

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460661

研究課題名(和文) 合成ペプチドを用いたHHV-6A、HHV-6B特異抗体測定法の開発

研究課題名(英文) Development of a method for measuring HHV-6A and HHV-6B specific antibodies using synthetic peptides

研究代表者

東本 祐紀 (Yuki, Higashimoto)

藤田保健衛生大学・医学部・研究員

研究者番号：20569701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：HHV-6Aの初感染臨床像、血清疫学はともに不明なままである。潜伏感染するヘルペスウイルス群の特性から、種特異的血清学的検査法の確立が必須である。そこで、種特異的合成ペプチドを用いたELISA法による抗体測定系を確立することを目的とした。

今回の我々の結果より、HHV-6A合成ペプチドは7種類の中から優位な結果を得ることが出来なかった。HHV-6BにおいてはHHV-6B 1ペプチドが最も良い結果を得たが、突発疹を診断するには物足りない結果であった。

研究成果の概要(英文)：The clinical feature and seroepidemiology of HHV-6A remain unclear. Establishment of a species-specific serological test method is indispensable from the characteristics of the latent infectious herpes virus group. Therefore, we aimed to establish an antibody measurement system by ELISA using species-specific synthetic peptides. Based on our results of this time, we could not obtain superior results from seven of the HHV-6A synthetic peptides. In HHV-6B, the HHV-6B 1 synthetic peptide gave the best results but it was unsatisfactory for diagnosing exanthema subitum.

研究分野：臨床検査学

キーワード：HHV-6A HHV-6B ELISA 合成ペプチド 抗体測定法

1. 研究開始当初の背景

HHV-6 は、遺伝子、蛋白レベルの解析結果を基に、現在 2 種類の種 (HHV-6A と HHV-6B) に分けられている。HHV-6B は小児の一般的な熱性発疹症である突発性発疹 (突発疹: ES) の起因ウイルスであることが明らかになっている。一方、HHV-6A に関しては、初感染臨床像、血清疫学はともにも不明なままである。

HHV-6A は polymerase chain reaction (PCR) 法をはじめとした核酸診断法により、主に中枢神経系疾患を中心とした難治性疾患への関与が示唆されている。さらに末梢血単核球や唾液を用いた PCR 法による解析の結果、HHV-6A 感染症には民族的要因あるいは地域的要因が関わっていることも示唆されている。

潜伏感染するヘルペスウイルス群の特性から、2 種類の種を区別する研究の最大の問題は、潜伏感染部位である被験者末梢血単核球や唾液を用いた PCR 法の解析結果が、必ずしも血清疫学を反映しない点にある。よって、HHV-6A 感染症の全貌を明らかにするためには、種特異的血清学的検査法の確立が必須である。

我々はこれまで種特異的な抗体測定法を目指し、イムノプロット法を用いてウイルス特異的な発現蛋白が、各ウイルス特異抗体と反応することを証明した (*J Clin Microbiol.* 2012 50:1245-51)。

2. 研究の目的

発現蛋白を用いた血清疫学を行うためには、多数の検体解析が可能な酵素抗体法 (ELISA) への移行が不可欠であるが、我々が作成した発現蛋白は精製過程に問題があり ELISA 用抗原として用いることはできなかった。よってこの問題を解決するため、合成ペプチドを用いた ELISA 法作成を着想した。そのために、本研究では HHV-6 感染時に宿主免疫の標的となり、且つ両種間で遺伝子ならびにアミノ酸レベルで相同性の低い領域において複数の合成ペプチドを作成し、ELISA 法による特異抗体測定系を確立、最終的に HHV-6A の疫学解析、初感染臨床像の解明を目指す。

3. 研究の方法

宿主免疫の標的となり、且つ両種間で遺伝子ならびにアミノ酸レベルで相同性の低い U11 遺伝子領域を選択する。この領域は、前述のように組換え蛋白を用いた実験で、HHV-6 種特異的抗体を検出可能なことが明らかとなっている (*J Clin Microbiol.* 2012 50:1245-51)。本研究では U11 遺伝子領域内に種特異的な合成ペプチドを作製し、HHV-6A、HHV-6B 感染患者血清を用いて ELISA 法の基礎検討を行った。

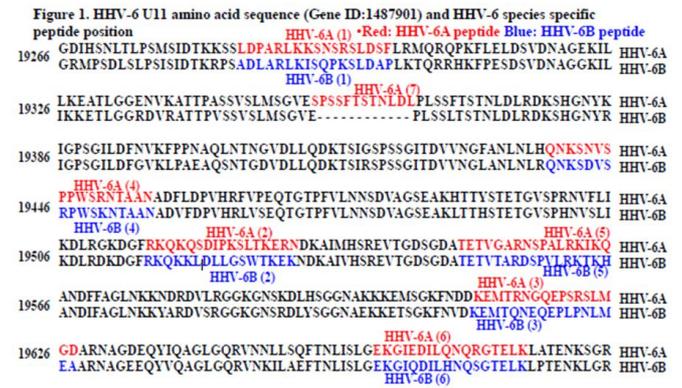
基礎検討後、HHV-6B に特異的な反応が確認できたペプチド 2 種類を選択した。

HHV-6B 感染患者血清を使用して HHV-6A (U1102 株) 感染細胞、HHV-6B (Z29 株) 感染細胞を抗原とした間接蛍光抗体法 (IFA 法) による抗体価測定、市販の HHV-6 IgG ELISA 法 (ABi: purified viral lysate (HHV-6B, strain Z-29) as the source of antigen)、合成ペプチドを用いた 2 種類の ELISA 法の結果を比較した。

4. 研究成果

HHV-6 U11 遺伝子領域から、HHV-6A 特異的合成ペプチド 7 種類、HHV-6B 特異的合成ペプチド 6 種類、HHV-6A、B 共通合成ペプチド 3 種類を作成した (図 1)。

図 1. HHV-6A, B 種特異的ペプチド



合成ペプチドを ELISA プレートに固相した後、ELISA 法の基礎検討として、突発疹ペア血清 (3 ペア 6 検体) および HHV-6A 感染患者血清を用いて血清希釈濃度 (100 倍、500 倍、1000 倍の 3 濃度) と、1 次抗体反応時間 (3 分、30 分、60 分の 3 種類) を確認した。検討の結果、血清は 100 倍希釈、1 次抗体反応時間は 60 分とした。

基礎検討後、HHV-6A 感染血清として、chromosomally integrated HHV-6A 患者血清 (n = 2) 慢性疲労症候群患者血清 (n = 1) 造血幹細胞移植患者 (n = 2) を、HHV-6B 感染血清として突発疹ペア血清 (12 ペア、n = 24) 薬剤性過敏症候群 (DIHS) 患者血清 (5 ペア、n = 10) を使用して合成ペプチドの反応性を確認した。その結果、HHV-6B の合成ペプチドにおいては、吸光度の OD 値が突発疹ペア血清で反応性の高かった 2 種類へ絞り込んだ (表 1)。

表 1. 突発疹ペア血清における吸光度差 (OD 値) の比較

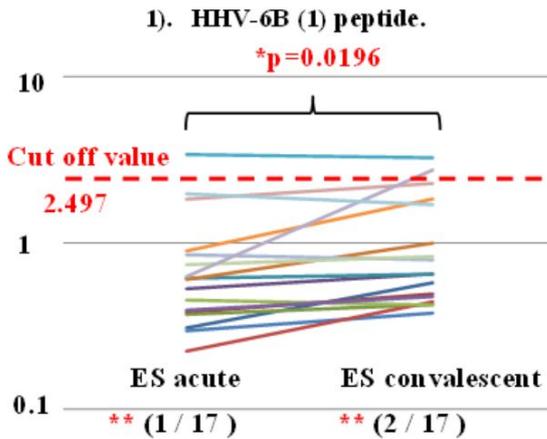
ペプチド名	acute	convalescent	p値
HHV-6B 1	0.332 ± 0.16	0.447 ± 0.21	<0.0001
HHV-6B 2	0.368 ± 0.17	0.456 ± 0.24	<0.0001

続いて臨床検体を追加測定し、突発疹ペア血清 (17 ペア、n = 34) 薬剤性過敏症候群患者血清 (5 ペア、n = 10) で、合成

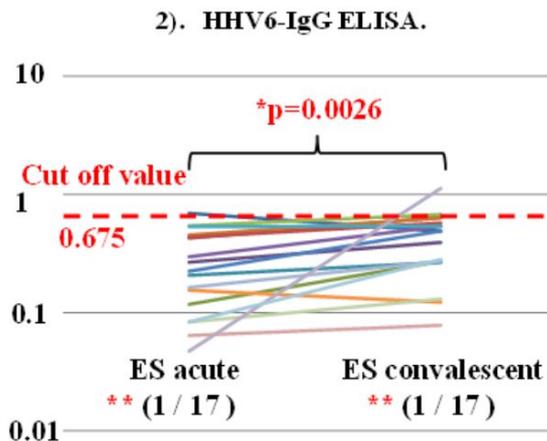
ペプチドを用いた2種類のELISA法の結果、市販のHHV-6 IgG ELISA法(ABi: purified viral lysate (HHV-6B, strain Z-29) as the source of antigen)、HHV-6A (U1102株)感染細胞、HHV-6B (Z29株)感染細胞を抗原とした間接蛍光抗体法による抗体価測定を比較した(図2)。

図2 ペア血清を用いたOD値の比較

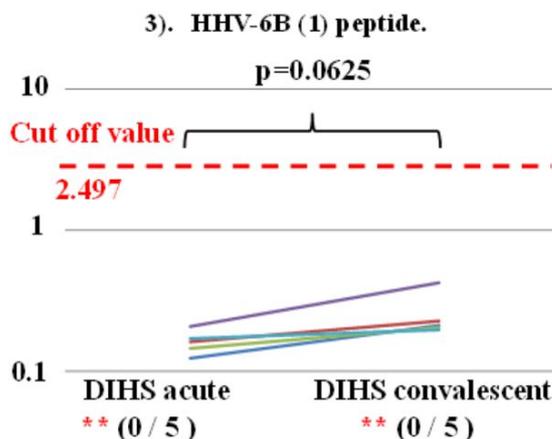
1) HHV-6B 1 ペプチドにおける突発疹ペア血清の比較



2) 市販のHHV-6 IgG ELISA法における突発疹ペア血清の比較



3) HHV-6B 1 ペプチドにおける薬剤性過敏症症候群(DIHS)ペア血清の比較



4) 全22例によるHHV-6B 1ペプチドによるELISA法、市販のHHV-6 IgG ELISA法、IFA法の3法での比較

No.	sampling days	OD values		IFA titer	
		6B (1) peptide	commercially	6A	6B
1	4	0.308	0.690	<8	<8
	20	0.575	0.487	>256	>256
2	3	0.382	0.425	<8	<8
	17	0.492	0.639	32	>256
3	4	0.371	0.117	8	<8
	18	0.426	0.271	128	>256
4	4	0.529	0.266	8	8
	12	0.649	0.391	>256	>256
5	0	0.613	0.206	8	<8
	12	0.648	0.265	128	>256
6	2	0.602	0.453	8	<8
	18	0.998	0.631	128	>256
7	3	0.296	0.223	8	<8
	17	0.378	0.488	128	>256
8	2	0.223	0.434	8	<8
	12	0.442	0.570	128	>256
9	2	0.453	0.542	8	<8
	12	0.422	0.675	128	>256
10	3	0.394	0.296	8	<8
	15	0.476	0.536	128	>256
11	5	3.401	0.533	16	16
	11	3.250	0.540	128	>256
12	2	0.894	0.154	<8	<8
	9	1.838	0.122	16	64
13	7	0.849	0.163	<8	8
	13	0.790	0.272	>256	>256
14	1	1.831	0.064	<8	<8
	8	2.276	0.078	16	32
15	2	0.739	0.083	8	8
	16	0.828	0.130	128	>256
16	0	0.628	0.047	<8	<8
	12	2.742	1.124	>256	>256
17	4	1.974	0.083	<8	<8
	15	1.698	0.281	>256	>256
18	12	0.123	0.442	<8	8
	37	0.212	2.767	256	>256
19	9	0.161	0.136	<8	8
	29	0.227	0.784	16	64
20	7	0.145	0.079	<8	8
	43	0.204	0.328	16	128
21	19	0.209	0.226	<8	16
	45	0.423	2.746	128	>256
22	21	0.170	0.088	<8	8
	38	0.195	0.353	32	128

以上まとめると、HHV-6A 合成ペプチドは7種類の中から優位な結果を得ることが出来なかった。HHV-6BにおいてはHHV-6B 1ペプチドが最も良い結果を得たが、突発疹を診断するには物足りない結果であった。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 15件)

1. Roseolovirus-associated encephalitis in immunocompetent and

- immunocompromised individuals.
Ongrádi J, Ablashi DV, Yoshikawa T, Stercz B, Ogata M. J Neurovirol. 査読有, Epub ahead of print, 2016.
2. Cycling probe-based real-time PCR for the detection of Human herpesvirus 6A and B. Ihira M, Yamaki A, Kato Y, Higashimoto Y, Kawamura Y, Yoshikawa T. J Med Virol. 査読有, 88(9):1628-35. doi: 10.1002/jmv.24513. Epub 2016.
 3. A simple cytogenetic method to detect chromosomally integrated human herpesvirus-6. Ohye T, Kawamura Y, Inagaki H, Yoshikawa A, Ihira M, Yoshikawa T, Kurahashi H. J Virol Methods. 査読有, 228:74-8. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.11.001. Epub 2016.
 4. Virological analysis of inherited chromosomally integrated human herpesvirus-6 in three hematopoietic stem cell transplant patients. Miura H, Kawamura Y, Kudo K, Ihira M, Ohye T, Kurahashi H, Kawashima N, Miyamura K, Yoshida N, Kato K, Takahashi Y, Kojima S, Yoshikawa T. Transpl Infect Dis. 査読有, Epub ahead of print.2015.
 5. Three infants with rotavirus gastroenteritis complicated by severe gastrointestinal bleeding. Kawamura Y, Miura H, Mori Y, Sugata K, Nakajima Y, Yamamoto Y, Morooka M, Tsuge I, Yoshikawa A, Taniguchi K, Yoshikawa T. J Med Virol. 査読有, Epub ahead of print, 2015.
 6. Pathogenesis of Severe Neutropenia in Patients with Primary Human Herpesvirus 6B Infection. Miura H, Kawamura Y, Ozeki E, Ihira M, Ohashi M, Yoshikawa T. Pediatr Infect Dis J. 査読有,34(9),1003-7,2015
 7. Pathogenic Role of Human Herpesvirus 6B Infection in Mesial Temporal Lobe Epilepsy. Kawamura Y, Nakayama A, Kato T, Miura H, Ishihara N, Ihira M, Takahashi Y, Matsuda K, Yoshikawa T. J Infect Dis. 査読有, 212(7), 1014-1021, 2015.
 8. Analysis of ganciclovir-resistant human herpesvirus 6B clinical isolates using quenching probe PCR methodology. Hiramatsu H, Suzuki R, Yamada S, Ihira M, Isegawa Y, Kawamura Y, Matsuoka E, Miura H, Yoshikawa T. Antimicrob Agents Chemother. 査読有, 59(5), 2618-24, 2015.
 9. The kinetics of urinary shedding of BK virus in children with renal disease. Yamamoto Y, Morooka M, Ihira M, Yoshikawa T. Microbiol Immunol. 査読有, 59(1),37-42,2015.
 10. Dual roles for the telomeric repeats in chromosomally integrated human herpesvirus-6. Ohye T, Inagaki H, Ihira M, Higashimoto Y, Kato K, Oikawa J, Yagasaki H, Niizuma T, Takahashi Y, Kojima S, Yoshikawa T, Kurahashi H. Sci Rep. 査読有, doi: 10.1038/srep04559, 2014.
 11. Direct detection of human herpesvirus 6B by the LAMP method using newly developed dry-reagents. Yoshikawa T, Matsuo T, Kawamura Y, Ohashi M, Yonekawa T, Kanda H, Notomi T, Ihira M. J Virol Methods. 査読有, doi: 10.1016/j.jviromet.2014.02.017. Epub ahead of print. 2014.
 12. Copy numbers of telomeric repeat sequences of human herpesvirus 6B in clinical isolates: possibility of mixed infections. Kato Y, Ihira M, Umeda M, Higashimoto Y, Kawamura Y, Ohashi M, Ishi J, Yoshikawa T. J Clin Microbiol. 査読有, 52(2):419-24, 2014.
 13. Virus specific cell-mediated immunity may play a role in controlling reactivated human herpesvirus 6B in patients under measles induced immunosuppression. Kumagai T, Yoshikawa T, Shiraki K, Yoshida M, Nakayama T, Ihira M, Asano Y. J Med Virol. 査読有, 86(4):658-65. 2014
 14. Cytokine and chemokine responses in the blood and cerebrospinal fluid of patients with human herpesvirus 6B-associated acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. Kawamura Y, Yamazaki Y, Ohashi M, Ihira M, Yoshikawa T. J Med Virol. 査読有, 86(3):512-8. 2014.
 15. Nationwide survey of rotavirus-associated encephalopathy and sudden unexpected death in Japan. Kawamura Y, Ohashi M, Ihira M, Hashimoto S, Taniguchi K, Yoshikawa T. Brain Dev. 査読有, 36(7):601-7. 2014.
- 〔学会発表〕(計 0件)
特記すべきことなし。
- 〔図書〕(計 0件)
特記すべきことなし。
- 〔産業財産権〕
特記すべきことなし。
- 出願状況(計 0件)
特記すべきことなし。
- 取得状況(計 0件)

特記すべきことなし。

〔その他〕

特記すべきことなし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東本 祐紀 (HIGASHIMOTO, Yuki)
藤田保健衛生大学・医学系研究科・研究員
研究者番号：20569701

(2) 研究分担者

吉川 哲史 (YOSHIKAWA, Tetsushi)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号：80288472

井平 勝 (HIRA, Masaru)
藤田保健衛生大学・医療科学部・教授
研究者番号：10290165

榎本 喜彦 (ENOMOTO, Yoshihiko)
藤田保健衛生大学・医学系研究科・研究員
研究者番号：00387713

杉山 博子 (SUGIYAMA, Hiroko)
藤田保健衛生大学・医学系研究科・研究員
研究者番号：10387714

加藤 友理 (KATO, Yuri)
藤田保健衛生大学・医学系研究科・研究員
研究者番号：70726968

(3) 連携研究者

なし。

(4) 研究協力者

なし。