

LAMP 法を用いたインフルエンザウイルス A 型および B 型の高感度迅速診断法に関する研究

日大生産工 (院)

○坂井 俊哉

日大生産工

小森谷 友絵 神野 英毅

【緒言】

2009 年 3 月および 4 月にヒト、ブタ、トリの 3 種類のインフルエンザウイルス遺伝子が交雑された新型インフルエンザウイルスの発生がメキシコおよびアメリカにおいて確認された¹⁾。発生確認から次々とヒトからヒトへ感染し、わずか 2、3 週間でウイルスは約 30 におよぶ国々に広がり、WHO により世界的大流行（パンデミック）が宣言され、警戒レベルがフェーズ 6 に引き上げられた。2009 年 5 月、我が国においても成田空港検疫で新型インフルエンザの患者が検知され、関西地域を中心とした集団感染が明らかになった。現在、本ウイルスによる疾患は減少傾向にあるが、今後の対策の一つとして迅速かつ高感度な検査診断が求められている。

現在、POCT (Point of Care Testing)におけるインフルエンザウイルスの診断法として免疫クロマト法などの免疫診断法が主流であるが、感染早期の患者において偽陰性を示す場合があり、バックアップとして高感度な遺伝子学的測定法が重要である。しかし、実験室測定法として標準的な Real-time RT-PCR 法は設備や測定時間などの制約があり、POCT にて運用できる診断法には成り得ていない。そこで我々は、等温で反応が進行し、対象遺伝子を高速かつ高効率に増幅可能な Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)法に着目した。本研究では、今後も感染が予測されるインフルエンザウイルスを対象とし、LAMP 法を原理とする高感度かつ迅速的な遺伝子学的測定法の構築を目的とした。

【実験方法】

1. 使用ウイルス

検討した標準サンプルとして A/Singapore/63/04/H1N1、A/Victoria/3/75/H3N2 および B/Yamanashi/166/98 不活化ウイルス粒子 (Zeptomatrix, USA) および 2008 年冬から 2009 年冬にインフルエンザ様患者から採取した鼻孔ぬぐい液を用いた。

2. 使用プライマー

インフルエンザウイルスにおいて最も変異の起こりにくい NP 部位および M 部位をターゲットとし、Influenza virus resource より選定したウイルス株の塩基配列をアライメント解析し、塩基配列が共通している領域より A 型共通検出用プライマーおよび B 型共通検出用プライマーを作製した。また、2009 年にパンデミックを引き起こした新型インフルエンザウイルス特異的プライマーも作製した。

3. LAMP 反応

標準サンプルより抽出した RNA を 10^2 倍～ 10^4 倍に希釈し標準 RNA とした。それぞれの標準 RNA を鋳型とし、各プライマーを用いて LAMP 法にて測定を行い、ループプライマーの有無による反応の時間変化、他のインフルエンザウイルスとの交差反応の有無を検討した。測定は RNA Amplification Kit (栄研化学)および Loopamp リアルタイム濁度測定装置 RT-160C (栄研化学)を用い、65℃、波長 660 nm での 10 秒毎の濁度変化を測定した。

Study on High Sensitive and Rapid Diagnosis for Influenza Virus A and B by LAMP Method

Toshiya SAKAI, Tomoe KOMORIYA and Hideki KOHNO

4. 検体測定

Suwannakarn らを改編したプライマーを用いて One-step multiplex real-time RT-PCR を行い、型判定を行った。陽性を示した検体は、Inoue²⁾らによる全ゲノム増幅を用い、任意の部位の Sequence 解析を行った。また、同検体を用い、各型に反応するプライマーを用いて LAMP 法にて測定を行い比較した。

【結果および考察】

LAMP 反応

設計したインフルエンザウイルス B 型共通検出用プライマーを用いて LAMP 法にて測定した結果、 10^3 copy サンプルおよび 10^2 copy サンプルにおいて反応が確認できた(Fig. 1)。10 copy のサンプルには反応を示さなかったが、インフルエンザが発症した患者さんにおいては反応が行えると考えられる。一方、インフルエンザウイルス A 型共通検出用プライマーは反応時間が 1 時間を超えてしまっているためターゲット領域の長さや GC 含有率などさらなる検討が必要である。

検体測定

One-step multiplex real-time RT-PCR により 12 検体を測定した結果、6 検体がインフルエンザウイルス A 型陽性であることが確認できた(Fig. 2)。これら 6 検体を Sequence 解析した結果、全て陽性検体であることが確認でき、3 検体は 2009 年パンデミック型であることが確認できた。そこで、B 型共通検出用プライマーおよび新型特異的プライマーを用いて LAMP 反応を行った結果、B 型共通検出用プライマーでは交差反応を示さないことが確認できた。一方、新型特異的プライマーを用いた結果、Sequence 解析で新型と判定された検体にのみ反応を示した(Fig. 3)。これより両プライマーは目的のインフルエンザ遺伝子のみを検出できることが確認でき、One-step multiplex real-time RT-PCR より迅速に検出することが確認できた。

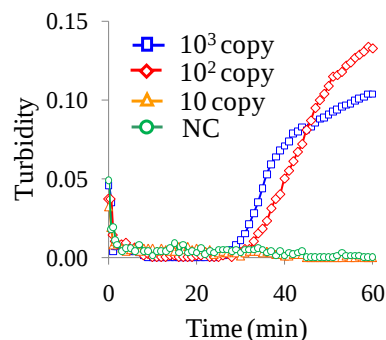


Fig. 1 Detection of influenza B virus by LAMP

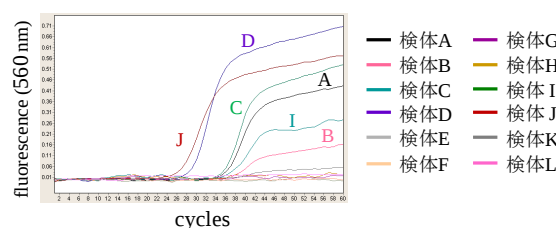


Fig. 2 Amplification curves of influenza A virus from clinical specimens by multiplex real-time RT-PCR

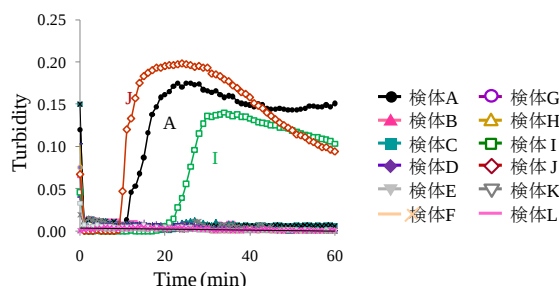


Fig. 3 Amplification curves of influenza A virus from clinical specimens by LAMP

【参考文献】

- 1) Centers for Disease Control and Prevention, Swine influenza A (H1N1) infection in two children-Southern California, March-April 2009. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 58, 2009, 400-402.
- 2) Inoue E, Wang X, Osawa Y, Okazaki K., Full genomic amplification and subtyping of influenza A virus using a single set of universal primers, Microbiol Immunol., 54(3), 2010, 129-134