

氏 名	塩 谷 泰 子
学 位 の 種 類	博士(医療科学)
学 位 記 番 号	甲 第 30 号
学位授与の日付	2023年3月12日
学 位 論 文 題 名	Development and evaluation of in house ELISA for quantitative analysis of rotavirus specific IgG and IgA 「ロタウイルス (RV) 特異的IgGおよびIgAの定量分析のためのin house ELISAの開発と評価」
指 導 教 員	教授 井 平 勝
論 文 審 査 委 員	主査 教授 齋 藤 邦 明
	副査 教授 成 瀬 寛 之
	教授 浅 田 恭 生

論文内容の要旨

ロタウイルス (RV) は小児急性胃腸炎の原因ウイルスであり、感染力が強く、衛生状態に関わらず、ほぼすべての小児が5歳までにRVに感染する。これに対しRVワクチンが開発され、全世界で接種されているが先進国での高い重症化予防効果に比べ、発展途上国では42-63%とその予防効果と著しく低い。したがってRVワクチンやRV胃腸炎による宿主免疫誘導を評価するRV抗体定量は、今後も重要となる。本論文では、ヒトRVのWa株を用いたRV特異的IgG、IgA測定のためのin house ELISAの開発を目的とした。これまでは、ELISA抗原としてRV VP6リコンビナント蛋白や増殖力が良好で実験室での取り扱いが容易なサルRV株のSA11を用いてきた。VP6は、ウイルス内殻に最も多く存在する蛋白で、強い抗体反応を誘導するとの報告があり、VP6は、種のRVを超えてその遺伝子配列が良く保存されている。しかし、VP6系統樹解析ではSA11はヒトRV株とは別の枝に分かれる。また、中和抗体の標的となる外殻蛋白VP4やVP7のSA11とWa株のアミノ酸配列相同性はそれぞれ71%と82%である。以上の点は、今回のin house ELISAの重要かつ優位な点として正確なRV抗体測定系が確立できると考えた。基礎検討では、標準血清を用いたRV IgGおよびRV IgAの同時・日差再現性のCV%は20%以下であり、RV胃腸炎乳児9名の入院時と退院時のペア血清でRV IgGは、採血間隔が5日以内と短かった4名患児を除いた5名で、IgAでは1名を除いて有意な抗体上昇を認めた。ワクチン接種前後の検体では、RV中和抗体価とRV IgGの間に有意な相関も確認した。以上の様に臨床測定に十分であることが証明されたため、以下の2つの研究を計画しRV抗体価測定を含め解析した。

① RV経口ワクチン接種後の免疫誘導能評価

ワクチン接種後の経時的な便中ワクチン株排泄のモニタリングと血清RV特異的IgG、IgA抗体価測定を行った。抗体価上昇群の1st dose平均便中RV1ウイルス排出量は有意に

高く、接種後便中RV1排泄量とRV IgG抗体価間に正相関がみられたことから、初回接種後RV1増殖がRV IgG抗体の誘導に重要と考えられた。また、2nd doseの平均便中RV1ウイルス排出量から強いRV1増殖は起きておらず、1st doseによって誘導された宿主免疫応答がRV1増幅を抑制すると考えた。また、本研究では、9名(50.0%)で1st dose 1か月後(2回目の経口接種前)でも便中RV1ウイルス排出があり、長期間にわたる便中排泄が確認されている。ワクチン接種後の腸内におけるRVウイルス増殖(特に1回目)が免疫応答に重要であることを具体的に証明した一方でRVウイルスの腸内増殖には個人差があることも明らかにした。

② 急性RV胃腸炎患者におけるRV抗原血症と液性免疫応答との関連

RV胃腸炎の抗原血症や免疫反応に対する報告はあるが、抗原血症と抗体価を同時に解析し評価した報告は少ない。そこで、RV胃腸炎患児における急性期と回復期の2回にわたり採血を行い得られた血清を用いてRV IgGおよびIgA抗体価を測定、抗原血症との関連を解析した。RV抗原血症は、感染初期から全症例から検出、第3病日にピークに達し、第8病日に検出限界以下となった。RV IgGまたはIgA抗体価と血清RV抗原値との間に明確な負の統計的相関が示された。発症後日数とRV IgGおよびIgA抗体価との間には正の相関が見られ、抗体価と抗原量の推移からはRV IgGに比してIgAの上昇が早く、RV IgGではなくIgAが感染の初期段階で血清からRV抗原を排除する上で重要な役割を果たしている可能性を示唆した。

ヒトRV株Waを抗原としたin house ELISAは、血清中のRV IgG、IgA抗体価を定量することが可能であり、RV感染症における免疫応答を解析してゆく上で非常に有用な方法であった。

論文審査結果の要旨

RV胃腸炎診断が、便中RV検出で行われる現況を基にin in house ELISA法開発目的の質問があった。臨床でRV抗体による胃腸炎診断が行われるのは少ないが、ワクチンが定期接種化され免疫誘導能評価にRV抗体測定は必須と回答された。従来の抗原として利用されるSA11とWaにおいて抗体の標的となるRV外殻蛋白(VP4、VP7)の相同性は70-80%と精製Wa株を抗原とするELISA法の優位性も説明された(SA11とWa抗原の比較は未実施)。ワクチンと免疫誘導の関連では、サンプル数が少ないことを指摘され今後研究の継続が望まれた。その他、多岐に亘る質問対し的確かつ丁寧に説明された。申請者は、本研究を主体的に実施したこと及び専門領域の知識を十分有していたことが確認され、博士(医療科学)の学位を与えるに十分な能力を有すると判定した。