

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：32206

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19698

研究課題名（和文）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

研究課題名（英文）Rapid detection method combining MALDI TOF MS and comprehensive drug resistance gene analysis of CPE

研究代表者

船島 由美子（Funashima, Yumiko）

国際医療福祉大学・福岡保健医療学部・講師

研究者番号：70752814

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：薬剤耐性菌の感染症治療ではカルバペネム抗菌薬に耐性を示すグラム陰性桿菌の世界的な蔓延が問題となっている。この耐性機構にはカルバペネマーゼの産生が大きく関与する。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カルバペネマーゼ主要5ファミリーを網羅的に遺伝子にて検出するLAMP法の開発に取り組んだ。その結果、bla IMP、bla KPC、bla VIM、bla NDM、bla OXA-48における多くの変異タイプに対応できるプライマーの設計に成功した。しかし、検証実験では残念ながら各変異タイプの菌株すべてを保有していないため、限定的な変異タイプの検証となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CDCの予測では、世界的な死亡者数は悪性新生物を抜いて2050年度には薬剤耐性菌感染症が100万人に達すると報告している。特にカルバペネム抗菌薬に耐性を示すグラム陰性桿菌の蔓延が問題となっている。薬剤耐性菌の蔓延を予防する早期の検出が極めて重要となる。本研究ではLAMP法を基本原理とし、開発途上国でも高額な機器を使用せず、かつ可能な限り変異した遺伝子タイプでも網羅的に検出するシステムの開発を実施した。その結果、増幅反応にヒートブロックを応用することで特殊な測定機器を使用せずに、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主要5ファミリーを網羅的に遺伝子にて検出することに成功した。

研究成果の概要（英文）：The worldwide spread of gram-negative bacilli resistant to carbapenem antibacterial agents has become a problem in the treatment of infectious diseases of drug-resistant bacteria. The production of carbapenemase involve a major role in this resistance mechanism. In this study, we worked on the development of a LAMP method that comprehensively detects the five major families of carbapenemase that hydrolyze carbapenem antibacterial drugs, which are considered to be the "last key" in antibacterial drug treatment. As a result, we succeeded in designing primers that can handle many mutation types in bla IMP, bla KPC, bla VIM, bla NDM, and bla OXA-48. However, in the verification experiment, since all the strains of each mutation type were not possessed, the verification of the limited mutation type was performed.

研究分野：臨床微生物学、感染制御学、医動物学

キーワード：LAMP法 カルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌

1. 研究開始当初の背景

2016年G7伊勢志摩サミットで発表された「伊勢志摩首脳宣言」の保健分野では、薬剤耐性対策の強化が盛り込まれた。わが国が発表した薬剤耐性対策アクションプランには、成果指標として、2020年までに腸内細菌科細菌を中心に薬剤耐性率の低減が求められている。薬剤耐性菌を低下させるためには、細菌が保有する薬剤耐性遺伝子を網羅的に検出し、同タイプの遺伝子型が蔓延しているか否かの正確かつ簡易な調査が必須である。現在、先進国ではPCR法による薬剤耐性菌遺伝子の検出が広く実施されているが、残念ながら開発途上国ではPCR法に関連する医療機器が高額なため普及に至っていない。先進国においても薬剤耐性菌遺伝子を検出し、ICT（Infection Control Team）が感染制御に努めても、薬剤耐性菌制御対策が乏しい開発途上国からヒトおよび食品の流入が継続・増加する現状ではグローバルな薬剤耐性菌対策は不十分と言える。そこで、65℃付近の一定温度で反応が進行するLAMP（Loop-Mediated Isothermal Amplification）法を応用し、高価な増幅機器を必要としない検出法を開発し、薬剤耐性菌遺伝子が網羅的に検出可能なシステムの構築を目指した。

薬剤耐性菌遺伝子の検出法として、CDC（Centers for Disease Control and Prevention）が、Urgent Threats（緊急）の対象としているCPE（Carbapenemase-producing *Enterobacteriales*）について薬剤耐性遺伝子の網羅的検出技術を開発する。CPEはCRE（Carbapenem-resistant *Enterobacteriales*）に含まれるβ-ラクタマーゼ産生菌である。近年、米国ではカルバペネム薬耐性腸内細菌科細菌は10年前と比較すると4倍に増加し、さらにカルバペネム薬耐性 *Klebsiella* 属に限定すると7倍にまで増加している。また、CPEはグラム陰性桿菌であり、エンドトキシンを産生して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・予後の悪化が想定される。さらに有効な治療薬が乏しいため、半数近くが死亡している。そのため、CREは「悪夢の細菌」とも呼ばれている。

わが国の薬剤耐性菌検出状況をJANIS（厚生労働省 院内感染対策サーベイランス事業）の公開情報で見ると、腸内細菌科細菌で何らかの薬剤耐性機構を保有する菌が分離される割合が年々増加傾向にある。

2. 研究の目的

わが国が2016年に発表した薬剤耐性対策（AMR）アクションプランでは、2020年までに薬剤耐性菌として蔓延傾向にあるカルバペネム系耐性腸内細菌科細菌、特にCPEを中心とした薬剤耐性菌検出率の低減が途上国に求められた。薬剤耐性菌の蔓延を防止するためには、細菌が保有する薬剤耐性遺伝子を網羅的に検出することが必須と言える。現在、一部の医療施設ではPCR法での薬剤耐性遺伝子を市販のキット類で検査しているが、耐性遺伝子領域に変異が存在する場合には検出できないため、変異が存在しても検出できる網羅的なプライマーの開発が必要である。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るため、薬剤耐性菌の蔓延を防止する対策も重要となる。

そこで、本研究ではCDC（Centers for Disease Control and Prevention）がUrgent Threatsの対象としているCPEをターゲットに、開発途上国でも高額な機器を必要とせず、迅速で網羅的に薬剤耐性菌遺伝子をLoop-Mediated Isothermal Amplification（LAMP）法にて検出する検査技術の構築を目的としている。

すなわち、①薬剤耐性遺伝子領域の塩基配列を比較解析し、変異部分が存在しても増幅可能なプライマーの設計を実施する。②開発途上国での使用においては、高額な機器を必要としない策として薬剤耐性遺伝子の増幅にヒートブロック、検出には蛍光反応を利用した目視判定可能な簡易検査システムを構築する。さらに、③現状の薬剤感受性試験による表現型を用いた薬剤耐性菌鑑別をより迅速に実践するため、最先端の質量分析装置でのスペクトル波形と組み合わせた薬剤耐性遺伝子の網羅的な検出技術を開発する。

この網羅的な検出法を確立することで、先進国および開発途上国において幅広く本検査技術が使用できる最大のメリットが生じる。この検査技術の普及により、CPE を対象としたグローバルな感染制御の実施が可能となる。

3. 研究の方法

(1) 薬剤耐性遺伝子領域の塩基配列の比較解析、変異部分が存在しても増幅可能なプライマー設計

① Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)法のプライマー設計

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、 β -lactamase data base35 (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 シークエンスデータを集積した。PrimerEXplorer V5 (<https://primerexplorer.jp/lampv5/index.html>) を利用し、LAMP 法プライマーを設計した。

② 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 primer、B3 primer はそれぞれ 5 μ M、FIP primer、BIP primer は 40 μ M、LF primer、LB primer は 20 μ M とした。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® (栄研化学株式会社) を用い、反応温度 63°C、60 分間観察後、80°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。

(2) 高額な機器を必要としない薬剤耐性遺伝子の増幅にヒートブロックの利用

LAMP 法専用の機器として LoopampEXIA® を使用せずに薬剤耐性遺伝子の増幅にヒートブロックを用いて LAMP 法を実施した。ヒートブロックで 63°C60 分、80°C5 分間不活化処理を行い、反応チューブを目視判定した。検出感度については、サンプルとして IMP-1 人工合成 DNA を用い 5 \times 10⁸、10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10¹、10⁰ コピー/ μ L の希釈系列を調製し、検出感度の確認を行った。

(3) 質量分析装置でのスペクトル波形を組み合わせた薬剤耐性遺伝子の検出

MALDI-TOF 自動細菌同定検査装置である MALDI Biotyper® (Bruker, DEU) を用いて、カルバペナーゼ非産生腸内細菌科細菌 (non-CPE) 396 株、CPE 267 株 (NDM 54 株、IMP 168 株、OXA 18 株、GES 9 株、VIM 6 株、KPC 12 株) の計 663 株を測定した。測定結果より、MALDI Biotyper®内の flexAnalysis および ClinPro Tools 解析ソフトを利用して、non-CPE と CPE のスペクトル波形の解析を行った。

4. 研究成果

(1) LAMP 法プライマー設計

今回は、IMP、KPC、NDM、VIM、OXA-48-like (Carbapenemase Big five) における多くの

変異タイプにも対応できるプライマーを設計した。設計した LAMP 法のプライマー配列を表 1 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。

また、KPC、NDM、VIM、OXA-48-like については、残念ながら各変異タイプの菌株すべてを保有していないため、限定的な変異タイプの検証となったが、対象とした菌株の薬剤耐性遺伝子はすべて検出することができた。

表 1. Carbapenemase Big five LAMP 法プライマー配列

VIM (base sequence VIM-1)

label	5'pos	3'pos	len	Sequence (5' → 3')
F3	62	79	18	GTCCGTTAGCCCATTCCG
B3	266	283	18	GTGCCGCTGTGTTTTTCG
FIP			41	TATGCGACCAAACACCATCGGC-AGCCGAGTGGTGAGTATCC
BIP			41	CGTTTGATGGCGCGGTCTACC-ACCCACGCTGTATCAATCA
LF	123	144	22	CTGGTAAAGTCGGACCTCTCCG
LB	222	241	20	CCGTGATGGTGATGAGTTGC

NDM (base sequence NDM-3)

label	5'pos	3'pos	len	Sequence (5' → 3')
F3	562	579	18	GGCCACACCAGTGACAAT
B3	735	754	20	CGGAATGGCTCATCACGATC
FIP			39	TGCGGAGCGACTTGGCCTT-GCACCGACATCGCTTTTGG
BIP			39	GATGCCGACACTGAGCACTACG-ATGCTGGCCTTGGGGAA
LF	623	637	15	TGTCCTTGATCAGGC

KPC (base sequence KPC-2)

label	5'pos	3'pos	len	Sequence (5' → 3')
F3	82	99	18	CTCGTCGCGGAACCATTC
B3	311	330	20	TTTTCCGAGATGGGTGACC
FIP			42	CCTCAGCGCGTAACCTTACAGT-AACTCGAACAGGACTTTGGC
BIP			41	TCAAGGGCTTCTTGCTGCCG-CGCATTTTTGCCGTAACGG
LF	124	143	20	GCGTACACCCGATGGAGCC
LB	260	276	17	CCGGCTTGCTGGACACA

OXA-48-like (base sequence OXA-48)

label	5'pos	3'pos	len	Sequence (5' → 3')
F3	152	170	19	AGCAGCAAGGATTTACCAA
B3	341	362	22	GGCACAACCTGAATATTTATCG
FIP			41	TCCTTAACCACGCCAAATCG-CAAGCATTTTTACCCGCATC
BIP			45	CAAGTCTTTAAGTGGGATGGACA-ATTAGATTATGATCGCGATTCC
LF	220	240	21	GGCGATCAAGCTATTGGGAAT
LB	294	313	20	GACGCGGATATCGCCACTT

IMP (Group-1) (base sequence IMP-1)

label	5'pos	3'pos	len	Sequence (5' → 3')
F3	55	72	18	GCAGAGTCTTTGCCAGAT
B3	253	274	22	TGCTGCCTTTTATTTATAGCC
FIP			44	TGTTTAGGAACAACGCCCCAC-AAAATTGAAAAGCTTGATGAAGG
BIP			44	TGGTGGTCTTGTAATGCTGA-CCAAGTGACTAACTTTTCAGT
LF	112	134	23	CCGTTAACTTCTCAAACGAAGT
LB	187	211	25	TACCTAATTGACTCCATTACGG

(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°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。VIM は 65°C、NDM は 61 と 63°C 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°Cを LAMP 反応温度とした。

(3) 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(pH 8.0) で×1/10 倍段階希釈し 2×10^2 まで作製し測定した。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、陽性反応となった。また、全 family において 2×10^3 コピーまでの陽性反応は 35 分以内に検出された。

(4) ヒートブロックを利用し、目視判定を行った LAMP 法

DNA 増幅試薬 D (栄研化学株式会社) と RNA/DNA 増幅試薬 D (栄研化学株式会社) の 2 つの試薬を用い、LoopampEXIA®とヒートブロックによる増幅反応にて LAMP 法を実施した。その結果、すべての対象菌株は DNA 増幅試薬 D、RNA/DNA 増幅試薬 D とともに 5×10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 コピー/ μ L で陽性と判断された。目視判定では、RNA/DNA 増幅試薬 D を用いた方法では、どの希釈段階においても比較的容易に陽性と判断することができた。しかし、DNA 増幅試薬 D では、濁度を目視判定するため、 5×10^0 コピー/ μ L などの低濃度では判定に苦慮することがあった。

(5) 耐性機序による特異的波形の確認

non-CPE と CPE 計 663 株の腸内細菌科目細菌を MALDI Biotyper®の flexAnalysis および ClinPro Tools を用いて、特異波形ピークの比較解析を実施した結果、CPE の検出感度は 85.7%、non-CPE の特異度は 80%であった。MALDI Biotyper®の測定波形ピークで CPE と non-CPE を鑑別できれば簡易かつ迅速性に優れているが、現段階での感度、特異度の成績では臨床微生物学検査へ利用するには、更なる改善が必要と判断された。

考察

CDC の予測では、世界的な死亡者数は悪性新生物を抜いて 2050 年度には薬剤耐性菌感染症が 1000 万人に達すると報告している。特にカルバペネム抗菌薬に耐性を示すグラム陰性桿菌の蔓延が問題となっている。薬剤耐性菌の蔓延を予防する早期の検出が極めて重要となる。本研究では LAMP 法を基本原理とし、カルバペネム系抗菌薬を加水分解する Carbapenemase Big five を網羅的に遺伝子にて検出する LAMP 法の開発に取り組んだ。その結果、*bla* IMP、*bla* KPC、*bla* VIM、*bla* NDM、*bla* OXA-48 における多くの変異タイプに対応できるプライマーの設計に成功した。しかし、検証実験では残念ながら各変異タイプの菌株すべてを保有していないため、限定的な変異タイプのための検証となった。

また、開発途上国でも高額な機器を使用せず、かつ可能な限り変異した遺伝子タイプでも網羅的に検出するシステムの開発を実施した。その結果、増幅反応にヒートブロックを適用することで特殊な測定機器を使用せず、カルバペネム系抗菌薬を加水分解する Carbapenemase Big five を網羅的に遺伝子にて検出することができた。このことより、LAMP 法の試薬とヒートブロックを保有すれば、開発途上国でも CPE の検出は可能と推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 船島由美子、菅原和行、平田雄哉、加藤匡平、佐藤謙一、佐々木泰治、永沢善三、梅村創	4. 巻 28巻
2. 論文標題 LAMP法を用いた簡易・迅速なCarbapenemase Big Five Gene 分析の試み	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JARMAM	6. 最初と最後の頁 77-83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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 船島由美子、平田雄哉、加藤匡平、花岩洋樹、成田妙子、真藤和弘、佐藤謙一、菅原和行、宮本比呂志、梅村創、永沢善三
2. 発表標題 分離株を用いたLAMP法Carbapenemase blaIMPgene検出法の評価
3. 学会等名 第30回日本臨床微生物学会・学術集会
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
研究分担者	永沢 善三 (Nagasawa Zenzo) (80706820)	国際医療福祉大学・福岡保健医療学部・教授 (32206)	
研究分担者	佐藤 謙一 (Sato Kenichi) (90505687)	国際医療福祉大学・福岡保健医療学部・准教授 (32206)	

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
---------	---------