

令和 4 年 5 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17923

研究課題名（和文）尿中薬剤耐性菌の迅速遺伝子検査法の開発と検証

研究課題名（英文）Development and evaluation of rapid molecular diagnostic test for drug-resistant bacteria in urine samples

研究代表者

松村 康史（Matsumura, Yasufumi）

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：80726828

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：ESBL産生菌と呼ばれる薬剤耐性菌の蔓延により、尿路感染症の主要な原因菌に対する主要な治療薬である第3世代セファロスポリンの効果が見込めなくなっている。しかし、これら耐性菌感染症の迅速診断法が存在しない。本研究では、臨床現場で簡便に安価で実施可能かつ高精度な尿中ESBL産生菌の迅速遺伝子検査法を開発した。実際の尿272検体を用いた検討で感度96%、特異度100%と高精度であることが証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本検査法の臨床での使用により、迅速・高精度・簡便・安価に検査室や臨床現場において、1時間以内に薬剤耐性菌感染症の有無の判定が可能となる。これにより、尿路感染症の治療において、薬剤耐性菌に対する早期の適切な治療と感受性菌であった場合双方において適切な抗菌薬選択が可能となり、患者の疾患治療成績の向上および、抗菌薬適正使用を通じた薬剤耐性菌の抑制に貢献できる見込みである。

研究成果の概要（英文）：Appropriate empiric antimicrobial treatment for urinary tract infections is challenging in the era of ESBL-producing Enterobacterales that exhibit multidrug-resistance including key treatment drugs of third-generation cephalosporins. However, appropriate rapid diagnostic tests are not available for clinical use. In this study, we developed a direct molecular testing method for rapid detection of ESBL-producing Enterobacterales from urine. A total of 272 clinical urine specimens were used for validation of the test. The test had a sensitivity of 96% and a specificity of 100%, indicating validity and reliability of the developed test.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：薬剤耐性菌 迅速診断

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

尿路感染症は、市中・医療関連感染症の双方において最も頻度が高い感染巣の一つで、年間1億5千万人が罹患している(Stamm et al, J Infect Dis. 2001)。尿路感染症の中でも急性腎盂腎炎は重症の病態で、敗血症から死亡に至ることもある。原因菌の約90%は腸内細菌科細菌であり、うち約90%は大腸菌である(Czaja et al. Clin Infect Dis. 2007)。治療薬としては、外来ではレボフロキサシンなどの fluoroquinolone (FQ)系の内服、入院では第3世代セファロスポリン(3rd generation cephalosporin, 以後3GC)の点滴治療が第一選択となっている (JAID/JSC 感染症治療ガイド2015など)。しかし、大腸菌の薬剤耐性率は2000年以降急増しており、FQと3GCの耐性率はそれぞれ42%、28%にも達している(2017年全国平均、JANIS サーベイランス)。

3GC耐性の殆どは、ESBL (Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase)および pAmpC (plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase)と呼ばれる広域セファロスポリン分解酵素の産生が原因である。応募者の検討では、3GC耐性大腸菌のうち83%がESBL(うち96%がCTX-M型)、15%がpAmpC(CMY-2, DHA-1型)遺伝子を有していた(Matsumura et al. Diagn Microbiol Infect Dis. 2016)。

尿路感染症の原因菌と薬剤感受性決定には迅速検査法が存在しないため、培養法を行う必要があるが、通常2~3日を要する。しかし、以下の点から初期の適切な抗菌薬投与選択が困難な状況となっている。(1)FQ, 3GC耐性菌は健常人にも拡散しており、患者リスク因子等からのFQ・3GC耐性の事前予測は困難である。(2)カルバペネムを盲目的に全例投与することは避ける必要がある。他の耐性菌を選択する可能性が高いばかりでなく、治療が困難なカルバペネム耐性菌もすでに出現しており、抗菌薬適正使用の観点から、不要な患者への使用は許容されない。適切な治療の遅れは予後の悪化につながることから、早期の感受性抗菌薬投与と、広域抗菌薬使用の抑制を両立するために迅速診断法が必要とされている。

### 2. 研究の目的

研究1. 尿中のFQ耐性因子・3GC耐性因子(ESBL遺伝子)を検出する迅速・高精度・簡便・安価な遺伝子検査法の開発

研究2. 臨床検体を用いた前向き検討により、上記検査法の精度と臨床的有用性の評価

### 3. 研究の方法

研究1. 尿中のFQ耐性大腸菌および3GC耐性因子遺伝子検査法の開発

#### 1.1. LAMP法プライマーの設計と基礎実験

大腸菌にFQ耐性を付与する gyrA SNPs (C248T+G259A)、ESBLについてはCTX-M型遺伝子(1, 2, 9グループの計3種)、pAmpCについてはCMY-2・DHA-1遺伝子に対するプライマーを設計した。反応時間を短くするためループプライマーも設計する。陽性・陰性コントロール菌株を用い反応を行い、FQ耐性・ESBL・pAmpC検出が各1反応で可能なプライマー混合比の調整を試みた。リアルタイム濁度計を用い反応の経時的モニタリングを行い、反応条件を最適化した。

#### 1.2. 模擬検体を用いた検証

尿とコントロール菌株を混合した模擬検体60 $\mu$ lから、PURE法を用いDNA抽出を行った。抽出されたDNAを用いて実際にLAMP反応を行い、十分な検出感度(10<sup>3</sup>CFU/mL以上)を担保できる抽出・反応条件を検討した。抽出・反応系が確定した後、プライマーを常温保存可能な乾燥状態、増幅の有無の判定を目視検出とし、検査法全体の最終確認を行った。

研究2. 臨床検体を用いた検査精度と臨床的有用性の評価

対象 2020年から2021年の間に、京都大学医学附属病院検査部において、尿の塗抹検査にて白血球・グラム陰性桿菌が陽性となった臨床検体の残余検体を対象とした。

方法 ルーチン業務(培養同定法)に用いた後の検体を用いて、同日中に本検査法を行った。培養法で得られた分離菌株を用いて、薬剤感受性と全ゲノム解析による遺伝子検査を行い、ESBL遺伝子検出に対する本検査法の感度・特異度等を求めた。臨床研究実施前に倫理委員会の承認を受

けた。

#### 4. 研究成果

研究1. LAMP法プライマーの新規設計と基礎実験を行い、フルオロキノロン耐性と関連する遺伝子変異 (*gyrA*)、第3世代セファロスポリン耐性と関連する耐性遺伝子群 (ESBL set: CTX-M-1 グループ, CTX-M-2 グループ, CTX-M-9 グループ; pAmpC set: CMY-2 および DHA-1 遺伝子) を検出する LAMP 法の実施手順を確立した。次に、尿とコントロール用菌株を混合した模擬検体 (n=2) を用いて、プライマー配合比や反応温度等の条件の調整を行った。その結果、PURE 法を用いた DNA 抽出法を組み合わせることで (図1) 60分以内に 60 μl の尿検体から 10<sup>4</sup> CFU/mL 以上の菌量において、CTX-1, -2, -9 遺伝子または CMY-2, DHA-1 遺伝子を 100% 検出でき、また陰性検体が陰性と判定できることを確認した。*gyrA* については、検出限界が 10<sup>6</sup> であり実用化が困難であった。

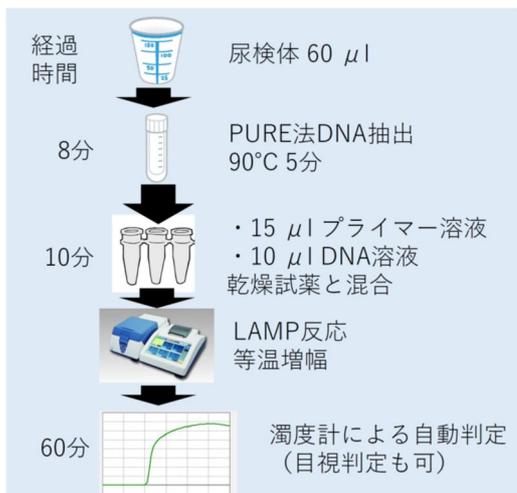


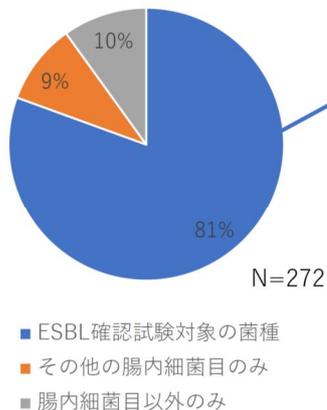
図1 迅速遺伝子検査法のフロー

#### 研究2. 臨床検体を用いた検査精度と臨床的有用性の評価

新型コロナウイルス感染症の影響により臨床検体を用いての検討が難しくなり、当初の計画よりも遅れ、検体数も少なくなったものの、272 検体の検討を行った。なお、臨床的検討はより重要性が高いと考えられる ESBL set のみについて行った。検体の内訳は、58%が入院患者、72%が中間尿であった (図2)。

図2 臨床検体の特徴

培養法の結果、ESBL 確認試験の対象となる菌種 (PEK) が 219 検体 (80%)、それ以外の腸内細菌目細菌が 26 検体、腸内細菌目以外のグラム陰性桿菌は 27 検体から検出があった。219 検体から 221 株の PEK が分離され、うち 48 検体からの 49 株で ESBL 産生菌が陽性となった (図3)。



菌種	検体数	うちESBL産生あり
ESBL確認試験対象の菌種	219 (80.5%)	48 (17.6%)
<i>Escherichia coli</i> <sup>a,b</sup>	161 (59.2%)	44 (27.3%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> <sup>a,b</sup>	33 (12.1%)	5 (17.2%)
<i>Klebsiella oxytoca</i> <sup>b</sup>	19 (7.0%)	0
<i>Proteus mirabilis</i>	8 (2.9%)	0

<sup>a</sup> 2検体で *E. coli*+*K. pneumoniae*が同時検出

<sup>b</sup> 5検体で下記の菌種とその他のGNRが同時検出

*K. pneumoniae* (n=2), *K. oxytoca* (n=2), *E. coli* (n=1)

- ESBL確認試験対象の菌種
- その他の腸内細菌目のみ
- 腸内細菌目以外のみ

### 図3 培養法による ESBL 産生菌の検出状況

これら 221 株の全ゲノム解析の結果、51 株（50 検体）から ESBL 遺伝子が検出された。培養法と全ゲノム解析結果を基準とした場合、本検査法は、感度 96%、特異度 100%、PPV 100%、NPV 99%と高精度であった（図3）。

検体中からのESBL産生菌検出（全ゲノム解析法）

検査結果	ESBL産生菌陰性	ESBL産生菌陽性	その他の腸内細菌目 非発酵菌のみ検出
直接LAMP法陰性	169	2 <sup>a</sup>	50
直接LAMP法陽性	0	48	3

Kappa(95%CI): 0.974 (0.938-1)      陰性一致率(95%CI): 100% (97.8-100)      陽性一致率(95%CI): 96% (92.6-100)

### 図3 迅速検査法の臨床性能

本検査法は十分な臨床診断精度を有していることから、ESBL 産生菌による尿路感染症の予測が可能となり、薬剤耐性菌対策に貢献できる見込みである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松村康史、篠原浩、土戸康弘、湯川理己、野口太郎、山本正樹、長尾美紀
2. 発表標題 LAMP法を用いた尿検体からのESBL産生菌迅速直接検出法の臨床性能評価
3. 学会等名 第96回日本感染症学会・学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------