




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 ①・論	第 667号	氏名	BENJAWAN SAECHUE
審査委員会委員	主査氏名	花田 礼子 ②	
	副査氏名	久保田 敏昭 ③	
	副査氏名	廣中 秀一 ④	
論文題目 Development of a portable reverse transcription loop-mediated isothermal amplification system to detect the E1 region of Chikungunya virus in a cost-effective manner. (チクングニアウイルス E1 領域を標的とした、逆転写ループ介在等温増幅(RT-LAMP)法による、安価かつ持ち運び可能な検出システムの開発)			
論文掲載雑誌名 Genes to Cells			
論文要旨 【背景と目的】チクングニア熱は持続的な関節痛を伴う蚊媒介性疾患である。現時点では、チクングニアウイルス (CHIKV) の確定診断は reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)法によるが、RT-PCR 法は高度な手技を伴う人員や精度の高い分析機器が必要である。一方、reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)法は迅速な解析が可能かつ簡易な機器を使用しており、様々な感染症において DNA をベースとした診断に使用されている。本研究では、CHIKV のエンベロープ 1 (E1) 遺伝子配列をターゲットにした dry RT-LAMP の開発ならびに CHIKV 検出システムの構築を行い、マウスサンプルならびにヒトのサンプルを用いて検証した。 【研究方法】CHIKV のエンベロープ 1 (E1) を標的とした 6 種類のプライマーを設定し、59°C60 分間のプロトコールで RT-LAMP 法を行った。検出方法としては、GelGreen ならびに hydroxynaphthol blue を用いた。本 RT-LAMP 法では CHIKV ならびに他のウイルスを用いて感度ならびに特異性を検証した。マウスを用いた実験では、IFNAR1 欠損マウスに CHIKV を感染させて血液サンプルを採取し、本 RT-LAMP 法の有効性とウイルス量依存的検出域を検証した。さらに、wet RT-LAMP 法を改良することで dry RT-LAMP 法を樹立し、そのウイルス検出域ならびに精度を解析するとともに、ヒトの CHIKV 症例から血液サンプルを採取して、CHIKV のスクリーニングに応用可能かどうかについても検討を行った。 【結果】本 RT-LAMP 法では、標的部位のプライマーを用いて 30 分以内に CHIKV の検出が可能であった。また、本測定系のウイルス価のカットオフ値は 8 PFU/反応あり、CHIKV 以外の arboviruses との交差反応は認められなかった (感度ならびに特異度が証明された。) CHIKV を感染させた IFNAR1 欠損マウスを用いた実験でも 30 分以内にウイルスの検出が可能であった。さらに、ヒトの感染症例におけるサンプルでも、wet/dry RT-LAMP のいずれにおいても 90% の確率でウイルスゲノムの検出が可能であった。 本研究では、新たに CHIKV に対する dry RT-LAMP 法を樹立し、CHIKV 感染マウスならびに CHIKV に感染したヒト症例の血液サンプルを用いて、ウイルス価の解析を行い、本測定系の評価をおこなった。その結果、本研究で樹立された dry RT-LAMP 測定系では、CHIKV 特異的ならびにウイルス価 8 PFU/反応以上の検出域が証明された。さらに本 dry RT-LAMP 法は安価で、感受性や精度も高く、システムの長期間保存も可能であることから、流行地域でのスクリーニングなどに有用であることが示された。 以上より、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。			

最終試験
の結果の要旨
~~学力の確認~~

審査区分 課・論	第 667 号	氏名	BENJAWAN SAECHUE
審査委員会委員	主査氏名	花田 礼子	
	副査氏名	久保田 敏昭	
	副査氏名	廣中 秀一	

学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。

- 1) Have you seen the patients of Chikungunya fever?
- 2) You mentioned that RT-LAMP system enables us to carry out on-site diagnosis without a cold chain in a cost-effective manner. How much does it keep price down?
- 3) The envelope proteins 1 is one of the structural proteins of Chikungunya virus.
Could you present other structural proteins of the virus?
- 4) The viremia in IFNAR1-deficient mice was high enough to cause death in all mice within 6 days post-infection.
Can you explain the symptoms of the infected mice?
- 5) Can you explain the method to dry up the reagents for the reaction?
- 6) You mentioned that “A process for removing or suppressing these inhibitory factors might be necessary.”.
Can you suggest the methods to suppress these inhibitory factors?
- 7) Can you explain why saccharides improve the sensitivity of the dry system ?
- 8) If CHIKV are detected by LAMP PCR earlier, what is the treatment for infected patients?
- 9) The information of DRY RT-LAMP method was listed in the handout, what is the source of these data?
- 10) What is the novel point in this study?
- 11) Are Gel Green and HNB essential in the future RT-LAMP PCR?
- 12) In DRY RT-LAMP, does contamination occur or not?
- 13) In RT-LAMP with clinical samples, CHIKV was not able to be detected in the serum. What is main reason for not being able to detect?
- 14) In the actual “on-site”, are purification of RNA from blood sample and/or improvement of RT-LAMP method major problems?
- 15) How much ratio is the mortality of CHIKV in human?
- 16) In general, how long dose CHIKV remain in blood in human?
- 17) You have mentioned about the outbreak. Is there any specific reason for outbreak of CHIKV?
- 18) Are there any other diseases except arboviruses or infections we can use this RT-LAMP?
- 19) What is the key point of your primer design?
- 20) Why did you put “tttt” on FIP and BIP primers?
- 21) Why did you focus on E1 region for making primer? Is this region very specific for CHIKV?
- 22) In your case, how long does it take to find the right primer sets?
- 23) Is it commonly use of Gel green for RT-LAMP? What is the benefit for using this?
- 24) What is the reason to add trehalose even for wet RT-LAMP system?
- 25) Why did you use INFNAR1 deficient mice?
- 26) What is the reason to detect false positive in this RT-LAMP method?
- 27) As CHIKV was detected 8 PFU per reaction. Does this relate to clinical severity?

これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 Benjawan Saechue

論 文 題 目

Development of a portable reverse transcription loop-mediated isothermal amplification system to detect the E1 region of Chikungunya virus in a cost-effective manner.

(チクングニアウイルス E1 領域を標的とした、逆転写ループ介在等温増幅(RT-LAMP)法による、安価かつ持ち運び可能な検出システムの開発)

要 旨

Background:

Chikungunya fever is a mosquito-borne disease that causes persistent arthralgia. Chikungunya virus (CHIKV) diagnostic assay currently relies on conventional reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method that require the highly skilled personnel and precision instruments. A reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) method is a rapid and simple tool used for the DNA-based diagnosis of a variety of infectious diseases. Therefore, we established a RT-LAMP system for CHIKV targeting the envelope protein 1 (E1) gene and the cold chain-free dried reagents of RT-LAMP system.

Method:

- 1) RT-LAMP system was performed at 59°C for 60 min using six primers targeting in E1 gene with GelGreen and hydroxynaphthol blue as the indicator. The RT-LAMP system was validated with CHIKV and other arboviruses to determine the sensitivity and specificity.
- 2) The serum was collected from CHIKV-infected IFNAR1-deficient mice to evaluate the detection ability of our system.
- 3) We developed the dry RT-LAMP system including trehalose to stabilize the enzymes and validate its potential utility as CHIKV screening kit using human clinical samples.

Result:

- 1) Our system enable us to detect the target region within 30 minutes at a constant temperature. The lower limit of CHIKV detection in the system was 8 PFU per reaction. Moreover, the system could detect only CHIKV without cross-reaction with other arboviruses.
- 2) CHIKV in the serum of IFNAR1-deficient mice could be detected within 30 minutes incubation.
- 3) Both the wet and dry RT-LAMP system could detect the viral genome in nine out of ten human samples (90%) within 20 and 60 minutes, respectively.

Conclusion:

We succeeded to establish the dry RT-LAMP system to detect E1 region of CHIKV that is inexpensive, sensitive, accurate, and preservable system. The system has a great potential utility to be applied for a novel CHIKV screening kit in the endemic areas.