



超高感度ウイルス検出法が拓く痛くないインフルエンザ診断 ～ウイルス 1 個を検出するデジタルアッセイ～

1. 発表者：

- 田端 和仁 (東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻 講師)
皆川 慶嘉 (東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻 主任研究員)
川口 侑子 (東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻 技術補佐員)
小野 真菜 (東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻 技術補佐員)
森泉 芳樹 (東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻 博士課程：研究当時)
山吉 誠也 (東京大学医科学研究所ウイルス感染分野 特任准教授)
河岡 義裕 (東京大学医科学研究所ウイルス感染分野 教授)
藤岡 容一郎 (北海道大学大学院医学研究院 講師)
大場 雄介 (北海道大学大学院医学研究院 教授)
野地 博行 (東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻 教授)

2. 発表のポイント：

- ◆インフルエンザウイルス 1 個を検出する技術を開発し、既存検査手法であるイムノクロマト法 (注 1) より 1,000 倍から 10,000 倍高感度に検出することに成功しました (図 1)。
- ◆微小な空間にインフルエンザウイルスを 1 個のみ閉じ込めて検出するデジタルインフルエンザ検出法 (注 2) を開発し、インフルエンザウイルスの検出や定量を簡便にしました。
- ◆本手法を検査に応用することでより早期にインフルエンザウイルスの検出が可能になり、インフルエンザの重篤化や流行を抑えることが期待されます。

3. 発表概要：

インフルエンザは、インフルエンザウイルスによって引き起こされる人獣共通の感染症です。毎年世界中で流行し、これまでも多くの死者や経済的損失がでています。また、ウイルスが変異する速度も速く、定期的に世界的な大流行 (パンデミック) を引き起こします。そのため、国際的に対策が検討されています。一方で、インフルエンザは薬による治療が可能です。さらに、インフルエンザに感染しても発熱などの症状が現れる前に薬を飲めば発症しないことも知られています。こうしたことから、インフルエンザをより早期に診断できる高感度な検査法が求められています。東京大学大学院工学系研究科の田端和仁講師、皆川慶嘉主任研究員、野地博行教授らの研究グループは微小空間にインフルエンザウイルス 1 個を閉じ込めて検出する、デジタルインフルエンザ検出法を開発し、既存のインフルエンザ検査法であるイムノクロマト法よりも 1,000 倍から 10,000 倍高感度にインフルエンザウイルスを検出できることを示しました。また、インフルエンザの患者のうがい液からもウイルス検出に成功し、より痛みが少ない検査方法の確立に道を開きました。デジタルインフルエンザ検出法 (図 2) によって、ウイルス量の少ないインフルエンザの発症直後や直前での検査を可能とし、早期の治療によって症状を抑えることで、体から出るウイルスを減らすことで流行を低減するといった効果が期待できます。

本研究は、内閣府 総合科学技術・イノベーション会議が主導する革新的研究開発推進プログラム (ImPACT) の野地博行プログラム・マネージャーの研究開発プログラムの一環として実施されました。

4. 発表内容：

● 研究の背景

インフルエンザは、インフルエンザウイルスが引き起こす流行性疾患です。毎年冬に大規模な流行が観測され、国内では 1000 万人以上が罹患します。また、近年では新型インフルエンザの発生も確認されており、パンデミックの発生も危惧されています。インフルエンザに対する有効な対策として、予防が第一となっていますが、現在では抗ウイルス薬も登場し、治療が可能です。また、抗ウイルス薬はインフルエンザの症状が出る前に服用すれば、発症することなく治癒することが知られています。このため、ウイルス量が少ない感染初期の段階からウイルスを検出する方法が求められます。一方、現在インフルエンザ診断の主流はイムノクロマト法という検査方法です。この検査方法では発熱などのインフルエンザの症状が現れてから 12 時間から 24 時間経過しないと正確な診断結果が得られないことがわかっています。また、検体採取に際しても痛みを伴うため、子供などには非常に負担の重い検査となっています。そのため、低侵襲かつ高感度な検査方法が求められています。

● 研究の内容

本研究グループはインフルエンザウイルスの高感度検出を達成するために、1 分子デジタル計測法の応用に注目しました。この方法は、酵素 1 分子を蛍光基質とともに数 fL (フェムトリットル： 10^{-15} リットル) から数十 fL の容器の中に閉じ込めて反応させることで、その産物の蛍光を計測することで、酵素 1 分子を検出する方法です。この方法では、酵素が閉じ込められている微小容器は蛍光を発し、閉じ込められていない容器は蛍光を発しません。そのため、蛍光を発している微小容器を 1 として、発していないものを 0 というように、信号を二値化 (デジタル化) して計測結果を取り扱うことができるようになります。このような計測法をデジタルアッセイと呼んでいます。一方、インフルエンザウイルスはその表面にノイラミニダーゼというキノコのように突出した形の酵素を持っています。このため、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼによって分解されると蛍光を発する蛍光基質を微小容器に閉じ込めれば、その容器は蛍光を発することになります。その蛍光を観測することで、インフルエンザウイルス 1 個を検出することが可能になると考え、本研究グループは 1cm^2 に 17fL の体積を持つ微小容器が 60 万個配置された微小容器のアレイを微細加工技術によって作成しました。この微小容器アレイにインフルエンザウイルスと蛍光基質を混ぜた溶液を導入して封入したところ、インフルエンザウイルス 1 個が確率的に微小容器内に閉じ込められて蛍光を発している様子が観察できました。このことから、デジタルインフルエンザアッセイが可能であることがわかりました。さらに、この蛍光を発している微小容器の数を数えることで、インフルエンザウイルスの個数や濃度が計算できます。そこで、この計測法におけるインフルエンザウイルスの検出限界とインフルエンザの診断に使われるイムノクロマト法の検出限界を比較したところ、デジタルインフルエンザアッセイの方が 10,000 倍高感度であることがわかりました。また、高感度化が達成されたため、実際の検査で使用される鼻腔拭い液より侵襲度の低いサンプルからもウイルスの検出が可能であると考えて、インフルエンザ患者のうがい液を用いて検出を試みました。この結果、イムノクロマト法では検出できないサンプルからもウイルスの検出に成功し、デジタルインフルエンザアッセイは患者検体からの検出にも有効であることを示しました。そのほ

かにも、インフルエンザウイルス 1 個を検出するという特長を生かして、ウイルス集団の不均一性に関して知見を得ることに成功しています。これは、ノイラミニダーゼ阻害剤であるオセルタミビル（タミフル）をタミフル耐性のないウイルスに加えてデジタルインフルエンザアッセイを行いました。このインフルエンザウイルスにはタミフルに対する耐性がないため、ノイラミニダーゼが阻害されるため、蛍光を発する微小容器がなくなります。ところが、本実験の結果は数万から数十万個のウイルスに 1 個は耐性を持つウイルスが存在することがわかりました。このように、ウイルス 1 個を見ることでウイルスの集団の分布を知ることができることも示しました。

● 今後の展望

デジタルインフルエンザウイルス検出法は、新しい検出手法を活用した高感度なインフルエンザウイルス検出法です。インフルエンザ診断に本方法を応用すれば、より早期に診断できるようになることで、初期症状のうちから治療できるようになると考えられます。これは、発熱などのつらさからの解放や、周囲へのウイルス飛散が減ることで流行を抑えるなどのさまざまなメリットがあると考えられます。また、高感度化によって、唾液などより簡単に採取できる検体で検査が可能になるため、個人での検査や痛みのない検査も実現できるようになります。本研究成果により、早期にインフルエンザウイルスの検出が可能になり、インフルエンザの重篤化や流行を抑えることが期待されます。

● 本研究の助成事業

本成果は、以下のプログラム・研究開発課題によって得られました。



内閣府 革新的研究開発推進プログラム (ImPACT)

<http://www.jst.go.jp/impact/>

プログラム・マネージャー：野地 博行

研究開発プログラム：豊かで安全な社会と新しいバイオものづくりを実現する人工細胞リアクタ研究開発課題：人工細胞デバイスおよび計測システム開発ならびにゲノム起動法の開発

研究開発責任者：田端 和仁（東京大学 講師）

田端 和仁 講師 研究期間：平成 27 年 3 月～平成 31 年 3 月

本研究開発課題では、微小チャンバーが高集積に並んだ人工細胞リアクタと、当該リアクタを用いた小型で簡単に操作可能な計測システムとを一体的に開発し、実用化を目指しています。

<野地博行プログラム・マネージャーのコメント>



ImPACT 野地プログラムでは、微小チャンバーが高集積に並んだ人工細胞リアクタを用い、酵素、核酸、ウイルスなどの 1 分子計測を対象としたデジタル計測技術を開発しています。今回開発に成功したデジタルインフルエンザウイルス検出法は、ウイルス濃度の低い検体からの検出が可能であり、低侵襲での検体採取を選択できることから、現在のインフルエンザ治療に転機をもたらすとともに、パンデミック対策に寄与するものと期待できます。また、本成果は医療診断装置の高感度化、ハイス

ループット化、および小型化へと貢献するものであり、この分野へのデジタル革命を起こす基盤技術であると考えています。

5. 発表雑誌：

雑誌名：*Scientific reports* (オンライン版：2019年1月31日)

論文タイトル：Antibody-free digital influenza virus counting based on neuraminidase activity

著者：*Kazuhito V. Tabata, Yoshihiro Minagawa, Yuko Kawaguchi, Mana Ono, Yoshiki Moriizumi, Seiya Yamayoshi, Yoichiro Fujioka, Yusuke Ohba, Yoshihiro Kawaoka, and *Hiroyuki Noji

DOI 番号：10.1038/s41598-018-37994-6

アブストラクト URL：www.nature.com/articles/s41598-018-37994-6

6. 問い合わせ先：

<研究に関すること>

東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻

講師 田端 和仁 (たばた かずひと)

〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

<ImPACTの事業に関すること>

内閣府 革新的研究開発推進プログラム担当室

〒100-8914 東京都千代田区永田町1-6-1

<ImPACTプログラム内容およびPMに関すること>

科学技術振興機構 革新的研究開発推進室

〒102-0076 東京都千代田区五番町 7 K's 五番町

<報道対応>

東京大学大学院工学系研究科 広報室

〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1

科学技術振興機構 広報課

〒102-0081 東京都千代田区四番町5番地3

7. 用語解説：

注1：イムノクロマト法

イムノクロマト法とは、抗原抗体反応を利用した迅速検査手法の1つです。インフルエンザや、ノロウイルス、アデノウイルス、妊娠検査などさまざまな検査法として利用されています。本方法の原理は、検出用のマーカーが結合した抗体と検査したいサンプルを混ぜ、サンプル中に含まれる抗原と検出用の抗体が結合します。その溶液をセルロース膜に滴下し、毛細管現象で溶液を展開します。セルロース膜の一部に検出部が設けられており、その部分にも抗原に対する抗体が固定化されています。検出部まで溶液が到達すると検出用抗体と結合した抗体が検出部分にトラップされ濃縮されます。その結果、検出用のマーカーがその部分に集まり目視で抗原が存在するかどうかを判定できます。

注2：デジタルインフルエンザ検出法

デジタルインフルエンザ検出法とは、微細加工技術で作成した微小液滴アレイにノイラミニダーゼが分解する蛍光基質とともに、インフルエンザウイルス1個を確率的に閉じ込めています。ウイルスがいる微小液滴は蛍光を発して、ウイルスがいない微小液滴は蛍光を発しません。蛍光を発している微小液滴を1とカウントし、発していない液滴を0とすると、デジタルデータのようにシグナルを取り扱うことができることから、デジタルアッセイと呼ばれています。添付資料の図2は、デジタルインフルエンザ検出法のイメージ図です。

9. 添付資料：

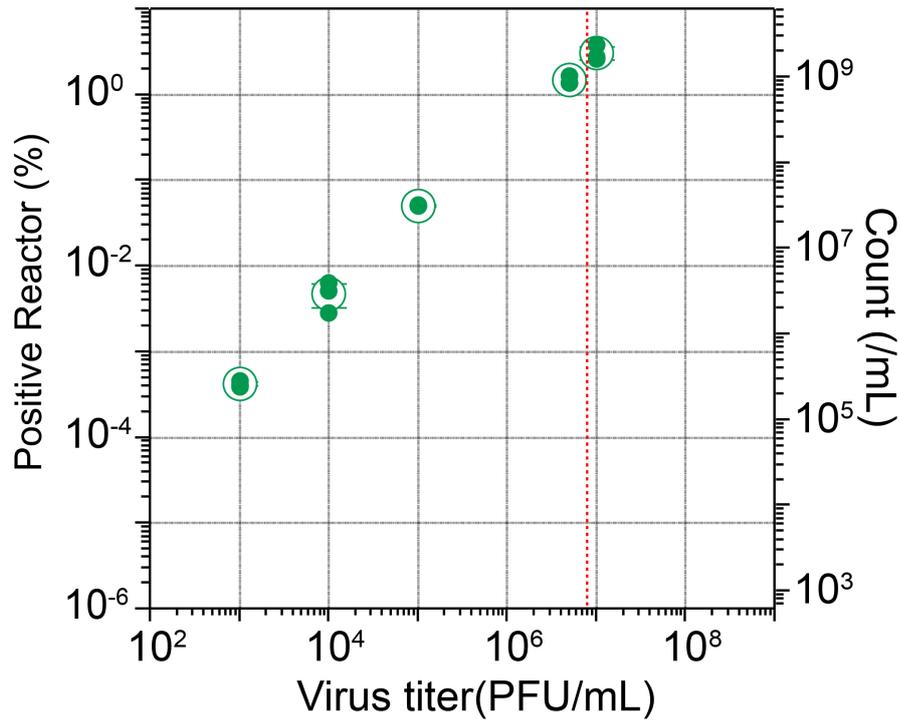


図1 デジタルインフルエンザ検出法によるインフルエンザウイルスの検出結果
デジタルインフルエンザ検出法では 10^3 PFU/ml の濃度までインフルエンザウイルスを検出できている。一方、市販の免疫クロマトキットを用いた場合はおよそ 10^7 PFU/ml 程度までしか検出できない（赤点線）。

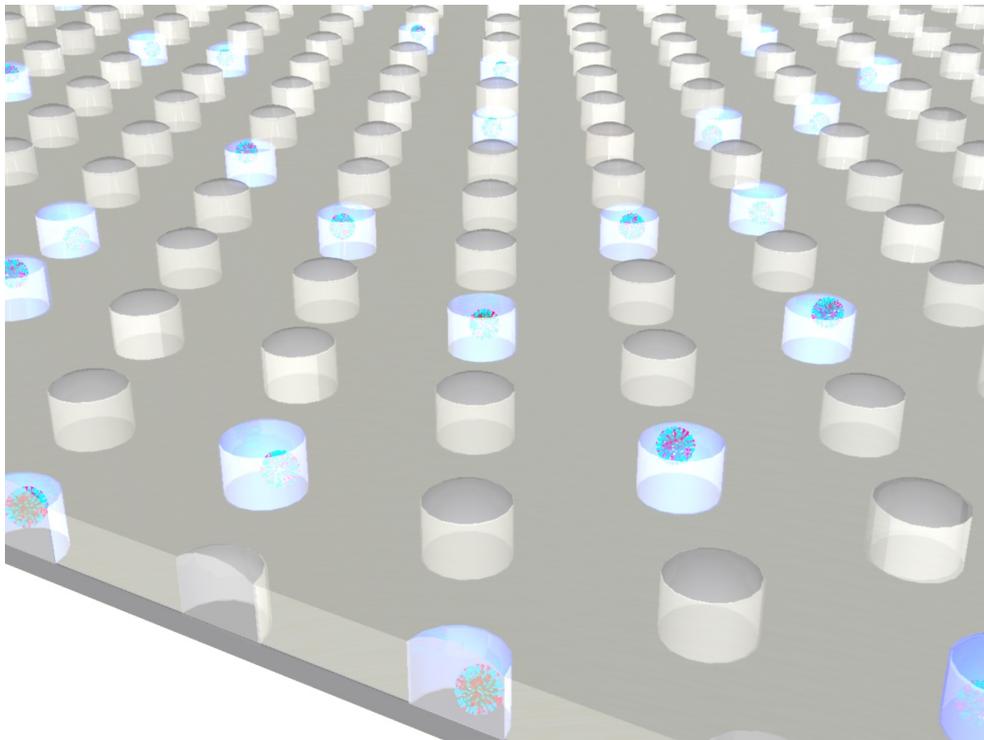


図2 デジタルインフルエンザ検出法