

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659297

研究課題名（和文） 高特異性・高感受性・低コストな熱帯感染症診断キットの開発

研究課題名（英文） Development of diagnosis test kits with high specificity, high sensitivity, and low cost against tropical infectious diseases.

研究代表者

生田 和良 (IKUTA KAZUYOSHI)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：60127181

研究成果の概要（和文）：

熱帯地域を中心とした途上国では、貧困層を中心に多くの感染症が流行している。その中で、デング熱・出血熱を引き起こすデングウイルスは、他の熱性感染症との鑑別診断が非常に困難である。本研究では、高感度、高特異性、安価、かつ簡易に取り扱い可能な迅速診断キットの開発を、イムノクロマトグラフ法を用いて行った。本研究では、デングウイルス、チクングンヤウイルス、及びインフルエンザウイルスをターゲットとした。

研究成果の概要（英文）：

Tropical infections are especially endemic in low-income populations in developing regions. Dengue disease that is induced by dengue virus is difficult for differential diagnosis from other fabric infectious diseases. The aim of this study, we developed immune-chromatograph rapid test kit against dengue, chikungunya, and influenza virus infections with high sensitivity, high specificity, low cost, and simple use at clinics.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床微生物学、迅速診断

1. 研究開始当初の背景

熱帯地域の感染症には様々なものがあり、アジア・アフリカを中心とした途上国では世界人口の1/6にあたる10億人が感染しており、生活の質に大きく影響しているとされている。しかしながら、これらの感染症は途上国での流行が中心であることから、診断キット、予防薬、ワクチン、治療薬の開発がビジネスとしては成り立たないと考えられ、長く顧みられてこなかったことから Neglected Tropical Diseases (NTD、顧みられない熱帯病)と言われている。WHOは特に17感染症をNTDとして特定し、対策に乗り出している。

NTDのほとんどが寄生虫感染症であるが、ウイルス感染症としては、唯一デング熱・デング出血熱が含まれる。デング熱・デング出血熱はデングウイルスの感染を起因とし、蚊媒介性に感染伝播される急性の熱帯感染症であり、世界中で25億人に感染リスクがあるとされており、年間約50万人がデングウイルス感染症により入院し、その内2.5%は死に至ると報告されている。本疾患は、初期の病変が急激な発熱疾患から始まることから、マラリア熱、インフルエンザ、及びデング熱と同様に近年アジアやアフリカに急速に広まっている蚊媒介性のチクングンヤウイルスを起因とするチクングンヤ熱等との鑑別診断が途上国や臨床の現場では非常に

困難である。その原因としては1) チクングンヤ熱に関しては、迅速診断キットが存在していない。2) インフルエンザのような迅速診断キットが存在するものについても、高価格の為、途上国では使用できない等の理由が考えられる。一方で、これらの感染症は、途上国への先進国からの渡航者が、先進国へ持ち帰った上で発症する「輸入感染症」でもあり、一方で、地球温暖化や海外旅行者の増加により、徐々にその感染地域を広げている。このことは、NTD が途上国だけに限定して危惧される感染症ではないことを示しており、先進国もその治療法、予防法、及び診断法の開発を率先して進める必要がある。

大阪大学微生物病研究所は文部科学省の新興・再興感染症研究拠点形成プログラム「大阪大学感染症国際研究拠点タイ感染症共同研究拠点」としてタイバンコク都及びノンタブリ県に2つの拠点を有している。バンコク都の拠点は2010年4月にタイのマヒドン大学熱帯医学部に共同研究拠点「Mahidol-Osaka Center for Infectious Diseases, MOCID」として立ち上げ、デングウイルスやチクングンヤウイルスに対する感染症に関する研究を行っている。本研究は大阪大学微生物病研究所、MOCID、及びマヒドン大学熱帯医学部間での共同研究として実施された。

2. 研究の目的

本研究では、途上国で使用可能なデング熱やチクングンヤ等の熱帯感染症に対する迅速鑑別診断キットの開発及びその普及を目的とする。即ち、高特異性、高感受性、低コスト、簡便な使用方法を持つ熱帯感染症診断キットの開発を行うことを目的とする。私たちはイムノクロマトグラフ法による迅速診断キットの開発に注目した。

チクングンヤウイルスに対しては、まだイムノクロマトグラフキットが存在していない。デング疾患に対しては、デングウイルス抗体を検出する迅速診断キットとウイルス抗原(NS1)を検出する迅速診断キットが存在する。ウイルス抗体を検出するキットは、感染初期の抗体誘導が十分になされていない時期において診断が困難であり、一方NS1を用いたイムノクロマトグラフキットが実用化されているものの感度が低く、高額であることから、不完全なものでしかない。そこで、これらのウイルスに対しては、単クローン抗体を作成し、キットの開発を行った。

また、本研究を進める上で、途上国の医師たちが、途上国等で開発された多少安価ではあるものの、低感度・低特異性の既存のイムノクロマトグラフキットを使った経験から、イムノクロマトグラフキット自体への不信

感を持っているケースが多く認められた。そこで、イムノクロマトグラフキットの途上国での普及を目指し、私たちが以前開発したインフルエンザ A/H1N1pdm 2009 に対するキットの評価を進め、キットの有用性の説明を行うとともに、途上国において実際に疫学的な解析に使用してもらい、イムノクロマトグラフキットの有用性の理解を進めた。

3. 研究の方法

(1) デングウイルスに対する迅速診断キットの開発

私たちは、デングウイルス抗原を直接検出可能な高感度、高特異性を持つキットの作製の検討を行った。そのため、下記の2種類の方法で抗体の作製を行ない、また、得られた抗体は、日本のメーカー(アルフレッサファーマ株式会社)にてイムノクロマトグラフキットの共同開発を行った。また、開発されたキットは、ラボ株や臨床ウイルス株を用いて評価を行った後、臨床検体を用いて評価を行った。

① 抗デングウイルスマウス単クローン抗体を用いたキットの開発

インフルエンザウイルスに対するイムノクロマトグラフキット作製の経験では、ウイルス表面の蛋白質であるヘモグリンチンに対する抗体より、核蛋白質に対する抗体の方が高い感度のキットを作製できる。そこで、デングウイルスに対しても、キャプシド蛋白質をターゲットにするとより高い感度のキットの作製を行えるものと考えた。

そこで、私たちは既にマウス由来初代培養細胞にSV40 T 遺伝子を導入することにより多くのマウス細胞株を樹立している。その中でデングウイルス高感受性細胞(B7細胞)を用い、DENV-2(New Guinea C strain)感染細胞を作製し、Freund's Complete Adjuvantと共にBALB/cマウスへの免疫を行った。その後、数回の免疫を行った上で、最終の免疫から3日後に脾臓を摘出し、脾細胞を分離し、マウスミエローマ細胞株(PAI細胞)と細胞融合を行った。抗体産生のスクリーニングはウイルス感染Vero細胞及びデングウイルスキャプシド蛋白質を発現した細胞を用いた間接蛍光抗体法にて行った。陽性細胞は、限界希釈法により細胞クローニングを行い、二次スクリーニングにてハイブリドーマ株を選択した上で、培養スケールの拡大を行った。ハイブリドーマ株の培養上清を用い、他の血清型のデングウイルスに対する反応性の検討を行った上で、ハイブリドーマ産生抗体の各種性状解析を行った。また、性状の優れた

抗体に関しては、BALB/c マウスを用いて腹水の作製を行いキットへの応用を行った。

② 抗 Dengue ウイルス ヒト型抗体を用いたキットの作製

本研究に先行して行われている JICA-JST SATREPS 事業にて得られた抗 Dengue ヒト型抗体において、Dengue ウイルスの全ての血清型に対して広域反応性を示す抗 Dengue ウイルス エンベロープ抗体及び抗 Dengue ウイルス prM 抗体の作製に成功した。SATREPS 事業では、抗体医薬の開発を目的としており、検査キットの開発を想定していなかったことから、本抗体を用いたキット開発を本研究にて行った。

(2) チクングンヤウイルスに対する迅速診断キットの開発

チクングンヤウイルスもマウス由来初代培養細胞 B7 細胞に対する感受性が高いことが示されていた。そこで、2009 年にマヒドン大学熱帯医学部にて患者より得られ、MOCID にて単離されたチクングンヤウイルス (CP10 株、ECSA 遺伝子型) を B7 細胞に感染させ、感作細胞を作成し、抗 Dengue ウイルスマウス単クローン抗体の作製法と同様に BALB/c マウスへ免疫し、ハイブリドーマの作製を行い、チクングンヤウイルス感染細胞を用いた間接蛍光抗体法にてスクリーニングを行い、陽性細胞を限界希釈法にてクローニングを行い、抗チクングンヤウイルス単クローン抗体産生ハイブリドーマの作製を行った。この抗体の詳細解析及びキットへの応用及びその評価を行った。

(3) インフルエンザ A/H1N1pdm 2009 特異検出キットの解析及びタイ臨床株を用いたキットの評価

私たちは、2009 年にアウトブレイクを引き起こしたインフルエンザ A/H1N1 pdm 2009 に対し、反応し、以前に流行していた A/H1N1 や A/H3N2 及び B 型には反応を示さないマウス単クローン抗体を作製し、イムノクロマトグラフ法を用いた迅速診断キットの開発に成功した (Mizuike R, et. al., Clin Vaccine Immunol. 2011;18(3):494-9)。しかしながら、開発を行ったシーズンは、ほぼ全てのインフルエンザが本ウイルスを起因としていたことから、他のウイルスと共存している環境下でどの程度の精度を保つのか、また、今後のインフルエンザのサーベイランスにどの程度使用可能か評価を行うため、引き続き、日本国内でもサンプルを収集し、キットの評価

を行った。

また、途上国での迅速診断キットの普及を考える上で、迅速診断キットの有用性を途上国の医師たちに理解を促す必要がある。そこで、マヒドン大学熱帯医学部においてタイの臨床医を集め、本キットの有用性に対するセミナーを行うと同時に、実際にマヒドン大学熱帯医学部と共同で本キットを用いてタイにおけるインフルエンザの疫学調査を実施した。

4. 研究成果

(1) Dengue ウイルスに対する迅速診断キットの開発

① 抗 Dengue ウイルスマウス単クローン抗体を用いたキットの開発

B7 細胞を用い、DENV-2 (New Guinea C strain) 感染細胞を作製し BALB/c マウスへの免疫を行ない、その脾細胞を用いて 60 クローンの抗 Dengue ウイルスマウス単クローン抗体産生ハイブリドーマを作製した。その中で、5 クローンは、Dengue ウイルスキャプシド蛋白質を認識するマウス単クローン抗体産生ハイブリドーマであった。5 クローンの内、3 クローンは DENV-2 特異抗体であり、残り 2 クローンは DENV-2 と DENV-4 のみを認識する抗体であった。Dengue ウイルスのキャプシド蛋白質の系統樹解析を行ったところ、他のウイルス蛋白質に比べ、多様性が高いことが示された (図 1)。このことは、Dengue ウイルス検出キットの為に必要な Dengue ウイルスの全ての血清型と反応を示す抗体の作製は難しいことを示していると考えられる (Noda M, et., al. Biologics. 2012;6:409-16)。

一方で、Dengue ウイルス血清型特異抗体の作製にはキャプシド蛋白質をターゲットにすることにより作製が簡易であることが示されたことから、Dengue ウイルス血清型判定キットの作製を行うことが可能であると考えられる。実際に途上国の医師や Dengue 研究者からはそのようなキットの開発の要望も強いことから、現在、デ

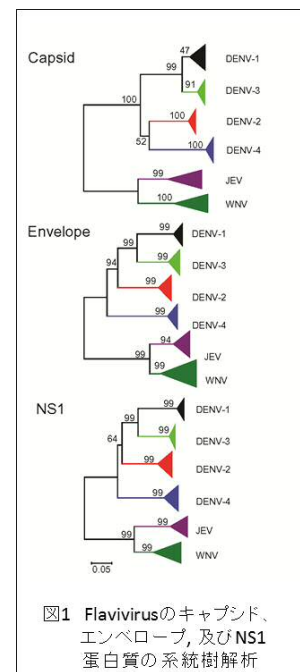


図1 Flavivirusのキャプシド、エンベロープ、及びNS1蛋白質の系統樹解析

ングウイルスの4種類の血清型特異反応性を示す抗体の作製を行っている。

② 抗デングウイルスヒト型抗体を用いたキットの作製

SATREPS 事業にて作成された抗デングウイルスヒト型抗体を用いてイムノクロマトグラフ迅速診断キットの開発を行った (Setthapramote C, et. al., Biochem Biophys Res Commun. 2012;423(4):867-72)。アルフレッサファーマ株式会社の協力の元、テストラインに抗デングウイルス prM ヒト型抗体を、金コロイド標識抗体には抗デングウイルスエンベロープヒト型抗体を用いてキットを開発した。現在、マヒドン大学熱帯医学部および MOCID にてタイ分離株及びタイ臨床検体を用いて評価を行っている。また、ヒト型抗体作製に使用した患者由来の血液より、デングウイルス遺伝子の検討を行ったところ、同一患者にデングウイルスの quasispecies が存在することが示され、報告を行った (Puiprom O, et. al., Biochem Biophys Res Commun. 2011;413(1):136-42)。

(2) チクングンヤウイルスに対する迅速診断キットの開発

抗チクングンヤウイルス単クローン抗体を作製するため、2009年にタイマヒドン大学熱帯医学部にて患者より得られ、MOCID にて単離されたチクングンヤウイルス ECSA 株を B7 細胞に感染させ、感作細胞を作製した。感作細胞を免疫源としてマウスにて免疫を行い、免疫脾細胞を用いてハイブリドーマの作製を行った。ハイブリドーマはチクングンヤウイルス感染細胞を用いて間接蛍光抗体法にてスクリーニングを行い、チクングンヤウイルス特異抗体の選択を行った。その結果、5 クローンの抗チクングンヤウイルス単クローン抗体が作製された。これらの抗体は、2006年にスリランカから帰国した旅行者が感染していたチクングンヤ株 (SL11131 strain) 及び 1952年にタンザニアにて分離された S27 strain を用いて反応性を検討したところ、両株に対し、

反応性を有していたことから、過去及び近年の流行株に広く反応性を示す抗体であることが示唆された。そこで、アルフレッサファーマ株式会社にてイムノクロマトグラフキット化を行い(図2)、マヒドン大学熱帯医学部及び



図2 チクングンヤウイルス迅速診断キット

MOCID にて臨床検体、臨床分離株、及びラボ株に対する反応性の検討を行っている。

同時に、収集した臨床分離株を、ケラチノサイト細胞である HaCaT 細胞に感染させたところ、IL-8 の誘導抑制が認められた。また、さらに蚊の唾液腺抽出物を添加したところ、チクングンヤウイルスの増殖能が高まり、IL-8 の誘導抑制がより強まることを示し、報告を行った (Puiprom O, et. al., Infect Genetics Evol. 2013 10;17C:210-215)。

(3) インフルエンザ A/H1N1pdm 2009 特異検出キットの解析及びタイ臨床株を用いたキットの評価

インフルエンザ A/H1N1pdm 2009 を特異的に認識するマウス単クローン抗体を用いたイムノクロマトグラフ迅速診断キットを 2010 年に開発した。本研究では、このキット及び季節性インフルエンザ検出迅速診断キットを用い、2010-2011 年シーズンに大阪府東成区医師会の協力の元、13 病院より 542 件のインフルエンザ様疾患患者由来検体の収集し、キットの評価を行った。迅速診断キットは、臨床現場で実際に医療関係者に使用していただき、その後 332 検体からの遺伝子解析を、283 検体からのウイルスの分離を試みた。また、臨床症状、投薬状況などの関連性の検討を行った。その結果、1) A/H1N1pdm 2009 検出キットは季節性インフルエンザキットより高感度であることが示され、併用して使用することでさらに診断の正確性を増すことが可能である。2) 両キットの感度・特異度の傾向が病院毎に異なっていることが示唆された。この要因として、各医院でのキットの使用法によるものであることが考えられる。迅速診断キットを使用する際は使用方法の徹底が必要である。3) 迅速診断キットを無視して投薬する場合とキットに従って投薬する場合では、キットに従って投薬するほうがより正確な投薬を行っていることが示された。迅速診断キットの有用性を示し(図3)、報告を行った (Sasaki T, et., al. PLoS One. 2012;7(11):e5067)。

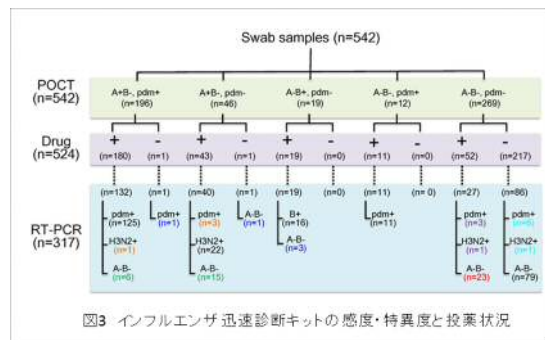


図3 インフルエンザ迅速診断キットの感度・特異度と投薬状況

更にマヒドン大学熱帯医学部にて、

2012-2013年に87検体のインフルエンザ様疾患患者収集し、タイ臨床検体を使用したキットの評価及びインフルエンザの疫学調査を行っている。

(4) 迅速診断キットの途上国における普及を目指して

途上国での迅速診断キットの普及を考える上での問題点としては、1) 迅速診断キットの価格が途上国で使用するには高額である。2) 途上国製の少し安価なキット性能が低いキットを使った経験から、途上国の医療関係者には、迅速診断キットの有用性を十分に理解していない人々が多い。そこで、株式会社 BL 及びアルフレッサファーマ株式会社の関係者に、マヒドン大学熱帯医学部に医療関係者向けにセミナーを開催し、迅速診断キットを実際に使用しながら説明を行ったと同時に、意見交換を行い、タイにおける迅速診断キットのニーズの把握を行った。特にデングウイルスのウイルス血清型鑑別迅速診断キットの開発は強く求められた。また、高感度・抗特異性の迅速診断キットの価格を下げるため、イムノクロマトグラフキットで使用される材料を日本の企業で作製し、そのアセンブリをタイの製薬企業で行うことで価格を下げられないかという意見もあり、現在その方向でタイの企業との交渉を進めている段階である。

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13件)

1. Puiprom O, Morales Vargas RE, Potiwat R, Chaichana P, Ikuta K, Ramasoota P, Okabayashi T. Characterization of chikungunya virus infection of a human keratinocyte cell line: Role of mosquito salivary gland protein in suppressing the host immune response. *Infect Genet Evol.* 2013;17C:210-215.

doi: 10.1016/j.meegid.2013.04.005. (査読有)

2. Sasaki T, Setthapramote C, Kurosu T, Nishimura M, Asai A, Omokoko MD, Pipattanaboon C, Pitaksajakul P, Limkittikul K, Subchareon A, Chaichana P, Okabayashi T, Hirai I, Leangwutiwong P, Misaki R, Fujiyama K, Ono K, Okuno Y, Ramasoota P, Ikuta K. Dengue virus neutralization and antibody-dependent enhancement activities of human monoclonal antibodies derived from dengue

patients at acute phase of secondary infection. *Antiviral Res.* 2013 ;98(3):423-31.

doi: 10.1016/j.antiviral.2013.03.018. (査読有)

3. Sasaki T, Kubota-Koketsu R, Takei M, Hagihara T, Iwamoto S, Murao T, Sawami K, Fukae D, Nakamura M, Nagata E, Kawakami A, Mitsubayashi Y, Ohno M, Uehara Y, Fukukawa T, Kanai Y, Kosaka M, Ikuta K. Reliability of a newly-developed immunochromatography diagnostic kit for pandemic influenza A/H1N1pdm virus: implications for drug administration. *PLoS One.* 2012;7:e50670. doi: 10.1371/journal.pone.0050670. (査読有)

4. Noda M, Masrinoul P, Punkum C, Pipattanaboon C, Ramasoota P, Setthapramote C, Sasaki T, Sasayama M, Yamashita A, Kurosu T, Ikuta K, Okabayashi T. Limited cross-reactivity of mouse monoclonal antibodies against Dengue virus capsid protein among four serotypes. *Biologics.* 2012;6:409-16.

doi: 10.2147/BTT.S37792. (査読有)

5. Setthapramote C, Sasaki T, Puiprom O, Limkittikul K, Pitaksajakul P, Pipattanaboon C, Sasayama M, Leangwutiwong P, Phumratanaprapin W, Chamnachanan S, Kusolsuk T, Jittmittraphap A, Asai A, Arias JF, Hirai I, Kuhara M, Okuno Y, Kurosu T, Ramasoota P, Ikuta K. Human monoclonal antibodies to neutralize all dengue virus serotypes using lymphocytes from patients at acute phase of the secondary infection. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;423(4):867-72.

doi: 10.1016/j.bbrc.2012.06.057. (査読有)

6. Mizuike R, Sasaki T, Baba K, Iwamoto H, Shibai Y, Kosaka M, Kubota-Koketsu R, Yang CS, Du A, Sakudo A, Tsujikawa M, Yunoki M, Ikuta K. Development of two types of rapid diagnostic test kits to detect the hemagglutinin or nucleoprotein of the swine-origin pandemic influenza A virus H1N1. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18(3):494-9.

doi: 10.1128/CVI.00269-10. (査読有)

7. Puiprom O, Yamashita A, Sasayama M, Limkittikul K, Boonha K, Jittmittraphap A, Leangwutiwong P, Kurosu T, Ramasoota P,

Ikuta K. Co-existence of major and minor viral populations from two different origins in patients secondarily infected with dengue virus serotype 2 in Bangkok. Biochem Biophys Res Commun. 2011;413(1):136-42.

doi: 10.1016/j.bbrc.2011.08.069. (査読有)
(他6件)

[学会発表] (計4件)

1. 佐々木正大、2010/11 シーズンの大阪府下におけるインフルエンザ様疾患患者検体を用いた Pandemic A (H1N1) 2009 迅速診断キットの評価、2012年6月17日、第53回日本臨床ウイルス学会 大阪
(他3件)

[その他]

ホームページ等

<http://virology.biken.osaka-u.ac.jp/>

マヒドン大学における医療関係者への迅速診断キットのセミナー (2011年7月27日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

生田 和良 (IKUTA KAZUYOSHI)
大阪大学・微生物病研究所・教授
研究者番号: 60127181

(2) 研究分担者

黒須 剛 (KUROSU TAKESHI)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号: 70432432

作道 章一 (SAKUDO AKIKAZU)
琉球大学・医学部保健学科・准教授
研究者番号: 10397672

(3) 研究協力者

岡林 環樹 (OKABAYASHI TAMAKI)
大阪大学・微生物病研究所・特任准教授
研究者番号: 10359995

佐々木 正大 (SASAKI TADAHIRO)
大阪大学・微生物病研究所・特任講師
研究者番号: 20547533

小坂 美恵子 (KOSAKA MIEKO)
アルフレッサファーマ株式会社・
診断薬研究開発部・室長
研究者番号: 70592278

中石 和成 (NAKAISHI KAZUNARI)
株式会社BL・商品開発部・部長
研究者番号: なし