







学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第705号	氏名	Catalino Santos Demetria
審査委員会委員	主査氏名	平松 知史	
	副査氏名	安部 隆三	
	副査氏名	小宮 亨介	
<p>論文題目 Evaluation of a real-time mobile PCR device (PCR 1100) for the detection of the rabies gene in field samples (リアルタイムモバイル PCR 装置 (PCR 1100) を用いた野外検体における狂犬病遺伝子の検出方法の評価)</p> <p>論文掲載雑誌名 Tropical Medicine and Health</p> <p>論文要旨 (背景) フィリピンでは年間 200 から 300 例の狂犬病による死亡者が発生し、世界でも有数の狂犬病まん延国である。狂犬病発症例の多くは遠隔地で報告されているが、同地域における犬の狂犬病ウイルスサーベイランスは十分ではない。そのために遠隔地でのサーベイランスを改善し、検査件数を増加させる必要がある。近年、携帯型の PCR 機器による様々な病原体の検出が行われるようになってきている。本研究において、LN34 プライマーと携帯型 PicoGene PCR1100 機器を用いて、狂犬病ウイルス遺伝子の検出系の確立を目的とし、検討を行った。 (方法) 検査試薬として LN34 プライマー/プローブ、KAPA3G Plant PCR キット、FastGene Scriptase II を用い、検査機器は、携帯型機器である PicoGene PCR1100、および比較対象として通常用いる real time PCR 機器を用いた。また検体は陽性コントロールとして合成 RNA を用いて検討を行った。さらに狂犬病ウイルス感染マウスの様々な組織検体や RADDL から得た感染あるいは非感染の犬などの動物検体を用いて研究を行った。 (結果) 合成 RNA である陽性コントロールを用いた今回の検査法における検出限界は、10 コピー/μl と通常の real time PCR 機器と同等であった。さらに検出時間も短時間で検出可能であった。狂犬病ウイルス感染マウスの検体を用いた検討では、brain、muzzle skin、salivary gland いずれの検体からも検出可能であった。また実際の犬や猫の検体を用いて、PicoGene PCR1100 と標準法である dFAT や通常の real time PCR 機器を用いた比較検討では、感度、特異度ともに 100% であり、Ct 値は通常の PCR 機器での結果と相関しており、PicoGene PCR1100 の方が、より低いコピー数でも検出可能であった。 (結論) 本研究で、携帯型 PCR 機器を用いた狂犬病ウイルス検出系によって実際の検体から同ウイルスの RNA を検出可能であることを示した。遠隔地における狂犬病の拡散は犬によることが多いことから、迅速で、持ち運び可能、且つ高感度な PCR1100 と LN34 プライマーによる検出系により、遠隔地での狂犬病ウイルスの検出に有用な方法となる。</p> <p>本研究は、簡便かつ短時間で高感度で狂犬病ウイルス検出可能な検査法の検討であり、本検出系の有用性が示された。こうした検査法の確立は、フィリピン、特に遠隔地における犬などの動物の狂犬病ウイルス保有状況サーベイランスに有益であると考えられ、今後の本法によるサーベイランスの実施が期待される。このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験
の結果の要旨
~~学力の確認~~

審査区分 課・論	第705号	氏名	Catalino Santos Demetria
審査委員会委員	主査氏名	平松 和史	
	副査氏名	安部 隆三	
	副査氏名	小宮 幸作	
<p>学位申請者は本論文の公开发表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 本研究では実験においてはマウス、野外検体としてはイヌとネコを用いており、またディスクッションではコウモリについても言及していたが、動物の種によって病態、検査方法に違いがあるのか。 2. 特に現実には vector の 99% がイヌであるのに、今回の実験系ではマウスを用いていることで考えられる問題は何か。 3. 本研究で用いた PCR1100 という装置自体は、すでに開発済みで、他の疾患での有用性が示されているが、本研究において発表者が行った既報と異なる部分はどこか。 4. 本研究において、WHO が推奨している Ag-Path ID One-step RT-PCR を含む 3 つの方法が機能せず、KAPASG のみが機能した理由は何か。 5. 検体として用いた brain、muzzle skin、salivary gland は、人間から採取することは困難であるため、本研究で確立した方法は人間の診断には適さないということか。人間の診断に用いるために考えられる方法はないか。 6. 実験室外で実際にこの方法で検査を行うためには、どうすればよいか。 7. フィリピンにおける狂犬病対策は、現在どのようなことが行われているのか。 8. 狂犬病撲滅において効果的な方法は何か。ワクチンと疫学調査とどちらが重要か。 9. フィールドサンプルから得られる検体は、脳からのみか。 10. 実地で今回のデバイスを使用した際に、感度・特異度が低下した場合に考えるべきことは何か。 11. 狂犬病ウイルスが muzzle skin に多く検出される理由は何か。 12. 動物における狂犬病ウイルス感染の有無を検査する方法として、dFAT、DRIT、RT-PCR の 3 つの方法があるが、フィリピンにおいて最も多く用いられている検査法はどれか。 13. PCR1100 を用いて、RT-PCR を行う場合、検体から RNA を抽出する必要があるが、RNA を抽出する際に用いる機器は、どのようなものがあるか。 14. 狂犬病ウイルス感染マウスの各種臓器からの検出の検討で、brain、muzzle skin、salivary gland を用いて検討しているが、検出されたウイルス量が最も多かったのはどの臓器か。 15. Table2 や Fig. 3B において、PCR1100 による結果を陽性、陰性と表示しているが、その際に陽性と判定したカットオフ値は、いくらと設定しているのか。 16. フィリピンにおける狂犬病まん延防止に最も重要な対策は、何であると考えるか。 <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 Catalino Santos Demetria

論 文 題 目

..... Evaluation of a real-time mobile PCR device (PCR 1100) for the detection of the rabies gene in
..... field samples

..... (リアルタイムモバイル PCR 装置 (PCR 1100) を用いた野外検体における狂犬病遺伝子の
..... 検出方法の評価)

要 旨

..... Background: The Philippines is ranked among the top countries with 200–300 annual deaths
..... due to rabies. Most human rabies cases have been reported in remote areas, where dog
..... surveillance is inadequate. Therefore, a strategy to effectively improve surveillance in remote
..... areas will increase the number of detections. Detecting pathogens using portable real-time reverse
..... transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) has the potential to be accepted in these areas.
..... Thus, we aimed to develop an assay to detect the rabies virus (RABV) genome by combining the
..... robust primer system LN34 with the PicoGene PCR1100 portable rapid instrument targeting
..... RABV RNA (PCR1100 assay)

..... Methods: Procedures were optimised using an LN34 primer/probe set, KAPA3G Plant PCR Kit
..... (KAPA Biosystems), FastGene Scriptase II (NIPPON Genetics), and an artificial positive control
..... RNA

