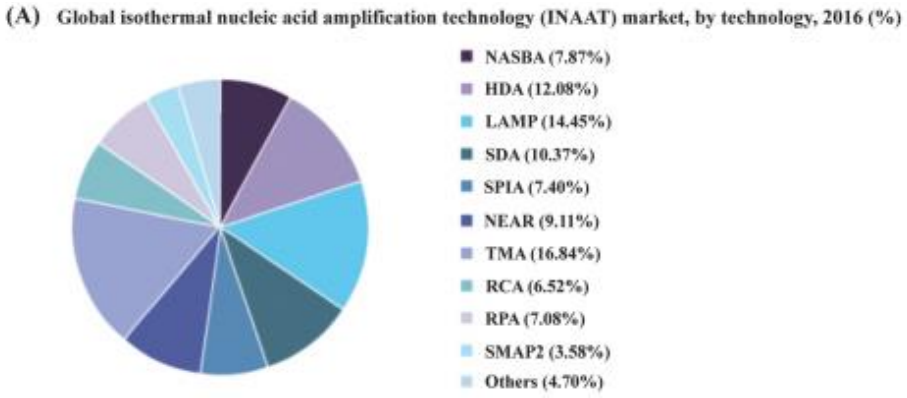
1. 序

1939 年に創業された栄研化学は、当初は栄養食品、検査試薬、微生物試験培地などの開発と販売を手掛け、創業以来生化学試薬メーカーとして堅実に成長を遂げてきました。その中で 1999 年 LAMP 法の完成を発表しています。今ではこの核酸増幅原理を用いた種々の遺伝子検査試薬製品ラインナップを抱え、栄研といえば LAMP と連想する人は多いことでしょう。

LAMP 法を用いた核酸検出キットは、腸管出血性大腸菌の診断薬での使用実績、2003 年の SARS パンデミックの際には SARS 核酸検出試薬キットとして申請から 1 ヶ月足らずでの迅速承認、ジカウイルスの検出キットとして製造承認を得るなど、数々の感染症において診断薬として多くの実績を残してきました。

PCR に比べ試料調製から検出段階までの時間短縮が期待できる、LAMP 法を含む等温核酸増幅方法はこれまでに種々のものが報告され、今では使用目的に応じてそれぞれ手法の感度、装置や試薬コストを考慮してユーザーがキットを入手できる状況となっています。

参考までに 2016 年時点での等温核酸増幅市場のシェアについて資料を紹介します。
（Analyst. Volume 144 Number 1 7 January 2019 Pages 1–350、Fig.1 から引用）



LAMP はシェア 14.45%を占め、TMA（Transcription Mediated Amplification）の 16.84%に次ぐシェア 2 位となっています。
1 位の TMA は米国 Hologic 社が保有する核酸増幅技術（開発は旧 Gen-probe 社）で、現在同社ではウイルス、細菌感染症診断薬の TMA キットラインナップを複数備えており、また今回の SARS-CoV-2 診断についても FDA 認可されたキットを保有しています（製品情報：https://www.hologic.com/hologic-products/diagnostic-solutions/hologic-sars-cov-2-assays）。

現在、世界中で未曾有のインパクトを与えている所謂新型コロナウイルス（以下 SARS-CoV-2）パンデミックにおいても、感染患者からのウイルス検出試薬として栄研は早くから LAMP による検査試薬の開発計画を発表し（2 月 14 日栄研プレスリリース：https://ssl4.eir-parts.net/doc/4549/tdnet/1798986/00.pdf)、3 月 19 日にはこの試薬が国内で保険適用となっています（3 月 19 日栄研プレスリリース：https://ssl4.eir-parts.net/doc/4549/tdnet/1808671/00.pdf）

実は LAMP (RT-LAMP）法を用いた SARS-CoV-2 検出は、栄研による試薬発売発表より以前に既に研究者コミュニティでは注目が集まっていたと見え、3 月 2 日には Mammoth Biosicences (CRISPR/Cas9 開発者、Doudna らが設立）により、CRISPR 法と LAMP を組み合わせた、確度の高い迅速 SARS-CoV-2 検出プロトコル（SARS-CoV-2 検出のための DETECTR 法）が発表され（Mammmoth 社プレスリリース：https://mammoth.bio/wp-content/uploads/2020/03/Mammoth-Biosciences-A-protocol-for-rapid-detection-of-SARS-CoV-2-using-CRISPR-diagnostics-DETECTR.pdf)、論文として Nat.biotech.に 4 月 16 日付けで発表されています（https://www.nature.com/articles/s41587-020-0513-4)。

同じく CRISPR を使用する核酸検出メソッドで、MIT の Zhang らの SHERLOCK があります。SHERLOCK での SARS-CoV-2 検出試薬は、パンデミックにおける CRISPR 試薬として初めて FDA の承認を取得しました（DETECTR はまだ未承認？)。この FDA 認可の SHERLOCK 法は 42℃で等温増幅しているため、LAMP（65℃）ではないと思われますが、SHERLOCK 改良法として STOP (SHERLOCK Testing in One Pot）が開発されていて（https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.05.04.20091231v1）こちらは核酸増幅に LAMP を使用しています。

上記のように、既に身近なものになった核酸等温増幅法である LAMP 法が今 SARS-CoV-2 パンデミック下で再び脚光を集めています。今回、SARS-CoV-2 パンデミックで改めて耳目を集める栄研の LAMP 法について、特許分析を通じて主要なプレイヤーとその動向を可視化する試みです。

参考)

Mol. BioSyst., 2014, 10, 970—1003（無料入手可）
Analyst. Volume 144 Number 1 7 January 2019 Pages 1–350（無料入手可）

2. 概要の調査

LAMP 法に関する特許出願を概観するため、それぞれの出願年別、出版年別の件数集計を行った。集計にあたり、母集団は下記の検索式により設定した。

2.1 概観調査のための母集団

概要分析のための検索式と母集団（検索実施：2020 年 5 月 19 日）

DB	SRPARTNER（日立情報）
対象公報	US,EP,WO,JP,CN
検索①	Title,Abst,Claim/LAMP "Loop-Mediated Isothermal Amplification"
検索②	Title,Abst,Claim/DNA RNA nucleic* nucleotide* nucleocide
検索③	Title,Abst,Claim/amplification
検索④	優先日,出願日/1998 年以降
母集団	上記(①*②*③)*④ US,EO,WO,JP　約 600 ファミリ CN　約 2600 ファミリ

上記ヒット集団をタイトル、アブストラクトの簡易的な閲覧を元にデータクリーニングを実施し、最終的に

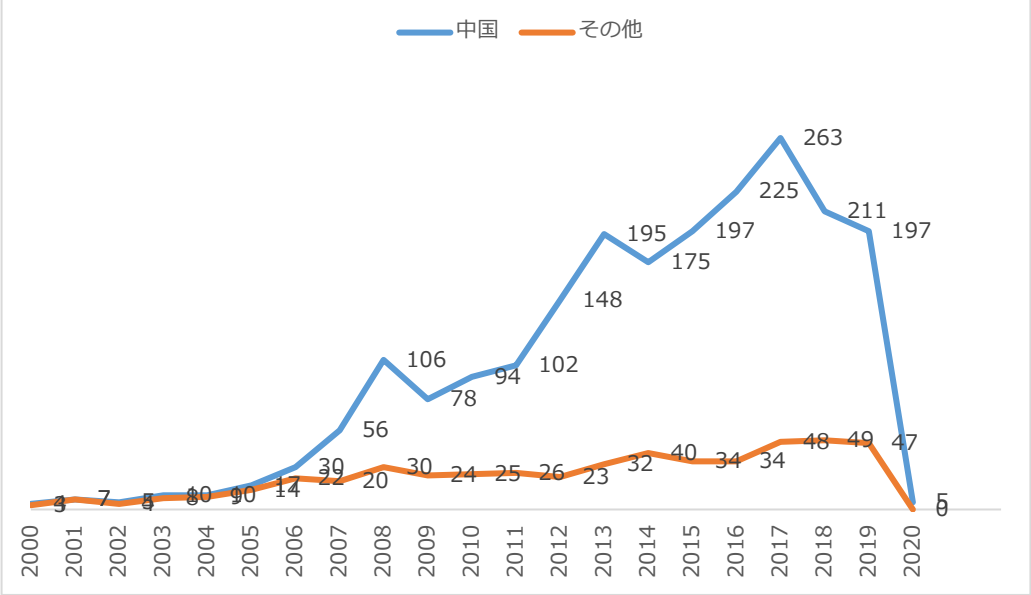
US,EP,WO,JP　499 ファミリ
CN　1755 ファミリ

を分析対象母集団とした。

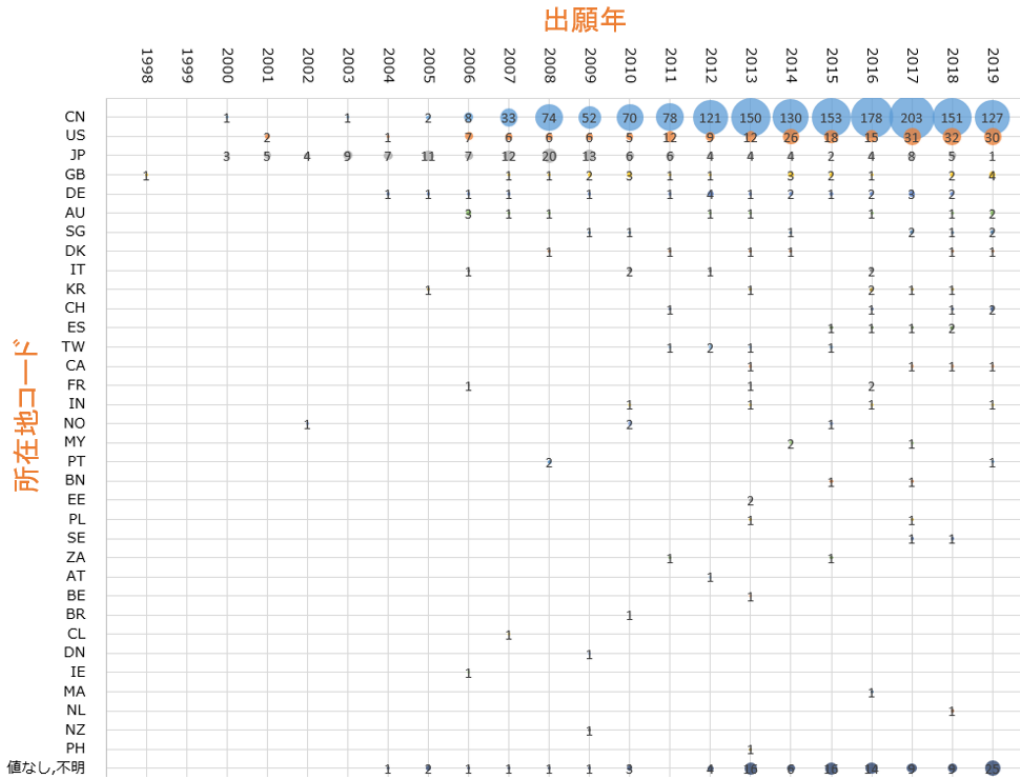
上記検索式の通り、ここでは「LAMP」というキーワードが定着した以降の文献を拾うことを目的としており、クレーム中に”LAMP”または"Loop-Mediated Isothermal Amplification"というキーワードを含むものに限定している。すなわち、栄研によって 98 年に出願された基本特許群は母集団に含まれない事に留意（基本特許では LAMP 等のキーワードは使われていない）。

2.2 中国での出願件数の急増

検索結果から世界的に見ると中国における LAMP 関連出願数が突出していた。これを可視化するため CN 公報、その他の公報を分けて出願年で集計した。



上記中国での出願が、中国国内出願人によるものなのか、それとも海外から中国へ向けての出願なのかを分析するため、データベース上で筆頭出願人名に付与される所在地コードと、各コードの出願件数を出願年を集計した。



集計結果から、中国での LAMP 関連出願の大半は中国国内出願人によるものであり、

それが 2007 年以降現在に至るまで急激に増加中であることも明らかであった。

2.3 2006 年、中国科学技術政策の転換点

では 2007 年前後に中国でどんなイベントが発生したのか、ネット検索していると 2006 年は中国国務院が「国家中長期科学技術発展規画綱要 2006-2020」を発表した年であり、中国国内でライフサイエンスを含む科学技術分野に急激に国費が投入されはじめた転換点であることが理解できた。これが上記出願の急増に影響しているものと思われる（LAMP に限らず、中国国内出願人によるあらゆる特許出願件数が大幅アップしはじめる年）。

ちなみに、中国国内出願人は国立大学や国所属研究機関が多く、出願内容は多岐に渡るものの、概ねタイトルを閲覧した感じでは「栽培品種のマーカー遺伝子」「ウイルス診断」に関するものが多かった（いずれも、特定の核酸配列をクレームし、その配列の検出方法として LAMP をクレーム）。中国国内出願人で、大学、研究機関以外ではバイオベンチャーの CAPITABIO の出願が突出していた（capitalbio tech.のページ：http://www.capitalbiotech.com/）。

この、「栽培品種のマーカー遺伝子」に関する出願は、この分野の中国系出願人に特徴的なもので、後述で考察する。

2.4 中国の種苗ビジネスと LAMP 関連出願

前述の「栽培品種のマーカー遺伝子」に関連する LAMP 関連出願について考察したい。近年、世界の種苗ビジネスは、人口増加にともなう食料需要を背景に、バイオテクノロジーの発展による品種改良や農薬開発のスピード化という要因もあり転換期を迎えている。それに伴いバイオ技術を高度化させたアグリビジネス大手同士の買収や合併が相次いでいるが、この中で従来、欧米各社の牙城だった種苗ビジネスのシェア争いは、近年中国系企業の大躍進により景色が変わつつある。象徴的な出来事としてスイスのアグリ大手、シンジェンタのケムチャイナ（中国化工）による買収がある。買収後のシンジェンタは、バイエル（モンサント買収後 1 位）、コルテバ（ダウ-デュポンの合弁、2 位）についで世界 3 位の規模を維持している。さらに世界 9 位に湖南省発祥のユエンロンピン・ハイテク・アグリカルチャー（袁隆平農業高科技）がランクインしている事も中国での種苗ビジネスの躍進を反映していると言える。

このような「種苗ビジネス」の発展にともない、中国では膨大な品種改良に関する特許出願がなされていることが知られており、恐らく今回の分析で明るみになった中国での LAMP 関連出願の急増は、このような種苗ビジネスを意識した中国政府、企業の出願戦略に相関しているのではないかと思わる。この分野での LAMP 関連出願は今後も増加し続けるのではないかと思う（なお、筆者は以前、CRISPR システムで使用され

る gRNA について特許調査を行った際に、中国企業、中国研究機関から大量の栽培品種の遺伝子編集用 gRNA 関連出願がなされているのを目にしたことがある)。

2.5 US,EP,WO,JP 出願の概要調査

LAMP 関連出願の概要分析として、この分野の主要出願人とその傾向を把握すべく出願人別の件数集計を行った。結果は下記表。

出願人	件数
TOSHIBA KK (JP)	18
EIKEN CHEMICAL (JP)	15
BROAD INST INC (US)	11
SYSMEX CORP (JP)	11
MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY (US)	10
CALIFORNIA INST OF TECHN (US)	9
HARVARD COLLEGE (US)	9
QIAGEN GMBH (DE)	9
BECTON DICKINSON CO (US)	6
CAPITALBIO CORP (CN)	6
RIKEN (JP)	6
UNIV TSINGHUA (CN)	6
The Regents of the University of California (US)	5
UNIV ARIZONA STATE (US)	5
UNIV NIHON (JP)	5
US HEALTH (US)	5

ここで、上記に掲載したこの分野の主要出願人から一部を抜粋してそのプロフィールと出願傾向を紹介する。

- **東芝 (JP)**

  2007 年ごろから、2018 年ごろまで継続して出願活動がみられる。

  食総研、麻布獣医学園、第一化学薬品（現積水メディカル)、実験動物中央研などと共願がある。

  出願はすべて、特定の疾患関連ウイルスや食中毒、疾患原因菌の核酸検出に使用するプライマーセット、検出/分析装置、分析メソッドに関連し、各出願で核酸増幅方法として LAMP がクレームされる。

  2012 年に、コロナウイルス検出のための LAMP プライマーセットに関する出願

が見られる（ネット検索をしたが、実際の製品に結びつく情報は得られず）。
その後も研究は続けられており、2019 年に LAMP 法を用いた miRNA 検出技術を開発したこと、miRNA 検出による１３種類のがん検出の実証を行うことを発表した。
また、LAMP 法による診断装置等の製品開発はグループ会社である東芝メディカルシステムズでも行われていたが、2016 年東芝メディカルシステムズはキヤノンに買収され、2018 年１月には東芝メディカルシステムからキヤノンメディカルシステムズに社名を変更した。キヤノンメディカルシステムズでは LAMP 法による核酸増幅を利用した遺伝子検出装置を販売している。

ウェブ検索によると、2019 年には常温での保存・輸送が可能な蛍光 LAMP 用試薬の開発について発表しており、LAMP 法による検査システムの開発を継続的かつ精力的に行っているといえる。今回のパンデミック禍においてもいち早く小型かつ迅速検査が可能な LAMP 法による SARS-CoV-2 遺伝子検出装置の開発を行うことを発表し、また、LAMP 法を用いた SARS-CoV-2 検出システムにより唾液での検査が可能であることを確認したことを発表している。

参考）
https://www.toshiba.co.jp/rdc/detail/1911_06.htm
https://www.jmac.or.jp/jwp/pdf/members/sympo/jmacsympo6/3-2_hashimoto_hp.pdf
https://jp.medical.canon/products/dnachip
https://jp.medical.canon/News/PressRelease/Detail/58429-834
https://jp.medical.canon/News/PressRelease/Detail/55803-834

- **BROAD 研（US), MIT (US), HARVARD 大（US)**
  FENG グループによる CRISPR システム関連出願が複数含まれる。2014 年～2019 年の出願。これらの中で、最も古いものは 2017 年末に出願された WO2018107129A1（CRISPR EFFECTOR SYSTEM BASED DIAGNOSTICS ）で、これが SHERLOCK システムの基礎特許（のうちの一つ）と思われる。クレームには CRISPR 試薬添加前のターゲット増幅工程として種々のものが挙げられ、そこに LAMP が含まれている。CRISPR 系出願の他は、マイクロ流路等を用いた核酸検出方法に関するもの。

- **CAPITALBIO CORP (CN), UNIV TSINGHUA (CN)**
  2000 年、北京で設立。マイクロ流路と組み合わせた LAMP ベースの診断キットなどを製造販売。その他マイクロアレイ解析機器なども手がける。

20010 年～2016 年の出願。出願は呼吸器病原因子に対する LAMP プライマーや、標識化試薬など。

- **シスメックス（JP)**
  LAMP 法を用いたウイルス、腫瘍マーカー、がん転移マーカー検出法や、RT-PCR または RT-LAMP 法での検出のための RNA 抽出手順を伴わないサンプル調整法、LAMP 法で核酸を増幅したサンプルの検出装置に関する出願がみられる。OSNA（One-Step Nucleic Acid Amplification：直接遺伝子増幅）法というサンプル調整から遺伝子増幅までをワンステップで行うリンパ節への転移癌検査システムを開発販売しており遺伝子増幅法として RT-LAMP 法が利用されている。

  参考）
  https://products.sysmex.co.jp/products/genetic/ST010340/features.html
  https://www.sysmex.co.jp/news/2020/200122.html

- **CALIFORNIA INST OF TECHN (US)**
  DNA 定量測定装置に関する出願で、使用する DNA の等温増幅法の一つとして LAMP 法が想定される。

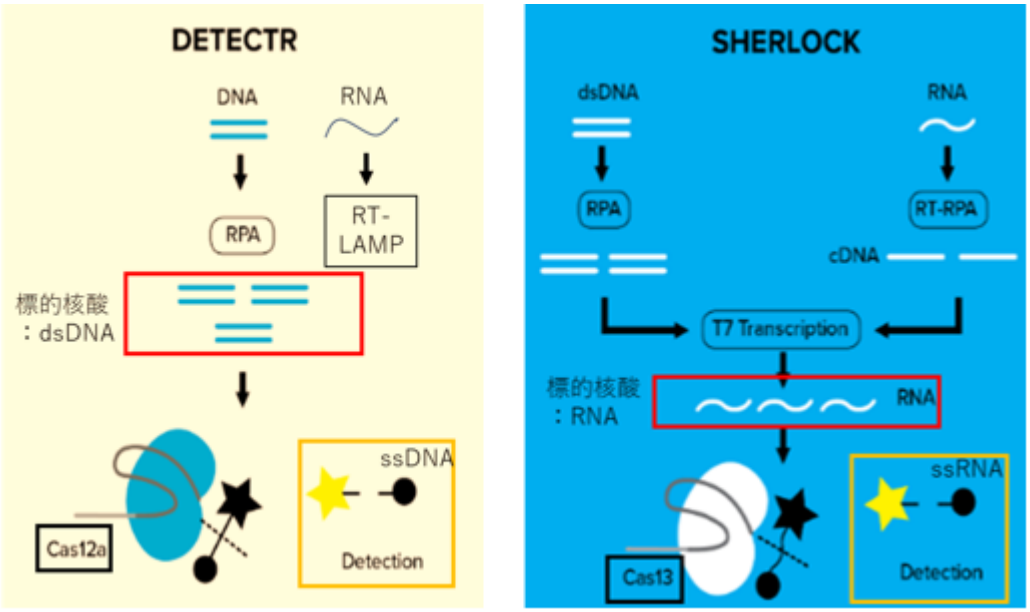
- **The regents of the University of California (US)、MAMMOTH BIOSCIENCES INC.(US)**
  出願件数は 5 件。
  US2019/0241954 では、Doudna らの Mammoth Biosciences 社で使用される CRISPR システムを用いたターゲット DNA 検出方法である DETECTR 法の基本特許をクレームしている。一部については US10253365 として登録されている。また US2019/0250156 で Kamei らはラテラルフローアッセイ（LFA）による核酸検出法について出願している。
  なお、序文で触れた DETECTR による SARS-CoV-2 検出メソッドを報告する 4 月 16 日付の Nature Biotech.誌で掲載されるキットは、この LFA をターゲット検出手段として用いている（Cas12 処理した標識化増幅産物を、LF ストリップに滴下し泳動し可視化する）。
  US2018/0373921 で Di Carlo らは LAMP 法等と液滴を組み合わせたターゲット検出手段について、ABATE らは WO2016126865 として多重エマルジョン核酸増幅法による核酸増幅産物の検出、定量化について、ZHAO ら WO2015048173 として、マイクロ流路を用いたマイクロ液滴でのターゲット分子検出システムの技術を出願している。5 件は、いずれもターゲット検出核酸技術であり検出ターゲットの特異的増幅手段として、検出の前処理ステップで LAMP 法を用いるもの

であった。

MAMMOTH BIOSCIENCES INC (US)による出願件数は 1 件で、レポーター核酸の切断により生成される信号を測定する測定装置であって、検出対象核酸の増幅を行う際の増幅方法として LAMP 法の使用が想定されている。これが DETECTR 法を使用した検出装置の基礎特許と推測される。

3. まとめ

上記の調査で話題に挙がった DETECTR と SHERLOCK について簡単に解説します。



図：DETECTR,SHERLOCK の反応機序
（https://blog.addgene.org/finding-nucleic-acids-with-sherlock-and-detectr から引用、加筆）

図示の通り、DETECTR 法で用いられる Cas12a は 2 本鎖 DNA に対し配列特異的に結合し結合後に副次的な（collateral）反応として、ssDNA を非選択的に分解する活性を持ちます。この活性を利用し、消光状態の（collateral 反応での切断により発光する）ssDNA をレポーターとして添加することにより Cas12a の標的となる DNA の検出を行うものです。反応前にターゲット核酸を特異的に増幅する処理をすることでより高感度化が可能です。

一方 SHERLOCK 法で用いられる Cas13a は、RNA を配列特異的に認識し結合します。その際に副次的な（collateral）反応として RNA を非選択的に分解する活性を持ちます。この活性を利用し消光状態の（collateral 反応での切断により発光する）ssRNA をレポータ

ーとして Cas13a の反応時に同時添加することにより Cas13a の標的となる RNA の検出を行います。Cas13a を反応させる前段階でサンプルを逆転写、増幅し、その後 T7RNA ポリメラーゼなどにより RNA 合成を行うことにより高感度化が可能です。また DNA についても増幅後、RNA 合成を行うことで高感度な検出が可能です。

上記 2 つのシステムは Cas 蛋白による「副次的な一本鎖核酸の切断反応」の発見に基づいています。とてもシンプルではありますが特異性は高く、ターゲット核酸さえ十分量あれば、大掛かりな装置が必要なくターゲットの有無を目視で確認できてしまう、という点で、既に実績ある等温増幅方法の LAMP と相性がよいと言えます。実際、ポイントオブケア診断を目指した 2 つのシステムを利用した SARS-CoV-2 検出キットはいずれも LFA ペーパーとチューブのみで構成されていて、まさに LAMP と CRISPR の合わせ技による理想的な診断キットといえます。

98 年栄研発の LAMP 技術が、2010 年代にゲノム編集：CRISPR システムと出会い更に進化を遂げたことでポイントオブケア診断薬として評価をうけ、さらにこれが SARS-CoV-2 パンデミックという人類の危機を背景に MIT 発、UC 発の「装置のいらない高感度診断技術」として活躍することになるとは、とても感慨深いものがありました。また、今回は母集団内の技術内容について詳細は閲覧していないので確かな事は言えませんが、CRISPR 以外の系と LAMP を組み合わせた、まだ世の中に登場していない優れた診断方法が母集団内に含まれている可能性も十分考えられます。

今回、特許分析を通じて LAMP 法を様々な形で利用し、権利化を試みている主要なプレイヤーをざっと眺めることができました。
この中で、中国勢では LAMP を「主題として」開発する企業は CAPITALBIOTECH を除いては特に見いだされなかったものの「LAMP を利用した技術開発」については出願件数が非常に多く、他の分野の例に漏れず中国の勢いを感じました。LAMP の基本特許の存続期間満了も相まって、これからもこの傾向は続くと思います。

過去の SARS, MERS, 新型インフルエンザ、そして今回の SARS-CoV-2 パンデミックを通じてさらに重要性が認識される LAMP 法ですが、今後 LAMP 自体の改良法や、LAMP と他の反応を組み合わせたものなど、さらなる技術発展の可能性に期待したいところです。

以上