

## 簡便・迅速なオンサイト感染症診断技術の開発

林田京子（北海道大学 人獣共通感染症リサーチセンター）

kyouko-h@czc.hokudai.ac.jp

遺伝子診断技術は人類・家畜の健康を脅かす感染症のコントロールに重要な役割を果たす。しかし、これまでの遺伝子診断法の多くは高度な技術と高価な設備を要するものが多く、フィールドに還元されることは稀であった。本研究では酵素の乾燥化を含むプロトコルの改良により、室温保存可能で、検体からワンステップで病原体遺伝子の有無が判定できる、簡便・迅速かつ安価なオンサイト感染症診断技術を開発した（CZC-LAMP法）。私たちは本法を用いてアフリカトリパノソーマ症のヒト・動物・媒介節足動物間での流行の実態を明らかにしてきた。本診断技術は現在、様々な病原体に応用展開を進めている。

### アフリカトリパノソーマ症とは

アフリカトリパノソーマ症はサブサハラアフリカ地域の風土病として古くから恐れられてきた疾病である。原因となるトリパノソーマ原虫はヒトや動物の血液中で活発に泳ぎ回る単細胞の微生物で、ヒトでは末期になると中枢神経系が侵され昏睡症状を呈するため、アフリカ睡眠病とも呼ばれる。野生動物や家畜から吸血性のツェツェバエを介してヒトに感染する人獣共通感染症であり、顧みられない熱帯病の一つに挙げられている。近年ではツェツェバエの駆除や、都市開発に伴う生息地の減少によりヒト患者数は大幅に減少してきているが、未だ撲滅には至っていない。本症の病原体トリパノソーマ原虫は牛を始めとする家畜にも感染し、このことは畜産業に甚大な被害を与え、サブサハラ地方の経済的成長の妨げと貧困の原因にもなっている。これら感染した家畜や野生動物はヒトへの感染源になるため、アフリカトリパノソーマ症の対策にはヒト・動物・媒介節足動物間における総合的な原虫の実態の把握と対策が必要である。

本症の感染初期は発熱や関節痛などマラリアと症状がほとんど同じであるため誤診されることが多く、中枢神経系の侵された末期になってようやく診断される患者がほとんどである。従って実際の発生数はもっと多い可能性が高い。中枢神経系の侵された二次感染期の治癒率は低いため、早期診断が医療現場で取りうる最も有効な対策方法となるのだが、現状アフリカの医療現場ではトリパノソーマ症の診断体制は十分に整っているとは言い難い。トリパノソーマ原虫は顕微鏡を注意深く見れば観察できるが、経験と知識を必要とし、少ない原虫数の感染初期には見逃すことも多い。また、ヒトに感染するトリパノソーマ種は2亜種が知られており、動物及び媒介節足動物ツェツェバエにおいては上記2亜種以外にも数種のトリパノソーマ原虫が感染する。これら原虫の種・亜種は形態はほとんど同じであるため、ヒト感染性であるか否かを含めて、遺伝子検査を実施しないと区別は不可能である。従って、トリパノソーマ症の患者を早期に正確に診断し、また動物や媒介昆虫での存在を証明するためには、高感度かつ種判別の可能な遺伝子診断系が必要となる。しかし言うまでもなく、アフリカでPCRをルーチンに診断法として使うのは困難である。

## CZC-LAMP 法の開発

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法は栄研化学が開発した、等温で反応が進む酵素を利用した簡便かつ高感度な遺伝子診断法で、すでに多くの感染症診断への応用が報告されている。等温反応なので、高価で安定電力供給を必要とする PCR の機械を必要としないのは大きなアドバンテージである。増えてきた遺伝子は UV 下で蛍光として確認することができるため電気泳動を必要とせず、結果の判定まで 1 時間以内と、遺伝子診断としては極めて迅速に結果を確認することができる。ヒト感染型のトリパノソーマ原虫を特異的に検出する系もすでに開発されており、私たちも実験室レベルでは良い結果を示すことを確認していた。しかし、実際にザンビアの地方部で実施しようとした時に、試薬の輸送と保管のクールドチェーンの確保という大きな問題に直面した。また、DNA を抽出したり何種類もある液体試薬を現場で正確に混合するというのも現実的ではなく、乾燥型のワンステップ試薬の必要性を強く感じた。

そこで私たちはオンサイトでも実施可能な診断系を作ることを目的に、簡便な検体調整法の検討と LAMP 試薬の乾燥化に取り組んだ。LAMP 試薬の乾燥化は酵素とトレハロースを混合し、低湿度の空気で風乾させることで実現した。これによって水溶液はガラス化し、高温条件下においても活性を失わない安定性を示した。反応に用いる検体は血液を直接使用できるようにした。したがって検体を溶解バッファーで希釈したのち、反応液と共にチューブへ加え、30 分-60 分程度等温で反応させ、ポータブルの LED 電球で蛍光を確認するという、極めてシンプルな検出手順を実現させた (図 1)。本手法を用いて、ザンビアにおいて重要な住血原虫であるトリパノソーマ原虫と、鑑別診断が重要になるマラリア原虫の検出の系を確立した<sup>1) 2)</sup>。

当初はこの乾燥試薬を一つ一つ手作りで作っていたが、現在は大量生産を目指して、バイオ用途に開発されたインクジェットプリンターを導入して安定供給を行っている。本インクジェットで作製した乾燥試薬は、30 度 50% の湿度で 6 か月保存した際にも感度が保たれることが確認できた。

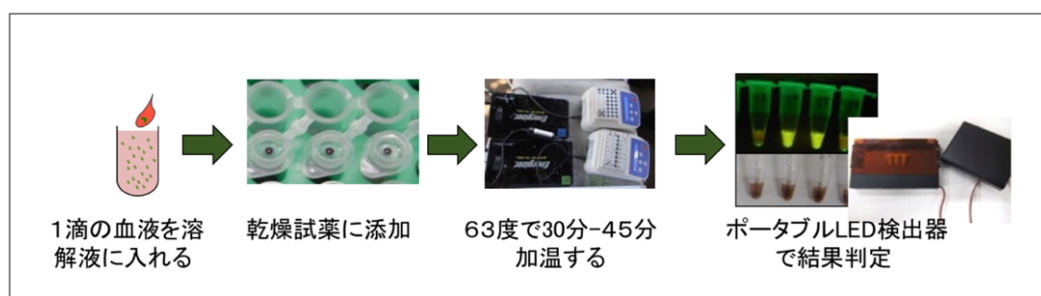


図 1 CZC-LAMP 法の手順

## アフリカトリパノソーマ原虫のヒト・動物・媒介節足動物における流行の実態調査

ツェツェバエの中に存在するヒト感染型トリパノソーマ原虫を検出することは、ヒトへ感染する前にリスクのある地域に未然に注意喚起できる点で意義がある。これまでにザンビア・マラウィにおける国立公園またはその近隣地域で、20 か所総数 3000 匹ほどのハエから本 LAMP 法を用いてトリパノソーマ原虫の検出を行ってきた。結果、特に感染率の高いハイ

リスク地域が同定されつつある<sup>3)4)</sup>。これをトリパノソーマ症のリスクマップとして関連機関と情報交換をするとともに、今後も採取地域を増やしてアップデートしていく予定である。動物においては、家畜である牛や国立公園内の野生動物を対象に調査を進めている。これにもやはり本 CZC-LAMP 法が活躍しており、一部の家畜・野生動物でヒト感染型トリパノソーマを保有することが明らかになりつつある<sup>4)5)</sup>。

ヒトにおけるトリパノソーマ感染についても、これまでに5件の症例について本診断法が確定診断と種の同定に活躍している<sup>6)</sup>。いずれの症例もやはり診断が遅れ、感染後期の神経症状を呈した段階での来院であった。そこでヒトでのトリパノソーマ症の感染実態を明らかにするべく、アクティブサーベイランスも進めている。これまでにトリパノソーマ症患者の出た4つの地域の人の住民を対象に、現場で180人に対してマラリアとトリパノソーマ症の、636人に対してトリパノソーマ症の診断を行った。幸いなことにこれまでにトリパノソーマ症の陽性は認められていない。上記ベクター調査によるリスクマップと合わせ、調査地を広げる予定である。診断薬の製造と使用の双方について、現地医療機関への技術移転も今後の課題である。

### CZC-LAMP 法の他熱帯病への応用展開

開発した酵素の乾燥化手法は逆転写酵素の乾燥化と RT-LAMP にも応用し、蚊媒介性疾病であるチクングニアウイルスをワンステップで検出する乾燥 LAMP 試薬を開発している。本ウイルスは近年その分布域を拡大しつつ大規模な流行を起こしており、流行は主にアジア型と East/Central/South African genotype (ECSA) の2つの遺伝子型によるものである。ブラジルでは2014年の本ウイルス侵入以降、これら2つの遺伝子型が混在して流行している。これら遺伝子型を特定することは流行の疫学を考察する上で重要である。そこで、CZC-LAMP 法の簡便さと近年開発された次世代シーケンサー MinION (Oxford Nanopore 社) のポータブルである利点を組み合わせ、オンサイトでウイルスゲノムの配列を解析する系を確立した (図2)<sup>7)</sup>。ブラジルリオデジャネイロにおいて流行時にチクングニアと診断された患者の血清検体を用いて試験した結果、MinION で遺伝子配列解析を行った16検体について、全て ECSA 型と判別された。すなわち1時間以内に血清から遺伝子診断を、1日以内に遺伝子型別が可能であることが示された。

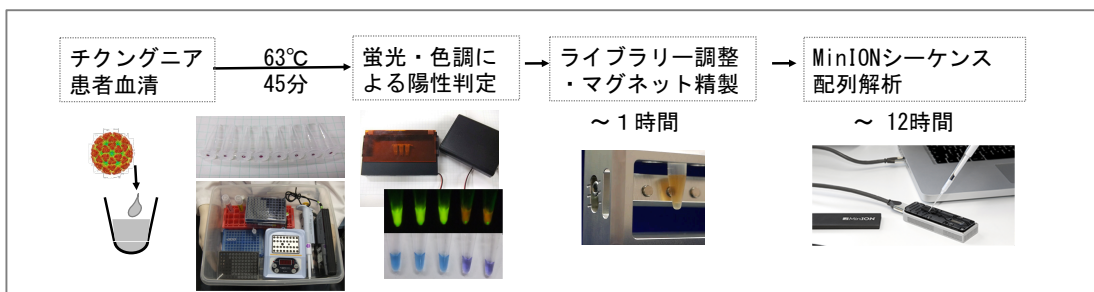


図2 CZC-LAMP 法と MinION を組み合わせたオンサイトジェノタイピング法

## おわりに

感染症の現場は困難なフィールドであることが多い。どのような場所でも簡単に実施可能で高感度なオンサイト診断系を、との思いで開発した CZC-LAMP 診断法の特長は電気がない野外でもバッテリーのみで実施可能なことである。設備を必要とせず病原体を検出し、さらにポータブル次世代シーケンサー技術と組み合わせることで遺伝子解析による流行の実態把握も可能であるため、緊急時においてもいち早く感染症拡大の把握と対策を講じることが可能である。本法は様々な病原体の検出に応用可能で、現在私たちは様々な熱帯感染症の診断とサーベイランスに本法の応用を進めている。本技術の発展を通して、感染症制圧に寄与していきたい。

## 謝辞

本研究は北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター及びザンビア大学の方々と共同で実施されたものです。多くの共同研究者と協力者の皆様に感謝申し上げます。また、本研究を実施するにあたり多大なご支援・ご指導をいただき、私をアフリカのフィールドへと導いてくださった杉本千尋教授にこの場を借りて感謝申し上げます。

## 引用文献

1. K. Hayashida, K. Kajino, H. Simukoko, M. Simuunza, J. Ndebe et al., (2017) Direct detection of falciparum and non-falciparum malaria DNA from a drop of blood with high sensitivity by the dried-LAMP system. *Parasites & Vectors*. Jan 13;10(1):26. doi: 10.1186/s13071-016-1949-8.
2. K. Hayashida, K. Kajino, L. Hachaambwa, B. Namangala and C. Sugimoto. (2015) Direct Blood Dry LAMP: A Rapid, Stable, and Easy Diagnostic Tool for Human African Trypanosomiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9(3): e0003578.
3. P. Nambara, J. Musaya, K. Hayashida, E. Maganga, E. Senga et al., (2018) Comparative evaluation of dry and liquid RIME LAMP in detecting trypanosomes in dead tsetseflies. *Onderstepoort J Vet Res*. 2018 Oct 3;85(1):e1-e6. doi: 10.4102/ojvr.v85i1.1543.
4. D. Laohasinnarong, Y. Goto, M. Asada, R. Nakao, K. Hayashida et al., (2015) Studies of trypanosomiasis in the Luangwa valley, north-eastern Zambia. *Parasites & Vectors*. 2015 Sep 30;8(1):497. doi: 10.1186/s13071-015-1112-y.
5. M. Lisulo, C. Sugimoto, K. Kajino, K. Hayashida, M. Mudenda et al.,(2014) Determination of the prevalence of African trypanosome species in indigenous dogs of Mambwe district, eastern Zambia, by loop-mediated isothermal amplification. *Parasites & Vectors* 7:19:doi:10.1186/1756-3305-7-19.
6. B. Namangala, L. Hachaambwa, K. Kajino, A.S. Mweene, K. Hayashida et al., (2012) The use of Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) to detect the re-emerging Human African Trypanosomiasis (HAT) in the Luangwa and Zambezi valleys. *Parasite & Vectors* 5:282. doi: 10.1186/1756-3305-5-282.
7. J. Yamagishi, L. R. Runtuwene, K. Hayashida, A. E. Mongan, L. A. N. Thi et al., (2017): Serotyping dengue virus with isothermal amplification and a portable sequencer. *Scientific Reports*. Jun 14;7(1):3510. doi: 10.1038/s41598-017-03734-5.