

モノクローナル抗体によるサイトメガロウイルス迅速診断法について

山西重機・三木一男・山本忠雄

I はじめに

ヒトサイトメガロウイルスは、先天性サイトメガロ症あるいは骨髄や腎などの臓器移植患者、ATL(成人T細胞白血病)、AIDSを含めたImmunocompromisedhostの日和見感染等で臨床ウイルス学上重要なウイルスである¹⁾。これらサイトメガロ感染症の診断には、臨床診断に加え実験室内診断とりわけウイルスの分離と同定が不可欠であるが細胞培養による分離同定は他のウイルスと比較して容易でなく、時間的にも制限があり、そこで我々は、ウイルスの迅速診断に応用することを目的としてサイトメガロウイルスに対するモノクローナル抗体を作成した。今回このモノクローナル抗体を利用して感度のよい、ペルオキシダーゼ標識抗体を用いたELISA(HRPO-ELISA)と蛍光ELISAを開発し、その特異性と併せて実用性について検討したのでその概要について報告する。

II 材料と方法

1 モノクローナル抗体作製法²⁾

サイトメガロウイルスAD 169株感染HEL細胞をフロインド完全アジュバンドとともにBALB/Cマウスに免疫し、ブースタとして感染細胞の超音波処理上清を腹腔内に接種後、脾細胞を取り出し、ミエローマ細胞(SP 2/0-Ag 14細胞)と50%ポリエチレングリコールで融合し、ハイブリドーマを作製した。ヒトサイトメガロウイルスAD 169株感染細胞を用いた間接蛍光抗体法でスクリーニングし、陽性のものを限界希釈法でクローニングした。

2 サイトメガロウイルス抗体検出ELISA

図1に示したようにIrmiereとGibsonらの方法³⁾で精製したサイトメガロウイルス抗原をコートし、さきに報告³⁾した方法に従った。また標識抗体はペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗マウスIgG(H鎖L鎖特異性)カッペル社を用いた。

プレートコート、精製サイトメガロウイルス

4°C over night
洗 浄

モノクローナル抗体を加える
37°C 1時間
洗 浄
ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG(H鎖L鎖特異性)
37°C 1時間
洗 浄
基質反応(0-phenyldiamine)
室温 1時間
反応停止(4N-H₂SO₄)
吸光度測定

図1 サイトメガロウイルス抗体検出ELISAの手順

3 サイトメガロウイルス検出HRPO-ELISA

図2に示したように抗サイトメガロウイルスIgG(モノクローナル抗体)をコートし、hoseradish peroxidase(HRPO, 東洋紡)と抗サイトメガロウイルスIgGをWillsonとNakaneの方法⁵⁾によって標識し、さきに報告⁶⁾した方法に従った。

プレートコート 抗サイトメガロウイルスIgG(モノクローナル抗体)
4°C over night
洗 浄
抗原を加える(検査材料)
37°C 1時間
洗 浄
ペルオキシダーゼ標識抗サイトメガロウイルスIgG(モノクローナル抗体)
37°C 1時間
洗 浄
基質反応(0-phenyldiamine)
室温 1時間
反応停止(4N-H₂SO₄)
吸光度測定

図2 サイトメガロウイルス検出HRPO-ELISAの手順

4 サイトメガロウイルス検出蛍光ELISA

図3のように、坂口ら⁷⁾の方法に従った。その手順は

プレートコート 抗サイトメガロウイルスIgG(モノクローナル抗体)
 37°C 3時間
 Post coating (2%BSA-PBS)
 室温 1時間
 洗 浄
 抗原を加える(検査材料)
 室温 over night
 洗 浄
 ビオチン標識抗サイトメガロウイルスIgG(モノクローナル抗体)
 室温 1時間 mixing
 洗 浄
 ベータガラクトシダーゼ標識ストレプトアビジン
 室温 1時間 mixing
 洗 浄
 基質(4メチルウンベリフェリル・β・D・ガラクトシド)
 37°C 2時間
 反応停止(グリシンNaOH)
 蛍光測定(4メチルウンベリフェロン)

図3 サイトメガロウイルス検出蛍光ELISAの手順

マイクロプレート(Immulon II Flat Bottom Plates)に抗サイトメガロウイルスIgGを加えて、37°C 恒温槽中に3時間静置しコートした。次に2%BSA-PBSでPost coatingをおこなったあと洗浄し、ウイルス抗原を加えて室温でover nightした。再び洗浄後、ビオチン標識⁹⁾した抗サイトメガロウイルスIgGを加え、室温1時間ミキサーで振とうした。更に洗浄し、ベータガラクトシダーゼ標識ストレプトアビジンを加え室温1時間ミキサーで振とうした。洗浄後、基質(4メチルウンベリフェリル・β・D・ガラクトシド)を加え、37°C2時間反応後、グリシン-NaOHを加えて反応を停止させ自動蛍光光度測定器(Fluoroskan Flow社)で蛍光を測定した。

III 結 果

1 サイトメガロウイルスに対するモノクローナル抗体の性状

クローニングの結果、得られた33株のサイトメガロウイルス特異抗体産生クローンのうち免疫沈殿法によって認識ポリペプチドの明らかな15種を表1のように、認識ポリペプチドと間接蛍光抗体法による抗原の局在から5群に分類した。さらに認識する抗原が早期あるいは後期に発現するか否かをDNA合成阻害剤によって調べたところ、いずれも後期抗原であった。

表1 ヒトサイトメガロウイルスに対するモノクローナル抗体の性状

群	局 在	認識ポリペプチド	抗原の発現	モノクローナル抗体
1	核(核内封入体)	140Kd	後期	CM-1, CM-3, CM-7, CM-9, CM-30
2	核(核内封入体)	45, 33Kd	後期	CM-8, CM-13
3	細胞質(細胞質内封入体)	56Kd	後期	CM-4, CM-6, CM-10, CM-12
4	細胞質(細胞質内封入体)	95Kd	後期	CM-25, CM-28
5	細胞質(びまん性)	60Kd	後期	CM-20, CM-30

表2 株特異性とヘルペスウイルスグループとの交叉反応

群	単クローン抗体	HCMV AD 169	HCMV OU-1	HCMV OU-2	VZV SY	HSV-1 F	HSV-2 HG52
1	CM1	+	+	+	-	-	-
	CM3	+	+	+	-	-	-
	CM7	+	+	+	-	-	-
	CM9	+	+	+	-	-	-
	CM30	+	+	+	-	-	-
2	CM8	+	+	+	-	-	-
	CM13	+	+	+	-	-	-
3	CM4	+	+	+	-	-	-
	CM6	+	+	+	-	-	-
	CM10	+	+	+	-	-	-
	CM12	+	+	+	-	-	-
4	CM25	+	+	+	-	-	-
	CM28	+	+	+	-	-	-
5	CM20	+	+	+	-	±	±
	CM23	+	+	+	-	-	-

また、これらモノクローナル抗体の株特異性ならびに他のヘルペスグループのウイルスとの交叉反応について検討した結果は、表2に示した。サイトメガロウイルスAD 169株、分離株でいずれの抗体ともよく反応した。

2 サイトメガロウイルスとモノクローナル抗体

5日間培養した感染HEL細胞とその培養上清をIrmiereとGibsonらの方法で密度勾配遠心し、未精製も含めて、6種類の抗原を用いて、これをコートし、15種類のモノクローナル抗体と反応させELISAで抗体を測定した結果は、図4に示した。培養上清由来の抗原では、CM-10、感染細胞由来の抗原からは、CM-20がより大きく反応した。

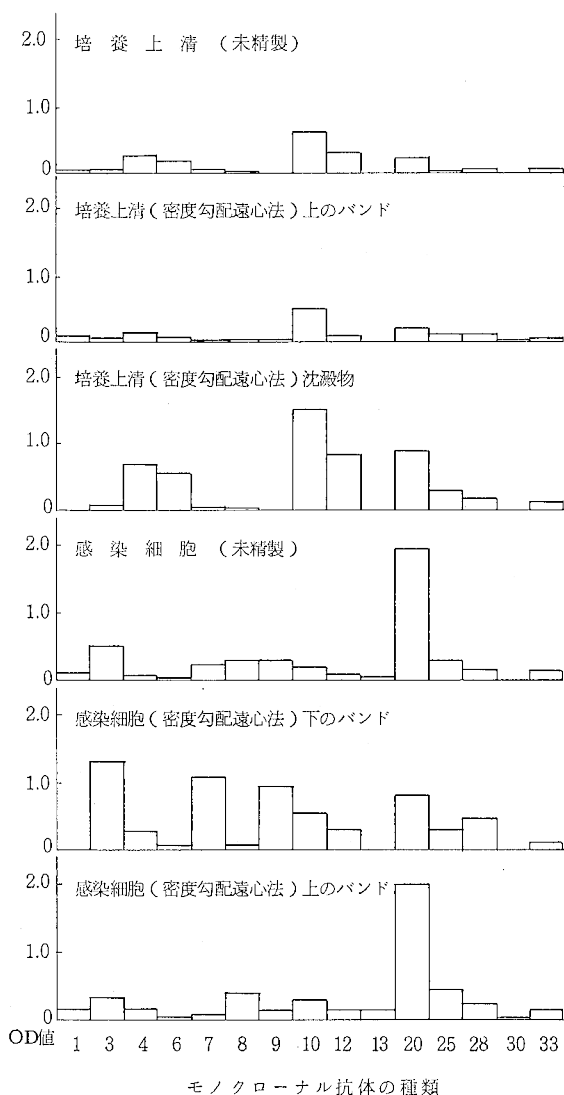


図4 サイトメガロウイルスとモノクローナル抗体の関係

3 各法を指標としたウイルスカ価の測定

モノクローナル抗体CM-20を用いて、感染HEL細胞より調整したウイルス液を対数希釈し、組織培養用マイクロプレートで8日間培養した。その結果、図5に示すように希釈培養穴20例中 10^{-1} で20例、 10^{-2} も20例全てで、CPE、蛍光ELISA、HRPO-ELISAで検出、 10^{-3} 、 10^{-4} では各法間で異なり、 10^{-5} では検出できなかった。このことから、調整ウイルス液は、Karberの式で算出すると、CPEを指標とした場合、 $TCID_{50}$ で $4.4 \times 10^4/ml$ 、蛍光ELISAで $5.0 \times 10^4/ml$ 、HRPO-ELISAで $6.3 \times 10^3/ml$ となった。

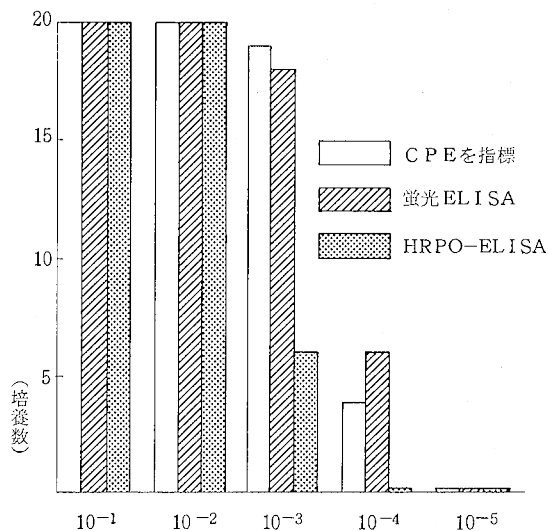


図5 各法を指標としたウイルスカ価の測定CM-20

4 蛍光ELISAとHRPO-ELISAの比較

2段階希釈した同一のウイルスについて、蛍光ELISAとHRPO-ELISAで測定し、その結果を図6に示した。蛍光ELISAは蛍光単位(たて軸の数値 $\times 1000$)で示し、使用したウイルスと同様に処理した非感染細胞の蛍光単位150の2倍値を陰性限界とした。また、HRPO-ELISAは、たて軸に吸光度を示し、使用したウイルスと同様に処理した非感染細胞の吸光度0.05の2倍値0.10を陰性限界とした。

両法をくらべると蛍光ELISAでは、256倍、HRPO-ELISAでは、ほぼ25倍で約10倍の感度差があった。

またウイルス培養上清の遮糖密度勾配遠心法による分画液について蛍光ELISAとHRPO-ELISAをおこなったのが、図7でTube上端から分画した。両法とも反応に差はあるが同傾向で、Tube6番目にピークがあり、また38番目の沈殿物でも高い反応を示した。

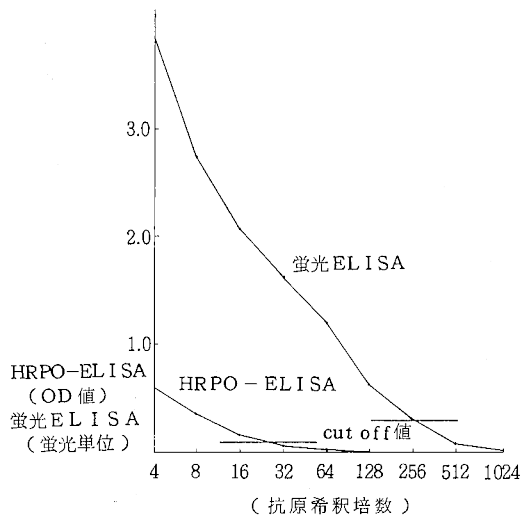


図6 蛍光ELISAとHRPO-ELISAの比較(CM-20)

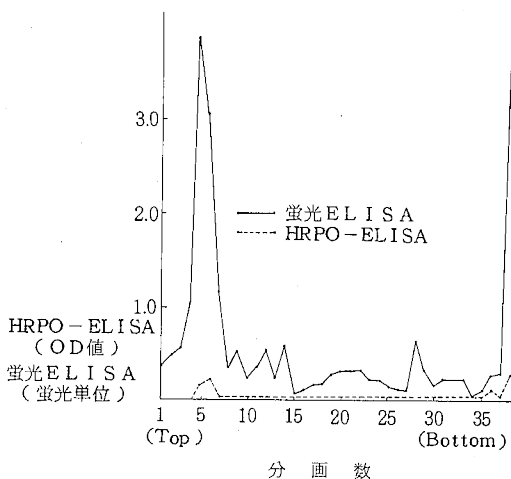


図7 ウイルス培養上清の遮糖密度勾配遠心法による分画(CM-20)

5 モノクローナル抗体によるHRPO-ELISAの比較

CM-3, CM-10, CM-20それぞれのモノクローナル抗体IgGをペルオキシダーゼで標識し、2段階希釈をした同一のウイルス液を用いて、HRPO-ELISAで測定した結果は図8に示した。

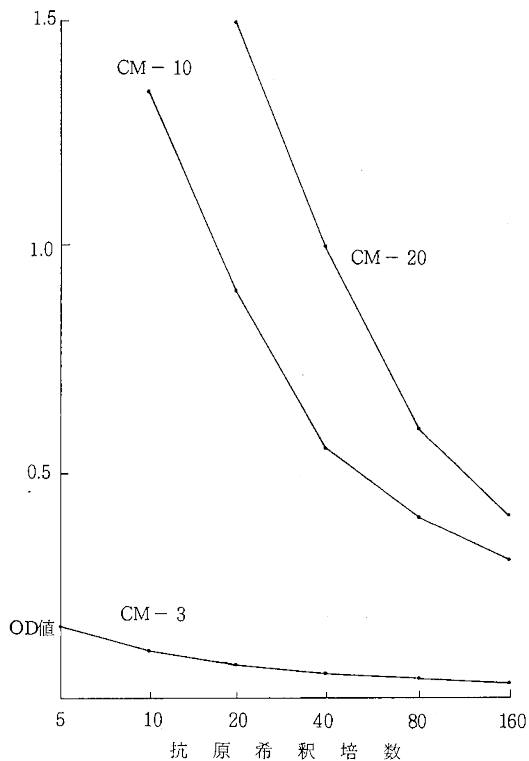


図8 モノクローナル抗体によるHRPO-ELISAの比較

用いたウイルスは、感染HEL細胞から精製したものでCM-20ではよく反応し、CM-10もまた感度よく検出することが可能であったが、CM-3の反応は低い検出感度であった。

6 モノクローナル抗体による蛍光ELISAの比較

モノクローナル抗体CM-10, CM-20でもって感染HEL細胞から精製した2段階希釈のウイルスに対して蛍光ELISAをおこなった結果は、図9に示した。CM-10にくらべて、CM-20が感度よく抗原検出が可能であった。

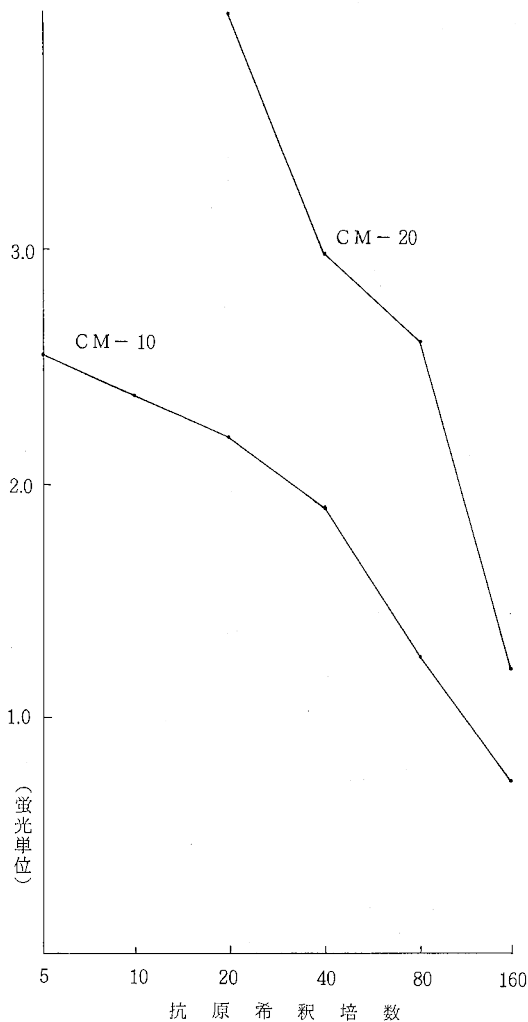


図9 モノクローナル抗体による蛍光ELISA感度の比較

IV 考 察

ヒトサイトメガロウイルス感染のほとんどは不顕性感染であり、本邦では地域差はあるが80%以上の人々が成人に達するようになるまでに抗体を獲得^{9) 10)}、そして全世界に浸淫しているウイルスであり、ヒト以外の動物にも広く存在するが、これら全て種属特異性があり、またこのウイルスは不安定であり、このためウイルス分離、その他の操作で注意が必要である。培養増殖に日数がかかり、臨床ウイルス学上の問題となるところである。

今回我々は、サイトメガロウイルスの迅速診断法を樹立するために、モノクローナル抗体を作製した。限界希釈法でクローニングした結果、認識ポリペプチドの明らかな15種の特異抗体産生のモノクローナル抗体を得た。

この15種に対するウイルス抗原を検討するために、5日間培養したHEL感染細胞から精製した抗原と培養上清から精製した抗原からの6種類を用いた。培養上清由来抗原は、3000rpm10分遠心した上清を40000 rpm 4時間遠心し、ウイルス粒子を集め精製した結果、Tube上端から $\frac{1}{3}$ のところの白濁のバンドと沈殿物を得た。また感染HEL細胞は超音波処理し、3000rpm10分した上清を精製した結果、Tube上端 $\frac{1}{3}$ のところの白濁バンドと下端 $\frac{1}{3}$ のところの白濁層を得た。これら精製ウイルスを抗原としてコートし、13種のモノクローナル抗体に対して抗体検出ELISAをおこなった。細胞由来抗原では、CM-20が高く反応し、培養上清由来抗原では、CM-10がよく反応した。また、モノクローナル抗体を分別した5群で見ると140 Kdの核内局在の抗原と反応する抗体では、感染細胞由来の下端の白濁層の抗原によく反応し、45・33Kdの核内局在の抗原と反応する抗体では、感染細胞由来の上の白濁バンド抗原と反応した。56Kdの細胞質内局在抗原と反応する抗体は、培養上清由来の沈殿物からの抗原と反応した95Kdと60Kdの細胞質内局在抗原と反応する抗体とは、高くはないが感染細胞由来抗原と反応した。

サイトメガロウイルスの迅速診断法としては、Spector¹¹⁾がDNAを直接短時間で検出する方法としてDNA-DNA hybridization assayを報告、また、モノクローナル抗体を用いた早期抗原の検出に、Shusterら¹²⁾、Alpertら¹³⁾、植野ら¹⁴⁾が蛍光抗体法を用いて報告しているが、今回我々は、作製したモノクローナル抗体から抗原が核に局在し140 KdのCM-3、抗原の局在が細胞質で56KdのCM-10、60KdのCM-20をそれぞれ用いて、蛍光ELISA、HRPO-ELISAを開発した。CM-20を用いた蛍光ELISAとHRPO-ELISAで同一のウイルス液を測定すると最大希釈培数で256倍と約25倍の差があり、他に報告はみないが、蛍光ELISAの抗原検出感度は、HRPO-ELISAにくらべると約10倍であった。

今回は、迅速の抗原検出方法として蛍光ELISA、HRPO-ELISAにモノクローナル抗体を用いて開発したが、それぞれ反応する抗原部分が異なるため検出感度に差があるため、Griffiths¹⁵⁾やVolpiら¹⁶⁾がおこなっているように7~9種のモノクローナル抗体を混合し、ポリクローナル抗体に近づけた抗体IgGをつくりより感度のよい方法を検討したい。

文 献

- 1) 千葉俊三：ヒトサイトメガロウイルスの臨床と疫学，ウイルス，31，111~121，(1981)。
- 2) 山田雅夫，山西重機，新居志郎：ヒトサイトメガロウイルスに対する単クローン抗体の作成，第57回日本感

- 染症学会西日本地方会総会講演抄録, 52 (1987)。
- 3) Irmiere, A., Gibson, W. : Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus, *Virology*, 130, 118-133, (1983)。
 - 4) 山西重機, 山本忠雄 : ELISAによる県内のムンプス抗体調査, 香川県衛生研究所報, 14, 17-25, (1985)。
 - 5) Wilson, M. B., Nakane, P. K. : Recent developments in the periodate method of conjugating horseradishperoxidase (HRPO) to antibodies. In immunofluorescence and related staining techniques. ed. Knapp, W., Holuber, K. and Wick, G., Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam. 215-224, (1978)。
 - 6) 山西重機, 三木一男, 山本忠雄 : ELISAによるヒト及びイヌロタウィルスの抗原検出とブタ, ウシ及びヒトロタウィルスの抗体測定, 香川県衛生研究所報, 15, 15-19, (1986)。
 - 7) 阪口雅弘, 井上栄, 吉沢晋, 池田耕一 : 蛍光サンドイッチELISAによる空気中スギ花粉量の測定, アレルギー, 36, 886-889, (1987)。
 - 8) 井上栄 : 微生物検査必携, ウィルス・クラミジア・リケッチャ検査, 54-55, (1987)。
 - 9) 古川宣 : サイトメガロウィルス感染症の研究の現況と将来, 小児科臨床, 33, 2499-2509, (1980)。
 - 10) 南嶋洋一 : サイトメガロウィルス感染症, 臨床とウィルス, 9, 43-49, (1981)。
 - 11) Spector, SA: Applications of DNA Probes to the study of human cytomegalovirus, *J clin Microbiol*, 23, 117-120, (1985)。
 - 12) Shuster, EA, Beneke, JS, Tegtmeier, GE, Pearson, GR. Monoclonal antibody for rapid laboratory detection of Cytomegalovirus infections: characterization and diagnostic application.: *Mayo clin Proc*, 60, 577-585, (1985)。
 - 13) Alpert, G. Mazeron, MC, Colimon. R, Plotkin, S: Rapid detection of human cytomegalovirus in the urine of human, *J Infect Dis*, 152, 631-633, (1985)。
 - 14) 植野一郎, 柴鶴義人, 南嶋洋一 : FITC標識モノクローナル抗体によるサイトメガロウィルスの迅速診断の試み, 臨床とウィルス, 16, 188-191, (1988)。
 - 15) Griffith's, PD. Panjuwani, DD. Stirk, PR, Ball, MG, Ganczakowski, M. Blacklock, HA, Prentice, HG: Rapid diagnosis of cytomegalovirus infection in immunocompromised patients by detection of early antigen fluorescent foci, *Lancet* 2, 1242-1244, (1984)。
 - 16) Volpi, A: Rapid diagnosis of pneumonia due to cytomegalovirus with specific monoclonal antibodies. *J Infect Dis*, 147, 1119-1120, (1983)。