

# 高感度検出技術としての遺伝子増幅法

山形浩一

シスメックス株式会社中央研究所：神戸市西区高塚台4-4-4（〒651-2271）

## SUMMARY

遺伝子増幅法であるPCR (Polymerase Chain Reaction) は、遺伝子解析技術として、生物学の分野において広く利用されているが、近年、臨床検査分野においても、新しい高感度検出法として、注目を集めるようになってきた。最近、遺伝子増幅法を臨床検査分野に導入するため、栄研化学(株)及びシスメックス(株)など、多くの企業により、より簡便な遺伝子増幅法の開発が精力的に行われている。また、最近、遺伝子増幅法の原理を応用して、微量のタンパク質を直接検出する新しい高感度検出法に関する研究が行われている。即ち、標的タンパク質に核酸を結合させ、核酸を増幅することによって、標的分子を高感度で検出する新しい方法(シグナル増幅法)が報告され始めている。

本稿では、PCR、最近報告されている遺伝子増幅法、及びシグナル増幅法について概観し、これらの臨床検査分野における将来の可能性について述べる。

## Key Words

遺伝子増幅 シグナル増幅 高感度検出 LAMP法

## はじめに

臨床検査分野においては、微量の標的分子を高感度で検出する、いわゆる、高感度検出法へのニーズは極めて高く、これまで、化学発光、生物発光など、各種高感度検出法が開発されてきた。図1に、現在用いられている各種検出法の感度範囲を示した。しかし、従来法の改良のみでは、もはや、これ以上の高感度化を望むことは、困難な状況になっている。

1985年、遺伝子増幅技術であるPCRが開発された<sup>1,2)</sup>。PCR (Polymerase Chain Reaction) は、遺伝子解析技術として、現在、生物学の分野で広く用いられている。最近のヒトゲノムシーケンスの解明などは、本増幅法に負うところが大きい。これによって、ポストゲノム時代の幕が開かれ、生命現象の解明が加速的に進み

始めたと言っても過言ではない。一方、臨床検査分野においては、上述のように、標的タンパク質を直接、高感度に検出することに、過去多くの精力が注がれてきた。最近、本増幅法を臨床検査分野に導入することによって、標的タンパク質をコードしているDNAもしくはRNAを増幅し、それを検出することが可能になってきた。これにより、従来法よりも高感度な検査が可能になり、今や感染症などの分野において、技術基盤が従来法から遺伝子増幅法へと変わる兆しが見え始めている。

最近、より簡便、且つ迅速に遺伝子検査を行うため、PCR以外の新しい遺伝子増幅法の開発が、特に我が国において盛んに行われている。それらのうち、栄研化学(株)及びシスメックス(株)により開発が進められているLAMP (Loop mediated isothermal Amplification)

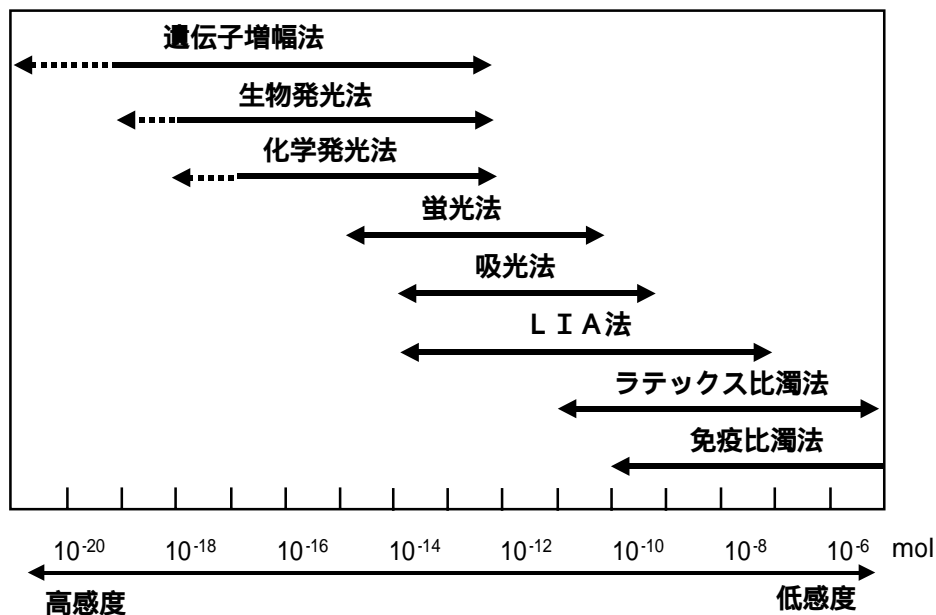


図1. 各種検出法の感度範囲

法<sup>3)</sup>は、遺伝子増幅反応を簡便に行えるため、臨床検査分野において、有用性が高い方法として注目を集めている。また、最近、遺伝子増幅法の原理を応用して、微量のタンパク質を直接検出する新しい試みがなされている。即ち、標的タンパク質に核酸を結合させ、核酸を増幅することによって、標的分子質を高感度で検出する方法が報告されている<sup>4)</sup>。

本稿では、PCR及び最近開発が進められている各種遺伝子増幅法、さらには遺伝子増幅法を基盤とした、タンパク質の新しい高感度検出法について概観し、将来の臨床検査分野におけるそれらの可能性について述べる。

### 主な遺伝子増幅法の原理と特徴

遺伝子を構成するDNA及びRNAは、ともに4つの塩基(DNAの場合はA, G, T, C、RNAの場合はA, G, U, C)から構成され、その配列によって、遺伝情報が保持されている。生体内では、DNAの複製、DNAからRNAへの転写、RNAからタンパク質の合成など、一連の反応が起きている。遺伝子増幅法は、これらのDNAやRNAの複製反応を試験管内で効率よく行うものである。

遺伝子増幅法は米国シータス社によりPCR法としてはじめて実用化された。PCRの原理を図2に示す。PCRでは増やしたい標的DNAを、95℃で一本鎖にし、60℃前後でプライマーと呼ばれる長さ20塩基前後の短いDNAをハイブリダイズ(二本鎖を形成)させ、これにDNA合成酵素を約70℃で動かせることにより、プライマーを伸長させ二本鎖DNAを合成する。その後、95℃に温度を上げることにより、もとの一本鎖DNAを再生させる。このような反応を繰り返すことによって、DNAの複製が連続して起こり、複製したDNAはそれ自身が鋳型となってさらに増幅が進むものである。このような効率のよい遺伝子増幅が可能になったのは、95℃においても活性が失われない耐熱性のDNA合成酵素の発見と<sup>2)</sup>、その安定供給に負うところが大きい。

PCRは遺伝子操作及びその解析技術として多用されている。ヒトゲノムの解析もPCRを中心とした技術なしでは到底実現できるものではなかった。また、PCRは極めて高感度な検出が可能であるため、感染症を中心とした検査・診断分野においても使われるようになってきている。

一方、PCRに替わろうとする新しい遺伝子増幅法が次々と開発されてきており、PCRに劣らない成績が得

表 1. 主な遺伝子増幅法

		遺伝子増幅						シグナル増幅					
増幅法		PCR	TMA	LAMP	ICAN	SDA	LCR	NASBA	b-DNA	RCAT	INVADER	CPT	PALSAR
会社名		Cetus (Roche)	Gen-prob (中外製薬)	栄研化学	宝酒造	BD (大塚製薬)	Abbott (Rocheとクロスサイエンス)	オルガントカ (カイノス)	Chiron (第一化学)	Molecular Staging	サードウェーブ (大塚製薬)	ID Biomedical	三光純薬
基本性能	最小感度 (分子数)	10	10	10	10	10	10	10	10000	10	1000	10 <sup>6</sup>	10 <sup>3</sup>
	特異性	中程度	中程度	高い	中程度	中程度	中程度	中程度	中程度	中程度	中程度	中程度	低い
	再現性・定量性	中程度	低い	低い	低い	低い?	?	低い	高い	?	?	?	?
	増幅時間 (標準)	1 hr	0.5 hr	15 min	1 hr	0.5 hr	2~3 hr	1.5 hr	2~3 hr	1 hr	4 hr	1.5 hr	0.5 min ~ 0.5 h
	増幅効率	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>10</sup>	10 <sup>9</sup>	?	?	10 <sup>8</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	?	?
	迅速検出	可能	可能	可能	開発中	可能	可能	開発中	増幅時間を含む	可能	可能	可能	開発中
反応装置	反応温度	変化 (60-95)	一定(40)	一定(65)	一定(50-65)	一定(60)	変化 (60-95)	一定(41)	一定(50-70)	一定	一定	一定(55)	一定(40-70)
	装置コスト	高い	中程度	安い	?	中程度	高い	中程度	中程度	中程度	中程度	中程度	?
必要な試薬	遺伝子試薬 (プライマー)数	3	2	4 or 6	2	2	4	2	2	2	2	1	2
	酵素数	1	2 or 3	1	2	2	1	1	0	1	2	1	0
	試薬コスト	安価	中程度	中程度	中程度	中程度	中程度	中程度	中程度	中程度	中程度	中程度	安価

られている。これまでに開発された主な遺伝子増幅法を表 1 にまとめた。これらのうち、RCAT 法や CPT 法などは、予め決めておいた塩基配列のみを複製する方法である。これらの方法は、シグナル増幅法と呼ばれるべきものであり、標的タンパク質に DNA を結合させ、この DNA を増幅することにより、微量タンパク質の高感度検出への可能性が検討されている。これらも表 1 に合わせて列挙しておく。

1. PCR

PCR では二つのプライマーで挟まれた標的 DNA が 1 回の温度サイクル(基本的には 95 1 分, 60 1 分, 70 1 分)で 2 倍に増え(図 2) n 回の温度サイクルをかけて増幅した場合、理論的には標的 DNA は 2<sup>n</sup> 倍に増えることになる。通常、30 回程度の温度サイクルにより、標的 DNA は 10<sup>8</sup> 倍程度にまで増幅される。PCR は最も広く普及した遺伝子増幅技術であり、増幅反応に必要な酵素も安価に入手することができる。このため PCR は、遺伝子検査として感染症を中心とした臨床検査にも最も幅広く応用されている。

PCR には標的 DNA の有無だけを検出する定性 PCR と標的 DNA を定量する定量 PCR の二つの方法があり、ともに臨床検査分野において用いられている。

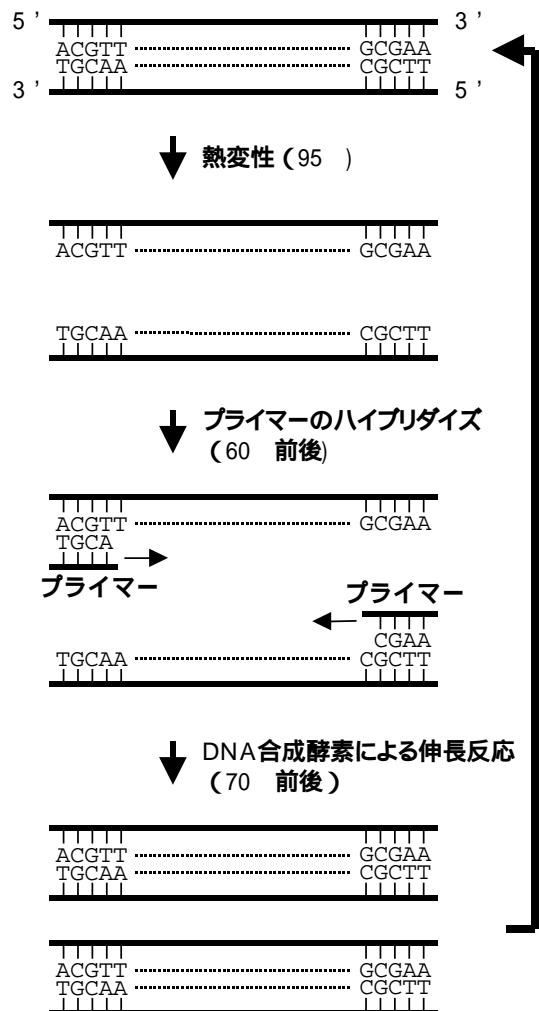


図 2. PCR の増幅原理

当初, PCRでは, 標的とするDNAの複製を大量に作り出すだけであり, この増幅産物を検出するためには, 別途, 検出のためのステップが必要であった。また, 本法においては, この増幅産物は, 原理上, それ自身が標的となるため, キャリーオーバーあるいはクロスコンタミネーションによる偽陽性が大きな問題となっていた。しかし, 同一反応容器内で増幅と検出を同時に行うリアルタイムPCRが実用化されて以来, 増幅産物による偽陽性の発生は大幅に減少した。さらに, この方法の開発により, 標的DNAの定量が可能になった。

リアルタイムPCRにおける検出方法には, 二つのものがある。一つは増幅した二本鎖DNAと結合して蛍光が発生する蛍光性インターカレーターを使う方法であり<sup>5)</sup>, もう一つは, TaqManプローブと呼ばれる増幅産物に選択的に結合できる蛍光標識DNAを用いる方法である<sup>6)</sup>(図3)。TaqManプローブは, 目的とするDNAが増幅した場合にのみ, 増幅したDNAに結合し, その複合体のうちTaqManプローブの部分のみがDNA合成酵素により分解される。TaqManプローブの両端には蛍光剤と消光剤が結合しており, TaqManプローブが分解してはじめて蛍光を発するようになる。

このように蛍光性インターカレーターを用いた方法, TaqManプローブを用いた方法とも, DNAが増幅した場合に蛍光強度が増加し, 標的DNAの増幅の有無を知ることができる。また, もともと反応液に含まれる標的DNAの含有量が多いほど蛍光強度の立ち上がりが早いので, 立ち上がり時間の差によって標的DNAの定量ができる。このリアルタイムPCRの原理に基づく定量PCRについても定性PCRと同様に広く応用が行われているが, 装置が高価, 増幅時間が2時間程度と長く, また検体からのDNAの抽出に手間がかかるなど, 解決すべき問題点は多い。

## 2. TMA(Transcription Mediated Amplification)法

遺伝子検査において, PCRに次いで多用されている遺伝子増幅法は, 中外製薬(株)の子会社であるGen-probe社(<http://www.gen-probe.com>)によって開発されたTMA法である<sup>7)</sup>。TMA法においては, 増幅反応は40前後の一定温度で進行し, 増幅時間も30分程度

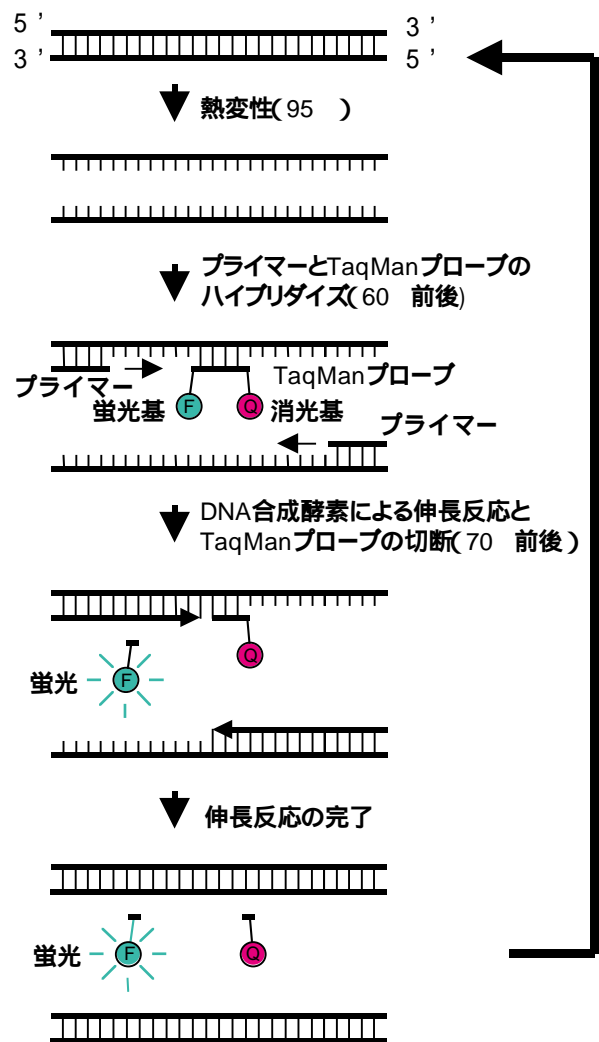


図3. 定量PCR (TaqMan PCR) の原理

と短いため, 迅速な検出が可能である。Gen-probe社のHPA (Hybridization Protection Assay) という簡便な高感度検出法と組み合わせることにより, 同一反応容器中で, 増幅反応と検出をPCRと同程度の感度をもって, 簡便に行うことができる。

## 3. LAMP法

LAMP法は栄研化学(株) (<http://www.eiken.co.jp>)により2000年に発表された新しい遺伝子増幅法である<sup>3)</sup>。LAMP法においては, 両端がループ構造となるDNAを介して増幅反応が進む(図4A, B)。増幅原理については大きく分けて二つのステップに分かれる。前半のステップは, 増幅サイクルに適した(両端がループ

構造となった)形の一本鎖DNA (Starting material)の合成である(図 4A)。後半のステップは、両端がループ構造になったDNA (Starting material)を介して起こる増幅反応サイクルである(図 4B)。この増幅反応サイクルで生成したDNAも分子内にループ構造を持つためDNA伸長反応の鋳型となり、さらに増幅反応が連続して起き、種々の大きさの増幅DNAが大量に生成する。LAMP法はその増幅原理から次の4つの特徴を持つ。

- 反応は等温下で進行する
- 4種類のプライマーを用いるため、
- 反応の特異性が高い
- 増幅反応が速い
- 増幅効率が高い

以下、それぞれの特徴について述べる。

#### 特徴1:等温反応

一般にDNA合成酵素によるDNA伸長反応では、通常一本鎖DNAを鋳型として、これにプライマーと呼ばれる短いDNAがハイブリダイズして二本鎖を形成し、ここを起点として伸長反応が進み二本鎖DNAが生成する。PCRにおいては、鋳型となる一本鎖DNAを生成させるために、まず反応液を95℃という高温条件下で熱変性処理し、二本鎖DNAを一本鎖状態に変性させる。これに対し、LAMP法においては、DNA合成酵素により伸長したDNAの両端部がループ構造を形成し、一本鎖状態を保持する。また、DNA合成酵素として鎖置換型DNAポリメラーゼを使用しているため、伸長反応により生成したDNAは、連続して起きる次のステップでの伸長反応に伴い、鋳型DNAからはがされ一本鎖状態になる。これらのことにより熱変性を行うことなしに、新たな伸長反応に必要な鋳型である一本鎖DNAを生成させることができる。

このようにLAMP法において、DNA合成酵素の最適温度(ここでは65℃)で伸長反応が連続的に進むため、増幅反応が効率よく起こると考えられる。等温反応であれば装置が簡単になるだけでなく、増幅反応の検出を安定して行うためにも重要であるなど実用化の点で意義は大きいと考えられる。

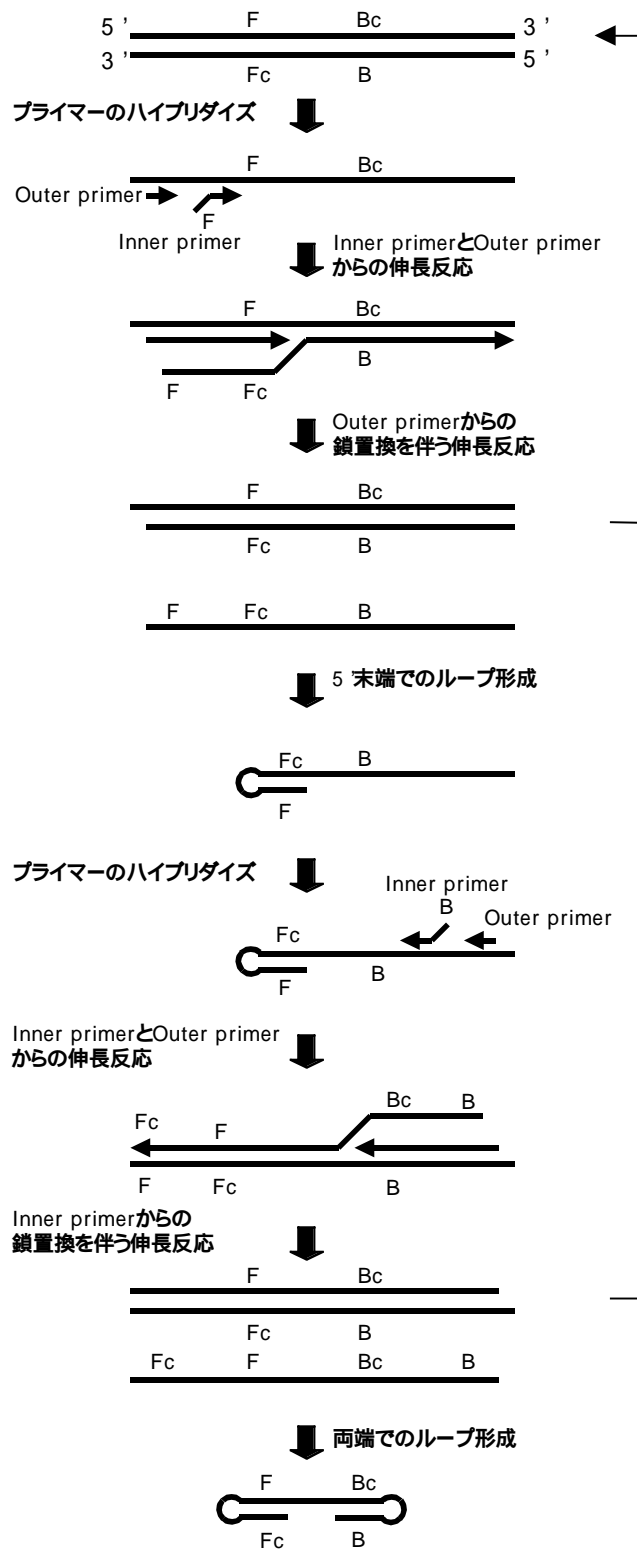


図 4 A. LAMP法の増幅原理



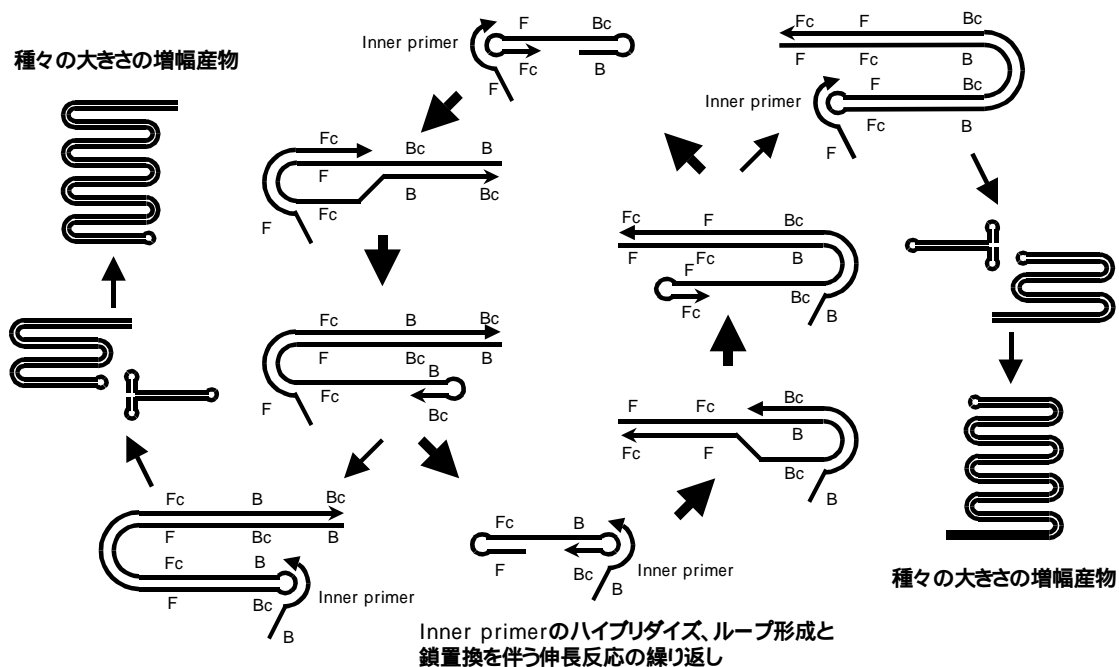


図 4 B. LAMP法の増幅原理

図中のBとBc, FとFcは、それぞれお互いに相補的な(ハイブリダイズし得る)塩基配列の領域を示す。

### 特徴2:高い特異性

PCRについては増幅したいDNAの両端に特異的に結合するプライマーを2種類使用し、この二つのプライマーに挟まれた領域のDNAを増幅する。このときプライマーが目的としないDNAに結合し、DNAの伸長反応が一旦起こってしまえば、これがさらに増幅反応の鋳型となるため、非特異的な増幅が起き、偽陽性を示すことになる。しかし、LAMP法においては、4種類のプライマーを用いて6ヶ所の領域を認識して増幅反応が進行するため、特異性が高いことが期待される。

### 特徴3:速い増幅

遺伝子増幅に必要な反応時間は、増幅反応に用いるDNA合成酵素の特性(伸長反応速度)と実際に伸長反応を行う時間によって決まる。LAMP法においては、反応温度を変化させる必要がなく、DNA合成酵素の至適温度で増幅反応を行うことができるため理論上、時間の無駄なく増幅反応が進む。これに対し、PCRでは、前で述べたように反応温度を変化させる必要があり、それぞれの目的温度に達するための時間がさらに必要になる。このため、同じ伸長反応速度を持つ

DNA合成酵素を使う場合、LAMP法はPCRより増幅時間を短くできる可能性がある。

### 特徴4:高い増幅効率

PCRの増幅効率は最大 $10^8$ 倍程度であるが、LAMP法の増幅効率は最大 $10^{10}$ 倍と高い。このため、増幅反応に伴う副生成物であるピロリン酸マグネシウムも大量に生成し、LAMP法においては、増幅反応が起きた場合にピロリン酸マグネシウムによる反応液の白濁が生じる。これに対しPCRにおいては、増幅効率が低い場合ピロリン酸マグネシウムの沈殿はほとんど生成しない。LAMP法においてピロリン酸マグネシウムの白濁により増幅を検出すれば、蛍光性インターカレーターあるいは蛍光標識DNAプローブが不要であり、PCRに比べ、安価で簡便な検出系が構築できる<sup>8)</sup>。

このようにLAMP法においては等温条件下で増幅反応が速く進み、かつ、蛍光標識DNAプローブなどを使わない簡便な検出が可能であることから、装置、試薬とも安価にできる可能性があり、臨床検査分野においては実用化するために有利であるものと期待され、注目を集めている。

#### 4. ICAN法

ICAN( Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic acids)は宝酒造(株)(<http://www.takara.co.jp>)によって考案され、発表された遺伝子増幅法である<sup>9)</sup>。この増幅法の原理はPCRに似ているが、プライマーとして部分的にRNAの配列を持つオリゴDNAを利用することにより、反応温度の上げ下げが不要になり、一定温度のもとPCRと同様の増幅反応を起こすことができる(図5)。ICAN法は、PCRに比べ増幅効率が高いという特徴を有し、DNAチップ等に使用するDNAの生産への利用が考えられている。しかし、増幅には1時間程度の時間がかかり、臨床検査分野において幅広く応用されるためには、さらに改良が必要であると考えられる。

#### 5. SDA法

SDA( Strand Displacement Amplification)法は、Becton Dickinson社(<http://www.bd.com>)により実用化が試みられている遺伝子増幅法であり、LAMP法やICAN法と同様に鎖置換型DNA合成酵素を用いる等温反応による遺伝子増幅法である<sup>10)</sup>。SDA法においては、制限酵素による伸長したDNAの切断と鎖置換型DNA合成酵素によるDNA伸長反応のサイクルの繰り返しにより増幅が起こる。SDA法は増幅時間が短いという特徴を有しているが応用例は少ない。

#### 6. LCR法

LCR( Ligase Chain Reaction)法は、Abbott社(<http://www.abbott.com>)により実用化が図られている遺伝子増幅法である<sup>11)</sup>。この方法は、標的DNAに近接してハイブリダイズし二本鎖を形成した二つのプライマー同士を結合させ、プライマーの約2倍の長さを持つDNAを増幅するものである。このとき、PCR法と同様にDNAの熱変性、プライマーのハイブリダイズ、結合反応という三つの反応を行うために反応温度を変化させる必要がある。増幅に時間がかかることもあり、幅広く応用されるには至っていない。

#### 7. NASBA法

NASBA( Nucleic Acid Sequence-Based Amplification)法はOrganon-technika社により開発が進められてきた

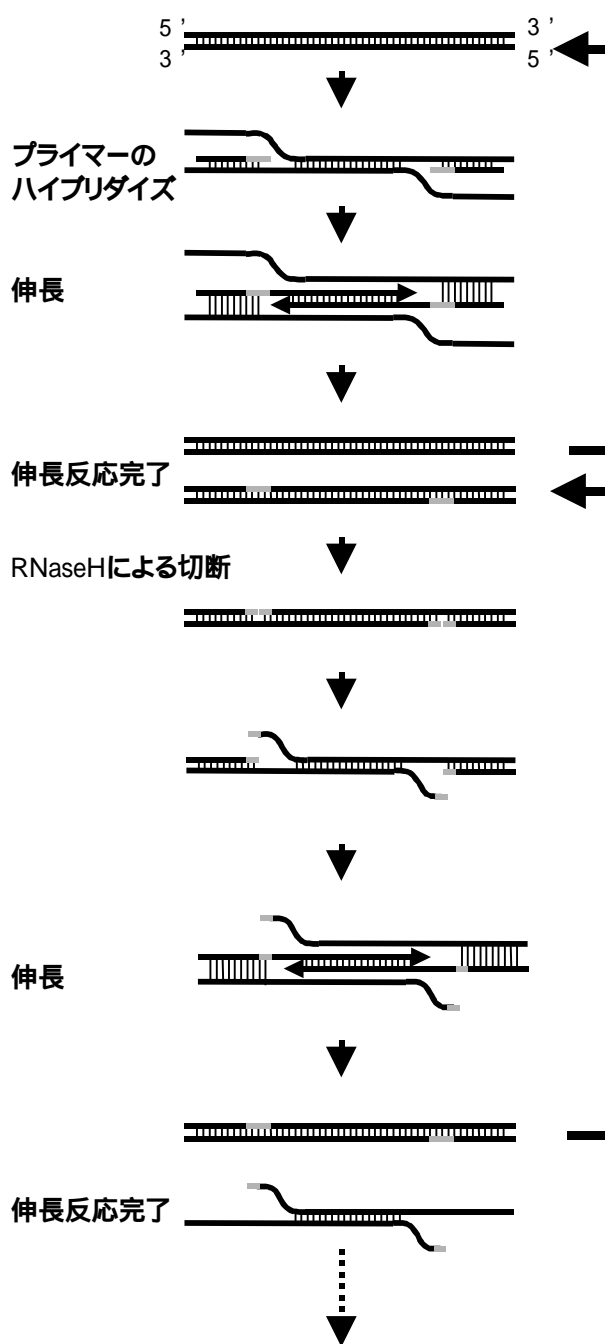


図5. ICAN法の増幅原理

遺伝子増幅法であり、標的RNAから一定温度の反応で大量のRNAを増幅する<sup>12)</sup>(原理は(株)カインスのHP参照, <http://www.kainos.co.jp>)。DNAに比べ不安定なRNAを増幅するため増幅産物の混入によるキャリアオーバー、偽陽性の可能性は少ないと考えられる。現在、研究用試薬としては販売されているが、臨床診断薬としては販売されていない。

## 8. bDNA 法

1. PCR から 7. NASBA までの遺伝子増幅法は標的分子自身の数を増やす方法であったが、この bDNA から 12. PALSAR の方法は、標的分子そのものを増幅するのではなく、標的分子に代わるものとして特定の塩基配列の DNA を増やすことで見かけ上、標的分子を増やして高感度化を図るシグナル増幅法である。

bDNA( branched-DNA probe )法は Chiron 社 (<http://www.chiron.com>)により開発された高感度 DNA 検査試薬である<sup>13)</sup>。bDNA 法は名前の通り、枝分かれした櫛状の特殊な構造の DNA プローブを用いる高感度 DNA 検出法である。固相表面に固定化した標的 DNA に対して枝分かれした DNA プローブによるハイブリダイゼーションを数回繰り返すことによりシグナルを数千倍に増幅する。定量性に優れており、主に肝炎治療の際のウイルス量モニタリング用として実用化されている。

## 9. RCAT 法

RCAT( Rolling Circle Amplification Technology )法は、Molecular Staging 社 (<http://www.molecularstaging.com>)により開発が続けられているシグナル増幅法である<sup>4)</sup>。RCAT では、標的 DNA に環状 DNA をハイブリダイズさせる。ハイブリダイズさせた環状 DNA を鋳型とし、標的 DNA をプライマーとして鎖置換型 DNA 合成酵素を作用させると鋳型の環状 DNA がこれまでに伸長した DNA をはがしながら伸長し、標的 DNA を極めて長く伸長できる(図 6)。その結果、検出対象物を大きくし検出を容易にできることになる。一定温度で反応が進むため、タンパク質に標的 DNA を結合させておくことでタンパク高感度検出の際のシグナル増幅法としても利用できる。また、最近では、RCAT 法をシグナル増幅だけではなく遺伝子増幅法としての応用も報告された<sup>14)</sup>。

## 10. INVADER 法

INVADER 法は遺伝子の 1 塩基の違い(変異)を高感度に効率よく検出するため、Third Wave Technology 社 (<http://www.twt.com>)により開発が行われているシグナル増幅法であり<sup>15)</sup>、SNPs( Single Nucleotide Polymorphism )研究に応用されている<sup>16)</sup>。この方法は、

標的 DNA に変異があった場合にのみプローブ DNA が酵素によって切断され、これがさらに他の蛍光標識プローブの分解を促進し、結果的に蛍光を発生させるという原理に基づいている。今後、INVADER 法は 1 塩基の違いを検出する必要のある一部の感染症診断、テーラーメイド医療分野などでは実用化が進むと考えられる。

## 11. CPT 法

CPT( Cycling Probe Technology )法は、ID Biomedical 社 (<http://www.idbiomed.com>)により実用化が試みられている高感度遺伝子検出のためのシグナル増幅法である<sup>17)</sup>。CPT 法においては、中央部には DNA ではなく RNA を組み込んだキメラプローブを用いる。さらに増幅反応後の検出を容易にするため、このキメラプローブの両端をそれぞれ蛍光基とピオチンで標識しておく。標的 DNA が存在する場合、標識キメラプローブは標的 DNA と結合し、RNaseH( DNA と RNA の二本鎖の RNA 側を切断する酵素 )により 2 つの部分に切断される。切断されたプローブは標的 DNA から外れ、標的 DNA には新たな標識キメラプローブが結合する。このようにして標的 DNA が存在する場合、標

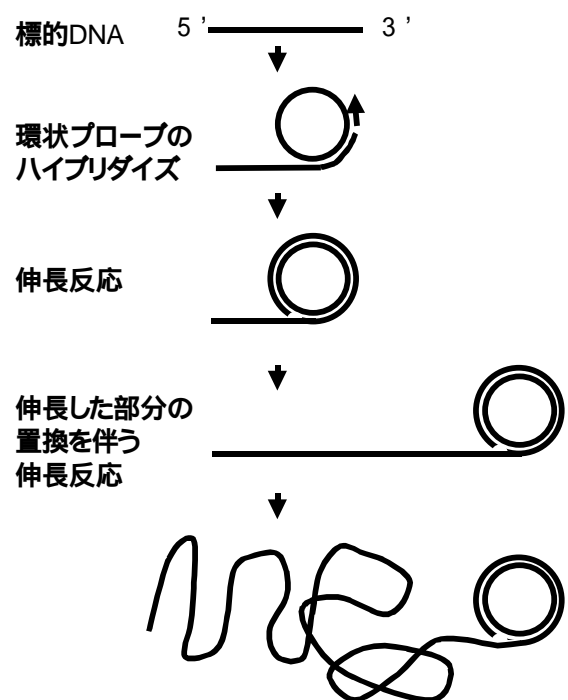


図6. RCAT法の増幅原理



識キメラプローブの分解物が蓄積することになる。蛍光基だけが標識されたプローブ分解物を検出する簡便な検出キットも開発されているが、増幅時間が長い、検出感度がよくないという点で実用化は進んでいない。

## 12. PALSAR 法

PALSAR( Probe Alternation Link Self-Assembly Reaction )法は、三光純薬(株)(<http://www.sankojunyaku.co.jp>)により開発されたシグナル増幅法である<sup>18)</sup>。PALSAR法においては、互いに特異的に結合し得る3つの領域からなる、2種類のDNAプローブを用いる。また、これらのDNAプローブには検出のため、蛍光基あるいはビオチンなどで標識しておく。この2種類のDNAプローブは互いにハイブリダイゼーションを繰り返すことにより、検出のための標識を含んだ巨大なDNAの複合体となる。標的DNAはこの巨大なDNAの複合体に結合することになり、非常に多くの標識を取り込んだ巨大な複合体として検出される。この方法の大きな特徴は、酵素を使用しない、反応時間が0.5～30分と短いという点である。但し、この方法においては標的とする遺伝子が存在しない場合も同様に、DNAプローブ同士の結合による巨大複体の生成が起こる。このため、偽陽性を減少させるためには標的遺伝子と結合していないDNAの巨大複体を効率的に除去する必要があると思われ、実用化にはまだ、時間を要すると考えられる。

## まとめ

代表的な遺伝子増幅法であるPCRと、これまでに開発が進められてきたその他の遺伝子増幅法を、シグナル増幅法も含めて紹介した。PCR以外の遺伝子増幅法についても数多くの研究がなされており、性能上はPCRと遜色ないものとなってきた。中でもLAMP法は、臨床検査分野において実用化するために有利であると考えられる点が多く、注目されている。

臨床検査分野における高感度検出技術として真に求められている遺伝子増幅法は、検体の前処理、増幅反応、そして増幅産物の検出という一連の操作が迅速簡便、高感度かつ正確に行えるものである。今後は、

検体の前処理も含めた一連の技術として、開発競争が続くものと考えられる。

## 参考文献

- 1) Saiki RK, et al. : Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230 : 1350, 1985.
- 2) Saiki RK, et al. : Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239 : 487, 1988.
- 3) Notomi T, et al. : Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28 : e63, 2000.
- 4) Lizardi PM, et al. : Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nature Genetics*, 19 : 225, 1998.
- 5) Higuchi R, et al. : Kinetic PCR analysis : real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 9 : 1026, 1993.
- 6) Livak KJ, et al. : Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Application*, 4 : 357, 1995.
- 7) Jonas S, et al. : Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 31 : 2410, 1993.
- 8) 森安義,他 : ピロリン酸マグネシウムの沈殿生成を指標としたLAMP法の簡易検出. 第23回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 : 379, 2000.
- 9) 畠田雅光,他 : 等温遺伝子増幅法アイキャン (ICAN) TM による結核菌検出試薬の開発. 第48回日本臨床検査医学会総会講演要旨集 : 96, 2001.
- 10) Walker G T, et al. : Strand displacement amplification-an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucleic Acids Research*, 20 : 1691, 1992.
- 11) Barany F : Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88 : 189, 1991.
- 12) Compton J : Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*, 350 : 91, 1991.
- 13) Urdea MS, et al. : Branched DNA amplification multimers

- 
- for the sensitive, direct detection of human hepatitis viruses. Nucleic Acids Symposium Series, 24 : 197, 1991.
- 14 ) Zhang DY, et al. : Ramification amplification - A novel isothermal DNA amplification method. Molecular Diagnosis, 6 : 141, 2001.
- 15 ) Lyamichev V, et al. : Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes. Nature Biotechnology, 17 : 292, 1999.
- 16 ) Wilkins SP, et al. : Analysis of single nucleotide polymorphisms with solid phase invasive cleavage reactions. Nucleic Acids Research, 15 : e77, 2001.
- 17 ) Bekkaoui F, et al. : Cycling probe technology with RNaseH attached to an oligonucleotide. Biotechniques, 20 : 240, 1996.
- 18 ) Usui M : GENE AMPLIFYING METHOD. US patent No. 6261846, 2001.

---

## Nucleic Acid Amplification Methods as Highly Sensitive Detection Technologies

Koichi YAMAGATA

Central Research Institute, Sysmex Corporation

4-4-4 Takatsukadai Nishi-ku, Kobe 651-2271

### SUMMARY

Nowadays, PCR ( Polymerase Chain Reaction ) , a nucleic acid amplification method, is widely used as a gene analysis method in the field of biology. This methodology has recently attracted great attention as a novel high-sensitive detection-method in the field of clinical diagnostics. Most recently, in order to introduce a nucleic acid amplification method into clinical diagnostics, many companies including Eiken Chemical Co. Ltd. and Sysmex Corporation have been studying extensively in search of a more effective and convenient amplificationmethod. Furthermore, based on the principle of the nucleic acid amplification reaction mentioned above, a novel method, named “ signal amplification method ” , has recently been reported for direct detection of a small amount of a protein with high-sensitivity; the method involves the direct detection of a protein by amplification of a nucleotide which covalently binds to the protein.

The author herein overviews the nucleic acid amplification methods including PCR, recently reported amplification methods having characteristics different from PCR and the signal amplification method, and discusses their potentiality in the future clinical diagnostics.

### Key Words

Nucleic Acid Amplification, Signal Amplification, Highly Sensitive Detection, LAMP