

国際医療福祉大学審査学位論文（博士）

平成三十年度大学院医療福祉学研究科博士課程・論文要旨

題目：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

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

キーワード：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、LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法

【研究の背景と目的】

近年、多くの医療機関でカルバペネム系抗菌薬に耐性を示す腸内細菌科細菌 (Carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* : CRE) が問題となっている。CRE の検出には薬剤感受性試験において MEPM (2 μ g/mL 以上) あるいは IPM (2 μ g/mL 以上) かつ CMZ (64 μ g/mL 以上) の基準を満たす腸内細菌科細菌が対象となるが、この CRE のなかにはカルバペネマーゼを産生する耐性菌 (CPE) や細胞膜透過性の低下あるいは薬剤排出ポンプの作用による耐性菌なども含まれる。今回、ヒトへの伝搬性が危惧される CRE なかで、約 8 割を占める加水分解タイプの CPE を対象に検討を実施した。CPE は主にプラスミドにカルバペネマーゼを産生する耐性遺伝子を保有している。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。そこで、これらのカルバペネマーゼ産生遺伝子 (5 タイプ) に注目し、LAMP 法でのプライマー開発を研究テーマに、迅速・簡易な測定法にてカルバペネマーゼ産生遺伝子の検出法の確立を目的とした。

【方法】

当大学関連施設および近隣の協力施設にて CRE と判定された臨床分離株と各カルバペネマーゼ活性を保有する National Collection of Type Cultures (NCTC) 株を用いた。

1.1. Multiplex -PCR

Trung et al.¹⁾の報告による 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 (関東化学株式会社) による Multiplex -PCR を実施した。

1.2. 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、 β -ラクタマーゼデータベースより DNA シークエンスデータを集積し、マルチプルアライメント処理を

行ない、その結果を PrimerEXplorer V5 を用いて LAMP 法プライマーを設計した。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。

【倫理上の配慮】

ヒトおよび環境から分離された細菌の菌株を対象とした研究のため該当しない。

【結果】

1.LAMP 法における反応温度に伴う濁度閾値時間の比較

設計した LAMP プライマーを用いて、反応温度を 58,61,63,65,67℃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結果、VIM,KPC,OXA-48-like は 65℃、NDM は 63℃、IMP は 61℃での反応が最も促進性が高かった。

2. LAMP 法における抽出原液の×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 2×10^9 CFU/mL の抽出原液を 2×10^9 コピー相当とみなし TE 液で×1/10 倍段階希釈し 2×10^2 まで作製し測定した。結果は、NDM, OXA, IMP は 2×10^3 コピーまで、KPC は 2×10^2 コピーまで、VIM は 2×10^4 コピーまで陽性反応を示した。

3.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

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を比較した結果すべて一致した。

【考察】

今回設計したプライマーを用いた LAMP 反応の最速温度は、VIM は 65℃、NDM は 63℃、KPC は 65℃、OXA-48-like は 65℃、IMP は 61℃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することが望ましいがカルバペネマーゼ産生遺伝子 (5 タイプ) を同時に分析する場合は、63℃が最も至適温度と考える。

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 2×10^3 コピー相当まで検出できた。臨床材料を直接分析する場合は追加検討が必要といえる。

今回の検討に用いた 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。

【結語】

今回、開発した LAMP プライマーは簡易かつ迅速なカルバペネマーゼ産生遺伝子 (5 タイプ) 検出法として有用であった。しかし、検討に用いた菌株はバリエーションの多様性が乏しく限定的であり、国際的交流の激化などに伴い多様なバリエーションの出現が想定されるため、カルバペネマーゼ産生遺伝子 (5 タイプ) の網羅的な検査法の確立が早急に望まれる。

【引用文献】

1) 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