

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 1 8 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 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

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）
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ー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ールにはない、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1ulをそれぞれのキットのプロトコールに従い、付属する試薬や指定された反応液（総量200ul, 350ul, 400ul）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1ul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時、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 deletional 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

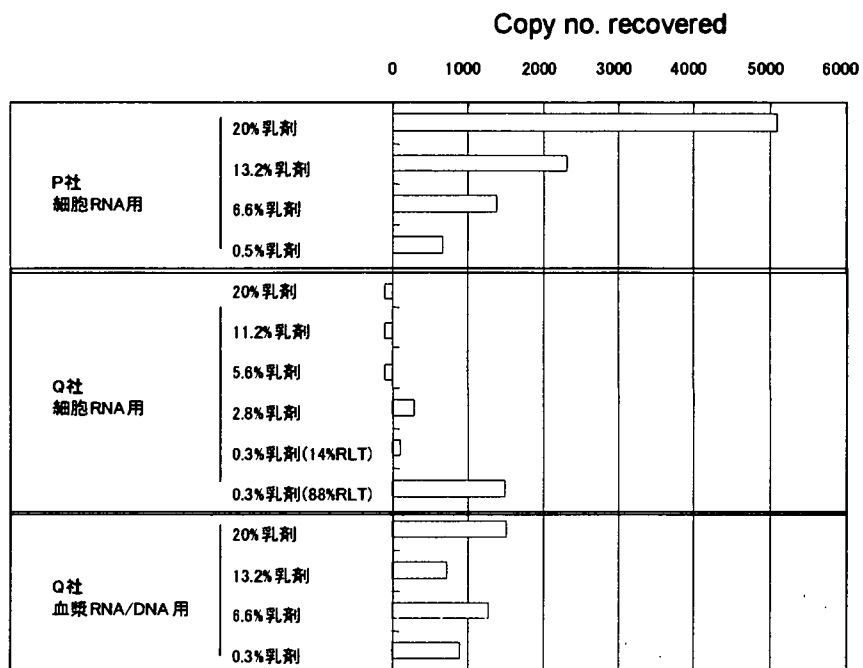


図2 乳剤含有HEVウイルス量と回収HEVウイルス遺伝子コピー数

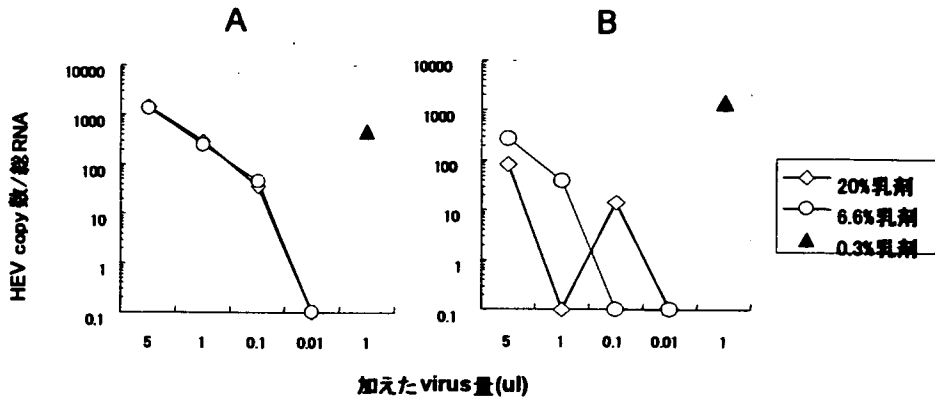
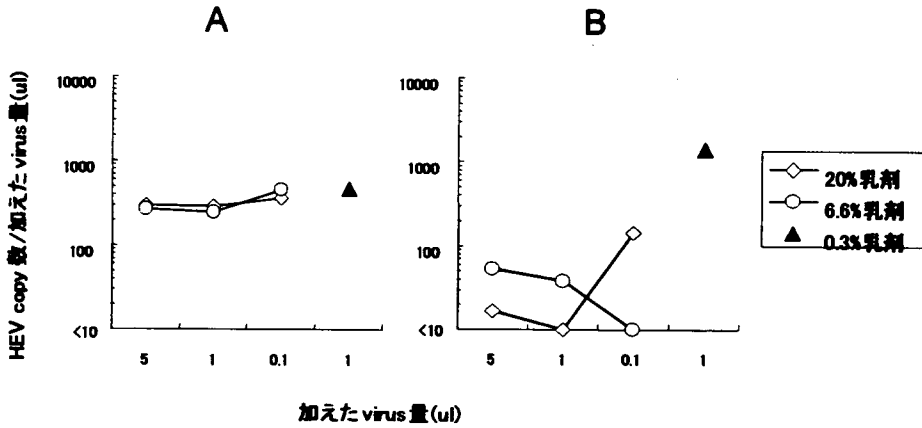


図3 乳剤含有HEVウイルス量と回収HEVウイルス遺伝子コピー数の比率



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 で一晚培養した。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

伝子のプライマー及びプローブを Primer Express 3 software (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて設計し、設計したオリゴ DNA は北海道システムサイエンスで合成した。リアルタイム PCR は、Applied Biosystems 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems) 及び SDS software v1.3 を用いて行った。20 μ l の反応液中には、1x Premix ExTaq (Takara, Shiga, Japan)、600 or 800 nM プライマー、100 nM Taqman プローブ及び希釈したゲノム DNA を添加した。95°C 10 秒後 35 サイクル (95°C 10 秒、60°C 35 秒) で増幅した。WGA を用いた増幅時の偏りを測定するために、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法を適用した。

マイクロアレイプローブの設計と作成

マイクロアレイにスポットしたオリゴ DNA は、Array Designer 3.01 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA) を用いて設計し、塩基配列は表 2 に示した。オリゴ DNA の設計条件は、60 mer、 T_m 75°C \pm 5.0°C、hairpin loops (<-3.0 kcal/mol) 及び self-dimer (<-3.0 kcal/mol)、クロスホモロジーを避けた。但し *F. tularensis* を標的としたオリゴ DNA は、*F. philomiragia* とはハイブリしないように設計した。

本研究で設計したマイクロアレイプローブの DNA 合成及びマイクロアレイ作成は、北海道システムサイエンス (Hokkaido, Japan) に委託した。100 μ M の 5' アミノ化されたオリゴ DNA は、GeneSlide (Toyokohan Co., Tokyo, Japan) 上スポットした。ポジジョンコントロールとして、Cy3 及び Cy5 でラベルした AHR オリゴ DNA を 10 μ M の濃度でスポットした。スポットされたスライドは、80°C で 1 時間固定化処理した後、0.5% SDS を含む 2x SSC 溶液で洗浄した。洗浄後のスライドは、0.5% SDS を含む 2x SSC 沸騰溶液で 10 分間処理した後、DW でリンス

し遠心乾燥した。

マイクロアレイのハイブリダイゼーションとデータ解析

サンプルのラベル化処理前に、DOP-PCR 又は Phi29 DNA ポリメラーゼ増幅由来の産物は、RsaI 及び AluI 処理を 37°C で 1 時間断片化処理を行った。一方 OmniPlex WGA 由来の産物は、400~1000bp 程度だったので断片化処理は行わなかった。増幅産物は、フェノール/クロロフォルム処理を行った後エタノール沈殿を行い、その沈殿物は 1 mM EDTA を含む 10 mM Tris-HCl 溶液に溶解した。得られた 2~10 μ g のサンプルは、Ulysis Alexa Fluor 660 Nucleic Acid Labeling Kit (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) を用いてラベル化処理を行った。ラベル化処理を行ったサンプルは、エタノール沈殿を行い DW に溶解した。2 μ g のラベル化サンプルは、95°C で 3 分間変性処理を行い、500 μ l のハイブリダイゼーションバッファー (終濃度: 4 μ g/ml 増幅産物、6x SSC、5x Denhardt's solution、50 mM sodium phosphate、0.5% SDS、及び 20% formamide) に調整した。450 μ l (1.8 μ g サンプル) のハイブリダイゼーション溶液はガセットスライド (Agilent) の上に拡げ、マイクロアレイスライドと張り合わせた。ハイブリダイゼーションは Hybridization Oven (Agilent) を用いて 50°C で一晩行った。ハイブリダイゼーション後のスライドは、0.5% SDS を含む 2x SSC で 50°C 5 分間 2 回洗浄した後 DW でリンスした。遠心乾燥したスライドは、100% 出力の赤色レーザー (633 nm; Alexa 660 and Cy5)、80% PMT、解像度 10 μ m の設定でスキャンした。得られた画像ファイルは、ScanArray Express software (Perkin Elmer) にて解析を行った。

C. 研究結果

WGA 法によるゲノム DNA の増幅

マイクロアレイを用いた検出法で必要とされる DNA 量 (1 μg 以上) を確保するために、4 種類の WGA 法 (DOP-PCR、Phi29 v1、Phi29 v2、OmniPlex WGA) の増幅効率を比較検討した。4 種類の WGA の増幅効率を評価するために、10 ng の *F. tularensis* 及び *E. coli* 由来のゲノム DNA を鋳型として用いて、各 WGA を行った (図 1)。*F. tularensis* を鋳型として用いた時、DOP-PCR では 3.3 μg 、Phi29v1 では 2.6 μg 、Phi29v2 では 1.5 μg 、OmniPlex では 1.5 μg の増幅産物が得られた。同様に、*E. coli* を鋳型として用いたときには、2.4 μg から 5.1 μg の産物が得られた。Phi29 v1 において鋳型 DNA を添加していない反応溶液で、増幅産物が観察された。この現象は過去にも報告されており、プライマー重合による非特異反応だと考えられた。ただし Phi29 v2 において、鋳型を添加しない場合では非特異反応は観察されず、非特異反応は抑制されていた。4 種類の WGA について、サンプル DNA から得られる差物量にばらつきが見られるものの、全ての WGA で 1 μg 以上の増幅産物が得られることを確認した。4 種類の WGA 法では、マイクロアレイサンプルとして必要な増幅効率を有していた。

各 WGA 法を用いて増幅反応を行った時の増幅産物のサイズを確認した (図 2)。各 WGA 法の反応溶液の一部を採取しアガロースゲル電気泳動を行った。DOP-PCR を用いた増幅法では、ゲノムの一部が不均一に増幅されたラダー状のバンドが 100bp~3kbp にわたって観察された。Phi29 DNA ポリメラーゼを用いた方法では、*F. tularensis* 及び *E. coli* 由来のゲノム DNA を均一に増幅しているスメア状のバンドが 1~10kbp 以上に渡って検出された。OmniPlex WGA 法では、予めゲノム DNA を断片化した後に増幅する

為 0.5~2kbp の均一に増幅されたスメアが検出された。これらの結果から、DOP-PCR はゲノム DNA を偏って増幅していると推測された。Phi29 v1、Phi29 v2、OmniPlex WGA 法による増幅では、ゲノム DNA を均一に増幅している事が考えられた。

増幅時の偏りの検証

4 種類の WGA による増幅時の偏りについて検証するにあたり、リアルタイム PCR の $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法を用いた。 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法では、リアルタイム PCR の反応系における増幅効率を 100% と仮定して、特定の遺伝子に対する各遺伝子の相対含量を測定する。そこで、本研究で設計したリアルタイム PCR 用のプライマー及び Taqman プローブの増幅効率 (Efficiency) が $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法を適応できる水準にあるかを検討した (図 3)。この結果全ての反応系で、約 100% の増幅効率が確認された。そこで、これらのプライマーと Taqman プローブを用い、4 種類の WGA 法による増幅産物中に、*F. tularensis* の *sdhA* 及び *atpA* 遺伝子又は *E. coli* の *ybdG* 及び *ycdS* 遺伝子の *gapA* 遺伝子に対する含有相対比を測定した (図 4)。DOP-PCR の増幅産物では、Phi29 DNA ポリメラーゼ又は OmniPlex WGA 法を用いた増幅法よりも顕著に増幅の偏りが検出された。DOP-PCR で検出された偏った増幅は、用いた 6MW プライマー (5' -CCGACTCGAGNNNNNATGTGG-3') の 3' 末端には 6 塩基の半特異的な塩基配列に依存しているためと考えられた。6MW プライマーの 3' 末端の 6 塩基から形成されている半特異的な塩基配列は、哺乳類ゲノム DNA では出現頻度が高いが、一部のバクテリアゲノム DNA では出現頻度が低いことが報告されている。これらの結果から、マイクロアレイを用いた病原体検出には DOP-PCR の適用し難く、Phi29 DNA ポリメラーゼ又は OmniPlex WGA 法の適応を念頭に置

き以降の実験を進めた。

病原体を検出するためのマイクロアレイのプロトタイプ

病原体を検出するためのマイクロアレイを作成するにあたり、簡易的に2種類のバクテリア *F. tularensis* 及び *E. coli* を標的とした。2種類のバクテリアから Array Designer でマイクロアレイプローブを作りやすい遺伝子を抽出し、60塩基、 T_m $75^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ で設計した(表2)。設計したマイクロアレイプローブは、BLAST検索にて、他のバクテリアとホモロジーが無いことを確認した。ただし、*F. tularensis* は同種の *F. philomiragia* とクロスハイブリしないように作成した。設計したマイクロアレイプローブは、ポジションコントロール及びネガティブコントロールと共に、図5に示したレイアウトでスポットした。

WGA産物のマイクロアレイへの反応性

10 ngのゲノムDNAは、4種類のWGA法にて増幅後、Alexa Fluor 660でラベル化した。1.8 μg のラベル化サンプルはマイクロアレイにハイブリさせ、スキャン画像を図6に示した。その結果、OmniPlex WGA法による増幅産物は、*F. tularensis* 及び *E. coli* の鋳型に対応する特異的な16遺伝子のスポット(Feature)が全て均一に強く検出された。Phi29 DNAポリメラーゼによる増幅産物は、OmniPlex WGA法による増幅産物よりも検出シグナルが弱く、不均一なシグナルで検出された。シグナルが弱くなる原因として、Phi29 DNAポリメラーゼではランダムヘキサマー(5'-NNNNNN-3')を用いるため、ランダムヘキサマー重合による増幅産物量の水増しされ、標的遺伝子に対する増幅産物量比が減少していると考えられる。DOP-PCRの産物をマイクロアレイに適用した場合、検出シグナルが弱く、遺

伝子によって激しいシグナルの偏りが生じていた。

DOP-PCR増幅産物の偏りが、マイクロアレイの蛍光強度(図6)とリアルタイムPCRで検出された増幅の偏りの値($2^{-\Delta\Delta C_t}$, 図4)との相関を各遺伝子について観察した(図7)。その結果、重決定係数(R^2)は0.992示し強い相関が観察され、DOP-PCR産物のマイクロアレイで検出される蛍光強度のバラつきは、各遺伝子の増幅量の差に依存していると推測された。DOP-PCR以外のWGA法において、マイクロアレイで検出されるシグナルの偏りと、増幅時の偏りとの相関は観察されなかった。

マイクロアレイを用いた *F. tularensis* 種の検出

本研究で使用したマイクロアレイは *F. tularensis* subsp. *tularensis* strain schu をレファレンス株として設計し、*F. tularensis* 株が全て検出できるように作成した。そこで、*F. tularensis* の5株及び *F. philomiragia* の1株のゲノムDNAをOmniPlex WGA法にて増幅し蛍光ラベル化後、マイクロアレイにハイブリさせた(図8)。その結果、設計当初の目的どおりに *F. tularensis* の5株は、マイクロアレイで検出可能であった。一方、*F. philomiragia* 029株は *F. tularensis* を検出するためのマイクロアレイプローブとは反応しなかった。

F. tularensis に対する患者血清は、*Brucella* 属バクテリアと交差反応を時折起こすことが知られている。そこで、本研究で作成したマイクロアレイと *Brucella* 属するバクテリアゲノムDNAサンプルとのクロスハイブリを検証した。この結果、このマイクロアレイでは、他属バクテリアサンプルとクロスハイブリ可能性が低いことが示唆された。以上の結果から、本研究におけるマイクロアレイを用いた検出では、

非特異反応は検出されなかった。

食品中に含まれる病原体を検出するためのマイクロアレイの開発

F. tularensis 及び E. coli を標的としたマイクロアレイでは、各バクテリアを特異的に検出可能であった。この設計方法を踏襲し、鳥インフルエンザウイルス HA 及び NA 遺伝子を型別に検出するマイクロアレイプローブを設計した (表 3、4)。60 塩基のマイクロアレイプローブは、約 92~95% 以上ホモロジーを有している相補鎖と反応することが知られている。そこで、鳥インフルエンザウイルスの HA 及び遺伝子を標的としたマイクロアレイプローブは、全て BLAST 検索を行い、その結果を The Influenza Sequence Database

(<http://www.flu.lanl.gov/>) に登録されている鳥インフルエンザ株と Accession number で関連付け総当りで調査した (図 10、11 及び表 5、6)。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。

D. 考察

4 種類の WGA について、バクテリアのゲノム DNA から得られる差物量にばらつきが見られるものの、全ての WGA で 1 µg 以上の増幅産物が得られることを確認した。4 種類の WGA 法では、マイクロアレイサンプルとして必要な増幅効率を有していた。しかし、リアルタイム PCR を用いた増幅時の偏り検証の結果、DOP-PCR はゲノム DNA を偏って増幅していると推測された。DOP-PCR についてプライマー濃度の検討、ポリメラーゼの変更、プログラムの変更等の検討を行ってみたが、増幅時の偏りが見られた。

さらに DOP-PCR における増幅時の偏りは、マイクロアレイに反映していた。Phi29 v1、Phi29 v2、OmniPlex WGA 法による増幅では、ゲノム DNA を均一に増幅している事が考えられた。マイクロアレイにおける検出では、OmniPlex WGA 法による増幅産物が標的遺伝子に対するシグナル強度及び、シグナルの均一性に優れていた。以上の結果より、マイクロアレイに最適なゲノム DNA の増幅法は、OmniPlex WGA 法であることが示唆された。

標的とした遺伝子がマイクロアレイにて特異的に検出できることが確認されたので、鳥インフルエンザを検出するためのマイクロアレイプローブの設計も行った。更に、ノロウイルス、ロタウイルス、ニューキャスルウイルス、E 型肝炎ウイルス、ベロ毒素遺伝子等の食品に含まれ得る病原体等を検出するためのマイクロアレイプローブを設計中である。今後これらのウイルスやバクテリア等を検出するためのマイクロアレイプローブの設計・作成及び特異性の検証を行う。また、食品サンプルには病原体以外にも食品の核酸が大量に含まれているので、病原体の核酸のみを効率良く増幅する手法の確立を行う。

E. 結論

病原体を検出するためのマイクロアレイに適切な核酸増幅法は、OmniPlex WGA 法である。マイクロアレイを用いれば、特異的に標的病原体核酸を検出できる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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

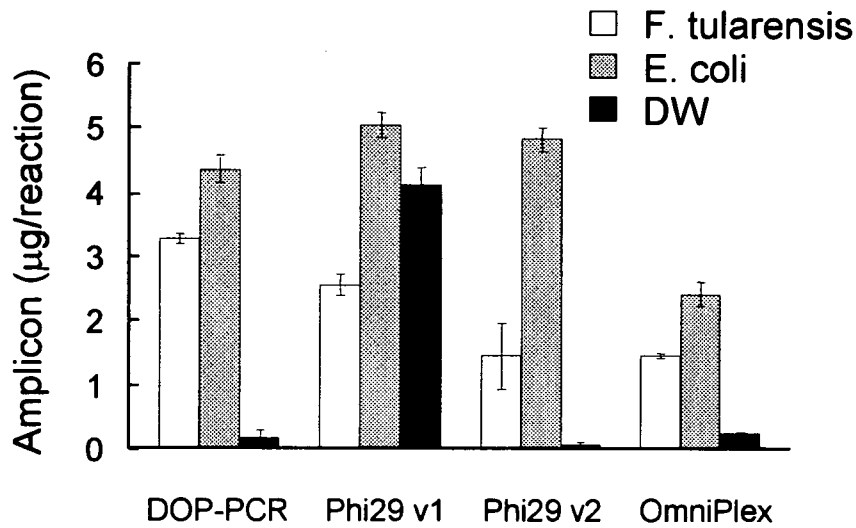


図1 各種WGA法による増幅産物の定量。F. tularensis及びE. coliから抽出した10 ngのゲノムDNAを鋳型として用いて、各WGA法を用いて増幅した産物を定量した。各々の実験は3連で行い、得られた平均産物量と標準誤差(SE)を示した。

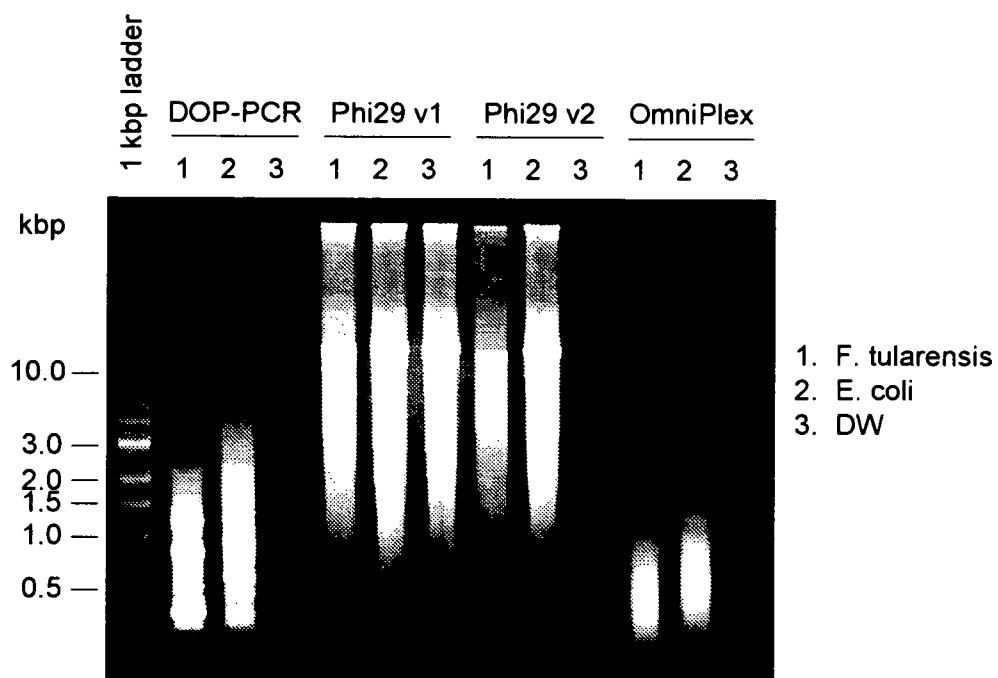


図2 WGA法による増幅産物サイズの確認。F. tularensis及びE. coliから抽出した10 ngのゲノムDNAを鋳型として用いて、各WGA法の増幅産物を電気泳動を行った。

表1 リアルタイムPCRに使用したプライマー

Name	Position	Length	Tm	Final conc.	Sequence
				(μ M)	
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> schu4 (NC_006570)					
ATP synthase subunit A: atpA (FTT0062) / amplicon size: 129bp					
Ft/atpA-F	787	25	58	0.6	5'-TTGACTAAACAAGCATGGGCTTATA-3'
Ft/atpA-P	835	27	69	0.6	5'-FAM-AGACCGCCTGGACGTGAAGCTTATCCT-Tamra-3'
Ft/atpA-R	915	24	59	0.1	5'-GTTGACTCTTGCAGCTCTTTCAAG-3'
succinate dehydrogenase, catalytic and NAD/flavoprotein subunit: sdhA (FT0074) / amplicon size: 76bp					
Ft/sdhA-F	379	24	58	0.8	5'-GGGATGTCAAGGAACATGATCCT-3'
Ft/sdhA-P	404	29	69	0.8	5'-FAM-CTAATCAAGCAGAAAGAACTTGCAGCA-Tamra-3'
Ft/sdhA-R	454	19	59	0.1	5'-GAGCATGCCCGTCTATC-3'
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: gapA (FT1368c) / amplicon size: 108bp					
Ft/gapA-F	579	27	58	0.6	5'-TGCATATACAGGTGACCAAATACTTT-3'
Ft/gapA-P	608	28	70	0.6	5'-FAM-ATGCTCCTCATGCGAAAAATGACTTCCG-Tamra-3'
Ft/gapA-R	686	24	59	0.1	5'-GCAGCACCAGTTGAGTTAGGTACA-3'
<i>Escherichia coli</i> K12 (NC_000913)					
putative outer membrane protein: ycdS (b1024) / amplicon size: 75bp					
Ec/ycdS-F	724	20	59	0.6	5'-CCTACGCGCAGTGAAAGTGA-3'
Ec/ycdS-P	754	19	69	0.6	5'-FAM-ATTGCCGATCGGCCCTCG-Tamra-3'
Ec/ycdS-R	798	25	60	0.1	5'-CAGAATTTCTAATGCAGCGTATTGG-3'
putative fimbrial-like protein: ybgD (b0719) / amplicon size: 69bp					
Ec/ybgD-F	192	21	59	0.6	5'-CCGGGAGCATCATAGCAATAA-3'
Ec/ybgD-P	215	23	69	0.6	5'-FAM-TGGCCGTCGACATTCGCTTGATC-Tamra-3'
Ec/ybgD-R	260	22	59	0.1	5'-TCAGAAGCAGGCAGATCACAGT-3'
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: gapA (b1779) / amplicon size: 78bp					
Ec/gapA-F	20	20	59	0.6	5'-TCAACGGTTTTGGCCGTATC-3'
Ec/gapA-P	42	24	69	0.6	5'-FAM-TCGATTGTTTTCCGTGCTGCTCA-Tamra-3'
Ec/gapA-R	97	22	60	0.1	5'-TGATTGCAACGATCTCGATGTC-3'

-F: Forward primer, -R: Reverse primer, -P: Taqman probe.

プローブは、5'末端に6-carboxy-fluorescein (FAM)及び3'末端にquencher (Tamra)ラベルした。

プライマー及びプローブは、Primer Express softwareを用いて設計した。

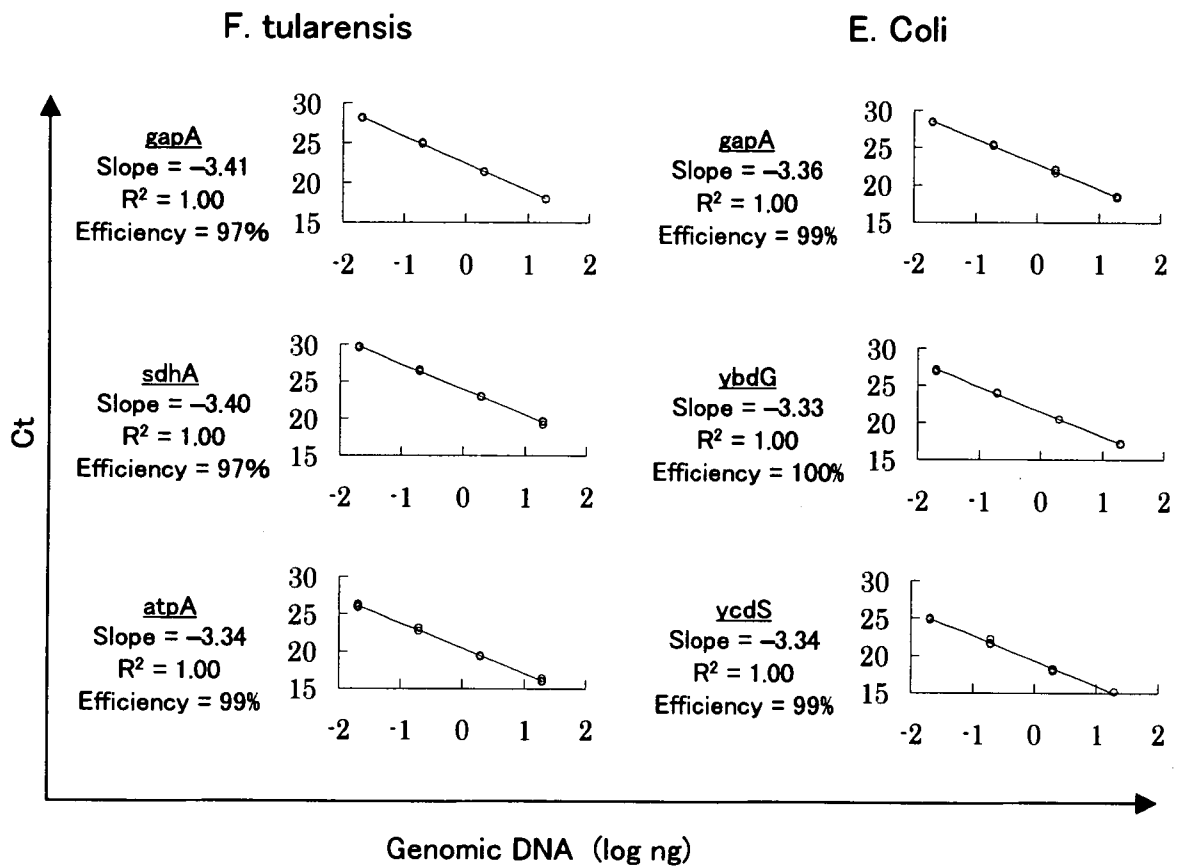


図3 リアルタイムPCRの増幅効率。WGAによる増幅の偏りを $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法で検証を行うにあたり、プライマーとTaqmanプローブを用いた増幅効率の測定を行った。*F. tularensis*及び*E. coli*のゲノムDNAを20ng~2pgまで10倍段階希釈した鋳型を用いて、リアルタイムPCRを行った。増幅効率 (Efficiency)は、 $(10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$ として算出した。本試験での増幅効率は、約100%だった。

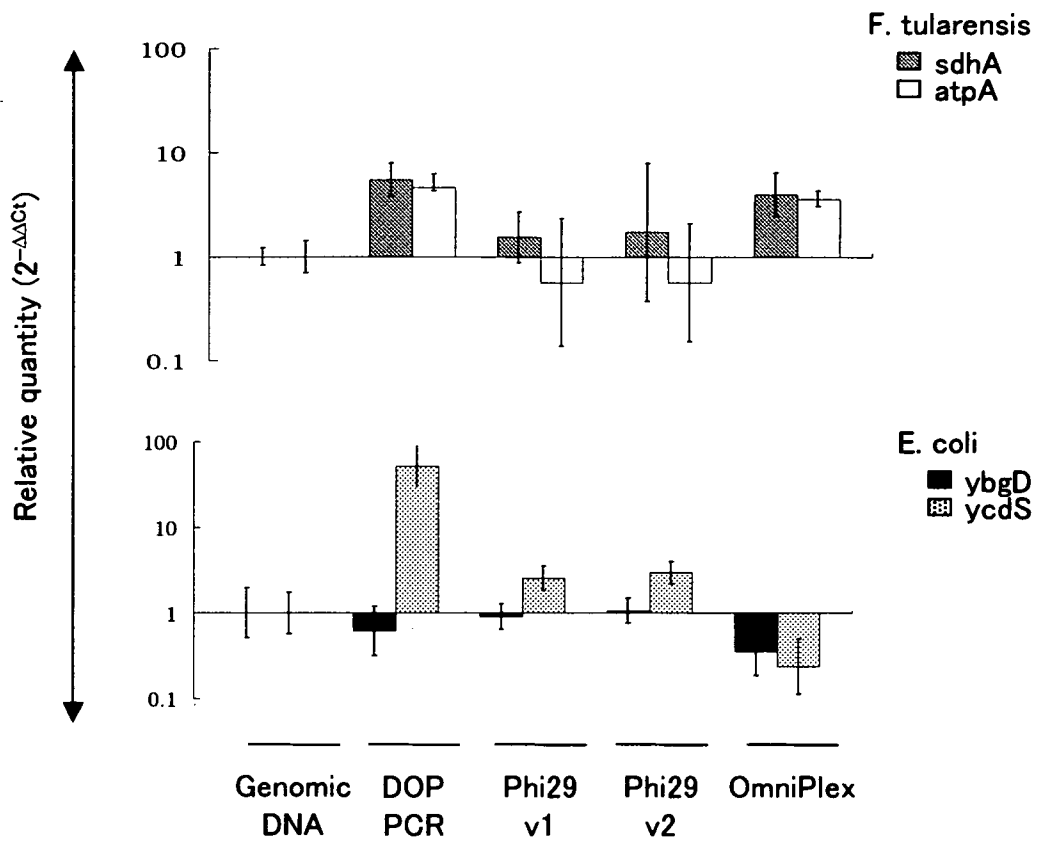


図4 4種類のWGA法における増幅時における偏りの測定。図に示した遺伝子は、 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法を用いて各バクテリアのgapA遺伝子にて標準化(normalization)を行い、gapA遺伝子の相対比として示した。このリアルタイムPCRには、20ngのゲノムDNA又は100倍希釈した各WGA法により増幅した反応溶液を2 μ l使用した。試験は3連で行い、各遺伝子のgapA遺伝子に対する増幅相対平均値及び最大最小値を示した。縦軸の値は1に近いほど増幅時の偏りは少ない。