

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21257

研究課題名(和文)感染症サーベイランスのためのインフルエンザウイルス新規検出法の創出

研究課題名(英文)Creation of novel influenza virus detection methods for infection surveillance

研究代表者

佐藤 智典(Sato, Toshinori)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・教授

研究者番号：00162454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：感染症における世界的大流行の発生や拡大を抑制するにはサーベイランスが重要であり、インフルエンザウイルス(IFV)の検出では赤血球凝集アッセイ法が行われている。本研究では、IFVの新規検出法を創出するために、IFV親和性糖鎖ライブラリーとそれを修飾した微粒子の開発を実施した。複数のIFV感受性細胞間での糖鎖の比較解析を行い、糖鎖プライマー法によりガングリオ系列の糖鎖ライブラリーを獲得した。MDCK細胞にアジド化糖鎖プライマーを投与して得られた糖鎖を微粒子に固定化した。得られた糖鎖提示微粒子とIFV株を相互作用することで、凝集アッセイ法によりH1、H3、H5、H7の全亜型で目視での検出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インフルエンザウイルス(IFV)やコロナウイルスなどの感染症におけるサーベイランスは、世界的大流行の発生や拡大を抑制するための重要な対策である。IFVの検出には赤血球凝集アッセイ法が行われている。本研究では、保存期間の短い赤血球を用いないIFVの簡便な検出手法の創出を目指した。そのために、IFVの受容体である糖鎖ライブラリーを細胞に作らせる手法を確立し、それを修飾した微粒子の開発を行った。得られた糖鎖修飾微粒子では、赤血球凝集アッセイ法と同程度の感度で人や鳥由来の多様な亜型のIFVを検出することに成功した。本成果は、IFVによる新たなパンデミックの脅威に対する対策になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Surveillance is important to control the outbreak and spread of pandemics in infectious diseases. Currently, hemagglutination assay is used to detect influenza virus (IFV). In this study, in order to create a new detection method for IFV, we developed glycan libraries recognized by IFV and microparticles modified with them. A comparative analysis of glycans expressed on several animal cells showing high sensitivity to IFV was performed, and a ganglio-series glycan library was obtained by the saccharide primer method. The glycan library obtained by administering the azidated saccharide primer to MDCK cells were immobilized on microparticles. By interacting the obtained glycan-modified microparticles with the IFVs, we succeeded in visually detecting all subtypes of H1, H3, H5, and H7 by the agglutination assay.

研究分野：糖鎖生命工学

キーワード：インフルエンザウイルス サーベイランス ウイルスセンシング 糖鎖ライブラリー 糖鎖プライマー 糖鎖修飾微粒子 凝集アッセイ 感染症対策

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

世界中の1年間の死亡者 5,500 万人のうち感染症による死亡者は約 1,000 万人とされている。主な感染症はエイズ、マラリア、結核であるが、それに加えてインフルエンザなどが知られている。近年の交通機関の発達によるグローバルな人的交流が活発になり、感染症の爆発的な拡大が危惧される時代になってきた。インフルエンザでは、20 世紀以降 4 度の世界的大流行（パンデミック）が起こり、中でも 1918 年のスペイン風邪では世界中で 3,000 万人が死亡したとされている。直近では、2009 年に H1N1pdm09 ウイルスによるパンデミックが起きている。毎年流行する季節性インフルエンザウイルス（IFV）は、A 型の H1 や H3 亜型および B 型ウイルスである。それに加えて、H5 や H7 亜型などの鳥由来の IFV が人に感染することが確認されており、新型インフルエンザとしてパンデミックの危険性が高まっていると考えられている。平成 20 年の厚生労働省のレポートでは、新型インフルエンザ発生時には国内での発症者数 3,200 万人、死亡者数は 17~64 万人、GDP 損失は 20~30 兆円になると見積もられている。高病原性の IFV の影響は人だけでなく家畜への影響も甚大であり、2013 年の中国では H7 亜型 IFV により 65 億ドルの損失が生じている。

高病原性の IFV によるパンデミックが起きる前に我々が行っておくべき対策は大きく分けて二つである。ひとつはワクチンや治療薬の開発であり、もうひとつは診断やサーベイランスにおけるウイルスの検出技術の開発である。グローバルな人的交流により、100 年前のスペイン風邪に比べて感染の拡大は短期間かつ広範囲になると危惧される。そこで、IFV の簡便な検出技術の開発は、世界規模での感染拡大を防止する上で急務であり、国際貢献の観点でも研究開発の意義は高い。ワクチン、治療薬および診断薬の開発には企業の目が向けられているが、多くの検体を簡便に評価することが求められるサーベイランスのような危機管理に対する研究開発への注目度は国内外において低く、遅れているのが現状である。

2. 研究の目的

インフルエンザなどの感染症におけるサーベイランスは、パンデミックの発生や拡大を食い止めるための重要な対策である。臨床検体からのウイルス分離時には、赤血球凝集アッセイ法による IFV の検出が行われている。ところが近年、赤血球を凝集しない IFV が出現しており、サーベイランスでの問題となっている。本研究では、感染症サーベイランスにおける IFV の新たな検出手法を創出するために、IFV が認識する糖鎖ライブラリーとそれを修飾した微粒子の開発を行う。そのために、IFV を検出するための糖鎖ライブラリーを独自の糖鎖プライマー法により構築する。それらを固定化した微粒子を IFV と混合することで、凝集アッセイによる IFV の検出を行う。特に、近い将来にパンデミックを起こす可能性のある動物由来 IFV 株の新たな検出法の確立を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、アジド化糖鎖ライブラリーを独自の糖鎖プライマー法で作製して、微粒子表面にクリック反応で固定化し、IFV との凝集アッセイを行った（図 1）。

（1）IFV を認識する糖鎖ライブラリーの作製

IFV の感染では多様な糖鎖が受容体となっている。糖鎖を使ったウイルス検出の研究例は多いが、ウイルスが認識する多様な糖鎖を合成するには多大な労力が必要である。そのよ

うな問題点を解決するのが、本研究代表者が開発してきた糖鎖プライマー法である。本研究では、多様な糖鎖ライブラリーを糖鎖プライマー法により作製した。糖鎖プライマーとは糖鎖合成経路での前駆体である。これまでに

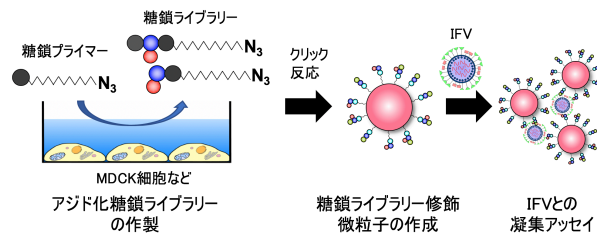


図1 研究方法の概要

図2に示す様な糖鎖プライマーを開発している。糖鎖プライマーを細胞培養液に二日間投与して糖鎖ライブラリーを合成した。

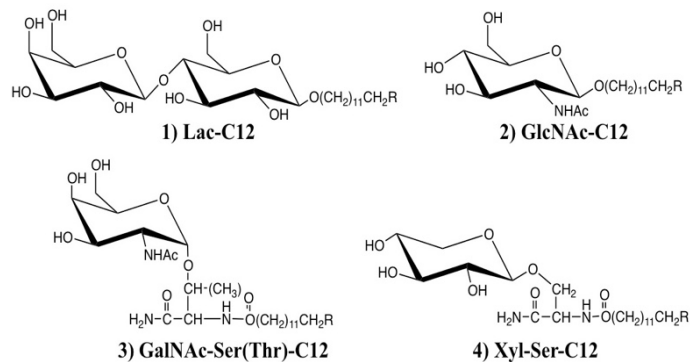


図2 糖鎖プライマーの構造 (R=H もしくは N₃)

糖鎖ライブラリーの作製には、IFV 感受性細胞であるイヌ腎臓由来 MDCK 細胞、ヒト肺基底上皮腺癌 A549 細胞、ヒト胎児腎細胞由来 HEK293 細胞などを用いた。それらの細胞株において、

糖鎖プライマー-Lac-C12 および GlcNAc-C12 を用いて検出された糖鎖と IFV 感受性との比較解析を行った。IFV 感受性は realtime RT-PCR 法により評価した。IFV 感受性が高く糖鎖合成量に優れた MDCK 細胞を用いてアジド化糖鎖プライマー-Lac-C12N₃ を投与して糖鎖ライブラリーを作製した。得られた糖鎖ライブラリーの組成は質量分析装置 (LC-MS) で解析した。糖鎖の構造は MS/MS 解析により、合成量はスペクトル強度より評価した。

(2) 糖鎖修飾微粒子と IFV 株との凝集アッセイ

研究項目1)で得られた糖鎖ライブラリーをポリスチレン(PSt)微粒子表面にクリック反応で修飾した(図3)。この時に、スペーサーとして直鎖型と分岐型の2種類を用いた。反応の進行はゼーター電位の測定により判断した。得られた糖鎖ライブラリー修飾微粒子を IFV 株と一定時間混合して、静置もしくは遠心した後に凝集状態を目視(図4)もしくは顕微鏡で観察した。本研究では、微粒子の種類(サイズなど)や糖鎖ライブラリーの固定化条件(スペーサーの種類、糖鎖密度)などを検討した。A型 IFV 株は人由来の H1 と H3 亜

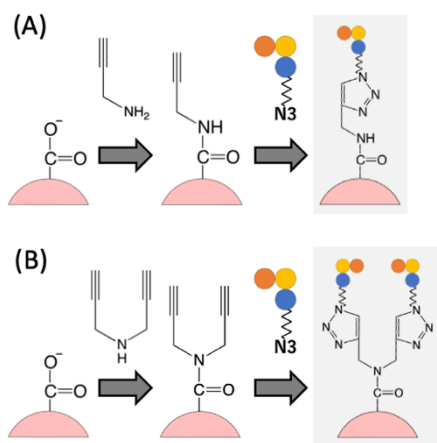


図3 微粒子表面への直鎖型(A)および分岐型のスペーサー(B)を用いた糖鎖の化学修飾法

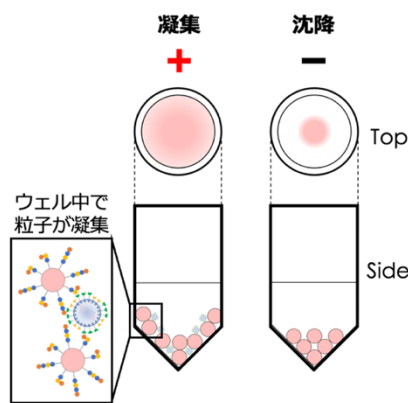


図4 ウイルスと糖鎖修飾微粒子を混合した際の凝集と沈降の模式図

型、および鳥由来の H5, と H7 亜型を用いた。

4. 研究成果

(1) IFV を認識する糖鎖ライブラリーの作製

糖鎖プライマー-Lac-C12 を各種細胞株と相互作用させて、得られた糖鎖ライブラリーの組成を LC-MS により解析し、22 種類の酸性糖鎖および 18 種類の中性糖鎖が得られた (表 1)。酸性糖鎖の多くは IFV の受容体として働くことが知られており、特に MDCK 細胞などでは、A9~A16 の様な酸性の長糖鎖や A17~A22 のような硫酸化糖鎖が豊富に含まれていることから、ウイルス検出のための微粒子への固定化に適していると考えられた。また、GlcNAc-C12 を同様の細胞に投与すると、14 種類の酸性糖鎖および 14 種類の中性糖鎖が得られた。糖鎖ライブラリー作製に用いた細胞のウイルス感受性は、MDCK 細胞や HEK293 細胞などでは H1, H3 および H5 亜型に対して高いことが確認された (図 5)。これらの結果より、微粒子に修飾する糖鎖ライブラリーの合成には MDCK 細胞が適していると判断した。

表 1 糖鎖プライマー-Lac-C12 を各細胞に投与して得られた糖鎖ライブラリー

	No.	Structure (P:Lac-C12)	MDCK	A549	HEK293	Vero	Caco-2	Hela	CHO
Acidic	Sialylated	A1	NeuAc2-3P	++++	++++	++++	++++	++++	+++
		A2	NeuAc2-6P	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	+++	N.D.
		A3	Ac + NeuAc-P	++++	++++	+++	++	+++	+++
		A4	2Ac + NeuAc-P	+++	++++	++++	+	+++	++
		A5	GalNAc-(NeuAc)-P	++	++++	++++	++	+++	++++
		A6	NeuAc-NeuAc-P	+	+++	++	N.D.	N.D.	N.D.
		A7	Ac-O-NeuAc-NeuAc-P	N.D.	++	N.D.	N.D.	++	+
		A8	Gal-HexNAc-(NeuAc)-P	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	+++
		A9	NeuAc-Gal-HexNAc-P	++++	++++	++++	++	+++	+++
		A10	NeuAc-Gal-HexNAc-Gal-P	++	++	++	+++	++	+
		A11	NeuAc + HexNAc-Gal-HexNAc-P	+	+++	++	+	+	++
		A12	2NeuAc + Gal-HexNAc-P	+++	++++	++++	++	+++	+++
		A13	NeuAc + Gal-HexNAc-Gal-HexNAc-P	+++	+++	+++	+	+	++
		A14	NeuAc-NeuAc-Gal-HexNAc-Gal-P	+++	+++	++	+++	++++	+
		A15	3NeuAc + Gal-HexNAc-P	++	+++	++	+	++	N.D.
		A16	2NeuAc + Gal-HexNAc-Gal-HexNAc-P	++	++++	++	+	++	++
	Sulfated	A17	HSO ₃ + P	++++	++++	++++	++++	++++	++
		A18	HSO ₃ + Gal-P	+++	++	+++	++	+++	+++
		A19	HSO ₃ + HexNAc-P	+	++++	++	++	+++	+
		A20	HSO ₃ + Gal-HexNAc-P	++	N.D.	N.D.	+	++	+
		A21	HSO ₃ + NeuAc, Gal-HexNAc-P	++	+++	++	++	N.D.	++
		A22	HSO ₃ + 2NeuAc, Gal-HexNAc-P	++	++	N.D.	+	+	++
Neutral	N1	Fuc-P	++++	+++	+++	++	++++	++	
	N2	Hex-P	++++	++++	++++	++++	++++	++++	
	N3	Hex-Hex-P	+++	++	+++	+++	+++	+++	
	N4	Hex-Hex-Hex-P	N.D.	N.D.	++	+	N.D.	+	
	N5	Hex-Hex-Hex-Hex-P	N.D.	+	N.D.	N.D.	+	N.D.	
	N6	HexNAc-Hex-P	++++	+++	++++	++++	+++	++++	
	N7	HexNAc-HexNAc-Hex-P	++++	+++	N.D.	+	N.D.	+	
	N8	Hex-HexNAc-Hex-P	++	++	++	+++	N.D.	+	
	N9	HexNAc-(Hex)-HexNAc-Hex-P	N.D.	+	N.D.	++	++	++	
	N10	Hex-HexNAc-(Hex)-HexNAc-Hex-P	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	+	
	N11	Fuc-Hex-HexNAc-Hex-P	N.D.	+	N.D.	N.D.	++	N.D.	
	N12	HexNAc-P	+++	++	++++	+++	+++	+++	
	N13	Hex-(Fuc)-HexNAc-P	++++	+++	++++	+++	+++	+++	
	N14	HexNAc-(Fuc)-Hex-HexNAc-P	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	+	
	N15	HexNAc-(Fuc)-Hex-(Fuc)-HexNAc-P	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	+	+	
	N16	Hex-(Fuc)-Hex-(Fuc)-HexNAc-P	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	+	
	N17	Fuc-Hex-(Fuc)-HexNAc-P	N.D.	+	N.D.	N.D.	++	N.D.	
	N18	Hex-HexNAc-(Fuc)-Hex-HexNAc-P	N.D.	N.D.	++	N.D.	N.D.	N.D.	

検出強度	Area/ mg protein	++++	>1.0 × 10 ¹⁰	+++	1.0 × 10 ⁹ - 1.0 × 10 ¹⁰	++	1.0 × 10 ⁸ - 1.0 × 10 ⁹	+	1.0 × 10 ⁷ - 1.0 × 10 ⁸	N.D.	<1.0 × 10 ⁶
------	---------------------	------	-------------------------	-----	---	----	--	---	--	------	------------------------

(2) 糖鎖修飾微粒子と IFV 株との凝集アッセイ

微粒子に修飾する糖鎖ライブラリーは、アグリコン末端にアジド基を有する Lac-C12N3 を用いた。微粒子としては表面にカルボキシ基をもつ PS 微粒子 (1 μm サイズ) を用いた。粒子へのリンカーや糖鎖の修飾はゼータ電位の測定により確認した。カルボキシ基提示状態の粒子のゼータ電位は -81 mV であり、リンカー分子のプロパルギルアミンとの縮合反応後では +1.7 mV だった。次に、アジド化糖鎖ライブラリーをクリック反応で修飾すると

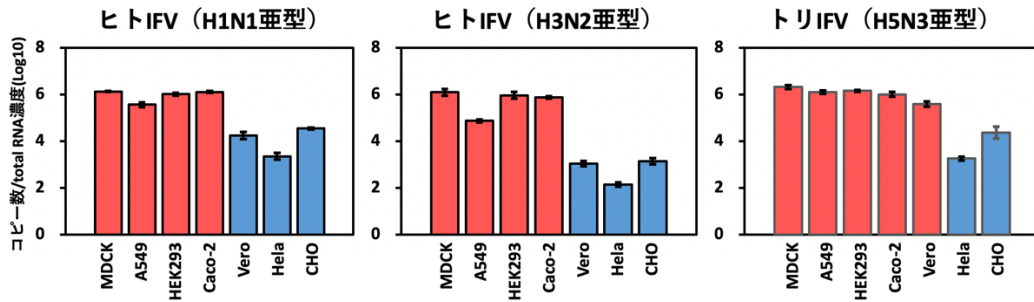


図 5 realtime RT-PCR 法による各細胞株での A 型インフルエンザウイルス (H1, H3, H5 亜型) に対する感受性の比較

ゼータ電位は-62 mV となった。これにより各反応プロセスでゼータ電位が変化したことから、糖鎖が修飾された判断した。次に、得られた糖鎖修飾微粒子を用いて凝集アッセイを行い、IFV の検出を行った。粒子が凝集すると沈降した赤い点が消失し、ウェルの底全体が赤くなる (図 4)。作製した糖鎖修飾微粒子を用いることで、ヒト IFV (A/H1N1、A/H3N2) およびトリ IFV (A/H5N3、A/H7N2) を検出できた (図 6)。ここで確認された検出感度はニワトリ赤血球とほぼ同程度であった。

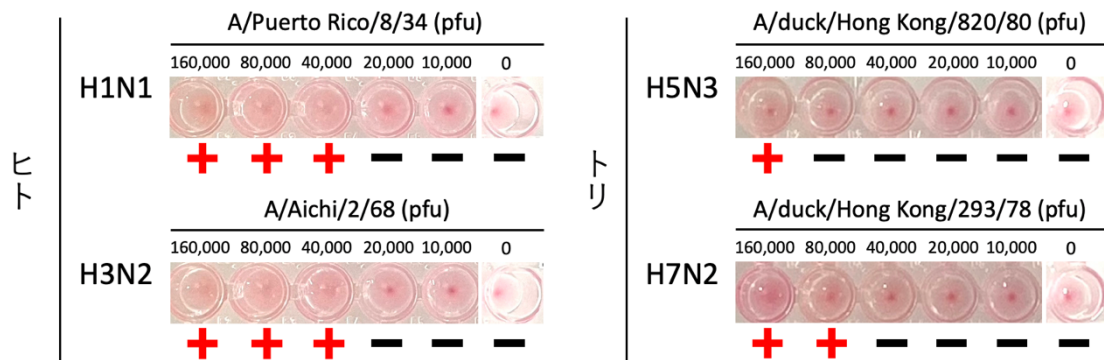


図 6 MDCK 細胞/Lac-C12N3 由来の糖鎖ライブラリーを固定化した微粒子を用いた IFV 株 (H1, H3, H5, H7 亜型) の凝集アッセイ。(+) : 凝集、(-) : 沈降。

次に、微粒子の粒子サイズの影響を確認するために、0.3、3 および 6 μm の PS 微粒子を用いて凝集アッセイを行った。その結果、0.3 μm の粒子では 24 時間後に凝集が確認できたが、検出感度は 1 μm の粒子よりも低下していた。一方、3 および 6 μm の粒子ではウイルス不含時で沈降が見られなかったため、凝集を確認できなかった。以上より、1 μm の粒子が凝集アッセイに最適であると判断した。また、直鎖型のリンカーの代わりに 2 分岐型のリンカーを用いて検出感度を比較したところ、どちらのリンカーを用いた場合でも検出感度に顕著な違いはなかった。これにより、糖鎖密度を 2 倍にしても検出感度向上への寄与はなく、単純な直鎖型のリンカーを用いた固定化でも十分であることが示された。

以上の結果をまとめる。MDCK 細胞に Lac-C12N3 を投与して得られた糖鎖ライブラリーを微粒子表面にクリック反応により修飾した。得られた糖鎖修飾微粒子は、A 型 IFV の H1、H3、H5 および H7 亜型の全てで凝集アッセイにより検出が可能であった。これにより、感染症サーベイランスにおいて、赤血球を用いることなく、IFV の検出が可能になると期待される。

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Teruhiko Matsubara, Ayaka Ogami, Haruka Kori, Mineo Hashizume, Toshinori Sato	4. 巻 -
2. 論文標題 Detection of Influenza Virus by Agglutination of Microparticles Immobilized a Mixed Glycan Receptor Produced from Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Applied Bio Materials	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsabm.2c00276	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 徳田 翔・藤本 稜・河野 里砂・松原 輝彦・佐藤 智典
2. 発表標題 インフルエンザウイルス感受性細胞で作らせた糖鎖ライブラリーを固定化した微粒子によるウイルスの検出
3. 学会等名 第30回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口 愛、久保 あかね、栗山 龍之介、松原 輝彦、大道寺 智、中屋 隆明、佐藤 智典
2. 発表標題 シアル酸模倣ペプチド修飾粒微粒子を用いたインフルエンザウイルスの選択的検出
3. 学会等名 第40回日本糖質学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ai Yamaguchi ¹ , Akane Kubo ¹ , Ryunosuke Kuriyama, Tomo Daidoji, Takaaki Nakaya, Teruhiko Matsubara, Toshinori Sato
2. 発表標題 Selective detection of influenza virus using peptide-modified polystyrene particles
3. 学会等名 Pacifichem 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kakeru Tokuda, Ryo Fujimoto, Risa Kono, Teruhiko Matsubara, Toshinori Sato
2. 発表標題 Novel influenza virus detection method using microparticles modified with glycans obtained by saccharide primer method
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021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