

SARS-CoV-2 診断における LAMP 法の有用性

¹⁾埼玉医科大学病院 中央検査部

²⁾同 感染症科・感染制御科

北川裕太郎¹⁾ 折原 悠太¹⁾
河村 亨¹⁾ 松岡 優¹⁾
樽本 憲人²⁾ 武内 信一¹⁾

川村利江子¹⁾ 小棚 雅寛¹⁾
酒井 純²⁾ 今井 一男²⁾
前崎 繁文²⁾ 前田 卓哉¹⁾

序 文

SARS-CoV-2 による新型コロナウイルス感染症は世界各地で増加し続け、2020 年 4 月 7 日現在、日本国内でも感染者数が 3,600 名を超えている。患者数の急激な増加に伴い、すべての医療機関で迅速かつ簡易的な検査体制が必要となっている¹⁾。Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法は、鎖置換反応を利用して一定温度で反応させることを特徴としており、検出までの行程を 1 ステップで行うことができる。今回、栄研化学株式会社より販売された「Loopamp 2019-nCoV 検出試薬キット」の有用性を検討したので報告する。

材料・方法

本検討は埼玉医科大学病院倫理審査委員会の承認を得て実施した（承認番号：19136）。

1) 対象検体

2020 年 2 月から 3 月にかけて、院内検査の依頼があった COVID-19 の疑いのある患者より採取した鼻咽頭スワブサンプル 76 件を用いた。

2) RNA 抽出方法

RNA 抽出は QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen 社) を使用して行い、最終的に Buffer AVE 60 μ L にて抽出した。

3) LAMP 法の設定

LAMP 反応の試薬は Loopamp 2019-nCoV 検出キット（栄研化学）を使用し、1 検体あたり RNA 抽出液 10 μ L、混合プライマー液 15 μ L を混和し、合計 25 μ L を反応液とした。反応は Loopamp リアルタイム濁度測定装置 LA-200 (栄研化学) を用いて 62.5°C、35 分間で行った。判定は増幅曲線が立ち上がったものを陽性とし、最終的に目視でも反応液が混濁していることを確認した。

4) 分析感度

LAMP 法の分析感度の評価のために、国立感染症研究所が COVID-19 の分子診断のための標準検体として提供した SARS-CoV-2 の精製 RNA を使用した。標準 RNA を 1.0×10^3 から 1.0×10^0 コピー/ μ L の範囲で 10 倍連続希釈し LAMP 法にて評価した。

5) 従来法との比較

従来法として RT-qPCR (TaqMan 法) を用いた。プライマーとプローブのセットは 2.4 μ M のフォワードプライマー 5'-AAA TTT TGG GGA CCA GGA AC-3'、3.2 μ M のリバースプライマー 5'-TGG CAG CTG TGT AGG TCA AC-3'、0.4 μ M のプローブ 5'-FAM-ATG TCG CGC ATT GGC ATG GA-TAMRA-3' を使用した (N2 セット)。温度条件は 50°C 30 分の逆転写、95°C 15 分の変性、94°C 15 秒、60°C 60 秒間のアニーリングを 40 サイクル行った。判定結果を LAMP 法と比較検討した。

結 果

1) 分析感度

SARS-CoV-2 RNA の 10 倍連続希釈液を増幅して、Loopamp 2019-nCoV 検出キットにおける検出下限を決定した。Fig. 1 は、LA-200 によるリアルタイムの濁度の検出結果を示している。反応時間 35 分以内での、RNA の最小量は 1.0×10^1 コピー/ μ L 反応であった。また、Fig. 2 に示すように、自然光下で目視にて濁度を確認することもできた。

2) 従来法と LAMP 法の比較

従来法である RT-qPCR を実施した 76 例のうち陽性は 30 例、陰性は 46 例であった。Table 1 に示すように、従来法と LAMP 法との一致率は 97.4% (74/76) であった。不一致例としては LAMP 法 (+) / RT-qPCR (-) が 2 例であった。

Fig. 1 LAMP 法による検出感度

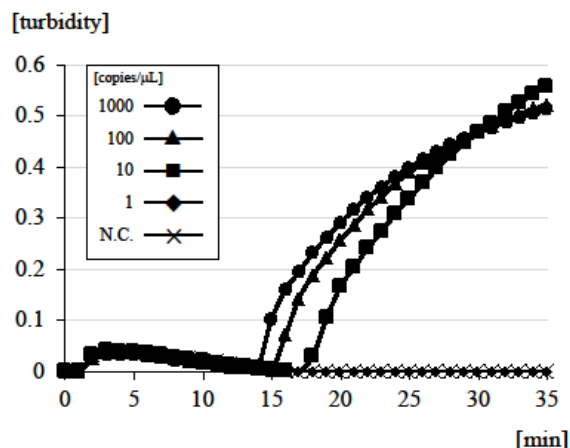
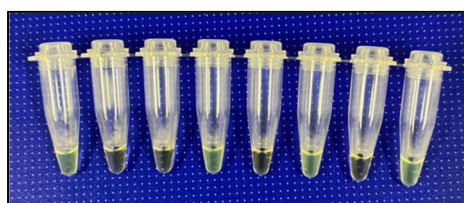


Fig. 2 LAMP 反応の肉眼判定



陽性の場合、混濁した緑色へと色調変化がみられる。

Table. 1 RT-qPCR と LAMP 法による検出結果

		LAMP 法		
		Positive	Negative	Total
RT-qPCR	Positive	30	0	30
	Negative	2	44	46
	Total	32	44	76

考 察

現在、COVID-19 は急速に拡大しており、世界中の国々でパンデミックを引き起こし、遺伝子検査が間に合わない状況である。このような状況下で、LAMP 法は多くのデバイスや材料を必要としないため、どこでも検査することが可能で、過酷な環境や孤立した場所での使用が期待されている²⁾。

今回の検討では、LAMP 法による最小検出感度は 1.0×10^1 コピー/ μL 反応であり十分な分析感度を確認できた。

また、従来法である RT-qPCR と LAMP 法の一致率は 97.4% と良好であり、診断感度は 100%、診断特異度は 95.7% であった。不一致例 2 例では各々 2 名の SARS-CoV-2 陽性患者の入院管理時の RT-qPCR 検査において陰性化した症例であった。これは、RT-

qPCR のサンプル使用量が 5 μL であるのに対して LAMP 法では 10 μL 使用するため RNA 抽出液中の濃度勾配や吸引率に依存するものと思われた。

我々が検討したこれらの評価により SARS-CoV-2 検出における LAMP 法の有用性は非常に高いと言える。

文 献

- 1) Wang J, Zhou M, Liu F. Exploring the reasons for healthcare workers infected with novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) in China. J Hosp Infect. In Press. doi: 10.1016/j.jhin.2020.03.002.
- 2) Nguyen T, Duong Bang D, Wolff A. 2019 Novel Coronavirus Disease (COVID-19): Paving the Road for Rapid Detection and Point-of-Care Diagnostics. Micromachines (Basel). 2020 Mar 14;11(3):E306. doi: 10.3390/mi11030306.