

平成15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

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

目 次

課題番号

20030933A KH51041	臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究	梨井 康 …… 1
934A KH51042	組換えDNA食品遺伝子産物の慢性経口毒性評価モデルの確立	廣瀬 雅雄 …… 5
935A KH51043	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦 善治 …… 10
936A KH51044	細胞内脂質輸送系に着目した血清脂質改善薬の開発のための基礎的研究	最上 知子 …… 16
KH51045	粘膜インフルエンザワクチンの実用化に関する研究	佐多 徹太郎 …… 21
937A KH51046	日本人糖尿病感受性遺伝子に基づく脂肪細胞を分子標的とした糖尿病・肥満の予防及び治療薬の開発	門脇 孝 …… 24
938A KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチン開発のための基礎研究	竹森 利忠 …… 27
939A KH51048	ノーウォークウイルスの超高感度核酸定量システム、及びベッドサイド抗原検出システムの開発	武田 直和 …… 31
940A KH51049	ワクチン創製の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島 朝人 …… 38
941A KH51050	食品および環境中の食中毒原因菌の病原因子に対する免疫学的高感度検出法に関する研究	五十君 静信 …… 43
942A KH51051	安全なアジュバントを用いた粘膜ワクチンの開発に関する研究	後藤 紀久 …… 48
943A KH51052	リポソーム表面結合型抗原のアレルギー予防・治療への応用に関する研究	内田 哲也 …… 55
944A KH51053	肺炎球菌感染症の標準的抗体価測定方法の確立に関する研究	岡部 信彦 …… 61
945A KH51054	PPAR α をターゲットとした生活習慣病予防薬の開発	片山 茂裕 …… 64
946A KH51055	感染症領域における先端的遺伝子診断技術の開発に関する研究	薄井 貢 …… 68
947A KH51056	乳幼児下痢症の原因ウイルス検出法に関する研究	西尾 治 …… 71
948A KH51057	可溶性ウイルス受容体等によるウイルス吸着阻止を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口 文広 …… 77
949A KH51058	EPA・DHA含有エステル交換構造脂質の体脂肪蓄積抑制効果に関する研究	斎藤 衛郎 …… 86
950A KH51059	エネルギー消費調節機構に立脚した生活習慣病予防薬に関する基礎研究	大坂 寿雅 …… 89
951A KH51060	遺伝子解析によるヒトエンテロウイルス同定の標準化	清水 博之 …… 93
952A		

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第六室
研究者 西尾 治

研究要旨

アストロウイルスとサポウイルスのイムノクロマト法の開発を目的とした。アストロウイルスは1～5型のポリクローナル抗体でイムノクロマトを構築し検討したところ、型特異性が強かったが、各型の抗血清を混合することで診断に用いることができると判断された。

サポウイルスは合成ペプチドを免疫して得られた抗体でイムノクロマトを作製し検討したところ、一つが良く反応し、検出の可能性が見出された。

分担研究者

- (1) 愛媛県立衛生環境研究所衛生研究課
大瀬戸光明
- (2) 国際試薬株式会社試薬開発本部開発研究部
高浜洋一、一口毅

A. 研究目的

乳幼児の下痢症を起こす病原体として、ロタウイルス、小型球形ウイルス、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(VP7)の抗原性によりA～G群に分類される。ヒトではA、B、C群の感染が報告されているが、世界的にほとんどが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亡くなっており、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型、41型は小児下痢症の原因の約10%を占め、その他の型の多くは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1～8の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、食中毒様集団発生を起こしている。

下痢症ウイルスを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行える。

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法等が知られている。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。

そこで、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～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法を構築したところ、アデノウイルス検出に用いることができることを明らかにした。また、凍結保存してあったアデノウイルス陽性検体を用い、ELISA による抗体反応の確認と、アデノウイルスと A 群ロタウイルス検出を同時に行うイムノクロマトを構築したものを用いて、新鮮患者便を用いて、その有用性を検討した。その結果、従来の ELISA に比べほぼ一致する結果が得られた。

平成 14 年度は ELISA で凍結保存してあったふん便材料のうちポリクローナル抗体で陽性のものが、作製したモノクローナル抗体でどのように反応するかを検討した。その結果、アデノウイルス検出に極めて良好な結果が得られた。以上から、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は、検出感度、他社の製品との比較、電子顕微鏡での検出成績と比較しても遜色のない結果であった。

15 年度はアストロウイルスおよび小型球形ウイルスのうち、乳幼児下痢症として問題となっている、サポウイルスを取り上げ、イムノクロマトを作製することにした。

しかし、サポウイルスは組織培養および動物における増殖系が無いことから、サポウイルス検出のための、合成ペプチドを作成することにした。なお、それをウサギに免疫し、得られた抗血清について、ELISA で抗体価について検討を行った。

B. 研究方法

1. アストロウイルス

アストロウイルス 1 から 5 型は CaCa2 細胞で増殖させたものを用いた。

2) 免疫ウサギ血清

ウサギ（日本白色種）に、アストロウイルスを精製後、1 週間隔で 2 回連続的に免疫し、さらに 2 週後に追加免疫後、1 週後に全採血を行い、抗体血清を得た。

3) 抗体価測定

サンドイッチ ELISA 法で行った。

4) イムノクロマトの構築

イムノクロマトは A 群ロタウイルスおよびアデノウイルスと同様に行った。

2. サポウイルス

1) 合成ペプチドの作成

サポウイルスのカプシド部分について

Genbank で検索し、よく保存されている部分で、SV412806、SV412797 および SV142797 の 3 つの部分を選んで、合成ペプチドを作成した。

2) 免疫血清の作成

合成ペプチドをウサギに、1 週間隔で 4 回連続的に免疫し、さらに 2 週後に追加免疫後、1 週後に全採血を行い、抗体血清を得た。

3) 抗体価測定

抗体価測定は 96 穴のマイクロプレート用プレートに、合成ペプチドをリン酸緩衝液 (pH7.4) で $5 \mu\text{g/ml}$ に希釈したものを、プレートの穴に各 $100 \mu\text{l}$ 宛入れた。その後 4°C で一夜静置した。

その後プレートを PBS で 3 回洗浄した。

洗浄後のプレートに作製した抗体を PBS で 1000 倍から 12800 倍まで、2 倍階段希釈したのち、各プレートに血清 1 希釈当たり、2 穴に $100 \mu\text{l}$ 宛入れた。

その 1 時間後にペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG を入れ、室温に 1 時間静置した。その後、プレートを 4 回洗浄後、OPD で発色させ、硫酸で発色停止を行い。吸光度を測定した。

4) イムノクロマトの構築

小型球形ウイルスではサポウイルスの培養系が無いために、サポウイルスのアミノ酸配列を検索し、高度に保存された領域での合成ペプチドに対する抗体をウサギで作製した。他のウイルスと同様にイムノクロマトを構築し検討し、反応性をハーフストリップ法により測定した。

(倫理面への配慮)

患者のふん便を用いた研究を行なう際には、研究対象者の人権擁護を第一に考え、個人が特定されないように、検体名等は番号のみとし、個人が特定されるような情報は記載しないようにした。また、個人が特定されるような情報の公開は行わない。

C. 研究結果

1. アストロウイルス

アストロウイルス血清 1~5 型に対するポリクローナル抗体を用い、それぞれのイムノクロマトを作製し、アストロウイルス 1~5 型による交差試験を行った。その結果

各血清型の培養ウイルスに対する反応性は、いずれもホモの組合せで良好に反応したが、ヘテロの組合せではほとんど反応は見られなかった (図 1)。このことからアストロウイルスの抗血清は型特異性が強いものであった。

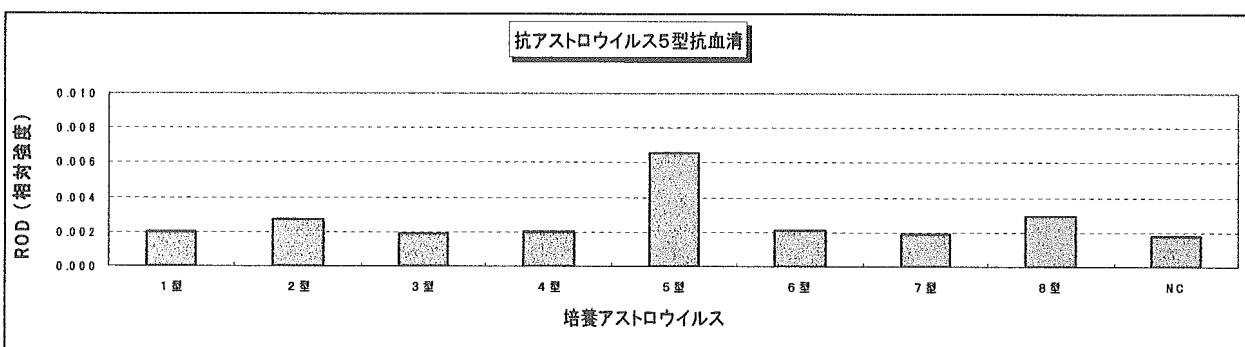
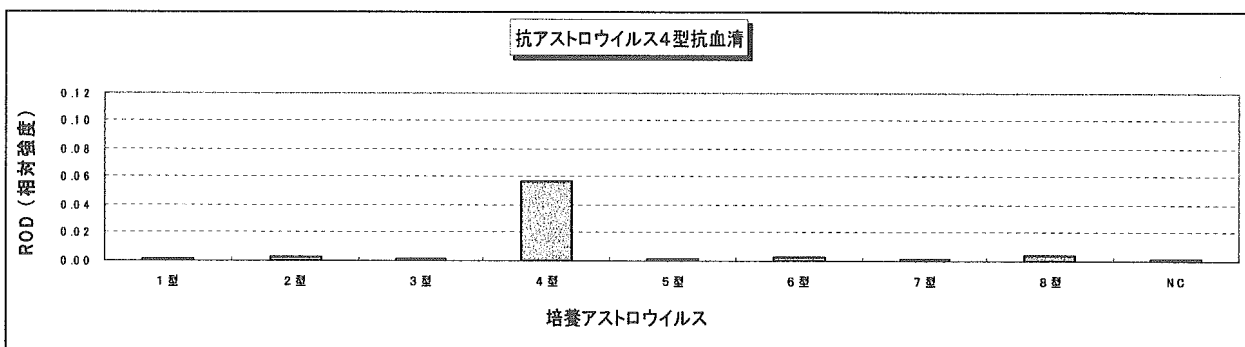
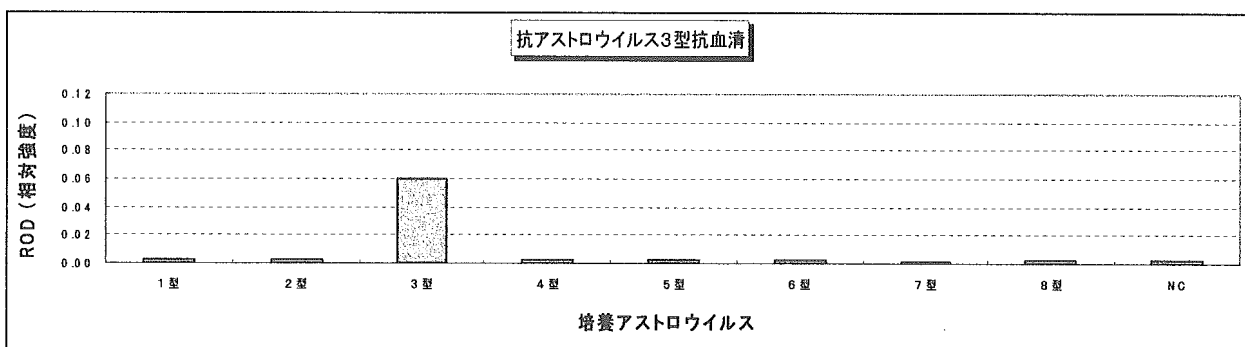
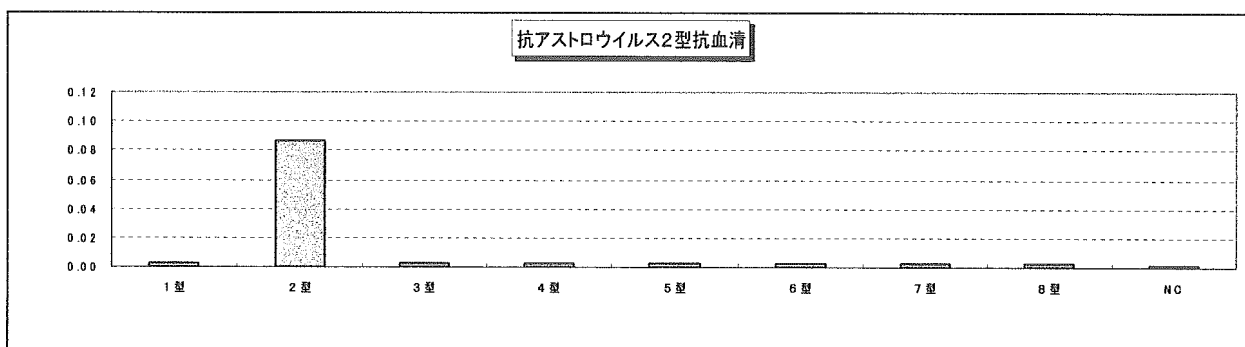
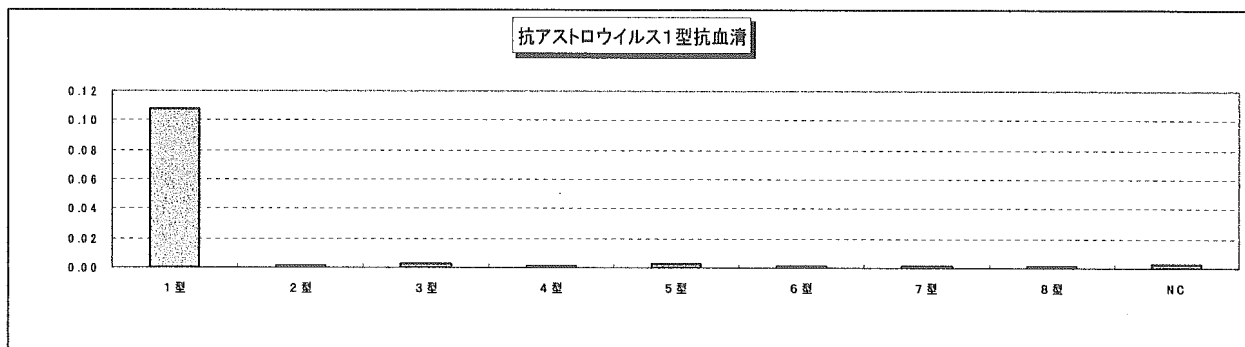


図1 イムノクロマト法による交差試験

2. サポウイルス

サポウイルス検出には、サポウイルスのカプシド領域で、よく保存されている領域から、3つの部分を選び、合成ペプチドを作製し、それをウサギで免疫し抗血清を得た。

各ペプチドで免疫した抗血清の抗体価を ELISA 法で測定した。

図2にはU95644の測定結果を示した。血清希釈で8,000倍まではOD値が3.0以上を示した。16,000倍、32,000倍とOD値が低下したものの、64,000倍でOD値が0.5以上であった。

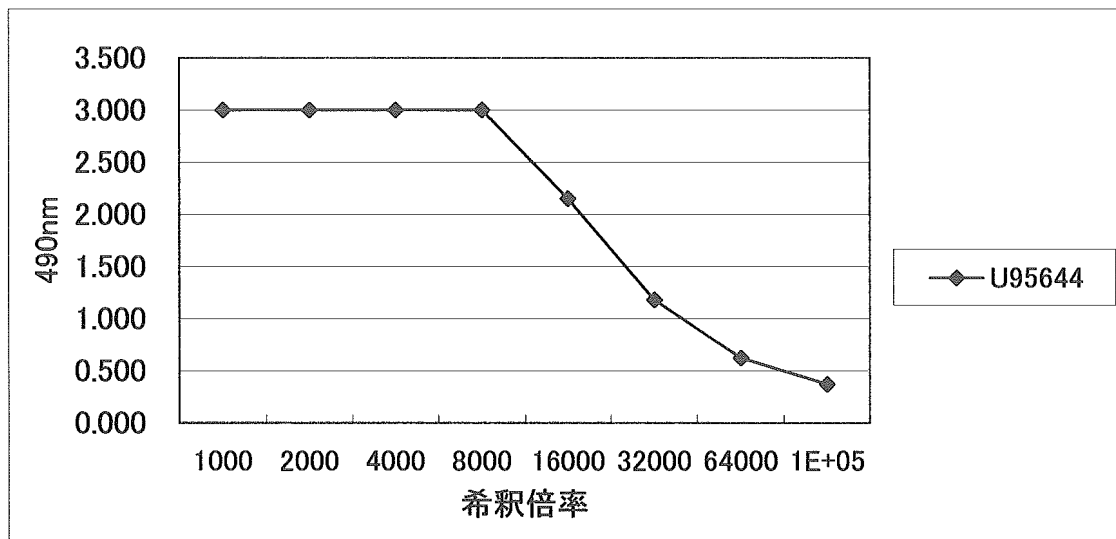


図2 U95644ELISA 測定値

図3にはSVI412806の抗血清のELISAによる抗体価を表した。血清希釈で2,000倍まではOD値が3.0以上を示した。4,000倍、8,000倍とOD値が低下したものの、16,000倍でOD値が0.5

以上であった。しかし、32,000倍以上の希釈ではOD値0.5以下となった。

SVI412797の抗血清の成績はSVI412806とほぼ同様であったので、図には示さなかった。

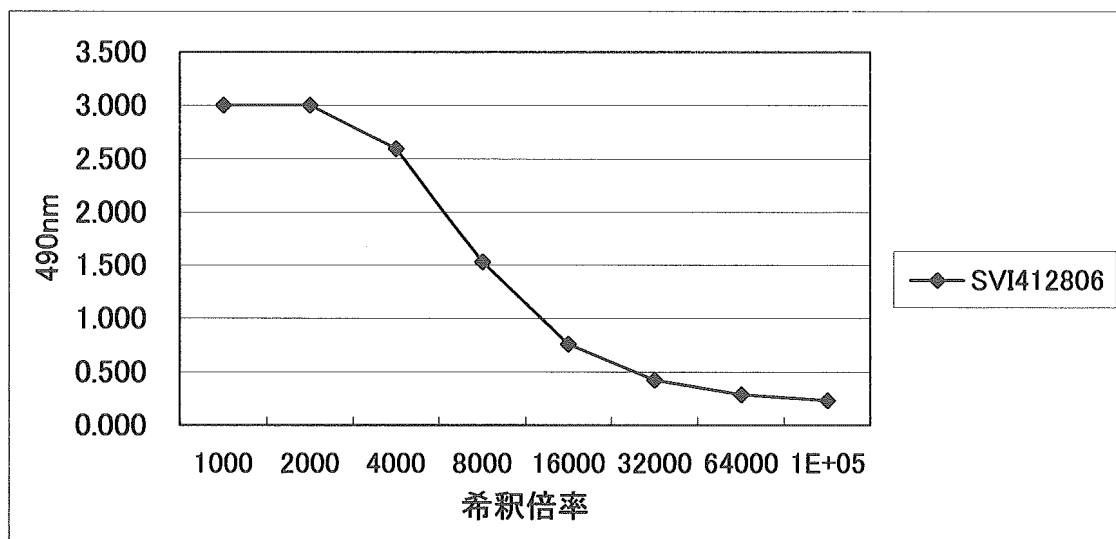


図3 SVI412806ELISA 測定値

以上の結果から、抗体の産生が認められたので、得られた抗血清を用いてサポウイルス検出系イムノクロマトを作製し、その反応性について検討したところ、ELISA では良く反応したが、それぞれの抗血清で作製したイムノクロマトは

U95644 で合成サポウイルス抗原 U95644 に対する特異反応が確認されたものの、SV142806 および SV142797 はイムノクロマト法では反応が認められなかった。(図 4)。

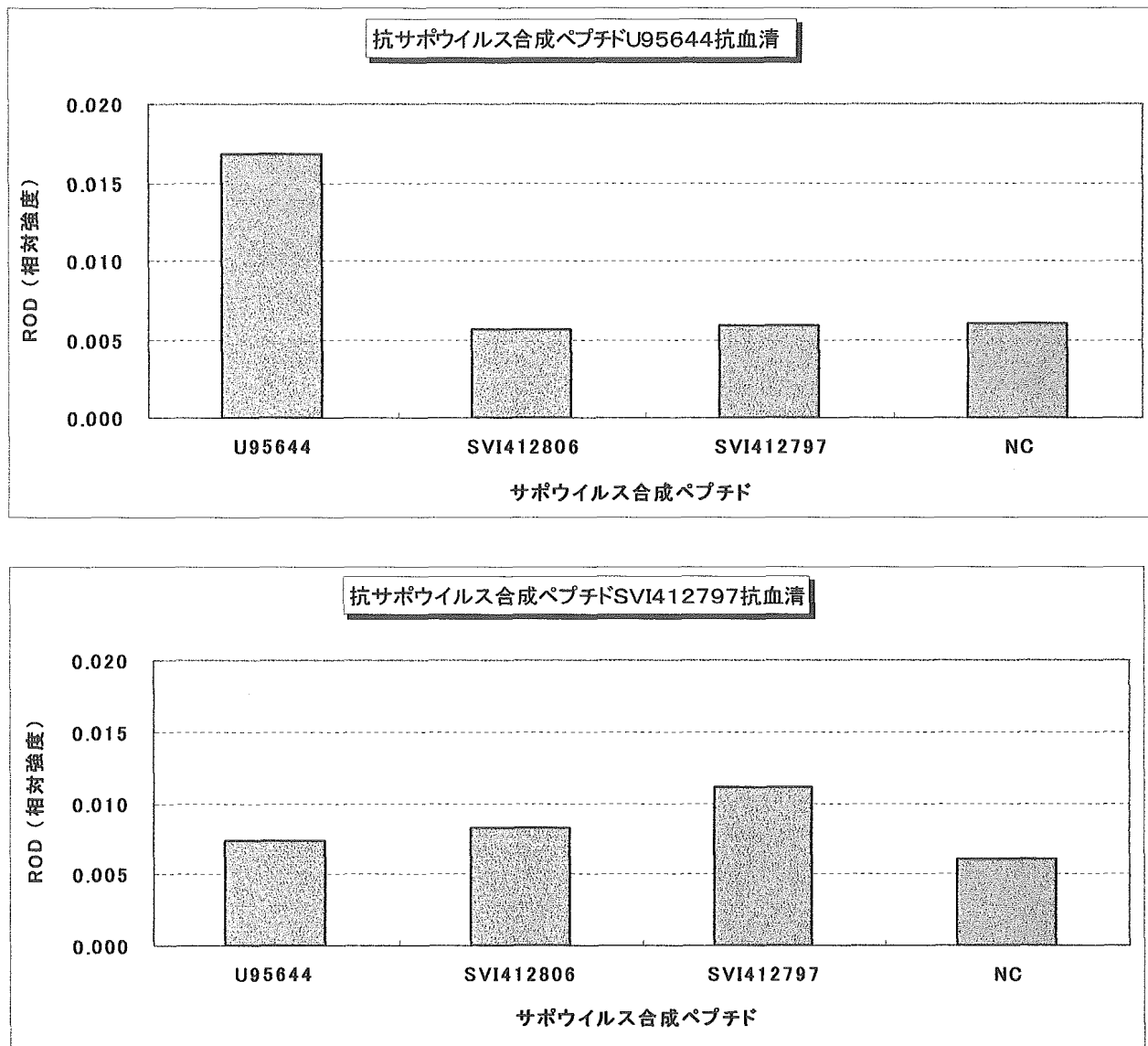


図 4 イムノクロマト法によるサポウイルス検出系の反応性

D. 考察

アストロウイルスの型特異モノクローナル抗体を基にイムノクロマトを構築し、検討したところ、反応性が低いため、ウイルス診断に用いるには困難と判断された。そこで本年度はイムノクロマトの構築を、1~5型のポリクローナル抗体を用いて行ったところ、サポウイルスのカ

プシド領域で、配列が良く保存されている部分のペプチドを合成し、ウサギに免疫して、抗体を作製した。

その結果、3つのペプチドともに抗体が産生され、それぞれのペプチドにおいて抗原性が認められた。

また、抗原性の強かったのは U95644 で、それ

に比べ、SV142806 および SV1412797 は 4 倍程度低かった。

この抗原性の差は、ペプチドによるものか、あるいは単に免疫したウサギの感受性の違いなのか更に検討する必要があると考えられた。

さらに、イムノクロマトを構築しその反応性について検討したところ、合成ペプチドの 1 種類に対する特異反応が確認され、今後臨床検体での検討しなければならないものの、可能性が示された。

以上の結果より、ロタウイルス、アデノウイルス、アストロウイルスおよびサポウイルスの 4 種の主要な乳幼児下痢症の原因ウイルスについて、イムノクロマト法での検出が可能であり、さらに複数のウイルスを同時に検出出来る可能性が示された。

E. 結論

本年度はアストロウイルス検出のイムノクロマトの構築をポリクローナル抗体で作製し、検討したところ、型特異性が強いものの、各抗血清を混合することにより、多くの型のアストロウイルスの検出が可能と考えられた。小型球形ウイルスのうち、サポウイルスのイムノクロマト法の開発を目的として、カプシド領域で、よく保存されている部分を 3ヶ所選択し、その部分のペプチドを合成し、ウサギに免疫し、抗血清を得た。得られた抗血清について ELISA 法で抗体価を測定したところ、合成した全てに抗体産生が認められ、これらペプチドには抗原性が存在することが明らかとなった。これを用いてイムノクロマトを作製し、検討したところ、イムノクロマトでの検出の可能性が見出された。

F. 研究発表

1. 論文発表

近藤玲子、山下育孝、吉田紀美、大瀬戸光明、浅井忠男、井上博雄、西尾治、秋山美穂：愛媛県において 10 月から流行したノーウォークウイルス様ウイルス胃腸炎。病原微生物検出情報，2003，24：9-10.

Doan LT, Okitsu S, Nishio O, Pham DT, Nguyen DH, Ushijima H. Epidemiological features of rotavirus infection among hospitalized children with

gastroenteritis in Ho Chi Minh City, Vietnam. J Med Virol. 2003, 69: 588-594

Yan H, Yagyu F, Okitsu S, Nishio O, Ushijima H.: Detection of norovirus (GI, GII), sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. J Virol Methods. 2003, 114: 37-44.

新川奈緒美, 川元孝久, 秋山美穂, 加藤由美子, 西尾治. 吐物が感染源と推察されたノロウイルス集団胃腸炎事例について. 臨床とウイルス 2004, 32:印刷中.

2. 学会発表

新川奈緒美、吉澄志磨、福田伸治、西香南子、杉枝正明、古屋由美子、三上稔之、西田知子、牛島廣治、秋山美穂、岡部信彦、西尾治：全国各地で発生したノロウイルス（NV）による食中毒事例について、第 51 回日本ウイルス学会、京都、2003 年 10 月 27-29 日

勢戸祥介、入谷展弘、久保英幸、改田厚、春木孝祐、西尾治、綾田稔、小倉壽：平成 14 年度に大阪市で検出された Norwalk virus の遺伝子型別。第 51 回日本ウイルス学会、京都、2003 年 10 月 27-29 日

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

平成15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

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

平成16年9月30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