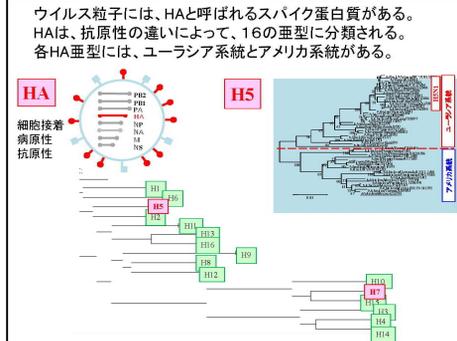
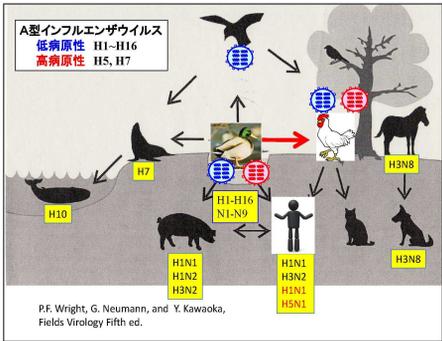


H5亜型鳥インフルエンザウイルスを幅広く検出する遺伝子検査法の開発

Genetic diagnosis methods for broad detection of diverse H5 subtype avian influenza viruses

塚本 健司 教授
麻布大学 獣医学部 獣医学科 衛生学第二研究室
Kenji Tsukamoto / Professor
Department of Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine



『従来技術との比較』

	信頼性 (検出の幅)	迅速性 (検出の簡便性)	検査装置	使用施設
PCR法	高い (網羅的検出 幅広い検出→実用化)	3時間 操作が複雑 専門技術者	高額装置 (500万円)	専門機関
ランプ法	低い (検出漏れ)	1時間 操作が簡単 技術者	小型 (安価)	専門機関 病院 農場

『開発のポイント』

プライマー専用データベースの構築と
プライマーの種類の比較検討

1. 専用データベースの構築 (HA遺伝子:1800塩基、遺伝子数:2211個) 各HA遺伝子について、Excelを用いて設計した。塩基番号毎に、AGTCの出現頻度を数値化し、保存領域を特定する。
2. 3種類のプライマーを設計、検出スペクトルを比較
 - 1 特定の株に特化した Strain-specific primer (Sプライマー)
 - 2 混合塩基を用いた Mixed-base containing primer (Mプライマー)
 - 3 ウイルス集団毎に設計した population primer (Pプライマー)

『開発のポイント』

どの領域にプライマーを設定すれば良いか？

H5亜型に特異的、亜型内のウイルスを広く検出するには、何処にプライマーを設計すれば良いか？

↓

データベースから H5亜型特異的、且つH5亜型に広く保存された領域を探し、実験によって、最も相応しい領域を選抜する。

実験: MプライマーとPプライマーの最適な組合せはどれか？
結果: PプライマーをFIP, BIPに使用すれば、高い検出率を実現。

Primer sites	Combination of primer type						
	1	2	3	4	5	6	7
FIP, BIP	S	M	P	M	P	P	P
F3, B3	S	M	P	P	M	P	M
FL, BL	S	M	P	P	P	M	M

Al virus strains	Patho-type	No. of primers used for the LAMP	Combination of primer type						
			6	6	114	56	86	76	56
dk/TKB/394/2005(H5N3)	LP	+	+	+	+	+	+	+	
dk/TKB/9/2005(H5N2)	LP	+	+	+	+	+	+	+	
mallard/MG/53/1976(H5N3)	LP	-	-	-	-	-	-	-	
dk/168/2005(H5N2)	LP	-	-	-	-	-	-	-	
dk/CB/1/2006(H5N3)	LP	-	-	-	-	-	-	-	
dk/TKB/189/2008(H5N2)	LP	+	+	+	+	+	+	+	
dk/CB/4/2009(H5N2)	LP	+	+	+	+	+	+	+	
ck/YG/7/2004(H5N1) 2.5	HP	+	+	+	+	+	+	+	
ck/MZ/K11/2007(H5N1) 2.2	HP	-	-	-	-	-	-	-	
swan/AKT/1/2008(H5N1) 2.3.2	HP	+	+	+	+	+	+	+	

No. of positive viruses / No tested: 4/10 6/10 10/10 9/10 10/10 10/10 10/10

実験: FIP, BIPプライマーを短くすれば、プライマー数を減らせる？
結果: 短いFIP, BIPはプライマー数減少、高検出率、迅速を実現

Primer sites	Combination of primer type		
	7	8	9 (2 conc.)
FIP, BIP	P (40, 36 mer)	P (30, 29 mer)	P (30, 29 mer)
F3, B3	M (20, 19 mer)	M (20, 19 mer)	M* (20, 19 mer)
FL, BL	M (20, 20 mer)	M (17 mer)	M (17 mer)

Al viruses	Patho-type	56	16	16
dk/TKB/394/2005(H5N3)	LP	(+30)	(+30)	(+45)
dk/TKB/9/2005(H5N2)	LP	(+30)	(+30)	(+45)
mallard/MG/53/1976(H5N3)	LP	(+60)	(+45)	(+30)
dk/TKB/188/2005(H5N2)	LP	(+60)	(+45)	(+45)
dk/CB/1/2006(H5N3)	LP	(+45)	(+45)	(+30)
dk/TKB/189/2008(H5N2)	LP	(+45)	(+45)	(+30)
dk/CB/4/2009(H5N2)	LP	(+45)	(+45)	(+30)
ck/YG/7/2004(H5N1) 2.5	HP	(+45)	(+45)	(+30)
ck/MZ/K11/2007(H5N1) 2.2	HP	(+45)	(+45)	(+30)
swan/AKT/1/2008(H5N1) 2.3.2	HP	(+45)	(+45)	(+30)
ck/BGD/CD08/2009(H5N1) 2.2	HP	(+30)	(+30)	(+30)
ck/BGD/15083/2012(H5N1) 2.3.2	HP	(+30)	(+30)	(+30)
dk/EGY/131050/2013(H5N1) 2.2.1	HP	(+45)	(+45)	(+45)
dk/VNV/OIE-0062/2012(H5N1) 1	HP	(+45)	(+45)	(+45)
falcon/HK/810/2009(H5N1) 2.3.4	HP	(+30)	(+30)	(+30)

No. of positive virus / No. tested: 10/10(45 min.) 10/10(44 min.) 15/15(35 min.)

実験: PM16プライマーセットの特異性と感度は？
結果: H5亜型特異的で、120分でも非特異反応はない。

Al virus strains	特異性			
	Subtype	Pathotype	Template	Detection
A/duck/Chiba/5/2007	H1N1	LP	cDNA	-
A/duck/Chiba/5/2007	H2N3	LP	cDNA	-
A/duck/Chiba/3/2007	H3N2	LP	cDNA	-
A/duck/Chiba/12/2008	H4N6	LP	cDNA	-
A/duck/Chiba/9/2005	H5N2	LP	各症 cDNA	+
A/duck/Chiba/10/2008	H5N1	LP	cDNA	-
A/duck/Tsukuba/30/2007	H7N7	LP	各症 cDNA	-
A/duck/Chiba/7/2008	H8N4	LP	cDNA	-
A/duck/Chiba/9/2008	H9N2	LP	cDNA	-
A/duck/Chiba/40/2006	H10N4	LP	cDNA	-
A/duck/Chiba/34/2006	H11N9	LP	cDNA	-
A/duck/Chiba/3/2006	H12N5	LP	cDNA	-
Newcastle disease virus B1 strain	vaccine	cDNA	-	-
Infectious bronchitis virus H120 strain	vaccine	cDNA	-	-

感度は100コピー: A/duck/Tsukuba/9/2005 (H5N2)

分子数	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰
cDNA検量	+	+	+	+	+	+	+	+

60分 120分

H5-RT-LAMP ウンステップ法

ウイルスは検出可能な濃度まで希釈して検量しました。

実験: 塩基ミスマッチは、何個まで増幅に影響しないか？
結果: プライマーサイト当たりX個、合計でY個までは許容される。

グループ	塩基ミスマッチ数								検出 (60分)
	F2	F1	B1	B2	F3	B3	FL	BL	
1									(-120)
2									(-120)
3									(+75)
4									(+75)
5									(+75)
6									+
7									+
8									+
9									+
10									+
11									+
12									+
13									+
14									+
15									+
16									+
17									+

実験: ユーラシア系統、アメリカ系統をどの程度、検出できるか？
結果: 両系統を検出 (検出率99.9%)

H5-HA遺伝子	検出数/検査数	検出率
ユーラシア系統	2209/2211	99.9%
アメリカ系統	386/ 386	100.0%
	2595/2597	99.9%

