

LAMP法を使った 結核迅速診断キット



結核研究所抗酸菌レファレンス部
副部長 御手洗 聡

結核の診断は比較的簡単です。なぜなら疑いのある患者から結核菌を分離すれば、他の検体からの汚染などの場合を除いて、それはそのまま基本的に結核症であることを示しているからです。従って、結核菌を検出する技術に簡単にアクセスできることが日常診療上はとても重要と言えます。

よく知られているように、喀痰をスライドに載せて染色し、直接顕微鏡で観察する検査法（塗抹鏡検）は迅速な結核診断方法として認識されており、広く世界中で利用されています。しかしながら、比較的多くの結核菌が検体中に含まれていることが「塗抹陽性」の条件であり、ある程度病気が進行していないと多くの結核菌を排出する事態にはなりません。事実本邦では比較的早めに受診される例が多いと思われ、結核患者のうち塗抹陽性となるのはおよそ半分に過ぎません。この診断感度上の問題を解決するには一般に感度の高い培養検査を実施しますが、よく知られているように結核菌の培養には時間がかかるため、特に菌量の少ない検体では迅速診断上の問題が発生します。

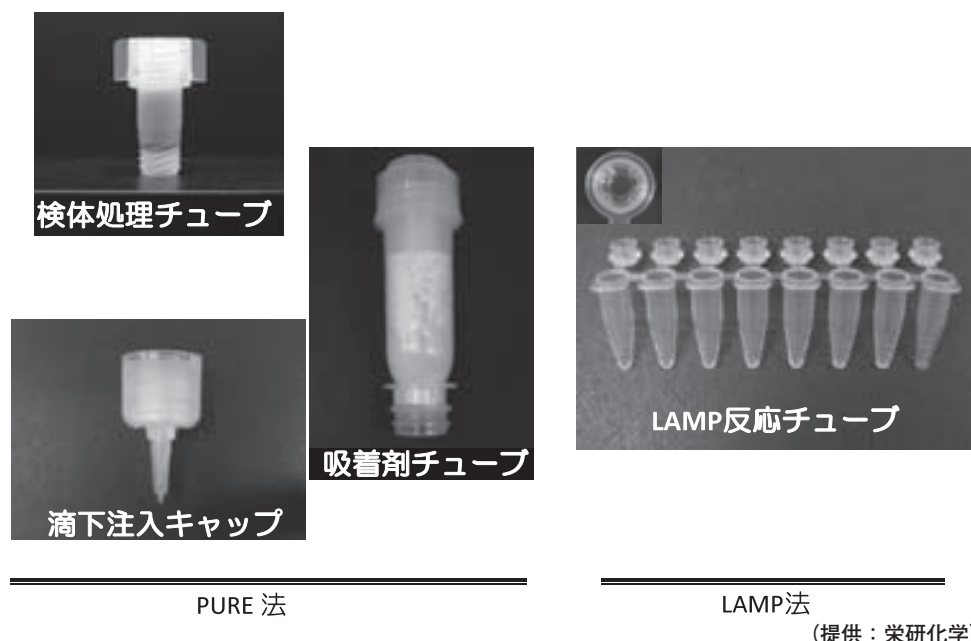
上記の問題点を解決してくれる診断法として最も有

用なのが遺伝子を人為的に短時間で増幅する「核酸増幅法」であることは周知の事実です。実際に本邦ではPCR（Polymerase Chain Reaction）、TMA（Transcription Mediated Amplification）、TRC（Transcription Reverse Transcription Concerted Amplification）などの方法が商業的に利用可能であり、年間100万件程度の検査が行われていると言われています。これほど多くの結核核酸増幅法検査を実施するのは世界でも日本だけです。ただしほとんどの方法は複雑な機器を必要としたりバイオセーフティ上の制約などがあるため、一部の病院や大手の検査センターでのみ実施されているのが現状です。核酸増幅法の有用性が明確であるにもかかわらず、多くの途上国で使用されていないのもこれらの理由があるためです。

新しい結核迅速診断

最近、複雑な機器を使用しなくても短時間で核酸を増幅できる方法として、栄研化学によりLAMP（Loop-mediated isothermal amplification）法と呼ば

図1 PURE法とLAMP法のキット構成



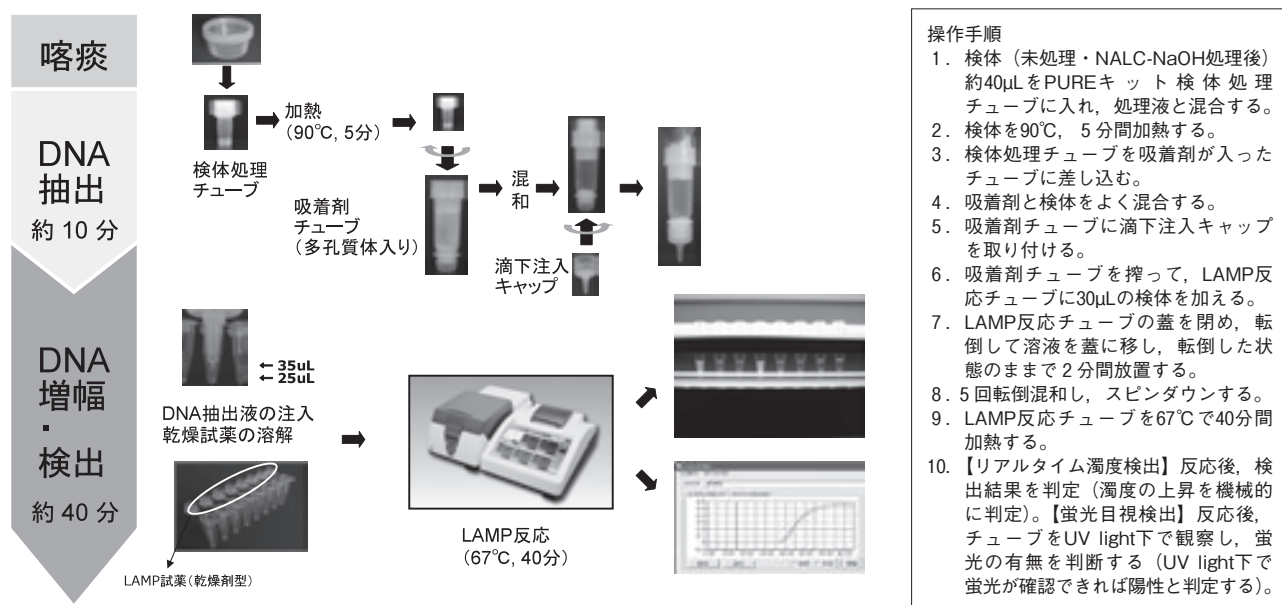
れる方法が開発されました。既にインフルエンザの診断キットなどが発売されていますが、今回結核菌検出のための専用キットが開発されました。このキットはPURE (Procedure for Ultra Rapid Extraction) 法と呼ばれる非常にシンプルで迅速な核酸抽出キットと併せて使用するようデザインされており、検体受領から結果の報告までが1時間以内で終了します (図1)。

具体的なPURE/LAMP結核菌検出キットの実施過程を図2に示します。検体としては、通常通り喀痰をNALC-NaOH処理したものを使用することも可能ですが、一番の利点は生の喀痰をそのまま使用することができる点です。採取した検体をPURE法の検体処理チューブに入れ、処理液と混合・加熱します。このステップで結核菌は不活化され、さらに菌体から核酸が溶出します。このままでは夾雑物が多く直接核酸増幅法に用いることはできないので、吸着体を含んだチューブに加熱した検体を加え、よく混合して夾雑物を吸着させます。残った緩衝液中の核酸検体を直接LAMP反応チューブに滴下し、乾燥化されている反応

試薬とよく混合した後67℃で40分間加熱します。LAMPによる核酸増幅反応は一定の温度で連続的に起こるので、反応は短時間で終了します。機器を用いて反応によって発生した物質を測定することも可能ですが、直接肉眼で沈殿物を確認する、あるいはUVライトを当てて蛍光の発生を確認することで、陽性の結果を確認することが可能です。反応の結果を判定するのに複雑な過程が必要ないのもLAMP法の利点となっています。

このLAMP法による結核菌検出キットは特異性が高く、基本的に結核菌以外の抗酸菌は増幅しません。臨床的診断精度については結核研究所と複十字病院、国立病院機構東京病院による共同臨床研究が実施されており (Mitarai S, et al. Evaluation of a simple loop-mediated isothermal amplification test kit for the diagnosis of tuberculosis. Int J Tuber Lung Dis. [in press]), 従来の核酸増幅法と変わらない精度が示されています (表1)。具体的にはそれぞれの病院で160名の患者から320検体を収集し、評価を実施しています。LAMPキットを未処理検体に用いた場合 (直接

図2 LAMPキットの処理過程と陽性反応



- 操作手順
1. 検体 (未処理・NALC-NaOH処理後) 約40μLをPUREキット検体処理チューブに入れ、処理液と混合する。
 2. 検体を90℃, 5分間加熱する。
 3. 検体処理チューブを吸着剤が入ったチューブに差し込む。
 4. 吸着剤と検体をよく混合する。
 5. 吸着剤チューブに滴下注入キャップを取り付ける。
 6. 吸着剤チューブを搾って、LAMP反応チューブに30μLの検体を加える。
 7. LAMP反応チューブの蓋を閉め、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。
 8. 5回転倒混和し、スピンドアウンする。
 9. LAMP反応チューブを67℃で40分間加熱する。
 10. 【リアルタイム濁度検出】反応後、検出結果を判定 (濁度の上昇を機械的に判定)。【蛍光目視検出】反応後、チューブをUV light下で観察し、蛍光の有無を判断する (UV light下で蛍光が確認できれば陽性と判定する)。

(提供: 栄研化学)

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

方法		疾患と患者数 (n=160)			結核診断感度 (% : 95%CI)	結核診断特異度 (% : 95%CI)
		結核	非結核	他の疾患		
直接LAMP	陽性	112	0	2	88.2 (81.4-92.7)	93.9 (80.4-98.3)
	陰性	15	18	13		
間接LAMP	陽性	106	0	0	83.5 (76.0-88.9)	100
	陰性	21	18	15		
Cobas Amplificor MTB	陽性	115	1	1	90.6 (84.2-94.5)	93.9 (80.4-98.3)
	陰性	12	17	14		
TRC Rapid MTB	陽性	114	0	1	89.8 (83.3-93.9)	97.0 (84.7-99.5)
	陰性	13	18	14		

(提供：栄研化学)

LAMP), 塗抹陽性・培養結核菌陽性検体における診断感度は98.2% (95%CI : 94.9-99.4) でした。同様に塗抹陰性・培養結核菌陽性検体では55.6% (95%CI : 43.4-68.0) でした。これらの診断感度はアンプリコア (ロシュダイアグノスティクス) およびTRCRapid M.TB(東ソー) と同等であり, 有意な差を認めませんでした。

海外でも活躍するLAMP法

このPURE/LAMPキットは検査コストも安く設定される予定で, さらに複雑な機械を必要としないため初期導入コストも低く抑えられると考えられます。またプロセスが簡単であることから, 検査技師以外でも簡単な訓練だけで実施可能であり, 検査技師のいない病院や診療所, あるいは夜間の救急の現場など, いろいろな場面での応用が期待されます。栄研化学はこのキットの開発をFIND (Foundation for Innovative

New Diagnostics) という財団と共同で行っており, これまで核酸増幅法検査を実施することが困難であった途上国においても広く導入が図られる予定です。HIV感染症患者では結核の合併が多く認められますが, 炎症反応が十分におこらないため従来の塗抹検査法の感度が低くなることが報告されています。HIVと結核を合併する患者はアフリカやアジアで多く見られており, 今後はこのような対象にLAMPキットが多く利用されると考えられます。FINDは結核高まん延国22カ国 (インド, 中国を含む) で行われている顕微鏡検査の当検査キットへの切り替えを求める方針とも伝えられており, 日本においても診断手順を再検討する必要があるかも知れません。

PURE/LAMPキットにより結核の核酸増幅法検査が日本ではさらに身近で利用しやすいものとなり, さらにこれまで利用が困難であった途上国の結核疑い患者にも広く使用されることが期待されます。