

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策の確立に関する研究」（H23-新興-一般-010）

分担研究総合報告書（H23-25 年度）

デングウイルス、チクングニアウイルスの迅速診断法の研究

研究分担者 森田 公一 長崎大学・熱帯医学研究所 教授

研究要旨：

熱帯、亜熱帯を中心として蚊で媒介されるウイルス感染症、特にデングウイルスとチクングニアウイルスの感染が世界的に増加・拡大傾向にある。とりわけ、デングウイルスによる被害は深刻であり、世界保健機関は毎年世界では 2000 万～4000 万の感染者が発生しているの見積もっている。我が国においても、アジア、アフリカ、中南米を旅行し帰国後発症するデング、チクングニア感染者が増加しており輸入感染症として重要であるが、加えて、こられのウイルスを媒介する能力のあるヒトスジシマカが本邦内で繁殖しているため、ウイルスの国内流行も視野に入れた対策を講じ、準備をしておくことが必要と思われる。本分担研究では、迅速診断法の開発、改良を目的とした。

初年度は日本で開発された遺伝子増幅検出技術である LAMP 法をデングウイルス等の検出に応用した手法を開発した。これまで開発された同様の手法の多くは 4 つあるデングウイルスの血清型それぞれについての検査が必要であったが、今回開発した方法では、1 つの検査で 4 つの型ともに高感度に検出することが可能であった。さらにデングウイルスと近縁の日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス等とは反応せず、非特異反応もほとんどなかった。このことから、本手は十分に有用な診断法であると判断した。

2 年次には迅速抗体診断法としてイムノクロマト法を開発し、あわせて安価な診断用抗原の供給を目的として遺伝子工学手法を用いたデングウイルス様粒子の作成技術を開発した。得られた結果から、本研究をさらに推進することでデングウイルスの高感度で安全、安価なベッドサイト抗体診断薬が供給可能であると判断した。

3 年次の研究では、過去 2 年間に得た経験を活用して、デングウイルスとの鑑別診断が必要な日本脳炎などの他のフラビウイルスについての LAMP 法の作成やウイルス様粒子作製法の構築を実施し、加えてこれまでに開発したデングウイルス、チクングニアウイルスの迅速検出技術をデング熱流行国で活用してデングウイルス、チクングニアウイルスの検出を実施しミャンマーでは同国に初めて ECSA 型 (East Central South African genotype) が侵入したことを明らかにした。

A. 研究目的

我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症のうち、特にデングウイルス感染やチクングニアウイルス感染等の簡便、迅速なウイルス遺伝子検出系、特異的抗体検出系を開発すること。またこれらのウイルスに対する抗体検出系診断薬に利用することのできる、安全、安価な診断用抗原を作成するため、ウイルス粒子様抗原を遺伝子工学手法を用いて作成し、その特性や感度について評価すること、加えて試作した手法を疾病流行地域で活用しその有用性について検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. デングウイルスをはじめとする LAMP 法による迅速診断法の開発

デング 1~4 型ウイルスの遺伝子ゲノム 3' 末端にあるコンセンサス配列からデングウイルスコンセンサスプライマーを合成した。栄研化学社製の RT-LAMP キットに LAMP プライマーを添加し、ウイルス培養液、ヒト血清サンプルから抽出した RNA を添加して Auto-turbidimeter で 63°C、1 時間測定した。RT-PCR 法はインビトロゲン社製の RT-PCR キットを用いて 2. の RT-PCR プライマーとサンプル RNA を添加し常法にしたがって、遺伝子増幅を行い、アガロース電気泳動によって増幅産物を検出した。黄熱ウイルスやダニ媒介性脳炎ウイルスについても同様に LAMP 法の実施した。

2. イムノクロマト法を用いた抗体診断薬の開発と、診断用抗原(ウイルス様粒子)作製

セルロース膜に抗ヒト IgM を固相化した。フラビウイルス特異的マウスモノクロー抗体の金コロイドによる標識は定法により行い、イムノクロマト法のバッファーに患者血清、標識抗体、抗原(4価のウイルス感染培養液)を混合し15分間IgM補足抗体を固相化したセルロース膜スティックを浸すことで固相化した抗ヒトIgMの位置に出現するバンドの有無で陽性、陰性を判断した。

(謝辞:イムノクロマト法については大塚製薬、織田哲也博士のご指導をいただきました。)

ウイルス様粒子の作製については昆虫細胞発現ベクター pIB/V5-His (Invitrogen 社製) を用いデングウイルス1型~4型までのPrM-E遺伝子をそれぞれ挿入して発現系を構築し blasticidin により高発現細胞を選択し安定発現系を得た。同様にして、日本脳炎ウイルスや黄熱ウイルスについてもウイルス粒子様抗原の発現を実施した。

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験については長崎大組換え DNA 安全委員会への申請許可を得て実施した。

3. 診断薬評価のための流行地での調査

2010年7月~10月の期間にミャンマー国にある Mandalay 小児病院をデング熱疑いで受診した患者のうちインフォームドコンセントが得られている 116 例の患者サンプルを得た。ウイルス特異的血清 IgM, IgG 検査、本研究で開発した LAMP 法や RT-PCR 法によりウイルス遺伝子の検出を実施し、併せて検体の一部をヒトスジマカ培養細胞クローン C6/36 細胞に接種しウイルス分離を実施した。分離されたチクングニアウイルスについては E 1 遺伝子部分の塩基配列を決定し MAFFT, version 7.058b によりアラインメントを調整して、Bayesian MCC tree (version 3.1.2) と FigTree software (version 1.4.0.) を用いて樹状解析を実施した。

(倫理面への配慮)

本研究におけるヒト血清の使用は、ミャンマー国、長崎大学熱帯医学研究所倫理委員会において承認をうけ実施した。

C. 結果

1. デングウイルスをはじめとする LAMP 法による迅速診断法の開発

デングコンセンサス RT-LAMP プライマーを用いて 4 つの血清型のデングウイルスの遺伝子が検出可能であった。検出限界は DEN-1, -2,

-3, -4 型の代表型 について、それぞれ 1, 10, 10, 1 copy であった。野生株 16 株を用いた RT-PCR 法との比較では 7 株で 10~100 倍高い感度、6 株では同じ感度であった。デングウイルスと近縁の日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス、セントルイス脳炎ウイルス等について consensus デング RT-PCR との反応性を検討したがいずれのウイルスでも遺伝子増幅はなかった。また、過去にウイルス分離が陽性であった患者サンプルから抽出した RNA から高感度にデングウイルス遺伝子が検出され、非感染者血清からの RNA では非特異的増殖は見られなかった。

バングラデシュで 2006 年~2009 年に採取されたデング熱疑いの有熱患者血清、42 例、88 例、21 例、126 例から、このデングコンセンサス LAMP 法を用いて、25 例のデング 1~3 型のウイルスが検出できた。この結果はウイルス分離、PCR 法による検査結果と概ね一致していた。

このほか、研究期間中に黄熱ウイルス、第媒介性脳炎ウイルスについても LAMP 法を応用して迅速ウイルス検出法の開発を完了し、以前に開発していた、ウエストナイルウイルス、日本脳炎ウイルス、チクングニアウイルスの LAMP 法と合わせて日本に侵入する可能性のある蚊媒介性ウイルスの迅速遺伝子検出のための LAMP 法が確立された。

2. イムノクロマト法を用いた抗体診断薬の開発と、診断用抗原(ウイルス様粒子)作製

抗ヒト IgM 抗体を固相化したイムノクロマト法すなわち IgM-補足法によりデング患者血清中に存在するデングウイルス特異的 IgM 抗体の検出が 15 分で判定可能であった。非特異的な反応はみられなかった。

昆虫細胞を用いた、ウイルス様粒子産生細胞が構築できた。抗原量はウイルス感染細胞上清と同等の力価をしめた。

3. デング熱、チクングニア熱流行地域での血清診断と分離ウイルスの分子疫学解析

116 例のデング熱疑い患者の血清抗体検査では特異的 IgM 検査において、チクングニア陽性 (5.2%)、デング陽性 (47.4%)、両方陽性 (6%) であった。特異的 IgG 検査ではチクングニア陽性 (14.6%)、デング陽性 (48.2%)、双方陽性 (7.7%) であった。ウイルス検査については 4 検体でチクングニアウイルス遺伝子陽性検体があり、C6/36 細胞接種によりウイルスが 4 株分離された。E 1 遺伝子 (遺伝子番号 9952 -11271) の塩基配列を決定し登録した (GenBank accession numbers- KF 590564, KF 590565, KF 590566, KF 590567)。これらの配列を樹状解析したところ、有史以来はじめてミャンマー国にアフリカのチクングニアウイルス ECSA 型 (East Central South African genotype) が侵入していたことが判明した。

D. 結論

1. デングウイルスの 4 つの血清型のすべてを同時に検出し得るデングウイルス共通 RT-LAMP 法を確立した。この RT-LAMP の検出限界は DEN-1, -2, -3 -4 型の代表型 について、それぞれ 1, 10, 10, 1 copy であった。デングウイルス 16 株を用いたコンセンサス RT-PCR 法との比較では 7 株で 10 ~ 100 倍高い感度、6 株では同じ感度であった。コンセンサス RT-PCR 法と他のフラビウイルスとのクロス反応はなかった。患者血清からも Consensus デング RT-LAMP でウイルスが検出でき、健康者血清からは非特異反応はなく、臨床検体からもデングウイルスを検出できた。

2. IgM 補足法によるデング特異的イムノクロマト法を作製し、ベッドサイド利用できる迅速抗体検査を開発した。この検査に用いることのできる安全なウイルス粒子様抗原を昆虫細胞で安定に発現する系を構築した。

3. ミャンマー国で臨床的にデング熱が疑われた患者の血清抗体検査により 47.4%はデングウイルス感染であることが確認できたが、5.2%はチクングニアウイルス感染であった。また 4 例ではチクングニアウイルスが分離され系統樹解析の結果、アフリカ由来の ECSA 遺伝子型が同国に侵入したことが判明した。

E. 考察

1. デングウイルスのコンセンサス LAMP デングウイルス感染症の迅速診断、フィールドサーベイランスに極めて有用であると考えられる。
2. イムノクロマト法によるデング抗体診断薬が開発でき、この診断試薬が市場に供給できれば国内でも国外でも有用であると思われる。
3. デングウイルスをはじめとして、フラビウイルス粒子様抗原は安全安価な抗原として有望であり、他のフラビウイルスやチクングニアウイルスについても同様に簡易抗体診断法を開発を継続する必要がある。
4. ミャンマー国への侵入が確認されたアフリカ由来のチクングニアウイルス(ECSA 型)は 2008 年-2009 年に近隣のマレーシア、タイ、2010 年には中国に侵入したことが確認されており、ミャンマー国へはこれらの近隣諸国から伝搬した可能性が高い。この系統のウイルスは従来のアジアで流行しているチクングニアウイルスよりも高い病原性を持つことが示されており今後、この系統のウイルスの拡大や我が国への伝搬には留意する必要がある。

F. 研究発表

1) 論文発表

Kwallah AO, et. al., A real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of yellow fever virus. *J Virol Methods.* ;Vol.193(1):23-27. 2013

Ngwe Tun MM, et. al., Serological characterization

of dengue virus infections observed among dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome cases in Upper Myanmar. *J.Med.Virol.* Vol.85:1258-1266, 2013

Hayasaka D, Aoki K, Morita K. Development of simple and rapid assay to detect viral RNA of tick-borne encephalitis virus by reverse transcription-loop -mediated isothermal amplification. *Virology Journal* Mar 4;10:68. 2013

Basu D. 他: First Isolation of Dengue Virus from the 2010 Epidemic in Nepal. *Tropical Medicine and Health* Vol. 41 No. 3: 1-9, 2013

2) 学会発表

Toru Kubo 他: Developing a panel of reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assays for comprehensive detection of causing viruses in pediatric severe pneumonia. *International Union of Microbiological Societies Congress, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011*

Mya Myat Ngwe Tun 他: Dengue primary infections observed among dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome cases in upper Myanmar. *International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011*

Allan ole Kwallar 他: A Real-time Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Rapid Detection of Yellow Fever Virus. *Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2013, Tokyo, Japan January 23 -24 , 2013.*

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし