

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-285749

(P2007-285749A)

(43) 公開日 平成19年11月1日(2007.11.1)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569 H	2 G O 5 4
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78 Z	4 H O 4 5
CO 7 K 14/11 (2006.01)	CO 7 K 14/11	
CO 7 K 16/10 (2006.01)	CO 7 K 16/10	

審査請求 未請求 請求項の数 14 O L (全 22 頁)

(21) 出願番号 特願2006-110704 (P2006-110704)	(71) 出願人 598041566 学校法人北里学園 東京都港区白金5丁目9番1号
(22) 出願日 平成18年4月13日 (2006.4.13)	(74) 代理人 100081086 弁理士 大家 邦久
特許法第30条第1項適用申請有り 第53回日本ウイルス学会学術集会、日本ウイルス学会主催、2005年11月20~22日開催 (プログラム・抄録集発行: 2005年11月1日)	(74) 代理人 100121050 弁理士 林 篤史
	(72) 発明者 竹原 一明 神奈川県相模原市北里1丁目15番1号 学校法人北里学園内
	(72) 発明者 中村 政幸 神奈川県相模原市北里1丁目15番1号 学校法人北里学園内
	Fターム(参考) 2G054 AA06 AB05 CA23 EA06 GA03 GB05
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インフルエンザ感染検査薬及び検査方法

(57) 【要約】

【課題】ゲル内沈降 ( A G P ) 試験に代わる多検体処理が可能で、高感度かつ高特異性の、インフルエンザ感染検査薬および検査方法。

【解決手段】インフルエンザウイルスの核タンパク質 ( N P ) を A I V 抗体検出抗原として用いるインフルエンザ感染検査薬および検査方法。好ましくは、A I V A/Duck/Aomori/478/02 ( H 1 N 1 ) の核タンパク質 ( N P ) 遺伝子に H i s - t a g 配列を付加しバキュロウイルスと昆虫細胞を用いて N P - H i s として発現させた核タンパク質 ( N P ) を A I V 抗体検出抗原として用いる。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

インフルエンザウイルスの核タンパク質 (NP) を AIV (トリインフルエンザウイルス) 抗体検出抗原として用いることを特徴とするインフルエンザ感染検査薬。

## 【請求項 2】

インフルエンザウイルスの核タンパク質 (NP) 遺伝子を AIV (トリインフルエンザウイルス) から単離し、バキュロウイルス発現系を用いて発現させた核タンパク質 (NP) を AIV 抗体検出抗原として用いる請求項 1 に記載のインフルエンザ感染検査薬。

## 【請求項 3】

AIV A/Duck/Aomori/478/02 (H1N1) の核タンパク質 (NP) 遺伝子に His-tag 配列を付加して NP-His として発現させた核タンパク質 (NP) を AIV 抗体検出抗原として用いる請求項 1 又は 2 に記載のインフルエンザ感染検査薬。 10

## 【請求項 4】

インフルエンザウイルスの核タンパク質 (NP) を、酵素結合免疫反応測定法 (ELISA) の固相化抗原として用いる請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のインフルエンザ感染検査薬。

## 【請求項 5】

(1) インフルエンザウイルスの核タンパク質 (NP) を酵素結合免疫反応測定法 (ELISA) の固相化抗原とし、少なくとも前記 (1) の固相化抗原と  
(2) インフルエンザウイルスの核タンパク質 (NP) に対し特異的に結合する抗核タンパク質モノクローナル抗体 (NP MA b) とからなる請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のインフルエンザ感染検査薬。 20

## 【請求項 6】

固相化抗原が ELISA プレートに固相化されている請求項 4 又は 5 に記載のインフルエンザ感染検査薬。

## 【請求項 7】

AIV A/budgeriger/Aichi/1/77 (H3N8) を免疫して作製した抗核タンパク質モノクローナル抗体 NP MA b (IgG1, ) を用いる請求項 5 に記載のインフルエンザ感染検査薬。

## 【請求項 8】

インフルエンザウイルスの核タンパク質を、酵素結合免疫反応測定法 (ELISA) の固相化抗原として用いることを特徴とするインフルエンザ感染検査方法。 30

## 【請求項 9】

インフルエンザウイルスの核タンパク質 (NP) 遺伝子を AIV から単離し、バキュロウイルス発現系を用いて発現させた核タンパク質 (NP) を、酵素結合免疫反応測定法 (ELISA) の固相化抗原として用いる請求項 8 に記載のインフルエンザ感染検査方法。

## 【請求項 10】

(1) インフルエンザウイルスの核タンパク質 (NP) を酵素結合免疫反応測定法 (ELISA) の固相化抗原として用い、少なくとも前記固相化抗原 (1) と  
(2) 前記核タンパク質 (NP) に対し特異的に結合する抗核タンパク質モノクローナル抗体 (NP MA b) を用いる請求項 8 又は 9 に記載のインフルエンザ感染検査方法。 40

## 【請求項 11】

(1) インフルエンザウイルスの核タンパク質 (NP) を酵素結合免疫反応測定法 (ELISA) の固相化抗原とし、次いで、  
(2) 被検血清を加えて、抗トリインフルエンザ (AIV) 抗体を前記 (1) の固相化抗原と反応させ、次いで、  
(3) 前記 (1) の核タンパク質 (NP) に対し特異的に結合する抗核タンパク質モノクローナル抗体 (NP MA b) を加えて、前記抗核タンパク質モノクローナル抗体 (NP MA b) を前記 (2) で加えた被検血清と競合反応させる請求項 10 に記載のインフルエンザ感染検査方法。 50

## 【請求項 1 2】

(1) インフルエンザウイルスの核タンパク質 (NP) を酵素結合免疫反応測定法 (ELISA) の固相化抗原とし、次いで、

(2) 被検血清を加えて、抗トリインフルエンザ (AIV) 抗体を前記 (1) の固相化抗原と反応させ、次いで、

(3) 前記 (1) の核タンパク質 (NP) に対し特異的に結合する抗核タンパク質モノクローナル抗体 (NP MA b) を加えて、前記抗核タンパク質モノクローナル抗体 (NP MA b) を前記 (2) で加えた被検血清と競合反応させ、次いで、

(4) 前記 (3) の抗 NP MA b のみと反応する酵素標識抗体を加え、次いで、

(5) 前記 (4) の酵素標識抗体の標識酵素の酵素基質を加えたときの発色を測定する請求項 1 1 に記載のインフルエンザ感染検査方法。 10

## 【請求項 1 3】

AIV A/budgeriger/Aichi/1/77 (H3N8) を免疫して作製した抗核タンパク質モノクローナル抗体 NP MA b (IgG1, ) を用いる請求項 1 0 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載のインフルエンザ感染検査方法。

## 【請求項 1 4】

抗原を固相化した ELISA プレートを用いる請求項 9 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載のインフルエンザ感染検査方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

20

## 【0001】

本発明は、インフルエンザ感染検査薬および検査方法に関する。更に詳しく言えば、迅速、高感度、多検体処理が可能な、A型インフルエンザ共通抗原を用いるインフルエンザ感染検査薬および検査方法に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

家禽において重要なウイルス性疾病として、トリインフルエンザ (Avian Influenza、以下 AI と略称する。) が挙げられ、家畜伝染病予防法において、高病原性トリインフルエンザ (highly pathogenic avian influenza、以下 HPAI と略称する。) は法定伝染病に、低病原性トリインフルエンザ (low pathogenic avian influenza、以下 LPAI と略称する。) は届出伝染病に指定されており、これら疾病は家禽産業への脅威である。オルソミクソ科 A 型インフルエンザウイルス属に属するトリインフルエンザウイルス (以下 AIV と略称する。) は、エンベロープを有し、直径約 80 ~ 120 nm で、マイナスイオン鎖の分節 RNA を持つ。このウイルスは核タンパク質 (以下 NP と略称する。) とマトリックスタンパク質 (以下 M と略称する。) によって A、B、C の 3 種類に抗原的に分けられ、B 型と C 型のウイルスはヒトにのみ感染する。A 型のウイルスだけがヒト、ウマ、ブタ、その他の哺乳類および広範な種類の家禽や野生鳥類に感染する。 30

## 【0003】

インフルエンザウイルス (Influenza virus) が産生する 11 種類のウイルスタンパク質は、表面タンパク質、内部タンパク質、それに、ウイルス粒子の内部には含まれない非構造タンパク質の大きく 3 つに分類できる。ウイルス粒子に含まれる表面タンパク質には赤血球凝集タンパク質 (以下 HA と略称する。)、ノイラミニダーゼ (以下 NA と略称する。)、マトリックス 2 タンパク質 (以下 M2 と略称する。) の 3 種類がある。内部タンパク質にはポリマーゼタンパク質 (PA、PB1、PB2)、NP、マトリックス 1 タンパク質 (以下 M1 と略称する。)、非構造タンパク質 2 (非構造という名称がついているが、ウイルス粒子内に取り込まれる: 以下 NS2 と略称する。) がある。非構造タンパク質 1 (以下 NS1 と略称する。) は、感染細胞の中で大量に産生されるが、ウイルス粒子の中には含まれない唯一のタンパク質である。表面タンパク質である HA と NA により血清型 (亜型) が HA で 15 タイプ (H1 ~ H15)、NA で 9 タイプ (N1 ~ N9) に分類されている。さらに最近では H13 と比較的近縁な新しい H16 が報告されている。 40 50

このH AとN Aのさまざまな組み合わせにより、数多い亜型のインフルエンザウイルスが存在する。A Iは病原性によってもH P A IとL P A Iに分類される。H P A Iは、鶏を始めとする様々な鳥類に全身性の症状を引き起こす急性の伝染病である。その症状等は多様であるが、致死率が高く伝播力も極めて強いため、発生すると養鶏産業に重大な影響を与える。

#### 【0004】

従来、A I VのH AおよびN A亜型は、15種のH Aと9種のN Aから作製した抗血清を用い、それぞれ赤血球凝集抑制(hemagglutination inhibition、以下H Iと略称する。)試験およびノイラミニダーゼ抑制(neuraminidase inhibition、以下N Iと略称する。)試験により決定されてきた。近年、ヒトのインフルエンザにおいては、H 1からH 3ウイルスおよびN 1とN 2ウイルスの血清型の同定に、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(reverse transcriptase polymerase chain reaction、以下R T - P C Rと略称する。)が用いられてきている。また、H 1~H 15のプライマーを用いたA I Vの診断法がLe eら(Journal of Virological Methods. 97:13-22.2001:非特許文献1)により報告され、日本でも採用されている。P C Rは、A型インフルエンザウイルスの検出において迅速かつ抗血清を必要としない効果的な方法として役立つと言われている。

10

#### 【0005】

近年、世界規模でA Iの発生が相次ぎ、さらに2004年1月に日本では約79年ぶりとなるH P A Iの発生が山口県で報告された。その発生に続き同年に大分県、京都府、大阪府でもH P A Iの発生が見られ、これらの血清型はいずれもH 5 N 1であった。さらに2005年に入っても茨城県でH 5 N 2の発生が見られるなど、A I V感染の状況把握および発生があった場合の効果的防除対策のために重要な血清学的診断の必要性が高まっており、A Iの的確かつ迅速な診断法を確立することが必要とされている。

20

#### 【0006】

ところが、A I Vには16のH A亜型があり、その血清学的診断には多数の抗血清(16種類と量)および抗原が必要となるため、診断法が複雑になる。また、現行の診断法には、感度、迅速性、および特異性等で改良すべき点が多い。現在、A I V抗体の検出の血清診断技術のために広く用いられているものはゲル内沈降(以下A G Pと略称する。)試験とH I試験である。A G P試験は沈降線を形成するために抗原と抗体の両方を多く必要とし、判定に少なくとも24時間必要とする。H I試験はA G P試験より感度が高くより迅速であるが、16のH A亜型があるため非常に手間がかかり、1検体あたりにかかる費用が高い。

30

#### 【0007】

間接E L I S Aでは多数の検体を簡便に検査でき、Snyderら(Avian Dis. 29 :136-44 . 1985:非特許文献2)によってA G P試験より感度、特異性が高いことが示されているが、非特異反応が多いとされ、比色定量のため比較的純粋な抗原とそれぞれの試験動物に対する種特異的酵素結合抗体が必要である。競合E L I S Aは組換え抗原とモノクローナル抗体(以下M A bと略称する。)を用いることで、非特異反応を抑え、感度と特異性を高めている。その有用性はZhouら(Avian Dis.42:517-22.1998:非特許文献3)とShaferら(Avian Dis.42:28-34.1998:非特許文献4)によって証明されており、種特異的酵素結合抗体を必要としないため様々な動物種においても診断できる可能性を持っている。

40

#### 【0008】

組換えタンパク質を用いたインフルエンザ診断系の有用性はいくつか報告されている。Harmonら(J Med Virol.27:25-30.1989:非特許文献5)は大腸菌によって発現したN Pを用いてヒトにおけるインフルエンザ抗体の検出を酵素測定法(E I A)により行い、発現N Pの抗原としての有用性を示した。Voetenら(Journal of Clinical Microbiology. 32 57-3531.1998:非特許文献6)は、A型およびB型のインフルエンザN Pを大腸菌で発現させ、それを用いたE L I S Aにより、ヒトにおけるA型およびB型インフルエンザ特異的I g GおよびI g Aの抗体推移を調べた。この実験により組換え抗原を用いたE L I S Aの特異性と迅速性が示されている。

50

## 【0009】

Yewdellら (J Immunol.126:1814-9.1981:非特許文献7) はM A bを用いてインフルエンザ感染細胞からのNPとMの発現をラジオイムノアッセイ(以下RIAと略称する)、蛍光抗体法、凝集試験等の方法で調べ、NPがMより多く発現されていること、又はこれらの試験で検出されやすいことを示している。つまり、診断においてより多く産生される、又は検出されやすいと考られるNPに対するM A bを用いることはインフルエンザの診断において重要である。さらに、これにより抗NP M A bを用いた診断の有用性が示され、Yewdellらによって作製されたM A bはDe Boerら (Arch Virol.115:47-61.1990:非特許文献8) のNP - E L I S Aにも用いられ、迅速で様々な動物種に用いることができることが示されている。

10

## 【0010】

バキュロウイルス発現組換えNPと抗NP M A bを用いた競合E L I S AはZhouら (非特許文献3) とShaferら (非特許文献4) によってその有用性が示されている。Zhouら (非特許文献3) は鶏、七面鳥、エミュー、ダチョウの血清を用い、競合E L I S A、A G P試験、H I試験の比較を行い、A G P試験陰性で競合E L I S A陽性かつH I陽性検体を検出し、競合E L I S AがA G P試験より感度と特異性が高く、H I試験と同等の感度と特異性を持つことを示した。Shaferら (非特許文献4) も同様に、鶏、七面鳥、走鳥類、ウズラ、キジ、ペンギンの血清を用い、競合E L I S A、A G P試験の比較を行い、この2つの検査結果の高い相関と競合E L I S Aの高い特異性を示した。Shaferら (非特許文献4) の競合E L I S Aでは抗原の精製は行っていない。

20

## 【0011】

【非特許文献1】Journal of Virological Methods. 97:13-22.2001

【非特許文献2】Avian Dis.29:136-44.1985

【非特許文献3】Avian Dis.42:517-22.1998

【非特許文献4】Avian Dis.42:28-34.1998

【非特許文献5】J Med Virol.27:25-30.1989

【非特許文献6】Journal of Clinical Microbiology.3257-3531.1998

【非特許文献7】J Immunol.126:1814-9.1981

【非特許文献8】Arch Virol.115:47-61.1990

【発明の開示】

30

【発明が解決しようとする課題】

## 【0012】

本発明者らが発現を試みたA I VのNPは、ウイルスの生活環を通していくつかの異なった機能を持つ498アミノ酸残基からなるタンパク質である。それは主にマイナス一本鎖RNA結合タンパク質として機能し、リボヌクレオプロテイン粒子(以下RNPsと略称する。)内の構造タンパク質である。加えて、NPは細胞質と核の間のRNPsの輸送と転写において重要な役割を担っている。NP遺伝子は1,565bpで、分節5にコードされている。NPはウイルス間で高く保存されており、鳥亜型の他のNPと95%以上のアミノ酸配列の一致を持っている。さらに、亜型を規定するHAやNAをコードする遺伝子分節とは異なる分節上に存在するため、HAとNAの抗原変異による影響を受けず、A型インフルエンザ共通であるので診断検査に利用される重要なタンパク質である。

40

## 【0013】

特に限定するものではないが、本発明者らは、発現系としてバキュロウイルス-昆虫細胞を用いた。バキュロウイルスとしては、核多角体病ウイルス(以下NPVと略称する。)に属するAutographa californica nuclear polyhedrosis virus(以下AcNPVと略称する。)を用いた。また、バキュロウイルス用トランスファーベクターとしてプラスミドpAcYM1を使用した。このベクターは、ポリヒドリン遺伝子開始コドンであるATGのAを含むプラスミドベクター(クローニング位置付近の塩基配列はA A A A A A A C C T A T A A A T A C G G A T C C Gであり、下線部は制限酵素BamHI認識部位)で最も高い発現効率を得られることで知られる。バキュロウイルス発現系のポイントは、ポ

50

リヒドリンと呼ばれる核内封入体構成タンパク質のプロモーターにある。発現させる遺伝子によっても異なるが、ウイルス感染末期では多いもので細胞総タンパク質の約50%が目的タンパク質であると言われる。この系においては、真核生物である昆虫細胞中でタンパク質の合成が行われるため、大腸菌などの原核生物あるいは酵母などの下等な真核生物の発現系とは異なり、タンパク質の正しい修飾が期待される。実際、シグナルペプチドの切断、リン酸化、糖鎖および脂肪酸の付加、タンパク質分解酵素による開裂などの修飾が確認されている。

#### 【0014】

本発明者らは、さらに、NPに対するMAbの作製を試みた。ポリクローナル抗体と比較して、MAbの利点は以下の3点(1)~(3)に集約される。

10

- (1) 目的分子の抗原決定基に対して、高力価で高特異性を有する抗体が得られること、
- (2) 抗体産生ハイブリドーマは、他の細胞株と同様に液体窒素保存が可能であり、実験者の必要に応じて抗体の調整が可能であること、
- (3) MAbの精製が容易であることである。

#### 【0015】

現行の診断法には、感度、迅速性、特異性等の面において改良すべき点が多く、AIVの診断基準とされているAGP試験は多検体処理に不向きで多くの抗体および抗原の量を必要とする。つまり、多検体を処理することができ、高感度かつ高特異性の診断系の開発が重要となってくる。さらに、AIVは様々な哺乳類および鳥類に感染するので、それら様々な動物種でのモニタリングも可能な方法が望ましい。

20

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0016】

本発明者らは、AIV株間で保存性が高いとされるAIV NPを、例えば、パキユロウイルスで発現させ、スクリーニング用抗原供給の可能性について鋭意検討し、さらに、AIV NPに対するMAbを作製し、AIVの高感度検出系として競合ELISAの有効性を鋭意検討し、NPを用いた高感度血清学的診断系の確立を試み、本発明を完成するに至った。

#### 【0017】

すなわち、本発明は、下記1~7に係るインフルエンザ感染検査薬、および下記8~14に係るインフルエンザ感染検査方法の発明である。

30

1. インフルエンザウイルスの核タンパク質(NP)をAIV(トリインフルエンザウイルス)抗体検出抗原として用いることを特徴とするインフルエンザ感染検査薬。
2. インフルエンザウイルスの核タンパク質(NP)遺伝子をAIV(トリインフルエンザウイルス)から単離し、パキユロウイルス発現系を用いて発現させた核タンパク質(NP)をAIV抗体検出抗原として用いる前記1に記載のインフルエンザ感染検査薬。
3. AIV A/Duck/Aomori/478/02(H1N1)の核タンパク質(NP)遺伝子にHis-tag配列を付加してNP-Hisとして発現させた核タンパク質(NP)をAIV抗体検出抗原として用いる前記1又は2に記載のインフルエンザ感染検査薬。
4. インフルエンザウイルスの核タンパク質(NP)を、酵素結合免疫反応測定法(ELISA)の固相化抗原として用いる前記1~3のいずれかに記載のインフルエンザ感染検査薬。
5. (1) インフルエンザウイルスの核タンパク質(NP)を酵素結合免疫反応測定法(ELISA)の固相化抗原とし、少なくとも前記(1)の固相化抗原と  
(2) インフルエンザウイルスの核タンパク質(NP)に対し特異的に結合する抗核タンパク質モノクローナル抗体(NPMAb)とからなる前記1~4のいずれかに記載のインフルエンザ感染検査薬。
6. 固相化抗原がELISAプレートに固相化されている前記4又は5に記載のインフルエンザ感染検査薬。
7. AIV A/budgeriger/Aichi/1/77(H3N8)を免疫して作製した抗核タンパク質モノクローナル抗体NPMAb(IgG1, )を用いる前記5に記載のインフル

50

エンザ感染検査薬。

8. インフルエンザウイルスの核タンパク質を、酵素結合免疫反応測定法 (ELISA) の固相化抗原として用いることを特徴とするインフルエンザ感染検査方法。

9. インフルエンザウイルスの核タンパク質 (NP) 遺伝子を AIV から単離し、パキユロウイルス発現系を用いて発現させた核タンパク質 (NP) を、酵素結合免疫反応測定法 (ELISA) の固相化抗原として用いる前記 8 に記載のインフルエンザ感染検査方法。

10. (1) インフルエンザウイルスの核タンパク質 (NP) を酵素結合免疫反応測定法 (ELISA) の固相化抗原として用い、少なくとも前記固相化抗原 (1) と

(2) 前記核タンパク質 (NP) に対し特異的に結合する抗核タンパク質モノクローナル抗体 (NP MA b) を用いる前記 8 又は 9 に記載のインフルエンザ感染検査方法。 10

11. (1) インフルエンザウイルスの核タンパク質 (NP) を酵素結合免疫反応測定法 (ELISA) の固相化抗原とし、次いで、

(2) 被検血清を加えて、抗トリインフルエンザ (AIV) 抗体を前記 (1) の固相化抗原と反応させ、次いで、

(3) 前記 (1) の核タンパク質 (NP) に対し特異的に結合する抗核タンパク質モノクローナル抗体 (NP MA b) を加えて、前記抗核タンパク質モノクローナル抗体 (NP MA b) を前記 (2) で加えた被検血清と競合反応させる前記 10 に記載のインフルエンザ感染検査方法。

12. (1) インフルエンザウイルスの核タンパク質 (NP) を酵素結合免疫反応測定法 (ELISA) の固相化抗原とし、次いで、 20

(2) 被検血清を加えて、抗トリインフルエンザ (AIV) 抗体を前記 (1) の固相化抗原と反応させ、次いで、

(3) 前記 (1) の核タンパク質 (NP) に対し特異的に結合する抗核タンパク質モノクローナル抗体 (NP MA b) を加えて、前記抗核タンパク質モノクローナル抗体 (NP MA b) を前記 (2) で加えた被検血清と競合反応させ、次いで、

(4) 前記 (3) の抗 NP MA b のみと反応する酵素標識抗体を加え、次いで、

(5) 前記 (4) の酵素標識抗体の標識酵素の酵素基質を加えたときの発色を測定する前記 11 に記載のインフルエンザ感染検査方法。

13. AIV A/budgeriger/Aichi/1/77 (H3N8) を免疫して作製した抗核タンパク質モノクローナル抗体 NP MA b (IgG1, ) を用いる前記 10 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のインフルエンザ感染検査方法。 30

14. 抗原を固相化した ELISA プレートを用いる前記 9 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のインフルエンザ感染検査方法。

#### 【発明の効果】

##### 【0018】

本発明に係る AIV NP His を用いた診断系は高い感度と特異性を示した。中でも、MA b を用いる競合 ELISA は高い有用性を示した。競合 ELISA による A 型インフルエンザ抗体の診断にはいくつかの有利な点がある。競合 ELISA は多検体処理が可能のため時間を節約することができる。組換えタンパク質を用いるためウイルスを用いる必要がない。さらに、ELISA プレートに抗原を固相化させ、保存しておくことで、検査を容易にし、更なる時間の短縮へとつながる。間接 ELISA のような純度の高い抗原の精製を必要としない。そして、様々な哺乳類および鳥類におけるモニタリングも同様の方法で検査できる可能性を持つ。 40

##### 【0019】

感度と特異性が低下しない、抗原を固相化した ELISA プレートの保存は、検査をより容易にし、他の検査機関への供給を容易とするので特に好ましい。本発明では、AIV NP His について His - tag を利用した精製を行った。精製抗原を用いると、ELISA の非特異反応を効果的に抑えることができる。しかし、精製には多くの時間を必要とし、さらに抗原の量も著しく少なくなる。非精製状態での競合 ELISA では多検体 50

処理をさらに効率よく行うことができる。本発明に係る診断系は、様々な動物種における血清を用い競合ELISAを行うことにより幅広く用いることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

AIV NP 遺伝子のクローニングは、分離A/Duck/Aomori/478/02 (H1N1) 株を鋳型とし、RTPCR法により各分節の全長を増幅させた。NP 遺伝子特異的プライマーはNPのC末端にヒスチジンタグを付加するように設計した。PCR産物をpCR2.1に挿入し、コンピテント細胞へトランスフォーメーションした。

【0021】

AIV NP 遺伝子の発現は特に限定されないが、好ましくはバキュロウイルス発現系により行う。組換えバキュロウイルス作製は、AIV NP His cDNAをバキュロウイルストランスファーベクターpAcYM1に挿入後、トランスフォーメーションを行い、pAIV NP His-pAcYM1とAcRP23-LacZとのコトランスフェクションにより組換えウイルスを作製した。このウイルスをブラッククローニングし、これをAcAIV NP Hisとした。得られたAcAIV NP HisをSf9細胞に感染させ、AIV NP Hisを発現させた。さらに、AcAIV NP His感染細胞から、ニカラムを用いてAIV NP Hisを精製した。

【0022】

本発明者らは、発現させたAIV NP Hisを用いELISAとAGP試験の有用性の検討を行った。精製AIV NP Hisを用いた間接ELISAでは、AIV免疫鶏血清については、実施した血清希釈において用いた野外正常鶏血清より有意に高い値を示し、また用いた全ての野外正常鶏血清において、実施した血清希釈における非特異的陽性反応は認められなかった。さらに、AIV NP Hisを用いたAGP試験ではAIV免疫鶏血清でのみ沈降線を形成し、野外正常鶏血清では非特異的陽性反応は認められなかった。野外ダチョウ血清においては全て陰性であった。なお、これらの結果はRNP抗原を用いた結果と同じであった。これらの結果より、発現したNPは、様々な検査法の抗AIV抗体検出用抗原として広く用いることができると考えられる。

【0023】

抗AIV NP MA bの作製では、精製AIV A/budgerigar/Aichi/1/77 (H3N8)を用いて免疫したマウスからMA b 11E5 (軽鎖、重鎖IgG1)が得られた。このMA b 11E5を濃縮し、反応性を調べたところ、抗原に精製AIV NP Hisを用いたELISAにおいて、 $1.0 \times 10^5$ 倍希釈まで反応した。抗原にAIV A/budgerigar/Aichi/1/77 (H3N8)と精製AIV NP Hisを用いたウェスタンブロッティングでは共にいずれの位置にもバンドが確認できなかった。このウェスタンブロッティング陰性であったことには以下のようなことが考えられる。

【0024】

細胞内でインフルエンザNPはオリゴマーとして安定している。さらに、このNPオリゴマーは非共有結合により結合していて、SDS抵抗性、広い温度範囲と塩類(1M NaCl, 1M KCl)や変性剤(8M 尿素)の存在下でも安定しているが、80以上の加熱とpH5以下でNPモノマーに解離する。つまり、抗原調整の段階での100の加熱やME+の影響により立体構造が変化した可能性がある。さらに、AIV A/budgerigar/Aichi/1/77 (H3N8)を抗原とした場合に、どの部分にもバンドが確認できなかったことと、ELISAで高い反応を示した精製AIV NP Hisにも全く反応しなかったことから、MA b 11E5に対するNPのエピトープが電気泳動又は加熱による影響で変化したのではないかと考えられる。

【0025】

本発明者らは、AIV NP HisとMA b 11E5を用いた競合ELISAの応用の検討を行った。競合ELISAにおいて、AIV免疫鶏血清は全てほぼ100%の抑制を示し、SPF鶏血清、野外正常鶏血清、ダチョウ血清においては抑制反応は認められなかった。またAGP価2~8である実際のH9N2感染鶏血清5検体はそれぞれ100%

10

20

30

40

50

、34%、100%、91%、80%の抑制率を示した。そこで、陰性検体の抑制率の平均値と標準偏差、また実験感染鶏血清の抑制率から、30%以上の抑制を陽性とすることにした。

#### 【0026】

さらに、H1からH12に対するAIV免疫鶏血清において、競合ELISAとAGP試験の陽性限界を比較したところ、競合ELISA陽性限界/AGP試験陽性限界は約1~10倍であり、AGP試験に比べ競合ELISAの方がより感度が高いことが判明した。

#### 【0027】

AGP試験と競合ELISAで判定結果が異なる検体が検出された。既にAGP試験により陰性と診断されている山口県でAI殺処分対象となった鶏血清75検体における競合ELISAの結果では、30%以上の抑制を示した検体が1検体あり、その抑制率は41%であった。なお、競合ELISAで30%以上の抑制を示した検体ではA/Duck/Hokkaido/84/02(H5N3)を用いたHI試験で血清希釈20倍まで検出可能であり、他の検体ではH5に非特異的に反応した検体はなかったので、この反応はH5亜型特異的であることが確認された。この結果は、競合ELISAがAIV感染の血清学的診断法としてAGP試験の代替法として用いることができることを示している。さらに、ELISAが数値として客観的に判定できるのに対し、AGP試験では判定が主観的なものになってしまい、明瞭な沈降線を形成しない場合に陽性を見落とす可能性がある。

10

#### 【0028】

ゲル内沈降(AGP)試験に代わる多検体処理が可能で、高感度かつ高特異性の、トリインフルエンザウイルス(AIV)の診断系を開発した。AIV株間で保存性が高くAIの診断に有用であるとされる核タンパク質(NP)を発現し、スクリーニング用抗原の供給を可能とし、さらにNPに対するモノクローナル抗体(MAb)の作製とそれを用いた競合ELISAの有用性を明らかにした。AIV A/Duck/Aomori/478/02(H1N1)のNP遺伝子にHis-tag配列を付加しバキュロウイルスと昆虫細胞を用いてNP-Hisとして発現した。抗NP MAb(IgG1, )はAIV A/budgeriger/Aichi/1/77(H3N8)を免疫して作製した。

20

#### 【0029】

AIV免疫血清と正常血清を用いた発現NPを抗原とした間接ELISA、AIV免疫血清と正常およびダチョウ血清を用いた発現NPを抗原としたAGP試験、いずれもAIV免疫血清を有意に検出し、用いた正常血清には非特異反応は認められず、また、ダチョウ血清は陰性だった。AIV免疫血清、実験感染血清、正常およびダチョウ血清を用いた競合ELISAでは陽性であるAIV免疫血清と実験感染血清では有意な競合が認められ、正常血清やダチョウ血清では競合は認められなかった。

30

#### 【0030】

さらに、AIV免疫血清を用いて競合ELISAとAGP試験の陽性限界を比較したところ、競合ELISAの方が1~10倍感度が良いことが示された。そこで、AI殺処分対象血清75検体について競合ELISAを実施したところ、陽性を1検体検出した。この検体を用いた赤血球凝集抑制試験ではH5亜型が特異的に抑制された。これらの結果から、発現したNPは様々な検査法のAIV抗体検出抗原として広く用いることができ、競合ELISAは短時間かつ高感度に抗AIV抗体を検出できることから、スクリーニングにとって有用性の高い検査法であることが示された。

40

#### 【実施例】

#### 【0031】

以下に実施例を示し、本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によって何らの制約を受けるものではない。

#### [材料および方法]

#### 1. 被検血清

AIV(H9N2亜型)実験感染鶏血清は、独立行政法人動物衛生研究所(茨城県つく

50

ば市)から分与された。A I 殺処分対象鶏血清 80 検体は山口県中部家畜保健衛生所から分与された。ダチョウ血清は山形朝日オーストリッチ産業センター(山形県朝日町)から分与された。野外正常鶏血清は青森ポトリ(青森県八戸市)から分与された。S P F 鶏血清は、化学及血清療法研究所(熊本県熊本市)から分与された。抗 A I V 免疫鶏血清は作製されたものを用いた。

#### 【0032】

##### 2. トリインフルエンザウイルス

参照ウイルス株として H A の 1 ~ 12 亜型、N A の 1 ~ 9 亜型を含むウイルスを用いた。これらの株は、北海道大学大学院獣医学研究科微生物学教室喜田宏教授から分与された。N P 抗原作製用には、A/budgerigar/Aichi/1/77(以下 A 株と略称する。)を社団法人動物用生物学的製剤協会(東京都)から購入した。N P 遺伝子クローニング用には、分離株 A/Duck/Aomori/478/02 を用いた。

10

#### 【0033】

##### 3. A I V の精製

A 株をリン酸緩衝生理食塩液(0.14M NaCl, 2mM KCl, 3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.2:以下 P B S と略称する。)で 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup> に希釈し 10 日齢の発育鶏卵(小岩井農場、岩手県雫石町)に接種した。3 日後、A 株感染漿尿液を回収し、1,100xg、10 分間、4℃ で遠心し上清を回収した。回収した上清を超遠心分離機 L E - 80 K (Beckman、東京都)と S W 28 Roter (Beckman) で 80,000xg、90 分間、4℃ で遠心した。上清は捨て、ペレットを 0.08% アジ化ナトリウム(以下 NaN<sub>3</sub> と略記する。)添加 P B S で再浮遊し 3 日間、4℃ で保存した。ペレットをよく攪拌し 30,000xg、5 分間遠心した。上清を回収し、10% となるようにショ糖を加え、さらに 20 ~ 80% のショ糖液を密度勾配上に重層し、80,000xg、90 分間、4℃ で遠心した。各フラクションを回収し P B S を 30ml 加え、80,000xg、90 分間、4℃ で遠心し、上清を捨てた。ペレットを 1ml の 0.08% NaN<sub>3</sub> 添加 P B S で再浮遊し精製 A/budgerigar/Aichi/1/77 とした。

20

#### 【0034】

##### 4. A G P 試験方法

###### 1) 寒天ゲルの作製

寒天ゲルの作製は、「鶏ウイルス病の診断法」(堀内貞治.鶏ウイルス病の診断法.pp. 595-606.1982.)に従って行った。リン酸緩衝液(0.02M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.4)に 8.0% の NaCl、1.0% の Bacto-Agar を混合した。その後、10% NaN<sub>3</sub> を 1.0% 加えた。シャーレに 25ml の寒天を入れ、寒天が固まってからゲルパンチャー(穴 5mm x 7well)で寒天を切り取り、吸引して穴を作り反応用寒天平板とした。

30

###### 2) A G P 抗原

発育鶏卵培養精製 A 株(以下 R N P 抗原と称する。)を用いた。

###### 3) A G P 試験

寒天ゲルの中央wellに A G P 抗原を、陽性血清として周囲のwell 1つおきに抗 A I V 鶏血清を、その間に被検血清をそれぞれ 30μl/well ずつ入れ、室温で 2 日観察した。沈降線が確認された最大血清希釈倍数の逆数を A G P 価とした。

40

#### 【0035】

##### 5. H I 試験(法)

H I 試験は、「O I E マニュアル」(O I E MANUAL OF DIAGNOSTIC TESTS AND VACCINES FOR TERRESTRIAL ANIMALS. HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA. O I E Terrestrial Manual. CHAPTER 2.1.14.2004.)に従って行った。

###### 1) H A 試験

96well U 型マイクロプレート(96 U W/O U T L I D S H M I C R O W E L L P L A T E : N a l g e N u n c International, NY, USA)を用い、ウイルス液 25μl を 0.15M 生理食塩水で 2 倍階段希釈し、さらに生理食塩水 25μl と等量混合後、0.5% 鶏赤血球液 50μl と等量混合した。室温で 1 時間静置後、H A の認められた最高希釈倍数の逆数を H A 価として判定し

50

た。HI試験(法)では通常HA抗原4単位に対する凝集抑制価を標準としているため、HA判定陽性時の最高希釈ウイルス液を1HA単位として4HA単位抗原を決定した(国立予防衛生研究所学友会.血清反応. pp. 192-201.1982.改訂二版 ウイルス実験学 各論.丸善株式会社 東京、前記「OIEマニュアル」)。

## 2) HI試験

被検血清25 $\mu$ lを生理食塩水で2倍階段希釈後、4HA単位抗原25 $\mu$ lと等量混合した。室温で1時間感作後、0.5%鶏赤血球液50 $\mu$ lと混合し、室温で1時間感作させて判定した。凝集抑制の最高希釈倍数の逆数をHI価とした。

【0036】

## 6. 遺伝子操作

遺伝子操作は、主として「Molecular cloning」(Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y.1989.)に従って行った。

【0037】

## 7. RT-PCR

### 1) RNA抽出

分離A/Duck/Aomori/478/02(H1N1)株の感染漿尿液0.25mlにISOGEN-LS(株式会社ニッポンジーン、東京都)0.75mlを加えた。続いて200 $\mu$ lクロロホルム(関東化学株式会社、東京都)を加え攪拌し、17,500 $\times$ g、15分間、4で遠心し、水層を回収した。さらに、3 $\mu$ lのEtachinmate(株式会社ニッポンジーン)を加え、500 $\mu$ lのイソプロパノール(関東化学株式会社)を加え、転倒混和後、17,500 $\times$ g、10分間、4で遠心し上清を捨てた。ペレットに1,000 $\mu$ lの70%エタノール(関東化学株式会社)を加え7,700 $\times$ g、2分間、4で遠心した。ペレットを10 $\mu$ lのddH<sub>2</sub>O(DEPC(関東化学株式会社)処理H<sub>2</sub>O)で再浮遊し、これをRNA抽出液とした。

【0038】

### 2) プライマーの設計

以降のサブクロニングを考慮して、AIVNPオープンリーディングフレーム(以下ORFと略記する。)の両端に本来の遺伝子中には存在しない制限酵素BamHI部位を、また得られるタンパク質の精製を考慮して3'末端側にはヒスチジンタグ(以下His-tagと記す。)配列を付加するよう設計した。AIVNP遺伝子配列を参考に、AIVNP遺伝子のORFに対し、フォワードプライマーとしてAIVNPF:5'-gggagatccacatcATGgcgctctcaag-3'、リバースプライマーとしてAIVNPRHis:5'-cggatcCTAatgatgatgatgatgatgatgattgtcactcctctgcatg-3'を設計した。なお、開始コドン、および終止コドンは大文字で、BamHI部位(G:GATCC)を下線で示した。“atgatgatgatgatgatg”はHis-tag配列部位である。

【0039】

### 3) RT-PCR

抽出したRNAを鋳型として、AI特異的プライマーであるUni12(Hoffmannら, Arch Virol. 146:2275-2289.2001.)を用いたRT-PCRにより相補的DNA(complementary DNA:以下cDNAと略記する。)を増幅した。GeneAmp RCA PCR core Kit(Perkin Elmer社、千葉県浦安市)を用いて、42 $\times$ 60分間、99 $\times$ 5分間、30 $\times$ 1分間の逆転写酵素反応を行った。続いて、遺伝子の増幅にはPCR Core Kit(Perkin-Elmer, MA, USA)を用いた。NP特異的プライマーを用い、変性を94 $\times$ 、プライマーのアニーリング温度を58 $\times$ 、cDNA合成を72とし、Step1(94 $\times$ 4分間)を1サイクル、Step2(94 $\times$ 20秒間、58 $\times$ 30秒間、72 $\times$ 7分間)を30サイクル、Step3(72 $\times$ 7分間)を1サイクル行った(Journal of Virological Methods. 97:13-22.2001)。

【0040】

## 8. アガロースゲル電気泳動

10

20

30

40

50

アガロースゲル電気泳動には、TBE緩衝液(0.1M Tris, 2mM EDTA, 85mM Boric acid)にSeaKem GTG Agarose(宝酒造株式会社、京都府)を加え、加熱溶解後エチジウムブロマイド(以下EtBrと略称する。)を最終濃度がそれぞれ1%、10ng/mlになるように加え、室温にてゲル化し作製した。試料を100Vの定電圧で30分から1時間泳動し、紫外線照射により核酸を検出した。DNAの長さは100bp DNA Ladder(宝酒造株式会社)と比較して推定した。

#### 【0041】

##### 9. AIVNP His 遺伝子のクローニングおよび配列決定

PCR法で増幅させたAIVNP His 遺伝子をTA Cloning Kit(Invitrogen, CA, USA)を用いて、プラスミドベクターであるpCR2.1にライゲーションさせた。これをHeat Shock法により宿主大腸菌JM109(宝酒造株式会社、京都)に形質導入させ、50μg/mlアンピシリン、0.12% X-gal(5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-β-D-Galactoside:宝酒造株式会社)添加TYM寒天培地(2% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 0.1% glucose, 10mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.5% bacto agar)上で37℃において一晩培養した。β-ガラクトシダーゼはX-galを代謝し、青色の色素を生成するが、AIVNP His 遺伝子がベクターのLacZ領域に挿入された場合、β-ガラクトシダーゼが産生させず、白色のコロニーが認められる。このWhite-Blue Selectionを利用して、白色コロニーを選択し、一晩、TYM液体培地(2% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 0.1% glucose, 10mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)中で培養し、pAIVNP His-pCR2.1を得た。これからプラスミドを抽出し、BamHIで消化後にアガロースゲル電気泳動によりAIVNP His 遺伝子挿入の確認を行った。抽出後BamHI消化されたプラスミド遺伝子とプライマー(AIVNPFおよびAIVNPR His)を用いてDideoxy Terminator法(Sangerら, J.Mol.Biol. 94:41.1975.)によりシーケンス反応を行った。反応には標識蛍光ジデオキシヌクレオチド(以下ddNTPと略称する。)を用いたDye Terminator Cycle Sequencing Kit FS(Perkin-Elmer)を使用した。96×45秒間、50×30秒間、60×4分間の反応を25サイクル行い、スピンカラムによる精製後、ABI PRISM310 Genetic Analyzer(Perkin-Elmer)により塩基配列を決定した。

#### 【0042】

##### 10. AIVNP His のバキュロウイルスでの発現

###### 1) トランスファーベクターの作製

クローニングで得られたpAIVNP His-pCR2.1をBamHI(宝酒造株式会社、京都)で消化後、アガロースゲル電気泳動で展開し、AIVNP His 遺伝子フラグメントをゲルごと切り出した。フェノール処理後エタノール沈殿によりAIVNP His 遺伝子を精製した。得られたフラグメントをBamHIで消化したバキュロウイルストランスファーベクターpAcYM1(Matsuuraら, J. Gen. Virol. 68:1233-1250.1987.)にTakara DNA Ligation Kit(宝酒造株式会社)を用いてライゲーションし、次いでHeat Shock法により宿主大腸菌JM109(宝酒造株式会社)に形質導入させた。これを50μg/mlアンピシリン添加TYM寒天培地上で一晩培養した。出現コロニーから50μg/mlアンピシリン添加TYM液体培地にて大量培養しpAIVNP His-pAcYM1を得た。プラスミドを抽出し、BamHI消化後アガロースゲル電気泳動によりAIVNP His 遺伝子の挿入を確認した。ここでpAcYM1のポリヒドロリンプロモーターに対しAIVNP His 遺伝子が正方向に挿入されていることを確認するため、AIVNP His 遺伝子を含むプラスミドを鋳型とするPCR法を行った。プライマーとしてpAcYM1のポリヒドロリンプロモーターとクローニングサイトの間に認識部位があるBac1Nプライマー(5'-tgataaccatctcgcaaa-3')およびAIVNP His 遺伝子3'末端に相補的なAIVNPR His プライマーを用いた。この方法では、ポリヒドロリンプロモーターに対し正方向に挿入された場合にのみ約1,500bpのバンドの位置に増幅が認められる。

#### 【0043】

## 2) バキュロウイルスおよび宿主細胞

バキュロウイルス野外株として A c N P V を用い、組換えウイルス作製親株には A c R P 2 3 - L a c Z ( Kittsら, Nucleic Acid Res. 18:5667-5672.1990.) を使用した。バキュロウイルスの宿主細胞としては、ヨトウガの一種 Spodoptera frugiperda の卵巣から樹立された I P L B - S f 2 1 A E (以下 S f 2 1 細胞と略称する。) あるいは S f 2 1 細胞からクローニングされた S f 9 細胞を用いた。S f 2 1 細胞は、T C - 1 0 0 昆虫培地 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)、以下 T C 1 0 0 ( 0 % ) と略称、にウシ胎児血清 (Fetal Calf Serum: 以下 F C S と略称する。) を 1 0 % 加えた T C 1 0 0 ( 1 0 % ) で維持し、クローニングに使用した。S f 9 細胞は、E S F 9 2 1 培地 (Expression System LLC, Woodland, CA, USA: 以下 E S F 9 2 1 と略称する。) を用い、スピナルチャー法により 2 8 条件で維持培養し、高力価ウイルス作製、大量発現に使用した。バキュロウイルスおよび S f 2 1 細胞は、NERC Institute of Virology (Oxford, UK) から分与され、S f 9 細胞は Expression Systems LLC (Woodland, CA, USA) から購入した。

10

【 0 0 4 4 】

## 3) 組換えバキュロウイルスの作製

p A I V N P H i s - p A c Y M 1 ( 1 0 μ g / m l ) 1 μ l 、 E c o 8 1 I で消化し直鎖状にした A c R P 2 3 - L a c Z D N A ( 1 μ g / m l ) 1 μ l に T C 1 0 0 ( 0 % ) を 6 μ l 加えた混合液 ( D N A 混合液 ) と、 T C 1 0 0 ( 0 % F C S ) 培地 8 μ l 、リポフェクチン ( G I B C O B R L ) 8 μ l との混合液 ( リポフェクチン混合液 ) をそれぞれ室温で 3 0 分間反応させた。次に D N A 混合液とリポフェクチン混合液とを混合し室温で 1 5 分間反応させた後、 S f 2 1 細胞にトランスフェクトし相同組換えにより組換えウイルスを作製した。2 8 で 3 日間培養後、培養液を回収し S f 2 1 細胞でブラッククローニングを行った。接種 3 日後にニュートラルレッド 3 0 0 μ g / m l 、 X - g a l ( 宝酒造株式会社 ) 7 5 μ g / m l を用いてブラックを染色した。接種 4 日後、光学顕微鏡下で青色の色素の認められないブラックを組換えウイルスの形成したブラックとみなし、同ブラックをパスツールピペットを用いて T C 1 0 0 ( 1 0 % ) 培地に回収し、ブラッククローニングとした。この操作を 3 回繰り返し白色ブラックのみを形成する組換えバキュロウイルスを獲得し、これを A c A I N P H i s と命名した。この A c A I N P H i s を S f 2 1 細胞で数継代し、シードウイルスとした。

20

【 0 0 4 5 】

## 4) タンパク質発現の確認

A c A I N P H i s を単層培養した S f 9 細胞 (  $1.5 \times 10^6$  Cells ) に感染の多重性 ( Multiplicity of infection: 以下 M O I と略称する。 ) を約 5 Plaque Forming Units (以下 P F U と略称する。 ) / cell で接種し、 E S F 9 2 1 培地を用いて 2 8 で培養し、接種 1、2、3、4、5 日後に細胞および上清を回収した。また、A c N P V あるいはネガティブコントロールとして培養液 (以下 Mock と略称する。 ) を同様に接種し、5 日後に細胞と上清を回収した。細胞については、昆虫細胞用リン酸緩衝生理食塩水 ( 0.14M NaCl, 26.82mM KCl, 8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.4: 以下 PBS-Ac と略記する。 ) で洗浄後、Laemmli ( Laemmli, U. K. Nature. 277:680-685.1970. ) の 4 × サンプルバッファー ( 62.5mM T r i s - H C l p H 6.8, 2 % S D S, 1 0 % Glycerol, 0.02% Bromophenol blue, 5 % 2 -メルカプトエタノール; 以下、2 M e + B u f f e r と略記する。 ) に再浮遊させた。また、培養上清については 2 M e + B u f f e r と 3 : 1 の割合で混合した。各試料を 1 0 0 で 5 分間煮沸し、S D S を含む 12.5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動 ( S D S - P A G E ) により展開した。泳動後、クマシーブリリアントブルー染色液 ( 4 5 % Methanol, 1 0 % Acetic acid, 0.025% Coomassie brilliant blue ) で染色 (以下 C B B 染色と略記する。 )、もしくはウエスタンブロッディングにより解析した。

30

40

【 0 0 4 6 】

## 5) ウェスタンブロッティング解析

S D S - P A G E 終了後、ゲルを転写緩衝液 ( 0.02M Tris, 0.15M Glycine, 0.01% SDS, 5 % Methanol ) で洗浄し、ウェスタンブロッティング装置ホライズプロット (アトー株式会

50

社、東京都)を用いて、ニトロセルロース膜Hybond C Extra (Amersham, Amersham, UK)に100 mAで1.5時間転写した。転写後、ニトロセルロース膜未結合部分をブロック液(1% Skim Milk Powder, 0.1% Tween-20をPBSで溶解)でブロッキングした。ついで一次抗体として抗ポリヒスチジンマウス血清(SIGMA, St. Lois, MO, USA:以下 polyHisと略称する。)を用い、室温で3時間反応させた。反応後、ブロック液で3回洗浄し、二次抗体を37℃で2時間反応させた。二次抗体は、ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgGウサギ血清(Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA)を希釈して用いた。反応後、PBSで3回洗浄し、BM blue POD substrate (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)を用いて発色させた。

#### 【0047】

10

#### 11. AIV NP Hisの大量発現および精製

1.5 × 10<sup>6</sup> cells/mlに調整したSf9細胞にAcAIV NP HisをMOI 5 PFU/cellで接種した。接種後24時間ごとに培養液の一部を採取して等量のトリパンブルー液と混合後、生細胞と死細胞の数をカウントした。生細胞数が5.0 × 10<sup>5</sup> cells/mlを下回った時点で700 × g、15分間遠心により細胞を沈殿させペレットを回収した。このペレットをXpress System Protein Purification Kit (Invitrogen)を用い、キット説明書に従い、AIV NP Hisを精製した。すなわち、培養細胞50 ml分のペレットを10 mlのNative Binding Bufferで再浮遊し、氷上でHandy Sonic model UR-20P (TOMY, 東京都)を用い超音波による細胞の破壊を行った。続いて4℃、15,000 × gで20分間遠心し、上清を回収し、2 M NaOHによりpHを7.6~7.8に調整した。ニッケルキレートカラムをDW<sub>2</sub>で洗浄し、Native Binding Bufferで平衡後、回収したAIV NP Hisを含む上清をニッケルキレートカラムに入れ1時間振盪させることでHis-tagを付加された発現タンパク質を吸着させた。吸着後のカラムをWash Bufferで洗浄し、50、500、1,000 mMの各濃度に調整したImidazoleを用いて1 mlずつの分画にし、His-tag付加タンパク質を溶出させた。これを12.5% SDS-PAGEで展開し、CBB染色による確認後、タンパク質が確認された分画をPBSで平衡化したPD10カラム(Amersham Pharmacia Biotech, 東京都)を通して脱塩した。これを同様に12.5% SDS-PAGEで展開し、CBB染色およびウェスタンブロッティングによる確認後、無菌濾過し、精製AIV NP Hisとした。精製AIV NP Hisのタンパク質含有量はMicro BCA Protein Assay Reagent Kit (PIERCE, Rockford, IN, USA)を用いて測定した。

20

30

#### 【0048】

#### 12. NP抗原を用いた間接ELISA

ELISAは、Kidaら(Kidaら, Virology. 122:38-47.1982.)の方法に従い実施した。精製AIV NP His(90 μg/ml)を抗原としてELISA用96 wellプレート(SUMILON、住友ベークライト株式会社、東京都)に50 μl/wellで播き、室温で2時間もしくは4℃で24時間静置した。抗原を回収し、抗原がコートされていないwell部分への非特異反応を防止するため、BSA10 (Bovine serum albumin fraction V (ナカライテスク株式会社、京都府) 10 mg/mlをPBSに添加、pH7.2)を100 μlずつ添加し、室温、1時間もしくは4℃、24時間静置後、PBST(0.05% Tween 20 添加PBS, pH7.4)で3回洗浄した。BSA5T (BSA fraction Vを5 mg/mlになるようPBSTに添加)で40、160、640、2,560倍に希釈した被検血清を50 μlずつ添加し、室温で1時間静置した。PBSTで4回洗浄後、BSA5Tで1,000倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗鶏IgGウサギ血清(CHEMICON International, Inc. CA, USA)を50 μlずつ添加し、室温で1時間反応後、発色剤(pH4.0, 0.05 M Citric buffer, 0.013% 過酸化水素, 2% 40 mM ABTS)を100 μlずつ添加し、暗室、室温で15分後と30分後にELISA plate reader(三光純薬株式会社、東京都)により405 nmにおける吸光度を測定した。

40

#### 【0049】

#### 13. NP抗原を用いたAGP試験

50

A c A I N P H i s 感染昆虫細胞をDisruption buffer (0.05M Tris-HCl, 0.5% Triton X100, 0.6M KCl) 処理して抗原とし、A G P 試験に従い行った。

#### 【0050】

##### 14. モノクローナル抗体の作製

###### 1) 供試マウス

6週齢BALB/c系雌マウス(日本クレア株式会社、東京都)1匹を用いた。

###### 2) 免疫抗原

モノクローナル抗体作製のための免疫源は、精製AIV A/budgerigar/Aichi/1/77 (H3N8)を用いた。精製ウイルスを最終濃度0.05%のホルマリンで不活化し、4で保存した。アジュバントにはフロイントコンプリートアジュバント(SIGMA)用い、PBSで4倍に希釈した精製ウイルスと等量混合し乳剤を作製した。作製した免疫源はマウスの腹腔内に200 $\mu$ l/headで接種した。同様に処理した乳剤を同様の方法で初回免疫から2週毎に複数回追加免疫を行い、最終追加免疫3日後にマウスを解剖した。

10

#### 【0051】

##### 3) ハイブリドーマの作製

マウスミエロマ細胞(J Immunol Methods. 35(1-2):1-21.1980:以下FO細胞と略称する。)を、RPMI 1640培地(ニッスイ、東京都)に10%FCSを添加した培地(以下10%RPMI 1640と略称する。)で、37、5%CO<sub>2</sub>で静置培養した。細胞培養ルーからFO細胞をはがし、100 $\times$ gで8分間遠心することにより細胞を集め、10%RPMI 1640で再浮遊し $2.0 \times 10^7$  cell/mlに調整し、融合に供した。最終免疫から3日後、マウスをエーテル麻酔下で心臓採血により安楽殺した後、その血液を37、5%CO<sub>2</sub>で1時間、さらに4で24時間静置した。24時間後に血清を分離し、-20で保存した。安楽殺処置後のマウス脾臓を摘出し、ディスプレイ注射器の内筒を用い、金属メッシュ上で脾臓を圧片することにより脾臓細胞を分離した。脾臓細胞に10%RPMI 1640を加え、脾臓細胞洗浄を100 $\times$ g、8分間、2回行った。洗浄した脾臓細胞を10%RPMI 1640で $1.0 \times 10^8$  cell/mlに調節した。

20

#### 【0052】

##### 4) マウスリンフォカインの作製

ハイブリドーマを増殖活性化させるため、マウスリンフォカインを作製した(KANE, M. M. and BANKS, J. N. Immunoassay Making and manipulating hybridoma cells. 5.1 Facilities and media Protocol. 11 37-40.)。抗原未接種のBALB/cマウスを安楽殺後、先述と同様な方法で脾臓を分離し、分離した脾臓細胞を2.5 $\mu$ l/ml lipopolysaccharide endotoxin(SIGMA:以下LPSと略称する。)含有10%RPMI 1640培地で37、5%CO<sub>2</sub>、4日間培養した。390 $\times$ g、5分間で遠心後、上清を回収し、26mm Syringe Filter 0.22 $\mu$ l(Corning Incorporated Corning, NY 14831, Germany)を用い濾過滅菌後、セラムチューブ(Greiner bio-one, Frickenhausen 1, Germany)に分注し-20で保存した。使用時はHT培地(SIGMA)で20倍希釈し100 $\mu$ l/wellで用いた。

30

#### 【0053】

##### 5) 細胞融合と選択

免疫マウスの脾臓細胞を $1.0 \times 10^8$  cell、FO細胞を $2 \times 10^7$  cellに調整し、脾臓細胞:FO細胞=5:1で混合した。100 $\times$ g、8分間遠心後、培養液を除去し、ポリエチレングリコール4000(関東化学株式会社、埼玉:以下PEGと略称する。)溶液(8.75 $\mu$ M PEG, 15%ジメチルスルフォキシド添加RPMI 1640)0.2mlを徐々に滴下しながら融合し、ハイブリドーマを作製した。

40

融合にあたりHAT培地(SIGMA)で細胞濃度を $10^6$  cell/mlに調整し、96wellプレート(96 Wells w/Lid, Flat Bottom:Greiner)に100 $\mu$ l/wellで播き、ハイブリドーマを選択した。得られたハイブリドーマに対し、北海道大学大学院獣医学研究科微生物学教室喜田宏教授から分与されたAIV抗原(A/Aichi/2/68)と粗精製AIV NP

50

を抗原としたE L I S Aでスクリーニングし、N P抗体産生ハイブリドーマを、5%リンフォカインを添加したH T培地を用い限界希釈法により2回クローニングを行った。クローニング後、アイソタイプを調べ、大量培養した。

#### 【0054】

##### 15. モノクローナル抗体の確認

###### 1) 抗A I V N P抗体検出用E L I S A

E L I S Aは、抗原として粗精製A I V N Pを、1次抗体にハイブリドーマ培養上清を、2次抗体にペルオキシダーゼ標識抗マウスI g Gウサギ血清(CHEMICON International, Inc. CA, USA)を用いて行った。

###### 2) ウェスタンブロッティング解析

抗原としてP B S (p H 7.2)で100倍希釈した精製A I V A/budgerigar/Aichi/1/77 (H 3 N 8)と精製A I V N P H i sを用い、12.5% S D S - P A G E電気泳動とウェスタンブロッティングを行った。1次抗体として、M A b産生ハイブリドーマ培養上清を用い、2次抗体には、ブロック液で1000倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスI g Gウサギ血清(Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA)を用いた。

#### 【0055】

##### 16. アイソタイプの決定

アイソタイプの決定は、Immuno pure Monoclonal Antibody Isotype kit I (PIERCE)を用い、製品マニュアルに基づいて行った。E L I S A用96wellプレート(SUMILON)にキット付属のcoating antibody solutionを50μlずつ固相化後、室温で2時間もしくは4で24時間静置した。溶液を取り除き125μlのblocking solutionを加え37で1時間静置した。125μlのwash bufferで4回洗浄後、M A bを含むハイブリドーマ培養上清と陽性対照を50μlずつ添加後、37で1時間反応させた。125μlのwash bufferで4回洗浄後、抗マウス特異的アイソタイプ(I g G 1, I g G 2 a, I g G 3, I g M, I g A, )ウサギ血清と陰性対照として正常ウサギ血清を滴下した。陽性対照には抗マウスI g Gを滴下し、37で1時間反応させた。125μlのwash bufferで4回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギI g Gヤギ血清を50μl加え、37で1時間反応させた。125μlのwash bufferで4回洗浄後、100μlのA B T S substrate solutionを加え、室温で30分間反応させ、E L I S A plate reader(三光純薬株式会社、東京都)により405nmにおける吸光度を測定した。

#### 【0056】

##### 17. M A bの精製および濃縮

クローニングを終了したM A b産生ハイブリドーマを大量培養フラット(INTEGRA Cell LineCL 1000)(IBS INTEGRA BIOSCIENCES, INTEGRA Biosciences AG, Switzerland)を用い培養した。細胞数が約 $2 \times 10^7 \sim 4 \times 10^7$  cell/mlの時期に、継代し、培養上清を回収した。大量培養フラット(INTEGRA Cell LineCL1000)から回収したM A b産生ハイブリドーマ培養上清から、Montage(商標) life science kits(MILLIPORE.com, MA, USA)を用いM A bの精製を行った。前処理としてキット付属の0.22mmマイクロレス-G Pで産生ハイブリドーマ培養上清中の塵埃を除去した。Binding bufferを用いてPROSEP-A media plugを平衡状態にし、上清を150xg、20分間遠心することでM A bをPROSEP-A media plugに吸着させた。続いて、Binding bufferで500xg、2分間の遠心を2回行いPROSEP-A media plugへの非結合タンパク質を洗浄および除去した。Elution bufferで500xg、5分間遠心し、溶出液でPROSEP-A media plugからM A bを溶出した。得られたM A bに対し、Amicon Ultra 15 centrifugal Filter 30K NMWLで脱塩と濃縮を行った。そして、等量のグリセロールを添加後、-20で保存した。

#### 【0057】

##### 18. 競合E L I S A

競合E L I S AはZhouら(Zhouら, Avian Dis. 42:757-761.1998.; Zhouら, Avian Dis. 42: 517-22. 1998)とShaferら(Shaferら, Avian Dis.42:28-34.1998)の方法に従って行った。抗原としてA I V N P H i s (50μl/well)をE L I S A用96wellプレ

10

20

30

40

50

ート (SUMILON) に 2 時間、室温又は 4℃、24 時間シートさせた。抗原を回収したのち、well を BSA 100 μl / well によって 2 時間、室温又は 4℃、24 時間ブロッキングした。Well を PBS T によって 3 回洗浄した。希釈した供試血清とブランクとコントロールとして BSA 5 T をそれぞれ 50 μl / well 添加し、37℃、20 分間反応させた。血清を除去することなしに、PBS で 20,000 倍希釈された MA b をブランク well を除き 50 μl / well、ブランク well には BSA 5 T をそれぞれ 50 μl / well 添加し、37℃、1 時間反応させた。Well を PBS T で 4 回洗浄した。BSA 5 T で 1,000 倍希釈されたペルオキシダーゼ標識抗マウス Ig G ウサギ血清 (CHEMICON International) を 50 μl / well 添加し、37℃、1 時間反応させた。Well を PBS T で 4 回洗浄した。100 μl / well の発色剤 (pH 4.0, 0.05M Citric buffer, 0.013% 過酸化水素, 2% 40 mM ABTS) を添加し、37℃、30 分間反応させた。30 分後、ELISA plate reader (三光純薬株式会社) を用い 405 nm (OD<sub>405</sub>) で測定した。コントロール (MA b のみ) と比較したサンプル血清の抑制率は、正しい値を得るためにブランク値の平均を引いた後に算出され、それは全ての供試血清値とコントロールの値から引かれた。その公式は、 $100 - (100 \times [ \text{供試血清値} - \text{ブランク値 (BSA 5 T)} / \text{コントロール値 (MA b のみ)} - \text{ブランク値 (BSA 5 T)} ] )$  である。抑制率 30% 以上を陽性とした。さらに、30% 以上の抑制を示した最大血清希釈倍数の逆数を競合 ELISA 価とした。

#### 【0058】

##### [結果]

#### 1. AIV NPHis 遺伝子の作製

分離 A/Duck/Aomori/478/02 (H1N1) 株の感染漿尿液から RNA を抽出し、抽出した RNA を鋳型として、AI 特異的プライマーである Uni12 を用いた RT-PCR により cDNA を増幅した。その cDNA に対し、NP 特異的プライマーである AIV NPF と AIV NPR His を設計し、これらを用いて PCR を行ったところ、NP の全長と考えられる約 1,500 塩基対の増幅を確認した。

得られた PCR 産物を TA Cloning Kit を用いて pCR2.1 にライゲーションし、コンピテント細胞である大腸菌 JM109 へトランスフォーメーションした。White-Blue Selection を利用して目的遺伝子の挿入されているホワイトコロニーを選択し、増菌培養を行った。得られた大腸菌からプラスミドを抽出し、BamHI で消化後、1% アガロースゲル電気泳動で展開した。100 bp DNA Ladder (宝酒造株式会社) と比較したところ、AIV NP His 遺伝子と推定される約 1,500 bp とベクターと推定される約 3,900 bp の 2 本のバンドが認められた。さらに、プライマー (AIV NPF と AIV NPR His) を用いた PCR により、5' 末端および 3' 末端から約 500 残基の塩基配列の一致を確認した。全長 NP の配列決定は行っていない。

#### 【0059】

#### 2. トランスファーベクターの構築

AIV NP His - pCR2.1 を BamHI で消化し、AIV NP His を含む断片をバキュロウイルストランスファーベクター pAcYM1 に Takara DNA Ligation Kit を用いてライゲーションした。さらにコンピテントセルにトランスフォーメーションし、大腸菌からプラスミドを抽出した。この抽出したプラスミドを BamHI で消化後、1% アガロースゲル電気泳動を行ったところ、約 1,500 bp の挿入遺伝子と約 10,000 bp の pAcYM1 ベクターの DNA が確認された。この約 1,500 bp のバンドが認められたプラスミドについて、AIV NP His 遺伝子が、ポリヒドロリンプロモーターに対して正方向に挿入されていることを確認するために、Bac1N プライマーと AIV NPR His を用いて PCR を行い、1% アガロースゲル電気泳動で展開した。約 1,500 bp のバンドの増幅が正方向に挿入されたことを示し、1,500 bp の増幅が認められたうちの一つのプラスミドを pAIV NP His - pAcYM1 とし、以下の発現実験に用いた。

#### 【0060】

#### 3. AIV NP His 発現組換えバキュロウイルスの作製

プラスミド pAIV NP His - pAcYM1 と AcRP23-LacZ DNA をコトランスフェクションし、培養上清を、X-gal 存在下でブラッククロニングを行った。White-Blue Selection により白色を示したブラックを 3 回ブラッククロニングし、Sf21 細胞で数継代後、高力価ウイルスを得、シードウイルスとした。ブラックアッセイの結果、このシードウイルスの力価は  $2.0 \times 10^8$  PFU/ml であった。これを組換えバキュロウイルス AcAIV NP His とした。

#### 【0061】

#### 4. 組換え AIV NP His の発現の確認

得られた AcAIV NP His を  $1.5 \times 10^6$  cell/ml 300 ml の Sf9 細胞に MOI を 5 PFU/cell で接種し、 $5.0 \times 10^5$  cell/ml を下回った時点で回収した。polyHis を用いたウェスタンブロッティングでは、AcAIV NP His 感染細胞で約 56 kDa のバンドが認められ、AcNPV 感染細胞および Mock では特異的バンドは認められなかった。

#### 【0062】

#### 5. AIV NP His の大量培養および精製

大量培養し、Ni カラムを用いて精製を行った。Ni カラムに吸着させた AIV NP His を Imidazole で溶出後、SDS-PAGE で展開し CBB 染色で確認した。500 mM で溶出させた際、約 56 kDa のバンドが認められた分画についてプールし、PD10 カラムを通して脱塩し、同様に CBB 染色およびウェスタンブロッティングを行った。ここで約 56 kDa のバンドが認められた分画を再度プールし、0.45 μm フィルターでろ過し、精製 AIV NP His とした。タンパク定量の結果、100 ml の Sf9 細胞培養ペレットから 90 μg/ml、総タンパク量 270 μg の精製 AIV NP His が得られた。

#### 【0063】

#### 6. AIV NP His を用いた ELISA

AIV 免疫鶏血清 12 検体については、実施した血清希釈 40 倍、160 倍、640 倍、2560 倍において、用いた野外正常鶏血清 10 検体より有意に高い値を示した。また、用いた全ての野外正常鶏血清において、実施した血清希釈における非特異的陽性反応は認められなかった。なお、陽性域は野外正常鶏血清の平均値と標準偏差から算出し、野外正常鶏血清における値に、その標準偏差の 3 倍を加えた値以上の反応を陽性とした。

#### 【0064】

#### 7. AIV NP His を用いた AGP 試験

AIV 免疫鶏血清 12 検体でのみ沈降線を確認することができ、野外鶏血清 164 検体では非特異的陽性反応は認められなかった。野外ダチョウ血清 448 検体では全て陰性であった。これらの結果は RNP 抗原を用いた試験結果と同様であった。

#### 【0065】

#### 8. 抗 AIV NP MA b の作製と同定

精製 AIV A/budgerigar/Aichi/1/77 (H3N8) を用いて免疫したマウスの脾臓細胞とミエローマ細胞から 10 種類の MA b 産生ハイブリドーマが得られた。そのうち培養上清が AIV NP 抗原に反応する 8 種類は NP に反応する MA b を産生するハイブリドーマとみなし、AIV 抗原 (A/Aichi/2/68) には反応するが AIV NP 抗原には反応しない 2 種類は他のタンパク質に反応する MA b を産生するハイブリドーマであるとみなした。なお、これら MA b のアイソタイプは、IgG1、IgG2、IgA、IgM であった。目的とする NP と反応する IgG は 11E5 と 6E10 に確認され、6E10 については限界希釈法を用いて 5 回クロニングを行ったが、軽鎖、重鎖 IgM および IgG2a の 2 種類の MA b 産生ハイブリドーマが混在していた。これ以上の分離は時間的に困難と考え、細胞を液体窒素で凍結保存した。11E5 については軽鎖、重鎖 IgG1 であった。

#### 【0066】

#### 9. MA b 11E5 の大量培養と精製および濃縮

クローニングが終了したM A b 産生ハイブリドーマ1 1 E 5をINTEGRA CellLineCL 100 0によって大量培養し、3 0 m lの培養上清を得た。さらに、Montage(商標) life science kits(MILLIPORE.com, MA, USA)を用い培養上清を精製した結果、4 0 0 μ lの濃縮されたM A b 1 1 E 5が得られた。

#### 【0067】

##### 1 0 . M A b 1 1 E 5の反応性

抗原に精製A I V N P H i sを用いたE L I S Aにおいて、濃縮前M A b 1 1 E 5では $1.0 \times 10^3$ 倍希釈、濃縮後M A b 1 1 E 5では $1.0 \times 10^5$ 倍希釈まで反応した。抗原としてA I V A/budgerigar/Aichi/1/77(H3N8)あるいは精製A I V N P H i sを抗原としたウェスタンブロッティング解析ではともにいずれの位置にもバンドが確認できなかった。つまり、ウェスタンブロッティング解析には反応しなかった。

#### 【0068】

##### 1 1 . M A b 1 1 E 5を用いた競合E L I S A

供試血清について、A I V免疫鶏血清は1 0 0倍希釈、その他の血清は5倍希釈でE L I S Aに用いた。A I V免疫鶏血清を用いた試験ではブランク平均値が0.218、コントロール平均値が1.311、H 4 N 5免疫血清値が0.201、H 5 N 3免疫血清値が0.23、H 9 N 2免疫血清値が0.194、H 1 1 N 6免疫血清値が0.204であった。S P F鶏血清ではブランク平均値が0.137、コントロール平均値が1.046、検体1が1.035、検体2が1.045、検体3が0.993であった。これらを既に示した公式にあてはめ抑制率を計算すると、  
 $H 4 N 5$ 免疫血清抑制率(%) =  $100 \times \left( \frac{100 \times [0.201 - 0.218 / 1.311 - 0.218]}{100} \right) = 101.5\%$ 、  
 $H 5 N 3$ 免疫血清抑制率(%) =  $100 \times \left( \frac{100 \times [0.23 - 0.218 / 1.311 - 0.218]}{100} \right) = 98.8572\%$ 、  
 $H 9 N 2$ 免疫血清抑制率(%) =  $100 \times \left( \frac{100 \times [0.194 - 0.218 / 1.311 - 0.218]}{100} \right) = 102.1\%$ 、  
 $H 1 1 N 6$ 免疫血清抑制率(%) =  $100 \times \left( \frac{100 \times [0.204 - 0.218 / 1.311 - 0.218]}{100} \right) = 101.2\%$ 、  
S P F血清検体1抑制率(%) =  $100 \times \left( \frac{100 \times [1.035 - 0.137 / 1.046 - 0.137]}{100} \right) = 1.174\%$ 、  
S P F血清検体2抑制率(%) =  $100 \times \left( \frac{100 \times [1.045 - 0.137 / 1.046 - 0.137]}{100} \right) = 0.073\%$ 、  
S P F血清検体3抑制率(%) =  $100 \times \left( \frac{100 \times [0.993 - 0.137 / 1.046 - 0.137]}{100} \right) = 5.798\%$ となり、他の検体についても同様の計算を行った。A I V免疫鶏血清7検体は全てほぼ1 0 0% (平均抑制率99.8%、標準偏差0.432)の抑制を示し、S P F鶏血清2 5検体(平均抑制率1.805%、標準偏差3.655)、野外正常鶏血清4 3検体(平均抑制率7.462%、標準偏差3.969)、ダチョウ血清3 1 1検体(平均抑制率4.833%、標準偏差4.683)においては抑制反応は認められなかった。またA G P価2 ~ 8である実際のH 9 N 2感染鶏血清5検体はそれぞれ1 0 0%、3 4%、1 0 0%、9 1%、8 0%の抑制率を示した。そこで、陰性検体の抑制率の平均値と標準偏差、また実験感染鶏血清の抑制率から、3 0%以上の抑制を陽性とする事とした。

#### 【0069】

##### 1 2 . 競合E L I S AとA G P試験の陽性限界の比較

H 1からH 1 2に対するA I V免疫鶏血清において、競合E L I S Aでは血清希釈約1 0 0倍から5 0 0倍(競合E L I S A価1 0 0 ~ 5 0 0)まで検出可能であり、A G P試験では約1 0倍から2 5 0倍(A G P価1 0 ~ 2 5 0)まで検出可能であった(表1)。つまり、競合E L I S A陽性限界/A G P試験陽性限界は約1 ~ 1 0倍であった。

#### 【0070】

【表 1】

表 1

血清型	C E L I S A	A G P	C E L I S A / A G P
H 1	2 5 0	5 0	5
H 2	1 0 0	1 0	1 0
H 3	< 1 0 0	1 0	< 1 0
H 4	5 0 0	2 5 0	2
H 5	5 0 0	2 5 0	2
H 6	1 0 0	1 0 0	1
H 7	1 0 0	5 0	2
H 8	5 0 0	5 0	1 0
H 9	2 5 0	5 0	5
H 1 0	1 0 0	1 0	1 0
H 1 1	2 5 0	1 0 0	2 . 5
H 1 2	5 0 0	1 0 0	5

10

## 【 0 0 7 1 】

## 1 3 . 感染血清の検出

20

既に山口県中部家畜保健衛生所において A G P 試験陰性と診断された A I 殺処分対象の鶏血清 7 5 検体における競合 E L I S A では、3 0 % 以上の抑制を示した検体が 1 検体でその抑制率は 4 1 %、2 0 ~ 3 0 % の抑制を示した検体が 1 検体でその抑制率は 2 1 %、1 5 ~ 2 0 % の抑制を示した検体が 3 検体、1 0 ~ 1 5 % の抑制を示した検体が 9 検体、5 ~ 1 0 % の抑制を示した検体が 2 8 検体、抑制が 5 % 以下であった検体が 3 3 検体であった (表 2)。なお、3 0 % 以上の抑制を示した検体について A/Duck/Hokkaido/8 4 / 0 2 (H 5 N 3) を用いた H I 試験を実施したところ、血清希釈 2 0 倍まで H 5 亜型特異的抑制が確認された。

## 【 0 0 7 2 】

## 【表 2】

30

表 2

抑制率	検体数
> 3 0 %	1 ( 4 1 %)
2 0 ~ 3 0 %	1
1 5 ~ 2 0 %	3
1 0 ~ 1 5 %	9
5 ~ 1 0 %	2 8
< 5 %	3 3
計	7 5

40

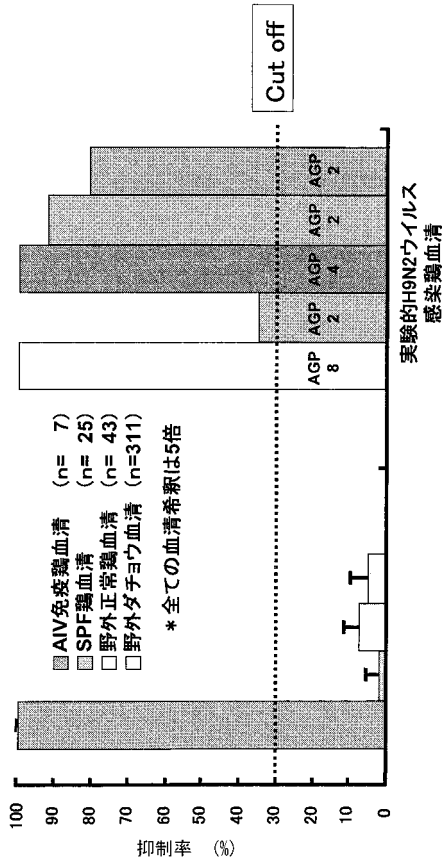
## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 0 7 3 】

【図 1】本発明に係る競合 E L I S A の Cut Off 値の設定を示す。

【 図 1 】

# 競合ELISAのCut off値の設定



フロントページの続き

Fターム(参考) 4H045 AA11 AA20 AA30 CA01 DA75 DA86 EA50 FA72 FA74