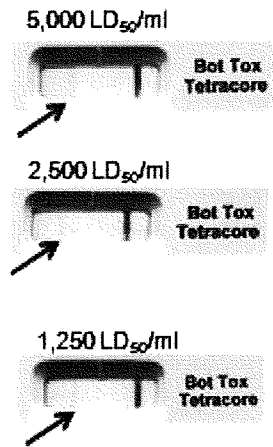


Type A



Type B

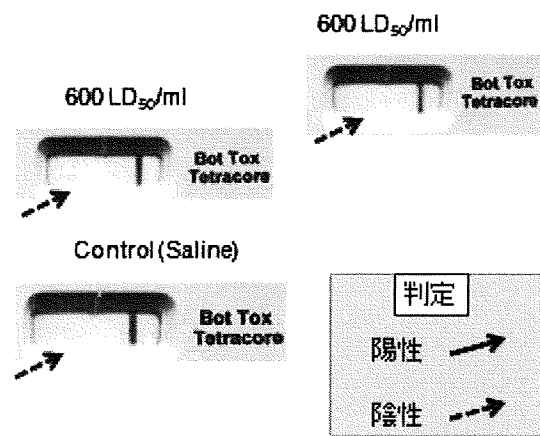


図7. A型菌とB型菌培養上清中の毒素を用いた感度と精度

II. 分担研究報告書

1. 迅速電顕観察法およびヒト病理検体の迅速診断法の開発 —フィールドで使用できる生物テロ感染病原体の検出法の確立 携帯用使い捨てカイロを用いた LAMP 法の検討—

研究分担者 佐多徹太郎 国立感染症研究所 感染病理部
研究協力者 波多野 弁 (国立感染症研究所・感染病理部 研究協力員)
福本 瞳 (国立感染症研究所・感染病理部 研究協力員)
片野晴隆 (国立感染症研究所・感染病理部)
井上 智 (国立感染症研究所・獣医科学部)

研究要旨 フィールドで簡便にしかも確実に生物テロ病原体の同定ができる診断法の確立を目指し、携帯用使い捨てカイロを用いた LAMP (Loop isothermal amplification) 法の開発に取り組んだ。標的遺伝子は炭疽菌の pag または capB 遺伝子とし、LAMP 反応は、反応液を含んだ PCR チューブを携帯用使い捨てカイロではさみ、発泡スチロール箱中で保温することで行った。反応後の遺伝子の増幅は目視で確認した。携帯用使い捨てカイロを用いた LAMP 法の感度及び特異性はヒートブロックを使用した LAMP 法と比較して差がなかった。また、発泡スチロール箱を用いて断熱することにより、外気温 4℃及び 37℃の状態でも使用できることが確認された。携帯用使い捨てカイロを用いた LAMP 法は、フィールドにおける有用な生物テロ病原体検出法になりうると考えられる。

A. 研究目的

2001 年のアメリカ炭疽菌テロ事件を契機とし、生物テロ対策はますます重要となっている。今まで多くの生物テロ病原体の検出法が開発されてきたが、その多くが PCR 法、イムクロマト法を用いたものである。PCR 法は感度が高く、信頼性も高い方法であるが、サーマルサイクラーなどの機器や電源などのインフラが必要であり、PCR システム全体を簡易に持ち運びできる訳ではない。イムクロマト法は簡易で迅速であるが、検出限界が 10^6 - 10^8 コピーで感度が低く、確実な診断法とはいえない。これらの問題を解決するため、われわれは LAMP 法に注目した。LAMP 法は、一定温度で遺伝子を増幅させる方法である。PCR 法がサーマルサイクラーを用いて厳密に温度管理をしなければいけないのに対し、LAMP 法は 60-65℃の一定温度が保つことができれば遺伝子増幅ができる。今回、一定温度供給源として携帯用使い捨てカイロを用い、フィールドで使用できる生物テロ病原体の新たな検出法の確立を目指した。

B. 研究方法

1) 検査材料

国立感染症研究所において保存されている、炭疽菌 (*B.anthraxis* BA101, *B.anthraxis* BA103, *B.anthraxis* BA104) の各菌液を 2 分し、一方の検体から DNA を抽出するとともに、もう一方の検体を希釈して soy agar plate で培養し colony formation unit (CFU) を計算した。特異性の検討に、*B. thuringiensis* GTC2847, *B. cereus* GTC419, *B. cereus* GTC1777, *B. cereus* GTC2826, *B. subtilis* NIID-1 から抽出された DNA を使用した。また、BA101 の DNA を鋳型とし、LAMP 法で用いた F3 及び B3 プライマーを用いて、PCR 法により pag 及び capB の DNA フラグメントを増幅させ、精製した後、感度の測定に用いた。携帯用使い捨てカイロは、異なる 4 社から発売されているものを購入して使用した。炭疽菌 pag 及び capB 遺伝子を標的にした LAMP 用のプライマーは、すでに論文に掲載されたものを使用した (Qiao et al. 2007 *Biotechnol Lett.*, 29, 1939-).

2) 実験方法

- a) 携帯用使い捨てカイロを用いた LAMP 法
8 連の反応チューブ (PCR チューブ) を携帯

用使い捨てカイロではさみ、さらに、紙タオル（キムタオル）で被覆し、発泡スチロールの箱に入れ、保温した（図 1 A）。遺伝子増幅の有無は反応後に紫外線照射下及び通常光下においてみられる緑色の蛍光強度で判定した（図 2 B）。また、カイロ内に温度計を差し込み、カイロ内部の温度変化を確認した。

b) LAMP 法の特異性の検討

炭疽菌、および近縁菌の DNA をサンプルに、ヒートブロックを用いて 60°C 60 分の条件で LAMP 法を行った。また、LAMP 法の産物を *Bam*HI, *Sph*I, *Hind*III の制限酵素で処理し、LAMP 法の特異性を確認した。

c) 携帯用使い捨てカイロ及びヒートブロックを用いた場合の比較

炭疽菌株 BA101 から抽出された DNA 及び *pag*, *capB* の DNA フラグメントを段階希釈し、携帯用使い捨てカイロを用いた場合とヒートブロックを用いた場合で LAMP 法の感度を比較検討した。

d) 外気温の違いによる携帯用使い捨てカイロ LAMP 法の感度の変化

携帯用使い捨てカイロをそれぞれ 4°C、室温及び 37°C の状態に置き、発泡スチロール箱の有無による LAMP 法の感度の変化を検討した。

（倫理面への配慮）

特になし

C. 研究結果

1) 携帯用使い捨てカイロの温度変化

カイロを紙タオルで包み、発泡スチロールの箱に入れた状態で、カイロ内の温度を温度計で測定した。カイロ内の温度は実験開始後、30 分には約 60°C に達し、その後、90 分にわたって 60°C 前後を維持した。（図 1 B）

2) 炭疽菌 LAMP 法の特異性の検討

本実験で使用する LAMP 法の特異性を複数の炭疽菌株、および、近縁菌株から抽出した DNA を用いて、通常の LAMP 法で検討した。その結果、3 つの炭疽菌株 BA101, BA103, BA104 では陽性シグナルが見られたが、近縁菌株である *B. thuringiensis* GTC2847, *B. cereus* GTC419, *B. cereus* GTC1777, *B. cereus* GTC2826, *B. subtilis* NIID-1 ではいずれも陰性であった（図 2 A）。LAMP 法の判定は、紫外

線下及び白熱光下で可能であった（図 2 B）。また、増幅された *pag* 及び *capB* の産物を制限酵素で処理したところ、*pag* のフラグメントは *Sph*I で、*capB* のフラグメントは *Bam*HI で消化され、標的遺伝子が特異的に増幅されていることが示された（図 3）。

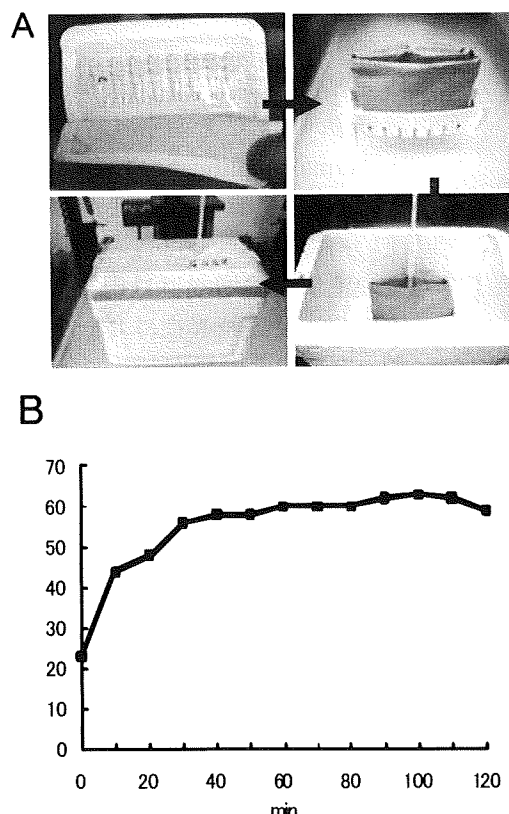


図 1 A: 携帯用使い捨てカイロを用いた LAMP 法 チューブをカイロに包み、紙タオルでつつんで発泡スチロールの箱に入れた。B: カイロの温度変化 実験開始から 30 分後には約 60°C に達し、その後、約 90 分にわたって 60°C 前後を保った。

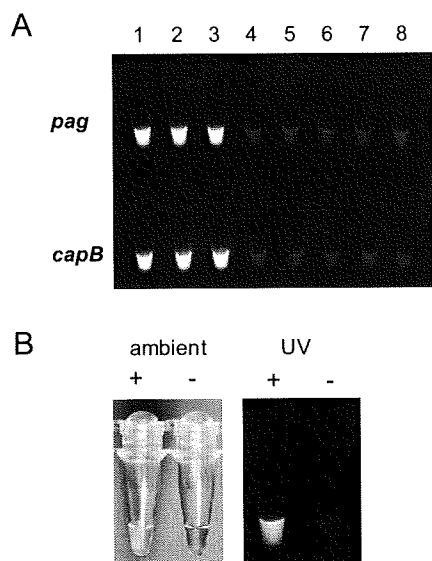


図 2 A: LAMP 法の特異性検討 1: *B. anthracis* (BA101), 2: *B. anthracis* (BA103), 3: *B. anthracis* (BA104), 4: *B. thuringiensis*, 5-7: *B. cereus*, 8: *B. subtilis*. B: 通常光下 (左) 及び紫外線照射下 (右) における LAMP 反応後試薬。遺伝子増幅された反応液は通常光下では緑色に、紫外線照射下では強い発光として目視できる。

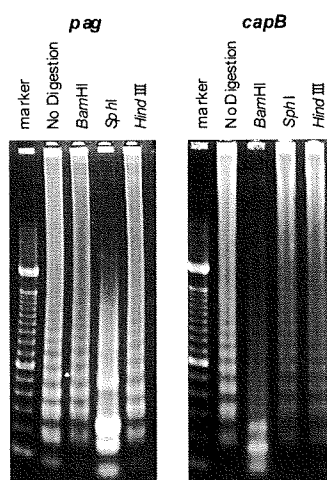


図 3. LAMP 産物の制限酵素処理。Pag, capB の DNA フラグメントはそれぞれ、SphI, BamHI の制限酵素切断部位を持つ。

3) 通常の LAMP 法と、携帯用使い捨てカイロを用いた LAMP 法の比較

DNA フラグメントおよび菌から抽出した DNA を段階希釈し、ヒートブロックを用いた通常の LAMP 法と、携帯用使い捨てカイロを用いた LAMP 法の感度の違いを検討した。その結果、pag 及び capB とともに、携帯用使い捨てカイロを用いた場合とヒートブロックを用いた場合で感度の違いはみられなかった (図 4)。

4) 外気温の違いによる携帯用使い捨てカイロ LAMP 法の感度の変化

携帯用使い捨てカイロを発泡スチロール箱内部に入れた場合、4°C、室温及び 37°C のいずれの場合でも LAMP 反応の感度の変化はみられなかった。発泡スチロール箱を用いない場合、4°C における検出限界は 10^8 コピー以上となり、感度の著しい低下が見られた。また、カイロを直接ポケットに入れた場合でも、検出限界は 10^8 以上となり、感度の低下が見られた (表 1)。これらの実験から、発泡スチロール箱を用いて、外気を遮断することがこの反応において重要であると思われる。

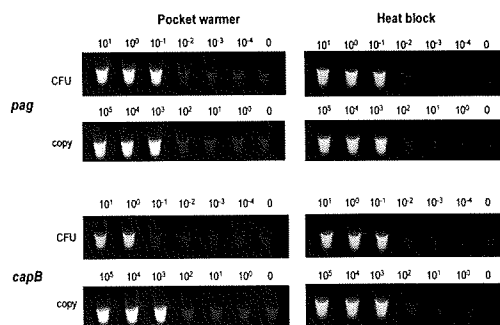


図 4. 携帯用使い捨てカイロを用いた場合と、ヒートブロックを用いた場合における感度の比較

	携帯用使い捨てカイロ							Heat block
	4° C		RT		37° C		ポケット内	
発泡スチロール箱	+	-	+	-	+	-	-	
pag	$10^3 > 10^8$	$10^3 > 10^8$	$10^3 > 10^8$	$10^3 > 10^8$	$10^3 > 10^8$	$10^3 > 10^8$	$10^3 > 10^8$	10^3
capB	$10^2 > 10^8$	$10^3 > 10^8$	$10^3 > 10^8$	$10^3 > 10^8$	$10^3 > 10^8$	$10^3 > 10^8$	$10^3 > 10^8$	10^3

表 1 外気温および発泡スチロール箱の検討実験の結果。

D. 考察

今回、一定温度供給源として携帯用使い捨てカイロを使用することで、より現場に近い場所で、より簡便で、確実な生物テロ病原体の検出法の確立を目指した。

これまで開発された生物テロ病原体の検出法はいずれも、サーマルサイクラーなどの重量のある機器を必要とし、生物テロの現場から機器のある施設まで、対象サンプルを輸送する必要がある。また、免疫クロマトのような簡易な検出法は必ずしも十分な感度があるとはいえなかった。本研究で示した携帯用使い捨てカイロを用いた LAMP 法は、携帯カイロと紙タオル、発泡スチロールという非常に簡易な物品で行うことができ、かつ、電源を必要としないため、生物テロの現場や、インフラの整備されていない現場でも炭疽菌 DNA の検出が可能である。

さらに、携帯用使い捨てカイロを用いた LAMP 法はヒートブロックを用いた通常の LAMP 法と比較しても感度及び特異性に遜色はみられない。通常の LAMP 法の感度は一般的な PCR 法とほぼ同様であり、本研究で用いたプライマーセットを用いた LAMP 法では炭疽菌を 10 孢子から検出することが可能とされている。これは実際の炭疽菌を用いた生物テロの検出では十分な感度であると予想される。

本研究で示したように、携帯用使い捨てカイロを用いた LAMP 法では発泡スチロール箱で外気温を断熱することが重要である。発泡スチロール箱を使用すれば、4℃という外気温にも左右されずに使用できるが、発泡スチロール箱を使わずに、ズボンのポケットなどに挿入しただけでは、かえって人体に熱を奪われ、LAMP の反応は阻害される。

携帯用使い捨てカイロを用いた LAMP 法をフィールドでも使用できるようにするためには、プライマーや酵素の輸送、保存方法の改良や、フィールドでも簡易に行える核酸抽出法の検討が必要である。しかし、すでに、前者に関しては LAMP 酵素、プライマーの凍結乾燥品が一部で発売されており、これは室温で長期保存が可能である。また、後者に関しても磁気ビーズを用いた核酸抽出法が開発されており、これは遠心器も必要としない方法である。今後、こうした試薬との組み合わせにより、携帯用使い捨てカイロを用いた LAMP 法が、さまざまな場面に応用可能な方法として改良されていくことが期待される。

E. 結論

携帯用使い捨てカイロを用いた LAMP 法を確立し、炭疽菌 DNA の検出に成功した。カイロと紙タオル、発泡スチロール箱を用いれば、外気温に大きく左右されることなく、ヒートブロックを用いた LAMP 法とほぼ同様の感度が得られることが分かった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

(1) 論文発表

- 1) Hatano B, Maki T, Obara T, Fukumoto H, Hagiwara K, Matsushita Y, Okutani A, Bazartseren B, Inoue S, Sata T, Katano H. LAMP Using a Disposable Pocket Warmer for Anthrax Detection, a Highly Mobile and Reliable Method for Anti-Bioterrorism. *Jpn J Infect Dis.* 2010;63:36-40.
- 2) Hatano B, Kojima A, Sata T, Katano H. Virus detection using viro-adembeads, a rapid capture system for viruses, and plaque assay in intentionally virus-contaminated beverages. *Jpn J Infect Dis.* 2010;63:52-4.
- 3) Tobiume M, Sato Y, Katano H, Nakajima N, Tanaka K, Noguchi A, Inoue S, Hasegawa H, Iwasa Y, Tanaka J, Hayashi H, Yoshida S, Kurane I, Sata T. Rabies virus dissemination in neural tissues of autopsy cases due to rabies imported into Japan from the Philippines: immunohistochemistry. *Pathol Int.* 2009 ;59:555-66.

(2) 発表

- 1) 波多野弁、小島朝人、佐多徹太郎、片野晴隆. バイオテロ対策を目的とした、飲料物からの迅速ウイルス回収法 -Viro-Adembeads を用いたウイルス回収法の検討. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会 11 月 東京。

H. 知的財産の出願・登録状況

特になし

2. ウイルス性特定病原体の鑑別診断法の開発

研究分担者 森川 茂 国立感染症研究所 ウイルス第一部
研究協力者 谷口 怜、佐山勇輔、福士秀悦、水谷哲也、西條政幸、
倉根一郎 (国立感染症研究所・ウイルス第一部)

研究要旨 エボラウイルスは、バイオテロリズムに用いられる危険性が最も高いウイルスの1つである。昨年度は、新種のエボラウイルスも高感度に検出できるリアルタイム RT-PCR を開発した。一方、フィリピンで豚にレストンエボラウイルス感染が確認されたため、サル以外の動物を介してウイルスが侵入する可能性が否定できなくなった。そこで、レストンエボラウイルス抗体検出系やレストンエボラウイルス特異的高感度遺伝子検出法を開発し、ヒトやサル以外の動物の検査も可能にした。

A. 研究目的

バイオテロリズムの危険性がかねてから指摘されている。これらの疑い患者が発生した場合等には、対象とするバイオテロ病原体別の実験室診断法による的確な診断を行うことは重要である。しかし、これらの検査を一元的に国立感染症研究所等で行なうことは物理的に不可能となる場合がある。このため、類似の初期症状を呈するウイルス感染症との鑑別診断を整備し地研等を含めた全国レベルで一次検査体制を構築することが重要である。本研究では最終的にバイオテロ病原体の的確な実験室診断法を整備・改良するとともに、類似の初期症状を呈するウイルス感染症との鑑別診断法を整備することを最終的な目的とする。

バイオテロ病原体のうち、出血熱ウイルス等では2008年の新種のエボラウイルス (*Bundibugyo ebolavirus*)、新種のラッサ様出血熱の原因アレナウイルス (*Lujo virus*)、新種の南米出血熱ウイルス (*Chapare virus*) 等の新興感染症の出現が相次いでいる。このように新種のウイルスが出現すると、これまでに整備されている検査法・検出法では対応できない。そこで、昨年度は新種のエボラウイルス (*Bundibugyo ebolavirus*) も含めて全てのエボラウイルス種に共通な高感度なリアルタイム RT-PCR による遺伝子検出法を開発した。

一方、2008年にレストンエボラウイルスの豚への感染が確認され、サル以外の動物を介

してウイルスが侵入する可能性が否定できなくなった。実際ヒトに抗体陽性者が確認されているが健康被害の報告はない。そこで、今年度はレストンエボラウイルス抗体検出系をさらに整備し、ヒトやサル以外の動物の検査系を開発することを目的とした。

B. 研究方法

1) レストンエボラウイルスの NP 抗体検出系 : 1996年のフィリピンでのカニクイザルのレストンエボラ流行時に分離されたウイルスの NP 遺伝子の carboxyl 末端に8ヒスチジンタグ (*his-tag*) を付加し、組換えバキュロウイルスで発現した。組換えバキュロウイルス感染昆虫細胞から2価イオン吸着クロマトグラフィーにより、レストンエボラウイルス NP を精製し、ELISA 抗原とした。

2) レストンエボラウイルスの GP 抗体検出系 : 膜糖蛋白 (GP) 遺伝子の carboxyl 末端に *his-tag* 付加した組換えバキュロウイルスを作製し、昆虫細胞で GP を発現した。数種類の組換え GP 発現バキュロウイルスを作製し比較した結果、GP の細胞外領域に *his-tag* 付加したものの発現レベルが高く抗原として適していた。そこでこの組換えバキュロウイルス感染昆虫細胞からレストンエボラウイルス GP を精製し、抗原とした。また、発現プラスミド pKS336 にレストンエボラウイルス GP の全長をクローニングしたプラスミドを HeLa 細胞に導入し、恒

常的にGPを発現する細胞株を樹立し、蛍光抗体法用抗原を作製した。

3) レストンエボラウイルス遺伝子検出系の改良：昨年度は、全てのエボラウイルス遺伝子を高感度に検出するリアルタイムRT-PCR法を開発したが、特定のエボラウイルス種に限定した高感度遺伝子検出系は、nested RT-PCR法の法が高感度である。そこで、フィリピンの豚のレストンエボラウイルス感染症で確認されたウイルスの遺伝子配列情報も加えてレストンエボラウイルス特異的なsemi-nested RT-PCR法を開発した。

(倫理面への配慮)
特になし

C. 研究結果

1) レストンエボラウイルスの NP 抗体検出系：サルのレストン流行時に抗体検査法として作製した抗原は、NP の carboxyl 側約半分の抗原を用いたものであった。感染サル血清中の抗体は、この領域にあるエピトープを良く認識するため、診断や血清疫学上有用であった。しかし、レストン感染豚血清では、この抗原を用いると抗体検出の感度が低かった。そこで、全 NP を抗原とするため、carboxyl 側に his-tag を付加してバキュロウイルスで発現し、精製した抗原を用いる ELISA を開発した (図 1)。この ELISA は、抗 NP ウサギ血清や感染サル血清中の抗体と強く反応した。

2) レストンエボラウイルスの GP 抗体検出系：carboxyl 末端に his-tag 付加した GP の細胞外領域を組換えバキュロウイルスで発現、精製した。この抗原の高度免疫ウサギ血清 (抗 GP ウサギ血清) を作製し、GP 抗体特異的 ELISA を開発した (図 1)。この ELISA により 1996 年のレストン流行時のサル血清中の抗体を検出できた。また、全 GP を HeLa 細胞で恒常的に発現する細胞株を樹立し、これを用いた蛍光抗体法用抗原を作製した結果、抗 GP ウサギ血清や感染サル血清と強く反応した (図 2)。

3) レストンエボラウイルス遺伝子検出系の改良：豚のリンパ節から RT-PCR により増幅したレストンエボラウイルスの NP 遺伝子配列と既知のエボラウイルスの配列を比較すると、サルのレストン流行時のウイルスの遺伝子配列と若干異なるが良く一致していた。そこで、いくつかのプライマーを設定して検討した結果、forward primer に ResNP1 (5' -GTA TTT GGA AGG TCA TGG ATT C-3')、reverse primer に ResNP2 (5' -GAT TGA TGA GGA CTA ATT TCT TG-3') を用いて 1 次 RT-PCR を実施し、ResNP1 と ResNP2A (5' -GCAAAT GCA GGG CAA TTT CTC TC-3') を用いて semi-nested PCR を行うと、1 コピーの遺伝子が検出できた (図 3)。

D. 考察

これまで、エボラウイルス、マールブルグウイルス共通の filoA/filoB primers による RT-PCR法が、国立感染症研究所や動物検疫所での遺伝子検査の方法として用いられてきた。しかし、新種のエボラウイルスが出現したため昨年度は、TaqMan RT-PCR法を開発し、10 コピー程度の遺伝子を検出できるエボラウイルス共通な高感度遺伝子検出法を開発した。その後、フィリピンで豚のレストンエボラウイルス感染が確認されたことから、エボラウイルスは霊長類以外にも感染宿主域があることが明らかとなった。また、フィロウイルスはコウモリを宿主動物とすることが明らかとなってきたため、レストンエボラウイルスの宿主を同定するためにも、各種抗体検査法の開発と改良、リアルタイムRT-PCR以上の高感度RT-PCR法の開発を行った。本年度は、NP 及びGP特異的抗体検出ELISAを改良・開発した。また、以前開発したNP抗体検出蛍光抗体法に加えて、GP抗体検出蛍光抗体法も開発した。さらに、抗原検出ELISAやVSVシュードタイプによる代替え中和試験法が開発済みであるため、レストンエボラウイルス感染症に関しては、全ての検出系が確立した。これらを用いてフィリピンのオオコウモリ種からレストンエボラウイルス特異的抗体が検出されている。今後、これらのシステムを用いてフィリピン及び周辺地域でのレストンエボラウ

イルス宿主動物や感染宿主域の解明に寄与したい。この研究は、フィリピンRITM、フィリピン大学、東北大学医学部、東大農学部と共同研究として行われた。

2. 実用新案登録
なし

E. 結論

豚でレストンエボラウイルス感染が確認されたことから、本年度はレストンエボラウイルス感染症の診断技術の向上を図った。これにより、従来の検査法では見落とす可能性があったヒトやサル以外の動物種でも検査が可能になった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

- 1) Nakauchi M, Fukushi S, Saijo M, Mizutani T, Ure AE, Romanowski V, Kurane I, Morikawa S. Characterization of monoclonal antibodies to Junin virus nucleocapsid protein and application to the diagnosis of hemorrhagic fever caused by South American arenaviruses. Clin Vaccine Immunol. 2009 ;16(8):1132-8
- 2) Saijo M, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Iizuka I, Shiota T, Sakai K, Ogata M, Fukushi S, Mizutani T, Sata T, Kurata T, Kurane I, Morikawa S. Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in non-human primates. J Gen Virol. 2009 ; 90:2266-71.
- 3) Iizuka I, Saijo M, Shiota T, Ami Y, Suzaki Y, Nagata N, Hasegawa H, Sakai K, Fukushi S, Mizutani T, Ogata M, Nakauchi M, Kurane I, Mizuguchi M, Morikawa S. Loop-mediated isothermal amplification-based diagnostic assay for monkeypox virus infections. J Med Virol. 2009;81(6):1102-8. 7.
- 4) Saito T, Fujii T, Kanatani Y, Saijo M, Morikawa S, Yokote H, Takeuchi T, Kuwabara N. Clinical and immunological response to attenuated tissue-cultured smallpox vaccine LC16m8. JAMA. 2009;301(10):1025-33.

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

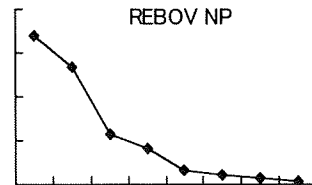
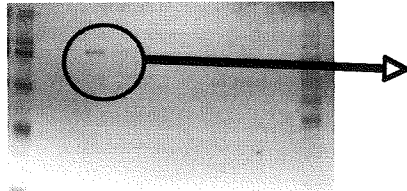
図1

組換えNP, -GPを用いたIgG-ELISA法

組換えNP, GPの発現と精製

IgG-ELISA

REBOV-NP



REBOV-GP

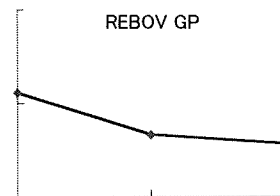
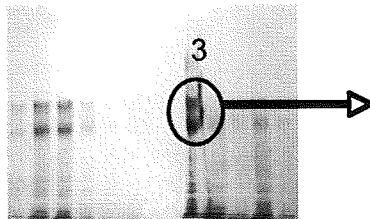
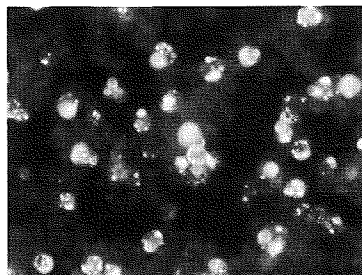


図2

間接蛍光抗体法による NP、GP特異抗体の検出

レストンNP特異抗体の検出



レストンGP特異抗体の検出

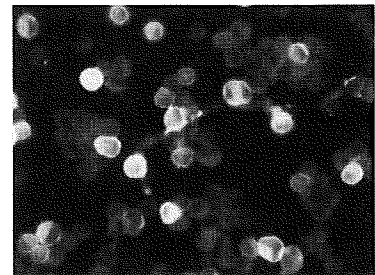
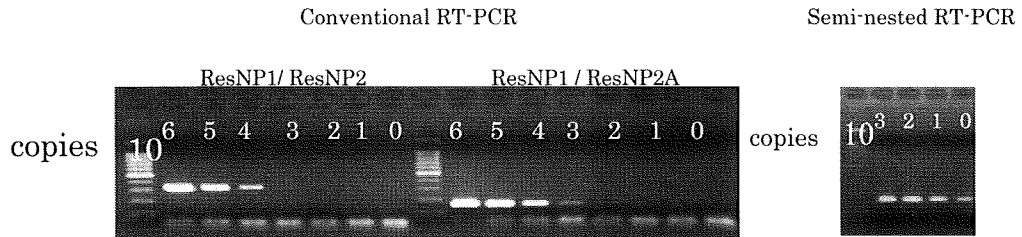


図3

レストン特異的semi-nested RT-PCR法



検出感度は、
Res-NP1/ NP2 : 1,000 copies / reaction
Res-NP1 / NP2A : 100 copies / reaction

検出感度は、1 copy / reaction

3. ウイルスによる人獣共通感染症の迅速診断法の開発

研究分担者 加来義浩 国立感染症研究所 獣医科学部

研究協力者 井上 智、野口 章、奥谷晶子 (国立感染症研究所・獣医科学部)

研究要旨 ヘニパウイルス感染症、リッサウイルス感染症など、国内での診断体制が十分に整備されていない人獣共通感染症を中心に、発生時・平時の両面に応用できる迅速診断法の開発・高度化を目的としている。今年度は、ニパウイルス (NiV)、狂犬病ウイルス (RV) の抗原検出 capture ELISA の開発を行った。抗 NiV-N, P, F, G 蛋白質ウサギ抗血清および抗 RV-N 蛋白質ウサギ抗血清より IgG を精製し、捕捉用抗体および検出用標識抗体としての反応性を検討した。NiV 検出系では、NiV-N, P, F, G 抗体を用いて conventional ELISA の反応性を比較した結果、最も反応性が高かった NiV-G 抗体を用いて capture ELISA の構築を行った。NiV-F/G 発現 VSV シュードタイプを用いて検出限界を調べたほか、検体の不活化処理法を定めるため、陽性対照抗原 (NiV-F/G 発現 VSV シュードタイプ) に種々の不活化剤を反応させ、ELISA 反応性への影響を確認した。また、RV-N 抗体を用いた capture ELISA は、陽性対照抗原 (イヌ用狂犬病ワクチン) を検出できることを確認した。今後は感染性ウイルスを用いて、さらに反応性の解析を行う。

A. 研究目的

人獣共通感染症の病原体 (zoonotic agent) の中には、比較的容易に伝播され、発病率、致死率が高いなどの特徴をもち、発生時にパニックを誘発するなど、社会的な影響が大きいものも少なくない。ニパウイルス (パラミクソウイルス科ヘニパウイルス属 *Nipah virus*: NiV) 感染症は、1998 年～99 年にかけてマレーシア、シンガポールで初めて発生し、ヒトに致死的な急性脳炎、ブタに主に呼吸器感染症の流行をもたらした新興の人獣共通感染症である。2001 年以降は、バングラデシュ、インドで、ほぼ毎年のように発生を繰り返している。これまでに日本国内での自然発生および、海外からの輸入症例は報告されておらず、本症を疑う症例が出現した場合、迅速に原因病原体を特定するとともに、発生の疫学的背景によっては他の宿主動物における感染状況を調べる必要がある。

一方、狂犬病は狂犬病ウイルス (ラブドウイルス科リッサウイルス属 *Rabies virus*: RV) を病原とする、古くから知られる人獣共通感染症

である。痙攣、麻痺といった神経症状を主徴とし、世界各地で毎年 5 万人以上の犠牲者を出している。わが国では、国内感染症例は 50 年以上発生していないが、2006 年 11 月に、京都、横浜において 36 年ぶりに輸入症例が報告され、2 名の方が亡くなった。RV は感染後であっても、速やかに予防的なワクチン接種を行えば発症を阻止できるが、ひとたび発症すると致死率はほぼ 100% であり、現在確実な治療法はない。このため、疑い症例から迅速に病原体を検出することが、極めて重要である。

これまで感染研の獣医科学部では、NiV および RV の迅速診断法として、遺伝子検出系 (conventional/realtime PCR) の整備を行ってきた。しかし、ゲノム (特に PCR プライマーの領域) に人為的に変異が加えられた病原体がバイオテロに使用された場合、PCR では検出できない可能性がある。このため、迅速診断系のひとつとして、PCR よりも幅広い変異に対応できる抗原検出系の整備が求められてきた。

そこで我々は、NiV-N, P, F, G 蛋白質ウサギポリクローナル抗体、RV-N 蛋白質ウサギポリクローナル抗体を用いて、抗原検出 capture ELISA の構築を行った。ともに、これまでに作製したウサギポリクローナル血清より、IgG を抽出し、捕捉用抗体および検出用標識抗体としての反応性を検討した。また NiV capture ELISA においては検体の不活化方法についても検討を行った。

B. 研究方法

1) 抗 NiV-N, P, F, G 蛋白質、抗体 RV-N ウサギポリクローナル抗体の精製

これまでに、プラスミド DNA 免疫により作製した、抗 NiV-N, P, F, G 蛋白質ウサギポリクローナル血清 8 種類(各蛋白質ごとに 2 種類ずつ) および抗 RV-N 蛋白質ウサギポリクローナル血清 1 種類から、IgG Purification Kit-G (同仁化学)を用いて、IgG を精製した(N1, N2, P1, P2, F1, F2, G3, G4 および RV-N-Ab)。方法は、キット添付のプロトコールに従った。これら 9 種類の IgG を capture ELISA における捕捉用抗体として利用した。

続いて、上記 IgG 各 200 μ g 相当から、Peroxidase Labeling Kit-NH₂ (同仁化学)を用いて、peroxidase (POD) 標識を行った(N1-POD, N2-POD, P1-POD, P2-POD, F1-POD, F2-POD, G3-POD, G4-POD および RV-N-Ab-POD)。方法は、キット添付のプロトコールに従った。これら 9 種類の IgG を capture ELISA における検出用標識抗体として利用した。

2) conventional ELISA

上記の検出用標識抗体の反応性を検討するため、不活化 NiV 抗原に対して conventional ELISA を行った。

具体的な手順は以下のとおり。

① NiV 検出 ELISA では、固相化抗原として、NiV 感染 Vero 細胞の可溶化(不活化)抗原液、非感染 Vero 細胞の可溶化抗原液の 2 種を用いた。これらを $\times 2,000$ 希釈し、96 穴プレート(Nunc Maxisorp)に、各ウェル 100 μ l ずつ加え、固相化した(4 $^{\circ}$ C、一晚)。また RV 検出 ELISA では、イヌ用狂犬病ワクチンを $\times 160$ 希釈し、同様に固相化した。② PBS-T (PBS,

0.05% Tween 20) で洗浄後、5% skim milk PBS-T で 1 時間ブロッキングした。③ 検出用標識抗体を、1% skim milk PBS-T で 2 倍ずつ階段希釈した。これらを 100 μ l/well ずつ、ブロッキング後のプレートに反応させた(37 $^{\circ}$ C、1 時間)。④ 洗浄後、 $\times 50,000$ 希釈した HRP 標識 Protein AG (Pierce) を 100 μ l 加え、反応させた(37 $^{\circ}$ C、1 時間)。⑤ 洗浄後、TMB 基質液 Sureblue (KPL) を用いて発色させた。10 分後に 47%硫酸液で反応を停止し、450nm の波長で吸光度を測定した。

3) 抗原検出 capture ELISA

上記で作製した捕捉用抗体、検出用標識抗体を用いて、capture ELISA を行った。

具体的な手順は以下のとおり。

① 捕捉用抗体を PBS で 20 μ g/ml に希釈し、96 穴プレートに各ウェル 100 μ l ずつ加え、固相化した(4 $^{\circ}$ C、一晚)②洗浄後、5% skim milk PBS-T で 1 時間ブロッキングした。③ 抗原検体を、1% skim milk PBS-T で希釈し、これらを 100 μ l/well ずつ加え、反応させた(37 $^{\circ}$ C、1 時間)。④ 洗浄後、希釈した検出用標識抗体を 100 μ l 加え、反応させた(37 $^{\circ}$ C、1 時間)。その後の発色反応は、conventional ELISA と同様とした。

4) 検体の不活化

上記の capture ELISA の手順において、③の抗原検体の反応後、洗浄を行い、以下の不活化剤を 100 μ l/well ずつ加え、反応させた(室温、10 分)。

- ・ 3.6%ホルムアルデヒド
- ・ 2.5%グルタルアルデヒド
- ・ メタノール

洗浄した後、上記の手順④へと進み、検出用標識抗体を反応させた。

(倫理面への配慮)

本研究課題では、ヒト検体あるいは実験動物を用いた実験を行っておらず、倫理面における問題はない。

C. 研究結果

1) conventional ELISA における反応性の検

討

1-1) NiV 検出 ELISA

不活化 NiV 抗原に対する conventional ELISA により、検出用標識抗体の反応性の比較を行った。その結果、全ての検出抗体について抗体濃度に依存した ELISA 値の反応曲線が得られたが、G3-, G4-POD に比べ、他の検出抗体による ELISA 値は極めて低かった (data not shown)。この原因を確かめるため、各検出抗体が由来するウサギ抗血清 (未精製) を用いて、conventional ELISA を行った。その結果、検出用標識抗体を用いた場合と、同様の反応傾向を示した (図 1) ことから、元となる抗血清中の抗体価の差が、検出用標識抗体の反応性に影響したと考えられた。これらの結果をふまえ、以降の実験には、反応性の高い G3-POD を検出用標識抗体として使用した。

1-2) RV 検出 ELISA

イヌ用狂犬病ワクチンに対する conventional ELISA により、検出用標識抗体の反応性を検討した。その結果、抗体濃度に依存した ELISA 値の反応曲線が得られ、陰性対照抗原 (BSA) に比べ、著しく高い反応性を示した (図 4) ことから、検出用標識抗体は特異的に RV 抗原を認識していると考えられた。イヌ用狂犬病ワクチンと BSA に対する反応のコントラストを考慮して、以降の capture ELISA では検出用標識抗体を $\times 400$ で使用することとした。

2) NiV capture ELISA における検出限界の確認

NiV-F/G 発現 VSV シュードタイプを階段希釈したうえで、capture ELISA の検出抗体として使用し、検出限界の確認を行った。その結果、抗原濃度に依存した ELISA 値の反応曲線が得られた。ELISA 値の threshold を 0.2 とした場合、検出限界は 1.3×10^3 IU (infectious units) と推定された (図 2)。

3) NiV capture ELISA における検体の不活化方法の検討

capture ELISA に供する検体の不活化処理法を定めるため、固相化抗体に陽性対照抗原 (NiV-F/G 発現 VSV シュードタイプ) を反応

させた後、プレートを各種不活化剤で処理し、ELISA 反応性への影響を確認した。捕捉用抗体、検出用標識抗体には G3, G3-POD を用いた。その結果、3.6%ホルムアルデヒドを用いた場合に、最も非不活化条件に近い反応性を示した (図 3)。

4) RV capture ELISA の反応性の確認

RV-N-Ab を固相化抗体に、RV-N-Ab-POD を検出用標識抗体に用いて、RV 検出 capture ELISA を行った。抗原として、イヌ用狂犬病ワクチンを $\times 20 \sim \times 20,480$ の範囲で 2 倍階段希釈して用いた。

その結果、抗原濃度に依存した ELISA 値の反応曲線が得られた (図 5)。

D. 考 察

バイオテロ疑い事例の発生時には、特異性の高い迅速診断系の選択肢を、なるべく多く確保することが不可欠である。本課題では、ゲノムに人為的な変異が加えられた病原体も、高感度に検出することを目的に、NiV および RV の抗原検出 capture ELISA の開発を行った。

捕捉抗体および検出用標識抗体には、抗 NiV-N, P, F, G 蛋白質ウサギポリクローナル血清、抗 RV-N 蛋白質ウサギポリクローナル血清より精製した IgG を用いた。ポリクローナル抗体を用いることにより、モノクローナル抗体を用いた場合よりも、(単一のエピトープ認識によらない) 幅広い抗原性状のウイルス検出が可能になると考えた。また、本血清はプラスミド DNA を高度免疫して作製したものであることから、培養細胞由来の外来蛋白質に対する抗体を含まないことから、高い特異性を示すことが期待された。

NiV の capture ELISA においては、昨年度 NiV-F, G 抗体 4 種を用いて、NiV 不活化抗原に対して感度の検討を行った結果、捕捉用抗体に G3、検出用 G3-POD を用いた場合に最も高感度であったことを報告した。そこで今年度は、F, G よりも発現量が多く、かつ抗原変異が少ない N, P 蛋白質を検出する ELISA 系の構築を試みた。ところが NiV-N1, N2, P1, P2 捕捉用抗体を用いて、固相化 NiV 不活化抗原に対して ELISA を行ったところ、反応性が著しく低い

ことが判明した。これは、図1に示すように、元となる血清の抗体価が NiV-G3/G4 血清に比べ、低かったためと考えられた。血清の抗体価が低かった理由としては、免疫に用いたプラスミド DNA や、蛋白質の種類よりも、免疫回数
の差が最も大きく影響したと推測される (NiV-F, G 抗血清では8回に対して、NiV-N, P 抗血清では5回)。そのため、今研究課題では、NiV-G3/G3-POD 抗体を用いた capture ELISA に的を絞り、検出限界の確認や反応条件の検討を行うこととした。ただし、NiV-N/P を検出する ELISA には上述のような利点があるため、将来的には高い抗体価を持つ抗 NiV-N/P 血清を再度作製したうえで、ELISA 系の構築を行うことも視野に入れる必要があるだろう。

NiV-F/G 発現シュードタイプを用いて、検出限界の確認を行った結果、 1.3×10^3 IU までのシュードタイプを検出することができた(図2)。今後、感染性ウイルスを用いて、同様に検出限界の確認を行う予定である。ただし、シュードタイプの作製時や、感染性ウイルスの増殖時には、感染性のある完全粒子の他に、エンベロープ膜とエンベロープ蛋白質だけから構成される中空粒子 (virus-like particle; VLP) が大量に産生される。F/G をターゲットにした ELISA 系ではこれらの VLP も検出対象となることから、検出限界として算出される値と、その中に含まれる完全粒子数には大きなずれがあることが推測される。このことから、検出限界の数値は、あくまでも目安程度に考えるべきであろう。

続いて、capture ELISA に供する検体の不活化法を検討するため、各種不活化剤による影響を比較した結果、抗原を反応させた後で、3.6%ホルムアルデヒドで処理した場合に、最も ELISA 値への影響が少ないことが分かった(図2)。ただしこの不活化方法は (エンベロープ上に発現している) NiV-G を検出する ELISA には有効であるが、(エンベロープに包まれている) NiV-N/P を検出する ELISA の場合には、これらの蛋白質を露出させるための界面活性剤の処理を加える必要がある。その場合、非処理対照と比べてさらに反応性が下がる可能性もある。不活化処理をすることで、微量の抗原が検出できなくなる危険性を考えるならば、

(作業者の安全が確保できるプロトコールを構築することを前提に) 検体の不活化処理を行わずに検査するという手段も検討する必要があるだろう。次年度は、豪州家畜衛生研究所との共同研究で、感染性 NiV を検体として用いて、3.6%ホルムアルデヒド不活化処理を行った場合の反応性を検討する。

一方、RV-N 検出 capture ELISA については、検出用標識抗体 RV-N-Ab-POD が、イヌ用狂犬病ワクチンに対して高い反応性を示すことが明らかになった。また、RV-N-Ab / RV-N-Ab-POD の組み合わせで capture ELISA を行った場合も、抗原濃度に依存した ELISA 値の反応曲線が得られたことから、本法は RV 検出系として大いに期待できる。ただし、NiV-N/P 検出 ELISA の項で述べたように、RV-N 検出系においては、感染性ウイルスを検体に用いた際は、N 蛋白質を露出させるための界面活性剤処理が必要となる。この処理が ELISA の感度に影響を与える可能性も十分にある。次年度は、感染性ウイルスを検体に用いたうえで、界面活性剤を用いた不活化法の検討も行う。そのうえで、本 ELISA における threshold 値を定めることとする。

E. 結論

抗 NiV-N, P, F, G 蛋白質ウサギポリクローナル抗体を用いて、NiV 抗原検出 capture ELISA 系を開発した。最も反応性が高かった抗体の組み合わせ (捕捉用抗体 G3、検出用標識抗体 G3-POD) を用いて、NiV-F/G 発現シュードタイプの検出限界を調べたところ、 1.3×10^3 IU であった。種々の不活化剤を用いて検体不活化方法の検討を行ったところ、3.6%ホルムアルデヒドを用いた場合に、最も ELISA への影響が少ないことがわかった。また、抗 RV-N 蛋白質ウサギポリクローナル抗体を用いて、RV 抗原検出 capture ELISA 系を開発した。今後、これらの方法の実用化に向けて、感染性ウイルスを用いて、反応性の確認を行う。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kaku Y, Noguchi A, Marsh GA, McEachern JA, Okutani A, Hotta K, Bazartseren B, Fukushi S, Broder CC, Yamada A, Inoue S, Wang LF. : A neutralization test for specific detection of Nipah virus antibodies using pseudotyped vesicular stomatitis virus expressing green fluorescent protein. *J Virol Methods*. 2009; 160:7-13.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
なし

図1 各ウサギ抗血清のELISA反応性の比較

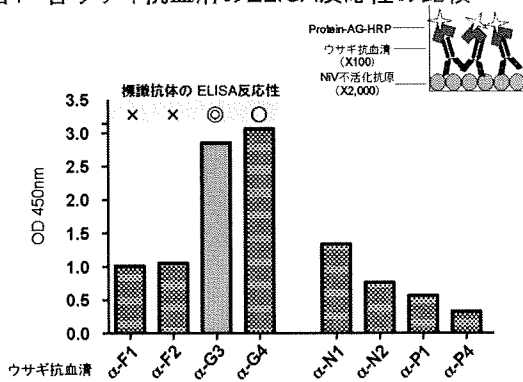


図2 シュードタイプを用いた
検出限界の測定

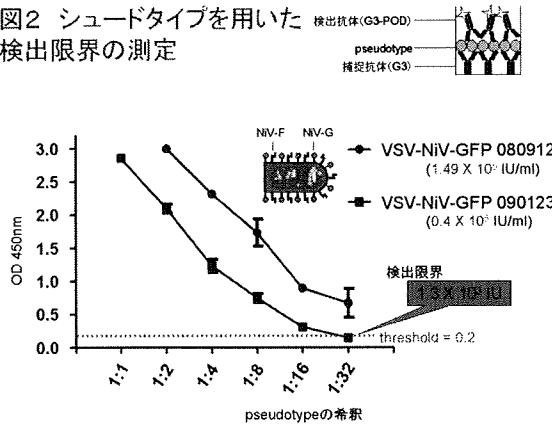


図3 NiV-F/G発現シュードタイプ 不活化の影響

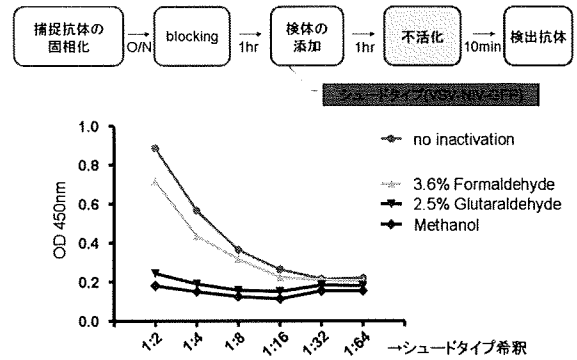


図4 POD標識RV-N抗体 反応性の検討

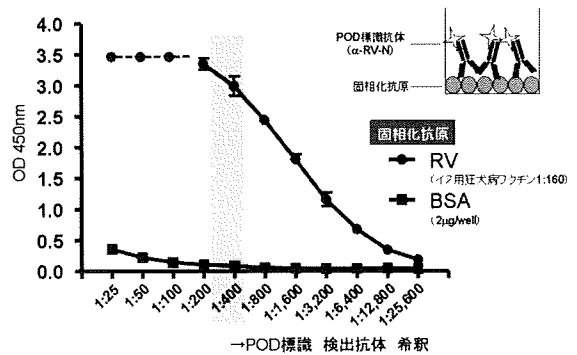
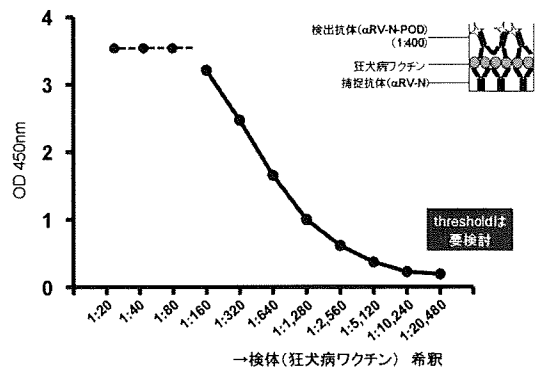


図5 RV-N capture ELISA 反応性の検討



4. 薬剤耐性を含む細菌迅速診断法の開発

—ペスト菌特異的抗体を用いたペスト菌の迅速検出系の開発—

研究分担者 高橋英之 国立感染症研究所 細菌第一部

研究要旨 バイオテロで使用される可能性が考えられるペスト菌の F1 antigen の合成ペプチドを三種合成し、それらを免疫したウサギ免疫血清を用いた間接抗体法 (Indirect Fluorescent Antibody、以下 IFA)によりペスト菌を検出する方法を検討した。ペスト菌に対してよく反応したが、ペスト菌の類縁菌である *Y. pseudotuberculosis* への交差反応も強く、ペスト菌を特異的に検出する抗体として使用不可能であると判断された。一方で、ペスト菌をウサギで免疫した抗ペスト菌ウサギ血清、それを F1 antigen を発現しないペスト菌で吸収した吸収抗ペスト菌ウサギ血清、さらに精製 F1 antigen を免疫した抗精製 F1 ウサギ血清を用いた IFA も検討し、吸収抗ペスト菌ウサギ血清及び抗精製 F1 ウサギ血清は *Y. pseudotuberculosis* 及び *Y. enterocolitica* への非常に弱い交差反応が認められたもののペスト菌に対して非常に強い蛍光像が得られ、ペスト菌を特異的に検出する抗体として直接抗体法への適用が期待された。

A. 研究目的

バイオテロリズムに使用されると想定されている微生物は、その重要度に応じてカテゴリー A,B,C に分けられている。肺ペストや腺ペストを引き起こすペスト菌は最も危険度の高いカテゴリー A に分類されている。使用される可能性のある病原体には、あらかじめ病原体の検出、診断、治療、予防に関する研究を実施しておく必要があると考えられた。現実に使用される病原体を予知することは不可能なので、現行の疾患サーベイランスと発生時対策にバイオテロに対する対策の準備を連携させることは不可欠である。従来は DNA レベルでのペスト菌の検出方法を開発してきたが、バイオテロの危険に面した場合にはあらゆる手法での検出が要求されてくると想定される。一昨年度から本研究では、ペスト菌のタンパクレベルでの検出系の確立を試みており、線毛様の構造をしてペスト菌の細胞表面に突出してペストに対する protective antigen、そしてペストの血清診断の際に使用される抗原としてよく知られている、ペスト菌の F1 antigen (図 1) に対するモノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法によるペスト菌の検出法を確立した。

本年度では市販のモノクローナル抗体ではなく、抗原を a) 生菌ペスト菌、b) ペスト菌から精製した F1 antigen を抗原としてウサギに免疫したウサギ血清、さらには c) a) のウサギ血清を F1 antigen を発現しないペスト菌で吸収した吸収ウサギ血清を用いてより多角的なペスト菌の免疫化学的検出法の確立を試みた。さらに、F1 antigen のエピトープと推測される領域のペプチ

ドを化学合成し、それらをウサギに免疫したペプチド抗体も作製して系の拡大を試みた。

B. 研究方法

1) ペスト菌のサンプルの調製

-70℃にてビーズ保存されているペスト菌を Brain-Heart Infusion 寒天培地にて 37℃、もしくは 27℃で 2~3 日間培養した。菌体は 10% のホルマリンで 1 時間不活化・固定し、固定ペスト菌を遠心により分離後 PBS に懸濁し、その一部分をスライドガラスに塗布して一時間 UV 照射してペスト菌の完全不活化を行なった。一方、メタノール及びアセトン固定の場合にはガラススライド上に 2 滴程の蒸留水を滴下し、1 µl loop のディスポーザブル白金耳で一白金耳分の菌体をプレートから接種して、スライドガラスでスメアした。ガラススライドを風乾後、メタノールもしくはアセトンを滴下し、1 分間再度風乾し、そのスライドガラスを一時間 UV 照射してペスト菌の完全不活化を行なった。

2) ペスト菌に対するウサギ血清の作製

ペスト菌 H1122 株に対するウサギ血清 (以下、抗ペスト菌ウサギ血清)、抗ペスト菌ウサギ血清を F1 antigen を発現しない株 MII40 及び YD-7 pgm⁻ で吸収したウサギ血清 (以下、吸収抗ペスト菌ウサギ血清) は 1970 年代に当部の研究員によって作製され、-70℃に保存されていたものを使用した。また、ペスト菌から精製した F1 antigen に対するウサギ血清 (以下、抗 F1 ウサギ血清) も同様に過去に在籍した研究員によって作製さ

れたものを使用した。

3) ペスト菌 F1 antigen のペプチド抗体の作製

ペスト菌 F1 antigen の全アミノ酸配列 170 アミノ酸残基のうち、76-89 残基 (TTRSTSVNFTDAAGD)、113-126 残基 (DSRDFDISPKVNGE)、157-170 残基 (GKYTDAVTVTVSNQ) に相当するペプチドを合成し、それらの混合ペプチドをアジュバントと共にウサギ二羽に免疫し、ウサギ血清 (以下、抗 F1 ペプチド抗体) #1 と #2 を得た。

4) IFA

1) で調製したガラススライド上に 500 μ l の生理食塩水 (以下 PBS) を用いて調製した 2% BSA を滴下し、室温で 30 分間ブロッキングした。その BSA 溶液を除去し、PBS で 100 倍希釈して調製したウサギ血清 (以下一次抗体) 溶液を 30 μ l 滴下し、カバーガラスをのせて CO₂ インキュベーター内 (37°C、5%CO₂) で 30 分静置する。その後、PBS で 3 回洗浄後、Alexa488 コンジュゲート抗マウス IgG 二次抗体 (Molecular Probes) を PBS で 200 倍希釈して調製した二次抗体液を 15 μ l 滴下し、カバーガラスをのせて CO₂ インキュベーター内で 1 時間静置する。PBS で 3 回洗浄後、蒸留水で洗浄し、FLUOROSHEILD (ImmunoBioScience) を 3 滴滴下してカバーガラスで封入した。そのサンプルを OLYMPUS BX51 を用いて観察し、HAMAMATSU ORCA-ER-1394 を介して画像を得た。

5) 画像の処理

4) で得られた位相差顕微鏡像や蛍光顕微鏡像は AQUA-Lite (HAMAMATSU) を用いて解析した。各画像は bmp 形式で出力し、その画像データを Adobe Photoshop CS2 にて整理した。

(倫理面への配慮)

特になし

C. 研究結果

本研究では抗ペスト菌ウサギ血清、吸収抗ペスト菌ウサギ血清及び抗 F1 ウサギ血清、そして抗 F1 ペプチド抗体を用いた間接抗体法 (Indirect Fluorescent Antibody、以下 IFA) によるペスト菌を検出する方法を検討した。

まずペスト菌の F1 antigen の合成ペプチドを抗原として作製した抗 F1 ペプチド抗体を用いてペスト菌の IFA による検出法の検討を行なった。Western blotting 法を用いて二種の抗 F1 ペプチド抗体をペスト菌の全抽出液に対する反応性を確認した結果、抗 F1 ペプチド抗体は F1 antigen の

発現が認められる 37°C 培養のペスト菌のすべての株と反応し、F1 antigen が発現しない 27°C 培養のペスト菌に対しては抗 F1 ペプチド抗体 #2 は全く反応が認められなかったが、抗 F1 ペプチド抗体 #1 は 10 kDa の F1 antigen とは異なる分子に若干の交差反応が認められた (図 2)。以上の結果から抗 F1 ペプチド抗体は IFA に適用可能であることが推測されたのでそれらの抗体を用いた IFA の系の検討を行なった。バイオテロに際して血液、喀痰、患部の切片といった臨床検体が想定される。それらは一般的な細菌検査ではスライドグラスにスメアを取り、メタノール固定、アセトン固定もしくは火炎固定にてサンプルが迅速に処理され、検査過程に移されることになる。その作業工程を踏まえ、メタノール固定、アセトン固定及びホルマリン固定処理したペスト菌 Yreka 株 (ワクチン株) の IFA 像の変化を検討した。その結果、アセトン固定及びホルマリン固定処理したサンプルに対しては蛍光像が認められたが、メタノール固定したサンプルに対しては良好な陽性の蛍光像が認められなかった (図 3)。さらに検討を繰り返した結果、ホルマリン固定サンプルと比較してアセトン固定サンプルの方が抗 F1 ペプチド抗体に安定して染色された (data not shown) ため、これ以降は抗 F1 ペプチド抗体のサンプルはアセトンにより固定処理し、さらに検討を進めた。次にペスト菌に対して特異的に反応するかをペスト菌の類縁菌である仮性結核菌 (*Y. pseudotuberculosis*)、エルシニア腸炎菌 (*Y. enterocolitica*) を用いて検証した。その結果、仮性結核菌 (*Y. pseudotuberculosis*) がペスト菌 Yreka 株と同様に抗 F1 ペプチド抗体 #2 によって染色されてしまうことが明らかとなった。同様の条件において抗 F1 ペプチド抗体 #1 も検討したが #2 と同様に *Y. pseudotuberculosis* との交差反応が認められた (data not shown)。以上、抗 F1 ペプチド抗体は Western blotting では F1 antigen の発現に依存した抗原抗体反応を示したにも関わらず、F1 antigen を発現しない *Y. pseudotuberculosis* との交差反応が出てしまう (図 4) ことから、抗 F1 ペプチド抗体はペスト菌特異的検出用の抗体としては不適であると判断された。

そこで、次に抗ペスト菌ウサギ血清、吸収抗ペスト菌ウサギ血清及び抗 F1 ウサギ血清に関して抗 F1 ペプチド抗体同様の検討を行なった。まずそれらのウサギ血清のペスト菌抗原に対する反応性を Western blotting 法により検討し、各種ウサギ血清は 27°C 培養のペスト菌に対しては F1 antigen とは異なる大きな分子量の分子と反応しているものの、37°C 培養のペスト菌と非常に良好に反応し、温度依存的な F1 antigen の発現に応じた抗原抗体反応が認められた (data not shown)。

次にサンプルの固定方法に関してはホルマリン固定処理したサンプルに対しては良好な蛍光像が認められたが、アセトン固定及びメタノール固定したサンプルに対しては良好な陽性の蛍光像が認められなかった(図5)。以上の結果からこれ以降はこれら3種の血清を適用するサンプルはすべてホルマリン固定処理を施して検討を実施した。次にペスト菌の類縁菌 *Y. pseudotuberculosis* 及び *Y. enterocolitica* との交差反応を検証したところ、いずれの血清も *Y. enterocolitica* との交差反応は認められなかったものの抗ペスト菌ウサギ血清はペスト菌と同レベルの感度で *Y. pseudotuberculosis* と交差反応を示し、ペスト菌特異的抗体としては使用出来ないと判断された(図6)。一方で、吸収抗ペスト菌ウサギ血清及び抗 F1 ウサギ血清に関しては非常に弱い *Y. pseudotuberculosis* との交差反応が認められるものの、ペスト菌に対して非常に強い反応を示した(図7、8)。また、吸収抗ペスト菌ウサギ血清と抗 F1 ウサギ血清は F1 antigen が発現している 37°C 培養のペスト菌に対してすべて良好な反応を示し、また F1 antigen が発現していない 27°C 培養のペスト菌に対しても弱いながら検出可能であった(図9、10)。以上の結果から、吸収抗ペスト菌ウサギ血清と抗 F1 ウサギ血清によるペスト菌を用いて免疫化学的な検出が可能であるということが示された。

D. 考察

バイオテロリズムでペスト菌が病原体として現実に使用される可能性は十分に考えられる。本研究ではペスト菌に対するポリクローナル抗体を作製して IFA によるタンパクレベルでのペスト菌特異的な検出系の確立を試みた。その結果、吸収抗ペスト菌ウサギ血清と抗 F1 ウサギ血清を用いた場合には F1 antigen を十分に発現しているペスト菌や発現していないペスト菌株においても検出可能である事が明らかとなった。一方で、抗 F1 ペプチド抗体や抗ペスト菌ウサギ血清は *Y. pseudotuberculosis* との強い交差反応が認められたために免疫化学的なペスト菌特異的検出に適用することは不可能であると判断された。おそらく抗 F1 ペプチド抗体の交差反応は F1 antigen の発現・構築には付随するシャペロンの存在が不可欠であり(図1)、そういう性質を持ち合わせた F1 antigen のペプチド自体も本来の立体構造をとることが出来ないために F1 antigen に対する抗体価が上がらず、*Y. pseudotuberculosis* にも存在するタンパクとの反応性を示してしまったと推測される。また抗ペスト菌ウサギ血清に関しては *Y. pseudotuberculosis* にも存在していると従来から知られているペスト菌との共通抗原に反応したことによる交差反応であると推測された。

本研究ではポリクローナル抗体の性質の検討を行ったため、一時間以内に作業が終了する直接抗体法(以下 DFA)ではなく、三時間ほど費やす IFA による検出系の確立にとどまった。次年度以降では IFA ではなく DFA の系を確立させる作業を行う予定である。

E. 結論

吸収抗ペスト菌ウサギ血清と抗 F1 ウサギ血清を用いた間接抗体法によるペスト菌の検出系を開発した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsuura M, Takahashi H, Watanabe H, Saito S, Kawahara K. : Immunomodulatory effects of *Yersinia pestis* lipopolysaccharides on human macrophages. Clin Vaccine Immunol., 17 (1): 49-55, 2010.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

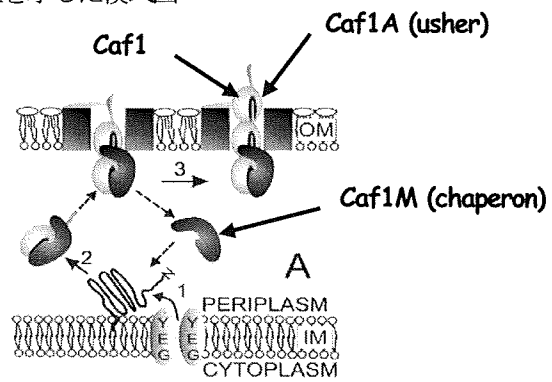
1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

図1 F1 antigen のペスト菌での所在を示した模式図



Molecular Microbiology (2002) 45(4), 983-995より抜粋

図2 Western blotting による抗 F1 ペプチド抗体の特異性の検証

