

# 新規に保険収載された検査法 LAMP法による結核菌群核酸検出検査、マイコプラズマ 核酸検出検査、レジオネラ核酸検出検査について

たかのひろし  
高野弘  
Hiroshi TAKANO

## はじめに

栄研化学オリジナルの遺伝子増幅技術である Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法<sup>1,2)</sup>を用いたマイコプラズマ P 検出試薬キット、レジオネラ検出試薬キット、結核菌群検出試薬キットが2011年10月1日付で保険適用が開始された。

この新規に保険収載された LAMP 法による検査法について概説する。

なお、LAMP 法の原理については栄研化学のゲノムサイト (<http://loopamp.eiken.co.jp/>) を参照されたい。

## I. 結核菌群核酸検出 (区分番号 ; D023-6、410 点)

この検査を行うための LAMP 法の試薬キットは Loopamp<sup>®</sup> 結核菌群検出試薬キットである (写真1)。この試薬キットは2011年4月18日付で厚生労働省より体外診断用医薬品として製造販売承認を取得

した (同年6月1日より発売)。

本製品は、LAMP 法を測定原理とし、検出感度を上げるため結核菌群ゲノム DNA の DNA gyrase subunit B および Insertion sequence IS6110 領域内に LAMP 法用のプライマーを2セット設計している。反応チューブの蓋に乾燥・保持されている結核菌群特異的プライマーを含む結核菌群検出用乾燥試薬 (写真2) と、別売の Loopamp PURE DNA 抽出キット (写真3) を用いてヒト由来検体 (喀痰) 中から DNA 抽出したサンプル溶液を反応チューブ内で



写真2 結核菌群検出用乾燥試薬



写真1 Loopamp<sup>®</sup> 結核菌群検出試薬キット



写真3 Loopamp PURE DNA 抽出キット

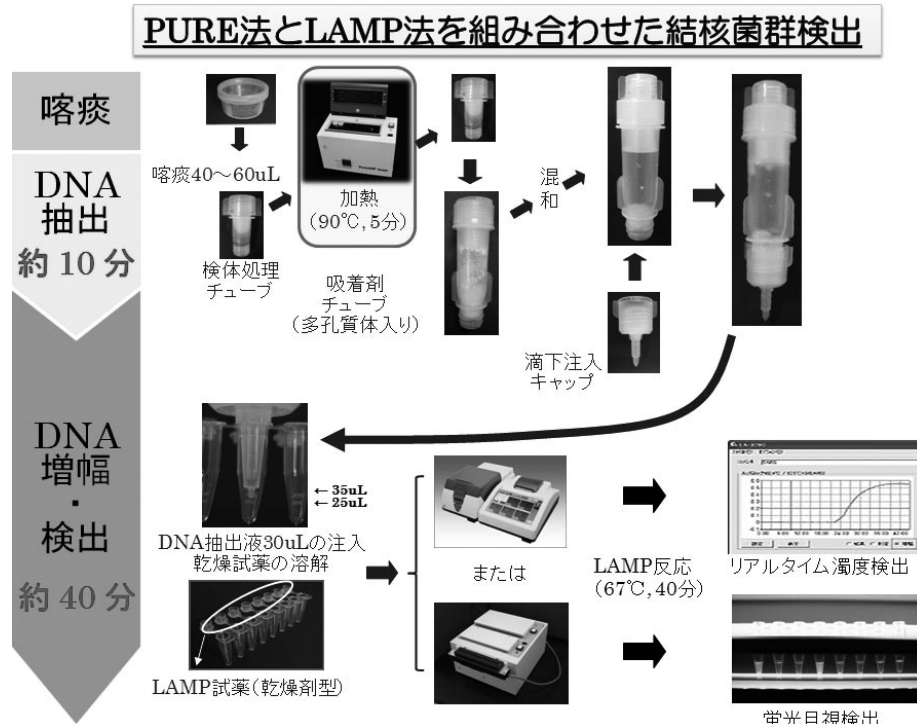


図1 LAMP法による結核菌群核酸検出検査手順概略

混合溶解する。その後67.0℃でインキュベートすることで、サンプル溶液中の結核菌群DNAから鎖置換型DNA合成酵素により増幅反応が進行する。核酸増幅の検出は、反応副産物であるピロリン酸マグネシウム（白色沈殿物質）の濁度を測定するか、紫外線照射装置を用いた蛍光目視で行う。

### 1. 検査手順

検査手順の概略を図1に示す。まず、膿性部分が存在する良質な咳痰、もしくは前処理した咳痰40～60μLを採取する。また、陰性コントロールMTB40～60μLを採取する。咳痰の採取は粘性のある咳痰もあるため通常、容易ではないが、粘性のある咳痰約200検体を用いて新規開発したチップを用いることでかなり容易に採取できる（ピペット-60セットとして発売、写真4）。

別売のLoopamp PURE DNA抽出キットを用いた抽出手順の概略を図2に示すが、まず咳痰を検体処理チューブに入れ、専用のPureLAMP heaterにて90℃、5分間加熱する。加熱後、検体処理チューブと吸着剤チューブを接合し、検体処理チューブ内の処理液を吸着剤チューブに移して吸着剤と混和させ、阻害成分を吸着させる。その後吸着剤チューブに滴下キャップを付けて、阻害成分の除かれたDNA

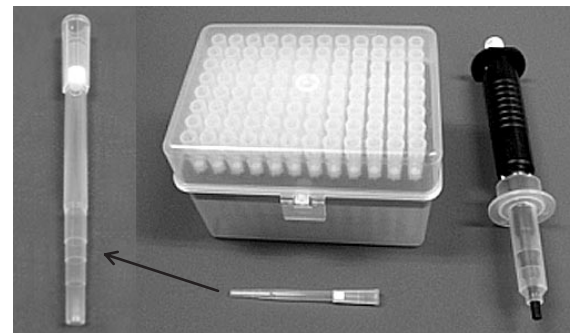


写真4 ピペット-60セット

抽出液を反応チューブに30μL添加する（サンプル溶液）。陰性コントロールも同様に処理する。また陽性コントロールは検出試薬キット添付のスポイトを用いて反応チューブに30μL直接添加する。サンプル溶液、またはコントロールを滴下した反応チューブを転倒して溶液を蓋に移し、転倒した状態のまま2分間放置する。そして5回転倒混和し、スピンドアウンする。

LAMP法専用リアルタイム濁度測定装置の反応ブロックに反応チューブをセットし、装置の操作法に従って反応を開始し、濁度測定（67.0℃、40分間）および判定を行う。また、蛍光目視検出を行う場合は紫外線照射装置を用いて増幅反応後の反応チューブ底面より紫外線を照射して、反応チューブ側面より

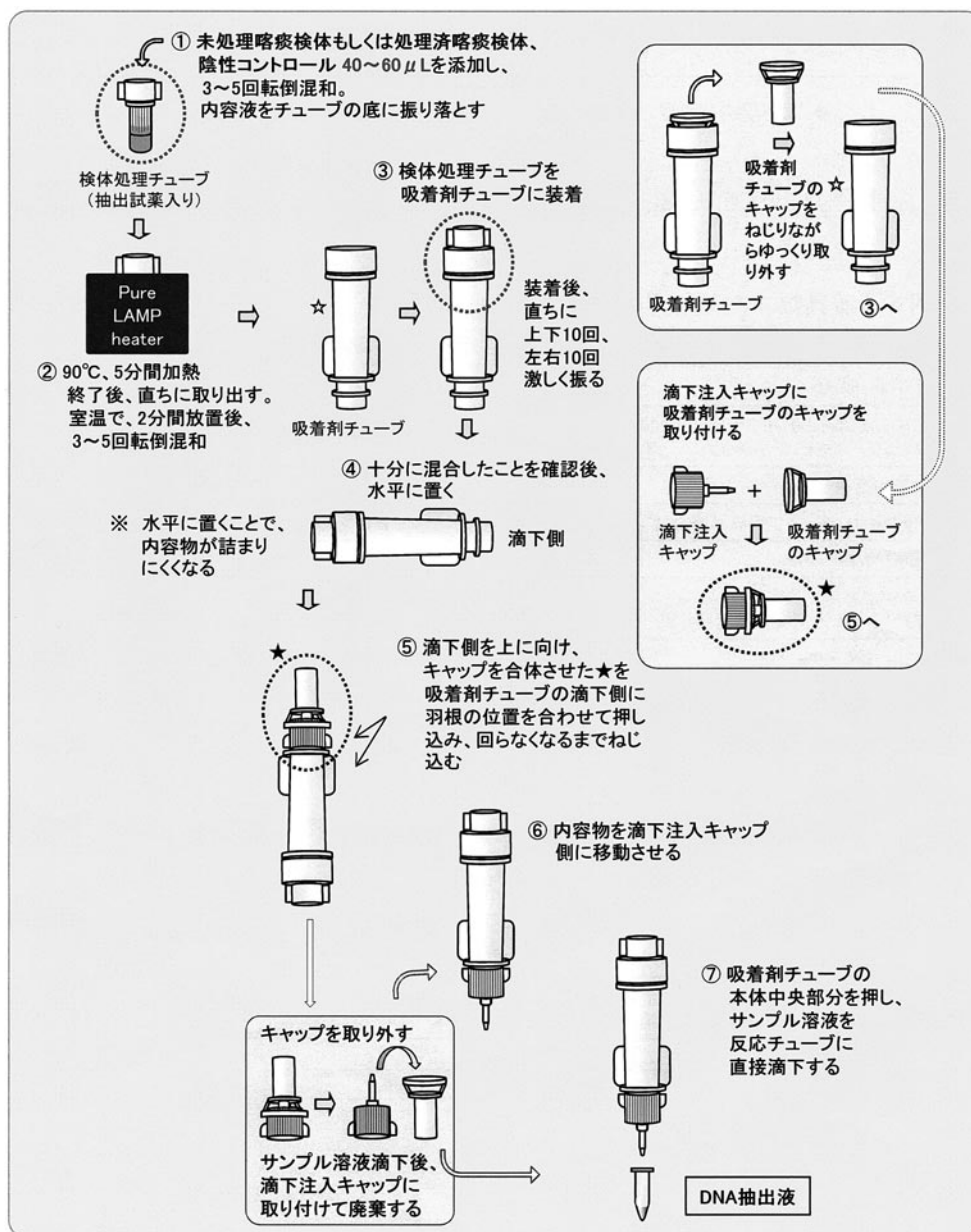


図 2 PURE DNA 抽出キット操作概略

目を眼鏡等で保護した状態で観察して行う。

注：検査手順の詳細は製品の添付文書参照。

## 2. 特徴・有用性

結核患者の早期発見、早期治療は、患者が重症化し排菌量が増加する可能性に加え、周囲の人々の感染の機会をも増加させる危険性があるため、非常に重要である。

塗抹検査は短時間で結果が得られるが、手技に熟練を要し、感度が低い。分離培養検査の感度は高いが、結果を得るまでに 6~8 週間を要する。一方、遺伝子検査は高感度で、検査に要する時間も分離培

養検査に比べ短い。検体前処理、コスト、専用設備を必要とする等の問題から、検査センターに検査を依頼することも多く、通常 2~3 日の所要時間を要する。

Loopamp<sup>®</sup> 結核菌群検出試薬キットは、LAMP 反応試薬を乾燥試薬化することで試薬調製ステップが簡略化され、簡易抽出法の採用によって、検体前処理・抽出操作についても簡易、迅速化が図られていることから、医療機関で実施可能なレベルの試薬キットである。Loopamp<sup>®</sup> 結核菌群検出試薬キットの最大の特徴は、NALC-NaOH 等で前処理した喀痰のみならず、未処理の喀痰から直接結核菌群の検出

表1 結核症の診断に関する LAMP キットおよび他の核酸増幅法の精度<sup>4)</sup>

Test		Patients diagnosed (N=160)			Sensitivity for TB diagnosis (% : 95%CI)	Specificity for TB diagnosis (% : 95%CI)
		TB	MOTT	Other disease		
Direct LAMP	Positive	112	0	2	88.2	93.9
	Negative	15	18	13	(81.4-92.7)	(80.4-98.3)
Indirect LAMP	Positive	106	0	0	83.5	100
	Negative	21	18	15	(76.0-88.9)	
Cobas AmpliCor MTB	Positive	115	1	1	90.6	93.9
	Negative	12	17	14	(84.2-94.5)	(80.4-98.3)
TRC Rapid MTB	Positive	114	0	1	89.8	97.0
	Negative	13	18	14	(83.3-93.9)	(84.7-99.5)

が可能であることで、この場合、検体採取から1時間以内で判定結果を得ることができる。従来の遺伝子検査法との一致率は高く、表1に示すとおり良好な結果が得られている<sup>3,4)</sup>。2日間検査のうち、一度でも結核菌群が検出された場合を症例として結核と診断した時、未処理喀痰からの直接結核菌群の検出（未処理喀痰の PURE/LAMP）では診断感度が88.2%（112/127）、診断特異度が93.9%（31/33）であった。またNALC-NaOH処理済喀痰からの結核菌群の検出（処理済喀痰の PURE/LAMP）では診断感度が83.5%（106/127）、診断特異度が100.0%（33/33）であった。

Loopamp<sup>®</sup>結核菌群検出試薬キットにより、結核病棟を有する専門医療機関から一般の医療機関までの幅広い施設において、遺伝子検査による結核菌群の検出が行えることで、結核菌群感染の迅速診断が可能となり、患者の早期発見、さらには感染拡大防止に貢献できるものと考えられる。

## II. マイコプラズマ核酸検出

(区分番号； D023-4、300点)

この検査を行うためのLAMP法の試薬キットはLoopamp<sup>®</sup>マイコプラズマP検出試薬キットである(写真5)。この試薬キットは2010年5月24日付けで厚生労働省より体外診断用医薬品として製造販売承認を取得した(同年7月14日より発売)。

この試薬キットは、等温で核酸増幅反応が進行するLAMP法を測定原理とし、*M. pneumoniae*の宿主細胞への吸着に参与する遺伝子領域に含まれる繰り返し配列であるSDC1遺伝子の一部にLAMP法用のプライマーを設計してある。この*M. pneumoniae*特異的プライマー、ヒト由来検体(咽頭拭い液(鼻

写真5 Loopamp<sup>®</sup>マイコプラズマP検出試薬キット

咽頭拭い液を含む)または喀痰)中からDNA抽出したサンプル溶液、デオキシヌクレオチド3リン酸と鎖置換型DNA合成酵素を混合し65℃でインキュベートすることで、サンプル溶液中の*M. pneumoniae* DNAから増幅反応が進行する。核酸増幅の検出は、反応副産物であるピロリン酸マグネシウム(白色沈殿物質)による濁度を測定することにより行う。

### 1. 検査手順

- a. 試験材料(咽頭拭い液：1,000 $\mu$ L、喀痰：100 $\mu$ L)を用意し、DNA分離用試薬を使用してDNA抽出液(約40～50 $\mu$ L)を得てサンプル溶液とする(氷上保冷)。その少量(10 $\mu$ L程度)を採取し、95℃、5分間加熱し、氷上で急冷(加熱変性)後、スピンドウンを行う(氷上保冷)。
- b. 別途用意したマスターミックス調製用滅菌チューブにリアクションミックスMycP1テストあたり20 $\mu$ Lと鎖置換型DNA合成酵素1テストあたり1 $\mu$ Lをそれぞれ必要な検体数分および陽性、陰性コントロール分をあわせて分注し、マスターミックスとする(氷上保冷)。
- c. Loopamp反応チューブにそれぞれマスターミッ

表2 咽頭拭い液と喀痰材料を用いた *M. pneumoniae* の LAMP法と培養法の比較成績<sup>6)</sup>

		LAMP法					
		1) 咽頭拭い液			2) 喀痰		
		+	-	計	+	-	計
培養法	+	59	1	60	16	1	17
	-	8	136	144	1	97	98
	計	67	137	204	17	98	115

表3 *M. pneumoniae* の LAMP法および抗体価測定と培養法の比較成績<sup>6)</sup>

		1) LAMP法			2) 抗マイコプラズマ抗体価		
		+	-	計	+	-	計
培養法	+	59	1	60	55	5	60
	-	9	138	147	12	135	147
	計	68	139	207	67	140	207

クスを20 $\mu$ L分注する。サンプル溶液、またはコントロールをそれぞれ5 $\mu$ L添加する。LAMP法専用リアルタイム濁度測定装置のプログラムをLoopamp<sup>®</sup>マイコプラズマP検出試薬キットにあわせて設定する。濁度測定装置の操作法に従い、装置の反応ブロックにチューブをセットして濁度測定(65 $^{\circ}$ C, 60分間)および判定を行う。判定は陽性コントロールで濁度が上昇し、陰性コントロールで濁度が上昇していないことを確認した上で、各検体の濁度の上昇が認められた場合を「陽性」、濁度の上昇がみられない場合を「陰性」とする。

注：検査手順の詳細は製品の添付文書参照。

## 2. 特徴・有用性

非定型肺炎の中で、*Mycoplasma pneumoniae*によるマイコプラズマ肺炎は頻度が高く、治療法が確立されているにもかかわらず、その診断は臨床症状だけでは困難であり、病原体の検出あるいは病原体に対する抗体の検出が利用されている。しかし、既存の方法では、治療後にしか結果が得られず、診断結果を早期に治療に反映できないため、診療現場ではエンピリック治療を行わざるを得ない状況にある。

Loopamp<sup>®</sup>マイコプラズマP検出試薬キットは、LAMP法によって検体中のマイコプラズマ遺伝子を検出するもので、検体採取から判定まで2時間以内に終了し、*M. pneumoniae*のみを特異的に検出することが可能である<sup>5)</sup>。Loopamp<sup>®</sup>マイコプラズマP検出試薬キットは培養法と高い一致率を示してお

表4 *M. pneumoniae* の LAMP法と臨床診断\*の比較成績

		LAMP法		
		+	-	計
培養法	+	68	8	76
	-	0	131	131
	計	68	139	207

\*臨床診断：患者所見の他、培養法やマイコプラズマ抗体価、CRP値など炎症マーカーの測定値等から総合的に判定したもの  
(添付文書データより)

り(表2、3)<sup>6)</sup>、臨床診断(患者所見の他、培養法やマイコプラズマ抗体価、CRP値など炎症マーカーの測定値等から総合的に判定したもの)に対する診断感度は89.5%(68/76)、診断特異度は100.0%(131/131)である<sup>7)</sup>。本製品はマイコプラズマ肺炎の発症早期の段階において、マイコプラズマを簡便・迅速に検出できることで、適切な治療方針を立て、エンピリック治療からマイコプラズマ感染に対する抗菌薬への速やかな切り替えが可能となる。

## Ⅲ. レジオネラ核酸検出 (区分番号；D023-4、300点)

この検査を行うためのLAMP法の試薬キットはLoopamp<sup>®</sup>レジオネラ検出試薬キットCである(写真6)。この試薬キットは2010年5月24日付けで厚生労働省より体外診断用医薬品として製造販売承認を取得した(同年7月14日より発売)。

本製品は、等温で核酸増幅反応が進行するLAMP法を測定原理とし、レジオネラの16SrRNA遺伝子の特異的な領域にLAMP法用のプライマーを設計



写真6 Loopamp® レジオネラ検出試薬キット C

してある。このレジオネラ特異的プライマー、ヒト由来検体（喀痰）中から DNA 抽出したサンプル溶液、デオキシヌクレオチド 3 リン酸と鎖置換型 DNA 合成酵素を混合し 65℃ でインキュベートすることで、サンプル溶液中のレジオネラ DNA から増幅反応が進行する。核酸増幅の検出は、反応副産物であるピロリン酸マグネシウム（白色沈殿物質）による濁度を測定することにより行う。

## 1. 検査手順

- a. 試験材料（喀痰：100 $\mu$ L）を用意し、DNA 分離用試薬を使用して DNA 抽出液（約 40～50 $\mu$ L）を得てサンプル溶液とする（氷上保冷）。その少量（10 $\mu$ L 程度）を採取し、95℃、5 分間加熱し、氷上で急冷（加熱変性）後、スピンドウンを行う（氷上保冷）。
- b. 別途用意したマスターミックス調製用滅菌チューブにリアクションミックス LegC 1 テストあたり 20 $\mu$ L と鎖置換型 DNA 合成酵素 1 テストあたり 1 $\mu$ L をそれぞれ必要な検体数分および陽性、陰性コントロール分をあわせて分注し、マスターミックスとする（氷上保冷）。
- c. Loopamp 反応チューブにそれぞれマスターミックスを 20 $\mu$ L 分注する。サンプル溶液、またはコントロールをそれぞれ 5 $\mu$ L 添加する。LAMP 法専用リアルタイム濁度測定装置のプログラムを Loopamp® レジオネラ検出試薬キットにあわせて設定する。濁度測定装置の操作法に従い、装置の反応ブロックにチューブをセットして濁度測定（65℃、60 分間）および判定を行う。判定は陽性コントロールで濁度が上昇し、陰性コントロールで濁度が上昇していないことを確認した上で、

各検体の濁度の上昇が認められた場合を「陽性」、濁度の上昇がみられない場合を「陰性」とする。

注：検査手順の詳細は製品の添付文書参照。

## 2. 特徴・有用性

レジオネラ感染は、 $\beta$ -ラクタム剤の投与が無効で症状の進行が早く重症化しやすいことから、早期に有効な治療が行われない場合には、予後が悪く致死率が高いため、早期診断が極めて重要である。

レジオネラ肺炎は典型的な臨床像を示すことが少なく、診断には尿中抗原検査が主に利用されている。この尿中抗原検査はレジオネラ肺炎起炎菌の半数程度を占める *Legionella pneumophila* 血清群 I を検出するが、その感度は十分とは言えず、また血清群 I 以外のレジオネラ属菌を検出することが困難なため、結果としてレジオネラ肺炎患者の約半数を見逃していると推定される。

Loopamp® レジオネラ検出試薬キット C は検体採取から判定まで 2 時間以内に終了し、*L. pneumophila* 血清群 I に加えて尿中抗原検査では検出困難な同血清群 I 以外の血清群および病原性を示すことが知られている 40 種以上のレジオネラ属菌種の殆ど全てを検出する<sup>8)</sup>。Loopamp® レジオネラ検出試薬キットは培養法と高い一致率を示しており（表 5、6）<sup>6)</sup>、臨床診断（患者所見の他、培養法や尿中抗原測定法、CRP 値など炎症マーカーの測定値等から総合的に判定したもの）に対する診断感度は 91.3%（21/23）、診断特異度は 100.0%（112/112）である<sup>9)</sup>。本製品は従来法では見逃していたレジオネラ肺炎を治療開始早期の段階で検出できることから、緊急性を要するレジオネラ肺炎の診療において的確な治療方針を立

表 5 *Legionella* spp. の LAMP 法と培養法の比較成績<sup>6)</sup>

		LAMP 法		
		+	-	計
培養法	+	22	1	23
	-	1	114	115
	計	23	115	138

表 6 *Legionella* spp. の LAMP 法と尿中抗原の比較成績<sup>6)</sup>

		LAMP 法		
		+	-	計
尿中抗原	+	13	0	13
	-	8	114	122
	計	21	114	135

表7 *Legionella* spp. の LAMP 法と臨床診断\*の比較成績

		LAMP 法		
		+	-	計
臨床診断	+	21	2	23
	-	0	112	112
	計	21	114	135

\*臨床診断；患者所見の他、培養法や尿中抗原測定法、CRP 値など炎症マーカーの測定値等から総合的に判定したもの

(添付文書データより)

てるのに役立ち、追加検査の削減、エンピリック治療による効果のない抗菌薬の長期投与の低減、患者の延命、予後の QOL 向上のために有用である。

注；区分番号、点数は平成 24 年度診療報酬改定に基づく。

## 文 献

1) Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al.. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* **28**

: E63, 2000

2) 高野 弘. LAMP 法の原理・特徴と遺伝子検査簡易化への取り組み. *都臨技会誌* **39**: 221-228, 2011.

3) 御手洗 聡. LAMP 法を使った結核迅速診断キット. *複十字* **339**: 11-13, 2011

4) Mitarai S, Okumura M, Toyota E, et al. Evaluation of a simple loop-mediated isothermal amplification test kit for the diagnosis of tuberculosis. *INT J TUBERC LUNG DIS* **15** (9): 1211-1217, 2011

5) 吉野 学, 安中 敏光, 小島 禎, 池戸 正成. LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法による *Mycoplasma pneumoniae* の高感度迅速検出. *感染症学会誌* **82**: 168-176, 2008

6) 山口恵三, 舘田一博, 中森祥隆, 他. LAMP 法を用いた *Mycoplasma pneumoniae* と *Legionella* spp. による呼吸器感染症の迅速診断薬の評価. *医学と薬学* **58**: 565-571, 2007

7) Loopamp<sup>®</sup>マイコプラズマ P 検出試薬キット添付文書

8) 安中敏光. LAMP 法による *Legionella* 属菌の検出. *JAR-MAM* **14**: 25-30, 2003

9) Loopamp<sup>®</sup>レジオネラ検出試薬キット C 添付文書