

学位論文題名

Characterization and application of epitope of
monoclonal antibody E5/G6,
which binds to the nucleocapsid protein of hantaviruses;
Development of serological assays for Thottapalayam virus,
an insectivore-borne hantavirus

(抗ハンタウイルス核蛋白単クローン抗体 E5/G6 エピトープの解析と応用；
食虫目由来ハンタウイルス Thottapalayam virus 血清診断法の確立)

学位論文内容の要旨

[背景]

ハンタウイルスはブニヤウイルス科ハンタウイルス属に属し、げっ歯類を自然宿主として、その排泄物等を介してヒトに感染する人獣共通感染症ウイルスである。ヒトに感染すると、ウイルス型によって腎症候性出血熱 (HFRS)あるいはハンタウイルス肺症候群(HPS)を起こす。宿主げっ歯類は持続感染しており、無症状でウイルスを排出する。

ハンタウイルス属は遺伝学的性状等を基に現在 22 種類に分類されており、それぞれ抗原性、病原性、宿主げっ歯類が異なっている。アジアからヨーロッパに分布する Hantaan (HTNV)、Seoul (SEOV)、Puumala (PUUV)および Dobrava (DOBV) virus は HFRS を、南北アメリカ大陸に分布する Sin Nombre (SNV)および Andes (ANDV) virus は HPS を引き起こす。

ハンタウイルスは一本鎖(-)RNA ウイルスであり、3 分節の S、M、L segment をゲノムとして持っており、それぞれ核蛋白(N)、ウイルス表面 Glycoprotein(Gc、Gn)、および RNA polymerase(LP)をコードしている。N は immunodominant であり、感染後 N に対する抗体は血清中に強く誘導されるため、組換 N 抗原(rN)を用いた血清学的感染診断は有効である。また、型共通抗原性保存領域である N の N 末端領域を削除した Truncated 抗原を用いたウイルス型鑑別診断も可能である。

モノクローナル抗体(MAb)E5/G6 は、マウスに HTNV の N を免疫して作出され、ハンタウイルス属の N の共通抗原エピトープを最も広く認識する MAb である。E5/G6 エピトープは N が立体構造を形成する際に内側に畳まれる領域と予想され、E5/G6 抗体は感染患者血清中に誘導されない。そのため、capture ELISA で抗原を捕捉するのに適しており、これまで E5/G6 を利用した capture ELISA が開発され、高信頼度の鑑別診断を可能にしてきた。

Thottapalayam virus (TPMV)は、1964年にインド南部で捕獲された食虫目 *Suncus murinus* (shrew)から分離されたウイルスである。その後 1976年に韓国でセスジネズミから HTNV が初めて分離されてハンタウイルス属が新たに作られたが、TPMV は分離以来未分類のまま、最近になってハンタウイルス属に属することが判明した。既報の TPMV S segment の塩基およびアミノ酸配列は、いずれも他のハンタウイルスとは大きく異なっており、M および L 配列についてはまだ報告されていない。shrew が自然宿主と予想されているが、これまで TPMV を対象とした疫

学調査は行われておらず、本来の自然宿主やヒトへの病原性も不明である。

[目的]

本研究では、MAb E5/G6 の認識エピトープ配列を解析した。また、これまでほとんど研究されていない TPMV について、抗原性プロファイルを行うとともに、TPMV N に E5/G6 エピトープを組み込んだ改変 rN (rN/E5G6) を作製し、E5/G6-capture ELISA の確立を試みた。これを用いて、東南アジア由来のヒト不明熱患者および野生 shrew の血清学的疫学調査を行った。

[方法]

ペプチド合成機を用いてさまざまな配列のペプチド鎖を合成し、それに E5/G6 産生ハイブリドーマ培養上清を反応させて E5/G6 エピトープ配列を決定した。さらに、異なったハンタウイルス間での E5/G6 の反応性の違いを検討した。また TPMV について、各種抗体を用いて抗原性解析を行った。E5/G6 エピトープを人工的に組み込んだ rN/E5G6 を作製し、TPMV 診断 ELISA 系を確立するとともに、東南アジア由来のヒト不明熱患者血清 478 検体および野外捕獲 shrew 血清 14 検体について抗体調査を行った。ELISA 陽性のものについて、TPMV 感染 Vero E6 細胞抗原を用いた間接蛍光抗体法 (IFA)、Western blot (WB)、および TPMV を用いたウイルス中和試験 (FRNT) を行い、確定診断を行った。

[結果]

SEOV SR-11 株 N アミノ酸(aa)配列に基づき、aa 140-160 の領域について 10 mer/9 overlap のペプチド鎖 32 種類を合成し、E5/G6 と反応させたところ、SYEDVNGIRK(aa164-173)および YEDVNGIRKP(aa165-174)に強い反応がみられた。さらに短いペプチドを合成して試験したところ、E5/G6 が認識する最小エピトープは EDVNGIRK(aa166-173)であることが明らかとなった。また、aa 165-174 について、1 aa ずつアラニンあるいはセリンに置換したアラニン/セリンスクリーンを行ったところ、D:167、G:170、I:171 および R:172 が E5/G6 結合に不可欠なアミノ酸残基であることが分かった。データベースより 80 種以上のハンタウイルス株の N 配列を調べたところ、各ウイルス型毎で共通の配列を有していることが分かった。それぞれの配列についてペプチド鎖を合成して E5/G6 と反応させたところ、本配列にはいくつかのバリエーションが存在するものの、すべて E5/G6 と反応することが分かった。特に PUUV や PHV 等の配列では、SEOV と比較して 115%と高い反応性を示した。一方、D:167 が E に置換された SNV、ANDV、TULV 等では若干反応性が低くなることが示されたが、E5/G6 はすべてのげっ歯類由来ハンタウイルスに反応することが証明された。このような広い反応スペクトルを持つ MAb はこれまでに開発されておらず、E5/G6 はハンタウイルス抗原検出試薬として非常に有用であることが分かった。

次に TPMV について抗原性解析を行った。TPMV 抗原の各 MAb に対する反応パターンを調べたところ、Gc 領域では他のげっ歯類由来ハンタウイルスと若干交差抗原性が認められたが、N および Gn 領域では交差せず、また感染マウス血清を用いた IFA 試験でも他のハンタウイルスと大きく抗原性が相違した。このことから、TPMV 感染を診断するには新たな診断法が必要であることが明らかとなった。

TPMV 感染マウス血清は WB において TPMV 抗原を認識しなかったことから、TPMV N には linear エピトープが存在しない可能性が示唆されたが、立体構造依存性エピトープを持つ蛋白を組換抗原として発現させる場合、昆虫細胞発現系が優れた抗原性を再現できることが知られている。そのため、TPMV N エンコード領域全長を発現する組換 baculo ウイルスを作製した。また、TPMV は唯一 E5/G6 と反応しないことが分かったため、エピトープ解析の結果に基づいて該当領域のアミノ酸配列を改変し、E5/G6 反応性を有する組換抗原(rN/E5G6)を作製した。rN/E5G6 は免疫血清と E5/G6 の双方に強く反応性を示したことから、E5/G6 capture ELISA に応用できる TPMV rN を作製することに成功した。また、これを用いた診断 ELISA 系の確立を試みたところ、免疫血清を特異的に検出することができ、特異性の高い TPMV 感染診断 ELISA 系の確立に成功した。本抗原、HTNV、PUUV および SNV 抗原を用いて、タイ由来ヒト不明熱患者血清について抗体調査を行ったところ、うち同一患者から採取された 2 例 (B-3、B-4) が TPMV IgG 抗体陽性であった。IgM 抗体は検出されなかった。別の 7 例については HTNV に弱い陽性

反応を示した。B-3 および B-4 について、さらに IFA、WB および FRNT を行ったところすべてに陽性を示し、TPMV 感染歴がある可能性が示唆された。さらに、インドネシアで捕獲された野生 shrew 血清について抗体調査を行ったところ、うち 2 例(#49、#69)が ELISA 試験陽性であり、さらに#49 については FRNT でも陽性反応が得られた。

[考察]

本研究では、E5/G6 エピトープを詳細に解析することにより MAb E5/G6 の有用性を示すとともに、本エピトープを組み込んだ TPMV rN 抗原の作製に成功した。さらに、これを用いて TPMV 抗体を特異的に検出できる血清学的診断法を確立した。本法を用いた疫学調査により、ヒト患者 2 例(1 名)および野生 shrew 2 例の陽性血清を発見した。ヒトおよび動物の TPMV 陽性例の報告はこれが初めてである。このことから TPMV はヒトへの感染性を持っていることが示唆されたが、IgM 抗体は検出されなかったため、病原性との関連性は不明である。野生 shrew については、ELISA 試験陽性を示した 2 例はいずれも IFA および WB では陽性であったが、うち 1 例のみ FRNT で TPMV を中和した。そのため、自然界では TPMV に関連する変異ウイルスが存在している可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 川 二 郎

副 査 教 授 有 賀 正

副 査 教 授 玉 城 英 彦

学 位 論 文 題 名

Characterization and application of epitope of monoclonal antibody E5/G6, which binds to the nucleocapsid protein of hantaviruses; Development of serological assays for Thottapalayam virus, an insectivore-borne hantavirus

(抗ハンタウイルス核蛋白単クローン抗体E5/G6エピトープの解析と応用；
食虫目由来ハンタウイルス Thottapalayam virus 血清診断法の確立)

ハンタウイルスはブニヤウイルス科ハンタウイルス属に属し、自然宿主である齧歯類からヒトに感染する人獣共通感染症原因ウイルスである。同属は遺伝学的性状を基に現在22種類に分類されており、アジアに分布する Hantaan (HTNV)、Seoul (SEOV)、ヨーロッパに分布する Puumala (PUUV) virus 等は腎症候性出血熱を、南北アメリカ大陸に分布する Sin Nombre (SNV)、Andes virus 等はハンタウイルス肺症候群を引き起こす。ハンタウイルスは3分節の ss(-)RNA ゲノム(S, M, L)を持っており、それぞれ核蛋白(N)、表面 Glycoprotein (Gc, Gn)、RNA polymerase をコードする。N は immunodominant であり、組換 N 抗原を用いた血清診断は有効である。モノクローナル抗体(MAb) E5/G6 は、ハンタウイルス属 N の共通抗原エピトープを広く認識する。E5/G6 抗体は患者血清中に誘導されないため、E5/G6 を N 抗原の捕捉に応用した capture ELISA 法 は高信頼度のハンタウイルス感染診断を可能にしてきた。Thottapalayam virus (TPMV)は、1964年にインド南部で食虫目 *Suncus murinus* (shrew) から分離された唯一の齧歯類以外から分離されたハンタウイルスである。TPMV S 配列は他の齧歯類由来ハンタウイルスとは大きく異なっており、M および L 配列については未だ報告はない。これまでに TPMV を対象とした疫学調査は行われておらず、TPMV の自然宿主、ヒトへの感染性および病原性は不明である。そのため、申請者は MAb E5/G6 の認識エピトープ配列を解析するとともに、本エピトープタグを組み込んだ TPMV 組換 N 抗原を作製して血清診断法を確立し、これを用いてヒトおよび shrew での TPMV 疫学調査を行った。

SEOV N アミノ酸(aa)配列に基づき、aa 140-180 について 10 mer/9 overlap のペプチド鎖 32

種類を合成してエピトープマッピングを行ったところ、aa 164-174 中に E5/G6 エピトープが存在することが予測された。さらに短いペプチド鎖で試験したところ、E5/G6 認識最小配列は EDVNGIRK (aa 166-173) の 8 mer であることが分かった。また、アラニン/セリンスクランを行なったところ、D:167、G:170、I:171 および R:172 が E5/G6 結合に必須な aa であることが明らかとなった。データベースより 80 種類以上の齧歯類由来ハンタウイルス株での該当領域配列を調べ、それぞれについて試験したところ、いずれも E5/G6 と反応することが分かった。このような広い反応スペクトルを持つ MAb は他に開発されておらず、E5/G6 はハンタウイルス抗原検出試薬として有用であることが分かった。

次に、TPMV について抗原性解析を行ったところ、Gc 領域では齧歯類由来ウイルスと若干交差抗原性が認められたが、N および Gn 領域では交差しなかった。また、TPMV は E5/G6 とも反応しないことが分かったため、エピトープ解析の結果に基づいて該当領域 aa 配列を改変し、E5/G6 反応性を有する TPMV 組換 N 抗原を作製した。また、これを用いた TPMV 感染診断 ELISA 系を確立した。本抗原、HTNV、PUUV および SNV N 抗原を用いて、タイ由来ヒト不明熱患者血清 478 検体の抗体調査を行ったところ、うち 2 検体 1 症例について抗 TPMV IgG 抗体陽性であった。これらは、さらに IFA、Western blot およびウイルス中和試験でも陽性を示した。TPMV はヒトへの感染性を有していることが明らかとなったが、いずれも IgM 抗体は検出されなかったため、病態との関連は断定できなかった。さらに、インドネシアで捕獲された野生 shrew 血清 14 検体について抗体調査を行ったところ、うち 2 検体で ELISA、IFA および Western blot 陽性が認められ、うち 1 検体でのみ中和抗体価が確認された。そのため、自然界では TPMV に類似する食虫目関連ウイルスが存在している可能性が示唆された。

この論文は、これまでほとんど研究がなされていなかった TPMV に対する血清診断法を新たに確立し、本ウイルスが東南アジアにおいて疾患の原因となり得ることを初めて明らかにした研究として高く評価され、今後本ウイルスの分布および流行の詳細が明らかになることが期待される。

審査にあたり、副査有賀教授から、shrew とヒトとの接点、TPMV の宿主域、ヒト陽性検体の症状と予想される TPMV の病態についての質問があった。同じく副査玉城教授から、shrew での陽性率、診断法の特異度と感度、今後の研究展開についての質問があった。次いで主査有川教授から、HTNV 型陽性検体の鑑別、地域差による shrew のバリエーションについて質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は本研究の結果や文献内容を引用し、自身の考察を交えながらおおむね適切な回答をした。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。