

論文の要旨

申請者 神 崎 裕 二

研究論文題目

PURE-LAMP 法を用いた肺外結核診断と BCG 同定検出法の開発

1 目 的

感染症診断において核酸増幅検査法(Nucleic acid amplification test; NAAT)は重要な検査法であり、特に polymerase chain reaction(PCR)法は先進国において幅広く普及しているが、開発途上国など資源に限りのある地域においては、導入に制限が生じている。

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法は迅速、簡易な NAAT として開発された新しい技術である。LAMP 法はサーマルサイクラーが不要で、反応液の混濁で判定が可能であるため、限られた検査環境においても実施可能であり、開発途上国での活用や、日本も含めた先進国における Point of care testing (POCT) としての活用が期待されている。また、周辺技術として Procedure for ultra rapid extraction(PURE)法による簡易 DNA 抽出キットの開発により LAMP 法は格段に簡易、迅速な検査になりつつある。

私はこの LAMP 法とその周辺技術である PURE 法に注目し、さらなる感染症診断に応用するべく、肺外結核の診断ならびに Bacillus Calmette-Guérin (BCG) の同定を試みた。

2 対象並びに方法

(1) PURE-LAMP 法の肺外結核症例への応用

PURE-LAMP 法は肺結核の診断への有用性が報告されているが、喀痰以外の試料に対する有効性は検証されていない。筆者は本法を肺外結核にも応用

可能ではないかと考え、確定診断された肺外結核患者を対象とし、その残余検体を用い PURE-LAMP 法により検体処理から核酸増幅、判定を施行し結核菌の検出を試みた。

(2) PURE-LAMP 法を用いた BCG を迅速検出同定する遺伝子検査方法の開発

(1) より PURE-LAMP 法は喀痰以外の検体にも応用可能と考え、PURE-LAMP 法により BCG を検出同定する検査法の開発を試みた。まず BCG 特異的に増幅反応を起こす LAMP 反応系を構築し、その系の感度と特異性を検証した。次に、BCG の菌懸濁液もしくは臨床疑似検体を用い、それらに対する BCG 検出同定 PURE-LAMP 法の検出感度を検証した。

(3) BCG 検出同定 PURE-LAMP 法の臨床症例への応用

(2) より BCG 検出同定 PURE-LAMP 法は臨床応用が可能と考え、BCG 尿路感染症患者の随時尿から BCG の検出同定を試みた。

3 成績

(1) PURE-LAMP 法の肺外結核症例への応用の検討

頸部リンパ節結核、脊椎カリエス、肺門縦隔リンパ節結核の肺外結核患者 3 例を対象とし、全症例で結核菌遺伝子の検出が可能であった。

(2) PURE-LAMP 法を用いた BCG を迅速同定する遺伝子検査方法の開発

LAMP 法により 64°C、30 分の反応時間で濁度計では 1 pg まで、60 分の反応ののち、肉眼判定では 10 pg までの BCG の DNA 検出が可能であった。特異性の検証では、結核菌群を含む細菌ならびに真菌に対し非特異的な増幅を認めず、増幅産物の熱解離曲線解析により特異的増幅であることが示唆された。疑似検体を用いた検出感度の検証では、生食を用い作成した疑似検体においては 1000 個までの BCG が検出可能であった。血清、尿、脳脊髄液および気管支洗浄液を用いた疑似検体に対しても同等の結果を得られたが、血清、希釈し

た全血の混入した疑似検体に関しては BCG の検出感度の低下を認め、希釈のない全血に関しては BCG の検出が不可能であった。

(3) BCG 同定 PURE-LAMP 法の臨床症例への応用

PURE-LAMP 法により尿検体から BCG の同定が直接可能で、経時的な比較では PCR 法と同様の推移を示した。

4 考 察

肺外結核 PCR 法により診断の感度を上げることができるが、それには PCR 法が施行できる設備が必要である。肺結核に対する PURE-LAMP 法は PCR 法と同等の結果が得られており、肺外結核診断においても LAMP 法は PCR 法に代替できる可能性があると思われた。さらには検体処理から判定まで 90 分で施行できるという利点があげられる。

BCG の検出同定 LAMP 法においては 1pg までの遺伝子が検出可能であった。既報告では *M.bovis* の DNA に対する PCR 法の検出感度は 10pg、LAMP 法では 1pg とされており、本研究の結果はそれと同程度の感度を有するものと思われた。

また、PURE-LAMP 法は 1000 個までの BCG を検出でき、BCG 分離培養株を同定するには十分な感度を有している。加えて、尿、気管支肺胞洗浄液、脳脊髄液から作成した疑似検体ならびに患者の尿沈渣から、直接 BCG を検出同定することも可能であったが、血清及び全血の混入した疑似検体での感度が低下、もしくは検出不能となったことから、各種臨床検体への直接応用については慎重な検討が必要と考えた。

以上、PURE-LAMP 法は肺外結核の診断ならびに BCG の検出同定にも有用と考えた。いずれも簡易迅速に実施が可能な検査法であり、設備の乏しい環境は

もとより、設備の整っている先進国においても POCT 診断技術としてこの PURE-LAMP 法の導入が期待される。

5 結 論

PURE-LAMP 法は喀痰以外の検体に対しても有用で、肺外結核の診断に対しても応用できる。さらに本研究で開発した BCG 同定 PURE-LAMP 法は 1000 個までの BCG を検出同定でき、BCG 分離株のみならず臨床検体に直接応用ができる可能性が示唆された。