

平成 31 年 3 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05229

研究課題名(和文) デングウイルス感染早期の高感度かつ迅速診断法の確立

研究課題名(英文) Development of a highly sensitive RNA virus detection method by artificial nucleoproteins

研究代表者

開発 邦宏 (KAIHATSU, KUNIHIRO)

大阪大学・産業科学研究所・特任准教授(常勤)

研究者番号：70419464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,720,000円

研究成果の概要(和文)：タイ保健省にて、デング熱患者の血液検体を用い、培養細胞上にウイルスを感染させ、細胞内に発現したウイルス蛋白質を蛍光修飾抗体により検出後、血清型(1-4型)を識別した。次に、血液上清にEDTAを加え、ゲノムRNAを単離後、逆転写酵素により相補鎖DNA合成、PCRにて二重鎖DNAを増幅し、血清型を識別した。デングウイルスを中和するIgM、IgGに結合する、抗IgM、抗IgG抗体をプレート上に固定化後、ELISA法にて検出した。上記知見を活用して、ウイルスの遺伝子/蛋白質複合体を抗体にて標識できた。この複合体をペプチド核酸により検出ライン上に捕獲することで、デングウイルスの同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトは、蚊が媒介するデングウイルスに複数回感染すると、デングショック熱やデング出血熱など重篤な感染症状を発症する。従来の抗体診断キットを用いた場合、デングウイルスに複数回感染した検体中の抗原検出感度が低下することがわかった。一方で、本プロジェクトで開発したペプチド核酸を用いれば同ウイルスの遺伝子/蛋白質複合体をその場で検出できることが明らかとなった。これらの知見はデング熱感染重症化の早期処置に有用となる新しい診断手法になりうると期待する。

研究成果の概要(英文)：At Ministry of Health of Thailand, we analyzed blood sample of dengue infected patients and succeeded to identify (1) the viral serotypes (1-4 type) on the virus infected cultured cells using fluorescent labeled antibodies. Then, (2) EDTA was added to the blood supernatant, and genomic RNA was identified after the viral RNA isolation, double stranded DNA amplification by PCR. (3) dengue virus specific IgM and IgG were detected by anti-IgM and anti-IgG on a plate and detected by ELISA method.

Based on the above described method, viral gene and the protein complex was labeled by chemically-modified antibody. The complex was captured by peptide nucleic acid on the test line in the sequence specific manner. It allow us to identify the presence of dengue virus in the specimen.

研究分野：核酸化学

キーワード：ウイルス バイオテクノロジー 遺伝子 核酸 蛋白質

1. 研究開始当初の背景

2014年、国内で70年ぶりに渡航歴のない邦人がデングウイルスに感染した。現在、世界では熱帯から温帯地域に住む30億人が、デングウイルスへの感染リスクにあり、重症化すれば死に至る為、感染初期(2-6日後)の確定診断法の確立が重要である。デングウイルスは一本の(+)差RNAを遺伝子を持つフラビウイルス科、フラビウイルス属に分類される直径40~50nmの球形ウイルスである。

このウイルスは蚊(ネッタイシマカ、ヒトスジシマカ)の吸血によって、ヒトの毛細血管内、または毛細血管周囲の組織に侵入し、主として単球/マクロファージ系細胞や樹状細胞に感染して増殖する。感染者の多くでは不顕性感染として終わるが、一部の感染者では、感染複製急性期(感染2~7日目)に突然の発熱で始まるデング熱を発症し、さらに、ごく一部の感染者では、血管透過性の亢進による血漿漏出を伴うデング出血熱を発症する。初回感染における重症化症例は殆どないが、2回目感染では重症化による致死率は高い。そのため、デングウイルスの早期診断法の確立が急務である。

今日、デング熱への感染診断では、培養細胞を用いたウイルス感染評価、ウイルスゲノムをポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により検出する、ウイルス抗原検出や特異抗体などをELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)やImmunochromatographyにより検出する、などが主流である。はウイルス抗原検出よりも正確である。しかしながら、培養細胞へのウイルス感染障害性を確認するには時間がかかる。核酸増幅操作には、手間・時間・コストがかかるうえ、感染初期段階では陰性を示す。でNS1蛋白質を検出する場合、ウイルス由来の蛋白質NS1を初期に検出可能であるが感度と特異度が低いことが問題であり、IgMやIgGは感染後期(5日以降)に産生されるため、初期感染を検出することが出来ない。その為、タイ保健省では主に、「核酸増幅法+抗体検出法」の両方を組み合わせたウイルス診断法が用いられている。

2. 研究の目的

デングウイルスの感染初期を確定診断するには、ウイルスのゲノム検出と抗原タンパク質を両方検出することが必要である。しかし、多検体を2つの異なる手法で診断するのは手間とコストを考えると現実的でない。本研究では、タイ王国におけるデング熱感染初期の臨床検体から、ウイルスゲノムを効果的に抽出する手法を確立する。さらに、申請者らが開発した新規核酸固定化プレートを用いて、ウイルスゲノムとゲノム結合性タンパク質を同時に迅速・目視検出する技術を確立するための試験研究を行う。

3. 研究の方法

タイ保健省において、血液検体の扱い方と現地でのデング熱診断法に関するノウハウと経験を教示いただいた。

まず、デング熱の急性感染期における患者検体中から、培養細胞を用いてウイルス分画・同定を行う方法、ウイルス遺伝子を抽出してMultiplex PCRによりデングウイルスの血清型(1-4型)を同定する方法、ELISAプレートを用いてデングウイルスを同定する方法を習得し、それぞれの手法の検出感度と確度を比較した。

またデングウイルスをアフリカミドリザル培養(Vero)細胞により増幅し、精製した。その後、デングウイルスの全血清型に共通して保存される遺伝子配列を特定し、これに相補的なペプチド核酸を合成した。同PNAが標的核酸に結合することを事前に評価する為、全血清型に保存される共通配列と同じ配列のDNAを準備し、PNAと相補鎖会合能をUV融解温度測定により評価した。また、ウイルス遺伝子と随伴する蛋白質を金コロイド修飾抗体により標識し、このウイルス遺伝子に保存される特徴的な配列をペプチド核酸によりラテラルフローストリップ上に捕獲することを試みた

4. 研究成果

タイ保健省にて、デング熱重症化患者の血液検体からウイルスを分離する手法を学んだ。血液検体中には何も加えないで遠心操作を行うことで血球細胞などを沈降させ、血清成分を取得した。

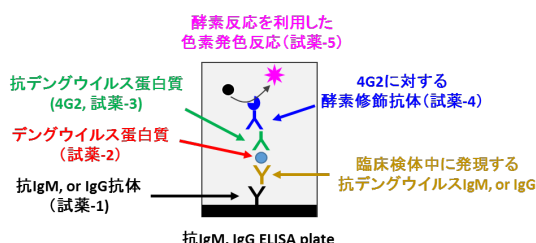
培養細胞を用いたウイルス感染評価系においては、前記血液検体から得た血清を、予め3-5日間前培養させた蚊由来培養(C6/36)細胞シートに感染させ、28で7日間培養した。その後、感染細胞中に発現するウイルス抗原蛋白質を蛍光修飾抗体(anti-dengue virus)により標識し、これを蛍光顕微鏡にて検出した(Direct immunofluorescence assay)。本手法を用いた場合、デングウイルスの血清型(DENV 1~4)までを抗体により特異的に識別することが可能であった。しかしながら、ウイルス同定までに1週間かかり、臨床現場での診断と患者の治療方針を策定するには不向きであることがわかった。

ウイルスゲノムをポリメラーゼ連鎖反応により同定する手法においては、前記血清上清にEDTAを加え、ゲノムRNAをUniversal primerを用い、逆転写酵素により相補鎖DNA(cDNA)に変換した。続いて、Universal primerを用いてcDNAを二重鎖DNAに変換した。そして、二重鎖DNAをUniversal primerによりPCR増幅後、デングウイルスの血清型が1-4型をそれぞれ特異的に増幅するプライ

マーを用いて、二重鎖 DNA をさらに増幅した。遺伝子増幅産物については、目的のものであるかをアガロース電気泳動により評価した。本手法は感度よく、ウイルス遺伝子が 100 コピー程度からでも十分検出可能であるものの、操作が複雑であり、遺伝子増幅とゲル電気泳動だけでも熟練の技術研究員の方が 1 日の工程を必要とすることがわかった。

ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 法を用いたウイルス検出に関しては、96 ウェルプレート上に、デングウイルスに感染した臨床検体中に発現するヒト IgM, IgG 抗体に対して、反応性を有する抗 IgM, 抗 IgG 抗体を予めプレート底面に固定したものを用意した。これに対して、血清サンプルを 100 倍希釈したものを滴下した。これによりデングウイルス蛋白質 (試薬-2) を捕獲した後、下記のとおり抗デングウイルス蛋白質抗体 (下図の 4G2、試薬-3) とこの 4G2 に対する酵素修飾抗体 (試薬-4) さらに前記酵素の基質 (試薬-5) を順次追加することで、検体中のウイルス蛋白質の有無を検出することができた。

しかしながら、各試薬を添加するステップ毎に 30 分～1時間のインキュベーション時間と操作ごとにプレート内に残った試薬を丁寧に洗浄除去する操作が必要である為、操作が煩雑であること、作業にも 1.5 日を要することが明らかとなった。このような診断方法は、タイ保健省などの研究機関では実施可能であるが、実際の臨床現場で使用するには不向きであることが課題であった。



またデング熱発症後、1 - 7 日後までの臨床検体を用いて調べた結果、ウイルス感染初期 (1 - 4 日まで) にはヒト体内で十分にデングウイルスに対する IgM, IgG 抗体が分泌されていないケースがあった。その為、検査対照としては約 5 - 6 日後にのみ解析可能であるという課題が明らかとなった。

上記の知見を活かし、ウイルスの蛋白質ではなく、ウイルスの遺伝子とそれに結合する蛋白質の複合体を捕獲することを試みた。具体的には、ウイルス遺伝子に随伴する蛋白質を認識する抗体を用い、これに金コロイドを修飾した。金コロイドには粒子系が約 40nm である一般的なイムノクロマト用のものを用いた。

一方で、デングウイルスの遺伝子/蛋白質

複合体のうち、ウイルスの遺伝子に共通して保存される核酸塩基の配列を特異的に認識する人工核酸 = ペプチド核酸を合成した。

まずはこのペプチド核酸をラテラルフローストリップのテストライン上に固定化して、ウイルス遺伝子と相補配列を有する蛍光修飾オリゴ DNA を作用させたところ、標的とする蛍光修飾 DNA を配列特異的に検出することができた。

次に、ウイルス溶液に対して、界面活性剤を含む緩衝液を加えて、ウイルス粒子内の遺伝子/蛋白質の複合体に対して金コロイド修飾抗体を作用させた。これをペプチド核酸固定化したテストライン上に作用させたところ、ウイルス遺伝子/蛋白質複合体を捕獲できることを目視で 15 分以内に確認することができた。

以上の研究により、タイ保健省におけるデングウイルスを、免疫染色法、遺伝子増幅法、ELISA 法、遺伝子/蛋白複合体検出法により同定する操作を実施した。その中でもの方法では簡便に臨床検体中のウイルスを同定できることから実用化の見込みが期待された。

ヒトはデングウイルスに複数回感染すると、デングショック熱やデング出血熱など重篤な感染症状を発症する。しかしながら、その検出が容易でないところが課題であった。本プロジェクトで開発したペプチド核酸を用いれば同ウイルスの遺伝子/蛋白質複合体をその場で検出できる可能性が示唆された。デング熱感染重症化の早期処置に有用となる新しい診断手法になりうると期待する。

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 2 件)

Future perspective of nucleic acid-based detection of dengue virus and its serotypes. K. Kaihatsu, E. Harada, H. Matsumura, A. Takenaka, N. Wichukchinda, A. Sa-Ngasang, N. Kato. J. Antivirals & Antiretrovirals. LXIX-LXXII, (2016)

ペプチド核酸クロマトを用いたウイルスゲノム情報の目視診断技術、開発邦宏、実験医学、34[16]、2688-2688、(2016)

〔学会発表〕(計 3 件)

Rapid identification of RNA viruses by peptide nucleic acid chromatography. K. Kaihatsu, Pacificchem-2015, Hawaii, USA. (Poster)、2015-12-14-19

Sequence specific detection of RNA viral gene by chemically-modified peptide

nucleic acid, Kunihiro Kaihatsu, The 6th Euro Virology Congress and Expo., Madrid, Spain. (Oral)、2016-03-10-12

Sequence-specific detection and visualization of dengue viral RNA-protein complex by peptide nucleic acid. K. Kaihatsu, Emi Harada, A. Takenaka, H. Matsumura, N. Kato. The 43rd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry. Kumamoto, Japan (Oral). 2017-11-14-16.

〔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〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

開発邦宏 (KAIHATSU, Kunihiro)

大阪大学 産業科学研究所・特任准教授

研究者番号：70419464

(2) 研究分担者

黒須剛 (KUROSU Takeshi)

国立感染症研究所 ウイルス第一部・主任

研究官

研究者番号：70432432

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし