学 位 論 文 の 要 約

氏　　名	Budi Saksono
学位論文題目	Study on the Development of Highly Sensitive Detection Method for Dengue Virus （デング熱ウイルスの高感度検出法の開発に関する研究）

第１章　序論

(1.1) 背景及び目的

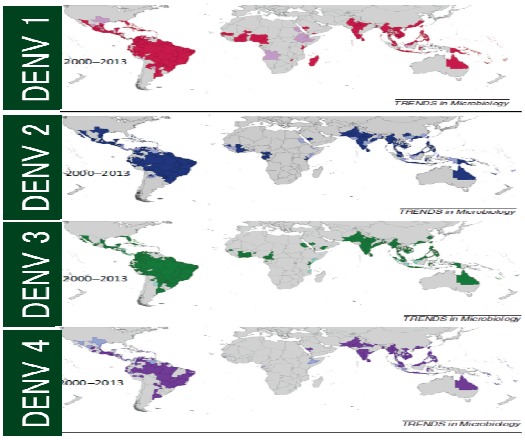


図1.1　世界的なデング感あ染の流行

デング熱病はデングウイルスにより、発症するもので蚊が媒介して人から人へ感染する。現在、5000万人～1億人の人はデング熱ウイルスに感染され、中でも～50万人がさらに重症化により入院しその重症化の中から2.5～5%は死に至ると報告された。現在、海外旅行の増加、地球温暖化により、デング熱ウイルスによる感染症が風洞病となる国の数が増えると推測される。一方、デング熱病を抑えるためのワクチンや特効な薬品はまだ開発する段階であること、またワクチンの投与により、Antibody Dependent Enhancement (ADE)が引き起こしてしまったと言う事件が報告されたこと、重症化する原因はの王もにADEを介して、乳児では一次感染で、子供及び大人では異なる型の二次感染によるもので発症したことから、デング熱ウイルス感染のマナジメントは環境の洗浄活動及びデング熱ウイルスの検出法に依存される。特に、ワクチンや特効な薬品がまだ販売されていない時に、重症化を推測できる検出法は望ましい。

今まで、販売されたデング熱ウイルスを検出法として、デング熱ウイルスの分離法、デング由来のNS1検出法、抗デング粒子のIgM / IgG検出法、そしてデング熱ウイルス由来RNAを検出法の事である。デング熱ウイルス分離法は正確だが、時間は一週間以上に掛かる。デング由来のNS1検出法は初期に短時間で結果わかるが異なるデング型に感度性が変わるのでFalse Negative/positiveの結果は良く得られる。IgMやIgGの場合、一次感染か二次感染を区別できるが発熱から4日後からしか検出できなくてまた他の抗Flavivirus抗体にも反応するので特異性には問題がある。デング熱ウイルス由来のRNAを検出法の場合、他の検出法と比べると初期で短時間でも一番感度の良い検出法だが、前修理にエクスパートが必要であり、また得られた結果をデング熱ウイルスの分離法の結果で比較する必要がある。よって、既に開発した検出法にまだ不便さが見られたため、本研究の目的はデング糖鎖結合の利用、ナノテクノロジーの利用、そして遺伝子診断技術の利用で高感度、簡便、正確な検査診断法の確立とする。

(1.2) 論文の構成

本論文は全5章で構成される。

第１章では本研究の背景及びその目的を示した。

第２章では糖鎖固定化ナノ粒子の作成について述べた。まず、DENV (DENV-1, -2, -4の三つのサブタイプ) のエンベロープ蛋白質との糖鎖相互作用を、48種の糖鎖を固定化したアレイ型シュガーチップを用いて、SPRイメージング法で解析した。高い結合活性を示した糖鎖のうち、ヘパリンと低分子の硫酸化デキストランを用いて、３種の糖鎖固定化ナノ粒子(SGNP)を作成して、DENVの濃縮実験を行い、適切な糖鎖固定化ナノ粒子を検討し、最適のSGNPを決定した。

第３章ではSGNPによるDENVの濃縮に基づいた in vitro 実験について述べた。DENV由来の標的DNA断片を含むプラスミドを作成し、またPCRのプライマーを、論文を参考に設計した。また、血清の存在下でSGNPによる濃縮が可能であり、DENVの検出限界が10 copies/・0と高感度であった。

第４章は，臨床検体を用いた実証実験について述べた。インドネシアにおいて、87例の患者検体を用い、常法である市販のRNA抽出キットを用いた方法と上述のように開発した方法（SGNP法）との比較検討を行った。SGNP法はRNA抽出法に比べて、1/20以下の検体量を用いたにもかかわらず、両者の間には統計的に差がないことが明らかとなり、煩雑な操作が必要なRNA抽出法よりもSGNP法は優れていることが示された。さらに、本方法はDENVのサブタイプを正確に同時に測定可能であり、さらに検出限界も10 copies/μLと高感度であり、さらにNS1やRNA抽出法で検出できないサンプルからもDENVを検出できた。

第５章は，本研究の総括を述べた。本研究によって、DENVの糖鎖結合活性、ナノテクノロジー、遺伝子診断法を融合させた高感度、簡便、正確なDENVの検査法開発を確立した。患者サンプルを用いた実証実験では、検出限界10 copies/μLで高感度な検査診断法であり、さらにDENVのサブタイプを正確に同時に測定可能であった。また、IFN-γのレベルなどの組み合わせ、軽症だけに終わるか重症化に進むかの推測も考えられる。よって、本研究の進むべきことは重症化の推測につかえるという実験、そしてNon－Invasiveな実験、またSGNPの利用でUniversalワクチン開発は今後の展望として重要と考えられる。

第２章　糖鎖固定化ナノ粒子の作成

(2.1)　概説

デング熱ウイルスは細胞に感染する時細胞表面に属するヘパランのような糖鎖と結合することが分かった。それ以来、様々な硫酸化糖鎖と結合することがしばしば報告された[1-5]。

(2.2)方法として、まず、良い金ナノ粒子を作成する目的で、(2.2.1)に高い相互作用を示したリガンドを選ぶ必要がある。そして(2.2.3)に示した技術で、最も高い相互作用を示した糖鎖を用いて3種類糖鎖固定化した金ナノ粒子を作成する(2.2.4)。出来た3種類糖鎖固定化

した金ナノ粒子を使用して濃縮実験によってウイルス粒子との結合効率を調べる(2.2.5)。

その結果として、3種の糖鎖固定化金ナノ粒子　(SGNP-A, SGNP-B, 及びSGNP-C) を作成した。出来た3種の糖鎖固定化金ナノ粒子を使用してデング熱ウイルスを濃縮実験を行った。結果は図　2.1に示したように、SGNP-Cは微量のデング熱ウイルスでもより効率的に濃縮し、検出可能になる。本研究はSGNP-Cを選んで、In vitro及び臨床濃縮実験を行い、SGNP-Cはデング熱ウイルスの検出法として検討した。

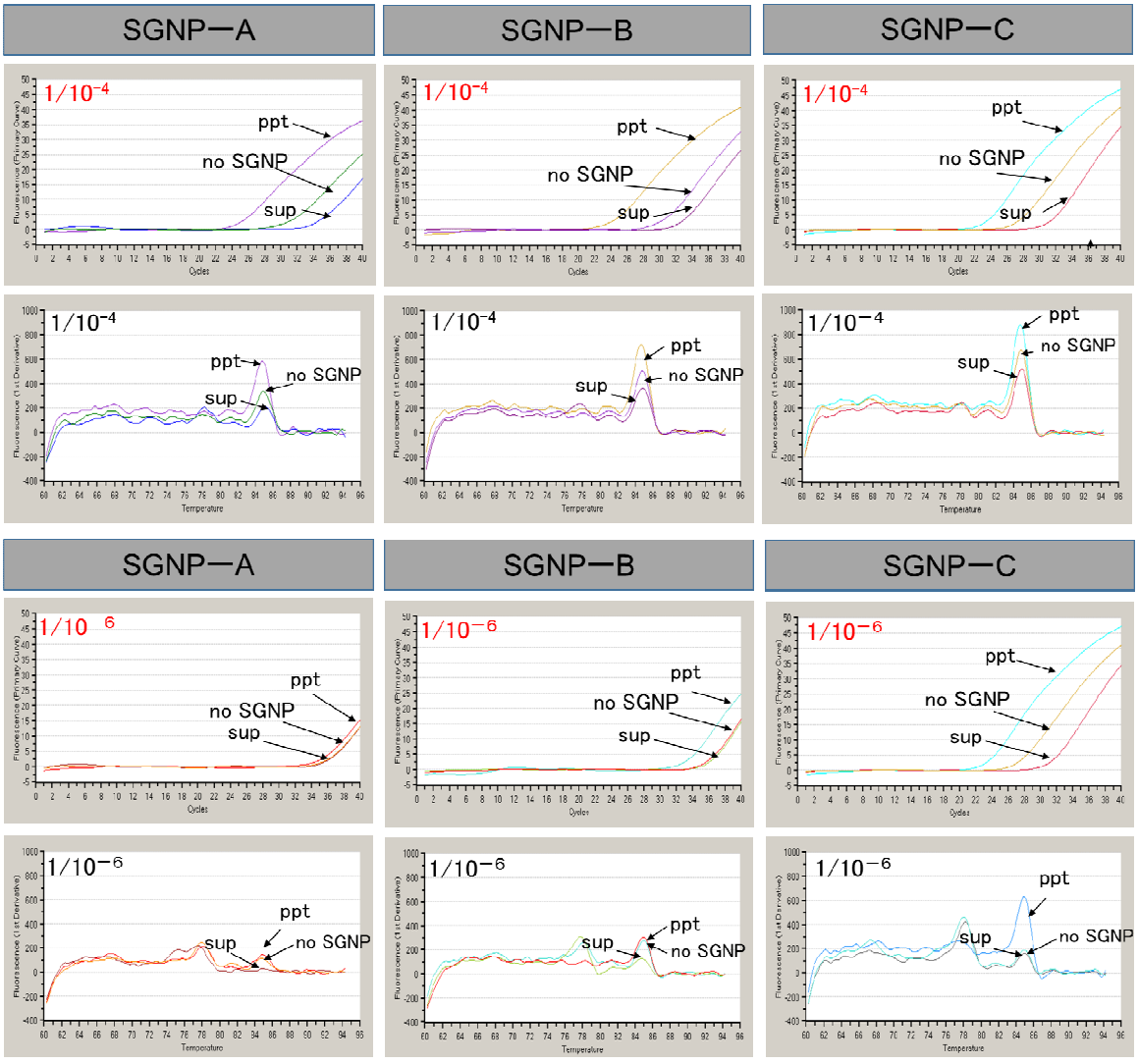


図2.1　濃縮実験のReal－time PCRの増幅曲線（Ct）融解温度（Tm）の分析した結果。上は1万倍希釈したDENV-1を下は100万倍希釈したDENV-1を用いたとき。

第3章　SGNPによるデング熱ウイルスによるIn vitro濃縮実験

(3.1) 背景

今までに様々なデング検出法は開発されてきた。その中で初期、検出できる法はNS1かデング由来RNAを検出方法が取り上げられた　[６]。NS1検出法は操作が簡単であるがDENV型に対して感度性が異なる恐れがあるため　[７]、検出法として相応しい方法でない。一方、RNA検出法はDENV型を識別可能で　[８]、短時間で高感度である性質を持つ。RNAを検出法もさらに改善され、中でもプライマーの検討　[９-１０]、Two stepから One step に変更した方法　[１１-１２]を次々と報告された。すなわち、目標があって、PCR法の改善は注目された。その中で、デング熱ウイルスをトラップし、遠心で濃縮して得たRNAをPCR法で検出方法はこの論文で初めて紹介された。第二章でSGNPの作り方とDENV濃縮実験にSGNP-Cが使用可能であることは述べた。本章はSGNP-Cの性質、特に濃縮率に関して*In vitro*実験で試みた。まず、感度性を測るには(3.2.2)に示したように、スタンダードカーブを作成し、コピー数とCt値との関係を調べた。そして、デング1型、2型、及び4型を用い、デング熱ウイルス濃縮実験を行った。また、血清の存在下で濃縮率を測った(3.3.3)。その結果、表3.1に示したように、デング熱ウイルス1型は少なくても（10コピー/μL）までは検出できた。そして、濃縮ことにより、検出不可な量を検出可能にすることが分かった。デング2型及び4型を用いた時、同様な結果が得られた。

表3.1　デング熱ウイルス１型を用いて濃縮実験を行い得た感度性（コピー数）の結果。

デング型	希釈率	SGNP - C						Non		
		ppt			sup					
		Ct値	Qty (CP)	Tm値	Ct値	Qty (CP)	Tm値	Ct値	Qty (CP)	Tm値
DENV-1	[1:10^{-3}]	27.1	1.27E+02	84.02	31.5	4.18E+00	85.24	30.41	9.74E+00	85.56
	[1:10^{-4}]	31.43	4.41E+00	85	34.22	5.05E-01	75.72	32.98	1.32E+00	85.07
	[1:10^{-6}]	35.08	2.63E-01	85.65	34.8	3.22E-01	74.93	36.36	9.57E-02	77.54

また、血清の存在下でデング2型及び4型を用いて濃縮実験を行った結果、表3.2に示したように、検出不可能なデングウイルス量を検出可能にすることが分かった。

表　3.1　血清存在下で、DENVの濃縮実験

デング型	希釈率	SGNP - C				Non	
		ppt		sup			
		Ct値	Tm値	Ct値	Tm値	Ct値	Tm値
DENV-2	[1:10^{-4}]	31.88	85.42	35.67	85.01	34.04	85.58
	[1:10^{-5}]	34.59	85.08	-	78.96	-	77.26
	[1:10^{-6}]	36.82	85.15	-	62.19	-	78.35
DENV-4	[1:10^{-4}]	31.92	85.39	34.53	84.93	34.04	85.58
	[1:10^{-5}]	34.26	85.11	-	78.33	-	77.26
	[1:10^{-6}]	36.37	84.93	-	78.08	-	78.35
CONTROL	PC					22.2	85.08
	NC					-	78.47

以上の結果から、本研究は濃縮実験により、微量なしかも検出できないデングウイルス量を検出できるようになる。また、1%血清の存在下でも濃縮が達成されたことから、臨床実験に進むことにした。

第４章　臨床研究

(4.1) 背景

デングの検出法の中でも、デング由来のRNAを検出するPCR法の開発は一番進んでいる。一般のPCR法によるデング検出法はRNA抽出法で得たRNAをPCR法に用いて検出する方法である。本方法はデング由来のRNAを得るため、一般の方法と違って血清中のDENVをトラップし濃縮する。SGNP-Cによる*In vivo*濃縮実験結果は三章に示したようにSGNP-Cが血清存在下で微量でも濃縮可能であることが分かったので、実際の患者の血清を使用して*in vivo*濃縮実験を行い、SGNP-Cは臨床実験に使用できる事を明らかにする。そのために、インドネシアに行って、インドネシア大学医学部に付属するデング熱研究グループと共同研究

を結び臨床実験を行った。

インドネシアではDENV2型はDHFやDSSに引き起こす原因と報告された　[13]。また、インドネシアでは全型のDENVが流行っている　[14]。よって、異なる型で再び感染される可能性がより高く、その第二次感染、そして同時に幾つかのDENV型に感染により、もっともシビアな症状、DHF・DSSになる可能性も高まっている　[15, 16]。そのような所、デング熱ウイルスを識別（セロタイピング）できるデング検出法は望ましい。デング検出法の中で、デング識別できる方法はRNAを元にして検出法である　[17, 18, 19]。

デングに対する薬やワクチンが存在しない状況では初期で高感度の検出法に依存性が高くなる。デング初期検出法とはNS1とRNAを元にした検出法の事である。そのような様々な点をインドネシアで調べることが可能となるであろう。

(4.2)は臨床実験の進め方を示した。まず、インドネシアの環境で再びデングウイルス検出法の条件及び感度性を検討した。そして、(4.3)に示したように87検体の血清を利用して本研究法はQiagen法を始め他の検出法と比較して感度性、簡便さなどを試みた。患者の血清は図4.1の状況でした。

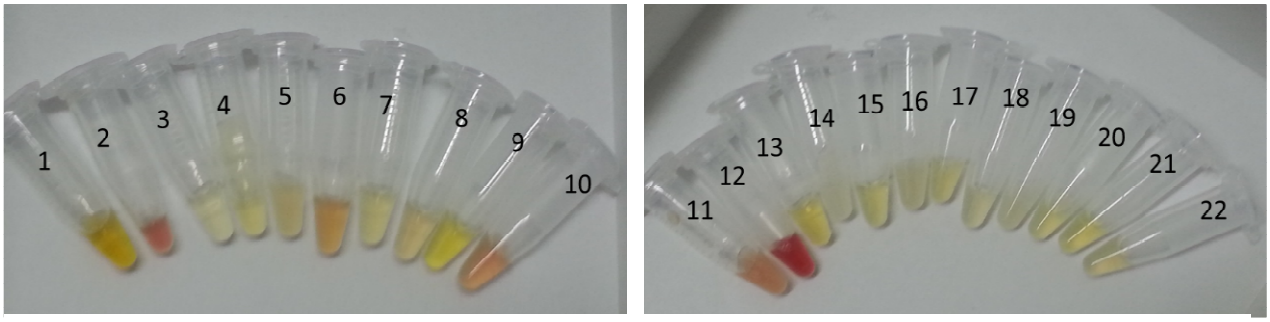


図4.1　様々な領域から送ってきた患者の血清サンプル

(4.2)デング型の識別

インドネシアで分離して得たデング熱ウイルスを精製し、Qiagen法で各デング熱ウイルス型由来するRNAを抽出して、それを鋳型にして得たReal－Time PCRに供した。

図の4.2に示したように、デング熱ウイルス1型～4型までのTm値はそれぞれ、84℃、81.5℃、85℃及び83℃でした。本研究で得たデータをインドネシア側がLanciotti法によるデング熱ウイルス型の識別結果と比較した所、7検体中から、6検体の亜型が一致したため、本研究はデング熱ウイルス型の識別することが可能となった。

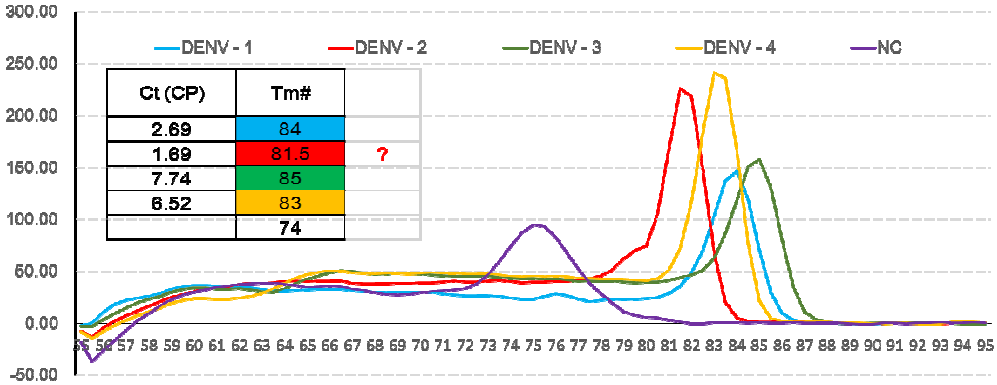


図4.2　Real Time PCR法により得た各デング型のTmカーブとTm値

また、感度性を測定すると、少なくとも100コピー／μLでは最低限であることが分かった。

(4.3)SGNP法はQiagen法との比較

87検体を使用してSGNP法及びQiagen法によるデング熱ウイルス診断した結果SGNP法では25検体は陽性でQiagen法では23検体は陽性であるため、系統的に差はない。しかし、SGNP法では６μLの血清から最終的に20μL（3倍希釈）の溶液に、Qiagen法では140μLの血清から50μLの溶液(3倍濃縮)にしたものをそれらの２μLにPCRに掛けたことから、本研究はSGNP法よりも感動が高いと考えられた。そして、SGNP法及びQiagen法で得た結果は他の

図4.1　SGNP法とQiagen法との比較した結果

	SGNP	Qiagen
Positive	25	23
Negative	62	64
Total	87	87

検出法により得た結果と比較したら、かなり面白い発見が見られた。その結果は次のチャプターに示した。

(4.4)SGNP法は他の検出法との比較

SGNP法及びQiagen法によるデング熱ウイルス検出法は他の検出法と比較して纏めたものは図4.2に示した。NS1法との比較ではSGNP法及びQiagen法の方は陽性が少ないが4検体がSGNP法のみでは陽性であるがNS1法及びQiagen法では陰性であることが検出された。それはSGNP法は初期でNS1法及びQiagen法では検出できない微量なデング熱ウイルスを検出できると考えられた。一方、NS1法では陽性でQiagen法及びSGNP法では陰性となる6検体は恐らく、発熱からかなり時間が立ったので血中のウイルス量子がなくなるのではないかと考えられた。また、NS1法及びQiagen法では陽性でSGNP法のみが陰性である3検体（これらの検体はIgM法及びQiagen法では陽性であるがSGNP法では陰性）は恐らく、IgMの存在下でSGNPがデング熱ウイルス粒子との結合は邪魔されたからと考えられた。それらの結果より、本研究は比較的に初期で、高感度、簡便さ、識別できるデング熱ウイルス検出法であることが分かった。

表4.2　様々なDENV検出法を同時比較

		SGNP		Total	Qiagent		Total
		Positive	Negative		Positive	Negative	
NS1	Positive	12	9	21	15	6	21
	Negative	4	40	44	0	44	44
Total		16	49	65	15	50	65
IgG	Positive	1	12	13	1	12	13
	Negative	15	37	52	14	38	52
Total		16	49	65	15	50	65
IgM	Positive	0	16	16	3	14	17
	Negative	16	33	49	11	37	48
Total		16	49	65	4	51	65

第５章　本研究のまとめと考察、今後の展望

本研究は微量な血清からでも初期で高感度、簡便、識別できるデング熱ウイルスの検出方法を確立した。デング特有なワクチンや特効な薬品の開発が進行中でSGNP法はデング熱ウイルスのマナジメントに大きな役割を果たせると考えられた。また、SGNP法はIgMにデング熱ウイルス粒子との結合が障害されること、Viral loadを測定できることから、IFN-γ及びIgMのレベルなどの情報との組み合わせで重症化になるかならないかを推測するにも重要な情報を提供すると考えらる。今後の展望としてデング熱ウイルスのワクチンや薬品が無い状況では初期でデング熱ウイルスの検出法の他に重症化の推測も必要とするので、SGNP法は重症化の推測の実験構成を立て、確立する必要がある。また同時にデング熱病に感染された患者は年齢的に乳児から老齢者までの幅広い患者の分類が存在するので、Invasiveな検出法の開発も重要であると考える。

参考文献

第２章

1. Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R.E., Fromm, J.R., Esko, J.D., Linhardt, R.J., Marks, R.M. (1997) Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat. Med.* 3, 866-71

2. Hung, S.L., Lee, P.L., Chen, H.W., Chen, L.K., Kao, C.L., King, C.C. (1999) Analysis of the steps involved in dengue virus entry into host cells. *Virology* 257, 156-67

3. Hilgard, P., Stockert, R. (2000) Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology* 32, 1069-77

4. Hidari, K.I.P.J., Takahashi, N., Arihara, M., Nagaoka, M., Morita, K., Suzuki, T. (2008) Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 376, 91-95.

5. Qiu, H., Tang, W., Tong, X., Ding, K., Zuo, J. (2007) Structure elucidation and sulfated derivatives preparation of two α-D-glucans from *Gastrodiaelata*B1. and their anti-dengue virus bioactivities. *Carbohydr. Res.*342, 2230 - 2236.

6. Huhtamo E, Hasu E, Uzcategui NY, Erra E, Nikkari S, Kantele A, Vapalahti O, Piiparinen H. 2010. Early diagnosis of dengue in travelers: Comparison of a novel real time RT-PCR, NS1 antigen detection and serology. Journal of Clinical Virology 47 (1):49 - 53.

7. Colombo TE, Vedovello D, Araki CS, Hugo CM, Izalco NPDS, Reis AFN, Costa FR, Cruz EAA, Casagrande L, Regatieri LJ, Jurandir FJ, Roberta VMB, Schmidt DJ, Nogueira ML. 2013. Dengue 4 false negative results by Panbio® Dengue Early Elisa assay in Brazil. Journal of Clinical Virology 58 (4): 710 - 712.

8. Houng HSH, Chen R CM, Vaughn DW, Niranjan KT. 2001. Development of a fluorogenic RT-PCR system for quantitative identification of dengue virus serotypes 1-4 using conserved and serotype-specific 3` noncoding sequences. Journal of Virological Methods. 95 (1):19 - 32.

9. Catherine L.K. Seah, Vincent T.K. Chow, Y.C. Chan. 1995. Semi nested PCR using NS3 primers for the detection and typing of dengue viruses in clinical serum specimens. Clinical and diagnostic virology 4(2): 113 - 120

10. Pongsiri P, Praianantathavorn K, Theambooniers A, Payungporn S, Poovorawan Y. 2012. Multiplex real time RT-PCR for detecting chikungunya virus and dengue virus. Asian Pasific Journal of Tropical Medicine. 5 (5):342 - 346.

11. Alma O, Capitan Z, Mendoza Y, Cisneros J, Moreno B, Zaldivar Y, Garcia M, Smith RE, Motta J, Pascale JM. 2012. Simple, specific molecular typing of dengue virus isolated using one-step RT PCR and restriction fragment length polymorphism. Journal of Virological Methods. 185(1):129 - 135.

12. Yong YK, Chong HT, Tan CT, Sharmala D. 2006. Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by taqman real time one step RT PCR. Journal of Virological Methods 138 (1):123 - 130.

13. Rantam FA, Purwati AN, Sasmono T, David L, Eryk H, Helen S, Deya K, Anas P, Benediktus Y, Soegijanto S, Nasronudin. 2013. Serotype infectivity and phylogenetic of dengue virus cause of dengue fever (DF), dengue hemorrhagic fever (DHF), and dengue shock syndrome (DSS) in Surabaya, Indonesia. African Journal of Internal Medicine 2 (5); 031 - 036.

14. Messina JP, Brady OJ, Scott TW, Zou C, Pigott DM, Duda, KA, Bhatt S, Katzelnick L, Howes RE, Battle KE, Simmons CP, Hay SI. 2014. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. Trends in Microbiology, 22 (3): 138 - 146

15. Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB. 2013. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. Archives of Virology 158 (7): 1445 - 1459

16. Zareen F, Idrees M, Bajwa, MA, Tahir Z, Ullah O, Zia MQ, Abrar H, Akram M, Khubaib, B, Afzal S, Munir S, Saleem S, Rauff B, Badar S, Naudhani M, Butt S, Aftab M, Ali L, Ali M. 2011. Serotype and genotype analysis of dengue virus by sequencing followed by phylogenetic analysis using samples from three mini outbreaks-2007 - 2009 in Pakistan. BMC Microbiology, 11 : 200

17. Johnson, BW, Russell BJ, Lanciotti RS. 2005. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. Journal of Clinical Microbiology 43 (10):4977 - 4983

18. Chien LJ, Liao TL, Shu PY, Huang JH, Gubler DJ, Chang, GJ. 2006. Development of real time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. Journal of Clinical Microbiology 44 (4): 1295 - 1304

19. Shu PY, Chang SF, Kuo YC, Yueh YY, Chien LJ, Sue CL, Lin TH, Huang JH. 2003. Development of group and serotype specific one step SYBR Green I Based real time reverse transcription PCR assay for dengue virus. Journal of Clinical Microbiology 41 (6): 2408 - 2416