

| | |
|------------|---|
| 氏名(本(国)籍) | Raihana Royan Rahimi (アフガニスタン・イスラム共和国) |
| 主指導教員名 | 東京農工大学 教授 下田 実 |
| 学位の種類 | 博士(獣医) |
| 学位記番号 | 獣医博甲第290号 |
| 学位授与年月日 | 平成21年9月11日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第3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 | 東京農工大学 |
| 学位論文題目 | Studies on Inhibition of Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus(HEV)by using Neutralizing Monoclonal Antibodies against HEV (豚血球凝集性脳脊髄炎ウイルス(HEV)のモノクローナル抗体を用いたHEVの感染防御の解明) |
| 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 猪熊 壽 副査 岩手大学 教授 津田 修 治 副査 東京農工大学 教授 本多 英 一 副査 岐阜大学 教授 福士 秀 人 |

論 文 の 内 容 の 要 旨

豚血球凝集性脳脊髄炎ウイルス(HEV)は乳のみ豚に脳脊髄炎や嘔吐、衰弱をおこすコロナウイルス科に属するウイルスである。

豚がHEVに感受性をもつ唯一の動物である。実験的にはマウス、ラットが感染する。3週間以内の子豚がHEVに感染した時100%の致死率になる。しかし3週間以上になると臨床症状は示さない。日本で1973年抗体を調べるHI試験では、約50%の豚でHEVの抗体を見つけた。1984年我が国で3ヶ月齢の豚で呼吸器からHEVを分離した。しかし我が国ではHEVの発生は起こっていない。

この研究で申請者は以下の問題を調べた。

- 1) HEV67N株に対するモノクローナル抗体(MAb)を作製すること。
- 2) 中和活性を持つMAbを作製すること。
- 3) 中和活性を持つMAbはHEVプロテインの免疫活性および抗原性を調べること
- 4) 中和活性を持つMAbはHEVの免疫療法に役立つかを調べること。

【第一章】 HEV67株に対するMAbの作製

HEVに対するMAbを作製した。ホルマリンで不活化したHEVで免疫した5週齢の雌

Balb/c マウスの脾細胞とハイブリドーマ細胞と融合させ 11 個の中和活性を持つ融合細胞を見いだした。11 個の中和活性 (NT) を持つ抗体は 1 : 20,000 から 1:800,000 であり,MAb 120 は最も NT 抗体は高く NT 価は 1:800,000 だった。次に MAb22 および 151 が高く NT 価は 1 : 400,000 であり.さらに MAb42 および 1F1 で 1:200,000 であった。また MAb61 および 97 は 1:160,000 および 1:80,000 と続き次に MAb3,37,124 はともに NT 価は 1:40,000 であった。最後に MAb17 が 1:20,000 と続いていた。

赤血球凝集阻止 (HI) 抗体は 1:400 から 1:409,600 であった。HI の最も高いものは MAb 120 で 1:409,6000 であり,次が MAb151 の 1:102,400 であった。低い HI 抗体価は MAb97 および 124 の 1:400 であった。

酵素抗体 (ELISA) は 1:4,450 および 1:6,400 であった。そして MAb61, 97 および 1F1 の ELISA 価は高くそれぞれ 1:150,000 および 1:104,200 さらに 1:250,000 であった。

ウェスタンブロット実験での観察のように SDS-PAGE で 2-メルカプトエタノール (ME) でのみ処理した精製ウイルスはどのタンパクとも反応しなかった。しかしプロテイン・インヒビターで処理したものはすべて約 150kDa と反応した。

IFA でみると MAb22 および 42 の蛍光抗体法では 5 時間で細胞内で蛍光を弱いながら発していた。それらは 10 時間さらに 24 時間で細胞のまわりに強く反応した。他の MAb では同様の蛍光がみられた。HEV の MAb のサブクラスは IgG2 と IgG1 であった。

[第二章] 作製された MAb の HEV 感染の防御と中和

MAb の感染防御効果を見るため HEV に感受性のある 10 日齢のマウスを用いて調べた。これらのマウスに MAb 免疫後 3 日目に HEV10⁶TCID₅₀ を接種し感染防御を 5 日間調べた。1:800 に希釈した MAb120 はウイルス感染後ウイルスの感染を完全に止めた。1:1,000 に希釈した MAb120 は 3 匹接種中 1 匹を生存させた。しかし MAb151 および 22 では 1:800 に希釈した場合 1 匹を死亡させた。MAb42 では 1:800 に希釈した場合 2 匹死亡させた。MAb1F1,3,37 および 17 では 1:800 に希釈した MAb ではすべてのマウスを死亡させた。1:400 に希釈した MAb は,MAb1F1 ではすべてマウスを生かし,MAb3 では 2 匹死亡させた。MAb37 および 17 はすべて死亡させた。

これらの結果は中和活性のある MAb が HEV 感染の防御と動物の治療に役立つことを示唆している。

審 査 結 果 の 要 旨

豚血球凝集性脳脊髄ウイルス (HEV) は乳のみ豚に脳脊髄炎や嘔吐,衰弱をおこすコロナウイルス科に属するウイルスである。

豚が HEV に感受性をもつ唯一の動物である。実験的にはマウス,ラットが感染する。3 週間以内の子豚が HEV に感染した時 100%の致死率になる。しかし 3 週間以上になると臨床症状は起こっていない。

申請者は以下の問題をしらべた。

- 1) HEV67N 株の対するモノクローナル抗体 (MAb) を作製すること。
- 2) 中和活性を持つ MAb は HEV の免疫療法に役立つかを調べること。

[第一章] HEV 67N 株に対する MAb の作製

HEV に対する MAb を作製した。ホルマリンで不活化した HEV で免疫した 5 週齢の雌 Balb/c マウスの脾細胞とハイブリドーマ細胞と融合させ 11 個の中和活性を持つ融合細胞を見いだした。11 個の中和活性 (NT) を持つ抗体は 1:20,000 から 1:800,000 であり, MAb120 は最も NT 抗体価は高く NT は 1:800,000 だった。次に MAb22 および 151 が高く 1:400,000 であり, さらに MAb42 および 1F1 で 1:200,000 であった。赤血球凝集阻止 (HI) 抗体は 1:400 から 1:409,600 であった。HI の最も高いものは MAb120 で 1:409,600 であり, 次が MAb151 の 1:102,400 であった。低い HI 抗体価は MAb97 および 124 の 1:400 であった。

IFA でみると MAb22 と 42 の蛍光抗体法では 5 時間で細胞内で蛍光を弱いながら発していた。それらは 10 時間さらに 24 時間で細胞のまわりに強く反応した。他の MAb では同様の蛍光がみられた。HEV の MAb のサブクラスは IgG2 と IgG1 であった。

[第二章] 作製された MAb の HEV 感染の防御と中和

MAb の感染防御効果を見るため HEV に感受性のある 10 日齢のマウスを用いて調べた。これらのマウスに免疫後 3 日目に HEV 10^5 TCID $_{50}$ を接種し感染防御を 5 日間調べた。1:800 に希釈した MAb120 はウイルス感染後完全阻止した。1:1,000 に希釈した MAb120 は 3 匹接種中 1 匹を感染阻止した。しかし MAb151 および 22 では 1:800 に希釈した場合 1 匹を死亡させた。MAb42 では 1:800 では 2 匹死亡させた。MAb1F1, 3, 37 および 17 では 1:800 に希釈した MAb ではすべてのマウスを死亡させた。1:400 に希釈した MAb は, MAb1F1 ではすべて生かし, MAb3 では 2 匹死亡させた。MAb37 および 17 はすべて死亡させた。

これらの結果は, 中和活性のある MAb が HEV 感染の防御と動物の治療に役立つことを示唆している。

以上について, 審査委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 : Analysis of the properties of neutralizing monoclonal antibodies against the hemagglutinating encephalomyelitis virus and inhibition of HEV infection by specific MAb

著 者 名 ; Raihama, R. R., Hayakawa, M., Sugiura, E., Sugiura, H., Hanaki, K., Taniguchi, T. and Honda, E.

学術雑誌 : Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年 : 71 (4) : 447-452, 2009