

平成 28 年度医療研究開発推進事業費補助金

(地球規模保健課題解決推進のための研究事業) 成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 医療分野国際科学技術共同研究開発推進事業 戦略的国際科学技術協力推進事業 (インド)

(英語) International Collaborative Research Program
Strategic International Research Cooperative Program (India)

補助事業課題名： (日本語) インドにおける高品質迅速診断キットの普及によるデングウイルス、チクングンヤウイルス、及びインフルエンザウイルスなどのウイルス感染症に対する鑑別診断法の精度向上

(英語) Improvement of the accuracy for differential diagnosis against viral infection - DENV, CHIKV, and FluV- by spreading of high quality RDT in India

補助事業担当者 (日本語) 国立感染症研究所 ウイルス第一部 主任研究官 黒須 剛

所属 役職 氏名： (英語) National Institute of Infectious Diseases, Department of Virology I, Research Scientist, Takeshi Kurosu

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究課題名 (日本語) インドにおける高品質迅速診断キットの普及によるデングウイルス、チクングンヤウイルス、及びインフルエンザウイルスなどのウイルス感染症に対する鑑別診断法の精度向上

(英語) Improvement of the accuracy for differential diagnosis against viral infection - DENV, CHIKV, and FluV- by spreading of high quality RDT in India

事業分担者 (日本語) 大阪大学 微生物病研究所 教授 塩田 達雄

所属 役職 氏名： (英語) Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Professor, Tatsuo Shioda

II. 成果の概要（総括研究報告）

本研究交流は、デングウイルス、チクングニアウイルス、及びインフルエンザウイルス感染症の簡易迅速診断キット開発を通じて、臨床現場へ診断キットを普及させることで、疫学的調査を行い、防疫に有益な診断基盤体制の構築を目指した。以下に詳細を記載する。

1. デングウイルス診断キットの開発とウイルス性状解析： イムノクロマト診断キット開発に必要な反応性の良い抗デングウイルス抗体を新規に取得することを目標とし、マウス細胞から得たデングウイルスをマウスに免疫し、ハイブリドーマを作成し、デングウイルスに反応する抗体を得た。多数のモノクローナル抗体のうち、実験室株 1~4 型、臨床株 1~4 型に広く反応する抗体 4 種程度（比較的強く反応する抗体）を確認し、これらを用いてイムノクロマトの試作を試みた。またノックアウトマウスを用いてウイルス性状解析を試み、急性期から病態末期までで血管安定性や重症化に関連する宿主因子群を同定した。重症化予測の新規診断キットの開発につながる成果である。

2. CHIKV 診断キットの開発及び疫学調査： 2016 年中のインド訪問（Sufdarjung Hospital と International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology）により患者血清を用いて安価型のストリップテストキットの評価を行ったが、様々な問題が生じた。しかし、2017 年 1 月のインド訪問までに大阪大学とアークレイ社が中心にキットを改良した。この新しいキットでは検出感度 93%以上の好成績を収めた。リアルタイム RT-PCR で定量された、様々な濃度のチクングニアウイルスを含む血清に対して、テストラインの濃淡に関して半定量的な結果を得ることができた。またチクングニアウイルスの IgM 抗体の存在、デングウイルスとの共感染の影響を受けることなく、チクングニアウイルス検出が可能な感度を維持していた。デングウイルスのみ感染している患者血清とは反応しないことを確認したが、今後、マラリアなど他の感染症に罹患している患者由来血清に反応しないことを確認し、反応の特異性を確認する。チクングニア感染の遺伝子解析では、ウイルスを培養細胞で分離・増幅し、約 45 検体のウイルス RNA 遺伝子を NGS により解析中である。

3. インフルエンザキットの検定：市販品の試験と同時に、大阪大学産業科学研究所の開発特任准教授（今年度から参加）の下で開発された、病原体の核酸配列に基づくキットの評価試験を行った。このキットは pdmH1N1 インフルエンザを特異的に検出可能であり、実験室株での有効性は確認済みであったが、今回初めて臨床検体を用いて試験を行った。日本では最近の流行がなく試験できなかったが、インドでは 2015 年から 2016 年初めまで、pdmH1N1 が流行する極めて特殊な状況があったため、実施可能となった。

4. 啓蒙活動について： Sufdarjung Hospital においてセミナーを開催し、日本側から 3 名、インド側から 2 名が「早期診断法の重要性」、「チクングニアウイルス診断の状況」、「新規インフルエンザ診断法」、「チクングニアウイルス流行状況」、「インドにおける 2016 年のチクングニアウイルス流行」のトピックについて医療関係スタッフを相手にセミナーを開催し、急性熱性疾患の早期診断について啓蒙活動を行った。

This collaborative research aims to develop easy-to-use rapid diagnosis test kits for dengue (DENV), chikungunya (CHIKV) and influenza viruses (FluV), for epidemiological study and the foundation of epidemics prevention by spreading diagnosis kits to bedside clinicians. Detailed activities are summarized as follows.

1. Development of a dengue virus detection kit and analysis of viral character: We aimed to

obtain good antibodies to react to dengue virus. We immunized mice with viruses produced in mouse cells, and obtained many hybridomas, producing antibodies reacting to DENV. We selected antibodies which react to all serotypes of DENV or react specifically to one serotype of DENV, and tried producing test diagnosis kit. We also performed mouse experiment to characterize virulence, and identify a set of host genes related to stability of blood vessel and severe condition. The results of these observations are very useful for future development of diagnosis kit, which predict severe case of dengue.

2. Development of a diagnosis kit for CHIKV: We visited Safdarjung Hospital and International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, India in 2016 to examine an economical strip kit; however, we met with several critical problems. Therefore, we improved kit and visited India again in January of 2017. New version of kit demonstrated over 93% sensitivity. Intensity of bands corresponded to the viral RNA levels measured by real-time RT-PCR. IgM to CHIKV or co-infection with DENV did not change sensitivity of kit. Although we confirmed that kit does not react with sera from DENV-infected patients without CHIKV infection, we further need to exam if it reacts with sera from patients with non-CHIKV infection, such as malaria. Sequence analysis of CHIKV isolated from patients using NGS is in progress.
3. Evaluation of an influenza kit: In addition to test commercial kit for influenza diagnosis, we examined the test kit, which was newly developed by Dr. Kaihatsu, Osaka University. This kit specifically targets nucleotide of pdmH1N1 FluV. Reactivity of kit to clinical specimens was not examined in Japan because pdmH1N1 had not been prevalent for last few years in Japan. However, the situation in India was different. We could examine it because India had cases from 2015 to 2016.
4. Outreach of early diagnosis: We held a seminar to clinical staffs at Safdarjung Hospital, Delhi in order to enlighten importance of early diagnosis. Three Japanese experts and 2 Indian clinical staffs gave talks entitled, "Overview of benefit of early diagnosis", "Prevalence of CHIKV and its situation of diagnosis kit", "A new method for diagnosis/ DNA/RNA based specific diagnosis", "Chikungunya- An update", and "Chikungunya outbreak in Delhi during 2016". We had

Two Indian researchers visited Japan, gave presentations at 2nd Scientific Symposium of Japan-India Research Exchange Projects within SICP in addition to 3 Japanese members, and had meeting about this project.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 1 件)

1. Dhole P, Nakayama EE, Saito A, Limkittikul K, Phanthanawiboon S, Shioda T, Kurosu T. Sequence diversity of dengue virus type 2 in brain and thymus of infected interferon receptor KO mice: implications for dengue virulence. *Virology Journal*. 2016. 13(1):199

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Transcriptome analysis using a fatal mouse model for severe dengue. 口頭, Kurosu T, Okuzaki D, Limkittikul K, Shimojima M, Fukushi S, Tani H, Saijo M. 第 64 回日本ウイルス

学会学術集会, 2016/10/23, 国内.

2. Sequence Diversity of Dengue Virus Type 2 in Brain and Thymus of infected Interferon Receptor KO mice: Implications for Dengue Virulence. 口頭, Dhole P, Nakayama EE, Limkittikul K, Phanthanawiboon S, Kazuyoshi I, Shioda T, Kurosu T. 第64回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23, 国内.
3. Chikungunya fever outbreak in 2016: a report from Delhi. 口頭 Gaint R. 2nd Scientific Symposium of Japan-India Research Exchange Projects within SICP, 2017/0324, 国内.
4. Prevalence of chikungunya virus and dengue virus in India. 口頭 Sunil S. 2nd Scientific Symposium of Japan-India Research Exchange Projects within SICP, 2017/0324, 国内.
5. Early diagnosis for acute febrile infectious diseases caused by virus infections. 口頭 Kurosu T. 2nd Scientific Symposium of Japan-India Research Exchange Projects within SICP, 2017/0324, 国内.
6. Evaluation of early diagnosis kit for chikungunya virus. 口頭 Okabayashi T. 2nd Scientific Symposium of Japan-India Research Exchange Projects within SICP, 2017/0324, 国内.
7. Sequence specific detection of RNA viral gene by chemically-modified peptide nucleic acid.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 医療分野国際科学技術共同研究開発推進事業
戦略的国際科学技術協力推進事業 (インド)
(英語) International Collaborative Research Program
Strategic International Research Cooperative Program (India)

研究開発課題名：(日本語) インドにおける高品質迅速診断キットの普及によるデングウイルス、
チクングンヤウイルス、及びインフルエンザウイルスなどのウイルス
感染症に対する鑑別診断法の精度向上
(英語) Improvement of the accuracy for differential diagnosis against viral
infection - DENV, CHIKV, and FluV- by spreading of high quality
RDT in India

研究開発担当者 (日本語) 大阪大学 微生物病研究所 教授 塩田 達雄
所属 役職 氏名：(英語) Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University,
Professor, Tatsuo Shioda

実施期間：平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

- ・ 研究開発代表者：国立感染症研究所・ウイルス第一部・黒須 剛 総括研究報告を参照。

本研究では、デングウイルス、チクングニアウイルス感染症の簡易迅速診断キット開発を目的とした。4つあるデングウイルス全ての型に反応する診断キット開発を目指し、ウイルス抗原を免疫したマウスから得られた多数の抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングを行い、全ての型に反応するハイブリドーマを数種類得ることができた。これらハイブリドーマについて国立感染症研究所と標的のウイルスタンパク質の確認、反応性について試験を行い、候補になるクローンを選択した。また CHIKV 診断のストリプトタイプのキットを作成し、検出感度を試験した。また反応性について免疫に用いたウイルスを用いて定量的解析を行い、患者血清中のウイルス量と対応していることを確認した。

We aimed to develop rapid diagnosis test kits for dengue (DENV) and chikungunya viruses

(CHIKV). We firstly intend to obtain good-reactive antibodies to all serotypes of DENVs from mice immunized with DENV antigens and screened them, and examined their reactivity to viral antigens to develop diagnosis kit for identification of all serotypes of DENVs. As a result, we have successfully obtained many hybridomas, reacting to all serotypes of DENVs. We further examined their reactivity to determine target viral proteins with National Institute of Infectious Diseases, Japan. Besides, we developed CHIKV diagnosis strip test kit and examined sensitivity of kit. We also confirmed it corresponds to viral titer in patients sera by quantitative analysis.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 1 件）

1. Dhole P, Nakayama EE, Saito A, Limkittikul K, Phanthanawiboon S, Shioda T, Kurosu T. Sequence diversity of dengue virus type 2 in brain and thymus of infected interferon receptor KO mice: implications for dengue virulence. *Virology Journal*. 2016. 13(1):199

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Sequence Diversity of Dengue Virus Type 2 in Brain and Thymus of infected Interferon Receptor KO mice: Implications for Dengue Virulence. 口頭, Dhole P, Nakayama EE, Limkittikul K, Phanthanawiboon S, Kazuyoshi I, Shioda T, Kurosu T. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願

該当なし。