

(19)日本国特許庁 (J P)

(12)特許公報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3227475号

(P 3 2 2 7 4 7 5)

(45)発行日 平成13年11月12日(2001.11.12)

(24)登録日 平成13年9月7日(2001.9.7)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	
C12N 15/09	ZNA	C12Q 1/68	A
C12Q 1/68		C12N 15/00	ZNA A

請求項の数 6 (全11頁)

(21)出願番号	特願平10 - 104420	(73)特許権者	501203344 独立行政法人 農業技術研究機構 茨城県つくば市観音台 3 - 1 - 1
(22)出願日	平成10年4月15日(1998.4.15)	(72)発明者	明石 博臣 茨城県つくば市竹園 1 丁目803 - 405
(65)公開番号	特開平11 - 290080	(74)代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔 (外1名)
(43)公開日	平成11年10月26日(1999.10.26)		
審査請求日	平成10年4月15日(1998.4.15)	審査官	上條 肇
特許法第30条第1項適用申請有り Journal of General Virology誌第78巻第11号(平成9年11月) Society for General Microbiology発行第2847 - 2851頁に発表			

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アカバネウイルス S RNAの全塩基配列と異常産関連ウイルス病遺伝子診断のためのプライマー配列

1	2
(57)【特許請求の範囲】	5' - GAAGGCCAAGATGGTCTTAC - 3'
【請求項1】以下の工程：	5' - GGCATCACAAATTGTGGCAGC - 3'
(a)対象動物の細胞及び/又は血液からRNAを含有する試料を調製する工程、	を用いたnested PCRをさらに行うことを特徴とする請求項1記載の判別方法。
(b)上記試料に対して、次のプライマー：	【請求項3】前記工程(c)において、工程(b)で得られる増幅断片を制限酵素で処理し、その制限断片長多型により、対象動物がアカバネウイルスに感染しているか否かを判別することを特徴とする請求項1又は2記載の判別方法。
5' - TAACTACGCATTGCAATGGC - 3'	10 【請求項4】以下の工程：
5' - TAAGCTTAGATCTGGATACC - 3'	(a)対象動物の細胞及び/又は血液からRNAを含有する試料を調製する工程、
を用いたRT-PCRを行う工程、及び	(b)上記試料に対して、次のプライマー：
(c)工程(b)で得られる増幅断片の有無により、対象動物がアカバネウイルスに感染しているか否かを判別する工程、	5' - CCCAACTCAATTTGATACC - 3'
を含んでなることを特徴とする、アカバネウイルス感染の判別方法。	5' - TTTGGAACACCATACTGGGG - 3'
【請求項2】前記工程(b)において、RT-PCR産物に対して、次のプライマー：	

を用いたRT-PCRを行う工程、及び
(c) 工程 (b) で得られる増幅断片の有無により、対象動物がアイノウイルスに感染しているか否かを判別する工程、
を含んでなることを特徴とする、アイノウイルス感染の判別方法。

【請求項 5】 前記工程 (b) において、RT-PCR産物に対して、次のプライマー：

5' - CCATCGTCTCTCAGGATATC - 3'

5' - ACAGCATTGAAGGCTGCACG - 3'

を用いたnested PCRをさらに行うことを特徴とする請求項 4 記載の判別方法。

【請求項 6】 前記工程 (c) において、工程 (b) で得られる増幅断片を制限酵素で処理し、その制限断片長多型により、対象動物がアイノウイルスに感染しているか否かを判別することを特徴とする請求項 4 又は 5 記載の判別方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】本発明は、ウシ、ヒツジ、ヤギ等の動物におけるアカバネウイルス及びアイノウイルスの遺伝子診断方法に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】ウシ、ヒツジ、ヤギ等の哺乳動物に流産、死産、早産等の異常産を引き起こすウイルスとして、わが国ではアカバネウイルス、カスバウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス及びアイノウイルスが知られている。これらのウイルスのうち、アカバネウイルス及びアイノウイルスは分類学上同じウイルス群 (ブニヤウイルス科) に属する。

【 0 0 0 3 】ブニヤウイルス科に属するウイルスの遺伝子は、3 分節に分かれた、マイナスの 1 本鎖 RNA であり、分子量の大きい方から L (large)、M (medium)、S (small) と命名されている。それぞれの RNA は L 蛋白、G 1 と G 2 の糖蛋白、N 蛋白をコードしていることが知られており、また各分節の両末端の 8 ~ 13 のヌクレオチドは同属間でよく保存され、3' 末端と 5' 末端は相補的でパンハンドル構造を形成することが知られている。

【 0 0 0 4 】アカバネウイルスとアイノウイルスとは性状が酷似しているため、アカバネウイルス感染とアイノウイルス感染との判別は容易ではない。一方、アカバネウイルス感染とアイノウイルス感染とを判別することは、ウイルス病の治療において重要であるとともに、ウイルス病の流行を予測する上でも非常に重要である。

【 0 0 0 5 】従来、アカバネウイルス感染とアイノウイルス感染との判別は、血清学的診断によって行われていた。

【 0 0 0 6 】しかし、この方法では、異状を呈した子ウシ等の初乳未摂取の血清が必要であること、血清反応自

体にも細胞が必要であること、感染の有無の判別に 1 週間以上の期間を要すること等、操作が煩雑で判別に長期間を要するという問題点があった。そこで、ウシ、ヒツジ、ヤギ等の動物におけるアカバネウイルス感染とアイノウイルス感染とを、簡易かつ精度よく判別できる方法の開発が望まれている。

【 0 0 0 7 】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、ウシ、ヒツジ、ヤギ等の動物におけるアカバネウイルス感染及びアイノウイルス感染を簡易かつ精度よく判別できる方法を提供することを目的とする。

【 0 0 0 8 】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究した結果、アカバネウイルスの S RNA の全塩基配列を決定することに成功し、このアカバネウイルスの S RNA の塩基配列と既に公知であるアイノウイルスの S RNA の塩基配列とを比較することにより、両塩基配列の異なる部分を明らかにした。そして、この塩基配列の違いに基づいて、アカバネウイルス RNA を特異的に増幅できる RT-PCR 及び nested PCR 用プライマー、並びにアイノウイルス S RNA を特異的に増幅できる RT-PCR 及び nested PCR 用プライマーを作製し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 0 9 】すなわち、本発明は、以下の工程：

(a) 対象動物の細胞及び / 又は血液から RNA を含有する試料を調製する工程、(b) 上記試料に対して、アカバネウイルス S RNA に特異的に結合するプライマーを用いた RT-PCR を行う工程、及び (c) 工程 (b) で得られる増幅断片の有無により、対象動物がアカバネウイルスに感染しているか否かを判別する工程、を含んでなることを特徴とする、アカバネウイルス感染の判別方法である。

【 0 0 1 0 】また、本発明は、上記プライマーが、次の 2 種のプライマー：

5' - TAACTACGCATTGCAATGGC - 3'

5' - TAAGCTTAGATCTGGATACC - 3'

であることを特徴とする上記判別方法である。さらに、本発明は、上記工程 (b) において、RT-PCR産物に対して、次の 2 種のプライマー：

5' - GAAGGCCAAGATGGTCTTAC - 3'

5' - GGCATCACAAATTGTGGCAGC - 3'

を用いた nested PCR をさらに行うことを特徴とする上記判別方法である。

【 0 0 1 1 】さらに、本発明は、上記工程 (c) において、工程 (b) で得られる増幅断片を制限酵素で処理し、その制限断片長多型により、対象動物がアカバネウイルスに感染しているか否かを判別することを特徴とする上記判別方法である。さらに、本発明は、以下の工程：

(a) 対象動物の細胞及び / 又は血液から RNA を含有

する試料を調製する工程、(b) 上記試料に対して、アイノウイルスS RNAに特異的に結合するプライマーを用いたRT-PCRを行う工程、及び(c) 工程(b) で得られる増幅断片の有無により、対象動物がアイノウイルスに感染しているか否かを判別する工程、を含んでなることを特徴とする、アイノウイルス感染の判別方法である。

【0012】さらに、本発明は、上記プライマーが、次の2種のプライマー：

5' - CCCAACTCAATTTGATACC - 3'

5' - TTTGGAACACCATACTGGGG - 3'

であることを特徴とする上記判別方法である。さらに、本発明は、上記工程(b) において、RT-PCR産物に対して、次の2種のプライマー：

5' - CCATCGTCTCTCAGGATATC - 3'

5' - ACAGCATTGAAGGCTGCACG - 3'

を用いたnested PCRをさらに行うことを特徴とする上記判別方法である。さらに、本発明は、上記工程(c) において、工程(b) で得られる増幅断片を制限酵素で処理し、その制限断片長多型により、対象動物がアイノウイルスに感染しているか否かを判別することを特徴とする上記判別方法である。

【0013】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。

1. アカバネウイルス感染の判別方法

本発明のアカバネウイルス感染の判別方法は、以下の工程：

(a) 対象動物の細胞及び/又は血液からRNAを含有する試料を調製する工程、(b) 上記試料に対して、アカバネウイルスS RNAに特異的に結合するプライマーを用いたRT-PCRを行う工程、及び(c) 工程(b) で得られる増幅断片の有無により、対象動物がアカバネウイルスに感染しているか否かを判別する工程、を含んでなることを特徴とする。

【0014】以下、各工程ごとに説明する。

(1) 工程(a)

工程(a) は、対象動物の細胞及び/又は血液からRNAを含有する試料を調製する工程である。工程(a) における対象動物とは、アカバネウイルス感染の有無を判別しようとする動物を意味する。対象動物は、アカバネウイルスに感染し得る動物である限り特に限定されず、いかなる動物であってもよい。このような対象動物としては、例えば、ウシ、ヒツジ、ヤギ、マウス、ハムスター、ニワトリ胎児等が挙げられる。

【0015】工程(a) で使用する対象動物の細胞及び/又は血液は、対象動物に由来する限り特に限定されず、いかなる組織由来の細胞及び/又は血液であってもよい。このような細胞及び/又は血液としては、例えば、脳、心臓、肺、脾臓、腎臓、肝臓等の組織由来の細胞及び/又は血液を使用することができる。対象動物の細胞及び/又は血液は、対象動物から常法に従って採取

することができる。また、対象動物の血液は、蚊、ヌカカ等の吸血昆虫材料から常法に従って採取することもできる。

【0016】工程(a) で調製するRNAを含有する試料とは、対象動物の細胞及び/又は血液由来のRNAを含有する試料を意味する。従って、RNAを含有する試料には、アカバネウイルスゲノムRNAが含有される限り、いかなるRNA、DNA、タンパク質等が含有されていてもよい。また、RNAを含有する試料は、常法に従って精製してもよい。

【0017】対象動物の細胞及び/又は血液からのRNAを含有する試料の調製は、常法に従って行うことができる。例えば、対象動物の細胞及び/又は血液を破碎し、可溶化剤によって可溶化した後、変性剤によってタンパク質を除去し、エタノール等によって沈殿させることによって、対象動物の細胞からRNAを含有する試料を調製することができる。

【0018】(2) 工程(b)

工程(b) は、上記試料に対して、アカバネウイルスS RNAに特異的に結合するプライマーを用いたRT-PCRを行う工程である。工程(b) で使用するプライマーは、アカバネウイルスS RNAに特異的に結合する限り、その塩基配列は特に限定されない。このようなプライマーの塩基配列は、例えば、アカバネウイルスS RNAの塩基配列とアイノウイルスS RNAの塩基配列との間で塩基配列の異なる部分に基づいて決定することができる。ここで、両ウイルスS RNAの塩基配列の間で塩基配列の異なる部分を図1に示す。図1中、両ウイルスS RNAの塩基配列が同一である部分は「:」によって表され、異なる部分は空欄によって表される。従って、図1に示される両ウイルスS RNAの塩基配列の異なる部分を適宜選択することにより、アカバネウイルスS RNAに特異的に結合するプライマーの塩基配列を決定することができる。

【0019】アカバネウイルスS RNAに特異的に結合するプライマーとしては、例えば、次の2種のプライマー：

5' - TAACTACGCATTGCAATGGC - 3'

5' - TAAGCTTAGATCTGGATACC - 3'

を例示することができる。

【0020】これらのプライマーのうち、5' - TAACTACGCATTGCAATGGC - 3' は、アカバネウイルスS RNAの19~38番目の塩基配列に相補的であり、5' - TAAGCTTAGATCTGGATACC - 3' は、アカバネウイルスS RNAの相補鎖の721~740番目の塩基配列に相補的である。従って、これらのプライマーは、アカバネウイルスゲノムS RNAに特異的に結合する。アカバネウイルスS RNAに特異的に結合するプライマーは、例えば、常法に従って化学合成することができる。

【0021】上記試料に対して、アカバネウイルスS RNAに特異的に結合するプライマーを用いたRT-PCRを行う

ことにより、試料中にアカバネウイルスS RNAが含有されている場合には、アカバネウイルスS RNAを特異的に増幅することができる。アカバネウイルスS RNAに特異的に結合するプライマーを用いたRT-PCRは、常法に従って行うことができる。RT-PCRの条件は、アカバネウイルスS RNAに特異的に結合するプライマーを用いる限り特に限定されない。

【0022】工程(b)において、アカバネウイルスS RNAに特異的に結合するプライマーを用いたRT-PCRにより得られるRT-PCR産物に対して、RT-PCR産物に特異的に結合するプライマーを用いたnested PCRをさらに行うことが好ましい。例えば、RT-PCRのプライマーとして5' - TAACTACGCATTGCAATGGC - 3'及び5' - TAAGCTTAGATCTGGATACC - 3'を使用した場合には、nested PCRのプライマーとして、次の2種のプライマー：

5' - GAAGCCAAGATGGTCTTAC - 3'

5' - GGCATCACAATTGTGGCAGC - 3'

を用いることができる。

【0023】これらのプライマーのうち、5' - GAAGGCCAAGATGGTCTTAC - 3'は、アカバネウイルスS RNAの177～196番目の塩基配列に相補的であり、5' - GGCATCACAATTGTGGCAGC - 3'は、アカバネウイルスS RNAの相補鎖の388～407番目の塩基配列に相補的である。従って、これらのプライマーは、RT-PCR産物に特異的に結合する。RT-PCR産物に特異的に結合するプライマーは、例えば、常法に従って化学合成することができる。

【0024】RT-PCR産物に対して、RT-PCR産物に特異的に結合するプライマーを用いたnested PCRを行うことにより、RT-PCR産物は特異的に増幅される。これにより、目的の領域以外に由来する産物を除去することができる。RT-PCR産物に特異的に結合するプライマーを用いたnested PCRは、常法に従って行うことができる。nested PCRの条件は、RT-PCR産物に特異的に結合するプライマーを用いる限り特に限定されない。

【0025】(3)工程(c)

工程(c)は、工程(b)で得られる増幅断片の有無により、対象動物がアカバネウイルスに感染しているか否かを判別する工程である。増幅断片の有無の確認は、常法に従って行うことができる。例えば、電気泳動により増幅断片の有無を確認することができる。

【0026】増幅断片の有無の確認の結果、増幅断片が存在する場合には、対象動物がアカバネウイルスに感染している可能性が高いと判別することができる。例えば、プライマーとして5' - TAACTACGCATTGCAATGGC - 3'及び5' - TAAGCTTAGATCTGGATACC - 3'を用いたRT-PCRを行った結果、増幅断片が得られた場合には、対象動物がアカバネウイルス又はTinarooウイルスに感染している可能性が高い。また、増幅断片の有無の確認の結果、増幅断片が存在しない場合には、対象動物がアカバネウイルスに感染していない可能性が高いと判別することがで

きる。特に、nested PCRを行った後、増幅断片が存在しない場合には、対象動物がアカバネウイルスに感染していない可能性が極めて高い。

【0027】対象動物がアカバネウイルスに感染しているか否かをさらに精度よく判別するために、増幅断片がアカバネウイルスS RNAに由来することを確認することが好ましい。増幅断片がアカバネウイルスS RNAに由来することを確認する方法としては、例えば、増幅断片を制限酵素で処理して得られる制限断片長多型解析を行う方法が挙げられる。

【0028】この際使用する制限酵素としては、増幅断片を切断し制限断片長多型を示し得るものであれば特に限定されない。このような制限酵素としては、例えば、アカバネウイルスS RNA由来の増幅断片を切断し得る制限酵素(例えば、Hph I等)やアカバネウイルスS RNA由来の増幅断片を切断し得ない制限酵素(例えば、Bst EI I等)を使用することができる。これらの制限酵素は、単独で使用してもよいが、2種以上を組み合わせ使用することが望ましい。

【0029】増幅断片を制限酵素で処理して得られる制限断片長多型は、例えば、サザンブロット法により検出することができる。増幅断片を制限酵素で処理して得られる制限断片長多型により、増幅断片がアカバネウイルスゲノムRNAを鋳型として増幅した断片であるか否かを判別することができる。従って、制限断片長多型により、試料中にアカバネウイルスゲノムRNAが含有されているか否かを判別することができ、これにより対象動物がアカバネウイルスに感染しているか否かをさらに精度よく判別することができる。

【0030】2. アイノウイルス感染の判別方法
本発明のアイノウイルス感染の判別方法は、以下の工程：

(a) 対象動物の細胞及び/又は血液からRNAを含有する試料を調製する工程、(b) 上記試料に対して、アイノウイルスS RNAに特異的に結合するプライマーを用いたRT-PCRを行う工程、及び(c) 工程(b)で得られる増幅断片の有無により、対象動物がアイノウイルスに感染しているか否かを判別する工程、を含んでなることを特徴とする。

【0031】以下、各工程ごとに説明する。

(1) 工程(a)

工程(a)は、対象動物の細胞及び/又は血液からRNAを含有する試料を調製する工程である。工程(a)は、上記アカバネウイルス感染の判別方法の工程(a)と同様にして行うことができる。

【0032】(2) 工程(b)

工程(b)は、上記試料に対して、アイノウイルスS RNAに特異的に結合するプライマーを用いたRT-PCRを行う工程である。工程(b)は、プライマーとしてアイノウイルスS RNAに特異的に結合するプライマーを使用してR

T-PCRを行う点を除けば、上記アカバネウイルス感染の判別方法の工程 (b) と同様にして行うことができる。

【 0 0 3 3 】工程 (b) で使用するプライマーは、アイノウイルス S RNA に特異的に結合する限り、その塩基配列は特に限定されない。このようなプライマーの塩基配列は、例えば、アカバネウイルス S RNA の塩基配列とアイノウイルス S RNA の塩基配列との間で塩基配列の異なる部分に基づいて決定することができる。両ウイルス S RNA の塩基配列の間で塩基配列の異なる部分を図 1 に示す。従って、図 1 に示される両ウイルス S RNA の塩基配列の異なる部分を適宜選択することにより、アイノウイルス S RNA に特異的に結合するプライマーの塩基配列を決定することができる。

【 0 0 3 4 】アイノウイルス S RNA に特異的に結合するプライマーとしては、例えば、次の 2 種のプライマー：

5' - CCCAACTCAATTTTCGATACC - 3'

5' - TTTGGAACACCATACTGGGG - 3'

を例示することができる。

【 0 0 3 5 】これらのプライマーのうち、5' - CCCAACTCAATTTTCGATACC - 3' はアイノウイルス S RNA の 132 ~ 151 番目の塩基配列に相補的であり、5' - TTTGGAACACCATACTGGGG - 3' はアイノウイルス S RNA の相補鎖の 761 ~ 780 番目の塩基配列に相補的である。従って、これらのプライマーは、アイノウイルス S RNA に特異的に結合する。

【 0 0 3 6 】また、工程 (b) において、アイノウイルス S RNA に特異的に結合するプライマーを用いた RT-PCR により得られる RT-PCR 産物に対して、RT-PCR 産物に特異的に結合するプライマーを用いた nested PCR をさらに行うことが好ましい。例えば、RT-PCR のプライマーとして 5' - CCCAACTCAATTTTCGATACC - 3' 及び 5' - TTTGGAACACCATACTGGGG - 3' を使用した場合には、nested PCR のプライマーとして、次の 2 種のプライマー：

5' - CCATCGTCTCTCAGGATATC - 3'

5' - ACAGCATTGAAGGCTGCACG - 3'

を用いることができる。

【 0 0 3 7 】これらのプライマーのうち、5' - CCATCGTCTCTCAGGATATC - 3' はアイノウイルス S RNA の 313 ~ 332 番目の塩基配列と相補的であり、5' - ACAGCATTGAAGGCTGCACG - 3' はアイノウイルス S RNA の相補鎖の 638 ~ 657 番目の塩基配列と相補的である。従って、これらのプライマーは、RT-PCR 産物に特異的に結合する。

【 0 0 3 8 】(3) 工程 (c)

工程 (c) は、工程 (b) で得られる増幅断片の有無により、対象動物がアイノウイルスに感染しているか否かを判別する工程である。工程 (c) は、上記アカバネウイルス感染の判別方法の工程 (c) と同様にして行うことができる。増幅断片の有無の確認の結果、増幅断片が存在する場合には、対象動物がアイノウイルスに感染している可能性が高いと判別することができる。例えば、プライマーとして 5' - CCCAACTCAATTTTCGATACC - 3' 及び

5' - TTTGGAACACCATACTGGGG - 3' を用いた RT-PCR を行い、増幅断片が得られた場合には、対象動物がアイノウイルス又は Peaton ウイルスに感染している可能性が高い。

【 0 0 3 9 】また、増幅断片の有無の確認の結果、増幅断片が存在しない場合には、対象動物がアイノウイルスに感染していない可能性が高いと判別することができる。特に、nested PCR を行った後、増幅断片が存在しない場合には、対象動物がアイノウイルスに感染していない可能性が極めて高い。工程 (c) において、対象動物がアイノウイルスに感染しているか否かをさらに精度よく判別するために、増幅断片がアイノウイルス S RNA に由来することを確認することが好ましい。

【 0 0 4 0 】増幅断片がアイノウイルス S RNA に由来することを確認する方法としては、例えば、増幅断片を制限酵素で処理して得られる制限断片長多型解析を行う方法が挙げられる。この際使用する制限酵素としては、増幅断片を切断し制限断片長多型を示し得るものであれば特に限定されない。このような制限酵素としては、例えば、アイノウイルス S RNA 由来の増幅断片を切断し得る制限酵素 (例えば、Ava II、Eco RI、Hae II 等) を使用することができる。

【 0 0 4 1 】

【実施例】以下、具体例を挙げて本発明をさらに詳細に説明する。

〔実施例 1〕アカバネウイルス S RNA の全塩基配列の決定

(1) アカバネウイルス S RNA の抽出

HmLu-1 細胞中で増殖させたアカバネウイルス OBE-1 株を、ショ糖密度勾配遠心分離法によって精製した。精製したアカバネウイルス OBE-1 株に SDS を添加した後、フェノール抽出により RNA を抽出し、エタノール沈殿により RNA を回収した。

【 0 0 4 2 】この RNA を、水酸化メチル水銀 10mM を含有する 1% アガロースゲル上に分離した。臭化エチジウムで染色した後、S RNA を含むバンドを切り出し、フェノールを用いて溶解、抽出した。次いで、RNA をエタノール沈殿した。これにより、アカバネウイルス S RNA が得られた。

【 0 0 4 3 】(2) アカバネウイルス S RNA の塩基配列決定

上記 (1) で得られた 5 μ g の精製 S RNA の 3' 末端にポリ A 鎖を付加した。

【 0 0 4 4 】ポリ A 鎖の付加は、ATP 及びポリアデニル酸 (ポリ A) ポリメラーゼを使用して、Sippel の方法 (Sippel, A.E. European Journal of Biochemistry 37: 31-40(1973)) に従って行った。ポリ A 鎖を付加した S RNA を Sephadex G-50 カラムで精製し、オリゴ (d T) を用いて c DNA 合成キット (Amersham 社) により 2 本鎖 c DNA を合成した。

【 0 0 4 5 】 合成した2本鎖 c D N A の3'末端に、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いてデオキシシチジル酸を付加し、PstIで切断しデオキシグアニン鎖を3'末端に付加したpBR322 (Bethesda Research Laboratories社)中へクローニングした。このプラスミドを用いてMC1061細胞を形質転換した後、ウイルスRNAを含むプラスミドを保有するクローンを回収し、cDNAプローブを用いたハイブリダイゼーションによりスクリーニングした (Bishop, d.H.Lら., Nucleic Acids Research 10. 3703-3713 (1982)参照)。最も大きいクローン (789ヌクレオチド長)の塩基配列をマキサム・ギルバート法により決定した。

【 0 0 4 6 】 以上により塩基配列決定された c D N A は完全長ではなかったため、既に報告されている他の同族ウイルスのS RNAの塩基配列を基にして、5'末端の塩基配列を推定し、合成プライマーを用いたRT-PCRにより残りの塩基配列を決定した。すなわち、プニヤウイルス科に属するウイルスは、相補的な末端配列 (9位にはミスマッチ (UとG)がある)を有することが知られている (Elliott, R.M. Journal of General Virology 71. 501-522 (1990); Elliott, R.M.ら Current Topics in Microbiology and Immunology 169. 91-141 (1991))。また、アイノウイルスS RNAに関するデータにより、3'末端及び5'末端の約25残基の配列は類似している (但し、9位には1つのミスマッチがあり、ゲノムセンスRNAの5'末端から10位には1個のヌクレオチドが付加されている)ことが明らかとなっている (Akashi, H.ら Virus Research 1. 51-63 (1984))。

【 0 0 4 7 】 そこで、2種のreverseプライマーを合成した。すなわち、プニヤウイルス共通型としてプライマー-AKSRS : 5'-AGTAGTGTGCTCCAC-3'、アイノウイルス型としてプライマー-AKSRL : 5'-AGTAGTGTGGCTCCAC-3'を合成した。RT-PCRによるアカバネウイルスS RNAの5'末端の増幅は、forwardプライマー-AKSF19: TAACTACGCATTGCAATG

GC-3'、及び上記2種のreverseプライマー (AKSRS及びAKSRL)によって行った。このforwardプライマーは、アカバネウイルスS RNAの19-38残基に対応する。

【 0 0 4 8 】 RT-PCRは、GeneAmp熱安定性rTth逆転写酵素RNA PCRキット (Perkin-Elmer Cetus社)を使用し、最終容量100µl中で、94 で30秒、55 で30秒及び72 で1分を1サイクルとし、これを25サイクル行った。reverseプライマーとしてAKSRSを使用した場合のRT-PCR産物の量は、reverseプライマーとしてAKSRLを使用した場合の4倍以上であった (データは示さず)。このRT-PCRの結果から、アカバネウイルスS RNAの5'末端配列は、「・・・CACCUCGUGUGAUGA」であると結論した。

【 0 0 4 9 】 従って、forwardプライマー及びreverseプライマーとしてAKSF19及びAKSRSを用いて得られたRT-PCR産物を、TAクローニングキット (Invitrogen社)を使用して直接プラスミドベクター-pCR II中へクローニングし、373S DNAシーケンサー (Applied Biosystems社)を使用してその塩基配列を決定した。決定されたcDNAの塩基配列を、配列番号1に示す。なお、配列番号1記載の塩基配列は、ポジティブ鎖cDNAの塩基配列により記載してある。

【 0 0 5 0 】 【 実施例 2 】 プライマーの作製
実施例1で決定されたアカバネウイルスOBE-1株のS RNAの塩基配列と既に公知であるアイノウイルスJaNAr28株のS RNAの塩基配列 (Akashi, H.ら Virus Research 1. 51-63 (1984))とを比較し、両者間で相同性の低い部分をコンピュータープログラム (GENETYXプログラム (Software Development社))を用いて検索した。この結果に基づき、プライマーをOligo 1000 DNA Synthesizer (Beckman社)により合成した。合成したプライマーの塩基配列、及び対応するウイルスS RNA中の位置を以下の表1に示す。

【 0 0 5 1 】

【 表 1 】

第1段	RT-PCR (アイノウイルス用)	
ATSF132	5'-CCCAACTCAATTCGATACC-3'	132-151
ATSR780	5'-TTTGGAAACACCATACTGGGG-3'	780-761
第1段	RT-PCR (アカバネウイルス用)	
AKSF19	5'-TAACTACGCATTGCAATGGC-3'	19-38
AKSR740	5'-TAAGCTTAGATCTGGATACC-3'	740-721
第2段	nested PCR (アイノウイルス用)	
ATSF313	5'-CCATCGTCTCTCAGGATATC-3'	313-332
ATSR657	5'-ACAGCATTGAAGGCTGCACG-3'	657-638
第2段	nested PCR (アカバネウイルス用)	
AKSF177	5'-GAAGCCAAGATGGTCTTAC-3'	177-195
AKSR407	5'-GGCATCACAAATGTGGCAGC-3'	407-388

【 0 0 5 2 】 【 実施例 3 】 ウイルスS RNA特異的プライマーを使用したRT-PCR及びnested PCRによるウイルスRNAの検出

(1) R N A の抽出

アカバネウイルスとしてOBE-1株を、アイノウイルスとしてJaNAr28株を使用した。

【 0 0 5 3 】 また、上記プライマーの特異性を確認するために、アカバネウイルス及びアイノウイルスと同一の

ウイルス群 (シンプ (Simbu) 血清群ウイルス) に属する5種のウイルス、すなわちDouglas (DOU) ウイルスのCSIR0150株 (Division of Animal Health, Australia)、Peaton (PEA) ウイルスのCSIR0110株 (Division of Animal Health, Australia)、Tinaroo (TIN) ウイルスのCSIR0153株 (Division of Animal Health, Australia)、Facy's Paddock (FP) ウイルスのCh16129株 (Berrimah Agricultural Research Center, Northern Territory, Aust

ralia)、及びThimiri(THI)ウイルスのCSIR01株(Berri mah Agricultural Research Center, Northern Territory, Australia)を対照として使用した。5 × 10⁶ PFUの各ウイルス感染培養液から、RNA STAT-50LS(TEL-TEST社)及びSepaGene(三光純薬社)を使用して、各ウイルスのRNAを抽出した。

【0054】(2) RT-PCR及びnested PCRによるウイルスS RNAの検出

上記7種のウイルスのRNAに対して、上記RT-PCR用プライマーを使用したRT-PCRを実施した。RT-PCRは、Gene Amp RNA PCRキット(Perkin-Elmer Cetus社)を使用して行った。RT-PCRは以下の条件で行った。

【0055】すなわち、ランダムヘキサマー、RNaseインヒビター、MgCl₂、4種のデオキシヌクレオチド及び逆転写酵素を含有する総容量19 µlの1 × PCRバッファー中に各ウイルスRNA 1 µlを混合し、室温で10分間、42 で15分間、99 で5分間、及び5 で5分間インキュベーションした。これに、バッファー、MgCl₂及びTaqDNAポリメラーゼを追加して最終容量100 µlとし、上記RT-PCR用プライマーを用いて、94 で30秒、55 で30秒及び72 で1分の1サイクルを25サイクル行った。

【0056】RT-PCR反応液を72 でさらに7分間保持した後、PCR産物をMagic PCR Preps (Promega社)によって精製し、これをnested PCRの鋳型DNAとして使用した。nested PCRは、TaqDNAポリメラーゼ(Amersham社)を用いて上記と同様の方法により行った。得られたPCR産物を2%アガロースゲル中で電気泳動し、臭化エチジウムにより染色した。制限酵素による消化は、製造業者の指示する条件に従って行った。

【0057】電気泳動の結果を図2に示す。なお、図2中、レーンMは分子量マーカー、レーン1及び9はアイノウイルス由来のRNA、レーン2及び10はアカバネウイルス由来のRNA、レーン3及び11はDOUウイルス由来のRNA、レーン4及び12はFPウイルス由来のRNA、レーン5及び13はPEAウイルス由来のRNA、レーン6及び14はTHIウイルス由来のRNA、レーン7及び15はTINウイルス由来のRNA、レーン8及び16は培養液上清を表す。また、図2の上部の「RT」はRT-PCRの結果を表し、「nested」はnested PCRの結果を表す。また、図2中のAはアイノウイルスS RNA特異的プライマーを使用した場合の結果を表し、BはアカバネウイルスS RNA特異的プライマーを使用した場合の結果を表す。

【0058】図2に示すように、アカバネウイルスS RNA特異的プライマーを使用したRT-PCR及びnested PCRの結果、アカバネウイルスRNA及びTINウイルスRNAを用いた場合に増幅産物が検出された。そこで、両ウイルスのRT-PCR産物を同定するために、両ウイルスのS RNAの塩基配列に基づいて、制限酵素(Hph I及びBst E I I)を選択した。

【0059】アカバネウイルスのRT-PCR産物は、Hph Iによってのみ消化されたが、TINウイルスのRT-PCR産物は、Bst E I Iによってのみ消化された。これにより、両ウイルスのRT-PCR産物は識別された。また、アイノウイルスS RNA特異的プライマーを使用したRT-PCR及びnested PCRの結果、RT-PCR産物及びnested PCR産物は、アイノウイルス及びPEAウイルスの両方で検出された。

【0060】そこで、両ウイルスのnested PCR産物を同定するために、3種の制限酵素(Ava II、Eco RI、及びHae II)を選択した。PEAウイルスのnested PCR産物は、制限酵素(Ava II、Eco RI、及びHae II)により消化されなかったが、アイノウイルスのnested PCR産物は、制限酵素(Ava II、Eco RI、及びHae II)により消化された。これにより、両ウイルスのnested PCR産物は識別された。以上のように、ウイルスS RNA特異的プライマーによるRT-PCR及びnested PCRと制限断片長多型とを組み合わせることにより、アカバネウイルスS RNAおよびアイノウイルスS RNAを感度よく検出でき、また両者を容易に識別できることが示された。

【0061】〔実施例4〕マウスへの応用

野外応用を目指すため、アカバネウイルスおよびアイノウイルスを6週齢マウスの脳内及び腹腔内に接種した。

この際、脳内には各ウイルス液0.1ml (10^{5.5} TCID₅₀/ml)を、また腹腔内には同ウイルス液0.2mlを接種した。接種5日後にマウスを安楽殺させ、臓器(脳、心臓、肺、脾臓、腎臓、肝臓)及び血液を採取した。

【0062】これらの臓器及び血液中のウイルスを検出するため、ウイルス力価測定を行うとともに、ウイルスRNAを抽出し、ウイルスS RNA特異的プライマーを使用したRT-PCR及びnested PCRを行った。なお、各臓器及び血液サンプルからのRNAの抽出は、RNAzol B (TEL-TEST社)を用いて行った。その結果を、以下の表2に示す。

【0063】

【表2】

15	16						
	脳	心	肺	脾	腎	肝	血液
(アカパネウイルス脳内接種)							
ウイルス力価	5.25	N.D.*	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
RT-PCR	+	-	-	-	-	-	-
nested PCR	+	+	-	-	+	-	+
(アカパネウイルス腹腔内接種)							
ウイルス力価	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
RT-PCR	-	-	-	-	-	-	-
nested PCR	+	+	+	+	+	+	+
(アイノウイルス脳内接種)							
ウイルス力価	5.55	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
RT-PCR	+	-	-	-	-	-	-
nested PCR	+	-	-	+	+	+	-
(アイノウイルス腹腔内接種)							
ウイルス力価	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
RT-PCR	-	-	-	-	-	-	-
nested PCR	-	+	-	-	+	+	-

※ 検出されず

【0064】表2に示すように、ウイルス力価測定によれば、アカパネウイルス及びアイノウイルスの双方とも脳内接種マウスの脳サンプルからのみ検出された。これに対して、nested PCRによれば、これ以外の多数の臓器からも各ウイルスのゲノムS RNAを検出することができた。これにより、ウイルスS RNA特異的プライマーを使用したnested PCRによるウイルスS RNA検出の高感度が

【0065】

【発明の効果】本発明により、ウシ、ヒツジ、ヤギ等の動物におけるアカパネウイルス感染及びアイノウイルス感染を簡易かつ高精度に判別できる方法を提供される。本発明によれば、従来、流行予測や診断が困難であった

アカパネウイルス及びアイノウイルス感染症の流行予測や診断が簡易かつ高精度にでき、これによりウイルス感染に対して早期に対処（ワクチン接種等）できる。

【0066】

【配列表】

配列番号：1

30 配列の長さ：858

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：アカパネウイルスOBE-1株

配列

```

AGTAGTGAAC TCCACTATTA ACTACGCATT GCAATGGCAA ATCAATTCAT TTTCAACGAT 60
GTTCCACAAC GGAATGCAGC TACATTTAAT CCGGATGCAG GGTATGTGGC ATTTATCAGT 120
AAGTATGGGC AGCAGCTCAA CTTTACTGTT GCTAGAGTCT TCTTCCTCAA CCAGAAGAAG 180
GCCAAGATGG TCTTACATAA GACGCCACAA CCAAGTGTGC ATCTTACTTT TGCAGGGGTC 240
AAATTTACAG TGGTTAATAA CCATTTTCCC CAGTACACTG CAAATCCAGT GTCAGACACT 300
GCCTTTACGC TTCACCGCAT CTCGGGCTAC TTAGCTCGCT GGGTTGCTGA GCAGTGCAAG 360
GCTAATCAGA TCAAATTTGC AGAGGCAGCT GCCACAATTG TGATGCCACT GGCTGAGGTG 420
AAGGGTTGCA CTTGGAGTGA CGGGTATGCA ATGTACCTGG GATTTGCCCC TGGTGCTGAG 480
ATGTTTCTGG AAACCTTTGA GTTTTACCCA CTGGTTATCG ACATGCACCG TGTGATAAAG 540
GATGGAATGG ATGTCAACTT CATGAGGAAG GTCTTACGTC AGAGGTATGG GCAGCTGACT 600
GCAGAAGAGT GGATGACATC TAAGTTGGAC GCAGTCAAGG CTGCATTTGG CTCAGTTGCC 660
CAAATATCCT GGGCTAAATC TGGCTTCTCA CCTGCAGCTA GAGCTTTCCT GGCTCAATTT 720

```


17	18
GGTATCCAGA TCTAAGCTTA ACTGATTCTC CAGTTTTTTC TTTTTTCTCT TCCTAAGTGC	780
ACCATGTCTA TGTGGTGAC ACCTTTGTTG AGCTGCTTGG ATTTTATTGT TTATAGTTAA	840
TTAGTGGAGC ACACTACT	858

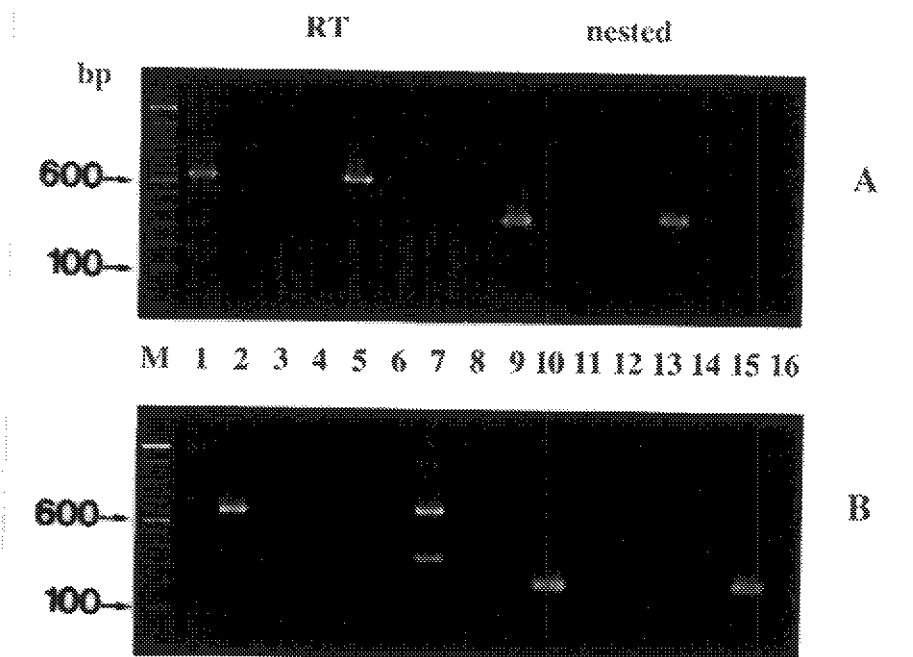
【図面の簡単な説明】

【図 1】アカバネウイルス S RNA の塩基配列とアインウ
イルス S RNA の塩基配列とを比較した図である。

【図 2】RT-PCR 産物及び nested PCR 産物の電気泳動の結果を表す写真である。

【図 2】

図面代用写真



【 図 1 】

AINOS 10 20 30 40 50 60
AGTAGTGTACTCCACTATAGAACAAGLTTTAAATGGCAAAACAATTTATTTTCCAAGA
OBES-FULL 10 20 30 40 50 60
AGTAGTGAAGTCCACTAT-TTACTACGCATTGCCAATGGAAATCAATTCATTTTCAACGA
AINOS 70 80 90 100 110 120
TGTTCCTCAACGGAAATCTCGCTACGTTTAAACCCGGAGGTCGGGTATGTGGCATTATTTGC
OBES-FULL 70 80 90 100 110 120
TGTTCCTCAACGGAAATGCAGCTACATTTAAATCCGGATGCAGGATATGTGGCATTATTTAG
AINOS 130 140 150 160 170 180
TAAACATGGGGCCCAACTCAATTCGATACCGGTAGATTTCTTCTTCCCTCAATCAGAAGAA
OBES-FULL 120 130 140 150 160 170 180
TAAGTATGGGCAGCAGCTCACTTTACTTGTGTGCTAGAGTCTTCTTCCCTCAACCCAGAAGAA
AINOS 190 200 210 220 230 240
GGCCAAGATGGTACTCAGTAAGACGGCACAACCAAGTGTATGATCTTACATTTGGTGGCAT
OBES-FULL 180 190 200 210 220 230 240
GGCCAAGATGGTCTTAAATAAGACGGCACAACCAAGTGTGATCTTACTTTTTCAGGGGT
AINOS 250 260 270 280 290 300
CAAGTTTACACACTGGTTAAATAACCAATTTTCCCAATACACAGCAAAATCTGTGGCAGAC
OBES-FULL 240 250 260 270 280 290 300
CAAATTTACAGTGGTTAAATAACCAATTTTCCCAAGTACACTGCAAATCCAGTGTCCAGAC
AINOS 310 320 330 340 350 360
TGCCTTCACCTTCCATCGTCTCTCAGGATATCTAGCAAATGGGTTCAGACCAATGTAA
OBES-FULL 300 310 320 330 340 350 360
TGCCTTTACGTTACCGCATCTTCGGCTACTTACGCTCGCTGGTTCGTGAGCAGTGCAA
AINOS 370 380 390 400 410 420
AACGAATCAGATTAAATTTGGCTGAGGCCATGGAAAAAATTTGTCATGCCACTGGCTGAACT
OBES-FULL 360 370 380 390 400 410 420
GCCTAATCAGATCAAATTTGCAGAGGCCACTGCCCAAATTTGATGCCACTGGCTGAGGT
AINOS 430 440 450 460 470 480
GAAAGGTGGCACCTGGACTGAAGGGCTGACTATGATATGTTGGGATTTCGACACAGGTGCTGA
OBES-FULL 420 430 440 450 460 470 480
GAAGGGTGGCACCTGGAGTGACGGGTATGCAATGTACCTGGGATTTGCCCTGGTGTCTGA
AINOS 490 500 510 520 530 540
AAVGTPTTAGAAACATTTGAATTTCTACCCCTTTGGTPTATGATATGCACACAGAGTGTGAA
OBES-FULL 480 490 500 510 520 530 540
GATGTTTCTGGAAACCTTTGAGTTTACCCTGGTTATCCACATGCCCGTGTGATAAA
AINOS 550 560 570 580 590 600
GGATGGAATGGATGTCAACTTTCAATGAGGAAGGTCTTTCGCCAGCGCTACGGCACATTTGAC
OBES-FULL 540 550 560 570 580 590 600
CGATGCAATGGATGTCAACTTTCAATGAGGAAGGTCTTACGTCAGAGGTATGGGCAGCTGAC
AINOS 610 620 630 640 650 660
TGCAGAACAGTGGATGACTTAAAAATAGATGCTGTCTCGTGACGCTTCAATGCTGTTTGG
OBES-FULL 600 610 620 630 640 650 660
TGCAGAACAGTGGATGACATCTAAGTTGGACCGCTCAAGCCTGCATTTGGCTCAGTTGC
AINOS 670 680 690 700 710 720
GCAGCTAAGCTGGCTAAATCAGGATTCACCAGCTGCTAGAGCCTTCCTTGCCTCAATTTG
OBES-FULL 660 670 680 690 700 710 720
CCAAATATCTGGCTAAATCTGGCTTCTCACTTCCAGCTAGAGCTTTCCTGGCTCAATTTG
AINOS 730 740 750 760 770 780
TGGCATAAACATCTAAATTTCTGTAATAACCCACCCCTTTCCCAAGTATGGGTTCCTCAAA
OBES-FULL 720 730 740 750 760 770 780
TGGTATCCAGATCTAAGCTTAAACTGATTTCCAGTTTTTTCTTTTCTCTTCTT-AAGT
AINOS 790 800 810 820 830
ACACCATACGCCAATTCCTG--CAGCATTGTTTA-TTICTT----TCTATTG---ATTGTT
OBES-FULL 780 790 800 810 820 830
GCACCATGCTTAATGGTGCACACCTTTTGTTCAGCTGCTGGATTTTAATGTTTATAGT
AINOS 840 850
-CTATGTGGAGCCACACTACT
OBES-FULL 840 850
AATTAGTGGAG-CACACTACT

フロントページの続き

- (56)参考文献 蛋白質 核酸 酵素、Vol. 41 [5] (1996) p. 696 - 699
Virus Res., Vol. 50 [2] (1997) p. 205 - 213
J. Vet. Med. Sci., Vol. 59 [9] (1997) p. 837 - 840
Res. Virol., Vol. 146 [5] (1995) p. 355 - 362
臨床と微生物, Vol. 24 [5] (1997) p. 557 - 565
Virus Research, Vol. 1 (1984) p. 51 - 63

- (58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
C12N 15/40 - 15/50
C12Q 1/68
BIOSIS (DIALOG)
GenBank/EMBL/DDBJ/P
IR/SwissProt/Genese
q
JICSTファイル(JOIS)
MEDLINE (STN)
WPI (DIALOG)