

# 生命・生物工学に基づく健康と疾患の研究グループ

## リアルタイム RT-LAMP 法を用いたインフルエンザウイルスの 遺伝子学的迅速診断の検討

日大生産工(PD) 根本 浩史、日大生産工 神野 英毅  
藍野大 牛島 廣治

本研究は、第一グループの生命・生物工学に基づく健康と疾患の研究グループの 1-5. 生命工学における臨床診断薬の研究開発の中で行われた研究である。臨床診断薬の開発において、ターゲットをウイルスにしぼり研究を行った。平成 17 年度は、イムノアッセイによるインフルエンザの検出、平成 18 年度は、*Baculovirus* タンパク発現系による *Astrovirus* capcid タンパクの作製、平成 19 年度は、リアルタイム PCR を用いた *Astrovirus* の検出、平成 20 年度は、マルチプレックスリアルタイム RT-PCR を用いたインフルエンザウイルスの検出を行ってきた。本研究は、さらに迅速に診断を行うため新たに LAMP 法を用いたインフルエンザの診断法の確立を行った。

### 1. 緒論

2009 年春にメキシコおよびアメリカにて確認されたブタ由来の新型インフルエンザウイルスは、交通機関の高度発達した現在において極めて短期間に世界的流行を示し、WHO が約 40 年ぶりにパンデミックを宣言する事態に至った。今後も本ウイルスの拡大が危惧されることから、その対策の一つとして迅速かつ高感度な検査診断が求められている。このような背景から、我々はより高感度なインフルエンザウイルスの検査を目的として、平成 20 年度にはマルチプレックスリアルタイム RT-PCR を検討し、遺伝子学的なインフルエンザウイルスの定量とウイルス型判別の同時測定を報告した。本法は従来の PCR 法と比較して高効率化な測定が可能であったが、その測定には 1 時間程度の測定時間と高度な光学的測定装置を必要とする。

一方、新規遺伝子増幅法である Loop-mediated Isothermal Amplification(LAMP)法は、等温で遺伝子増幅が行え、その測定は溶液濁度の変化から行える<sup>1)</sup>。また、6 領域を 4 本のプライマーで増幅する

ことから特異的かつ高感度な測定を特徴とする。さらに本法は簡易な恒温機能付濁度測定装置にて測定可能であり、POCT 用途としても期待できる。そこで本研究では、LAMP 法を原理とするインフルエンザウイルスの高感度かつ迅速的な遺伝子学的測定法を検討したので報告する。

### 2. 材料、実験方法

#### 2-1. 使用サンプル、検体およびプライマー

標準サンプルとしてインフルエンザ A H1N1 型 (Singapore/63/04)および H3N2 型 (A/Victoria/3/75)、B 型(Yamanashi/166/98)の核酸保持不活化ウイルス粒子(Zeptemrix, USA)を使用した。また、臨床検体として 2008 年冬から 2009 年秋にインフルエンザ様症状を示した患者から採取した鼻孔ぬぐい液 10 検体を用いた。各ウイルス型共通検出用プライマーおよびルーブプライマー(LP)は新型およびB型インフルエンザウイルスの NP および M 部位塩基配列をアライメント解析し、LAMP 法プライマー作製支援ソフト Primer Explorer ver.4 を用いて作製した(Table 1)。

#### 2-2. ウイルス RNA の抽出

各サンプル、検体からのインフルエンザウイルス RNA の抽出は、QIAamp Viral RNA Mini キット (Qiagen, USA)もしくは Magstration System 6GC 全自動遺伝子抽出器(プレジションシステムサイエンス)を使用して付属の説明書に従い抽出した。各抽出 RNA サンプルは使用直前まで氷温で保存し、一部は-80℃にて冷凍保存した。標準ウイルスサンプルより抽出した各インフルエンザ RNA は4 μg/ml MS2-RNA 溶解液 (Roche Diagnostics, USA)にて

Table 1 LAMP Primer for Influenza B virus

Primer	Sequence (5'-3')
FluB-M-FIP	GCGTTCCTAGTTTTACTTGCAT-TGATGAAAGCTCAGCGCTACT
FluB-M-BIP	TGCGAGAAACAAGCATCACAT-TCTGCATTCTCGTCTCACT
FluB-M-F3	ATTTGAAATAGCAGAAGGCC
FluB-M-B3	TGTCATAGCTGAGACCATC
FluB-M-LF	CCAGGATTCAGGTACATGACCATG
FluB-M-LB	ACACAGGGCTCATAGCAGAGCA

段階希釈して、標準 RNA サンプルとした。

### 2-3. リアルタイム RT-LAMP 測定

標準 RNA サンプルを  $10^2$  倍～ $10^5$  倍に希釈して内部標準として、各ウイルス型に対応した FIP, BIP, F3, B3 の 4 つのプライマーをそれぞれ用いて各サンプルの RT-LAMP を行った。また、LF, LB の 2 つの LP を追加し、反応の高効率化を検討した。測定は RNA Amplification Kit (栄研化学) を Table 2 に示す組成の反応液を調製し、Loopamp リアルタイム濁度測定装置 RT-160C (栄研化学)により逆転写反応を含めて  $63^{\circ}\text{C}$ 、波長 660 nm にて 10 秒毎の濁度変化を 1 時間測定した。

### 2-4. マルチプレックスリアルタイム RT-PCR 測定

採取した検体のインフルエンザウイルスのスクリーニング測定として、以前報告したマルチプレックスリアルタイム RT-PCR 法を行った。Table 3 のプライマーおよび TaqMan プロブを使用し、RNA-direct realtime PCR (TOYOBO)を用いて Table 4 に示す試薬を調整した。測定は LightCycler II リアルタイム PCR 測定装置 (Roche Diagnostics, USA)を使用し、Table 5 の条件にて PCR 反応を行い、530 nm と 560 nm の測定の解析を行った。

### 2-5. インフルエンザ A 型遺伝子の全領域増幅とそのシーケンス解析

インフルエンザ A 型ウイルスが測定されたサンプルは、Inoueらの報告した方法<sup>2)</sup>を参考に RT-PCR を行い、ウイルスの遺伝子全領域遺伝子を増幅した。さらにその増幅産物を精製して、CEQ8000 遺伝子シーケンス解析装置 (Beckman Coulter, USA)にて配列を解析し、BLAST 検索を行いウイルス亜型の確認を行った。

## 3. 結果

### 3-1. リアルタイム RT-LAMP の反応性

設計したプライマーを用いて LAMP 法を行った結果を Fig. 1 に示す。B 型に対応したプライマーと  $10^1$ ～ $10^4$  まで希釈したインフルエンザ B 型標準 RNA サンプルを使用した測定では 1 時間以内に全てのサンプルにおいて LAMP 反応による特異的な反応液の濁度上昇が確認できた。このとき、遺伝子濃度が濃いほど濁度上昇の起点時間 (CT)は短くなり、 $10^3$  希釈したサンプルのみ若干速く反応し乖離

したものの、およそ直線的な遺伝子希釈率対 CT の検量線を作製することができた (Fig. 2)。

### 3-2. LP による LAMP 反応の高効率化

前述したインフルエンザ B 型の測定にて、LF および LB から構成される LP を追加して LAMP 法を行った結果を Fig. 3 に示す。LP を使用することで CT が 20%程度短縮され、LAMP 反応の高効率化が確認できた。

### 3-3. マルチプレックスリアルタイム RT-PCR 法による臨床検体のスクリーニング測定

インフルエンザ A 型の蛍光反応を 560 nm、B 型を 530 nm の波長で測定した結果を Fig. 4 に示す。測定開始より 50～70 分間に 560 nm のチャンネルにて 4 つの検体が蛍光反応を示し、インフルエンザ A 型陽性と確認された。

### 3-4. リアルタイム RT-LAMP 法による新型インフルエンザの測定

前項で測定したサンプルを新型インフルエンザ検出用 LAMP プライマーおよび LP を用いた LAMP 法にて測定した結果を Fig. 5 に示す。

スクリーニング測定でインフルエンザ A 型陽性が確

Table 2 Composition of reaction reagent with LAMP

Reagent	Volume ( $\mu\text{l}$ / reaction)
RNase Free $\text{H}_2\text{O}$	3.56
2 $\times$ Reaction Mix.	10.0
Primer Mix.	1.44
Enzyme Mix.	1.0
Distilled Water	3.56
RNA Sample	4.0
Total	20.0

Table 3 Primers for Multiplex real-time RT-PCR

Type, gene	Name	Sequence (5'-3')
A, M	FLA-M-F151	CATGGARTGGCTAAAGACAAGACC
	FLA-M-P218	HEX-ACGCTCACCGTGCCAGT-BHQ1
	FLA-M-R276	AGGGCATTGACAAAKCGTCTA
B, M	FLB-M-F439	CTCTGTGCTTTRTGCGARAAAC
	FluB-P135	FAM-TCAGCTATGAACACAGCAA-BHQ1
	FLB-MR	CCTTCYCCATCTTTTGACTTGC

Table 4 Composition of reaction reagent with Multiplex real-time RT-PCR

Reagent	Volume ( $\mu\text{l}$ / reaction)
RNase Free $\text{H}_2\text{O}$	4.5
Realtime PCR Master Mix	10
50mM $\text{Mn}(\text{OAc})_2$	1.0
Each Primer (10pmol/ $\mu\text{l}$ )	0.5/each
Each Probe (10pmol/ $\mu\text{l}$ )	0.25/each
RNA Sample	2.0
Total	20.0

認された4つの検体のうち、A検体のみが反応開始から20分程度で濁度上昇を示し、新型インフルエンザ陽性と判定された。

### 3-5. インフルエンザ A 型ウイルス遺伝子の全領域

#### 増幅による新型インフルエンザの確定

新型インフルエンザと判定された検体のウイルス遺伝子を全増幅した結果を Fig. 6 に示す。2.3 kb 以下 8 本の増幅バンドが確認され、これは先の報告例と良く一致した。そこで、約 1.8 kb 付近に出現した HA 部位と考えられるバンドより遺伝子を抽出・精製し、シーケンス解析を行った。その結果、A 検体は A/Texas/44312415/2009 (H1N1)ウイルスの HA とおおよそ一致し、この検体を新型インフルエンザウイルスと確定した。

## 4. 考察

新型インフルエンザ発生後、その水際対策として空港・検疫等にて迅速診断が実施された。しかし、感染間もない患者からは検出されるウイルス量が少ないため、現行のイムノクロマト法のみでは対応できない場面もあった。また、その感度、特異性を補うためにも、別途に遺伝子学的なウイルス確定検査を行う必要があったが、現行法ではその測定時間やコスト等の問題から採取全検体の測定には至らなかった。そして我々は、以前よりインフルエンザパンデミック期のこのような状況を予測し、免疫・遺伝子学的手法による迅速、高感度かつハイスループット測定が可能な診断法を検討・提案してきた。

このような背景を元に検討を行った遺伝子学的測定法の1種である RT-LAMP 法は、RT-PCR 法と同様にごく少量の遺伝子を酵素により増幅して検出する手法である。本法は 4 本ないし 6 本のプライマーと鎖置換型 DNA ポリメラーゼおよび逆転写酵素を使用し、逆転写反応を含めて 60~65°C 程度の等温で反応が進行する。そして遺伝子の対数的増幅期には大量の dNTP が消費され、遊離したピロリン酸が反応液中のマグネシウムと結合し、溶液濁度の上昇が起こる。最終的にその反応液は目視でも判別できるほど白濁するが、この過程を経時的に吸光度測定することで定量 PCR と同じように遺伝子定量を行うことができる。すなわち、本法は消費電力が少ない小型かつ簡易な測定装置にて運用可能であり、POC 用途の遺伝子定量法として有効と考えられる。

Table 5 Condition of Multiplex real-time RT-PCR

Condition		Acquisition
Stage 1 Reverse transcription		
90°C	30 sec	
91°C	20 sec	
95°C	30 sec	
Stage 2 PCR/60 cycles		
95°C	0 sec	None
60°C	45 sec	Single

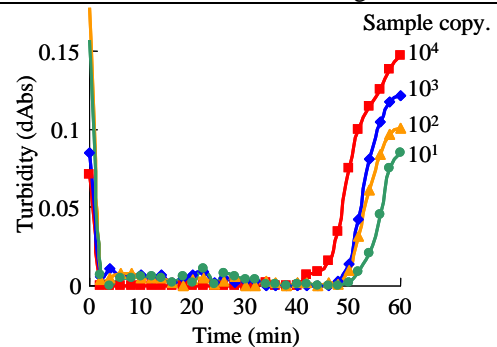


Fig. 1 Real-time kinetics of LAMP reaction for 10 fold serial dilution of influenza B virus samples

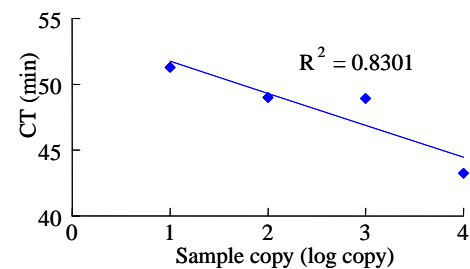


Fig. 2 A calibration curve of CT vs sample copy for real-time RT-LAMP.

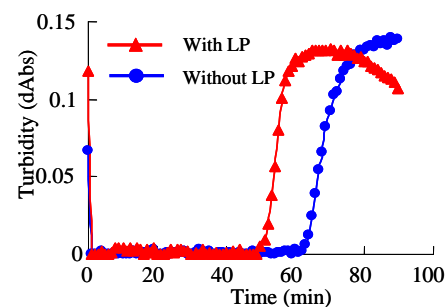


Fig. 3 Result of improvement on amplification efficiency for LAMP reaction using loop-primers (LP).

インフルエンザ B 型標準サンプルを用いた LAMP 測定では、リアルタイム PCR 法と同じように、遺伝子量に応じて CT は変化し、直線的な検量線を作製することができた (Fig. 1)。しかし、その相関性はリアルタイム PCR 法と比較してあまり高くはなかった (Fig. 2)。これは、増幅温度サイクルごとに遺伝子増幅量の上限がある PCR 反応と比較して、LAMP 反

応は全ステージに渡り酵素反応論的に増幅し、遺伝子濃度などの反応初期における僅かな差異が反応全体に大きく影響を及ぼすためと考えられる。また、増幅した遺伝子は反応液濁度上昇により間接的に検出していることも挙げられる。そのため、本法にて定量測定を行うときにはプライマー濃度などの反応系のトレーサビリティ、特に測定対象における明確な基準が必要であり、予め遺伝子コピー数が判明しているサンプルを内部標準として使用した絶対定量法を行うことが望ましい。一方、その反応は迅速であり、 $10^4$  希釈した遺伝子サンプルであっても1時間以内に検出できた (Fig. 1)。しかも、LPを併用することでさらに反応時間の短縮が確認できた (Fig. 3)。これは LAMP 増幅産物に配列特異的な LP が結合することで遺伝子増幅反応基点が増えるためであり、その仕組み上、反応特異性を犠牲にせず反応効率の上昇が期待できる。このことは、同じ臨床検体をマルチプレックスリアルタイム RT-PCR 法と LAMP 法にて測定した結果を比較しても明確であり、LAMP 法では 30 分以内に反応の立ち上がりを確認でき、迅速な測定が行えた。

本研究では LAMP 法による新型インフルエンザの検出を検討した。LAMP 法で使用するプライマーは測定対象中の 1~数塩基の変異も識別する高い特異性を示すが、その設計条件を変更することで複数の変異が含まれる塩基配列に対しても、安定的に反応性を持たせることができる。そのため、インフルエンザのような遺伝子変異が起こりやすいウイルスであっても、複数の亜型に特異的かつ多少変異が含まれても安定して反応するプライマーを設計することができる。本検討で作製したプライマーは NP 部位を対象としており、季節性のインフルエンザ A H1N1 型には反応しないが、新型インフルエンザであるブタ由来の H1N1 に対して安定的に反応すると考えられ、実際に採取時期が異なる検体を測定しても反応性が確認できた。

## 5. 結論

迅速かつ高感度なインフルエンザの測定を行うために、リアルタイム RT-LAMP 法による遺伝子学的測定を検討した。本法は逆転写反応から遺伝子増幅までを等温・ワンステップで行えて、その反応行程は濁度変化より経時的に測定することができた。

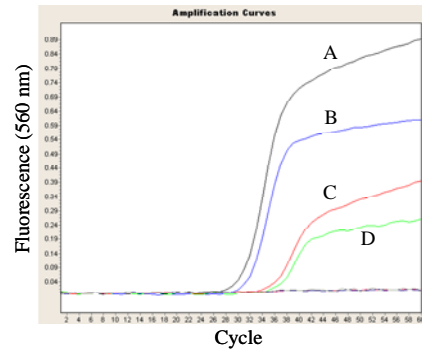


Fig. 4 Amplification curves of influenza virus type A from clinical specimens by multiplex real-time RT-PCR.

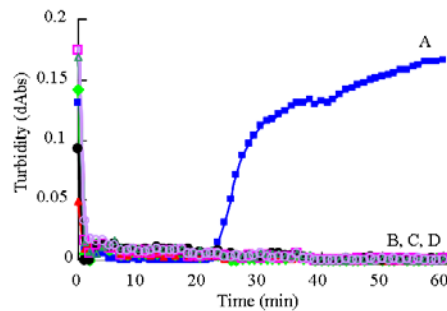


Fig. 5 Real-time kinetics for measurement of novel influenza virus by real time RT-LAMP.

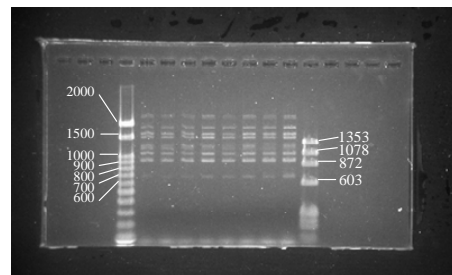


Fig. 6 Full length amplification of all eight segments of influenza virus type A from clinical specimens by RT-PCR.

また、新型インフルエンザウイルスの測定では迅速的な反応性を示し、従来型と新型を明確に判別することが可能であった。本法はその特徴から、POC用途の遺伝子定量法として運用可能であり、今後拡大が予測される新型インフルエンザにおける多角的な対策の一つになると期待できる。

## 参考文献

- 1) Tsugunori Notomi *et al.*, Loop-mediated isothermal amplification of DNA, *Nucleic Acids Res.*, 28, E63 (2000)
- 2) Emi Inoue *et al.*, Full genomic amplification and subtyping of influenza A virus, *Microbiol Immunol.*, in press.