

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659314

研究課題名(和文)新規蛍光増強法 Impactag の開発と超高感度イムノクロマト診断への応用

研究課題名(英文) Developing the high sensitive immunochromatography with a new method for improving immunofluorescent signals

研究代表者

芝崎 太 (SHIBASAKI, Futoshi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・参事研究員

研究者番号：90300954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、当研究室が開発した超高感度同時多項目測定法(MUSTag法)をさらに応用して開発した蛍光シグナル増強法を基盤技術とした新しいイムノクロマト診断法及びデバイス作製をめざす研究である。

MUSTag法の応用であるIMPACTagでは、理論的な予想の10倍までは届かず残念せざるをえなかった。但し、インフルエンザウイルス検出では、蛍光イムノクロマト法の開発を平行して行った結果、従来よりも100倍高感度なイムノクロマトチップと測定機器が完成した。また、パピローマウイルスのL1蛋白を用いて子宮頸癌ワクチン接種後の抗体価を高感度に検出できるアッセイ系も完成した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the specific aim to develop the fluorescent enhancement methods (IMPACTag) for improving the MUSTag sensitivity and also apply this methods to immunochromatography and the devices.

First, we tried to develop the IMPACTag, but the sensitivity was not enough to our goal, and we changed the strategy to use fluorescent beads instead of IMPACTag. During our research term, we succeeded in developing the high sensitive immunochromatography (IC) tips and the device in collaboration with companies. For detection of influenza viruses, the IC chip and the device could detect viruses 100 fold more sensitive than conventional methods. Furthermore, we also succeeded in the developing the assay system for detecting antibodies against papilloma virus L1 proteins. the system will be available for the evaluation of the cervical cancer vaccine effect after the inoculation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病体検査学

キーワード：診断 蛍光 イムノクロマト インフルエンザ 子宮頸癌

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎えた現在、医療費の削減や患者の QOL 向上実現のために、疾患を早期に診断し、的確な薬効予測に基づく投薬で早期に完治する予防的治療の確立が重要である。各種疾患の的確な診断法開発のためには、次世代の汎用的診断技術として「蛋白バイオマーカーの同時多項目分析技術」および「迅速簡易測定技術」の臨床診断への応用が急がれている。

2. 研究の目的

そこで本研究は、当研究室が開発した超高感度同時多項目測定法 (MUSTag 法) をさらに応用して開発した蛍光シグナル増強法 (ImpacTag 法) を基盤技術とした新しいイムノクロマト診断法及びデバイス作製し、緊急性を有する鳥インフルエンザの亜型識別 (H5N1) と、社会的認知度が近年上昇している子宮頸癌予防ワクチンの中の抗体検出 (タイプ 16 型、18 型) も含めた超高感度イムノクロマト法 (従来法の 1,000 倍以上の感度) の確立をめざす研究であり、最終的には外来・屋外いづれでも実施可能な場所を問わない多項目診断が可能な完成度を達成目標に設定した。

3. 研究の方法

(1) GANP マウスと抗体

AB の型別判断には抗 A 型 NP 抗体として 56-1 (IgG2a 標識抗体) と A43-6 (IgG2a 固相化抗体) を抗 B 型 NP 抗体として 47-23 (IgG2b 標識抗体) と B58-17 (IgG2a 固相化抗体) をそれぞれ用いた。

抗 H5 亜型 HA 抗体は熊本大学の GANP マウスを用いた。抗原は A/bar-headed goose/Qinghai/1A/2005 の HA 遺伝子 (His タグ付加、開裂部位は削除済み) をワクシニアウイルスに組み込んだものを RK13 細胞に感染させ、Ni カラムによって精製したものをを用いた。GANP から得られた抗体 10 種類および通常のマウスを使った抗体 2 種類をピックアップし、その反応域を確認した。

これらのすべての組み合わせで金コロイド

の IC を作製し、その反応性・反応域を考慮し最終的に Type-E (固相化: 8C1, 標識: 5H7) と Type-N (固相化: 7A5-1, 標識: 14A7) の二種類の IC を候補とした。

(2) FLIC の構築

標識抗体は藤倉化成の蛍光ビーズで標識した。5%ラテックス原液 100 μ L に感作 Buffer を 900 μ L 加え、0.5%に希釈調製した。WSC を感作 Buffer で溶解し(1 mg/mL)、ラテックス分散液に 300 μ L 添加した。室温で 15 分間転倒混和したのち、標識予定の抗体を 0.3 mg 添加し、1 時間転倒混和する。遠心して上清を除いたのち、1%BSA 溶液を感作ラテックスに加え、超音波で再分散後、室温で 1 時間転倒混和した (室温)。遠心して上清を除き、界面活性剤溶液(0.1% Tween-20、0.1%BSA、10 mM HEPES-NaOH (pH 7.7))を加えて超音波で再分散後、遠心して上清を除いた。R2 試薬用緩衝液(0.1% BSA、10 mM HEPES- NaOH (pH7.7)) に分散したち、37 $^{\circ}$ C で 48 時間エージングを行った。

蛍光物質は 2-[3-Chloro-5-[1,1-dimethyl-3-(3-methyl-butyl)-1,3-dihydro-benzo[e]indol-2-ylidene]-penta-1,3-dienyl]-1,1-dimethyl-3-(3-methyl-butyl)-1H-benzo[e]indolium hexafluorophosphate. であり、最大励起波長 683nm 蛍光波長 701nm である。

FLIC の泳動バッファは 50 mM Tris-HCl (pH=7.2), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 を用い、1 ストリップに 100 μ l を滴下した。蛍光は共同開発した蛍光イムノクロマトリーダによって行い、その励起波長は 660nm 蛍光波長は 710nm である。

(3) 使用ウイルス

実験室株のウイルスは A/WSN/1933、A/Puerto Rico/8/1934、A/Aichi/2/1968、A/duck/Hokkaido/Vac-3/2007、B/Tokyo/15480/2008、B/Mass/3/1966 を用いた。B/Tokyo/15480/2008 は東京都健康安全研究センターより分与された。A/duck/Hokkaido/Vac-3/2007 は北海道大学獣医学部喜田研究室から分与されたもので、A/Duck/Hokkaido/101/04 (H5N3)と

A/Duck/Hokkaido/262/04 (H6N1)の二つのウイルスを人工的にリアソートして作成された低病原性のH5N1ウイルスである。このウイルスはH5N1に対してのワクチン候補株でもある。それ以外の株はATCCより購入した。

高病原性トリインフルエンザウイルスH5N1 亜型はA/Whooper Swan/Mongolia/3/2005とA/Whooper Swan/Hokkaido/1/2008の二つを用いた。これらは両方北海道大学獣医学部喜田研究室から分与されたもので、東京都医学総合研究所のBSL3ルームで使用された。

これらのウイルスはMDCK細胞もしくは有精鶏卵に感染させ、獲得した。ウイルスの感染価は一般的なプラークアッセイによって測定した。

それ以外の表に示されたウイルスはすべて北海道大学獣医学部喜田研究室への出張実験の際に用いられた。ウイルスストックは喜田研で精卵によって獲得された。低病原性の株はHA価を測定し、高病原性の株はTCID50を測定してある。

臨床検体はアドテック社によって回収され、それぞれのICを法に加え、ウイルス分離及びリアルタイムPCRによって確定診断した。

4. 研究成果

AB型診断におけるFLICの構築

FLICの構築の最初の段階として、インフルエンザウイルスのABの型判別を行うシステムを構築した。FLICと通常のIC法との違いは二点ある。標識を蛍光ビーズへ変えたことと、蛍光を識別するために専用のICリーダーを設計したことである。

A型B型それぞれのNPタンパク特異的な抗体を用いたFLICを構築し、研究室株の各種IAV、IBVに対して検出限界値を測定した。シグナル/バックグラウンド比(S/B値)を検出ラインで測定し、カットオフである1を越したものを陽性と判断した。pfu量に対してのS/B値をグラフにプロットし、近似直線を作製した。近似直線がS/B値=1となる点を検出限界値として計算した。

比較対象としては同一の抗体を用いて商品化されているプロラストFluを使用し、それぞれの検出限界を測定した。

実験室株のウイルスに対してFLICは非常に高い検出感度を示し、A/WSN/1933株やA/Aichi/2/1968株、B/Tokyo/15480/2008株は1桁のpfuでも検出可能であった。ほとんどの株ではプロラストFluの感度と比較してFLICの感度は100倍前後の感度改善が見られた。A/Puerto Rico/8/1934株のみが456.3pfu(10分)と相対的に感度が低かったが、それでもプロラストFluと比較すると10倍以上の感度改善が見られた。続けて複数の種類の亜型・系統でも認識可能かどうかの検討を行った。A型に関してはH1からH16までの亜型を、B型に関しては山形系統・ビクトリア系統の両系統をそれぞれ測定した。比較対象としてプロラストFluを用いた。FLICは今回テストしたすべての亜型・系統に関して認識が可能であり、プロラストFluと比較して10倍以上の感度改善が見られた。

本研究目的はパンデミック対策であり、現在パンデミックを引き起こした際に一番問題となるのはH5N1亜型を中心とした高病原性トリインフルエンザウイルスである。HPAIVに対してFLICが反応可能であるかどうかの確認を行った。使用したのは1997年から2011年までに単離されたHPAIV H5N1亜型5株と2003年に1名の死者を出したH7N7亜型の計6株である。検討の結果すべてのHPAIVに対してFLICは診断することが可能であった。従って本システムはHPAIVのパンデミックにも対応可能であると考えられる。

更に他の病原体に対して交差反応をしないことを確認するために、25種類の一般的な病原体をテストしたが、すべてにおいて交差反応を示すことはなかった。

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11件)

1. S. Hasan, J. Dong, Y. Hara, Y. Morizane, E. Shibasaki and H. Ueda. "Protein-based open sandwich immuno-PCR for sensitive detection of small biomarkers." *Anal Sci*

- 29(9): 871-876, 2013. (査読有)
2. H. Ogiwara, F. Yasui, K. Munekata, A. Takagi-Kamiya, T. Munakata, N. Nomura, F. Shibasaki, K. Kuwahara, N. Sakaguchi, Y. Sakoda, H. Kida and M. Kohara. "Histopathological Evaluation of the Diversity of Cells Susceptible to H5N1 Virulent Avian Influenza Virus." *Am J Pathol. S0002-9440(13)00681-0*, 2013. (査読有)
 3. Akira Sakurai, Katsuyoshi Takayama, Namiko Nomura, Tsubasa Munakata, Naoki Yamamoto, Tsuruki Tamura, Jitsuho Yamada, Masako Hashimoto, Kazuhiko Kuwahara, Yoshihiro Sakoda, Yoshihiko Suda, Yukuharu Kobayashi, Nobuo Sakaguchi, Hiroshi Kida, Michinori Kohara, Futoshi Shibasaki: Broad-Spectrum Detection of H5 Subtype Influenza A Viruses with a New Fluorescent Immunochromatography System. *PLoS ONE* 8(11): e76753, 2013 (査読有)
 4. Dong J, Sakurai A, Nomura N, Park EY, Shibasaki F, Ueda H: Isolation of recombinant phage antibodies targeting the hemagglutinin cleavage site of highly pathogenic avian influenza virus. *PLoS One*. 8(4): e61158, 2013. (査読有)
 5. 櫻井 陽 野村奈美子 細川幸生 橋本麻紗子 芝崎 太 原光彦 関谷紀貴 田中 理子: 高感度蛍光イムノクロマト法の開発とインフルエンザウイルス検出への応用 **東京都福祉保健医療学会誌** (2012 年度版) pp30-31, 2013. (査読有)
 6. Sakurai A, Shibasaki F Updated Values for Molecular Diagnosis for Highly Pathogenic Avian Influenza Virus. *Viruses*. 4(8):1235-1257, 2012 (doi:10.3390/v4081235) (査読有)
 7. 遠藤典子, 芝崎 太: **新機能抗体開発ハンドブック** ~ 次世代抗体創薬から産業の展開まで ~ 第1編 抗体開発技術-基礎 第4章 抗原-抗体反応の評価 9. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). 査読有 (株式会社エヌ・ティー・エス; 2012年8月28日発刊)
 8. Sakurai A, Nomura N, Nanba R, Sinkai T, Iwaki T, Obayashi T, Hashimoto K, Hasegawa M, Sakoda Y, Naito A, Morizane Y, Hosaka M, Tsuboi K, Kida H, Kai A, Shibasaki F : Rapid typing of influenza viruses using super high-speed quantitative real-time PCR. *J Virol Methods*. 178(1-2):75-81, 2011. (査読有)
 9. 櫻井 陽, 南波玲子, 野村奈美子, 内藤 暁宏, 森實芳仁, 芝崎 太, 大林民典, 後藤 薫, 新開敬行, 長谷川道弥, 保坂三継, 甲斐明美: インフルエンザ迅速遺伝子診断法の開発 **東京都福祉保健医療学会誌** 7-11. 2011 (査読無し)
- [学会発表](計13件)
1. 芝崎 太: バイオベンチャー企業の知恵と技術. 東京都立産業技術研究センター「バイオ応用技術フォーラム」. 2013.9.2 東京イノベーションハブ (招待講演)
 2. 櫻井 陽, 野村奈美子, 細川幸生, 橋本麻紗子, 芝崎 太: 新規インフルエンザ診断技術の開発 Cell Biology Summer Meeting (CBSM) 2013, 2013.7.13, 山梨・笛吹市
 3. Shibasaki F, Sakurai A, Nomura N, Hashimoto A, Kohara M, Kuwahara K, and Sakaguchi N: Development of New Diagnosis Systems for Detecting Influenza Viruses. 2013 TEPIK&APACI International Influenza Symposium. 2013.7.12, Seoul, Korea
 4. Shibasaki F and Koide T: Open the Future Gate for Bio-Medical Partnerships vs"TOBIRA". The American Chamber of Commerce in Japan (ACCJ). 2013.6.28 Tokyo (招待講演)
 5. 芝崎 太: 産官学医連携による実用化開発の現状. 三重大学地方イノベーション学研究科講義. 2013.6.25 (招待講演)
 6. Shibasaki F : Opening Remark: 3rd IGAKUKEN International Symposium. 2013.2.15 Igakuken
 7. 芝崎 太, 櫻井 陽, 野村奈美子: イン

- フルエンザウイルスの新規診断法．第 2 回研究フォーラム． 2013.2.5 東京
8. 芝崎 太、櫻井 陽、野村奈美子：開発した H5 インフルエンザ用抗体の特徴．1 月 30 日 鹿児島大学共同獣医学部附属越境性動物疾病制御 (TAD) 研究センターセミナー． 2013.1.30 鹿児島
 9. Akira Sakurai：Development of new diagnosis systems for detecting influenza viruses. 3rd IGAKUKEN International Symposium on Control of Influenza virus and Hepatitis. 2013.1.15, Tokyo
 10. 櫻井 陽、野村奈美子、細川幸生、橋本麻紗子、芝崎 太、原 光彦、関谷紀貴、田中理子：高感度蛍光イムノクロマト法の開発とインフルエンザウイルス検出への応用 2012 年 第 8 回東京都福祉保健医療学会 東京 2012.12.21 (医学・医療の部 最優秀賞を受賞)
 11. 櫻井 陽 (協力研究者：芝崎 太、川島育夫、梶原直樹、野村奈美子、橋本麻紗子) 高病原性トリインフルエンザウイルス H5N1 亜型における新規侵入経路の発見 2012 年 第 60 回日本ウイルス学会総会 大阪 2012.11.13-15
 12. 櫻井 陽：超高速 RT-PCR によるインフルエンザウイルス検出系の確立 第 11 回 CBSM2012、2012.8.31~9.2 伊勢市
 13. 芝崎 太、櫻井 陽、野村奈美子、遠藤典子：バイオマーカーの臨床評価に基づく基盤診断法・機器の開発。日本プロテオーム学会 2012 年大会 2012.7.27 東京 (招待講演)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.molmed.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

芝崎 太 (SHIBASAKI, Futoshi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム
医科学研究分野・参事研究員

研究者番号：90300954

(2)研究分担者

櫻井 陽 (SAKURAI, Akira)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム
医科学研究分野・研究員

研究者番号：40546628

遠藤 典子 (ENDO, Fumiko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム
医科学研究分野・研究員

研究者番号：80546630