

ブ1-3本に小分けして保存する(-80°C. なければ-20°C)。

注3) :多くの軟組織は2回破碎で十分乳剤化するが、動物種によっては、脾臓、腸管、脾臓、リンパ節などは破碎しづらいことがある。よって、乳剤化の具合を目視で判断し、破碎回数を調節すること。15秒x10回程度の破碎では乳剤の温度はそれほど上がらない。温度の上昇がある時は数回破碎後、一時水中で冷やし、再度破碎操作をする。

#### 4. ウイルス RNA/DNA の抽出 (1%乳剤から抽出する手順)

<Precision 社製自動核酸抽出装置を使用した例>

1. 培地(又は生理食塩水)を180ul 入れたRNA/DNA 抽出キットの付属チューブに10%乳剤20ul を加える。
2. RNA/DNA 抽出キット(GC series Magtration-MagaZorb RNA Common Kit)を用いてRNA/DNA を抽出する。  
※ RNA/DNA 抽出機の抽出条件を設定する(オペレーションフロー図 参照)
  1. DNase 処理 「処理しない」を選ぶ(RNA ウイルスだけを目的とする時DNase 処理をする)(注4)。
  2. 溶出量(elution volume) 50ul とする。
3. 溶出されたRNA(約50ul)から1ul をとりcDNA 合成へ。
4. 残りのRNA は-20°Cで保存。更に、長期保存したい場合はエタノール沈殿状態で保存すると良い。100ul RNA 溶液(RNA を50ul でelution した場合はDEPC H<sub>2</sub>O 50ul を加える)に4M NaOAc 8ul, H<sub>2</sub>O 81ul, 100% EtOH 300ul 加えて-80°C (又は-20°C) 保存。

注4) DNase 処理をする時のDNase 調製(40 units/sample 使用)の仕方。

DNaseI (RNase-free) Takara (Code. 2215A) をキット付属のチューブに buffer 80ul、DNaseI 8ul (5U/ul) を入れ、RNA/DNA 抽出機のチップラックの指定位置にセットする。

#### 5. cDNA の合成

random hexamers をプライマーとしてcDNA を合成する。

<Invitrogen の Superscript 1st-strand Synthesis kit を使用した例>

酵素類の安定のために全て氷上にて行う。

##### 1. PCR 用チューブに

RNA	1ul
random hexamers	1ul
10mM dNTP mix	1ul
DEPC-treated water	7ul / total 10ul

を加え、65°Cで5分インキュベーションする。複数サンプルを同時に行う場合はRNA以外の試薬をサンプル数本分まとめて混ぜて作り、PCRチューブに分注し、最後にRNAを加える。このとき実際のサンプル数より2本分ほど多く作ると後で不足せずに済む。

##### 2. 氷上で1分以上冷却する。

3. 

10×RT buffer	2ul
25mM MgCl <sub>2</sub>	4ul
0.1M DTT	2ul
RNaseOUT Recombinant	

Ribonuclease Inhibitor 1ul / total 9ul

を混ぜておいたものを PCR チューブに 9ul 加え、チューブの壁に着いた試薬を軽く遠心しておとす。複数サンプルを同時に行う場合は上記混合液をサンプル数分まとめて作成し、9ul を PCR チューブに加える。総容量 19ul になる。

4. 25°Cで2分間インキュベーションする。
5. Superscript II RT を 1ul ずつ加え 25°Cで10分間インキュベーションする。総容量 20ul。
6. 42°Cで50分間インキュベーションする。
7. 70°Cで15分間インキュベーションする。
8. 氷上で冷却する。
9. チューブの壁に着いた試薬を軽く遠心しておとす。
10. RNaseH を 1ul ずつ加え 37°Cで20分間インキュベーションする。
11. PCR に使用するまで -20°Cで保存する。

## 6. PCR

合成した cDNA 溶液 20ul から 1ul をとり PCR の反応液に加え、サーマルサイクラーで増幅し、2% アガロースゲルで電気泳動してバンドを確認する。

後述「7. 備考-3)multiplex PCR 法の例」を参考のこと。

## 7. 備考

### 1) 使用済みメタルコーンの洗浄方法

1. 使用後、1N-NaOH 溶液に漬けておく。
2. 水道水でメタルコーンについた臓器片などを洗い流す。
3. 120°C 20min autoclave。
4. MilliQ 水で7回水洗。
5. アセトン洗浄1回（乾燥が早くなる）。
6. 乾燥 60°C 1時間。
7. ガラス容器に入れ（シャーレなど）アルミホイルで包み乾熱滅菌（180°C~200°C 3時間）。

### 2) 保存したエタノール沈殿 DNA/RNA から核酸を抽出する方法

1. 手順4-4でDNA/RNAをエタノール沈殿したサンプルを取りだし、軽くボルテックスした後、必要量を新しいチューブに分ける。
2. 15,000rpm, 10min 遠心する。
3. 上清をすてる。(RNAのペレットが見えないことが多いので慎重に)
4. 70% エタノール (DEPC H<sub>2</sub>O) を 1ml 加える。
5. 15,000rpm, 5min 遠心する。
6. 上清をすて、RNA を風乾する。(ペレットが見えないことが多い。乾かしすぎると DNA/RNA が H<sub>2</sub>O に溶けにくくなる)
7. 適量の DEPC 処理 H<sub>2</sub>O に溶解する。

### 3) multiplex PCR 法の例

上記の方法で作成されたウイルス DNA/cDNA を鋳型にした様々な PCR 法が可能である。

豚の DNA 及び RNA ウイルスの検出を目的とした multiplex PCR 法が報告され(Ogawa ら、J. Virol. Method. 160: 210-214, 2009)、3種類のブタ DNA ウイルスと6種類のブタ RNA ウイルスがそれぞれ1つの PCR 反応で検出できるようになった。以下はその PCR プライマーを利用した方法の概要である。

#### A. multiplex PCR (Ogawa ら、J. Virol. Method. 160: 210-214, 2009 による)

##### a. DNA ウイルス 3 種(PCV2、PPV、SuHV)

PCR 用チューブに PCR 反応溶液を調整する。(1サンプルあたり)

	Quick Tag HS DyeMix (東洋紡)	10 $\mu$ l
	H <sub>2</sub> O	8.6 $\mu$ l
プライマー	PCV2-F(10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ l
	PCV2-R(10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ l
	PRV-gB-F(10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ l
	PRV-gB-R(10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ l
	PPV-F(10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ l
	PPV-R(10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ l
	cDNA	1 $\mu$ l / total 20 $\mu$ l

スピンドウンを行った後、以下の条件で PCR 反応を行う。

94°C	1 分	} 35 サイクル
94°C	30 秒	
53°C	90 秒	
72°C	90 秒	
72°C	2 分	

##### b. RNA ウイルス 6 種(JEV、PEDV、PoRV-A、TGEV、PRRSV、GETV)

PCR 用チューブに PCR 反応溶液を調整する。(1サンプルあたり)

	Quick Tag HS DyeMix (東洋紡)	10 $\mu$ l
	H <sub>2</sub> O	6.6 $\mu$ l
	PRRS-Fb(10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ l
プライマー	PRRS-Rb(10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ l
	JEV-F(10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ l
	JEV-R(10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ l
	PEDV-F(10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ l
	PEDV-R(10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ l
	PoRV-GAPPV-NSP4-F(10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ l
	PoRV-GAPPV-NSP4-R(10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ l
	TGEV-F(10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ l
	TGEV-R(10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ l
	GETV-F(10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ l
GETV-R(10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ l	
	cDNA	1 $\mu$ l / total 20 $\mu$ l

スピンドウンを行った後、以下の条件で PCR 反応を行う。

94°C	1 分
------	-----

94°C	30 秒	} 35 サイクル
53°C	30 秒	
72°C	60 秒	
72°C	2 分	

Ogawa ら (J. Virol. Method. 160 (2009) 210-214) の使用した multiplex PCR プライマーの組み合わせと配列。

ウイルス	プライマー名	プライマー配列(5' - 3')	PCR産物分子量	
DNA型	PCV2	PCV2-F	CAGCAACATGCCAGCAAGAAGAAT	703bp
		PCV2-R	TCGATCACACAGTCTCAGTAG	
	PPV	PPV-F	CACAGAAGCAACAGCAATTAGG	203bp
		PPV-R	CTAGCTCTTGTGAAGATGTGG	
	SuHV1	gB-F	CCTCGTAGTACACGTACCCG	368bp
		gB-R	CTGGTGCGAGCTGCAGAACAAG	
RNA型	JEV	JEV-F	TGATGACCATYAACAACACGG	605bp
		JEV-R	CATGCGGACGTCCAATGTTG	
	PEDV	PEDV-F	GATATGTTTGTAAATGGTAACTC	503bp
		PEDV-R	AGCATAGCTAAAAGGCAATGC	
	PoRV-A	GAPRV-NSP-F	TTACTCTACATAAGCATCAAT	416bp
		GAPRV-NSP-R	GACGGCAACTCAACCTCTCACAT	
	TGEV	TGEV-F	GATATGTTTGTAAATGGTAAACCC	299bp
		TGEV-R	CTCTATAGCTGAACGATACTTAC	
	PRRSV	PRRSV -Fb	TTGACGCTATGTGATCTGAATG	809bp
		PRRSV -Rb	ACTTTCRACGTGGTGGGC	
	GETV	GETV-F	GGTGTGAAAAGCGAGAAGC	160bp
		GETV-R	TGCCTGGAACCTCACTCACTG	

※DNAウイルス

PCV2 : porcine circovirus type 2 豚サーコウイルス2型

PPV : porcine parvovirus 豚パルボウイルス

SuHV-1 : suid herpesvirus 1 オーエスキーウイルス(届)

※RNAウイルス

JEV : Japanese encephalitis virus 日本脳炎ウイルス(法)(人獣)

PEDV : porcine epidemic diarrhea virus 豚流行性下痢ウイルス(届)

PoRV-A : porcine rotavirus A 豚ロタウイルス

TGEV : transmissible gastroenteritis virus 伝染性胃腸炎ウイルス(届)

PRRSV : porcine reproductive and respiratory syndrome virus 豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス

GETV : Getah virus ゲタウイルス

## 8. 使用品のリスト

機器、キット、試薬 など	製品名	メーカー 名	価格	備考
臓器破碎機	Multi-beads shocker	YASUI	定価 ¥ 2,100,000 ~	
	ビーズ式細胞破碎装 置(非冷却型MS-100)	TOMY	定価 ¥ 698,000	
Φ12メタルコーン	MC-0215	YASUI	¥64,000/100個	
Φ5 ジルコニア	ZB-50	TOMY	¥10,000/300g	
Φ2 ジルコニア	ZB-20	TOMY	¥10,000/300g	
臓器破碎用チューブ	臓器破碎機に合った もの			
RNA/DNA抽出機	Magtration System 6GC	Precision System Science Co., Ltd.	定価 ¥2,400,000	
同ICカード	Magtration- MagaZorb RNA/Common code. I6054	Precision System Science Co., Ltd.	¥120,000	
RNA/DNA抽出キット	GC series Magtration- MagaZorb RNA Common Kit code.No.E2004	Precision System Science Co., Ltd.	¥42,000/48tests	¥875/test
DNaseI (RNase- free)	code. 2215A	Takara	¥12,000/5000U	
cDNA合成キット	SuperScript™First- Strand Synthesis system for RT-PCR 11904-018	Invitroge n	¥54,100/50反応	¥1,082/sample
Taqポリメラーゼ	Takara EXTaq RR001A	タカラバ イオ (株)	¥27,000/ 250 U	1sample 20ul (0.5U) で行う と ¥54/sample
PCR用primer				
アガロース	(アガロースS 312- 01193)	(和光純 業)	(¥13,200/100g)	
電気泳動装置	ミューピッド2 plus	アドバン ス	¥42,800	
				試薬のみの合計 ¥2,011/sample

## 9. 参考 Web サイトおよび引用文献

1. 安井器械株式会社 <http://www.yasuikikai.co.jp/>
2. 株式会社トミー精工 <http://bio.tomys.co.jp/>
3. プレシジョン・システム・サイエンス株式会社 <http://www.pss.co.jp/>
4. Ogawa H, et. al. Multiplex PCR and multiplex RT-PCR for inclusive detection of major swine DNA and RNA viruses in pigs with multiple infections. J Virol Methods. 160:210-4. 2009

## 牛リンパ肉腫からの牛白血病ウイルス *env* 遺伝子検出法の改良

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：1999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ウイルスの疫学調査が重要である。従来、検査対象牛のBLV感染を証明するためには、OIEのマニュアルに準拠したPCR法によって腫瘍検体から*env*遺伝子を検出していた。本研究では検査法の簡略化ならびに標準化を目指し、新たな耐熱性DNAポリメラーゼを試用するとともに陽性対照DNAを調整した。その結果、検査時間の大幅な短縮ならびに高感度化に成功し、食肉衛生検査所での検査が容易となった。

### A. 研究目的

ウシの白血病は、疫学的および臨床病理学的所見から地方病性および散発性に分類される。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、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に近縁であるが、ヒトへの感染はない。ウイルス感染牛の多くは不顕性であり、約1/3がリンパ球増多症を呈する。さらに、全体の数%がB細胞性の白血病を発症して全身性のリンパ肉腫を認めるようになる。感染牛は終生抗体を産生するためゲル内沈降反応やELISAなどによる血清診断が行われ、欧州諸国では抗体陽性牛の摘発・淘汰によって清浄化に成功している。病原診断では、ウイルス分離とPCR法によるリンパ球ゲ

ノム中のプロウイルス検出が行われる。

OIEのマニュアルでは*env*遺伝子領域内の440塩基、あるいはnestedPCRによって341塩基を検出するが、その操作は煩雑であった。そこで本研究では、一般的な食肉衛生検査所においても実施可能な方法を確認するためにOIEマニュアルの簡略化を試みた。また、反応の特異性を担保するために陽性対照を新たに調整した。

### B. 研究方法

1. **腫瘍組織**：10歳6ヶ月齢雌黒毛和種の第三胃に認められた肉腫を用いた。採材後約5ヶ月間-20℃に保存された後、凍結下北海道医療大学に輸送された。その後、使用時まで-80℃に保存された。

2. **核酸抽出**：約5mgの組織片を1.5mLのマイクロチューブに取り、Quick Gene

DNA tissue kit S (FUJIFILM) 同梱の Tissue Lysis Buffer 180  $\mu$ L および 1.5 mg/mL Proteinase K 20  $\mu$ L を加え、55°C 中で 1 晩振とう混和した。その後キット添付のマニュアルに従って 200  $\mu$ L の Elution buffer を用いて溶出して肉腫細胞ゲノム精製 DNA を得た。

3. PCR-1 : OIE の診断マニュアルに準じ、gp51 領域をコードする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 28.25  $\mu$ L、5 X GoTaq Flexi buffer (Promega) 10 $\mu$ L、10 mM dNTPs mix 1 $\mu$ L、10 $\mu$ M プライマー OBLV1A (5'-CTTTGTGTGCCAAGTCTCCCAG ATACA-3') および OBLV6A (5'-CCAACA TATAGCACAGTCTGGGAAGGC-3') 各 2  $\mu$ L、精製 DNA 溶液 2.5 $\mu$ L を混和し、最後に 25 mM MgCl<sub>2</sub> 4 $\mu$ L および 5 U/ $\mu$ 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. PCR-2 : Phire Animal Tissue Direct PCR kit (FINNZYMES) 同梱の Dilution Buffer 20 $\mu$ L を 1.5 mL のマイクロチューブに取り、約 5 mg の組織片を入れた。これに 0.5 $\mu$ L の DNA Release Additive を加え、攪拌後、室温に 5 分間静置した。98°C、2 分間加熱後、遠心して得た上清に精製水 180 $\mu$ L を加え鋳型 DNA 液とした。精製水 16.5  $\mu$ L、2 X Phire Animal Tissue PCR Buffer 25 $\mu$ L、10 $\mu$ M プライマー OBLV1A および OBLV6A 各 2.5  $\mu$ L、Phire Hot Start II DNA polymerase 1 $\mu$ L に鋳型 DNA 溶液 2.5 $\mu$ L を加え、混合した。98°C に 5 分間保持した後、98°C/5 秒、60°C/5 秒、72°C/20

秒を 40 回繰り返す、最後に 72°C、1 分間反応させた。

5. 陽性対照 DNA の調整 : インフルエンザ A ウイルス NS 遺伝子 cDNA を Inoue et al. (2010) の方法で増幅した。これを鋳型に 5'-CTTTGTGTGCCAAGTCTCCCAGATA CACTGATCTAGACCTGCAGGCTCAGC AAAAGCAGG-3' および 5'-CCAACATAT AGCACAGTCTGGGAAGGCCGTGGTAC CATGGTCTAGAGT-3' (下線部は各々 OBLV1A および OBLV6A の配列と同じ) プライマー対を用いて PCR を行ない、986 塩基の DNA 断片を増幅した。これをアガロース電気泳動に供し、1000 塩基付近のバンドを切り出した。Wizard SV and PCR Clean-Up system (Promega) を用いて DNA を精製し、陽性対照 DNA とした。

### C. 研究結果

1. 陽性対照 DNA の検定 : 陽性対照 DNA を精製水で 0.2ng/ $\mu$ L に調整した。これを 4 倍階段希釈し、各々の 2.5 $\mu$ L を PCR1 に供した。陰性対照としては精製水を用いた。図 1 に示すように、4<sup>-13</sup> 希釈においても 1000 塩基付近にバンドが認められた。

ついで、陽性対照 4<sup>-12</sup> 希釈、肉腫細胞ゲノム精製 DNA および精製水を鋳型として PCR1 を実施した。図 2 に示すように、陽性対照と検体のバンドは明確な区別が可能であった。また、全ての反応において非特異的な増幅産物は認められなかった。

2. PCR-1 と PCR-2 の感度比較 : 精製 DNA を鋳型として用いる PCR-1 と粗抽出 DNA を用いる PCR-2 の感度を比較するため、ほぼ同じ重量の腫瘍組織から各々 200 $\mu$ L の鋳型 DNA を調整した。これを 1 : 40 希釈し

たものを原液として 5 倍階段希釈を用意し、2.5 $\mu$ L ずつを各々の反応に供した。図 3 に示すように、精製 DNA を鋳型として用いる PCR1 では 5<sup>4</sup> 希釈が検出限界であった。一方、粗抽出 DNA を用いる PCR-2 では 5<sup>5</sup> 希釈まで特異的なバンドが検出された。即ち、PCR-2 は出発材料換算で少なくとも 5 倍の感度を有していた。

#### D. 考察

本研究で用いるプライマー対では、440 塩基の *env* 遺伝子断片を検出する。一方、対照 DNA では 986 塩基のバンドが増幅される。この断片長の差は通常のアガロース電気泳動で容易に判別が可能であった。また、PCR-1 のみならず PCR-2 においても非特異産物を増幅させることはなかった（結果示さず）。したがって、本対照 DNA は BLV *env* 遺伝子検出における陽性対照として極めて有用と考えられる。しかしながら、OIE マニュアルの nested PCR に対応するためには、2nd PCR のプライマーに相補的な内部配列を導入する必要がある。

OIE マニュアルに基づいた PCR1 では鋳型 DNA を高度に精製する必要があった。そのため、検査に 1 晩以上を要するのみならず、DNA の抽出・精製に特定の機器、試薬あるいはキットが必要であった。また多段階の操作が必要なため、多くの検体を並列処理する際には試料間の交差汚染が危惧された。そこで本研究では、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 DNA の精製操作を省くことを試みた。その結果、検査時間を大幅に短縮することに成功したのみならず、出発材料換算で少なくとも 5 倍の検出感度が得られた。PCR 産物の量で比

較した場合、PCR1 では 5<sup>2</sup> 希釈で明らかな減少が認められたのに対し、PCR-2 では 5<sup>5</sup> 希釈でも十分な蛍光が観察された。したがって、実際に検査を実施するうえでは 100 倍程度の感度が得られるものと考えられる。PCR-2 を適用することによって、一般的な食肉衛生検査所においても BLV 感染の遺伝子検査が可能になると考えられる。

#### E. 結論

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る。

#### 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

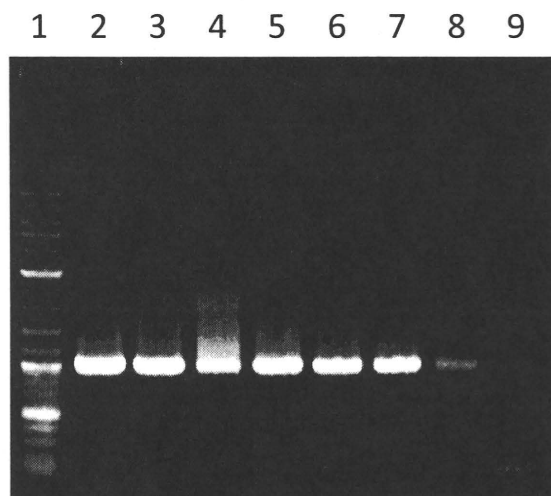


図 1. 陽性対照 DNA を鋳型とした PCR. レーン 1, 100-bp DNA ラダー； レーン 2~8, 陽性対照 DNA  $4^7 \sim 4^{13}$ ; レーン 9, 精製水



図2. *env*遺伝子の検出. レーン1, 100-bp DNA ラダー; レーン2, 陽性対照 DNA; レーン3, ウシリンパ肉腫 DNA; レーン4, 精製水

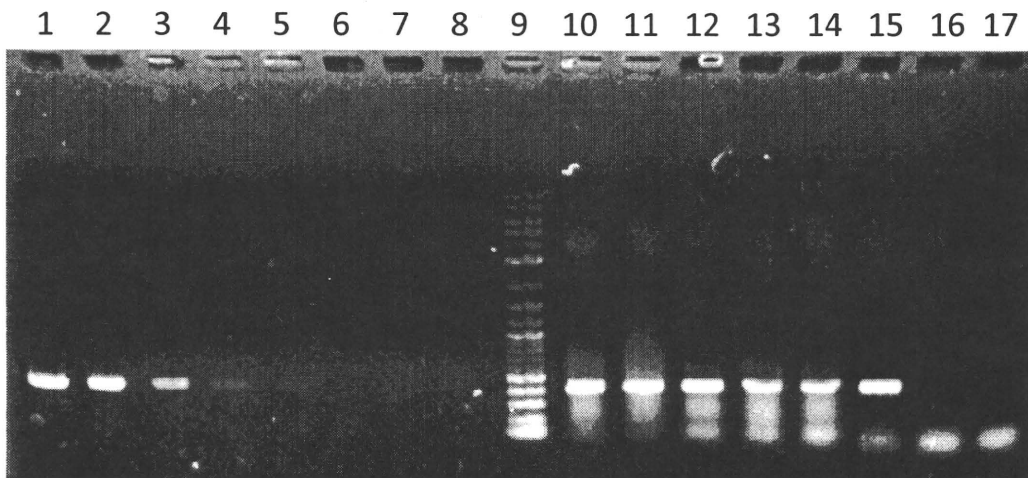


図3. PCR1 と PCR2 の比較. レーン1~8, PCR1 ウシリンパ肉腫 DNA  $5^0 \sim 5^7$ ; レーン8, 100-bp DNA ラダー; レーン9~17, PCR1 ウシリンパ肉腫 DNA  $5^0 \sim 5^7$

## 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  $55.3 \pm 5.2$  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  $97.1 \pm 11.3$  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症するのに対し、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  $\mu$ 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 : 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 $\mu$ M 各 1.5 $\mu$ L、10X AccuPrime Pfx DNA polymerase buffer (Invitrogen) 5 $\mu$ L、精製水 37 $\mu$ L、鋳型 DNA 4 $\mu$ L をマイクロチューブに取り、2.5 U/ $\mu$ L AccuPrime Pfx DNA polymerase (Invitrogen) 1 $\mu$ 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'-CGGGATCCATTACCTGATAACGA-3'、5'-CCGAGGGCAATTGGCATTGGTA-3'、5'-CCCGACGACTCTGATCAACT-3'、5'-GGAAAGCGGCATATGGGGACAT-3'、5'-GCCAGTTACTTGTATTCTACCC-3'、3'-GCGCCTAGGCCTGCATGATCTTTC-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 $\pm$ 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 $\pm$ 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- $\kappa$ 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  $\alpha$  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  $\beta$  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症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<sup>+</sup>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
Consensus 1 --SVVWGPHSLHACPALVLSNDVITIDAWCPLCGPHERLQFERIDITTLTCETHRINWTADGRPCGLNGTLFPRLVHSETRPQGPRLWINCPLPAVRAQPGPVLSLSPFERSPFQPVYQCQL 120
#4 -----K-----I-----
#5 -----
#7, #35 -----
#8 & other 5 -----
#11 -----
#12 -----
#18 -----
#20 -----
#27 -----K-----Q-----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-----M-----
#142 -----
#156 -----
#158 -----R-----M-----
#159 -----
#166 -----
#168 -----
#184 -----T-----
#186 -----
#187 -----
#188 -----
#191 -----
#194 -----R-----
#206 -----
#207 -----V-----
#209 -----S-----K-----T-----F-----

```

```

121
Consensus 240 PSASSDGCPIIGHGLLPWNNLVTHFVLGKVLILNQMANFSLLPSPDITLVDPRLRSVFAPDTRGAIIRYLSLTLTLCPATCILPLGEPFSPNVPICRFPRDSNEPPLSEFELPLIQTPGLS
#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 -----
#66 -----
#69 -----A-----
#72 -----
#81 -----P-----
#92 -----R-----P-----
#105 -----T-----P-----
#110 -----
#111, #137 -----
#114 -----
#129, #185, #208 -----
#134 -----
#135 -----
#142 -----
#156 -----
#158 -----G-----
#159 -----
#166 -----
#168 -----
#184 -----
#186 -----
#187 -----
#188 -----
#191 -----
#194 -----
#206 -----
#207 -----T-----P-----T-----
#209 -----

```

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 WSVPAIDLFLTGPPSPCDRLHVWSSPQALQRFHDPDLTWSELVASKIRLDSPLKQLLENEWLSRLP

#4 -----  
 #5 -----  
 #7, #35 -----  
 #8 & other 5 -----  
 #11 -----  
 #12 -----  
 #18 -----  
 #20 -----  
 #27 -----  
 #29 -----  
 #32 -----  
 #34 -----  
 #35 -----  
 #40 -----  
 #45 -----H-----  
 #61 -----R-----  
 #66 -----  
 #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)	
Leu	32 (69.6)	55.3 ± 5.2	} P=0.00035
Pro	14 (30.4)	97.1 ± 11.3	
Total	46 (100)	68.0 ± 5.7	



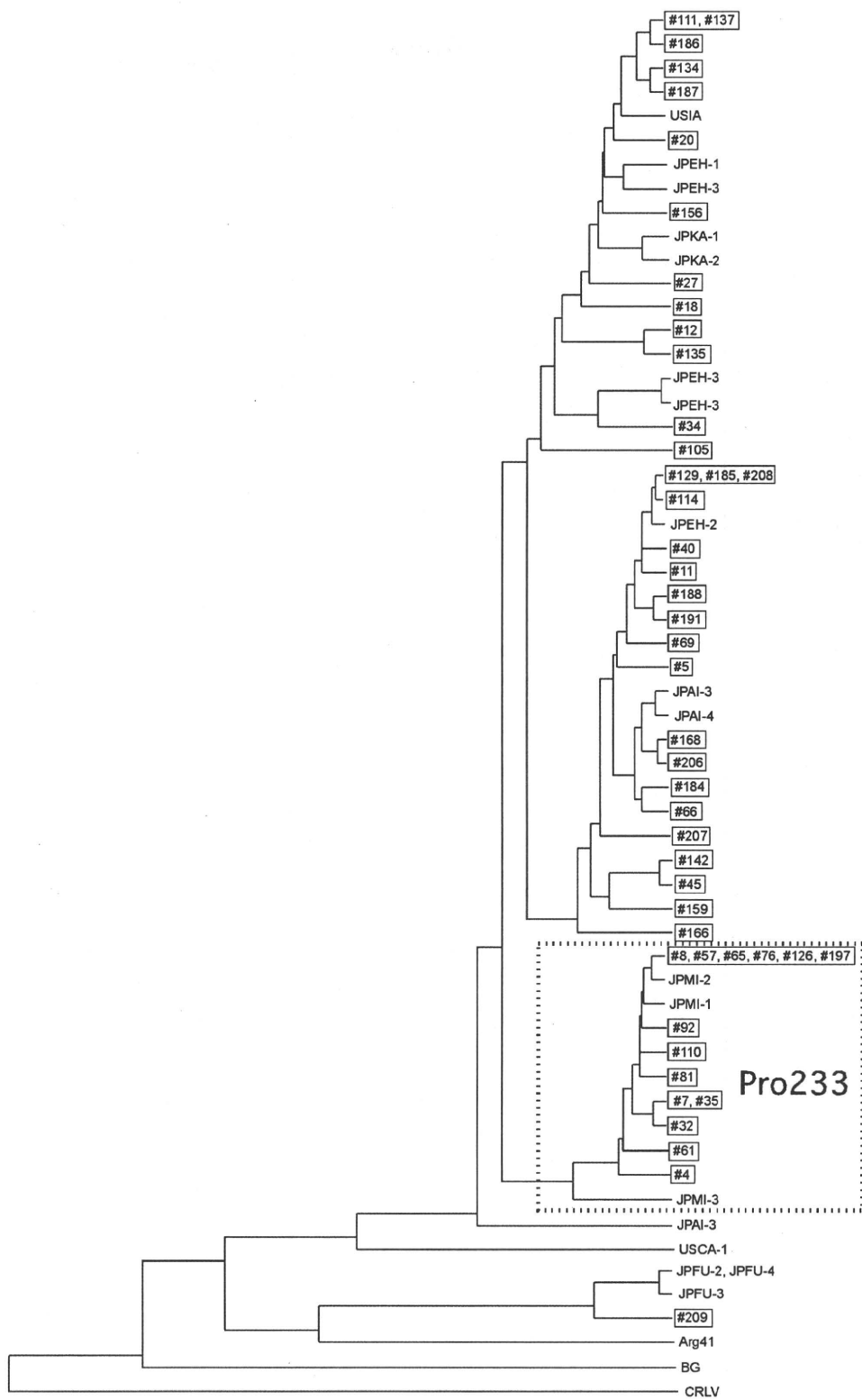


図 2. *tax* 遺伝子に基づく BLV の進化系統樹。本研究で得られた配列は  で囲った。

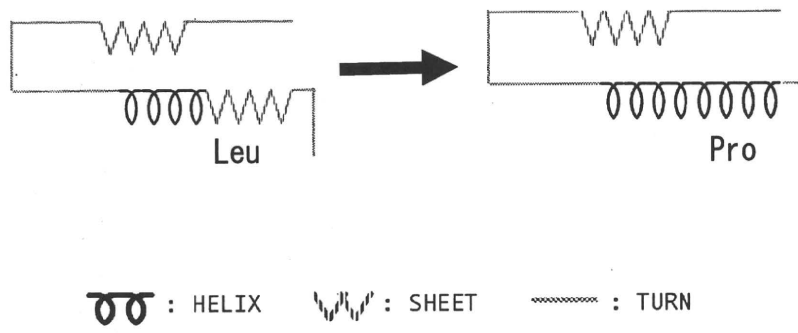


図 3. Leu233→Pro233 変異で予想される Tax の二次構造の変化

## 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