

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500500

研究課題名(和文) マウス日和見感染症起因微生物4種を同時に検出する技術研究

研究課題名(英文) Development of a method for simultaneous detection of 4 opportunistic pathogen in mouse

研究代表者

花木 賢一 (Ken-Ichi, Hanaki)

岩手医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40376421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では免疫不全マウスを用いた実験を障害すると考えられる主要な日和見感染症起因微生物であり、感染マウスの糞便に排出される黄色ブドウ球菌、マウス肝炎ウイルス(MHV)、マウスノロウイルス(MNV)、肺パストツレラを単一の方法で同時に検出を可能にすることを目的として等温遺伝子増幅法(LAMP法)の開発を行った。

MHVとMNVに対しては62～90分の反応で検出する逆転写LAMP法をそれぞれ完成させた。また、黄色ブドウ球菌に対しては薬剤耐性能と消毒薬耐性能も同時に判別する3つのLAMP法を完成している。肺パストツレラを検出するLAMP法は特異プライマーの設計ができておらず、検討継続中である。

研究成果の概要(英文)：Opportunistic organisms, which rarely cause infections in immunocompetent mice, can cause infections in immunocompromised mice. Since opportunistic infection may alter research results using immunocompromised mice, health certificate showing the immunocompromised mouse colony is free from specific opportunistic pathogens is important for biomedical researchers.

The purpose of this study is development of simple and rapid diagnostic loop-mediated isothermal amplification (LAMP) methods for detecting 4 opportunistic pathogens: Staphylococcus aureus (Sa), mouse hepatitis virus (MHV), murine norovirus (MNV), and Pasteurella pneumotropica (Pp). Reverse transcription-LAMP methods for the detection of MHV and MNV have been developed and published in the Journal of Virological Methods. LAMP methods for the detection of antiseptic- and methicillin-resistant Sa had also been developed. However, LAMP method for the detection of Pp has been under construction.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学、実験動物学

キーワード：診断 検査 マウス 日和見感染症 等温遺伝子増幅法

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝子改変技術により作出された免疫疾患モデルを含む免疫不全マウスは、日和見感染症起因微生物によっても健康を害される。そのため、免疫系が正常な動物に比べて特定病原微生物の厳格な排除 (Specific Pathogen Free ; SPF) が必要になる。しかし、SPF 状態を確認する現行の検査は群 (部屋またはラック) 単位で行われており、特定病原微生物による実験動物の感染を発見できないことがある。そのことに起因する感染事故として、他施設から SPF が保証された遺伝子改変マウスを導入したが、そのマウスはマウス肝炎ウイルス (MHV) に感染しており、MHV の持ち込みと感染拡大を許してしまったという事例がある。このような感染事故は、SPF 保証がケージ (個体) 単位でなされていたら防止できた可能性が高い。

(2) ケージ単位で SPF 保証を実現する技術候補の一つとして、微量血清で複数の病原微生物の感染履歴を同時に調べることができるマイクロビーズ法があり、国内外で開発研究が行われている。しかし、マイクロビーズ法は抗体を産生できない免疫不全動物での微生物検査には適用できない。免疫不全動物では病原微生物感染の直接証明、即ち、病原微生物の遺伝子検査を行うのが適当と考えられる。問題として遺伝子検査で主流の Polymerase Chain Reaction (PCR) 法は反応条件が対象微生物 (または遺伝子) 毎に異なること、網羅的検索には多くの労力と機器設備が必要になることである。そのため、大規模な動物実験施設や専門の受託検査機関を除いて遺伝子検査は行われていない。

(3) 2003 年に栄研化学株式会社より発表された等温遺伝子増幅法 : Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法は、ヒートブロックやウォーターバスのような 60~65 の定温を維持できる安価な装置で実施でき、反応の所要時間は最適化できた場合で 60 分以内といった PCR 法に比べて優れた特長がある。また、研究代表者らは LAMP 法では遺伝子増幅に伴って  $Mg^{++}$  イオンが著しく減少することに着目し、 $Mg^{++}$  イオン濃度により色が変化する金属指示薬 Hydroxy Naphthol Blue を事前に反応液へ添加するのみで遺伝子増幅の有無を誰でも判定できる比色 LAMP 法を確立している (Goto et al., 2009. *BioTechniques* 46, 167-172)。従って、比色 LAMP 法を病原微生物の検査へ応用すると、分子生物学的知識と技能、高価な機器設備を必要とすることなく、遺伝子増幅法による高感度な検査を実施できると考えた。

## 2. 研究の目的

マウスの SPF 管理上重要とされる病原微生物のうち、日和見感染症を引き起こす 4 種の病原微生物 : 黄色ブドウ球菌、MHV (今

日世界中で蔓延しているのは弱毒株であり、免疫正常マウスが感染しても臨床症状を示さない。そこで、本研究では日和見感染症起因微生物に位置づけた。) マウスノロウイルス (MNV) 及び肺パスツレラに対して、LAMP プライマーを設計し、純培養されたそれぞれの対象微生物のゲノムを陽性対照、類縁あるいは宿主体内における増殖部位が同一の微生物のゲノムを陰性対照として特異性を確認する。検出感度は既報の PCR 法を基準として同等以上となることを目標とする。最後に、理化学研究所バイオリソースセンター (理研 BRC) に寄託、検疫中のマウスあるいは動物実験施設で飼育中のマウスの糞便より抽出した RNA または DNA を用い、4 種の病原微生物の検出感度と特異性を明らかにして実用性を評価する。

## 3. 研究の方法

### (1) MHV の検出

コロナウイルス属の RNA ウイルスである MHV (ゲノム長約 32Kb) は遺伝子変異が多く認められ、組織親和性と病原性の異なる多数の株が知られている。そこで、GenBank に全長の遺伝子配列が登録されている 8 株の MHV と MHV の近縁でありラットに病原性を示すがマウスには自然感染しないラットコロナウイルス (RCV) Parker 株の遺伝子配列を遺伝子解析ソフト Genetyx-Mac v16 (日本ジェネティックス) で比較して変異の少ない領域を特定した。その領域において、LAMP プライマーデザインソフト PrimerExplore v4 (富士通) でプライマーを設計し、その配列情報を基にさらに手動で特異性の確からしいプライマーを再設計した。LAMP プライマーの特異性評価は MHV : 17 株とラット唾液腺腺炎ウイルス (SDAV) を含む RCV : 6 株を陽性対照、ヒトコロナウイルス (HCV) OC43 株、ブタコロナウイルス (HEV, TGEV, PDEV) : 5 株、牛コロナウイルス (BCV) : 2 株を陰性対照として High Pure Viral RNA Kit (Roche) を用いて抽出したゲノム RNA を鋳型とする比色 Reverse Transcription (RT) -LAMP 反応 (62 90 分) により行った。検出感度比較は MHV-3 RNA の 10 倍希釈列を用い、MHV を検出する標準的な RT-PCR 法 (Homberger et al., 1991. *J. Clin. Microbiol.* 29, 2789-2793) と遺伝子検査法では最も高感度と考えられる nested RT-PCR 法 (Yamada et al., 1998. *Exp. Anim.* 47, 261-264) を対照として行った。実用性評価は理研 BRC で検疫中の 69 マウスケージより採集した糞便の精製水懸濁遠心上清より High Pure Viral RNA Kit を用いて抽出した RNA を被検体として実施した。

### (2) MNV の検出

MNV はカリシウイルス科ノロウイルス属の RNA ウイルス (ゲノム長約 7.4Kb) で、遺伝子配列の異なる多くの分離株が

GenBank に登録されている。そこで、はじめに GenBank に登録されている 72 株の全長あるいはほぼ全長の MNV 遺伝子配列を Genetyx-Mac v16 で比較し、良好に配列が保存されている領域を特定した。次に、その領域において PrimerExplore v4 で LAMP プライマーを設計し、その配列情報を基にさらに手動で特異性の確からしいプライマーを再設計した。LAMP プライマーの特異性評価は国際標準株 MNV-1 と国内分離株 MNV-S7 の 2 株から High Pure Viral RNA Kit を用いて抽出したゲノム RNA、ウイルスは入手できないがプライマー領域で配列の大きく異なる国内外分離株 8 株 [4, Berlin/04/06, KHU-1, MT30-2, NIH-2747, TW2006, TW2007, WU11] とイギリスの野生ネズミで検出された MNV 様ウイルス 1 株 [Apo960] の MNV-1.CW1 遺伝子 (GenBank ID: DQ285629) の nt 4801–5200 に対応する 400 塩基を含むプラスミド DNA を陽性対照、カリシウイルス科のネコカリシウイルス (FCV) から抽出したゲノム RNA を陰性対照とする比色 RT-LAMP 反応 (62–90 分) により行った。検出感度比較は MNV-1 RNA と MNV-S7 RNA の各 10 倍希釈列を用い、MNV を検出する TaqMan real-time RT-PCR 法 (Kitajima et al., 2010. J. Virol. Methods 169:269–273) を対照として行った。実用性評価は理研 BRC で検疫中の 120 マウススケージより採集した糞便の PBS 懸濁遠心上清より抽出した RNA を被検体とし、比較対照として TaqMan real-time RT-PCR 法に加えて nested RT-PCR 法 (Kitajima et al., 2009. Microbiol. Immunol. 53:531–534) を実施した。

### (3) 肺パストツレラの検出

グラム陰性短桿菌である肺パストツレラ (*Pasteurella pneumotropica*) は生物学的性状に差がある Jawetz 型と Heyl 型の 2 種類があり、両型を区別して検出する PCR 法 (Kodjo et al., 1999. Lab. Anim. Sci. 49:49–53) と TaqMan real-time PCR 法 (Dole et al., 2010. Comp. Med. 60:427–435) は 16S rRNA を標的遺伝子としている。そこで、LAMP プライマーは GenBank に登録された肺パストツレラの 16S rRNA (Jawetz 型 10 株と Heyl 型 13 株) と肺パストツレラと同じくパストツレラ科に属する *Pasteurella* 属、*Haemophilus* 属、及び *Actinobacillus* 属、合計 42 株の 16S rRNA の遺伝子配列を Genetyx-Mac v16 で比較し、肺パストツレラと他のパストツレラ科に属する菌株とを区別し、かつ、Jawetz 型と Heyl 型の識別を可能にするように LAMP プライマーを手動で設計した。LAMP プライマーの特異性評価は Kodjo らの開発した PCR 法で生物型が同定されている理研 BRC における分離株を含む 12 株の抽出ゲノム DNA を陽性対照、緑膿菌 PAO1 株と黄色ブドウ球菌 N315 株の抽出ゲノム

DNA を陰性対照とする比色 LAMP 反応 (63–60 分) により行った。検出感度の比較は Jawetz 型 (GenBank ID: GU809188) と Heyl 型 (GU809174) のそれぞれ nt201–600 を含むプラスミド DNA の 10 倍希釈列を用い、Dole らの開発した TaqMan real-time PCR 法を対照として行った。さらに、16S rRNA の LAMP プライマー領域で配列が極めて近似している、あるいはマウスから分離されているパストツレラ科に属する 7 菌株の Jawetz 型 (GU809188) の nt201–600 に対応する 400 塩基を含むプラスミド DNA [Bisgaard Taxon 17 strain CCUG17206 (AY362902), Bisgaard taxon 22 (AY172726), *Haemophilus* sp. HK445 (FJ685624), *Actinobacillus muris* strain NCTC12432 (AY362894), *Actinobacillus muris* strain 1065/11 (JX010704), *Actinobacillus capsulatus* strain CCUG12396 (AY362886), *Actinobacillus* sp. CCUG28030 (AF224302)] を用いて特異性の検討を行った。

### (4) 黄色ブドウ球菌の検出

グラム陽性球菌である黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) はヒトでは皮膚表面、毛孔、特に鼻腔内に存在する常在細菌である。マウスでは咬傷等により感染して皮膚炎や皮下膿瘍を形成することがある。研究代表者は国立国際医療研究センター研究所感染制御研究部との共同研究により、黄色ブドウ球菌と他の細菌を識別し (*femB*-LAMP)、薬剤耐性能 (*mecA*-LAMP) と消毒薬耐性能 (*qacA*-LAMP) の有無を判別できる 3 つの LAMP 法を確立して報告している (Hanaki et al., 2011. J. Microbiol. Methods 84:251–254)。そこで、*femB*-LAMP 法をマウスの黄色ブドウ球菌感染診断へ応用できることを確認するための実用性評価は、マウス糞便を 4 マウス飼育施設から 48 サンプル収集し、ZR Fecal DNA Kit (Zymo Research) により抽出した DNA を被検体とする比色 LAMP 反応 (63–60 分) により行った。

### (5) MNV の検出

MNV は細胞培養系と感染動物モデルの無いヒトノロウイルス研究の代用ウイルスとして、様々な分野で利用されている。その際、ウイルス RNA の定量は重要な評価指標の一つであり、いくつかの TaqMan real-time RT-PCR 法が開発されている。しかし、それらのほとんどは MNV-1 RNA の定量に特化し、高価な TaqMan プローブを必要とすることからも汎用性に乏しい。そこで、既知の MNV すべてのゲノム RNA の定量を可能にする real-time RT-PCR 法を安価に実施できるよう SYBR Green I real-time RT-PCR 法を開発を行った。プライマーは GenBank に登録された 101 株の MNV の ORF1–ORF2 junction の遺伝子配列を Genetyx-Mac v16

で比較して最も良く保存されている領域を特定し、PCR プライマーの必要要件 (Innis and Gelfand, 1990. Optimization of PCRs. In: PCR protocols. San Diego: Academic Press, Inc. pp. 3–12) を満たすプライマーを手動で設計した。合計 10 通りのプライマーの組合せより MNV-S7 RNA の 10 倍希釈列を鋳型として実験的に検出感度と特異性を最良とする組合せを選抜し、さらに解析に要する時間を最短とする反応条件を実験的に決定した。検出感度と定量性は 7 株の MNV プラスミド DNA [ 1.CW1, Apo960, Berlin/04/06, KHU-1, S7-PP3, TW2006, TW2007 ] を用いて評価した。実用性評価は理研 BRC で検疫中の 158 マウスゲージより採集した糞便の PBS 懸濁遠心上清より抽出した RNA を被検体とし、比較対照として Kitajima ( 2010 ) らの開発した TaqMan real-time RT-PCR 法を実施した。

#### 4. 研究成果

##### (1) MHV を検出する RT-LAMP 法

MHV の遺伝子配列はヌクレオキャプシド蛋白質をコードする open reading frame (ORF) 7 で保存されているため、RT-PCR 法の標的遺伝子として採用されている。しかし、LAMP プライマーの設計では ORF7 で 6 ヶ所のプライマー領域を設定できず、ウイルスゲノムの 5' 端において一組のプライマーを設計した。また、PrimerExplore v4 で設計されたプライマー領域では 3' 端側 5 塩基内にミスマッチがあり、このことは DNA 合成における特異性と複製効率にマイナスへ働く。そこで、3' 端側 5 塩基内にミスマッチが生じないよう複数のプライマー領域を手動再設計し、MHV-3 RNA の 10 倍希釈列を鋳型とする比色 RT-LAMP 反応で検出感度が最良なものを選抜した。特異性は 17 株の MHV と 6 株の RCV のゲノム RNA を鋳型としたものはすべて陽性、8 株のその他哺乳動物由来コロナウイルスのゲノム RNA を鋳型としたものはすべて陰性であることにより確認した。MHV-3 RNA の 10 倍希釈列を鋳型とする検出感度比較では、比色 RT-LAMP 法は RT-PCR 法に対して 3.2 倍高感度であったが、nested RT-PCR 法に対しては 31.6 倍感度が劣った。この nested RT-PCR 法に対して著しく検出感度が劣ることを補うために、同一サンプルについて RT-LAMP 法は N=2 で行う duplicate RT-LAMP 法を採用し、69 マウス糞便より抽出した RNA を用いた実用性評価を行った。その結果、duplicate RT-LAMP 法は nested RT-PCR 法に対して検出感度は 85.7%、特異性は 100% であった。Nested RT-PCR 法は操作が煩雑な上、検査結果を得るまでの所要時間が 5 時間近く要するのに対し、duplicate RT-LAMP 法は操作が簡便で所要時間が 90 分であることを考慮すると、動物実験施設で行う MHV の遺伝子検査法として十分な実用性と検出感度を備えた方法と

考える。

##### (2) MNV を検出する RT-LAMP 法

MNV の遺伝子配列は ORF1-ORF2 junction で高度に保存されていることが知られており、PrimerExplore v4 による LAMP プライマー設計はその領域で行った。しかし、MHV に対する LAMP プライマー設計同様にプライマー領域の 3' 端側 5 塩基内にミスマッチが存在した。そこで、3' 端側 5 塩基内にミスマッチが生じないよう複数のプライマー領域を手動再設計し、MNV-S7 RNA の 10 倍希釈列を鋳型とする比色 RT-LAMP 反応で検出感度が最良なものを選抜した。特異性は *in silico* 解析に加えて MNV 株の遺伝子配列を含む 9 種のプラスミド DNA 間ではほぼ同等の検出感度で陽性を示すこと、FCV RNA と MNV に感染していないことが明らかなマウス糞便由来 RNA を鋳型とする場合に陰性となることにより確認した。MNV-1 RNA と MNV-S7 RNA を鋳型とする検出感度比較では、RT-LAMP 法は TaqMan real-time RT-PCR 法に比べて 50 倍低感度であった。しかし、120 マウス糞便より抽出した RNA を用いた実用性評価では、RT-LAMP 法は TaqMan real-time RT-PCR 法に対して検出感度は 96.4%、特異性は 100% であった。また、nested RT-PCR 法に対しても検出感度は 94.7%、特異性は 100% であった。MHV の場合と異なり従来法との検出感度の差が小さいことについて、MNV は免疫正常マウスでも持続感染が成立することから、糞便中に RT-LAMP 法でも検出可能な水準での MNV が排泄された結果、他 2 法とほぼ同等の検出感度を示したものと考えられる。

##### (3) 肺パスツレラを検出する LAMP 法

肺パスツレラの Jawetz 型と Heyl 型の特異的 16S rRNA 遺伝子配列は、Dole ら ( 2010 ) のシーケンス解析結果よりわずか 23 塩基の領域にあることが判っており、FIP プライマーにその一部を含むように設計した。また、FIP プライマーのみにより他のパスツレラ科 *Pasteurella* 属、*Haemophilus* 属、及び *Actinobacillus* 属とも区別できると考えた。理研 BRC 分離株を含む肺パスツレラ 12 株の Jawetz 型と Heyl 型の識別は、比色 LAMP 反応で Dole ら ( 2010 ) の開発した TaqMan real-time PCR 法の結果と完全に一致した。また、緑膿菌 PAO1 株または黄色ブドウ球菌 N315 株の抽出ゲノム DNA を含む比色 LAMP 反応は何れも陰性であった。しかし、Jawetz 型と Heyl 型のそれぞれ 16S rRNA 配列の 400 塩基を含むプラスミド DNA の 10 倍希釈列を用いた検出感度比較では、比色 LAMP 法の検出感度は TaqMan real-time PCR 法の 1/1000 に過ぎなかった。さらに、肺パスツレラ以外のパスツレラ科に属する菌株の 16S rRNA 遺伝子配列を含むプラスミド DNA の中には、期待に反して比色 LAMP

反応陽性となるものがあった。

#### (4) 黄色ブドウ球菌を検出する LAMP 法

細胞壁ペプチドグリカンペンタグリシン架橋の形成に含まれ、メチシリン耐性に関わる因子 (*femB*) 遺伝子に対して LAMP プライマーを設計し、臨床分離株を含む 196 株の黄色ブドウ球菌、6 株の表皮ブドウ球菌 (*S. epidermidis*)、4 株のコアグラネゼ陰性ブドウ球菌 (coagulase-negative staphylococci)、27 種の非ブドウ球菌属細菌よりポイル法により抽出したゲノム DNA を用いて 100% の特異性を示すことを明らかにしている (Hanaki et al., 2011. J. Microbiol. Methods 84:251–254)。この *femB*-LAMP 法による 4 マウス飼育施設のケージからランダムに採取したマウス糞便からの黄色ブドウ球菌の検出では、13/48 ケージで比色 LAMP 反応陽性であった。また、免疫不全マウスのみを飼育している飼育施設由来糞便は 100% 比色 LAMP 反応陰性 (0/24) であった。実験動物繁殖業者が黄色ブドウ球菌を SPF 対象としているのは免疫不全マウスに限定しており、免疫正常 SPF マウスの中には飼育施設導入前から黄色ブドウ球菌に感染していることがある。そのことが本結果に反映されたと推察される。なお、同時に薬剤耐性を検査する *mecA*-LAMP 法と消毒薬耐性を検査する *qacA*-LAMP 法を実施したが、すべて比色 LAMP 反応陰性であり、薬剤耐性及び消毒薬耐性黄色ブドウ球菌の存在は何れも確認できなかった。

#### (5) MNV を検出する real-time RT-PCR 法

MNV の様々な分離株を検出するための既報の定量 RT-PCR 法は、RT と PCR を 2 段階に分けて行う Kitajima (2010) らの TaqMan real-time RT-PCR 法のみである。この 2 段階法では RT 反応にランダムプライマーを用いるため、RT 反応のみで 2 時間以上要し、操作も煩雑である。そこで、本研究では安価で簡便に実施できる one-step SYBR Green I real-time RT-PCR 法について検討した。検出感度と非特異反応の有無の検討において最良の結果が得られたプライマーセットは 18 と 17 塩基長というプライマーとしては短い鎖長であり、in silico 解析で増幅が疑われるマウスの遺伝子が 1 つ同定された。しかし、MNV 未感染マウス糞便由来 RNA を鋳型とする SYBR Green I real-time RT-PCR では非特異反応を認めなかった。定量性は 7 種の MNV プラスミド DNA を用いて、何れの場合も  $10^{-10}$ – $10^{-8}$  コピーで直線性を示した。また、7 種の MNV プラスミド DNA 間で定量性に著しい差異を認めなかった。一方、TaqMan real-time RT-PCR 法では Apo960 株のプラスミド DNA で他株に比べて 10 倍低い定量性を示した。158 マウス糞便より抽出した RNA を用いた実用性評価では、SYBR Green I real-time RT-PCR 法は陽

性が 91 に対し、TaqMan real-time RT-PCR 法は陽性が 88 であった。この結果は再実験でも再現された。SYBR Green I real-time RT-PCR 法は約 1 時間で反応から判定までを終えることができるため、現時点で最も実用的、高感度、かつ、安価な MNV RNA の定量 RT-PCR 法と考えられる。

#### (6) まとめ

本研究では日和見感染症を引き起こす病原微生物：黄色ブドウ球菌、MHV、MNV、及び肺パスツレラを同時に検出することを目的としてそれぞれの比色 LAMP 法の開発を行った。その結果、黄色ブドウ球菌についてはマウス糞便より抽出した DNA を被検体として、63–60 分で検出できる比色 LAMP 法を確立した。また、MHV と MNV についてはマウス糞便より抽出した RNA を被検体として、62–90 分という同一条件で検出できる比色 RT-LAMP 法をそれぞれ確立した。唯一、肺パスツレラに対しては特異的 LAMP プライマーの設計ができていない。しかし、研究代表者らは日和見感染症起因微生物の一つである緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) を検出する比色 LAMP 法を確立して発表しており (Goto et al., 2010. J. Microbiol. Methods 81:247–252) 反応条件は黄色ブドウ球菌を検出する比色 LAMP 法と同一である。従って、LAMP 法のみで肺パスツレラを除く日和見感染症起因微生物 4 種を検出することが可能である。そして、それぞれのゲノム調製は生理食塩水に糞便を溶解した遠心上清からウイルス RNA の抽出 (High Pure Viral RNA Kit) ペレットから細菌 DNA の抽出 (ZR Fecal DNA Kit) を行うことで、マウス個体レベル (糞便一個) で 4 種の病原微生物を同時、迅速、簡便、かつ高感度に検出することができる。この方法は免疫不全マウスを多数飼育している動物実験施設の日和見感染症起因微生物をモニタリングする上で画期的手法と言える。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 3 件)

Hanaki, K., Ike, F., Hatakeyama, R., Hirano, N. (2013) Reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification for the detection of rodent coronaviruses. J Virol Methods. 187:222–227.

DOI: 10.1016/j.jviromet.2012.10.008

Hanaki, K., Ike, F., Kajita, A., Yasuno, W., Yanagiba, M., Goto, M., Sakai, K., Ami, Y., Kyuwa, S. (2014) Detection of murine norovirus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. J Virol Methods. 204C:17–24.

DOI: 10.1016/j.jviromet.2014.03.025

Hanaki, K., Ike, F., Kajita, A., Yasuno, W., Yanagiba, M., Goto, M., Sakai, K., Ami, Y., Kyuwa, S. (2014) A Broadly Reactive One-Step SYBR Green I Real-Time RT-PCR Assay for Rapid Detection of Murine Norovirus. PLoS One. 9:e98108.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0098108

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

花木 賢一 (HANAKI, Ken-Ichi)  
岩手医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：40376421

### 〔学会発表〕(計6件)

花木賢一、池郁生 LAMP 法による黄色ブドウ球菌の薬剤耐性、消毒薬抵抗性の判別 第58回日本実験動物学会総会 平成23年5月25日 東京・タワーホール船堀

花木賢一、佐藤綾子、池郁生、平野紀夫 RT-LAMP 法によるマウス肝炎ウイルスの検出 第152回日本獣医学会学術集会 平成23年9月19日 大阪府立大学

佐藤綾子、松原和衛、谷口隆秀、本多英一、花木賢一 エンベロープを有する RNA ウイルスに対する免疫捕捉 RT-LAMP 法の検討 第152回日本獣医学会学術集会 平成23年9月19日 大阪府立大学

花木賢一、酒井宏治、池郁生、久和茂 RT-LAMP 法によるマウスノロウイルスの検出 第154回日本獣医学会学術集会 平成24年9月14日 岩手大学

花木賢一、池郁生 LAMP 法によりマウス糞便から4微生物を一括検出する方法の検討 第60回日本実験動物学会総会 平成25年5月15日 つくば国際会議場

花木賢一、池郁生、酒井宏治、網康至、久和茂 マウスノロウイルスを検出するリアルタイム RT-PCR 法の検討 第61回日本ウイルス学会学術集会 平成25年11月10日 神戸国際会議場

### 〔図書〕(計0件)

#### 〔産業財産権〕

##### ○出願状況(計1件)

名称：齧歯類コロナウイルスの検出方法

発明者：花木賢一

権利者：学校法人岩手医科大学

種類：特許

番号：特願 2011-184596

出願年月日：平成23年8月26日

国内外の別：国内

##### ○取得状況(計0件)

#### 〔その他〕

ホームページ等

[http://www7b.biglobe.ne.jp/~civs-imu/Center\\_for\\_In\\_vivo\\_Science/DLAM.html](http://www7b.biglobe.ne.jp/~civs-imu/Center_for_In_vivo_Science/DLAM.html)