

厚生労働科学研究費補助金  
食品の安心・安全確保推進研究事業

# 食肉における家畜・家禽の ウイルス疾病に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 棚 林 清

平成18（2006）年3月

## 目 次

I. 総括研究報告	
食肉における家畜・家禽のウイルス疾病に関する研究	1
棚林 清	
II. 分担研究報告	
1. 豚に感染するウイルスの検出法に関する研究	7
池田 秀利	
2. 病原体ゲノム検出のための核酸増幅法の基礎検討	15
棚林 清	
3. 家禽のウイルス疾病に関する研究： 鳥インフルエンザウイルスの簡易迅速高感度検出法の開発	23
伊藤 壽啓	
4. 市販の人用インフルエンザ検査キットの 鳥インフルエンザウイルスでの評価	43
棚林 清	
5. 食肉に供される動物における A 群ロタウイルス及び 日本脳炎ウイルスの汚染状況調査に関する研究	51
杉山 誠	
6. エゾシカにおける E 型肝炎ウイルスの疫学調査	59
岡崎克則	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	63

# I. 総括研究報告書

## 食肉における家畜・家禽のウイルス疾病に関する研究

主任研究者：棚林 清 国立感染症研究所獣医科学部 第三室長

研究要旨：と畜検査及び食鳥検査は、望診、触診等を基本とした検査実施要領に基づき行われている。異常を発見した場合には、必要に応じてさらに精密な検査を行うこととしている。しかし、2004年には、高病原性鳥インフルエンザが発生し、罹患した食鳥が搬入された食鳥処理場における食鳥検査によって疾病を確認することができなかったという事例が発生した。ウイルス疾病に対しては、通常の検査以外に精密な検査が必要になる。また、異常が認められた個体や群のウイルス学的検索は通常の検査では迅速性や経済性から実施しにくい。本研究では食用に供される家畜などのウイルス性疾病について実施可能な検査方法の開発や改良を実施し、食肉などの更なる安全性確保のために検査体制整備のための技術的基盤を提供することを目的とした。また、食肉等に関連して人に感染する可能性があるウイルスとしてA群ロタウイルスやE型肝炎ウイルスなども考えられことからこれらも含め実態調査を実施することも目的とした。初年度は以下のような成果が得られた。

簡便で信頼性の高いウイルス学的検査の一つであるPCR検査法において安定した検査結果を得るために、ウイルス遺伝子の検出に至る各過程の至適実験条件を検討することとし、まず、臓器乳剤化の過程について条件検討を行った。臓器乳剤化は市販のビーズと臓器破砕装置2種で検討し、概ね同程度の結果が得られた。臓器破砕用ビーズとしてメタルコーンが最も多種類の臓器に適用可能であった。より安価なジルコニアビーズは、脳、肝臓、筋肉などの臓器の乳剤化では問題なかったが、脾臓、腎臓、肺などの臓器では長い破砕時間が必要であった。多種類の病原体ゲノムを一括して検出するマイクロアレイ法への応用を考え、病原体核酸を偏り無く増幅する核酸増幅法の基礎的検討を細菌DNAをモデルに実施しDOP-PCRとPhi29 DNAポリメラーゼにより微量な病原体が含まれる検体からも核酸増幅が可能で検出同定に応用できる可能性が示唆された。

家禽におけるウイルス疾患として問題となっている高病原性鳥インフルエンザについて検査所等でも実施可能な市販の人用インフルエンザ診断キットについて検討した。キットにより検出感度に差があるものの鶏糞を混入させても多くのキットで非特異的反応は無く検出された。しかし、検出感度がかなり低く鳥インフルエンザに応用することは可能であるが、現状のままではその有効性に問題があった。さらに、鳥インフルエンザウイルスを検出する迅速高感度診断法としてのLAMP法の確立を目的として、鳥インフルエンザウイルスに共通したプライマーの設計を実施し有効なプライマーの候補を選択することが出来た。

食用として供される家畜や野生動物におけるA群ロタウイルス及び日本脳炎ウイ

ルスについて血清疫学調査を実施した結果、全国のウシ 343 例のうち、52.2%が P[17] 遺伝子型のトリロタウイルスの、46.6%が P[4]あるいは P[8] 遺伝子型のヒトロタウイルスの、そして 60.9%が P[2]あるいは P[3] 遺伝子型のロタウイルスの感染を受けたと考えられた。ウシではヒト以外の動物由来ロタウイルスが感染環の中心となっており、これにトリロタウイルスやヒトロタウイルスの感染が高頻度で加わる非常に複雑な感染環を形成していると推測された。一方、イノシシ 234 例の 25.2%が日本脳炎ウイルスに対する中和抗体を保有していた。これに対し、同様な環境に生息するニホンジカおよびニホンザルにおける中和抗体保有率は、それぞれ 1.6%および 4.2%と低率であり、タヌキには抗体保有個体は認められなかった。この結果から、食肉に供されるイノシシが日本脳炎ウイルスに高い感受性を有し、同ウイルスの感染環に増幅動物として係わっている可能性が示唆された。さらに、北海道ではエゾシカ有効活用推進事業の一環としてシカ肉の普及が図られつつあり、エゾシカにおける E 型肝炎ウイルス抗体調査を実施した。31 頭の血清を ELISA に供したところ、感染が疑われる個体が 1 例認められたことから Western blotting によって反応特異性の確認を行うとともに、さらに多くの検体を調べる必要があると考えられた。

#### 分担研究者

岡崎 克則 北海道医療大学薬学部・教授  
池田 秀利 動物衛生研究所感染病研究部・  
上席研究官  
伊藤 壽啓 鳥取大学農学部獣医学科・教授  
杉山 誠 岐阜大学大学院連合獣医学研究  
科・教授

#### A. 研究目的

と畜検査及び食鳥検査は、望診、触診等を基本とした検査実施要領に基づき行われている。異常を発見した場合には、必要に応じてさらに精密な検査を行うこととしている。しかし、2004 年には、高病原性鳥インフルエンザが発生し、り患した食鳥が搬入された食鳥処理場における食鳥検査によって疾病を確認することができなかったという事例が発生した。ウイルス疾病に対しては、通常の検査以外に精密な検査が必要になる。また、異常が認められた個体や群のウイルス学的検索は通常の検査では迅速性や経済性から実施しにくい。本研究では食用に供される家畜などのウイルス性疾病につい

て実施可能な検査方法の開発や改良を実施し、食肉などの更なる安全性確保のために検査体制整備のための技術的基盤を提供することを目的とした。また、食肉等に関連して人に感染する可能性があるウイルスとして A 群ロタウイルスや E 型肝炎ウイルスなども考えられことからこれらも含め実態調査を実施することも目的とした。

#### B. 研究方法

1. 豚に感染するウイルスの PCR 法のための条件検討として市販の機器 2 種とビーズ形ジルコニア系セラミックス、ビーズ形ステンレス、コーン形ステンレス（メタルコーン）、球形ガラスを用いて臓器の乳剤化の条件を検討した。
2. 多種類の病原体を一括して検出するためのマイクロアレイ法への応用を考え、検体中に存在する病原体核酸を偏り無く増幅する DOP-PCR と Phi29 DNA ポリメラーゼを用いた核酸増幅法の基礎的検討を細菌 DNA をモデルに実施した。

3. 市販の人インフルエンザ用診断キットについて異なる血清型型の鳥インフルエンザウイルスを用い、その検出感度、特異性等を検討した。また、1株のカモ由来ウイルス株を用いて各種市販キットの検出感度、操作性並びに鶏糞を混入した時の反応性を比較した。

4. 鳥インフルエンザウイルスを検出する迅速高感度診断法としての LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法の確立を目的として、鳥インフルエンザウイルスに共通したプライマーの設計を実施し、有効なプライマーの候補を選択した。

5. A 群ロタウイルスおよび日本脳炎ウイルスに対する血清疫学的調査を実施した。1997-1998 年にかけて、全国で採取されたウシの血清 343 例をラテックス凝集 (LA) 試験に供試した。大腸菌で発現させ、精製したトリロタウイルス P0-13 株、ヒトロタウイルス Wa 株及びサルロタウイルス SA-11 株の GST 融合 VP8 蛋白質を抗原とした LA (各 P0-、Wa- 及び SA-LA) 試験を用いて各抗体価を測定した。また、1991-2004 年にかけて、岐阜県で採取されたニホンザル 96 例及びタヌキ 40 例、兵庫、岩手、岐阜県を中心に採取されたニホンジカ 64 例、ならびに岐阜、滋賀、愛知、及び四国 4 県を中心に採取されたイノシシ 234 例の血清を、日本脳炎ウイルス JaGAR01 株を攻撃ウイルスとした中和試験に供試した。

6. 北海道日高地方で捕獲されたエゾシカ 31 頭から得た血清を組換えバキュロウイルスによって産生された E 型肝炎ウイルス様中空粒子を抗原とする ELISA に供した。

## C. 研究結果

1. 豚に感染するウイルスの PCR 法のための条件検討：臓器の乳剤化の条件を検討した結果、

T 社と Y 社の破碎装置を使った場合、φ12 または φ15 メタルコーンを用いて 15~30 秒の振盪を 3-4 回行えば調査した 15 臓器は乳剤化された。メタルコーンは高価であるが迅速で安定した結果が得られた。また、より安価なジルコニアビーズは幾つかの軟組織では十分使用可能であった。

2. DOP-PCR と Phi29 DNA ポリメラーゼにより 10 ng の *E. Coli* および *F. tularensis* ゲノム DNA から 1~3μg 程度の増幅 DNA 断片が得られる事が確認された。

3. 人インフルエンザ抗原検出キット (キャピリア Flu A, B、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) を用いて、異なる型 (H5, H7 および H9) の鳥インフルエンザウイルスに対する最小検出量を調べた結果、ウイルス株間でばらつきは見られるものの、その値は  $10^{5.83}$  から  $10^{7.83}$  EID<sub>50</sub>/0.1ml の範囲で、人インフルエンザウイルスに対する最小検出量 ( $10^4$ ) と比較してかなり低いことが判明した。鳥パラミクソウイルスやウイルスを含まない試料を用いた場合には、何れもバンドが検出されなかったことから、本キットの特異性は確認された。

また、1株のカモ由来ウイルスを用いて各種市販キットで比較したところ  $10^{4.5}$  から  $10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub> のウイルス量が必要で検出感度に差がみられた。また操作性においては検体処理後の反応操作が 1 回で済むキットの方が適していると考えられた。ウイルス液に鶏糞を混入させた場合、多くのキットで非特異的反応は無く、検出感度も保たれていたが低下するものもあった。

4. LAMP 法による鳥インフルエンザウイルスを検出する迅速高感度診断法の確立を目的として鳥インフルエンザウイルスに共通したプライマーの設計した。10 組のプライマーのうち、1 組のプライマー (ID:95) を用いて、LAMP 法を

実施した。その結果、用いたすべてのウイルスについて陽性の結果が得られた。また、陰性対象として同時に実施した、RNA 不含サンプルおよび鳥パラミクソウイルスの RNA ではいずれも陰性となり、特異性も確認された。

5. A群ロタウイルス及び日本脳炎ウイルスについて血清疫学調査を実施した結果、全国のウシ343例のうち、52.2%がP[17]遺伝子型のトリロタウイルスの、46.6%がP[4]あるいはP[8]遺伝子型のヒトロタウイルスの、そして60.9%がP[2]あるいはP[3]遺伝子型のロタウイルスの感染を受けたと考えられた。一方、イノシシ234例の25.2%が日本脳炎ウイルスに対する中和抗体を保有していた。これに対し、同様な環境に生息するニホンジカおよびニホンザルにおける中和抗体保有率は、それぞれ1.6%および4.2%と低率であり、タヌキには抗体保有個体は認められなかった。

6. エゾシカの31頭の血清におけるE型肝炎ウイルス抗体調査をELISAにて実施したところ、感染が疑われる個体が1例認められた。

#### D. 考察

と畜検査及び食鳥検査は、望診、触診等を基本とした検査実施要領に基づき行われている。異常を発見した場合には、必要に応じてさらに精密な検査を行うこととしている。しかし、2004年には、高病原性鳥インフルエンザが発生し、り患した食鳥が搬入された食鳥処理場における食鳥検査によって疾病を確認することができなかったという事例が発生した。ウイルス疾病に対しては、通常の検査以外に精密な検査が必要になる。また、異常が認められた個体や群のウイルス学的検索は通常の検査では迅速性や経済性から実施しにくい。本研究では食用に供される家畜などのウイルス性疾病について実施可能な検査方法の開発や改良を実施し、

食肉などの更なる安全性確保のために検査体制整備のための技術的基盤を提供することを目的とした。食肉等に関連して人に感染する可能性があるウイルスとしてA群ロタウイルスやE型肝炎ウイルスなども考えられことからこれらも含め実態調査を実施することも目的とした。初年度は以下のような成果が得られた。

簡便で信頼性の高いウイルス学的検査の一つである PCR 検査法において安定した検査結果を得るために、ウイルス遺伝子の検出に至る各過程の至適実験条件を検討することとし、まず、臓器乳剤化の過程について条件検討を行った。臓器乳剤化は市販のビーズと臓器破砕装置2種で検討し、概ね同程度の結果が得られた。臓器破砕用ビーズとしてメタルコーンが最も多種類の臓器に適用可能であった。より安価なジルコニアビーズは、脳、肝臓、筋肉などの臓器の乳剤化では問題なかったが、脾臓、腎臓、肺などの臓器では長い破砕時間が必要であった。多種類の病原体ゲノムを一括して検出するマイクロアレイ法への応用を考え、病原体核酸を偏り無く増幅する核酸増幅法の基礎的検討を細菌 DNA をモデルに実施し DOP-PCR と Phi29 DNA ポリメラーゼにより微量な病原体が含まれる検体からも核酸増幅が可能で検出同定に応用できる可能性が示唆された。

家禽におけるウイルス疾患として問題となっている高病原性鳥インフルエンザについて検査所等でも実施可能な市販の人インフルエンザ用診断キットについて検討した。キットにより検出感度に差があるものの鶏糞を混入させても多くのキットで非特異的の反応は無く検出された。しかし、検出感度がかなり低く鳥インフルエンザに応用することは可能であるが、現状のままではその有効性に問題があった。さらに、鳥インフルエンザウイルスを検出する迅速高感度診断法としての LAMP 法の確立を目的として、鳥インフルエンザウイルスに共通したプライマーの設計を実施し有効なプライマーの候補を選択することが出来た。

食用として供される家畜や野生動物における A 群ロタウイルス及び日本脳炎ウイルスについて血清疫学調査を実施した結果、全国のウシ 343 例のうち、52.2%が P[17] 遺伝子型のトリロタウイルスの、46.6%が P[4] あるいは P[8] 遺伝子型のヒトロタウイルスの、そして 60.9%が P[2] あるいは P[3] 遺伝子型のロタウイルスの感染を受けたと考えられた。ウシではヒト以外の動物由来ロタウイルスが感染環の中心となっており、これにトリロタウイルスやヒトロタウイルスの感染が高頻度で加わる非常に複雑な感染環を形成していると推測された。一方、イノシシ 234 例の 25.2%が日本脳炎ウイルスに対する中和抗体を保有していた。これに対し、同様な環境に生息するニホンジカおよびニホンザルにおける中和抗体保有率は、それぞれ 1.6%および 4.2%と低率であり、タヌキには抗体保有個体は認められなかった。この結果から、食肉に供されるイノシシが日本脳炎ウイルスに高い感受性を有し、同ウイルスの感染環に増幅動物として係わっている可能性が示唆された。さらに、北海道ではエゾシカ有効活用推進事業の一環としてシカ肉の普及が図られつつあり、エゾシカにおける E 型肝炎ウイルス抗体調査を実施した。31 頭の血清を ELISA に供したところ、感染が疑われる個体が 1 例認められたことから Western blotting によって反応特異性の確認を行うとともに、さらに多くの検体を調べる必要があると考えられた。これらの研究成果は食肉などの更なる安全性確保のための検査体制整備のための技術的基盤としての情報として公衆衛生行政に貢献するものと考えられる。

## E. 結論

食用に供される家畜・家禽のウイルス疾病の検査において簡便で信頼性の高いウイルス学的検査の一つである PCR 検査法において検体処理条件や多種類病原体ゲノムの核酸増幅法の検討は、今後の食肉・食鳥検査所での検査技術

に有用な基礎的技術資料となる。今後、食肉・食鳥検査所等でも実施可能な技術となるように方法の確立が必要である。家禽における鳥インフルエンザ検査のために人用インフルエンザ検査キットを応用する場合はその感度等を考慮して使用することが必要である。また LAMP 法による鳥インフルエンザウイルスの検出方法が開発されたがさらに有用性を検討し、食鳥検査所での検査に応用可能になるようにする必要がある。食肉に供される家畜・家禽や野生動物でロタウイルス、日本脳炎ウイルス、E 型肝炎ウイルス抗体が検出されたが、ウイルスの排泄状況についてさらに調査する必要がある。

## F. 健康危険情報

特に無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照

### 2. 学会発表

1) 宮崎綾子、加藤花名子、吉井雅晃、李天成、武田直和、恒光裕、池田秀利：イノシシにおける E 型肝炎ウイルス抗体保有状況。第 140 回日本獣医学会学術集会、2005 年 9 月（鹿児島）

2) 吉井雅晃、宮崎綾子、加藤花名子、池田秀利、恒光裕：豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス日本分離株における Nsp2 領域の遺伝子多型。第 140 回日本獣医学会学術集会、2005 年 9 月（鹿児島）

3) 望月雅美、大内敦夫、川上和夫、石田卓夫、Tian-Cheng Li、武田直和、恒光裕、池田秀利：犬と猫における E 型肝炎ウイルス疫学調査。第



140回日本獣医学会学術集会、2005年9月（鹿児島）

4) 恒光裕、勝田賢、川島健司、神山麻理子、小野寺利幸、庄司智太郎、池田秀利、宮崎綾子、吉井雅晃、李天成、武田直和：ノトバイオート豚でのE型肝炎ウイルスの実験感染。第140回日本獣医学会学術集会、2005年9月（鹿児島）

5) 伊藤壽啓：鳥インフルエンザの人への感染の可能性。日本寄生虫学会分子生物生理生化学研究会シンポジウム。米子市。2005年4月7日。

6) 南 要絵、常國良太、伊藤啓史、河岡義裕、喜田 宏、伊藤壽啓：鶏気嚢継代によるニューカッスル病ウイルスの強毒化。中国四国ウイルス研究会。倉敷市。2005年6月18-19日。

7) 伊藤啓史、井上 和幸、大槻公一、河岡義裕、伊藤壽啓：水禽由来インフルエンザウイルスの鶏への適応に関する研究。中国四国ウイルス研究会。倉敷市。2005年6月18-19日。

8) Ito H., Ito T., Hikida, M., Yashiro, J., Otsuka, A., Kida, H., and Otsuki K. : Outbreak of highly pathogenic avian influenza in Japan and anti-influenza virus activity of povidone-iodine products. 第5回アジア太平洋消毒会議。2005年7月。ケアン

ズ。

9) 伊藤壽啓：高病原性鳥インフルエンザの発生（茨城）と感染経路。平成16年度鶏病研究会岩手支部。盛岡市。2005年9月7日。

10) 高木愛香、杉山 誠、伊藤直人、淺野玄、坪田敏男、源 宣之：国内の野生動物における日本脳炎ウイルスに対する血清疫学調査、第139回日本獣医学会学術集会、2005年4月（和光）

11) 杉山 誠、高木愛香、源 宣之、伊藤直人、淺野 玄、坪田敏男、石黒直隆、伊藤雅、山下照夫、榮 賢司：国内の野生動物における日本脳炎ウイルスに対する血清疫学調査-イノシシが日本脳炎ウイルスの増幅動物である可能性-、第5回人と動物の共通感染症研究会学術集会、2005年11月（東京）

12) 岡崎克則：仮性狂犬病ウイルス gB 糖蛋白の開裂はシンシチウム形成に参与する。第53回日本ウイルス学会学術集会、2005年11月（横浜）

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

## Ⅱ. 分担研究報告書

## 豚に感染するウイルスの検出法に関する研究

分担研究者 池田 秀利 動物衛生研究所 上席研究官  
研究協力者 加藤花名子 動物衛生研究所  
永野 英樹 動物衛生研究所

研究要旨:と畜場や食鳥処理場においてウイルス性疾病の検査を実施するためには、各処理場に適合し、かつすべての処理場で同レベルの検査結果が出せるような検査体制を検討する必要がある。食肉・食鳥処理場で実行可能な簡便で信頼性の高いウイルス学的検査の一つはPCR検査法である。本研究では安定したPCR検査結果を得るために、市販の機器を利用した検査システムを構築することを目的として、検査臓器の乳剤化→ウイルス核酸の抽出→PCR法によるウイルス遺伝子の検出に至る各過程の至適実験条件を検討することとした。今年度は臓器乳剤化の過程について条件検討を行った。臓器乳剤化は市販のビーズを使った臓器破碎装置2台で検討したが、概ね同程度の結果が得られた。臓器破碎用ビーズとしてメタルコーンが調査した中では最も多種類の臓器に適用可能であった。しかし、高価なのが難点であった。より安価なジルコニアビーズは、脳、肝臓、筋肉などの臓器の乳剤化では問題なかったが、脾臓、腎臓、肺などの臓器では長い破碎時間が必要であった。

### A. 研究目的

と畜検査及び食鳥検査は、望診、触診等を基本とした検査実施要領に基づき行われている。異常を発見した場合には、必要に応じてさらに精密な検査を行うこととしているが、臨床症状がほとんどないウイルス疾病に対しては、煩雑なウイルス学的検査が必要なため、迅速性や経済性から実施されていないのが現状である。本研究班は、と畜場や食鳥処理場におけるウイルス性疾病の実態調査や検査体制を検討するための基礎的資料を作る

ことが目的である。食肉・食鳥処理場で実行可能なウイルス学的検査の一つはPCR検査法である。我々は安定したPCR検査結果を得るために、市販の機器を利用した検査システムの構築を考え、臓器を乳剤化、ウイルス核酸の抽出、PCR法によるウイルス遺伝子の検出、の各過程の至適実験条件を検討することとし、今年度は臓器を乳剤化の条件検討を行った。

### B. 研究方法

#### 1. 動物臓器の乳剤化

凍結保存チューブ（アシストNo. 72. 69

3) にブタあるいはシカの臓器100mg (肝臓及び心臓) と細胞培養用培地1mlと種々のビーズを加え (図1)、市販の臓器破碎装置で激しく振盪して臓器を乳剤化した。ビーズはビーズ形ジルコニア系セラミックス、ビーズ形ステンレス、コーン形ステンレス (メタルコーン)、球形ガラスを用いた (図1)。

## 2. 破碎装置

臓器の破碎はT社とY社の破碎装置で行った (図2)。今後実施する検査場の状況を考え、いずれの装置も冷却装置のない機種を室温で用い、各社マニュアルに従い15~30秒の振盪と1分間の氷冷を1サイクルとして、サイクルを繰り返した。1サイクルごとに目視で乳剤化の程度の判定をした。

## 3. 乳剤中のRNA性状

臓器乳剤上清からIsogen LSで総RNAを回収し、アガロースゲル電気泳動でrRNAの性状を観察した。

## C. 研究結果

1. 振盪時の臓器乳剤濃度を10%、25%、50%で比較した。RNA回収率には大差なかったが、rRNAの変性は10%乳剤が最も少なく (図3-⑤)、25% (図3-⑦)、50%乳剤 (図3-⑥) が激しかった。従って、以後10%乳剤を作製する条件で比較した。

2. 心臓が肝臓より乳剤化が難しいという傾向は色々なビーズを使った実験で観察された (表1と2)。

3. 2社の破碎装置は乳剤化の早さと程度において大差なかった (表1と2)。

4. ビーズの大きさは、ガラス、ジルコニアとも直径1mm以下では破碎力が弱く、5mm程度のビーズが必要だった (表1)。

5. タルコーン ( $\phi 12$  と  $\phi 15$ ) は今回調べたビーズの中で最も破碎力が強かった (表2)。

6. メタルコーン以外のビーズを大小2種組み合わせた場合、ほぼ大ビーズ単独使用の効果と同等であった (表2)。

7. さらにシカの15臓器について検討した。 $\phi 15$ メタルコーンとジルコニア ( $\phi 5-1$ 個と $\phi 2-0.4g$ の混合)ビーズを用いて、Y社製ホモジェナイザーで破碎する条件で比較したところ、破碎しやすさは、臓器やビーズによって異なっていた。 $\phi 15$ メタルコーンはすべての臓器を3回以内の攪拌で乳剤化した。が、 $\phi 5$ ジルコニアビーズでは膵臓は8回以上、腎臓は6回の攪拌を要した。特に膵臓、腎臓、肺、胃については、 $\phi 15$ メタルコーンと $\phi 5$ ジルコニアビーズの差が顕著であった (表3)。

## D. 考察

2社の臓器破碎用機器を用いて、動物臓器を乳剤化する条件を検討した。全体的にみると2社の機器は同程度の効力と考えられた。臓器乳剤化には、ビーズの種類と臓器の種類が2因子関わっている。心臓と肝臓で調べる限り、ビーズは直径5mm程度の大粒であることが必要であった (表1)。大粒ビーズの中でもメタルコーンは最も破碎力が強かった (表2)。臓器別で見ると、メタルコーンでは膵臓、膵臓、腸管、腸管リンパ節の破碎に少し時間を要したが全体的には比較

的簡単に乳剤化できたのに対し、φ5ジルコニアでは多くの臓器が乳剤化に時間を要した。すなわち、膵臓は8回の攪拌でも完全乳剤化が困難で、腎臓、胃は6回の攪拌を必要とした。臓器によっては、メタルコーンとφ5ジルコニアの乳剤化効率異なるように思われるが、理由は不明である。

メタルコーンの最大の難点はコストである。メタルコーンは640円/個、φ5ジルコニアビーズは13円/個、φ4.8ステンレスビーズは18円/個である。

メタルコーンに時々見られる問題点は、重量が重いいため破砕時にチューブを壊すことである。これについてはさらなる条件検討が必要である。

## E. 結論

T社とY社の破砕装置を使った場合、φ12 または φ15 メタルコーンを用いて15～30秒の振盪を3-4回行えば調査した15臓器は乳剤化された。メタルコーンは高価であるが迅速で安定した結果が得られた。より安価なジルコニアビーズは幾つかの軟組織では十分使用可能であると考える。

## F. 健康危険情報

特に無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Masaaki Yoshii, Yoshiyuki Kaku, Yosuke Murakami, Mitsugu Shimizu, Kanako Kato, Ikeda Hidetoshi. Genetic variation and geographic distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Japan. Arch Virol. 2005 150:2313-24.

2) 池田秀利：動物に感染しているE型肝炎ウイルス。消化器科 141(2) 173-178, 2005.

### 2. 学会発表

1) 宮崎綾子、加藤花名子、吉井雅晃、李天成、武田直和、恒光裕、池田秀利：イノシシにおけるE型肝炎ウイルス抗体保有状況。第140回日本獣医学会学術集会、2005年9月（鹿児島）

2) 吉井雅晃、宮崎綾子、加藤花名子、池田秀利、恒光裕：豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス日本分離株におけるNs p2領域の遺伝子多型。第140回日本獣医学会学術集会、2005年9月（鹿児島）

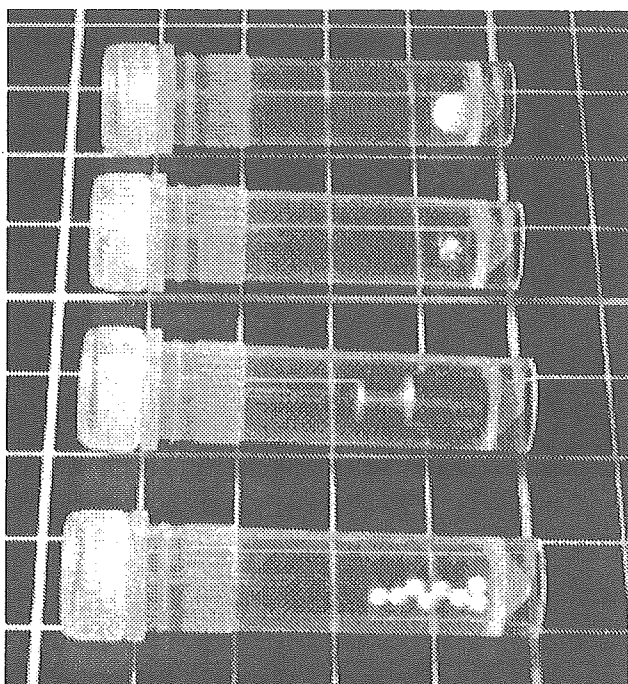
3) 望月雅美、大内敦夫、川上和夫、石田卓夫、Tian-Cheng Li, 武田直和、恒光裕、池田秀利：犬と猫におけるE型肝炎ウイルス疫学調査。第140回日本獣医学会学術集会、2005年9月（鹿児島）

4) 恒光裕、勝田賢、川島健司、神山麻理子、小野寺利幸、庄司智太郎、池田秀利、宮崎綾子、吉井雅晃、李天成、武田直和：ノトバイオート豚でのE型肝炎ウイルスの実験感染。第140回日本獣医学会学術集会、2005年9月（鹿児島）

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

図1



Φ5 ジルコニア

Φ4.8 ステンレス

Φ12 メタルコーン

Φ2 ジルコニア

図2

T社製ホモジェナイザー



Y社製ホモジェナイザー

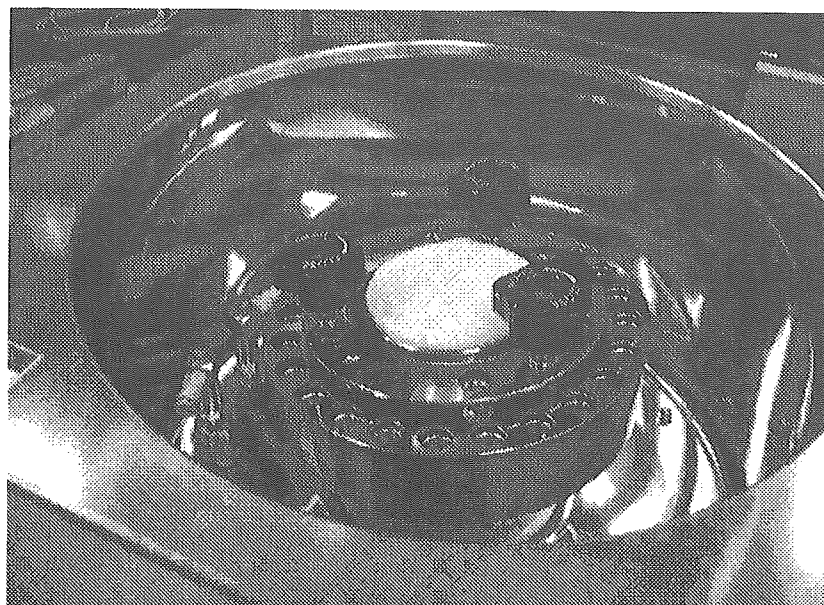
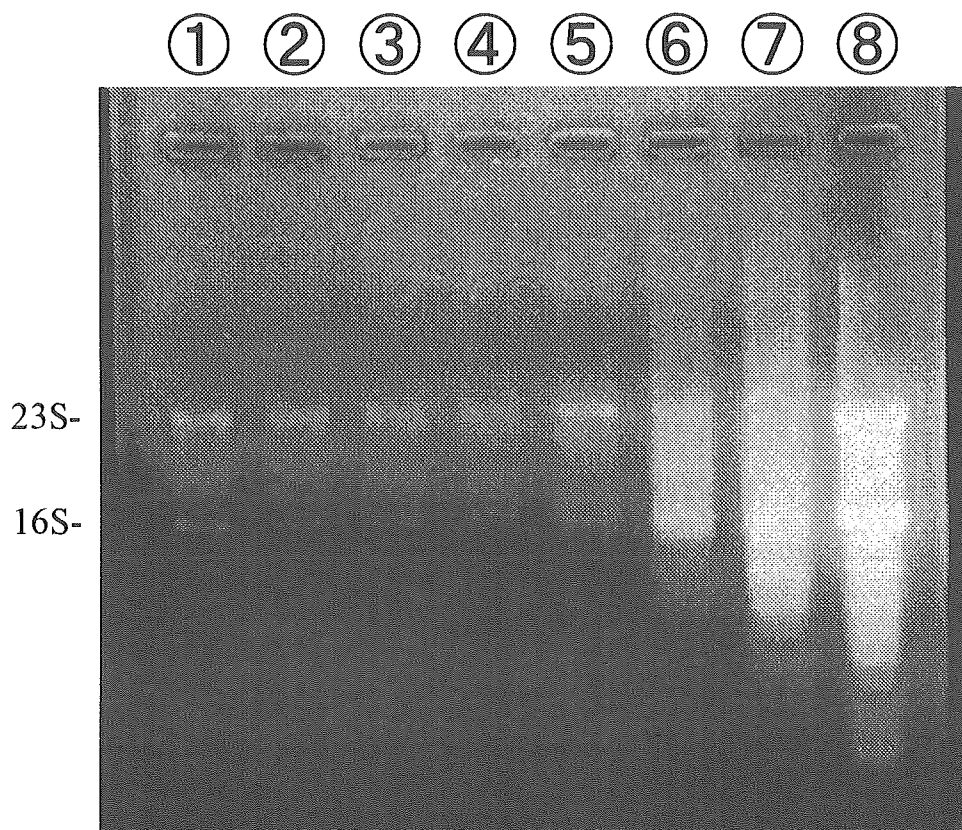


図3



- ①  $\Phi$ 5ジルコニア+ $\Phi$ 2ジルコニア0.4 (10%乳剤)
- ②  $\Phi$ 5ジルコニア+ $\Phi$ 2ジルコニア0.2 (10%乳剤)
- ③  $\Phi$ 5ジルコニア+ $\Phi$ 2ジルコニア0.1 (10%乳剤)
- ④  $\Phi$ 5ジルコニア+ $\Phi$ 1ガラス0.4 (10%乳剤)
- ⑤  $\Phi$ 5ジルコニア+ $\Phi$ 1ガラス0.2 (10%乳剤)
- ⑥  $\Phi$ 5ジルコニア+ $\Phi$ 2ジルコニア0.2 (50%乳剤)
- ⑦  $\Phi$ 5ジルコニア+ $\Phi$ 2ジルコニア0.2 (25%乳剤)
- ⑧ 他キット(isogen)によって抽出した肝臓総RNA



表 1

		乳剤化までの攪拌回数			
		TOMY		YASUI	
		心臓	肝臓	心臓	肝臓
ビーズ					
1	Φ0.1ガラス約0.4g	>8	2	>8	3
2	Φ0.5ガラス約0.4g	>8	1	>8	5
3	Φ1ガラス約0.4g	>8	2	>8	1
4	Φ0.5ジルコニア約0.4g	>8	2	>8	1
5	Φ2ジルコニア約0.4g	>8	3	>8	1
6	Φ5ジルコニア1個約0.4g	5	1	6	3
7	Φ4.8ステンレス1個約0.4g	2	2	4	1

表 2

			乳剤化までの攪拌回数			
			TOMY		YASUI	
			心臓	肝臓	心臓	肝臓
ビーズの組み合わせ						
1	-	+Φ2ジルコニア	7	4	>8	1
2	Φ5ジルコニア		6	1	6	1
3	Φ5ジルコニア	+Φ2ジルコニア	3	1	8	2
4	Φ4.8ステンレス		2	1	6	1
5	Φ4.8ステンレス	+Φ2ジルコニア	2	1	(>3)	2
6	Φ12メタルコーン		1	1	1	1
7	Φ12メタルコーン	+Φ2ジルコニア	1	1	1	1
8	Φ15メタルコーン		1	1	1	1
9	Φ15メタルコーン	+Φ2ジルコニア	1	1	1	1

表 3

動物番号	臓器が破碎されるまでの攪拌回数			
	メタルコーン		ジルコニア	
	(Φ15)		(Φ5-1個 + Φ2-0.4g)	
	No. 10	No. 11	No. 10	No. 11
脳	1	1	1	1
扁桃	1*	1*	2*	2*
心臓	1	1	3	3
肺	1*	1*	4*	4*
肝臓	1	1	1	1
腎臓	1*	1*	6	6
脾臓	3*	3*	2	2
膵臓	2	2	>8	>8
胃	2*	2*	6	6
十二指腸	2*	2*	4	4
空腸	2*	2*	4	4
回腸	2*	2*	4	4
大腸	1*	1*	2*	2*
腸間リンパ	2*	2*	2	2
筋肉	1	1	1	1

\*:臓器線維が観察されたもの

## 病原体ゲノム検出のための核酸増幅法の基礎検討

分担研究者 棚林 清 国立感染症研究所獣医科学部 室長  
協力研究者 宇田晶彦 国立感染症研究所獣医科学部 研究員

研究要旨：家畜・家禽のウイルス疾病の診断検査において多種類の病原体を一括して検出するためのマイクロアレイ法への応用を考え、検体中に存在する病原体核酸を偏り無く増幅する核酸増幅法の基礎的検討を細菌 DNA をモデルに実施した。DOP-PCR と Phi29 DNA ポリメラーゼにより 10 ng の *E. Coli* および *F. tularensis* ゲノム DNA から 1~3 $\mu$ g 程度の増幅 DNA 断片が得られる事が確認され、これらの核酸増幅法によりウイルス等の微量な病原体が含まれる検体からも核酸増幅が可能で検出同定に活用できる可能性が示唆された。

### A. 研究目的

各種感染症の診断にあたっては臨床的診断とともに確実な実験室検査が必要である。検査の基本となるのは病原因子の分離同定であるが、特にウイルス感染においては困難な場合や時間を要する場合が多く、今日では PCR による検出同定が広く応用されている。しかしながらウイルス毎に特異的プライマーを設計してそれぞれで反応を行わなければならない。多種類の病原体が関わる家畜・家禽におけるウイルス疾患の検査において多種類の病原体ゲノム核酸を一括して検出同定する方法の開発が期待される。本研究では多種類の病原体を一括して検出するためのマイクロアレイ法への応用を考え、検体中に存在する病原体核酸を偏り無く増幅する方法の基礎的検討として DOP-PCR（degenerate oligonucleotide-primed PCR）法と Phi29 DNA ポリメラーゼ増幅法

の検討を細菌 DNA をモデルに実施した。

### B. 研究方法

#### 1. DOP-PCR

DOP-PCR のプライマーは、Telenius らによって設計された 6MW プライマー（5' -CCGACTCGAGNNNNNATGTGG-3'）を使用した。ポリメラーゼは、ExTaq（Takara）、Pfu polymerase（Prmega）、Taq（Invitrogen）、LA Taq（Takara）、DOP-PCR Master（Roche）を使用した。DOP-PCR の鋳型 DNA として、10 ng の *E. Coli* DH5 $\alpha$ 株および *F. tularensis* Schu4 株のゲノム DNA を用いた。反応液は、1 ユニットのポリメラーゼ、1x PCR buffer、2  $\mu$ M の 6MW プライマー、250  $\mu$ M の dNTP 溶液、および 10 ng のサンプルゲノム DNA またはネガティブコントロールとして DW を含む総量 20  $\mu$ l で調製した。DOP-PCR のプログラムとして 3 種

類用意した (図 1)。

プログラム 1 ; 95°C 5 分+5 サイクル (95°C 1 分、30°C 1.5 分、[上昇率 0.35°C /秒] 72°C 3 分)+35 サイクル(95°C 1 分、62°C 1 分、72°C 1.5 分)+72°C 7 分。

プログラム 2 ; 95°C 5 分+5 サイクル (95°C 0.5 分、30°C 0.5 分、[上昇率 0.7°C /秒] 72°C 1.5 分)+35 サイクル (95°C 0.5 分、62°C 0.5 分、72°C 1.5 分)+72°C 7 分。

プログラム 3 ; 95°C 5 分+40 サイクル (95°C 0.5 分、55°C 0.5 分、72°C 1 分)+72°C 7 分。

増幅後のサンプルは、MicroSpin S-400 HR で精製し、濃度を Nano Drop ND-1000 で測定した。回収量は、精製後のサンプルの重量から予め測定した風袋との差から求めた。増幅を確認するために 0.7%アガロースで電気泳動を行った。

## 2. Phi29 DNA ポリメラーゼ増幅

Phi29 DNA ポリメラーゼ増幅の鋳型 DNA として、10 ng の *E. Coli* DH5 $\alpha$ 株および *F. tularensis* Schu4 株のゲノム DNA を用いた。サンプルゲノム DNA の増幅は、GenomiPhi DNA Amplification Kit (Amersham) を用いた。サンプル 1  $\mu$ l をキットに添付されていたサンプル溶液 9  $\mu$ l へ添加し、95°C で 5 分間熱処理を行った後氷上で 5 分間静置した。変性処理を行ったサンプルに Phi29 DNA ポリメラーゼを含む溶液を 10  $\mu$ l 添加し、30°C で 18 時間増幅した後、65°C で 10 分間ポリメラーゼの変性処理を行った。増幅後のサンプルは、MicroSpin S-400 HR で精製し、濃度を Nano Drop ND-1000 で測定した。回収量は、精製後のサンプルの重量から予め測定した風袋との差から求めた。増幅を確認するために 0.7%アガロースで電気泳動を行った。

## C. 研究結果

### 1. DOP-PCR の条件検討

*E. Coli* および *F. tularensis* のゲノム DNA を鋳型として様々なポリメラーゼ使用した時の増幅効率の差異および至適 PCR プログラムの検討を行った (図 2)。その結果、ExTaq (Takara) および Taq (Invitrogen) で *E. Coli* および *F. tularensis* のゲノム DNA の種類に依存せず、0.5~10 kbp のラダーを含むスメア状の増幅 DNA が検出された。DOP-Master (Rchoe) では、僅かにスメア状の増幅 DNA が観察されたが、その他のポリメラーゼに関して全く増幅は検出されなかった。DOP-PCR のプログラムに関して、PCR プログラム 1 及び 2 では良好な増幅が検出された。プログラム 3 では僅かに増幅された DNA のラダーが検出されたが、プログラム 1 および 2 よりも特異性が高くなっているため、均一な増幅をしめすスメアは検出されなかった。このことから DOP-PCR に使用する酵素は ExTaq または Taq ポリメラーゼ、プログラムは 1 または 2 が最適である可能性が示唆された。

DOP-PCR 用のプライマー 6MW の至的濃度検討も行った。10 ng の *E. Coli* および *F. tularensis* ゲノム DNA を鋳型にして 0.13~4  $\mu$ M の 6MW プライマーを PCR 反応液に添加した (図 3)。その結果、プライマー濃度 1~4  $\mu$ M で増幅が確認されたが、0.5  $\mu$ M 以下では増幅は確認できなかった。特に 2  $\mu$ M で 0.5~10 kbp にわたる長いラダーを含むスメアが検出され、この結果からプライマー濃度は 2  $\mu$ M が最適であると考えられた。

### 2. Phi29 DNA ポリメラーゼによる増幅

*E. Coli* および *F. tularensis* のゲノム DNA を鋳型として Phi29 DNA ポリメラーゼによる増幅を確認した (図 4)。その結果、DH5 $\alpha$ 株および Schu4 株のゲノム DNA において均一な増幅を示す 0.5~100 kbp のスメア