

表 6

疾病名	疥癬
病原体名	ヒゼンダニ
文献番号	SM-1-1
タイトル	Sarcoptes scabiei in animal spreading to man
雑誌名、巻、号	Trop Geogr Med 1993,45(3) 142-3
著者名	Malay Mitra, S K Mahanta S Sen C Ghosh, A K Hatl
発生日	1991年12月最終週
発生場所	インド
患者 (若しくは感染者)	西ベンガル州Birbhum地区Fewgram村及びNurpur村
職業	記載なし
性別	成人男性12名 成人女性18名 子供(男性)5名 子供(女性)7名
年齢	
症状	
潜伏期間	
暴露(感染)状況	ヒゼンダニに感染したヤギ
感染源	放畜中のヤギから羊、牛などほかの家畜へ感染が広がったが、この地域では人間がヤギと同室で夜を過ごすため、人間にも感染した
感染経路	
診断方法	記載なし
治療方法	7%のヘキサクロロヘンセンの治療が有効
対応	動物の感染に対してはデルタメトリンとアミトラズの殺虫剤が有効
その他	人の死亡例はなし 未治療のヤギ19例、牛1例に死亡例あり 伝染病の発生は1992年3月に沈着

表 7

疾病名	疥癬	
病原体名	Sarcoptes Scabiei	
文献番号	SM-1-2	
タイトル	動物からヒトへのSarcoptes scabieiの伝染およびその抑制	
雑誌名、巻、号	J Indian Med Assoc 1995 Apr,93(4) 142-3	
著者名	Malay Mitra, S K Mahanta, S Sen, C Ghosh, A K Hati	
発生日	国	イント
発生場所		
患者	都市、地方	女性(成人18名、小児7名)、男性(成人12、小児5名)
(若しくは感染者)	職業	
	性別	指の間、肘、胸部、大腿部、臀部、外陰部における、夜間に悪化する強い痒み、丘疹、引っかき傷を伴う
	年齢	
症状		
潜伏期間		ヤギ
暴露(感染)状況	感染源	
	感染経路	ヤギから、ヒツジ、ウシなどの家畜に広がり、接触したヒトに伝染。ヤギと一緒に寝る村人もいる。
診断方法		ヘンゼンヘキサクロリド(2%)
治療方法		
対応		
その他		

表 8

疾病名	疥癬	
病原体名	ダニ	
文献番号	SM-1-3	
タイトル	ヒト疥癬の真皮における細胞浸潤のin situ解析	
雑誌名、巻、号	The American Journal of Dermatopathology(1982) 4 9-15	
著者名	Edvard S Falk Roald Matre	
発生日	国 都市、地方 職業 性別 年齢	7名
発生場所		
患者 (若しくは感染者)		
症状		
潜伏期間	ダニ	
暴露(感染)状況		
診断方法	疥癬患者の真皮における細胞浸潤を赤血球吸着法及び免疫蛍光抗体法で解析した。7名すべての真皮検体で単核細胞の浸潤が認められた。浸潤している主細胞はTリンパ球であり、わずかなマクロファージの浸潤も見られたが、Bリンパ球はほとんど検出されなかった。本論文では疥癬の真皮病変においてTリンパ球の浸潤は特異的であり、細胞介在性の免疫応答は疥癬の病因を知る上で特に重要であると結論付けている。	
治療方法		
対応		
その他		

表 9

疾病名	キュウセンヒゼンダニ症、毛包虫症、ヒゼンダニ疥癬	
病原体名	Psoroptes ovis*,Psoroptes cuniculi*,Demodex canis Leydig*,Demodex bovis Stiles*,Demodex caprae Railliet*,Sarcoptes scabiei	
文献番号	SM-1-4	
タイトル	家畜のキュウセンヒゼンダニ症及び毛包虫症とヒトヒゼンダニ疥癬に関する近年の進歩	
雑誌名、巻、号	International Journal of Dermatology(1981)20 585-588	
著者名	William F Fisher	
発生日	国 都市、地方 職業 性別 年齢 感染源 感染経路	疥癬は寄生ダニによる皮膚疾患である。ダニの重要な種にはキュウセンヒゼンダニ類、シヨクヒヒゼンダニ類、Psorergates類、ヒゼンダニ類、ニキビダニ類及びトリヒゼンダニ類があり、ヒトに寄生するのはヒゼンダニ類とニキビダニ類である。ヒゼンダニに対して免疫応答が起こるが、形成される抗体のタイプやそのメカニズムについてはほとんど知られていない。様々なタイプの免疫グロブリンの力価が影響を受けるとされている。(IgA力価抑制、IgG及びIgM力価上昇、IgE力価上昇または変化なし)
発生場所		
患者 (若しくは感染者)		
症状		
潜伏期間		
暴露(感染)状況		
診断方法		
治療方法		
対応		
その他		

\*は動物のみの情報

表 10

疾病名	コクシジウム症(トキソプラズマ症 オオスポラ症 肉胞子虫症 クリプトスポリウム症 アイメリア*及びイノスポラ感染症*)			
病原体名	Toxoplasma gondii Neospora caninum Sarcocystis ovicanis* Cryptosporidium parvum Eimeria columbarum* E. Labbeana* Isospora suis*			
文献番号	NC-1-1			
タイトル	ヒト及び動物のコクシジウム症に対する化学療法 現状と展望			
雑誌名 巻号	Parasitol Res(1996)82 193-199			
著者名	A Haberkorn			
	トキソプラズマ症	ネオスポラ症	肉胞子虫症	クリプトスポリウム症
発生日				
発生場所				
患者 (若しくは感染者)				
職業 性別 年齢				
症状			下痢	
潜伏期間				
暴露(感染)状況	ネコ			
感染源				
感染経路				
診断方法				
治療方法	葉酸拮抗剤ピリメタミンとスルホンアミドの併用。耐性のある場合はトリメプリムとスルファメトキサゾールの併用(まれにクリンダマインを予防的治療で併用)。再発時はピリメタミンとスルファジアゾン又はクリンダマインの併用あるいはピリメタミン単独		スルホンアミド	ヘリコバクターピロリ菌の試験では耐性の問題に加え効果も不十分。パロモイニンが最も有効。ジクラズリルは臨床試験で効果得られず。本症のエイズ患者の50%に対してヘンゼンアセトニトリル (letrazuril)に顕著な改善あり
対応				
その他	Toxoplasma gondii及び他の微生物に対して選択的ノビドロ葉酸還元酵素阻害剤ノアミノヒリミジンepiroprnm)in vitro活性あり	細胞培養でN. caninumに対して pinthrexim 塩酸クリンダマイニン、ジクラズリル、robenidine ピリメタミンが有効		

\*は動物のみの情報

表 11

疾病名	intracerebral myiasis	
病原体名	<i>Hypoderma bovis</i>	
文献番号	WI-2-1	
タイトル	Intracerebral myiasis from <i>Hypoderma bovis</i> larva in a child	
雑誌名、巻、号	Journal of Neurosurgery 71	
著者名	Mufit Kalelioglu, MD, Gonul Akturk, MD, Fadıl Akturk, MD Sezer S Komsuoglu, MD, Kayhan Kuzeyli, MD Yılmaz Tıgın,	
発生日		
発生場所	国	トルコ
	都市、地方	北東部の農場
患者	職業	
(若しくは感染者)	性別	男性
	年齢	8
症状	10日間の痙攣(focal motor-type convulsion)	
潜伏期間		
暴露(感染)状況	感染源	
	感染経路	
診断方法	右側頭頂後頭葉のCTスキャンによる血腫とその周囲の水腫の発見	
治療方法	外科手術による虫体及び血腫の除去	
対応		
その他	手術後6ヵ月で神経症状を残さず完治	

表 12

疾病名	皮膚ハエウジ症による過好酸球増加症	
病原体名	<i>Hypoderma bovis</i>	
文献番号	WI-2-2	
タイトル	Hypereosinophilia due to Myiasis	
雑誌名、巻、号	Acta Haematologica 99	
著者名	A Nacajas, I Cardenal, M A Pinan, A Ortiz, I Astigarraga, A Fdez-Tejer	
発生日	国	スペイン
発生場所	都市、地方	
患者 (若しくは感染者)	職業	
	性別	男性
	年齢	2
症状	初診時 痛みを伴う右側臀筋の血腫、2ヵ月間に渡る断続的な 38.5°C以下の発熱 治療開始5日後 発熱、頭痛、頸部硬直 一ヵ月後 筋肉痛、皮膚結節形成	
潜伏期間	感染源	
暴露(感染)状況	感染経路	
診断方法	血液検査、生検(皮膚結節の試験的切開)	
治療方法	ステロイド投与、頭皮の結節からの外科手術による虫体の除去	
対応		
その他	手術後は特に処置を必要とせず快復	

表 13

疾病名	眼内ハエウジ症	
病原体名	<i>Hypoderma bovis</i>	
文献番号	WI-2-3	
タイトル	A case of intra-ocular myiasis due to <i>Hypoderma bovis</i>	
雑誌名、巻、号	Israel Journal of Medical Science	
著者名	W Sachs, B Feldman-Muhsam	
発生日	1966/1/3	
発生場所	国	イスラエル
	都市、地方	農業地帯
患者 (若しくは感染者)	職業	
	性別	男性
	年齢	14
症状	左目の疼痛、角膜糜爛、二日後に視力低下	
潜伏期間	9か月	
暴露(感染)状況	感染源	
	感染経路	<i>Hypoderma bovis</i> の感染は一般に親バエが皮膚に卵を産みつけることによる
診断方法	前房に虫体を発見	
治療方法	虫体の除去	
対応		
その他	処置後は何事もなく快復	



表 14

疾病名	intracerebral myiasis	
病原体名	<i>Hypoderma bovis</i>	
文献番号	WI-2-4	
タイトル	Intracerebral Myiasis in a Child	
雑誌名、巻、号	Pediatric Radiology 10	
著者名	J M Poullaud J Dupont, R Gilly, and Cl Lapras	
発生日		
発生場所	国	フランス
	都市、地方	牛を飼っている農場
患者 (若しくは感染者)	職業	
	性別	男性
	年齢	6
症状		顔面麻痺、上肢の弛緩性麻痺
潜伏期間		
暴露(感染)状況	感染源	
	感染経路	頭蓋開口部より神経か血管を伝って侵入?
診断方法		頸動脈造影による血管の変位の発見
治療方法		外科手術による虫体及び血腫の除去
対応		
その他		手術後2ヵ月で快復、軽度の運動障害が残ったが、2年後には完全

表 15

疾病名	oral myiasis	
病原体名	<i>Hypoderma bovis</i>	
文献番号	WI-2-5	
タイトル	Oral myiasis caused by hypoderma bovis larvae in a child A case report	
雑誌名、巻、号	Journal of Oral Science Vol 42, No 4	
著者名	Behcet Erol, Gulden Unlu, Kadri Balci and Rezzan Tanrikulu	
発生日	国	トルコ
発生場所	都市、地方	
患者 (若しくは感染者)	職業	
	性別	女性
	年齢	4
症状		痛みを伴わない上嘴唇及びその内側の腫脹、軟口蓋に穿孔
潜伏期間		
暴露(感染)状況	感染源	
	感染経路	眠っているときなどに親バエが口腔内に産卵し、歯周ポケットなどから幼虫が侵入?
診断方法		
治療方法		虫体の除去、穿孔の消毒
対応		
その他		患者の口腔内及び全身的な衛生状態は悪かった

表 16

疾病名	馬伝染性子宮炎
病原体名	<i>Tylorella equigenitalis</i>
文献番号	CE-1-1
タイトル	ウマ伝染性子宮炎1977の起因菌とヒトの性病
雑誌名、巻、号	The Lancet 1978年11月18日号
著者名	①C E D TAYLOR and R O ROSENTHAL ②A E WILKINSON and P RODIN
発生日	
発生場所	国 都市、地方
患者 (若しくは感染者)	職業 性別 年齢
症状	
潜伏期間	
暴露(感染)状況	感染源 感染経路
診断方法	
治療方法	
その他	ウマ伝染性子宮炎1977(CEM)の起因菌に対する凝集素が性病のヒト血清中に高率にみられ血清検査により凝集素を保有している人の割合を調査した。
	血清検査 I 健全男性 4% 生殖器治療中の男性・ 13% 健全女性 7% 生殖器治療中の女性 22%
	血清検査 II (非淋菌性尿道炎男性220人を対象) 32%が凝集素を保有 CEMの起因菌が尿道炎の原因である可能性は低く、CEMの起因菌は人の間で感染するか疾患を生じることはないといえよう。
	血清検査 III (性病患者423人を対象) 49人が凝集素を保有 男性35人・非特異性尿道炎(17)、淋疾(6)(3は淋疾後尿道炎)、その他(5)、疾患なし(7) 女性11人 淋疾(3)、非特異性尿道炎男性との接触(3)、疣贅(1)、陰部疱疹(1)、その他(3) 妊娠中女性 3人
	保有は必ずしも感染を意味するものではなく、CEMの起因菌と抗原を共有する他の菌によつ凝集素が存在している可能性がある。

表 17

疾病名	非淋菌性尿道炎	
病原体名	ウマ伝染性子宮炎の病原体 ( <i>Haemophilus equigenitalis</i> ) およびその関連病原	
文献番号	CE-1-2	
タイトル	ウマ伝染性子宮炎1977の病原体に対する非淋菌性尿道炎患者の血清学的	
雑誌名、巻、号	Lancet 1979 Mar 31,1(8118) 700-1	
著者名	C E D Taylor, R O Rosenthal D Taylor-Robinson	
発生日	1976-1977	
発生場所	国	イギリス
	都市、地方	Middlesex州
患者 (若しくは感染者)	職業	
	性別	
	年齢	
症状		
潜伏期間		
暴露(感染)状況	感染源	
	感染経路	
診断方法		
治療方法	ミノマイシン(200 mgその後100 mgを1日2回6日間)あるいはリファンピシン(600 mg/日を6日間)	
対応		
その他		

表 18

疾病名	馬伝染性子宮炎	
病原体名	<i>Taylorella equigenitalis</i>	
文献番号	CE-1-3	
タイトル	AGGLUTININS TO THE CAUSATIVE ORGANISM OF CONTAGIOUS EQUINE METRITIS 1977 IN HUMAN SERUM	
雑誌名、巻、号	Lancet 1978 May 13, 1(8072) 1038	
著者名	C E D Taylor	R O Rosenthal
発生日	1977年	
発生場所	国	Britain
	都市、地方	
患者	職業	
(若しくは感染者)	性別	男女
	年齢	
症状		
潜伏期間		
暴露(感染)状況	感染源	不明
	感染経路	不明
診断方法	凝集反応	
治療方法		
対応		
その他	健康な男女、生殖器科に通っている男女、マタニティクリニックに通っている女性の血清に対して、凝集反応で診断した。その結果、生殖器科に通っている男女が他に比べ陽性が多かった(20%程度、他は10%未満)。馬から人へ直接感染したことが予想されるが、4人の外科獣医からは凝集が検出できなかった。よって、馬伝染性子宮炎の原因生物と同一の、または抗原的に関連した他の生物による性病が存在するのかを検証しなくてはならない。	

表 19

疾病名	馬伝染性子宮炎	
病原体名	<i>Tylorella eugenitalis</i>	
文献番号	CE-1-4	
タイトル	Agglutinins to Causative Organism of Contagious Equine Metritis 1977 in Human Serum	
雑誌名、巻、号	The Lancet, June 10 1978	
著者名	J E Smith C R Young	
発生日		<p>国 都市、地方 職業 性別 年齢</p> <p>感染源 感染経路</p>
発生場所		
患者 (若しくは感染者)		
症状		
潜伏期間		
暴露(感染)状況		
診断方法		
治療方法		
対応		
その他		
<p>性病患者の血清が馬伝染性子宮炎の原因菌の凝集反応を示すことがあるが、この菌が馬から人に直接感染することは考えにくい</p>		

表 20

疾病名 病原体名 文献番号	ナイロヒ羊病 ナイロヒ羊病ウイルス(ブニヤウイルス科フレボウイルス属) NS-1-1		
タイトル 雑誌名 巻、号 著者名	Infections by viruses of the families Bunyaviridae and Filoviridae Rev sci tech Off int Epiz 2000 19(1) H Zeller & B Bouloy		
発生日 発生場所	国	1910年 ケニア	イント スリランカ
患者 (若しくは感染者)	都市、地方 職業 性別 年齢	ナイロヒ ヒノ	ヒソノ ヤギ Ganyamウイルスが分離
症状 潜伏期間 暴露(感染)状況	感染源 感染経路	急性出血性胃腸炎、食欲不振、結膜のチアノーゼ、呼吸促進、鼻汁 腹痛を伴う粘血便の下痢 ヒソノ ヤギ マダニ(Phipicephalus appendiculatus属)が媒介 マダニ(Phipicephalus pulchellus属)が媒介(まれ) マダニ(Haemaphysalis intermedia属)が媒介	
診断方法	ウイルス分離(血漿、腎、腸間膜リンパ節を材料にBHK-21細胞を使用/乳のみマウスの脳内接 ウイルス抗体の検出(免疫蛍光検査) ウイルス抗原の検出(PR-PCR)		
治療方法 対応 その他	ダニの駆除は計画されてきたが、継続は難しくコストも甚大 致死率90% ウガンダ ソマリア ルワンダ、タンザニア、ボソワナ、ナミビアでも発生 野生動物に感染例及び抗体の検出はない ヒトへの感染例(研究室職員の感染例が報告されるのみ)はまれ(発熱、頭痛、腹痛を伴う)		

表 21

疾病名	アルボウイルス感染	
病原体名	リフトレバー熱ウイルス、シントビスウイルス、dugbeウイルス、デング熱ウイルス2型、ウエストナイル熱ウイルス、チクンクンヤウイルス、ナイロビひつじ病ウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス	
文献番号	NS-1-2	
タイトル	ケニア沿岸の人々におけるアルボウイルス感染症の血清学的徴候	
雑誌名、巻、号	Journal of Tropical Medicine and Hygiene(1991)94 166-168	
著者名	J C Morrill B K Johnson C Hyams F Okoth P M Lukei M Mugambi J Woody	
発生日	国	都市、地方
発生場所		
患者 (若しくは感染者)	職業	性別
症状	年齢	
潜伏期間	感染源	感染経路
暴露(感染)状況		
診断方法		
治療方法		
対応		
その他	1624名の血清を収集し、間接免疫蛍光抗体法を用いて8つのアルボウイルス感染症に対する抗体を調べた。抗体の保有率はリフトレバー熱 28%、シントビス 26%、dugbe 21%、デング熱2型 10%、ウエストナイル熱 09%、チクンクンヤ 07%、ナイロビひつじ病 03%で、クリミア・コンゴ出血熱の抗体は検出されなかった。各ウイルスに対する抗体価も低く、全体的にアルボウイルス活性は低かった。	



厚生労働科学研究費補助金(食品安全確保研究事業)  
分担研究報告書

Q熱コクシエラの鶏卵からの検出に関する研究

分担研究者	岸本壽男	国立感染症研究所	ウイルス第一部第五室	室長
協力研究者	小川基彦	国立感染症研究所	ウイルス第一部第五室	主任研究官
協力研究者	佐藤 梢	国立感染症研究所	ウイルス第一部第五室	流動研究員
協力研究者	貞升健志	東京都健康安全研究センター	微生物部ウイルス研究科	主任研究官
協力研究者	平井昭彦	東京都健康安全研究センター	微生物部ウイルス研究科	主任研究官
協力研究者	甲斐明美	東京都健康安全研究センター	微生物部ウイルス研究科	科長
協力研究者	諸角 聖	東京都健康安全研究センター	微生物部	部長
協力研究者	百田隆祥	栄研化学株式会社	生物化学研究所	研究員
協力研究者	小島 禎	栄研化学株式会社	生物化学研究所	課長
協力研究者	池戸正成	栄研化学株式会社	生物化学研究所	部長

研究要旨 近年、食品の安全性確認が求められているか、鶏卵や関連食品などのQ熱コクシエラ(*Coxiella burnetii* *C burnetii*)汚染の実態や、感染リスクについては、その検出法が未だ確立されていないため不明な点が多い。本研究は鶏卵の *C burnetii* による汚染の実態を調査・検証し、鶏卵や関連食品からの感染リスクを検討することを目的とした。初年度としては、感染研並びに研究協力施設にて、*C burnetii* の鶏卵からの確実な検出法についてそれぞれ検討した。まず鶏卵からのDNA抽出法の検討を行い、さらに特異的かつ高感度な菌の検出法として、各種遺伝子検出法について検討した。遺伝子検出法としては、従来の nested-PCR 法に加え、新たに TaqMan 法による Real Time PCR 法、LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法を利用した検出系について開発し、850~3400 個/卵の感度をほぼ確立した。これらを用いて市販鶏卵についても 2 施設で初期調査を行ったが、計 215 個の卵からは *C burnetii* は検出されなかった。今後、さらに検出方法を比較し改善するとともに、市販鶏卵やその他の関連食品、親鶏等の実態調査を進める予定である。

A 研究目的

わが国において、近年、鶏卵や関連食品の一部が *C burnetii* に汚染されている可能性があるとの指摘があり、鶏卵の *C burnetii* による汚染の実態を調査・検証し、鶏卵や関連食品からの感染リスクを検討する必要性

が生じた。本件に関連する背景として、過去の成績では、まず 1950 年代に生卵からヒトへ感染したとされる報告がある (J Microbiol Epidemiol Immunobiol 1957)。この報告では、飼育していた飼育場 (野外) の鶏およびダニ、また卵殻および卵殻膜から

*C burnetii* が同定されている。一方で、別の報告では、鶏の感染実験により鶏から卵への垂直感染はおこらなかったとしている (Avian Disease 1977)。また、疫学的に鶏や野鳥に *C burnetii* による汚染があることも報告されている (J Wildlife Diseases 1971, 1979, Avian Disease 1977)。但し、これらの報告は、当時使用された検査法の感度か不明で、報告によって方法も様々であり不明な点も多い。近年、欧米において卵や鶏肉から *C burnetii* に感染したとされる症例の報告はなく、卵や卵関連食品からの Q 熱感染のリスクの検討に参考となる報告はない。そこで、将来的に鶏肉や鶏卵の安全性を確保するためには、鶏卵汚染の実態調査と並行して以下の 3 点、すなわち 1 わか国の鶏の汚染状況、2 感染鶏でのコクシエラの動態、3 人の健康被害の実態、これらをあわせて調査検討することか望ましいと思われる。

以上のような現状認識に基づき、本年度の研究では、まず汚染卵であった場合に、確実に陽性と確認できるように、卵からの特異的かつ高感度な菌の検出法の確立と市販卵の初期調査を目的とした。

## 国立感染症研究所における検討

### B 研究方法

まず卵からの検出法の検討において、感度試験用として菌数をカウントした *C burnetii* 陽性コントロールを国立感染症研究所で作成し、東京都健康安全研究センター、栄研化学(株)生物化学研究所に分与し、3 施設でこれを用いた。

鶏卵からの *C burnetii* の検出法の開発には、高感度、高特異性に加え、大量の検体を簡便かつ迅速に処理出来る方法が必要であるため、

#### 1 TaqMan 法による Real Time PCR 法の確立

#### 2 鶏卵からの DNA 抽出法の確立

#### 3 市販の卵からの検出の試み

について検討を行った。以下に詳細な方法を示した。

#### 1 TaqMan 法による Real Time PCR 法の確立

##### ①TaqManMGB プローブおよびプライマーの設計

*C burnetii* NM 株の外膜蛋白質 (com1) およびインサーション配列 (IS1111a) に対するプローブとプライマーを Primer Express ソフトウェア (Applied Biosystems) を用いて設計した。最終的に、他の菌やヒトゲノムへのホモロジーが極めて低く、*C burnetii* のみに特異性が高い各 2 組、計 4 組のプローブおよびプライマーを作成した。それぞれの配列は、QompF1 5'-CGC TGC CAA AGT ATC ATT AGC A-3'、QompR1 5'-CGC GTC GTG GAA AGC ATA A-3'、QompP1 5'-ATT TTC CTT GTT TAG CG-3'、QompF2 5'-ATA GCC GCC CCC TCT CAA T-3'、QompR2 5'-TCT ACT AAA ACT TCT GGG TGG TTG ACT-3'、QompP2 5'-AGT CAA AGA CAT ACA AAG C-3'、QISF1 5'-CAC CAA TGG TGG CCA ATT TAA-3'、QISR1 5'-AAA GAA AGC GGT TGC ATT CG-3'、QISP1 5'-ATA TCC GGC ATC ACG A-3'、QISF2 5'-GCG AGC GTG GGT GAC ATT-3'、QISR2 5'-ACC CAA TAA ACG CCG ACA AC-3'、QompP2 5'-ATC AAT TTC ATC GTT CCC GG-3' である。

##### ②Real Time PCR の実施条件

反応は、ABI PRISM 7000 および 7500 (Applied Biosystems) を用いて、TaqMan Universal Master Mix (2x) (Applied Biosystems) 12.5  $\mu$ l、プライマー各 900nM、Taq Man MGB プローブ 250nM、サンプル DNA 10ng 以上を含む計 25  $\mu$ l の反応液で、50°C 2 分の UNG 活性化反応、95°C 10 分の

TaqGold 活性化および UNG 不活化反応のあと、95℃15 秒および 60 度 1 分の 2 ステップ PCR を 40 サイクル行った。

### ③検出法の感度の検討

感度の検討には、*C burnettii* Nine Mile 株 II 相菌ホルマリン不活化死菌（以下 II 相菌）を用いた。II 相菌の培養および精製は定法にしたかかって行った。菌数の測定は、II 相菌を 10 倍段階希釈して、各希釈の 10 $\mu$ l を直径 5mm のマルチウエルプレートのウエルにのせ、乾燥および固定後、定法にしたかかって蛍光染色し、10 $\mu$ l 中の菌数を計測した。

計測した既知の濃度（菌数）の II 相菌を段階希釈して、各 PCR 反応に 100, 10, 1, 0.1, 0.01 個の菌が含まれるように調整して感度の検討を行った。

### ④特異性の検討

*Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter iwoffii*, *Alcaligenes faecalis*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Chryseobacterium indologenes*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium breve*, *Flavobacterium odoratum*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila* (Serogroup 1), *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella arizonae*, *Bacillus subtilis*,

*Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *C pneumoniae*, *C psittaci*, *Rickettsia japonica*, *R conori*, *R typhi*, *R prowazekii*, *Ehrlichia chaffeensis*, *E canis*, HE, *E sennetsu*, *Orientia tsutsugamushi* の計 46 株に対する反応を調べた。

### 2 鶏卵からの DNA 抽出法の検討

まず夜卵を用いた予備実験で、卵白が混入すると DNA 抽出が困難であることが判明したため、以後卵黄からの抽出法を検討した。

#### ①PBS+NaCl および Tween20 濃度の卵黄への影響

PBS 中の NaCl の濃度を (2.9~7.9% まで) 変え、卵黄へ等量加えたときの影響を調べた。また、PBS 中の Tween20 の濃度を (0.01~2.0%) 変え、同様に解析した。

#### 方法

- 50~600 $\mu$ l の卵黄+600 $\mu$ l の PBS+NaCl 溶液 or PBS+Tween20 溶液を用いる。
- 激しく攪拌 3 分。
- 14,000rpm 15 分 4℃。
- 沈渣を観察。

#### ②スパイク試験（スモールスケール）

#### 方法

- 卵黄約 500 $\mu$ l に 5.9%PBS-NaCl 750 $\mu$ l と *C burnettii* (10~10<sup>5</sup> 個/tube) を加える。
- ホルテノクス 3 分。
- 遠心 14,000rpm 30 分 4℃。
- 上清をピペットで捨て、50 $\mu$ l 程度残す。
- 130 $\mu$ l ATL に 20 $\mu$ l proteinase K を加える。
- 200 $\mu$ l AL 液を加える。
- ホルテノクス。
- 56℃ 一晩インキュベート（時々ホルテッ

クス)。

- ・200  $\mu$ l のエタノールを加えて、ホルテックス 15 秒。

あとは、プロトコールにしたかで行う。最終的に、50  $\mu$ l の AE 液で溶出。そのうち 25  $\mu$ l を 125  $\mu$ l の系で Real Time PCR に使用した。

### ③スパイク試験 (ラーシスケール)

#### 方法

- ・卵殻の消毒 卵殻を消毒アルコール、ヨーhurt、消毒アルコールの順で消毒、グローブも消毒する。
- ・割卵 目玉焼きを作るときの要領で、割卵し、シャーレにあける。直径15cmのシャーレを使用し、4個入れる(別々でもよい)。
- ・卵白を除く 卵黄を吸わないように、アスピレーターで吸って捨てる(25mlピペット使用)。
- ・25mlのピペットの先を卵黄に突き刺して、卵黄を吸引する。10ml以上吸って、約10mlを50mlの遠心管に入れる。
- ・菌を  $10^2 \sim 10^5$  個加える。
- ・8%NaCl-PBSを20ml加える。TAITEC VR36で数分間混和する。
- ・10,000rpm 45分遠心する。
- ・上清をデカンテーションで捨てる。さらに、残りをP1000で吸って捨てる。
- ・400  $\mu$ lのPBS(20  $\mu$ l proteinase K(20mg/ml含む)を加え、ホルテックスする。
- ・56°C 一晩インキュベート。
- ・そのうち200  $\mu$ lをとって、Qiagenのプロトコールに従って、以後の操作を行い、最終的に50  $\mu$ lのAE液で溶出した。

### 3 市販の卵からの検出の試み

以下の都内のスーパー2店で購入した合計115個の卵について検査を行った。検査には卵黄 500  $\mu$ l を用い、上記の方法で

6%PBS-NaCl を用いて行った。また、陽性コントロールとして *Salmonella enteritidis* を500個および50個を500  $\mu$ lの卵黄にスパイクして用いた。検出には、omp1 および IS1 のプローブおよびプライマーのセットを用いた。また、サルモネラの検出は、サルモネラ菌 invA 遺伝子検出用 Primer Set SIN-1, -2 (タカラバイオ株式会社) を用いた。

#### 試供卵

都内スーパーAで購入

1~10 H養鶏場(埼玉)

11~22 (20欠番) KA卵(福島)

23~32 SZ卵(埼玉)

33~42 SA卵(愛知)

43~50 SSN(愛知)

都内スーパーBで購入

51~56 AHY(群馬)

57~62 SFたまご サルモネラチェック

63~70 W卵(茨城)

71~80 FSの卵(茨城)

81~88 新鮮卵M(茨城)

89~94 Mたまご(茨城)

95~100 WO(青森)

101~108 NK卵(茨城)

109~116 MG(濃厚卵)(埼玉)

### C 研究結果

#### 1 設計したプライマーおよびプローブの感度

表1のように、今回設計したIS遺伝子に対するプライマーおよびプローブ IS1RT が最も感度が高く、0.01~0.1個の菌が検出可能であった。IS2RT に関してもほぼ同等の感度が得られた。また、外膜蛋白質に対するプライマーおよびプローブ omp1RT および omp2RT は1~0.1個の菌が検出可能で、同じ