LAMP 法によるアフリカトリパノソーマ高感度検出

井上 昇，オリエル テキソエ，久保木 基高、杉本 千尋
（帯広畜産大学原虫病研究センター・先端予防治療学分野）

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and its application for the detection of African trypanosomes

Noboru INOUE, Oriel M. M. THEKISOE, Noritaka KUBOKI, Chihiro SUGIMOTO
(Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, National Research Center for Protozoan Diseases, Research Unit for Advanced Preventive Medicine)

SUMMARY

While PCR is a method of choice for the detection of African trypanosomes in both man and animals, the expense of this method negates its use as a diagnostic method for the detection of African trypanosomosis in African countries where it is endemic. The loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reaction is a method that amplifies DNA with high specificity, efficiency and rapidity under isothermal conditions using only simple incubators. An added advantage of LAMP over PCR-based methods is that DNA amplification can be monitored spectrophotometrically and/or with the naked eye, without the use of dyes. Here we present our conditions for a highly sensitive, specific and easy diagnostic assay based on LAMP technology for the detection of parasites of the *Trypanosoma brucei* group (including *T. b. brucei*, *T. b. gambiense*, *T. b. rhodesiense*, and *T. evansi*) and *T. congolense*. We show that the sensitivity of the LAMP-based method in detecting trypanosomes in vitro is up to 100 times higher than that of PCR-based methods in laboratory conditions. *In vivo* studies in mice infected with human-infective *T. b. gambiense* further highlight the potential clinical importance of LAMP as a diagnostic tool for identification of African trypanosomiasis.

［目的］現在最も一般的に行なわれているアフリカトリパノソーマ病診断法は、鏡検による原虫検出法である。蛍光抗体法、ラテックス凝集反応および CF 反応などの血清診断法は簡便・安価であるが、特異性・検出感度などに問題がある。一方、ELISA および PCR 法は実施にあたって高価な機器を必要とするため広く用いられるには至っていない。LAMP 法は新しい高感度 DNA 増幅法であり、反応が一定温度で行なわれるため、高価な機器を必要とせず、簡便・高感度かつ迅速に DNA 増幅を行なうことができる。また、同法は DNA 増幅効率が極めて高く、DNA 合成反応副産物であるピロリン酸が反応液中のマグネシウムイオンと結合して沈殿し、反応液を白濁させるため、反応液の白濁によって陽性判定を行なうこ

とができる画期的な方法である。そこで演者らはLAMP 法を用いたトリパノソーマ検出法の確立を試みた。

［材料と方法］*Trypanosoma brucei* 鞭毛抗原遺伝子である *PFR* A および *T. congolense* リボソーム P0蛋白質を標的遺伝子とし、LAMP プライマーを設計した。LAMP プライマーの設計は栄研化学株式会社がオンラインで提供するプライマー設計ソフトウエア・Primer Explorer を用いて行った。

［結果と考察］*Trypanosoma brucei* および *T. congolense* から抽出したトータル DNA を用いて LAMP 反応を行った結果、両プライマーで良好な増幅が得られた。10 µg/µl から1 pg/µl まで10倍階段希釈したトリパノソーマ DNA を鋳型に、*PFR* A および P0に対する PCR と LAMP 法の検出感度を比較した結果、*PFR* A では PCR の100倍（1 pg）、P0では PCR と同等（1 µg）であった。また、P0プライマーは *T. congolense* 特異的であったが、*PFR* A プライマーは *T. brucei* グループである *T. b. brucei, T. b. gambiense, T. b. rhodesiense* に加えて近縁種の *T. evansi* にも反応した。次に、*T. b. gambiense* 慢性感染マウスより経時的に採取した血液サンプルを FTA ろ紙（ワットマン）に吸収乾燥させ、精製試薬を用いて DNA を精製し、鋳型として、*PFR* A に対する LAMP 法および PCR を行なった。その結果、LAMP 法は鏡検による検出法より感度が高かったが、PCR では鏡検よりも検出感度が低かった。以上の結果より、LAMP 法は特異的・簡便かつ高感度なトリパノソーマ診断法として応用可能であることが明らかとなった。

［文献］

1) Thekisoe, O. M. M. et al., (2005) Veterinary Parasitology 130 (3-4): 327-330.
2) Kuboki, N. et al., (2003) Journal of Clinical Microbiology, 41 (12): 5517-5524.
3) Notomi, T. et al. (2000) Nucleic Acids Res. 28: e63.