

他誌掲載論文 (2011年10月~2012年9月)

(1) 蛍光消光現象を利用したDuplex RT-LAMP法によるノロウイルス遺伝子グループ I および II の同時検出および識別

(山田裕子, 桑山勝*1, 重本直樹, 谷澤由枝, 松尾健, 福田伸治 日本食品微生物学会雑誌, 28(4), 226-231, 2011)

我々は、ノロウイルス (NoV) 遺伝子グループ I (G I) および遺伝子グループ II (G II) の同時遺伝子増幅を行い、クエンチャーによる蛍光消光現象を利用して、1本のチューブでNoV G I およびG II を迅速かつ簡便に検出・識別するDuplex RT-LAMP法を確立した。本法は、RT-LAMP反応後に電気泳動あるいはハイブリダイゼーションなどの追加操作を必要とせず、増幅に使用した蛍光標識プライマーと相補配列を有するクエンチャー標識オリゴヌクレオチドを反応チューブに加えるのみで、紫外線を反応チューブに照射した際の蛍光色から増幅された遺伝子を視覚的に検出・識別可能である。RT-PCR法でNoV陽性の糞便70検体を用いてDuplex RT-LAMP法を検証したところ、1反応チューブあたりの遺伝子コピー数が103から104以上でそれぞれNoV G I は赤色、G II は緑色、G I およびG II 混合は一部が混色の黄色の陽性反応を示し、その有用性が確認された。本法は、NoV食中毒または感染症発生時に、糞便検体からのNoV G I およびG II 遺伝子の迅速検出および遺伝子グループのスクリーニング試験法として、多くの検査機関での利用が期待される。さらに、我々の開発したクエンチャー標識オリゴヌクレオチドによる蛍光消光現象は、すべての遺伝子増幅法に応用可能であり、幅広い分野への応用が期待される。

*1広島県西部畜産事務所

(2) 新しいRSウイルス迅速診断キット「プライムチェックRSV」、アデノウイルス迅速診断キット「プライムチェックアデノ」の有用性の検討

(波多野修一*1, 原三千丸*2, 鈴木英太郎*3, 植村幹二郎*4, 高尾信一 医学と薬学, 66(3), 559-567, 2011)

イムノクロマト法による新しいRSウイルス、アデノウイルス迅速診断キット「プライムチェックRSV」、「プライムチェックアデノ」がアルフレッサファーマ株式会社により開発され、性能評価を行う機会を得た。臨床分離株を用いた最小検出感度試験では「プライムチェックRSV」はSubtype A : $1.4 \times 10^2 \sim 5.6 \times 10^3$ TCID₅₀/mL, Subtype B : $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^4$ TCID₅₀/mL, 「プライムチェックアデノ」は $1.0 \times 10^2 \sim 1.4 \times 10^3$ TCID₅₀/mLであった。臨床分離株培養上清の希釈液を用いた既存キットとの反応性比較試験において各キットより高感度であると

いう結果を得た。患者検体を用いた相関性試験は「プライムチェックRSV」と既存キット2製品について鼻腔ぬぐい液 (それぞれn=120, 123), 鼻腔吸引液 (各n=110) の各検体で実施し、いずれの検体種においても既存キット2製品と陽性一致率, 陰性一致率, 全体一致率は90%以上を示した。「プライムチェックアデノ」も既存キット2製品と咽頭ぬぐい液 (それぞれn=218, 289) を用いた相関性試験を実施した。各既存キットと陽性一致率, 陰性一致率, 全体一致率は95%以上を示した。以上の結果より「プライムチェックRSV」、「プライムチェックアデノ」は、ともに良好な臨床性能を有しており、臨床現場においてこれらの感染症の迅速診断に有用であると考えられた。

*1はたの小児科, *2原小児科, *3鈴木小児科医院, *4うえむら小児内科クリニック

(3) インフルエンザウイルスおよびRSウイルス同時検出迅速キット「プライムチェックFlu・RSV」の有用性の検討

(波多野修一*1, 原三千丸*2, 鈴木英太郎*3, 植村幹二郎*4, 高尾信一 小児科臨床, 65(1), 2145-150, 2012)

インフルエンザウイルスおよびRSウイルス同時検出迅速キットの試用機会を得たので、その性能評価を行った。「プライムチェックFlu・RSV」と既存の2製品の相関性試験を行ったところ、陽性一致率, 陰性一致率, 全体一致率とも95%以上の相関が認められた。また、インフルエンザウイルス分離培養法との相関率も高かった。

本キットは、インフルエンザウイルスとRSウイルスが同時に検出できるため、同時期に流行している時には、検体採取の際の患者負担の軽減, 検査操作の簡便化, 診療時間の短縮が期待できる。さらに患者や保護者への説明の際にも有用であり、小児外来繁忙期である冬季の小児呼吸器感染症の診療に有用性が非常に高いと考えられた。

*1はたの小児科, *2原小児科, *3鈴木小児科医院, *4うえむら小児内科クリニック

(4) Influenza viral load and rapid influenza diagnostic tests in children and adults.

(Hara M*1, Morihara M*2, Takao S, Fukuda S, Shimazu Y, Tanizawa Y and Matsuo T Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 73(1),99-100,2012)

インフルエンザ迅速診断キット試用に際して問題となる感度とウイルス量との関係について、小児と成人の患者について比較した。その結果、小児と成人の間では、排泄されるウイルス量には差は認められなかった

が、採取可能な検体量が成人に比較して小児の方が有意に多かった。このことが、成人に比較して小児の方が迅速診断キットの陽性率が高く算定される原因の1つと考えられた。

*1原小児科, *2森原内科

(5) 蛍光RT-multiplex PCR法を用いた食中毒起因微生物の包括的検出

(重本直樹, 谷澤由枝, 山田裕子, 大原祥子*1, 松尾健, 福田伸治 日本食品微生物学会雑誌, 29(1), 11-17, 2012)

食中毒の原因の上位を占める12種の病原微生物(細菌9種およびウイルス3種)の包括的検出に、蛍光標識プライマーを用いたRT-multiplex PCR法を適用した。患者糞便から細菌DNAおよびウイルスRNAを市販のウイルスRNA抽出キットを用いて同時抽出し、逆転写反応後に逆転写反応物を鋳型にしてmultiplex PCR法を実施した。12種の病原微生物を3つのグループに区分し、AセットはDiarrheagenic *E. coli*を、Bセットは*Salmonella* spp., *V. parahaemolyticus*, *C. jejuni*および*C. coli*を、Cセットは*C. perfringens*, Norovirus, SapovirusおよびAstrovirusを対象としたプライマーセットとした。食中毒等集団感染45事例と散発15事例に本法を適用した結果、常法である培養法あるいはmonoplex PCR法と有意差はなく、ほぼ同等の感度と特異度が得られた。本法は核酸抽出から遺伝子検出までを6-7時間で完了できることから、食中毒原因微生物の迅速スクリーニング検査法として有効であることが確認された。

*1広島県食肉衛生検査所

(6) 麻しんの確定診断と鑑別診断が可能となるTaqMan real-time PCRパネルの開発と、その臨床応用

(高尾信一, 重本直樹, 島津幸枝, 谷澤由枝, 福田伸治, 松尾健 広島県獣医学会雑誌, 27, 71-77, 2012)

麻しんの確定診断と、麻しん類似疾患の鑑別診断を一度の検査で可能なTaqMan realtime PCR法を用いたアッセイパネル(TaqManパネル)を開発した。このTaqManパネルでは、麻しんウイルス、風疹ウイルス、パルボウイルスB19型、エンテロウイルス、ヒトヘルペスウイルス6型および7型の6種類のウイルスが検出可能である。麻しんを疑う患者27名から採取された検体(咽頭拭い液, 尿, 血液, 血清)86検体についてTaqManパネルを用いて解析を実施した結果、8名が麻しん、4名が伝染

性紅斑、3名がエンテロウイルス感染症、1名が風しんであると検査診断することが可能であった。このTaqManパネルは、麻しんウイルスを高感度に検出できるだけでなく、麻しんと鑑別が必要なウイルスについても網羅的に検出可能であるので、麻しんの確定診断と鑑別診断に有用な検査手法であると考えられる。

(7) 酸化還元電位差を用いた環境改善技術の検討

(松本英之, 岡本拓 全国環境研究会誌, 36(3), 51-57, 2011)

環境中に存在する酸化還元電位差を用いて、還元環境の改善と電気エネルギーの回収を目的とした技術を確立するために、基礎的な検討を行った。硫化ナトリウム溶液等を用いた模擬還元環境の酸化実験では、得られる電流は微小であったが、電解水の循環やセルの多層化により得られる電力を上昇させることができた。また、環境中の還元状態にある河川及び内港の底質を用いて還元環境解消実験を行ったところ、底質表層の酸化が確認できた。さらに、外部電力を印加することにより酸化が促進できる可能性が示唆された。

(8) システム収穫表「広島県立木在庫表示システム」の開発に係る心材材積推定に関する考察

(山本哲也, 川上嘉章*1, 時光博史*2, 岡部茂*3 森林応用研究, 21(2), 33-38, 2012)

スギ・ヒノキ林を丸太の在庫として、径級別本数と材質を表示するシステム収穫表(広島県「立木在庫表示システム」)の開発に取り組んだ際、材質の中でも心材材積推定に関して検討した。広島県北部の三次市、庄原市の40年生前後のスギ林6箇所とヒノキ林9箇所を調査地とし、毎木調査と樹幹解析を行い、樹高、胸高直径(DBH)、樹皮厚、辺材厚、心材厚の関係について解析した。その結果、若齢林及び高齢林での推定精度の確保など課題はあるものの、任意の立木の皮付DBHから樹皮厚を控除し皮内DBHを求め、その値と樹高から皮内現実幹曲線を推定し、それから辺材厚を控除することにより、立木の心材厚及び心材材積の推定が概ね可能になったと考えられた。

*1広島県立総合技術研究所林業技術センター(現所属広島県緑化センター), *2広島県立総合技術研究所林業技術センター(故人), *3広島県立総合技術研究所林業技術センター