

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：82505

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460882

研究課題名(和文) 網羅的遺伝子増幅による病原ウイルスの迅速同定法に関する研究

研究課題名(英文) Research on rapid identification method of pathogenic virus based on exhaustive gene amplification

研究代表者

武藤 淳二 (Muto, Junji)

科学警察研究所・法科学第一部・主任研究官

研究者番号：80432186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：スワブや臓器等の法医学的試料から網羅的ウイルス遺伝子検出法(RDV法)を応用してウイルス遺伝子を検出できるか検討した。剖検に供されたネコの咽頭及び鼻腔スワブ試料からRDV法によりネコカリシウイルス及びネコヘルペスウイルスの遺伝子を検出し、迅速にウイルスを同定できた。死後経過が臓器中のウイルス遺伝子にもたらす影響を調べるため、インフルエンザウイルス遺伝子をターゲットとして、様々な長さの断片を増幅する定量PCRにより解析した。その結果、感染マウスの肺試料中のウイルス遺伝子が切断されている可能性が示唆され、臓器試料からウイルス遺伝子を検出する際、比較的短い断片を用いることが望ましいと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We explored detectability of infecting viral genes from forensic sample including swab and organ by applying rapid determination system of viral RNA/DNA sequences (RDV). We detected genes of feline calicivirus and feline herpesvirus from throat and nasal cavity swab samples of autopsied cat by the RDV method, and then we rapidly identified these viruses by PCR and direct sequence of PCR product. To measure the impact of postmortem change on viral genes contained in organ, we performed quantitative PCRs that amplify a variety of lengths of influenza virus gene. As the result, it suggested the possibility that influenza virus genes were broken in the lung sample of the infected mouse. Therefore, it was deemed desirable to use a comparatively short fragment amplified by the RDV method in the case of detection of virus gene from organ sample.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス 網羅的遺伝子検出法 PCR 死後経過 同定 定量PCR 病理検査 法医学

1. 研究開始当初の背景

- (1) 微生物の同定を行う際、細菌では培養、分離及び遺伝子検査等を比較的簡便に実施でき、結果も短期間に得られる。特に遺伝子検査では、あらゆる細菌がゲノムに保有する 16S リボソーム RNA 遺伝子を増幅し、その配列情報を調べることで、迅速な菌種の同定が可能である。しかしウイルスの場合、16S リボソーム RNA 遺伝子のような普遍的な遺伝子は存在しないことから、病態等からウイルス種を推定し、ウイルス種に特異的な ELISA や PCR 等の各種検査を数多く組み合わせることで同定を進めていかなければならない。このように試料からウイルスを同定するには多大な時間と労力を要する。
- (2) ウイルスに非特異的なプライマーを用いて網羅的にウイルス遺伝子を増幅し、ダイレクトシーケンスによって増幅断片の塩基配列を決定してウイルスを検出する RDV 法が開発された (Mizutani et al., Emerg. Infect. Dis., 13(2), 2007, 322-4)。これにより迅速にウイルス種を推定でき、通常の試料のほか、ウイルス種の推定が困難な試料についても迅速な同定が可能となった。
- (3) 法医学では、血液、体液、臓器、スワブで採取したもの、死後経過したもの、腐敗したもの等様々な試料を取り扱う。

2. 研究の目的

本研究では、ウイルス種によらず、網羅的にウイルス遺伝子を検出できる RDV 法に着目し、法医学的試料から迅速にウイルスを同定することを目的とした。また、死後経過した臓器試料では、DNA や RNA の分解が予想されるが、このような法医学的試料について、RDV 法に適用できるか検討した。

3. 研究の方法

- (1) スワブ試料からのウイルス遺伝子検出
試料の作製及びウイルス分離
突然元気消失して死亡し、岐阜大学獣医病理学教室で病理解剖に供されたネコ (16 日齢) から咽頭及び鼻腔スワブを採取し、それぞれを BD 社ユニバーサル・バイラル・トランスポートのウイルス輸送用培地に浸し、細菌や夾雑物を除くためにウイルス輸送用培地を 0.2 μm フィルターでろ過したものを試料とした。ウイルスの分離は、試料をネコ腎臓由来の CRFK 細胞に接種し、細胞の円形化、膨化及び剥離等の細胞変性効果を指標として行った。
RDV 法によるウイルス遺伝子の検出
各スワブ試料及び細胞変性効果の見ら

れた CRFK 細胞の培養上清を RNase A と DNase I で処理してウイルス粒子外に存在する細胞由来等の DNA や RNA を分解した後、ウイルス由来の DNA や RNA を抽出した (図 1)。RNA は抽出後に 2 本鎖 cDNA を合成した。Whole Genome Amplification Kit を用いて、断片化、アダプター付加及び増幅を行って 1 次ライブラリーを作製した。制限酵素 *Hae* III で消化し、別のアダプターを付加した後、非特異的なプライマーを用いて増幅を行って 2 次ライブラリーを作製した。さらに、増幅断片のダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、NCBI (全米バイオテクノロジー情報センター) のデータベースに照会した。

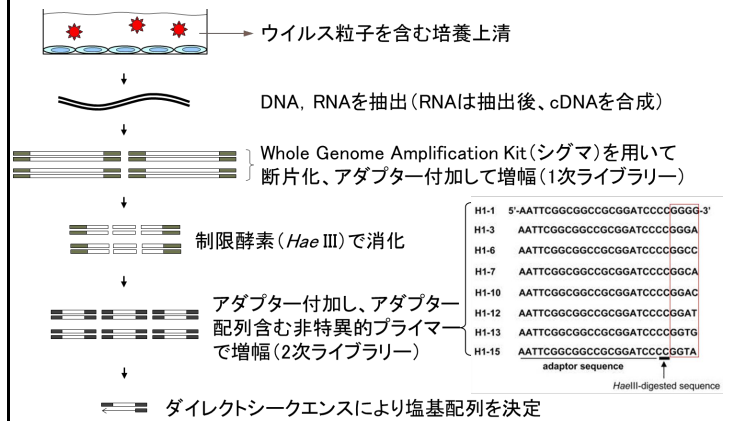


図 1 RDV 法によるウイルス遺伝子の検出

ウイルスの同定

RDV 法により検出したウイルスを同定するため、該当するウイルス種に特異的なプライマーを用意し、PCR により目的とする長さのウイルス遺伝子断片が増幅されるか確認した。さらに、増幅断片のダイレクトシーケンスを行い、目的とするウイルスの配列を確認することにより、ウイルスを同定した。

- (2) 死後経過した臓器試料からのウイルス遺伝子の定量

インフルエンザウイルスの接種

死後経過が臓器中のウイルス遺伝子にもたらず分解等の影響を見るため、マウスにインフルエンザウイルスを接種し、死後、解剖して各種臓器を採取し、病理検査と遺伝子実験用試料の作製に用いた。

定量 PCR

ウイルス遺伝子への分解等の影響を検討するため、インフルエンザウイルスの PB1 遺伝子をターゲットとしてプライマーを設計し、100~600 bp の様々な長さの断片を増幅するリアルタイム PCR 法による定量 PCR の実験系を作成した。

臓器試料におけるコピー数の定量

作成した定量 PCR の実験系により、臓器試料において、増幅産物の長さごとに PB1 遺伝子のコピー数を定量した。

4. 研究成果

(1) スワブ試料からのウイルス遺伝子検出 病理検査及びウイルス分離

病理所見では、肺の組織において核内封入体が見られ、ネコヘルペスウイルスによる肺炎が疑われた。咽頭及び鼻腔のスワブ試料を CRFK 細胞に接種すると、それぞれ 1 日後及び 3 日後に細胞変性効果が見られ、ウイルスが分離されたことから、培養上清を回収した。

RDV 法によるウイルス遺伝子の検出

各スワブ試料及び回収した培養上清から RDV 法により網羅的に遺伝子を増幅し、ダイレクトシーケンスを行って増幅断片の塩基配列を解析した。その結果、咽頭スワブ試料接種後の培養上清から得た cDNA から、ネコやシュードモナス属等細菌の遺伝子のほか、ネコカリシウイルスの遺伝子が検出された。また、鼻腔スワブ試料から抽出した DNA から、バークホルデリア属等の細菌遺伝子のほか、ネコヘルペスウイルスの遺伝子が検出された。

特異的 PCR による確認とウイルスの同定

RDV 法によりネコヘルペスウイルス及びネコカリシウイルスの遺伝子が検出されたことから、ヘルペスウイルス及びカリシウイルスのポリメラーゼ遺伝子に特異的なプライマー (VanDevanter et al., J. Clin. Microbiol., 34(7), 1996, 1666-71 及び Hashimoto et al., J. Vet. Med. Sci., 61(6), 1999, 603-8) を用いて PCR を行った。その結果、図 2 のとおり、目的とする長さの遺伝子断片が増幅された。さらに、各増幅断片の塩基配列がネコヘルペスウイルス及びネコカリシウイルスの遺伝子と確認され、咽頭及び鼻腔スワブから分離されたウイルスがネコカリシウイルス及びネコヘルペスウイルスと同定された。

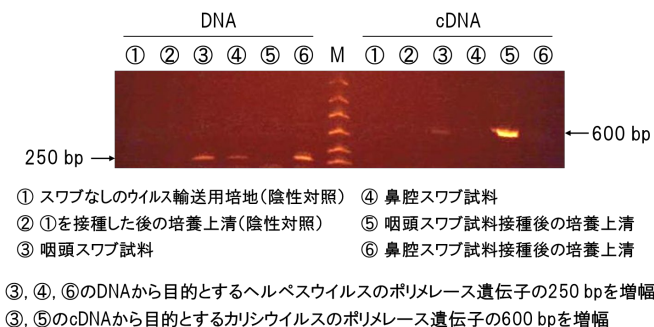


図 2 特異的 PCR による確認

考察

ウイルスの同定にあたり、病理所見からネコヘルペスウイルスが推定され、実際に RDV 法及び特異的 PCR によりネコヘルペスウイルスが同定された。一方、カリシウイルスのように病理所見等から推定の難し

いウイルスもあり、ウイルスの迅速同定に RDV 法は有用である。また通常、RDV 法ではウイルス分離したもからウイルス遺伝子を検出するが、今回、鼻腔スワブ試料から直接ヘルペスウイルス遺伝子が検出され、試料をそのまま RDV 法に用いる方法も同定の迅速化に有効であると考えられた。

(2) 死後経過した臓器試料からのウイルス遺伝子の定量

定量 PCR の実験系の確立

既報の PB1 遺伝子の 104 bp を増幅するプライマーセット (Urushisaki et al., Evid. Based Complement. Alternat. Med., 2011, 2011, 254914) を使用したほか、PB1 遺伝子の 334、402、406、418、503、518 及び 559 bp を増幅するプライマーセットを設計し、定量 PCR における増幅性や非特異反応の有無を確認した。その結果、104、402 及び 559 bp の遺伝子断片を増幅する実験系を用いることとした。

病理検査

各種臓器の病理検査を行ったところ、肺の肺胞上皮細胞において、ウイルス感染による傷害と考えられる硝子膜の形成が確認された。一方、他臓器においてウイルス感染に関係する病変は見られなかった。このことから、定量 PCR の実験系に肺試料を用いた。

臓器試料のウイルス遺伝子の定量

採取した肺からホモジネートを作製し、そこから RNA を抽出して cDNA を合成した。それぞれの長さの遺伝子断片を増幅する実験系を用いて、cDNA 1 マイクロリットル当たりのコピー数を定量したところ、104 bp では 97 万コピー、402 bp では 52 万コピー、559 bp では 24 万コピーとなり、増幅断片が長くなるにつれてコピー数が減少する傾向が見られた。

考察

死後経過によってインフルエンザウイルス感染マウスの肺試料中のウイルス遺伝子が断片化している可能性が示唆された。このことから、RDV 法を臓器等の法医学的試料に応用する場合、比較的短い遺伝子断片を用いることが望ましいと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

J. Hosokawa-Muto, Y. Fujinami, N. Mizuno, Evaluation of the Universal Viral Transport system for long-term storage of virus specimens for microbial forensics, J. Forensic Leg. Med., 査読有, Vol. 34, 2015, pp. 29-33
DOI: 10.1016/j.jflm.2015.04.019

Y. Sassa, VN. Bui, K. Saitoh, et al., Parrot bornavirus-2 and -4 RNA detected in wild bird samples in Japan are phylogenetically adjacent to those found in pet birds in Japan, Virus Genes, 査読有, Vol. 51, 2015, pp. 234-243
DOI: 10.1007/s11262-015-1240-7

J. Hosokawa-Muto, Y. Fujinami, N. Mizuno, Assessment of viable bacteria and bacterial DNA in blood and bloodstain specimens stored under various conditions, J. Forensic Leg. Med., 査読有, Vol. 20, 2013, pp. 1035-1040
DOI: 10.1016/j.jflm.2013.09.024

Y. Sassa, M. Horie, K. Fujino, et al., Molecular epidemiology of avian bornavirus from pet birds in Japan, Virus Genes, 査読有, Vol. 47, 2013, pp. 173-177
DOI: 10.1007/s11262-013-0913-3

〔学会発表〕(計7件)

佐々悠木子、村上智亮、鈴木和彦、他、MuBV-1 の株化培養細胞での宿主域の検討、第9回日本ボルナウイルス研究会、2016年1月29日、鹿児島大学(鹿児島市)

水野なつ子、武藤淳二、藤浪良仁、次世代シーケンスデータからの病原因子遺伝子検知について、日本法科学技術学会第21回学術集会、2015年11月12日、東京大学フューチャーセンター(千葉県柏市)

佐々悠木子、堀江真行、鈴木研太、他、ジュウシマツに見つかったトリボルナウイルス(MuBV-1)の免疫組織学的解析と分離、第8回日本ボルナウイルス研究会、2015年3月24日、京都産業大学(京都市)

佐々悠木子、堀江真行、鈴木研太、他、新規遺伝子型トリボルナウイルス(ABV-BF)の解析、第157回日本獣医学会学術集会、2014年9月9日、北海道大学(札幌市)

武藤淳二、藤浪良仁、水野なつ子、網羅的遺伝子増幅による動物死体材料からのウイルス遺伝子の検出、第98次日本法医学会学術全国集会、2014年6月19日、福岡国際会議場(福岡市)

武藤淳二、藤浪良仁、水野なつ子、ウイルス検体採取キットに長期間保存した

ウイルスの生存状態及び遺伝子学的検査の評価、第156回日本獣医学会学術集会、2013年9月21日、岐阜大学(岐阜市)

El-Shaymaa El-Nahass, Noura Alkhalefa, Khaled El-Dakhly, 福士秀人、酒井洋樹、柳井徳磨、Hepato-pathogenicity of Equine herpesvirus-9 (EHV-9) in hamsters、第156回日本獣医学会学術集会、2013年9月20日、岐阜大学(岐阜市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武藤 淳二(MUTO, Junji)
科学警察研究所・法科学第一部・主任研究官
研究者番号: 80432186

(2) 研究分担者

酒井 洋樹(SAKAI, Hiroki)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号: 40283288

佐々 悠木子(SASSA, Yukiko)
東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教
研究者番号: 20582464