

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410169

研究課題名(和文) 抗原ペプチドとナノ微粒子を使ったマラリア感染検査デバイスの材料研究

研究課題名(英文) Novel Polymer Nanospheres for Serological Diagnosis of Malaria

研究代表者

奥 浩之 (Oku, Hiroyuki)

群馬大学・大学院理工学府・准教授

研究者番号：20301749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：マラリアは熱帯・亜熱帯を中心に蔓延する世界最大の感染症であり、世界中で最先端の科学技術を織り込んだ診断法、治療薬、ワクチンの開発が進められている。一方で最先端の技術は、必ずしも流行地では使えない問題や、必要とする患者には届かないという問題が指摘されている。そこで我々は、流行地でも普及可能な材料技術を目指し、マラリアの診断に有用な高分子材料による抗体価測定キットの開発を行った。高分子ナノ微粒子は線重合反応から作成した。抗原ペプチド配列はマラリア原虫酵素のアミノ酸配列から設計し、微粒子表面に化学修飾することで検査材料を作成した。最後に被験血清と反応させることで各ペプチド抗原の特徴を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Malaria is a major public health problem especially in tropical and sub-tropical regions of the world. The methods most commonly used to diagnose malaria patients sera, such as IFAT and ELISA, are not easy methods to examine in the bedside and the clinical laboratory. Here, we wish to report novel diagnostic nanospheres for the detection of specific antibodies in malaria patients' sera. The peptide antigen was designed from a Plasmodium specific sequence in lactate dehydrogenase. The test-material is prepared by chemical coupling of the peptides to the surface of the nanosphere. We have compared the reactivity against malaria patients' sera collected in endemic regions of the Philippines: (a) Mixed infected-, (b) falciparum-, (c) vivax-malaria patients, and (d) feverish patients (malaria-negative). Successful results were observed for the nanosphere material, which showed good specificity for three kinds of malaria patients compared with feverish patients.

研究分野：生体関連科学

キーワード：微粒子 高分子 ペプチド 抗原 マラリア 血清 抗体価 生体材料

1. 研究開始当初の背景

マラリアは熱帯・亜熱帯を中心に蔓延する世界最大の感染症であり、世界中で最先端の科学技術を織り込んだ診断法、治療薬、ワクチンの開発が進められている。一方で最先端の対策手法や医療は、必ずしもマラリア流行地の開発途上国では使えない問題や、必要とする患者には届かないという問題が指摘されている。

(1-1) 現在のニーズ (本研究の必要性)

(1-1a) 世界的にはマラリア患者血清 / 血漿中のマラリア原虫抗原への抗体価測定は、非流行国においては輸入マラリア患者の検査、輸血用血液の検査として行われている。流行国においては疫学調査に用いられている。何れも現在は IFAT 法や ELISA 法によって測定されるため、抗原の調整や作業は複雑であり、一般的な検査とはいえない。

(1-1b) 例えば現在、フィリピン各地域において土着マラリアの根絶活動が進められている (下記写真、媒介蚊への消毒、顕微鏡検査の普及活動)。マラリア根絶の証明には各地域において長期にわたる住民の抗体検査が有用である。そのため流行地でも使用できる、安価で簡便な検査キットの技術開発が望まれている。

(1-2) 申請者らの研究成果

申請者らは、熱帯熱マラリア原虫の解糖系酵素、エノラーゼについて合成ペプチド抗原を用いた抗原性の研究を行ってきた。その過程で高分子ナノ粒子を用いた(1-2a)抗原を徐放するワクチン材料 (特開 2009-256324) や (1-2b) 抗体価測定材料の開発 (特願 2011-110679) を行い、(1-2c,1-2d) 熱帯熱マラリア感染の履歴診断への有用性を示した。

2. 研究の目的

(2-1) 従来の方と問題点

(2-1a) 世界的に用いられている方法として、マラリア患者血清 / 血漿中のマラリア原虫抗原への抗体価の検出は、IFAT 法や ELISA 法で測定される。しかし抗原の調整や作業は複雑であり、一般の病院検査室では簡単には実施できない。

(2-1b) ELISA 法による市販検査キットもあるが非常に高価なため (下図) 普及しているとは言い難い。従ってマラリア流行地の病院であっても、非流行地のトラベルクリニックであっても、精密な測定機器を必要とせず、安価で簡便に抗体価測定が可能な技術開発は広く望まれている。

(2-1c) また、簡易検査キットを目指した研究例もあるが実用化されていない。これは培養した熱帯熱マラリア原虫の抗原を物理吸着したラテックス (ポリスチレン微粒子) と患者血清の反応を顕微鏡観察する、やや古い方法で行われている。

(2-2) 本研究・・・従来の問題点を解決するポテンシャル

(2-2a) 一方、本研究では化学合成されたペプチド抗原を用いており、感染履歴に対応した明瞭な抗体価が測定されている点で特筆すべきである。また、材料化学的な視点からマラリア対策に資する研究を行っていることは世界中でも他に例を見ない。

3. 研究の方法

マラリアは世界最大の感染症であり、流行地でも普及可能な抗体検査キットの開発が求められている。そこで我々は従来の抗体価検査法 (IFAT や ELISA) に代わりうる、合成ペプチド抗原と合成高分子ナノ粒子を用いた新しい検査材料の研究開発を進めている。本材料は化学合成原料から構成されるため、コールドチェーンが不要となる革新的な特徴を有している。本研究では、マラリア原虫蛋白質について新しいペプチド抗原の設計と合成、抗原を化学修飾したナノ粒子の作成と免疫学的反応性、抗原微粒子を使った Dip-Stick 型の抗体価測定法の開発、の3点について研究を行った。

4. 研究成果

(a1) 高分子ナノ粒子の作成

はじめに原子力機構の線照射施設に於いて放射線重合により高分子ナノ粒子 (2G 微粒子) を作成した。微粒子形成モノマーとして diethylene glycol dimethacrylate (2G) を、抗原結合モノマーには例えば methacryloyl succinimide (抗原のアミノ基と反応) を用いた。

(a2) 抗原の化学合成

次にマラリア原虫蛋白質について新しいペプチド抗原の設計と合成を行う。例えば lactate dehydrogenase を用いた。

(b1) 抗原ナノ粒子の作成

作成した抗原ペプチドと高分子ナノ粒子から抗原微粒子を作成した。

(b2) 免疫学的反応性の検証

得られた抗原ナノ粒子について免疫学的反応性を検証した。具体的には微粒子表面に抗原が化学修飾されていることを IFAT によって蛍光検出した。引き続いて、96穴マイクロプレートを用いたラテックス凝集反応によって抗血清や患者血清との反応性を確認した。抗体価測定は 96穴マイクロプレート上に被検血清の希釈系列を作成後、検査用微粒子の懸濁液を滴下、振とうの後、凝集像を観察した。本研究の被験血清として、マラリア既往流行地住民、既往の無い日本人ボランティアの検体を用いて、それぞれの抗原ペプチドに特徴的な反応性が明らかとなった。

(c1) Dip-Stick 型の抗体価測定キット

さらに、抗原微粒子を使って Dip-Stick 型の抗体価測定法を試作した。具体的には緻密な

不織布のフィルターペーパーに抗原ナノ微粒子を埋め込むことで作成した。これは従来スライドガラス上で行われる IFAT を、フィルターペーパー上で行うことから着想したアイデアである。つまり従来の Dip-Stick 型検査キットはニトロセルロース膜上にモノクロー抗体や蛋白抗原が吸着されているが、本研究のような低分子量ペプチド抗原には適していない(予備実験より)。同様に 96 穴プレートを用いた ELISA 測定も血清中の抗体検出には適していない。一方ナノ微粒子は表面積の大きな固相担体であり、ペプチド抗原と血清中の抗体との反応性が良好であると考へた。

作成した Dip-Stick 型の抗体価測定キットを用いて(a)マラリア感染履歴のある血清の場合、(b)感染履歴の無い場合(正常血清)について Dip-Stick 上での反応を試みた。またフィルターペーパーの選定、血清の希釈率や検出用試薬(金微粒子や蛍光色素、検出試薬の用量)について最適化を試みた。

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 2 件)

(1) H. Oku, R. Onishi, U. Arai, Y. Kimoto, K. Yamada, K. Shinozuka, K. Yano, S. Kano. Epitope Mapping of Monoclonal Antibodies Targeting the Loop Region of Plasmodium falciparum Enolase, In Peptide Science 2014, A. Otaka, Ed.; Protein Research Foundation: Osaka, pp.275-278. (2015). 査読有。

(2) 奥浩之、マラリア原虫エノラーゼを標的とした、all-synthetic 材料による人工抗原と抗体価検査キットの開発、月刊「化学工業」Vol.67, No.7, 2016, in press. 査読無。

[学会発表](計 13 件)

(1) Hiroyuki Oku, Risa Onishi, Yudai Kimoto, Nana Isomoto, Suguru Niwa, Miho Oue, Tetsuya Nakamura, Kazuhiko Yano, and Shigeyuki Kano. Development Project and Proof of Concept Study of a Peptide Vaccine Targeting Plasmodium falciparum Enolase. 2nd International Symposium of Gunma University Medical Innovation (GUMI 2015), Maebashi Japan. (December 8th, 2015)

(2) 新井詩子、大西里咲、木本侑大、山田圭一、奥浩之、矢野和彦、狩野繁之 「マラリア原虫エノラーゼの部分ペプチドを用いた免疫血清のエピトープマッピング」日本化学会関東支部群馬地区地域懇談会、群馬工業高等専門学校、2015 年 12 月 5 日。

(3) 大西里咲、新井詩子、山田圭一、奥浩

之、矢野和彦、狩野繁之 「マラリア原虫エノラーゼの部分ペプチドを用いたモノクローナル抗体作成とエピトープマッピング」日本化学会関東支部群馬地区地域懇談会、群馬工業高等専門学校、2015 年 12 月 5 日。

(4) Hiroyuki Oku, Yudai Kimoto, Nana Isomoto, Suguru Niwa, Kazuo Shinozuka, Kazuhiko Yano, and Shigeyuki Kano. Identification of a Novel Plasminogen-Binding Sequence in the Loop Region of Plasmodium falciparum Enolase. Joint International Tropical Medicine Meeting 2015 (JITMM 2015), Bangkok Thailand. (December 2nd-4th, 2015)

(5) H. Oku, R. Onishi, U. Arai, Y. Kimoto, K. Yamada, M. Ohue, Y. Ohyama, T. Nakamura, K. Yano, and S. Kano. Development Project of an All-Synthetic Nano/Micro-Sphere Vaccine Targeting Plasmodium falciparum Enolase. 1st International Symposium of Gunma University Medical Innovation (AMDE 2014). Kiryu City. (December 5th, 2014)

(6) H. Oku, U. Arai, R. Ohnishi, Y. Kimoto, K. Yamada, K. Yano, and S. Kano. EPITOPE MAPPING OF INHIBITORY ANTIBODIES TARGETING THE LOOP REGION OF Plasmodium falciparum ENOLASE USING SYNTHETIC PEPTIDE LIBRARIES. Joint International Conference of Tropical Medicine and Malaria 2014 (JITMM 2014). Bangkok, Thailand. (December 2nd-4th, 2014)

(7) 奥浩之・大西里咲・新井詩子・木本侑大・山田圭一・篠塚和夫・矢野和彦・狩野繁之 「熱帯熱マラリア原虫エノラーゼの部分ペプチドを用いたモノクローナル抗体作成とエピトープマッピング」第 51 回ペプチド討論会; 徳島市、2014 年 10 月 22-24 日。

(8) H. Oku, U. Arai, R. Ohnishi, Y. Kimoto, M. Murakami, S. Sato, K. Yamada, K. Yano, and S. Kano. Epitope mapping of inhibitory monoclonal antibodies targeting the loop region of Plasmodium falciparum enolase using a combination of synthetic peptide libraries. 13th International Congress of Parasitology (ICOPA XIII). Mexico City, Mexico. (August 10th-15th, 2014)

(9) 北村慎也、福野麻衣、山田圭一、奥浩之、Brian Bacay, Elena A Villacorte、Pilarita T Rivera、長谷川伸、前川康成、矢野和彦、狩野繁之 「マラリア原虫の乳酸脱水素酵素から設計したペプチド抗原を用いた高分子ナノ微粒子」高分子学会関東支部第 28 回群馬・栃木地区講演会、群馬大学理工学部桐生キャンパス、2014 年 3 月 7 日。

(10) Hiroyuki Oku, Kazuhiko Yano, Shinya Kitamura, Keiichi Yamada, Elena A Villacorte, Pilarita T Rivera, Shigeyuki Kano. Novel Polymer Nanospheres for Serological Diagnosis of Malaria. Joint International Conference of Tropical Medicine and Malaria 2013 (JITMM 2013). Bangkok, Thailand. (December 11th-13th, 2013)

(11) Hiroyuki Oku, Kazuhiko Yano, Shinya Kitamura, Keiichi Yamada, Elena A Villacorte, Pilarita T Rivera, Shigeyuki Kano. -Ray Polymerized Nanospheres for Serological Diagnosis of Malaria. American Society of Tropical Medicine & Hygiene (ASTMH) 62nd Annual Meeting. Washington, DC, USA. (November 13th-17th, 2013)

(12) 奥 浩之「マラリアの基礎とワクチン」第 24 回トラベラーズワクチンフォーラム研修会、国立国際医療研究センター、2013 年 9 月 14 日。

(13) 矢野和彦, 石上盛敏, 奥浩之, Elena A. Villacorte, Pilarita T. Rivera, 狩野繁之「LAMP 法を用いた三日熱マラリア患者の鑑別診断：フィリピンでの実例」第 24 回日本臨床寄生虫学会、東大寺総合文化センター、2013 年 6 月 15 日。

〔図書〕(計 0 件)
なし

〔産業財産権〕
出願状況 (計 5 件)

名称：熱帯熱マラリア原虫のエノラーゼタンパク質の部分配列を用いた人工抗原とその製造方法
発明者：奥 浩之, 矢野和彦, 狩野繁之
権利者：国立大学法人群馬大学、国立研究開発法人国立国際医療研究センター
種類：PCT 出願
番号：PCT/JP2015/083437
出願年月日：平成 27 年 11 月 27 日
国内外の別：PCT

名称：熱帯熱マラリア原虫感染症の検査及び診断薬、並びに検査及び診断キット
発明者：奥 浩之, 矢野和彦, 狩野繁之
権利者：国立大学法人群馬大学
種類：PCT 出願
番号：PCT/JP2015/061014
出願年月日：平成 27 年 4 月 8 日
国内外の別：PCT

名称：熱帯熱マラリア原虫のエノラーゼタン

パク質の部分配列を用いた人工抗原とその製造方法

発明者：奥 浩之, 矢野和彦, 狩野繁之
権利者：国立大学法人群馬大学、国立研究開発法人国立国際医療研究センター
種類：特許出願
番号：特願 2014-241420
出願年月日：平成 26 年 11 月 28 日
国内外の別：国内

名称：熱帯熱マラリア原虫感染症の検査及び診断薬、並びに検査及び診断キット
発明者：奥 浩之, 矢野和彦, 狩野繁之
権利者：国立大学法人群馬大学
種類：特許出願
番号：特願 2014-080399
出願年月日：平成 26 年 4 月 8 日
国内外の別：国内

名称：三日熱マラリアと熱帯熱マラリアの双方を検出するペプチドおよび抗体検査材料
発明者：奥 浩之, 北村慎也, 山田圭一, 矢野和彦, 狩野繁之
権利者：国立大学法人群馬大学、国立研究開発法人国立国際医療研究センター
種類：PCT 出願
番号：PCT/JP2013/079666
出願年月日：平成 25 年 11 月 1 日
国内外の別：PCT

取得状況 (計 2 件)

名称：ペプチド提示微粒子の製造方法
発明者：奥浩之, 岩崎綾乃, 矢野和彦, 狩野繁之
権利者：国立大学法人群馬大学
種類：特許
番号：特許第 5899548 号
出願番号：特願 2011-110679
出願年月日：平成 23 年 5 月 17 日
取得年月日：平成 28 年 3 月 18 日
国内外の別：国内

名称：微粒子およびその製造方法
発明者：奥 浩之, 依義宣, 山田圭一, 片貝良一, 鈴木 守, 佐藤久美子, 狩野繁之
権利者：国立大学法人群馬大学
種類：特許
番号：特許第 5429789 号
出願番号：特願 2009- 059789
出願年月日：平成 21 年 3 月 12 日
取得年月日：平成 25 年 12 月 13 日
国内外の別：国内

〔その他〕

1) 奥浩之 首都圏北部 4 大学発 新技術説明会における技術説明講演 (2015 年 6 月 9 日、JST 東京本部別館ホール)「微粒子を用いたマラリアワクチンと抗体価検査キット」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥 浩之 (OKU, Hiroyuki)
国立大学法人群馬大学・大学院理工学府分子化学部門・准教授
研究者番号： 20301749

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

矢野 和彦 (YANO, Kazuhiko)
国立研究開発法人国立国際医療研究センター・研究所・上級研究員
研究者番号： 30392393

狩野 繁之 (KANO, Shigeyuki)
国立研究開発法人国立国際医療研究センター・研究所・部長
研究者番号： 60233912