

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月17日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591186

研究課題名（和文） LAMP 法パネルを用いた小児重症肺炎の迅速診断系の確立とその臨床応用に関する研究

研究課題名（英文） Developing a panel of reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assays for comprehensive detection of causing viruses in pediatric severe pneumonia

研究代表者

久保 亨 (KUBO TORU)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：50444873

研究成果の概要（和文）：パンデミックインフルエンザウイルス感染をはじめとする小児重症ウイルス性肺炎において、迅速な診断の確立はその予後を左右しうる重要な要素であり、迅速・簡便な確定診断法の確立は非常に重要である。我々は小児重症ウイルス性肺炎の原因ウイルスに対するLAMP法のセット、すなわちLAMP法パネルを作成し、このパネルを用いて小児重症ウイルス性肺炎の迅速な鑑別診断がベッドサイドのレベルでも行えるシステムの構築を目指した。

研究成果の概要（英文）：The reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) method is a rapid, accurate and easy to use molecular amplifying diagnostic method which has been used for diagnosis of various infectious diseases. We are trying to develop an ambient diagnostic system for pediatric viral pneumonia using a panel of RT-LAMP reactions together with a concise nucleic acid extraction method. This system has the potential to be used as a simple tool for rapid laboratory diagnosis of infectious diseases in basic diagnostic facilities in resource limited settings, even in a disaster affected area.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児感染症学、感染症、ウイルス、臨床

1. 研究開始当初の背景

（1）小児ウイルス性肺炎の迅速確定診断法の必要性

2009年の春先から世界中で流行の始まったパンデミック H1N1 インフルエンザウイルス感染症に見られたように、小児重症ウイルス性肺炎の迅速確定診断は、その治療方針の決定と予後を左右する極めて重要な

要素である。小児の新型インフルエンザウイルス感染症においては発症後に急速に症状が悪化する例も少なくなく、このことから、小児重症ウイルス性肺炎に対しての迅速・簡便、正確な、より広い範囲の医療機関で行うことのできる、確定診断法の確立は急務と考えられた。

(2) 研究開始当初の小児ウイルス性肺炎の迅速確定診断法

研究開始当初は新型インフルエンザ感染症をはじめとする重症ウイルス性呼吸器感染症の確定診断法としては、リアルタイムPCR法、中でも数種類のウイルスを同時に検出することが可能なマルチプレックス・リアルタイムPCR法が確立されているが、この方法には高額な機器（研究開始当時1台約1千万円）や特殊な試薬（プライマー・プローブなど）が必要であり、診断確定までに要する時間も3時間以上と長く、小規模病院の外來や病棟レベルで使用するのは困難であった。またリアルタイムPCR法はそのシステムの特性から、少数の検体を頻回に検査するには適していなかった。

(3) LAMP法パネル開発の技術的背景

LAMP法は日本の栄研化学社によって開発された簡便で迅速な遺伝子増幅検査法であり、特殊な機器を用いることなく、60°C程度の一定温度で1時間弱加熱するだけで目的ウイルスの同定を行うことができ、既にSARSや強毒性H5N1インフルエンザウイルス感染症などの診断に応用されている。我々はこのLAMP法をパンデミックH1N1インフルエンザウイルス感染症の迅速診断のために応用することに成功し、実際に臨床使用が可能なることも確認した。

2. 研究の目的

(1) LAMP法はその迅速性・簡便性から、ベッドサイドにおける診断目的での使用が可能で、小児重症ウイルス性肺炎の迅速確定診断法として極めて適していると考えられる。しかし研究開始当初は、小児のウイルス性呼吸器感染症を網羅的に診断することのできるLAMP法のセット、すなわちLAMP法パネルを用いた迅速診断法はまだ確立されていなかった。このシステムの開発を行い、新型インフルエンザに対するLAMP法とともに臨床現場に導入できれば、長崎県の離島など地方の小病院レベルにおいても小児重症ウイルス性呼吸器感染症の迅速確定診断を独自に行うことができると考えられた。

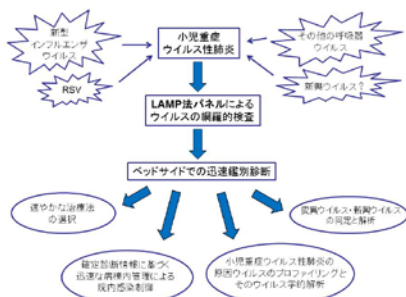


図1. 研究の目的

(2) 本研究では小児重症ウイルス性呼吸器感染症の網羅的迅速確定診断を行えるLAMP法パネルの作成を行い、実際の臨床の現場における応用を目指した。

(3) 同時にこのシステムを用いてインフルエンザパンデミック期にどのような原因ウイルスが小児重症ウイルス性呼吸器感染症を引き起こしているのかを明らかにし、それらウイルスについてウイルス分離や遺伝子配列決定などのウイルス学的解析も行っていくことを目的とした。

(4) 今後何年間かは新型インフルエンザウイルスのパンデミックが規模を変えながらも続いていくことが予想されており、このLAMP法パネルを用いた簡易迅速確定診断の系が臨床に応用できれば、速やかな治療法の選択や院内感染制御において臨床の現場が受ける恩恵は大きいと思われた。

(5) また、現在必ずしも詳しく解析されているとは言えない小児重症ウイルス性呼吸器感染症の原因ウイルスに関して解明していくことにつながり、同定されるウイルスの詳しいウイルス学的解析は今後の治療薬の創薬のためにも有用な情報となることが期待された。

(6) 加えて、このLAMP法パネルを用いた系は、変異ウイルスや新興の未知ウイルスを検出するためのサーベイランスの機能を果たすことも期待され、新興の未知ウイルスが同定されれば、その科学的意義は大きいと考えられた。

3. 研究の方法

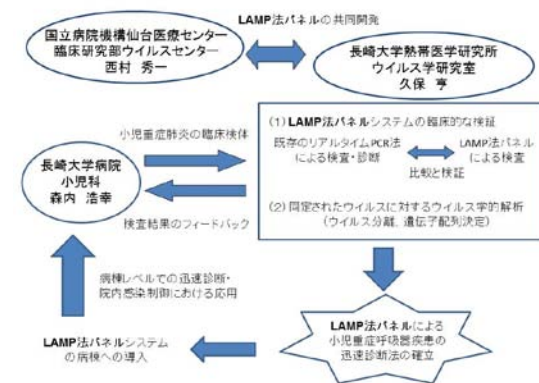


図2. 本研究の組織図と役割分担

(1) 初年度の平成22年度より、国立病院機構仙台医療センター臨床研究部ウイルス

センター・センター長の西村秀一博士と共同で、主要呼吸器疾患ウイルスに対する LAMP 法パネルの作成を開始した。

各ウイルスに対する LAMP プライマーセットをコンピューター・ソフトウェア (Primer Explorer v4) を用いて設計した後、合成する。今回 LAMP 法パネルの対象としたウイルスは以下のものである。

1. 新型インフルエンザウイルス (Pandemic (H1N1) 2009)
2. 季節性インフルエンザウイルス (A/H1N1、A/H3N2、B 型、C 型)
3. 強毒性鳥インフルエンザウイルス (A/H5N1)
4. SARS ウイルス
5. RSV
6. パラインフルエンザウイルス
7. メタニューモウイルス
8. アデノウイルス
9. コロナウイルス NL63
10. ライノウイルス
11. エンテロウイルス

このうち、1-5 までのウイルスに関しては既に LAMP 法が他のグループにより確立されており、残りのウイルスに対して独自に LAMP プライマーのデザイン・合成を行った。

(2) 合成された LAMP プライマーを用いた LAMP 反応の、標的とするウイルスの検出の感度を、分離されたウイルスから抽出された核酸を用いて調べる。また標的以外のウイルスとの交差反応性がないことを検定する。これらの検定のために必要なウイルス遺伝子は、国立病院機構仙台医療センター臨床研究部ウイルスセンターに保存されているものを用いた。

(3) 同時に、対象とする各ウイルスに対するリアルタイム PCR 法のためのプライマー・プローブ (既に実用化され論文発表されているもの) の合成も行い、リアルタイム PCR 法による検査システムのセットアップも行った。新たにデザインされた LAMP 法と、既存のリアルタイム PCR 法の感度を比較し、臨床応用の可能性を実験室レベルで検証した。

(4) 長崎大学病院小児科教授森内浩幸博士および他の研究協力者よりインフォームド consent のもと患者の臨床検体 (鼻咽頭ぬぐい液、気管支洗浄液など) の提供を受け、既存のリアルタイム PCR 法と新たに作成した LAMP 法パネルの両方により検査することで両者の結果を比較し、LAMP 法パネルによる迅速診断系の臨床レベルでの応用の実現性の検定を行った。

(5) 同時に、検体より同定されたウイルスのウイルス学的解析 (ウイルスの分離、遺伝子配列の決定など) も行う。この時原因となるウイルスが同定できなかった検体に関しては、さらなる網羅的な検索を行うこととした。

(6) LAMP 法パネルの完成後には長崎大学病院小児科病棟や他の研究協力医療機関にこのシステムを導入し、ベッドサイドでの迅速確定診断や、診断結果に基づく病棟内管理による院内感染制御への応用を目指すこととした。また、この LAMP 法パネルを用いたシステムを、全国の他の医療機関への紹介を行ったり、これら簡便、安価で正確な診断技術の発展途上国における導入についても模索していくこととした。

4. 研究成果

(1) LAMP法パネルの作成

本研究期間中に小児重症ウイルス性肺炎の原因となる主要なウイルスに対する LAMP 法の系を作成することができた。

研究開始から平成23年度までに、季節性インフルエンザウイルス (A型 (Pdm、H1、H3)、B型およびC型)、パラインフルエンザウイルス (1型—4型)、RSウイルスに対する LAMP 法を作成し、培養ウイルス由来の RNA のみでなく、臨床検体から抽出した核酸中のウイルス RNA を増幅可能であることを確認している。また、既存のリアルタイム PCR 法と比較して、ほぼ同等の感度・特異度を示した。

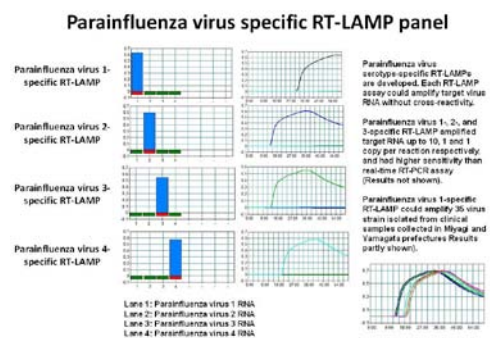


図 3. パラインフルエンザウイルスの各血清型特異的な LAMP 法の増幅反応の結果

平成24年度はコロナウイルス、エンテロウイルスに対する LAMP 法の作成を行った。エンテロウイルスは小児のいわゆる「夏かぜ」のウイルスであるが、重症例では致死的な髄膜炎や脳炎を引き起こし、インフルエンザウイルスや RSウイルスによる脳炎との鑑別が必要となる疾患である。

ヒトメタニューモウイルス、アデノウイルスに対するLAMP法の作成は現在も継続中である。

(2) 呼吸器感染症原因微生物検査のためのマルチプレックス・リアルタイム PCR の系の確立

LAMP 法パネルとの比較検討のためにセットアップを始めたマルチプレックス・リアルタイム PCR の系であったが、本研究期間中に図4に示したように、16種類のウイルス(パラインフルエンザウイルス(1型-4型)、RSウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ライノウイルス、アデノウイルス、コロナウイルス(OC43、229E、HKU1、NL63)、インフルエンザウイルス(A型、B型、C型)、エンテロウイルス)に加え、10種類の細菌(肺炎球菌、レンサ球菌、インフルエンザ桿菌、マイコプラズマ、レジオネラ、クラミジア、結核菌、黄色ブドウ球菌、百日咳菌、MRSAの*mecA*遺伝子)検出を可能としたマルチプレックス・リアルタイム PCR の系を作成することができた。

セット名	微生物名	セット名	微生物名
セット1	パラインフルエンザウイルス1	セット5	インフルエンザ菌
	パラインフルエンザウイルス2		肺炎球菌
	パラインフルエンザウイルス3		結核菌
	パラインフルエンザウイルス4		
セット2	RSウイルス	セット6	エンテロウイルス
	メタニューモウイルス		レジオネラ
	ライノウイルス		マイコプラズマ
セット3	アデノウイルス	セット7	クラミジア
	コロナウイルス HKU1		ブドウ球菌
	コロナウイルス 229E		百日咳菌
	コロナウイルス OC43		<i>mecA</i> 遺伝子 (MRSA)
	コロナウイルス NL63		レンサ球菌
セット4	インフルエンザB		
	インフルエンザC		
	インフルエンザA		
	RNaseP(コントロール)		

図4. マルチプレックス・リアルタイム PCR の系

この合計7セットのプライマー・プローブのミックスからなるマルチプレックス・リアルタイム PCR の系は日常診療における肺炎の原因微生物の特定に極めて有用な方法となった。本法は迅速かつ比較的安価・簡便でありながら、臨床的に極めて有用な情報を得ることができ、今後 LAMP 法パネルとともに地域医療の現場においても大きな貢献がなされることが期待される。

(3) 臨床現場における呼吸器感染症のスクリーニングシステムの確立

本研究の開始から長崎県内の協力医療機関においてインフォームドコンセントのもと収集された、インフルエンザをはじめとする呼吸器感染症症例の臨床検体の解析を行い、現在までに1000検体以上の解析を行った。平成24年度に日本赤十字社長崎原爆諫早病院および周辺の医療機関において肺炎

をはじめとする呼吸器感染症例から収集された198の臨床検体を上記マルチプレックス・リアルタイム PCR 法でスクリーニングしたところ、うち115例(58.1%)で原因となる病原体を特定することができた。83例(41.9%)では原因が特定されなかった。原因が特定できなかった例が多かった理由としては、成人患者が多かったこと、既に抗生剤等で治療を受けていた患者が多かったことなども考えられるが、現在その理由を検討中である。

このように、本研究により臨床現場における呼吸器感染症のスクリーニングの系を確立することができた。また、研究開始当初に期待していた以上の数の臨床検体を収集することができ、これは本研究のような基礎と臨床を結ぶトランスレーショナル・リサーチの成功といえる。

(4) 同時に、この検査システムを用いて、インフルエンザパンデミック期とその後にどのような原因ウイルスが小児重症ウイルス性呼吸器感染症を引き起こしているのかを明らかにするためのウイルス学的解析も行ってきた。上述のスクリーニング系によっても原因微生物が不明な検体に関しては、次世代シーケンサーを用いて網羅的な検索のできる系の開発を進めている。

(5) 今回の研究を通じて地域医療における呼吸器感染症のスクリーニングシステムを確立することができ、得られる結果を実際の臨床にフィードバックし診断の参考とすることで患者ならびに医療従事者が受けた恩恵は大きい。今後はさらにこのシステムを拡充し、新型インフルエンザ、新型コロナウイルス、SFTSウイルスなどに対するLAMP法やリアルタイム PCR 法を作成することで、新興感染症診断に備えたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

中山哲夫・福島喜代康・久保亨・森田公一、インフルエンザウイルス迅速診断キットの検出感度、医学と薬学、査読無、64巻、2010、273-280

〔学会発表〕(計 6 件)

① 久保 亨、吾郷 昌信、森内 浩幸、西村 秀二、森田 公一、エンテロウイルス71に対するRT-LAMP法を用いた迅速診断系の開発とその臨床応用に関する研究、第60

回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月14日、グランキューブ大阪（大阪府）

- ② 久保 亨、吾郷 昌信、森内 浩幸、森田 公一、エンテロウイルス 71 に対する RT-LAMP 法を用いた迅速診断系の開発とその臨床応用に関する研究、第 86 回日本感染症学会総会学術講演会、2012 年 4 月 26 日、長崎ブリックホール（長崎県）
- ③ Toru Kubo, Hidekazu Nishimura, Hiroyuki Moriuchi, Kouichi Morita, Developing a panel of reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assays for comprehensive detection of causing viruses in pediatric severe pneumonia, XV International Congress of Virology, 2011 年 9 月 16 日、札幌コンベンションセンター（北海道）
- ④ 久保 亨、福島 喜代康、西村 秀一、河野 茂、森田 公一、新型および季節性インフルエンザ迅速鑑別診断のための RT-LAMP 法パネルの開発と、その臨床応用について、第 85 回日本感染症学会総会学術講演会、2011 年 4 月 21 日、ザプリンスパークタワー東京（東京都）
- ⑤ 久保 亨、L. Q. Mai、吾郷 昌信、福島 喜代康、西村 秀一、吉川 亮、山口 顕徳、平野 学、井手 昇太郎、河野 茂、長谷部太、森田 公一、新型および季節性インフルエンザの迅速鑑別診断のための RT-LAMP 法パネルの開発と、その臨床応用の研究、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 8 日、徳島県徳島市あわぎんホール（徳島県）
- ⑥ 久保 亨、福島 喜代康、西村 秀一、井手 昇太郎、河野 茂、森田 公一、新型インフルエンザウイルス特異的 RT-LAMP 法の開発と、その臨床応用の研究、第 84 回日本感染症学会総会学術講演会、2010 年 4 月 6 日、京都府京都市国立京都国際会館（京都府）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 亨 (KUBO TORU)

長崎大学・熱帯医学研究所・客員研究員

研究者番号：50444873

(2) 研究分担者

森内 浩幸 (MORIUCHI HIROYUKI)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：90315234

西村 秀一 (NISHIMURA HIDEKAZU)

独立行政法人国立病院機構仙台医療センター臨床研究部・臨床研究部ウイルスセンター・臨床研究部ウイルスセンター長

研究者番号：50172698