

め世界各国の厚生行政当局からも強く望まれている。

【研究目的】 この様な世界のニーズに応ずるために、総合科学技術会議の指定による SARS 緊急研究の 1 テーマ『SARS の簡易迅速診断法の開発』の指定を受けて、上記の条件を満たす SARS 迅速簡易診断キットの開発・実用化を目標として研究を進めた。

【研究方法】 全く新規の原理に基づいた診断キットの開発は時間的に不可能であったので、それまでに報告されていた各種の迅速診断法を検索し、また幾つかの提案とともに、その有用性、実現性などを検討した。その中で、栄研化学(株)が独自に基本技術を開発し、既に幾つかの病原体の診断方法として実用化されて高い評価を得ている新規遺伝子増幅法(LAMP 法)に基づいた SARS コロナウイルス遺伝子検出法が最も有力な候補と考えられた。この方法は、5 月の時点で、最も基礎研究段階が進んでおり、検出方法も高価な装置や特別な技術を必要とせず、15-20 分程度という短時間で結果が得られ、目視による判定も可能であり、感度と特異性が十分に高いことが予想され、しかも低価格な簡易迅速診断法であることが期待された。しかも、開発が成功した際には、キット化して大量に製造・供給することも期待できることから、今後の開発研究の進展が期待される候補として、高い優先度をもつと判断された。これに関して、合同研究班会議で取り上げ検討された結果、栄研化学との共同開発チームを構成して、効率よく簡易迅速診断キットの開発を進めることとなった。

本キットの開発共同プロジェクトにおいては、キット本体の設計、試験製造、ウイ

ルス RNA 標準品を用いた性能試験は栄研化学が担当し、国立感染症研究所の役割は、客観的な観点から、臨床検体を用いて、従来の RT-PCR 法との感度を比較評価することである。

臨床評価に際して、国内では SARS 患者検体が得られないことから、WHO の SARS 研究ネットワークを通じて東南アジアなど SARS 流行地域の関連研究機関に協力を求め、海外の研究機関および国立感染症研において性能試験を実施した。限られた臨床検体の共有と有効な使用に関するネットワーク内の協議が、様々な利害が絡んで困難な状況にあったが、6 月にバンコクで開催された APEC 会議における厚生労働大臣による 5 カ国との二者会談における協力要請によって、検体の提供および共同研究が可能となった。これに基づいて、7 月には香港、シンガポール、ベトナム、台湾等と厚生労働省との間での実務者会談が行われ、LAMP 法による SARS 遺伝子診断キットの臨床試験に関する国際協力体制が整った。このような国際協力体制の下で、当該国を中心とする研究機関の協力により臨床評価を進め、その結果を国立感染症研究所(合同研究班分担研究者)が中心となりまとめ上げた。

【治験試薬および対照試薬】

1.治験試薬：SARS/RT-LAMP 検出試薬

2.対照試薬：

国立感染症研究所ウイルス第 3 部自製 RT-PCR 試薬

香港中文大学医学部自製 RT-PCR 試薬

香港特别行政区衛生部ウイルス部門自製 RT-PCR 試薬

【患者検体およびパネル検体】

検体の種類は、香港、ベトナムの SARS 患者および接触者から様々な日時に採取した、血清(血漿)、咽頭拭い液・咽頭鼻腔拭い液、糞

便などである。

[測定施設]

1. 国立感染症研究所

WHO パネル検体、ベトナムから送られた SARS 感染患者との接触者の血清(血漿)各種検体

1. 香港中文大学

血清(血漿)、咽頭・鼻腔拭い液、糞便

2. 香港特別行政区政府衛生署血清

[測定結果]

1. 国立感染症研究所

(1) WHO パネル検体サーベランス(表1)

(2) RT-PCR 感染患者との接触者検体(表2、表3)

2. 香港中文大学(表5)

3. 香港特別行政区政府衛生署(表6)

[結果および考察]

1. 国立感染症研究所

(1) WHO SARS 診断施設を対象とした SARS 診断感度に関するパネル検体による性能試験

平成15年6月にドイツ・ベルリンのロベルト・コッホ研究所が中心となり、WHO の SARS コロナウイルス遺伝子RNAのパネル標品を各検査施設に配布した。各施設では、各々で行っている方法を用いた測定を行い、その結果をベルリンに報告した。今回その結果が集計されて評価され、中間報告が平成15年11月にジュネーブで開催された WHO SARS 研究検査ネットワーク会議で発表された。但し個別の結果報告は行われていない。「感染症研究所の RT-PCR は明らかに感度不足であるが、LAMP 法は素晴らしく優秀な結果である」との LAMP 法に対する高い評価を示すコメントが届いた。

(2) SARS 感染患者との接触者検体

感染研で今回検討したベトナムからの送付検体は、感染患者との接触者のものであり、症

状を呈していないヒト由来のものである。しかし、この中には時間経過とともに血清抗体が陽性となったものもあり、これらは不顕性感染であったと判断される。まず無症状の患者接触者の検体からこれだけの陽性例が検出できた事に疫学的な意義があり、不顕性感染の実態を調査する意味で重要である。従って本検査においては、血清検体が貴重なため、一テスト当たり 5 μ L の血清を使用せざるを得なかった。そのため検体量を増した場合には検出率が高くなった(表4)。実際の試験では、2~3mL 以上の採血は可能であるので、LAMP 法の感度は今回の成績の 25 倍程度であると判断される。

2. 香港中文大学

香港中文大学の RT-PCR 法においては、検体からウイルス RNA を抽出する際に、感度を上げる目的で、カラムに 5 回通して約 10 倍に濃縮した上で nested RT-PCR を行っており、測定所要時間が 7 時間以上と臨床現場では実際的なものでない。LAMP 法との比較においては、陽性率はほぼ同程度であるが、操作性の違いを考慮すると、利便性においては LAMP 法の優位は問題にならない。

3. 香港特別行政区政府衛生署

全ての検体は抗体陽性となった患者由来のものであり、発症後順目的に揃ったパネル検体である。自家 RT-PCR 用いて測定した際には、検体は採取直後で非凍結状態のまま試験に供しているが、今回の LAMP 法を実施した際には、一旦凍結保存されていたものを融解して用いている。検体量が少ないため、他の試験については同時に行われていない。このような保存状況においても、LAMP 法は自家 RT-PCR と同等の成績であった。

発症後早い時期には、検体中のウイルス RNA のコピー数は検出感度限界付近と極端

に少ないため、陰性となることは仕方ない。SARS 患者においては、そもそも病初期においてはウイルス遺伝子が上気道粘膜には存在しないと考えられている。一方、早い時期からウイルス血漿となることから、血液を検体とした方が再現性のある結果が得られている。しかし、血中の濃度も検出限界に近いため、同じ検体を分けて検査を行っても、全ての検査が陽性とはならないことは理にかなっている。

それよりも2週目に入って陰性結果が多いのが懸念されると責任者の Wilina Lim 博士が指摘している。

[結論] SARS/RT-LAMP 検出試薬は国立感染症研究所が現在行っている RT-PCR よりも感度が高いが、香港特別行政区政府衛生署の自家製 RT-PCR また香港中文大学の自家製 nested RT-PCR とはほぼ同等であった。

また発症初期の血清では陰性の割合が高いが、今回は $5\mu\text{L}$ という微量の血清検体を用いたために感度が低くなっていると考えられる。実際に患者が出た場合の現場では、十分量の血液を採血出来るので、血清 $200\mu\text{L}$ を使用することが可能である。従って、現場で LAMP 法のキットを使用する際の検出感度は、今回の成績よりも 5~40 倍程度高くなるものと考えられる。

現行の RT-PCR 法においては、感度の問題もさることながら、実験室内の交叉汚染による擬陽性例が多い。WHO では当初、なるべく感度を上げて、偽陽性も含めて検出し、見逃しを無くすることを目標にしていた。しかし、SARS が流行していないインフルエンザの流行期においては、これらの偽陽性例が全て報告されると、現場はいちいち対応せねばならず、その影響は大きな問題となっている。そのため、最近 WHO では、高感度よりはむしろ偽陽性を出さないために特異性を高めて

精度を向上させることを強く要請している。この点については RT-LAMP の増幅原理からも理解できるように特異性が圧倒的に高く、これは他施設での各種コロナウイルスとの交差反応が全くないこと、及びこの度の陰性の臨床検体の成績からも実証されている。

臨床材料を用いた性能試験においては、系統的なパネル検体が存在せず、貴重な検体のごく一部分のみを使用せざるを得ない状況であり、今回の検体数以上の検体を用いた試験の実施は実際上不可能に近い。限られた成績ではあるが、LAMP 法は SARS の初期診断には、十分に使用可能であると判断される。

また本キットは、高価な特殊装置および特別の技術を必要とせず、15~30 分程度という短時間で結果が得られ、目視による判定も可能であり、特異性が十分に高いこと、また感度も現在使用されている既存の方法と同等以上であり、しかも低価格な簡易迅速診断法であることと結論できる。

[発表業績]

1. Nakajima, N., Y. Asahi-Ozaki, N. Nagata, Y. Sato, F. Dizon, F.J. Paladin, R. M. Olveda, T. Odagiri, M. Tashiro, T. Sata :SARS corona virus-infected cells in lung detected by new in-situ hybridization technique. Jpn. J. Infect. Dis. 56, 139-141, 2003
2. Haagmans, B. L., T. Kuiken, B.E. Martina, R. A. M. Fouchier, G.F. Remmelzwaan, G.V. Amerongen, D. V. Rhiel, T. de Jong, S. Itamura, K.-H. Chan, M. Tashiro, A.D.M.E. Osterhaus
Pegylated interferon-alpha protects type 1 pneumocytes against SARS coronavirus infection in macaques. Nature Med. 10: 1-4, 2004
3. Poon, L. L. M., C. S. W Leunga, M.

- Tashiro, K. H. Chan, B. W. Y. Wong, K. Y. Yuen, Y. Guan, J. S. M. Peiris. :Rapid Detection of SARS Coronavirus by Loop-mediated Isothermal Amplification. Clin. Chem. 50:1050-1052, 2004
4. Takasuka, N., Fujii,H., Takahashi, Y., Kasai, M., Morikawa,S., Itamura,S., Ishii,K., Sakaguchi,M., Ohnishi,K., Ohshima,M., Hashimoto,S., Odagiri,T., Tashiro,M., Yoshikura,H., Takemori,T., Tsunetsugu-Yokota, Y. : A subcutaneously injected UV-inactivated SARS coronavirus vaccine elicits systemic humoral immunity in mice. Int. Immunol. 16:1423-1439, 2004
5. Okada, M., Takemoto, Y, Okuno, Y., Hashimoto, S., Yoshika, S., Fukunaga, Y., Tanaka, T., Kita, Y., Kuwayama S., Muraki, Y., Kanamaru, N., Takai, H., Okada, C., Sakaguchi, Y., Furukawa, I., Yamada, K., Matsumoto, K., Kase, T., de Mello, D. E., Peiris, J.S.M., Chen, P-J., Yamamoto, N.,Yoshinaka, Y., Nomura, T., Ishida, I., Morikawa, S., Tashiro, M., Sakatani, M.:The development of vaccines against SARS coronavirus in mice an SCID-PBL/hu mice. Vaccine 23: 2269-2272, 2005
6. Ohnishi, K., Sakaguchi, M., Kaji, T., Kagawa, K., Taniyama, T., Kasai, M., Tsubetsugu-Yokota, Y., Ohshima, M., Yamamoto, K., Takasuka, N., Hashimoto, S., Ato, M., Fujii, H., Takahashi, Y., Marikawa, S., Ishii, K., Sata, T., Takagi, H., Itamura, S., Odagiri, T., Miyamura, T., Kurane, I., Tashiro, M., Kurata, T., Yoshikura, H., Takemori, T.:Immunological detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by monoclonal antibodies. Jpn. J. Infect. Dis., 58; 88-95, 2005
7. Saijo, M., Ogino, T., Taguchi, F., Notomi, T., Fukushi, S., Mizutani, T., Matsuyama, S., Long, H.-T., Hanh, G. T.-H., Kurane, I., Tashiro, M., Morikawa, S. : Recombinant nucleocapsid protein-based IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of SARS. J. Virol. Methods 125; 181-186, 2005
8. Matsuyama, S., Ujike, M., Morikawa, S., Tashiro, M., Taguchi,F. : Protease-mediated enhancement of SARS coronavirus infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102; 12543- 12547, 2005
9. Fukushi, S., Mizutani, T., Saijo, M., Kurane,I.,Taguchi,F.,Tashiro,M.,Morikawa,S. : Establishment of a novel SARS-CoV neutralizing assay using vesicular stomatitis virus pseudotype bearing SARS-CoV protein. Arch. Virol. 2007

表1 WHOパネル検体サバーランス

パネル番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
LAMP キット	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
	(2/2)	(2/2)	(0/2)	(2/2)	(1/2)	(2/2)	(0/2)	(0/2)	(2/2)	(2/2)
	⑥	①		④	⑦	③			②	③
RT-PCR	-	+++	-	++	+	+	-	+	+	-

本キットの下段：(陽性数/陰性数)

①～⑦はコピー数の多い順序を示す。

表 2-国立感染症研究所におけるベトナム患者との接触者検体での測定結果 一検体数での集計一

Specimen type	Number of sample	RT-LAMP Turbidity		RT-LAMP Visual Fluorescence		RT-PCR	
		Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
serum	279	30	249	30	231	1	65

表 2-2 国立感染症研究所におけるベトナム患者との接触者検体での測定結果
一接触者数での集計

Specimen type	Number of patinet	RT-LAMP Turbidity		RT-LAMP Visual Fluorescence		RT-PCR	
		Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
serum	141	15	126	16	114	1 (2)	43 (42)

表 3 国立感染症研究所におけるモンゴル、香港及び台湾患者検体の測定結果

Nationality	Specimen type	Number of patinet	RT-LAMP Turbidity		RT-LAMP Visual Fluorescence		RT-PCR	
			Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
Mongolia	serum	2 2	2	2 0			2	2 0
Hong Kong	serum	7	4	3			2	5
Chinese Taipei	serum	2 0	3	1 7			3	1 7
Total		4 9	9	4 0			7	4 2

表 4 香港中文大学における測定結果

Diagnosis	Specimen Type	n	RT-LAMP Turbidity		RT-LAMP Visual Fluorescence		RT-PCR	
			Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
Positive	DEEP NASAL SWAB	6	4	2	4	2	5	1
	NASAL SWAB	7	4	3	3	4	3	4
	NASAL SWAB RESP	1	0	1	1	0	0	1
	RECTAL SWAB	10	8	2	6	4	7	3
	STOOL	68	56	12	55	13	60	8
	STOOL(RECTAL SWAB)	1	0	1	0	1	0	1
	RESP THROAT GARGLE	1	0	1	0	1	1	0
	THROAT GARGLE	11	5	6	2	9	10	1
	THROAT SWAB	3	1	2	2	1	3	0
	SPUTUM	1	1	0	1	0	1	0
Total %		109	79 72.4	30 27.5	74 67.9	35 32.1	90 82.6	19 17.4
Negative	NASOPHARYNGEAL ASPIRATE	2	0	2	0	2	0	2
	STOOL	5	0	5	0	5	0	5
	THROAT NASAL SWAB	2	0	2	0	2	0	2
	TRACHEAL ASPIRATE	1	0	1	0	1	0	1
Total %		10	0 0.0	10 100.0	0 0.0	10 100.0	0 0.0	10 100.0
Unknown (Positive Patient)	PLASMA	10	1	9	0	10	0	10
Total %		10	1 10.0	9 90.0	0 0.0	10 100.0	0 0.0	10 100.0
Unknown (Expected Negative)	PLASMA	10	0	10	0	10	0	10
Total %		10	0 0.0	10 100.0	0 0.0	10 100.0	0 0.0	10 100.0
Unknown (real time)	PLASMA	10	2	8	1	9	3	7

PCR positive in same day blood specimen)	SERUM	11	2	9	1	9	5	6
Total %		21	4 19.0	17 81.0	2 10.0	19 90.0	8 38.1	13 61.9

表 5 香港特別行政区政府衛生署における測定結果

Diagnosis	Specimen Type	Day-onset	n	RT-LAMP Turbidity		RT-LAMP Visual Fluorescence	
				Positive	Negative	Positive	Negative
Positive	serum	0	1	0	1	0	1
		1	4	0	4	0	4
		2	4	1	3	1	3
		3	8	1	7	1	7
		4	2	0	2	0	2
		5	6	1	5	1	5
		6	2	0	2	0	2
		7	9	5	4	1	2
		8	7	2	5		
		9	4	0	4		
		10	3	1	2		
		Total	50	11	39	4	26
Negative	serum		30	0	30		

表 6 総計

diagnosis	specimen type	institution	nationality	n	RT-LAMP turbidity		RT-LAMP visual fluorescence		RT-PCR	
					positive	negative	positive	negative	positive	negative
positive	serum/plasma	国立感染研	Mongolian							
		香港衛生署	Chinese							
		中文大学	Taiwan	50	11	39	4	26		
	nasal swab 他	中文大学	Chinese	14	8	6	8	6	8	6
	throat swab 他	中文大学	Chinese	16	7	9	5	11	15	1
	stool 他	中文大学	Chinese	79	64	15	61	18	67	12
小計				159	90	69	78	61	90	19
positive (不顕性)	serum	国立感染研	Vietnam	141	15	126	16	114	1	43
unknown (positive)	serum/plasma	中文大学	Chinese	31	5	26	2	29	9	22
合計				331	108	223	96	204	100	84
negative	serum	香港衛生署	Chinese	30	0	30	0	30		
	others	中文大学	Chinese	10	0	10	0	10	0	10
小計				40	0	40	0	40	0	10
unknown (negative)	plasma	中文大学	Chinese	10	0	10	0	10	0	10
合計				50	0	50	0	50	0	20

厚生労働科学研究費補助金 （新興再興感染症研究事業）
「SARS コロナウイルス検査法の精度向上及び迅速化に関する研究」

分担研究報告書

「LAMP 法による SARS 診断法の改良」

分担研究者 納富継宣 （栄研化学株式会社 生物化学研究所 副所長）

協力研究者 峰川晴美 神田秀俊 仙波晶平 幸保孝（同生物化学研究所第2部）

研究要旨 LAMP 法を用いた高感度なゲノム検出系の更なる簡便化、高感度化を目指し検討を行い、以下に示す結果が得られた。

(1)SARS 遺伝子の3つの領域にてそれぞれプライマー設計を行ったが、現在開発済みセット以上の成績は得られなかった。

(2) 延べ42種類の逆転写酵素についてスクリーニングを実施し、逆転写反応の阻害がみられたラクトフェリンとヘパリンの影響が小さな酵素を1種見いだした。本酵素を使用することで現在使用の酵素と感度も同等で阻害に強い系となりうることが示唆された。

(3) ゼオライトを利用した検体の濃縮を兼ねた新規ウイルスゲノム抽出法の検討を行い、全量反応に持ち込める新規な抽出方法を開発した。本法は遠心分離が必要なため、フィルター化を試みたが完成には至らなかった。

(4) LAMP 反応溶液に RNase inhibitor を添加しておくことで、唾液中の RNase の影響抑制に有効であることが判明した。また、RNase inhibitor を含む検体処理液にて咽頭スワブを懸濁した擬似検体を熱処理し、そのまま検体とする簡易な前処理での測定可能性が示唆された。

以上の検討により、LAMP 測定系の高感度化には結びつかなかったが、測定系の堅牢性が高まり、また前処理簡便化の可能性が示された。

A. 研究目的

LAMP 法による SARS-CoV 遺伝子検出法の改良を行い、測定感度向上、測定効率改善および操作性の改善を行うことを目的とする。これらの成果は、SARS が临床上疑われた場合、より迅速、正確に診断を可能にすることにより、患者の隔離、二次感染防止対策をより有効に行うことを可能にする。

B. 研究方法

1. LAMP 法に用いるプライマーの改良

現行開発済みの試薬のプライマーは SARS-CoV ゲノムの塩基配列番号 18000 近辺の領域に設定した。本研究では、感度向上を目的として、9,000 付近、14,000 付近及

び28,000付近を中心にプライマー設計し感度比較を行った。

2. LAMP 法に用いる逆転写酵素のスクリーニング

逆転写工程を改善するために、まず逆転写酵素を広くスクリーニングすることから研究を開始し、延べ42種類（メーカー違い含む）の酵素についてスクリーニングを実施した。

3.新規ウイルスRNA抽出方法の検討

現在、ウイルスの抽出には QIAGEN 社の RNA 抽出ミニキットを用いているが、抽出 RNA の10分の1しか増幅反応へ持込め

ない。もし、全量を反応に持ち込むことが可能になれば、検体の検出感度は1桁上昇することになる。そこで HCV_LAMP 系をモデル系として、検体の濃縮を兼ねた新規ウイルスゲノム抽出法の検討を行った。

4. RNase inhibitor の効果

RNA を特に高感度に検出する場合、微量の RNase の影響により検出感度が低下する恐れがある。そこで RNase の影響を抑制するために RT-LAMP 系に RNase inhibitor の添加が有効であるかどうか検討した。

5. 簡易前処理法の検討

インフルエンザ A 型ウイルスをモデル系として、咽頭ぬぐい液を簡便処理にてそのまま検体として、用いることの可能性を検討した。具体的には、抽出液組成の検討および温度処理条件を検討した。

C. 研究結果

1. LAMP 法に用いるプライマーの改良
SARS-CoV ゲノムの塩基配列番号 9000、14000、28000 近辺の領域でそれぞれプライマー設計を行い、増幅効率の良好なセットについて感度比較を行ったところ、いずれの領域でも増幅可能であったが現在開発済みセット以上の成績は得られなかった。

2. LAMP 法に用いる逆転写酵素のスクリーニング

現行酵素と同等の反応性を有するものを17種類見出し、感度比較を行ったが特に感度が向上するものはなかった。しかし逆転写反応の阻害がみられたラクトフェリンとヘパリンを用いて阻害の影響を検討したところ、阻害の影響が小さいものが1種みつかった。

3. 新規ウイルス RNA 抽出方法の検討

RNA ウイルスである HCV をモデルとして検討を行い、ゼオライトパウダーを核酸吸着担体とした、抽出 RNA を全量反応に持ち込める新規な抽出方法を開発した。現行法で採用していたカラムを用いた方法に比べ10倍以上の高感度化を達成した。本法は遠心分離が必要なため、さらなる簡便化をめざし、ゼオライトのフィルター化を試みたが完成には至らなかった。

4. RNase inhibitor の効果

RNase を含むものとしてヒトの唾液を反応溶液に添加すると反応阻害がみられるが、さらに RNase inhibitor を加えると反応が回復することが判明した。このように反応溶液に RNase inhibitor を添加しておくことは RNase の影響抑制に有効であることがわかった。

5. 簡易前処理法の検討

FluA-LAMP の系を用いて、咽頭スワブの生理食塩水懸濁液を非イオン性界面活性剤、RNase inhibitor を含む処理液と等量混合し、80℃、5 分間処理後、検体として用いたところ、25 μ l LAMP 反応液中にスワブ懸濁液として、4.5 μ l まで持ち込むことが可能であった。

D. 考察

1. LAMP 法に用いるプライマーの改良
残念ながら現行プライマーセットを超える感度を有するセットを見いだせなかった。プライマーの変更では検出感度向上は難しいものと思われる。

2. LAMP 法に用いる逆転写酵素のスクリーニング

RNA を鋳型とする LAMP 法では、初期反

応が逆転写反応であるため、本工程が全体の測定感度に大きく左右すると考えられる。今回の検討で、逆転写が持つ RNaseH 活性の有無が測定感度に大きく関与していることが示唆された。

逆転写反応の阻害物質であるヘパリン、ラクトフェリンの影響が少ない酵素が1つであるが見つかった。この酵素は2つの酵素のブレンド品であったが、ブレンドの効果なのか、他の添加物の効果なのかは判明していない。

3.新規ウイルスRNA抽出方法の検討

ゼオライトを用いた本法は現行法に比べ10倍以上の高感度化を達成したが、抽出時間は1時間以上を要すること、および洗浄のため複数回の遠心分離操作を必要とするなど煩雑である。迅速化および操作の簡便化をめざしフィルター化を試みたが完成には至っていない。実用化のためには今後更なる検討が必要である。

4. RNase inhibitor の効果

RNase inhibitor を添加することで、RNA を特に高感度に検出する場合に効果を発揮するものと期待できる。

5. 簡易前処理法の検討

咽頭スワブを懸濁した疑似検体を熱処理し、そのまま検体とする簡易な前処理での測定可能性が示唆された。FluA-LAMP の系の結果であるがスワブ自体の LAMP への影響自体は把握可能であった。ウイルス種による差はあると思われるが、SARS コロナウイルスでも同程度の処理で可能性はあると思われる。QIAGEN 社の RNA 抽出ミニキットでは溶出液の10分の1程度を増幅反応に用いるので、検体 100 μ l からでは 10 μ l 分の持ち込みとなる。今回の直接法による

4.5 μ l 持ち込みはやや少ないが簡便性を考慮すると十分検討に値する結果と思われる。

E. 結論

LAMP 法による SARS-CoV 遺伝子検出法の改良研究を行った。プライマーの改良による検出感度の向上は達成できなかったが、逆転写酵素のスクリーニングおよび RNase inhibitor 添加により、現系より阻害に強い堅牢な系とすることができた。また咽頭スワブ検体では加熱処理を伴う簡便な前処理での測定可能性を示すことができた。

F. 健康危険情報

なし

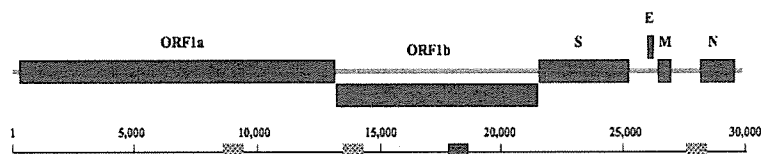
G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

1. プライマーの改良(別領域での設定)



現行プライマー:塩基配列番号 18,000付近

改良プライマー:塩基配列番号 9,000付近

14,000付近

28,000付近

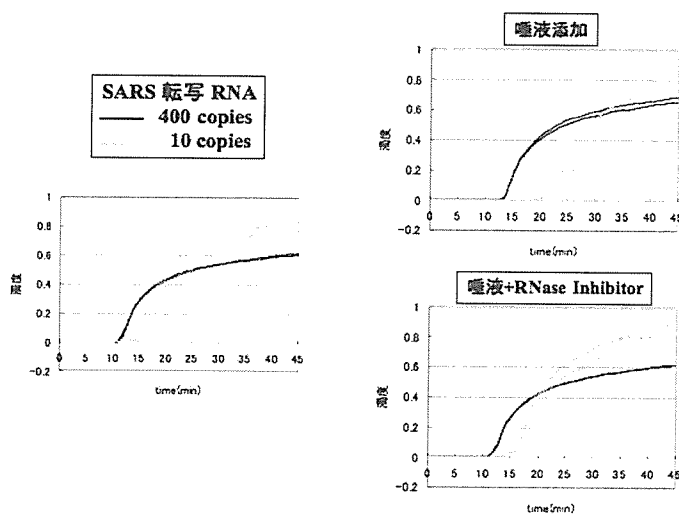
2.逆転写酵素の再スクリーニング結果

名称	メーカー	酵素の由来	RNaseH	反応温度	感度
AMV Reverse Transcriptase	FINNZYMES	AMV	+	41~45℃	◎
"	STRATAGENE	AMV	+	42℃	○
"	SIGMA	AMV	+	37℃	○
M-MLV Reverse Transcriptase	Invitrogen	AMV	+	37℃	○
Cloned AMV Reverse Transcriptase	Invitrogen	AMV	+	42~60℃	◎
StrataScript	Stratagene	M-MLV	-		○
PowerScript	clontech	M-MLV	-	42℃	△
ReverScriptIII	WAKO	M-MLV	-	37~42℃	○
SensiScript	QIAGEN	?	?	37℃	◎
OmniScript	QIAGEN	?	?	37℃	◎
Transcriptor	Roche	?	+	42~65℃	◎
ImProm II	Promega	?	?	37~42℃	◎
MultiScribe Reverse Transcriptase	ABI	M-MLV	?	42	○
Reverse iT RTase Blend	日本ジェネティクス	AMV+MMLV	+	42~57	◎
Reflectase Reverse Transcriptase	Active Motif	AMV	+	37~70	△
AMV Reverse Transcriptase	Qbiogene,Inc.	AMV	+	37	◎
BcaBest polymerase	タカラバイオ	Bacillus caldotenax	?	65	△
HIV Reverse Transcriptase, Recombinant/LS05003	Worthington Biochemical Co.	-	?	?	△
HIV REVERSE TRANSCRIPTASE, RECOMB.	Calbiochem-Novabiochem Co.	-	?	?	◎
Reverse Transcriptase, HIV	CHIMERx	-	?	?	△

3. 新規ウイルスRNA抽出方法の検討

HCV copy/100uL	ゼオライト抽出法		QIAamp viral RNA mini kit	
	Positive		Positive	
	Ct(min)±SD	n=4	Ct(min)±SD	n=4
20	19.38±3.34	2	N.D.	0
25	29.57±11.67	4	45.8	1
50	22.06±6.04	4	30.52±3.74	3
100	17.53±0.61	4	26.1	1
250	15.96±0.43	4	20.8	1
500	15.33±0.23	4	23.52±4.21	3
1000	14.77±0.19	4	20.34±1.46	4

4. RNase Inhibitorの効果

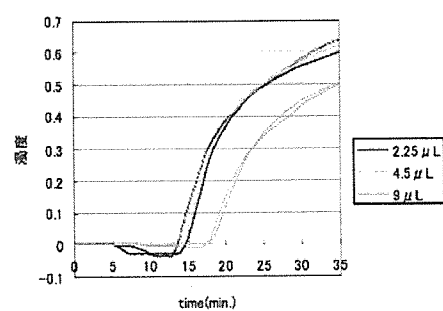


5. 簡易前処理法の検討

【簡易前処理法】

FluA 擬似検体
(培養ウイルス+正常人咽頭ぬぐい液)
前処理液
↓
80°C 5分間
↓
一部をLAMP反応

【検体持ち込み量】



厚生科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）
分担研究報告書

SARS 鑑別診断法の開発

分担研究者 北村義浩 東京大学医科学研究所先端医療研究センター感染症分野助教授

研究要旨

SARS との鑑別診断上最も重要な疾患の一つであるインフルエンザの診断のために従来 RT-LAMP 法による検出系を開発した。しかし、実際の臨床検体について適用可能かどうか不明であった。そこで冬季に発生した上気道炎症状を有する発熱成人患者の鼻咽頭ぬぐい液検体（310 検体）について RT-LAMP 法でインフルエンザウイルスの検出・診断を試みたところこの臨床サンプルを対象として、RT-LAMP 法によるインフルエンザウイルスの診断ができた。同じサンプルについて抗原検出法でも検出を試みたところ A 型インフルエンザについては、従来の抗原検出キットに比べて RT-LAMP 法の方が感度が高かった。したがって、RT-LAMP によるインフルエンザウイルスの検出・診断法は抗原量が不十分な病初期の診断に特に有用であると推測された。

A. 研究目的

感染症の確定診断には起因微生物の検出が欠かせない。特に SARS、インフルエンザのようなパンデミックを起こす可能性のある感染症のまん延の防止を図る上で、本研究が目指す「迅速」鑑別診断は「特異的」診断よりも意義がある。SARS と鑑別すべき急性呼吸器感染症の起因微生物の迅速診断技術を開発することを目的とする。迅速な診断が可能になれば有効な封じ込め（公衆衛生学的な対応）を執ることができる。

で検出した。昨年度までに SARS-CoV の鑑別診断対象として、インフルエンザウイルスの検出については極めて高い感度を達成できた。

【抗原検出】市販のキット（エスプライン、富士レビオ、または、ポクテム）を用いてインフルエンザウイルス（A 型）の抗原を検出した。

（倫理面での配慮）

弊所倫理委員会の許可を得ている。患者からはインフォームドコンセントを得ている。

B. 研究方法

【検体】冬季（2005 年 11 月から 2006 年 3 月まで）に発生した上気道炎症状（咽頭痛等）を有する発熱患者（成人（14-81 歳、平均 37 歳）、310 人の鼻咽頭ぬぐい液検体について起因ウイルスの検出を行った。対象としたのはインフルエンザウイルス（A 型）である。

【核酸増幅検出方法】検体から RNA を抽出し核酸増幅法の一つである RT-LAMP 法

C. 研究結果

昨年度、感度を測定するために、比較対象の基準として p24 (HIV-1 由来)の断片と標的微生物の標的領域を連結させたキメラ RNA を合成し感度比較用核酸とした（図 1）。この核酸の希釈系列を作製して検出されなくなる限界希釈度を求め感度の比較に使った（図 2）。A 型インフルエンザウイル

ス検出用プライマーセットで高感度のプライマーセットを見出した（図3）。これを用いて、臨床検体を対象に RT-LAMP 法をイムノクロマト法と比較したところ以下のような結果を得た。

G. 発表
該当無し

インフルエンザ A		Kit		total
		(+)	(-)	
RT-LAMP	(+)	93	95	188
	(-)	7	115	122
Total		100	210	310

D. 考察

臨床サンプルを対象として、インフルエンザウイルスの診断ができた。A型インフルエンザについては、従来の抗原検出キットに比べてRT-LAMP法の方が感度が高かった。病早期における試料中の不十分なウイルス量や、検体採取における手技的な問題を反映しているかもしれない。一方、抗原キットで陽性と出たサンプルのうち7サンプルがLAMP法では陰性と判定された。我々が用いたプライマーセットでは検出できないウイルスが存在する可能性を示唆しているかもしれない。今後詳細なウイルス学的な解析が必要である。

E. 結論

RT-LAMPによるインフルエンザウイルスの検出・診断は抗原量が不十分な病初期の診断に特に有用であると推測される。

F. 健康危険情報

該当なし

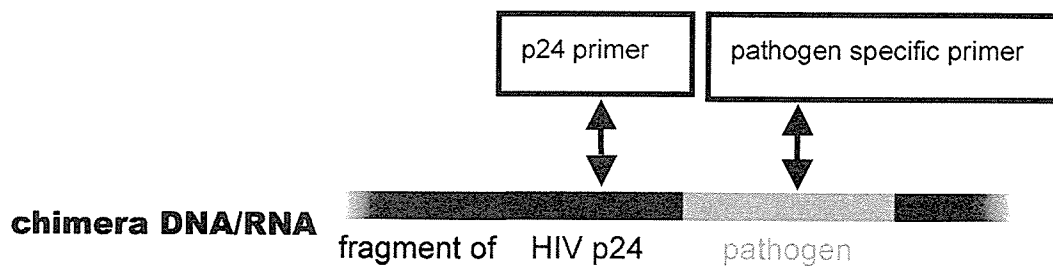


図1. HIV-1 p24遺伝子断片と標的微生物の標的領域を連結させたキメラ核酸
当該キメラ核酸をT7 RNAポリメラーゼを用いて*in vitro*合成し、感度比較用核酸とした。
これにより正確に2つのプライマーセットの感度比較ができる。

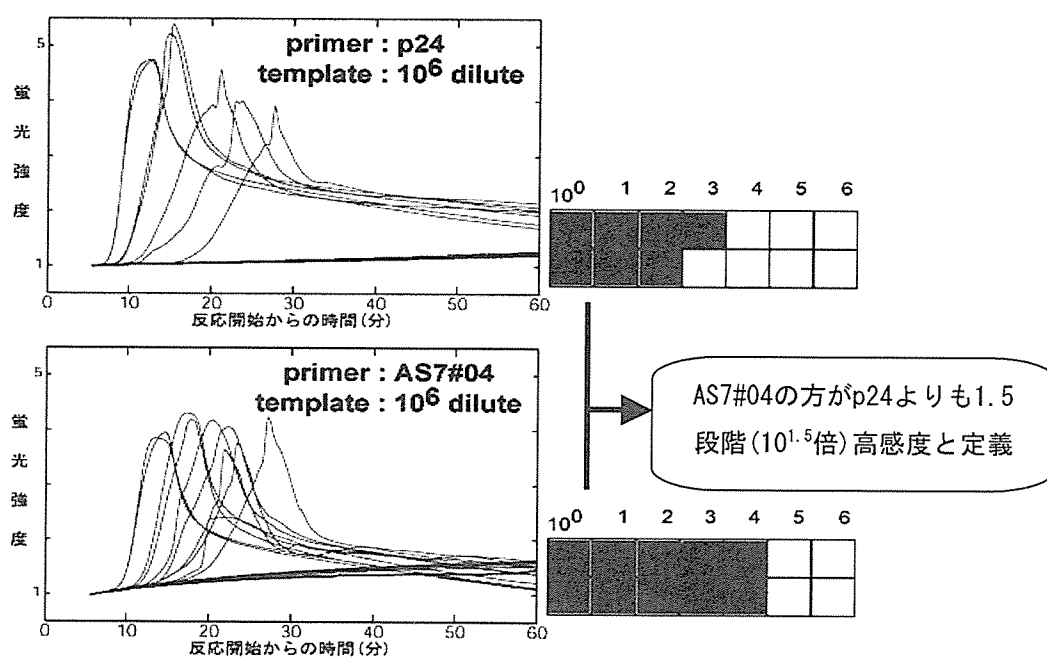


図2. LAMP法の感度比較法の例

鋳型に p24/Influenza キメラ RNA の 10 倍希釈系列を用いて HIV p24-LAMP と AS7#4-LAMP の検出感度を比較した。この場合、AS7#4-LAMP の感度が HIV p24-LAMP の 1.5 倍の感度とする。

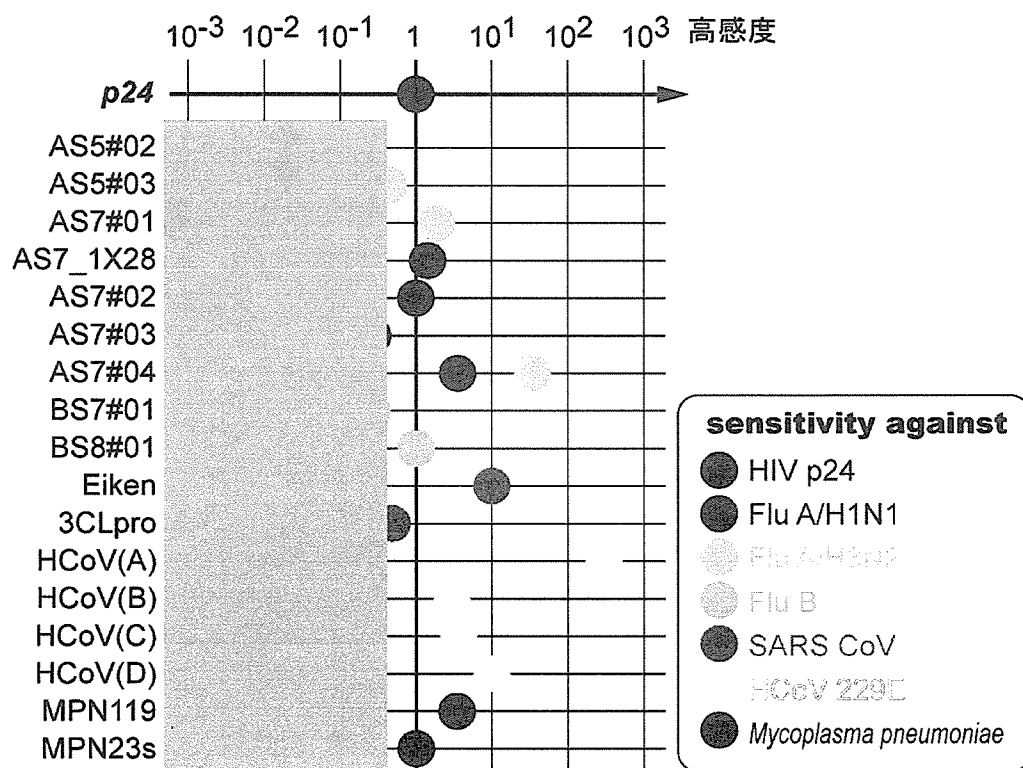


図3. LAMP法の感度比較

A型インフルエンザウイルス検出用プライマーセット7種の内、AS7#04が最も高感度であった。B型インフルエンザウイルス検出用プライマーセットでは、BS8#01の感度が高かった。

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）
分担研究報告書

SARS コロナウイルス検査法の精度向上及び迅速化に関する研究

分担研究課題：SARS-CoV 等の新興ウイルスを網羅的・迅速に検出する Rapid Determination of Viral RNA Sequence (RDV)法の確立

分担研究者：森川茂（国立感染症研究所ウイルス第1部第1室長）

協力研究者：水谷哲也、福士秀悦、西條政幸、倉根一郎（同、ウイルス第1部）

研究要旨：SARS 等の様に未知の新興ウイルス感染症発生時には、通常ウイルスの分離後種々の方法によりウイルス種を同定し、近縁ウイルスの遺伝子情報に基づいた primer を設計して PCR 法により遺伝子配列情報を得る。そのため、新興ウイルスの遺伝子情報を得るまでにかかなりの期間が必要となる。本研究では、血清や培養細胞上清中の RNA ウイルスの遺伝子の特異的な primer を用いずに、効率よく増幅して遺伝子配列を決定する Rapid Determination of Viral RNA Sequence (RDV)法を確立した。RDV 法は、ウイルス粒子外の核酸を nuclease 処理により除去し、特異的 primer を用いない whole genome amplification 技術を用いて遺伝子を均等に増幅し、さらにアダプターを付加した後に特殊な primer sets による PCR を行いにダイレクトシーケンスを行なうことに特長がある。本方法で、培養上清中のマウス肝炎ウイルスや SARS-CoV を効率よく検出することができ、新興ウイルスの網羅的検出方法として有用であることが示された。

A. 研究目的

重症急性呼吸器症候群（SARS）は、2003年に中国で発生後に世界中に広まり大流行した高熱と呼吸器症状を主徴とする新興ウイルス感染症である。近年、SARS 以外にも多くの RNA ウイルスによる新興ウイルス感染症が発生している。また、北米でのウエストナイル熱やトルコでのクリミア・コンゴ出血熱の大流行の様に、これまで発生の見られなかった地域に重篤なウイルス感染症が頻繁に発生している。これらの新興・再興感染症発生時に、迅速に病原ウイルスを同定し、遺伝子配列情報を得ることは、迅速な血清診断法を確立するためにも重要である。昨年までに、Representational

Difference Analysis(RDA)法を改良して未知の RNA ウイルスを検出するための方法を確立した。この方法は新興ウイルスの遺伝子を検出するために有用であると考えられるが、結果が出るまでに1週間ほど要する。また、増幅された遺伝子はプラスミドベクターにクローニングして遺伝子配列を決定する必要がある。このため、未知のウイルスによる重篤な新興ウイルス感染症の場合、遺伝子組換え実験が大臣確認実験となるため、迅速な対応が困難となる。

そこで、既存の全ゲノム均等増幅法の技術と特殊な primer sets を用いることにより二次PCR産物をシングルバンドとして得る技術を開発し、遺伝子組み換えを行なわず

に直接増幅産物の遺伝子配列情報を得る方法を開発し、SARS 等の新興ウイルス感染症発生時により迅速に病原ウイルス遺伝子情報を得られる体制を整備することを目的とした。

B. 方法

Rapid Determination of Viral RNA Sequence (RDV) 法を以下のように行なった。概略を図 1 に示す。

1. 検体の前処理：検体 10 μ L (1000 PFU 以上)を DNaseI, RNaseA で 37°C, 30 分間処理してウイルス粒子外の核酸を除去する。
2. RNA 抽出：Agilent Total RNA isolation mini kit (Agilent Technologies Inc., CA)のプロトコルに従い、RNA を抽出する (10 μ L)。
3. 逆転写反応：RNA 6 μ L を random primer、Superscript III で逆転写後、RNase H 処理する。
4. 一次ライブラリーの作製：Sigma Whole genome amplification (WGA) kit のプロトコルに従い、DNA を fragmentation して、リンカー付加後に universal primers による PCR で 70 サイクル増幅する。
5. 二次ライブラリーの作製：一次ライブラリー DNA を HaeIII で切断後、アダプターを付加し、特別にデザインした primers の組み合わせ 96 種類で PCR を 70 サイクル行ない、二次ライブラリーを作製する (図 2)。いくつかの primer set の組み合わせで PCR 産物がシングルバンドとして増幅されるため、それらをダイレクトシーケンスすることにより、

検体中に含まれるウイルスの遺伝子配列の部分情報を得る。

C. 結果

1. RDV 法の特長 (図 1)：

RDV 法は、1) 動物や人の血清・培養上清から細胞由来 DNA、RNA を除去した後、ウイルス RNA を抽出し、逆転写酵素と RNase H を用いて効率よく 2 本鎖の cDNA を作製する。2) WGA kit による全ゲノム均等増幅法によりウイルス遺伝子 cDNA の 1 次ライブラリーを作製する。3) Hae III 切断とリンカーライゲーション後に、特別にデザインした primers の組み合わせで 2 次ライブラリーを作製し、得られた PCR amplicons をダイレクトシーケンス法でウイルスゲノムの塩基配列を決定する方法である。この、二次ライブラリー作製時に用いる primer sets は理論的に全ての配列に対応できないが、リンカー付加時に一次ライブラリーの amplicon 同士がタンデムにライゲーションされることによりウイルス遺伝子断片を含むキメラ遺伝子として増幅されることが多いため、網羅的にウイルス遺伝子が増幅できる (図 2)。RDV 法は網羅的に RNA ウイルスのゲノムの cDNA を増幅するので、理論上あらゆる RNA ウイルスを検出でき、また、この操作は 2 日以内に完了するので、新興・再興ウイルス感染症発生時にウイルス遺伝子情報を得て原因ウイルスを迅速に同定する上で有用であると考えられる。特に、新興ウイルス感染症の原因ウイルスの遺伝子組み換えは、大臣確認実験対象となるため、実験承認を得るまでに時間を要する。この点でも、RDV 法は、遺

伝子組み換えを要さないで遺伝子配列を決定できるため、遺伝子組み換え申請が不要であることから、SARS の様な重篤な新興ウイルス感染症発生時の対応上極めて有用なウイルス同定法と考えられる。

2. コロナウイルスへの応用

SARS-CoV はコロナウイルス科に属するので、RDV 法が SARS-CoV に適用できるかを検討するために、コロナウイルスのプロトタイプであるマウス肝炎ウイルス(MHV)を用いて検討した。MHV 感染細胞の培養上清 (1×10^3 PFU 程度) を対象に RDV 法を行い、増幅された 10 amplicons の遺伝子配列を解析したところ 5 amplicons で MHV の塩基配列が得られた (図 3, 4)。

3. SARS-CoV への応用

SARS-CoV 感染 Vero E6 細胞の培養上清 (2×10^6 PFU 程度) を対象に RDV 法を行なった。5 amplicons の塩基配列を決定したところ、3 amplicons が SARS-CoV の配列であった (図 5)。

D. 考察

SARS の様にこれまで未知の新興ウイルス感染症発生時には、通常ウイルスの分離後種々の方法によりウイルス種を同定し、近縁ウイルスの遺伝子情報に基づいた primer を設計して PCR 法により遺伝子配列情報を得る。そのため、新興ウイルスの遺伝子情報を得るまでにかかなりの期間が必要となる。このようにして得られた遺伝子配列情報により RT-PCR や LAMP 法の primers が設定され、原因ウイルスの高感度検出法が開発されるため、迅速診断法の一つであるウイルス遺伝子検出法の確立までには相

当時間を要する。これまでに、ウイルス感染細胞 RNA から細胞由来 RNA をサブトラクトすることによりウイルス由来遺伝子を増幅する Representational difference analysis (RDA 法) を改良して、SARS-CoV にも有効であることを明らかにしたが、RDA 法では、遺伝子配列情報を得るまでに 1 週間程度要し、さらに遺伝子配列の決定には遺伝子組み換えが必要である。そこで、本研究では、血清や培養細胞上清中の RNA ウイルスの遺伝子の特異的な primer を用いずに、効率よく増幅して遺伝子配列を決定する Rapid Determination of Viral RNA Sequence (RDV) 法を確立した。RDV 法は、ウイルス粒子外の核酸を nuclease 処理により除去し、特異的 primer を用いない whole genome amplification 技術を用いて遺伝子を均等に増幅し、さらにアダプターを付加した後に特殊な primer sets による PCR を行いにダイレクトシーケンスを行なうことに特長がある。RDV 法で、培養上清中の MHV や SARS-CoV を効率よく検出することができ、新興ウイルスの網羅的検出方法として有用であることが示された。RDV 法は 2 日以内でウイルスの遺伝子断片の塩基配列が明らかになるので、新興ウイルス感染症の原因ウイルスの迅速な同定に有用であると考えられる。RDV 法により得られた遺伝子配列情報からウイルス特異的 primers を作製することにより、RT-PCR や LAMP 法による高感度ウイルス遺伝子検出法の確立がより迅速に可能となる。また、新興ウイルス感染症の原因ウイルスの遺伝子組み換えは、大臣確認実験対象となるため、実験承認を得るまでに時間を要する。この点でも、RDV