

表 19

疾病名	馬伝染性子宮炎
病原体名	<i>Taylorella euigenitalis</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	
発生場所	国
患者	都市、地方
(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	
対応	
その他	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

表 20

疾病名 病原体名 文献番号	ナイロビ羊病 ナイロビ羊病ウイルス(ブン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 都市、地方	1910年 ケニア ナイロビ	インド・スリランカ
患者 (若しくは感染者)	職業 性別 年齢	ヒツジ	ヒツジ・ヤギ Ganjam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 ヒツジ・ヤギ ・マダニ(Phipicephalus appendiculatus属)が媒介 ・マダニ(Phipicephalus pulchellus属)が媒介(まれ) ・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)	
診断方法			
治療方法 対応 その他	<ul style="list-style-type: none"> ・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、ボツワナ、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、シンドビスウイルス、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、チクングンヤウイルス、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. Iukei, M.Mugambi, J.Woody	
発生日	国	
発生場所		
患者 (若しくは感染者)	職業	
	性別	
	年齢	
症状	感染源	
潜伏期間		
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 2.8%、シンドビス 2.6%、dugbe 2.1%、デング熱2型 1.0%、ウエストナイル熱 0.9%、チクングンヤ 0.7%、ナイロビひつじ病 0.3%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
協力研究者	山本茂貴	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部	部長

研究要旨:近年、食品の安全性確認が求められているが、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が不明で、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. わが国の鶏の汚染状況、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が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) およびインサージョン配列 (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 μ 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 μ 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°C15 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. burnetti* 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がって行った。菌数の測定は、II 相菌を 10 倍段階希釈して、各希釈の 10 μ 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、定法にしたがって蛍光染色し、10 μ 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* (Serogroup1), *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. typhii*, *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

まず液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 μ l の卵黄+600 μ 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°C。
- 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 μ l に 5.9%PBS-NaCl 750 μ l と *C. burnetti* (10~10⁵ 個/tube) を加える。
- ボルテックス 3 分。
- 遠心 14,000rpm 30 分 4°C。
- 上清をピペットで捨て、50 μ l 程度残す。
- 130 μ l ATL に 20 μ l proteinase K を加える。
- 200 μ l AL 液を加える。
- ボルテックス。
- 56°C 一晩インキュベート（時々ボルテッ

クス)。

- ・200 μ l のエタノールを加えて、ボルテックス 15 秒。

あとは、プロトコールにしたがって行う。最終的に、50 μ l の AE 液で溶出。そのうち 2.5 μ l を 12.5 μ l の系で Real Time PCR に使用した。

③スパイク試験 (ラージスケール)

方法:

- ・卵殻の消毒: 卵殻を消毒アルコール、ヨード、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 $10^2 \sim 10^6$ 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 μ lのPBS(20 μ l proteinase K(20mg/ml含む)を加え、ボルテックスする。
- ・56°C 一晩インキュベート。
- ・そのうち200 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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

遺伝子を標的とした nested PCR より感度が高かった。

次に、FAM 標識の omp1 および 2 と VIC 標識の IS1 および 2 を併用したところ、omp2 と IS1 を併用すると感度が著しく落ちることが示された。

2. 設計したプライマーおよびプローブの特異性

omp1 と IS1、omp1 と IS2 の組み合わせで、FAM と VIC の同時検出で検討した。その結果、IS2 は 35 サイクル前から、一般細菌のいくつかに非特異的に反応した。また、omp1 と IS1 は 36 サイクル以降で、いくつかの細菌に非特異的に反応したが、36 サイクル以前では陽性のものはなかった。

3. PBS+NaCl および Tween20 濃度の卵黄への影響

卵黄 500 μ l に等量の PBS-NaCl を加えたときに、NaCl 濃度が 2.9%以上で顕著なペレット量の減少がみられた。また、Tween20 の濃度はペレットの量に影響しなかった。

4. スパイク試験の結果

表 2 に IS2 により 2 回行った結果を示す。検体あたりスモールスケールでは 1,000 個、ラージスケールでは 10,000 個まで 2 回とも検出可能であった。Omp1 についてもほぼ同様結果であった。

5. 市販鶏卵の初期調査の結果

市販鶏卵、計 115 個の卵黄 500 μ l からの *C. burnetii* 遺伝子検出ではすべて陰性であった。コントロールとして用いた *S. enteritidis* は 500 個でスパイクしたものが 4/4 (100%) 陽性、50 個が 1/4 (25%) 陽性であった。

東京都健康安全研究センターにおける検討 B 研究方法

1. 卵黄からの *C. burnetii* 遺伝子検出法の検討

卵黄をストマッカーにより、よく粉砕後、既知のコピー数の *C. burnetii* Nine Mile 株 II 相菌を添加した。0.25~2.0 M のモル濃度の異なる NaCl 加 PBS をそれぞれ等量加えホモジナイズし、25,000G で高速遠心後の卵成分の沈殿量を比較した。さらに、遠心沈渣を SDS、proteinase K で消化後、NaI 法により DNA を抽出した (または、市販キット QIA amp DNA Mini Kit で抽出し、DNA 溶液を 20 μ l に濃縮)。得られた DNA 10 μ l を材料に、com1 遺伝子をターゲットとした nested PCR 法による遺伝子検出をおこなった。

2. 市販鶏卵の初期調査

東京都内で販売されていた卵 100 個について、上記の方法により検査を実施した。

C. 研究結果

1. 卵黄からの *C. burnetii* 遺伝子検出法の検討

NaCl 濃度 1M の PBS を加え、ホモジナイズ後、25,000G で遠心した場合に *C. burnetii* の検出感度を落とさずに、卵成分の沈殿量が最も少なくなり *C. burnetii* 遺伝子の抽出効果が最も高いことが判明した。また、同操作による鶏卵 (卵黄) 中への添加実験を実施した結果、*C. burnetii* 検出感度は 5×10^2 個/卵黄 10ml であった。

2. 市販鶏卵の初期調査の結果

市販鶏卵 100 個の検査を実施した結果、*C. burnetii* 遺伝子は検出されなかった。

栄研化学(株)生物化学研究所における検討 B 研究方法

1. LAMP 法を用いた *C. burnetii* の検出法

①プライマーの設計と LAMP 反応 *C. burnetii* に特異的である 27-kDa outer membrane protein をコードしている遺伝子 (com 1) を標的として LAMP の基本プライマーを設計し、あわせてより効率よく増幅させるために Loop primer の設計を行った。全量を 25 μ l として、65°C の等温で 60 分間の反応条件で測定した。Loop primer の効果確認には蛍光リアルタイム測定装置 (ABI 7000) を、それ以外の測定にはリアルタイム濁度測定装置 (LA-200) を用いて測定した。② 使用菌株

C. burnetii の鑄型として Nine Mile 株の genomic DNA を用いた。*C. burnetii* 以外の菌株として市中肺炎の起炎菌を中心に 35 菌株を用いた。③感度試験 *C. burnetii* は蛍光染色によるカウント法で細胞数を確認したのから調製した genomic DNA を希釈し、600、60、6 個/test になるように調製し LAMP 反応を行った。なお、対照として「Q熱診断マニュアル」(国立感染症研究所・地方衛生研究所編) 記載の PCR 法で測定した。④特異性試験 *C. burnetii* 以外の 35 菌株は $6 \times 10^3 \sim 6 \times 10^4$ 個/test の濃度で測定した。⑤増幅産物の確認 LAMP 産物の電気泳動による確認およびプライマーの F1 領域と F2 領域間に制限酵素 Hinc II で切断される配列があるのを利用して、産物が目的とした遺伝子領域であるかどうか確認を行った。

2. 卵からの *C. burnetii* DNA 抽出と検出法の確立

鶏卵から *C. burnetii* を検出するための処理法について検討を行った。菌体の回収効率については、

- ① 卵黄の採取法の検討: 卵黄のみを採取する・検体量を多くし検出感度を確保する
- ② 卵黄の沈殿量の検討: 塩濃度を高め沈殿量を軽減する

③ QIAamp DNA Mini Kit による DNA 抽出の検討: 抽出効率を高める。

これら 3 つの要因について検討した。

C. 研究結果

1. LAMP 法を用いた *C. burnetii* の検出

com 1 を標的として LAMP の基本プライマーを設計し、さらに Loop primer を添加することで検出時間を 20~30 分短縮することができた。これらの系により *C. burnetii* Nine Mile 株の genomic DNA を 65°C の等温で 30 分以内に検出できた。検出感度は 6 個/test で、対照である nested PCR 法と同等であった。

C. burnetii のみ増幅し、非 *C. burnetii* 35 菌株に対しては本菌の検出感度の数千倍から数万倍の鑄型量でも、LAMP 反応は認められず、高い特異性を示した。従って、本法は、*C. burnetii* の迅速検出に有用であると考えられた。

2. 卵からの *C. burnetii* DNA 抽出と検出法の確立

卵白と分離した卵黄を比較的目の粗いメッシュに通すことで、効率よく卵黄のみを採取することが出来た。

全卵より卵黄のみを 10ml 採取し、5% NaCl, 0.1% Tween-20/0.01M PB pH 7.2 を 30ml 添加した後、13,000rpm・45 分・4°C で遠心し、上清除去後、2ml の TE を添加・混合後、12,000rpm・45 分・4°C の条件で遠心し、その沈殿物を QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen 社製) を用いて DNA 抽出する方法が至適であると考えられた。本法で *C. burnetii* II 相菌の死菌を用いて添加回収実験を行った結果、LAMP 法によって 1,000 個/卵黄 10ml (卵 1 個の卵黄量を 17ml とすると 1,700 個/卵黄 1 個) が検出可能であり、添加した菌体と同等の回収結果が得られた。

D. 考察

国立感染症研究所での検討結果に関して、今回の結果から、*C. burnetii* 検出のために新たに設計したプライマーおよびプローブによる Real Time PCR 法は、omp1 と IS2 の組み合わせによる検出が感度および特異性ともに良好であった。しかし、36 サイクル以降では、いくつかの細菌に対し陽性となったので、以後の検査では 36 サイクル以前で上昇するもの（陽性コントロールと曲線がほぼ同じ高さまで）を陽性、上昇途中のものおよびそれ以降で上昇するものを擬陽性あるいは保留、全く上昇しないものを陰性としてすることとした。

PBS+NaCl および Tween20 濃度の卵黄への影響は、塩濃度が高いほどペレットが小さくなり、Tween20 の濃度はペレットの量には影響しなかった。そこで、高塩濃度や高 Tween20 の存在下では、DNA 抽出に影響がでることを懸念し、スパイク試験では、スモールスケールでは 5.9%NaCl-PBS を、ラージスケールでは 8%NaCl-PBS を使用することとした。その結果、スモールスケールでは、最大で卵黄 500 μ l 内に 100 個の菌を、ラージスケールでは、最大で卵黄 10ml あたり 10,000 個の菌の検出が可能であった。これを、卵一個の卵黄量 17ml に換算すると、スモールスケールでは卵一個あたり 3400 個の、ラージスケールでは 17,000 個の菌が検出可能である。従って、今回のスパイク試験の結果から、スモールスケールの方がより高感度であることが示された。また、スモールスケールの方が一度に多くの検体を処理することが可能で、手技も煩雑でないため、市販の卵からの検出にはスモールスケールを用いることにした。

市販鶏卵の検査結果は 115 個すべてが陰性であった。陽性コントロールとして用いた *S. enteritidis* は 500 個をスパイクしたとき

は常に陽性となったので、検出限界は最低でも卵一個あたり 17,000 個と考えられた。しかし、50 個の菌が検出される場合もあり、実際の感度はこの検出限界よりも若干高いものと推察された。今後さらに、卵黄からの DNA 抽出法を改良し感度を上げていくための検討が必要と考えている。

次に東京都健康安全研究センターにおける検討では、卵黄からの *C. burnetii* 遺伝子検出法について、卵黄への添加実験で nested PCR による *C. burnetii* 検出感度は 5×10^2 個/卵黄 10ml であった。これは鶏卵 1 個（卵黄 17ml）あたりでは 850 個となる。また、市販鶏卵の初期調査として市販卵 100 個の検査を実施した結果、*C. burnetii* 遺伝子は検出されなかった。

さらに栄研化学(株)生物化学研究所における検討では、LAMP 法での *C. burnetii* 検出感度は 1,700 個/卵黄 1 個のスパイク量 (1,000 個/10ml) が得られた。これは、操作中のロスが無かったと仮定すると最終的に約 12.5 個/assay (5 μ l) の計算となる。Genomic DNA と II 相死菌の反応性を比較したところ、II 相死菌の反応性は LAMP でも nested PCR でも比較的悪く、50 個/assay は検出できるが、5 個/assay は検出されなかった。このことから、約 12.5 個/assay は LAMP 検出感度限界に位置していると考えられた。

以上のように、今回 3 施設での検討を行うにあたり、感度検定用のサンプルは同一のものを使用し、3 施設でそれぞれ可能な範囲で抽出法などの統一をした上で、検出法はそれぞれの独自に検討を行った。種々の条件の違いがあり、感度を単純に比較することはできないが、方法は異なっても 3 施設での *C. burnetii* 検出感度は 850 個～3400 個/卵 1 個という範囲であった。

今後の課題としては、①それぞれの検出法について検出感度の向上を目指すこと、②市販鶏卵についての調査を追加検討し、結果によっては関連食品についても検討すること、③親鶏、死ごもり卵などに対する血清および分子疫学を展開し、汚染状況の把握を様々な角度から行うこと、④鶏の感染実験を行い、コクシエラの体内動態や卵への移行の有無、移行する菌数などを調査すること、⑤マウスを用いた経口感染モデルを確立し、感染に必要な最低菌量を検討すること、⑥人のQ熱症例での感染経路の検討をすること、などがあげられる。

E. 結論

本年度の解析で得られた *C. burnetii* 検出感度は、850 個～3400 個/卵 1 個という範囲であり、これによる市販鶏卵の初期調査ではすべて陰性であったが、その感度が卵の *C. burnetii* 汚染の有無の検討や健康被害のリスクの検討に十分かどうか、まだ情報が少なく判断することは困難である。今後さらに検出方法の改善に向けた検討を行うとともに市販鶏卵からの検出数を追加する予定であるが、鶏卵の *C. burnetii* 汚染の有無のみの検証、実態調査にとどまらず、親鳥の実態調査や経口感染などに対する基本的な検討をすすめていく必要があると思われる。

F. 健康危険情報

今回の解析からは、*C. burnetii* に汚染された卵は検出しなかった。但し、限られた数の結果であることと、検出限界以下の汚染がないとはいえないことから、健康被害の有無の結論には至っていない。現時点でいたずらに危険性を指摘することは慎むべきであり、今後もその可能性については引き続き考慮しつつ研究の進捗を見守ることが望ましい。

G. 研究発表

1. 発表論文

なし

2. 学会発表

- 1) 佐藤 梢, 小川基彦, アグス・セティヨノ, 山崎 勉, 岸本寿男: Real Time PCR (TaqMan) による *Coxiella burnetii* 検出法の開発. 第 21 回日本クラミジア研究会・第 10 回リケッチア研究会. 東京. 2003 年 11 月 1 日 -2 日
- 2) 佐藤 梢, 小川基彦, アグス・セティヨノ, 山崎 勉, 岸本寿男: Real Time PCR (TaqMan) による *Coxiella burnetii* 検出法の開発. 第 52 回東日本感染症学会. 横浜. 2003 年 10 月 30 日 -31 日
- 3) 平井昭彦, 金子誠二, 仲真晶子, 石崎直人, 小田桐恵, 甲斐明美, 貞升健志, 新開敬行, 村田以和夫, 諸角 聖: 市販牛乳中の *Coxiella burnetii* 汚染状況および鶏卵中の *C. burnetii* 検査法の検討. 第 137 回日本獣医学会学術総会. 2004 年 4 月
- 4) 貞升健志, 新開敬行, 金子誠二, 平井昭彦, 仲真晶子, 石崎直人, 小田桐恵, 甲斐明美, 村田以和夫, 諸角 聖: マヨネーズ中の *Coxiella burnetii* 検査法の検討. 第 137 回日本獣医学会学術総会. 2004 年 4 月
- 5) 百田隆祥, 小島 禎, 池戸正成, 小川基彦, 佐藤 梢, アグススティヨノ, 岸本寿男: LAMP 法による *Coxiella burnetii* の検出の基礎. 第 21 回日本クラミジア研究会・第 10 回リケッチア研究会. 東京. 2003 年 11 月 1 日 -2 日
- 6) Momoda, T., Ogawa, M., Kojima, T., Ikedo, M., Sato, K., Setiyono, A., Kishimoto, T.: Sensitive and Rapid Detection of *Coxiella burnetii* by Loop-mediated Isothermal Amplification

(LAMP), a Novel DNA Amplification Method. American Society for Microbiology 104th General Meeting. New Orleans, LA, USA. May 24, 2004.

なし。

2. 実用新案登録

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

3. その他

なし。

1. 特許取得

表 1. 設計したプライマーおよびプローブの感度

			検出可能な菌数				
			100	10	1	0.1	0.01
omp1FAM	Real Time PCR	1回目	+	+	+	+	-
		2回目	+	+	+	-	-
omp2FAM	Real Time PCR	1回目	+	+	+	+	-
		2回目	+	+	+	-	-
IS1VIC	Real Time PCR	1回目	+	+	+	+	+
		2回目	+	+	+	+	-
IS2VIC	Real Time PCR	1回目	+	+	+	+	-
		2回目	+	+	+	+	-
Com12-34	nested PCR	1回目	+	+	+	-	-
		2回目	+	+	+	-	-

表 2. スパイク試験の結果

		スパイク菌数/検体				
検体量(卵黄量)		100,000	10,000	1,000	100	10
Small Scale 5.9%	0.5ml	++	++	++	±+	--
Large Scale 8%	10ml	++	++	±-	--	NT

+ : 35 サイクル以前に上昇、± : 36 サイクル以後に上昇、- : 上昇せず
(IS2 により 2 回行った結果。Omp1 もほぼ同様の結果)

検体の受付から判定までの流れ

自治体担当者または本省より連絡

送付票ファックス

採材日、検体数、到着予定日時

担当者連絡先（氏名、所属、電話、ファックス、(E-mail) 確認）

検体受理（内容確認）

番号記入

ディレクティジェンFluA+Bによる再試

RNA抽出（残りは-80℃保管、三室冷凍庫上段）

RT-PCR、アガロース電気泳動（一次判定）

本省へ連絡

塩基配列解析

陽性対照の混入否定、HA塩基配列及び解裂部位のアミノ酸配列推定（高病原性型）

（二次判定）報告

塩基配列解析およびウイルス分離

MDCK細胞準備、発育鶏卵注文、ニワトリ血球注文

検体接種（細胞、発育鶏卵）

HA反応、蛍光抗体、HI試験、RT-PCR

三次判定（確定）

ウイルス分離された場合はウイルス三部へ同定確認依頼

検体からの RNA 抽出

作業場所：3 室 P2 日立安全キャビネット

作業服：手袋、マスク、ブルーディスポ前着、キャップ（3 室 P2 に設置）

器具類：ピペットマン、フィルターチップ、ピンセット（3 室 P2 の内棚のタイトボックス）
ディスポピペット、ピペットエイド（3 室 P2 引き出し）

試薬準備（はじめてキットの箱を開いたとき）キット（青い箱）は 3 室 P2 棚上段

QIAamp Viral RNA Mini Kit (for viral RNA purification from plasma, serum, and cell-free body fluids, QIAGEN #52904)

- ・ エタノール：未開封又は RNA 用としたボトルから 50ml チューブにデカントにより分注
- ・ Carrier RNA の Buffer AVL への添加
Carrier RNA のチューブに 1ml の Buffer AVL を加え、溶解後もとのボトルに戻す。
4℃保存、6 ヶ月安定
(使用直前に沈殿がないか確認。必要なら 80℃で溶かして室温に戻す)
- ・ Buffer AW1 の調整
19ml の AW1 濃縮液に 25ml のエタノール（96 から 100%）を添加
室温保存、1 年間安定
- ・ Buffer AW2 の調整
13ml の AW2 濃縮液に 30ml のエタノール（96 から 100%）を添加
室温保存、1 年間安定

操作を始める前に

- ・ サンプルを室温（15 から 25℃）にする。
- ・ Buffer AVE（溶出液）を室温に戻す。
- ・ Buffer AW1, AW2 にエタノールを加えたか確認
- ・ Buffer AVL/Carrier RNA に沈殿がないか確認
- ・ 遠心機の温度は室温

操作手順（緑のチューブはキットに入っていないのでアシストチューブを使用）

1. Buffer AVL/carrier RNA 560 μ l を 1.5ml microtube に分注
2. サンプル 140 μ l を加えて 15 秒間 Vortex。
3. 室温 10 分間保温。
4. 軽く遠心
5. 560 μ l のエタノールを添加（ここまでで 1260 μ l）、15 秒間 Vortex、軽く遠心
6. 630 μ l を QUAamp スピнкаラムに注入（2ml チューブにセットしておく）。キャップをして 6000g（8000rpm）、1 分間遠心。濾過液とチューブは捨てる。
7. 再度残りの液 630 μ l を添加遠心。濾過液とチューブは捨てる。
8. スピнкаラムを 2ml チューブにセット。AW1 500 μ l を添加。8000rpm、1 分間遠心。
9. スピнкаラムを 2ml チューブにセット。AW2 500 μ l を添加。14000rpm、3 分間遠心。
- 9a. スピнкаラムを 2ml チューブにセット。14000rpm、1 分間遠心。
10. スピнкаラムを 1.5ml チューブにセット。AVE 60 μ l を添加。室温 1 分間保温。8000rpm、1 分間遠心。

11. RT-PCR に使用。残りは -80°C 保管（3 室超低温冷凍庫上段-1）

RT-PCR

TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV) #RR024A or B、共通（バイオテロ用）冷凍冷蔵庫に保管

試薬の分注作業は今岡または井上の実験台にて行う。

検体の添加は該当チューブだけを3室P2に搬入する。

陽性対照 RNA の添加は三室実験台にて該当チューブだけを移動して行う。

器具の用意

ピペットマン P20, P200、フィルターチップ(P20, P200) 0.2ml PCR tubes、チューブラック (for 0.2ml, 0.5ml, 1.5ml microtubes)

(試薬分注用、検体 RNA 添加用、陽性コントロール添加用は別々のピペットを使用すること。3室P2の内棚のタイトボックス)

Thermal cycler (ASTECH model PC806, File: HPAI-RTPCR in Box3)

氷

検出用プライマーセット

A型インフルエンザ検出用プライマーセット

Type A/M30F : TTCTAACCGAGGTCGAAACG

Type A/M264R2 : ACAAAGCGTCTACGCTGCAG

PCR産物の長さ : 231 bp

ウイルス三部西藤さん設計 (50 μ M stock, 20 μ M working solution)

H5 515f : CATACCCAACAATAAAGAGG

H5 1220r : GTGTTCATTTTGTAAATGAT

PCR産物の長さ : 708bp

感染研ホームページ (ウイルス三部) (100 μ M stock, 20 μ M working solution)

新たに合成したプライマーセット (50pmol/ μ l) も同じ箱に保管してあります。(共通 (バイオテロ用) 冷凍冷蔵庫に保管、アシスト緑の箱)

陽性対照 RNA

A/duck/Hong Kong/820/80 抽出 RNA (三室超低温冷凍庫上段アシストボックスに保管)

(32 μ を使ったときに 10⁶ 希釈まで陽性になるはず、ウイルス三部今井、)

RT-PCR 試薬混合分注

A 型インフルエンザウイルス検出 (M遺伝子、231bp 増幅)

[プライマー以外はすべてキット]

	1 反応	5 反応	反応
DW	5 μ l	25 μ l	μ l
10x One Step RNA PCR Buffer	5 μ l	25 μ l	μ l
dNTP mix (10mM each)	5 μ l	25 μ l	μ l
MgCl ₂ (25mM)	10 μ l	50 μ l	μ l
M30F primer (20 μ M)	1 μ l	5 μ l	μ l
M264R2 primer (20 μ M)	1 μ l	5 μ l	μ l
RNase Inhibitor (40U/ μ l)	1 μ l	5 μ l	μ l
AMV RTase XL (5U/ μ l)	1 μ l	5 μ l	μ l
AMV-Optimized Taq (5U/ μ l)	1 μ l	5 μ l	μ l
Total	30 μ l	150 μ l	μ l

H5 インフルエンザウイルス特異的検出 (HA 遺伝子、708bp 増幅)

[プライマー以外はすべてキット]

	1 反応	5 反応	反応
DW	5 μ l	25 μ l	μ l
10x One Step RNA PCR Buffer	5 μ l	25 μ l	μ l
dNTP mix (10mM each)	5 μ l	25 μ l	μ l
MgCl ₂ (25mM)	10 μ l	50 μ l	μ l
H5/515f primer (20 μ M)	1 μ l	5 μ l	μ l
H5/1220r primer (20 μ M)	1 μ l	5 μ l	μ l
RNase Inhibitor (40U/ μ l)	1 μ l	5 μ l	μ l
AMV RTase XL (5U/ μ l)	1 μ l	5 μ l	μ l
AMV-Optimized Taq (5U/ μ l)	1 μ l	5 μ l	μ l
Total	30 μ l	150 μ l	μ l

軽く Vortex、遠心後 30 μ l ずつ分注 (氷上においておく)

検体添加と反応

20 μ l の DW (陰性対照)、検体 RNA、陽性対照 RNA を順次添加
(チューブのフタはその度に開閉)

Program Temp Control System (ASTEC model PC806,) にセットする

File: HPAI-RTPCR in Box3

50°C x 30min

94°C x 2min

94°C x 1min ↓ ←

45°C x 1min ↓ ↑ 30 cycles
72°C x 2min → ↑

72°C x 10min
4°C x ∞

↓↓

アガロースゲル電気泳動による検出

アガロースゲル電気泳動による増幅 DNA 断片の検出

泳動用バッファー、ゲルの調製

1x TAE containing EtBr

DW	1960ml
50x TAE	40ml
10mg/ml EtBr	100 μ l
<hr/>	
Total	2000ml

1.5% agarose gel

SeaKem GTG agarose 1.5g

1x TAE containing EtBr 100ml

電子レンジで 2- 3 分間加熱融解

ミューピッド 8 レーン用には 15ml、17 レーン用には 30ml を入れる

固化後 1x TAE containing EtBr に保存

検体のゲル電気泳動

ゲルをミューピッドにセットし、泳動バッファーをゲルが浸るまで加える。

RT-PCR 反応終了液 10 μ l に 1 μ l の loading buffer を添加

マーカー (100bp DNA Ladder、TaKaRa#3407A、100-1500bp)

5 μ l に 1 μ l の添付の 6x loading buffer を加える (500bp: 約 150ng、他は約 50ng、)

100V、30 分泳動

写真撮影、プリントとファイル保存

(M 遺伝子 : 231bp、HA 遺伝子 : 708bp)