

図2

T社製ホモジェナイザー



Y社製ホモジェナイザー

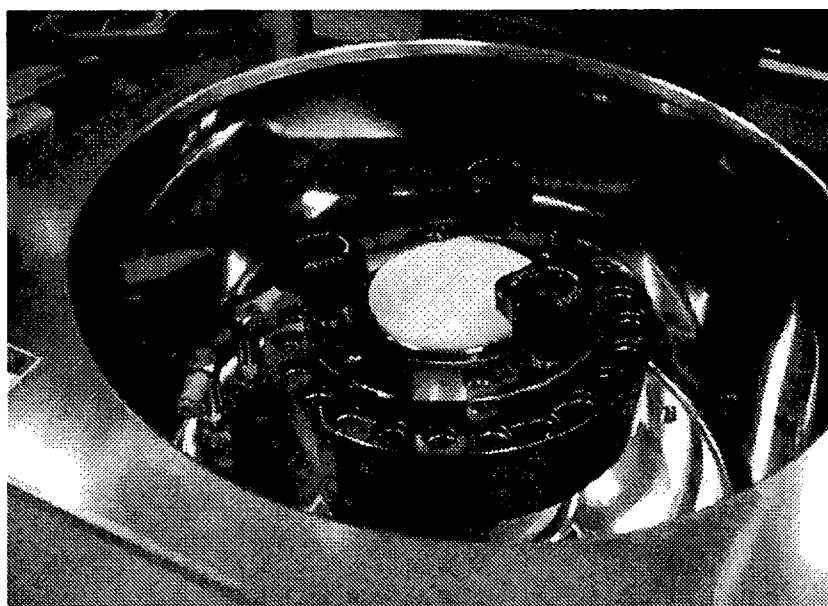
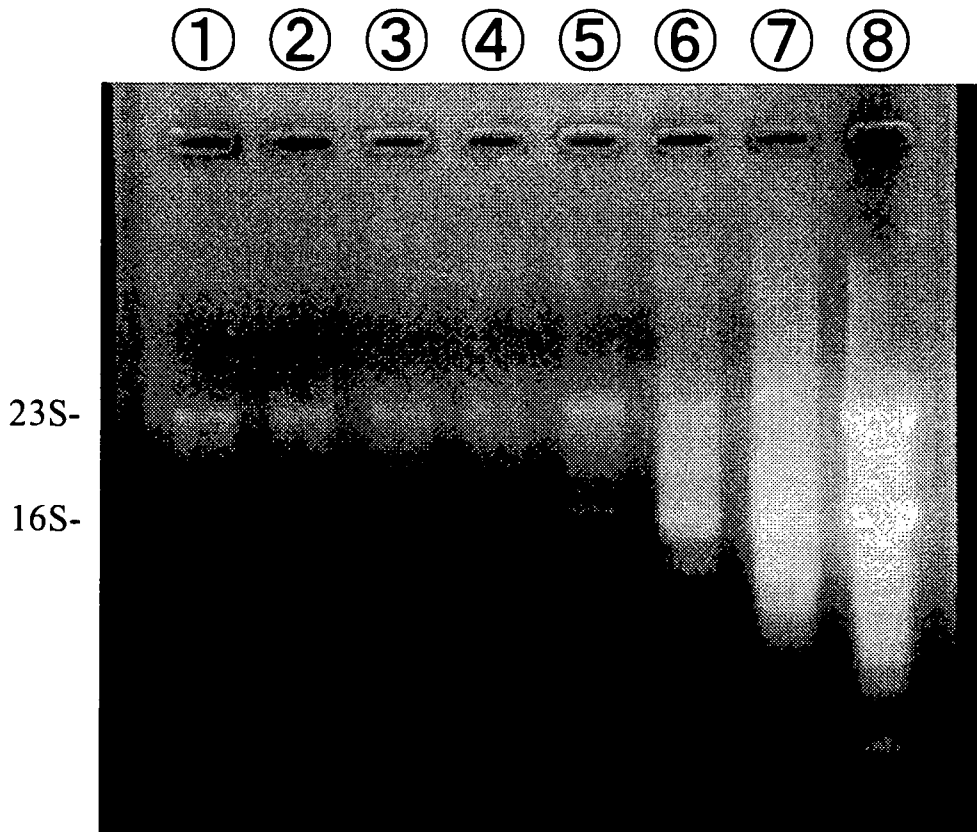


図3



- ① Φ 5ジルコニア+ Φ 2ジルコニア0.4 (10%乳剤)
- ② Φ 5ジルコニア+ Φ 2ジルコニア0.2 (10%乳剤)
- ③ Φ 5ジルコニア+ Φ 2ジルコニア0.1 (10%乳剤)
- ④ Φ 5ジルコニア+ Φ 1ガラス0.4 (10%乳剤)
- ⑤ Φ 5ジルコニア+ Φ 1ガラス0.2 (10%乳剤)
- ⑥ Φ 5ジルコニア+ Φ 2ジルコニア0.2 (50%乳剤)
- ⑦ Φ 5ジルコニア+ Φ 2ジルコニア0.2 (25%乳剤)
- ⑧ 他キット(isogen)によって抽出した肝臓総RNA

表 1

ビーズ		乳剤化までの攪拌回数			
		TOMY		YASUI	
		心臓	肝臓	心臓	肝臓
1	Φ0.1ガラス約0.4g	>8	2	>8	3
2	Φ0.5ガラス約0.4g	>8	1	>8	5
3	Φ1ガラス約0.4g	>8	2	>8	1
4	Φ0.5ジルコニア約0.4g	>8	2	>8	1
5	Φ2ジルコニア約0.4g	>8	3	>8	1
6	Φ5ジルコニア1個約0.4g	5	1	6	3
7	Φ4.8ステンレス1個約0.4g	2	2	4	1

表 2

ビーズの組み合わせ			乳剤化までの攪拌回数			
			TOMY		YASUI	
			心臓	肝臓	心臓	肝臓
1	-	+Φ2ジルコニア	7	4	>8	1
2	Φ5ジルコニア		6	1	6	1
3	Φ5ジルコニア	+Φ2ジルコニア	3	1	8	2
4	Φ4.8ステンレス		2	1	6	1
5	Φ4.8ステンレス	+Φ2ジルコニア	2	1	(>3)	2
6	Φ12メタルコーン		1	1	1	1
7	Φ12メタルコーン	+Φ2ジルコニア	1	1	1	1
8	Φ15メタルコーン		1	1	1	1
9	Φ15メタルコーン	+Φ2ジルコニア	1	1	1	1

表 3

動物番号	臓器が破碎されるまでの攪拌回数			
	メタルコーン		ジルコニア	
	(Φ15)		(Φ5-1個 + Φ2-0.4g)	
	No. 10	No. 11	No. 10	No. 11
脳	1	1	1	1
扁桃	1*	1*	2*	2*
心臓	1	1	3	3
肺	1*	1*	4*	4*
肝臓	1	1	1	1
腎臓	1*	1*	6	6
脾臓	3*	3*	2	2
膵臓	2	2	>8	>8
胃	2*	2*	6	6
十二指腸	2*	2*	4	4
空腸	2*	2*	4	4
回腸	2*	2*	4	4
大腸	1*	1*	2*	2*
腸間リンパ	2*	2*	2	2
筋肉	1	1	1	1

*:臓器線維が観察されたもの

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

病原体ゲノム検出のための核酸増幅法の基礎検討

分担研究者 棚林 清 国立感染症研究所獣医科学部 室長
協力研究者 宇田晶彦 国立感染症研究所獣医科学部 研究員

研究要旨：家畜・家禽のウイルス疾病の診断検査において多種類の病原体を一括して検出するためのマイクロアレイ法への応用を考え、検体中に存在する病原体核酸を偏り無く増幅する核酸増幅法の基礎的検討を細菌 DNA をモデルに実施した。DOP-PCR と Phi29 DNA ポリメラーゼにより 10 ng の *E. Coli* および *F. tularensis* ゲノム DNA から 1~3 μ g 程度の増幅 DNA 断片が得られる事が確認され、これらの核酸増幅法によりウイルス等の微量な病原体が含まれる検体からも核酸増幅が可能で検出同定に応用できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

各種感染症の診断にあたっては臨床的診断とともに確実な実験室検査が必要である。検査の基本となるのは病原因子の分離同定であるが、特にウイルス感染においては困難な場合や時間を要する場合が多く、今日では PCR による検出同定が広く応用されている。しかしながらウイルス毎に特異的プライマーを設計してそれぞれで反応を行わなければならない。多種類の病原体が関わる家畜・家禽におけるウイルス疾患の検査において多種類の病原体ゲノム核酸を一括して検出同定する方法の開発が期待される。本研究では多種類の病原体を一括して検出するためのマイクロアレイ法への応用を考え、検体中に存在する病原体核酸を偏り無く増幅する方法の基礎的検討として DOP-PCR（degenerate oligonucleotide-primed PCR）法と Phi29 DNA ポリメラーゼ増幅法

の検討を細菌 DNA をモデルに実施した。

B. 研究方法

1. DOP-PCR

DOP-PCR のプライマーは、Telenius らによって設計された 6MW プライマー（5' -CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3'）を使用した。ポリメラーゼは、ExTaq (Takara)、Pfu polymerase (Prmega)、Taq (Invitrogen)、LA Taq (Takara)、DOP-PCR Master (Roche)を使用した。DOP-PCR の鋳型 DNA として、10 ng の *E. Coli* DH5 α 株および *F. tularensis* Schu4 株のゲノム DNA を用いた。反応液は、1 ユニットのポリメラーゼ、1x PCR buffer、2 μ M の 6MW プライマー、250 μ M の dNTP 溶液、および 10 ng のサンプルゲノム DNA またはネガティブコントロールとして DW を含む総量 20 μ l で調製した。DOP-PCR のプログラムとして 3 種

類用意した (図 1)。

プログラム 1 ; 95°C 5 分+5 サイクル (95°C 1 分、30°C 1.5 分、[上昇率 0.35°C /秒] 72°C 3 分)+35 サイクル(95°C 1 分、62°C 1 分、72°C 1.5 分)+72°C 7 分。

プログラム 2 ; 95°C 5 分+5 サイクル (95°C 0.5 分、30°C 0.5 分、[上昇率 0.7°C /秒] 72°C 1.5 分)+35 サイクル (95°C 0.5 分、62°C 0.5 分、72°C 1.5 分)+72°C 7 分。

プログラム 3 ; 95°C 5 分+40 サイクル (95°C 0.5 分、55°C 0.5 分、72°C 1 分)+72°C 7 分。

増幅後のサンプルは、MicroSpin S-400 HR で精製し、濃度を Nano Drop ND-1000 で測定した。回収液量は、精製後のサンプルの重量から予め測定した風袋との差から求めた。増幅を確認するために 0.7%アガロースで電気泳動を行った。

2. Phi29 DNA ポリメラーゼ増幅

Phi29 DNA ポリメラーゼ増幅の鋳型 DNA として、10 ng の *E. Coli* DH5 α 株および *F. tularensis* Schu4 株のゲノム DNA を用いた。サンプルゲノム DNA の増幅は、GenomiPhi DNA Amplification Kit (Amersham) を用いた。サンプル 1 μ l をキットに添付されていたサンプル溶液 9 μ l へ添加し、95°C で 5 分間熱処理を行った後氷上で 5 分間静置した。変性処理を行ったサンプルに Phi29 DNA ポリメラーゼを含む溶液を 10 μ l 添加し、30°C で 18 時間増幅した後、65°C で 10 分間ポリメラーゼの変性処理を行った。増幅後のサンプルは、MicroSpin S-400 HR で精製し、濃度を Nano Drop ND-1000 で測定した。回収液量は、精製後のサンプルの重量から予め測定した風袋との差から求めた。増幅を確認するために 0.7%アガロースで電気泳動を行った。

C. 研究結果

1. DOP-PCR の条件検討

E. Coli および *F. tularensis* のゲノム DNA を鋳型として様々なポリメラーゼ使用した時の増幅効率の差異および至適 PCR プログラムの検討を行った (図 2)。その結果、ExTaq (Takara) および Taq (Invitrogen) で *E. Coli* および *F. tularensis* のゲノム DNA の種類に依存せず、0.5~10 kbp のラダーを含むスメア状の増幅 DNA が検出された。DOP-Master (Rchoe) では、僅かにスメア状の増幅 DAN が観察されたが、その他のポリメラーゼに関して全く増幅は検出されなかった。DOP-PCR のプログラムに関して、PCR プログラム 1 及び 2 では良好な増幅が検出された。プログラム 3 では僅かに増幅された DNA のラダーが検出されたが、プログラム 1 および 2 よりも特異性が高くなっているため、均一な増幅をしめすスメアは検出されなかった。このことから DOP-PCR に使用する酵素は ExTaq または Taq ポリメラーゼ、プログラムは 1 または 2 が最適である可能性が示唆された。

DOP-PCR 用のプライマー 6MW の至的濃度検討も行った。10 ng の *E. Coli* および *F. tularensis* ゲノム DNA を鋳型にして 0.13~4 μ M の 6MW プライマーを PCR 反応液に添加した (図 3)。その結果、プライマー濃度 1~4 μ M で増幅が確認されたが、0.5 μ M 以下では増幅は確認できなかった。特に 2 μ M で 0.5~10 kbp にわたる長いラダーを含むスメアが検出され、この結果からプライマー濃度は 2 μ M が最適であると考えられた。

2. Phi29 DNA ポリメラーゼによる増幅

E. Coli および *F. tularensis* のゲノム DNA を鋳型として Phi29 DNA ポリメラーゼによる増幅を確認した (図 4)。その結果、DH5 α 株および Schu4 株のゲノム DNA において均一な増幅を示す 0.5~100 kbp のスメア

状の増幅 DNA が電気泳動で確認された。また、コントロールとして用いた DW でも増幅が確認された。この現象は、ランダムヘキサマープライマーが非特異アニーリングとそれに続く伸張反応が連続的に起こる事による事が知られている。Phi29 DNA ポリメラーゼがゲノム DNA を増幅しているリアルタイム PCR を用いて検証した。

3. ゲノム DNA 由来増幅産物の確認

DOP-PCR ならびに Phi29 DNA ポリメラーゼによって、ゲノム DNA が増幅されている事を確認するためにリアルタイム PCR を用いて検証した。 *E. Coli* および *F. tularensis* のゲノム DNA を鋳型として増幅したサンプルを TE バッファーで 100 倍希釈し、 *E. Coli* および *F. tularensis* の G3PDH 遺伝子について Applied Biosystems 7500 リアルタイム PCR システムで確認を行った。その結果、両株の G3PDH 遺伝子について特異的な増幅を検出できた。この事から、DOP-PCR と Phi29 DNA ポリメラーゼは各ゲノム DNA を増幅している事が推測された。

4. 増幅効率の検討

DOP-PCR ならびに Phi29 DNA ポリメラーゼによる増幅効率を検討するために、10 ng の *E. Coli* および *F. tularensis* ゲノム DNA を鋳型とした増幅後の各反応液について濃度と液量を測定し、増幅 DNA 量を算出した (図 5)。その結果、DOP-PCR プログラム 1 では、1.1 μg (*F. tularensis*) と 1.8 μg (*E. Coli*) の増幅 DNA が得られ、プログラム 2 では、1.8 μg (*F. tularensis*) と 2.1 μg (*E. Coli*) の増幅 DNA が得られた。一方、Phi29 DNA ポリメラーゼによる増幅では、3.1 μg (*F. tularensis*) と 4.3 μg (*E. Coli*) の増幅 DNA が確認され、Phi29 DNA ポリメラーゼが効率的にゲノム DNA を増幅している事を確認した。

D. 考察

DOP-PCR と Phi29 DNA ポリメラーゼによる DNA 増幅は、10 ng のゲノム DNA を増幅可能である事が証明された。DOP-PCR のポリメラーゼの選定にあたり、5 種類のポリメラーゼを用意したが、ExTaq と Taq のみで良好な増幅が見られた。DOP-PCR におけるポリメラーゼの増幅性能差は、通常の PCR と比較して長時間の高温状態に晒される事から、ポリメラーゼの高温耐性度に依存したと推測された。 *E. Coli* および *F. tularensis* の DOP-PCR を用いた増幅では、均一な増幅を示すスミアの中に半特異的増幅を示すラダーが検出された。一方、Phi29 DNA ポリメラーゼを用いた増幅では、スミアのみが観察された。この事から、Phi29 DNA ポリメラーゼを用いた増幅が DOP-PCR と比較して均一に増幅している可能性が示唆された。

DOP-PCR は、プログラム 2 で 2.7 時間、プログラム 1 で 4 時間を要する。一方の Phi29 DNA ポリメラーゼによる増幅は 18 時間を要する。迅速性を求める場合は、DOP-PCR 法が適していると考えられる。しかし DOP-PCR はサイマルサイクラーを必要とするが、Phi29 DNA ポリメラーゼによる増幅は 30°C のインキュベーターさえあれば何処でも適用できる。以上の結果、緊急性とゲノム DNA 増幅の均等性を考慮し、使い分ける事が可能であると考えられる。

これらの核酸増幅法によりウイルス等の微量な病原体が含まれる検体からも核酸増幅が可能で各種核酸の検出同定に応用できる可能性が示唆された。今後予想される家畜・家禽のウイルスゲノムについての応用を行う必要があると考えられる。

E. 結論

検体中に含まれる病原体核酸の均一な増幅方法の基礎的検討を行った。DOP-PCR と Phi29 DNA ポリメラーゼにより 10 ng の *E. Coli* および *F. tularensis* ゲノム DNA から 1~3µg 程度の増幅 DNA 断片が得られる事が確認され、ウイルスを含む他の病原体核酸検出に応用できる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

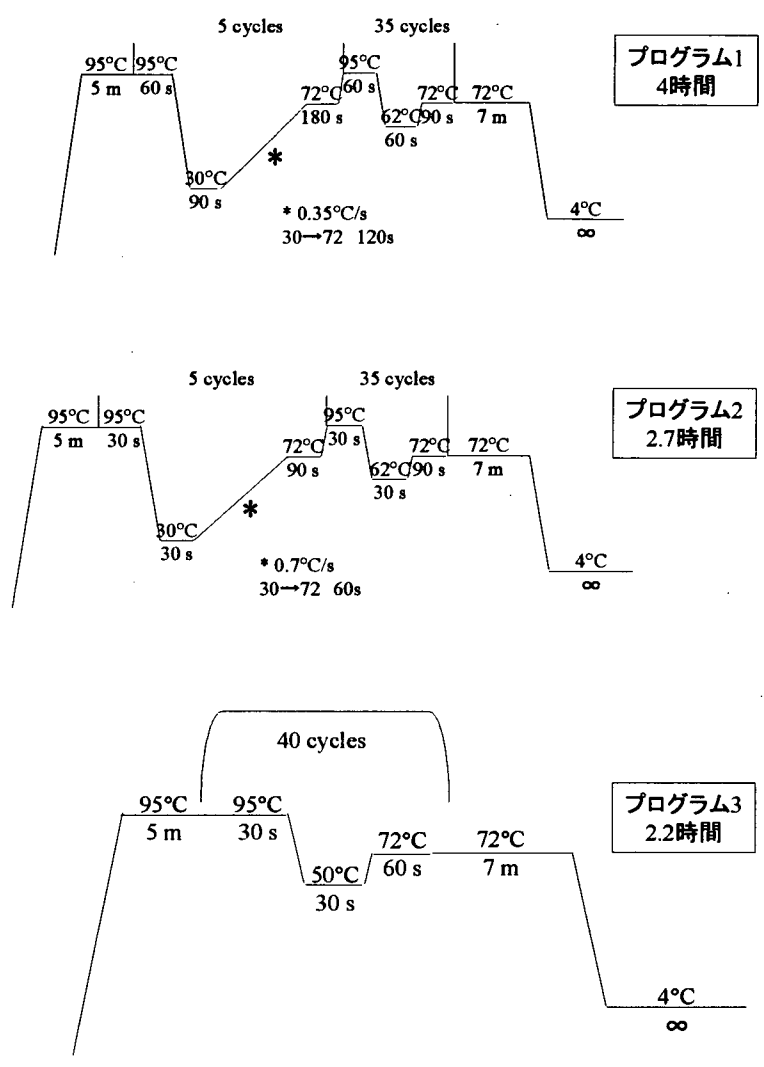
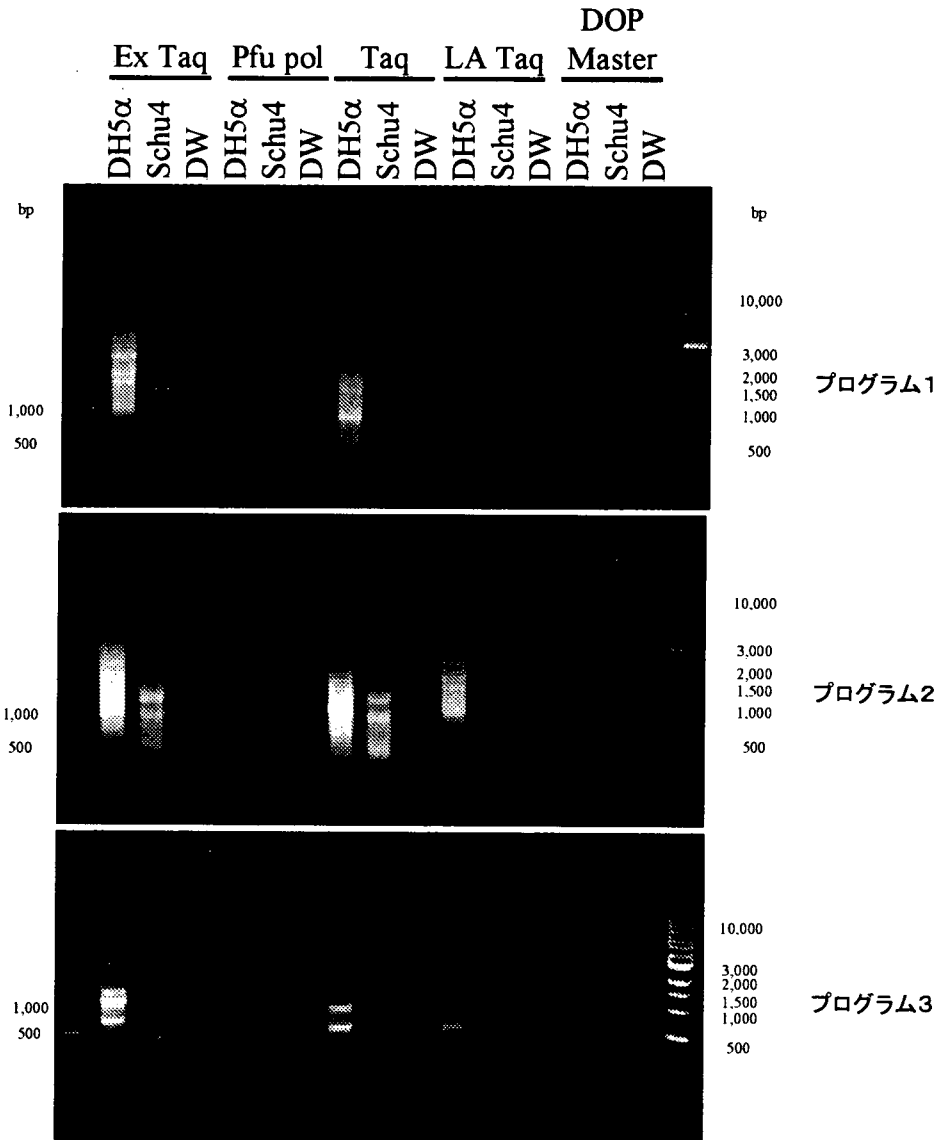


図 1 : DOP-PCR のプログラム



Schu; *Francisella tularensis* Schu4 genomic DNA
 DH5α; *Escherichia coli* DH5α genomic DNA

図 2 : DOP-PCR の条件検討

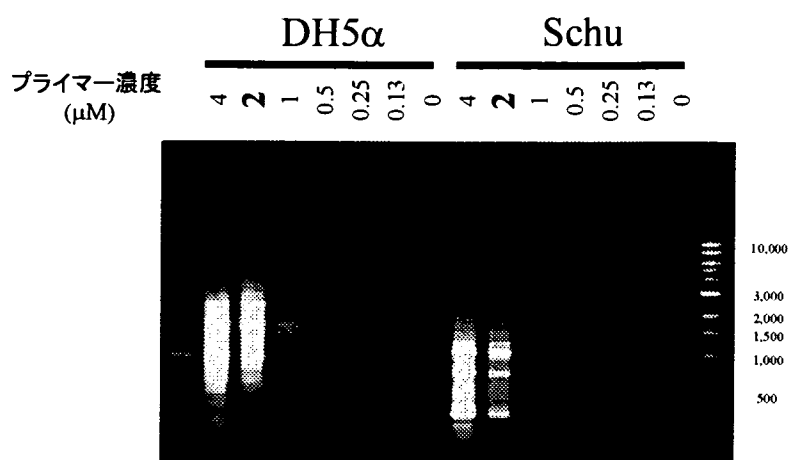
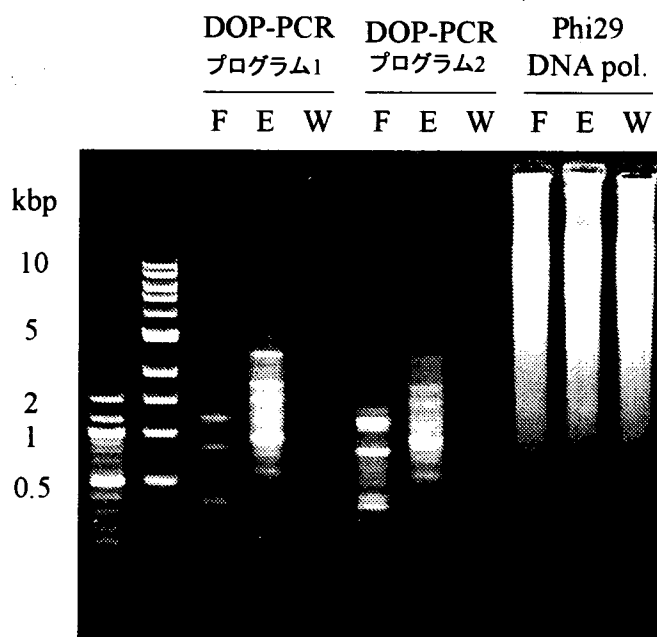


図 3 : DOP-PCR におけるプライマー濃度の検討



F; *Francisella tularensis* Schu4 genomic DNA
 E; *Escherichia coli* DH5 α genomic DNA
 W; DW

図 4. Phi29DNA ポリメラーゼを用いた DNA 増幅

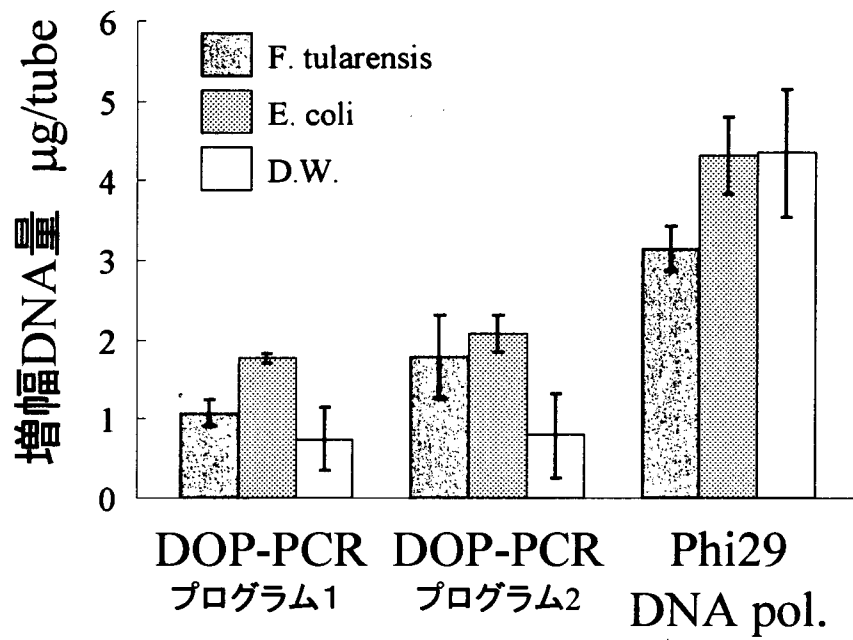


図5：DOP-PCR およびPhi29 DNA ポリメラーゼの増幅効率の検討

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

家禽のウイルス疾病に関する研究
：鳥インフルエンザウイルスの簡易迅速高感度検出法の開発

分担研究者：伊藤壽啓 鳥取大学農学部 教授
協力研究者：伊藤啓史 鳥取大学農学部 助教授

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. インフルエンザ診断キットの鳥インフルエンザへの応用

現在、様々な医療現場で使用されている人インフルエンザ診断キットを用いて、異なる血清亜型の鳥インフルエンザウイルスを用い、その検出感度、特異性等を検討した。

1) ウイルス株

用いたウイルス株は以下の6株である。これらのウイルスは鳥取大学農学部獣医公衆衛生学研究室に保存されているものを10日齢発育鶏卵で増殖培養したものである。それぞれのウイルスはまず、発育鶏卵を用いて50%感染量（EID₅₀/ml）をReed & Munchの方法で求めた。また、それぞれのウイルスは実験

に供するまで、-80℃の超低温フリーザーに保管した。

A/whistling swan/Shimane/499/83 (H5N3)
A/teal/Tottori/150/02 (H5N3)
A/whistling swan/Shimane/580/02 (H5N3)
A/Whistling swan/Shimane/42/80 (H7N7)
A/pintail duck/Shimane/78/88 (H7N8)
A/duck/Hokkaido/26/99 (H9N2)

2) エンザ迅速診断キットを用いた鳥インフルエンザウイルスの検出

人インフルエンザ迅速診断キット(キャピリア Flu A, B、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社)を用いた鳥インフルエンザウイルスの検出は添付のプロトコールに準じて実施した。検出感度の判定試験では各ウイルス液をPBSで10倍階段希釈したものをを用いた。

2. 鳥インフルエンザウイルスM遺伝子を標的としたLAMP法の確立

1) ウイルス株

A/duck/Hong Kong/276/78 (H2N2)
A/whistling swan/Shimane/499/83 (H5N3)

A/teal/Tottori/150/02 (H5N3)
A/whistling swan/Shimane/580/02 (H5N3)
A/whistling swan/Shimane/42/80 (H7N7)
A/pintail duck/Shimane/78/88 (H7N8)
A/turkey/Ontario/6118/68 (H8N4)
A/duck/Hokkaido/26/99 (H9N2)
A/turkey/Wiscon/1/66 (H9N2)
Avian paramyxovirus

2) RNA抽出

それぞれのウイルス液からviral RNA kit(Qiagen社)を用い、製品に添付のプロトコールに従ってRNAを抽出した。

3) プライマー設計

標的遺伝子に対して図1に示した通り、3'末端側からF3c、F2c、F1c という3つの領域を、5'末端側からB1、B2、B3という3つの領域をそれぞれ規定し、この6つの領域を用いて下記の4種類のプライマーを設計した。尚、各primerの説明は以下の通りである。

FIP: F2c領域と相補的な配列であるF2領域を3'末端側に持ち、5'末端側にF1c領域と同じ配列を持つように設計する。

F3 Primer: F3c領域と相補的な配列であるF3領域を持つように設計する。

BIP: B2c領域と相補的な配列であるB2領域を3'末端側に持ち、5'末端側にB1c領域と同じ配列を持つように設計する。

B3 Primer: B3c領域と相補的な配列であるB3領域を持つように設計する。

4) LAMP法

設計したM primerおよびLoopamp DNA増幅試薬キット(栄研化学株式会社)を用いて、各ウイルスの抽出RNAを検体とし、ウイルス遺伝子の検出を行った。方法は添付のプロトコールに準じて実施した。

C. 研究結果

1. 現行の人インフルエンザ用診断キットの鳥インフルエンザへの応用

人インフルエンザ抗原検出キット(キャピリアFlu A, B、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社)を用いて、異なる亜型(H5, H7およびH9)の鳥インフルエンザウイルスに対する最小検出量を調べた。その結果、表1に示す通り、ウイルス株間ではばらつきは見られるものの、その値は $10^{5.83}$ から $10^{7.83}$ EID50/0.1mlの範囲で、人インフルエンザウイルスに対する最小検出量(10^4)と比較して、かなり低いことが判明した。

一方、鳥パラミクソウイルスを用いた場合、あるいはウイルスを含まない試料を用いた場合には、何れもバンドが検出されなかったことから、本キットの特異性は確認された。

2. 鳥インフルエンザウイルスM遺伝子LAMP法のためのプライマーの設計

LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法は標的遺伝子の6つの領域に対して4種類のプライマーを設定し、鎖置換反応を利用して一定温度で反応させることを特徴とする遺伝子検出法である。サンプルとなる遺伝子、プライマー、鎖置換型DNA合成酵素、基質等を混合し、一定温度 (65°C 付近) で保温することによって反応が進み、検出までの工程を1ステップで行うことができる。また、増幅効率が高いことからDNAを15分〜1時間程度で 10^9 〜 10^{10} 倍に増幅することができ、また、極めて高い特異性から増幅産物の有無で目的とする標的遺伝子配列の有無を判定することができる。従って食鳥処理場等でも特別な機器を使用せずに、トータルコストを低減した形で、鳥インフルエンザの診断ができる可能性が考えられた。

現在、H5およびH7亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスを検出するプライマーが設計され、キットとしてすでに市販されている (栄研化学)。しかしながら、昨年6月に茨城県の養鶏場で発生したH5亜型の鳥インフルエンザのように、原因ウイルスが抗原変異を起こしてHA遺伝子の塩基配列もまた大きく異なった株による流行が今後も発生する可能性は少なくない。また、H5やH7以外の亜型のウイルスによる流行の可能性も決して否定は出来ない。一般にスクリーニングやサーベイランス調査においては出来る限り広範囲にウイルスを検出することが条件となるため、H5およびH7ウイルスのみを

検出する現行の市販キットでは不十分と考えられた。そこで本研究では全ての亜型の鳥インフルエンザウイルスを検出できるprimerの設計を試みた。

標的遺伝子としてインフルエンザウイルスの8本の遺伝子セグメントのうち、株間でよく保存され、かつデータバンクに比較的多くの塩基配列情報が登録されているM遺伝子を選択した。

LAMP法による増幅反応を成功させるためには、最適なプライマー設計が必要不可欠である。

そこで以下の点に注意して鳥インフルエンザウイルスに共通したM遺伝子プライマーの設計を行った。

1) プライマー間距離

F2領域の外側〜B2領域の外側までの距離は120〜180塩基、F2とF3領域間、B2とB3領域間は0〜20塩基程度とする。ループを形成する部分 (F2・5'末端〜F1・5'末端、B2・5'末端〜B1・5'末端) の距離は40〜60塩基程度とする。

2) 各プライマー領域のT_m値

GC rich、Normalの場合60〜65°C、AT richの場合55〜60°C程度とする。

3) 各プライマー領域の末端安定性

F1c/B1cの5'末端およびF2/B2、F3/B3の3'末端からそれぞれ6塩基のdGを-4kcal/mol以下とする。

4) GC含量

GC rich、Normalの場合50〜60%、AT richの場合40〜50%程度とする。

5) 二次構造

極端に二次構造をとらないようにするとともに、3'末端がAT richあるいは相補的にならないようにする。

6) その他

増幅領域内でプライマーに利用した配列以外の場所に適当な制限酵素部位があると、増幅産物の確認に利用できる。

以上の点を考慮したプライマーを設計するため、まず、データベースに登録されている鳥インフルエンザウイルス計57株の塩基配列を得た。その株名を表にまとめた。これらの塩基配列情報をもとに遺伝子解析ソフトClustal Xを用いて、アラインメント解析を行い、コンセンサス配列情報を得た(図2)。

その成績をプライマー設計支援ソフトに入力した結果、合計10組のプライマー候補が選択された(図3)。

3. 鳥インフルエンザウイルスM遺伝子LAMP法による遺伝子検出

設計された10組のプライマーのうち、1組のプライマー(ID:95)を用いて、LAMP法を実施した。その結果、用いたすべてのウイルスについて陽性の結果が得られた(図4)。また、陰性対象として同時に実施した、RNA不含サンプルおよび鳥パラミクソウイルスのRNAではいずれも陰性となり、特異性も確認された。以上の成績から、本プライマーを用いたLAMP法によって鳥インフルエンザウイルスを検出できることが明らかとなった。

D. 考察

本研究においてまず、人インフルエンザ用診断キットを用いて異なる亜型の鳥インフルエンザウイルスの最小検出量を調べた結果、人インフルエンザウイルスに対するそれと比べて 10^2 から 10^4 程度低いことが判明した。用いたウイルス株はH5亜型2株、H7亜型2株およびH9亜型1株の計5株で、検出量は株によって異なったが、何れも高濃度のウイルスが試料中に存在しなければ検出出来ないことが明らかとなった。今後は検出感度を

向上させるべく、試料中のウイルスを簡便な方法で濃縮する方法の検討を試みる。また、今回用いた人インフルエンザ用診断キットは現在、市販されている複数種のキットのうちの1種類のみでの検討であることから、次年度は他社製のキットについても検討する計画である。

次に新たな迅速高感度診断キットとして最近、注目されているLAMP法について鳥インフルエンザへの応用について検討した。現在、すでにH5およびH7亜型のウイルスを検出するキットが市販されているが、これらのキットはHA遺伝子を標的としているため、抗原変異の影響を受けやすい。そこで本研究では将来的に異なる亜型の鳥インフルエンザウイルス流行の可能性も考慮に入れ、すべての鳥インフルエンザウイルスを広範囲に検出可能な診断法の確立を目指した。そのため、ウイルス株間でよく保存されたM遺伝子を標的としてLAMP法のprimerを設計した。得られた成績から10組のprimer候補が選択されたが、今回はそのうちの1組のみについて検討した結果、用いたいずれの亜型の鳥インフルエンザウイルスをも検出可能であった。

今後更に様々な血清亜型、宿主、地域、分離年の鳥インフルエンザウイルスを用いて本法の有効性を確認していくとともに、primer部分の塩基配列が1部異なるウイルス株についてもどこまで検出可能か否かを明らかにする計画である。また、検出感度、不純物混入時の非特異反応の出現、RNA抽出法の簡便化などについても検討し、最終的に本法が食鳥処理場等で実際に迅速簡便高感度な診断法として応用可能か否かを評価していく予定である。

E. 結論

本研究によって人インフルエンザ用診断

キットを鳥インフルエンザに応用することは可能であるが検出感度がかなり低く、現状のままではその有効性に問題のあることが確認された。

一方、鳥インフルエンザウイルスを検出する迅速高感度診断法としてのLAMP法の確立を目的として、鳥インフルエンザウイルスに共通したプライマーの設計を実施し、有効なプライマーの候補を選択することが出来た。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Shinya, K., Sutou, A., Kawakami, M., Sakamoto, H., Umemura, T., Kawaoka, Y., and Ito, T. (2005) Neurovirulence of H7N7 influenza A virus: Brain stem encephalitis accompanied with aspiration pneumonia in mice. *Arch. Virol.* 150, 1653-1660.

2) Kogure, T., Suzuki, T., Takahashi, T., Miyamoto, D., Hidari, K. I. P. J., Chao-Tan, G., Ito, T., Kawaoka Y., and Suzuki, Y. (2006) Human trachea primary epithelial cells express both sialyl-2-3-Gal receptor for human parainfluenza virus type 1 and avian influenza viruses, and sialyl-2-6-Gal receptor for human influenza viruses. *Glycoconjugate J.* 23:99-104.

3) T. Horimoto, A. Takada, K. Fujii, H. Goto, M. Hatta, S. Watanabe, K. Iwatsuki-Horimoto, M. Ito, Y. Tagawa-Sakai, S. Yamada, H. Ito, T. Ito,

M. Imai, S. Itamura, T. Odagiri, M. Tashiro, W. Lim, Y. Guan, M. Peiris, and Y. Kawaoka (2006) The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate. *Vaccine*, (in press)

4) Nishiguchi, A., Yamamoto, T., Tsutsui, T., Sugizaki, T., Mase, M., Tsukamoto, K., Ito, T., and Terakado, N. (2006) Outbreak and successful control of highly pathogenic avian influenza in Japan in 2004 caused by an H5N1 subtype. *Scientific and Technical Review of the OIE*, 24 (3), (in press)

5) Ito H., Ito T., Hikida, M., Yashiro, J., Otsuka, A., Kida, H., and Otsuki K. (2006) Outbreak of highly pathogenic avian influenza in Japan and anti-influenza virus activity of povidone-iodine products. *Dermatology*, in press

6) 伊藤壽啓(2005): インフルエンザウイルスのレセプター特異性と膜。膜。30(2), 62-67.

7) 伊藤壽啓(2005): 高病原性鳥インフルエンザ発症と人への感染。食品の包装。36(2), 84-90.

8) 伊藤壽啓(2005): インフルエンザ講座 16。鳥インフルエンザとは。インフルエンザ。6(2), 56-59.

9) 伊藤壽啓(2005): 家禽ペストとインフルエンザ。インフルエンザ。6(2), 5-6.

10) 伊藤啓史、伊藤壽啓 (2005): インフ

ルエンザウイルスの種間伝搬。獣医畜産新報、58(10), 861-864

1 1) 伊藤壽啓(2006): 高病原性鳥インフルエンザの現状。感染症。36(1), in press.

2. 学会発表

1) 伊藤壽啓: 鳥インフルエンザの人への感染の可能性。日本寄生虫学会分子生物生理生化学研究会シンポジウム。米子市。2005年4月7日。

2) 南 要絵、常國良太、伊藤啓史、河岡義裕、喜田 宏、伊藤壽啓: 鶏気嚢継代によるニューカッスル病ウイルスの強毒化。中国四国ウイルス研究会。倉敷市。2005年6月18-19日。

3) 伊藤啓史、井上 和幸、大槻公一、河岡義裕、伊藤壽啓: 水禽由来インフルエンザウイルスの鶏への適応に関する研究。中国四国

ウイルス研究会。倉敷市。2005年6月18-19日。

4) Ito H., Ito T., Hikida, M., Yashiro, J., Otsuka, A., Kida, H., and Otsuki K. : Outbreak of highly pathogenic avian influenza in Japan and anti-influenza virus activity of povidone-iodine products. 第5回アジア太平洋消毒会議。2005年7月。ケアンズ。

5) 伊藤壽啓: 高病原性鳥インフルエンザの発生(茨城)と感染経路。平成16年度鶏病研究会岩手支部。盛岡市。2005年9月7日。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表1 人インフルエンザ診断キットを用いた鳥インフルエンザウイルスの検出

ウイルス株	最小検出量 (EID ₅₀ /0.1ml)
A/whistling swan/Shimane/499/83 (H5N3)	10 ⁶
A/teal/Tottori/150/02 (H5N3)	10 ⁶
A/whistling swan/Shimane/580/02 (H5N3)	10 ^{6.17}
A/whistling swan /Shimane/42/80 (H7N7)	10 ^{7.83}
A/pintail duck/Shimane/78/88 (H7N8)	10 ^{5.83}
A/duck/Hokkaido/26/99 (H9N2)	10 ^{6.17}

表2 M 遺伝子のアラインメント解析に用いた鳥インフルエンザウイルス株名

A/whistling swan/Shimane/499/83	A/duck/Czechoslovakia/56
A/avian/Netherlands/33/03	A/chicken/Netherlands/1/03
A/turkey/Italy/214845/2002	A/turkey/Italy/4603/1999
A/chicken/Victoria/1/85	A/duck/HongKong/3461/99
A/Budgerigar/Hokkaido/1/77	A/Chicken/Gxi/12/2004
A/Duck/Gxi/13/2004	A/Chicken/Laos/7191/2004
A/Chicken/Vietnam/1/2004	A/chicken/Hubei/327/2004
A/duck/China/E319-2/03	A/Duck/Hunan/15/2004
A/Chicken/HK/NT873.3/01	A/duck/Shandong/093/2004
A/Goose/Guangdong/1/96	A/chicken/Jilin/9/2004
A/chicken/Beijing/8/98	A/chicken/Henan/5/98
A/chicken/Hebei/31/00	A/chicken/Ningxia/4/99
A/chicken/Guangdong/21/02	A/chicken/Guangdong/47/01
A/chicken/Guangdong/10/00	A/chicken/Jiangsu/1/00
A/chicken/Henan/43/02	A/chicken/Jilin/53/01
A/chicken/Heilongjiang/48/01	A/chicken/Henan/26/00
A/chicken/Shanghai/10/01	A/chicken/Fujian/25/00
A/chicken/Shijiazhuang/2/98	A/Chicken/Shanghai/F/98
A/chicken/Shenzhen/9/97	A/duck/Nanjing/1/97
A/chicken/Shandong/6/96	A/chicken/Guangdong/5/97
A/chicken/Heil/35/00	A/chicken/Guangxi/9/99
A/chukka/HK/FY295/00	A/quail/HK/SF550/00
A/pheasant/HK/NT261/00	A/Teal/HongKong/W312/97
A/pheasant/HK/SH39/99	A/pheasant/HK/FY294/00
A/quail/HK/1721-20/99	A/chicken/BC/04
A/GSC_chicken/BC/04	A/turkey/Minnesota/833/80
A/turkey/Wisconsin/66	A/turkey/Minnesota/166/81
A/Gull/Massachusetts/26/80	A/gull/Maryland/1815/79
A/gull/Maryland/1824/78	