

表1 RT-LAMP法によるNDV遺伝子の検出

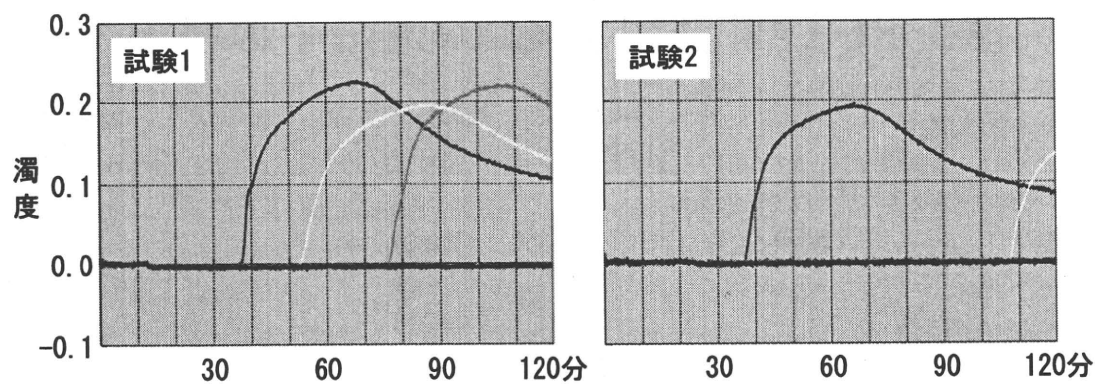
ウイルス株	Class (Genotype)	検出に要した 時間(分)	ウイルス感染価 (logEID ₅₀ /0.1 mL)
goose/Alaska/418/91	I	25	7.75
duck/Siberia/1036/99	I	25	7.50
Queensland/66	II (I)	44	5.16
Japan/Ishii/62	II (I)	36	7.50
Hitchner B1/48	II (II)	33	7.50
Komarov/40	II (II)	39	7.75
TCND	II (II)	30	8.50
Italy/45	II (IV)	49	5.75
Herts/33	II (IV)	35	6.75
Hong Kong/3/76	II (VI)	24	7.50
Quail	II (VI)	32	7.50
Japan/Miyadera/51	II (II)	51	7.50
Japan/Okinawa/91	II (VIII)	40	6.16
IS5	II (VII)	25	NT
NYF3	II (VII)	25	NT

NT：試験実施せず

表2 RT-LAMP法によるNDV感染鶏からの
ウイルス遺伝子の検出

鶏 No.	スワブ	ウイルス接種後の日数					
		1	2	3	4	5	6
1	気管	+/2.8 ^a	+/3.2	+/4.2	+/3.5	+/4.5	NT ^b
	クロアカ	+/<1.0	-/<1.0	-/<1.0	+/<1.0	-/3.5	NT
2	気管	+/4.2	+/2.5	+/3.8	+/1.5	+/3.5	+/2.8
	クロアカ	-/<1.0	-/<1.0	+/2.8	-/<1.0	+/4.5	+/5.8
3	気管	+/2.2	+/4.0	+/3.8	+/3.5	+/2.5	+/3.2
	クロアカ	-/<1.0	-/<1.0	-/<1.0	-/<1.0	-/<1.0	+/3.8
4	気管	+/3.8	+/4.5	+/5.8	+/5.5	+/5.5	NT
	クロアカ	-/<1.0	+/<1.0	-/3.8	+/5.8	+/<1.0	NT

^a ウイルス遺伝子検出/ウイルス感染価、^b 鶏死亡のため試験実施せず



- Viral RNA Mini Kit (カラム使用) で抽出
- QuickExtract Kitで抽出、100倍希釈
- QuickExtract Kitで抽出、10倍希釈
- QuickExtract Kitで抽出、原液
- 陰性コントロール

図1 簡便なウイルスRNA抽出法の検討

高病原性鳥インフルエンザ検査のための検体輸送用培地の検討

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：食鳥処理場で高病原性鳥インフルエンザ(HPAI)が疑われた場合、簡易迅速キットによる検査に続いて確定検査のための検体採取と検査可能な施設への輸送が必要である。本研究ではウイルスを安定して輸送するための検体輸送用培地の検討を引き続き行った。組織培養用培地、生理食塩水および市販の検体輸送用培地に H5N1 亜型インフルエンザウイルスおよび他の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 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、採取された検体は輸送中の温度管理が重要である。

A 研究目的

2004 年と 2007 年には H5N1 亜型インフルエンザウイルスによる国内での高病原性鳥インフルエンザ(HPAI)の発生があったが、東南アジアなどではその後も継続して発生している。また、2010 年から 2011 年にかけて再び本邦においても養鶏場での HPAI が発生し、食鳥処理場に出荷された事例も起きた。

食鳥検査において本疾病が疑われた場合はインフルエンザ簡易キットでの一次的な検査に続き、さらに精密な検査のために検査可能な検査所または施設に速やかに輸送することが必要となる。

本研究では確認検査を要した場合にウイルス分離や RT-PCR 等のウイルスゲノム RNA を検出するための検査に適した輸送用培地について、昨年度に続きさらに、ウイルス株を追加して実施するとともに実際の検体、特にクロアカスワブに混入する糞便の影響についても検討した。

B.研究方法

1. 検体輸送用培地：細胞培養用液体培地 (E-MEM, 和光純薬社)または生理食塩水(生食水、大塚製薬社)にペニシリン 500u/ml, ストレプトマイシン 500µg/ml, ファンギゾン 2.0µg/ml, ゲンタマイシン 100µg/ml, 0.5%の牛血清アルブミンを添加して用いた。また、市販の輸送培地として 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 (UVT、日本 BD 社) [成分：ハンクス緩衝塩類、ウシ血清アルブミン、L-システイン、ゼラチン、ショ糖、L-グルタミン酸、HEPES 緩衝液、バンコマイシン、アンフォテリシン B、コリスチン、フェノールレッド、pH7.3±0.2 (25℃)]を用いた。

2. 供試ウイルス：A/duck/Hyogo/35/01 (H5N1; Hyogo 株、神戸市環境保健研究所より分与)、A/Brisbane/59/2007 (H1N1), A/WSN/33 (H1N1; 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より分与)、A/Blowfly/Kyoto/I93/2004 (H5N1;Kyoto株)、A/Mallard/Miyazaki/MZ5/2007 (H1N3 ; MZ株) (当室で分離)を10日令発育鶏卵に接種して増殖させ、その漿尿液をウイルスストックとした。

3. ウイルス生残性試験:各検体輸送用培地 9ml にストックウイルス液を1ml加え混和後、0.2ml ずつを1.5ml マイクロチューブに分注し4℃または20℃で保管した。0, 1, 3, 5, 7, 14, 21 日目に-80℃に凍結し、ウイルス感染価測定とRNA抽出まで保管した。クロアカスワブを検体とした場合を想定し、正常ニワトリの糞便を生理食塩水で10%乳剤とし、これをウイルス液に1/10量(最終濃度1%)添加し、上記同様に保存した。

4. 感染価の測定: MDCK細胞に10倍段階希釈した試験材料を96穴マイクロプレートの4穴ずつに添加し4日後に細胞変性を確認して50%感染価を測定した。

C. 研究結果

1. H5亜型ウイルスの生残性:ウイルス液を3種の輸送用培地に添加し4℃または20℃で保管した後の残存感染価を測定した。

H5N1亜型Kyoto株及びHyogo株を3種類の輸送用培地に添加して4℃保管した場合ではいずれのウイルス株や培地で21日までほとんど感染価の低下が見られないか 10^1 程度の低下であった(図1、4℃ ●□●)。一方、20℃保管ではKyoto株においてUVT、生食水、E-MEMで 10^1 、 10^2 、 10^3 低下した。また、Hyogo株ではUVTと生食水で 10^1 の低下であったがE-MEMでは検出限界以下まで低下した(図1、20℃ ●□●)。

糞便が混入した場合(最終濃度1%)においては4℃ではほとんど糞便混入の影響はなかったが、20℃保管ではKyoto株でUVT(▲)14日目、

E-MEM(▲)21日目で検出限界以下、生食(▽)21日目で 10^2 低下した(図1 20℃左)。Hyogo株ではUVT(▲)7日目、E-MEM(▲)21日目で検出限界以下となり、生食(△)21日目で 10^1 低下した(図1 20℃右)

2. 他の亜型ウイルス株の生残性:野生カモ由来H1亜型株(MZ株)及びヒト由来株(Brisbane及びWSN株)について3種の輸送用培地で20℃保管した場合の感染価を測定した。MZ株は低い感染価のストック液であったがUVT、生食で21日目まで感染性が確認できた(図2 ▲)。またヒト由来Brisbane株はM-MEMを除き21日間感染性が保たれた(図2 ◇)。WSN株は安定性が低くM-MEMでは14日までに検出限界以下となった(図2 ▼)。

なお、RT-PCRによるウイルスゲノムの検出は感染価が確認できなくなった20℃21日間保存検体でも検出可能であった。

D. 考察

食鳥処理場において高病原性鳥インフルエンザが疑われ簡易迅速インフルエンザ診断キットにより検査により陽性疑いとなった場合には、さらにウイルス分離やゲノム検出を行うために各処理場または検査所から検査可能な施設へ検体を輸送することとなる。その際、ウイルスができるだけ安定した状態で輸送する必要がある。本研究では、検体輸送用培地として市販品を含めて3種類の輸送用培地について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。

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℃)で保存した場合には明らかな感染価の減少が見られた。一般的にウイルス検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使用可能と考えられた。

採取する検体がクロアカスワブの場合には糞便が混入するが、その時のウイルス感染価は使用する輸送培地と温度条件により著しくウイルスの安定性が低下する場合があった。特に、Hyogo 株では糞便が混入することで直ちに感染価が 10^1 程度低下した (図 1 20°C 右)。UVT や M-MEM において糞便混入の影響が強く認められ、UVT の pH は 7.4 から 4.3 へと低下し、M-MEM では pH7.3 から 8.1 へと上昇していた。これらの pH の変化がウイルスの安定性に影響したものと考えられた。

また、ウイルス株によっても安定性が異なっていたが、糞便混入検体においても 4°C では著しいウイルスの生残性の低下は見られないことから、いずれの輸送培地の使用の際も 4°C で温度管理が重要であると考えられる。

E. 結論

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°C 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°C 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。

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

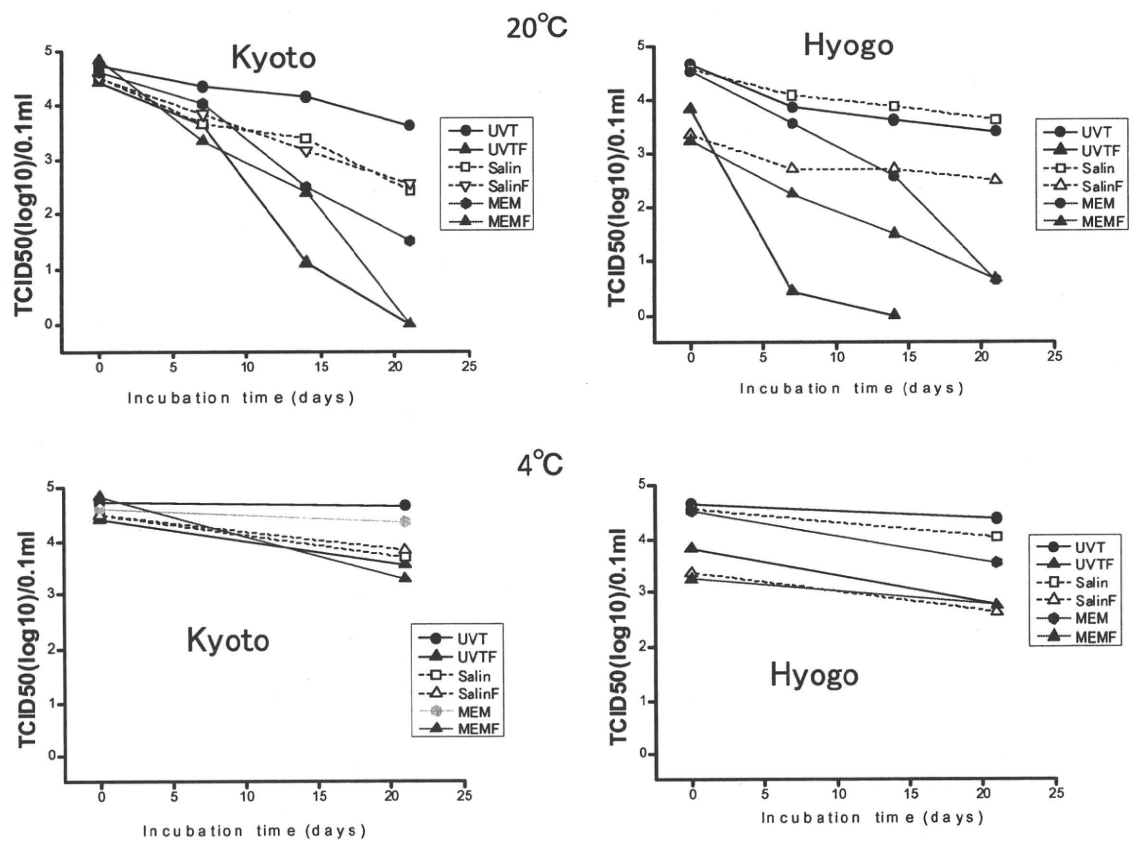


図1 H5 亜型インフルエンザウイルス (Kyoto 株と Hyogo 株) の輸送用培地及び保存温度、糞便混入の生残性への影響

UVT (日本BD ユニバーサルバイラルトランスポート)。UVT+F (糞を添加)、Salin (生理食塩水)。Salin+F (糞を添加)、MEM (組織培養用培地)。MEM+F (糞を添加)。TCID₅₀ : 50% tissue culture infectious dose。検出限界は 10^{1.5}TCID₅₀/0.1ml。

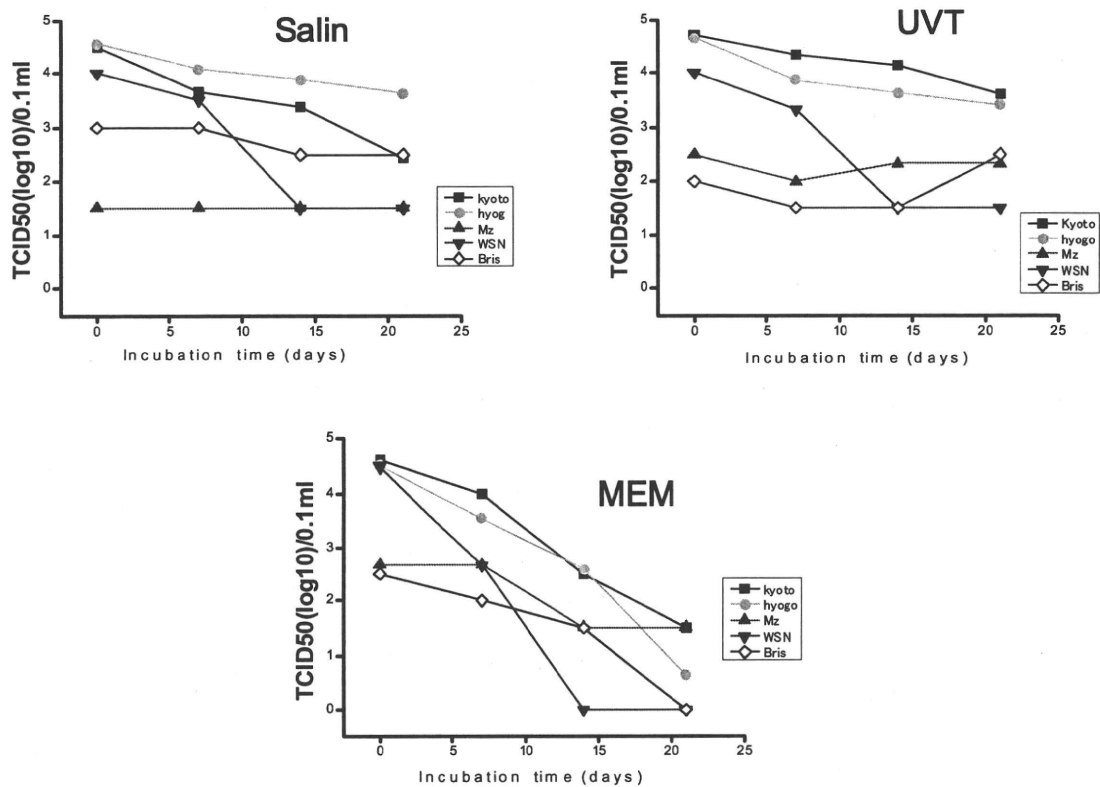


図2 H5 亜型インフルエンザウイルス及び H1 亜型ウイルスの各種輸送培地での安定性
 Kyoto: A/Blowfly /Kyoto/I93/2004 (H5N1)、Hyogo: A/duck/Hyogo/35/01(H5N1), Mz:
 A/Mallard/ Miyazaki/MZ5/2007 (H1N3), WSN: A/WSN/33(H1N1), Bris: A/Brisbane
 /59/2007(H1N1)
 UVT (日本BD ユニバーサルバイラルトランスポート)、Sa l i n(生理食塩水)。MEM (組
 織培養用培地)。TCID₅₀ : 50%tissue culture infectious dose。検出限界は 10^{1.5}TCID₅₀/0.1ml。

DNA プローブを用いた簡便ウイルス検出法の検討

研究研究者 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

研究要旨 我々は病原体核酸網羅的検出用マイクロアレイを開発してきたが、高価であるためにその利用は制限されていた。そこで本研究では、安価で網羅的な病原体核酸検出系の開発を目的とし、インフルエンザウイルス RNA をモデルとして用いた RT-PCR/マイクロプレートハイブリダイゼーション (MPH) 法の基礎的条件検討を行った。この検討の結果、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った。また、オリゴ DNA プローブの検出感度の検討をおこなった結果、 10^4 コピーの H1 Narita 株でも検出することができた。以上の結果より、安価な網羅的検出システムに RT-PCR/マイクロプレートハイブリダイゼーション法が最適である可能性が示唆された。

A. 研究目的

ヒトや家畜に感染し被害をもたらすウイルス、細菌、真菌は枚挙に暇がない。我々は、これらの病原体を一括網羅的に検出するマイクロアレイの構築を行ってきた。しかし、マイクロアレイを用いた検出システムは非常に高価でその利用は制限されている。そこで本研究ではこれまでの研究成果を応用し、安価で簡易な網羅的病原体システムである RT-PCR/マイクロプレートハイブリダイゼーション (Microplate Hybridization, MPH) 法の検討を行った。特に、ハイブリダイゼーションに用いるプローブ、反応液等の諸条件の基礎データ取得するために、インフルエンザウイルス RNA を用いて検証を行った。

B. 研究方法

1. オリゴ DNA プローブ

インフルエンザウイルスを標的としたプローブは、ArrayDesigner 4 を用いて設計した。

設計したオリゴ DNA プローブは、北海道システムサイエンスに合成委託した。

2. プローブ固相化プレート

オリゴ DNA プローブ固相化マイクロプレートを作製するために、スミロン ELISA 製品・カルボタイプ (住友ベークライト) を使用した。20 mg/ml 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDAC ; 別名 WSC 和光社製) および 1 pmol のオリゴ DNA プローブを含む 100 μ l の 10 mM リン酸緩衝液 (pH 5.8) を各 well に分注し、50°C で一晚固相化反応させた。0.1% Tween20 を含む 5x SSC で 3 回洗浄した後、Blocking One (ナカライテスク社製) を用いて室温 1 時間でブロッキングした。その後 0.1% Tween20 を含む 5x SSC で 3 回洗浄した。

3. インフルエンザウイルス RNA サンプル

本研究では、H1N1 Narita 株、H1N1

Brisbane 株、H3N1 Uruguay 株、H5N1 Hyogo 株、H5N1 Kyoto 株を用いた。これらのウイルス RNA は、QIAamp UltraSens Virus Kit (Qiagen 社製) を用いて精製した。

4. RT-PCR

インフルエンザウイルス RNA は TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV) (Takara 社製) を用いて増幅した。増幅に使用したビオチン修飾センス (AAGCAAAAGCAGGGG) およびアンチセンス (GGATGGTGAATGCCCA) プライマーは、H1 から H16 までで比較的保存されていた領域を選択し、設計した。1 ng のサンプル RNA はキット付属の説明書に従い反応液を調製し、50°C30 分で逆転写反応させた後、94°C2 分で逆転写酵素を不活化した。続く PCR 反応は 94°C30 秒、55°C30 秒、72°C30 秒で 30 サイクル増幅させた。

5. マイクロプレートハイブリダイゼーション (MPH)

RT-PCR で増幅した 0.5 μ l のインフルエンザウイルスサンプルは、指定しない限り 5x SSC と 40%ホルムアミドを含むハイブリ溶液と混合し、プローブ固相化プレートと 37°C一晩反応させた。0.1% Tween20 を含む 5x SSC で 3 回洗浄し、アビジン HRP と 37°C1 時間反応させた。更に、0.1% Tween20 を含む 5x SSC で 3 回洗浄し、TMB で発色させ 1 N 硫酸で反応を停止させた。モデル 680 マイクロプレートリーダー (Biorad 社製) を用い、450 nm (参照波長: 650 nm) の吸光度を測定した。

C. 研究結果

1. 至適反応条件の検索

マイクロプレートハイブリダイゼーション (MPH) 法に用いるオリゴ DNA プローブの最適な鎖長を検証するために、H1 Narita 株を標的とした様々な鎖長 (25、40、50、および

60 塩基) のオリゴ DNA プローブを各 2 種類ずつ設計し、プレートに固相化した。反応の特異性を検証するために、H1 または H5 全般を検出するためのプローブも固相化した (図 2A)。一方、ハイブリダイゼーションに用いる 5x SSC に添加するホルムアミドの濃度を検証するために、0%から 50%ホルムアミドを用意しプローブと反応させた (図 2A)。

H1 Narita 株の RT-PCR 産物を種々のプローブとハイブリさせた結果、50 塩基のプローブかつ、40%ホルムアミドの反応液の時に最も高い吸光度を示すことが明らかとなった (図 2B)。H5 Hyogo 株の RT-PCR 産物を反応させた場合でも 40%ホルムアミドを含む 5x SSC 反応液が最適であることが明らかとなった (図 2C)。

2. プローブ特異性検証

RT-PCR/マイクロプレートハイブリダイゼーション法の検出感度と特異性の検討を行った。 10^3 から 10^8 コピーの H1 Narita 株 (nH1)、H1 Brisbane 株 (H1)、H5 Hyogo 株 (H5) RNA を鋳型とし RT-PCR で増幅後、50mer の H1 Narita 株プローブと反応させ、吸光度を測定した (図 3)。H1 Narita 株 (nH1) の RT-PCR 産物をハイブリさせた場合、 10^4 コピーのサンプルでもバックグラウンドよりもはるかに高い吸光度を示し、特異的に検出可能であった。一方で、H1 Brisbane 株 (H1)、H5 Hyogo 株 (H5) の RT-PCR 産物をハイブリさせてもバックグラウンドレベルの吸光度しか得られなかった、このことから本研究で開発したオリゴ DNA プローブは、高感度・高特異性を有している可能性が示唆された。

D. 考察

本研究では、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た。H1 Narita 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。

E. 結論

安価な病原体網羅的検出システムに 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。

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

なし

マイクロプレートハイブリダイゼーション(MPH)法

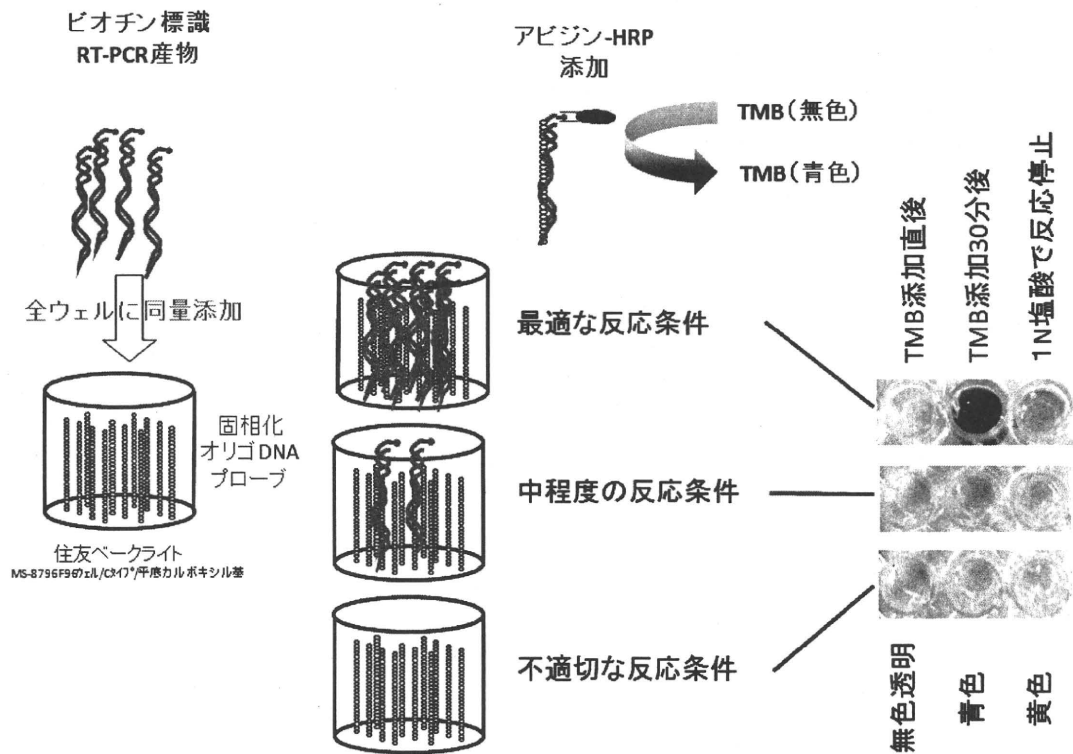


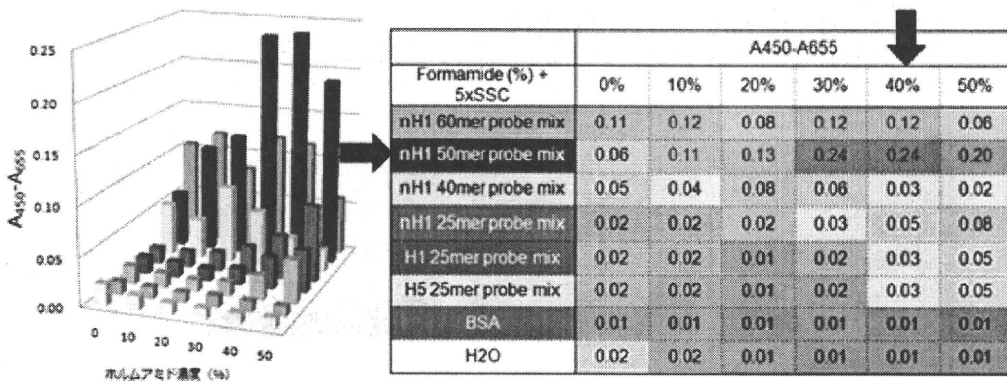
図 1.本研究で検証したマイクロプレートハイブリダイゼーション法の概要。ビオチン修飾プライマーを用いて増幅したインフルエンザウイルス RNA の RT-PCR 産物はホルムアミドを含む 5x SSC 緩衝液と混合し、固相化オリゴ DNA プローブと反応させる。相同しなかったまたは、余剰な RT-PCR 産物を洗浄し、アビジン HRP と反応させた後 TMB で発色させ、1N 塩酸で反応を停止させた。サンプルである RT-PCR 産物とオリゴ DNA プローブの配列が完全に相補し、反応条件が適切であれば発色基質 (TMB) を添加後青く発色し、停止液で黄色く変色する。RT-PCR 産物とプローブが相補しなければ、TMB を添加しても発色しない。

A

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
5xSSC + ホルムアミド濃度		0%	10%	20%	30%	40%	50%						
nH1 60mer probe mix	A												
nH1 50mer probe mix	B												
nH1 40mer probe mix	C												
nH1 25mer probe mix	D												
H1 25mer probe mix	E												
H5 25mer probe mix	F												
BSA	G												
H2O	H												

B

H1 Narita株
RT-PCR産物のハイブリダイゼーション



C

H5 Hyogo株
RT-PCR産物のハイブリダイゼーション

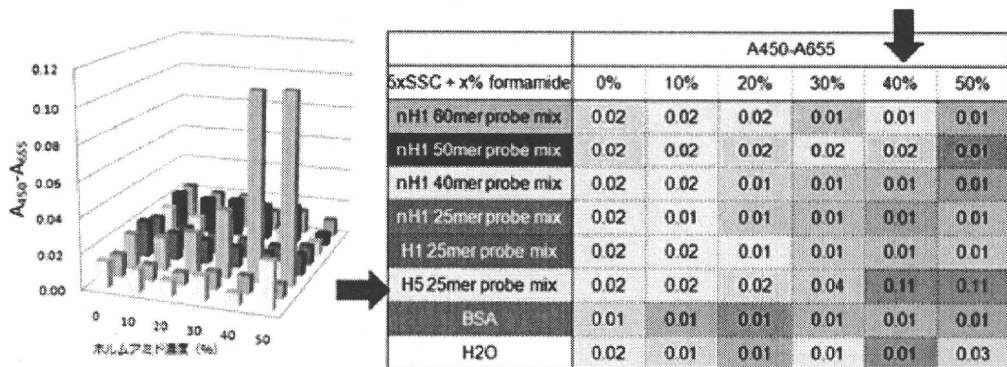
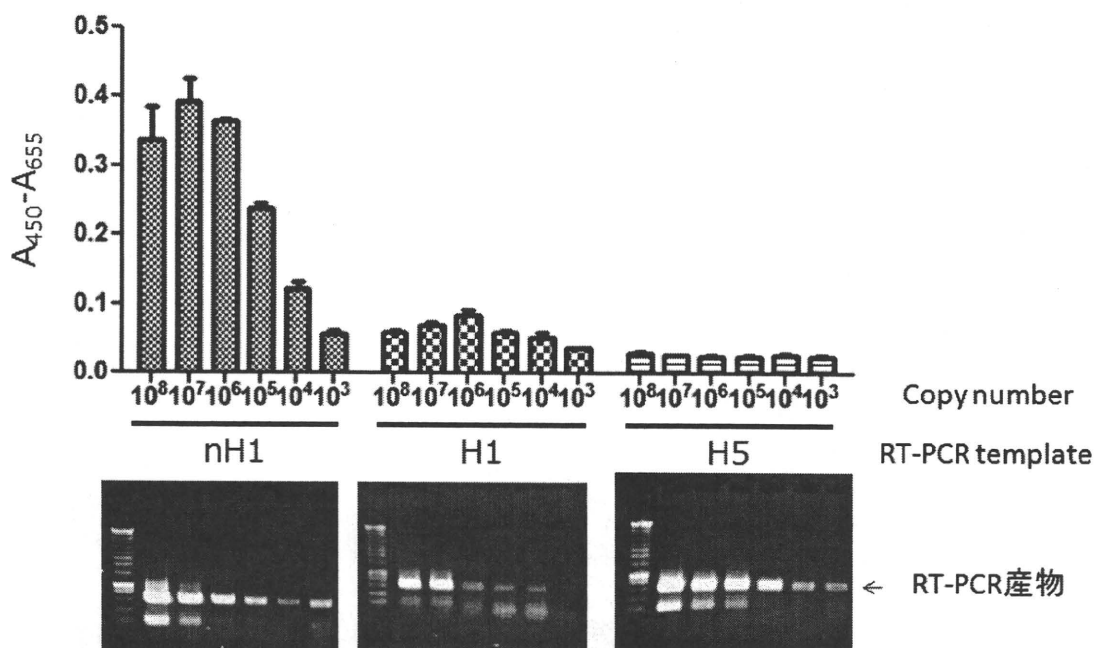


図 2. マイクロプレートハイブリダイゼーション法の基礎的条件検討の結果。(A) 固相化オリゴ DNA プローブと反応溶液中のホルムアミド濃度の 96 穴プレートレイアウト。様々な長さの H1 Narita 株に対するオリゴ DNA プローブ (nH1) を 12 穴分固相化した。また、H1 Narita 株以外を認識する汎 H1 および汎 H5 用プローブも別途固相化した。反応溶液の条件検討の際に用いたホルムアミド濃度は、2 連で反応させた。(B) H1 Narita 株の RT-PCR 産物を各種固相化プローブと反応させたときの吸光度。図に示した値は 2 穴分の平均値を示した。(C) H5 Hyogo 株の RT-PCR 産物を各種固相化プローブと反応させたときの吸光度。図に示した値は 2 穴分の平均値を示した。

nH1プローブに検出感度の検討



10⁴コピーまでMPH法にて検出できる可能性が示唆された。

図3. マイクロプレートハイブリダイゼーション法の検出感度と特異性の検討。各濃度のH1 Narita株 (nH1)、H1 Brisbane株 (H1)、H5 Hyogo株 (H5) RNAを鋳型としRT-PCRで増幅後、50merのH1 Narita株プローブと反応させた時の吸光度を棒グラフで示した。H1 Narita株 (nH1)のRT-PCR産物をハイブリさせた場合、10⁴コピーのサンプルでも検出可能であった。一方、H1 Brisbane株 (H1)、H5 Hyogo株 (H5)のRT-PCR産物をハイブリさせてもバックグラウンドレベルの吸光度しか得られなかった、このことから本研究で開発したオリゴDNAプローブは、高感度・高特異性を有している可能性が示唆された。

と畜場に搬入された豚における A 群ロタウイルスの感染状況 及び簡便なウイルス全遺伝子解析法の確立とその応用

研究分担者 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・特別協力研究員
岡寺康太 岐阜大学 応用生物科学部・獣医学課程 6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、と畜場に搬入された豚における本ウイルスの排泄状況を解析した。また、前年度に引き続き簡便なロタウイルス遺伝子解析法の開発を進めた。食肉に供される健康な豚 177 例の 9.6%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、前年度の検出率 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。

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かった。そこで、平成 21 年度の本研究において、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、牛と豚における本ウイルスの感染環の解析を行った。その結果、健康な豚において A 群ロタウイルスの常在性が示唆されたことから、2 県のと畜場に搬入された豚を材料に同ウイルスの検出を行い、排泄状況を把握し、食肉を介しての人へのリスクの

評価を試みた。また、A 群ロタウイルス流行の原因究明を図るため、前年度に引き続き糞便材料から直接的に多種の分節遺伝子解析を可能とする簡便な方法の改良を進めた。

B.研究方法

1. 2009 年 5 月に群馬県及び 2010 年 2 月に名古屋市食肉衛生検査所に搬入された健康な豚それぞれ 87 例及び 90 例の計 177 例より採材された豚糞便サンプルについて、RT-PCR 法により A 群ロタウイルス VP4 遺伝子の検出を行った。これまで自然界での感染状況調査の際には、感度を上げるため Semi-nested RT-PCR 法（検出限界 0.5~1 ffu）を採用してきたが、今回は食肉からのリスクを評価するために感染源

として問題となる量の観点から、感度が低い RT-PCR 法（検出限界 $10^2 \sim 10^3$ ffu）を採用した。陽性検体についてダイレクトシークエンスあるいは TA クローニングにより同ウイルス VP4 及び VP7 遺伝子の部分配列を決定し、P 及び G 遺伝子型を決定した。

2. 本プロジェクトで開発した簡便な分節遺伝子解析法である RT-PCR 法に改良を加え、RT-semi-nested PCR 法の確立を行った。 -80°C で保存されていたロタウイルス遺伝子陽性の牛糞便 20%乳剤 11 例を用いて、VP4、VP7、NSP2、NSP3、NSP4 及び NSP5 の 6 つの分節を対象に簡便法を試みた。従来の方法で RT-PCR を行った後、得られた PCR 産物を鋳型にして semi-nested PCR を行った。

C. 研究結果

1. と畜上に搬入された豚におけるロタウイルスの排泄状況

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た（表 1）。VP4 及び VP7 遺伝子の解析から、G 及び P 遺伝子型の組み合わせが 9 通りあった（表 2）。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（AIP67 株、図 1、相同率 99.8%）、同様に人ロタウイルスに近縁な G1 遺伝子型（AIP21 株、図 2、相同率 94.8%）の A 群ロタウイルスも健常豚より検出された。17 例中 2 例において、ダイレクトシークエンスで二重の波形が、TA クローニングにより異なるクローンが見出され、異なった遺伝子型ウイルスの混合感染が確認できた。さらに、混合感染の結果起こる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（図 3）。

2. 全分節遺伝子の簡便解析法の糞便サンプルへの応用と改良

従来の RT-PCR 法で、11 例の糞便サンプルを用いて VP4、VP7、NSP2、NSP3、NSP4 及び NSP5 の 6 つの分節遺伝子の増幅を試みたところ、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（表 3）。一方、新たにプライマーを設計し、これまでの方法で得られた PCR 産物を鋳型にして semi-nested PCR を行った結果、66 遺伝子中 56（84.5%）の増幅が可能となった（表 4）。結果として、11 例中 5 例で 6 つの遺伝子を増幅することができ、これらの塩基配列を解読することにより、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。

D. 考察

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、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。これまで、本ウイルスの感染環を解明するために、感度の高い semi-nested RT-PCR 法を採用し、解析を行ってきた。本法は、計算上 0.5~1 粒子のウイルス遺伝子の検出が可能であることが予備的実験から明らかとなっている。一方、実際の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。食肉でのリスクを過剰に評価しないためには、感度の低い検出法が必要である。そこで、今回は $10^2 \sim 3$ のウイルス粒子の遺伝子が検出可能な通常の RT-PCR 法によりウイルス遺伝子の検出を行った。その結果、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。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ヒトへのリスクとなると考えられた。

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。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。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

なし

G. 研究発表

Abe, M., Ito, N.a, 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) 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、正谷達膳、中川敬介、山岡理子、杉山 誠：A 群ロタウイルスの感染環境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 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表 1. と畜場に搬入された豚における RT-PCR 法によるロタウイルス遺伝子の検出

糞便採取地	由来地域	例数 (農家数)	検出例数 (農家数)	検出率(%)
名古屋市 食肉衛生検査所	愛知県	55 (11)	8 (5)	14.5
	岐阜県	15 (3)	2 (1)	13.3
	三重県	15 (3)	2 (1)	13.3
	静岡県	5 (1)	1 (1)	20.0
	計	90 (18)	13 (8)	14.4
群馬県 食肉衛生検査所	地域 A	20	0	0
	地域 B	12	0	0
	地域 C	9	1	11.1
	地域 D	2	0	0
	地域 E	44	3	6.8
	計	87	4	4.6
計		177	17	9.6

表 2. 健常豚より検出されたロタウイルスの G/P 遺伝子型

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	計
P[7]	2						2
P[13]			3	3	3	1	10
P[27]		3		1		1	5
P[34]		2					2
計	2	5	3	4	3	2	19

表 3. 糞便サンプルを用いた簡便法による各分節遺伝子型別 (RT-PCR 法)

サンプル	VP4	VP7	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
GB1-76	P11	G10	N2	T9	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	—	—	—	—	—

表 4. 糞便サンプルを用いた簡便法による各分節遺伝子型別 (semi-nested RT-PCR 法)

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

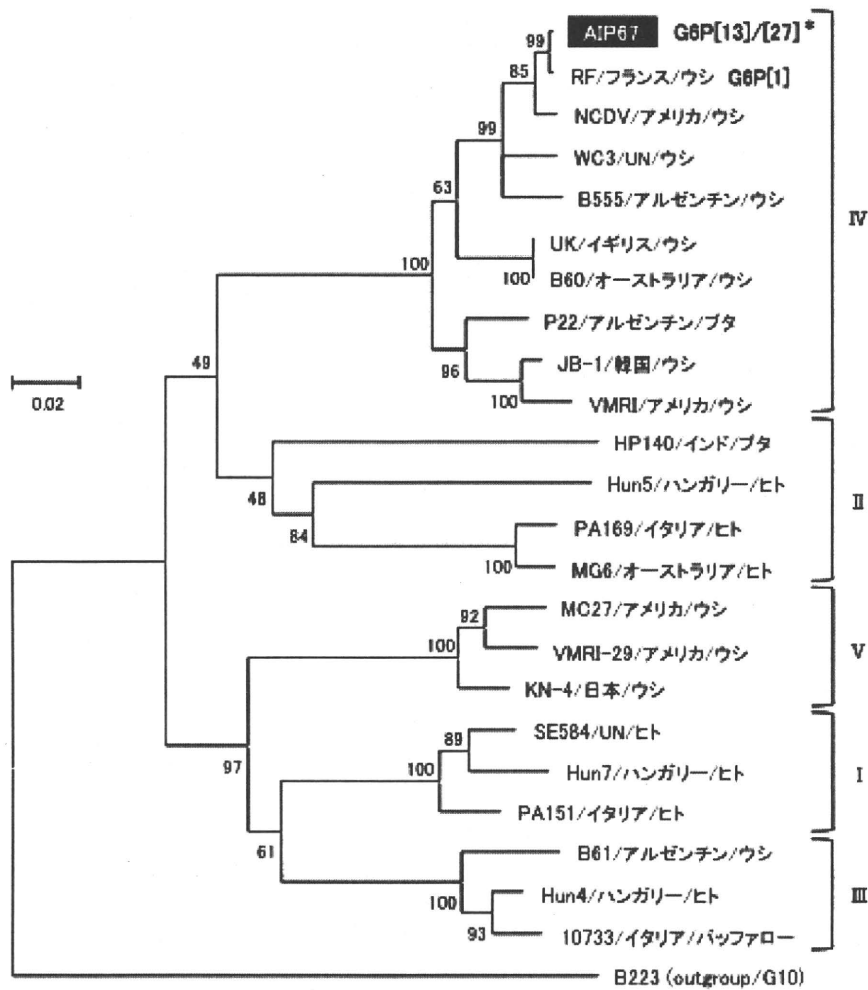


図1. G6 遺伝子型ロタウイルスの VP7 遺伝子部分塩基配列に基づいた系統解析

解析領域: NCDV 株 nt 81-894 (814 bp)

UN: 検出国不明

*TA クローニングにより 2 株 (VP4 遺伝子) の混在を確認

解析に用いた株の accession number を下に示す。

RF (X65940), NCDV (M12394), WC3 (AY050272), B555 (DQ631820), UK (X00896), B60 (M64680), P22 (EF474079), JB-1 (AY596798), VMRI (U53924), HP140 (DQ003293), Hun5 (EF554109), PA169 (EF554131), MG6 (EF554098), MC27 (AF162435), VMRI-29 (U50332), KN-4 (D12710), SE584 (EF672609), Hun7 (AJ488134), PA151 (L20881), B61 (DQ637812), Hun4 (AJ487833), 10733 (AY281360), B223 (X57852)

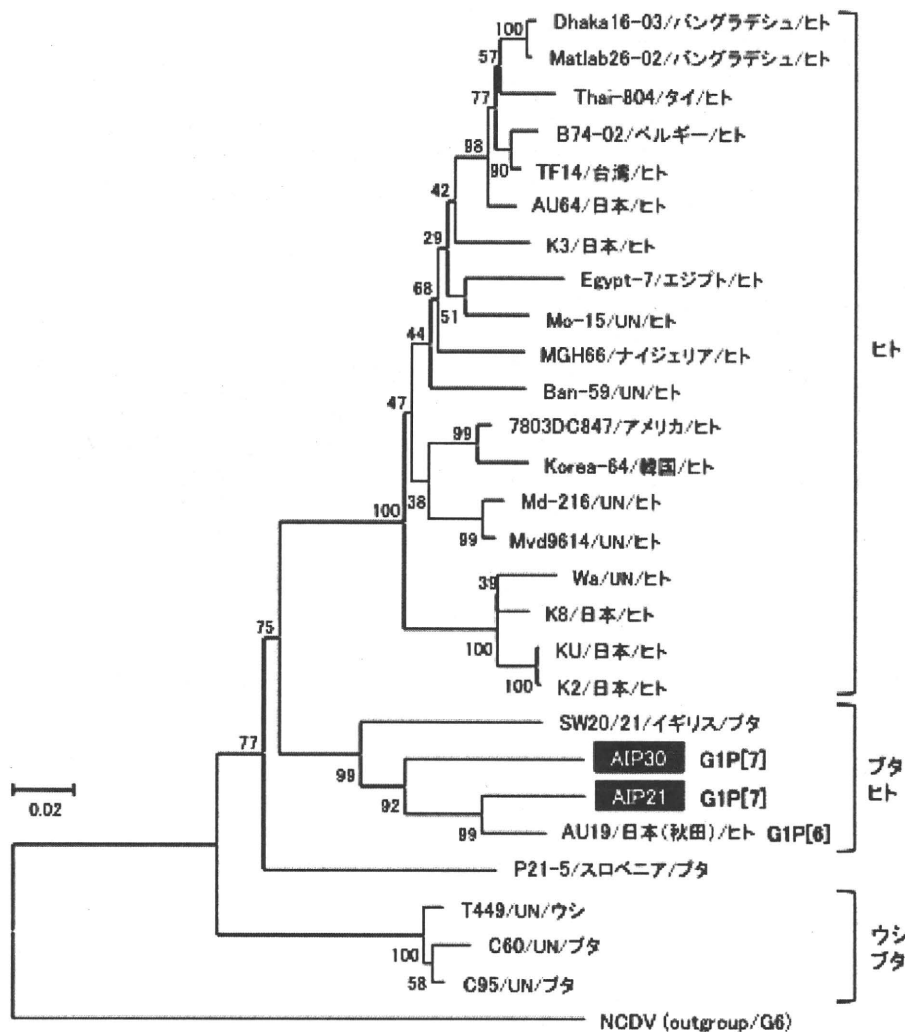


図 2. G1 遺伝子型ロタウイルスの VP7 遺伝子部分塩基配列に基づいた系統解析

解析領域：NCDV 株 nt 141-888 (748 bp)

UN：検出国不明

解析に用いた株の accession number を下に示す。

Dhaka16-03 (DQ492674), Matlab26-02 (AY631054), Thai-804 (DQ512979),
 B74-02 (AY635048), TF14 (AF183860), AU64 (AB081801), K3 (D16317),
 Egypt-7 (U26373), Mo-15 (U26382), MGH66 (Y08033), Ban-59 (U26366),
 7803DC847 (GU723354), Korea-64 (U26378), Md-216 (U26380),
 Mvd9614 (AF480296), Wa (K02033), K8 (D16344), KU (AB222787), K2 (D16323),
 SW20/21 (AF426162), AU19 (AB018697), P21-5 (DQ629928), T449 (M92651),
 C60 (L24164), C95 (L24165), NCDV (M12394)