



(題字：相良祐輔学長)

国立大学法人 高知大学学報

高知大学学位授与記録第二十八号

総務課広報室発行

本学は、次の者に博士（学術）の学位を授与したので、高知大学学位規則第15条に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

目 次

学位記番号	氏名	学位論文の題目	ページ
乙総科博第1号	大槻 隆司	Loop-mediated isothermal amplification method (LAMP法) によるブルセラ属菌と毒素産生性コレラ菌の迅速検出法	1

<p>ふりがな 氏名(本籍) 学位の種類 学位記番号 学位授与の要件 学位授与年月日 学位論文題目 発表誌名</p>	<p>おおつき りゅうじ 大槻 隆司 (千葉県) 博士(理学) 乙総科博第1号 学位規則第4条第2項該当 平成20年9月5日 Loop-mediated isothermal amplification method (LAMP 法) によるブルセラ属菌と毒素産生性コレラ菌の迅速検出法 (1) Journal of Applied Microbiology 104: 1815-1823</p> <p style="text-align: right;">審査委員 主査 教授 鈴木 知彦 副査 教授 川村 和夫 副査 教授 逸見 豊 副査 教授 松岡 達臣</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

論文の内容の要旨

ブルセラ属菌 (*Brucella* spp.) は人獣共通感染症の一つであるブルセラ症の起因菌であり、感染するとヒトでは波状熱を、動物では不妊や流産などの繁殖障害を引き起こす。共同生活者として動物への依存度が強い国や地域では、未だに重要な感染症の一つであり、公衆衛生上や農業経済上問題となっている。また本菌はバイオテロでの使用が古くから危惧されており、米国疾病予防センターでは、炭疽菌・天然痘などに次ぐ危険度の高い病原体として、category B に分類している。ブルセラ症に特有の症状は無く、多様な症状を呈する為、診断には検査室での細菌学検査が必須であるが、従来からの免疫学・血清学的な方法では、類縁菌や同一抗原を持つ *Yersinia enterocolitica* に交差が見られることが問題となっている。近年 PCR 法などによる診断法が開発されており、ブルセラ菌の特異的検出や迅速診断に役立っている。しかしながら本症の流行地域である発展途上国等では、サーマルサイクラーのような高額機器の使用は困難である為、PCR による診断法は普及には至っていない。そこで本研究では PCR に変わる診断法として、近年開発された遺伝子増幅法の1つである、LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法を用いた迅速検出法の開発を行った。ターゲットには *B. abortus* 31 kDa 細胞表面タンパク質遺伝子 (*BCSP31*) を用いた。菌株は参照株・ワクチン株・臨床分離株等の他に、遺伝学的・血清学的に関連する類縁菌株を用いて特異性を評価した。またブルセラ菌に感染させたマウスから脾臓・肝臓を摘出し、それらの精製 DNA を用いて、感染材料からの検出の評価を行った。本方法は 63°C 恒温下・反応時間 40 分で、ブルセラ属 6 菌種を特異的かつ高感度 (DNA 10 fg) に増幅した。また感染マウス臓器由来 DNA や汚染ミルクからも検出が可能であった。従来の PCR 法と比べて、検出感度は同等で反応時間が短縮されたことその他、本方法は恒温ブロックなどの簡便な機器があれば行うことが可能である事から、本研究で開発された検出法は、オンサイトでの検査実施や、発展途上国等での検査にも有益であると考えられた。

一方コレラは毒素産生性コレラ菌 (*Vibrio cholerae* O1, O139) で汚染された水や食品を介して経口感染し、激しい水溶性下痢を発症する。世界中で年間 24 万人以上が感染し、6000 人以上の死亡が報告されている。本研究ではコレラ毒素サブユニット A 遺伝子 (*ctxA*) をターゲットに LAMP 法を用いた迅速検出法の開発を行った。その結果 63°C 恒温下・反応時間 40 分で、毒素産生性コレラ菌を特異的に増幅した。本方法を応用し、実際の発生を想定して、患者便のスワブサンプルからの簡便な検出が可能かどうか現在検討を進め、将来的には発展途上国等での検査に応用することを考えている。

論文審査の結果の要旨

LAMP法は2000年に栄研化学の納富らによって開発された、鎖置換DNA伸長反応を用いた新しい遺伝子増幅法である。この方法はターゲット遺伝子の増幅に6種類のプライマーを用いる為特異性が高く、60°C～65°Cの恒温反応により、非常に高い増幅効率 ($10^9\sim 10^{10}$ 倍) でターゲット遺伝子を短時間に増幅出来る。また増幅産物は直接目視が可能であり電気泳動を必要としない。こうした理由から現在までに様々な病原体の検出法として応用されている。本研究では、LAMP法によるブルセラ属菌と毒素産生性コレラ菌の迅速検出法について述べている。本論文は、以下の2章から成っており、その概要は以下の通りである。

第1章「LAMP法によるブルセラ属菌迅速検出法」

ブルセラ属菌 (*Brucella* spp.) は、人獣共通感染症の1つであるブルセラ症の起因菌であり、本菌感染によりヒトでは波状熱を、動物では不妊や流産などの繁殖障害を引き起こす。中東や西アジアなどの流行地域では、ブルセラ症は公衆衛生や農業経済上問題となっており、予防や迅速診断法の確立が求められている。本研究では、LAMP法によるブルセラ属菌の迅速検出法の開発を行った。

2組のブルセラ属菌特異的 LAMP プライマーを、*B. abortus* BCSP31 遺伝子 (GenBank Accession No.: M20404) の配列をもとに、LAMP Primer 設計ソフトウェア (Primer Explorer V4 : <http://primerexplorer.jp/>) を用いて設計した。特異性の確認のため、菌株はブルセラ属6菌種 (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. canis*, *B. ovis*) の参照株・ワクチン株・臨床分離株を含む計22株を用いた。また、ブルセラ菌と同一抗原を持つために、ローズベンガルテストの様な従来からの免疫学的方法では判別が困難な *Yersinia enterocolitica* O:9 株の他、遺伝学的・血清学的に関連する類縁菌28株を用いて特異性を評価した。

培養した菌株から抽出したDNAを10×段階希釈してリアルタイムLAMPに用い、検出時間・感度を評価した。また報告のあるSYBR Green Iを用いたリアルタイムPCR法との感度の比較を行った。さらにブルセラ菌に感染させたマウスから脾臓と肝臓を摘出し、それらから抽出したtotal DNAを用いて、感染臓器からのLAMP検出の評価を行うと共に、ブルセラ菌汚染牛乳からの検出を実施した。

本方法は63°C 35分の恒温反応により、ブルセラ属6菌種を特異的かつ高感度 (DNA 10 fg) に検出した。この感度は報告のあるリアルタイムPCR法による感度と同程度であった。しかしながらリアルタイムPCR法では42サイクル以上の増幅で*V. cholerae* O1 の非特異的増幅が見られたが、本研究のLAMP法では見られなかった。また感染マウスの脾臓では、1反応あたり 8.2×10^2 CFUから、汚染牛乳からは増菌培養無しで、 4.9×10^4 CFUからの検出が可能であった。これらの結果から本研究のLAMP法は、感染初期のブルセラ症の迅速診断だけでなく、少量の菌の環境汚染の検出にも有用である事が示唆された。

論文審査の結果の要旨

第2章「LAMP法による毒素産生性コレラ菌迅速検出法」

コレラは最も重要な水伝染性の下痢性疾患の1つであり、発展途上国を中心に世界中で毎年24万人以上が感染し、6,000人以上の死亡が報告されている。海外旅行や国際物流が盛んな今日では、本邦でも輸入感染症として毎年約30～50人の患者が発生している。重症コレラの場合、下痢便の量は1日に10Lを超えることがあり、治療をしなかったならば24時間以内に脱水症で死亡する。しかしながら、重篤な脱水症状を起こす前に十分な輸液を行えば致命率は低い。それゆえ早期の診断と治療開始が重要であり、簡易で迅速な診断法の確立が求められている。本研究では、LAMP法による毒素産生性コレラ菌の迅速検出法の開発を行った。

コレラ毒素サブユニットA (*ctxA*) 遺伝子 (GenBank Accession No.: X00171) の配列をもとに、1組のプライマーセットを設計した。毒素産生性コレラ菌 (*Vibrio cholerae* O1, O139) 5株の他、同属の *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* を含むコレラ菌以外の菌株 (15株) を用いて LAMP プライマーの特異性を評価した。さらに、臨床応用のために人工的に毒素産生性コレラ菌を接種した糞便から抽出した DNA を使って、リアルタイム LAMP 法による糞便からのコレラ菌の検出を試みた。

本方法では63°C 40分の恒温反応で、毒素産生性コレラ菌を特異的に増幅し、検出限界は1反応あたりDNA 100 fgであった。また毒素産生性コレラ菌接種糞便からは、1反応あたり 2.1×10^1 CFU からの検出が可能であったが、コレラ菌未接種の糞便から抽出したDNAを用いた場合は何も増幅しなかった。糞便中には様々な腸内細菌が含まれているが、本方法は毒素産生性コレラ菌未接種の糞便から抽出したDNAからは何も増幅しなかったことから、その特異性は極めて高く、患者便からのコレラ菌検出などにも十分応用可能な事が示唆された。

以上を総括すると、LAMP法は60°C～65°Cの恒温反応で増幅するので、ヒートブロックや、ウォーターバスなどの安価な機器があれば実行可能な事や、増幅産物は直接目視が可能であり電気泳動を必要としない為、ブルセラ症やコレラの流行地域である発展途上国等における利用も期待できる。本研究による LAMP 法を用いたブルセラ属菌と毒素産生性コレラ菌の迅速検出法は、どちらも極めて高い特異性と検出感度を持ち合わせた検出法であり、ブルセラ症やコレラの迅速診断や監視に有用であると考えられた。

この内容の一部は、以下の査読付きの国際誌に公表されている。

Ohtsuki R, Kawamoto K, Kato Y, Shah MM, Ezaki T, Makino S-I. (2008) Rapid detection of *Brucella* spp. by the loop-mediated isothermal amplification method. Journal of Applied Microbiology 104: 1815-1823

さらに大槻隆司氏はこの他に査読付きの論文を4報発表しており、また国際学会等で複数回発表している。これらのことを総合すると、大槻氏は博士の学位を取得するに十分値すると思われる。