

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 棚 林 清

平成19（2007）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. 病原体を検出するためのマイクロアレイに用いる増幅法の検討 -----	15
棚林 清	

3. 食肉における家畜・家禽のウイルス疾病に関する研究	
家禽のウイルス疾病に関する研究： -----	39
伊藤 壽啓	

4. 市販の人用インフルエンザ検査キットの高病原性鳥インフルエンザ	
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 群ロタウイルスの感染状況調査 -----	49
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 -----	65
---------------------------	----

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：食用に供される家畜などのウイルス性疾病について食鳥・食肉検査所などで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、また、家畜・家禽および食世に供される野生動物等で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て今年度は以下のような成果が得られた。

安定した PCR 検査結果を得るために、市販の機器や試薬を利用した検査システムを構築することを目指し、肝臓の臓器乳剤から DNA ウイルスと RNA ウイルスの遺伝子を検出する効率について、4 種の市販 DNA/RNA 抽出キットを種々の条件で比較検討した。DNA ウイルス（豚パルボウイルス）の場合、調べた 3 種の DNA/RNA 抽出キットは PCR での遺伝子効率において大きな差はなかった。RNA ウイルス（E 型肝炎ウイルス）の場合、P 社の「細胞又は組織サンプルからのトータル RNA 精製用キット」が、種々の臓器濃度条件下でも安定した結果が得られ、迅速で簡便で信頼性の高いウイルス遺伝子抽出系に適していると考えられた。

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検討している。本検出法では多量の検体核酸が求められることから、4 種類の Whole genome amplification (WGA) 法と 2 種類の細菌 DNA を用いて偏り無く核酸を増幅する方法を検討し OmniPlex WGA 法による核酸増幅が最適であることが示唆された。さらに鳥インフルエンザウイルス検出のためのプローブ設計をすることが出来た。

家禽の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用インフルエンザ診断キットについて検討した。高病原性インフルエンザウイルスとの反応性を調べたところキットにより検出感度に大きな差があることが明らかになった。また、鶏肉の乳剤を混入させても非特異的反応は認められなかった。しかし、検出感度は人インフルエンザウイルスに比べがかなり低く鳥インフルエンザに应用することは可能であるが鳥類由来ウイルスに应用するに当たっては注意が必要である。迅速高感度診断法としての LAMP 法を引き続き検討した。本研究で設計した A 型インフルエンザウイルスに共通の MP プライマーを用いたときは 10^2 EID₅₀/0.1ml であった。RT-PCR 法に比べ、RT-LAMP 法は等温で反応が進み、検出も黙視で行えることから、現段階ではこの RT-LAMP 法がもっとも有効な迅速診断法であると考えられた。

食用として供される家畜や野生動物における A 群ロタウイルスについて感染状況の調査を実施した。野生のイノシシで 23.6%に P[17] 遺伝子型のトリロタウイルス、40.7%に P[4] あるいは [8] 遺伝子型のヒトロタウイルス、また 56.0%が P[2] あるいは

[3] 遺伝子型のロタウイルスの抗体が検出され、1例からはVP4 遺伝子が陽性となった。ウシについては昨年度の血清疫学調査で様々なロタウイルスが流行していることが推測されたため、糞便からのウイルス検出を試み 587 例のうち子牛の正常便 1 例からロタウイルス VP4 遺伝子が検出された。

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。エゾシカ 225 頭の抗体検査の結果、28 検体 (12.4%) が抗体陽性であり、陽性率は、加齢とともに上昇する傾向にあった。ELISA 抗体陽性血清のうち 1 検体が Western blot においても陽性反応を示した。

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 動物衛生研究所人獣感染症研究
チーム長
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ること

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. ブタに感染するウイルスの PCR 法のための条件検討：ブタ肝臓乳剤の上清を検査材料としてウイルス核酸の抽出方法について市販の 4 つの核酸抽出キットを比較検討した。ウイルス核酸の検出は RNA ウイルスである E 型肝炎ウイルス (HEV)、DNA ウイルスのブタパルボウイルス (PPV) を用いた。

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の応用：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検討を実施した。さらに報告されているすべての鳥インフルエンザウイルスを検出するためのプローブ設計を試みた。

3. 市販の人インフルエンザ用診断キットについて H5N1 亜型高病原性ウイルス株を用いて各種市販キットの検出感度、操作性並びに鶏肉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) 法を確立するために作製した鳥インフルエンザウイルスに共通の MP プライマーと市販のプライマーおよび通

常の RT-PCR 法との検出感度や操作性について比較検討した。

5. A 群ロタウイルスに対する血清疫学的調査およびウイルス遺伝子検出：イノシシの血清 182 例についてトリ、ヒト、およびサルロタウイルスの GST 融合 VP8 蛋白質を抗原とした各抗体価を測定した。さらに臨床的に健康なウシの糞便 587 例と野生イノシシの腸管内容物 135 例について A 群ロタウイルス VP4 遺伝子の検出を行った。

6. エゾシカにおける E 型肝炎ウイルスの感染状況を調べるために 225 頭から得た血清について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 およびウエスタンブロット法による測定を実施した。

C. 研究結果

1. ブタに感染するウイルスの PCR 法のための条件検討：肝臓の臓器乳剤から DNA ウイルスと RNA ウイルスの遺伝子を検出する効率について、4 種の市販 DNA/RNA 抽出キットを種々の条件で比較検討した結果、DNA ウイルス（豚パルボウイルス）の場合、調べた 3 種の DNA/RNA 抽出キットは PCR での遺伝子効率において大きな差はなかった。RNA ウイルス（E 型肝炎ウイルス）の場合、P 社の「細胞又は組織サンプルからのトータル RNA 精製用キット」が、種々の臓器濃度条件下でも安定した結果が得られ、迅速、簡便で信頼性の高いウイルス遺伝子抽出系に適していると考えられた。

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の応用：4 種類の Whole genome amplification (WGA) 法と 2 種類のバクテリア (*F. tularensis* 及び *E. coli*) を用いて偏り無く核酸を増幅する方法を簡易的に

検討した。その結果、OmniPlex WGA 法又は Phi29 DNA ポリメラーゼを用いた増幅法では、高い増幅効率と殆ど偏り無い増幅が確認された。DOP-PCR において高い増幅率が認められたが、他の WGA 法よりも激しく偏った増幅が観察された。これらの産物を Alex660 蛍光色素でラベル化しマイクロアレイで 2 種類のバクテリア特異的検出を試みた結果、OmniPlex WGA 法を用いた増幅産物において特異的かつ均一なシグナルが強く検出された。以上の結果から、病原体を検出するためのマイクロアレイには、OmniPlex WGA 法による核酸増幅が最適であることが示唆された。

さらに、鳥インフルエンザウイルスに対するプローブ設計を行い、60 種類の HA 遺伝子を標的としたマイクロアレイプローブは鳥インフルエンザウイルスに対して 96% の検出網羅率を示し、40 種類の NA 遺伝子を標的としたマイクロアレイプローブは 98% の検出網羅率を示した。

3. 現行の人用インフルエンザ診断キットの鳥インフルエンザウイルス検出への応用

市販の鶏肉を用いて作成した 10% 乳剤に既知の感染価の H5 ウイルスを混合し、人用インフルエンザ診断キットによる検出限界を測定した結果、 10^6 EID₅₀/ml で、PBS 希釈ウイルス液の場合とほぼ同程度であった。しかし、その検出限界値 (HAU 換算で約 13 HAU) は人インフルエンザウイルスに対するそれ (0.16 HAU) に比べて明らかに低くかった。一方、鶏肉乳剤のみによる非特異陽性反応は認められなかった。

11 種類の市販キットの高病原性ウイルス株との反応性は $10^{6.3}$ TCID₅₀ のウイルスを 8 種のキットで検出可能であったが、3 種のキットではシグナルが観察されなかった。6 種のキットでは $10^{3.3}$ TCID₅₀ の、2 種は $10^{4.3}$ のウイルスを検出できた。いずれのキットでも $10^{2.3}$ TCID₅₀ のウイルスは検出できなかった。

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：RT-PCR法およびRT-LAMP法についてそれぞれ検出感度を調べた結果、RT-PCR法では 10^2 EID₅₀/0.1ml、RT-LAMP法では市販のH5プライマーを用いたとき 10^3 EID₅₀/0.1ml、本研究で設計したA型インフルエンザウイルスに共通のMPプライマーを用いたときは 10^2 EID₅₀/0.1mlであった。

5. A群ロタウイルスに対する血清疫学的調査およびウイルス遺伝子検出：ウシとイノシシについて、A群ウイルスの感染状況についての調査を行った。野生のイノシシ182例について、P遺伝子型特異抗体検出法により血清疫学調査を実施した結果、23.6%のイノシシがP[17]遺伝子型のトリロタウイルスの、40.7%がP[4]あるいは[8]遺伝子型のヒトロタウイルスの、56.0%がP[2]あるいは[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。またイノシシの腸管内容物135例からロタウイルスVP4遺伝子の検出を試みたところ、1例が陽性となった。

ウシでは様々なロタウイルスが流行していることが推測されたことから、ウシ糞便の遺伝子検出を行ったところ587例のうち子牛の正常便1例からロタウイルスVP4遺伝子が検出された。

6. 2006年2月～9月、北海道日高地区で捕獲されたエゾシカ225頭から血清を採種し、バキュロウイルスで発現したE型肝炎ウイルス(HEV)様粒子を抗原としたELISAに供した。その結果、28検体(12.4%)が抗体陽性であった。抗体陽性率は、2～5歳にかけて加齢とともに上昇する傾向にあった。ELISA抗体陽性血清のうち1検体がWestern blotにおいても陽性反応を示した。

D. 考察

家畜等の食肉からの病原体検出で用いられ

るPCR検査におけるブタ肝臓の臓器乳剤からDNAウイルスとRNAウイルスの遺伝子を検出する効率について、4種の市販DNA/RNA抽出キットを種々の条件で比較検討した。DNAウイルス(豚パルボウイルス)の場合、調べた3種のDNA/RNA抽出キットはPCRでの遺伝子効率において大きな差はなかった。RNAウイルス(E型肝炎ウイルス)の場合、P社の「細胞又は組織サンプルからのトータルRNA精製用キット」が、種々の臓器濃度条件下でも安定した結果が得られ、迅速で簡便で信頼性の高いウイルス遺伝子抽出系に適していると考えられた。

マイクロアレイ法は多種類の病原体ゲノムを一括して検出することが可能と考えられる有用性が期待されるが、これに用いる核酸増幅法としてOmniPlex WGA法による核酸増幅が最適であることが示唆された。さらに鳥インフルエンザウイルス検出のためのプローブ設計をすることができたが、他の多くのプローブ設計をすすめる必要がある。

家禽の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高病原性インフルエンザウイルス株との反応性を調べたところキットにより検出感度に大きな差があることが明らかになった。一方、糞便や鶏肉の混入でも非特異的反応は認められなかった。しかし、検出感度は人インフルエンザウイルスに比べがかなり低く鳥類由来ウイルスに応用するに当たってはキットの選択と更なる改良の必要がある。

迅速高感度診断法としてのLAMP法を引き続き検討した。本研究で設計したA型インフルエンザウイルスに共通のMPプライマー-T-PCR法に比べ、RT-LAMP法は等温で反応が進み、検出も黙視で行えることから、現段階ではこのRT-LAMP法がもっとも有効な迅速診断法であると考えられた。

食用として供される家畜や野生動物におけ

るA群ロタウイルスについて感染状況の調査で、広範囲のイノシシにさまざまなP遺伝子型のロタウイルスが高率に感染していること、さらにイノシシにおいて新しいP遺伝子型のロタウイルスが流行している可能性が示唆されウイルス遺伝子も初めてが検出された。また、ウシでもロタウイルス遺伝子が検出され病原性などさらに解析する必要がある。

エゾシカにおけるE型肝炎ウイルス抗体調査で225頭の抗体検査の結果、28検体(12.4%)が陽性でありエゾシカでの感染と生息域のブタとの関連についてさらに調査する必要がある。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検査法における検体の乳剤化さらにRNAおよびDNA抽出のためのキットの選択ができ、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。また、多数の病原体を一括して検出するマイクロアレイは有用と考えられるがさらに実施可能な技術となるような方法の確立が必要である。

鳥インフルエンザ検査においての有用な簡易検査キットの候補が選択できたが感度が低く改良が望まれる。またLAMP法による鳥インフルエンザウイルスの検出方法を開発でき他のウイルス株での検証をして食鳥検査所での検査にも応用可能になるようにする必要がある。食肉に供されるウシ、イノシシでのロタウイルスがまた、エゾシカでのE型肝炎ウイルスの感染が起きていることがあることがわかったがさらに詳細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) 吉井雅晃、山岸健、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のPCR法による亜型識別 第142回日本獣医学会学術集会 2006

2) M. Yoshii, A. Miyazaki, K. Kato, H. Ikeda, T. Okinaga, H. Tsunemitsu : Evolutionary dynamics of North American-type PRRSV into three subtypes characterized by two deletional mutations in Nsp2 gene. International PRRS Symposium 2006.

3) Ito, T. : DIFFERING POTENTIAL OF AVIRULENT WATERFOWL ISOLATES FOR BECOMING HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA VIRUSES BY PASSAGING IN CHICKENS. 第1回国際人獣共通感染症学会総会, ソウル, 2006. 1.19

4) Ito, T. : Different potential of avirulent waterfowl isolates to become highly pathogenic avian influenza virus by passaging in chickens. Second Japan-China Bilateral Symposium on Avian Influenza, Tokyo. 2007. 2. 6-7

5) Ito, T., Ito, H., and Otsuki, K. : DIFFERING POTENTIAL OF AVIRULENT WATERFOWL ISOLATES FOR BECOMING HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA VIRUSES BY PASSAGING IN CHICKENS, Asian Research Forum on Emerging

and Reemerging Infections - 2006, Tokyo.
2006. 2. 19-20

6) 伊藤 啓史、野村 文恵、大槻 公一、伊藤 壽啓：ニューカッスル病ウイルスのアヒルにおける病原性の獲得。第 22 回中国四国ウイルス研究会。鳥取。2007. 6. 10-11

7) 藤本 佳万、小島 三奈、伊藤 啓史、河岡 義裕、大槻 公一、伊藤 壽啓：インフルエンザウイルスの腸管増殖能に関わる NA 蛋白の low-pH 抵抗性。第 22 回中国四国ウイルス研究会。鳥取。2007. 6. 10-11

8) 伊藤壽啓：我が国の鳥インフルエンザ・モニタリングの最新情報紹介，日本採卵養鶏産業研究会第四回研究セミナー，福島県二本松市，2006. 6. 22-23

9) 伊藤壽啓：高病原性鳥インフルエンザの国内発生とその感染経路。第 28 回家畜衛生講習会。熊本。2006. 8. 8-10

10) 伊藤壽啓：高病原性鳥インフルエンザと新型ウイルス出現の可能性。日本進化学会シンポジウム 17「保全進化地球環境の今後」。東京代々木オリンピックセンター。2006. 8. 30-31

11) Ito, T. : Pathogenesis of avian influenza virus. Regional workshop for the control of

avian influenza, Sapporo, 2006. 9. 12

12) 伊藤壽啓：鳥インフルエンザ。日本遺伝学会第 78 回大会。つくば。2006. 9. 25-27

13) 伊藤壽啓：異なる宿主（ヒトも含む）における A I V の感染と病態。平成 18 年度全国秋季鶏病技術研修会。山形。2006. 10. 20

14) 伊藤壽啓：鳥インフルエンザウイルスの感染と病態。西日本感染症学会。岡山。2006. 11. 24

15) 川口まり子、伊藤直人、石黒直隆、山下照夫、杉山 誠：野生イノシシにおける血清疫学調査より推測される新型 A 群ロタウイルス流行の可能性、第 142 回日本獣医学会学術集会、2006 年 9 月（山口）

16) 井上恵美、富山大輔、岡崎克則 「エゾシカにおける E 型肝炎ウイルス抗体の検出」第 54 回日本ウイルス学会（11 月 19 日、名古屋市）

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 人獣感染症研究チーム長
研究協力者 恒光 裕 動物衛生研究所 ウイルス病研究チーム長
研究協力者 加藤花名子 動物衛生研究所

研究要旨：ウイルス性疾病の診断には病原体であるウイルスの検出と分析が重要である。感染性ウイルスの検出分離には長時間かかるが、ウイルス遺伝子の検出には簡便で迅速な方法がある。PCR法は最も汎用されているウイルス遺伝子検出法の1つである。食肉・食鳥処理場で実行可能なウイルス検査法としても有望である。ただし、検査体制は多数の処理場に適応し、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に設定する必要がある。本研究では安定したPCR検査結果を得るために、市販の機器や試薬を利用した検査システムを構築することを目指し、検査臓器の乳剤化→ウイルス核酸の抽出→PCR法という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。今年度はウイルス核酸を抽出する過程について、市販の核酸抽出キット4種を比較して有効性を検討した。4種のキットは本来血漿や少数の細胞からの核酸抽出を目的としたものであるが、本研究では、同一臓器乳剤から感染性ウイルスと核酸抽出の両方を得ることが必要なため、条件を検討した。得られた実験結果から、1キットが我々の目的には最適だと考えられた。

A. 研究目的

現在、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、臨床症状のないウイルス疾病に対しては、ウイルス学的検査が煩雑なため、迅速性や経済性から精密な検査は実施されていないのが現状である。本研究は、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、今年度はウイルス核酸の抽出過程の条件検討を行った。

B. 研究方法

1) 動物臓器の乳剤化

臓器の乳剤化は昨年度の条件検討データを基に、小遠心管にブタ肝臓100mgと培地1mlと細胞培養用ビーズを加え、Y社の臓器破碎装置で激しく振盪する方法を採った。ビーズはコーン形ステンレス（メタルコーン）を用いた。臓器乳剤を8,000xgで5分間遠心し、上清をウイルス検査材料とした。

2) 核酸抽出キット

ウイルス核酸の抽出には2社から発売されている4つの核酸抽出キットを用いた。

- (a) P社 -全血からDNA抽出用
- (b) P社 -細胞又は組織サンプルからトータルRNA精製用
- (c) Q社 -培養細胞や白血球からトータルRNA精製用
- (d) Q社 -血清及び血漿からウイルスDNA/RNA精製用

それぞれのキットに付属している各種試薬の組成は不明である。P社とQ社は同一の自動核酸抽出機を使用するが、各キットに指定されたデジタル化抽出プロトコルに従って自動的に抽出される。

3) ウイルス核酸の検出

実験にはRNAウイルスであるE型肝炎ウイルス（HEV）、DNAウイルスのブタパルボウイルス（PPV）を用いた。HEVは野外分離HEV株を実験感染した単一ロットのブタ肝臓乳剤を用いた。その株のウイルス核酸配列を基に恒光が設計したリアルタイムRT-PCRの検出系を用いた。

ブタパルボウイルスDNAの検出は、ウイルス特異的なプライマーを用いたPCR法を用いた。

C. 研究結果

仮にと畜場や食鳥処理場における検査

で、病原体のウイルス核酸が検出された場合、次に同一サンプルから感染性ウイルスを分離して更に解析することが想定される。ところが、市販のDNA/RNA抽出キットは血清や少量の培養細胞から直ちにウイルス・細胞の核酸を抽出するように作られている。そのため、血清や細胞サンプルに蛋白変性剤を直接添加して乳剤化する方法が採られているため、そのサンプルにウイルスがあっても感染性が失われる。従って、一旦、臓器の乳剤を作製し、感染性ウイルス用のサンプルを保存してから、同乳剤から市販キットを用いてウイルス核酸抽出過程に入る必要がある。よって、市販のDNA/RNA抽出キットのプロトコルにはない、臓器乳剤からウイルス核酸を抽出する条件を検討した。

1) まず、RNAウイルスであるHEVについて3つの市販のDNA/RNA抽出キットの検出効率を比較した。各キットは血清や細胞から核酸を抽出するためのものであるが、この実験ではHEV感染ブタの肝臓乳剤を少量（乳剤濃度0.3-0.5%）用いた。

a) HEV感染肝乳剤1 μ lをそれぞれのキットのプロトコルに従い、付属する試薬や指定された反応液（総量200 μ l, 350 μ l, 400 μ l）を加えてHEV RNAを抽出した。HEV RNAの回収効率をリアルタイムRT-PCR法で定量的に測定した（図1）。

感染肝乳剤1 μ l以外は他の蛋白成分を加えずにRNA回収を行った場合、3社のキットはほぼ同等のウイルスゲノムを回収した。すなわち、P社細胞RNA抽出用キット、Q社細胞RNA抽出用キット、Q社血漿RNA/DNA抽出用キットによって回収されたHEV RNAは、それぞれ671（0.5%乳剤）、1487（0.3%乳剤）、901（0.3%乳剤）copies/sampleで、差は2倍程度で

あった(図1)。

b) 次に、肝乳剤の濃度を上げたときにウイルスRNAの回収効率にどのような影響を及ぼすかを調べるために、上記実験系に非感染ブタ肝臓乳剤をさらに加えて、回収されたウイルスRNA量を比較した。その結果、3つのキットで大きな差が出た。

P社細胞RNA抽出用キットの場合、乳剤濃度を0.5%から6.6%、13.2%、20%と上げるに従い、回収ウイルスコピーが約7倍増加した。

Q社細胞RNA抽出用キットは、2.8%肝乳剤では0.3%肝乳剤よりHEV RNAの回収が1/5に減少し、さらに肝乳剤を5.6%、11.2%、20%に増やすとウイルスRNAが検出できなくなった。

Q社血漿RNA/DNA抽出用キットでは、追加肝乳剤を6.6%、13.2%、20%と増やしても回収されたウイルスコピーは1265、720、1507であり、追加肝乳剤がない場合(0.3%、901copies)とほぼ同等のコピー数(70%増から20%減の範囲)であった。

臓器乳剤濃度が増えるとウイルスRNAの回収率が悪くなったQ社細胞RNA抽出用キットは、元のプロトコールでは10mgの臓器に対してRLT試薬350ul、2ME 10ulを添加して乳剤化することになっている。追加肝乳剤を増やすことによって相対的にRLT試薬を減少させたことが、回収率の減少に結びついたことが考えられる。すなわち、同じ0.3%ウイルス感染肝乳剤であるが、RLT試薬を88%加えたものと14%加えたものを比較すると、回収されたウイルスコピー数は1087から104と約1/10に減少したことからも裏付けられた(図1)。

2) 一定の肝乳剤濃度において、含まれるウイルス濃度が異なるとき、定量性を

持ってE型肝炎ウイルスゲノムが回収されるかどうかを調べた。調べたキットは、前実験で比較的成績の良かったP社細胞RNA抽出用キットとQ社血漿RNA/DNA抽出用キットの2つである。肝乳剤濃度を20%と6.6%にした条件で比較し、加える感染肝乳剤量(ウイルス量に相当する)を5ul, 1ul, 0.1ul, 0.01ulと変化させてウイルスRNA回収量を比較した。

a) P社細胞RNA抽出用キットは、肝乳剤濃度20%、6.6%とも同等のウイルスコピーが検出され、感染肝乳剤量0.1ulまでウイルスコピーが検出された(図2-A)。

ウイルスRNAが定量性を持って回収されているかを計算した。それぞれの実験サンプルで、回収されたウイルスコピー数を加えたウイルス乳剤量で割ると、20%乳剤では285~353コピー/ulウイルス乳剤、6.6%乳剤では242~453コピー/ulウイルス乳剤の範囲に収まっていた(図3-A)。これは追加肝乳剤が無い場合に回収されたウイルスゲノム量(462コピー/ulウイルス乳剤、図3-Aの▲印)と同等で、肝乳剤濃度に関わらず定量性を持ってウイルスゲノムが回収されていることを示していた。

b) Q社血漿RNA/DNA抽出用キットは、前述のP社細胞RNA抽出用キットよりも回収されるウイルスゲノムコピー数が肝乳剤濃度20%でも6.6%でも約1/10程度少なく(図2-B)、かつ、実験群ごとのばらつきも大きく(図2-B)、定量性も劣っていた(図3-B)。肝乳剤追加実験群のいずれも、肝乳剤非追加サンプルで回収されたコピー数(1422コピー/ulウイルス乳剤)よりも1/10以下の回収率であった(図2-B)。

3) DNAをゲノムにもつPPVについて、3

キット（P社細胞RNA抽出用キット、P社全血DNA抽出用キット、Q社血漿RNA/DNA抽出用キット）を用いて核酸を抽出し、PCR法で増幅されるPPV DNA量を比較した。

肝乳剤濃度を20%、6.6%、0.3%の条件下で、ウイルス液を段階希釈して原液、1/100希釈、1/10,000希釈、1/1,000,000希釈液を一定量混ぜ、ウイルスゲノム検出限界を求めた。

いずれの乳剤濃度でも、1/100希釈までは強いPPVゲノムのバンドが観察され、1/10,000希釈では検出されたり、されなかったりしたが、全体的には3キットは同等の検出感度を持つと考えられた。

D. 考察

と畜場や食鳥処理場において実施するウイルス検査としてPCR法があり、本研究は迅速で簡便なPCR法の条件設定に焦点を絞った。実施するにあたり、全国の多数の処理場が検出感度をそろえて検査することが望まれ、統一した器具や試薬、マニュアルの使用が必要であろう。昨年度は、臓器を乳剤化する段階でのビーズや臓器破砕機の比較をして適切な実験条件を見いだしたが、今年度は、その臓器乳剤からウイルス核酸を抽出するステップについて検討するため、4つの核酸抽出キットを比較し、比較的安定した結果を得ることのできる条件を検討した。

実験結果の要約を表2にまとめた。

PCR法は多様な病原体や臓器について汎用されるうる手技であり、多様な検査材料に対して柔軟に対応できる検査キットが望ましいと考える。

DNAウイルスであるPPVについては、比較した3つの核酸抽出キット（P社細胞RNA抽出用キット、P社全血DNA抽出用キット、Q社血漿RNA/DNA抽出用キット）は、同等の検出効率で臓器乳剤の濃度にも大

きく影響されなかった。

RNAウイルスのHEVについては、検査する臓器乳剤の濃度が低い場合は、恐らく比較した3キットとも有用であろう。しかし、臓器濃度が高い場合、キットによってウイルス遺伝子の検出率に大きく影響されると考えられた。その理由は、キットによるRNA抽出後、逆転写酵素によるcDNA合成反応の段階における阻害物質の存在などが考えられる。その点で、P社細胞RNA抽出用キットは、ウイルス遺伝子検出率は他2キットと同等であるが、広い臓器乳剤濃度範囲でウイルス遺伝子検出率が低下することなく、しかも定量性をもって検出されていたので、調べた限り最も適切なキットと考えられる。

平成17、18年度の実験成績を基にしてと畜場や食鳥処理場で実施できる汎用性のあるPCRプロトコールを作成する予定である。

E. 結論

肝臓の臓器乳剤からDNAウイルスとRNAウイルスの遺伝子を検出する効率について、4種の市販DNA/RNA抽出キットを種々の条件で比較検討した。

DNAウイルス（豚パルボウイルス）の場合、調べた3種のDNA/RNA抽出キットはPCRでの遺伝子効率において大きな差はなかった。

RNAウイルス（E型肝炎ウイルス）の場合、P社の「細胞又は組織サンプルからのトータルRNA精製用キット」が、種々の臓器濃度条件下でも安定した結果が得られ、迅速で簡便で信頼性の高いウイルス遺伝子抽出系に適していると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Different fecal shedding patterns of two common strains of hepatitis E virus at three Japanese Swine farms. Nakai I, Kato K, Miyazaki A, Yoshi M, Li TC, Takeda N, Tsunemitsu H, Ikeda H. *Am J Trop Med Hyg* 75: 1171-7. 2006.
- 2) Epidemiological study of hepatitis E virus infection of dogs and cats in Japan. Mochizuki M, Ouchi A, Kawakami K, Ishida T, Li TC, Takeda N, Ikeda H, Tsunemitsu H. *Vet Rec* 159: 853-4. 2006.

2. 学会発表

- 1) 豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス日本分離株のPCR法による亜型識別: 吉井

雅晃、山岸健、宮崎綾子、加藤花名子、池田秀利、恒光裕 第142回日本獣医学会学術集会 2006

- 2) Evolutionary dynamics of North American-type PRRSV into three subtypes characterized by two deletion mutations in Nsp2 gene. M. Yoshi, A. Miyazaki, K. Kato, H. Ikeda, T. Okinaga, H. Tsunemitsu. International PRRS Symposium 2006

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 ブタ肝乳剤濃度の違いによるHEV遺伝子回収率への影響

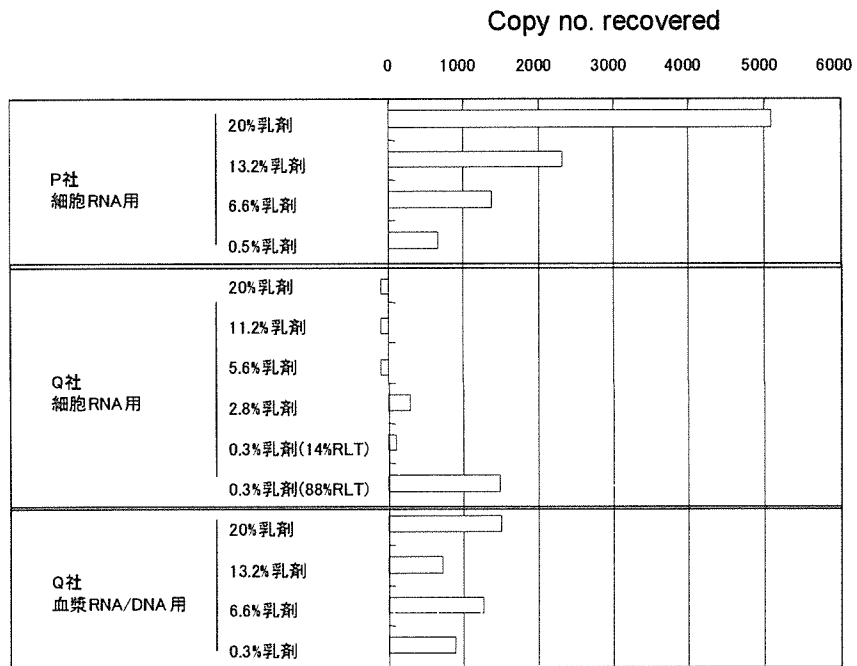


図2 乳剤含有HEVウイルス量と回収HEVウイルス遺伝子コピー数

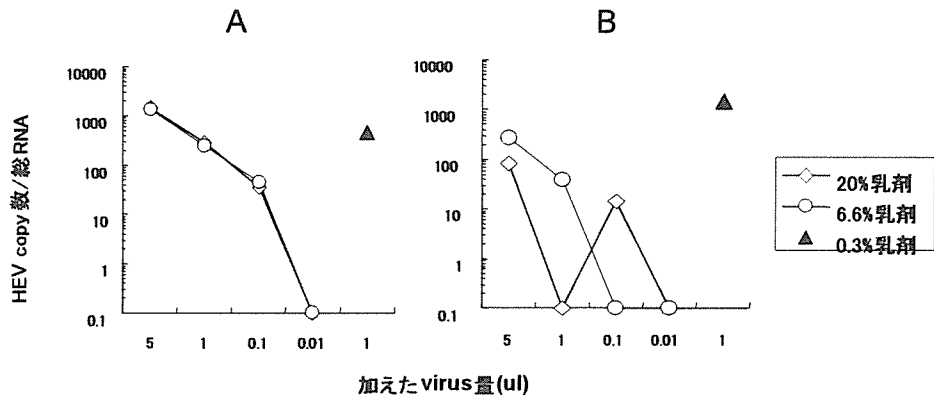
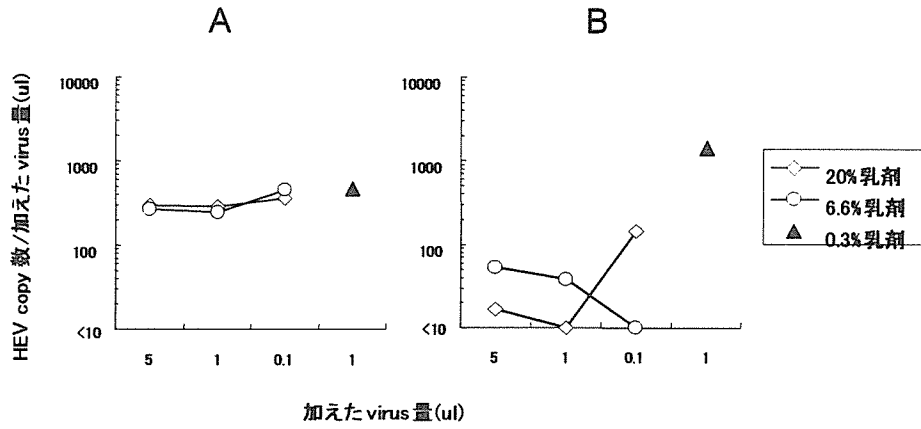


図3 乳剤含有HEVウイルス量と回収HEVウイルス遺伝子コピー数の比率



A: P社細胞RNA用, B: Q社血漿RNA/DNA用

表1 DNAウイルス遺伝子のPCRによる検出

キット	添加肝乳 剤濃度	ウイルス希釈(log10)			
		0	-2	-4	-6
P社細胞RNA用	20%	-	++	+	-
Q社血液RNA/DNA用		++	++	-	-
P社血液DNA用		++	++	-	-
P社細胞RNA用	6.6%	++	++	+	-
Q社血液RNA/DNA用		++	++	+	-
P社血液DNA用		++	++	-	-
P社細胞RNA用	0.3%	++	++	+	-
Q社血液RNA/DNA用		++	+	+	-
P社血液DNA用		++	++	+/-	-

表2 結果の要約

核酸抽出キット	Hepatitis E virus				Porcine parvovirus	
	乳剤濃度 の影響	検出効率	定量性	乳剤濃度 の影響	検出効率	
P社-細胞RNA抽出用	3+ 少	1+ 良	2+ 良	1+ 少	1+ 良	
P社-全血DNA抽出用	-	-	-	1+ 少	1+ 良	
Q社-細胞RNA抽出用	1+ 大	2+ 良	-	-	-	
Q社-血清DNA/RNA抽出用	2+ 少	2+ 良	1+ 不良	1+ 少	1+ 良	

3+: 優れている、2+: やや良、1+: 使用できる

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費）
分担研究報告書

病原体を検出するためのマイクロアレイに用いる増幅法の検討

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： 本研究では食肉などに含まれる多種類の病原体を同時に検出するために、マイクロアレイへの応用を試みている。マイクロアレイを用いた検出法では多量の検体核酸が求められることから、4種類のWhole genome amplification (WGA) 法と2種類のバクテリア (*F. tularensis* 及び *E. coli*) を用いて偏り無く核酸を増幅する方法を簡易的に検討した。その結果、OmniPlex WGA 法又は Phi29 DNA ポリメラーゼを用いた増幅法では、高い増幅効率と殆ど偏り無い増幅が確認された。DOP-PCR において高い増幅率が認められたが、他の WGA 法よりも激しく偏った増幅が観察された。これらの産物を Alex660 蛍光色素でラベル化しマイクロアレイで2種類のバクテリア特異的検出を試みた。その結果、OmniPlex WGA 法を用いた増幅産物において特異的かつ均一なシグナルが強く検出された。以上の結果から、病原体を検出するためのマイクロアレイには、OmniPlex WGA 法による核酸増幅が最適であることが示唆された。

A. 研究目的

病原体の検出は、病原体タンパク質に対する抗体を用いて検出する方法と、病原体核酸を増幅し電気泳動を用いて検出する方法の2種類に大別される。病原体核酸を増幅し検出する方法は、特異性及び検出感度で優れている。マイクロアレイは、1枚のスライドガラス上に数万の標的遺伝子の相補鎖をプリントし、1サンプルから同時多検出試験を行えるプラットフォームである。従来から用いられている PCR を用いた検出試験では同時に行える検出数には限界があるので、マイクロアレイを用いた病原体核酸検出法は有望であると考えられた。しか

し、マイクロアレイを用いた標的遺伝子の検出には、大量の核酸が要求されることから、何らかの遺伝子増幅法が必要であった。

そこで、本研究では2種類のバクテリア (*F. tularensis* 及び *E. coli*) を評価対象とし、4種類の whole genome amplification (WGA) 法 (DOP-PCR、Phi29 v1、Phi29 v2、OmniPlex WGA) を検討した。また各 WGA 法由来の増幅産物を蛍光ラベル化し、マイクロアレイを用いた病原体検出法の検討も実施した。

B. 研究方法

バクテリア株及び DNA 抽出法

本研究で使用した全ての *Francisella* 株 (*F. tularensis* subsp. *tularensis* schu 株、BH8859 株、38 株、*F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS 株、yama 株、*F. tularensis* subsp. *novicida* U112 株、*F. philomiragia* 029 株) は、8%ヒツジ血液チョコレートを含む Eugon 寒天培地にて培養した。*Escherichia coli* K12 ER2925 株は、New England BioLabs (NEB, Beverly, MA) から入手し Luria-Bertani (LB) 培地にて 37°C で一晩培養した。培養した各細菌からの DNA 抽出は、DNA Isolation Kit for Cells and Tissue (Roche, Mannheim, Germany) 又は、SepaGene (Sanko-junyaku, Tokyo) を用いた。

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。DOP-PCR の鋳型として、10 ng の *E. coli* K12 株および *F. tularensis* schu 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 μ M の 6MW プライマー、250 μ 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 μ l で調整した。DOP-PCR のプログラムは、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。増幅後のサンプルは、使用するまで-30°C で保存した。

Phi29 DNA ポリメラーゼを用いた増幅

Phi29 DNA ポリメラーゼを用いた増幅には、GenomiPhi DNA Amplification Kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 及び GenomiPhi DNA Amplification Kit version

2 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) を使用した。この 2 種類のキットは、簡易的に Phi29 v1 及び Phi29 v2 と命名した。鋳型 DNA として、10 ng の *E. coli* K12 株および *F. tularensis* schu 株のゲノム DNA を用いた。1 μ l のサンプル DNA 溶液をキットに添付されていたサンプル溶液 9 μ 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。熱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 μ l 添加し、30°C で 18 時間 (Phi29 v1) 又は 2 時間 (Phi29 v2) 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、使用するまで-30°C で保存した。

OmniPlex WGA

OmniPlex WGA 法を用いた増幅では、GenomePlex Whole Genome Amplification Kit (Sigma, Poole, UK) を使用した。鋳型 DNA として、10 ng の *E. coli* K12 株および *F. tularensis* schu 株のゲノム DNA を用いた。ゲノム DNA は、Fragmentation Buffer を添加し 95°C で 4 分間の断片化処理を行った後急冷した。Library Preparation Buffer 及び Library Stabilization Buffer を添加した後 95°C で 2 分間サンプル DNA を更に変性させた。変性した DNA サンプルは、Library Preparation Enzyme を添加し 16°C で 20 分間、24°C で 20 分間、37°C で 20 分間、75°C 5 分間インキュベートした。インキュベート後のサンプルは、12.5 ユニットの Takara ExTaq を含む Amplification Master Mix を更に添加し、95°C 3 分、14 サイクル (95°C 15 秒、65°C 5 分) で鋳型 DNA を増幅した。

Real-time PCR

F. tularensis 及び *E. coli* ゲノム塩基配列にもとづき、各細菌の 3 標的遺