

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15263

研究課題名(和文) 核酸クロマトグラフィーを利用した4種マラリア原虫マルチプレックス検出法の開発

研究課題名(英文) Rapid and sensitive multiplex single-tube nested PCR for the identification of four human Plasmodium species

研究代表者

平塚 真弘 (Hiratsuka, Masahiro)

東北大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：50282140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：Multiplex single-tube nested PCRと核酸クロマトグラフィーを利用して、5種のマラリア原虫(熱帯熱マラリア、三日熱マラリア、卵形マラリア、四日熱マラリア及びサルマラリア)に特徴的なDNA配列をタグ配列付加プライマーによりPCR増幅し、それらの産物を相補DNA配列がプリントされた細い短冊状の核酸クロマトグラフィーストリップに展開することで検出されたバンドの位置から、マラリア感染の有無及び感染マラリアの原虫種を同時に特定できる簡易迅速診断法の構築に成功した。

研究成果の概要(英文)：Malaria is caused by five species of Plasmodium in humans. Microscopy is currently used for pathogen detection, requiring considerable training and technical expertise as the parasites are often difficult to differentiate morphologically. Rapid diagnostic tests are as reliable as microscopy and offer faster diagnoses but possess lower detection limits and are incapable of distinguishing among the parasitic species. To improve global health efforts towards malaria control, a rapid, sensitive, species-specific, and economically viable diagnostic method is needed. In this study, we designed a malaria diagnostic method involving a multiplex single-tube nested PCR targeting Plasmodium mitochondrial cytochrome c oxidase III and single-stranded tag hybridization chromatographic printed-array strip. This system also enables the identification of both single- and mixed-species malaria infections.

研究分野：ゲノム薬理学

キーワード：マラリア 核酸クロマトグラフィー 診断法

### 1. 研究開始当初の背景

現在、マラリアは世界で年間およそ 1 億 9800 万人の患者が罹患し、死亡者数は 58 万 4000 人と報告されている。ヒトに感染する代表的なマラリア原虫には、熱帯熱マラリア、三日熱マラリア、四日熱マラリア及び卵形マラリアの 4 種類が知られている。マラリア感染の診断の遅れは治療の遅れに繋がり、重症化の後に死亡する例も少なくない。したがって、マラリア流行地で実施可能な簡便、迅速、高感度かつ複数の原虫種を特異性高く検出できる診断法の開発が国際的に喫緊の課題となっている。一般的に、マラリア原虫の検査は血液塗抹標本をギムザ染色して光学顕微鏡で観察する方法がゴールドスタンダードである。この顕微鏡法は、熟練者によって確定診断あるいは否定が可能であるが、原虫密度が少ない場合は長い検査時間と高度な技術が要求され、結果的に治療が遅れることが生じる。そのため、イムノクロマトグラフィーを利用したマラリア迅速診断法が開発されている。しかし、マラリア種を区別する特異性は低く、種によって効果的な薬物が異なるために問題となっている。それに対して、PCR 法は感度が良く、複数原虫の混合感染に対しても高い特異性で診断できる。しかし、最終的な DNA 増幅物を検出するためには、高額な蛍光検出器の使用や煩雑なゲル電気泳動を行う必要があり、ルーチン診断に適合させるために検出法のさらなる簡便化が求められている。

### 2. 研究の目的

本研究では、核酸クロマトグラフィーを利用して、4 種のマラリア原虫（熱帯熱、三日熱、四日熱、および卵形マラリア）の感染の有無及び種の特性を 1 時間以内に診断できるキットを開発することが目的である。方法は、マラリア原虫ミトコンドリア DNA のシトクローム C オキシダーゼ 遺伝子をターゲットとして、(1) DNA タグ及びビオチンラベルプライマーによる原虫種特異的 PCR を行い、(2) その産物をアビジンラベル青色ナノ粒子含有展開液と混合し、(3) DNA タグの相補配列がプリントされた核酸クロマトグラフィーストリップに展開させ、(4) 青色のラインの位置で視覚的に診断を行う。同法は、高額な検出機器や煩雑な解析操作を必要としない特徴を持ち、マラリア流行地域で実施可能な画期的な診断キットとなり得ることができると期待されている。

### 3. 研究の方法

本研究では、4 種のマラリア原虫に特徴的な DNA 配列をタグ配列付加プライマーにより PCR 増幅し、それらの産物を相補 DNA 配列がプリントされた細い短冊状の核酸クロマトグラフィーストリップに展開することで、検出されたバンドの位置からマラリア感染の有無及びマラリア原虫種を目視で特定でき

る検出法を開発する (図 1)。

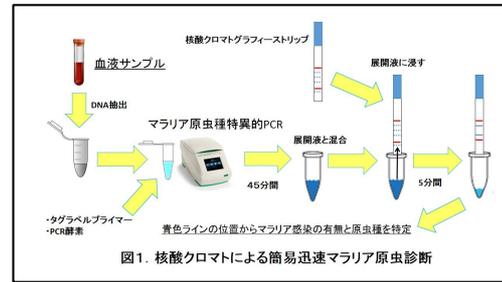


図 1. 核酸クロマトによる簡易迅速マラリア原虫診断

本研究では、図 2 に示したように、マラリア原虫のミトコンドリア DNA 上に存在する cox3 遺伝子を PCR で 1 次増幅した後、その産物を鋳型として 2 次 PCR を行う。

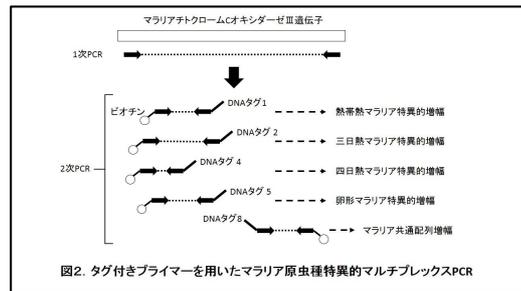


図 2. タグ付きプライマーを用いたマラリア原虫種特異的マルチプレックスPCR

2 次 PCR に用いるプライマーは種特異的な cox3 配列増幅が得られる場所を選択し、一方のプライマーの 5 端には種で配列の異なるようにした 10 塩基程度の DNA タグを連結する。なお、DNA タグが PCR 中に 2 重鎖にならないようにスペーサーを挟んで連結する。このプライマー構造がこれまでにない斬新な方法論の提案である。また、もう一方のプライマーの 5 端にはビオチンをラベルする。同様な構造のプライマーを 4 種のマラリアの cox3 共通配列でも作製する。1 本の PCR チューブ内で 5 種のプライマーセットを含むマルチプレックス PCR を行う。仮に、熱帯熱マラリアに感染していた場合、DNA タグ 1 を有したプライマーセット及び DNA タグ 8 を有した共通プライマーセットで PCR 増幅が起こる。次に、アビジンを結合させた青色ナノ粒子を含む展開バッファーに得られた PCR 反応液を混合し、核酸クロマトグラフィーストリップに展開する。ストリップ上には、DNA タグ配列に相補的なオリゴヌクレオチドがライン上にプリントされている。PCR 産物に連結された DNA タグとストリップ上の相補配列オリゴが結合し、青色ナノ粒子が凝集して目視可能なレベルのバンドを形成することでマラ

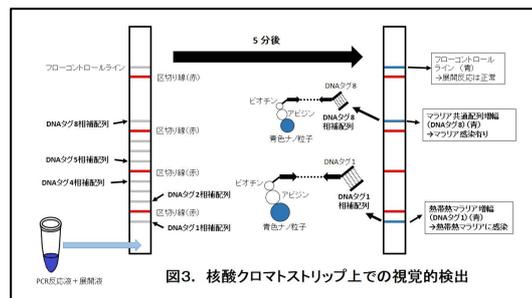
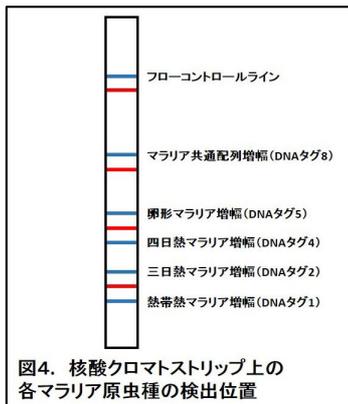


図 3. 核酸クロマトストリップ上での視覚的検出

リア感染の有無 (DNA タグ 8) と熱帯熱マ  
リアの特定 (DNA タグ 1) を可能にする (図 3)。

もし、複数カ所でバンドが検出されれば、  
種の異なるマラリア原虫が混合感染してい  
ることも明らかにすることができる (図 4)。



#### (1) マラリア原虫特異的 PCR 条件の検討

4 種のマラリア原虫種を特異的に同定する  
ことを目指して、各マラリア原虫に特徴的な  
DNA 配列を PCR 増幅できる条件を検討した。  
すでに、連携研究者である大阪市立大学大  
学院医学研究科・金子明教授のグループが、  
2015年にマラリア原虫ミトコンドリア DNA の  
cox3 遺伝子をターゲットとして、種特異的  
検出する方法を報告しており、同法を参考にし  
て PCR 条件を検討した。標準 DNA として、4  
種のマラリアに単独感染したケニア人及び  
ヴァヌアツ人由来の精製済み DNA (大阪市立  
大学より提供) を使用した。用いる PCR プ  
ライマーは、各マラリア種に特徴的な cox3 遺  
伝子配列に続き、スペーサー配列 (3 つのカー  
ボン連結) DNA タグ配列 (図 2) を連結し  
た。なお、プライマーとタグ DNA の連結部に  
スペーサーを入れることで、タグ部分が PCR  
時に 2 重鎖にならず、その後のストリップ上  
での相補配列との結合を効率的なものにする。  
また、リバースプライマーも各マラリア  
種に特徴的な配列を選択し、末端にはピオチ  
ンをラベルする。これらのプライマーセット  
を使用し、各マラリア原虫種を特異的に増幅  
できる PCR 条件を検討する。なお、この時点  
では、1 種類のマラリア種を 1 本のチューブ  
で反応させるシングル PCR で条件を検討し、  
鋳型とプライマーの組み合わせが一致しな  
い場合 (例えば、鋳型が熱帯熱マラリア DNA  
でプライマーが三日熱マラリア増幅用) にお  
いて、非特異的な増幅が全く認められないよ  
うな条件を見出す。また、4 種のマラリア原  
虫 cox3 遺伝子の共通配列を増幅するプライ  
マーセットも構築した。

#### (2) マルチプレックス PCR 条件の検討

4 種のマラリア原虫 cox3 遺伝子を特異的に  
増幅する PCR プライマーセット及び共通配列  
を増幅するプライマー、計 5 種のセットを 1  
本のチューブ内でマルチプレックス PCR する  
最適反応条件を検討した。検討する項目は、

プライマーの精製グレード (ゲル濾過、OPC  
精製、HPLC 精製)、DNA ポリメラーゼの各社  
製品、反応温度条件とした。得られた PCR 産  
物をシーケンス解析することで非特異的  
増幅が起こらない条件を決定した。

#### (3) 核酸クロマトグラフィー反応条件の検討

プライマーの 5' 側に 10 塩基程度の DNA タ  
グを連結するが、すでに、クロスリアクティ  
ビティーのない 8 種類の DNA タグ配列を設計  
している。これらの中から、各マラリア原虫  
種の検出に最適なタグの組み合わせを検討  
する。PCR 終了後、反応物にアビジン結合青  
色ナノ粒子を含む展開バッファーを混合し、  
核酸クロマトグラフィーストリップ上に展  
開するが、青色のバンドが明確に目視でき  
るような展開条件 (バッファー組成など) を  
検討した (図 3)。

#### 4. 研究成果

研究計画段階では、4 種のマラリア原虫を  
検出する系を構築予定であったが、研究の進  
捗が予想以上に進んだため、ヒトに感染する  
サルマラリアも検出項目に加え、合計 5 種の  
マラリア検出系を構築することにした。その  
結果、各マラリア原虫種の cox3 遺伝子領域  
を挿入したコントロールプラスミドを鋳型  
として PCR を行ったところ、目的とする位置  
にバンドが正確に検出され、非特異的なバン  
ドは認められなかった。また、ネガティブコ  
ントロールとしてマラリア非感染者由来 DNA  
を用いたところ、バンドは検出されなかった。

#### (1) 核酸クロマトグラフィーストリップの検 出感度の検討

マラリア診断において、感染患者の末梢血  
から抽出される原虫 DNA が微量の場合でも、  
正確な検出に耐えうる感度を有しているこ  
とは適切な治療を開始する上で重要である。  
ここでは、二本鎖 DNA 選択的に定量した cox3  
遺伝子挿入プラスミドを段階希釈したもの  
を MSTNPCR の鋳型 DNA として用いること  
で、同法の検出感度の検討を行った。その結  
果、EtBr 染色したアガロースゲル電気泳動  
において原虫種特異的増幅産物は  $10^3 \sim 10^4$   
コピーまで確認できた。一方、核酸クロマト  
グラフィーストリップでは  $10 \sim 10^2$  コピー  
まで検出することができた。以上より、核酸  
クロマトグラフィーストリップの検出感度  
はアガロースゲル電気泳動の検出感度より  
10 倍以上、高感度である可能性が示唆され  
た。

#### (2) 混合感染例の検討

マラリア流行地域では複数のマラリア原  
虫種に感染している場合がある。各マラリア  
原虫 cox3 プラスミドを混合することで疑似  
的な混合感染例を作製し、同時検出可能か  
否かの検討を行った。なお、用いたプラスミ  
ド量は 103 コピーとした。その結果、2 種、  
3 種、4 種及び 5 種のいずれのマラリア原虫

との組み合わせにおいても、目的のバンドを目視で正確に検出することができた。

### (3) 核酸クロマトグラフィーの展開温度による検出感度の検討

高度な研究施設だけでなく、一般病院やマラリア流行地域の現場診療所のような十分な検査体制が整っていない施設においてマラリア感染診断を行うにあたり、検査結果が環境温度にできるだけ影響されないことが重要である。ここでは、熱帯熱マラリア原虫 *cox3* プラスミドを用いて MSTNPCR を行い、4~40 において核酸クロマトグラフィーを行った。その結果、温度が上昇するにしたがって、マラリア共通増幅 (*pan-Plasmodium*) のバンド強度の増大が観察された。

### (4) 臨床サンプルを用いた診断法の評価

マラリア流行地域から採取されたヒト臨床検体 152 サンプルを用いて、同法の感度 (Sensitivity)、特異度 (Specificity)、陽性的中率 (Positive predictive value; PPV) 及び陰性的中率 (Negative predictive value; NPV) を評価した。これらの検体は大阪市立大学医学部医学研究科寄生虫学分野教授 金子明先生より、乾燥濾紙にスポットした末梢血から抽出された DNA サンプルとして供与された。対照とするマラリア検出法は、これまでに論文報告のあった Nested PCR による検出法を参考にした。また、各臨床検体サンプルに付随する顕微鏡法及び RDTs (Paracheck Pf) の診断結果とも比較した。その結果、核酸クロマトグラフィーによるマラリア原虫感染の検出法は、感度 93.5%、特異度 100%、PPV 100% 及び NPV 100% であった。また、感染しているマラリア原虫種の特定については、感度 88.7%、特異度 100%、PPV 100% 及び NPV 92.8% であった。

本章では、Multiplex single-tube nested PCR (MSTNPCR) と核酸クロマトグラフィーを利用して、マラリア感染の有無及び感染マラリアの原虫種をマルチプレックスで特定できる診断デバイスを開発した。また、ヒト臨床サンプルを用いて診断法の感度、特異度、PPV 及び NPV を評価した。

今回構築した方法は 1 本のチューブで Nested PCR と Multiplex PCR を行うことができる。Nested PCR は 1 次 PCR 後、その一部を 2 次 PCR に用いる 2 段階の操作が必要である。MSTNPCR はアニーリングの温度を段階的に変えることで、1 本のチューブ内で Nested PCR を行うことが可能となり、操作が簡便となる。また、従来の PCR によるマラリア診断法では、原虫種ごとにプライマーセットを用いて PCR 増幅する必要があったため、コンタミネーションのリスクがある。Multiplex PCR により、1 本のチューブ内で各原虫種に特異的な配列を同時に増幅することが可能となり、操作の簡便化と結果の確実性が期待できる。

核酸クロマトグラフィーはアガロースゲル電気泳動に比べて、10 倍以上の高感度を示した。本検討において、核酸クロマトグラフィーは PCR 増幅産物を 1  $\mu$ L、アガロースゲル電気泳動は 4  $\mu$ L 使用した。このことから核酸クロマトグラフィーはアガロースゲル電気泳動の 40 倍以上の感度を有していることが示唆された。また、核酸クロマトグラフィーは展開温度に依存せず、目的のバンドを検出することができた。核酸クロマトグラフィーはバンドの位置を視覚的に判定でき、特別なトレーニングを必要とせず、誰でも判定可能である。したがって、高度な検査施設だけでなく一般病院や現場診療所でも検査可能であることが示唆された。

本検討で用いた 5  $\mu$ L の鋳型 DNA は、血液約 0.25  $\mu$ L に相当する。マラリア原虫あたりのミトコンドリア DNA 数は 20-150 コピー存在することが報告されている。本検討において、熱帯熱マラリアに対して 10 コピーまで検出できたことから、同法は 0.3 parasites/ $\mu$ L of blood の検出感度があると示唆された。ケニア・ヴィクトリア湖島嶼で行われた調査では、マラリア感染者の 91.8% が無症候性保有者であり、多くが顕微鏡法検出下限以下の原虫密度であったことが報告されている。また、無症候性マラリア保有者における原虫密度は 5 parasites/ $\mu$ L of blood と報告されている。一方で、MDA によるマラリアコントロールを行う際に、モニタリングに必要なマラリア診断の感度は 20 parasites/ $\mu$ L と推測されており、本診断法は MDA におけるマラリア流行調査に利用可能であると示唆された。したがって、本診断法によって無症候性マラリア保有者の診断が可能となり、従来よりも正確なマラリア感染者数の調査が可能であると考えられる。

臨床サンプルを用いた検出系の評価において、対照とした既報の Nested PCR 法に対して、顕微鏡法及び RDTs は低い感度を示し、これまでの報告と一致する結果となった。一方、今回開発した MSTNPCR によるマラリア原虫種の同定は感度 88.7% であった。結果が一致しなかった 7 サンプルのうち、4 サンプルにおいては Nested PCR 法で単独感染が認められたのに対し、MSTNPCR では陰性であった。残りの 3 サンプルにおいては、Nested PCR で混合感染が認められたのに対し、MSTNPCR ではそのうちの一部のみ検出した。異なる結果が得られた原因として、MSTNPCR と Nested PCR 法の検出感度が異なることが考えられる。MSTNPCR は 40 サイクルの PCR 増幅反応を行っているのに対し、Nested PCR 法は 1 次 PCR で 40 サイクル、2 次 PCR で 30 サイクルの PCR 増幅反応を行っており、Nested PCR 法が微量の DNA 量に対しても検出可能であったことが考えられた。そのため、Nested PCR 法では同定されたマラリア原虫種が核酸クロマトグラフィーでは検出できず、感度及び NPV が低い結果となったと考えられる。今回用いた

DNA サンプルは、ろ紙血検体から抽出した DNA を用いている。抽出に用いる血液サンプル量や血液の保存状態によって、DNA の抽出効率が変化することから、鋳型に用いるサンプル処理法をさらに検討することで、同法の感度及び NPV の改善が期待できる。

#### 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 1 件)

Saito T, Kikuchi A, Kaneko A, Isozumi R, Teramoto I, Kimura M, Hirasawa N, Hiratsuka M, Rapid and sensitive multiplex single-tube nested PCR for the identification of five human Plasmodium species. Parasitol. Int., 査読有、67:277-283 (2018), DOI: 10.1016/j.parint.2018.01.005

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：5 種マラリア原虫のマルチプレックス簡易迅速検出法

発明者：平塚真弘、齋藤雄大

権利者：国立大学法人東北大学

種類：特許

番号：特願 2017-70144

出願年月日：2017 年 3 月 31 日

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：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

平塚 真弘 (HIRATSUKA, Masahiro)

東北大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：50282140

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

金子 明 (KANEKO, Akira)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：60169563

##### (4) 研究協力者

( )