

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

長沢光章より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号乙第 2676 号

学位申請者 : なが さわ みつ あき
長 沢 光 章

学位審査論文 : Loop-mediated isothermal amplification assay for 16S rRNA methylase genes in Gram-negative bacteria

(Loop-mediated isothermal amplification 法によるグラム陰性菌の 16S rRNA メチラーゼ遺伝子検出)

著 者 : Mitsuaki Nagasawa, Mitsuo Kaku, Kazunari Kamachi, Keigo Shibayama, Yoshichika Arakawa, Keizo Yamaguchi, Yoshikazu Ishii

公 表 誌 : Journal of Infection and Chemotherapy 20(10):635-638, 2014

論文内容の要旨 :

アミノ配糖体系薬に対する高度耐性株は、*Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* などのグラム陰性桿菌に認められるが、日本では 2003 年に初めて報告された。これらアミノ配糖体系薬高度耐性株は 16S rRNA methylase 遺伝子を獲得することにより、臨床で用いられるゲンタマイシン、アミカシンなどを含むすべてのアミノ配糖体系薬に薬剤耐性を示す。現在までに、10 種の異なる 16S rRNA methylase 遺伝子が見つかり、プラスミド上に存在することが多く他菌種に伝播・拡散する可能性がある。特に、カルバペネム系薬とフルオロキノロン系薬に耐性を示す *P. aeruginosa* が、アミノ配糖体系薬高度耐性を獲得した菌株による感染症では抗菌薬治療は極めて困難となる。

これらのことから、臨床分離株が保有する 16S rRNA methylase 遺伝子の状況を把握することは、経験的抗菌薬治療や感染制御を適切に実施する上での意義は大きい。さらに、迅速かつ簡便な検出方法の開発により、アミノ配糖体系薬高度耐性株による感染症に対して迅速かつ適切に対応できると考えられる。これまで PCR 法が開発されているが、サーマルサイクラーなどの機器を必要とするため、限られた施設で実施され広く普及していない。

今回、アミノ配糖体系薬に対して高度耐性を付与する 16S rRNA methylase 遺伝子のうち、日本でその検出が報告されている *rmtA*, *rmtB* および *armA* を検出する Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) プライマーを設計し、新規検出法を開発した。

LAMP プライマーは、各遺伝子の特異配列に対し、設計支援ソフト Primer Explorer Version 3 を使用して設計した。LAMP 反応の基本試薬は、Loopamp DNA amplification kit を用いた。具体的には、反応チューブに 2×reaction mixture 12.5 μL、各プライマー 1 μL、Bst-DNA polymerase 1 μL、検体菌株を 95°C、10 分で抽出し遠心して得た上清液 2 μL、Loopamp fluorescent detection reagent 1 μL、蒸留水 2.5 μL を混合した。LAMP 反応は、65°C、60 分間実施し、結果は目視にて緑の蛍光色を陽性と判定した。

検出感度は、*rmtA*、*rmtB* および *armA* とも 102 copies/tube であった。検出時間は、*rmtA* は 1.0×10^7 copies/tube で 15 分、 1.0×10^2 copies/tube で 32 分、同様に *rmtB* は 23 分、52 分、*armA* では 27 分、41 分であった。また、DNA シークエンスで *rmtA*、*rmtB*、および *armA* の保有が確認されている保存株 9 菌種 65 株を用いて測定した結果、感度および特異性は 100% であった。今回開発した LAMP 法は、特別な機器を必要とせず、簡便で、高い感度・特異性を有し、迅速に検出することを可能とした。

次に、臨床分離株の 16S rRNA methylase 遺伝子の保有状況について調査した。全国 36 施設の 2008 年および 2013 年から 2014 年の臨床分離株 8,447 株のうちアミノ配糖体系薬に耐性（ゲンタマイシンの MIC が $16 \mu\text{g}/\text{dL}$ 以上、またはアミカシンの MIC が $64 \mu\text{g}/\text{dL}$ 以上）を示す 191 株について測定した。*rmtB* 陽性は 0.06 % (3 株/4,929 株) で認められ、その内訳は *E. coli*、*Enterobacter cloacae* および *Citrobacter freundii* とすべて腸内細菌科細菌であった。一方、*rmtA* は 0.10 % (3 株/3,284 株) の *P. aeruginosa* で、*armA* は 0.85 % (2 株/234 株) の *Acinetobacter* spp. から検出された。これらの結果は、2004 年に 16S rRNA methylase 遺伝子の保有状況を調査した既報と比較して、その検出率に増加傾向を認めなかった。しかし、既報では腸内細菌科細菌が保有する 16S rRNA methylase 遺伝子の殆どが *armA* で *rmtB* は 1 株のみであった。今回の結果から、*armA* から *rmtB* へ変化した理由は不明であるが、腸内細菌科細菌に拡散し始めている可能性が示唆された。

今回の研究から、広域のアミノ配糖体系薬に対して高度耐性を付与する 16S rRNA methylase 遺伝子の臨床分離株の保有状況を調査・把握することの重要性が認識された。そのためには、どの医療施設でも簡便かつ迅速に実施できる検査方法を構築することが必要で、LAMP 法による 16S rRNA methylase 遺伝子検出法は、そのための有望なツールの一つとして期待される。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号乙第 2676 号	氏 名	長 沢 光 章
学位審査担当者	主 査	澁 谷 和 俊
	副 査	草 地 信 也
	副 査	中 島 耕 一
	副 査	宮 崎 修 一
	副 査	中 野 裕 康
<p>学位審査論文の審査結果の要旨 :</p> <p>平成 26 年 12 月 25 日 (水) 12:00-13:00 医学部第 2 セミナー室にて、5 名の審査委員の出席の下 (書面による事前審査委員 1 名を含む) で学位審査が行われた。</p> <p>審査論文は、申請者らが設計・開発したアミノ配糖体系薬高度耐性遺伝子である 16S rRNA methylase 遺伝子である <i>rmtA</i>, <i>rmtB</i> および <i>armA</i> を検出する Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) プライマーおよびこれを用いた新規検出系の評価を記したものである。</p> <p>LAMP プライマーは、設計支援ソフトを使用して設計された。LAMP 反応は常法に従って実施し、結果は目視にて緑の蛍光色を陽性と判定した。検出感度は、<i>rmtA</i>, <i>rmtB</i> および <i>armA</i> とともに 102 copies/tube であり、いずれの検出時間も実用に適する時間内に留まった。また、陽性対象とした保存株を用いた感度および特異性は 100%であった。更に臨床分離株について検討したところ、<i>rmtB</i> は腸内細菌科細菌のみに陽性で検出率は 0.06 % (3 株/4,929 株)、<i>rmtA</i> と <i>armA</i> は、夫々 <i>P. aeruginosa</i> と <i>Acinetobacter</i> spp. のみの陽性で、その検出率は 0.10 % (3 株/3,284 株) および 0.85 % (2 株/234 株) であった。以上の結果は、申請者らが開発した新規アミノ配糖体系薬耐性遺伝子検出系の有用性を示唆すると同時に耐性菌の布動向調査に資する実用性を実証したものと評価される。</p> <p>研究概要説明の後に審査委員より「16S rRNA メチラーゼ遺伝子」に関する名称の適否、その存在部位、既知のアミノ配糖系薬耐性機構、本耐性菌拡散の予測、LAMP 法における反応温度の設定根拠等について質疑があり、申請者はこの全てにおいて適切かつ詳細に回答した。</p> <p>以上の結果より、申請者の研究が独創性に優れた価値あるものと認定し、審査委員全員の一致で学位授与に相当すると判断した。</p>		