

DNA を用いて MMDPA 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、MMDPA 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

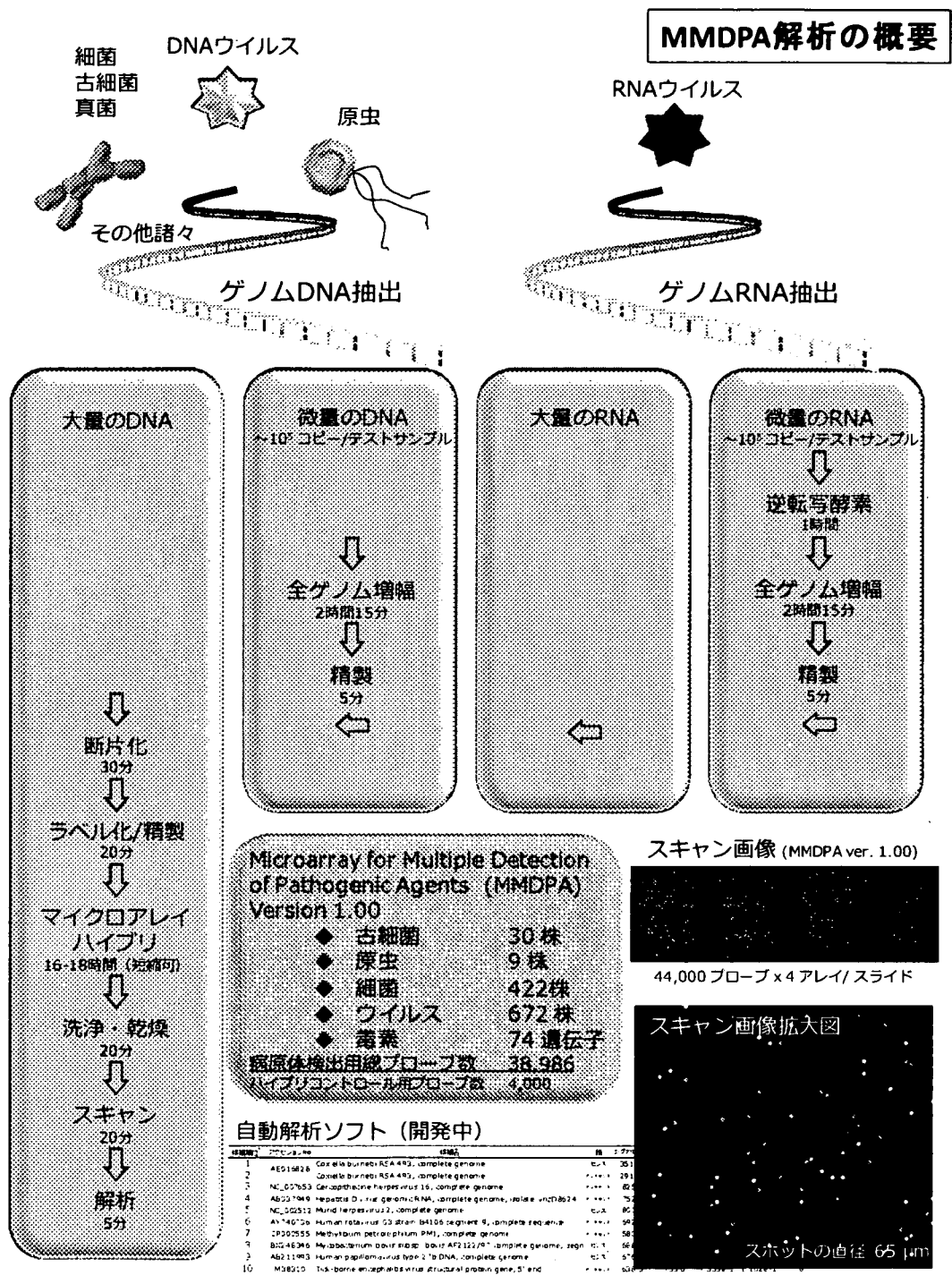


図. MMDPA の概要

表1. Influenza A virus (A/Puerto Rico/8/34(H1N1))のMMDPA解析結果

候補順位 [†]	アクセシオンNo.	候補名	シグナル平均値	シグナル中央値	p [*]	Z [‡]	スポット数
1	AY122326	Influenza A virus (A/Marton/43(H1N1)) neuraminidase gene, partial cc	1323.1	1088.8	2.62e-13	3.188e+0	7
2	CY000026	Influenza A virus (A/New York/32/2003(H3N2)) segment 7, complete	723.6	493.0	3.688e-6	1.637e+0	8
3	CY017060	Influenza A virus (A/chicken/Viet Nam/17/2005(H5N1)) segment 7, cc	323.1	347.5	1.413e-1	6.006e-1	6
4	NC_004317	Plasmodium falciparum 3D7 chromosome 14, complete sequence	227.5	261.0	6.143e-2	3.536e-1	28
5	AY684906	Influenza A virus (A/black-headed gull/Netherlands/1/00(H13N8)) mal	372.1	238.0	3.965e-2	7.275e-1	8
6	CY009628	Influenza A virus (A/Swine/31(H1N1)) segment 4, complete sequence	306.3	179.0	4.452e-2	5.573e-1	13
7	AL939112	Streptomyces coelicolor A3(2) complete genome; segment 9/29	124.0	155.5	8.822e-1	8.555e-2	3
8	M85198	Vibrio cholerae NAG-ST (stm) gene, complete cds	135.8	152.0	8.698e-1	1.159e-1	2
9	NC_004317	Plasmodium falciparum 3D7 chromosome 14, complete sequence	161.5	149.0	3.331e-1	1.83e-1	28
10	X61560	S.pyogenes strain MGAS156 speA gene (allele 1) for type A exotoxin	114.8	145.0	9.306e-1	6.161e-2	2
11	AB043500	Influenza A virus (A/Ibaraki/90/1998(H1N1)) HA gene for hemagglutinin	377.2	137.0	1.92e-2	7.406e-1	10
12	BX248347	Mycobacterium bovis subsp. bovis AF2122/97 complete genome; segn	121.5	136.8	8.911e-1	7.908e-2	3
13	AE017220	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraesuis str. SC-B67,	109.2	125.0	9.349e-1	4.717e-2	3
14	CP000026	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Paratyphi A str. ATCC 915	119.3	123.0	8.835e-1	7.326e-2	4
15	X78230	C.botulinum type B (NCTC 7273) nontoxic-nonhemagglutinin gene	101.0	121.8	9.64e-1	2.604e-2	3
16	NC_002077	Adeno-associated virus 1, complete genome	146.1	119.0	6.863e-1	1.428e-1	8
17	AJ000766	Clostridium perfringens gene encoding enterotoxin	97.5	117.5	9.765e-1	1.699e-2	3
18	BX842580	Mycobacterium tuberculosis H37Rv complete genome; segment 9/13	120.4	117.0	8.098e-1	7.611e-2	10
19	M29255	E.coli heat-stable toxin (st) gene, complete cds	102.2	115.8	9.599e-1	2.906e-2	3
20	M11118	S.aureus enterotoxin B gene, complete cds	109.2	115.5	8.937e-1	4.723e-2	8
21	DQ324666	Gallid herpesvirus 1 isolate Bio-Trach UL47 and glycoprotein G genes,	130.9	115.5	8.172e-1	1.034e-1	5
22	EF173414	Human rhinovirus 11, complete genome	95.8	114.0	9.735e-1	1.256e-2	7
23	AJ620205	Human papillomavirus type 43 complete genome	100.4	113.5	9.486e-1	2.439e-2	7
24	BX842576	Mycobacterium tuberculosis H37Rv complete genome; segment 5/13	89.3	113.0	9.915e-1	-4.352e-3	6
25	M95206	Clostridium perfringens epsilon-toxin (etxD) gene, complete cds	88.8	113.0	9.936e-1	-5.645e-3	2
26	M74117	Human papillomavirus type 35 complete genome	109.4	113.0	8.799e-1	4.777e-2	10
27	X51661	S.aureus enterotoxin C3 gene (entC3)	107.3	113.0	9.327e-1	4.221e-2	4
28	AF508557	Influenza A virus (A/Duck/Germany/113/95(H9N2)) segment 4 hemaç	101.3	112.0	9.479e-1	2.669e-2	6
29	X92973	C.botulinum A ntsh and bont genes	101.8	111.8	9.61e-1	2.82e-2	3
30	CY005930	Influenza A virus (A/shorebird/DE/10/2004(H10N7)) segment 4, comp	102.4	111.5	9.329e-1	2.976e-2	8

[†] 候補順位は、各標的スポットのシグナル中央値を降順に上位30位まで示した。

^{*} p は有意水準 (α) = 0.001 で算出し、帰無仮説が棄却できた場合灰色の背景で示した。

[‡] Z が棄却限界値 (3.09) より大の場合は帰無仮説を棄却し、背景を灰色で示した。

表2. Influenza A virus (A/WSN/33(H1N1))のMMDPA解析結果

候補順位*	アクセシオンNo.	候補名	シグナル平均値	シグナル中央値	p	Z†	スポット数
1	AY122326	Influenza A virus (A/Marton/43(H1N1)) neuraminidase gene, partial cc	1213.0	1483.3	2.576e-14	8.814e+0	7
2	CY000026	Influenza A virus (A/New York/32/2003(H3N2)) segment 7, complete	728.6	867.5	9.148e-14	5.01e+0	8
3	AY684906	Influenza A virus (A/black-headed gull/Netherlands/1/00(H13N8)) ma1	445.5	435.0	2.944e-13	2.79e+0	8
4	NC_004317	Plasmodium falciparum 3D7 chromosome 14, complete sequence	324.7	374.0	2.025e-13	1.852e+0	28
5		Plasmodium falciparum 3D7 chromosome 14, complete sequence	335.3	354.5	1.914e-13	1.935e+0	28
6	CY017060	Influenza A virus (A/chicken/Viet Nam/17/2005(H5N1)) segment 7, cc	489.2	280.0	3.415e-13	3.132e+0	6
7	AB043500	Influenza A virus (A/Ibaraki/90/1998(H1N1)) HA gene for hemagglutinin	447.3	225.0	2.531e-13	2.804e+0	10
8	CY009628	Influenza A virus (A/Swine/31(H1N1)) segment 4, complete sequence	266.8	176.0	5.592e-7	1.389e+0	13
9	CP000133	Rhizobium etli CFN 42, complete genome	183.9	161.0	1.399e-1	7.382e-1	4
10	Y16009	Clostridium perfringens cpe gene	111.3	148.5	8.113e-1	1.689e-1	2
11	M85198	Vibrio cholerae NAG-ST (strn) gene, complete cds	111.5	145.0	8.091e-1	1.708e-1	2
12	AJ224480	Clostridium botulinum gene encoding C2 toxin (component-1)	105.0	135.5	8.105e-1	1.199e-1	4
13	M95206	Clostridium perfringens epsilon-toxin (etxD) gene, complete cds	110.3	125.5	8.199e-1	1.61e-1	2
14	X53180	Clostridium butyricum gene for botulinum type E toxin, partial	102.3	125.0	8.894e-1	9.831e-2	2
15		Clostridium butyricum gene for botulinum type E toxin, partial	91.5	123.0	9.841e-1	1.405e-2	2
16	AL627276	Salmonella enterica serovar Typhi (Salmonella typhi) strain CT18, cont	108.5	121.8	7.986e-1	1.473e-1	3
17	M29255	E.coli heat-stable toxin (st) gene, complete cds	103.5	119.8	8.515e-1	1.081e-1	3
18	AE017220	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraesuis str. SC-B67,	104.2	118.0	8.444e-1	1.133e-1	3
19	CP000259	Streptococcus pyogenes MGAS9429, complete genome	96.8	117.0	9.121e-1	5.52e-2	4
20	NC_003888	Streptomyces coelicolor A3(2), complete genome	110.1	116.5	7.489e-1	1.6e-1	4
21	X92973	C.botulinum A nth and bont genes	105.2	116.3	8.338e-1	1.212e-1	3
22	CP000038	Shigella sonnei Ss046, complete genome	108.7	115.5	7.392e-1	1.489e-1	5
23	AL939114	Streptomyces coelicolor A3(2) complete genome; segment 11/29	105.8	115.3	8.267e-1	1.264e-1	3
24	CP000359	Deinococcus geothermalis DSM 11300, complete genome	109.5	115.0	7.04e-1	1.551e-1	6
25	CP000378	Burkholderia cenocepacia AU 1054 chromosome 1, complete sequence	109.5	115.0	8.263e-1	1.551e-1	2
26	AF419157	Aeromonas hydrophila isolate SSU enterotoxin (ast) gene, complete c	105.9	115.0	7.557e-1	1.271e-1	6
27	CP000250	Rhodopseudomonas palustris HaA2, complete genome	94.1	115.0	9.448e-1	3.461e-2	4
28	AY302543	Human echovirus 17 strain CHHE-29 complete genome	105.1	114.5	7.335e-1	1.204e-1	8
29	AY726732	Chikungunya virus strain 37997, complete genome	104.6	114.0	7.409e-1	1.169e-1	8
30	BX248346	Mycobacterium bovis subsp. bovis AF2122/97 complete genome; segn	108.1	113.0	7.728e-1	1.444e-1	4

* 候補順位は、各標的スポットのシグナル中央値を降順に上位30位まで示した。

† p は有意水準 (α) = 0.001 で算出し、帰無仮説が棄却できた場合灰色の背景で示した。

‡ Z が棄却限界値 (3.09) より大の場合は帰無仮説を棄却し、背景を灰色で示した。

表3. Influenza A virus (A/duck/Hyogo/35/01(H5N1))のMMDPA解析結果

候補順位*	アクセシオンNo.	候補名	シグナル中央値	シグナル中央値	p	Z	スポット数
1	AB166864	Influenza A virus (A/chicken/Yamaguchi/7/2004(H5N1)) NA gene for r	センス	4655.1	4082.8	1.51e-14	9.768e+0
2	CY017060	Influenza A virus (A/chicken/Viet Nam/17/2005(H5N1)) segment 7, cc	センス	3493.0	1979.0	5.418e-14	7.266e+0
3	EF101756	Influenza A virus (A/Thailand/271/2005(H1N1)) neuraminidase gene,	センス	1650.8	1566.5	2.42e-13	3.31e+0
4	NC_004317	Plasmodium falciparum 3D7 chromosome 14, complete sequence	アソチセンス	1314.8	1563.0	9.193e-14	2.596e+0
5	AY684906	Influenza A virus (A/black-headed gull/Netherlands/1/00(H13N8)) mal	センス	1202.8	1265.5	3.125e-11	2.349e+0
6	NC_004317	Plasmodium falciparum 3D7 chromosome 14, complete sequence	センス	836.1	1063.0	2.554e-13	1.573e+0
7	CY000026	Influenza A virus (A/New York/32/2003(H3N2)) segment 7, complete	センス	2940.4	798.0	6.439e-14	6.081e+0
8	AB189053	Influenza A virus (A/crow/Kyoto/53/2004(H5N1)) HA gene for hemagi	センス	2584.2	719.0	6.772e-14	5.314e+0
9	CP000577	Rhodobacter sphaeroides ATCC 17029 chromosome 1, complete sequ	センス	199.2	255.0	7.345e-1	1.958e-1
10	AB000860	Akabane virus RNA for nucleoprotein, complete cds	センス	162.5	202.5	8.392e-1	1.172e-1
11	NC_003888	Streptomyces coelicolor A3(2), complete genome	センス	154.9	179.0	8.402e-1	1.008e-1
12	CP000133	Rhizobium etli CFN 42, complete genome	センス	543.6	167.0	6.161e-2	9.346e-1
13	NC_001809	Louping ill virus, complete genome	アソチセンス	137.3	160.0	8.773e-1	6.304e-2
14	U10527	Bordetella pertussis BP338 DNA dermonecrotic toxin (dnt) gene, comp	センス	122.3	151.5	9.508e-1	3.084e-2
15	AE017220	Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraesuis str. SC-B67,	アソチセンス	137.2	150.8	9.133e-1	6.284e-2
16	X07869	Influenza A virus (A/chicken/Scotland/59(H5N1)) mRNA for haemaggl	センス	317.6	140.3	2.341e-1	4.498e-1
17	AL627276	Salmonella enterica serovar Typhi (Salmonella typhi) strain CT18, corr	アソチセンス	119.5	139.3	9.655e-1	2.495e-2
18	NC_003888	Streptomyces coelicolor A3(2), complete genome	アソチセンス	134.5	139.0	9.09e-1	5.713e-2
19	M85198	Vibrio cholerae NAG-ST (stn) gene, complete cds	センス	108.8	138.5	9.979e-1	1.889e-3
20	AY395706	Human papillomavirus type 62 isolate Qv18091, complete genome	センス	174.1	138.0	7.072e-1	1.42e-1
21	NC_009127	Koi herpesvirus, complete genome	センス	247.1	133.5	2.473e-1	2.988e-1
22	CP000661	Rhodobacter sphaeroides ATCC 17025, complete genome	センス	112.2	132.8	9.873e-1	9.217e-3
23	M95206	Clostridium perfringens epsilon-toxin (etxD) gene, complete cds	アソチセンス	117.3	130.0	9.773e-1	2.012e-2
24	CY005359	Influenza A virus (A/laughing gull/DE/94/2000(H12N4)) segment 6, α	アソチセンス	173.2	129.0	7.54e-1	1.401e-1
25	Y16009	Clostridium perfringens cpe gene	センス	104.8	128.0	9.925e-1	-6.69e-3
26	NC_002512	Murid herpesvirus 2, complete genome	アソチセンス	377.0	126.0	6.756e-2	5.781e-1
27	AP006840	Symbiobacterium thermophilum IAM 14863 DNA, complete genome	アソチセンス	132.9	124.8	8.721e-1	5.367e-2
28	AF419157	Aeromonas hydrophila isolate SSU enterotoxin (ast) gene, complete α	アソチセンス	149.9	124.5	8.252e-1	9.019e-2
29	CT573213	Frankia alni str. ACN14A chromosome, complete sequence	センス	127.5	124.0	9.25e-1	4.211e-2
30	AB211993	Human papillomavirus type 27b DNA, complete genome	センス	105.7	123.5	9.935e-1	-4.722e-3

* 候補順位は、各標的スポットのシグナル中央値を降順に上位30位まで示した。

* pは有意水準 (α) = 0.001で算出し、帰無仮説が棄却できた場合灰色の背景で示した。

* Zが棄却限界値 (3.09) より大の場合は帰無仮説を棄却し、背景を灰色で示した。

表4. *Coxiella burnetii* Ohio のMMMPA解析結果

候補順位*	アクセッションNo.	候補名	シグナル平均値	シグナル中央値	p	Z†	スポット数
1	AE016828	<i>Coxiella burnetii</i> RSA 493, complete genome	3514.0	2763.0	3.575e-14	4.202e-0	30
2		<i>Coxiella burnetii</i> RSA 493, complete genome	2919.9	2597.5	5.795e-14	3.374e-0	30
3	NC_007653	Cercopithecine herpesvirus 16, complete genome	825.3	1021.0	4.55e-1	3.735e-1	4
4	AB037949	Hepatitis D virus genomic RNA, complete genome, isolate:VnzD8624	752.5	854.0	5.444e-1	2.711e-1	5
5	NC_002512	Murid herpesvirus 2, complete genome	800.4	787.5	2.844e-1	3.386e-1	10
6	AY740736	Human rotavirus G3 strain B4106 segment 9, complete sequence	692.9	778.5	6.467e-1	1.871e-1	6
7	CP000555	Methylibium petroleiphilum PM1, complete genome	580.3	762.0	9.679e-1	2.843e-2	2
8	BX248346	Mycobacterium bovis subsp. bovis AF2122/97 complete genome; segn	688.4	740.0	7.178e-1	1.807e-1	4
9	AB211993	Human papillomavirus type 27b DNA, complete genome	676.0	735.5	7.773e-1	1.633e-1	3
10	M38310	Tick-borne encephalitis virus structural protein gene, 5' end	638.3	733.0	7.553e-1	1.102e-1	8
11	CP000378	Burkholderia cenocepacia AU 1054 chromosome 1, complete sequence	581.5	725.0	9.659e-1	3.02e-2	2
12	M35514	<i>S. pyogenes</i> streptococcal pyrogenic exotoxin type C (speC) gene, com	724.0	724.0			1
13		<i>S. pyogenes</i> streptococcal pyrogenic exotoxin type C (speC) gene, com	689.0	724.0			1
14	M29171	<i>L. monocytogenes</i> SH-activated hemolysin pseudogene, 3' end	698.8	722.3	7.35e-1	1.955e-1	3
15	BX640415	Bordetella pertussis strain Tohama I, complete genome; segment 5/12	616.6	722.0	8.734e-1	7.967e-2	4
16	CP000378	Burkholderia cenocepacia AU 1054 chromosome 1, complete sequence	565.8	722.0	9.91e-1	8.012e-3	2
17	M62877	Human papilloma virus type 51 genomic DNA, partial sequence	679.9	720.0	6.553e-1	1.687e-1	7
18	AB037949	Hepatitis D virus genomic RNA, complete genome, isolate:VnzD8624	626.3	716.8	8.347e-1	9.334e-2	5
19	NC_006560	Cercopithecine herpesvirus 2, complete genome	1060.3	709.5	8.406e-2	7.054e-1	6
20	AB027021	Human papillomavirus type 82 DNA, complete genome	739.1	709.0	5.368e-1	2.522e-1	6
21	AB289336	Influenza A virus (A/mallard/Astrakhan/263/1982(H14N5)) NA gene fr	712.2	705.0	5.444e-1	2.143e-1	8
22	CP000017	Streptococcus pyogenes MGA55005, complete genome	697.1	704.0	6.661e-1	1.93e-1	5
23	BX640430	Bordetella parapertussis strain 12822, complete genome; segment 8/1	750.0	701.0	5.123e-1	2.676e-1	6
24	D50409	Hepatitis C virus (isolate BEBE1) genomic RNA, complete genome	660.3	700.8	6.108e-1	1.412e-1	13
25	AB274042	Influenza A virus (A/duck/Hokkaido/18/00(H10N4)) NA gene for neur	689.0	695.8	6.847e-1	1.816e-1	5
26	AL627282	Salmonella enterica serovar Typhi (Salmonella typhi) strain CT18, com	615.3	695.3	8.927e-1	7.785e-2	3
27	AL939114	Streptomyces coelicolor A3(2) complete genome; segment 11/29	597.3	694.5	9.276e-1	5.249e-2	3
28	AY695810	Human rotavirus G9 strain BA202 nonfunctional VP7 glycoprotein, com	607.4	694.0	8.815e-1	6.666e-2	5
29	CP000681	Shewanella putrefaciens CN-32, complete genome	703.0	693.0	5.245e-1	2.013e-1	10
30	CP000086	Burkholderia thailandensis E264 chromosome I, complete sequence	653.8	692.0	7.678e-1	1.32e-1	5

* 候補順位は、各標的スポットのシグナル中央値を降順に上位30位まで示した。

† p は有意水準 ($\alpha = 0.001$) で算出し、帰無仮説が棄却できた場合灰色の背景で示した。

‡ Z が棄却限界値 (3.09) より大の場合は帰無仮説を棄却し、背景を灰色で示した。

表5. *Escherichia coli* k12 のMMDDPA解析結果

候補順位*	アクセシオンNo.	候補名	シグナル平均値	シグナル中央値	p	Z [†]	スポット数	
1	AC_000091	<i>Escherichia coli</i> W3110 DNA, complete genome	センズ	5117.2	4629.3	2.087e-14	6.589e+0	17
2	U00096	<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655, complete genome	センズ	5144.9	4112.0	2.864e-14	6.635e+0	16
3	CP000036	<i>Shigella boydii</i> Sb227, complete genome	センズ	3747.5	3897.0	7.416e-14	4.589e+0	11
4	CP000034	<i>Shigella dysenteriae</i> Sd197, complete genome	アンチセンズ	4749.9	3896.5	2.953e-14	6.005e+0	15
5	AC_000091	<i>Escherichia coli</i> W3110 DNA, complete genome	アンチセンズ	4417.5	3861.5	3.375e-14	5.615e+0	17
6	AE014073	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 2457T, complete genome	アンチセンズ	3970.2	3847.0	7.194e-14	4.923e+0	12
7	U00096	<i>Escherichia coli</i> K12 MG1655, complete genome	アンチセンズ	4619.6	3838.0	2.731e-14	5.905e+0	16
8	AE005674	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301, complete genome	アンチセンズ	3934.2	3649.0	6.528e-14	4.87e+0	12
9	CP000036	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301, complete genome	アンチセンズ	4059.0	3613.3	5.884e-14	5.023e+0	11
10	AE005674	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301, complete genome	センズ	4157.9	3365.0	6.262e-14	5.174e+0	12
11	AE014073	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 2457T, complete genome	センズ	4493.8	3226.0	4.174e-14	5.656e+0	12
12	CP000034	<i>Shigella dysenteriae</i> Sd197, complete genome	センズ	2680.8	2569.3	1.303e-13	3.077e+0	15
13	CP000378	<i>Burkholderia cenocepacia</i> AU 1054 chromosome 1, complete sequence	センズ	623.3	806.0	8.9e-1	9.777e-2	2
14	AL627282	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi (<i>Salmonella typhi</i>) strain CT18, contig	センズ	618.7	711.3	8.744e-1	9.125e-2	3
15	AB037949	Hepatitis D virus genomic RNA, complete genome, isolate:VnzD8624	センズ	606.9	707.0	8.678e-1	7.447e-2	5
16	BX640415	<i>Bordetella pertussis</i> strain Tohama 1, complete genome; segment 5/12	センズ	624.0	706.0	8.433e-1	9.885e-2	4
17	AB211993	Human papillomavirus type 27b DNA, complete genome	センズ	670.3	699.5	7.752e-1	1.649e-1	3
18	D50409	Hepatitis C virus (isolate BEBE1) genomic RNA, complete genome	アンチセンズ	647.9	694.0	6.319e-1	1.329e-1	13
19	AL627282	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi (<i>Salmonella typhi</i>) strain CT18, contig	アンチセンズ	625.0	693.8	8.621e-1	1.003e-1	3
20	AL939112	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) complete genome; segment 9/29	センズ	618.3	692.5	8.751e-1	9.077e-2	3
21	X62560	Influenza A virus (A/equine/London/1416/73(H7N7)) gene for haemagglutinin	センズ	618.4	687.5	7.973e-1	9.083e-2	8
22	AF419157	<i>Aeromonas hydrophila</i> isolate SSU enterotoxin (ast) gene, complete α	センズ	757.7	687.5	4.784e-1	2.894e-1	6
23	AE004091	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1, complete genome	アンチセンズ	629.6	687.0	7.627e-1	1.068e-1	8
24	NC_003888	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2), complete genome	センズ	602.0	687.0	8.926e-1	6.749e-2	4
25	CP000446	<i>Shewanella</i> sp. MR-4, complete genome	センズ	631.6	686.5	6.814e-1	1.098e-1	14
26	M85198	<i>Vibrio cholerae</i> NAG-ST (stn) gene, complete cds	アンチセンズ	535.5	686.0	9.692e-1	-2.731e-2	2
27	M35514	<i>S. pyogenes</i> streptococcal pyrogenic exotoxin type C (speC) gene, complete cds	センズ	684.0	684.0			1
28	NC_001545	<i>S. pyogenes</i> streptococcal pyrogenic exotoxin type C (speC) gene, complete cds	アンチセンズ	495.0	684.0			1
29	NC_001545	<i>Rubella virus</i> , complete genome	アンチセンズ	604.7	670.0	9.017e-1	7.129e-2	3
30	BX248346	<i>Mycobacterium bovis</i> subsp. <i>bovis</i> AF2122/97 complete genome; segn	センズ	595.6	669.0	9.07e-1	5.84e-2	4

* 候補順位は、各標的スポットのシグナル中央値を降順に上位30位まで示した。

† p は有意水準 (α) = 0.001 で算出し、帰無仮説が棄却できた場合灰色の背景で示した。

‡ Z が棄却限界値 (3.09) より大の場合は帰無仮説を棄却し、背景を灰色で示した。

表6. *Yersinia enterocolitica* Pa 177 (O9:B2) のMMDDPA解析結果

候補順位 [†]	アクセッションNo.	候補名	シグナル平均値	シグナル中央値	p	Z [‡]	スポット数
1	AM286415	<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> 8081 complete genome	アンチセンス 478.4	シグナル平均値 352.3	1.003e-2	5.62e-1	21
2	AB118841	<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> 8081 complete genome	センス 386.8	シグナル平均値 339.8	1.073e-1	3.515e-1	21
3	AE004969	Hepatitis delta virus DNA, complete genome, strain:Miyako(JA-M31)	アンチセンス 315.8	シグナル平均値 324.0	6.745e-1	1.878e-1	5
4	AF419157	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> FA 1090, complete genome	アンチセンス 284.3	シグナル平均値 321.0	8.178e-1	1.152e-1	4
5	AL939112	<i>Aeromonas hydrophila</i> isolate SSU enterotoxin (ast) gene, complete α	アンチセンス 291.1	シグナル平均値 289.0	7.484e-1	1.309e-1	6
6	M35514	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) complete genome; segment: 9/29	センス 266.3	シグナル平均値 288.5	8.98e-1	7.403e-2	3
7	AL627282	<i>S. pyogenes</i> streptococcal pyrogenic exotoxin type C (speC) gene, com	センス 286.0	シグナル平均値 286.0			1
8	CU234118	<i>S. pyogenes</i> streptococcal pyrogenic exotoxin type C (speC) gene, com	アンチセンス 239.5	シグナル平均値 286.0			1
9	AE016958	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi (Salmonella typhi) strain CT18, corr	アンチセンス 264.8	シグナル平均値 285.0	9.027e-1	7.058e-2	3
10	M29171	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi (Salmonella typhi) strain CT18, corr	センス 258.0	シグナル平均値 282.5	9.243e-1	5.487e-2	3
11	AY896761	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278, complete sequence	センス 360.8	シグナル平均値 281.5	4.755e-1	2.913e-1	6
12	BX640415	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> str. k10, complete geno	アンチセンス 252.3	シグナル平均値 280.0	9.336e-1	4.165e-2	4
13	CP000378	<i>L. monocytogenes</i> SH-activated hemolysin pseudogene, 3' end	センス 257.0	シグナル平均値 280.0	9.275e-1	5.256e-2	3
14	CP000378	Human enterovirus B strain EV6-14103-00 from Russia polyprotein ge	センス 264.0	シグナル平均値 277.0	8.908e-1	6.866e-2	4
15	X61560	<i>Bordetella pertussis</i> strain Tohama I, complete genome; segment 5/12	センス 251.8	シグナル平均値 273.0	9.354e-1	4.05e-2	4
16	M95206	<i>Burkholderia cenocepacia</i> AU 1054 chromosome 1, complete sequence	センス 237.0	シグナル平均値 273.0	9.926e-1	6.583e-3	2
17	CP000554	<i>S. pyogenes</i> strain MGAS156 speA gene (allele 1) for type A exotoxin	センス 246.8	シグナル平均値 272.5	9.673e-1	2.9e-2	2
18	EF173420	<i>Clostridium perfringens</i> epsilon-toxin (etxD) gene, complete cds	センス 234.5	シグナル平均値 272.0	9.991e-1	8.378e-4	2
19	NC_001676	<i>Prochlorococcus marinus</i> str. MIT 9303, complete genome	アンチセンス 244.8	シグナル平均値 271.5	9.611e-1	2.44e-2	4
20	AE014073	Human rhinovirus 17, complete genome	センス 253.3	シグナル平均値 269.8	9.215e-1	4.406e-2	5
21	AB107799	Human papillomavirus - 54, complete genome	アンチセンス 259.0	シグナル平均値 269.0	8.568e-1	5.706e-2	10
22	NC_001408	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 2457T, complete genome	アンチセンス 260.0	シグナル平均値 269.0	8.366e-1	5.956e-2	12
23	M62877	Ibaraki virus gene for core protein VP3, partial cds, strain:KA84	アンチセンス 252.9	シグナル平均値 269.0	9.313e-1	4.308e-2	4
24	CP000539	Avian leukosis virus - RSA, complete genome	センス 249.4	シグナル平均値 269.0	9.211e-1	3.504e-2	8
25	NC_006560	Human enterovirus B strain EV6-10887-99 from Russia polyprotein ge	アンチセンス 249.9	シグナル平均値 269.0	9.354e-1	3.625e-2	5
26	NC_001545	Human papilloma virus type 51 genomic DNA, partial sequence	センス 319.1	シグナル平均値 268.5	6.054e-1	1.953e-1	7
27	NC_006560	<i>Acidovorax</i> sp. JS42, complete genome	アンチセンス 274.5	シグナル平均値 267.8	7.58e-1	9.293e-2	11
28	AM406671	<i>Rubella</i> virus, complete genome	アンチセンス 247.8	シグナル平均値 267.8	9.565e-1	3.149e-2	3
29	AM406671	<i>Cercopithecine herpesvirus</i> 2, complete genome	センス 249.8	シグナル平均値 267.0	9.296e-1	3.609e-2	6
30	AM406671	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363, complete genome	センス 285.0	シグナル平均値 266.5	7.937e-1	1.169e-1	5

[†] 候補順位は、各標的スポットのシグナル中央値を降順に上位30位まで示した。
^{*} pは有意水準 (α) = 0.001で算出し、帰無仮説が棄却できた場合灰色の背景で示した。
[‡] Zが棄却限界値 (3.09) より大の場合は帰無仮説を棄却し、背景を灰色で示した。

表7. *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* SCHU のMMDPA解析結果

候補順位 [†]	アクセシオンNo.	候補名	シグナル平均値	シグナル中央値	p	Z	スポット数
1	CP000608	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> WY96-3418, complete genome	アンチセンス	5811.0	4761.8	4.774e-14	3.428e+0
2	CP000803	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> FTA, complete genome	センス	4596.9	4399.8	1.199e-13	2.512e+0
3	AM233362	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> LVS complete genome	センス	4640.3	4117.0	9.881e-14	2.546e+0
4	AM286280	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> strain FSC 198 complete genome	アンチセンス	4417.4	4103.5	1.279e-13	2.394e+0
5	CP000608	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> WY96-3418, complete genome	センス	6213.1	4089.3	5.329e-14	3.629e+0
6	NC_007880	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> , complete genome	センス	4683.7	4061.0	1.092e-13	2.572e+0
7	CP000437	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> OSU18, complete genome	アンチセンス	4443.7	3953.3	1.241e-13	2.407e+0
8	AJ749949	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> OSU18, complete genome	センス	4176.1	3937.0	1.423e-13	2.226e+0
9	AJ749949	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> SCHU S4 complete genome	アンチセンス	4313.7	3927.8	1.281e-13	2.317e+0
10	AM233362	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> LVS complete genome	アンチセンス	4814.9	3731.0	9.726e-14	2.663e+0
11	NC_007880	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> , complete genome	アンチセンス	4262.5	3719.0	1.352e-13	2.288e+0
12	CP000803	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> FTA, complete genome	アンチセンス	4304.4	3439.3	1.452e-13	2.314e+0
13	AJ749949	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> SCHU S4 complete genome	センス	3730.0	3202.3	1.927e-13	1.921e+0
14	AM286280	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> strain FSC 198 complete genome	センス	4108.6	2921.0	1.69e-13	2.179e+0
15	AL939114	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) complete genome; segment 11/29	センス	2114.5	2865.3	1.568e-1	8.175e-1
16	AB000860	Akabane virus RNA for nucleoprotein, complete cds	アンチセンス	1758.2	2308.3	3.186e-1	5.758e-1
17	NC_006560	Cercopithecine herpesvirus 2, complete genome	アンチセンス	2312.4	1630.0	1.974e-2	9.518e-1
18	AE004969	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> FA 1090, complete genome	アンチセンス	1162.0	1363.0	7.315e-1	1.716e-1
19	CY005359	Influenza A virus (A/laughing gull/DE/94/2000(H12N4)) segment 6, c1	センス	1313.3	1294.8	5.398e-1	2.742e-1
20	AE014075	<i>Escherichia coli</i> CFT073, complete genome	アンチセンス	1348.4	1271.0	3.713e-1	2.98e-1
21	EF174468	Human coxsackievirus B2 isolate KOR 04-243, complete genome	アンチセンス	1164.9	1243.0	6.461e-1	1.736e-1
22	NC_006269	Sapovirus Hu/Dresden/pJG-Sap01/DE, complete genome	センス	1099.0	1241.0	7.732e-1	1.289e-1
23	CP000577	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17029 chromosome 1, complete sequ	アンチセンス	1010.5	1230.3	9.051e-1	6.887e-2
24	AY395706	Human papillomavirus type 62 isolate Qv18091, complete genome	センス	1227.4	1204.5	5.678e-1	2.159e-1
25	AL939112	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) complete genome; segment 9/29	センス	980.2	1201.8	9.333e-1	4.831e-2
26	U31778	Human papillomavirus type 20, complete genome	センス	1383.4	1183.5	3.344e-1	3.218e-1
27	EF362755	Human papillomavirus type 2 isolate C1, complete genome	アンチセンス	1074.0	1166.0	7.84e-1	1.119e-1
28	AB118841	Hepatitis delta virus DNA, complete genome, strain: Miyako(JA-M31)	アンチセンス	1502.3	1163.8	3.683e-1	4.024e-1
29	AM039952	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> complete genome	センス	1002.1	1162.3	8.671e-1	6.325e-2
30	NC_003888	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2), complete genome	アンチセンス	1030.3	1162.0	8.693e-1	8.227e-2

[†] 候補順位は、各標的スポットのシグナル中央値を降順に上位30位まで示した。

* p は有意水準 (α) = 0.001で算出し、帰無仮説が棄却できた場合灰色の背景で示した。

† Z が棄却限界値 (3.09) より大の場合は帰無仮説を棄却し、背景を灰色で示した。

食肉における家畜・家禽のウイルス疾病に関する研究

家禽のウイルス疾病に関する研究

分担研究者 伊藤壽啓 鳥取大学農学部教授

研究要旨：本研究では、高病原性鳥インフルエンザに対して応用可能な現存の検査キットや方法の有用性を検証すること、ならびに新たな簡易迅速高感度検査法の開発を試みる。これらの研究結果に基づき、食鳥処理場等における鳥インフルエンザの検査体制の構築を最終目標とする。

A. 研究目的

2004年1月、我が国において79年ぶりに高病原性鳥インフルエンザが西日本の3府県4箇所が発生し、総計27万5千羽の鶏が死亡あるいは殺処分された他、移動制限区域内の鶏卵生産農場あるいは肉用鶏生産農場など合計178戸（約420万羽）が生産物の移動を制限され、莫大な経済的損害を被った。さらにこの頃、ベトナムやタイで本ウイルスが人にも感染し、死亡例が次々と報告されていたことから、一般消費者による鶏肉・鶏卵離れが深刻化し、所謂風評被害が拡大して直接的被害よりもはるかに大きな間接的被害が生じた。3月までの約4ヵ月間で、その生産者らが被った被害総額は約138億円と試算されている。さらに2004年の国内発生のうち、京都の事例では感染鶏が食鳥処理場に搬入され、それを通常の検査では認知できなかったという事実も判明した。本病のように明確な臨床症状を呈しない疾病については、通常検査の上に精密なウイルス学的検査が必要となる。しかし一般にウイルス学的検査は煩雑で時間を要することから、それに代わる迅

速高感度かつ簡便な診断法の開発が切望されている。

そこで本研究では鶏肉鶏卵等の安全確保ならびにそのための施策立案に有用な基礎的資料を提供することを目的として、鳥インフルエンザに対する迅速高感度診断法の確立を目指す。

B. 研究方法

1. 供試ウイルス

野生水禽由来 A 型インフルエンザウイルス分離株 A/teal/Tottori/150/02 (H5N3) (以下150株) および150株を鶏雛の気嚢で12代継代して得られた強毒変異株を用いた。これらのウイルスは、ペニシリン1,000 U/ml およびストレプトマイシン1.0 mg/ml を添加したリン酸緩衝食塩水 (phosphate buffered saline; 以下PBS) で1,000倍に希釈し、10日齢発育鶏卵8個の漿尿膜腔内に0.1 ml ごと接種し、37°Cで48時間培養した。その後、4°Cで一晩冷却し、ウイルス感染漿尿膜液を採取し、そのHA価を測定した。状態が良くかつHA価の高い漿尿液

を以後の実験に用いるために、分注して -80°C に保存した。

2. 赤血球凝集 (HA) 試験

赤血球凝集 (HA) 試験は 96 穴 U 字型マイクロタイタープレートを用いて、Sever の方法に準じて行った。すなわち、マイクロタイタープレートの各穴に $25\mu\text{l}$ の PBS を分注し、 $25\mu\text{l}$ の被験ウイルス液を 2 倍希釈した。各穴に $25\mu\text{l}$ の PBS と、 $50\mu\text{l}$ の 0.75% のニワトリ赤血球浮遊液を加えて十分に震盪混和した。室温で 30 分静置後、完全凝集が認められた被験液の最大希釈倍数の逆数をそのウイルスの HA 価とした。

3. 鶏肉乳剤の作成

市販の鶏胸肉 5 g を鋏で細かく切り刻んだ後、海砂を加えて乳鉢と乳棒ですり潰した。これにペニシリン 10,000 U/ml およびストレプトマイシン 10 mg/ml を添加した PBS 5 ml を徐々に加えながら、さらに鶏肉をすり潰した後、2,000 rpm で 10 分間遠心分離した。その上清を回収し、使用時まで -80°C に保存した。なお、市販鶏肉中にインフルエンザウイルスが存在しないことは、鶏肉乳剤を 10 日齢発育鶏卵に接種し、ウイルスが増殖してこないことにより確認した。

4. インフルエンザ迅速診断キット

インフルエンザ迅速診断キットは富士レビオ株式会社のインフルエンザ A および B ウイルス検出用の「エスプラインインフルエンザ A&B-N 試験」を添付文書に従い使用した。ウイルス液を十分に染み込ませた付属の綿棒をスクイズチューブ内の検体処理液に浸し、綿球部

を指で挟みながら 10 回程度綿棒を回転させた。その後、スクイズチューブを強めに押さえて綿球部から液を搾り出し、約 $30\mu\text{l}$ (2 滴) を反応カセットの検体滴下部中央に滴下した。室温で 15 分間静置した後、テストプレートの判定部を観察し、判定部 [A] および [r] の両方にわずかでもラインが認められた場合を陽性と判定した。判定部 [A] にラインが認められず、[r] にのみラインが認められた場合は陰性と判定した (図 1)。

5. ウイルス RNA の抽出

ウイルス RNA の抽出は QIAamp Viral RNA Mini Kit (キアゲン社製) を用いた。

ウイルス液 $140\mu\text{l}$ に Buffer AVL/carrier RNA $560\mu\text{l}$ を加え、よく混和し、室温で 10 分間インキュベートした。次に 100% エタノールを $560\mu\text{l}$ 添加してよく混和した後、その混合液を QIAamp スピнкаラムに $630\mu\text{l}$ 注入し、8,000 rpm、1 分間遠心して、RNA を吸着させた。濾過液を除去後、同様の操作を混合液がなくなるまで繰り返した。ついで、スピнкаラムに Buffer AW1 を $500\mu\text{l}$ 添加し、8,000 rpm、1 分間遠心、さらに Buffer AW2 を $500\mu\text{l}$ 添加して、13,000 rpm、2 分間遠心することにより洗浄した。続いてスピнкаラムを 1.5 ml チューブに Buffer AVE $60\mu\text{l}$ を添加し、室温で 1 分間インキュベートした後、8,000 rpm、1 分間遠心し、RNA を溶出させた。回収された液をウイルス RNA とし、 -80°C で保存した。

6. RT-PCR 法

RT の反応液組成は以下の通りである。反応温度、時間は、 65°C を 5 分 42°C を 45 分 70°C を 15 分を 1 サイクル行った。逆転写酵素は

Primsript reverse transcriptase (タカラバイオ社製) を用いた。

ウイルス RNA	5.0 μ l
5 \times Primsript RT buffer	5.0 μ l
2mM dNTP mix	1.0 μ l
100 μ M Uni12 primer	1.0 μ l
Primsript reverse transcriptase (200U/ μ l)	0.5 μ l
RNase Inhibitor(40U/ μ l)	0.5 μ l
H ₂ O	8.0 μ l

PCR の反応液組成は以下の通りである。PCR 用耐熱性酵素は KOD Dash DNA polymerase (東洋紡社製) を用いた。プライマーの配列は NP-1192: 5' -AGCAGATACTGGGCCATAAAG- 3'、NPR-1501: 5' -TTGTCTCCGAAGAAATAAGA-3' である。反応温度、時間、サイクル数は、95 $^{\circ}$ C 2 分を 1 サイクル行った後、95 $^{\circ}$ C 30 秒、57 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 40 秒を 35 サイクル、さらに 72 $^{\circ}$ C 5 分を 1 サイクル行った。

RT 産物	1.0 μ l
10 \times KOD Dash buffer	1.0 μ l
10mM dNTP mix	1.0 μ l
5 μ M NP1192	1.0 μ l
5 μ M NPR1501	1.0 μ l
KOD Dash DNA polymerase (2.5U/ μ l)	0.1 μ l
H ₂ O	4.9 μ l

7. RT-LAMP 法

LAMP 法は Loopamp リアルタイム濁度測定装置 RT-160C (栄研化学社製)、LoopampRNA 増幅キット (栄研化学社製)、Loopamp 反応チュー

ブ (栄研化学社製) および Loopamp プライマーセット Avian Flu H5 (栄研化学社製) を用い添付のプロトコールに準じて行った。反応液の組成は以下の通りで、反応温度、時間は 63 $^{\circ}$ C 35 分、80 $^{\circ}$ C 5 分である。結果は、基本的にはリアルタイム濁度測定装置 RT-160C の判定に従った。さらに 3%アガロースゲルで泳動して反応産物がラダー状に検出されることを確認した。

2 \times Reaction mix	12.5 μ l
Enzyme mix	1.0 μ l
Primer mix Flu H5	2.5 μ l
H ₂ O	4.0 μ l
試験サンプル (ウイルス RNA)	5.0 μ l

8. アガロースゲル電気泳動

アガロースゲルの作製および泳動用バッファーには TBE バッファー [89mM 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1, 3-プロパンジオール、89mM ホウ酸、2mM エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物 (EDTA)] を用いた。アガロースゲルはアガロース S (ニッポンジーオン社製) を TBE バッファーで 3%になるように溶解し、エチジウムブロマイドを 0.1 μ g/ml 添加した。泳動サンプルには Tracking Dye (0.25%ブROMフェノールブルー、40%ショ糖添加 TBE バッファー) を 5:1 で加え、Mupid ミニゲル泳動槽 (ADVANCE 社製) を用いて、100V で 20 分間泳動後、ルミノイメージアナライザ (LAS-1000UVmini ver. 1.2) (FUJIFILM 社製) で観察した。

9. 感染実験

150 株の強毒変異株感染漿尿液を、PBS で 10

倍希釈し 0.2 ml を 4 週齢の鶏に静脈内接種した。経過を観察し死亡を確認した後、解剖し、もも肉、胸肉、ささみ、のど肉、手羽、心臓、筋胃、肝臓の各部位の 10%乳剤を作成し、ウイルス感染価（50%発育鶏卵感染量）の測定および RNA 抽出に供した。

10. 50%発育鶏卵感染量 (EID₅₀) の測定

ウイルス感染鶏の臓器乳剤をペニシリン G カリウム（明治製菓社製）1,000U/ml 及び硫酸ストレプトマイシン（明治製菓社製）1mg/ml を含む滅菌 PBS で 10 倍階段希釈し、各希釈段階の希釈液 0.1ml をそれぞれ 3 個の 10 日齢発育鶏卵の漿尿膜腔に接種した。37°C で 36 時間培養後、漿尿液を採取し、赤血球凝集試験を行い、Reed と Muench の方法により 0.1 ml あたりの 50%発育鶏卵感染価 (EID₅₀/ml) を求めた。

C. 研究結果

1. インフルエンザウイルス迅速診断キットによる鶏肉中の鳥インフルエンザウイルスの検出

迅速診断キットによる鶏肉中の鳥インフルエンザウイルスの検出限界を確認する試験を行った。市販の鶏胸肉から作成した 10%乳剤に、既知の感染価の鳥インフルエンザウイルス 150 株を混合し、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 および開発段階にある H5 亜型鳥インフルエンザウイルスに特異的な迅速診断キットの 2 種について検出感度を比較した。

結果を表 1 に示した。ヒト用インフルエンザ迅速診断キットでの鶏肉中（鶏肉乳剤）のウイ

ルス検出限界は 10⁵ EID₅₀/0.1 ml で、PBS でウイルスを希釈した場合と同じであった。

2. RT-PCR 法および RT-LAMP 法による鶏肉中の鳥インフルエンザウイルス遺伝子の検出

遺伝子診断法である RT-PCR 法と RT-LAMP 法（Loopamp RNA 増幅キットおよび Loopamp プライマーセット Avian Flu H5）による鶏肉中の鳥インフルエンザウイルス遺伝子の検出感度の比較を行った。いずれの方法においても 10³ EID₅₀/0.1 ml のウイルス量が検出可能で、迅速診断キットより 100~1,000 倍高い感度であった。またウイルスを PBS のみで希釈した場合と、乳剤を混合させた場合で有意な差は認められなかった（表 2 および図 2）。しかし、同じ希釈段階で比較した際、いずれの希釈段階でも鶏肉乳剤で希釈されたウイルスの方が陽性と判定されるまでの時間がわずかではあるが延長した。（表 3 および図 3）

3. RT-LAMP 法による高病原性鳥インフルエンザウイルス感染鶏からのウイルス遺伝子の検出

高病原性鳥インフルエンザウイルス感染鶏に由来する鶏肉から、実際に RT-LAMP 法によりウイルス遺伝子が検出可能か否かを確認する目的で、4 週齢の鶏に高病原性鳥インフルエンザウイルスを感染させた。感染鶏はウイルス接種後およそ 72 時間後に死亡した。感染鶏から一般的に食用となる部位、臓器から RNA を抽出し、RT-LAMP 法によるウイルス遺伝子の検出を試みたところ、（表 4）および（図 4）に示す通り、全ての部位、臓器について検出が可能であった。また、各部位、臓器中のウイルス感染価は 10^{8.5}~10^{6.0} EID₅₀/g であった。測定装置がウ

ウイルス RNA を検出するまでに要した時間は、1,273～1,745 秒で、ウイルス感染価との明確な相関はなかった。

D. 考察

本研究では、近年新たに開発された RT-LAMP 法が食鳥処理場のスクリーニング検査や食鳥肉中の鳥インフルエンザウイルス検出に応用可能かを検討し、さらにその検出感度について、従来用いられてきた簡易迅速診断キットおよび RT-PCR 法との比較を行った。

鳥インフルエンザの確定診断法であるウイルス分離法は、生のウイルスそのものを分離することから最も確実な方法であり、検出感度も高い（検出限界値1～10 EID₅₀/0.1 ml）。しかし、発育鶏卵を常に準備しておく必要性や診断が確定するまでに長時間を要する点などから、より迅速な検査法の開発が望まれていた。

一方、迅速診断キットは抗原抗体反応によりウイルス抗原を検出するものであり、15分程度で判定が可能である。その簡便性から、食鳥処理場におけるスクリーニング検査にも使用されているが、本来はヒトインフルエンザの検出を目的として開発されたもので、鳥インフルエンザウイルスの検出において感度が低いことが懸念される。このことは、本研究においてもあらためて確認された（表1）。

迅速診断キットを用いて診断する場合、検出感度の低さに加えて非特異反応の出現や反応阻害物の存在が問題となることがある。国内における鳥インフルエンザ流行時にも、非特異反応による擬陽性が問題となった。平成17年度は迅速診断キットによる野外サンプルからのウイルス検出を想定し、野鳥の糞便中に反応を阻害する物質や擬陽性を呈する物質の存在を

調べ、水鳥の糞便中に擬陽性を呈する物質が含まれている場合があることを報告した。本年度は、鶏肉中にそのような物質が存在するかを調べたが、非特異反応による擬陽性は認められなかった。いずれにしても、迅速診断キットによるウイルス検出法はウイルス分離法と比較して1/10,000程度と著しく検出感度が低く、抗体の選択等により検出感度を向上させる必要があると考えられた。

近年様々な感染症の診断法として遺伝子診断が実用化されているが、そのなかで最も広く使われている方法がPCR法である。鳥インフルエンザの診断においても、適切なプライマーの設計が可能であれば、4時間程度で判定が可能であり、予備的診断としての価値は高いと考えられている。しかし、PCR法は反応に複雑な温度管理が必要であり、そのための特殊な機器が必要である。一方、近年我が国で開発された LAMP法はすべての反応を同温かつ1ステップで行うことができる。また、LAMP反応に逆転写反応を付加することでRNAの検出も可能で、1時間程度でRNAウイルスによる感染症の診断が可能である。既に医療現場において重症急性呼吸器症候群（SARS）の診断にRT-LAMP法は応用されている。平成17年度に報告した通り、野外サンプルからのH5鳥インフルエンザウイルスの検出に、市販のH5ウイルス検出用プライマー（LoopampプライマーセットAvian Flu H5）を用いたRT-LAMP法がRT-PCR法と同様の高い検出感度であり、特異性の点からも非常に有用であることが明らかとなった。そこで本年度は食鳥肉中のH5鳥インフルエンザウイルス検出を想定し、鶏肉乳剤とウイルスの混合材料を用い、ウイルス遺伝子の検出を試みた。その結果、鶏肉乳剤中のH5鳥インフルエンザウイルス遺伝

子の検出感度は、RT-LAMP法はRT-PCR法と同じ 10^3 EID₅₀/0.1 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（表2および図2）。

RT-LAMP法によるH5ウイルスの検出はImaiらおよびJayawardeneらにより報告されており、それぞれの検出限界値は0.01プラーク形成単位 (pfu) /反応および0.002pfu/反応であった。本研究で得られた検出限界値 10^3 EID₅₀/0.1 mlを1反応あたりに換算するとおよそ100 EID₅₀/反応となる。ウイルス感染価を表すpfu値とEID₅₀値は測定方法が全く異なるため単純に比較することはできないが、pfu値の方がEID₅₀値より100倍程度低くなることを経験している。このことを考慮すると、本研究で求められたRT-LAMP法による検出限界値はおおよそ1 pfu/反応となり、以前の報告と比較して100～500倍低かった。この理由としては、使用したウイルス株とそれに対するプライマーの配列、RNA抽出方法等の差異であると考えられる。Imaiらは1960～1970年代に分離された株に対するRT-LAMP法の検出感度がRT-PCRの1/100～1/1000であったことを報告している。本研究で用いた市販のH5プライマーセットの配列情報は特許の関係で不明であるが、野生水禽由来の150株との相同性が低いのかも知れない。したがって、その時の流行に合わせた適切なプライマーの設計が非常に重要であると考えられた。RNA抽出方法については、本研究では10倍階段希釈したウイルス液からそれぞれRNAを抽出し、RT-LAMP法に供したのに対し、ImaiらおよびJayawardeneらは高感染価のウイルス液から抽出したRNAを10倍階段希釈し、RT-LAMPに供して

いることが異なった。実験的なデータはないが、本研究で行った方法ではウイルス濃度が薄くなるにつれて、RNAの抽出効率が悪くなっているのかも知れない。もし、そうであるなら、RNA抽出を含めたRT-LAMP法によるH5鳥インフルエンザウイルスの検出限界値は我々の実験結果に近い値となることも考えられた。また、LAMP法においては、反応開始時の遺伝子量と反応時間には相関関係があることが知られている。本研究では同じ希釈段階で比較した際、いずれの希釈段階でも鶏肉乳剤で希釈されたウイルスの方が陽性と判定されるまでの時間がわずかではあるが延長した（表3および図3）。これは筋組織に含まれるRNA分解酵素 (RNase) やその他の夾雑物によりRNA収量が減少したためと考えられる。これらのことから、検出限界値を過大評価しないためにも、より現場に近い実験条件を設定し評価することが重要である。

本実験においては、実際に高病原性鳥インフルエンザウイルスによる鶏の感染実験を行い、食用となる部位（胸肉、もも肉、ささみ、のど肉、手羽、筋胃、心臓、肝臓）からのウイルス遺伝子の検出をRT-LAMP法で検討した。その結果、全ての部位でウイルス遺伝子を検出することができた。それぞれの部位におけるウイルス感染価は $10^{6.0} \sim 10^{8.5}$ EID₅₀/g（ウイルスRNA抽出に使用した臓器乳剤では $10^{4.0} \sim 10^{6.5}$ EID₅₀/0.1 ml）で、先に求めた検出限界値以上であった。したがって、ウイルス株や鶏の個体差等による差はあるであろうが、鶏を死に至らしめる程ウイルスが増殖した個体であれば、いずれの臓器からもRT-LAMP法によりウイルス遺伝子を検出することは可能であると考えられた。しかし、鳥インフルエンザの早期発見という観点から考えると、感染初期でまだウイルス感染価がそ

れほど高くない時期にRT-LAMP法がどの程度有用であるかを今後検討する必要がある。各部位のウイルス感染価とRT-LAMP法によるウイルス遺伝子検出が陽性と判定されるまでの時間のあいだに明確な相関関係は見られなかった。これは、各部位を構成する細胞の種類やRNaseの含有量、脂肪、筋組織量の差による可能性が考えられる。特に筋胃では組織中のウイルス感染価が高いにも関わらず、反応時間が極端に延長した(表4および図4)。鶏等、穀物食の鳥の筋胃は非常に発達した平滑筋と結合組織からなる。収縮性の蛋白質、結合組織、コラーゲン等を多量に含む組織は破碎が困難でRNAの収量が低い。このような組織からウイルス検出を行う際は筋組織に特化したRNA抽出法を考慮する必要がある。また、このような部位ではウイルスが存在するにも関わらず、検出されない可能性があるため、鳥検査場でのスクリーニングや、食肉からのウイルス検出を行う際の供試部位について検討を行う必要があると考えられる。

E. 結論

食鳥肉からの鳥インフルエンザウイルス(AIV)検出を目的として、市販鶏肉の乳剤に低病原性AIVを混合したものを被検材料として、簡易迅速診断キット、RT-LAMP法、RT-PCR法の検出感度を比較した。その結果、簡易キットのそれは 2×10^6 EID₅₀/gと非常に低く、PCR法とLAMP法ではいずれも 2×10^4 EID₅₀/gであった。また高病原性AIV実験感染鶏の各食用部位からLAMP法を用いてウイルス検出を試みた結果、いずれの部位も検出可能であったが、それらの感染価と反応時間に明確な相関関係は認められなかった。

以上の成績から、LAMP法は食鳥肉からのAIV検出に有用ではあるが、RNA抽出法あるいは供

試部位の選定にはさらなる検討を要すると考えられた。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamana H, Ito H, Ito T, Murase T, Motoike K, Wakabayashi K, Otsuki K. (2007) Strong antiviral activity of heated and hydrated dolomite--preliminary investigation. J. Vet. Med. Sci., 69(2):217-219.

Guo CT, Takahashi N, Yagi H, Kato K, Takahashi T, Yi SQ, Chen Y, Ito T, Otsuki K, Kida H, Kawaoka Y, Hidari KI, Miyamoto D, Suzuki T, Suzuki Y. (2007) The quail and chicken intestine have sialyl-galactose sugar chains responsible for the binding of influenza A viruses to human type receptors. Glycobiology, 17(7):713-724.

Shinya K, Watanabe S, Ito T, Kasai N, Kawaoka Y. (2007) Adaptation of an H7N7 equine influenza A virus in mice. J. Gen. Virol., 88(2):547-553.

伊藤壽啓(2007):鳥インフルエンザとパンデミック。炎症と免疫。15(3):80-85.

伊藤壽啓(2007):高病原性鳥インフルエンザ。生物の科学遺伝。別冊No.20「進化でどこまでわかるか?」172-175.

伊藤壽啓(2007):野鳥と鳥インフルエンザとの関わり。鶏病研究会報。43(増刊号):9-14.

伊藤壽啓(2007):連載《インフルエンザ講座》宮崎県及び岡山県の養鶏場で発生した高病原性鳥インフルエンザの感染ルート究明。インフルエンザ。9(1):9-10.

伊藤壽啓(2007):10年前の鳥インフルエンザ・イン・ホンコン。インフルエンザ。9(1):64-67.

2. 学会発表

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 年度系統プロイラー事業九州三県研修会講演。佐賀市。2007

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

該当なし

表 1. インフルエンザ迅速診断キットによる検出限界

診断キット	希釈液	検出限界ウイルス感染価
		(log EID ₅₀ /0.1 ml)
ヒト用迅速診断キット	PBS	5
	乳剤	5

表 2. RT-LAMP 法と RT-PCR 法による検出感度

希釈液	検出限界ウイルス感染価 (log EID ₅₀ /0.1 ml)	
	RT-LAMP 法	RT-PCR 法
PBS	3	3
鶏肉乳剤	3	3

表 3. RT-LAMP 法による検出限界の測定

	希釈液	ウイルス感染価 (log EID ₅₀ /0.1ml)			
		5	4	3	2
		測定装置が陽性と判定 するのに要した時間 (秒)	PBS	1141	1263
	乳剤	1177	1372	1711	-

*- : 検出されず

表 4. 各部位のウイルス力価と RT-LAMP 法による判定

部位	ウイルス感染価 (log EID ₅₀ /g)	判定	測定装置が陽性と判定 するのに要した時間 (秒)
心臓	8.5	+	1273
肝臓	7.3	+	1419
もも肉	6.5	+	1385
笹身	6.5	+	1489
のど肉	6.5	+	1281
手羽	6.5	+	1441
砂囊	6.5	+	1745
胸肉	6.0	+	1452