

ハトサーコウイルスに関する研究

東部家畜保健衛生所 山本英次

はじめに

ハトサーコウイルス (PiCV) は、サーコウイルス科に属する、環状 1 本鎖、約 2000 塩基の DNA ウイルスである。PiCV 感染症は、活力低下や下痢などの症状を引き起こすハトの疾病で、ヨーロッパ、アメリカ、中国など、多くの国で報告されている。これまでに、16 株の PiCV 全遺伝子情報が GenBank に登録されており、利用可能である。一方、国内でも PiCV 感染症の発生が報告されているが、診断は病理組織学的検査を主体に実施されている。我々の知る限り、これまでに国内での PiCV の遺伝子学的検索は実施されていない。

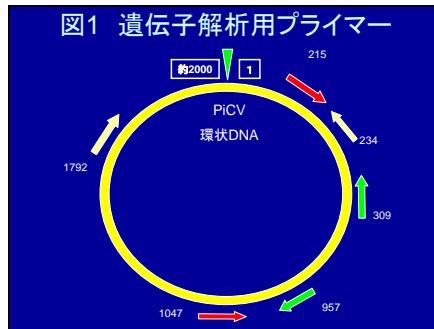
目的

- ①: 県内で検出された PiCV の全遺伝子情報を解析し、国内での PiCV 疫学情報収集の第一歩とする。
 - ②: 遺伝子の定量が可能なりアルタイム PCR (以下 qPCR) による PiCV 遺伝子検出法を開発する。
 - ③: 感染源の一つとも考えられる野生ドバトにおける、ハトサーコウイルス保有状況を調査する。
- 以上の 3 点を目的に、本研究を実施した。

材料と方法

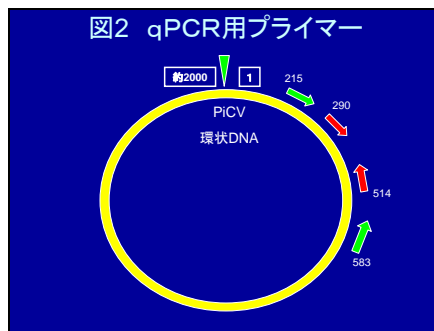
- ①: PiCV 県内検出株の全遺伝子配列の決定と既報株との比較解析

慢性下痢症を呈したため病性鑑定を実施した、県内飼育レースバトの肝臓から抽出された DNA を材料とし、既報の PiCV 全塩基配列を参考に、フリーソフト「Primer 3」を用いて 3 種類のプライマーセット (図 1) を作成した。インバース PCR、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、フリーソフト「MEGA 4」を用いて分子系統樹解析の実施した。



- ②: qPCR による PiCV 遺伝子検出法の開発

まず、検出用プライマーとして、PiCV 遺伝子の高度に保存されている領域にプライマーを設定した。さらに、この検出用プライマーの外側に標準 DNA 用のプライマーを設定した (図 2)。この標準 DNA 用プライマーで増幅した PCR 産物を精製した。この溶液の DNA 濃度を測定し、遺伝子コピー数を計算、 $10^8 \sim 10^9$ コピー/ μl の標準 DNA 液を作成した。この標準 DNA 液を用い、検出用プライマーで PCR を実施、定量的に遺伝子を検出できるかを検証した。



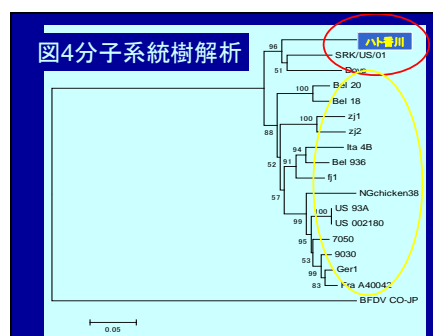
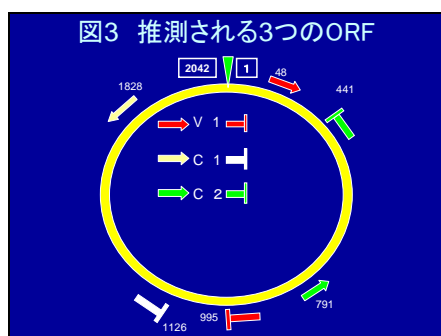
- ③: 野生ドバトにおける、ハトサーコウイルス保有状況調査

材料として県内に生息する野生ハトの糞便、60 検体を用いた。糞便は PBS⁻を用いて 20%乳剤とし、市販キットを用いて DNA を抽出した。この DNA を用いて、前出の qPCR 法による PiCV 遺伝子の検出を実施した。

結果

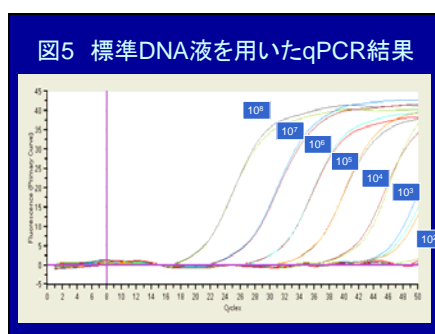
①：PiCV 県内検出株の全遺伝子配列の決定と既報株との比較解析

PiCV 県内検出株の全塩基配列を決定した結果、総塩基長は 2042 塩基で、他のハトサーコウイルスと同様に 3つの翻訳領域をもつことが推測された (図 3)。今回の県内検出株と既報の 16 株の全塩基配列を用いた分子系統樹解析を実施した結果、これまで報告されているハトサーコウイルスは大きく 2 つに分類され、今回の検出株は他の 2 株とともに 1 つのグループを形成した (図 4)。



②：qPCR による PiCV 遺伝子検出法の開発

標準 DNA 液を用いて、qPCR を実施した結果、定量的に遺伝子が検出できることが確認できた。この qPCR 検出系では、PiCV 遺伝子を 10^3 コピー/ μ l 程度含む DNA 溶液からの検出が可能であった (図 5)。



③：野生ドバトにおける、ハトサーコウイルス保有状況調査

60 検体中、4 検体が陽性を示し、陽性率は 6.7%であった。陽性検体の遺伝子量は $2.8 \times 10^3 \sim 8.9 \times 10^6$ であった。

考察

本研究で用いた PiCV 県内検出株は、これまで報告されている PiCV の中では遺伝子学的にマイナーなグループに属することが判明した。同一のグループに属するものには、PBFV の様に羽に障害のあるセネガルドブから検出されたものも含まれていた。PiCV 感染ハトで報告された症状には、通常羽の障害は含まれない。この点からも、PiCV 県内検出株は特異な性状を持つ株である可能性もある。また、今回開発した PiCV 遺伝子の qPCR 検出系は、PiCV 遺伝子を特異的、定量的に検出できることが証明された。この検出系を用いて、野生ドバトの糞便からの PiCV 遺伝子の検出を試みた結果、PiCV 遺伝子を検出することが可能であった。この結果は野生のドバトが PiCV の感染源となる可能性を示唆している。しかし、現時点での国内における PiCV の情報は十分とはいえない。今後、さらなる疫学情報の収集が必要であり、今回開発した qPCR 検出法はその一助となると思われる。