

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460514

研究課題名(和文) シングルタグ・ハイブリダイゼーション法を活用したマラリア遺伝子検査ツールの開発

研究課題名(英文) Development of a multiplex STH-PAS assay as a tool for malaria diagnosis.

研究代表者

川合 覚 (Kawai, Satoru)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：70275733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではシングルタグ・ハイブリダイゼーション法(STH法)とクロマトPAS(Printed Array-Strip)を組み合わせた、マラリアの新たな遺伝子検査ツールの開発を試みた。Plasmodium属ミトコンドリアDNAのCytochrom b geneを標的遺伝子とし、ヒト感染性マラリアの5種類を鑑別した。その結果、本法で設定どおりの陽性バンドが検出され、各種の鑑別が可能であった。次に混合感染を想定した実験を試みた。その結果、2～3種類の原虫gDNAを混合したサンプルでは明瞭な陽性バンドを検出することができたが、4種類以上になると非特異反応や、本来出現する陽性バンドの消失が生じた。

研究成果の概要(英文)：The diagnosis of malaria at regional clinics in endemic areas has mainly been performed by microscopic examination of blood smears because of its ease and rapid application. However, the blood stages of malaria parasites often difficult to differentiate morphologically. Therefore, to improve global health efforts towards malaria control, a rapid, sensitive, species-specific, and economically viable diagnostic method is needed. In the present study, we developed a single-stranded tag hybridization chromatographic printed-array strip (STH-PAS) method for the molecular diagnosis of malaria infection and evaluated its sensitivity, specificity, and clinical applicability. We presented the successful development of a STH-PAS method for detecting malaria parasites, using a primer set that targets the cytochrom b gene of the parasites. The detection sensitivity was found to be at least 100 times higher than that of agarose gel electrophoresis with ethidium bromide.

研究分野：寄生虫病学

キーワード：マラリア STH-PAS法 遺伝子診断法 P. falciparum P. vivax P. malariae P. ovale P. knowles

1. 研究開始当初の背景

マラリアは熱帯・亜熱帯を中心とした地域に広く分布しており、いままなお年間 3 億～5 億人の有病者と、150～270 万人の死亡者を数える重要感染症のひとつである。これまでマラリアの診断は、高い頻度で致死経過をとる熱帯熱マラリア（悪性マラリア）と、比較的軽症で致死経過は稀な三日熱マラリア、四日熱マラリア、卵形マラリア（良性マラリア）の 4 種類を対象としてきた。しかし、近年その 4 種類に加え、人獣共通感染性サルマラリア原虫の一種である *Plasmodium knowlesi* によるヒトの自然感染例が、東南アジアの広い範囲で次々に報告され、国内でも 2012 年に *P. knowlesi* 感染症例が発生したことから、現在では新たなマラリア原虫種を視野に入れた鑑別診断が不可欠となっている。マラリアを疑う患者に対しては、(1) 迅速に原虫寄生の有無を確認、(2) 陽性であった場合は早急に原虫種を同定、(3) さらに熱帯熱マラリアでは薬剤耐性の程度を見極める、ことが早期の治療方針決定や患者の予後に大きく関わってくる。これまでマラリア診断の初期対応としては、末梢血液ギムザ染色標本から原虫の形態的特徴を確認することや、免疫クロマトグラフィー法を応用したマラリア迅速診断キット（ICT）を用いた判定が基本となっている。しかし、これらの手技は遺伝子検査法に比較して検出限界が低く、経験の乏しい判定者には正確な原虫種の同定が困難である。さらにヒト・*P. knowlesi* 感染では複数の原虫種が混合感染する症例が多く報告されており、このような症例では原虫種の同定は一層困難を極めることとなる。また、原虫の形態観察や ICT といった簡易的

な方法では、熱帯熱マラリア原虫の薬剤耐性に関する情報は得ることができない。現在までのところ信頼性の高い原虫種の鑑別には nested PCR（n PCR）や Loop mediated isothermal amplification (LAMP) といった遺伝子検査技術が主力となっている。

2. 研究の目的

本研究では、STH-PAS によるマルチターゲット DNA 検査技術を応用し、マラリアの新たな遺伝子検査ツールの確立を目指す。本研究では、ヒト感染性マラリア原虫の 5 種類を単独感染だけでなく混合感染についても、迅速かつ正確に鑑別診断することを目的とする。

3. 研究の方法

ヒト感染性マラリア原虫の 5 種類を 1 本の検出ストリップ上で鑑別する検査ツールを確立する。各原虫種特異的プライマーの設計、およびタグ付プライマーによる PCR と PAS による検出を試行した。

(1) STH の原理（図 1）

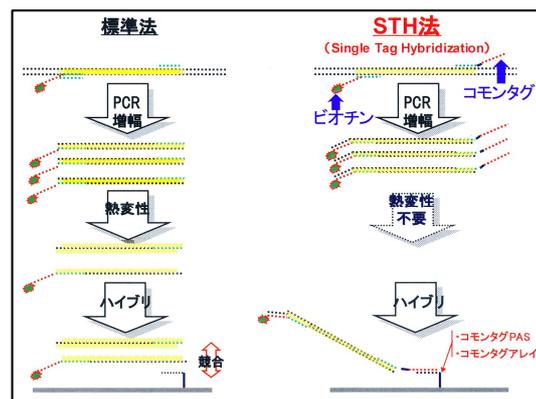


図 1 に示すように、STH 法は PCR プローブにタグ DNA を結合させ、1 本鎖のタグ DNA 付き PCR 増幅産物を得る。さらに同 PCR 増幅産物を、固相化した相補タグ DNA とハイブリ反応させることで、その増幅産物を検出する。これらの反応は 1 本鎖 DNA 同士のハイブリ反応

で検出するため、熱変性が不要で、高い検出感度が得られる。

(2) PAS による PCR 増幅産物の検出原理

(図 2)

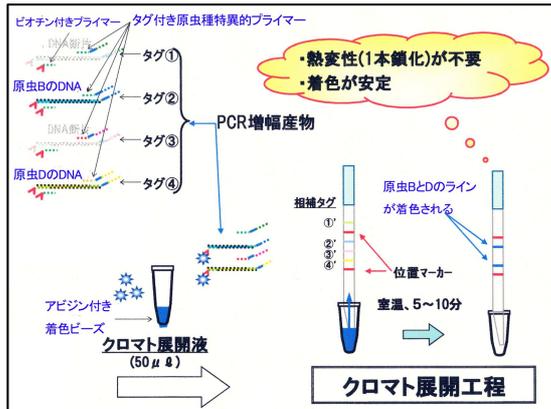
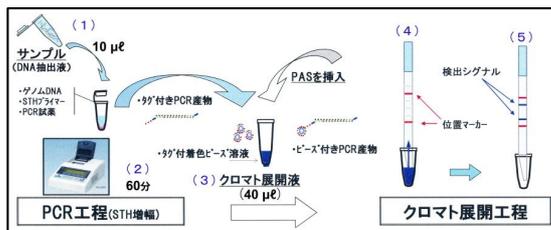


図 2 に示すように、本法ではビオチンおよびタグ付プライマーによる原虫種特異的な PCR 増幅産物を作製する。同 PCR 増幅産物は、クロマト展開液中でアビジン付着色ビーズと結合する。PAS には相補タグが固相化しており、タグ付 PCR 増幅産物をクロマト展開すると、原虫種特異的なバンドとして検出することができる。

(3) STH-PAS 法の基本操作 (図 3)



基本操作は以下の手順となる(図 3): 感染血液より一般的な DNA 抽出キットを用いて原虫 DNA を抽出、タグ付プライマーによるマルチプレックス PCR、タグ付 PCR 増幅産物にクロマト展開液を混和、クロマト展開液を混合したタグ付 PCR 増幅産物を PAS にクロマト展開、検出シグナルを目視で判定。

(4) STH-PAS 法の特徴

・検査時間が短い: PCR 約 60 分間、PAS への

クロマト展開約 10 分間、全行程 70 分間程度で結果を判定することができる。

- ・スキルが不要: PCR、PAS へのクロマト展開共に熟練した技術は不要で、結果判定も目視で評価することができる。
- ・多項目同時検査: 現在 12 項目までのターゲット遺伝子の同時検査が可能。
- ・PAS の汎用使用: タグとプライマーの組み合わせを変えることにより、各種のマルチターゲット遺伝子検査に使用することができる。

4 . 研究成果

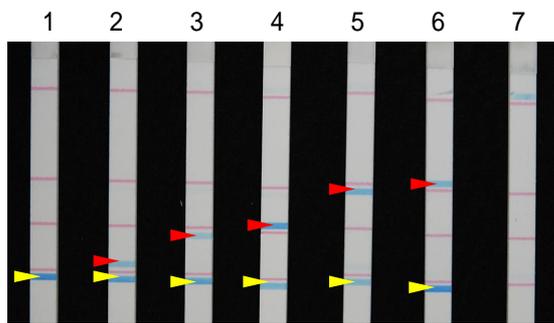
(1) STH-PAS 法によるマラリア鑑別診断

マラリア原虫の 18s SSUrRNA gene を標的遺伝子とした既存のマルチプレックス PCR を応用した。全種共通の領域で Forward primer を設計し、ビオチン標識した。種特異的な領域で Reverse primer を設計し、各 Reverse primer に以下のようなシングルタグを標識した: Universal (B1), *P. falciparum* (B2), *P. vivax* (B4), *P. malariae* (B5), *P. ovale* (B7), *P. knowlesi* (B8)。

本研究では B8 タイプのストリップを用いて、(B1)に genus *Plasmodium*、(B2)に *P. falciparum*、(B4)に *P. vivax*、(B5)に *P. malariae*、(B7)に *P. ovale*、(B8)に *P. knowlesi* が検出されるように設定した。

PCR は *P. yoelii* および 5 種のヒトマラリア原虫から精製した genomic DNA をテンプレートとして使い、増幅産物を STH-PAS 法でクロマト展開した。その結果、*P. yoelii* では (B1)、*P. falciparum* では (B1) (B2)、*P. vivax* では (B1) (B4)、*P. malariae* では (B1) (B5)、*P. ovale* では (B1) (B7)、*P. knowlesi* では

(B1) (B8)の位置にバンドが検出された(図4)
(図4)



1:P. yoelli, 2:P. falciparum, 3:P. vivax,
4:P. malariae, 5: P. ovale, 6: P. knowlesi,
7: Neg control
黄色矢印: genus Plasmodium の特異バンド
赤色矢印: 各種マラリア原虫の特異バンド

(2) ゲル泳動法と STH-PAS 法による検出感度の比較

各原虫種の標的遺伝子配列に準じた合成 DNA を作成し、 $10^8 \sim 1$ コピーの段階希釈液を作製した。これらの希釈液をテンプレートとして PCR を行い、増幅産物の検出感度をゲル泳動法と STH-PAS 法で比較した。その結果、*P. falciparum* の合成遺伝子では、ゲル泳動法の検出限界は 10^3 コピーであったのに対し、STH-PAS 法では 10 コピーまで検出することができた。他の原虫種においても、同様の傾向が認められ、いずれもゲル泳動法に比較して STH-PAS 法の方が高い検出感度であった(結果は非表示)。

(3) 2 種類のプライマーセットによる検出感度の比較

本研究では 18s SSUrRNA gene に対するプライマーセットだけでなく、ミトコンドリア DNA の Cytochrom *b* gene を標的遺伝子としたプライマーセットを設計し、PCR に用いた。その結果、いずれのマラリア原虫種も Cytochrom *b* gene に対するプライマーセ

ットの方が高い検出感度が認められた(結果は非表示)。

(4) 混合感染を想定した試み

2~5 種類の gDNA を混合したサンプルを複製し、それらを鋳型として STH-PAS を試みた。その結果、2~3 種類の原虫 gDNA を混合させた場合は、設定どおりの位置に明瞭な陽性バンドを検出することができた。しかしながら、4 種類以上の場合、非特異反応の出現や、本来出現する陽性バンドの消失が生じた。したがって、現行の STH-PAS では、3 種類より少ないマラリア原虫種の混合感染であれば同時に同定可能であるが、4 種類以上になると不具合が生じるため、さらなる条件検討が必要であった。

<引用文献>

- 1) 狩野繁之(2014) : マラリア . 臨床と微生物, 41, 311-314.
- 2) 川合 覚、狩野繁之 (2013) : 人獣共通感染性サルマラリア : *Plasmodium knowlesi* 感染症. 化学療法の領域, 29 S-1, 264-270.
- 3) Hayashi, M. *et al.* (2013): A new protocol to detect multiple foodborne pathogens with PCR dipstick DNA chromatography after a six-hour enrichment culture in a broad-range food pathogen enrichment broth. *BioMed Res Int*, 2013, ID 295050, 10 pages.
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/295050>
- 4) Tian, L. *et al.* (2014): Rapid and sensitive PCR-dipstick DNA chromatography for multiplex analysis of the oral microbiota. *BioMed Res Int*, 2014, ID 180323, 10 pages.
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/180323>
- 5) Hong, N.V. *et al.* A modified semi-nested multiplex malaria PCR

(SnM-PCR) for the identification of the five human Plasmodium species occurring in Southeast Asia. Am J Trop Med Hyg, 89, 721-723.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

川合 覚、丹羽孝介、川瀬三雄、美田敏宏：STH-PAS 法を活用したマラリア遺伝子診断ツールの開発。日本臨床寄生虫学会誌 26：86-89，2015。

〔学会発表〕(計 2件)

川合 覚、丹羽孝介、川瀬三雄、美田敏宏：STH-PAS 法を活用したマラリア遺伝子診断ツールの開発、第 26 回日本臨床寄生虫学会大会、2015 年 6 月、宇都宮市

川合 覚、丹羽孝介、川瀬三雄、美田敏宏：シングルタグ・ハイブリダイゼーション法を活用したマラリア遺伝子診断ツールの開発、第 22 回分子寄生虫学ワークショップ、第 12 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会、2014 年 8 月 31 日、帯広市

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
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

川合 覚 (Kawai, Satoru)
獨協医科大学・医学部・教授
研究者番号：70275733

(2)研究分担者

美田 敏宏 (Mita, Toshihiro)
順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号：80318013

(4)研究分担者

川瀬 三雄 (Kawase, Mitsuo)
東北大学・医工学研究科・教授
研究者番号：50108057

(5)研究協力者

丹羽 孝介 (Niwa, Kosuke)
日本ガイシ株式会社