

遺伝子増幅手法の最適化で網羅的な 寄生虫症検査を実現

北海道大学 人獣共通感染症国際共同研究所
国際協力・教育部門 助教 杉 達紀

2025年10月16日

寄生虫の疾患

- ✓ 热帯地域では未だに寄生虫疾患は多くの患者を苦しめている
- ✓ 血液から検出可能な寄生虫疾患はマラリアを筆頭に数多く存在する
- ✓ これらの熱帯病は日本においては輸入症例である

疾患名	推定患者数	主な病原体	参考WHO情報源
マラリア	約2億6300万人(2023年)	<i>Plasmodium</i> 属	World Malaria Report 2024
ビルハルツ住血吸虫症	約2億4000万人(2022年)	<i>Schistosoma</i> 属	World Health Statistics 2024
リンパ系フィラリア症	約5000万人(2022年)	<i>Wuchereria bancrofti</i> 等	WHO NTD Fact Sheet
リーシュマニア症	年間約100～130万人が新規発症	<i>Leishmania</i> 属	WHO Leishmaniasis fact sheet
シャガス病	約700～800万人	<i>Trypanosoma cruzi</i>	WHO Chagas Dis. fact sheet
アフリカトリパンソーマ症	年間1000人未満	<i>Trypanosoma brucei</i>	WHO HAT Fact Sheet

形が見える寄生虫は顕微鏡で全て観察可能
→血液中に十分な数がいるとは限らない、検出感度が不足

寄生虫の疾患と診断の意義

- ✓ 同属の寄生虫であっても治療方針が異なる場合がある（マラリアの例を示す）
- ✓ 既存の顕微鏡検査やRDTは診断の精度に難がある（引用文献）
- ✓ 流行地で広く見られる混合感染時に低感染度の寄生虫が見落とされる（引用文献）

マラリア寄生虫の種類	標準治療薬	備考・特記事項
熱帯熱マラリア原虫	ACT(アルテメチル合剤) アトバコン・プログアニル合剤	クロロキン耐性あり。
四日熱マラリア原虫	クロロキン(感受性地域) ACT系(耐性地域)+プリマキン	休眠体(hypnozoites)根治 目的にプリマキン追加 (G6PD検査も必要)
卵形マラリア原虫	クロロキン+プリマキン	根治目的にプリマキン追加
三日熱マラリア原虫	クロロキン	
ノレザイ猿マラリア原虫	クロロキンまたはACT	ヒト感染例は増加中

WHO:guideline for the treatment of malaria, 3rd ed.

顕微鏡で実現していた、対象に限らずに寄生虫を検出する網羅性と
十分な検出感度、鑑別性能が両立できる検査が求められている

従来技術とその問題点 その①

顕微鏡検査：

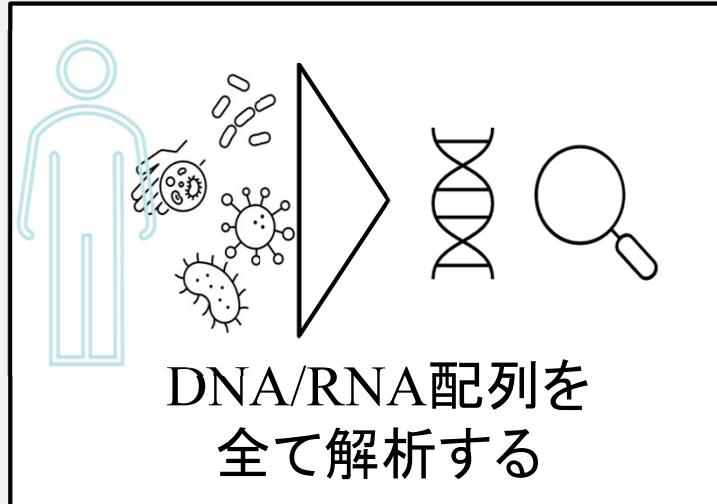
対象に限られない寄生虫検査の従来技術である
蔓延地域外で検査技術者の養成が困難

- 低感度による見落とし
- 寄生虫種類の鑑別の不備

- 本邦のように輸入症例が主である非蔓延地
- 撲滅途上で患者数が減少する場合
 - 代替の網羅的寄生虫検査が必要

次世代シークエンサーを用いた病原体検出

- ✓ ショットガン配列解析による網羅的病原体検出
- ✓ 16Sリボソーム配列を活用した細菌の効率的な検査
- ✓ 類縁病原体で保存された配列を活用したウイルスの効率的な検査



一つのPCRで類縁の病原体の特徴的な配列のみを増幅して解析



細菌が保有する
16S rRNA配列



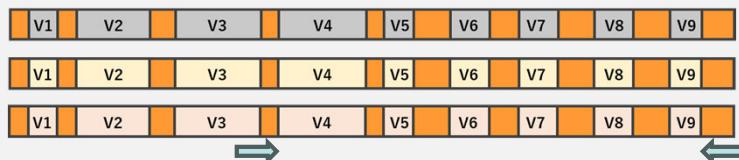
フラビウイルスの
RNA依存Pol

NGSは前提知識のない病原体検出が可能
効率の良い検査（低コスト化）には病原体の配列のみを解析する必要がある

NGS検査の寄生虫検査適用への障壁

- ✓ 全ての寄生虫は真核生物であるため、18S rRNAを保有する。
- ✓ 18S rRNA遺伝子を増幅すると宿主動物の遺伝子も増幅される
- ✓ 寄生虫の遺伝子のみを増幅する仕組みが必要

真核生物が保有する18S rRNA配列



寄生虫の全てをカバーするPCR

↓
真核生物全てをカバーするPCR

↓
ヒトや動物の配列も増えてしまう！

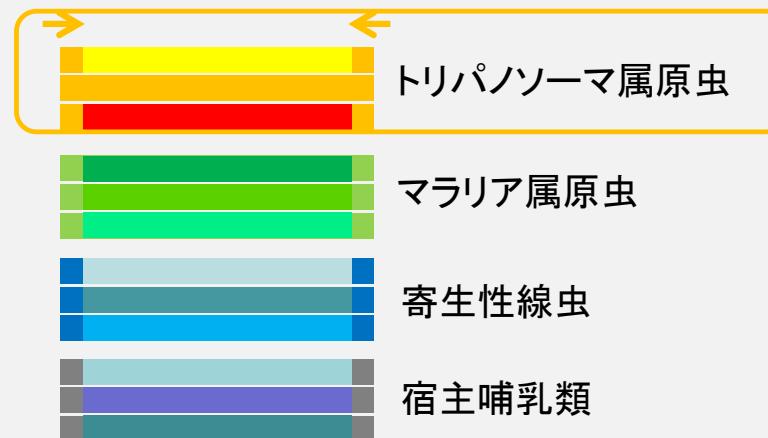


細菌を網羅的に解析する16S ribosomal RNA配列のように、真核生物である寄生虫は18S ribosomal RNAを保有している。しかし、そのまま増幅すると宿主配列ばかりになる

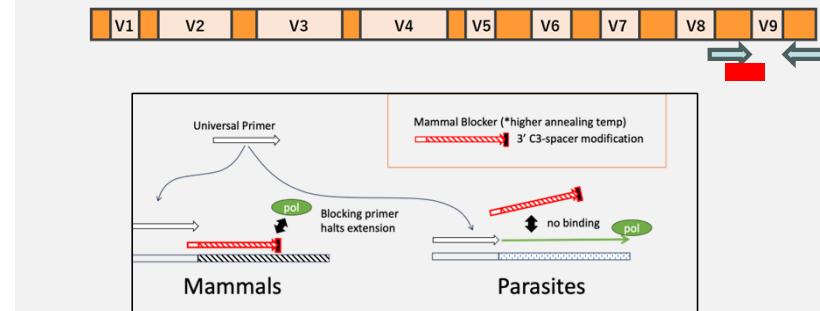
NGS検査の寄生虫検査適用への2つの解決策

- ✓ 基礎研究で用いられている寄生虫NGS検出は大きく二つの方策をとる
 - ①対象の寄生虫種類を絞る
 - ②宿主配列のPCR増幅を阻害する

① 対象の寄生虫種類を絞る



②宿主配列のPCR増幅を阻害する



真核生物V9領域(200bp)の増幅 + 宿主配列PCRの抑制 (PMID: 30172254)

標的寄生虫のみを増幅するプライマー
→宿主配列は増幅されない
→標的外の寄生虫も増幅されない

配列解析に用いる領域は200bpのみ
→生物種同定が不十分
→高精度のNGSが必要で高コスト

従来技術とその問題点 その②

従来の寄生虫NGS検査：

対象の病原体が限られる

網羅性を保った検査は高精度NGSが必要

→網羅性を保有しつつ、低精度、低コストNGSで解析可能な検査手法

ポータブルNGSによる低成本な病原体検査

- ✓ POCTと適合しやすい小スケール検体数で低成本にNGS解析が可能
- ✓ 1日以内に遺伝子増幅～NGS配列解析が完了可能
- ✓ 解析配列長に制限がない

✓ ポータブルNGS検査に必要な機器

PCR +



- ✓ 導入コストが安価
- ✓ 2万円でおよそ 300Mb以上の配列を解析可能
- ✓ 配列読み取り精度は低いが、長く読み取れる

✓ 病原体検出への応用実証例

細菌

髄膜炎起因菌の迅速検出 [PMID:31709051]

ウイルス

フライヴィルスの一括検出[PMID:]

パラミクソウイルスの一括検出[PMID:31709051]

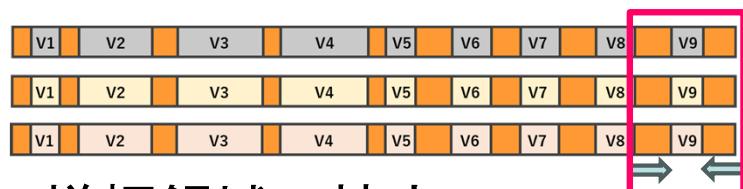
寄生虫薬剤耐性

マラリアの薬剤耐性多型の検出[]

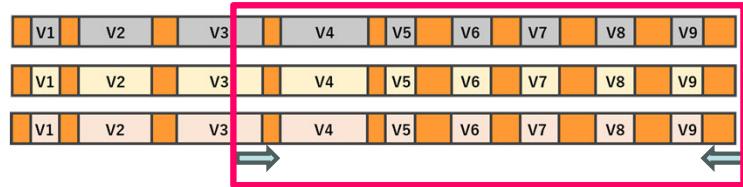
1回のNGS解析で10-40検体が検査できると → 1検体あたり500-2000円での実費で検査できる

ポータブルNGSで網羅的寄生虫検査を実現するには？

- ✓ ポータブルNGSは低精度である
→寄生虫生物種鑑別が十分な長さの遺伝子領域を増幅する必要
- ✓ 網羅的でありながら低コストな検査を実現したい
→上記の長い遺伝子領域増幅で使用可能な宿主配列の増幅阻害技術が必要

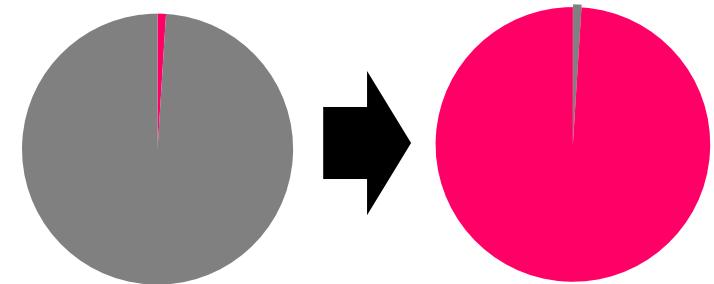


増幅領域の拡大で
生物種同定の精度向上



長い増幅領域で使用可能な
ブロッキングプライマーの設計

■ 寄生虫
■ 宿主



ポータブルNGSでの寄生虫検査に必要となる遺伝子増幅技術の最適化
解析に必要な遺伝子長の決定とブロッキングプライマーの設計を実施した

寄生虫の生物種鑑別に必要な対象配列長

- ✓ 従来技術ではV9領域のみが解析対象であった。
- ✓ V4-9までの1kb超の領域を解析することでポータブルNGSにおいても種鑑別性能を担保

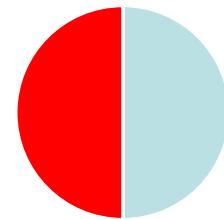


既報で用いられたV9領域

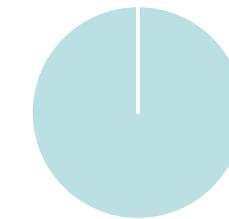
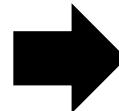


本技術で検討したV4-9領域

熱帯熱マラリア原虫の配列を
エラー率10%でシミュレートした場合の生物種同定結果



■ 热帯热マラリア
■ 同定できない配列

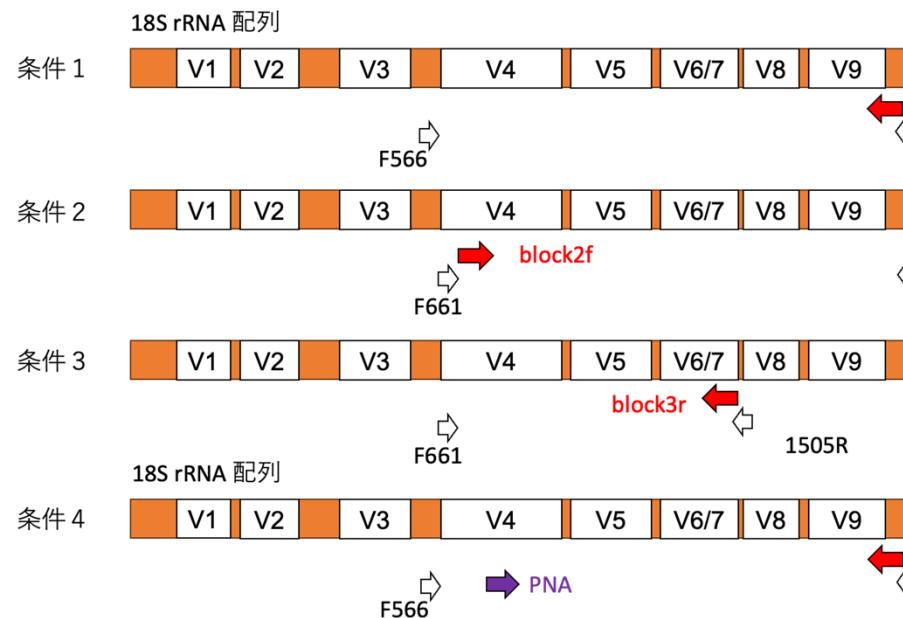


■ 热帯热マラリア
■ 同定できない配列

増幅する遺伝子断片長をV4-9領域に設定することで
ポータブルNGSによる寄生虫生物種の鑑別性能が改善する

宿主配列の増幅を抑制する技術

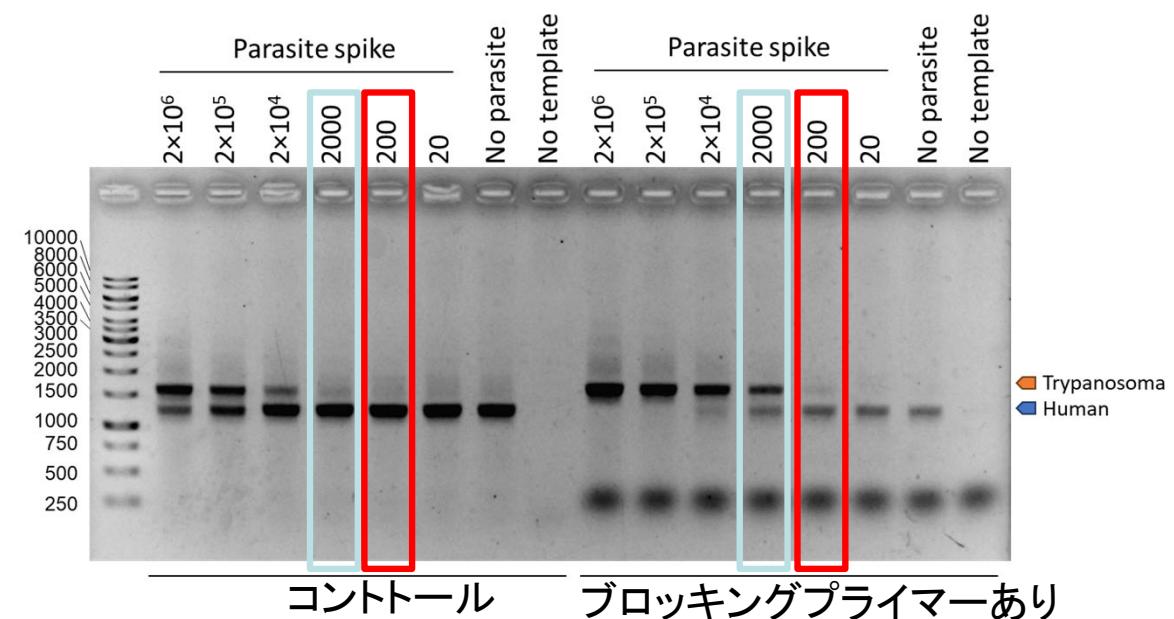
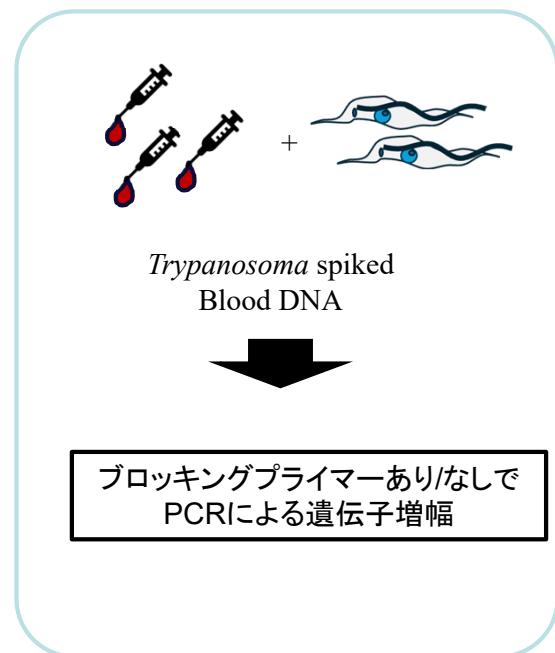
- ✓ V4-9領域の増幅と同時に使用可能なブロッキングプライマーが必要
- ✓ 既知のPCR阻害原理を用いて、本検査に必要なブロッキングプライマー配列を設計した



寄生虫の長い遺伝子断片をくまなく増幅するユニバーサルプライマーと組み合わせることができるブロッキングプライマーを設計した

開発したブロッキングプライマーの性能①

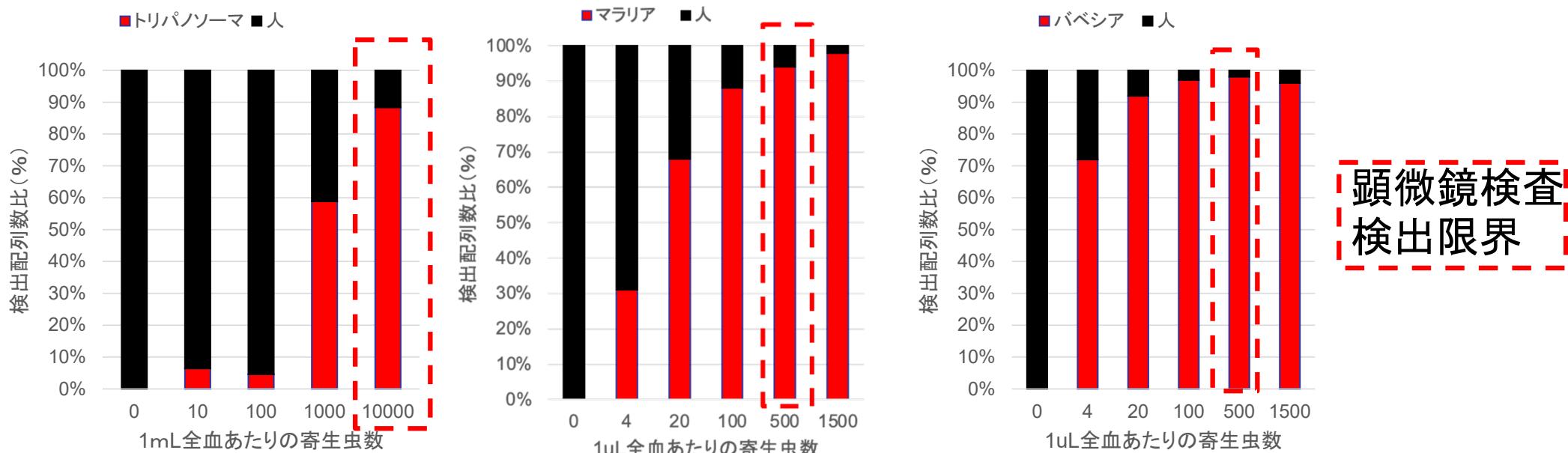
- ✓ 設計したブロッキングプライマーは宿主配列の増幅を阻害可能であった
- ✓ 添加した寄生虫由来の配列の検出に成功した



新規設計のブロッキングプライマーは寄生虫の長い遺伝子断片をくまなく増幅する
PCRと組み合わせることが可能であり、宿主配列の増幅を抑制した

ポータブルNGSによる寄生虫検査の感度

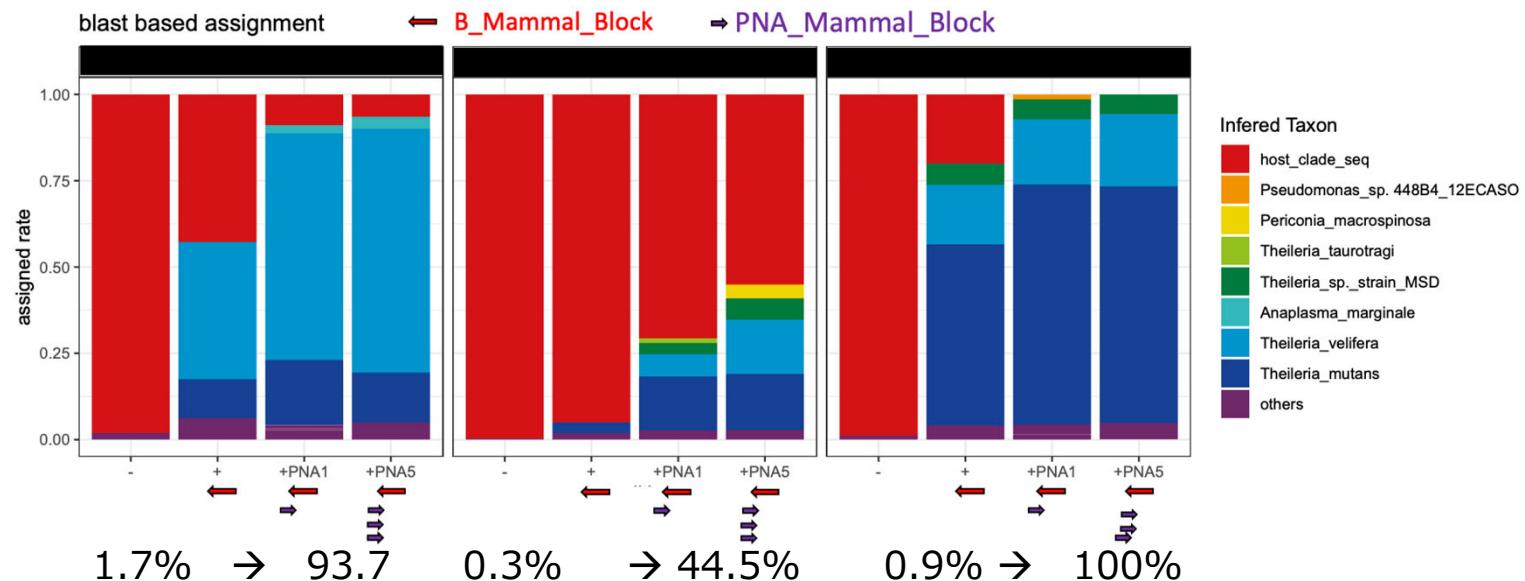
- ✓ 寄生虫を健常人の血液にスパイクした模擬検体を用いて、検出感度を検討した
- ✓ 顕微鏡検査を超える、従来の遺伝子検査と同等の検査感度が達成された



3種のモデルとなる住血寄生虫について顕微鏡検査での検出限界以下の寄生虫濃度で
十分に寄生虫遺伝子を濃縮した

寄生虫症血液での実証試験

- ✓ 寄生虫が感染していた牛の血液検体で実際の効果を検証した
- ✓ 宿主由来配列の増幅はブロッキングプライマーで抑制された。
- ✓ 宿主以外の解析したい配列は0.3-1.7% → 44.5 – 100%まで濃縮された



宿主以外の
配列割合

ブロッキングプライマー有無でNGS解析による検出コストは約50-150倍に低減できた
数10検体単位を1回のポータブルNGSで解析するために十分な濃縮程度であった

新技術の特徴・従来技術との比較

- ポータブルNGSでの寄生虫網羅的検査を実現するために必要な、長い断片の遺伝子増幅と宿主配列の增幅阻害の両立を可能とした。
- 顕微鏡検査と比較した場合、遺伝子検査による高感度、配列解析による客観的な生物種観別性能が担保される。
- 基礎研究用途で利用されていた短断片 + 高精度NGSでの寄生虫検査と比較して、長い断片での寄生虫遺伝子配列解析が可能となり、正確な生物種の判別が可能となった。
- ポータブルNGSを活用することで、件数が少ない寄生虫疾患において実際の臨床検査を想定する小スケール（～20検体）における一回の検査コストがおよそ1/15となった。

想定される用途

- 本技術の特徴は網羅的な寄生虫検査を出検数が少ない状況でも比較的安価に提供することを可能とする。そのため、本邦における寄生虫輸入症例などの希少例の検査に特に有用であると考えられる。
- 一括での寄生虫検査が可能であることから、伴侶動物や家畜など感染している可能性がある対象寄生虫種が多い場合に、複数の検査をすることなく、寄生虫の有無を判定することが可能となる。
- 想定外の寄生虫も含めて捉えることが可能であることから、新興感染症の予防も含めた病原体モニタリングが必要な状況（輸血血液のサーベイ、家畜輸入検疫における防疫）にも有用と考えられる。検体数が増加する場合は、ポータブルNGSと同原理の大規模NGSへスケールすることも可能である。

実用化に向けた課題

- 実験室レベルでヒト、動物から寄生虫の検出に使用できることの概念実証は完了。検査の結果は、検体の取り扱いや試験手技などにも影響されるため、社会実装に向けては検査全体の品質保証のための仕組みが必要
→ 内部コントロールの添加などの結果保証の仕組みが必要
- データ解析のパラメーター選定については解析技術者が複数の条件を比較しつつ選定している、最適なパラメータ推定とパラメーター選択の自動化が必要。
- 1回の試験で検査可能な検体数は、コストに直結
→ 1回の試験にまとめて十分な感度が担保できる検体数の検討が必要
→ 実際の寄生虫症患者検体を用いた検討および検証が必要

社会実装への道筋

時期	取り組む課題	社会実装へ取り組みについて記載
基礎技術の確立	基礎研究	・寄生虫遺伝子を網羅的に增幅可能する際に活用可能であるブロッキングプライマーの設計完了
	現在	・ブロッキングプライマーの性能検証 ・寄生虫検査としての基礎性能検証
	1年後	・検査品質担保のための仕組みづくり ・データ解析パイプラインの最適パラメータ推定
普及準備	3年後	・データ解析パイプラインの自動化 ・適用可能な検体種(宿主生物種)の拡大
臨床応用	5年後	・ヒトおよび獣医療の臨床検体を対象とした、研究用途における寄生虫網羅的検査サービスの提供

企業への期待

- 未実装である検査の品質管理のための仕組みについては、例えば「内部コントロール」として寄生虫遺伝子増幅、寄生虫同定に影響を与えない人工配列の合成、添加、製造ロットごとの品質管理を組み込むことによって克服できると考えている。
- 本検査に必要な遺伝子検査キットの開発、製造、販売などの経験を持つ企業との連携を希望する。
- その他、ヒト医療、獣医療、動物検疫、保全医療の研究者等の需要者に、本手法による遺伝子増幅およびデータ解析による寄生虫検査サービスを提供することが可能である、遺伝子検査サービスの開発、提供の経験を持つ企業に興味を持っていただけすると幸甚である。

企業への貢献、PRポイント

- 本技術はポータブルNGSを活用した遺伝子検査薬の基礎技術として利用が可能である。研究用および臨床検査用途の検査キット、検査サービスの開発を目的とした産学連携共同研究を実施できる。
- 本邦で入手困難である寄生虫症患者検体の代替として、培養した寄生虫をスパイクした模擬検体提供に協力できる。
- 本技術の導入にあたり、国外熱帯地域の研究パートナーとの共同で患者検体を用いた実証試験を実施し、検査手法の科学的な裏付けを行うことが可能。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : ブロッキングプライマー及びその利用
- 出願番号 : 特願2025-005095
- 出願人 : 国立大学法人北海道大学
- 発明者 : 山岸 潤也、杉 達紀、林田 京子

お問い合わせ先

**北海道大学 産学・地域協働推進機構
産学・地域協働推進機構 ワンストップ窓口**

<https://www.mcip.hokudai.ac.jp/about/onestop.html>