

Dinh Tuan Duc 論文内容の要旨

主 論 文

AN UPDATED LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION METHOD FOR RAPID DIAGNOSIS OF H5N1 AVIAN INFLUENZA VIRUSES

(鳥インフルエンザ H5N1 ウイルスに対する LAMP 法を用いた診断法の開発)

Duc Tuan Dinh, Mai Thi Quynh Le, Cuong Duc Vuong, Hutoshi Hasebe
and Kouichi Morita

(Tropical Medicine and Health, 2011 年掲載予定)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻
(主任指導教員：森田 公一 教授)

【緒 言】

1997 年に香港で初めて確認された高病原性鳥インフルエンザ A ウイルス (H5N1) のヒト感染はその後アジア、アフリカの開発途上国に拡大し、その対策は世界の保健衛生上の重要課題となっている。現在、感染経路は鳥からの直接感染による段階と考えられており、世界保健機関 (WHO) では感染者を早期に発見して感染拡大を封じ込める early containment を重要な対応戦略と位置付けている。この戦略はウイルスが変化してヒト-ヒト感染によって伝搬するようになるパンデミックを防ぐために重要である。このため、ヒト感染が多数発生している開発途上国の第一線病院でも利用可能な迅速診断法の開発、改良が重要であり、種々の手法による診断法の開発が提案されている。今回、我々は H5N1 ウイルスのヒト感染が多数発生しているベトナムにおいて、同国の限られたリソース環境でも早期封じ込め戦略に利用可能な手法として Loop-Mediated Isothermal Amplification Method (LAMP) 法を応用しベトナムで流行しているインフルエンザ A (H5N1) ウイルスを特異的に、かつ高感度に検出できる手法の開発を目的としてこの研究を実施した。

【対象と方法】

GeneBankに登録されているインフルエンザAウイルス(H5N1)の塩基配列データ、および我々がベトナムで分離した H5N1 ウイルスのHA遺伝子部分の配列アラインメントを作成し配列が保存された領域を複数選出し、これを標的として1セット6本のプライマーからなるLAMP反応用のプライマーを栄研化学社から提供されたプログラムを用いて設計した。検体RNAの逆転写(RT)と遺伝子増幅(LAMP)を1本の試験管で反応させるRT-LAMP検出系を構築した。この系を用いて2004年から2007年までにベトナムで分離した H5N1ウイルス株について、感度・特異性の検討をおこないその結果に基づいてプライマーを最適化した。さらにベトナム国立衛生疫学研究所(長崎大学ベトナム研究拠点)に保存されている鳥インフルエンザ感染疑いのヒト臨床検体(2007年、2008年)を用いて診断系の評価を行った。対照としてWHO推奨のRT-PCR法および他の機関から発表されたLAMPシステムを用いた結果と比較した。

【結 果】

- 1) 構築したRT-LAMP法では1PFU相当の H5N1 ウイルス遺伝子を20分以内で検出することができた。
- 2) 今回構築したRT-LAMP法ではインフルエンザH1やH3型、他の呼吸器系ウイルスとは反応することはなく高い検出特異性を示した。
- 3) WHOのRT-PCRや他のLAMP法との比較においては、本法は前者とは同等(7株)あるいは低い検出感度(2株)を示したが、後者とは同等(5株)あるいは高い(4株)感度を示した。
- 4) 患者材料を使つての検出比較においてはWHOのRT-PCR法との一致率は100%であり偽陽性はゼロであった。

【考 察】

今回、構築した系は現在データベースに登録されている H5N1 ウイルスをできるだけ幅広く検出できるようプライマーを設計し、ベトナムの患者検体から特異的に高い感度と特異性でウイルス遺伝子を検出した。しかし、インフルエンザウイルス遺伝子には高頻度に遺伝子変異が発生することが知られている。今回の研究でもウイルス検出感度はウイルス株間で大きく異なる場合があり、本手法を実際に利用する場合には、流行地域におけるヒトおよび鳥において日常的にウイルスサーベイランスを実施し、ウイルスの変異を適時把握しシステムの有効性を検証することが重要であると考えられる。この観点からもWHO推奨の検出系だけでなく、LAMP法を含む複数のバックアップ検出系を保有することは有意義である。

本手法では蛍光色素発色試薬を組み合わせることによって特殊な機器を用いることなく肉眼で陽性確認が可能であることから、ベトナムのような開発途上国の地方病院、保健施設においても利用することが可能であり、本手法はWHOが推進する早期封じ込め戦略に寄与することが期待される。