

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670267

研究課題名(和文) 非構造蛋白質の機能性ドメインに着目したフラビウイルス感染症迅速鑑別診断法の開発

研究課題名(英文) Development of a rapid diagnostic system for flavivirus infections focussing on the functional domains of non-structural proteins.

研究代表者

井戸 栄治 (Ido, Eiji)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：70183176

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)：デング熱、ウエストナイル熱、黄熱など蚊で媒介されるウイルス性疾患は、互いに症状も似ており、しかも血清学的に交叉を示すことから、免疫学的検査のみによって診断を下すことは困難である。本研究では、これらフラビウイルス感染症を、1回の検査で迅速に鑑別できる遺伝子診断法を開発することを目的とした。データベース上の配列情報を精査した結果、ウイルス増殖に必須なメチルトランスフェラーゼとRNAポリメラーゼをコードしている非構造蛋白質NS5遺伝子内に共通プライマーを設定したRT-PCRにより各ウイルス群が明確に判別できることを見出し、実際に少なくともデングウイルスの4つの血清型が鑑別診断できることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Mosquito-borne flavivirus infections such as dengue fever, West Nile fever, and yellow fever etc. exhibit clinically similar symptoms. Besides, they are sometimes serologically cross-reactive, Therefore, it was very difficult to diagnose them only by conventional immunological tests. This study aimed at developing a rapid diagnostic system by a single universal genetic test. By scrutinizing the whole viral genomic sequences on database, we have found that part of their viral non-structural NS5 genes coding a methyltransferase and an RNA polymerase essential for viral replication would be able to differentiate the respective flavivirus species and that actually the RT-PCR by use of a set of universal primers on the concerned NS5 region clearly can tell at least 4 different serotypes of dengue viruses.

研究分野：ウイルス学

キーワード：フラビウイルス デング熱 ウエストナイル熱 黄熱病 鑑別診断

1. 研究開始当初の背景

(1) 2014年の8月から9月にかけて東京の代々木公園周辺を発生源として我が国に70年振りにデング熱が国内感染として報告されたことを好例として、近年、それまで熱帯や亜熱帯地域に限定的に発生すると考えられていた蚊媒介性ウイルス性疾患が温帯地域でも発生する現象が国内に留まらず地球規模で起こっている。地球温暖化によって蚊など媒介昆虫の生息域が拡大しつつあること、航空機網の発達などによりグローバルレベルでの激しい人や物資の激しい移動が、益々その確率を増大させているのではないかと思われる。蚊で媒介されるデング熱、ウエストナイル熱、黄熱病など、いわゆるフラビウイルス感染症は、互いに症状が類似しており、しかも部分的に血清学的交叉反応を示すことから、単に発熱患者を免疫学的検査キットで調べたくらいでは正確な診断ができず、それぞれ個別に開発された遺伝子診断法などと併用して初めて診断が下されるのが実状である。しかし、これでは各々の感染症に対して個別に診断のための試薬を用意して置かねばならず、全国の医療検査機関でそれを実行するのは経費的にも効率的ではない。一つの共通した検査法でフラビウイルス感染症のどれであるかが当たりをつけられれば、適切な治療と感染予防対策がより早期に開始できるものと考えられた。

(2) 我々は、ガーナ共和国やコンゴ民主・コンゴ両共和国等アフリカ大陸からの検体に対して、種々の会社製品(たとえばPanBio社やStandard Diagnostics社など)の抗デング熱IgG抗体や同IgM抗体検出キットやウイルス抗原検出キットを使用してみたが、その検査結果はともするとバラバラで一貫性が無く、今ひとつ製品の信頼性に欠けるといふ印象を拭えなかった。既に報告されているRT-PCR法などによる遺伝子解析も試してみたが、いずれも陽性のバンドは得られず、そもそも遺伝子型の報告が僅少のアフリカ大陸などで流行する株に対して既報の手法が通用するののかという疑問さえも持たれた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、上記の制限や疑問を解決するために、一つの共通する実験方法でフラビウイルス感染症の各々を鑑別する新しい検査システムを開発すること、そしてそれを実際の臨床検体に応用して実効性を確かめることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 初めにNational Center for Biotechnology for Information (NCBI)のデータベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/sequence-analysis/>) からフラビウイルス群であるデングウイルスの4つの血清型、ウエス

トナイルウイルスとそれに近縁であると知られているKunjinウイルス、黄熱ウイルスそれぞれのグループに属するウイルス株の全ゲノム遺伝子情報を少なくとも3株取り出し、それらをGenetyxのソフトウェアを用いて、各ウイルス群の遺伝子構成図に基づき、類縁の蛋白質についてはそれらが並列して比較し易いようにアラインメントした。すると特に非構造蛋白質であるNS5遺伝子では、グループ内の株間は無論のこと、グループを超えても高い相同性があることが容易に見て取れた。NS5遺伝子領域は、メチルトランスフェラーゼとRNA依存性RNAポリメラーゼをコードしており、どちらもウイルス増殖に必須の酵素である。一般的に言って、こうした機能性蛋白質をコードする領域は、遺伝子配列の相同性が高いconservative regionと比較的配列がバラバラなnon-conservative regionが入れ子になっているのが通例である。こうした観点から具にアラインメントを眺めると、RT-PCR用のプライマー配列を設定するのに適切と思われる部位がNS5遺伝子領域には何ヶ所か存在することが明らかであった。表1に、そのようにして設定したプライマーの配列情報を示す。ただし、このプライマー設計に際しては、なるだけ多種類のウイルス群かつ多様な株に対応できるように、所々に混合配列を持つ所謂degenerative primerにする工夫を施している。また反応条件は、Qiagen社のOneStep RT-PCRのキットに推奨の条件をそのまま採用した。

表1 デングウイルス検出のためのRT-PCR用プライマー配列

DENG-NS5-F1	AGYGGAGTRGAAGGRGAAGG (20mer)
DENG-NS5-R	AGCATGTCTTCXGTXGTCATCCA (23mer) (Y: C, T / R: A, G / X: A, G, C, T)
Dengue-Dus	TCAATATGCTGAAACGCGGAGAAACCG (28mer)
Dengue-Duc	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTT (29mer)

注. 上の2つのプライマー配列が我々によって設計考案されたもので、下には参考として国立感染症研究所の検査マニュアル(引用文献参照)で推奨されているプライマーDengue-Dus/Dengue-Ducの配列を示している。

4. 研究成果

(1) これまで報告されている多くのフラビウイルスの遺伝子解析法では、ウイルスのEnvelope蛋白質をコードする領域にプライマーを設定することが多かった。実際、デングウイルスの4つの血清型すべてに共通して

反応すると言われている PrM から C 遺伝子領域に設定されたプライマー Dengue-Dus/Dengue-Duc を用いると、確かに 4 つの血清型の標準株から抽出したゲノム RNA を鋳型とした時に、いずれもよく増幅することを確認した (図 1)。

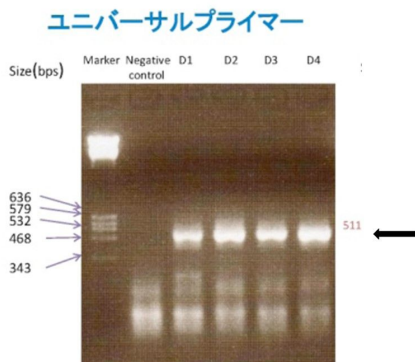


図 1 国立感染症研究所のデングウイルス検出用マニュアルで推奨されるユニバーサルプライマー Dus/Duc による RT-PCR のゲル電気泳動写真 (4 つの血清型 D1 ~ D4 の標準株ウイルス抽出 RNA に対して 511 bp (矢印) の PCR 産物が得られている。)

しかし、このプライマーの配列は、報告された当時、未だ degenerative primer の有用性が認識されていない時代でもあり、株によっては配列がマッチせずに増幅できない場合もあることが知られていた。

(2) 我々が開発したプライマーを用いた RT-PCR は全長約 920 bp であるが、図 2 に示すようにこれも 4 つの血清型のデングウイルス RNA をいずれも明瞭に検出できることが確かめられた。

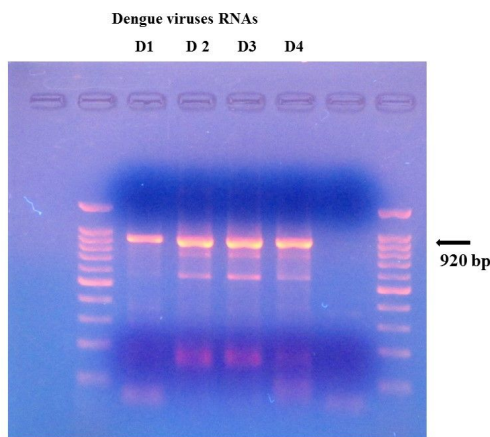


図 2 NS5 遺伝子領域に設定されたプライマーによる 4 つの血清型デングウイルス RNA の RT-PCR のゲル電気泳動写真

なお、この新規プライマーによる PCR 産物

は 920 bp の長さがあり、NS5 遺伝子全体が約 3,000 bp 長であるのに対して約 1/3 の長さでしかない。しかしながら、図 3 で示すように、この 920 bp の長さの配列から作成される分子系統樹は、NS5 遺伝子全体の配列から作成される分子系統樹と比べ、ほとんど同一のトポロジーの樹形を示すことが明らかである。

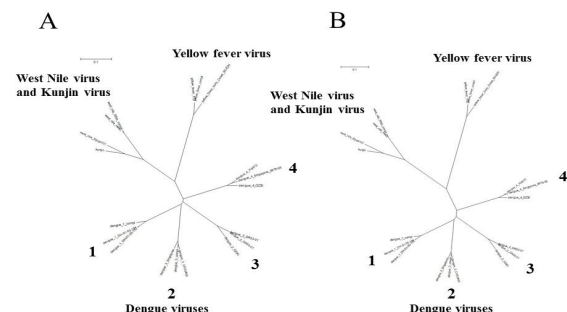


図 3 フラビウイルスの NS5 遺伝子領域の配列から作成した分子系統 (A は NS5 遺伝子領域全体 (約 3,000 bp) の配列情報から作成し、B はその一部でプライマー DENG-NS5-F1 と DENG-NS5-R 間の配列情報 (920 bp) から作成している。)

この図 3 の結果は、NS5 の部分配列だけでも十分にフラビウイルス各群の鑑別診断が可能であることを意味している。

(3) 実際の臨床検体にこの新しい系を応用してみたかどうかを示したのが図 4 である。コンゴ民主共和国から得られた 2 つの検体は、デングウイルスの抗原検出キットにより陽性反応を示したため既報の Dus/Duc プライマーを用いて RT-PCR を試みてみたのであるが、予想される大きさのバンドが得られなかったものである。

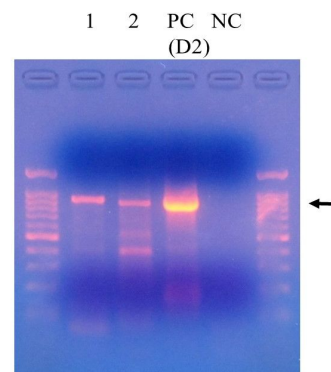


図 4 コンゴ民主共和国から得られたある検体を NS5 遺伝子に設定した新しいプライマーを用いて RT-PCR した時のゲル電気泳動写真 (レーン 1 と 2 が検体で、3 は陽性コントロールの D2、その右は陰性コントロール)

既報のDus/Ducプライマーでは検出できなかったのが、新しいプライマーによるRT-PCRによって予想サイズである920bp長のPCR産物を生じていることが明らかである。産物の遺伝子配列情報は、使用したプライマーそのものをsequence primerとして用いることによって解析することができ、またこの920bp長の領域内部にも相同性が高い領域が2ヶ所ほど認められたため、そこに設定したプライマーによってnested PCRや配列分析が可能であることも確認することができた。

このように極めて優れた迅速簡便診断法が開発された訳であるが、手持ちのウイルス病原体の種類に限られていたため、デングウイルス以外の他のフラビウイルス感染症に対しても有効であるか否かを検証することが課題として残されている。また最近、NS5遺伝子に着目したプライマーは、他にも幾つかの研究グループから提唱されており(引用文献やを参照のこと)、それらと比較しても我々の系が感度や汎用性に関して優れていることを立証することは今後の検討課題である。少なくとも我が国で採用されている既報の手法より、有用性が高いと思われる方法が開発されたことだけは確かであろう。

<引用文献>

国立感染症研究所病原体検査マニュアル
(デング熱ウイルス)

<http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/Dengue2014.pdf>

MaherSturgess SL, et al: Universal primers that amplify RNA from all three flavivirus subgroups. *Virology*, 5:16, 2008.

doi: 10.1186/1743-422X-5-16

Patel P, et al: Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. *Virology*, 10:58, 2013.

doi: 10.1186/1743-422X-10-58.

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 1件)

Ido E, Suzuki T, Ampofo WK, Ayi I, Yamaoka S, Koram KA, Ohta N: Joint research project on infectious diseases in West-African subregion. *J Disaster Res*, 査読有, 9(5):813-817 (2014).

<http://www.fujipress.jp/finder/xslt.php?mode=present&inputfile=DSSTR000900050007.xml&xslparam=ref|jscript>

[学会発表](計 2件)

井戸栄治, Steve Ahuka, 伊吹謙太郎, James Brandful, Jean-Jacques Muyembe:

デングウイルスの4つの血清型各群間を簡便かつ迅速に鑑別可能とするPCR法の開発. 第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月10-12日.

井戸栄治, Steve Ahuka, 伊吹謙太郎, James Brandful, Jean-Jacques Muyembe: フラビウイルスの各群を迅速に鑑別可能とするPCR法の開発に関する検討. 第55回日本熱帯医学会・第29回国際保健医療学会学術大会合同大会、東京、2014年11月1-3日.

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等
特になし。

6. 研究組織

(1)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・特任教授

研究者番号: 70183176

(2)研究分担者

伊吹 謙太郎 (IBUKI, Kentaro)

京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 00273524

(3)連携研究者

なし。