

論文の要旨

申請者 田村信介

研究論文題目

LAMP 法と ARMS 法及び SNPs タイピングを組み合わせた一塩基置換
変異判別法の確立と病原体同定及び薬剤耐性の判定への応用

1 目的

一塩基変異及び多型の意義が明らかになってきており、医療分野のみならず他の分野に
応用されている。感染症では、薬剤耐性との相関などが報告されてきている。

感染症対処には病原体の同定及び性質の判定が重要であり、その伝播能や変異能から迅速
性が、途上国等でも行うため簡便性が要求される。近年発展した遺伝子解析を用いる手
法は培養に比して迅速だが、それでも一定の時間、技術、設備等を要する。よって、迅速
かつ簡便な遺伝子解析技術、特に一塩基変異の同定手法は有用である。

Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法は迅速かつ簡便な核酸増幅技術である。
LAMP 法の応用に、一塩基変異を検出できる SNPs タイピングと、特異性を高める
Amplification Refractory Mutation System (ARMS) 法を応用した ARMS-LAMP 法がある。し
かし、これらの手法には、検体濃度や反応時間によっては意図しない増幅が認められる、
一塩基変異の検出は困難、などの問題点がある。

今回我々は既存の手法の問題点を踏まえた新しい一塩基変異同定法 ARMS-SNP LAMP
法を開発した。そして、*Haemophilus influenzae* を用い、その同定と薬剤耐性
beta-lactamase-negative ampicillin-resistant (BLNAR) に相関する *ftsI* の c.1578T>A 及び
c.1578T>G の野生型 c.1578T との判別ができるかを評価した。

2 対象並びに方法

検体にはナショナルバイオリソースプロジェクトから分与された *H. influenzae* 及び
他の微生物のゲノム DNA と、防衛医科大学校病院で採取された臨床検体から分離さ
れた *H. influenzae* (臨床検体株) のゲノム DNA を用いた。

既存のデータベースに登録されている 636 個の *H. influenzae* の *ftsI* の塩基配列データ
を収集・解析し、最も頻度の高い塩基を確定した塩基配列を基に、まず SNPs タイピング
のプライマーセットを設計し、これに ARMS 法を導入した。

次に、設計されたプライマーセットのうち最適なものを実験的に選択した。

評価として、感度、特異度、増幅産物の特異性、交叉反応及び臨床検体株の変異の判定
を行った。

なお、本研究は防衛医科大学校倫理委員会の承認（承認番号 2472「 β ラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性インフルエンザ菌の迅速診断法の開発」）を得て行った。

3 成績

c.1578T、c.1578T>A 及び c.1578T>G を判定する ARMS-SNP LAMP 法のプライマーセットをそれぞれ 16 通りずつ設計できた。その中から実験的にそれぞれ 1 つずつを選択した。感度は c.1578T と c.1578T>G を検出するプライマーセットで 1 反応あたり 1pg、c.1578T>A で 10pg だった。特異度は、1 反応あたり 1ng の他のゲノム DNA で増幅を認めなかった。増幅産物を熱解離曲線解析により解析したが、全ての増幅産物で同じ熱解離曲線を示し、非特異的増幅がないことが示唆された。

交叉反応は 54 種のゲノム DNA で行ったが、1 反応あたり 1ng で増幅を認めなかった。臨床検体株では、T、A 検出プライマーセットが感度・特異度とも 100.0%、G 検出プライマーセットが感度 77.8%、特異度 95.0%となった。

4 考察

薬剤耐性に相関する一塩基変異 c.1578T>A、c.1578T>G と c.1578T の判定ができ、薬剤耐性の推定が可能であった。また、交叉反応は認められず、種の同定も可能であると考えた。

プライマーの設計は困難であり、また、最適なプライマーセットの選択は実験的によらざるを得ず、今後の課題と考えた。c.1578T>A を検出するプライマーセットは比較的感度が悪く、また、G 検出プライマーセットでは臨床検体の判定で判定できない検体が認められ、プライマーの設計や反応条件に改善の余地があるものと考えた。

この手法は一塩基変異を迅速かつ簡便に同定するもので広く応用が可能であることから、様々な分野で有用であると考えられた。

5 結論

LAMP 法を応用した迅速かつ簡便な新規一塩基変異同定法 ARMS-SNP LAMP 法を開発した。

この手法を用いて、*H. Influenzae* の BLNAR と相関する c.1578T>A、c.1578T>G と野生型 c.1578T の判定をすることができた。同時に種の同定も可能であった。