

[原 著]

Loopamp PURE DNA 抽出キットを用いた  
Loopamp 結核菌群検出試薬キットの有用性の検討

小林昌弘<sup>1)</sup>・青木貞男<sup>1)</sup>・小池勝人<sup>1)</sup>・守屋 任<sup>2)</sup>・加藤 稔<sup>1)</sup>・齋藤武文<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> 独立行政法人国立病院機構茨城東病院臨床検査科

<sup>2)</sup> 独立行政法人国立病院機構災害医療センター臨床検査科

<sup>3)</sup> 独立行政法人国立病院機構茨城東病院内科診療部呼吸器内科

(平成 26 年 9 月 1 日受付, 平成 26 年 11 月 11 日受理)

*Mycobacterium tuberculosis* complex (MTB) の迅速な検出・同定は、診断・治療の観点からだけでなく、感染管理上においても重要となってくる。今回、我々は新たな結核菌群迅速診断キットである Loopamp Procedure for Ultra Rapid Extraction DNA 抽出キット (PURE 法) と Loop-mediated isothermal amplification (LAMP 法) を組み合わせた Loopamp 結核菌群検出試薬キット (TB-LAMP 法) の検査性能の評価を行ったので報告する。対象は咯出痰 161 検体とし塗抹・培養・同定結果およびコバス TaqManMTB (TaqMan 法) と TB-LAMP 法との結果について検討を行った。培養検査結果を標準とした TB-LAMP 法及び TaqMan 法の感度、特異度は共に 84%, 100% であった。一致率については 98.8% であり TB-LAMP 法、TaqMan 法のいずれか一方に陽性であった検体が 2 検体認められた。抗酸菌集菌塗抹陽性、陰性の 2 群に分けた場合の感度については、集菌塗抹陽性検体では共に 100% であり、集菌塗抹陰性検体では共に 73% であった。増幅阻害については TB-LAMP 法を実施した 161 検体において陽性コントロール、陰性コントロール共に正常な結果であり培養検査結果から増幅阻害による陰性結果はなかったと考えられた。以上のことから TB-LAMP 法の検査性能は、従来の核酸増幅検査と同等であると言える。

**Key words:** 結核菌群, 核酸増幅検査, TB-LAMP 法, TaqMan 法

## 1. 序文

日本における結核罹患率は漸減傾向が続いてはいるが、2012 年結核罹患率は人口 10 万人対 16.7<sup>1)</sup> と罹患率が 10 以下の欧米先進諸国と比べ高い値となっている。また、結核の集団感染事例は未だに報告されており結核は現在においても公衆衛生上、大変重要な感染症であると言える。結核の診断には基本的に細菌検査により結核菌を検出することが必要であり、古くから塗抹検査や培養検査が行われてきた。これらの検査は

現在においても抗酸菌検査には欠かせない検査ではあるが、迅速診断の観点からでは塗抹検査は感度が低く、結核菌か非結核性抗酸菌 (NTM) かの区別が困難であり、培養検査は培養に長時間を有するという問題がある。そのため、現在では高い感度と特異度を有する遺伝子検査、特に核酸増幅検査は迅速診断法として大変重要な検査法となっている<sup>2)</sup>。しかし、その核酸増幅検査であっても多くの場合検査には前処理をした検査材料を用いなければならないため、処理操作が煩雑であり測定に時間を有することから結果報告には最短でも数時間は要し、検体の提出時間によっては当日中の結果報告が困難であることが現状である。このため、核酸増幅検査のさらなる迅速化が期待されていた。

2011 年 6 月に TB-LAMP 法<sup>3)</sup>を用いた Loopamp 結核菌群検出試薬キット (栄研化学) が発売された。

著者連絡先: (〒319-1113) 茨城県那珂郡東海村照沼 825  
独立行政法人国立病院機構茨城東病院臨床検査科  
小林昌弘  
TEL: 029-282-1151  
FAX: 029-282-7156

このキットは PURE 法と呼ばれる簡易 DNA 抽出と併用して使用することにより、未処理の喀痰から直接結核菌群の検出が可能となり検体提出から結果報告が 1 時間以内で得ることが可能となった。

今回、TB-LAMP 法の検査性能を評価することを目的とし、塗抹・培養・同定結果および TaqMan 法（ロッシュダイアグノスティクス）と TB-LAMP 法との結果について比較検討を行ったので報告する。

## II. 対象と方法

### 1. 対象

2011 年 7 月から 2012 年 8 月までに当院の微生物検査室に抗酸菌検査依頼があった喀出痰 161 症例 161 検体を検討対象とした。

### 2. 方法

#### 1) 抗酸菌前処理法

喀出痰溶解剤スプタザイム（極東工業製薬：SAP）と NALC-NaOH 試薬「ニッスイ」（日水製薬：NALC-NaOH）を使用し、結核菌検査指針 2007<sup>2)</sup>に従って SAP-NALC-NaOH 法で実施した。

#### 2) 抗酸菌塗抹検査

結核菌検査指針 2007<sup>2)</sup>に従い作成した集菌塗抹標本に対しオーラミン・ローダミン染色を行った後、蛍光顕微鏡にて鏡検し（-）、（±）、（1+）、（2+）、（3+）の 5 段階に分け、判定を行った。

#### 3) 抗酸菌培養検査

抗酸菌培養検査は液体培養と固形培養の併用培養を実施した。液体培養は BacT/ALERT3D（シスメックス・ピオメリュー）にて最長 6 週間培養し、陽性シグナルの出た検体については培養液で塗抹標本を作製しオーラミン・ローダミン染色にて染色を行い、抗酸菌を確認した。固形培養は 2% 小川 PS 培地（日水製薬）または工藤 PD 培地“ニチビー”（日本ビーシージー製造）を用いて最長 8 週間培養を実施した。

#### 4) 抗酸菌核酸増幅検査

##### (1) TB-LAMP 法

###### ① 検体の調整から核酸抽出

検査材料は喀出痰のみを対象とし、未処理喀痰もしくは前処理済喀痰のどちらか一方を用いた。検体量は 40 から 60  $\mu$ L 使用した。核酸抽出には PURE 法を用いた。PURE 法の操作手順は試薬操作マニュアル<sup>5)</sup>に従い実施した。

###### ② Loopamp 結核菌群検出試薬溶解から核酸増幅・検出

核酸抽出液を Loopamp 結核菌群検出試薬に溶解させた後、リアルタイム濁度測定装置 RT-160C（栄研

化学）を用いて、増幅・検出を行った。結果判定については濁度判定と目視判定の両方を行い、濁度の上昇、もしくは緑色の蛍光が発した場合は陽性と判定した。操作手順及び結果判定については試薬操作マニュアル<sup>5)</sup>に従い実施、判定を行った。

##### (2) TaqMan 法

###### ① 核酸抽出

前処理後検体を用いて、タックマンマイコ用検体前処理試薬添加剤セット「SOL-M」を添加調製したアンプリコマイコバクテリウム検体前処理試薬セット II にて核酸抽出を実施した。操作手順は添付文章<sup>6)</sup>に従った。

###### ② 核酸増幅・検出

試薬調製並びに処理手順は添付文章<sup>7)</sup>に従い実施した。結果判定は自動判定に従い、内部コントロール（IC）陰性を増幅阻害とした。

##### 5) 同定検査

MTB, *Mycobacterium avium* (MAV), *Mycobacterium intracellulare* (MIN) の同定には TaqMan 法およびコバス TaqManMAI を用い、他の抗酸菌については DDH マイコバクテリア（極東製薬工業）を用いて行った。

##### 6) 統計解析法

有意差検定には  $\chi^2$  検定と t 検定を用い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。また、一致率の検討には kappa coefficient ( $\kappa$  係数) を用いた。

## III. 結果

検討対象 161 検体のうち、集菌塗抹が陽性 21 検体 (13%)、陰性検体 140 検体 (87%) であった。培養検査陽性となったのは 51 検体 (32%) であり、MTB 25 株 (16%)、MAV 11 株 (7%)、MIN 10 株 (6%)、*Mycobacterium gordonae* 3 株 (2%)、*Mycobacterium kansasii* 2 株 (1%)、培養陰性 110 株 (68%) であった。

### 1. 感度・特異度・一致率の比較

培養法結果を標準とした、TB-LAMP 法と TaqMan 法の感度、特異度、一致率を求めた。感度は TB-LAMP 法、TaqMan 法共に 84% (21/25)、特異度については TB-LAMP 法、TaqMan 法共に 100% (136/136) であり、NTM における偽陽性は認められなかった (表 1)。一致率については 98.8% (159/161)、 $\kappa$  係数は 0.95 と高い一致率となったが、TB-LAMP 法または TaqMan 法のみ陽性であった検体が 2 検体認められた (表 2)。

表 1. 培養法結果を標準とした TB-LAMP 法と TaqMan 法の精度

		培養法結果				感度	特異度
		MTB (25)	NTM (26)	陰性 (110)	計 (161)		
TB-LAMP 法	陽性	21	0	0	21	21/25 (84%)	136/136 (100%)
	陰性	4	26	110	140		
	計	25	26	110	161		
TaqMan 法	陽性	21	0	0	21	21/25 (84%)	136/136 (100%)
	陰性	4	26	110	140		
	計	25	26	110	161		
		抗酸菌集菌塗抹陽性/培養法陽性			抗酸菌集菌塗抹陰性/培養法陽性		
		MTB (10)	NTM (11)	計 (21)	MTB (15)	NTM (15)	計 (30)
TB-LAMP 法	陽性	10	0	10	11	0	11
	陰性	0	11	11	4	15	19
	計	10	11	21	15	12	30
検出率		100% (10/10)			73% (11/15)		
TaqMan 法	陽性	10	0	10	11	0	11
	陰性	0	11	11	4	15	19
	計	10	11	21	15	12	30
検出率		100% (10/10)			73% (11/15)		

表 2. TB-LAMP 法と TaqMan 法の一一致率

		TaqMan 法			
		陽性	陰性	増幅阻害	計
TB-LAMP 法	陽性	20	1	0	21
	陰性	1	139	0	140
	計	21	140	0	161
一致率		159/161 (98.8%)			

## 2. 塗抹陽性検体における検査成績の比較

集菌塗抹で陽性となった 21 検体はすべて培養法で陽性となり、そのうち MTB と同定されたのは 10 検体であった。TB-LAMP 法および TaqMan 法の検出率は共に 100% (10/10) であった。また、偽陽性については共に認められなかった (表 1)。

## 3. 塗抹陰性検体における検査成績の比較

集菌塗抹陰性 140 検体のうち、培養法で陽性となったのは 30 検体であり、そのうち MTB と同定されたのは 15 検体であった。TB-LAMP 法および TaqMan 法の検出率は共に 73% (11/15) であった。偽陽性については共に認められなかった (表 1)。

## 4. 培養陽性日数と TB-LAMP 法結果の比較

培養法にて MTB 陽性となった 25 検体を対象に集菌塗抹陽性/TB-LAMP 法陽性、集菌塗抹陰性/TB-

LAMP 法陽性、集菌塗抹陰性/TB-LAMP 法陰性の 3 群に分け、液体培養および固形培養の平均陽性化日数の比較を行った。

集菌塗抹陽性/TB-LAMP 法陽性検体は 10 件あり、平均培養陽性化日数は液体培養が  $13.7 \pm 4.3$  日、固形培養が  $3.5 \pm 0.7$  週であった。集菌塗抹陰性/TB-LAMP 法陽性検体は 11 検体あり、平均培養陽性化日数は液体培養が  $21.3 \pm 4.4$  日、固形培養が  $3.7 \pm 0.7$  週であった。また、固形培養陰性検体が 4 検体あった。集菌塗抹陰性/TB-LAMP 法陰性検体は 4 検体あり、平均培養陽性化日数は液体培養が  $35.8 \pm 3.4$  日、固形培養が  $5.5 \pm 1.0$  週であった。また、固形培養陰性検体が 2 検体あった (表 3)。液体培養における平均培養陽性化日数は集菌塗抹陽性/TB-LAMP 法陽性検体が集菌塗抹陰性/TB-LAMP 法陽性検体より有意差 (t 検定) をもって早い結果となった。

## IV. 考察

MTB の迅速な検出・同定は適切な治療方法の選択や感染管理において極めて重要となる。現在主流となっている核酸増幅検査法は標的遺伝子の増幅と検出を同時に行うリアルタイム PCR や Transcription-reverse transcription concerted reaction (TRC) で

表 3. 平均培養陽性化日数と集菌塗抹, TB-LAMP 法検査成績の比較

	集菌塗抹陽性/TB-LAMP 法陽性 (10)	集菌塗抹陰性/TB-LAMP 法陽性 (11)	集菌塗抹陰性/TB-LAMP 法陰性 (4)
液体培養	13.7±4.3 日	21.3±4.4 日	35.8±3.4 日
固形培養	3.5±0.7 週	3.7±0.7 週 (4 例培養陰性)	5.5±1.0 週 (2 例培養陰性)

あり, 国内で保険適用されている方法は TaqMan 法と TRC Rapid M.TB (東ソー: TRC 法) である。これらの方法は約 1 時間 30 分~2 時間 30 分で結果を得ることができ, PCR を原理とした従来の検査法に比べ飛躍的に検出までの時間が短縮した。しかしながら, 検体の前処理・核酸抽出操作は用手法であり, これらの操作が煩雑であることや前処理操作に約 1 時間 20 分の時間を要することから, 夜間当直時や通常時間内であっても午後に提出された検体ではたとえ塗抹検査陽性者であっても当日中の結果報告が困難であるのが現状である。このため, さらに簡便性・迅速性に優れた核酸増幅検査法が求められていた。

TB-LAMP 法は PURE 法を用いて核酸抽出を行うことによって, 検体の前処理操作が必要なく, 検体が提出されてから核酸抽出までは約 10 分で行うことができる<sup>8)</sup>。核酸増幅・検出はリアルタイム濁度測定装置を用いて行い, 反応時間が 40 分であることから結果報告を 1 時間以内に行うことが可能となった<sup>8)</sup>。また, Loopamp 結核菌群検出試薬キットの結核菌群検出用乾燥試薬 (dMTB) は反応チューブの蓋に乾燥・保持されているため試薬調製の必要がなく, 核酸抽出までの操作が簡便であることから, 従来の核酸増幅検査法に比べ作業量が格段に軽減していると言える。

検出感度, 特異度については TB-LAMP 法, TaqMan 法ともに培養法を標準とした場合は 84% と 100% であり, 統計学的な有意差 ( $\chi^2$  検定) は認められず, 同等の検査成績を得ることができた。一致率については 98.8% と TB-LAMP 法, TaqMan 法のみ陽性であった検体が 1 検体ずつ認められた。この不一致 2 検体はいずれも集菌塗抹陰性検体であった。増幅阻害については, TB-LAMP 法, TaqMan 法ともに陽性, 陰性コントロールは正常な結果を示し, TaqMan 法においては IC 陰性の結果は認められなかった。また, TB-LAMP 法陰性検体については培養陽性日数から検体中に含まれる菌量が微量であったことが推察され, 増幅阻害による偽陰性はなかったと考えられた。これらのことから, 不一致 2 検体については検体中に含まれる菌量が微量であったために, サンプリング時に結核菌群を採取することができず, 陰性となった可

能性が考えられた。抗菌集菌塗抹陽性, 陰性の 2 群に分けた場合の検出感度については 100% と 73% であり, 集菌塗抹陰性検体において検出感度の低下が認められた。御手洗らは未処理検体を用いて TB-LAMP 法を行った場合, 塗抹陽性/培養結核菌陽性検体, 塗抹陰性/培養結核菌陽性検体における診断感度は 98.2%, 55.6% であったと報告している<sup>9)</sup>。これらのことから塗抹陰性検体を用いて検査を行う場合は, 従来の核酸増幅検査法と同様に感度が低下することを念頭において検査する必要があると考えられた。しかしながら, 本検討において偽陽性は認められず, 集菌塗抹陽性検体における感度は 100% であった。このことから感染管理上重要となる排菌者における早期診断, NTM との鑑別に有用であると言える。

## V. 結語

TB-LAMP 法の検出感度は従来法と同等であり, 核酸抽出操作が簡便であることから検体提出から結果報告までの時間が飛躍的に向上されることが期待される。また, その簡便性から, 核酸増幅検査を行っていない施設においても導入が可能であることから結核の迅速診断及び感染管理における重要なツールになりえると言える。

なお, 本論文の要旨は第 24 回日本臨床微生物学会総会にて発表した。

## 文 献

- 1) 結核予防会. 2013. 結核の統計 2013 年版. 結核予防会, 東京.
- 2) 日本結核病学会抗菌薬検査法検討委員会. 2007. 結核菌検査指針 2007. 結核予防会, 東京.
- 3) Notomi, T, H Okayama, H Masubuchi, et al. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 28: E63.
- 4) 高野 弘. 2011. 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.
- 5) マイコバクテリウム核酸テスト Loopamp 結核菌群検出試薬キット 試薬操作マニュアル. 栄研化学.

- 6) タックマンマイコ用検体前処理試薬添加剤セット「SOL-M」添付文書. 島津製作所.
- 7) コバス TaqMan MTB・MAI 添付文書. ロッシュ・ダイアグノスティックス社.
- 8) 高野 弘. 2012. 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. モダンメディア 58 (8): 246-249.
- 9) Mitara, S., M. Okumura, E. Toyota, et al. 2011. Evaluation of a simple loop-mediated isothermal amplification test kit for the diagnosis of tuberculosis. INT J TUBERC LUNG DIS 15 (9): 1211-1217.

## Evaluation of the PURE-LAMP method for diagnosing *Mycobacterium tuberculosis* complex

Masahiro Kobayashi<sup>1)</sup>, Sadao Aoki<sup>1)</sup>, Katuhito Koike<sup>1)</sup>, Ataru moriya<sup>2)</sup>, Minoru Katou<sup>1)</sup>, Takefumi Saito<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Clinical Laboratory, National Hospital Organization Ibarakihigashi National Hospital

<sup>2)</sup>Department of Clinical Laboratory, National Hospital Organization Disaster Medical Center

<sup>3)</sup>Department of Respiratory Medicine, National Hospital Organization Ibarakihigashi National Hospital

Nucleic acid amplification (NAA)-test is important tool for diagnosing *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTB). We investigated new NAA-test using the Procedure for Ultra Rapid Extraction (PURE)-Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. This study was used only sputum and compared smear-test, culture-test, identification-test and other NAA-test. The LAMP method and other NAA-test exhibited a sensitivity of 84%. There are showed the same result on 159 specimens from a total of 161 sputum specimens. A sensitivity of smear-positivity and smear negative were 100% and 73% together with the LAMP method and other NAA-test.

Amplification inhibition of the LAMP method was not considered from positive control, negative control and culture-test result. From the above, it was considered that the LAMP method was equivalent to the conventional NAA-test.