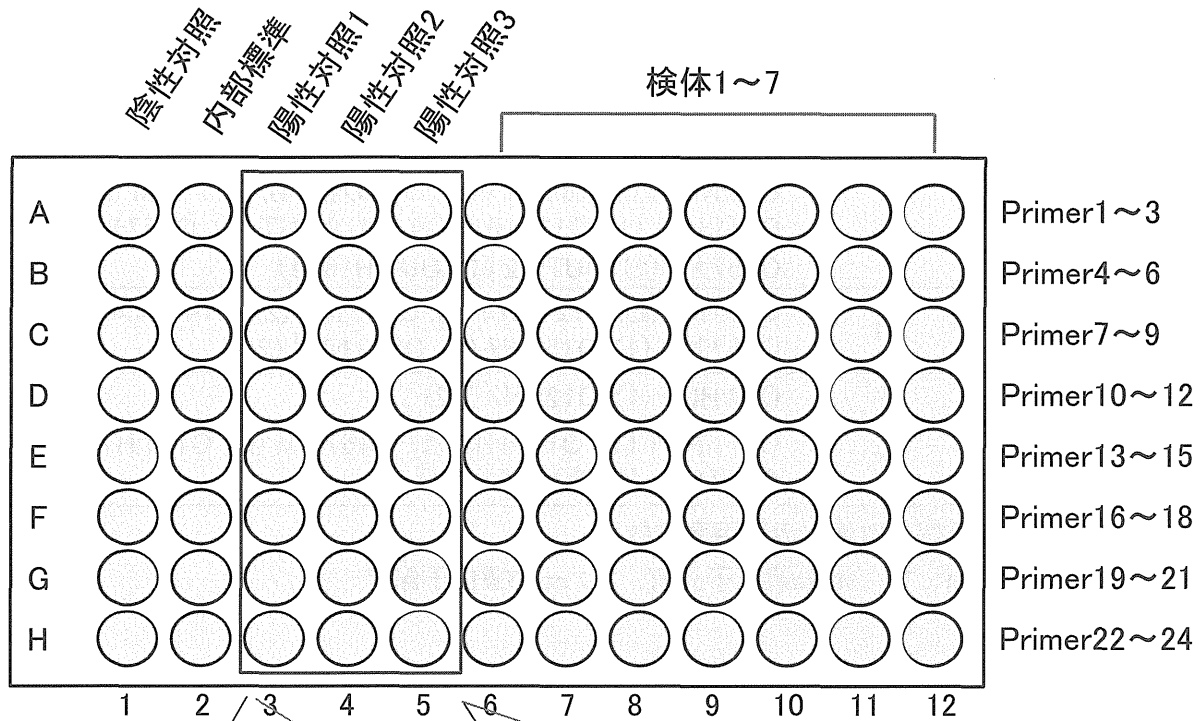


図1 RFBS24システム ウェルの配置



	RFBS24IVの陽性対照配置図			RFBS24Vの陽性対照配置図		
	第3列	第4列	第5列	第3列	第4列	第5列
	陽性対照1	陽性対照2	陽性対照3	陽性対照1	陽性対照2	陽性対照3
A set	<i>Cl. Perfringens</i>	<i>P. alcalifaciens</i>	ETEC(LT)	<i>Cl. Perfringens</i>	<i>P. alcalifaciens</i>	EHEC(stx2)
B set	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>trh</i> positive <i>V. parahaemolyticus</i>	EHEC(stx1)	<i>C. jejuni</i>	<i>trh</i> positive <i>V. parahaemolyticus</i>
C set	<i>L. monocytogenes</i>	emetic <i>B. cereus</i>	<i>V. cholerae</i>	ETEC(LT)	emetic <i>B. cereus</i>	<i>V. cholerae</i>
D set	ETEC (ST)	EPEC(<i>eae</i>)	enterotoxigenic <i>B. cereus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	EPEC(<i>eae</i>)	enterotoxigenic <i>B. cereus</i>
E set	EAEC (<i>aggR</i>)	EHEC(<i>stx1</i>)	<i>S. aureus</i>	<i>C. coli</i>	EAEC (<i>aggR</i>)	<i>S. aureus</i>
F set	<i>tdh</i> positive <i>V. parahaemolyticus</i>	EHEC(<i>stx2</i>)	<i>Pl. shigelloides</i>	ETEC (ST)	<i>tdh</i> positive <i>V. parahaemolyticus</i>	<i>Pl. shigelloides</i>
G set	EAEC (<i>astA</i>)	EIEC, <i>Shigella</i> spp.	<i>A. hydrophila</i>	EAEC (<i>astA</i>)	EIEC, <i>Shigella</i> spp.	<i>A. hydrophila</i>
H set	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Salmonella</i> spp.	DAEC (<i>daaD</i>)	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Salmonella</i> spp.	DAEC (<i>daaD</i>)

RFBS24IVおよびRFBS24VのA~H setの検出遺伝子組み合わせ

-陽性対照検出配置図による-

図2 競合型内部標準の概念図

set A	<i>cpe</i> primer	<i>Clostridium perfringens</i>
set B	<i>AB</i> primer	<i>Campylobacter jejuni</i>
set C	<i>ces</i> primer	emetic <i>Bacillus cereus</i>
set D	<i>eae</i> primer	EPEC (<i>eae</i>)
set E	<i>femB</i> primer	<i>Staphylococcus aureus</i>
set F	<i>tdh</i> primer	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (<i>tdh</i>)
set G	<i>astA</i> primer	EPEC (<i>astA</i>)
set H	<i>invA</i> primer	<i>Salmonella</i> spp.
spacer	AHHI	

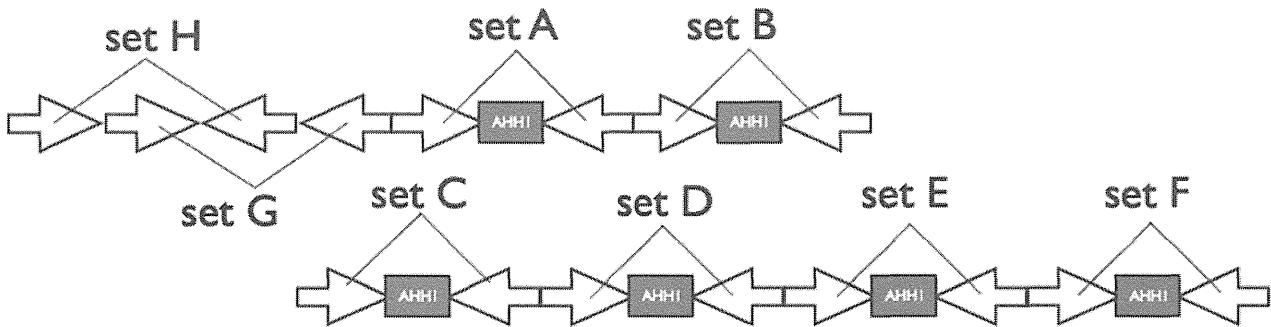


図3-1 24種の標的遺伝子増幅曲線と融解曲線分析 (1)

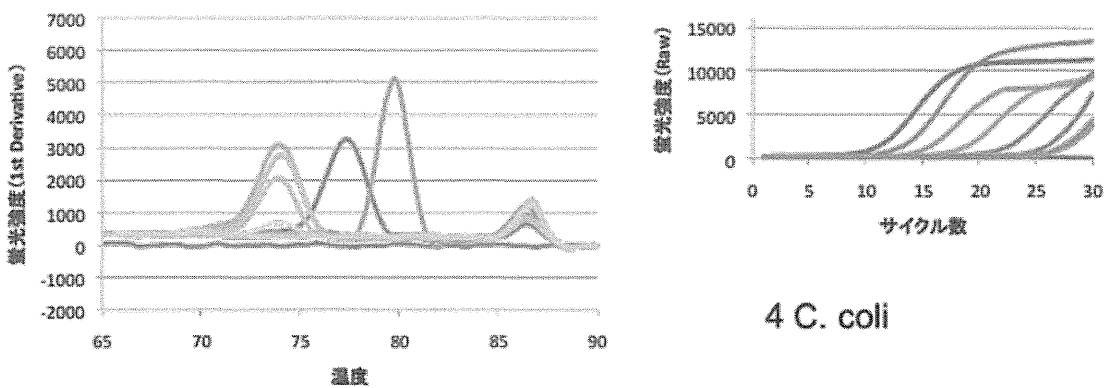
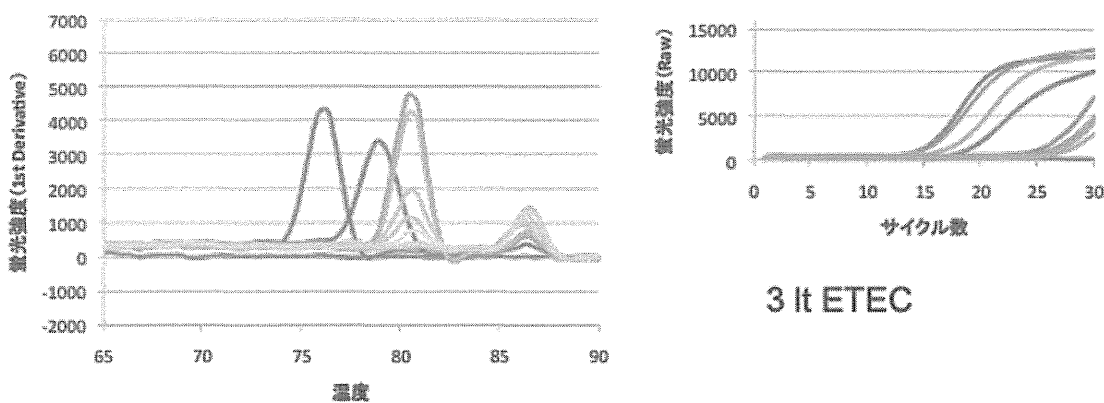
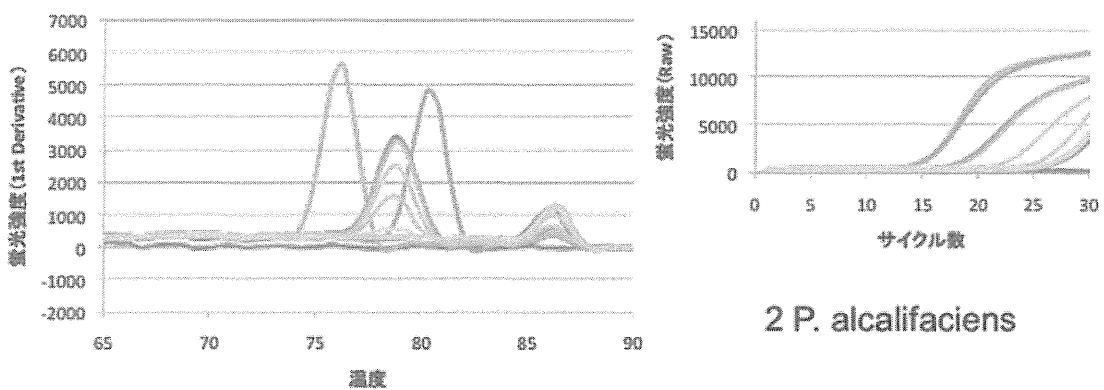
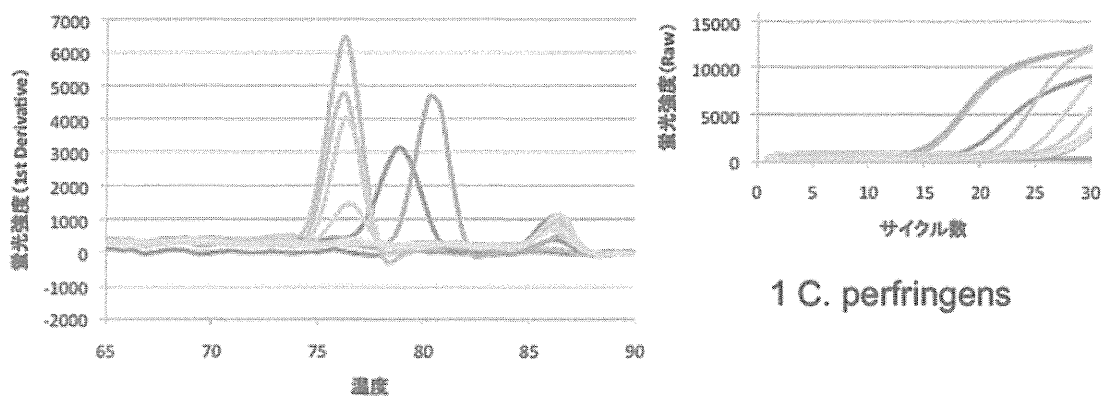
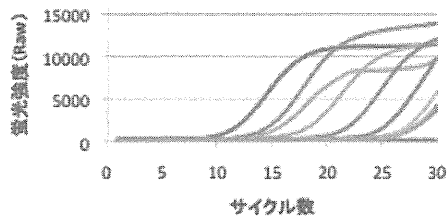
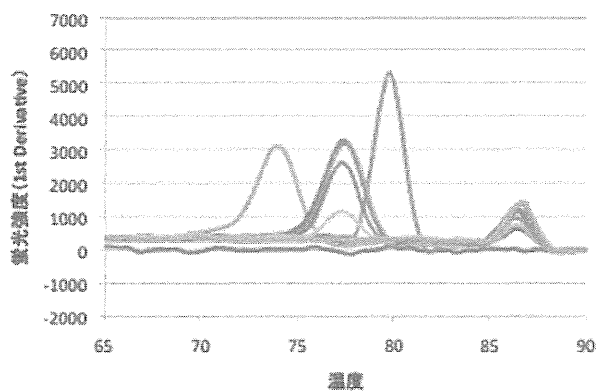
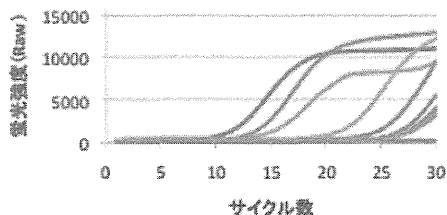
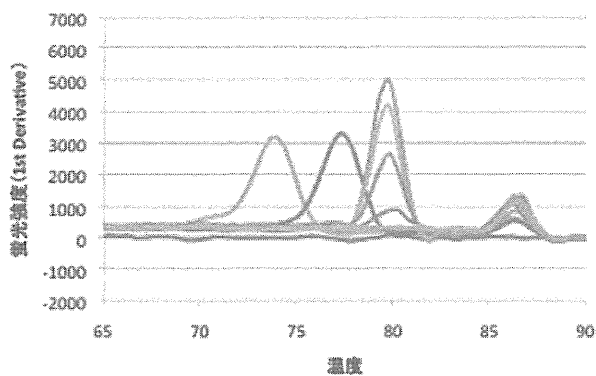


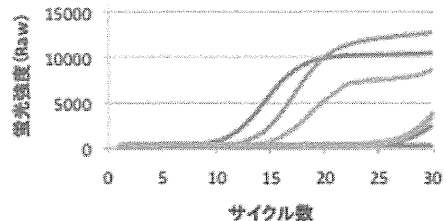
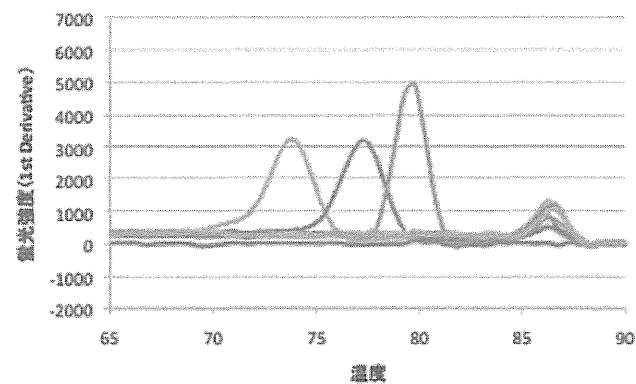
図3-2 24種の標的遺伝子増幅曲線と融解曲線分析 (2)



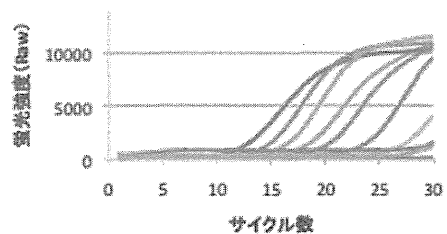
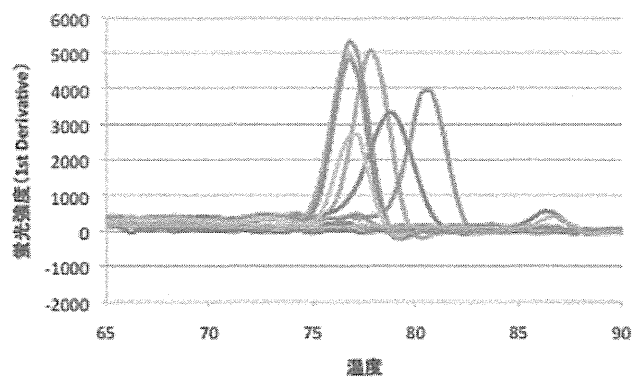
5 *C. jejuni*



6 trh1 *V. parahaemolyticus*

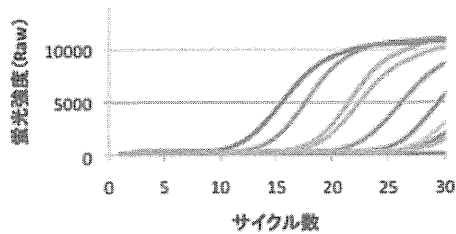
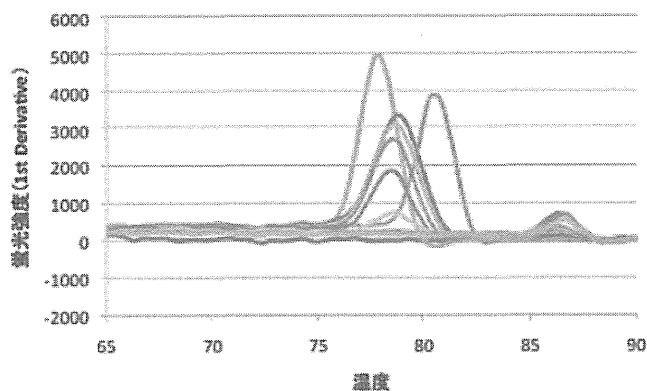


7 trh2 *V. parahaemolyticus*

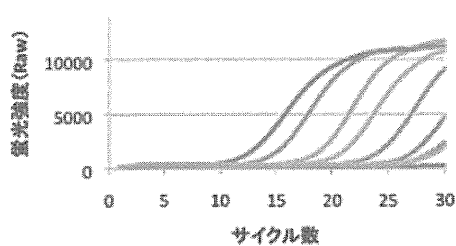
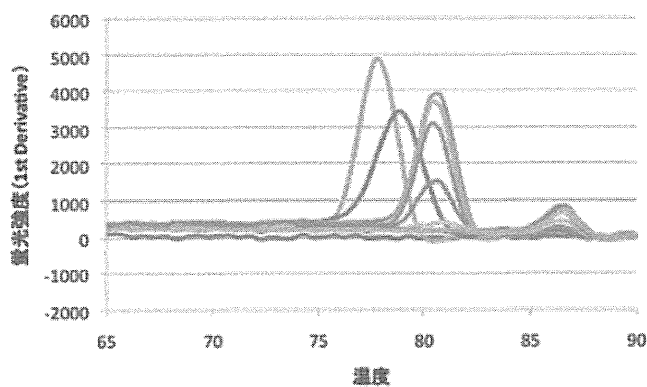


8 *L. monocytogenes*

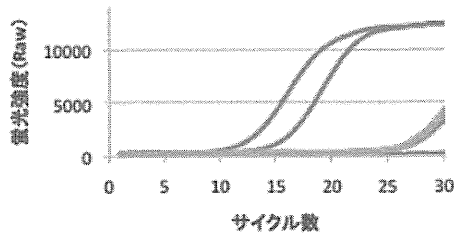
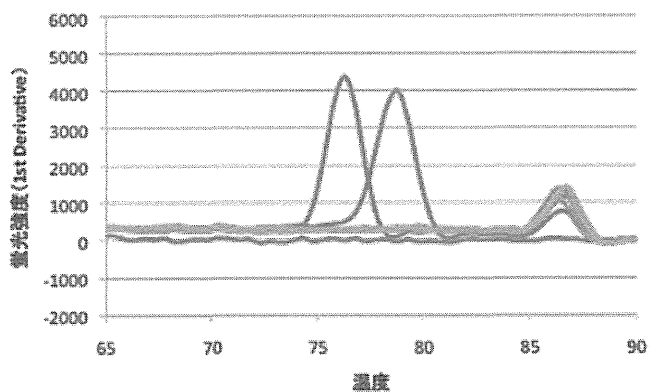
図3-3 24種の標的遺伝子増幅曲線と融解曲線分析 (3)



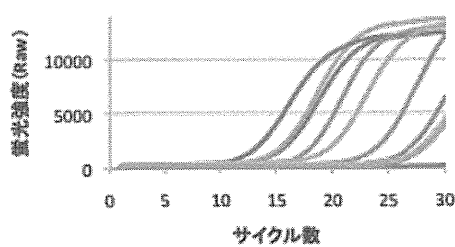
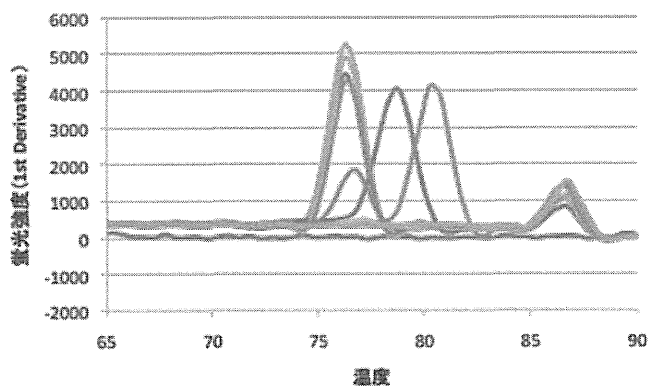
9 emetic *B. cereus*



10 *V. cholerae*



11 sth ETEC



12 stp ETEC

図3-4 24種の標的遺伝子増幅曲線と融解曲線分析 (4)

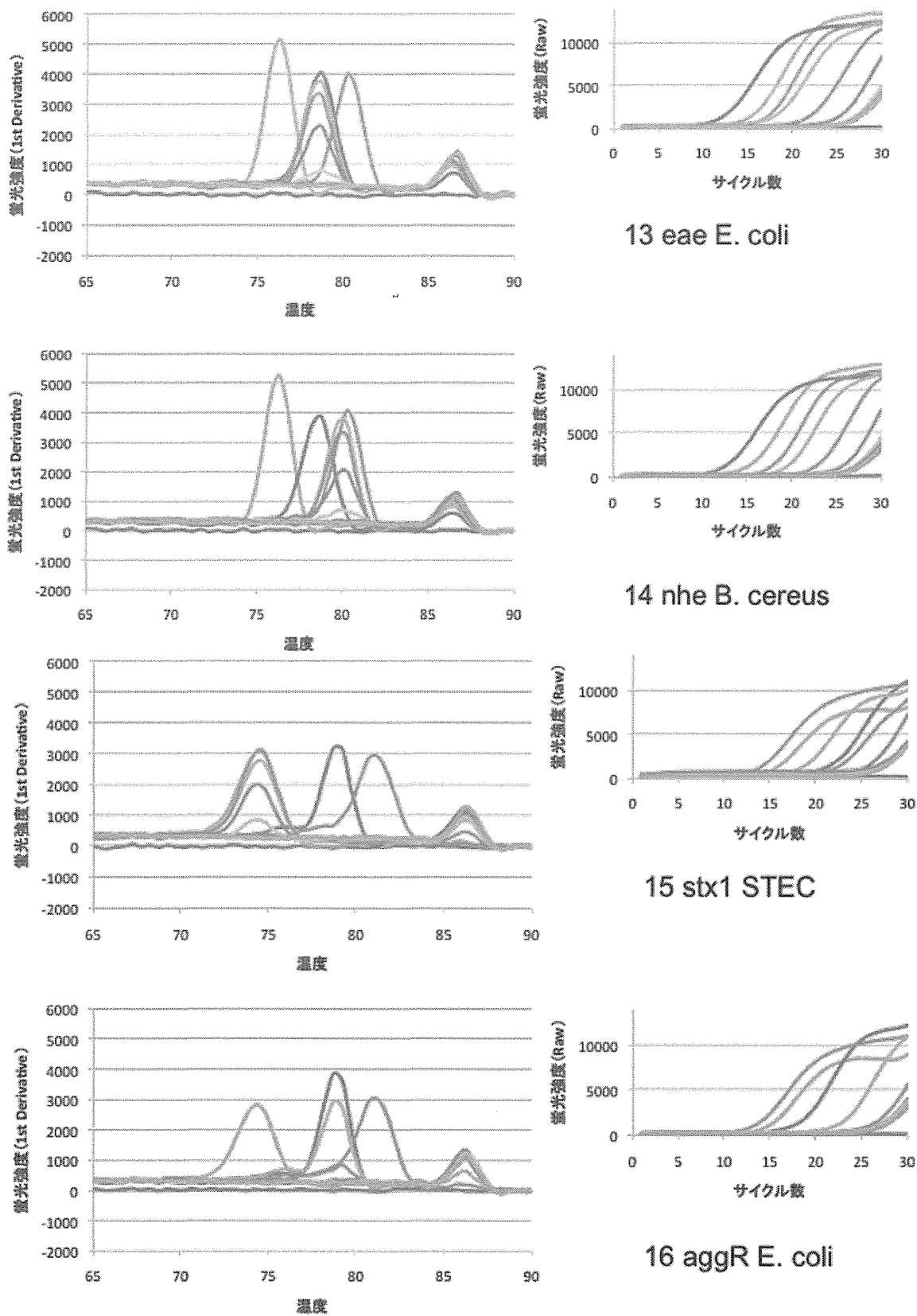


図3-5 24種の標的遺伝子増幅曲線と融解曲線分析 (5)

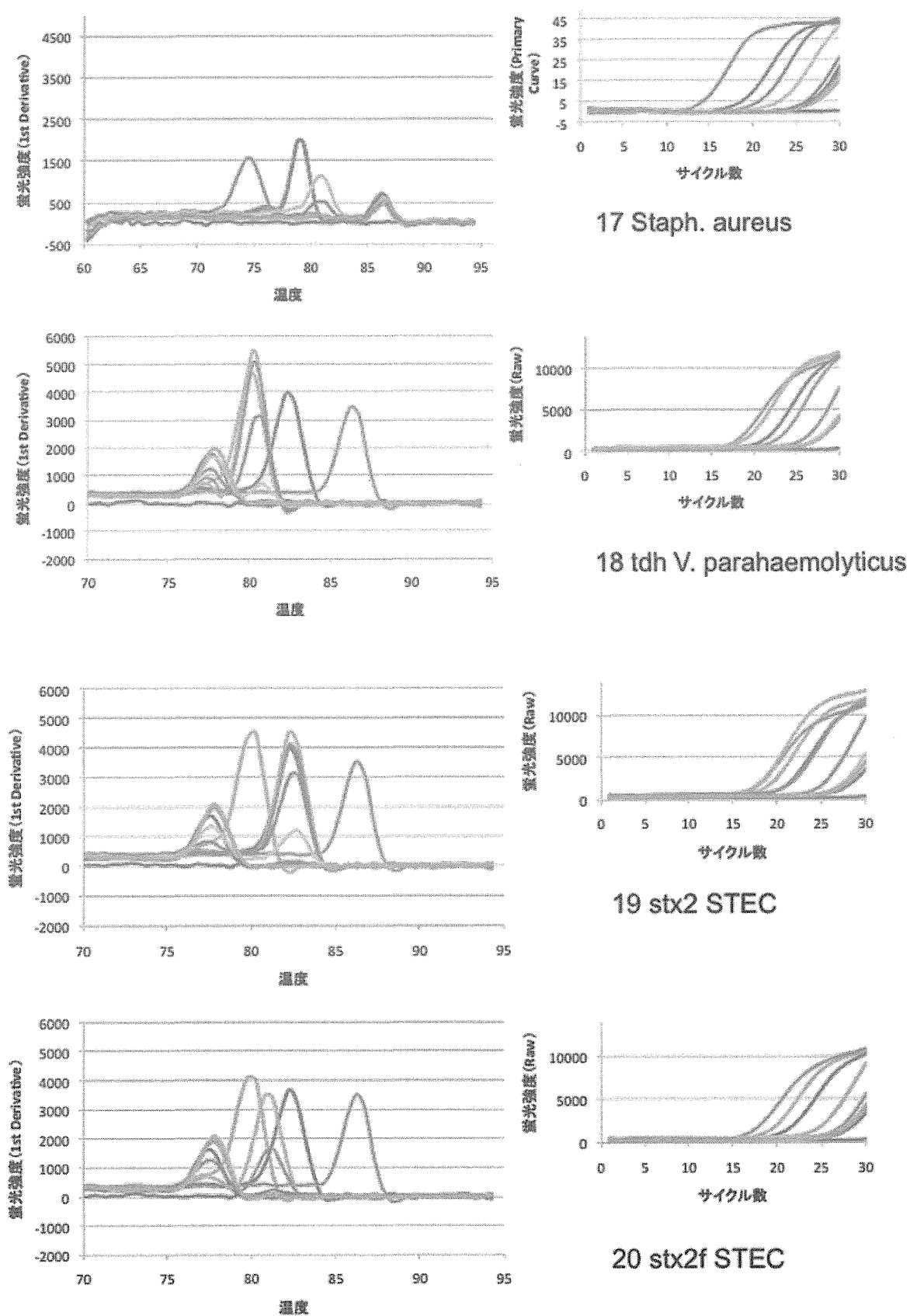


図3-6 24種の標的遺伝子増幅曲線と融解曲線分析 (6)

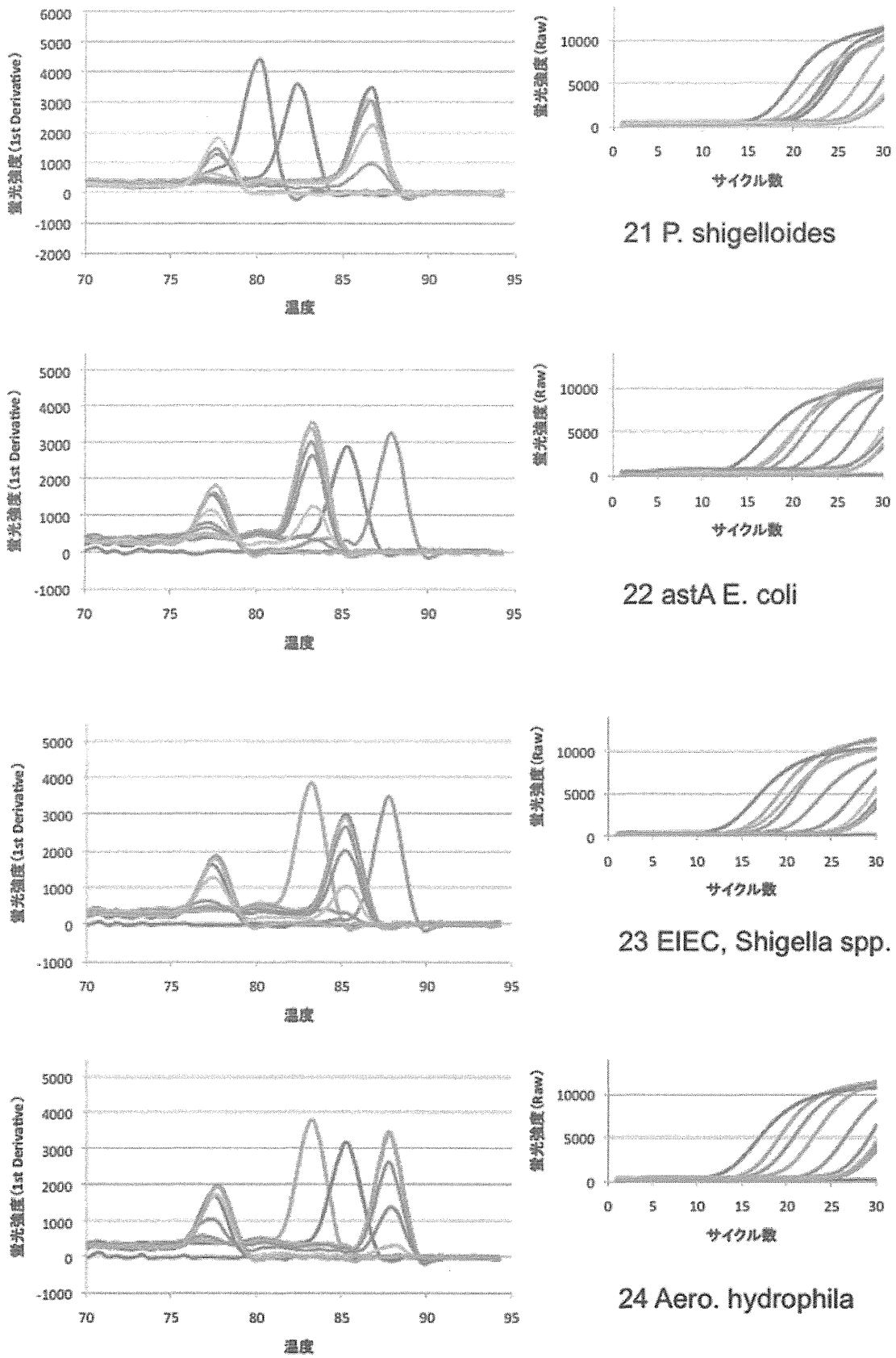
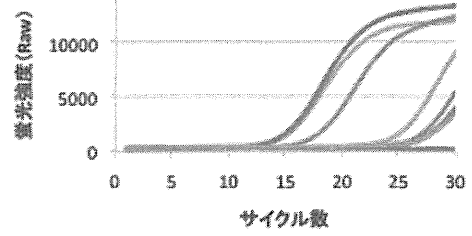
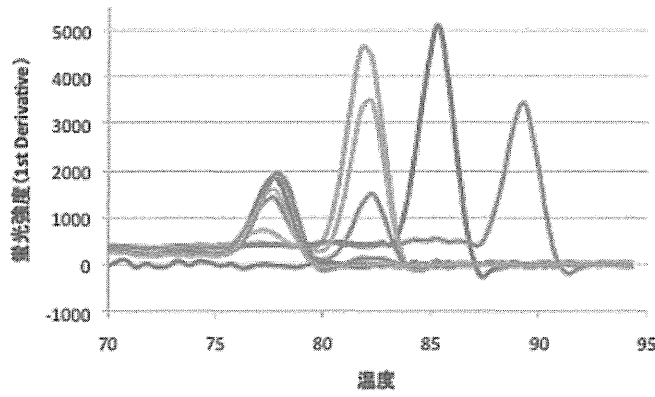
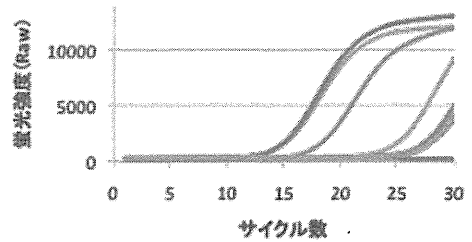
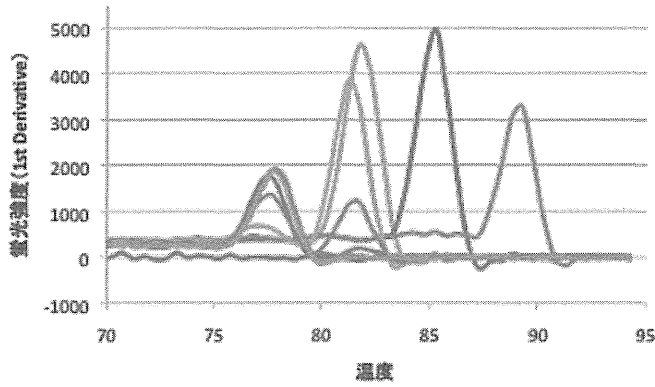


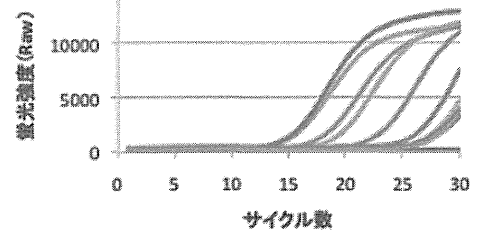
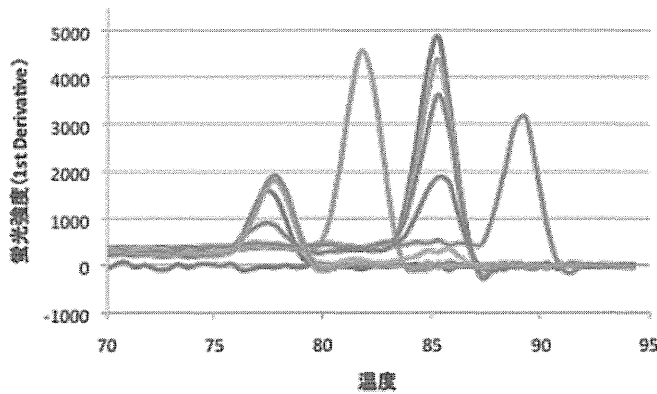
図3-7 24種の標的遺伝子増幅曲線と融解曲線分析 (7)



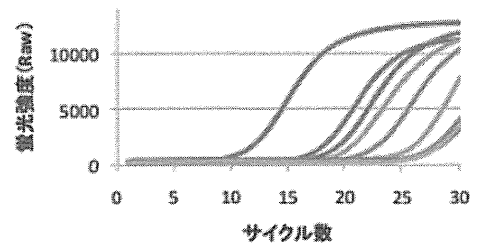
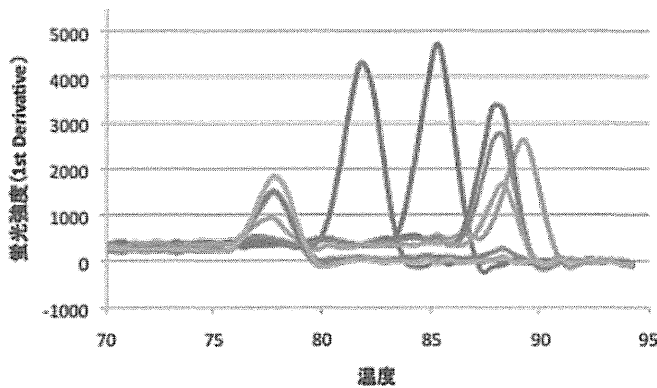
25 *Y. enterocolitica*



26 *Y. pseudotuberculosis*



27 *Salmonella* spp.



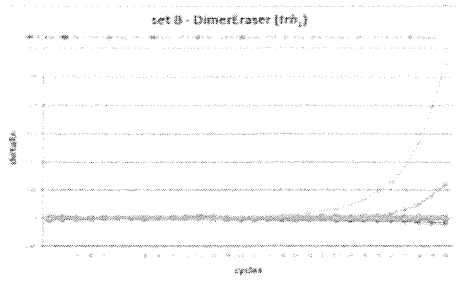
28 *daaD E. coli*

図4-1 *trh*遺伝子増幅に関する追加試験 (*Taq*の変更)

*trh*遺伝子増幅に関する改良試験

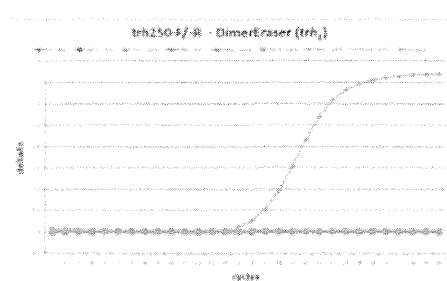
DimerEraserでの増幅曲線

プライマー:RFBS24IVのset B

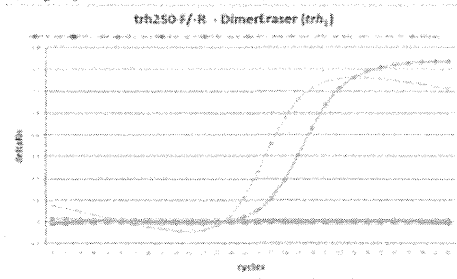


Single primerでの増幅曲線

SYBR Premix DimerEraser 使用



プライマー:trh250-F/trh250-R



SYBR Premix Ex Taq II 使用

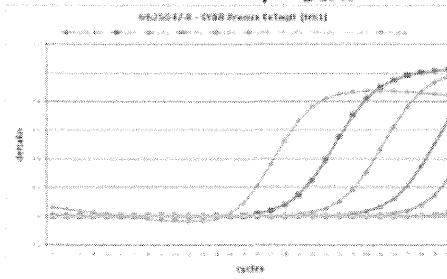


図4-2 *trh*遺伝子増幅に関する追加試験 (伸長反応時間の変更)

*trh*遺伝子増幅に関する改良試験

参考 (伸長時間72°C30秒)

	Ct	Tm
10 ⁰	24.72	80.14
10 ⁻¹	27.55	86.62
10 ⁻²	29.51	86.57
10 ⁻³	28.7	86.62
10 ⁻⁴	-	86.68
10 ⁻⁵	28.28	86.59

伸長時間72°C・1minに設定した場合

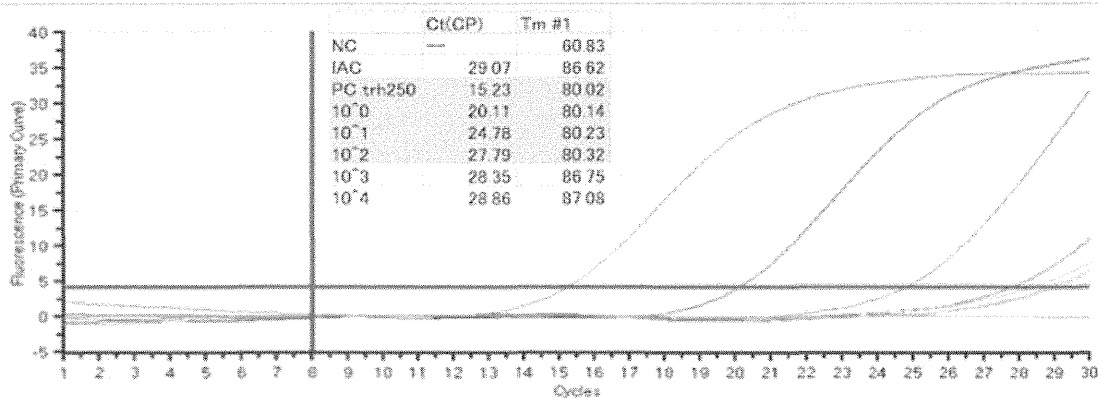


図5-1 Tm値のずれによる推定困難な菌種 (1)

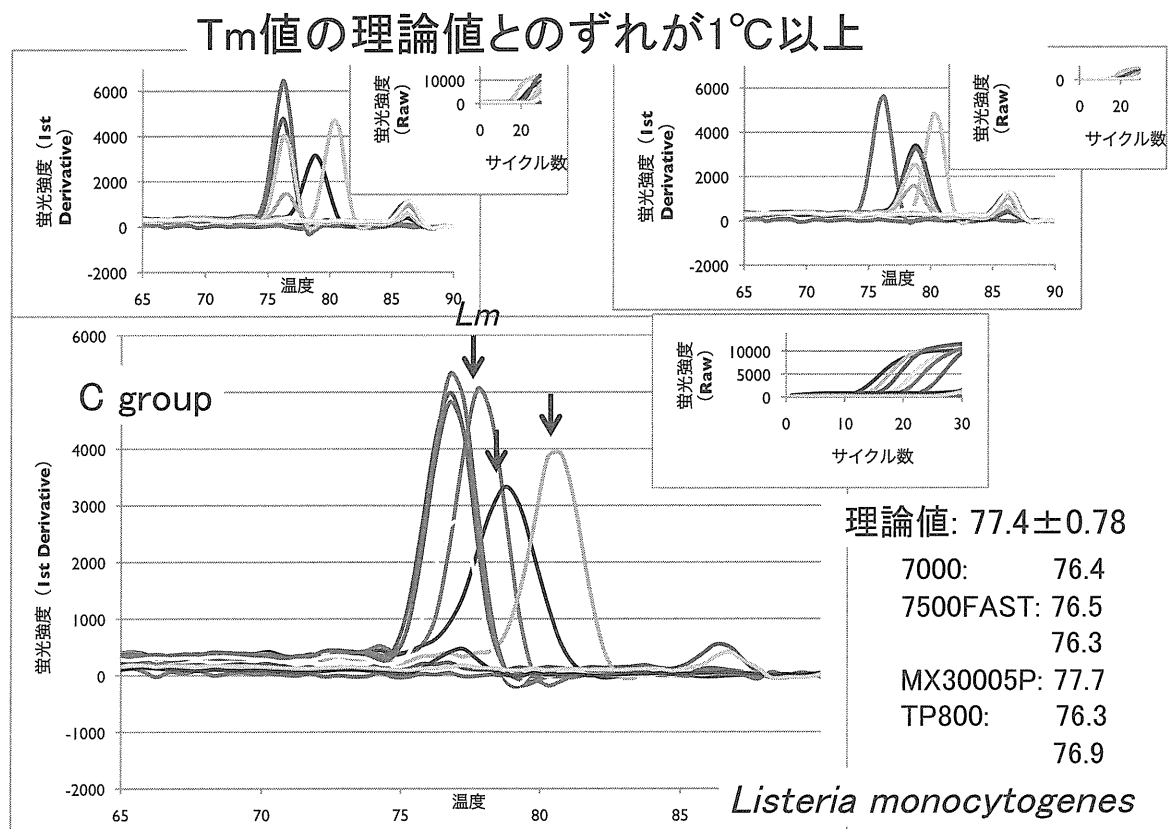


図5-2 Tm値のずれによる推定困難な菌種 (2)

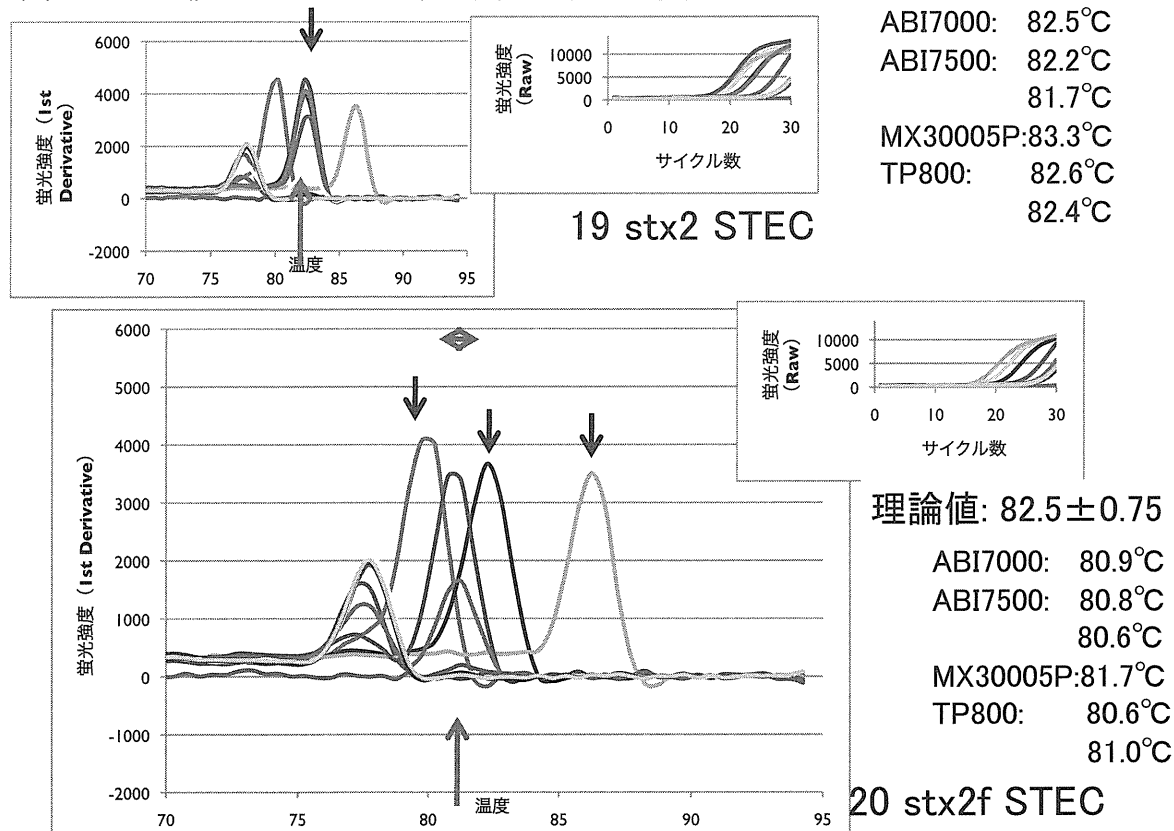
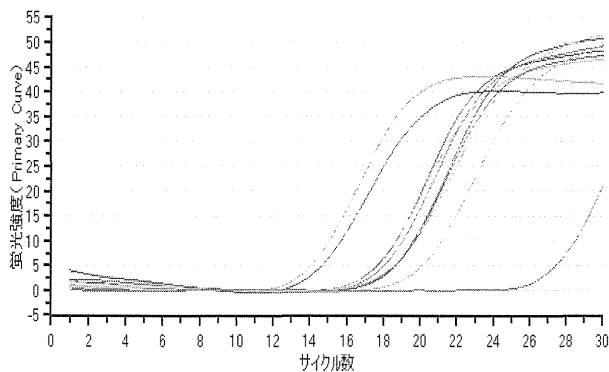
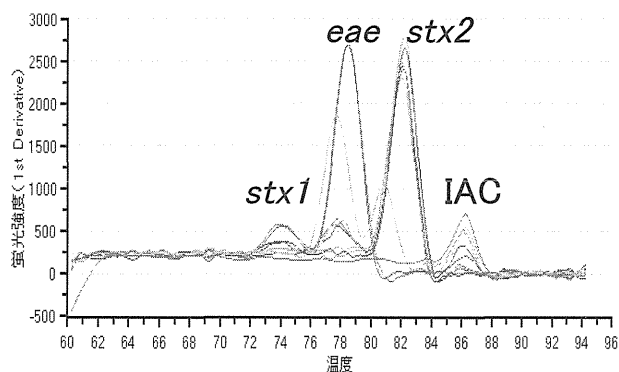


図6 試薬毎の増幅曲線と融解曲線

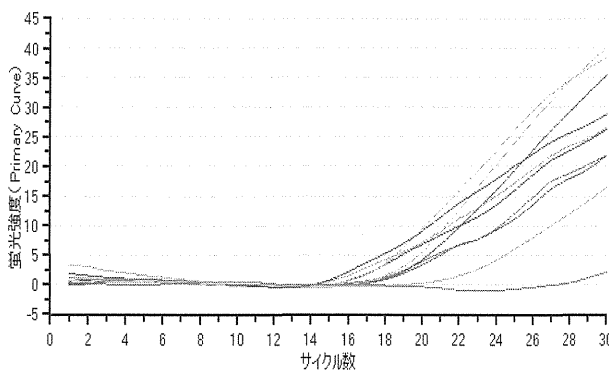
a-1: DE増幅曲線



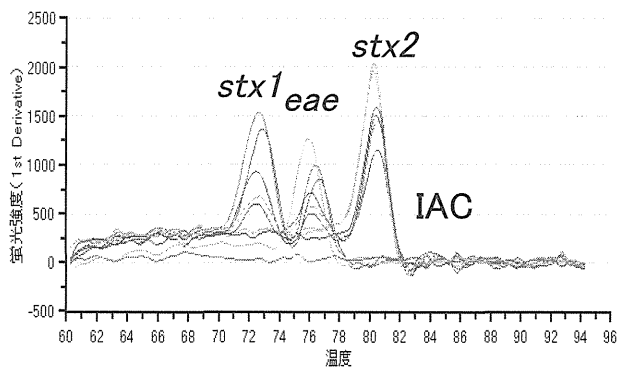
a-2: DE融解曲線



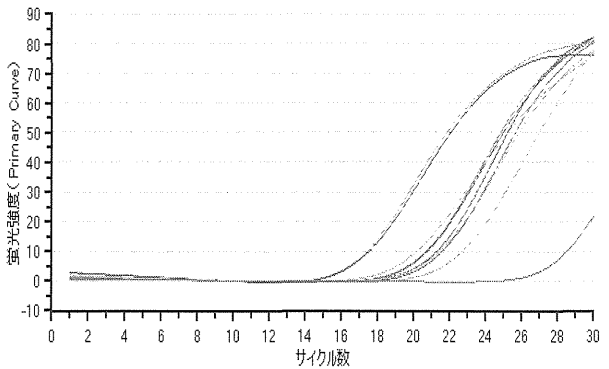
b-1: PSG増幅曲線



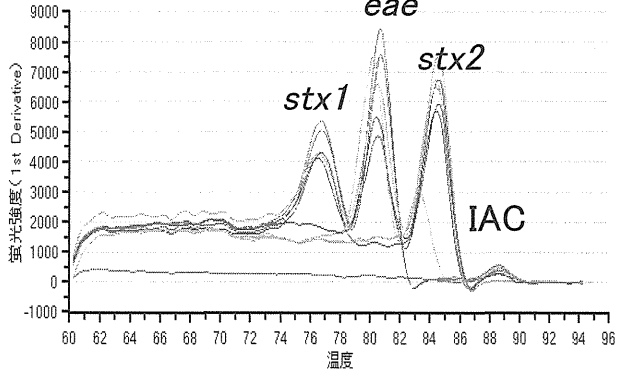
b-2: PSG融解曲線



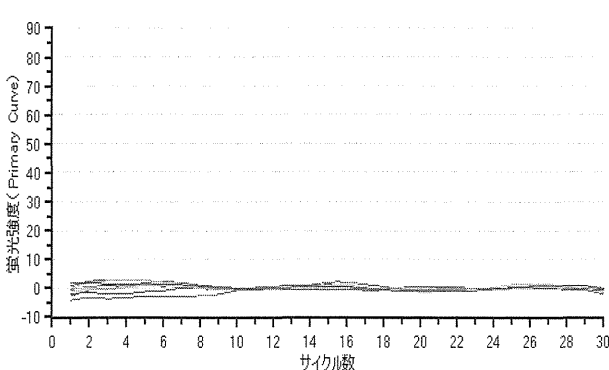
c-1: ADP増幅曲線



c-2: ADP融解曲線



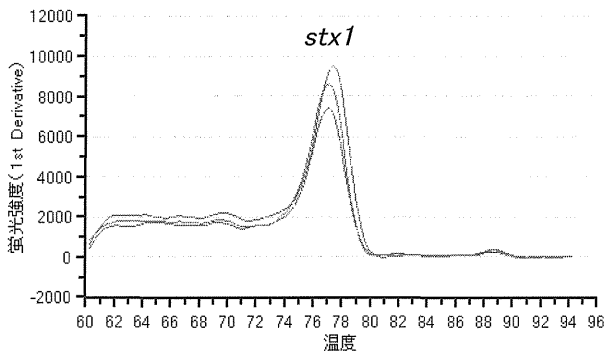
d-1: BDP融解曲線



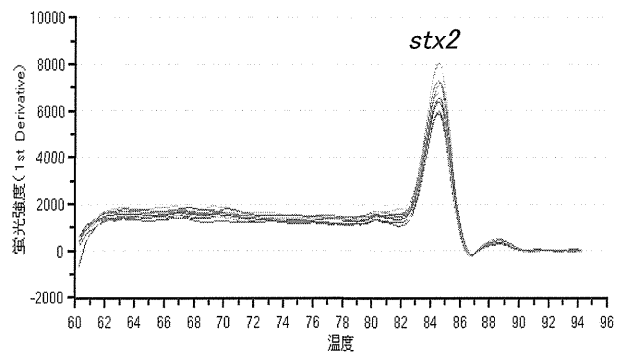
STEC 9株 (O119:HUT (*stx1*, *eeae*), O145:NM (*stx2*, *eeae*), O153:NM (*stx2f*, *eeae*), O157:NM (*stx1*, *stx2*, *eeae*), O168:HUT (*stx2*), OUT:H2 (*stx1*, *eeae*), OUT:NM (*stx2*), O157:H7 (*stx1*, *stx2c*, *eeae*), O128:H2 (*stx1*, *stx2d*)) のDNAを使用し, a)はDimer Eraser, b)はPower SYBR Green, c)はAmpdirect, d)はBYOTAQ DPを使用している. a-1, b-1, c-1, d-1は増幅曲線, a-2, b-2, c-2は融解曲線.

図7 マルチプレックス リアルタイムPCRによる各遺伝子型の融解曲線

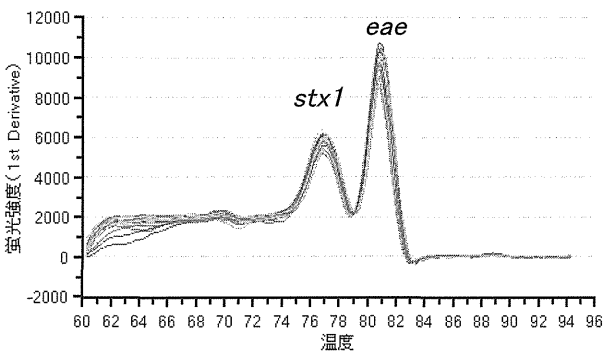
a) *stx1*保有株



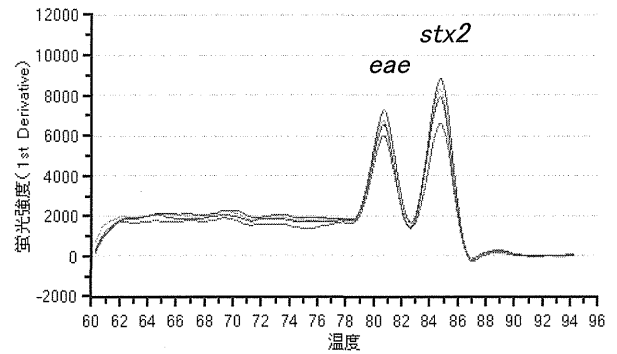
b) *stx2*保有株



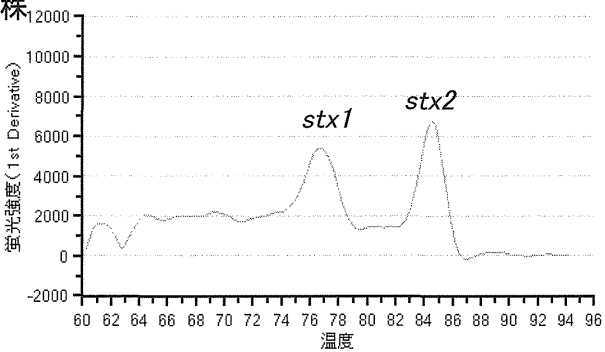
c) *stx1, eae*保有株



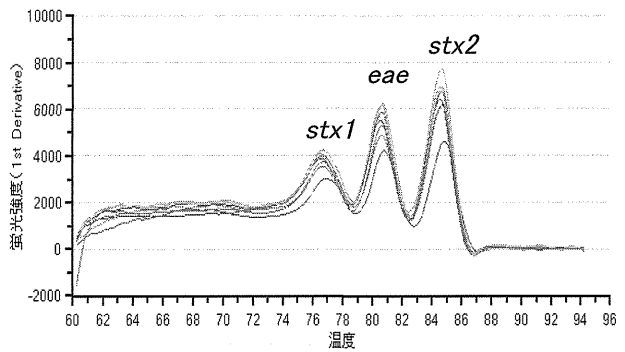
d) *stx2, eae*保有株



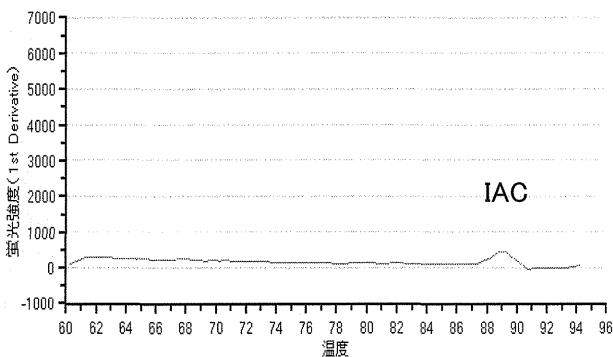
e) *stx1, stx2*保有株



f) *stx1, stx2, eae*保有株

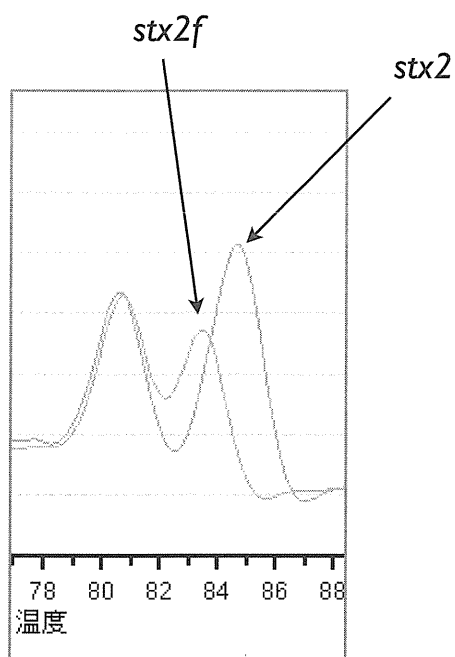


g) Negative



a)はO91:NM (2), O91:HUT (1), b)はO8:NM (1), O142:HUT (1), O28ac:NM (1), O8:H19 (2), O8:NM (1), OUT:HUT (1), OUT:NM (2), c)はO103:H2 (3), O111:H21 (1), O111:HUT (1), O111:NM (2), O157:H7(2), O157:NM (3), O26:H11 (6), O26:NM (2), OUT:H16 (1), d)はO121:H19 (1), O145:NM (1), O157:H7(2), e)はO128:H2 (1), f)はO111:HUT (1), O121:H19 (1), O157:H7 (5), g)はNegative Control. Negative control以外ではIACはほと

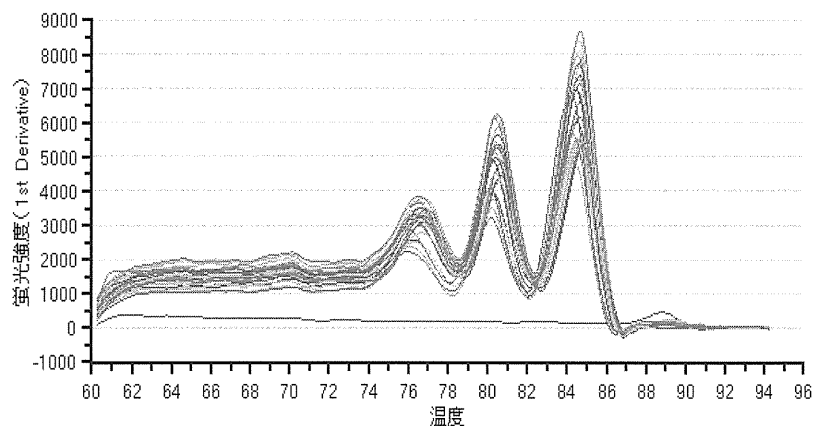
図8 stx2とstx2fの融解曲線の違い



stx2fはstx2よりもTm値が若干低くなった。

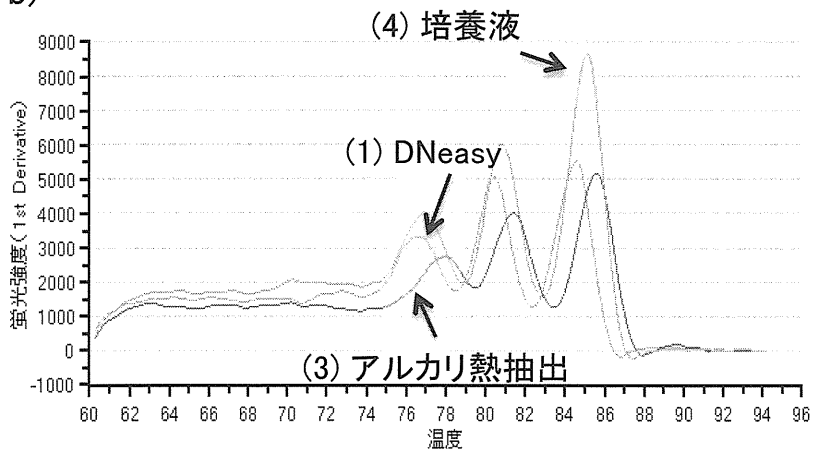
図9 DNA抽出法による融解曲線の違い

a)



a)は (1) DNeasy, (2) TE煮沸法, (5) 培養液のTEによる10倍希釈に対するマルチプレックスリアルタイムPCRの融解曲線。ほぼ一致している。

b)



b)は (1) DNeasy, (3) アルカリ熱抽出, (4) 培養液に対するマルチプレックスリアルタイムPCRの融解曲線。これらはTm値が若干異なり、一致しないことがある。

厚生労働科学研究費補助金(地域健康危機管理対策研究事業)研究報告書

地方衛生研究所における網羅的迅速検査法の確立と、その精度管理の実施、及び疫学機能の強化に関する研究

分担報告書(ウイルス部門)

主任研究者	調 恒明	山口県環境保健センター	所長
分担研究者	高橋和郎	大阪府立公衆衛生研究所	副所長
協力研究者	皆川洋子	愛知県衛生研究所	所長
	山下照夫	愛知県衛生研究所	ウイルス研究室長
	安達啓一	愛知県衛生研究所	主任
	千々和勝己	福岡県保健環境研究所	微生物部長
	世良暢之	福岡県保健環境研究所	ウイルス課長
	吉富秀亮	福岡県保健環境研究所	研究員
	村田祥子	山口県環境保健センター	専門研究員
	濱岡修二	山口県環境保健センター	専門研究員
	加瀬哲男	大阪府立公衆衛生研究所	ウイルス課長
	山崎謙治	大阪府立公衆衛生研究所	ウイルス課主任研究員
	倉田貴子	大阪府立公衆衛生研究所	ウイルス課研究員
	中田恵子	大阪府立公衆衛生研究所	ウイルス課研究員
	上林大起	大阪府立公衆衛生研究所	ウイルス課研究員

研究概要

研究目的: 地方衛生研究所が健康危機管理事例に対処するために必要な網羅的な迅速検査方法を確立し、検査機能の強化、充実を計ることを目的とする。本研究では各衛生研究所が呼吸器ウイルスおよびエンテロウイルス(EV)の迅速網羅的診断法の検出感度を評価し、さらに臨床検体を用いて性能評価を行い、衛生研究所が本検出法を適切に導入できる情報を提供することを目的とする。

研究方法: 研究協力4衛研において呼吸器感染症および中枢神経感染症患者検体に対して、作製した網羅的迅速マルチプレックスPCR診断法を用いて病原体の検出を行い、その検出率、検出状況等を検討する。

結果: 小児呼吸器感染症の235検体について、1種類以上の病原体が検出された陽性率は約60-80%、また、1,2種類のウイルスが検出された割合はそれぞれ80-100, 10-20%と既報と同等な値であった。髄膜炎の場合では、髄液、咽頭スワブ、便からの検出率はそれぞれ、約10-20, 20-25, 30-50%であった。これらは既報の検出率と比較すると遜色ないものと考えられる。中枢神経系感染症の20検体のEV検査において、4衛研での一致率は85%(17/20)であった。不一致例3例の原因は検出感度差と考えられた。各地衛研の呼吸器感染症の検体に対して他の3衛研がともに検出可能であった検体の一致率は愛知、山口、福岡、大阪の検体についてそれぞれ80, 60, 80, 70%(平均73%)であった。また、3衛研間におけるPCR法結果の完全一致率は愛知、山口、福岡、大阪検体では、それぞれ55, 45, 60, 55%(平均54%)であった。

考察: 各地衛研の呼吸器感染症検体に対しての3地衛研がともに検出可能であった一致率は73%と期待していたよりやや低い値であった。この解釈として、各地衛研での検出感度の差は上下10倍以内の範囲ではあるが、検体中に十分なウイルス遺伝子量が存在すれば検出は容易であるものの、比較的少量しか存在しない場合は、検出感度の差が検体からのウイルスの検出の可否に影響したことが考えられる。今後、本マルチプレックスPCR法を導入する場合、検出感度の確認と高度化は必要であると考えられる。

A. 研究目的

地方衛生研究所が健康危機管理事例に対処するために必要な網羅的な迅速検査方法、およびそれらや既存の核酸増幅法の精度管理法を確立し、検査機能の強化、充実を計ることを目的とする。本研究では迅速網羅的診断法(呼吸器ウイルスおよびEV)の検出感度を評価し、さらに4地衛研(山口環境保健センター(以下山口)、大阪府立公衆衛生研究所(以下大阪)、愛知県衛生研究所(以下愛知))、福岡県保健環境研究所(以下福岡))が臨床検体を用いて、本方法が同程度の精度で機能するか否かの性能評価を行う。

B. 研究方法

1. 網羅的 PCR 法の検出感度の再現性

研究協力者である4地衛研において、本研究班が確立した網羅的 PCR 法の検出感度の再現性を確認する。担当する網羅的 PCR 法: 呼吸器ウイルスマルチプレックス PCR-1, 2 は大阪、呼吸器ウイルスマルチプレックス PCR-3, 4は福岡、EVPCR 法は愛知が担当する。

2. 網羅的迅速マルチプレックス PCR 診断法の臨床検体への応用

研究協力4地衛研において呼吸器感染症および中枢神経感染症患者検体に対して、作製した網羅的迅速マルチプレックス PCR 診断法を用いて検査を行い、検出率等を検討する。

3. 同一臨床検体を用いた各地衛研での性能評価

- 1). 中枢神経感染症: 愛知が所有する20検体の抽出RNAを各地衛研へ配布後、本検出法で同定する。検出感度の差が認められることが想定され、低感度の場合、それを克服する方法を検討し実証を試みる。
- 2). 呼吸器感染症: 各4地衛研が呼吸器感染症の咽頭、鼻腔スワブ20検体から核酸を抽出し、各地衛研へ配布後本検出法で同定する。

C. 研究結果

1. 網羅的 PCR 法の検出感度の再現性の確認

4地衛研で行った各 PCR 法の検出感度の結果を表1-3に示す。

- 1) 福岡が作製した8種のウイルスを検出する

呼吸器マルチプレックス PCR 法の検出感度(表1)

大阪の結果では8種のうち3種では基準の検出感度よりもさらに50倍以上の高感度であった。山口では1種のウイルスでやや高感度であった。愛知では基準と同等の感度であった。

- 2) 大阪が作製した8種類のウイルスを検出する呼吸器マルチプレックス PCR 法の検出感度(表2) 他の3地衛研での実験結果ではほぼ同様の感度であった。

- 3) 愛知の EVPCR 法の検出感度(表3) 本方法では4種類のコントロールウイルスを用いた。福岡では2種のウイルスでやや高感度であった。山口、大阪では VP1 で不検出の場合が認められた。

結果を要約すると、検討した PCR 法の検出感度は、4地衛研で用いた PCR 試薬や増幅機器の違いにより多少異なっていた。特に不検出である場合も見られた。

2. 網羅的迅速マルチプレックス PCR 診断法の臨床検体への応用

1). 呼吸器感染症

福岡県保健環境研究所

対象(表4):

呼吸器感染症(気管支喘息を含む)と診断された小児85名(男49,女36、平均年齢3歳2か月) PCR 法による検出結果(表5):

1種類以上の病原体が検出された陽性率は64%(54/85)であり、1および2種類の病原微生物が検出された割合は、それぞれ91%(49/54)、9.3%(5/54)であった。検出頻度の高い微生物はライノウイルス、マイコプラズマ、RSウイルスであった。

愛知県衛生研究所

対象(表6):

呼吸器感染症と診断された小児48名(男29,女19、平均年齢3歳8か月)

PCR 法による検出結果(表6):

1種類の病原体が検出された陽性率は17%(8/48)であった。2種類以上のウイルスが検出された症例は認めなかった。検出頻度の高い微生物はヒトメタニューモウイルスであった。

山口県環境保健センター

対象(表7):

呼吸器感染症と診断された小児64名(男26,女38、平均年齢3歳8か月)

PCR 法による検出結果(表7, 8):

1種類以上の病原体が検出された陽性率は81%(52/64)であり、1および2, 3種類の病原

微生物が検出された割合は、それぞれ90%(47/52)、7.7%(4/52)、1.9%(1/52)であった。検出頻度の高い微生物は、単独検出の場合、ヒトメタニューモウイルス、マイコプラズマであり、2種類検出の場合はアデノウイルス(3/4)であった。3種類検出された1検体では、ライノウイルス、ヒトメタニューモウイルス、パラインフルエンザウイルス3が検出された。

大阪府立公衆衛生研究所

対象(表9):

RS ウイルス感染疑い呼吸器感染症と診断された小児38名(男26,女38、平均年齢3歳8か月)

PCR法による検出結果(表9):

1種類以上の病原体が検出された陽性率は84%(32/38)であり、1および2種類の病原微生物が検出された割合は、それぞれ81%(26/32)、19%(6/32)であった。検出頻度の高い微生物は、単独検出の場合、RS ウイルス、アデノウイルスであり、2種類検出の場合は全例RSウイルスが検出された。

2). 中枢神経感染症

(1)脳炎、脳症

対象(表10):

脳炎、脳症と臨床診断された患者総計26例(福岡3例、愛知17例、山口1例、大阪5例、山口を除き全例小児例)

PCR法による検出結果:

脳炎、脳症患者26例において、髄液16検体からEVが検出された例はなく、咽頭スワブ11検体中1検体からライノウイルスが検出された。便4検体は陰性であった。

(2)無菌性髄膜炎

対象(表11):

無菌性髄膜炎と臨床診断された患者総計69例(福岡8例、愛知34例、山口6例、大阪21例、全例小児例)

PCR法による検出結果:

髄液からの検出率は福岡13%(1/8、エコー7)、愛知14%(4/28、すべてCB4)、山口17%(1/6、CB1)、大阪50%(2/4、全てCB4)であった。咽頭スワブからの検出率は愛知25%(2/8、CA16、EV71)、大阪19%(4/21、CB4(2件)、E3、ライノウイルス)であった。便からの検出率は愛知58%(7/12、EV71(4件)、CB4、E6、E30)、大阪27%(3/11、CB1、CB4、E3)であった。各衛生研究所において、少なくとも1種類の検体で陽性となった率は、福岡13%(1/8)、愛知3

5%(12/34)、山口17%(1/6)、大阪29%(6/21)であった。

同一患者で2種類の検体から病原体が検出された症例では、検出された病原体は同一種であった。同様に3種類すべてから同一の病原体が検出された症例は認められなかった。

3). 研究過程において遭遇した本PCR法の問題点

1)PCR産物の電気泳動において、ヒトメタニューモウイルスのバンドと同じ位置にヒト由来遺伝子の増幅産物を認める症例があった。臨床検体によってはPCRでの非特異増幅反応が多い場合があり、特にnested PCRでよく見られた。

2)呼吸器病原体の半数はSingle PCRで行っているが、やや感度が低い場合がある。Single PCRで陰性であった6検体中4検体でnested PCRを行うとアデノウイルスを検出した。Single PCRのみで病原検索ができなかった場合はnestedで検索可能な場合がある。

3. 同一臨床検体を用いた各地衛研での性能評価

1). 中枢神経系感染症(表12)

20検体のEV検査において4地衛研での一致率は85%(17/20)であった。山口は完全一致、福岡は全てを検出し、さらに検体19では新たにCB2を検出した。福岡の予備的検出感度試験ではEVの検出感度が愛知より高かった。大阪の検出率は90%(18/20)であった。不一致例3例の原因は検出感度差によるものと推測された。

2). 呼吸器感染症

各地衛研の検体に対して他の3地衛研がともに検出可能であった検体の一致率は愛知、山口、福岡、大阪の検体についてそれぞれ80、60、80、70%(平均73%)であった。また、3地衛研間におけるPCR法結果の完全一致率は愛知、山口、福岡、大阪検体では、それぞれ55、45、60、55%(平均54%)であった。ウイルス別の4地衛研間での検出一致率は、一致率が100%であったものはパラインフルエンザウイルス、A型インフルエンザウイルス、ヒトメタニューモウイルス、80%以上のものはアデノウイルス、RSウイルス、コロナNL63、70%代はライノ、60%代はマイコプラズマウイルス、50%代はボカウイルス、B型インフルエンザウイルス、EVであり、10%代の低値のものはコロナC43であった。

D. 考察

網羅的迅速マルチプレックス PCR 診断法の臨床検体への応用

1. 呼吸器感染症

研究協力4地衛研において小児呼吸器感染症の検体、それぞれ約40-80検体について、1種類以上の病原体が検出された陽性率は約60-80%であった。一地衛研では陽性率は低値であった。その原因は不明であるが、可能性として対象患者の内容(外来、入院等、臨床症状の差異など)が異なることや、検出方法(機器、器具)の差異などが考えられる。

1および2種類の病原体が検出された割合は、それぞれ80-100、10-20%と既報と同等な値であった。大部分の検体から1種類の病原体が検出され、これらが起因微生物と考えられるが、今回は血清診断を行っておらず推測の域を出ない。2、3種類の微生物が検出された場合では、予想されたように持続潜伏感染するアデノウイルスが比較的高頻度で検出された。しかしどの微生物が起因しているのかは血清診断を必要とする。

呼吸器感染症の約10%がボカウイルスによるものであるとの報告が多いが、今回の200検体ほどの結果では検出されなかった。この原因としてPCR法の感度がまだ十分高くないことや、検体採取の時期の違い(ボカウイルスは冬季に多い)などによるものと考えられる。これを克服するためには、さらに症例数を増やし検討する必要があると考えられる。

2. 中枢神経感染症

(1) 脳炎、脳症

髄液16検体からEVが検出された例はなく、咽頭スワブ11検体中1検体からライノウイルスが検出された。脳炎、脳症の原因としてEVを含め種々の微生物があげられているが、今回は髄液の検体数も少なく検出されなかった。咽頭スワブ1検体からライノウイルスが検出されたが、本疾患への病原性の観点からは血清診断を行う必要があると考えられる。

(2) 無菌性髄膜炎

髄液、咽頭スワブ、便からの病原体検出率はそれぞれ、約10-20、20-25、30-50%であり、一部を除いて既報と同様な検出率であった。また、4地衛研全体で患者検体中少なくとも1種類の検体から病原体が検出された陽性率は29%(20/69)であった。既報の検出率と比較すると遜色ないものと考えられる。髄液から検出された病原体は原因病原体と診断可能であるが、咽頭ス

ワブ、便から検出されたものは確定的でない場合もあり、ペア血清による血清診断が必要である。しかし本PCR法を用いて病原診断へ繋がったことは重要な点である。

同一臨床検体を用いた各地衛研での性能評価

各地衛研の呼吸器感染症検体に対しての3地衛研がともに検出可能であった一致率は平均73%(60-80%)とやや低い値であった。この解釈として、各地衛研での検出感度の差は上下10倍以内の範囲ではあるが、検体中に十分なウイルス遺伝子量が存在すれば検出は容易であるものの、比較的少量しか存在しない場合は、検出感度の差が検体からのウイルスの検出の可否に影響したことが最も考えられる。各地衛研のそれぞれの衛研の検体における検出率は70-95%と高い検出率を示す衛研もみられた。今後、本マルチプレックスPCR法を導入する場合、検出感度の確認と高度化は必要であると考えられる。特に低検出率であったコロナC43、EV、B型インフルエンザ、ボカウイルスの検出感度は高く設定することが望ましい。

F. 研究発表

なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表1

福岡呼吸器マルチプレックスPCR2種の検出感度の結果要約

病原体名	PC濃度	希釈倍率			
		福岡(基準)	大阪	愛知	山口
Influ C	7.3713E+12	1E+10	1E+11	1E+11	1E+11
Corona OC43	4.1373E+12	1E+11	1E+10	1E+12	1E+12
Corona NL68	5.1002E+13	1E+10	1E+10	1E+11	1E+12
Rhino		256	10000	256	1024
Echo25		256	1000	512	256
Mycoplasma		2	100	16	16
Boca		2	100	8	16
Adeno		78125	100000	3.90E+05	1.60E+04
使用機種		ABI 2720	タカラDice	Minicycler	ABI 9700
		ABI Veriti			

使用キット

	1stRT-PCR	2nd PCR
福岡	Qiagen one-step RT-PCR kit	TAKARA ExTaq
大阪	Qiagen one-step RT-PCR kit	KODFX 東洋紡
愛知	Qiagen one-step RT-PCR kit	TAKARA ExTaq
山口	Qiagen one-step RT-PCR kit	TAKARA ExTaq

表2

大阪呼吸器マルチプレックスPCR2種の検出感度の結果要約

病原体	検出限界				
	大阪		福岡	山口	愛知
Parainfluenza 1	1.00E-03	TCID50/ul	2E-04	0.001	0.00233
Parainfluenza 2	1.00E-2~1.00E-3	TCID50/ul	2.33E-3.2	0.01	2.33E-2.2
Parainfluenza 3	1.00E-1~1.00E-2	TCID50/ul	2.33E-2.4	0.1	2.33E-1.4
Parainfluenza 4	1.00E-04	TCID50/ul	2.33E-4.7	0.001	2.33E-3.7
Influenza A	1.00E-2~1.00E-3	ffu/ul	0.049	0.01	0.0485
Influenza B	1.00E-2~1.00E-3	ffu/ul	0.005	0.01	0.00466
RSV	1.00E-3~1.00E-4	TCID50/ul	7E-05	1E-04	0.000746
Hu Metapneumo	10~100	copy/ul	450	1000	450
使用機種	タカラDice		ABI 2720	ABI9700	Minicycler
			ABI Veriti		
1stRT-PCR		2nd PCR			
Qiagen one-step RT-PCR kit		KODFX 東洋紡			

表3

愛知エンテロPCR2種の検出感度の結果要約

PCR法による検出限界(希釈倍率 10^x)

	愛知		大阪		山口		福岡	
	VP1	VP4-2	VP1	VP4-2	VP1	VP4-2	VP1	VP4-2
PV-1	-3	-4	-3	-5	不検出	-5	-4	-6
EV71	-2	-5	-3	-5	不検出	-4	-1	-4
CV-B5	-3	-4	-4	-4	不検出	-5	-4	-6
CV-A24	-2	-5	不検出*	-4	不検出	-4	-3	-6

使用キット	愛知のキット	愛知のキット	Qiagen one-step RT-PCR kit TAKARA ExTaq	愛知のキット
使用機器	* MiniCycler(BIO-RAD)	PERKIN ELMER CETUS	ABI 9700	ABI Veriti ASTEC

*CA24についてはMinicycler,Diceの機器を用いても同様の結果であった。

表4

呼吸器感染症 (福岡衛研)

対象	サーベイランス	呼吸器感染症	全体
	咽頭炎、上気道炎、下気道炎のいずれかの症状を呈する患者	喘息または喘鳴症状を呈する小児	
患者数	30 (男20,女10)	55 (男29,女26)	85 (男49,女36)
平均年齢	2歳2か月 (0歳2か月～12歳0か月)	3歳8か月(0歳10か月～11歳0か月)	3歳2か月