

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 16 日現在

機関番号：84407

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659171

研究課題名（和文） 新型インフルエンザに対する迅速診断法の開発

研究課題名（英文） Development of a rapid diagnosis test against H5N1 influenza viruses

研究代表者

西村 公志（NISHIMURA HIROSHI）

大阪府立公衆衛生研究所・企画総務部・主任研究員

研究者番号：80250299

研究成果の概要（和文）： H5 亜型のトリインフルエンザウイルス(AIV)を比較的高感度で検出する発光系免疫抗体法を作製した。この診断法はエジプトで 2007-2009 年に鳥類から分離された 10 株の H5N1 ウイルスのうち 9 株に反応した。また、H5N1, H5N2, H5N3, H5N9 亜型それぞれ 1 株には反応を認めたが、H5 亜型以外のトリ IV9 亜型やヒト IV には反応せず、H5 亜型特異的に反応し、検出感度も市販の診断キットの感度と同等で臨床応用可能な性能であった。

研究成果の概要（英文）：

We have developed a rapid diagnosis test detecting specifically the H5 subtype of influenza virus (IV) at high sensitivity. This rapid test could be applied for clinical trial to detect the H5N1 virus.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	0	1,200,000
2010 年度	900,000	0	900,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	270,000	3,270,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学、公衆衛生学・健康科学

キーワード：新型インフルエンザ、迅速診断、免疫クロマト法

1. 研究開始当初の背景

H5（H7も含め）亜型高病原性トリイ

ンフルエンザウイルスに対する迅速診断法の確立は、世界的にも焦眉の急である。国

内では2008年国立国際医療センターがH5亜型を診断する免疫クロマト法を開発したが、米国、中国、シンガポールでは多額の国家予算により開発が進んでおり、日本では国立感染症研究所に億単位の資金が投入されたが、いまだ成功しておらず、競争は激しい。私どもは2007年すべてのHA亜型の鳥インフルエンザウイルスのみを10分で検出可能な免疫クロマト法（ヒトインフルエンザウイルスには反応しない）を開発した（特許申請中）。本方法の検出感度は、市販のヒトインフルエンザ検出キットとはほぼ同等の高感度を有しており、現在臨床試験を行うべく模索している。しかし、新型インフルエンザウイルスの出現機構には2種類あり、1）現在のH5ウイルスが徐々にヒト型に変異し新型となる（スペインかぜ） 2）ブタの体内でトリとヒトのインフルエンザウイルスが遺伝子交雑を起こしハイブリッドウイルスとして新型となる（香港かぜ、アジアかぜ）、双方の機序による出現が危惧されている。本方法では1）の場合、検出可能であるが、2）には対応不可能である。

2. 研究の目的

2008年現在、H5N1亜型による高病原性トリインフルエンザウイルスがアジアに定着し、散発的流行を起こし、時に人に感染し依然として致死率は高い（2008年は77%）。WHOは、このウイルスがより人での伝播性を獲得し、新型インフルエンザとなり世界規模での大流行を起こす可能性が高まっていると警告しており、各国においてその対策は焦眉の急である。H5亜型の新型インフルエンザが発生した場合、危機管理対策上、感染伝播阻止のため迅速にH5型を診断する必要がある。現在、ヒトインフルエンザの診断に用いられている迅速診断法はA型かB型かを鑑別する方法であり、新型か従来型かを現行の診断キットで鑑別することは不可能である。現在PCR法による診断に要する時間は、検査施

設へ検体を搬入後、早くて半日（約6時間）を要し、ウイルス分離法では2-3日を要する。そこで、本研究では、より迅速に10分以内でH5亜型（さらに危惧されるH7亜型を含める）を特異的に、かつ高感度に型別診断することが可能な免疫クロマト法を確立し、迅速な感染伝播防止対策を可能にすることを目的とする。

3. 研究の方法

1) 抗H5亜型HAモノクローナル抗体（MAb）を用いた迅速診断法の作製

現在作製し保持している複数のH5特異的MAb抗体を用いて光発光免疫抗体法を作製する。具体的にはガラスビーズ担体に1種類のMAbを結合させ、抗原反応後異なる種類の酵素標識したMAbを反応させ、酵素反応により発光する基質を加え発光量を定量的に測定する。カットオフ値は健常人の鼻腔スワブを用いて定量し、平均値+3SDをカットオフ値とした。

2) 本迅速診断法の特異性の評価

本診断法の特異性を評価するために、各種H5亜型IV、H5亜型以外のIVや他の呼吸器ウイルス、細菌に対する反応性を確認し特異性を検討する。また、健常人の正常鼻腔スワブに対して疑陽性反応がないことを確認し、性能を評価する。

3) H5N1 AIVに対する反応性の評価

H5N1 AIVに対する最小検出感度はA/duck/Egypt/D1Br12/2007（H5N1）を用いて検討する。感度が期待以上に向上しない場合は、発光系の増感法の改良を試み、また、より高結合性の抗体を作製する。市販のヒトインフルエンザウイルス検出キットと同等かそれ以上の感度を得ることを目標とする。

4. 研究成果

1) 抗H5亜型HAモノクローナル抗体を用いた迅速診断法の作製

作製、保存していた複数の抗H5亜型HAモノクローナル抗体を用いて、サンドイッチ法による比較的高感度な光発光免疫抗体検出法を作製した。その中で最も感度良くH5N9型のトリインフルエンザウイルスに反応する抗体の組み合わせを特定できた。さらに感度を向上させるため、抗H5亜型HAモノクローナル抗体を検索したところ、国立感染症研究所が所有する抗体を用いた場合に、より検出感度が向上し、現在ヒトインフルエンザに際して臨床に应用されている検出法の検出感度よりもさらに10倍感度の高い検出法であることが判明した。

2) 本迅速診断法の特異性の評価

H5亜型についてはH5N1, H5N2, H5N3, H5N9亜型それぞれ1株には反応を認めた。一方、ヒトインフルエンザウイルス20株(野生株およびワクチン株)には反応せず、また、H5亜型以外の亜型のトリインフルエンザウイルスにも反応を認めなかった。

しかし例外として、H7N2亜型1株に反応を認めた。

IV以外の呼吸器ウイルス10属20株と呼吸器に感染する細菌類10種類には反応しなかった。

3) H5N1 AIVに対する反応性の評価

エジプトで2007-2009年に鳥類から分離された10株のH5N1ウイルスに対する反応性を検討した。その結果、9株(4種の亜系統(A-D)を含む、下表参照)に反応したが、2009年に鶏から分離された1株には反応しなかった。反応しなかった株は4種の亜系

統のうち亜系統Cに属する株chicken/Egypt/RIMD29-3/2009 (H5N1)(C亜系統)であった。エジプトにおいてH5N1ウイルスに感染した患者から高頻度に分離されるA, B亜系統の2株には反応した。

表1.

A/chicken/Egypt/RIMD1-5/2008 (H5N1)
A/chicken/Egypt/RIMD5-3/2008 (H5N1)
A/chicken/Egypt/RIMD8-14/2008 (H5N1)
A/duck/Egypt/D1Br12/2007 (H5N1)
A/chicken/Egypt/RIMD12-3/2008 (H5N1)
A/Egypt/N02039/2009 (H5N1)
A/chicken/Egypt/RIMD28-1/2009 (H5N1)
A/chicken/Egypt/RIMD4-3/2008 (H5N1)
A/chicken/Egypt/RIMD11-1/2008 (H5N1)

本診断法の検出感度の評価はA/duck/Egypt/D1Br12/2007 (H5N1)を用いて行った。その結果1/8HAUが最小検出限界であった。

4) 特許申請状況

本診断法に対して特許を申請した(下記参照)

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)

[産業財産権]
○出願状況(計1件)

名称:H5亜型インフルエンザウイルスを特異的に認識するモノクローナル抗体
発明者:三澤 修平、曾家 義博、西村 研

吾、横田 恭子、大西 和夫、阿戸 学、
高橋 宜聖、大島 正道、平山 中己、板
村 繁之、小林 和夫、高橋 和郎

権利者：東洋紡績株式会社、国立感染症研
究所、大阪府

種類：特許

番号：特願 2011-227748

出願年月日：平成 23 年 10 月 17 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 公志 (NISHIMURA HIROSHI)

大阪府立公衆衛生研究所・企画総務部・主
任研究員

研究者番号：80250299

(2) 研究分担者

高橋 和郎 (TAKAHASHI KAZUO)

大阪府立公衆衛生研究所・感染症部・副所
長兼感染症部長

研究者番号：10171472