

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

乳幼児下痢症の原因ウイルス検出法に関する研究

所 属 国立公衆衛生院 衛生微生物学部
研究者 西尾 治

分担研究者

- (1) 愛媛県衛生環境研究所微生物検査室 大瀬戸 光明
(2) 国際試薬株式会社 研究開発部 天辻 康夫、一口 毅

要旨

乳幼児下痢症のウイルス診断キットとして A 群ロタウイルスおよびアデノウイルスの検出のイムノクロマト法を開発したところ、本診断法は短時間で診断が行なえ、且つ簡便であり、特別な器具等も不要であり、A 群ロタウイルスおよびアデノウイルスの検査が 1 本のイムノクロマトで行なえ、交差反応も見られなかった。また他社の既存のキットと比較したところ非常に高い一致率で、臨床サイドでの迅速診断に用いることができると判断された。今後他のキットとの不一致例の解明と検出感度を高めること、またさらに多くのウイルスを同時に検出できるようにすることが必要と考えている。

1. 研究目的

小児のウイルス性下痢症の主要原因として、ロタウイルス、ノーウォークウイルス、腸管アデノウイルス、アストロウイルスが知られている。これらのウイルスは時に大規模な流行を、さらに病院内感染を起こすことがある。細菌性かウイルス性かにより治療法が異なり、また、ウイルス性の場合は院内感染防止の即時対応を必要とする。従って下痢症患者の病因の迅速な診断は非常に重要である。

原因ウイルスの同定のためには現在ではロタウイルスあるいはアデノウイルス抗原の簡易な測定法やウイルス分離法、PCR 法で行われている。しかしながら、ウイルス分離法では検体の採取から分離・同定までに数週間以上を要し、また、PCR 法と同様に検査を実施できる施設も限定され、熟練した技術を要するため臨床の現場での検査は困難である。一方、簡易測定法では特別な施設・器具を使用しないため臨床現場での検査に期待が寄せられているが、現在、市販されている各キットともに判定の容易さ、操作性、検出ウイルスの種類などで必ずしも満足が得られものではない。

ロタウイルスとアデノウイルスは迅速診断キットが開発されており、両ウイルスを同時に検出するキットも市販されている。しかし、アストロウイルスは、マイクロプレート ELISA 法による検出キットが市販されているが、必ずしも迅速とはいえず、ベッドサイドでの診断には向いていない。SRSV の ELISA 法による検出キットも最近開発されたが、アストロウイルス検出キットと同様簡便性に欠けるため、臨床現場での使用に向いていない。

今回、我々はロタウイルスと腸管アデノウイルスに加えてアストロウイルスの 3 種類のウイルスを同時に検出するキットを開発するため、アデノウイルス、アストロウイルスの単クローン抗体を作製し、その性状を調べ、キットへの開発を実施した。

第一段階として、糞便中の A 群ロタウイルス及びアデノウイルスの同時検出を可能とする測定系の構築を行った。

2. 研究方法

(1) モノクローナル抗体の作製

イムノクロマト法を開発するに当り、それに用いる抗体はアデノウイルス並びにアストロウイルスではモノクローナル抗体を作製することとした。

アデノウイルス 40 型は標準株、アデノウイルス 41 型は日本分離株、アストロウイルスは 3 型標準株を用いた。モノクローナル抗体の作製は各抗原の精製粒子で免疫した Balb/c マウスの脾臓細胞と SP/2-O ミエローマ細胞を、ポリエチレングリコール 4000 で細胞融合させ、HAT 培地で抗体産生細胞を選択して作製

した。

(2) モノクローナル抗体の特異性の検討

得られたクローンはマウス腹腔に接種し免疫腹水を作製し、それらの血清学的性状を調べた。ポリクローナル抗体は、精製ウイルス粒子をウサギに免疫して作製した。

(3) 開発したイムノクロマト法による検出感度の検討

開発したイムノクロマト法による検出感度は市販されているキットと比較検討した。用いた材料はロタ陽性検体 (10%乳剤 in PBS) 22 検体、アデノ陽性検体 (10%乳剤 in PBS) 32 検体、陰性検体 (10%乳剤 in PBS) 3 検体、希釈なし検体 22 検体、社内ボランティア検体 (希釈なし) 9 検体、計 88 検体を測定した。

3. 研究成果

(1) 作製したアデノウイルスモノクローナル抗体の特異性における検討

アデノウイルス 40 型および 41 型を抗原として作製したモノクローナル抗体の 3 クローンについて、アデノウイルス 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, 19, 31, 37, 39, 40, 41 型の 17 血清型を用い、これら抗原の特異性を ELISA 法で検討した (表 1)。

その結果特性から 3 つに分けることができた。すなわち全てのアデノウイルスに反応するアデノウイルス共通特異モノクローナル抗体、アデノウイルス 40 型にのみ反応するアデノウイルス 40 型特異モノクローナル抗体およびアデノウイルス 41 型にのみ反応するアデノウイルス 41 型特異モノクローナル抗体であった (表 1)。これら作製したモノクローナル抗体はいずれも IgG にクラス分けされた。

次に、乳幼児下痢症患者材料のうち電子顕微鏡でアデノウイルス粒子が見出された 24 検体を検討したところ、11 件はアデノウイルス 40 型、10 件がアデノウイルス 41 型、3 件が血清型不明で、中和試験による同定結果と一致した。また、アデノウイルス群モノクローナル抗体は全ての検体と反応した。

表 1. ポリクローナル抗体と 3 種類のモノクローナル抗体を用いた ELISA と IFA におけるアデノウイルス検査結果

Sub-group	Type	ELISA (OD 価)				IFA		
		Ad41	GPS*1	15D*2	12D*2	1F*2	15D	12D
A	Ad12	>2.000	1.329	0.014	0.012	+	-	-
A	Ad31	>2.000	>2.000	0.020	0.016	+	-	-
B1	Ad 3	>2.000	1.140	0.002	0.000	+	-	-
B1	Ad 7	>2.000	1.372	0.005	0.024	+	-	-
B2	Ad11	0.900	1.615	0.015	0.027	+	-	-
B2	Ad34	>2.000	1.429	0.034	0.008	+	-	-
B2	Ad35	>2.000	>2.000	0.038	0.042	+	-	-
C	Ad 1	>2.000	1.810	0.031	0.016	+	-	-
C	Ad 2	>2.000	1.040	0.022	0.028	+	-	-
C	Ad 5	>2.000	1.231	0.012	0.011	+	-	-
C	Ad 6	>2.000	0.990	0.018	0.010	+	-	-
D	Ad 8	1.300	0.790	0.009	0.015	+	-	-
D	Ad19	>2.000	>2.000	0.023	0.014	+	-	-
D	Ad37	>2.000	>2.000	0.024	0.016	+	-	-
E	Ad 4	>2.000	1.026	0.008	0.011	+	-	-
F	Ad40	>2.000	>2.000	1.720	0.022	+	+	-
F	Ad41	>2.000	>2.000	0.031	>2.000	+	-	+

*1: 抗アデノウイルス 41 型モルモット血清

*2: モノクローナル抗体

(2) 作製したアストロウイルスに対するモノクローナル抗体の特異性の検討

3 クローンの抗アストロウイルスモノクローナル抗体について、1 型から 7 型までのアストロウイルス抗原との反応性を ELISA で検討した。モノクローナル抗体-3A3 はすべての血清型と良く反応し、モノクローナル抗体-3A3 がアストロウイルス群に特異的であることが示された。

次に、金コロイド法により、モノクローナル抗体がウイルス粒子のどの部分に結合するか調べるため免

疫電子顕微鏡法を実施した。その結果モノクローナル抗体-4D11、3B1 では、ウイルス粒子の凝集像とともに、金コロイドがウイルス粒子の周辺部に集中している像がみられた。一方、モノクローナル抗体-3A3 では、ウイルス粒子は凝集せず、金コロイドのウイルス粒子との結合像もみられなかった。モノクローナル抗体-3A3 はイムノグロブリンサブクラス G2a で、ウイルス粒子との結合部位は不明であったが、アストロウイルス群特異的抗体と判断された。

モノクローナル抗体-3A3 はウイルス粒子の外縁に結合していないことから、この抗体の結合部位はカプシドの内側であろうと考えられた。

次に、ELISA により糞便材料を用い、モノクローナル抗体-3A3 の反応性を評価した。電子顕微鏡法でアストロウイルス陽性糞便 74 検体中 45 検体 (60.8%) が ELISA で陽性と判定された。電子顕微鏡で陰性であった 123 検体は、2 検体を除いて全て ELISA 陰性であった。この 2 検体は CaCo-2 細胞での培養法でアストロウイルスが分離された。さらに、ロタウイルス、アデノウイルス、SRSV、及び未分類の 25-30nm のウイルス粒子を含む糞便 60 検体においても、良好な特異性を示し、ロタウイルス陽性例と SRSV 陽性例の各 1 検体でアストロウイルス陽性であった 2 件を除いて全て陰性であった。これらのことからモノクローナル抗体-3A3 は、アストロウイルスに特異的な反応を示し、糞便中に共存する可能性が高い種々の下痢症ウイルスとの交差反応は認められなかった。全体的に ELISA は電子顕微鏡法と比較して、検出感度は 66% で、特異性は 100% であった。

(3) ロタウイルスおよびアデノウイルスに対するモノクローナル抗体のイムノクロマト法の適応について
ロタウイルスおよびアデノウイルス検出のためのイムノクロマト法について検討することにした。

ロタウイルス陽性サンプルを測定した場合は固相の抗ロタウイルス抗体塗布部に、アデノウイルス陽性サンプルを測定した場合は固相の抗アデノウイルス交代塗布部に青色ラテックスによるラインが見られ、陰性サンプル (PBS) を測定した場合は、ラインは見られなかった (図 1)。明瞭に判定を行うことができた。

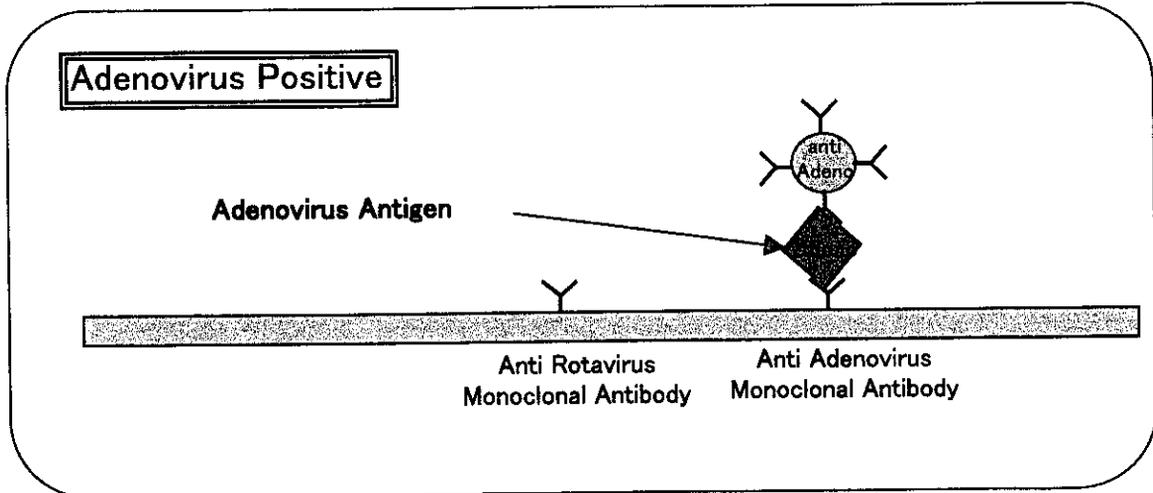
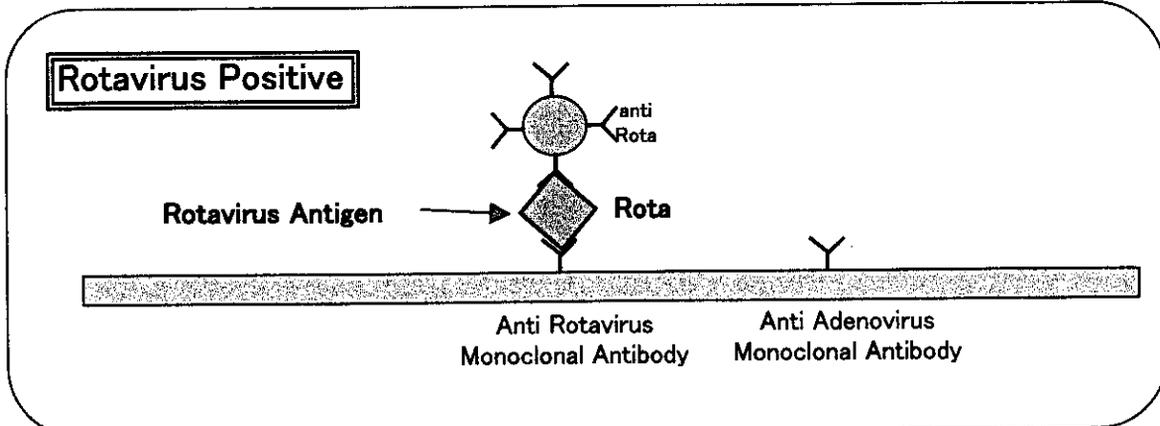
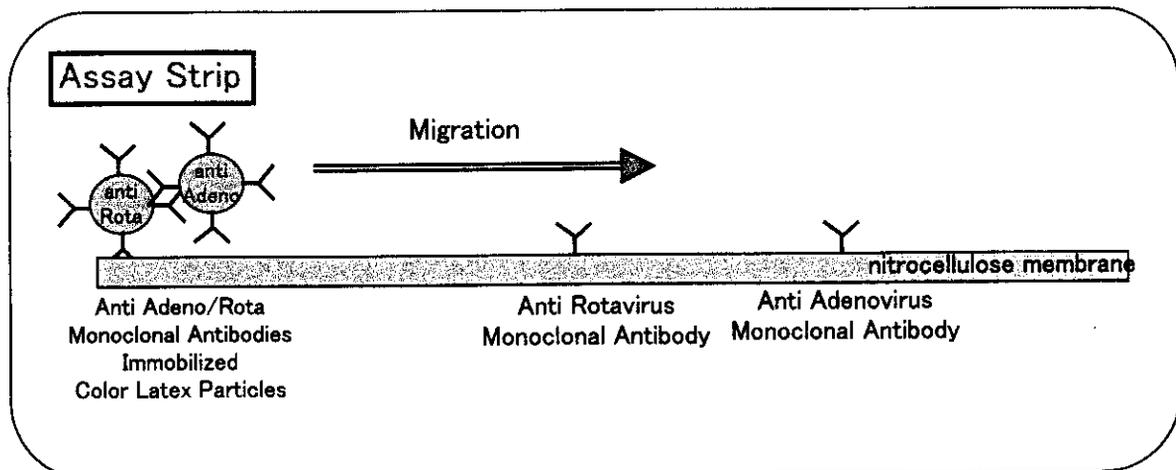


図1 測定原理

(4) イムノクロマトの検出感度の検討

培養ウイルスを用いた A 群ロタウイルスの検出感度は、市販の B 測定試薬よりも 3 管高く、測定試薬 C と同等であったが、A 測定試薬とは 7 管の差が見られた。

培養ウイルスを用いたアデノウイルスの検出感度は市販のキットと比較したところ 1 管高いものと 1 管低いものが見られた。

A 測定試薬の A 群ロタウイルス検出の感度は 87.5% (28/32)、特異性 100% (24/24)、陽性的中率 100% (28/28)、陰性的中率 85.7% (24/28)、一致率 92.9% (52/56) であった(表 2-A)。B 測定試薬を基準とした場合は、感度 100% (16/16)、特異性 81.9% (56/72)、陽性的中率 55.2% (16/29)、陰性的中率 100% (59/59)、一致率 85.2% (75/88) であった(表 2-B)。C 測定試薬は、感度 93.8% (30/32)、特異性 100% (56/56)、陽性的中率 100% (30/30)、陰性的中率 96.6% (56/58)、一致率 97.7% (86/88) であった(表 2-C)。

表 2-A

Comparison of IRC Rota/Adenovirus detection kit and A kit for Rotavirus

		A kit				
		+	-	total		
IRC Rota/Adenovirus detection kit	+	28	0	28	Sensitivity	87.5% (28/32)
	-	4	24	28	Specificity	100.0% (24/24)
					Positive Predictive Value	100.0% (28/28)
					Negative Predictive Value	85.7% (24/28)
total		32	24	56	Efficiency	92.9% (52/56)

表 2-B

Comparison of IRC Rota/Adenovirus detection kit and B kit for Rotavirus

		B kit				
		+	-	total		
IRC Rota/Adenovirus detection kit	+	16	13	29	Sensitivity	100.0% (16/16)
	-	0	59	59	Specificity	81.9% (59/72)
					Positive Predictive Value	55.2% (16/29)
					Negative Predictive Value	100.0% (59/59)
total		16	72	88	Efficiency	85.2% (75/88)

表 2-C

Comparison of IRC Rota/Adenovirus detection kit and C kit for Rotavirus

		C kit				
		+	-	total		
IRC Rota/Adenovirus detection kit	+	30	0	30	Sensitivity	93.8% (30/32)
	-	2	56	58	Specificity	100.0% (56/56)
					Positive Predictive Value	100.0% (30/30)
					Negative Predictive Value	96.6% (56/58)
total		32	56	88	Efficiency	97.7% (86/88)

アデノを基準とした A 測定試薬のアデノウイルス検出の感度は 91.2% (31/34)、特異性 100% (32/32)、陽性的中率 100% (31/31)、陰性的中率 91.4% (32/35)、一致率 95.5% (63/66) であった(表 3-A)。B 測定試薬では感度 92.3% (12/13)、特異性 74.7% (56/75)、陽性的中率 38.7% (12/31)、陰性的中率 98.2% (56/57)、一致率 77.3% (68/88) であった(表 3-B)。C 測定試薬を基準とした場合は、感度 93.8%

(30/32)、特異性 98.2% (56/57)、陽性的中率 96.8% (30/31)、陰性的中率 96.5% (55/57)、一致率 96.6% (85/88) であった(表 3-C)。

表 3-A

Comparison of IRC Rota/Adenovirus detection kit and A kit for Adenovirus

		A kit				
		+	-	total		
IRC	+	31	0	31	Sensitivity	91.2% (31/34)
Rota/Adenovirus					Specificity	100.0% (32/32)
detection kit	-	3	32	35	Positive Predictive Value	100.0% (31/31)
					Negative Predictive Value	91.4% (32/35)
total		34	32	66	Efficiency	95.5% (63/66)

表 3-B

Comparison of IRC Rota/Adenovirus detection kit and B kit for Adenovirus

		B kit				
		+	-	total		
IRC	+	12	19	31	Sensitivity	92.3% (12/13)
Rota/Adenovirus					Specificity	74.7% (56/75)
detection kit	-	1	56	57	Positive Predictive Value	38.7% (12/31)
					Negative Predictive Value	98.2% (56/57)
total		13	75	88	Efficiency	77.3% (68/88)

表 3-C

Comparison of IRC Rota/Adenovirus detection kit and C kit for Adenovirus

		C kit				
		+	-	total		
IRC	+	30	1	31	Sensitivity	93.8% (30/32)
Rota/Adenovirus					Specificity	98.2% (55/56)
detection kit	-	2	55	57	Positive Predictive Value	96.8% (30/31)
					Negative Predictive Value	96.5% (55/57)
total		32	56	88	Efficiency	96.6% (85/88)

ロタ/アデノウイルス測定試薬陰性の不一致検体は、吸光度は低く(OD0.21以下)、A測定試薬も陰性で、ウイルス量が少なくタイピングが不可能な検体であった。

4. 考 察

小児の下痢症の主な原因ウイルスとしては、ロタウイルス、小型球形ウイルス、腸管アデノウイルスとアストロウイルスの4種のウイルスが知られている。ロタウイルス感染症は主に冬期に乳幼児で多発し重症化することがある。A群ロタウイルスは内殻蛋白質(VP6)の抗原性によりA~G群に分類され、ヒトではA、B、C群の感染が報告されているが、日本ではほとんどがA群であるため、本試薬にはVP6のA群特異的抗原に対するモノクローナル抗体を用いた。また発展途上国では毎年A群ロタウイルスによって80万人以上の乳幼児が無くなっており、A群ロタウイルスのワクチン開発をWHOが推奨しているものの、未だ完全なものは開発されていない。

アデノウイルスはA~F亜群、1~43の血清型に分類されており、アデノウイルス感染症は年間を通じて見られ、F亜群の40、41型は小児下痢症の原因の約10%を占め、その他の型も二次的に腸管で増殖するこ

とが報告されている。アデノウイルス感染は特に夏季に流行することが多く、消化器系疾患だけでなく眼科系疾患、呼吸器系疾患など様々な症状を引き起こす。

アストロウイルスは1から8血清型が知られており、乳幼児や老人で冬期から春先にかけて下痢症の起因となっている。時として乳児院、学校での流行も起こすことがある。さらに小型球形ウイルスは晩秋から冬期にかけて乳幼児に下痢症を起こし、食品媒介下痢症の集団発生の主な原因ウイルスでもある。このように、ウイルス性下痢症には多くのウイルスが存在しており、迅速診断することにより治療法の確定、院内感染防止、感染拡大防止の対策が可能となる。このことから、一度に多くのウイルスを短時間、且つ簡便に実施できるキットの開発が強く望まれている。

ロタウイルスと腸管アデノウイルスはすでに、凝集法やイムノクロマト法によるベッドサイドで検査できる迅速診断法が開発されている。小型球形ウイルスは抗原性、遺伝子塩基配列共に変異の幅及び速度が大きく、未だ迅速診断法の実用化には目途がっていない。

そこで今回、まず初めにロタウイルスとアデノウイルスにアストロウイルスを加えて、3種の下痢症起因ウイルスを同時に迅速診断できるキットの開発をめざし、アデノウイルスとアストロウイルスのモノクローナル抗体を作製し、キットへの適用の可能性を検討した。

アデノウイルスおよびアストロウイルスのモノクローナル抗体を作製し、その特異性を検討したところ、アデノウイルスはモノクローナル抗体(12D)F群全てと反応した。A群ロタウイルス、アストロウイルス、SRSVと交差反応は起こらなかった。またA群ロタウイルスの群特異モノクローナル抗体はA群ロタウイルスの1から4型の全てと反応した。以上の成績からアデノウイルスおよびロタウイルスのモノクローナル抗体はイムノクロマトに用いることができると考えられた。そこでこのロタウイルスとアデノウイルスのモノクローナル抗体を用いてイムノクロマトを作製し、A群ロタウイルス及びアデノウイルスの同時検出が可能か否かについて検討したところ、2つのウイルスの検出に用いても交叉反応が認められず、両ウイルスでそれぞれに診断が可能であった。

次いで培養ウイルスを用いた他社製品との検出感度の比較では、一致率は92.9% (52/56) と非常に良好なものであった。

不一致例が存在したことから、診断キットの検出感度をさらに高めたいと考えている。

さらに、既存のキットとの不一致検体4検体のうち1検体はEIAにおいて全て陰性であったため、Cキットでの非特異反応である可能性も考えられる。これら不一致例についてその要因を追求していきたいと考えている。

アデノウイルスについては、他のキットとの比較では95%以上の一致率で良好な結果であった。不一致検体は全てEIAにおいてタイピングができなかった検体で、これらはウイルス量が少ないことや40、41型以外のアデノウイルスである可能性が示唆された。

今回の検出率の検討は-80℃で保存されていた糞便検体を用いた。今後、新鮮検体を用いて性能を引き続き確認する必要があると思われる。

得られた結果より、イムノクロマト法を測定原理とした時に、独立した2項目を1テストで構築しても、それぞれの性能に干渉しないことが明らかとなった。このことから今回作製したアストロウイルスのモノクローナル抗体もイムノクロマト法に用いることができると判断される結果が得られたのでさらにこのウイルスを増やす検討を継続している。

5.まとめ

今回作製したアデノウイルスに対するアデノウイルス群特異モノクローナル抗体を作製し、市販のA群ロタウイルスのVP6特異モノクローナル抗体を用いてイムノクロマト法による両ウイルスを同時に1本で行なえる診断キットを作製したところ、既存のキットと非常に良く一致する結果が得られた。今後他キットとの不一致例の解明と検出感度を高めると共に、さらに検査項目を追加したいと考えている。

6.研究発表

なし

7.知的所有権の取得状況

なし

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社