

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860450

研究課題名(和文) ウイルス直接検出法を応用した環境中ポリオウイルスのサーベイランス

研究課題名(英文) Direct detection of polioviruses from environmental samples

研究代表者

中村 朋史 (Nakamura, Tomofumi)

国立感染症研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：90446881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：陰電化膜およびPVR-MBの併用により、PVを約5000倍に濃縮することが可能であった。また、カプシド全領域増幅法を試したところ、目的断片(約4.0 kbp)の良好な増幅がみられ、その後に行ったリアルタイムPCRおよびNGSにおいてもPVを高感度かつ正確に検出可能であった。本手法を用いてPVの存在が疑われるパキスタンの河水の解析を行った。NGSを用いることにより、増幅された断片中に含まれるPVおよび非PVエンテロウイルスを一括して検出・解析できることに加え、ウイルス同士のリコンビネーション等も検討可能であった。環境サーベイランスにおける本手法の有用性が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：BY using negatively-charged filter and magnetic nanobeads with PV receptor (PVR-MB), we could concentrate spiked PV to 5,000-fold conc. Besides this, entire capsid coding region amplification (ECRA) method and NGS analysis were highest sensitive at PV detection than any other methods. From the analysis of PV-positive Pakistani environmental samples, we could identify many kinds of PVs, including vaccine and wild strains, and other non-PV enteroviruses. It was strongly suggested that this combination method was high sensitive and time-saving PV detection tool with informative virus sequences. And this method is effective environmental PV surveillance technique without bias often found in cell culture based PV isolation.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ポリオウイルス 環境サーベイランス レセプター結合型ビーズ 次世代シーケンス

1. 研究開始当初の背景

WHO は 1988 年より Global Polio Eradication Initiative (GPEI) を開始し、大規模な経口生ポリオワクチン (OPV) の接種キャンペーン等により、ポリオ根絶を目指してきた。GPEI の活動により PV による麻痺症例数は大幅に減少した (2012 年においては 223 症例)。しかしながら、PV 常在国であるアフガニスタン、パキスタン、ナイジェリアでの流行に加え、ソマリア、ケニアなどでも 2013 年に入って伝播と考えられる症例が報告されており、未だ野生株ポリオウイルス伝播終息の目処が立っていないのが現状である。世界的なポリオ根絶の最終段階においては、麻痺患者からの PV 分離が無くなることに加え、PV による麻痺症例のない地域においても環境中すなわち河川や下水等から PV が検出されなくなることが必須である。そのため、PV のモニタリング精度の向上も含めた検査体制の構築はポリオ根絶において重要な役割を担っており、環境ウイルスサーベイランスを始めとする PV の実験室診断法は常に改善・改良が求められてきた。

現在、急性麻痺 (AFP) サーベイランスの一環として行われている PV の分離・同定は培養細胞によるウイルス分離をベースとしている。この手法は検出感度等における利点を有しているものの、培養細胞の観察に関する習熟が必要であることに加え、検体の搬入から結果の判明まで 1-2 週間程度を要するといった点が課題であった。そのため、細胞分離を経ない直接的かつ迅速で高感度な PV 検出法の開発研究は WHO/GPEI によっても強く推奨されており、手法の確立・標準化および従来法との感度・精度の比較検討が望まれていた。

2. 研究の目的

本研究では、ウイルス濃縮法を応用した直接検出法を用いて環境水におけるポリオウイルスサーベイランスを行い、その有効性を実証することを目的とする。

ポリオウイルス (PV) は急性灰白髄炎 (いわゆるポリオ) の原因ウイルスであり、乳幼児に対してときに終生回復することのない麻痺を引き起こす重要な病原体として知られている。申請者が所属する国立感染症研究所ウイルス第二部第二室は WHO グローバルポリオ研究室ネットワーク (GPLN) の一員として、ポリオ根絶に関する種々の活動および研究を進めてきた。ポリオ根絶へ向けたステップの一つとして迅速で高感度な PV 検出法の確立は必須である。本研究では、これまで行われてきた陰電化膜と磁性ビーズを用いた PV 濃縮法を組み合わせる新規手法により、より迅速かつ簡便で直接的な環境 PV サーベイランスを行い、その有効性を実証することを目的とする。

本研究では、環境検体からの新たなポリオウイルス検出法として検討を進めている、陰

電化膜と磁性ビーズを用いた PV 濃縮法を組み合わせる新規手法の有効性を実証することを目的とした。加えて、PV RNA の高感度検出・解析法に関する検討も行った。

3. 研究の方法

スパイク試験

環境水を模したバッファーに力価既知の PV をスパイクし、陰電化膜およびポリオウイルス特異的レセプター結合型ビーズ (PVR-MB) による PV の濃縮効率を算出した。

PV (RNA) 検出法の検討

PV RNA の検出・解析にはポリオウイルス型別特異的リアルタイム PCR、エンテロウイルス C 群に特異的なカプシド全領域増幅法 (ECRA 法)、次世代シーケンシング (NGS) を用いた。

実際の環境検体解析

上記の検討によって有用であることが見出された手法の組み合わせを用いて、PV 陽性が疑われる環境検体 (パキスタンの河川水、研究協力者より入手) からの PV 検出・解析を試みた。

4. 研究成果

スパイク試験

最初に環境水を模したバッファーに PV をスパイクし、モデル試験を行った。種々の条件を検討した結果、陰電化膜および PVR-MB を併用した場合、PV を約 5000 倍に濃縮することが可能となった。

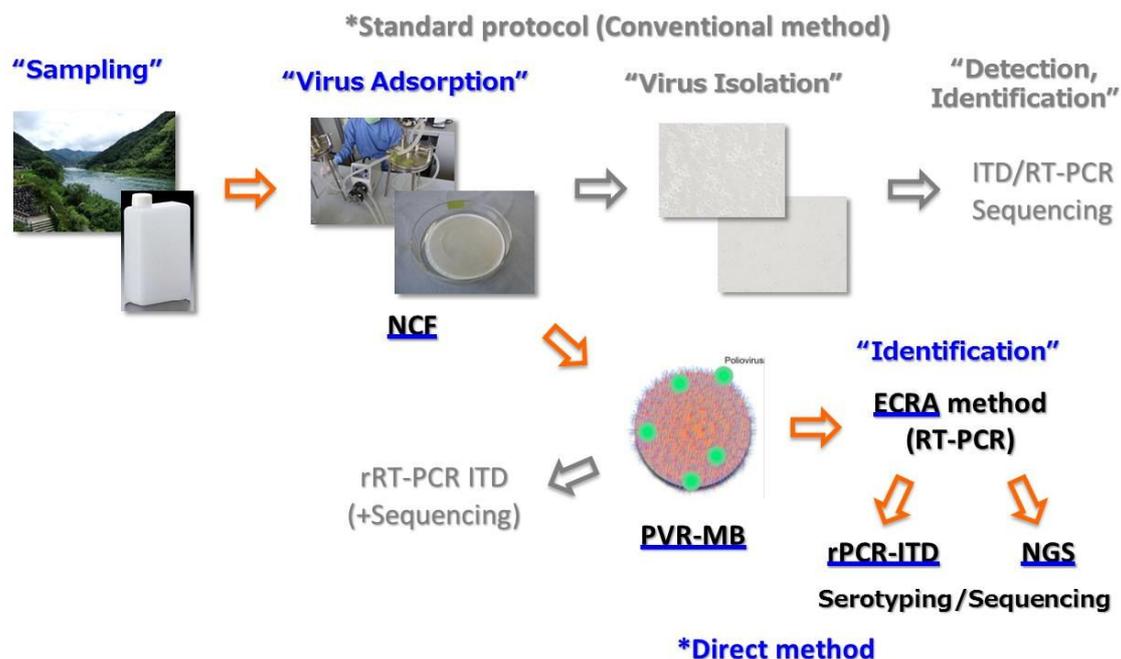
PV (RNA) 検出法の検討

当所解析に用いる予定であった US CDC 開発のポリオウイルス型別特異的リアルタイム PCR はプライマー等にイノシン残基が挿入されているためか、アニーリング温度も低く、予想していた感度に達しなかった。そこでカプシド全領域増幅法 (ECRA 法) を試したところ、リアルタイム PCR では検出が困難であったサンプルからも目的断片 (約 4.0 kbp) の良好な増幅がみられた。さらにその後に行ったリアルタイム PCR および NGS においてもスパイクした PV を高感度かつ正確に検出可能であった。

実際の環境検体解析

本手法を用いて PV の存在が疑われるパキスタンの河川水中に含まれることが予想される PV の検出・解析を行った。NGS を用いることにより、増幅された断片中に含まれる PV および非 PV エンテロウイルスを一括して検出・解析できることに加え、ウイルス同士のリコンビネーション等も検討可能である。環境サーベイランスにおける本手法の有用性が強く示唆された。Figures に本手法のスキームとパキスタンの環境検体より検出されたウイルスを示した。本手法 (Direct method) は従来用いられてきた培養細胞によるウイルス分離の代替法としてウイルス同定までの時間短縮、NGS によって得られる詳細な配列情報などにおいて非常に優位性があると考えられる。

○ PV detection methods from environmental samples



	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	No. 7	No. 8	No. 9
PVs (DNA BLAST)		Sabin 1 Sabin 2 Sabin 3	wPV1	Sabin 1	wPV1 Sabin 2 Sabin 3	wPV1	wPV1 Sabin 1 Sabin 2	Sabin 1 Sabin 3	wPV1 Sabin 3
NPEVs (DNA BLAST)	EV76 CVA20	EV90 EV99 CVA13 E24	EV90 EV91 EV99 CVA8 CVA13 CVA19 CVA24 E14	EV76	EV76 EV99 CVA11 CVA13 CVA20 CVA21 CVA24	EV76 EV89 EV90 CVA11 CVA20	EV76 EV90 EV99 CVA10 CVA13 CVA17 CVA19 CVA20 CVA21 CVA24	EV76 EV91 EV99 CVA13 CVA19 CVA21 CVA22 CVA24	EV76 EV99 CVA10 CVA11 CVA13 CVA20 CVA24

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 4 件)

1. Arita, M., D. R. Kilpatrick, T. Nakamura, C. C. Burns, D. Bukbuk, S. B. Oderinde, M. S. Oberste, O. M. Kew, M. A. Pallansch and H. Shimizu (2015). "Development of an efficient entire-capsid-coding-region amplification method for direct detection of poliovirus from stool extracts." J Clin Microbiol 53(1): 73-78.

2. Li, T. C., T. Yang, S. Yoshizaki, Y. Ami, Y. Suzaki, K. Ishii, K. Haga, T. Nakamura, S. Ochiai, W. Takaji and R. Johne (2015). "Construction and characterization of an infectious cDNA clone of rat hepatitis E virus." J Gen Virol.

3. Li, T. C., S. Yoshizaki, T. Yang, M. Kataoka, T. Nakamura, Y. Ami, S. Yuriko, N. Takeda and T. Wakita (2016). "Production of infectious ferret hepatitis E virus in a human hepatocarcinoma cell line PLC/PRF/5." Virus Res 213: 283-288.

4. Nakamura, T., M. Hamasaki, H. Yoshitomi, T. Ishibashi, C. Yoshiyama, E. Maeda, N. Sera and H. Yoshida (2015). "Environmental Surveillance of Poliovirus in Sewage Water around the Introduction Period for Inactivated Polio Vaccine in Japan." Appl Environ Microbiol 81(5): 1859-1864.

[学会発表](計 2 件)

1. T. Nakamura, M. Arita, H. Shimizu. Development of direct detection method of

polioviruses from environmental samples.
第 63 回日本ウイルス学会学術集会，福岡市，
2015

2. 中村 朋史、有田 峰太郎、清水 博之. ウ
イルス受容体特異性を応用した環境水から
のポリオウイルス直接検出法の開発. 第 62
回日本ウイルス学会学術集会，横浜市，2014

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 朋史 (NAKAMURA, Tomofumi)
国立感染症研究所ウイルス第二部研究員
研究者番号：90446881

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：