

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08434

研究課題名(和文) 各種アルボウイルスの鑑別診断法の開発

研究課題名(英文) Development of differential diagnostics for various arboviruses

研究代表者

井上 真吾 (INOUE, Shingo)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：00346925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アルボウイルスの中で血清学的に交差反応がある事が知られているフラビウイルス科の黄熱ウイルスおよびデングウイルス間の鑑別診断を目指してIgMおよびIgG検出エピトープブロッキングELISAの開発を目指した。その結果、IgG検出系においては黄熱ワクチン接種者の血清を有意に検出できた。

IgM検出系については、黄熱に自然感染した患者血清が研究期間中に入手できなかったため本検出系が有効に機能するかが検証できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、黄熱とデング熱といった同じウイルス科に属し血清交差反応を示すフラビウイルス感染症が共に存在している地域において明確に区別を付けられることで正確な診断が可能になり、感染症流行状況の把握が出来るという点である。さらに、デング熱の場合二次感染であれば重症化し、デング出血熱やデングショック症候群にもなるため、デングウイルス感染症であるか否かの診断法の開発は社会的に大変意義のあるものである。今回は黄熱の診断ができたところで終わってしまったが、本件作法でデング熱でないことを判定できれば鑑別診断法の開発として一歩前進したことになると思う。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project was to develop the differential diagnostic system between flaviviruses (yellow fever (YFV) versus dengue virus (DENV)) using IgM or IgG detection Epitope blocking (EB) ELISA system. Regarding the IgG detection EB ELISA system, YFV vaccinated person's serum was successfully detected using this system. However, IgM detection system was not able to evaluate this system due to the lack of YFV naturally infected patient sera which shows high IgM antibody titer.

研究分野：ウイルス学

キーワード：黄熱ウイルス デングウイルス エピトープブロッキングELISA モノクローナル抗体 血清交差反応
IgM抗体 IgG抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ウイルス感染症の診断法には、ウイルス分離、ウイルス遺伝子の検出(PCR)などウイルスの存在を証明する方法が多くの場合取られてきたが、ウイルス血症の時期を過ぎてしまうとこれらの方法は困難となり、血清診断(IgM抗体、IgG抗体検出ELISAおよび中和試験など)が行われてきた。蚊やダニなどが媒介する熱帯地域のアルボウイルス感染症の診断法の問題には、コスト、P3実験施設、時間などいろいろあるが、それ以上の問題は血清診断では同じウイルス科に属する別のウイルスと患者抗体との交差反応が強くなるため正確な診断が難しい点である。例えば東南アジアではデング熱と日本脳炎、東アフリカではチクングニア熱とオニオンニオン熱、オセアニア地域ではチクングニア熱とロスリバー熱、アフリカや中南米では黄熱とデング熱とジカ熱がそれぞれ区別できる診断法の開発が喫緊の課題である。

(2) これまでの血清学的診断法の弱点である血清交差反応を解決する新しい方法として、ウイルス特異的なモノクローナル抗体を用いた検査法の開発である。モノクローナル抗体は様々なウイルスタンパクのエピトープの内一つだけを認識し結合する。そのエピトープの中にはウイルス特異的なエピトープもあれば同じウイルス科で共通なエピトープもある。ということは、ウイルス特異的なエピトープの認識するモノクローナル抗体をうまく利用すれば、この患者がどのウイルスに感染しているのか診断できるはずであると考えた。そこで競合ELISA(Competitive ELISAとEpitope Blocking ELISA)が報告されていた(Paweska JT et al., 2005, Konishi et al., 2011)^{①、②}。しかし残念ながら、これらはいずれもIgG抗体の量の差を測定することにより病原体を特定しており、IgM抗体を測定することが必要である急性感染症の診断の場合には不十分であり、IgM抗体の測定ができるエピトープブロッキングELISAの開発が急務とされていた。IgM抗体を上記の方法で測定できることになれば多くのアルボウイルスの診断に直結できると考え、本研究に至った。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、蚊が媒介するウイルス(アルボウイルス)病を実験室診断で見分ける方法を開発することである。アルボウイルス感染症にはデング熱、日本脳炎、黄熱、西ナイル熱(脳炎)、ジカウイルス感染症、チクングニア熱、オニオンニオン熱、ロスリバー熱、シンドビス、リフトバレー熱などがあり、軽症例では発熱、インフルエンザ様症状、筋肉痛、関節痛、腹痛、重症例では、脳炎、髄膜炎、出血熱、関節炎など似通っているため臨床症状から区別するのが非常に難しい。今日、活発な海外への渡航、貨物の輸送等によりこれらのアルボウイルスたちが日本へ侵入してくることが頻繁に発生しているにもかかわらず、現在用いられている診断法は十分に迅速とは言い難い。アウトブレイク対策は時間との戦いであり、診断が遅れば患者数は増加し汚染地域は見る見る広がっていく。そこで、迅速かつ正確な診断法を開発することでよりの確な治療、早期の封じ込め対策、有効な予防策の実施などが可能となり、現代のグローバルな感染症の発生に迅速に対応できることが可能となる。

(2) これらの問題点を解決するため本研究では、エピトープブロッキングELISA(又は競合的ELISA)を応用した診断法の開発を目指す。この方法はすでに一部で報告されており、技術的に可能であることを示している(Paweska JT et al., 2005, Konishi et al., 2011)^{①、②}。本法は各ウイルス特異的モノクローナル抗体を用い、患者血清中の抗体によりモノクローナル抗体の結合すべきエピトープが多くブロックされてしまうか否かにより同ウイルス科に属する2つあ

るいは 3 つのウイルス病のうちどのウイルスに感染しているのかを区別する方法である。ここまでは、すでに技術的に確立されている検査法であるため新たな研究テーマとは言い難い。本研究テーマの取り組みの新しい点は、今まで報告されてきたエピトープブロッキング ELISA (又は競合的 ELISA) が IgG 抗体の有無を調べていたのに対し、IgM 抗体の存在を調べる点である。それは IgG 抗体が過去の感染歴を知るのに役立つのに対し IgM 抗体は現在の感染症が何によるものなのかを知ることができる点にある。急性感染症の診断には IgM の検出およびその抗体価の上昇を見ることが重要である。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、フラビウイルス科ウイルスによる黄熱とデング熱を区別できるウイルス特異的 IgM 検出エピトープブロッキング ELISA (競合 ELISA) の開発を目指した。具体的な方法としては、下記のような 4 つのステップを考えた。

【ステップ 1】組換えタンパクのデザイン

【ステップ 2】組換えタンパクの発現と精製

【ステップ 3】モノクローナル抗体の作出と反応性の評価

【ステップ 4】診断キットへのモノクローナル抗体の応用とキットの評価

【ステップ 1】組換えタンパクのデザイン

同じウイルス科のウイルス間の遺伝子情報を比較し、同じウイルスの株間ではよく保存されているが近縁ウイルスとは明らかに配列の異なるという 2 つの条件を満たす領域を選定し PCR にて増幅する。具体的には、GENEBANK に登録されている各種近縁ウイルスの遺伝子配列を並べて比較し、IgM 抗体が標的としやすいエンベロープタンパク、NS1 タンパク等の遺伝子配列のうち各ウイルス特有の配列のある部分を PCR 増幅する。

【ステップ 2】組換えタンパクの発現と精製

PCR 増幅したウイルスタンパクの遺伝子を各種タンパク発現系に組み込み組換えタンパクを発現させる。具体的には、人工合成あるいは PCR にて標的タンパクの DNA を増幅し、大腸菌のタンパク発現系のプラスミド DNA に組み込む、あるいはカイコに感染するバキュロウイルスを用いたタンパク発現系 (Bac-to-Bac Baculovirus Expression system) を用いてタンパクを発現させる。そして産生されたウイルスタンパクを Refolding、透析、タグ標識を利用したカラム精製法 (His タグ、Frag タグ) にて純度の高い精製ウイルスタンパクを調製する。

【ステップ 3】モノクローナル抗体の作出と反応性の評価

これらの精製組換えタンパクを用いて、マウスに免疫し、モノクローナル抗体を発生する。そしてこのモノクローナル抗体のウイルスとの反応性および特異性について評価する。具体的には、マウスに精製タンパクを複数回免疫し、脾臓を取出し、ミエローマ細胞と細胞融合させ、抗体産生細胞のクローンを複数回スクリーニングし、ウイルス特異的に反応するモノクローナル抗体を産生しているクローンを選別する。その際、同じウイルスに関しては複数の株を用いて株間での反応の安定性が高く、異なるウイルスとの反応が非常に低い、ウイルス特異的モノクローナル抗体を選別していく (本研究の一つ目のキーポイント)。

【ステップ 4】診断キットの開発とキットの評価

開発したウイルス特異的モノクローナル抗体を用いてまずは IgG 抗体の測定系エピトープブロッキング ELISA の開発を目指した。その具体的なアプローチとしては、アッセイ抗原 (黄熱ウイルス組換え発現エンベロープタンパクドメイン I, II, III) を固相化した ELISA プレートに黄

熱患者（あるいは黄熱ワクチン接種者）の IgG 陽性血清を結合させ、その後加えた黄熱ウイルス特異的モノクローナル抗体がどの程度その結合を阻害されるかを IgG 陰性血清の場合と吸光度の差の大きさにより抗体結合阻害率（%）を計算した。デングウイルス感染者の血清の場合はモノクローナル抗体と競合しないので、抗体結合阻害率は低い値を示す。逆にデングウイルス組換え発現エンベロープタンパクをアッセイ抗原として用いた場合黄熱患者血清（あるいは黄熱ワクチン接種者）であろうとデング患者であろうと黄熱ウイルス特異的モノクローナル抗体は結合しないので、抗体結合阻害率は低い値を示す。この2つのアッセイ抗原を使ったエピトープブロッキング ELISA で異なる反応性を示すことにより診断が出来る。

4. 研究成果

(1) 2019 年度は黄熱ウイルス組換えエンベロープタンパクの内ドメイン I,II,III をすべて含む抗原が反応性が高いことが判ったので、大腸菌タンパク発現系を用いた抗原の準備を行った。

(2) Adungo ら (2016) が当研究室で開発した抗黄熱ウイルスモノクローナル抗体が数多く作出されていた。その中から抗黄熱ウイルスモノクローナル抗体全 9 クローンの大量生産および大量精製し、これらのクローンが全て、黄熱ウイルス特異的であることを確認した。

(3) これら黄熱ウイルス組換えタンパクと黄熱ウイルス特異的モノクローナル抗体を用いた IgG 検出エピトープブロッキング ELISA を開発した。黄熱自然感染患者血清が入手できなかったため、黄熱ワクチン接種者血清を用いて行ったところ、競合による強い阻害効率の値が計測できたクローンが1つ、弱い阻害効率で計測できたモノクローナル抗体のクローンが2つあることが判明した。黄熱ワクチン接種者の血清はいずれも50%以上の阻害効率を示したが、デング患者の血清では20%から40%にとどまったので、有意に区別が出来ることを示した。

(4) 2019 年 11 月に始まった世界的な新型コロナウイルス感染症の流行で、2020 年度および2021 年度は新型コロナウイルス IgG 抗体検出系 ELISA の開発を行う必要性に迫られたため、本研究は中断した。なお新型コロナウイルス IgG 抗体検出系 ELISA の開発および評価の成果は Mutantu ら (2021) にて発表された。エピトープブロッキング ELISA 法ではないが、SARS-CoV-2 ウイルスの組換えタンパクの大腸菌発現系でのアッセイ抗原を用いた IgG 間接 ELISA の開発と SARS-CoV2 ウイルス特異的なモノクローナル抗体を用いての IgM 補足 ELISA 法の開発（未発表）などに本研究の成果が活かされた。

<引用文献>

Paweska JT *et al.*, An inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to Rift Valley fever virus in humans, domestic and wild ruminants. *Journal of Virological Methods*, 2005, 127, 10-18.

Konishi E and Konishi M, Nonstructural protein 1 antibody-based epitope blocking enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate Japanese encephalitis virus from dengue virus infections in humans. *Jpn J Infect Dis.*, 2011, 64 284-291.

Adungo F. *et al.*, Development and characterization of monoclonal antibodies to yellow fever virus and their application in antigen detection and IgM capture ELISA. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2016, 23(8), 689-697.

Mutantu P. *et al.*, Development and evaluation of quantitative immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of coronavirus disease 2019 using truncated recombinant nucleocapsid protein as assay antigen. *International J environmental res. and*

public health, 2021, 18, 9630, 1-14.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Pierre Nsele Mutantu, Mya Myat Ngwe Tun, Takeshi Nabeshima, Fuxun Yu, Patrick Kakoni Mukadi, Takeshi Tanaka, Masato Tashiro, Ayumi Fujita, Nobuhiro Kanie, Ryosaku Oshiro, Takahiro Takazono, Yoshifumi Imamura, Tatsuro Hirayama, Meng Ling Moi, Shingo Inoue, Koichi Izumikawa, Jiro Yasuda, Kouichi Morita	4. 巻 18
2. 論文標題 Development and Evaluation of Quantitative Immunoglobulin G Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Diagnosis of Coronavirus Disease 2019 Using Truncated Recombinant Nucleocapsid Protein as Assay Antigen	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of environmental research and public health	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijerph18189630	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Pierre Mutantu
2. 発表標題 Development of quantitative Immunoglobulin G Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID 19)
3. 学会等名 Joint Congress on Global Health 2020 in Osaka
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------