

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04556

研究課題名（和文）超高感度で特異的なデング熱診断システムの開発

研究課題名（英文）Development of an ultrasensitive and specific dengue fever diagnostic system

研究代表者

伊藤 悦朗（Ito, Etsuro）

早稲田大学・教育・総合科学学術院・教授

研究者番号：80203131

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：我が国でも今後増加すると思われる熱帯性感染症などの早期診断を確実にを行うためには、検体から極微量の病原体成分を短時間で特異的に検出する超高感度検出法を開発する必要がある。我々は、サンドイッチELISA法とチオNADサイクリング法とを組み合わせた「極微量タンパク質測定法」の原理を発明した。本研究ではこの原理に基づいた測定法を最適化することで、タンパク質を超高感度で測定する世界初のシステムの構築を目指した。その適用例としてデング熱（デングウイルス）の早期診断システムの構築を試みた。デングウイルスNS1タンパク質をモデルタンパク質とし、かつ、患者検体は、台湾の高雄医学大学から共同研究として譲渡された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって超高感度タンパク質測定法が確立できたので、血中のタンパク質のみならず、さらに格段に低い濃度で存在すると考えられる尿中または唾液中のタンパク質の測定が可能となるはずである。これによって非侵襲的診断が可能となり、特に採血が困難な新生児や高齢の患者にとっては極めて安心・安全な診断法となる。この社会的意義は大きいと考える。なお本方法は、抗体を交換するだけでいかなる感染症にも応用でき、極めて高い汎用性がある点に、学術的意義がある。

研究成果の概要（英文）：To achieve early diagnosis of tropical infectious diseases, which are expected to increase in Japan in the future, it is necessary to develop an ultrasensitive detection method to specifically detect trace amounts of pathogen components from specimens in a short time. We have invented the principle of "ultra trace protein assay" combining the sandwich ELISA and thio-NAD cycling methods. By optimizing the assay based on this principle, we aimed to construct the system to measure proteins with ultrasensitivity. As an example of its application, we attempted to construct an early diagnosis system for dengue fever (dengue virus). The dengue virus NS1 protein was used as a model protein, and patient samples were transferred from Kaohsiung Medical University in Taiwan as a joint research project.

研究分野：物理系薬学

キーワード：タンパク質測定 感染症 デング熱

1. 研究開始当初の背景

我が国でも今後増加すると思われる熱帯性感染症などの早期診断を確実に行うためには、検体から極微量の病原体成分を短時間で特異的に検出する超高感度検出法を開発する必要がある。これまでは病原体の核酸増幅法が最高感度を得るものとして推奨されてきたが、本研究の目的達成にはさらなる高感度化が必要となる。我々は、サンドイッチ ELISA 法とチオ NAD サイクリング法とを組み合わせた「極微量タンパク質測定法」の原理を發明した。本研究ではこの原理に基づいた測定法を最適化することで、タンパク質を 10^{-18} moles/assay の超高感度で測定する世界初のシステムの構築を目指す。その適用例としてデング熱(デングウイルス)の早期診断システムの構築を試みる。

例えば HIV 検査の場合、ウイルス成分の検出による早期診断と抗ウイルス抗体の検出による後期診断とが現在併用されている。早期診断には NAT 法と呼ばれる PCR 法(すなわち核酸検出法)が利用されているが、これに必要な作業はさほど簡便とは言えず、肝腎の感度も決して高くない。そのためどうしても感染からその鑑別可能時期までに空白期間(Window Period)が生じることになる。当然のことながらこの Window Period をいかに短くするかが医療現場における最重要課題のひとつである。1つの HIV ウイルスあたり、2コピーの RNA が存在し、かつ HIV-1 p24 タンパク質は約 3000(つまり 10^3)個存在する。一般的に NAT 法は 10^3 コピーくらいの検出感度なので、 10^6 個のタンパク質(つまり 10^{-18} moles のタンパク質)が検出できれば、HIV-1 p24 タンパク質の核酸検査ではなく、タンパク質そのものを用いた早期診断抗原検査が可能となる。実際に、我々は 10^{-18} moles/assay の HIV-1 p24 タンパク質検出に成功した実績がある。

本研究では我々の検出方法をさらにブラッシュアップして高感度化し、それを用いてデングウイルスの検出に適用したい。

2. 研究の目的

申請者がこれまでに開発してきた、サンドイッチ ELISA 法とチオ NAD サイクリング法とを組み合わせた「タンパク質の超高感度検出システム」をさらに高感度化し、これをデング熱の早期診断に応用可能かを調べる。これが本研究の目的である。

上述したとおり、我々が開発した「タンパク質の超高感度 ELISA 法」において、(A)まずはさらなる高感度化を図るべく、酵素の改良、基質の改良を含んだ至適条件の検討を行う。目標は、デングウイルス NS1 タンパク質(非構造タンパク質)をモデルタンパク質として 10^{-18} moles/assay の検出を可能にすることである。ちなみに NS1 タンパク質は、我が国の国立感染症研究所ならびに WHO や米国 CDC によって検出が推奨されているタンパク質である。(B)超高感度 ELISA 法の至適条件決定後に、デング熱患者から採取した血液において、デングウイルスの検出を試み、早期診断システムを構築する。ちなみに、NS1 タンパク質は敢えて抽出処理を施す必要は無く、血中に漏出してくることがわかっている。この患者検体は、台湾の高雄医学大学から共同研究として譲渡される。

3. 研究の方法

我々が開発したのが、サンドイッチ ELISA 法と酵素サイクリング法とを組み合わせた「タンパク質の超高感度検出システム」である(図1)。このシステムでは、使用する酵素の種類ができるだけ少ない方が至適条件の決定が容易になるため、その酵素サイクリング法ステップには、酵素が1種類ですむチオ NAD サイクリング法を採用した。サンドイッチ ELISA 法とチオ NAD サイクリング法の2つを組み合わせることで、シグナルは測定時間に対して二次関数的に(正確には三角数として)増加し、短時間での高感度測定が望める。このように我々の超高感度法に基づき、さらにその格段の改良を試みた。

初年度(令和2年度)は、我々の超高感度 ELISA 法を基に、デングウイルス NS1 抗原を特異的に超高感度で検出するための至適条件を探索した。まず、NS1 タンパク質を特異的に認識する抗体の入手に成功した。デングウイルスはフラビノウイルス科フラビノウイルス属のウイルスで、同属には日本脳炎ウイルス、西ナイルウイルス、黄熱ウイルス、ジカウイルスなどがあり、これらの NS1 タンパク質はどれも極め

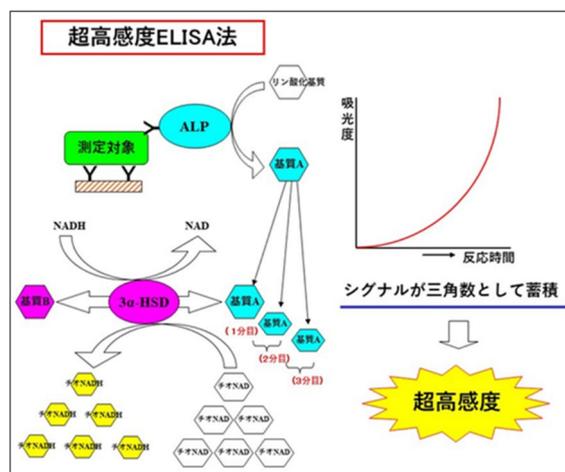


図1. タンパク質の高校感度検出システム

てよく似ている。幸運なことに、我々の超高感度 ELISA 法に興味を示した抗体メーカー A 社が、もともと国内 B 大学で開発されたデングウイルス NS1 タンパク質に対する特異的抗体を持ち込んできた。今回の実験システムにこれを組み込むことにする。超高感度を達成するためには、他にも徹底した至適条件の探索が必要である。酵素については図 1 で示したように、ALP (アルカリリホスファターゼ) と 3 α -HSD (ヒドロキステロイド脱水素酵素) を使用する。本研究において、ALP ならびに 3 α -HSD について市販品で最適なものを見出すことができた。さらに、基質については、図 1 にあるように基本形は Androsterone であるが、その構造上の改良も試みて、最善のものを見出した。

令和 3・4 年度には、台湾・高雄医学大学から譲渡されたデング熱患者の血液の検体を用いて、我々の測定システムで検体内の NS1 タンパク質が十分に測定可能かどうかを検証した。そして、これまでの経験を踏まえて添加回収試験も並行して行った。つまり、血液が、我々の測定システムにどれだけの障害をもたらすかを調べ、その障害効果を検体の希釈によって回避できるかどうか判断した。

4. 研究成果

最初にデングウイルスの NS1 のリコンビナントタンパク質をバッファー中で測定して、検出限界を求めた (図 2)。200 pg/mL から 6.25 pg/mL の希釈を用いることで、最も安定した結果を得ることができた。そして、検出限界が 1.15 pg/mL (2.88×10^{-18} moles/assay) で、定量限界が 7.86 pg/mL (1.96×10^{-17} moles/assay) となり、十分良好な結果を得ることができた。

血清成分が我々の超高感度 ELISA を邪魔しないことを確認するために、添加回収試験を行い、血清の最適な希釈率を求めた。その結果、10 倍希釈が最も回収率の割合が高く、110% であることがわかった。しかし、10 倍希釈の条件では患者血清量が実験に十分でなかったため、回収率が 83% と 2 番目に良かった 1000 倍希釈を選択した。

次に、台湾高雄医学大学から患者血清を 50 検体入手した。その際に、デング熱の種類や高雄医学大学側で行った qPCR によるサイクル閾値 (Ct) などは、ブラインドテストとして情報を明らかにしないで、早稲田大学側での研究を遂行した。われわれの超高感度 ELISA 法におけるシグナル・ノイズ比 (S/N 比) が 1 より大きい場合にデング熱感染陽性、小さい場合に陰性という基準を設けた。

その結果、患者 50 検体すべてにおいて、S/N 比は 1 以上であった。のことは、すべての患者検体が、我々の超高感度 ELISA 法におけるデング熱感染陽性という定義に合致し、高雄医学大学で行われた qPCR の結果と一致することを意味した。qPCR による陽性結果と、我々の超高感度 ELISA 法の陽性結果とは 100% 一致したわけだが、ただしこれは台湾の国としての流行に依存するのだが、50 検体のうち、タイプ 1 が 15 検体、タイプ 2 が 35 検体であることがわかり、本法による臨床診断の可能性をさらに評価するためには、タイプ 3 と 4 の陽性患者検体が必要であることが判明した。

さらなる解析として、我々の当社の超高感度 ELISA による定量結果と、高雄医学大学の qPCR の Ct 値とを比較してみたところ、相関関係は見いだせなかった (図 3)。この点は今後の課題だと考えている。

結論として、NS1 タンパク質を用いたデングウイルスに対する超高感度検出系を確立できた。50 人の患者検体を用いて、臨床診断への応用の可能性が評価できた。そして、qPCR の陽性反応と比較すると 100% の一致を認めることができた。

将来の展望であるが、超高感度 ELISA デングウイルス検出システムの今後の応用について考えたい。診断のための臨床患者検出のほか、疫病の予防においても我々のシステムは重要な役目を果たすであろう。デング熱は蚊が媒介する病気であるため、人間同士のウイルス感染の心配はない。現在、デング熱に関してワクチンがないため、デング熱の予防は、蚊の媒介動物の駆除に重点が置かれている。すなわち、動物の血清 NS1 タンパク質の検出においても本研究はその重要性を示すことになる。もちろん我々

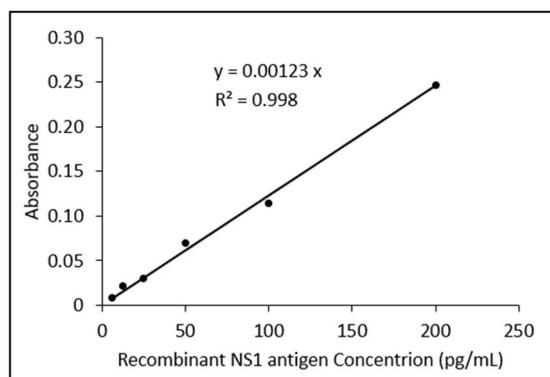


図 2. デングウイルスの NS1 タンパク質を用いたキャリブレーションカーブ

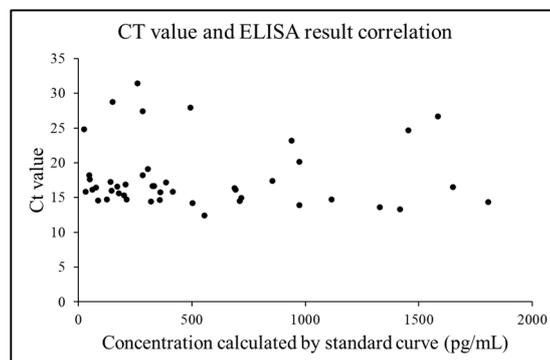


図 3 超高感度 ELISA から得られた NS1 タンパク質量と qPCR の Ct 値の比較

の方法のさらなる改良も必要である。超高感度 ELISA 法のプロトコルの合理化、特に抗原結合時間の問題は、我々のもう一つの課題だと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 K. Iha, N. Tsurusawa, H. -Y. Tsai, M. -W. Lin, H. Sonoda, S. Watabe, T. Yoshimura, E. Ito	4. 巻 654
2. 論文標題 Ultrasensitive ELISA detection of proteins in separated lumen and membrane fractions of cancer cell exosomes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anal. Biochem.	6. 最初と最後の頁 114831
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ab.2022.114831	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
1. 著者名 N. Tsurusawa, K. Iha, A. Sato, H. -Y. Tsai, H. Sonoda, S. Watabe, T. Yoshimura, D. -C. Wu, M. -W. Lin, E. Ito	4. 巻 14
2. 論文標題 Ultrasensitive detection of GRP78 in exosomes and observation of migration and proliferation of cancer cells by application of GRP78-containing exosomes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3887
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14163887	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
1. 著者名 K. Iha, A. Sato, H. -Y. Tsai, H. Sonoda, S. Watabe, T. Yoshimura, M. -W. Lin, E. Ito	4. 巻 44
2. 論文標題 Gastric cancer cell-derived exosomal GRP78 enhances angiogenesis upon stimulation of vascular endothelial cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Curr. Issues Mol. Biol.	6. 最初と最後の頁 6145-6157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cimb44120419	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
1. 著者名 S. Yamura, N. Kawada, S. Yamakado, Y. Kyosei, S. Watabe, T. Yoshimura, Y. Murase, S. Mitarai, E. Ito	4. 巻 204
2. 論文標題 Non-amplification nucleic acid detection with thio-NAD cycling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Microbiol. Meth.	6. 最初と最後の頁 106647
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mimet.2022.106647	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

1. 著者名 Kyosei Y, Namba M, Makioka D, Kokubun A, Watabe S, Yoshimura T, Sasaki T, Shioda T, Ito E.	4. 巻 9
2. 論文標題 Ultrasensitive Detection of SARS-CoV-2 Spike Proteins Using the Thio-NAD Cycling Reaction: A Preliminary Study before Clinical Trials	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 2214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms9112214	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 -

1. 著者名 Tsurusawa N, Chang J, Namba M, Makioka D, Yamura S, Iha K, Kyosei Y, Watabe S, Yoshimura T, Ito E.	4. 巻 10
2. 論文標題 Modified ELISA for Ultrasensitive Diagnosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Clin Med.	6. 最初と最後の頁 5197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm10215197	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 -

1. 著者名 Kyosei Y, Namba M, Yamura S, Watabe S, Yoshimura T, Sasaki T, Shioda T, Ito E.	4. 巻 44
2. 論文標題 Improved Detection Sensitivity of an Antigen Test for SARS-CoV-2 Nucleocapsid Proteins with Thio-NAD Cycling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull.	6. 最初と最後の頁 1332-1336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b21-00387	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 -

1. 著者名 Kyosei Y, Yamura S, Namba M, Yoshimura T, Watabe S, Ito E.	4. 巻 18
2. 論文標題 Antigen tests for COVID-19	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biophys Physicobiol.	6. 最初と最後の頁 28-39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.bppb-v18.004	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 -

1. 著者名 Iha K, Kyosei Y, Namba M, Makioka D, Yamura S, Watabe S, Yoshimura T, Ito E.	4. 巻 37
2. 論文標題 Zeptomole Detection of an Enzyme by a Simple Colorimetric Method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anal Sci.	6. 最初と最後の頁 1469-1472
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.21N009	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 -

1. 著者名 Ito E, Iha K, Yoshimura T, Nakaishi K, Watabe S.	4. 巻 101
2. 論文標題 Early diagnosis with ultrasensitive ELISA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Adv Clin Chem.	6. 最初と最後の頁 121-133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.acc.2020.06.002	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	戸谷 勇輝 (Totani Yuki) (90843897)	早稲田大学・教育・総合科学学術院・助手 (32689)	

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
---------	---------