

[原 著]

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法による レジオネラ属菌の検出

安中敏光¹⁾・吉野 学¹⁾・百田隆祥¹⁾
根本二郎¹⁾・砂田亜津子¹⁾・小島 禎¹⁾
池戸正成¹⁾・石井良和²⁾・山口恵三²⁾

¹⁾ 栄研化学株式会社 生物化学研究所

²⁾ 東邦大学医学部 微生物学教室

(平成14年11月29日受付, 平成15年3月14日受理)

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法は迅速かつ高感度, そして特異性の高い新規遺伝子増幅法である。本法の酵素反応は一定温度 (65℃付近) で進行し, 増幅産物量が多いため, 1ステップの簡便な方法で増幅反応を行うことができる¹⁾。今回我々は16S rRNA 遺伝子を標的としたLAMP法によるレジオネラ属菌の検出方法を構築した。レジオネラ属6菌種の16S rRNA 遺伝子配列からレジオネラ属菌に特異的なLAMP法のプライマーを設計し, レジオネラ属6菌種13株および市中肺炎の起原因菌として分離頻度の高い菌を含むレジオネラ属以外の19菌種各1株を用いた特異性試験を行った。また, *Legionella pneumophila* を用いて検出感度を試験した。その結果, *Legionella micdadei* を除くレジオネラ属5菌種12株はすべて50分以内に遺伝子の増幅が認められ, レジオネラ属以外の19菌種19株はすべて遺伝子の増幅が認められなかった。また, *L. pneumophila* では60 CFU/testまで検出可能であった。

Key words: *Legionella*, DNA amplification, rapid detection, LAMP, loop-mediated isothermal amplification

レジオネラ属菌は自然界の土壌や淡水に生息するグラム陰性桿菌であり, 2001年現在, 48菌種が報告されている^{2~7)}。この48菌種はレジオネラ肺炎患者から分離された20菌種と, 環境材料から分離された28菌種に分かれるが, 本菌の病原因子が解明されていない現状ではすべてのレジオネラ属菌がレジオネラ症の原因菌になり得ると考えられ, 病原体のバイオセーフティーレベル分類でもすべてがレベル2とされている⁸⁾。

レジオネラ症の多くは本菌で汚染された水が何らかの理由によりエアロゾル化し, これを感受性宿主が経気道的に吸入することによって発症する。臨床例にお

いて感染源が特定されることはまれであるが, クーリングタワー冷却水, 温泉, 循環式浴槽, 噴水, プール, 池, 給水給湯設備, 加湿器, 呼吸管理装置などが感染源として知られている^{9,10)}。

レジオネラ症の治療では本菌が主にマクロファージなどの細胞内で増殖するため, *in vitro*での抗菌活性に加えて細胞内への移行性に優れた薬剤でなければ臨床効果が期待できない。すなわち, 現在多用されているβ-ラクタム剤やアミノグリコシド剤は臨床的には細胞内移行性が悪いために無効であり, エリスロマイシン, リファンピシン, ニューキノロンなどが選択薬となる。しかし, レジオネラ症は臨床診断, 菌の培養ともに困難であることから, 重篤化した後に有効抗菌剤を使用する機会が多い。また, レジオネラ症は症状の進行が速く, 死亡率も高いことから, 迅速かつ正確にレジオネラ属菌を検出し, 適切な治療をすることが必要である^{11,12)}。

今回我々はレジオネラ属菌の16S rRNA 遺伝子を標的として, *Legionella micdadei* を除くレジオネラ属菌

著者連絡先: (〒329-0114)

栃木県下都賀郡野木町大字野木143

栄研化学株式会社 生物化学研究所

安中敏光

TEL 0280-57-0717

FAX 0280-57-0712

E-mail toshimitsu_annaka@eiken.co.jp

を特異的に検出することができる loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法を構築したので報告する。

I. 材料・方法

1. LAMPプライマー

標的遺伝子はレジオネラ属菌の16S rRNA 遺伝子とした。レジオネラ属菌としてレジオネラ肺炎患者からの分離頻度が高い6菌種 (Legionella pneumophila, Legionella bozemanii, Legionella dumoffii, Legionella gormanii, Legionella longbeachae, L. micdadei) を選び¹³⁾, レジオネラ属以外の菌として市中肺炎の起因菌を含む7菌種 (Alcaligenes xylosoxidans, Escherichia coli, Haemophilus influenzae, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens, Staphylococcus epidermidis) を選んで, GenBank Databaseに登録されているそれぞれの16S rRNA 遺伝子配列を用いたアライメント解析を行った。アライメント解析には遺伝情報処理ソフトウェアGENETYX-WIN (ゼネティックス, 東京)を用いた。レジオネラ属菌特異的なLAMPプライマーの設計に際しては, 16S rRNA 遺伝子がすべての細菌に存在するため, レジオネラ属の菌種間ではホモロジーが高く, レジオネ

ラ属菌とそれ以外の菌の間ではホモロジーが低くなるように異なる6箇所の領域を選んだ。この6領域の塩基配列を用いて作製した4種類のプライマー, すなわち, forward inner primer (FIP: 5'末端側にF1 regionと相補的な配列を有し, 3'末端側がF2 regionと同じ配列から成り, リンカー配列はない), backward inner primer (BIP: 5'末端側にB1 regionと同じ配列を有し, 3'末端側がB2 regionと相補的な配列から成り, リンカー配列はない), forward outer primer (F3: F3 regionと同じ配列), backward outer primer (B3: B3 regionと相補的な配列) をLAMPプライマーとした (Fig. 1)。

2. 試験菌株

レジオネラ属菌はL. pneumophilaのserogroup 1~6を含む6菌種13株を用い, BCYE a寒天培地で37℃, 3日間培養した。レジオネラ属以外の菌 (非レジオネラ属菌) はグラム陰性桿菌14菌種, グラム陽性球菌4菌種, 各1株とBranhamella catarrhalis 1株の計19菌種19株を用いた。これらの菌株のうちH. influenzaeとB. catarrhalis以外の菌種は血液寒天培地を用い, ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌は30℃で18~48時間, それ以外の菌は37℃で18時間培養した。H. influenzaeとB. catarrhalisはチョコレート寒天培地で5% CO2条

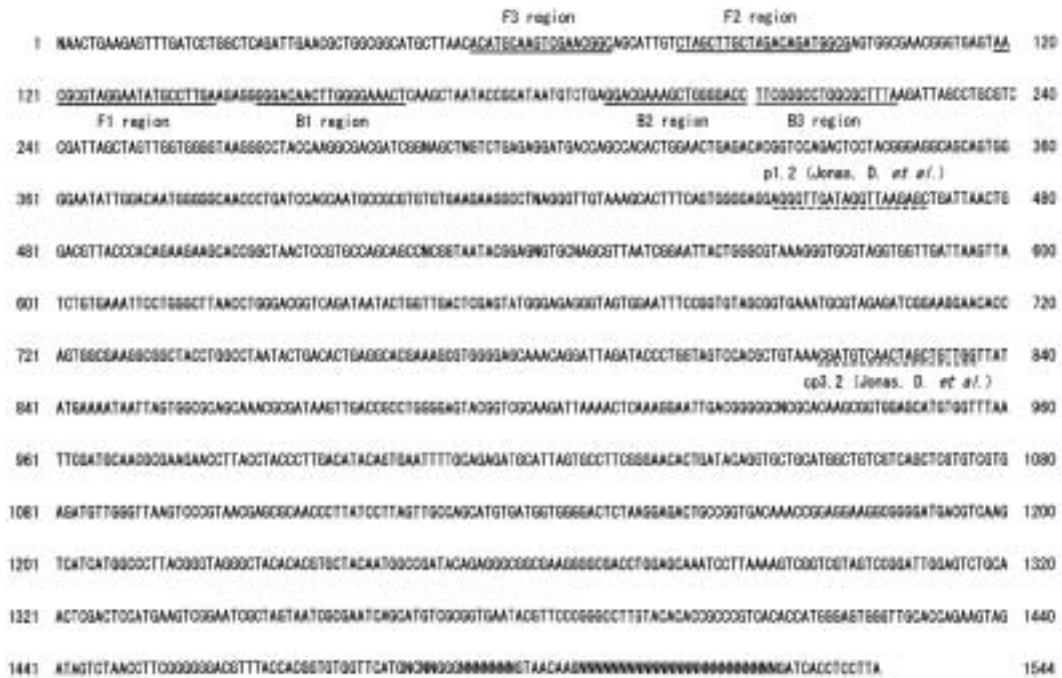


Fig. 1 Nucleotide sequence of *Legionella pneumophila* 16S rRNA gene used for designing the LAMP and PCR primers

Table 1 Comparison between the specificity of LAMP and PCR

Bacterial strains	LAMP		PCR	
	6 × 10 ³ CFU/test (6 × 10 ³ copies/test)	6 × 10 ⁵ CFU/test	6 × 10 ³ CFU/test (6 × 10 ³ copies/test)	6 × 10 ⁵ CFU/test
<i>Legionella pneumophila</i> ATCC 33152 serogroup 1	+		+	
<i>Legionella pneumophila</i> ATCC 33153 serogroup 1	+		+	
<i>Legionella pneumophila</i> ATCC 33154 serogroup 2	+		+	
<i>Legionella pneumophila</i> ATCC 33155 serogroup 3	+		+	
<i>Legionella pneumophila</i> ATCC 33156 serogroup 4	+		+	
<i>Legionella pneumophila</i> ATCC 33216 serogroup 5	+		+	
<i>Legionella pneumophila</i> ATCC 33215 serogroup 6	+		+	
<i>Legionella bozemanii</i> ATCC 33217	+		+	
<i>Legionella dumoffii</i> ATCC 33279	+		+	
<i>Legionella dumoffii</i> ATCC 33343	+		+	
<i>Legionella gormanii</i> ATCC 33297	+		+	
<i>Legionella longbeachae</i> ATCC 33462	+		+	
<i>Legionella micdadei</i> ATCC 33218	-		+	
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	-	-	-	*
<i>Acinetobacter lwoffii</i> ATCC 15309	-	-	-	*
<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 19209	-	-	-	-
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i> ATCC 27061	-	-	-	-
<i>Branhamella catarrhalis</i> EKN 5652	-	-	NT	NT
<i>Chryseobacterium indologenes</i> ATCC 29897	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	-	-	-	*
<i>Flavobacterium breve</i> ATCC 43319	-	-	*	*
<i>Flavobacterium odoratum</i> ATCC 4651	-	-	-	+
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 9795	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525	-	-	+	*
<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17588	-	-	*	*
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 8100	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990	-	-	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	-	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	-	-	-	-

+: positive or specific band was observed, -: negative, *: nonspecific bands were observed, NT: not tested

件下, 37℃で18時間培養した。試験に際しては, 平板培地上の各菌株のコロニーを生理食塩水中にMcFarland No. 3.0 (約1.2 × 10⁹ CFU/ml) になるように菌懸濁液を調製した (Table 1)。

3. 特異性試験

レジオネラ属菌は菌株によって集落が得られるまでの培養日数に差異があったため, 便宜上, 精製DNAを用いた。精製DNAはDNeasy™ Tissue Kit (QIAGEN, Tokyo) を用いて各菌懸濁液から全DNAを抽出し, 260 nmでの吸光度により各DNA濃度を27 ng/ml (約6 × 10⁶ copies/ml) に調製した¹⁴⁾。非レジオネラ属菌はTE緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) を用いて, 各菌懸濁液をそれぞれ約

6 × 10⁶ CFU/mlおよび約6 × 10⁸ CFU/mlに希釈した。これらは95℃で5分間の熱処理後, 氷冷して, 12,000 rpm, 4℃, 10分間の遠心分離を行い, その上清1 μlをDNA溶液として試験に用いた (Fig. 2)。すなわち, レジオネラ属菌は約6 × 10³ copies/test相当, 非レジオネラ属菌は約6 × 10³ CFU/test相当および約6 × 10⁵ CFU/test相当のDNA溶液を検体として用いた。

LAMP反応は鎖置換型DNAポリメラーゼである*Bst* DNA polymerase (New England Biolabs, USA), プライマー, dNTPs, バッファーおよびインターカレーターとしてethidium bromideを含む反応溶液24 μlに, 前記の検体1 μlを添加して65℃の等温で120分間

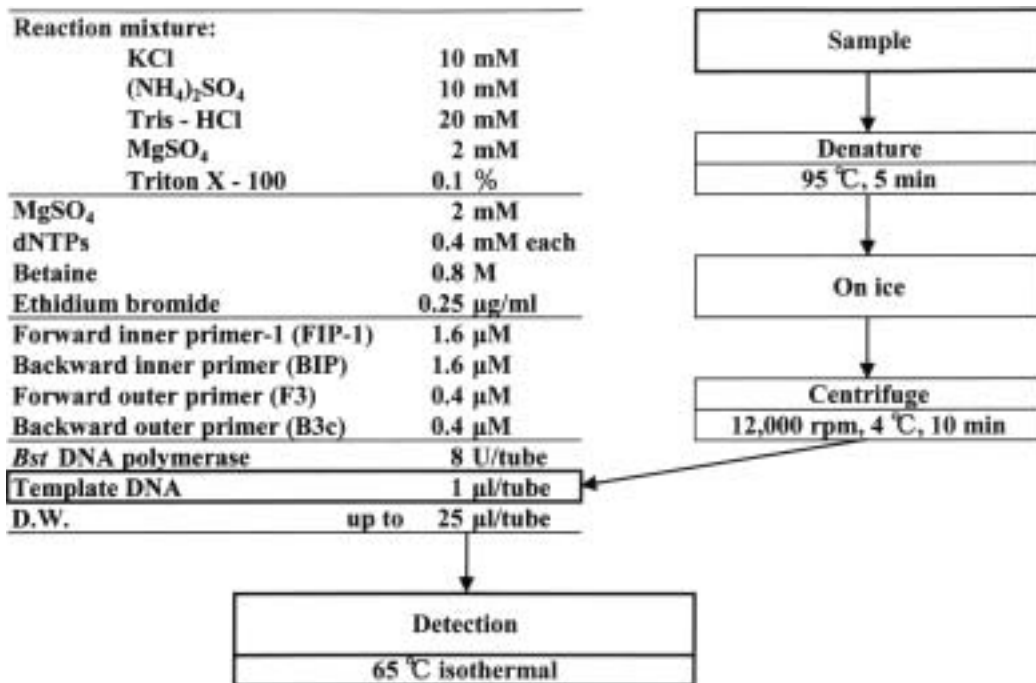


Fig. 2 Components of reaction mixture for the LAMP method and its protocol

行った (Fig. 2)。LAMP増幅産物の検出にはABI PRISM® 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Tokyo) を用いて蛍光強度を反応開始から経時的に測定し、反応時間内に一定レベル ($\Delta Rn = 100$) の蛍光強度を示した検体を陽性と判定した (Table 1)。

PCR反応はレジオネラ属菌の16S rRNA 遺伝子を標的としたJonasらの方法に従い¹⁵⁾、反応溶液24 µlに前記の検体1 µlを添加して行った。サーマルサイクラーT3 Thermocycler (Whatman Biometra, Germany) を用いて熱変性 (94 °C, 1分)、アニーリング (57 °C, 1.5分)、伸長反応 (72 °C, 1分) に至る過程を1サイクルとして、これを40サイクル行った。PCR増幅産物の検出は2% (W/V) アガロースゲル電気泳動で行い、ゲルには1レーンあたりPCR反応液5 µlをアプライした。100 Vの定電圧で50分間電気泳動を行い、0.5 µg/mlのethidium bromide溶液中で電気泳動後のゲルを染色した。UVトランスイルミネーター下でバンドの有無と、同時に電気泳動したDNAサイズマーカーとの相対的移動度からPCR増幅産物のサイズを確認した。本法で増幅される特異的増幅産物のサイズは386 bpであるため、この特異的増幅産物のバンドのみが認められた検体を陽性と判定した (Table 1)。

4. 感度試験

L. pneumophila ATCC 33152の菌懸濁液をTE緩衝液を用いて10倍連続希釈段階系列を作製し、それぞれ95 °Cで5分間の熱処理を行った。氷冷後、12,000 rpm, 4 °C, 10分間の遠心分離を行い、その上清1 µlを検体として用いた (Fig. 2)。菌懸濁液中の菌数はBCYE *a* 寒天培地を用いた生菌数測定法で確認した。すなわち試験に用いた検体は、6 CFU/test ~ 6×10^5 CFU/testの6段階と無添加の陰性対照である (Fig. 3, 4)。

LAMP反応およびPCR反応は特異性試験と同条件で行った。ただし、アガロースゲル電気泳動によるPCR増幅産物の検出では、1レーンあたりPCR反応液10 µlをアプライした。

II. 結果

1. LAMPプライマー

レジオネラ属菌特異的なLAMPプライマーを作製するために、*L. pneumophila*の16S rRNA 遺伝子配列 (GenBank accession number M59157) 上の異なる6領域の塩基配列を用いて4種類のLAMPプライマーを作製した。LAMPプライマー設計領域における*L. pneumophila*の塩基配列と、その他のレジオネラ属菌の塩基配列とのアライメント解析の結果、いくつかの塩基に相異があった。そこで、各レジオネラ属菌との

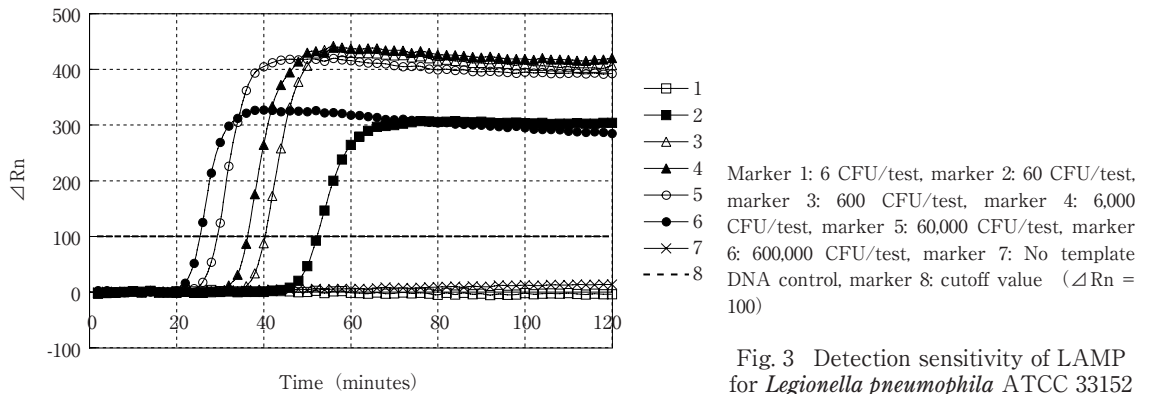


Fig. 3 Detection sensitivity of LAMP for *Legionella pneumophila* ATCC 33152

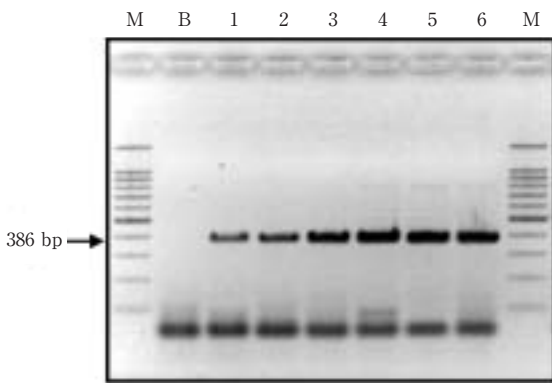


Fig. 4 Detection sensitivity of PCR for *Legionella pneumophila* ATCC 33152

Lane 1: 6 CFU/test, lane 2: 60 CFU/test, lane 3: 600 CFU/test, lane 4: 6,000 CFU/test, lane 5: 60,000 CFU/test, lane 6: 600,000 CFU/test, B: No template DNA control, M: 100 bp molecular weight marker

反応性を確認しながらLAMPプライマーを改良した結果、FIPの5'末端から37番目と39番目のAをそれぞれR (= A or G)にしたFIP-1を用いることで*L. micdadei*以外のレジオネラ属菌に対する反応性が向上した。以上の結果、*L. micdadei*を除くレジオネラ属5菌種12株をすべて50分以内に検出することができるLAMPプライマーセットを作製することができた (Table 1)。

2. 特異性試験

*L. micdadei*を除くレジオネラ属5菌種12株は、LAMP法およびPCR法のいずれの方法でもすべて遺伝子の増幅が認められた。しかし、非レジオネラ属19菌種19株は、LAMP法では約 6×10^3 CFU/test相当および約 6×10^5 CFU/test相当のいずれの場合でもすべて遺伝子の増幅が認められなかったが、PCR法では*P. fluorescens* ATCC 13525の約 6×10^3 CFU/test相

当と、*Chryseobacterium indologenes* ATCC 29897と*Flavobacterium odoratum* ATCC 4651の約 6×10^5 CFU/test相当の場合に特異的増幅産物と同じ386 bpのバンドのみが認められた。さらに、PCR法では約 6×10^3 CFU/test相当の場合に2株、約 6×10^5 CFU/test相当の場合に6株で386 bpのバンド以外の非特異的なバンドが認められた (Table 1)。

3. 感度試験

L. pneumophila ATCC 33152はLAMP法では60 CFU/test, PCR法では6 CFU/testまで検出可能であった (Fig. 3, 4)。しかし、検出時間はLAMP法が50分以内と迅速であったのに対して、PCR法では検出までに約4.5時間を要した。

III. 考察

現在、レジオネラ肺炎の確定診断は培養法あるいは血清抗体価測定で行われているが¹⁶⁾、培養法では特殊な培地を用いる必要があり、コロニー形成にも3~10日間を要している。また、血清抗体価測定では発症から抗体検出が可能となるまでに2週間以上を要するため、レトロスペクティブな診断にならざるを得ない。このように、培養法と血清抗体価測定は確定診断としての価値は高いが、診断までにきわめて長い時間を要している¹²⁾。

一方、補助診断として尿中抗原検出法やPCR法を併用することで診断率が向上してきている。これらの方法は培養法や血清抗体価測定に比べて感度や迅速性の面で優れているが、尿中抗原検出法では*L. pneumophila*のserogroup 1しか検出できないキットがあるなど検出法として満足できるものとはいえない¹²⁾。また、PCR法では2つの領域の認識で反応を行うために特異性の保証が難しく、特異性確保のためには別途プローブ等を用いたsouthern blotなどを行う必要があり、

信頼性の高い検査を行うための操作は煩雑である。そのため、簡便で安価であることが要求される日常検査の分野には浸透しているとはいえない¹⁷⁾。

LAMP法は増幅反応が一定の温度で進行する酵素を用いる。また、6領域を認識する4種類のプライマーを用いることから、LAMP法によって得られる増幅産物の特異性はきわめて高いという特徴を有している。このように、LAMP法は簡便・迅速・正確という特徴を兼ね備え、PCR法と全く異なる新規な技術である¹⁷⁾。

今回我々が構築したレジオネラ属菌に対するLAMP法では、*L. micdadei*を除くレジオネラ属5菌種12株においてすべて50分以内に遺伝子の増幅が認められた。また、非レジオネラ属19菌種19株はすべて120分の反応時間でも遺伝子の増幅が認められなかった (Table 1)。以上の結果、*L. micdadei*を除くレジオネラ属菌に対するLAMP法は高い特異性を有し、簡便、迅速な検出方法であることが確認された。

Jonasらが報告したPCR法ではレジオネラ属6菌種13株において、すべて386 bpのバンドのみが認められたが、非レジオネラ属菌である*P. fluorescens* ATCC 13525, *C. indologenes* ATCC 29897および*F. odoratum* ATCC 4651を対象とした場合にも386 bpのバンドのみが認められた (Table 1)。データは示さないがこれからPCR増幅産物を、増幅領域内を認識する制限酵素で切断すると、レジオネラ属菌で認められた386 bpのバンドはすべて予想されるサイズのバンド数本に切断されたが、非レジオネラ属菌で認められた386 bpのバンドは切断されなかった。以上のことから、Jonasらが報告したPCR法で単にPCR増幅産物の有無を検出するだけでは、レジオネラ属菌と非レジオネラ属菌を正確に識別することは困難であると思われた。今回の特異性試験では、LAMP法の方がJonasらのPCR法よりも高い特異性を有するという成績が得られたが (Table 1)、LAMPプライマーとJonasらのPCRプライマーでは標的遺伝子上の増幅領域が異なるため、成績を単純に比較することはできない。

L. pneumophila ATCC 33152を用いた感度試験の結果、LAMP法では60 CFU/test、PCR法では6 CFU/testまで検出可能であったが、検出時間はPCR法が約4.5時間と長時間を要したのに対し、LAMP法は50分以内と迅速であった (Fig. 3, 4)。これは、従来の培養法によるレジオネラ属菌の検出に3日以上の日数を要していたことを考えると、検出時間の大幅な短縮である。

LAMPプライマー設計領域における*L. pneumophila*の塩基配列と、その他のレジオネラ属菌の塩基配列と

のアライメント解析の結果、いくつかの塩基に相異が認められた。特にF2 regionにおいては、*L. micdadei*の塩基配列は*L. pneumophila*の塩基配列と比較して22塩基中5塩基の相異があり、アライメント解析に用いた*L. pneumophila*以外のレジオネラ属菌の中では最も塩基の相異が大きかった。このことが、今回、*L. micdadei*を検出することができなかった原因であると思われる。現在、*L. micdadei*の塩基配列に対応したプライマーを新たに加えることで*L. micdadei*を検出できるように検討中である。また、今回の特異性試験において、レジオネラ属菌では便宜上、精製DNAを用いたが生菌を用いた場合でも全く同じ成績が得られている。このように煩雑なDNA抽出操作が不要であることは、簡便、迅速なレジオネラ属菌の検出に大きく貢献できると思われる。

今回我々が構築したLAMP法で*L. micdadei*を除くレジオネラ属菌を特異的に、感度良く、50分以内と迅速に検出することができた。これにより、臨床あるいは環境検体から簡便、迅速、正確にレジオネラ属菌が検出可能になるとと思われる。現在、*L. micdadei*を含むレジオネラ属の他の菌種との反応性の向上、検出感度の向上および増幅時間の短縮¹⁸⁾を目的に改良を進めている。また、今回はreal time PCR用のサーマルサイクラーを使用してLAMP増幅産物の定量的検出を実施したが、LAMP法は目視での定性的検出も可能であるので¹⁹⁾、高価な検出器を使用しない検出方法の開発も進めている。今後は検出感度に関する検討を踏まえた上で、喀痰などの臨床検体を用いた検討を実施したいと考えている。

文 献

- 1) Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, et al.: Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*, 28: e63, 2000.
- 2) 江崎孝行, 劉 淑君, 広瀬健二, 他: 1980から1994年までに発表された細菌種名リスト. *Microbiol. Cult. Coll.*, 11: 31~91, 1995.
- 3) Hookey, J. V., N. A. Saunders, N. K. Fry, et al.: Phylogeny of *Legionellaceae* based on small-subunit ribosomal DNA sequences and proposal of *Legionella lytica* comb. nov. for *Legionella*-like amoebal pathogens. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46: 526~531, 1996.
- 4) Benson, R. F., W. L. Thacker, M. I. Daneshvar, et al.: *Legionella waltersii* sp. nov. and an unnamed *Legionella* genomospecies isolated from water in Australia. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46: 631~634, 1996.

- 5) Presti, F. L., S. Riffard, H. Meugnier, et al.: *Legionella taurinensis* sp. nov., a new species antigenically similar to *Legionella spiritensis*. Int. J. Syst. Bacteriol., 49: 397 ~ 403, 1999.
- 6) Adeleke, A. A., B. S. Fields, R. F. Benson, et al.: *Legionella drozanskii* sp. nov., *Legionella rowbothamii* sp. nov. and *Legionella fallonii* sp. nov.: three unusual new *Legionella* species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51: 1151 ~ 1160, 2001.
- 7) Presti, F. L., S. Riffard, H. Meugnier, et al.: *Legionella gresilensis* sp. nov. and *Legionella beliardensis* sp. nov., isolated from water in France. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51: 1949 ~ 1957, 2001.
- 8) 日本細菌学会バイオセイフティー委員会: 日本細菌学会バイオハザード防止指針の改訂 (バイオセイフティー指針の制定) について, 日本細菌学雑誌, 54: 667 ~ 715, 1999.
- 9) 大塚喜人, 坂上伸哉, 西山宏幸, 他: 4-1. レジオネラ検査ガイド. p. 70 ~ 85, 第13回日本臨床微生物学会総会ワークショップ, 2002.
- 10) 小川 博: B-I-6. 感染源と感染経路. p. 13 ~ 17, 新版レジオネラ症防止指針 (厚生省生活衛生局企画課監修). 財団法人ビル管理教育センター, 東京, 2000.
- 11) 平松啓一, 山西弘一: 4-II-5. レジオネラ属菌と感染症. p. 206 ~ 208, 標準微生物学 (第7版). 医学書院, 東京, 2000.
- 12) 小出道夫, 齋藤 厚: レジオネラ症, 臨床検査, 42: 523 ~ 528, 1998.
- 13) 宮本比呂志, 吉田真一: レジオネラ属菌の菌種・菌株による病原性の差異, 臨床と微生物, 25: 17 ~ 23, 1998.
- 14) Bender, L., M. Ott, R. Marre, et al.: Genome analysis of *Legionella* spp. by orthogonal field alternation gel electrophoresis (OFAGE). FEMS Microbiol. Lett., 60: 253 ~ 257, 1990.
- 15) Jonas, D., A. Rosenbaum, S. Weyrich, et al.: Enzyme-linked immunoassay for detection of PCR-amplified DNA of legionellae in bronchoalveolar fluid. J. Clin. Microbiol., 33: 1247 ~ 1252, 1995.
- 16) 上田 泰: レジオネラ肺炎診断基準, 日医会誌, 105: 1150 ~ 1151, 1991.
- 17) 神田秀俊, 納富継宣: 新しい遺伝子増幅法, ファルマシア, 37: 889 ~ 893, 2001.
- 18) Nagamine, K., T. Hase, T. Notomi: Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Mol. Cell. Probes, 16: 223 ~ 229, 2002.
- 19) Mori, Y., K. Nagamine, N. Tomita, et al.: Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. Biochem. Biophys. Res. Commun., 289: 150 ~ 154, 2001.

Rapid and simple detection of *Legionella* species by LAMP, a new DNA amplification method

Toshimitsu Annaka¹⁾, Manabu Yoshino¹⁾, Takayoshi Momoda¹⁾
 Jiro Nemoto¹⁾, Atsuko Sunada¹⁾, Tadashi Kojima¹⁾
 Masanari Ikedo¹⁾, Yoshikazu Ishii²⁾, Keizo Yamaguchi²⁾

¹⁾ Eiken Chemical Co., Ltd.

²⁾ Toho Univ. School of Medicine

Legionella is a common cause of community-acquired respiratory tract infections and occasionally causes nosocomial pneumonia. Rapid and accurate detection of legionellae is important for diagnosis and treatment of patients. In order to detect legionellae, a new DNA amplification method was designed and evaluated. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method amplifies DNA with high specificity, sensitivity, and rapidity under isothermal conditions at 65 °C. This method employs a DNA polymerase with strand displacement activity and a set of four specially designed primers that recognize a total of six distinct sequences on the target DNA. The primers targeting 16S rRNA gene were designed in order to detect a wide range of *Legionella* species. We could specifically detect the clinically important *Legionella* species including *Legionella pneumophila* serogroups 1 to 6, *Legionella bozemanii*, *Legionella dumoffii*, *Legionella gormanii*, and *Legionella longbeachae*. The detection limit of the assay was 60 CFU per test of *L. pneumophila* strain. Furthermore, all of the positive LAMP results could be obtained within 50 minutes. The LAMP method was able to detect a wide range of *Legionella* species with high specificity, sensitivity, rapidity, and a simple procedure.