

論文の内容の要旨

論文題目 急性呼吸器感染症診断における LAMP 法の有用性の検討

指導教官 岩本愛吉 教授

東京大学医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 松村武史

発熱、咽頭痛、咳嗽、喀痰、鼻汁などを呈する急性呼吸器感染症は日常診療においてしばしば遭遇する疾患である。急性呼吸器感染症の原因となる病原微生物はさまざまであるが、なかでもウイルスは頻度が多くインフルエンザのように流行や肺炎の合併をおこすものがあり、病原微生物として重要である。しかし、症状や所見では特異的なものはなく、臨床症状からウイルスを特定することは不可能であり、一般的に用いられてきた検査はウイルス分離や特異的な抗体を測定する血清学的検査であり、診断までに数週間の期間を要するため、日常診療において治療法選択のための手段として用いることは不可能であった。さらに、近年、重症急性呼吸器症候群 (SARS) やトリインフルエンザウイルスのヒトへの感染などが登場したことにより、死亡率の高い新興ウイルス性呼吸器感染症が流行したと

きに、従来の方法では迅速に的確な対応を即座にとることができないことが明らかになった。そのためウイルス感染症の迅速でかつ感度、特異度の良い診断法の登場が期待されるようになった。

最近では、免疫クロマトグラフィーを用いて抗原を検出する迅速診断法 (IC 法) が臨床の場においてインフルエンザウイルスや RS ウイルスの診断に役立っている。しかし、ウイルスの種類が限られ、また、検体の採取時期や採取手技などにより偽陰性を生じるなどの問題がある。また、感度や特異度が優れた polymerase chain reaction (PCR) 法は価格、手技、設備などの問題があり、外来や病棟で行われることなく、専門の検査機関へ依頼されているのが実情である。これらの短所を克服する新たな核酸増幅法として loop-mediated isothermal amplification method (LAMP 法) が開発された。

LAMP 法は標的遺伝子の 6 つの領域を認識する 4 種類のプライマーを用いた恒温下に反応を進める、感度の極めて高い核酸増幅法であり、その特異性の高さから検出も容易である。また、RNA 増幅においては、逆転写酵素を反応系に加えるだけで DNA と同様の手技で増幅を行うことができる利点を持つ。当教室では数年前より SARS をはじめとする急性呼吸器感染症の迅速診断法を確立するために LAMP 法の研究に取り組んでおり、複数の病原微生物のプライマーを作成してきた。

この研究では、LAMP 法を用いて臨床検体を測定し、臨床で使用頻度の高い IC 法と比較することで有用性を検討した。さらに LAMP 法の工程を簡易にするために核酸抽出を省略

した LAMP 法での RNA ウイルスの検出も試みた。対象としたのはインフルエンザウイルス A/B (Flu-A/B) 、RS ウイルス A/B (RSV-A/B) 、メタニューモウイルス(MPV) であり、これらはいずれも RNA ウイルスであり、冬季に多く、インフルエンザ様の症状をきたすことが知られている。これらに対するプライマーはすでに当教室において開発されており、インフルエンザウイルスと RS ウイルスについて LAMP 法と IC 法と比較したところ、LAMP 法は IC 法の限界の 10 分の 1 以下のウイルス濃度も検出可能であった。また、インフルエンザウイルス A について LAMP 法とほぼ同じ配列を増幅する RT-PCR と nested-PCR を作成し、実験室株を用いて LAMP 法と感度を比較したところ、LAMP 法は RT-PCR より優れ、nested-PCR より劣っていることがわかった。

臨床検体は、発熱や咽頭痛などを訴えて外来を受診し、臨床的にインフルエンザが疑われ IC 法を行った患者の鼻腔ぬぐい液であり、IC 法の結果と体温や症状、ワクチン接種の有無などの患者情報を同時に記録した。2005 年 12 月から 2006 年 3 月の間に、230 人から 236 検体の検体を採取した(6 人の患者は同一エピソード内に 2 回受診し、2 回 IC 法を行った)。

患者の基本情報は男性 99 人、女性 131 人、平均年齢は 36.7 歳、基礎疾患は 19.1%に、6 ヶ月以内のインフルエンザワクチン接種歴は 13.9%に、インフルエンザ患者との明らかな接触は 18.2%にみられた。患者に診られた症状は 38.5 度以上の発熱が 87.3%にみられ最も多く、次いで咽頭痛や咳嗽、鼻汁が 30%以上の患者にみられた。症状の発現から検体採取までの平均日数は 1.95 日であった。

全検体に Flu-A / B、RSV-A / B、MPV の 5 種類のプライマーを用いて LAMP 法による検出を行った。Flu-A / B の IC 法は検体採取時に全検体に、RSV の IC 法は LAMP 法施行時に一部の検体に施行した。LAMP 法の結果は 236 検体中 Flu-A がもっとも多く 135 検体 (57.2%) から検出され、Flu-B は 7 検体 (3.0%)、RSV-A と RSV-B はそれぞれ 4 検体から検出された。MPV は 1 検体も検出されなかった。IC 法では、Flu-A は 236 検体中 90 検体 (38.1%) から検出され、Flu-B は 1 検体 (0.4%) のみから検出、RSV は 186 検体について行ったが 1 検体 (0.5%) のみから検出された。LAMP 法と IC 法の結果を比較したところ、陽性率は Flu-A、Flu-B において LAMP 法の方が高く、IC 法陰性の検体から Flu-A では 146 検体中 52 検体、Flu-B では 235 検体中 6 検体で陽性となった。RSV は IC 法が陰性の 185 検体中 4 検体が LAMP 法で陽性となったが、LAMP 法が IC 法より陽性率が高いとはいえなかった。同一エピソード内に 2 回病院を受診し、1 回目は Flu-A / B の IC 法が陰性であったが、2 回目に Flu-A 陽性となった症例が 3 例存在したが、この 3 症例の 1 回目の受診時に採取した検体における LAMP 法の結果は、3 検体中 2 検体において Flu-A 陽性であった。しかし、LAMP 法と IC 法がともに陽性の患者と、IC 法が陰性で LAMP 法が陽性の患者のデータを比較したところ、最高体温と発症から来院までの日数には統計学的な差はなかった。また、Flu-A に対して核酸抽出を省略して行った LAMP 法では、従来の LAMP 法に比べ感度は 50% と低いものの特異性には問題がなく、ウイルスを短時間で検出できる可能性があることが示された。

さらに、入院中の急性呼吸器感染症症状のある患者 11 名の鼻腔ぬぐい液検体に対して同

様の LAMP 法を行ったが、血液疾患や免疫不全の基礎疾患のある患者 3 名から、RSV-A を 1 検体で、RSV-B を 2 検体で検出することができた。

Flu-A について IC 法が陽性で LAMP が陰性の検体が 7 検体存在し、それらに LAMP 法と同一の遺伝子配列を増幅する RT-PCR や nested-PCR を行ったところ、RT-PCR では 7 検体のうち 1 検体から、nested-PCR では前述の 1 検体を含む 4 検体から目的遺伝子を検出した。このことから、LAMP 法はプライマーの設定部分が多いため臨床検体では偽陰性が出現する可能性や、IC 法に偽陽性が存在する可能性が示唆された。

今回はインフルエンザウイルス、RS ウイルス、メタニューモウイルスに対して LAMP 法を用い、急性呼吸器感染症患者の鼻腔ぬぐい液からの病原微生物の検出に成功した。臨床的にインフルエンザを疑う患者を対象としたため疫学的な検討はできなかったが、LAMP 法がインフルエンザウイルス A/B について IC 法より感度が良く、LAMP 法が IC 法より発症早期の患者から検出できる可能性があることが示された。RS ウイルスやメタニューモウイルスについては今回の研究では IC 法に比べ感度が良いとは結論できなかったが、入院中の急性呼吸器感染症症状のある患者から RS ウイルスを検出したことや、予備的実験において IC 法より感度が良かったことなどから、小児や免疫不全者など対象とした場合に有用となる可能性があると考えられた。さらに LAMP 法は核酸抽出を行わない場合にも検出できる可能性があり、PCR 法に比べ簡便さの面で優れていることが示された。