

論文の内容の要旨

氏名：笹野まり

専攻分野の名称：博士（医学）

論文題名：LAMP法によるOXA(オキサシリナーゼ)-48型βラクタマーゼ産生遺伝子の検出法

背景：薬剤耐性菌の蔓延とともに、院内感染の原因となるカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌(carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*;CPE)株の分離報告が増加している。この中で、OXA(オキサシリナーゼ)-48型βラクタマーゼ産生株の国内からの検出例は、すべて海外渡航歴を有する症例であった。海外渡航歴のない症例が2017年に初めて報告されてから、無症候性の保菌者が国内に潜在している可能性が危惧されている。培養法を用いたOXA-48型βラクタマーゼ産生菌に対する検査法は存在せず、現時点ではPolymerase Chain Reaction(PCR)法やLoop-mediated Isothermal Amplification(LAMP)法などの遺伝子検出法にてのみ、診断が可能である。しかしPCR法には高価な機器と、反応阻害物質を多く含む臨床検体からのDNA精製および電気泳動などの煩雑な手技が必要とされるといった問題点がある。

目的：OXA-48型βラクタマーゼ産生遺伝子の検出法として、PCR法にかわるLAMP法の新たなプライマーを開発し、その有用性を検証した。さらに臨床応用のために、反応阻害物質を多く含む臨床検体(髄液、血液、便、尿、および喀痰)を用いて、LAMP法の感度を検証した。

方法：OXA-48型βラクタマーゼ産生遺伝子の核酸を増幅するLAMP法のプライマーを設計した。6種類のβラクタマーゼ産生遺伝子を有することがわかっている4菌種8菌株の基準株、9菌種9菌株の陰性対照株、そして5菌種20菌株の臨床分離株の合計37菌株を用いて特異度を評価した。またOXA-48型基準株からの精製DNAにて希釈系列を作製し、感度を評価した。さらに臨床検体(髄液、血液、便、尿、および喀痰)からの抽出液にOXA-48型精製DNAを添加し、実際の臨床検体に近い条件で感度を評価した。PCR法でも同一検体を用いた実験を行い、結果を比較・検討した。

結果：本研究のLAMP法プライマーは、OXA-48型産生株4株を特異的に検出した。他のβラクタマーゼ産生株ならびに腸内細菌科細菌等との交差反応は認めなかった。精製DNAを用いたLAMP法は一反応あたり10コピーまで検出可能で、PCR法と比べ10倍高い感度であった。さらに上記臨床検体を用いたDNA添加検体でも、LAMP法は一反応あたり10コピーまで検出可能で、PCR法と比べ、 10^2 倍以上の高感度を示した。

結論：本研究において私は、LAMP法によるOXA-48型βラクタマーゼ産生遺伝子の検出法を開発した。本法は、反応阻害物質を多く含む便や血液においてもPCR法に比較し、高感度を示した。OXA-48型βラクタマーゼ産生菌による感染拡散予防には、保菌者の早期隔離・接触感染対策が極めて重要である。保菌者診断において、LAMP法はPCR法にかわる遺伝子検出法として臨床応用が期待できる。