

分担研究報告書

病原体の病理学的検出法の確立

研究分担者 中島 典子（国立感染症研究所・感染病理部）

研究要旨 バイオテロに使用された既知あるいは未知の病原体を病理組織中に検出する方法として、病原体のゲノムをオリゴヌクレオチドプローブを用いた *in situ* hybridization 法がある。今年度は我々が開発した高感度で特異性の高い *in situ* hybridization-AT tailing (ISH-AT) 法と市販されている Z 型オリゴヌクレオチドプローブを用いた分岐 DNA-ISH 法である ViewRNA 法と RNAscope 法を比較検討した。標的核酸のコピー数が 100/細胞の場合は両者とも検出可能であり、プローブ作製までの日数、とコストパフォーマンスの面からも、ISH-AT 法を第 1 選択としてよいことがわかった。非常に少ないコピー数のゲノムを検出する際は、プローブ数の多い、分岐 DNA-ISH 法も試行する予定である。分岐 DNA-ISH 法である View RNA 法と RNAscope 法については今後さらに比較検討する予定である。

A . 研究目的

バイオテロ対策として病原体の病理学的検出法を確立しておく必要がある。免疫組織化学や *in situ* 核酸検出法は組織切片上で病原体の検出ができる方法であり、病原体の体内分布や病変との関連を考えるうえで重要な病理学的解析法である。組織切片上で病原体を検出する方法には病原体の蛋白抗原を検出する免疫組織化学と遺伝子核酸を検出する *in situ* hybridization (ISH) 法がある。良質な抗体がすでにある場合、免疫組織化学は安定した検出系となるが、未知の病原体等の場合、あらたに特異的な抗体を作製しなければならず、時間を要し緊急対応は難しい。外来病原体遺伝子を次世代シーケンス法等により同定できるよう

になった近年、塩基配列情報に基づいて ISH 法用のオリゴヌクレオチドプローブを作成するのは容易である。従来、オリゴヌクレオチドプローブによる ISH 法は感度が低く実用的でなかったが、我々の開発した ISH-AT 法や市販の Z 型オリゴヌクレオチドプローブ（ターゲットハイブリ）と分岐 DNA プローブを用いた ISH 法は高感度で特異性の高い方法であり、緊急時の迅速病理学的病原体検出法の有力なツールとなる。分岐 DNA-ISH 法は現在 2 社から販売されている。QuantiGene View RNA (Affymetrix 社、ベリタス社) と RNAscope (ACD 社、コスモバイオ) であり、後者のほうが反応ステップが多いが、それだけ感度がいいと宣伝されている。また後者では、HRP-DAB の発色が

可能であり、より解像度の高い染色像が得られる。この方法で用いるプローブは標的遺伝子の塩基配列情報(最低 300 塩基長以上)を提供するだけで検出用の混合プローブを注文できる。実際の生物テロや新興・再興感染症発生に備え、最良の検出方法を確立するために、今回、ISH-AT 法と ViewRNA 法、RNAscope 法を比較検討した。

B . 研究方法

1)材料

a) 病理組織標本

ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織を使用。ヒト剖検組織:パンデミックインフルエンザ A/H1N1pdm09 剖検肺組織、重症熱性血小板減少症候群(SFTS)剖検リンパ節。動物実験剖検組織:中東呼吸器症候群コロナウイルス(MERS CoV)感染マウス組織(国立感染症研究所・感染病理部岩田先生より分与)。

b) プローブ

・ISH-AT 法用のプローブの作成:A/H1N1pdm 09 (AB538390.1):NP 領域に 2 ヶ所。

SFTSV :S 鎖領域 1 ヶ所、L 鎖領域 1 ヶ所に設計したプローブ。

MERS-CoV: :NP 及び Env 領域に 1 種類ずつ作製した。ISH-AT 施行時には、2 種類のプローブの mixture とした。

・分岐 DNA-ISH 法のプローブの注文(ベリタス社):A(H1N1)pdm 09 (AB538390.1) NP 部分 20 ヶ所の混合プローブと 2 ヶ所の混合プローブ、SFTSV S 鎖領域に 20 ヶ所(ベリタス社)あるいは 19 ヶ所の混合プローブ(コスモバイオ社)を作成した。

2) 方法

・ISH-AT 法

前処理法:抗原賦活液(DAKO 社)中で 95℃、40 分、膜透過処理を行い、Proteinase K(PK)(DAKO 社)濃度を 0.1, 1, 5, 10, 100 µg/ml にして至適濃度を決定した。また RNAscope 法のキットの Pretreatment 2 液で煮沸 15 分、Pretreatment 3 液 40℃ 処理を 15 あるいは 30 分行った。

発色法:アルカリフォスファターゼ-Fast red の系と、HRP-DAB の系の両方を試行した。後者では検出感度を上げる際はチラミドで増幅する CSA 法を併用した。

・分岐プローブ ISH 法

分岐 DNA-ISH 法は基本的に添付説明書に従ったが、ホルマリン再固定のステップは省略した。(倫理面への配慮)検討材料は剖検組織であり、剖検時に使用の承諾が得られている。感染動物標本に関しては動物実験委員会の承認を得て実験が行われた。

C . 研究結果

(1) ISH-AT 法の前処理

前処理の条件はサンプルによって至適化しないといけませんが、これまで PK はまず 0.1 µg/ml で試行し、検出できない場合は 1 µg/ml にしてきた。A/H1N1pdm09 肺炎の剖検肺組織(100 コピー/細胞)を用いて前処理で結果がどのように変わるか確認したところ、PK=1 がもっとも検出率がよく、10, 50, 100 µg/ml にすると抗原シグナルが増えても組織の形態が損傷されて(過消化)いた。RNAscope の試薬を用いた前処理ではヒト肺組織で推奨されている strong という条件で PK1 µg/ml と同等の結果が得られた。

(2) ISH-AT 法による MERS CoV 感染マウス組織におけるウイルス RNA の検出

免疫組織化学で示されたウイルス抗原の局在に一致してウイルスゲノムが検出された。

ウイルスコピー数が 10^5 コピーと 10^3 コピーの検体で試行したが、コピー数が多い切片でより多くの陽性シグナルが検出された。 10^3 コピーの検体でも陽性シグナルが得られた。

(3) ISH-AT 法と分岐 DNA-ISH に用いるプローブの比較

双方とも標的核酸の 40 塩基に対し、1 つあるいは 1 組のオリゴプローブがハイブリする。A/H1N1pdm09 の NP 領域 2 ヲ所に ISH-AT 用オリゴヌクレオチドプローブを作成し混合プローブとした。分岐 DNA-ISH 法用には NP 領域 20 ヲ所の混合プローブと 2 ヲ所の混合プローブを用意した。切片中の mRNA のコピー数が 10^4 コピー/細胞である切片において、2 ヲ所の混合プローブを用いた ISH-AT 法では十分量検出できたが、2 ヲ所の混合 Z 型プローブを用いた分岐プローブ-ISH 法ではほとんど検出できなかった。よって 2 ヲ所の probe (結合部分は計 80 塩基長)での検出感度は ISH-AT 法のほうが高感度といえる。RNAscope の系では 2 ヲ所の混合 Z 型プローブで検出可能かどうか今後解析する予定である。RNAscope 法では標的核酸について最低 300 塩基長を要するので ISH-AT 法と同等の感度には 5-7 組のプローブ mixture を要することが予想される。逆に ISH-AT 法ではプローブ数を増やすことで検出感度を上げられる可能性が十分考えられた。

(4) SFTS 剖検リンパ節におけるウイルスゲノムの検出

ISH-AT 法と ViewRNA 法で比較すると、迅速・簡便性、感度はほぼ同等であった。

ISH-AT-CSA 法と RNAscope 法を比較するとコピー数の多い切片では両者の検出感度はほぼ同

等であったが、コピー数が少なくなると RNAscope 法のほうがよりシグナル/ノイズ比が高く、陽性シグナルが多かった。

D. 考察

次世代シーケンス法などにより患者あるいは死亡者から採取した検体中の病原体遺伝子を同定され、塩基配列の一部でも確定できれば、速やかに ISH 用のオリゴヌクレオチドプローブを作成し、病理切片中で病原体遺伝子検出し、その体内分布(局在)を明らかにできる。検出方法としてはコピー数がある程度あれば ISH-AT 法が最もはやく対処できる。死亡時にはすでに組織中に残存するウイルスコピー数が少ない場合はリアルタイム RT-PCR で切片中に残存する標的遺伝子の量を測定し、1000 コピー以上であれば ISH-AT 法で検出できる可能性があると判断している。コピー数が少ない場合、市販の分岐 DNA-ISH 法も試行してみるべきである。現在国内ではベリタス社(Quant iGene View RNA)とコスモバイオ(RNAscope ACD 社)が販売している。難点は非常にコストがかかることである。1 スライドの反応にプローブと試薬代が 1-2 万円かかる。RNAscope 法のほうが感度がよいと思われるが、リアルタイム RT-PCR により解析したコピー数とつぎ合わせてより詳細な検出感度を検討する必要がある。また非特異シグナルなども併せて検討する予定である。

E. 結論

病原体遺伝子の in situ 検出法を比較検 AT 法、ISH-AViewRNA 法、RNAscope 法では、標的核酸のコピー数が 100/細胞の場合はほぼ同様の検出感度であった。プローブ作製までの日数、

とコストパフォーマンスの面からも、ISH-AT法を第1選択としてよいことがわかった。非常に少ないコピー数のゲノムを検出する際は、ISH-AT法の前処理やプローブ数を増やすなどの工夫をしながら、プローブ数の多い、分岐DNA-ISH法も試行する予定である。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1. 論文発表

1. Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Sato Y, Nakajima N, Koike S, Iwasaki T, Sata T, Yamashita T, Minagawa H, Taguchi F, Hasegawa H, Shimizu H, Nagata N. Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infections. *Neuropathology*. Sep 28. 2014 [Epub ahead of print]
2. Moritake H, Kamimura S, Nunoi H, Nakayama H, Suminoe A, Inada H, Inagaki J, Yanai F, Okamoto Y, Shinkoda Y, Shimomura M, Itonaga N, Hotta N, Hidaka Y, Ohara O, Yanagimachi M, Nakajima N, Okamura J, Kawano Y. Clinical characteristics and genetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia with hemophagocytic lymphohistiocytosis: a Japanese retrospective study by the Kyushu-Yamaguchi Children's Cancer Study Group. *Int J Hematol*. 100(1):70-8, 2014

3. Watanabe T, Zhong G, Russell CA, Nakajima N, Hatta M, Hanson A, McBride R, Burke DF, Takahashi K, Fukuyama S, Tomita Y, Maher EA, Watanabe S, Imai M, Neumann G, Hasegawa H, Paulson JC, Smith DJ, Kawaoka Y. Circulating avian influenza viruses closely related to the 1918 virus have pandemic potential. *Cell Host Microbe*. 15(6):692-705, 2014
4. Sakai K, Ami Y, Tahara M, Kubota T, Anraku M, Abe M, Nakajima N, Sekizuka T, Shirato K, Suzaki Y, Aina A, Nakatsu Y, Kanou K, Nakamura K, Suzuki T, Komase K, Nobusawa E, Maenaka K, Kuroda M, Hasegawa H, Kawaoka Y, Tashiro M, Takeda M. The host protease TMPRSS2 plays a major role in in vivo replication of emerging H7N9 and seasonal influenza viruses. *J Virol*. 88(10):5608-16, 2014
5. Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M. The first identification and

retrospective study of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Japan. J Infect Dis. 209(6):816-27, 2014

6. 中島典子 : H5N1 高病原性鳥インフルエンザウイルスに感染したヒトの臨床、病理およびウイルス学的知見 . 化学療法の領域 30:40-48, 2014
7. 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹 : ウイルス性肺炎 . 病理と臨床 32 : 1146-1153, 2014
8. 中島典子 : オリゴヌクレオチドプローブを用いた新しいin situ ハイブリダイゼーション法 . 呼吸 33: 152-159, 2014
9. 高橋健太、鈴木忠樹、中島典子、飛梅 実、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹 : 脳炎・脳症の病理 Neuroinfection . 神経感染症 19:32-39, 2014
10. 中島典子 : インフルエンザ感染症の病理 . 小児内科 2014, 45:1935-1941

2. 学会発表

1) 国際発表

1. Kouji Sakai, Yasushi Ami, Maino Tahara, Noriko Nakajima, Makoto Kuroda, Hideki Hasegawa, Yoshihiro Kawaoka, Masato Tashiro, Makoto Takeda. The host protease Tmprss2 play a major role for influenza virus replication in vivo. International Union of Microbiological Societies (IUMS 2014)- XIVth

International congress of Bacteriology and Applied Microbiology, XIVth International Congress of Mycology, XVIth International Congress of Virology (カナダ) 2014

2. Osamu Kotani, Naeem Asif, Tadaki Suzuki, Naoko Iwata, Noriko Nakajima, Harutaka Katano, Takushi Hosomi, Hiroyuki Tsukagoshi, Hideki Hasegawa, Fumihiro Taguchi, Hiroyuki Shimizu, Noriyo Nagata Comparative analyses of the pathogenicity of two isolates of Saffold virus in neonatal mouse. International Picornavirus meeting (Europic2014) (ベルギー) 2014
3. Noriko Nakajima, Yuko Sato, Hideki Hasegawa, Hoang Ngoc Thach, Nguyen Trung Thuy, Tran Minh Dien, Nguyen Thanh Liem, Shoji Kawachi, Kazuo Suzuki Pathological study of Severe ARDS cases in NHP-Hanoi International symposium and Teikyo-Harvard program (東京) 2014

2) 国内発表

1. 酒井宏治、網康 至、田原舞乃、久保田耐安楽正輝、中島典子、高下恵美、関塚剛史、駒瀬勝啓、信澤枝里、小田切孝人、前仲勝実、黒田 誠、長谷川秀樹、河岡義裕、田代真人、竹田 誠 : II 型膜貫通型セリンプロテアーゼ Tmprss2 は、HA 開裂部位に mono-basic なアミノ酸配列をもつ A 型インフルエンザウイルスに対する肺内必須活性化酵素である . 第 62 回日本ウイルス学

会学術集会（横浜）2014年11月

2. 渡辺登喜子、Gongxun Zhong Col in Russell、中島典子、八田正人、Anthony Handson、高橋健太、渡辺真治、今井正樹、長谷川秀樹、河岡義裕：スペイン風邪ウイルスに類
似の鳥インフルエンザウイルスのパンデ
ミックポテンシャル．第 62 回日本ウイル
ス学会学術集会（横浜）2014年11月
 3. 朴ウンシル、佐藤由子、中島典子、古屋哲
也、水谷哲也、今岡浩一、森川 茂：日本
国内ネコにおける新規モルビリウイルス
（feline morbillivirus, FMV）の疫学調
査．第 62 回日本ウイルス学会学術集会（横
浜）2014年11月
 4. 福本 瞳、高橋健太、佐藤由子、峰 宗太郎、
保科しほ、中島典子、佐伯秀久、長谷川秀
樹、黒田 誠、片野晴隆：網羅的ウイルス
検出法 multivirus real-time PCR の改良
と臨床検体への応用．第 62 回日本ウイル
ス学会学術集会（横浜）2014年11月
 5. 竹田 誠、中島典子、河岡義裕：TMPRSS2 は、
インフルエンザの病原性発現に必須の宿
主プロテアーゼである．第 88 回日本感染
症学会学術講演会（福岡）2014
 6. 竹田 誠、中島典子、水田克巳：宿主プロ
テアーゼ TMPRSS2 は、急性呼吸器感染症ウ
イルスの生体内活性化酵素である．第 55
回日本臨床ウイルス学会（札幌）2014
 7. 仲里 巖、喜舎場由香、新垣和也、加藤誠
也、中島典子、片野晴隆、長谷川秀樹：新
生児心筋炎の 3 剖検例．第 103 回日本病理
学会総会（広島）2014
 8. 秋田英貴、鄭子文、中島典子、星本和種、
笹島ゆう子、瀧本雅文：風疹感染胎盤の一
例．第 103 回日本病理学会総会（広島）2014
 9. 中島典子、渡辺登喜子、佐藤由子、高橋健
太、鈴木忠樹、田代真人、河岡義裕、長谷
川秀樹：ヒトから分離された H7N9 亜型鳥
インフルエンザウイルス感染動物モデル
の病理学的解析．第 103 回日本病理学会総
会（広島）2014
 10. 長谷川秀樹、亀井敏昭、高橋 徹、鈴木忠
樹、片野晴隆、中島典子、森川 茂、西條
政幸、倉田 毅：日本国内で発生した重症
熱性血小板減少症候群（SFTS）の病理解析．
第 103 回日本病理学会総会（広島）2014
- H 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

