

go/35/01(H5N1)【兵庫】(神戸市環境保健研究所より分与)、A/Blowfly /Kyoto/I93/2004(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 10^5 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 10^5 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 10^5 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 10^5 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分で、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、プロトコール 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 法のプロトコールを比較したところを WHO のプロトコール 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	TGGACAAANCCTCTACGCTGCAG
		A/M30F2/08	ATGAGYCTTYTAACCGAGGTCGAAACG
		Expected product	232bp
	H5	H5-248-270F	GTGACGAATTCATCAATGTRCCG
		H5-671-647R	CTCTGGTTTAGTGTTGATGTYCCAA
		Expected product	424bp
	N1	N1-580-607F	TGAAGTACAATGGCATAATAACWGACAC
		N1-891-918R	CCACTGCATATATATCCTATTTGATACTCC
		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)-TTTGTGTTACGCTCACCCT-(TAMRA)
		Expected product	75bp
	M	FLUA-2F	CATTGGGATCTTGCACTTGATATT
		FLUAM-2R	AAACCGTATTTAAGGCGACGATAA
		FLUA-2P	(FAM)-TGGATTCTTGATCGTCTTTCTCAAATGCA-(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	FAMATYTCGGCTTTGAGGGGGCCTGMGB
		MP-39-67For	CCMAGGTCGAAACGTAYGTTCTCTCTATC
		MP-183-153Rev	TGACAGRATYGGTCTTGCTTTAGCCAYTCCA
		Expected product	146bp
	H5	H5-Probe-239-RVa	FAMAGCCAYCCAGCTACRCTACAMGB
		H5-Probe-239-RVb	FAMAGCCATCCCGCAACACTACAMGB
		H5HA-205-227v2 F	CGATCTAGAYGGGGTGAARCCTC
		H5HA-326-302v2-R	CCTTCTCCACTATGTANGACCATTC
		Expected product	122bp
	N1	N1-Probe-501-525-v3	FAMTCAGCRAGTGCTGCCATGATGGCAMGB
		N1-For-474-502-v2	TAYAACTCAAGGTTTGAGTCTGTGCTTG
		N1-Rev-603-631-v2	ATGTTTCTCCTCCAACCTCTTGATRGTC
		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 各プロトコルの反応条件

Volume(μl)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(5μM)	3		3-step cycling		
		Reverse primer (5μM)	3		Denaturation	30 sec	94 °C
		Enzyme mix	1		Annealing	30 sec	55 °C
		Rnase inhibitor(20u/μl)	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			
		RNase free Water	1.5		Annealing	30 sec	50 °C
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(10μM)	1.5		3-step cycling		
		Reverse primer (10μM)	1.5		Denaturation	30 sec	94 °C
		Enzyme mix	1		Annealing	30 sec	50 °C
		Rnase inhibitor(20u/μl)	0.5		Extension	45 sec	72 °C
		RNase free Water	9.5		Number of cycles	40	
		Total	20		Final extension	10 min	72 °C
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				
		Rnase inhibitor	1		3-step cycling		
		RNA	4.2		Initial PCR activation	10 min	95 °C
					Denaturation	10 sec	95 °C
		RNase free Water	7.6		Annealing	15 sec	56 °C
		Mgcl ₂	2.4		Extension	10 sec	72 °C
Real-time RT-PCR PROTOCOL 2		Primer and probe mix (H5orM)	3	M,H5,N1	Number of cycles	50	
		"Hot Start" reaction mix	2		Final extension	30 sec	40 °C
		cDNA	5				
		Total volume	20				
		RNase free Water	3.65				
		2X QuantiTect Probe RT-PCR Master I	12.5				
		Forward Primer(10μM)	1.5			30 min	50 °C
		Reverse Primer (10μM)	1.5			15 min	95 °C
		probe (5μM)	0.5			15 sec	94 °C
Real-time RT-PCR PROTOCOL 3		QuantiTect RT mix	0.25	M,H5,N1	Data collection	75 sec	54 °C
		Rnase inhibitor	0.1		Number of cycles	45	
		RNA template	5				
		Total volume	25				
		H5-Probe-239-RVa 0.375 μl					
		H5-Probe-239-RVb 0.125 μl					
		RNase free Water	17.5			2 min	50 °C
		5x EZ buffer	10			30 min	60 °C
Real-time RT-PCR PROTOCOL 3		Forward Primer(10μM)	1	M,H5,N1		5 min	95 °C
		Reverse Primer (10μM)	1			20 sec	94 °C
		probe (5μM)	1		Data collection	60 sec	60 °C
		Mn(Oac) ₂	6		Number of cycles	50	
		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 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
M	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
H A (H 5)	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
N A (N 1)	NT	NT	NT	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程度に細切し、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2,500 rpm、20秒間破碎処理を行った。破碎したサンプルは、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、超音波破碎機 (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、スキミルック、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

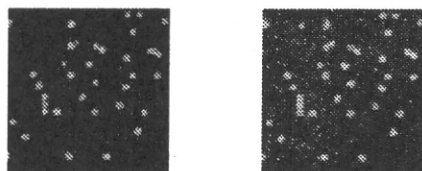


Fig. 1 濃度依存的バックグラウンド蛍光強度の増大。
様々な濃度に調製した*F. tularensis* ゲノムDNAを断片化後Alexa546で標識し、病原体検出用マイクロアレイ (MMDPA ver.1) とハイブリさせた。

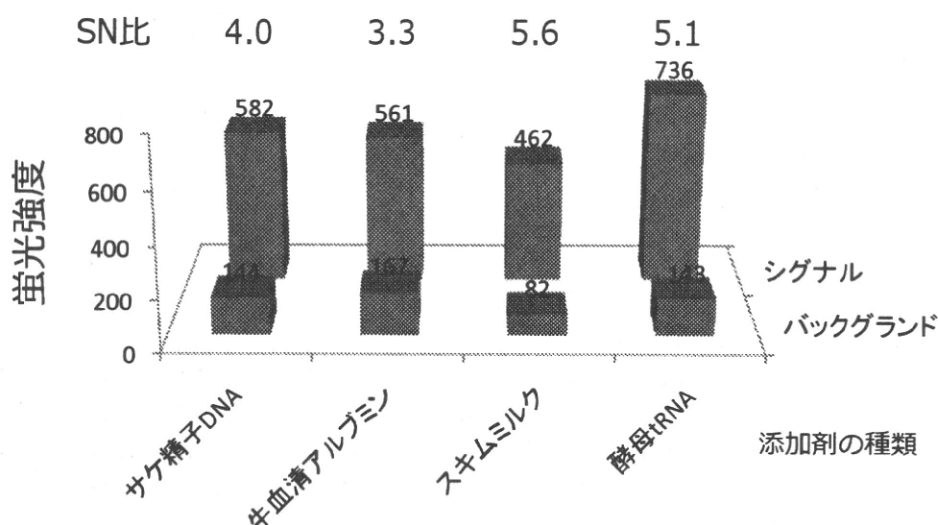


Fig. 2 ハイブリ溶液添加剤の検討

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

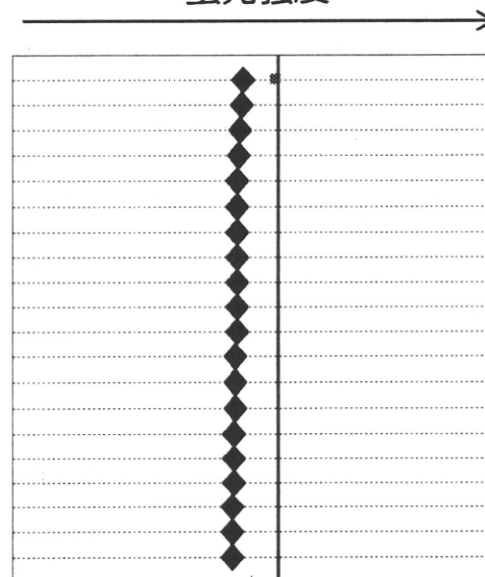
標的 : <i>S. pyogenes</i> streptococcal pyrogenic exotoxin type C (speC) gene, complete cds	
Primer set 1	
speC(313)s	
配列	: TGCAGGGTAAATTTTCAACG
speC(493)a	
配列	: GCAGGCGTAATTCCTCCATA
Primer set 2	
speC(498)s	
配列	: AGGAATTACGCCTGCTCAAA
speC(695)a	
配列	: AATTCGATTCTGCCGCTTA
標的 : <i>Streptomyces coelicolor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

豚 廃棄脾臓

内臓全廃棄

候補順位	Acession No.	検出病原体候補
1	M35514	<i>S.pyogenes</i> streptococcal pyrogenic exotoxin type C (sp
2	AF419157	<i>Aeromonas hydrophila</i> isolate SSU enterotoxin (ast) ger
3	CP000661	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17025, complete genom
4	CY005359	Influenza A virus (A/laughing gull/DE/94/2000(H12N4))
5	CU234118	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278, complete sequence
6	AY262282	Human papillomavirus type 18 complete sequence
7	CP000580	<i>Mycobacterium</i> sp. JLS, complete genome
8	NC_002657	Classical swine fever virus, complete genome
9	DQ080081	Human papillomavirus type 101, complete genome
10	Y16009	<i>Clostridium perfringens</i> cpe gene
11	AL939114	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) complete genome; segm
12	M17357	<i>S.aureus</i> eta gene encoding epidermolytic toxin A, com
13	CP000378	<i>Burkholderia cenocepacia</i> AU 1054 chromosome 1, corr
14	NC_007323	<i>Bacillus anthracis</i> str. 'Ames Ancestor' plasmid pXO2, cc
15	CP000259	<i>Streptococcus pyogenes</i> MGAS9429, complete genome
16	DQ278891	Hepatitis C virus subtype 6k isolate KM45, complete ger
17	NC_007322	<i>Bacillus anthracis</i> str. 'Ames Ancestor' plasmid pXO1, cc
18	AB099607	Influenza C virus (C/Yamagata/6/2000) NS gene for non
19	AF391541	Bovine coronavirus isolate BCoV-ENT, complete genom
20	CY015021	Influenza A virus (A/chicken/Victoria/1985(H7N7)) segn

蛍光強度



内臓全廃棄

候補順位	Acession No.	検出病原体候補
1	M35514	<i>S.pyogenes</i> streptococcal pyrogenic exotoxin type C (sp
2	CP000250	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> HaA2, complete genome
3	Y16009	<i>Clostridium perfringens</i> cpe gene
4	X03929	<i>Streptococcus pyogenes</i> speA gene for exotoxin type A
5	AE017220	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Choleraes
6	NC_004317	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7 chromosome 14, complete
7	NC_002657	Classical swine fever virus, complete genome
8	NC_007322	<i>Bacillus anthracis</i> str. 'Ames Ancestor' plasmid pXO1, cc
9	CP000661	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17025, complete genom
10	M80837	<i>Clostridium perfringens</i> type B (strain NCTC 8533) epsil
11	DQ080081	Human papillomavirus type 101, complete genome
12	NC_001479	Encephalomyocarditis virus, complete genome
13	CP000480	<i>Mycobacterium smegmatis</i> str. MC2 155, complete gen
14	AY274504	Kunjin virus clone FLSDX polyprotein mRNA, complete c
15	AF436130	Human papillomavirus type 74 subtype AE10, complete
16	AY302555	Human echovirus 32 strain PR-10 complete genome
17	U31786	Human papillomavirus type 37, complete genome
18	AL627276	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi (<i>Salmonella typhi</i>) st
19	AF345636	Hantaan virus isolate 84FLi segment M, complete sequ
20	A10937	Human rhinovirus 89 (HRV89), complete genome

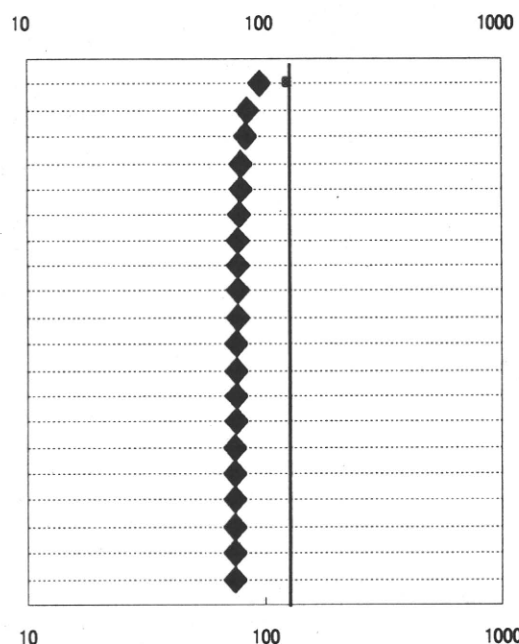


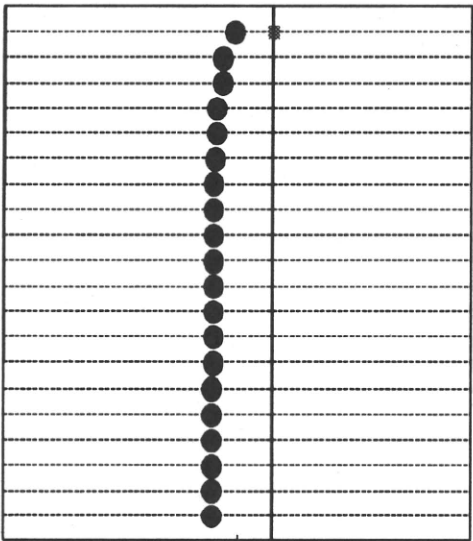
Fig. 3 廃棄処分臓器からの病原体検出

食肉処理場で廃棄処分となった検体から、DNA及びRNAを含む核酸溶液を抽出した。核酸溶液は断片化、Alexa546蛍光標識処理後病原体検出用マイクロアレイと反応させた。検体毎の各スポットシグナル蛍光強度はGenBankアクセッション毎にまとめられ、その中央値をグラフに示した。シグナル蛍光強度の高い順にランキングし、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。グラフ中央に示した線とピンクの点は、上記条件①(マイクロアレイ全体のバックグラウンド蛍光シグナル強度の2.5倍以上)を示している。

豚 廃棄肝臓

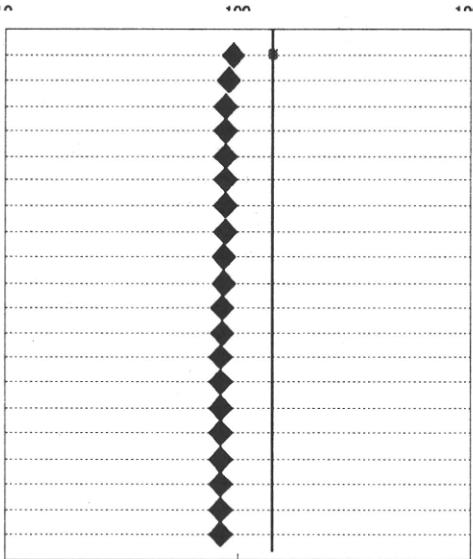
肝炎

候補順位	Acession No.	検出病原体候補
1	AL939114	Streptomyces coelicolor A3(2) complete genome; segr
2	CP000661	Rhodobacter sphaeroides ATCC 17025, complete genc
3	M80837	Clostridium perfringens type B (strain NCTC 8533) epsi
4	NC_009127	Cyprinid herpesvirus 3, complete genome
5	NC_002657	Classical swine fever virus, complete genome
6	AB118841	Hepatitis delta virus DNA, complete genome, strain:M
7	DQ080081	Human papillomavirus type 101, complete genome
8	NC_007345	Theileria parva strain Muguga chromosome 2, comple
9	NC_004325	Plasmodium falciparum 3D7 chromosome 1, complete
10	U37537	Human papillomavirus type 57b complete genome
11	AP007255	Magnetospirillum magneticum AMB-1 DNA, complete
12	AF241359	Enterovirus CA55-1988, complete genome
13	L13198	Clostridium perfringens type B beta-toxin gene, compl
14	NC_001458	Human papillomavirus type 63, complete genome
15	NC_002512	Murid herpesvirus 2, complete genome
16	X61560	S.pyogenes strain MGAS156 speA gene (allele 1) for ty
17	BX842576	Mycobacterium tuberculosis H37Rv complete genome
18	CP000091	Ralstonia eutropha JMP134 chromosome 2, complete
19	AB201226	Human papillomavirus type 94 DNA, nearly complete
20	AF104263	Hepatitis D virus strain TW2667, complete genome



寄生虫性肝炎

候補順位	Acession No.	検出病原体候補
1	AL939114	Streptomyces coelicolor A3(2) complete genome; segr
2	AY684891	Influenza A virus (A/black-headed gull/Sweden/5/99) (t
3	AY262282	Human papillomavirus type 18 complete sequence
4	NC_009127	Cyprinid herpesvirus 3, complete genome
5	AB000860	Akabane virus RNA for nucleoprotein, complete cds
6	CP000250	Rhodopseudomonas palustris HaA2, complete genom
7	AL627276	Salmonella enterica serovar Typhi (Salmonella typhi) s
8	X03929	Streptococcus pyogenes speA gene for exotoxin type
9	CP000580	Mycobacterium sp. JLS, complete genome
10	NC_006560	Cercopithecine herpesvirus 2, complete genome
11	AB211993	Human papillomavirus type 27b DNA, complete genom
12	DQ010921	Feline coronavirus strain FIPV 79-1146, complete genc
13	BX640415	Bordetella pertussis strain Tohama I, complete genom
14	BX248345	Mycobacterium bovis subsp. bovis AF2122/97 complet
15	CP000479	Mycobacterium avium 104, complete genome
16	AF345636	Hantaan virus isolate 84FLI segment M, complete sequ
17	AE017220	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraes
18	CP000661	Rhodobacter sphaeroides ATCC 17025, complete genc
19	NC_001479	Encephalomyocarditis virus, complete genome
20	DQ080081	Human papillomavirus type 101, complete genome



内臓全廃棄

候補順位	Acession No.	検出病原体候補
1	AL939114	Streptomyces coelicolor A3(2) complete genome; segm
2	AL627276	Salmonella enterica serovar Typhi (Salmonella typhi) st
3	CP000259	Streptococcus pyogenes MGAS9429, complete genome
4	Y16009	Clostridium perfringens cpe gene
5	CP000261	Streptococcus pyogenes MGAS2096, complete genome
6	CP000250	Rhodopseudomonas palustris HaA2, complete genome
7	AF053400	Clostridium difficile truncated toxin A gene, complete c
8	BA000019	Nostoc sp. PCC 7120 DNA, complete genome
9	AB027021	Human papillomavirus type 82 DNA, complete genome
10	AF106299	Human rotavirus G2 strain TF85 VP7 protein (VP7) gene
11	BX640415	Bordetella pertussis strain Tohama I, complete genome
12	CY021487	Influenza A virus (A/turkey/Italy/4608/2003(H7N3)) seg
13	EF208930	Hantavirus CJAp93 segment M, complete sequence
14	CU234118	Bradyrhizobium sp. ORS278, complete sequence
15	NC_004325	Plasmodium falciparum 3D7 chromosome 1, complete
16	DQ324666	Gallid herpesvirus 1 isolate Bio-Trach UL47 and glycopr.
17	NC_007323	Bacillus anthracis str. 'Ames Ancestor' plasmid pXO2, cc
18	AY395706	Human papillomavirus type 62 isolate Qv18091, compl
19	AF114383	Coxsackievirus B5 strain Faulkner, complete genome

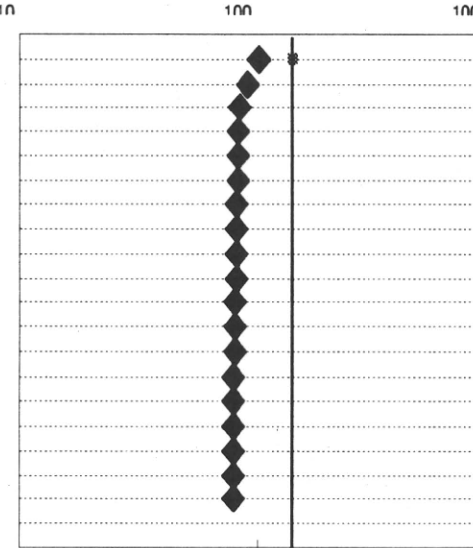


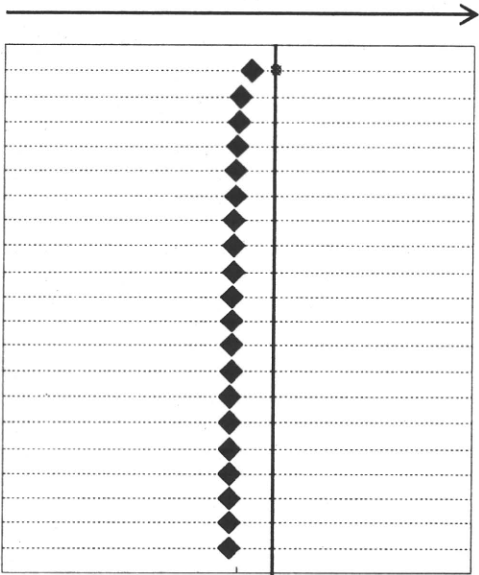
Fig. 3 続き

豚 廃棄肝臓

内臓全廃棄

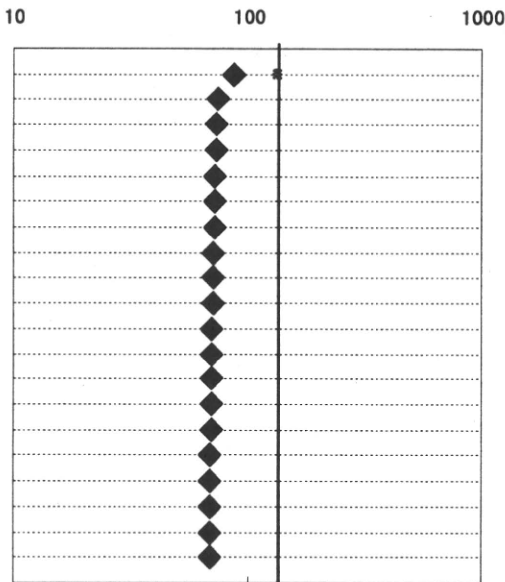
候補順位	Acession No.	検出病原体候補
1	M35514	S.pyogenes streptococcal pyrogenic exotoxin type C (sp
2	DQ462191	Human T-lymphotropic virus 3 strain Pyl 43, complete g
3	M85198	Vibrio cholerae NAG-ST (stn) gene, complete cds
4	AB027021	Human papillomavirus type 82 DNA, complete genome
5	AF293960	Human papillomavirus type 84, complete genome
6	NC_003266	Human adenovirus E, complete genome
7	CP000261	Streptococcus pyogenes MGAS2096, complete genome
8	AF419157	Aeromonas hydrophila isolate SSU enterotoxin (ast) gei
9	AE014613	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi Ty2,
10	AL627276	Salmonella enterica serovar Typhi (Salmonella typhi) st
11	CP000453	Alkalilimnicola ehrlichei MLHE-1, complete genome
12	AY395706	Human papillomavirus type 62 isolate Qv18091, compl
13	AF436130	Human papillomavirus type 74 subtype AE10, complete
14	DQ366347	Norovirus Hu/OsakaNI/2004/JP ORF1 and ORF2 mRNA,
15	AM039952	Xanthomonas campestris pv. vesicatoria complete gene
16	CP000259	Streptococcus pyogenes MGAS9429, complete genome
17	CY015021	Influenza A virus (A/chicken/Victoria/1985(H7N7)) segn
18	DQ473489	Human rhinovirus 70, complete genome
19	NC_003047	Sinorhizobium meliloti 1021, complete genome
20	CP000058	Pseudomonas syringae pv. phaseolicola 1448A, comple

蛍光強度



肝硬変

候補順位	Acession No.	検出病原体候補
1	M98037	Clostridium perfringens enterotoxin gene, complete cd
2	AL939114	Streptomyces coelicolor A3(2) complete genome; segm
3	AJ224480	Clostridium botulinum gene encoding C2 toxin (compor
4	U31788	Human papillomavirus type 44, complete genome
5	CP000259	Streptococcus pyogenes MGAS9429, complete genome
6	CP000431	Rhodococcus sp. RHA1, complete genome
7	D45904	Clostridium perfringens DNA for lambda toxin (metallo
8	AY395706	Human papillomavirus type 62 isolate Qv18091, compl
9	AM039952	Xanthomonas campestris pv. vesicatoria complete gene
10	CY005359	Influenza A virus (A/laughing gull/DE/94/2000(H12N4))
11	AB080575	Hepatitis E virus genomic RNA, complete genome, isola
12	AP007255	Magnetospirillum magneticum AMB-1 DNA, complete g
13	AB027021	Human papillomavirus type 82 DNA, complete genome
14	AY302559	Human echovirus 7 strain Wallace complete genome
15	AE017220	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraesu
16	CP000261	Streptococcus pyogenes MGAS2096, complete genome
17	CP000552	Prochlorococcus marinus str. MIT 9515, complete geno
18	CP000576	Prochlorococcus marinus str. MIT 9301, complete geno
19	CP000479	Mycobacterium avium 104, complete genome
20	J02615	S.aureus toxic shock syndrome toxin-1 gene, complete



肝抱膜炎

候補順位	Acession No.	検出病原体候補
1	AY302555	Human echovirus 32 strain PR-10 complete genome
2	X92973	C.botulinum A ntnh and bont genes
3	X61560	S.pyogenes strain MGAS156 speA gene (allele 1) for ty
4	NC_009127	Cyprinid herpesvirus 3, complete genome
5	CP000525	Burkholderia mallei SAVP1 chromosome II, complete s
6	AB051292	Japanese encephalitis virus gene for viral protein, com
7	DQ835770	Hepatitis C virus subtype 6i isolate Th602, complete ge
8	DQ080083	Human papillomavirus type 102, complete genome
9	CP000133	Rhizobium etli CFN 42, complete genome
10	D00435	Swine vesicular disease virus (STRAIN H/3 '76) genom
11	CP000577	Rhodobacter sphaeroides ATCC 17029 chromosome 1,
12	CP000479	Mycobacterium avium 104, complete genome
13	M35514	S.pyogenes streptococcal pyrogenic exotoxin type C (s
14	AY302548	Human echovirus 24 strain DeCamp complete genome
15	AY896761	Human enterovirus B strain EV6-14103-00 from Russia
16	DQ473489	Human rhinovirus 70, complete genome
17	NC_007323	Bacillus anthracis str. 'Ames Ancestor' plasmid pXO2, c
18	X62560	Influenza A virus (A/equine/London/1416/73(H7N7)) g
19	AF391541	Bovine coronavirus isolate BCoV-ENT, complete genon

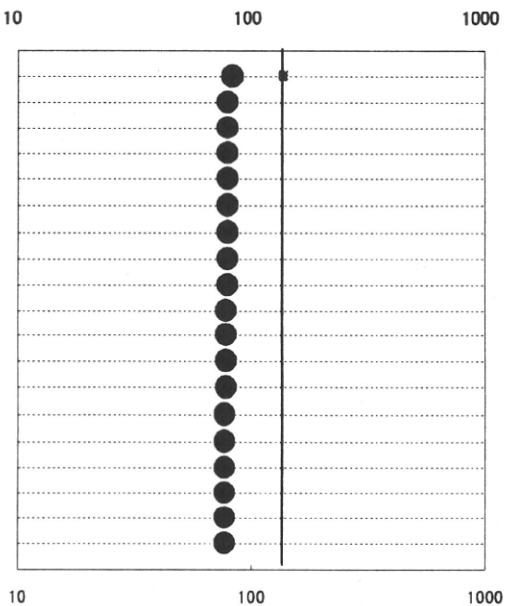


Fig. 3 続き

豚 廃棄心臓

心外膜炎

候補順位	Acession No.	検出病原体候補
1	AE004969	Neisseria gonorrhoeae FA 1090, complete genome
2	M98037	Clostridium perfringens enterotoxin gene, complete cd
3	AY302549	Human echovirus 25 strain JV-4 complete genome
4	M35514	S.pyogenes streptococcal pyrogenic exotoxin type C (sp
5	AM039952	Xanthomonas campestris pv. vesicatoria complete genc
6	AE017220	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraesu
7	DQ462191	Human T-lymphotropic virus 3 strain Pyl 43, complete g
8	AE017221	Thermus thermophilus HB27, complete genome
9	AP007255	Magnetospirillum magneticum AMB-1 DNA, complete g
10	NC_003888	Streptomyces coelicolor A3(2), complete genome
11	CP000479	Mycobacterium avium 104, complete genome
12	CP000086	Burkholderia thailandensis E264 chromosome I, comple
13	U10527	Bordetella pertussis BP338 DNA dermonecrotic toxin (d
14	NC_001676	Human papillomavirus - 54, complete genome
15	NC_009127	Cyprinid herpesvirus 3, complete genome
16	AY684891	Influenza A virus (A/black-headed gull/Sweden/5/99(H
17	AB201226	Human papillomavirus type 94 DNA, nearly complete g
18	DQ080079	Human papillomavirus type 68a, complete genome
19	NC_001408	Avian leukosis virus - RSA, complete genome
20	AF531420	Human papillomavirus type 92, complete genome
21	NC_001458	Human papillomavirus type 63, complete genome

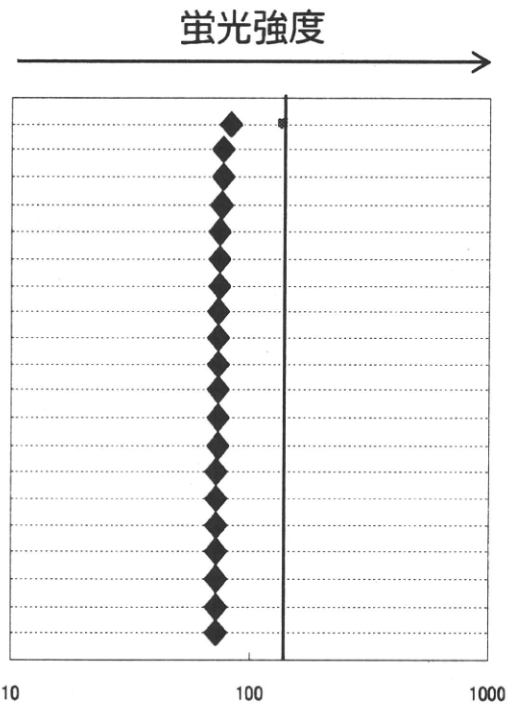


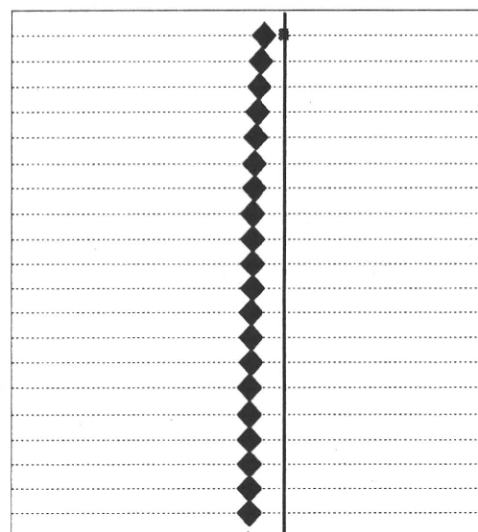
Fig. 3 続き

豚 廃棄肺

流行性肺炎SEP

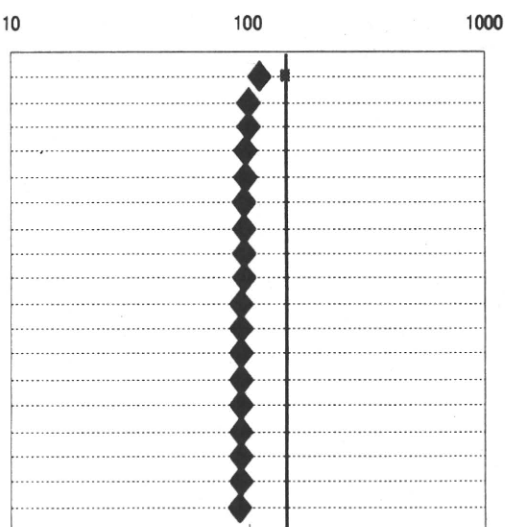
候補順位	Acession No.	検出病原体候補
1	M35514	S.pyogenes streptococcal pyrogenic exotoxin type C (sp
2	CP000577	Rhodobacter sphaeroides ATCC 17029 chromosome 1,
3	X53180	Clostridium butyricum gene for botulinum type E toxin,
4	CP000250	Rhodopseudomonas palustris HaA2, complete genome
5	M12737	Human papillomavirus type 8, complete genome
6	AM039952	Xanthomonas campestris pv. vesicatoria complete genc
7	EF208930	Hantavirus CJA93 segment M, complete sequence
8	X61560	S.pyogenes strain MGAS156 speA gene (allele 1) for typ
9	AJ224480	Clostridium botulinum gene encoding C2 toxin (compor
10	U10527	Bordetella pertussis BP338 DNA dermonecrotic toxin (d
11	Y16009	Clostridium perfringens cpe gene
12	BX248347	Mycobacterium bovis subsp. bovis AF2122/97 complet
13	DQ011855	Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus strai
14	AB099607	Influenza C virus (C/Yamagata/6/2000) NS gene for non
15	CP000440	Burkholderia ambifaria AMMD chromosome 1, complet
16	CU234118	Bradyrhizobium sp. ORS278, complete sequence
17	CP000479	Mycobacterium avium 104, complete genome
18	AE004969	Neisseria gonorrhoeae FA 1090, complete genome
19	M26090	Influenza A virus (A/ring-billed gull/Maryland/704/197
20	AY302549	Human echovirus 25 strain JV-4 complete genome

蛍光強度



肺炎

候補順位	Acession No.	検出病原体候補
1	M35514	S.pyogenes streptococcal pyrogenic exotoxin type C (sp
2	DQ462191	Human T-lymphotropic virus 3 strain Pyl 43, complete g
3	M85198	Vibrio cholerae NAG-ST (stn) gene, complete cds
4	AB027021	Human papillomavirus type 82 DNA, complete genome
5	AF293960	Human papillomavirus type 84, complete genome
6	NC_003266	Human adenovirus E, complete genome
7	CP000261	Streptococcus pyogenes MGAS2096, complete genome
8	AF419157	Aeromonas hydrophila isolate SSU enterotoxin (ast) gei
9	AE014613	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi Ty2,
10	AL627276	Salmonella enterica serovar Typhi (Salmonella typhi) st
11	CP000453	12/20
12	AY395706	Alkalilimnicola ehrlichei MLHE-1, complete genome
13	AF436130	Human papillomavirus type 62 isolate Qv18091, compl
14	DQ366347	Human papillomavirus type 74 subtype AE10, complete
15	AM039952	Norovirus Hu/OsakaNI/2004/JP ORF1 and ORF2 mRNA,
16	CP000259	Xanthomonas campestris pv. vesicatoria complete genc
17	CY015021	Streptococcus pyogenes MGAS9429, complete genome
18	DQ473489	Influenza A virus (A/chicken/Victoria/1985(H7N7)) segn
		Human rhinovirus 70, complete genome



流行性肺炎SEP

候補順位	Acession No.	検出病原体候補
1	M35514	S.pyogenes streptococcal pyrogenic exotoxin type C (sp
2	NC_001545	Rubella virus, complete genome
3	CP000261	Streptococcus pyogenes MGAS2096, complete genome
4	AE017221	Thermus thermophilus HB27, complete genome
5	M98037	Clostridium perfringens enterotoxin gene, complete cd
6	BX248347	Mycobacterium bovis subsp. bovis AF2122/97 complet
7	NC_001479	Encephalomyocarditis virus, complete genome
8	AY302555	Human echovirus 32 strain PR-10 complete genome
9	AE004969	Neisseria gonorrhoeae FA 1090, complete genome
10	CP000259	Streptococcus pyogenes MGAS9429, complete genome
11	CP000555	Methylibium petroleiphilum PM1, complete genome
12	AB000860	Akabane virus RNA for nucleoprotein, complete cds
13	CP000017	Streptococcus pyogenes MGAS5005, complete genome
14	NC_006560	Cercopithecine herpesvirus 2, complete genome
15	AB018697	Human rotavirus A gene for VP7, complete cds
16	AY395706	Human papillomavirus type 62 isolate Qv18091, compl
17	NC_004148	Human metapneumovirus, complete genome
18	AB043500	Influenza A virus (A/Ibaraki/90/1998(H1N1)) HA gene fr
19	J04353	Human papillomavirus type 31 (HPV-31) complete genc
20	M12737	Human papillomavirus type 8, complete genome

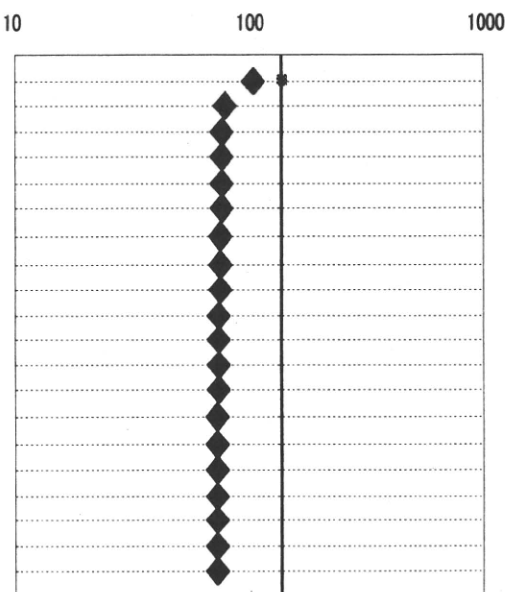


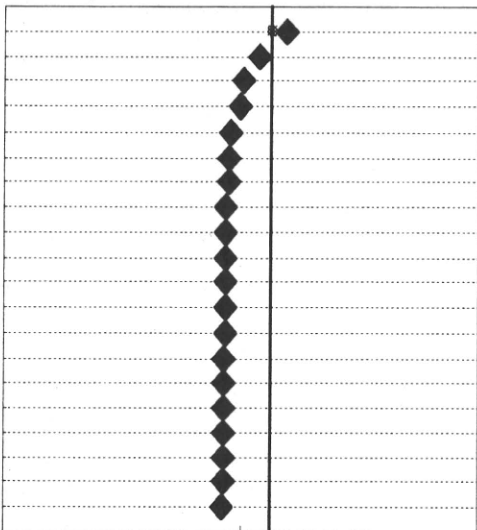
Fig. 3 続き

豚 廃棄下顎リンパ節

抗酸菌症

候補順位	Acession No.	検出病原体候補
1	M35514	<i>S.pyogenes</i> streptococcal pyrogenic exotoxin type C (sp
2	AL939114	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) complete genome; segm
3	NC_003468	Andes virus segment L, complete sequence
4	D42143	<i>Staphylococcus aureus</i> hlg2 gene for gamma-hemolysin
5	AF104263	Hepatitis D virus strain TW2667, complete genome
6	EF362755	Human papillomavirus type 2 isolate C1, complete genome
7	DQ010921	Feline coronavirus strain FIPV 79-1146, complete genome
8	NC_009127	Cyprinid herpesvirus 3, complete genome
9	AY395706	Human papillomavirus type 62 isolate Qv18091, complete genome
10	DQ835770	Hepatitis C virus subtype 6i isolate Th602, complete genome
11	X03929	<i>Streptococcus pyogenes</i> speA gene for exotoxin type I
12	NC_001576	Human papillomavirus type 10, complete genome
13	DQ186797	Bluetongue virus 9 isolate BUL1999/01 inner core structure
14	CP000359	<i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300, complete genome
15	M12737	Human papillomavirus type 8, complete genome
16	AB118846	Hepatitis delta virus DNA, complete genome, strain: Miy
17	X61560	<i>S.pyogenes</i> strain MGAS156 speA gene (allele 1) for type
18	CP000431	<i>Rhodococcus</i> sp. RHA1, complete genome
19	NC_002067	Human adenovirus D, complete genome
20	NC_004325	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7 chromosome 1, complete

蛍光強度



非定型抗酸菌症

候補順位	Acession No.	検出病原体候補
1	AL939114	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) complete genome; segment
2	CP000661	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17025, complete genome
3	X61560	<i>S.pyogenes</i> strain MGAS156 speA gene (allele 1) for type
4	DQ010921	Feline coronavirus strain FIPV 79-1146, complete genome
5	BA000019	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 DNA, complete genome
6	M95206	<i>Clostridium perfringens</i> epsilon-toxin (etxD) gene, complete
7	NC_006077	<i>Kluyveromyces lactis</i> mitochondrion, complete genome
8	DQ080081	Human papillomavirus type 101, complete genome
9	AY302546	Human echovirus 20 strain JV-1 complete genome
10	M12197	Poliovirus type 2 (Lansing strain), complete genome
11	CP000378	<i>Burkholderia cenocepacia</i> AU 1054 chromosome 1, complete
12	NC_009127	Cyprinid herpesvirus 3, complete genome
13	X03929	<i>Streptococcus pyogenes</i> speA gene for exotoxin type I
14	CP000555	<i>Methylobium petroleiphilum</i> PM1, complete genome
15	AY525843	Human metapneumovirus isolate NL/1/99, complete genome
16	U37537	Human papillomavirus type 57b complete genome
17	AY395706	Human papillomavirus type 62 isolate Qv18091, complete genome
18	AB039776	Norwalk-like virus genomic RNA, complete genome, isolate
19	D21208	Human papillomavirus type 67 complete genome
20	BK001744	TPA_exp: Suid herpesvirus 1, complete genome
21	AY494850	Duck hepatitis B virus, complete genome

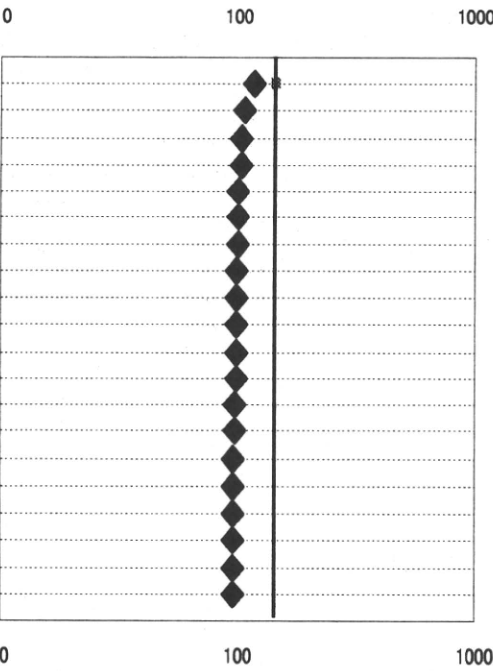


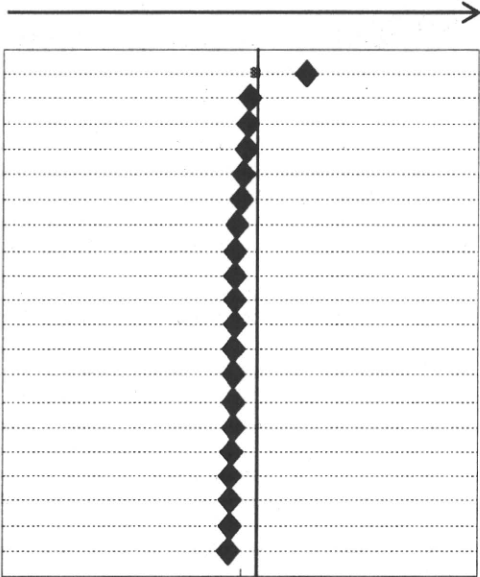
Fig. 3 続き

牛 廃棄肝臓

富脈斑

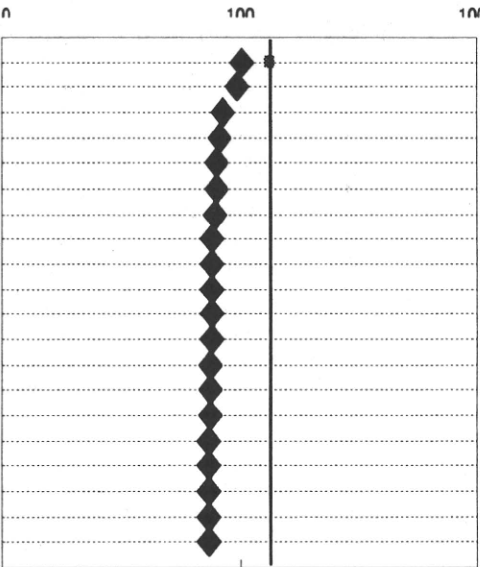
候補順位	Acession No.	検出病原体候補
1	AL939114	Streptomyces coelicolor A3(2) complete genome; segm
2	AF104263	Hepatitis D virus strain TW2667, complete genome
3	AE017221	Thermus thermophilus HB27, complete genome
4	NC_006560	Cercopithecine herpesvirus 2, complete genome
5	AB027021	Human papillomavirus type 82 DNA, complete genome
6	M12732	Human papillomavirus type 33, complete genome
7	AE017220	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraesu
8	BK001744	TPA_exp: Suid herpesvirus 1, complete genome
9	DQ835770	Hepatitis C virus subtype 6i isolate Th602, complete gei
10	NC_006077	Kluyveromyces lactis mitochondrion, complete genome
11	AF419157	Aeromonas hydrophila isolate SSU enterotoxin (ast) gei
12	NC_009127	Cyprinid herpesvirus 3, complete genome
13	DQ010921	Feline coronavirus strain FIPV 79-1146, complete genor
14	AY395706	Human papillomavirus type 62 isolate Qv18091, compl
15	DQ080081	Human papillomavirus type 101, complete genome
16	Y16009	Clostridium perfringens cpe gene
17	AY896760	Human enterovirus B strain EV6-10887-99 from Russia
18	CP000479	Mycobacterium avium 104, complete genome
19	X74483	Human papillomavirus type 56 genomic DNA
20	AM406671	Lactococcus lactis subsp. cremoris MG1363, complete g

蛍光強度



富脈斑

候補順位	Acession No.	s検出病原体候補
1	AL939114	Streptomyces coelicolor A3(2) complete genome; segm
2	CP000661	Rhodobacter sphaeroides ATCC 17025, complete genor
3	DQ080081	Human papillomavirus type 101, complete genome
4	NC_003468	Andes virus segment L, complete sequence
5	CP000431	Rhodococcus sp. RHA1, complete genome
6	AF419157	Aeromonas hydrophila isolate SSU enterotoxin (ast) gei
7	M12737	Human papillomavirus type 8, complete genome
8	X03929	Streptococcus pyogenes speA gene for exotoxin type /
9	NC_003888	Streptomyces coelicolor A3(2), complete genome
10	NC_001676	Human papillomavirus - 54, complete genome
11	CP000577	Rhodobacter sphaeroides ATCC 17029 chromosome 1,
12	CP000479	Mycobacterium avium 104, complete genome
13	NC_004325	Plasmodium falciparum 3D7 chromosome 1, complete
14	CP000017	Streptococcus pyogenes MGAS5005, complete genome
15	NC_006077	Kluyveromyces lactis mitochondrion, complete genome
16	CP000555	Methylibium petroleiphilum PM1, complete genome
17	EF151503	Eastern equine encephalitis virus strain BeAr436087, cc
18	CP000378	Burkholderia cenocepacia AU 1054 chromosome 1, con
19	CP000259	Streptococcus pyogenes MGAS9429, complete genome
20	AE017220	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraesu



富脈斑

候補順位	Acession No.	検出病原体候補
1	AL939114	Streptomyces coelicolor A3(2) complete genome; segm
2	AF419157	Aeromonas hydrophila isolate SSU enterotoxin (ast) gei
3	AB027021	Human papillomavirus type 82 DNA, complete genome
4	M12732	Human papillomavirus type 33, complete genome
5	AE017220	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraesu
6	DQ835767	Hepatitis C virus subtype 6m isolate B4/92, complete g
7	DQ080081	Human papillomavirus type 101, complete genome
8	AM183330	Hepatitis delta virus complete virion genome, strain dFi
9	DQ010921	Feline coronavirus strain FIPV 79-1146, complete genor
10	AJ620350	Influenza A virus (A/Chicken/Germany/R28/03(H7N7))
11	CP000359	Deinococcus geothermalis DSM 11300, complete genor
12	NC_003888	Streptomyces coelicolor A3(2), complete genome
13	EF208930	Hantavirus CJA93 segment M, complete sequence
14	AJ400628	Human papillomavirus type 87 (candidate) complete ge
15	AJ577594	Human echovirus 11, isolate ROU-9191, complete virio
16	D00435	Swine vesicular disease virus (STRAIN H/3 '76) genomic
17	CP000431	Rhodococcus sp. RHA1, complete genome
18	J04353	Human papillomavirus type 31 (HPV-31) complete genc
19	BX248347	Mycobacterium bovis subsp. bovis AF2122/97 complete
20	CT573213	Frankia alni str. ACN14A chromosome, complete seque

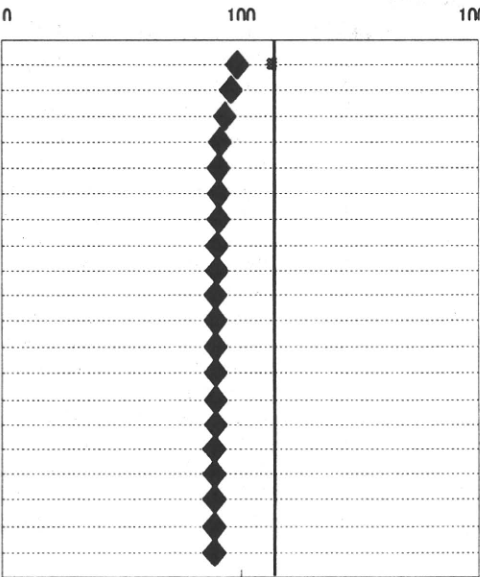


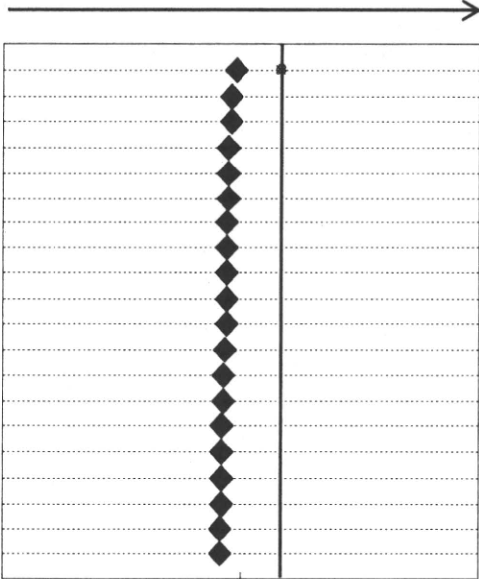
Fig. 3 続き

牛 廃棄肝臓

富脈斑

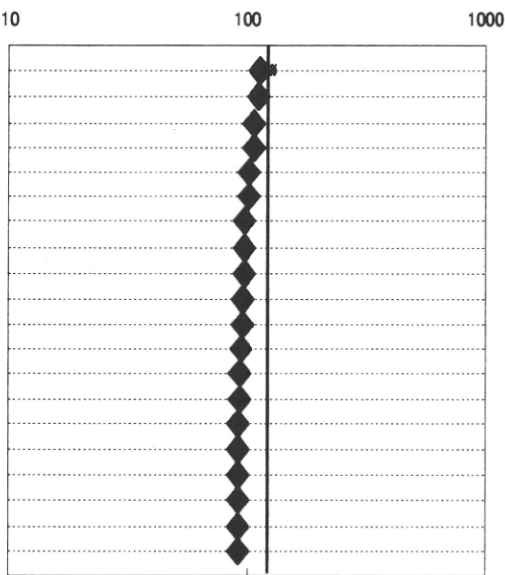
候補順位	Acession No.	検出病原体候補
1	AL939114	Streptomyces coelicolor A3(2) complete genome; segm
2	AE017220	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraesu
3	X03929	Streptococcus pyrogenes speA gene for exotoxin type I
4	NC_003888	Streptomyces coelicolor A3(2), complete genome
5	CP000577	Rhodobacter sphaeroides ATCC 17029 chromosome 1,
6	CP000661	Rhodobacter sphaeroides ATCC 17025, complete genor
7	NC_002512	Murid herpesvirus 2, complete genome
8	NC_006077	Kluyveromyces lactis mitochondrion, complete genome
9	AF419157	Aeromonas hydrophila isolate SSU enterotoxin (ast) gei
10	AF436130	Human papillomavirus type 74 subtype AE10, complete
11	DQ080081	Human papillomavirus type 101, complete genome
12	AJ577594	Human echovirus 11, isolate ROU-9191, complete virio
13	M12737	Human papillomavirus type 8, complete genome
14	CP000431	Rhodococcus sp. RHA1, complete genome
15	AM406671	Lactococcus lactis subsp. cremoris MG1363, complete g
16	NC_002067	Human adenovirus D, complete genome
17	AB027021	Human papillomavirus type 82 DNA, complete genome
18	CP000479	Mycobacterium avium 104, complete genome
19	AY395706	Human papillomavirus type 62 isolate Qv18091, compl
20	AF184083	Human rotavirus B strain CAL outer capsid protein VP7

蛍光強度



富脈斑

候補順位	Acession No.	検出病原体候補
1	DQ080081	Human papillomavirus type 101, complete genome
2	AL939114	Streptomyces coelicolor A3(2) complete genome; segm
3	CP000378	Burkholderia cenocepacia AU 1054 chromosome 1, con
4	AE017220	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraesu
5	NC_003468	Andes virus segment L, complete sequence
6	X61560	S.pyogenes strain MGAS156 speA gene (allele 1) for typ
7	CP000259	Streptococcus pyogenes MGAS9429, complete genome
8	AB118846	Hepatitis delta virus DNA, complete genome, strain:Mi
9	NC_001545	Rubella virus, complete genome
10	NC_001676	Human papillomavirus - 54, complete genome
11	BX248347	Mycobacterium bovis subsp. bovis AF2122/97 complet
12	X70827	Human papillomavirus type 4 complete genome
13	L13198	Clotridium perfringens type B beta-toxin gene, comple
14	X92973	C.botulinum A ntnh and bont genes
15	DQ835770	Hepatitis C virus subtype 6i isolate Th602, complete gei
16	X03929	Streptococcus pyrogenes speA gene for exotoxin type I
17	CP000431	Rhodococcus sp. RHA1, complete genome
18	BK001744	TPA_exp: Suid herpesvirus 1, complete genome
19	NC_001593	Human papillomavirus type 53, complete genome
20	AE004969	Neisseria gonorrhoeae FA 1090, complete genome



富脈斑

候補順位	Acession No.	検出病原体候補
1	Y16009	Clostridium perfringens cpe gene
2	D42143	Staphylococcus aureus hlg2 gene for gamma-hemolysir
3	AE017221	Thermus thermophilus HB27, complete genome
4	X03929	Streptococcus pyrogenes speA gene for exotoxin type I
5	A10937	Human rhinovirus 89 (HRV89), complete genome
6	CP000661	Rhodobacter sphaeroides ATCC 17025, complete genor
7	CP000555	Methylibium petroleiphilum PM1, complete genome
8	M35514	S.pyogenes streptococcal pyrogenic exotoxin type C (sp
9	CP000580	Mycobacterium sp. JLS, complete genome
10	DQ080081	Human papillomavirus type 101, complete genome
11	AY494850	Duck hepatitis B virus, complete genome
12	AY684891	Influenza A virus (A/black-headed gull/Sweden/5/99(H
13	CP000086	Burkholderia thailandensis E264 chromosome I, compl
14	NC_003888	Streptomyces coelicolor A3(2), complete genome
15	AE017220	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraesu
16	CP000431	Rhodococcus sp. RHA1, complete genome
17	AY262282	Human papillomavirus type 18 complete sequence
18	M17357	S.aureus eta gene encoding epidermolytic toxin A, com
19	BX640415	Bordetella pertussis strain Tohama I, complete genome

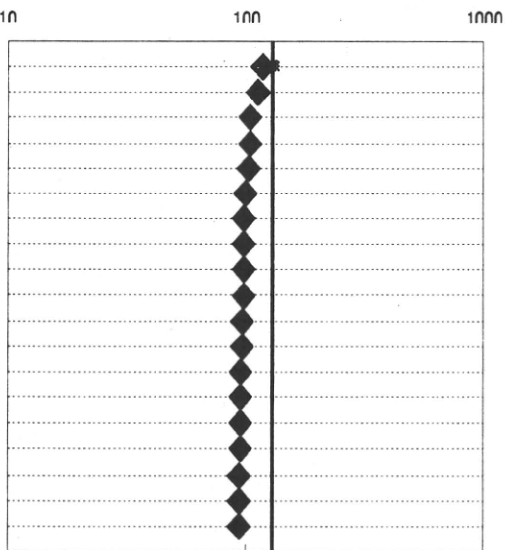
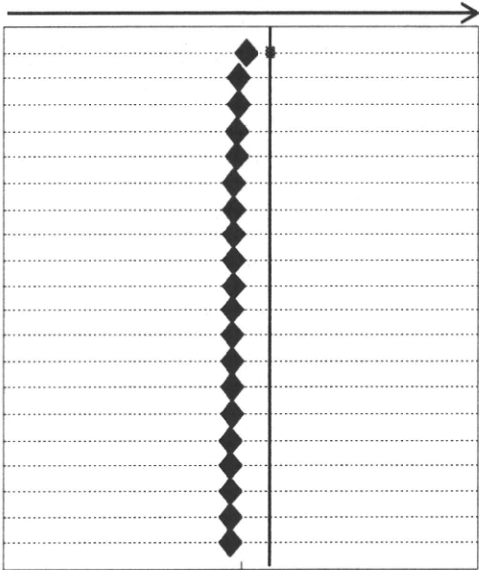


Fig. 3 続き

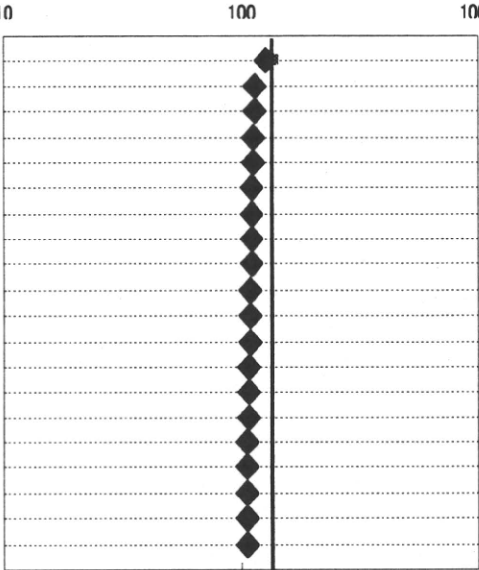
牛 廃棄肝臓

膿瘍	候補順位	Acession No.	検出病原体候補
	1	X03929	Streptococcus pyogenes speA gene for exotoxin type I
	2	CP000661	Rhodobacter sphaeroides ATCC 17025, complete genom
	3	AL939114	Streptomyces coelicolor A3(2) complete genome; segm
	4	AY740736	Human rotavirus G3 strain B4106 segment 9, complete
	5	NC_003888	Streptomyces coelicolor A3(2), complete genome
	6	NC_006560	Cercopithecine herpesvirus 2, complete genome
	7	AM039952	Xanthomonas campestris pv. vesicatoria complete genom
	8	EF362755	Human papillomavirus type 2 isolate C1, complete genom
	9	CP000555	Methylibium petroleiphilum PM1, complete genome
	10	AF419157	Aeromonas hydrophila isolate SSU enterotoxin (ast) ge
	11	DQ080081	Human papillomavirus type 101, complete genome
	12	NC_007935	Paracoccidioides brasiliensis mitochondrion, complete
	13	DQ080079	Human papillomavirus type 68a, complete genome
	14	U06714	Human papillomavirus type 1a (3-3), complete genome
	15	BX248347	Mycobacterium bovis subsp. bovis AF2122/97 complet
	16	NC_002067	Human adenovirus D, complete genome
	17	AF125673	Human papillomavirus type 16 isolate 16W12E, comple
	18	X70827	Human papillomavirus type 4 complete genome
	19	BK001744	TPA_exp: Suid herpesvirus 1, complete genome
	20	CP000133	Rhizobium etli CFN 42, complete genome

蛍光強度



膿瘍	候補順位	Acession No.	検出病原体候補
	1	AL939114	Streptomyces coelicolor A3(2) complete genome; segm
	2	M85198	Vibrio cholerae NAG-ST (stn) gene, complete cds
	3	CP000259	Streptococcus pyogenes MGAS9429, complete genome
	4	M17357	S.aureus eta gene encoding epidermolytic toxin A, com
	5	AF419157	Aeromonas hydrophila isolate SSU enterotoxin (ast) ge
	6	AJ400628	Human papillomavirus type 87 (candidate) complete ge
	7	CP000359	Deinococcus geothermalis DSM 11300, complete genom
	8	NC_007323	Bacillus anthracis str. 'Ames Ancestor' plasmid pXO2, cc
	9	Y16009	Clostridium perfringens cpe gene
	10	AP007255	Magnetospirillum magneticum AMB-1 DNA, complete g
	11	AB292661	Influenza A virus (A/duck/Hong Kong/22B/1976(H3N6))
	12	M18970	S.aureus enterotoxin A (entA) gene, complete cds
	13	X61560	S.pyogenes strain MGAS156 speA gene (allele 1) for typ
	14	AY302556	Human echovirus 33 strain Toluca-3 complete genome
	15	CP000555	Methylibium petroleiphilum PM1, complete genome
	16	DQ473489	Human rhinovirus 70, complete genome
	17	CY005548	Influenza A virus (A/duck/Hong Kong/278/1978(H2N9))
	18	AY875692	Human coxsackievirus B5 isolate 2000/CSF/KOR, compl
	19	DQ080081	Human papillomavirus type 101, complete genome
	20	AB289343	Influenza A virus (A/turkey/Ontario/6118/1968(H8N4))



鋸屑肝	候補順位	Acession No.	検出病原体候補
	1	AL939114	Streptomyces coelicolor A3(2) complete genome; segm
	2	NC_006560	Cercopithecine herpesvirus 2, complete genome
	3	AF419157	Aeromonas hydrophila isolate SSU enterotoxin (ast) ge
	4	NC_002512	Murid herpesvirus 2, complete genome
	5	CP000577	Rhodobacter sphaeroides ATCC 17029 chromosome 1,
	6	AF125673	Human papillomavirus type 16 isolate 16W12E, comple
	7	AF436130	Human papillomavirus type 74 subtype AE10, complete
	8	CP000259	Streptococcus pyogenes MGAS9429, complete genome
	9	BX640439	Bordetella bronchiseptica strain RB50, complete genom
	10	NC_003888	Streptomyces coelicolor A3(2), complete genome
	11	CT573213	Frankia alni str. ACN14A chromosome, complete seque
	12	NC_001458	Human papillomavirus type 63, complete genome
	13	AF104263	Hepatitis D virus strain TW2667, complete genome
	14	CY014993	Influenza A virus (A/fowl/Dobson/1927(H7N7)) segmen
	15	AE004969	Neisseria gonorrhoeae FA 1090, complete genome
	16	X78230	C.botulinum type B (NCTC 7273) nontoxic-nonhemaggl
	17	Y16009	Clostridium perfringens cpe gene
	18	BX640417	Bordetella pertussis strain Tohama I, complete genome
	19	BK001744	TPA_exp: Suid herpesvirus 1, complete genome
	20	AB099607	Influenza C virus (C/Yamagata/6/2000) NS gene for non

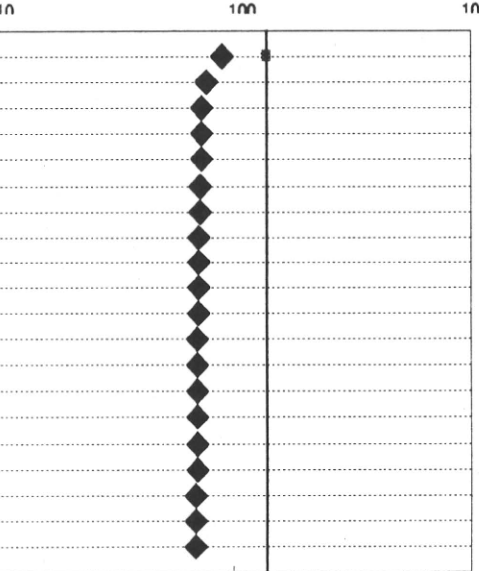
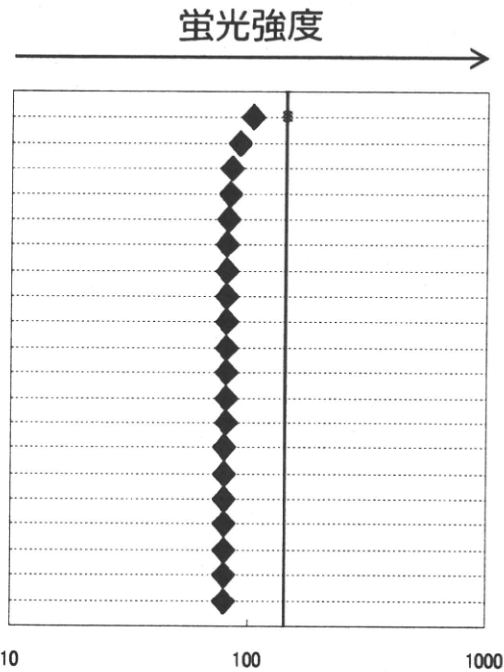


Fig. 3 続き

牛 廃棄肝臓

正常

候補順位	Acession No.	検出病原体候補
1	NC_003888	Streptomyces coelicolor A3(2), complete genome
2	AL939114	Streptomyces coelicolor A3(2) complete genome; segm
3	AF419157	Aeromonas hydrophila isolate SSU enterotoxin (ast) gei
4	NC_009127	Cyprinid herpesvirus 3, complete genome
5	CP000431	Rhodococcus sp. RHA1, complete genome
6	X74483	Human papillomavirus type 56 genomic DNA
7	CP000661	Rhodobacter sphaeroides ATCC 17025, complete genor
8	NC_006077	Kluyveromyces lactis mitochondrion, complete genome
9	CU234118	Bradyrhizobium sp. ORS278, complete sequence
10	AJ400628	Human papillomavirus type 87 (candidate) complete g
11	AE017220	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraesu
12	DQ080081	Human papillomavirus type 101, complete genome
13	BK001744	TPA_exp: Suid herpesvirus 1, complete genome
14	D00435	Swine vesicular disease virus (STRAIN H/3 '76) genomic
15	EF208930	Hantavirus CJAp93 segment M, complete sequence
16	CP000479	Mycobacterium avium 104, complete genome
17	BX248347	Mycobacterium bovis subsp. bovis AF2122/97 complet
18	A10937	Human rhinovirus 89 (HRV89), complete genome
19	AF241359	Enterovirus CA55-1988, complete genome
20	AF436128	Human papillomavirus - cand89, complete genome



牛 廃棄胃

胃炎

候補順位	Acession No.	検出病原体候補
1	D42143	Staphylococcus aureus hlg2 gene for gamma-hemolysin
2	X53180	Clostridium butyricum gene for botulinum type E toxin,
3	DQ080081	Human papillomavirus type 101, complete genome
4	M35514	S.pyogenes streptococcal pyrogenic exotoxin type C (sp
5	AY302543	Human echovirus 17 strain CHHE-29 complete genome
6	NC_001545	Rubella virus, complete genome
7	AY726732	Chikungunya virus strain 37997, complete genome
8	AJ224480	Clostridium botulinum gene encoding C2 toxin (compon
9	CP000261	Streptococcus pyogenes MGA52096, complete genome
10	AE014613	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi Ty2, c
11	X74474	Human papillomavirus type 30 genomic DNA
12	X03929	Streptococcus pyogenes speA gene for exotoxin type A
13	AB289344	Influenza A virus (A/turkey/Ontario/6118/1968(H8N4))
14	AY826423	Sapovirus swine/OH-JJ259/00/US polyprotein gene, par
15	CP000661	Rhodobacter sphaeroides ATCC 17025, complete genon
16	CP000577	Rhodobacter sphaeroides ATCC 17029 chromosome 1, c
17	U10527	Bordetella pertussis BP338 DNA dermonecrotic toxin (d
18	AY302552	Human echovirus 29 strain JV-10 complete genome
19	AE014075	Escherichia coli CFT073, complete genome
20	CP000038	Shigella sonnei Ss046, complete genome

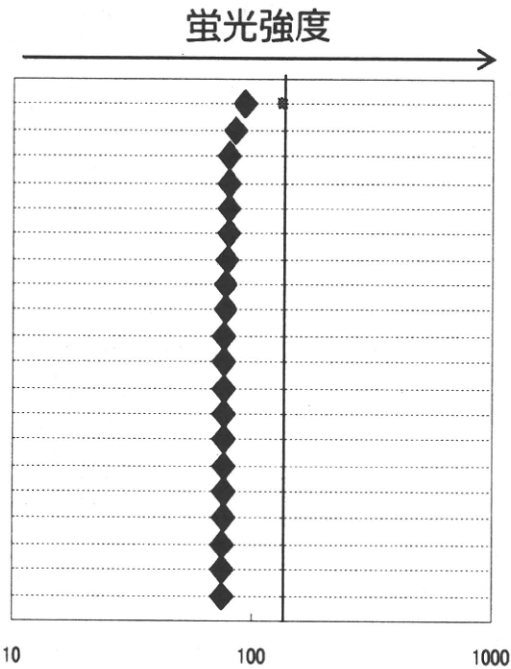


Fig. 3 続き