

ジーン クロード バリンギット

論文内容の要旨

主 論 文

A Simple and High-Throughput ELISA-Based Neutralization Assay for the Determination of Anti-Flavivirus Neutralizing Antibodies

ELISA 法を基盤とした簡便でハイスループットなフラビウイルス
中和抗体測定法の開発

Jean Claude Balingit, Minh Huong Phu Ly, 松田麻未, 鈴木亮介, 長谷部太,
森田公一, Meng Ling Moi

Vaccines • 8 巻 2 号 297 2020 年
<https://doi.org/10.3390/vaccines8020297>
[15 ページ]

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻
(主任指導教員：森田公一教授)

諸 言

デングウイルス、日本脳炎ウイルス、ジカウイルスなどの蚊媒介性フラビウイルスは熱帯・亜熱帯地域において流行を繰り返しており、保健衛生上の重要な問題となっている。これらのフラビウイルスは抗原性が極めて似通っており、患者血清中に存在する抗体は高い交叉反応を示すことが知られている。このため、各種血清診断法においては培養細胞を用いて実施するプラーク減少中和試験 (PRNT: plaque reduction neutralization test) による中和抗体価の測定が最もウイルス特異性の高い血清診断法となっている。しかしながらこの手法は手技が煩雑であり、多数の検体を処理するには時間がかかるなど利便性に問題があった。そこで、本研究では酵素免疫測定法 (ELISA 法) を用いて、簡便に多数検体のウイルス中和抗体を測定できる手法

(EMNT:ELISA-based Micro Neutralization Test)を開発し、従来法と比較してその有用性を検討した。

対象と方法

PRNTは定法に従いウイルスと希釈血清混合液を37℃、1時間反応させたのち12穴プレートに培養したBHK-21細胞に感染させた。感染細胞は5～7日間培養し固定後、クリスタルバイオレットによる細胞染色を行い、可視化されたプラーク数の50%減少を示す最高血清希釈度により中和抗体価を決定した。EMNTではウイルス血清混合液を96プレートに培養したBHK-21細胞に接種し3日間培養後の培養上清を抗原検出ELISA法にてウイルス抗原量を吸光度により評価し50%減少を示す最高血清希釈度を決定し中和抗体価とした。評価に用いた抗体は、抗フラビ単クローン抗体3検体、デング熱回復期患者血清12検体、ジカ熱回復期患者血清13検体を使用した。さらに、抗体依存性感染増強(ADE)を検証する目的で、ヒトFcレセプター (FcγRIIA) 発現BHK-21細胞を用いて上記の中和試験を実施して ADE抗体を測定した。用いたウイルスはデング1型～4型(DENV1-4)、ジカウイルス(ZIKV)、日本脳炎ウイルス(JEV)である。

結 果

EMNT法と従来のPRNT法とで得られた中和抗体価 (BHK-21細胞) の相関は6種のウイルス全体で($r = 0.8361$; $p < 0.001$)であった。またADEを評価できるヒトFcレセプター (FcγRIIA) 発現 BHK-21細胞を用いた中和抗体価での相関は6種のウイルス全体で($r = 0.7865$; $p < 0.001$)となりEMNT法の結果とNT法の結果は高い相関をしめした。それぞれのウイルスに関しての同様の比較でもEMNTとPRNTの結果は同様に高い相関を示した。さらにEMNTは384穴プレートを用いても信頼性の高い中和抗体を算出することが可能であった。くわえてデング1型ウイルスの一回増殖性ウイルス用粒子(SRIPs)を用いてもEMNT法は機能することを確認できた。

考 察

今回開発したEMNT法は従来法より簡便で少ない労力で信頼性の高いフラビウイルス中和抗体の計測が可能である。加えて、ハイスループットな中和抗体計測法であり、今後デング熱やジカ熱、日本脳炎などのフラビウイルス感染症のサーベイランスやワクチントライアルの抗体調査において有用であると考えられる。またEMNT法は384穴プレートでも機能し、くわえてSRIPsを用いた検査系も利用できることから感染性ウイルスを用いることなく中和抗体の測定が可能となり、研究インフラの十分でない開発途上国においても活用が期待される。