

博士学位論文内容の要旨

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)

序論

ニワトリ 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、産卵鶏の卵巣で血液から卵黄へ移行するため、卵黄の水溶性画分から大量に精製することが可能である。産卵鶏に対する免疫注射で特異的 IgY 抗体を得る方法として、従来から抗原（死菌、精製タンパク質等）をアジュバント（免疫増強剤）と混合し、産卵鶏の筋肉に注射する方法が用いられてきた。本論文で、著者は①現在、免疫実験に頻用されているアジュバント（FCA や FIA）に加え、食品増粘多糖類λ-カラギーナンのアジュバント活性、および②DNA 免疫の IgY 抗体調製法への適用の 2 点を軸に各種免疫法による特異的 IgY 抗体の誘導とその精製 IgY 抗体の特性を検討した。

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

第一章では黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 特異的 IgY 抗体を調製し、*S. aureus* 増殖抑制作用について検討した。また、FCA・FIA・λ-カラギーナンのアジュバント効果を比較検討した。方法として、産卵鶏に *S. aureus* のホルマリン処理死菌液を FCA・FIA・λ-カラギーナンのいずれかと混合して免疫注射を行い、IgY を各免疫鶏の鶏卵卵黄から精製した。その結果、アジュバントとして FIA を利用した免疫鶏の希釈卵黄、およびその凍結保存卵黄から精製した FIA-IgY が最も高い特異的抗体価を示し、精製ポリクローナル抗体に含まれる *S. aureus* 特異的抗体の割合や *S. aureus* 増殖抑制作用についても、この IgY で最も高い結果となった。λ-カラギーナン併用によってもアジュバント効果が示されたが、その精製 IgY には菌の増殖抑制作用はみられなかった。アトピー性皮膚炎の症状悪化の予防を目的とした抗 *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 を利用する必要があることが示唆された。

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 抗体の調製

～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有用な狂犬病ウイルス核タンパク質 (RV-N) に対する特異的 IgY 抗体を調製することを目的とした。まず RV-N 遺伝子を pcDNA 3.1 に導入した組換えプラスミド DNA (pcDNA-N) を調製した。産卵鶏 8 羽を 4 群（各 2 羽）に分け、Cont 群は無免疫、その他の群は pcDNA-N (400 μg/羽) を隔週で全 8

回筋肉注射した。4週目以降はアジュバントとして、FCAまたは λ -カラギーナンを3群および4群の各2羽に追加投与した。隔週で全8回の筋肉注射の結果、pcDNA-N単独注射では2羽中1羽で抗体価が上昇し、アジュバント併用群では全個体で卵黄中抗体価が上昇した。精製した各IgYをELISA、Western BlotおよびDot Blotで抗原RV-Nの検出感度を比較した結果、検出感度に差が見られたものの、これらは一次抗体としてRV-Nの検出に利用可能であることが示された。

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、アジュバント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）で強い抗体価を有するIgY抗体が調製可能か検討し、また、卵黄中抗体価の経時的推移についてDNA免疫法と従来のタンパク質免疫法を比較した。希釈卵黄を用いたELISAの結果、タンパク質免疫を実施した群では全ての個体において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羽で高い抗体価を示した。一方、pcDNA-Nとアジュバントの併用注射のみでは、抗体価は上昇しなかった。本研究において、DNA免疫法における免疫前アジュバント刺激の有効性が示唆されたが、現状では、より確実に高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

第三章においてアジュバント前投与DNA免疫法で調製したIgY(2種)と通常のタンパク質免疫法で調製したIgY(2種)の特異的抗体価と変性抗原に対する結合能力について詳細に検討を行った。本章では、各IgY抗体を狂犬病の判定に利用される免疫組織化学染色(IHC)へ用いた。その結果、タンパク質免疫法で調製した抗体2種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抗体は検出できなかった。その理由として、10%ホルマリン処理や加熱処理(60℃, 30分)し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と比較して変性抗原に対する結合能力が低く、また未変性抗原に対しても抗体価が低い為であると考えられた。

結論

本研究で実施したIgY抗体調製法により①死菌・精製タンパク質・プラスミドDNAを抗原(免疫源)として特異的IgY抗体の調製に成功し、②食品添加物である λ -カラギーナンのアジュバント活性が示された。また、③検討した中では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。さらに、④アジュバント前投与DNA免疫法がDNA単独注射やアジュバントとの同時注射に比べて特異的IgY抗体の誘導に有用であることが示された。⑤しかし、これらのDNA免疫法で得られたIgY抗体はタンパク質免疫法で調製したIgYと比較すると変性抗原に対する結合能力が顕著に低下し、未変性抗原に対しても抗体価が低いことが示された。さらに抗体価を上昇させる免疫法の開発が必要であるが、本研究において、DNA免疫で簡易に特異的IgYを調製する方法と、その幅広い活用に向けた種々の課題が示された。