

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：34504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05914

研究課題名(和文) ラマン分光法を用いたウイルス感染のリアルタイム分析

研究課題名(英文) Real time analysis of virus infection using Raman spectroscopy

研究代表者

佐藤 英俊 (SATO, HIDETOSHI)

関西学院大学・理工学部・教授

研究者番号：10300873

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：感染者無しでヒト感染性ウイルスを3時間で検出する技術の開発を目指している。ヒト培養細胞にウイルス試料を加え、ラマン分光分析法で感染細胞に現れる変化を検出する技術である。DNAウイルスに加えRNAウイルス(レンチウイルス)を感染3時間で検出できることを確認した。スペクトル分析は核酸の組成変化を示していた。実験に用いる遺伝子組換えウイルスは、ウイルス起源のタンパク質の遺伝子を持たない。細胞へ取り込まれることが知られるウイルス外殻タンパク質のみを細胞に加えた場合、ラマンスペクトルの変化が観測されなかった。従って、ウイルスの核酸複製は感染初期から生じ、ラマン分析によって検出できることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

開発した技術は、従来難しかった空気中のヒト感染性ウイルスを、選択的に検出することを可能とする技術の基礎である。空気中に漂うウイルスを、短時間、連続的、かつ低コストでスクリーニング検出することで、病原性ウイルスのパンデミックを阻止することができる。一方、一部の研究者が指摘するように無数の無症状ウイルスが実在して病原性ウイルスが検出できない場合、これは、ウイルス研究に対する重要な情報であるとともに、高等生物間のウイルス媒介の遺伝子交換が頻繁に起きていることを示唆するものであり、生物進化の研究に対する重要な貢献になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the study is to develop a technique to detect human infectious viruses without any patients. The technique is based on the Raman analysis of live human cells cultured with a sample which may includes viruses. We have succeeded in detection of RNA virus as well as DNA virus only in 3 h after the virus infection. The spectrum suggested the modifications of nucleic acids in the infected cell. The recombinant virus used in the study lacked genes of proteins. When the virus capsid protein was added in the cultured cells, there was no change observed in the spectrum. Hence, the genetic duplication due to the virus takes place quite early after the infection and it is capable to detect it by Raman analysis.

研究分野：生命医用分光学

キーワード：ウイルス検出 ウイルススクリーニング 感染性ウイルス ラマン分光法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト感染性ウイルスは、誰かが感染し何らかの症状を顕して、初めてその存在を検出することができる。しかし、人が症状を呈するまでには感染後数日を要することから、現在の技術で感染性の高いウイルスの拡散を押さえることは不可能である。また、エボラ、デング、MARS、SARSウイルスなど、致死率の高いウイルスについても、人が犠牲になって初めて存在が確認されるのが現状である。空気中に浮遊したり、物に付着したヒト感染性ウイルスを、光学顕微鏡で見つけ出すことはできず、PCR 検出は、特定された既知ウイルスについては応用できるが、タイプや型の分からないウイルスには応用できない。複数の培養細胞に対するウイルスの増殖能力などを用いてウイルスの種類を特定する技術はあるが、数日~10 日の時間が必要である。従って、新しい原理に基づくヒト感染性ウイルスの検出技術が必要である。我々はヒト培養細胞を用いて、アデノウイルスの侵入を、感染後わずか3 時間で検出する技術の開発に成功した。本技術が他のウイルスにも応用できるのか調査し、またその検出原理を明らかにすることで、開発技術と知見をヒト感染性ウイルスのリアルタイムスクリーニング技術の開発に役立てることを目指す。

2. 研究の目的

犠牲者が出る前に、かつウイルス拡散を阻止できるほど早く、ヒト感染性ウイルスを検出する技術を実現することが、最終的な目的である。本研究では、ラマン分光およびレーザー技術を用い、ウイルスの細胞への感染を研究する基盤技術を開発する。本研究では、ウイルス感染のごく初期に細胞に生じる分子レベルの変化を調べ、ウイルス特異性や変化の原因を明らかにすることを目指している。本技術がヒト感染性ウイルスの一般的な検出法となり得るのか、どこまでウイルスの判別が可能かなどについての知見を得ることが必要である。開発技術は免疫染色や遺伝子解析と異なり、未知ウイルスへの応用が可能である。検出時間の短縮、判別できるウイルス種の判別への応用の他、ウイルス疾患に対する創薬や治療法の研究開発に資する新しい技術へと発展させる基盤とすることを目指す。

3. 研究の方法

早期検出技術の開発と判別根拠の解明を目指して実験を進めた。ウイルスは安全な遺伝子組換え体を用いた。DNA ウイルスであるアデノウイルスとともに、RNA ウイルスであるレンチウイルスを用い、細胞の反応を経時的に、詳細に調査した。研究初期に技術開発を集中し、装置の改良とウイルスの効率的な調整技術の構築を行った。当研究室で開発した蛍光-ラマン顕微システムを用い、蛍光タンパク質を用いた標識実験を導入した。ウイルス感染による細胞内分子組成の変化は小さく、精度や再現性の確認が重要であり、最終的に多数のデータを集めて信頼性の高い判別モデルを構築した。ウイルスの外殻タンパク質は細胞に取り込まれることが知られており、外殻タンパク質のみを培養細胞に加え、細胞の反応を研究することで、ラマン分光分析で検出されている変化がどのような生命活動に由来するのかを調査した。

4. 研究成果

早期検出

RNA ウイルスであるレンチウイルスを精製し、細胞に導入して反応を詳細に解析する実験手順を構築した。ウイルス感染に対する細胞の反応は、短時間では小さいため、高感度な測定と分析技術が必要であった。我々が開発した蛍光-ラマン顕微鏡の試料室には CO₂ インキュベーターを搭載している。感度改良のために導入した水浸レンズが熱を奪うなどの問題で、温度制御の精度が低下することが明らかとなり、これを改善するなどの改良を行った。

遺伝子改変レンチウイルスは、遺伝子として RNA を持ち、GFP を宿主細胞で発現させる能力を持つ。外殻タンパク質をコードする遺伝子を取り除いてあり、外殻タンパク質はプラスミドを用いて別の細胞で発現させ、増殖させた RNA と融合してウイルス体を作り出す。従って、培養細胞に作用させると GFP による蛍光を示すが、ウイルスは増殖しない。

図1に、レンチウイルスを感染させた HEK293 細胞の、感染3 時間後のラマン分光分析結果を示す。各マークがランダムに選ばれた単一細胞のデータを示している。ウイルス無しの細胞は点線より下の同グループに観測され、細胞が安定的に培養されていることを示している。ウイルス導入直後(0 時間培養)の細胞も、点線以下のグループに重なって分布しており、ウイルス侵入にはある程度時間がかかることを示している。一方、ウイルス導入から3 時間後の細胞のうち、多くの細胞が点線を越えて判別されている。24 時間まで観測を続けたが、ウイルス感染細胞のデータはウイルス無しのグループ側に戻ることは無かった。本結

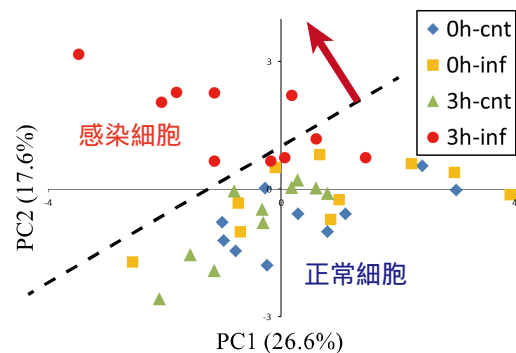


図1、レンチウイルスに感染した細胞の変化を分析したPCAスコアプロット。(ウイルス無し、0 時間培養)、(ウイルス有り、0 時間培養)、(ウイルス無し、3 時間培養)、(ウイルス有り、3 時間培養)

果は、DNA ウィルスであるアデノウィルスと同様に、ラマン分光分析を用いて RNA ウィルスであるレンチウィルスの細胞への感染が3時間で検出できることを示している。細胞内の GFP 発現は、感染 24 時間後によろやく 30%の細胞で観測された。本研究で用いたレンチウィルスは宿主細胞ゲノムに GFP 遺伝子を組み込んで発現させることから、遺伝子組み込み反応や細胞のタンパク質合成には長い時間がかかることを示唆している。

判別根拠の解明

レンチウィルス感染の判別への貢献が高い、主成分 2 のローディングを分析した結果、全ての観測時間で核酸のスペクトル領域で強い変化が見られることが示唆された。9 時間目よりタンパク質の変化が強く観測されたアデノウィルスとは大きく異なる。遺伝子組換えアデノウィルスはレンチウィルスとは異なる仕組みで安全性を確保する。ウィルス感染の初期に順次発現する E1-E4 タンパク質のうち、E1 と E3 を除去している。E1 が無いとウィルス遺伝子を複製する働きを持つ E2 が発現せず、感染反応はそこで停止する。(E3 は免疫システムを無効化するタンパク質で本研究には関係ない。) HEK293 細胞は遺伝子改変により、E1 遺伝子をすでに持っているため、遺伝子組換えアデノウィルスはこの細胞内でのみ通常の増殖反応を示す。一方レンチウィルスは、ウィルスが持つわずかな逆転写酵素と遺伝子組換えで生じる GFP 以外に、細胞内にタンパク質を生じない。判別に関わる成分分析の結果は、ウィルスの持つ特徴を明らかに反映していることが分かる。

次に、レンチウィルス感染で生じる核酸成分の変化の原因について研究した。アデノウィルス感染初期に観測される核酸成分の変化との比較を試みたが、ノイズが強く両者が一致しているかどうかを確認することは、現時点では困難であった。レンチウィルスの外殻タンパク質は細胞に取り込まれることが知られている。外殻タンパク質を含む培養液を細胞に添加し、24 時間の観察を行ったが、細胞変化は検出されなかった。この結果は、細胞がウィルス感染時に行うとされる抗原提示反応などの活動が、大規模な遺伝子複製やタンパク質発現などを含まないことを示している。すなわち、ウィルス遺伝子の侵入によって開始される各種の遺伝子複製反応は、ウィルスの性質に支配される大規模な反応であり、異なるウィルス種を感染の早期(3時間以内)に判別できることを示唆している。

実用化のための展望

本研究成果は、ラマン分光法を用いたヒト培養細胞の分析により、ヒト感染性ウィルスを3時間以内に検出および判別できることを示唆している。現在の世界における COVID-19 ウィルスの感染拡大状況は、ヒト感染性ウィルスが社会に与える影響が甚大になり得ることを示している。特に国や地域を越えた感染の拡大では、飛行機や船などの密室での空気・飛沫感染が問題になることを示した。開発技術ではウィルスを含む培養液を細胞に添加しているが、空気中の飛沫などを培養液中に収集する技術を完成させれば、連続的、低コスト、かつリアルタイムに近いヒト感染性ウィルスのモニタリングが可能となる。また、本技術をマイクロ流路に応用し、最小発症ウィルス数以下での細胞感染観察を行うことにより、安全で効率よい封じ込めレベルを実現し、危険なウィルスの研究を加速することもできるであろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mahardika Anggara, Susanto A. B., Pramesti Rini, Matsuyoshi Hiroko, Andriana Bibin Bintang, Matsuda Yusuke, Sato Hidetoshi	4. 巻 31
2. 論文標題 Application of imaging Raman spectroscopy to study the distribution of Kappa carrageenan in the seaweed Kappaphycus alvarezii	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Applied Phycology	6. 最初と最後の頁 1383 ~ 1390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10811-018-1618-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hashimoto Kosuke, Andriana Bibin B., Matsuyoshi Hiroko, Sato Hidetoshi	4. 巻 143
2. 論文標題 Discrimination analysis of excitatory and inhibitory neurons using Raman spectroscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Analyst	6. 最初と最後の頁 2889 ~ 2894
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8AN00051D	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Moor Kamila, Terada Yusuke, Taketani Akinori, Matsuyoshi Hiroko, Ohtani Kiyoshi, Sato Hidetoshi	4. 巻 23
2. 論文標題 Early detection of virus infection in live human cells using Raman spectroscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Optics	6. 最初と最後の頁 1 ~ 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1117/1.JBO.23.9.097001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mahardika Anggara, Andriana Bibin B., Susanto AB, Matsuyoshi Hiroko, Sato Hidetoshi	4. 巻 72
2. 論文標題 Development of Quantitative Analysis Techniques for Saccharification Reactions Using Raman Spectroscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Applied Spectroscopy	6. 最初と最後の頁 1606 ~ 1612
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0003702818779093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Taketani Akinori、Andriana Bibin B.、Matsuyoshi Hiroko、Sato Hidetoshi	4. 巻 142
2. 論文標題 Raman endoscopy for monitoring the anticancer drug treatment of colorectal tumors in live mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Analyst	6. 最初と最後の頁 3680 ~ 3688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c7an00720e	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 B. B. Andriana, A. Mahardika, A. Maryani, A. Taketani, S. Kato, S. Fujiwara, H. Sato
2. 発表標題 Raman Probe Study of Biogenic Molecules Essential Content on Tempeh
3. 学会等名 SCIX2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Sato, K. Hashimoto, A. Mahardika, K. Moor, M. Ishigaki, A. Taketani, B. B. Andriana, and H. Matsuyoshi
2. 発表標題 Development of instrument and analytical method for clinical application of Raman spectroscopy
3. 学会等名 SCIX2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Sato, K. Moor, A. Mahardika, K. Hashimoto, A. Taketani, M. Ishigaki, and B. B. Andriana
2. 発表標題 Raman Spectroscopy for Analysis Biological Reaction
3. 学会等名 ICORS 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Sato, A. Maharadika, K. Hashimoto, K. Moor, A. Taketani, B. B. Andriana, H. Matsuyoshi, C. Huck, and Y. Ozaki
2. 発表標題 Development of instrument and analysis technique for clinical Raman spectroscopy
3. 学会等名 SPEC 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hidetoshi Sato, Bibin B. Andriana, Hiroko Matsuyoshi, Yasuhiro Maeda, and Satoshi Wada
2. 発表標題 Develeopment of CARS system with dual-wavelength oscillation electronically tuned Ti:sapphire laser
3. 学会等名 Scix (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤英俊, アンガラ マハラディカ, 竹谷皓規, ビビン B. アンドリアナ, 松吉ひろ子
2. 発表標題 医師が使える生体ラマン分光分析技術を目指して
3. 学会等名 医用分光学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤英俊, 竹谷皓規, アンドリアナB. ビビン, 松吉ひろ子
2. 発表標題 医学に利用できるラマン分光技術の開発
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2017年~2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----