

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102  
研究種目：基盤研究(C)（一般）  
研究期間：2021～2023  
課題番号：21K07340  
研究課題名（和文）金属と金属キレータを用いた核酸増幅量の高感度検出技術の開発とその実用可能性の検証

研究課題名（英文）Development of high-sensitivity detection technology for nucleic acid amplification using metal and metal chelator and verification of its practicality

研究代表者  
外園 栄作（Hokazono, Eisaku）  
九州大学・医学研究院・講師

研究者番号：60404042  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：これまでも核酸を用いた検査において様々な増幅技術の開発・実用化が行われてきたが増幅の程度を検出する技術においては、蛍光標識によるプローブ検出法が主であり、高価な機器が必須で汎用に乏しかった。そこで、核酸増幅時に生成されるピロリン酸に着目し、より簡便な核酸増幅量の検出技術と核酸定量の開発を試み、本法の技術応用の可能性について探索・検証を行った。結果、ピロリン酸検出の酵素反応系の構築と本法が核酸の増幅の有無を検出するにあたり既存の方法と遜色ない感度を有していることを確認した。簡便・迅速検出の特性を活かして、今後、感染症を含む災害時などの遺伝子関連検査への本技術の展開が期待される。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本検討の成果として、ピロリン酸の高感度検出系の構築に至った。また、既存の核酸増幅技術（PCR法）との比較検討において、本法が核酸の増幅の有無を検出するにあたり遜色ない感度を有していることを確認した。本検討内容はAnalytical Biochemistryへの論文掲載に至った。本技術は、迅速かつ簡便な新しい核酸増幅定性・定量検出システムとして、緊急時・災害時の電気、水などのライフラインの乏しい医療現場での感染症などの遺伝子検査キットの検出系全般への高感度技術の応用展開への可能性を示すものであると考える。

研究成果の概要（英文）：Various amplification techniques have been developed and put to practical use in nucleic acid-based testing. However, the development of technology for detecting the degree of amplification has been mainly based on improved probe detection using fluorescent labeling, and expensive equipment has been indispensable. Therefore, we focused on pyrophosphate, which is produced during nucleic acid amplification, and attempted to develop a simpler technique for detecting the amplified amount of nucleic acids. As a result, we established a high-sensitivity detection method for pyrophosphate and confirmed that the sensitivity of this method is comparable to existing nucleic acid amplification methods. Taking advantage of this simple and rapid detection characteristic, our method is expected to be applied to gene-related tests for disasters including infectious diseases in the future.

研究分野：臨床化学

キーワード：高感度検出 核酸増幅 金属キレータ ピロリン酸

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

パンデミックを引き起こした新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)をはじめB型肝炎ウイルス(HBV)また、結核菌やサルモネラ菌など感染症の原因となるウイルスや細菌の検出において、遺伝子検査は、その高い特異性から感染症診療において今や必須の検査といえる。また、糖尿病などの生活習慣病や種々癌に対するスクリーニング検査や未病の観点からも、臨床上の身近な検査・診断ツールとして遺伝子検査が利用されている。そして昨今、様々なストレスがもたらす細胞レベルでの老化に関連した疾患研究においても遺伝子レベルでの潜在的なバイオマーカーの探索ツールとして、遺伝子検査は利用され、幅広い分野において今後さらにその需要が高まることが期待されている。

我々は、これまで様々な臨床検査における測定法の改良や診断バイオマーカーを含む新しい測定法の開発・研究に携わってきたが、生体試料分析において最も重要な事は、最後の検出段階における感度とその簡便さ、汎用性が、目的物質の検出において大きな鍵を握っていると考えている。医療インフラ整備の乏しい地域をはじめ、昨今の世界的な異常気象に伴う災害発生時など、ライフラインが滞った際には特に、大病院などの一部の高度な医療機関でしか使えない検査手法のニーズよりも、「如何に迅速で簡便に結果が出せるか」ということに特化した技術が重要であり、遺伝子検査においても汎用性の高いリーズナブルな核酸増幅における検出技術の更なる改良が求められている。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、従来主流であった蛍光色素による検出ではなく、核酸の増幅時に副産物として生成されるピロリン酸に着目し、酵素法を用いてこのピロリン酸を高感度に検出し、特別な機器や分析環境条件を問わない、かつ、目視にて増幅量を検出可能な、より簡便な核酸増幅量の検出技術を確立する。そして、確立した本法を生化学自動分析装置に展開し、その検出感度や簡便性を現行法と比較・検証する事で、後進国など医療インフラ整備の乏しい地域においても、本法の技術システムが臨床応用可能であるかについて探索・実証する事が本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

#### (1) 高感度ピロリン酸検出法の分析条件の検討

ピロリン酸に対する初発酵素 Hypoxanthine phosphoribosyltransferase の至適 pH を考慮して緩衝液の pH、濃度の検討また、金属と金属錯体の試薬の組み合わせ、各濃度について検討を行った。

#### (2) 核酸増幅後試料を用いた本法の有用性の検証

陰性、陽性コントロールを用いて LAMP 法で増幅した核酸試料を用いて実際に本法でピロリン酸が検出の可能性を検証した。

### 4. 研究成果

表 1 に示すように低～高濃度のいずれのピロリン酸溶液に対しても再現性の高い結果を得るに至った。また、図 1 に示すように、核酸増幅時に生成されるピロリン酸濃度を十分にカバーできる定量直線性を確認することができた。また、陰性、陽性コントロールを用いて LAMP 法で増幅

した核酸試料を用いた検討においては、図2に示すように、陰性コントロール試料群と陽性コントロール試料群において2群を分けるために十分な差を見出すに至り、ピロリン酸の定量から増幅の有無の検出が可能であることを示唆するデータを得るに至った。

本法に用いられている金属・金属錯体を用いた過酸化水素の高感度検出技術は当初、血液や尿を対象とした分析を想定した検出技術を目指していたが、試料中の蛋白等の妨害を受けやすいことを鑑みて核酸増幅試料を測定対象とすることとした。結果、核酸増幅試料の有無の検出に応用できたことから、今後は実試料検体を含めた臨床的な有用性の検証が必要となる。これら検証により細菌検査やウイルス診断検査における本法の核酸増幅の検出技術としての実用性を提供できるものとする。さらに、緊急時・災害時の電気、水などのライフラインの乏しい医療現場での感染症などの遺伝子検査キットの検出系全般への高感度技術の応用展開への可能性も広がると考える。

本検討において得られた知見は *Analytical Biochemistry* への論文掲載を行った。  
(DOI: 10.1016/j.ab.2023.115371)

|             | 低濃度   | 中濃度   | 高濃度   |
|-------------|-------|-------|-------|
| データ数 (n)    | 20    | 20    | 20    |
| 平均 (μmol/L) | 0.223 | 0.333 | 0.578 |
| SD (μmol/L) | 0.008 | 0.005 | 0.009 |
| CV (%)      | 3.67  | 1.45  | 1.63  |

表1 ピロリン酸溶液を用いた本法の再現性

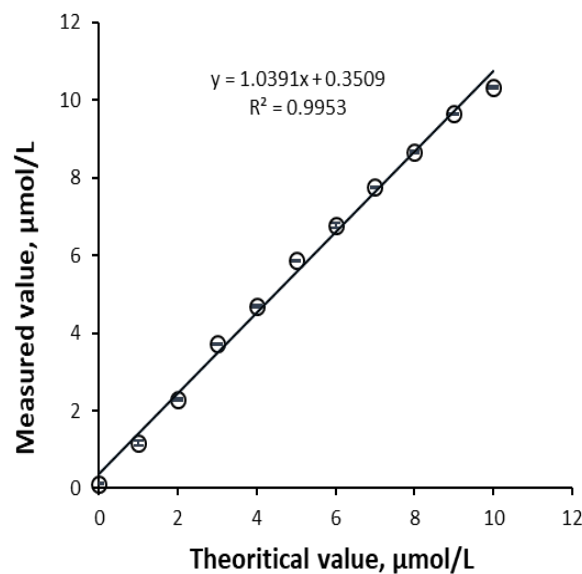


図1 ピロリン酸溶液による本法の

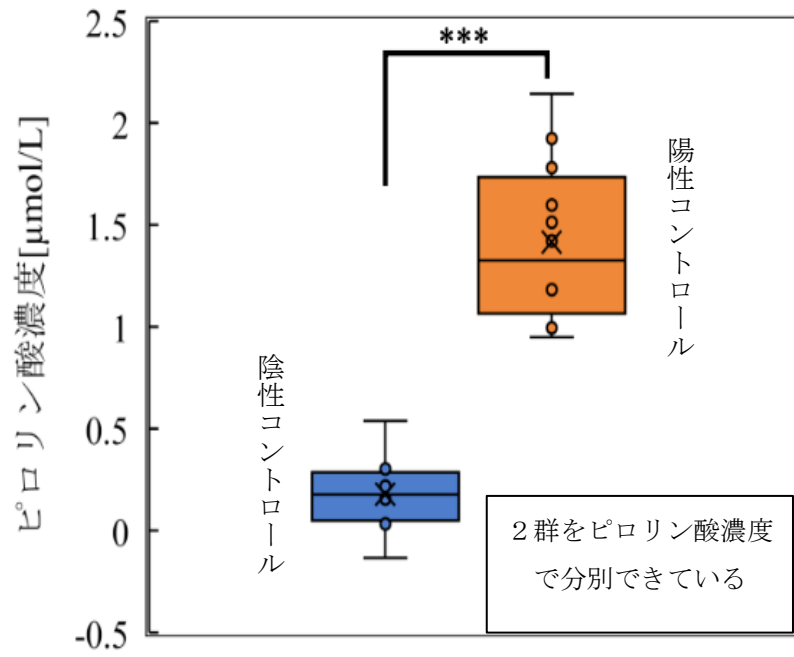


図2 陰性、陽性群におけるピロリン酸濃度の比較

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 0件）

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Eisaku Hokazono, Saori Fukumoto, Takeshi Uchiumi, Susumu Osawa  | 4. 巻<br>684     |
| 2. 論文標題<br>Pyrophosphate detection method using 5-Br-PAPS to detect nucleic acid amplification - Application to LAMP method | 5. 発行年<br>2024年 |
| 3. 雑誌名<br>Analytical Biochemistry   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.ab.2023.115371   | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-       |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>福元沙織、大澤 進、外園栄作                                |
| 2. 発表標題<br>LAMP法およびPCR法における核酸増幅後試料中に含まれるピロリン酸の高感度検出技術の開発 |
| 3. 学会等名<br>第33回生物試料分析科学会年次学術集会                           |
| 4. 発表年<br>2023年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>福元沙織、大澤 進、外園栄作                              |
| 2. 発表標題<br>核酸増幅過程における副産物ピロリン酸の高感度検出技術の開発および核酸増幅後試料への応用 |
| 3. 学会等名<br>第54回日本医療検査化学会                               |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>福元沙織、内海 健、外園栄作                |
| 2. 発表標題<br>核酸増幅過程の副産物ピロリン酸の高感度検出技術に関する検討 |
| 3. 学会等名<br>第61回日本臨床化学会年次学術集会             |
| 4. 発表年<br>2021年                          |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|               | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                       | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)            | 備考 |
|---------------|---|----------------------------------|----|
| 研究<br>分担<br>者 | 内海 健<br><br>(Uchiumi Takeshi)<br><br>(80253798) | 九州大学・医学研究院・教授<br><br><br>(17102) |    |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|