

LAMP法を用いたSARSコロナウイルス核酸増幅検査

Genetic detection for SARS coronavirus by LAMP method

たしろまさひと
田代真人
Masato TASHIRO

要 旨

SARSの再出現・再流行が危惧される中、SARSコロナウイルス感染を簡易、迅速、高感度に検出でき、潜伏期から発症早期にかけて信頼性のある診断方法の開発がSARS対策の緊急課題になっていた。そこで、国産遺伝子技術であるLAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法を測定原理として、SARSコロナウイルス遺伝子の特異的に検出する検査試薬キット Loopamp® SARS コロナウイルス検出試薬キットを開発し、諸外国の協力により臨床検体を用いた性能評価試験を行った。その結果、昨年12月18日に体外診断用医薬品として承認、保険適用された。本キットは迅速かつ特異的にSARSコロナウイルス遺伝子を検出することができ、SARS診断の補助として空港の検疫所、衛生研究所や医療機関等でのSARSに対する水際の防御、感染拡大阻止に役立つものと期待される。

はじめに

SARS (重症急性呼吸器症候群: Severe Acute Respiratory Syndrome) の患者発生は、東アジアを中心に32カ国から報告され、2002年11月1日より2003年7月31日までに、感染者 (可能性例を含む) は8,098人、死者774人、その致死率は9.6%となった (WHO報告2003年9月26日改訂)。SARSの病原体は冬季に流行する可能性の高いコロナウイルスの1種であり、低温条件下ではその感染性は予想以上に安定であることから、今冬のSARS

の再出現・再流行が危惧されていた。SARSの初期症状は発熱と呼吸器症状であり、臨床的にはインフルエンザウイルスとの区別は難しい。そのため、両者の正確な鑑別診断が極めて重要である。

発症初期においてSARSコロナウイルス感染を診断する方法としては、鼻腔・咽頭拭い液、血清、便などの患者検体からウイルス遺伝子を取り出し、これを増幅して検出するRT-PCR法が実用化されている。しかし、検査に要する時間は半日以上であり、目の前の患者の緊急診断には十分に対応できない。しかも、検出感度は50~70%と満足いくものではなく、たとえ検査結果が陰性であっても、ウイルス感染を否定できないのが現状である。一方、2時間程度で診断可能なreal-time RT-PCR法も開発されているが、感度は同程度であり、また高額な特殊機器を必要とするため、一般的な普及は難しい。したがって、SARSコロナウイルス感染を短時間に簡単に診断できるような、より感度が高く信頼性のある診断方法の開発がSARS対策の緊急課題になっていた。

我々のグループは、長崎大学熱帯医学研究所の森田公一教授、栄研化学と協力して、国産遺伝子技術であるLAMP法¹⁾を測定原理として、特殊な機器を必要とせず、1時間以内にSARSコロナウイルスの遺伝子を検出できる、感度の良い簡易診断法を開発した。この診断法によるLoopamp® SARSコロナウイルス検出試薬キットが昨年12月18日、体外診断用医薬品としての製造承認を得て、保険適用されるに至ったので、その概要を紹介する。

I. SARS コロナウイルス

昨年の2月から東アジアを中心に世界中へ流行が拡大したSARSに対しては、WHOを中心に各国の研究機関が協力して懸命に原因微生物の特定に努力した結果、新型のコロナウイルスとして分離されたSARSコロナウイルスが病原ウイルスであることが同定された。このウイルスは、エンベロープを有し、表面に王冠の形をした突起（スパイク）を有する直径100 nmの球形のウイルス粒子であり、ウイルス遺伝子は約3万塩基のゲノムサイズを持つプラス鎖で1重鎖RNAであることが判明した^{2~5)}。現時点では、このgenome RNAを特異的に増幅して検出することでSARSコロナウイルスの感染を判定することが、早期診断として唯一の方法である。

II. Loopamp® SARS コロナウイルス 検出試薬キット

本キットは、栄研化学が独自に開発したLAMP法を測定原理として利用している。LAMP反応機構の詳細は、栄研化学のゲノムサイト (<http://loopamp.eiken.co.jp/>) を参照されたい。本キットはリアクションミックス SARS (6種類のLAMP用プライマーとdNTPsの混液)、蛍光・目視検出試薬、エンザイムミックス (鎖置換型合成酵素と逆転写酵素の混液)、陽性コントロール SARS (SARS RNA)、蒸留水から構成されている (図1)。リアクションミックス中に含有されるLAMP用のプライマーは、多くのRT-PCRと同様にSARSコロナウイルス genome RNAのReplicase 1B領域内で設計されている (図2)。プライマーが設計された領域は



図1 Loopamp® SARS コロナウイルス検出試薬キット

他のコロナウイルスとのホモロジーが低く、逆に既存遺伝子データベースに登録されている47種類のSARSコロナウイルスでは比較的保存された領域である。しかも6カ所に対する6種類のプライマーを用いるために、LAMP法により極めて特異的にSARSコロナウイルスが検出可能である。ただし、AY304488株はプライマー設定領域の3'末端に1箇所の変異が存在するため、本キットでの検出感度を低下させる可能性がある。

本キットを用いた検査では、初めにウイルスRNA分離用試薬を用いてヒト由来検体中のRNAを抽出し、サンプル溶液を調製する。このサンプル溶液と6種類のSARSコロナウイルス特異的プライマー、4種類のデオキシヌクレオチド3リン酸、逆転写酵素、鎖置換型DNA合成酵素、蛍光・目視検出用試薬 (カルセイン) を混合し62~63℃でインキュベートする。サンプル溶液中のSARSコロナウイルスRNAを基に逆転写酵素によりcDNAが合成される。さらに、このcDNAから鎖置換型DNA合成酵素により二重鎖DNAが複製される。この反応は、基質が消費され尽くされるまで同一温度で繰り返され、DNA増幅反応が進行する。LAMP法の大きな特徴は、すべての反応が単一温度により進行するので、通常のPCRに用いるサーマルサイクラーを必要としないことである。核酸増幅の検出は、反応副産物であるピロリン酸マグネシウム (白色沈殿物質) による濁度を測定することにより行う⁶⁾。DNA産物を電気泳動する必要はない。また、紫外線照射装置を用いることにより、より明確に目視で判定することも可能である。なお、試薬

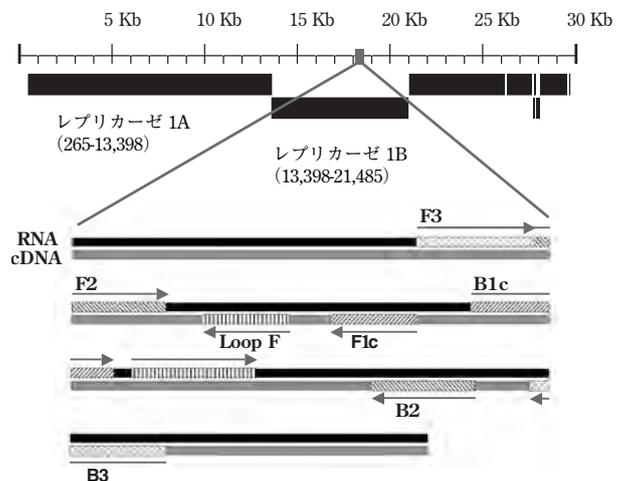


図2 LAMP用プライマーの設計位置

中に含まれているカルセインは、反応前にはマンガンイオンと結合して消光しているが、LAMP反応が進行すると、生成するピロリン酸イオンにマンガンイオンを奪われるため蛍光を発するようになる⁷⁾。

1. 操作および判定方法

操作および判定方法の概略を示す。詳細は本キットの添付文書⁸⁾および本キットに関する栄研の専用ウェブサイト (<http://loopamp.eiken.co.jp/j/sars/index.html>) を参照されたい。

1) 検査対象、試験材料の調製方法

検査対象はSARSが疑われる有症状者で、検体は糞便を第一選択とし、鼻腔咽頭拭い液についても検体とすることが可能である。国内では対象検体としての承認は見送られたが、海外での検討では、血漿や血清を用いても、高い検出率が示されている。

検体は、糞便の場合、約10～30倍量程度の0.89% NaCl溶液に懸濁し、4000×gで20分遠心後、上清を0.22μmのフィルターで濾過し、140μLをウイルス分離用試薬(QIAamp Viral RNA Mini Kit)のAVL buffer 560μLと混合し、試験材料液とする。咽頭鼻腔拭い液の場合は140μLをAVL bufferと混合し、試験材料液とする。なお、検体を採取する際、ならびに採取した患者検体を取り扱う際は通常の病原体に対する臨床検査に準じた十分なバイオハザード対策を取る必要がある。取り扱う場所、器具等については施設の安全規定に従って実施する。

2) サンプル溶液の調製

試験材料液140μLからQIAamp Viral RNA Mini Kitを使用してRNA抽出液を得る。この際、キャリアRNA量は1検体(1カラム)当たり3μgとし、溶出は60μLのAVE bufferで1回行う。

3) 試薬の調製

まず、試薬キットに含まれるリアクションミックス、エンザイムミックスなどの各試薬を室温で解凍し、解凍後直ちに氷上に保存する。次に、本キットの添付文書に従い、別途用意したマスターミックス調製用滅菌チューブに1テスト当たりリアクションミックスSARS 20μL、蛍光・目視検出用試薬1μLとエンザイムミックス1μLを分注、混合する。なお、調製したマスターミックスはすぐに使用する。

4) 操作、判定

- ① マスターミックスとサンプル溶液の混合(氷上)：まず反応チューブにマスターミックス20μLを分注する。次に、サンプル溶液5μLを添加し、全量25μLとする。なお、コントロール反応用に、サンプル溶液の代わりに陽性コントロールSARS 5μLを添加した陽性コントロールと、蒸留水5μLを添加した陰性コントロールをそれぞれ作製する。
- ② リアルタイム濁度検出を行う場合の増幅反応および判定(標準法)(図3)：Loopamp®リアルタイム濁度測定装置(LA-320CまたはRT-160C)(図4)のプログラムを本キット用にあわせる。次に表

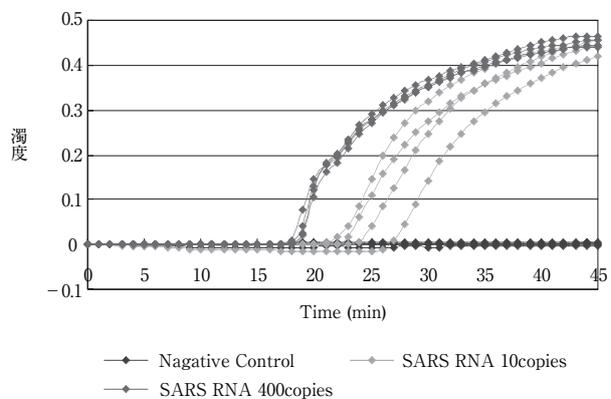


図3 リアルタイム濁度検出による判定

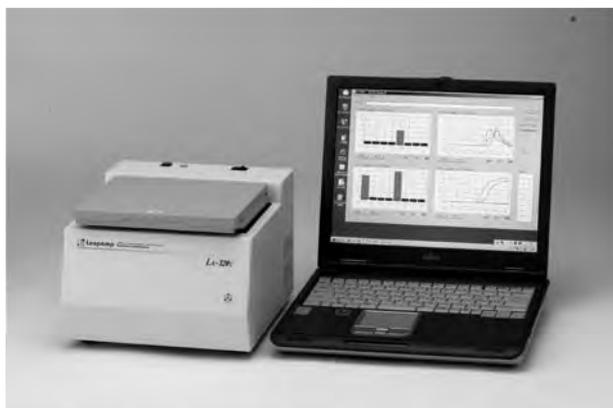


図4 Loopamp®リアルタイム濁度測定装置。左：LA-320C，右：RT-160C

示温度が 62.5℃に達していることを確認した後、調製した試料をセットし測定を開始する。陽性コントロールと陰性コントロールの濁度の上昇の有無より増幅反応が正常に進行しているか否か確認する。次に、各検体の判定を行う。増幅反応時間内（45分間）に濁度の上昇が認められた場合を「陽性」、濁度の上昇がみられない場合を「陰性」とする。最後に酵素失活処理（Loopamp リアルタイム濁度測定装置では自動処理される）が終了していることを確認した後、装置から反応チューブを取りだし、そのままキャップを開けずに廃棄する。

③ 蛍光目視検出を行う場合の増幅方法および判定（図5）：インキュベーター（温度精度が±0.5℃以内：ホットボンネット付）を 62～63℃に設定し、表示温度が設定温度に達していることを確認する。次に調製した試料をセットし、増幅反応（62～63℃，45分間）を行う。45分後にヒートブロックを用いて酵素失活操作（80℃，5分間または95℃，2分間）を行う。判定は、紫外線照射装置を用いて反応チューブ底面より紫外線を照射して、反応チューブ側面より目を眼鏡等で保護した状態で観察して行う。陽性コントロール SARS と同様に緑色の蛍光を発すれば陽性で、陰性コントロールと同様に蛍光を発しなければ陰性と判定する。

2. 最低検出感度

陽性検体 3 検体を希釈して 74～0.49 コピー / テ

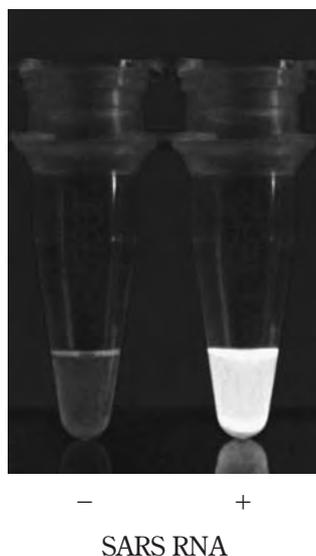


図5 蛍光目視検出による判定

ストの各濃度の検体を作製し、複数回測定したところ、最小検出感度（50%以上の検出率）は2.3～9.2 コピー / テストであり、100%の検出率を示す検出感度は、10 コピー / テストと考えられた。

また、WHO による盲検検体を用いた SARS 検査性能評価においては、本検査キットによる結果は、すべての項目において高い感度と特異性を示したとの報告を受けている。

3. 交差反応性

SARS コロナウイルスと同じ科に属する他のコロナウイルス（Serogroup 1 のヒトコロナウイルス、犬コロナウイルス，Serogroup 2 の牛コロナウイルス，ラットコロナウイルスなど）および SARS との鑑別を要する発熱性疾患の病因ウイルス（インフルエンザウイルス，RS ウイルス，パラインフルエンザウイルス，黄熱ウイルスなど）について測定したところ、結果はすべて陰性であり、交差反応は認められなかった（表1）。

4. 妨害物質，抗凝固剤

遊離型ビリルビン（10.2mg/dL），抱合型ビリルビン（19.8mg/dL），乳ビ（ホルマジン濁度2,470度）による測定への影響は認められなかった。

ヘパリンは 12.5U/mL では、増幅反応開始時間の遅延をもたらし、50U/mL では陽性検体の陰性化が

表1 交差反応性

ヒトコロナウイルス (SerogroupG1)	4株	陰性
ヒト腸コロナウイルス (SerogroupG1)	1株	陰性
猫コロナウイルス (SerogroupG1)	3株	陰性
牛コロナウイルス (SerogroupG2)	3株	陰性
犬コロナウイルス (SerogroupG1)	2株	陰性
ウサギコロナウイルス	1株	陰性
ラットコロナウイルス (SerogroupG2)	1株	陰性
マウス肝炎ウイルス (SerogroupG2)	1株	陰性
鶏伝染性気管支炎ウイルス (SerogroupG3)	1株	陰性
豚伝染性胃腸炎ウイルス (SerogroupG1)	1株	陰性
猫伝染性腹膜炎ウイルス (SerogroupG1)	1株	陰性
インフルエンザウイルス A	8株	陰性
インフルエンザウイルス B	4株	陰性
RSウイルス (呼吸器合胞ウイルス)	2株	陰性
麻疹ウイルス	1株	陰性
デング熱ウイルス	1株	陰性
黄熱ウイルス	1株	陰性

認められた。EDTA (7.5mg/mL) およびクエン酸 Na (1.26%) による測定への影響は認められなかった。したがって、血漿を検体とする場合には、ヘパリンは用いないほうがよい。

Ⅲ. 臨床成績

本キットを用いて、国立感染症研究所を中心とする香港、ベトナム、シンガポール、台湾等との国際協力による臨床評価と長崎大学熱帯医学研究所によ

る臨床評価について、WHO の症例定義に従った臨床診断、および検体の種類別に、本キットによる判定結果を集計した結果の一部を表 2 に、さらに検体の採取時期別の陽性率を糞便、鼻腔咽頭拭い液について表 3 に示す。

発症当時の WHO の症例定義に従って SARS 可能性例とみなされた症例から得られた検体について、リアルタイム濁度検出による陽性率は、検体別に糞便：81.0% (64/79)、鼻腔咽頭拭い液：56.3% (9/16)、鼻腔咽頭うがい液、吸引液、喀痰：42.9%

表 2 臨床性能試験の総集計

臨床診断	検体の種類	n	本キット (リアルタイム濁度)		本キット (蛍光目視)	
			陽性	陰性	陽性	陰性
SARS #1	糞便	79	64	15	61	18
	鼻腔咽頭拭い液	16	9	7	9	7
	鼻腔咽頭うがい液、 吸引液、喀痰	14	6	8	4	10
	血清	78	21	57	14	44
合計		187	100	87	88	79
SARS 疑い例 #2	血清	9	1	8	1	8
SARS 可能性例 #2	血清	10	3	7	3	7
接触者	血清	143	15	128	16	117
不明 #3	血清、血漿	31	5	26	2	28
合計		193	24	169	22	160
非 SARS 患者	糞便	5	0	5	0	5
	鼻腔咽頭拭い液	2	0	2	0	2
	鼻咽腔、気管吸引液	3	0	3	0	3
	血清	30	0	30		
不明 #4	血漿	10	0	10	0	10
健常人	血清、血漿	47	0	47	0	47
合計		97	0	97	0	67

注 1) #1: 発症当時の WHO の症例定義に従って SARS 可能性例とみなされ、さらに血清学的に感染が確認された例。

#2: 発症当時の WHO の症例定義に従って判定された例。

#3: 施設がおそらく SARS と考えている、あるいは他の PCR で陽性であった例。

#4: 施設がおそらく非 SARS 患者と考えている例。

注 2) リアルタイム濁度判定と蛍光目視判定で母数が異なるのは、蛍光目視で検討が行われなかった検体が含まれる。

表 3 検体採取時期による陽性率

臨床診断	検体 (由来)	本キット 判定	n	検体採取日：発症日からの日数				
				発症当日	1～7日	8～14日	15～21日	22～66日
SARS	糞便	陽性	64	3	12	16	17	16
		陰性	15	1	4	2	6	2
		陽性率	81.0%	75.0%	75.0%	88.9%	73.9%	88.9%
	鼻腔 咽頭	陽性	9	1	6	1	1	0
		陰性	7	2	4	0	0	1
		陽性率	56.3%	33.3%	60.0%	100.0%	100.0%	0.0%

(6/14), 血清: 26.9% (21/78) であった。また, 蛍光目視検出による陽性率はそれぞれ順に, 77.2% (61/79), 56.3% (9/16), 28.6% (4/14), 24.1% (14/58) であった。さらに, SARS 疑い例, 可能性例, 不明 (過去に SARS 陽性と判定された例) と, SARS 患者接触者からの血清, 血漿検体では, 本キットのリアルタイム濁度検出による陽性率は 12.4% (24/193), 蛍光目視検出による陽性率は 12.1% (22/182) であった。一方, 非 SARS 患者, 不明 (施設が非 SARS 患者と考えている例), 健康人の血清, 血漿, その他の 97 検体では, 本キットによるリアルタイム濁度検出, 蛍光目視検出ともにすべて陰性であった。

また, 糞便を検体とした場合, 陽性率は発症後から高いが 10 日前後が最も高かった。一方, 血清・血漿を用いた試験では, 発症早期においても 50~80% 前後の陽性率が報告されている。

今回の臨床検討に用いた検体は, 日本での SARS 可能性例の発生がないために, すべて海外研究機関に依存している。SARS 発生初期の混乱と原因病原体がわからない中で検体も採取されていたため, 背景情報が十分な適切な検体で臨床評価ができたとは言えない。そのため, 本キットによる適切な測定時期, 血清検体での検討等まだ十分ではない部分がある。検体量を増したり, RNA を濃縮すると更に感度は上昇するが, 現行の一般的な方法では, 発症早期における陽性率は 80% にとどまっている。そのため, 厚生労働省によりさらなる情報収集, 血清等での有用性の確立など本キットの性能向上を求める承認条件が付けられている。

SARS 患者では, 潜伏期から発症後 5 日目まではいずれの検体においてもウイルス含有量が極めて低いことが示されており, どのような方法を用いても検出できない可能性も存在する⁹⁾。したがって, ここにウイルス遺伝子検出による SARS コロナウイルス感染診断の限界があるのかもしれない。今後, 栄研化学, および関係機関と協力して本キットのさらなる性能向上を図ることを考えている。

おわりに

インフルエンザの流行時期と重なって SARS が再流行するという懸念は, 2003 年 12 月から一般の

SARS 患者が発生している中国における速やかな現地での対応と, WHO および各国関係機関の協力により, 幸いにも現実化はしていない。しかし, SARS の予防に関しては, 現時点では積極的手段は存在しない。感染予防や発症・重症化阻止に有効な医薬品も確立されておらず, ワクチン開発も実用化までには最短でも 2~3 年はかかる。したがって, 依然として早期発見と隔離が重要であることになりなく, 本キットが SARS 診断の補助として日本の水際での防御, 感染拡大を防ぐ一助になるものと考えられる。高価な特殊機器を必要とせず, 簡便に短時間で結果の判定が可能な本キットは, 現行の RT-PCR に比べて特異性と感度が高いことと相まって, 諸外国においても高い関心が寄せられており, 広く普及することが期待されている。

また, 本キットで用いられた測定原理を応用して, 他の多くの新興, 再興感染症を簡易, 迅速に検出し, 感染拡大阻止に役立つ試薬が開発されることを期待したい。

文 献

- 1) Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., et al.: Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 28: E63, 2000.
- 2) Ksiazek T.G., Erdman D., Goldsmith C.S., et al.: A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 348:1953-1966, 2003.
- 3) Drosten C., Gunther S., Preiser W., et al.: Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 348:1967-1976, 2003.
- 4) Marra MA, Jones SJM, Astell CR, et al.: The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* 300: 1399-1404, 2003.
- 5) Holmes KV: SARS-associated coronavirus. *N Engl J Med* 348:1948-1951, 2003.
- 6) Mori Y., Nagamine K., Tomita N., et al.: Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 150-154, 2001.
- 7) 富田憲弘, 森安義, 納富継宣: 第 26 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集, 2003.
- 8) 栄研化学株式会社 Loopamp® SARS コロナウイルス検出試薬キット添付文書
- 9) Peiris JSM, Chu CM, Cheng VCC, et al.: Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet* 361: 1767-1772, 2003.