

論 文 要 旨

Diagnosis of active tuberculosis using MPB64, a specific antigen of
Mycobacterium bovis

(ウシ結核菌に特異的な抗原 MPB64 を用いた活動性結核患者の診断)

関西医科大学公衆衛生学講座

(指導：西山 利正 教授)

玉 田 育 子

【はじめに】

結核感染は、WHOによると2010年1年間に世界で約880万人の新規患者が発生し110万人が死亡と報告されている。特にその分布は発展途上国が中心であるため、安価で簡便な診断法の開発が急務である。現在、結核の診断は、塗抹・培養検査、核酸増幅法検査、菌種同定検査、ツベルクリン反応と Interferon-Gamma Release Assay を中心とした結核感染診断法、画像検査などがある。現在まで血清を用いた結核の簡易な診断用キットがすでに販売されているが、感度やコストなど問題点も多々ある。そこで我々は発展途上国で治療対象となる活動性結核の被験者に侵襲なく、途上国のフィールドで行えるスクリーニング検査法の開発を目的とし、診断用抗原として合成抗原である MPB64 を用いた Dot-blot 法を施行し、検体として患者と健常者の血清と尿を用い診断の有用性の検討を行った。

【研究方法】

検体は結核専門病院入院中の微生物学的診断がなされた28名の活動性結核患者のうち十分なインフォームドコンセントのもとに承諾を得られた者からの血清と尿を用いた。患者平均年齢は62.4歳で、男女比は22:6であった。また健常者は同様にインフォームドコンセントのもとに得られた、BCG接種済みで、喀痰培養検査にて結核菌陰性で、結核に罹患していない同病院に通院中の患者20名とした。平均年齢は50.9歳で、男女比は4:1であった。

MPB64 抗原は、すでにクローン化されているウシ結核菌 (*Mycobacterium bovis*, BCG Tokyo) 菌体抗原をコードする遺伝子 mpb64 を PCR 法によりその全長を取得し、発現ベクター pET-DEST42 を用いて発現させアフィニティー精製した。この精製抗原を用いて Dot-blot 法により、その反応性を検討した。

次に Dot-blot 法による患者及び健常者の血清及び尿における反応性の評価は、強い陽性反応を「2」弱い陽性反応を「1」反応がなかったものを陰性とした。

【結果】

最初に MPB64 蛋白を抗原として、Western-blotting 法により活動性結核患者と健常者血清の反応性を検討した。活動性結核患者において30KDa付近に特異的なシグナルを認めたが、健常者ではいずれにおいても検出されなかった。また一人の結核患者の入院から退院までの経過を検討したところ精製抗原 MPB64 を用いた Dot-blot 法による結果は、活動性の時期に血清および尿ともに「1」

から「2」を示したが、治療後（約3ヶ月後）には、血清、尿ともに減弱した。この結果は、血沈及び培養の結果と相関していた。

次に MPB64 を用いた Dot-blot 法による反応性を結核患者群及び健常者群の血清と尿を用いて、比較検討した。その結果、まず血清では健常者と比較して患者の方が有意に高く ($P < 0.01$)、さらに結核患者の活動期以外の時期と比較して活動期の方が有意に高かった ($P < 0.05$)。また、尿においても同様に健常者と比較して患者の方が有意に高く ($P < 0.01$)、結核患者の活動期以外の時期と比較して活動期の方が有意に高かった ($P < 0.01$)。

さらに Dot-blot 法を用いた血清と尿の間の相関を検討するため、健常者、患者活動期、患者活動期以外の時期の3つのグループに分け検討した。その結果、健常者を含むすべての対象において血清と尿との相関を検討したところ、両者の間に正の相関が認められた。 ($n=34, r=0.672$)。

【考察】

結核の補助診断方法は現在血清を用いた方法が主流であるが、フィールドにおける活動性結核の簡便な診断法として、特に尿を用いて診断するキットの開発が必要である。尿を用いた場合、血清を用いた場合より手技が簡便でしかも感染の危険性が軽減され、遠心機等の特別な設備が不要であることから非常に有用でありスクリーニング法に適すると思われる。

今回開発した Dot-blot 法を用いた活動性結核の診断法は、抗原として MPB64 を用い、検体として血清と尿を用いて、活動期と活動期以外の時期の患者と健常者の比較検討を行った。その結果、反応性は血清、尿ともに、健常者と比較して患者の方が有意に高く、活動期においても有意差が認められ、さらに尿と血清の間に正の相関関係が認められた。

今回の結果から活動期の患者の全員が血清および尿の両方においていずれも「1」および「2」であった。さらに、「2」は活動期の患者のみであった。このことから、本法を用いた場合、「1」および「2」は結核患者を疑い、さらに「2」は活動期の可能性を示唆する結果となった。

本研究により、簡便に採取できる尿を用いて活動性結核患者をスクリーニングすることが可能であることを示した。今後、この方法を用いて発展途上国でのフィールドワークで実際に活用し、さらなるデータの蓄積を検討していく予定である。