

令和元年9月5日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08947

研究課題名（和文）LAMP法によるヘルペスウイルス感染症のpoint of care test開発

研究課題名（英文）The point of care testing of herpesvirus infection by LAMP method

研究代表者

井平 勝（Ihira, Masaru）

藤田医科大学・保健学研究科・教授

研究者番号：10290165

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：LAMP法の高感度検出法構築のためRecombinaseとLAMP法の融合による解決（R-LAMP）を着想した。これによるHHV-6 DNAの検出下限は、10コピー/反応であった。ポリメラーゼスパイラル反応（PSR）によるVZV DNA検出では、LAMPよりも高感度な方法を構築出来たが、No template control (NTC)の濁度上昇が確認された。このために、E probeを使用したが、NTCの蛍光強度の増加があった。しかし、NTC増幅とPSRによるVZV増幅は、融解温度分析により識別可能であった。本研究では、LAMP法の感度の改善を行う手法、あらたな等温増幅法を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サンプルから病原体遺伝子を検出することにより迅速診断することは重要である。近年、本邦で発明された迅速に病原遺伝子増幅するLAMP方法がよく使われるようになった。LAMP法は優れた遺伝子増幅法であるが、感度に優れた検出法を構築するのは経験と時間を要する。これらの問題に対し本研究は、感度に優れたLAMP法を簡易に構築することを目的に他の遺伝子増幅法（RPA法）との組み合わせ、または近年報告されたLAMPとは異なる等温増幅方法（PSR法）による検出法を検討した。これらによって簡易に高感度検出法が構築出来れば、遺伝子診断によるPOCTとして臨床でより広く利用できるの可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The LAMP method which need six primers has problem to difficult select of primer for sensitive detection methods. In order to solve this problem, we proposed combining recombinase polymerase amplification (RPA) and the LAMP. Lower detection limits of this method (R-LAMP) to detect HHV-6 DNA were 10 copies/ reaction. Next, polymerase spiral reaction (PSR) have been developed to detect VZV DNA. The VZV PSR method could detect 10 copies / reaction of VZV DNA and more sensitive than LAMP. However, turbidity of no template control (NTC) increases by primer dimer. To discriminate between increase of turbidity by primer dimer and DNA amplification, Eprobe was used in PSR. The detection limit of PSR with Eprobe was 10 copies / reaction. However, an increase in the fluorescence intensity of NTC was confirmed by amplification of VZV DNA using PSR with Eprobe. Melting temperature analysis indicated that there was a clear difference in peak fluorescence temperature between NTC and PSR products.

研究分野：臨床ウイルス学

キーワード：LAMP PSR Eprobe HHV-6 VZV

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、我が国で開発された等温核酸増幅技術である **loop-mediated isothermal amplification (LAMP)** 法を用い、ヒトヘルペスウイルス感染症迅速診断法開発を行ってきた。しかし、いまだ解決に至っていない問題も存在する。一つは、我々が構築した **LAMP** 法においてもみられた不十分な標的遺伝子増幅感度である。**LAMP** 法では、最大 **6** つの **primer** を使用することから至適 **primer** や反応条件設定が困難になる。感度上昇のための熱変性法は、**96** による **2** 本鎖 **DNA** から **1** 本鎖への変性により **primer** のアニールが促進されるが、**LAMP** 反応で利用される **Bst DNA polymerase** が非耐熱性であることから、**80** 以上の熱変性を使えない。したがって **LAMP** 法では、サンプルを加熱、**1** 本鎖への変性を行ってから **LAMP** 反応を行い検出感度の上昇に期待する。二つ目は、**LAMP** 法による定量法の開発である。定量 **LAMP** 法についてはいくつか報告があるが **DNA** 増幅スピードが **PCR** 法と比較すると早いことから定量法反応条件設定は困難となることが多い

2. 研究の目的

前述の **LAMP** 法における二つの問題点を解決することを目標とする。一つ目の感度上昇に関して本研究では、他の等温増幅法で **DNA** 変性のために使われている **recombinase** を応用することで感度に優れた **LAMP** 法を簡易に構築することを検討する。二つ目は、**LAMP** 法による遺伝子の定量的法の開発である。近年、等温増幅法にも利用可能な **probe** として報告された **Eprobe** を用いて、**LAMP** 法による簡便な遺伝子定量法を開発する。本研究では現在の **LAMP** 法が抱える未解決の二大問題を解決し、ヘルペスウイルス感染症に最適な **point of care test (PCT)** としての臨床応用を目指すことにした。

3. 研究の方法

Recombinase polymerase amplification (RPA) では、リコンビナーゼが協調的に **primer** と結合、リコンビナーゼ-**primer** が標的 **DNA** をスキャンする様、相同性配列を探し、アニール、**DNA** 増幅が開始される。この時、**single-stranded DNA binding protein : SSB** は、**primer** のアニールにより一本鎖となった **DNA** 鎖を安定させる。**RPA** では、熱による融解なしに **DNA** 増幅を可能にしている。本研究では、**LAMP** 法の感度上昇のためにこれを利用することにした。

(1) LAMP 反応と RPA 反応の組み合わせ (R-LAMP 法)

X5 LAMP buffer (250mM Tris-HCL、50mM KCL、50mM (NH₄)₂SO₄、40mM MgSO₄、4M betaine、0.2% tween20)、1.4mM dNTPs、HHV-6 primer mix(Ihira et al.2004 JID)、8U Bst polymerase (BioLabs)、75ng リコンビナーゼ(RecA: BioLabs)、3mM ATP (BioLabs)、300ngSSB (T4 gene 32 protein: BioLabs)にサンプル 5 μl を混合し全量を 25 μL とした。サンプルの熱変性は行わなかった。増幅装置は、LA200 (Teramecs 社)を用い反応温度、時間は 63 で 60 分とした。濁度が、0.1 以上に達したものを陽性とした。また、0.1 達するまでの時間(Threshold time : Tt)を測定した。

対象と方法

対象として HHV-6LAMP 法を対象にした。LAMP 増幅領域をサブクロニング、コピー数を決定したプラスミドを段階希釈して検出感度決定に用いた。最初に R-LAMP 法の至適条件を決定するために ReaA 100ng、ATP 3mM に固定、SSB を 0ng、200ng、500ng、600ng、700ng、1000ng に可変した。SSB 至適濃度を決定した後、RecA の濃度を 80ng、100ng、200ng に可変して RecA の至適濃度を決定した。LAMP の buffer、prime、dNTPs、Bst polymerase 濃度は既に報告した従来の LAMP 反応と同じ、反応温度は 63 とした。

結果

結果を以下に示す(表1)。SSB が反応あたり 500ng と 600ng で検出感度はいずれも 10 コピー/反応であった。1000ng では LAMP 反応による増幅は確認できなかった。表2 に至適 SSB 濃度を 600ng と固定して Rec A を可変 (80-200ng) した R-LAMP 法の感度を示す。Rec A を 80ng とした時は、10 コピー/反応、100ng と 200ng では 100 コピー/反応であった。図1 に R-LAMP 法における HHV-6 plasmid と Tt の関連を示す。10⁴ から 10 コピー/反応の間において良好な直線関係を認めた。相関係数(R²)は、SSB500ng で、0.99、SSB600ng は、0.97。

表1 R-LAMP の至適条件設定 : SSB

ATP	3mM					
	75ng					
Rec A	75ng					
SSB (ng)	0	200	500	600	700	1000
HHV-6*						
10 ⁴	+	+	+	+	+	-
10 ³	+	+	+	+	+	-
10 ²	+	-	+	+	-	-
10	-	+	+	+	-	-
1	-	-	-	-	-	-

表2 R-LAMP の至適条件設定 : Rec A

ATP	3mM			
	Rec A	80	100	200
SSB (ng)	600			
HHV-6				
10 ⁴	+	+	+	+
10 ³	+	+	+	+
10 ²	+	+	+	+
10	+	-	-	-
1	-	-	-	-

小括 1

本研究では、熱変性の代わりに感度上昇を試みるため、リコンビナーゼ(Rec A)とSSB(T4 gene 32 protein)についてR-LAMP法における至適条件を決定した。至適条件下においてプラスミド濃度とTtの間には良好な直線関係がありR-LAMP法における定量の可能性が示された。我々の検討によると熱変性を併用した時のHHV-6LAMP法の感度は10コピー/反応(Ihira et al.2004 JID)であり今回のR-LAMP法と比較すると差は認められなかった。一方、R-LAMP法では、単純に熱を加える方法と異なりリコンビナーゼ、ATP、SSBなどが必要となり経済的コストも多くなることが欠点である。

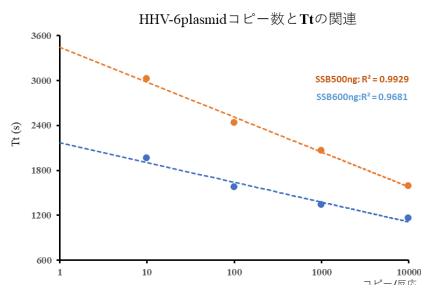


表1 R-LAMPの至適条件設定：SSB

(2)ポリメラーゼスパイラルリアクション (PSR)

LAMP法は、簡易な方法であるがさらなる簡便化のためには熱変性工程以外の感度上昇手法を検討する必要があった。そこで、近年報告された他の等温核酸増幅法について検討することを計画した。本法は、polymerase sprial reaction (PSA)法と呼ばれ primerの5末端領域がそれぞれ一重のループ構造をとるように設計されており最終的に増幅産物は、自身の5末端と3末端が相補配列となりループを形成する。DNA伸長は、自己を鋳型としながらDNA増幅が行われる。DNA伸長により5末端側は、糸がほどけるように一本鎖となって伸びてゆく。まず既に報告されているPSR法に関する報告を参考に primerを設計した。

PSR法によるVZV(水泡帯状疱疹ウイルス)-DNA迅速診断法の構築

我々の設計したVZV-LAMPは、皮膚ぬぐい液を対象とした水痘、帯状疱疹の迅速診断には有用であったが中枢神経疾患を対象とした髄液から抽出したDNAを用いた比較検討によって十分な感度を得られておらず(kimura et. al)感度改善の必要性があった。今回、VZVの核酸増幅を目的として、PSR法の primerを設計、至適温度、Mg濃度などの至適条件を決定した。同じ等温増幅法のPSR反応における影響を確認するためトレハロースの至適濃度を検討した。

方法

VZV-PSR法の詳細は以下のとおりである。X1 Thermopol buffer (20 mM Tris-HCl、10 mM (NH₄)₂SO₄、10 mM KCl、2 mM MgSO₄、0.1% Triton® X-100、0.8M betaine)、1.4mM dNTPs、VZV-PSR primer mix、8U Bst polymerase にサンプル5μlを混合し全量を25μlとした。サンプルとして、LAMP法にてVZV DNA陽性が確認された帯状疱疹患者病変部ぬぐい液で、検体を10²~10⁴倍希釈して用いた。サンプルは96 1分で熱変性したサンプルを用いた。同一サンプルを用いてMg濃度(4mM、6mM、8mM、10mM)、トレハロース(0mM、80mM、100mM、120mM、200mM)の至適濃度について、濁度が0.1に達する時間を基準に決定した。増幅装置は、(1)と同様、反応温度、時間は65、80分で行った。Mg濃度、トレハロース濃度の決定後、VZV-PSRの標的領域をサブクロニングしてコピー数を決定した。このプラスミドを段階希釈し、熱変性を加えてから5μlをサンプルとし最適条件下での3日連続してVZV-PSR法を行い再現性の確認を行った。

結果

Mg濃度が4mMの時はいずれの希釈倍率においてもDNA増幅が確認できなかった。最も増幅時間が短かったのは8mM(10²:1302秒、10³:1578秒、10⁴:1839秒)であった。トレハロースを0-200mM濃度に可変してもTt値に影響なかった(図6)。続いてコピー数が決定したVZV標的領域を含むプラスミドによるVZV-PSR法の検出感度を測定したところ10⁴-10コピーまでに濁度の上昇が確認され、プラスミドコピー数とTt値の間には優れた直線性が確認できた(図7)。3日間の再現性の指標となる各プラスミドのCV値1.8-5.7%であった。NTC(no template control)にも61±4.9分で濁度上昇が確認された。図5にPSR反応においてMg濃度を可変した時のTt値を示した。

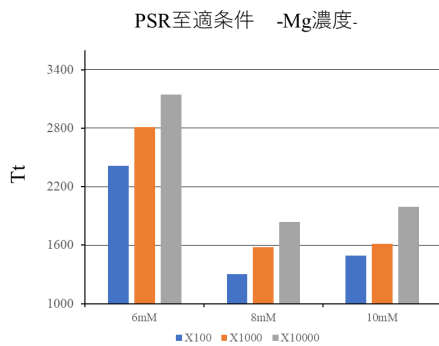


図5 PSR 至適条件の検討 Mg 濃度

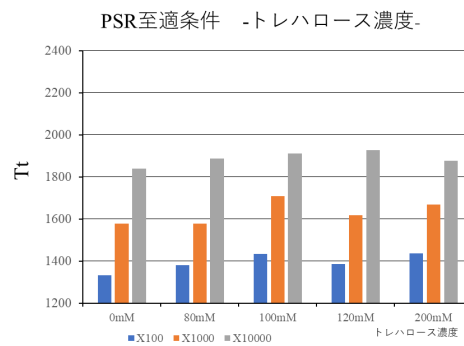


図5 PSR 至適条件の検討 トレハロース濃度

小括2

PSR 法では、最小2組の primer のみで増幅可能であり LAMP 法における増幅促進の loop primer にあたる IB,IF を加えても4つである。PSR の至適条件について検討し反応速度からみて Mg、トレハロースなどの至適条件を決定することができた。結果として検出感度は10 コピー/反応と VZV-LAMP 法に比較して高い感度を得ることができた。しかし、定量性評価では、 10^4 - 10 コピー/反応に関して良好な直線関係が得られているもの再現性が CV 5% を超えており安定した定量評価法としては問題が残った。さらに LAMP 法では生じなかった NTC の濁度上昇がみられるのも問題であった。この NTC 産物を電気泳動すると VZV 増幅産物とは明らかに異なったパターンを示し primer ダイマーであることを確認した(図なし)。

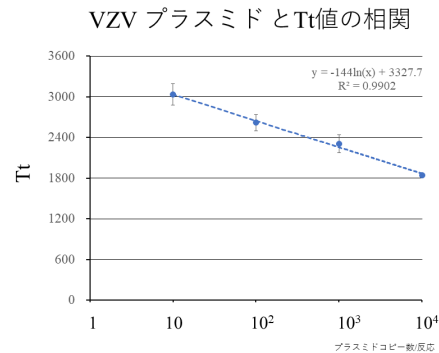


図7 VZV プラスミドと Tt の相関

(3)PSR 法に Eprobe を組み合わせた VZV DNA 定量法

VZV-PSR 法は、VZV-LAMP 法に比較して感度に優れていたが日差再現性や primer dimer の問題が明らかとなった。この解決のため濁度による判定ではなく、probe による識別を試みることにした。2013 年 Hanami らによって発表された新しい蛍光プローブである Eprobe は、配列中異なるチミン塩基に蛍光色素を2つ持ち蛍光色素は、1本鎖の状態では、ふたつの色素による励起子相互作用が働いて蛍光発光が抑制され、標的領域に Eprobe がアニールするとこれが解除され発光する。この発光と消失を測定することで、増幅された鋳型 DNA の定量や遺伝子の変異検出を行うことが可能となる。

方法

Eprobe と VZV-PSR 法による VZV-DNA 定量法は(2)で決定した至適条件、温度、測定時間、primer を使用し、反応全量 25 μ l に Eprobe 0.42 μ M 加えた。VZV-PSR 増幅領域の IB、IF に挟まれた領域に Eprobe 設計支援ツール(<http://dnaform.com/edesign2/>)によって 12nt 塩基を Eprobe 配列(TCCGGTTCGCGCC)として決定した。蛍光強度のリアルタイム測定には Stepone (ABI) を用いた。増幅後には、熱解離曲線を計測した。

結果

図7A)に示すように Cycle threshold (Ct)が増加してゆくごとに蛍光強度の上昇が確認され、プラスミド濃度の高いサンプルほど早く蛍光強度の上昇が確認できた。1 コピー/反応の蛍光強度は、上昇しなかった。NTC の蛍光強度は、Ct 値が 45 前後に閾値(0.02)に達した。B)では、Ct と VZV-PSR 増幅産物には直線関係がみられておりスタンダード曲線を作ることができた。ダイナミックレンジは、 10^6 から 10 コピー/反応にわたって確認された。

図7C)には、VZV-PSR 増幅産物の熱解離曲線を示す。図8C)に示すように1 コピー/反応では、その蛍光強度は増えていないことは確認できた。 10^6 から 10 コピー/反応についてその蛍光強度のピークは、61.5 でありプラスミドの量にかかわらず一致していた。NTC では、蛍光強度のピークでは、そのピークは 88.4 と他の増幅産物値は大きくかけ離れていた。

小括 3

VZV-PSR 法と Eprobe による定量法の検出感度は、10 コピー/反応と考えられ同時に優れたダイナミックレンジが確認された(図 8B)。一方で濁度測定と同じように Eprobe においても非特異反応が確認された(図 8A)。LAMP のような等温増幅法における定量法としては、(1) や (2) で検討した濁度のほか SYBR などのインターカレターが利用されている。これは、非特異反応がある場合、両者を識別困難である。Eprobe は、ターゲットの DNA 配列と結合し 2 本鎖を形成すると、2 つの色素が分かれて DNA の 2 本鎖構造に入り込み、色素間の励起子相互作用が解除され蛍光を発するため等温増幅法でも利用可能となる。

(2) で確認された濁度の上昇は、NTC の電気泳動パターンから primer ダイマーであることが確認されたため probe による識別を行ったが、Eprobe によっても NTC の蛍光強度上昇が確認された。この原因を探るため、PSR primer の配列について oligoanalyzer (<https://sg.idtdna.com/calc/analyzer>)を用いて解析しところ Ft PSRNo1 と BtPSENo1 のアニールによって生じる産物中に Eprobe の 12 塩基中 8 塩基、6 塩基のアニールする可能性がある配列が生じる可能性があった。Eprobe による非特異反応は、熱解離曲線による蛍光強度のピークが明らかに異なることから区別可能であることを図 8C) に示した。

4. 研究成果

PCR に基づく迅速検出法と比較して等温増幅法による標的遺伝子の検出は簡易迅速な検出法を構築できる。その中でも LAMP 法は、簡易遺伝子増幅法として広く利用されるようになってきたが、primer 設計は複雑でその設計ソフトも準備されているものの高感度検出系の構築には経験と時間を要する。そこで本研究では、他の等温増幅法と組み合わせることで簡易に感度上昇する方法を構築することを目的とした。LAMP 法と RPA 法を組み合わせても (R-LAMP 法) 標的遺伝子が増幅することを証明し、至適条件を設定によって熱変性とほぼ同等な検出感度を構築することができた。しかし、熱変性と同じ感度であれば、熱を加えるだけの手間と比較すると RPA 試薬コスト、複雑化する検査工程と問題は残った。R-LAMP 法による増幅は、濁度を指標とした場合も定量性評価においても良好な直線性を確認できた。今後、臨床検体による real-time PCR 法との比較は今後必要となる。

PSR は、自身をループ状に結びこれを構造基本単位として自己を鋳型として増幅する。PSR による VZV DNA の検出については、VZV-LAMP 法と比較してより高感度な検出系を構築でき PSR 単独の検出系として使用できると考える。トレハロースは、核酸や polymerase を保護、反応阻害物質を吸着するとされている。今後、DNA 抽出を行わずサンプルから直接検出を行うようことを検討予定であるが、この場合ではトレハロースについても再度検討することは必要かもしれない。PSR 法では、定量法としての再現性については CV 値が 5 % を超えており定量法として問題が残った。この解決のため PSR 法による増幅産物検出に Eprobe を用いた。Eprobe による VZV DNA 検出は 45 分以内に増幅が終了しており高感度、迅速な方法であることが示唆されている (図 7B)。Eprobe の未使用、使用にかかわらず非特異反応が認められた。濁度判定においては 60 分前後の濁度上昇、Eprobe においては 45 分前後の蛍光強度上昇である。これらの原因は、既に述べたように濁度判定では primer ダイマー、Eprobe では、ミスアニールの可能性と予想された。Eprobe では、熱解離曲線にて識別可能であることを示したが解析時間が延長するなど POCT として問題が残った。Eprobe は、チミンに色素を結合することからその設計には制限があるものの異なった部位に probe 設計は可能でありさらに検討を加える。

本研究では、解決すべき問題も残ったものの LAMP 法に RPA 法を組み合わせた増幅法、PSR 法による高感度な VZV DNA 検出など標的遺伝子増幅法の改善、新規構築を行った。今後、研究の継続により等温増幅法を用いた高感度な遺伝子検査法を構築する。

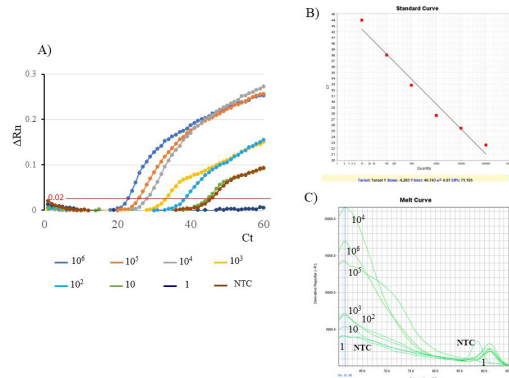


図 8 A) VZV-PSR 法と Eprobe による蛍光強度の時間的変化 B) VZV-PSR 法スタンダード曲線 C) VZV-PSR 法熱解離曲線