

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17936

研究課題名（和文）ブルーリ潰瘍と他のskin NTDsに対する簡易遺伝子診断法の開発

研究課題名（英文）Development of rapid diagnostic tools for Buruli ulcer and other skin NTDs

研究代表者

三木田 馨（MIKITA, Kei）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：40793881

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ブルーリ潰瘍は、西アフリカを中心に流行するMycobacterium ulceransによる皮膚感染症であり、WHOの挙げる20のNTDsのうちの一つである。早期の診断・治療を行わないと全身の広範囲の潰瘍を生じ、関節に病変が及ぶことで永続的な機能障害を呈する。近年ブルーリ潰瘍流行地域は拡大しているが、主に流行している西アフリカでの特定の施設以外での確定診断の実施は困難である。そこで、どこでも実施可能なブルーリ潰瘍診断法開発のために、LAMPクロマトグラフィを用いた検出法の開発を行い、良好な結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究をさらに発展させ、ブルーリ潰瘍流行地域のフィールドでの実施を可能にすることで、早期の発見・治療が容易になり、ブルーリ潰瘍の疾病対策に資することが期待される。

研究成果の概要（英文）： Buruli ulcer is a skin infection caused by Mycobacterium ulcerans that is endemic mainly in West Africa and is one of the 20 NTDs listed by WHO. Without early diagnosis and treatment, extensive ulcers will develop throughout the body, and lead to permanent functional disability. In recent years, the endemic area of Buruli ulcer has been expanding, but in West Africa, the main endemic area, it is difficult to make a definitive diagnosis except at specific facilities.

Therefore, to develop a diagnostic method for Buruli ulcer that can be performed anywhere, we have developed a detection method using LAMP chromatography and have obtained good results.

研究分野：熱帯医学・寄生虫学

キーワード：ブルーリ潰瘍 簡易診断法 Buruli ulcer

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ブルーリ潰瘍(Buruli ulcer: BU)は、西アフリカを中心に流行する *Mycobacterium ulcerans* による皮膚感染症であり、WHO の挙げる 20 の NTDs のうちのひとつである。早期の診断・治療を行わないと全身の広範囲の潰瘍を生じ、関節に病変が及ぶことで 25% の患者に永続的な機能障害を呈する。近年 BU 流行地域は 33 ヶ国に拡大しており、実際 2000 年以降でも新たに 5 ヶ国から報告がされている。本邦では、これまでに 66 例の報告があり、2016 年にはオーストラリアでも 1 年間に 186 名の新規患者が報告されている。

このように、BU は、西アフリカ諸国だけでなく、先進国においても重要な疾患である。

環境中の水系に存在する *M. ulcerans* からの感染経路は未だ不明であるが、早期治療群では 80% が治癒するとされ、疾病対策に早期の診断が非常に重要でかつ効果的である。しかしながら、BU が主に流行している西アフリカでの特定の施設以外での確定診断(培養、病理検査、PCR 検査)の実施は困難である。加えて、BU 流行地域では他の皮膚感染症 (skin NTDs) も同時に流行しており、それらとの鑑別診断も重要である。

以上のような状況の中で、BU 流行地域で‘どこでも誰にでも’実施可能な、BU と他の skin NTDs に対する“multiplex な簡易診断法”の開発が求められている。

2. 研究の目的

本研究は、LAMP 法または RPA 法と DNA クロマトグラフィを組み合わせ、‘どこでも誰にでも’実施可能な、BU と他の skin NTDs を同時に診断する“multiplex”な皮膚感染症簡易遺伝子診断法の確立を目的としている。

3. 研究の方法

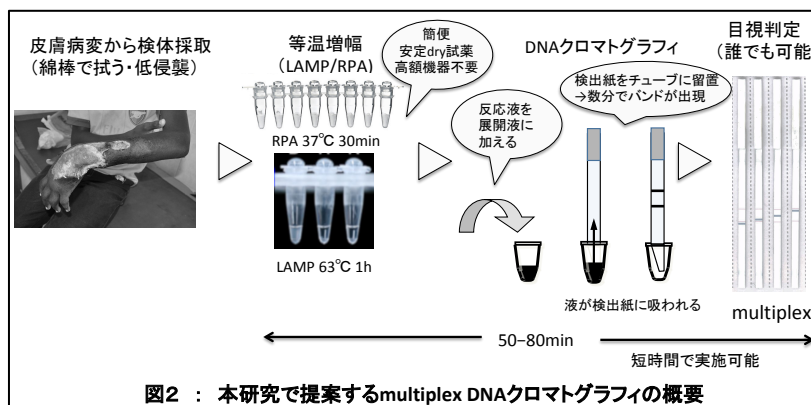
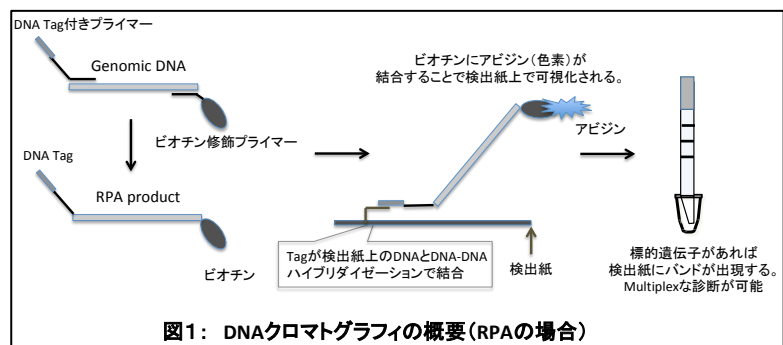
(1) LAMP/RPA 法の確立: 標的遺伝子の決定・プライマー作製: 今回の検討では、ブルーリ潰瘍を標的に診断系を構築した。これまでの報告、申請者らの研究を基に標的遺伝子を決定し PrimerExplorer V5 (栄研化学) を用いて LAMP プライマーセットを、Primer3Plus を用いて RPA プライマーセットを作製した。

(2) 感度・特異度の判定: 段階希釈した各病原体の DNA 溶液を、LAMP 法では、リアルタイム LAMP 濁度測定器 (LoopampEXIA (栄研化学)) で反応させ (63°C、60 分)、感度・特異度検討を行った。RPA 法では、TwistAmp®Basic を用いて RPA 反応を行い、反応液を PCR 精製キットで精製、電気泳動を行い、検討を行った。

(3) LAMP/RNA クロマトグラフィの確立: 標識されたプライマーを用い、段階希釈した各病原体の DNA 溶液を、それぞれ LAMP 反応、RPA 反応を行い、各プライマーセットの感度・特異度の検討を行った (図 1)。

(4) LAMP クロマトグラフィを用いた臨床分離株検出の検討: 臨床分離株 (ベナン株 1 検体、オーストラリア株 2 検体) を用いて、LAMP クロマトグラフィの評価を行った。

(5) コートジボワールでの LAMP/RNA クロマトグラフィの評価: コートジボワールの共同研究施設で保存してあるブルーリ潰瘍患者由来保存菌株を用いた検討を行なった (図 2)。



4. 研究成果

(1) LAMP/RPA 法の確立

M. ulcerans IS2404 を標的にした LAMP 法と RPA 法の開発を行った。複数のプライマーセットを作成し、*M. ulcerans* IS2404 プラスミドの段階希釈液を用いて、検出感度比較を行なったところ、PCR と real-time PCR と同等の検出感度を呈した(結果は非表示)。

(2) LAMP/RPA クロマトグラフィの確立

(1) で得られた LAMP/RPA プライマーセットそれぞれにビオチン、tag の修飾を行い LAMP/RPA クロマトグラフィを作成した。(1) と同じプラスミドの段階希釈液を用いて、検出感度比較を行なったところ、(1) で得られた LAMP/RPA 法と同等の検出感度を呈した。さらに、特異度を明らかにするために、非結核性抗酸菌 30 株を用いて LAMP/RPA クロマトグラフィをそれぞれ行なったところ、非特異反応はみられず良好な特異度を得た。

(3) 臨床分離株を用いた検討

(2) で得られた LAMP クロマトグラフィを用いて、臨床分離株(ベナン株 1 検体、オーストラリア株 2 検体)の検出を試み、すべての検出に成功した、

(4) コートジボワールでの LAMP クロマトグラフィの検討

(2) で得られた LAMP クロマトグラフィに必要な一式をコートジボワールに送付し、現地で検討を実施した(結果は非表示)。

(5) 今後の展望

LAMP クロマトグラフィを用いたブルーリ潰瘍診断法開発を行った。手技が簡便であり、必要な機器が少ないため今後はフィールドでの応用を進めることで、疾病対策に資すると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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			
コートジボワール	Pasteur Institute			