

表2 マイクロアレイのために設計したオリゴDNA

Sym bol	Gene name	Accession number	position	Sequence (60 mer)*	Tm
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> Schu 4, complete genome (NC_006570)					
F01	atpA	FTT0062	898	AGAGCTGCAAGAGTCAACGAAGAATATGTCGAGAAAATTACAAAATGGTGAAGTGAAGGT	73.7
F02	sdhA	FTT0074	498	TTTCTATACGGAGTGGTTTGTCTGTTGATTGGTTAAGGCGGATGATGGTAGTATIGCTGG	75.3
F03	valA	FTT0109	32	AGTCTCAGGGATCTAGTAATCTAAGTGGAGAAATGACAAACCATCAGAAAGTAGGCACTC	73.4
F04	valB	FTT0110	280	TTGAAGTAACAAGTGGTACTCTAGCAACTCAATGTGGCGATGAGCCGCGATGTTATTT	75.3
F05	parC	FTT0396	791	AGGTTTCAAGTGTCTGGCTAATGGAGCAAAATCGCTAAATGAACCTAAGCAACAGAAGATTA	74.8
F06	asd	FTT0425c	757	AGGGTCTAGAACTAGAGTACTATCTTTGTCTAAGCGTAGTGTGATGCGAGCTCTATCCA	75.0
F07	aroA	FTT0588	448	CCTTTGACAATAATAGCTAAATCTTTGGATGGTGGTTATATAGAAGTTGATGGCGAGAAG	71.3
F08	mdh	FTT0535c	289	AGCAACAATTCGCGCACCACCCTTCTAGTCTCGATACTATAGCATCTAAACCGCTCTTG	75.0
F09	alr	FTT0573	893	CTATGGCTGGTAGAATGAGTATGGATGGTGTACAGTATCGTTAGGAATTAATGAATACG	72.1
F10	fopA	FTT0583	262	GGAACTCCTAACTCTCCATCAGGTGCTGGTGTAACTTCAACAATCGGTTATAACATCAAT	74.9
F11	galE	FTT0791	601	CTCATGCCTTATGTGCGCAAGTAGGTGCTGGTAAACTAGCTAAACTTAGTATCTTTGGT	75.0
F12	mglB	FTT1276	302	GCGAATTTGGTTATGGAAATTAATCAATGAAGCGAAGATGATGAAACTGCTAATCTTA	71.6
F13	iglD	FTT1356c	1014	TTATAAGGATAAGACCTGTCTGCAAACTTTCACATCTAAATCAAAGCTAACGATTCCCT	71.8
F14	iglC	FTT1357c	561	CAGTAGGATCAGTCTCACATGAATGGTCTCGCCACTTGTACCTGTTGCTTGTATCA	74.8
F15	pdpD	FTT1360c	53	CCTCTAGCTGGTACAGTTGCTAAGACACTAAACCTTGTGAACTTCTAATCTCTTCATGT	73.0
F16	minD	FTT1606	32	TAGTAACTTCTGGTAAAGGTGGTGTGGTAAACTACTTCAAGTGCCGCTGTGTCATATG	74.6
<i>Escherichia coli</i> K12, complete genome (NC_000913)					
E01	ykgK	b0294	26	GAGTACAGCTTGGCCTCAGCATTACGCCGATGGGTATACACTGCTTCACACTACAATTT	76.6
E02	eaeH	b0297	399	TTCGCTGGAAATGCTTTATCCGATTTATGATACGCCGACAAATATGTTGTTCACTCAGGG	74.8
E03	ykgA	b0300	581	CGTCTGCTGTAGCCAGATTTCTGTGCGATATCTTCGATTGAAATAGGGTGTCAAGATTG	75.4
E04	betT	b0314	819	GITCGTATTGTTATGGGCGACACTTCGTCTCGCTTAATGC ACTGTGCTGAATGTTGG	77.0
E05	yahE	b0319	223	GGTATTACGGTTGGTCAACATCTTCAATAGAGATGAGTCGTTGTCGGCGTTGGCTGTCC	76.6
E06	yahK	b0325	1	ATGAAGTCAAAGCTGTTGGTGCATATCCGCTAAACAACCCTTGAACCGATGGATATC	74.9
E07	ybbV	b0510	1177	GGTAAGTTTATTCACCTTATGGAACCGTTATCGCGTGTTCATGGTTTGTCCGGCTCATC	75.3
E08	ybbY	b0513	1030	AGTATCCCTTACCCGTTGAGTAGTGGGTCATGCTGGTTCTTATCTGCTTACTCTTT	76.1
E09	yIbA	b0515	18	GGTTACAATCTTTCAGTAAATATAGCTGAACGCTTACCACGCCCTACACCAATAACCAG	75.2
E10	ybcK	b0544	401	CCATACTTATAGCACAAGGGCAAATGAAGAAAGCGAGATAAAGTCAAGTCGGGTTAAAT	73.1
E11	ompT	b0565	425	CTGAATCCCTCTCAGAACTGTAGATATAGGAACACCTCTGGCTGTAAAGCTATAACGG	74.9
E12	ybgD	b0719	350	GCCACTTTATGCTATGATGCTCCCGTTTATATGGGTTGTCGTGACTTGTCCAAGATCT	76.0
E13	yedQ	b1022	237	TATGTGTCGACGGATATGTGTCAATTCAATTTAACGGTACACCGGCAAGTTGGACTG	75.6
E14	yedR	b1023	1168	CAATTCGACGCAATTTGCCAAACCTGATTC AAGGGTGAAGAACATGTCATAACCGAGTTT	76.4
E15	yedS	b1024	983	GTTAATGCTGTCCAGGCTTGTTCACCTCCAGATTAATATTACGTGGCTCGATCACTTCT	75.1
E16	yciQ	b1268	704	CGAATATTTTCAGCCATCTCTTTTACCTCCACGTCATCGTTGTTAATTTGGTTCCGT	74.3
Position marker/ <i>Homo sapiens</i> aryl hydrocarbon receptor (NM_001621)					
P	AHR	NM_001621	701	AGAGACCGACTTAATACAGAGTTGGACCGT	62.0

全てのオリゴDNAは、スライドへ共有結合させるため5'アミノ基を付加した。

* AHRは、ポジションコントロールに用いた。

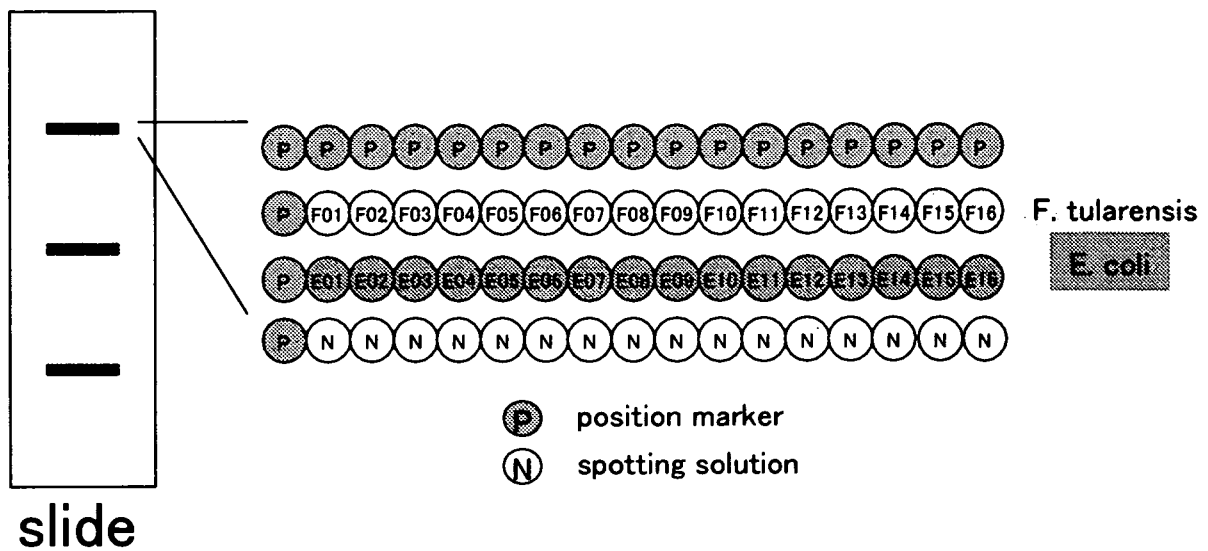
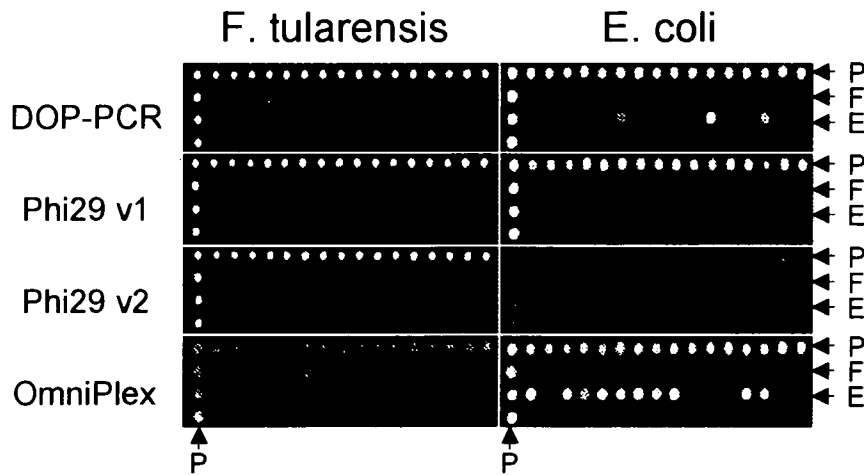
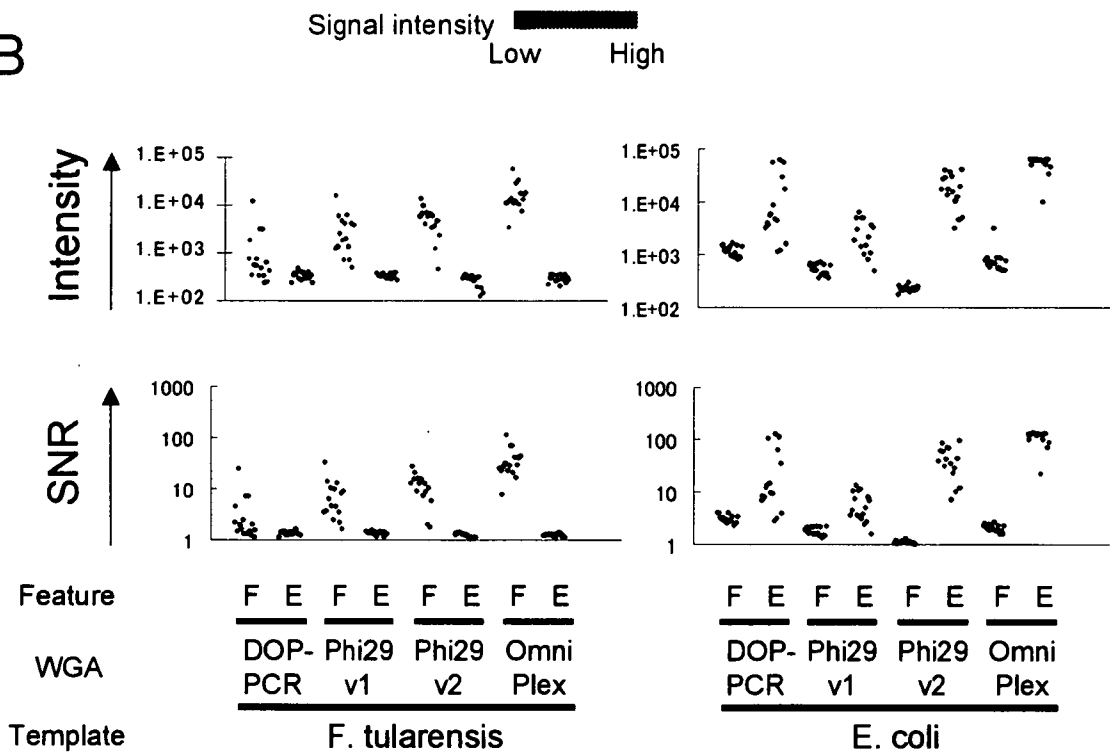


図5 マイクロアレイのレイアウト。オリゴDNAプローブは、左図に示した1 inch × 3 inchスライドに3アレイ分スポットした。Cy3ラベルAHR及びCy5ラベルAHRを等量混合しポジションコントロール(灰色スポット)とし、スポット溶液のみをネガティブコントロール(白スポット)としてスポットした。F. tularensis(黄色)及びE. coli(オレンジ)の遺伝子を標的としたオリゴDNAは、各バクテリアにつき16プローブをスポットした。全てのスポットの直径は180 μ m、中心間距離300 μ mでスポットした。スポットレイアウト中に書かれている記号は、表2に示した標的遺伝子を表している。

A



B



F; features of *F. tularensis*
E; features of *E. coli*.

図6 マクロアレイを用いた病原体検出。 *F. tularensis*及び *E. coli*から抽出した10 ngのゲノムDNAを鋳型として用いて、各WGA法を用いて増幅し、ULYSIS Alexa Fluor 660 Nucleic Acid Labeling Kitでラベル化後、1.8 µgのラベル化サンプルをマイクロアレイにハイブリさせた。ハイブリさせたマイクロアレイスライドは、洗浄・乾燥後、ScanArray Express (PerkinElmer)を用いてスキャンした。(A)スキャン画像。ポジションマーカーをP、 *F. tularensis*のスポットをF、 *E. coli*のスポットをEと示した。(B)スポットの蛍光強度の解析。スキャン画像をScanArray Express softwareで解析し、各スポットのシグナル、ローカルバックグラウンド、シグナル-バックグラウンド(Intensity)、シグナル/バックグラウンド(SNR)をエクセルに出力した。各遺伝子の平均シグナル強度及(上段; Intensity)及びシグナルノイズ比(下段; SNR)は点で示した。

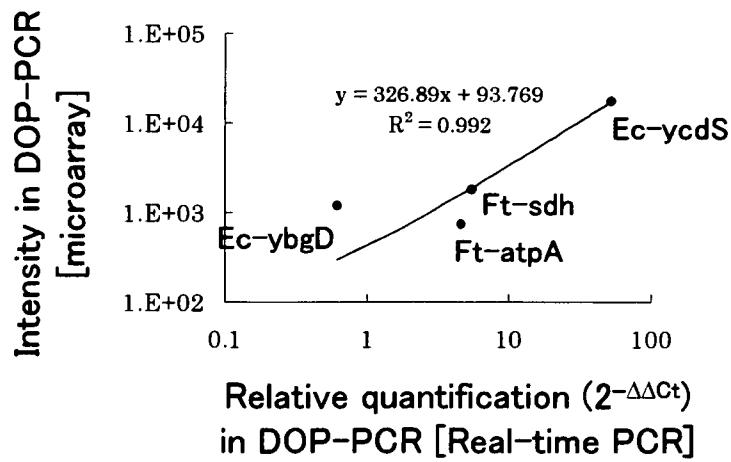


図7 マイクロアレイで検出される蛍光強度 (Intensity) とDOP-PCRにおける増幅の偏りとの相関。横軸に図6に示したマイクロアレイで測定された蛍光強度 (シグナルバックグラウンド) を、縦軸に図4で示した各遺伝子の $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 値を示した。

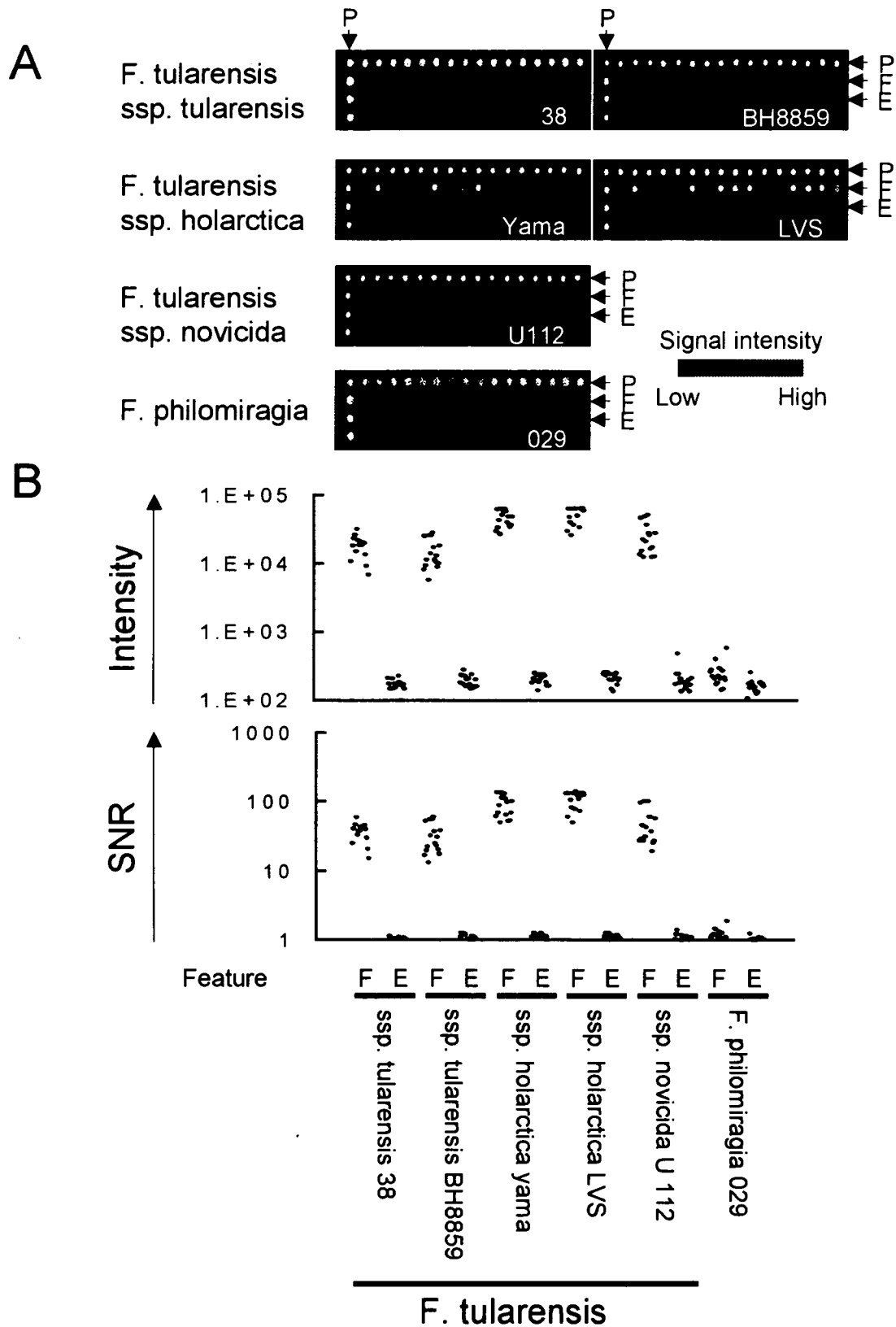


図8 *F. tularensis*株の検出。 *F. tularensis*株のゲノムDNAを鋳型とし、OmniPlex WGAにて増幅・ラベル化後、サンプルをマイクロアレイにハイブリさせた。(A) *F. tularensis*株由来のサンプルから得られたスキャン画像。(B)得られたスキャン画像を解析し、スポットの蛍光強度の解析。スキャン画像をScanArray Express softwareで解析し、各スポットのシグナル、ローカルバックグラウンド、シグナル・バックグラウンド(Intensity)、シグナル/バックグラウンド(SNR)をエクセルに出力した。各遺伝子の平均シグナル強度及(上段)びシグナルノイズ比(下段)は点で示した。

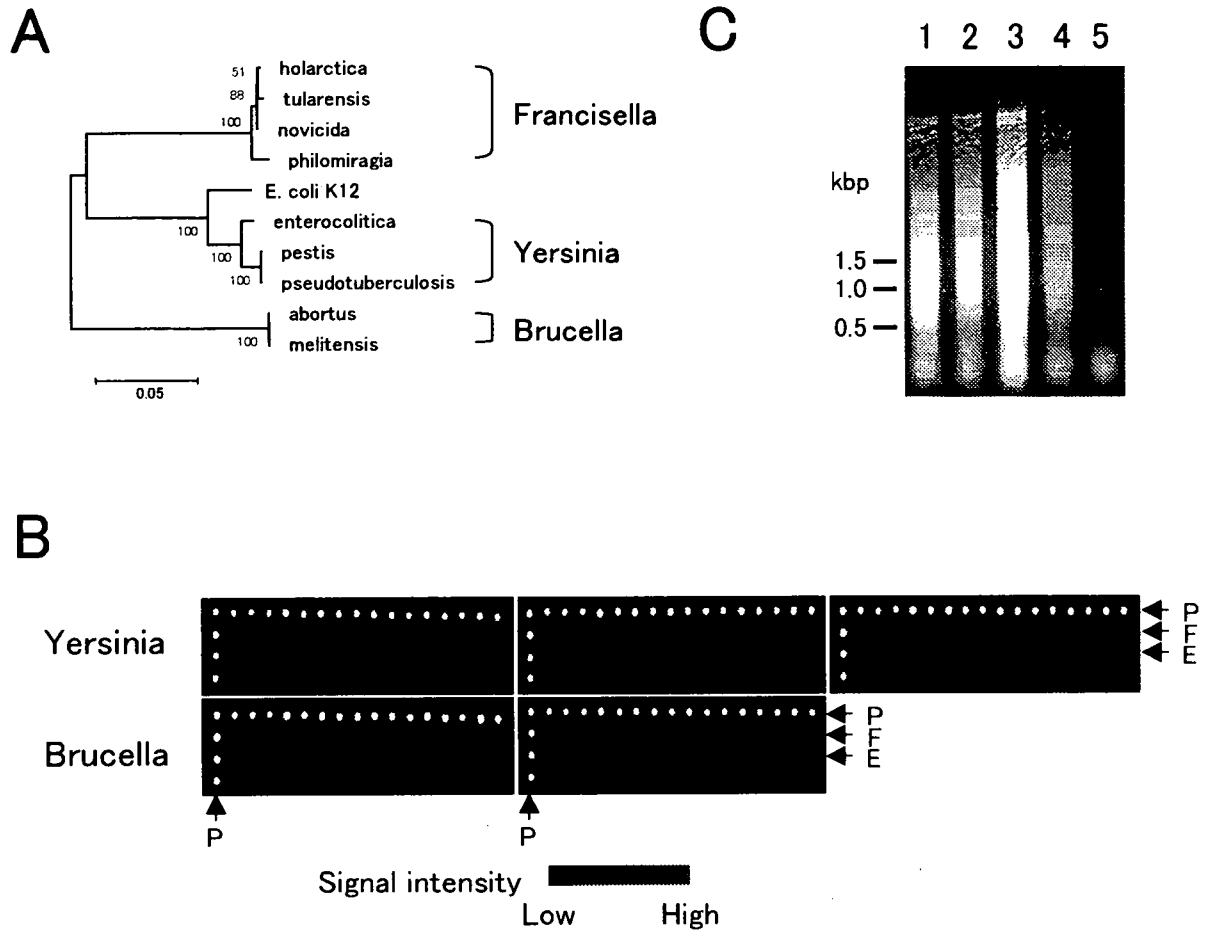
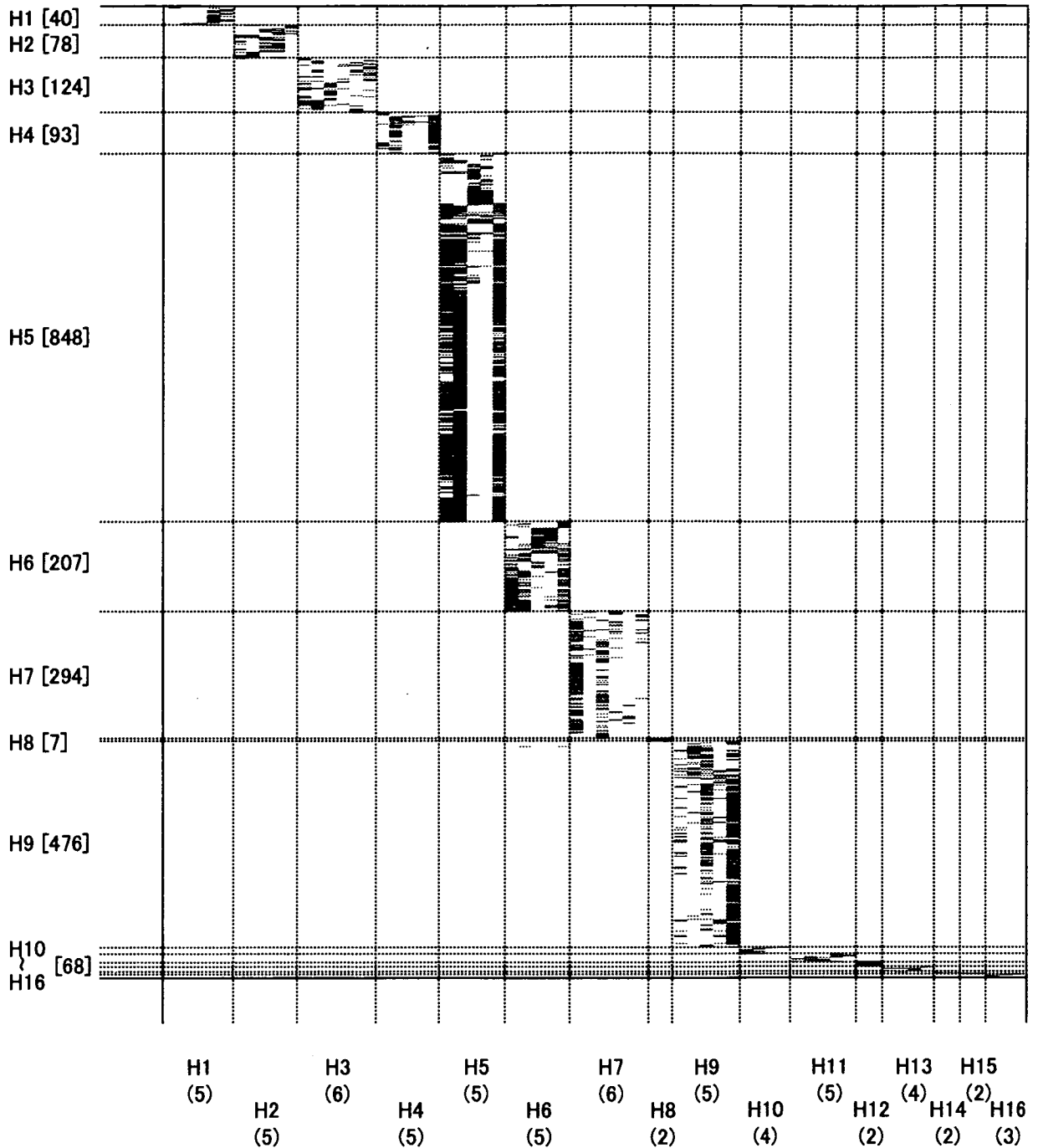


図9 マイクロアレイのクロスハイブリの検討。(A) *F. tularensis*及びその他バクテリアの16Sリボゾーナル遺伝子における系統樹。系統樹解析には、*F. tularensis* subsp. *tularensis* (NC_006570), *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS (AJ698866), *F. novicida* (AY968237), *F. philomiragia* (AY928394), *Brucella melitensis* biovar *Abortus* (AF091354), *Brucella melitensis* (AE009462), *Yersinia pestis* (AF282306), *Yersinia enterocolitica* (Z49828), *Yersinia pseudotuberculosis* (AF366375), *E. coli* K12 (U00096)を用いた。(B) マイクロアレイスライドのスクリーン画像。(C) *Yersinia enterocolitica* (lane 1), *pestis* (lane 2), and *pseudotuberculosis* (lane 3), and *Brucella abortus* (lane 4) and *melitensis* (lane 5) から抽出したゲノムDNAを用いて OmniPlex WGA法で増幅した産物を電気泳動した。

表3 鳥インフルエンザウイルスのHAに対するマイクロアレイプローブ

Probe name	Probe Sequence	Length	Tm	GC%
H1-AB271115-276	GCTGCTCACGGCGAACTCATGGTCCTATATAATAGAGACTTCAAATTCAGAAAATGGAAC	60	73.8	41.7
H1-AY180460-1582	ATGGAGTGAATTTGGAATCAATGGGAGTCTATCAGATTCTGGCGATCTACTCAACTGTGCG	60	74.7	43.3
H1-AY233393-906	TATAAACACCAGCCTCCATTTTCAGAAATATACACCAGTCACAATTGGAGAATGTCCAAA	60	73.5	38.3
H1-CY004546-49	TTGTGCTATTCTGTATATTCCTGTACTGAAAGCTGACACCATCTGTGTGGGCTACCATG	60	74.9	43.3
H1-Z46441-914	CCTTGAACAGTAGTCTTCCTTTTCAGAACGTACATCCCATCACTATTGGAGAATGCCCCA	60	75.6	45
H2-AB266382-1	GAACATGGTCTGGTTGACAAAAGAAAGGGTCAATACCCAGTTGCCAAAAGATCATACAA	60	74.9	41.7
H2-AY180400-30	GCCAGAAATGGTCAATATATATGGGAGAAAGAAAATCCGAGGAATGGTTTGTGCTACCCAGG	60	74.5	43.3
H2-CY003863-1548	TGAAGAAGAATCCAAGCTGAACAGAACCAGAAATCAAAGGAGTGAATTTGAGCAACATGGG	60	75.1	41.7
H2-CY003992-72	CACAGTAGTGAAGGGGACCAATATGTATCGGATACCATGCCAACAAATCCACAGAAAA	60	74.5	41.7
H2-CY005546-963	GTGCCATCCACTGACAATAGGTGAATGCCCTAAATATGTAAATCAGAAAAGCTGGTCTT	60	74.3	40
H3-AJ697866-230	GTTTCATCAGTGAAGTTTCACTTGGAGAGTGGTCAACTGAGGAGGCAATGGG	60	76.2	46.7
H3-AJ697866-447	AACAACCTGTATGTTCAAGCCTCAGGAAGAGTCAAGTCTCTACAGGAGAAAGCAACAG	60	76.9	48.3
H3-AY180431-341	CATCAGGCACATTGGAGTTCATTACTGAAGTTTCCCTGGACAGGGGCTACTCAGAATG	60	76.9	48.3
H3-AY633172-1052	TAGCAGGGTTCATAGAAAATGGATGGGAAGGAATGATAGATGGTTGGTATGGTTTCAGCG	60	75	43.3
H3-AY779254-323	CAGCTTACAGCAACTGTTACCTTATGATGTCGCGGATATGCCCTCCCTGGATGGTACAG	60	76.4	48.3
H3-CY005941-548	TGGAAGTGCTTACCCAGTGTGAATGTGACTATGCCAAATAATGACAACCTTTGACAAAATT	60	73.5	36.7
H4-AY180443-86	CGATGTGCCAGACTACCAGAGCCTGAGAAGCATACTCGCCAACAATGGGAAATTTGAATT	60	77.1	46.7
H4-CY004939-1615	TTCTTTTCCATATCATGCTTCTTACTCGTTGCACTACTTTTTCAGCCTTTATTTTGTGGGC	60	73.4	38.3
H4-CY006030-358	CGTGCCAGATTACAGAGTTTTGAGAAGCATACTTGGCAACAATGGGAAATTTGAGTTCAT	60	75.1	41.7
H4-DQ327834-1552	AACCGATTTTCAGATTCAGGGAGTCAAGTTCAGCCAGGGATACAAGGACATTATTCTTTGG	60	74.8	43.3
H4-J02102-140	TTGACTGATGACCAAGTGAAGTTGTCCTGCTGCCCAGGAATAGTGAATCGCAACATCTA	60	75.5	43.3
H5-AB241624-63	TGGTTACCATGCAAACTCAGACAGAACAGGTTGACACAATAATGAAAAGAAATGTTAC	60	73.6	38.3
H5-AM231714-117	CTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGTACC	60	75.8	48.3
H5-AY497079-178	TGGCTCTTGGAAATCCAATGTGTGATGAATTCCTGAATGTGCCGGAATGGTCATACATT	60	75.7	41.7
H5-AY497079-20	ATCATGCAAACTAACAAAACAGTTGACACAATCATGGAAGAATGTGACGGTCA	60	73.4	35
H5-AY590576-270	TGTATGGAAGTGAAGAAACCGAACGTATGACTACCCGAGTATTGAGAAGCAAGA	60	74.6	41.7
H6-AF474034-718	H6-AF474034-718	60	74.6	41.7
H6-AJ421063-1579	GGTGTGATCAAATCTTGGCATTTATAGTACGGTATCGAGCAGCCTAGTGTGGTAGGG	60	74.9	45
H6-CY004137-977	TCCCAATATGTTAAAAGTAAGACCTAAAACCTAGCAACTGGTCTGAGGAATGTCCCA	60	74	40
H6-CY004142-1666	TGGGTCTTGGATGTGCTCGAATGGCTCAATGCAATGCAGGATATGTATATAATTAGGAA	60	74.3	40
H6-DQ376652-1658	GATCATGGCAATGGGTCTTTGGATGTGTTCAAATGGTTCAATGCAATGCAGGATATGTAT	60	74.6	40
H7-AB269694-212	ATGCCAATTTGGAAGGGATTGCTATCATAGTGGAGGGACAATAATAAGTAATTTGCCCT	60	74.3	40
H7-AF202231-1433	CTGAAGAGGATGGCACTGGTTGTTTTGAGATTTTCCACAAATGTGATGATGGCTGTATGG	60	75.3	43.3
H7-AF322024-138	GCACAAGATCAGGTTCTTCTTCTATGCAGAGATGAAGTGGTTGCTGTGCAATTCAGACA	60	75.3	43.3
H7-M24457-1564	H7-M24457-1564	60	74.5	41.7
H7-AY303633-1532	CAATACAGAGCCGAATCGCTACAGAACAGAATACAGATAGACCCAGTGAATTTGAGTGGC	60	75.1	45
H7-J02164-111	CGGAACAAAAGTGAACACACTAACAGAGAGAGGGATTGAGGTAGTGAATGCCACAGAAAC	60	75.3	45
H8-J02089-167	TGGGAAACAGAGAAACATCCCGCTTATGTAACACTGATTTAGGTGCCCAATTGGAAGT	60	75.8	45
H8-J02089-89	GATCACTCAAACTCCACAGGACATGTTCAACTGTTCAATGCAATGCAGGATGATGATG	60	76	45
H9-AF218089-161	GACATTCGAGTGAGATCCAATGGAATCTAATTGCTCCGTGGTATGGACACATTCTCTC	60	75.3	45
H9-AF218095-18	AGGCTGACACAAACAAGTGTGACAACAGAAATATAAACCGAACTTTCAAACAGTGA	60	74.7	40
H9-AM286688-359	TTCTACCAAGAAATCCAGATCTTTCCAGACACAATTTGGAATGTGACTTACAGTGGAA	60	73.6	40
H9-AY768559-194	H9-AY768559-194	60	75.3	45
H9-DQ108932-165	ATTGCGAGTAAAGTCCAATGGGAATCTAATTGCTCCATGGTATGGGCACATTCTTTGAGG	60	75.4	43.3
H10-CY005930-115	CGTAAAGACTCTCACAAACGAAAAGGAAGAGGTGACCAATGCTACTGAAACCGTGGAAAG	60	75.5	45
H10-CY005930-1389	ATCTATACGAAAGGGTGAAGGAAGCAACTAAGGCAAAATGCAGAAGAAGATGGAAAAGGGT	60	75.1	41.7
H10-J02110-261	CAGCTTGTGACCTGCACCTTACCCTGGAGATGGGAGACTTTGATAGAGAGAGAAAATCTA	60	75.9	46.7
H10-M21647-1168	AGCTATTGACCAAATCACAGGGAACTGAACAGGTTGATTGAGAAGACCAACTGAGTT	60	75.2	41.7
H11-AY684895-767	TTGGACAATGGTCAAACAGGAGAGTCAATAACATTTGAGTCTAATGGTGCATTCTTGGC	60	74.9	41.7
H11-CY005923-79	CAGACGAAATCTGCATTGGATACCTGAGCAACAACCTCAACAGAGAAAGTGGACACAATA	60	74.7	41.7
H11-CY005924-538	AGTCAGGGACATATCTGTTTATACGGAGGAGCTTCAACAACACCAAAGGAAGAGATGAT	60	75	43.3
H11-J02107-75	AAAGCAGATGAGATCTGTATCGGGTATTTAAGCAACAACCTCGACAGACAAGTTGACACA	60	74.3	40
H11-J02161-65	CCTTTGCGTGAAAGCGGATGAGATCTGATTTGGCTATTTAAGCAACAATTCGACAGACAA	60	75	41.7
H12-CY012840-392	AAGAGTGAAGATGTTTGAATTCACCAATGGAATGTCACATACACTGGAACAGCAAGGC	60	75.1	41.7
H12-J02104-258	GCAATCCCAAATGTGATCTTTATTTGAAATGGCAGGGAATGGTCATACATAGTAGAGAGGC	60	73.9	41.7
H13-AY684887-1281	TCAGGTGGAACAAAGAATAAATATGCTTGCAGACAGAATAGATGATGCTGTAACCTGATGT	60	72.7	36.7
H13-CY005931-1281	TCAGGTGGAACAGGATAAATATGCTTGCAGACAGAATAGATGACGCTGTAACCTGATGT	60	74.1	40
H13-K00383-268	GGGTTGGATAGTAGGAAATCCTGCCTGACTAGCAACTTTGGAATCAGAGAGTGGTCATA	60	75.1	45
H13-M26090-1531	ATGGAACGTATGACCACACTGAGTATGCAGAGGAGTCAAAGTTAAAGAGGCAAGAAATCG	60	75	43.3
H14-M35996-1403	TAAGAGAGAAATGCAGAAGATCAAGGCAACGGTTGTTTCGAGATATCCATCAGTGTGACA	60	74.9	41.7
H14-M35996-857	GGATTGGGTGATGCACAGCCCTTGTCTAAGTATGATAAAGGTTCCATCAAAGTGCACAAC	60	76.1	45
H15-L43916-1422	CTATGAGAGAGTGAGAAGACAGCTAAGGGAGAATGCCGAGGAGGATGGAACCTGGATGTTT	60	76.5	48.3
H15-L43916-569	AACCAGCCCTAATTTGTTGGGAGTACATCTTTCAAGTTCCTTGGATGAGCAAAAATAGC	60	75	41.7
H16-AY684888-687	AAAGAGTGGAGCAGACGGTACGAATTTGAAATTTGAAACAGGATAGGAGACGGTCAAAGA	60	76	45
H16-AY684891-181	GATCTCGTTGAAACAAACCACACAGGAACATACTGCTCACTGAATGGAATCAGCCCAATT	60	75.7	43.3
H16-CY005933-695	GAATGGAGCAAACGGTATGAACTTGAATTTGAAACAGAATAGGAGATGGACAGAGAAGC	60	74.7	43.3

鳥インフルエンザHA型 [登録株数]



各HA型を標的としたマイクロアレイプローブ (設計数)

図10 鳥インフルエンザHAタンパク質を標的としたマイクロアレイプローブの事前評価。鳥インフルエンザのHAタンパク質を標的とし設計した66種類のマイクロアレイプローブを各々BLASTサーチし、The Influenza Sequence Databaseに登録されているインフルエンザ株(HA1~HA16型; 合計2233株)とのE-valueを総当りで示した。この解析には、ProbeMower (Symplus,東京)を使用した。縦軸にはデータベースに登録されているインフルエンザHAタンパク質の型及び登録数を、横軸には本研究で標的とした各HA型及びプローブ数を示した。BLASTサーチにおいて、E-valueが $1E-15$ 以下(約95%ホモロジー以上)を示したものをマイクロアレイにて検出可能と推測し、赤色バーで表した。

表4 鳥インフルエンザウイルスのHAに対するマイクロアレイプローブの評価

HA型	プローブ数	データベース登録株数*	検出可能株数**	検出不可能株数
H1	5	40	38 (95%)	2 (5%)
H2	5	78	78 (100%)	0 (0%)
H3	6	124	116 (94%)	8 (6%)
H4	5	93	88 (95%)	5 (5%)
H5	5	848	823 (97%)	25 (3%)
H6	5	207	199 (96%)	8 (4%)
H7	6	294	275 (94%)	19 (6%)
H8	2	7	7 (100%)	0 (0%)
H9	5	476	450 (95%)	26 (5%)
H10	4	16	15 (94%)	1 (6%)
H11	5	17	17 (100%)	0 (0%)
H12	2	12	11 (92%)	1 (8%)
H13	4	12	10 (83%)	2 (17%)
H14	2	2	2 (100%)	0 (0%)
H15	2	2	2 (100%)	0 (0%)
H16	3	5	5 (100%)	0 (0%)
合計	66	2233	2136 (96%)	97 (4%)

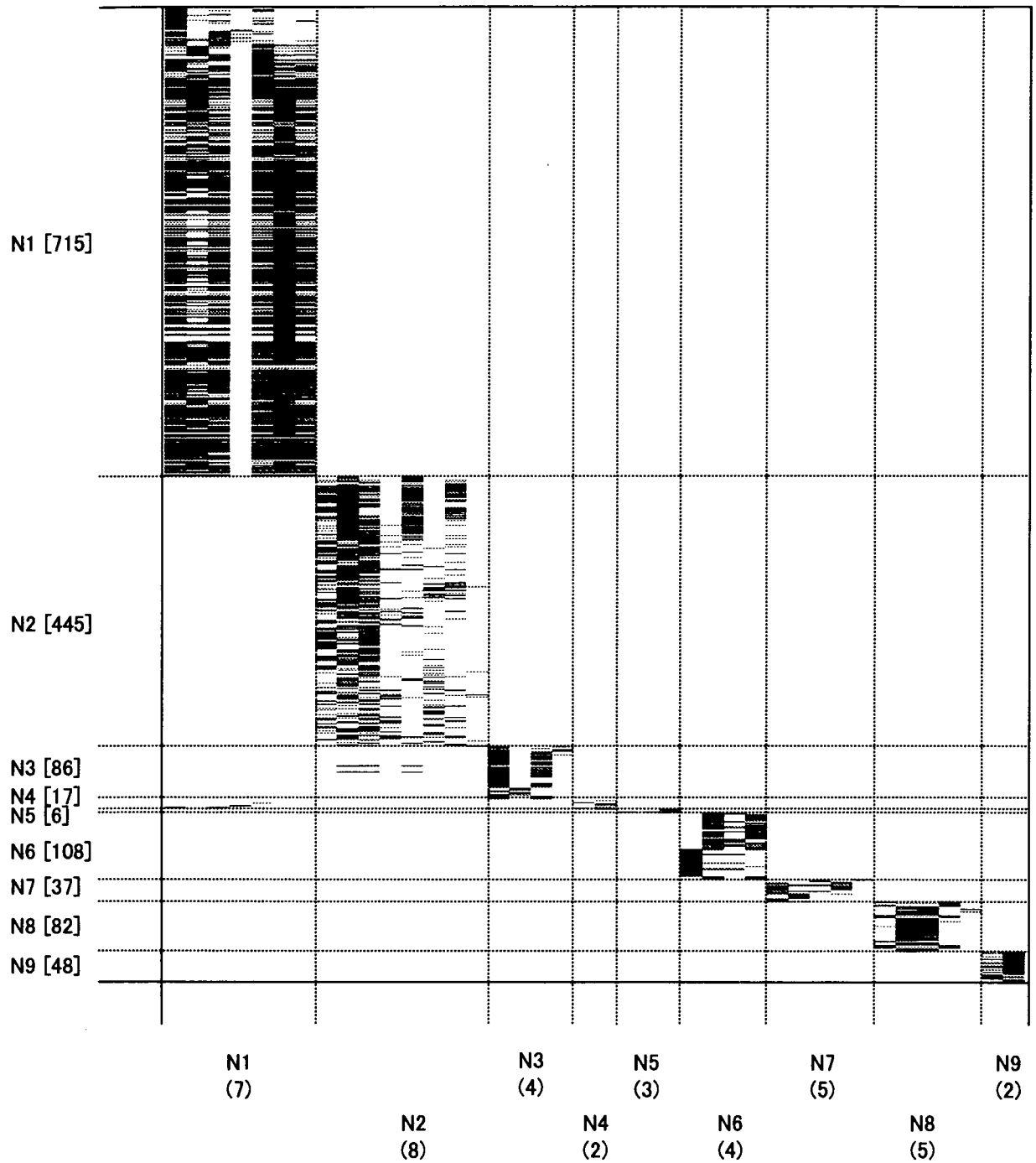
* The Influenza Sequence Database <http://www.flu.lanl.gov/> (2006年10月時点)

** 各型を標的とした複数のマイクロアレイプローブ内のBLAST検索でE-Valueが $1E-15$ 以下(ホモロジー約95%以上)を示した株数。

表5 鳥インフルエンザウイルスのNAに対するマイクロアレイプローブ

Probe name	Probe Sequence	Length	Tm	GC%
N1-AB265202-1111	TGAAGCAAGATATCGTAGCAATAACTGATTGGTCAGGATATAGCGGGAGTTTTGTCCAGC	60	75	43.3
N1-AF250481-570	TGGCATAATAACAGACACCCATCAAGAGTTGGAGGAACAACATACTGAGGACACAAGAGTC	60	74.8	43.3
N1-AY261521-1200	TTGTAGCAATAACTGATTGGTCAGGATATAGCGGAAGTTTTGTTCCAGCATCCAGAAGCTGA	60	74.2	40
N1-CY015137-1165	AGACTGATGGTAGCTTCTCTGTGAAACAGGATATTGTAGCGATTACTGATTGGTCAGGCT	60	75.1	43.3
N1-DQ376724-1297	CTAGTGGGAGCAGCATATCCTTTTGTGGTGAAATAGTGACACTGTGGGTTGGCTTTGGC	60	77	48.3
N1-DQ997095-612	AGTTGGAGGAACAACATACTGAGAACTCAAGAGTCTGAATGTGCATGTGTAATGGCTCT	60	74.9	41.7
N1-ISDN48794-1199	CAGGATATAGCGGGAGTTTTGTCCAGCATCCAGAAGCTGACAGGATTAGATTGCATAAGAC	60	75	45
N2-AY180820-211	GAATACAGGAATTGGTCAAAACCACAAATGTCAAATCACAGGGTTCGCTCCTTTCTCCAAG	60	75.2	43.3
N2-AY254113-515	CATGGTTGCATGTTTGTGTCAGTGGGATGATAGAAATGCGACTGCTAGTTTCATTTACA	60	75	41.7
N2-AY664708-914	TAAATATGGCAGATTATAGTATTGATTCCAGTTATGTGTGCTCAGGACTTGTGGTGACA	60	72.3	36.7
N2-AY768566-77	GAAATGATGTTTTGGATGGGAGAACAAATCAGCAAGGATTACAGCTAGGTTATGAAACTT	60	75	41.7
N2-CY005626-1312	ACAGGAACTAGAGTATGGTGGACCTCAAAATAGTATTGTTGATTTTTGTGGCACTTCAGG	60	73.4	40
N2-DQ116085-450	AAATAGGCAAGTCATAGTTGACAGTGATAATTTGTCTGGGTATTCTGGTATATTCTCTGT	60	71.2	35
N2-DQ402042-401	TTGGGCGAGGGAACCACGCTAGACAACAACACTCAAAATGGCACAATACATGATAGGATTC	60	76.4	45
N2-DQ470000-125	GCAACTCCTCCCCAAACAACCAGTAATGCTGTGTGAACCAACAATAATAGAAAGAAACA	60	74.4	40
N3-AJ627494-1258	TCTTGGACAAGCAATAGTATAGTTACTTTCTGTGGACTAGACAATGAACCTGGATCGGGA	60	74.1	41.7
N3-AY303638-327	TGAGAACAAAGGATGTCATAGTCAAGGGAACCTACATTAGCTGCGATAACGATCACTG	60	75.4	45
N3-AY646080-68	TGTCAACAATAGCCCTTCTCATTGGAGTGGGAAACTTAGTTTTCAACACAGTCATACATG	60	73.8	40
N3-K01014-48	AGGTGTCGTGAACACTACTCTATCAACAATAGCCCTTCTCATTGGAATTGGAACCTGAT	60	74.7	41.7
N4-AB274042-632	GTATCATCACCAGCACATTAAGAGCTGGAAAGGCAACATTATGCGAACACAAGAGTCTG	60	74.9	43.3
N4-CY003986-1136	TTGAGATGGTATGGGATGCTAATGGATGGGTGTCAACAGACAAGGATTCAAATGGTGTAC	60	75.2	43.3
N5-CY005693-90	CCTCATGTGGCGTCAATAGCCTTGGGAGTAATATCAGCAACCAAGACAACAAGTACAT	60	74.8	41.7
N5-K01018-103	CAATAGCCATAGGAACAATATCAGTGACAAAAGAAAGCAGCGTGCATATCTGCAACACCA	60	75	41.7
N5-K01019-210	GTCAACACACCATAACATTGGAATCATGAGCCAGAATTCCTCAACAACACGGAACCTCTC	60	75.7	45
N6-AY180790-34	CCTGTGTGAAGTAAGCTCATGGCATATTCTGTGCAAGACAACGCAATAAGGATAGGTGA	60	75.1	43.3
N6-CY005569-24	TCCAAATCAGAAGATAATATGCATTTGACGACAGGAATGACACTATCGGTAGTAAGCCT	60	73.8	40
N6-K01029-43	TGCATTTGAGCTACAGGAATGACACTATCGGTAGTAAGCCTCCTAATAGGAATTGCCAAT	60	74.6	41.7
N6-V01095-29	ATCAGAAGATAATATGCATCTCAGCAACAGGAATGACACTATCCGTAGTAAGTCAGCTAA	60	72.6	38.3
N7-CY004435-1107	GCCGCACAATAAGTCCCTCGTTCCAGGAGTGGTTTTGAGATGTTGAAGATACCTAATGCTG	60	76.3	46.7
N7-DQ374401-32	TCTGGAGTGGCAATAGCACTTAGTGTACTGAACTTATTGATAGGAATCTCAAATGTCGGA	60	73.5	40
N7-J02099-14	TGATTGAGAATGAATCCTAATCAGAACTATTTGCACTATCTGGAGTCGCAATAGCACTT	60	72.5	36.7
N7-K01036-84	ACTTACTAATAGGAATATCCAATGTGGGGCTGAATGTCTCATTACACTTAAAGAACAAACA	60	71.5	35
N7-M38330-608	GGGAATAATGACAATGCTACAGCGACGGTGTATTACAACAGGAGACTTACTACTACTATT	60	72.8	40
N8-DQ885994-795	TGGAGGACATATTGAAGAGTGTCTTGTACCCTAATGATGGGAAAGTGGAAATGCGTATG	60	74.9	43.3
N8-CY005045-667	CCTGGGCCGGAGATATTCTAAGAAGCTCAGGAATCATCATGCATTGCATTCAAGGTGAAT	60	76	45
N8-CY005045-802	TAATTTGGGCAAACTGAAATCAGCTTCAATGGAGGCCATATAGAAGAATGCTCATGCTACC	60	74.7	41.7
N8-CY005796-259	GCACCTTACATGAACAATACAGAAGCAATATGTGATGTCAAGGGCTTTGCACCTTTCTCCA	60	75	41.7
N8-K01002-170	TAGGGAAGACAATGAGACCGTGAGGATTGAAAAGGTAAACAATGGCACAATACCAATGT	60	75.1	41.7
N9-AY180832-255	TTCTATGCTCTAAGCCAAGGGACAACAATCAGAGGGAAACACTCAAACGGAACAATACAC	60	75.2	43.3
N9-U84107-237	CTTGGACAATGGGACTGGCCGTATGGGGCTAAAATAGAGTACTTCTCTAAGATACAGAA	60	75	45

鳥インフルエンザNA [登録株数]



各NA型を標的としたマイクロアレイプローブ
(設計数)

図11 鳥インフルエンザNAタンパク質を標的としたマイクロアレイプローブの事前評価。鳥インフルエンザのNAタンパク質を標的とし設計した40種類のマイクロアレイプローブを各々BLASTサーチし、The Influenza Sequence Databaseに登録されているインフルエンザ株 (NA1~NA9型; 合計1544株) とのE-valueを総当りで示した。図10と同様の解析を行った。

表6 鳥インフルエンザウイルスのNAに対するマイクロレイプローブの評価

NA型	プローブ 数	データベース 登録株数*	検出可能 株数**	検出不可能 株数
N1	7	715	699 (97%)	16 (3%)
N2	8	445	440 (99%)	5 (1%)
N3	4	86	83 (97%)	3 (3%)
N4	2	17	11 (65%)	6 (35%)
N5	3	6	6 (100%)	0 (0%)
N6	4	108	108 (100%)	0 (0%)
N7	5	37	37 (100%)	0 (0%)
N8	5	82	82 (100%)	0 (0%)
N9	2	48	48 (100%)	0 (0%)
合計	40	1544	1514 (98%)	30 (2%)

* The Influenza Sequence Database <http://www.flu.lanl.gov/> (2006年10月時点)

** 各型を標的とした複数のマイクロレイプローブ内のBLAST検索でE-Valueが $1E-15$ 以下(ホモロジー約95%以上)を示した株数。

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. 人インフルエンザ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検出への応用

(1) ウイルス株

用いたウイルス株は野生水禽由来 A/whistling swan/Shimane/499/83 (H5N3) 株である。本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。本ウイルスの50%感染量 (EID₅₀/ml) は発育鶏卵を用いて 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。

(2) インフルエンザ迅速診断キットを用いた鶏肉中の鳥インフルエンザウイルスの検出

鳥インフルエンザ感染鶏肉を想定し、市販の

鶏肉を用いて作成した10%乳剤に既知の感染価のウイルスを混合し、人用インフルエンザ診断キットによる検出限界を測定した。人用インフルエンザ迅速診断キットによる鳥インフルエンザウイルスの検出はエスプライン「インフルエンザA&B-N」（富士レビオ株式会社）を用い、添付のプロトコールに準じて行った。

2. AMP法の検出感度の検討

(1) RNA抽出

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。

(2) プライマー

昨年度設計したA型インフルエンザウイルスに共通のMプライマーを用いた。各プライマーの配列は以下の通りである。

F1 TTTATGCCAAACTTTTCTCCCGG

F2 TTGCACTTGATATTGTGGATT

F3 TGATCCTCTCGTTGTTGC

B1 AGTGCCTGAGTCTATGAGGG

B2 TGCTACCAGTAAAACAGTTG

B3 ATCTCGACTCATTTTTGATGGAA

(3) LAMP法

上記のプライマーセットおよび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行った。

3. RT-PCR法

(1) プライマー

A型インフルエンザウイルスに共通のプライマーとして以下のプライマーペアを用いた。

Forward primer NP-1192 1192~

AGCAGATACTGGGCCATAAAG

Reverse primer NPR-1501 ~1501

TTGTCTCCGAAGAAATAAGA

(2) 反応条件

RT-PCRは添付のプロトコールに準じ、以下の

反応条件で実施した。まず、逆転写反応はRandom Primer $5\mu\text{l}$ 、DDW $1\mu\text{l}$ 、RNA試料 $5\mu\text{l}$ を混合し、 95°C 、5分間加熱後、氷上で急冷した。その後、 $5\times\text{buffer}$ $5\mu\text{l}$ 、 10mM dNTP mix $2\mu\text{l}$ 、RNase inhibitor $0.5\mu\text{l}$ 、Reverse transcriptase $0.5\mu\text{l}$ 、DDW $6\mu\text{l}$ を混合し、 42°C で1時間反応を行った。PCR反応は試料 $0.3\mu\text{l}$ 、 $10\times\text{buffer}$ (MgCl₂添加) $1\mu\text{l}$ 、 10mM dNTP mix $1\mu\text{l}$ 、Forward primer $1\mu\text{l}$ 、Reverse primer $1\mu\text{l}$ 、ポリメラーゼ (Kod-Dash) $0.1\mu\text{l}$ 、DDW $5.6\mu\text{l}$ を混合し、PCR cycleは 95°C 2分反応後、 95°C 30秒、 57°C 30秒、 72°C 40秒の条件で35サイクル反応を行い、最後に 72°C 5分の伸長反応を行った。

常法に従ってアガロースゲル電気泳動を行い、PCR産物の定量と非特異的バンドの有無を調べた。

C. 研究結果

1. 現行の人用インフルエンザ診断キットの鶏肉中の鳥インフルエンザウイルス検出への応用

本年度はまず鳥インフルエンザ感染鶏肉を想定し、市販の鶏肉を用いて作成した10%乳剤に既知の感染価のH5ウイルスを混合し、人用インフルエンザ診断キットによる検出限界を測定した。その結果、鶏肉乳剤中のウイルスの検出限界は $10^6\text{EID}_{50}/\text{ml}$ で、PBS希釈ウイルス液の場合とほぼ同程度であった。一方、鶏肉乳剤のみによる非特異陽性反応は認められなかった。この成績から鶏肉には診断キットの反応を阻害する因子は含まれていないと考えられた。

2. LAMP法による検出感度の検討

昨年度に引き続き、より高感度な遺伝子診断法について検討した。RT-PCR法およびRT-LAMP法についてそれぞれ検出感度を調べた結果、RT-PCR法では $10^2\text{EID}_{50}/0.1\text{ml}$ 、RT-LAMP法では市販のH5プライマーを用いたとき

$10^3\text{EID}_{50}/0.1\text{ml}$ 、昨年度本研究で設計したA型

インフルエンザウイルスに共通のMPプライマーを用いたときは 10^2 EID₅₀/0.1mlであった。

D. 考察

市販の鶏肉を用いて作成した10%乳剤に既知の感染価のH5ウイルスを混合し、人用インフルエンザ診断キットによる検出限界を測定したところ、 10^6 EID₅₀/mlで、その検出限界値(HAU換算で約13HAU)は人インフルエンザウイルスに対するそれ(0.16HAU)に比べて明らかに低く、人用インフルエンザ診断キットが鳥インフルエンザウイルスに対して検出感度が著しく低い可能性が示唆された。

LAMP法によるウイルス検出感度の検討を行ったところ、開発した方法が高感度であることがわかり、反応温度管理にサーマルサイクラー、検出にUVイルミネーター等が必要であるRT-PCR法に比べ、RT-LAMP法は等温で反応が進み、検出も黙視で行えることから、現段階ではこのRT-LAMP法がもっとも有効な迅速診断法であると考えられた。

次年度はこれまで我が国で発生した異なるH5ウイルス(山口株、茨城株および宮崎株)について、本診断法の有効性をさらに検討する計画である。

E. 結論

10%鶏肉乳剤中のH5ウイルスを人用インフルエンザ診断キットによる検出限界を測定した結果、 10^6 EID₅₀/mlで、PBS希釈ウイルス液の場合とほぼ同程度であった。一方、鶏肉乳剤のみによる非特異陽性反応は認められなかった。

本研究で設計したA型インフルエンザウイルスに共通のMPプライマーを用いたLAMP法で 10^2 EID₅₀/0.1mlのウイルスを検出できた。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

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*, 212 (suppl 1) 109-112.

Horimoto, T., Takada, A., Fujii, K., Goto, H., Hatta, M., Watanabe, S., Iwatsuki-Horimoto, K., Ito, M., Tagawa-Sakai, Y., Yamada, S., Ito, H., Ito, T., Imai, M., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Lim, W., Guan, Y., Peiris, M., and Kawaoka, Y. (2006) The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate. *Vaccine*, 24 (17) 3669-3676.

Yamana, H., Ito, H., Ito, T., Murase, T., Motoike, K., Miyoshi, N., Wakabayashi, K., and Otsuki, K. (2007) Strong Antiviral Activity of Heated and Hydrated Dolomite - Preliminary Investigation. *J. Vet. Med. Sci.*, (in press)

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), 1-6.

伊藤啓史、伊藤壽啓(2006):インフルエンザウ

イルスの種間伝播。獣医畜産新報。58(10)
861-864.

伊藤壽啓(2006):高病原性鳥インフルエンザ。
カレントセラピー24(12), 17-20

伊藤壽啓(2006):第1章「人獣共通感染症」高
病原性鳥インフルエンザ-病原性と生態。生物
の科学遺伝。別冊No.19、45-49

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?」(印刷中)

2. 学会発表

Ito, T. : DIFFERING POTENTIAL OF AVIRULENT
WATERFOWL ISOLATES FOR BECOMING HIGHLY
PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA VIRUSES BY
PASSAGING IN CHICKENS. 第1回国際人獣共通
感染症学会総会, ソウル, 2006. 1. 19

Ito, T. : Different potential of avirulent
waterfowl isolates to become highly
pathogenic avian influenza virus by
passaging in chickens. Second Japan-China
Bilateral Symposium on Avian Influenza,
Tokyo. 2007. 2. 6-7

Ito, T., Ito, H., and Otsuki, K. : DIFFERING
POTENTIAL OF AVIRULENT WATERFOWL ISOLATES
FOR BECOMING HIGHLY PATHOGENIC AVIAN
INFLUENZA VIRUSES BY PASSAGING IN CHICKENS,
Asian Research Forum on Emerging and
Reemerging Infections - 2006, Tokyo.
2006. 2. 19-20

伊藤 啓史、野村 文恵、大槻 公一、伊藤 壽啓:
ニューカッスル病ウイルスのアヒルにおける
病原性の獲得。第22回中国四国ウイルス研究

会。鳥取。2007. 6. 10-11

藤本 佳万、小島 三奈、伊藤 啓史、河岡 義裕、
大槻 公一、伊藤 壽啓: インフルエンザウイル
スの腸管増殖能に関わるNA蛋白のlow-pH抵抗
性。第22回中国四国ウイルス研究会。鳥取。
2007. 6. 10-11

伊藤壽啓:我が国の鳥インフルエンザ・モニタ
リングの最新情報紹介, 日本採卵養鶏産業研究
会第四回研究セミナー, 福島県二本松市,
2006. 6. 22-23

伊藤壽啓:高病原性鳥インフルエンザの国内発
生とその感染経路。第28回家畜衛生講習会。
熊本。2006. 8. 8-10

伊藤壽啓:高病原性鳥インフルエンザと新型ウ
イルス出現の可能性。日本進化学会シンポジウ
ム17「保全進化地球環境の今後」。東京代々木
オリンピックセンター。2006. 8. 30-31

Ito, T. : Pathogenesis of avian influenza
virus. Regional workshop for the control of
avian influenza, Sapporo, 2006. 9. 12

伊藤壽啓:鳥インフルエンザ。日本遺伝学会第
78回大会。つくば。2006. 9. 25-27

伊藤壽啓:異なる宿主(ヒトも含む)における
A I Vの感染と病態。平成18年度全国秋季鶏
病技術研修会。山形。2006. 10. 20

伊藤壽啓:鳥インフルエンザウイルスの感染と
病態。西日本感染症学会。岡山。2006. 11. 24

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

該当なし

市販の人用インフルエンザ検査キットの
高病原性鳥インフルエンザウイルスでの評価

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 山本美江 国立感染症研究所獣医科学部 研究員
堀田明豊 国立感染症研究所獣医科学部 研究員

研究要旨：各種市販の人用インフルエンザ検査キットを用いて H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの検出を試みたところ $10^{3.3}$ から $10^{4.3}$ TCID₅₀ のウイルスを検出できるキットもあったが、 $10^{6.3}$ でも検出できないキットもあり、感度に差があることがわかった。先に調べた低病原性の H5N1 亜型ウイルス株を用いた場合とは検出感度に差があることが明らかになった。人用インフルエンザ検査キットを鳥類由来インフルエンザウイルスの検査に応用する場合は感度や操作が容易性を考慮して使用する必要があると考えられた。

A. 研究目的

2004年本邦においても高病原性鳥インフルエンザが発生し、京都の事例では感染鶏が食鳥処理場に搬入された事例があった。また、その後も海外では本病が家禽でも発生が続いており、さらに2007年には再び日本国内で4例の高病原性鳥インフルエンザの発生があり国民の関心も高い。食鳥検査において通常の検査では感知できないようなウイルス疾病ではウイルス学的検査が必要となる。一般にウイルス学的検査は煩雑で時間を要することから、迅速高感度かつ簡便な診断法の開発が必要である。本研究では食鳥検査所で鳥インフルエンザを簡易に検査する方法として既に人用に開発市販されている各種インフルエンザ検査キットの鳥インフルエンザウイルスでの検出感度や操

作性について検討することを目的とした。昨年度に続き今年度は H5N1 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスを用いて比較検討した。

B. 研究方法

1. 供試ウイルス：高病原性鳥インフルエンザの発生があった養鶏場近くで採取されたオオクロバエより発育鶏卵にて分離された高病原性鳥インフルエンザウイルス (A/Blowfly/Kyoto/93/2004 H5N1) で、発育鶏卵で増殖させ、使用まで -80°C に分注保存した。50%感染価は MDCK 細胞および発育鶏卵を用いて Reed & Munch の方法で求めた。

2. インフルエンザ検査キットでの反

応：購入供試した 12 キットを表 1 に示した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で希釈したウイルス液 100 μ l を各キットに同梱されている各規定量の検体処理液に加え攪拌後、テストプレートにろ過フィルターを通し各キットの指示に従い滴下した。また、ストリップタイプのは攪拌後ろ過フィルターを通さずに抽出液に投入した。各ウイルス希釈液あたり 3 キットを用いた。標準の判定時間まで静置し、目視判定した。明らかな発色できたものを++、やや薄いものを+、また、シグナルはあるが判定しにくい場合を±、シグナルが見えないものを-とした。確認のため複数人で判定した。

C. 研究結果

1. 各種インフルエンザウイルス抗原検出キットでの検出

ウイルス液を PBS にて 10 倍段階希釈し、その 0.1ml を各キットの規定量の検体処理液に添加後各キットに滴下もしくはストリップを浸漬させ判定した。結果の一覧を表 2 に示した。

10^{6.3} TCID₅₀ のウイルスを各キット同梱の検体処理液に添加後反応させた場合は供試した 8 種のキットで検出可能であった。しかし 3 種のキットではシグナルが観察されなかった。

6 種のキットでは 10^{3.3} TCID₅₀ の、2 種は 10^{4.3} のウイルスを検出できた。いずれのキットでも 10^{2.3} TCID₅₀ のウイルスは検出できなかった。

同じ H5N1 亜型ウイルスの A/duck/Hyogo/35/2001 では 10^{4.5} TCID₅₀ が検出限界であったが今回用いた A/blowfly/Kyoto/93/2004 では約 10 倍ほど感度よく検出されたキットもあった一方、10^{6.3} TCID₅₀ のウイルスで陽性シグナ

ルを示さないキットもあった。2 つのウイルス株を用いた結果では検出感度で逆転した感度を示すものは無かったものの感度に差があった。

D. 考察

人用のインフルエンザ診断のために開発された簡易インフルエンザウイルス抗原検出キットを鳥インフルエンザウイルス株で検出感度や食鳥検査所での一時スクリーニング検査として用いる場合の感度について今回高病原性の H5N1 亜型ウイルスを用いて検出感度を調べ、昨年実施した同じ亜型ウイルスと比較した。

A/duck/Hyogo/35/2001 株よりも約 10 倍感度が良いキットもあったが 3 キットについては 10^{6.3} TCID₅₀ のウイルスを添加しても反応せず、ウイルス株によってキットの検出感度に差があることがわかり、鳥類由来インフルエンザウイルスの検査のスクリーニングテストではキットの選択も考慮しなければならにと考えられた。また、今後さらに多種類のウイルス株についての検討も必要とも考えられた。

さらに、これまで報告されている人由来ウイルスでの必要量より多く、鳥類由来ウイルスを効率よく検出できる簡易なキットの開発製品化が期待される。

E. 結論

各種市販の人用インフルエンザ検査キットを用いて H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの検出を試みたところ 10^{3.3} から 10^{4.3} TCID₅₀ のウイルスを検出できるキットもあったが、10^{6.3} でも検出できないキットもあり、感度に差があることがわかった。また、ウイルスの株により検出感度に差があることが明らかになった。人用インフルエンザキッ

トを鳥インフルエンザウイルスの検査に応用する場合は感度や操作が容易性も考慮して使用する必要性があると考えられた。さらに多数の鳥類由来ウイルス株での検討やより高感度で簡易な検査法の開発が必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

特に無し

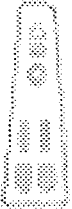
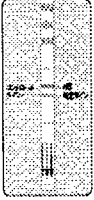



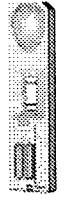
G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表1-1 試験に供したインフルエンザウイルス簡易検出キット

商品名 (メーカー)	形状	試料添加法 操作ステップ	判定までの 所要時間	有効期間
BD Fluエグザマン (日本ベクトン・ディッ キンソン)		滴下 1ステップ	15分	9ヶ月
QuickVueラピッドSP influ (住友製薬バイオ メデカル)		スティック	10分	24ヶ月
エスプラインインフルエ ンザA&B-N (富士レビオ)		滴下 1ステップ	15分	15ヶ月
ダイレクテイジエン FluA+B (日本ベクトン・ ダイキンソン)		滴下 7ステップ	15分	6ヶ月
クイックーインフルA・B 「生研」 (デンカ生研)		滴下 1ステップ	15分	16ヶ月
ポクテムインフルエンザ A/B(シスメックス=大塚)		滴下 1ステップ	15分	12ヶ月