



医学検査のあゆみ-23

LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法の原理と応用

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP); Principle and applications.

たかの ひろし さかい えい いち ささき やす はる
高野 弘：酒井 栄一：佐々木 泰治
Hiroshi TAKANO Eiichi SAKAI Yasuharu SASAKI

はじめに

LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification : ループ介在等温増幅) 法は、栄研化学が独自に開発した国産の遺伝子増幅技術です。1980 年代 PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 法の登場により、栄研化学は臨床検査分野において遺伝子診断は重要かつ不可欠な検査になると考え、研究所においてその根幹となる遺伝子増幅技術の新規開発に取り組みました。そして、試行錯誤の末、60℃ 付近で働く鎖置換型 DNA 合成酵素と、自己の配列を鋳型とする連続的な DNA 伸長反応のために工夫されたプライマーの利用による、新しい遺伝子増幅技術 LAMP 法の開発に至りました¹⁾。

栄研化学は、この LAMP 法を広く普及させるため 2000 年 5 月に技術公開し、その技術の斬新さと実現の可能性を示すため、2002 年 3 月に第一号製品である牛胚性判別試薬キット^{2,3)}を発売しました。この試薬を発売してからすでに 10 年以上を経過する中で、さまざまな国の多くの研究者が LAMP 法の特徴を活かして、多様な分野での応用を図っています。

本稿では、LAMP 法について原理および特徴、そして各分野における LAMP 法の応用例、新規周辺技術の開発についてご紹介します。

I. LAMP 法の原理と特徴

LAMP 法は、図 1 に示すとおり標的遺伝子の 6 箇所の領域に対して 4 種類のプライマーを設計し、

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ます。対象遺伝子を DNA とした場合、サンプルとなる遺伝子、プライマー、鎖置換型 DNA 合成酵素、基質等を一緒に、一定温度 (60 ~ 65℃ 付近) で保温することにより、遺伝子の増幅反応から検出までを 1 ステップの工程で行うことができます。対象遺伝子を RNA とした場合には、逆転写酵素を試薬に最初から追加することで、DNA と同様に 1 ステップで増幅・検出を行うことができます (RT-LAMP 法)。

LAMP 法では標的遺伝子について、3' 末端側から F3c、F2c、F1c という 3 つの領域を、5' 末端側で B1、B2、B3 という領域を規定し、この 6 領域に対し、4 種類のプライマー (FIP、F3 プライマー、BIP、B3 プライマー) を設計します。FIP は標的遺伝子の F2c 領域と相補的な F2 領域を 3' 末端側に持ち、5' 末端側に標的遺伝子の F1c 領域と同じ配列を持つように設計し、F3 プライマーは標的遺伝子の F3c 領域と相補的な F3 領域を持つように設計します。逆鎖側の BIP、B3 プライマーも同様に設計します (図 1)。最適なプライマー設計が LAMP 法による

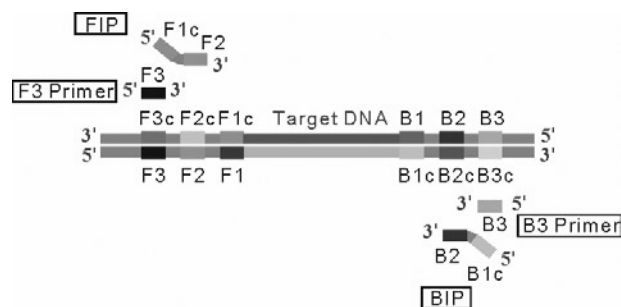


図 1 LAMP 法のプライマー設計領域

増幅を成功させる必要不可欠な条件ですが、栄研化学では富士通株式会社と共同で、PrimerExplorer®という LAMP 法専用のプライマー設計支援ソフトを、無償で利用できるよう Web 上でサービスを提供しています (<http://primerexplorer.jp/>)。

上記 4 種類のプライマーを含む試薬を 60 ～ 65℃ の一定温度で反応させることで、鋳型 DNA の 3' 末端部分にループ構造を作らせ、自己アニールによる 3' 末端からの自己を鋳型とした DNA 合成反応が可能となります (図 2a, b)。形成されたループ構造にもプライマーがアニール可能で、3' 末端を起点とした DNA 合成反応が生じます。その結果、両端にループ

を持ったダンベル様構造をした一本鎖 DNA が生成され、この構造が LAMP 法増幅サイクルの起点構造となります (図 2a (8))。次のステップとして、ダンベル構造の 3' 末端側の一本鎖ループ部分に FIP がアニールして、先の反応で合成された二本鎖を剥がしながら DNA の伸長・合成反応が進み、新たに一本鎖部分の 3' 末端側にループ構造を作り出し、自己を鋳型とする鎖置換型 DNA 合成反応により両端に一本鎖ループ部分をもつダンベル構造の裏返し構造 (図 2b (11)) ができます。そして、この図 2b (11) の構造から (8) の構造が作り出され、増幅サイクルが回り出します。この増幅サイクルの結果、両端に

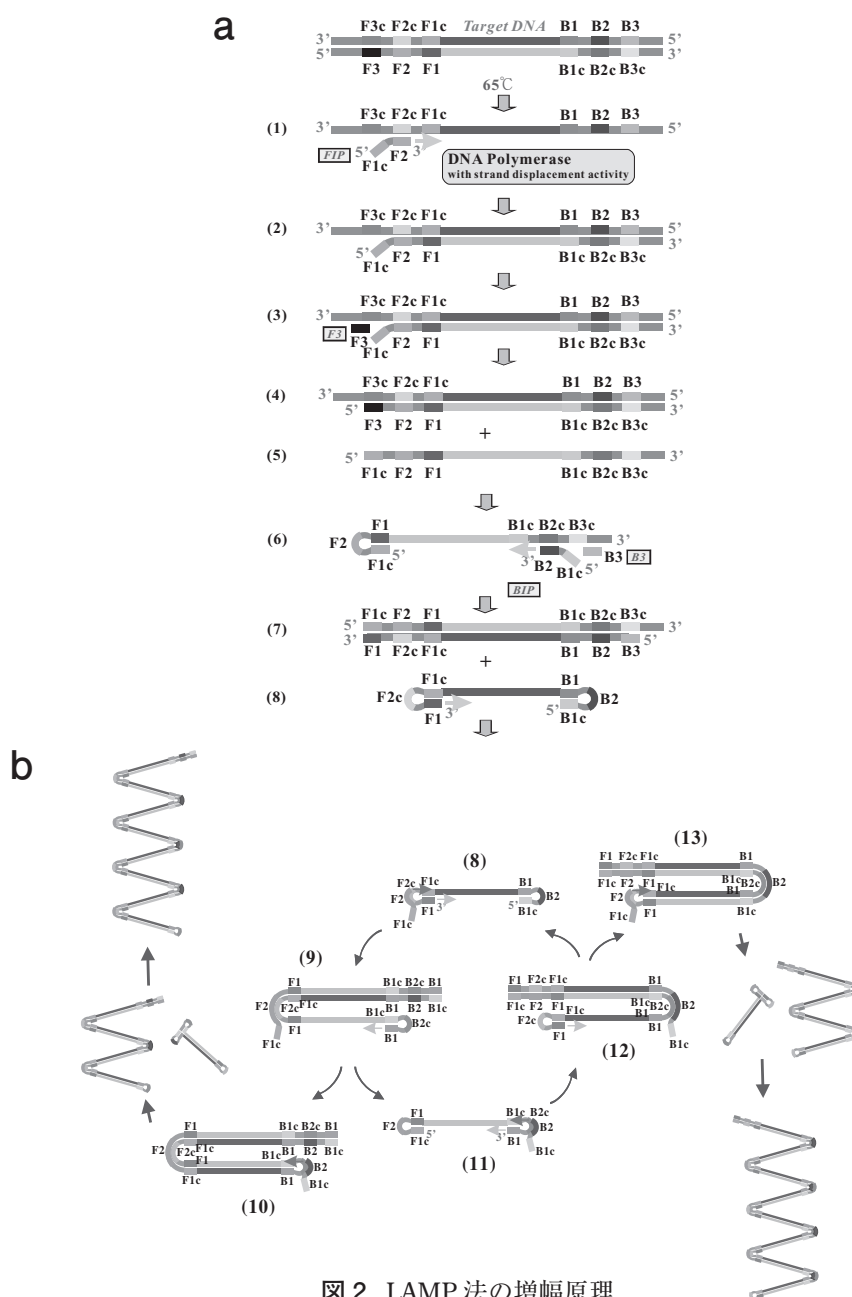


図 2 LAMP 法の増幅原理

ループを持ったダンベル様構造の増幅産物や、互いに相補的な配列が交互に繰り返された増幅産物がいろいろなサイズで生成されます。この増幅サイクルは、理論上、基質またはプライマーがすべて消費されるまで続きます。詳細は原理の動画も視聴可能な Eiken GENOME SITE (<http://loopamp.eiken.co.jp>) を参照してください。

II. LAMP 法の特徴

LAMP 法は以下の特徴を有しています。

- 1) 鋳型 2 本鎖 DNA の 1 本鎖への変性ステップを含めて増幅、検出のすべての反応を等温で行うことができる簡易な反応系です。
- 2) 増幅反応は連続的に速やかに進行するため増幅効率が高く、微量の遺伝子を短時間に検出できる迅速な反応系です。更にループプライマー (Loop primer; 図 3) というプライマーを追加設計することで、増幅時間をより短縮させることが可能です⁴⁾。
- 3) 4 つのプライマーを使用して 6 つの領域を認識させることから、極めて高い特異性を有しています。原理的には設定した 6 つの領域がその順番に並んでいないと増幅反応が起こりません。増幅産物はすべて標的遺伝子となるため、増幅の有無により標的遺伝子の検出が可能となります。更に高い増幅効率のため増幅産物が桁外れに大量に産生され、蛍光インターカレーター、あるいは副生成物ピロリン酸マグネシウムの白濁を利用することで、目視検出が可能です⁵⁾ (図 4)。
- 4) 特別な検出機器、試薬を用いなくても標的遺伝子配列の増幅の有無を確認できます。
- 5) 増幅産物は同一鎖上で互いに逆向きの配列が連結した繰り返し構造です。

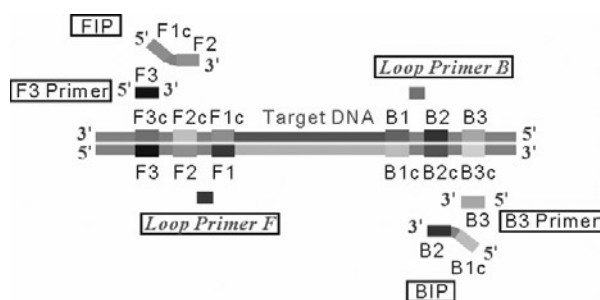


図 3 ループプライマーの設計領域

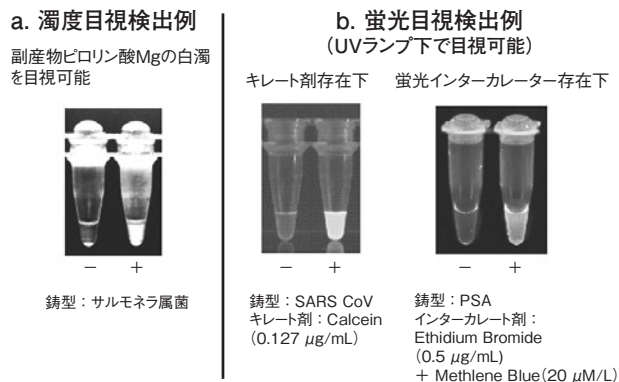


図 4 LAMP 法における目視検出例

- 6) 検出までを 1 ステップで行うことができる簡易な遺伝子検査が可能です。鋳型が RNA でも逆転写酵素を添加することにより、1 ステップ、一定温度で増幅が可能です。
- 7) 増幅反応が強く、阻害物質の影響を受け難いため、核酸抽出の簡易化が可能です。

III. LAMP 法の応用

PubMed で検索される LAMP 法関連論文数は 2013 年 12 月末現在で 1100 以上となります (図 5)。近年は、日本以外の海外研究者が LAMP 法の特徴を活かした遺伝子検査技術を多様な分野に応用しています。特にここ 3 年間は中国人研究者の論文が最も多いようです。これまでの論文内容を分野別に分類してみると、図 6 に示すとおり医療分野が約 40% を占めていますが、畜産、水産、食品、植物、環境など多岐に渡ります。

誌面の都合上、すべてをご紹介することはできませんが、LAMP 法の特徴を活かした応用例を以下にご紹介します。

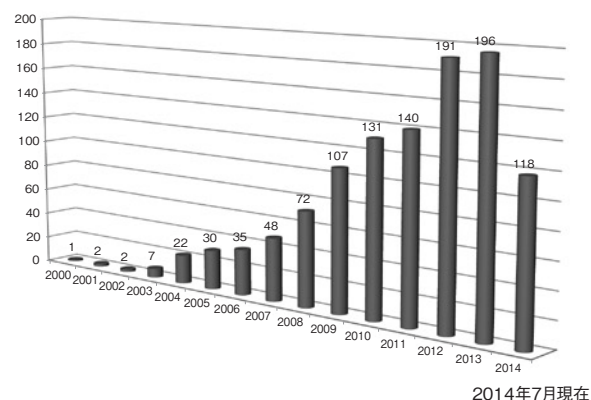


図 5 PubMed で検索される LAMP 法関連論文数の推移

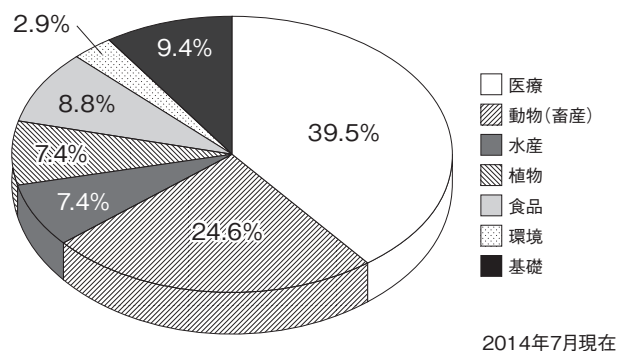


図6 PubMedで検索されるLAMP法関連論文内容の内訳

1. 医療分野での応用例

医療分野への応用として、まずLAMP法の簡易性、迅速性という特長を活かした感染症、特に新興、再興感染症への応用があげられます。新興感染症の定義は「かつては知られていなかった、この20年間に新しく認識された感染症で、局地的に、あるいは国際的に公衆衛生上の問題となる感染症」(WHO)ですが、その1つが2002年11月中国広東省における重篤な非定型肺炎の流行に端を発し、世界的規模で流行したSARSコロナウイルスです。LAMP法はこのSARSコロナウイルス検出に応用され^{6~9)}、本邦においては検出キットが体外診断用医薬品として厚労省より承認されています。表1に示すとおり、

表1 新興感染症、再興感染症へのLAMP法の応用

	疾患	病原体	主なLAMP応用例報告
新興感染症	SARS(重症急性呼吸器症候群)	SARSコロナウイルス	Poon LL, et al. 2004 ⁶⁾ , Hong TC, et al. 2004 ⁷⁾ , 田口文広 他 2004 ⁸⁾ , 田代真人 2004 ⁹⁾
	鳥インフルエンザ	H5N1亜型、H7N9亜型インフルエンザウイルス	Imai M, et al. 2006 ¹⁰⁾ , Imai M, et al. 2007 ¹¹⁾ , Imai K, et al. 2007 ¹²⁾ , Jayawardena S, et al. 2007 ¹³⁾ , Yoshida H, et al. 2011 ¹⁴⁾ , 国立感染症研究所インフルエンザ研究センター 2013 ¹⁵⁾
	ウエストナイル熱	ウエストナイルウイルス	Parida M, et al. 2004 ¹⁶⁾ , Shukla J, et al. 2012 ¹⁷⁾
	エボラ出血熱	エボラウイルス	Kurosaki Y, et al. 2007 ¹⁸⁾
	クリプトスポリジウム症	クリプトスポリジウム	Karanis P, et al. 2007 ¹⁹⁾ , Bakheit MA, et al. 2008 ²⁰⁾ , Inomata A, et al. 2009 ²¹⁾
	クリミア・コンゴ出血熱	クリミア・コンゴ出血熱ウイルス	Osman HA, et al. 2013 ²²⁾
	後天性免疫不全症候群(HIV)	ヒト免疫不全ウイルス(HIV)	Curtis KA, et al. 2008 ²³⁾ , Hosaka N, et al. 2009 ²⁴⁾
	重症熱性血小板減少症候群	重症熱性血小板減少症候群ウイルス	Yang G, et al. 2012 ²⁵⁾ , Xu H, et al. 2013 ²⁶⁾
	腸管出血性大腸菌感染症	O26, O111, O157等のベロ毒素を産生する大腸菌	Hara-Kudo Y, et al. 2007 ^{27, 28)}
	ニパウイルス感染症	ニパウイルス	
	日本紅斑熱	日本紅斑熱リケッチア	
	バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌(VRSA)感染症	バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌(VRSA)	
	マールブルグ病	マールブルグウイルス	Kurosaki Y, et al. 2010 ²⁹⁾
	ラッサ熱	ラッサウイルス	
主な再興感染症	マラリア	マラリア原虫	Poon LL et al. 2006 ³⁰⁾ , Han ET, et al. 2007 ³¹⁾ , Polley SD, et al. 2010 ³²⁾ , Sirichaisinthop J, et al. 2011 ³³⁾ , Polley SD, et al. 2013 ³⁴⁾
	ペスト	ペスト菌	
	ジフテリア	ジフテリア菌	
	結核	結核菌	Iwamoto T, et al. 2003 ³⁵⁾ , Boehme CC, et al. 2007 ³⁶⁾ , Mitarai S, et al. 2011 ³⁷⁾
	百日咳	百日咳菌	Kamachi K, et al. 2006 ³⁸⁾
	サルモネラ感染症	サルモネラ(<i>Salmonella enterica</i>)	Hara-Kudo Y, et al. 2005 ³⁹⁾
	コレラ	コレラ菌	Yamazaki W, et al. 2008 ⁴⁰⁾ , Okada K, et al. 2010 ⁴¹⁾
	狂犬病	狂犬病ウイルス	Boldbaatar B, et al. 2009 ⁴²⁾ , Saitou Y, et al. 2010 ⁴³⁾
	デング熱	デングウイルス	Parida MM, et al. 2005 ⁴⁴⁾
	黄熱病	黄熱ウイルス	Kwallah Ao, 2013 ⁴⁵⁾
	インフルエンザ	インフルエンザウイルス	Poon LL, et al. 2005 ⁴⁶⁾ , Ito M, et al. 2006 ⁴⁷⁾ , 納富継宣 他 2009 ⁴⁸⁾ , Kubo T, et al. 2010 ⁴⁹⁾ , 重本直樹 他 2010 ⁵⁰⁾ , Nakauchi M, et al. 2011 ⁵¹⁾
	住血吸虫症 Schistosomiasis	ビルハルツ住血吸虫、インターカラーツム住血吸虫、日本住血吸虫、マンソン住血吸虫、メコン住血吸虫	Xu J, et al. 2010 ⁵²⁾
	トキソプラズマ症	トキソプラズマ(<i>Toxoplasma gondii</i>)	Sotiriadou I, et al. 2008 ⁵³⁾ , Krasteva D, et al. 2009 ⁵⁴⁾
	リーシュマニア症	リーシュマニア	Takagi H, et al. 2009 ⁵⁵⁾ , Adams ER, et al. 2010 ⁵⁶⁾
	エキノコックス症	エキノコックス	Salant H, et al. 2012 ⁵⁷⁾

(2014年7月現在)

この SARS コロナウイルスに限らず、主な新興感染症、再興感染症の病原体に対して LAMP 法の応用例があります^{6～57)}。

栄研化学では、この SARS コロナウイルス検出試薬を最初の体外診断用医薬品⁵⁸⁾として発売した後、H5 亜型インフルエンザウイルス^{10, 11, 47)}、H1pdm2009 インフルエンザウイルス^{50, 59～62)}、A 型インフルエンザウイルス^{50, 59～62)}、マイコプラズマ・ニューモニエ^{63～64, 66～70)}、レジオネラ属菌^{65～67)}、そして結核菌群を検出する試薬キット^{36, 67, 71～72)}を体外診断用医薬品として厚生労働省より承認を受け、発売しています。いずれもすべて保険適用になっています(表 2)。

また、栄研化学から LAMP 法特許を許諾された企業から、体外診断用医薬品として、摘出された乳癌、大腸癌又は胃癌所属リンパ節中の CK19 mRNA の検出(乳癌、大腸癌又は胃癌におけるリンパ節転移診断の補助に用いる)試薬(シスメックス社リノアンプ BC、OSNA 法)^{73, 74)}、LAMP 法と電流検出型 DNA チップ法を組み合わせた子宮頸部細胞中の 13

種高リスクヒトパピローマウイルス (HPV) ゲノムの検出と型判別(高リスク HPV 感染診断の補助に使用される)試薬(積水メディカル社クリニチップ® HPV)が製品化されています⁷⁵⁾。一方、海外においては、抗生物質の長期使用により下痢症や腸炎を引き起こし、院内感染を引き起こす菌として重要な *Clostridium difficile* や、A 群レンサ球菌、B 群レンサ球菌、マイコプラズマ、百日咳菌の検出試薬が製品化(Meridian Bioscience Inc.)されています^{76～80)}。

表 2 の他、栄研化学における医療分野の応用例としては、臨床研究用途の製品として百日咳菌検出試薬キット⁸¹⁾、単純ヘルペスウイルス (HSV-1/2) 検出試薬キット⁸²⁾が発売され、海外向け製品として、Loopamp™ *Trypanosoma brucei* Detection Kit⁸³⁾、Loopamp™ MALARIA Pan/Pf Detection Kit³¹⁾が製品化されています。また、一部 LAMP プライマーも臨床研究用として発売しています(表 3)。

更に、医療分野での LAMP 応用例としては、中山らによる麻疹、おたふく風邪、RSV、風疹に対す

表 2 医療分野への応用(体外診断用医薬品：栄研化学)

製品名	製造承認日	保険適用	剤型	核酸抽出	対象検体種	反応温度	反応時間	プライマー設計領域	参考文献
Loopamp® SARSコロナウイルス検出試薬キット	2003/12/18	有	液状試薬	QIAGEN法	糞便、鼻腔拭い液	62～63℃	45分	ゲノムRNAの Replicase 1B領域内	8, 9, 57)
Loopamp® H5亜型インフルエンザウイルス検出試薬キット	2008/9/19	有	液状試薬	QIAGEN法	咽頭拭い液	60～63℃	35分	ゲノムRNAのヘマグルチニン領域内	10, 11, 47)
Loopamp® H1pdm2009 インフルエンザウイルス検出試薬キット	2010/6/2	有	乾燥試薬	専用抽出試薬	鼻腔拭い液 咽頭拭い液	62.5℃	35分	ゲノムRNAのヘマグルチニン領域内	50, 58～61)
Loopamp® A型インフルエンザウイルス検出試薬キット	2010/10/5	有	乾燥試薬	専用抽出試薬		62.5℃	35分	ゲノムRNAのマトリックスプロテイン領域内	50, 58～61)
Loopamp® マイコプラズマP検出試薬キット	2010/5/24	有	液状試薬	QIAGEN法又はSR DNA抽出キット	咽頭拭い液(鼻咽頭拭い液を含む)、喀痰	65℃	60分	SDC1遺伝子内	62, 63, 65～69)
Loopamp® レジオネラ検出試薬キットC	2010/5/24	有	液状試薬	QIAGEN法	喀痰	65℃	60分	16SrRNA	63～66)
Loopamp® 結核菌群検出試薬キット	2011/4/18	有	乾燥試薬	PURE法	喀痰	67℃	40分	GyrB, IS6110	36, 66, 70, 71)

(2014年7月現在)

表 3 臨床研究用途の LAMP プライマー製品

製品名	核酸抽出	反応温度	反応時間	プライマー設計領域	参考文献	販売
Loopamp® プライマーセット WNV	QIAGEN法	63℃	35分	ゲノムRNAの envelope領域内	15)	栄研化学
Loopamp® プライマーセット Avian Flu H7	QIAGEN法	62.5℃	35分	ゲノムRNAのヘマグルチニン領域内		栄研化学
LAMP法用プライマーセット Measles Virus	MagExtractor™ -Viral RNA-	63℃	40分	ゲノムRNAのヘマグルチニン領域内	84)	ニッポンジーン
LAMP法用プライマーセット Mumps Virus	QIAGEN法	63℃	40分	ゲノムRNAのマトリックスプロテイン領域内	85)	ニッポンジーン

(2014年7月現在)

る LAMP 系^{84~87)}、吉川らによる一連のヘルペスウイルスに対する検出系^{88~94)}、森田らによる熱帯地域で流行している感染症に対する検出系^{95~97)}、槇村らによる PCP、真菌に対する検出系^{98, 99)}、関らによる肺炎球菌¹⁰⁰⁾、インフルエンザ菌¹⁰¹⁾ に対する検出系があります。以上の他にも多くの医療分野への応用例^{102~129)} があり、主なものをまとめて表 4 に示します。

2. 畜産分野での応用例

製品化された応用例としては、栄研化学が北海道畜産試験場と共同で開発した牛の受精卵の性判別をする Loopamp 牛胚性判別試薬キットがあります^{2, 3)}。

図 7 に示すとおり、これまでの PCR 法を用いた判別技術は、作業が煩雑で時間がかかり、高価な設備が必要でしたが、LAMP 法の試薬キットを用いた検査は約 40 分と短時間で、高い特異性があり、雄特異のおよび雌雄共通プライマーで誤判定の可能性を極力排除しています(図 7)。

この試薬キットを当時、乳牛を増産して国民に牛乳を十分に飲ませる政策を実施していた中国に積極的に紹介したことが契機となり、中国では家畜の疾病診断に LAMP 法が盛んに応用され、家畜の疾病による畜産農家の経済的損失の低減および疾病のまん延防止に貢献すべく、公的な研究機関がかなりの研究費を投じて研究開発しています。

表 4 医療分野における主な LAMP 法の応用(表 1 の応用例を除く)

検出対象の微生物	主な LAMP 法の応用報告
Measles virus	Fujino M, et al. 2005 ⁸⁴⁾
Mumps virus	Okafuji T, et al. 2005 ⁸⁵⁾
Respiratory syncytial virus	Ushio M, et al. 2005 ⁸⁶⁾
Rubella virus	Mori N, et al. 2006 ⁸⁷⁾
HHV-1 (HSV-1)	Enomoto Y, et al. 2005 ⁸⁸⁾
HHV-2 (HSV-2)	Enomoto Y, et al. 2005 ⁸⁸⁾
HHV-3 (VZV : varicella zoster virus)	Okamoto S, et al. 2004 ⁸⁹⁾
HHV-4 (EBV : Epstein-Barr virus)	Iwata S, et al. 2006 ⁹⁰⁾
HHV-5 (CMV : cytomegalovirus)	Suzuki R, et al. 2006 ⁹¹⁾
HHV-6	Ihira M, et al. 2004 ⁹²⁾
HHV-7	Yoshikawa T, et al. 2004 ⁹³⁾
HHV-8 (KSHV : Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus)	Kuhara T, et al. 2007 ⁹⁴⁾
Japanese encephalitis virus	Parida MM, et al. 2006 ⁹⁵⁾
Chikungunya virus	Parida MM, et al. 2007 ⁹⁶⁾
Rift Valley fever virus	Le Roux CA, et al. 2008 ⁹⁷⁾
HAV	Yoneyama T, et al. 2007 ¹⁰²⁾
HBV	Notomi T, et al. 2000 ¹⁾ , Cai Z, et al. 2011 ¹⁰³⁾
HCV	Yang J, et al. 2011 ¹⁰⁴⁾
HEV	Zhang LQ, et al. 2012 ¹⁰⁵⁾
Adenovirus	Wakabayashi T, et al. 2004 ¹⁰⁶⁾
Monkeypox virus	Iizuka I, et al. 2009 ¹⁰⁷⁾
Human papillomavirus	Hagiwara M, et al. 2007 ¹⁰⁸⁾
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	吉野 学, 他 2008 ⁶³⁾ , 山口 恵三, 他 2007 ⁶⁴⁾
<i>Legionella</i> spp.	安中 敏光, 他 2003 ⁶³⁾ , 山口 恵三, 他 2007 ⁶⁴⁾
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Seki M, et al. 2005 ¹⁰⁰⁾
<i>Haemophilus influenzae</i>	Torigoe H, et al. 2007 ¹⁰¹⁾
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Kawai Y, et al. 2009 ¹⁰⁹⁾
<i>Coxiella burnetii</i>	Pan L, et al. 2013 ¹¹⁰⁾
<i>Chlamydia trachomatis</i>	保坂 憲光, 他. 2008 ¹¹¹⁾
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	保坂 憲光, 他. 2008 ¹¹¹⁾
<i>Clostridium difficile</i>	Kato H, et al. 2005 ¹¹²⁾ , Lalonde V, et al. 2011 ¹¹³⁾
<i>Helicobacter pylori</i>	Minami M, et al. 2006 ¹¹⁴⁾
<i>Neisseria meningitidis</i>	McKenna JP, et al. 2011 ¹¹⁵⁾
<i>Vibrio vulnificus</i>	根本 二郎, 他 2008 ¹¹⁶⁾
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Horisaka T, et al. 2004 ¹¹⁷⁾
<i>Prevotella intermedia</i>	Miyagawa J, et al. 2008 ¹¹⁸⁾
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	Osawa R, et al. 2007 ¹¹⁹⁾ , Miyagawa J, et al. 2008 ¹¹⁸⁾
<i>Treponema denticola</i>	Miyagawa J, et al. 2008 ¹¹⁸⁾
メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌	小島 禎, 他 2006 ¹²⁰⁾
MRSA	Misawa Y, et al. 2007 ¹²¹⁾ , Hanaki K, et al. 2011 ¹²²⁾
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	Uemura N, et al. 2008 ⁹⁸⁾
<i>Aspergillus fumigatus</i>	鈴木 渉, 他 2005 ⁹⁹⁾
<i>Trypanosoma brucei</i>	Kuboki N, et al. 2003 ¹²³⁾ , Njiru ZK, et al. 2011 ⁸³⁾
検出対象の癌関連遺伝子、項目	主な LAMP 法の応用報告
cytokeratin19 (CK19) mRNA	Horibe D, et al. 2007 ¹²⁴⁾ , Visser M, et al. 2008 ¹²⁵⁾
Wilms' tumor gene (WT1) mRNA	Morishita S, et al. 2009 ¹²⁶⁾
EGFR	Ikeda S, et al. 2007 ¹²⁷⁾
SNPs ; P450 CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6	神田 秀俊, 他 2001 ¹²⁸⁾ , Iwasaki K, et al. 2003 ¹²⁹⁾

日本での畜産分野での応用例としては、絵野澤らによるヨーネ病への応用¹³⁰⁾、山崎らによる口蹄疫への応用があります¹³¹⁾。山崎らは、国際獣疫事務局（OIE）が基本とするPCR法では、判定までに約5時間を要するのに対し、アジアで感染拡大する4タイプの口蹄疫を、最短45分で診断できるLAMP法を用いた検出系を検討しています。

畜産分野における主な応用例^{132～138)}をまとめて表5に示します。

3. 水産分野での応用例

栄研化学では、コイヘルペスウイルス（KHV）^{139～140)}（図8）とアユ冷水病についてLAMP用プライマーセット[®]を製品化しました。特に、KHVは錦鯉等の

#：2014年3月末発売中止。

愛好家や国内外の錦鯉等の流通業者にとっても重要な問題であり、この方面でもLAMP法は実社会の役に立っています。

この他、コイ春ウイルス血症、海老（えび）の白斑病にもLAMP法が検討されています^{141～143)}。

その他の水産分野における主な応用例^{144～147)}をまとめて表6に示します。

4. 植物分野での応用例

この分野は福田ら、平田らの研究によりLAMP法の応用が進んでいる分野の1つです。福田らはLAMP法をトマト黄化葉巻ウイルス、シンビジウムモザイクウイルス、タバココナジラミのバイオタイプQ等の検出へ応用しています。主な応用例^{148～161)}をまとめて表7に示します。和歌山県農業協同組合連合会の植物バイオセンターでは、平田らの

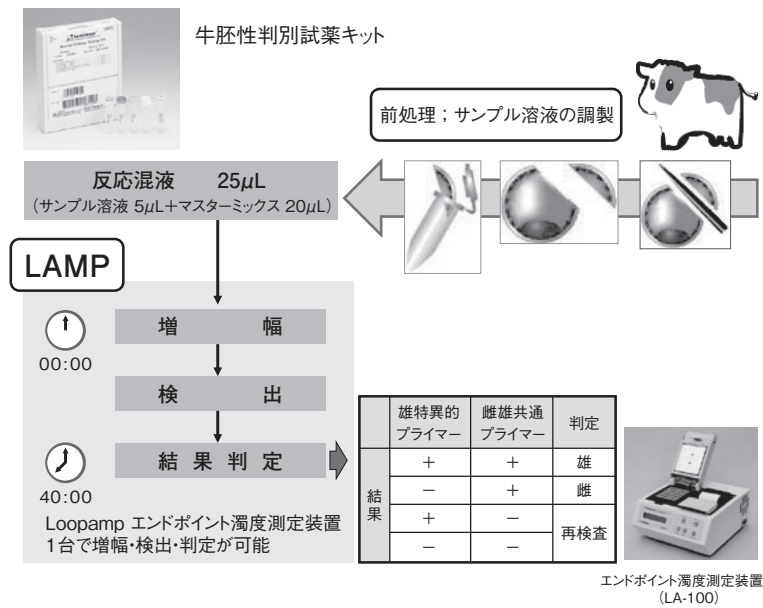


図7 LAMP法による牛の受精卵の性判別

表5 畜産分野における主なLAMP法の応用

検出対象の微生物、項目、疾患等	主なLAMP法の応用報告
Bovine Embryo Sexing	副島隆浩, 他 2003 ²⁾ , 陰山聡一, 他 2003 ³⁾
Avian Influenza Viruses	Imai M, et al. 2006 ¹⁰⁾ , Imai M, et al. 2007 ^{11, 12)} , Jayawardena S, et al. 2007 ¹³⁾ , Yoshida H, et al. 2011 ¹⁴⁾
Johne's disease-paratuberculosis (<i>Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis</i>)	Enosawa M, et al. 2003 ¹³⁰⁾
Foot-and-mouth disease	Yamazaki W, et al. 2013 ¹³¹⁾
Equine piroplasmosis	Alhassan A, et al. 2007 ¹³²⁾
Equine rotavirus	Nemoto M, et al. 2010 ¹³³⁾
Equine herpesvirus	Nemoto M, et al. 2011 ¹³⁴⁾
Newcastle disease virus	Pham HM, et al. 2005 ¹³⁵⁾
Bovine leukemia virus	Komiyama C, et al. 2009 ¹³⁶⁾
<i>Brucella spp.</i>	Ohtsuki R, et al. 2008 ¹³⁷⁾
<i>Ehrlichia ruminantium</i>	Nakao R, et al. 2010 ¹³⁸⁾

(2014年7月現在)

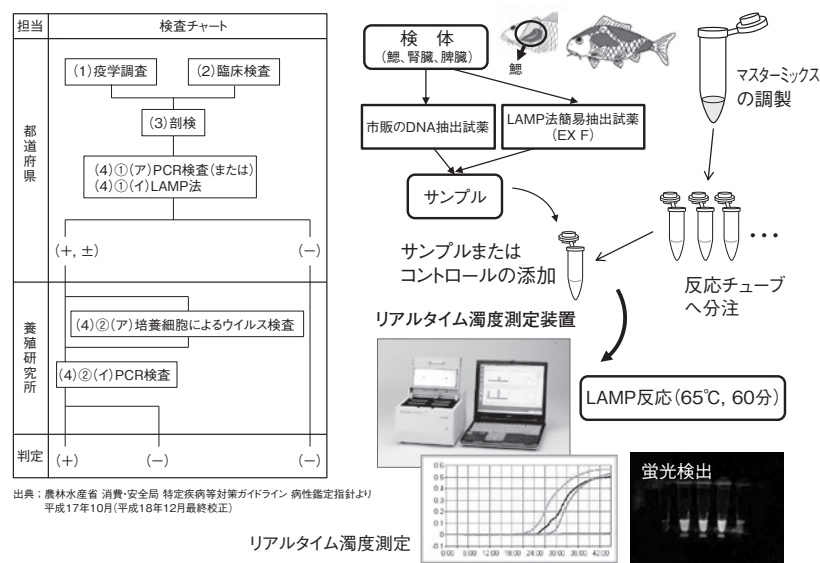


図8 KHV 検査の流れと LAMP の操作概略

表6 水産分野における主なLAMP法の応用

検出対象の微生物、項目、疾患等	主なLAMP法の応用報告
Koi herpesvirus (KHV) 冷水病 (Cold water disease) (<i>Flavobacterium psychrophilum</i>) コイ春ウイルス血症 (SVC : Spring Viremia of Carp) White spot syndrome virus (WSSV) Yellowhead Virus (YHV) Edwardsiellosis (<i>Edwardsiella tarda</i>) Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) Iridovirus disease of red sea bream (RSIV)	吉野 学, 他 2006 ¹³⁹⁾ , Yoshino M, et al. 2009 ¹⁴⁰⁾ Fujiwara-Nagata E, et al. 2009 ¹⁴¹⁾ Shivappa RB, et al. 2008 ¹⁴²⁾ Kono T, et al. 2004 ¹⁴³⁾ Mekata T, et al. 2006 ¹⁴⁴⁾ Savan R, et al. 2004 ¹⁴⁵⁾ Gunimaladevi I, et al. 2005 ¹⁴⁶⁾ Caipang CM, et al. 2004 ¹⁴⁷⁾

(2014年7月現在)

表7 植物分野(農林業分野を含む)における主なLAMP法の応用

検出対象の微生物、項目、疾患等	主なLAMP法の応用報告	受託検査項目
トマト黄化葉巻ウイルス Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)	Fukuta S, et al. 2003 ¹⁴⁸⁾ , 福田 至朗, 他 2003 ¹⁴⁹⁾ Peng J, et al. 2012 ¹⁵⁰⁾ Fukuta S, et al. 2004 ¹⁵¹⁾	※
キュウリモザイクウイルス Cucumber mosaic virus (CMV)		※
トマト黄化えそウイルス Tomato spotted wilt virus (TSWV)		※
インパチエンスネクロティックスポットウイルス Impatiens Necrotic Spot Virus (INSV)		※
キク茎えそウイルス Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV)		※
ラズベリーブッシュドワーフウイルス Raspberry bushy dwarf virus (RBDV)		※
ブルヌスネクロティックリングスポットウイルス Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV)		※
ウンシュウ萎縮ウイルス Satsuma dwarf virus (SDV)		※
カンキツモザイクウイルス Citrus mosaic virus (CiMV)		※
リンゴステムグルーピングウイルス Apple Stem Grooving Capillovirus (ASGV)		※
プラムボックスウイルス Plum pox virus (PPV)	横浜植物防疫所, 2009 ¹⁵²⁾	※
シンビジウムモザイクウイルス Cymbidium mosaic virus (CyMV)	福田 至朗, 他 2003 ¹⁵³⁾	※
メロン黄化えそウイルス Melon Yellow Spot Virus (MYSV)	竹内 良彦, 他 2006 ¹⁵⁴⁾	※
ウリ類退緑黄化 ウイルス Cucurbit chlorotic yellows virus (CCYV)	Okuda M, 2010 ¹⁵⁵⁾	※
キクわい化ウイルス Chrysanthemum stunt viroid (CSVd)		※
キククロティックモトルウイルス (CChMVd)		※
ホップわい化ウイルス Hop stunt viroid (HSVd)		※
コリウスブルメイウイルス Coleus blumei Viroid (CbVd)		※
トマトクロティックドワーフウイルス Tomato chlorotic dwarf viroid (TCDVd)		※
ポテトスピンドルチューブウイルス Potato spindle tuber viroid (PSTVd)		※
カンキツエキソコーティスウイルス Citrus Exocortis Viroid (CEVd)		※
カンキツグリーニング病 (黄龍病) Huanglongbing (HLB)	Okuda M, et al. 2005 ¹⁵⁶⁾	
タバココナジラミバイオタイプQ (Bemisia tabaci Q biotype)	竹内 良彦, 他 2006 ¹⁵⁷⁾	
イチジク株枯病菌 (<i>Ceratocystis fimbriata</i>)	福田 至朗, 他 2009 ¹⁵⁸⁾	
アジサイ葉化病ファイトプラズマ (Candidatus Phytoplasma asteris, Candidatus Phytoplasma japonicum)	Sugawara K, 2012 ¹⁵⁹⁾	
コシヒカリとコシヒカリ以外の品種判別	岸根 雅宏, 他 2011 ¹⁶⁰⁾	
マツノザイセンチュウ (<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>)	Kikuchi T, et al. 2009 ¹⁶¹⁾	

※：和歌山県農業協同組合連合会の植物バイオセンターにおける病害検定の受託項目 (2014年7月現在)

LAMP法を用いた研究成果を用いて病害検定として表7に※で示すウイルス、ウイロイドで受託検査しています。

製品としては、株式会社ニッポンジーンからトマト黄化葉巻ウイルス検出用など、福田ら、奥田らの研究成果が表8に示す試薬キットとなって発売されています。これら製品の多くはサンプルを爪楊枝で突いて検査溶液に浸す方法と蛍光目視判定が採用されており(図9)、検査現場で取り扱いやすい試薬形態になっています。

5. 食品検査分野での応用例

近年、食品の品質要求に対しては厳しさが増しており、「農場から食卓」まで一貫した安全確保が求められています。食品の製造、加工関連企業では製品の安全性管理はもとより、迅速なクレーム対応や素早い工程の修正・改善を行うため、検査のスピード化や検査数の増加に伴う労力を軽減する検査法が要望されています。しかし、従来の食品の微生物検査は培養法が基本であり、増菌培養、分離培養お

表8 植物分野(農林業分野を含む)のLAMP製品

製品名	検出対象	抽出方法	反応温度	反応時間	検出方法	参考文献
トマト黄化葉巻病検出キット	トマト黄化葉巻ウイルス(TYLCV)	爪楊枝法	63℃	60分	蛍光目視	148, 149)
ウリ類退緑黄化ウイルス検出キット	ウリ類緑黄化ウイルス(CCYV)	チューブキャプチャー法 又は爪楊枝法	63℃	60分	蛍光目視	155)
カンキツグリーニング病診断キット	<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	HLB抽出液	65℃	60分	蛍光目視	156)
タバコナジラミバイオタイプQ検出キット	タバコナジラミのバイオタイプQ	爪楊枝法(WF摩砕液)	60℃	60分	蛍光目視	157)
コシヒカリLAMP判別キット	コシヒカリとコシヒカリ以外の品種	コメDNA抽出キット	63℃	40分	蛍光目視	160)
マツ材線虫病診断キット	マツノザイセンチュウ (<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>)	Bx抽出液	63℃	60分	蛍光目視	161)
プラムボックスウイルス検出キット	プラムボックスウイルス (plum pox virus)	爪楊枝法	63℃	60分	蛍光目視	162, 163)
ファイトプラズマ検出キット	アジサイ葉化病ファイトプラズマ (<i>Candidatus Phytoplasma asteris</i> 及び <i>Candidatus Phytoplasma japonicum</i>)	Phytoplasma抽出液	<i>Ca. P. asteris</i> ; 61℃ <i>Ca. P. japonicum</i> ; 63℃	60分	蛍光目視	164)
イチジクモザイク病診断キット	フィグモザイクウイルス (fig mosaic virus)	爪楊枝法	62℃	60分	蛍光目視	165)

(2014年7月現在)

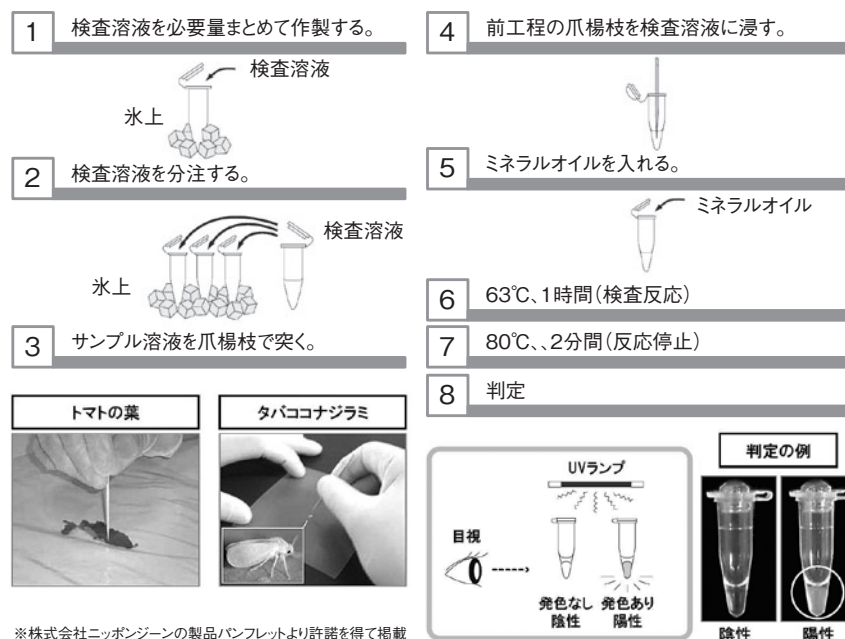


図9 LAMP法によるトマト黄化葉巻病診断の概略

び確認試験の実施で、検出までの日数と多くの労力を要するため、培養法に代わる簡易・迅速な微生物検査法として遺伝子増幅法が食品検査分野に応用されつつあります。

栄研化学はこの分野では表9に示す製品を発売しています^{39, 166～175)}。

特に、富山県での2011年の食中毒事件を契機に、腸管出血性大腸菌については、2012年5月にこれまでであった各種通知が統合され（食安監発0515第3号）¹⁷⁶⁾、更に2012年12月の通知（食安監発1217第3号）¹⁷⁷⁾において、対象に食肉を含めた検査法として遺伝子検査法が記載されています。この通知にはLAMP法も記載され、通知記載の抽出法が実施できるように試薬キットの構成も変更されています。

海外（米国）においても、サルモネラ、O157のLAMP系がAOACの認証を得ることができ、食品検査分野においてもLAMP法が社会貢献できる場面が増えつつあります。

また、LAMP法は簡易な操作で遺伝子検査ができる利点があり、食品、飲料工場の品質管理にも利用

されています（例えば、ビール増殖菌の工程チェック¹⁷⁸⁾）。

6. 環境衛生検査分野での応用例

環境衛生検査分野での応用例として、栄研化学は環境水（温泉水、浴槽水、冷却塔水等）のレジオネラ属菌^{65, 179, 180)}を、環境水（水道水等）のクリプトスポリジウム、ジアルジア^{181, 182)}を高感度、迅速、簡便に検出する試薬キットを製品化して発売しています（表10）。

2012年3月に「水道に関するクリプトスポリジウム等の検出のための検査方法の見直し等について」（健水発0302第2～4号 厚生労働省健康局水道課長）にて、「水道における指標菌及びクリプトスポリジウム等の検査方法について」（平成19年3月30日健水発第0330006号 厚生労働省健康局水道課長通知）が一部改正されて遺伝子検査法としてLAMP法も記載され、クリプトスポリジウム検出用、およびジアルジア検出用の試薬キットが適用されることになりました。

表9 食品検査分野のLAMP製品

製品名	使用目的	核酸抽出	反応温度	反応時間	検出方法	参考文献
サルモネラ検出試薬キット	食品又は環境由来検体中のサルモネラ属菌の検出	簡易抽出法	65℃	60分	リアルタイム濁度測定	39, 166～168)
腸管出血性大腸菌検出試薬キット	食品又は環境由来検体中の腸管出血性大腸菌の検出	簡易抽出法又は厚生省通知記載法	65℃	60分	リアルタイム濁度測定	166, 168～170)
腸管出血性大腸菌検出試薬キット（外因性コントロール入り）	食品又は環境由来検体中の腸管出血性大腸菌の検出	厚生省通知記載法	65℃	60分	リアルタイム濁度測定	169, 170)
ベロ毒素（VT）タイピング試薬キット	食品微生物検査で腸管出血性大腸菌と疑われた菌株の菌希釈液を検体としたVT1, VT2のタイピング	簡易抽出法	65℃	60分	リアルタイム濁度測定	168, 169)
大腸菌O157検出試薬キット	食品又は環境由来検体中の大腸菌O157の検出	簡易抽出法	65℃	60分	リアルタイム濁度測定	171)
L.monocytogenes検出試薬キット	食品又は環境由来検体中のL.monocytogenesの検出	簡易抽出法	65℃	60分	リアルタイム濁度測定	172)
カンピロバクター検出試薬キット	食品又は環境由来検体中のC.jejuni及びC.coliの検出	簡易抽出法	65℃	60分	リアルタイム濁度測定	173～175)

（2014年7月現在）

表10 環境衛生検査分野のLAMP製品

製品名	使用目的	核酸抽出	反応温度	反応時間	検出方法	参考文献
レジオネラ検出試薬キットE	環境水（温泉水、浴槽水、冷却塔水等）の検水をろ過濃縮法又は冷却遠心濃縮法で処理した100倍濃縮検水を検体としたレジオネラ属菌の検出	アルカリ熱抽出法	65℃	60分	リアルタイム濁度測定	65, 179, 180)
クリプトスポリジウム検出試薬キット	環境由来検体中Cryptosporidium属の検出	免疫磁気ビーズ濃縮法によるビーズ/オーシスト・シスト複合体（磁気ビーズと結合し塩酸解離前の状態）を用意。DNA抽出方法については別途「Loopamp クリプトスポリジウム/ジアルジア操作マニュアル」を参照。	63℃	60分	リアルタイム濁度測定	181, 182)
ジアルジア検出試薬キット	環境由来検体中のGiardia属の検出		63℃	60分	リアルタイム濁度測定	

（2014年7月現在）

7. その他の分野での応用例

栄研化学は研究用途としてノロウイルスの Genogroup I、Genogroup IIを検出する試薬キットを製品化し発売しています^{175～183)}。

その他、2012年には産業用試薬として、化粧品や医薬品の製造工程における品質管理に利用いただけるよう、資生堂と共同開発を実施した特定微生物検査試薬キット2種類を製品化して発売しました。この試薬キットはLAMP法を用いて日本薬局方(日局)収載の特定微生物試験で規定されている細菌項目[*Escherichia coli* (大腸菌)、*Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌)、*Salmonella* spp. (サルモネラ属菌)、*Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌)]を検出する試薬キット(細菌マルチ4)と真菌を検出する試薬キット(真菌カンジダ)です。これら試薬キットは、栄研化学の最新技術である乾燥試薬化と簡易抽出技術を組み合わせることで、化粧品・医薬品原料等における品質管理現場でもLAMP法を用いた遺伝子検査が簡易、迅速に実施できるようにしています¹⁸⁴⁾(図10)。

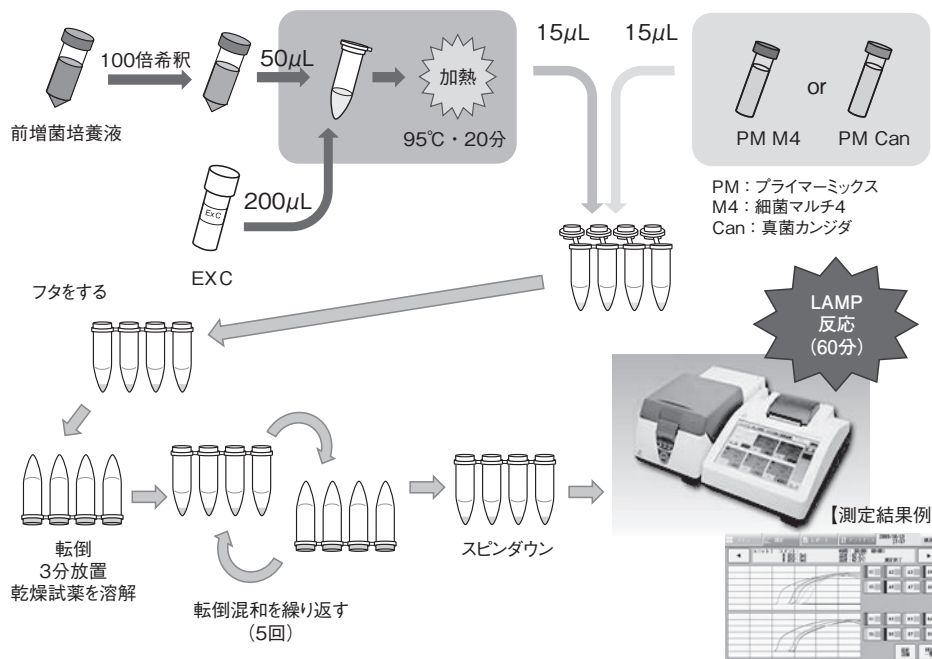
IV. 周辺技術の開発

1. 乾燥試薬化と簡易抽出技術

1) H1pdm2009 インフルエンザウイルス検出試薬キットでの簡易化の取り組み

LAMP法は検体中の阻害物質の影響を比較的受け難いものの^{66, 185, 186)}、検体からの核酸抽出は従来通りの方法が利用されることが多く、検査の簡易化、迅速化の大きな障害になっています。そこで、遺伝子検査を特殊な検査ではなく普通の検査として普及させていくためには簡易な前処理技術が不可欠であり、インフルエンザウイルス検出をモデル系として簡易抽出法の検討を進めました。対象検体種が鼻腔あるいは咽頭拭い液であれば、非常に簡単に操作できる抽出法を開発することに成功しました^{48, 59, 62)}。

鼻腔あるいは咽頭拭い液を専用抽出試薬に入れ、10回ほど攪拌するだけで、インフルエンザウイルスから核酸(RNA)を抽出することができます。試薬キット中にあるH1pdm2009 インフルエンザウイ



ルス検出用の LAMP プライマーミックスと、この抽出検体液を、蓋の内側に乾燥増幅試薬が固定されている反応チューブに分注し、溶解・転倒混和後、増幅装置にセットするだけで、操作は非常に簡単、迅速に終わります。62.5℃、35 分間のインキュベーション後、増幅の検出は上述のリアルタイム濁度測定装置を用いた濁度検出法、あるいは目視による蛍光検出のいずれも可能です (図 11)。ここで試薬を乾燥化し、抽出検体液で乾燥試薬を溶かすことで試薬調製の手間をほぼ省き、試薬の保存温度も 2～8℃を可能にしました。

前処理操作を上述の通り簡易、迅速化しても測定系の検出感度は 80 コピーで、その臨床成績は国立感染症研究所の病原体検出マニュアル H1N1 新型インフルエンザ (2009 年 11 月 ver.2) に従ったリアルタイム RT-PCR 法 (TaqMan Probe 法) と同等でした^{60, 61)}。

2) PURE 法の開発と LAMP 法による結核菌群検出との組み合わせ

上記 H1pdm2009 インフルエンザウイルス検出試薬キットで用いた簡易前処理技術はマイクロピペット操作を伴います。栄研化学では非営利団体 FIND (Foundation for Innovative New Diagnostics) と組んで、途上国における結核撲滅に貢献するため、途上国の検査環境でも実施可能な、LAMP 法による簡易、迅速な結核菌群検出試薬キットを開発してきました^{36, 37)}。この試薬キット開発においても大きな障害は対象検体である喀痰からの核酸 (DNA) 抽出でした。喀痰からの結核の遺伝子検査は、通常 NALC-NaOH 処理をした後、それぞれ所定の核酸抽出操作を行うため、煩雑な操作と時間を要します。そのような操作を途上国の検査環境で実施することは大変難しく、この課題を解決するため栄研化学では超簡易前処理技術である PURE (Procedure for Ultra Rapid Extraction) 法を開発しました¹⁸⁷⁾ (図 12)。

PURE 法は専用容器を用いることにより、従来の核酸抽出・精製に必要とされた煩雑なピペット操作や高速遠心分離操作を行わずに、簡易かつ迅速に核酸を抽出できるように開発された核酸抽出法です。抽出操作は、アルカリ変性剤を含む PURE 法専用の検体処理チューブに検体 (結核の場合は喀痰) を添加し 90℃、5 分加熱により、喀痰中の結核菌を死滅させ、核酸を抽出させます。次に、この検体処理

チューブを PURE 法専用の吸着剤チューブに装着し、激しく振って LAMP 反応阻害物を吸着剤に吸着させます。そして、この吸着剤チューブに PURE 法専用の滴下注入キャップを取り付けて、チューブ側面を押すことにより、核酸抽出液を蓋の内側に乾燥増幅試薬が固定されている反応チューブに分注します。乾燥試薬を溶解・転倒混和後、反応チューブを増幅装置にセットし、67℃、40 分間インキュベート後、増幅の検出は上述のリアルタイム濁度測定装置を用いた濁度検出法、あるいは目視による蛍光検出のいずれも可能です。喀痰の採取から約 1 時間で判定が可能となりました (図 13)。なお、乾燥増幅試薬が固定されている反応チューブの保存温度は室温です。

PURE 法と LAMP 法を組み合わせた結核菌群の検出系は、NALC-NaOH 処理しない喀痰から簡易、迅速に結核菌群を検出でき、その最小検出感度は 0.38 ゲノム相当 / テストでした。そして結核菌群の検出率は NALC-NaOH 処理をした検体による従来の遺伝子検査法と同等でした^{37, 188, 189)}。

すなわち、PURE 法により複雑な細胞壁を持つグラム陽性菌でも簡易な操作で核酸抽出が可能となり、その簡易な操作と室温保存が可能な試薬により、検査現場での使用と、海外、特に途上国での遺伝子検査法の使用を容易にするものと考えます。

この PURE 法は、結核菌群の検出だけではなく単純ヘルペスウイルス (HSV-1/2) 検出のための検体 (子宮頸管又は外陰部拭い液) からの核酸抽出にも利用できます⁷⁸⁾。

3) SR DNA 抽出キットの開発と LAMP 法によるマイコプラズマ・ニューモニエ検出との組み合わせ

2011 年 10 月に保険収載された Loopamp[®] マイコプラズマ P 検出試薬キットは、LAMP 法によって咽頭拭い液 (鼻咽頭拭い液を含む) 又は喀痰検体中の *Mycoplasma pneumoniae* 遺伝子を検出するものです。検体採取から判定まで約 2 時間で終了し、*M. pneumoniae* のみを特異的に検出することが可能でしたが、市販の核酸抽出キットを用いているため核酸抽出ステップが煩雑で、検査現場への負担が少なくありませんでした。市販の核酸抽出キットは核酸を高度に精製・濃縮できる反面、操作ステップが多く、約 1 時間要し、高速遠心機を必要とします。

そこで、当社は操作数を数ステップで 10 分以内

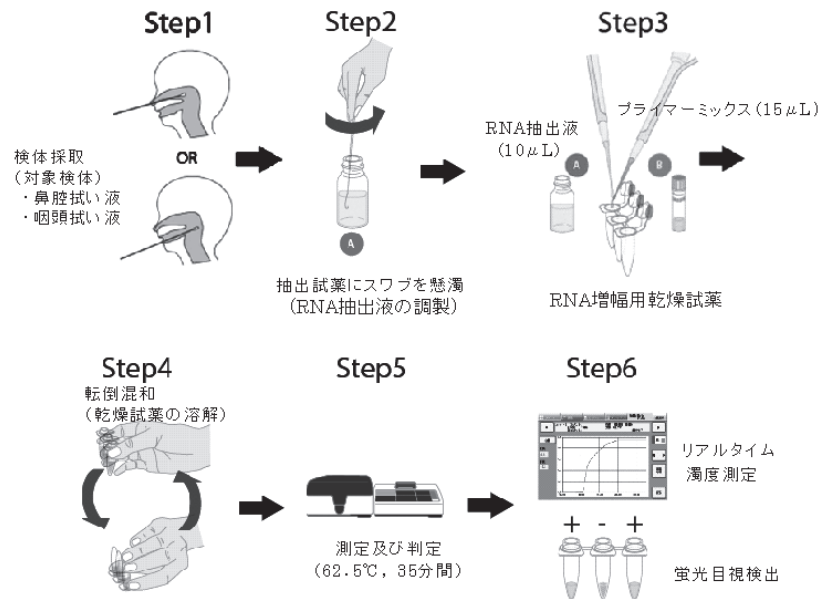


図 11 インフルエンザ核酸検出における操作の簡易化

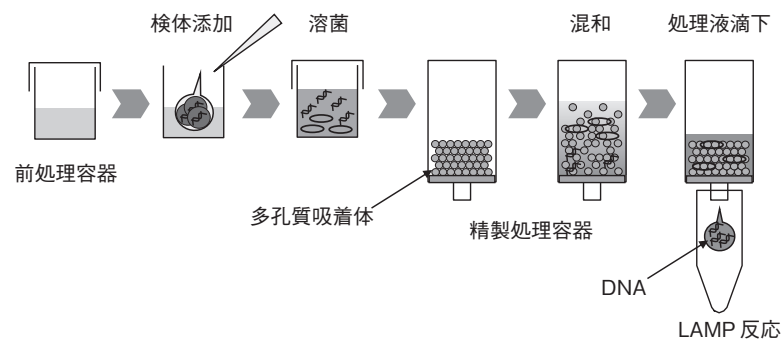


図 12 PURE (Procedure for Ultra Rapid Extraction) 法

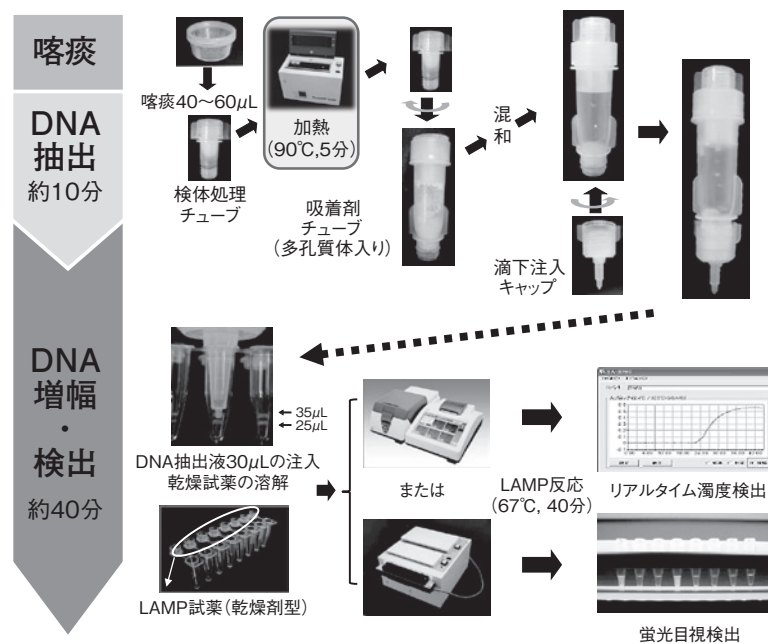


図 13 PURE 法と LAMP 法を組み合わせた結核菌群検出

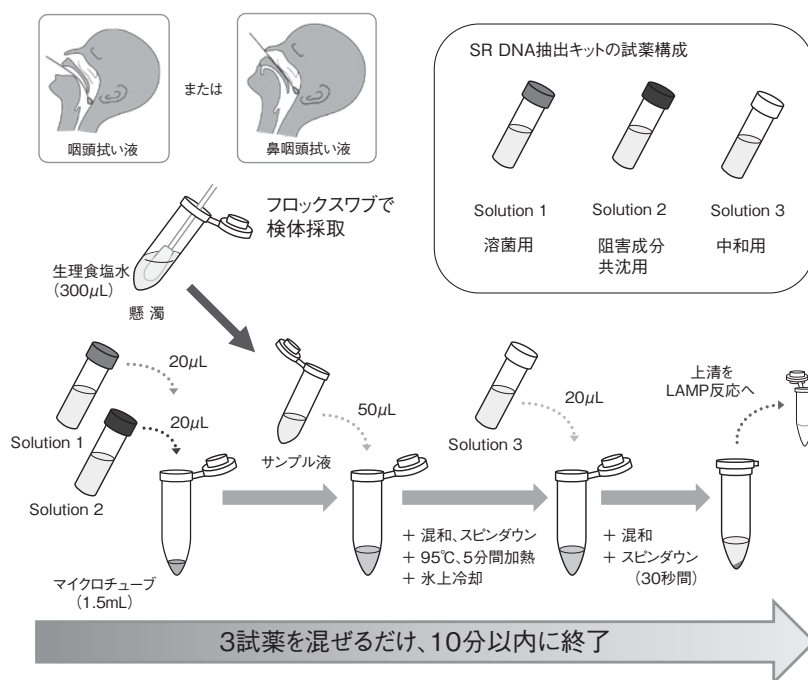


図 14 SR DNA 抽出キットの操作概略

に核酸抽出が終了する簡易核酸抽出キットの開発に着手し、2013年10月にSR DNA 抽出キットを発売しました。この抽出キットは図14に示すとおり、高速遠心機を必要とせず、3試薬をピペット操作で混ぜるだけで、10分以内に終了します¹⁹⁰⁾。これにより、病院検査室においてLoopamp® マイコプラズマP検出試薬キットが導入し易くなり、マイコプラズマ肺炎の治療開始早期の段階での診断に大きく貢献できるものと考えられます。

まとめ

遺伝子検査は特殊な検査と考えられていましたが、国産の遺伝子増幅技術LAMP法により、増幅・検出ステップは簡易、迅速化されてきました。そのLAMP法の特長を生かした応用例が医療分野のみならず、畜産、水産、植物、食品など多くの分野で応用され、実用化されています。年1回開催されているLAMP研究会においては、さまざまな分野でのLAMP法の応用例について研究者から報告され、研究会参加者との間で活発な討議がなされています。更に、近畿LAMP研究会（K-LAMP）でも臨床応用例が研究発表され、臨床現場からの課題や要望が提起されています。また、年3回開催されているLAMP法のプライマー設計の仕方を説明するe-Loopampス

クールには毎回10名以上の出席者があり、参加者はLAMP法のプライマー設計を学んで、LAMP法を活用したご研究、実用化を検討していただいています。

しかし、遺伝子検査の操作工程上で増幅技術だけが簡易、迅速化されても十分とは言えず、検査現場に遺伝子検査が浸透していくためには、抽出、試薬調製等の前処理段階の簡易、迅速化が望まれています。この工程が煩雑で、時間を要している間は、遺伝子検査は特殊検査の域を出たとは言えないと思われます。試薬の乾燥化、PURE法等の簡易抽出法の開発により、LAMP法による遺伝子検査は格段に簡易、迅速になりつつあります。

栄研化学では、新規周辺技術を多くの製品に適用するとともに、関連企業、研究者の方々と協力して、各分野へLAMP法による遺伝子検査が浸透していくよう今後も努めていきたいと考えています。

そのために今後も遺伝子検査を実施する、あるいは実施したいと考えている検査現場のご要望、ご意見を拝聴しながら、使いやすく高精度な遺伝子検査法を提供するため、定量技術、多項目同時検出なども視野に入れて全社一丸となってLAMP法およびその周辺技術に創意工夫を続けていきたいと考えています。

文 献

- 1) Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al.: loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000 ; **28** : E63.
- 2) 副島隆浩, 渡辺恵子: 新しい遺伝子増幅法 (LAMP法) の原理と性判別への応用. *日本胚移植学雑誌*. 2003 ; **25** (2): 92-98.
- 3) 陰山聡一, 平山博樹: 新しい遺伝子増幅法 (LAMP法) による牛胚の性判別. *日本胚移植学雑誌*. 2003 ; **25** (3): 136-140.
- 4) Nagamine K, Hase T, Notomi T: Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*. 2002 ; **16** : 223-229.
- 5) Mori Y, Nagamine K, Tomita N et al.: Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 ; **289** : 50-154.
- 6) Poon LL, Leung CS, Tashiro M, Chan KH, et al.: Rapid detection of the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a loop-mediated isothermal amplification assay. *Clin Chem*. 2004 ; **50** (6): 1050-1052.
- 7) Hong TC, Mai QL, Morita K, et al.: Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Clin Microbiol*. 2004 ; **42** (5): 1956-1961.
- 8) 田口文広, 田代真人, 納富継宣: SARS ウイルス迅速診断. *日本小児科医会会報*. 2004 ; **27** : 43-46.
- 9) 田代真人: LAMP法を用いたSARSコロナウイルス核酸増幅検査. *モダンメディア*. 2004 ; **50** : 12-17.
- 10) Imai M, Ninomiya A, Minekawa H, et al.: Development of H5-RT-LAMP(loop-mediated isothermal amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection. *Vaccine*. 2006 ; **10** ; 24 (44-46): 6679-6682.
- 11) Imai M, Ninomiya A, Minekawa H, et al.: Rapid diagnosis of H5N1 avian influenza virus infection by newly developed influenza H5 hemagglutinin gene-specific loop-mediated isothermal amplification method. *J Virol Methods*. 2007 ; **141** (2): 173-180.
- 12) Imai K, Nakamura K, Mase M, et al.: Partial protection against challenge with the highly pathogenic H5N1 influenza virus isolated in Japan in chickens infected with the H9N2 influenza virus. *Arch Virol*. 2007 ; **152** (7): 1395-1400.
- 13) Jayawardena S, Cheung CY, Barr I, et al.: loop-mediated isothermal amplification for influenza A(H5N1) virus. *Emerg Infect Dis*. 2007 ; **13** (6): 899-901.
- 14) Yoshida H, Sakoda Y, Endo M, et al.: Evaluation of the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) as a screening method for the detection of influenza viruses in the fecal materials of water birds. *J Vet Med Sci*. 2011 ; **73** (6): 753-758.
- 15) 国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター: 鳥インフルエンザA(H7N9) ウイルス検出マニュアル(第2版). http://www.nih.go.jp/niid/images/flu/H7N9manual/h7n9_manual_v2.pdf, 2013.
- 16) Parida M, Posadas G, Morita K, et al.: Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *J Clin Microbiol*. 2004 ; **42** (1): 257-263.
- 17) Shukla J, Saxena D, Rathinam S, et al.: Molecular detection and characterization of West Nile virus associated with multifocal retinitis in patients from southern India. *Int J Infect Dis*. 2012 ; **16** (1): e53-59.
- 18) Kurosaki Y, Takada A, Ebihara H, et al.: Rapid and simple detection of Ebola virus by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods*. 2006 ; **141** (1): 78-83.
- 19) Karanis P, Thekisoe O, Kiouptsi K, et al.: Development and preliminary evaluation of a loop-mediated isothermal amplification procedure for sensitive detection of cryptosporidium oocysts in fecal and water samples. *Appl Environ Microbiol*. 2007 ; **73** (17): 5660-5662.
- 20) Bakheit MA, Torra D, Palomino LA, et al.: Sensitive and specific detection of Cryptosporidium species in PCR-negative samples by loop-mediated isothermal DNA amplification and confirmation of generated LAMP products by sequencing. *Vet Parasitol*. 2008 ; **158** (1-2): 11-22.
- 21) Inomata A, Kishida N, Momoda T, et al.: Development and evaluation of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and high-sensitive detection of Cryptosporidium in water samples. *Water Sci Technol*. 2009 ; **60** (8): 2167-2172.
- 22) Osman HA, Eltom KH, Musa NO et al.: Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay for detection of Crimean Congo hemorrhagic fever virus in Sudan. *J Virol Methods*. 2013 ; **190** (1-2): 4-10.
- 23) Curtis KA, Rudolph DL, Owen SM.: Rapid detection of HIV-1 by reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *J Virol Methods*. 2008 ; **151** (2): 264-270.
- 24) Hosaka N, Ndembu N, Ishizaki A, et al.: Rapid detection of human immunodeficiency virus type 1 group M by a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *J Virol Methods*. 2009 ; **157** (2): 195-199.
- 25) Yang G, Li B, Liu L, et al.: Development and evaluation of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of a new SFTS bunyavirus. *Arch Virol*. 2012 ; **157** (9): 1779-1783.
- 26) Xu H, Zhang L, Shen G, et al.: Establishment of a novel one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid identification of RNA from the severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *J Virol Methods*. 2013 ; **194** (1-2): 21-25.
- 27) Hara-Kudo Y, Nemoto J, Ohtsuka K, et al.: Sensitive and rapid detection of Vero toxin-producing Escherichia coli using loop-mediated isothermal amplification. *J Med*

- Microbiol. 2007 ; **56**(Pt 3): 398-406.
- 28) Hara-Kudo Y, Konishi N, Ohtsuka K, et al.: Detection of Verotoxigenic *Escherichia coli* O157 and O26 in food by plating methods and LAMP method : a collaborative study. *Int J Food Microbiol.* 2007 ; **122**(1-2): 156-161.
 - 29) Kurosaki Y, Grolla A, Fukuma A, et al.: Development and evaluation of a simple assay for Marburg virus detection using a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification method. *J Clin Microbiol.* 2010 ; **48**(7): 2330-2336.
 - 30) Poon LL, Wong BW, Ma EH, et al.: Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria : detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification. *Clin Chem.* 2006 ; **52**(2): 303-306.
 - 31) Han ET, Watanabe R, Sattabongkot J, et al.: Detection of four *Plasmodium* species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2007 ; **45**(8): 2521-2528.
 - 32) Polley SD, Mori Y, Watson J, et al.: Mitochondrial DNA targets increase sensitivity of malaria detection using loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol.* 2010 ; **48**(8): 2866-2871.
 - 33) Sirichaisinthop J, Buates S, Watanabe R, et al.: Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for malaria diagnosis in a field setting. *Am J Trop Med Hyg.* 2011 ; **85**(4): 594-596.
 - 34) Polley SD, González IJ, Mohamed D, et al.: Clinical evaluation of a loop-mediated amplification kit for diagnosis of imported malaria. *J Infect Dis.* 2013 ; **208**(4): 637-644.
 - 35) Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K.: loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. *J Clin Microbiol.* 2003 ; **41**(6): 2616-2622.
 - 36) Boehme CC, Nabeta P, Henostroza G, et al.: Operational feasibility of using loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of pulmonary tuberculosis in microscopy centers of developing countries. *J Clin Microbiol.* 2007 ; **45**(6): 1936-1940.
 - 37) 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.* 2011 ; **15**(9): 1211-1217.
 - 38) Kamachi K, Toyoizumi-Ajisaka H, Toda K, et al.: Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. *J Clin Microbiol.* 2006 ; **44**(5): 1899-1902.
 - 39) Hara-Kudo Y, Yoshino M, Kojima T, et al.: loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Salmonella*. *FEMS Microbiol Lett.* 2005 ; **253**(1): 155-161.
 - 40) Yamazaki W, Seto K, Taguchi M, et al.: Sensitive and rapid detection of cholera toxin-producing *Vibrio cholerae* using a loop-mediated isothermal amplification. *BMC Microbiol.* 2008 ; **8** : 94.
 - 41) Okada K, Chantaroj S, Taniguchi T, et al.: A rapid, simple, and sensitive loop-mediated isothermal amplification method to detect toxigenic *Vibrio cholerae* in rectal swab samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010 ; **66**(2): 135-139.
 - 42) Boldbaatar B, Inoue S, Sugiura N, et al.: Rapid detection of rabies virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Jpn J Infect Dis.* 2009 ; **62**(3): 187-191.
 - 43) Saitou Y, Kobayashi Y, Hirano S, et al.: A method for simultaneous detection and identification of Brazilian dog- and vampire bat-related rabies virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *J Virol Methods.* 2010 ; **168**(1-2): 13-17.
 - 44) Parida M, Horioke K, Morita K, et al.: Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *J Clin Microbiol.* 2005 ; **43**(6): 2895-2903.
 - 45) Kwallah Ao, Inoue S, Muigai AW, et al.: A real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of yellow fever virus. *J Virol Methods.* 2013 ; **193**(1): 23-27.
 - 46) Poon LL, Leung CS, Chan KH, et al.: Detection of human influenza A viruses by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol.* 2005 ; **43**(1): 427-430.
 - 47) Ito M, Watanabe M, Nakagawa N, et al.: Rapid detection and typing of influenza A and B by loop-mediated isothermal amplification : comparison with immunochromatography and virus isolation. *J Virol Methods.* 2006 ; **135**(2): 272-275.
 - 48) 納富継宣, 森 安義, 富田憲弘 他 : LAMP法によるインフルエンザの迅速検査. *細胞.* 2009 ; **41**(14): 34-37.
 - 49) Kubo T, Agoh M, Mai le Q, et al.: Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for detection of pandemic (H1N1) 2009 virus as a novel molecular method for diagnosis of pandemic influenza in resource-limited settings. *J Clin Microbiol.* 2010 ; **48**(3): 728-735.
 - 50) 重本直樹, 福田伸治, 高尾信一, 他 : Reverse Transcription-Loop-mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) 法による新型インフルエンザウイルスおよび季節性A型インフルエンザウイルス (H1N1, H3N2) の迅速検出. *感染症誌.* 2010 ; **84** : 431-436.
 - 51) Nakauchi M, Yoshikawa T, Nakai H, et al.: Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for rapid diagnosis of pandemic influenza A/ H1N1 2009 virus. *J Med Virol.* 2011 ; **83**(1): 10-15.
 - 52) Xu J, Rong R, Zhang HQ, et al.: Sensitive and rapid detection of *Schistosoma japonicum* DNA by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Int J Parasitol.* 2010 ; **40**(3): 327-331.
 - 53) Sotiriadou I, Karanis P.: Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Toxoplasma gondii* in water samples and comparative findings by polymerase

- chain reaction and immunofluorescence test (IFT). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008 ; **62** (4): 357-365.
- 54) Krasteva D, Toubiana M, Hartati S, et al.: Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) as a diagnostic tool of toxoplasmosis. *Vet Parasitol.* 2009 ; **162** (3-4): 327-331.
 - 55) Takagi H, Itoh M, Islam MZ, et al.: Sensitive, specific, and rapid detection of *Leishmania donovani* DNA by loop-mediated isothermal amplification. *Am J Trop Med Hyg.* 2009 ; **81** (4): 578-582.
 - 56) Adams ER, Schoone GJ, Ageed AF, et al.: Development of a reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the sensitive detection of *Leishmania* parasites in clinical samples. *Am J Trop Med Hyg.* 2010 ; **82** (4): 591-596.
 - 57) Salant H, Abbasi I, Hamburger J.: The development of a loop-mediated isothermal amplification method (LAMP) for *Echinococcus granulosus* [corrected] coproduct detection. *Am J Trop Med Hyg.* 2012 ; **87** (5): 883-887.
 - 58) 高野弘, 石塚昌弘: SARS コロナウイルスの遺伝子検査: Loopamp® SARS コロナウイルス検出試薬キット. *細胞.* 2004 ; **36** (4): 19-22.
 - 59) 森 安義, 仙波晶平, 富田憲弘 他: LAMPによるインフルエンザ迅速検査. *BIO Clinica.* 2010 ; **25** (5): 82-86.
 - 60) Nakauchi M, Yoshikawa T, Nakai H, et al.: Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for rapid diagnosis of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus. *J Medical Virology.* 2011 ; **83** (1): 10-15.
 - 61) 吉川哲史, 中井英剛, 菅田 健 他: RT-LAMP法によるA型および新型インフルエンザウイルス (AH1pdm) 検出の臨床的検討. *診療と新薬.* 2011 ; **48** (1): 19-26.
 - 62) 仙波晶平, 森 安義, 富田憲弘 他: LAMP法によるインフルエンザの迅速遺伝子検査. *Bio Clinica.* 2011 ; **26** (13) 臨増: 85-88.
 - 63) 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.* 2008 ; **82**: 168-176.
 - 64) 山口恵三, 館田一博, 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.* 2007 ; **58**: 565-571.
 - 65) 安中敏光: LAMP法による *Legionella* 属菌の検出. *JARMAM.* 2003 ; **14**: 25-30.
 - 66) 百田隆祥, 下條誉幸, 納富継宣: LAMP法を用いた *Mycoplasma pneumoniae* と *Legionella* spp. の高感度迅速検出. *臨床と微生物.* 2012 ; **39** (臨増): 549-556.
 - 67) 高野 弘: 新規に保険収載された検査法 LAMP 法による結核菌群検出検査、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. *モダンメディア.* 2012 ; **58** (8): 246-252.
 - 68) 浦山耕太郎, 坂野 堯, 青木大地, 他: 肺炎マイコプラズマ感染症における loop-mediated isothermal amplification 法の有用性. *小児科臨床.* 2012 ; **65** (12): 2649-2652.
 - 69) 松田親史, 竹谷 健, 竹内志津枝, 他: LAMP法を原理とした Loopamp マイコプラズマ P 検出試薬キットの有用性. *JARMAM.* 2013 ; **23** (2): 53-59.
 - 70) 杵渕貴洋, 加野大樹, 角谷不二雄, 他: *Mycoplasma* 感染症診断における LAMP 法を用いた *Mycoplasma pneumoniae* DNA 検出の有用性と従来法 (培養法・血清学的検査法) の比較検討. *日本臨床微生物学雑誌.* 2013 ; **23** (2): 87-94.
 - 71) 御手洗 聡: LAMP 法を使った結核迅速診断キット. *複十字.* 2011 ; **339**: 11-13.
 - 72) 副島 隆浩, 高野 弘: 結核菌群核酸検出—Loopamp® 結核菌群検出試薬キット—. *小児科臨床.* 2012 ; **65** (12): 2703-2708.
 - 73) Tamaki Y, Akiyama F, Iwase T, et al.: Molecular detection of lymph node metastases in breast cancer patients: results of a multicenter trial using the one-step nucleic acid amplification assay. *Clin Cancer Res.* 2009 ; **15** (8): 2879-2884.
 - 74) Yamamoto H, Sekimoto M, Oya M, et al.: OSNA-based novel molecular testing for lymph node metastases in colorectal cancer patients: results from a multicenter clinical performance study in Japan. *Ann Surg Oncol.* 2011 ; **18**: 1891-1898.
 - 75) Satoh T, Matsumoto K, Fujii T, et al.: Rapid genotyping of carcinogenic human papillomavirus by loop-mediated isothermal amplification using a new automated DNA test (Clinchip HPV™). *J Virol Methods.* 2013 ; **188** (1-2): 83-93.
 - 76) Meridian Bioscience, Inc.: illumigene® *C. difficile* Package Insert, REV. 08/13
 - 77) Meridian Bioscience, Inc.: illumigene® Group A *Streptococcus* (Group A Strep) DNA Amplification Assay Package Insert, REV. 09/12
 - 78) Meridian Bioscience, Inc.: illumigene® Group B *Streptococcus* (GBS) Package Insert, REV. 05/12
 - 79) Meridian Bioscience, Inc.: illumigene® *Mycoplasma* DNA Amplification Assay Package Insert, REV. 05/13
 - 80) Meridian Bioscience, Inc.: illumigene® Pertussis DNA Amplification Assay Package Insert, REV. 04/14
 - 81) Kamachi K, Toyozumi-Ajisaka H, Toda K, et al.: Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. *J Clin Microbiol.* 2006 ; **44** (5): 1899-1902.
 - 82) 東出誠司, 保坂憲光, 太田嘉則, 他: 新しい核酸抽出法を用いた LAMP 法による単純ヘルペスウイルスの検出. *日本性感染症学会誌.* 2010 ; **21** (1): 120-127.
 - 83) Njiru ZK, Traub R, Ouma JO, et al.: Detection of Group 1 *Trypanosoma brucei gambiense* by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol.* 2011 ; **49** (4): 1530-1536.
 - 84) Fujino M, Yoshida N, Nakayama T, et al.: A simple method for the detection of measles virus genome by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *J Med Virol.* 2005 ; **76** (3): 406-413.
 - 85) Okafuji T, Yoshida N, Nakayama T, et al.: Rapid diagnostic method for detection of mumps virus genome by loop-

- mediated isothermal amplification. J Clin Microbiol. 2005 ; **43**(4): 1625-1631.
- 86) Ushio M, Yui I, Nakayama T, et al.: Detection of respiratory syncytial virus genome by subgroups-A, B specific reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). J Med Virol. 2005 ; **77**(1): 121-127.
 - 87) Mori N, Motegi Y, Nakayama T et al.: Development of a new method for diagnosis of rubella virus infection by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. J Clin Microbiol. 2006 ; **44**(9): 3268-3273.
 - 88) Enomoto Y, Yoshikawa T, Ihira M, et al.: Rapid diagnosis of herpes simplex virus infection by a loop-mediated isothermal amplification method. J Clin Microbiol. 2005 ; **43**(2): 951-955.
 - 89) Okamoto S, Yoshikawa T, Ihira M, et al.: Rapid detection of varicella-zoster virus infection by a loop-mediated isothermal amplification method. J Med Virol. 2004 ; **74**(4): 677-682.
 - 90) Iwata S, Shibata Y, Yoshikawa T, et al.: Rapid detection of Epstein-Barr virus DNA by loop-mediated isothermal amplification method. J Clin Virol. 2006 ; **37**(2): 128-133.
 - 91) Suzuki R, Yoshikawa T, Ihira M, et al.: Development of the loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of cytomegalovirus DNA. J Virol Methods. 2006 ; **132**(1-2): 216-221.
 - 92) Ihira M, Yoshikawa T, Enomoto Y, et al.: Rapid diagnosis of human herpesvirus 6 infection by a novel DNA amplification method, loop-mediated isothermal amplification. J Clin Microbiol. 2004 ; **42**(1): 140-145.
 - 93) Yoshikawa T, Ihira M, Akimoto S, et al.: Detection of human herpesvirus 7 DNA by loop-mediated isothermal amplification. J Clin Microbiol. 2004 ; **42**(3): 1348-1352.
 - 94) Kuhara T, Yoshikawa T, Ihira M, et al.: Rapid detection of human herpesvirus 8 DNA using loop-mediated isothermal amplification. J Virol Methods. 2007 ; **144**(1-2): 79-85.
 - 95) Parida MM, Santhosh SR, Morita K, et al.: Development and evaluation of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and real-time detection of Japanese encephalitis virus. J Clin Microbiol. 2006 ; **44**(11): 4172-4178.
 - 96) Parida MM, Santhosh SR, Morita K, et al.: Rapid and real-time detection of Chikungunya virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. J Clin Microbiol. 2007 ; **45**(2): 351-357.
 - 97) Le Roux CA, Kubo T, Morita K, et al.: Development and evaluation of a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Rift Valley fever virus in clinical specimens. J Clin Microbiol. 2008 ; **47**(3): 645-651.
 - 98) Uemura N, Makimura K, Onozaki M, et al.: Development of a loop-mediated isothermal amplification method for diagnosing Pneumocystis pneumonia. J Med Microbiol. 2008 ; **57**(Pt 1): 50-57.
 - 99) 鈴木 渉, 藤崎竜一, 横村浩一, 他 : LAMP法を用いた *Aspergillus fumigatus* 特異的検出系の構築. 第49回日本医真菌学会総会, 2005
 - 100) Seki M, Yamashita Y, Torigoe H, et al.: loop-mediated isothermal amplification method targeting the *lytA* gene for detection of *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Microbiol. 2005 ; **43**(4): 1581-1586.
 - 101) Torigoe H, Seki M, Yamashita Y, et al.: Detection of *Haemophilus influenzae* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of the outer membrane protein P6 gene. Jpn J Infect Dis. 2007 ; **60**(1): 55-58.
 - 102) Yoneyama T, Kiyohara T, Shimasaki N, et al.: Rapid and real-time detection of hepatitis A virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. J Virol Methods. 2007 ; **145**(2): 162-168.
 - 103) Cai Z, Lou G, Cai T, et al.: Development of a novel genotype-specific loop-mediated isothermal amplification technique for Hepatitis B virus genotypes B and C genotyping and quantification. J Clin Virol. 2011 ; **52**(4): 288-294.
 - 104) Yang J, Fang MX, Li J, et al.: Detection of hepatitis C virus by an improved loop-mediated isothermal amplification assay. Arch Virol. 2011 ; **156**(8): 1387-1396.
 - 105) Zhang LQ, Zhao FR, Liu ZG, et al.: Simple and rapid detection of swine hepatitis E virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. Arch Virol. 2012 ; **157**(12): 2383-2388.
 - 106) Wakabayashi T, Yamashita R, Kakita T, et al.: Rapid and sensitive diagnosis of adenoviral keratoconjunctivitis by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. Curr Eye Res. 2004 ; **28**(6): 445-450.
 - 107) Iizuka I, Saijo M, Shiota T, et al.: Loop-mediated isothermal amplification-based diagnostic assay for monkeypox virus infections. J Med Virol. 2009 ; **81**(6): 1102-1108.
 - 108) Hagiwara M, Sasaki H, Matsuo K, et al.: Loop-mediated isothermal amplification method for detection of human papillomavirus type 6, 11, 16, and 18. J Med Virol. 2007 ; **79**(5): 605-615.
 - 109) Kawai Y, Kishi F, Ouchi K, et al.: Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of *Chlamydomphila pneumoniae*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009 ; **28**(7): 801-805.
 - 110) Pan L, Zhang L, Fan D, et al.: Rapid, simple and sensitive detection of Q fever by loop-mediated isothermal amplification of the *htpAB* gene. PLoS Negl Trop Dis. 2013 ; **7**(5): e2231.
 - 111) 保坂憲光, 細部高英, 近藤秀弥, 他 : LAMP法を用いた *Chlamydia trachomatis* と *Neisseria gonorrhoeae* 検出法の開発. 日性感染症会誌. 2008 ; **19**(1): 103-109.
 - 112) Kato H, Yokoyama T, Kato H, et al.: Rapid and simple method for detecting the toxin B gene of *Clostridium difficile* in stool specimens by loop-mediated isothermal amplification. J Clin Microbiol. 2005 ; **43**(12): 6108-6112.
 - 113) Lalande V, Barrault L, Wadel S, et al.: Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis of *Clostridium difficile* infections. J Clin Microbiol. 2011 ; **49**(7): 2714-2716.

- 114) Minami M, Ohta M, Ohkura T, et al.: Use of a combination of brushing technique and the loop-mediated isothermal amplification method as a novel, rapid, and safe system for detection of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol.* 2006 ; **44** (11): 4032-4037.
- 115) McKenna JP, Fairley DJ, Shields MD, et al.: Development and clinical validation of a loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of *Neisseria meningitidis*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011 ; **69** (2): 137-144.
- 116) 根本二郎, 小島 禎, 草場耕二, 他 : Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法を用いた *Vibrio vulnificus* の迅速検出. *感染症誌.* 2008 ; **82** (5): 407-413.
- 117) Horisaka T, Fujita K, Hayashidani H, et al.: Sensitive and specific detection of *Yersinia pseudotuberculosis* by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol.* 2004 ; **42** (11): 5349-5352.
- 118) Miyagawa J, Maeda H, Murauchi T, et al.: Rapid and simple detection of eight major periodontal pathogens by the loop-mediated isothermal amplification method. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008 ; **53** (3): 314-321.
- 119) Osawa R, Yoshida A, Masakiyo Y, et al.: Rapid detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* using a loop-mediated isothermal amplification method. *Oral Microbiol Immunol.* 2007 ; **22** (4): 252-259.
- 120) 小島 禎, 柴田尚宏, 池戸正成, 他 : Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法によるメタロ- β -ラクタマーゼ遺伝子の迅速・簡易検出の検討. *感染症学雑誌.* 2006 ; **80** (4): 405-412.
- 121) Misawa Y, Yoshida A, Saito R, et al.: Application of loop-mediated isothermal amplification technique to rapid and direct detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in blood cultures. *J Infect Chemother.* 2007 Jun ; **13** (3): 134-140.
- 122) Hanaki K, Sekiguchi J, Shimada K, et al.: Loop-mediated isothermal amplification assays for identification of anti-septic- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Methods.* 2011 ; **84** (2): 251-254.
- 123) Kuboki N, Inoue N, Sakurai T, et al.: Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. *J Clin Microbiol.* 2003 ; **41** (12): 5517-5524.
- 124) Horibe D, Ochiai T, Shimada H, et al.: Rapid detection of metastasis of gastric cancer using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Int J Cancer.* 2007 ; **120** (5): 1063-1069.
- 125) Visser M, Jiwa M, Horstman A, et al.: Intra-operative rapid diagnostic method based on CK19 mRNA expression for the detection of lymph node metastases in breast cancer. *Int J Cancer.* 2008 ; **122** (11): 2562-2567.
- 126) Morishita S, Tani H, Kurata S, et al.: Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid and simple quantification of WT1 mRNA. *Clin Biochem.* 2009 ; **42** (6): 515-520.
- 127) Ikeda S, Takabe K, Inagaki M, et al.: Detection of gene point mutation in paraffin sections using in situ loop-mediated isothermal amplification. *Pathol Int.* 2007 ; **57** (9): 594-599.
- 128) 神田秀俊, 納富継宣 : 新しい遺伝子増幅法. *ファルマシア.* 2001 ; **37** (10): 889-893.
- 129) Iwasaki K, Notomi T, Kanda H, et al.: Validation of the Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Single Nucleotide Polymorphism Genotyping with Whole Blood. *Genome Letters.* 2003 ; **2** : 119-126.
- 130) Enosawa M, Kageyama S, Sawai K et al.: Use of loop-mediated isothermal amplification of the IS900 sequence for rapid detection of cultured *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2003 ; **41** (9): 4359-4365.
- 131) Yamazaki W, Mioulet V, Murray L, et al.: Development and evaluation of multiplex RT-LAMP assays for rapid and sensitive detection of foot-and-mouth disease virus. *J Virol Methods.* 2013 ; **192** (1-2): 18-24.
- 132) Alhassan A, Thekisoe OM, Yokoyama N, et al.: Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for diagnosis of equine piroplasmiasis. *Vet Parasitol.* 2007 ; **143** (2): 155-160.
- 133) Nemoto M, Imagawa H, Tsujimura K, et al.: Detection of equine rotavirus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *J Vet Med Sci.* 2010 ; **72** (6): 823-826.
- 134) Nemoto M, Ohta M, Tsujimura K, et al.: Direct detection of equine herpesvirus type 1 DNA in nasal swabs by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *J Vet Med Sci.* 2011 ; **73** (9): 1225-1227.
- 135) Pham HM, Nakajima C, Ohashi K, et al.: Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Newcastle disease virus. *J Clin Microbiol.* 2005 ; **43** (4): 1646-1650.
- 136) Komiyama C, Suzuki K, Miura Y, et al.: Development of loop-mediated isothermal amplification method for diagnosis of bovine leukemia virus infection. *J Virol Methods.* 2009 ; **157** (2): 175-179.
- 137) Ohtsuki R, Kawamoto K, Kato Y, et al.: Rapid detection of *Brucella* spp. by the loop-mediated isothermal amplification method. *J Appl Microbiol.* 2008 ; **104** (6): 1815-1823.
- 138) Nakao R, Stromdahl EY, Magona JW, et al.: Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for rapid detection of *Ehrlichia ruminantium*. *BMC Microbiol.* 2010 ; **10** : 296.
- 139) 吉野 学, 渡 一, 小島 禎, 他 : LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法によるコイヘルペスウイルスの高感度迅速検出. *魚病研究.* 2006 ; **41** (1): 19-27.
- 140) Yoshino M, Watari H, Kojima T, et al.: Rapid, sensitive and simple detection method for koi herpesvirus using loop-mediated isothermal amplification. *Microbiol Immunol.* 2009 ; **53** (7): 375-383.
- 141) Fujiwara-Nagata E, Eguchi M.: Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and simple detection of *Flavobacterium psychrophilum*. *J Fish Dis.* 2009 ; **32** (10): 873-881.
- 142) Shivappa RB, Savan R, Kono T, et al.: Detection of spring

- viraemia of carp virus (SVCV) by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in koi carp, *Cyprinus carpio* L. J Fish Dis. 2008 ; **31** (4): 249-258.
- 143) Kono T, Savan R, Sakai M, et al.: Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification. J Virol Methods. 2004 ; **115** (1): 59-65.
 - 144) Mekata T, Kono T, Savan R, et al.: Detection of yellow head virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). J Virol Methods. 2006 ; **135** (2): 151-156.
 - 145) Savan R, Igarashi A, Matsuoka S, et al.: Sensitive and rapid detection of edwardsiellosis in fish by a loop-mediated isothermal amplification method. Appl Environ Microbiol. 2004 ; **70** (1): 621-624.
 - 146) Gunimaladevi I, Kono T, Lapatra SE, et al.: A loop mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Arch Virol. 2005 ; **150** (5): 899-909.
 - 147) Caipang CM, Haraguchi I, Ohira T, et al.: Rapid detection of a fish iridovirus using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). J Virol Methods. 2004 ; **121** (2): 155-161.
 - 148) Fukuta S, Kato S, Yoshida K, et al.: Detection of tomato yellow leaf curl virus by loop-mediated isothermal amplification reaction. J Virol Methods. 2003 ; **112** (1-2), 35-40.
 - 149) 福田至朗, 吉田桂子, 他: LAMP法によるトマト黄化葉巻ウイルス検出技術の開発. プレインテクノニュース. 2003 ; **100** : 28-31.
 - 150) Peng J, Shi M, Xia Z, et al.: Detection of cucumber mosaic virus isolates from banana by one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. Arch Virol. 2012 ; **157** (11): 2213-2217.
 - 151) Fukuta S, Ohishi K, Yoshida K, et al.: Development of immunocapture reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of tomato spotted wilt virus from chrysanthemum. J Virol Methods. 2004 ; **121** (1): 49-55.
 - 152) 横浜植物防疫所: RT-LAMP法を用いたPlum pox virusの検出について. 植物防疫所病害虫情報. 2009 ; **No.88** : 8.
 - 153) 福田至朗, 加藤晋朗, 吉田桂子, 他: Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) 法によるシンビジウムモザイクウイルス (CyMV) の検出. 日本植物病理學會報. 2003 ; **69** (4), 411-414.
 - 154) 竹内良彦, 福田至朗, 大矢俊夫: RT-LAMP法によるメロン黄化えそウイルス (MYSV) の検出. 愛知農総試研報. 2006 ; **38** : 57-63.
 - 155) Okuda M, Okazaki S, Yamasaki S, et al.: Host Range and Complete Genome Sequence of Cucurbit chlorotic yellows virus, a New Member of the Genus Crinivirus. Phytopathology. 2010 ; **100** (6): 560-566.
 - 156) Okuda M, Matsumoto M, Tanaka Y, et al.: Characterization of the *tufB*-*secE*-*nusG*-*rplKAJL*-*rpoB* gene cluster of the citrus greening organism and detection by Loop-mediated isothermal amplification. Plant Disease. 2005 ; **89** : 705.
 - 157) 竹内良彦, 福田至朗, 大矢俊夫: タバココナジラミのバイオタイプQをLAMP法により迅速に識別できる. 平成18年度関東東北陸農農業研究成果情報, 2006.
 - 158) 福田至朗, 三宅律幸, 間下なぎさ, 他: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法によるイチジク株枯病菌の検出. 愛知農総試研報. 2009 ; **41** : 1-6.
 - 159) Sugawara K, Himeno M, Namba S, et al.: J. Gen. Plant Pathol. 2012 ; **78** : 389-397.
 - 160) 岸根雅宏, 奥西智哉: LAMP法を利用したコシヒカリの高精度・迅速識別. 日本食品化学工学会誌. 2011 ; **58** (12) : 584-589.
 - 161) Kikuchi T, Aikawa T, Oeda Y, et al.: A rapid and precise diagnostic method for detecting the Pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* by loop-mediated isothermal amplification. Phytopathology. 2009 ; **99** (12): 1365-1369.
 - 162) Maejima K, Hoshi H, Namba S, et al.: First report of plum pox virus infecting Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) in Japan. J Gen Plant Pathol. 2010 ; **76** (3): 229-231.
 - 163) Maejima K, Himeno M, Namba S, et al.: Molecular epidemiology of plum pox virus in Japan. Phytopathology. 2011 ; **101** (5): 567-574.
 - 164) Namba S, Kato S, Iwanami S, et al.: Detection and differentiation of plant pathogenic mycoplasma-like organisms using polymerase chain reaction. Phytopathology. 1993 ; **83** (7): 786-791.
 - 165) Walia JJ, Salem NM, Falk BW. (2009) Partial sequence and survey analysis identify a multipartite, negative-sense RNA virus associated with fig mosaic. Plant Dis. **93** (1): 4
 - 166) 小島 禎: 新規遺伝子増幅法LAMP法の基礎と食品微生物検査への応用. 食品工業8月30日号. 2003 ; 39-47.
 - 167) 山田尊士: 新規遺伝子増幅法LAMP法による食中毒起因菌の迅速検査. ジャパンフードサイエンス. 2004 ; **43** : 43-50.
 - 168) 松下 秀, 加藤 玲, 尾形和恵, 他: 腸管感染症におけるLAMP法の応用. モダンメディア. 2004 ; **50** (12): 293-299.
 - 169) 根本二郎, 百田隆祥, 砂田亜津子, 他: LAMP法を用いた腸管出血性大腸菌の検出. 第23回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集p40 (2002)
 - 170) Hara-Kudo Y, Nemoto J, Ohtsuka K, et al.: Sensitive and rapid detection of Vero toxin-producing *Escherichia coli* using loop-mediated isothermal amplification. J Med Microbiol. 2007 ; **56** (Pt 3): 398-406.
 - 171) 砂田亜津子, 他: 第14回日本臨床微生物学会講演要旨集. 2003 ; 193.
 - 172) 吉野 学, 他: 第25回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集. 2004 ; 22.
 - 173) 百田隆祥, 他: 第26回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集. 2005 ; 82.
 - 174) 百田隆祥: LAMP法 (Loop-mediated Isothermal Amplification) を用いたカンピロバクターの高感度迅速検出. 農産物・食品検査法の新展開. 2010 ; 97-105.
 - 175) 高野 弘: LAMP法を用いたノロウイルス・カンピロバクターの検出試薬キット. 月刊フードケミカル. 2011 ; **1** : 67-71.

- 176) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長：腸管出血性大腸菌026、0111及びO157の検査法について. 食安監発0515第3号, 平成24年5月15日
- 177) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長：腸管出血性大腸菌026、0111及びO157の検査法について. 食安監発1217第3号, 平成24年12月17日
- 178) Tsuchiya Y, Ogawa M, Nakakita Y, et al.: Identification of Beer-Spoilage Microorganisms Using the Loop-mediated Isothermal Amplification Method. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 2007; **65**(2): 77-80.
- 179) 安中敏光, 他：日本臨床微生物学雑誌. 2003; **13**(1): 19-25.
- 180) 井上浩章, 野田晃子, 縣 邦雄, 他：LAMP法, PCR法を用いた浴槽水レジオネラ属菌の迅速検査に関する調査研究. 防菌防黴誌. 2004; **32**(10): 481-487.
- 181) 遠藤卓郎, 他：LAMP-MPN法の検討・平成18年度 厚生労働科学研究費補助金(地域健康危機管理研究事業)最近の科学的知見に基づく水質基準の見直し等に関する研究(主任研究者：眞柄泰基)より、分担研究報告書
- 182) 百田隆祥, 小島 禎, 池戸正成, 他：LAMP法(Loop-mediated Isothermal Amplification)を用いたクリプトスポリジウムおよびジアルジアの高感度迅速検出. 水環境学会誌. 2009; **32**(6): 321-324.
- 183) 福田伸治, 高尾信一, 桑山 勝, 他：LAMP法による糞便からのノロウイルスの検出. 第52回日本ウイルス学会学術集会プログラム・講演要旨集. 2004; 272.
- 184) 保坂憲光, 吉野 学, 横田江利子, 他：LAMP法の化粧品微生物限度試験への応用. *FRAGRANCE JOURNAL*. 2012; **7**: 69-73.
- 185) Kaneko H, Iida T, Aoki K, et al.: Sensitive and rapid detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus DNA by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol.* 2005; **43**(7): 3290-3296.
- 186) Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, et al.: Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J Biochem Biophys Methods*. 2006; **70**(3): 499-501.
- 187) 幸 保孝：核酸増幅検査法の進歩. 保健師・看護師の結核展望. 2011; **97**: 85-89.
- 188) 斎藤武文, 鶴崎聡俊, 恩田直美, 他：臨床検体におけるPURE-LAMPとコバスTaqManMTBの比較検討. 結核. 2013; **88**(2): 262.
- 189) 吉多仁子, 小野原健一, 田澤友美, 他：塗抹陰性・MGIT法陽性検体での結核菌群核酸増幅迅速診断におけるコバス®TaqMan法とLAMP法の有用性の比較検討. 結核. 2013; **88**(11): 727-733.
- 190) 東出誠司：LAMP法による迅速診断肺炎マイコプラズマの検出. 第20回日本臨床微生物学会教育セミナー. 2013.