

令和元年6月14日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09149

研究課題名（和文）検体に尿を用いた結核迅速診断キットの実用化の検討

研究課題名（英文）Evaluation of practical use of tuberculosis rapid diagnosis kit using urine sample

研究代表者

神田 靖士（KANDA, Seiji）

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70295799

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は発展途上国でも使用可能な新規結核診断法を開発する目的で安価で安全で迅速に活動性結核を診断する手法の検討を行った。新規診断用抗原としてクローニングしたDNAを用いて、発現ベクターへのクローニング、大腸菌による発現させたタンパクの精製を行った。このタンパクを抗原としてラオス国内にて収集した尿を検体として用い検討した結果、活動性結核患者の検体を用いた場合は確実に陽性を示すことが分かった。しかしながら以前報告したMPB64を用いた診断法を含めて、抗原抗体反応を用いた結核の診断法は非活動性結核患者において弱いながら非特異的反応が生じることが考えられBCGのワクチン接種の影響と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

結核は世界の約1/4の人口が感染しているとの報告もあり、公衆衛生上の大きな問題となっている。診断の遅れが感染の拡大に関与していることが考えられ、結核患者の早期の診断が感染制御において不可欠である。申請者が考える新規結核診断法は結核感染の流行地である発展途上国において容易に採取可能な検体で実施するスクリーニング法を想定し、ランニングコスト的に、注射器、血清分離のための遠心機などの準備の必要もなく、しかも非常に安価で実施可能である尿を用いた活動性結核スクリーニング法である。今後新規バイオマーカーなどの使用を含めた改良を加え実用化することで、世界における結核の流行を抑制したいと考える。

研究成果の概要（英文）：In order to develop a new TB diagnosis method that can be used in developing countries, this study examined a method to diagnose active TB at low cost, safely and quickly. As a novel diagnostic antigen, the DNA which was selected by screening was cloned into an expression vector and purified the expressed protein. As a result of using this protein as an antigen, the reactions were exactly positive when urine samples of an active tuberculosis patients collected in Laos was used. However, including the previously reported using MPB64, the antigen-antibody reaction when non TB infected samples was used showed false positive that might be a nonspecific reaction caused by the effect of vaccination with BCG.

研究分野：分子生物学

キーワード：結核 尿 発展途上国 迅速診断法

## 1. 研究開始当初の背景

世界では1,040万人が結核に罹患し、170万人が結核で死亡している(2016年)。死亡の大半は低所得国と中所得国で発生し、東南アジア、中国、アフリカ等である(厚生労働省検疫所2018年ニュース)。結核の診断は胸部X線撮影や日本国内で承認されている結核診断キットとしてTスポットTBが「ゴールドスタンダード」として用いられているが、発展途上国では、細胞培養の装置や手技の習熟が必要である点などから実施が困難である。このような現状から、発展途上国をはじめとした世界中で使用可能な安価でより簡便な結核診断法が強く求められている。

## 2. 研究の目的

採血によらず簡便に採取できる尿を検体として、発展途上国でも簡便迅速にできる活動性結核の新たな迅速診断法を確立することを目的とした。診断の手法として患者の尿に含まれる結核菌に対する特異抗体を検出する方法を考え、以前報告した( )MPB64に加えて新たな結核特異抗原を探索する目的で結核菌cDNAライブラリーに対して患者血清を用いてスクリーニングを行い、新規診断用抗原を探索することも目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) サンプル収集

以前の我々の研究成果で国内の結核患者の検体を用いてMPB64抗原による診断法を発展途上国の中でも流行国の一つであるラオス国内で発生した活動性結核患者のサンプルを用いて実施した。ラオスにて結核疑いの患者から喀痰を採取し、喀痰中の結核菌の有無を顕微鏡で確認し、さらにGeneXpertにて喀痰中の結核菌を検出し、どちらも陽性を示した患者を活動性結核患者とした。また、どちらも陰性を示した患者を非結核患者としてネガティブコントロールとして用いた。

### (2) MPB64 抗原を用いた結核診断用抗原としての評価の検討

様々な抗原量のMPB64をニトロセルロース膜上にプロットし、患者サンプルとインキュベートした後に2次抗体を種々の希釈倍率で添加し、TMBにて反応性の検出を行った。

### (3) 新規診断用抗原の探索

新規診断用抗原の探索を目的として、結核菌cDNAライブラリーから結核患者の血清と尿を用いてスクリーニングを行った。また、陽性を示したクローンに関してクローニングを行い、リコンビナントタンパクとして発現させ、患者検体を用いてその反応性を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 新規診断用抗原の探索

以前、当研究室にて構築した結核菌由来cDNAライブラリーを用いてスクリーニングにより活動性結核患者において陽性を示したDNAを用いて、発現ベクターへのクローニング、大腸菌による発現させたタンパクの精製を行った。このタンパクを抗原として同様にラオス国内にて収集した尿を検体として用いDotBlot法にて検討した結果、活動性結核患者の検体を用いた場合確実に陽性を示すことが分かった。これにより新規結核診断用抗原の候補の一つとしての可能性を示唆した。

### (2) MPB64 抗原を用いた結核診断用抗原としての評価の検討

ラオス国内の病院にて結核疑いを含め結核患者から採取した尿を検体として、以前報告した結核患者に特異抗体が検出されたMPB64抗原を用いてDotBlot法により抗原量及び反応条件の最適化を行った。また、対象には結核が疑われたもののGeneXpert(Realtime PCR法を用いた結核診断機器)及び喀痰中の結核菌が検出されなかったサンプルを用いた。その結果、確実に活動性結核患者の検体を用いた場合MPB64に対して陽性反応を示した。しかしながら非活動性結核患者においても弱いながら非特異的反応が生じることがわかった。この原因の一つとしてBCGのワクチン接種の影響と考えられた。今後は結核診断法を確立すべく抗原抗体反応を使用しない新たなバイオマーカーの探索が必要となるだろう。

## <引用文献>

Diagnosis of active tuberculosis using MPB64, a specific antigen of *Mycobacterium bovis*. Yasuko Tamada, Seiji Kanda, Atsuko Yoshidome, Itoko Hayashi, Mari Miyake and Toshimasa Nishiyama. *Microbiol Immunol* 2012; 56: 740-747 doi:10.1111/j.1348-0421.2012.00504.x

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 2 件)

Shared expression of mucin12 in *Ascaris lumbricoides* and the human small intestine  
Itoko Hayashi, Seiji Kanda, Pheophet Lamaningao, Nobuyuki Mishima, Toshimasa Nishiyama  
Molecular and Biochemical Parasitology, 227 p19-24, 2019  
doi:10.1016/j.molbiopara.2018.11.004. (査読有り)

Lamaningao P, Kanda S, Laimanivong S, Shimono T, Darcy A, Phyaluenglath A, Mishima N,  
Nishiyama T. Development of a PCR Assay for Diagnosing Trematode (*Opisthorchis* and  
*Haplorchis*) Infections in Human Stools. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene  
96(1) 221-228,2017 doi:10.4269/ajtmh.16-0165 (査読有り)

### 〔学会発表〕(計 3 件)

神田靖土 新規活動性結核の迅速診断法 JST ライフサイエンス新技術説明会  
2018年12月11日

Pheophet Lamaningao, Seiji Kanda, Sakhone Laimanivong, Takaki Shimono, Andrew Waleluma  
Darcy, Amphay Phyaluenglath, Nobuyuki Mishima, and Toshimasa Nishiyama.  
Development of a PCR Assay for Diagnosing Trematode(*Opisthorchis* and *Haplorchis*)  
Infections in Human Stools  
11th National Health Research Forum “Health Research Capacity Strengthening toward  
Sustainable Development” Vientiane Capital, Lao 2017

Lamaningao p, Kanda S, Laimanivong S, Shimono T, Darcy WA, Phyaluenglath A, Mishima  
N, Nishiyama T. Development of a PCR Assay for Diagnosing Trematode (*Opisthorchis* and  
*Haplorchis*) Infections in Human Stools  
生命科学系学会合同年次大会(第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会) 2017  
年12月6日~9日

### 〔図書〕(計 0 件)

### 〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：検査キット及び検査法  
発明者：西山利正、神田靖土  
権利者：関西医科大学  
種類：特許  
番号：特許願 2016-60798 号  
特許開 2017-173184 号  
出願年：平成 28 年  
国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：西山 利正

ローマ字氏名：(NISHIYAMA Toshimasa)

所属研究機関名：関西医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：10192254

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：ペーオペット・ラーマニーガオ

ローマ字氏名：(Pheophet, Lamaningao)

研究協力者氏名：トラカーン・サイパーンナ

ローマ字氏名：(Thonelakhan, Xaypangna)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。