

Borghan, M. A., Mori, Y., El-Mahmoudy, A-B., Ito, N., Sugiyama, M., Takewaki, T. & Minamoto, N.	Induction of Nitric Oxide Synthase by Rotavirus Enterotoxin NSP4: Implication for Rotavirus Pathogenicity.	J. Gen. Virol.			In press
Okazaki, K	Proteolytic cleavage of glycoprotein B is dispensable for in vitro replication but required for syncytium formation of pseudorabies virus.	J. Gen. Virol.			in press

## IV. 平成19年研究報告書

## 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ロタウイルスやE型肝炎ウイルスについても調査を実施することも目的として19年度は以下のような成果が得られた。

食肉・食鳥衛生検査所等でも、簡便、迅速かつ安定した結果が得られるウイルス検査としてPCRによるウイルス遺伝子検出法を基本技術とし、これまでに、臓器の乳剤化、ウイルス核酸の抽出、PCR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した。今年度は、実際に野外材料を用いて、設定した実験条件の適性を調べた。日本の養豚農場で常在化しているDNAウイルスのブタサーコウイルス2型とRNAウイルスのE型肝炎ウイルスについて、イノシシ108頭の肝臓を試験したところ、それぞれ4頭と7頭で陽性となり、他の解析から両ウイルスが低頻度に検出されることが予想されていたものと同程度の検出結果が得られ、設定した実験条件の有効性が確かめられた。

多種類の病原体ゲノムを一括して検出するためにマイクロアレイ技術の応用を試みており、これまでに古細菌、原虫、細菌、ウイルス合計1133株の全長ゲノム配列とタンパク毒素等74遺伝子から特異的かつ最適なプローブを設計選別し38,986プローブを搭載したマイクロアレイを作出した。この病原体検出用マイクロアレイの有効性を探る基礎データ取得のためにインフルエンザウイルス、コクシエラ (*Coxiella burnetii*)、大腸菌、エルシニア (*Yersinia enterocolitica*) および野兔病菌のゲノム核酸を用いて検討した結果、これらの病原体が特異的に検出可能であることが示された。

高病原性鳥インフルエンザの検査について迅速診断キットを検討した。人用キットと開発中のH5亜型鳥インフルエンザ特異キットを調べたところ鶏肉乳剤中の検出限界はともに $10^5$  EID<sub>50</sub>/0.1 mlであった。また、海外市販のキットの検出感度は人用キットに比べ10から100倍低かったがH5亜型やニューカッスル病ウイルス検出できることは感度を注意すれば利用できると考えられた。本研究で開発した鳥インフルエンザウイルスM遺伝子を検出するRT-LAMP法の鶏肉中での検出感度を調べたところ $10^3$  EID<sub>50</sub>/0.1 mlであった。さらに実験感染鶏の各臓器（感染価 $10^{8.5}$ ~ $10^{6.0}$  EID<sub>50</sub>/g）について検出を試みたところすべてで検出可能であった。

健康なウシにおけるA群ロタウイルスの感染動態についての調査を実施した。nested PCRの条件を再検討し約100倍高感度な方法で健康なウシの糞便2146例について、ロタウイルスVP4遺伝子の検出を試みた。陽性44例のVP4遺伝子の塩基配列を解読した結果、ウイルスの遺伝子型はP[5]、P[11]、P[14]と考えられた。さらに、同一農場で検出され

たロタウイルスに遺伝子組換え体が存在し、非流行時であってもウイルス分節の組換えが起きていることが示された。食肉に供される健康なウシにおいても、下痢症の起因となるロタウイルスが常在しており、感染環を形成していることが明らかとなった。

2007年4月～2008年1月、北海道日高地区で捕獲されたエゾシカ321頭の血清をE型肝炎ウイルス様粒子抗原ELISAに供した。その結果、22検体(6.9%)が抗体陽性であった。調査域には養豚場が点在し、少なくとも2件は放牧養豚を実施している。日高地区のエゾシカの抗HEV抗体保有状況にはブタとの関連が強く示唆される。

## 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 岐阜大学応用生物科学部・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検査所での検査技術の普及の遅れや迅速性、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検査所等でも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法検出のための条件検討の検証：前年度まで検討した市販の機器や試薬を利用して、臓器の乳剤化、ウイルス核酸の抽出、PCRによるウイルス遺伝子の検出、の各過程の至適実験条件について、今年度は実際に野外材料を用いて、実験条件の適性を調べた。検査したウイルスはDNAウイルスであるブタサーコウイルス2型とRNAウイルスであるE型肝炎ウイルスで、両ウイルスとも日本の養豚農場で常在化しているウイルスである。調査した動物はイノシシで、他の解析から両ウイルスが低頻度に検出されることが予想されている約100頭の肝臓について試験した。

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の応用：古細菌、原虫、細菌、ウイルス合計1133株の全長ゲノム配列とタンパク毒素等74遺伝子から特異的かつ最適なプローブを設計・選別し38,986プローブを搭載したマイクロアレイを作成した。この病原体検出用マイクロアレイの有効性を探る基礎データ取得のためにインフルエンザウイルス、コキシエラ(*Coxiella burnetii*)、大腸菌、エルシニア(*Yersinia enterocolitica*)および野兔病菌のゲノム核酸での反応性を調べた。

3. 人用キットならびに開発中及び国外市販鳥インフルエンザ迅速診断キットの有効性評価：ヒト

用インフルエンザ迅速診断キット（エスプラインインフルエンザ A&B-N、富士レビオ）と開発中の H5 亜型鳥インフルエンザ特異キットの鶏肉乳剤中でのウイルスの検出限界を調べた。また、海外市販のキット（Anigen Rapid AIV Ag/H5 AIV Ag および Anigen Rapid AIV Ag/ NDV Ag、ANIMAL GENETICS 社）と国内人用キットのウイルス検出感度を調べた。

4. 鳥インフルエンザウイルス M 遺伝子を検出する RT-LAMP 法の評価：本研究で開発した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)法を用いて、鶏肉乳剤中のウイルス検出感度を RT-PCR 法と比較した。また、実験感染鶏の各臓器について検出を試みた。

5. 健康牛糞便における A 群ロタウイルス遺伝子の検出と解析：健康なウシにおける A 群ロタウイルスの感染動態について nested PCR の条件を再検討し約 100 倍高感度な方法で健康なウシの糞便 2146 例について、ロタウイルス VP4 遺伝子の検出を試みた。陽性 44 例の VP4 遺伝子の塩基配列を解読解析した。

6. エゾシカにおける E 型肝炎ウイルスの感染状況調査：2007 年 4 月～2008 年 1 月、北海道日高地区で捕獲されたエゾシカ 321 頭の血清を E 型肝炎ウイルス様粒子抗原 ELISA に供し感染状況を調査した。

### C. 研究結果

1. ブタに感染するウイルスの PCR 法検出のための条件検討の検証：前年度まで検討した市販の機器や試薬を利用した臓器の乳剤化、ウイルス核酸の抽出、PCR によるウイルス遺伝子の検出の各過程の実験条件の適性を調べるためにイノシシの肝臓 108 検体中のブタサーコウイルス 2 型 (DNA ウイルス) と E 型肝炎ウイルス (RNA ウイルス)

のゲノム検出を行い、それぞれ 4 頭と 7 頭で陽性となった。両ウイルスとも日本の養豚農場で常在化しているウイルスでイノシシにおいては、他の解析から両ウイルスが低頻度に検出されることが予想されている結果と同等であり試験方法の有効性が確かめられた。

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：古細菌、原虫、細菌、ウイルスやタンパク毒素遺伝子 38,986 プローブを搭載した試作マイクロアレイを作出した。この病原体検出用マイクロアレイを用いてインフルエンザウイルス、コクシエラ (*Coxiella burnetii*)、大腸菌、エルシニア (*Yersinia enterocolitica*) および野兔病菌のゲノム核酸での反応性を調べたところ該当するスポットにおいて高い蛍光シグナルが認められた。

3. 人用キットならびに開発中及び国外市販鳥インフルエンザ迅速診断キットの有効性評価：ヒト用インフルエンザ迅速診断キット（エスプラインインフルエンザ A&B-N、富士レビオ）と開発中の H5 亜型鳥インフルエンザ特異キットの鶏肉乳剤中でのウイルスの検出限界を調べたところ鶏肉乳剤中の検出限界はともに  $10^5$  EID<sub>50</sub>/0.1 ml であった。また、海外市販のキット Anigen Rapid AIV Ag/H5 AIV Ag および Anigen Rapid AIV Ag/ NDV Ag、ANIMAL GENETICS 社の検出感度は人用キット（エスプラインインフルエンザ A&B-N、富士レビオ）に比べ 10 から 100 倍低かった。H5 亜型検出ではさらに感度が低かったが交差反応はなかった。

4. 鳥インフルエンザウイルス M 遺伝子を検出する RT-LAMP 法の評価：本研究で開発した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)法を用いて、鶏肉乳剤中のウイルス検出感度を RT-PCR 法と比較したところいずれの方法でも  $10^3$  EID<sub>50</sub>/0.1 ml のウイルス量が検出可能であった。また、実験感染鶏の各臓器につい

ではいずれの検体でもウイルスゲノムの検出陽性となった。

5. 健康牛糞便におけるA群ロタウイルス遺伝子の検出と解析：健康なウシにおけるA群ロタウイルスの感染動態について nested PCR の条件を再検討し約 100 倍高感度な方法に改良できた。この方法で 2006 年 4 月から 2007 年 6 月に採取された、岐阜県内の健康なウシから採取した糞便 2146 例について、ロタウイルス VP4 遺伝子の検出を試み、44 例で陽性となった。検出された VP4 遺伝子の塩基配列を解読した結果、これらのウイルスの遺伝子型は P[5]、P[11]、P[14]と考えられた。さらに、同一農場で検出されたロタウイルスに遺伝子組換え体が存在し、非流行時であってもウイルス分節の組換えが起きていることが示された。

6. エゾシカにおける E 型肝炎ウイルスの感染状況調査：2007 年 4 月～2008 年 1 月、北海道日高地区で捕獲されたエゾシカ 321 頭の血清を E 型肝炎ウイルス様粒子抗原 ELISA に供し感染状況を調査したところ 22 検体 (6.9%) が抗体陽性であった。4 月から 7 月に高い陽性率だった。山岳部では 19 頭中 1 頭であったが平野部では 95 頭中 12 頭であった。抗体陽性率と年齢に相関は認められなかった。

#### D. 考察

前年度まで行った臓器材料調整からウイルス遺伝子の検出に至る過程の至適実験条件を検討した結果を基に、一定の手法を決め、野外材料について PCV2 ゲノム (DNA ウイルス) と HEV ゲノム (RNA ウイルス) の検出を試みた。それぞれの検出率は 4/108 頭、7/108 頭であり、この結果は我々が通常行っている方法——乳剤化をガラスホモジェナイザー、核酸抽出をフェノール系試薬——で行った時とほぼ同等であった。従って、設定条件はほぼ妥当だと判断した。

試作した病原体検出マイクロアレイでインフ

ルエンザウイルス、Q 熱の原因菌 (*Coxiella burnetii*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、エルシニア (*Yersinia enterocolitica*)、および野兔病菌 (*Francisella tularensis*) のゲノム核酸の検出ができたが、臨床サンプルや野外サンプル等の雑多な核酸が含まれているサンプルにおいて、の検証と改良などが今後必要であると考えられた。

鳥インフルエンザウイルスの検出に人用インフルエンザ迅速診断キットと開発中の H5 亜型検出キットの鶏肉乳剤での感度また、海外のキットの感度を調べたがウイルス分離法と比して 1/10,000 程度と著しく検出感度が低く、迅速簡易ではあるが使用にあたっては感度を十分に考慮する必要がある。さらに抗体の選択等により検出感度を向上させる改良などが必要と考えられた。

本研究で設計した鳥インフルエンザウイルスの M 遺伝子を増幅する RT-LAMP 法の検出感度は鶏肉乳剤中の H5 鳥インフルエンザウイルスで RT-PCR 法と同じ  $10^3$  EID<sub>50</sub>/0.1 ml であった。さらにウイルスが鶏肉乳剤中に存在しても、PBS 中に存在しても検出限界の差はみられず、RT-LAMP 法が食肉中の鳥インフルエンザウイルスを検査するのに有用であることが示された。また、ウイルス感染鶏各臓器のすべてで検出できたが、ウイルス量の少ない時期での検討や RNA 抽出方法や供試部位についても検討が必要と考えられた。

健康なウシの糞便からロタウイルス VP4 遺伝子が 44 例で陽性となった。検出されたウイルスの遺伝子型は P[5]、P[11]、P[14]と考えられた。さらに、同一農場で検出されたロタウイルスに遺伝子組換え体が存在し、非流行時であってもウイルス分節の組換えが起きていることが示された。健康なウシにおいても、下痢症の起因となるロタウイルスが常在しており、感染環を形成していることが明らかとなった。

昨年度に続き北海道日高地方のエゾシカで抗 HEV 抗体を保有することが示されブタの関与が強く示唆されることからエゾシカへの感染経路を明らかにするために養豚場での調査が望まれ

る。

## E. 結論

PCR 検査法における臓器の乳剤化、ウイルス核酸の抽出、PCR 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実際に野外材料で調べ、設定した実験条件の有効性が確かめられた。

原虫、細菌、ウイルスなどの 38,986 プローブを搭載した病原体検出マイクロアレイを作出し、インフルエンザウイルスや病原細菌などのゲノム核酸を特異的に検出できた。

人用インフルエンザ迅速診断キットと開発中の H5 亜型鳥インフルエンザ特異キットでの鶏肉乳剤中のウイルス検出限界はともに  $10^5$  EID<sub>50</sub>/0.1 ml であった。また、本研究で開発した鳥インフルエンザウイルス検出 RT-LAMP 法の鶏肉中での検出感度は  $10^3$  EID<sub>50</sub>/0.1 ml で、実験感染鶏の各臓器で検出可能であった。

健康な牛糞便の 2146 例中 44 例で P[5]、P[11]、P[14] 遺伝子型ロタウイルスが PCR で検出された。エゾシカ 6.9% が抗体陽性で 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。

## 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

加藤花名子、宮崎綾子、吉井雅晃、土屋公幸（東京農業大学）、仲谷 淳、金森弘樹、李天成、武田直和、恒光裕、池田秀利。野生動物における抗 E 型肝炎ウイルス抗体の保有状況調査。第 144 回日本獣医学会学術集会 2007.9（酪農学園大）

伊藤壽啓：野鳥による H5N1 ウイルスの伝播について 第 143 回日本獣医学会学術集会緊急シンポジウム「新たな高病原性鳥インフルエンザの発生をうけて」つくば, 2007

伊藤壽啓：高病原性鳥インフルエンザウイルスの国内発生と感染経路。琴浦町農林水産業活性化研究会講演, 鳥取, 2007

伊藤 壽 啓 : Pathogenesis of avian influenza virus. 山口大学大学院連合獣医学研究科平成 19 年度共通ゼミナール特別講演. 鳥取, 2007

伊藤壽啓：国内野鳥のウイルス検索。新興・再興感染症連携群シンポジウム「高病原性鳥インフルエンザウイルスの伝播解明と新型インフルエンザ対策研究への取組」東京, 2007

梶原将大、迫田義博、伊藤壽啓、高田礼人、伊藤公人、岸田典子、五十嵐学、磯田典和、曾田公輔、R. G. Webster、喜田宏：動物インフルエンザのグローバルサーベイランスと全ての亜型ウイルスライブラリーの構築。第 144 回日本獣医学会学術集会。江別市。2007

伊藤壽啓：「センター紹介、国内発生と進入経路」鳥取大学イブニングセミナー「鳥インフルエンザは怖くない!？」東京。2007

伊藤壽啓：野鳥と鳥インフルエンザとの関わり。平成 19 年度秋季全国鶏病技術研修会。前橋市。2007

新矢恭子、村本裕紀子、Yuwei Gao、Guohua Deng、Shufang Fan、Qiyun Zhu、Hualan Chen、野田岳志、田村大輔、伊藤啓史、伊藤壽啓、河岡義裕：アカゲザルを用いた中国ヒト由来 H5N1 鳥インフルエンザウイルスの病原性解析。第 55 回日本ウイルス学会学術集会。札幌市。2007

梶原将大、迫田義博、伊藤壽啓、高田礼人、岸田典子、五十嵐学、磯田典和、曾田公輔、喜田 宏 動物インフルエンザのグローバルサーベイランスと全ての亜型ウイルスライブラリーの構築。第 55 回日本ウイルス学会学術集会。札幌市。2007

伊藤壽啓：海外の AI 発生状況報告及び実態調査報

告, 日本採卵養鶏産業研究会第五回研究セミナー, 福島県二本松市, 2007

伊藤壽啓: 高病原性鳥インフルエンザの感染経路究明～特に野鳥での調査を中心にして. 第 35 回東北家畜衛生協議会検討会. 秋田市. 2007

伊藤壽啓: 鳥インフルエンザの現状と感染防除対策. 山口県高病原性鳥インフルエンザ防疫強化緊急対策に係る野生動物等の防除に関する検討会講演. 山口市. 2007

伊藤壽啓: 高病原性鳥インフルエンザと野鳥との関わりについて. 東海北陸地区鶏病技術研修会特別講演. 名古屋. 2007

伊藤壽啓: 鳥インフルエンザの感染経路とその対策について. 平成 19 年度系統ブロイラー事業九州三県研修会講演. 佐賀市. 2007

山本美江、堀田明豊、藤田修、宇田晶彦、山田章雄、棚林 清。インフルエンザ迅速診断キットの鳥類由来 H5N1 亜型ウイルスでの反応性の比較。第 145 回日本獣医学会学術集会 2008 年 3 月 (麻布大)

安部昌子、長谷部文子、伊藤直人、野村亜利、前田昌美、高須正規、村瀬哲磨、宮澤清志、杉山誠：成牛における A 群ロタウイルスの動態調査、第 144 回日本獣医学会学術集会、2007 年 9 月 (江別)

大澤宜明、黒田和道、芝田敏克、原田勇一、井上恵美、岡崎克則、清水一史 「サリチル酸ナトリウムによるインフルエンザウイルス mRNA 核外輸送に対する阻害機構の解明」第 55 回日本ウイルス学会 2007 年 10 月 (札幌市)

富山大輔、川口紘史、浅野逸郎、井上恵美、岡崎克則 「エゾシカにおける E 型肝炎ウイルスの血清疫学調査」第 55 回日本ウイルス学会 2007 年 10 月 (札幌市)

#### 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：現在、食肉・食鳥処理施設では詳細なウイルス検査はなされていないが、この研究では、仮にこれから行うとしたらどのような方法で、簡便、迅速かつ安定した結果が得られるウイルス検査が可能かを調べてきた。PCRによるウイルス遺伝子検出法を基本技術とすることにし、前年度まで、市販の機器や試薬を利用して、臓器の乳剤化、ウイルス核酸の抽出、PCR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した。その成果を踏まえ、今年度は実際に野外材料を用いて、設定した実験条件の適性を調べた。検査したウイルスはDNAウイルスであるブタサーコウイルス2型とRNAウイルスであるE型肝炎ウイルスで、両ウイルスとも日本の養豚農場で常在化しているウイルスである。調査した動物はイノシシで、他の解析から両ウイルスが低頻度に検出されることが予想されていた。約100頭の肝臓について試験したところ、DNAウイルスでもRNAウイルスでも良好な検出結果が得られ、設定した実験条件の有効性が確かめられた。

#### A. 研究目的

食肉・食鳥処理場においても実施可能な簡便で迅速に行えるウイルス検査の一つはPCR法による病原体遺伝子検出である。本研究は多数の食肉検査機関で安定したPCR検査結果を得られるように、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た。

前年度まではウイルス遺伝子の検出に至る過程（臓器の乳剤化→ウイルス核酸の抽出→PCR法）を中心に至適条件を探った。今年度は、DNAウイルスであるブタサーコウイルス2型（PCV2）遺伝子を検出するリアルタイムPCR法を用いて検出の定量性を

検証するとともに、我々が設定したウイルス核酸抽出条件で、実際にイノシシ臓器材料についてDNAウイルス、RNAウイルスを検出する野外試験を行った。

#### B. 研究方法

##### 1) 肝臓サンプルの乳剤化。

小遠心管にイノシシ肝臓100mgと細胞培養用培地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2つに分け、一つを予備のウイルス検査材料用に保存し、一つを核酸抽出用に用いた。

## 2) ウイルス核酸の抽出。

P社製自動核酸抽出装置でRNA/DNA抽出キット(GC series Magtration-MagaZorb RNA Common Kit)を用いてウイルスRNAおよびウイルスDNAを同時に抽出した。

## 3) ウイルス遺伝子の検出

今回の実験ではRNAウイルスであるE型肝炎ウイルス(HEV)、DNAウイルスのブタサーコウイルス2型(PCV2)を検出した。HEVゲノムは肝臓RNA/DNAサンプルをランダムプライマーで逆転写酵素処理を行った後、HEV特異的PCRプライマーで1st PCR、nested PCRで検出した。PCV2ゲノムは肝臓RNA/DNAサンプルから恒光らのreal-time PCR法によってゲノムを定量的に検出した。

## C. 研究結果

### 1) PCV2 用 real-time PCR 法の定量性についての実験的検討。

用いた PCV2 用 real-time PCR 法がブタ肝乳剤から抽出した核酸であっても定量性を持って検出できるか否かを実験的に検討した。

高濃度 PCV2 ウイルス粒子が含まれているブタ血清サンプル一定量と PCV2 陰性のブタ肝乳剤(最終濃度 20%, 16.6%, 13.2%, 9.4%, 6.6%, 0%)を混ぜ、設定条件で核酸抽出し、real-time PCR で抽出された PCV2 ゲノムコピー数を比較すると、ほぼ同程度( $\sim 10^7$  copy/reaction)の検出効率であった(図1)。

また、10倍段階希釈した PCV2 サンプルに肝乳剤を 20%、6.6%混ぜたサンプルから回収されたウイルスゲノムは、肝乳剤の混ぜないサンプルと同様に定量的に検出された(図2)。10倍段階希釈した PCV2 サンプルについて、用いた real-time PCR 法と通常の PCR 法の検出限界を比較すると、同程度の検出限界を示した。

これらの結果から、用いた PCV2 用

real-time PCR 法は、比較的広い臓器乳剤濃度範囲に適用できると考えられた。

### 2) イノシン肝臓サンプルを用いた設定条件の有効性検討。

これまで行った臓器乳剤作製から PCR 法を行うまでの工程の様々な実験条件検討を踏まえ、一定の手法を設定して、イノシン 108 個体の肝臓から DNA ウイルスと RNA ウイルスの検出を試みた。

PCV2 ゲノム(DNA ウイルス)は 4/108 頭から検出され、HEV ゲノム(RNA ウイルス)は 7/108 頭から検出された(表1)。

## D. 考察

前年度まで行った臓器材料調整からウイルス遺伝子の検出に至る過程の至適実験条件を検討した結果を基に、一定の手法を決め、野外材料について PCV2 ゲノム(DNA ウイルス)と HEV ゲノム(RNA ウイルス)の検出を試みた。それぞれの検出率は 4/108 頭、7/108 頭であり、この結果は我々が通常行っている方法——乳剤化をガラスホモジェナイザー、核酸抽出をフェノール系試薬——で行った時とほぼ同等であった。従って、設定条件はほぼ妥当だと判断した。

我々が選んだ細胞破碎機や自動核酸抽出機を使った方法は他の方法に比べて幾つかのメリットがある。

- 1) 機械操作部分が多く、また、規格化した試薬を使用するため、人的操作によるデータのバラツキが少なくなる。
- 2) 検査者が直接サンプルに接触する機会が少ないため、PCR法で問題になるDNAのコンタミの危険性が少なくなる。
- 3) 検査者の熟練度をさほど高く求めなくとも良い。
- 4) 核酸抽出で一般に汎用されるフェノールを廃棄するには特別な廃棄業者に依頼する必要があるが、この自動核酸抽出

出機で用いる核酸抽出キットはフェノールを使わないため一般排水に廃棄可能である。

これらのメリットは畜場や食鳥処理場などでウイルス検査を始める場合に特に重要であろう。

今回の野外材料調査では対照ウイルスをPCV2とHEVに限定して行った。いずれも養豚に常在し、イノシシでもある程度の感染が想定されたため、この野外材料調査には適当と思われたからである。畜場や食鳥処理場での検査は多数のウイルスを対照にしなければならない。その時、検査法を通常のPCR、RT-PCRではなく、リアルタイムPCR（RT-PCR）での検出系を選択するのが適切だと思われる。

リアルタイムPCR（RT-PCR）は遺伝子配列を解析することができないため、データの信頼性を直接確認できないというデメリットがあるが、畜場や食鳥処理場での検査としては幾つかのメリットが挙げられる。

- 1) 通常のPCR法では必要となるアガロースゲル作製器、アガロースゲル電気泳動装置、トランスイルミネーター、ゲル撮影装置、など多数の機器やスペースが不必要で、操作も単純である。
- 2) DNAのバンドを観察するという主観的判断ではなく、数値でウイルスコピー数の結果がでるため、判断に熟練を必要としない。

我々の実験では、HEV（RNAウイルス）とPCV2（DNAウイルス）についてリアルタイムPCR（RT-PCR）法の有効性を確認し、検出感度は通常のPCR（RT-PCR）法と同等で、定量性も低い肝臓乳剤濃度であれば問題ないと判断した。一方、リアルタイムPCR（RT-PCR）法の限界は、遺伝子配列が多様なウイルス（例えばHEV）では検出漏れや他のウイルスとの交叉性を十分考慮しなければならないことなどが挙げられる。

## E. 結論

前年度までに、食肉・食鳥処理場で実施可能な簡便で迅速なウイルス検査としてPCR法を選び、市販の機器・試薬を用いた実験条件の検討をした。最適と思われる実験条件で実際にイノシシ肝臓についてウイルス遺伝子検出を実施した。PCV2ゲノム（DNAウイルス）は4/108頭から検出され、HEVゲノム（RNAウイルス）は7/108頭から検出された。この結果は、PCRに至るまでの各工程（臓器の乳剤化、ウイルス核酸の抽出、PCR法）で設定した条件が有効であることを裏付けるものである。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表
  - 1) 野生動物における抗E型肝炎ウイルス抗体の保有状況調査。第144回日本獣医学会学術集会 2007.9 加藤花名子、宮崎綾子、吉井雅晃、土屋公幸（東京農業大学）、仲谷 淳、金森弘樹、李天成、武田直和、恒光裕、池田秀利

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他  
なし

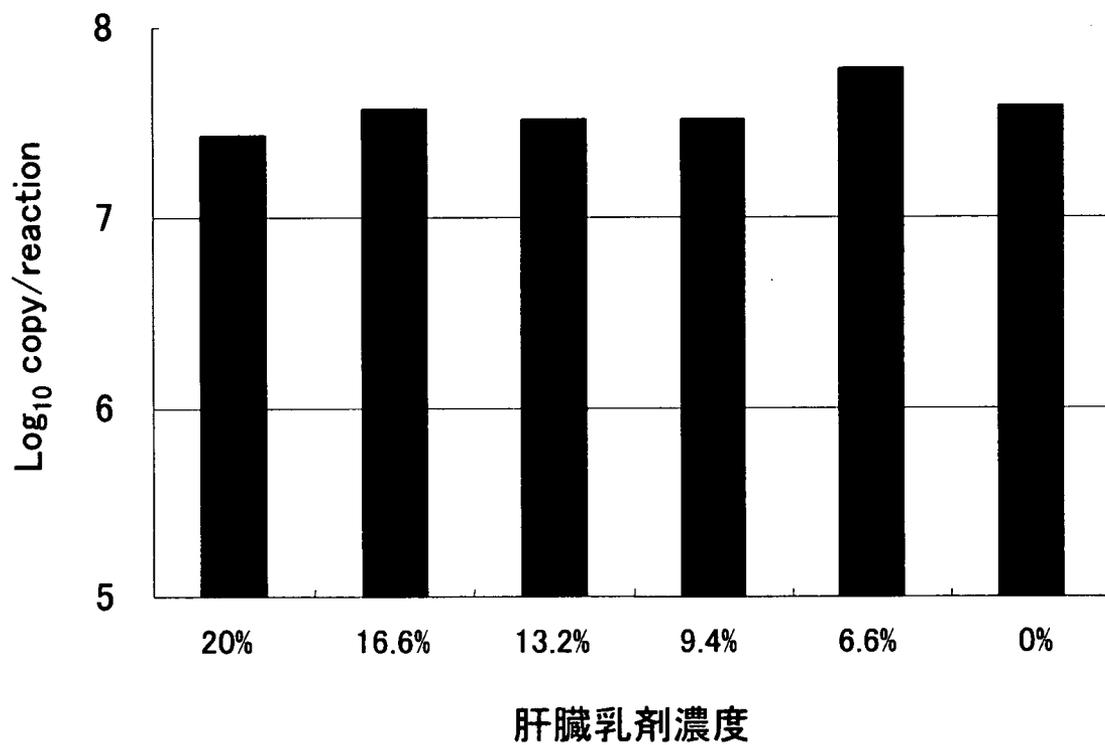


図1 一定量ブタサーコウイルス2型に肝乳剤を異なる濃度で混ぜたサンプルからのウイルスゲノムの検出

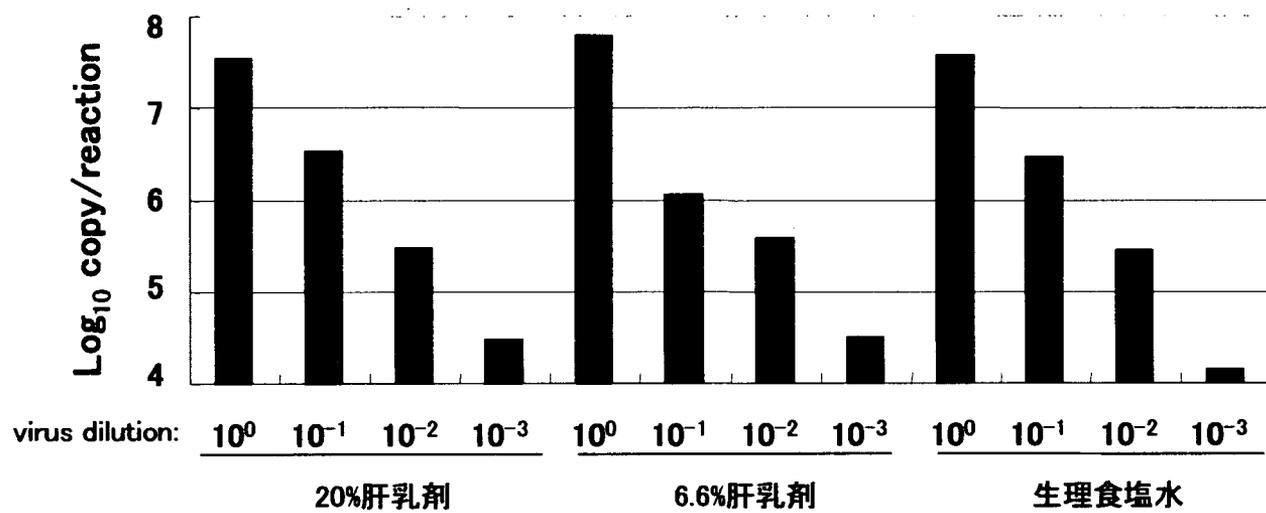


図2 段階希釈したブタサーコウイルス2型を混ぜた肝臓乳剤からウイルスゲノムの検出

表1 イノシシ108頭の肝臓から検出されたブタサーコウイルス2型、E型肝炎ウイルスゲノム

Porcine circovirus type 2	
Boar no.	copy no./3mg liver
1	7090000
2	8027
3	5037
4	120

Hepatitis E virus	
Boar no.	1st PCR/nested PCR
1	+/+
2	+/+
3	+/+
4	+/+
5	-/+
6	-/+
7	-/+

### 病原体を検出するためのマイクロアレイの開発

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：本研究では食品に含まれる多種類の病原体を同時に検出するために、マイクロアレイの応用を試みている。ゲノムプロジェクトが終了している又は途中の古細菌 30株、原虫9株、細菌422株、ウイルス672株の合計1133株の全長ゲノム配列とタンパク毒素等74遺伝子から特異的かつ最適なプローブを5万超種類設計した。設計した全てのプローブはホモロジー検索を行い、各病原体に対する特異的検出に有効であると推測された38,986プローブを選定し、これらのプローブを搭載したMicroarray for Multiple Detection of Pathogenic Agents (MMDPA) version 1.00 を開発した。本研究では、病原体検出用マイクロアレイプローブが各病原体に対する特異性が確保されている事を明らかにし、その有効性を探る基礎データ取得を目的とした。インフルエンザウイルス、Q熱の原因菌 (*Coxiella burnetii*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、エルシニア (*Yersinia enterocolitica*)、および野兔病菌 (*Francisella tularensis*) のゲノム核酸を用いて検討した結果、これらの病原体は MMDPA で特異的に検出可能であることが示された。

#### 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体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用いられている。しかし、その病原体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疾病の検査では病原体核酸を一括して同定する方法の開発が期待されているが、

マイクロアレイを用いた検出法が最適であると思われた。

マイクロアレイは、数十から数十万遺伝子を標的とした相補的な核酸を固定化したスライドガラスを使用し、蛍光ラベルした核酸試料を会合させ、試料中の目的遺伝子の有無のみならず定量的に検出する方法である。発売当初高価であったマイクロアレイは、近年安価になり中央検査室レベルでの実効性にも現実味が出てきた。そこで数年後の本格的普及価格帯到達前に、ヒト、家畜、家禽等に病原性（ウイルス、細菌、真菌、原虫等）を示す既知の微生物を1回の

検査で一括、簡単、網羅的に同時検出可能なマイクロアレイ開発が待たれている。

本研究では、38,986種類の病原体検出用プローブを搭載したMicroarray for Multiple Detection of Pathogenic Agents (MM DPA) version 1.00 を開発し、その有効性を探る基礎データ取得を目的とした。

## B. 研究方法

### 1. バクテリア及びウイルスからの核酸抽出

本研究で使用した *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。*E. coli* からの DNA 抽出は、DNA Isolation Kit for Cells and Tissue (Roche, Mannheim, Germany) を使用した。*Coxiella burnetii* Ohio、*Francisella tularensis* subsp. *tularensis* SCHU、および *Yersinia enterocolitica* Pa 177 (O9:B2) のゲノム DNA を含む核酸抽出溶液は、国立感染症研究所獣医科学部の藤田博士と今岡博士から分与して頂いた。

インフルエンザウイルス 3 株 (PR8、WSN、A/duck/Hyogo/35/01(H5N1)) は、QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いてゲノム RNA を精製した。

### 2. バクテリア由来ゲノム DNA の増幅

Phi29 DNA ポリメラーゼを用いた増幅には、illustra GenomiPhi V2 Kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ) を使用した。鋳型 DNA として、10 ng の *Coxiella burnetii*、*Francisella tularensis*、および *Yersinia*

*enterocolitica* の核酸を用いた。1  $\mu$ 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  $\mu$ 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。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反応溶液を 10  $\mu$ l 添加し、30°C で 2 時間増幅した後、65°C で 10 分間ポリメラーゼの熱変性処理を行った。増幅後のサンプルは、使用するまで -30°C で保存した。

### 3. マイクロアレイプローブの設計と作成

ゲノムプロジェクトが終了している又は進行中を含む古細菌30株、原虫9株、細菌422株、ウイルス672株の合計1133株の全長ゲノム配列又は一部の塩基配列は、DDBJ (DNA Data Bank of Japan) 又はNCBI (National Center for Biotechnology Information) からダウンロードした。得られた塩基配列は、Array Designer 3.01 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA) へ読み込み、アクセッション No. ごとに 10~500種類のセンス鎖マイクロアレイプローブを設計した。プローブの設計時の条件は、60 mer、 $T_m$  75°C  $\pm$  5.0°C、ヘアピンループ (<-3.0 kcal/mol) 及びセルフダイマー (<-3.0 kcal/mol)、そしてクロスホモロジーは極力避けた。総計5万を超える全てのセンス鎖プローブ候補は ProbeMower (Sympluss, Tokyo, Japan) を用いてホモロジー検索 (BLAST検索) および結果取得を行い、十分な特異性を持つ19,493種類のセンス鎖プローブを選定した。更に、そのアンチセンス鎖プローブとの合計38,986種類のプローブをマイクロアレイに搭載させた。ハイブリダイゼーションの外部評価用に別途400種

類のコントロールスポットを10連でマイクロアレイスライドにプリントした。全てのマイクロアレイスライドはAgilentに生産委託し、44,000プローブ×4アレイ/スライドのレイアウトで作成した。このマイクロアレイスライドは MMPDAと名付けた (図1)。

#### 4. 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

Phi29 DNA ポリメラーゼを用いて増幅した産物やゲノム RNA は、Bioruptor (Cosmo Bio, Tokyo, Japan) で 250W、30 秒インターバルで 30 分間超音波断片化処理を行った。断片化処理を行った核酸サンプルは、熱変性処理後 Ulysis Alexa Fluor 546 Nucleic Acid Labeling Kit (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) を用いて 80°C で 15 分間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、DNA の場合 NucleoSpin ExtractII (MACHEREY-NAGEL, USA) で、RNA の場合 Rneasy mini kit (Qiagen) で精製した。サンプルは 100  $\mu$ l のハイブリダイゼーションバッファー (終濃度: 濃度未知の増幅産物、6 $\times$  SSC、5 $\times$  Denhardt's solution、50 mM sodium phosphate、0.5% SDS、及び 20% formamide) に調整し、95 °C で 3 分間熱処理を行い 2 分間氷上で静置、以降使用するまで 50 °C で保温した。100  $\mu$ l のハイブリダイゼーションサンプル溶液はガスケットスライド (Agilent) の上に拵げ、マイクロアレイスライドと張り合わせホルダーにセットした。ハイブリダイゼーションは Hybridization Oven (Agilent) を用いて 50°C、毎分 10 回転で一晩行った。ハイブリダイゼーション後のスライドは、0.5% SDS を含む 2 $\times$  SSC

で 50°C 5 分間 1 回、1 $\times$  SSC で 50°C 5 分間 2 回洗浄した。ミリ Q 水でリンスした後遠心乾燥したスライドは、Agilent Scanner (Agilent) を用いて、100% 出力の緑色レーザー (Alexa 546 および Cy3 検出用)、100% PMT、解像度 5  $\mu$ m、ダイナミックレンジ OFF の設定でスキャンした。得られた画像ファイルから、Feature Extraction (Agilent) を用いて各スポットの蛍光強度を数値化した。

#### 5. シグナルの統計解析

Feature Extraction によって出力されたデータテキストファイルは、Gene Array Utility version 080131 (GAU; Symplus, Tokyo, Japan) に読み込み各種解析を行った。以下に簡単な解析手順を記す。データテキストファイルに含まれる 38,986 病原体検出プローブ由来スポットの 62 項目に及ぶデータ中からアクセッション No.、プローブ名、遺伝子名、およびシグナル蛍光強度の 4 項目を抽出した。抽出したデータはアクセッション No. 毎にまとめ、さらにセンスまたはアンチセンス鎖に細分し『群』とした。群内のシグナル平均値および中央値を算出し、シグナル蛍光強度中央値の高い順に該当候補として順位を付けた。

『標的スポット群』と『全スポットから標的スポットを除いた群』を形成するシグナル蛍光強度の分散状態が、統計学的有意差が観察されるか見極めるため、有意水準 ( $\alpha$ ) = 0.001 【0.1%の確率で偶然有意差があると判定される水準】で p 値を算出した。算出された p 値は帰無仮説【母集団の分散状態に差は無いと言う仮説】が棄却可能か、つまり対立仮説【母集団の分散状態に差は有ると言う仮説】が成立するかを検証した。

同時に z 値も、同様の水準である限界値 = 3.09 に設定し帰無仮説【母集団の平均値が等しい】が棄却できるか、つまり対立仮説【母集団の平均値が等しくない】が成立するか検証した。p 値は 0.001 よりも小さい値であるとき、Z 値は 3.09 より大きい値であったとき帰無仮説が棄却できると考え、表 1~7 内で該当するデータの背景を灰色で示した。

## C. 研究結果

### 1. インフルエンザウイルスゲノムをサンプルとした MMPDA 解析

精製したインフルエンザウイルス由来のゲノム RNA は超音波処理にて断片化し、ラベル化したサンプルは MMPDA とハイブリさせた。A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) をサンプルとした場合、期待どおり A/Marton/43 (H1N1) NA が最も強いシグナルとして検出された。また、 $p = 2.62e-13$ 、 $Z = 3.18$  と統計学的にも帰無仮説が十分に棄却できる水準だった (表 1)。このサンプルの MMPDA 解析で 2 番目に強いシグナルを発していたのは (A/New York/32/2003 (H3N2) NA だったが、蛍光シグナルの強さは 1 番目の候補と比較して 5 割の水準であり、p 値は高いものの Z 値において有意差が確認できる水準ではなかった。故に特異的に H1N1 インフルエンザウイルスを検出できたと考えられる。

MMPDA には 6 種類の H1 hemagglutinin (HA) 塩基配列に対応するプローブ群が搭載済みである。しかし A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) サンプルにおいて最も強くシグナルが検出された H1 HA (CY009628) 由来プローブ群でも 6 位だった (表 1)。HA

遺伝子はインフルエンザウイルスの中で最も遺伝的多様性に富んでいる遺伝子なので、A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) の HA 遺伝子配列は、MMPDA ver. 1.00 プローブ群では網羅できなかったためと考えられる。今後 MMPDA を拡張するにあたり、HA 遺伝子の網羅率を向上させる事で、この問題点は改善可能であると考えられる。

その他のインフルエンザウイルス株 A/duck/Hyogo/35/01 (H5N1) や A/WSN/33 (H1N1) のゲノム RNA を用についても同様な MMPDA 解析を行った結果、NA 遺伝子は特異性と信頼性をもって検出できた (表 2 および 3)。これら 2 株についても HA 検出用プローブは改善の余地が残されていたが、今後 MMPDA を拡張することによって解決できる問題であると考えられた。

### 2. バクテリアゲノムをサンプルとした MMPDA 解析

バクテリアからゲノム DNA を精製した後、増幅、断片化、ラベル化した後 MMPDA とハイブリダイゼーションを行った。*Coxiella burnetii* Ohio (Q 熱原因菌) を MMPDA 解析した場合、シグナル強度、p、および Z は同種の *Coxiella burnetii* RSA 493 が最も高い値を示した (表 4)。同サンプルにおいて Cercopithecine herpesvirus 16 が 3 番目に高いシグナル強度を示したが、*Coxiella burnetii* の 4 割程度蛍光強度であり、p および Z で帰無仮説が棄却できない水準であった。故に *Coxiella burnetii* Ohio をサンプルとした場合、同種の *Coxiella burnetii* RSA 493 のみが MMPDA 解析で特定的に検出できた。

*Escherichia coli* k12 (大腸菌) のゲノム

DNA を用いて MMPDA 解析した結果、*Escherichia coli* が最も高い蛍光シグナルを発していたが、*Shigella* 属 (赤痢菌) も同レベルの高いシグナルが検出された (表 5)。*Escherichia* 属と *Shigella* 属の遺伝子配列は、DNA-DNA 分子交雑法では分別が付かないほど相同性が高く、この結果も妥当なものだと考えられる。*Escherichia* 属と *Shigella* 属の相同性を考慮しても、*Escherichia coli* のシグナルは *Shigella* 属よりも高い候補順位を付けられ、特異的に同定できたと考えられる。

*Yersinia enterocolitica* Pa 177 (09:B2) (表 6) および *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* SCHU (表 7) のゲノム DNA について MMPDA 解析を行った結果、どちらのサンプルも各病原体に該当するスポットにおいて蛍光強度が高く検出され、特異的に同定できたと考えられる。

#### D. 考察

マイクロアレイは製造工程および作業工程で生じた視認できない傷、塩類析出による結晶の残存、作業中に付着した塵などはレーザーを乱反射させ誤った強い蛍光シグナルを引き起こす。病原体核酸をマイクロアレイで同定・検出する為には、強い蛍光シグナルを発するスポットのみで同定する事は不可能であると考えられた。そこで MMPDA では、病原体株 (アクセッション No.) あたり平均 30 種類の病原体検出用プローブを搭載させ、エラー耐性のあるデータ解析の可能性を持たせた。

本研究では、インフルエンザウイルス、Q 熱の原因菌 (*Coxiella burnetii*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、エルシニア (*Yersin*

*ia enterocolitica*)、および野兔病菌 (*Francisella tularensis*) のゲノム核酸を用いて MMPDA とハイブリダイゼーションさせ、スポットの蛍光強度を得た。この蛍光強度を基に、中央値、平均値、 $p$ 、 $Z$  を算出した。幸いなことに、MMPDA に搭載されたプローブ特異性が非常に高い為、上記病原体サンプルにおいて各病原体が該当するスポットのみ高い蛍光シグナルを発し、平均値や中央値のみでも標的サンプルの検出は十分に可能であった。しかし臨床サンプルや野外サンプル等の雑多な核酸が含まれているサンプルにおいて、該当するスポット以外にも非特異的に蛍光を発するスポットが出現する可能性は否定できない。これらのサンプルにおいて想定していた病原体が偶然検出されたのか否かを検証する為には、統計学的な裏付けは重要な考慮要因と成り得る。

本研究では、1枚あたりのスライドに 4 万弱の病原体検出用プローブを 4 アレイ搭載した MMPDA ver 1.00 の開発、病原体検出用プローブの特異性の確認および統計学的手法を用いた検出病原体の絞込みにおいて、当初の計画を上回る成果を収める事に成功した。

#### E. 結論

改善の余地は有るが、MMPDA を用いればあらゆるウイルス、細菌、古細菌、真菌、等々が 1 回の試験で同定可能であ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

Uda A, Tanabayashi K, Fujita O, Hotta A, Yamamoto Y, Yamada A. Comparison of whole genome amplification methods for detecting pathogenic bacterial genomic DNA using microarray. Jpn J Infect Dis. 2007 60:355-61.

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

特許出願準備中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし