

PURE-LAMP 法を用いた肺外結核診断と
BCG 同定検出法の開発

神 崎 裕 二

(総合内科学専攻)

防衛医科大学校

平成 29 年度

目 次

第1章 緒言	1 頁
第2章 PURE-LAMP法の肺外結核症例への応用	
第1節 目的	7 頁
第2節 方法	7 頁
第3節 結果	8 頁
第4節 小括	9 頁
第3章 PURE-LAMP法を用いたBCGを迅速同定する遺伝子検査方法の開発	
第1節 目的	10 頁
第2節 方法	10 頁
第3節 結果	14 頁
第4節 小括	16 頁
第4章 BCG同定PURE-LAMP法の臨床症例への応用	
第1節 目的	17 頁
第2節 方法	17 頁
第3節 結果	18 頁
第4節 小括	19 頁
第5章 考察	20 頁
第6章 結論	26 頁
謝辞	27 頁

引用文献 28頁

図表 42頁

第1章 緒言

近年、エボラウイルス病や重症急性呼吸器症候群 (severe acute respiratory syndrome, SARS) などの新興感染症が出現し脅威となっている。このような状況のなか、十分な設備がなくても迅速かつ正確な診断を可能にする感染症検査手法の必要性が高まっており、臨床現場即時検査 (point of care testing, POCT) という検査システムの概念が注目されている(1)。これは被験者の傍らで医療従事者が行う検査システムのことで、コンパクトで操作が簡便であり検査時間の短縮などにより迅速適切に医療、看護、予防に寄与するという利点を有している。一方、感染症診断において核酸増幅検査法 (nucleic acid amplification test, NAAT) は重要な検査法であり、特に polymerase chain reaction (PCR) 法は先進国において幅広く普及しているが、開発途上国など資源に限りのある地域においては、一定の設備と熟練が必要なためその導入には制限が生じている(2)。

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法は迅速、簡易、精確な革新的 NAAT として、納富らにより報告された技術であり(3)、2000年に提唱されて、1000以上の論文が報告されている。この方法では、PCR法のように熱変性のステップを繰り返す必要がないため、一定温度で自己増殖的に目的領域の遺伝子を高効率に増幅することが可能である。反応にサーマルサイクラーが不要で、また、6種類の遺伝子領域を認識するプライマーを設計することで特異性が

非常に高く、さらに、判定には電気泳動も不要であり、反応液の混濁で判定が可能である（図 1）。LAMP 法は検査法として汎用性が極めて高く、限られた検査環境においても実施可能な実用性の高い検査であることから、開発途上国での検査や、日本も含めた先進国における POCT としての活用が一層期待されている。

この LAMP 法はすでにいくつかの感染症診断に応用されており、SARS コロナウイルスに始まり(4)、以降、H5 亜型インフルエンザウイルス(5)、A 型インフルエンザウイルスおよび A (H1N1) pdm 09 インフルエンザウイルス(6)、レジオネラおよびマイコプラズマ(7)、肺結核における結核菌群検出等に応用され(8)、体外診断用医薬品として承認、販売されている。また、マラリア(9, 10)、皮膚リーシュマニア(11)、ニューモシスチス肺炎(12)などでの臨床応用例が報告されている。さらに、LAMP 法の周辺技術の開発により、本法は格段に簡易、迅速な検査になりつつある。特に procedure for ultra rapid extraction (PURE) 法による DNA 抽出キット(8)は、熱処理した検体から多孔質吸着体により DNA をきわめて簡易に精製する技術であり、LAMP 法と組み合わせることにより迅速な診断を可能にする（図 2）。この PURE キットはプラスチック製のチューブに充填された密閉構造となっており、検体間のコンタミネーションや検査室汚染、検査者への病原体暴露を防ぐことができ、結核蔓延国の顕微鏡検査を実施している施設でも利用することが可能で、顕微鏡検査に代わるあるいは顕微鏡検査を補強する

検査として、WHO の推奨を受けている(13)。

筆者は、この PURE-LAMP 法をさらなる感染症診断に応用するべく、肺外結核の診断ならびに bacillus Calmette-Guérin (BCG) の検出同定に応用を試みた。

肺外結核は世界の結核例のうちおよそ四分の一に達しており、HIV 感染症例においてはさらに高い比率を占めている(14, 15)。薬剤耐性結核菌が増加しているという観点からも結核症の迅速で正確な診断が重要となっている。塗抹検査と培養検査が現在の結核診断のゴールドスタンダードであるが、肺外結核症例のうち塗抹検査での陽性率は 1~37%、培養検査は 12~80%とされており(16)、塗抹検査は感度に欠け、培養検査は時間を要するという問題を抱えていた。一方、PCR 法は肺結核のみならず肺外結核例においても迅速で正確な結核菌検出が可能であるが(17, 18)、前述のように医療資源の乏しい地域においてはその導入には限界がある。

BCG は、ウシ型結核菌 (*Mycobacterium bovis*: *M. bovis*) を長期間にわたり継代培養して得られた弱毒株であり、我が国では小児の重症結核症である結核性髄膜炎や粟粒結核の発症予防に有効なワクチンとして使用されている(19, 20)。一方、BCG は膀胱癌および尿管癌などの尿路上皮癌の再発・進行予防の目的で、低コストの薬剤としてすでに臨床応用されている(21, 22)。しかし BCG

ワクチン接種および膀胱内投与後には全身的な有害事象として、骨炎(23)、泌尿・生殖器感染症、肝炎および肺炎(24)などが報告されている。さらに、播種性のBCG感染症を引き起こした場合の予後は極めて不良であり、特に免疫不全患者や後天性免疫不全症候群(AIDS)患者でその傾向が顕著である(25, 26)。

また、現状の臨床検査ではBCGの同定が困難であることから、適切な病原体診断が遅れることが多く、最終的には治療薬投与の遅れがさらに本症の予後を悪化させる要因になると考えられている(27)。

これまで、結核菌群 (*M. tuberculosis* complex: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*) 同定のゴールドスタンダードは、小川培地を用いた培養検査後に各種生化学的検査を加える検査法であり、現在でも臨床の現場で用いられている(28, 29)。しかしながら、この方法では結核菌群の中で正確な菌種判別ができない上、判定までに1か月以上を要することが欠点であった。近年では結核菌培養は自動化され(BACTEC mycobacterial growth indicator tube: MGIT 960)、同定までの時間短縮には成功しているものの、やはり結核菌群の菌種同定は不可能である(30)。そのため、BCGを含めた正確な診断を得るためには、フェージ型別検査(31)、高速液体クロマトグラフィー(32)、*IS1081* フィンガープリンティング(33)、そしてPCR法(34)などが用いられてきたが、いずれの方法も一定の設備技術を要し、検査室内で容易に実施

できる臨床検査としては普及していない。BCG は市中流行の微生物ではなく BCG 投与歴のある患者に感染が限定されており、BCG 投与後にみられた病態において結核菌群が証明されれば、臨床的には BCG 感染症が疑われるものの、医療科学と言う見地から確定診断と疫学的情報収集は欠かせない。

従って、簡便かつ迅速に実施可能な BCG の同定法の開発は臨床上の重要な課題であり、BCG を用いた治療に伴う有害事象を POCT 診断技術として対応できる検査方法が望まれている。

BCG は、結核菌 (*M. tuberculosis*) と比較して染色体遺伝子上に 16 の遺伝子領域に欠失が存在することが報告されている(35)。そのなかでも、詳細な説明は後述するが、region of difference 1 (RD1) といわれる領域の欠失は BCG に極めて特異的であり、分子生物学的種同定には最も信頼できる標的遺伝子であると考えられている。PCR 法を活用した様々な方法でこの欠失を検出し、種同定を行う検査技術がこれまで報告されてきたが(36-38)、その実用性に問題が残されていた。

筆者は、LAMP 法とその周辺技術である PURE 法に注目し、PURE-LAMP 法が喀痰のみならず様々な組織検体に対しても適応できるのではないかと考えた。本研究では、1) PURE-LAMP 法が肺外結核症例の診断に対しても有用であるかどうか検討した。次に 2) BCG を迅速に検出同定する LAMP 法を独自に設計し、臨床

疑似検体を用い、それを PURE 法と組み合わせた際の有用性を検討した。最後に 3) BCG 同定 PURE-LAMP 法を実際の臨床症例に応用し、その有用性を検討した。

第2章 PURE-LAMP法の肺外結核症例への応用

第1節 目的

PURE法を用いた簡易DNA抽出キットと一体化された結核菌群診断キットは、喀痰を試料とした肺結核の診断への有用性が報告されているが、喀痰以外の試料に対する有効性は検証されていない。本章ではPURE-LAMP法結核菌群診断キットの肺外結核診断に対する有用性を臨床例から検討した。

第2節 方法

(1) 症例（対象）

2014年4月から2015年3月の間に防衛医科大学校病院において、BacT/ALERT[®] three-dimensional microbial detection system (bioMerieux, Nurtigen, Germany) を利用した培養法、ならびにCobas TaqMan MTB test kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を利用したPCR法で確定診断された肺外結核患者を対象とし、その残余検体を用いた。

(2) PURE法を用いたDNA抽出法

組織懸濁液60 μ Lまたは蒸留水を用いて作成した拭い液100 μ Lを、Loopamp[®] PURE DNA抽出キット (Eiken Chemical, Tokyo, Japan) に付属して

いる緩衝液 960 μL に混入、攪拌し、ヒートブロックを用いて 100 $^{\circ}\text{C}$ 、5 分で加熱した。その後多孔質吸着体を用い、溶液から 30 μL の DNA 抽出液を得た。

(3) LAMP 法による核酸増幅と判定方法

LAMP 法による核酸増幅は Loopamp[®]結核菌群検出試薬キット (Eiken Chemical) の添付文書で推奨されている通り、67 $^{\circ}\text{C}$ 、40 分の条件で施行した。増幅の判定については、蛍光イルミネーター (ECX-F15.M, Eberhardzell, Germany) を用いた紫外線励起 (312 nm, 10000 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) による蛍光の肉眼的評価または LA-200 濁度計 (Eiken Chemical) を用い、リアルタイムに濁度計測を行い判定した。

(4) 倫理的な配慮

本研究計画はヘルシンキ宣言を遵守しており、臨床情報の解析に関しても本校の倫理委員会の承認を得ている (防衛医科大学校倫理委員会承認番号 2098)。

第 3 節 結果

(1) 患者背景

当該期間中に培養ならびに PCR 法で肺外結核と確定診断された患者は 3 例であった。3 例の臨床情報を表 1 に示す。1 例目は頸部リンパ節結核と診断された

フィリピン国籍の患者で（図 3a）、生検リンパ節断面の拭い液を検査に用いた。2 例目は脊椎カリエスと診断された日本国籍の患者で（図 3b、c）、L5 椎体周囲に形成された膿瘍の穿刺吸引検体を用いた。3 例目は肺門、縦隔リンパ節結核と診断されたガーナ国籍の患者で（図 3d、e）、超音波気管支鏡下穿刺吸引検体を用いた。すべての症例において HIV 罹患はなく、肺結核の既往も確認できなかった。

（2）結果

全症例で PURE-LAMP 法による核酸増幅法を用い、40 分の増幅反応後には蛍光の肉眼目視判定で結核菌遺伝子の検出が可能であった。また、症例 2 および 3 においては濁度計を用いて陽性と判定できた。検体処理から結果判定までに要した時間は、90 分程度であった。代表的な結果として、症例 2 における目視判定結果および濁度計による判定結果を図 4 に示す。

第 4 節 小括

本研究では病変拭い液および膿瘍を用いた PURE-LAMP 法により、3 症例全例が肺外結核と診断できたことから、PURE-LAMP 法は喀痰以外の検体にも応用が可能であると考えられた。また、その工程は簡便で、検体処理から結果判定まで 90 分程度で施行可能であり、POCT 検査として有用と思われた。

第3章 PURE-LAMP法を用いたBCGを迅速同定する遺伝子検査方法の開発

第1節 目的

第2章においてPURE-LAMP法は喀痰以外の検体においても病原体検出に有用と考えられた。このPURE-LAMP法を用い、BCGに特異的にみられるRD1の欠失の検出を行うことで、簡易で迅速にBCGを同定する遺伝子検査の開発が可能と考え、検討を行った。

第2節 方法

(1) BCG 遺伝子の精製

BCG株を小川培地 (Kyokuto Pharmaceutical, Tokyo, Japan) で培養したのち、Isoplantキット (Nippon gene, Toyama, Japan) を用いてその添付文書に従って染色体DNAを抽出した。精製したDNAは、TEバッファーを用いて最終濃度が1.0 fg/ μ Lから1.0 ng/ μ Lになるように調整した。なお、DNAは実験に使用するまで-20℃で凍結保存した。

(2) プライマー設計とLAMP反応条件の構築

LAMP反応に用いるプライマー設計のため、GenBankデータベースからRD1領

域を含む BCG の遺伝子情報 (GenBank accession no. AP010918.1) を抽出し、他の抗酸菌群の遺伝子情報とともに BLAST 検索により相同領域を同定した(図 5) (39)。最終的に、Web 上に公開されている LAMP プライマー設計支援ソフトである PrimerExplorer 4 を用い(40)、F1 プライマーの 5' 末端側が欠失を跨ぐようにプライマーを設計し、RD1 領域の欠失をもつ BCG に対してのみ特異的に増幅する LAMP 反応系を構築した(図 6)。設計したプライマーの塩基配列は表 2 に示した。

LAMP 反応には、Loopamp DNA Amplification Reagent Kit (Eiken Chemical) を用いた。LAMP 反応産物の検出には、リアルタイム濁度測定装置(以下、濁度計)(Loopamp EXIA, Eiken Chemical)を用いてリアルタイムかつ定量的に LAMP 反応を検出したほか、肉眼目視での定性的判定、ならびに反応産物を蛍光物質により発色させ、より明瞭な肉眼的定性判定についても検証した。反応液の組成は、1. DNA サンプル (1 μ L)、2. FIP・BIP プライマー (40 pmol)、3. F3・B3 プライマー (20 pmol) および 4. *Bst* DNA polymerase (1 μ L) のほか、reaction buffer (20 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 8 mM MgSO₄, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween 20, 0.8 M betaine, 1.4 mM each dNTP) を添加した。蛍光発色の際には、さらに蛍光発色試薬 (fluorescent detection reagent, Eiken Chemical) を 1 μ L 添加した。最後に蒸留水を加え、反応溶液を 25 μ L

に調製して LAMP 反応を行った。至適反応温度を明らかにするため、LAMP 反応温度は 61 °C、62 °C、63 °C、64 °C でそれぞれ複数回反応させ、最も高感度に増幅が得られた温度を至適温度とし、最終的に 64 °C を反応至適温度と決定した。

(3) 感度の検証

上記項目で作成した 1.0 fg/μL から 1.0 ng/μL に段階希釈した BCG の精製 DNA 溶液を用い、LAMP 反応の検出感度を解析した。反応は至適温度である 64 °C で行い、DNA の検出限界濃度を検証した。

(4) 特異性の検証

先に設計した LAMP プライマーセットが、BCG 以外の病原体 DNA に交差反応しないことを確認するため、目的とする配列を含まないグラム陽性菌、陰性菌、真菌の子嚢菌、担子菌等微生物各科、属から代表的な微生物を 44 種 49 株選別し (表 3)、ナショナル・バイオリソース・プロジェクトの中核拠点である国立大学法人岐阜大学研究推進・社会連携機構 微生物遺伝資源保存センターより譲渡を受けた精製 DNA 10 ng/μL を用い、今回設計したプライマーにおける交差反応を検証した。検証には RD1 遺伝子に欠損がみられない結核菌群である *M. tuberculosis* と *M. microti* を含めた。

次に、LAMP 反応物が BCG 株菌の遺伝子配列に特異的であり、非特異的増幅や

プライマーダイマーではないことを検証した。LAMP 法の増幅産物によるコンタミネーションを防ぐため、反応後のチューブ開封を要する制限酵素での処理や電気泳動、塩基配列決定を避け、リアルタイム PCR システムであるライトサイクラー (Roche LightCycler LC480 System, Roche Diagnostics) を用いて LAMP 反応を行い、増幅産物の熱解離曲線に基づく解析を行った(12)。反応は 96 ウェル・プレートを用い、Tth pyrophosphatase (20 mU/mL) (New England Biolabs, MA, USA) と YO-PRO-1 (0.25 µg/mL) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を添加し LAMP 反応を行うことで、リアルタイムにインターカレーターである YO-PRO-1 の蛍光を定量的に測定することで解析を実施した。反応は 64 °C で 60 分間行い、BCG の精製遺伝子は 1 ng/反応から 1 fg/反応まで段階希釈したものを用いた。最終的に熱解離曲線による解析を行うため、LAMP 反応終了後に 60 °C から 80 °C まで毎秒 0.2 °C の加熱速度で 96 ウェル・プレートを加熱させながら断続的に蛍光を測定し、ライトサイクラーに付属のソフトウェアを用いて熱解離曲線を作成した。

(5) 疑似検体を用いた PURE-LAMP 法による検出感度の検証

今回設計した BCG 同定のための LAMP 反応について、実際の臨床検体への応用の可能性を検証するため、菌液から迅速かつ効率的に LAMP 反応に使用できる純度の DNA が PURE キットにより抽出できるか検討した(41)。このキットに

よる抽出効率の検証には、MGIT 液体培地で培養した BCG の懸濁液を作成し、生理食塩水及び全血、血清、尿、脳脊髄液 (Biopredic International, Saint-Gregoire, France) と $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ で保存されていた非結核患者に施行された気管支肺胞洗浄液の残余検体を用いて、マクファーランド比濁法により菌液濃度を $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^7$ cells/mL に調整した臨床疑似検体を作成した。続いて、これら菌液 (100 μL) を PURE キット付属の抽出液 (960 μL) に混じ、 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、10 分間加熱処理をした。その後、キット添付の使用説明書に従いその全量をパッケージングされた高分子吸着体に加え、十分に攪拌したのちフィルター抽出し、DNA の粗抽出液を得た。これを各菌種につき 3 検体を別個に PURE 法により DNA 精製を行い試料とした。得られた DNA 粗抽出液 1 μL を鋳型 DNA とし、先に検証した蛍光発色 LAMP 法での BCG 遺伝子の検出感度を検証した。

(6) 倫理的な配慮

この検査で用いた気管支肺胞洗浄液を本研究で用いることについては本校の倫理委員会の承認を得ている (防衛医科大学校倫理委員会承認番号 2310)。

第 3 節 結果

(1) 感度の検証

濁度計で増幅産物を検出した場合には、30 分の反応時間で 1 pg/反応の遺伝

子まで検出することができた (図 7)。一方、蛍光試薬を添加し、60 分の反応ののち肉眼判定で増幅産物を検出した場合には、10 pg/反応の遺伝子まで検出することができた (図 8)。

(2) 特異性の検証

44 種 49 株の細菌ならびに真菌に対してはいずれの遺伝子でも今回設計した LAMP 反応において非特異的な増幅はみられなかった。濁度計を用いた実験結果の一部を図 9 に示す。

ライトサイクラーでは 1 pg/反応までの DNA 濃度で増幅が可能であり (図 10a)、熱解離曲線解析では、全ての DNA 濃度においてアニーリングピークを与える温度は同一であり、この結果から、LAMP 反応生成物が均一な特異的増幅産物であることが示唆された (図 10b)。

(3) 疑似検体を用いた PURE-LAMP 法による検出感度の検証

PURE キットを用いた DNA 簡易精製・抽出法と LAMP 法とを組み合わせることで、生理食塩水を用いて作成した BCG の懸濁液は 1.0×10^3 cells/反応まで検出できることが明らかとなった。尿、脳脊髄液および気管支肺胞洗浄液を用いた臨床疑似検体に対しても同等の結果を得られたが、血清を用いた疑似検体では、この菌数においては、3 検体中 1 検体が陰性となった。また、全血の混入した疑似検体に関しては、生食を用いて 2 割に希釈した検体は同等の菌数の

BCG を検知できたが、4 割希釈の検体から検出感度が低下し始め、希釈率が低まるに従ってさらに検出感度は低下し、希釈のない全血においては 1.0×10^6 cells/反応の検出同定も不可能であった（表 4）。

第 4 節 小括

本研究では、BCG で極めて特徴的にみられる RD1 遺伝子の欠失を含む配列を認識し、特異的に検出可能な LAMP 反応系を独自に構築した。さらに細菌、BCG を除く抗酸菌、真菌に交差反応を認めないことを 44 種 49 株の微生物検体で確認したほか、増幅産物が BCG 配列特異的であることを検証した。この検出系の開発により、BCG の迅速な同定と治療導入が可能となるだけでなく、LAMP 法により遺伝子欠失の有無を判定できる可能性を明らかにした。さらに、PURE キットを組み合わせた場合にも、臨床疑似検体において BCG を検出同定することが可能で、検体処理から遺伝子同定まで迅速かつ簡易的に検査が実施可能であることを明らかにした。

第4章 BCG 同定 PURE-LAMP 法の臨床症例への応用

第1節 目的

第3章において構築した BCG 同定 PURE-LAMP 法は臨床検体への応用が可能と考えられた。そこで著者は、この PURE-LAMP 法を実際に BCG 感染症症例へ臨床応用することを試みた。

第2節 方法

(1) 症例

防衛医科大学校病院において、膀胱癌に対し BCG 膀胱注入療法を受けた後、BCG 尿路感染症を発症した患者を対象とし、その残余尿検体を用いて研究を行った。

(2) PURE 法を用いた DNA 抽出法

患者随時尿 10 mL から尿沈渣を作成した後、PURE キット (Eiken Chemical) に付属の 960 μ L の緩衝液に攪拌し、ヒートブロックを用いて、100 $^{\circ}$ C、5 分で加熱した。その後多孔質吸着体を用い溶液から 1 μ L の DNA 抽出液を得た。

(3) LAMP 法による核酸増幅と判定方法

LAMP 法による核酸増幅は第3章の通り 64 $^{\circ}$ C の条件で実施した。増幅の有無

については、蛍光発色させて、肉眼で判定を行った。

(4) 倫理的な配慮

本研究計画はヘルシンキ宣言を遵守しており、臨床情報の解析に関しても本校の倫理委員会の承認を得ている（防衛医科大学校倫理委員会承認番号2246）。

第3節 結果

(1) 症例

患者は76歳の男性。膀胱癌に対し、防衛医科大学校病院泌尿器科で経尿道的切除術を施行された。病理組織学的診断は尿路上皮癌 pT1 および上皮内癌であった。術後、外来にて、BCG (Tokyo 172 strain) 80 mg の膀胱内注入療法を、週1回、8週間施行された。その2年後に、血尿、頻尿、排尿時痛が出現し、尿検査で結核菌に対するPCR法が陽性であったため、尿路結核の疑いで当科を紹介された。

(2) 結果

PURE-LAMP法により尿検体からBCGの同定が直接可能であった。検体の処理から判定までに要した時間は、1時間以内であった。イソニアジドとリファンピシンによる治療経過において、経時的にBCG遺伝子の有無をモニターしたところ、

治療開始前から治療開始後 30 日まで BCG の同定、検出が可能であった (図 11)。

LAMP 法の検出感度は PCR 法と同等程度であり、実用化の可能性を有することが示された。患者は治療開始から 30 日で自覚症状が改善し、60 日で LAMP 法及び PCR 法が陰性となり、2 剤を計 180 日投与して治療を終了した。その後、BCG 感染症の再発を認めていない。

第 4 節 小括

BCG 尿路感染症患者から採取した随時尿 10 mL から PURE 法により DNA 溶液を簡易精製したのち、LAMP 法により BCG を検出同定することが可能であった。この LAMP 法では臨床検体の処理から判定までが 1 時間以内の実施可能であり、今後同様の症例は速やかに BCG 感染症と確定診断し、適切に治療を開始することができるものと考えられた (42)。

第5章 考察

本研究により2つの目的に対するPURE-LAMP法の有用性が検討できた。すなわち1つは肺外結核への診断応用、2つ目はBCGの検出同定法の開発である。

肺外結核は鑑別診断が悪性腫瘍や様々な感染症など多岐にわたり、診断が困難な疾患である。また、本邦における肺外結核患者数は2012年で7125人、2015年で6241人と低下傾向にあるが、全結核症例に対する割合は2012年で33.4%、2015年で34.1%を占めている(43)。また、他の先進国においては、むしろ全結核症例に対しての肺外結核患者数の割合が増加していることも報告されており(44-46)、注意が必要な疾患である。診断は針吸引生検や切除検体を塗抹、培養、病理検査することによってなされるが、塗抹検査による感受性は0~77.8%、培養検査では8~80%、PCR法では33~94.6%とされ(47, 48)、PCR法を組み合わせることで感度を上げることができると報告されているが(49)、それにはPCRが実施できる設備が必要である。肺結核に対するLAMP法の感度は、塗抹及び培養陽性の喀痰検体では98.2%、塗抹陰性培養陽性の喀痰検体では55.6%とされており(8)、PCR法と同等の結果が得られており(50)、肺外結核診断においてもLAMP法はPCR法に代替できる可能性があると思われた。また、LAMP法にも検出限界がみられるものの、本研究では塗抹陰性の2つの検体でもLAMP法により結核菌検出が可能であったことに加え、さら

には検体処理から判定まで 90 分で実施できるという利点があげられ、設備の乏しい環境はもとより、設備の整っている先進国においても PURE-LAMP 法のような POCT 診断技術の開発、臨床応用は有益と思われる。実際に LAMP 法が POCT 検査として成果を上げている報告としてはエボラウイルス病がある。エボラウイルス病は治療的アプローチ開始の観点から、6 時間から 3 日までの間に診断することが望ましいとされているが、既存の ELISA 法や RT-PCR 法では発症から診断までに 3 日から 10 日を要しており、POCT 診断技術の開発が望まれていた(51)。長崎大学が開発したエボラウイルス病に対する RT-LAMP 法はポータブルデバイスと組み合わせることで、15 分でエボラウイルス病を診断が可能で、感度・特異度はともに 100%であり、エボラウイルス病に対する POCT 検査として活用が期待されている(52)。

BCG の検出同定法においては、分離培養した BCG から精製した DNA 溶液では濁度計もしくはライトサイクラーを用いた場合 1 pg/反応まで、蛍光を用いた肉眼判定では 10 pg/反応までの検出が可能であった。既報告では *M. bovis* の DNA に対する PCR 法の検出感度は 10 pg、16S r RNA を標的とした LAMP では 1 pg とされており(53)、本研究の結果はそれと同程度の感度を有するものと思われた。また、LAMP 法は PCR 法と比べて反応阻害物質のコンタミネーションに強く(13)、PURE 法との組み合わせが可能である。PURE 法と組み合わせた場合で

も、本反応系は 1000 個の BCG を検出でき、BCG 分離培養株を同定するには十分な感度を有していることに加え、臨床検体に対して直接 PURE-LAMP を実施できる可能性がある。尿、気管支肺胞洗浄液、脳脊髄液から作成した疑似検体ならばに患者の尿沈渣から PURE-LAMP 法で BCG を直接検出同定することが可能であったが、血清および全血の混入した疑似検体での感度が低下、もしくは検出不能となったことから、臨床検体への直接応用については手法の改善など、今後慎重な検討が必要と思われた。

核酸増幅法において試料を精製するうえで、その阻害物質に注意が必要である。核酸増幅阻害物質が妨げとなる機序として、直接的な DNA への作用、DNA ポリメラーゼやマグネシウムへの作用、細胞溶解の処置への作用(54)があげられる。PCR 法での検討において、核酸増幅阻害物質として胆汁(55)、多糖類(56)、コラーゲン(57)、ミオグロビン(58)、メラニン(59)、蛋白分解酵素(60, 61)、カルシウム(61)、尿(62)のほか、本研究でも阻害作用を認めた全血(63)および血清(64)が報告され、全血や血清に含まれる IgG(64)、ヘモグロビンやラクトフェリン(65)がその主要な阻害因子とされている。IgG は一本鎖 DNA に作用することで、ヘモグロビンおよびラクトフェリンは鉄イオンを介して DNA 合成に作用することで核酸増幅を阻害する。そのため、DNA 精製の過程で、これらの阻害物質をいかに除去するかが核酸増幅法の実施において重要である。

LAMP 法はこれらの阻害物質に対する抵抗性を有することからも注目され、阻害物質の混入を防げない簡易な DNA 抽出法でも遺伝子増幅に問題が無いことが期待されたが、その検出感度は鋳型 DNA の抽出精製効率に影響されることには PCR 法と同じく変わらない。血液の混入した試料から PURE-LAMP 法により BCG を検出可能にするには、PURE 法を行う前に反応阻害物質を除去することにより、細菌由来の DNA の抽出精製効率を上げる方法が挙げられる。近年、直接血液から血流感染を診断する PCR 法に対して開発された阻害物質を除去する方法としては、MolYsis™ (Molzylm GmbH, Bremen, Germany) (66)および Polaris (Biocartis N.V., Mechelen, Belgium) (67)が報告されている。MolYsis は、カオトロピック剤及び界面活性剤を用いて、哺乳類細胞を選択的に溶解させ、カオトロピック剤や界面活性剤に影響されない DNase を用いヒト由来 DNA を消化し病原体成分だけを残すことができる。Polaris はヒト由来の細胞とその DNA を化学的に劣化させる。このような手法を PURE-LAMP 法に組み合わせることが、血液検体および血液が混入した試料からの BCG 検出感度を改善させる可能性があるが、このように精密な核酸抽出手法を組み合わせると、簡便性という PURE-LAMP 法の利点を損なうことが懸念される。一方、このような手法は以下に述べる BCG 血流感染のように重篤で、迅速な診断が望まれる症例への適応が期待される。

BCG 膀胱内注入療法を施行され、BCG 尿路感染症を発症した症例においては、BCG 投与後から発症まで2年間が経過している。BCG 投与後に BCG 感染症を発症した8例と既報告33例について報告した文献では、1時間以内から3か月以内に発症した早期発症例25例と1年以上かけて発症した晚期発症例16例に分けて患者の特徴が検討されている(68)。早期発症例は発熱などの全身症状を伴い、ほとんどが肺や肝臓および血流感染で発症し、発症のメカニズムとしては投与時の血行性散布と過敏症の病態関与が考えられている。一方、晚期発症例のうち12例は局所感染で発症しており、その内訳は尿路感染症5例、血管の感染4例、脊椎感染2例、胸壁感染1例であった。この晚期発症には BCG 感染が成立した部位において BCG が再活性化する病態が考えられるが、本症例の特徴もこの晚期発症者のそれに合致している。臨床疑似検体を用いた BCG 同定検出 PURE-LAMP 法の検出感度の検討において、尿による感度の低下は見られておらず、このような晚期発症の BCG 尿路感染症の診断に対して有用であることが期待される。

また、BCG は内因性に抗結核薬であるピラジナミドに耐性を有しており(69)、BCG 感染症の治療としてはピラジナミドを除いたイソニアジドとリファンピシンの2剤を中心とする多剤併用療法が行われるが、*M. tuberculosis* 感染症との鑑別ができない場合にはピラジナミドも投与されることがある。しか

し、BCG 感染症早期発症者の半数においてはトランスアミナーゼの上昇を認めており (68)、さらに結核治療においてベースラインのトランスアミナーゼの上昇はピラジナミドによる重篤な肝障害の危険因子となることも報告されている (70)。BCG 同定 PURE-LAMP 法により血流感染など早期発症 BCG 感染症の迅速な診断が可能となれば、有害事象を引き起こし得るピラジナミド投与を回避することで、重篤な肝障害の発生を防ぐことができると考えられた。

また、本研究で筆者が開発した BCG 同定 LAMP 法は、単に標的遺伝子を増幅しているだけでなく、遺伝子の欠失を検出しているという意味も有している。このような可能性を追究し、今後、同様の手法を利用して遺伝子領域の挿入、欠失、一塩基多型などの差異を検出する、より高精度な LAMP 法による性質診断法の開発が期待できるのではないかと考えられた。

第6章 結論

1. 肺外結核の診断に PURE-LAMP 法は有用であり、喀痰以外の検体に対しても PURE-LAMP 法は適応が可能と考えられた。
2. BCG を他の結核菌群と鑑別同定するための LAMP 法を開発することに成功した。同法は 1~10 pg の BCG DNA 検出感度を有しており、特異性も高く、結核菌群を含めたほかの細菌、真菌に対して交差反応を認めなかった。また、PURE 法と組み合わせた場合でも、各種臨床疑似検体に対して 1.0×10^3 cells/反応までの感度で BCG の検出同定が可能であった。
3. BCG 同定 PURE-LAMP 法を臨床検体に直接応用できる可能性が示された。

謝辞

本稿を終えるに当たり、御指導、御高閲を賜りました、防衛医科大学校国際感染症学講座教授 宮平靖博士、防衛医科大学校内科学講座（感染症・呼吸器）教授 川名明彦博士、防衛医科大学校泌尿器科学講座講師 佐藤全伯博士に衷心より感謝申し上げます。

本研究の実施、遂行及び論文の作成に際し御指導頂きました、防衛医科大学校内科学講座（感染症・呼吸器）元助教 前田卓哉博士（現埼玉医科大学微生物学教室准教授）に深謝申し上げます。

本研究の遂行に関し、貴重な御助言、御協力を賜りました、防衛医科大学校病院検査部結城篤技官ならびに濱本隆明技官に深く感謝の意を表します。

本研究の主旨は、PLoS One. 2015;10(7):e0133759、Internal Medicine. 2015;54(11):1447-50、Urology Case Reports. 2017;14:24-6 で発表した。

引用文献

1. Price CP. Point of care testing. *BMJ*. 2001;322(7297):1285-8.
2. Urdea M, Penny LA, Olmsted SS, Giovanni MY, Kaspar P, Shepherd A, et al. Requirements for high impact diagnostics in the developing world. *Nature*. 2006;444 Suppl 1:73-9.
3. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. 2000;28(12):E63.
4. Hong TC, Mai QL, Cuong DV, Parida M, Minekawa H, Notomi T, et al. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(5):1956-61.
5. Imai M, Ninomiya A, Minekawa H, Notomi T, Ishizaki T, Van Tu P, et al. Rapid diagnosis of H5N1 avian influenza virus infection by newly developed influenza H5 hemagglutinin gene-specific loop-mediated isothermal amplification method. *Journal of Virological Methods*. 2007;141(2):173-80.

6. Nakauchi M, Yoshikawa T, Nakai H, Sugata K, Yoshikawa A, Asano Y, et al. Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for rapid diagnosis of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus. *Journal of Medical Virology*. 2011;83(1):10-5.
7. 山口恵三. 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試薬の評価. *医学と薬学*. 2007;58:565-71.
8. Mitarai S, Okumura M, Toyota E, Yoshiyama T, Aono A, Sejimo A, et al. Evaluation of a simple loop-mediated isothermal amplification test kit for the diagnosis of tuberculosis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2011;15(9):1211-7, i.
9. Hopkins H, Gonzalez IJ, Polley SD, Angutoko P, Ategeka J, Asimwe C, et al. Highly sensitive detection of malaria parasitemia in a malaria-endemic setting: performance of a new loop-mediated isothermal amplification kit in a remote clinic in Uganda. *Journal of Infectious Diseases*. 2013;208(4):645-52.
10. Polley SD, Gonzalez IJ, Mohamed D, Daly R, Bowers K, Watson J, et al. Clinical evaluation of a loop-mediated amplification kit for diagnosis of imported malaria. *Journal of Infectious Diseases*.

2013;208(4):637-44.

11. Adams ER, Schoone GJ, Ageed AF, Safi SE, Schallig HD. Development of a reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the sensitive detection of Leishmania parasites in clinical samples. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2010;82(4):591-6.

12. Uemura N, Makimura K, Onozaki M, Otsuka Y, Shibuya Y, Yazaki H, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for diagnosing Pneumocystis pneumonia. Journal of Medical Microbiology. 2008;57(1):50-7.

13. The Use of Loop-Mediated Isothermal Amplification (TB-LAMP) for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: Policy Guidance. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. 2016, Geneva.

14. Jones BE, Young SM, Antoniskis D, Davidson PT, Kramer F, Barnes PF. Relationship of the manifestations of tuberculosis to CD4 cell counts in patients with human immunodeficiency virus infection. The American Review of Respiratory Disease. 1993;148(5):1292-7.

15. Nelson L, Wells C. Global epidemiology of childhood tuberculosis

[Childhood TB]. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. 2004;8(5):636-47.

16. Sharma SK, Mohan A. Extrapulmonary tuberculosis. The Indian Journal of Medical Research. 2004;120(4):316-53.

17. Boehme CC, Nicol MP, Nabeta P, Michael JS, Gotuzzo E, Tahirli R, et al. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralised use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multicentre implementation study. Lancet. 2011;377(9776):1495-505.

18. Tortoli E, Russo C, Piersimoni C, Mazzola E, Dal Monte P, Pascarella M, et al. Clinical validation of Xpert MTB/RIF for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. European Respiratory Journal. 2012;40(2):442-7.

19. Trunz BB, Fine P, Dye C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. Lancet. 2006;367(9517):1173-80.

20. Rodrigues LC, Mangtani P, Abubakar I. How does the level of BCG

vaccine protection against tuberculosis fall over time? *BMJ*. 2011;343:d5974.

21. Sylvester RJ, van der MA, Lamm DL. Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *Journal of Urology*. 2002;168(5):1964-70.

22. Milstein JB, Gibson JJ. Quality control of BCG vaccine by WHO: a review of factors that may influence vaccine effectiveness and safety. *Bulletin of the World Health Organization* 1990;68:93-108.

23. Kroger L, Korppi M, Brander E, Kroger H, Wasz-Hockert O, Backman A, et al. Osteitis caused by bacille Calmette-Guerin vaccination: a retrospective analysis of 222 cases. *Journal of Infectious Diseases*. 1995;172(2):574-6.

24. Gonzalez OY, Musher DM, Brar I, Furgeson S, Boktour MR, Septimus EJ, et al. Spectrum of bacille Calmette-Guerin (BCG) infection after intravesical BCG immunotherapy. *Clinical Infectious Diseases*. 2003;36(2):140-8.

25. Sadeghi-Shabestari M, Rezaei N. Disseminated bacille Calmette-

- Guerin in Iranian children with severe combined immunodeficiency. International Journal of Infectious Diseases. 2009;13(6):e420-3.
26. Talbot EA, Perkins MD, Silva SF, Frothingham R. Disseminated bacille Calmette-Guerin disease after vaccination: case report and review. Clinical Infectious Diseases. 1997;24(6):1139-46.
27. Niemann S, Richter E, Rusch-Gerdes S. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis*. Journal of Clinical Microbiology. 2000;38(1):152-7.
28. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002;99(6):3684-9.
29. Grange GM, Yates MD, Kantor IN. Guidelines for speciation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Second edition. WHO. 1996.
30. Tortoli E, Cichero P, Piersimoni C, Simonetti MT, Gesu G, Nista D. Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: multicenter study. Journal of Clinical Microbiology.

1999;37(11):3578-82.

31. Jones WD. Differentiation of known strains of BCG from isolates of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* by using mycobacteriophage 33D. *Journal of Clinical Microbiology*. 1975;1(4):391-2.

32. Floyd M, Silcox V, Jones W, Butler W, Kilburn J. Separation of *Mycobacterium bovis* BCG from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by using high-performance liquid chromatography of mycolic acids. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992;30(5):1327-30.

33. van Soolingen D, Hermans P, De Haas P, Van Embden J. Insertion element IS1081-associated restriction fragment length polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex species: a reliable tool for recognizing *Mycobacterium bovis* BCG. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992;30(7):1772-7.

34. Frothingham R. Differentiation of strains in *Mycobacterium tuberculosis* complex by DNA sequence polymorphisms, including rapid identification of *M. bovis* BCG. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995;33(4):840-4.

35. Behr M, Wilson M, Gill W, Salamon H, Schoolnik G, Rane S, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science*. 1999;284(5419):1520-3.
36. Talbot EA, Williams DL, Frothingham R. PCR identification of *Mycobacterium bovis* BCG. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997;35(3):566-9.
37. Parsons LM, Brosch R, Cole ST, Somoskövi Á, Loder A, Bretzel G, et al. Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002;40(7):2339-45.
38. Huard RC, de Oliveira Lazzarini LC, Butler WR, van Soolingen D, Ho JL. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(4):1637-50.
39. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 1990;215(3):403-10.
40. Eiken Chemical. "PrimerExplorer V4". LAMP primer designing software. [updated 2017 April 7]. Available from: <http://primerexplorer.jp/index.html>.

41. Kawano S, Maeda T, Suzuki T, Abe T, Mikita K, Hamakawa Y, et al. Loop-mediated isothermal amplification with the Procedure for Ultra Rapid Extraction kit for the diagnosis of pneumocystis pneumonia. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2015;21(3):224-6.
42. Tachi K, Sato A, Kouzaki Y, Maeda T, Kawana A, Asano T. A Case of *Bacillus Calmette-Guérin* Cystitis Diagnosed with a Novel Loop-mediated Isothermal Amplification Method. *Urology Case Reports*. 2017;14:24-6.
43. 公益財団法人結核予防会結核研究所疫学情報センター. “新登録患者数—登録時結核病類、性、年齢階級別”: 結核の統計 年報; 2015. Available from: <http://www.jata.or.jp/rit/ekigaku/>.
44. Kruijshaar ME, Abubakar I. Increase in extrapulmonary tuberculosis in England and Wales 1999-2006. *Thorax*. 2009;64(12):1090-5.
45. Peto HM, Pratt RH, Harrington TA, LoBue PA, Armstrong LR. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in the United States, 1993-2006. *Clinical Infectious Diseases*. 2009;49(9):1350-7.
46. Te Beek L. Extrapulmonary Tuberculosis by Nationality, the Netherlands, 1993-2001—Volume 12, Number 9—September 2006—Emerging Infectious Disease Journal—CDC. 2006.

47. Kim JH, Kim YJ, Ki C-S, Kim J-Y, Lee NY. Evaluation of Cobas TaqMan MTB PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Clinical Microbiology. 2011;49(1):173-6.
48. Mittal P, Handa U, Mohan H, Gupta V. Comparative evaluation of fine needle aspiration cytology, culture, and PCR in diagnosis of tuberculous lymphadenitis. Diagnostic Cytopathology. 2011;39(11):822-6.
49. Derese Y, Hailu E, Assefa T, Bekele Y, Mihret A, Aseffa A, et al. Comparison of PCR with standard culture of fine needle aspiration samples in the diagnosis of tuberculosis lymphadenitis. Journal of Infection in Developing Countries. 2011;6(01):53-7.
50. Ou X, Li Q, Xia H, Pang Y, Wang S, Zhao B, et al. Diagnostic accuracy of the PURE-LAMP test for pulmonary tuberculosis at the county-level laboratory in China. PloS one. 2014;9(5):e94544.
51. Kaushik A, Tiwari S, Jayant RD, Marty A, Nair M. Towards detection and diagnosis of Ebola virus disease at point-of-care. Biosensors and Bioelectronics. 2016;75:254-72.
52. Kurosaki Y, Magassouba NF, Oloniniyi OK, Cherif MS, Sakabe S, Takada A, et al. Development and evaluation of reverse transcription-loop-

mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay coupled with a portable device for rapid diagnosis of Ebola virus disease in Guinea. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2016;10(2):e0004472.

53. Zhu RY, Zhang KX, Zhao MQ, Liu YH, Xu YY, Ju CM, et al. Use of visual loop-mediated isothermal amplification of rimM sequence for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. Journal of Microbiological Methods. 2009;78(3):339-43.

54. Rådström P, Knutsson R, Wolffs P, Lövenklev M, Löfström C. Pre-PCR processing. Molecular Biotechnology. 2004;26(2):133-46.

55. Lantz PG, Matsson M, Wadström T, Rådström P. Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR. Journal of Microbiological Methods. 1997;28(3):159-67.

56. Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, Petry KG, Bonnet J, Vidal R, et al. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. Journal of Clinical Microbiology. 1997;35(4):995-8.

57. Kim CH, Khan M, Morin DE, Hurley WL, Tripathy DN, Kehrlî M Jr, et al. Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus* nuc

- gene in bovine milk. *Journal of Dairy Science*. 2001;84(1):74-83.
58. Bélec L, Authier J, Eliezer - Vanerot MC, Piédouillet C, Mohamed AS, Gherardi RK. Myoglobin as a polymerase chain reaction (PCR) inhibitor: a limitation for PCR from skeletal muscle tissue avoided by the use of *Thermus thermophilus* polymerase. *Muscle & Nerve*. 1998;21(8):1064-7.
59. Eckhart L, Bach J, Ban J, Tschachler E. Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits its activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000;271(3):726-30.
60. Powell H, Gooding C, Garrett S, Lund B, McKee R. Proteinase inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*. 1994;18(1):59-61.
61. Bickley J, Short J, McDowell D, Parkes H. Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Letters in Applied Microbiology*. 1996;22(2):153-8.
62. Khan G, Kangro H, Coates P, Heath R. Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. *Journal of*

Clinical Pathology. 1991;44(5):360-5.

63. Akane A, Matsubara K, Nakamura H, Takahashi S, Kimura K. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. Journal of Forensic Science. 1994;39(2):362-72.

64. Al-Soud WA, Jönsson LJ, Rådström P. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. Journal of Clinical Microbiology. 2000;38(1):345-50.

65. Al-Soud WA, Rådström P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. Journal of Clinical Microbiology. 2001;39(2):485-93.

66. McCann CD, Jordan JA. Evaluation of MolYsis™ Complete5 DNA extraction method for detecting *Staphylococcus aureus* DNA from whole blood in a sepsis model using PCR/pyrosequencing. Journal of Microbiological Methods. 2014;99:1-7.

67. Loonen AJ, Bos MP, van Meerbergen B, Neerken S, Catsburg A, Dobbelaer I, et al. Comparison of pathogen DNA isolation methods from

large volumes of whole blood to improve molecular diagnosis of bloodstream infections. PloS one. 2013;8(8):e72349.

68. Gonzalez OY, Musher DM, Brar I, Furgeson S, Boktour MR, Septimus EJ, et al. Spectrum of bacille Calmette-Guérin (BCG) infection after intravesical BCG immunotherapy. Clinical Infectious Diseases. 2003;36(2):140-8.

69. Ritz N, Tebruegge M, Connell TG, Sievers A, Robins-Browne R, Curtis N. Susceptibility of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strains to antituberculous antibiotics. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2009;53(1):316-8.

70. Teleman M, Chee C, Earnest A, Wang Y. Hepatotoxicity of tuberculosis chemotherapy under general programme conditions in Singapore. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. 2002;6(8):699-705.

图·表

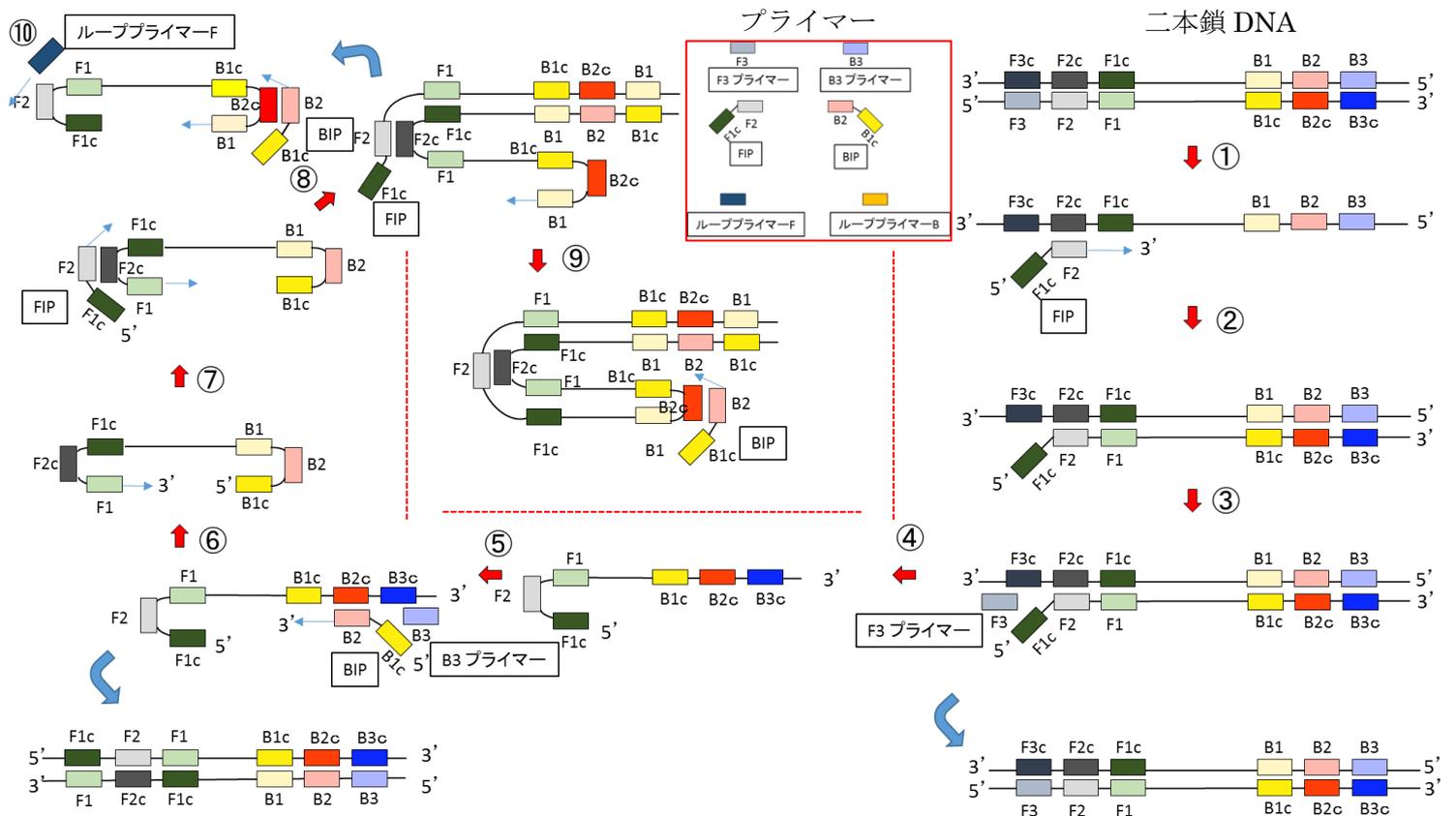


図 1 : LAMP 法の原理概略図

標的遺伝子の 6 領域に合わせ、4 種のプライマーを作成する。

また、ダンベル構造の 5' 末端側のループの 1 本鎖部分 (B1 領域と B2 領域の間あるいは F1 領域と F2 領域の間) に相補的な配列を持つループプライマー (それぞれループプライマー-B、ループプライマー-F) を用いることにより、DNA 合成の起点を増やすことが可能となる。

① 2 本鎖 DNA が動的平衡状態となる温度では、いずれかのプライマーが相補的領域にアニールし、そこから伸展するため 1 本鎖 DNA となる。そのため LAMP 法は PCR 法のように 1 本鎖に熱変性する過程を要さない。以下は FIP がまず結合するものとして説明する。

② FIP の F2 領域の 3' 末端を起点として鋳型 DNA と相補的な DNA 鎖が合成される。

③ FIP の外側に F3 プライマーがアニールし、その 3' 末端を起点として、先に合成されている FIP からの DNA 鎖を剥がしながら DNA 鎖が伸長する。

④ F3 プライマーから合成された DNA 鎖と鋳型 DNA が 2 本鎖となる (青矢印)。F3 プライマーからの DNA 伸展によって剥がされた先に合成された DNA 鎖は、1 本鎖 DNA となる。この DNA 鎖は、5' 末端側に相補的な領域 F1c、F1 を持つため、自己アニールを起こしてループを形成する (赤矢印)。

⑤ BIP の B2 領域の 3' 末端を起点として鋳型 DNA と相補的な DNA 鎖が合成される。

- ⑥ BIP の外側に B3 プライマーがアニールし DNA 鎖が伸長し、B3 プライマーから DNA 鎖と鋳型 DNA が 2 本鎖となる（青矢印）。BF3 プライマーからの DNA 伸長によって剥がされた DNA 鎖は、1 本鎖 DNA となる（赤矢印）。
- ⑦ 剥がされた DNA 鎖は両端で自己アニールし、増幅の起点となるダンベル構造となる。
- ⑧ ダンベル構造では自己アニールした F1 領域から DNA 伸長が起こる。また、F2c 領域は一本鎖であるため FIP がアニールでき、アニールすると F2 末端から DNA 伸長が起こる。
- ⑨ FIP からの進展によって一本鎖となった F1 領域から伸長した DNA は、FIP によって伸長した DNA 鎖をはがす。はがれた DNA 鎖は⑦と相補的な配列を持つダンベル構造となり、新たな起点となる（青矢印）。B2c 領域は一本鎖であるため BIP がアニールでき、アニールすると B2 領域から DNA 伸長が起こる。以後同様の DNA 伸長が新たな起点を作りながら進んでいく。
- ⑩ また、ループプライマー F はダンベル構造の F1 領域と F2 領域の間、ループプライマー B は B1 領域と B2 領域の間にアニールすることにより、すべてのループが増幅の起点となることで、増幅時間を短縮させることが可能である。



図2：PURE DNA 抽出キットとその原理の概略図

1. 検体を検体処理チューブに添加し、煮沸する。チューブ中の抽出試薬が、検体中に含まれる細菌及びウイルスを破砕することにより、核酸が溶液中に遊離する。
2. 1. の溶液を、吸着剤チューブ中の多孔質体と混合することにより、検体中に含まれる核酸増幅反応の阻害物質等が除去される。
3. 2. の混合物を、滴下注入キャップ中のメンブレンフィルターに通すことにより、核酸溶液のみが抽出される。

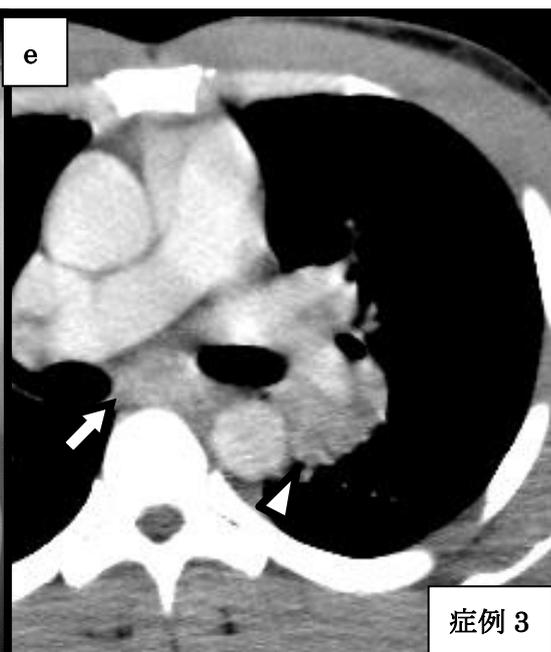
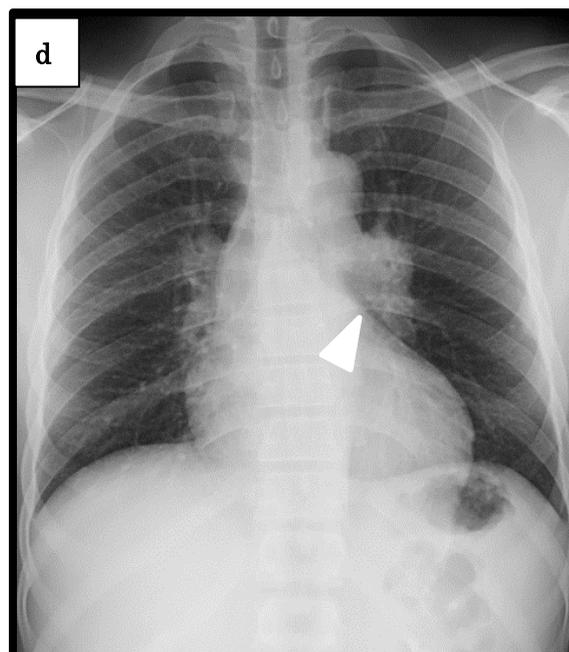
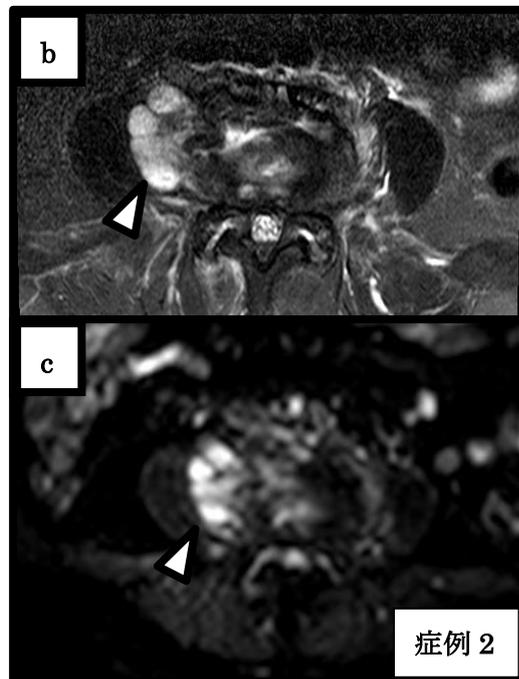
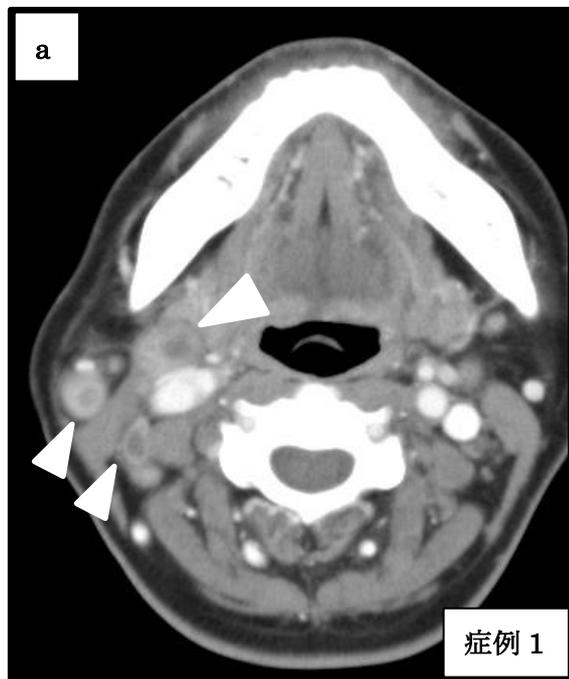


図 3：対象患者における画像所見

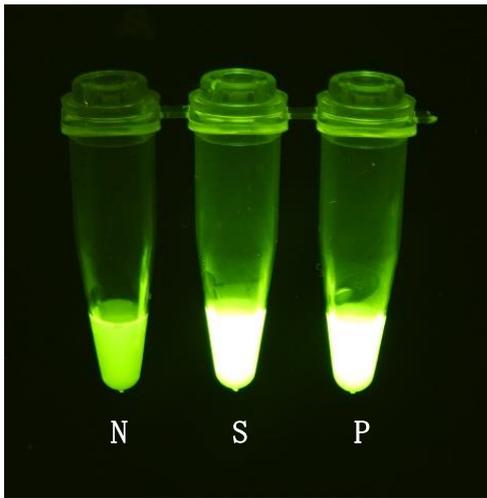
(a) 症例 1：頸部造影 CT では周囲にのみ造影効果を伴う複数の腫大したリンパ節を認めた（矢頭）。

(b) 症例 2：腰椎 MRI の T2 強調像で L4/5 の椎間板ならびに L5 椎体周囲に高信号領域を認めた（矢頭）。

(c) 症例 2：拡散強調像では同領域に拡散制限を認め（矢頭）、膿瘍形成が示唆された。

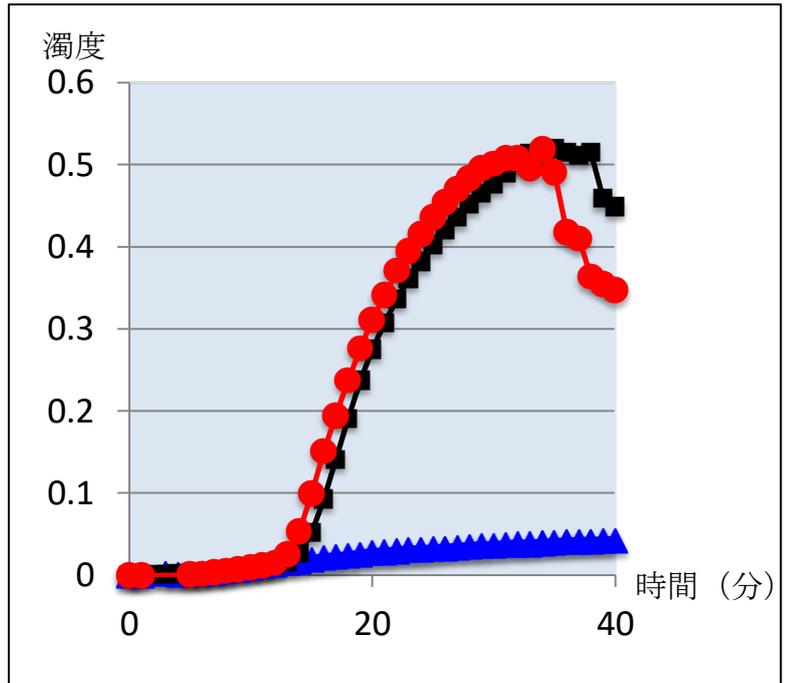
(d) 症例 3：胸部エックス線写真では左肺門部の腫脹を認めた（矢頭）。肺野には陰影を認めなかった。

(e) 症例 3：胸部造影 CT では内部不均一に造影効果を伴う縦隔（矢印）および左肺門部の腫大したリンパ節（矢頭）を認めた。



N, 陰性コントロール
 S, 患者検体
 P, 陽性コントロール

a



b

図 4：肺外結核患者症例 2 における LAMP 法判定結果

(a) 目視による判定結果

40 分後の反応後に、陽性コントロール及び患者検体において LAMP 陽性と判定した。

(b) 濁度による判定結果

陽性コントロールおよび患者検体において反応開始 15 分程度から濁度上昇を認め、LAMP 陽性と判定した。

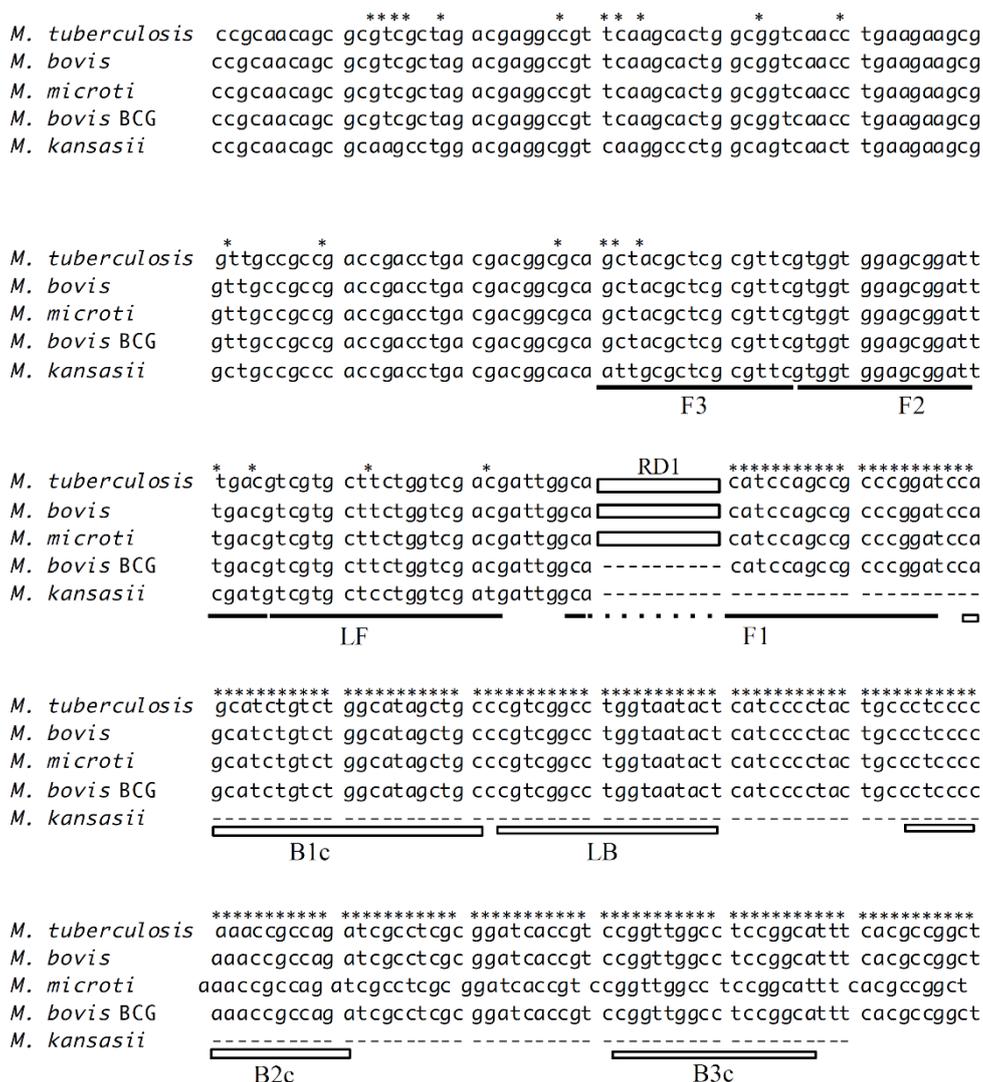


図 5 : BCG を含む各種抗酸菌群における、9500 塩基の RD1 遺伝子近傍の塩基配列の相同性と LAMP 法実施プライマー領域。BCG に特異的に RD1 遺伝子の欠失がみられ、*M. tuberculosis*、*M. bovis* そして *M. microti* では、ボックスで囲んだ RD1 遺伝子が存在することを示している。配列の下に示す下線は、プライマー設計に用いた F1、F2、F3 領域と、B1、B2、B3 領域に相補的な配列である B1c、B2c、B3c 領域、およびループプライマー F および B がアニールする領域を LF、LB とした 8 領域を示している。FIP は F2 領域を 3' 末端側に持ち、5' 末端側に F1 領域と相補的な配列である F1c の配列を持つように設計した。BIP は B2 領域を 3' 末端側に持ち、5' 末端側に B1c 領域と同じ配列を持つように設計した。F3 プライマーとループプライマー B は図の F3 および LB の領域の配列、B3 プライマーとループプライマー F は図の B3c および LF の領域と相補的な配列を持つように設計した。F3 から B3c が、また F1 自体が欠失する RD1 遺伝子領域を跨ぐようプライマーを設計し、BCG 特異的に増幅する系を構築した。

* : 結核菌群で共通の塩基配列を示す。

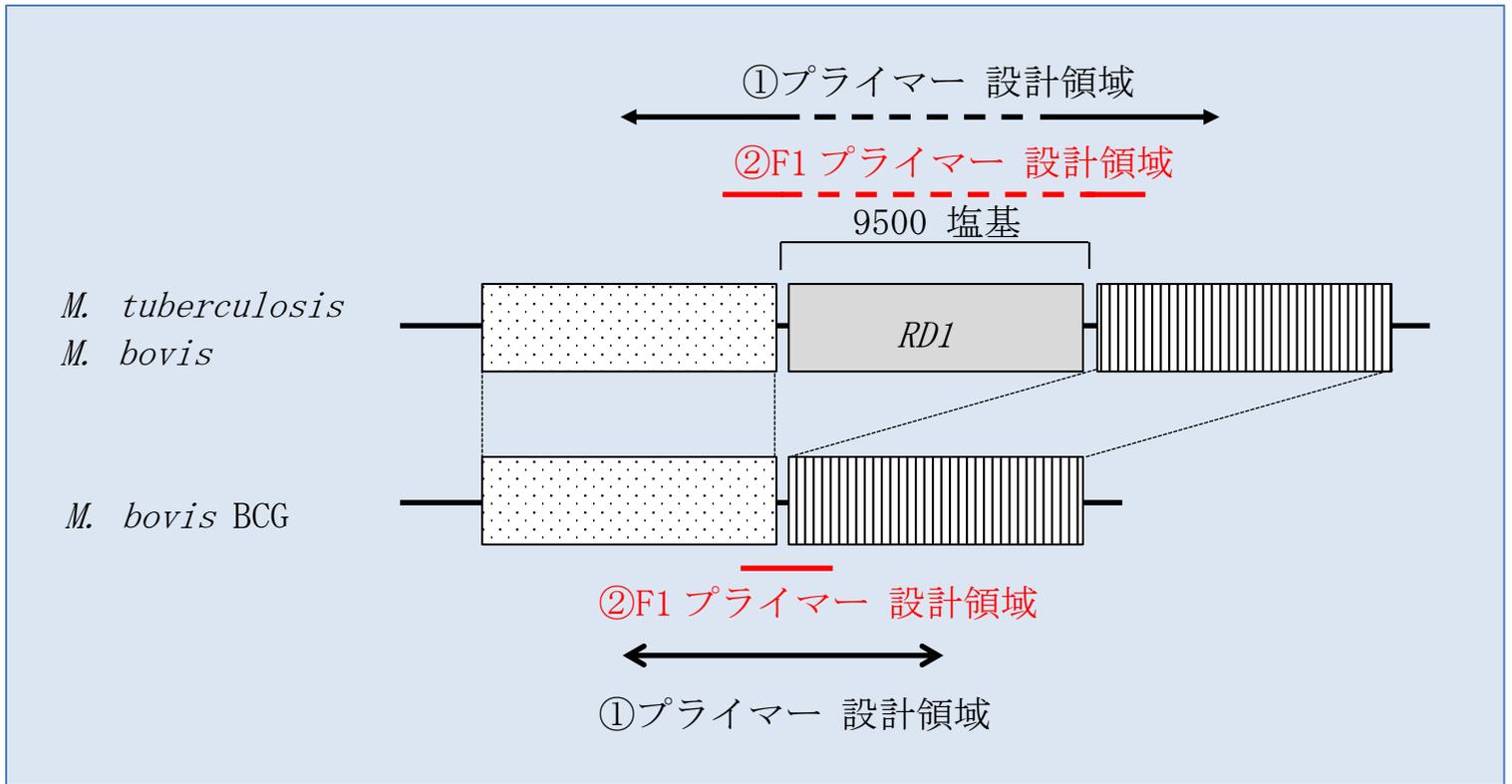


図 6 : RD1 領域の欠失特異的に増幅するプライマーの設計図

- 1 : F1 から B3c の設計領域全体が *M. bovis* BCG に欠失する RD 1 領域を跨ぐ。
- 2 : F1 プライマーの設計領域も *M. bovis* BCG に欠失する RD 1 領域を跨ぐ。

プライマー設計は通常 F2 領域の外側～B2 領域の外側までの距離は 120～180 塩基、F2 と F3 領域間、B2 と B3 領域間は 0～20 塩基程度が目安であるが、このプライマーの設計領域が跨いでいる RD1 領域は 9500 塩基の長さを有している。このため、RD1 領域が存在する場合には遺伝子増幅は起こらない。またこれに加えて、RD1 領域が保たれている場合には F1 プライマーがアニーリングを起こさないように設計を工夫し、RD1 領域欠失の場合にのみ特異的に遺伝子増幅が起こるように設定した。

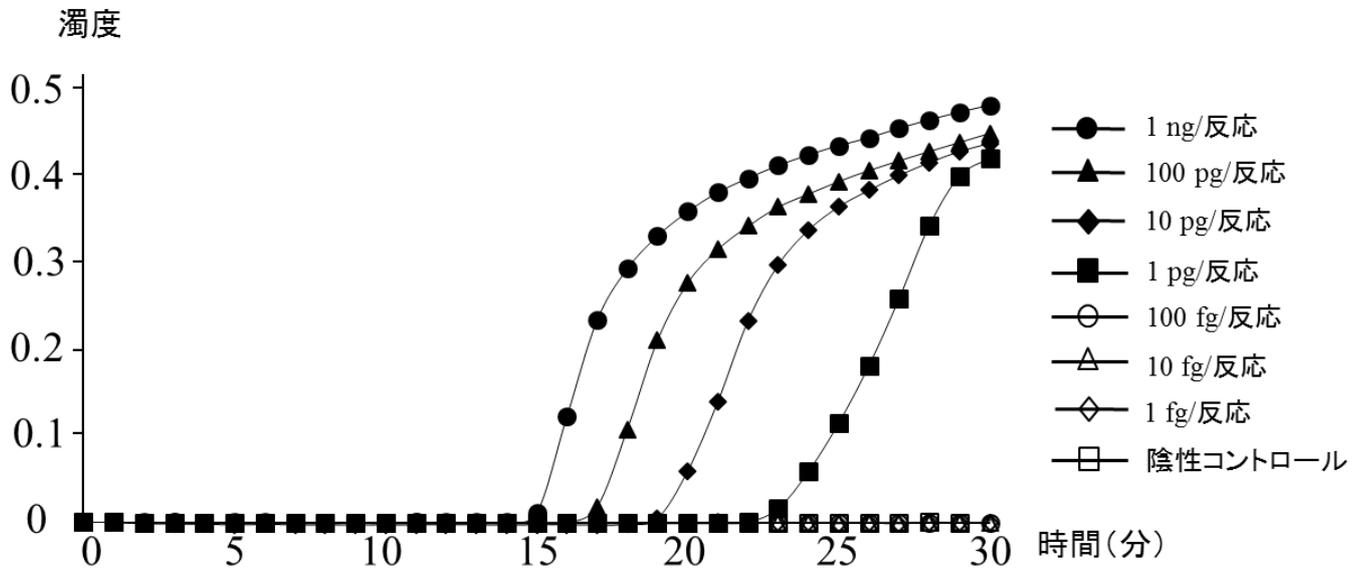


図 7：精製 BCG DNA に対する濁度計を用いた LAMP 反応の検出感度の検証。1 pg/反応まで遺伝子の増幅を検知できた。

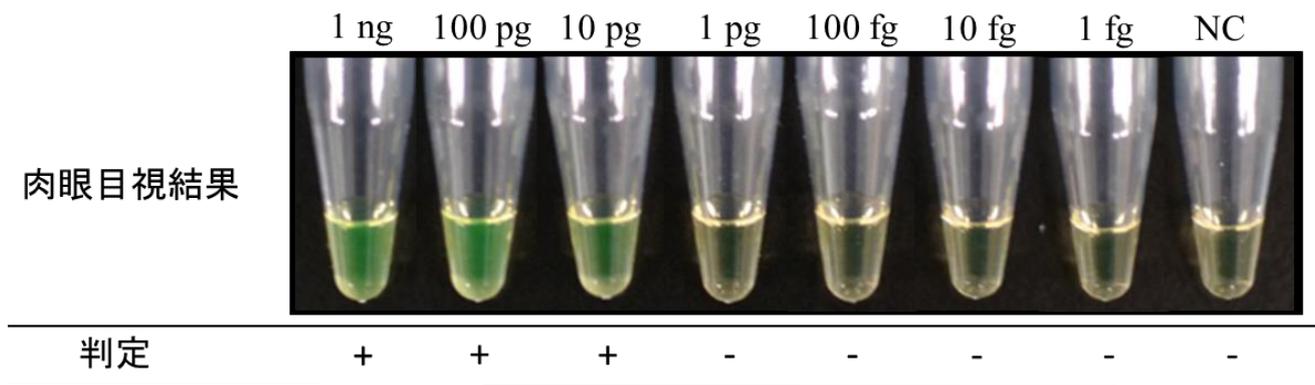


図 8: 精製 BCG DNA に対する蛍光目視判定を用いた LAMP 反応の検出感度の検証。60 分の反応後の結果。濁度計より検出感度が低下し、10 pg/反応まで遺伝子の増幅を検知できた。NC, negative control.

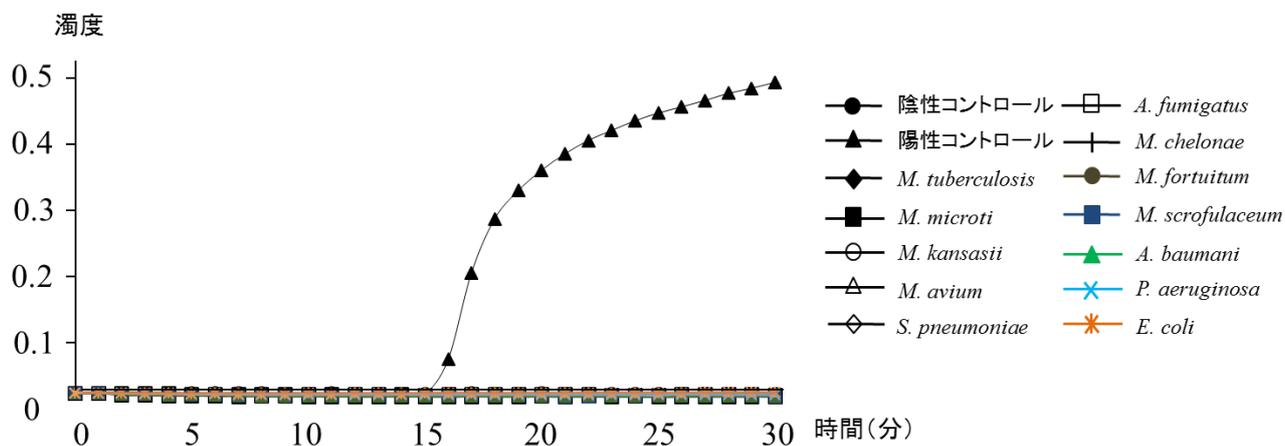
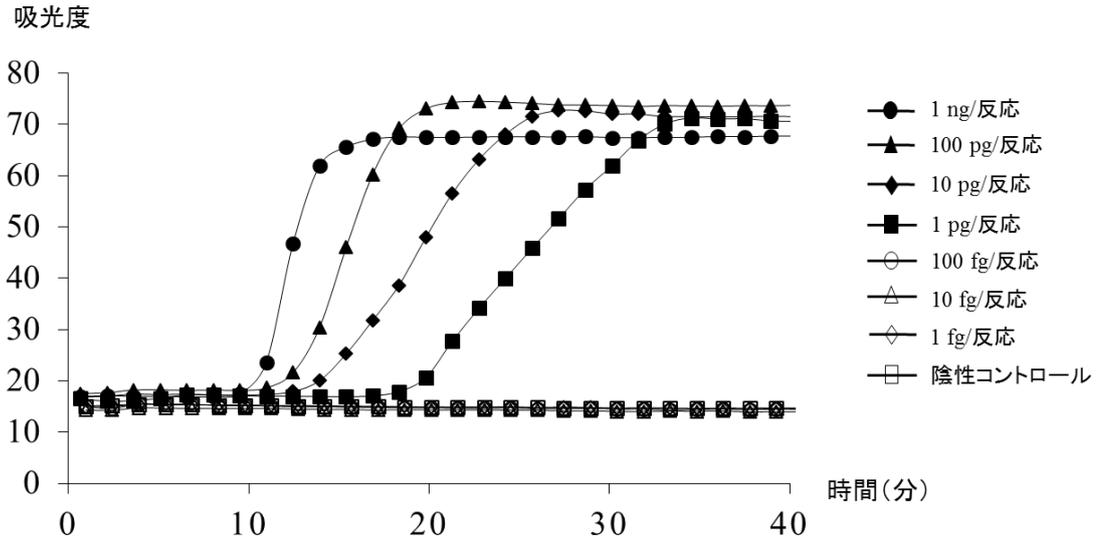


図 9：濁度計による交差反応の検証。44 種 49 株の微生物のうち、結核菌群である *M. tuberculosis* および *M. microti* を含む細菌、抗酸菌、真菌から代表的な 12 種の結果を示す。各微生物および陽性コントロール (BCG) については精製 DNA 10 ng/ μ L を、陰性コントロールには蒸留水を用いた。30 分の反応で、陽性コントロールのみ濁度の上昇を認めている。44 種 49 株の微生物に対して同様の結果が得られ、設計した LAMP 反応において交差反応がみられないことを確認した。

a



b

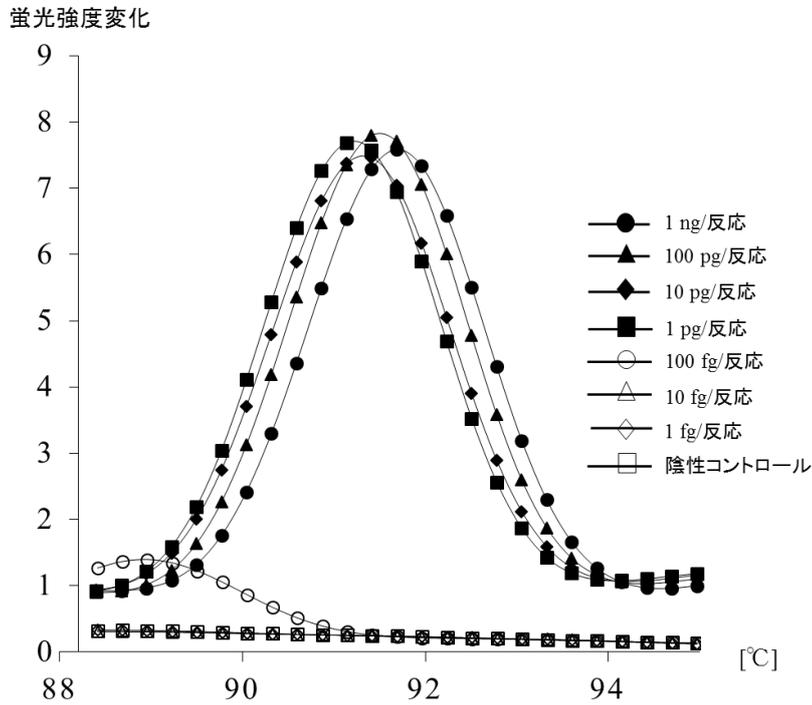
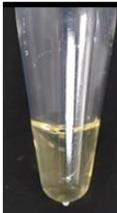


図 10 : 精製 BCG DNA に対するライトサイクラーを用いたリアルタイム LAMP 法の結果。(a) 検出感度を検証し、精製 BCG DNA 1 pg/反応まで遺伝子増幅を検知できた。(b) 熱解離曲線を用い LAMP 増幅産物の特異性を検証した。いずれの濃度における増幅産物も、アニーリングピークを 91 °C とする熱解離曲線を示し、反応が非特異的もしくはプライマーダイマーではないことが示唆された。

	<div style="display: flex; justify-content: space-between; border: 1px solid black;"> <div style="background-color: yellow; padding: 2px;">イソニアジド</div> <div style="background-color: red; padding: 2px;">リファンピシン</div> </div>						
	NC	PC	Pre	Day 30	Day 60	Day 120	Day 180
LAMP結果							
	—	+	+	+	—	—	—
PCR結果	—	+	+	+	—	—	—
塗抹	—	+	—	—	—	—	—
培養	—	+	—	—	—	—	—

NC: 陰性コントロール, PC: 陽性コントロール, Pre: 治療開始前.

図 11 : 対象症例の臨床経過と BCG 尿路感染症に対する PURE-LAMP 反応の結果。随時尿 10 mL の尿沈渣を PURE 法で簡易精製したのち、LAMP 法による核酸増幅を蛍光目視で判定し、BCG を検出同定することが可能であった。経時的には治療開始前から、イソニアジドとリファンピシンによる治療開始後 30 日まで BCG の同定、検出が可能であった。イソニアジドとリファンピシンによる治療開始から 30 日で自覚症状の改善を認め、60 日で LAMP 法及び PCR 法が陰性となった。2 剤を計 180 日投与し治療を終了した。

番号	年齢 (国籍)	診断	検体	塗抹	培養	PCR	LAMP
1	41 (フィリピン)	結核性リンパ節炎	頸部リンパ節割面拭い液	+	+	+	+
2	84 (日本)	脊椎カリエス	L5 椎体周囲膿瘍の 経皮穿刺吸引検体	-	+	+	+
3	23 (ガーナ)	結核性リンパ節炎	縦隔リンパ節穿刺吸引 (EBUS-TBNA*) 検体	-	+	+	+

*EBUS-TBNA; endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration

+, 病原体陽性

-, 同陰性

表 1: 患者背景と各種検査結果

3 症例が対象となり、いずれも LAMP 法により肺外結核と診断しえた。

プライマー	塩基配列 (5' - 3')	塩基長
F3	GCTACGCTCGCGTTCG	16
B3	ATGCCGGAGGCCAACC	16
FIP*	ATCCGGGCGGCTGGATGTGTGGTGGAGCGGATTTGACG	38
BIP**	AGCATCTGTCTGGCATAGCTGCATCTGGCGGTTTGGGGAG	40
LF	CGTCGACCAGAAGCACGA	18
LB	CCGTCGGCCTGGTAATACT	19

表 2：設計した LAMP プライマーの塩基配列

F3 および B3：アウタープライマー，FIP 及び BIP：インナープライマー，LF および LB：ループプライマー

*FIP は F2 領域を 3' 末端側に持ち、5' 末端側に F1 領域と相補的な配列である F1c の配列を持つように設計した。

**BIP は B2 領域を 3' 末端側に持ち、5' 末端側に B1 領域と相補的な配列である B1c 領域と同じ配列を持つように設計した。

細菌 (GTC* 番号 : 菌名)			真菌 (IFM** 番号 : 菌名)		
CI***	<i>Mycobacterium</i>	<i>tuberculosis</i>	4924	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigatus</i>
12853		<i>microti</i>	41398		<i>niger</i>
00614		<i>kansasii</i>	5366		<i>flavus</i>
00603		<i>avium</i>	5505	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
00612		<i>gordonae</i>	61880		<i>gattii</i>
00613		<i>intracellulare</i>	4949	<i>Candida</i>	<i>albicans</i>
00616		<i>marinum</i>	5489		<i>glabrata</i>
15340		<i>chelonae</i>	5462		<i>krusei</i>
15378		<i>fortuitum</i>	5464		<i>parapsilosis</i>
15673		<i>scrofulaceum</i>	5446		<i>tropicalis</i>
00980	<i>Streptococcus</i>	<i>pneumoniae</i>	40507	<i>Mucor</i>	<i>circinelloides</i>
01524	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	40515	<i>Rhizopus</i>	<i>oryzae</i>
15087	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	0138	<i>Nocardia</i>	<i>farcinica</i>
03814	<i>Haemophilus</i>	<i>influenza</i>	55089	<i>Spirotrichum</i>	<i>purpureum</i>
03941		<i>influenza</i>	49269	<i>Basidiobolus</i>	<i>meristosporus</i>
10424		<i>influenza</i>	5279	<i>Trichophyton</i>	<i>violaceum</i>
10426		<i>influenza</i>	40746	<i>Epidermophyton</i>	<i>floccosum</i>
14643	<i>Acinetobacter</i>	<i>baumanii</i>	41980	<i>Microsporium</i>	<i>ferrugineum</i>
00745	<i>Legionella</i>	<i>pneumophila</i>	4805	<i>Cladosporium</i>	<i>carrionii</i>
3p0017	<i>Burkholderia</i>	<i>pseudomallei</i>	40081	<i>Malassezia</i>	<i>furfur</i>
3p0025		<i>pseudomallei</i>	46458	<i>Madurella</i>	<i>mycetomi</i>
3p0056		<i>pseudomallei</i>	4856	<i>Fonsecaea</i>	<i>pedrosoi</i>
03411	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	40732	<i>Trichophyton</i>	<i>rubrum</i>
13866	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	CI***	<i>Pneumocystis</i>	<i>jirovecii</i>
14757	<i>Proteus</i>	<i>mirabilis</i>			

表 3 : LAMP 反応の特異性検証に用いた菌株

表で示す 44 種 49 株のグラム陽性菌、陰性菌、真菌の子嚢菌、担子菌等微生物各科、属から代表的な微生物の DNA 溶液 10 ng/mL を特異性の検証に用い、すべての微生物において交差反応を認めなかった。

*GTC, Gifu type culture: 岐阜大学微生物遺伝資源保存センター管理番号

**IFM, Institute of Food Microbiology: 千葉大学真菌医学研究センター管理番号

***CI, 臨床分離株

試料	作成した BCG 懸濁液の濃度 (菌数 cells/反応)							
	NC	10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
生食 100 μL	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3
生食 80 μL/全血 20 μL	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3
生食 60 μL/全血 40 μL	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3
生食 40 μL/全血 60 μL	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3
生食 20 μL/全血 80 μL	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3
全血 100 μL	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
血清 100 μL	0/3	0/3	0/3	0/3	2/3	3/3	3/3	3/3
尿 100 μL	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3
脳脊髄液 100 μL	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3
気管支肺胞洗浄液 100 μL	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3

NC：陰性コントロール (PURE キットを介さず蒸留水を添加した)

表 4：各種 BCG 疑似検体における反応結果

各条件 3 検体で反応を行い、結果を陽性数/3 として表に示す。生理食塩水を用いて作成した BCG の懸濁液は 1.0×10^3 cells/反応まで検出できた。尿、脳脊髄液および気管支肺胞洗浄液を用いた臨床疑似検体に対しても同等の結果を得られた。血清を用いた疑似検体では、この菌数においては、3 検体中 1 検体が陰性となった。全血の混入した疑似検体に関しては、4 割希釈の検体から検出感度が低下し始め、希釈率が低まるに従ってさらに検出感度は低下し、希釈のない全血においては 1.0×10^6 cells/反応の検出同定も不可能であった。