

国際医療福祉大学審査学位論文（博士）

国際医療福祉大学審査学位論文（博士）

大学院医療福祉学研究科博士課程

**LAMP法を用いた簡易・迅速なIMP, KPC, NDM,  
VIM, OXA-48-likeカルバペネマーゼ産生遺伝子  
の網羅的検出法に関する研究**

平成30年度

保健医療学専攻 臨床検査学分野

学籍番号：16S3052 氏名：船島 由美子

研究指導教員 永沢 善三 教授

副研究指導教員 佐藤 謙一 准教授

# LAMP法を用いた簡易・迅速なIMP, KPC, NDM, VIM, OXA-48-like

## カルバペネマーゼ産生遺伝子の網羅的検出法に関する研究

船島 由美子

### 要 旨

感染症治療においてカルバペネマーゼのタイプ鑑別と堅実な検出は臨床上極めて意義が高い。今回、カルバペネマーゼ産生遺伝子であるKPC、NDM、VIM、OXA-48-like、IMPをターゲットに、最新塩基配列情報に基づいたLoop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 検出プライマーを設計し、その検出法を確立した。菌株からのDNA抽出はアルカリ煮沸法と市販キットを使用した。LAMP法での反応温度はVIM : 65° C、NDM : 63° C、KPC : 65° C、OXA-48-like : 65° C、IMP : 61° C での反応促進が認められ、同時分析ではLAMP反応を63° C、60分間とした。その結果、10<sup>3</sup>copies/mL相当菌量までの検出が可能であった。Multiplex-polymerase chain reaction (Multiplex-PCR) で検証した36菌株との反応性では、VIM (4/4 : LAMP法陽性菌株数/ Multiplex-PCR結果からの供試菌株数)、NDM (2/2)、KPC (4/4)、OXA-48-like (4/4)、IMP (17/17) であり、LAMP法によるカルバペネマーゼの各タイプにおける陽性菌株および陰性菌株との反応性は全て一致し、全株の検出反応時間も全て30分以内であった。また、VIMはVIM-1-likeとVIM-2-likeの2系統とも検出可能であった。供試菌株数およびバリエーションの乏しさは課題として残るが、今回のLAMP法は簡易かつ迅速なカルバペネマーゼ検出法として特異性および測定感度共に高く臨床上有用であると考えられる。

**Key words :** カルバペネム耐性腸内細菌科細菌  
カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌  
LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法

# Comprehensive detection method of simple and rapid Carbapenemase IMP, KPC, NDM, VIM, OXA-48-like genes by the LAMP method

Yumiko Funashima

## Summary

Reliable detection and typing of carbapenemase is important in the treatment of infectious diseases. In this study we newly designed LAMP primer based on the latest information and established a detection method for Carbapenemase KPC, NDM, VIM, OXA-48-like, IMP gene. For DNA extraction from strains, alkaline boiling method and commercial kit were used. The reaction temperatures of the LAMP method was VIM: 65 ° C, NDM: 63 ° C, KPC: 65 ° C, OXA-48-like: 65 ° C, IMP: 61 ° C. And simultaneous LAMP method was at 63 ° C, for 60 minutes. It was possible to detect up to 10<sup>3</sup> copies / mL. The reactivity of LAMP using 36 strains verified by Multiplex - PCR was VIM (4/4: number of LAMP method positive strains / number of strains evaluated), NDM (2/2), KPC (4/4), OXA-48-like (4/4), IMP (17/17). The type of carbapenemase determined by the LAMP method were all consistent with multiplex PCR. All strains were detected within 30 minutes. In VIM, both VIM-1-like and VIM-2-like were able to detect. In this study, although the number and variation of the strains evaluated was limited, LAMP method was clinically useful as a simple and rapid carbapenemase detection method.

Key words : Carbapenem - resistant *Enterobacteriaceae* ( CRE )

Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* ( CPE )

Loop-Mediated Isothermal Amplification assay ( LAMP )

## 【 略 語 】

- AMR : Antimicrobio Resistance 薬剤耐性
- カルバペネマーゼ主要5ファミリー  
: KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) 、  
NDM (New Delhi metallo-beta-lactamase) 、  
VIM (Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase) 、  
OXA-48-like (Oxacillin carbapenemases-48-like) 、  
IMP (Imipenemase metallo-beta-lactamase) の総称
- CPE : Carbapenemase-pruducing *Enterobacteriaceae*  
カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌
- CRE : Carbapenem - resistant *Enterobacteriaceae*  
カルバペネム耐性腸内細菌科細菌
- ESBL : Extended Spectrum beta Lactamase 基質特異性拡張型  $\beta$  ラクタマーゼ
- IMP : Imipenemase metallo-beta-lactamase
- KPC : *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
- LAMP : Loop-Mediated Isothermal Amplification
- MIC : Minimum Inhibitory Concentration 最少発育阻止濃度
- Multiplex -PCR : Multiplex-polymerase chain reaction
- NDM : New Delhi metallo-beta-lactamase
- OXA-48-like : Oxacillin carbapenemases-48-like
- PCR : polymerase chain reaction
- VIM : Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase

## 目 次

第 1 章 はじめに	1
1.1 研究の背景	1
1.2 研究の目的	3
1.3 日本における CRE 感染症の定義	3
1.4 日本における CRE 検出状況	5
1.5 日本における CRE 検出方法と CPE の推定方法	8
1.6 CPE 遺伝子型分類	9
1.7 日本における CPE 検出の問題点	10
第 2 章 対象と方法	11
2.1 対象	11
2.2 方法	11
2.2.1 Multiplex-polymerase chain reaction (Multiplex –PCR)	
2.2.1-1 Multiplex –PCR の原理	11
2.2.1-2 Multiplex –PCR の実施方法	11
2.2.2 Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)法	
2.2.2-1 LAMP 法の原理	11

2.2.2-2 LAMP 法の臨床応用	14
2.2.2-3 LAMP 法プライマー設計方法	16
2.2.2-4 LAMP法の実施方法	17
2.3 検査方法の流れ	18
第3章 結果	19
3.1 LAMP法によるカルバペネマーゼプライマーの開発経緯	19
3.2 LAMP法によるカルバペネマーゼプライマーの配列	21
3.3 LAMP法における反応温度の比較	23
3.4 抽出原液の×1/10倍段階希釈系列の反応性	25
3.5-1 Multiplex-PCRおよびLAMP法によるカルバペネマーゼ タイプ別分析結果 1	26
3.5-2 Multiplex-PCRとLAMP法の分析結果 2	28
第4章 考察	31
第5章 結語	33
倫理上の配慮	34
利益相反および公的研究費の開示	34
謝辞	34
参考文献	35
資料	38

# 第1章 はじめに

## 1.1 研究の背景

近年、多くの医療機関で薬剤耐性菌感染症が問題となっている。JANIS（厚生労働省 院内感染対策サーベイランス事業）の公開情報によると、腸内細菌科細菌では何らかの薬剤耐性遺伝子を保有する細菌の割合が高い<sup>1)</sup>。わが国のカルバペネム耐性腸内細菌科細菌（Carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* : CRE）の検出率は年々増加傾向にある。CREによる血流感染症の場合、カルバペネム系抗菌薬感性による血流感染症と比較して死亡率が26～44%高いとの報告がある<sup>2)</sup>。2014年2月に大阪府の病院で国内初のCREによる医療関連感染が報告された。CREはその後、散発的に医療関連感染例が報告されている。大阪府での医療関連感染がきっかけとなり、2014年9月よりCRE感染症が感染症法の5類感染症として追加された。CREの中でもCPE（Carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*）の検出が問題となる。その理由としては、CPEの耐性遺伝子は染色体に保持するタイプとプラスミドに保有するタイプに分けられる。特にプラスミド保有のタイプは、容易に他菌株に伝搬するため、施設内での蔓延を招く可能性が高い。

国外に目を向けると多くの薬剤耐性菌が問題となり、CPEの耐性遺伝子に多くの変異型が存在し、その上、各耐性遺伝子の検出状況は地域で大きく異なっている。図1に世界における主なCPEの分布状況を示す<sup>3)</sup>。

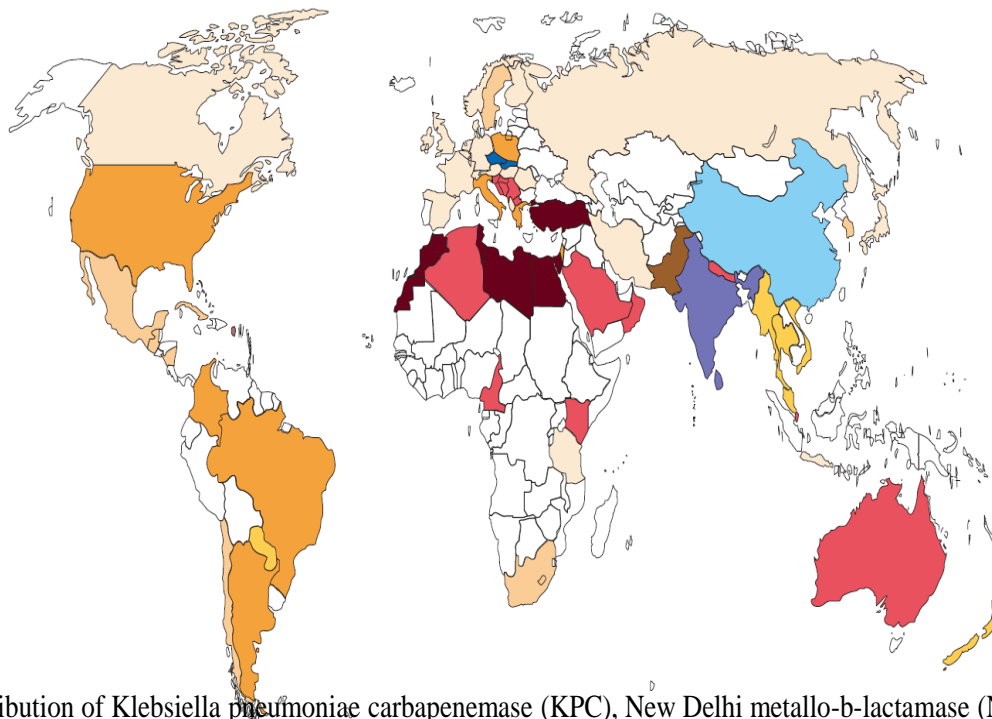
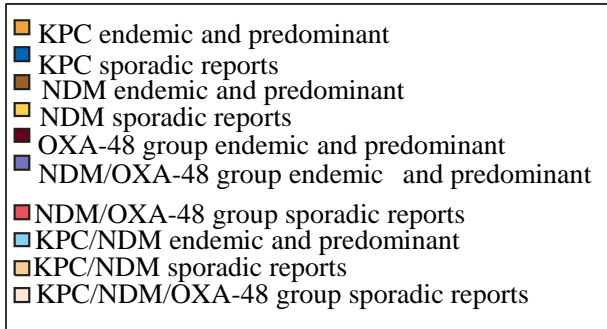
米国CDC（Centers for Disease Control and Prevention）はUrgent（緊急の対応が必要な）の対象としてCPEを挙げている<sup>4)</sup>。CDCの報告によると、健康な人ではCPE感染症を発症せず、病院や老人ホームおよびその他の医療施設の患者に発症する。その中でも、呼吸装置や尿（膀胱）カテーテル、静脈カテーテルのような装置を必要とする患者および特定の抗生物質の長期治療を受けている患者に対しては、CPE感染のリスクが高くなるため、感染症の治療は非常に困難となり、感染した患者の50%近くが死亡すると述べている<sup>5)</sup>。

現在では、CPEは10年前と比較すると4倍に増加し、さらにカルバペネム系薬剤耐性*Klebsiella*属に限定すると7倍にまで増えている<sup>6,7)</sup>。また、CPEはグラム陰性桿菌でありエンドトキシンを産生するため、血液中に侵入し敗血症を起こした場合には、エンドトキシンショックや多臓器不全を誘発し、症状の重篤化・予後の悪化を招き半数近くが死亡している。そのため、CPEは「悪魔の細菌」とも呼ばれている<sup>6,7)</sup>。

世界的に蔓延傾向にあるCPEではあるが、他国に比べわが国では幸いにしてCPEの検出率は低い<sup>8)</sup>。しかし、2016年に発表された薬剤耐性（Antimicrobial Resistance : AMR）対策アクションプランでは、薬剤耐性菌検出率の低減が挙げられた<sup>8)</sup>。

実際、わが国の臨床微生物検査室ではカルバペネマーゼを産生するCPEの検出

法として、1) 抗菌薬ディスクを用いて生物学的反応による表現型を用いた方法、2) カルバペネム加水分解酵素を検出する方法、3) カルバペネマーゼ産生遺伝子を検出する方法が用いられている<sup>9)</sup>。しかし、いずれの方法においてもカルバペネマーゼ活性の強弱や分子構造上の多様性および手技の複雑性などがある<sup>9)</sup>。



Distribution of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM), and OXA-48 group carbapenemases worldwide.

Mayo clin Proc.2015;90(3):395-403一部改変

図1. 世界におけるCPEの分布状況



## 1.2 研究の目的

現在、多くの医療機関で実施される薬剤感受性試験による表現型を用いたCPEの検出には判定薬剤の基準値以下のCPEも存在するため限界がある<sup>9)</sup>。しかも、CPEが放出する抗菌薬加水分解酵素が多くのファミリーに存在し、その上、数多くの変異型も存在する。さらに、ひとつの菌株で複数の耐性遺伝子を保有する菌種も検出されているため、現状においてCPEの検出は困難な状況にあると言える<sup>9)</sup>。そのため、一部の医療施設では表現型を用いたCPEの検出法以外にpolymerase chain reaction ( PCR ) 法による薬剤耐性遺伝子検査を実施している。しかし、市販のPCRキットでは、耐性遺伝子領域にある変異型を網羅的に検出できない構成となっている。そこで、施設内におけるCPEの蔓延を予防する手段の一つとして、変異型が存在しても検出できる薬剤耐性遺伝子を迅速かつ網羅的に検出する検査法は必須と言える。

CPEの検出状況は、日本ではIMP (Imipenemase metallo-beta-lactamase) 型が多く、欧米ではKPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) 型、OXA (Oxacillin carbapenemases) -48-like 型、東南アジア諸国ではNDM (New Delhi metallo-beta-lactamase) 型、イタリアなどではVIM (Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase) 型などが主流をなしている<sup>9,10,11)</sup>。今回は、特に重要と言われるこれらIMP型、KPC型、OXA-48-like 型、NDM型、VIM型の5つのカルバペネマーゼ（以下：カルバペネマーゼ主要5ファミリー）遺伝子をターゲットとして、Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を用いて簡易・迅速かつ網羅的に検出する方法を考案した。LAMP法は増幅反応が速く、増幅高率も高く、かつ微量の標的遺伝子を迅速に検出でき、加えて特殊な装置を必要としない特徴がある<sup>12)</sup>。このLAMP法によりカルバペネマーゼ主要5ファミリー遺伝子のそれぞれの変異型を網羅的に検出できるプライマーの開発・検証を目的として研究を進めた。

## 1.3 日本におけるCRE感染症の定義

CREとはカルバペネムを始めとする広域β-ラクタマーゼ系抗菌薬を加水分解するカルバペネマーゼやAmpC β-ラクタマーゼの産生、細胞膜透過性の低下、排出ポンプの作用あるいはExtended Spectrum beta (β) Lactamase (基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ：ESBL) 産生菌の一部を含む薬剤耐性菌の総称である<sup>9)</sup>。

厚生労働省が定義する<sup>13)</sup>CRE感染症は、メロペネム (MEPM) などのカルバペネム系抗菌薬及び広域β-ラクタム剤に対して耐性を示す腸内細菌科細菌による感染症であり、CPE感染症はCRE感染症の一部に含まれる。臨床的特徴としては、主に感染防御機能の低下した患者や外科手術後の患者、抗菌薬を長期にわたって使用している患者などに感染症を起こす<sup>13)</sup>。また、健常者にも感染症を起こすことがある。疾患では肺炎などの呼吸器感染症、尿路感染症、手術部位や外傷

部位の感染症、カテーテル関連血流感染症、敗血症、髄膜炎など多様な感染症を起こす。ただし、無症状で腸管等に保菌されることも多いとされている<sup>13)</sup>。

CREの届出基準（表1）としては、次の通りである。

- 1) 通常無菌の検体である血液、腹水、胸水、髄液などでは、MEPMのMIC（Minimum Inhibitory Concentration）値が $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上であること、またはイミペネム（IPM）のMIC値が $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、かつセフメタゾール（CMZ）のMIC値が $64\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上ある場合には、CRE感染症の5類全数報告の対象となる。
- 2) 通常無菌的な検体でない喀痰、膿、尿などでは、MEPMのMIC値が $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上であること、またはIPMのMIC値が $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、かつCMZのMIC値が $64\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上ある場合で、検出菌が感染症の起炎菌と判定された場合には、CRE感染症の5類全数報告の対象となる。ただし、この判定基準ではCPEと断定することはできない問題点がある。

検査方法	検査材料
<p>分離・同定による腸内細菌科細菌の検出、かつ、次のいずれかによるカルバペネム系薬剤及び広域β-ラクタム剤に対する耐性の確認</p> <p>ア メロペネムのMIC値が2μg/ml以上であること、又はメロペネムの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が22mm以下であること</p> <p>イ 次のいずれにも該当することの確認</p> <p>(ア) イミペネムのMIC値が2μg/ml以上であること、又はイミペネムの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が22mm以下であること</p> <p>(イ) セフトメゾールのMIC値が64μg/ml以上であること、又はセフトメゾールの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が12mm以下であること</p> <p>次のいずれにも該当することの確認</p> <p>ア 分離・同定による腸内細菌科細菌の検出</p> <p>イ 次のいずれかによるカルバペネム系薬剤及び広域β-ラクタム剤に対する耐性の確認</p> <p>(ア) メロペネムのMIC値が2μg/ml以上であること、又はメロペネムの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が22mm以下であること</p> <p>(イ) 次のいずれにも該当することの確認</p> <p>    a イミペネムのMIC値が2μg/ml以上であること、又はイミペネムの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が22mm以下であること</p> <p>    b セフトメゾールのMIC値が64μg/ml以上であること、又はセフトメゾールの感受性ディスク(KB)の阻止円の直径が12mm以下であること</p> <p>ウ 分離菌が感染症の起原因菌と判定されること</p>	<p>血液、腹水、胸水、髄液その他の通常無菌的であるべき検体</p> <p>喀痰、膿、尿その他の通常無菌的ではない検体</p>

<https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou11/01-05-140912-1.html>

表1. 届出のために必要な検査所見

## 1.4 日本におけるCRE検出状況

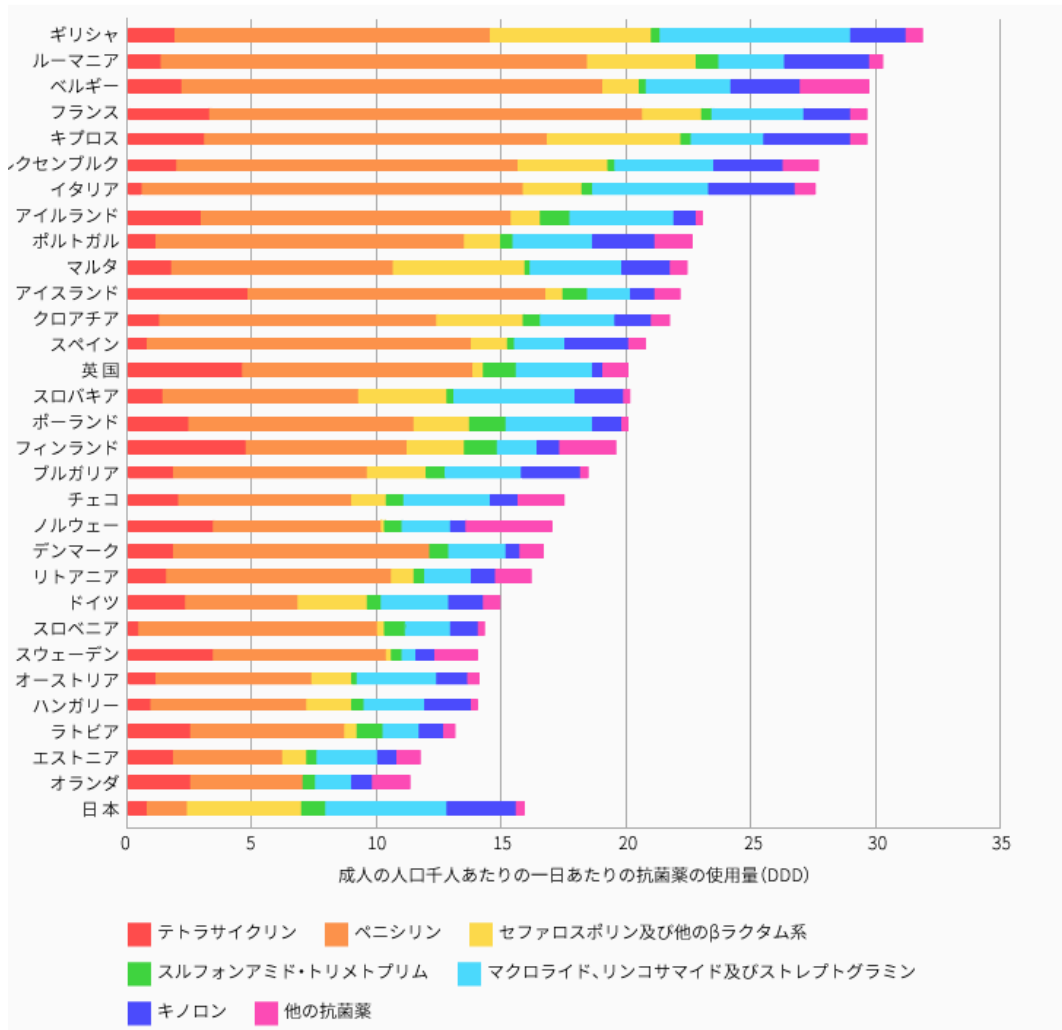
近年、薬剤耐性菌が世界中で増加傾向にある。2013年では薬剤耐性菌に起因する死亡者数は低く見積もって70万人とされている。今後、何も対策を講じない場合、2050年には世界で1000万人の死亡が想定され、がんによる死亡者数を超えるとした報告<sup>14)</sup>がある。薬剤耐性菌が拡大した原因の1つとして、抗菌薬の不適切な使用があげられる。わが国における2013年のヒトに対する抗菌薬使用量は、人口千人当たり1日約15.8 DDD (Defined daily dose) となっている<sup>8)</sup>。

抗菌薬の種類別使用割合を他国と比較すると、セファロスポリンおよび他のβラクタム系薬、マクロライド系薬やキノロン系薬が多く使用されている傾向にあり、ペニシリン系薬の使用は低くなっている（図2）。

一方、*Staphylococcus aureus*に占めるメチシリン耐性率や*Streptococcus pneumoniae*におけるペニシリン耐性率はやや高い傾向にある（図3）。

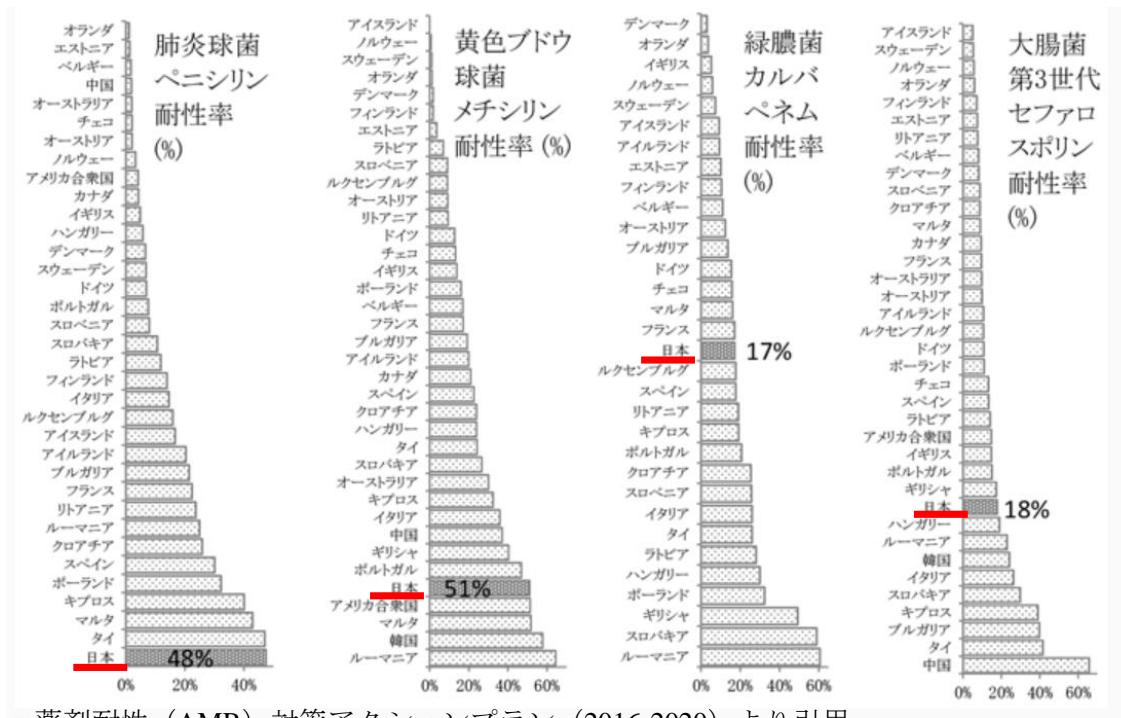
JANISでは2015年から正式にCREを集計対象とした。2018年9月5日に公開された情報（<https://janis.mhlw.go.jp/report/kensa.html>）では、2017年は7572人からCREが分離された。CREの分離率は検体提出患者数を分母とした場合に0.27%で、腸内細菌科細菌分離患者数を分母とした場合には0.83%であった。CREの菌種別内訳（図4）は*Enterobacter aerogenes*が35.2%、*Enterobacter cloacae*が30.5%、*Klebsiella pneumoniae*が8.9%、*Escherichia coli*が7.0%、*Serratia marcescens*が4.3%である。

世界中で問題となっているCREの検出状況は、わが国では0.1-0.2%と低い水準を保っている<sup>1)</sup>。しかし、国際交流の激化などに伴いCRE感染症の増加や多様な変異型の出現が想定される<sup>15)</sup>。



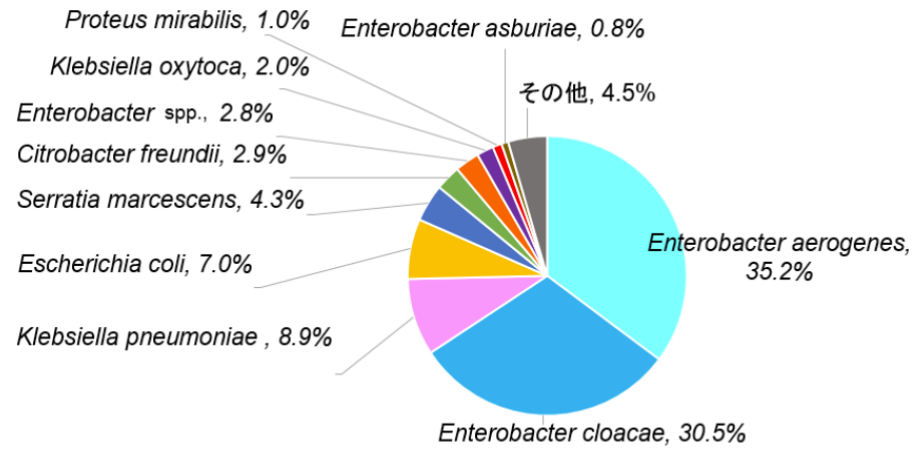
薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン (2016-2020) 、  
 AMR臨床リファレンスセンター (<http://amr.ncgm.go.jp/about/contact.html>) より引用

図2. 欧州および日本における抗菌薬使用量の国際比較



- 薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン (2016-2020) より引用

図3. ヒトにおける薬剤耐性傾向を示す微生物の薬剤耐性率の国際比較



JANIS (<https://janis.mhlw.go.jp/report/kensa.html>) より引用

図4. CREの菌種別分離率

### 1.5 日本におけるCRE検出方法とCPEの推定方法

微生物検査室におけるCREの検出方法は、薬剤感受性試験の結果から行われている。CREが検出されれば、多くの微生物検査室ではCPEのスクリーニング法とし

て、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M100-S27<sup>16)</sup>に掲載されている The Modified Hodge Test (MHT)、Carba NP test および modified carbapenem inactivation method (mCIM) 等が中心に実施されている<sup>17)</sup>。

## 1.6 CPE遺伝子型分類

CPEは抗菌薬治療の“最後の切り札”とされるカルバペネム系抗菌薬を加水分解する。CPEの耐性遺伝子は染色体に保持するタイプとプラスミドに保有するタイプに分けられる。この耐性遺伝子から産生される酵素群のなかで、IMP、KPC、NDM、VIM、OXA-48-like、は、日本・欧米・東南アジア諸国・イタリアなどで主流をなす薬剤耐性菌として警戒されている。これらのカルバペネマーゼ産生遺伝子は、ほとんどの抗菌薬を破壊する酵素活性の強さのみならず、KPCでは31の変異型、NDMでは21の変異型、VIMでは51の変異型、OXA-48-likeでは少なくとも30の変異型、IMPでは62の変異型（2018年6月現在）が報告されており<sup>18)</sup>、極めて多様性に富んでいる。

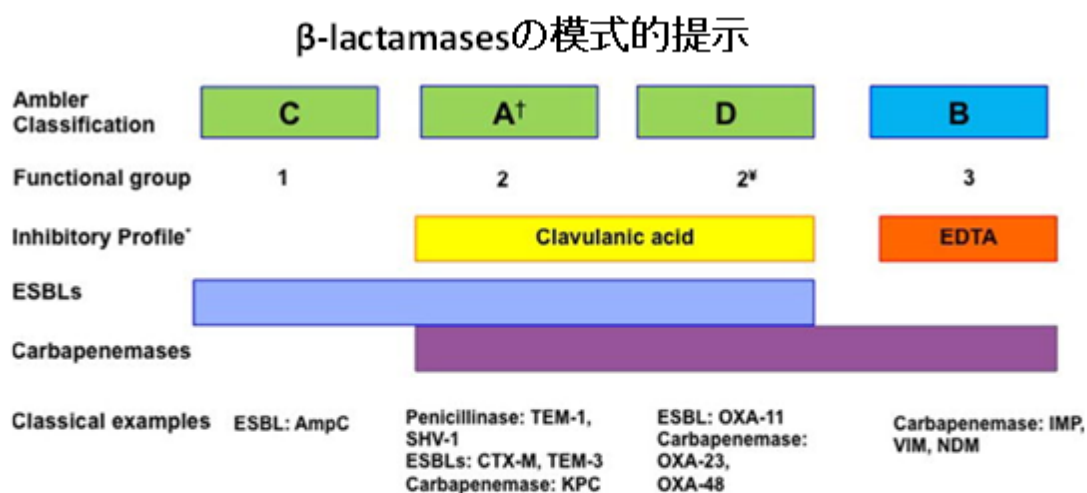
1980年代に入ると薬剤耐性菌の主要なβ-ラクタマーゼについて多数の酵素が報告され、基質特異に基づく分類法では複雑な分類が予想されたため、Amblerは多数のβ-ラクタマーゼのアミノ酸配列を基に、4種類の異なるクラス（クラスA～D）に分類した<sup>19)</sup>。図5にβ-ラクタマーゼの模式図<sup>20)</sup>を示す。

KPCはクラスAに属している。1996年に米国でカルバペネム系抗菌薬を分解する酵素を産生する*K. pneumoniae*から初めて検出された<sup>21)</sup>。KPC型β-ラクタマーゼは、ペニシリン系、セファロスポリン系、モノバクタム系を含むβ-ラクタム系抗菌薬を加水分解することができる酵素である。クラブラン酸（Clavulanic acid : CVA）などのβ-ラクタマーゼ阻害薬で阻害されるため、カルバペネム系抗菌薬とCVAを組み合わせたディスク法でスクリーニング検査が行われる。

IMP、VIM、NDMはクラスBに属する。これらは活性に亜鉛を必要とし、メタロ-β-ラクタマーゼと呼ばれる。クラスBはモノバクタム系薬を除くほぼすべてのβ-ラクタム薬を加水分解し、CVAやスルバクタムなどのβ-ラクタマーゼ阻害剤が機能しないため、この酵素保有菌は临床上問題となる可能性が大きい<sup>22)</sup>。IMPは1991年に日本において腸内細菌科細菌である*Serratia marcescens*からカルバペネム系薬剤耐性であるIMP-1型が検出され報告された<sup>23)</sup>。現在では腸内細菌科細菌のみならず、*Pseudomonas aeruginosa*や*Acinetobacter baumannii*などのブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌にもIMP型が検出されている現状にある。クラスBは海外での検出率が高いVIMとわが国での検出率が高いIMP型が知られている。しかし、NDM-1はVIMとの相同性が約30%しかない新規のメタロ-β-ラクタマーゼとして報告されている<sup>24)</sup>。

OXAはクラスDに属する。クラスDはオキサシリナーゼ、OXA型β-ラクタマーゼとして知られ、Amblerの分類の中でも遺伝子学的にも、生化学的にも最も多

様な酵素である。OXA-48-likeはペニシリン系抗菌薬の分解活性が高くカルバペネム系抗菌薬には、低いか中程度で、MEPMと比較してIPMは分解活性はるかに高い<sup>25,26)</sup>。



β-ラクタマーゼの分子分類はAmblerの分類に従う。  
Bush, Jacobiの分類の主な機能グループとの関連も示した。



† クラスA酵素は最も多様であり、ペニシリナーゼ、ESBLおよびカルバペネマーゼを含む。

\* アンブラークラスD酵素は、機能サブグループ2dに属する。

\* サブグループ2bに属するクラスA酵素は、クラブラン酸阻害に耐性である

Erin R. Green, Joan Mecsas. Mechanisms of Antibiotic Resistance.  
Microbiol Spectr. 2016 Apr; 4(2): 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. 一部改変

図5. β-ラクタマーゼの模式図

## 1.7 日本におけるCPE検出の問題点

国内ではIMP-1とIMP-6によるCPEが多く検出されている<sup>27)</sup>。IMP-1とIMP-6はアミノ酸配列が1カ所のみ変化したものである。IMP-6では分解活性が弱いタイプの株が分離されることもある。そのため、IMP-6産生の菌株では日常的な薬剤感受性検査でIPMに耐性と判定されない場合が多く、見落とされる危険性があるためアウトブレイクを引き起こす原因にもなる。また、わが国で実施されている通常のPCR検査ではIMP-1とIMP-6の識別は困難な状況にある<sup>28)</sup>。

表現型を用いたCPE検出法では、カルバペネム系抗菌薬のMIC値が低値で感性和判定される菌株を認める場合がある。また、MEPMに耐性(2μg/mL以上)を示すが、IMPには感受性を示す“ステレス型”と呼ばれている菌株も存在する。したがって、これらのカルバペネム抗菌薬に感性を示す菌株は表現型では検出できない。そのため、表現型のみでのCPEの検出には限界が生じてくる。



## 第2章 対象と方法

### 2.1 対象

当大学関連施設において検出されたCRE菌株と近隣協の協力施設より分与された菌株およびカルバペネマーゼを保有するNational Collection of Type Cultures (NCTC)菌株を対象とした。菌株は“KBM”ヒツジ血液寒天培地（コージンバイオ株式会社）に分離し、35°Cの好氣的条件下で18から20時間培養を行った。

PCR法にはシカジーニアス<sup>®</sup> DNA抽出試薬（関東化学株式会社）を、LAMP法にはアルカリ煮沸法<sup>29)</sup>を用いてDNAを抽出した。

### 2.2 方法

#### 2.2.1 Multiplex-polymerase chain reaction (Multiplex –PCR)

##### 2.2.1-1 Multiplex –PCR原理

Multiplex –PCRは一つの反応チューブに2セット以上のプライマー対を含み、一度の反応で複数の標的遺伝子が検出可能である<sup>30)</sup>。感染症検査では感染症の種類や検査材料別に、起炎菌として頻度の高い複数の病原体を2～4時間ほどで一度に検索できる利点がある。しかし、欠点としてプライマーのアニーリング温度や反応液組成の濃度調整など至適反応条件の設定が複雑になること、シングル反応に対して検出感度が低下する傾向がある。

##### 2.2.1-2 Multiplex –PCRの実施方法

Trung et al.<sup>31)</sup> の報告に基づき一部を改変してMultiplex –PCRを行なった。Multiplex –PCRはPlatinum<sup>™</sup> Multiplex PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用い、PCR条件の内、アニーリング温度のみを60°Cに改変した。PCR productは2% SeaKem<sup>®</sup> GTG<sup>™</sup> アガロースゲルをTBE bufferで電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色した。さらに、シカジーニアス<sup>®</sup> カルバペネマーゼ遺伝子型検出キット（関東化学株式会社）によるMultiplex –PCRも実施した。測定操作は手順書に準拠した。

#### 2.2.2 Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)法

##### 2.2.2-1 LAMP法の原理

2000年に納富ら<sup>32)</sup>が開発した技術である。プライマーは標的遺伝子上の合計6つ

領域に対して4種類の特別に設計されたプライマーのセットを使用する。設計したプライマーと増幅したい標的遺伝子を含むサンプルとその他の試薬を専用のチューブ内で混合させる。その後、一定温度（60～65℃）で保温することにより、以下の1)～13)<sup>33)</sup>（図6、図7）の反応が進む。

- 1) 2本鎖DNAは65℃付近では動的平衡状態にあるため、いずれかのプライマーが2本鎖DNAの相補的な部分にアニールし、そこから伸長することで片側の鎖がはがされて1本鎖状態になる。そのため、LAMP法ではPCR法のように2本鎖DNAを1本鎖に熱変性する過程を必要としない。
- 2) 鎖置換型DNAポリメラーゼの働きにより、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、鎖置換型DNAポリメラーゼの働きによって、先に合成されているFIPからのDNA鎖を剥がしながらDNA合成が伸長していく。
- 4) F3プライマーから合成されたDNA鎖と鋳型DNAが2本鎖になる。
- 5) FIPから先に合成されたDNA鎖は、F3プライマーからのDNA鎖によって剥がされて1本鎖DNAとなるが、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。
- 6) 5)のDNA鎖に対してBIPがアニールし、このBIPの3'末端を起点として相補的なDNAの合成が行われる。この過程でループは剥がされて伸びる。さらに、BIPの外側にB3プライマーがアニールし、その3'末端を起点として、鎖置換型DNAポリメラーゼの働きによって、先に合成されているBIPからのDNA鎖を剥がしながらDNA合成が伸長していく。
- 7) 6)の過程により2本鎖DNAができる。
- 8) 6)の過程で剥がされたBIPから合成されたDNA鎖は両端に相補的な配列を持つため自己アニールし、ループを形成してダンベル型の構造となる。この8)は、LAMP法における増幅サイクルの起点構造となるものであり、これまでの過程は、LAMP法における増幅サイクルの起点構造を作るための過程ということになる。
- 9) 8)の構造で、3'末端のF1領域を起点として自己を鋳型としたDNA合成が伸長し、この時、5'末端側のループは剥がされて伸びる。さらに、3'末端側のループのF2c領域は1本鎖であるためFIPがアニールすることができ、そのF2領域の3'末端を起点として、F1領域から先に合成されているDNA鎖を剥がしながらDNA合成が伸長していく。
- 10) 9)において、FIPから伸長合成されたDNA鎖によって剥がされて1本鎖となったF1領域から伸長したDNA鎖は、その3'末端側に相補的な領域を持つためループを形成する。このループのB1領域の3'末端から、1本鎖となった自己を鋳型としてDNA合成が始まる。そして、そのDNA鎖が2本鎖部分となっているFIPからのDNA鎖を剥がしながら伸長し、10)の構造と

なる。

- 11) 上記の過程によって、FIPから合成されたDNA鎖は1本鎖となり、その両端にそれぞれ相補的な領域F1、F1c及びB1c、B1を持っているため自己アニールしてループを形成し、11)の構造となる。11)の構造は、8)の構造と全く相補的な構造となる。
- 12) 11)の構造では、8)の場合と同様にB1領域の3'末端を起点として自己を鋳型としたDNA合成が行われ、さらに1本鎖となっているB2c領域にBIPがアニールしてB1領域からのDNA鎖を剥がしながらDNA合成が行われる。それにより、ちょうど8)、9)、11)と同様の過程を経て再び8)の構造ができる。
- 13) 10)の構造において、1本鎖となっているB2c領域にBIPがアニールし、2本鎖部分を剥がしながらDNA鎖が合成されます。そして、これらの過程の結果、同一鎖上に互いに相補的な配列を繰り返す構造の増幅産物が様々なサイズで形成されていく。

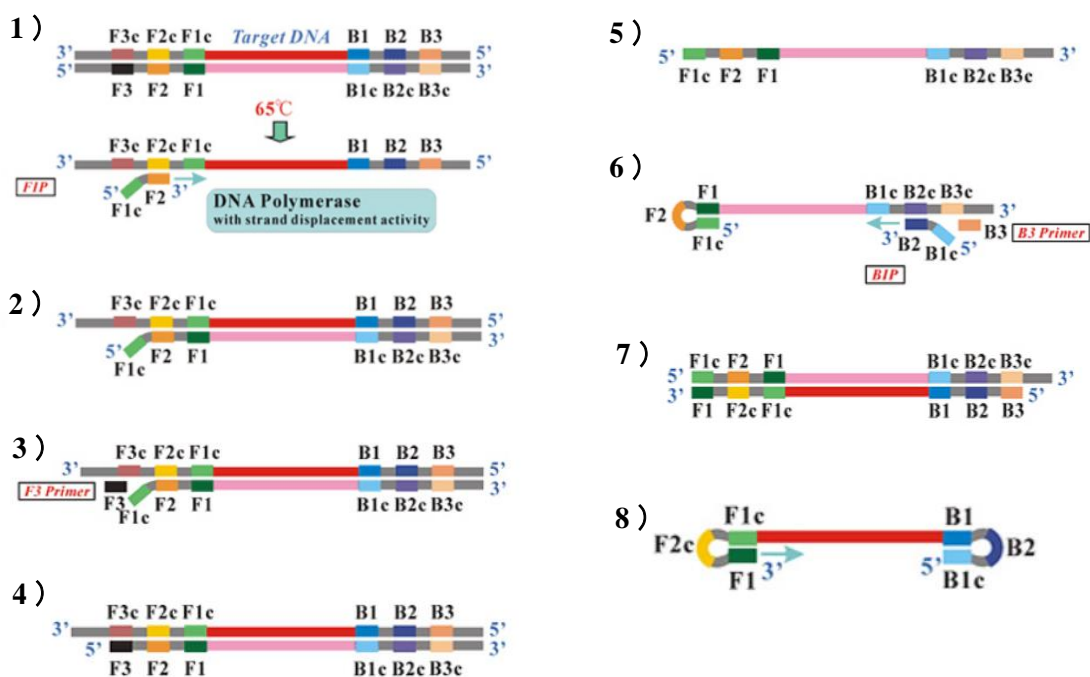


図6. LAMP法反応の進み方 (1)

(<http://loopamp.eiken.co.jp/lamp/principle.html>を引用、一部改変)

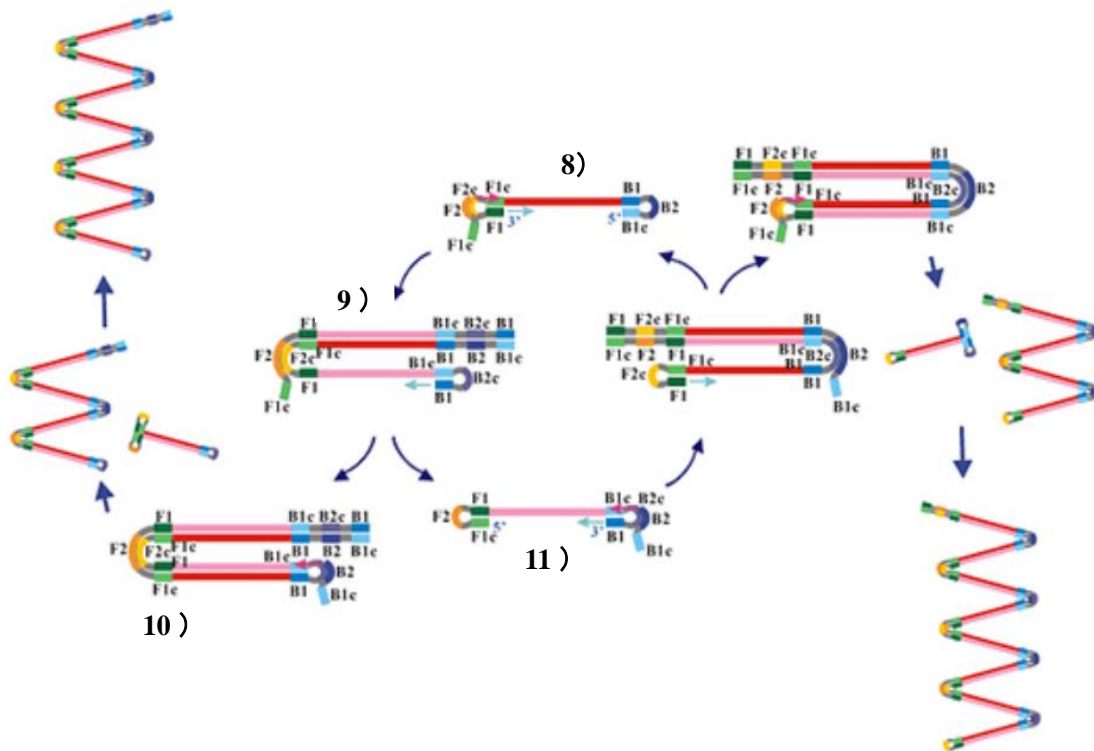


図7. LAMP法反応の進み方 (2)

(<http://loopamp.eiken.co.jp/lamp/principle.html>を引用、一部改変)

### 2.2.2-2 LAMP法の応用

PubMedで検索されるLAMP法の関連文献数は、現在約2250以上である。日本以外の研究者がLAMP法の特徴を活かした遺伝子技術を多様な分野に応用している。2014年では医療分野についての研究が約40%を占めている<sup>34)</sup>。その他には畜産、水産、食品、植物、環境など多岐にわたっている。

医療用の応用例として、簡易性・迅速性であるLAMP法の特徴を活かした感染症の応用があげられる。その中で体外診断用医薬品として厚生労働省より承認を受け、発売されているものを表2に示す。また、新興感染症や再興感染症への応用も多く挙げられている(表3)。

表2. 医療分野への応用（体外診断用医薬品：栄研化学）

製品名	製造承認日	保険適用	剤型	核酸抽出	対象検体種	反応温度	反応時間	プライマー設計領域
Loopamp® SARSコロナウイルス検出試薬キット	2003/12/18	有	液状試薬	QIAGEN法	糞便、鼻腔拭い液	62~63℃	45分	ゲノムRNAのReplicase 1B領域内
Loopamp® H5亜型インフルエンザウイルス検出試薬キット	2008/9/19	有	液状試薬	QIAGEN法	咽頭拭い液	60~63℃	35分	ゲノムRNAのヘマグルチニン領域内
Loopamp® H1pdm2009インフルエンザウイルス試薬キット	2010/6/2	有	乾燥試薬	専用抽出試薬	鼻腔拭い液 咽頭拭い液	62.5℃	35分	ゲノムRNAのヘマグルチニン領域内
Loopamp® A型インフルエンザウイルス検出試薬キット	2010/10/5	有	乾燥試薬	専用抽出試薬		62.5℃	35分	ゲノムRNAのマトリックスプロテイン領域内
Loopamp® マイコプラズマP検出試薬キット	2010/5/24	有	液状試薬	QIAGEN法又はSR DNA抽出キット	咽頭拭い液 (鼻咽頭拭い液を含む)、喀痰	65℃	60分	SDC1遺伝子内
Loopamp® レジオネラ検出試薬キットC	2010/5/24	有	液状試薬	QIAGEN法	喀痰	65℃	60分	16SrRNA
Loopamp® 結核菌群検出試薬キット	2011/4/18	有	乾燥試薬	PURE法	喀痰	67℃	40分	GyrB, IS6110

モダンメディア 60巻7号2014より引用

(2014年7月現在)

表3. 新興感染症、再興感染症へのLAMP法の応用

	疾患	病原体	主なLAMP応用例報告
新興感染症	SARS(重症急性呼吸器症候群)	SARSコロナウイルス	Poon LL, et al. 2004 <sup>6)</sup> , Hong TC, et al. 2004 <sup>7)</sup> , 田口文広 他 2004 <sup>8)</sup> , 田代真人 2004 <sup>9)</sup>
	鳥インフルエンザ	H5N1亜型、H7N9亜型インフルエンザウイルス	Imai M, et al. 2006 <sup>10)</sup> , Imai M, et al. 2007 <sup>11)</sup> , Imai K, et al. 2007 <sup>12)</sup> , Jayawardena S, et al. 2007 <sup>13)</sup> , Yoshida H, et al. 2011 <sup>14)</sup> , 国立感染症研究所インフルエンザ研究センター 2013 <sup>15)</sup>
	ウエストナイル熱	ウエストナイルウイルス	Parida M, et al. 2004 <sup>16)</sup> , Shukla J, et al. 2012 <sup>17)</sup>
	エボラ出血熱	エボラウイルス	Kurosaki Y, et al. 2007 <sup>18)</sup>
	クリプトスポリジウム症	クリプトスポリジウム	Karanis P, et al. 2007 <sup>19)</sup> , Bakheit MA, et al. 2008 <sup>20)</sup> , Inomata A, et al. 2009 <sup>21)</sup>
	クリミア・コンゴ出血熱	クリミア・コンゴ出血熱ウイルス	Osman HA, et al. 2013 <sup>22)</sup>
	後天性免疫不全症候群 (HIV)	ヒト免疫不全ウイルス (HIV)	Curtis KA, et al. 2008 <sup>23)</sup> , Hosaka N, et al. 2009 <sup>24)</sup>
	重症熱性血小板減少症候群	重症熱性血小板減少症候群ウイルス	Yang G, et al. 2012 <sup>25)</sup> , Xu H, et al. 2013 <sup>26)</sup>
	腸管出血性大腸菌感染症	O26, O111, O157等のペロ毒素を産生する大腸菌	Hara-Kudo Y, et al. 2007 <sup>27, 28)</sup>
	ニパウイルス感染症	ニパウイルス	
	日本紅斑熱	日本紅斑熱リケッチア	
	バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌 (VRSA) 感染症	バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌 (VRSA)	
	マールブルグ病	マールブルグウイルス	Kurosaki Y, et al. 2010 <sup>29)</sup>
	ラッサ熱	ラッサウイルス	
主な再興感染症	マラリア	マラリア原虫	Poon LL et al. 2006 <sup>30)</sup> , Han ET, et al. 2007 <sup>31)</sup> , Polley SD, et al. 2010 <sup>32)</sup> , Sirichaisinthop J, et al. 2011 <sup>33)</sup> , Polley SD, et al. 2013 <sup>34)</sup>
	ベスト	ベスト菌	
	ジフテリア	ジフテリア菌	
	結核	結核菌	Iwamoto T, et al. 2003 <sup>35)</sup> , Boehme CC, et al. 2007 <sup>36)</sup> , Mitarai S, et al. 2011 <sup>37)</sup>
	百日咳	百日咳菌	Kamachi K, et al. 2006 <sup>38)</sup>
	サルモネラ感染症	サルモネラ ( <i>Salmonella enterica</i> )	Hara-Kudo Y, et al. 2005 <sup>39)</sup>
	コレラ	コレラ菌	Yamazaki W, et al. 2008 <sup>40)</sup> , Okada K, et al. 2010 <sup>41)</sup>
	狂犬病	狂犬病ウイルス	Boldbaatar B, et al. 2009 <sup>42)</sup> , Saitou Y, et al. 2010 <sup>43)</sup>
	デング熱	デングウイルス	Parida MM, et al. 2005 <sup>44)</sup>
	黄熱病	黄熱ウイルス	Kwallah Ao, 2013 <sup>45)</sup>
	インフルエンザ	インフルエンザウイルス	Poon LL, et al. 2005 <sup>46)</sup> , Ito M, et al. 2006 <sup>47)</sup> , 納富継宣 他 2009 <sup>48)</sup> , Kubo T, et al. 2010 <sup>49)</sup> , 重本直樹 他 2010 <sup>50)</sup> , Nakauchi M, et al. 2011 <sup>51)</sup>
	住血吸虫症 Schistosomiasis	ビルハルツ住血吸虫、インターカラーツム住血吸虫、日本住血吸虫、マンソン住血吸虫、メコン住血吸虫	Xu J, et al. 2010 <sup>52)</sup>
	トキソプラズマ症	トキソプラズマ ( <i>Toxoplasma gondii</i> )	Sotiriadou I, et al. 2008 <sup>53)</sup> , Krasteva D, et al. 2009 <sup>54)</sup>
	リーシュマニア症	リーシュマニア	Takagi H, et al. 2009 <sup>55)</sup> , Adams ER, et al. 2010 <sup>56)</sup>
エキノコックス症	エキノコックス	Salant H, et al. 2012 <sup>57)</sup>	

モダンメディア 60巻7号2014より引用

(2014年7月現在)

### 2.2.2-3 LAMP法プライマー設計方法

IMP、KPC、NDM、VIM、OXA-48-likeの各酵素ファミリーの全変異については、 $\beta$ -lactamase data base<sup>35)</sup> (BLDB : <http://bldb.eu/>) からNational Center for Biotechnology Information (NCBI) の GenBank

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) にアクセスし変異に対応したGenBank IDより、各変異のDNAシーケンスデータをFASTA形式でWordPadに集積した。カルバペネマーゼのファミリー毎に集積したDNAシーケンスデータは、DNA

DATA Bank of Japan (DDBJ) の clustalW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>) に入力しマルチプルアライメント処理を行った。各ファミリーのマルチプルアライメント結果をWordPadにテキストドキュメント形式で保存し、PrimerEXplorer V5

(<https://primerexplorer.jp/lampv5/index.html>) に入力し、LAMP法プライマーを設計した。この時、プライマー設計のベースとする変異のDNAシーケンスデータをアライメント結果の最上段に移行した。また、プライマー設計時KPC、NDM以外については、Mutation/ConsensusをF1c innerおよびB1c inner以下まで、全て塩基変異の混入を許諾すると同時にプライマー作成の諸条件を一部変更し設計した。さらにIMP 変異についてはマルチプルアライメント結果の近似性から3グループに分け、グループ毎にプライマーを設計した。いずれのファミリーについても数セットのRegularPrimerについて、その反応性を比較検討し1セットのRegularPrimerを選定した。さらに、再度PrimerEXplorer V5を用いRegularPrimerに対応するLoop primerを設計した。今回の実験は、すべてBLDB Last updated : June 20, 2018に基づいた。

#### 2.2.2-4 LAMP法の実施方法

LAMP法の測定はLoopamp DNA 増幅試薬D (栄研化学株式会社) を使用した。Primer濃度はF3、B3 primer 5 $\mu$ M、FIP、BIP primer 40 $\mu$ M、LFにLB primer 20 $\mu$ Mとした(表4)。反応液 25 $\mu$ Lに対し、100mM KCl 5 $\mu$ L、試料2 $\mu$ Lを添加し精製水にてメスアップした(表5)。基本的な測定操作は、取扱説明書に準拠した。測定はリアルタイム濁度測定装置 LoopampEXIA<sup>®</sup> (栄研化学株式会社) (図8)を用い、反応温度63 $^{\circ}$ C、60分間観察後、80 $^{\circ}$ C、5分間不活化処理した。結果は、濁度 0.1を越した時間threshold times (Tt)で評価した。

表4. Primer Mix 調製量

primer F3 (20 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ L
primer B3 (20 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ L
primer FIP (40 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ L
primer BIP (40 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ L
primer LF (50 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ L
primer LB (50 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ L
1test当たり	3.3 $\mu$ L

表5. 反応試薬添加量

精製水	14.7 $\mu$ L
100mM KCl	5.0 $\mu$ L
Primer Mix	3.3 $\mu$ L
Template	2.0 $\mu$ L
Total	25.0 $\mu$ L

※NDM については、LFのみのためTE(pH7.0)を用いて調製



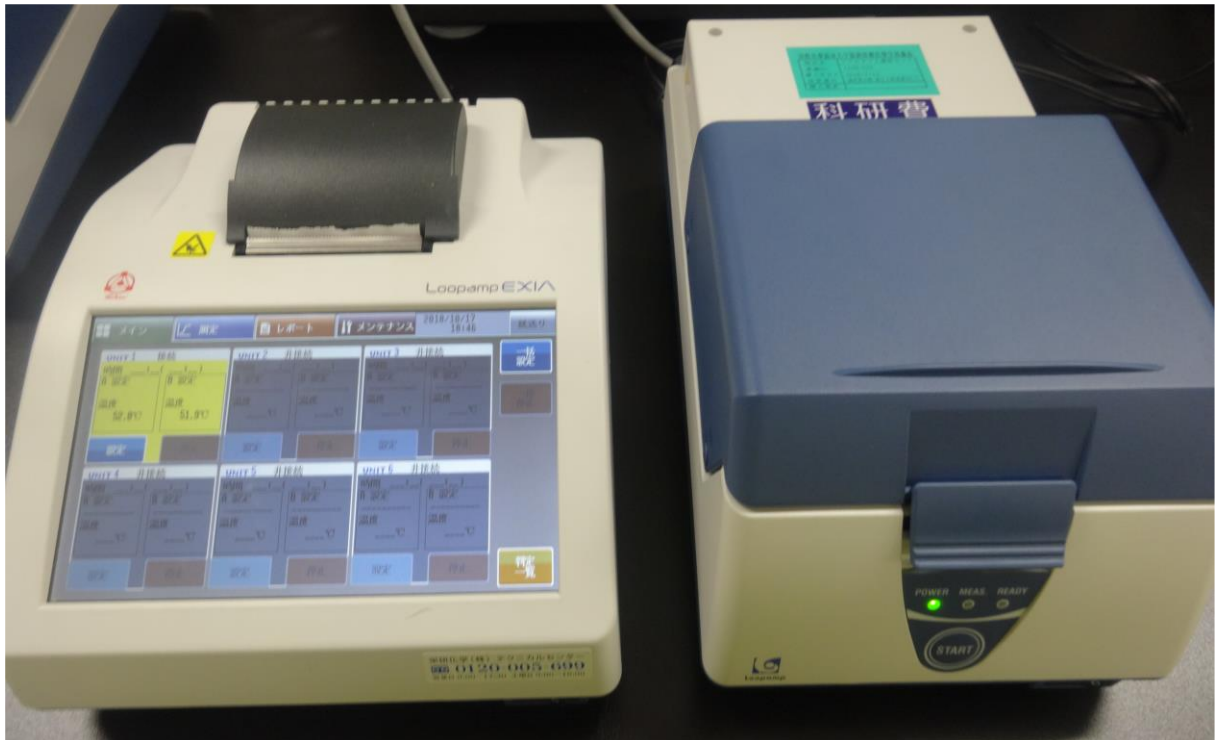


図8. リアルタイム濁度測定装置 LoopampEXIA® (栄研化学株式会社)

### 2.3 検査方法の流れ

本研究で実施した保存菌株の分離からカルバペネマーゼ主要5ファミリー遺伝子検出法の流れを図9に示す。

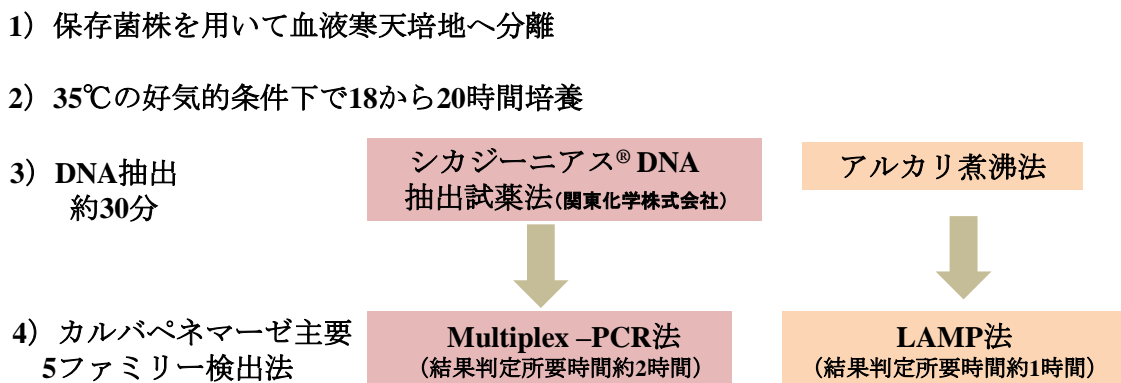


図9. カルバペネマーゼ主要5ファミリー遺伝子検出法の流れ



### 第3章 結果

#### 3.1 LAMP 法によるカルバペネマーゼプライマーの開発経緯

日本・欧米・東南アジア諸国・イタリアなどで主流をなす薬剤耐性遺伝子であるIMP、KPC、NDM、VIM、OXA-48-likeの各酵素ファミリーの全変異については以下1)～3)の操作を実施した。

- 1) BLDB (<http://bldb.eu/>) からNCBIのGenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) にアクセスし変異に対応したGenBank IDより、各変異のDNAシークエンスデータをFASTA形式でWordPadに集積した(図10)。
- 2) DDBJ のclustalW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>) に入力しマルチプルアライメント処理を行った(図11)。
- 3) 各ファミリーのマルチプルアライメント結果をWordPadにテキストドキュメント形式で保存し、PrimerEXplorer V5 (<https://primerexplorer.jp/lampv5/index.html>) に入力し、LAMP法プライマーを設計した。(図12、図13)

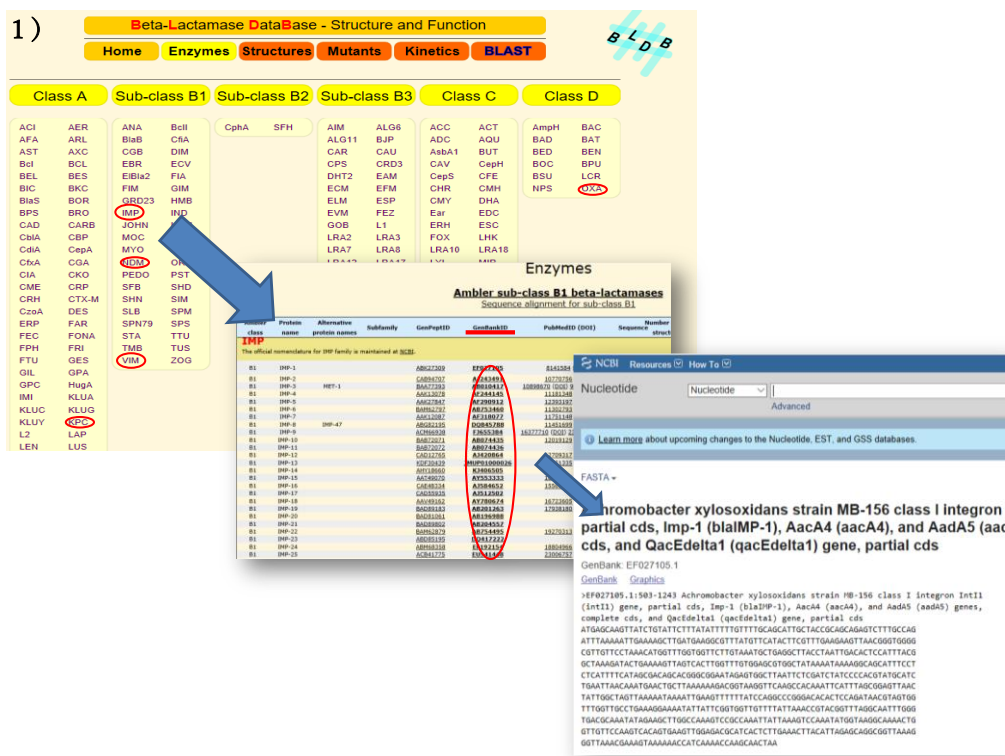


図10. 各変異のDNAシークエンスデータの収集



PrimerExplorer V5 Software

1. Turn on the check box to make an order.  
 2. Push "Confirm" button in order to transfer to page "Order".  
 3. Push "Save List" button to download Excel format file.

Confirm Save List DesignID: F01026094306

Primer set: sorting rule (None)

Target DNA (Consensus):  
 [Sequence]

Primer list (ID, 5'pos, 3'pos, len, Tm, 5'dG, 3'dG, GRate, Sequence):

ID	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GRate	Sequence
F3	475	494	20	55.15	-4.74	-4.77	0.45	CGATAACGCTAGTGGTTG
B3	646	663	18	57.73	-6.59	-4.41	0.50	TGCGTC CCA TTCACT
FIP			46					TTGGCTCACCCAAAT CCA CCTGAA GAAAA TTATCGG
BIP			40					TAGAAGCTTGCCCAAGTCGG TGA C AACACCAAGTT
F2	497	521	25	59.65	-6.25	-5.18	0.36	CCTGAA GAAAA TTATCGG
F1c	548	568	21	62.61	-6.24	-5.33	0.48	TTGGCTCACCCAAAT CCA
B2	626	644	19	56.17	-4.41	-5.00	0.42	TGAC C AACACCAAGTT
B1c	572	592	21	62.31	-3.43	-6.02	0.52	TAGAAGCTTGCCCAAGTCGG

Primer information: ID: 1, dimer(minimum)dG=-2.27

Primer information: ID: 2, dimer(minimum)dG=-2.27

図13. PrimerExplorer V5を用いたプライマー設計②

### 3.2 LAMP法によるカルバペネマーゼプライマーの配列

設計したLAMP法のプライマー配列を表6に示した。IMP、KPC、NDM、VIM、OXA-48-like 各タンパク質に対応したプライマー配列を表記し、各々の5' position no.および3' position no.とプライマー長を記載した。NDMについてはLoop プライマーのLFのみの設計となった。IMPについては、変異の煩雑性から3グループに分けてプライマーを設計した。しかし、グループ2とグループ3については対象とする変異株の保有が無く検証ができなかったためグループ1のみ検証を行った。グループ1は、IMP-1, -3, -4, -5, -6, -7, -9, -10, -15, -25, -26, -28, -29, -30, -34, -38, -40, -42, -43, -45, 5-1, -52, -53, -55, -59, -60, -61, -62, -66, -70の30の変異型を含む。

VIM (base sequence VIM-1)				
label	5'pos	3'pos	len	Sequence (5' → 3')
F3	62	79	18	GTCCGTTAGCCCAATTCCG
B3	266	283	18	GTGCCGCTGTGTTTTICG
FIP			41	TATGCGACCAAAACACCAATCGGC-AGCCGAGTGGTGAGTATCC
BIP			41	CGTTTGAATGGCGCGGTCTACC-ACCCACGCTGTATCAATCA
LF	123	144	22	CTGGTAAAGTCGGACCTCTCCG
LB	222	241	20	CCGTGATGGTGTGATGAGTTGC
NDM (base sequence NDM-3)				
F3	562	579	18	GGCCACACCAAGTACAAT
B3	735	754	20	CGGAATGGCTCATCACGATC
FIP			39	TTGCCGAGCGACTTGGCCTT-GCACCCGACATCGCTTTTTGG
BIP			39	GATGCCGACACTGAGCACTACG-ATGCTGGCCTTGGGGAA
LF	623	637	15	TGTCCTTGATCAGGC
KPC (base sequence KPC-2)				
F3	82	99	18	CTCGTCGCGGAAACCAATC
B3	311	330	20	TTTTTCCGAGATGGGTGACC
FIP			42	CCTCAGCGCGGTAACTTACAGT-AACTCGAACAGGACTTTGGC
BIP			41	TTCAAAGGGCTTCTTGTGTCGCGG-CGCAATTTTTGCCCCGTAAACGG
LF	124	143	20	GCGTACACACCCGATGGAGCC
LB	260	276	17	CCGGCTTGTCTGGACACA
OXA-48-like (base sequence OXA-48)				
F3	152	170	19	AGCAGCAAAGGATTTACCAA
B3	341	362	22	GGCACAACTGAATATTTTCATCG
FIP			41	TCCTTAACCAACGCCCAAATCG-CAAGCATTTTTACCCGCATC
BIP			45	CAAGTCTTTAAGTGGGATGGACA-ATTAGATTATGATCGCGATTCC
LF	220	240	21	GGCGATCAAAGCTATTGGGAAT
LB	294	313	20	GACGGCGGATATCGCCACTT
IMP (Group-1) (base sequence IMP-1)				
F3	55	72	18	GCAGAGTC TTGCCAGAT
B3	253	274	22	TGCTGCCTTTTAATTTTATAGCC
FIP			44	TGTTTAGGAACAACGCCCCAC-AAAATTGAAAAGCTTGATGAAGG
BIP			44	TTGGTGGTTCTTGTAAATGCTGA-CCAAAGTACTAACTTTTCAGT
LF	112	134	23	CCGTTA ACTTCTTCAAAACGAAAGT
LB	187	211	25	TACCTAATTGACACTCCATTACGG

表6. カルバペネマーゼ主要5 LAMP法プライマー配列

### 3.3 LAMP法における反応温度の比較

アルカリ煮沸法にて抽出したDNAを用い、LAMP反応を58°C、61°C、63°C、65°C、67°C、と変化させ各温度における濁度0.1の閾値時間を比較した（図14）。その結果を図15に示した。

VIMは65°C、NDMは61°Cと63°Cの間、KPCは65°C、OXA-48-likeは65°C、IMPは61°Cでの反応が最も促進性が高かった。今回の研究では同時測定が目的のため、いずれの反応にも大きな影響が無い63°CをLAMP反応温度と設定した（表7）。

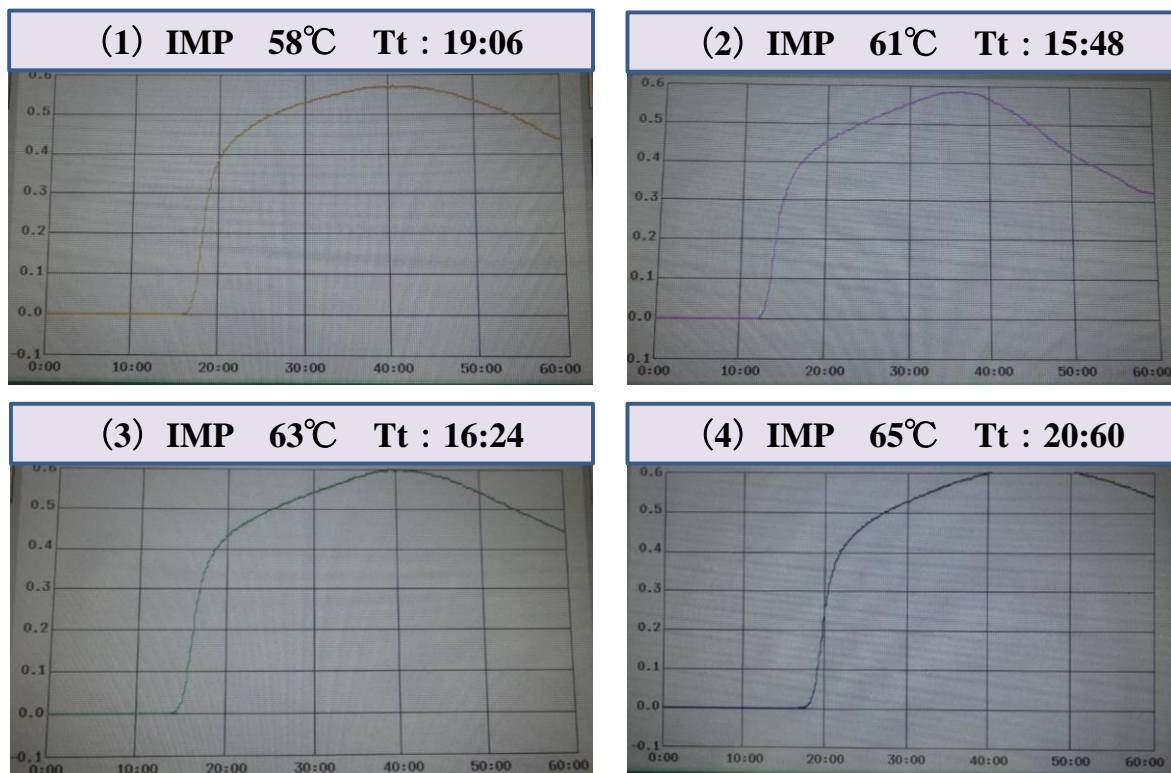


図14. LAMP法の結果画面

反応温度の比較検討のグラフ写真。IMPの測定結果を例に示す。

- (1) 58°C、60分測の結果は濁度閾値時間19：06であった。
- (2) 61°C、60分測の結果は濁度閾値時間15：48であった。
- (3) 63°C、60分測の結果は濁度閾値時間16：24であった。
- (4) 65°C、60分測の結果は濁度閾値時間20：60であった。

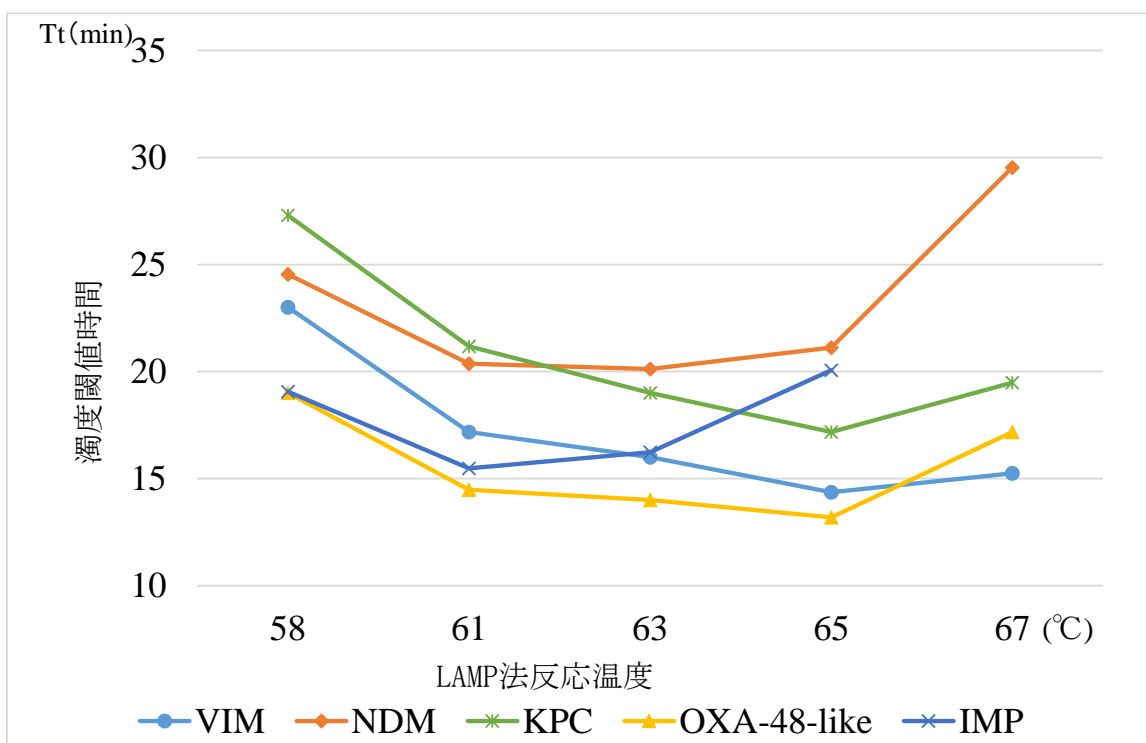


図15. LAMP反応温度に伴う濁度閾値時間の比較

表7. LAMP法反応温度の比較

	58°C	61°C	63°C	65°C	67°C
VIM	23.00	17.18	16.00	14.36	15.24
NDM	24.54	20.36	20.12	21.12	29.54
KPC	27.30	21.18	19.00	17.18	19.48
OXA-48-like	19.00	14.48	14.00	13.18	17.18
IMP	19.06	15.48	16.24	20.06	-

(min)

### 3.4 抽出原液の×1/10倍段階希釈系列の反応性

アルカリ煮沸法による操作から逆算した $2 \times 10^9$ CFU/mLの抽出原液を $2 \times 10^9$ コピー相当とみなし、TE液 (pH8.0) で×1/10倍段階希釈し $2 \times 10^2$ コピー相当まで作製し測定した。結果は図16に示したようにNDM, OXA, IMPは $2 \times 10^3$ コピー相当、KPCは $2 \times 10^2$ コピー相当、VIMは $2 \times 10^4$ コピー相当まで陽性反応を示した。また、VIM以外4つのファミリーにおいて $2 \times 10^3$ コピー相当までの陽性反応は表8に示した様に35分以内に検出された。

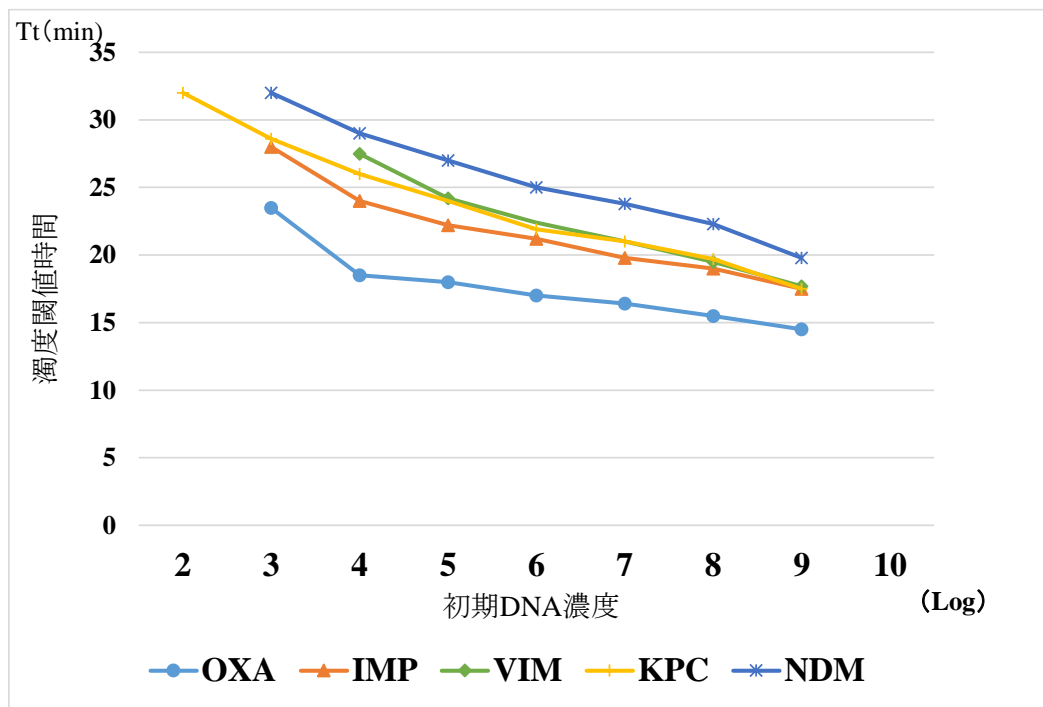


図16. 抽出原液の×1/10倍段階希釈系列の反応

表8. 抽出原液の×1/10倍段階希釈系列の反応時間

copies 相当	希釈率	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>
$2 \times 10^9$	$1 \times 10^0$	17:36	19:36	19:24	14:48	17:30
$2 \times 10^8$	$1 \times 10^{-1}$	19:24	22:24	19:36	15:48	18:54
$2 \times 10^7$	$1 \times 10^{-2}$	20:06	23:42	21:54	16:30	19:54
$2 \times 10^6$	$1 \times 10^{-3}$	21:30	25:12	23:24	17:24	21:30
$2 \times 10^5$	$1 \times 10^{-4}$	24:36	26:54	24:12	17:48	22:18
$2 \times 10^4$	$1 \times 10^{-5}$	27:30	28:24	27:06	18:54	24:06
$2 \times 10^3$	$1 \times 10^{-6}$	—	32:18	28:00	23:42	28:00
$2 \times 10^2$	$1 \times 10^{-7}$	—	—	32:06	—	—

(min)



### 3.5-1 Multiplex-PCRおよびLAMP法によるカルバペネマーゼ

#### タイプ別分析結果 1

Trung et al.の報告に準拠したMultiplex-PCR (図17)、およびシカジーニクス®カルバペネマーゼ遺伝子型検出キット (図18) を用いた36株はすべて一致した。また、Trung et al.の報告に準拠したMultiplex-PCR分析結果を表9に示した。同時に36株をカルバペネマーゼタイプ別LAMP法にて分析した結果も一覧化し併記した。

供試菌株36株において、Multiplex-PCRおよびLAMP法によるカルバペネマーゼタイプは全て一致した。さらに、LAMP法においてカルバペネマーゼタイプ間の非特異反応は認められなかった。また、36菌株の中に、*K. pneumoniae* NCTC 13440 (VIM-1)および*P. aeruginosa* NCTC 13437 (VIM-10 : VIM-2-like)菌株を含みいずれもVIMのLAMP法は陽性であった。

#### Multiplex-PCR

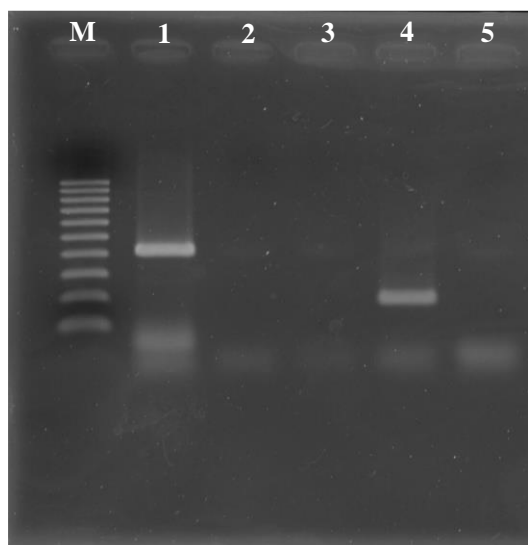


図17. Trung et al.の報告に準拠したMultiplex-PCRを用いた泳動像の一部

- 1 : ESBL-1 (TEM;422bp,CTX-M;590bp,SHV;739bp)
- 2 : ESBL-2 (VEB;391bp,GES;604bp,PER-1;731bp)
- 3 : Carba-1 (NDM;200bp,SPM;291bp,VIM;320bp)
- 4 : Carba-2 (IMP;204bp,AIM;326bp,KPC/BIC;412bp,DIM;710bp)
- 5 : Carba-3 (Oxa-23like group;482bp, Oxa-48like group;286bp,  
Oxa-58like group;599bp)

M : Marker(100bp)

※TEM,IMPのみ陽性と判定



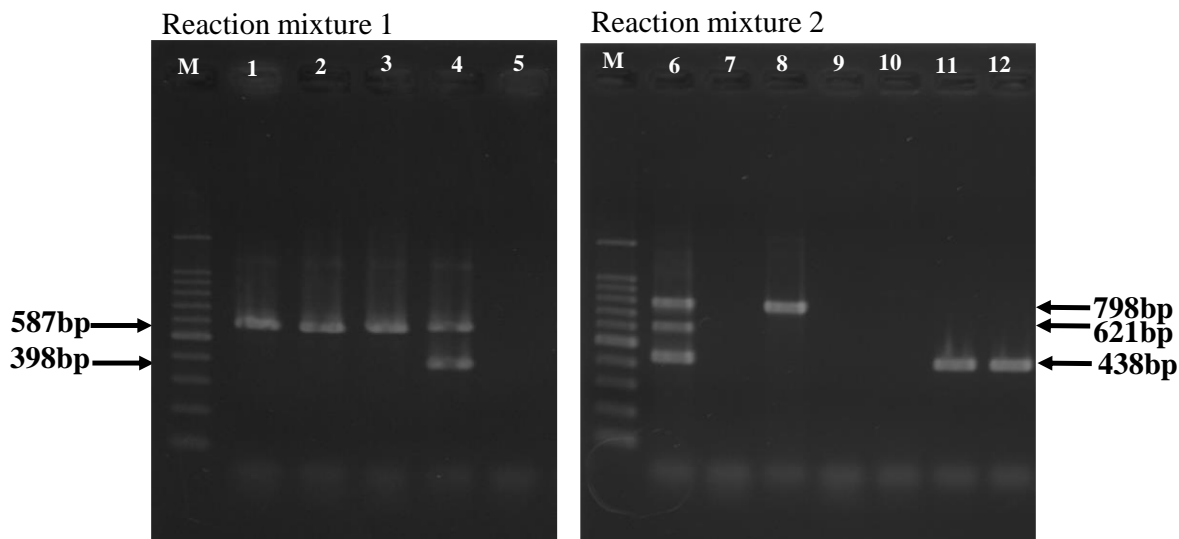


図18. シカジーニクス® カルバペネマーゼ遺伝子型検出キットを用いた電気泳動像の一部

1 : *bla*<sub>IMP-1</sub> 2 : *bla*<sub>IMP-1</sub> 3 : *bla*<sub>IMP-1</sub>

4 : positive control (587bp: *bla*<sub>IMP-1</sub>, 398bp: *bla*<sub>VIM</sub>) 5 : negative control

6 : positive control (798bp: *bla*<sub>KPC</sub>, 621bp: *bla*<sub>NDM</sub>, 438bp: *bla*<sub>OXA-48</sub>)

7 : negative control 8 : *bla*<sub>KPC</sub> 9 : negative 10 : negative 11 : *bla*<sub>OXA-48</sub>

12 : *bla*<sub>OXA-48</sub> M : Marker(100bp)

※IMP、OXA-48に陽性を示した結果の一部を示した

表9. Multiplex-PCRおよびLAMP法によるカルバペネマーゼタイプ別結果

		LAMP法					
		供試株数	IMP	OXA-48-like	KPC	VIM	NDM
Multiplex-PCR 検出 Carbapenemase type	IMP	17	17	0	0	0	0
	OXA-48-like	4	0	4	0	0	0
	KPC	4	0	0	4	0	0
	VIM	4*	0	0	0	4	0
	NDM	2	0	0	0	0	2
	GES	3	0	0	0	0	0
	ESBL only	2	0	0	0	0	0

\* *K. pneumoniae* NCTC 13440 (VIM-1)および

*P. aeruginosa* NCTC 13437( VIM-10 : VIM-2-like)菌株を含む

### 3.5-2 Multiplex-PCRとLAMP法の分析結果 2

近隣施設より分与いただいた菌株を無作為に16菌株選び、それぞれの菌株についてTrung et al.の報告に準拠したMultiplex-PCR (図19) およびLAMP法 (図20) を実施した。その結果を表10に示した。IMP陽性9菌株、KPC陽性2菌株、OXA-48-like陽性株4菌株であった。1株はMultiplex-PCR、LAMP法ともに陰性であった。16菌株すべてがMultiplex-PCRとLAMP法の結果が一致した。

#### Multiplex-PCR

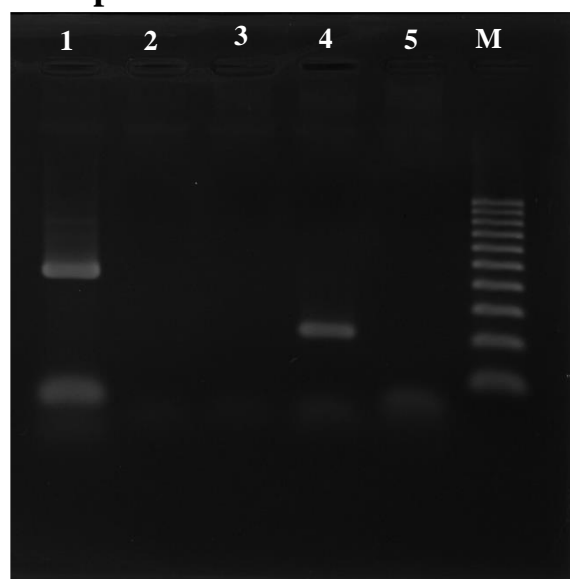


図19. Trung et al.の報告に準拠したMultiplex-PCRの泳動結果の一部

1 : ESBL-1 (TEM;422bp,CTX-M;590bp,SHV;739bp)

2 : ESBL-2 (VEB;391bp,GES;604bp,PER-1;731bp)

3 : Carba-1 (NDM;200bp,SPM;291bp,VIM;320bp)

4 : Carba-2 (IMP;204bp,AIM;326bp,KPC/BIC;412bp,DIM;710bp)

5 : Carba-3 (Oxa-23like group;482bp, Oxa-48like group;286bp,  
Oxa-58like group;599bp)

M : Marker(100bp)

※TEM,IMPのみ陽性と判定

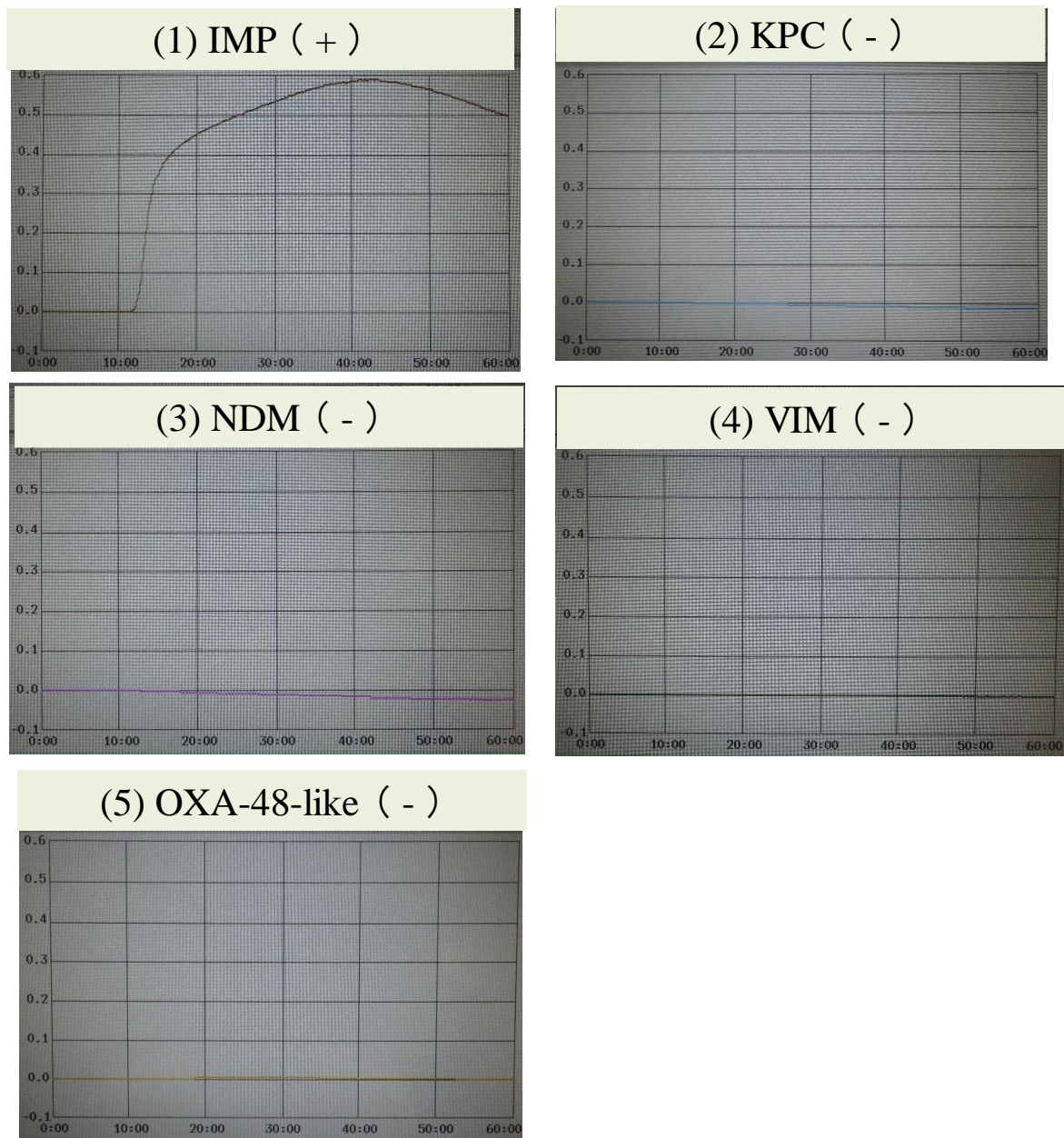


図20. LAMP法にてIMPのみ陽性反応を示した結果

IMP陽性の測定結果を例に示す。

63° C、60分の条件にてLAMP法を実施した。

(1) IMP (2) KPC (3) NDM (4) VIM (5) OXA-48-likeを測定した。

(1) のIMPのみ閾値時間14:50となり陽性反応を示した。その他 (2) ~ (5) については陰性であった。

表10. Multiplex-PCRとLAMP法の比較

	Multiplex-PCR					LAMP 法				
	IMP	VIM	NDM	KPC	OXA-48-like	IMP	VIM	NDM	KPC	OXA-48-like
Sample No. 1	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Sample No. 2	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Sample No. 3	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Sample No. 4	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Sample No. 5	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Sample No. 6	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Sample No. 7	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Sample No. 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sample No. 9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sample No. 10	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Sample No. 11	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Sample No. 12	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Sample No. 13	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Sample No. 14	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Sample No. 15	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Sample No. 16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	0	0	2	4	9	0	0	2	4

## 第4章 考察

近年、多くの医療機関で薬剤耐性菌感染症が問題となっている。わが国での薬剤耐性菌の歴史的背景をみると、第2次世界大戦後には多剤耐性ブドウ球菌や多剤耐性赤痢菌の増加がすでに認められていた。その後、薬剤耐性菌が社会的問題としてとり挙げられるようになったきっかけは、東京大学医学部附属病院にてご主人を感染症で亡くされた富家恵海子氏の「院内感染」<sup>36)</sup>が出版されたことである。Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) は1980年代より急激な増加傾向を示し始めた。その後、ペニシリン耐性肺炎球菌やβ-ラクタマーゼ非産生アンピシリン (ABPC) 耐性*Haemophilus influenzae*、Vancomycin resistant *Enterococcus* spp.

(VRE) などの薬剤耐性菌の耐性機構は1種類の薬剤耐性遺伝子による耐性であったため、臨床微生物検査室では、表現型や遺伝子検査で容易に検出することができた。2000年代に入るとグラム陰性桿菌であるESBL産生菌の*E. coli*、*K. pneumoniae* が急激な勢いで検出されるようになり、近年ではCPEや細胞膜透過性の低下による腸内細菌科細菌が検出される現状となっている。これらのグラム陰性菌の耐性機構は1種類の耐性遺伝子のみではなく、複数の耐性遺伝子が関与しているため、表現系による検出に限界を感じている。そこで、本研究では抗菌薬治療の“最後の切り札”とされるカルバペネム系抗菌薬を加水分解するCPEの耐性遺伝子のカルバペネマーゼ主要5ファミリー遺伝子を網羅的に検出するLAMP法の開発を博士課程でのテーマとした。下記にLAMP法でのプライマー開発における考察を記載する。

今回設計したLAMP法カルバペネマーゼ主要5ファミリー遺伝子のプライマーを用いた反応温度の比較では、VIMは65°C、NDMは63°C、KPCは65°C、OXA-48-likeは65°C、IMPは61°Cで最速反応を示した。単独のカルバペネマーゼを目的とする場合は最速反応温度で行うべきであるが、カルバペネマーゼ主要5ファミリー遺伝子を同時に検出する場合は、63°Cが最も至適温度と考える。しかし、反応温度を上げることは特異性の向上にもつながるが、プライマーのミスマッチが存在する型についてはさらに詳細な検証が必要になる。

抽出原液の×1/10倍段階希釈系列の反応性では、測定感度はいずれのカルバペネマーゼタイプでもVIM以外は $2 \times 10^3$  copies相当まで検出できた。DNA量が少ない試料については、試料中テンプレート採取時に左右されることもあり正確な評価は困難であると推察される。この事は分離株からの分析では問題とならないが今後、臨床材料を直接分析する場合は重要性を増すと考えられる。今回の実験で検討した36株の分析では、既報のmultiplex-PCR およびLAMP法でのカルバペネマーゼタイプは全て一致した結果が得られた。しかし、この事は多様な変異型の反応性を評価するものでは無いため、今後も可能な限りCPEの多種多様な菌株を収集し評価する必要がある。

NDMとKPCについては、マルチプルアライメント結果より、全てのLAMP法プ

ライマーと全変異型の塩基配列が一致しているため全変異型の検出が推測できる。LAMP法プライマー設計において多様化しているのがIMPである。IMPについては変異型の多さより、1セットのLAMP法プライマーでの対応は困難なためIMP全ての変異型をマルチプルアライメントの結果からグループ1からグループ3の3つのグループに分類しプライマーを設計した。この中でグループ1のプライマーセットはわが国で頻発する変異型を多く含むことと所有菌株の関係から、今回はIMPグループ1についてのみ検証した。

本研究では変異型の多様性が乏しく限定的であったことが想定される。しかし、今後は交通網の多様化、国際的交流の激化などに伴い多様な変異型の出現が想定されるためカルバペネマーゼ主要5ファミリー遺伝子の検査法確立の早期対応が望まれる。

## 第 5 章 結 語

今回、最新塩基配列情報に基づいた LAMP 検出プライマーを設計し、抗菌薬治療の“最後の切り札”とされるカルバペネム系抗菌薬を加水分解する CPE の耐性遺伝子で、カルバペネマーゼ主要 5 ファミリー遺伝子を網羅的に検出する LAMP 法を開発した。検出精度の評価では、当大学関連施設において検出された CRE 株と近隣協の協力施設より分与された菌株およびカルバペネマーゼを保有する NCTC 株を対象とした結果（36 株）、陽性株および陰性株との反応性は全て一致した。しかし、CPE の耐性遺伝子には多くの変異型が存在し、KPC では 31 種類、NDM で 21 種類、VIM では 51 種類、OXA-48-like では少なくとも 30 種類、IMP では 62 種類が現状で報告され、しかも、各耐性遺伝子の世界的な分布は地域で大きく異なっている。本研究でカルバペネマーゼ主要 5 ファミリー遺伝子を網羅的に評価するため、多くの変異型の菌株を入手すべく努力したが、残念ながらわが国で検出された変異型以外の菌株は収集できなかった。今後は多くの施設に菌株収集を依頼し、更なる精度の検証を進めていきたいと考える。

また、カルバペネマーゼ主要 5 ファミリー遺伝子は染色体に保持するタイプとプラスミドに保有するタイプに分けられる。特にプラスミド保有のタイプは、容易に他菌に伝搬するため、施設で検出された CPE の蔓延状況の有無を確認する必要がある。現状における菌株間の相同性については、Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) 法や PCR-based ORF typing (POT) 法が使用されている現状にある。ただし、PFGE 法はキットが販売されておらず、試薬の選定から行わなければならない上に、煩雑な手技であり、結果を得るまでの日数も必要とする。また、POT 法では MRSA や *P. aeruginosa*、*Acinetobacter* spp.、*Clostridium difficile* に限られた市販キットが発売されており、残念ながら CPE に関する菌株間の相同性については検討できない状況にある。そこで、国際医療福祉大学 福岡保健医療学部 医学検査学科では Repetitive-Sequence-Based PCR (rep-PCR)<sup>37)</sup>を用いた疫学解析の検討も行っている。この方法は通常の PCR 検査で複数の増幅バンドを分離できる特徴があるため、菌株間の相同性を評価するスクリーニング検査法としては有用性があると考えている。今までの予備検討では *P. aeruginosa* や腸内細菌科細菌での鑑別は可能と考えている。

2016 年に発表された AMR 対策アクションプランにおいて、CPE の薬剤耐性菌検出率を低減させ、かつ施設内感染の蔓延を防止するには、LAMP 法での CPE 遺伝子と rep-PCR 法による菌株間の相同性を検証する方法を組み合わせることが必要と考え、2018 年度挑戦的萌芽研究：課題番号 18K19698 「CPE の網羅的薬剤耐性遺伝子の変異解析と質量分析法を組み合わせた迅速検査法」にて検討を予定している。このような検討は迅速な抗菌剤治療への貢献だけでなく、感染対策への貢献にもつながると考えている。

## 倫理上の配慮

平成14年6月に文部科学省および厚生労働省より「疫学研究に関する倫理指針」<sup>38)</sup>が出された。その内容に対して、一般社団法人日本臨床微生物学会より「患者検体から分離された細菌、カビ、ウイルス、原虫などの微生物について倫理指針の適用について」の質問<sup>39)</sup>がなされ、「分離した微生物そのものの分析を行うのみで、提供者の健康に関する事項を研究対象としない場合は、疫学研究に該当せず、指針の対象外となる」と回答が得られている。

このことにより、本研究は該当しないと考える。

## 利益相反および公的研究費の開示

分離培養に使用した“KBM”ヒツジ血液寒天培地（コージンバイオ株式会社）、PCR法で使用したシカジーニアス<sup>®</sup> DNA抽出試薬（関東化学株式会社）、シカジーニアス<sup>®</sup> カルバペネマーゼ遺伝子型検出キット（関東化学株式会社）LAMP法で使用したLoopamp DNA 増幅試薬D（栄研化学株式会社）などに関し利益相反はない。また、研究を推進する上でご指導頂いた栄研化学株式会社の佐々木泰治様および株式会社菅原バイオテック研究所の菅原和行様との間にも報告すべき利益相反はない。

本研究は平成30年度科学研究費（18K19698）の助成を受けた。

## 謝辞

本研究の実施の機会を与えていただき、その遂行にあたって終始、ご支援とご指導を賜りました指導教員である永沢善三教授・学科長、本テーマを研究するにあたり取り組み方をご指導いただきました副指導教員の佐藤謙一准教授および本研究を遂行するうえで、遺伝子解析についての知識や実験について熱心にご指導をいただきました株式会社菅原バイオテック教育研究所（元 長崎大学病院 検査部）の菅原和行様および栄研化学株式会社の佐々木泰治様に深く感謝いたします。また、菌株の収集、実験にご協力いただきました医療法人社団 高邦会 高木病院内 臨床微生物・遺伝子検査研究センターのスタッフの皆様、実験に協力していただいた国際医療福祉大学大学院 医療福祉学研究科 保健医療学専攻 臨床検査学分野 平田雄哉氏に心より御礼申し上げます。



## 参考文献

- 1) 厚生労働省 院内感染対策サーベイランス 検査部門. 公開情報 2017年1月～12月年報(全集計対象医療機関).  
([https://janis.mhlw.go.jp/report/open\\_report/2017/3/1/ken\\_Open\\_Report\\_201700.pdf](https://janis.mhlw.go.jp/report/open_report/2017/3/1/ken_Open_Report_201700.pdf))
- 2) Falagas, M.E., Tansarli, G.S., Karageorgopoulos D.,E.,et al. Deaths Attributable to Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Infections.Emerging Infectious Diseases.2014; 20(7):1170-1175
- 3) Vasoo S, Barreto JN, Tosh PK. Emerging issues in gram-negative bacterial resistance: an update for the practicing clinician. Mayo Clinic Proceedings. 2015;90(3):395-403.
- 4) Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. (<https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>)
- 5) Centers for Disease Control and Prevention. Healthcare-associated Infections. (<https://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/cre-patients.html>)
- 6) 国立感染症研究所. 米国CDCが警告を発したカルバペネム耐性腸内細菌(CRE)に関するQ&A.2013. (<https://www.niid.go.jp/niid/ja/cre-m/2384-idsc/3306-carbapenem-qa.html>)
- 7) Centers for Disease Control and Prevention. Making Health Care Safer.2013. (<https://www.cdc.gov/vitalsigns/HAI/CRE/>)
- 8) 厚生労働省 薬剤耐性(AMR)対策アクションプラン2016-2020  
(<https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000120769.pdf>)
- 9) 感染症関連四学会連携. カルバペネムに耐性化傾向を示す腸内細菌科細菌の問題 (2017) —カルバペネマーゼ産生菌を対象とした感染対策の重要性—  
([http://www.kansensho.or.jp/guidelines/pdf/4gakkai\\_carbapenem\\_2017.pdf](http://www.kansensho.or.jp/guidelines/pdf/4gakkai_carbapenem_2017.pdf))
- 10) UK Standards for Microbiology Investigations Detection of bacteria with carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamases (carbapenemases). Public Health England. 2016. ([https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/554654/B\\_60i2.1.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/554654/B_60i2.1.pdf))
- 11) Neil Woodford. The PHE CPE Toolkit and the need to detect Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. Public Health England.2014. (<http://bsac.org.uk/wp-content/uploads/2012/02/BSAC-Userday-Neil-Woodford.pdf>)
- 12) 池戸正成.新規遺伝子増幅法：LAMP法.日本臨床微生物学雑誌.2005;25(1):1-8.
- 13) 厚生労働省. カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症.感染症法に基づく医師及び獣医師の届出について.(<https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou11/01-05-140912-1.html>)
- 14) Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations The

Review on Antimicrobial Resistance Chaired by Jim O'Neill December 2014

([https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations\\_1.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf))

- 15) 館田一博. 国内・国外における耐性菌の動向と今後の課題. 臨床と微生物. 2015;42(増刊号):19-24
- 16) Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 27th informational supplement. CLSI document M100-S27. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- 17) 山田景土, 長野則之, 齋藤良一. 表現型からみる carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* の網羅的スクリーニング法. 日本臨床微生物学雑誌. 2017; 27(4):47-54.
- 18) Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function. (<http://www.bldb.eu/>)
- 19) Ambler RP. The structure of beta-lactamases. Philosophical Transactions of the Royal Society B. 1980; 289(1036):321-331.
- 20) Jose M. Munita, Cesar A. Arias, Mechanisms of Antibiotic Resistance. Microbiology Spectrum. 2016; 4(2)
- 21) Yigit H., Queenan AM., Anderson GJ., et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52 (2):809
- 22) 矢野寿一, 平潟洋一, 賀来満夫. 海外における薬剤耐性グラム陰性桿菌の動向. 日本化学療法学会雑誌. 2011;59:8-16.
- 23) Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R., et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1994; 38:71-78.
- 24) Yong D, Toleman M A, Giske C G, et al. Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53: 5046-54
- 25) Poirel L, Héritier C, Tolùn V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48(1):15-22.
- 26) 長野則之, 長野由紀子. クラスD  $\beta$ -ラクタマーゼ. 臨床と微生物. 2015;42(4):43-49.
- 27) 荒川宜親. カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (carbapenem-resistant

- Enterobacteriaceae*, CRE) 等 新型多剤耐性菌のグローバル化と臨床的留意点. 日本化学療法学会雑誌. 2015; 63 (2): 187-197.
- 28) 荒川宜親. 腸内細菌科菌種におけるカルバペネム耐性メカニズムとその特長および動向. IASR. 2014;35:283-284 (<https://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr-sp/2302-related-articles/related-articles-418/5203-dj4181.html>)
- 29) Multiplex Real-Time PCR Detection of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) and New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM-1) (<https://www.cdc.gov/HAI/pdfs/labSettings/KPC-NDM-protocol-2011.pdf>)
- 30) 大楠清文. 感染症診断のための遺伝子検査の適応と実践. 2010. シスメックス株式会社 学術本部
- 31) Trung, N.T., Hien, T.T., Huyen, T.T., et al. Simple multiplex PCR assays to detect common pathogens and associated genes encoding for acquired extended spectrum betalactamases (ESBL) or carbapenemases from surgical site specimens in Vietnam. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2015; 14:23
- 32) Tsugunori N, Hiroto O, Harumi M, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. 2000; 15; 28(12): e63.
- 33) 牛久保宏. LAMP法の原理—遺伝子の簡易・迅速な増幅法—ウイルス. 2004; 54(1):107-112
- 34) 高野弘, 酒井栄一, 佐々木泰治. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)法の原理と応用. *モダンメディア*. 2014; 60(7)
- 35) Naas. T., Oueslati. S., Bonnin. R. A., et al., Beta-Lactamase DataBase (BLDB) – Structure and Function. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2017; 32:917-919.
- 36) 富家恵美子. 院内感染. 第1版. 東京: 河出書房. 1990.
- 37) Mimi H, Joe H, Traci B. Microbial DNA Typing by Automated Repetitive-Sequence-Based PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43(1):199-207
- 38) 厚生労働省. 疫学研究に関する倫理指針. (<https://www.mhlw.go.jp/general/seido/kousei/i-kenkyu/ekigaku/0504sisin.html>)
- 39) 一般社団法人日本臨床微生物学会. 「疫学研究に関する倫理指針」について. (<http://www.jscm.org/m-info/17.html>)

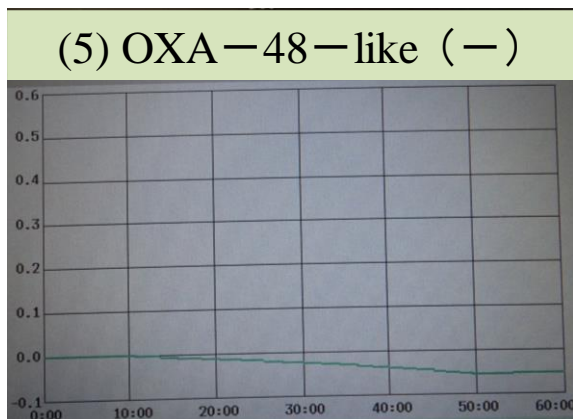
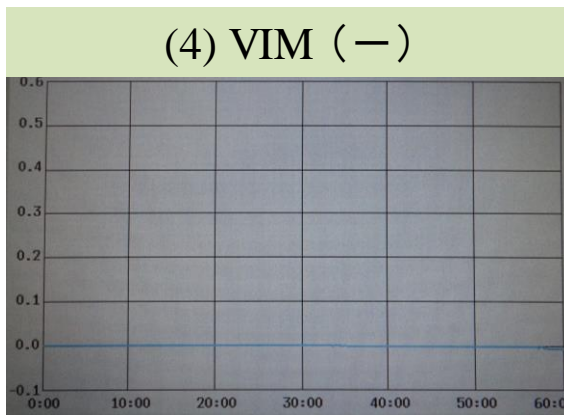
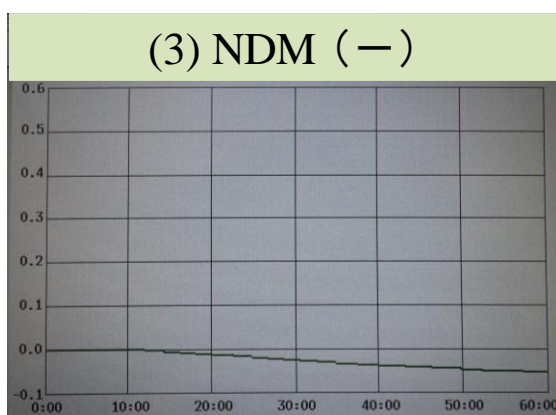
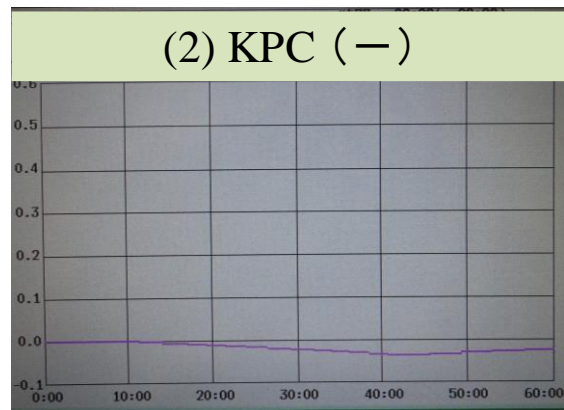
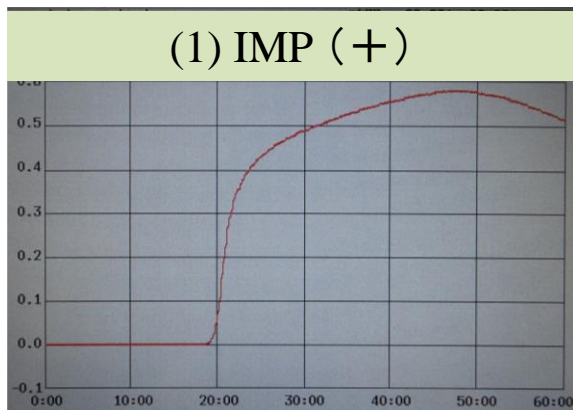
## 資料 1

### 【 今後の展望 】

医療施設において慢性疾患治療中の患者や免疫低下症患者もしくは高齢者で抗菌剤投与前患者、長期抗菌剤投与患者などは、迅速な耐性菌検査情報を必要とする。今回の研究では一晩培養時間を要する菌株を対象とした耐性菌の検出方法であったが、今後は抗菌剤治療に貢献できるさらなる迅速耐性菌情報の提供の試みとして、検体から直接DNA抽出を行い、LAMP法を実施する予定である。予備実験として、糞便にIMP陽性の菌株を混ぜ模擬検体を作製した。模擬検体をLoopamp®PURE DNA抽出キット（栄研化学株式会社）を用いてDNA抽出を行い、LAMP法を実施した。その結果（資料1-1）、本研究結果と同様にIMPのみ陽性となった。このことより、検体提出から数時間での耐性菌の鑑別が可能となる。さらなる検討としてCRE保菌患者検体を用いてLAMP法を行う予定である。現在、CRE保菌患者検体使用について本大学の倫理委員会の承認を申請である。その後、臨床微生物・遺伝子検査研究センターのある高木病院に協力いただくために、高木病院の倫理委員会の承認を受ける予定である。

また、開発途上国では残念ながら高額な遺伝子検査機器が普及していない現状にあり、薬剤耐性菌の蔓延が懸念される。薬剤耐性菌の蔓延を防止するため、高価な遺伝子検査機器を保有していない施設や国でも簡易に実施できる遺伝子検査法として、専用の機器を必要とせず、簡易・迅速に薬剤耐性遺伝子のタイプが鑑別できる遺伝子増幅法としてLAMP法の導入を考える。その方法として、増幅にヒートブロックを用い、また、検出には蛍光反応を利用して目視判定を行えるように検討予定である。

資料1-1



模擬検体からDNA抽出を実施したLAMP法結果  
IMP陽性の測定結果を例に示す。

63° C、60分の条件にてLAMP法を実施した。

(1) IMP (2) KPC (3) NDM (4) VIM (5) OXA-48-likeを測定した。

(1) のIMPのみ閾値時間21:12となり陽性反応を示した。その他 (2) ~ (5) については陰性であった。

## 資料 2

### 【 研究成果状況 】

本研究の関連研究である「CPEの網羅的薬剤耐性遺伝子の変異解析と質量分析法を組み合わせた迅速検出法」が平成30年度科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）挑戦的研究（萌芽）として採択された。また、平成31年1月に発行予定の臨床微生物迅速診断研究会誌（JARMAM）に「LAMP法を用いた簡易・迅速なCarbapenemase Big five gene分析の試み」（平成30年9月19日受理）が掲載予定である（資料2-1に添付）。その他、平成31年2月に開催される第30回日本臨床微生物学会総会・学術集会において「分離株を用いたLAMP法 Carbapenemase *bla*<sub>IMP</sub> gene 検出法の評価」について発表予定である（資料2-2に抄録を添付）。

## LAMP法を用いた簡易・迅速な Carbapenemase Big Five Gene 分析の試み

A Trial of Simple and Rapid Carbapenemase  
Big Five Gene Analysis Using LAMP Method船島由美子<sup>\*1,\*2</sup>・菅原和行<sup>\*3</sup>・平田雄哉<sup>\*2</sup>・加藤匡平<sup>\*4</sup>・  
佐藤謙一<sup>\*1,\*2</sup>・佐々木泰治<sup>\*5</sup>・永沢善三<sup>\*1,\*2</sup>・梅村 創<sup>\*1,\*2,\*4</sup><sup>\*1</sup>国際医療福祉大学 福岡保健医療学部 医学検査学科<sup>\*2</sup>国際医療福祉大学大学院 保健医療学専攻 臨床検査分野<sup>\*3</sup>株式会社菅原バイオテック教育研究所<sup>\*4</sup>医療法人社団 高邦会 高木病院 検査技術部<sup>\*5</sup>栄研化学株式会社

(平成30年9月3日受付, 平成30年9月19日受理)

**要 旨** 感染症治療においてカルバペネマーゼのタイプ鑑別と、堅実な検出は臨床上極めて意義が高い。今回、Carbapenemase Big five gene を新たに、最新塩基配列情報に基づいた Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 検出プライマーを設計し、その検出法を確立した。菌株からの DNA 抽出はアルカリ煮沸法と市販キットを使用した。LAMP 法での反応温度は、VIM: 65°C, NDM: 63°C, KPC: 65°C, OXA-48-like: 65°C, IMP: 61°C での反応促進が認められ、同時分析では LAMP 反応 63°C, 60 分とした。10<sup>3</sup> copies/mL 相当菌量までの検出が可能であった。Multiplex-polymerase chain reaction (Multiplex-PCR) で検証した 36 株との反応性は、VIM (4/4: LAMP 法陽性株数/Multiplex-PCR 結果からの供試株数)、NDM (2/2), KPC (4/4), OXA-48-like (4/4), IMP (17/17) LAMP 法カルバペネマーゼ各タイプの陽性株および陰性株との反応性はすべて一致した。全株の検出反応時間はすべて 30 分以内であった。また、VIM は、VIM-1-like と VIM-2-like の 2 系統とも検出可能であった。供試菌株数およびバリエーションの多様性の乏しさは課題として残るが、今回の LAMP 法は、簡易かつ迅速なカルバペネマーゼ検出法として特異性、測定感度共に高く臨床上有用であった。

**Key Words:** Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* (CRE), Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE), Drug-resistant gene, Loop-Mediated Isothermal Amplification assay (LAMP assay), Multiplex-polymerase chain reaction (Multiplex-PCR)

## 序 文

今日、多剤耐性 (MDR) グラム陰性桿菌、なかでも腸内細菌科の感染が世界的に猛威を振るいつつある。わが国においてもその傾向が見られ早急な対応策が求められている。これら MDR はβ-ラクタム系薬剤、フルオロキノロン系薬剤およびアミノグリコシド系薬剤など従来グラム陰性菌に有

効とされた主要な抗菌剤クラスすべてに耐性、もしくは利用可能な薬剤すべてにおいて耐性を示すなどの系統的な MDR パターンを持ち事態は深刻である。

細菌感染治療薬のなかでβ-ラクタム系薬剤は殺菌効果特性を持つ安全性や信頼性の高い抗生物質である。このβ-ラクタム系抗生物質を加水分解し不活化する酵素β-ラクタマーゼ (BL) (EC: 3.5.2.6) を持つ MDR グラム陰性細菌が世界的に蔓延している。

BL 酵素は、基質特異性の相異とアミノ酸配列の相同性に基づいて、A (ペニシリナーゼ)、B (メタロβ-ラクタマーゼ)、C (セファロスポリナー

別刷請求先: ☎ 831-8501 福岡県大川市榎津 137-1

国際医療福祉大学 福岡保健医療学部

医学検査学科

船島由美子

E-mail: funashima@iuhw.ac.jp



ぜ), D (オキサシリナーゼ) と4つのクラスに分類されている。クラス A, C および D は反応経路にアシル酵素付加物が関与し活性部位にセリン残基を持つ, 一方クラス B は中間体を形成せず機能発現には亜鉛イオンが必要でありメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ (MBL) と呼ばれカルバペネム系抗生物質を分解する特徴がある。ペニシリナーゼはペニシリン系抗生物質と第二世代セファロスポリンを分解し, セファロスポリナーゼは主にセファロスポリンを分解する。オキサシリナーゼはオキサシリンをも分解するペニシリナーゼである。

現在, BL 媒介耐性で最も危惧されているのは, 抗生物質治療の最後の切り札とされているカルバペネム系薬剤を加水分解する MBL (IMP, VIM, NDM, ...) およびクラス A, クラス D セリン-カルバペネマーゼ (KPC, IMI, GES, OXA-48, OXA-23, OXA-40, ...) である。なかでも, IMP, VIM, NDM, KPC, OXA-48-like は Carbapenemase Big five として恐れられている。

1970 年代初期にはいくつかの BL が知られていたが, 近年では BL の数は急速な増加とともに多数の新規酵素 family やそのバリエーションが報告されている (Table 1)。また, これらは国際的には地域特性が見られるが, 今日における交通網の発達により短期間で交差伝播も認められている。近年は, 単独の耐性酵素を保持する菌種株よりも同時に複数の耐性酵素を保持する菌種株の増加傾向が顕著であり, 酵素活性による表現系検査での検出結果は複雑多様化して困難を極め, その検出同定には遺伝子検査の確立が望まれている。

これら MDR を指標とした遺伝子検査法はすでに数多く報告されている<sup>1)~4)</sup>。しかし, 遺伝子検査においても新たな耐性酵素の出現や次々と検出される多数のバリエーションを網羅的に検出するには耐性酵素の塩基変異へのプライマーシーケンスの対応不備な面も課題として残されている。今回, Carbapenemase Big five を対象とし, 検出操作の簡易性および迅速性から LAMP 法を選択した。

Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法でのプライマーをカルバペネマーゼの最新データベース (BLDB Last updated: 2018 年 6 月 20 日) より取得したシーケンスデータを基に新たにプライマーを設計し, 可能な限り網羅的検出を目指した迅速・簡易な測定法を確立し, その課題についても検証したので報告する。

## 対象・方法

### 1. 対象

当大学関連施設において検出されたカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) 株と近隣の協力施設の分与株および各カルバペネマーゼ活性を保有する NCTC 株を供試した。

### 2. 方法

菌株は TSA 血液寒天培地 (コージンバイオ株式会社) で一晚培養をおこなった。また, PCR にはシカジーニクス DNA 抽出試薬 (関東化学株式会社) を, LAMP 法にはアルカリ煮沸法<sup>5)</sup>を用い DNA を抽出した。

#### 2.1 Multiplex-PCR

供試菌株は, Trung *et al.* の報告<sup>6)</sup>に基づき

Table 1. BLDB posted Carbapenemase "Big Five" variant number

Last updated: June 20, 2018.

Carbapenemase Big five	Last number	Real variant number
NDM	21	21
KPC	33	31
IMP	70	62
VIM	54	51 (VIM-1-like 26, VIM-2like 24, VIM-7 1)
OXA-48-like		30 *(carbapenemase 14, ESBL 2, $\beta$ -lactamase 14) +62 (carbapenemase 2, $\beta$ -lactamase 60)

\*after the protein name denotes a temporary name in BLDB, while waiting for a definitive assignment by NCBI. GeneBankIDs represented in bold face correspond to entries for which NCBI has assigned a RefSeq

<http://www.bldb.eu/>



VED-F primer を変更し名称の一部を改変した Multiplex-polymerase chain reaction (Multiplex-PCR) を実施した。VED-F primer は変更するなど一部改変した。Multiplex-PCR は Platinum™ Multiplex PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用い、PCR 条件については、アニーリング温度のみを 60℃ に改変した。PCR 増幅産物を 2% SeaKem® GTG™ アガロースゲルにて電気泳動後、エチジウムブロマイド染色を実施した。さらに、シカジーニウス® カルバペネマーゼ遺伝子型検出キット (関東化学(株)) による Multiplex-PCR も実施した。また、一部不確かな IMP 株についてはクイックチェイサー® IMP ((株)ミズホメディー) を併用した。いずれの方法も測定操作は手順書に準拠した。

## 2.2 LAMP プライマー設計

KPC, NDM, VIM, IMP, OXA-48-like の各酵素 family の全バリエーションについて、 $\beta$ -ラクタマーゼデータベース<sup>7)</sup>「BLDB」: <http://bldb.eu/> から NCBI (National Center for Biotechnology Information) の GenBank : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> にアクセスしバリエーションに対応した GenBank ID より、各バリエーションの DNA シークエンスデータを FASTA 形式で WordPad に集積した。カルバペネマーゼ family ごとに集積 DNA シークエンスデータは、DDBJ (DNA DATA Bank of Japan) の clustalW: <http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/> に入力しマルチプルアライメント処理を行った。各 family のマルチプルアライメント結果を WordPad にテキストドキュメント形式で保存し、PrimerEXplorer V5: <https://primerexplorer.jp/lampv5/index.html> に入力し、LAMP 法プライマーを設計した。このときプライマー設計のベースとするバリエーションの DNA シークエンスデータをアライメント結果の最上段に移行した。また、プライマー設計時 KPC, NDM 以外については、Mutation/Consensus を F1c inner および B1c inner 以下まで、すべて塩基変異の混入を許諾すると同時にプライマー作成の諸条件を一部変更し設計した。さらに IMP バリエーションについてはマルチプルアライメント結果の近似性から

3 グループに分け、グループごとにプライマーを設計した。いずれの family についても数セットの Regular プライマーについて、その反応性を比較検討し、1 セットの Regular プライマーを選定した。さらに、再度 Primer EXplorer V5 を用い Regular プライマーに対応する Loop プライマーを設計した。今回の実験は、すべて「BLDB」Last updated: June 20, 2018 に基づいた。

LAMP 法の測定は Loopamp DNA 増幅試薬 D (栄研化学株式会社) を使用した。プライマー濃度は F3, B3 プライマー 5  $\mu$ M, FIP, BIP プライマー 40  $\mu$ M, LF, LB プライマー 20  $\mu$ M とした。反応液 25  $\mu$ l に対し、100 mM KCl 5  $\mu$ l, 試料 2  $\mu$ l を添加し精製水にてメスアップした。基本的な測定操作は、取扱説明書に準拠した。測定はリアルタイム濁度測定装置 LoopampEXIA® を用い、反応温度 63℃, 60 分間観察後、80℃, 5 分間不活化処理した。結果は、濁度 0.1 を超した閾値時間 ( $T$ ) で評価した。

## 成 績

### 1. Carbapenemase Big five LAMP 法 プライマーシークエンス

本研究のために設計した LAMP 法のプライマーシークエンスを Table 2 に示した。VIM, NDM, KPC, OXA-48-like, IMP 各タンパク質に対応したプライマーシークエンスを表記し、各々の 5' position no. および 3' position no. とプライマー長を記載した。NDM については Loop プライマーの LF のみの設計となった。IMP については 3 グループの中でグループ 2 とグループ 3 については対象バリエーション株の保有が無く検証できなかったためグループ 1 のみの記載とした。

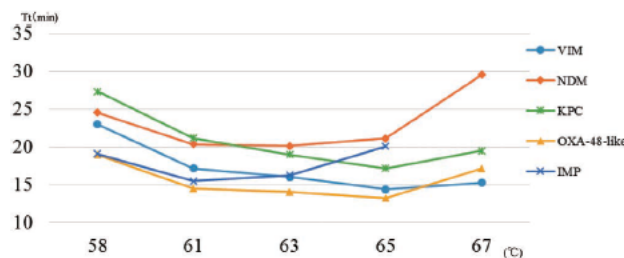
グループ 1 には、IMP-1, -3, -4, -5, -6, -7, -9, -10, -15, -25, -26, -28, -29, -30, -34, -38, -40, -42, -43, -45, -5-1, -52, -53, -55, -59, -60, -61, -62, -66, -70 の 30 のバリエーションを含む。

### 2. Carbapenemase Big five LAMP 法における反応温度に伴う濁度閾値時間の比較

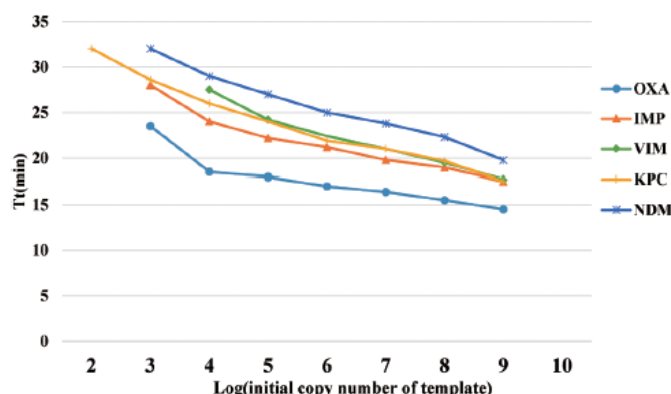
アルカリ煮沸法にて抽出した DNA を用い、LAMP 反応を 58, 61, 63, 65, 67℃ と変化させ各温

**Table 2.** Carbapenemase Big 5 LAMP assay primer sequence

VIM (base sequence VIM-1)				
label	5'pos	3'pos	len	Sequence (5'→3')
F3	62	79	18	GTCCGTTAGCCCATTCGG
B3	266	283	18	GTGCCGCTGTGTTTTTCG
FIP			41	TATGCGACCAAACACCATCGGC-AGCCGAGTGGTGAGTATCC
BIP			41	CGTTTGATGGCGCGGTCTACC-ACCCACGCTGTATCAATCA
LF	123	144	22	CTGGTAAAGTCCGACCTCTCCG
LB	222	241	20	CCGTGATGGTGATGAGTTGC
NDM (base sequence NDM-3)				
F3	562	579	18	GGCCACACCAGTGACAAT
B3	735	754	20	CGGAATGGCTCATCACGATC
FIP			39	TTGCCGAGCGACTTGGCCTT-GCACCGACATCGCTTTTGG
BIP			39	GATGCCGACACTGAGCACTACG-ATGCTGGCCTTGGGGAA
LF	623	637	15	TGTCCTTGATCAGGC
KPC (base sequence KPC-2)				
F3	82	99	18	CTCGTCGCGGAACCATTC
B3	311	330	20	TTTTTCCGAGATGGGTGACC
FIP			42	CCTCAGCGCGGTAACCTACAGT-AACTCGAACAGGACTTTGGC
BIP			41	TTCAAGGGCTTCTTGCTGCCG-CGCATTTTTGCCGTAACGG
LF	124	143	20	GCGTACACACCGATGGAGCC
LB	260	276	17	CCGGCTTGCTGGACACA
OXA-48-like (base sequence OXA-48)				
F3	152	170	19	AGCAGCAAGGATTTACCAA
B3	341	362	22	GGCACAACCTGAATATTTTCATCG
FIP			41	TCCTTAACCAAGCCCAAATCG-CAAGCATTTTTACCCGCATC
BIP			45	CAAGTCTTTAAGTGGGATGGACA-ATTAGATTATGATCGCGATTCC
LF	220	240	21	GGCGATCAAGCTATTGGGAAT
LB	294	313	20	GACGCGGATATCGCCACTT
IMP (Group-1) (base sequence IMP-1)				
F3	55	72	18	GCAGAGTCTTTGCCAGAT
B3	253	274	22	TGCTGCCTTTTATTTTATAGCC
FIP			44	TGTTTAGGAACAACGCCCCAC-AAAATTGAAAAGCTTGATGAAGG
BIP			44	TTGGTGGTTCTTGTAATGCTGA-CCAAGTGACTAACTTTTCAGT
LF	112	134	23	CCGTTAACCTTCTTCAAACGAAGT
LB	187	211	25	TACCTAATTGACACTCCATTTACGG



**Fig. 1.** Comparison of turbidity threshold time with Carbapenemase Big 5 LAMP reaction temperature. Turbidity time (Tt) exceeding turbidity 0.1 of each carbapenemase by the LAMP method was shown. The lower the Tt value, the more accelerated the reaction. In IMP, LAMP reaction (67°C, 30 minutes) was not observed.



**Fig. 2.** Reactivity of  $\times 1/10$  fold serial dilution series of extract stock solution

The preparation bacterial solution was extracted with DNA by alkaline boiling method, and the extract solution at this time was set to be equivalent to  $2 \times 10^9$  copies, and ten-fold dilution series was prepared with TE buffer (pH 8.0). Each dilution was measured by the carbapenemase type LAMP method. The measurement value is indicated by time Tt exceeding turbidity 0.1. A smaller Tt value indicates that the reaction is faster.

**Table 3.** Results of analysis by carbapenemase type by Multiplex-PCR and LAMP

Multiplex-PCR detection Carbapenemase type	Number of samples to be tested	LAMP-assay IMP	LAMP-assay OXA-48-like	LAMP-assay KPC	LAMP-assay VIM	LAMP-assay NDM
IMP	17	17/17	0/17	0/17	0/17	0/17
OXA-48-like	4	0/4	4/4	0/4	0/4	0/4
KPC	4	0/4	0/4	4/4	0/4	0/4
VIM	4*	0/4	0/4	0/4	4/4	0/4
NDM	2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2
GES	3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
ESBL only	2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

(Number of positive strains/number of test strains)

\* Including 2 strains *Klebsiella pneumoniae* NCTC 13440 (VIM-1), *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 13437 (VIM-10; VIM-2-like)

The extract solution with the Cica Genus DNA extraction reagent was diluted ten-fold with TE buffer (pH 8.0) to prepare template samples of Multiplex-PCR and LAMP method.

度における濁度 0.1 の閾値時間を比較した結果を Fig. 1 に示した。

VIM は 65℃, NDM は 61 と 63℃ 間, KPC は 65℃, OXA-48-like は 65℃, IMP は 61℃ での反応が最も促進性が高かった。今回の研究では同時測定が目的のためいずれの反応にもほとんど影響なく、わが国での検出が最も多い IMP に重点を置き 63℃ を LAMP 反応温度とした。

### 3. 抽出原液の $\times 1/10$ 倍段階希釈系列の反応性

アルカリ煮沸法による操作から逆算した  $2 \times 10^9$  CFU/ml の抽出原液を  $2 \times 10^9$  コピー相当とみ

なし TE 液 (pH 8.0) で  $\times 1/10$  倍段階希釈し  $2 \times 10^2$  まで作製し測定した。結果を Fig. 2 に示した。NDM, OXA, IMP は  $2 \times 10^3$  コピーまで, KPC は  $2 \times 10^2$  コピーまで, VIM は  $2 \times 10^4$  コピーまで、陽性反応となった。また、全 family において  $2 \times 10^3$  コピーまでの陽性反応は 35 分以内に検出された。

### 4. Multiplex-PCR および LAMP によるカルバペネマーゼタイプ別分析結果

Trung *et al.* の報告に準拠した Multiplex-PCR, およびシカジーニクス® カルバペネマーゼ遺伝



子型検出キットを用いた供試 36 株の分析結果は Table 3 に示した。同時に本 36 株をカルバペネマーゼタイプ別 LAMP 法にて分析した結果も一覧化し併記した。

供試菌株 36 株において、Multiplex-PCR および LAMP 法によるカルバペネマーゼタイプはすべて一致した。さらに、LAMP 法においてカルバペネマーゼタイプ間の非特異反応は認められなかった。また、36 株の中に、*Klebsiella pneumoniae* NCTC 13440 (VIM-1) および *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 13437 (VIM-10 : VIM-2-like) 株を含みいずれも VIM LAMP 法陽性であった。

### 考 察

今回設計した、Carbapenemase Big five のプライマーを用いた LAMP 反応の最速温度は、VIM は 65°C、NDM は 63°C、KPC は 65°C、OXA-48-like は 65°C、IMP は 61°C であった。これらのカルバペネマーゼを単独で分析する場合は最速反応温度で施行して良いが Carbapenemase Big five を同時に分析する場合は、63°C が最も至適温度といえる。しかし、反応温度を上げることは、特異性の向上にもつながるがプライマー不一致が存在するタイプではさらに詳細な検証を必要とするものと思われる。希釈試料から類推する測定感度はいずれのカルバペネマーゼタイプでも VIM 以外は  $2 \times 10^3$  コピー相当まで検出できた。低希薄試料においては、試料中のテンプレート採取の有無は by chance に左右される側面もあり正確な評価は困難である。このことは分離株からの分析では問題とならないが臨床材料を直接分析する場合は重要性を増す。今回の実験で供した 36 株の分析では、既報の multiplex-PCR および LAMP 法でのカルバペネマーゼタイプはすべて一致した結果が得られた。しかし、このことは多様なバリエーションへの反応性を評価するものではない。今回の結果で興味あることは、36 株の中に NCTC 13440 (VIM-1) と NCTC 13437 (VIM-10) 株を含むことである。VIM-10 は VIM-2-like に分類され、Table 1 に示した様に VIM はそのほとんどが VIM-1-like (26 バリエーション) と VIM-2-like (24 バ

リエーション) に分類され塩基変異の傾向はこの 2 つのグループ間で異なる。VIM LAMP プライマーが NCTC 13440 (VIM-1) と NCTC 13437 (VIM-10) 株を検出できた事については、今回は示さなかったが VIM のマルチプルアライメント結果より VIM-7 を除くすべてのバリエーション検出の可能性が示唆された。また、ほかのカルバペネマーゼタイプにおいては同様にマルチプルアライメント結果より、NDM, KPC はすべての LAMP プライマーと全バリエーションが一致しているため全バリエーション検出が推測できる。OXA-48-like は、対象とした 30 バリエーションのうち OXA-436 (BL) および OXA-535 (カルバペネマーゼ)、OXA-54 (カルバペネマーゼ) の 3 バリエーションについては反応性の検証が必要である。また、OXA-48-like については検出されたバリエーションの中にカルバペネマーゼ、extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) およびそれ以外の BL を含むことである。近年特に表現系活性が低い OXA-48-like の遺伝子検査は臨床重要性を増している。LAMP プライマー設計においてさらに多様化しているのが IMP である。IMP については、1 セットの LAMP プライマーでの対応は困難なため IMP すべてのバリエーションをマルチプルアライメントの結果から 3 グループに分類した。この中でグループ 1 のプライマーセットはわが国で頻発するバリエーションの多くを包括する 30 のバリエーションを含むことと菌株保有の都合上から、今回は IMP グループ 1 についてのみ検証した。グループ 2 (10 バリエーション) およびグループ 3 (21 バリエーション) については対象菌株の調達ができず反応性の検証はできなかった。理論的にはグループ 1 のプライマーセットがグループ 2, 3 の一部との反応性も推測されるがこれには実証が必要である。LAMP 法 IMP のプライマーセットには、バリエーションの一部がいずれかのプライマー site との不一致を含むものがあり多種のバリエーション菌株を用いた実証が望まれる。さらに、IMP バリエーションの中で IMP-64 は他のバリエーションに対し塩基相同性が低くマルチプルアライメントの結果に混乱を生じたためアライメント操作から除外した。

今回の LAMP 法によるカルバペネマーゼ検出法では、OXA-48-like および IMP の対象とするバリエーションの一部にプライマー site の不一致が存在し、その反応性が対象バリエーション株を調達できずに検証できなかった。LAMP 法におけるプライマー site の不一致の反応性評価の情報は少ないため、今は、対象株による実証試験が最も堅実な反応性評価である。これの対処には混合塩基プライマー等の検証を急ぐべきと思われる。

### 文 献

- Kim, H. J., Kim, H. S., Lee, J. M., Yoon, S. S., Yong, D. (2016): Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* Harboring *bla<sub>VIM2</sub>*, *bla<sub>IMP1</sub>* and *bla<sub>OXA-23</sub>* genes by using loop-mediated isothermal amplification methods. *Ann Lab Med.*, **36**(1): 15-22.
- Cheng, C., Zheng, F., Rui, Y. (2014): Rapid detection of *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, and *bla<sub>VIM</sub>* carbapenemase genes in bacteria by loop-mediated isothermal amplification. *Microb. Drug Resist.*, **20**(6): 533-538.
- Mlynarcik, P., Roderova, M., Kolar, M. (2016): Primer Evaluation for PCR and its Application for Detection of Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Jundishapur J. Microbiol.*, **9**(1): e29314.
- Cheng, C., Zheng, F., Rui, Y. (2014): Rapid detection of *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, and *bla<sub>VIM</sub>* carbapenemase genes in bacteria by loop-mediated isothermal amplification. *Microb Drug Resist.*, **20**(6): 533-538.
- Multiplex Real-Time PCR Detection of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) and New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM-1) genes (<https://www.cdc.gov/hai/pdfs/labsettings/KPC-NDM-protocol-2011.pdf>)
- Trung, N. T., Hien, T. T., Huyen, T. T., Quyen, D. T., Binh, M. T., Hoan, P. Q., Meyer, C. G., Velavan, T. P., le. Song, H. (2015): Simple multiplex PCR assays to detect common pathogens and associated genes encoding for acquired extended spectrum betalactamases (ESBL) or carbapenemases from surgical site specimens in Vietnam. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, **14**: 23.
- Naas, T., Oueslati, S., Bonnin, R. A., Dabos, M. L., Zavala, A., Dortet, L., Retailleau, P., Iorga, B. (2017): Beta-lactamase database (BLDB)-structure and function. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **32**(1): 917-919.

### A Trial of Simple and Rapid Carbapenemase Big Five Gene Analysis Using LAMP Method

Yumiko FUNASHIMA<sup>\*1,\*2</sup>, Kazuyuki SUGAHARA<sup>\*3</sup>, Yuya HIRATA<sup>\*2</sup>, Kyohei KATO<sup>\*4</sup>, Kenichi SATO<sup>\*1,\*2</sup>, Yasuharu SASAKI<sup>\*5</sup>, Zenzo NAGASAWA<sup>\*1,\*2</sup>, and Tsukuru UMEMURA<sup>\*1,\*2,\*4</sup>

<sup>\*1</sup> Department of Medical Technology and Science, Faculty of Fukuoka Health Care, International University of Health and Welfare

<sup>\*2</sup> Department of Medical Laboratory Science, International University of Health and Welfare Graduate School.

<sup>\*3</sup> Sugahara Biotech Education & Research Institute, Inc.

<sup>\*4</sup> Department of Clinical Laboratory, Medical Kouhoukai Takagi Hospital

<sup>\*5</sup> Eiken Chemical Company, Ltd.

Reliable detection and typing of carbapenemase is important in the treatment of infectious diseases. In this study we newly designed LAMP primer based on the latest information, and established a detection method for Carbapenemase Big five gene. For DNA extraction from strains, alkaline boiling method and commercial kit were used. The reaction temperatures of the LAMP method was VIM: 65°C, NDM: 63°C, KPC: 65°C, OXA-48-like: 65°C, IMP: 61°C. And simultaneous LAMP method was at 63°C, for 60 min. It was possible to detect up to 10<sup>3</sup> copies/ml. The reactivity of LAMP using 36 strains verified by Multiplex-PCR was VIM (4/4: number of LAMP method positive strains/number of strains evaluated), NDM (2/2), KPC (4/4), OXA-48-like (4/4), IMP (17/17). The type of carbapenemase determined by the LAMP method were all consistent with multiplex PCR. All strains were detected within 30 min. In VIM, both VIM-1-like and VIM-2-like were able to detect. In this study, although the number and variation of the strains evaluated was limited, LAMP method was clinically useful as a simple and rapid carbapenemase detection method.

## 分離株を用いた LAMP 法 Carbapenemase *bla*<sub>IMP</sub> gene 検出法の評価

船島由美子<sup>1)、2)</sup>、平田雄哉<sup>2)</sup>、加藤匡平<sup>3)</sup>、花岩洋樹<sup>3)</sup>、成田妙子<sup>3)</sup>、真藤和弘<sup>3)</sup>、  
佐藤謙一<sup>1)、2)</sup>、菅原和行<sup>4)</sup>、宮本比呂志<sup>5)</sup>、梅村創<sup>1)、2)、3)</sup>、永沢善三<sup>1)、2)</sup>

- 1) 国際医療福祉大学 福岡保健医療学部 医学検査学科
- 2) 国際医療福祉大学大学院 保健医療学専攻 臨床検査学分野
- 3) 医療法人社団 高邦会 高木病院 検査技術部
- 4) (株) 菅原バイオテック教育研究所
- 5) 佐賀大学医学部病因病態科学講座微生物学分野

【背景・目的】近年、多くの医療機関で多剤耐性菌感染症が問題となり、中でもカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE)である *bla*<sub>IMP</sub> gene 保有は我国での検出数も多く、その鑑別は重要である。*bla*<sub>IMP</sub> は現在、約 70 近くの variant が報告され、その多様な遺伝子配列のため primer site の塩基変異は遺伝子検出法に大きく影響する。今回、われわれは LAMP 法 primer を独自に設計・確立し、既存法と比較評価したので報告する。

【対象・方法】当大学関連施設および近隣施設よりカルバペネム系抗菌薬耐性腸内細菌科細菌 (CRE)の分与株を用いた。*bla*<sub>IMP</sub> gene の有無は Trung et al. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials (2015) 14:23 の ESBL-Carbapenemase Multiplex-PCR、シカジーニクス® カルバペネマーゼ遺伝子型検出キットおよびクイック チェイサー®IMP を用いた。LAMP 法は、PrimerExplorer V5 により Primer をデザインし、Loopamp EXIA を使用し測定を行った。

【結果】今回、確立した LAMP 法は、反応温度 61°C が最適であった。検出感度は、template 量からの推定値、 $2 \times 10^3$  CFU/mL 相当量迄 30 分以内で検出可能であった。供試 32 株中、Trung et al.による Multiplex-PCR で IMP が検出された 23 株とは全て一致した。また、カルバペネマーゼ遺伝子型検出キットで IMP が検出された 17 株は全て陽性であった。

【考察】今回の供試菌株は、variant の多様性が乏しく限定的であったことが想定される。しかし、今後は国際交流の激化などに伴い多様な variant の出現が想定されるため早期対応が望まれる。今回、開発した LAMP 法は、簡易かつ迅速な IMP 検出法として有用であった。

【背景・目的】近年、多くの医療機関で多剤耐性菌感染症が問題となり、中でもカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE)である *bla*<sub>IMP</sub> gene 保有は我国での検出数も多く、その鑑別は重要である。*bla*<sub>IMP</sub> は現在、約 70 近くの variant が報告され、その多様な遺伝子配列のため primer site の塩基変異は遺伝子検出法に大きく影響する。今回、われわれは LAMP 法 primer を独自に設計・確立し、既存法と比較評価したので報告する。

【対象・方法】当大学関連施設および近隣施設よりカルバペネム系抗菌薬耐性腸内細菌科細菌 (CRE)の分与株を用いた。*bla*<sub>IMP</sub> gene の有無は Trung et al. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials (2015) 14:23 の Multiplex-PCR、シカジーニクス® カルバペネマーゼ遺伝子型検出キットを用いた。LAMP 法は、PrimerExplorer V5 により Primer をデザインし、測定を行った。

【結果】今回、確立した LAMP 法は、反応温度 61°C が最適であった。検出感度は、template 量からの推定値、 $2 \times 10^3$  CFU/mL 相当量迄 30 分以内で検出可能であった。供試 32 株中、Trung et al.による Multiplex-PCR で IMP が検出された 23 株とは全て一致した。また、カルバペネマーゼ遺伝子型検出キットで IMP が検出された 17 株は全て陽性であった。

【考察】今回の供試菌株は、variant の多様性が乏しく限定的であったことが想定される。しかし、今後は国際交流の激化などに伴い多様な variant の出現が想定されるため早期対応が望まれる。今回、開発した LAMP 法は、簡易かつ迅速な IMP 検出法として有用であった。