

導電性中空糸膜と RT-LAMP 法を用いた新たなウイルス検出法の 臨床応用の可能性に関する検討

Study on the possibility of clinical application of the new virus detection using the metal-coated hollow fiber membrane and reverse transcription loop-mediated isothermal amplification

片倉 基* 菅原 俊継* 木村 主幸* 相川 武司**
渡邊 翔太郎** 秋山 正晴* 有澤 準二*

Motoki Katakura Toshitsugu Sugawara Kazuyuki Kimura Takeshi Aikawa
Syotaro Watanabe Masaharu Akiyama Junji Arisawa

Abstract

Human blood collected from donors is tested for viruses by nucleic acid amplification test (NAT), because blood products are made of human blood. However, infections exposed to the blood products including virus have been reported. From this background, we propose a new viral detection method using a metal-coated hollow fiber (MCH) membrane made of polypropylene coated with metal. This membrane has high conductivity and high viral concentrated effect. We found that viral detection using this membrane and the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). This viral detection method was confirmed that rapid and equal sensitivity than NAT against DNA or RNA virus.

In this report, we examined whether RT-LAMP in this detection could detect both DNA virus and RNA virus from sample mixed DNA virus and RNA virus.

As a result, RT-LAMP could detect both DNA virus and RNA virus from sample mixed both DNA virus and RNA virus.

Viral detection using MCH-membrane will contribute to not only the inhibition of viral infection by contaminated blood products, but also the rapid provision of platelet products which have short expiration dates.

1. はじめに

現在、日本赤十字社では献血血液をもとに作製される血液製剤の安全性を確保するため、様々な検査が実施されている。特に、ウイルス検査に関しては、従来の血清学的検査に加えて、1999年10月から、全ての献血血液に対して、血液中に存在するウイルスの核酸を利用した核酸増幅検査(Nucleic acid Amplification Test; NAT)が実施されている。NATでは、輸血によって引き起こされるウイルス感染症として特に重大な問題であったB型肝炎ウイルス(Hepatitis B virus; HBV)、C型肝炎ウイルス(Hepatitis C virus; HCV)そして、ヒト免疫不全

ウイルス(Human immunodeficiency virus; HIV)を対象としており、このNAT導入によりこれまでの血清学的検査では検出できなかったウイルス汚染度の低い検体からも、ウイルスを検出できるようになった。そのため、輸血によるウイルス感染症のリスクは減少し、血液製剤の安全性は向上した(1, 2, 3, 4)。

NATスクリーニングは、1999年500人分の検体からごく少量ずつを1つにまとめた500プール検体から開始され、2000年には50プール、2004年には20プールに縮小し、検出感度の向上を図ってきたが、輸血によるウイルス感染例は少ないながら

* 北海道科学大学大学院 工学研究科 医療工学専攻

** 北海道科学大学 保健医療学部 臨床工学科

も毎年報告されていた。2014年8月からは、検体1つ1つを個別に検査する個別 NAT に移行し、これまでのプール検体による検査に比べ、さらに検出感度が向上した。しかし、現行の個別 NAT においても検出できない濃度のウイルスを含む献血血液があり得るのが現状であり、感度もほぼ限界近くの低濃度であり、これ以上の検出率の上昇はサンプル量に依存するといわれている⁽⁵⁾。

このような背景から当研究室では、臨床においてより安全な血液製剤をより早く提供することを目的とし、迅速かつ高感度にウイルスの検出が可能となる新たなウイルス検出法として、独自に開発したウイルス捕捉デバイスである導電性中空糸膜(metal-coated hollow fiber membrane ; MCH)と核酸増幅法の一種である RT-LAMP(reverse transcription loop-mediated isothermal amplification)法を利用した手法を考案した。導電性中空糸膜は、ポリプロピレン製の多孔質膜を基材とし、この膜の表面に無電解メッキ法⁽⁶⁾により金属(Ni)を独自に被覆したものである⁽⁷⁾。よって、微粒子に対する高い捕捉能力と導電性を併せ持ち、サンプルを吸引するだけでウイルスを捕捉できるため、多量のサンプルを対象とした時、それだけ多くのウイルスを膜に捕らえることができる。さらに、核酸の電気的特性を利用することで、緩衝液中へウイルス核酸の分離を簡便かつ迅速に行える。つまり、多量のサンプル中のウイルスを少量の緩衝液中へと濃縮することができるデバイスである。本手法で用いられている RT-LAMP 法は、一定温度(60~65°C)でインキュベートすることにより、核酸の増幅から検出までを1ステップで行える LAMP(loop-mediated isothermal amplification)法⁽⁸⁾を応用したもので、RNA ウイルスを検出するための逆転写反応の工程が組み込まれている。RT-LAMP 法は特異性と増幅効率が高く、核酸を15分~1時間の短時間で 10^9 ~ 10^{10} 倍に増幅できるのが特徴である。

導電性中空糸膜と RT-LAMP 法を用いた本手法の有効性と NAT への適用の可能性を明らかにするために、HBV と同じ DNA ウイルスである単純ヘルペスウイルス1型(Herpes simplex virus type1 ; HSV-1)と、HCV や HIV と同じ RNA ウイルスであるネコカリシウイルス(feline calicivirus ; FCV)をそれぞれのウイルスのモデルウイルスとして様々な検討を行ってきた。

その結果、DNA ウイルスと RNA ウイルスどちらのウイルスに対してもサンプルの吸引量を増加させ、さらに捕捉したウイルス核酸を分離する緩衝液量を減らすことで、ウイルスの濃縮効率を上げることが可能となった。これより、約100倍検出感度を向上できることがわかっており⁽⁹⁾、現行の個別 NAT と同等の感度で検出が可能であり、個別 NAT よりも短時間で検出できる⁽¹⁰⁾。また、NAT への適用を想定し、NAT と同様の血液保存液が含まれたヒト血漿を検査試料とした検証においても、導電性中空糸膜を用いることで DNA ウイルスと RNA ウイルスそれぞれを安定して検出が行えることが判明している^(9,10,11)。

このように、本手法の有効性や NAT への適用性を示してきたが、これらは DNA ウイルスと RNA ウイルスを個別に検査対象として検討した結果である。現行の NAT では、HBV、HCV、HIV の3種類を対象に、これらのウイルスを同時に検出している。つまり複数のウイルスが検体中に存在している場合でも、互いのウイルスや試薬等の影響を受けることなくそれぞれのウイルスを検出できる。本手法の NAT への適用を想定した場合、本手法においても複数のウイルスを同時に検出可能であること明らかにすることは必要不可欠であると考えられる。

そこで本報では、NAT への適用の可能性を示すためにまず RT-LAMP 法において DNA ウイルスと RNA ウイルスを含む混合試料から、両ウイルスをそれぞれ検出可能か検証した。

2. 実験材料

2.1 ウイルス

本研究では、実際に問題とされている DNA ウイルスである HBV、RNA ウイルスである HCV や HIV を本検査法で検出することを最終的な目的としている。現段階ではその基礎検討であるため、DNA ウイルスである HSV-1、RNA ウイルスである FCV を検査対象として実験を行った。HSV-1 は、ヘルペスウイルス科アルファヘルペスウイルス亜科に属し、外径120~200nm、正20面体の球形ウイルスであり、二本鎖の DNA を持つ。今回使用した HSV-1 (HSV-HF RK-14) は、神奈川県立衛生短期大学より分与を受けた。

FCV は、カリシウイルス科ベシウイルス属に属し、外径35~40 nm、正20面体の小型球形ウイルスで一本鎖 RNA を持つ⁽¹¹⁾。今回使用した FCV(ATCC

No. VR-782)は、世界最大の細胞・微生物・遺伝子バンクである ATCC(American type culture collection)より分譲を受けた。

なお、本実験ではこれらのウイルスを滅菌水を用いて、HSV-1 は 5×10^3 PFU/mL、FCV は 1×10^3 PFU/mL の濃度になるように 10 倍段階希釈により調製し、これらを 1:1 の割合で混合することで、混合試料を作製した。

2.2 制限酵素

制限酵素は、2 本鎖 DNA の特定の塩基配列を認識し、これを切断する働きをもつ酵素である⁽¹²⁾。

当研究室では、RT-LAMP 法によりウイルス遺伝子を増幅し、電気泳動により結果の判定を行っているため、複数のウイルスを区別することができない。そこで本研究では、NAT への適用を想定した本手法によるウイルスの同時検出の検証を行う際、HSV-1 と FCV が同時検出できているか確認するために制限酵素を使用した。

使用した制限酵素は、HSV-1 の増幅産物に対して、*Hae*III を、FCV の増幅産物に対しては *Alu*I を選択し、それぞれの塩基配列の任意の部分で切断した。なお、互いの増幅産物の塩基配列内に、認識切断部位がないことも確認した。

3. 実験方法

3.1 RT-LAMP 法の増幅産物の制限酵素処理

NAT への適用を想定した複数のウイルスの同時検出について検証するにあたり、まず HSV-1 と FCV それぞれの核酸増幅産物を制限酵素処理することにより、区別できるか検証した。また、同時検出の際には、制限酵素も混合させるため、制限酵素が互いの核酸増幅産物に影響しないかについても検証した。

2.1 節のように調製したそれぞれのウイルス液を 94°C で 10 分間加温した後、80°C で 30 分間インキュベートし、ウイルス被膜を破壊することで、それぞれの核酸を得た。この核酸浮遊液から、RT-LAMP 法の規定量である 5 μ L を適用し核酸増幅を行った。核酸増幅には、HSV-1 と FCV についてそれぞれプライマー設計ソフト「Primer Explorer V3」で設計したプライマーを用いて、65°C で 60 分間の増幅反応を行った後、80°C で 5 分間加温し、酵素を失活することで増幅反応を終了した。次に、それぞれの増幅産物を HSV-1 に対しては *Hae*III、FCV に対しては *Alu*I によって、37°C で 120 分間の制限

酵素処理を別々に行った。その後、それぞれの増幅産物を 3%アガロースゲルで電気泳動(10V/cm、60 分間)し、エチジウム・ブロマイドによって 10 分間染色した。最後にこれを紫外線照射し、CCD カメラにて撮影した。

3.2 DNA ウイルスと RNA ウイルスの同時検出

本手法の NAT への適用の可能性を明らかにするために、本手法で採用している RT-LAMP 法においても、NAT 同様に複数のウイルスを同時に増幅し、それぞれを検出できるかどうか検証した。

2.1 節の HSV-1 と FCV を含む混合試料を 94°C で 10 分間加温した後、80°C で 30 分間インキュベートし、ウイルス被膜を破壊することで、両者の核酸を得た。この混合試料から RT-LAMP 法の規定量である 5 μ L を RT-LAMP 法へ適用した。その後、増幅産物を *Hae*III と *Alu*I を等量混ぜた制限酵素によって 37°C で 120 分間の処理を同時に行った。処理後、それぞれの増幅産物を 3%アガロースゲルで電気泳動(10V/cm、60 分間)し、エチジウム・ブロマイドによって 10 分間染色した。最後にこれを紫外線照射し、CCD カメラにて撮影した。

4. 実験結果

4.1 RT-LAMP 法の増幅産物の制限酵素処理

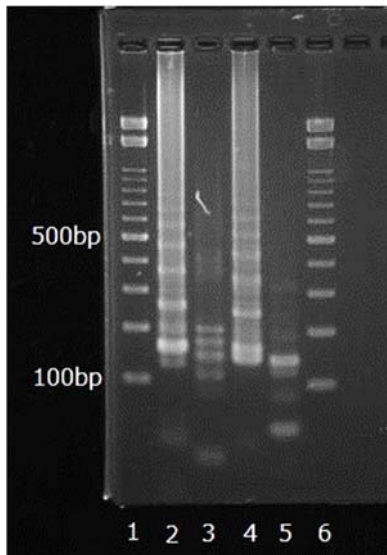
HSV-1 と FCV の結果を比較するために 1 つの 3%アガロースにて電気泳動した結果を図 1 に示す。図 1 のレーン 1 と 6 は分子サイズマーカーであり、増幅産物の長さ(base pair ; bp)の指標となる。レーン 2 とレーン 4 は RT-LAMP 法による HSV-1 と FCV のそれぞれの増幅産物である。本研究では、HSV-1 と FCV の核酸のうち標的としたのはそれぞれ 180bp と 149bp であるため、180bp、149bp 付近まで伸びた核酸バンドが確認されれば HSV-1 と FCV 由来の核酸増幅産物であるといえる。図 1 に示すようにレーン 2 と 4 では、それぞれ標的とした長さ付近まで伸びた核酸バンドを確認でき、適切な増幅が行えたといえる。レーン 3 と 5 は、HSV-1 と FCV の増幅産物をそれぞれの制限酵素によって処理した核酸フラグメントである。制限酵素によって処理することにより HSV-1 は 200bp、180bp、150bp、40bp 付近に、FCV では 140bp、70bp 付近に核酸フラグメントが確認できた。

このように制限酵素処理したそれぞれの増幅産物から、HSV-1 と FCV を区別することができると考えられる。そのため、本手法の NAT への適用を

想定した同時検出の検証の際も、制限酵素処理により区別された増幅産物を見分けることで、同時検出可能なのか示すことができると考えられる。

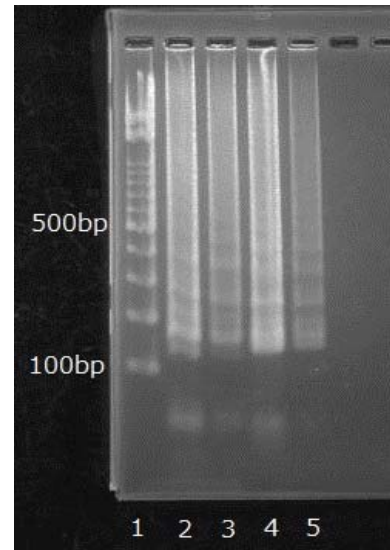
また、HSV-1 の増幅産物に対して *AluI* を、FCV の増幅産物に対して *HaeIII* を使用し、同様の実験を行い、互いの制限酵素が増幅産物に影響しないか検証した。

その結果を図 2 に示す。レーン 3 は HSV-1 の増幅産物を *AluI* によって、またレーン 5 は FCV の増幅産物を *HaeIII* によって処理したものである。レーン 3 とレーン 5 で増幅産物が切れていないことが確認できたため、同時検出の際、制限酵素を混合させても、互いの制限酵素が増幅産物に影響しないことが示された。



レーン 1, 6: 分子サイズマーカー (bp)
 2: HSV-1 増幅産物
 3: HSV-1 増幅産物を *HaeIII* 処理
 4: FCV 増幅産物
 5: FCV 増幅産物を *AluI* 処理

図 1 RT-LAMP 法による増幅産物を制限酵素処理



レーン 1: 分子サイズマーカー (bp)
 2: HSV-1 増幅産物
 3: HSV-1 増幅産物を *AluI* 処理
 4: FCV 増幅産物
 5: FCV 増幅産物を *HaeIII* 処理

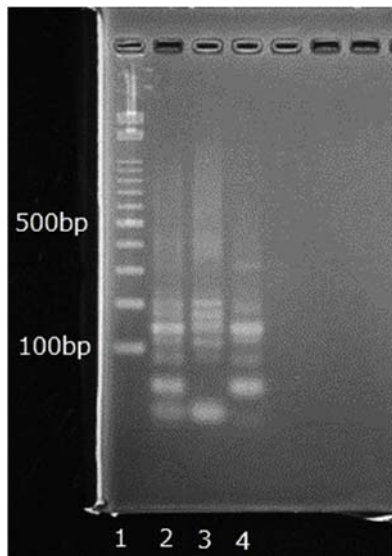
図 2 制限酵素による互いの増幅産物への影響

4.2 DNA ウイルスと RNA ウイルスの同時検出

HSV-1 と FCV の 2 種類の核酸を混合させ RT-LAMP 法により同時に増幅した。その結果を図 3 に示す。

レーン 2 は HSV-1 と FCV の核酸を混合し同時に増幅した後、*HaeIII* と *AluI* を等量混ぜた制限酵素によって制限酵素処理した核酸フラグメントである。レーン 3 と 4 は HSV-1 と FCV のそれぞれの増幅産物を *HaeIII* と *AluI* により処理した核酸フラグメントである。HSV-1 と FCV の核酸の同時増幅が適切に行われた場合、理論的にはレーン 3 と 4 が混合された核酸フラグメントがレーン 2 に確認できると考えられる。実際に図 3 のレーン 2 では、レーン 3 と 4 が混合された核酸フラグメントが確認でき、予測通りの核酸フラグメントを確認することができた。この結果から、DNA ウイルスと RNA ウイルスの 2 種類のウイルス核酸を含む混合試料を対象とした RT-LAMP 法においても同時検出できることが初めて示された。つまり、本手法でも NAT 同様に複数のウイルスをそれぞれ同時に検出できる可能性が明らかになった。

なお、検討した 3 回の実験において同様の結果が得られ、再現性についても確認できた。



- レーン 1:分子サイズマーカ (bp)
 2:ウイルスの同時増幅後、制限酵素処理
 3:HSV-1 増幅産物の *Hae*III 処理
 4:FCV 増幅産物の *Alu*I 処理

図3 2種類のウイルスの同時検出

5. 考察

本研究により、2種類のウイルスを検査対象にしても、RT-LAMP法により同時にそれぞれを検出できることが示された。

この理由として、RT-LAMP法には4種類のプライマーを設計することにより標的遺伝子配列を特異的に増幅できるという特徴があるため、これによりHSV-1とFCVを特異的に増幅可能であったことと、それぞれの制限酵素が互いに影響することなく、適切に配列を認識し酵素反応が起きていたと考えられる。

これらは、本手法をHBV、HCV、HIVの3種類のウイルスを対象としている現行のNATに適用しても、本研究の結果と同様に、それらのウイルスを適切に同時検出できる可能性を示している。この結果より、導電性中空糸膜とRT-LAMP法を用いた本手法がNATへ適用できる可能性がさらに示されたと考えられる。

次に、本手法のNATへの適用の可能性について述べる。現行のNATの検出感度はほぼ限界値であり、これ以上の感度向上はサンプル量に依存しているといわれている⁽⁵⁾。一方本手法は、検査に使う

サンプル量を増やすことと、核酸分離用緩衝液の量を減らすことで簡単に検出感度の向上を実現できるのが最大の特徴である。これより、これまでのサンプル吸引量である10mLをさらに増やすことで、検出感度を向上させることができると考えられる⁽¹¹⁾。また、これまでの検討で導電性中空糸膜によるFCVの捕捉率が約30~40%であることがわかっている。これは、導電性中空糸膜の細孔径100nmに対し、FCVの外径が35~40nmであることが原因だと考えられている。したがって、導電性中空糸膜の細孔径をウイルスの外径より小さくすることで、ウイルスを全て膜中に捕捉することが可能になり、さらに検出感度の向上が見込めると考えられる。このように、本手法は検出感度のさらなる向上の可能性を有している。

また、本手法とNATの検査時間を比較すると、NATは5~6時間程度かかる⁽¹³⁾のに対し、導電性中空糸膜を用いた本手法は約2時間30分である。その内訳は、検査試料の吸引とウイルス被膜の溶解に約5分、核酸分離と濃縮処理で約25分、核酸増幅(RT-LAMP法)に約60分、電気泳動による結果の解析に約60分となっている。

本手法のNATへの適用を想定した際、プローブが標識されたプライマーを使用してリアルタイムRT-LAMP⁽¹⁴⁾を採用し、さらに核酸増幅時間を約30分に短縮できるループプライマーという新たな試薬を追加することで、60分かかる電気泳動が不要になり、さらなる時間短縮が図れるものと期待される。

以上より、本手法は、1時間という短い検査時間で高感度に複数のウイルスを検出できる可能性を有している。

血液製剤の中でも血小板製剤は、有効期間が採血後96時間以内と非常に短いため、できるだけ早い検査時間が求められている。本手法では、このような血液製剤をより迅速に臨床現場へ提供することが可能となるため、献血血液の有効利用にもつながり、非常に重要な意味を持っていると考えられる。

6. まとめ

本報では、本手法のNATへの適用を想定し、本手法で採用しているRT-LAMP法において複数のウイルスが同時に検出できるか検討した。その結果、2種類のウイルスを含む混合試料を対象とした場

合でも RT-LAMP 法によって同時に検出可能であることが初めて示され、本手法を NAT へ適用できる可能性が示された。本手法は、多量のサンプル吸引によるウイルス濃縮が可能であるため、高感度な検出が可能である。さらに、検出時間も NAT より短時間であることから、有効期間が短い血液製剤などを迅速に提供可能である。これより、本手法は安全な血液製剤を迅速に提供可能で、血液を介したウイルス感染のリスクを軽減できることが期待できるため臨床現場において大きく貢献できるものと期待される。

今後は、導電性中空糸膜を用いたウイルス濃縮の工程を含む本手法によるウイルスの同時検出と、NAT 同様のヒト血漿試料からの同時検出についても検討し、本手法の NAT 適用の可能性をより明らかにしていく予定である。

7. 参考文献

- (1) Japanese red cross NAT screening research group, Nationwide nucleic acid amplification testing of hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type 1 for blood transfusion and follow-up study of nucleic acid amplification positive donors, *Jpn.J.Infect.*53. pp.116-123, 2000.
- (2) 佐藤進一郎, 池田久寛, “献血血液の核酸増幅検査(NAT)によるウイルススクリーニング,” *人工血液*, Vol.10, No.1, pp.11-16, 2002.
- (3) Satake M, Taira R, Yugi H, Hino S, Kanemitsu K, Ikeda H, Tadokoro K. Transfusion.Infectivity of blood components with low hepatitis B virus DNA levels identified in a lookback program. Vol. 47, No.7, pp.197-205, 2007.
- (4) 阿部英樹, 東寛, 池田久寛, “輸血用血液製剤のウイルス不活化の現状と課題,” “日本輸血会,” Vol.51, No.5, pp.491-506, 2005.
- (5) 佐竹正博, “NAT 導入と血液の安全性: 到達点と課題,” “日本輸血細胞治療学会誌,” Vol.61, No.2, pp.166-167, 2015.
- (6) 逢坂哲彌, 後藤文男, “無電解めっきの基礎と応用,” “表面,” Vol.23, No.3, pp.138-148, 1985.
- (7) 大井諒, 菅原俊継, 黒田聡, 有澤準二, 木村主幸, “導電性中空糸膜と RT-LAMP 法を用いた DNA ウイルスと RNA ウイルスのマルチプレックス検出に関する基礎的検討,” *電子情報通信学会技術研究報告*, MBE2013-110, pp.79-83, Jan.2014.
- (8) T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino and T. Hase, Loop-mediated Isothermal amplification of DNA, *Nucleic Acids Res.* Vol.28, No.12, pp.63, 2000.
- (9) 海老川慎, 菅原俊継, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 五十嵐治, “遺伝子増幅法を利用した導電性中空糸膜によるウイルス検出法に及ぼす血清の影響,” “電子情報通信学会技術研究報告,” MBE2004-65, pp.53-56, 2004.
- (10) 菅原俊継, 木村主幸, 三澤顕次, 有澤準二, 井川氏治, “LAMP 法を利用した導電性中空糸膜による模擬血清試料からのウイルス検出,” “生体医工学,” Vol.42, No.4, pp.395-403, 2004.
- (11) 遠藤太一, 菅原俊継, 有澤準二, 木村主幸, 五十嵐治, “ヒト血漿試料からの RNA ウイルス検出における導電性中空糸膜と RT-LAMP 法を用いた感度向上効果,” “電子情報通信学会技術研究報告,” MBE2011-91, pp. 65-70, 2012.
- (12) 穴戸和夫, 塚越規弘, “微生物科学-基礎・バイオ・環境利用まで-,” “昭晃堂”, pp.101-103, 1999.
- (13) 関口定美, 佐藤進一郎, “輸血後肝炎の現状とその予防,” “臨床検査,” Vol.43, No.3, pp.255-263, 1999.
- (14) 宮西節子, “遺伝子検査に用いられる主な電気泳動,” “検査と技術,” Vol.27, No.13, pp.1519-1523, 1999.