

鳥インフルエンザの検査に関する研究

研究分担者 伊藤壽啓 鳥取大学農学部 教授

研究協力者 伊藤啓史 鳥取大学農学部 准教授

研究要旨：鳥インフルエンザの検査について食鳥衛生検査所でも実施可能な鳥類由来ウイルスも検出できる市販ヒト用簡易診断キットでの有用性の評価、これまでに開発された LAMP 法や RT-PCR 法が検査所で実施可能かを検査所の協力を得て検証するとともに改良を行い、具体的な検査マニュアルの作成を目標として、今年度は検査の第一段階である検体採取について実地での検討を行い、検体採取マニュアル案を作成した。

A. 研究目的

本研究では鳥インフルエンザの検査について食肉衛生検査所でも実施可能な検査マニュアルを作成することを目的として、2004 年高病原性鳥インフルエンザ発生時に作成された暫定的検査マニュアルの、検査所で利用可能な検査マニュアルの改正を検査所との協議しつつ作成する。材料採取法や市販キットの取り扱い等の評価を実施するとともに、これまでの研究で開発された LAMP 法や RT-PCR 法が検査所で実施可能かを検証する。今年度は材料採取法について検討する。

B. 研究方法

鳥インフルエンザの検査について食肉検査所検査所でも実施可能な鳥類由来ウイルスも検出できる市販ヒト用簡易診断キットでの取り扱い等に関する評価を行うために、

協力が得られた食鳥処理場の現地視察を行うとともに、検査所担当の協力を得て実際のニワトリを用いての検体採取法の検討を行なった。

C. 研究結果

平成 16 年 3 月 12 日付けで厚生労働省から各都道府県及び保健所設置市に対して、鶏が食鳥処理場へ搬入された後に、高率に死亡する等、鳥インフルエンザが疑われる場合は、現場で簡易検査キットによるスクリーニング検査を実施するよう通知がされている。そのスクリーニング検査の流れは別紙 1 のごとくであるが、実際の簡易検査に際して具体的なマニュアルは存在せず、現場ではその必要性が高まっている。とくに簡易キットでの検査及びその後のウイルス分離、PCR 検査のための検体採取法は検査結果の信頼性に直接影響することから、

食鳥処理場における実施に即したマニュアルを作成することは極めて重要と考えられる。そこで本年度は、茨城県の食鳥処理場を訪問し、食肉衛生検査所の担当者と採材の仕方、簡易キットでの検査の仕方などについてまず意見交換を行った。また、実際に鶏の生体を用いて検体採取ならびに簡易キットのデモンストレーションを実施しながら、段階ごとの確認を行った。それらに基づいて、一連の検体採取の流れをとりまとめ、鳥インフルエンザ検査の第一段階である検体採取法マニュアル案を作成した(別紙2)。

D. 考察

作成した鳥インフルエンザ検査のための検体採取法マニュアル案の中で、とくに気管スワブ採取に関しては自治体によって異なる手法が用いられている可能性が考えられた。すなわち、気管を切開し、直接綿棒を気管下部に挿入して拭い液を採取する方法や、口腔から直接気管口に綿棒を挿入し、気管上部の拭い液を採取する方法などである。前者は簡易キット用検体とウイルス分離もしくはPCR検査用検体を異なる場所からそれぞれ採取が可能であるという利点があるが、後者は気管上部の同一部分から複数回採取することになる。一方、前者は1個体ごとに頸部の解剖が必要であり、後者はその必要はなく、周囲の汚染の程度を最小限に抑えられる利点がある。ウイルス分離やPCR検査の検出感度を考慮して、マニュアル案では後者を採用することとした。

しかし、気管口に直接綿棒を挿入する手技には多少の経験を要することから、写真付きのわかりやすいマニュアルが必要と判断された。

検体採取用鶏の安楽殺の方法、あるいは検体採取後の周囲の消毒、滅菌に関しても具体的には自治体によって様々な方法が用いられている可能性がある。しかし、各々の現場の状況、事情に即した最善の方法があると考えられることから、今後多くの情報を収集し、マニュアル案の中に組み込んでいく必要があると考えられた。

今後の方針として、まず土台となるマニュアル案を早急に作成し、それをさらに各地方自治体に送付等して出来得る限り多くの意見を求め、より具体的かつ有用な検査マニュアルの完成を目指していきたい。

E. 結論

鳥インフルエンザの検査について、本年度はまず食肉衛生検査所における材料採取に関する暫定的な検査マニュアル案を作成した。さらに実際に食肉衛生検査所の協力を得て、材料採取のデモンストレーションを実施し、現場サイドとの意見交換を行った。今後はさらに多くの意見、要望等を集約し、実際に利用可能な検査マニュアルの改正を行っていく計画である。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ito, T. (2008) Outbreaks of highly pathogenic avian influenza in Japan. *Glob. Env. Res.*12(1):15-20.

Motoike, K., Hirano, S., Yamana, H., Onda, T., Maeda, T., Ito, T., and Hayakawa, M.(2008) Antiviral activities of heated dolomite power. *Biocontrol Sci.* 13(4): 131-138.

2. 学会発表

藤本 佳万、新矢 恭子、伊藤 啓史、伊藤 壽啓 (2008) H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する陸生野鳥の感受性。3月28-30日。第145回日本獣医学会学術集会 (麻布大)

シバコティ・サカル、藤本 佳万、伊藤 啓

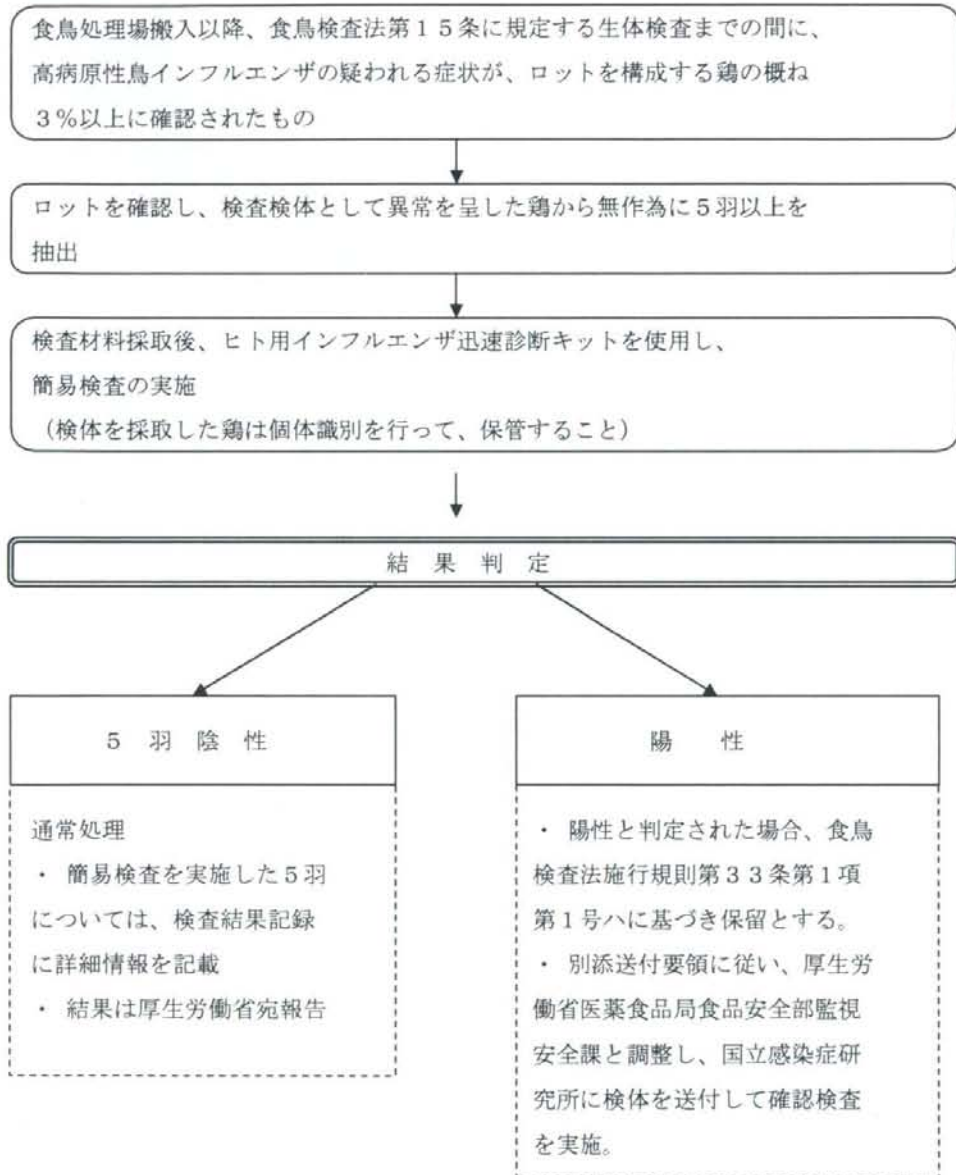
史、伊藤 壽啓(2008) Characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus isolated from a mountain hawk eagle in Japan. 3月28-30日。第145回日本獣医学会学術集会 (麻布大)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当無し
2. 実用新案登録
該当無し

別紙1

スクリーニング検査の流れ



別紙 2

(案)

高病原性鳥インフルエンザ検査マニュアル（食鳥処理場）

（検体採取編）

（1）検査に必要な物品等

N95マスク

ラテックス手袋

前掛け

防護服

ゴーグル

長靴

厚手ビニール袋（厚さ0.1mm 以上のものが望ましい）

ドライアイス

消毒用アルコール（70%エタノール）、その他消毒薬

消石灰 床面消毒用

滅菌綿棒（大きさの異なるものを2種類程度用意しておく）

サンプル管（滅菌試験管、スクリーキャップ、2～5ml 程度）綿棒が入る太さであれば良い。ハサミ（紙製の綿棒の柄は切って入れる）

検体輸送用培地

簡易検査キット

輸送用容器（国連規格輸送容器）

蓄冷材

感染性廃棄物処理容器 死亡個体やその他の廃棄物処理にあると良い。

（2）検査試料の採取

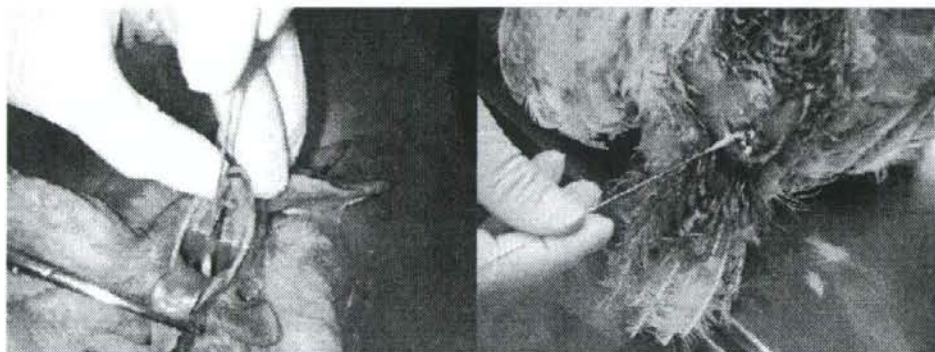
- ・ 検査試料として異常を呈した鶏から無作為に5羽を抽出し、それらから個別に気管スワブと総排泄腔（クローカ）スワブを採取する。
- ・ 試料の採取や簡易検査は、日頃から手法や検査結果の判定に習熟しておくことが望ましい。
- ・ 試料採取の際には周囲へのウイルス拡散を防ぐよう、消毒準備等十分な配慮が必要である。

1 鶏を保定したまま、1羽ずつ厚手のビニール袋（ドライアイス入り）にいれ、二酸化炭素による安楽殺を行う（図1）。



図1 鶏の安楽殺

2 綿棒の先に触れないよう注意し、鶏の気管内（図2A）または総排泄腔内（図2B）に挿入する。とくに気管スワブは口腔から綿棒を気管口に直接挿入するが、その際、舌をピンセット等で引き出すことで気管口の確認がしやすくなる（図3）。挿入した綿棒で気管内腔表面の粘膜を数回強めに擦るようにして採取する。



A 気管スワブの採取

B クロアカスワブの採取

図2 検体（スワブ）採取の方法

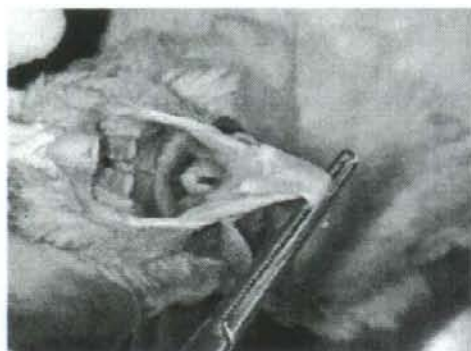


図3 鶏の気管口

3 最初に採取したスワブは簡易キット診断用として、抽出液の入ったチューブに直接入れる（図4）。



図4 簡易診断キット用検体

4 さらに確認検査用に再び各スワブを採取し、それらは個別にサンプル管（輸送用培地を含む）に入れ、蓋を密閉する（図5）。長い綿棒の場合は柄を折るか切るかして、確実に蓋が閉まるようにする。サンプル管に記録番号、スワブの区分を油性マジックで記入する。



図5 ウイルス分離用検体

(3) 簡易検査の実施

1 スワブを検体として、各検査キット（迅速診断キット）の取り扱い説明書に従って、操作する（図6）。担当者はあらかじめ検査手法や検査結果の判定に習熟しておくことが望ましい。



図6 簡易診断キット

2 簡易検査で陽性と判定された場合は、厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課と調整し、国立感染症研究所へ速やかに検体を送付する（図7）。



図7 検体の輸送

3 検体（スワブ）の送付は輸送中に破損しないように国連規格容器またはそれに準ずる容器を用い、適切な方法で行う。

4 5羽全て陰性と判定された場合もその旨、厚生労働省宛報告する。

5 検査に使用したスワブや簡易検査キットの廃棄にあたっては、感染性廃棄物として処分するか、密閉して完全に焼却処分する。

（4）個体の保管

検体採取後の鶏個体は再検査等の可能性もあるため、二重のビニール袋等に密閉して汚染が広がらないように配慮し、冷凍保存（ -20°C 以下）することが望ましい。

（5）検体の送付など

検体の検査機関への送付には国際規格の専用容器に準じた密閉できる容器を使用する。

（参考）国連規格輸送用容器について

感染性物質の輸送のために外部の圧力に耐える構造の特製容器。国連規格容器は試料送付後、検査機関等で消毒し、再利用に耐えないと判断したものは廃棄。製品については、インターネット上で情報を取得することが可能。

以上

リアルタイム RT-PCR による鳥類由来インフルエンザウイルス

検出法の検討

分担研究者 棚林 清 国立感染症研究所 獣医科学部 第三室長
研究協力者 山本美江 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官

研究要旨:食鳥検査において高病原性鳥インフルエンザが疑われインフルエンザ簡易診断キットを用いた検査を実施し疑いが強くなった場合は、ウイルス分離により確認する必要がある。しかしこれは時間を要することからウイルスゲノム RNA を検出する手法として RT-PCR 法があるがさらに高感度・迅速な方法としてリアルタイム RT-PCR 法が有用と考えられることから、WHO 推奨プロトコールのうちの方法が有用かを検討したところ、インフルエンザ A ウイルス共通、H5 亜型、N1 亜型を検出するプロトコール 2 が感度良く検出することができることが分かった。

A 研究目的

2004 年、2007 年と本邦においても養鶏場で高病原性鳥インフルエンザが発生し、2004 年の京都の事例では感染鶏が食鳥処理場に搬入された事例があった。食鳥検査においてウイルス疾病が疑われた場合はウイルス学的精密検査が必要となる。一般にウイルス学的検査は煩雑で時間を要する事から簡易な迅速かつ高感度な診断法が必要である。

本研究では食鳥検査の過程で鳥インフルエンザが疑われ、確認検査を要した場合にウイルス分離とともに速やかに結果を得ることが期待されるウイルスゲノム RNA を検出する RT-PCR 法やリアルタイム RT-PCR を検討することにした。今年度は 5 種類のプロトコールが示されている WHO 推奨プロトコールで鳥類由来 H5N1 亜型を含むインフルエンザ A ウイルスの検出を比較検討した。

B. 研究方法

1. ゲノム増幅プロトコール

Recommendations and laboratory procedures for detection of avian influenza A (H5N1) virus in specimens from suspected human cases (Revised August 2007) WHO に示されている 2 種類の RT-PCR と 3 種類のリアルタイム RT-PCR のプロトコールに従ってプライマーおよびプローブを作製した(表 1)。一部については改良されたプライマーを用いた。また、反応液には RNase 阻害剤を加えた以外は反応液調整及び反応条件はそれぞれのプロトコールに従った(表 2)。

2. 供試ウイルス

A/WSN/33 (H1N1) [WSN]、A/ Pueruto-Rico /8/34 (H1N1) [PR8]、A/Mallard/ Miyazaki/MZ5/2007 (H1N3) [MZ5]、A/duck/Hyo

go/35/01 (H5N1) 【兵庫】(神戸市環境保健研究所より分与)、A/Blowfly /Kyoto/193/2004 (H5N1) 【京都】の5株のインフルエンザ A ウイルスを10日令発育鶏卵に接種して増殖させ、これらの漿尿液から QIAamp Viral RNA Mini Kit を用い RNA を抽出した。各ゲノム検出プロトコールによる試験には抽出 RNA を10倍段階希釈して用いた。

C. 研究結果

1. RT-PCR 法での反応

両プロトコールともにインフルエンザ A ウイルスの M, HA (H5), NA (N1) 遺伝子を増幅する従来型の RT-PCR 法である。インフルエンザ A ウイルス共通の M 遺伝子の増幅では 10^6 希釈 MZ5 株のプロトコール 2 を除いてすべての株で検出された。H5 亜型検出では両プロトコールともに兵庫株、京都株と反応し、他の亜型の株とは反応しなかった。N1 亜型検出ではプロトコール 2 で WSN 株 PR8 株と反応が悪かった。他の NA 亜型の株とは反応しなかった (表 3)。なお、試薬の調整から RT-PCR までが約 3 時間、ゲルによる電気泳動と染色を含めると 4 時間程度の操作時間が必要であった。

2. リアルタイム RT-PCR 法での反応

3 種のリアルタイム RT-PCR プロトコールはインフルエンザ A ウイルスの M, HA (H5) を検出するがプロトコール 2 は NA (N1) も検出するプロトコールとなっている。これらのプロトコールで M 遺伝子を対象に 5 株のウイルス RNA との反応性を調べたところすべてで 10^6 希釈 RNA を検出できた (表 4)。

HA の H5 亜型ウイルス RNA 検出を実施したところプロトコール 1 は兵庫株とは反応しなかったが京都株には反応した。プロトコール 3

では兵庫株、京都株ともに 10^3 希釈では反応したが 10^6 希釈では検出できなかった。一方、プロトコール 2 では両 H5N1 亜型ウイルス株の 10^6 希釈でも検出可能であった (表 4)。

プロトコール 2 についてはさらに希釈したウイルス RNA について実施したところ M では 10^6 希釈から 10^7 希釈まで反応した。H5 亜型では京都株で 10^6 希釈まで、兵庫株で 10^5 希釈まで反応した。H5 以外の亜型ウイルス WSN、PR8、MZ5 とは 10^3 希釈でも交差反応はなかった。N1 亜型では京都株、兵庫株ともに 10^6 希釈まで反応したが N1 亜型の PR8 株と WSN 株には 10^3 希釈でも反応しなかった。N3 亜型の MZ5 株との交差反応はなかった (表 5)。

検査の所要時間はプロトコール 1 が約 90 分、プロトコール 2 と 3 は約 150 分だった。

D. 考察

鳥インフルエンザの診断またはウイルスの検出においては簡易迅速高感度を実施できることが必要である。一方、インフルエンザ A ウイルス、特に鳥類由来株においては各種亜型の株が存在し遺伝子検出においては注意が必要となる。本研究では、2003 年以降世界各地で家禽や野鳥さらにはヒトにも感染を起こしている H5N1 亜型ウイルスを検出するための RT-PCR 及びリアルタイム RT-PCR のプロトコールが WHO により公表されており、本研究ではこれらのプロトコールで H5N1 亜型ウイルス 2 株を含む 5 株ウイルスで比較検討した。従来の RT-PCR 法に比べるとリアルタイム PCR 法が 10 倍以上高感度であり、結果が得られるまでの時間も短縮できる。リアルタイム RT-PCR の 3 プロトコールの比較においては、H5 および N1 亜型も検出するプロトコール 2 が感度も合わせて良い結果が得られた。また、特異性についても確保されており現状では、機器等の整備が整っていれば迅速高感度に鳥類由来ウイルスを検出す

る方法として有用と考えられる。

しかしながら、本研究の結果でみられた N1 亜型 2 株が、プロトコル 2 の NA で反応しなかったのは、近年流行している高病原性鳥インフルエンザの起因ウイルスを標的に設計されたプライマー・プローブであるため塩基配列がマッチしていないことが考えられ、このように塩基配列の差異が大きいウイルス株や H5 や N1 亜型以外ウイルスには対応できないことから特に高病原性鳥インフルエンザの起因ウイルスの塩基配列情報をもとにプライマー・プローブの更新が必要にあることを考慮しなければならない。

E. 結論

高病原性鳥インフルエンザの起因となるインフルエンザ A ウイルスのゲノム RNA を高感度短時間にまた、H5N1 亜型まで特異的に検出する複

数のリアルタイム RT-PCR 法のプロトコルを比較したところを WHO のプロトコル 2 が有用であることがわかった。しかし、ウイルスの変異や H7 亜型など異なる亜型のウイルスについても検出できるプライマー・プローブの準備や最新のウイルス情報をもとにした更新も重要と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

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

表1-1

Primers		Sequences	
Conventional RT-PCR PROTOCOL 1	M	M30F:	TTC TAA CCG AGG TCG AAA CG
		M264R2:	ACA AAG CGT CTA CGC TGC AG
		Expected product	232bp
	H5	H5-1:	GCC ATT CCA CAA CAT ACA CCC
		H5-3:	CTC CCC TGC TCA TTG CTA TG
		Expected product	219bp
N1	N1-1:	TTG CTT GGT CGG CAA GTG C	
	N1-2:	CCA GTC CAC CCA TTT GGA TCC	
	Expected product	616bp	
Conventional RT-PCR PROTOCOL 2*	M	A/M264R3/08	TGGACAAACGCTCTACGCTGCAG
		A/M30F2/08	ATGAGYCTTYAACCGAGGTCGAAACG
		Expected product	232bp
	H5	H5-248-270F	GTGACGAATTCATCAATGTRCCG
		H5-671-647R	CTCTGGTTTAGTGTTGATGTGYCAA
		Expected product	424bp
N1	N1-580-607F	TGAAGTACAATGGCATAATAACWGACAC	
	N1-891-918R	CCACTGCATATATCCTATTTGATACTCC	
	Expected product	343bp	

表1-2

TaqMan Primers and Probe		Sequences	
Real-time RT-PCR PROTOCOL 1	M	FLUAM-1F:	AAGACCAATCCTGTACCTCTGA
		FLUAM-1R	CAA AGCGTCTACGCTGCAGTCC
		FLUA-1P	(FAM)-TTTGTGTTACGCTCACCGT-(TAMRA)
		Expected product	75bp
	M	FLUA-2F	CATTGGGATCTTGCACCTGATATT
		FLUAM-2R	AAACCGTATTTAAGGCGACGATAA
		FLUA-2P	(FAM)-TGGATCTTGATCGCTTTTCTCAAATGCA-(TAMRA)
		Expected product	101bp
	H5	H5-347R	TCTTCATAGTCATTGAAATCCCCTG
		H5-266F	TGCCGGAATGGTCTTACATAGTG
		H5-290P	(FAM)-AGAAGGCCAATCCAGTCAATGACCTCTGTTA-(TAMRA)
		Expected product	81bp
H5	H5-1615F	GTGGCGAGCTCCCTAGCA	
	H5-1695R	TCTGCATTGTAACGACCCATTG	
	H5-1634P:	(FAM)TGGCAATCATGGTAGCTGGTCTATCCTTATGG(TAMRA)	
	Expected product	80bp	
Real-time RT-PCR PROTOCOL 2	M	MP-96-75ProbeAs	FAMATYTCGGCTTTGAGGGGCGCTGMGB
		MP-39-67For	CCMAGGTCGAAACGTAYGTTCTCTCTATC
		MP-183-153Rev	TGACAGRATYGGTCTTGTCTTTAGCCAYTCCA
		Expected product	146bp
	H5	H5-Probe-239-RVa	FAMAGCCAYCCAGCTACRCTACAMGB
		H5-Probe-239-RVb	FAMAGCCATCCGCAACACTACAMGB
		H5HA-205-227v2 F	CGATCTAGAYGGGGTGAARCCCTC
		H5HA-326-302v2-R	CCTTCTCCACTATGTANGACCATTCT
Expected product	122bp		
N1	N1-Probe-501-525-v3	FAMTCAGCRAGTGCTGCCATGATGGCAGMB	
	N1-For-474-502-v2	TAYAACCAAGGTTTGTCTGTGYGCTTG	
	N1-Rev-603-631-v2	ATGTTTCTCCTCCAACTCTTGATRGTTCT	
	Expected product	161bp	
Real-time RT-PCR PROTOCOL 3	M	RF 1073	AAG-ACC-AAT-CCT-GTC-ACC-TCT-GA -3'
		RF 1074	CAA-AGC-GTC-TAC-GCT-GCA-GTC-C-3'
		RF 1293	FAM-TTT-GTG-TTC-ACG-CTC-ACC-GTG-CC-TAMRA-3'
	Expected product	328bp	
	H5	RF 1151	GGA-ACT-TAC-CAA-ATA-CTG-TCA-ATT-TAT-TCA-3'
		RF 1152	CCA-TAA-AGA-TAG-ACC-AGC-TAC-CAT-GA-3'
RF 1153		FAM-TTG-CCA-GTG-CTA-GGG-AAC-TCG-CCA-CTAMRA-3'	
Expected product			

表2 各プロトコールの反応条件

Volume(μ l)per reaction		PCR temperature cycling conditions					
Conventional RT-PCR PROTOCOL 1	M	5x QIAGEN RT-PCR buffer	5	M	Reverse transcription	30 min	50 °C
		dNTP mix	1		Initial PCR activation	15 min	95 °C
		Forward primer(5 μ M)	3	3-step cycling			
		Reverse primer (5 μ M)	3	Denaturation	30 sec	94 °C	
		Enzyme mix	1	Annealing	30 sec	55 °C	
		Rnase inhibitor(20u/ μ l)	0.5	Extension	30 sec	72 °C	
		RNase free Water	6.5	Number of cycles	40		
		Total	20	Final extension	2 min	72 °C	
	H5,N1	Q-solution	5	H5,N1	Annealing	30 sec	50 °C
		RNase free Water	1.5				
Conventional RT-PCR PROTOCOL 2	M,H5,N1	5x QIAGEN RT-PCR buffer	5	M,H5,N1	Reverse transcription	30 min	50 °C
		dNTP mix	1	Initial PCR activation	15 min	95 °C	
		Forward primer(10 μ M)	1.5	3-step cycling			
		Reverse primer (10 μ M)	1.5	Denaturation	30 sec	94 °C	
		Enzyme mix	1	Annealing	30 sec	50 °C	
		Rnase inhibitor(20u/ μ l)	0.5	Extension	45 sec	72 °C	
		RNase free Water	9.5	Number of cycles	40		
		Total	20	Final extension	10 min	72 °C	
Volume(μ l)per reaction		PCR temperature cycling conditions					
Real-time RT-PCR PROTOCOL 1		10XPCR buffer	2	M,H5,N1	Reverse transcription	10 min	RT
		Mgcl ₂	2.8			15 min	42 °C
		dNTP	8			5 min	95 °C
		Random hexmer	1	chill in ice			
		MuLV Reverse Transcriptase	1	3-step cycling			
		Rnase inhibitor	1	Initial PCR activation	10 min	95 °C	
		RNA	4.2	Denaturation	10 sec	95 °C	
		RNase free Water	7.6	Annealing	15 sec	56 °C	
		Mgcl ₂	2.4	Extension	10 sec	72 °C	
		Primer and probe mix (H5orM)	3	Number of cycles	50		
		"Hot Start" reaction mix	2	Final extension	30 sec	40 °C	
		cDNA	5				
		Total volume	20				
	Real-time RT-PCR PROTOCOL 2		RNase free Water	3.65	M,H5,N1		30 min
		2X QuantiTect Probe RT-PCR Master I	12.5			15 min	95 °C
		Forward Primer(10 μ M)	1.5			15 sec	94 °C
		Reverse Primer (10 μ M)	1.5			75 sec	54 °C
		probe (5 μ M)	0.5	Number of cycles	45		
		QuantiTect RT mix	0.25				
		Rnase inhibitor	0.1				
		RNA template	5				
		Total volume	25				
		*					
Real-time RT-PCR PROTOCOL 3		H5-Probe-239-RVa 0.375 μ l		M,H5,N1		2 min	50 °C
		H5-Probe-239-RVb 0.125 μ l				30 min	60 °C
		RNase free Water	17.5			5 min	95 °C
		5x EZ buffer	10			20 sec	94 °C
		Forward Primer(10 μ M)	1			60 sec	60 °C
		Reverse Primer (10 μ M)	1	Number of cycles	50		
		probe (5 μ M)	1				
		Mn(Oac) ₂	6				
		dNTP	6				
		rTth polymerase	2				
		Amperase	0.5				
		RNA template	5				
		Total volume	50				

*For the reaction of H5 detection, a mixture of two probes is used.

表3 コンベンショナルPT-PCRでの反応

Mgene	WSN		PR8		MZ5		兵庫		京都	
	10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻⁵
Conventional RT-PCR PROTOCOL 1	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
Conventional RT-PCR PROTOCOL 2*	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

H5	WSN		PR8		MZ5		兵庫		京都	
	10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻⁵
Conventional RT-PCR PROTOCOL 1	(-)	NT	(-)	NT	(-)	NT	(+)	(+)	(+)	(+)
Conventional RT-PCR PROTOCOL 2*	(-)	NT	(-)	NT	(-)	NT	(+)	(+)	(+)	(+)

N1	WSN		PR8		MZ5		兵庫		京都	
	10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻⁵
Conventional RT-PCR PROTOCOL 1	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	NT	(+)	(+)	(+)	1/2
Conventional RT-PCR PROTOCOL 2*	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	NT	(+)	(+)	(+)	1/2

NT: 10³ (-)のため実施せず

* 2008年NIID改良版による

表4 リアルタイムRT-PCRでの反応

M	WSN	PR8	MZ5	兵庫	京都
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵
Real-time RT-PCR PROTOCOL 1	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Real-time RT-PCR PROTOCOL 2	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Real-time RT-PCR PROTOCOL 3	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

HA (H5)	WSN	PR8	MZ5	兵庫		京都	
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻⁵
Real-time RT-PCR PROTOCOL 1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
Real-time RT-PCR PROTOCOL 2	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
Real-time RT-PCR PROTOCOL 3	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)

表5 プロトコール2での検出限界

RT-PCR PROTOCOL 2	WSN		PR8		MZ5		兵庫		京都		
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
M	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
HA (H5)	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	(+)	(-)	(-)	(-)
NA (N1)	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	(+)	(+)	(-)	(-)

NT:10³ (-)のため実施せず

マイクロアレイ技術を用いた廃棄牛および豚臓器からの
病原体検出の試み

分担研究者
協力研究者

棚林 清
宇田晶彦

国立感染症研究所獣医科学部第三室 室長
国立感染症研究所獣医科学部 主任研究官

研究要旨：食肉処理場で廃棄処分された牛および豚臓器に含まれる病原体を網羅的に検出同定することを目的とした。本試験を行うにあたり臓器由来核酸と比べ病原体核酸の含有量は微量であると想像された為、病原体由来核酸の検出感度向上を図る必要があった。試験あたりの検査試料増量とハイブリ溶液の改良を行った結果、従来に比して約3倍の検出感度が得られるようになった。この病原体検出用マイクロアレイを用いて、食肉処理場で廃棄処分された臓器の32検体について病原体検出を行った結果、一部の検体から放線菌ゲノムがまたは化膿連鎖球菌 *speC* が検出され、放線菌ゲノムについてはPCRでも増幅が認められた。これらの結果から、食肉処理場で処分された一部の臓器には、放線菌ゲノムや化膿連鎖球菌 *speC* 由来核酸が含まれている可能性が示唆された。

A. 研究目的

病原体の検出同定は、培養分離、生化学検査、又はPCRを用いた遺伝子診断等で行われる。従来の遺伝子検出法は、基本的に1試験あたり1病原体で行われるので、予め状況証拠や臨床症状等で病原体の絞り込み作業が必要であった。更に、既知の病原体の各株において、塩基配列の多型性が見られる場合もある。既知の病原体の多型性や変異が限定されていれば、従来の検出法でも十分に対応可能であるが、新規の病原体や既知の病原体の大きな変異は従来の検出法では検出不可能となる可能性も推測され、この場合迅速な対応は困難となる。そこで、ヒトに病原性をもたらす病原体においては、複数の遺伝子領域を検出する検査が必要となり、マイクロアレイを用いた検出系は最も有効な手段と考えられる。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、蛍光ラベルした試料の核酸を会合させ、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。微量の核酸しか入手できない場合でも、目的病原体ゲノムを増幅後検出可能である。

細菌、真菌、原虫等のrRNA遺伝子は、分子生物学の黎明期から解析が進められ、現在では殆どの生物の塩基配列が公開されている。PCRやマイクロアレイによって病原体検出を試みる

場合、rRNAを標的とするのは常套手段である。しかしrRNAは、科、属、または種間塩基配列保存性が高い故に、標的病原体特異的検出には不向きである。そこで前年度までにマイクロアレイで病原体を特異的検出するために、古細菌30株、原虫9株、細菌422株、ウイルス672株の合計1133株とタンパク毒素等74遺伝子を標準株とし、全ゲノム配列から特異的かつ最適な5万超種類のセンス鎖プローブを設計した。設計した全プローブはホモロジー検索を行い、十分な特異性を持つ19,493種類のセンス鎖プローブとそのアンチセンス鎖プローブの合計38,986種類のプローブをマイクロアレイに搭載させた。

これまでに病原体検出用マイクロアレイプローブが各病原体にたいして特異性が確保されている事を明らかにしてきた。本年度は、食肉処理場で廃棄処分された臓器35検体に含まれる病原体の検出を試みた。

B. 研究方法

食肉サンプル

国内食肉処理場で、病変が認められ廃棄処分となった豚および牛臓器を一部採材し、使用するまで-80℃で保管した。採材したサンプルの中、32検体について検査を行った。

病原体検出用マイクロアレイ

本研究では、162科、292属、525種、1200を超える株の生物・ウイルス・毒素遺伝子を標的とした病原体検出用マイクロアレイ (MMDPA ver.1; 38,986種類のプローブ) を使用した。このマイクロアレイはアジレント社 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) に製造委託した。

核酸抽出

豚肉及び牛肉サンプルは200 mg程度に細切り、1/4 inch Ceramic Sphere (MP Biomedicals, LLC, Irvine, CA) と Garnet Matrix A Bulk (MP Biomedicals, LLC, Irvine, CA) を入れた2.0 mlチューブに移した後、mini bead-beater (Biospec Products, Bartlesville, OK) を用いて2500 rpm、20秒間破砕処理を行った。破砕したサンプルは、SepaGene (SankoJunyaku Co., Tokyo, Japan) を用いてDNA及びRNAを含む核酸溶液を抽出した。抽出したサンプルから核酸10 µgを新しいチューブへ移し、超音波破砕機 (Bioraptor UCD-250, Cosmobio.) で断片化処理 (4℃冷却水循環下、30秒:30秒オン・オフインターバル設定) を5分間行った。また、培養した *Francisella tularensis* Schu 株も、SepaGene (SankoJunyaku Co.) を用いて核酸を同様に抽出後、超音波で断片化した。

核酸蛍光標識とハイブリ

断片化処理済サンプルは、ULYSIS® Alexa Fluor® 546 Nucleic Acid Labeling Kit (Molecular Probes Inc, Eugene, OR) で蛍光標識後、エタノール沈澱し水に溶解し NanoDropで核酸濃度を測定した。3 µgの蛍光標識済核酸を100 µlのハイブリ緩衝液 (6× SSC, 5× Denhardt's solution, 50 mM sodium phosphate, 0.5% SDS, 20% formamide, 5% Skim milk, 50 µg/ml Yeast tRNA) に溶解した。これらのサンプルは、病原体検出用マイクロアレイと50℃ 18時間ハイブリさせ、50℃ 0.5% SDSを含む 6× SSC 5分間、50℃ 1× SSC 5分間を2回、室温 ミリQ水で10秒間洗浄した。マイクロアレイは、DNA Microarray Scanner (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) でスキャンし、各病原体スポットの蛍光強度は Feature Extraction Software Version 9.5.1で

取得した。蛍光強度情報はテキストファイルにて保管した。

病原体検出用マイクロアレイ解析

各病原体の蛍光強度が記されたテキストファイルは、Gene Array Utilityソフトウェア (Symplus, Tokyo, Japan) で読み込んだ後、同ソフトで病原体検出解析を行った。本研究において、GenBankアクセッション毎の蛍光強度中央値が、3条件 (①マイクロアレイ全体のバックグラウンド蛍光強度の2.5倍以上、②p値が0.001以下、③z値が3.5以上) を満たした場合、該当するGenBankアクセッションの病原体が陽性と判定した。

C. 研究結果

本年度は、食肉処理場で廃棄処分された牛および豚臓器に含まれる病原体の同定を行うことを目的とした。しかし、臓器由来核酸と比べ病原体核酸の含有量は微量であると想像された為、病原体由来核酸の検出感度向上を図る必要があると考えられた。

病原体検出用マイクロアレイの検出感度向上

病原体検出用マイクロアレイの検出感度を改善する為に、試験あたりの核酸増量を検討した。昨年度に確立した方法では、解析あたりの検査核酸量は1 µg/アレイに固定していた。本年度は、可能な限り濃度を高めた蛍光標識した *F. tularensis* (48 µg/アレイ) や蛍光標識したインフルエンザウイルス (核酸濃度不明: 10⁸ TCID₅₀ 相当) のゲノム核酸を準備し、病原体検出用マイクロアレイ解析を行った。この結果、解析に投入した核酸量に応じて、特異的シグナル蛍光強度が増強されたが、バックグラウンド(ノイズ) 蛍光強度も同時に増大した (Fig. 1)。この時の特異的シグナル/バックグラウンド (SN) 比は、従来通りか悪化し、単純に核酸量の増大する戦略は非特異反応を助長する事が明らかになった。そこで、非特異反応抑制するために広く用いられている牛血清アルブミン (BSA)、サケ精子DNA、スキムミルク、酵母 tRNA をハイブリ溶液に添加し、この効果を検証した。各々の添加剤は、蛍光標識した1 µg の *F. tularensis* ゲノム核酸と共に病原体検出用マイクロアレイと反応させ、SN比を観察した (Fig. 2)。この結

果、スキムミルクを添加したハイブリ溶液は最も高いSN比 (5.6) を示したが、最も低い特異的シグナル蛍光強度 (462) だった。一方、酵母tRNAを添加したハイブリ溶液を添加した場合、SN比 (5.1) はスキムミルクに次ぎ、特異的シグナル蛍光強度 (736) は最も高かった。スキムミルクと酵母tRNAは両者共に捨てがたい性質を有していたので、以降の実験では適切な濃度に調整したスキムミルクと酵母tRNAを添加済みハイブリ溶液を使用した。

廃棄処分臓器からの病原体検出

食肉処理場で廃棄処分となった肝臓、脾臓、その他臓器の1 cm 角大からSepaGeneを用いてDNAおよびRNAを含む核酸溶液を抽出し、断片化、蛍光標識を行った。各3 µgの標識済み核酸は病原体検出用マイクロアレイと各々反応させた。この結果、放線菌 (AL939114: *Streptomyces coelicolor* A3(2) complete genome: segment 11/29) と、化膿連鎖球菌 exotoxin type C (M35514: *S. pyogenes* streptococcal pyrogenic exotoxin type C (*speC*) gene, complete cds) が一部の検体から検出された。この検査結果を受けて、PCRによる同定作業も行った。放線菌が検出されたサンプルではPCRで同ゲノムは増幅が確認されたが、化膿連鎖球菌 *speC* はPCRで検出できなかった。

以上の結果から、食肉処理場で廃棄処分された一部臓器サンプルに放線菌が含まれる可能性は示唆された。一方、化膿連鎖球菌 *speC* は、PCRの検出限界以下の核酸が含まれていたか、同遺伝子由来RNAがマイクロアレイで検出された可能性が示唆された。

D. 考察

食肉中に含まれる病原体検出を試みる時、サンプル核酸を量的に確保するのは容易いが、検出しなければならない病原体核酸は必ずしも多く含まれているとは限らない。サンプルが微量しか入手できない場合、全ゲノム増幅を行えば核酸の量的確保は可能であるが、病原体核酸含有量という質的問題に直面する場合が想定される。そこで本研究では、この問題を解決する手段として、ハイブリ溶液改良と共に、「検出感度以上の標的核酸をマイクロアレイと反応させる」

方法を採用した。改良した方法を用いて食肉処理場で廃棄処分された臓器を病原体検出用マイクロアレイで検査した結果、一部のサンプルから放線菌 (*Streptomyces coelicolor*) や化膿連鎖球菌 *speC* が検出された。放線菌が検出されたサンプルにおいて、PCRでも同菌増幅産物が確認されたことから、これらのサンプル中に放線菌由来核酸が含まれる可能性が強く示唆された。

本研究で検出された *Streptomyces coelicolor* は、土壌に生息する細菌で家畜やヒトに病原性を与えない。このことから、食肉処理場で廃棄された病変臓器は、*Streptomyces coelicolor* によって病変を起こした可能性は低く、家畜腸内に生息していた本菌が廃棄処理過程で付着し、検出に至ったと考えられた。また、一部の臓器において化膿連鎖球菌 *speC* が病原体検出用マイクロアレイ検査陽性、PCR検査陰性判定された。同菌ゲノム (AE004092) は同マイクロアレイ解析では陰性であった事を考慮し、*speC* 遺伝子検出について更なる検証が必要がある。

E. 結論

病原体検出用マイクロアレイ解析の結果、食肉処理場で廃棄処分された臓器サンプルに放線菌ゲノムまたは化膿連鎖球菌 *speC* 由来の核酸が含まれる可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願中

F. tularensis ゲノムDNA
480 ng/array 48 µg/array



Fig. 1 濃度依存的バックグラウンド蛍光強度の増大。
様々な濃度に調製した*F. tularensis* ゲノムDNAを断片化後Alexa546で標識し、病原体検出用マイクロアレイ (MMDPA ver.1) とハイブリさせた。

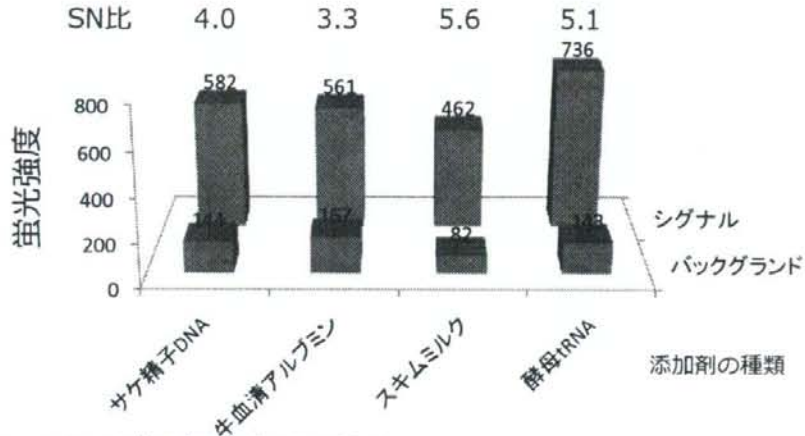


Fig. 2 ハイブリ溶液添加剤の検討

サケ精子DNA、牛血清アルブミン、スキムミルク、酵母tRNAは、1 µg の標識済み*F. tularensis* ゲノムDNAと混合し、病原体検出用マイクロアレイと反応させた。各添加剤を加えた時に得られた特異的シグナル蛍光強度とバックグラウンド蛍光強度及び、シグナル/バックグラウンド (SN) 比を示した。

Table 1 PCRに用いてプライマー

標的 : <i>S. pyogenes</i> streptococcal pyrogenic exotoxin type C (speC) gene, complete cds	
Primer set 1	
speC(313)s	
配列	: TGCAGGGTAAATTTTCAACG
speC(493)a	
配列	: GCAGGCGTAATTCCTCCATA
Primer set 2	
speC(498)s	
配列	: AGGAATTACGCTGCTCAA
speC(695)a	
配列	: AATTCGATTCTGCCGCTTA
標的 : <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) complete genome; segment 11/29	
Primer set 1	
Strepm(36104)s	
配列	: CATCAGGCACCACCAAGTTT
Strepm(36312)a	
配列	: ACAGGGAGTAGAGCGGTGAG
Primer set 2	
Strepm(47653)s	
配列	: AGAATAGGGGGAGCTTCGAG
Strepm(47846)a	
配列	: TCTTCCTTGACCACCAAC