

# 博士学位論文審査結果の要旨

学位申請者氏名	久保 七彩
論文題目	特異的 IgY 抗体の調製における免疫源およびアジュバントの検討
論文審査担当者	主 査 八田 一 (印)
	審査委員 川添 禎浩 (印)
	審査委員 松尾 道憲 (印)

特異的 IgY 抗体は、哺乳類の IgG 抗体に相当する免疫グロブリンであり、産卵鶏に異物抗原（死菌や精製タンパク質等）を免疫注射し、その鶏卵卵黄からポリクローナル IgY として大量精製することができる。従来、免疫注射は抗原とアジュバント（免疫増強剤）を混合し、産卵鶏へ筋肉注射する方法が用いられている。本学位論文は、特異的 IgY の調製を目的として、①通常の結核菌死菌および流動パラフィンを用いる FCA や FIA アジュバントに加え食品増粘多糖類λ-カラギーナンのアジュバント効果、および②免疫源として DNA 免疫の IgY 調製法への適用に着目し、高力価特異的 IgY の誘導とその精製 IgY の特性を詳細に比較検討したものである。本学位論文で開示された知見は、検査や研究・医療の現場で必要とされている多種多様な特異的抗体を IgY 抗体として、鶏の卵からより簡単にかつ大量に調製する方法の確立に役立つ研究成果である。

## 第一章： 各種アジュバントの特異的抗体産生能の比較および抗 *Staphylococcus aureus* IgY の菌増殖抑制作用

第一章では、アトピー性皮膚炎増悪の一因となる黄色ブドウ球菌 (*S.aureus*) に対する IgY を調製し、その *S.aureus* 増殖抑制効果が示された。FIA アジュバントを用い調製した抗 *S.aureus* IgY の特異的抗体含有率は全 IgY の 18.1%、λ-カラギーナンを用い調製した抗 *S.aureus* IgY は 7.0% であった。それら IgY の増殖抑制効果は、培養後 4～24 時間で FIA 抗 *S.aureus* IgY のみ、有意に *S.aureus* 増殖抑制効果を示した。アトピー性皮膚炎症状の悪化を防ぐ抗 *S. aureus* IgY の調製には、現状ではオイルアジュバントである FIA を利用し、少なくとも特異的抗体含有率 18.1%以上が必要であることが示された。

## 第二章： DNA 免疫法による抗狂犬病ウイルス核タンパク質 (RV-N) IgY の調製 ～アジュバント併用法の検討～

第二章では、DNA 免疫法を IgY の調製に応用し、狂犬病ウイルスの研究や診断に必要な狂犬病ウイルス核タンパク質 (RV-N) に対する特異的 IgY が調製された。RV-N 組換えプラスミド DNA (pcDNA-N) を単独で免疫注射する方法およびアジュバントとして FCA やλ-カラギーナンを併用する免疫法を比較した結果、二週間毎に計 8 回の免疫注射で、pcDNA-N の単独注射では 2 羽中 1 羽で、pcDNA-N に FCA またはλ-カラギーナンを併用した群では全個体 (各群 2 羽中 2 羽) で、卵

黄 IgY 抗体価 (ELISA 値) が上昇した。すなわち、DNA 免疫法と水溶性増粘多糖類である  $\lambda$ -カラギーナンを併用し、FCA アジュバント併用と同等の高力価の抗 RV-N IgY が得られ、各精製 IgY は ELISA、Western Blot や Dot Blot の一次抗体として RV-N 検出に利用できることが示された。

### 第三章： 抗狂犬病ウイルス核タンパク質 IgY の調製 ～アジュバント前投与 DNA 免疫法とタンパク質免疫法との比較～

第三章では、産卵鶏にアジュバントのみを事前に投与した後に DNA 免疫を実施する方法 (アジュバント前投与 DNA 免疫法) で高力価 IgY が調製可能であることが示された。しかし、従来法の遺伝子組換えタンパク質を抗原として用いる免疫法と比較した結果、タンパク質免疫群では全ての個体 (n=3) で抗体価が上昇したが、アジュバント前投与 DNA 免疫法では 3 羽中 1 羽でしか高い抗体価が得られなかった。すなわち、DNA 免疫法における免疫前アジュバント刺激の有効性は示されたが、より確実に強い抗体価を有する特異的 IgY を誘導することができるのは従来のタンパク質免疫法であった。

### 第四章： アジュバント前投与 DNA 免疫法とタンパク質免疫法で調製した抗狂犬病ウイルス核タンパク質 IgY の特性

第四章では、第三章で調製した各抗 RV-N IgY を使用し、DNA 免疫法と通常のタンパク質免疫法で調製した IgY の特異的抗体価および変性抗原に対する反応性が詳細に検討された。動物に対する狂犬病の判定に利用される免疫組織化学染色 (IHC) で、タンパク質免疫法で調製した抗 RV-N IgY はウイルス感染犬の脳切片中に存在するウイルス抗原を検出できたが、アジュバント前投与 DNA 免疫法で調製した IgY では検出できなかった。その理由として、IHC 試料の調製過程で行われる 10%ホルマリン処理や加熱処理 (60°C, 30 分) を行った狂犬病ワクチンを用いた ELISA の結果から、DNA 免疫法で調製した IgY はタンパク質免疫法で調製した IgY と比較し、変性抗原に対する結合力が低く、未変性抗原に対しても若干抗体価が低いためであると考察している。

以上、本学位論文で特筆すべきは以下の 5 点である。①産卵鶏にプラスミド DNA を免疫源として免疫注射し特異的 IgY の調製に成功した。②新規のアジュバントとして、食品添加物である  $\lambda$ -カラギーナンが抗体活性を上昇させることを見出した。③産卵鶏に対し、死菌を抗原とする場合は FIA が、プラスミド DNA を免疫源とする場合は FCA が最適なアジュバントであった。④アジュバント前投与 DNA 免疫法が特異的 IgY 抗体の誘導に有用であることを示した。⑤DNA 免疫法で得た IgY 抗体はタンパク質免疫法で得た IgY と比較し、変性抗原に対する結合力が低く、また未変性抗原に対しても若干抗体価が低いことを示した。なお、一般的に抗原として免疫注射に使用する遺伝子組換えタンパク質の発現と精製には多くの手間と時間とコストがかかる。従って、今後、産卵鶏に対して短期間に、かつ、より確実に抗体価を上昇させられる DNA 免疫法を最適化することにより、現在市場で枯渇している狂犬病ウイルスに対する特異的抗体や多種多様な特異的抗体を IgY 抗体として、鶏卵卵黄から調製できる可能性が示された。

このように、本研究は高度な知識・テクニック、既成概念にとらわれない自由な発想に裏打ちされたものであり、基礎から応用に至る広い範囲において今後の実用化、応用展開の期待される十分な成果が得られている。よって審査員一同は、本論文が京都女子大学大学院家政学研究科博士 (学術) の学位論文として価値あるものと認めた。