

Loopamp
LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)

栄研化学株式会社
www.oncochem.co.jp

LAMP法とPURE法を組み合わせた結核菌群の検出

栄研化学株式会社

千葉県臨床検査技師会 第3回微生物検査研究班研修会
2011.9.4

Loopamp
LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)

栄研化学株式会社
www.oncochem.co.jp

結核：日本の現状

Loopamp
LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)

栄研化学株式会社
www.oncochem.co.jp

結核についてインターネットで検索すると…

- 33人が結核集団感染、2人発症
岡山市の民間病院
2011.6.23
- 随自で結核集団感染
10人が感染・84人が陽性反応
感染拡大防止を徹底
2010.4.19
- 病院で結核集団感染
日向、3人発症
2010年11月27日
- 網走刑務所で結核集団感染
15人感染、3人発症
2010年11月22日
- 結核集団感染で80代女性死亡
厚木の特養ホーム
2010.10.8
- ハリセンはるか
結核入院、
芸能界感染不安
2009/4/7
- 広島市の病院で結核集団感染
2011.2.1

結核は「過去」の病気ではありません！

Loopamp
LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)

栄研化学株式会社
www.oncochem.co.jp

新登録結核患者数および罹患率の年次推移

患者数
結核速性陽性
結核患者数
罹患率(人口10万人)
結核速性陽性
結核罹患率

＜旧分類＞
＜新分類＞

YASR
JISREI/Agri-Sys/StatSoft/PIgraf

- 1999年「結核緊急事態宣言」
- いまだに24,000人以上の患者が新たに登録されている
- 日本の結核罹患率は2008年に人口10万人あたり19.4人 → 「中蔓延国」
欧米先進国は10人以下
- 人口10万人あたり10人以下の「低蔓延国」になるには10年以上、
100万人あたり1人以下の「制圧」までには50年以上かかる(予測)。

Loopamp
LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)

栄研化学株式会社
www.oncochem.co.jp

結核新登録患者の年齢別推移

65歳以上が半数以上

0% 20% 40% 60% 80% 100%

0-4 5-9 10-14 15-19 20-24 25-29 30-34
35-39 40-44 45-49 50-54 55-59 60-64 65-69
70-74 75-79 80-84 85-90 90+

結核の統計2009より

Loopamp
LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)

栄研化学株式会社
www.oncochem.co.jp

結核罹患率の地域性

全結核罹患率(人口10万人対) 2008年

日本の罹患率: 19.4


財団法人結核予防会結核研究所疫学情報センターHPより

結核とは？

- *Mycobacterium tuberculosis* (ヒト型結核菌)、*M. bovis* (ウシ型結核菌)、*M. africanum* (アフリカ型結核菌) 等の **結核菌群により引き起こされる感染症**。
日本の結核は主に *M. tuberculosis* による。
- 結核菌は1882年に細菌学者コッホが発見。
- 明治時代～昭和20年代は国民病、亡国病。
- 50年前までは、年間死亡者数も10数万人に及び死亡原因の第1位。

結核菌とは？

- グラム陽性桿菌。芽胞、莢膜、鞭毛を持たない細長い細菌。
- 細胞壁に脂質・蠟質を含むため、一度染色されると酸などでも脱色されにくい抗酸菌。
- 消毒薬や有機溶媒処理にも抵抗性が強い。
- 人工培地では分裂速度が遅く、培養に約1カ月を要する。
- 吸入感染で、周囲に菌を排出している健康保菌者などが感染源となる。



なぜ 結核罹患率が高いのか

- **集団感染が増加**
 - ・若い世代で結核に対する抵抗力(免疫)をもたない人々が増加
 - ・診断の遅れなどによる集団感染・院内感染が増加
- **高齢者での発病が増加**
 - ・新登録患者の半数以上が65歳以上
 - ・戦前・終戦直後に感染を受け、加齢、病气などで免疫力が低下
- **診断されにくい(診断の遅れにつながる)**
 - ・発病するとたちまち重症化するが、重病にならないと診断がつきにくい
- **社会的経済弱者の発病が増加**
 - ・ホームレスをはじめ、健康管理の機会に恵まれない人たちの発病が目立つ
- **服薬の不徹底**
 - ・治療脱落が多い
 - ・結果として、多剤耐性結核が出現している

結核患者を減らすには、早期発見、早期治療、治療の徹底により感染拡大防止が重要

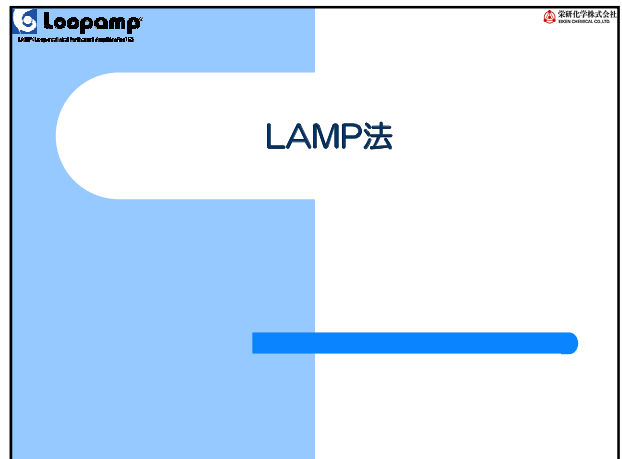
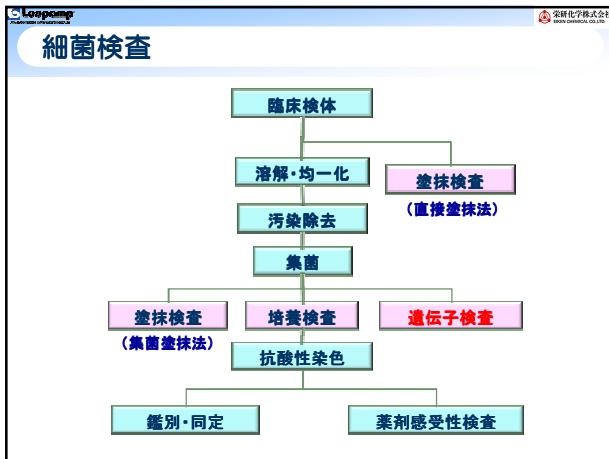
結核の検査

感染を知るための検査

- **ツベルクリン反応検査**
 - ・結核菌が作るたんぱく質成分(精製ツベルクリン、PPD)を皮膚に注射し、48時間後の皮膚反応を観察する。
 - ・結核菌に感染した人は発赤も大きく固くなる。
- **クオンティフェロン(QFT)検査**
 - ・血液検査によって結核の感染を調べる。
 - ・BCGに反応しない特異蛋白ESAT-6、CFP-10を血液に作用させる。
 - ・結核菌の感染を受けている人のリンパ球ではインターフェロンγが放出されるが、非感染者では放出されない。
 - ・BCGの影響は受けませんが、結核既感染は陽性となる。

発病を知るための検査

- **엑스線検査**
 - 定期健康診断
 - 結核患者が発生した際の接触者健診
 - ※集団感染が疑われるとき: 6カ月後、1年後、場合により2年後も
- **細菌検査**
 - 塗抹検査 ... 結核菌か非結核性抗酸菌か鑑別できない
 - 培養検査 ... 培養に時間がかかる
 - 遺伝子検査 ... 結核菌群を検出できるが、手技が煩雑



LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法

プライマー設計

増幅原理

- 抽出したDNA
- プライマー
- 鎖置換型DNAポリメラーゼ
- dNTPs
- 反応バッファー

をチューブ内で混合し、約65°Cでインキュベート

- 4つのプライマー（6つの領域を使用）
- 温度サイクルを必要としない（65°C付近一定温度）
- 増幅産物は標的遺伝子の相補的配列が繰り返されたもの
- 増幅効率は10¹⁰倍（PCRの100倍から1,000倍）

LAMP法による簡易検出

【ピロリン酸マグネシウムによるリアルタイム濁度検出】

増幅反応の過程で生成する副産物：**ピロリン酸マグネシウムによる白濁**をリアルタイムに検出する。

リアルタイム増幅グラフ

【蛍光検出】

カルセイン結合力V Mn^{2+} dNTPs Mg^{2+} → DNA polymerase → 増幅 → カルセイン結合力 Mn^{2+} $P_2O_4^{4-}$ → ピロリン酸Mg(白濁) ピロリン酸Mg(白濁)

LAMP法の特徴と利点

- 等温（65°C付近）で遺伝子を増幅できる**
反応装置を単純化可能
- 特異性が非常に高い**
増幅の有無で目的菌を検出
- 増幅効率が非常に高い**
反応が1時間程度で終了
- 増幅産物の量が非常に多い**
副産物で増幅を確認
- RNAからも1ステップ**
逆転写の操作を簡略化できる

迅速・簡便・精確な検査 幅広く応用可能

PURE法：Procedure for Ultra Rapid Extraction 法

迅速・簡易なDNA抽出法

PURE法の特徴

- 検体由来の阻害物質を除去
- 検体処理時間は、約10分

Loopamp®
LAMP法とPURE法を組み合わせた
結核菌群検出


Loopamp® 結核菌群検出試薬キット

- 使用目的：喀痰から抽出された結核菌群DNAの検出
(結核菌群感染が疑われる有症状者を対象とする診断の補助)
- 保険適用申請中


試薬構成：

		48テスト分	96テスト分
結核菌群検出用乾燥試薬	dMTB	48tubes × 1	48tubes × 2
陽性コントロール	PC MTB	0.4mL × 1	0.4mL × 1
陰性コントロール	NC MTB	0.5mL × 3	0.5mL × 6
陽性コントロール用スポイト		12droppers × 1	12droppers × 1

貯蔵方法：室温保存
有効期間：15ヵ月間



Loopamp® PURE DNA抽出キット



	90テスト分
検体処理チューブ	90本
吸着剤チューブ	90本
滴下注入キャップ	90個

貯蔵方法：室温保存
有効期間：2年間

結核菌群検出のための操作手順



喀痰
DNA抽出 約10分
DNA増幅・検出 約40分

検査全体を通して、感染およびコンタミネーションのリスクを低減

試薬以外に必要な器具・装置

DNAの抽出

安全キャビネット	感染性の検体を扱うため
ピペット-60セット (推奨) (チップ6本/箱×4箱 +マイクロピペット1本)	痰、及び陽性コントロールを採取するため
ヒートブロック (PureLAMP heater)	結核菌を不活化 (溶解) させるため

DNAの増幅

微量簡易遠心機	微量な試薬を遠心してチューブの先に集める (スピンドダウン) ため
8連マイクロチューブ用簡易遠心機	LAMP反応液を遠心してチューブの先に集める (スピンドダウン) ため
LAMP法専用リアルタイム濁度測定装置	LAMPの増幅から検出までを行うため (リアルタイムに増幅曲線の確認が可能)
インキュベーター (蛍光測定部付恒温装置 LF-160)	LAMPの増幅から検出までを行うため (蛍光目視での確認が可能)

装置の組み合わせ (①,②の何れか)

① リアルタイム濁度検出

簡易前処理槽 PureLAMP heater + EXIA LA-320C RT-160C

② 蛍光検出

蛍光測定部付恒温装置 LF-160

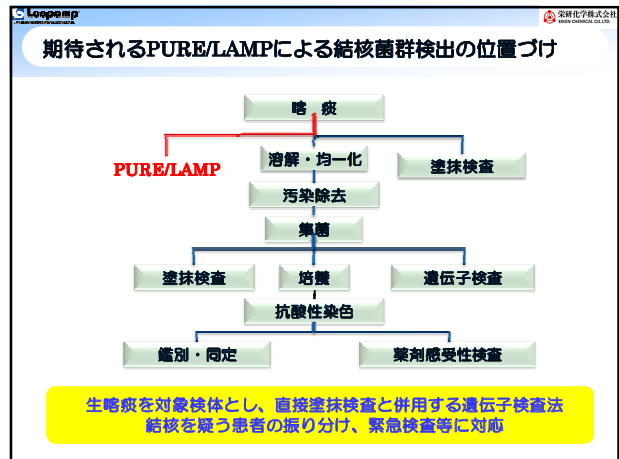
PURE法とLAMP法を用いた結核菌群検出の臨床試験データ

160名の結核疑い患者から2日連続で早期痰を採取
各検査で、2日間の検査のうち一度でも結核菌群が検出された場合を陽性と判定

		患者診断数 (n=160)			結核診断感度	結核診断特異度
		結核 (127例)	非結核性抗酸菌	他疾患		
PURE/LAMP (未処理喀痰)	陽性	112	0	2*2	88.2%	93.9%
	陰性	15*1	18	13		
PCR法 (NALC-NaOH処理済喀痰)	陽性	115	1*4	1*5	90.6%	93.9%
	陰性	12*3	17	14		
TRC法 (NALC-NaOH処理済喀痰)	陽性	114	0	1*7	89.8%	97.0%
	陰性	13*6	18	14		

*1: 直接塗抹 - : 15症例、*2: 何れも結核後遺症・肺アスペルギルス症、
*3: 集菌塗抹 - : 12症例、*4: *M. kansasii*、*5: 肺炎
*6: 集菌塗抹 - : 13症例、*7: 気管支拡張症

Mitarai, IJTLD, in press



まとめ

Loopamp® PURE DNA抽出キットと
Loopamp® 結核菌群検出試薬キットを一緒に用いることで

- 生喀痰からの結核菌群検出
- NALC-NaOH処理を行わない遺伝子検査
- 喀痰採取から1時間以内での結果報告

が可能となり、
結核を疑う患者さんの早期発見・早期治療、及び
院内感染を含む感染拡大防止に貢献します。

LAMP法を用いた試薬キット

● 細菌	体外診断用医薬品	結核菌群 検出試薬キット マイコプラズマ 検出試薬キット レジオネラ 検出試薬キットC	栄研化学販売品
環境衛生検査用		レジオネラ 検出試薬キットE クリプトスポリジウム 検出試薬キット ジアルジア 検出試薬キット	eGenomeOrder 販売品
食品・環境検査用		サルモネラ 検出試薬キット 腸管出血性大腸菌 検出試薬キット ペロ毒菌(VTEC)タイプ 検出試薬キット 大腸菌O157 検出試薬キット <i>L. monocytogenes</i> 検出試薬キット カンピロバクター 検出試薬キット プライマーセット <i>A. baumannii</i> プライマーセット 冷水細菌	その他
研究用		百日咳菌 検出試薬キット	
● ウイルス	体外診断用医薬品	H1pdm2009インフルエンザウイルス 検出試薬キット A型インフルエンザウイルス 検出試薬キット H5N1型インフルエンザウイルス 検出試薬キット SARSコロナウイルス 検出試薬キット 単純ヘルペスウイルス (HSV-1/2) 検出試薬キット	
研究用		プロウイルスG/C 検出試薬キット プライマーセット WNV プライマーセット Avian Flu H5 プライマーセット Avian Flu H7 プライマーセット KHV	
● その他	研究用	牛胚性判別 試薬キット	

ご清聴ありがとうございました