

審査の結果の要旨

氏名 宮田一平

本研究は新興感染症の重症急性呼吸器症候群 (SARS) と鑑別を要する病原体と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、核酸増幅法の LAMP 法を用いて SARS coronavirus と Humancoronavirus 229E, Influenzavirus A/B, *Mycoplasma pneumoniae* とを鑑別する系を開発することを試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. リアルタイム PCR 装置を用いて、反応の極めて早い段階において増幅反応を検出する手法を考案し、プログラムとして実用可能にした。この結果、十分な核酸量があれば、反応開始から 10 分頃から陽性の結果を判定する事が可能となった。
従来の核酸増幅法 (RT-PCR 法) による RNA の検出では、反応開始から 10 分程度の時点では、まだ逆転写の過程の途中であり、増幅反応を確認するまでの所要時間において、既存技術の限界の 1 つが克服された。
2. 病原体検出の LAMP 法プライマーがそれぞれ、鑑別対象の病原体のみを特異的に検出することを確認した。
3. RT-LAMP 法による検出系の検出限界が従来法である RT-PCR 法による検出限界に匹敵する事を確認した。
4. 複数の検出系の検出限界を、同一の検体を用いて相互に比較する事を目的として、2 つの異なる検出対象配列を繋いだキメラ核酸それぞれ作製した。これらのキメラ核酸を用いて検出系を相互に比較する系を作出し、比較が可能なることを確認した。
このキメラ核酸の検出対象配列の一方に、既存の高感度定量法 (Amplicor 法) の検出対象配列 (HIV-1 の p24 配列) を用い、既存の定量法による定量も想定した系とした。
5. 上述の比較系を用いて、それぞれの LAMP 法プライマーを相互に比較し、検出能力に優れたプライマーを選別する方法論を確立し、鑑別対象に挙げたそれぞれの病原体を検出する優れたプライマーをそれぞれ得ることができた。
6. キメラ核酸をパッケージした MLV ベクターを作製し、これから得られる核酸が検出対象として利用可能な事を確認した。
ベクター内の RNA は、RNA 分解酵素に富む生体試料に混入しても保護されるため、

「疑似検体」として利用することが可能である。このような「疑似検体」は、SARS の場合のように臨床検体の入手が事実上不可能な場合に、安全性の高い代替品として研究開発に用いることが可能である。

以上、本論文は LAMP 法を用いた核酸増幅法による、病原体の迅速な鑑別診断系を作製する際に必要とされる基礎的な方法論として、増幅反応の反応の極めて早期における迅速判定、プライマー (検出系) の検出限界のキメラ核酸を用いた厳密な相互比較、MLV ベクターによる安全な疑似検体の提供の方法論をそれぞれ確立した。その上で、これらの方法論に基づいて複数の対象病原体に対する、迅速な鑑別診断系を確立することに成功した。この方法論で得られた成果は検出限界、検出時間のそれぞれにおいて、既報の LAMP 法による検出系の報告との比較においても優れている。本研究において開発されたこれらの方法論とその成果は、核酸増幅法による病原体の迅速診断法の開発において重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。