

Real-time RT-LAMP 法を用いたウイルス感染症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 (PD)

根本 浩史

日大生産工

小森谷 友絵

神野 英毅

【緒言】

2009 年 4 月にメキシコおよびアメリカにて確認された新型 Influenza virus によって、日本でも流行地域からの帰国者を中心に全国各地で緊急検査が実施されたことは記憶に新しい。交通機関の発達した現代社会において、今後もこのような感染の拡大の防止を目的として感染者を早期に発見することが必要であり、迅速かつ正確な検査が重要な要素となる。

現在、Influenza virus の主流の検査法として遺伝子学的診断法が用いられている。中でも Real-time RT-PCR 法は Influenza virus の確定診断として用いられるが、操作が複雑で時間を必要とする。そこで、操作の簡略化および検査時間の短縮を目的とし、新規遺伝子増幅法である Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)法に着目した。LAMP 法は等温で遺伝子増幅が行え、迅速に遺伝子を検出できる<sup>1)</sup>。また、操作が簡便で、6 領域を 4 本のプライマーで増幅することから特異的かつ高感度な測定を行うことができる。

本研究では、Influenza virus を対象として LAMP 法を原理とする高感度かつ迅速な遺伝子学的測定法の構築を目的とした。

【実験方法】

1. 使用したウイルス

検討した標準サンプルとして Influenza A 型 (Singapore/63/04 H1N1)、Influenza A 型(H3N2)、Influenza B 型(Yamanashi/166/98)不活化ウイルス粒子(Zeptomatrix, USA)および 2008 年冬から 2009

年秋に Influenza 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

Influenza B 型(Yamanashi/166/98)不活化ウイルス粒子の塩基配列を含めて、Influenza virus resource より選定した Influenza B 型の塩基配列をアライメント解析し、LAMP 法プライマー作製支援ソフト Primer Explorer ver.4 を用いて共通検出用プライマーおよびループプライマー(LP)を作製した(Table 1)。また同様に A/H1N1、A/H3N2 および新型 Influenza に特異的に反応するプライマーを設計した。

Table 1 LAMP Primer for Influenza B virus

| Primer     | Sequence (5'－3')                             |
|------------|----------------------------------------------|
| FluB-M-FIP | GCGTTCCTAGTTTTACTTGCAT-TGATGAAAGCTCAGCGCTACT |
| FluB-M-BIP | TGCGAGAAACAAGCATCACAT-TCTGCATTTCTCGTCTCACT   |
| FluB-M-F3  | ATTTGAAATAGCAGAAGGCC                         |
| FluB-M-B3  | TGTTCATAGCTGAGACCATC                         |
| FluB-M-LF  | CCAGGATTCAGGTACATGACC-ATG                    |
| FluB-M-LB  | ACACAGGGCTCATAGCAGAGCA                       |

3. RT-LAMP 反応

標準サンプルより抽出した RNA を  $10^2$  倍～ $10^5$  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

Study on High Sensitive and Rapid Diagnosis for Viral Infection by Real-time RT-LAMP Method

Toshiya SAKAI, Hiroshi NEMOTO, Tomoe KOMORIYA, Hideki KOHNO

RT-LAMP 法にて測定を行った。また、LP を追加し、反応の時間変化を検討した。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、63℃、波長 660 nm での 10 秒毎の濁度変化を測定した。

#### 4. 検体測定

Suwannakarn <sup>2)</sup>らを改編したプライマーを用いて One-step multiplex real-time RT-PCR を行った。測定には RNA-direct realtime PCR (TOYOBO)および LightCycler II リアルタイム測定装置 (Roche Diagnostics, USA)を用いた。また、同じ検体を用い、各亜型に特異的に反応するプライマーを用いて RT-LAMP 法にて測定を行い比較した。

#### 【結果および考察】

##### ◎RT-LAMP 反応

設計した Influenza B 共通検出用プライマーを用いて LAMP 法にて測定した結果、各希釈サンプルで濃度に応じた検出が行えた(Fig. 1)。また、LP を使用することにより短時間での濁度上昇を確認できた。

##### ◎検体測定

Influenza A 型の蛍光反応を 560 nm、B 型を 530 nm の波長で測定した結果、560 nm で検体 A、B、C、D で増幅曲線の立ち上がりを確認できた(Fig. 2)。これより 4 検体は Influenza A 型陽性であると確認できた。また、新型 Influenza 特異的プライマーで LAMP 測定を行った結果、検体 A で増幅曲線の立ち上がりを確認できた(Fig. 3)。これより検体 A は新型 Influenza virus であると示唆される。

そこで、両測定法の増幅曲線の立ち上がりを比較すると、Multiplex real-time RT-PCR 法では 28 cycle (約 50 分)で立ち上がり確認されたのに対し、Real-time RT-LAMP 法では約 20 分で立ち上がり確認できた。これより LAMP 法を用いることで迅速に検出できることが明らかになった。

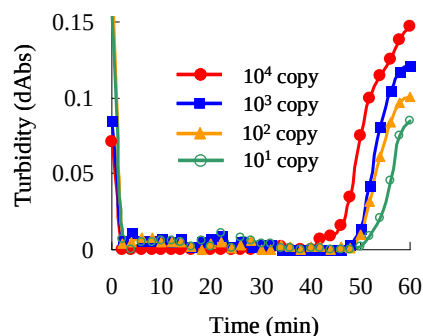


Fig. 1 Detection of Influenza B virus by RT-LAMP

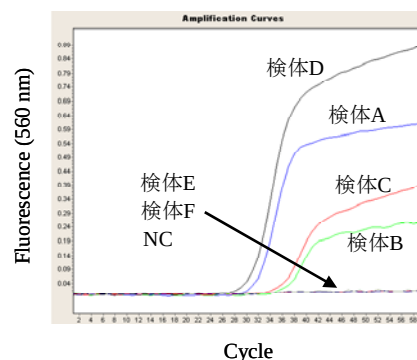


Fig. 2 Detection of Influenza viruses from Influenza-like patient by multiplex real-time RT-PCR

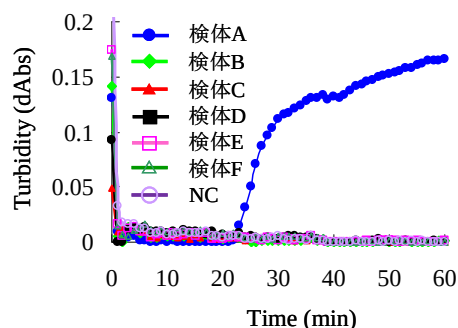


Fig. 3 Detection of Influenza viruses from Influenza like specimen by RT-LAMP

#### 【参考文献】

- 1) Tsugunori Notomi et al, Loop-mediated isothermal amplification of DNA, *Nucleic Acids Research*, **28**, No.12, 2000, e63
- 2) Kamol Suwannakarn et al, Typing (A/B) and subtyping (H1/H3/H5) of influenza A virus by Multiplex real-time RT-PCR assays, *Journal of Virological Method*, **152**, 2008, 25-31