

座 談 会

LAMP法を用いた 遺伝子検査の現状と将来展望



語 り 手

国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 第三室長
栄研化学株式会社 研究開発統括部生物化学研究所 副所長
和歌山県農業協同組合連合会 植物バイオセンター センター長
帝京大学医真菌研究センター 准教授

工藤由起子
納富 継宣
平田 行正
槇村 浩一

(五十音順・敬称略)

聞 き 手

北里大学 北里生命科学研究所 ウイルス感染制御学研究室 教授 中山 哲夫

[平成20年6月24日(火)収録]

はじめに

中山 今日はお暑い中お集まりいただきましてありがとうございます。

はじめにこの座談会を開くようになったいきさつですが、今年1月に『モダンメディア』の初代編集委員であられた東邦大学名誉教授の桑原章吾先生が亡くなりました。亡くなられる少し前に宿題のような形で、せっかく栄研化学でLAMP法を開発し、すごくいい検査方法なのに世間にあまり知られていないのではないか。ということで、LAMP法を使っているいろいろなお仕事をされている先生に集まってい

ただいて座談会を開催してはどうか、というご提案があったそうです。

私は四代目の『モダンメディア』の編集委員ですが、そのころから麻疹ウイルス等々のLAMP法をやり始めたいきさつがあります。それで今日は私が司会を担当して、LAMP法を研究や実際に現場で利用され、深く理解されている皆様にお集まりいただいた次第です。また、医療の分野と全く関係がないといいますが、われわれが全然知らない植物という分野で平田先生にもいらっしゃっていただいています。

今日は忌憚のないご意見をお伺いできればと思い

ます。よろしくお願いします。

LAMP法はすごくいい検査方法です。それは皆様ご承知のとおりだと思います。他に遺伝子の増幅方法としてPCR法がありますが、今日、ここへ来る前にPubMedでPCR法を探してみたところ35万件ヒットしました。その次の手段は何かというリアルタイムPCR法ということで、それを探しますとヒットしたのは2万9,286件です。LAMP法はいくつかあるのかなと見ると176件でした(2008年6月末)。

今までずっと見ていましたが、2007年からどんどん増えています。ただ、ほとんどが日本の研究者を中心とした論文が出ている状態ですから、日本だけではなく世界にもっと出ていかなければいけない検査法だと思います。そのような今後の展開も含めてお話いただき、楽しい座談会にしていければと思います。

I. LAMP法の開発

中山 まず最初にどういうきっかけでLAMP法ができたのか。その開発の経緯と基本原理とその特徴ということで開発者の納富先生にお話をいただきたいと思います。よろしくお願いします。

納富 弊社はご存じのように診断薬メーカーですから、もちろんいろいろな検査試薬を作っています。遺伝子検査分野にも乗り出そうということで、二十数年前から研究を始めていました。

遺伝子検査は、最初はラジオアイソトープでラベルしたものを使ったDNAのハイブリダイゼーション法で検査することから始まりました。先ほど中山先生から紹介のありましたPCR法が発明されて爆発的にいろいろな方面で遺伝子検査が広まってきました。

われわれは当然PCR法を使って診断薬を作ったのですが、残念ながら特許の壁がありまして、特に臨床診断薬に関しましてはなかなか開発することができない。弊社もPCR法の検討はしながらも自分たちで技術を作り上げないとこの分野には乗り出せないというところから、では増幅法も考えようではないかということになりました。

数人のチームを作って開発することになり、そこに私も途中から合流した形になりますが、われわれ

の中だけででもいろいろな遺伝子増幅メカニズムを考えて、それこそ10個以上の増幅法を考えたのですが、途中で限界がきました。

いくつかは頭の中で考えていたとおりには全くいかないものがありました。また、そこそこうまくはいくけれども増幅倍率として100倍ぐらいは増幅するけれど、そのぐらい増幅しても応用範囲が限定されます。また、これは面白いなと思って調べていくと既に特許や論文で発表されたりしていました。そういうことがいっぱいあって、これはもう新しい方法を考案するのは難しいのではないかとあきらめかけていましたが、よく会社も我慢して実験させてくれていたと思います。

やるからには単なるPCR法の代替ではなく特徴のある方法を見つけなくていけない。ほかにも一定温度で増幅する方法はいくつかありますが、これより簡単にやりたいとも考えていた中で、たまたま末端にループを作らせて自分自身にハイブリダイズさせると、そこから自己伸長するのではないかということに改めて気づきました。

これは当たり前の現象なのですが、それがきっかけになって、あらっと思ったんです。こういうのを作らせるにはどうしたらいいだろうと。そこから今のLAMP法の基になっているプライマーのユニークな構造を思いついたのです。

ループを作らせるにはあらかじめ内部にある配列をプライマーの末端にくっつけておけばできるのではないかということで、それを2つ組み合わせて、今度は反応図を1つ1つ、こういったらこうなるだろうというのをずっと書いていったんです。ここにLAMP法のパンフレットがありますが、この説明のLAMP法の原理図そのままなのです(図)。

ですから、このとおり書いていったら図の下の方に出てくるダンベル型と呼んでいる構造が自然とでき上がることがわかりました。さらに反応を進めた図を書いていくとサイクルの部分ができ上がりました。サイクルするということはこれは持続する反応だということで、あと延々と長く伸びたものもずっと書いていって、どんどん伸長鎖が伸びていくので、これは面白いということで今までに考案したものと違い、まともに増幅が起きそうな気がしました。

それで上司のところに行って議論したところ、こ

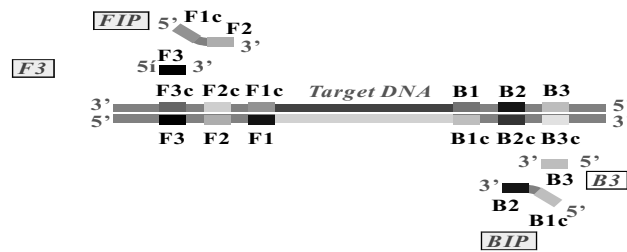
『LAMP 法』

LAMP 法 (Loop-mediated Isothermal Amplification) は、DNA を短時間で増幅・検出する技術です。通常 PCR 法は DNA を増幅する際に 2 種類のプライマーを使用し 3 段階の温度変化を必要としますが、LAMP 法は、4 種類のプライマーと鎖置換活性を持つ DNA 合成酵素を用い、60 ～ 65℃ 付近の一定温度でインキュベートするだけで、連続的に反応が進行します。連続的に反応が進むため増幅効率が高く、短時間 (1 時間以内) に標的遺伝子を増幅することができる上、増幅と同時に生成される副産物による濁りで増幅の様子をモニタリングできることから、増幅・検出までの全工程を 1 チューブ内で終えることができます。

増幅反応は、インナープライマー (FIP および BIP) により生成するステムループ構造からの自己伸長反応と、ループ部分に新たにアニールしたインナープライマーからの鎖置換合成反応を繰り返すことで進行します。

LAMP 法原理の詳細については、栄研化学のゲノムサイト (<http://loopamp.eiken.co.jp>) をご覧ください。

プライマー



(増幅サイクル)

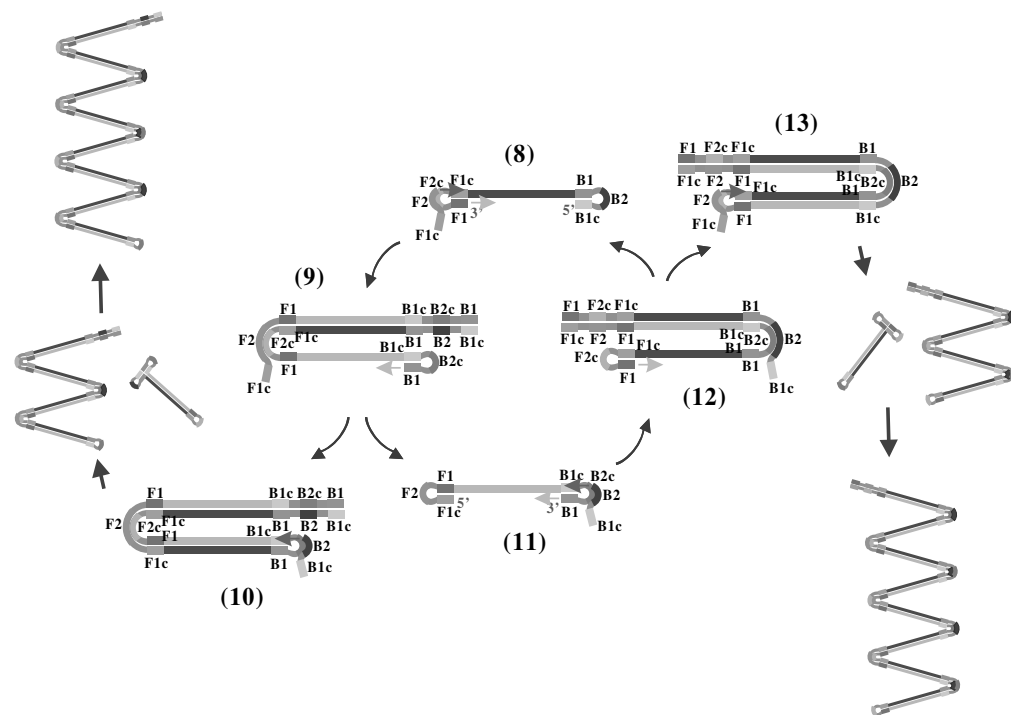
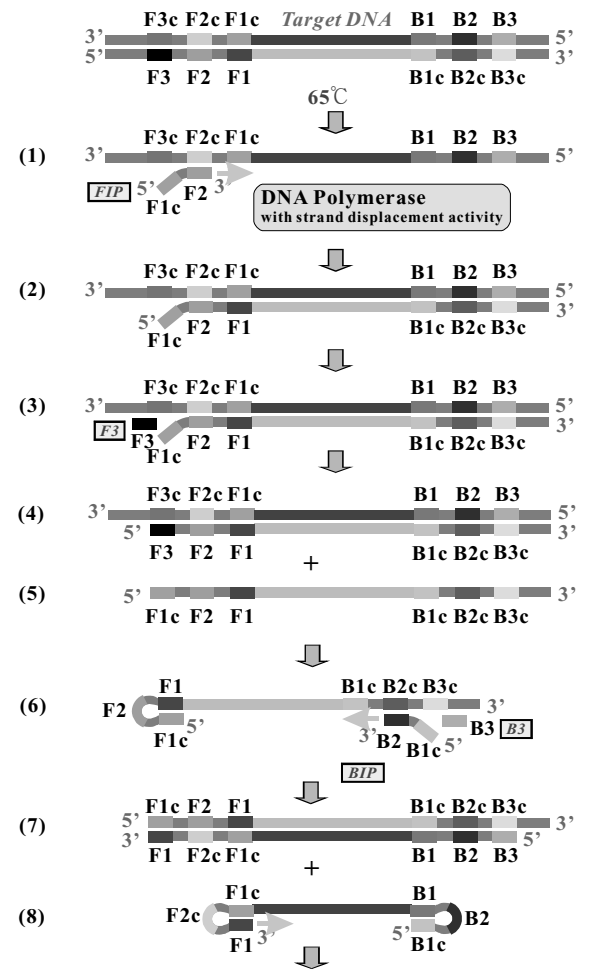


図 LAMP 法の原理

LAMP法原理



れはいけるかもしれないという話になりました。じゃあこれが最後の一踏ん張りということで実験の準備をしました。

実験を始めてからは結構速くうまくいきました。最初の実験はうまくいきませんでした。酵素は最初 VentDNA ポリメラーゼを使いましたが、同じように鎖置換活性を持った酵素がいくつかありまして、それを並べて増幅させてみました。そうしたら1つだけ見なれぬラダー状の電気泳動パターンが見えました。

最初、私はこうなるとは思っていなかったんです。連続する反応なので、完全にスメアを引いた形になるのではないかと考えていたら、ラダーパターンが出ました。

これはサイズマーカーが真ん中に流してしまったのかなと考えたぐらいでした。しかし、はっと気づいて、反応には律速段階というのがあるはずだ。プライマーがアニールするというのはやはり時間がかかるのだから、そこで1回止まるのではないかと。そうすると、そういうのができてもおかしくないことに気づいて再現させてみました。

そのサイズも測ってみると原理図から考えられるサイズの大きさにちょうどラダーパターンになっていたものですから、これは間違いのないと確信しました。実験を開始して4回目の実験なので、ここはすごく早かったですね。自分でもびっくりしました。増幅法を考案したときではなく、電気泳動で増幅が確認できたときが、一番うれしかったです。それ以降は大変なことが多いですね。(笑) 余談ですが。

中山 一番最初はループのプライマーを作るところですね。それがわれわれの感覚からすると何でこういうことを思いついたのか、ということが気になりますが、そこはどうですか。いきなり思いついたのか。今までベースがあってそういうことをやられたのでしょうか。

納富 ベースはなかったんです。鎖置換型活性を利用した増幅法はいくつかありますから、酵素は知っていました。ですから、何か邪魔者があってもばんばん外しながら増幅してくれるというのはわかっていました。そこで先ほど言ったループを作るというのがあって、このループを作らせるにはどうしたらいいかと考えたんです。

そうすると、末端に自分と相補的な配列がないといけな。実際に、そういうのは自然にあるかというと、そういうことはめったにない話なので、これをどうにかして作ろうと思って、そのときにプライマーの末端につけておいたら、合成反応が行って帰ってきたときにはその配列はついていると気づいた。ということでずっと反応を書いていたら LAMP 法ができ上がったということです。

中山 それから後が速かったというのはびっくりしますが。

納富 多分蓄積があったからだと思います。今までのたくさんの無駄な実験があって、例えば反応の組成みたいなものもこんな感じがいいのだろうみたいなものは大分熟成されてきていたからだと思います。

中山 この図は、僕なんかはずっと見ていても、1回目はわかって、また2日ぐらい寝るともうわからなくなってしまう。またこうやって見て、それでだんだんわかってきたような感じがしますが、メカニズムとしてはなかなか複雑ですよ。

このループまでは何とかわかりますが、その後はなかなかわかりにくいんです。

納富 でも、末端では同じことが全部起きていて、ループを巻いて延びると、そこにプライマーがついて、そこからもう1回延びる。その反応の組み合わせだけなので。

中山 学生さんに話すときにはわかっているように話すんですが、本当にそうなのと言われるとなかなかわからないところが多いんです。

納富 私も最初からこうなるだろうと思ってやったわけではないんです。書いていたらこうなってしまったみたいところがあります。

II. 医療・食品衛生分野での LAMP 法の応用

1. 食品衛生分野での遺伝子診断

中山 こんな難しい原理をわれわれは使っているわけですが、次に医療面でこれをずっと使われている先生がいらっしゃいます。国立医薬食品衛生研究所の微生物のほうでサルモネラ、腸管出血性大腸菌に使われています工藤先生、どういうことをやられているのかお話ししていただければと思います。



工藤 由起子 先生

工藤 私は医療ということではありませんが、食品の安全性の方面からの研究に LAMP 法を使っています。食品というのはかなり細菌が多いものがあるので、培養法ではどうしてもほかの競合する菌を抑えて目的の菌だけ検出することが難しいのです。

そういったことで感度の良い方法が必要とされています。そういった状況の中で遺伝子検査はほかの菌にかかわらず対象の遺伝子があれば検出できるということで、遺伝子検査を取り入れていくことも考えているわけです。

ただ、最も普及している PCR 法ですと操作が多いので煩雑で時間がかかることもあり、あまり食品分野で取り入れられていないといえるかと思います。LAMP 法では食品分野に関連するキット化された商品もありますし、非常に単純な試薬構成になっていますので、そういった意味では初心者でも取っつきやすい気がします。私としては遺伝子検査を取り入れるきっかけになることを期待しています。

私は、特にサルモネラと腸管出血性大腸菌を対象にして官民共同型の研究事業の中で LAMP 法を食品に応用した研究をしてきました。サルモネラですと鶏卵汚染という問題が大きいのですが、卵の成分が反応阻害物質を持っていますし、卵自体の濁りが濁度測定にも影響したりもして、試薬キットや計測機器について工夫されて開発されてきた経緯を見してきました。サルモネラの場合は培養法も優れているのですが、培養日数がかかるので、それと同等以上に検出感度があり迅速な方法ということで、LAMP 法は有用な方法と思っています。

それから腸管出血性大腸菌というのも患者数はサルモネラより少ないのですが、患者さんが亡くなったり重篤な症状になったりすることがあって、非常に大事な食中毒菌です。特に O157 という血清型が非常に有名ですが、ほかの血清型でも感染が起こり重篤な症状を引き起こしているの、血清型にかかわらず志賀毒素を持っているかというところで検査するとなると、どうしても遺伝子に頼らざるを得なくなってきました。そういった中で食品分野の遺伝子検査に慣れていない方も使うということでは LAMP 法はやりやすいということで使われていることも多いかと思います。リアルタイム PCR 法とか通常の PCR 法ももちろん汎用されていますが、LAMP 法も特にこの腸管出血性大腸菌では活用されているものだと思います。

食品の腸管出血性大腸菌 O157 と O26 の検査法では、いろいろな遺伝子検査の中の 1 つに LAMP 法も入れて評価しましたが、性能が他の方法に比べて劣ることはありませんでしたし、操作性という点からすると簡単という感触を持つ人も多いと思いました。

中山 先生の方だと食中毒で食品から検出して、患者さんの臨床検体からするようなことはあまりないですか。

工藤 そうですね。食品に含まれるさまざまな菌の中から少数の対象菌を検出することが現実で、そうすると増菌培養が必要ですが、どうしても対象菌と一緒にほかの菌も増えてくるので、あまり対象菌だけが強く増殖するということは期待できません。その後に選択性のある寒天培地に塗抹してみても、完ぺきな選択培地はないので、どうしても対象菌以外が多く生育してきて対象菌のコロニーを培地上に見つけることができないこともあります。そうしたときにはこの遺伝子検査が大事になってきます。

中山 例えば食中毒を起こすようなことがありますね。そのときは食品を抜き取ってきてやるような検査ですか。

工藤 食中毒事件でどの食品が原因だったか追及するときにも使いますし、安全な食品が供給されるために流通食品を抜き取り検査する場合もありその際にも使うことがあります。汚染食品が見つければ流通を止めることができますので、そういった検査

も非常に大事なことです。

中山 それは主としてサルモネラと O157 が多いんですか。

工藤 サルモネラと O157 を代表として試薬キットがある病原体では比較的使われているかと思います。

中山 そうするとターゲットとしてはサルモネラや O157 が今あるけれども、あともっとビブリオとかそんなものができたらいいなと思うものはたくさんありますか。

工藤 最近ではノロウイルスではかなり使われていると思います。患者さんが増えていますし、先日、学会発表で聞いた話では GI に対する改良も行われたということでしたので、より使いやすいキットができていないのでしょうか。

2. 深在性真菌症の遺伝子診断

中山 キット化されているといいのですが、キット化されていない榎村先生。(笑)

榎村 キット化がなかなか大変ですね。私どもは真菌症、特に深在性真菌症の遺伝子診断をしている立場としてお話しさせていただくのですが、真菌症の場合は臨床診断が困難な上に、確定診断に必要な培養の陽性率が極端に低い事が問題です。そのために培養を必要としない真菌症の検査法が待たれています。

また、もし起因菌が培養できたとしても形態学的な同定がなかなか難しい場合があるので、遺伝子同定法も必要になります。その点においても LAMP 法は大変期待が持たれる方法として私ども開発を続けているところです。

ところが今日臨床的な問題が大きい深在性真菌症の場合は、人の検体の中に含まれるごくわずかな真菌を検出することが大変困難なため、研究開発と実用の面で難渋しています。先ほどの工藤先生のお悩みと同じようなものですが、もう少し問題が複雑かもしれないのは、第一に検体に含まれ、試料として回収可能な真菌細胞数（遺伝子診断の点で言えばゲノムコピー数）が、バクテリアやウイルス感染（または汚染）に比較して少ない点にあります。また第二に、その少量の標的となる真菌ゲノム DNA を、白血球等組織に由来する大量のヒトゲノムの中から検出しなければいけない点であります。

LAMP 法のすばらしいところの 1 つは、さまざまな阻害物質に対する強靱性というか、非常に強い DNA ポリメラーゼの活性です。例えば、ヒト臨床検体を対象とした遺伝子検査上度々問題となるのがヘモグロビンによる DNA ポリメラーゼ活性の阻害ですが、私たちが感じるところでは LAMP 反応におけるヘモグロビンなどの影響は PCR 法に比べて 100 分の 1 か 1,000 分の 1 程度であって、少々のがあっても LAMP 法で増えることは間違いがない。

しかし、ヒトのゲノムが大量に入ってくるとやはり確実に邪魔されます。現在までに私どもの研究室でも、さまざまな深在性真菌症の起因菌を検出するための LAMP 法を開発してきたのですが、当初、考えていたほどはいい感度が出なかったため研究が中断したものが幾つかあります。その原因の 1 つとして、臨床検体中のヒトのゲノムが影響していたものと考えています。

その中でもだんだん知恵もついてきて、遺伝子診断法に適した「いい検体」、しかも通常の方法で検出が困難なものについて模索してきました。その一例が、今年報告したニューモシスチス肺炎に対する LAMP 法を用いた遺伝子診断法です。以前カリニ原虫と呼ばれていた *Pneumocystis carinii* は真菌に再分類された後、ネズミを宿主とする *P. carinii* と他の動物を宿主とする菌種に分けられました。そのためヒトを宿主とする本属菌種は、*Pneumocystis jirovecii*（ニューモシスチス・イロベチー）となりかつての「カリニ肺炎」は「ニューモシスチス肺炎」または「PCP」と呼ばれることになりました。

本菌に対する LAMP 法を開発する利点は、①その培養が臨床微生物検査のレベルでは不可能であることと、②検査室における本菌の検出は喀痰または気管・気管支洗浄液等の顕微鏡検査に頼らざるを得ないけれども、本菌検出に優れた検査担当者でなければ十分な検出感度が期待できないことにあります。また、③ *Pneumocystis* が他の主要病原真菌や環境菌と分子系統上比較的隔離されていることから、特異的プライマーセットの設計が理論上容易ですから、遺伝子診断の格好のターゲットになりました。

しかも、例えばエイズなどの易感染患者に発症した本症では、気管支洗浄液中に比較的大量の菌体が存在し、また同検体中には LAMP 反応の阻害物質



横村 浩一 先生

になるものが少ないことも好都合です。

そこで、ニューモシスチス肺炎に対する LAMP 診断法を開発したのですが、先に述べた通り真菌の場合はとにかく検体中の菌量が少ないために検出感度が鋳型 DNA の抽出精製効率に影響されるという状況に変わりはありません。

LAMP 法に注目した一番の理由は、先ほど言いました阻害物質に対する強靱性であったわけです。ですからできるだけ抽出法をスキップできる、簡便なものに持っていくことができるというのが一番期待したところです。実際に私どもの検討においても、確かに検体によっては単純な煮沸上清などの簡単な前処理検体ですら、LAMP のカクテルに混ぜて反応するだけで検出できるというラッキーなケースもありました。しかし、臨床検体を増やして検討すると、必ずしも上手く行かない。つまり当然のことながら、検体中に含まれる菌量がケースによって検体によってばらつきが大きいのです。

というわけで、検体の精製と濃縮という過程をスキップして単純にボイルと煮汁だけでやるということではうまく診断ができなくて、最終的には今われわれがやっている最も優れた遺伝子抽出法を導入して初めて安定するということに至っているところ です。

ですから、LAMP 法の利点を生かしているか、いないかという、鋳型の抽出法にはお金も時間もかかっている、われわれの一番最近の論文にしても本当は生かしきっていないのです。

もう 1 つ別のアプローチもあります。今までの臨床検体の話で、ごくわずかな菌体が臨床検体に

入っているということではいろいろ苦労していますが、一方で同定ということに腹をくくってしまえば臨床検体中に含まれる宿主 DNA の影響はほとんど考えなくてすみますし、LAMP 法特有の阻害物質に対する強靱性が遺憾なく発揮されると思いますから、分離菌体の同定に関しては単純にすりつぶして LAMP 法にかけるという方法が有望だと思います。

ですから、そちらのほうの開発もこれからやっていかなければいけないとは思っているところです。

真菌の LAMP 法に関しては、初めいくつかパラパラと出てからは止まってしまった経緯があります。それはほとんどの研究者が臨床検体に対してうまくいだろうという期待が極端に大きかったのが 1 つの理由です。

もう 1 つの問題が、多分後で出てくるといいますが PCR 法と比較してもより深刻な、増幅産物による鋳型汚染 (コンタミネーション) に違いないと考えています。LAMP 法が報告された初期の研究者はみんな電気泳動で LAMP 産物を同定していましたが、これが大きな問題でした。つまり、新しい系を開発する際には、(当時はプライマー設計の良いツールもノウハウもなかった) 一生懸命プライマーを作り、どんどん反応して、電気泳動で増幅産物に特有なラダーを検出しようと頑張ります。そして、初めて LAMP 反応が上手くいくと、ものすごく喜ぶわけです。やっと動き出したと。すると、さらに頑張って反応と電気泳動を繰り返す。臨床検体に適用しても、安定して増幅が得られるようになったと思っていると、そのうちのものすごくよく増幅がかかるようになるわけです。これは完ぺきな系になったと思ったら、陰性コントロールまで完ぺきに増えたりするということがわかる。そうすると大変なショックを受けるわけです。

私どもは、「コンタミの嵐」と呼んでいます、何度も見舞われていて、何度も起こっているのもそういう意味で、今は冷静に対応できますが、1 回これが起こるとラボで「LAMP 禁止 1 カ月間の刑」となります。つまり、夜間実験室に UV をつけて 1 カ月間 LAMP をやってはいけないということになると大体終息するということがわかっていますので大変不便ですが諦めて我慢すればいいのですが、多分その辺で何人かの研究者は撤退してしまったと思います。

コンタミネーションという技術的な不備かと思われがちですが、おそらく電気泳動をする限り技術によらず必ず起きます。今、栄研化学の基本的なキットでは電気泳動を推奨していないと思いますが、LAMP法は電気泳動さえしなければ完ぺきな方法です。しかし、電気泳動によるラダーの像が今年出た論文にもいくつも出ています。ラダーを見てしまうといつか必ず大変な目に遭う。(笑) 少なくとも積極的にLAMP法の開発をしようという研究者には教えて上げないといけないことの1つだろうと思います。

その出鼻を挫かれてしまって、とにかく1カ月研究ができないというのは大変なショックです。逆にいうと1カ月止めておけば大丈夫だというトラブルシューティングもあるということまで含めて、情報を提供すれば、成熟してきたLAMP法です。でまた改めて研究開発を始める人もいるだろうと思います。

もちろん既製品があるのも大変良い。手軽に遺伝子診断ができるのは非常にいいことですが、それだけではもったいないので、どんどん新規の開発をしていくためには増幅産物の別の検出法、例えば濁度もいいですし、蛍光もいい、私どもがやっているような熱乖離曲線で増幅産物の特異性を確認するような方法も実際的には非常にいいと思います。そういうアプリケーションがどんどん出てくるといいだろう。そうすればより一般的に使われる遺伝子診断法、同定法になっていくのではないかと思います。

中山 コンタミの話になるとなかなか、お互い苦労しているんです。(笑)

要するに抽出法が一番問題ですか。

榎村 抽出が問題ですね。結局、菌体が少ない場合には抽出(濃縮と精製)は非常に重要です。良い抽出法を利用すれば多くの阻害物質の影響を最小限にできます。しかし、いろいろな阻害物質がありますが、最悪の阻害(影響)物質はヒトの検体中で最後まで除くことができないヒトの遺伝子そのものです。ですから、それをどうすることができるかが大きな課題です。

3. 麻疹と遺伝子診断

中山 私の話になりますが、私はずっと麻疹をやっております。去年新聞に出て大騒ぎになって

いる話ですが、その前の流行が2001年にありました。そのときに麻疹患者が約3万3000人報告されています。

そのときの麻疹は5歳以下のワクチンを受けていない子たちが主流で、典型的な症状があつて、臨床診断もかなりできる状態だったんです。その中でsecondary vaccine failureと言ってワクチンを受けていても免疫力が下がってきて、また罹患する。そうすると典型的な症状をとらないんですね。麻疹の症状でなくて、熱が出ている、発疹が出ているだけで臨床的に麻疹かどうかわからないという症例が増加してきています。

こうした例ではウイルス分離をしようとしてもほとんど分離できません。もともとワクチンで誘導された免疫がある程度残っていますから、新たに感染した麻疹ウイルスのウイルス量はかなり少ない。症状も軽いわけですから、それを診断しなければいけないということで、ずっとPCR法をやっていたわけですが、PCR法も同じようにコンタミするわけです。そこのテクニックはやはり同じなわけで、ずっと悩むわけです。

ウイルス分離はできない、PCR法は出るけれども感度やコンタミの問題もある。それはずっとぬぐいきれない問題だったわけです。

ある程度落ち着いてきて、麻疹ももう終わるのではないかと思っていましたが、高校生、大学生から大人を中心とした麻疹が去年流行しました。その中に臨床診断がつかない、熱だけとか発疹だけの症例が多く認められました。麻疹の典型的な症状をとっていないのですから、診断ができない。また、ウイルスは少量ですが排出しており新たな感染源になっていく。それをストップさせるにはやはり迅速診断キットみたいなものが必要になります。

WHOが提唱しているのは、ウイルス分離をしてIgMの麻疹の抗体を測れば98%診断ができるとWHOは思っています。ところが、日本の中のそうしたsecondary vaccine failureのような修飾麻疹は、ウイルス分離は全然できない。IgMは早期には陰性のものが半分以上あるわけですから、そういうものを確実に診断しなければいけないということでやり始めているんです。

去年の流行に関してはLAMP法で麻疹の診断はかなり確実にできることはわかりました。WHOの

方針としては、麻疹のelimination（排除）に向かっているのですから、その中でWHOが目指しているものは麻疹の全患者把握です。その全患者把握というのは、実験室診断に基づいた麻疹のサーベイランスを強化すること。日本はそれが全然できていなかったわけです。

それで新たに立ち上げようとしてやっているのがウイルス分離とIgMでWHOに準じてやるのですが、そこにPCR法がやっと入ってきたんです。PCR法とリアルタイムで、じゃあLAMP法をやってみようよと言ったら、まだそれは研究段階だということで、日本の中のスタンダードとなるような病原診断の中にはまだLAMP法が入らない状況です。

麻疹以外にも風疹、おたふくかぜ、RSとかウイルス感染症、私のところはRNAのウイルスを中心にやっています。

榎村先生が言われたように、私たちのところの臨床検体が咽頭のぬぐい液とか髄液とかで、ほとんど人の組織が入ってこない検体ですから、抽出に関してはそんなに苦労した記憶はないんですね。

あといろいろなウイルス、DNAのウイルスもいろいろな先生がやっています。ヒトゲノムの混入に関して、抽出に関してそんなに苦労した記憶はないと思います。プライマーのセッティングをあっちに変える、こっちに変えるということでやっています。

先ほどの榎村先生のチューブを開けるなどという話、泳動するなどということですが、われわれのほうはLAMP法で増幅した遺伝子のシークエンスを見ようとしています。われわれはワクチンをやっていますから、ワクチンを接種した後の副反応として熱が出たり、おたふくかぜでは無菌性髄膜炎が出たりする。

それに関してLAMP法で増幅させるターゲットの中に制限酵素サイトを入れておいて、それでワクチン株か野生株かを鑑別している状況です。要するに病原診断以外の応用をやっているわけです。まだそんなに困ったことはありませんが、やはり何回かありますが、同じように2〜3週間それをやらないと大体収まるんです。麻疹でコンタミすれば、麻疹をちょっとやめておいて風疹にするとか、違うウイルスをターゲットにしてやっています。

本当はそんなことは論文に書かないんですが、やはり一番困るところですね。それはLAMP法に限

らずPCR法にしろリアルタイムにしろ、そうした基本的なところでそういうのは一番注意しなければいけないということですね。

あと、遺伝子迅速診断キットというイメージをわれわれは考えていますが、われわれが考えているものと臨床家の先生が考えているものは違います。要するにインフルエンザの迅速診断キットみたいに診察室の裏側ですぐできるようなものをイメージしているのです。

それを一般の開業の先生で今までやっていたことがある人、遺伝子をいじっていてPCR法をやっていた人がやるのだったら、そんなに大きな問題はないのだと思うのです。今まで経験がなくても簡単に診断がつく、LAMP法の光の部分だけ見てしまうと、うちでもすぐできるような錯覚を持ってしまうわけです。

それで自分のところでやってみるけれども、やはり問題はあるかもしれない。そういうところは迅速診断キットとしてどういうレベルを対象としてそれを普及させていくかを、これから先のストラテジーとして考えなければいけない状況にあると思います。

病院の中のラボだったらいいとか、僕は最初からそう思っているんです。特にこれから麻疹も全数報告の全数がラボ診断になる。ところが去年も2001年と同じように3万人ぐらい出ています。今年ももう1万人ぐらい出ているんです。1万人を全部ラボベース実験室診断に基づいたサーベイランスはまずできないんです。もうちょっと少なくなってきたから多分、全数の実験室診断になると思います。

そのときには多分もっと診断がつかない状況になってくる。ワクチンが普及して、ほとんどみんなワクチンをやっていて、麻疹ウイルスが入ってきて感染しても発熱だけ、発疹だけという診断がつかない。そうすると国とかWHOが求めているものはウイルスがいるかどうか。要するに麻疹ウイルスがいるかどうか。ところが臨床家が求めているものは目の前にいる、熱が出て発疹が出ている患者さんが麻疹かどうか。ですから、ものの考え方が違うわけです。

全体的な国のレベルのウイルス検査のレベルと臨床家が目の前で困っていることに対しての迅速遺伝子診断法としてのLAMP法は、そういうふうに多

面性がある。これから LAMP 法はどっちを目指していくかということがあると思います。

僕が一番最初にやり始めたのは、DNA の増幅はできるのだろうと思っていて、RNA もできるようになったら、これはすごいなと思っていて、多分デングウイルス（RNA のウイルス）でどこかの学会で LAMP 法の報告があって、これはいいなと思って使い始めた次第です。

今年の臨床ウイルス学会でも演題の中に LAMP 法というのはかなりたくさんありました。2～3 年前にやっと出始めてきて、今、病原診断の中では LAMP 法の占める割合というのはかなり高くなってきました。迅速性、簡便性、特異性も高いし、ちゃんとやれば非特異はあまりないということで、病原診断に関してはこれからどんどん道は開けていくと思います。これから、先にいろいろな応用も出てくると思います。

Ⅲ. 農業分野での遺伝子診断の実践

中山 そうした医療面だけではなくて、今日、僕が一番聞きたかった話が、植物に関してこういうことをやっている先生がいるのだということで座談会でお話しいただこうということになったんです。同じ医療の先生ばかりではつまらないということではないのですが話が広がらないねということで、こうした農業分野、植物の疾病対策ということで平田先生をお招きしています。われわれが知らない世界の話を聞けるのではないかと期待していますので、よろしくお願いします。

平田 JA 和歌山県農協連の平田と申します。私も、農業分野で LAMP 法での診断をしているということ、対象が植物であるということ、そして何より栄研化学からライセンスを 2002 年にいただいて受託検査をしていて、実際にお金もうけをしているところでちょっと毛色が違って来るかなと思います。

最初に私が LAMP 法を始めた経緯は、もともと民間の生物工学の研究所にいまして、次の就職口を探している矢先に、和歌山の農協の営農指導をしている人間が「キクの病気に大変困っているから助けてください」と言ってきたのです。これが「キクわい化病」という背丈が低くなる病気でした。



平田 行正 先生

花屋でキクの花を見ている一般の方は気にしないと思いますが、キクは市場では背が低くなると二束三文の値段になります。その「キクわい化病」と言われる背が低くなる病気が蔓延してしまうと農家はほとんど収入がなくなってしまいます。

そのキクのわい化病というのは、ウイルスもどきの意味でウイロイドと言われる病原体が引き起こす病気です。この植物特有の病原体は、種類によりさまざまですが、250～400bp ぐらいの環状の RNA が正体です。それが普通の状態では輪ゴムをひねったような形で存在するものですから分解酵素の影響を受けずに何年も、感染力を持って存在している。これが植物のキクの体内で増えてしまうと、キクの背が低くなってしまいうことで、キクでは非常に重要な病害でした。

何とかしてくれということだまされて……本当にだまされていたらしいのですが、泣きつかれて和歌山の農協に転職して何とかしようということで大学の先生にもお願いしました。

当時は電気泳動から入りまして、その後、RNA プローブを使ったハイブリダイゼーション、そして RT-PCR のハイブリダイゼーションとどんどん感度を上げていく中で、クローズアップされてきたのが検出感度の問題です。PCR ハイブリタイゼーションを使っても PCR 自体が増幅しないと話にならない。これは阻害物質の影響と思われます。植物の場合にも非常に重要な問題として存在します。

そのような状況でより高感度な分析法を探している中で LAMP 法の特許が成立したというニュースを見ました。真っ先に栄研化学にメールをさせ

ていただいてお話を伺い、何とか使わせてほしいということで植物分野での応用が始まったということです。

使ってみると非常にいい方法でした。そして、私どもはマンパワーがないものですから、朝からPCRを始めますとゆっくりしたPCRで、電気泳動をして染色して、結果が出るのが2時か3時で、失敗したと思った瞬間に2バッチ目にかかるかどうかというのは、その日の機嫌といいますか体力によってですね。今からかかったら結果が出るのは夜の10時だなどと思うとなかなか2バッチ目にかかる気がわいてこないです。

でも、LAMP法ですと特にリアルタイムでは30分もしたらうまくいったかいかの判断ができる。すると1日5バッチ、6バッチの実験系が組めるという点では私たちにとってはいろいろな意味での技術を向上させるために適切な方法だったということです。

そういう中でいろいろなことを考えて、LAMP法自体にもいろいろな工夫はしておりますけれども、先ほど先生方もおっしゃられている抽出法の改良に興味だんだんシフトしていく。これが最大限のポイントだなどということになってきました。

植物の場合は油脂成分もありますけれども、多糖類、蛋白、ポリフェノールそれからゲノムといいますか、植物本来が持っているRNA、そういうものが阻害物質として考えられるわけですが、それをどうやって取り除くかという話。そのほかになんとかステップを簡略化できないかというようなことを私たちができる範囲で手当たり次第に試みているわけです。

年によって変動はありますが、去年1年間の受託検査で4,000検体弱のウイルス・ウイロイド検査をやっております。ほとんどがこのウイロイドです。植物の分野ではウイルスはかかっても捨てればいいやみたいなどころがあります。ところが、ウイロイドはいつまでたっても取り除けない、フリー化という治療ができない。でも捨てるわけにもいかないということで、この短い配列のRNAにいつまでも悩まされています。

検査対象も植物ですし、あまり細かなところは気にせずに同定といいますか、チェックできればいいやという考えで次から次へと新しいプライマーを開

発することはできます。先日も新しいウイロイド、トマトに感染するとひどい被害を出すウイロイドが私どもの維持している植物に見つかりました。

それを国の検査機関の先生方はPCR法でチェックされていた。私どものほうでは、見つかったというニュースを聞いて、その日のうちにプライマーを設計して、届いたプライマーで確認をして、1週間後には私たちが持っている感染の可能性のある植物をすべてチェックすることができました。このトータルでのスピードは他の検査法ではなかなかないのではないかと考えております。

LAMP法は特異性が高いものですから、もちろんプライマーダイマーは気をつけなければいけませんけれども、そういうものがなければ宿主に対してポジコン、ネガコンを持ってきちっと増幅すればほぼ間違いのない。いろいろな系統のウイルスがそろって、それが全部増幅することを確認できればいいのですが、計算上動くはずだということでプライマーを設計しております。

そういう意味では富士通株式会社のLAMP法プライマー設計支援ソフトウェアと併せて使いこなせると非常に速いテンポでの開発ができます。新しいウイルスが植物分野で出ても私たちのほうではわりと迅速に対応できます。LAMP法のおかげで検査のほかの部分に集中できる時間が増えてきたということで、非常に助かっております。

先ほどお話がありましたコンタミネーションという点では、受託検査を行っている私どものところでは出すわけにいきませんので、部屋を4つに分けるという作戦で、抽出をする部屋、試薬を調整する部屋、テンプレートを追加する部屋、それから実際に増幅をかける部屋、これらを別々にしております。そして、お話にもありましたようにふたは絶対に開けない。これを大前提にしております。

一時期、ウイロイドとは植物の体内のどこにあるのかを突き止めるためにin situのRT-LAMPをやったのですが、これは非常に感度のすばらしく高い方法ではありましたが、洗浄するときにカバーグラスを開けるという最大の欠点があります。私は建物を変え、服も着替えてやったのですが、本体の受託検査の方でコンタミが止まらなくなりました。

これでは、商売の受託検査に影響が及ぶということで、それ以上in situしないでくださいと釘を刺さ

れて終わってしまいました。

LAMP 法自体は、感度がそこそこに高いという認識は私たちも持っておりますが、コンタミが怖いという現象はふたを開ける、増幅産物を散らしてしまうということが一番の問題なのかなと思っております。

中山 キクとトマト以外にまだいっぱいありますか。

平田 対象の植物は、和歌山県は果樹県ですのでいろいろな柑橘、ウメ、モモ、ブルーベリー、カキ、加えて色々な花、野菜それぞれに名前を持っているウイルスがあります。みんな共通のウイルスにかかってくると楽なのですが、それぞれが名前を持って、トマト何とかウイルスとか、ペチュニア何とかウイルスとか、カリブラコアという花の小さなペチュニアがありますが、カリブラコアは何ウイルスとか、そんなのが山ほどあります。

そんな植物を外国に送る時、例えばオランダに送るときにどれぐらいの数のウイルスをチェックしているのかとある花苗を輸出している方に聞いたところ、30 種ぐらいのウイルスチェックをしているとのことでした。そのぐらいいろいろなウイルスを1つの植物でもチェックしないとウイルスにかかっていないという証明にならないということなのだそうです。

中山 例えばキクわい化病だけだったら、キクだけにずっといるのですか。

平田 宿主に対してひどいことをして見つかったという点で名前がついているのですが、トマトにもうつりますし、柑橘にもうつることができる。うつった先で悪いことをしなくても感染は成立するようです。

中山 それは何も起こさないわけですか。

平田 無病徴感染ということで、ただキャリアにはなり得ます。

中山 そうすると環境の中で考えてみると、どの植物に何があってもおかしくないということですか。

平田 はい。そういう中でも何とか植物は生き続けているということです。先ほどのトマトのウィロイドは同じナス科の植物のペチュニアという花に無病徴感染をして日本に入ってきたと考えられます。

私たちもペチュニアに関してはノーマークだったものですから、普通に培養してお客様にお返しした

ところウィロイドが抜けていなくて、それがトマトに感染して問題を引き起こしました。種類も多くて対応も大変です。

中山 LAMP 法に関しては病原診断がほぼ確立されたみたいいろいろなところからの報告があります。動物もそうですし、お魚のほうもいっぱい出ています。これから病原体に関してはいろいろな分野に応用はどんどん行くと思いますが、PunMed で癌とかそういうものも出てきています。そういうものに関してこれから先、ほかの分野の開発は栄研さんのほうでどういう展開があるか納富さんにお伺いしたいのですが。

IV. LAMP 法の今後の展開

納富 直接の感染症以外というものに関してはやっています、まだ議論しているところです。ほかのメーカーさんが癌のリンパ節転移の試薬を開発されていますが……。

話はずれるかもしれませんが、今一番気にしているのは先ほどから問題になっている抽出の部分をもっと簡単にしてあげないと、なかなか LAMP 法の特徴を生かした展開ができないということで、抽出の部分を何とかしたい。

抽出はそれぞれの先生方が困っていらっしゃるように千差万別で、検体によって全然違うので、これだという1つの方法はなかなか難しいのです。現在われわれは結核菌をターゲットにしまして、ちょうどお話があったというのもあって、途上国でも実施可能な遺伝子検査を LAMP 法で開発しようとしています。

結核の検査は途上国ではほとんど塗抹検査ですが、その診断の質をもう少し上げていって結核の撲滅に貢献していきたいということです。途上国でのもっといい診断方法を探していた FIND : The Foundation for Innovative New Diagnostics という非営利機関に LAMP 法を目に留めていただいて、共同開発を開始しました。LAMP 法が速いとか一定の温度でできるといったって、それだけで途上国でできるわけではないんです。

先進国の現場検査でも同様なので、結核検査を題材として簡便な抽出法を開発して、それをベースに展開していこうとしているところです。



中山 哲夫 先生

アンプダイレクトという方法がありますがこれはPCR試薬に阻害物質をマスクする、阻害しないようにするものを入れてダイレクトにしようとしています。

われわれが今回ろうとしている方法は阻害物質をある程度簡単に取ってしまって、あとはLAMP法の阻害の強さを生かしてやろうということで、ある多孔質を用いてざっと阻害物質を取って、それをそのままLAMP反応に用います。結核の系ではうまくいき始めているところです。ですから、この方法を使えばわりと簡単に前処理が終わると思います。

もう1つはLAMP反応試薬のほうの問題です。冷凍してある試薬をフリーザーから出してきて、それを混ぜ合わせてマスターミックスを作る。これは研究者だったら普通にできますが、それをルーチンでやるとなるとまだ1つの壁があるということで、これも反応チューブにすべての試薬が乾燥状態で入っているものを今開発しています。

先ほどの簡単な抽出法には、PURE法という名前をつけているのですが、PURE法で出てきた抽出液を1滴たらして乾燥試薬が溶けて反応試薬は全部でき上がって、そのまま温めれば増幅が始まります。抽出から検出まで簡単な系になりつつあるなというところで期待しています。

中山 それは臨床検体で簡単にできるようになりますね。

納富 そうです。

中山 榎村先生、結核と真菌で違うかもしれませんが、そういうのはどうですか。

榎村 それがあればずいぶん変わってくると思います。現在深在性真菌症起因菌で一番問題になっているのはアスペルギルスです。アスペルギルスの場合は今までPCR法の経験も長くて血清PCRなどは今商業化されていますが、どうしても血中に出てくる菌量は少ない。したがって鋳型となる真菌DNA量が少ないために感度が落ちます。当然、本菌の標的臓器である呼吸器の検体に一番菌量が多いわけです。

ところが、呼吸器検体の内でも。特に最も採りやすい喀痰検体にはさまざまな阻害物質が含まれます。そのうちの一部のものでも除けるのであれば、今すでにあるLAMP法を実用化していくうえで助けになるかとは思いますが。

今伺ったドライの製品は非常に期待ができますね。

納富 そうですね。

榎村 あとはさっきのふたを開けてはいけないということも併せてラボオンチップ (Lab-on-a-chip) 化に進んでいただければ、初めて応用範囲が広がり、本当の臨床検査試薬になっていくだろう。今の時点では実験室試薬です。

ですから、臨床検査室で簡単に使えるためには試薬が先ほどの方法で検体1滴をたらして、機械にかける (かけなくてもいいですが)、そうすると想定する何れの菌かというところがハイブリダイゼーションか何かがわかってくれば非常にいいですね。

その後チップはそのまま安全に捨ててくださればコンタミも起こらない。(笑) やはりコンタミに関してはみんなかなりナーバスになっていますので、それさえ除ければ夢のような方法に違いないです。

納富 多項目検査みたいなものはどうですか。

榎村 ぜひともほしいと思います。多項目もあまり難しいことを考えなくてもいいんです。つまり1つの検体をいくつもの特異的LAMP試薬がドライに入っている1つのチップの中に注入して、各ウェルに分配する。そして、そこで反応後に何らかの方法で検出してあげればいいので、特にマルチプレックスのようなことをする必要は全くないと思います。ラボオンチップのいいのができれば、それが可能になるかと思っています。

そこまでできて本当は遺伝子診断法が初めて実用化できたということになるのだらうと思います。

ですから、今、培養で使われているバイテックと

か、デイドという培養ベースの自動機器に相当するもので遺伝子検査版ができるというのがひとまずのゴールでしょう。それができれば地上でも使えるし、もっとへき地でも使えるし、それこそ宇宙ステーションの中でも使えるものになります。

しかも、定温増幅法である LAMP 法を使えば、それは簡単にコンパクトにできるはずだということで、期待は非常に大きいです。そのための方法論としてのフリーズドライなり遺伝子抽出なり、あるいはこんなに小さなラボオンチップの開発なりというところで大きな期待がもたれます。

納富 頑張ります。(笑)

中山 先生の呼吸器のほうは細菌もあるし、ウイルスもあるし、真菌もあるし、真菌が一番診断がつかない。そこが一番問題になっています。

それから、外国のメーカーはリアルタイムなどでもいろいろな病原体の診断ができるようなものは今セットになって出ています。でも、あんなのが使えるのか、お金が高いのに。そこのところをもっと簡素化して、コストダウンしなければいけない。

結核は東南アジアなど低開発国ではやっていると思いますが、LAMP 法は機械が要らないからすぐ飛びつくんです。それに加えて、その前の抽出がもっと簡単になって、何分かでできるようになればもっともっと普及しますね。

工藤先生はバクテリアのほうですが、抽出にはあまり苦労しないですか。

工藤 今お聞きしていてずいぶん状況が違うのかなと思います。私の場合、食品対象でしかやっていないので、ほかの分野の状況は知らないですが、食品の場合はアルカリ熱抽出の試薬を使うことを前提にしていることが多く、食品中の油分が多いもの、阻害が比較的多いものでも、抽出が比較的安定しています。カラムを使った抽出精製法などいろいろなメーカーからの製品がありますが、そういったものと比較して、むしろ抽出精製ステップが多いものよりも単純なアルカリ熱抽出のほう効率が良い時もあります。現状の方法である程度は抽出ができていると思っています。

中山 今のやり方でそんなに苦労はないと。(笑)

工藤 チーズのように水分活性が比較的低く油分が多いものなどアルカリ抽出が不得意とする食品もあります。もちろん、食品の種類が多いですから 1

つの方法で完璧というのは難しいので、食品ごとに方法を変えるなど現実的ではないですが、さらに抽出法を追求する余地はあります。しかし、あまり深刻ではないと思います。それと、皆さんと違うことで私はあまりコンタミが起こったことがないのです。もう 5～6 年以上使っていますが、コンタミの経験の記憶がないのです。腸管出血性大腸菌の試験法などで質問が来ることがあります。例えば、LAMP 法で志賀毒素遺伝子が陽性になりました。でも、培養しても志賀毒素陽性の菌が取れないと言われます。おそらく培養法が遺伝子検査に追いついていないのです。食品から食中毒菌を分離される先生方はご存じですが、非常にたくさんの細菌が培養法では生育してくるということで、分離できなくてどっちが正しいのか非常に悩まされるところです。私はそういったことを解消したいと思って、LAMP 法で志賀毒素陽性になったものの培養液をラボに送ってもらって、そこから根気強く志賀毒素陽性の菌を拾ったことがあります。ルーチンで検査をやっていたらしゃる人には時間がかかってできないと言われたことがあります。工夫して分離を試みますと、10 検体以上で確実に志賀毒素陽性の菌を分離しました。

中山 培養もできるということですか。

工藤 そうです。培養液の希釈列を作って選択培地に塗抹し、同時に LAMP 法でどの希釈段まで志賀毒素陽性の菌がいるか確かめながら寒天培地からコロニーを拾っていくのです。密集していたら集団に分けてさらにその集団の掻き取り浮遊液を希釈し同様に選択培地と LAMP 法を使って志賀毒素陽性の菌を追って行くのです。このようにステップを踏んで次第に志賀毒素陽性の菌が比較的高い割合で存在する菌の浮遊液を作り、最終的に寒天培地上のコロニーとして志賀毒素陽性の菌を分離します。4 日くらいで必ず取れます。非常にマイナーな血清型でも確実に菌を拾うことができます。こういった経験もあり、LAMP 法で陽性になったサンプルには目的の菌はいると思っています。でも、LAMP 法で志賀毒素遺伝子が陽性でも培養で志賀毒素陽性の菌が取れない場合はこの根気強い方法で分離してくださいとお話ししても、なかなか実行には移していただけないのですが。

中山 先生のところは食品の上に乗っているもの



納富 継宣 氏

ですから、菌数としてはもともとそんなに多くない、すごく少ないわけですね、われわれのやっているところから見ると、コピー数がすごく少ないわけです。

平田先生のほうの植物のウィロイドというのは原材料の中にはコピー数としてたくさんありますか。

平田 罹病株はけた違いの数がありますが、私たちはそれを取り除いたものを販売しているものですから、かかっていないよという証明になると本当に重箱の隅をつつく話になってきて、検出感度との闘いみたいな話になります。本当にないのかわからないけれども、減らしたことは事実だということでお客様にはご了解をいただいています。

中山 あることを証明するのではなくて、先生のところはないことを証明しなければいけない。

平田 証明したいのですが非常に難しい。いつまでたってもそれは完璧にはできません。植物には、ウイルスフリー、ウィロイドフリーという言葉がありますが、「保証はできないけれど出来るだけのことはしています」という形で販売していくことになります。私たちのこの時点での技術では検出できませんでしたということですね。

それが阻害物質であったり、いろいろなことで検出できないことも多いようなのですが、通常の抽出法で検出できないやつが in situ RT-LAMP で見たときには組織の中にボコボコ見えてくることもあって、まだまだやらなければいけないことは多いなと思っています。

中山 そっちのほうの方が面白そうですね。どこにいるのか。(笑) やってはいけないことは何かやりた

くなりますね。

平田 見たら最後ですから。(笑) ふたを開けてしまいますし。(笑)

V. それぞれの分野での今後の展開

中山 今日、病原体のほうでお話ししていただきましたが、これから先生方の分野でも展開がいろいろ出てくると思います。食品衛生のほうで工藤先生、これからどういうものをターゲットにやろうと思っていますか。

工藤 いろいろな行政ニーズを考えますと、やはり主な食中毒細菌がひとそろいあると遺伝子検査の選択肢の1つとして選べるのであるといいなと思っています。腸炎ビブリオなど、大分食中毒は減ってきていますが、日本で昔から多い食中毒でしたので、そういったものも必要だと思っています。

中山 横村先生はどうですか。これから何をやるうか。

横村 いろいろやっていますが、宇宙で使える LAMP 法の開発も良いのではないのでしょうか。宇宙ステーションの中でも可能な微生物検査は、地上でもスペースが限られた検査室、医療過疎地区、その他の特殊な環境において大変有用なツールになります。そのためには PCR 法はあまりにも面倒なので、先ほど教えていただいたフリーズドライの試薬が可能となるのであれば、LAMP 法は非常にいい候補になります。

例えばラボオンチップのタイプで今、エンドトキシンなどを測定できるような機械もありますけど、そういうものに LAMP 法を乗せてしまえばいいわけです。先ほど言いましたようにいくつかのウェルの中でこれが増幅できればこいつがいるということがわかれば、感染の診断ができる。そういうものを1つ開発していくための基礎実験をやっていかなければいけない。

あと、私たちはずっと深在性のことばかり考えていたのですが、よく考えたら表在性の真菌症も診断治療が難しい。もっとまずいのは微生物学者が減っているんです。特に医学領域において病原体側を見られる人がどんどん減っています。

皮膚科領域の遺伝子診断も思ったよりうまくいきます。というのは、検体の性質上深在性でわれわれ

が困っていたような問題が、表在性ではほぼ解決していたりします。ですから、その辺の開発によって、一般的に使える真菌症遺伝子診断法は、「そうか、初めからもっと簡単な方をやればよかったんだ」というツールが供給できるのではないかと思います。

中山 上層部をぬぐってくればいいわけですね。

槇村 表面が見えているんですかね。(笑)

中山 見えていますね。(笑)

槇村 よく考えたら、何だ、最初にやれよなど。本当に恥ずかしい限りです。しかも、ほぼ脱核していますからね。

中山 そうですね。

槇村 今までの悩みが一遍に解決してしまったんです。

中山 でも、やはり深在性のものを僕たちは知りたい。(笑)

槇村 そうそう、深在性は深在性でまたやらなければいけないんですが。

中山 平田先生、これからの展開は。

平田 先ほども申し上げたようにやはり速い。開発も慣れると相当速いというところで、今、日本の農業もそうですが、世界的に温暖化が進んできて訳のわからない病気が次から次へと植物分野では出てきています。そういうものに素早く対応できる、こういうことが1つのメリットなのだろうと思いますので、私どもも日本の農業分野に出てくるいろいろなウイルス、ウイロイドによる病気に素早く対応できるセンターになっていこうと思っています。

中山 先ほど海外から入ってきたとおっしゃっていましたね。外国はそれに対して輸入制限みたいなところで検査などはあるんですか。

平田 していますけれども、あまりに入ってくる植物の量もチェックしなきゃならない病気の数も多すぎて手が全然回っていない。そういうレベルのところで動いているということだろうと思います。

中山 水際で止めないとだめですね。

平田 それは国の仕事で、私どもは新しいウイルスが見えたときに生産者が対応していくための手段を講じるしかないのですが。

中山 世界的に植物の検疫に関しては、それほど厳密に検査されていない感じですか

平田 そうですね。数が多すぎてすべてをチェックすることは非常に難しいと思います。特に無病徴

で持っているものに関してはほとんどチェックできないのではないかと思います。

槇村 先生が言われたラボオンチップで10、20、30、40とポンと出ればまた別ですが、そういうのでも出ない限りは相当難しい話です。

槇村 今はもう特異的なプライマーセットがあれば、あとは栄研化学がその気になればできるわけですね。1つのチップの中に全部入れておくわけですね。それで検体をジュジュジュと入れて、反応させれば結果が出るわけですね。ですから、そういうものを1つでも2つでも出していけば全く違ってくると思います。

納富 やりたいと思っていて、やり始めているところなのですが。

槇村 ぜひともお願いします。

中山 ずいぶん将来的な展望になってきましたね。

納富 確かに槇村先生がおっしゃるようにもっとLAMP法の特徴を出していけないとだめだと思っています。

PCR法と同じことももちろんできるのだけれども、何か違う特徴をもっと出していけないと、LAMP法自体も皆さんが心配されているように広がっていかないのではないかと。

またわれわれ自身が市場を開拓する努力をもっとしていけないといけないかなと思っています。目の前にある売れているものにどうしても引かれてしまうところがありますが、最終的にはLAMP法の特徴を生かしたところで開発していきたいと思っています。

中山 私たちが外国へ行ってWHOとか中国とかあちこちへ行くと一番最初にすごいと言います。やはりやりたいみたいです。病原診断もちゃんとできていないところですから、それに対して需要はかなり大きいですが、コストの面がかかわってくる。WHOに言わせると、すごいけれどもリアルタイムと比較してコストはどう??となるんですね。(笑)

今、リアルタイムも機械自体がどんどん安くなっています。これから先どういう特徴を持ってやっていくかという、迅速性と特異性がかなり高いところと簡便性をこれから売りにして世界に出ないと。

さっきもインターネットで調べたら遺伝子レベルの検査のところにLAMP法が入ってきています。

ヒトゲノムの遺伝子検査というか、肺癌のテーラーメイドのやつで薬剤が効くかどうかというのを LAMP 法で診断するような報告も出ているようです。

感染症に限らず遺伝子をターゲットにしてこれからどういう方向性があるのかもいろいろな道があるのではないかと思います。それはやはりふたを開けなければいけないので、ちょっと困るかな。

プライマーを変えて末端のところで SNPs 解析のところで合わないようなプライマーを作る。それはなかなか難しいというお話は聞きましたが、それはどうですか。

納富 できてしまえばいいのですが、酵素が 100% の特異性を持っていないといいますが、マイナーな現象でもいったん起きるとばんばん増えてしまうみたいところがあって、プライマーの設計がいつも以上に難しいし、反応条件の厳密性が出てきます。

やはりチップみたいなプラットフォームでプローブを使って検出させるような方法も組み合わせていったほうがいいのではないかとはいっています。

中山 平田先生が受託研究に至ったところというのは、それだけ需要が大きいのですか。

平田 そうですね。4,000 検体のうち 9 割以上はウイロイドという病気です。それはウイルスのようにタンパク質を持ちませんので ELISA などではチェックできませんし、簡単には取り除くこともできない。でも、ほとんどのキクがかかっている中で薄いやつを選抜しなければいけないという非常にやっかいなもののために需要があるわけです。

中山 受託検査というと検体当たりに関して費用は発生するわけですね。

平田 はい。1 つは検査して検査結果をお返しするだけのものと、検体自体をお預かりして、その濃度を薄くしてフリーのような状態にしてお返しするのが 2 種類あります。4,000 検体といたしましたのはただ検査するものです。

この病気は、暑いと被害が大きくなる病気です。去年、一昨年と猛暑が続いて、キクの産地、特に西南暖地で億単位の被害が発生しています、それで私たちの検体が増えたというのもあるのですが。これからどんどん地球が暑くなっていくと、そういう病気が増えていくのだろーと思います。

VI. LAMP 法に望むこと

中山 最初お話ししましたように、今日は LAMP 法をもっと広げようという趣旨があるわけです。納富先生から栄研のこれからの展望はお聞きしましたが、工藤先生これから LAMP 法に望むことはございますか。

工藤 LAMP 法はリアルタイム PCR 法より機械の価格も安いのではないかと思います。それから、食品の分野ではキット化が十分進んでいますので、だれでも手軽にできるものになりつつあると思います。世界的にも食品に対する安全性を求める声は高まっていますので、いろいろな国で簡単に検査ができる方法として発展が期待できるのではないのでしょうか。海外の研究者や機関とも連携をしていただいて、ぜひ広げていただきたいと思っています。国際誌に論文を出しますと海外の研究者から問い合わせをもらいます。LAMP 法について聞かれて、栄研化学のホームページをお教えしたりしますので、世界で関心は高いのではないかと思います。

中山 栄研化学のホームページに英語バージョンはないですか。

工藤 ありますので、参考にしています。

納富 英語は一応ありますが、更新が日本語版より遅れることもあります。

工藤 反応が一定温度でできるといっても、やはり専用の機械があったほうがリアルタイムで見ることができますし、そういった機械も英語バージョンがあるといいのかと思います。すでにあるのですか。

納富 はい、外国にも出せるようになっています。

工藤 試薬キットだけ買えば、ほかのメーカーの機械を使って応用できるというような仕方もあるのかと思います。

中山 横村先生、LAMP 法に期待するものは、いかがですか。

横村 もう十二分に期待しています。ですから、先ほどのドライのキットがすぐにでも使えればユーザーは当然増えます。

それと、これも先ほどもうお話ししてしまったのですが、ラボオンチップ化のための道筋ですね。私どもは製品がないものを開発している立場として

は、ユーザーが新たに作ったものに関してもフリーズドライのミックスチャーをラボオンチップ化してくれるようなサービスがあれば、どんどん開発ができる可能性があります。

私どもは研究者が少ないのでノロノロしていますが、進むときにはいきなり進みます。そういうときに対応していただけるような、栄研さんでなければできないような試薬のところから、もうちょっとチップあるいは機械のところまで一連のサービスを提供していただければ、そこに乗れるということになります。開発をしない人の場合はでき上がったものを使うというサービスがあると大変助かると思います。

例えばいろいろな研究者が論文に出したレベルのもの、多分そのような反応系は栄研クオリティでは製品ではないんです。半製品だと思いますが、そんなものでも作ってやろう。使いたい人には使わせてやろう。ある程度うまくいったら栄研でもう一度ブラッシュアップしてやろう。そういうような戦略もあるかと思っています。

ですから、せっかく日本で開発したものであって、しかも栄研化学のようにそういうところでちゃんと面倒を見てくださる会社がやっているわけですから、いろいろな立場のユーザーがどこからでも入って行って、みんなで使い合えるようなシステムを考えていただくと大変有用であろうと考えています。大いに期待しているということです。

中山 平田先生はどうですか。もっと望むこと。

平田 私も大分お世話になっていますが、先ほど工藤先生が言われた英語のホームページもそうですし、私たちのところに海外から依頼がきて、プライマーを作ってあげて、それでよかったからほかのウイルスも全部作りたいとか、やはり皆さんそういうことおっしゃられます。英語のホームページもそうですし、講習会も頻繁に開いていただいているのですが、ホームページ上にユーザーフォーラムがなかったりしますね。

納富 ないですね。

平田 堅いなと思って。(笑) そういうのがもっとあってFAQ (Frequently Asked Questions : 頻繁に尋ねられる質問) が載っていると初めての人がとっかかりやすかったかなと思います。

楨村 今ここで話しているようなチップが公開

されていないから、初めて開発なりに使ってみようという人がつまずくのです。ですから、その辺のつまずきを解決してあげるような情報があるといいですね。

中山 最後に僕が望むことですが、いっぱいあります。(笑) せっかくこんないい検査法ですから、食品衛生のほうはかなりキット化できていますが、医薬品の中の体外診断薬というのはかなりハードルが高いんです。そのところの需要はかなり高いわけですが、プライマーのセットを研究試薬のセットとしてライブラリーで。今までいろいろな論文が出ています。ウイルスに関してバクテリアに関しても。

そのプライマーのセットをライブラリー化しておいて、保険点数のとれる体外診断薬にするのが望まれますが、研究試薬であっても、それを使ってやりたい施設はたくさんあると思います。その研究試薬としてサプライしておいて、その中でデータを集めていくのも手ではないかと思っています。特に麻疹の流行のときにはすごくもったいないことをしたなと。(笑)

これから先もワクチンに関連したウイルス感染症にしろ百日咳にしろ、今感染症対策としてはワクチンが一番大切なものになっていますが、お金があつてどんどんワクチン政策を進めていけばある程度少なくなります。少なくなったときに何が問題なのかということちゃんと診断できることです。

要するに臨床診断キット、臨床診断のいろいろなツールがちゃんとできていないとワクチン行政としてワクチンを推進して病気をなくしたと言っても、その中で病気はいろいろな病態で変わってくるわけですから、それに対して病原体をちゃんと診断できること、ワクチンと病原診断は感染症対策の両輪だと思っています。それに対してLAMP法は病原診断に関して迅速性を持って対応できるという一番いい方法です。

臨床家が目の前にいる患者さんに対して何が一番困るのかということで、インフルエンザの迅速診断キットがなぜあれだけ出ているのかということです。病原診断の価値観とといいますか、単純に目の前にいる患者さんを診断するだけではなくて、その先の感染症対策としての病原診断という意味合いを考えていけば、もっともっと道は開いてくるのではな

いかと思っています。

われわれはワクチンをやっているからそういう観点ですっと見っていますが、それは臨床の先生方と見る目とはそんなにずれていないと思います。臨床の目の前の患者さんのこと、それからワクチンをやって病気のこと、その病気をなくするためにはワクチンと病原診断は両輪だということで、もっともっと研究試薬として出してもらえればうれしいです。

納富 今日はたくさんのご助言をいただきまし

た。プライマーセットを含めて LAMP 試薬をどんどん製品化していきたいという気持ちは前からありました。製品化プロセスを見直して、もっとフットワークをよくして、ユーザーニーズにこたえられるようにしていきたいなと思っています。本当にどうもありがとうございました。

中山 この座談会が今後の発展につながればと思います。来年の PubMed で 500 ぐらいに。(笑)

どうもありがとうございました。