

鶏用生ワクチンからのトリ白血病ウイルス遺伝子の検出

誌名	農林水産省動物医薬品検査所年報 = Annual report of the National Veterinary Assay Laboratory
ISSN	03887421
著者	大槻, 紀之 田口, 邦史 高木, 昌美 後藤, 起佐子 伊藤, 治
巻/号	41号
掲載ページ	p. 37-40
発行年月	2004年12月

〔技術資料〕

鶏用生ワクチンからのトリ白血病ウイルス遺伝子の検出

大槻紀之¹、田口邦史、高木昌美、後藤起佐子、伊藤 治

(受付：平成16年8月2日、受理：平成16年10月18日)

〔TECHNICAL REPORT〕

DETECTION OF CONTAMINATION WITH AVIAN LEUKOSIS VIRUS
GENETIC SEQUENCES IN LIVE-VIRUS POULTRY VACCINESNoriyuki OTSUKI¹, Kunihiro TAGUCHI, Masami TAKAGI, Kisako GOTOH and Osamu ITOH*National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 1-15-1 Tokura, Kokubunji-shi, Tokyo 185-8511, Japan*
(Received : August 2, 2004 ; Accepted : October 18, 2004)

Avian leukosis viruses (ALV) were reported to have been found in some Marek's disease vaccines in the USA in July 2003. The cause was suspected to be the use of SPF eggs that were contaminated with ALV in the manufacture of the vaccines. Moreover, the ALV-contaminated eggs were thought to be have come from a specific supplier (Supplier A). We investigated the presence of ALV genetic sequences and antigen in eleven vaccines (including seven vaccines that used SPF eggs from Supplier A as raw material) licensed in Japan.

The results were as follows:

1. ALV genetic sequences were detected in all vaccines manufactured using eggs from Supplier A.
2. There was no evidence that ALV viral antigen or replication-competent ALV existed in any of the vaccines examined.

2003年7月に米国コロラド州デンバーで行われたAmerican Association of Avian Pathologists主催の学術集会においてマレック病 (MD) 生ワクチン中に迷入していたトリ白血病ウイルス (ALV) により、ワクチン接種鶏が鶏白血病に感染したことが報告された。同時に、その原因がワクチン製造に用いられたA社が供給したSPF鶏卵であることも報告された (Fadly 2003)。我が国においてもA社のSPF鶏卵を輸入し、鶏用生ワクチンの製造に用いられていることが判明した。

動物用生物学的製剤基準 (動生剤基準) 一般試験法における鶏用生ワクチンの迷入ウイルス否定試験では、レトロウイルス科に属するALVや細網内皮症ウイルスは明確な細胞変性を伴わずに増殖するため、COFAL (complement fixation test for avian leukosis viruses) 試験及び蛍光抗体法によってそれぞれ試験を行うことが規定されており (農林水産省 2002)、これらのA社由来の発育鶏卵を製造用材料として用いた鶏用生ワクチンについても、製造者の実施する小分け製品における迷入ウイルス否定試験によりALV陰性であった。そのため、我々は製造者の実施する試験とは異なる方法でALVによる汚染の有無の再調査を行った。

1 材料及び方法

(1) ワクチン及び細胞

10日齢のSPF鶏卵 ((株) 日生研、LM系) から常法により胚線維芽細胞 (CEF) を作製し、実験に用いた。A社由来SPF鶏卵を使用して製造されたMD生ワクチン4ロット、鶏痘生ワクチン2ロット、伝染性ファブリキウス囊病生ワクチン1ロット、さらに他のSPF鶏卵を用い製造されたMD生ワクチン4ロットを供試した。また、各試験の陽性コントロールとして、当所で保持しているALV,A亜群に属するラウス随伴ウイルス1型 (RAV1) を用いた。

(2) 細胞培養試料の作製

動生剤基準 (農林水産省2002) の迷入ウイルス否定試験法1.1に準じ細胞接種試料を調製し、その試料を単層培養状態のCEFに接種し37°Cで10日間培養後、培養細胞及び上清を3回凍結融解した後3,000rpm、10分間遠心処理を行いその上清を細胞培養試料とし、遺伝子検出試験及び抗原検出ELISA試験に供試した。

(3) ワクチン及び細胞培養試料からのALV遺伝子検出試験

ALV遺伝子の検出にはRT-PCR法及びPCR法を利用した。各サンプルからの遺伝子の抽出にはHigh Pure Viral RNA kit (ロ

¹ 現国立感染症研究所
National Institute of Infectious Diseases

シュ)を用いた。ワクチンはワクチン添付の溶解用液又はリン酸緩衝食塩液を用い1 ml中100羽分となるように希釈または溶解した後、2回の凍結融解を行い3,000rpm、10分間遠心しその上清を、RAV1及び細胞培養試料は原液を用いキットの使用 방법에従い遺伝子を抽出した。両試験にはALV各亜群(A,B,C,D及びJ亜群)に対する反応性が確認されており、ALVの表面糖蛋白(env)をコードする遺伝子の一部を標的としたプライマーセットF4(5'-AGCAAGAAAGACCCGGAGAAG-3')、R3(5'-GTGATTGATTAACCCATTTGC-3')を用いた(未発表)。RT-PCRはSuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq(インビトロジェン)を用い、鋳型遺伝子10 µlとし、逆転写反応を50℃30分、アニール温度を55℃、伸長反応温度を72℃とし、試薬のプロトコールに従い反応を行った。PCR反応にはTakara Ex Taq(タカラバイオ)を用い鋳型遺伝子10 µl、プライマー濃度をそれぞれ0.5 µM、dNTPをそれぞれ0.2 mM、Ex Taqを0.25ユニットとしトータル50 µlの容量で反応を行った。PCR反応は94℃1分間の熱変性の後、94℃15秒、55℃30秒、72℃1分の処理を40回繰り返す、最後に72℃5分の反応を行った。RT-PCR及びPCR終了後アガロースゲル電気泳動により増幅産物の有無を確認した。また、増幅産物が認められたものの一部についてPCRダイレクトシーケンス(タカラバイオ・受託サービス)を行い、その塩基配列を決定した。

(4) 細胞培養試料からのウイルス抗原検出ELISA試験

Avian Leukosis Virus Antigen Test Kit(IDEXX製)を米国より入手し細胞培養試料を検体とし試験を行った。本キットは、ALV各亜群(A,B,C,D,E及びJ)共通抗原であるp27抗原を鶏血清等から検出するELISAキットであるが、細胞の培養上清からALVを検出できることも報告されている(高木ら2000、菱山ら2002)。本キットの使用方法は菱山ら(2002)の報告に従った。

2 結 果

ワクチンを試料として用いた遺伝子検出試験においてRT-PCR反応では陽性コントロールに約800bpの遺伝子増幅産物が確認されたが、ワクチンサンプルからは増幅産物は確認されなかった。一方PCR反応ではA社の発育鶏卵を製造材料とした全てのワクチンにおいて陽性コントロールと同サイズの約800bpの遺伝子増幅産物が確認され、ALV遺伝子が存在する可能性が示唆された(Table 1)。そこで、ALV遺伝子の存在が示唆されたサンプルのうちMD生ワクチン2ロットの遺伝子増幅産物の塩基配列約720bpをPCRダイレクトシーケンスにより決定し、得られた塩基配列をデータベースに登録されている配列と比較したところ、両遺伝子増幅産物から得られた塩基配列は完全に一致するとともにALV,E亜群ウイルスであるRAV0-A1のenv遺伝子と99%の相同性を示した(Fig.1)。

また、細胞培養試料を用いた遺伝子検出試験ではRT-PCR、

PCR問わず陽性コントロールを除く各試料において遺伝子増幅産物は確認されなかった(Table 1)。

細胞培養試料を用いたALV抗原検出ELISA試験では、供試した各試料のうち陽性対照を除き全ての試料において陰性となり、ALV共通抗原であるp27抗原は検出できなかった(Table 1)。

3 考 察

試験に供試したA社由来SPF鶏卵を製造材料とした各種生ワクチンにおいてALV遺伝子検出を目的としたPCR反応でALV遺伝子の存在が示唆された。また、得られた増幅産物の塩基配列を特定したところALV,E亜群ウイルスである、RAV0-A1株のenv遺伝子と高い相同性を示した。RAV0-A1株はE亜群のウイルスであるがそのenvはA亜群のそれを保持している株であること(Lupianiら 2000)、またA亜群に属するRAV-1のenvの塩基配列の一部と今回得られた塩基配列は約94%の相同性を示したことより、今回塩基配列を特定した2つの遺伝子増幅産物は、A亜群ウイルスのenvをコードする遺伝子の一部である可能性が高いと考えられた。しかしRT-PCRではALV遺伝子が検出されず、製剤中にはALV由来のRNAが存在しないことが示唆された。この結果より1本鎖のRNAを保有するALVが製剤中にはウイルス粒子としては存在しないことが推測された。ALVはレトロウイルス科アルファレトロウイルス属のウイルスであり、本ウイルスに起因する疾病としてリンパ球性白血病などがある。ALVはenvに存在するgp85抗原の違いによりA-Jの各亜群に分けられ、各亜群のうち鶏に病原性を示すウイルスは外来性ウイルスであるA,B,C,D,J亜群ウイルス及び内在性ウイルスのE亜群ウイルスである。内在性ウイルスでは宿主細胞の遺伝子上にプロウイルスと呼ばれる形でウイルス遺伝子が存在し、本遺伝子よりウイルスの産生が行われる。一般に内在性ALVは外来性ALVに比べウイルス複製能及び病原性が低いとされている(Coffin 1994)。ALVでは内在性、外来性を問わずウイルスの遺伝子断片が宿主細胞染色体遺伝子上に存在することが知られている(Coffin 1994)。これらのことよりPCR反応で得られた遺伝子増幅産物はALVウイルス粒子由来ではなく、製造に用いられた鶏細胞の遺伝子由来に由来していることが想定された。またPCR反応において、A社由来SPF鶏卵を製造に用いたワクチンでのみ陽性反応が認められることは、A社のSPF鶏の系統はその遺伝子上にALVの遺伝子を保有している可能性の高いことが考えられた。

しかしながら、ワクチンサンプルをCEFに接種し10日間培養し作製した細胞培養試料を用いた抗原検出試験ではALV各亜群共通抗原であるp27抗原が検出されなかったこと、また同じサンプルを用いALV遺伝子検出を行った結果、ALVの遺伝子は検出されなかった。このことはワクチンサンプル中には複製可能なALVが存在しないことを意味しているものと示唆される。さらにALV,A亜群遺伝子のみを特異的に検出するPCR反応において、ワクチン及び細胞培養試料からALV,A亜群遺伝子は検出さ

Table1. Results of RT-PCR and PCR for ALV env gene using vaccine samples, and detection of the ALV antigen and env gene using samples prepared for antigen detection

Vaccine ¹⁾	Samples prepared for gene detection		Samples prepared for antigen detection		
	RT-PCR	PCR	p27 antigen	RT-PCR	PCR
MD1*	-	+	-	-	-
MD2*	-	+	-	-	-
MD3*	-	+	-	-	-
MD4*	-	+	-	-	-
MD5	-	-	-	-	-
MD6	-	-	-	-	-
MD7	-	-	-	-	-
MD8	-	-	-	-	-
FP1*	-	+	-	-	-
FP2*	-	+	-	-	-
IBD*	-	+	-	-	-
Positive control	+	+	+	+	+

* : Made using eggs from the SPF chick supplier A as raw material.

1)MD;Marek's disease,FP;Fowl pox,IBD;infectious bursal disease

Positive control was a suspension of rous-associated virus type 1(subgroup A).

れなかった (データ示さず)。

以上のことより、A社由来SPF鶏卵を製造材料として用いたワクチン中には少なくともALV,A亜群ウイルスのenvをコードする遺伝子の一部が存在するが、ワクチン中に複製能を持つALVは存在しないと考えられる。このためA社由来のSPF鶏卵を用いて作製したワクチンを鶏に接種してもALV感染を起こさないものと考えられた。

トリに関わらず多くの動物種においてその染色体遺伝子上にレトロウイルスの遺伝子が完全な形あるいは不完全な形で存在していることは一般に知られている (Coffin 1996)。

本研究で問題としたA社由来のSPF鶏の系統においてもALVの遺伝子の一部を染色体遺伝子上に保持していることが強く疑われるものの、感染性を持つウイルスは存在しないと考えられ、本系統由来の発育鶏卵を製造材料としたワクチンを使用することにより、ALVの感染が発生する危険性はないと考えられた。

4 謝 辞

抗原検出試験に御協力頂いた国立感染症研究所加藤篤博士に深謝いたします。

文 献

- Coffin,J.M(1994) Avian leukosis viruses. In *Encyclopedia of Virology* vol 1.pp66-71. Academic Press.
- Coffin,J.M(1996) Retroviridae. In *Field Virology*, 3rd edition. pp1767-1848. Lippincott-raven Publishers,Philadelphia.
- Fadly,A.M(2003) Contamination of live-virus poultry vaccines with avian leucosis viruses: A whitepaper. A meeting held during the 2003 conference of the American Association of Avian Pathologists.
- 菱山美智子、小浜友昭、竹内薫、加藤篤、田代真人 (2002) 生ワクチンに混入する可能性のあるトリ白血ウイルスの簡便な検出方法について. *臨床とウイルス*30,172-179.
- Lupiani,B.,Hunt,H.,Silva,R. & Fadly,A.(2000) Identification and characterization of recombinant subgroup J avian leukosis viruses(ALV) expressing subgroup A ALV envelope. *Virology* 276,37-43.
- 農林水産省(2002) 動物用生物学的製剤基準. 平成14年10月
- 高木昌美、石丸雅敏、伊藤治(2000) 鶏白血ウイルス抗原検出用ELISAキットの有用性評価. *動物医薬品検査所年報* 37,21-24.