

新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
委託業務成果報告

(委託業務題目)

国内侵入・流行が危惧される昆虫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

担当責任者研究報告書

デングウイルス・リフトバレー熱ウイルスの病原体迅速検査法の確立
に関わる技術開発

担当責任者： 森田公一 長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学分野

研究要旨：

蚊で媒介されるウイルス疾患のなかで、デングウイルス感染症は、毎年約1億人が感染し、数十万人が重症のデング出血熱を発症すると見積もられている。これにともない、我が国の輸入症例も増加し、2013年は249例を超えて感染症法施行後最高の症例数となった。そしてついに、2014年8月～9月にかけて東京都において70年ぶりの国内流行が発生し160名以上の患者が確認された。一方、リフトバレー熱はアフリカを中心に発生しており、近年では中近東へも侵入して患者発生が報告され、アジアひいては日本にも侵入することが危惧される。これらのウイルス感染症の国内侵入の阻止、および侵入した場合その被害を最小限に食い止めるためには、迅速診断法の開発は重要である。本分担研究では、これら二つの蚊媒介性ウイルス感染症の簡便な実験室診断法を確立し、キット化の基盤的開発研究をすることを目的として、研究初年度はデング熱の迅速診断法の開発を実施し、デングウイルス NS1 蛋白を大腸菌発現系にて大量発現させ、加えて NS1 蛋白に対する単クローン抗体を樹立し、さらにイムノクロマト法による NS1 抗原検出キットを試作した。

A. 研究目的

デング熱、リフトバレー熱の迅速診断法の簡便な実験室診断法を確立し、キット化の基盤的開発研究をすることを目的として、研究初年度はデング熱のイムノクロマト法を用いた迅速診断法の開発を実施した。

B. 研究方法

1) NS1 抗原の大腸菌発現系での発現：

デング 2 型ウイルスの非構造蛋白質の NS1 蛋白遺伝子を大腸菌発現ベクター pQE30 のクローニングサイトに挿入して His-tag を付加した状態で大腸菌に発現させ、溶菌処理を実施した後、定法により高速遠心にて不純物を除去し、ニッケルカラムにて精製した。

2) 単クローン抗体の樹立：

発現 NS1 蛋白を BALB/マウスに免疫し、4 回免疫したのち、脾臓を摘出して B 細胞を精製し、ミエローマ細胞 SP2/0 を用いてハイブリドーマ細胞を樹立して NS1 蛋白に対する単クローン抗体を作成した。抗体のデングウイルス NS1 抗原に対する特異的結合は、ウイルス感染細胞の間接蛍光染色、および、NS1 抗原発現バキュロウイルス感染細胞の免疫染色、およびウエスタンブロット法により確認した。さらに特異性を確認した、単クローン抗体は定法にしたがって金コロイドと結合させ、金コロイド標識 NS1 単クローン抗体を作成した。

3) イムノクロマト法による NS1 抗原検出系の作製：

ニトロセルロースメンブレン (HSF 240) に抗 NS1 モノクローナル抗体をコーティングしたのち乾燥させ、その後ブロッキング溶液で処理し、バッファーで洗浄して再度乾燥させた。乾燥したメンブレンは細い短冊状に切断して、イムノクロマト法に使用した。抗原検出能力の確認のため、NS1 抗原陽性検体と金コロイド標識 NS1 単クローン抗体、バッファー溶液を $40\mu\text{l}$ をロードし、 $100\mu\text{l}$ のバッファー溶液でさらにチェイスしてバンドが検出されるか否かを 30 分後に判定した。

(倫理面からの配慮について)

本年度の研究では、ヒトサンプルを用いた研究は実施していないので、特段の配慮は必要ないが、次年度以降はヒトサンプルを用いた検証実験を行うため、長崎大学病院倫理委員会の承認を得て実施する予定である。

C. 研究結果

1) NS1 抗原の大腸菌発現系での発現：

大腸菌発現デング 2 型ウイルス NS1 蛋白抗原の回収率は 1 リットル培養で約 10mg の収率であった。カラム精製した発現蛋白質をポリアクリルアミド電気泳動でその分子量が設計値と一致することが確認された (図 1 左)。また抗 His 抗体を用いたウエスタンブロット法によりこの蛋白が発現蛋白であることを確認した (図 1 右)。

2) 単クローン抗体の樹立：

合計12ハイブリドーマを得た。デング2型ウイルス NS1 蛋白との反応性をウエスタンブロット法、間接蛍光法で確認した。図2にはデング NS1 蛋白単クローン抗体がデングウイルス感染細胞と反応し、日本脳炎ウイルス感染細胞とは反応しないことを示している。

3) イムノクロマト法による NS1 抗原検出系の作製：

今回試作したイムノクロマト法の試験結果を図3に示す。ロードしたサンプルはデングウイルス感染細胞液上清 (DEN2-ICF)、日本脳炎有ウイルス感染細胞上清 (JEV-ICF)、デング NS1 発現バキュロウイルス感染細胞上清、陰性コントロール、精製デングウイルス NS1 抗原である。陰性コントロール、日本脳炎ウイルス検体ではバンドは検出されず、デング NS1 抗原が含まれる残りの3つのサンプルではバンドが検出された。

D. 考察

本年度開発したデングウイルス2型NS1タンパク質の大腸菌発現蛋白は1リットル培養で多量の抗原を発現させることが可能であり、今後血清診断系をふくむ多方面での活用が期待される。ただし、今の処可溶性が低く、現在、再フォールディング等の方法により可溶性の向上を模索中である。しかし、今回試作したイムノクロマト法によるデングウイルスの NS1 抗原検出キットは十分に機能した。今後、単クローン抗体のメンブレン

上のブロットを実際の製造に用いられる線上噴霧に切り替えることで感度の向上が期待され、限界感度試験、患者血清を用いた評価へと進展させることが必要である。またさらなる感度向上をめざして銀粒子を用いた超高感度化も検討する。

E. 結論

大腸菌発現によるデングウイルス NS1 タンパク質高発現系と抗 NS1 単クローン抗体を樹立してイムノクロマト法によるデング NS1 抗原検出キットを試作した。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

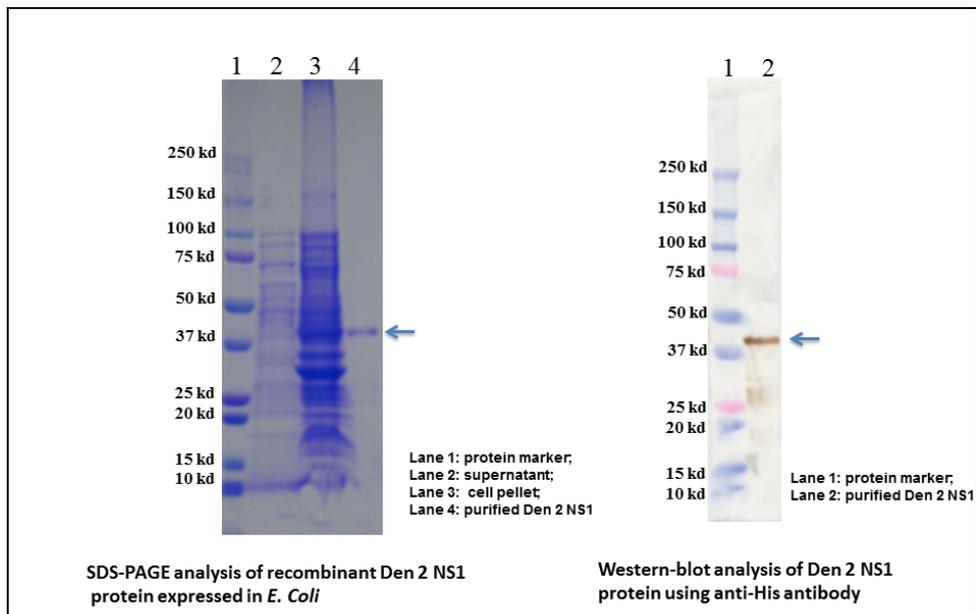
- 1) 森田公一、デング熱の世界的な流行と予防対策に関する将来的展望. 化学療法の領域. Vol.30 . 275-281. 2014
- 2) Muhareva Raekiansyah, Lyre Anni Espada-Murao, Kenta Okamoto, Toru Kubo, Kouichi Morita . Dengue virus neither directly mediates hyperpermeability nor enhances TNF- α -induced permeability in vitro. Japanese Journal of Infectious Diseases, Vol.67:86-94, 2014
- 3) Tomoko Abe, Ayumi Sando, Fumiteru Teraoka, Tadamune Otsubo, Kouichi Morita, Hiroaki Tokiwa , Kiyoshi Ikeda , Takashi Suzuki , Kazuya I.P.J. Hidari. Computational design of a sulfoglucuronide derivative fitting into a

- hydrophobic pocket of dengue virus E protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol449:32-37, 2014
- 4) Ngwe Tun MM, Thant KZ, Inoue S, Nabeshima T, Aoki K, Kyaw AK, Myint T, Tar T, Maung KTT, Hayasaka D, Morita K. Emergence of East Central South African Genotype of Chikungunya Virus in Myanmar, 2010. *Emerg Infect Dis*. 20:1378–1381, 2014
- 5) Ngwe Tun MM, Aoki K, Senba M, Buerano CC, Shirai K, Suzuki R, Morita K, Hayasaka D. Protective role of TNF- α , IL-10 and IL-2 in mice infected with the Oshima strain of Tick-borne encephalitis virus. *Sci Rep*. 4:5344, 2014
- 6) Aoki K, Shimada S, Simantini DS, Ngwe Tun MM, Buerano CC, Morita K, Hayasaka D. Type-I interferon response affects an inoculation dose-independent mortality in mice following Japanese encephalitis virus infection. *Virology*. 11; 105, 2014
- 7) 森田公一、デング熱：日本にも忍び寄る熱帯感染症、感染症道場、Vol.3, p41-44, 2014
- 8) 森田公一：感染症診療 update (デング熱)：日本医師会雑誌 143 巻・特別号 (2)、S388-389, 2014
- 9) 高松由基、森田公一：デング熱ワクチン、臨床と微生物、Vol.41:763-770, 2014
- 10) Leo Uchida, Lyre Anni Espada-Murao, Yuki Takamatsu, Kenta Okamoto, Daisuke Hayasaka, Fuxun Yu, Takeshi Nabeshima, Corazon C. Buerano, and Kouichi Morita. The dengue virus conceals double-stranded RNA in the intracellular membrane to escape from an interferon response. *Scientific Reports*. 4:7395. doi: 10.1038/srep07395. 2014
- ## 2. 学会発表
- 1) 井上真吾, Allan ole Kwallah, Salame Ashur, Mulati Omuyundo, Missiani Ochwoto, Samson Muuo, Lucy Okubi, Matilu Mwau, 森田公一：ケニアインド洋沿岸におけるデング熱の発生報告, 第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 山口, 2014 年 5 月 16 日～5 月 17 日
- 2) 内田玲麻, Espada-Murao Lyre Anni, 早坂大輔, 森田公一：Double stranded-RNA concealing によるデングウイルスの I 型 IFN 誘導回避機構, 第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 山口, 2014 年 5 月 16 日～5 月 17 日
- 3) 高松由基, 岡本健太, Dinh Tuan Duc, 余福勲, 早坂大輔, 内田玲麻, 鍋島武, Corazon C Buerano, 森田公一：NS1' タンパク質はトリ細胞で日本脳炎ウイルスの増殖及び適応に機能する, 第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 山口, 2014 年 5 月 16 日～5 月 17 日
- 4) 鍋島武, 二見恭子, 今西望, 吉川亮, 松本文昭, 高松由基, 内田玲麻, 森田公一：長崎県対馬と五島列島における蚊の採集と JEV の分離, 第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 山口, 2014 年 5 月 16 日～5 月 17 日

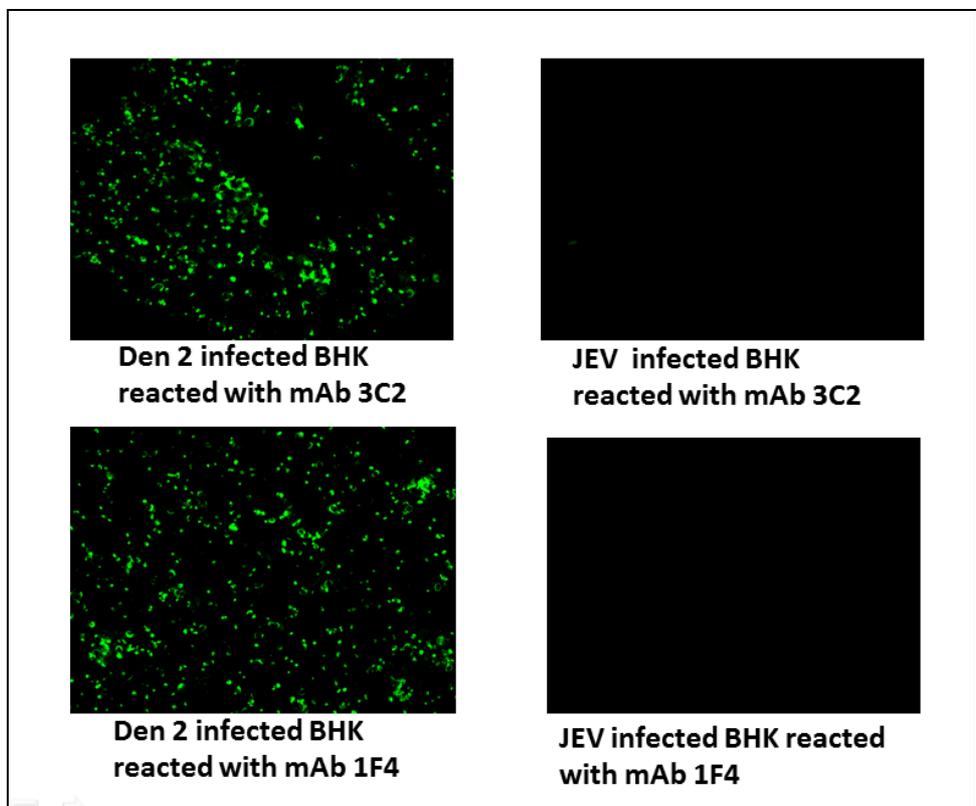
- 5) 森田公一：デング熱の基礎と臨床、4学会緊急セミナー「エボラ出血熱、デング熱への対応」、東京、ベルサール汐留、2014年10月13日
- 6) 森田公一：わが国へ侵入が危惧されるフラビウイルス感染症、第14回ヒトと動物の共通感染症研究会学術集会、東京、国立感染症研究所、2014年11月8日
- 7) 内田玲麻、浦田秀造、高松由基、森田公一、早坂大輔：脂質合成阻害薬によるヒト培養細胞におけるデングウイルス感染抑制、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月10日～11月12日
- 8) 余福勲、Adungo Ferdinand、早坂大輔、森田公一：Development of monoclonal antibodies against SFTS virus nucleocapsid protein and application in sero-diagnosis, 第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月10日～11月12日
- 9) 森田公一：デングウイルス感染の自然免疫系制御機構の解明、第46回九州微生物研究会、福岡、平成25年12月22日
- 10) Kouichi Morita, The function of Japanese encephalitis virus NS1' protein on pathogenicity in avian hosts. 49th US-Japan Medical Science Cooperation Program, Viral Diseases Panel Meeting, Taipei, Taiwan, 2015, January 28, 2015.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

<図1>大腸菌による Dengue 2 型ウイルス NS1 蛋白の発現



<図2>単クローン抗体と Dengue ウイルス(左)、日本脳炎ウイルス(右)との反応性
(間接蛍光染色法)



(図3) イムノクロマト法によるデング 2 型 NS1 抗原の検出

