

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15325

研究課題名(和文) デング熱・チクングニア熱を1回の検査で鑑別できる簡易診断キットの開発

研究課題名(英文) Development of a rapid diagnostic kit for detecting dengue fever and chikungunya fever by a single test

研究代表者

井戸 栄治 (ID0, Eiji)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：70183176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、デング熱やチクングニア熱など蚊媒介性ウイルス感染症が従来の存在地域を飛び越えて、新たな大陸や国・地域で新興感染症として猛威を奮っている。これらの感染症は、種々の分子的技術を駆使しなければ鑑別診断しにくく、治療・予防対策を講ずる上で大きな妨げとなっている。デング熱については、既にNS1抗原を特異的に認識する系が確立している。本研究は、特にチクングニアウイルス構造蛋白質を抗原として迅速に鑑別できる簡易キットの開発を目指した。最初に同疾患が流行中のアフリカ検体から抗原ウイルスを分離し、次に全ゲノム遺伝子解析を行い、これらの情報を元にイムノクロマトグラムに使用できるモノクローナル抗体を作成した。

研究成果の概要(英文)：Mosquito-vectored viral infections such as dengue and chikungunya fevers are recently expanding their original habitats and becoming new threats as emerging diseases in the naive countries. It is difficult to distinguish one from others by symptoms alone without using the modern molecular techniques. This fact is hindering the development of effective counter measures against these viral infections. The specific diagnostic system for dengue virus is already established by detecting NS1 antigens. We targeted chikungunya structural proteins for developing a rapid diagnostic system. The chikungunya virus was isolated from the specimens collected during its outbreak, and then its full-genome sequence analysis was completed. Based on these data, we have succeeded in establishing mouse monoclonal antibodies by which chikungunya virus can be detected on an immunochromatography strip.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス デング熱 チクングニア熱 感染症 診断

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、蚊で媒介されるウイルス感染症、たとえばデング熱やチクングニア熱、最近ではジカ熱などが、それまで存在が知られていた元々の生息域を大きく飛び越えて、全く新しい大陸や国・地域で流行を起こす、いわゆる新興感染症となって人々の健康の脅威となるケースが顕著に発生している。デング熱はおそらくアジアの熱帯地域に元々あったものが、17世紀以降の奴隷貿易を契機に、新大陸に持ち込まれ、今日、東南アジアは言うまでもなく、中南米においても猛威を奮っている。チクングニア熱は外来アフリカ大陸中央部の森に限局して存在していたと考えられていたが、20世紀半ば頃にはアジア諸国の方へ伝播を始め、21世紀に入ってから太平洋諸国での大流行を経て、現在中南米で一大アウトブレイクを引き起こしている。ジカ熱もほぼ同様の履歴を示している。こうした大流行がどのようなメカニズムにより引き起こされるのかについては、未だ確たる答えは出ていないのが現状であり、過去の出来事の解析から将来の感染症流行予測のヒントが得られるかも知れない。

(2) これら上記3つの蚊媒介性ウイルス感染症は、互いに症状が発熱・頭痛・筋肉痛・下痢(嘔吐)・発疹と酷似しており、血清学的な検査や遺伝子検査なしに鑑別診断することは極めて困難であるという特徴がある。ところが、こうした新興感染症の経験が無い、特に発展途上国ではそうした作業が可能な設備も機器も備わっていないため、結果として適切な治療・予防の策を直ちに講ずることが出来ないか、あるいは大いに遅れを取るという問題が発生する危険性が高い。しかも、これらのウイルス感染症は媒介の蚊の種類(ネッタイシマカおよびヒトスジシマカ)を共通することがあり、一つがアウトブレイクすると他のも同時にアウトブレイクを起こす頻度が高いことが知られるようになって来た。短時間で済ませられる、可能であれば1回の簡便な検査で同時に複数の病原体の鑑別が出来る検査キットの開発が切望されている。

2. 研究の目的

(1) 研究は、実際にこうした蚊媒介性ウイルス感染症の大流行が発生した2012年のコンゴ民主共和国の首都キンシャサの医療関係者からその時多数の発熱患者を襲った病原体同定の依頼を受けたことが端緒になっている。まずは、その病原体の同定とその詳

細な解析が第一の目的であった。第二の目的は、高価な実験設備や機器を必要としない簡易迅速診断システムを開発することである。具体的には、当該感染症に対するイムノクロマトグラムのキットを開発することを究極の目的とした。その際に、短時間で検査が済ませられるよう、一つのイムノクロマトグラムで2つ、ないしは3つの同時判定が出来ることを最終目標とした。

(2) 第二の目的は、高価な実験設備や機器を必要としない簡易迅速診断システムを開発することである。具体的には、当該感染症に対するイムノクロマトグラムのキットを開発することを究極の目的とした。その際に、短時間で検査が済ませられるよう、一つのイムノクロマトグラムで2つ、ないしは3つの同時判定が出来ることを最終目標とした。

3. 研究の方法

(1) 流行中に病院に押し寄せた多数の患者血清の一部が将来の病原体同定のためにと病院の冷凍庫内に保管されていた。しかし、検体の量は非常に少なく、様々な検査手段を駆使する程の余裕は皆無という状況下、(発熱のエピソードから言ってマラリヤは一応除外されていたので)臨床症状から最初にチクングニア熱を疑い、次にデング熱を視野に入れて種々の同定作業を進めた。

(2) イムノクロマトグラムの系を構築するには、何よりも標的抗原をより感度良く認識できる特異的なモノクローナル抗体を作成することが肝心である。デング熱については、ウイルスのNS1抗原を検出するのが最も診断法として信頼できる(無論ウイルス遺伝子を捕捉することがより確実であることは言うまでもない)というのが定説になっており、その系については既に幾つかの会社から市販品が出ており確立していたので、ここではチクングニアウイルス(以下CHIKVと略す)粒子を抗原として検知できる系の確立に焦点を定めた。陽性を判明した検体からウイルス分離を行い、その遺伝子配列を決定して、このデータを元にマウスのモノクローナル抗体作成を行った。なお、抗体作成については、こうしたモノクローナル抗体作成を専門とするB社に委託した。

4. 研究成果

(1) コンゴ民主共和国の首都キンシャサで

2012年に発生した発熱疾患の病原体同定病院で保管されていた検体は合計 96 検体あり、それら全てについて CTK 社の CHIKV 抗 IgM 抗体検出キットを用いて調べたところ、10 検体で陽性のバンドを確認した(図 1)。

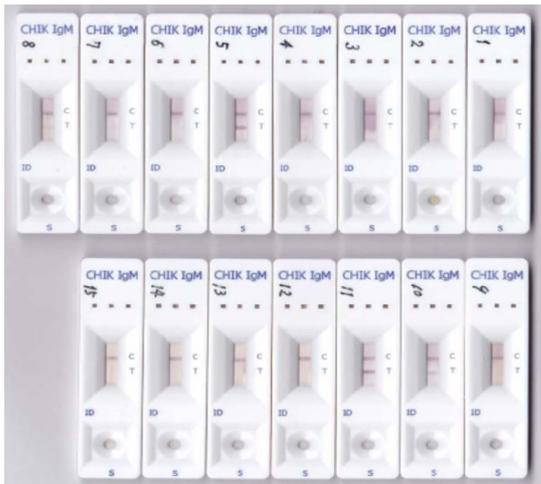


図 1 CHIKV 抗 IgM 抗体の検出結果

次に各血清検体から RNA を Qiagen 社の viral RNA 抽出キットを用いて取り出し、それを鋳型として CHIKV を特異的に検出することが出来るプライマーセット2種類を用いて RT-PCR を行った(図 2)。

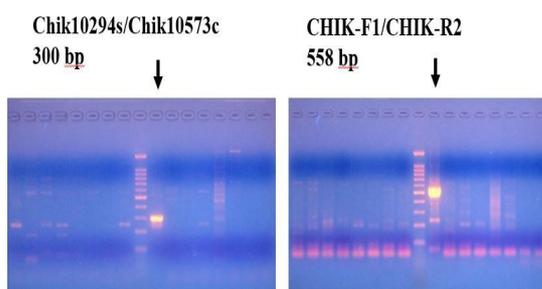


図 2 RT-PCR による CHIKV の RNA 検出

異なったプライマーセットに対して、それぞれほぼ予定サイズのバンドが DNA マーカーの右隣のレーン(黒の矢印)に現れ、実際にこの産物を遺伝子解析した結果、CHIKV であることが確認された。

(2) コンゴ民主共和国の CHIKV 株の特徴
RT-PCR で得られた産物の遺伝子配列を既報の様々な株と共に系統解析した結果を図 3 に示す。CHIKV については従来 prototype である ECSA (East/Central/South African) 型と West African 型、そして Asia 型の3つのクラスターに別れると言われていたの

るが、今回の結果は予想に反してコンゴ民主共和国の株は、2 種類のプライマー領域のどちらでもそれら既知の3つのクラスターとは別のクラスターに属することが明らかとなった。

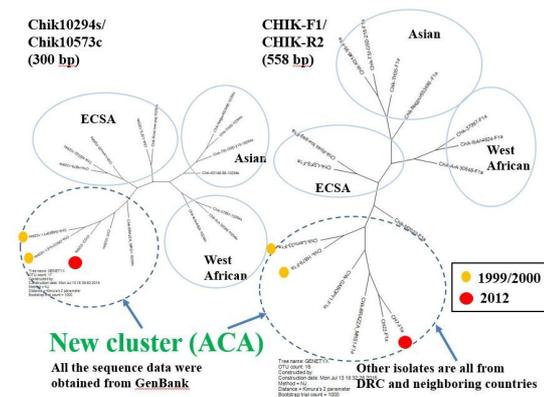


図 3 種々の CHIKV 株の系統解析結果 (コンゴ民主共和国株は赤丸)

実は、チクングニア熱が同地で流行したのは2012年が初めてではなく、1999/2000年にも流行していたことが報告されている(引用文献)。この時の株については部分遺伝子配列だけが得られており、上図ではそれが黄色の丸印で示されている。データベースを詳しく検索してみると、2007年のガボン、2011年のコンゴ共和国からの CHIKV 株が皆すべて同じクラスターに属することが判明した。興味深いことは、これらの国々が全てアフリカ大陸の大西洋岸に互いに隣接していることである。これまでアジアや中南米のチクングニア熱を報告しているグループは、こうした独自のクラスターが存在していることについては未だ十分に認識しておらず、当研究代表者らはこれを暫定的に ACA (Atlantic Central African) 型と呼ぶことにして今後の更なる検証を進めてみたいと考えている。

(3) コンゴ民主共和国からの CHIKV 株の細胞培養による分離

RT-PCR による結果から、CHIKV 株であることは確実なのであるが、当初の目的である簡易検査キットを開発するためには、様々な株にも感度良く反応するものを作らなければ意味がない。そこでウイルスを細胞培養によって分離することを試みた。細胞としてはアフリカミドリザル由来の Vero 細胞と蚊由来の C6/36 細胞を用いた。血清検体の一部を細胞

に接種し培養すると、3-4 日後に明らかな CPE が観察され、これを繰り返し継代しても続くことによってウイルス分離が成功したものと考えられた。結果的には、細胞培養した 20 検体の内、2 検体がそのような状態となり、確認はそれぞれ RT-PCR によってなされた。即ち計 2 株が分離されたことになる。

(4) 分離 CHIKV 株の全遺伝子配列情報の解析

ウイルスが分離されると、元の検体量が不足していた問題は解決され、全ゲノム情報の獲得に移行することは比較的容易である。NCBI のデータベースを参考に、全ゲノム領域に亘って保存性が高い領域を探し出し、約 500 ~ 600 塩基おきに増幅用のプライマーを設定し、gene-walking 式に読むことで全遺伝子配列 (約 10,700 塩基長) を決定した。

(5) E1 蛋白質中の A226V ミクロ変異

全ゲノムを解析した結果、当然のことながらゲノム全体に亘って Prototype の ECSA 株などとはかなり異なる変異が随所に見られたのであるが、極めて驚いたことに E1 蛋白質の 226 番目のアミノ酸がアラニンからバリンに変異していたことが判明した (表 1)。

表 1 世界各地で報告された CHIKV 株の E1 蛋白質中に見られたミクロ変異

Country	Year	Strain	E2-211	E1-226	AA Seq	Lineage
Leunion	2005	05-115	I211T	A226	ORPAA	ECSA
Leunion	2006	LR2006 CPV1	I211T	A226V	ORPAV	ECSA
Tanzania	1963	Ross	I211	A226	ORPAA	ECSA
South Africa	1966	Vereeni ging	I211	A226	ORPAA	ECSA
Congo	1960	LSFS	I211	A226	ORPAA	ECSA?
Angola	1962	M2022	I211	A226	ORPAA	ECSA?
Nigeria	1964	IhE5	I211T	A226	ORPAA	West Af
Senegal	1966	SH2830	I211T	A226	ORPAA	West Af
Senegal	1963	37997	I211T	A226	ORPAA	West Af
Senegal	2005	HD 180760	I211T	A226	ORPAA	West Af
Thailand	1968	TH35	I211T	A226	ORPSA	Asian
Indonesia	1963	JK123574	I211T	A226	ORPSA	Asian
India	1963	I-634029	I211T	A226	ORPSA	Asian
Puerto Rico	2014	PR-S4	I211T	A226	ORPSA	Asian
Mexico	2015	InDRE 4CHIK	I211T	A226	ORPSA	Asian
Columbia	2015	WHCHK22	I211T	A226	ORPSA	Asian
Brazil	2015	AMA2736/AH04298	I211T	A226	ORPSA	Asian
India	2006	IND-06-1W12	I211T	A226	ORPAA	ECSA
India	2008	RGB356/AL08	I211T	A226V	ORPAV	ECSA
Singapore	2008	SGEHCIS421708	I211T	A226V	ORPAV	ECSA
Italy	2007	ITA07-RA1	I211T	A226V	ORPAV	ECSA
Gabon	2007	GABCPV1	I211T	A226V	ORPAV	ACA
Rep Congo	2011	BRAZZA MR51	I211T	A226V	ORPAV	ACA
DR Congo	2000	Chik DR0007	ND	A226	ORPAA	ACA
DR Congo	2012	DRC_105	I211T	A226V	ORPAV	ACA

この A226V 変異は、古い CHIKV 株には全く見られなかったもので、2005/6 年にインド洋のレユニオン島におけるチクングニア熱の大アウトブレイク中 (島民の大半である約 20

万人以上に感染が広がった) に生れた特徴的な変異であることが明らかにされ (引用文献) 特に関心な点は、この変異によりネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) よりもヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*) に適応して後者の体内でよく増殖することが、その後複数グループの研究により明らかにされたことである。後者の蚊種は熱帯のみならず、我が国を含めて温帯地域でも生息が可能であるから、CHIKV の伝播と分子進化の関係は新たな謎と興味を惹く課題である。と言うのは、系統解析の結果によるとレユニオン島の株は ECSA 型に属するものであり、コンゴ民主株は ACA 株に属している。1999/2000 年の株についてはウイルス分離がなされていないが、偶然にも配列分析がなされている領域が 226 番目付近であり、その結果によると Alanine はそのまま変異がないことが判明した。つまり、両株が別々のクラスターに属することを勘案すると、この A226V の変異はレユニオン島で起こった変異とは全く独立に、2000 年よりも後に西南部アフリカで起こったと推測されるのである。時を同じくして、この年代頃よりアフリカ大陸の各地でそれまで存在していなかったヒトスジシマカが相次いで発見されている。本題とは離れるが、蚊の生態学的地理分布の変化はウイルスの分子進化を考察する上で極めて重要な関連因子であることは間違いない。

(6) CHIKV のコア構造蛋白質を検出可能なモノクローナル抗体の作成とイムノクロマトグラムの試作

CHIKV は、遺伝子配列から見て少なくとも 4 つのクラスターに分類されることが明らかとなったため、例えばアジア型のみとか ECSA 型のみを抗原にしてモノクローナル抗体を作成したとしても、対象の株によっては検知が全くできないか、極めて非効率になるという問題が発生する可能性が考えられた。そこで、種々の株の遺伝子情報を並列させ、そうしたことが最も起こりにくく、また抗原認識を甚だしく妨げると考えられる糖鎖サイトを全てつぶした仮想的共通配列を持つ蛋白質を抗原としてマウスに接種した (このステップはこうした作業に熟練したノウハウを持つ B 研究所に完全委託) 現在この抗体を金コロイドと結合させ、イムノクロマトグラムの系を試作することに没頭している最中である。当初の計画通りであれば、抗体作成は 1 年目には完了し、2 年目には通常の金コ

ロイドによる赤色バンドを確認した後に、異なった色彩のカラーピースを持ちいて Dengue ウイルスと CHIKV をそれぞれ別々に認識できるイムノクロマトグラムを完成したかったのであるが、分離した CHIKV 株が当初の予想に反して極めてユニークな変異配列を持っていたことが明らかとなり、検討すべき事項が大幅に増加したため、肝心の部分まで漕ぎ着けていないことが反省しきりであると同時に残念でならない。しかしながら、予定よりも遅れたとはいえ、モノクローナル抗体は無事作成されたので、今後のリカバリーに全力で取り組むつもりである。また貴重な研究材料となるウイルス株が得られたことは望外の成果であり、媒介蚊の生態学的地理分布とウイルス分子進化の関心の謎を解明するという新しい研究課題に発展的に取り組める可能性が開かれたことは、一つの大きな副産物ではなかったかと考えている。

<引用文献>

Muyembe-Tamfum, J.J., Peyrefitte, C.N., Yogolelo, R., Mathina Basisya, E., Koyange, D., Pukuta, E., Mashako, M., Tolou, H., Durand, J.P.: Epidemic of chikungunya virus in 1999 and 2000 in Democratic Republic of Congo. *Med Trop (Mars)*. 2003;63(6):637-8.

Schuffenecker I, et al.: Genome micro evolution of chikungunya viruses the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med.*, 3(7):e263, 2006.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

井戸 栄治: アフリカ大陸における蚊媒介性ウイルス感染症. 別冊 *Bio Clinica*, 6(2):128-133, 2017.

〔学会発表〕(計 6 件)

Ido, E., Ahuka, S., Karhemere, S., Ibuki, K., Muyembe, J.J.: Cocirculation of dengue virus during an outbreak of chikungunya virus in Democratic Republic of Congo. 17th International Congress of Virology (IUMS2017), Singapore, Singapore, July 17-21, 2017.

井戸 栄治, Ahuka, S., Karhemere, S., 伊吹謙太郎, Muyembe, J.J.: コンゴ民主共和国で流行した Dengue ウイルスの遺伝子解析から推測された同ウイルスの感染伝播経路. 第 52 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会, 大阪, 2017 年 10 月 23 日.

井戸 栄治, Ahuka, S., 伊吹 謙太郎, Muyembe, J.J.: チクングニアウイルス E1 蛋

白質中のマイクロ変異から読み解く同ウイルスのパンデミック史. 第 52 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 沖縄, 2017 年 5 月 19-20 日.

Ido, E., Ahuka, S., Karhemere, S., Ibuki, K., Muyembe, J.J.: Full genome sequence analysis of chikungunya virus isolated from DR Congo and the role of microevolution A226V in the viral E1 protein. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, W2-6-10, p.208, 札幌, 2016 年 10 月 23-26 日.

Shibata, M., Nishimura, Y., Ido, E., Ahuka, S., Muyembe, J.J., Ibuki, K.: Development of a novel RT-LAMP system for detection of all the genotypes of chikungunya virus. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, P2-082, p.341, 札幌, 2016 年 10 月 23-26 日.

柴田 弥拓, 西村 佑紀, 井戸 栄治, Steve Ahuka, Jean-Jacques Muyembe, 伊吹謙太郎: 全ての遺伝子型のチクングニアウイルスを検出可能とする新規遺伝子増幅法の開発. 第 11 回日本臨床検査学教育学会学術大会, 神戸, 2016 年 8 月 31 日-9 月 2 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

特になし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井戸 栄治 (IDO, Eiji)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号: 70183176

(2) 研究分担者

なし。

(3) 連携研究者

なし。

(4) 研究協力者

なし。