

題目

LAMP 法と ARMS 法及び SNPs タイピングを  
組み合わせた一塩基置換変異判別法の確立と  
病原体同定及び薬剤耐性の判定への応用

たむら しんすけ

田村 信介

(成長発達臨床医学専攻)

防衛医科大学校

平成28年度

## 目 次

第 1 章 緒言	1 頁
第 2 章 LAMP 法と ARMS 法及び SNPs タイピングを組み合わせた 一塩基置換変異判別法の確立と病原体同定及び薬剤耐性の 判定への応用	6 頁
第 3 章 結論	24 頁
謝辞	25 頁
単語・略語説明	26 頁
引用文献	29 頁
図表	34 頁

## 第1章 緒言

近年、ヒトを含む様々な生物において種々の性質の違いをもたらす遺伝子変異や多型が明らかになってきている。医療分野においては、ヒト遺伝子における変異を標的とした疾患診断への応用を始めとして、遺伝子多型による個体の性質の判定、たとえば薬剤副作用の蓋然性の判定によるテーラーメイド医療<sup>1,2)</sup>など、様々な視点から研究され応用されてきている。これらの知見は医療分野のみならず、農林水産分野、衛生・公衆衛生分野など非常に幅広い領域で同様に応用されてきている。

感染症は、医療分野においては患者数が多く、衛生・公衆衛生の側面においてもその感染伝播能及び突然変異能のため人間社会を脅かす潜在性に富む。これは農林水産分野においても同様である。このことから、感染症には迅速かつ適切な対応が不可欠となる。感染症対応に重要なのは病原体の同定及び病原性や薬剤耐性など性質の判定である。そして現在では、様々な性質変化をもたらす遺伝子変異や多型に関する知見の集積及び解析技術の飛躍的な進歩により、病原体の同定やその性質の判定が可能となった<sup>3,4,5,6,7)</sup>。加えて感染症対応では即応性も重要であり、病原体の同定やその性質の判定が迅速にできることが求められる。これは国内の先進的な検査・解析機器類が設置されていない一般医療現場や国外の衛生基盤や医療態勢の整備が途上にある諸地域であっても同じであり、感染症対応の改善は地球規模の課題である。また、先進医療設備が整備されている地域でも、大規模災害等における先進的診断手法の無力化への対応が課題となる。

病原体同定手法において、培養は依然として標準であり、確定診断を可能とする。しかし、培養には一定の期間や熟練した技術が必要であり、さらに培養が不可能又は困難な病原体も存在する<sup>8)</sup>。遺伝子解析技術は飛躍的な発展を遂げ、

それを用いた病原体の同定手法<sup>9, 10, 11)</sup>が実績を上げている。最近では技術の簡便化、一般化が進み、その運用は以前よりは容易になった。しかし、それでも、遺伝子解析技術の運用には維持管理に多大な費用と労力を要する専用精密機器と比較的高い技術が必要であり、これが国内外の一般医療現場への導入を妨げている主要な理由となっている。一般医療現場での実現性に問題を抱える上記2つの手法と異なり、免疫学的検査は簡易検査キットにより検査室内のみならず患者のそばで検体採取後に即時に実施可能である。免疫学的検査は飛躍的な発展を遂げた結果、対象病原体も増え、一般医療現場を大きく変えている。しかし、免疫学的検査は感度の面では必ずしも最適な手法とは言えない。特に抗体検出を目的とする手法では、検体量が検出限界を超えるまで一定の時間を要することが問題としてあげられる。

このように、病原体の同定を目的とした既存の手法にはそれぞれに優れた特長がありながらも同時に限界がある。そのため、病原体検査において、感度、特異度ともに優れ、かつ迅速性、簡便性においても一般医療現場で実施可能な新しい手法が望まれている。感度・特異度から言えば病原体における遺伝子の多様性、即ち変異や多型が新しい手法の標的となり得る。迅速かつ簡便な遺伝子解析技術を応用した、既存には無い特長を有する手法の開発が医療分野や他の幅広い分野において非常に重要な課題である。

Loop-Mediated Isothermal Amplification（以下、「LAMP」という。）法は、我が国で開発された革新的な核酸増幅技術である<sup>12)</sup>。LAMP法は、2本鎖DNAと1本鎖DNAとが動的平衡状態にある65℃付近の温度で鎖置換型DNAポリメラーゼを作用させることにより、Polymerase chain reaction（以下「PCR」という）法でいうDenaturationとAnnealingが同時並行的に連続的に進行する。その特長は

これまで応用され実績を上げてきた PCR 法に比して、迅速性、簡便性及び特異性が優れていることが挙げられる。

この迅速性及び簡便性は、PCR 法では反応の進行に 3 段階の温度変化を要し、また増幅の判定に電気泳動など別工程が必要であることに比べ、LAMP 法では反応が恒温で連続的に進行し、判定が目視で行えることによる。結果、LAMP 法は全工程が 1 時間程度で済み、サーマルサイクラーなどの専用機器の取り扱いや電気泳動法のような手技の経験が無くとも結果を得ることが可能である。また、特異性の高さは核酸増幅用プライマーを PCR 法の 2 領域に比べ 6 領域に設定することによる。

このように、LAMP 法ではその特長から、既存の病原体同定の手法である培養、PCR 法を用いる遺伝子解析、免疫学的検査と比較し、核酸増幅による標的塩基配列の有無を迅速かつ簡便に高い特異性で判定できる。実際、一般医療においては種々の微生物検出を目的とする体外診断用医薬品として、また農林水産分野や衛生・公衆衛生分野においては、環境衛生検査及び食品・環境検査用試薬などとして実用化されてきている<sup>13)</sup>。そして、その恩恵は国内の一般医療現場に留まらず、衛生基盤や医療態勢が不十分な国外諸地域でも医療や研究等に成果をあげ始めている<sup>14)</sup>。

このように、実用性を証明する報告が相次ぐ LAMP 法であるが、その感染病原体の同定の原理は種や属に特異的に保存されている遺伝子領域（以下「保存領域」という。）を検出し核酸を増幅することであるため、保存領域の塩基配列相同性が極めて高い検体の場合にはそれが感染病原体でなくとも増幅する可能性が問題とされるようになった。この問題は、例えば感染病原体とその近縁種との区別をつけたいときに顕著となる可能性が高く、LAMP 法の応用可能性を拡げるため克服すべき課題として認識され始めている。

この課題を克服し LAMP 法の実用性をより拓げるため、病原体遺伝子の保存領域の検出のみならず、より僅かな相違を検出する手法の開発を目指してきた。そしてこれまでに、保存領域における一部欠失を検出する手法を開発した<sup>15)</sup>。これは新たな手法で設計したプライマーにより保存領域における一部欠失があった場合のみ増幅させ、その有無を区別するものである。さらに、我々が開発した手法の有用性を明らかにするため、結核ワクチン株である *Mycobacterium bovis* BCG の迅速かつ簡便な検出系を構築した。この系を用いた解析では *M. bovis* BCG のみの特異的に増幅され、*M. bovis*、結核菌、非定型抗酸菌及び他の微生物間との交叉反応は認められなかった。さらに、より医療現場に即して想定した血液、髄液、尿、気管支肺胞洗浄液などを混入させた検体でも *M. bovis* BCG が検出できた。これらの結果からこの手法により、保存領域の相同性が極めて高くその増幅で区別をつけることが困難である抗酸菌近縁種の感染においても一部欠失という僅かな相違を区別でき、病原体の由来を推定することが可能となった。

今回我々は、上記の LAMP 法を応用した遺伝子一部欠失配列の検出手法をさらにすすめ、迅速かつ簡便な一塩基置換の検出手法を新規に開発した。

近年の飛躍的な生物遺伝情報の蓄積は、ヒトの薬剤副作用感受性や細菌の薬剤耐性など、一塩基変異や多型により様々な性質を示すことを明らかにしてきた。今回新規開発した一塩基置換の検出手法は、医療等の態勢が未整備な地域であっても実行できることから汎用性が高い。本手法は感染症領域に限っても、国内の一般医療現場における病原体の同定及び性質の判定に有用であるのみな

らず、極めて適応性に富み容易に遺伝子変異を蓄積させていく感染病原体を国内外において追跡できることから、衛生・公衆衛生学的な対応に極めて有用であると考えられる。さらに、冒頭で述べたとおり、感染症以外、さらには医療以外の分野においても一塩基変異や多型の知見は非常に幅広い領域で応用されており、この手法は幅広い領域で汎用可能であると考えられた。

## 第2章 LAMP法とARMS法及びSNPsタイピングを組み合わせた一塩基置換変異判別法の確立と病原体同定及び薬剤耐性の判定への応用

### 第1節 背景

生物のゲノム情報が蓄積されるにつれて、僅か一塩基の変異によって生じる形質の違い、疾病発症への影響を解析することが可能となったのみならず、個体識別などへも応用可能となっており、その解析には専用の機器が必要なDNAシーケンシング、マイクロアレイ法、PCR法などが使われてきている。

LAMP法は迅速かつ簡便な核酸増幅技術である。LAMP法では、65°C付近の恒温状態で鎖置換型DNAポリメラーゼを作用させることにより、標的とする遺伝子増幅の有無を専用の機器を用いずに判定できる。LAMP法(図1a)は核酸増幅用プライマーをPCR法の2領域に比して6領域(4種類)に設定することからPCR法に比して一般に特異度が高いが、一塩基程度の変異であればプライマーと相補でなくとも反応が進行してしまうことがある。LAMP法を応用し、さらに特異的に核酸塩基配列の変異や多型を検出する方法として、これまでSNPsタイピング<sup>16)</sup>とAmplification Refractory Mutation System<sup>17)</sup>(ARMS。以下「ARMS」という。)を適用したLAMP法(以下「ARMS-LAMP法」という。)<sup>18)</sup>が報告されている。

SNPsタイピング(図1b)は、一塩基多型(Single Nucleotide Polymorphism: SNP。以下「SNP」という。)を解析する技術として登場した。鋳型配列のF1及びB1の3'末端は、増幅起点のF1c及びB1cの5'末端に相補する。通常のLAMP法においてはF1及びB1の3'末端の間が増幅の標的領域となるが、SNPsタイピングでは、これらの3'末端をいずれも標的となるSNPの存在が予想される塩基領域(以下、「標的SNP領域」という。)と同一になるようにプライマー領域を設定



する。これによって、SNP が実際に存在する場合には、プライマーにおける遺伝子増幅起点である F1c 及び B1c の 5'末端塩基の両方が鋳型配列における相補領域である F1 及び B1 の 3'末端塩基と異なることになるため、増幅が全く起こらないか又は反応の進行が大幅に遅くなり、増副産物の検出までの時間に大きな違いが生じる。ただし、LAMP 法は一塩基置換のみであればそれを越えて反応が進行することがあるため、検体濃度や反応時間によっては標的 SNP 領域に SNP があっても最終的に遺伝子増幅が認められることがある。

ARMS は、PCR 法などによる遺伝子増幅の際、プライマー領域において近接した 2 塩基以上の置換があると標的とする遺伝子増幅が不可能になることを利用して遺伝子変異を検出する手法として報告された。これと LAMP 法を組み合わせることで遺伝子変異の検出に応用する手法が ARMS-LAMP 法である。ARMS-LAMP 法 (図 1c) は、まず、増幅開始起点である F1c 及び B1c の 5'末端の相補領域である F1 及び B1 の 3'末端又はその付近に検出目的の変異領域の両端を設定する。次に FIP、BIP の片方又は両方の F1c、B1c の 5'末端から数塩基分 3'側に塩基置換を挿入する。ARMS-LAMP 法ではない通常の LAMP 法においては、実際に変異が存在し F1、B1 の 3'末端がプライマーと相補でないときでも一塩基置換のみであるためこれを越えて反応が進行することがある。これに対し、ARMS-LAMP 法においては、変異がないときは ARMS-LAMP 法による一塩基置換のみとなりこれを越えて反応が進行するが、変異が存在するときには ARMS-LAMP 法による一塩基置換と合わせて近接する 2 か所に変異が存在することになるため、増幅が全く起こらないか又は反応の進行が大幅に遅くなり、増幅産物の検出までの時間に大きな違いが生じる。ただし、変異が SNP など一塩基変異であった場合、F1、B1 のいずれかでは ARMS の塩基置換を挿入できないため、そのプライマーにおいては反応が進行し、最終的に増幅産物が検出さ

れてしまう可能性がある。

このように、上記の各手法はその特長を生かし有益である一方で、どちらも検体濃度や反応時間によっては遺伝子変異があっても反応が進行し、最終的に遺伝子増幅が認められてしまうことが大きな欠点として認識されている。そのため、検体濃度が不明な場合がほとんどであることが想定される一般医療現場や国内外のフィールド調査においてはその陽性／陰性の判定が困難となることが予想される。

この問題を克服するため、今回我々は SNPs タイピングと ARMS-LAMP 法とを組み合わせることでさらに特異度を高める手法(以下「ARMS-SNP LAMP 法」という。)を新規に開発することに成功した。ARMS-SNP LAMP 法(図 1d)の要点は、まず鋳型配列において SNPs タイピングとして標的 SNP 領域に F1 及び B1 の 3'末端が重なるように設定し、それに基づき設計したプライマーにおいて ARMS-LAMP 法として F1c、B1c の片方又は両方に塩基置換を挿入することである。これにより、SNP が存在するときには、プライマーの F1c 及び B1c のいずれにおいても増幅起点である 5'末端が鋳型配列と相補でなくかつ 2 塩基の置換が生じることとなる。よって、標的とする遺伝子の増幅がさらに困難になり、高濃度検体であっても、標的 SNP 領域が合致しないプライマーでは増幅しないか又は大幅に遅延する。

以上が、今回我々が新規に開発した一塩基変異の同定手法である ARMS-SNP LAMP 法の基本原理である。

我々が新規に開発した ARMS-SNP LAMP 法の有用性を検討するための検体として、病原体である *Haemophilus influenzae* を選択した。

*H. influenzae* では、Penicillin Binding Protein (以下「PBP」という。) -3 をコー

ドする *ftsI* の特定の一塩基変異が beta-lactamase-negative ampicillin-resistant<sup>19)</sup> (以下「BLNAR」という。) 形質と極めて強く相関している<sup>20)</sup>。BLNAR 形質を持つ *H. influenzae* は近年顕著に増加してきている<sup>21)</sup>ことから、迅速な *H. influenzae* の同定及び BLNAR 形質の有無の判定が治療選択を適時に決定するために重要である。しかし、現在でも病原体の同定及び BLNAR 形質の判定は主に培養及び最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration: MIC。以下、「MIC」という。) の測定など旧来の手法によっており、その結果が出るまでに一定の時間を要することが問題とされている。また、BLNAR 形質及びそれをもたらす遺伝子変異 (genetic BLNAR: 以下、「gBLNAR」という。) の有無の判定は、一塩基置換を同定できる既存の手法<sup>22)</sup>によっても可能であるが、専用の設備機器及び一定の技術が必要であり、一般医療現場や国内外における衛生基盤が脆弱で先進医療技術提供が困難な環境では実施が困難である。

*H. influenzae* の BLNAR 形質の有無は *ftsI* の 517 番及び 526 番アミノ酸変異の有無に強い相関関係が存在することが報告されている<sup>23, 24, 25)</sup>。このうち 526 番アミノ酸については、このアミノ酸をコードする塩基配列は薬剤感受性野生株では AAT であるが、これが AAG 又は AAA に一塩基置換したときに BLNAR 形質と相関関係があることが報告されている。AAC については AAT と同じくアスパラギンをコードするが、*H. influenzae* の *ftsI* の 526 番アミノ酸におけるこの変異は既報告<sup>26)</sup>及び公開されているデータベースには認められなかったため、後述するように遺伝子増幅用プライマー設計の際に AAC の選択枝を除外している。

最終的な BLNAR 形質の判定が MIC 測定によることから、gBLNAR の存在だけで BLNAR 形質があると断言はできないが、高い相関性を示す既報告により、強く示唆すると言うことはできる。よって、gBLNAR の検出は培養や MIC の結果が得られるはるか以前に治療方針を決定できるといった臨床的な観点からも

有益である。ゆえに、これを可能とする一塩基置換の有無を迅速かつ簡便に判定する手法は有用である。

## 第2節 目的

本研究では、一塩基変異を迅速かつ簡便に同定する新規手法の開発を目的とした。そして、*H. influenzae* の *ftsI* の 526 番アミノ酸における一塩基変異を用い、この手法が迅速かつ簡便に種の同定及び gBLNAR の有無の判定を行えるかについて検討した。

本手法の開発にあたり、反応結果に影響を及ぼす検体濃度について、これが厳密に一定ではなくても一塩基変異の判定が可能となることを目標とした。また、LAMP 法の特長である簡便性を最大限に活かすため、器材は主に酵素反応用の恒温装置を使用し、判定は計測装置のみならず目視でも行うこととした。

なお、本研究は防衛医科大学校倫理委員会の承認（承認番号 2472 「βラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性インフルエンザ菌の迅速診断法の開発」）を得て行った。

## 第3節 方法

### （1）*H. influenzae* の *ftsI* の標準配列の決定

米国の National Center for Biotechnology Information (NCBI) に登録されている塩基配列データのうち、「ftsI」、「fts1」、「fts-1」、「PBP3」及び「PBP-3」のキーワードで検索し、抽出した *H. influenzae* の *ftsI* の 636 個及び日本のナショナルバイオリソースプロジェクト<sup>27)</sup>から分与された 4 個を加えた計 640 遺伝子の配列情報を解析した。

これらの配列情報を基に *H. influenzae* の *ftsI* 全塩基について共通配列を明らか

にし、塩基置換がある場合には最も頻度の高い塩基を確定し、我々が本研究を推進するうえで中心となる配列（以下「標準配列」という。）を決定した。

## （2）検体

検体は、ナショナルバイオリソースプロジェクト（岐阜大学大学院医学研究科）から分与された各種微生物のゲノム DNA を用いた（表 1）。それらに加えて、防衛医科大学校病院で平成 22 年 1 月から平成 28 年 6 月までに採取された臨床検体から単離された *H. influenzae* 株（以下「臨床検体株」という。）のうち精製できた 57 株のゲノム DNA を用いた。

核酸の精製はキットであるイージー・エクストラクト for DNA/RNA（エーエムアール株式会社、岐阜県）を用いて以下の要領で行った。菌体懸濁液を加熱して殺滅し、沈殿させる。沈殿物にキット内のライシスバッファー（細胞溶解用緩衝液）450 $\mu$ l と SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）溶液 25 $\mu$ l を加えた後、プロテアーゼ K を 100 $\mu$ g/ml になるように加え、50 $^{\circ}$ C で上清が粘調になるまで 60～90 分間程度加温する。この検体にキット内のフェノール混合液を検体と等量加え懸濁し、10 分間遠心し、上清を採取する。この手順を 2 回以上繰り返す。採取した上清に NaCl を 0.15M になるように加え、99.5% エタノールを上清の 2 倍量加えてゲノム DNA を沈殿させ、5 分間遠心する。沈殿物に 70% エタノールを加えて 5 分間遠心し、沈殿物を乾燥させる。乾燥物を TE バッファーに溶解し、精製ゲノム DNA とした。

臨床検体株のゲノム DNA 濃度は、蛍光インターカラー法を用いて決定した。リアルタイム PCR 装置は LightCycler<sup>®</sup> 480（ロシュ・ダイアグノスティック

ス株式会社、東京都) を、試薬は SsoFast™ EvaGreen® Supermix (バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社、東京都) を用い、反応液組成、反応液量、反応条件等は全てメーカーの推奨プロトコールに準拠した。プライマーは、臨床検体株のシーケンスにより決定された塩基配列情報を用いて、フォワードプライマー : 5'- GTGCAACAGTCGCTTATGGT-3'、リバープライマー : 5'-GCATAGGCACGAGCAATTTG-3' と設計した。反応液組成は SsoFast™ EvaGreen® Supermix を 10µl、フォワードプライマー及びリバープライマーを 300nM とし、検体を加え、最終的に反応液量が 20µl となるよう水を加え総量を調整した。反応条件は、95°C30 秒間 1 サイクルで活性化させた後、95°C5 秒間で変性、55°C20 秒間で生成・伸長という反応を 40 サイクル繰り返した。

### (3) 感度及び特異度の測定

核酸増幅用試薬は Loopamp® DNA 増幅試薬キット (栄研化学株式会社、東京都) を用いた。反応液組成及び反応液量はメーカー推奨プロトコールに準拠した。

反応液組成は、RM Buffer が 12.5µl、*Bst* DNA polymerase が 1µl、F3 及び B3 プライマーを 5pmol、FIP 及び BIP プライマーを 40pmol、LF プライマーを 20pmol とし、検体を加え、反応液量が 25µl となるよう水を加えて総量を調整した。なお、Loopamp® 蛍光・目視検出試薬 (栄研化学株式会社、東京都) を結果判定用に用いるときは、蛍光・目視検出試薬 1µl を加えてから、反応液量を調整した。反応温度は 61°C に設定した。

増幅の検出・測定には、Loopamp®リアルタイム濁度測定装置 LA-200 (栄研化学株式会社、東京都) を用いた。また、蛍光・目視検出試薬を用いた目視による感度も検討した。さらに、LightCycler®480 を用いた LAMP 法におけるリアル

タイム蛍光検出<sup>28)</sup>を行い、熱解離曲線解析による非特異的反応の検討を行った。

#### (4) ARMS-SNP LAMP 法のプライマーの設計

プライマーはLAMP法プライマー設計支援ソフトウェアである PrimerExplorer V4 (栄研化学株式会社、東京都) を用いて設計した。

*ftsI* 遺伝子の標準配列において、まず、標的 SNP 領域が F1 及び B1 の 3'末端に合致するように F1 と B1 を設定し SNPs タイピングのプライマーセットを設計した。次に、このプライマーセットにおける F1c 及び B1c の片方又は両方の 5'末端から 2 塩基分 3'側の塩基について標準配列に一塩基置換を挿入し ARMS-LAMP 法を導入したプライマーセットを設計した。

設計したプライマーを示す (図 2)。X は標的 SNP 領域の塩基を、x はその相補塩基を示す。 $\alpha$  及び  $\beta$  は FIP 及び BIP プライマー領域において ARMS により置換した塩基を示す。

標的 SNP 領域の塩基 X は、薬剤感受性野生株では X=T であり、gBLNAR では X=A 又は X=G である。この 3 通りの SNPs タイピングのプライマーを作成した。一方、 $\alpha$  及び  $\beta$  は A、G、C、T のいずれかであることから、1 種類の SNPs タイピングにつき、16 通りの ARMS-LAMP 法のプライマーセットを作成した。なお、X=C については、既報告に認められず、NCBI に登録されている塩基配列データ、ナショナルバイオリソースプロジェクトから分譲されたゲノム DNA 及び臨床検体株に見いだすことができなかつたため、検討の結果、作成の必要はないと判断した。

#### (5) ARMS-SNP LAMP 法のプライマーの決定及び感度、特異度の測定

検体は、ナショナルバイオリソースプロジェクトから分譲された JNBP\_02719

(野生株)、JNBP\_02665 (c.1578T>G) 及び臨床検体株 (c.1578T>A) のゲノム DNA を一反応当たり 1ng から 10 倍ずつ段階希釈したものをを用いた。

感度及び特異度の測定には、Loopamp<sup>®</sup>リアルタイム濁度測定装置 LA-200 を用いた。また、Loopamp<sup>®</sup> 蛍光・目視検出試薬を用いた目視による感度も検討した。さらに、LightCycler<sup>®</sup>480 を用いた熱解離曲線解析による非特異的反応の検討を行った。

(6) ARMS-SNP LAMP 法他種属微生物株ゲノム DNA における交叉反応性  
反応液組成及び反応温度は前項と同一の条件で実施した。検体は表 1 に掲げた微生物ゲノム DNA を用い、濃度は一反応当たり 1ng に設定した。

測定には、Loopamp<sup>®</sup>リアルタイム濁度測定装置 LA-200 を用いた。

(7) ARMS-SNP LAMP 法の臨床検体株における gBLNAR の判定

反応液組成及び反応温度は前項と同一の条件で実施した。検体は臨床検体株のゲノム DNA を用い、濃度は一反応当たり 1ng に設定した。

測定には、Loopamp<sup>®</sup>リアルタイム濁度測定装置 LA-200 を用いた。

#### 第 4 節 結果

(1) ARMS-SNP LAMP 法のプライマーセットの決定

標的 SNP 領域における塩基について、野生型の T 及び変異型の A と G を検出するために最適なプライマーセットを決定するため、設計した 16 種類ずつ全 48 種類のプライマーセットを用い、標的 SNP 領域の塩基が T である野生株と A、G である変異株の 3 種類のゲノム DNA の増幅反応を検証した (図 3)。

図 3 における X はゲノム DNA の標的 SNP 領域に入る塩基を示し (図 2)、た



たとえば  $X=T$  は標的 SNP 領域の塩基が T であるゲノム DNA に合致する SNPs タイピングのプライマーセット（以下「T 検出プライマーセット」とする。）であることを示す。よって、T 検出プライマーセットは、標的 SNP 領域の塩基が T であるゲノム DNA を増幅させ、それ以外のゲノム DNA は増幅させないことが期待される。 $\alpha$  は FIP において、 $\beta$  は BIP において、それぞれ ARMS により置換される領域の塩基を示す（図 2）。図 3 では最上段が  $\alpha=A$  で 2 段目が  $\alpha=G$ 、3 段目が  $\alpha=C$  で最下段が  $\alpha=T$  とし、また、最左列が  $\beta=A$  で 2 列目が  $\beta=G$ 、3 列目が  $\beta=C$  で最右列が  $\beta=T$  としている。標準配列では  $\alpha=A$  及び  $\beta=A$  であるので、 $\alpha=A$  かつ  $\beta=A$ （最上段、最左列）は ARMS が導入されていないプライマーセットの結果を示しており、これは SNPs タイピングのみと同義となる。

ARMS-SNP LAMP 法における最適プライマーセットの決定の過程について、図 3 の T 検出プライマーセットの結果を用いて具体的に説明する。両方のプライマーに ARMS を導入していない  $\alpha=A$  かつ  $\beta=A$ （最上段、最左列）では、標的 SNP 領域の塩基が T 検出プライマーセットと合致しない A（破線）又は G（点線）のゲノム DNA は合致する T（実線）に比べると増幅反応の度合いが非常に悪いことが明らかである。しかし、一反応当たりの検体 DNA 量が 1ng と多い場合には標的 SNP 領域の塩基が A（破線）又は G（点線）の場合でも増幅反応が検出されており、これがさらに多量であった場合には少量の合致するゲノム DNA よりも早期に増幅する可能性がある。よって、このようなプライマーセットでは濃度が不明な検体の一塩基置換の検出及び決定という目的からいえば不適當である。BIP にのみ ARMS を導入した  $\beta=A$ （最左翼列、2 段目以下）では、合致しない A 及び G のゲノム DNA の増幅は非常に抑制されている。特にこの  $\beta=A$  かつ  $\alpha=G$  では合致しないゲノムの増幅は認められず、このようなプライマーセットでは検体のゲノム DNA の濃度によらず塩基置換の判定が可能となる。

しかしながら、例えば  $\alpha=C$  かつ  $\beta=G$ 、C、T では、合致しないゲノム DNA の増幅は認められていないものの合致するゲノム DNA の増幅も悪く、こうしたものは実用性に劣ると考えた。

この実験結果を踏まえ、プライマーセットの決定に当たっては、標的 SNP 領域の塩基が当該プライマーセットと合致しないゲノム DNA を増幅しないものうち、合致するゲノム DNA の増幅感度が最もよいものとした。この基準に照らした結果、T 検出プライマーセットは FIP には  $\alpha=A$  から  $\alpha=G$  へ塩基置換した ARMS を導入し BIP には  $\beta=A$  のままで ARMS を導入しないセット（上から 2 段目、最左列）に決定した。

X=T と同様に、図 3 の X=A は標的 SNP 領域の塩基が A であるゲノム DNA を検出するプライマーセット（以下「A 検出プライマーセット」とする。）を示す。A 検出プライマーセットについて同じ基準に照らした結果、FIP は  $\beta=A$  のままで ARMS を導入せず、BIP に  $\beta=A$  から  $\beta=G$  へ塩基置換した ARMS を導入したセット（最上段、左から 2 列目）に決定した。

X=T 及び X=A と同様に、図 3 の X=G は標的 SNP 領域の塩基が G であるゲノム DNA を検出するプライマーセット（以下「G 検出プライマーセット」とする。）を示す。G 検出プライマーセットについて同じ基準に照らした結果、FIP は  $\beta=A$  のままで ARMS を導入せず、BIP に  $\beta=A$  から  $\beta=G$  へ塩基置換した ARMS を導入したセット（最上段、左から 2 列目）に決定した。

ただし、A 検出プライマーセットの遺伝子増幅の度合いは、T 検出プライマーセット及び G 検出プライマーセットに比べて顕著に悪い。このことは、考察において言及するが、プライマー設計や反応条件の再設定が必要になる可能性もあるものと推察した。

## (2) *H. influenzae* のゲノム DNA を用いた ARMS-SNP LAMP 法の感度及び特異度の測定

決定した ARMS-SNP LAMP 法のプライマーセットについて、まず、リアルタイム濁度測定装置を用いた詳細な感度及び特異度を示す (図 4)。検体には *H. influenzae* のゲノム DNA を用いた。感度は、T 検出プライマーセット及び G 検出プライマーセットでは一反応当たり 1pg、A 検出プライマーセットでは一反応当たり 10pg であった。特異度は、全てのプライマーセットにおいて、一反応当たり 1ng で他のゲノム DNA の増幅は認められなかった。

次に、Loopamp<sup>®</sup> 蛍光・目視検出試薬を用いた目視による感度を示す (図 5)。T 検出プライマーセット及び G 検出プライマーセットでは一反応当たり 10pg、A 検出プライマーセットでは一反応当たり 100pg であった。図には代表として T 検出プライマーセットの結果を示している。

さらに、LightCycler<sup>®</sup>480 を用いたリアルタイム蛍光検出による熱解離曲線解析の結果を示す (図 6)。各検出プライマーセットにおける熱解離曲線は同一の頂点を示しており、各濃度における反応が非特異的反応ではないことが示唆された。

## (3) 他種属菌株のゲノム DNA との交叉反応測定

決定した各検出プライマーセットについて、表 1 に掲げたリソース名を持つ菌種のゲノム DNA を検体として反応させた (図 7)。結果は、*H. Influenzae* 以外のゲノム DNA は増幅が認められなかった。図には代表として T 検出プライマーセットの結果を示している。

## (4) 臨床検体株における gBLNAR の判定

決定した各検出プライマーセットについて、臨床検体株から精製したゲノム DNA を検体として反応させた (図 8)。なお、T 検出プライマーセットに用いた検体数と、A 及び G 検出プライマーセットに用いた検体数は、実験時期の違いのために若干異なっている。

結果は、T 検出プライマーでは標的 SNP 領域の塩基が T であるゲノム DNA のみが、A 検出プライマーでは標的 SNP 領域の塩基が A であるゲノム DNA のみが増幅し、感度・特異度とも 100%であった。G 検出プライマーでは標的 SNP 領域の塩基が G である 27 検体のうち 21 検体で増幅し、感度は 77.8%であった。また、G でない 20 検体のうち 1 検体が増幅し、特異度は 95%であった。

## 第 5 節 考察

病原体の同定手法は、長足の進歩を遂げた。しかし、病原体の多様性とその多様性を生み出す機構が明らかにされるにつれて、病原体の同定は新たな手法や従前の手法の改善が期待されるようになった。例えば、近縁種間の識別は従来の手法では非常に困難であるため、新たな同定手法の開発が迅速かつ適切な診断のためには益々重要になっていくであろう。病原体の識別に関し、特に喫緊の課題となっているものが薬剤耐性である。

病原体の薬剤耐性は、病原体の多様性と、その多様性を生み出す機構に深く関わっていることから、その態様は多岐にわたるうえに変化が早い。そのため、病原体は環境等に適応し新たな薬剤耐性を獲得してしまう。こうして、莫大な予算を投下してようやく得られた抗菌薬等が、人々の不適切な使用によって早々に耐性を獲得され急速に効能が失われていった事例は枚挙にいとまがない<sup>29)</sup>。世界保健機関も病原体の薬剤耐性を解決が望まれる重要課題として位置付け、多くの場面で警告を発している<sup>30, 31)</sup>。加えて昨今では新規抗菌薬の開発

速度が大幅に減速している<sup>32, 33)</sup>。こうした現状は、感染症対策において薬剤耐性を生じさせない複合的な対策の立案が不可欠であることを示唆している。

その複合的な対策のひとつに、薬剤耐性を迅速に発見する手法の開発は、抗菌薬の適正使用に資することから間違いなく含まれるであろう。グローバル化の進展に伴う国際的な往来の増加により、薬剤耐性形質を獲得した病原体が全地球規模的な循環を見せる可能性もある。よって、薬剤耐性形質をもつ病原体について、身近な医療現場における迅速な診断とともに、国内外の医療資源に乏しい地域においても追跡を可能にする、病原体同定の迅速かつ簡便な新規手法が待望されていると言ってもよい。

我々が新規手法として開発した ARMS-SNP LAMP 法は、留まるところを知らない病原体多様性の進展と、それに伴う抗菌薬に対する耐性獲得を早期に感知し、速やかな対策手法の立案に寄与するであろうと思われる。

ARMS-SNP LAMP 法の特長は、迅速かつ簡便に一塩基置換を検出できることである。今回、*H. influenzae* における gBLNAR 判定のための ARMS-SNP LAMP 法のプライマーセットについては、条件設定を試行錯誤した結果、図 4 で示した通り、標的 SNP 領域の塩基が合致したプライマーセットを使用した場合における検出感度は、X=T 及び X=G の場合に一反応当たりのゲノム DNA 検体量で 1pg、X=A の場合は同 10pg であった。一方で、図 3 で示した通り、標的 SNP 領域の塩基が合致しないプライマーセットを使用した場合における最少検出ゲノム DNA 量が 100pg であることから、少なくともこの範囲にある検体については ARMS-SNP LAMP 法による判定が可能であり、状況によっては検体 DNA 量を段階希釈することで標的 SNP 領域の塩基を判定出来ることが示された。

さらに、ARMS-SNP LAMP 法の交叉反応の有無を検討するために、表 1 に示

された他病原体種属を用いて検証したところ、図 7 で代表的な結果を示した通り、いずれのプライマーセットでも増幅が認められなかった。このことから、ARMS-SNP LAMP 法は高い特異性をもち、薬剤耐性の判定に加えて、感染病原体の同定も同時に可能であることを示唆している。

ARMS-SNP LAMP 法の開発にあたって、最も困難で試行錯誤を繰り返した点は最適なプライマーの設計である。本研究において日本のナショナルバイオリソースプロジェクトから分与され実験に供したゲノム DNA は、米国 NCBI に登録されている塩基配列データ等から作成しプライマー設計の基とした標準配列と比べ、プライマー領域を含めた一部の領域において異なる塩基配列も存在したが、プライマー設計を工夫し試行錯誤した結果、問題なく増幅することを確認した。このことから、今回最適化に成功したプライマーセットを用いて、標準配列とは異なる塩基配列をもつ *H. influenzae* の検出についても ARMS-SNP LAMP 法により可能であることが示唆された。このことについては、データをさらに蓄積し、検証を重ねていきたいと考えている。

ただし、図 3 を見れば明らかなように、X=A の場合の ARMS-SNP LAMP 法の感度は、X=T 及び X=G の場合に比べて劣っている。また、臨床検体における gBLNAR の判定結果（図 8）では G 検出プライマーセットの感度及び特異度が他のものに比してやや劣っている。この理由について、ARMS で導入する塩基の決定は実験によっているが、T 検出プライマーセットでは  $\alpha=G$ 、 $\beta=A$  であるところ、A 及び G 検出プライマーセットでは  $\alpha=A$ 、 $\beta=G$  と異なっており、これが感度の差異として現れている可能性がある。また、このプライマーセットは最初に野生型である X=T の標準配列を用いて T 検出プライマーセットを作成し、その後この X の塩基を変異型である A 及び G に置換して A 及び G 検出プライマーセットを作成していることから、A 及び G 検出プライマーセットは、T

検出プライマーセットほどには最適化されていない可能性が考えられた。さらに、同じ理由で至適反応条件がそれぞれで異なる可能性も考えられた。

ARMS において導入する塩基の如何による感度及び特異度の差異は、現在のところ机上で予測することは困難であり、今回は実験的にしか求められなかった。しかし、種々の病原体を解析することで、今後理論的な予測も可能になるかもしれない。

本研究において、APMS-SNP LAMP 法の高い特異性と有用性が示された一方で、ある程度予測されたことであるが、通常の SNPs タイピングに比して、病原体の検出感度が若干悪くなることが示された。医療現場における病原体の検出感度の低下の影響は、薬剤耐性の判定という利点と比較考量されるものであることから、今後も検証を加えて行く必要がある。

今回の ARMS-SNP LAMP 法の応用性については、様々な議論があることが予想される。

その中でも、感染症分野における懸念事項として挙げられる最たるものが、一塩基置換の有無で薬剤耐性を判定する合理性であろう。全ての薬剤耐性が単一の遺伝子変異で引き起こされることは考えにくい。むしろ、抗菌薬存在下で一塩基置換が定着に至るまでの時間経過の中においてはその一塩基置換のみならず複数の遺伝子変異が誘導されているであろうことから、最終的な形質は一つの薬剤耐性であっても、その原因となる遺伝子変異は複数存在することが考えやすい。この観点から言えば、薬剤耐性の有無の判定は、培養法を用いた MIC の測定によることが原則となる。しかし、この原則的な手法の実施は時間がかかり、医療現場における迅速性の要求を満たせない場合があるという矛盾が存在している。我々が本研究において対象とした *H. influenzae* については、

gBLNAR の存在と、BLNAR 形質による薬剤感受性の MIC 測定による判定結果との間に高度の相関関係が存在していることが報告されている<sup>23, 24)</sup>。この相関関係は、日本における報告を見ればほぼ 100%であり<sup>34)</sup>、gBLNAR が不在の野生型であれば非常に高い確度で BLNAR 形質でなく薬剤感受性であると判定できると主張できる。

一般医療現場において抗菌薬を選択する際に、MIC 測定という原則的な手法の結果を待ちながら、その間は経験的な、ときに過剰な抗菌薬の選択をすることと比して、患者を診察して間を置かずに gBLNAR の有無を判定し、それを指標として抗菌薬の選択をすることは、大きな不利益が存在するとは思われない。ただし、今回用いたインフルエンザ菌の DNA の抽出には数時間を要しており、迅速性は限定的であるとの議論がある可能性は否定できない。しかし、本研究では感度・特異度などの検証のため定量的に DNA が抽出できる手法を用いたが、本来 LAMP 法では夾雑物が存在しても DNA 増幅反応は特異的に進行することから、実用においては定量的な DNA 抽出法である必要は無く、全行程の時間は短縮できる。そして、将来的にインフルエンザ菌や他の菌における簡便な DNA 抽出法が確立されれば、本手法もさらに実用性が増すものと考えられる。このような点から、我々が開発した ARMS-SNP LAMP 法は、一般医療現場や衛生基盤や医療態勢の整備が途上にある国外諸地域などにおける医療資源に乏しい状況を想定したとき、抗菌薬の適正使用という観点から一定の有用性があると考えられる。

最後に、このような臨床に直結する研究を推進して行く上で、基礎研究の重要性を改めて強調しておきたい。本研究において臨床における有用性について検討を重ねた ARMS-SNP LAMP 法を様々な対象に実施する場合、その対象における遺伝子と形質の相関に関する先行情報の存在が不可欠である。本研究にお



いては、前述の培養による MIC 測定という原則的な手法により確定した BLNAR 形質による薬剤感受性・耐性と、遺伝子上に存在する gBLNAR にみられるある種の一塩基置換に存在する高度な相関関係の報告がこれにあたる。その先行情報を得るためには、薬剤耐性に関して言えば、薬剤耐性を付与する機構の理解が欠かせないため、薬剤耐性病原体の基礎的な解析を強力に推進する必要がある、世界的に高まる薬剤耐性病原体に対する懸念に対してはこの基礎的な解析を含めた総合的多角的なアプローチ<sup>35, 36, 37, 38, 39, 40)</sup>が不可欠であることを示している。

## 第6節 結論

一塩基置換変異を迅速かつ簡便に検出できる ARMS-SNP LAMP 法を新規に開発した。

*H. Influenzae* の gBLNAR の判定を行う ARMS-SNP LAMP 法のプライマーを設計できた。

このプライマーにより、1pg~10pg のゲノム DNA があれば gBLNAR を判定できた。また、非特異的反応がないことが示唆された。さらに交叉反応は認められず、種の同定も同時に可能であった。

### 第3章 結論

LAMP 法を応用した、一塩基置換変異の迅速かつ簡便な検出法である ARMS-SNP LAMP 法を新規に開発した。

ARMS-SNP LAMP 法を用いて、*H. Influenzae* の同定及びその一塩基置換変異である gBLNAR の判定が可能であった。同時に種の同定も可能であった。

LAMP 法及びその応用である ARMS-SNP LAMP 法は、種の同定や、薬剤耐性など遺伝子変異に伴う性質の判定の有力な手法となりうることが示された。さらに、この手法は特段の機器を要せず、一般医療現場や発展途上国等の設備等の不十分な環境にあっても迅速かつ簡便に実施することができるため、一般医療現場における迅速検査や発展途上国等の不十分な環境における医療、衛生、農林水産等に広く応用できるものと考えられた。

## 謝辞

本研究の実施及び本論文の作成にあたり、全般にわたりご指導を賜りました防衛医科大学校小児科学講座教授の野々山恵章先生、同内科学（感染症・呼吸器）教授の川名明彦先生及び同国際感染症学教授の宮平靖先生に深甚なる謝意を表します。また、詳細なご指導を賜りました同内科学（感染症・呼吸器）指定講師（当時）の前田卓哉先生（現埼玉医科大学医学部微生物学講座担当准教授）と実験に際し多大なるご助力を賜りました森近恭子様には厚く御礼を申し上げます。さらに、検体採取にご協力を賜りました防衛医科大学校病院検査部微生物学検査部門の結城篤先生及び濱本隆明先生、貴重なご助言を賜りました慶應義塾大学医学部感染症学教室の岩田敏教授、生方公子先生、諸角美由紀先生及び岐阜大学大学院再生医科学専攻再生分子統御学病原体制御学の江崎孝行教授、宮田町子先生に深謝いたします。そして、貴重なご指導ご指摘をいただきました教官・研究科生の皆様、検体採取にご同意くださいました患者・保護者の皆様に感謝いたします。

なお、本研究ではゲノム DNA を、ナショナルバイオリソースプロジェクトとして国立大学法人岐阜大学微生物遺伝資源保存センター及び国立大学法人千葉大学真菌医学研究センターから分与していただきました。

## 単語・略語説明

### Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

我が国で開発された迅速かつ簡便に実施できる核酸増幅技術。恒温環境下で連続的に反応が進行すること及び反応の結果を目視で確認できることから特殊な機器を要せず、迅速かつ簡便に核酸増幅の有無を判定できる。この特長を活かし、医療、衛生、農林水産分野での応用や、発展途上国での研究等に広く活用されている。

### Polymerase chain reaction (PCR)

2本鎖DNAが温度により解離・結合状態が変化する性質を応用した核酸増幅技術。反応の進行には精密な温度変化が必要であるため、サーマルサイクラーと呼ばれる専用の機器を必要とする。また、反応の結果を確認するには電気泳動など別の工程を必要とする。

### Amplification Refractory Mutation System (ARMS)

PCRにおける特異度を高める手法。プライマー領域に近接して複数の塩基のミスマッチがあるとプライマーのアニーリング（結合）が阻害され増幅反応が進行しなくなることを利用する。

### SNPs タイピング

LAMP法における一塩基変異を同定する手法。LAMP法ではF1c及びB1cと呼ばれる領域の5'末端が常に増幅起点となることを利用し、ここに同時に重ねて検出標的の一塩基変異の領域を設定することで、変異があれば常に増幅起点がミスマッチとなり反応が遅延する。

### Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

一塩基変異のうち、頻度が概ね1%以上であるもの。薬剤に対する作用・副作用の蓋然性への影響など、これまで病的とされてこなかった個体の性質等との関連が報告されてきており、個別化医療等への応用が進められている。一塩基多型とも呼ばれる。

### *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*)

病原性を持つ細菌の一種。様々な型があり、気道感染症や侵襲的感染症の主要病原菌となる。培養には通常と異なる培地や環境を要する。近年、薬剤耐性を示す株が増加しており、その機構の研究が進んでいる。

### Penicillin Binding Protein (PBP)

細菌の細胞壁合成に必要な酵素。βラクタム系抗菌薬と結合すると、細菌の細胞壁合成が阻害され増殖できなくなることから、その作用標的となる。ペニシリン結合タンパク質とも呼ばれる。

### beta-lactamase-negative ampicillin-resistant (BLNAR)

βラクタマーゼによらない薬剤耐性。βラクタム系抗菌薬に対する耐性は、これを分解するβラクタマーゼの産生によることがあるが、BLNARではβラクタマーゼの産生によらずに耐性を示す。機構としてPBPの変異によるβラクタム系抗菌薬の結合阻害が知られており、*H. influenzae*のBLNARはこれによる。βラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性とも呼ばれる。

genetic BLNAR (gBLNAR)

BLNAR をもたらす又は強く相関する遺伝子形質。

minimum inhibitory concentration (MIC)

微生物の発育を阻止できる抗菌薬等の最小濃度。微生物の抗菌薬等に対する感受性の指標の1つで、薬剤感受性・耐性の判定における原則的手法とされる。最小発育阻止濃度とも呼ばれる。

## 参考文献

- 1) McCarthy JJ, Hilfiker R. The use of single-nucleotide polymorphism maps in pharmacogenomics. *Nat Biotechnol.* 2000;18:505-8.
- 2) Chakravarti A. To a future of genetic medicine. *Nature.* 2001;409:822-3.
- 3) Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 1980;32:314-31.
- 4) Snipes KP, Hirsh DC, Kasten RW, Hansen LM, Hird DW, Carpenter TE, et al. Use of an rRNA probe and restriction endonuclease analysis to fingerprint *Pasteurella multocida* isolated from turkeys and wildlife. *J Clin Microbiol.* 1989;27:1847-53.
- 5) Koeuth T, Versalovic J, Lupski JR. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Res.* 1995;5:408-18.
- 6) Chan MS, Maiden MC, Spratt BG. Database-driven multi locus sequence typing (MLST) of bacterial pathogens. *Bioinformatics.* 2001;17:1077-83.
- 7) Carle GF, Olson MV. An electrophoretic karyotype for yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82:3756-60.
- 8) 山口英世. ニューモシスチスとはどんな微生物か?—その生物学と分類学を中心に—. *モダンメディア.* 2011;57:125-145.
- 9) Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 1991;173:697-703.
- 10) Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol.* 1994;32:335-51.

- 11) Tsai JC, Teng LJ, Hsueh PR. Direct detection of bacterial pathogens in brain abscesses by polymerase chain reaction amplification and sequencing of partial 16S ribosomal deoxyribonucleic acid fragments. *Neurosurgery*. 2004 Nov;55(5):1154-62.
- 12) Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000;28:E63.
- 13) 高野弘, 酒井栄一, 佐々木泰治. LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法の原理と応用. *モダンメディア*. 2014; 60:211-231.
- 14) Bojang AL, Mendy FS, Tientcheu LD, Otu J, Antonio M, Kampmann B, et al. Comparison of TB-LAMP, GeneXpert MTB/RIF and culture for diagnosis of pulmonary tuberculosis in The Gambia. *J Infect*. 2016;72:332-7.
- 15) Kouzaki Y, Maeda T, Sasaki H, Tamura S, Hamamoto T, Yuki A, et al. A simple and rapid identification method for *Mycobacterium bovis* BCG with Loop-mediated isothermal amplification. *PLoS One*. 2015;10:e0133759.
- 16) Iwasaki M, Yonekawa T, Otsuka K, Suzuki W, Nagamine K, Hase T, et al. Validation of the Loop-mediated isothermal amplification method for single nucleotide polymorphism genotyping with whole blood. *Genome Letters*. 2003;2:119-126.
- 17) Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res*. 1989;17:2503-16.
- 18) Ikeda S, Takabe K, Inagaki M, Funakoshi N, Suzuki K. Detection of gene point mutation in paraffin sections using in situ loop-mediated isothermal amplification. *Pathol Int*. 2007;57:594-9.
- 19) Markowitz SM. Isolation of an ampicillin-resistant, non-beta-lactamase-producing strain of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents*



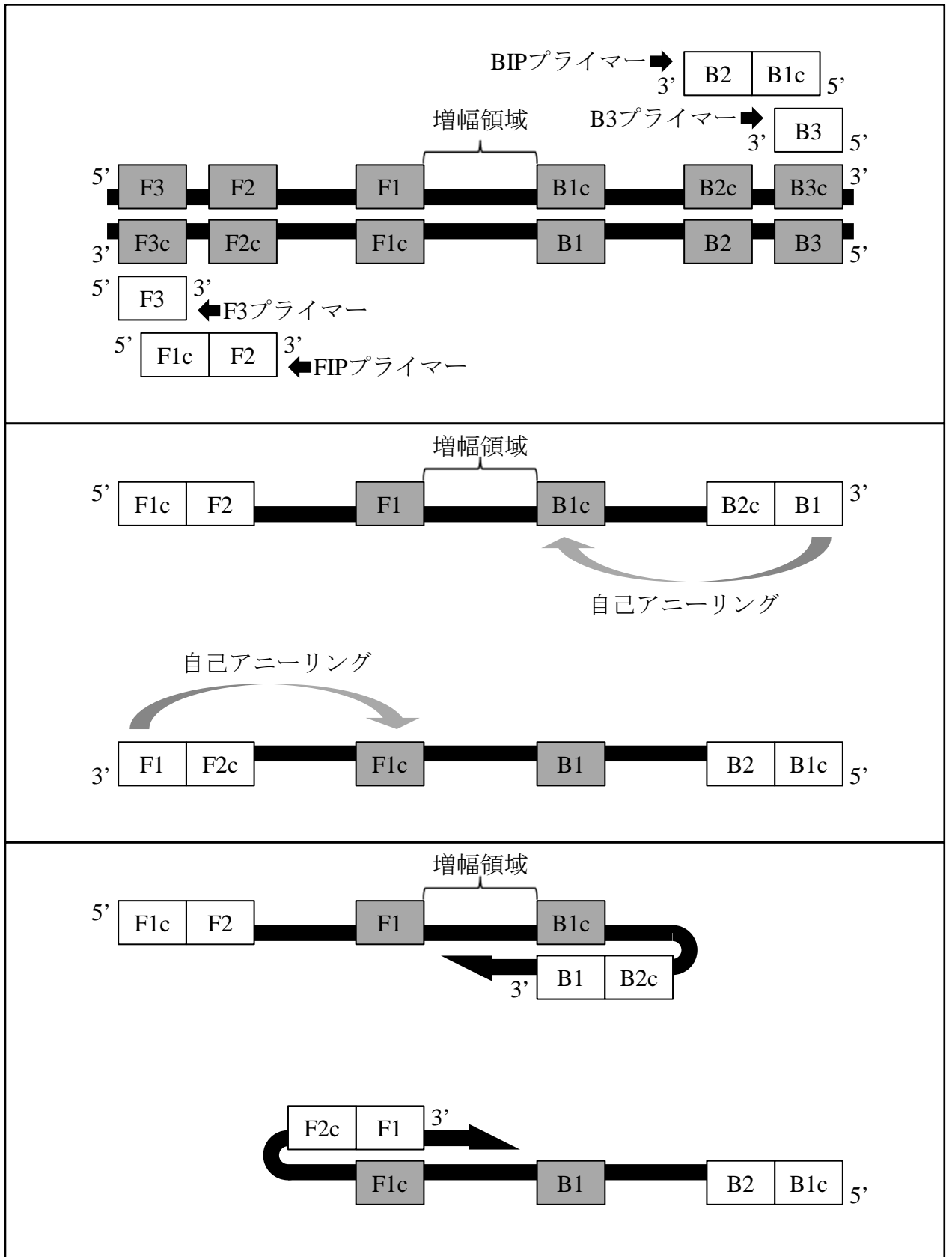
Chemother. 1980;17:80-3.

- 20) 生方公子. 耐性インフルエンザ菌. 医学のあゆみ. 2004;209:525-528.
- 21) Shiro H, Sato Y, Toyonaga Y, Hanaki H, Sunakawa K. Nationwide survey of the development of drug resistance in the pediatric field in 2000-2001, 2004, 2007, 2010, and 2012: evaluation of the changes in drug sensitivity of *Haemophilus influenzae* and patients' background factors. *J Infect Chemother.* 2015;21:247-56.
- 22) Hasegawa K, Yamamoto K, Chiba N, Kobayashi R, Nagai K, Jacobs MR, et al. Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. *Microb Drug Resist.* 2003;9:39-46.
- 23) Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, Chiba N, Hasegawa K, Takeuchi Y, et al. Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with beta-lactam resistance in beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:1693-9.
- 24) Dabernat H, Delmas C, Seguy M, Pelissier R, Faucon G, Bennamani S, et al. Diversity of beta-lactam resistance-conferring amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:2208-18.
- 25) Søndergaard A, Witherden EA, Nørskov-Lauritsen N, Tristram SG. Interspecies transfer of the penicillin-binding protein 3-encoding gene *ftsI* between *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus* can confer reduced susceptibility to  $\beta$ -lactam antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:4339-42.
- 26) Witherden EA, Kunde D, Tristram SG. PCR screening for the N526K substitution in isolates of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus*. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68:2255-8.

- 27) Yamazaki Y, Sugawara H. National BioResource Project Information Center. *Exp Anim.* 2009;58:75-84.
- 28) Uemura N, Makimura K, Onozaki M, Otsuka Y, Shibuya Y, Yazaki H, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for diagnosing *Pneumocystis pneumonia*. *J Med Microbiol.* 2008;57:50-7.
- 29) U. S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013.* 2013.
- 30) World Health Organization. *The evolving threat of antimicrobial resistance - Options for action.* 2012.
- 31) World Health Organization. *Global Action Plan on Antimicrobial Resistance.* 2015.
- 32) Infectious Diseases Society of America. *The 10 x '20 Initiative: pursuing a global commitment to develop 10 new antibacterial drugs by 2020.* *Clin Infect Dis.* 2010;50:1081-3.
- 33) 舘田一博. 抗菌薬開発停滞の打破に向けて. *日本内科学会雑誌.* 2013;102:2908-2914.
- 34) Hotomi M, Fujihara K, Billal DS, Suzuki K, Nishimura T, Baba S, et al. Genetic characteristics and clonal dissemination of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* strains isolated from the upper respiratory tract of patients in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:3969-76.
- 35) Kelly R, Zoubiane G, Walsh D, Ward R, Goossens H. Public funding for research on antibacterial resistance in the JPIAMR countries, the European Commission, and related European Union agencies: a systematic observational analysis. *Lancet Infect Dis.* 2016;16:431-40.

- 36) Global Research Collaboration for Infectious Disease Preparedness (GloPID-R). Final Report: Connecting and Mapping. 2016.
- 37) United States. National Action Plan for Combating Antibiotic-resistant Bacteria. 2015.
- 38) Transatlantic Taskforce on Antimicrobial Resistance. Progress report. 2014.
- 39) Abe S. Japan's vision for a peaceful and healthier world. Lancet. 2015;386:2367-9.
- 40) 国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議. 薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン 2016-2020. 2016.

図1a. LAMP法



## 図1. LAMP法

太い線及び長方形は一本鎖DNAを示す。灰色の長方形は鋳型DNA及びそれを基に複製されたDNAを示す。白色の長方形はプライマー及びそれを基に複製されたDNAを示す。「c」を付した長方形は、その領域及び配列と相補であることを示す。

### 図1a. LAMP法におけるプライマー領域と増幅反応の概要

#### 上段：LAMP法のプライマー領域及びプライマー

プライマー領域（灰色の長方形）は鋳型DNAの5'側から3'側に向かってF3、F2、F1、B1c、B2c、B3cと示される。プライマーは、B1cとB2の配列をつなげた「BIPプライマー」とB3の配列の「B3プライマー」を使用する。相補鎖でも同様にFIPプライマーとF3プライマーを使用する。

#### 中段：自己アニーリング

初期の反応の結果、図に示す中間構造をとる。3'末端のF1とB1が中間にあるF1cとB1cにそれぞれ自己アニーリングする。煩雑になるため図では示していないが、5'末端のF1cとB1cも中間のF1とB1にそれぞれ自己アニーリングする。その結果、それぞれの末端でループを形成したダンベル型の増幅起点構造をとる。

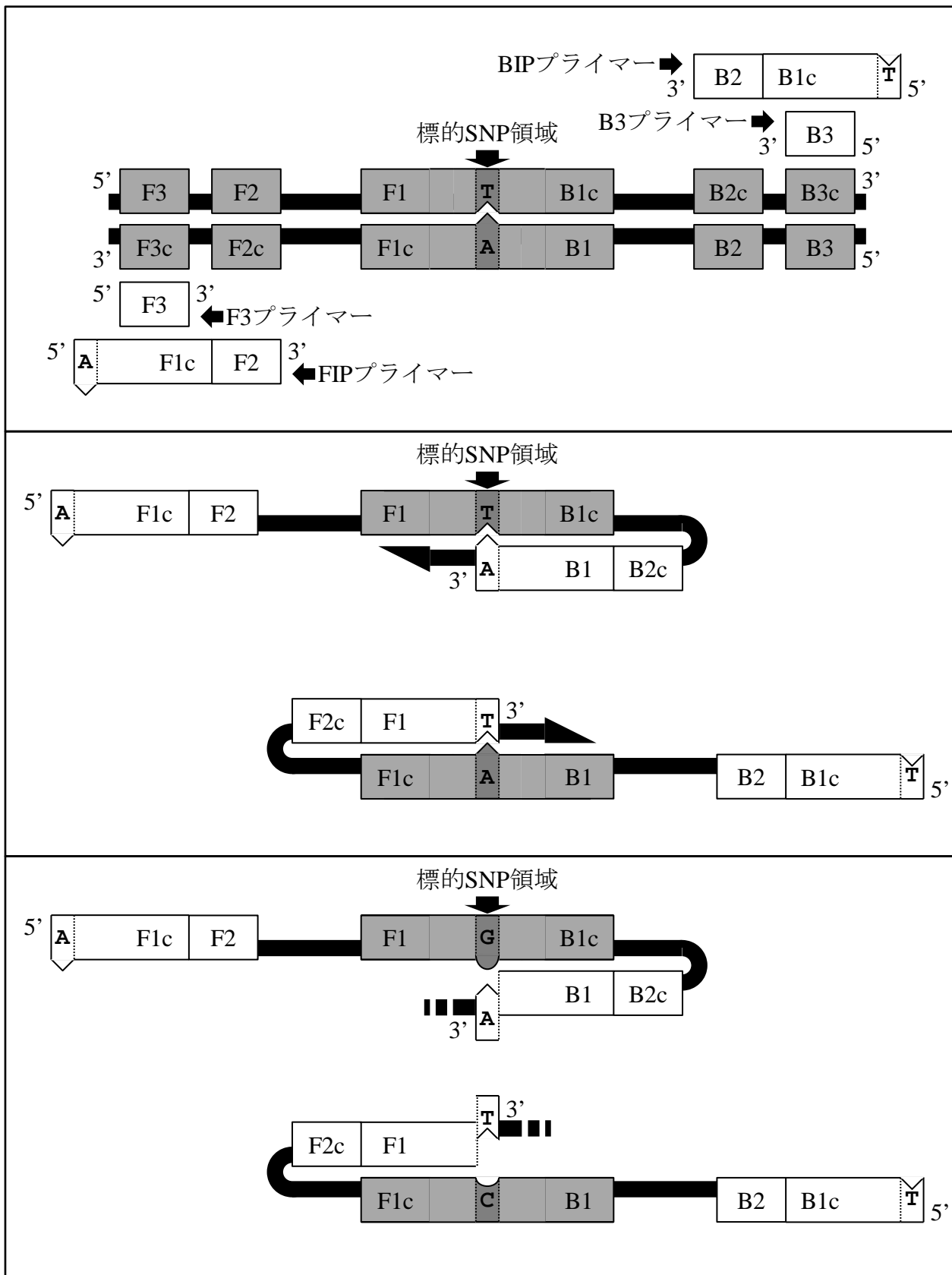
#### 下段：増幅起点構造

F1及びB1の3'末端から増幅反応が進行する。このとき酵素は、そのアニーリングをはがしながらDNA鎖を合成する特性により、5'末端側の自己アニーリングをはがしながら反応を進行させる。

5'末端まで反応が進行すると、5'末端にあるB1c及びF1cを鋳型に複製されたB1及びF1は中間に複製されたB1c及びF1cに再び自己アニーリングする。このB1及びF1は3'末端であるため、ここから増幅反応が再度進行する。こうして増幅反応が連続的に進行する。

このように、LAMP法では、F1c及びB1cの5'末端が増幅反応の起点となるため、この領域におけるプライマーと鋳型DNAとの相補性が増幅効率に特に影響する。なお、3'末端にあるF1及びB1はプライマー由来であり、中間にあるF1c及びB1cは鋳型DNA由来である。

図1b. SNPsタイピング



## 図1b. SNPsタイピング

SNPsタイピングは、LAMP法を応用した一塩基変異の検出手法である。

上段：SNPsタイピングのプライマー領域及びプライマー

検出目的の標的SNP領域をF1c及びB1cの5'末端に同時に重ねて設定することで、SNPの有無による増幅効率の影響を増大させる。図中の濃灰色は標的SNP領域で、F1c及びB1cの5'末端を重ねていることを示す。

中段：鋳型DNAにSNPがない場合の反応

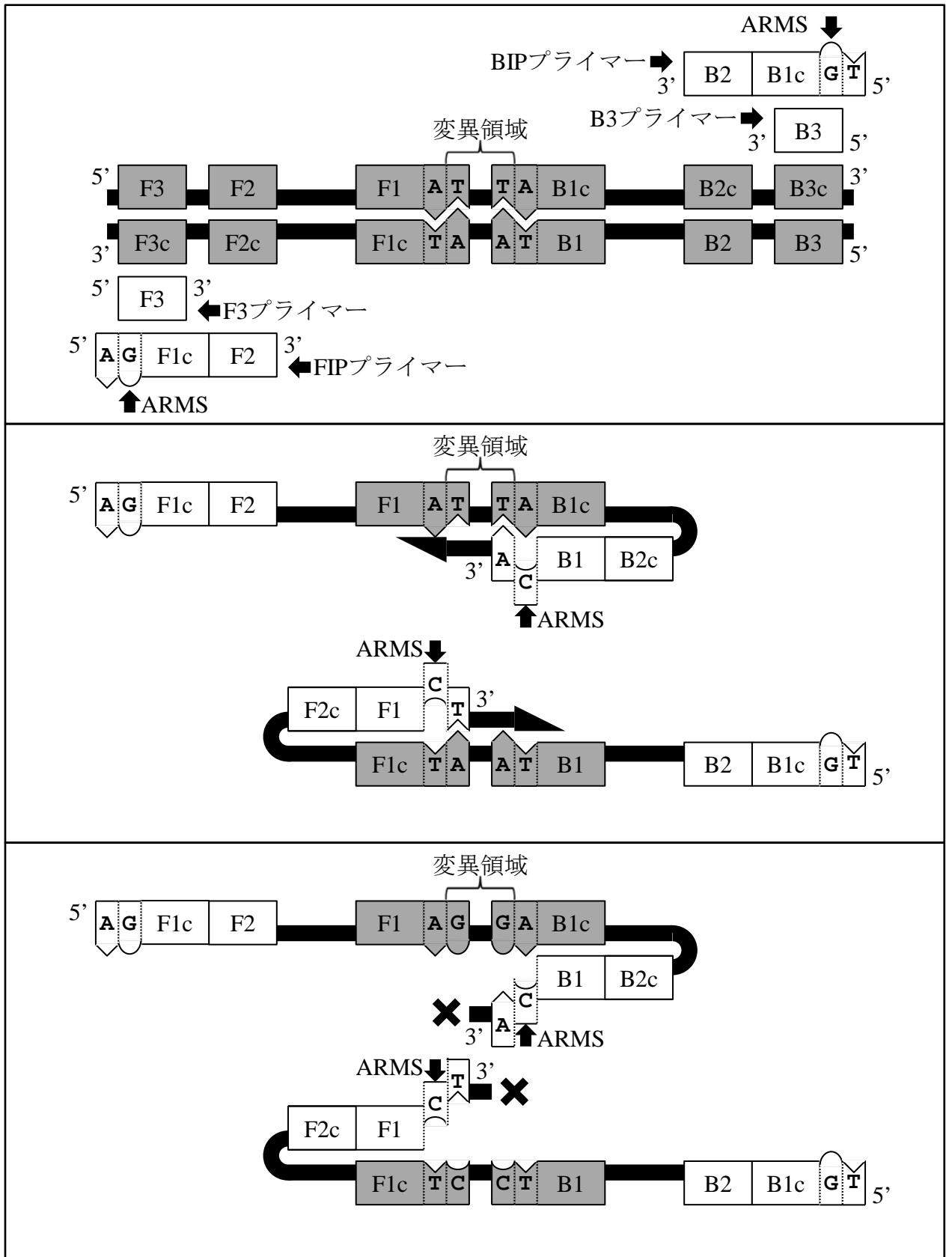
鋳型DNA由来である標的SNP領域の塩基とプライマー由来であるF1及びB1の3'末端の塩基が相補であるため、いずれも自己アニーリングでき、反応が進行する。

下段：鋳型DNAにSNPがある場合の反応

鋳型DNA由来である標的SNP領域の塩基とプライマー由来であるF1及びB1の3'末端の塩基が相補でないため、いずれも自己アニーリングできず、増幅反応の進行が極端に遅くなる。

ただし、1塩基の相違では増幅反応が進行することがあるため、たとえSNPがあっても最終的に増幅反応は進行することがある。

図1c. ARMS LAMP法





### 図1c. ARMS-LAMP法

ARMS-LAMP法は、変異領域の有無をPCR法で検出する技術をLAMP法に応用した手法である。

上段：ARMS-LAMP法のプライマー領域及びプライマー

鋳型DNAのF1及びB1の3'末端を標的である変異領域の末端に設定し、プライマーのF1c及びB1cにおいて、5'末端から1~2塩基分3'側の塩基をあえて鋳型DNAと異ならせる。

中段：鋳型DNAに変異がない場合の反応

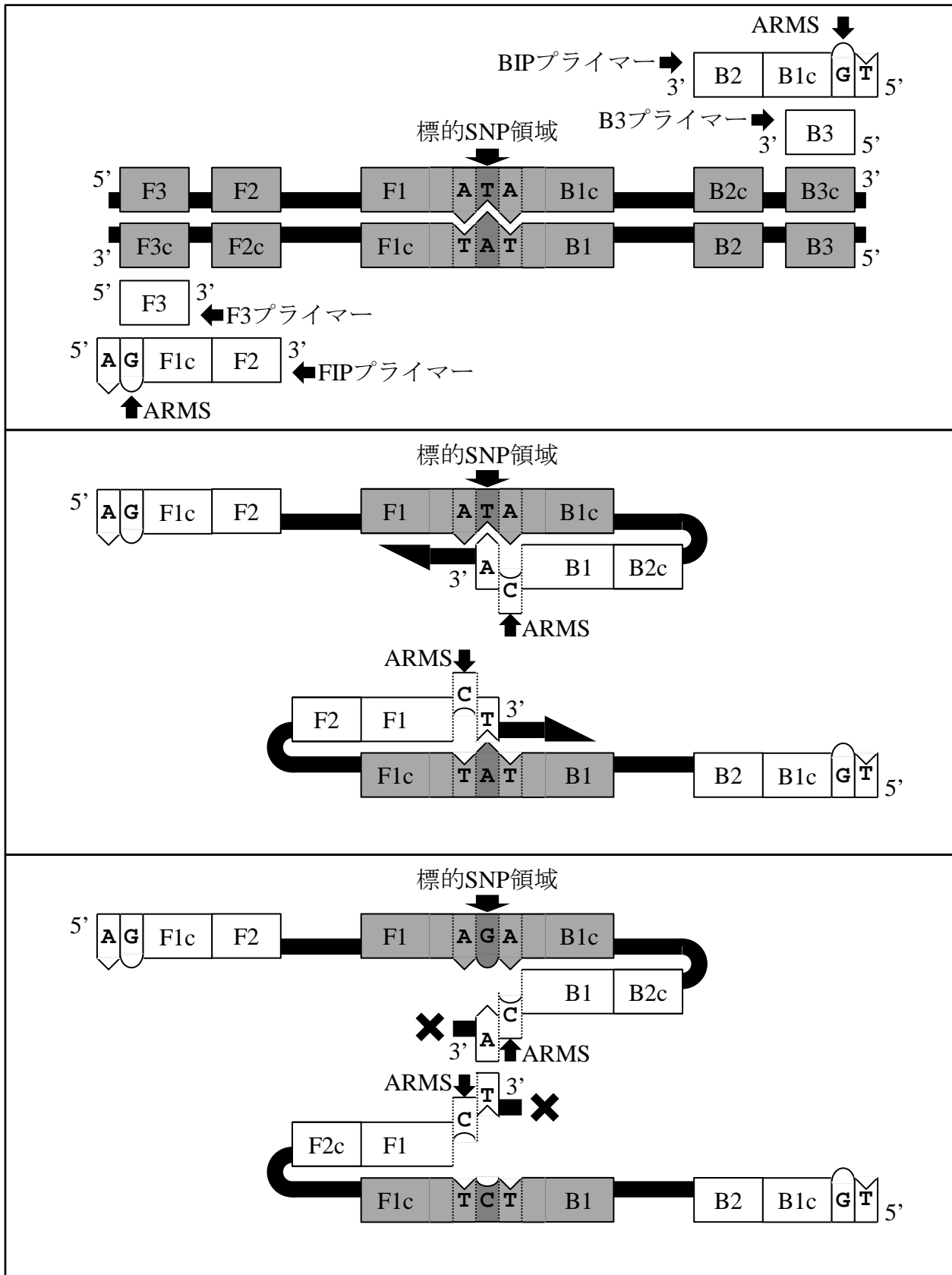
3'末端のF1及びB1が変異領域である中間のF1c及びB1cと相補であるため、変異はARMS-LAMP法による1塩基のみとなる。1塩基の変異であれば自己アニーリングでき、反応が進行する。

下段：鋳型DNAに変異がある場合の反応

3'末端のF1及びB1が変異領域である中間のF1c及びB1cと相補でないため、変異はARMS-LAMP法によるものと合わせて2塩基となる。2塩基の変異では、たとえその次の塩基が相補であったとしてもアニーリングは非常に困難であり、反応が大幅に阻害される。

ただし、標的とする変異が1塩基の場合、鋳型DNAのF1及びB1の両方にその標的とする配列相違を設定することができないため、判定不能である。

図1d. ARMS-SNPLAMP法



#### 図1d. ARMS-SNP LAMP法

SNPsタイピングにARMS法を組み合わせた手法である。SNPsタイピングの、一塩基変異があっても増幅反応が進行することがある点と、ARMS-LAMP法の、変異が1塩基の場合は判定ができない点を相互に補い、一塩基変異をより確実に検出できる。

上段：ARMS-SNP LAMP法のプライマー領域及びプライマー

検出目的の標的SNP領域をF1c及びB1cの5'末端に同時に重ねて設定する。さらに、プライマーのF1c及びB1cにおいて、5'末端から1~2塩基分3'側の塩基をあえて鋳型DNAと相違させる。

中段：鋳型DNAに一塩基変異がない場合の反応

鋳型DNA由来である標的SNP領域の塩基とプライマー由来であるF1及びB1の3'末端の塩基が相補であるため、相違はARMS-LAMP法による1塩基のみとなる。1塩基の相違であれば自己アニーリングでき、反応が進行する。

下段：鋳型DNAに一塩基変異がある場合の反応

鋳型DNA由来である標的SNP領域の塩基とプライマー由来であるF1及びB1の3'末端の塩基が相補でないため、相違はARMS-LAMP法によるものと合わせて2塩基となる。2塩基の相違では、たとえその次の塩基が相補であったとしてもアニーリングは非常に困難であり、反応が大幅に阻害される。

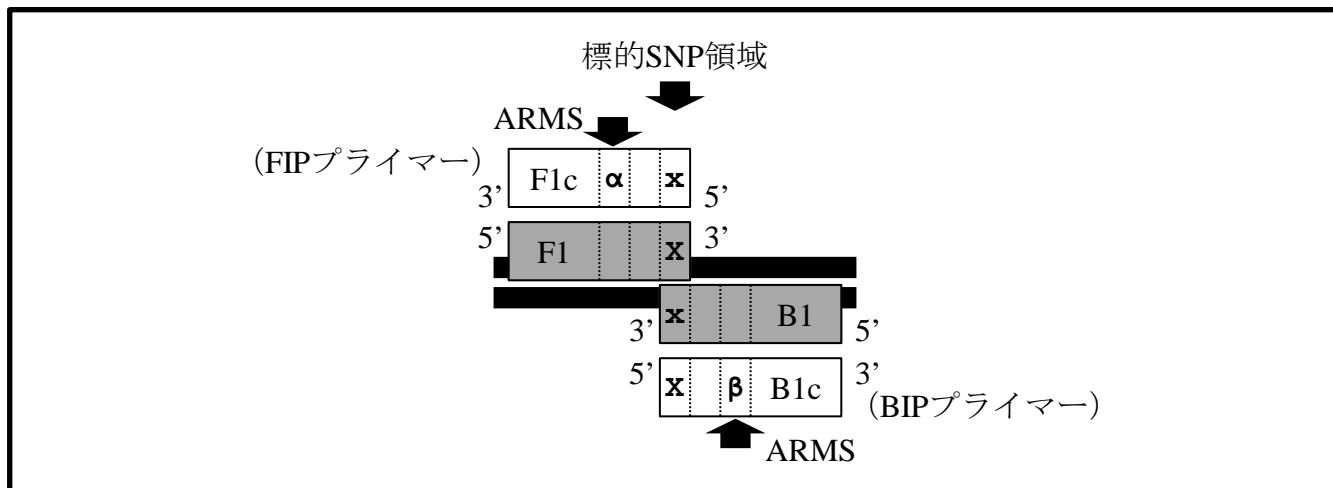
表1. 検体のゲノムDNAのリソース名

Bacteria (JNBP numbers; Name)			Fungus (IFN numbers; Name)		
05698	<i>Streptococcus</i>	<i>piogenes</i>	4924	<i>Aspergillus</i>	<i>fumigatus</i>
05652	<i>S.</i>	<i>mutans</i>	41398	<i>A.</i>	<i>niger</i>
05511	<i>S.</i>	<i>agalactiae</i>	5366	<i>A.</i>	<i>flavus</i>
05681	<i>S.</i>	<i>pneumoniae</i>	5505	<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>
05252	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	61880	<i>C.</i>	<i>gattii</i>
05279	<i>S.</i>	<i>aureus</i> (MRSA)	4949	<i>Candida</i>	<i>albicans</i>
05336	<i>S.</i>	<i>epidermidis</i>	5489	<i>C.</i>	<i>glabrata</i>
02775	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	5462	<i>C.</i>	<i>krusei</i>
02019	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	5464	<i>C.</i>	<i>parapsilosis</i>
01568	<i>Citrobacter</i>	<i>farmeri</i>	5446	<i>C.</i>	<i>tropicalis</i>
01922	<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	40507	<i>Mucor</i>	<i>circinelloides</i>
04166	<i>Proteus</i>	<i>mirabilis</i>	40515	<i>Rhizopus</i>	<i>oryzae</i>
05051	<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>	0138	<i>Nocardia</i>	<i>farcinica</i>
04211	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	55089	<i>Spirotrichum</i>	<i>purpureum</i>
01429	<i>Burkholderia</i>	<i>pseudomallei</i>	49269	<i>Basidiobolus</i>	<i>meristosporus</i>
01112	<i>Acinetobacter</i>	<i>baumanii</i>	5279	<i>Trichophyton</i>	<i>violaceum</i>
03104	<i>Moraxella</i>	<i>catarrhalis</i>	40746	<i>Epidermophyton</i>	<i>floccosum</i>
05487	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophilia</i>	41980	<i>Microsporum</i>	<i>ferrugineum</i>
02860	<i>Legionella</i>	<i>pneumophila</i>	4805	<i>Cladosporium</i>	<i>carrionii</i>
01754	<i>Corynebacterium</i>	<i>diphtheriae</i>	40081	<i>Malassezia</i>	<i>furfur</i>
CL*	<i>Mycobacterium</i>	<i>tuberculosis</i>	46458	<i>Madurella</i>	<i>mycetomi</i>
03828	<i>M.</i>	<i>microti</i>	4856	<i>Fonsecaea</i>	<i>pedrosoi</i>
03463	<i>M.</i>	<i>kansasii</i>	40732	<i>Trichophyton</i>	<i>rubrum</i>
03179	<i>M.</i>	<i>avium</i>	CL*	<i>Pneumocystis</i>	<i>jirovecii</i>
03326	<i>M.</i>	<i>gordonae</i>			
03370	<i>M.</i>	<i>intracellulare</i>			
03537	<i>M.</i>	<i>marinum</i>			
03231	<i>M.</i>	<i>chelonae</i>			
03282	<i>M.</i>	<i>fortuitum</i>			
03611	<i>M.</i>	<i>scrofulaceum</i>			
02665	<i>Haemophilus</i>	<i>influenzae</i> (BLNAR)			
02719	<i>H.</i>	<i>influenzae</i>			

CL\*: clinically isolated strain

ナショナルバイオリソースプロジェクトから分与されたゲノムDNAの由来菌株の種属及びリソース名を示す。CLは臨床検体から抽出したゲノムDNAを示す。

図2. ARMS-SNP LAMP法のプライマーセット

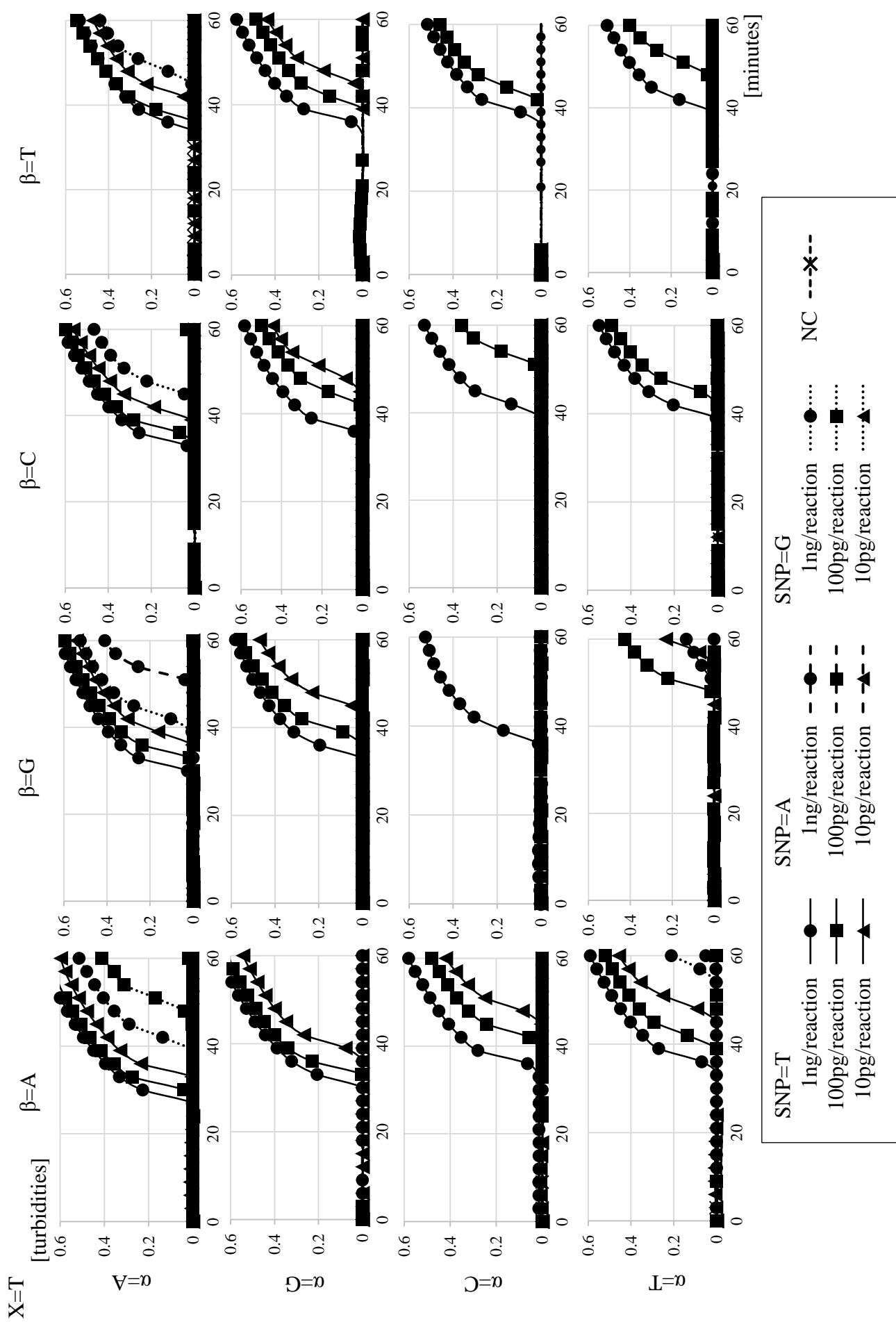


Primer Type	Sequences (5'-3')	Length
FIP	<b>xT<math>\alpha</math></b> TACATAATGTCCATTTTCAA-CAATGGTGAAGGCTACC	41
BIP	<b>XA<math>\beta</math></b> ATATGTGGCATTACTGC-CACTAATGCATAACGAGGGTC	42
F3	TTGTGGGAATTTTAGAGAAAGT	22
B3	CCACCATAATATTCTCCTGCT	21
LF	TACCCGTTTTTCACGCCGACAC	21

BIPの5'末端にあるXは、検出目的のSNP領域に入る塩基を示す。Xに入った塩基をSNPに持つ核酸は増幅するが、異なるSNPをもつ核酸は増幅しないか増幅が大幅に遅れる。このプライマーセットにおけるXは野生型であるTか、変異型であるA又はGのいずれかとなる。FIPの5'末端にあるxは、Xの相補塩基となる。

FIP及びBIPの5'末端から2塩基分3'側にある $\alpha$ 及び $\beta$ には、鋳型配列にかかわらず、A、G、C、Tのいずれかが入る。

図3. *H. Influenzae*のゲノムDNAにおける感度及び特異度



X=A

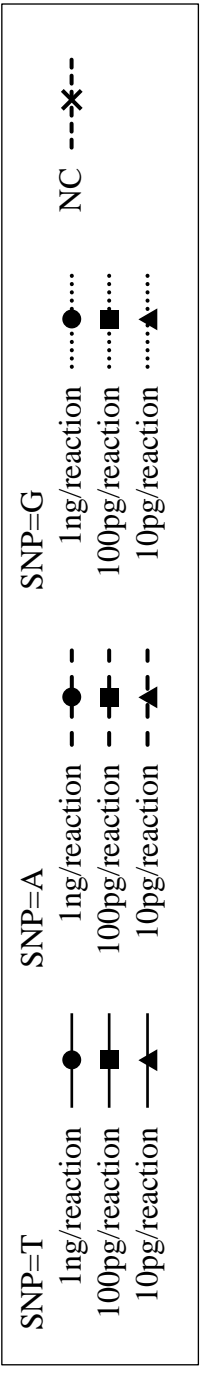
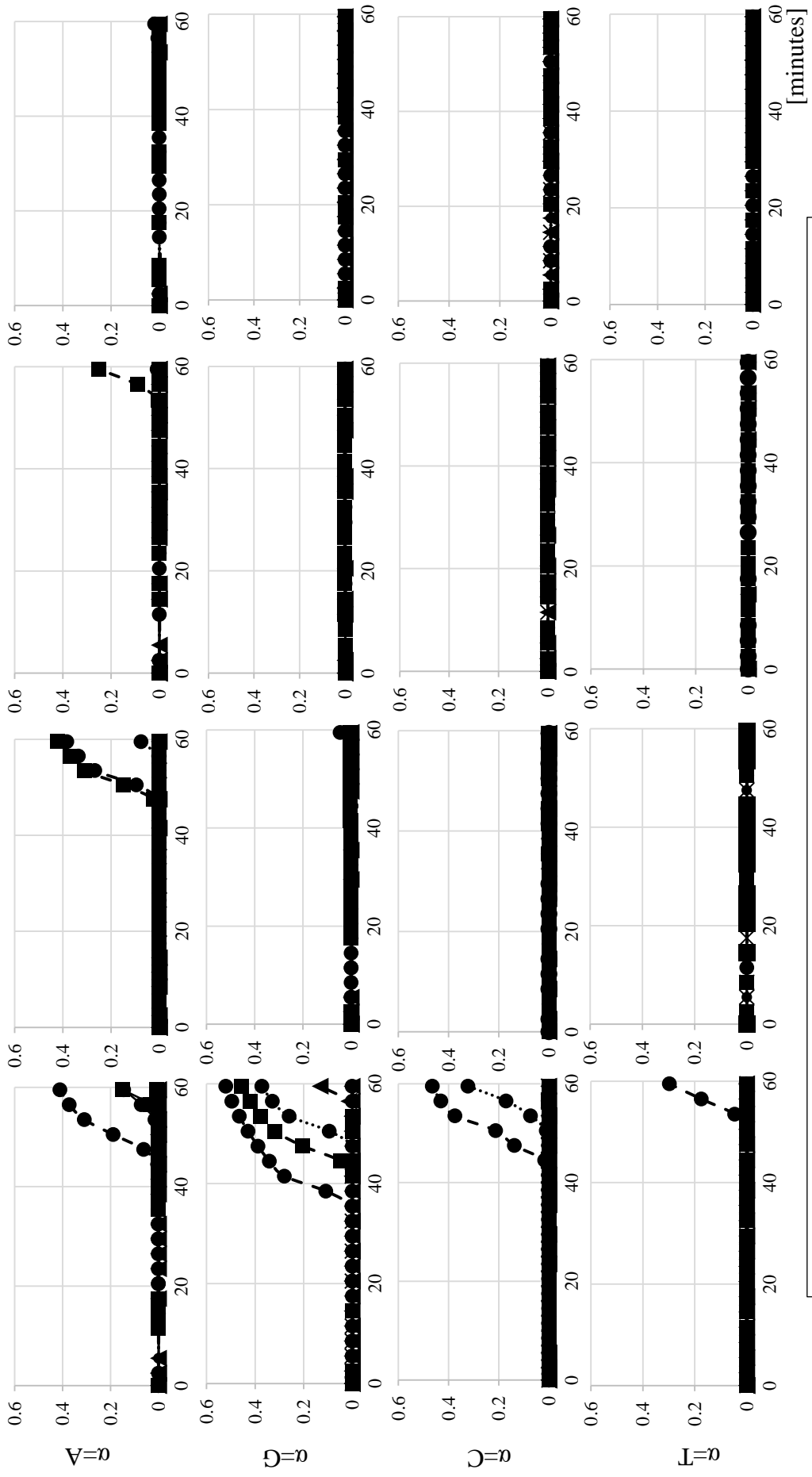
$\beta=A$

$\beta=G$

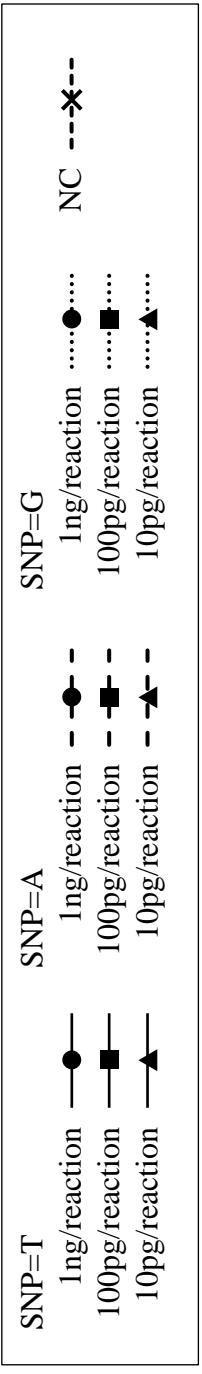
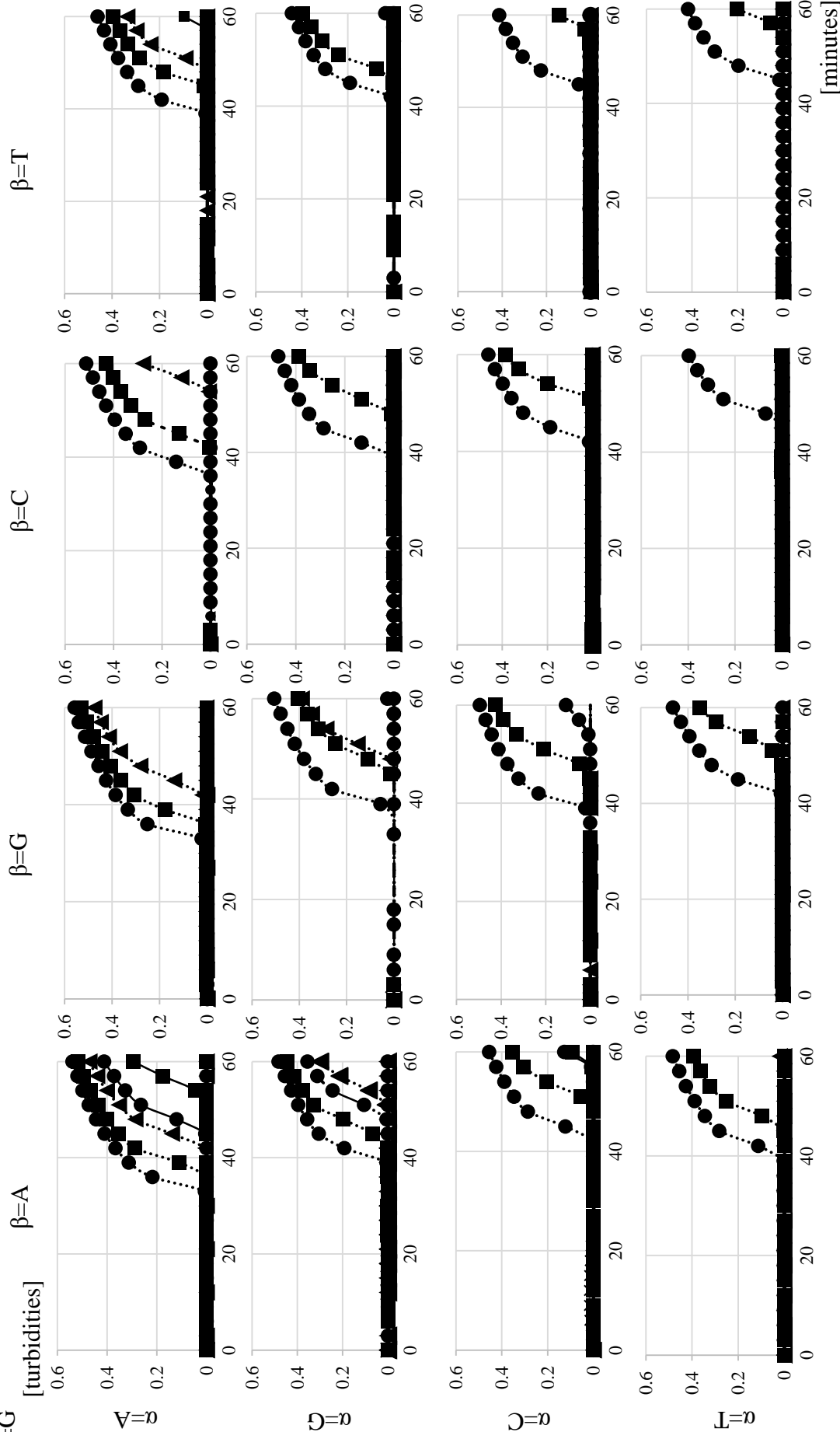
$\beta=C$

$\beta=T$

[turbidities]



X=G

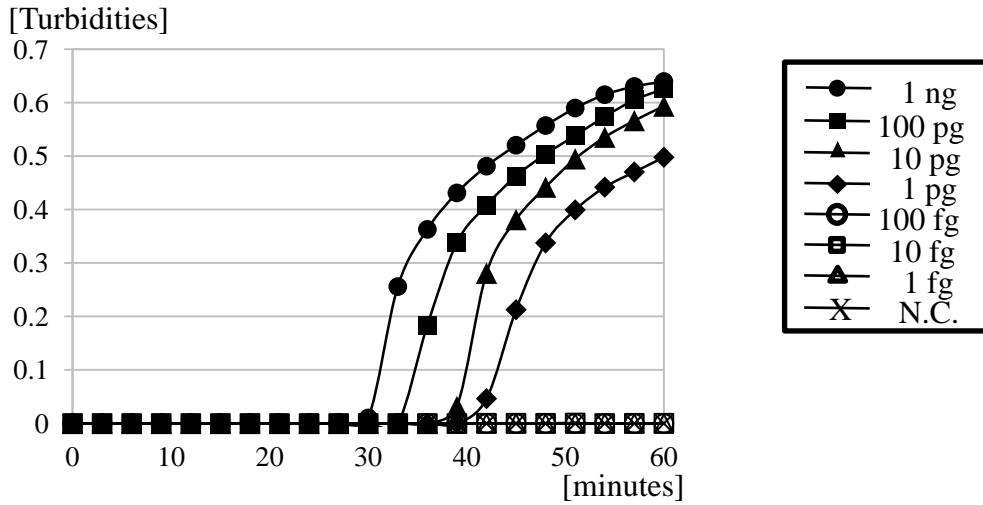




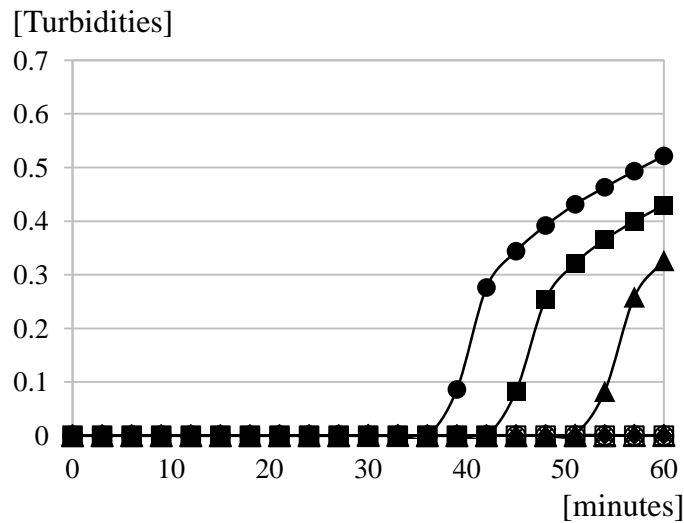
Xは、プライマーにおけるSNP領域を示す。ここに、検出目的のSNPが入る。 $\alpha$ はFIPにおける、 $\beta$ はBIPにおける、ARMSにより置換される領域の塩基を示す。標準配列ではいずれもAであるため、 $\alpha=A$ 及び $\beta=A$ はARMSを導入しないことと同義となる。それぞれのグラフのセットは、上段はT検出プライマー、中段はG検出プライマー、下段はA検出プライマーにおける結果を示す。それぞれにおいて、最上段はFIPにARMSを導入しないもの、2段目はFIPにARMSとしてGを導入したもの、3段目はFIPにARMSとしてCを導入したもの、最下段はFIPにARMSとしてTを導入したものを示し、最左翼はFIPにARMSを導入しないもの、2列目はBIPにARMSとしてGを導入したもの、3列目はBIPにARMSとしてCを導入したもの、最右翼はFIPにARMSとしてTを導入したものを示す。

図4.決定した各検出プライマーセットにおける詳細な感度及び特異度

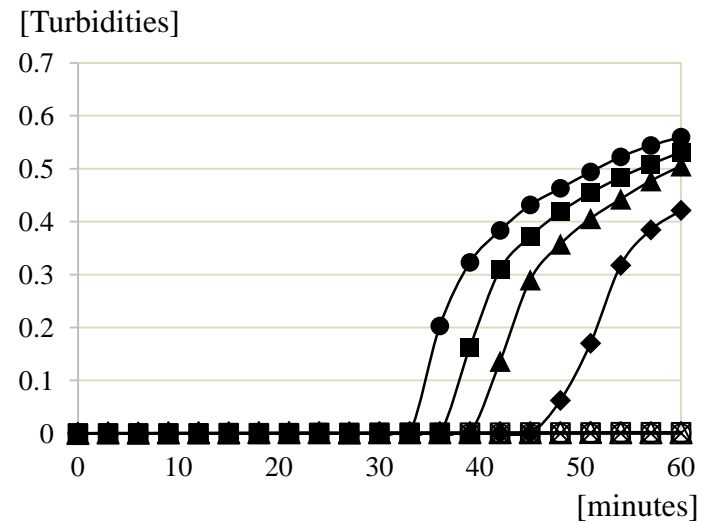
X=T ( $\alpha=G, \beta=A$ )



X=A ( $\alpha=A, \beta=G$ )



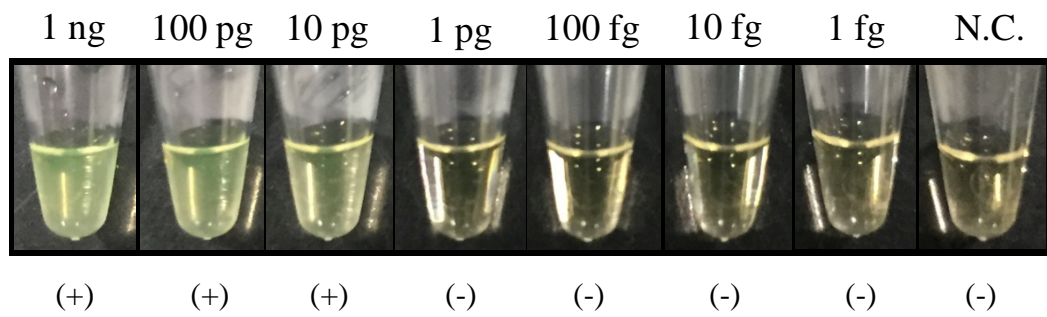
X=G ( $\alpha=A, \beta=G$ )



上段はT検出プライマーセットの、下段左はA検出プライマーセットの、下段右はG検出プライマーセットの結果をそれぞれ示す。

T及びG検出プライマーセットは一反応当たり1pgまで、A検出プライマーセットでは同10pg以上の検体において増幅反応が認められた。また、全てのプライマーセットにおいて、一反応当たり1ngで他のゲノムDNAの増幅は認められなかった。

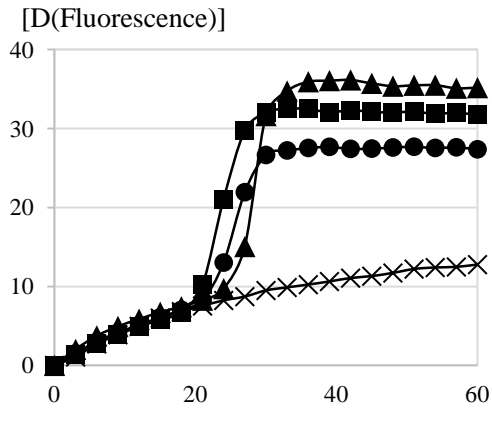
図5. 目視による感度



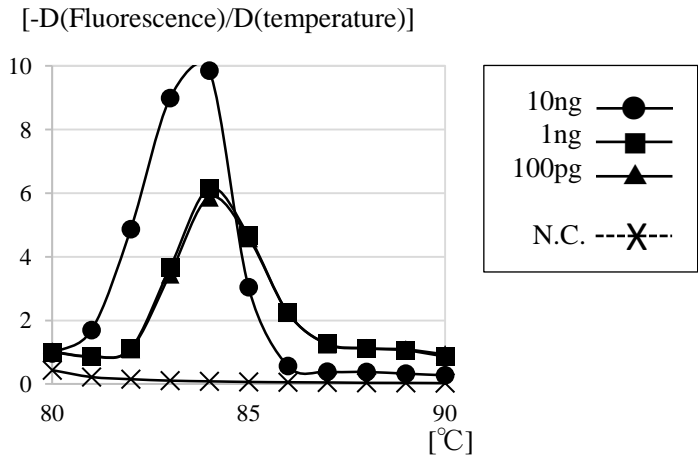
代表としてT検出プライマーセットの結果を示す。10pgまで検出可能となっている。

図6.決定した各検出プライマーセットにおけるアルタイム蛍光検出による熱解離曲線解析

X=T ( $\alpha=G, \beta=A$ )

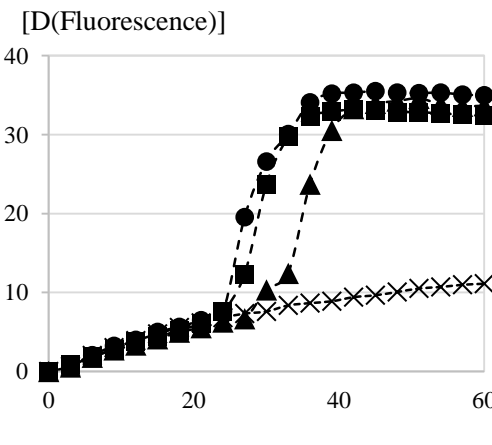


[minutes]

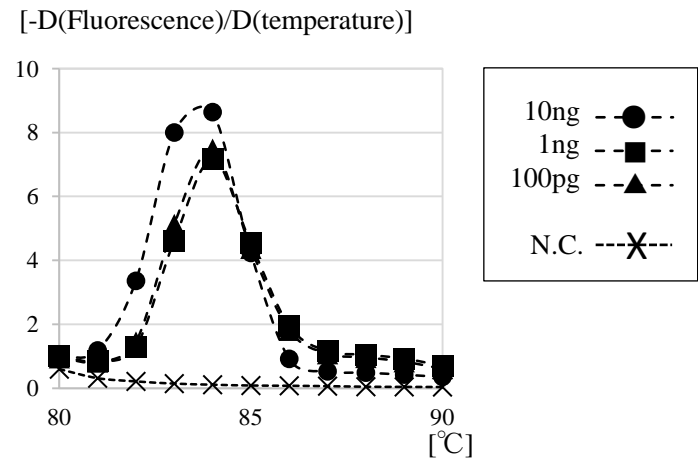


[°C]

X=A ( $\alpha=A, \beta=G$ )

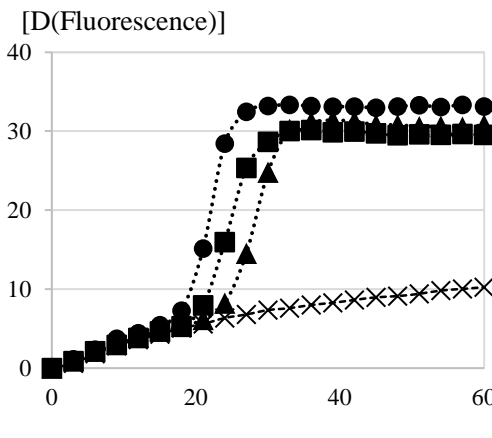


[minutes]

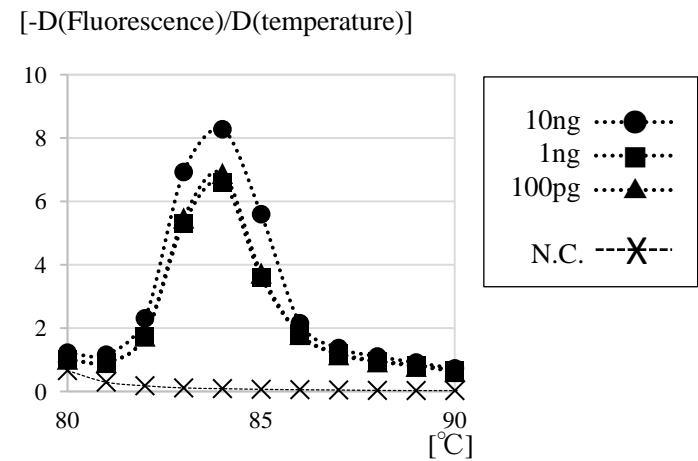


[°C]

X=G ( $\alpha=A, \beta=G$ )



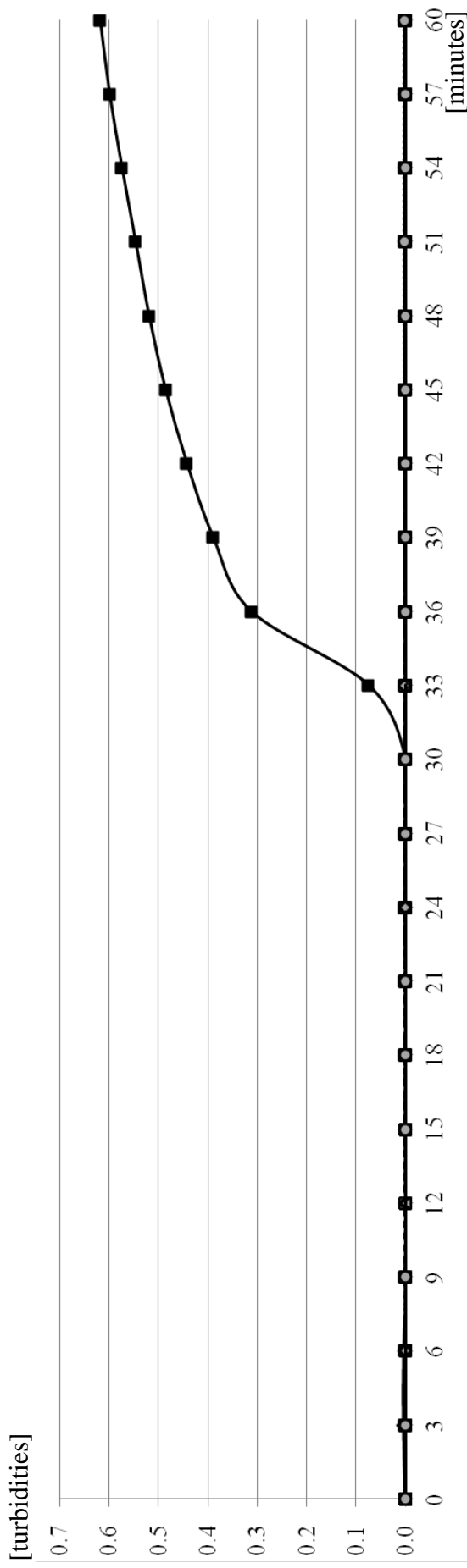
[minutes]



[°C]

上段はT検出プライマーセットの、中段はA検出プライマーセットの、下段はG検出プライマーセットの結果をそれぞれ示す。それぞれの左側のグラフは増幅曲線を、右側のグラフは熱解離曲線を示す。熱解離曲線の頂点が同じ温度であれば、同一の増幅産物であることが示唆される。

図7 T検出プライマーセットによる交叉反応の有無の検討

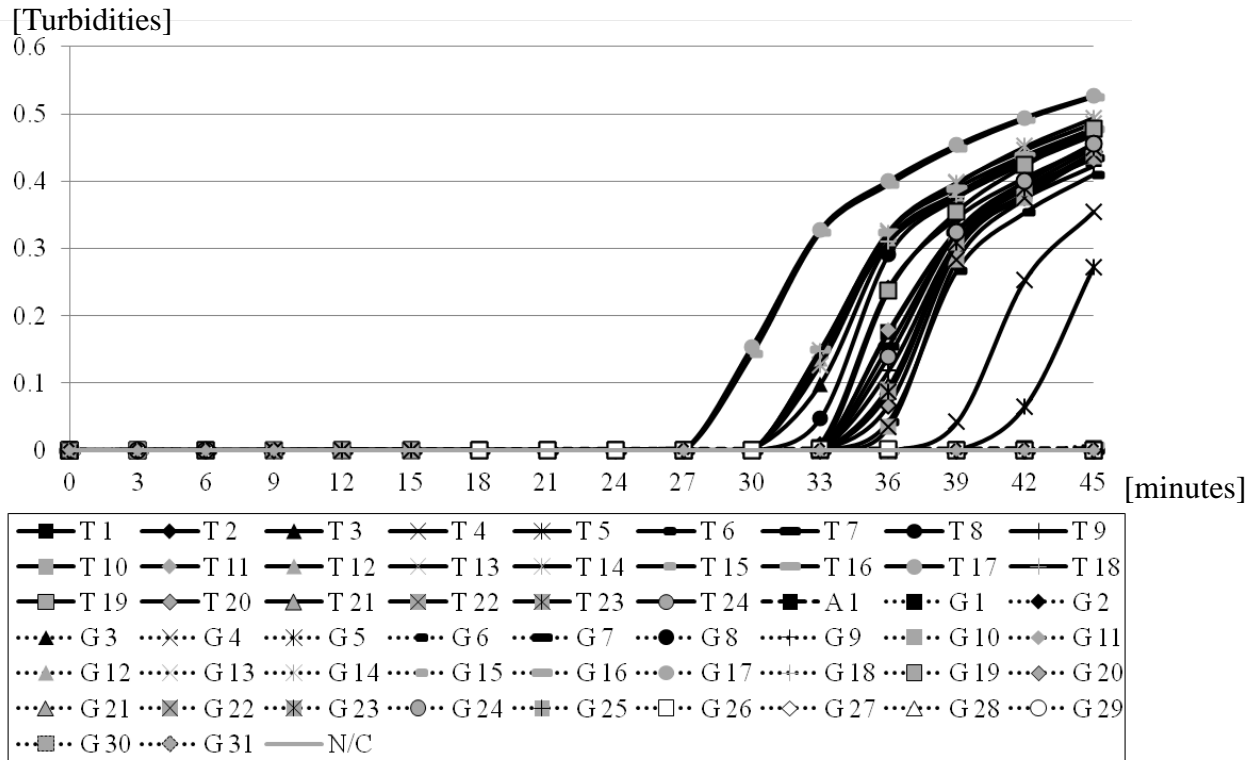


- *Haemophilus influenzae* (P/C)
- *Streptococcus agalactiae*
- ...▲... *Staphylococcus aureus* (MRSA)
- ◆--- *Escherichia coli*
- *Proteus mirabilis*
- ▲— *Burkholderia pseudomallei*
- *Stenotrophomonas maltophilia*
- ◇— *Mycobacterium tuberculosis*
- ...□... *Mycobacterium avium*
- ...○... *Mycobacterium marinum*
- △--- *Mycobacterium scrofulaceum*
- ◇— *Aspergillus flavus*
- *Candida albicans*
- *Candida parapsilosis*
- ▲— *Rhizopus oryzae*
- ...◆... *Basidiobolus meristosporus*
- *Microsporium ferrugineum*
- *Madurella mycetomi*
- ▲— *Pneumocystis jirovecii*
- ▲— *Streptococcus piogenes*
- ...◆... *Streptococcus pneumoniae*
- *Staphylococcus epidermidis*
- ▲--- *Citrobacter farmeri*
- ◆— *Serratia marcescens*
- *Acinetobacter baumannii*
- *Legionella pneumophila*
- △— *Mycobacterium microti*
- ...□... *Mycobacterium goodii*
- *Mycobacterium chelonae*
- *Aspergillus fumigatus*
- △— *Cryptococcus neoformans*
- ◇— *Candida glabrata*
- *Candida tropicalis*
- *Nocardia farcinica*
- ...◆... *Trichophyton violaceum*
- *Cladosporium carrionii*
- *Fonsecaea pedrosoi*
- ◆— *N/C*
- ▲— *Streptococcus mitis*
- ...◆... *Staphylococcus aureus*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Enterobacter cloacae*
- ▲— *Pseudomonas aeruginosa*
- *Moraxella catarrhalis*
- ◇— *Corynebacterium diphtheriae*
- *Mycobacterium kansasii*
- ...△... *Mycobacterium intracellulare*
- ◇--- *Mycobacterium fortuitum*
- *Aspergillus niger*
- *Cryptococcus gattii*
- △— *Candida krusei*
- ◆— *Mucor circinelloides*
- ...◆... *Spirotrichum purpureum*
- ◆... *Epidermophyton floccosum*
- ▲--- *Malassezia furfur*
- ◆— *Trichophyton rubrum*

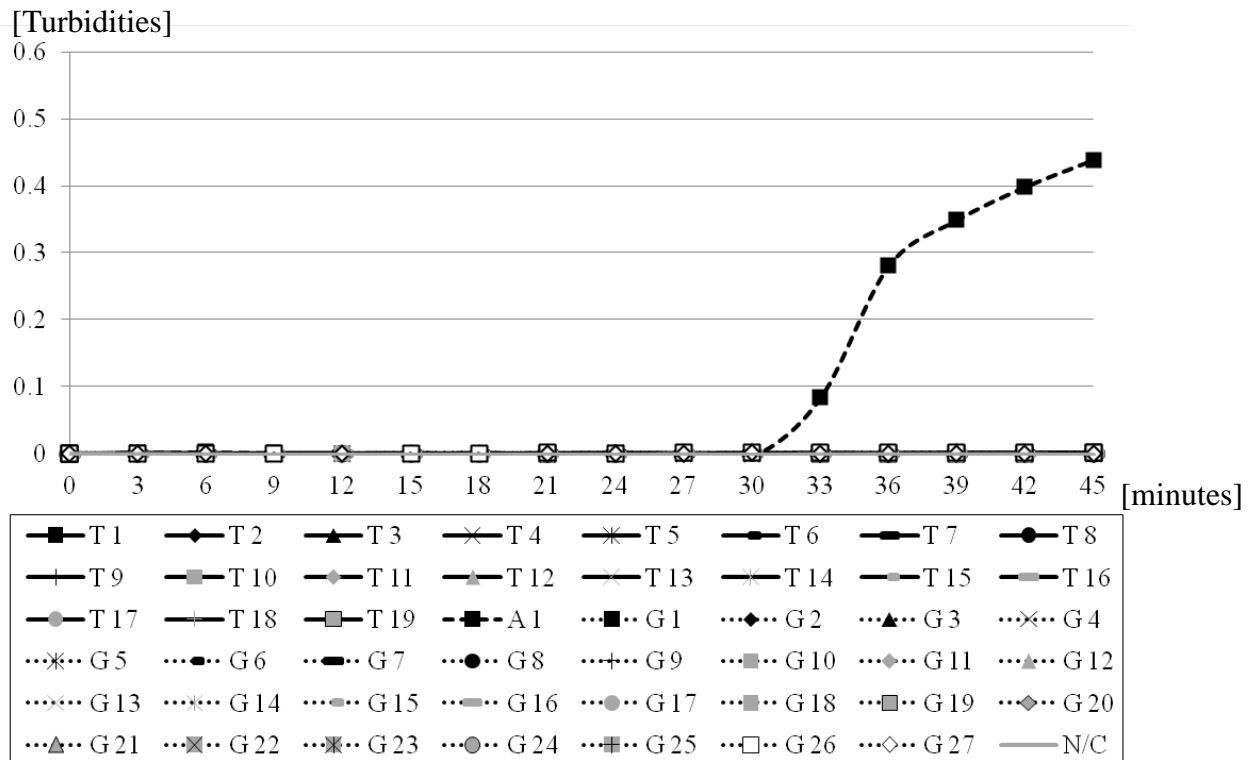
表1に掲げた微生物株のゲノムDNAにける増幅反応を示す。N/Cは陰性コントロールである。H. influenzae以外は増幅が認められなかった。

図8 臨床検体の、各プライマーセットによるgBLNARの判定結果

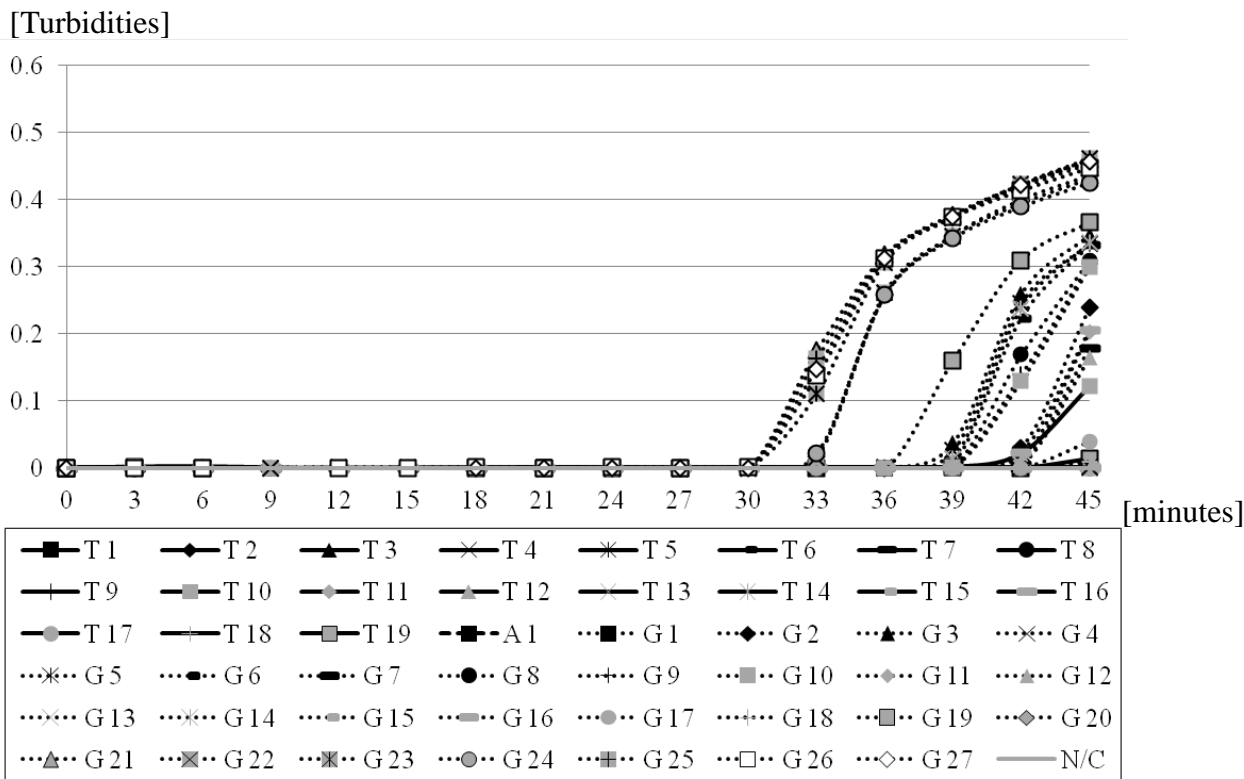
X=T ( $\alpha=G, \beta=A$ )



X=A ( $\alpha=A, \beta=G$ )



$X=G (\alpha=A, \beta=G)$



		検体			感度	特異度
		T	A	G		
プライマー	T	24/24	0/1	0/31	100.0% (24/24)	100.0% (32/32)
	A	0/19	1/1	0/27	100.0% (1/1)	100.0% (46/46)
	G	1/19	0/1	21/27	77.8% (21/27)	95.0% (19/20)

凡例のT、A、Gはシーケンスにより決定した検体の標的SNP領域の塩基を、数字はそれぞれの通し番号を示している。N/Cは陰性コントロールである。シーケンスにより標的SNP領域の塩基がTと決定した検体は実線で、同じくAは破線で、Gは点線で示している。濃度は全て一反応あたり1ngである。表は、グラフの結果を数値の表としてまとめたもので、濁度のカットオフ値は0.1である。なお、T検出プライマーセットに用いた検体数と、A及びG検出プライマーセットに用いた検体数は、実験時期の違いのために若干異なっている。

T検出プライマーでは標的SNP領域の塩基がTであるゲノムDNAのみが、A検出プライマーでは標的SNP領域の塩基がAであるゲノムDNAのみが増幅している。G検出プライマーでは標的SNP領域の塩基がGである27検体のうち21検体で増幅し、また、Gでない20検体のうち1検体が増幅している。T、A検出プライマーセットでは感度、特異度とも100%だったが、G検出プライマーセットでは感度がやや劣る。