

食鳥処理場において高病原性鳥インフルエンザ (HPAI)が疑われた場合、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。その輸送用培地として市販品を含めて3種類の培地中での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結果、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った。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4℃での温度管理が重要であると考えられる。なお、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った。

マイクロアレイ技術による網羅的病原体ゲノム検出で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インフルエンザウイルスRNAをモデルとして、RT-PCR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、H1Narita株のRT-PCR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と考えられた。

A群ロタウイルスの豚における排泄状況を知るために前年度、Nested RT-PCR法により健康な豚169例からA群ロタウイルスの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。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、これまで、本ウイルスの感染環を解明するために採用していた、感度の高いsemi-nested RT-PCR法(計算上0.5~1粒子のウイルス遺伝子の検出が可能)から、食肉でのリスクを過剰に評価しないためにも $10^{2\sim3}$ のウイルス粒子(本ウイルスの感染には100粒子程度が必要と考えられている)の遺伝子が検出可能な

RT-PCR法を採用しウイルス遺伝子の検出を行った結果、前年度の検出率40.2%には及ばないものの、約1割の豚より本ウイルス遺伝子が検出され、食肉でのリスクが示唆された。さらに、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様相も明らかとなったことから、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ヒトへのリスクとなると考えられた。

A群ロタウイルスの疫学的研究には、全11ゲノム分節を解析する必要と考えられている。しかしその作業は煩雑であり、簡便な方法が求められている。昨年度は、開発した簡便法を直接糞便サンプルに応用したが、54.5%と低い検出率であった。今年度は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、大幅に改善することができた。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。

E. 結論

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」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検出されなかった。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、プライマーを変更することにより他のウイルス検査にも応用できると考えられた。

2008年のサンプルで検出されたブタサーコウイルス2型の核酸配列を決定したところ、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が可能であった。

PCR 法による牛白血病ウイルス検出法の改良法を検討した。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過去の検出率と同等の成績が得られたが、検査機器等が異なることから各検査室では微調整やさらなる手技の習熟も必要と考えられた。

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→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。

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。また、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。

マイクロアレイ病原体網羅的検出システムに用いたプローブは安価簡便な RT-PCR/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。

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。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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) 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.
- 3) 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.

- 4) 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)
- 5) Abe, M., Ito, N., Masatani, T., Nakagawa, K., Yamaoka, S., Kanamaru, Y., Suzuki, H., Shibano, K., Arashi, Y. and Sugiyama, M. Whole genome characterization of new bovine rotavirus G21P[29] and G24P[33] strains provides evidence for interspecies transmission. J. Gen. Virol. (in press).

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）

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

- 1) 安部昌子、伊藤直人、杉山 誠：ウシ正常個体由来 A 群ロタウイルスの全ゲノムを対象とした分子系統学的解析. 第 150 回日本獣医学会学術集会 (2010 年 9 月、帯広)
- 2) 岡寺康太、安部昌子、伊藤直人、杉山 誠：と畜場に搬入された豚における A 群ロタウイルスの検出およびその遺伝学的解析. 第 150 回日本獣医学会学術集会 (2010 年 9 月、帯広)
- 3) 安部昌子、伊藤直人、正谷達磨、中川敬介、山岡理子、杉山 誠：A 群ロタウイルスの感染環における野生イノシシの関与. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (2010 年 11 月、徳島)

H. 知的財産権の出願・登録状況

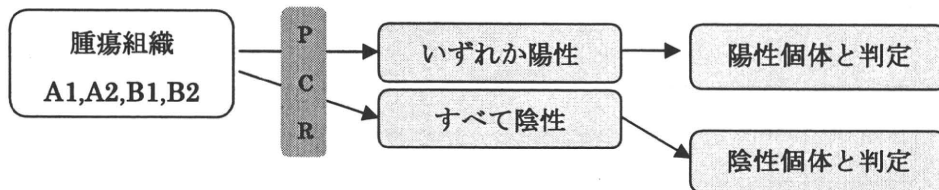
1. 特許取得
病原体を検出するためのマイクロアレイ又はそれを含むキット (2010 年 8 月 19 日公開
番号：2010178687)
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

牛白血病疑い腫瘍組織からの牛白血病ウイルスゲノム検出
 BLVenv-PCR プロトコール
 ver. 4 (2010.9.9)

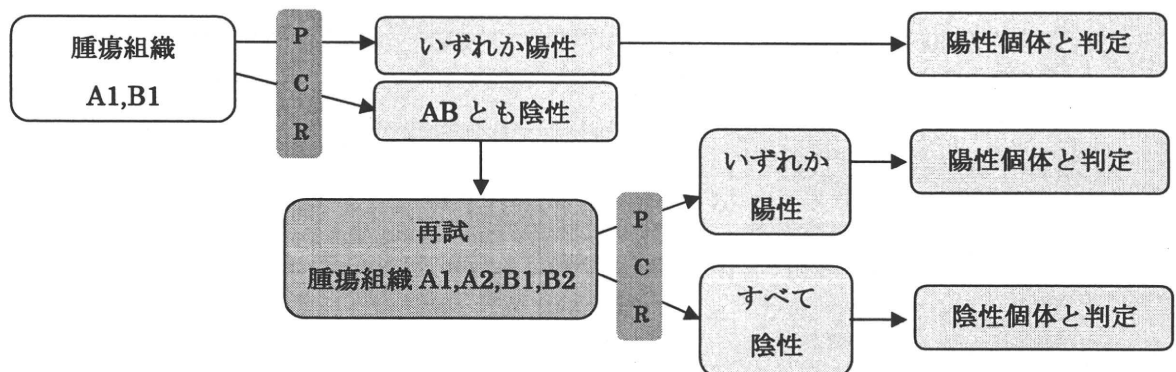
検査と判定手順 (各検査室の都合で処理検体数は適宜変更ください)

(例)

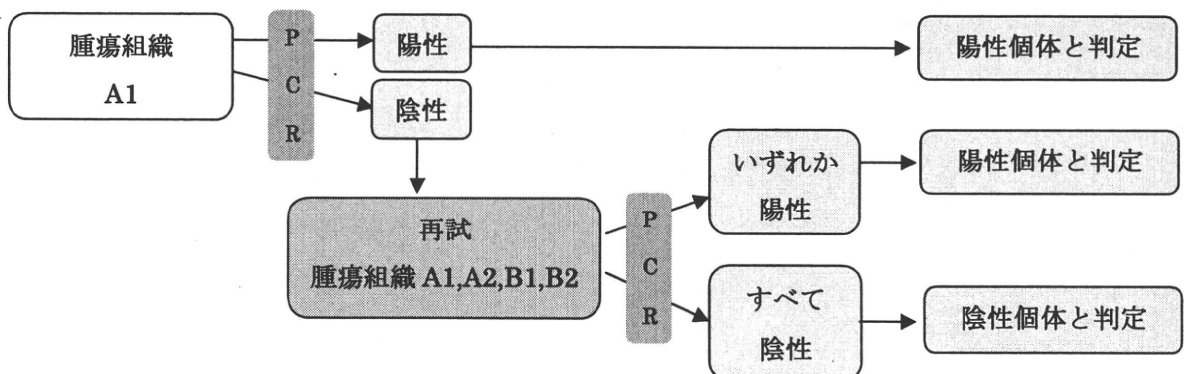
◇ 1回の検査が3頭未満のとき (最少4検体、最大12検体)



◇ 1回の検査が4から7頭の場合 (最少8検体、最大14検体)



◇ 1回の検査が8頭以上の場合 (最少8検体)



牛白血病疑い腫瘍組織からの牛白血病ウイルスゲノム検出

BLVenv-PCR プロトコール ver. 4

記録用紙付

【Phire Animal Tissue Direct PCR kit (FINNZYMES)を用いた PCR】

17 コームアガロースゲル電気泳動層の使用に合わせて 14 検体を検査する場合

(14 検体+陽性対照 DNA+陰性対照+マーカー=17 レーン)

実施日 _____ 実施者 _____

検体	結果
1	_____
2	_____
3	_____
4	_____
5	_____
6	_____
7	_____
8	_____
9	_____
10	_____
11	_____
12	_____
13	_____
14	_____
15 DW	_____
	陽性対照 _____

適当な位置にサイズマーカーを泳動する。

1. 検体処理

開始時刻 _____ :

- ブロックヒーターを 98℃ に設定。
1.5ml マイクロチューブ (15 本) に 20µl の Dilution Buffer [Finzymes # F-132, Lot _____, _____ 開封] を入れる。
- 組織 2 - 5mg を入れる。1 本には DW 5µl
【大きすぎないように注意】 (写真 1、写真 2)
- 0.5µl の DNA Release Additive [Finzymes # F-132, Lot _____, _____ 開封] を加える。【多検体処理の場合は Dilution Buffer に先に加えても可】
- Vortex
- 軽くスピンドウン
- 室温 2 - 5 分間静置
- 98℃ 2 分間加熱【通常のエッペンドルフチューブは蓋が開くので注意】
- 軽くスピンドウン
- 上清を新しいマイクロチューブ (15 本) に移す。
- 使用時まで氷上

終了時刻 _____ :

- (PCR に使用した残りは -20℃ 保管)

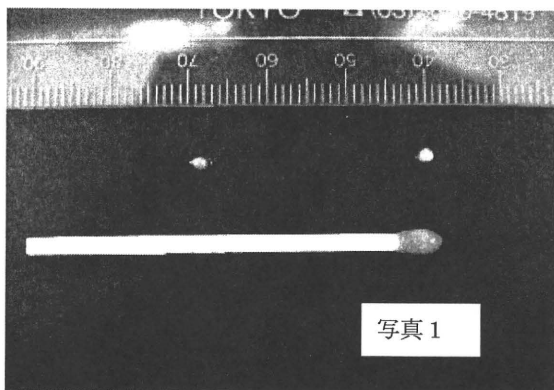


写真 1

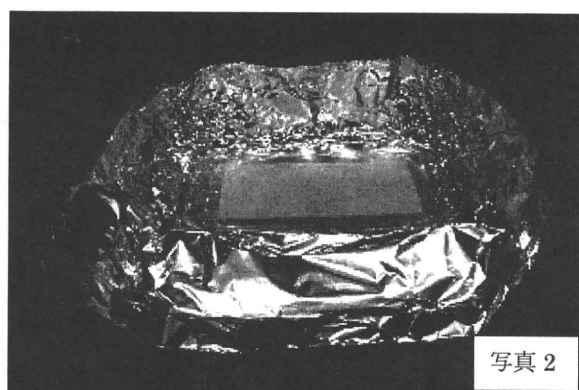


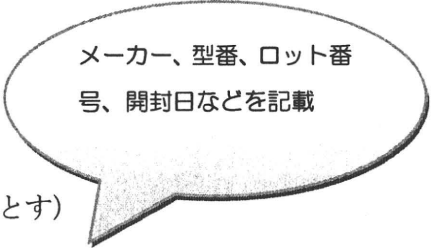
写真 2

写真 1. サンプルの大きさはマッチ棒の先よりさらに小さい。写真 2. 組織切り出し用台：凍結試料が融けるのを防ぐため、冷却したアルミブロック上にアルミホイル、パラフィルム (2~3 枚) を敷く。試料毎にパラフィルムを交換する。

2. PCR

(1) プライマーDNAの調製

作成日 _____ 調製者 _____



メーカー、型番、ロット番号、開封日などを記載

- 合成オリゴDNAのチューブを軽く遠心する（乾燥DNAを落とす）
- ゆっくり蓋をとり、TE [_____]を指定量（供給されるチューブに記載された量）を添加。
【2010年7月配布分については OBLV1A:72.9 μ l、OBLV6A:65.9 μ l】
- ボルテックス後、軽く遠心する（100pmol/ μ l=100 μ Mの液）
【ストック液として-20 $^{\circ}$ C保管、20 μ l ずつくらいに分注しておくで凍結融解回数が減らせる】
- 10 μ lの100 μ M DNAと90 μ lのDEPC-DW [_____]を混合する（10 μ M=10pmol/ μ l液）
【ワーキング液として-20 $^{\circ}$ C保管】
【使用量が少ない場合は5 μ lの100 μ M DNAと45 μ lのDEPC-DWでもよい】

(2) PCR 液の混合 (50 μ l での反応)

(0.5ml PCR チューブ使用の場合は 50 μ l の反応系で実施)

17 コームアガロースゲル電気泳動層の使用に合わせて検体数を調整して実施する場合
(14 検体+陰性対照+陽性対照 DNA+マーカーのレーン=17 レーン)

開始時刻 _____ :

・ 1.5ml マイクロチューブに以下を混合する。(上から順番)

	1 検体分	x17
DEPC-DW [_____]	16.5 μ l	280.5 μ l <input type="checkbox"/>
2 \times Phire Animal Tissue PCR Buffer* [Finzymes #F-141, Lot _____ 開封]	25.0 μ l	425.0 μ l <input type="checkbox"/>
Forward primer (10 μ M OBLV1A) [_____ 調製]	2.5 μ l	42.5 μ l <input type="checkbox"/>
Reverse primer (10 μ M OBLV6A) [_____ 調製]	2.5 μ l	42.5 μ l <input type="checkbox"/>
Phire Hot Start II DNA polymerase [Finzymes #F-122S, Lot _____ 開封]	1.0 μ l	17.0 μ l <input type="checkbox"/>
Total	47.5μl	807.5μl <input type="checkbox"/>

- 軽く vortex、軽く遠心
- 47.5 μ l ずつ PCR チューブに分注 (16 本)
- 陰性対照を 2.5 μ l 添加
- 検体 DNA 2.5 μ l を添加 (14 検体分)
- 陽性対照 DNA 2.5 μ l を添加

終了時刻 _____ :

PCR

サーマルサイクラー [機種 _____]

プログラム名 [_____]

開始時刻 _____ :

終了時刻 _____ :

98 $^{\circ}$ C 5分
▼
98 $^{\circ}$ C 5秒
60 $^{\circ}$ C 5秒
72 $^{\circ}$ C 20秒 } 40サイクル
▼
72 $^{\circ}$ C 1分
▼
4 $^{\circ}$ C 保管

(2) PCR 液の混合 (25 μ l での反応)

開始時刻 _____ :

・ 1.5ml マイクロチューブに以下を混合する。(上から順番)

	1 検体分	x17
DEPC-DW	8.25 μ l	140.25 μ l <input type="checkbox"/>
[_____]		
2 \times Phire Animal Tissue PCR Buffer*	12.50 μ l	212.50 μ l <input type="checkbox"/>
[Finzymes #F-141, Lot _____, 開封]		
Forward primer (10 μ M OBLV1A)	1.25 μ l	21.25 μ l <input type="checkbox"/>
[_____ 調製]		
Reverse primer (10 μ M OBLV6A)	1.25 μ l	21.25 μ l <input type="checkbox"/>
[_____ 調製]		
Phire HotStart II DNA polymerase*	0.50 μ l	8.50 μ l <input type="checkbox"/>
[Finzymes #F-122S, Lot _____, 開封]		
Total	23.75μl	403.75μl <input type="checkbox"/>

- 軽く vortex、軽く遠心
- 23.75 μ l ずつ PCR チューブに分注 (16 本)
- 陰性対照を 1.25 μ l 添加
- 検体 DNA 1.25 μ l を添加 (14 検体分)
- 陽性対照 DNA 1.25 μ l を添加

終了時刻 _____ :

PCR

サーマルサイクラー [機種 _____]

プログラム名 [_____]

開始時刻 _____ :

終了時刻 _____ :

98 $^{\circ}$ C 5分



98 $^{\circ}$ C 5秒

60 $^{\circ}$ C 5秒

72 $^{\circ}$ C 20秒



72 $^{\circ}$ C 1分



4 $^{\circ}$ C 保管

} 40サイクル

(2) PCR 液の混合 (20 μ l での反応)

開始時刻 _____ :

・ 1.5ml マイクロチューブに以下を混合する。(上から順番)

	1 検体分	x17
DEPC-DW [_____]	6.6 μ l	112.2 μ l <input type="checkbox"/>
2 \times Phire Animal Tissue PCR Buffer* [Finzymes #F-141, Lot _____, 開封]	10 μ l	170.0 μ l <input type="checkbox"/>
Forward primer (10 μ M OBLV1A) [_____ 調製]	1 μ l	17.0 μ l <input type="checkbox"/>
Reverse primer (10 μ M OBLV6A) [_____ 調製]	1 μ l	17.0 μ l <input type="checkbox"/>
Phire HotStart II DNA polymerase* [Finzymes #F-122S, Lot _____, 開封]	0.4 μ l	6.8 μ l <input type="checkbox"/>
Total	19μl	323.0μl <input type="checkbox"/>

- 軽く vortex、軽く遠心
- 19 μ l ずつ PCR チューブに分注 (16 本)
- 陰性対照を 1 μ l 添加
- 検体 DNA 1 μ l を添加 (14 検体分)
- 陽性対照 DNA(新) 1 μ l を添加

終了時刻 _____ :

PCR

サーマルサイクラー [機種 _____]

プログラム名 [_____]

開始時刻 _____ :

終了時刻 _____ :

98 $^{\circ}$ C 5分



98 $^{\circ}$ C 5秒

60 $^{\circ}$ C 5秒

72 $^{\circ}$ C 20秒



72 $^{\circ}$ C 1分



4 $^{\circ}$ C 保管

40サイクル

(3) アガロース電気泳動 (ミューピッドミニゲル電気泳動装置)

***ゲルの作製**

開始時刻 _____ :

アガロース [Agarose S 日ジ#312-01193 Lot _____ 開封]0.5g

1 x TAE with EtBr [_____ 調製] 50ml

電子レンジで融解

■ 1xTAE with EtBr の調製[_____]

DW [_____] 1960m

50x TAE [_____] 40ml

10mg/ml エチジウムブロミド液 [_____] 100 μ l

ゲル作製プレートに添加 (17 レーンコム : 30ml)

室温で固化【急ぐ時は冷蔵庫で】

終了時刻 _____ :

【複数のゲルを一度に作っておけば、PCR 終了サンプルの電気泳動をすぐに実施できる。

乾かないようにして冷蔵 1 週間は OK】

***電気泳動と写真撮影**

開始時刻 _____ :

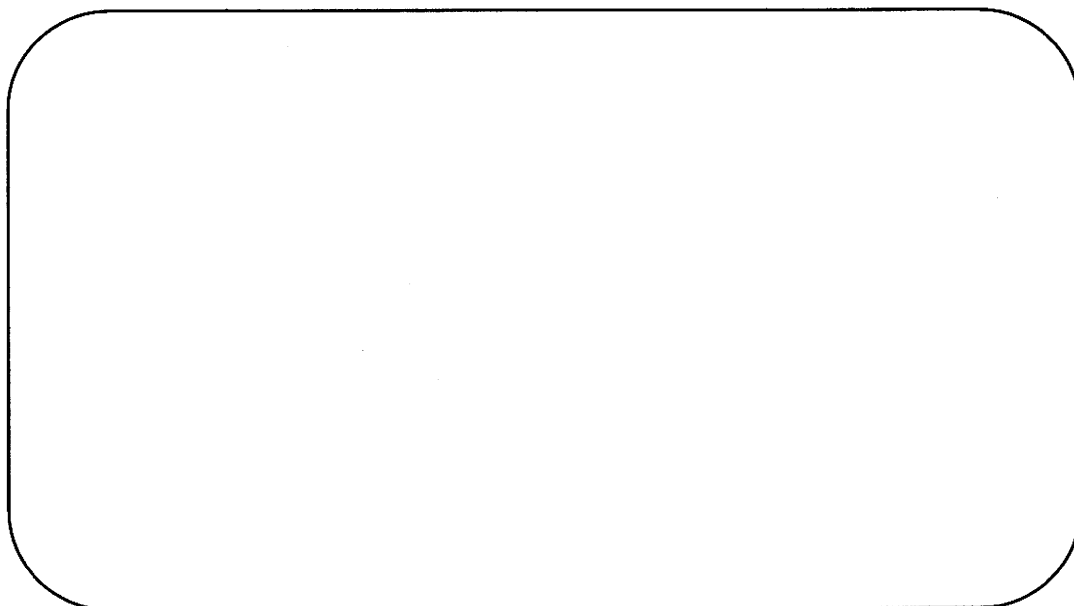
- PCR 終了液 (20 μ l)
- Gel Loading Dye [Finzymes #F-350, Lot _____ , _____ 開封] 5 μ l
- 5 μ l をゲルの各ウェルに添加*
- DNA サイズマーカー[_____ , _____ 開封] _____ μ l/lane
- 100V で約 30 分間泳動 (BPB 色素のラインが約 500bp)

*【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



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 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が出なかった。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が可能であった。

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 [▼] (84)	93/120 [▼] (78)
SuHV-1 : suid herpesvirus 1 オーエスキーウイルス(届)	0/120 [▼] (0)	0/120 [▼] (0)
PPV : porcine parvovirus 豚パルボウイルス	68/120 [▼] (57)	65/120 [▼] (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 [▼] (0)	0/120 [▼] (0)
JEV : Japanese encephalitis virus 日本脳炎ウイルス(法)(人獣)	0/120 [▼] (0)	0/120 [▼] (0)
PEDV : porcine epidemic diarrhea virus 豚流行性下痢ウイルス(届)	0/120 [▼] (0)	0/120 [▼] (0)
PoRV-A : porcine rotavirus A 豚ロタウイルス	0/120 [▼] (0)	0/120 [▼] (0)
TGEV : transmissible gastroenteritis virus 伝染性胃腸炎ウイルス(届)	0/120 [▼] (0)	0/120 [▼] (0)
GETV : Getah virus ゲタウイルス	0/120 [▼] (0)	0/120 [▼] (0)
HEV : hepatitis E virus E型肝炎ウイルス	0/34 [▼] (0)	0/120 [▼] (0)

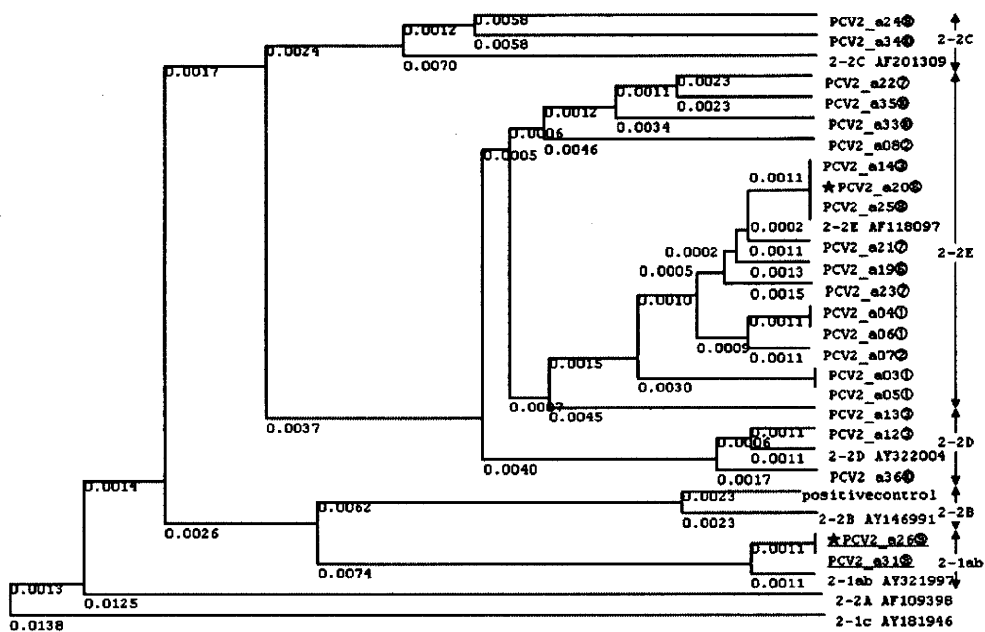
表2 PCV2遺伝子型特異的なPCRプライマー (PCV2a、PCV2 b) を用いたブタサーコウイルス2型遺伝子の検出

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。

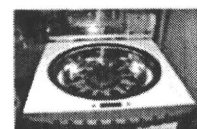
以下に簡単な検査の流れを図解する。

<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 I Micro Smash



YASUI Multi-beads shocker

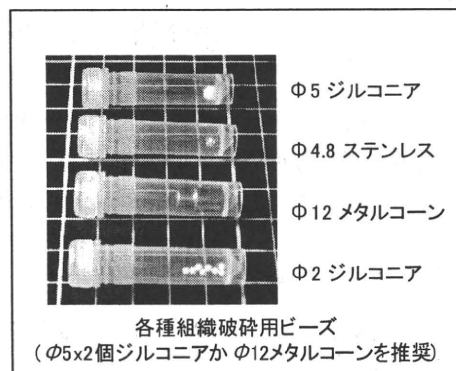
臓器乳剤作成装置



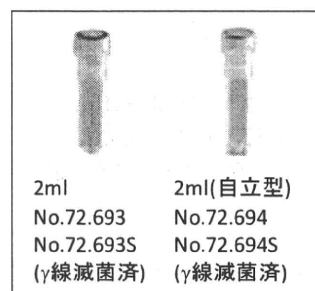
自動核酸抽出装置
(Precision System Science Co., Ltd.)

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 Magstration-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 粒入追加しても可)、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℃) 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℃)。
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