

(様式 13)

氏名(本籍) 飯島孝太(埼玉県)  
学位の種類 博士(歯学)  
学位記番号 甲 第405号  
学位授与日 2023年3月15日  
学位授与の要件 博士の学位論文提出者(学位規程第11条第1項該当者)  
学位論文題目 Detection of SARS-CoV-2 and the L452R spike mutation using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification plus bioluminescent assay in real-time (RT-LAMP-BART)  
論文審査委員 (主査)教授 星野 倫範  
(副査)教授 菊池 建太郎  
(副査)教授 竹島 浩  
(副査)教授 日比野 靖

### 論文内容の要旨

【背景】SARS-CoV-2を原因ウイルスによる新型コロナウイルス感染症(COVID-19)は世界保健機構(WHO)よりパンデミックが宣言されてから2年以上が経過したが、未だに収束をしておらず、感染状況の把握のためにSARS-CoV-2の迅速かつ確実な検出が必要とされている。SARS-CoV-2の同定検出は、すでにくつかりの手法が開発されているが変異株の出現により状況が複雑化している。その変異は感染力や重症化率に影響を与えるSpikeタンパクに生じることから、早期に変異株を迅速に同定する手法を開発することは意義のあることである。本研究では、SARS-CoV-2とSARS-CoV-2の重要な変異(L452R)を検出できるRT-LAMP-BART(Bioluminescent Assay in Real-Time)法による検出法の開発を行い、反応特異性と検出感度に関して従来法であるリアルタイムRT-PCR法と比較を行った。

【材料・方法】本研究ではSARS-CoV-2のRdRp領域およびSpike領域の変異L452Rを標的としてLAMP(Loop-mediated isothermal amplification) primerを設計した。また、Wild typeの反応を阻害する為、L452Rの変異前領域にペプチド核酸(PNA, Peptide Nucleic Acid)プローブを設計した。RT-LAMP-BART反応は、BartMaster-25 乾燥試薬(Erva Molecular)用いてリアルタイム測定装置PCRun (Biogal Galed Labs, Kibbutz Galed, Israel)/ 3MTM Molecular Detection Instrument MDS100 (3M, SaintPaul, MN, USA)を使用し60℃、60分間行った。検体には標的配列を含む人工RNAを用いて反応特異性および検出感度を評価した。反応特異性の評価では、呼吸器感染症に関連する18種類の病原体のからの核酸を用いて評価した。検出感度や臨床への応用の評価は、標的配列を含む人工RNAを鼻咽頭スワブおよび唾液からのウイルス抽出液に添加し、これを検体として反応を行った。そして、臨床検体による反応への影響を評価し(倫理承認番号: A2001)、従来法であるリアルタイムRT-PCR法との比較を行った。

【結果】RT-LAMP-BART法の反応特異性は良好であり、SARS-CoV-2のみを特異的に検出した。また、PNAプローブを加えることで変異株を正しく識別した。検出限界では、検体検査開始後25分以内に1反応あたり80コピーを検出したが、従来法のリアルタイムRT-PCR法では130分以内に1反応あたり5コピーを検出した。これは、RT-LAMP-BART法では従来法よりは感度は低いが迅速に結果を得ることを示した。また、臨床への応用を想定した標的配列を含む人工RNAを唾液および、鼻咽頭スワブからの抽出液に添加して検体としたRT-LAMP-BART法および従来法であるリアルタイムRT-PCR法では、サンプル中の生体物質によって阻害されたもののSARS-CoV-2を検出することが可能であった。

【考察】開発された方法は、SARS-CoV-2およびSpikeタンパク変異の正確な識別が可能であった。本法

(様式 13)

は簡便で正確、迅速、安価な検出法であり、COVID-19 のスクリーニング検査や変異株による感染の特定に充分応用できる可能性が示唆された。

#### **論文審査および試験結果の要旨**

本研究の目的は、新型コロナウイルス SARS-CoV-2 のスパイク蛋白における L452R 変異（452 番目のアミノ酸がロイシンからアルギニンに変異）を RT-LAMP-BART 法を用いた検出同定法により確立することであり、PNA プローブを用いることでより正確に同定されることが示唆された。今回の結果は、SARS-CoV-2 の変異株を正確かつ簡便に検出できることから新型コロナウイルス感染症の臨床検査として意義のあるものと考えられる。

明海大学大学院歯学研究科 飯島 孝太に対する最終試験は、2022 年 12 月 26 日、主査 星野 倫範教授、副査竹島 浩教授、日比野 靖教授、菊池 建太郎教授により、主論文の内容及び専攻学術に関し、口頭試問をもって実施した。その結果、合格と認めた。また、飯島 孝太の語学試験は、大学院入学時の外国語試験、及び二年次実施した英語コアプログラムの試験結果をもって合格とした。

よって申請者 飯島 孝太の本論文は、博士（歯学）の学位論文に値するものであり、飯島 孝太は博士（歯学）の額を授与されるに値するものと判断した。