

乳幼児下痢症の原因ウイルス検出法に関する研究

所 属 国立感染症研究所 感染症情報センター
研究者 西尾 治

分担研究者

- (1) 愛媛県立衛生環境研究所衛生研究課微生物検査室 大瀬戸 光明
(2) 国際試薬株式会社研究開発センター研究開発部 天辻 康夫、一口 毅

要 旨

本研究では4種類の下痢症ウイルスの同時検出キットの開発を進めている。A群ロタウイルスとアデノウイルスを同時に検出するイムノクロマト法を構築した。本年度は両ウイルス検出に非常に良い結果が得られた。アストロウイルスの検出には検討が必要である。

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、ノロウイルス、腸管アデノウイルス（アデノウイルス40,41型）、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、ウイルス性の場合に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が非常に重要である。

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ではなく、ベッドサイドでの診断には向いていない。小型球形ウイルスの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。

原因ウイルスの診断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法等が開発されている。しかし、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るものではない。そこで、一度に多くの原因ウイルスを診断可能なイムノクロマト法の開発を行なうことにした。このキットであれば、特別な器具、機器等は不要であり、発展途上国でも使用することが可能となる。

本研究ではロタウイルスと腸管アデノウイルス、アストロウイルスおよび小型球形ウイルスの4種類のウイルスを30分以内に同時に検出するキットの開発を進めている。

第一段階として、平成13年度はアデノウイルス40型および41型を用いて、モノクローナル抗体を作製し、アデノウイルス共通、アデノウイルス40型特異およびアデノウイルス41型特異抗体を得た。アデノウイルス共通抗体はアデノウイルス亜型AからF群の全てに反応することを明らかにした。その抗体を用いてイムノクロマトを構築したところ、アデノウイルス検出に使用できることが示された。さらにA群ロタウイルスのモノクローナル抗体を用いて、ロタウイルスとアデノウイルスが1本のイムノクロマトで同時検出を可能とする測定系（IRC-Rota/Adeno）を構築した。

本年度はIRC-Rota/Adenoについて、新鮮臨床材料で検討を行い、その評価をすることにした。

さらに、アストロウイルスの同時測定の可能性を判断するため、IRC-Rota/Adenoと同様にアストロウイルス抗原検出系の構築の可能性について検討したので報告する。

2. 研究方法

1) アデノウイルス共通モノクローナル抗体の ELISA 法によるふん便検体の検討

病院の小児科に受診し、急性胃腸炎と診断された患者便で、凍結保存してあったふん便を 26 件用いた。ポリクローナル抗体を用いた ELISA 法は、捕獲抗体にアデノウイルス 41 型ウサギ抗体を、検出抗体にアデノウイルス 41 型モルモット抗体を用いた、発色基質液にはテトラメチルベンジジンを加え、450nm の吸光度を測定した。

モノクローナル抗体を用いたアデノウイルス検出 ELISA 法は、捕獲抗体に抗アデノウイルス 40 型および 41 型ウサギ抗体を混合して用い、検出抗体には抗アデノウイルス群モノクローナル抗体、抗アデノウイルス 40 型特異モノクローナル抗体、抗アデノウイルス 41 型特異モノクローナル抗体を用いた。発色基質液にはテトラメチルベンジジンを加え、450nm の吸光度を測定した。

2) 新鮮臨床材料を用いた IRC-Rota/Adeno の検討

新鮮臨床材料 21 件は IRC-Rota/Adeno で両ウイルスの検出と他社のキットおよび ELISA 法で比較した。別の新鮮臨床材料 80 件は IRC-Rota/Adeno ロタウイルスおよびアデノウイルス検出の他社のキットおよび電子顕微鏡によるウイルス検出と比較検討を行った。キットは添付マニュアルに従って行った。

IRC-Rota/Adeno：抗ウイルスモノクローナル抗体を結合した青色ラテックス粒子と同じ抗ウイルスモノクローナル抗体を固相化したニトロセルロースメンブレンから成っている。ロタウイルス検出用には VP6 の A 群特異抗原に対するモノクローナル抗体を、アデノウイルス検出用には、我々が作成したアデノウイルス群特異モノクローナル抗体を使用した。検査手順はキット添付の綿棒でふん便を微量採取し、検体処理液 0.3ml の入った容器内でよく攪拌・混和後、容器にフィルター付分注用キャップを取り付け、3-4 滴をアッセイカートリッジに滴下、室温で 15 分間静置後判定した。ロタウイルス陽性検体の場合、検体中のウイルスは、抗ロタウイルスモノクローナル抗体結合ラテックスと免疫複合体を形成、移動して、固相化された抗ロタウイルス抗体に補足され、その結果青色のラインが出現する。アデノウイルス陽性検体の場合も同様に、抗アデノウイルス抗体を固相化した部位に青色のラインが出現の有無でウイルス診断を行った。

ロタウイルス抗原検出用 ELISA：捕獲抗体にロタウイルス Wa ウサギ抗体を、検出抗体にはロタウイルス Wa モルモット抗体を、型別には検出抗体に VP7 の 1 から 4 型のモノクローナル抗体を用いた。

3) アストロウイルス検出イムノクロマト法の検討

昨年度、構築したロタウイルス及びアデノウイルス検出系と同様の原理でアストロウイルス検出の可能性を判断するため、昨年度大瀬戸が樹立した 3 種類の抗アストロウイルス抗体(モノクローナル抗体 2 種類、ポリクローナル抗体 1 種類)のうちの 1 種類(モノクローナル抗体：#3B1)を用いて抗体感作メンブレン及び抗体感作着色粒子を調製した。調製した固相メンブレン及び抗体感作着色粒子はハーフストリップ法により反応させ、発色ラインを目視にて確認した。確認のためには大瀬戸博士より供与されたアストロウイルス type3 を用いた。

なお、検体処理液としては前回報告したロタウイルス、アデノウイルスの 2 項目を同時測定可能な測定系と同じものを使用した。

アストロウイルスに対するモノクローナル抗体 (#3A3)、ポリクローナル抗体 (アストロウイルス 3 型免疫ウサギ血清) と培養・増殖させたアストロウイルス (Type4, 8) を用いて測定系の感度・特異性及び抗体の組合わせ試験を実施した。

4) 小型球形ウイルスではサッポロウイルスについて開発することになっているが、サッポロウイルスは培養系が無いために、アミノ酸配列を検索し、高度に保存された領域での免疫原の作製を進めている。これを用いて、イムノクロマト法を構築することになっている。

3. 研究成果

1) アデノウイルス共通モノクローナル抗体の ELISA 法によるふん便検体の検討

アデノウイルス共通のポリクローナル抗体を用いた ELISA 法でアデノウイルス陽性の 16 件は全てモノクローナル抗体を用いた方法においても陽性を示した。また 8 件はポリクローナル抗体およびモノ

クローナル抗体を用いた ELISA 法で全て陰性であった。

アデノウイルス 40 および 41 型のみならず、型別できなかつたものも両方法で同一の結果が得られた。

2) 新鮮検体における各方法の検討

(1) 病院の小児科に受診し、急性胃腸炎と診断された患者便 21 件について、IRC-Rota/Adeno を用い、両ウイルスの検出を行うとともに、市販のキットと比較した。市販キットは、ロタウイルス検出にはイムノカード ST ロタウイルス (TFB 社)、アデノウイルス検出にはアデノクロン E (TFB 社) を用いた。また、ポリクローナル抗体を用いた ELISA 法によるロタウイルスとアデノウイルスの検出およびロタウイルスのモノクローナル抗体を用いた ELISA 法による型別試験との比較を行った。

IRC-Rota/Adeno と市販キットによるロタウイルス陽性は 14 件とアデノウイルス陽性は 1 件、両ウイルス陰性は 5 件で、他社の市販キットでも全く同様な結果であった。

さらに、われわれの開発した ELISA 法と比較すると 1 例でポリクローナル抗体を用いた ELISA 法でロタウイルスが非常に低い価ながら陽性であったが、この検体は IRC-Rota/Adeno、市販キットおよびモノクローナル抗体を用いたロタウイルスの型別試験では陰性であった。

なお、検体 2 例からはノロウイルスが検出されたが、イムノクロマトをはじめとする全ての検査法で交差反応は見られなかった。同様にロタウイルスとアデノウイルスの間でも認められなかった。

(2) 新鮮検体における各方法の検討

乳幼児の急性胃腸炎と診断された患者便について電子顕微鏡によるウイルス検出(表 1)と、IRC-Rota/Adeno、市販のキットによるウイルス診断を比較検討した(表 2)。

2002 年 3 月、4 月の感染性胃腸炎患者からの電子顕微鏡によるウイルス検出結果および IRC-Rota/Adeno とラピッドテストアデノ(第一化学製)によるロタウイルス、アデノウイルスの検出結果ではこの期間に検査した 80 例のうち、ロタウイルスが 32 例(40%)、ノロウイルスが 11 例(14%)、アデノウイルスが 2 例、アストロウイルスが 1 例と多種類のウイルスが検出された。

IRC-Rota/Adeno では、ロタウイルスが 29 例(36%)、アデノウイルスが 2 例検出された。電子顕微鏡でロタウイルス陽性かつ IRC-Rota/Adeno で陰性のものが 3 例あり、この 3 例のうち 2 例は ELISA でロタウイルス陽性であった。1 例はロタウイルスとノロウイルスとの混合感染例であったが、ELISA は陰性であった。3 例とも電子顕微鏡によって観察されたロタウイルス粒子数が少なかった。

IRC-Rota/Adeno ではその他のノロウイルスやアストロウイルスとは全く交差反応はみられなかった。また、56 例については IRC-Rota/Adeno とラピッドテストを同時に行ったが、そのうち 1 例のみ IRC-Rota/Adeno 陽性でラピッドテスト陰性であった。この 1 例は電子顕微鏡で 2+ とマークされており比較的粒子数は多かったと思われ、ELISA では G 血清型 3 型と同定された。

電子顕微鏡と IRC-Rota/Adeno との比較では、電子顕微鏡を基準とした IRC-Rota/Adeno のロタウイルス及びアデノウイルス検出感度は 31/34 で 91%、特異性は 100%(46/46)、一致率は 77/80 で 96.3% を示し、良好な成績が得られた。電子顕微鏡のその他にはノロウイルス 10 例、アストロウイルス 1 例が含まれているが、IRC-Rota/Adeno では交差反応はみられなかった。

表 1 電子顕微鏡法と試作キット IRC-Rota/Adeno との比較

IRC-Rota/Adeno	電子顕微鏡法				計
	HRV	AdV	その他	—	
HRV	29				29
AdV		2			2
—	3		11	35	49
計	32	2	11	35	80

感 度 : 91.2% (31/34)
 特異性 : 100% (46/46)
 一致率 : 96.3% (77/80)

表2 既存キットと IRC-Rota/Adeno との比較

IRC-Rota/Adeno	ラピッドテスト ロタ-アデノ		計
	HRV	—	
HRV	23	1	24
—		32	32
計	23	33	56

感 度 : 100% (23/23)
 特異性 : 97.0% (32/33)
 一致率 : 98.2% (55/56)

3) アストロウイルス検出イムノクロマト法の検討

固相メンブレン及び抗体感作粒子双方に抗アストロウイルスモノクローナル抗体#3B1を使用してハーフストリップ法を行った結果、アストロウイルス3型の培養上清の100倍希釈まで検出可能であった。(表3)

表3 イムノクロマトによるアストロウイルス検出感度

抗体感作 メンブレン	抗体感作 着色粒子	アストロウイルス type3			
		0	x 1000	x 100	x 10
#3B1	#3B1	—	—	1+	4+

判定は目視にて陰性：—、陽性：1+<2+<3+<4+とスコアした。

抗体感作メンブレンに使用した抗体と抗体感作着色粒子に感作した抗体の組合せとして①#3B1+#3B1、②#3B1+アストロウイルス3型免疫ウサギ血清、③アストロウイルス3型アストロウイルス3型免疫ウサギ血清+#3B1、④アストロウイルス免疫ウサギ血清+アストロウイルス3型免疫ウサギ血清の4パターンの組合せでアストロウイルス Type3 の検出が可能であった。①#3B1+#3B1 ではアストロウイルス Type3 の10倍希釈サンプルで4+の非常に強いシグナルが得られたが、100倍希釈サンプルでは1+の強さのシグナルしか得られなかった(表4)。この反応性の強さは③アストロウイルス3型+#3B1の組合せとほぼ同等であった。一方、②#3B1+アストロウイルス3型免疫ウサギ血清の組合せでは10倍希釈サンプルで4+、10倍希釈サンプルでも2+であり、今回、反応性が確認された4パターンの組合せ中で一番強いシグナルが得られた。逆に、④アストロウイルス3型+アストロウイルス3型のポリクローナル抗体同士の組合せでは今回の4パターン中一番弱い反応性であった。特異性については type4 及び type8 の培養ウイルスの10倍希釈液の検出可能な組合せは無かった。

また、今回の組合せ試験ではPBSを陰性コントロールとして使用したときに非特異的な反応と考えられるシグナルは観察されなかった。

表4 アストロウイルス検出試薬の基礎的検討

抗体感作 メンブレン 使用抗体	抗体感作 粒子 使用抗体	N. C. (PBS)	Astrovirus Type3			Astrovirus Type4			Astrovirus Type8		
			x10	x100	x1000	x10	x100	x1000	x10	x100	x1000
#3A3	#3A3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	#3B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AST-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
#3B1	#3A3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	#3B1	-	4+	1+	-	-	-	-	-	-	-
	AST-3	-	4+	2+	-	-	-	-	-	-	-
AST-3	#3A3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	#3B1	-	4+	1+	-	-	-	-	-	-	-
	AST-3	-	2+	-	-	-	-	-	-	-	-

結果は、陰性は-、陽性は1+<2+<3+<4+と目視によるスコアで示した

#3A3：アストロウイルス3型特異モノクローナル抗体

#3B1：アストロウイルス3型特異モノクローナル抗体

AST-3：アストロウイルス3型免疫ウサギ血清

4. 考 察

昨年度はアデノウイルスの共通のモノクローナル抗体を作製し、この抗体はELISA法でふん便中のアデノウイルスを検出することが可能であった。

IRC-Rota/Adeno法について新鮮臨床材料を用い、他社の市販キットおよびわれわれのELISA法で検討したところ、他社のキットとは100%一致し、またELISA法とはロタウイルスの検出では全く同一の成績が得られた。アデノウイルス検出において、1例の非常に低い価のものは今回構築したイムノクロマト法および他社のキットで陰性であった。このことはイムノクロマト法がELISA法よりも検出感度において若干低いといわれていることを示しているものと考えられた。しかし、アデノウイルス40,41型による下痢症患者ではふん便中に大量のウイルスを排泄することから、この程度の検出感度を有しておれば、通常のウイルス診断には特に問題はないものと考えられた。またノロウイルスが検出されたふん便材料ではロタウイルスおよびアデノウイルスともに陰性であり、交差反応はないものと考えられた。

2002年3月から4月は、ロタウイルス、アデノウイルスだけではなくノロウイルスやアストロウイルスが混在して流行した時期であったため、ロタウイルス、アデノウイルスに対する検出感度だけでなく、他の胃腸炎を起こすウイルスとの間の交差反応の検討にも適した時期であった。新鮮ふん便検査期間中にはアデノウイルス陽性例が少なかったものの、本キットは電子顕微鏡との比較において検出感度、特異性、一致率とも高く良好な成績が得られた。また、既存の市販キットとの比較においても、非常によく一致した結果であった。

今回性能を検討したIRC-Rota/Adenoは、操作性、迅速性に優れていた。キットにふん便採取用綿棒、希釈液、フィルター付滴下ノズル等必要な物がすべて含まれていること、操作が簡単、迅速で、遠心器等の器具を必要としない。さらにふん便を入手後20分以内に結果が得られること等からベッドサイドでの検査に非常に適しているキットであると思われた。

1ショットでロタウイルス、アデノウイルス及びアストロウイルスの3種類のウイルスを同時に検出できるキットの開発を検討するために、アストロウイルス3型特異モノクローナル抗体の#3B1+アストロウイルス3型免疫ウサギ血清の組合せではアストロウイルスtype3で100倍希釈サンプルを用いた場合に強い反応が観察された。しかしアストロウイルス共通特異モノクローナル抗体の#3A3（アストロウイルスの内殻に存在するエピトープを認識）は全てのアストロウイルスのTypeに反応するクローンであることがELISA法による検討で確認されているが、この#3A3を用いてイムノクロマト系で

評価したときに全く反応性が確認されなかった。このことは①抗体感作メンブレンまたは抗体感作着色粒子の調製不良、②ウイルス粒子の処理（破壊）不足、③不適切な反応条件の3点が考えられた。

以上のことからイムノクロマト法を測定原理とし、ロタウイルス・アデノウイルス・アストロウイルスについて同時に検出を行える迅速診断試薬の可能性が示唆された。しかし、さらに検討しなければならにと考えている。

5. まとめ

昨年度、作製したアデノウイルス共通のモノクローナル抗体はふん便材料からアデノウイルスを検出することができた。

本年度は昨年構築した、ロタウイルスとアデノウイルスを同時に検出できるイムノクロマト法について、新鮮臨床材料を用いて、他社のキットと比較検討したところ、他社のものとほぼ同一の成績が得られた。

アストロウイルスの検出に関しては、迅速診断の可能性が示唆されたが、すべての血清型を検出できるようにするにはさらに検討しなければならない。

6. 研究発表

なし

7. 知的所有権の取得状況

なし