

令和 4 年 4 月 12 日現在

機関番号：13901  
 研究種目：若手研究  
 研究期間：2019～2021  
 課題番号：19K16444  
 研究課題名(和文)非結核性抗酸菌に対する等温増幅法を用いたクラリスロマイシン耐性遺伝子検出法の開発

研究課題名(英文)Evaluation of a rapid detection method of clarithromycin resistance genes in *Mycobacterium avium* using the Amplification Refractory Mutation System-Loop-Mediated Isothermal Amplification method

研究代表者  
 稲垣 孝行 (Inagaki, Takayuki)  
 名古屋大学・医学部附属病院・薬剤師

研究者番号：90835406  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：*Mycobacterium avium*感染症の治療のキードラッグであるクラリスロマイシン(CAM)耐性化は、23SrRNAの点変異と報告がある。本研究では、遺伝子変異検出法のARMS法と等温遺伝子増幅法のLAMP法を応用し、CAM耐性を判定する方法を開発した。*M. avium* 104基準株よりプライマーを設計し、*M. avium* 臨床分離株30株を用いてARMS-LAMPを実施した。その結果、感度・特異度が高く、数時間で判定可能であった。一方、シーケンス解析との差異は、変異型同士の混合株や非特異的な反応が考えられる。開発したARMS-LAMP法は、臨床上有益な検査法である可能性を明らかにした。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の感染症検査は、大型機器を用いて感染症を迅速に診断する技術の研究開発が主流となっている。しかしこれらの大型機器は、初期費用が高額なため、一般病院や開業医院などに普及することは困難である。一方でARMS-LAMP法は、専用の大型機器等の必要がなく、比較的安価に導入しやすい特長がある。また、LAMP法プライマー設計支援ソフトは、無償で提供されており、誰でも比較的容易にプライマー設計が可能である。ARMS-LAMP法を各種の感染症に対する迅速診断技術に応用し、新たな検査法として臨床に貢献する上で、本研究課題により得られた研究成果が重要な情報となり、学術的・社会的意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：Clarithromycin resistance, a key drug in the treatment of *Mycobacterium avium* diseases, has been reported to be caused by point mutations in 23SrRNA. In this study, we adapted a rapid detection method using the ARMS-LAMP to identify a mutation in the 23S rRNA gene in *M. avium* isolates. Primers for ARMS-LAMP were designed using PrimerExplorerV5 software based on the nucleotide sequence data for 23S rRNA in *M. avium* strain 104, and ARMS-LAMP was performed using 30 clinical *M. avium* isolates. As a result, the ARMS-LAMP method has high sensitivity and specificity, and could be determined in a few hours. On the other hand, this discrepancy between ARMS-LAMP and sequence analysis might be due to non-specific binding or the presence of mixtures of drug-susceptible and -resistant subpopulations in various proportions. The developed ARMS-LAMP method was found to have the potential to be a clinically beneficial examination method.

研究分野：医療薬学

キーワード：クラリスロマイシン *Mycobacterium avium* 薬剤耐性遺伝子 23SrRNA ARMS法 LAMP法 肺MAC症 非結核性抗酸菌

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

非結核性抗酸菌が引き起こす肺 *Mycobacterium avium* complex(MAC)症は、結核に比べて確実に有効な治療薬がなく、呼吸不全に至り死亡する症例もある難治性感染症である。また近年日本では、非結核性抗酸菌症の罹患率が急増し、結核の罹患率を既に上回っている現状である。肺 MAC 症の治療に関しては、クラリスロマイシン(CAM)を中心とした多剤併用療法が有効とされており、CAM の耐性化が臨床的な悪化を予測する重要な予後因子となっている。そのため、迅速かつ簡便に CAM に対する薬剤耐性の有無を検出する方法が臨床上重要な課題として求められている。

MAC 症における薬剤感受性試験については、結核の治療と異なり薬剤感受性試験の有用性が低いため、CAM などの一部の抗菌薬のみ薬剤感受性試験の結果を考慮すべきとされている。しかし、薬剤感受性試験では、発育が遅いことから検体提出から判定結果が出るまで長時間を要してしまうこと、正確な感受性判定に一定の熟練が必要であることなどの問題点が挙げられる。*M. avium* における CAM 耐性菌の場合、マクロライド結合部位の 23S rRNA におけるドメイン 領域にあるペプチジルトランスフェラーゼ活性中心の 2058 と 2059 番目のどちらかのアデニンに点変異が起きていると報告がある。申請者らのこれまでの調査で、薬剤感受性試験と薬剤耐性遺伝子の変異との相関性を明らかにしている (Inagaki et al., J. Antimicrob. Chemother., 66, 722-729, 2011)。

次に、申請者らは、遺伝子変異の検出法の一つである Amplification refractory mutation system (ARMS) -Polymerase chain reaction (PCR) 法を応用して、CAM 耐性遺伝子迅速検出法を開発した(Inagaki et al., J. Antimicrob. Chemother., 66, 722-729, 2011)。開発した ARMS-PCR 法を用いた CLR 耐性遺伝子検出法は、通常 2 週間以上かかる従来の薬剤感受性試験に比べて、約 1 日で薬剤耐性の有無の判定が可能となった。ARMS-PCR 法とは、プライマー部位にミスマッチがあることで、変異部位との合計 2 箇所のミスマッチによりプライマーのアニーリングができなくなる方法である。一方で、新たな問題点として ARMS-PCR 法は、通常の PCR 法と同様に操作するため、熟練した技術や特殊な設備が必要である。

### 2. 研究の目的

上記のような背景から、申請者らは、等温遺伝子増幅法の 1 つである Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法に着目した。LAMP 法とは、標的遺伝子の配列から 6 つの領域を選んで組み合わせた 4 種類のプライマーと鎖置換型 DNA 合成酵素を用いて、一定温度で反応させる遺伝子増幅法である。そのため、以下のことが LAMP 法の特徴として挙げられる。1) 6 つの領域を含む 4 種類のプライマーを設定するため、PCR 法に比べて標的遺伝子配列を特異的に増幅できる。2) 一定の温度で増幅するため、PCR 法で用いられるサーマルサイクラーなどの高額な装置や器具を必要としない。3) この方法は増幅効率が高いため、微量の DNA でも検出が可能であり、短時間で増幅可能である。4) また、この方法は目視での検出が可能のため、アガロースゲルを用いた電気泳動を必要としない。

本研究では、遺伝子変異検出法である ARMS 法及び等温遺伝子増幅法である LAMP 法を応用し、特殊な機器が一切必要なく、簡便に迅速に CAM 耐性の有無を判定する ARMS-LAMP 法を開発し、臨床分離株を用いて、有用性を検討することを目的としている。

### 3. 研究の方法

#### (1) 薬剤感受性試験

独立行政法人国立病院機構東名古屋病院から分与された肺 MAC 症患者由来 *M. avium* 臨床分離株 30 株について、液体培地マイコプロスをを用いて培養した後、プロスミック NTM を用いて国際標準法に準拠する薬剤感受性試験を実施した。方法はマニュアルに従った。

#### (2) CAM の薬剤耐性に関与する遺伝子領域 (23S rRNA) における DNA シーケンス解析

薬剤感受性試験にて CAM 耐性・感受性と判定された株を bacteria genomic Prep Mini Spin Kit を用いて DNA の抽出を行った。PCR は、Jamal らの方法 (Jamal et al., Tuberc. Lung. Dis., 80, 1-4, 2000) に従った。得られた PCR 産物について、23S rRNA における DNA シーケンス解析を試みた。

#### (3) ARMS-LAMP に用いるプライマーの設計

全ゲノム解析を既に完了している *M. avium* 基準株における 23S rRNA に対するデータより、LAMP 法プライマー設計支援ソフト「PrimerExplorerV5」を用いて、マニュアルに従って、最も至適条件の高い野生型 (CAM 感受性菌株) 検出用プライマーセット (以下、WTPS)、ならびに変異型 (CAM 耐性菌株) 検出用プライマーセット (以下 MTPS) を設計した。

#### (4) *M. avium* 臨床分離株に対する ARMS-LAMP 法を用いた解析

*M. avium* 臨床分離株を培養後に抽出した DNA を用いて、設計した WTPS および MTPS と LoopampDNA 増幅試薬キットを使用して ARMS-LAMP 法を実施した。リアルタイム濁度測定装置 (LoopampEXIA) を用いて 63 °C で 60 分間の LAMP 反応を測定した。

( 5 ) ARMS-LAMP 法におけるループプライマー (LP) を用いた増幅時間の短縮の検討

LAMP 法にて使用するプライマーセットに LP を追加した場合、増幅時間 30 分以内に短縮することができる。PrimerExplorerV5 により LP を設計し、WTPS および MTPS に LP を追加して ARMS-LAMP 法を実施した。LAMP 反応には、LoopampEXIA を用いて測定し、増幅時間の短縮の可能性について検証した。

( 6 ) ARMS-LAMP 法における蛍光強度による目視検出の検討

本研究は、一般病院・開業医院での実用化を目指しており、LAMP 法に専用の機器を使用せず、紫外線照射装置 (UV ランプ) を用いて目視による検出について調べた。Loopamp 蛍光・目視検出試薬を追加して ARMS-LAMP 法を実施し、蛍光強度による目視検出の可能性について検証した。

( 7 ) 統計学的解析

ARMS-LAMP 法の検出結果については、薬剤感受性試験の結果と比較して、感度〔 = 真陽性 / ( 真陽性 + 偽陰性 ) 〕および特異度〔 = 真陰性 / ( 真陰性 + 偽陽性 ) 〕を計算し評価した。また、シーケンス解析結果との一致率を計算し評価した。

4 . 研究成果

( 1 ) 薬剤感受性試験

臨床分離株 30 株を対象に CAM に対する薬剤感受性試験の結果、肺 MAC 症由来 *Mycobacterium avium* 臨床分離株 21 株が耐性であった。残りの肺 MAC 症由来 *Mycobacterium avium* 臨床分離株 9 株は感受性であった。

( 2 ) CAM の薬剤耐性に関与する遺伝子領域 (23S rRNA) における DNA シーケンス解析

薬剤感受性検査において感受性と判定された 9 株、耐性と判定された 21 株について、23S rRNA ドメイン 領域の DNA シーケンス解析を行なった。感受性 9 株はすべて野生型であった。一方、耐性であった株では 21 株のうち、1 株が野生型であり、残 20 株が変異型であった。変異型 20 株のうち 14 株が 2058 番目に変異を起こしており、6 株が 2059 番目に変異を起こしていた。内訳は、A2058G 変異型 5 株、A2058C 変異型 3 株、A2058T 変異型 6 株、A2059G 変異型 2 株で、A2059C 変異型 4 株であった。

( 3 ) *M. avium* 臨床分離株に対する ARMS-LAMP 法を用いた解析

*M. avium* 検体における ARMS-LAMP 法の結果を図 1 に示す。全ての検体で対応するプライマーセットに LAMP 反応が認められた。一方で、A2058C 変異型においては、3 株中 1 株で GA-MTPS に、同じく 3 株中 1 株で WTPS の LAMP 反応が認められた。同様に、A2059C 変異型 4 株中 1 株で、CA-WTPS の LAMP 反応が認められた。これらのシーケンス解析結果の差異について、一部の検体で感受性株と変異株の混在型や変異型同士の混合株の可能性が示唆される。次に A2058T 変異型に関しては、すべての検体で WTPS の LAMP 反応が認められており、非特異的な反応の可能性が示唆される。

Strain	Total number	MIC (µg/mL)	Genotype	ARMS-LAMP					
				WTPS	GA-MTPS	CA-MTPS	TA-MTPS	AG-MTPS	AC-MTPS
Reference strain									
<i>Mycobacterium avium</i> 104	1	0.25	AA	+	-	-	-	-	-
GTC603(ATCC25291)	1	0.25	AA	+	-	-	-	-	-
Clinical isolates									
CLR-susceptible strains	9	< 8	AA	+	-	-	-	-	-
CLR-resistant strains	1	>32	AA	+	-	-	-	-	-
	5	>32	GA	-	+	-	-	-	-
	1	>32	CA	-	-	+	-	-	-
	1	>32	CA	-	+	+	-	-	-
	1	>32	CA	+	-	+	-	-	-
	6	>32	TA	+	-	-	+	-	-
	2	>32	AG	-	-	-	-	+	-
3	>32	AC	-	-	-	-	-	+	
1	>32	AC	-	-	+	-	-	+	

図 1

( 4 ) ARMS-LAMP 法における LP を用いた増幅時間の短縮の検討

*M. avium* 基準株 2 株および検討に使用した肺 *M. avium* 症患者由来株 18 株の全ての検体で、耐性の有無に関わらず LAMP 反応が認められた。従って、ARMS-LAMP 法は LP を用いた増幅時間の短縮が困難であることが判明した。

( 5 ) ARMS-LAMP 法における蛍光強度による目視検出の検討

*M. avium* 基準株 2 株および検討に使用した肺 *M. avium* 症患者由来株 18 株の全ての検体で、耐性の有無に関わらず、全般的に区別しがたい発光現象が確認された。一方で、蛍光目視検出試薬を追加せずに ARMS-LAMP 法を実施した後に、蛍光灯下で目視による直接検出を *M. avium* 基準株 2 株および検討に使用した肺 *M. avium* 症患者由来株 18 株を用いて検証した結果、専用の検出機器における濁度の測定結果に相関して LAMP 反応液の白濁を目視で確認することが可能であった。

( 6 ) 統計学的解析

薬剤感受性試験と ARMS-LAMP を比較した結果、感度 61.9% (13/21)、特異度は 100% (9/9) であった。仮に混在型を耐性とカウントすれば、感度 95.2% (20/21)、特異度 100% (9/9) であった。シーケンス解析と ARMS-LAMP を比較した結果、シーケンス解析との一致率 76.7% (23/30) であった。

これまで、培養後に抽出した DNA を用いて *M. avium* 臨床分離株に対する CAM 耐性の有無を判定する ARMS-LAMP 法の開発を行ってきた。その結果、開発した ARMS-LAMP 法は、全ての検体で対応するプライマーセットに反応を示し、高感度・高特異度で薬剤耐性の判定が可能であった。一方で、薬剤感受性試験やシーケンス解析との差異は、感受性株と変異株の混在型や変異型同士の混合株、非特異的な反応などの可能性が示唆された。また、現時点で野生型のみを検出するプライマーセットを設計するまでには至らなかった。さらに、LP を用いた LAMP 反応時間の短縮は困難であったが、蛍光灯下で LAMP 反応液の白濁を目視で確認することは可能であった。以上の結果から、ARMS-LAMP 法は、感度・特異度が高く、*M. avium* に対する CAM 薬剤耐性の判定が数時間で可能な検査法であることが示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 稲垣孝行, 打矢恵一, 旭将来, 八木哲也, 中川拓, 小川賢二
2. 発表標題 ARMS-LAMP法を用いたMycobacterium aviumのクラリスロマイシン耐性遺伝子迅速検出法の開発と評価
3. 学会等名 第96回日本結核・非結核性抗酸菌症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Inagaki T, Asahi S, Ogawa K, Nakagawa T, Nikai T, Yamada K, Yagi T, Uchiya K
2. 発表標題 Evaluation of a rapid detection method of clarithromycin resistance genes in Mycobacterium avium using the Amplification Refractory Mutation System-Loop-Mediated Isothermal Amplification method
3. 学会等名 IDweek 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲垣孝行, 高橋弘泰, 山田清文, 八木哲也
2. 発表標題 第14回日本化学療法学会 支部奨励賞 臨床部門 受賞講演「ヒト-ヒト感染が疑われる肺Mycobacterium abscessus complex症の小児症例」
3. 学会等名 第 68 回日本化学療法学会西日本支部総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲垣孝行
2. 発表標題 高齢者に多い感染症 ～結核・非結核性抗酸菌症の現状と治療、空気感染対策について～
3. 学会等名 第3回日本老年薬学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲垣孝行, 高橋弘泰, 山田清文, 八木哲也
2. 発表標題 ヒト-ヒト感染が疑われる肺Mycobacterium abscessus complex症の小児症例
3. 学会等名 第67 回日本化学療法学会西日本支部総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関