

Ferdinard Adungo 論文内容の要旨

主 論 文

Development and Characterisation of Monoclonal Antibodies to Yellow Fever Virus and Their Application in Antigen Detection and IgM Capture ELISA

(黄熱ウイルスに対する単クローン抗体の作製と特異抗原及び抗体検出 ELISA 法への応用)

Ferdinard Adungo, 余 福勲, David Kamau, 井上真吾, 早坂 大輔,
Posadas-Herrera Guillermo, Rosemary Sang, Matilu Mwau, 森田 公一

(Clinical and Vaccine Immunology 2016 年掲載予定)

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)

【緒 言】

黄熱病はウイルス性出血熱の1つであり、現在でもアフリカ、南米で患者発生が見られる蚊媒介性ウイルス感染症である。有効なワクチンは存在するが、アフリカでは年間170万人が発症し、このうち2万9千人～6万人が死亡していると見積もられている。アフリカにおいて有効な黄熱病対策を実施するうえで現在もっとも大きな課題は、アウトブレイクの早期発見、確認作業が難しい事であり、その理由は確定診断が可能な診断施設および、商業的に供給可能な診断薬が欠如していることである。本研究では、アフリカの開発途上国に供給可能な診断薬を開発する一助として、黄熱ウイルスに対する特異的かつ高反応性の単クローン抗体を樹立し、それを用いた黄熱ウイルス抗原、抗体検出系を開発することである。

【対象と方法】

ケニアの国立中央医学研究所で分離した黄熱ウイルス新鮮分離株 (Baringo-1)、および17D株のE蛋白質遺伝子 cDNA に His-tag 配列を付加し、プラスミドベクター (pQE-30) に組み込んだのち、大腸菌(XL-1 Blue)に導入して、E蛋白質を大量発現させた。発現蛋白質はニッケルカラム等を用いて高純度に精製し、BALB/c マウスにアジュバンドとともに3回免疫し、特異的抗体産生を確認したのち、定法により単クローンを作製した。単クローン抗体の特異性は黄熱ウイルス野生株 (Baringo-1, -2)、17D株、デングウイルス、日本脳炎ウイルス感染細胞の免疫染色法により比較検証した。また単クローンが認識するエピトープのマッピングはE蛋白遺伝子を6つのフラグメントに分割して発現させたペプチドに対する反応性で判定した。特異的 IgG の測定は

間接 ELISA 法、特異的 IgM の測定は IgM 捕捉 ELISA 法、中和抗体の測定はフォーカス法により評価した。構築した診断法の特異性の評価には黄熱患者、デング熱患者、日本脳炎患者血清を用いた。抗原検出法の評価はウイルス感染培養液上清を用いた。

【結 果】

1. 合計 26 個のハイブリドーマ細胞を得て、E 蛋白質を認識する 8 つの単クローン抗体を樹立した
2. その IgG サブタイプは IgG1 (4 クローン)、IgG2a (1 クローン)、IgG2b (3 クローン) であった。
3. ペプチドマッピングの結果、3 つの単クローン抗体は E 蛋白の 1-51 残基の領域、2 の単クローン抗体は 52-135 残基の領域を認識しており、3 つの単クローン抗体は立体構造を認識していた。
4. 全ての単クローン抗体でウイルス中和活性は検出できなかった。
5. 2 つ単クローン抗体 (8H3、3F4) を用いて IgM 捕捉 ELISA 法を構築し、健康人 30 検体、黄熱ウイルス感染ヒト血清 12 検体 (黄熱患者 6 検体、ワクチン接種者 6 検体)、他のフラビウイルス感染者血清 7 検体 (デング熱 4 検体、日本脳炎 3 検体)、合計 49 検体を測定した。全ての健康人と他のフラビウイルス感染者 37 検体は全て陰性であり、黄熱ウイルス感染者 12 検体は全て陽性で、感度、特異度ともに 100% であった。
6. 単クローン抗体 (4C9, 3F4) を用いて構築したサンドイッチ ELISA 法による抗原検出法を用いて実施した感染培養液中の抗原検出限界は 1000ffu/ml となった。

【考 察】

黄熱ウイルス野生株の E 蛋白質に対する種特異的な単クローン抗体を樹立し、黄熱特異的 IgM 抗体の検出や抗原検出に利用可能であることが確認された。これまで、黄熱の診断にはワクチン株 (17D) 株に対する単クローン抗体と 17D 株抗原が用いられてきたが、今後は我々のグループで開発している黄熱ウイルス野生株 VLP (ウイルス様粒子) と今回樹立した野生株の単クローン抗体で構築する診断系により、より感度が高い抗体、抗原検出系が構築できる可能性がある。

また、今回作製した IgM 捕捉 ELISA はデング熱患者の血清とは交叉反応がなかったが、アフリカではデング熱患者数が増加傾向にあり、ジカ熱患者も発生していることから、今後さらに多くの患者血清で交叉反応の評価が必要である。

今回作製した抗原検出 ELISA システムではこれまでより高い感度が得られ、今後フィールドでの黄熱ウイルス保有媒介蚊の調査や、患者血清中のウイルス抗原の検出などにも活用が期待される。

今後、本研究で樹立した単クローン抗体を活用してアフリカの開発途上国で供給可能な黄熱迅速診断薬の開発が期待される。