

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656307

研究課題名(和文) 蛍光偏光を用いた感染性を有する水系感染症ウイルスの迅速且つ簡便な新規定量法の開発

研究課題名(英文) Development of a rapid and simple method based on fluorescence polarization for quantification of waterborne viruses

研究代表者

白崎 伸隆 (SHIRASAKI, NOBUTAKA)

北海道大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60604692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、従来から医学・薬学分野においてタンパク質間相互作用の評価等に広く用いられている蛍光偏光の原理を応用し、感染性を有する水系感染症ウイルスを迅速且つ簡便に高感度で定量可能な新たなウイルス定量法を開発することを試みた。結果として、蛍光偏光法に使用するマイクロプレートの種類、抗体の種類、抗体濃度、反応時間といった条件の最適化を図ることにより、ノロウイルス粒子を30分以内に簡便に検出することに成功した。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to develop a rapid and simple method applying fluorescence polarization which has been used as a tool to evaluate protein-protein interaction for quantification of waterborne viruses. As a result, novel method that can detect norovirus particles within 30 min was successfully developed based on the investigation of effects of plate type, antibody type, antibody concentration and antigen-antibody reaction time on virus detection by fluorescence polarization.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：水系感染症 ノロウイルス 蛍光偏光法 カプシドタンパク質 抗原抗体反応 金コロイド 3DNA 複合体

1. 研究開始当初の背景

分子生物学的な微生物検出・定量技術の発展に伴い、水環境における病原微生物汚染の実態調査が広く行われ、水道水源と成り得る水環境中に水系感染症を引き起こす病原性ウイルスが存在していることは周知の事実となっている。従って、病原性ウイルスによる水系感染症を制御していくためには、水中の感染性を有するウイルスの存在を迅速に捉え、感染症拡大前に浄水処理の強化等の事前策を講じる必要がある。しかしながら、ブラック形成法に代表される既存のウイルス感染力評価手法は、熟練された技術が必要であり、定量に数日間かかるといった問題がある。また、ノロウイルスに代表される培養不可能なウイルスに関しては、人体実験以外に感染力価を評価する手法が確立されていないのが現状である。これらのことから、感染性を有する水系感染症ウイルスを迅速且つ簡便に高感度で定量可能な新規のウイルス定量法の確立が求められている。

このような状況の中、ごく最近、ウイルス粒子を形成するカプシドタンパク質の変性を捉えることにより、ノロウイルスに代表される培養不可能な病原性ウイルスについても感染性を評価できる可能性が示唆されており、また、タンパク質間の相互作用を迅速且つ簡便に評価する手法として、蛍光偏光法が注目されるようになってきた。これらを組み合わせると、蛍光偏光法によりウイルスの感染性を決定づけるカプシドタンパク質の変性を迅速且つ簡便に捉えることができるため、感染性を有する水系感染症ウイルスの定量が原理的には可能となる。

2. 研究の目的

本研究では、従来から医学・薬学の分野においてタンパク質間相互作用の評価等に広く用いられている蛍光偏光の原理を応用し、感染性を有する水系感染症ウイルスを迅速且つ簡便に高感度で定量可能な新たなウイルス定量法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 使用したウイルス、抗体

本研究では、水系感染症を引き起こす病原性ウイルスとして、ノロウイルスを研究対象とした。ノロウイルスは、生体外での効率的な培養法が未だ確立されていないことから、野生のノロウイルスと表面構造的（抗原的）に同等なノロウイルスのウイルス様粒子（Virus-Like Particles: VLPs）を、遺伝子組換えバキュロウイルスとカイコ細胞を用いたタンパク質発現法により作製し、実験に使用した。

蛍光偏光法に使用する抗体、すなわち、ノロウイルス VLPs のカプシドタンパクに結合する抗体は、VLPs をマウスに経口摂取することにより作製し、得られた 10 種類のモノクローナル抗体の中から、VLPs との反応特

異性が最も高い IgG 抗体及び IgM 抗体を酵素免疫測定法（ELISA）により選択し、実験に使用した。

(2) 蛍光偏光法

本研究では、(1)で作製した IgG 抗体を蛍光色素である FITC で標識した FITC 標識化 IgG 抗体を蛍光偏光法に用いることにより、VLPs の検出・定量を行った。VLPs を PBS にて段階希釈した後、96 ウェル蛍光測定用ブラックプレートに 100 μ L 添加した。ここに、所定の濃度（37, 184 nM）になるように PBS あるいは抗原抗体反応増強用バッファーにて希釈した FITC 標識 IgG 抗体を 100 μ L 添加し、数回ピペティングした後、37°C にて所定の時間（30, 60, 120 分）インキュベートした。インキュベート後のプレートを蛍光偏光測定用マイクロプレートリーダー（励起波長 485 nm, 蛍光波長 535 nm）に供することにより、蛍光偏光度を測定した。

(3) 検出感度の高感度化

蛍光偏光法による VLPs 検出の高感度化を図るため、FITC 標識化 IgG 抗体に加え、(1)で作製した IgM 抗体をビオチン標識したビオチン化 IgM 抗体、ビオチンと高い結合力を有するストレプトアビジンを金コロイドに結合させたストレプトアビジン結合金コロイド、更には、ビオチンに対する抗体を結合させた抗ビオチン 3DNA を蛍光偏光法に用いた。

VLPs を PBS にて段階希釈した後、96 ウェル蛍光測定用ブラックプレートに 100 μ L 添加した。ここに、PBS にて希釈した FITC 標識 IgG 抗体（37 nM）を 100 μ L 添加し、数回ピペティングした後、37°C にて 30 分間インキュベートした。この後、PBS にて希釈したビオチン化 IgM 抗体（131 nM）10 μ L とストレプトアビジン結合金コロイド（ストレプトアビジン濃度 155 nM）10 μ L あるいは PBS にて希釈した抗ビオチン 3DNA（10 ng/ μ L）10 μ L を混合し、37°C にて 30 分間インキュベートしたものを添加し、数回ピペティングした後、同様に 37°C にて 30 分間インキュベートした。インキュベート後のプレートを蛍光偏光測定用マイクロプレートリーダー（励起波長 485 nm, 蛍光波長 535 nm）に供することにより、蛍光偏光度を測定した。

4. 研究成果

(1) 作製した VLPs の特性

作製したノロウイルス VLPs を電子顕微鏡（TEM）にて観察したところ、粒子状に自己組織化された VLPs が確認された。また、観察された VLPs の粒径は 35–39 nm であり、野生のノロウイルスの粒径と同程度であった。加えて、VLPs を構成するカプシドタンパク質をマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法（MALDI-TOF-MS 法）にて分析したところ、野生のノロウイル

スを構成するカプシドタンパク質と同等であることが確認された。従って、遺伝子組換えバキュロウイルスとカイコ細胞を用いたタンパク質発現法により作製した VLPs は、野生のノロウイルスと表面構造的に同等であると判断した。

(2) 蛍光偏光法による VLPs の定量

FITC 標識化 IgG 抗体を用いた蛍光偏光法による VLPs の定量結果を図 1 及び図 2 に示す。図 1 より、 10^{10} VLPs/mL 以上の VLPs 濃度において、ネガティブコントロールよりも蛍光偏光度が高い値となった。従って、本研究で作製した FITC 標識化 IgG 抗体を蛍光偏光法に用いることにより、VLPs を検出可能であることが確認された。VLPs と FITC 標識化 IgG 抗体の反応時間が蛍光偏光度に与える影響を評価したところ、反応時間によって蛍光偏光度に差が見られ、120 分の反応時間においては、30 分及び 60 分の反応時間に比べて蛍光偏光度が低下した(図 1)。従って、VLPs と FITC 標識化 IgG 抗体の反応時間は 30 分が妥当であると考えられた。また、FITC 標識化 IgG 抗体の濃度が蛍光偏光度に与える影響を評価したところ、抗体濃度によって蛍光偏光度に差が見られ、184 nM の抗体濃度を用いた場合、37 nM の抗体濃度を用いた場合に比べて蛍光偏光度が低下した(図 2)。従って、FITC 標識化 IgG 抗体の濃度は 37 nM が妥当であると考えられた。同様に、96 ウェル蛍光測定用ブラックプレートの種類及び抗原抗体反応増強用バッファーによる FITC 標識化 IgG 抗体の希釈が蛍光偏光度に与える影響を評価し、96 ウェル FIA ブラックプレート(平底, No binding)の使用及び PBS による FITC 標識化 IgG 抗体の希釈が適当であることが確認された。以上の結果から、96 ウェル FIA ブラックプレート(平底, No binding)及び PBS にて 37 nM に希釈した FITC 標識化 IgG 抗体を蛍光偏光法に使用し、VLPs と FITC 標識化 IgG 抗体の反応時間を 30 分とすることにより、 10^{10} VLPs/mL 程度以上の VLPs を検出・定量できることが示された。

(3) 複合体形成による検出感度の高感度化

FITC 標識化 IgG 抗体に加え、ビオチン化 IgM 抗体及びストレプトアビジン結合金コロイドを蛍光偏光法に用いることにより、VLPs 検出の高感度化を試みたところ、FITC 標識化 IgG 抗体のみを用いた場合に比べ、FITC 標識化 IgG 抗体-VLPs-金コロイド結合 IgM 抗体の複合体を形成させることにより、幾分検出感度が向上した。また、FITC 標識化 IgG 抗体-VLPs-3DNA 結合 IgM 抗体の複合体を形成させた場合においても同様の傾向が見られた。しかしながら、検出感度の飛躍的な向上は見られなかったことから、FITC 標識化 IgG 抗体のみを蛍光偏光法に用いた場合が最も迅速且つ簡便にノロウイルス粒子を検出できることが明らかとなった。

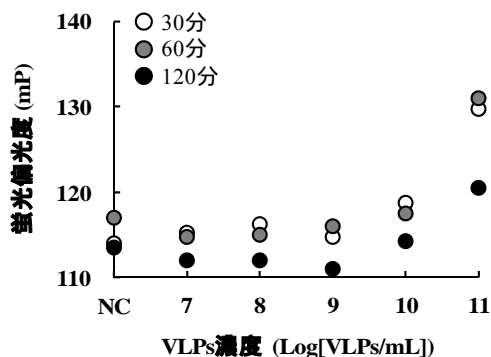


図1. 蛍光偏光法における抗原抗体反応時間の影響 (プレート: 平型 No binding, 抗体希釈: PBS, 抗体濃度: 37 nM, NC: ネガティブコントロール)

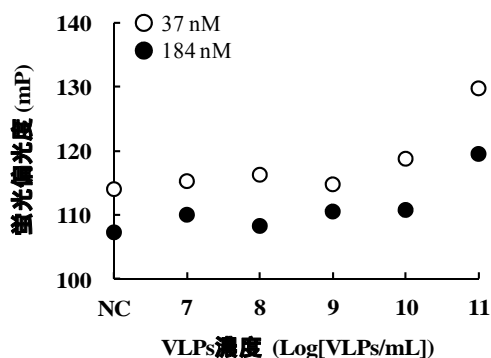


図2. 蛍光偏光法における抗体濃度の影響 (プレート: 平型 No binding, 抗体希釈: PBS, 抗原抗体反応時間: 30分, NC: ネガティブコントロール)

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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

Shirasaki, N., Matsushita, T., Tatsuki, Y. and Matsui, Y. Estimating norovirus removal performance in an in-line coagulation-ceramic microfiltration process by using recombinant norovirus VLPs and immuno-PCR method. 7th IWA Specialised Membrane Technology Conference and Exhibition for Water and Wastewater Treatment and Reuse, 27 August 2013, Toronto, Canada.

白崎伸隆, 田附雄一, 松下拓, 松井佳彦. ウイルス様粒子と Immuno-PCR 法を併用したノロウイルスの膜ろ過処理性評価及び処理メカニズムの解明. 第 50 回環境工学研究フォーラム, 2013 年 11 月 20 日, 北海道札幌市.

白崎伸隆, 田附雄一, 松下拓, 松井佳彦. インライン凝集-セラミック膜ろ過処理によるノロウイルス粒子の効果的除去. 土木学会平成 25 年度全国大会, 第 68 回

年次学術講演会, 2013年9月4日, 千葉県習志野市.

Shirasaki, N., Matsushita, T. and Matsui, Y. Virus removal by a coagulation–microfiltration process. The 4th IWA Asia-Pacific Young Water Professionals Conference 2012, Health-Related Water Microbiology Special Session, 8 December 2012, Tokyo, Japan.

白崎伸隆, 田附雄一, 松下拓, 松井佳彦. ウイルス様粒子と新規イムノPCR法を併用したヒトノロウイルスの膜ろ過処理性評価. 土木学会平成24年度全国大会, 第67回年次学術講演会, 2012年9月6日, 愛知県名古屋市.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白崎 伸隆 (SHIRASAKI NOBUTAKA)

北海道大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号: 60604692