

麻疹及び風疹の迅速診断のための検査法の検討

Comparison of Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification
with Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
as Methods for the Rapid Diagnosis of Measles virus and Rubella virus Infection

濱野雅子 (ウイルス科), 小倉 肇

Masako Hamano and Hajime Ogura

風疹ウイルス乾燥弱毒生ワクチン(TO-336株, 武田薬品工業(株)製, 製造番号:E601, ウイルス含有量 \geq 1400 PFU/バイアル)を用いた。

(2) ウイルスRNAの抽出

乾燥生ワクチンを当所使用のウイルス検体輸送液(10.0%牛血清アルブミン0.5%ゼラチン0.47%HEPES 500U/mlペニシリン 500 μ g/mlストレプトマイシン 500 μ g/mlカナマイシン 添加 Ear1'BSS)で $10^0 \sim 10^6$ 倍に段階希釈したものから, 核酸抽出装置(QIAcube: QIAGEN社製)と市販のウイルスRNAキット(QIAamp viral RNA mini kit: QIAGEN社製)でRNAを抽出して供試検体とした。

(3) RT-LAMP法

RT-LAMP法は, 麻しんウイルスはFujino, M.らの方法¹⁾, 風疹ウイルスはMori, N.らの方法²⁾に従い, 抽

出RNA 5 μ lを表1に示すプライマーセットにより Loopampリアルタイム濁度測定装置(RT-160C: 栄研化学(株)製)を用いて63 $^{\circ}$ C60分間増幅を行い, 濁度を経時的に測定して装置内蔵の解析ソフトにより自動判定した。

(4) RT-PCR法

麻しんウイルスのRT-PCR法はHA遺伝子を標的とする方法³⁾, 風疹ウイルスのRT-PCR法はE1遺伝子を標的とする方法⁴⁾に従って, それぞれ1st-PCR, nested-PCRを実施した。使用したプライマーセットを表2に示す。麻しんウイルスRT-PCRは, 抽出RNA 5 μ lを42 $^{\circ}$ C35分逆転写し, その全量を増幅した。PCR条件は, 94 $^{\circ}$ C2分プレヒート後94 $^{\circ}$ C2分53 $^{\circ}$ C3分(nestedは55 $^{\circ}$ C3分)72 $^{\circ}$ C2.5分を30サイクル増幅, ファイナルエクステンション72 $^{\circ}$ C7分で実施した。風疹ウイルスの

表1. RT-LAMP法による麻しんウイルス及び風疹ウイルス検出用プライマーセット

ウイルス名	プライマー名	塩基長 (base)	塩基配列
麻しん ウイルス	MV - F 3	18	5'-ACA TTG GCA TCT GAA CTC-3'
	MV - FIP	42	5'-TGT CCT CAG TAG TAT GCA TTG CAG GTA TCA CTG CCG AGG ATG-3'
	MV - F-Loop	14	5'-ATC TCT GAA ACA AG-3'
	MV - B 3	18	5'-TCC TCG ACT CTG TTT GAC-3'
	MV - BIP	46	5'-AGC CCA AGT GTC ATT TCT ACA CGG TGT CCT ATC TTC CTT GCC CCC C-3'
	MV - B-Loop	17	5'-CAA AGT GAG AAT GAG CT-3'
風疹 ウイルス	RuV - F 3	20	5'-GCA TCT GGA ATG GCA CAC AG-3'
	RuV - FIP	35	5'-AGA GGC CAG CTG CGC GTA CCG CGC GTG CAC CTT CT-3'
	RuV - F-Loop	15	5'-CCA GAG GAG TAG GCG-3'
	RuV - B 3	18	5'-CCG CTT GTG CGA GTA GTG-3'
	RuV - BIP	34	5'-ACC GCG TGC GAG GTT GAA TGT CGG TGG GGA AGC C-3'
	RuV - B-Loop	15	5'-CCT GCC TTC GGA CAC-3'

* 区別のため、原著論文のプライマー名に麻しんウイルス用はMVを、風疹ウイルス用はRuVを付加した

表2. RT-PCR法による麻しんウイルスおよび風疹ウイルス検出用プライマーセット

ウイルス名	1st or nested	プライマー名	塩基長 (base)	塩基配列
麻しん ウイルス	1st用	MHL1	20	5'-AAC GGA TGA TCC AGT GAT AG-3'
		MHR1	20	5'-TTG AAT CTC GGT ATC CAC TC-3'
	nested用	MHL2	20	5'-TAC CTC TCA TCT CAC AGA GG-3'
		MHR2	20	5'-CAC CTA AGG CTA GGT TCT TC-3'
風疹 ウイルス	1st用	E 1-A	20	5'-GGC CTC TTA CTT CAA CCC TG-3'
		E 1-B	20	5'-CCG AGG CCC CAC CGG GAC TG-3'
	nested用	E 1-C	20	5'-GCG GCA GCT ACT ACA AGC AG-3'
		E 1-D	20	5'-TCG GGC GGG ACC TGG ACC TC-3'

RT-PCRは抽出RNA 5 μ lを42 $^{\circ}$ C 60分逆転写し、その3/20量を増幅したため、RNA量換算としては0.75 μ lであった。PCR条件は1st, nestedともに、94 $^{\circ}$ C 2分プレヒート後94 $^{\circ}$ C 1分55 $^{\circ}$ C 2分72 $^{\circ}$ C 1.5分を30サイクル増幅、ファイナルエクステンション72 $^{\circ}$ C 5分で実施した。

3 結果

(1) NRT-LAMP法とRT-PCR法による麻しんウイルスの検出

麻しんウイルスは、RT-LAMP法では10³倍希釈(≥0.11 CCID₅₀ / test)まで検出し得た。RT-PCR法では、1st-PCRで10²倍希釈(≥1.1 CCID₅₀ / test), nested-PCRで10⁵倍希釈(≥0.0011 CCID₅₀ / test)まで検出し得た(表3)。

表3. 麻しんウイルスの RT-LAMP 法と RT-PCR 法による検出感度の比較

Sample No.	希釈	供試ウイルス量 (CCID ₅₀)	RT-LAMP	RT-PCR*	
				1st	nested
1	1	≥110	+	+	+
2	10	≥11	+	+	+
3	10 ²	≥1.1	+	+	+
4	10 ³	≥0.11	+	-	+
5	10 ⁴	≥0.011	-	-	+
6	10 ⁵	≥0.0011	-	-	+
7	10 ⁶	≥0.00011	-	-	-

*増幅に供し得たウイルスRNA量は、RT-LAMP、RT-PCRともに5 μ l

(2) RT-LAMP法とRT-PCR法による風疹ウイルスの検出

風疹ウイルスは、RT-LAMP法では10³倍希釈(≥0.012 PFU / test)まで検出し得た。RT-PCR法では、1st-PCRでは検出できなかったが、nested-PCRで10倍希釈(≥1.2 PFU / test)まで検出し得た(表4)。RT-LAMP法と同量のRNAを増幅した場合の風疹ウイルスRT-PCRの検出限界を換算すると、nested PCRで≥0.18PFUになった。

表4. 風疹ウイルスの RT-LAMP 法と RT-PCR 法による検出感度の比較

Sample No.	希釈	供試ウイルス量 (PFU)	RT-LAMP	RT-PCR*	
				1st	nested
1	1	≥12	+	-	+
2	10	≥1.2	+	-	+
3	10 ²	≥0.12	+	-	-
4	10 ³	≥0.012	+	-	-
5	10 ⁴	≥0.0012	-	-	-
6	10 ⁵	≥0.00012	-	-	-
7	10 ⁶	≥0.000012	-	-	-

増幅に供し得たウイルスRNA量は、RT-LAMP 5 μ l に対し、RT-PCR 0.75 μ l

(3) RT-LAMP法とRT-PCR法の検査所要時間の比較

各検査法における検体前処理～判定までの最短所要時間は、RT-LAMP法では麻しんウイルス風疹ウイルスともに約155分であった。RT-PCR法では、麻しんウイルスの場合約665分、風疹ウイルスの場合約490分であった。(図1)

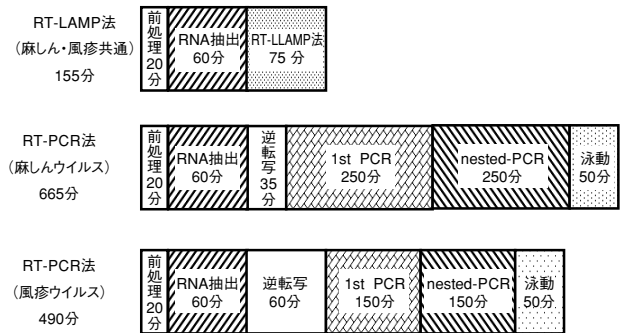


図1. RT-LAMP 法と RT-PCR 法の検査所要時間比較

4 考察

RT-LAMP法とRT-PCR法の検出感度を比較すると、同量のRNAを増幅した麻しんウイルスの場合、RT-LAMP法はRT-PCR法(1st)の10倍、RT-PCR法(nested)の100分の1であり、RT-LAMP法が優れているとはいえなかった。一方、風疹ウイルスの場合は、増幅に供試得たRNA量を等量と仮定して換算した場合のRT-PCR法(nested)と比較してもRT-LAMP法が勝っていた。

検査所要時間では、RT-LAMP法が麻しんウイルス、風疹ウイルスともにRT-PCR法の1/4～1/3の時間で検出でき、迅速性ではRT-LAMP法が優れていた。また、麻しんウイルス及び風疹ウイルスのRT-LAMP法は同一の増幅条件であるため、少数の検体であれば同時検索が可能であり、逆転写、増幅条件ともに異なる両ウイルスのRT-PCR法より有利と考えられる。

RT-LAMP法のもう一つの利点は、新たな機器整備の必要がないことである。RT-LAMP法には専用の測定機器であるLoopampリアルタイム濁度測定装置が必要であるが、多くの地方衛生研究所においてはSARS対策用としてすでに整備されており、新規にこの検査法を導入しても機器購入の必要はない。

一方、RT-LAMP法は、増幅産物を詳細な遺伝子解析に使用できない欠点があり、検出感度も考慮した場

合、現時点では二者択一ではなく、RT-PCR法との使い分けが効果的と考えられる。すなわち、ウイルス排出量が多いと考えられる有熱期の患者等の迅速診断にRT-LAMP法を用い、陽性であれば速やかに報告するとともにRT-PCR法を実施して詳細な解析を行う。麻疹ウイルスの場合は、RT-LAMP法陰性の場合もRT-PCR法を行ってウイルスの有無を確認する必要がある。

5 まとめ

- (1) RT-LAMP法の検出感度は、麻疹ウイルスではnested RT-PCR法より低く、風疹ウイルスではnested RT-PCR法より高かった。
- (2) 検査所用時間は、RT-LAMP法はRT-PCR法の1/4～1/3であり、迅速性に優れ、増幅条件が同一であることから麻疹・風疹両ウイルスの同時検索も可能であった。
- (3) RT-LAMP法は、増幅産物が遺伝子解析に使用できない欠点はあるが、迅速・簡便であり、RT-PCR法と適切に組み合わせることで、患者の迅速な鑑別診断と病原体スクリーニングがより効率的に実施できる。

本研究は、平成19年度厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)により行われた。

6 文献

- 1) Fujino, M., Yoshida, N., Yamaguchi, S., Hosaka, N., Ota, Y., Notomi, T., Nakayama, T. : A simple method for the detection of Measles virus genome by Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), J. Med. Virol., 76, 406-413, 2005
- 2) Mori, N., Motegi, Y., Shimamura, Y., Ezaki, T., Natsumeda, T., Yonekawa, T., Ota, Y., Notomi, T., Nakayama, T. : Development of a new method for diagnosis of Rubella virus infection by reverse transcription-Loop-mediated isothermal amplification, J. Clin. Microbiol., 44, 3268-3273, 2006
- 3) 国立感染症研究所編:「病原体検出マニュアル」[麻疹], 11-13, 2002
- 4) 国立感染症研究所編:「病原体検出マニュアル」, [風疹], 9-12, 2002