

LAMP法を用いたGuiana extended-spectrum (GES) 型 メタロβ-ラクタマーゼ遺伝子検出法の開発

Dong Wook Kim^{1), 2)}, 早川 智¹⁾, 関 みつ子^{1), 3)}

A loop-mediated isothermal amplification method detecting the Guiana extended-spectrum (GES) type β-lactamase gene

Dong Wook KIM^{1), 2)}, Satoshi HAYAKAWA¹⁾, Mitsuko SEKI^{1), 3)}

要旨

正確・簡便な遺伝子増幅法Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を用いて、昨今その流行が報告されているGuiana extended-spectrum (GES) 型メタロβ-ラクタマーゼ遺伝子 (*bla_{GES}*) を有する細菌感染例の検出法を開発した。さらに、同法を用いてカルバペネム分解能を有する *bla_{GES}* の同定も試みた。開発された方法は、海外において分離・収集されたサンプルを用いて評価し、その有用性を確認した。

1. はじめに

Guiana extended-spectrum (GES) 型 β-lactamase は2000年にフランス領ギアナではじめて報告されたclass A型の基質拡張型β-lactamaseで¹⁾、表1に示すように我が国でも分離が報告されている。GES型βラクタマーゼ遺伝子 (*bla_{GES}*) のうち、単一のミスセンス変異 (G493A) を有するものはカルバペネム分解能を有し、我が国でも問題になっている^{2,4)}。薬物耐性の迅速かつ確実な同定は臨床において重要であるが、標準的に用いられるのは培養法であり、様々なバリエーションの同定には直接シーケンス法による塩基配列決定が必要である。

Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法は日本で開発された、迅速、簡易、精確な遺伝子増幅法である⁵⁾。この方法ではサンプルと試薬を混合し、一定温度 (65°C付近) で反応が進み、検出までの工程を1ステップで行える。特別な試薬、機器を使用せず、コストの低減等、ベッドサイドや途上国において非常に有望な検出法で、日本のみならず国際的にも注目されている。我々はLAMP法による *bla_{GES}* およびカルバペネム分解能を有する *bla_{GES}* の迅速検出法を開発したので報告する。

表1 我が国のGES型多剤耐性菌による院内感染事例

GES-type (菌種)	発症年および事例	
GES-4 (肺炎桿菌)	2009-10	三次病棟院内感染 ²⁾
GES-5 (緑膿菌)	2013-4	慢性期病棟院内感染 ³⁾
GES-24 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	2016	一般病床 ⁴⁾

1) 日本大学医学部

2) College of Pharmacy, Hanyang University

3) 明海大学歯学部

早川 智 : hayakawa.satoshi@nihon-u.ac.jp

表2 臨床緑膿菌分離株を用いた評価

緑膿菌臨床分離株 no.	Origin of Isolate		Genotype	Meropenem	Assays		
	地域	Anatomical site			PCR	<i>bla</i> _{GES} -LAMP	Carba- <i>bla</i> _{GES} -LAMP
<i>bla</i> _{GES} -producing strains							
14831	南米	気道感染	<i>bla</i> _{GES} -1	(S)	(+)	(+)	(-)
14948	南米	腹腔内感染	<i>bla</i> _{GES} -5	(R)	(+)	(+)	(+)
13856	インド	unknown	<i>bla</i> _{GES} -7	(S)	(+)	(+)	(-)
13848	インド	unknown	<i>bla</i> _{GES} -9	(S)	(+)	(+)	(-)
13880	メキシコ	unknown	<i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{GES-19} , <i>bla</i> _{GES-20-like}	(R)	(+)	(+)	(+)
Nine other β-lactamase-producing strains					(-)	(-)	(-)

2. 対象及び方法

1) *bla*_{GES} のコンセンサス配列に対して LAMP プライマーの設計を行い, *bla*_{GES} を含む 8 つの β-lactamase 遺伝子を有する基準株を用いて, 設計されたプライマーの特異性を評価した。また, 検出限界は, 精製した DNA および DNA を添加した臨床サンプル (尿, 痰, および血液) を使用して評価した。さらに, 2003 年から 2012 年の間に世界中の様々な地理的環境から分離・収集され, 次世代シーケンサーによりその特徴が明らかにされた β-lactamase 遺伝子を有する臨床分離株計 14 株⁶⁾ を用い, LAMP 法の臨床的評価をおこなった。結果は従来法である PCR 法⁷⁾ と比較した。

2) *bla*_{GES} に単一のミスセンス変異 (G493A) を有するバリエーションを検出するため, PCR の変法である Amplification Refractory Mutation System (ARMS) を LAMP プライマーの設計に応用した⁵⁾。*bla*_{GES} (*bla*_{GES} -1, 5, 7, 9, 19/20) 産生菌 6 株, およびその他の β ラクタマーゼ産生菌 16 株を用いて評価した。

3. 結果

1) 表 2 および 3 に結果を示す。*bla*_{GES} の LAMP 検出法の特異性は良好で, 反応当たりの検出限界は DNA 10 コピーまでと PCR 法より 10 倍優れていた。臨床分離株を用いた評価でも *bla*_{GES} のみを正確に検出した。LAMP 法の感度は, 尿, 痰, および血液へ DNA を添加し, 鋳型として用いた場合でも, 精製した DNA と同様に *bla*_{GES} を検出した。PCR 法は血液サンプル中の *bla*_{GES} を検出できなかった。

2) *bla*_{GES} に単一のミスセンス変異 (G493A) を有するバリエーションの LAMP 検出法では, 最小 DNA 10⁴ コピーまでの検出が可能で, メロペネムに耐性を示

表3 PCRおよびLAMPアッセイの検出限界

	PCR	<i>bla</i> _{GES} -LAMP
Purified DNA	10 ² copies ^a	10
DNA Spiked specimens 尿 ^b	10 ²	10
喀痰 ^c	10 ²	10
血液 ^c	> 10 ⁵	10

^a Amount of DNA per reaction; ^b Supernatant data obtained after boiling and centrifugation; ^c Samples prepared via Loo-pamp™ PURE DNA extraction kit (Eiken Chemical Co.).

す *bla*_{GES} (*bla*_{GES}-5, 19/20) のみを検出したが, その他の β ラクタマーゼとの交差反応は示さなかった (表 2)。

4. 考察

本研究では, *bla*_{GES} を検出する新たな LAMP 検出法を開発した。*bla*_{GES} のうち複数のバリエーションはカルバペネム分解能を有し, また, β-ラクタマーゼ遺伝子は伝達性のプラスミドにより他の菌株や菌種に, 伝達, 拡散する。したがって, グラム陰性桿菌がこのタイプの β-ラクタマーゼを獲得すると, 致命的な院内感染症を引き起こす可能性がある。抗菌薬の適正使用のためには, 薬物感受性の迅速かつ確実な識別が必要である。

本研究で開発された *bla*_{GES} の LAMP 検出法は PCR 法と同等の高い特異性と PCR 法より 10 倍優れた検出限界を示した。DNA を添加した臨床サンプルを鋳型として用いた場合であっても, LAMP 反応は問題なく進行し, 精製された DNA を鋳型として用いた場合に匹敵する結果であった。対照的に, PCR 反応では, 血液採取の際に用いるヘパリンとタンパク質等による阻害が認められ, 検出不可能であった。

さらに, 本研究では ARMS を用いて *bla*_{GES} のミス

センス変異 (G493A) に特異的なプライマーを設計した。ARMSは1989年にPCR法で初めて用いられ、2007年に、池田らがLAMPのプライマー設計に適用し、特定の点突然変異の検出に成功している⁵⁾。変異特異的プライマーの検出限界はやや高めであるが、カルバペネム分解能を有するバリエントがLAMP法によって検出可能であることが示された。臨床応用には、より多くの**blac_{ES}**のバリエントを有するサンプルを用いた検討が必要である。

従来の**blac_{ES}**の検出法は、ランニングコストが高く、設備の整った研究室が必要であったが、LAMP法はこれらの問題を解決することができることから、臨床現場や途上国での応用が期待される。

5. 結 語

LAMP法による**blac_{ES}**およびカルバペネム分解能を有する**blac_{ES}**バリエントの迅速診断法を開発した。開発された**blac_{ES}**検出法は感度、特異度ともに高く、血液や喀痰DNAなどに含まれる反応阻害物質の影響も受けにくいことが示された。LAMP法はPCR法に比べ簡便かつ迅速であり、迅速診断の有用なツールとなる可能性が示唆された。

文 献

- Poirel L, Le Thomas I, Naas T, et al. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 622–632.
- Yamasaki K, Komatsu M, Ono T, et al. Nosocomial spread of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing **blac_{ES-4}** carbapenemase at a Japanese hospital. *J Infect Chemother* 2017; 23: 40–44.
- Kanayama A, Kawahara R, Yamagishi T, et al. Successful control of an outbreak of GES-5 extended-spectrum β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a long-term care facility in Japan. *J Hosp Infect* 2016; 93: 35–41.
- Uechi K, Tada T, Sawachi Y, et al. A carbapenem-resistant clinical isolate of *Aeromonas hydrophila* in Japan harbouring an acquired gene encoding GES-24 β -lactamase. *J Med Microbiol* 2018; 67: 1535–1537.
- Takano C, Seki M, Kim DW, et al. Development of a Novel Loop-Mediated Isothermal Amplification Method to Detect Guiana Extended-Spectrum (GES) β -Lactamase Genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* 2019; 10: 25.
- Kos VN, Deraspe M, McLaughlin RE, et al. The resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in relationship to phenotypic susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 427–436.
- Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, et al. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 906–909.



写真1 Prof. Dong Wook Kim (中央)