

令和 3 年 8 月 23 日現在

機関番号：82801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K12125

研究課題名(和文) 抗酸菌前処理法の効率化に関する研究

研究課題名(英文) Development of effective pre-treatment method for the detection of Mycobacteria

研究代表者

御手洗 聡 (Mitarai, Satoshi)

公益財団法人結核予防会 結核研究所・抗酸菌部・部長

研究者番号：30501671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：誘電泳動(Dielectrophoresis: DEP)を用いた前処理法が結核菌核酸増幅法の感度上昇に寄与するかBCGを用いて検討した。結核菌の捕集に最適なDEP条件を検討し、DEP前後の菌量をreal-time PCR測定して捕捉率を算出し、最適なDEPの条件を決定した。DEP法は周波数100 kHzにおいて捕捉率が73.2-84.9%と最も高かった。

LAMP法(栄研化学) LAMP法で10回連続陰性であった検体においてDEP法濃縮を実施した結果、10回中8回で陽性結果が得られ、感度は有意に上昇した($p=0.0007$)。この技術により結核菌検査感度が更に高まることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

誘電泳動法によって抗酸菌(結核菌)の効率的濃縮条件を決定した。またその技術により結核菌の核酸増幅法による検出感度を上昇させることが可能であることを実証した。これは現状の結核菌核酸増幅法検査の弱点である検体濃縮過程に寄与する技術であり、学術的には抗酸菌の誘電泳動濃縮が可能であることを証明し、社会的にはこの技術の応用で結核菌検査の高感度化・迅速診断に寄与する。

研究成果の概要(英文)：An effective concentration method is required to detect Mycobacterium tuberculosis (MTB) in paucibacillary specimens. Dielectrophoresis (DEP), a phenomenon in which a force is exerted on a dielectric particle subjected to a non-uniform electric field, is useful for concentrating bacteria. To investigate whether the DEP method increases nucleic acid amplification test (NAAT) sensitivity. First, the capture rates were examined for multiple electrode settings by calculating the bacterial load before and after DEP with real-time PCR. Second, LAMP was performed using samples with 10 consecutive negative results by conventional LAMP and DEP treated samples. The capture rate was the highest with 100 kHz frequency (73.2-84.9%). LAMP with DEP was performed using conventional LAMP-negative specimens, and eight of ten tests (80%) were positive. The sensitivity was higher than that of the conventional LAMP method ($p = 0.0007$). The DEP method has the potential to increase NAAT sensitivity for MTB.

研究分野：臨床細菌学

キーワード：結核菌 検体処理 抗酸菌濃縮 誘電泳動 核酸増幅法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗酸菌検査による臨床検体からの細菌学的検出感度は、塗抹検査で 6,000 cfu/mL 程度、培養検査で 100 cfu/mL 程度、核酸増幅法検査で 1,000 cfu/mL 程度と言われている。しかしながら、実験室内では核酸増幅法検査は 1 個の結核菌でも検出可能な感度を持っている。さらにマルチコピーの遺伝子を標的とする TB-LAMP (栄研化学) の様な検査キットでは、理論上 0.34 コピーの結核菌を検出可能となっている。以前から Bags'n beads や TB-Beads といったリガンドによる微生物回収ビーズは存在したが、それらも特に低結核菌濃度の検体では物理的接触が制限され、濃度依存的となっていた。そのため、最も高感度な液体培養法でも臨床検体中に 100 CFU/mL 程度の菌濃度を必要とし、例えば肺結核患者全体の 80% 強までしか細菌学的に証明できない。さらに検体中の結核菌濃度が低いほど培養陽性までに時間がかかる。核酸増幅法は迅速だが感度の点で液体培地に劣る。原因は検体中から迅速性と感度を確保するのに十分な結核菌を回収・濃縮できないことにあり、この問題を解決し、結核菌検査を高感度化・迅速化することを必要としている。この状況は現在でも変わっていない。

2. 研究の目的

本研究では、結核が疑われる患者の臨床検体からの効率的な結核菌の回収・濃縮を目指した。我々の先行研究で電氣的に細菌を集菌する技術を開発したが、静電氣的結合をキャンセルして結核菌あるいは核酸のみを抽出する過程が困難あるいは非効率的であり、現時点では培養検査にしか使用できない。また、一部の培養法ではビーズが均一に採取できないため、検体間で効率に差が生じる。誘電泳動法では、流体中を移動する微生物を電氣的に捕獲することが可能であり、さらに通電の中止により電極から簡単に分離させることもでき、ビーズ捕獲に比べて微生物単体での回収効率が高い。既に真菌や食品中の微生物検出で実績があるが、結核菌のようなバイオハザードレベルの高い感染性微生物への適応はこれまで行われていない。理論的には、従来法では濃度依存的で収容できなかった結核菌を捕獲することが可能で、溶出量を最小化して検体中に含まれる全ての結核菌を核酸増幅反応系に持ち込むことができれば、結核菌検出感度は大幅に向上するはずである。夾雑物を洗浄して結核菌を「きれいに」することも可能で、核酸増幅時の阻害も回避できる。また、この方法で結核菌のみを特異的に回収することができれば、雑菌処理過程が不要あるいは簡易となり、雑菌処理液に含まれる NaOH で不活化されていた結核菌も発育可能となり、培養感度も上昇することが期待される。さらに直接ゲノム解析の可能性もある。

3. 研究の方法

- 1) 臨床分離株を含む複数の結核菌株を培養し、懸濁液を作成した。この際、分散媒を均質化処理後の喀痰として、結核菌を捕獲するのに最適な電流・電圧および周波数を特定した。
- 2) 喀痰を均質化するための試薬をセミアルカリプロテアーゼ、N アセチル L シスチン、その他で検討した。電極に結核菌を捕獲した状態でバッファー洗浄することが可能か(洗浄液での捕獲特性の変化)を評価し、最適な検体処理・誘電泳動条件を決定した。
- 3) 2 年目以降は、初年度中に特定した前処理・誘電泳動条件下で実際の結核患者の臨床検体を処理し、従来法 (NALC-NaOH 処理・遠心集菌) で処理した検体との間で核酸増幅効率、培養陽性度を比較検討した。
- 4) 2 年目までに特定した抗酸菌特異的誘電泳動設定で集菌効率を証明する実験を行った。通常法の loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法 (栄研化学) (60 μ L の検体を PURE DNA 抽出キットで DNA 抽出し、そのうちの 30 μ L で LAMP を施行) を、低導電率バッファーで置換・希釈 (1/1,000, 1/2,500, 1/5,000) した *M. tuberculosis* var. BCG の検体で行った。10 回連続で陰性結果を示した最小希釈検体 (1/5,000, 理論濃度 10^3 cfu/ml) を DEP 法を用いた前処理法の検討に使用した。前述の結果で得られた最適な条件で DEP 法を用いた前処理を行った。1 mL の検体を DEP チップ 50 μ L に検体を濃縮させ、そのうちの 30 μ L を直接 LAMP チューブに移し LAMP 検出を施行した。

4. 研究成果

- 1) 懸濁液の作製
誘電泳動法は検体の導電率が結果に影響するため、より導電率が低い Buffer が必要であった。スクロースとグルコース水溶液に 0.05% Tween 80 を添加した溶液に、イオン交換樹脂 SMNUPB を加えてイオン交換を行い、導電率 1 μ S/cm の Buffer を作製可能とした。
- 2) 抗酸菌における最適な誘電泳動の設定 (BCG 培養液での検討)
平成 30 年度の結果から再検討のうえ誘電泳動の最適設定は周波数 100 kHz、電圧 10 V、流速 0.5 mL/h とした。流速をこれ以上とすると、捕捉率が低下した。抗酸菌における誘電泳動法は周波数 100 kHz において捕捉率が 73.2–84.9% と最も高かった。
- 3) 機器の改良
誘電泳動の機器をファンクションジェネレーターに変更した。以前の機器と比較し、チップに接続するチャンネルが 2 つに増加したため捕捉率の改善が見込まれた。また、捕捉面積を増やした

チップを使用することで、捕捉率の向上が見込まれた。上記検体、機器の改良により検体濃縮は最大 16 倍(検体量 2 mL で誘電泳動を行った場合)となった。回収率はチップから菌の回収(チップ自体への菌の接着)に問題があるため正確に算出できていないが、40%程度と見込まれた。

4) LAMP 法による結核菌検出の高感度化実証

従来の LAMP 法で 10 回連続陰性の結果であった 5,000 倍希釈検体において DEP 法を用いた前処理後に LAMP を施行した結果、10 回中 8 回で陽性結果が得られ、検査感度は有意に上昇した($p=0.0007$)。一方で、DEP 法においても 10 回中 2 回で LAMP 陰性であった。定量的 real-time PCR による捕捉率の結果が示すように、DEP 法の前処理においても全ての菌を捕捉、回収できていない。この点をさらに改良する必要が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 283.Takeda S, Chikamatsu K, Aono A, Igarashi Y, Morishige Y, Murase Y, Takaki A, Yamada H, Mitrai S.	4. 巻 7
2. 論文標題 Dielectrophoresis concentration method for increased sensitivity of the loop-mediated isothermal amplification test for the Mycobacterium tuberculosis complex.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology and Mycology	6. 最初と最後の頁 1157
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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
研究協力者	武田 啓太 (Takeda Keita)	国立病院機構 東京病院・呼吸器センター	

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