

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：33916  
研究種目：基盤研究(C)  
研究期間：2011～2013  
課題番号：23590693  
研究課題名(和文) HHV-6 variant 特異的抗体測定法の開発

研究課題名(英文) HHV-6 species specific serological assay

## 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(研究院)・研究員

研究者番号：20569701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：Human herpesvirus 6 (HHV-6) は、2種類のspecies (HHV-6A, HHV-6B) に分けられている。HHV-6 Bの初感染像は突発性発疹(突発疹)であるが、HHV-6 Aに関する感染形態は未だ明らかでない。そこで、HHV-6 Aの初感染像、血清疫学解明を目的とし、HHV-6 species特異的抗体測定法確立を目指した。我々はHHV-6 U11遺伝子領域から大腸菌発現系を構築した。さらに同領域から合成ペプチドを25種類作成し、2種類のHHV-6B特異的ペプチドはELISA法で使用する抗原として有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：HHV-6 is divided into two species; HHV-6A and HHV-6B. Primary HHV-6B infection causes exanthem subitum (ES) that is common infectious disease in childhood. In contrast to HHV-6B, epidemiology and clinical feature of HHV-6A infection remains unclear because of no species-specific serological assay. To elucidate full-spectrum of HHV-6A infection, we sought to develop species-specific HHV-6 serological assay.

We have developed a new immunoblot assay that could discriminate between HHV-6A and B antibodies. However, this method is inappropriate for high-throughput analysis. Then, we tried to use synthesized peptides located within the target regions. Two peptide will be able to use ELISA for species-specific ELISA assays.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床検査医学 小児科学 ウイルス学

### 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の初感染像は、我々を含めわが国の研究者により突発疹であることが明らかにされ、血清疫学をはじめとして様々な臨床ウイルス学的成績が蓄積されてきた。一方、HHV-6Aに関しては、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。しかしながら初感染臨床像、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、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、前述のように種特異的血清学的検査法の確立が必須である。

### 2. 研究の目的

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ウイルスに特異的な抗原蛋白を作成し、発現蛋白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

HHV-6AとHHV-6B間の遺伝子相同性は95%以上で、アミノ酸レベルでの相同性も高いことから、既存の感染細胞を抗原として用いた間接蛍光抗体法では抗体の交差反応性が問題となる。よって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を選定した。

選択された候補遺伝子で糖鎖修飾されないものについて、大腸菌発現系で組み換え蛋白を作製した。蛋白発現には、pET22b(+ )ベクター(Novagen社)を使用し、候補遺伝子をクローニングするため適切なプライマーを設計。テンプレートには、HHV-6A(U1102株)ならびにHHV-6B(Z29株)感染臍帯血リンパ球から抽出したDNAを使用した。

精製した候補遺伝子の合成蛋白を用いて、ウェスタンブロットングにてHHV-6B既感染者血清、突発疹患児ペア血清、HHV-6A感染慢性疲労症候群患者血清( : Dr. Dan Petersonらより分与、HHV-6 Foundationとの共同研究)、HHV-6再活性化として造血幹細胞移植(HSCT)患者ペア血清、Drug induced hypersensitivity syndrome(DIHS)患者ペア血清との反応性を確認した。またIFA法によるHHV-6の抗体価とも比較を行

った。

### 4. 研究成果

#### (1) 遺伝子領域の選択

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として、U11、U47、U54の3つを選定した。3つの遺伝子領域から組み換え蛋白を大腸菌発現系で作製し、それぞれの組み換え蛋白について、既存のモノクローナル抗体および突発疹ペア血清での反応性を考慮した結果、U11遺伝子領域で、HHV-6A、HHV-6Bの型判別が可能である結果が得られた。

#### (2) ウェスタンブロットング法による発現蛋白の確認

HHV-6 U11 遺伝子領域は、HHV-6A が p100、HHV-6B が 101K をコードしている。発現蛋白の末端に付加されている His-tag と 101K に対するモノクローナル抗体(MAB8535)を使用して発現蛋白の確認を行った(図1)。101K に対するモノクローナル抗体との反応性から、HHV-6B 特異的組み換え蛋白 101K を作製することができた。

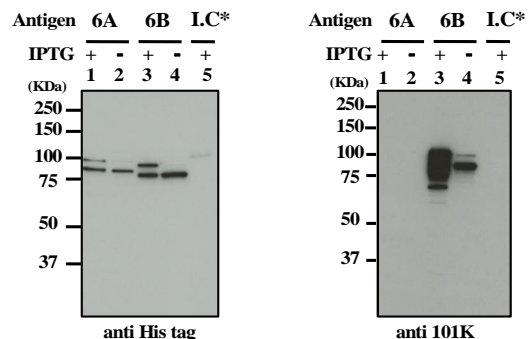


図1:ウェスタンブロットング法を用いたU11 遺伝子領域の組み換え蛋白と anti His Tag (左)、anti 101K (右)に対する反応性

#### (3) ウェスタンブロットング法による臨床検体との反応性

HHV-6A 既感染者(HHV-6 foundation より供与)3 検体のうち、2 検体は p100 および 101K に反応した。HHV-6A 感染患者血清は、HHV-6B 感染情報がないことから、HHV-6A、HHV-6B の重感染、もしくはHHV-6B との交差反応性が考えられた。この問題を解決するには HHV-6A 初感染血清が必要不可欠であるが、世界的にも報告が少なく困難な問題である。

HHV-6B 初感染である突発疹患児 12 ペア 24 検体において、全ての急性期血清は 101K とは反応しなかったが、回復期血清 10 検体(83.3%)は 101K と反応した。反応しなかった 2 検体は、回復期の採血時期が 10 日、11 日と短く、IFA 法の抗体価も低かった。

HHV-6 再活性である DIHS 患者 6 ペア 12 検体において、急性期血清 3 検体で 101K と反応した。また回復期血清は 6 検

体全てで 101K と反応し、そのうち 2 検体は p100、101K の両方に反応した。DIHS の回復期に HHV-6A とも交差反応しうる抗体を産生した可能性が考えられた。一方で同じ HHV-6 再活性化である HSCT 患者 5 ペア 10 検体において、全ての急性期、回復期で 101K と反応した。日本における結成疫学調査でも多くの移植患者は HHV-6 seropositive であることから、過去の報告とも一致する結果となった。

HHV-6B 既感染である健常成人血清 38 検体では、31 検体(81.6%)で 101K と反応した。反応しなかった 7 検体は、HHV-6 抗体価が低かったことから、検出限界であることが考えられた。さらに 4 検体(10.5%)においては、p100 および 101K の両方に反応した。4 検体について、唾液および末梢血単核球から PCR 解析をおこなったが、HHV-6A についての情報は得られなかった。

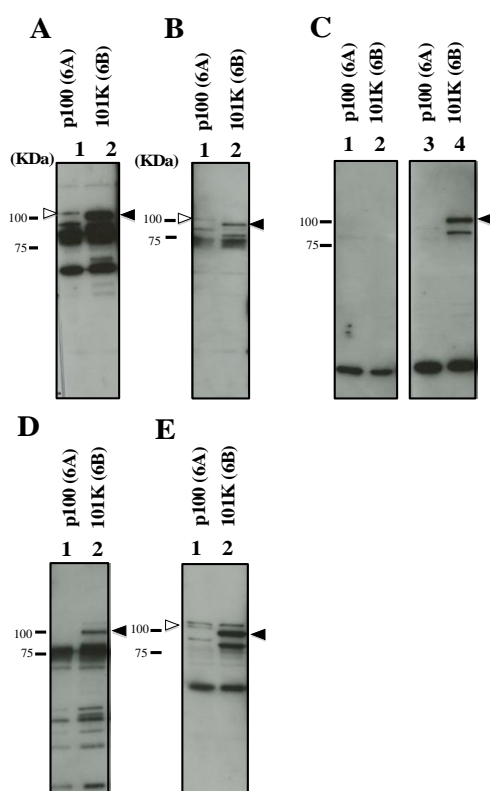


図 2: ウエスタンブロッティング法による組み換え蛋白 p100、101K と HHV-6 患者血清との反応性

A、B:HHV-6A 患者血清、C:突発疹患者血清(レーン 1,2 は急性期、レーン 3,4 は回復期)、D:101K のみに反応する健常成人血清、E:p100 にも反応する健常成人血清

#### (4)結果のまとめ

HHV-6A 初感染患者から集めた検体でさらなる血清疫学調査が必要である。また同時に多検体を効率よく調査するためには、イムノプロット法ではなく、ELISA 法を用いた新たな方法を構築することが重要である。

## 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 5 件)

1. Development of human herpesvirus 6 variant specific immunoblotting assay. Higashimoto Y, Ohta A, Nishiyama Y, Ihira M, Sugata K, Asano Y, Ablashi DV, Yoshikawa T. J Clin Microbiol 2012 ;50:1245-51 査読有
2. Development of real-time RT-PCR assays for detection of three classes of HHV-6 gene expressions. Ihira M, Higashimoto Y, Sugiyama H, Enomoto Y, Kawamura Y, Nakai H, Sugata K, Asano Y, Yoshikawa T. J Med Virol 2012 84:1388-1395 査読有
3. Serum biomarker kinetics with three different courses of HHV-6 encephalitis. Kawamura Y, Nakai H, Sugata K, Yoshikawa T. Brain Develop 2012 doi:pii: S0387-7604(12)00214-8. 査読有
4. Kinetics of the cytokines and chemokines in cases with primary HHV-6 infection. Yoshikawa T, Sugata K, Asano Y, Ihira M, Kumagai T. J Clin Virol 2011 50:65-8 査読有
5. Different characteristics of human herpesvirus 6 encephalitis between primary infection and viral reactivation. Kawamura Y, Sugata K, Ihira M, Mihara T, Mutoh T, Asano Y, Yoshikawa T. J Clin Virol 2011, 51:12-9. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

- 1) IHW (International Herpesvirus Workshop) 2011. Gdansk, poland にて 2011 年 7 月 24 日 poster 発表。発表者：東本 祐紀  
Development of human herpesvirus 6 variant specific immunoblotting assay
- 2) IDWeek 2012. San Deigo, California にて 2012 年 10 月 17 日 poster 発表。発表者：東本 祐紀  
Development of species-specific peptides ELISA assay for HHV-6

〔図書〕(計 0 件)

なし。

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

なし。

○取得状況(計 0 件)

なし。

〔その他〕

特になし。

## 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 (IHIRA, 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

(3)連携研究者

なし。