

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 19 日現在

機関番号：17201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659507

研究課題名（和文） 喀痰中の結核菌を迅速に検出するイムノクロマト法の開発

研究課題名（英文） Study of a Rapid Test for *Mycobacterium tuberculosis* Complex Using an Immunochromatographic Assay

研究代表者

永田 正喜 (NAGATA MASAKI)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：90467952

研究成果の概要（和文）：本研究では、MPB64 を指標とする迅速診断法の検討を行った。抗酸菌が多くタンパク質を産生することは知られているが、このうちの一つである MPB64 は結核菌群に特異的な分泌タンパク質である。本検討は新たに開発されたイムノクロマト法による迅速診断キットであり、結核菌群を特異的に検出することが可能となっている。本研究では液体培地との組合せによる迅速検出法の検討および喀痰を集菌処理した検体を直接イムノクロマト法で測定する直説法の検討を行った。喀痰中の結核菌濃度の高い検体については従来の培養法よりも短時間で検出することが可能であった。また、喀痰中の結核菌濃度が一定量以上含まれる検体については、患者喀痰から直接結核菌を検出することが可能であった。今回の検討結果から、課題は残るものの、本検出法は結核菌群の迅速検出に有効な測定方法だと考える。

研究成果の概要（英文）：We investigated simple and rapid test for *M. tuberculosis* complex by using immunochromatographic assay (ICA) to detect MPB64. Several secreted mycobacterial proteins have been reported. Among these secreted proteins, MPB64, has been identified as a *M. tuberculosis* complex-specific secretory protein. This kit is the newly developed ICA for rapid discrimination between the *M. tuberculosis* complex and the mycobacteria other than *M. tuberculosis* (MOTT). Primary investigation, we study rapid identification of the *M. tuberculosis* complex in combination with the culture systems based on liquid media. In this method, we can easily detect the *M. tuberculosis* complex from MOTT. Secondary, we investigated direct testing method from clinical specimens. Specimens were placed into the test well of kits, after concentrating the sediments processed and decontaminated. Direct testing method could correctly detect between the *M. tuberculosis* complex and MOTT, specimens contain high volume of *M. tuberculosis* complex. With a few issue, this system is useful for the rapid isolation and detection of *M. tuberculosis* complex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：感染症診断学、結核、免疫クロマト、迅速診断

1. 研究開始当初の背景

多剤耐性結核の出現頻度の増加や、結核蔓延国からの人的流入などにより、先進国においても今後結核の増加が懸念されている。今後の結核対策において耐性結核の発生予防のためにも積極的かつ適切な治療、医療提供や感染予防のあり方は優先課題であり、そのためにも患者に対する迅速かつ確な診断はとても重要である。また、日本では非結核性抗酸菌症が増加傾向を認めており、結核の罹患率の減少とも相まって抗酸菌感染症の30～40%を占めるとまでいわれている。非結核性抗酸菌症の感染、診断、治療などは、結核とは全く異なるので、結核と非結核性抗酸菌との判別は極めて重要である。

2. 研究の目的

本研究では結核菌群が特異的に産生するMPB64を測定対象とし、免疫クロマトグラフィ法を測定方法として、結核菌群を迅速・特異的に検出する検討を行った。本研究で測定対象としているMPB64 (Mycobacterial protein fraction from BCG of Rm 0.64 in electrophoresis) は結核菌群 (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*) に特異的な分泌タンパク質であり、非結核性抗酸菌では産生が認められていない。この迅速測定法を用いると、検査に掛かるコストは遺伝子増幅法と比較すると10分の一以下であり、特殊な機器を必要としないため結核蔓延国であるアジア・アフリカ諸国などの海外でも迅速検査が

可能となる。また結果が得られるまでの時間も、培養法と比較すると大幅な短縮が可能となり、結核の早期診断・早期治療が期待できる。

3. 研究の方法

本研究では同意の得られた患者から採取された凍結喀痰を用いて、液体培地との組合せによる迅速検出法の検討、喀痰からの直接検出法の検討を行った。

まず初めに基礎検討としてMPB64がどのように検出されるか、MPB64を産生する弱毒型抗酸菌である*M. bovis* BCG 東京株を用いて、MPB64の経時的観察を行った(図1)。この基礎検討の結果から、MPB64は濃度依存的に増加する傾向が認められた。喀痰中に一定量以上の菌が存在すれば結核菌を特異的に迅速検出できる可能性が示唆されたため、患者の喀痰を用いた検討を行った。

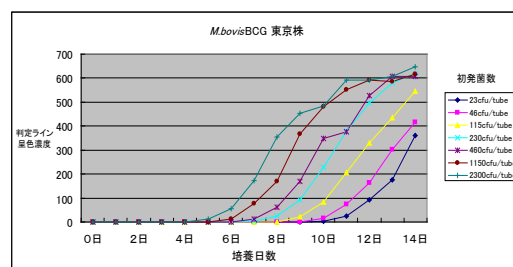


図1. *M.bovis* BCG 東京株を用いたMPB64の経時的観察

(1) 検討1では、液体培地に7H9をベースとした栄養豊富な液体培地を考案し、白金・金コロイドを標識物とした免疫クロマト法との組合せにより、結核菌の早期検出法を検討した。塗沫検査およびPCR法により

あらかじめ検体情報が判明している同意の得られた患者喀痰を 12 検体用いた。喀痰の均質化および消化・汚染除去のための前処理を行い、液体培地に接種した。これを培養試料とし、培養開始直後、24 時間後、3 日後、7 日後にイムクロマト法で MPB64 の経時的観察を行った。

(2) 検討 1 の結果から、喀痰中の抗酸菌濃度が高ければ MPB64 を培養早期に検出できる可能性が示されたため、検討 2 では検体数を増やして測定を行った。今回の検討では、検体情報が判明していない同意の得られた患者喀痰 53 検体を用いた。

(3) 喀痰からの直接検出法の検討を行った。検体情報が全く判明していない 36 の喀痰検体を用いて、イムクロマト用抽出液による喀痰中 MPB64 の抽出を行い、イムクロマトで MPB64 を測定した。また、粘性の影響を避けるためフィルター付きノズルでろ過したものをイムクロマトに滴下した。塗沫検査及び小川培地による生菌数の確認とともに、喀痰直接法で陽性反応が認められた検体については、さらにアンプリコア (ロシュ) による PCR 検査を行った。

#### 4. 研究成果

(1) あらかじめ与えられた喀痰の検体情報をもとに、喀痰中に存在する抗酸菌の濃度を便宜的に低 (ガフキー 1 号、2 号)、中 (ガフキー 5 号)、高 (ガフキー 9 号) の 3 段階、各 3 検体の計 9 検体および非結核性抗酸菌 3 検体について検討を行った。

培養開始直後から MPB64 の経時的観察を行ったところ、早いものでは培養開始時より陽性判定が可能であった。喀痰中抗酸菌濃度が中濃度以上の検体 (ガフキー 5 号以上) では培養 3 日目ごろより検出可能であった。しかしながら、検体によって MPB64 の産生速度は異なり、ガフキー 9 号の検体でも培養 7 日目

になって初めて陽性となった検体もみられた。また、低濃度の検体 (ガフキー 1 号、2 号) では 7 日目までに検出することができず MPB64 は濃度依存的な傾向が認められた。一方、本来 MPB64 を産生しない *M. avium* で、理由は不明であるが非特異的反応が 1 検体認められた (表 1)。

表 1. 相関性に関する結果 (検討 1)

		PCR		
		結核	非結核性抗酸菌	計
迅速測定法 (イムクロマト法)	陽性	5	1	6
	陰性	4	2	6
	計	9	3	12

陽性一致率: 83.3% (5/9)

陰性一致率: 66.7% (2/3)

全体一致率: 58.3% (7/12)

(2) 培養 0 時間で MPB64 が検出されたものは 4 検体あった。培養 24 時間では新たに 3 検体が検出された。培養 3 日目では 3 検体増え合計 10 検体となった。培養 7 日目では新たに 3 検体から MPB64 が検出され、全 53 検体中 13 検体から陽性反応が認められた。全 53 検体中 PCR 法で結果が判明した検体の相関結果を示す (表 2)。

表 2. 相関性に関する結果 (検討 2)

		PCR		
		陽性	陰性	計
迅速測定法 (イムクロマト法)	陽性	9	4	13
	陰性	5	0	5
	計	14	4	18

陽性一致率: 64.3% (9/14)

陰性一致率: 0% (0/4)

全体一致率: 50.0% (9/18)

(3) 結核疑いで採痰した 36 検体について喀痰

直接法の検討を行った。PCR法との相関結果が得られた検体について表に示す(表3)。イムノクロマトキットへは、喀痰:抽出液=1:2の割合で混合した試料をフィルターを過して滴下したが、さらさらした唾液様のものから非常に粘性の強い濃性の喀痰まで様々で一様にはろ過出来ず、労力を要した。また強い粘性のため、キット上での展開不良が発生しイムノクロマトリーダーで吸光度が測定できなかった検体もあった。

表3. 相関性に関する結果(検討3)

		PCR		
		陽性	陰性	計
喀痰直接法 (イムノクロマト法)	陽性	4	1	5
	陰性	0	3	3
	計	4	4	8

陽性一致率:100% (4/5)

陰性一致率:75%(3/4)

全体一致率:87.5% (7/8)

以上示したように、イムノクロマト法を用いた結核菌群の迅速測定法の検討を行った。栄養豊富な液体培地とイムノクロマト法との組合せによる結核菌群迅速検出法の検討では、粘性の影響でイムノクロマトの展開が困難な検体もあった。これは一般的に用いられている液体培養法と比較すると培地容量が少ないために、喀痰由来の細胞、白血球、粘液等莢雑物の影響が生じやすいためだと考えられる。また非特異的反応も認められたが、これも粘性等の影響によりイムノクロマトが展開していくうえで凝集反応が起こったことが原因だと考えられる。

喀痰からの直接検出法の検討36検体のうちPCR法との相関結果が得られた8検体の結果、PCR法との陽性一致率、陰性一致率及び全体一致率は、それぞれ100%、75.0%、87.5%であり、良好な結果が得られた。液体培地とイムノクロマト法との組合せによる迅速検出法と同様、粘性の強い検体が多いため喀痰からのMPB64の

抽出方法などに課題は残るが、本検討の有用性については新たな迅速測定法となり得ると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永田 正喜 (NAGATA MASAKI)  
佐賀大学・医学部・助教  
研究者番号: 90467952

(2) 研究分担者

宮本 比呂志 (MIYAMOTO HIROSHI)  
佐賀大学・医学部・教授  
研究者番号: 40229894

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号: