

バイオテロ対策のための備蓄されている細胞培養痘そうワクチンの備蓄等、バイオテロ病原体への検査対応、
公衆衛生との関連のあり方に関する研究
分担報告書

分担研究課題名 ウイルス性出血熱の診断法の充実化

所 属 国立感染症研究所ウイルス第一部
研究分担者 下島 昌幸

研究要旨:

ウイルス性出血熱の実験室診断法の1つとして病原体の構成蛋白質を検出する抗原検出法があり、試薬として単クローン抗体が用いられている。単クローン抗体の調製はハイブリドーマに依存し、ハイブリドーマは超低温保存されている。つまりハイブリドーマの適切な保存が継続されなければ抗体が用意できなくなり現行の抗原検出法をいずれ実施できなくなる。

そこで、抗体の供給をより安定なものにするため抗体の遺伝子化に取り組んだ。アルゼンチン出血熱の原因ウイルスであるフニンウイルスの NP 蛋白質に対する抗体のハイブリドーマについて、mRNA より抗体の可変領域の遺伝子を RT-PCR により増幅し、その塩基配列を決定した。

抗体の可変領域の配列情報が得られたため、抗体全体の遺伝子化を行なうことにより、比較的容易で長期にわたる保存、抗体の再調整が可能となる。また抗体の加工を行なうことにより、抗原検出の感度の上昇や迅速化も期待される。

A. 研究目的

ウイルス性出血熱はエボラウイルス、フニンウイルス等により引き起こされ、その病原性の高さや承認されたワクチンが無いことなどから、病原体がバイオテロの材料になる可能性がある。国立感染症研究所ウイルス第一部ではウイルス性出血熱の実験室診断法として遺伝子検出法や抗原検出法など複数の検査法を整備しており、感染症発生のみでなくバイオテロ発生にも備えている。

このうち抗原検出法は病原体の抗原を抗体を用いて検出するものである。遺伝子検出法と比べ感度が劣る点は否めないが、病原体の新しい変異種が遺伝子検出法で検出できない場合でも抗原検出法により検出できる可能性があるという特徴を持つ。

抗原検出法では、一般的に複数の抗体を試薬として用いて病原体の抗原をサンドイッチして検出するが、特異性および感度を高めるため少なくとも1つは単クローン抗体が用いられる。国立感染症研究所ウイルス第一部の抗原検出法でもそうであり、単クローン抗体は通常通りマウスを免疫して脾細胞よりハイブリドーマを作製し得られている。ハイブリドーマは細胞であるため、その保管は液体窒素や冷凍庫を用いて超低温の状態に維持しており、定期的な液体窒素の供給や冷凍庫の正常運転の継続的な監視を必要としている。この労力を要する適切な保管がなくては、単クローン抗体の継続的な供給は困難で、現行の抗原検出法はいずれ実施できなくなる。

そこで、国立感染症研究所ウイルス第一部で作製され出血熱ウイルスの抗原検出法に用いられている単クローン抗体(フニンウイルスの NP 蛋白質に対する抗体を産生するもの)について、ハイブリドーマの mRNA より抗体遺伝子の RT-PCR を行ない、抗体可変領域の塩基配列の決定を行なった。

B. 研究方法

フニンウイルス NP 蛋白質に対するマウス単クローン抗体 C11-12, C6-9, E4-2 について、各ハイブリドーマより mRNA を調製した。抗体の H 鎖、L 鎖の定常領域部分に対するプライマーを用いて可変領域をコードする部分を RT-PCR にて増幅させた。プラスミドにクローニング後、各ハイブリドーマの H/L 鎖それぞれについて塩基配列を決定した。

【倫理面への配慮】

該当なし

C. 研究結果

いずれのハイブリドーマについても抗体の H/L 鎖それぞれについて 10 クローン以上の塩基配列を決定しコンセンサス配列を得た。配列をアミノ酸に変換し、可変領域のアミノ酸配列を決定した。

D. 考察

アルゼンチン出血熱を引き起こすフニンウイルスについて、NP 蛋白質を検出する抗原検出法に用いられている試薬(単クローン抗体)の遺伝子情

報が得られた。仮にハイブリドーマの保管に問題があり生育しなくなったとしても、抗体全体の遺伝子化による容易な保存、またその遺伝子からの抗体の永続的な調製が可能となったため、現行の抗原検出法の維持が強められた。

抗体の遺伝子情報に基づく応用、例えば親和性の向上や抗原認識部位のタンデム化による検出感度の上昇、あるいは蛍光標識による検出の迅速化など、抗原検出法の改良も実施可能となった。

E. 結論

フニンウイルスの抗原検出法に用いられている単クローン抗体の可変領域の配列情報を得た。

F. 危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

