

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390146

研究課題名(和文)呼吸器ウイルス検出用オンチップデバイスの開発と診断への応用

研究課題名(英文)Development of PNA-based chromatography for rapid detection of respiratory viruses

研究代表者

中屋 隆明(NAKAYA, TAKAAKI)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80271633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、インフルエンザウイルスの亜型特異的な塩基配列を持つ新規ペプチド核酸(PNA)をプローブとして、H1、H3およびH7亜型ウイルス(ゲノム)を検出するためのクロマトグラフィーキットを作製し、その評価を行った。その結果、PNAクロマトキットは、ヒト由来の季節性H1とH3亜型に対しては 1.0×10^4 ffu/kit、トリ由来のH7型に対しては 5.0×10^5 ffu/kitのウイルス量があれば検出できることがわかった。加えて、若干の偽陽性反応を示したものの、インフルエンザウイルスの亜型間を識別することができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a novel chromatography kit for the subtype-specific detection of influenza A viruses. Azobenzene-tethered hairpin-type peptide nucleic acid (Tail-clamp PNA-AZO) possessing a subtype-specific complementary sequence against human influenza A virus, H1-, H3-, and avian H7-subtype, was synthesized and attached to a chromatography strip. The sensitivity of the chromatography was approximately 1.0×10^4 ffu/kit for H1N1 and H3N2, and 5.0×10^5 ffu/kit for H7N7, respectively. The PNA-chromatography specifically detected each influenza A virus tested, although it slightly reacted with other subtypes. Even though further improvement is necessary to use it clinically as a rapid diagnostic kit, this system could be applied for the sequence-specific detection of influenza viruses, including drug-resistant viruses as well as highly-pathogenic avian influenza viruses.

研究分野：ウイルス学

キーワード：迅速診断 デバイス インフルエンザウイルス ペプチド核酸

1. 研究開始当初の背景

人類はこれまでに多くの感染症の病因となる微生物を発見し克服してきたが、今世紀になってもなお SARS/MERS コロナウイルスのような新しい呼吸器感染症が突如出現し、重大な脅威をもたらしている。加えて、H5N1/H7N9 鳥インフルエンザウイルスのヒトへの致死感染や 2009 年 H1N1pdm インフルエンザウイルスの汎流行など、既知の呼吸器ウイルスが我々の社会生活に深刻な影響を与える事例は数多く存在する。そのため、このような新興・再興ウイルス感染症のアウトブレイクに際し、それを早期に発見し、制圧するための、簡便かつ高感度なウイルス検出装置の開発が不可欠である。

現在、医療現場におけるウイルス診断には、イムノクロマト法などの抗体検出法や PCR などの核酸増幅を基盤とした遺伝子増幅法が用いられている。しかしながら、イムノクロマト法は使用する抗体によって感度、特異性が大きく左右される。一方、遺伝子増幅法は増幅・検出装置等の専用機器が必要であり、検出に時間がかかるため、ベッドサイドでの利用は困難である。また、DNA チップを基盤技術としたマイクロアレイ法についても高額な検出機器が必要であり、実用化には多くの課題が残っている。

本研究では、これまでに確立してきたクロマトグラフィーを基盤としたウイルス検出システムを改良し、臨床検体（鼻汁、咽頭スワブ）からの呼吸器病原ウイルスをイムノクロマト法以上の高感度で迅速・特異的に検出するデバイスを開発することを計画した。

特に、ペプチド核酸（PNA）をプローブとするクロマトキットの開発を研究の中心課題とした。（モノクローナル）抗体とは異なり、塩基配列を任意に改変することが可能な PNA プローブを用いることにより、インフルエンザウイルスの亜型間の識別ならびに薬剤耐性株の検出への応用が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、PNAを基盤とする新規人工核酸プローブを用いて、迅速診断が可能なクロマトグラフィーキットを作製し、吸器病原ウイルス、特にインフルエンザウイルスを標的として、評価試験を行うことを目的とした。

そのために、インフルエンザウイルス各亜型に特異的な塩基配列を持つ新規 PNA を合成し、季節性（ヒト）インフルエンザ H1、H3 亜型および鳥インフルエンザウイルス H7 亜型ウイルス（ゲノム）を検出するためのクロマトグラフィーキットを作製し、ウイルスを用いて評価を行った。

3. 研究の方法

(1) PNA の合成

インフルエンザウイルスゲノムの遺伝子配列データベースから、H1、H3、H7 の各血清型に特異的に保存されるゲノム塩基配列を抽出し、各亜型のゲノム RNA 保存配列を核酸塩基特異的に認識するペプチド核酸（Fig.1A）を合成した。

PNA には標的 RNA と ワトソン-クリック塩基対を形成する 15 塩基、 フーグスティン塩基対を形成する 7~4 塩基、 のそれぞれをアゾベンゼンアミノ酸(AZO, Fig.1B)により架橋する設計とした。PNA 末端にはスパーサー分子（AEEA, Fig. 1C）を介してビオチンを導入した（Table 1）。

Table 1. H1, H3, H7 亜型検出用の Tail-Clamp PNA 配列と設計

PNA	塩基配列 (N-C term)
H1 検出用	H-(Lys) ₃ -TCCCTCT-AZO-TCTCCCTGGGG GCAA-Lys-(AEEA) ₂ -Lys(Biotin)-NH ₂
H3 検出用	H-(Lys) ₃ -TTCCCT-AZO-TCCCTTAGGTCA CTA-Lys-(AEEA) ₂ -Lys(Biotin)-NH ₂
H7 検出用	H-(Lys) ₃ -CTTC-AZO-CTTCGGGGCATCAT G-Lys-(AEEA) ₂ -Lys(Biotin)-NH ₂

Lys; lysine, AZO; azobenzene, AEEA;
2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)acetic acid,
Lys(Biotin); biotin-modified lysine.

(2) クロマトグラフィーキットの作製

クロマトグラフィー(クロマト)のテストラインには、PNA のピオチンを捕獲するピオチン結合型分子を塗布し、コントロールラインには A 型インフルエンザウイルス全般に保存される核タンパク質(NP)のエピトープを認識するモノクローナル抗体(Anti-NP)を塗布した (Fig. 1D)。ウイルスサンプルをクロマト上に展開後、テストライン上で亜型特異的な“ゲノム RNA-核タンパク質複合体”、コントロールラインで核タンパク質を捕獲し、核タンパク質を検出用の金コロイド修飾した抗 NP モノクローナル抗体 (Gold-anti-NP) にて標識した。

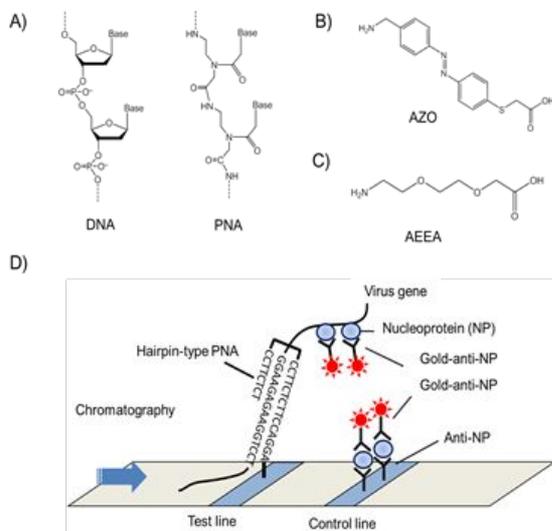


Fig. 1 A) DNA と PNA の化学構造。B) 核酸リンカー分子: AZO(アゾベンゼンアミノ酸)。C) スペース分子: AEEA(アミノエチルエトキシアセテート)。D) ヘアピントタイプ PNA による標的ゲノム結合様式。

4. 研究成果

(1) クロマトグラフィーキットの評価

作製した各クロマトキットに対して、以下のインフルエンザウイルス株を用いた評価試験を行った。

ヒト分離ウイルス(ワクチン株)

A/Beijing/262/95 (H1N1)

A/Panama/2007/99 (H3N2)

トリ分離ウイルス

A/Duck/Hong Kong/293/78 (H7N2)

精製した各ウイルスを感染力価 (ffu: focus forming unit) を指標として、 $10\mu\text{l}$ あたり、 $1.0 \times 10^4 \sim 5.0 \times 10^5$ ffu/キットになるように調整した。各希釈ウイルスとペプチド核酸 ($0.5\mu\text{g}$) $5\mu\text{l}$ を、界面活性剤を含む検体抽出液 $105\mu\text{l}$ を混合し、全量 $120\mu\text{l}$ としてきつとクロマトのサンプルパット上に添加した。

その結果、クロマトのテストライン上では、ウイルスの亜型に適した PNA を滴下した場合に目視で明確なバンド(赤いライン)を確認することができた (Fig. 2)。

ヒト感染性の H1 と H3 亜型に対する検出感度は 1.0×10^4 ffu/kit であり、トリ由来の H7 型に対しては 5.0×10^5 ffu/kit であった。

なお、当該試験において、コントロールラインは、塗布した抗体の反応性が保管中に低下した為に検出感度が下がったことが推測された。今後はライン塗布時に抗体と糖類を添加することで問題の解決を試みる予定である。

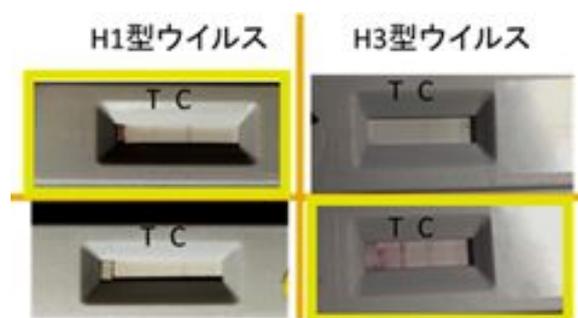


Fig. 2 H1 (上段), H3 型 (下段) 検出用の新規 PNA クロマトを用いた H1, H3 型ウイルス診断結果。図中の T はテストライン、C はコントロールラインを示す。H1 型検出用は H1 型を、H3 型検出用は H3 型を検出することが明らかとなった。

本研究では PNA クロマトグラフィーを全て自作し、ウイルス亜型をゲノム保存配

列に基づいて識別することに成功した。

今後はその感度と特異度をさらに高めることを目指す。

(2) ヒト呼吸器上皮細胞を用いたインフルエンザウイルス高感受性株の作出

ヒト細気管支の上皮細胞より(不死化)細胞株を樹立し、H5N1等の鳥インフルエンザウイルス(AIV)感染動態の解析を進め、以下の知見を得た。

細気管支上皮細胞には異なるエンドソームpH(後期エンドソーム:pH5.0とpH5.5)を持つ細胞が存在し、細胞内に侵入したウイルスの増殖を制御していること。

多くのAIVではpH5.5細胞では増殖が限定的であるのに対し、高病原性H5N1ウイルスが例外的に、(ヒト由来臨床株と同様)両タイプの細胞に高率に感染し、増殖すること。

これら樹立した細胞は、ヒト生体内の呼吸器上皮細胞の性質を癌由来細胞株に比べてより強く反映していることが期待できる。

今後はインフルエンザウイルスのみならず、各種重症呼吸器感染症を引き起こす病原ウイルスの分離培養に応用できるか否かを評価する予定である。

(3) H5N1 検出用イムノクロマトキット

企業との共同研究により、H5N1ウイルスを特異的に検出する金コロイドを用いたイムノクロマトキットの開発に成功し、〔産業財産権〕記述した特許を取得した。

また、研究期間中の受賞、新聞発表を以下にまとめた。

<受賞、新聞報道等>

名称 (年月)	概要
受賞	
化学とマイクロ・ナノシステム学会ポスター賞 2013年5月	マイクロデバイス上におけるウイルス粒子の分取、検出技術 (開発邦宏)

日本化学会、優秀講演賞(産業) 2013年4月	新規ペプチド核酸クロマトを用いたインフルエンザウイルスゲノムの診断技術の創製に関する評価(開発邦宏)
米国電気電子学会 MHS-2012 最優秀論文賞 2012年10月	マイクロデバイスを用いたニューカッスルウイルスの分離方法に関する評価(中屋隆明、中村昇太、開発邦宏)
新聞発表	
毎日新聞、朝日新聞、産経新聞、共同ニュース(共同通信、ほか地方紙13紙WEB)、時事ドットコム、ヤフーニュース 2013年8月21日	「インフルの型、5分で判定 阪大准教授開発 町の医師も診断可能」 (開発邦宏)
日本経済新聞 2014年7月	「新型インフル判定」 新型インフルエンザウイルスを判定できる核酸クロマトの発表。(開発邦宏)
日経産業新聞 2014年12月4日	「インフル実験ヒト細胞で」 ヒト呼吸器上皮細胞よりインフルエンザ高感受性(不死化)細胞株の樹立に成功。(大道寺智、中屋隆明)

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20件)

<英文原著> ([4] 以外全て査読有り)

1. Watanabe Y, Arai Y, Daidoji T, Kawashita N, Ibrahim MS, El-Gendy E, Hiramatsu H, Kubota-Kokestu R, Takagi T, Murata T, Takahashi K, Okuno Y, Nakaya T, Suzuki Y, Ikuta K. Characterization of H5N1 Influenza Virus Variants with Hemagglutinin Mutations Isolated from Patients. mBio. 2015 Apr 7;. 6 (2). e00081-15. doi:10.1128/mBio.00081-15
2. Okamoto M, Miyazawa T, Morikawa S, Ono F, Nakamura S, Sato E, Yoshida T, Yoshikawa R, Sakai K, Mizutani T, Nagata N, Takano J, Okabayashi S, Hamano M, Fujimoto K, Nakaya T, Iida T, Horii T, Miyabe-Nishiwaki T, Watanabe A, Kaneko A, Saito A, Matsui A, Hayakawa T, Suzuki J, Akari H, Matsuzawa T, Hirai H. Emergence of infectious malignant thrombocytopenia in Japanese macaques (*Macaca fuscata*) by SRV-4 after transmission to a novel host. Sci Rep. 2015 Mar 6;5:8850. doi: 10.1038/srep08850.
3. Daidoji T, Watanabe Y, Ibrahim MS, Yasugi M, Maruyama H, Masuda T, Arai F, Ohba T, Honda A, Ikuta K, Nakaya T. Avian Influenza Virus Infection of Immortalized

- Human Respiratory Epithelial Cells Depends upon a Delicate Balance between Hemagglutinin Acid Stability and Endosomal pH.
J Biol Chem. 2015 Apr 24;290(17):10627-42. doi: 10.1074/jbc.M114.611327. Epub 2015 Feb 11.
4. Motooka D, Nakamura S, Hagiwara K, Nakaya T. Viral detection by high-throughput sequencing. *Methods Mol Biol.* 2015;1236:125-34. doi: 10.1007/978-1-4939-1743-3_11.
 5. Watanabe Y, Ito T, Ibrahim MS, Arai Y, Hotta K, Phuong HV, Hang NL, Mai LQ, Soda K, Yamaoka M, Poetranto ED, Wulandari L, Hiramatsu H, Daidoji T, Kubota-Koketsu R, Sriwilaijaroen N, Nakaya T, Okuno Y, Takahashi T, Suzuki T, Ito T, Hotta H, Yamashiro T, Hayashi T, Morita K, Ikuta K, Suzuki Y. A novel immunochromatographic system for easy-to-use detection of group 1 avian influenza viruses with acquired human-type receptor binding specificity. *Biosens Bioelectron.* 2014 Oct 22;65C:211-219. doi: 10.1016/j.bios.2014.10.036.
 6. Niimi M, Masuda T, Kaihatsu K, Kato N, Nakamura S, Nakaya T, Arai F. Virus purification and enrichment by hydroxyapatite chromatography on a chip. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 2014, 201:185-190. doi: 10.1016/j.snb.2014.04.011
 7. Pan Y, Sasaki T, Kubota-Koketsu R, Inoue Y, Yasugi M, Yamashita A, Ramadhany R, Arai Y, Du A, Boonsathorn N, Ibrahim MS, Daidoji T, Nakaya T, Ono KI, Okuno Y, Ikuta K, Watanabe Y. Human monoclonal antibodies derived from a patient infected with 2009 pandemic influenza A virus broadly cross-neutralize group 1 influenza viruses. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014, Jul 18;450(1):42-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.060.
 8. M. Yasugi, R. Kubota-Koketsu, A. Yamashita, N. Kawashita, A. Du, R. Misaki, M. Kuhara, N. Boonsathorn, K. Fujiyama, Y. Okuno, T. Nakaya, Ikuta K, “Emerging antigenic variants at the antigenic site Sb in pandemic A(H1N1)2009 influenza virus in Japan detected by a human monoclonal antibody”, *PLoS One*, Vol.8(10), e77892 (2013) doi: 10.1371/journal.pone.0077892.
 9. Kaihatsu K, Sawada S, Kato N. Rapid identification of swine-origin influenza A virus by peptide nucleic acid-chromatography. *J. Antivirals & Antiretrovirals s. 4, 77-79 (2013).*
 10. *K. Kaihatsu, S. Sawada, S. Nakamura, T. Nakaya T, Yasunaga, N. Kato, “Sequence-Specific and Visual Identification of the Influenza Virus NS Gene by Azobenzene-Tethered Bis-Peptide Nucleic Acid”, *PLoS ONE*, Vol.8(5), e64017 (2013) doi: 10.1371/journal.pone.0064017.
 11. M. Morita, K. Kuba, M. Nakayama, A. Ichikawa, J. Katahira, R. Iwamoto, T. Watanebe, S. Sakabe, T. Daidoji, S. Nakamura, A. Kadowaki, T. Nakanishi, H. Nakanishi, R. Taguchi, T. Nakaya, M. Murakami, Y. Yoneda, H. Arai, Y. Kawaoka, J.M. Penninger, M. Arita, *Y. Imai, “The lipid mediator protectin D1 inhibits influenza virus replication and improves severe influenza”, *Cell*, Vol.153, pp.1–14 (2013) doi: 10.1016/j.cell.2013.02.027
 12. M. Yasugi, R. Kubota-Koketsu, A. Yamashita, N. Kawashita, A. Du, T. Sasaki, M. Nishimura, R. Misaki, M. Kuhara, N. Boonsathorn, K. Fujiyama, Y. Okuno, T. Nakaya, * K. Ikuta, “Human Monoclonal Antibodies Broadly Neutralizing against Influenza B Virus”, *PLoS Pathog.*, Vol.9(2), e1003150 (2013) doi: 10.1371/journal.ppat.1003150
 13. M.E. Manriquez, A. Makino, M. Tanaka, Y. Abe, H. Yoshida, I. Morioka, S. Arakawa, Y. Takeshima, K. Iwata, J. Takasaki, T. Manabe, T. Nakaya, S. Nakamura, A.L. Iglesias, R.M. Rossales, E.P. Mirabal, T. Ito, T. Kitazawa, T. Oka, M. Yamashita, K. Kudo, K. Shinya. “Emergence of HA mutants during influenza virus pneumonia.” *Int J Clin Exp Pathol.*;5(8):787-795. (2012)
 14. E, Iino R, Morone N, Kaihatsu K, Sakakihara S, Kato N, Noji H. Label-free single-particle imaging of the influenza virus by objective-type total internal reflection dark-field microscopy. *PLoS One.* 2012;7(11):e49208. doi: 10.1371/journal.pone.0049208
 15. Y. Watanabe, M.S. Ibrahim, H.F. Ellakany, N. Kawashita, T. Daidoji, T. Takagi, T. Yasunaga, T. Nakaya, * K. Ikuta, “Antigenic Analysis of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus H5N1 Sublineages Co-Circulating in Egypt”, *J Gen Virol.* Vol.93(Pt 10), pp.2215-2226 (2012) doi: 10.1099/vir.0.044032-0
- <和文原著> (全て査読無し)
- [1] 中屋隆明 「ヒューマンパピローマウイルスの最新の話題」, 京府医大誌 123(5), 319-324, (2014)
 - [2] 中屋隆明 「鳥インフルエンザ」 *Neuroinfection* 18(1), 28-33, (2013)
 - [3] 中屋隆明 「インフルエンザウイルスHA

- タンパク質の病原性分子機構」京府医大誌 122(3), 123-131, 総説, (2013)
- [4] 中屋隆明「次世代シーケンサーのウイルス性疾患同定への適用」臨床とウイルス 40(4), 177-183, (2012)
- [5] 中村昇太, 中屋隆明, 飯田哲也「メタゲノム解析を応用した網羅的病原体検出法」最新医学 67(No.9):131-133, (2012)

〔学会発表〕(計 15 件)

- [1] 中屋隆明、「環境中微生物の網羅的探索(メタゲノム解析)」第 2 回大気エアロゾルシンポジウム、日本、平成 27 年 2 月 20 日、(基調講演)
- [2] 中屋隆明、「しのび寄る新興感染症における最新の話題」第 20 回京都地域医療フォーラム、日本、平成 26 年 9 月 20 日、(招待講演)
- [3] 中屋隆明、「鳥インフルエンザ」日本神経感染症学会、日本、平成 24 年 10 月 20 日、(教育講演)
- [4] 中屋隆明、「インフルエンザウイルスの宿主域拡大戦略」CREST 公開シンポジウム「光が拓く細胞解析の新展開」、日本、平成 24 年 8 月 18 日、(招待講演)
- [5] 中屋隆明、「新興・再興ウイルス感染症のダイナミクス」びわ湖国際医療フォーラム、日本、平成 24 年 7 月 14 日、(特別講演)

- [6] 開發邦宏、「Improved sequence-specificity of Tolane-modified peptide nucleic acid」第 11 回バイオオプティクス研究会、日本、2014 年 12 月 5 - 6 日(招待講演)
- [7] 開發邦宏、「ウイルス遺伝子の迅速目視診断技術の開発」イノベーションジャパン-2014、日本、2014 年 9 月 10 - 12 日、(依頼講演)
- [8] 開發邦宏、「Diagnosis of influenza virus gene by peptide nucleic acid-immobilized device」Microbiology & Infections Disease Asia Congress. 中国、2014 年 6 月 27 - 29 日(招待講演)
- [9] 開發邦宏、「Rapid identification of influenza A virus gene by peptide nucleic acid-chromatography」Annual World Congress of Microbes. シンガポール、2014 年 6 月 9 - 11 日(招待講演)
- [10] 開發邦宏、「Effect of Non-natural Amino Acids on the Functions of Peptide and Peptide Nucleic Acid.」Annual World Protein & Peptide Conference. 中国、2014 年 4 月 24 - 29 日(招待講演)
- [11] 開發邦宏、「Identification of influenza virus by anti-viral gene peptide nucleic acid」The 17th Sanken International Symposium, The 2nd International Symposium of Nano-Macro Materials, Device, and System Research Alliance Project、日本、平成 26 年 1 月 21 - 22 日(招待講演)
- [12] 開發邦宏、「ゲノム一塩基変異を識別す

る非天然核酸の創製」第 10 回バイオオプティクス研究会、日本、2013 年 12 月 8 日(招待講演)

- [13] 開發邦宏、「Diagnosis of influenza A/H1N1pdm virus genome by hairpin-type peptide nucleic acid chromatography」Option for the Control of Influenza IIIV. 南アフリカ、2013 年 9 月(依頼講演)
- [14] 開發邦宏、「ペプチド核酸の DNA, RNA 識別に及ぼす化学修飾の影響」第 9 回バイオオプティクス研究会、日本、2012 年 12 月 7 日(招待講演)
- [15] 開發邦宏、「ヘアピン型ペプチド核酸を用いたタミフル耐性ウイルスの迅速診断キットの開発」TANAKA ホールディングス研究助成記念講演会、日本、2012 年 6 月 15 日(招待講演)

〔図書〕(計 2 件)

- [1] 開發邦宏、加藤修雄、「ペプチド核酸を利用したインフルエンザウイルスのゲノム診断法」化学工業 8 巻、25-29 頁、2013 年 8 月
- [2] 中村昇太、飯田哲也・中屋隆明・堀井俊宏、「感染症研究への次世代シーケンサーの応用」化学同人、2015 年 3 月

〔産業財産権〕

- 出願状況(計 0 件)
取得状況(計 1 件)
名称：高病原性鳥インフルエンザ H5N1 亜型ウイルスの検出キット
発明者：中屋隆明(他 4 名)
権利者：田中貴金属工業(株)・大阪大学
種類：
番号：第 5597190 号
出願年月日：平成 21 年 10 月 1 日
取得年月日：平成 26 年 8 月 15 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中屋 隆明 (NAKAYA, Takaaki)
京都府立医科大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：8 0 2 7 1 6 3 3

(2) 研究分担者

開發 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：7 0 4 1 9 4 6 4

(3) 連携研究者