

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21698

研究課題名(和文) ナノポア・シーケンサー活用によるRNAウイルス感染症に対する迅速診断法の開発

研究課題名(英文) Development of the rapid diagnostic method for RNA virus infections by use of a Nanopore sequencer

研究代表者

井戸 栄治 (Ido, Eiji)

千葉大学・大学院医学研究院・特任教授

研究者番号：70183176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、新型コロナウイルスを好例にチクングニア熱やデング熱といった蚊媒介性RNAウイルスによる感染流行地域が拡大するなど、世界的に新興RNAウイルス感染症の脅威が急速に高まっている。本研究は、そうした新興感染症に対して、超小型の核酸配列分析装置MinIONを利用することによって、病原体を迅速に鑑別できる診断法の開発を目的にしている。機を一にして2019年以降、チクングニア熱、デング熱(前2つはアフリカ)、そしてCOVID-19と3種のRNAウイルス感染症が相次いで発生した。ここでは、本装置の使用を含めて、どのようにこれらの感染症に対応したかを報告している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超小型核酸配列分析装置MinIONは、最近開発された次世代型の解析ツールで、その軽量さと手軽さからフィールド調査における微生物の分析などに利用されている。同様の理由から、感染症の迅速診断においてもその利用価値は大いにありと想定され、現在、その応用範囲を拡げるべく検出限界を含めた実際の利用例の蓄積が強く求められている。本装置普及とそのノウハウ確立の暁には、大型で高価なシーケンサーが無くとも早急に病原体が明らかになるので、迅速な感染予防体制を構築することができるなど、その社会的意義について述べるまでもない。

研究成果の概要(英文)：As seen in the examples of the pandemic of SARS-CoV-2 and frequent outbreak news of mosquito-vectored viral infections such as dengue and chikungunya fevers outside from the previously known endemic zones, the threats of emerging RNA viruses are extremely rising on the earth in recent years. In this study, we intended to develop a rapid diagnostic system for emerging RNA viral infections using a handy sequencer MinION. Coincidentally outbreaks of chikungunya and dengue fevers (in Africa) and world-wide COVID-19 occurred one after another since 2019. Here we report how we responded to these infectious diseases including the use of MinION.

研究分野：ウイルス学

キーワード：感染症 ウイルス 迅速診断法 RNA チクングニア熱 デング熱 新型コロナウイルス ナノポア・シーケンサー

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、2019 年末に中国武漢市周辺に端を発し瞬く間に感染拡大を起こした新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は、変異を繰り返しながら今なお世界中を席卷している。その他にもチクングニア熱・デング熱・ジカ熱と呼ばれる蚊媒介性 RNA ウイルス感染症は、従来の常識を超えて流行地域を拡大するなど、新興 RNA ウイルス感染症の脅威が年々急速に増大している。

(2) こうした感染症対策には治療薬開発や予防のためのワクチン開発が必要であることは無論であるが、迅速かつ信頼できる診断法の確立が第一に求められる。しかしながら、新型コロナウイルスの病原ウイルス SARS-CoV-2 の例に示されるように、単に病原体を同定するだけでなく、次々と生じる新たな変異型をいち早く察知することがとりわけ重要になって来ている。遺伝子解析に関するハード面については、従来型のシーケンサーに加えて次世代型のシーケンサーが種々開発され、実際に使用されている。しかし、そうした装置の多くは、大型かつ高価格のため誰もが簡単に使用できないという難点があった。そうした状況下、Oxford Nanopore Technology 社が手のひらサイズの超小型核酸配列分析装置 MinION を開発した。装置の軽量さと操作の手軽さから、様々な野外環境下における微生物探索・同定など、特にフィールド調査に優位性を発揮し始めていた。

2. 研究の目的

予期し得ない場所と時期に次々と発生する新興感染症の多くは、病原体のゲノムが RNA のウイルスである。本研究は、従来から行われている病原体同定・遺伝子解析の手法に加えて超小型のシーケンサー装置 MinION を活用することによって、高額な機器を所持していない小規模の医療機関などでも RNA ウイルス感染症の迅速鑑別診断を可能とすることを目標とした。

3. 研究の方法

(1) 本研究の開始直前、まるでそれを予想していたかのように、2019 年以降、本研究代表者が長年研究協力関係にあるアフリカの 2 つの国よりチクングニア熱(コンゴ共和国)とデング熱(コンゴ民主共和国)発生ニュースが飛び込んで来た。それぞれ現場に急行して検体を入手し、可能な限り現地で簡易なウイルス学的診断実験(以下にその一部を記載)を行った。そこへ 2020 年に年が変わってから直ぐに我が国でも COVID-19 患者発生非常事態となり、図らずも本研究にとっては最適の材料、即ち 3 種類の RNA ウイルス感染症の検体が揃って入手できる状況となった。以下、各々の感染症に対して、従来法ではどのような解析を行ったか、また MinION 利用のためにはどのような工夫をしたかを述べる。

(2) 基本的に、患者の臨床症状や発生状況等の関連情報に基づき、ある程度病原体の当たりをつけてから具体的な実験に取り掛かったことは言うまでもない。通常、イムノクロマトグラフィ- (ICT) の kit などが手元にあり、その場で病原体の見当がつけられる場合にはそこから着手した。次に、検体(血清または鼻腔拭い液など)から市販の抽出 kit (Qiagen の Viral RNA Extraction kit) を用いて RNA を抽出し、該当の病原体ウイルスに特異的なプライマー対を用いて RT-PCR を行った。ゲル電気泳動により増幅 PCR 産物バンドの有無を確認し、陽性の場合には Sanger 法による遺伝子配列分析および MinION による配列分析を行い、最終的な核酸配列を決定した。また分子系統解析は、MEGAX のソフトウェアを用いて NCBI の database 上のレファレンス配列を含めて系統樹を作成した。以下、3 種類の感染症別に個々の結果を述べる。

4. 研究成果

(1) コンゴ共和国で大規模なアウトブレイクを起こしたチクングニア熱の大流行

2019 年 1 月中旬、アフリカのコンゴ共和国にあって大西洋沿岸に近く同国で 2 番目の大都市 Pointe-Noire 市の北方約 30km に位置する Diosso という小さな村の診療所に突如 1 日当たり 100 人以上の発熱患者が連日押しかけるという異常事態が発生した。その後、この感染爆発は瞬く間に全国へと拡大し、同年 5 月には少なく見積もっても 7,000 人以上の患者が報告されている。患者の多くが蚊に刺されたことを訴え、また症状から何らかの蚊媒介性 RNA ウイルス感染症が病因として疑われた。手持ちのデングウイルス NS1 抗原検出用 ICT の判定では、ほぼ全てが陰性。しかし、チクングニアウイルス (CHIKV) に対する IgM 抗体検出用の ICT を用いたところ、幾つかの検

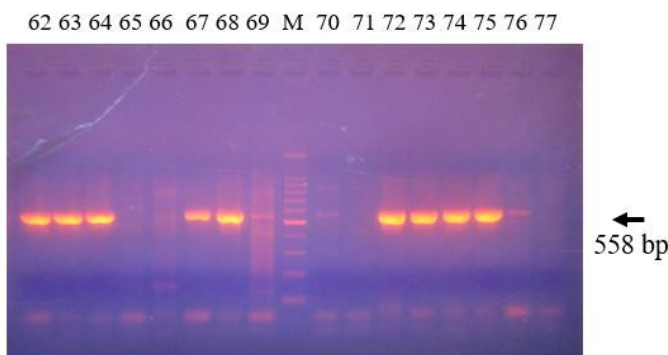


図 1 CHIKV の E2 領域の RT-PCR

体が陽性反応を示したことから(本報告書作成時点において CHIKV の抗原検出用の検査 kit は市販されていない)、同ウイルスが主要原因であろうと推定された。エンベロップ蛋白質の一つである E2 領域を検出できる One-Step RT-PCR を行ったところ、103 検体中 65 検体から 558 bp 長の陽性バンドが得られ診断は確定した。図 1 にその結果の一部を示す。

E2 の塩基配列情報を元に作成した分子系統樹を図 2 に示す。同国では 2011 年に最初の大規模なチクングニア熱の流行が記録されている。今回の流行はその系統の再燃ではなく、遺伝子配列的にはむしろ直前にアンゴラから報告された株に近縁性を示し、以前から中央アフリカー帯に存在していた系統であることが明らかとなった。もう一つのウイルスエンベロップ蛋白質 E1 にはヒトスジシマカに適應したアミノ酸変異として知られる A226V の変異が入っており、事実ほぼ同時期に現地周辺の蚊を採集したところ、ネッタイシマカの他に以前には見られなかったヒトスジシマカが半数近くを占めることが分かった。

MinION の解析には、短い DNA 断片よりもある程度長い鎖長の DNA 試料が解析に向いている。以前の常識では非常に長い PCR 産物を得ようとする PCR 反応が不完全になると考えられていた。しかし、最近では酵素の改良が進み、例えば ThermoFisher Scientific 社製の SuperScriptIII Platinum One-Step RT-PCR の kit を用いると 10kb 近くの PCR 産物を得ることが可能である。CHIKV のゲノム(約 12,000 base)をほぼ 2 等分にした 2 つの断片を 1 回のランで増幅することすら可能である。増幅された DNA 試料を Qiagen の Mini-PCR Purification kit で精製することにより、MinION (データ解析ソフトがプリインストールされている Mk1C)と Flongle の Flow Cell (図 3 に Flongle を装着した装置の写真を示す) に検体をアプライするのに十分な DNA 量(約 400 ng 前後)を容易に得ることが出来る。ちなみに本研究代表者は、コストと検体数を考慮して短時間にサンプル調整が完了する Rapid Sequencing kit を主に用いた。

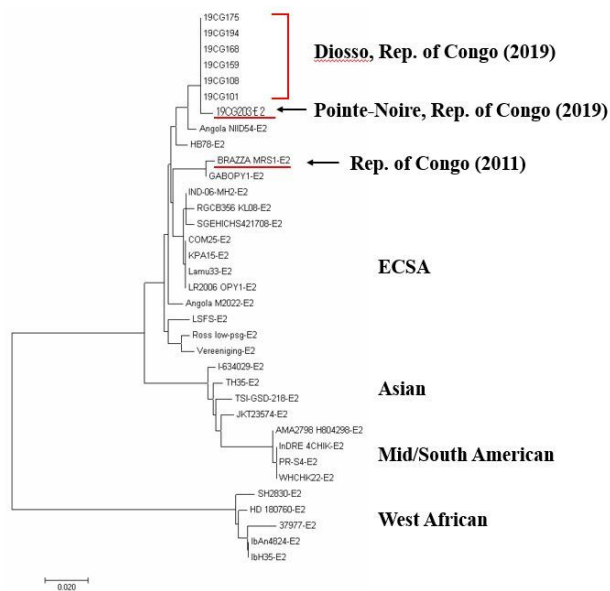


図 2 E2 配列から作成した分子系統樹



図 3 MinION の Mk1C 本体と Flongle

(2) コンゴ民主共和国で遭遇した 2 つのデング熱症例

2020 年 2 月、コンゴ民主共和国の首都 Kinshasa 市を訪問中に、2 名の若い邦人が発熱を訴え大使館の医務室を訪れるという事例に遭遇した。3 種類のデングウイルス (DENV) NS1 抗原検出用 ICT の結果はいずれも明瞭な陽性となり(図 4)、デング熱であることはほぼ確実と思われた。

また同ウイルスの C/PrM 領域を検出できる RT-PCR においても両者は陽性となり診断が確定した。ここでも MinION 解析用には長鎖の DNA の方が適しているため、全ゲノム(約 10,700 base)を 3 分割した One-Step RT-PCR の系を確立し、全ゲノムの配列情報を得ることに成功した。その結果、分子系統樹(図 8)から容易に読み取れるように、2 名が感染していたウイルスは、

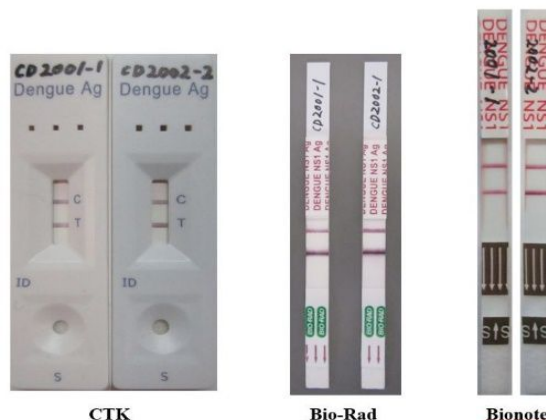


図 4 DENV NS1 抗原検出用 ICT

一つは2型で、もう一つは3型の血清型と相異なっていたことが明らかとなった(各々の株を CD2001 と CD2002 と命名)。なお、彼ら2名は全く別の団体に所属しており、首都近郊以外には移動したことはないということであった。

デング熱の場合、血清型が異なる株に再感染すると重症化することが知られている。これまで同国からなされた報告(数は極めて少ない)に拠ると常に1種類の血清型であったのに対し、今回初めて複数の血清型のウイルスがほぼ同時期に存在することが確認されたことから、デング出血熱の可能性があり得ることを意味するものであり、今後定期的な監視の強化が必要と考えられた。

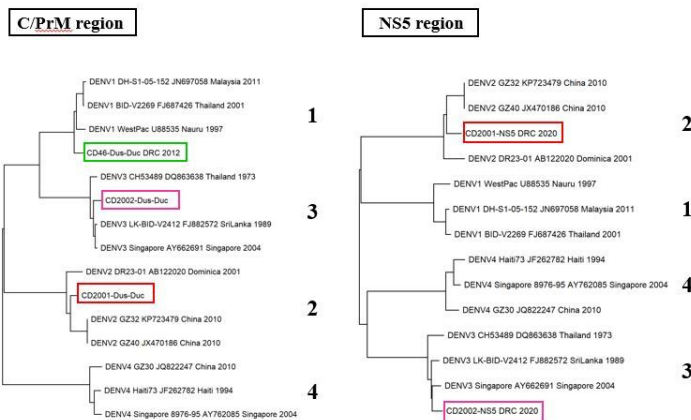


図5 DENVの2つの領域で作成した分子系統樹 [赤枠がCD2001で桃色枠がCD2002、緑枠は2012年にKinshasaで確認された株]

(3) 我が国で流行した種々の SARS-CoV-2 変異株の遺伝子解析

国内で新型コロナウイルスの感染が初めて確認されたのは患者Aで、年末から年始にかけて中国への渡航歴があり、武漢市滞在中に発熱、その後帰国して療養するも症状が軽快せず、最終的に診断がついたのが2020年1月15日である。その後にはクルーズ船のダイヤモンド・プリンセス号船内に多数の感染者が発生したことが明らかとなり、程なくヨーロッパなどからの帰国者を起点として国内の感染者が急激に増加した。

本研究代表者が所属する千葉大学の病院にも感染者受け入れの要請が高まり、同時に検査と遺伝子解析が必要となって来た。Real-time PCRなど診断のための検査については病院の検査部が主体となって対応に当たったが、変異の確認など主にウイルス学的研究の視点から必然的に新型コロナウイルスにも関わることとなった。

具体的には、感受性のVERO/TMPRSS2細胞を用いた培養による臨床検体からのウイルス分離や分離したウイルスの遺伝子解析である。詳細は省くが、国立感染症研究所が推奨する幾つかのPCR検出系とは別に、変異株をいち早く見つける方法としてSpike蛋白質遺伝子全域(約4kb)を丸ごと増幅出来る下記のPrimer setを用いたRT-PCRの系など多数の実験系を確立した(図6のAでは明瞭な4kbの産物が見られる)。

CoV-21421-F
GGGGTACTGCTGTTATGTCTTTAAAAGAAGG
CoV-25423-R
GATTCACCTTGCTTCAAAGTTACAGTTCC

使用酵素は先に述べたSuperScriptIII Platinumで、この方法により原株やD614G変異株は勿論、変異株から変異株、更にはOmicronのBA.2系統株まで、Ct値が低い検体ならば鼻拭い液から直接に、Ct値が高い場合にはウイルス分離をした後の培養上清を出発材料として、確実に1回のOne-Step RT-PCRで解析に十分なDNAを得ることが出来る。これは、変異株の種類に拠らずそのまま直ちにMinIONの解析に持って行くことが出来るため大変便利な検出系となった。

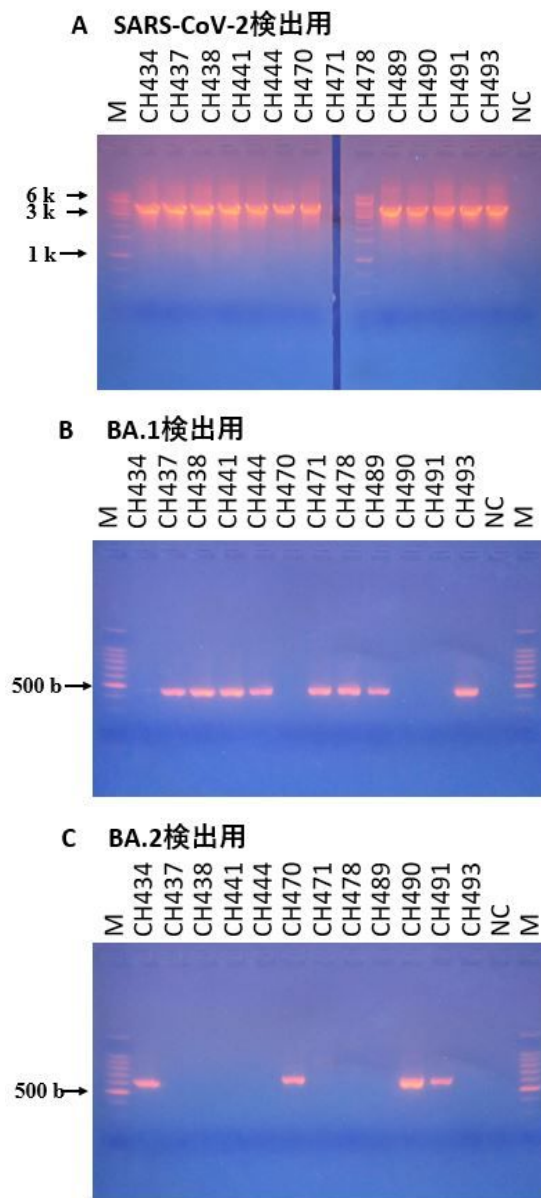


図6 BA系統を判別できるRT-PCR

2022年1月以降になると、それまでの株に代わって Omicron 株の BA.1 系統が主流となり、3月に入ると BA.2 系統がそれに取り替わるようになった。それぞれを配列分析すれば無論株の系統を明らかにすることが出来るのであるが、Omicron 株になると Spike 蛋白質の N-terminal domain 遺伝子領域に各系統に共通で、かつ特徴的な 3 塩基から 9 塩基の遺伝子欠失や挿入が見られる(図 7 を参照)。

Species/Abbrev	Genetic Sequence
1. MN908947.3_Severe_acute_respiratory_syndrome_coronavirus_2_isolate_Wuhan-Hu-1_complete_genome	...T A T T C T A A G C A C G C C C T A T T A A T T T A G T G C G T... G A T C T C C C T C A G G G T T T T T C G G
2. hCoV-19/USMIL-CDC-STM-ENE92F73A/2022/IEPI_ISL_12712014 2022-05-02-BA.4	...T A T T C T A A G C A C G C C C T A T T A A T T T A G G C G T... G A T C T C C C T C A G G G T T T T T C G G
3. hCoV-19/Israel/CVL-8007096/2022/IEPI_ISL_12742008 2022-05-10-BA.4	...T A T T C T A A G C A C G C C C T A T T A A T T T A G G C G T... G A T C T C C C T C A G G G T T T T T C G G
4. hCoV-19/South_Africa/NCV1196/2022/IEPI_ISL_12474478 2022-04-14-BA.4	...T A T T C T A A G C A C G C C C T A T T A A T T T A G G C G T... G A T C T C C C T C A G G G T T T T T C G G
5. hCoV-19/Spain/GA-CHUVI-19542094/2022/IEPI_ISL_12727048 2022-05-07-BA.5	...T A T T C T A A G C A C G C C C T A T T A A T T T A G G C G T... G A T C T C C C T C A G G G T T T T T C G G
6. hCoV-19/US/CA-CDC-STM-S54F/HRN3/2022/IEPI_ISL_12300640 2022-04-11-BA.5	...T A T T C T A A G C A C G C C C T A T T A A T T T A G G C G T... G A T C T C C C T C A G G G T T T T T C G G
7. hCoV-19/South_Africa/NCID-N3947/2022/IEPI_ISL_12477010 2022-04-05-BA.5	...T A T T C T A A G C A C G C C C T A T T A A T T T A G G C G T... G A T C T C C C T C A G G G T T T T T C G G
8. hCoV-19/Denmark/DCG-422289/2022/IEPI_ISL_11029017 2022-01-20-BA.1	...T A T T C T A A G C A C G C C C T A T T A A T T T A G G C G T... T A G T G C G T G A G C C A G A G A T C C C C T C G G T T T T C G G
9. hCoV-19/Japan/YCH1234/2022/IEPI_ISL_11050908 2022-03-09-BA.1	...T A T T C T A A G C A C G C C C T A T T A A T T T A G G C G T... T A G T G C G T G A G C C A G A G A T C C C C T C G G T T T T C G G
10. hCoV-19/US/ATX-BSWT/Emple-ILL-R38-0007/2022/IEPI_ISL_11048773 2022-02-24-BA.1.1	...T A T T C T A A G C A C G C C C T A T T A A T T T A G G C G T... T A G T G C G T G A G C C A G A G A T C C C C T C G G T T T T C G G
11. hCoV-19/Japan/RMD06005/2022/IEPI_ISL_11020053 2022-01-21-BA.1.1.5	...T A T T C T A A G C A C G C C C T A T T A A T T T A G G C G T... T A G T G C G T G A G C C A G A G A T C C C C T C G G T T T T C G G
12. hCoV-19/Japan/YCH1209/2022/IEPI_ISL_11018131 2022-03-01-BA.2.1.0	...T A T T C T A A G C A C G C C C T A T T A A T T T A G G C G T... G A T C T C C C T C A G G G T T T T T C G G
13. hCoV-19/Japan/PG-198989/2022/IEPI_ISL_10882502 2022-01-15-BA.2.3	...T A T T C T A A G C A C G C C C T A T T A A T T T A G G C G T... G A T C T C C C T C A G G G T T T T T C G G
14. hCoV-19/Japan/PG-200033/2022/IEPI_ISL_10849150 2022-01-10-BA.2.3	...T A T T C T A A G C A C G C C C T A T T A A T T T A G G C G T... G A T C T C C C T C A G G G T T T T T C G G
15. hCoV-19/Japan/PG-194979/2022/IEPI_ISL_10682460 2022-02-03-BA.2.3.1	...T A T T C T A A G C A C G C C C T A T T A A T T T A G G C G T... G A T C T C C C T C A G G G T T T T T C G G
16. hCoV-19/Germany/BY-RK41-593434/2022/IEPI_ISL_10910936 2022-02-09-BA.3	...T A T T C T A A G C A C G C C C T A T T A A T T T A G G C G T... G A T C T C C C T C A G G G T T T T T C G G
17. hCoV-19/South_Africa/NCID-N30497/2021/IEPI_ISL_10667188 2021-12-07-BA.3	...T A T T C T A A G C A C G C C C T A T T A A T T T A G G C G T... G A T C T C C C T C A G G G T T T T T C G G
18. hCoV-19/Netherlands/NH-ALJMC-004171/2022/IEPI_ISL_10925486 2022-02-23-BA.3.1	...T A T T C T A A G C A C G C C C T A T T A A T T T A G G C G T... T A G T G C G T... G A T C T C C C T C A G G G T T T T T C G G

図 7 Omicron 変異株の BA.1 系統から最新の BA.5 系統の Spike 遺伝子の核酸配列の一部 [22,200 番目近傍の塩基配列を示す]

それまでも 変異株などでアミノ酸残基の欠失などは見られていたが、2~3 個のアミノ酸が消失、または追加するのであるから分子構造も大きく変わる筈である。こうした塩基の欠失や挿入部分に着目して、それにピッタリ対応するよう 2 対の Primer set を設計したところ、PCR 産物の有無だけで BA.1 系統か BA.2 系統かを判別することが可能である(図 6 の B と C)。この判別が正しいことは、実際に配列分析することで確認された。なお千葉大学でウイルス分離がなされ、遺伝子解析された株と既知の株などから作成された分子系統樹を図 8 に示した。

- CoV-21746-Omi-F
 GTTACTTGGTTCATGTTATCTC
 CoV-22205-Omi-R
 CCCTGAGGGAGATCTTCTGGCTC
- CoV-21614-Omi-BA2-F
 CTTATAACCACTCAATCATAAC
 CoV-22259-Omi-BA2-R
 CCGAAAAACCCTGAGGGAGATCACGCC

以上、本研究によって病原体に関してある程度事前の見当がついている場合には、最適な Primer set と kit を用いることにより、MinION の能力を最大に発揮させる実例を幾つか示すことが出来たものと考えられる。今回は RNA を DNA にして解析したが、Oxford Nanopore Technology 社では RNA を direct に解析出来る kit も提供開始している。RNA の直接解析による病原体診断や、そもそも全くの予備情報が無い未知病原体に対する解析が次の課題として残されている。

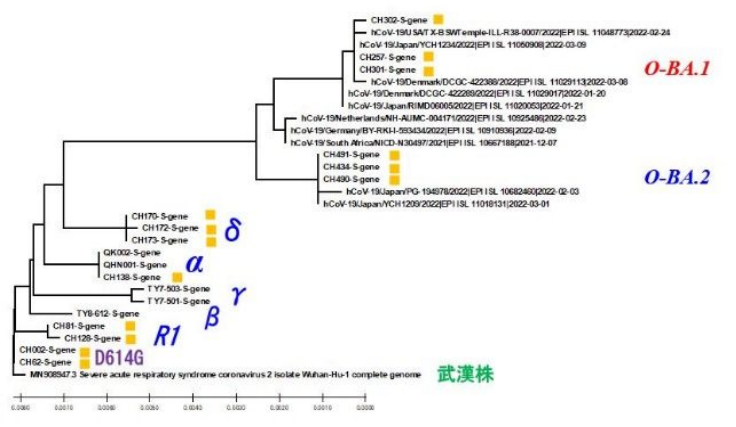


図 8 千葉大学で分離された様々な SARS-CoV-2 変異株の Spike 遺伝子配列から作成した分子系統樹 [■ 千葉大学で分離した株]

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 井戸 栄治, 齋藤 謙悟, 尾野本 浩司, 米山 光俊, 小川 知子, 白澤 浩.
2. 発表標題 高ウイルス量の新型コロナウイルスに対して増殖抑制効果のある3剤混合の組み合わせ - 新規抗ウイルス薬カクテル療法の可能性.
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井戸 栄治, 浅川 俊, Steve Ahuka, Stomy Karhemere, Jean Jacques Muyembe Tamfum.
2. 発表標題 2020年2月にコンゴ民主共和国からほぼ同時期に分離された血清型が 相異なる 2 つのデングウイルス株の全ゲノム遺伝子解析.
3. 学会等名 第27回トガ・フラビ・ベスチウイルス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ido E, Taty-Taty R, Portella C, Bitsindou P, Ndinga E, Kouraogo T, Gislain A, Guimbi C, Saito K, Shirasawa H.
2. 発表標題 Molecular epidemiology of chikungunya outbreak in Republic of Congo in 2019 and its correlation with the invasion of Aedes albopictus into the country.
3. 学会等名 3rd International Conference on Zika Virus and Aedes Related Infections (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ido E, Asakawa S, Ahuka S, Karhemere S, Saito K, Ogawa T, Shirasawa H, Muyembe JJ.
2. 発表標題 Two different serotypes of dengue virus were almost simultaneously identified in early 2020 in Democratic Republic of Congo.
3. 学会等名 Joint Congress on Global Health 2020 in Osaka
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
コンゴ共和国	Cabinet du Dr Raphael Taty Taty	Ministry of Health	WHO/Congo	
コンゴ民主共和国	National Institute of Biomed Res			