

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659508

研究課題名(和文) 表面プラズモン共鳴を応用したデング出血熱重症化予測バイオマーカーの測定法の開発

研究課題名(英文) Development of novel biomarker assay system for severe dengue virus infection.

研究代表者

安波 道郎 (Yasunami, Michio)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：80244127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：デング出血熱の重症化を事前に予測するバイオマーカーの迅速測定に適う測定機として、市販ポータブルSPR測定機数機種のパフォーマンス比較を経て、オプトクエスト社製SPR01を選定した。病態形成への関与が想定される血漿中の物質として、感染負荷を反映する病原体由来の非構造タンパクNS1および宿主応答の指標となる、IP10とCCL3(MIP-1)の3種類を選定し、2種類の異なる抗体を用いたサンドウィッチ法による測定系を設計した。ベトナム社会主義共和国ホーチミン市の医療機関で収集した検体に適用して、これらが重症化事前予測バイオマーカーとして有益であるかを検討した。

研究成果の概要(英文)：Dengue hemorrhagic fever, a severe sequela of dengue virus infection is a life-threatening condition unless proper treatments are not applied. In the present study, a commercially-available portable SPR device SPR01 (Optoquest, Ageo, Japan) was used for development of rapid quantitative assay of biomarkers for dengue hemorrhagic fever. Dengue virus non-structural protein NS1 and two chemokines, IP10 and CCL3 (MIP-1 alpha) were selected as candidates for such biomarkers. Quantitative assays for dengue virus NS1, IP10 and CCL3 were successfully designed and applied to plasma samples collected in hospitals in Ho Chi Minh City, Vietnam, for the evaluation of its usefulness.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：感染症内科学

キーワード：感染症 重症化予測 バイオマーカー デング出血熱 免疫測定 国際情報交換

1. 研究開始当初の背景

東南アジアや中南米の熱帯地域で流行しているデングウイルスは、媒介蚊の吸血によって体内に侵入し、数日の潜伏期ののちにインフルエンザ様の全身倦怠感、頭痛、関節痛を伴う発熱をひきおこす。多くの場合は3~7日程度の経過で自然に軽快する「(狭義の)デング熱」におわるが、デング熱を発症した患者の一部(約1割程度)は3~7日の発熱期のうち、解熱時に前後して血小板減少、点状出血や消化管出血などの出血傾向、胸水や腹水など血漿成分の血管外漏出をきたす「デング出血熱」を発症する。さらにその中には循環虚脱状態に陥る「デングショック症候群」に進行するものもあり、適切な治療を施さなければ致命的な結果となる。デング出血熱では上記出血熱症状の発症時期に種々の炎症性サイトカインの血中濃度上昇(いわゆる「サイトカインストーム」)を伴うことがこれまでの多くの研究からわかってきたが、どの因子が重症例に特徴的に、重症化に先立って異常値を示すかについての十分な評価結果がないため、発症事前予測バイオマーカーとして実用化されているものはない。我々は、デング出血熱患者の全血 RNA を用いたトランスクリプトーム解析を行ない、血液凝固系や補体系の活性化、プロスタグランジン代謝系の異常、内因性プロテアーゼ阻害物質の活性化がみられることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究では、これまでにデング出血熱の経過中に上昇することが報告されている MIP1 (CCL3)などのサイトカインや感染負荷を反映するウイルス由来蛋白質をデング出血熱発症予測バイオマーカーの候補として選定し、測定結果を治療法選択のための情報として活用できるように、臨床現場に即した簡便で迅速かつ定量的な測定法の確立を試みた。また、ベトナム・ホーチミン市にて臨床検体を収集し、その有用性を確認することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)バイオマーカー候補の選択 デング出血熱重症化要因の解析、重症化進行時の遺伝子発現解析・サイトカイン定量の結果から、IP10、MIP1、デングウイルス非構造蛋白 NS1 の3種の蛋白質を重症化事前予測バイオマーカーの候補とした。

(2)表面プラズモン共鳴(SPR)による測定系の確立 臨床現場に即した迅速測定に適用可能なポータブル SPR 測定機を用いた測定を設計するに当たり、市販モノクローナル抗体を入手した。SPR の信号は金薄膜表面での分子間相互作用(抗体による抗原のトラップ)の結果増加する分子量に依存するため、本計画で捉えようとしている3種類の標的のような比較的低分子量の物質の存在を可視化するには2種類の抗体でのサンドイッチ法が有効と考

えられ、互いに競合しない2種類の抗体を用いた。

(3)測定技術の移転 ベトナム・ホーチミン市パスツール研究所の Vu TQ Huong 博士、Nguyen TP Lan 博士の研究室にポータブル SPR 測定機での迅速定量測定系の技術移転を行ない、検証実験に用いる臨床検体の選択基準・検体採取後手順を確定した。

(4)臨床検体の収集 研究倫理審査を経て、ベトナム・ホーチミン市での臨床検体収集を開始する。発熱と特徴的皮膚症状に基づいて臨床的デング熱と診断されて入院加療を受ける患者について入院時に書面によるインフォームドコンセントを得て、ウイルス検査並びに経過観察のため血液検査にあわせて本研究用の採血を依頼した。採血後血漿分離して直ちに-20℃に凍結保存し後日測定した。

4. 研究成果

迅速測定に適用可能な測定機として、市販ポータブル SPR 測定機数機種のパフォーマンス比較を経て、オプトクエスト社製 SPR01 を選定した。3種類の標的 IP10、MIP1、デングウイルス非構造蛋白 NS1 に対しそれぞれ2種類の異なる抗体を用いた測定系を設計し、リコンビナントの標的物質により十分な感度と特異性を持つ測定系であることを確認した。ベトナム社会主義共和国ホーチミン市の医療機関で収集した臨床的にデング熱と診断された発症初期の検体に適用した。

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6件)

Mori M, Wichukchinda N, Miyahara R, Rojanawiwat A, Pathipvanich P, Maekawa T, Miura T, Goulder P, Yasunami M, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P. HLA-B*35:05 is a protective allele with a unique structure among HIV-1 CRF01_AE-infected Thais, in whom the B*57 frequency is low. AIDS (査読有) 28(7): 959-967 (2014)

doi: 10.1097/QAD.000000000000206.

Dhoubhadel BG, Yasunami M, Yoshida LM, Thi HA, Thi TH, Thi TA, Watanabe K, Suzuki M, Morimoto K, Dang DA, Ariyoshi K. A novel high-throughput method for molecular serotyping and serotype-specific quantification of *Streptococcus pneumoniae* using a nanofluidic real-time PCR system. J Med Microbiol. (査読有) 63 (Pt 4):528-539(2014)

doi: 10.1099/jmm.0.071464-0.

Migita K, Abiru S, Ohtani M, Jiuchi Y, Maeda Y, Bae SK, Bekki S, Hashimoto S, Yesmembetov K, Nagaoka S, Nakamura M, Komori A, Ichikawa T, Nakao K,

Yatsushashi H, Ishibashi H, Yasunami M. HLA-DP gene polymorphisms and hepatitis B infection in the Japanese population. *Transl Res.* (査読有) 160: 443-444 (2012)

doi: 10.1016/j.trsl.2012.06.003.

Omar AH, Shibata H, Yasunami M, Yamazaki A, Ofori MF, Akanmori BD, Shuaibu MN, Kikuchi M, Hirayama K. The rs150311303 polymorphism in FcγRIIa enhances IgG binding capacity. *Scand J Immunol.* (査読有) 76:167-174 (2012)

doi: 10.1111/j.1365-3083.2012.02715.x

Furuta T, Muraio LA, Lan NT, Huy NT, Huong VT, Thuy TT, Tham VD, Nga CT, Ha TT, Ohmoto Y, Kikuchi M, Morita K, Yasunami M, Hirayama K, Watanabe N. Association of mast cell-derived VEGF and proteases in Dengue shock syndrome. *PLoS Negl Trop Dis.* (査読有) 6:e1505 (2012)

doi: 10.1371/journal.pntd.0001505.

Tran TNH, Nguyen TH, Lyre AM, Nguyen TPL, Tran TT, Ha MT, Cao TPN, Vo VT, Tran VD, Kikuchi M, Yasunami M, Morita K, Vu TQH, Hirayama K. Elevated Levels of Cell-Free Circulating DNA in Patients with Acute Dengue Virus Infection. *PLoS ONE* (査読有) 6(10): e25969 (2011)

doi: 10.1371/journal.pone.0025969.

〔学会発表〕(計8件)

Michio Yasunami, Reiko Miyahara, Lay-Myint Yoshida, Hitomi Nakamura, Kensuke Takahashi, Vu Dinh Thiem, Trinh Xuan Mai, Bui Trong Chien, Dang Duc Anh, Le Huu Tho, Hiroyuki Moriuchi, Koya Ariyoshi. Nha Trang Birth Cohort Study ---A Prospective Study for the Identification of Risk Factors for Childhood Infection/Infectious Diseases. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections - 2014. January 20-22, 2014. Sendai, Japan (口演)

Michio Yasunami. What are we learning about hepatitis virus infection from the Nha Trang birth cohort study in Vietnam? Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections - 2014. January 20-22, 2014, Sendai, Japan (口演)

Michio Yasunami, Reiko Miyahara, Lay-Myint Yoshida, Hitomi Nakamura, Kensuke Takahashi, Trinh Xuan Mai, Bui Trong Chien, Vu Dinh Thiem, Le Huu Tho, Dang Duc Anh, Koya Ariyoshi. A birth cohort study revealed that the susceptibility to acute lower respiratory infection was associated with TLR10-TLR1-TLR6 polymorphisms. 日本

免疫学会総会、2013年12月11-13日、幕張(口演)

Michio Yasunami, Nuanjun Wichukchinda, Akiko Takaki, Archawin Rojanawiwat, Panita Pathipvanich, Pathom Sawanpanyalert, Koya Ariyoshi. Cell type-specific, type I interferon-induced expression of APOBEC3G in HIV-exposed seronegatives. The 11th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. November 18-22, 2013, Bangkok, Thailand (ポスター)

Michio Yasunami, Reiko Miyahara, Lay-Myint Yoshida, Hitomi Nakamura, Kensuke Takahashi, Vu Dinh Thiem, Trinh Xuan Mai, Bui Trong Chien, Dang Duc Anh, Le Huu Tho, Koya Ariyoshi. Nha Trang Birth Cohort Study: a population-based study for the identification of phenotype expression of genetic risk factors for childhood infectious diseases in Vietnam. The American Society of Human Genetics 63rd Annual Meeting. October 22-26, 2013, Boston, USA (ポスター)

Michio Yasunami, Reiko Miyahara, Lay Myint Yoshida, Hitomi Nakamura, Kensuke Takahashi, Vu Thi Que Huong, Trinh Xuan Mai, Vu Dinh Thiem, Le Huu Tho, Dang Duc Anh, Hiroyuki Moriuchi and Koya Ariyoshi, "A Challenge to Clarify to What Extent the Human Genetic Variations Determine the Risk for Childhood Infection and Infectious Diseases---the NhaTrang Birth Cohort Study" NhaTrang Birth Cohort Symposium, Nov. 28, 2012, NhaTrang, Vietnam (口演)

安波道郎「東南アジアの臨床疫学フィールドから学ぶウイルス感染症学」第60回日本ウイルス学会学術集会シンポジウム2「熱帯感染症」2012年11月13-15日 大阪(口演)

Michio Yasunami. Launching population-based immunogenetic phenotype study in Vietnam. SCIENTIFIC CONFERENCE PIHCMC 17 November 2011 Ho Chi Minh City, Vietnam (口演)

〔図書〕(計0件)

〔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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安波 道郎 (YASUNAMI, Michio)
長崎大学・熱帯医学研究所・教授
研究者番号：80244127

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし