

Thai Hong Thi Cam 論文内容の要旨

主 論 文

Development and Evaluation of a Novel Loop-Mediated Isothermal
Amplification Method for Rapid Detection of Severe Acute
Respiratory Syndrome Coronavirus

LAMP 法を用いた SARS-CoV の迅速検出系の開発とその評価

Hong Thi Cam Thai, Mai Quynh Le, Cuong Duc Vuong, Manmohan Parida, Harumi Minekawa,
Tsugunori Notomi, Futoshi Hasebe, and Kouichi Morita

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY

42 巻 5 号 1956-1961 2004 年

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)

【緒 言】

重症急性呼吸器症候群 (SARS) は発熱や空咳、呼吸困難、頭痛、低酸素血症などの症状をともない重篤な肺炎をおこす新興感染症である。ウイルスは咳やくしゃみの飛沫で伝播されと考えられているが、糞便・尿汚染といった他の感染ルートも否定はできない。現在、SARS ウイルスに有効な抗ウイルス剤やワクチンはないので、SARS-CoV 感染の迅速な実験室診断が患者管理や院内感染防止に重要である。従って、迅速で特異性の高い SARS-CoV の診断系の開発は将来起こりうる SARS の流行を予測・防止するための監視機構を構築するうえで不可欠である。この研究はわが国で近年開発された核酸増幅診断法である LAMP 法を応用した SARS ウイルス遺伝子の迅速検出系 (ワンステップ・シングル・チューブ・リアルタイム定量 RT-LAMP 法) を創出しその感度や特異性について、実際にベトナムで発生した SARS の流行時に患者から採取された臨床検体を用いて検証することを目的に実施した。

【対象と方法】

臨床材料は 2003 年、ベトナムで SARS 流行時に臨床的に SARS だと疑われハノイ・フレンチ病院やニンビン病院に入院していた 45 人の患者から計 49 の材料を採取した (咽頭洗浄液 15 検体、咽頭ぬぐい液 13 検体、洗浄液とぬぐい液の混合したもの 21 検体)。使用した SARS ウイルスは患者の咽頭洗浄液から Vero-E6 細胞をもちいて分離した。ウイルス感染価はプラーク法を用いて測定した。LAMP プライマーの設計はデザインング・サポート・ソフトウェア・プログラム (富士通) を用いて行い、標的配列上の異なる領域を 8 つ認識する、外側のプライマー 2 つと内側のプライマー 2 つ、ループ・プライマー 2 つで構成された 6 つのプライマー 1 組を設計した。患者

検体またはウイルス感染培養液 140 μ l から QIAamp viral RNA mini kit を用いて RNA を抽出し Loopamp DNA amplification kit (栄研化学社) と上記のプライマーを混合して Loopamp リアルタイム濁度測定装置 (LA-200, Teramecs) にセットし 63℃ で 60 分間 (6 秒間隔) 400nm の吸光度を測定した。対象とした RT-PCR 法はドイツ・ハンブルク Benhard-Nocht 研究所が設計したプライマーを用いて実施した。

【結 果】

患者の咽頭洗浄液から SARS-CoV を分離した。このウイルス株をもちいて RT-LAMP 法を標準化した。即ち、反応の至的溫度、プライマー濃度、バッファー塩濃度などの核酸増幅の最適条件を設定した。また増幅された生成物はシーケンスや電気泳動により標的遺伝子であることを確認した。この結果、今回開発した SARS RT-LAMP の感度 (検出限界) は 0.01 PFU であり、対象とした RT-PCR は 1 PFU であった。また、臨床材料から抽出した RNA を用いて RT-LAMP と RT-PCR 法とを比較した。その結果、2 つの検査システム間で 88%(52/59) の一致を見た。RT-PCR 法では 49 個のサンプル中 6 検体が陽性で 43 検体が陰性であったが、RT-LAMP 法では RT-PCR で陰性だとされた検体のうち 7 検体から SARS-CoV 遺伝子を検出することが出来た。RT-LAMP 法と RT-PCR の比較による RT-LAMP 法の感度・特異性はそれぞれ 100% と 87% だった。15 個の咽頭洗浄液サンプルからの検出率でみると、RT-LAMP 法では 67%(10/15) が陽性で、RT-PCR では 27% が陽性であった。またどちらのシステムでも咽頭ぬぐい液からは陽性は 1 つも検出されなかった。健常人の咽頭洗浄液 10 検体からも陽性は検出されなかった。

【考 察】

今回開発した RT-LAMP 法による SARS 遺伝子の検出系の検出限界は対象とした RT-PCR よりも 100 倍敏感であった。また、ベトナムで SARS 流行中に採取された臨床検体を解析した結果からは、この RT-LAMP 法を用いれば、咽頭洗浄液から感染初期段階で SARS-CoV を検出することが可能であることが明らかとなり、本手法は迅速な SARS-CoV 診断法として有用であることが示された。検査に用いる臨床検体としては咽頭ぬぐい液よりも咽頭洗浄液の方がウイルス検出効率が低いことが示された。また本法は高額な機器を使用することなくリアルタイムの高感度検出操作が可能であるばかりでなく、熟練した人材を必要としないため、ベッドサイドでの臨床診断や開発途上国での応用も可能であると期待される。