

令和 4 年 9 月 7 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07878

研究課題名(和文)LAMP法による中枢神経感染症Syndromic testing panel構築

研究課題名(英文)Syndromic testing panel for central nervous system infections using the LAMP method

研究代表者

井平 勝 (Ihira, Masaru)

藤田医科大学・保健学研究科・教授

研究者番号：10290165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：LAMP法は、簡易な機器構造であり、システム小型化や検査多重化を可能とするMicro流体chipの組み合わせは、複数標的を検査する症候別検査に適する。脳炎、脳症を疑った髄液のLAMP法とreal-time PCR法の比較では、HHV-6、VZVにおいて結果は一致したが、HSV-1、HSV-2では不一致検体があった。皮膚水泡疾患を対象とした場合、両者の結果は一致した。Micro流体chip LAMP法では、Real-time PCRを基準とすると、Micro流体LAMPの感度は、HSV-1：90%、HSV-2：100%、VZV：100%であり、特異性は96%、100%、100%と優れていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染症領域では、症状に基づき複数病原を同時に検査するsyndromic testingが行われPCRを基礎としている。本邦で開発されたLAMP法は、迅速性・簡便性・コストのアドバンテージがあり、LAMP法を基礎とするsyndromic testing構築の意義は大きい。本研究は、脳炎・脳症を対象とした場合、一部が不完全でありさらに検討を必要とするが、皮膚ぬぐい液による水疱性疾患識別のためのMicro流体LAMPについてはreal-timePCRと比較しても十分な感度を確認した。

研究成果の概要(英文)：The LAMP method consists of a simple instrument structure, and the combination of microfluidic chips, which enables system miniaturization and multiplexing of tests, is suitable for the Syndromic testing panel. Comparison of LAMP and real-time PCR assays of spinal fluid suspected of encephalitis/encephalopathy showed concordance for HHV-6 and VZV LAMPs but did not have enough sensitivity to detect HSV-2 and EBV DNA by LAMPs. After determining the lower detection limit of multiplex LAMP-based on a microfluidic chip, the clinical utility was confirmed using 32 samples. If real-time PCR was used as a standard, sensitivity of HSV-1, HSV-2, and VZV LAMPs based on microfluidic chip were 90%, 100%, and 100%, and the specificity of three methods were 96%, 100% and 100%, respectively. Multiplex LAMP, based on a microfluidic chip that detects three alpha herpesviruses, may be useful in laboratory diagnosis of patients with vesicular skin lesions.

研究分野：臨床ウイルス

キーワード：Syndromic test LAMP real time PCR HSV-1 HSV-2 VZV HHV-6

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

本邦で開発された等温核酸増幅法の loop mediated isothermal amplification(LAMP)は、様々な感染症を対象とした Point of Care testing (POCT) としての有用性が報告されてきた。一方で最近の感染症診断の流れは、臨床症状に基づき病原体を類推し検査対象を選択する手法から、可能性のある複数標的を同時に検査する Syndromic (症候群) testing (ex.呼吸器疾患パネル、消化管疾患パネル、肺炎パネル、脳炎パネルなど)にシフトしつつある。Syndromic testing のほとんどは、マルチプレックス(複合) PCR を基本としており一回の反応で複数のターゲットを検出するように設計される。マルチプレックス法には、同一反応チューブ内で複数ターゲットを増幅する方法と複数の個別ウェルを配列したプレートやパウチの中で単一標的を検出する方法がある。多くのマルチプレックス PCR 法では、同一反応チューブ内で複数の標的を同時に増幅する反応条件設定が困難なことから複数の個別ウェルを配列した方式が選択されている。個別ウェルを配列した方式については同時にそれぞれの反応を行うだけに見えるが、近年報告されているマイクロ流路による遺伝子チップ上での反応は、従来の PCR チューブよりも極微量での反応で行うことによって試薬も減量が可能になっており経済的効果も高い。少量サンプルで複数の検査が可能となる点も優れている。PCR 法と LAMP 法それぞれの測定機器は、PCR が高価な精密温度制御装置(サーマルサイクラー)などを必要とするが、LAMP 法は、標的遺伝子増幅に関して一定温度を保持するコントロールだけで済む LAMP 測定機器の方が安価、簡易な構造であるとのメリットがある。すでに発売されているマルチプレックス PCR 機器は、LAMP 機器はもとより Real-time PCR 機器よりもさらに高価な機器となっている。我々が目指すマルチプレックス LAMP の測定機器は、今後開発を行うことになるが PCR 機器よりも価格を抑えられると予想している。

2. 研究の目的

Syndromic testing の利点は、臨床症状に基づいた起因病原体の同時測定による迅速な診断と早期治療開始にある。また、起因病原体の同定に基づく治療は、迅速な診断抗菌薬の適正使用につながり、WHO が推進する薬剤耐性に関するグローバル・アクション・プランを遂行する上でも極めて重要である。本研究では、我々がこれまでヘルペスウイルス感染症診断の POCT としての有用性を報告してきた LAMP 法をさらに発展させ、これらウイルスの多くが起因病原体となる中枢神経感染症を対象とした LAMP 法による Syndromic testing panel 構築を目指した。

従来の PCR チューブ内で行う LAMP 法は、1回のサンプル調製で1項目の検査しか行えず、複数項目のウイルス診断には、検査対象の数だけ煩雑な操作とサンプル・試薬が必要となる。マイクロ流体デバイス上に LAMP 法を実装することで、複数種類のウイルス検査が可能なマルチプレックス遺伝子診断デバイスの開発を着想した。診断デバイスは、ポリジメチルシロキサン(PDMS: 45 mm × 25 mm)豊橋科学技術大学 柴田隆行先生らが作製した遺伝子チップを用いた(図1)。

本研究では、簡易迅速な POCT としての有用性をもった LAMP 法による Syndromic testing 法の構築により本邦で開発された LAMP 法をさらにグローバルなスタンダードな検査法としてゆく方法として LAMP 法によるマイクロ流路遺伝子チップを用いたマルチプレックス LAMP 法の開発を目標とした。

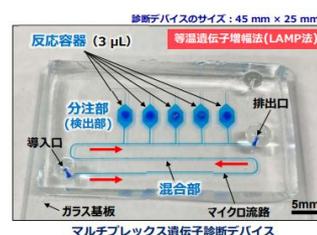


図1 マルチプレックス診断デバイス

3. 研究の方法

(1) 脳炎、脳症を疑われた髄液による LAMP 法と real-time PCR 法による検出比較

これまで報告してきたヘルペスウイルスを検出する LAMP 法について中枢神経感染症を疑われた髄液を使用して検出が可能か遺伝子チップ上の検討に先んじて通常の LAMP 法での検出を確認すると同時に real-time PCR で各ウイルス量の定量を行い比較することにした。本研究室に解析依頼のあった 225 例(男性 128 例/女性 97 例) 合計 277 検体を対象とした。髄液 200μl から QIAamp DNA Mini Kit を用いて DNA を抽出、HSV-1、HSV-2、VZV、EBV、CMV、HHV-6、HHV-7 の 7 種類のヒトヘルペスウイルスに特異的な real-time PCR 法(ABI StepOne)を行い髄液中のウイルス DNA を定量した。

次に、各ウイルスの real-time PCR 陽性例と無作為に選出した 20 名の各 real-time PCR 陰性例について、抽出した DNA を用いた各々のウイルスの LAMP 法を施行した。さらに、7 種類のヒトヘルペスウイルスいずれか 1 種類でも検出された real-time PCR 陽性例の髄液 DNA と DNA 抽出を省略しそのままを検体として、7 種類のヒトヘルペスウイルスに特異的な real-time PCR 法とそれぞれの LAMP 法を施行した。各 LAMP 法の詳細はすでに報告してある方法に従った。

(2) マイクロ流路チップを用いた 3 種 (HSV-1、HSV-2、VZV) LAMP 法によるマルチプレ

ツクス化のための基礎検討

中枢神経感染症を目的とする遺伝子チップによるマルチプレックス LAMP 法については、Primer 設計・LAMP 法条件設定にかかわる改善が必要と考えられた(4-(1)結果参照)ため皮膚ぬぐい液を対象としたマルチプレックス LAMP 法の基礎検討を最初に行うことにした。皮膚ぬぐい液による臨床検討は既に報告しており診断のための十分か感度を持っていることは確認されている。

最初にマイクロ流路チップの反応部(今回は流路チップ上の5つの反応部のうち3つを使用して検討した)にそれぞれ単純ヘルペスウイルス1(HSV-1)、単純ヘルペスウイルス2(HSV-2)、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)の primer を FIP、BIP 7.5pmol、LPB、LPF 3.3pmol、F3、B3 1.1pmol を室温で乾燥、固相化した。3-(1)で用いた LAMP 反応試薬から primer を除いた反応液に 5µl のサンプルを混合し 96 1 分間加熱、氷上で冷却後 1µl の Bst polymerase を追加してからマイクロ流路チップの試薬導入口からマイクロ流路内(幅 200µm、高さ 50µm)に注入した(マイクロ流路チップを満たすのに必要なのは 25µl であった)。マイクロ流路チップを封入後、全体を湯中(65)にて温度コントロールを行い、反応時間は 1 時間とした。反応容器内の濁度上昇を肉眼で観察し白濁がみられた反応容器を陽性とした。HSV-1、HSV-2、VZV LAMP 法のそれぞれの標的領域を含む領域をサブクローニング、コピー数を決定したプラスミドを段階希釈して感度と特異性を確認した。マイクロ流路チップ特異性には 1×10^8 コピー/ml の HSV-1、HSV-2、VZV それぞれの標的領域を含む plasmid をもちいた。感度決定には、マイクロ流路チップの 5 つの反応容器にすべて同じ LAMP 法の primer を乾燥固定し、それぞれの標的領域を含む 1000 コピー/反応と 500 コピー/反応の plasmid をマイクロ流路チップに用いて行った。

(3) 皮膚ぬぐい液を用いたマイクロ流路チップ LAMP 法による Syndromic testing 法の構築

患者から採取した皮膚ぬぐい液と LAMP 増幅試薬(DNA LAMP 増幅試薬, 栄研化学)を 200µl PCR チューブに混合、96 1 分間加熱後、氷上に静置、1µl の Bst polymerase を加えた(反応液量は 25µl)。本研究では、ヘルペスウイルスが疑われる 32 検体のスワブサンプルが対象とした。PCR チューブ(総容量 25µL)を用いた 3 種類(HSV-1、HSV-2、VZV) LAMP の詳細については、既に報告した方法を用いた。マイクロ流体マルチプレックス LAMP のプライマーは、従来の LAMP と同様である。ポリジメチルシロキサン(PDMS)ベースのデバイスは、マイクロ流路と 5 つの反応チャンバー(容量 3µL)で構成されており、1 つのデバイスに必要な総容量は 25µL であった。各プライマーをマイクロ流体デバイス上の各反応チャンパーに空気乾燥させた後、多重化反応として使用した。マイクロ流体マルチプレックス LAMP の結果は、従来の LAMP および各リアルタイム PCR と比較された。

4. 研究成果

(1) 脳炎、脳症を疑われた髄液による LAMP 法と real-time PCR 法による検出比較

225 症例の合計 277 検体の髄液から抽出した DNA を用いた real-time PCR 法による各ウイルスの検出率は HSV-1 : 7 検体(2.5%)、HSV-2 : 5 検体(1.8%)、VZV : 8 検体(2.9%)、EBV : 7 検体(2.5%)、HHV-6 : 6 検体(2.1%)であった。CMV と HHV-7 は real-time PCR 法で検出されなかったため LAMP 法との比較は行なわなかった。

Real-time PCR 陽性例の DNA を用いた LAMP 法の比較を表 1 に示す。2 種類以上のヘルペスウイルスが同時に検出された髄液はなかった。抽出 DNA を用いた場合、HHV-6 LAMP は real-time PCR 法と結果は完全に一致した。不一致が多かったヘルペスウイルスは EBV LAMP 法の 7 検体中 3 検体の 42.8%、HSV-2 の 5 検体中 3 検体の 60.0%であった。DNA 抽出を行わず髄液をそのままサンプルとした直接法(real-time PCR と LAMP)の比較(表 2)では、DNA を使った real-time PCR と比較して直接法の両法の一致率は低下したが、LAMP 法の方はそれよりもさらにやや低値を示した。HHV-6 では、直接法でも両者の結果は一致していた。また real-time PCR 陰性例として無作為に選択した DNA を使った real-time PCR 法 陰性症例の各ウイルスの LAMP 法も全て陰性であった。

表 1: Real-time PCR 法と LAMP 法の比較 (抽出 DNA)

	LAMP 陽性 / Real-time PCR 陽性 (%)
HSV-1	5 / 7 (71.4)
HSV-2	3 / 5 (60.0)
VZV	7 / 8 (87.5)
EBV	3 / 7 (42.8)
HHV-6	6 / 6 (100)

表 3: 抽出 DNA real-time PCR 法を基準とした時の直接 real-time PCR 法と LAMP 法の比較

	直接法 (%)	
	Real-time PCR法	LAMP法
HSV-1	5/7 (71.4)	4/7 (57.1)
HSV-2	3/5 (60.0)	3/5 (60.0)
VZV	6/8 (75.0)	5/8 (62.5)
EBV	1/7 (14.3)	2/7 (28.6)
HHV-6	6/6 (100)	6/6 (100)

定量結果との比較では、LAMP の不一致検体はいずれもコピー数の少ない検体であった(図 2)。これらは、Real-time 法と比較して LAMP 法の検出感度が低いことを示していた。抽出 DNA を用いた場合、50%以下の EBV、60%の検出感度の HSV-2 LAMP では、特に改善が必要と考えられた。抽出を省略できる直接法は、迅速診断には有用であるが LAMP 法はもちろん real-time 法でも検出率がさらに低下することから HHV-6 を除けば現実的とは言えない。HHV-6 LAMP 法を除いて Primer 設計、条件設定の改善が必要であると考えられた。

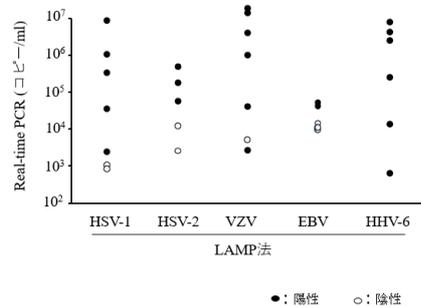


図 2: 抽出 DNA による Real-time PCR と LAMP 法比較

(2) マイクロ流路チップを用いた LAMP 法による Syndromic testing 法の構築

マイクロ流路チップによる HSV-1、HSV-2、VZV LAMP 法は、 10^8 コピー/ml の各 plasmid においてお互いに交差反応を認めなかった(図 3)。しかし、 10^9 コピー/ml のプラスミドを用いた特異性試験では、HSV-1 LAMP 法において VZV plasmid により濁度上昇を認められた(図なし)。

マイクロ流路チップによる各 LAMP 法の感度は、HSV-1 LAMP 法でマイクロ流路チップ上の 5 つの反応容器を用いて 5 重測定をおこなったところ 1000 コピーが 4 容器、500 コピーで 3 容器で濁度上昇が確認できた。同様に、HSV-2 LAMP 法では 1000 コピーで 5 容器、500 コピーで 4 容器、VZV LAMP 法では、1000 コピー、500 コピーともにすべての容器で検出可能であった。以上よりほぼ 500 コピーあれば検出できることが示唆された。

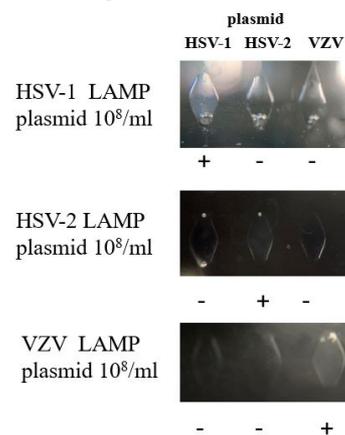


図 3 マイクロ流路チップ特異性

(3) 皮膚ぬぐい液を用いたマイクロ流路チップ LAMP 法による Syndromic testing 法の構築

Real-time PCR 法により皮膚ぬぐい液から HSV-1 は 10/35 (28.6%)、HSV-2 は 4/35 (11.4%)、VZV は 12/35 (34.3%) で検出された。従来の 3 種類の独立したそれぞれの LAMP 法とマイクロ流路チップ LAMP 法の結果は完全に一致した。Real-time PCR とマイクロ流路チップ LAMP 法の間で異なる結果が 2 つあった。1 つは、HSV-1 real-time PCR が陽性でマイクロ流路チップ LAMP 法の HSV-1 が陰性、もう 1 つはその逆の結果であった。他のサンプルでは、real-time PCR の結果はマイクロ流路チップ LAMP 法と完全に一致した。

Real-time PCR を基準とした場合、マイクロ流体チップを用いたマルチプレックス (HSV-1、HSV-2、VZV) LAMP の感度はそれぞれ 90%、100%、100% であり、特異性は 96%、100%、100% であった。

(4) まとめ

髄液をサンプルとして使用した場合、real-time PCR と比較すると中枢神経感染症を目的とする遺伝子チップによるマルチプレックス LAMP 法については必要とされる感度に達していない LAMP 法 (特に EBV、HSV-2) があった。さらに検討が必要と考えられた。

水痘予防のためワクチンの定期接種化に伴い、水痘のブレイクスルーが増加していることから、HSV-1、HSV-2 および水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) のポイントオブケア検査 (鑑別診断) は重要となっている。皮膚ぬぐい液を用いた各 LAMP 法 (HSV-1、HSV-2、VZV) についてはすでに臨床的有用性について検討済みであったので遺伝子チップによるマルチプレックス LAMP 法への変更について検討を加えた。マイクロ流路チップを用いた LAMP 法による各ウイルスの感度は、500 コピー/反応であることを明らかにした。また、皮膚ぬぐい液をサンプルとした場合、マイクロ流路チップを用いた LAMP 法は、real-time PCR 法とほぼ一致していることからマルチプレックス LAMP 法として利用できることを証明した。今後、試薬の乾燥化を検討することによって手順を簡略化する。また、検査者は、サンプルを注入するのみとなることからコンタミネーションのリスクを低減、陽性・陰性コントロールについて担保できるなどの利点があることからこれらの検討を継続する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fumihiko Hattori , Yoshiki Kawamura , Kei Kozawa, Hiroki Miura, Misa Miyake, Akiko Yoshikawa, Masaru Ihira , Tetsushi Yoshikawa	4. 巻 38(10)
2. 論文標題 Clinical Characteristics of Primary HHV-6B Infection in Children Visiting the Emergency Room	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatr Infect Dis J .	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/INF.0000000000002379.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Higashimoto Y, Kawamura Y, Kuboshiki A, Hattori F, Miura H, Nishimura N, Ozaki T, Ihira M, Yoshikawa T; Nagoya VZV study group.	4. 巻 119
2. 論文標題 Reliability of Direct Varicella Zoster Virus Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Diagnosis of Breakthrough Varicella	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Virol .	6. 最初と最後の頁 53-58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jcv.2019.07.009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	東本 祐紀 (Higashimoto Yuki) (20569701)	藤田医科大学・医療科学部・講師 (33916)	
研究分担者	吉川 哲史 (Yoshikawa Tetsushi) (80288472)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------