

1) 時間軸で考える臨床微生物検査

¹ 江南厚生病院 臨床検査技術科、² 江南厚生病院 こども医療センター

○舟橋 恵二¹、西村 直子²、尾崎 隆男²

臨床微生物検査は一般的に手間と時間がかかり、最終結果報告までに少なくとも数日を要する。小児の日常診療で経験することの多い百日咳やマイコプラズマ肺炎の実験室診断として培養法や抗体価測定が用いられているが、急性期での診断は困難である。当院では両疾患の迅速診断法として簡易遺伝子検査 Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP 法) を実施している。今回、LAMP 法によるこれまでの DNA 検出成績を報告するとともに、従来の実験室診断法（百日咳：培養法と血清学的診断法、マイコプラズマ肺炎：血清学的診断法）による成績と比較検討した。百日咳の検討は、2008 年 4 月～2009 年 3 月に長引く咳を主訴に当院小児科を受診した患者 316 例から採取した後鼻腔ぬぐい液 316 検体を対象とし、LAMP 法を用いた百日咳菌 DNA の検出と培養を行った。LAMP 陽性であった患者について、ペア血清（急性・回復期）の百日咳凝集素価を測定した。LAMP 法による百日咳菌 DNA 陽性は 19 検体（6.0%）、培養陽性は 15 検体（4.7%）であり、培養陽性はすべて LAMP 陽性であった。LAMP 陽性 19 例中 8 例（42.1%）が百日咳凝集素価（山口株）の陽転または 4 倍以上の上昇を認めた。マイコプラズマ肺炎の検討では、2009 年 4 月～2010 年 3 月に当院こども医療センターに肺炎で入院した 357 例から採取した咽頭ぬぐい液 357 検体を対象とし、LAMP 法を用いてマイコプラズマ・ニューモニエ DNA の検出を行った。LAMP 陽性であった患者について、ペア血清（入・退院時）のマイコプラズマ・ニューモニエ CF 抗体価を測定した。LAMP 法によるマイコプラズマ・ニューモニエ DNA 陽性は 37 検体（10.4%）であった。LAMP 陽性 37 例中 28 例（75.7%）が CF 抗体陽転または 4 倍以上の抗体価上昇を認めた。なお LAMP 法では、QIAamp@DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて検体中の DNA 抽出精製を行い、Loopamp リアルタイム濁度測定装置 RT-160C (栄研化学) にて増幅および検出を行った。百日咳は国立感染症研究所細菌第二部で設計されたプライマー (Kamachi K et al. : J Clin Microbiol 2006; 44) を、マイコプラズマ肺炎では吉野らが設計したプライマー (吉野学ほか：感染症学雑誌 2008; 82) を使用した。LAMP 法はわが国で開発された新たな遺伝子増幅法である。検体から DNA を抽出後、試薬と混合して一定温度 (60～65℃) で反応が進むため、特殊な機器を必要としない。増幅効率が高いことから、DNA を 15 分～1 時間で 10^9 ～ 10^{10} 倍に増幅できることが特徴である。百日咳とマイコプラズマ肺炎の実験室診断において、LAMP 法は従来の方法より感度が高く、結果判定までの時間は 2 時間以内であった。LAMP 法は非常に有用性の高い検査法と思われた。