

称号及び氏名	博士(獣医学) 足立 和英
学位授与の日付	平成20年3月31日
論文名	「Generation of immunoglobulin yolk from ostrich ( <i>Struthio camelus</i> ) eggs - Development of neutralization antibodies against highly pathogenic H5N1 avian influenza virus- (ダチョウ( <i>Struthio camelus</i> ) 卵からの卵黄抗体作製-高病原性鳥インフルエンザ H5N1 ウイルスに対する中和抗体の開発-)」
論文審査委員	主査 小川 和重 副査 小谷 猛夫 副査 岡田 利也 副査 塚本 康浩

## 論文要旨

### 緒言

抗体は蛋白質の機能解析など学術研究に重要であるとともに、治療や診断・検出技術への適応による幅広い産業利用がなされており、有用抗体の新規開発が期待されている。現在、世界規模で抗体の研究開発競争が行われているが、ヒトや家畜のタンパク質やその複合体を特異的に認識する抗体を作製する際、従来のマウス、ウサギなどの哺乳類を用いた方法では、目的抗原の相同性の高さゆえに有用抗体の産生が困難なことがある。さらに、マウスを用いたモノクローナル抗体作製の場合、その煩雑さと高い製造コストが大きな問題となっている。また、ウサギを用いる場合には1個体から得られる血液量が少ないことから、大量の抗体を作製するには多数の個体が必要となるため、抗原のコストや個体間で生じる抗体の質と量の差が問題になる。一方、鶏を用いた卵黄抗体の作製も行われているが、大量の抗体が必要となる際は、多数の個体が必要となり、同様に、抗原コストおよび鶏間のロット差が問題となる。鶏のモノクローナル抗体の作製も行われているが、十分量の抗体量を得るには莫大な手間と培養細胞・培養液が必要となる。

本研究では、抗原コストと抗原の相同性の問題を克服する目的で、大型鳥類であるダチョウを免疫動物に用いて抗体の大量作製法の開発を試みた。ダチョウは体重最大約 160kg、体高 2.5m、卵の重さは約 1.5kg（鶏の約 30 倍）であり、年間最大 100 個程の産卵が可能である。また、寿命は 50～60 年以上と言われており、数十年間の継続した採卵を期待できる。また、これまでに産業廃棄物であるモヤシやオカラを主飼料としたダチョウの低コスト飼養法を開発した。このことより、ダチョウを用いれば大量の抗体が安価で作製可能であり、抗体の工業的な利用が実現しうると期待し本研究を行った。その結果、これまでのニワトリ卵黄を材料にした抗体精製法を改良してダチョウ卵黄の抗体精製法を開発し、その応用として、高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 の中和抗体を大量に作製することができた。

## 1. ダチョウを利用した抗体作製法の開発

ダチョウは環境によるストレスに非常に弱く、雄との同居飼育、飼料、移動、ヒトとの接触などの要因で容易に産卵が停止する。そこでまず、産卵数を減らすことなく免疫が行えるための飼育環境を整備した。1) 雌の個飼い、2) 採血・免疫する際の保定枠の設置、3) 人工照明の設置、により良好な産卵数の確保が実現した。また、右側頸静脈から採血することで、安全かつ迅速な採血が可能になった。

### ダチョウ卵黄抗体の精製

鶏卵抗体精製法を改良し、ダチョウ卵黄より塩析・透析・濾過フィルター処理して卵黄抗体を精製した。免疫したダチョウ卵の卵黄 1 個から精製される卵黄抗体量を算出したところ約 2g であったことから、1 羽のダチョウから年間最大約 200 g の卵黄抗体の回収が可能となった。SDS - PAGE によりダチョウ卵黄抗体は約 220kDa（H 鎖は約 80kDa, L 鎖は約 30kDa）であることが判明した。精製したダチョウ卵黄抗体をウサギに免疫してダチョウ卵黄抗体に対するポリクローナル抗体を作製し、HRP または FITC を標識することで 2 次抗体として使用した。

### 抗原免疫とダチョウ抗体価の測定

産卵ダチョウに各種抗原を筋肉内接種（隔週免疫）し、寒天ゲル内沈降反応及び ELISA によって血清および卵黄精製液中の抗体力価の経時的変化を検討した。アルミゲル・アジ

ュバントとフロイントアジュバントを用いてインフルエンザウイルス HA 抗原に対する抗体産生の効率を比較検討した結果、フロイントアジュバントが抗体産生を飛躍的に増強させることが明らかになったので、本研究で用いた全ての抗原に対しこのアジュバントを用いて抗体産生を検討した。インフルエンザウイルス HA 他に抗原として、鶏伝染性気管支炎ウイルス、鶏痘ウイルス、イヌパルボウイルス、*Salmonella Enteritidis*、Collagen (Type I from rat tail)、CD166 (human) を用いた。接種抗原量は 50 - 200 $\mu$ g /回でウサギに免疫する際とはほぼ同量、鶏への倍量で行った。寒天ゲル内沈降反応および ELISA を用いて抗体産生を確認したところ、いずれの抗原免疫に対しても血清および卵黄内ともに初回免疫 3 週目より抗体価の急激な上昇が認められ、約 8 週目以降で最高値を維持した。また、鶏卵で作製した抗 HA 抗体と比較したところ、ダチョウ卵黄抗体の方が抗体価が高いことが判明した。

ダチョウ卵黄抗体の有用性を示す応用研究として、細胞接着分子 CD166 の機能に及ぼす影響を検討した。CD166 (別名 ALCAM/SC1/BEN) は同種分子間の結合を介した細胞間接着能を有する膜蛋白である。CD166 を強発現させたマウス乳癌細胞 (JYG - B) は静置培養すると、著しい自己凝集能が認められた。培養液中に抗 CD166 ウサギポリクローナル抗体または抗 CD166 ダチョウ卵黄抗体を添加すると、ダチョウ卵黄抗体がより強い自己凝集の抑制を示した。このことより、ダチョウでは CD166 蛋白の細胞接着に重要な領域に結合する抗体が作製できたことが示唆された。

## 2. 高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) に対するダチョウ卵黄抗体の作製とその応用化

ヒトの新型インフルエンザとなることが懸念されている H5N1 亜型の高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する中和抗体を工業的に大量作製できれば、H5N1 ウイルス感染防止用素材の開発が可能になると期待される。そこで、ダチョウを用いて上記ウイルスを中和可能な卵黄抗体の作製を行った。

### 抗インフルエンザウイルス HA 抗体の作製

産卵ダチョウにヒト・インフルエンザ A 型株 (A/ニューカレドニア/20/99 [H1N1]、A/広島/52/2005 [H3N2])、B 型株 (B/マレーシア/2506/2004) の HA 混合液を隔週免疫 (各 30  $\mu$ g) した。また、H5N1 ベトナム株の HA 抗原の遺伝子をバキュロウイルスに導入しウイルス感染細胞から作製・精製した H5 リコンビナント蛋白(rH5)も同様に隔週免疫した。

卵黄抗体価を ELISA にて確認したところ、rH5 を免疫したダチョウ卵黄では抗体価の著しい上昇が確認され、約 8 週で最高値を取り、以降維持された。次に、H5N1 を感染させた MDCK 細胞を用いてダチョウ卵黄抗体の反応性を免疫蛍光抗体法により検討した。その結果、rH5 を免疫した卵黄抗体が感染細胞内の H5N1 に強く反応することが判明した。免疫前卵黄抗体およびヒト・インフルエンザウイルス HA 抗原を免疫した卵黄抗体には殆ど反応性が認められなかった。

#### 高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) の中和試験

インドネシアの養鶏場で死亡した鶏より分離したウイルスを使用した。MDCK および発育鶏卵にウイルスを接種し RNA を回収した。H5N1 および A 型インフルエンザウイルス HA に特異的なプライマーを用いた PCR により H5N1 であることを確認した。

次に、ウイルスの感染価を測定するために、ウイルスを接種した発育鶏卵の漿尿液より回収したウイルス液を MDCK 細胞に接種し、その細胞変性効果 (CPE) の発現から 50% 組織培養感染量 (TCID<sub>50</sub>) を算出した。算出されたウイルス力価から中和試験に用いるウイルスを 100TCID<sub>50</sub> にそろえ、段階希釈したダチョウ卵黄抗体溶液と等量混合し反応させた。反応溶液を MDCK 細胞に接種し、その後の CPE 発現から 50% 組織培養感染抑制値を測定、算出した。同様に発育鶏卵を用いて中和試験を行うために、50% 発育鶏卵感染量 (EID<sub>50</sub>) を算出、100EID<sub>50</sub> のウイルス液と段階希釈した卵黄抗体と等量混合させ 11 日齢の発育鶏卵の漿尿膜に接種した。胚子生死から 50% 発育鶏卵感染抑制値を算出した。

抗 H5 ダチョウ抗体と反応させた場合、50% 組織培養感染抑制値は 6.66  $\mu$ g/ml、50% 発育鶏卵感染抑制値は 63.34  $\mu$ g/ml であった。一方、ヒト・インフルエンザウイルス (H1N1、H3N2、B 型) に対するダチョウ抗体でも同様に中和反応を試みたが、H5N1 に対する感染抑制は見られなかった。

#### 高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1) 抗体の応用例

抗 H5N1 ダチョウ卵黄抗体を用いた抗原抗体反応による H5N1 ウイルスの感染防止を目的として、以下の 2 つの実験を行った。

1) ダチョウ卵黄抗体担持フィルターの検証：病原体防止用調湿性不織布に抗 H5N1 ダチョウ卵黄抗体を担持させ、H5N1 ウイルス感染の不活化作用を検討した。抗体担持フィルターに 10<sup>7.55</sup>TCID<sub>50</sub> の H5N1 ウイルス液を通過させたところ、MDCK 細胞への感染力価は 99.4% 減少した。

2) 鶏を用いた感染実験：10日齢のSPF鶏の鼻腔内に $10^{7.55}$ TCID<sub>50</sub>のH5N1ウイルスを接種した。接種鶏の筋肉内に免疫前または抗H5N1ダチョウ卵黄抗体を投与したところ、免疫前卵黄抗体を投与したH5N1接種鶏は100%の個体が死亡したが、抗H5N1卵黄抗体を投与した鶏の死亡率は25%であった。このことより、抗H5N1ダチョウ卵黄抗体は生体内でもH5N1ウイルスの中和性を有することが示唆された。

## まとめ

本研究から、ダチョウを利用した卵黄抗体の作製法は、均一で大量な抗体を提供するのに適していることが実証できた。ダチョウでは相同性が高いために作製が困難であった哺乳類の抗原に対する抗体も作製可能であるので、この抗体作製法は、従来の研究、診断・検査としての利用に加え、工業的な応用化が期待でき、有用な方法であると考えられる。また、本研究では高病原性鳥インフルエンザH5N1ウイルスに対する新規中和ダチョウ卵黄抗体の大量作製に成功した。この抗体を利用することでH5N1ウイルスのパンデミックに対する防御手段となり得るかもしれない。

## 審査結果の要旨

抗体は学術研究、病気の診断・治療や病原体の検出などに汎用される分子ツールであるため、世界規模で有用抗体の開発が行われている。産業利用目的で大量の抗体作製を計画する際、ウサギなどを用いたポリクローナル抗体作製を選択する場合は、得られる血液が少量であるため多くの個体と多量の抗原を必要とし、抗原コストや個体間で生じる抗体の質の差が問題になる。マウスなどを用いたモノクローナル抗体作製の場合は、均質で大量の抗体が得られる利点はあるが、作製過程が煩雑で製造コストが割高になる。また、抗体作製では、目的抗原蛋白に対して免疫動物が著しく相同性の高い蛋白を発現している場合は抗原として認識されない可能性が高いことを留意する必要がある。ヒトなど哺乳類の蛋白を抗原とする場合、免疫動物としてマウス・ウサギなど哺乳類ではなく鳥類である鶏を用いて卵黄抗体作製を計画することで、抗原相同性の問題を解消することができる。本研究では、産業利用を念頭に抗原コストと抗原の相同性の問題を克服する目的で、大型鳥類であるダチョウを免疫動物に用いた抗体の大量作製法を開発した。また、この方法で高病原性鳥インフルエンザウイルスH5N1 (H5N1) に対する中和抗体を作製し、その有用性を明らかにした。

第1章では、ダチョウを免疫動物に用いる場合の至適な免疫方法・卵黄抗体精製法を確立し、卵黄抗体の有用性を実証した。約1.5kgのダチョウ卵は鶏卵の約25倍で、数十年間にわたって年間約100個の採卵が期待できるが、ストレスが要因となり産卵は容易に停止する。そこで(1)個飼い、(2)人工照明、(3)保定枠の設置など飼育環境を整備して良好な産卵数の確保を実現し、安全・迅速な採血法を確立した。また、鶏卵抗体精製法を改良し、塩析・透析・濾過フィルター処理するだけで、純度の高い約220kDaのIgYを卵黄1個から約2g得ることができるダチョウ卵黄抗体精製法を確立した。

フロイントアジュバントを加えた各種抗原(human CD166、インフルエンザウイルスHAなど)50-200 µgを隔週で筋肉内接種し、寒天ゲル内沈降反応とELISAにより血清と卵黄精製液の抗体価の経時変化を検討した結果、ともに免疫3週目より抗体価が上昇し、8週目以降で最高値を維持することが明らかになった。応用例として、哺乳類間で相同性の高い細胞接着分子CD166を強発現させたマウス乳癌細胞JYG-Bの細胞自己凝集抑制効果を抗CD166ウサギポリクローナル抗体とダチョウ卵黄抗体で比較検討した結果、後者により強い抑制効果が認められ、細胞接着に重要な領域に結合する抗CD166抗体がダチョウを免疫動物に用いることで作製できることが示唆された。

第2章では、ヒトの新型インフルエンザになることが懸念されているH5N1に対するダチョウ卵黄抗体を作製し、その中和活性を検証した。H5N1ベトナム株のHA抗原遺伝子をバキュロウイルスに導入し、ウイルス感染細胞から精製したH5リコンビナント蛋白(rH5)を隔週免疫して卵黄抗体(抗rH5)を作製・精製した。インドネシアで分離されたH5N1野外株を発育鶏卵に接種・回収したウイルス液に対し、MDCK細胞の細胞変性効果(CPE)による50%組織培養感染量(TCID<sub>50</sub>)と胚子の生死による50%発育鶏卵感染量(EID<sub>50</sub>)から、ウイルス感染力価を算出して2種類の中和試験に使用した。段階希釈した抗rH5とウイルス液(10<sup>2</sup> TCID<sub>50</sub>あるいは10<sup>2</sup> EID<sub>50</sub>)を等量混合して中和反応後、MDCK細胞に接種してCPEから50%組織培養感染抑制値を、11日齢の発育鶏卵の漿尿膜に接種して胚子生死から50%発育鶏卵感染抑制値を算出した結果、それぞれ6.66 µg/ml、63.34 µg/mlの値を示し、H5N1に対する感染抑制効果が認められ、抗rH5の中和抗体としての有用性が実証された。本抗体の応用例として、①抗rH5を担持した病原体防止用調湿性フィルターに10<sup>7.55</sup> TCID<sub>50</sub> H5N1を通過させたウイルス液の感染力価が99.4%減少したこと、②10日齢SPF鶏鼻腔内に10<sup>7.55</sup> TCID<sub>50</sub> H5N1を接種した鶏の死亡率が、あらかじめ抗rH5を筋肉内に投与した場合は75%減少したことから、本抗体の産業利用の可能性とともに生体内でもH5N1中和活性を有することが実験的に明示された。

本研究の成果は、(1)ダチョウを免疫動物とする卵黄抗体の作製・精製法を確立し、均一で大量のポリクローナル抗体を提供できる有用な方法であることを実証した点、(2)ダチョウは哺乳類間で相同性の高い蛋白に対する抗体作製に対し有用な免疫動物であることを示唆した点、(3)H5N1 に対する新規中和ダチョウ卵黄抗体の大量作製に成功した点にまとめることができる。これらの成果は、医学・獣医学の発展に貢献すると判断されるだけでなく、産業利用目的で新規抗体作製を計画する際にダチョウ卵黄抗体作製法が選択肢の一つとして新たに加わることを示しており、社会的貢献度も高い。従って、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。