

時にインフルエンザウイルスの型・亜型を迅速に同定できることを臨床現場においても確認できた。今後、本検査の普及によりインフルエンザ感染症の早期発見が可能となり、感染予防と治療に有用となるものと考えられる。

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 生田陽二, 甘利昭一郎, 小田新, 石川涼子, 滝有希子, 内山健太郎, 吉田知広, 大場邦弘, 野田絵理, 河野寿夫: 2009/2010年シーズンパンデミックインフルエンザA(H1N1)2009肺炎25症例の検討. 小児科臨床 64: 2349-2354, 2011
- 2) 大場邦弘, 小林匠, 甘利昭一郎, 生田陽二, 石川涼子, 滝有希子, 内山健太郎, 吉田知広, 野田絵理, 河野寿夫, 松井清彦, 高山郁代, 中内美名, 影山努: Reverse transcription-Loop-mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP)法を用いたA型およびH1 pdm 2009インフルエンザウイルス検出キットの臨床的有用性の検討. 小児科臨床 65: 275-279, 2012

2. 学会発表 なし

表1 2011/2012シーズンのインフルエンザ同定検査結果

抗ウイルス薬投与前				抗ウイルス薬投与後			
		イムノクロマト法				イムノクロマト法	
		A型	陽性 陰性			A型	陽性 陰性
Direct RT-LAMP法	陽性	20	2	Direct RT-LAMP法	陽性	10	1
	陰性	0	8		陰性	0	8
		リアルタイムRT-PCR法				リアルタイムRT-PCR法	
		A型	陽性 陰性			A型	陽性 陰性
Direct RT-LAMP法	陽性	22	0	Direct RT-LAMP法	陽性	11	0
	陰性	0	8		陰性	0	8
		リアルタイムRT-PCR法				リアルタイムRT-PCR法	
		H3	陽性 陰性			H3	陽性 陰性
Direct RT-LAMP法	陽性	22	0	Direct RT-LAMP法	陽性	9	0
	陰性	0	8		陰性	2	8
		イムノクロマト法				イムノクロマト法	
		B型	陽性 陰性			B型	陽性 陰性
Direct RT-LAMP法	陽性	2	0	Direct RT-LAMP法	陽性	3	0
	陰性	1	8		陰性	0	8
		リアルタイムRT-PCR法				リアルタイムRT-PCR法	
		B型	陽性 陰性			B型	陽性 陰性
Direct RT-LAMP法	陽性	2	0	Direct RT-LAMP法	陽性	3	0
	陰性	0	8		陰性	0	8

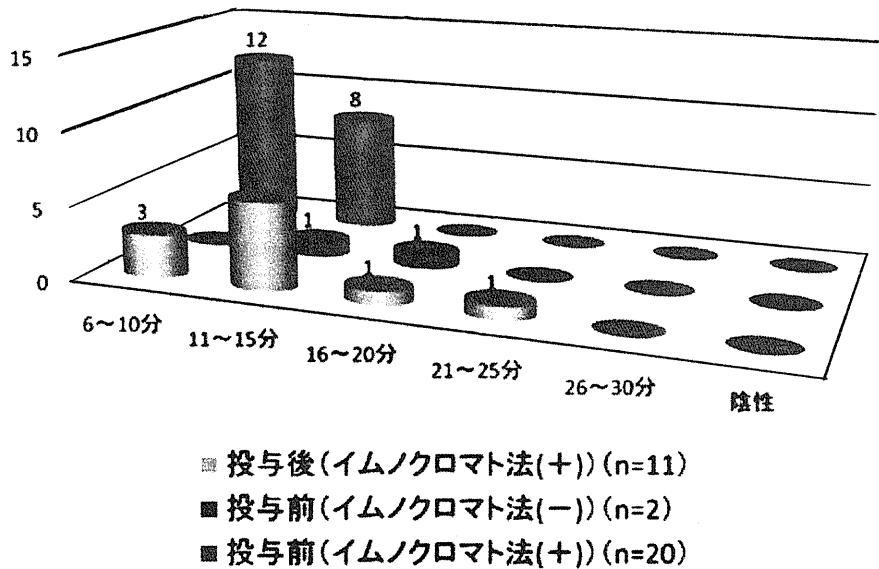


図1 抗ウイルス薬投与前後でのDirect RT-LAMP typeA 陽性判定時間 (ソニー株式会社製)

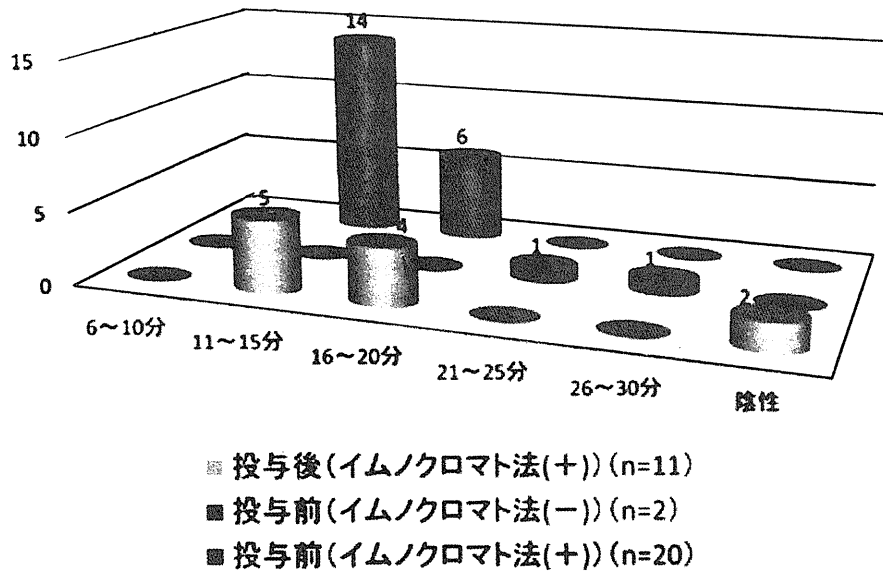


図2 抗ウイルス薬投与前後のDirect rRT-LAMP H3 陽性判定時間 (ソニー株式会社製)

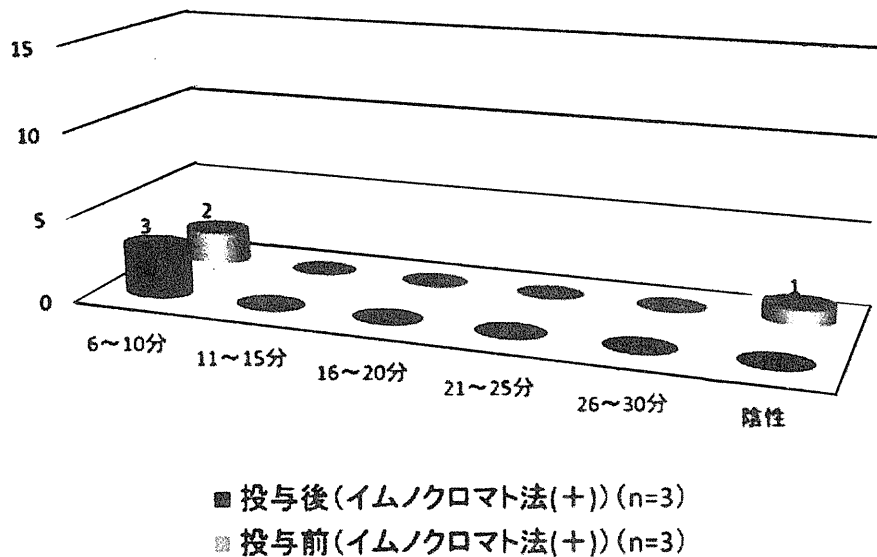


図3 抗ウイルス薬投与前後のDirect rRT-LAMP typeB 陽性判定時間 (ソニー株式会社製)

RSV 核酸検出系の検討

研究分担者 松井清彦（国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター）

研究要旨

本邦におけるインフルエンザウイルスの流行時期は毎年 11 月から 3 月までの冬期であるが、同時期に小児や乳幼児に重篤な呼吸器症状を惹起することもある respiratory syncytial virus (RSV) の流行も見られる。インフルエンザウイルスおよび RSV はいずれも呼吸器症状を呈することから、臨床症状から両ウイルスの診断を区別することは困難であると思われる。これらのウイルスの診断を迅速かつ簡便に行うことができる方法として、loop-mediate isothermal amplification (LAMP) 法や reverse transcription loop-mediate isothermal amplification (RT-LAMP) 法が開発された。いずれの方法も簡便な操作で検体中のウイルスの核酸を増幅することができ、反応時間も 30 分程度で検査結果を得る事が可能である。そこで、高感度でウイルス RNA を検出することができる RT-PCR 法と LAMP 法を用いて RSV ウイルスの RNA を検出感度の比較を行い、LAMP 法の有用性の検討を行った。

A. 研究目的

呼吸器感染症の原因となるウイルスには、インフルエンザウイルスをはじめとして RSV、パラインフルエンザウイルス、コロナウイルス、ライノウイルス、ヒトメタニューモウイルスやアデノウイルスなど多くのウイルスが関与している。これらの病原ウイルスを検出する方法として、患者検体から直接ウイルスを分離培養することが望ましいがウイルス分離には時間がかかるうえ必ずウイルスが分離されとは限らない。分離培養のほか、ウイルスの検出には蛍光抗体を用いてウイルス抗原を検出する方法やイムノクロマト法の原理を応用した迅速診断キットがあるが高感度に検出することはできない。感度良くウイルスを検出する方法としては、患者検体からウイルス核酸を増幅して検出する Polymerase Chain

Reaction(PCR 法) や Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR 法)、さらに PCR 法を改良した real-time PCR 法や real-time RT-PCR 法などがあるが、これらの検査は高価な機器が必要であるばかりでなく検体から核酸を抽出するための煩雑な操作も必要である。また、核酸検出法は高感度のため、検査中のコンタミネーションが問題となるなど、臨床現場でのルーチン検査には不向きである。簡便で迅速にウイルスの核酸を検出する方法として、loop-mediate isothermal amplification (LAMP) 法や reverse transcription loop-mediate isothermal amplification (RT-LAMP) 法が開発され、検体から核酸を抽出せずにウイルスの核酸を増幅することができるようになった。

LAMP法を用いて簡便で迅速にインフルエンザや他の呼吸器ウイルスの核酸を増幅することができる検査法が構築することができ臨床の場で用いることができれば、呼吸器ウイルスの診断に有用であると思われる。そこで、世界中に広く蔓延し流行を繰り返し、小児や乳幼児に重篤な症状を呈することもあり、さらに本邦では冬期にインフルエンザと流行が重複するためインフルエンザウイルスとの鑑別が重要であると思われるRSVについて、人工合成したRNAを用いてRT-PCR法とLAMP法で核酸検出の感度の比較を行い、LAMP法が有用であるか検討を行った。

B. 研究方法

人工合成遺伝子の構築

RSVのA型およびB型のM遺伝子の一部にRNA合成開始の認識配列であるT7プロモータを付加した人工合成遺伝子をpUC57ベクターに挿入したプラスミドを作製した(ベックス)。

RSV M 遺伝子 (DNA) の増幅

作製したプラスミドを鋳型として、T7プロモータを含んだRSVのM遺伝子特異的プライマーを用いてPCR反応を行った。反応後、PCR産物を1.2%のアガロースゲルにて電気泳動を行って目的のDNAバンドの切り出しを行いGel Extraction Kit(QIAGEN Cat.No28706)を用いてアガロースゲルよりDNAの抽出をキットの添付書に従って行ったが、ゲル成分を除去するために洗浄を添付書よりも1回多く行った。抽出した、DNAを再度1.2%のアガロースゲルにて電気泳動を行い、バンドの確認を行った。電気泳動終了後、抽出DNAの濃度をNanoDrop(Thermo Fisher Scientific社)にて測定した。

RSV M 遺伝子 (RNA) の合成

RSV M 遺伝子のRNA合成は、T7 RiboMAX Express Large Scale RNA Production System (Promega Cat.No P1320)を用いて添付書に従って行った。RNA合成反応後、産物にDnaseを加え鋳型DNAを酵素処理してRNeasy Mini Kit(QIAGEN Cat.No74104)を用いてRNAのclean upを行った。このRNAを1.2%のアガロースゲルにて電気泳動を行いバンドの確認をした後、RNA濃度をNanoDrop(Thermo Fisher Scientific社)にて測定した。測定したRNAの濃度より、合成RNAのコピー数の算出を行いRT-PCR反応に用いた。

RT-PCR 反応

合成RNAを 10^8 から 10^{-2} コピー/ μ lに蒸留水(大塚製薬)にて希釈を行いRT-PCRの検体として用いた。RT-PCR反応は、QuantiTect Probe RT-PCR Kit(QIAGEN Cat.No20443)を用いた。プライマーとプローブの終濃度は、それぞれ 0.6μ Mおよび 0.1μ Mになるように調製を行った。プライマーは、Kuyperら(J.Clin Virol 2004;31(2):123-9)の報告にあるForward (5'-GGAAACATACGTGAACAAGCTTCA-3')、RSV A型特異的 Reverse (5'-CATCGTCTTTTCTAAGACATTGTATTGA-3') RSV B型特異的 Reverse (5'-TCATCATCTTTTCTAGAACATTGTACTGA-3')およびプローブは(5'-(FAM)TGTGTATGTGGAGCCTT(MGB)を用いた。RT-PCR反応は、LightCycler480(Roche Diagnostics)を用い、RT反応を 50°C 30min、で行った後、 94°C 15minにてDenatureを行いPCRサイクルは 94°C 15sec、 56°C 1min 15secで45サイクルにて行った。

RT-LAMP 法

RT-LAMP法によるRSVウイルスの検出には、Looamp A型インフルエンザウイルス検出試薬キット(栄研化学)を用い、試薬キットに添付のプライマーをRSVウイルス検出

用のプライマーに変更して用いた。RSV Type A の検出には、RSAM-F3; GGGGCAAATATGGAAACATACGT、RSAM-B3; GAAGGTCCATTGGGTGTG、RSAM-FIP (F1c + F2); AGGGTCATCGTCTTTTCTAAGACAttttTTCACGAAG GCTCCACAT、RSAM-BIP (B1c + B2); ATCACTTACAATATGGGTGCCcttttGTATGTTGACAT TAGCTAGTTCT、RSAM-Loop F; TTGTATTGAACAGCAGCTGTGT、RSAM-Loop B; ATGCCAGCAGATTTACTTATA を用いた。同様に RSV Type B の検出には、RSBM-F3; GGGCAAATATGGAAACATACG、RSBM-B3; CCTTTGGGCGTAGAGATC、RSBM-FIP (F1c + F2); GTTAGTGATGCAGGATCATCATCTTttttTGAACAAGC TTCACGAAGG、RSBM-BIP (B1c + B2); TATGGGTGCCTATGTTCCAGTttttGCTTCACTA GTATGTTGATGCT、RSBM-Loop F; GTACTGAACAGCTGCTGTGTAT、RSBM-Loop B; GCAGACTTGCTCATAAAGAAGCTTG を用いた。これらのプライマーを 100 μ M に調整後、1 検体あたり FIP; 0.4 μ l、BIP; 0.4 0.4 μ l、Loop F; 0.2 μ l、Loop B; 0.2 μ l、F3; 0.05 μ l、B3; 0.05 μ l、滅菌蒸留水; 3.7 μ l に混合した後、10 μ l のプライマー希釈液に加えて LAMP 法に用いた。プライマーと 10 倍希釈を行った検体 RNA の反応は、添付書に従い 15 μ l のプライマーに 10 μ l の検体 RNA を加え、65°C にて 35 分間反応させた。

(倫理面への配慮)

今回の研究には、臨床検体や実験動物を用いてないため倫理上は問題ないと思われる。

C. 研究結果

T7 プロモータによってプラスミドから合成した RNA を 10^8 から 10^{-2} コピー/ μ l に希釈した RSV ウイルスを RT-PCR 法にて検出を行ったところ、RSV Type A の各 RNA の希釈での Ct 値 (2 回の検査の平均) は 10^8 : 10.88、

10^7 : 14.34、 10^6 : 17.84、 10^5 : 21.24、 10^4 : 24.54、 10^3 : 27.40、 10^2 : 29.72、 10^1 : 31.04、 310^0 : 31.34、 10^{-1} : 31.65、 10^{-2} : 32.29 であった。同様に、RSV Type B の各 RNA の希釈での Ct 値 (2 回の検査の平均) は 10^8 : 10.63、 10^7 : 14.07、 10^6 : 17.89、 10^5 : 21.29、 10^4 : 25.83、 10^3 : 29.29、 10^2 : 31.80、 10^1 : 32.79、 310^0 : 33.26、 10^{-1} : 32.92、 10^{-2} : 33.50 であった。

一方、RT-PCR 法で用いた同じ検体の LAMP 法による RSV Type A および Type B の検出では、Type A では 10^2 コピー/ μ l の RNA を検出することができた。同様に Type B においても 10^2 コピー/ μ l の RNA を検出することができた。さらに、LAMP 法での検出限界を求めるために 10^2 および 10^1 コピー/ μ l に希釈した RNA の 4 検体を用いて LAMP を行ったところ、Type A では 4 検体とも 10^2 コピー/ μ l の RNA を検出したが 10^1 コピー/ μ l は検出することができなかった。Type B では、 10^2 コピー/ μ l の 1 検体のみ検出できたが 3 検体については、RNA を検出することはできなかった。そこで、 10^3 コピー/ μ l および 10^2 コピー/ μ l の RNA を用いて LAMP 法を行ったところ、 10^3 コピー/ μ l は 4 検体とも RNA を検出することができたが 10^2 コピー/ μ l では 2 検体からのみ RNA を検出した。

D. 考察

RSV ウイルスの M 遺伝子の一部を挿入した人工遺伝子のプラスミドより、RNA を合成し RT-PCR 法と LAMP 法による RSV ウイルスの核酸検出の感度を比較した。合成した RNA を 10^8 から 10^{-2} コピー/ μ l に調整した RNA を用いた RT-PCR の Ct 値では、RSV Type A および Type B は 10^{-2} コピー/ μ l まで検出することができた。Ct 値の比較では、RSV Type A は 10^8 から 10^1 コピー/ μ l、RSV Type B では 10^8 から 10^2 コピー/ μ l までは RNA の希釈に伴い Ct 値も高くなっていたが、低濃

度の RNA では稀釈が高くなっても Ct 値に変化は認められなかった。このことは、プラスミド DNA から RNA を合成した後に DNA 分解酵素によって鋳型 DNA を分解した時に完全に DNA を分解しきれずに DNA が残っていたためであると考えられる。Ct 値の変化から RT-PCR 法の検出感度は、RSV Type A は 10^1 コピー/ μ l、RSV Type B は 10^2 コピー/ μ l と推察された。RT-PCR 法と LAMP 法を比較すると、RSV Type A および RSV Type B ともに 10 倍程度 RT-PCR 法が感度よく RNA を検出することができた。

E. 結論

RT-PCR 法と LAMP 法による、RSV ウイルスの RNA の検出感度を比較したところ RT-PCR 法が LAMP 法に比べて 10 倍ほど高感度に検出することができた。今回の検討は、RSV ウイルスを構成するタンパク質の一つである M タンパク質の遺伝子の一部を人工合成した後、RNA を合成し検討を行った結果である。

操作を比較すると RT-PCR 法を行うには、RNA ウイルスや臨床検体からの RNA 抽出を行わなければならないので煩雑であるが、LAMP 法では RNA の抽出が不要であるため操作は RT-PCR に比べて簡便である。反応時間においても、RT-PCR 法は結果を得るまでに 3 時間ほどかかるが LAMP 法は 1 時間以内に結果を得ることができる。

感度を比較すると、RT-PCR 法の方が高感度に RSV ウイルスの RNA を検出することができるが操作性や反応時間の点では LAMP 法の方が簡便な操作で短時間のうちに検査結果を得ることができる。臨床現場では、簡便な操作で短い時間で検査結果が得られることが求められると思われるので LAMP 法は、臨床現場で有用であると思われる。

今後は、RSV ウイルス粒子から直接 RNA を抽出したものや RSV ウイルス感染と診断

された患者検体からの検体を用いて RT-PCR 法と LAMP 法を比較してさらに検討を加えていかなければならないと考える。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍 該当なし

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takayama I, Sato H, Watanabe A, Omi-Furutani M, Sugai A, Kanki K, Yoneda M, Kai C	The nucleocapsid protein of measles virus blocks host interferon response.	Virology	In press	In press	2012
Fukushi S, Nakauchi M, Mizutani T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S	Antigen-capture ELISA for the detection of Rift Valley fever virus nucleoprotein using new monoclonal antibodies.	Journal of Virological Methods.	In press	In press	2012
Nakauchi M, Ujike M, Obuchi M, Takashita E, Takayama I, Ejima M, Oba K, Konomi N, Odagiri T, Tashiro M, Kagiyama T	Rapid discrimination of oseltamivir-resistant 275Y and -susceptible 275H substitutions in the neuraminidase gene of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus by duplex one-step RT-PCR assay.	Journal of Medical Virology.	83	1121-1127	2011
大場邦弘, 小林匠, 甘利昭一郎, 生田陽二, 石川涼子, 滝有希子, 内山健太郎, 吉田知広, 野田絵理, 河野寿夫, 松井清彦, 高山郁代, 中内美名, 影山努	Reverse transcription-Loop-mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) 法を用いたA型およびH1 pdm 2009インフルエンザウイルス検出キットの臨床的有用性の検討	小児科臨床	65	275-279	2012

生田陽二, 甘利昭一郎, 小田新, 石川涼子, 滝有 希子, 内山健太郎, 吉田 知広, 大場邦弘, 野田絵 理, 河野寿夫	2009/2010年シーズンパンデミ ックインフルエンザA (H1N1) 2009肺炎25症例の検討	小児科臨床	64	2349-2354	2011
--	--	-------	----	-----------	------

