

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：33910

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670219

研究課題名(和文) ヒトへの感染力の強い高病原性鳥インフルエンザウイルスの監視デバイスの開発

研究課題名(英文) Development of a device for the surveillance of the mutated highly pathogenic influenza viruses which acquired human-type receptor binding specificity

研究代表者

鈴木 康夫 (SUZUKI, Yasuo)

中部大学・生命健康科学部・教授

研究者番号：00046278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)のヒト適応変異をウイルス受容体への結合性の変化として簡便且つ高精度に捉える新イムノクロマトデバイスを構築した。本デバイスは、ヒトおよび動物に対して非侵襲的であり、軽量(5グラム以下)、小型(最大長：15 cm以下)、高速(全ての反応が30分以内で終了)、高精度(従来のELISAを基盤とするアッセイの結果と変わらない)であり、実際にエジプト、ベトナム、インドネシアで分離された株での実用性が確認された。これにより、ヒト適応変異H5N1の発生を国際的に監視するシステムの基盤構築が可能となった。

研究成果の概要(英文)：We developed a Novel Immunochromatographic device for Easy-to-use detection of highly pathogenic avian Influenza viruses (H5N1) with acquired human-type receptor binding specificity. This device is non-invasive for human and animal, light (less than 5gram), small (less than 15cm) and can be completed in 30min and do not require special equipment or skills, thereby avoiding some disadvantages of current methods (ELISA) for analyzing influenza virus receptor binding specificity. We confirmed its practicability using native virus isolated in Egypt, Vietnam and Indonesia. The device developed in this study can be used for the international surveillance system for human adapted H5N1 mutants in the field.

研究分野：ウイルス学、生化学

キーワード：インフルエンザウイルス 高病原性鳥インフルエンザウイルス デバイス ヒト 監視 鳥 変異 シアル酸

1. 研究開始当初の背景

これまでの記録されているインフルエンザ世界流行は、何れも鳥インフルエンザウイルスが変異して(ブタなどの中間宿主を介する場合もある)ヒト間伝播能力を獲得した事が原因である。そこで、この変異を事前に監視し、感染防疫体制を確立することが、長い間、国際的に切望されてきた。しかし、その日常的監視技術は未開発であった。高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1亜型、以下H5N1と略)は、1997年香港で歴史上初めてニワトリ ヒト伝播(18人感染6人死亡)が起こって以来、ヒトへの伝播は、現在、世界16ヶ国に広がった(840人感染、447人死亡、致死率約60%、5月1日、2015年、WHO)。今のところ、ヒト-ヒト感染は限定的だが、家族内感染は起こっている。仮に本ウイルスが、高病原性を維持しつつ、ヒト間伝播を可能とする変異を遂げ、パンデミック発生の場合、人類の健康のみならず社会的、経済的損失は計り知れない。よってこの変異ウイルスの早期検出、封じ込めは、極めて重要である。本研究では、この新型変異ウイルスの高感度簡易診断技術の開発に挑戦し(世界初)パンデミック発生を阻止する国際的協力体制を構築する。1)我々はH5N1のヒト適応性変異の第一段階は、ウイルスの宿主レセプター(シアロ糖鎖)への結合特異性が、鳥が持つ鳥型レセプター(Siaα2-3Galβ1-4GlcNAc 1-)への結合性からヒトの上気道に存在するヒト型レセプター(Siaα2-6Galβ1-4GlcNAc 1-)への結合性に変わる事であることを見出してきた(J. Biol. Chem., 1985, 1986; J. Virol., 2000; Nature, 2004, 2005)。2)これまでのH5N1の変異監視は、抗原変異、遺伝子変異のみであり、この方法では、ヒトへの適応性獲得フェノタイプ変異(ヒトの喉、上気道、肺などの呼吸器に存在するヒト型レセプターシアロ糖鎖へ結合性獲得変異)は、監視出来なかった。申請者らはそれを可能とする「基本技術」を開発した(Nature, 2006)。3)それにより、ヒト型レセプター結合性変異株(中国、ベトナム、タイ、エジプト分離株)を発見し、H5N1は、確実にヒトへの適応性を獲得する変異を遂げつつあることを明らかにしてきた(J. Virol., 2005, J. Virol., 2007; Nature, 2006, 2012; PLoS Pathogens, 2011; mBio, 2015)。さらに、4)H5N1ウイルスヘマグルチニン(HA)スパイクの4つのアミノ酸置換変異がフェレット(インフルエンザのヒトモデル動物)間飛沫感染を可能にすることを先駆的に明らかにした(Nature, 2012)。しかもこの変異は、遺伝子や抗原変異監視では、決して検出できず、ヒト上気道に存在するヒト型レセプターシアロ糖鎖(Siaα2-6Gal)への結合変異の監視が必須であることを明らかにした。5)今回、成果を得たH5N1の

ヒト適応変異診断デバイスは、申請者らの上記、基礎研究実績から生まれた日本独自の世界初の応用研究であり、これまで不可能であった高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)のヒトへの適応性フェノタイプ獲得変異(ヒト型レセプターシアロ糖鎖結合性獲得変異)監視を初めて可能とするものである。

2. 研究の目的

本研究では、下記の3つに研究項目に焦点を絞り、これを達成することを目的とした。

- A) 高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)のヒト型レセプター適応変異診断プロトタイプデバイスの構築
- B) 試作デバイスの実用性評価(阪大・微研・生田和良教授、渡邊洋平助教、エジプトアレキサンドリア大と連携)。
- C) 本診断・監視技術の評価を国際規模で行う基本システムの構築。

すなわち、平成25年~26年度の2年間で、H5N1発生開発途上国でも使用可能な、軽量(5グラム以下)、迅速(検出全行程、15分以下)、高感度(2^{3-4} HAU)、高額な測定機器不要(目視、開発途上国でも使用可能)、高精度(鳥H5N1ウイルス、鳥およびヒト型両レセプター結合変異株(中間型)、ヒト型レセプターのみ結合変異株(ヒト型)の3株を識別検出)な「H5N1のヒト適応変異監視デバイス」を開発し、実際に、鳥ヒトへH5N1の伝播が発生しているが、不特定多数ヒト間伝播は未発生の国(エジプト、インドネシアなど)で実用的に使用可能な「体制基盤」を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

具体的に下記3つ(A,B,C)の研究方法で行った。項目A)ヒト型レセプター適応変異診断プロトタイプデバイスの構築、その改良(平成25年度、26年度前半)。項目B)試作デバイスの実用性評価(阪大・微研と連携(平成26年度)。項目C)本診断・監視技術の評価を国際規模で行う基本システムの構築(阪大・微研、エジプトアレキサンドリア大(阪大経由)、ベトナムNIHE、インドネシアイルランガ大などと連携、平成26年度)。すなわち、

(1)項目Aに関して:遺伝子解析や抗原性変異解析のみでは感知できない、H5N1の鳥ヒト宿主域の変異(フェノタイプ変異:鳥型シアロ糖鎖レセプター「Sia 2-3Gal 1-4GlcNAc 1-(鳥型レセプターまたは2-3と略)」からヒト型受容体「(Sia 2-6Gal 1-4GlcNAc 1-(ヒト型レセプターまたは2-6と略)」)結合能力獲得変異を高感度(ウイルスのHA力価として 2^5 HAU以下)・短時間(15分以内)で検出する小型装置(イムノクロマトを原理と

するデバイス)を構築した。既に、申請者らは、「鳥、ヒトインフルエンザウイルスが特異的に結合できる2種の異なる人工ポリマー：Sia 2-3(または2-6)

Gal 1-4GlcNAc 1-spacer-グルタミン酸ポリマー」の化学合成に成功し、これを96穴プレートに固相化し、鳥型およびヒト型ウイルスを分別して測定出来る基本材料を考案した。本研究では、この基本材料を改良し、さらに、高感度、高特異性、簡便なイムノクロマトを基盤とするプロトタイプデバイスを構築した。

(2)項目Bに関して：上記プロトタイプデバイスと天然の高病原性H5N1分離ウイルス(エジプト分離株を用いた)を用いて装置の有用性を評価し、より高感度、高特異性を持つものへと改良した(BSL3施設を有する大阪大・生田和良教授、渡邊洋平助教と連携した)。発生国(アジア、アフリカ)の多くは発展途上国であり、高性能機器を保有していない。そこで、敢えて高価な機器を用いず安全・簡便に測定出来る材料を構築した。本技術により、鳥型H5N1ウイルス(鳥型レセプター、2-3のみへ結合する)ヒトヒト間伝播能力を獲得した変異ヒト型H5N1ウイルス(ヒト気道上部に存在するヒト型レセプター、2-6のみへ結合)さらに鳥ヒトへの伝播能力を獲得した変異H5N1ウイルス(ヒト適応H5N1ウイルス、ヒト-鳥両型ウイルス)(ヒト気道上部に存在するヒト型レセプター、2-6、および鳥が持つ鳥型レセプター、2-3の両方へ結合する)の3種のウイルスが同時に識別診断可能となるデバイスを構築した。これにより、パンデミックへの移行を段階的に把握可能とし、世界流行発生予知が可能となる。

(3)項目Cに関して：本監視技術の評価を国内、国際規模で行うシステムを構築した。H5N1ウイルスを扱える大阪大学(生田和良教授)国立感染研との連携構築を進めた。さらに、J-GRID・感染症研究国際ネットワークを介して、エジプト、インドネシア、ベトナムの国立研究所、大学と連携研究を進めた。

4. 研究成果

(1)イムノクロマトを原理とする高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)のヒト適応変異診断デバイス(プロトタイプ)の開発
先ず、遺伝子解析のみでは感知できない、H5N1のトリヒト宿主域の変異(変異のフェノタイプ：すなわち、新型インフルエンザの発生に伴うレセプター認識特異性変異)を高感度且つ簡便にサーベイする材料を構築した。我々は、既に、「鳥、ヒトインフルエンザウイルスが特異的に結合できる2種の異なる人工ポリマー：Neu5Ac 2-3(または6)Gal 1-4GlcNAc 1-グルタミン酸ポリマー」を化学合成し、これを96穴プレートに

固相化し、鳥型およびヒト型ウイルスを分別してELISAを基盤として測定出来る基本材料を考案した。本研究では、この基本材料を、さらに、高感度、高特異性、簡便な材料(イムノクロマトを利用する材料)に改良した。具体的には、化学合成したウイルスレセプターシアロ糖鎖(ヒト型：Neu5Ac 2-6Gal 1-4GlcNAc 1-;鳥型：Neu5Ac 2-3Gal 1-4GlcNAc 1-)をビーズ等の担体に結合させ、これにウイルス検体を結合させ、そのウイルスをH5N1抗体とヒト型、鳥型糖鎖を特異的に識別・結合できるレクチンを塗布したストリップ上に展開し、ヒト型、鳥型レセプター認識H5N1ウイルスを特異的に識別検出させるデバイスを試作した。これら一連の実験により、材料キットのプロトタイプを完成させた。今回、実用性が確認されたのち高病原性H5N1を実際に用いてその有用性を評価した。この場合、P3施設を有する大阪大・微生物病研究所の生田和良教授、渡邊洋平助教との共同研究体制を構築し、発生国(特に今回は、ここ数年、最も鳥ヒトへの感染が頻繁に起こり死者も急速に増えているエジプト)における高病原性鳥インフルエンザウイルスH5N1分離株を用いた。具体的には、ラテックスポリマー(ビーズ)に、今回、化学合成した高病原性鳥インフルエンザウイルスのレセプターシアロ糖鎖(Neu5Ac 2-3Gal)(青色ビーズに結合させる)または、ヒト間で流行するインフルエンザウイルス(高病原性鳥インフルエンザウイルスが変異してヒト-ヒト感染可能となったウイルス)のレセプターシアロ糖鎖(Neu5Ac 2-6Gal)(赤色ビーズに結合)を結合させ、それを予め、H5N1ウイルスと反応させる。この時、高病原性鳥インフルエンザウイルスは青色ビーズに結合し、ヒト型へ変異したウイルスは赤色ビーズへ結合する。それをイムノクロマトの担体(ストリップ)上で毛管現象により展開し、予め、ビーズに結合したH5N1ウイルスの抗体によりウイルスと結合したビーズを捕捉する。これにより、被検ウイルスがヒト型のレセプターへ結合する変異体であった場合は、赤色ビーズが捕捉され、赤色のバンドがイムノクロマトストリップ上に現れる。バンドが青色であれば、鳥レセプターを認識するウイルスであることが目視で判別できる。H5ウイルスでなく、季節性のインフルエンザウイルス(H1N1やH3N2亜型)の場合は、抗体と反応しないのでバンドは現れない。反応系が問題なく進んでいるか否かは、対照においたレクチンとの反応性を調べることによりモニターする。赤色、青色のバンドは目視により容易に判別できる。そのため、高額な測定機器は必要無く、発展途上の発生国でも利用可能な軽量(5グラム以下)安価、簡便、高速検知可能(15分以内で検出可能)なデバイスとなる。今回構築したイムノクロマトの装置(プロトタイプ)を図1に示す。

Device 構成 (2: テストストリップ)

テストストリップ(断面図)

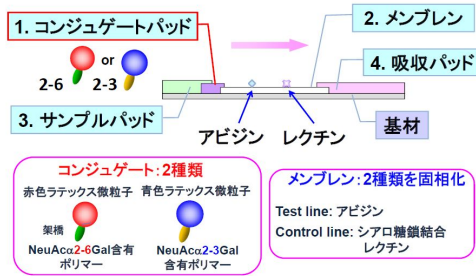


図1 H5N1 鳥ウイルスのヒトレセプター結合性獲得変異を高速、簡便に監視するイムノクロマトを原理とするデバイスの構築

(2) イムノクロマトを原理とする高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)のヒト適応変異診断デバイスによる簡便操作法の開発

本研究では、本デバイスが、発展途上国で、高額な機器が使えない場所でも適用可能な簡便操作法を開発した。本プロトタイプは、5グラム以下、最大長さ15cm以下であり、軽量、小型であるため、自由に運搬が可能である。操作法は、鳥インフルエンザ H5N1 ウイルス(赤血球凝集力価として 2^7 HAU)を含む被検液を10ul、ビオチン化抗ヘマグルチニン抗体(C179抗体、本抗体は、H5以外にH1, H2, H6にも反応する)を含む展開液を3滴、イムノクロマトストリップに滴下することにより15分以内に特異的にヒト型受容体結合変異が高感度に目視検出可能であるように調製した。これにより、高額な機器を用いずとも、世界初の簡便且つ高精度な高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)のヒト適応変異診断デバイスによる簡便操作法を開発した(図2)。

Device 構成 (1: 展開液)

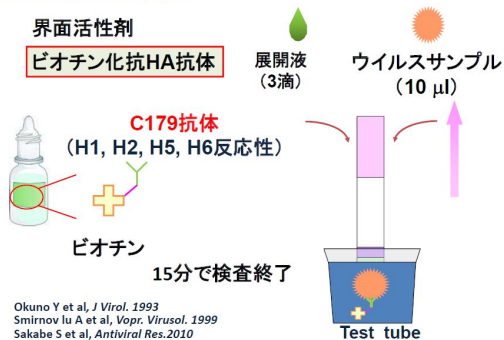


図2 デバイスの構成

判定方法を図3に示す。被検試料(H5N1 亜型ウイルス)が鳥型レセプターに結合する場合は、ストリップ上に青色のバンドのみが、ヒト型レセプターへ結合出来る変異を遂げている場合は赤色のバンドのみが現れる。被検試料が鳥型、ヒト型両方のレセプターへ結合する場合は、赤色、青色の両方のバンドが現

れる。以上により、明確に高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)がヒト型レセプターへの結合性を獲得したか否かを簡便に判定可能であった。

判定方法

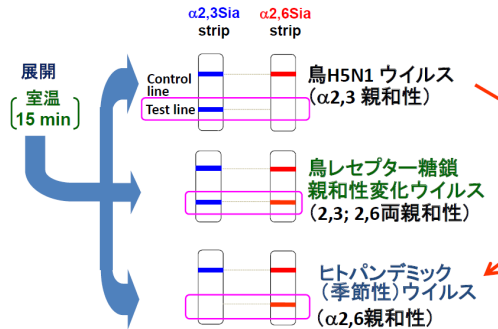


図3 鳥およびヒト型レセプター結合特異性を監視する判定方法

(3) イムノクロマトを原理とする高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)のヒト適応変異診断デバイスによる、実際にヒトへ伝播が頻繁に起こっているエジプト、ベトナムおよびインドネシア分離株を用いた実用性の評価

エジプトでは、2006年以降、H5N1 ウイルスのヒトへの伝播が頻繁に起こりはじめ、2012年まで、インドネシアに次ぐ死者、感染者が発生している。我々は、大阪大学微生物病研究所と共同でエジプトにおけるニワトリ、ヒトからの H5N1 分離株を用いて、ヒト型レセプターへの結合性が起こっているか否かを我々が開発し、使ってきたELISAを基盤とするアッセイ法で調べた。その結果、ニワトリやヒトから分離された株の中に、ヒト型レセプターに結合する変異株を発見した(5)。今回、ELISA法よりも簡便、高速なイムノクロマトを原理とするアッセイデバイスを用いて、分離株の濃度を変化させ、各々の濃度における特異性を評価した(図4、5)。その結果、鳥型レセプター($2-3$ Sia)のみに結合する

結果

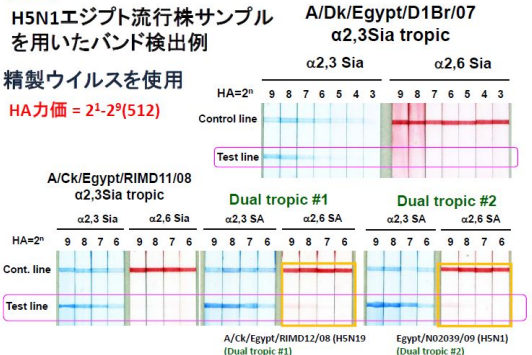


図4 今回開発されたデバイスによるエジプトで分離された高病原性鳥インフルエ

ンザウイルス(H5N1)の鳥およびヒト型レセプターへの結合性評価

A/Dk/Egypt/D1Br/07 (H5N1) および A/Ck/Egypt/RIMD11/08 (H5N1、野生株) ($\alpha 2,3$ Sia tropic) は、本法でも全く同様に鳥型レセプター ($\alpha 2-3\text{Sia}$) のみに結合した。一方、ヒト型レセプターにも結合するようになった A/Ck/Egypt/RIMD11/08 (H5N1) の変異株 (Dual tropic #1, #2) は、本法でも鳥 ($\alpha 2-3\text{Sia}$) およびヒト型レセプター ($\alpha 2-6\text{Sia}$) の両方に結合性を示す発見した。図4の目視判定結果を +、- で表したものを図5に示した。これにより、ウイルスの濃度は、赤血球凝集単位として $2^2 \sim 2^7$ HAU の範囲で測定可能であることが判明した。

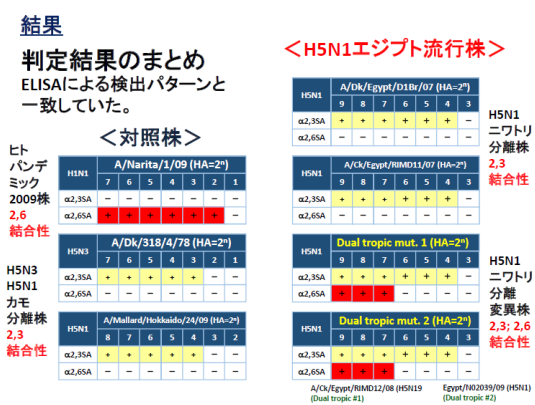


図5 図4で得られた結果の +、- 表示による結果

このデバイスを、ベトナム NIHE、およびインドネシアのアイランガ大学との連携で、当地で分離された H5N1 株、それぞれ、26 株、7 株につきヒト型レセプターへの結合性を調べたが、全て鳥型であり、ヒト型レセプターへの結合性を獲得した変異株はこれまで見つかっていない。本デバイスは、H5N1 ウイルスのヒトへの適応性獲得フェノタイプ (表現型) 変異 (H5N1 がヒト型レセプターシア口糖鎖 (Sia 2-6Gal 1-4GlcNAc 1- への結合性を獲得する変異) をウイルスヘマグルチニンとその宿主細胞受容体シア口糖鎖 (生体成分・生理活性分子) との分子間相互作用として捉えるものである。この基本技術は、申請者らが先駆的・継続的 (20 年以上に渡る) に開拓してきたもので、真に独創的である。本研究により開発されたデバイスは、今後、世界初の鳥インフルエンザウイルスのヒト適応性変異 (ヒト型レセプター結合性変異) 獲得を高速、簡便、高性能に監視する有用な道具として、グローバルな利用を可能とするものである。

5 . 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計 6 件)
鈴木康夫: インフルエンザウイルスのシア口糖鎖生物学 - 鳥インフルエンザウイルスのヒト適応性変異の分子基盤 - 生化学査読有, 87 巻, 348-361 (2015), DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870348. Y.Watanabe, T. Ito, M.S. Ibrahim, Y. Suzuki, et al: A novel immunochromatographic system for easy-to-use detection of group 1 avian influenza viruses with acquired human-type receptor binding specificity. Biosensors and Bioelectronics, 査読有, 65, 211-219 (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.10.036.
Guojun Wang, Guohua Deng, Jianzhong Shi, Weiyu Luo, Guoquan Zhang, Qianyi Zhang, Liling Liu, Yongping Jiang, Chengjun Li, Nongluk Sriwilaijaroen, Hiroaki Hiramatsu, Yasuo Suzuki, Yoshihiro Kawaoka, Hualan Chen: H6 influenza viruses pose a potential threat to human health. J. Virol., 査読有, 88 3953-3964 (2014). DOI: 10.1128/JVI.03292-13.
Xuyong Li, Jianzhong Shi, Jing Guo, Guohua Deng, Qianyi Zhang, Jinliang Wang, Xijun He, Keicheng Wang, Jiming Chen, Yuanyuan Li, Jun Fan, Huiui Kong, Chunyang Gu, Yuantao Guan, Yasuo Suzuki, Yoshihiro Kawaoka, Liling Liu, Yongping Jiang, Guobin Tian, Yanbing Li, Zhigao Bu, Hualan Chen: Genetics, receptor binding property, and transmissibility in mammals of naturally isolated H9N2 Avian Influenza viruses. PLoS Pathogens, 査読有, Vol. 10, issue 11, e-1004508 (2014), DOI: 10.1371/journal.ppat.1004508.
N. Onsirisakul, S. Nakakita, C. Boonarkart, A. Kongchanagul, O. Suptawiwat, P. Puthavathana, K. Chaichuen, K. Kittinyom, Y. Suzuki, P. Auewarakul: Substrate specificity of avian Influenza H5N1 neuraminidase. World Journal of Virology, 査読有, 3, 30-36 (2014), DOI: 10.5501/wjv.v3.i4.30.
Tadanobu Takahashi, Tatsuya Kawakami, Takashi Mizuno, Akira Minami, Yuko Uchida, Takehiko Saito, Shigeyuki Matsui, Makoto Ogata, Taichi Usui, Nongluk Sriwilaijaroen, Hiroaki Hiramatsu, Yasuo Suzuki, Takashi Suzuki: Sensitive and Direct Detection of Receptor Binding Specificity of Highly Pathogenic Avian Influenza A virus in Clinical Samples. PLoS ONE, 査読有, 8 (10): e78125 (2013), DOI: 10.1371/journal.pone.0078125.

〔学会発表〕(計2件)

Kawahara, T., Suzuki, Y., Tamada, A., Sriwilaijaroen, N., Matsumoto, K.: Spreading of influenza virus in north Africa and southeast Asia. 5th Asia-Arab Sustainable Energy, May 10-13, 2015 University of Tsukuba, Japan.

鈴木康夫: 高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒトへの適応性獲得の分子基盤、日本神経ウイルス研究会、2014年6月20日～2014年6月21日、アクトシティ浜松・研修交流センター(静岡県浜松市)

〔図書〕(計3件)

Nongluk Sriwilaijaroen, Yasuo Suzuki: Molecular Basis of a Pandemic of Avian-type Influenza Virus. Methods and Protocols, Part 4, Chapter 38: Overview. "Lectins"/Methods in Molecular Biology (Humana Press), 447-480 (2014). Nongluk Sriwilaijaroen, Yasuo Suzuki: A Simple Viral Neuraminidase-based Detection for High-throughput Screening of Viral Hemagglutinin-host Receptor Specificity. Chapter 10. "Lectins"/Methods in Molecular Biology (Humana Press), 107-120 (2014).

鈴木康夫: インフルエンザパンデミックプラン 持続可能な社会をめざして「未来」をつくる ESD pp.70-71、飯吉厚夫、稲崎一郎、福井弘道 [編]「持続可能な開発のための教育 (ESD) に関するユネスコ世界会議」2014年11月日本開催記念、平凡社 2014年9月17日 初版第一刷

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 康夫 (SUZUKI, Yasuo)
中部大学・生命健康科学部・教授
研究者番号: 00046278