からロタウイルス遺伝子が検出された。その遺伝子型には、スロベニアでの調査と同様、顕著な多様性が認められた。今後、A県にのみで見られる現象かどうかを検証するために他の県での調査を行う必要がある。

前年度の本プロジェクトにおいて、分離ウイルスを用いて開発した全分節遺伝子の簡便な開発法が野外サンプルに応用できるかどうか検証を行った。一方、最近、遺伝子型別のためにはORFの50%以上かつ500bp以上の遺伝子を解析しなければならないとの基準がRCWGにより定められた。これまでに開発した簡便法のうち、この基準に合致するのは、VP7、NSP2、NSP3、NSP4及びNSP5の5つの分節遺伝子を対象とした場合である。そこで、これら遺伝子を対象に簡便法の糞便サンプル11例への応用を試みた。その結果、11例中4例のみで5つの分節遺伝子の解析が可能であった。従って、全遺伝子を検出するためには、簡便法の改善を図る必要がある。また、RCWGの基準に合致するようにすることも求められる。

#### E. 結論

健康な牛に存在するロタウイルスは分節遺伝子を頻繁に組換えることにより多様性を獲得していることが明らかとなった。また、健康な豚において、多様なロタウイルスが常在化していることが示された。前年度開発したロタウイルスの全分節遺伝子を解析する簡便法を野



外サンプルに応用するためには、方法の改善が必要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Abe, M., Ito, N., Morikawa, S., Takasu, M., Murase, T., Kawashima, T., Kawai, Y., Kohara, J. & Sugiyama, M.: Molecular epidemiology of rotaviruses among healthy calves in Japan: Isolation of a novel bovine rotavirus bearing new P and G genotypes. *Virus Res.* 144, 250-257. 2009.

##### 2. 学会発表

1) 安部昌子、伊藤直人、高須正規、村瀬哲磨、杉山 誠: 健康な牛における A 群ロタウイルスの遺伝子動態解析. 第 148 回日本獣医学会学術集会 (2009 年 9 月、鳥取)

2) 森川繁樹、安部昌子、伊藤直人、杉山 誠: イノシシとブタに常在する A 群ロタウイルスの遺伝的関連性. 第 148 回日本獣医学会学術集会 (2009 年 9 月、鳥取)

3) 安部昌子、伊藤直人、杉山 誠: 自然界における A 群ロタウイルスの動態: 牛正常便由来ロタウイルスの遺伝的解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (2009 年 10 月、東京)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

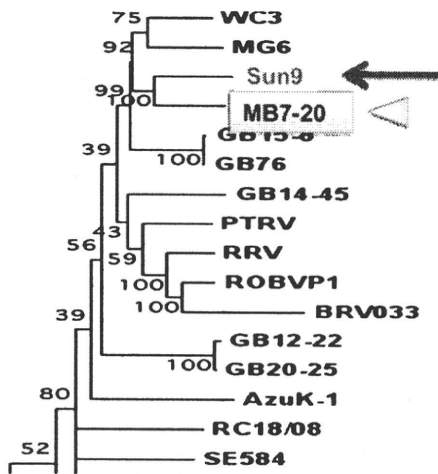
2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

表 1. 健康な牛から分離されたウイルスの全分節の遺伝子型

分節遺伝子	分離ウイルス						
	GB1-76	GB15-8	GB12-22	GB20-25	GB14-45	MB7-20	AzuK-1
VP7	G10	G10	G8	G8	G6	G8	G21
VP4	P11	P11	P11	P11	P11	P14	P29
VP6	I2	I2	I2	I2	I2	I2	I2
VP1	R2	R2	R2	R2	R2	R2	R2
VP2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2
VP3	M2	M2	M2	M2	M2	M2	M2
NSP1	A13	A13	A13	A13	A3	A3	A13
NSP2	N2	N2	N2	N2	N2	N2	N2
NSP3	T6	T6	T6	T6	T6	T6	T9
NSP4	E2	E2	E2	E2	E2	E2	E2
NSP5, 6	H3	H3	H3	H3	H3	H3	H3

VP1 遺伝子



VP2 遺伝子

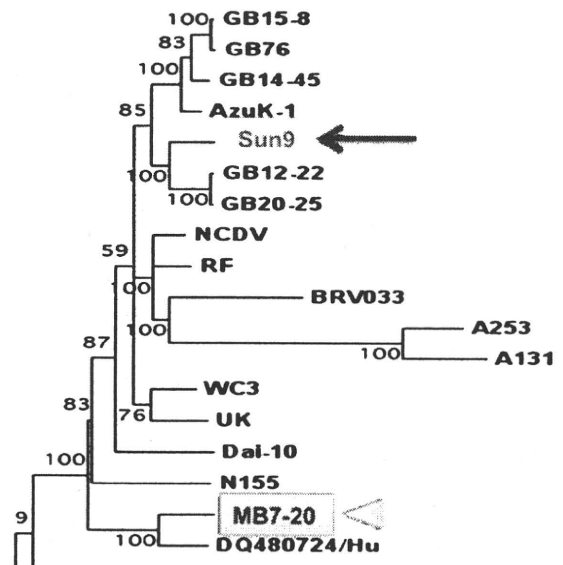


図 1. 牛から分離されたロタウイルスの VP1 及び VP2 遺伝子の遺伝学的関係

表 2. 健康な豚から検出されたロタウイルスの推定 P 及び G 遺伝子型

	G1	G2	G3	G4	G5	G9	G11	計
P1						1		1
P6			1	1		2		4
P7			1					1
P13	2	2	6	4	8	9	3	34
P23				1		1		2
P27		4	1					6
P?		4		1		1		7
P??		1		1				2
計	2	11	9	8	8	14	3	55

表 3. 簡便法により糞便サンプルより検出されたロタウイルスの遺伝子型

糞便サンプル	各分節の遺伝子型					
	VP4	VP7	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
GB1-76	P11	G10	N2	T6	E2	H3
GB2-6	P29	-	-	-	-	-
GB9-3	P29	G21	N2	T9	E2	H3
GB11-3	P29	G21	-	-	-	-
GB12-4	P11	G10	-	-	-	-
GB12-22	P11	G8	N2	T6	E2	H3
GB14-45	P11	G6	N2	T6	E2	H3
GB15-35	P11	-	N2	-	E2	H3
GB16-44	P29	-	-	-	-	-
GB18-10	P29	-	-	-	-	-
GB20-40	P29	-	-	-	-	-

- : 検出できなかった

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Inoue, E., Wang, X., Osawa, Y., and Okazaki, K	Full genomic amplification and subtyping of influenza A virus using a single set of universal primers.	Microbiol. Immunol.	54 (3)	129-134	2010
Usui T, Yamaguchi T, Ito H, Ozaki H, Murase T, Ito T.	Evolutionary genetics of highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses isolated from whooper swans in northern Japan in 2008.	Virus Genes	39 (3)	319-323	2009
Tsunekuni R, Ito H, Otsuki K, Kida H, Ito T.	Genetic comparisons between lentogenic Newcastle disease virus isolated from waterfowl and velogenic variants.	Virus Genes	40 (2)	252-255	2009
Tsunekuni R, Ito H, Kida H, Otsuki K, Ito T.	Increase in the Neuraminidase Activity of a Nonpathogenic Newcastle Disease Virus Isolate during Passaging in Chickens.	J Vet Med Sci.			in press
Shivakoti S, Ito H, Otsuki K, Ito T.	Characterization of H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Isolated from a Mountain Hawk Eagle in Japan.	J Vet Med Sci.			in press
Shivakoti S, Ito H, Murase T, Ono E, Takakuwa H, Yamashiro T, Otsuki K, Ito T.	Development of Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Assay for Detection of Avian Influenza Viruses in Field Specimens.	J Vet Med Sci.			in press
Abe, M., Ito, N., Morikawa, S., Takasu, M., Murase, T., Kawashima, T., Kawai, Y., Kohara, J. & Sugiyama, M.	Molecular epidemiology of rotaviruses among healthy calves in Japan: Isolation of a novel bovine rotavirus bearing new P and G genotypes.	Virus Res	144 (1-2)	250-257	2009