

ヒト糞便中の抗 *Norovirus*-IgA 検出のための ELISA 法の検討

森 功次*, 林 志直*, 佐々木 由紀子*,
野口 やよい*, 村田 以和夫*, 諸 角 聖**

Design of ELISA Method for Detection of Fecal Anti-Norovirus IgA

Kohji MORI*, Yukinao HAYASHI*, Yukiko SASAKI*,
Yayoi NOGUCHI*, Iwao MURATA* and Satoshi MOROZUMI**

A majority of viral gastroenteritis is caused by the *Norovirus* (NV). PCR is usually used as a screening test for the NV. We have designed a new method for detecting anti-NV IgA from fecal samples by ELISA, fixed with the expressed NV protein as an antigen. On comparison between our new method and PCR, although there are differences in the results, quality of samples which has relation for time course of antibody appearance. However, for detection of NV, PCR and IgA-ELISA each have effective terms in time course of NV infection status in patients.

Keywords: ノロウイルス norovirus, 抗 NV-IgA 抗体 anti-NV IgA, 酵素抗体法 Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA) 集団胃腸炎 community gastroenteritis, ウイルス性胃腸炎 viral gastroenteritis

はじめに

ウイルス性胃腸炎の集団事例中、検出ウイルスの大半をしめるのは *Norovirus* (ノロウイルス: NV) である¹⁾。現在のところ NV のスクリーニング検査は、ウイルス遺伝子の検出を目的とした RT-PCR 法によって実施されている。PCR 法は検出感度が高いという利点はあるが、逆転写酵素など検査に用いる試薬が高価なこと、手技が煩雑なこと、さらに検体の搬入から結果が得られるまでに 2, 3 日を要することなどの問題点がある。そこでスクリーニング検査のためには、簡易・迅速な検査法の新たな開発研究が必要とされている。すでに NV の抗原を検出する酵素抗体法 (ELISA 法) によるキットが市販されているが、NV の変異が多様なことから対応できる範囲に限りがあると考えられている。

NV は腸管上皮細胞に感染し、その結果として粘膜組織には NV に特異的な IgA 抗体が産生されるとともに、NV による胃腸炎は一過性の感染であるため、抗原排泄期より抗体産生期のほうが長いことが考えられる。今回これらの点に着目し、簡易なスクリーニング検査のみならず、集団胃腸炎におけるウイルスキャリアーや既往者の検索、感染経過の推定に応用する目的で、ELISA 法による糞便試料中の抗 NV-IgA 抗体検出法について検討を行った。糞便試料からの IgA 測定系についての報告は、ワクチントライアルの関係から培養可能なノタウイルスの感染と免疫応答についての報告がなされている²⁻⁵⁾。しかし、NV に関してはパキウイルスを用いて発現させた NV 中空粒子による免

疫応答についての報告が主である⁶⁻¹⁰⁾。NV は現在のところ培養方法が確立していないため、ELISA 法に用いる抗原を得ることが困難である。したがって、NV に特異的なタンパク質を大腸菌に発現させ、抗原を得る方法についても検討を行ったので報告する。

方 法

1. ヒト糞便試料中の IgA 抗体測定 ELISA 法の開発

1) 糞便試料の作製: 糞便を PBS(-) で 10% 乳剤とし、HCFC141b (ダイキン) を等量加えて混和後 3,000 rpm, 4, 15 分間の遠心を行った。得られた上層をさらに 6,000 rpm, 4, 30 分間遠心し、この上清に Okhuysen ら¹¹⁾ の方法にしたがい、プロテアーゼ阻害剤としてアプロチニン (Aprotinin: Bovine lung protease inhibitor: Sigma) を 1% の割合で添加し、IgA 抗体測定用の試料とした。

2) total-IgA の測定: 糞便試料中の total-IgA 抗体を検出する目的で、96 穴プレート (MAXISORP: NUNC) に抗ヒト IgA 抗体 (1 mg/ml, Sigma) を Carbonate Buffer (pH9.6) で 200 倍したものを 1 穴あたり 100 μ l ずつ分注し、4, overnight で固相化した。この固相プレートを 0.1% tween 加 PBS(-) で洗浄後、1% FCS 加 PBS(-) で 37, 3 時間のブロッキングを行い、抗 IgA 抗体測定用プレートとした。いくつか反応条件を検討した結果から、まずこのプレートに糞便試料 100 μ l を加えて 37, 3 時間の反応後洗浄し、次に HRP-conjugate 抗ヒト IgA 抗体 (Sigma) の 1,000 倍溶液を 100 μ l 添加し 37, 1 時間の反応を行

* 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakuninn-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** 東京都健康安全研究センター微生物部

った。さらに洗浄し tetramethylbenzidine(TMB)溶液 200 μ l を加え室温で 5 分反応させ、停止液 50 μ l を加えて 450/650 nm の波長で吸光度の測定を行った。

2. NV 抗原の作製

1) 超遠心分離法による糞便試料からの抗原精製：糞便試料を PBS(-)により 10%乳剤とし、HCFC を等量添加後 3,000 rpm, 4 分, 15 分間の遠心を行い、得られた上層をさらに 6,000 rpm, 4 分, 30 分間の遠心を行った。この上清を 30%のショ糖溶液に重層し、27,000 rpm, 4 分, 3 時間の超遠心を行った。得られたペレットを TN バッファーで再浮遊させ、この浮遊液を部分精製ウイルス抗原として Carbonate Buffer(pH9.6)を用いて 4 分, overnight で 96 穴プレートに固相化した。

2) 大腸菌による NV 特異タンパク質の発現：NV 特異タンパクの発現には IMPACT-CN(Biolabs) キットを用い、大腸菌による NV 抗原の増幅を試みた。抗原タンパク質の増幅を試みた領域は、NV ウイルス粒子を形成する capsid 領域の全域でなく、capsid 領域の中でも共通性の高い S ドメインを標的とした。NV の G および G に型別された試料をもとに実施した。得られたタンパク質溶液を抗原として 96 穴プレートに Carbonate Buffer(pH9.6)を用いて 4 分, overnight で固定した。

3) 抗 NV 抗体の測定：上記の 1), 2) で作製した抗原固相化プレートを total-IgA 検出用プレートと同様の条件でブロッキングし、糞便試料との反応を行った。

結果および考察

1. Total-IgA の測定

NV 陽性の糞便試料を用いて total-IgA の測定を行った結果、試料の希釈倍率が 10 から 10² 程度では希釈による吸光度の減少が明確でなかったため、2 から 2²² まで希釈列を作製し、測定を行った。その結果 2¹⁵ 程度まで吸光度 0.1 を越えるものがみられた。また糞便試料に含まれる IgA 抗体のレベルと、血液中に含まれる IgA 抗体のレベルを比較する目的で、NV 陽性患者から得られた血清について、POD 標識の抗ヒト IgA 抗体を用いて血清中の IgA 検

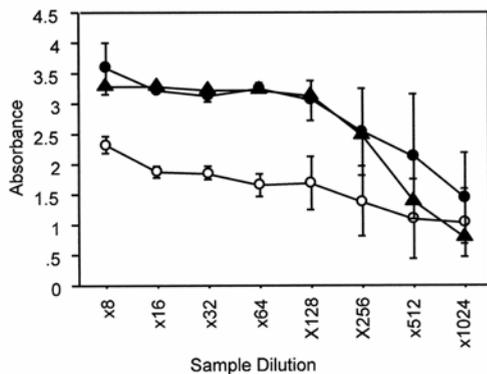


Fig.1 Detection of Total IgA

● NV PCR positive ○ NV PCR negative ▲ Patient serum

出を試みた結果、糞便試料と同じ希釈倍率では同程度または低い値を示した。しかし NV 陰性事例の糞便試料を用いて希釈列を作製した場合でも、512 倍で陽性を示す例がみられた。以上の結果から糞便試料に含まれる total-IgA 抗体は ELISA 法により検出できることは確認されたが、total-IgA の測定では NV に非特異的な IgA が多量に糞便試料に含まれることがわかり、NV 陽性試料と陰性試料間に IgA レベルの明確な差は認められなかったため、特異的 IgA の測定法の開発に移行した (Fig.1)。

2. 糞便試料からの部分精製抗原を用いた糞便中の IgA 検出

糞便試料から部分精製した抗原を固相化したプレートをを用いて、NV に特異的な糞便中の IgA 検出を試みた。部分精製抗原の希釈列 10 倍から 1,280 倍を作製してプレートに固相化し、NV 陽性の糞便試料と NV 陰性の糞便試料を 100 μ l ずつ添加して ELISA を行った。反応後の吸光度を測定した結果 total-IgA の測定系より低値の吸光度を示す傾向がみられた。また、この抗原に対する糞便試料中の IgA レベルと血中の IgG レベルを比較する目的で患者血清の希釈列を作製し、POD 標識の抗ヒト IgG 抗体を用いて抗原に特異な血清中の IgG 検出を試みた。その結果、NV 陽性の糞便試料と同様、血清中の IgG の吸光度は total-IgA 測定系より低い傾向がみられ、血中の NV に特異的な IgG 抗体のレベルは糞便中の IgA 抗体のレベルより低いことが推察された。このような吸光度の低値推移は、抗原の特異性が向上した結果であると思われる。希釈による吸光度の低下は NV 陰性試料で特に顕著であったが、そのうちいくつかは NV 陰性の試料にもかかわらず 1,280 倍の抗原を固相化したウェルでも吸光度が 0.1 を越える試料がみられた。NV に特異的な IgA を測定するためには糞便試料の超遠心のペレットより得られた抗原を用いた測定系では、抗原の精製度を高める等により特異性をさらに向上させる必要があると考えられた (Fig.2)。

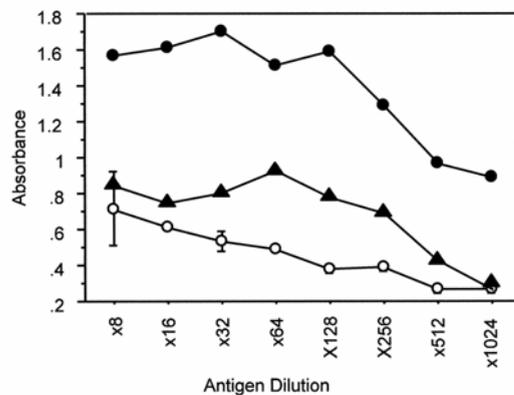


Fig.2 Reaction of IgA and Fecal Antigen

● NV PCR positive ○ NV PCR negative ▲ Patient serum

3. 大腸菌に発現させたタンパク質を用いた特異的 IgA の検出

capsid 領域の N 末端側の遺伝子を増幅するプライマー

として G 用の G1R1, G1F2 および G 用の G2R1, G2F2 がそれぞれ設定されている¹²⁾。本検討に当たっては PCR プロダクトを組み込む際のフレームや末端アミノ酸, 制限酵素サイトなどの制約などから, それぞれのプライマーをモディファイしたものを作製した (Table 1)。

G1R1	5'-CCAACCSARCCATTRTACATTTG-3'
	5'-AAACTGCAGAACCCAGCCATTATA-3'
G1F2	5'-TGATGATGGCGTCTAAGGAC-3'
	5'-ATGATGATGGCGTCTAAGGAC-3'
G2R1	5'-GCATAACCATTRTACATTCT-3'
	5'-AAACTGCAGATAACCATTGTACAT-3'
G2F2	5'-GTGAATGAAGATGGCGTCGA-3'
	5'-TGAATGAAGATGGCGTCG-3'

Table 1. Modified Primers for Protein Expression

これらのプライマーペアにより RT-PCR を行い, 得られた PCR プロダクトを Sure Clone Ligation Kit (amersham pharmacia) および IMPACT-CN キット添付の pTYB ベクターを用いて添付のコンピテントセル (*E.Coli* Strain ER2566) に導入し, 大腸菌細胞の形質転換を行った。これを LB/Amp プレートで培養し出現した白色コロニーとなったものを選択し, 得られたクローンからキットのプロトコールにしたがってタンパク質を発現させ精製した。すなわち, クローン大腸菌は 0.5 mM IPTG 添加の LB/Amp 培地で振とう培養することにより, 大腸菌と同時に目的とするタンパク質とキチンピーズに結合できるバインディングドメインを発現させた。タンパク質発現後の菌液を 3,000rpm, 4, 10 分間の遠心により集菌し, Cell Lysis Buffer で浮遊させた後に超音波処理により菌体を破砕した。この液をキチンピーズ (Biolabs) を充填したカラム (Biorad) に通し, バインディングドメインに結合させ目的のタンパク質を捕捉させた。このカラムを 1 M NaCl で洗浄後, 50 mM の DTT を含む Cleavage Buffer を加えて 16, 40 時間でタンパク質とキチンの解裂反応を行い, DTT を含まない Cleavage Buffer により回収を行った。得られたタンパク質を 10 倍から 1,280 倍に希釈してプレートに固相化し, NV 陽性の糞便試料を 100 μ l ずつ添加して ELISA を行った。反応後の吸光度をみると, 反応に用いた G 型別試料は, G 由来のタンパク質および G 由来のタンパク質双方に等しく反応していた。このことは NV の capsid 領域の中で比較的共通性の高い S ドメインを

ターゲットとしたためと考えられる。しかし超遠心により得られた抗原との反応系と比較して, 測定値はさらに低い値で推移していた。

同様に患者血清の希釈列を作製し, NV に特異的な血清中の IgG 検出を試みた結果, 超遠心による抗原の測定値と比較して, 血清中の IgG の測定値もまた低い値で推移した (Fig.3)。

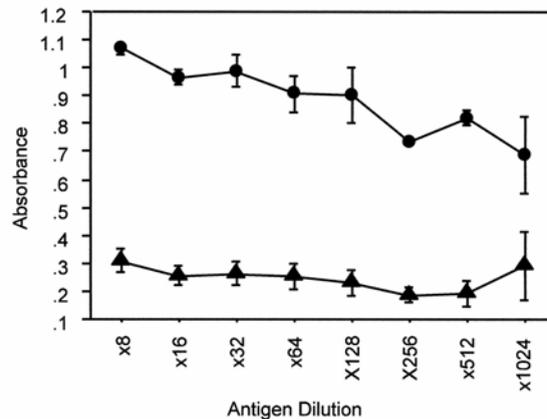


Fig.3 Reaction of IgA and Expression Antigen

● NV PCR positive ▲ Patient serum

このことから NV に特異的な血清中の IgG 抗体のレベルは糞便試料中に含まれる IgA レベルと比較して低いものと推察された。また患者のペア血清の IgG を測定した結果, G プレートで 0.231 から 0.450 および G プレートで 0.294 から 0.428 といずれも急性期より回復期の吸光度が高値を示した。このことから発現させたタンパク質は NV に特異的な抗原であることが確認された。

4. 集団胃腸炎事例における NV 特異的 IgA 測定 ELISA 法の検討

大腸菌に発現させた NV タンパク質を 100 倍希釈して固相化プレートを作成し, NV が検出された集団胃腸炎事例の試料 12 件について IgA 抗体の測定を試みた。反応は total-IgA の測定とあわせて G プレートおよび G プレートに試料を 10, 20, 40, 100 倍希釈して反応を行った (Fig.4)。

この測定値をもとに, 実際の集団例でのスクリーニング検査を考慮してカットオフ値を 0.1 から 0.4 に設定して判定を行い, 陽性群と陰性群試料の希釈倍率とあわせて条件ごとの実測値の有意差検定を試みた。それぞれのカットオフ値による判定および陽性群と陰性群との間に有意差が認められた中で, 希釈倍数とカットオフ値の適合性を検討した。その結果, 最も吸光度の高い組み合わせは, 試料を 10 倍希釈, カットオフ値 0.3 とすることであった。この組み合わせは Fisher の PLSD 法による検定で有意差 ($p < 0.05$) が認められた (Table 2)。この判定基準により, PCR 法の結果と比較検討した。

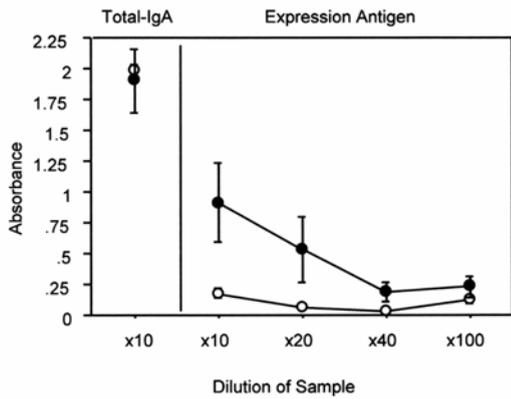


Fig.4A Detection of Faecal IgA in Community Case by Expression GI antigen

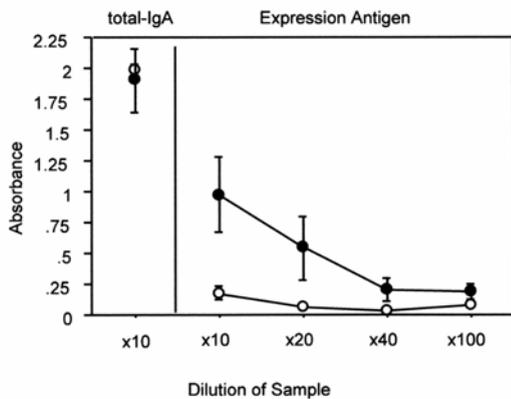


Fig.4B Detection of Faecal IgA in Community Case by Expression GII Antigen

G	Dilution of Antigen	Dilution of Antigen			
		10	20	40	100
Cuttoff	0.1	10	5	3	7
	0.2	7	3	3	3
	0.3	5	3	2	2
	0.4	5	3	2	2

G	Dilution of Antigen	Dilution of Antigen			
		10	20	40	100
Cuttoff	0.1	10	5	3	4
	0.2	8	3	3	2
	0.3	5	3	2	2
	0.4	5	3	2	1

Table2. Comparison of Number between Positive and Cutoff

bold :Area for Significant Difference

検討に用いた集団 12 件の内訳は、PCR 陽性 8 件、陰性 4 件である。G プレート、G プレートとも IgA-ELISA 法の NV 陽性試料の検出感度は PCR 法に比較して 62.5%(5/8)の一致率を示した。また、この集団例における

PCR 法と ELISA 双法の結果の一致率は 75%(9/12)であった (Table3)。

G	PCR	IgA-ELISA	
		Positive	Negative
G	Positive	5	3
	Negative	0	4

G	PCR	IgA-ELISA	
		Positive	Negative
G	Positive	5	3
	Negative	0	4

Table3. Comparison of Results Obtained from PCR and IgA-ELISA

通常の検査に用いられている nested-PCR 法と比較したところ、IgA-ELISA 法と PCR 法の結果に差異がみられる結果となった。その理由として 2 点が考えられる。まず特異的な抗体の糞便中への出現時期という点である。ロタウイルスのワクチントライアルや NV の中空粒子を用いた免疫応答に関する実験から、糞便中に特異的な IgM 抗体が出現するのが感染から約 4 日後、IgA 抗体の出現が約 1 週間後と報告されている^{11,13)}。そのために PCR 法陽性、ELISA 法陰性となる試料がみられたと考えられる。2 点目として ELISA 法には PCR のように試料中に含まれる遺伝子を増幅するステップがない点がある。検査のため実際に搬入されて来る検体は糞便量が一定でなく、時には 1g に満たない場合も見受けられる。したがって通常の集団胃腸炎のスクリーニング検査に IgA-ELISA 法を導入した場合には、検体の採取時期や量により、ELISA 法と PCR 法の検査結果に差異がみられる可能性がある。しかし、抗体産生は抗原排出より長いと考えられることから、感染から時間の経過した試料については ELISA 法陽性、PCR 法陰性となる場合も考えられる。この点から胃腸炎の施設内での流行事例などでは、抗体価から既往者の検索や感染経過の推定が可能であると考えられる。したがって、NV の検索において IgA-ELISA 法はその検査法の特性を活かすことにより PCR 法を補完する検査法の一つとなりうると思われた。

我々は抗 NV-IgA-ELISA 法を開発し、NV 集団感染事例のスクリーニング検査に応用できるか否かについて検討した。IgA-ELISA 法を実際の検査に用いるためには、さらに多くの試料を用いた検討が必要である。とりわけ、NV が関与する事例中の非発症者および病原として食中毒細菌が検出された集団事例の試料、あるいは健康者の試料などについて、陽性・陰性の基準をどのように設定すべきか、時間が経過した際の抗体価の推移や測定値の解釈など今後に残された課題は多い。さらにデータの蓄積をはかり、感度の向上など改良をはかる余地がある。

今回我々が設計し、大腸菌に発現させたタンパク質は中空粒子と異なりコンポーネントであるため、G、G の

共通抗体作製などへの応用も可能性がある。また、今回検討した IgA 抗体の測定系と抗原発現系の手技は、呼吸器系ウイルス感染症や他のウイルス感染症の検査にも応用可能であると思われる。

文 献

- 1) 林 志直, 森 功次, 野口やよい, 他: 東京衛研年報, **51**, 8-13, 2000.
- 2) Siadat-Pajough M, Cai L: *Viral Immunol*, **14**, 31-47, 2001.
- 3) Coulson BS, Grimwood K, Masendycz PJ, et al: *J Clin Microbiol*, **28**, 1367-74, 1990.
- 4) Losonsky GA, Rennels MB, Lim Y, et al: *Pediatr Infect Dis J*, **7**, 388-93, 1988.
- 5) Grimwood K, Lund JC, Coulson BS, et al: *J Clin Microbiol*, **26**, 732-8, 1988.
- 6) Ball JM, Graham DY, Opekun AR, et al: *Gastroenterology*, **117**, 40-48, 1999.
- 7) Ball JM, Hardy ME, Atmer RL, et al: *J Virol*, **72**, 1345-53, 1998.
- 8) Kitamoto N, Tanaka T, Natori K, et al: *J Clin Microbiol*, **40**, 2459-2465, 2002.
- 9) Guerrero AR, Ball JM, Krater SS, et al: *J Virol*, **75**, 9713-9722, 2001.
- 10) Gray JJ, Cunliffe C, Ball J, et al: *J Clin Microbiol*, **32**, 3059-63, 1994.
- 11) Okhuysen PC, Jiang X, Ye L, et al: *JID*, **17**, 566-9, 1995.
- 12) Kobayashi S, Sakae K, Suzuki Y, et al: *Microbiol Immunol*, **44**, 687-93, 2000.
- 13) Oldham G, Bridger JC, Howard CJ, et al: *J Virol*, **67**, 5012-5019, 1993.