

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460682

研究課題名(和文) サイトメガロウイルスに対する細胞性免疫能測定検査の開発と病態解明

研究課題名(英文) Development of a clinical examination for evaluation of cytomegalovirus (CMV)-specific cellular immunity and study for CMV-pathogenesis by the examination.

研究代表者

錫谷 達夫 (Suzutani, Tatsuo)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40196895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヒトサイトメガロウイルス(human cytomegalovirus; HCMV)に対する細胞性免疫を簡便に調べられる検査の開発を試みた。ヘパリン採血した末梢血にHCMVのタンパク・前初期タンパク(IE-1)またはpp65、または紫外線で不活化したウイルス粒子を加えて24時間培養後、分泌されたIFN- $\gamma$ の量をELISAで測定した。検討の結果、pp65タンパクが最も用量依存的にIFN- $\gamma$ を誘導した。しかし、ELISPOTとの相関は見られず、遊離されるIFN- $\gamma$ 量の個人差が大きく、正常値を求めることもできなかった。ただ、一個人の細胞性免疫の変動を評価には有効な検査であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Human cytomegalovirus (HCMV) induces severe diseases in immunocompromised patients. To manage these patients, an easy clinical examination for the monitoring of disease risk is required. In this study, we modified the interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) release test (QuantiFERON-CMV) using HCMV immediate early-1 (IE-1) or pp65 whole proteins, or UV-inactivated HCMV particles as an antigen. The response of heparinized peripheral blood from healthy volunteers to the pp65 protein showed an obvious dose-dependent sigmoid curve, although no correlation was observed between results of this assay and an ELISPOT assay. The addition of pp65 to the blood samples at a final concentration of  $1 \times 10^3$  to  $1 \times 10^5$  pg/ml was found to be optimum. IFN- $\gamma$  secretion from peripheral blood cells differed significantly between individuals; therefore, the assay could not be normalized. Nevertheless, it was found to be particularly useful for observing fluctuations in cellular immune activity on an individual level.

研究分野：ウイルス学

キーワード：サイトメガロウイルス インターフェロン 細胞性免疫

### 1. 研究開始当初の背景

サイトメガロウイルス(CMV)感染症は日和見感染症として頻度の高い重要な疾患である。発症の危険性をモニタリングするためにはCMV 特異的な細胞性免疫能の測定が重要であるが、この活性を測定するためには主要組織適合抗原が一致したターゲット細胞が必要であり、臨床の現場で測定することは不可能である。簡便な検査法として、ターゲット細胞を必要としないELISPOT assay やテトラマーを用いた方法が開発されているが、試薬が高価である、特殊な機器が必要である、特別な手技が必要であることなどから研究として利用されるのみである。

細胞性免疫を測定するより簡便な方法として quantiFERON-CMV が開発され市販されている。全血にCMV 抗原を添加して1日培養後、血漿に分泌された interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) を ELISA で測定するというこの方法は(IFN- $\gamma$  遊離試験)、特殊な機器や技術が必要としない優れた検査法である。しかし、市販されているキットでは抗原として21種の合成オリゴペプチドを用いているため、HLA のタイプによって反応性が異なる可能性や抗原提示細胞を経ずにリンパ球を活性化するため、樹状細胞やマクロファージの活性は反映しないという欠点が考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では抗原特異的 IFN- $\gamma$  遊離試験をさらに改良し、抗原提示細胞とT細胞の活性全体を測定できる方法を確認する。そしてこの検査法の有用性を実際のヒト検体で確認する。

### 3. 研究の方法

1) ウイルス抗原: CMV 抗原として、精製し、紫外線照射によって不活化したウイルス粒子と市販されている Immediate early-1 タンパク (IE-1)、pp65 タンパクを用いた。

2) IFN- $\gamma$  遊離試験: 本研究への参加を文書にて承諾したボランティアからヘパリン採血した全血 100  $\mu$ l に種々の濃度に希釈した抗原 10  $\mu$ l 加え、24 時間 CO<sub>2</sub> インキュベータで培養した。培養後、遠心して血漿を分離し、IFN- $\gamma$  の測定まで-80 で保存した。IFN- $\gamma$  は ELISA で定量した。

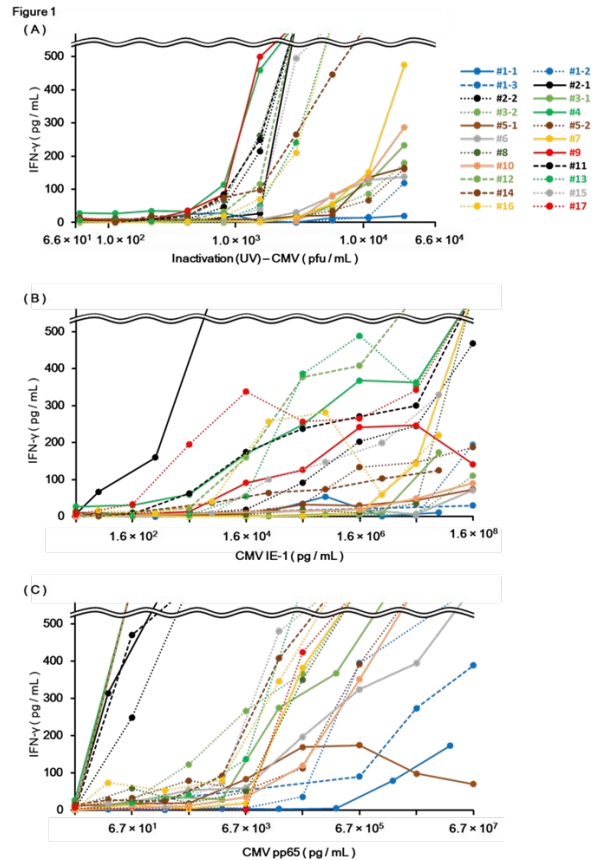
3) ヨーグルト摂取試験: 本研究への参加を承諾したボランティアにヨーグルト 80g を8週間にわたって毎日食べていただき、その前後で採血をした。

4) 研究倫理: 本研究のためにボランティアから採血することやヨーグルトを摂取していただくことに関し、福島県立医科大学倫理委員会から承認を得た。

### 4. 研究成果

1) IFN- $\gamma$  遊離試験: 今回用いたウイルス粒子、IE-1 タンパク、pp65 タンパクのいずれの抗原でも用量依存的に IFN- $\gamma$  分泌量の

増加が認められたが、ボランティア中、ただ1人いた CMV 未感染者 (Fig.1 中の #1) でも抗原量が多いと IFN- $\gamma$  の分泌が認められた。従って、この非特異的な IFN- $\gamma$  遊離が起こらない抗原量の設定が重要であることが分かった。

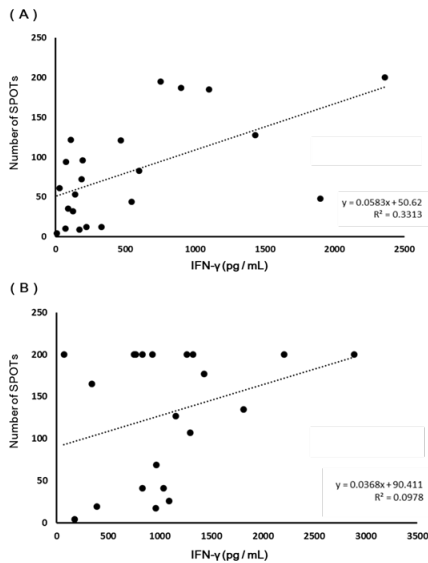


### 抗原間の特徴として

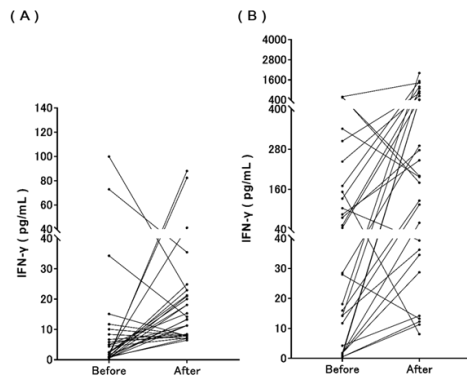
ウイルス粒子に対する反応は低濃度でも反応する人と、高濃度でなくては反応しない人の2群に分かれる (Fig.1A)。

IE-1 に比較し、pp65 に対する反応性が一般に高く、また S 字状曲線がきれいであることが分かった (Fig. 1B,C)。そこで以降の実験は pp65 を抗原とし、非特異的反応が見られない  $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$  pg/ml で細胞を刺激することとした。

2) ELISPOT assay との比較: IFN- $\gamma$  遊離試験と ELISPOT assay を比較検討したところ、この2つの測定法の間に相関は認められないこと、そして IFN- $\gamma$  遊離試験に定量性はないことが分かった。



3) ヨーグルト摂食による免疫活性増強効果判定への応用：日本人のおよそ80%がCMVに潜伏感染していることから、IFN- $\gamma$ 遊離試験でCMVに対する細胞性免疫能を測定することで、個人の細胞性免疫活性全体を押し量れるのではないかと考えられる。そこで、健康なボランティア29名に8週間にわたって1日80gのヨーグルトを食べていただき、その前後でIFN- $\gamma$ 遊離試験を行った。



(A)はヨーグルトを食べる前後の末梢血をpp65で刺激せずに培養し、IFN- $\gamma$ の分泌量を測定したもの、(B)は $1 \times 10^4$  pg/mlのpp65で刺激した時の結果である。抗原刺激なしでも培養前後でIFN- $\gamma$ 産生量が増加しているが、pp65刺激によって抗原特異的に反応した細胞からより多くのIFN- $\gamma$ が分泌された。この結果からヨーグルト摂食によってIFN- $\gamma$ 産生細胞の活性が優位に高まっていることが分かり、CMV抗原特異的IFN- $\gamma$ 遊離試験は細胞性免疫能の活性評価に有用であることが示された。

## 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 1 件)

Kobayashi T, Sato J, Ikuta K, Kannno R, Nishiyama K, Koshizuka T, Ishioka K, Suzutani T. Modification of HCMV-specific IFN- $\gamma$  release test (quantiFERON-CMV) and the novel proposal of its application. Fukushima J Med Sci, 2017 (in press)

〔学会発表〕(計 2 件)

〔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

錫谷達夫 (SUZUTANI, Tatsuo)  
福島県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：40196895

### (2) 研究分担者

小林敬広 (KOBAYASHI, Takahiro)  
福島県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：00708745

生田和史 (IKUTA, Kazufumi)  
福島県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：60512184

腰塚哲朗 (KOSHIZUKA, Tetsuo)  
福島県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号： 20416267

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：

(4)研究協力者 ( )