

学 術

糖鎖ナノテクノロジーを用いた高感度ウイルス検査法の臨床応用(前方視的観察研究)

村上 直樹 医療法人あゆみ会・村上こどもクリニック 理事長・院長
西 順一郎(共同研究者)鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・微生物学分野・教授
隅田 泰生(共同研究者)鹿児島大学大学院理工学研究科・教授

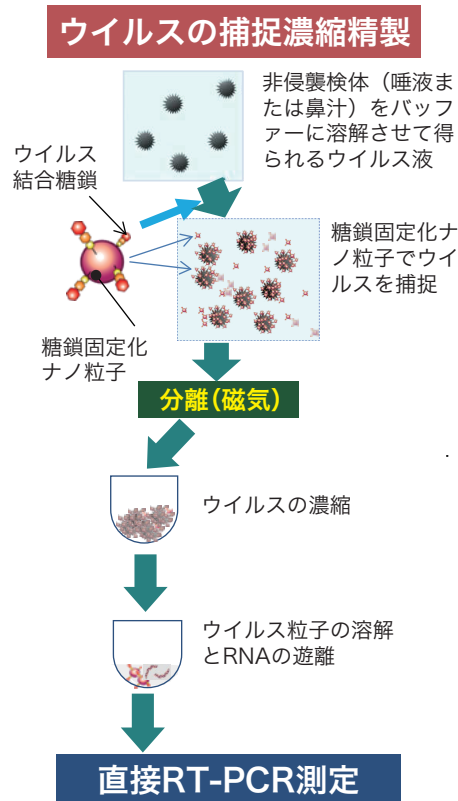
【研究目的】

ウイルス感染症の早期診断には、イムノクロマト法による迅速診断キットが用いられているが、感染初期にはその感度は十分でない。また、迅速検査キットが開発されていないウイルスも多い。本研究は、鹿児島大学大学院理工学研究科化学生命・化学工学専攻生体分子コンジュゲート分野の隅田泰生教授らが開発した糖鎖ナノテクノロジーを用いた高感度ウイルス検査法(図1参照)のインフルエンザ感染症診療における有用性を評価する。

【研究方法】

本院を受診したインフルエンザ症状を有する患者236名(2017~18シーズン、2017年12月1日から2018年1月29日まで)の、唾液または鼻汁を、前者はス

ポイト、後者は鼻汁採取用のブラシ(BD社製)で採取し、院内において採取した検体をPBS(1%抗生剤入り)と混合した。この混合液を10000RPMで5秒間遠心し、その上清を共同研究者の隅田が開発したウイルス捕捉濃縮精製法に供試した。即



- ①ウイルスが細胞に感染する際に最初に結合する糖鎖を表面に固定化した磁性金ナノ粒子(SMGNP)を調製する。
- ②ウイルス液とSMGNPを混合すると、SMGNPは糖鎖を介してウイルス表面に多数結合し、ウイルスを捕捉する。
- ③SMGNPに捕捉されたウイルスは外部磁気によって容易に分離されるので、ウイルスの濃縮と精製を簡便迅速に行える。そして、ウイルス粒子をSDSによって分解し、ウイルス中の遺伝子を測定する。
- ④ウイルスの濃縮と精製が同時に行われているので、それ以上の精製をする必要がなく、遺伝子の検査診断の感度と簡便性が飛躍的に高まる。
- ⑤高速RT-PCR装置を用いれば、迅速診断キットと同等の時間内に、ウイルス濃度の低い唾液などの非侵襲性検体を用いても院内で検査することが可能となる。

図1 高感度ウイルス検査法の概要

ち、図1に示すように、糖鎖結合性磁性ナノ粒子(SMGNP)と混合、さらに磁性

マイクロ粒子を混合したのち、磁性分離して上清を除去、磁性分離物をPBSで洗浄後、磁性分離物に0.1%SDSを少量加えてウイルス粒子を破壊したのち、そのSDS溶液中のRNAを、さらに精製する事なく院内に設置したRT-PCRに供試し、インフルエンザウイルス遺伝子を測定した。なお、RT-PCR機器は、隅田が他の共同研究で開発した高速RT-PCR機を使用し、プローブ法(TaqMan法)で行った。この方法により、非侵襲的な検体採取から、最短で15分以内にインフルエンザの判定を行うことが可能であった。また、院内で得られたウイルス濃縮液(SDS溶液)を、鹿児島大学理工学研究科において通常のRT-PCR測定装置を用いてA型、A亜型、B型の遺伝子をインターカレーター法(SYB-G法)で分析する検証実験を行い、院内で得られた結果と比較した。

【結果】

236名のインフルエンザ様症状を呈する患者のうち、院内の高速RT-PCRによって35名からA型(未検出201名)、104名からB型(未検出132名)の遺伝子が検出された。検証実験ではA型39名(うちH3亜型15名、H1N1pdm亜型24名)、B型107名、未検査8名であった。なお、院内において鼻腔粘膜スワブを用いて行った迅速診断キットではA型陽性14名、B型陽性18名、陰性23名(未検査181名)であり、迅速診断キットが陽性を呈した検体は、全て本研究における院内での迅速遺伝子検査で陽性を示した。迅速診断キット陰性者23例のうち、本法では6名がB陽性であり、26.1%(6/23)からインフルエンザウイルス遺伝子が検出された。

【考察】

本研究で用いた検査法によって、迅速診断キットとは異なり、発症初期に、患者に苦痛を与えない非侵襲的な検体である唾液や鼻汁を用いて、迅速診断キットより高い陽性率でインフルエンザを診断することが出来た。また、TaqMan法とSYB-G法の違いはあるが(通常は、後者がやや感度が高いとされている)、ほぼ同等の陽性率で検査を行うことが出来た。

【結語】

以上の様に、当院においてインフルエンザウイルス感染症の早期診断を確実に行うことができおり、本研究は感染症診療および院内感染対策において大きな意義があるとおもわれる。即ち、「患者に痛みを与えない」検査で、「より早期の診断」が可能になり、的確な薬剤を使用し抗菌薬を投与する機会が減ることから、耐性菌の発生を防止できる。さらに早期であれば、投与する抗インフルエンザ薬の量も少なくすることも将来可能であると思われるので、薬剤にかかるコストは大きく削減できるであろう。患者にとっては、病状が悪化する前に診断と的確な治療がなされるので、早期治療が期待され、メリットは大きいと確信する。

なお、本法は鹿児島大学病院から「糖鎖ナノテクノロジーを用いた高感度ウイルス検査法による感染症診療および院内感染対策支援」という名称で先進医療の届出がなされ、昨年11月の先進医療会議で「適」と判定され、本年1月1日付けで厚生労働大臣の告示がなされた。本院も、鹿児島大学病院に協力しており、九州厚生局から本年1月15日付けでこの先進医療の実施が認められている。