

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 (要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
病理系感染制御科学専攻

笹野 まり

修了年 2020 年

指導教員 早川 智

背景: 薬剤耐性菌の蔓延とともに、臨床の場で最後の切り札として使用されるカルバペネム系抗菌薬に耐性を示す、腸内細菌科細菌・緑膿菌そして *Acinetobacter baumannii* の分離報告が、世界中で増加している。WHO が公表した緊急に新規抗菌薬開発の必要な 12 種類の薬剤耐性菌の中にも、これらが含まれており、いずれも新規抗菌薬開発の必要性に関して、最も緊急性の高い「重大」の区分に分類されている(1)。このうち、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE)) の中には、カルバペネム系抗菌薬を加水分解するカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE)) が含まれる。カルバペネマーゼ遺伝子はプラスミド上に存在し、接合メカニズムを介して、異なる菌種間にも水平伝播する(2)。そのため、院内感染の起因菌診断において、菌種の同定とは別に、生物学的性状の診断に困難をきたす。CPE の分離報告は、2000 年以降世界中で増加している(3)。代表的なカルバペネマーゼ遺伝子には、IMP 型、KPC 型、VIM 型、NDM 型そして OXA (オキサシリナーゼ)-48 型の 5 種類がある。この中で OXA-48 型 β ラクタマーゼ産生株は、日本国内からは海外渡航歴のある症例からこれまで検出されてきた。しかし、2017 年に海外渡航歴のない症例が初めて報告され(4)、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。従来、培養法を用いたカルバペネマーゼ産生菌のスクリーニング検査として、KPC 型に対するボロン酸や、IMP 型・NDM 型・VIM 型に対する EDTA を用いたディスク法(5)が知られているが、OXA-48 型に対する阻害剤がまだ発見されていない(6)。そのため、ディスク法による診断が困難であり、現時点では Polymerase Chain Reaction (PCR) 法などの遺伝子診断法に頼らざるを得ない。PCR 法に代わる遺伝子検出法として、ループ介在等温増幅 (Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)) 法がある。LAMP 法は、2000 年に納富らが報告した(7)等温核酸増幅法の一つであり、鎖置換型 DNA ポリメラーゼの作用により、DNA の 2 本鎖から 1 本鎖への変性を必要としない。そのため、鋳型 DNA の増幅反応は、すべて等温で連続的に進行し、高価なサーマルサイクラーを必要とせず、簡易なヒートブロックインキュベーターによる反応が可能である。さらに鋳型 DNA の 6 領域に対して 4 種類のプライマーを設計するため、標的遺伝子配列を特異的に増幅可能であり、かつ増幅効率が低いという利点を有する。また鋳型 DNA の増幅副産物として生成されるピロリン酸マグネシウムによる白濁を生じるため、リアルタイム濁度測定装置での濁度の測定(8)ならびに白濁の目視によって、標的遺伝子の有無を判定することが可能である。判定の際も、反応チューブを開ける必要がないため、増幅した DNA による実験室汚染の心配がない。また、核酸の増幅効率がよく、臨床検体に含まれる核酸増幅反応阻害物質の影響を受けにくい。そのため、簡易な DNA 抽出法でも検出が可能であることより、臨床検体への応用性が高いと考えられる。

目的: 本研究は、OXA-48 型 β ラクタマーゼ産生遺伝子を迅速かつ精確に検出する、PCR 法にかわる新たな LAMP 法の開発を目的とした。本法の有用性を、OXA-48 型 β ラクタマーゼ産生株から抽出した精製 DNA を用いて特異度と感度を調べ、同一検体で施行した PCR 法の結果と、比較検証した。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、そして喀痰）を用いて、同様に LAMP 法および PCR 法を実施し、反応阻害物質の影響を比較検討した。

方法: National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を使用し、OXA-48 型 β ラクタマーゼ産生遺伝子の一部 (GenBank accession number, JN571569.1) を標的遺伝子とした。Primer Explorer V5 software (<https://primerexplorer.jp/lampv5/index.html>) (FUJITSU, 2016) を使用し、この標的遺伝子の塩基配列情報をもとに、4 種類の LAMP プライマーを設計した。さらに、LAMP 法の増幅効率を高め、反応速度を短縮するために 2 種類のループプライマーの設計もあわせておこない、合計 6 種類を LAMP プライマーセットとして、検証をおこなった。LAMP 反応の条件としては、template DNA, LAMP プライマーセット, Bst DNA polymerase 等を含む合計 25 μ l のリアクションミックスを、63°C 等温で 60 分間反応させた。LAMP 反応チューブの濁度は、リアルタイム濁度測定装置および目視で判定した。LAMP 法によって得られた増幅産物は、ダイレクトシーケンス解析を他施設でおこなった。以上の条件で、6 種類の異なる 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基準株 8 菌株、陰性対照株 9 菌株、そして臨床分離株 20 菌株の合計 37 菌株を用いて、OXA-48 型 β ラクタマーゼ産生遺伝子に対する LAMP 法の特異度を評価した。続いて、OXA-48 型 β ラクタマーゼ産生遺伝子を有する基準株から抽出した精製 DNA にて、10 倍の希釈系列を作製し、LAMP 法の感度を評価した。さらに 5 人以上の臨床検体（髄液、血液、便、尿、そして喀痰）に Procedure for Ultra Rapid Extraction (PURE) 法による簡易抽出法、または加熱遠心による処理をほどこし、OXA-48 型 β ラクタマーゼ産生株からの抽出 DNA を添加したスパイク検体で、LAMP 法と PCR 法の感度を比較・評価した。最後に、NCBI の BLAST を使用し、標的遺伝子の OXA-48 型 β ラクタマーゼ産生遺伝子 (GenBank accession number, JN571569.1) と、カルバペネム耐性を有する 6 種類のバリエーション (OXA-162, OXA-181, OXA-204, OXA-232, OXA-244, OXA-245) について、塩基配列の相同性検索を *in silico* でおこない、本研究の LAMP primer set がこれらバリエーションを検出するかどうかを検討した。。

結果: 本研究の LAMP プライマーは、OXA-48 型 β ラクタマーゼ産生株 4 株を特異的に検出した。ダイレクトシーケンス解析の結果から、LAMP 反応産物は、予測された領域と一致することを確認した。また OXA-48 型 β ラクタマーゼのバリエーションで、カルバペネム耐性を有する OXA-181 型も、本 LAMP プライマーによって、検出が可能であった。その一方で、OXA-48 型 β ラクタマーゼ産生株以外との交差反応を認めず、高い特異度がみられた。OXA-48 型

β ラクタマーゼ産生株の精製DNAを用いたLAMP法の感度は一反応あたり10コピーであり、PCR法の 10^2 コピーと比較して、10倍高感度であった。さらにPURE法または加熱遠心処理をおこなった臨床検体（髄液、血液、便、尿、そして喀痰）を用いて作製したDNAスパイク検体の感度も、LAMP法はすべて一反応あたり10コピーと、精製DNAと同等の高い感度を示した。一方PCR法では、一反応あたり尿・喀痰・髄液で 10^3 コピー、血液で 10^4 コピー、そして便では 10^5 コピー以上と著しく低感度であった。6種類のOXA-48型バリエント（OXA-162, OXA-181, OXA-204, OXA-232, OXA-244, OXA-245）と、OXA-48型 β ラクタマーゼ遺伝子（GenBank accession number, JN571569.1）の塩基配列について相同性検索をおこなった。その結果、本LAMPプライマーは、これらの共通塩基配列をターゲットとしており、OXA-48型バリエントの検出も可能であることが、推測された。

結論：私が開発したLAMP法によるOXA-48型 β ラクタマーゼ産生遺伝子の検出は既知の方法を増幅効率で上回り、院内感染拡散予防の観点においてPCR法に代わる核酸増幅・遺伝子検出法となる可能性がある。特に反応阻害物質を含む臨床検体においても、高い感度を示したことから臨床応用が期待できる。

【参考文献】

1. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious diseases*. 2018;18(3):318-27.
2. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging infectious diseases*. 2011;17(10):1791-8.
3. Doi Y, Paterson DL. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2015;36(1):74-84.
4. 板垣沙紀, 田澤庸子, 菊地勇治, 古畑由紀江, 堀内啓, 柴山恵吾, et al. 海外渡航歴のない患者から分離された OXA-48 型カルバペネマーゼ産生 *Klebsiella pneumoniae*. *日本臨床微生物学雑誌*. 2017;27:41-7.
5. Bakthavatchalam YD, Anandan S, Veeraraghavan B. Laboratory Detection and Clinical Implication of Oxacillinase-48 like Carbapenemase: The Hidden Threat. *Journal of global infectious diseases*. 2016;8(1):41-50.
6. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2012;18(5):432-8.
7. 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.
8. Mori Y, Kitao M, Tomita N, Notomi T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *Journal of biochemical and biophysical methods*. 2004;59(2):145-57.