

## 5. 県他機関との協力および家保での適正技術 (appropriate technology:AT) で希少ウイルス (Mammalian orthoreovirus/bovine) の診断法を開発した事例

宇佐家畜保健衛生所・<sup>1)</sup>大分家畜保健衛生所

○ (病鑑) 長岡健朗・病鑑 人見 徹<sup>1)</sup>・病鑑 中出 圭祐<sup>1)</sup>

【はじめに】近年の科学技術の進歩は著しく、ウイルスの同定においても次世代シーケンサーのような最先端技術は絶大な威力を発揮する。しかし、このような重厚長大な技術は必ずしも家保での使用に適してはいない。今回、ATとしてのAP(arbitrarily priming)-PCR法によりMammalian orthoreovirus/bovineを同定し、その診断法を開発した。また、その過程において県他機関との協力が大きな役割を果たした。それらの事例を紹介する。

【AP-PCR法】AP-PCR法では、対象遺伝子に特異的なプライマーを用いる通常のPCR法と異なり、任意のプライマーを非特異的に反応させ、PCRを行う。今回、我々は、3'末端の配列を変えた8種のプライマーを用いて、効率的にAP-PCR法を行い、その生成物の遺伝子配列を解析することにより未知のRNAウイルスを同定する方法を開発し、応用した。

【県他機関との協力】平成26年度から、年度当初に県衛生環境研究センターに機器使用依頼書を提出、遺伝子解析装置や透過型電子顕微鏡の使用を依頼し、また、遺伝子解析装置では、当所で消耗品の一部を負担している。これにより遺伝子解析が手軽に利用できるようになった。

【ウイルスの由来・同定】ウイルスは平成24年2月に風邪症状（呼吸器・下痢症状）を呈した和牛の糞便から分離された。HRT細胞でCPEが認められたが牛コロナウイルスを含む検査したすべてのウイルスに対するPCRは陰性で同定不能であった。このウイルスの遺伝子をAP-PCR法で増幅し遺伝子解析したところ、解析された34塩基からMammalian orthoreovirus/bovineであることが示唆された。そのため、東京農工大学に全塩基配列の解析を依頼したところMammalian orthoreovirus/bovineと同定された。

【Mammalian orthoreovirus/bovine診断法の開発】ほ乳類のレオウイルス (Mammalian reovirus) のL1遺伝子およびL3遺伝子に対する既知のPCR法で本ウイルスの遺伝子増幅を試みたが増幅しなかった。本ウイルスの遺伝子のこれらプライマーとの結合部位は、数カ所で塩基配列が異なっていた。そこで、プライマーの配列を本ウイルスに合わせて修正を行ったところL1遺伝子およびL3遺伝子とも良好な増幅が見られた。また、本ウイルスはHRT細胞で良好なCPEを発現するので中和試験での抗体検査も可能である。

【考察】Mammalian orthoreovirus/bovineについては文献等の情報もごく限られ、その病原性や浸潤状況はほとんど知られていない。今回、その診断法が開発されたことから、今後の調査が病性の確定につながるものと思われる。今回、Mammalian orthoreovirus/bovineの同定に至るには県内他機関との協力が大いに貢献した。今後もこのような協力関係の進展が望まれる。また、次世代シーケンサーのような先端機器があれば未知ウイルスの同定は困難ではないと思われるが、それをすべての同定困難ウイルスに応用するのは現実的ではない。その橋渡しをするべき、今回のAP-PCR法のようなATの開発は、家畜保健衛生所の大きな責務のひとつであると考えられる。