

[別紙1]

## 論文の内容の要旨

論文題目 急性呼吸器感染症の起因微生物の同定法の開発に関する基礎的研究  
指導教員 五十嵐 隆 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成14年4月1日入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 宮田 一平

重症急性呼吸器症候群(SARS)は2002年11月から8ヶ月間に世界26ヶ国で流行し、9.6%の高い死亡率を記録した新種のコロナウイルス—SARS coronavirus—による伝染病である。本症候群に対して適切な治療・予防の方策を講じるためには感冒や市中肺炎と鑑別することが重要であるにもかかわらず、非特異的な気道感染症状を呈するため、この鑑別は困難である。一般に病原微生物の存在は抗原あるいは核酸を検出することで証明できるが、より感度が高いのは核酸を検出する方法である。

本研究では核酸増幅法のうち感度・特異度に優れるLAMP法を用いて、この鑑別診断を迅速に高感度・高特異度で達成する系を確立することを目的とした。LAMP法は頻用されるPCR法に基づく方法に比べて費用・時間・手技の容易さにおいても利点を有する核酸増幅法である。

SARS coronavirus と、鑑別対象の Humancoronavirus 229E, Influenzavirus A/B, *Mycoplasma pneumoniae* に対する LAMP 法プライマーをそれぞれ設計し、その感度・特異度をそれぞれの病原体から抽出した核酸を対照として LightCycler 装置上で評価した。あわせて、高感度定量法 (Amplicor 法; Roche Diagnostic Systems, Inc.) が確立している HIV-1 由来の p24 配列と我々の検出対象配列とを連結したキメラ核酸をパッケージングした MLV ベクターを作製した。このベクターから抽出した RNA を用いて HIV-1 由来の p24 配列に対し

て設計した LAMP プライマーの感度を基準として、各々の LAMP プライマーの検出感度を相互に比較した。また、*in vitro* 転写したキメラ RNA の希釈系列を用いて one-step RT-PCR 法による検出限界と RT-LAMP による検出限界との比較をおこなった。

まず、LAMP 法における核酸の増幅を反応の早期に判定する方法を考案し、コンピュータ・プログラムとして実装した。この判定法により、十分な核酸量がある場合には反応開始から 10 分程度で結果の判定が可能となった。このように反応開始から早い時点で陽性の結果が得られる事は、一刻も早い対応が可能となり、SARS の迅速診断の場合には非常に有用であると考えられる。

設計したプライマーはそれぞれ目的とする病原体を特異的に検出できた。検出感度 (検出限界) の定量的な評価については、対照核酸の調製方法によってばらつきを認めたが、病原体から抽出した核酸を対照とした評価では高感度のものでは  $10^2$  [copies/反応] のオーダー以上の感度を認めるものもあり、*in vitro* 転写した RNA を対照とした場合には  $10^1$  [copies/反応] のオーダーの感度を認めた。MLV ベクターから抽出したキメラ RNA はキメラの断片のそれぞれに対するプライマーで特異的に検出可能であった。また、検出限界の比較の結果、RT-LAMP 法は RT-PCR 法と同等以上の検出限界を有することが示された。

以上、LAMP 法を用いて上記の病原体を特異的かつ高感度で、迅速に鑑別できる系を開発した。LAMP 法にもとづくこの系の検出限界は RT-PCR 法と同等以上であることも示された。LAMP 法の実行ならびに結果の判定が容易である事に加え、従来の PCR 法にもとづく方法と同等以上の感度を有するという、これらの結果から、本研究の成果は迅速診断系としての利用に適したものと考えられる。

さらに、HIV-1 由来の p24 断片と検出対象配列から成るキメラ RNA と、このキメラ RNA をパッケージした MLV ベクターを作製し、それぞれの RNA が LAMP 法で特異的に検出可能な事を確認した。このキメラ RNA の段階希釈系列を用いて、それぞれの検出対象配列に対するプライマーの検出限界を、p24 に対するプライマーの検出感度を基準とした尺度で、相互に比較する系を確立することができた。すなわち、同一の検出対象を用いて複数の検出系を比較する事が可能となった。

さらに、HIV-1 由来の p24 断片は既存の高感度定量法を用いて定量することが可能である。このため、このキメラ核酸をパッケージした MLV ベクターを混入した鼻汁や血清などに混入した試料は、その中のベクター粒子数を定量可能な「疑似検体」として用いることが可能である。このように、既存の定量法を介して、汎用的に関心の対象の核酸配列を有するベクター粒子の定量を生物学的力価ではなく、粒子数 (核酸のコピー数) で定量することが可能となった。数的に定量が可能なこのベクターを用いた「疑似検体」は、SARS のように臨床検体を入手できない際に、安全な「疑似検体」として検出法の研究開発などに応用が可能と考えられる。