

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 12日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659298

研究課題名（和文）新理論に基づいた臨床検体中ウイルス粒子の網羅的分離・精製技術の開発

研究課題名（英文）Development of method for comprehensive isolation and purification of viral particles from clinical specimens

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：80271633

研究成果の概要（和文）：

感染症病原体に対する網羅的ゲノム探索（メタゲノミック診断）システムにおいて、核酸抽出前のステップにおける技術革新を目指し、HPLCやフィールドフローフラクショネーション（FFF）等を用いたウイルス粒子の精製試験を行った。その結果、FFFと光散乱検出器を用いることにより、溶液中のウイルス粒子画分を検出し、精製することが可能である予備的な試験結果を得た。さらにハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーはウイルスを高回収率で精製することが可能である結果を得た。

研究成果の概要（英文）：

A more effective method to purify viral particles from clinical specimens is required in metagenomic analysis of pathogens using a high-throughput DNA sequencer. In this study, a novel virion purification method using HPLC or field flow fractionation was evaluated. Even in the preliminary results, field flow fractionation combined with a light scattering detector could isolate the virion fraction from a crude virus solution, such as influenza and Newcastle disease virus. In addition, it was demonstrated that hydroxyapatite chromatography effectively purified viral particles from allantoic fluid from an infected embryonated egg. These results suggested that the above methods could be useful for virion fractionation from crude samples.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：ウイルス、ウイルス粒子精製、インフルエンザウイルス、ニューカッスル病ウイルス、メタゲノム

1. 研究開始当初の背景

現在実用化されている病原体の遺伝子診

断法（PCR、マイクロアレイ等）はゲノム情報が明らかにされた病原体に対してのみ有効である。感染症遺伝子診断の更なる高性能

化を図る上で、未知の病原体をも網羅的に検出できる技術が求められている。

一方、近年の DNA 配列決定技術の進歩は著しく、「次世代シーケンサー：NGS」は、半日で数百メガ塩基対（約百万クローン）以上の DNA 配列を解読するハイスループット性能を有する。加えて平成 22 年夏にベンチトップ型のシーケンサーが発売され、低コスト化（13 万円/ラン）が実現された。その結果 1 検体を 1 万円以下で解析することが可能となった。

申請者らはこれまで次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析：「ヒト臨床検体からの病原ウイルスゲノムの網羅的な迅速診断システムの開発」に取り組んできた。挑戦的萌芽研究「次世代シーケンサーによる未知病原体同定システム構築に必要な新技術開発； H21-H22」において、診断システムの迅速化（検体の核酸抽出からシーケンス解析までを簡潔・短縮化）および検出感度上昇（抽出核酸中における宿主由来遺伝子混入率を低下させる方法を開発）を検討課題として研究した。その結果、検体中からの核酸抽出後の各過程の迅速化・効率化をある程度達成することができた。

一方、上記したシーケンサーの低コスト化（ハード）および解析技術の向上（ソフト）に伴い、メタゲノム診断システムを医療現場に導入する可能性が高まってきた。しかしながら、現在の検出感度（ $1E+04$ コピー/サンプル）をさらに 10-100 倍高めることが臨床応用に必要であると考えられた。

そこで本研究では、臨床検体からのウイルス分画の精製方法を検討するため、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、フィールドフローフラクショネーション、あるいはハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーといった新しいナノ微粒子の分離テクノロジーを利用することを計画した。分離後、ウイルス粒子分画から（ウイルス）核酸を抽出し、メタゲノム診断システムに組み込むことにより、上記目標を達成することが考えられた。

2. 研究の目的

次世代シーケンサーの低コスト化および解析技術の向上に伴い、同機器を感染症の網羅的診断システムとして医療現場に導入できる可能性が高まってきた。しかしながら、現在の検出感度（ $1E+04$ コピー/サンプル）をさらに 10-100 倍高めることが臨床応用に必要であると考えられる。

そのために、本研究では、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）あるいはフィールドフローフラクショネーションといった新しいナノ微粒子の分離テクノロジーを同システムに導入し、臨床検体中のウイルス粒子分画

を分離精製するための方法論を確立することを研究の目的とした。

これまでに無いウイルスソーティングシステムを開発することにより、大幅な検出感度の向上が期待でき、さらに新しいウイルス診断法（メタゲノム解析）開発のための基盤となることが期待できる。

3. 研究の方法

ウイルス液の調製

インフルエンザウイルス（ヒトワクチン株）およびニューカッスル病ウイルス（家禽ワクチン株）は、発育鶏卵あるいは MDCK 細胞に接種した後、しょう尿液あるいは培養上清を回収し、ウイルス液とした。また、エーテル処理によりウイルス不活化を行った。

HPLC によるウイルス分離試験（予備試験）

C18 カラムを用いて不活化後のウイルス分離を試みた。サンプルは以下の 3 サンプル・サンプル 1（S01）不活化ウイルス原液・サンプル 1（S02）S01 の 100 倍希釈・サンプル 1（S03）ウイルス非感染細胞の培養液（コントロール）を用い、移動層は水/アセトニトリル系で HPLC を行った（実験は富山県立医科大学・工学部・五十嵐 康弘 教授の研究室の協力を得た）。

また、フィールドフローフラクショネーションおよびハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーの使用は、各機器の使用プロトコルに従った。

4. 研究成果

全ての研究を通して、大阪大学・微生物病研究所の中村 昇太 助教の協力を得た。

予備試験として行った HPLC によるウイルス分離試験では、（不活化）ウイルス原液 S01 に白濁が見られたため、希釈した S02 を $0.45 \mu\text{m}$ のフィルター処理を行い、その後 $20 \mu\text{L}$ を HPLC にかけて。その結果、小さなピークが観測され、このピークはタンパク質様の UV スペクトルを示していた。S02 では濃度が薄すぎると判断し、S01 の $0.45 \mu\text{m}$ のフィルター処理ではフィルターが詰まってしまい、濾過できなかつたため、10 倍程度希釈したサンプルを作成し、そのフィルター処理を行った。しかし、当サンプルを用いたピークの高さは希釈倍率から予想される変化がみられなかった。不活化ウイルスの可溶性に問題があり、このような結果になったと考えられた。

最後にインジェクション量を変えた試験を行った。同じく 10 倍希釈した S01 サンプルのインジェクション量を $100 \mu\text{L}$ に変え、

HPLC を行った。その結果、これまでに見られたピーク以外に、小さなピークを観測した。このピークは典型的な核酸のスペクトルを示しており、上記の蛋白質様のスペクトルと合わせて考えると、不活化処理によって、ウイルスの内殻や蛋白質・核酸複合体が壊れ、それぞれが溶出されている可能性があった。しかし、いずれのクロマトグラムもピーク強度が弱く、不明瞭であったため、可溶化条件や濃縮条件を検討しなければならないと考えられた。

このような予備試験の考察を基に、得られたフラクションから核酸抽出し、ウイルス特異的プライマーでPCRを行ったが明確なバンドは確認できなかった。その後、不活化ウイルスの調製方法についていくつかの検討を試みたが、改善は見られなかった。また、本研究の当初の目的である「臨床検体中のウイルス粒子分画を分離精製するための方法」を模索するためには、（不活化ステップを経ない）感染性ウイルスを用いた解析がより望ましいと考えられ、他の目的にも使用するHPLCを用いた試験研究の継続に限界を感じた。加えて、研究期間中（平成23年12月）の研究代表者（大阪大学微生物病研究所より京都府立医科大学大学院医学研究科へ）の異動により、研究期間中におけるこれ以上のHPLC解析は困難であると判断した。

フィールドフローフラクシオネーション（クロスフロー）および光散乱検出器を用いたウイルスの分離精製試験の予備試験を行ったところ、ウイルス分画と考えられるフラクションを得ることができた。しかしながら、同解析は大阪大学において試験的に検討したものであり、上述した研究代表者の異動により、同機械を用いたこれ以上の解析は困難であると判断した。

最後に、HOYA株式会社の協力を得て、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーを用いたインフルエンザウイルスおよびニューカッスル病ウイルスの精製について検討した。感染細胞培養液中のウイルスを対象とし、ハイドロキシアパタイト担体に同ウイルス液をロードしてウイルス粒子を吸着させ、リン酸ナトリウムバッファーで溶出することができた。この結果からハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーは、インフルエンザウイルスなど、ある種のウイルスを吸着溶出させて精製に用いることが可能であると考えられた。インフルエンザウイルスを用いた精製効率評価試験では、赤血球凝集試験ベースの回収率は80%以上、感染価試験(TCID₅₀)ベースの回収率は100%以上であった。この場合、感染性ウイルス粒子は全ウイルス粒子の10%以下であることが報告されていることか

ら、以上の結果が得られたと推察される。

これらの結果より、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーはインフルエンザウイルスを高回収率で精製することが可能であると考えられた。

従来のウイルス粒子の濃縮・精製は主に超遠心分離法が主体であった。この方法は、大量のウイルス液を対象にした場合には効果的であるが、臨床検体などの少量、かつ様々な夾雑物を含む検体を対象とした精製には不向きであった。また、超遠心分離の小型化、低価格化にも難点があった。

そこで本研究では、それとは異なるメカニズムで臨床検体中のウイルス粒子の濃縮・精製法の評価を行った。HPLCやフィールドフローフラクシオネーションは、大型、高額な機器であり、本研究で目的とするメタゲノム解析のための臨床検体へ応用することは、超遠心分離機と同様困難である。しかしながら、新しい原理を用いたウイルス精製法を追求し、その可能性を明らかにした点は、挑戦的萌芽研究のコンセプトに合致するのではないかと考える。また、メカニズムは異なるが、本研究を基盤として、さらなる小型化、低価格化が可能なデバイスを用いたウイルス濃縮・精製法を用いたシステムの開発にも現在取り組んでいる。

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3件）

（査読無）

①中屋隆明

次世代シーケンサーのウイルス性疾患特定への適用.

臨床とウイルス 40(No. 4):177-183, 2012

②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

③中村昇太, 中屋隆明, 飯田哲也.

感染症のメタゲノミック診断.

化学療法の領域 27(No. 9): 114-120, 2011

〔学会発表〕(計2件)

①中屋隆明

次世代シーケンサーが切り拓く感染症の
メタゲノム学
京都産業大学・バイオフィォーラム 2011
(2012年1月16日・京都市)

②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/ 特別講演
(2012年7月14日・大津市)

〔図書〕(計1件)

Nakaya T, Nakamura S, Iida T, Horii T
et al. Direct metagenomic detection of
viral pathogens in human specimens
using an unbiased high-throughput
sequencing approach.
Handbook of Molecular Microbial
Ecology II, 73-82. Metagenomics in
Different Habitats. Wiley-Blackwell,
Hoboken, NJ, USA. 2011.

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.biken.osaka-u.ac.jp/act/act_nakaya.php

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/doc/classes/basicmedicine/221.html>

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/did/>

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
研究者番号：80271633

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：