

学 位 論 文 要 旨

氏 名 長 島 真 美



論 文 題 目

「感染症起因ウイルスの検出・解析を目的とした遺伝子検査法の開発」

指 導 教 授 承 認 印

石 井 直 仁



感染症起因ウイルスの検出・解析を目的とした

遺伝子検査法の開発

氏名： 長島 真美

ウイルス感染症の早期診断は、患者を早期に適切な治療へと繋ぐために重要であり、感染症の蔓延を防ぐ上でも重要な役割を持つ。また、ウイルスは多様であり、同種類であっても薬剤耐性変異ウイルスやサブタイプが存在し、これらのウイルスを検出と同時に分類することは大きな意味がある。そこで、リアルタイム PCR 法を用いた検出法等を開発し、感染症起因ウイルスの迅速・高感度な検出・解析を目的とし研究を実施した。

まず、口内炎、性器ヘルペスや脳炎などを起こす単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus : HSV) の型別かつウイルス定量が可能な迅速検査法の構築を目的として、real-time PCR 法の開発を行った。開発法は、他のヘルペス群ウイルス (VZV、EBV、HHV-6 等) との交差反応はなく、HSV-1 及び HSV-2 を特異的に検出し、両ウイルスともに 15copies/tube 以上の遺伝子量があれば検出・定量が可能であることが確認された。さらに、HSV-1 と HSV-2 とで異なる色素を標識した蛍光プローブを用いることで、検出感度を落とすことなく同時に HSV-1 及び HSV-2 遺伝子を検出できることが確認された。実際に、性感染症謬減退定点医療機関から搬入された検体で検討したところ、HSV-2 感染が多いとされてきた性器ヘルペスにおいて、HSV-1 が検出される割合が高くなっていることを明らかにした。

次に、2009 年に新型インフルエンザとして席卷したのち、季節性インフルエンザとなっている AH1N1pdm09 について、オセルタミビル (タミフル) 耐性ウイルスの有無を調査する目的で検討を行った。オセルタミビル耐性ウイルスは、ノイラミニダーゼタンパク質の 275 位のアミノ酸がヒスチジンからチロシンに置換 (H275Y) されたアミノ酸変異を持つ。H275H/Y を検出する real-time PCR 法は一度に多数検体の検出が可能であり、シーケンス法による解析よりも短時間で解析できることから、ウイルス分離株のみならず臨床検体のスクリーニング検査としての有効性が示された。加えて、AH3N2 亜型、B 型の薬剤耐性検出系を開発し、さらにバロキサビルマルボキシル耐性変異の検出系を構築し、東京都内における薬剤耐性インフルエンザウイルスのモニタリングに使用し、年に数株の耐性ウイルスを検出している。

次に、新型コロナウイルス (COVID-19) の原因ウイルスである SARS-CoV-2 の迅速検査法の構築を目的として、real-time PCR 法の開発を行った。検出対象の遺伝子領域を orflab 領域と N 領域の 2 ヶ所設定することにより、公定法よりも特異性が高い検出系を構築した。また、SARS-CoV-2 遺伝子が検出された COVID-19 患者由来

の咽頭ぬぐい液を VeroE6 細胞に接種し、SARS-CoV-2 を分離した (TKYE6182_2020 株)。TKYE6182_2020 株は、日本人から初めて分離された SARS-CoV-2 であり、次世代シーケンサーを用いた解析を行い、29、903 塩基の配列を決定した (GenBank Accession No. LC529905)。また、SARS-CoV-2 は Wuhan-Hu-1 株の 8、782 番目および 28、114 番目の塩基の違いによって 2 つのサブタイプ (L または S) に分類される。Wuhan-Hu-1 株は 8、782 番目が C、28、114 番目が T の L タイプであり、TKYE6182_2020 も 同じタイプであることが明らかとなった。その後も、S タイプや感染性の強いタイプとされる D614G 変異保有タイプが分離されている。

開発した real-time PCR 法を利用して、COVID-19 の重症度が異なる患者の尿中の SARS-CoV-2 遺伝子の検出及び排出期間を調査した。それまで、尿から SARS-CoV-2 は検出されないとされていたが、高感度なリアルタイム PCR により COVID-19 と診断された 20 人中 2 人の尿から SARS-CoV-2 遺伝子が検出された。1 例は重度の COVID-19 患者で、5 日間尿中へのウイルス排出が確認されたことから、尿を含め、中等度から重度の COVID-19 の患者の検体を扱う際には、感染予防と管理措置も講じる必要があることを明らかにした。

本研究では、主にリアルタイム PCR 法等を用い、HSV-1/2 検査法、薬剤耐性インフルエンザウイルス検査法、COVID-19 検査法等を開発した。これらの方法により、性器ヘルペスにおける HSV-1 の関与、オセルタミビル耐性ウイルスの存在を明らかにし、さらに高感度な SARS-CoV-2 検査法の構築により、重症患者の尿からの SARS-CoV-2 が検出されることを明らかにした。また、本研究で開発した方法は、東京都における行政検査に利用されている。