

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860311

研究課題名(和文) 標的部位特異的な抗体を用いた鳥インフルエンザA(H7N9)迅速診断系の構築

研究課題名(英文) Development of monoclonal antibodies specific for H7 HA and their application to rapid detection of influenza A/H7N9 virus

研究代表者

高橋 仁 (Takahashi, Hitoshi)

国立感染症研究所・インフルエンザウイルス研究センター・主任研究官

研究者番号：60555762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：今後、大流行を引き起こす可能性のあるA(H7N9)インフルエンザの高感度・特異的な迅速診断系を構築することを目的とした研究を行った。A(H7N9)ウイルスのHAアミノ酸配列の比較から、免疫原となるペプチド配列を決定し、これを元にモノクローナル抗体の作製を行った。得られた抗体はH7 HA蛋白質を特異的に認識し、他の亜型のHA蛋白質には反応しないことが示された。この抗体を用いたサンドイッチELISA系の構築を試みたところ、H7 HA蛋白質に対して反応性を示す抗体の組み合わせが得られた。

研究成果の概要(英文)：The avian influenza A/H7N9 virus caused first human infection in early 2013 in China. The H7N9 virus infection is sporadically occurring in humans and has the potential to cause serious future pandemic. To detect H7N9 virus sensitively and specifically by immunoassay, we produced monoclonal antibodies (mAbs) recognizing linear epitopes specific for H7 hemagglutinin (HA). When two peptides having conserved to linear epitopes of H7 HA immunized to mice, some mAb clones were obtained by the screening ELISA. These mAbs were reacted with H7 virus antigen specifically, not with other subtype virus antigens. The combination of these mAbs was specific for H7N9 virus and reacted most efficiently in sandwich ELISA.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザ 診断 H7N9

1. 研究開始当初の背景

2013年3月に中国で確認された鳥インフルエンザ A(H7N9)のヒトへの発症は高い致死性を有し、今後大流行を引き起こす危険性がある。そのため、A(H7N9)インフルエンザの迅速診断系を構築しておくことは、感染拡大を防ぎ適切な治療選択を行う上でも重要である。現在市販されている迅速診断キットでは H7 等の HA 亜型判別まではできず、HA 亜型判別を行うためには各亜型特異的な抗体が必要となる。しかしながら、A(H7N9)ウイルスは免疫原性が低いという報告もあり、従来ウイルス抗原を用いた抗体作製法では H7 HA 特異的な抗体が得にくいことが考えられた。そこで、本研究では標的部位特異的なペプチドを用いた抗体作製法を用いることにより H7 HA 特異的な抗体を作製し、これを用いた高感度・特異的な A(H7N9)インフルエンザ迅速診断系の構築を行った。

2. 研究の目的

本研究では A(H7N9)ウイルスの HA 蛋白質の標的部位特異的なモノクローナル抗体の作製と、これを用いた高感度・特異的な A(H7N9)インフルエンザ迅速診断系の構築を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

H7 HA 特異的なモノクローナル抗体を得るために、免疫原となるペプチド配列の決定とモノクローナル抗体クローンの作製、ELISA 法による H7 HA 蛋白質を認識するモノクローナル抗体のスクリーニング、より効果的に抗体を反応させるためにウイルス抗原への界面活性剤処理条件の検討を実施した。

免疫原となるペプチド配列の決定

インフルエンザウイルス遺伝子データベースに登録されている、ヒトに感染し分離された A(H7N9)ウイルスの HA 遺伝子配列を抽出し配列比較を行った。その中で H7 HA 特異的で保存性の高い領域を選び出し、且つ HA 蛋白質の立体構造予測から表面上に位置する部位を選択した。さらに、より確実に H7 HA 特異的な抗体を得るために、抗体作製のための効果的なペプチド配列の選択法として報告されている (1)疎水性と親水性両方のアミノ酸を含む領域、(2)二次構造予測からループ構造や シート構造を含む領域、(3)糖鎖付加部位やリン酸化部位を避けた領域を選択することを考慮に入れて 2 つのペプチド配列の決定を行った。

H7 HA 特異的なモノクローナル抗体の作製で決定した配列のペプチド合成を行い、

合成したペプチドをマウスに免疫し、そこから得られる抗体産生細胞と骨髄腫細胞を融合させ自律増殖能を持たせたハイブリドーマを作製した。その後、得られたハイブリドーマのクローニングを行い、各クローンの培養上清中に含まれるモノクローナル抗体のスクリーニングを行った。スクリーニングは示すように、A(H7N9)ウイルスを抗原とした ELISA 法にて実施した。

ELISA 法による H7 HA 特異的なモノクローナル抗体のスクリーニング

A(H7N9)ウイルスをリバースジェネティクス法で弱毒化させたウイルス株を抗原として、得られた抗体クローンが H7 HA 蛋白質を認識するかのスクリーニングを ELISA 法により実施した。スクリーニングにより得られた抗体が H7 HA 亜型特異的であるかを確認するために、他の HA 亜型のウイルス抗原に対しても ELISA 試験を実施し、H7 HA 亜型特異性の有無について確認を行った。

より効果的に抗体を反応させるためのウイルス抗原への界面活性剤処理条件の検討

本研究はペプチド抗原を用いて免疫を行うため、得られる抗体は元の免疫原蛋白質の立体構造を認識できない可能性もあり、通常の抗体スクリーニングでは H7 HA 蛋白質を認識する抗体が得にくいことも考えられる。そこで、ウイルス抗原を種々の界面活性剤で処理し、H7 HA 蛋白質との反応性を高めることのできる界面活性剤条件の検討を ELISA 法により行った。

4. 研究成果

A(H7N9)ウイルスの HA アミノ酸配列の比較を行い、H7 HA 特異的で保存性の高い領域を選び出し、且つ HA 蛋白質の立体構造予測から表面上に位置する部位を選択し、免疫原となるペプチド配列を決定した。この合成したペプチドをマウスに免疫し、そこから作製したハイブリドーマ細胞の培養上清を用いて ELISA による一次スクリーニングを行った結果、H7 HA 蛋白質を認識するモノクローナル抗体クローンが得られた。得られた抗体クローンは H7 HA 蛋白質を認識し、H1pdm、H3 および H5 HA 蛋白質には反応しないことが示された。この中から反応性の高い抗体クローンを選択し、そのハイブリドーマ細胞を用いてマウス腹水作製および抗体精製を行った。得られた精製抗体を標識し、サンドイッチ ELISA 系の構築を試みたところ、H7 HA 蛋白質に対して反応性を示す抗体の組み合わせが得られた。しかしながら、そのような抗体の組み合わせが得られたものの、その反応性は低いものであった。そこで、ウイルス抗原の界面活性剤処理条件の検討を行い、サンド

イッチ ELISA 系での反応性向上を試みた。その結果、今まで行っていた条件よりも 7~10 倍程度反応性の高くなる界面活性剤とその至適濃度を見出すことができた。この条件におけるサンドイッチ ELISA 系では、より高感度に H7 HA 蛋白質を認識し、H1pdm、H3 および H5 HA 蛋白質には反応しないことが示された。また、今回作製したモノクローナル抗体はウイルス中和活性を持たないことも示された。

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2件)

Tetsu Sugimura, Hitoshi Takahashi, Kenta Jounai, Konomi Ohshio, Masaya Kanayama, Kyoko Tazumi, Yoko Tanihata, Yutaka Miura, Daisuke Fujiwara and Norio Yamamoto.

Effects of oral intake of plasmacytoid dendritic cells-stimulative lactic acid bacterial strain on pathogenesis of influenza-like illness and immunological response to influenza virus.

British Journal of Nutrition, 114(5):727-733, 2015

Ikuyo Takayama, Hitoshi Takahashi, Mina Nakauchi, Shiho Nagata, Masato Tashiro, Tsutomu Kageyama.

Development of a diagnostic system for novel influenza A(H7N9) virus using real-time RT-PCR assay in Japan.

Japanese Journal of Infectious Diseases, 68(2):113-118, 2015

[学会発表](計5件)

高橋仁, 中内美名, 永田志保, 小田切孝人, 影山努: H7 HA 特異的なモノクローナル抗体の作製と H7N9 インフルエンザ迅速診断系構築の検討
第 63 回日本ウイルス学会学術集会
福岡 2015 年 11 月

原田勇一, 高橋仁, 浜本いつき, 浅沼秀樹, 許斐奈美, 小田切孝人, 信澤枝里: 季節性培養細胞インフルエンザワクチン製造開発への取り組み(製造株作製用ウイルスの分離)

第 63 回日本ウイルス学会学術集会
福岡 2015 年 11 月

高山郁代, 仙波晶平, 中内美名, 高橋仁,

白戸憲也, 米川俊広, 大場邦弘, 松山州徳, 瀬川雄司, 小田切孝人, 影山努: RT-LAMP 法による多項目同時遺伝子検査法を用いたインフルエンザウイルスおよび MERS コロナウイルスを含む呼吸器感染症ウイルスの同定

第 63 回日本ウイルス学会学術集会
福岡 2015 年 11 月

久保英幸, 改田 厚, 入谷展弘, 山元誠司, 高山郁代, 中内美名, 高橋仁, 影山努: マイクロ流路チップ - Direct RT-LAMP 法を用いた呼吸器病原ウイルス遺伝子検出

第 63 回日本ウイルス学会学術集会
福岡 2015 年 11 月

Hitoshi Takahashi, Mina Nakauchi, Shiho Nagata, Takato Odagiri, Tsutomu Kageyama. Development of monoclonal antibodies specific for H7 HA and their application to rapid detection of influenza A/H7N9 virus.

16th Negative Strand Virus Meeting.
Siena, Italy. June 2015.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 仁 (TAKAHASHI, Hitoshi)
国立感染症研究所・インフルエンザウイルス研究センター・主任研究官
研究者番号: 60555762

(2)研究分担者
なし

研究者番号：

(3)連携研究者
なし

研究者番号：