

氏 名 (本籍)	本 井 ゆり恵 (群馬県)
学 位 の 種 類	博士 (獣医)
学 位 記 番 号	獣医博甲第 1 8 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 1 7 年 3 月 1 4 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	Studies on the Egg Yolk Antibody (IgY) to the Recombinant Proteins of Rabies Virus (狂犬病ウイルス組換え蛋白に対する鶏卵抗体に関する研究)
審 査 委 員	主査 岐 阜 大 学 教 授 山 田 章 雄 副査 帯広畜産大学 教 授 牧 野 壮 一 副査 岩 手 大 学 教 授 品 川 邦 汎 副査 東京農工大学 教 授 本 多 英 一 副査 岐 阜 大 学 教 授 源 宣 之

論 文 の 内 容 の 要 旨

狂犬病は、発症すれば 100%死亡するウイルス感染症であり、アジアを中心として年間約 6 万人が死亡していると推定されている。狂犬病ウイルス暴露後の発症予防は、ウイルス暴露部位の洗浄、狂犬病ワクチンの接種および抗狂犬病ウイルス免疫グロブリン (RIG) 投与により行われている。RIG はヒト由来 (HRIG)、ウマ由来 (ERIG) とともに、狂犬病流行地であるアジアやアフリカでは経済的あるいは量的な理由から入手が困難な状態にある。

本研究では、大量かつ安全にしかも安価に抗狂犬病ウイルス抗体を作出するために、大腸菌で発現させた狂犬病ウイルス (CVS-11 株) の組換え蛋白を産卵鶏に免疫することで鶏卵卵黄から特異抗体 (IgY) を得ることを試みた。はじめに、大腸菌発現組換え N 蛋白および P 蛋白 (rN、rP) で鶏を免疫し、IgY 抗体を作成した。作出した IgY 抗体のウイルスに対する反応性を、感染細胞を抗原とした間接蛍光抗体法 (IFA)、ウイルス蛋白を抗原としたウエスタンブロット法、ウイルス感染マウスの脳組織切片を用いた免疫組織化学で調べたところ、いずれの方法においてもウイルス抗原を特異的に検出できることが明らかになった。これらの成績から、これらの抗体が狂犬病ウイルス検出用に使用できる感度と特異性を有していることが明らかになった。

次に同様の手法で狂犬病ウイルスに対する中和抗体の作出を試みた。狂犬病ウイルス G 蛋白の一部分 (G-F2) を大腸菌で発現させて免疫抗原とし (rG-F2)、抗 rG-F2IgY 抗体を作出した。この抗体は IFA でウイルス特異的であることが確認されたため、中和抗体価を測定したところ中和活性が確認された。この成績は大腸菌で発現した G-F2 蛋白は高次構造に依存しない中和エпитープを含んでいることを示唆している。実際既にアミノ酸 260-267 番目で構成されるエпитープの他、モノクローナル抗体で検出されるいくつかの中和エпитープが存在しており、これらは高次構造に依存しない中和エпитープとして報告されている。そこで、合成ペプチドを抗原とした競合 ELISA ならびにペプチド競合中和試験を試みたところ、G-F2 蛋白は高次構造に依存しない中和エпитープを含んでいることが確認できた。

マウスにおける抗 rG-F2 抗体による狂犬病の発症阻止試験の結果、ウイルス接種後に抗体を接種しなかった群では 90% の死亡率を示したのに対し、抗 rG-F2 抗体 (80 IU/Kg) をウイルス接種部位に同時期に接種した群では 75% のマウスが生残することが明らかにされた。

を示している。即ち狂犬病の流行地である開発途上国等において、安全に安価にかつ大量に、診断用あるいは曝露後予防用の抗狂犬病ウイルス抗体を産生する可能性を開くものとして大いに期待される。

審 査 結 果 の 要 旨

狂犬病は、発症すれば 100% 死亡するウイルス感染症であり、アジアを中心として年間約 6 万人が死亡していると推定されている。しかし曝露後の発症予防が可能であり、曝露部位の洗浄および狂犬病ワクチンの接種が行われる。相当程度の曝露の場合には免疫グロブリンが投与されるが、ヒト由来 (HRIG)、ウマ由来 (ERIG) とともに、狂犬病流行地であるアジアやアフリカでは経済的あるいは量的な理由から入手が困難な状態にある。

申請者は、大量かつ安全にしかも安価に抗狂犬病ウイルス抗体を作出するために、狂犬病ウイルスの組換え蛋白を抗原として産卵鶏に免疫することで特異抗体 (IgY) を得ることを試みた。まず、狂犬病ウイルス (CVS-11 株) の N 蛋白および P 蛋白を大腸菌で発現させ (rN、rP)、それぞれに対する IgY 抗体を作出した。ウイルス蛋白を抗原としたウエスタンブロット法、狂犬病ウイルス感染マウスの脳組織切片を用いた免疫組織化学によりこれらの抗体が狂犬病ウイルスに特異的であることを確認した。

次に同様の手法で狂犬病ウイルスに対する中和抗体の作出を試みた。狂犬病ウイルス G 蛋白の一部分 (G-F2) を大腸菌で発現させて免疫抗原とし (rG-F2)、免疫鶏卵法により抗 rG-F2 抗体を作出した。この抗体は IFA でウイルス特異的であることが確認されたため、中和抗体価を測定したところ中和活性が確認された。この成績は大腸菌で発現した G-F2 蛋白は高次構造に依存しない中和エピ

トープを含んでいることを示唆している。実際既にアミノ酸 260-267 番目で構成されるエピトープの他、モノクローナル抗体で検出されるいくつかの中和エピトープが存在しており、これらは高次構造に依存しない中和エピトープとして報告されている。そこで、合成ペプチドを抗原とした競合 ELISA ならびにペプチド競合中和試験を試みたところ、G-F2 蛋白は高次構造に依存しない中和エピトープを含んでいることが確認できた。

マウスにおける抗 rG-F2 抗体による狂犬病の発症阻止試験の結果、ウイルス接種後に抗体を接種しなかった群では 90%の死亡率を示したのに対し、抗 rG-F2 抗体 (80 IU/Kg) をウイルス接種部位に同時期に接種した群では 75%のマウスが生残することが明らかにされた。

本研究の成果は、大腸菌で発現させた組換え蛋白で鶏を免疫することにより、狂犬病ウイルス蛋白に特異的な抗体を安全かつ安価にしかも大量に産生できることを示している。即ち狂犬病の流行地である開発途上国等において、安全に安価にかつ大量に、診断用あるいは曝露後予防用の抗狂犬病ウイルス抗体を産生する可能性を開くものとして大いに期待される。

以上について、審査員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Production of rabies neutralizing antibody in hen's eggs using a part of the G protein expressed in *Escherichia coli*
著 者 名 : Motoi, Y., Sato, K., Hatta, H., Morimoto, K., Inoue, S. and Yamada, A.
学術雑誌名 : Vaccine
巻・号・頁・発行年 : 印刷中

既発表論文

- 1) 題 目 : First detection of *Ehrlichia platys* in dogs and ticks in Okinawa, Japan
著 者 名 : Motoi, Y., Satoh, H., Inokuma, H., Kiyuuna, T., Muramatsu, Y., Ueno, H. and Morita, C
学術雑誌名 : Microbiology and Immunology
巻・号・頁・発行年 : 45:1: 89-91, 2001

2) 題 目 : Characterization of spotted fever group rickettsiae detected
in dogs and ticks in Okinawa, Japan
著 者 名 : Satoh, H., Motoi, Y., Camer, G.A., Inokuma, H., Izawa, M.,
Kiyuuna, T., Kumazawa, N., Muramatsu, Y., Ueno, H.
and Morita, C.

学術雑誌名 : Microbiology and Immunology

巻・号・頁・発行年 : 46:4: 257-263, 2002

その他の学術論文

1) 題 目 : Prevalence of spotted fever rickettsial antibodies in dogs
and rodents in the Philippines

著 者 名 : Camer, G.A., Masangkay, J., Satoh, H., Okabayashi, T.,
Norizuki, S., Motoi, Y., Ueno, H. and Morita, C.

学術雑誌名 : Japanese Journal of Infectious Diseases

巻・号・頁・発行年 : 53:4: 162-163, 2000

2) 題 目 : Safe and easy monitoring of anti-rabies antibody in dogs
using His-tagged recombinant N-protein

著 者 名 : Inoue, S., Motoi, Y., Kashimura, T., Ono, K. and Yamada, A.

学術雑誌名 : Japanese Journal of Infectious Diseases

巻・号・頁・発行年 : 56:4: 158-160, 2003

3) 題 目 : The absence of anti-rabies antibody in the sera of feral
raccoons (*Procyon lotor*) captured in Hokkaido, Japan

著 者 名 : Inoue, S., Asano, M., Motoi, Y., Makino, T. and Yamada, A.

学術雑誌名 : Japanese Journal of Infectious Diseases

巻・号・頁・発行年 : 57:3: 110-112, 2004