

氏 名	周 敏
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 甲第 693 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 6 年 3 月 1 0 日
学 位 論 文 題 目	Expeditious neutralization assay for human metapneumovirus based on a recombinant virus expressing Renilla luciferase. (ウミシイタケ由来ルシフェラーゼを発現する組換えヒトメタニューモウイルスを用いた迅速中和抗体価測定法)
審 査 委 員	主 査 教 授 小 笠 原 一 誠 副 査 教 授 縣 保 年 副 査 教 授 岡 部 英 俊

論文内容要旨

※整理番号	699	(ふりがな) 氏名	しゅう 周 敏
学位論文題目	Expeditious neutralization assay for human metapneumovirus based on a recombinant virus expressing Renilla luciferase. (ウミシイタケ由来ルシフェラーゼを発現する組換えヒトメタニューモウイルスを用いた迅速中和抗体価測定法)		
<p>【目的】</p> <p>ヒトメタニューモウイルス(HMPV)は気管支炎・細気管支炎を起こす呼吸器ウイルスである。先天性心疾患をもつ乳幼児や低出生体重児等では重症化することがあるため、小児科領域ではRSウイルスとならんで重要な呼吸器感染症となっている。</p> <p>HMPV 感染に対する免疫応答の解析やワクチン開発には、迅速で信頼性の高い中和抗体価測定法が求められる。しかしながら、HMPV は、培養細胞での増殖が遅く細胞変性効果も弱いため、細胞変性効果やプラークを指標とするこれまでの中和抗体価測定法では、1週間以上を要し、免疫染色等の煩雑な操作が必要である。近年、緑色蛍光色素タンパク質(GFP)発現組換えウイルスを用いた改良法 (NA-GFP 法) が報告され、免疫染色は省略できるようになったが、それでも測定に3-5日ほどかかっていた。</p> <p>そこで本研究では、測定時間の大幅な短縮を目的として、ウミシイタケ由来ルシフェラーゼ (Rluc)を発現する組換えHMPV(rHMPV)を利用した迅速な中和抗体価測定法(NA-Rluc 法)を開発することにした。</p> <p>【方法】</p> <p>(1)HMPV のリバーシジェネティクス法:HMPV Jpn03-1 株のゲノム全塩基配列を決定した。転写複製に関わる N、P、L、M2-1 タンパク質発現プラスミドと、HMPV ゲノム RNA を発現するプラスミドを作製し、それらを培養細胞に導入することで組換えウイルスを作製する系を確立した。次に、ゲノム発現プラスミドを改変し、GFP と Rluc を発現する rHMPV-Rluc/GFP と GFP を発現する rHMPV-GFP を作製した。(2)プラークアッセイ:ウイルスを LLC-MK2 細胞に接種後、トリプシン含有 3%メチルセルロース培養液を重層し、一週間後にプラーク数を計測した。(3)免疫沈降とイムノプロット解析:HMPV に対して高い中和能を有する血清 No.9 を使って解析した。血清 No.9 を protein G あるいは Glutathione セファロースビーズと混合後、遠心し、その上清をコントロールとして利用した。FLAG タグ付加ウイルスタンパク質(F,G,SH)を一過性に発現させた HEK293T の細胞溶解液を血清 No.9 あるいはビーズ処理コントロールを使って免疫沈降後、抗 FLAG 抗体によるイムノプロット解析を行った。(4)NA-Rluc 法と NA-GFP 法:段階希釈した血清と rHMPV-Rluc/GFP (50pfu/well) を混合後、LLC-MK2 細胞に接種した。NA-Rluc 法では、トリプシン非添加培養液を重層し、1日後に Rluc 活性を測定した。NA-GFP 法では、トリプシン含有培養液を重層し、7日後に LAS-4000 を利用して GFP 発現を定量化した。中和抗体価は、Rluc 活性あるいは GFP 発現が 50%に抑制されたときの血清希釈倍率の逆数と定義した。</p>			

【結果】

(1)HMPV のリバースジェネティクス法を確立し、目的の rHMPV-Rluc/GFP と rHMPV-GFP を得た。(2)rHMPV-Rluc/GFP の増殖能は、野生株とほぼ同じ増殖能をもつ rHMPV-GFP と大きな差はなかった。(3)HMPV は、多段増殖するのにトリプシンを必要とする。rHMPV-Rluc/GFP は、10 pfu/well 以上で接種すれば、トリプシン非存在下でも接種 24 時間後には Rluc 活性を検出できることがわかった。(4)Rluc 活性を指標とした血清 No.9 の中和曲線は、GFP 発現を指標とした場合とほぼ同様のものが得られた。protein G 処理により IgG を除いたコントロールサンプルでは、中和活性が喪失していた。イムノプロットの結果から、中和活性は、HMPV F タンパク質に結合する IgG に由来すると推定された。(5)ヒト血清 23 検体について、NA-Rluc 法と NA-GFP 法で中和抗体価を測定した。中和抗体陽性・陰性の判定は、両者の間ですべて一致した。また、両者の中和抗体価の値には正の相関が認められた。

【考察】

NA-GFP 法でも 3-5 日の測定時間が必要であったが、今回確立した NA-Rluc 法は 1 日以内と大幅な時間短縮ができた。また、培養液にトリプシンを添加する必要がないため、トリプシンによる細胞剥離が起こらず、測定が失敗するリスクは激減した。NA-GFP 法と同程度の感度と特異性を持つことが明らかとなったが、使用ウイルス量 (50pfu/well) を減らすことにより、より高感度な測定法に改善できる可能性がある。また、NA-Rluc 法では、アガロース重層や免疫染色など煩雑の手順が不必要であり、操作の簡便性の点でも NA-GFP 法に劣らない。今後、Rluc 活性測定のプロセスを自動化すれば、多数のサンプルを迅速に測定できるかもしれない。

【結論】

今回確立した HMPV 中和抗体価測定法は、これまでの方法の中で最も迅速且つ簡便な測定法となった。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	699	氏名	周 敏
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11 ポイント、600 字以内で作成のこと。)</p> <p>ヒトメタニューモウイルス (HMPV) 感染に対する免疫応答の解析やワクチン開発には、迅速で信頼性の高い中和抗体価測定方法が必要である。しかし、HMPV は培養細胞での増殖が遅く、測定に 1 週間以上を要する。そこで、本研究では、測定時間の大幅な短縮を目的として、ウミシイタケ由来ルシフェラーゼ (RLuc) を発現する組換え HMPV を作成し、迅速な中和抗体価測定方法 (NA-RLuc 法) の開発を試みた。その結果、</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) HMPV のリバーシジェネティクス法を確立し、ウミシイタケ由来ルシフェラーゼを発現する組換え HMPV (rHMPV-RLuc/GFP) を作成し、野生株と同等の増殖能を確認した。 2) rHMPV-RLuc/GFP 感染 24 時間後に、トリプシン非存在下でも RLuc 活性を検出できた。 3) 中和抗体 No. 9 による中和曲線は、RLuc 活性を指標としても GFP 発現を指標としてもほぼ同じであった。 4) ヒト血清 23 検体の中和抗体陽性・陰性の判定は、NA-RLuc 法と NA-GFP 法ですべて一致し、中和抗体価は正の相関を認めた。 <p>以上の結果から、NA-RLuc 法はこれまでの中和抗体価測定法の中で最も迅速かつ簡便な方法であることが明らかとなった。</p> <p>本論文は、HMPV の迅速かつ簡便な中和抗体価測定法を開発したものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 600 字)</p>			
<p>(平成 28 年 1 月 28 日)</p> <p>26</p>			