

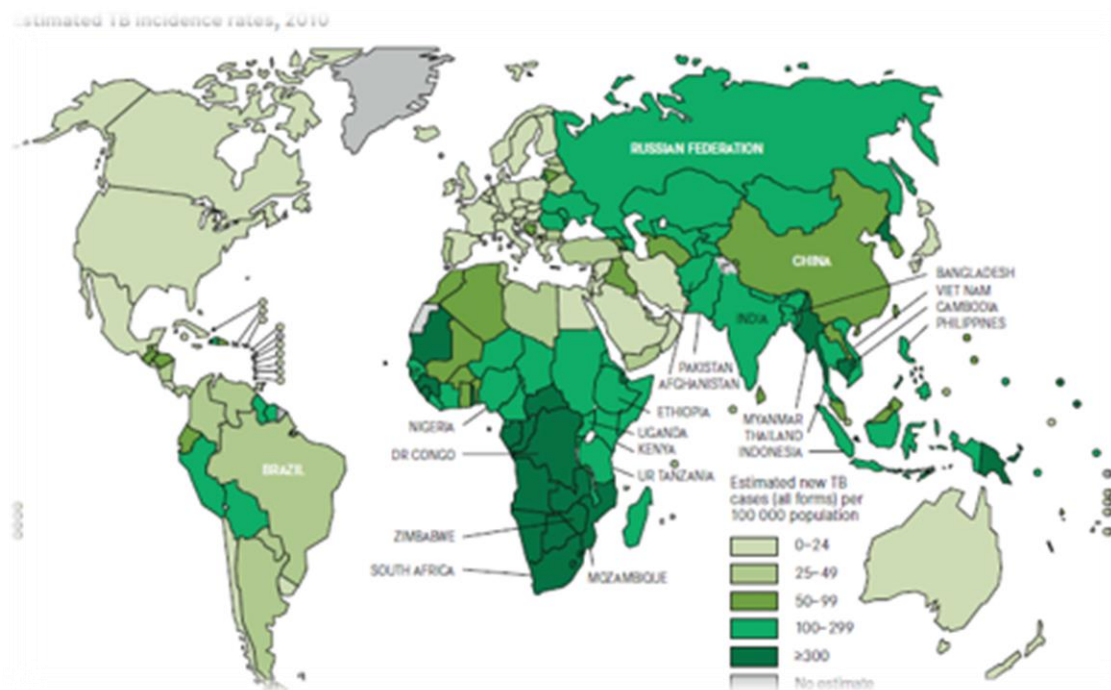
# どこでも使用可能な小型バッテリー駆動診断システムの開発 ～特に活動性結核のスクリーニング法に関して～

関西医科大学 医学部  
衛生・公衆衛生学講座  
准教授 神田 靖士

2022年12月8日

# 背景(結核の現状)

- 結核は飛沫核感染（空気感染）する細菌感染症である。
- アフリカ、東南アジアなどで特に流行している。
- 診断法は存在するが、流行地では実施が困難である。
- HIVとの混合感染者の増加に伴い確実な診断法の確立が急務である。



出典：WHOのホームページ

## 結核診断用のキット(先進国など)

### IFN- $\gamma$ の産生を調べる最近のキット

#### ①.結核診断キット(T-SPOT TB)

- ・ 血液2-8mlを採取し末梢血単核球を結核特異抗原と反応させ、IFN- $\gamma$ の産生細胞を計測する手法
- ✓ 2012年日本で体外診断薬として承認
- ✓ 結果まで約48時間必要
- ✓ 保険点数630点(6300円)
- ✓ 細胞の分離と培養の機器が必要



#### ② インターフェロン- $\gamma$ 遊離試験キット クオンティフェロンTBゴールド

保険適用

体外診断用医薬品

製造販売承認番号：22100AMI00003000

原理は①と同じ  
保険点数630点(6300円)

出典

先進国で使用されるキット(高価)

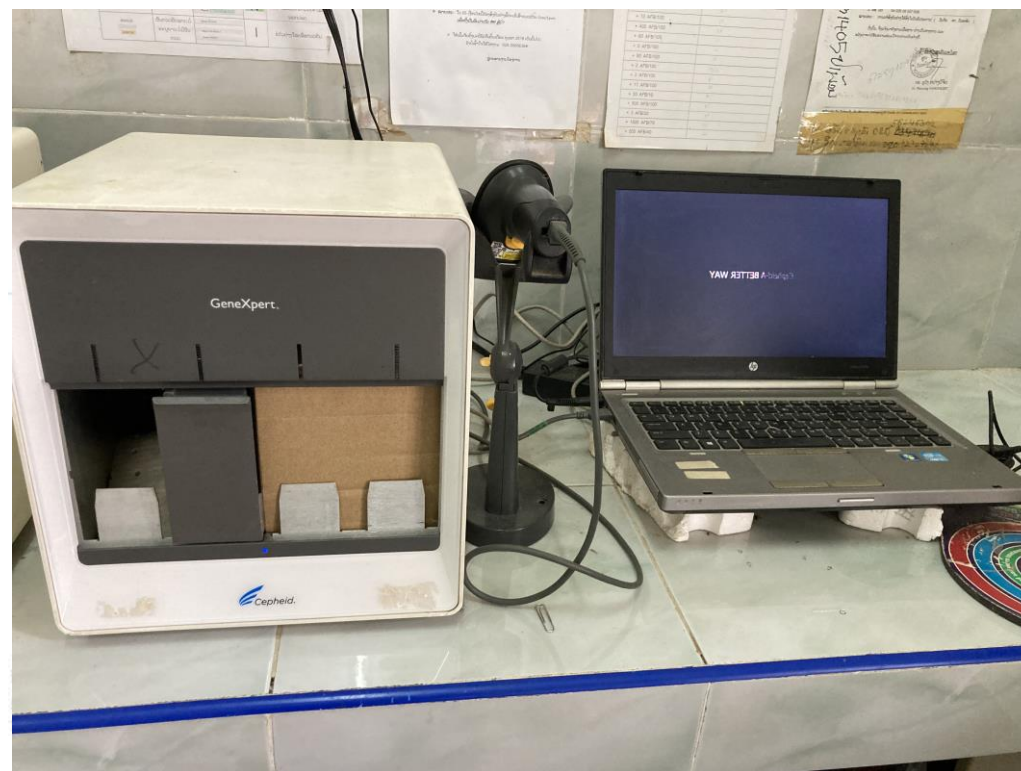
## 結核診断用のキットと装置(発展途上国など)

グローバルファンドの支援があれば・・・

### Real-time PCR法による

○ GeneXpert

## 喀痰中の結核菌の遺伝子を検出



ランニングコスト: \$18 (グローバルファンドでの価格\$9)

発展途上国で導入されるも高価なため設置機関は限定的

# ラオス国における結核の現状と共同研究



## ラオスの結核の現状

罹患率 182 (人口10万人対) 13.3(日本)

死亡率 53 (人口10万人対) 1.5(日本)

ラオスの約5,730人の結核患者が受診した(2017)  
TB-HIV混合感染症例が27例 (5.5%) と報告されている。  
県内にGeneXpertが2台設置 (県の基幹病院のみ、国内に29台)

ラオス保健省及びカムワン県保健局との共同研究



カムワン県保健局局长Dr.Thonelakhan が関西医科大学を  
表敬訪問(2017.11.20)

⇒ 結核感染が多いラオス国内でのサンプル収集

# ラオス農村部の医療施設



## 既存のキットを発展途上国で実施する上での問題点

- 採血が必須(血液を扱うためリスクあり)
- 診断までに時間がかかる(48時間必要)
- 機器が必須(発展途上国では設備がない)
- 高価である(発展途上国では使用不可)
- HIV感染などで免疫不全要因があれば偽陰性になる

# 目的

発展途上国において使用可能な

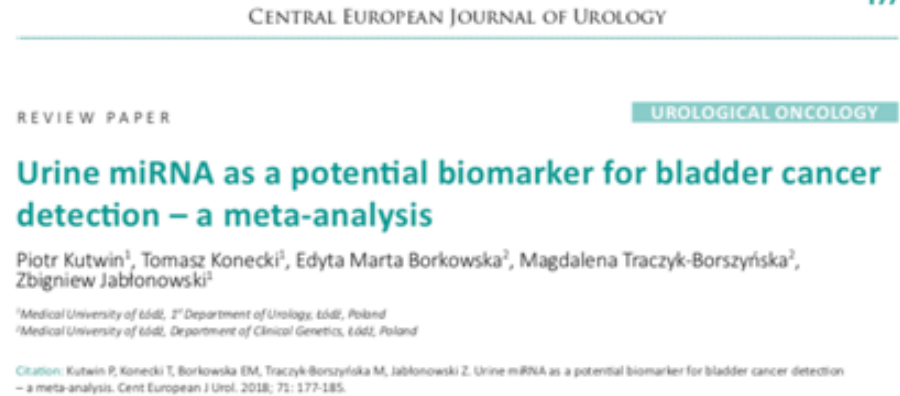
- ✓ 安価に
- ✓ 確実に
- ✓ 迅速に
- ✓ 安全に

肺結核（活動性結核）を診断する新たなスクリーニング法を開発することを目的とする。

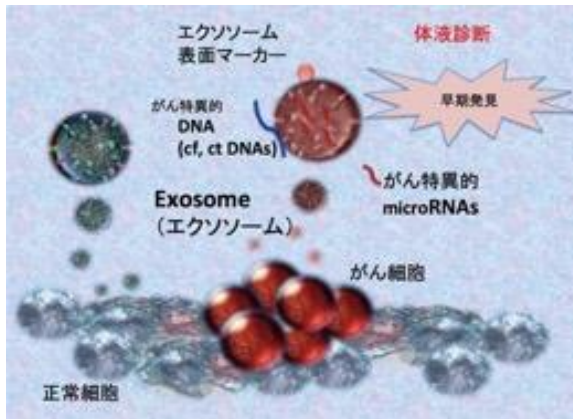


## 新規バイオマーカーの探索

### がんの領域で診断用マーカーとしてのmiRNAが報告



同様に...



結核感染による肺の炎症

尿中に排出される特異miRNA

結核の新規バイオマーカー

国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野 落谷孝広先生

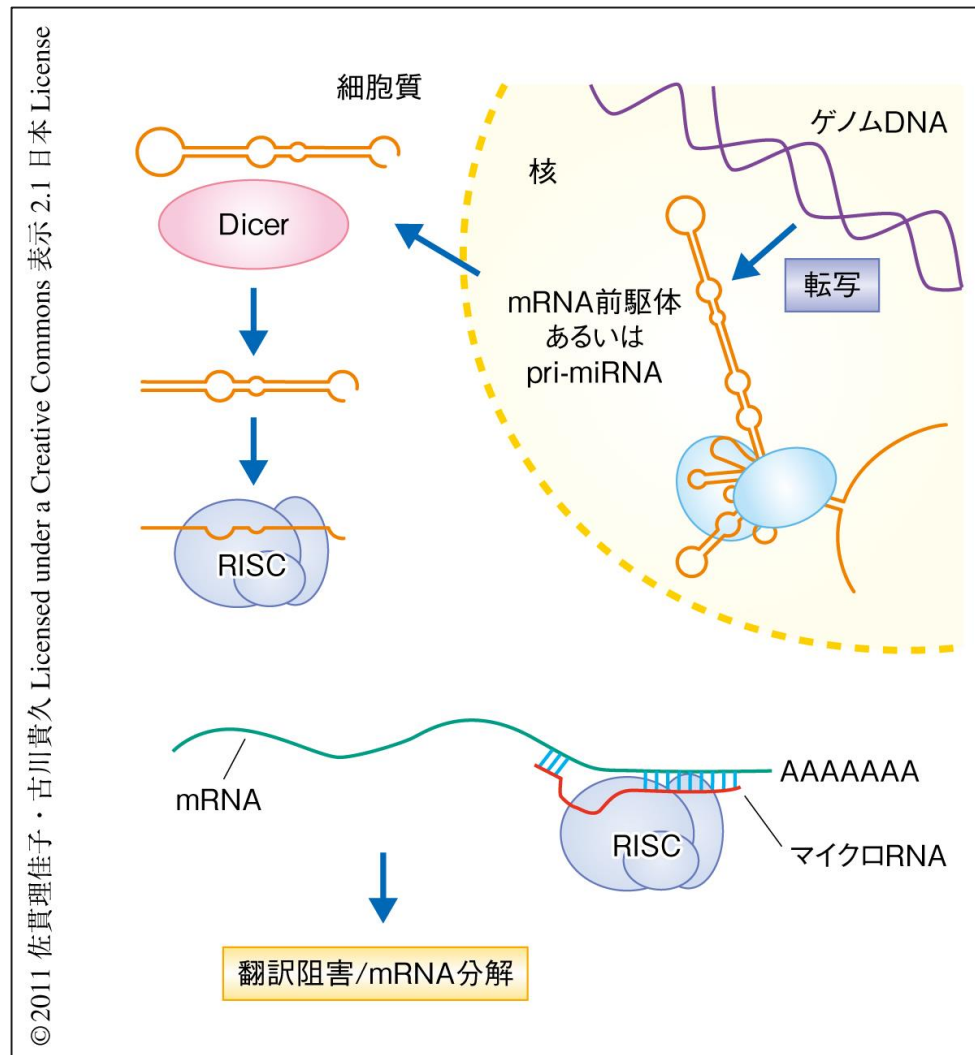
結核感染で見られる特異的miRNAが存在するのでは？

# microRNA (miRNA)

miRNAはゲノムDNAにコードされている機能性non-coding RNAの1つ。成熟したものは21~25塩基長に調整された後、ターゲット遺伝子の発現を抑制する。

ヒトのmiRNAは2500種以上あり、複数のmRNA配列に部分相補的に結合し遺伝子発現を強力に抑制する。

血清や血漿中のmiRNAは細胞間の情報伝達機能を持つことが示されており、各種疾患や生命現象のバイオマーカーとして注目されている（膵癌早期診断など多数）。



©2011 佐貫理佳子・古川貴久 Licensed under a Creative Commons 表示 2.1 日本 License

# 結核感染に特異的なmiRNAの網羅的探索

ラオス国内で収集した活動性結核患者の尿  
対照:ラオス人健常者(非結核患者) 9人  
ラオス人活動性結核患者 14人



アフィニティー法によるTotal RNAの抽出



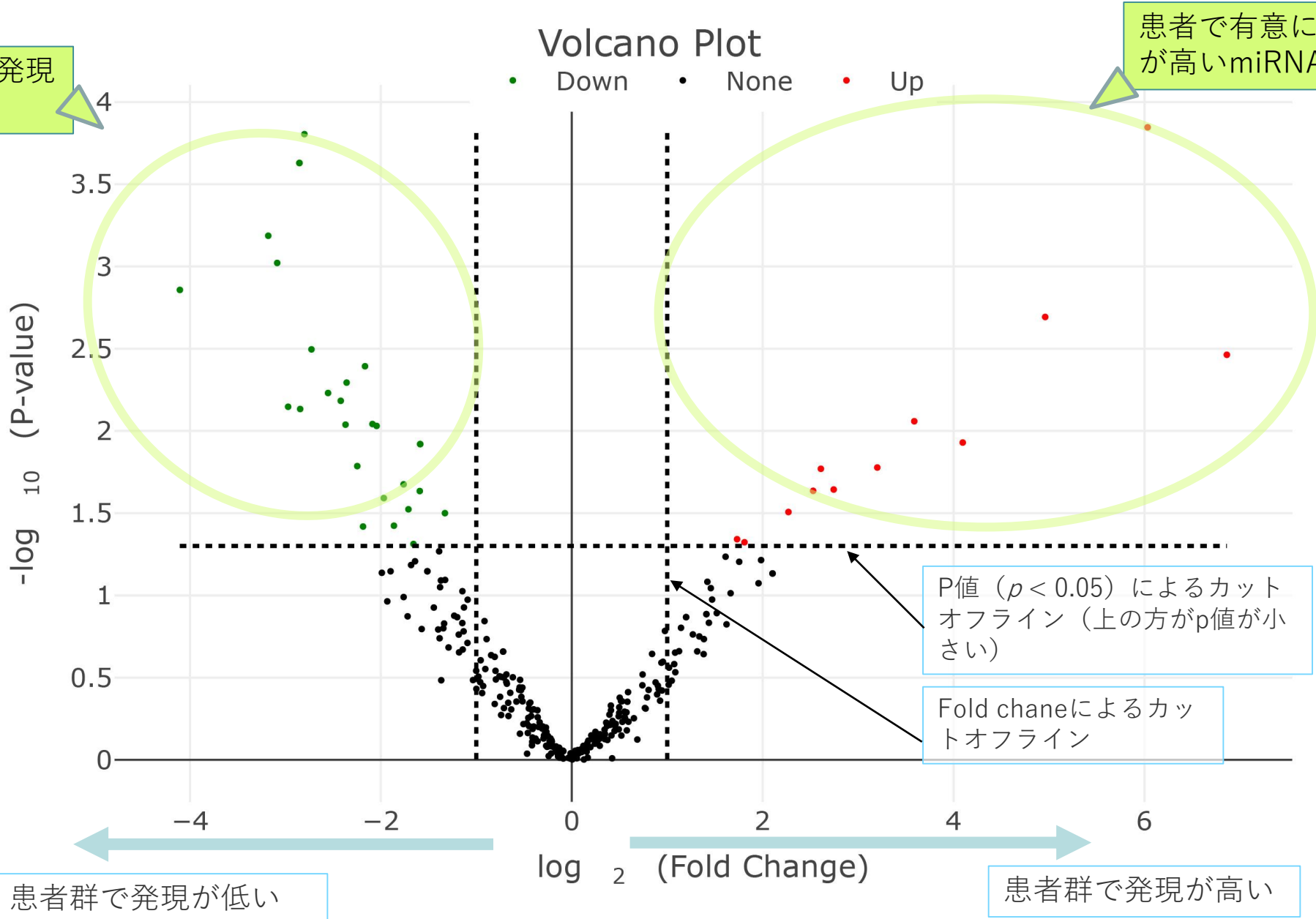
逆転写反応

Small RNA librariesの作成

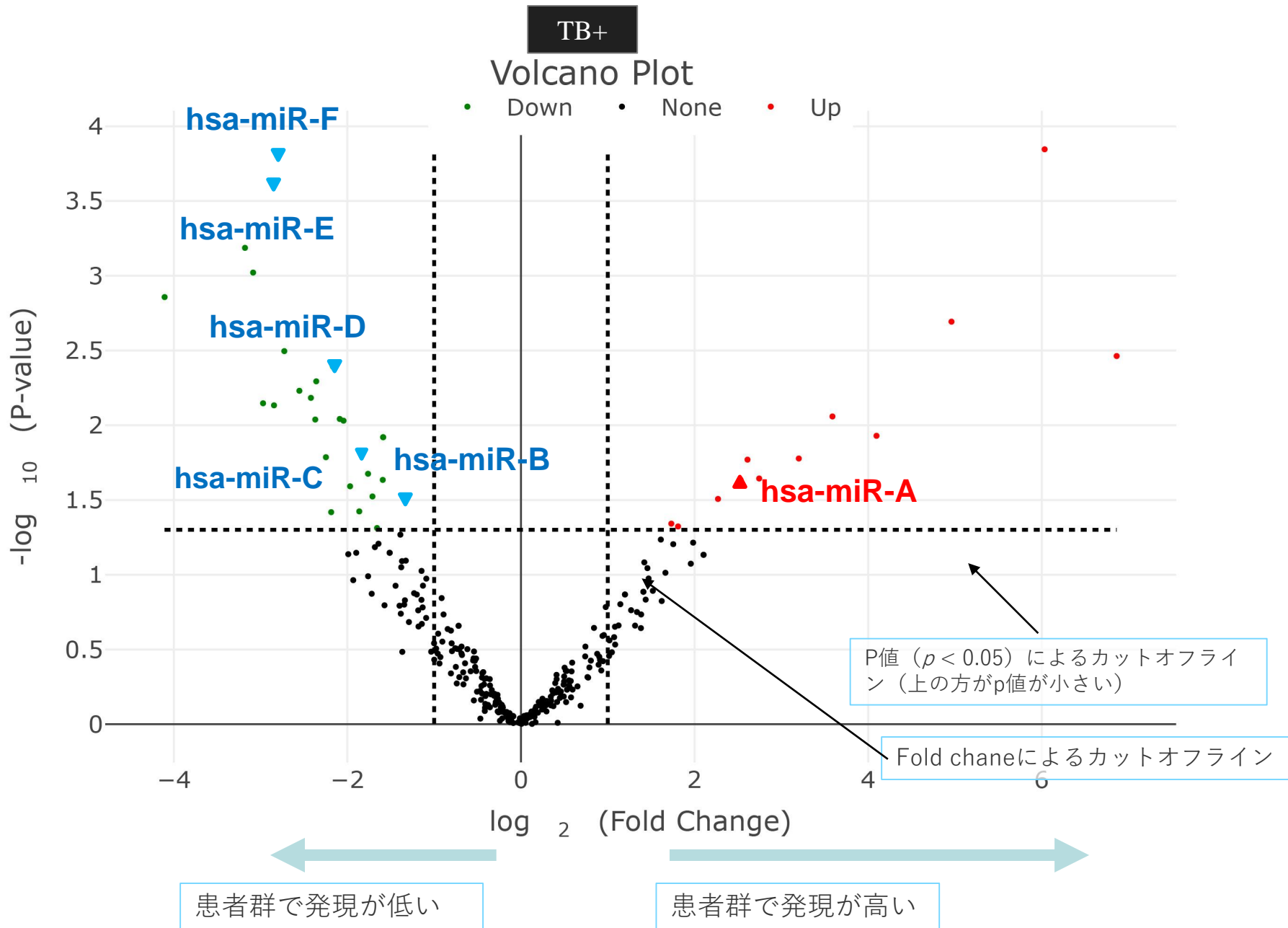


次世代シーケンサーによる網羅的解析

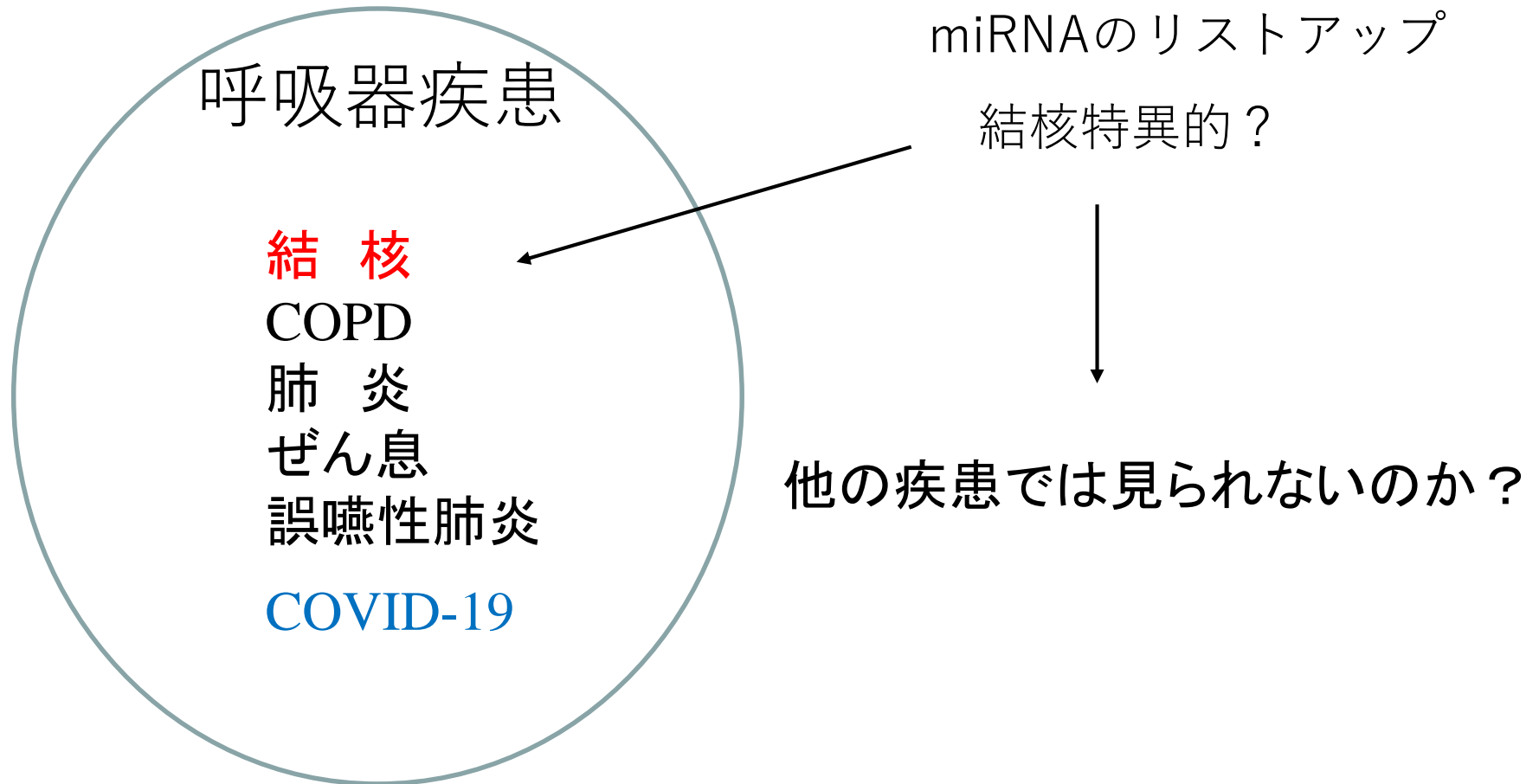
# 結核感染により変動するmiRNA (Volcano Plot)



# 結核感染により変動するmiRNA (Volcano Plot)



# 疾患特異的バイオマーカーの探索



# COVID-19患者における疾患特異的miRNAの探索

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19)

患者 関西医科大学

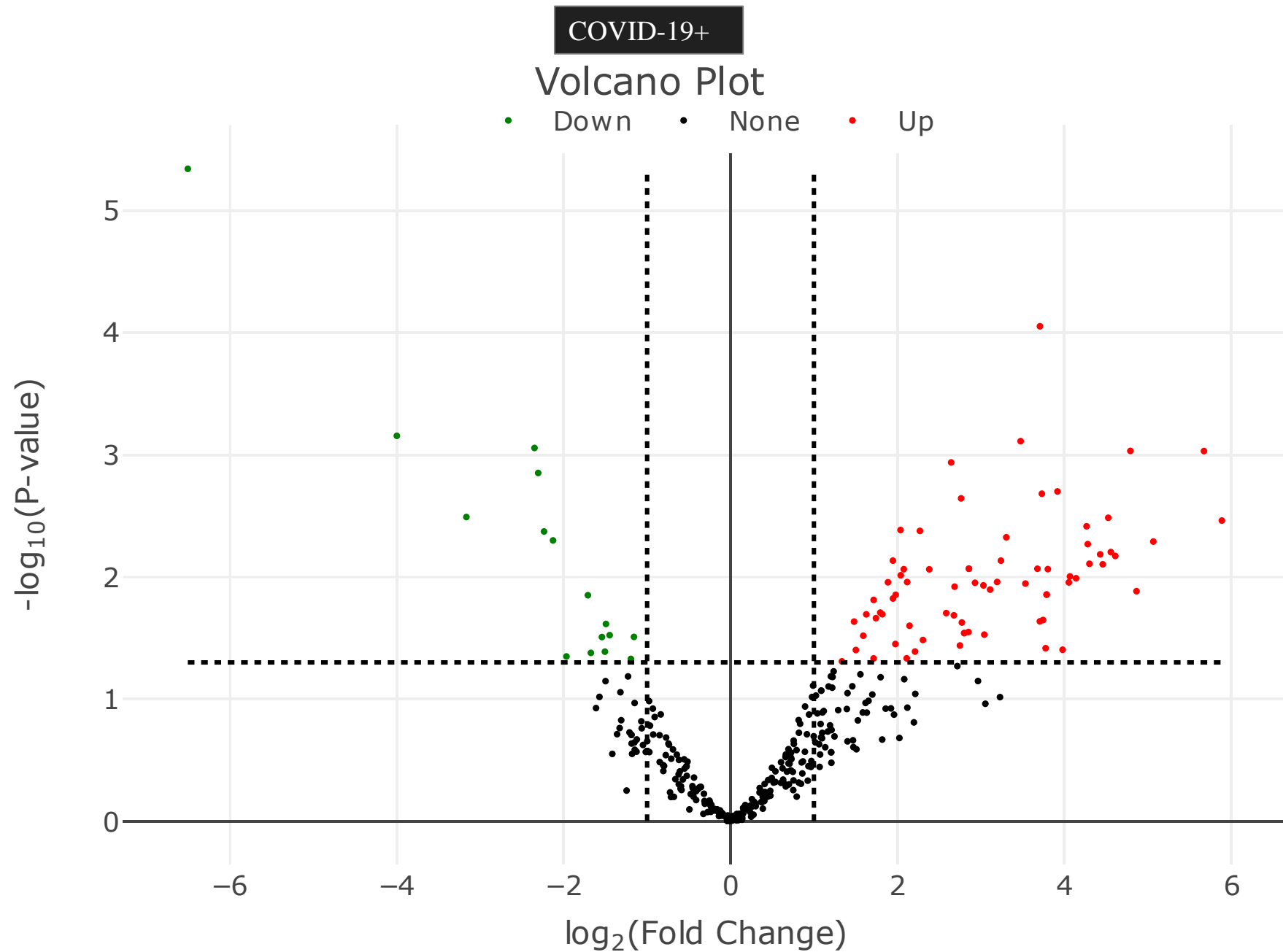
総合医療センター入院患者  
(軽症、中等症、重症: 人工呼吸器管理) 14名

健常者(日本人) 7名

検体: 尿(15ml)を使用

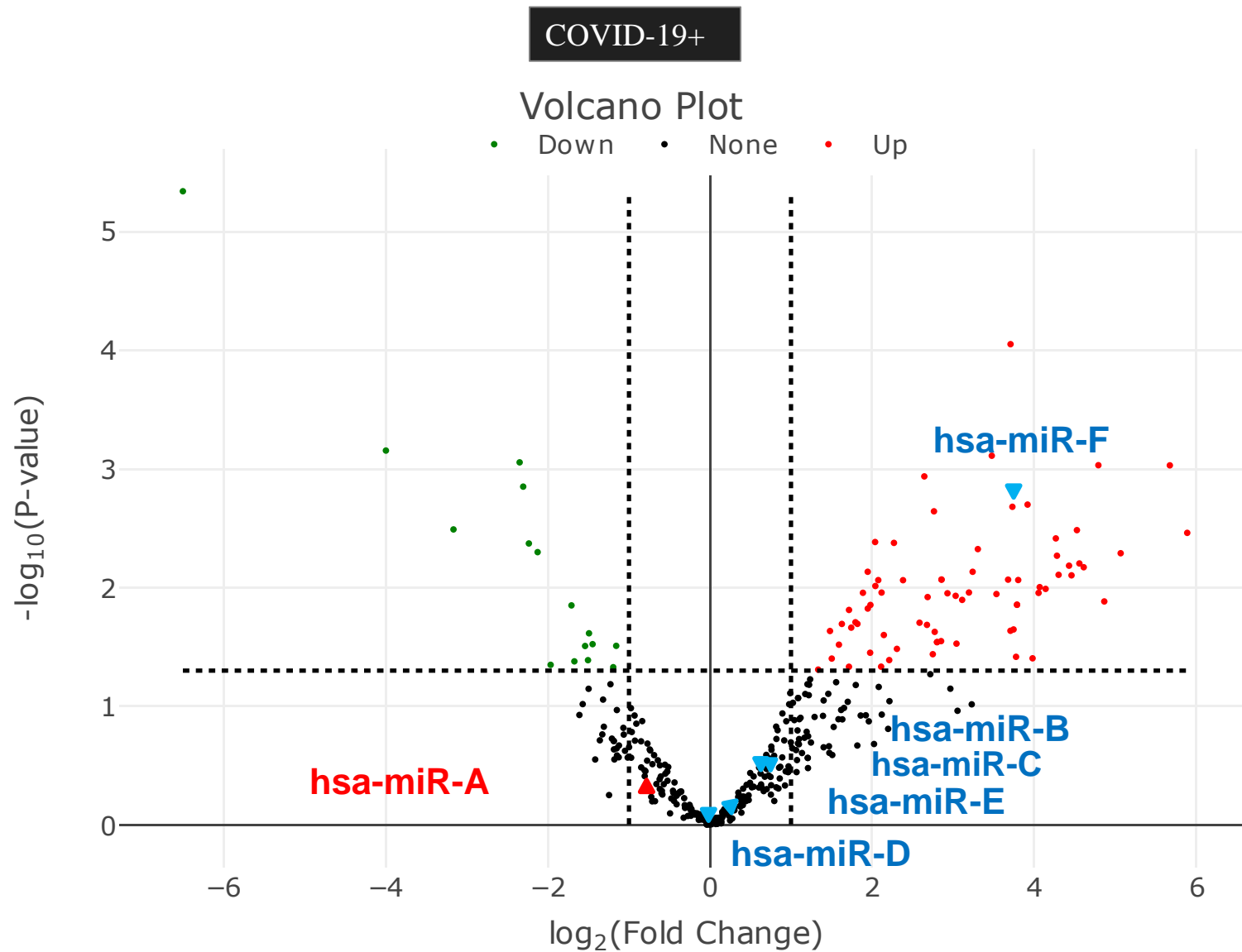
次世代シーケンサーによるmiRNAの網羅的解析を実施

# SARS-CoV-2感染により変動するmiRNA (Volcano Plot)



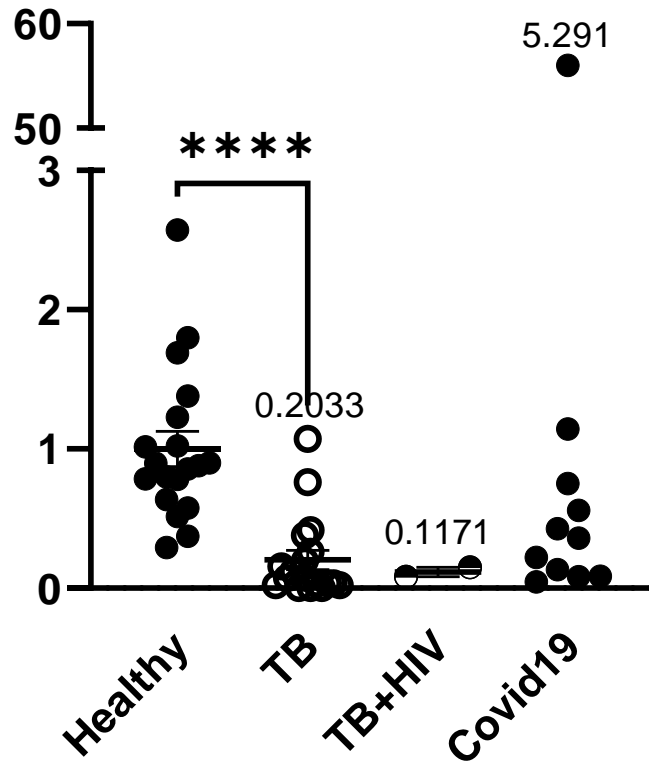


# SARS-CoV-2感染により変動するmiRNA (Volcano Plot)



# 各候補miRNAの定量的解析の結果

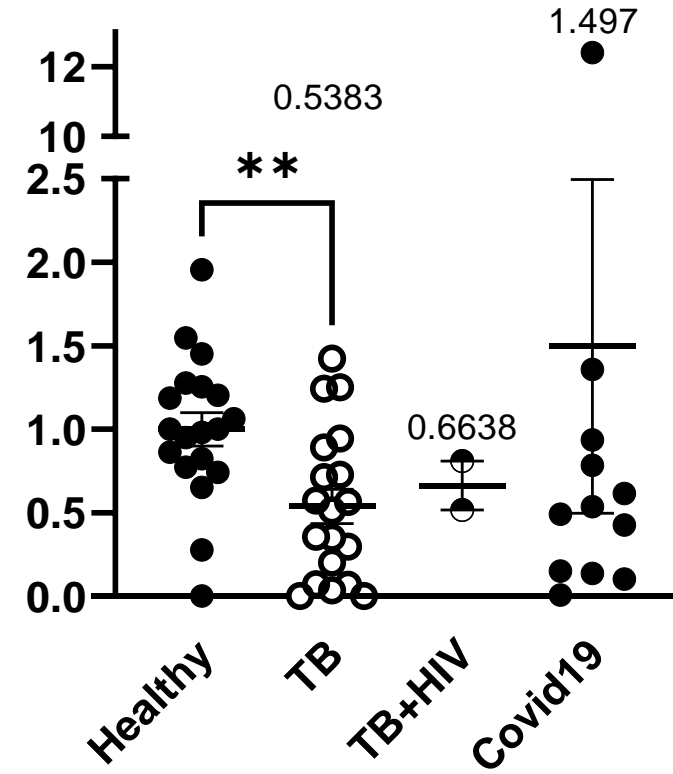
hsa-miR-C



TB (-) N = 19  
TB (+) N = 18  
TB (+)/HIV (+) N = 2  
Covid-19 N = 12

感度0.889 特異度0.889

hsa-miR-E

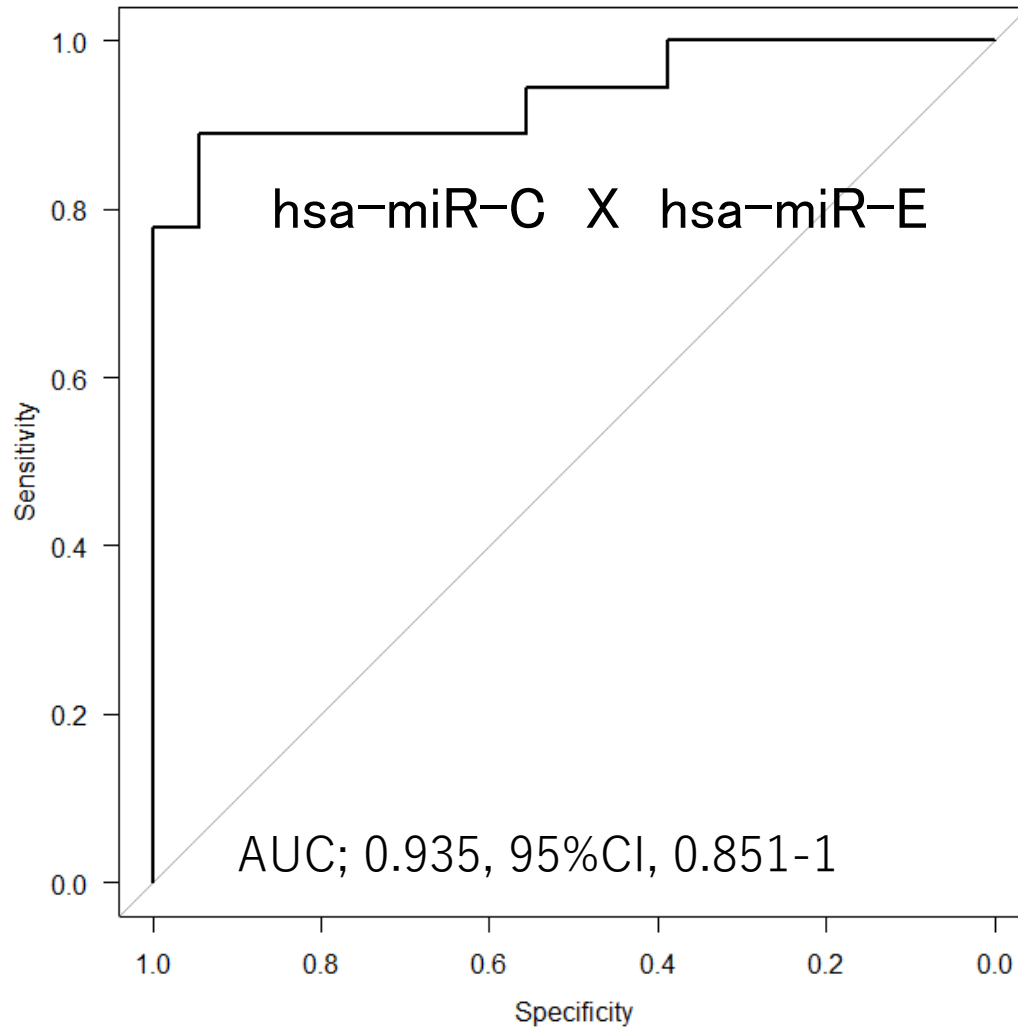


TB (-) N = 19  
TB (+) N = 19  
TB (+)/HIV (+) N = 2  
Covid-19 N = 12

感度0.842 特異度0.737

# 組み合わせによる精度の上昇

ROC曲線による解析



感度0.889, 特異度0.944

陰性的中率; 89.47368%  
陽性的中率; 94.11765%

# 問題の解決手段(イメージ)

大がかりな機器を使用せず尿中の微量な  
miRNAの検出法の確立

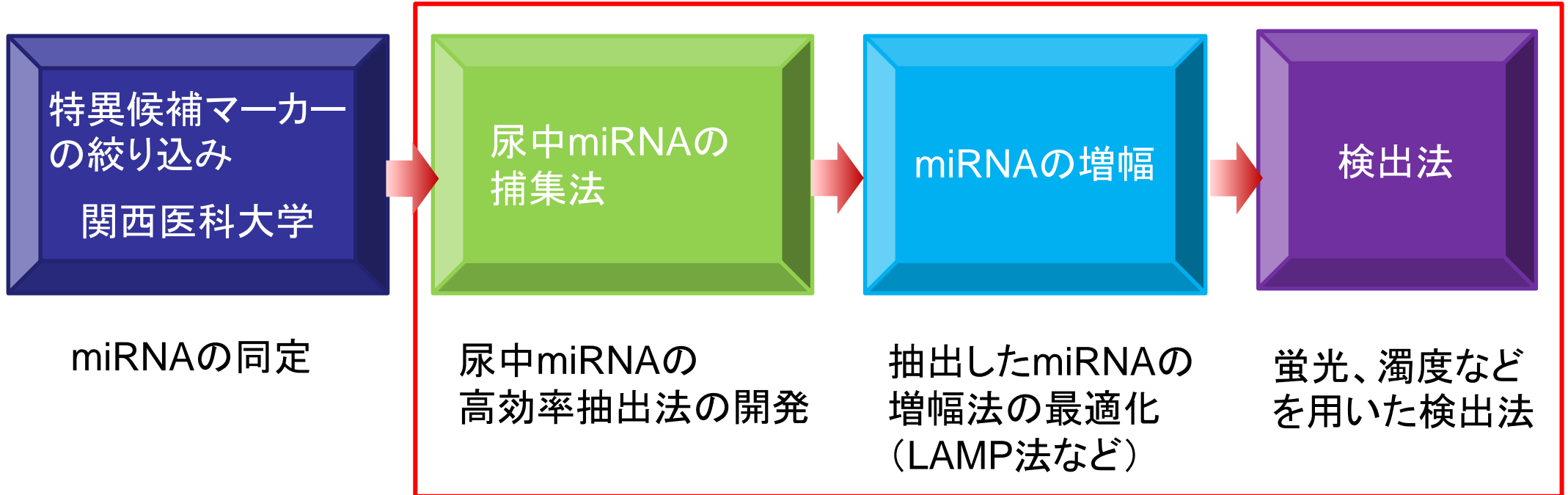
miRNAをなんとか可視化したい！

## 求める技術要素

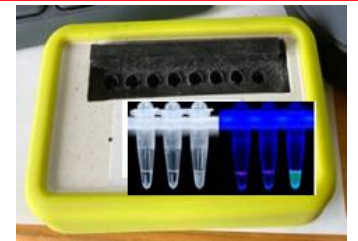
微量なmiRNAを検出するために

1. 濃縮する
2. 増幅する
3. シグナルを増強する

# 診断システムのプロトコール



民間企業2社とアカデミアのコンソーシアム



診断デバイスの製造

# 企業と発表者の役割分担

## 企業にお願いしたいこと

- 尿からRNA（ターゲットmiRNA）の高効率な抽出法の開発
- 微量なターゲットmiRNAを増幅又は高感度に検出する方法の開発
- キットとしてのデバイス化(製品化)

## 求める企業の種類

1. キット化（デバイス化）する企業  
（濃縮法、検出法などの開発）
2. 量産化する企業
3. アジア、アフリカ地域に販売  
ルートを有する医療機器メーカー

## 発表者が行うこと

1. バイオマーカーとしてのmiRNAの特定
2. 試作品評価
3. 学会発表
4. 競争資金の獲得協力
5. ライセンス供与など

## 既存の診断キットと新規バイオマーカーを指標とした診断法の比較

	Tスポット.TB	新規バイオマーカーを用いた診断法
必要な機器、設備	遠心機、細胞培養装置が必要	特別な装置は必要なし (小型バッテリー駆動デバイス)
判定までにかかる時間	少なくとも24時間必要	2時間程度(予測)
判定の正確性	感度: 97.5% 特異度: 99.1% *HIV感染など免疫不全状態では陰性と判定されることがある。	数種類のmiRNAを組み合わせることで確実に判定可能
安全性 (医療従事者側)	採血が必要(HIVなどの感染リスクあり)	喀痰及び血液は扱わない
コスト	高価 6,300円/検体	1000円~1500円/検体

## 用途

活動性結核の診断を非侵襲性の検体である尿を用いてスクリーニング的に実施する。

## 市場性

アフリカ、アジアをはじめ主に発展途上国での市場がメインとなる。しかし、感染していないことを確認する診断法としての有用性と先進国での市場を考慮すると全世界での使用が見込まれる。

1キット:1,000円として

### 発展途上国

63億人

6.3兆円

### 国内

医師数： 304,759人

30億円

看護師：1,149,397人

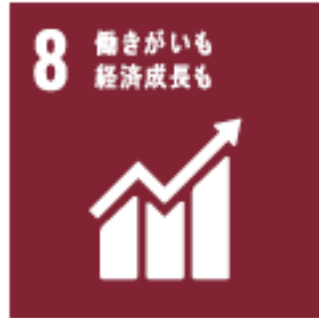
115億円

計：145億円



# 今回の取り組みを通じて貢献可能なSDGs目標

## SUSTAINABLE DEVELOPMENT GOALS



3 すべての人に健康と福祉を

# 本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：結核感染試料のスクリーニング方法及びこれに用いる  
プローブセット
  - 出願番号：特願2021-207106
  - 出願人：関西医科大学
  - 発明者：神田 靖士、下埜 敬紀、西山 利正
- 
- 発明の名称：結核感染の検査方法
  - 出願番号：特願2020-107042号 PCT/JP2021/023027
  - 出願人：関西医科大学
  - 発明者：神田 靖士、下埜 敬紀、西山 利正

# 産学連携の経歴

- 2022年3月～ 民間企業2社と1大学との間で  
秘密保持契約を締結

# お問い合わせ先

関西医科大学

産学知財統括室 佐々木 健一

研究部研究課産学知財統括係 溝上、田中

T E L 072-804-2324

F A X 072-804-2686

e-mail [sangaku@hirakata.kmu.ac.jp](mailto:sangaku@hirakata.kmu.ac.jp)