

令和3年度 博士学位論文

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

京都女子大学大学院 家政学研究科 生活環境学専攻
博士後期課程 食物栄養学領域

久保七彩

目次

序論	1
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 <i>Staphylococcus aureus</i> IgY の菌増殖抑制作用	3
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～	16
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～	28
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	41
総括	53
参考文献	55
公表	62
論文要旨	63
謝辞	66

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ことで母子免疫抗体として機能する。哺乳類の特異的抗体（ポリクローナル抗体）を得るには採血する必要があるが、卵黄中には約 1% (w/w%) の IgY 抗体が含まれるため、卵黄の水溶性画分から大量の IgY 抗体を得ることができる¹⁾。筆者は鶏卵の卵黄から IgY 抗体を精製する方法としてλ-カラギーナン法²⁾を用いている。これは食品加工の分野において増粘多糖類として使用されているλ-カラギーナン(λ-carrageenan)を卵黄リポタンパク質の凝集剤として用いる方法である。すなわち卵黄リポタンパク質凝集物を除いた卵黄水溶性画分に対して 15%硫酸ナトリウム塩析操作を一回行うことで 100 g の卵黄から約 0.4~0.5 g の IgY 抗体を 90%以上の純度で得ることが可能である。このように採血が不要であり、かつ大量の特異的ポリクローナル抗体が鶏卵卵黄から容易に精製可能な点が、免疫動物として産卵鶏を用いる利点である。

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。近年、動物実験用のアジュバントとして頻用されているフロイントのコンプリートアジュバント（FCA : Freund's complete adjuvant）やインコンプリートアジュバント（FIA : Freund's incomplete adjuvant）に加え、様々な種類のアジュバントが研究・開発されている³⁾。一方、筆者は上記の様に IgY 精製にも使用している水溶性増粘多糖類のλ-カラギーナンの免疫賦活作用に着目した。食品加工の分野において増粘剤として用いられるλ-カラギーナンにアジュバント作用が見いだされれば、安全性の高い家畜・家禽用ワクチンアジュバントとしても利用できる可能性がある。

また、前述の通り従来の免疫法では抗原（免疫源）となる死菌やタンパク質を動物体内に注射し、抗原に対する免疫応答を誘導するのが一般的であるが、近年新規の免疫法として DNA 免疫法^{4,5)}が着目されている。主に動物・ヒトを対象としたワクチンとしての利用を目的とした研究が進んでいるが、特異的抗体の調製を目的とした免疫方法としても注目されている⁶⁻⁹⁾。従来からの方法でタンパク質特異的抗体を調製する場合、抗原タンパク質が調製できず、目的の抗体を得ることが困難な場合がある。一方、DNA 免疫法では抗原となるタンパク質をコードする DNA 配列をプラスミド DNA に組み込むことで、動物体内で抗原タンパク質を発現させ、その抗原に対する特異的抗体を誘導することが可能となる。なお、この DNA 免疫による IgY 抗体の誘導に関しては数報の報告がある¹⁰⁻¹⁶⁾ものの、特異的抗体価を最大化する免疫方法の確立には至っていない。従って、この DNA 免疫による特異的

IgY 抗体調製法が確立されることで、より多様な IgY 抗体を鶏卵卵黄から得られるようになることを期待できる。

本論文で、筆者は①FCA・FIA と λ -カラギーナンのアジュバントとしての活用、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 IgY 抗体の誘導とその精製 IgY 抗体の特性を検討した。これらの改良を加えた IgY 抗体調製法により、検査や研究・医療の現場で必要となる多様な特異的抗体を IgY 抗体として、より簡単にかつ大量に調製する方法の開発を目指す。なお、本論文では①黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*; *S. aureus*) と②狂犬病ウイルス核タンパク質に特異的な IgY 抗体をそれぞれ調製した。

黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) は食中毒菌として有名であるが、アトピー性皮膚炎増悪の一因としても知られており¹⁷⁾、特異的 IgY 抗体の静菌作用によりアトピー性皮膚炎の炎症悪化が抑えられる可能性がある。また、狂犬病ウイルス核タンパク質 (RV-N) は狂犬病ウイルスを構成するタンパク質の一つ¹⁸⁾である。狂犬病はウイルス感染動物の体液に暴露することによってヒトにも感染・発症しうる人獣共通感染症であり¹⁹⁻²¹⁾、WHO によると世界で年間約 6 万人がこの感染症により死亡している²²⁾。抗 RV-N 抗体は動物に対するウイルス検査試薬として用いられており、より安定的な供給のために IgY 抗体が着目されている²³⁾。よって、これらの抗原に特異性を有する IgY 抗体を調製し、その利用可能性について検討した。

本論文は以下の 4 章により構成される。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 -カラギーナンを *S. aureus* 死菌と混合して接種することで、それぞれのアジュバント効果を比較検討した。第二章以降では、狂犬病ウイルス核タンパク質 (RV-N) 特異的 IgY 抗体を DNA 免疫法で調製した。第二章では、組換えプラスミド DNA を単独で注射する方法に加え、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について検討を行った。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。第四章では、第三章で調製した各種抗 RV-N IgY 抗体を使用し、DNA 免疫法とタンパク質免疫法で調製した IgY 抗体の抗体価や変性抗原に対する反応性について比較を行った。

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

要約

アトピー性皮膚炎は乳幼児や小児に一般的な皮膚疾患であり、皮膚上の黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の増殖で増悪する。本研究において、*S. aureus* に対する IgY 抗体を調製し、その *S. aureus* 増殖抑制効果について検討した。また、産卵鶏の細菌抗原に対する特異的抗体産生能における水溶性アジュバント (λ -カラギーナン) と油性アジュバント (FCA および FIA) のアジュバント効果を比較した。

方法として、まずホルマリン処理した *S. aureus* を、 λ -カラギーナン (水溶性増粘多糖類) およびフロイントのコンプリートアジュバント (FCA) もしくはインコンプリートアジュバント (FIA) と混合した状態で産卵鶏に筋肉注射した。続いて回収した鶏卵の卵黄から抗 *S. aureus* IgY (FIA-IgY・FCA/FIA-IgY・ λ Carra-IgY) を精製した。それぞれの精製 IgY の抗体価は ELISA で測定し、ポリクローナル IgY に占める *S. aureus* 特異的 IgY 抗体の割合についても測定した。さらに、in vitro の実験系において *S. aureus* に対する増殖抑制効果を調べた。

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、FCA/FIA-IgY と λ Carra-IgY がそれに続いた。また、精製したポリクローナル IgY 抗体中の抗原特異的抗体の割合は FIA-IgY が 18.1%、FCA/FIA-IgY が 12.9%、 λ Carra-IgY が 7.0% となり、調製した抗体の内 FIA-IgY のみが *S. aureus* の液体培地中での増殖を抑制した。

本研究において、産卵鶏に対し FIA をアジュバントとして用いることで調製した抗 *S. aureus* IgY (特異的 IgY=18.1%) で *S. aureus* の増殖抑制効果が確認された。 λ -カラギーナンはアジュバント効果を示したが、*S. aureus* の増殖を抑制しなかった。おそらく、*S. aureus* の増殖を抑制するには特異的 IgY の割合を 18% 以上に高める必要があると思われる。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 を利用する必要があることが示唆された。

I. 緒言

アトピー性皮膚炎とは寛解と増悪を繰り返し、掻痒感を伴う皮膚疾患である。特に乳幼児期・小児期に問題となるが、患者の一部は成人後も湿疹病変が慢性的にみられる^{24,25)}。ま

た、かねてよりアトピー性皮膚炎患者の皮膚において黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*; *S. aureus*) が多いことが知られている²⁶⁾。通常、皮膚では非病原性の表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) が優勢であるが、Leyden らが 1974 年に行った調査では 50 名の慢性プラークを有するアトピー性皮膚炎患者のうち、90%の患者において皮膚より多量の *S. aureus* が検出された²⁷⁾。また、動物実験や小児を対象とした観察研究において、アトピー性皮膚炎の増悪期には皮膚上細菌叢の多様性が低下し、*S. aureus* の割合が高まることも報告されている^{28,29)}。アトピー性皮膚炎患者の皮膚は水分や脂質等が不足した乾燥状態であるため、菌体が細胞間に侵入しやすい状態になっており、*S. aureus* の増殖に伴う免疫反応によって炎症が増悪する²⁶⁾とされている。最も一般的なアトピー性皮膚炎の治療法はステロイド剤塗布による炎症の鎮静化である¹⁷⁾が、ステロイド剤では細菌の増殖は防ぐことができない。

一方、細菌の増殖抑制効果を持つものとして、近年、細菌特異的 IgY 抗体の調製とその細菌増殖抑制作用が報告されている³⁰⁻³³⁾。本研究においては、高純度の抗 *S. aureus* IgY 抗体を調製し、得られた精製 IgY の *S. aureus* に対する増殖抑制効果を調べることで、アトピー性皮膚炎患者の皮膚細菌叢の改善に、特異的 IgY 抗体が利用可能か検討した。

通常、動物の免疫活性を上昇させ十分な量の特異的抗体を作らせるため、抗原と共にアジュバント (免疫賦活剤) が接種される。本研究では、アジュバントの一つとして λ -カラギーナンの利用可能性について検討を行った。カラギーナンは紅藻から抽出される多糖類であり、食品加工の分野において増粘多糖類として使用されている³⁴⁾。D-ガラクトースと 3,6-アンヒドロガラクトースの α -1,3 または β -1,4 グリコシド結合を 1 単位とする繰り返し構造により構成されており、3,6-アンヒドロガラクトースおよび硫酸エステル基 (-O-SO₃⁻) の数によって分類分けされる。主な種類は ι -、 κ -、 λ -カラギーナンである (図 1.1)。

従来、カラギーナンは、ラットのフットパットに注射すると「カラギーナン浮腫」と呼ばれる炎症 (免疫反応) を惹起することが知られており、動物実験で炎症誘発物質として用いられてきた^{35, 36)}。また、マウスやラットのみならずニワトリのヒナのフットパットへの注射でも炎症が起きること^{37, 38)}、ニワトリのヒナに抗原 (マイコプラズマ) を ι -カラギーナンと共に投与することで、菌感染実験における気嚢炎の発症率を下げること^{39, 40)}も報告されている。

特異的抗体の産生を目的とする免疫実験においては、通常、油性アジュバントであるフロイトのコンプリートアジュバント (FCA) やインコンプリートアジュバント (FIA) が頻用されている³⁾が、炎症誘発作用を有するカラギーナンについても、特異的 IgY 抗体の大量調

製を目的とした産卵鶏に対する免疫注射に利用できると考えられる。本研究においてはカラギーナンの中でも最も水溶性が高い λ -カラギーナンのアジュバント作用を、油性アジュバントである FCA や FIA と比較した。

すなわち、第一章では、 λ -カラギーナンによる特異的 IgY 抗体誘導の可能性について明らかにするとともに、精製した抗 *S. aureus* IgY の菌増殖抑制効果を評価することで、アトピー性皮膚炎の症状悪化を防ぐ IgY 抗体の調製法について検討を行うことを目的とし、下記の実験を実施した。

II. 材料および方法

1. 材料および機器

食品添加物グレードの λ -カラギーナンは太陽化学（株）（三重県）から入手した。フロイントのコンプリートアジュバント（FCA : Freund's complete adjuvant）およびインコンプリートアジュバント（FIA : Freund's incomplete adjuvant）は Becton, Dickinson and Company (USA)から購入した。BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay は Promega (USA)から購入した。その他の試薬は特級試薬を利用した。

2. 産卵鶏への免疫

S. aureus のホルマリン処理死菌液 (8.4×10^9 cfu/mL) とフロイントのインコンプリートアジュバント (FIA)、コンプリートアジュバント (FCA)、2% λ -カラギーナン液または生理食塩水 (0.9% NaCl) をそれぞれ等量混合し、乳化または均質化したものを抗原液とした。産卵鶏（ボリスブラウン種、276 日齢）に対し、合計 1 mL (4.2×10^9 cfu/mL) の各種抗原液を右浅胸筋の 3~4 か所に注射した。それぞれのアジュバントを用いて各群 3 羽に免疫注射を実施し、初回免疫と同様の方法で追加免疫を 2 週間毎に 3 回行った。なお、初回免疫に FCA を使用した群では、二回目以降の追加免疫では FIA をアジュバントとして利用した (FCA/FIA 群)。また、コントロール群として免疫注射なしの群を置いた。

FIA 群・FCA/FIA 群・ λ -カラギーナン群・生理食塩水群の各産卵鶏が生んだ卵は、全て産卵日に回収し産卵数を 2 週間毎に調べた。その内、抗体価測定用に初回免疫から 2 週間ごとの鶏卵卵黄を 0.05%アジ化ナトリウムで 2 倍希釈し、測定まで 4°C で保存した。その他の卵から分離した卵黄は、IgY 精製用に各個体別に 2 週ごとにまとめて -30°C で保存した。

本研究における動物実験の方法については、日本学術会議の「動物実験の適切な実施に向けたガイドライン」（2006 年）に準拠し実施した。

3. *S. aureus* に対する特異的 IgY 抗体価の推移 (ELISA)

各ニワトリが産生した卵黄中の IgY 抗体価の推移を ELISA で調べた。ホルマリン不活化処理後 *S. aureus* (8.4×10^{11} cfu/mL) を ELISA コーティング Buffer (pH 9.6) で 100 倍希釈し (8.4×10^9 cfu/mL)、96 well マイクロプレート (Sumitomo Bakelite, Japan) に 50 μ L/well で分注した。37°C で 1 時間静置し、0.05% Tween20 含有 TBS (TBS-T) で 4 度洗浄した。続いて 10 mg/mL エディブルコラーゲン (E-CAN : Nippon Syoji, Japan) 溶解 TBS-T 液を 200 μ L/well 分注し、37°C で 1 時間静置後、TBS-T で 4 度洗浄した。一次抗体サンプルとして卵黄 2 倍希釈液をさらに TBS-T で希釈して 2,000 倍希釈液とし、50 μ L/well 分注し、37°C で 1 時間反応させた。TBS-T で洗浄後、二次抗体として ALP 標識 Rabbit 抗-Chicken/Turkey IgY(H+L) (Abnova, Taiwan) の 2,000 倍希釈液を 100 μ L/well 分注し、上記と同様にインキュベートおよび洗浄した。1 mg/mL 基質 (*p*-フェニルリン酸 2Na) 溶液を 100 μ L/well 分注し、37°C で 15 分間の酵素反応を行った後、2 M NaOH 50 μ L/well で反応を停止させた。マイクロプレートリーダー (Infinite 200 PRO, Tecan Japan, Japan) で Abs. 405 nm の吸光度を測定した。

4. IgY の精製

IgY の精製は、ELISA の結果において各群で最も高い抗体価を示した個体 (図 1.2) が産卵した 2 週間分の卵黄を使用し、 λ -カラギーナン法²⁾で行った。凍結によりリポタンパク質を変性させた卵黄 100 g を解凍した後、ホモミキサー (TK HomoMixer Mark II, Tokushu-kika, Japan) を使用し、0.36% 塩化ナトリウム水溶液 700 mL 中に分散させた。卵黄分散液をゆっくりと攪拌しながら 0.4% λ -カラギーナン水溶液 200 mL を添加し、1 時間室温で静置した後、遠心分離 (20°C, 7,500 rpm, 20 min) した。水溶性タンパク質画分である上清を回収し、15% (w/v) の硫酸ナトリウムを添加溶解し、室温で攪拌しながら一晚塩析した。塩析後、遠心分離 (20°C, 7,500 rpm, 30 min) で沈殿を回収し、10 mM リン酸 Buffer (pH 7.2) 50 mL に溶解した後、低温条件 (4°C) で同じリン酸 Buffer を外液として透析を実施した (6 h \sim ×4 回)。透析後の IgY 溶液は 0.45 μ m MF に通し、吸光度 (Abs. 280 nm) を測定した後、凍結乾燥し-30°C で保存した。なお、各精製 IgY の抗体濃度は光路長 1 cm における 1% IgY 溶液の吸光度 (Abs. 280 nm) を 15.8 として計算した⁴⁾。

精製した IgY はアジュバントに FIA・FCA/FIA・ λ -カラギーナンを使用したものはそれぞれ「FIA-IgY」・「FCA/FIA-IgY」・「 λ Carra-IgY」とし、コントロールは「Cont-IgY」とした。

5. 精製 IgY 抗体の純度検定

精製 IgY 抗体の純度は HPLC および SDS-PAGE で確認した。HPLC は高速液体クロマトグラフ SCL-10A (Shimadzu, Japan) および TSKgel G3000SW (Tosoh, Japan) のカラムを用い、0.1 M 硫酸ナトリウム添加 0.05 M リン酸 Buffer (pH 6.8) をカラム溶媒 (流速: 0.5 mL/min) として、ゲル濾過カラム通過液の Abs. 280 nm をモニタリングした。SDS-PAGE は Laemmli による方法⁴²⁾に従って実施した。電気泳動槽として slab type vertical gel system (ATTO, Japan)、泳動用ゲルとして 5-20% グラジエントゲル (c-PAGEL HR, ATTO)、分子量マーカーとして EzProtein Ladder (ATTO) を用いた。

6. 精製 IgY を用いた ELISA

各精製 IgY を TBS-T で 5 µg/mL に希釈したものを一次抗体として、上記「3. *S. aureus* に対する特異的 IgY 抗体価の推移 (ELISA)」に記載の方法で ELISA を実施した。抗原とするホルマリン処理後 *S. aureus* はコーティング Buffer で 7.4×10^7 cfu/mL に希釈し、50 µL/well で固相化した。

7. 特異的 IgY 含有量の推定

HPLC を用いたゲル濾過により、精製ポリクローナル抗体中の抗原特異的 IgY 抗体の含有割合を測定した。精製 IgY を 2 mg/mL 濃度となるように 10 mM リン酸 Buffer に溶解し、ホルマリン処理後 *S. aureus* 菌液 (9.3×10^8 cfu/mL) を等量混合して 37°C で 30 分以上振とうして特異的 IgY 抗体と菌体を反応させた。続いて、混合液を遠心分離 (5000 rpm, 10 分, 4°C) して上清 (抗原未吸着 IgY を含有) を回収し、上記「5. 精製 IgY 抗体の純度検定」と同様の方法で HPLC に供した。1 mg/mL IgY 溶液を HPLC にかけた時の IgY ピーク面積 (積分値) を 100% として、抗原未吸着 IgY 溶液を HPLC にかけた時のピーク面積の割合を算出し、その差を *S. aureus* 特異的 IgY 含有量 (%) とした。

8. *S. aureus* 増殖抑制試験

調製した抗 *S. aureus* IgY による細菌増殖抑制効果を調べる目的で、96 well プレート上での *S. aureus* 培養試験を行った。2 倍濃度の LB 培地 (Lennox, Sigma-Aldrich Japan, Japan) で *S. aureus* を 5.78×10^6 cfu/mL に希釈した菌液と 20 mg/mL の各 IgY 溶液を等量で混合し、この各菌/IgY 混合液を細胞培養用 96 well プレート (TPP, Switzerland) に 100 µL/well 分注した。37°C で 24 時間静置培養し、その間、経時的に 80 µL ずつ 96 well

透明プレート (Greiner bio-one, Austria) に分取して吸光度計で濁度 (Abs. 600 nm) を測定した後、30 μ L を 96 well 黒色プレート (Sumitomo Bakelite) に分取し BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay kit で ATP 活性の測定を行った。発光量の測定にはマイクロプレートリーダー SpectraMax i3x (Molecular Device Japan, Japan) を用いた。

9. 統計処理

産卵数と菌液濁度・ATP 活性に関するデータ (8, 10, 24 h) は一元配置分散分析 (ANOVA) で処理し、さらに事後解析として Tukey-Kramer 検定を実施した。これらの統計解析は Excel 統計 (社会情報サービス, Japan) を用いて行った。

III. 結果

1. 卵黄中の特異的 IgY 抗体価 (ELISA 値) および産卵率の推移

2,000 倍希釈卵黄液を一次抗体サンプルとして実施した ELISA の結果を図 1.2 (A~E) に示す。アジュバント無し (生理食塩水群) では 3 羽中 1 羽にのみ、僅かな抗体価上昇がみられた (図 1.2 (B))。一方で FIA 群では値の変動はあるものの、各個体で IgY 抗体価が大きく上昇し、FCA/FIA 群でも 3 羽すべての抗体価が上昇した (図 1.2 (C・D))。λ-カラギーナン群でも 3 羽全ての個体において FCA/FIA 群と同程度に抗体価が上昇した (図 1.2 (E))。

また、各群の 2 週間ごとの産卵数および産卵率を表 1.1 に示す。Cont 群の 2 週間ごとの産卵率を 100% とすると、FIA 群では Day15~28 (2-4 週目) に産卵率が 59.1% に、FCA/FIA 群では Day29~42 (4-6 週目) に 60.5% にまで低下し、それぞれの群の産卵数は Cont 群との間に有意な差がみられた (それぞれ $p = 0.19$, $p = 0.07$)。一方で λ Carra 群の最低産卵率は Day29~42 (4-6 週目) の 81.6% であり、Cont 群との間に有意な差は認められなかった。

2. IgY 精製の結果

λ-カラギーナン法による IgY 抗体の精製では Cont-IgY、FIA-IgY、FCA/FIA-IgY、λ Carra-IgY の順にタンパク質量で 427.3、460.7、473.0、451.1 mg 得られ、100 g 中の IgY を 1,000 mg¹⁾ とすると各 IgY の回収率は 42.7%~47.3% となった。また、HPLC の結果、その IgY 純度はそれぞれ 99.0~100% であった (表 1.2)。SDS-PAGE では主なバンドとして IgY の H 鎖と L 鎖がみられ、僅かに他の分子量のバンドもみられた (データ未掲載)。

3. 精製 IgY と菌体抗原との反応性

各精製 IgY の抗原 (*S. aureus*) との反応性を測定した ELISA の結果を図 1.3 に示す。FIA-IgY で最も抗原との反応性が高く、次いで FCA/FIA-IgY、 λ Carra-IgY の順に ELISA 値が高い結果となった。

4. 精製 IgY 中の特異的 IgY 抗体含有割合の推定

HPLC を用いて求めた IgY のピーク面積 (積分値) を基に推定した各精製 IgY 中の抗原特異的抗体含有率は、Cont-IgY で 0%、FIA-IgY で 18.1%、FCA/FIA-IgY で 12.9%、 λ Carra-IgY で 7.0%であった (表 1.2)。

5. 精製 IgY による *S. aureus* の増殖抑制

各特異的抗体 (終濃度 10 mg/mL) を培地に添加して *S. aureus* を培養し、経時的に濁度 (Abs. 600 nm)、ATP 活性を測定した結果を図 1.4 (A・B)に示す。濁度測定においては、Cont-IgY・FCA/FIA-IgY・ λ Carra-IgY 添加と比較して FIA-IgY 添加で 24 時間値が有意に低くなった ($p < 0.05$)。FCA/FIA-IgY および λ Carra-IgY を添加した場合においては Cont-IgY 添加よりも 24 時間値がやや低下したが、統計学的に有意な差はなかった (図 1.4 (A))。ATP アッセイにおいても、Cont-IgY・FCA/FIA-IgY・ λ Carra-IgY 添加と比較して FIA-IgY 添加では発光量 (ATP 活性) の 24 時間値が有意に低くなった ($p < 0.05$) (図 1.4 (B))。また、8 時間値および 10 時間値でも、FIA-IgY 添加で濁度と発光量はそれぞれ有意に低い結果となった ($p < 0.05$)。

IV. 考察

1. 油性/水溶性アジュバントと免疫活性の上昇

本研究において FIA、FCA/FIA の組み合わせ、および λ -カラギーナンのアジュバントとしての使用により、*S. aureus* 特異的 IgY 抗体の抗体価が上昇することが示された。これらのアジュバント効果を比較すると、ELISA 値として抗原との反応性が最も高い IgY は FIA をアジュバントとして用いた場合であり、次いで、FCA/FIA と λ -カラギーナンが続いた。FCA と FIA は油性アジュバントであり、抗原液と乳化した状態で注射することで、注射箇所抗原を留め、徐々に抗原を放出する³⁾。なお、FCA には結核菌の死菌が含まれているが、FIA には含まれていない。一般的に、FCA の強い免疫賦活化作用は結核菌の死菌が免疫動物の局所に強い炎症作用を生じさせるためであると考えられている³⁾。し

かし、本研究では FCA/FIA の組み合わせ（初回免疫のみ FCA を、追加免疫は FIA を利用）よりも FIA のみを最初から連続使用することで高い抗体活性が得られた。類似した結果は Shimizu らによっても報告されており⁴³⁾、FCA 中に存在する結核菌の構成成分により *S.aureus* に対する IgY 抗体の産生がむしろ抑制されたと考えられる。

また、カラギーナンは古くから炎症誘発作用を持つ物質として知られている。本研究において 2% λ -カラギーナンのアジュバント活性は油性アジュバントである FIA より低かったものの抗 *S. aureus* IgY を顕著に誘導したことから、 λ -カラギーナンは産卵鶏に免疫注射を実施する際の水溶性アジュバントとして利用できる可能性が示された。一般的に油性アジュバントは抗原溶液とエマルジョンを形成させた状態で免疫注射に用いる³⁾が、このようなエマルジョンは強い粘性を持つ混合物である。このため、大規模な IgY 抗体の調製において、この高粘度のエマルジョンを連続注射することは困難である。一方で λ -カラギーナンはゲルを形成せず、3 種のカラギーナンの中でも最も粘性が低い³⁴⁾ため、2% という高濃度であっても産卵鶏に対して連続して注射することが可能である。さらに、本研究において、 λ Carra 群の産卵率は FIA 群および FCA/FIA 群と比較して最も高く維持された（表 1.1）。従って、 λ -カラギーナンは IgY 調製を目的とした多数の産卵鶏に対する筋肉注射のアジュバントとして、または、現在一般的なワクチンに添加されている水酸化アルミニウムや他の水溶性アジュバントの様に、産業用ワクチンのアジュバントとしても利用できる可能性が考えられる。

2. 特異的 IgY 抗体の *S. aureus* 増殖抑制作用

増殖抑制試験において、Cont-IgY に比較して FIA-IgY は 24 時間後の *S. aureus* 増殖を抑制した。なお、*S. aureus* 特異的抗体の割合は FIA-IgY で最も高かった（18.1%）。従って、特異的抗体の割合（%）や抗体価が本実験で調製した FIA-IgY を超える抗 *S. aureus* IgY 抗体を用いた場合に、培地中における *S. aureus* の増殖抑制作用を 24 時間まで期待することができると言える。なお、特異的抗体が細菌の増殖を抑制するメカニズムについては未だ明らかにされていないが、Lin らは大腸菌表面の輸送体 FepA のリガンド結合部位に特異的なモノクローナル抗体により大腸菌の増殖が抑制されたことを報告している⁴⁴⁾。本研究で調製したポリクローナル抗体（FIA-IgY）でも同様に、*S. aureus* 表面の特定の部位に結合することで、菌の増殖を妨げたと考えられる。

本研究で実施した増殖抑制試験では 5.8×10^6 cfu/mL の *S. aureus* を、終濃度 10 mg/mL の各 IgY 抗体を添加した LB 培地中で、37°C の温度で培養した。Leyden らは、プ

ラークや滲出液のあるアトピー性皮膚炎患者の皮膚上の *S. aureus* 量は $1.0 \times 10^6 \sim 1.4 \times 10^7$ cfu/cm²であったと報告している²⁷⁾ため、本増殖抑制試験で設定した培養開始時の菌数は実際の皮膚上の菌量が再現されていると言える。一方、培養は *S. aureus* にとって良好な環境と言える LB 培地中、温度 37°C で実施され、この環境下でも FIA-IgY は菌の増殖を抑制できたことから、本研究で得られた抗 *S. aureus* IgY はアトピー性皮膚炎患者の皮膚上でも *S. aureus* の増殖を抑制できる可能性がある。

結語

本研究では、*S. aureus* の死菌を各種アジュバントと共に、産卵鶏に対し免疫注射を実施することで強い抗体価を有する抗 *S. aureus* IgY 抗体の調製を試みた。まず、 λ -カラギーナンをアジュバントとして免疫注射を実施することで *S. aureus* 特異的 IgY 抗体が誘導できることが示された。水溶性増粘多糖類である λ -カラギーナンをアジュバントとして用いることで産業的規模であっても筋肉注射を連続的に行うことができ、また産卵率 (%) が下がる危険性も低いという利点がある。一方で、調製した IgY のうち、*S. aureus* の増殖を 24 時間抑制できた抗体は FIA をアジュバントとして用い調製した IgY 抗体のみであり、その IgY が有する *S. aureus* 特異的抗体%は全 IgY 抗体の 18.1%であった。すなわち、*S. aureus* 増殖抑制作用を 24 時間維持し、アトピー性皮膚炎の症状悪化を防ぐ IgY 抗体の調製には、現状では油性アジュバントの FIA の利用が有効であり、ポリクローナル抗体中に占める *S. aureus* 特異的抗体が 18.1%以上の IgY 抗体の調製が必要であることが示唆された。

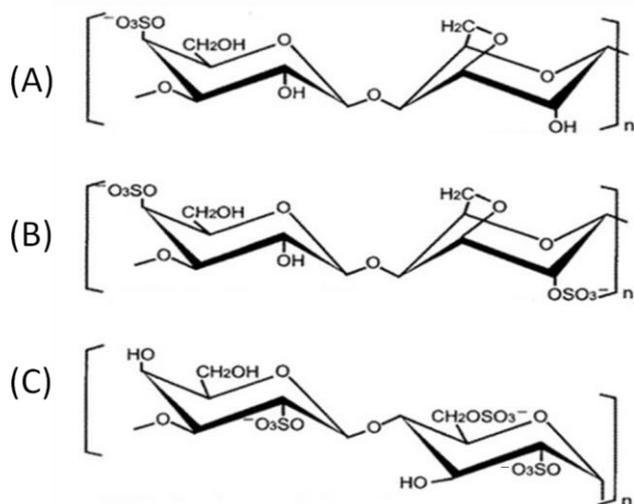


図 1.1 各種カラギーナンの基本構造

(A)は κ -カラギーナン、(B) は ι -カラギーナン、(C)は λ -カラギーナンを示す。

表 1.1 2週間ごとの産卵数と産卵率の変化

	Cont group	Saline group	FIA group	FCA/FIA group	λ Carra group
Day1~14 (0-2w)	14.0 (100%)	11.7 (83.3%)	12.0 (85.7%)	13.0 (92.9%)	13.0 (92.9%)
Day15~28 (2-4w)	14.7 (100%)	12.7 (86.4%)	8.7 (59.1%) [$p = 0.19$]	12.3 (84.1%)	12.0 (81.8%)
Day29~42 (4-6w)	12.7 (100%)	12.0 (94.7%)	10.7 (84.2%)	7.7 (60.5%) [$p = 0.07$]	10.3 (81.6%)
Day43~56 (6-8w)	13.3 (100%)	12.0 (90.0%)	12.3 (92.5%)	11.7 (87.5%)	12.7 (95.0%)
Day57~70 (8-10w)	13.7 (100%)	13.0 (95.1%)	13.0 (95.1%)	12.3 (90.2%)	12.0 (87.8%)
Day71~84 (10-12w)	13.3 (100%)	12.7 (95.0%)	12.3 (92.5%)	11.3 (85.0%)	11.7 (87.5%)
Average	13.6 (100%)	12.3 (90.6%)	11.5 (84.5%)	11.4 (83.7%)	11.9 (87.8%)

2週間ごとの各群(n=3)の産卵率(%)は同じ週のCont群(無免疫)の産卵率を100%として算出した。

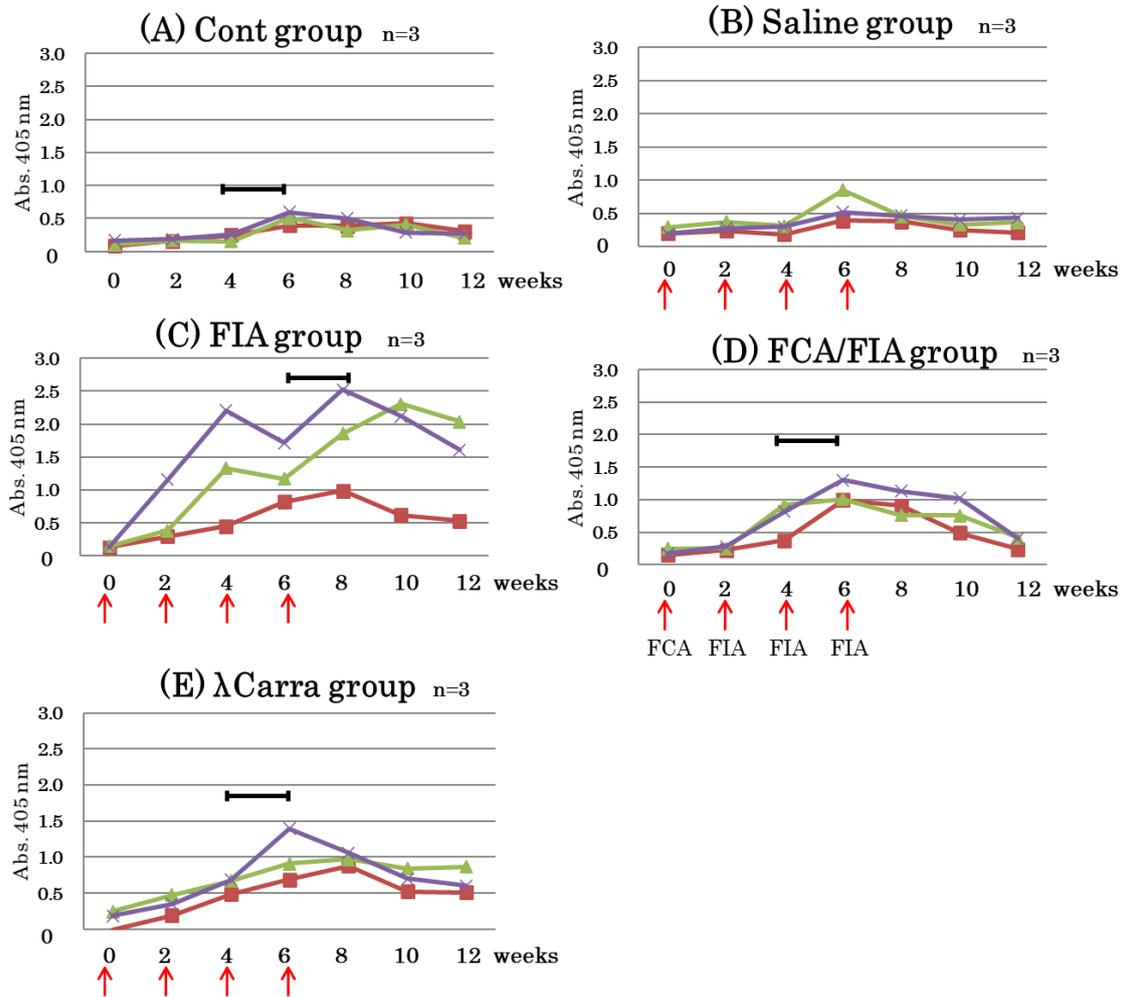


図 1.2 卵黄中の抗 *S. aureus* IgY の抗体価の変化

ELISA で各個体 (-x-, -■-, -▲-) の希釈卵黄の抗体価を測定した結果を群別に示す。矢印は免疫注射を実施したことを示す。(A), (C), (D), (E)の -x- で示す個体の、**—** で表記する期間の鶏卵から卵黄を分離し IgY 抗体の精製に使用した。

表 1.2 各精製 IgY 抗体のプロフィール

	The amount of IgY (mg) from 100g Egg Yolk	Purity measured by HPLC	Proportion of IgY specific to <i>S. aureus</i>
Cont-IgY	427.3	99.0%	0%
FIA-IgY	460.7	100%	18.1%
FCA/FIA-IgY	473.0	100%	12.9%
λ Carra-IgY	451.1	100%	7.0%

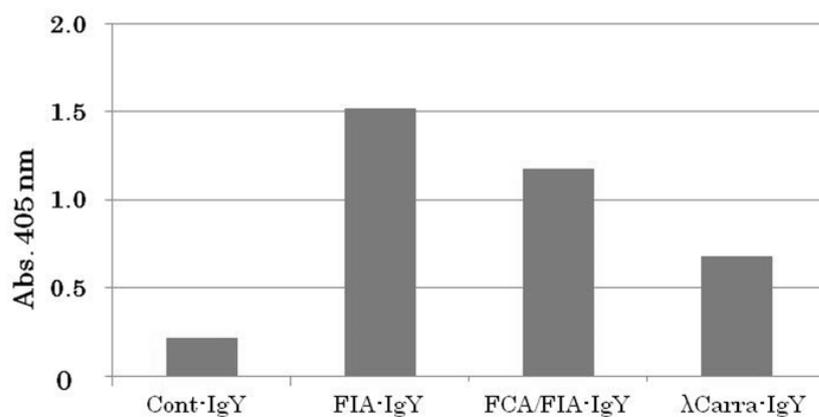


図 1.3 ELISA による各精製 IgY 抗体の *S. aureus* に対する反応性

それぞれの精製 IgY 抗体は 5 μ g/mL の濃度で一次抗体として用いた。

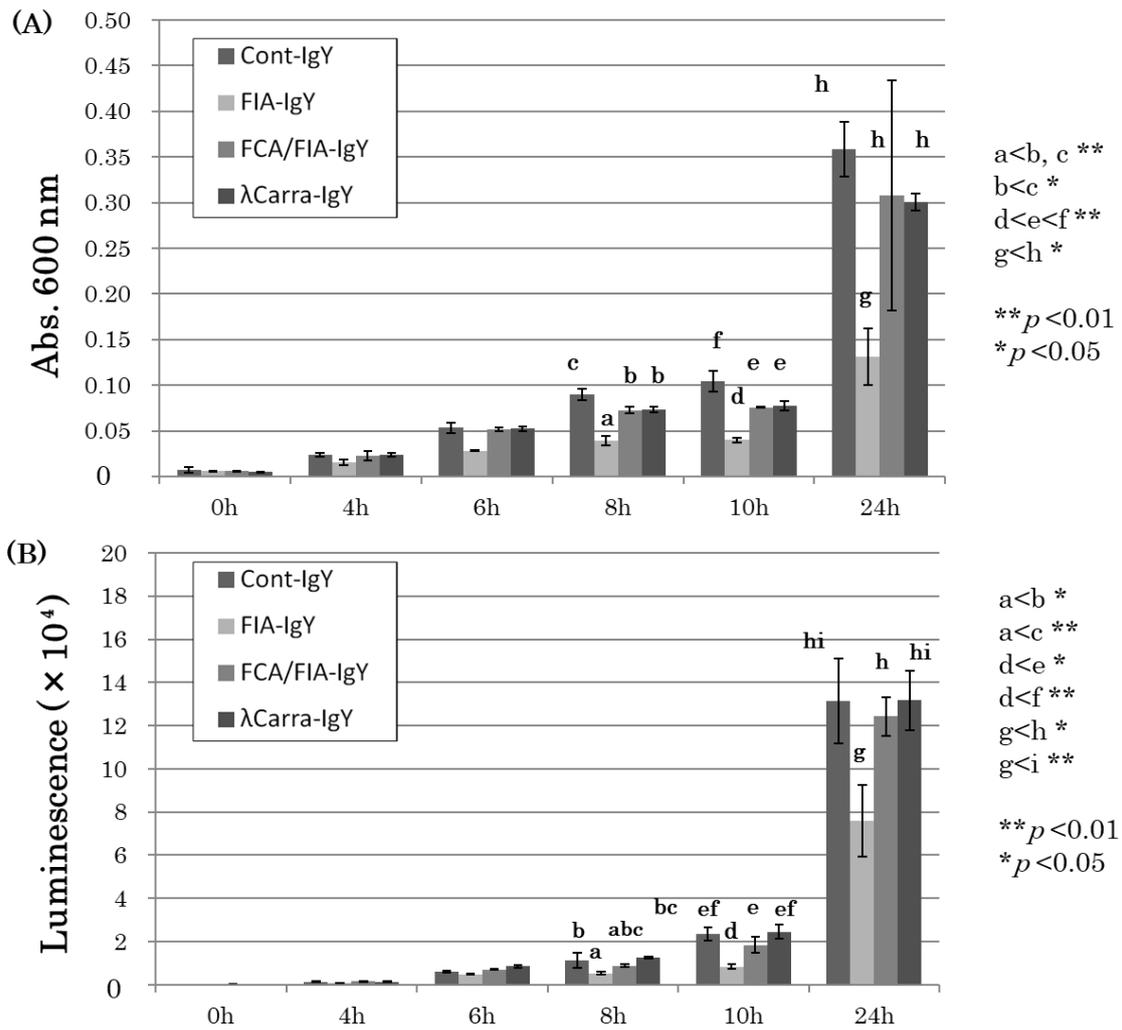


図 1.4 濁度(A)および発光量(B)の測定による *S. aureus* 増殖量の変化

各精製 IgY 抗体を添加し培養した際の *S. aureus* 増殖量を、濁度(A)と細菌の ATP 活性に由来する発光量(B)として測定した。データは平均±標準偏差で示し(n=3)、異なる文字は統計的に有意な差があることを示す。

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～

要約

本研究では、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、コントロール群は無免疫、その他の群は pcDNA-N (400 μ g/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。卵は毎日採取し、2 週間毎に卵黄の特異的抗体価を ELISA で測定した。さらに各群の卵黄 (16~19 週目) から IgY を精製し、それぞれ Cont IgY、pcDNA-N IgY、pcDNA-N + FCA IgY、および pcDNA-N + λ Carra IgY を得た。各精製 IgY を ELISA・Western Blot・Dot Blot で抗原 RV-N の検出感度を比較した。その結果、pcDNA-N アジュバント無し群の 2 羽中 1 羽で卵黄 ELISA 値 (抗体価) が上昇し、アジュバント併用群では全個体で卵黄 ELISA 値が上昇した。また、水溶性増粘多糖類である λ -カラギーナンの併用により、FCA に匹敵するアジュバント効果が得られた。Cont IgY を除く各精製 IgY は ELISA・Western Blot・Dot Blot で RV-N を検出できたが、検出感度に差が見られた。すなわち、pcDNA-N + λ Carra IgY は ELISA で、pcDNA-N + FCA IgY は Western Blot と Dot Blot で RV-N の検出感度が高かった。以上の結果より、DNA 免疫法で λ -カラギーナンや FCA をアジュバントとして併用することにより抗 RV-N IgY 抗体が得られ、これらは一次抗体として RV-N の検出に利用できることが示された。

I. 緒言

近年、ワクチン接種や特異的抗体調製の方法として、DNA 免疫法が注目されている。DNA 免疫法では、抗原タンパク質をコードする外来遺伝子とプロモーター/ターミネーターを含む発現ベクター (プラスミド) を構築し免疫注射に用いる。免疫注射された組換えプラスミド DNA は免疫動物の細胞内で外来タンパク質を発現し、この発現タンパク質が抗原となり、免疫活性を賦活化することで抗原特異的抗体が産生される。DNA 免疫法の安全性は、動物実験および臨床研究で確認されている⁴⁵⁻⁴⁸⁾。また、最近では COVID-19 のワクチン候補として、DNA 免疫法を用いる方法が注目されている⁴⁹⁾。なお、ニワトリへの免疫注射に

関しては、ウイルス¹⁰⁻¹²、細菌¹³⁻¹⁵および哺乳類¹⁶のタンパク質に対する特異的 IgY が、DNA 免疫法により誘導されたことが報告されている。

狂犬病は、狂犬病ウイルス (Rhabdoviridae 科、Lyssavirus 属) に感染した動物 (特にイヌ) の唾液を介して感染する人獣共通感染症である⁵⁰。狂犬病発症後の致死率は 100% であり、現在でも東南アジアやアフリカ地域において公衆衛生上の大きな問題となっている¹⁹⁻²¹。WHO の狂犬病治療ガイドラインでは、ワクチン接種に加えて精製されたヒトまたはウマ由来の抗狂犬病免疫グロブリンを注射することが推奨されている⁵¹が、近年は治療に必要な免疫グロブリンが枯渇状態にある⁵²。一方で、産卵鶏免疫法で鶏卵から特異的 IgY 抗体の大量調製が可能であることから、上記の免疫グロブリンの代替として IgY 抗体の利用が期待されている⁵³。

さらに、狂犬病のウイルス検査では、感染が疑われる動物の体液や脳組織の固定化切片からウイルスを検出するため、リッサウイルス抗原を標的としたポリクローナル抗体やモノクローナル抗体が用いられてきた²¹。現在、この狂犬病ウイルス検査用抗体についても、安価で、かつ継続的な供給が必要とされている⁵⁴。

我々の研究グループは過去に、狂犬病ウイルスの特定遺伝子から大腸菌で組換えタンパク質を発現させ精製し、産卵鶏に免疫注射を行うという従来の方法により、その鶏卵卵黄より核タンパク質 (RV-N)、リン酸化タンパク質 (RV-P)、および表層糖タンパク質 (RV-G) に対する鶏卵抗体 (IgY) を調製した。そして、抗 RV-N IgY が狂犬病ウイルスの検出に、抗 RV-G IgY がヒトまたはウマ由来の抗狂犬病免疫グロブリンの代替として感染防止に利用可能であることを報告した^{23,53}。

本研究の目的は、DNA 免疫法で産卵鶏に対し免疫注射を実施し、その鶏卵卵黄から特異的 IgY 抗体として、狂犬病ウイルスの研究や検査で用いることができる抗 RV-N IgY を調製することである。また、我々は第一章において微生物抗原に対する水溶性多糖類 λ -カラギーナン (食品添加物) のアジュバント効果を見出した⁵⁵。本研究では λ -カラギーナンが DNA 免疫法でもアジュバントとして利用できるか、FCA (フロイントのコンプリートアジュバント) と比較して検討した。

II. 材料および方法

1. アニマルケア

本研究は、京都女子大学動物実験委員会の承認を得た (認証番号 2020-13)。また、動物とその飼育に関わるすべての手順は、「動物実験の適切な実施のためのガイドライン」(日本

学会会議、2006年)に準拠し行った。

2. 試料および機器

食品添加物グレードのλ-カラギーナンは太陽化学株式会社(三重県)より入手した。フロイントのコンプリートアジュバント(FCA: Freund's complete adjuvant)はBecton, Dickinson and Company (USA)から入手した。DNA purification NucleoBond Xtra MidiはMacherey-Nagel (USA)から入手した。狂犬病ウイルス組織培養不活化ワクチン(シード)はKM バイオロジクス (Japan)から入手した。他の試薬については、特級試薬を使用した。

3. 組換えプラスミドの調製

組換えプラスミドは国立感染症研究所獣医科学部の井上智先生と野口章先生から譲渡いただいた組換えプラスミド pcDNA-N を増幅・精製して使用した。なお、この pcDNA-N は狂犬病ウイルス challenge-virus-standard (CVS) 株由来の核(N)タンパク質遺伝子を pcDNA 3.1 (Thermo Fisher Scientific, USA) にライゲートしたものである(図 2.1)。pcDNA-N を大腸菌 DH5α コンピテント細胞 (Takara, Japan) で増幅し、プラスミド DNA 精製キット NucleoBond Xtra Midi plasmid DNA purification kit のプロトコールに従って精製した。この組換えプラスミド DNA を 10 mM phosphate Buffer +150 mM NaCl 溶液 (pH 7.4, 以下 PBS) で 1 mg/mL に濃度調整し、-30°C で保存した。

4. 産卵鶏へのプラスミド DNA 免疫

8羽の産卵鶏(ボリスブラウン種, 416日齢)を2羽ずつ4群に分けた。1群は免疫注射なしのコントロールとし、2~4群の6羽の浅胸筋にRV-N組換えプラスミドDNA (pcDNA-N)を針なし圧力注射器Twin-Jector®Ez II (JCRファーマシューティカルズ, Japan)を用いて注射した(400 µg/羽)。注射は2週間毎に8回繰り返した。4週目(3回目)の注射からは、3群と4群の各2羽にアジュバントとして1 mL/羽のFCAまたは2%λ-カラギーナンを、pcDNA-N注射部位の周辺4ヶ所に分けて注射した。注射前に各産卵鶏の上肢静脈から採血し、遠心分離で血清を分離し-30°Cで保存した。採卵は毎日行い、初回の注射から2週間毎に割卵して分離した卵黄を0.1%アジ化ナトリウム液で2倍希釈し(2倍希釈卵黄液)、4°Cで保存した。それ以外の卵黄は個別別に2週間ごとにまとめ均質化し、-30°Cで凍結保存してIgY抗体の精製に使用した。

5. 血清と卵黄をサンプルとした ELISA

ELISA は、第一章の「II. 材料および方法, 3. *S. aureus* に対する特異的 IgY 抗体価の推移 (ELISA)」に記載の方法に従って実施した。狂犬病ウイルス組織培養不活化ワクチンを ELISA コーティングバッファー (pH9.6) で 10 倍希釈し、96 well ELISA プレート (Sumitomo Bakelite, Japan) にコーティングした。2 倍希釈卵黄液は Tween20 を 0.05% 含む 20 mM トリス緩衝液 (TBS-T, pH 7.4) でさらに 2,000 倍希釈し、一次抗体として各 well に添加した (50 μ L/well)。TBS-T で 3 回洗浄後、ALP 標識抗 IgY (H+L) ウサギ抗体 (Abnova, Taiwan) を二次抗体として 4,000 倍希釈して使用し (100 μ L/well)、TBS-T で 4 回洗浄後、1 mg/mL 基質 (*p*-ニトロフェニルリン酸 2Na) 溶液で発色させ (37°C, 反応時間 10 分)、Abs. 405 nm の吸光度を測定した。

6. IgY の精製

卵黄からの IgY 精製は、第一章に記載した λ -カラギーナン法²⁾で実施した。各群で高い ELISA 値 (抗体価) を示した産卵鶏一羽 (図 2.2) の 16~19 週目の卵黄をまとめ、凍結したものを IgY 精製に用いた。精製された IgY 抗体の濃度は、1% IgY 溶液は光路長 1 cm において Abs. 280 nm の吸光度が 15.8 である⁴⁾ことを用いて算出した。各 IgY の純度は HPLC ゲル濾過および SDS-PAGE により評価した。

7. 精製 IgY を用いた ELISA

各精製 IgY の特異的抗体価の比較は、それぞれの IgY 濃度を TBS-T で 0.1, 1.0, 10.0, 100.0 μ g/mL に調整し、上記「5. 血清と卵黄をサンプルとした ELISA」のプロトコールに従って測定した。

8. 遺伝子組換え RV-N の精製

CVS 株由来の RV-N の全遺伝子を In-Fusion HD Cloning (Takara, Japan) により、pET-42a プラスミドベクター (Merck, Germany) にライゲートした。組換えベクターを Rosetta-gami B (DE3) pLysS Competent Cells (Merck) に形質転換し、産生させた組換え RV-N (rRV-N) を His-trap FF crud (Cytiva, Japan) を用いて 8 M 尿素による変性条件下で常法に従い精製した。

9. Western Blot および Dot Blot

Western Blot は、まず rRV-N を 5-20% 勾配ゲル (c-PAGEL HR, ATTO, Japan) と Slab type vertical gel system (ATTO) を用いて SDS-PAGE に供した。Laemmli 法⁴²⁾による電気泳動の後、タンパク質を PVDF 膜 (BIO-RAD, USA) に転写した。PVDF 膜を PBS で洗浄後、5% スキムミルク PBS 溶液を用い室温で 1 時間ブロッキングした。PBS で洗浄した後、各レーンのメンブレンを切り取り、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 各精製 IgY 0.1% BSA/TBS-T 溶液 (5 mL) 中でインキュベートした。全ての PVDF 膜を TBS-T で洗浄し、10,000 倍希釈した二次抗体 (HLP 標識抗 IgY ウサギ IgG [Sigma-Aldrich, USA]) 5 mL でインキュベートし、同様に洗浄した。最後に、免疫複合体を Chemi-Lumi One Ultra (Nacalai Tesque, Japan) で染色し、Lumino Graph I (ATTO) を用いて化学発光を測定した。

また、Dot Blot も精製 rRV-N を抗原として実施した。0.25 mg/mL の rRV-N を連続的に 2 倍希釈し (最終濃度 : 0.250、0.125、0.063、0.031、0.015、0.007 mg/mL) それぞれの 2 μL を親水処理した PVDF 膜上に滴下した。ブロッキングは 10 mL の 3% スキムミルク PBS 溶液で行い、その他の手順は上記の Western Blot のプロトコールに従った。

III. 結果

1. ELISA による希釈卵黄中の IgY 抗体価の変化と産卵率

希釈卵黄をサンプルとした ELISA の結果を図 2.2 に示す。pcDNA-N を単独で投与した 2 群 (pcDNA-N 群) で卵黄の ELISA 値 (抗体価) が上昇したのは 2 羽中 1 羽のみであった (図 2.2(II))。一方、アジュバントとして FCA もしくは λ -カラギーナンを注射した 3 群 (pcDNA-N + FCA 群) と 4 群 (pcDNA-N + λ Carra 群) は全ての個体で卵黄中 ELISA 値が上昇した (図 2.2(III・IV))。3 群の IgY 抗体価は、4 群よりも早く上昇した。一方で 4 群の IgY 活性の上昇は緩やかであったが最高値は 3 群よりも高くなった。なお、2~4 群の DNA 免疫群の産卵率は、コントロールである 1 群と比べて低下しなかった (データ未掲載)。

2. IgY 抗体の精製

IgY の精製は λ -カラギーナン法で行った。1~4 群の各一個体に由来する卵黄から精製された IgY はそれぞれ Cont IgY (コントロール)、pcDNA-N IgY、pcDNA-N + FCA IgY、pcDNA-N + λ Carra IgY とした。各 IgY を SDS-PAGE に供した結果、IgY の H 鎖 (70 kDa) と L 鎖 (20 kDa) 以外にも、H 鎖と L 鎖の間に不純物を示すバンドが僅かながら見

られた（データ未掲載）。一方、HPLCによる純度分析では単一のピークを示し、各 IgY のピーク面積（積分値）から算出した純度はいずれも 98.7%以上であった（データ未掲載）。

3. 精製 IgY 抗体の ELISA における反応性

各特異的 IgY 抗体はワクチンに含まれる狂犬病ウイルス核タンパク質 (RV-N) を ELISA で検出した (図 2.3)。ELISA 値は Cont IgY を除く各精製 IgY の濃度に比例して上昇した。IgY 濃度 10 µg/mL では、pcDNA-N + λ Carra IgY の ELISA 値が約 1.1 で最も高く、次いで pcDNA-N + FCA IgY が約 0.8、アジュバント併用なしの pcDNA-N IgY が約 0.6、Cont IgY が約 0.1 であった (図 2.3)。

4. 精製 IgY 抗体の Western Blot と Dot Blot における反応性

Western Blot での rRV-N 検出結果を図 2.4 (A) に示す。SDS-PAGE へ供したいずれの濃度 (0.025~0.1 mg/mL) であっても、Cont IgY は rRV-N を検出しなかった。pcDNA-N IgY および pcDNA-N + FCA IgY では、最小濃度である 0.025 mg/mL においても、rRV-N が約 57 kDa 付近に検出された。一方、pcDNA-N + λ Carra IgY では抗原濃度 0.05 mg/mL および 0.1 mg/mL で rRV-N を検出した (図 2.4 (A))。

Dot Blot の結果においても、これら 3 種類の IgY は rRV-N を検出した。特に pcDNA-N + FCA IgY は他の IgY よりも rRV-N を高感度に検出した (図 2.4 (B))。

IV. 考察

1. DNA 免疫法とアジュバント利用による特異的 IgY 抗体の誘導

本研究では、鶏卵抗体 (IgY) の調製に DNA 免疫法とアジュバントを併用し、狂犬病ウイルス核タンパク質 (RV-N) に対する特異的 IgY の調製に成功した。一般的に、アジュバント未使用で IgY 抗体を得られることは稀である。一方で RV-N 遺伝子を導入したプラスミド DNA (pcDNA-N) を単独で免疫注射した 1 群では 2 羽の産卵鶏の内 1 羽のみに特異的 IgY 抗体が誘導された。すなわち、2 羽中 1 羽の卵黄 ELISA 値 (抗体価) のみが 2 週目の追加免疫後に上昇し、4 週目で最大値となった (図 2.2 (II))。また、それら鶏の血清を用いた ELISA 値も同様の結果を示した (データ未掲載)。なぜ 2 羽中 1 羽のみ、特異的 IgY 活性が誘導されたのかは明らかではないが、免疫注射時に pcDNA-N が筋肉細胞のみならず樹状細胞などの抗原提示細胞内に入り⁴⁾、急速かつ高度に免疫活性を賦活化した可能性が考えられる。あるいは産卵鶏の免疫賦活に関連する遺伝子の多様性、すなわち単に個体差に

起因する結果である可能性も考えられる。

一方、DNA 免疫法でアジュバントを併用した 3・4 群の全ての産卵鶏で、血清および卵黄に抗原特異的 IgY 抗体が誘導された。第一章で示した様に、 λ -カラギーナンはホルマリオンで不活化処理した細菌を採卵鶏に免疫する際のアジュバントとしての活性を有している⁵⁵⁾。我々の知る限りでは、本研究は λ -カラギーナンが産卵鶏に対して実施する DNA 免疫のアジュバントとして利用可能であることを示した最初の報告である。また、我々は第一章で λ -カラギーナンは FCA に比べて産卵率を低下させないことも報告した⁵⁵⁾。このことから、 λ -カラギーナンをアジュバントとして利用することにより産卵鶏の免疫注射箇所の炎症による痛みやストレスを緩和できる可能性がある。

2. DNA 免疫法で調製した IgY 抗体の性質

本研究で pcDNA-N 単独、およびアジュバント併用により調製した 3 種の IgY 抗体 (pcDNA-N IgY・pcDNA-N + FCA IgY・pcDNA-N + λ Carra IgY) は、ELISA・Western Blot・Dot Blot で抗原 (RV-N) を検出した。ELISA と Western Blot・Dot Blot において、RV-N に対する反応性が pcDNA-N + FCA IgY と pcDNA-N + λ Carra IgY で逆転した理由としては、アジュバントの種類によって誘導された IgY 抗体の抗原認識部位が異なったためであると考えられる。すなわち、ELISA では狂犬病ウイルスワクチン (未変性 RV-N 含有) を固相化抗原としたが、この未変性タンパク質を強く認識する抗体が pcDNA-N + λ Carra IgY に多く含まれていたと考えられる。一方で、Western Blot や Dot Blot では 8 M 尿素や SDS + 2-メルカプトエタノールで変性した組換え RV-N タンパク質を用いたので、変性抗原を強く認識する抗体が pcDNA-N + FCA IgY に多く含まれていたのではないかと思われる。今後、実際に狂犬病感染動物の組織切片をサンプルとし、これらの IgY 抗体が狂犬病ウイルスの検出に使えるかを検討する必要があるが、本研究において産卵鶏免疫法で組換えプラスミド DNA 注射とアジュバント注射を併用すれば、免疫鶏卵から特異的 IgY 抗体の大量調製ができることが示唆された。

3. DNA 免疫法を利用する利点

DNA 免疫法では従来の IgY 抗体調製法の様に、時間をかけてウイルスの組換えタンパク質を発現・精製する必要が無い。一般的に組換えタンパク質の調製において、大腸菌等に十分な量のタンパク質を発現させることが困難な場合があり、かつ免疫動物への注射に用いるために目的タンパク質を高純度に精製するには多くの工程が必要であり、これらは簡単

な操作ではない。一方、DNA 免疫法では組換えプラスミド DNA の調製のみで免疫注射が可能であり、この免疫方法は研究資源が限られている状況でも実行可能だと考える。例えば、本研究でプラスミド DNA に組み込んだ狂犬病ウイルス核タンパク質 (RV-N) の遺伝子の代わりに、感染抗原である G タンパク質 (RV-G) を組み込んだプラスミドを用いて産卵鶏に対する DNA 免疫を実施することで、不足する抗狂犬病免疫グロブリンの代替として利用可能な IgY 抗体の大量調製も可能になると考える (図 3.1 参照)。今後、これらの狂犬病ウイルスに対する特異的 IgY 抗体を用いて、ウイルス検出やウイルス感染阻害の実用性を示すことができれば、開発途上国で枯渇状態である狂犬病ウイルスに対する検査抗体や中和抗体の供給に大いに貢献できることが期待される。

結語

本研究では、狂犬病ウイルス核タンパク質 (RV-N) 遺伝子を導入したプラスミド DNA を注射し、アジュバントとして λ -カラギーナンや FCA を併用することにより、産卵鶏の免疫活性を賦活化し、産卵鶏に RV-N 特異的 IgY 抗体を誘導することが可能であることを示した。そして、免疫鶏の鶏卵卵黄から精製した抗 RV-N IgY は ELISA と Western Blot および Dot Blot の一次抗体として RV-N の検出に利用することができた。この DNA 免疫法による IgY 抗体調製法は、免疫時に用いる抗原タンパク質の調製が困難な場合における新たな抗体調製法としての活用が期待され、また現在枯渇状態である狂犬病ウイルスに対する検査抗体や中和抗体の供給に貢献できると期待される。

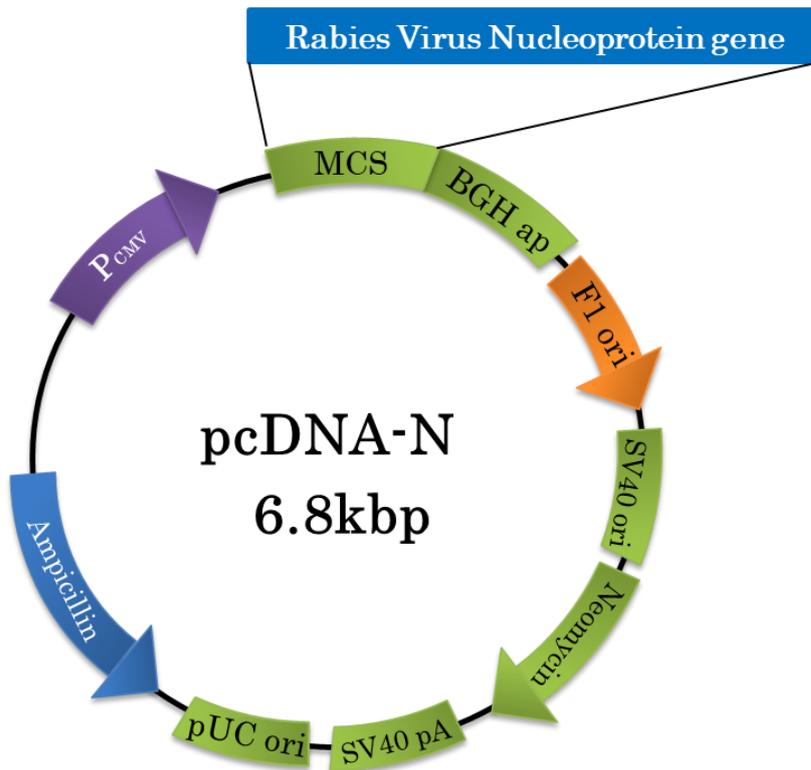


図 2.1 狂犬病ウイルス核タンパク質遺伝子組換えプラスミド(**pcDNA-N**)の DNA マップ

狂犬病ウイルス核 (N) タンパク質 (RV-N) の塩基配列は、狂犬病ウイルス challenge-virus-standard (CVS) 株由来のものが使用された。この DNA をサイトメガロウイルス (CMV) プロモーターを有するプラスミドベクター pcDNA3.1 に挿入することで作成された組換えプラスミド (pcDNA-N) を、免疫実験に使用した。

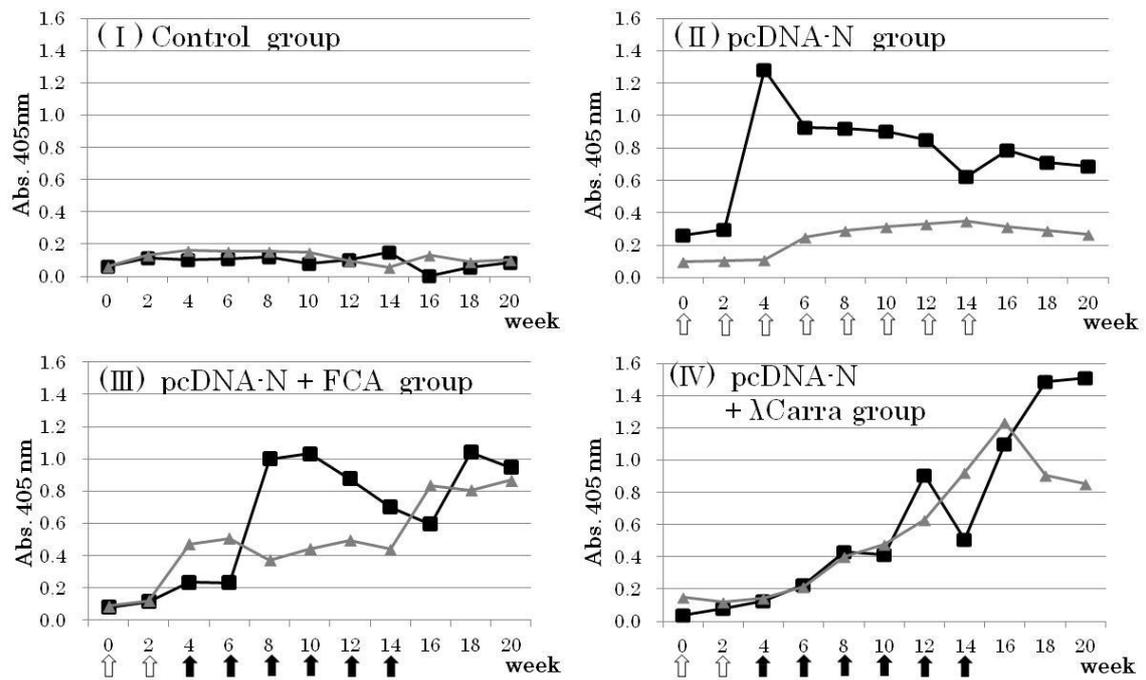


図 2.2 卵黄中の抗 RV-N IgY 抗体活性の変化 (ELISA)

1~4 群の各個体の卵黄中 IgY 抗体価の変化を示す。各群の一個体 (—■—) に由来する、初回免疫後 16~19 週目のプール卵黄を IgY 抗体の精製に使用した。⇧と⇩はそれぞれ、pcDNA-N 単独注射とアジュバント (FCA またはλ-カラギーナン) 併用による免疫注射を示す。

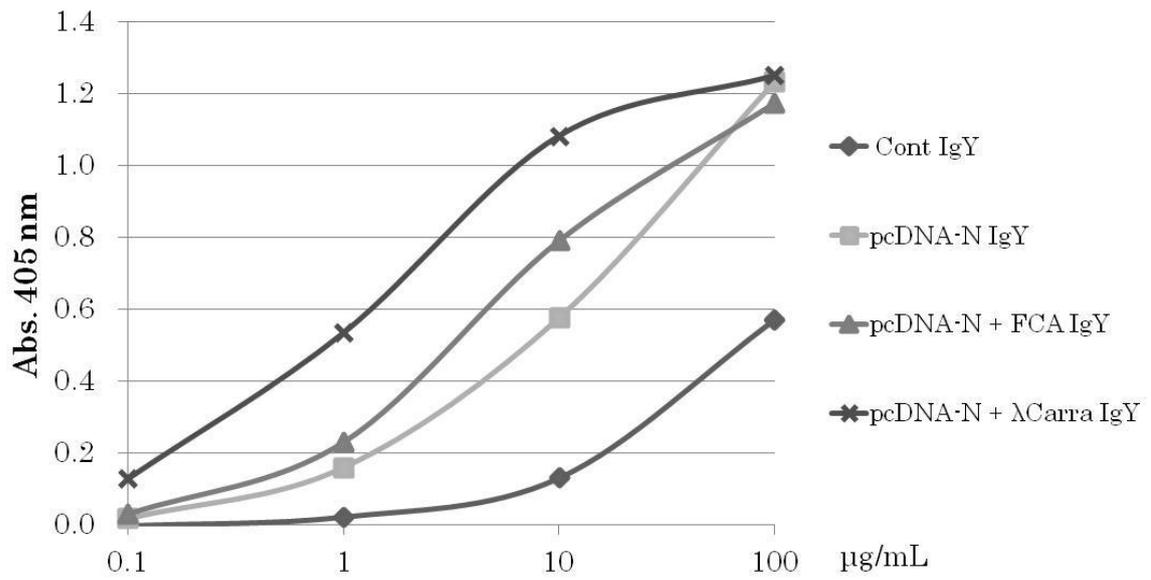


図 2.3 各精製 IgY 抗体の狂犬病ウイルスワクチンに対する反応性 (ELISA)

それぞれの精製 IgY 抗体は 0.1~100 µg/mL の濃度で一次抗体として用いた。

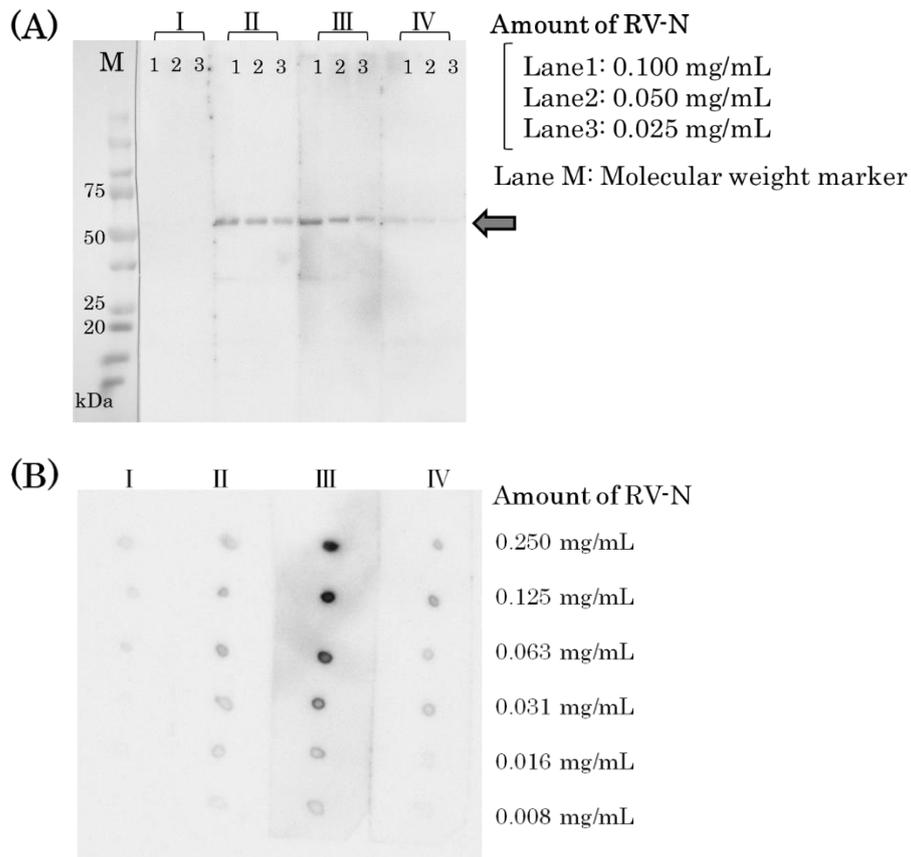


図 2.4 Western Blot (A) と Dot Blot (B) による組換え狂犬病ウイルス核タンパク質 (rRV-N) の検出

精製した Cont IgY (I), pcDNA-N IgY (II), pcDNA-N + FCA IgY (III) と pcDNA-N + λ Carra IgY (IV) はそれぞれ一次抗体として 10 μ g/mL の濃度で使用した。(A)の矢印は狂犬病ウイルス核タンパク質 (RV-N) の分子量 (約 57 kDa) を示す。

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～

要約

本研究ではニワトリ卵黄から、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て、産卵鶏にアジュバント (λ -カラギーナンもしくは FCA) の事前注射 (免疫前刺激) を行い、局所の免疫活性を上昇させることで、DNA 免疫で強い抗体価を有する IgY 抗体を得ることが可能か検討した (アジュバント前投与 DNA 免疫法)。また、産卵鶏への免疫方法として、DNA 免疫法と従来のタンパク質免疫法を実施し、それぞれの鶏卵卵黄に移行する特異的 IgY 抗体の抗体価 (ELISA 値) の推移も比較した。

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かが、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、組換えプラスミド DNA 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、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。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 免疫法を研究開発することにより、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を鶏卵卵黄から調製できる可能性がある。

I. 緒言

狂犬病ウイルスは核タンパク質 (RV-N)、糖タンパク質 (RV-G)、リン酸化タンパク質 (RV-P) などから構成されている¹⁸⁾ (図 3.1)。我々は狂犬病の検査試薬となり得る RV-N 特異的 IgY 抗体の新たな調製法の確立を目標としており、これまでに、従来法である遺伝子組換えタンパク質を抗原として注射する方法 (タンパク質免疫法)²³⁾、および遺伝子組換えプラスミド DNA を注射し RV-N をニワトリ筋肉中で発現させる方法 (DNA 免疫法)⁵⁶⁾で RV-N に特異性を有する IgY 抗体の調製に成功し報告している。本研究では、DNA 免疫法において既に使用実績のあるアジュバント (λ -カラギーナンおよび FCA) を事前に免疫賦活剤として注射することにより、その注射局所に各種免疫担当細胞を集め (免疫前刺激)、プラスミド DNA から発現した抗原に対してより強い免疫応答を誘導することが可能かを検討し

た。また、同じロットで日齢が同じ産卵鶏を用い DNA 免疫法とタンパク質免疫法による免疫実験を行い、それぞれの卵黄中に誘導される特異的 IgY 抗体価の変動を調べた。また、各群で最も高い特異的抗体価を示すプール卵黄から IgY を精製し、RV-N 抗原に対する特異的抗体価を比較した。

II. 材料および方法

1. 試料および試薬

食品添加物グレードのλ-カラギーナンは太陽化学（株）より入手した。フロイントのコンプリートアジュバント（FCA : Freund's complete adjuvant）およびインコンプリートアジュバント（FIA : Freund's incomplete adjuvant）は Becton, Dickinson and Company（USA）から入手した。DNA purification NucleoBond Xtra Midi は Macherey-nagel (USA) から入手した。狂犬病ウイルス組織培養不活化ワクチン（シード）は KM バイオロジクス（Japan）から入手した。他の試薬については、特級試薬を使用した。

2. 組換えプラスミドの調製

第二章「II. 材料および方法, 3. 組換えプラスミドの調製」と同様に、狂犬病ウイルスの challenge-virus-standard (CVS) 株由来の RV-N 遺伝子(アクセッション番号:AB069973) を pcDNA 3.1 (Thermo Fisher science, USA) にライゲートすることで作成された組換えプラスミド DNA (pcDNA-N) を免疫注射に用いた (図 2.1)。pcDNA-N を大腸菌 DH5α コンピテント細胞 (Takara, Japan) で増幅し、プラスミド DNA 精製キット NucleoBond Xtra Midi のプロトコールに従って精製した。この組換えプラスミド DNA を 10 mM phosphate Buffer +150 mM NaCl 溶液 (pH 7.4, 以下 PBS) で 1 mg/mL に調整し、-30°C で保存した。なお、本研究における遺伝子組換え実験に関しては、京都女子大学の組換え DNA 実験安全委員会により承認を得た (承認番号 : 20-2-03)。

3. 遺伝子組換え RV-N の精製

CVS 株由来の RV-N の全遺伝子を、In-Fusion HD Cloning (Takara) を用いて pET-42a プラスミドベクター (Merck, Germany) に挿入した。組換えベクターを Rosetta-gami B (DE3) pLysS Competent Cells (Merck) に形質転換し、産生させた組換え RV-N (rRV-N) を His-trap FF crud (Cytiva, Japan) を用いて 8 M 尿素による変性条件下で精製した。さらに透析により尿素を除去したが、尿素濃度が低下すると組換えタンパク質が不溶化した。

そこで、完全に脱尿素し不溶化凝集した状態 (rRV-N in 0M Urea) と 4 M 尿素中で可溶化した状態 (rRV-N in 4M Urea) の 2 種類の遺伝子組換え RV-N 抗原を調製した。

4. 産卵鶏への免疫注射

免疫注射のスケジュールや各群に対する処置について表 3.1 および図 3.2 に示した。計 24 羽の産卵鶏 (ボリスブラウン種, 356 日齢) を 3 羽ずつ 8 群に分けた。1~5 群に対しては pcDNA-N を針なし圧力注射器 Twin-Jector®Ez (JCR ファーマシューティカルズ社, Japan) を用いて浅胸筋に注射した (400 µg/羽)。このうち、1~4 群については注射箇所の周囲にアジュバントとしてそれぞれ 2% λ-カラギーナンもしくは FCA 1 mL を注射した。なお、2・4 群については初回の pcDNA-N 注射の直前 1 週間に、各アジュバント 1 mL の投与を 3 度行った (免疫前刺激) (図 3.2)。以降、この 2% λ-カラギーナンもしくは FCA で免疫前刺激を行った後に pcDNA-N 注射を行う方法を「アジュバント前投与 DNA 免疫法」と定義する。5 群は pcDNA-N 単独の注射を行った。上記の 1~5 群は初回免疫後、2 週毎に同じ内容で追加免疫を 3 回実施した。6 群は免疫注射なしのコントロール群とした。7・8 群については、各 1 mL の rRV-N in 0M Urea または rRV-N in 4M Urea (0.5 mg/mL) をそれぞれ等量の FCA で乳化し、免疫注射を実施した。追加免疫は各抗原液 0.5 mL を等量の FIA と乳化し、2 週毎に 3 回実施した。

4・6 週目の免疫注射の直前には注射箇所の炎症の程度を目視で確認し、数値化した。この際「炎症なし」を 0 点、「わずかに変異あり」を 1 点、「炎症あり」を 2 点、「強い炎症あり」を 3 点として評価を行った。この評価は 2 名により行われ、代表的な個体については炎症部分の撮影を行った。採卵は毎日行い、割卵まで 4°C で保存した。初回免疫 (DNA 免疫またはタンパク質免疫) を行った日を 0 週目の初日とし、各個体ごとに 2 週間毎の卵 1 個から分離した卵黄を 0.1% アジ化ナトリウム液で 2 倍希釈し、4°C で保存した。これを 2 倍希釈卵黄保存液とする。それ以外の卵黄は 2 週間毎に割卵・分離・均質化し、-30°C で凍結保存して IgY の精製に使用した。

本研究は、京都女子大学の動物委員会の承認を得た (認証番号 2020-12)。また、動物とその飼育に関わるすべての手順は、「動物実験の適切な実施に向けたガイドライン」(日本学術会議、2006 年) に準拠し行った。

5. 希釈卵黄を用いた ELISA

ELISA は、第二章「II. 材料および方法, 5. 血清と卵黄をサンプルとした ELISA」で示した手順に従って実施した。すなわち、狂犬病ウイルスワクチンを ELISA コーティングバッファー (pH 9.6) で 10 倍希釈し、96 well ELISA プレート (Sumitomo Bakelite, Japan) に固相化した。2 倍希釈卵黄保存液は Tween20 を 0.05% 添加したトリス緩衝液 (pH 7.4, TBS-T) でさらに 1,000 倍希釈し、一次抗体として各 well に添加した (50 μ L/well)。次いで、TBS-T で 3 回洗浄後、ALP 標識抗 IgY (H+L) 抗体 (Abnova, Taiwan) を二次抗体として 4,000 倍希釈して使用し (100 μ L/well)、TBS-T で 3 回洗浄後、基質 (1 mg/mL *p*-ニトロフェニルリン酸 2Na 水溶液 [pH 9.5]) で発色させ、Abs. 405 nm の吸光度を測定した。反応温度は 37°C とし、酵素反応時間は DNA 免疫を実施した 1~5 群および 6 群 (コントロール) では 20 分、タンパク質免疫を実施した 7・8 群では 15 分とした。

6. IgY の精製

卵黄からの IgY 精製は、第一章および第二章と同様に λ -カラギーナン改良法で実施した。2・4・7・8 群で最も高い抗体価を示した各 1 羽と 6 群 (コントロール群) の 1 羽の卵黄 (図 3.4 の点線囲み) をそれぞれまとめ、-30°C で 2 週間以上保存することでリポタンパク質を凍結変性させたプール卵黄を IgY 精製に用いた。精製した IgY の濃度は、1% IgY 溶液の Abs. 280 nm における吸光度が 15.8 である⁴²⁾ことを用いて計算した。各 IgY の純度は、SDS-PAGE に供した後、ポリアクリルアミドゲルを Lumino Graph II (ATTO, Japan) で撮影し CsAnalyser4 (ATTO) で解析することで、各レーン中の全てのタンパク質分画における H 鎖および L 鎖が占める比率として推定した。精製 IgY は凍結乾燥により粉末化し、-30 °C で保存した。

7. 精製 IgY を用いた ELISA

狂犬病ウイルスワクチンに対する各精製 IgY の抗体価を比較する目的で、ELISA を実施した。各 IgY は TBS-T で 100 μ g/mL に希釈し一次抗体として用いた。ELISA の手順は上記「5. 希釈卵黄を用いた ELISA」に記した方法と同様に行った。統計処理は、Excel 統計 (社会情報サービス, Japan) を用いて行い、データは平均値 \pm 標準偏差で示した。また、対応の無い 5 群間の比較には一元配置分散分析 (ANOVA) を行い有意差が認められた場合は Tukey 検定を行った。危険率 5% で有意差有りとした。

III. 結果

1. 産卵率および炎症

コントロール群 (6 群) の産卵率を 100%とした各群の産卵率は、3・4 群でのみ低下がみられた。これらの群では 2~3 週目で産卵率が最も低く、50%前後まで低下したが、その後徐々に回復した (データ未掲載)。4・6 週目の時点における炎症の程度の評価結果を表 3.2 に示し、0 点から 3 点までの代表的な個体の注射箇所の写真を図 3.3 の A~D に示す。1~4 群においては、pcDNA-N のみを注射した 5 群よりもより強い炎症反応がみられた。1・2 群 (λ -カラギーナン併用) よりも 3・4 群 (FCA 併用) で炎症が強くなる傾向がみられ、同じアジュバントを使用した場合では特に免疫前刺激を行った 2・4 群で炎症が強くなる傾向がみられた。7・8 群間では 7 群で炎症がやや強い傾向があった。

2. 卵黄中の IgY 抗体価の推移

卵黄中の IgY 抗体価の推移を図 3.4 に示す。pcDNA-N の単独注射を実施した 5 群および初回免疫と同時にアジュバント注射を始めた 1・3 群では、ELISA 値 (抗体価) の最大値は 0.5~0.8 であった (図 3.4 (I・III・V))。一方、アジュバントによる免疫前刺激を実施した 2・4 群においては、各群 1 羽ではあるが高い ELISA 値を有する個体がみられた (図 3.4 (II・IV))。組換えタンパク質を免疫注射した 7・8 群においてはすべての個体で ELISA 値が上昇した (図 3.4 (VII・VIII))。

DNA 免疫法とタンパク質免疫法の 2 つの方法による卵黄中の ELISA 値の推移に着目すると、それぞれ最高値となる時期に違いがみられた。タンパク質免疫では ELISA 値は 6~8 週目に最高値となった後、速やかに低下し、12 週目時点では最高値の約 2/3 となった (図 3.4 (VII・VIII))。一方、DNA 免疫 (アジュバント前投与 DNA 免疫法) を行った 2・4 群中の高い ELISA 値を示した個体においては、最高値に到達したのはおおよそ 8~10 週目であり、少なくとも 12 週目までは ELISA 値の大きな低下は見られなかった (図 3.4 (II・IV))。

3. IgY の精製

2・4・6・7・8 群の各 1 個体 (図 3.4) のプール卵黄より精製した IgY のそれぞれ名称は pcDNA-N with λ -Carra IgY、pcDNA-N with FCA IgY、Cont IgY、rRV-N in 0M Urea IgY、rRV-N in 4M Urea IgY とした。また、各精製 IgY を SDS-PAGE に供した結果を図 3.5 に示す。それぞれ、IgY の H 鎖 (約 70kDa) と L 鎖 (約 20 kDa) の大きなバンドが確認でき、両者の間に不純物を示すバンドがみられた。各 IgY 抗体の収量はプール卵黄 100 g あ

たり 0.338~0.682 g であり、SDS-PAGE の結果を解析することによって得られた推定純度は 86.7%~90.1%であった。

4. 精製 IgY による ELISA

精製した各種 IgY の狂犬病ウイルスワクチンに対する抗体価を ELISA で比較した結果を図 3.6 に示す。Cont IgY と比較して、アジュバント前投与 DNA 免疫法で調製した pcDNA-N with λ -Carra IgY と pcDNA-N with FCA IgY、およびタンパク質免疫法で調製した rRV-N in 0M Urea IgY と rRV-N in 4M Urea IgY はそれぞれ十分な抗体価を示した。なお、免疫法が異なる特異的 IgY 抗体間では、pcDNA-N with λ -Carra IgY と rRV-N in 0M Urea IgY 間には有意な差 ($p < 0.01$) が認められた。

IV. 考察

1. DNA 免疫におけるアジュバントを用いた免疫前刺激の有用性

アジュバントとは、抗原となる物質と共に注射することでその抗原性を補助する役割を持つものである。種々のアジュバントが現在開発されているが、本研究で用いた FCA は結核菌の死菌を含み強い免疫賦活作用を有する³⁾。また、 λ -カラギーナンは高濃度で炎症作用を有し動物実験における浮腫誘発剤としても用いられている(カラギーナン浮腫)³⁴⁾。なお、我々は第二章にて産卵鶏に DNA 免疫を 8 回繰り返し、これらのアジュバント効果を既に報告している⁵⁶⁾。本研究においてはアジュバントを用いた免疫前刺激を行い、かつ pcDNA-N を 4 回注射することで、抗原特異的 IgY 抗体の調製に成功した。すなわち免疫前刺激として、初回の DNA 注射の前週に λ -カラギーナンまたは FCA 単独注射を 3 回実施すると、目視で観察できる炎症が強く起こり(表 3.2)、それらの個体の内 1 羽ずつではあるが、卵黄中に含まれる IgY 抗体価は高くなった(図 3.4(II・IV))。DNA 免疫法でより高い免疫応答を誘導するためには、各細胞内で発現した抗原タンパク質が動物体内の抗原提示細胞に効率的に認識される必要がある⁵⁾。本研究で免疫前刺激と DNA 免疫の組み合わせで抗体価が上昇した個体については、アジュバントを事前に筋肉注射することで炎症が誘発され、これにより各種免疫担当細胞を局所に遊走させた後、さらにその炎症箇所には圧力注射器で DNA 免疫注射を行った(アジュバント前投与 DNA 免疫法)。これにより、プラスミド DNA にライゲートした遺伝子から発現した抗原タンパク質に対する免疫応答が効率よく起きたと考えられる。

2. タンパク質免疫法における尿素濃度の影響

通常、尿素を完全に除いたものを遺伝子組換えタンパク質抗原とする方法が一般的であるが、本研究において 4 M 尿素を含んだ可溶化精製タンパク質と完全に脱尿素 (0 M) を行った不溶化凝集した精製タンパク質を抗原として免疫実験を行った結果、いずれの抗原でも抗原に対して特異性を有する IgY 抗体が誘導された (図 3.4 (VIII・VII))。脱尿素条件下では不溶化凝集したタンパク質がウイルス粒子本来の構造とは著しく異なる変性状態であると考えられる。一方、4 M 尿素変性条件下ではタンパク質は可溶化状態で、尿素により水素結合および疎水結合が抑制された立体構造をとっていると考えられる。これらの抗原タンパク質の立体構造の差が産生される IgY の抗原特異性に影響する可能性があり、今後、それぞれの IgY 抗体の変性 RV-N との反応性を調べる必要がある。なお、本研究では 4 M 尿素変性条件下でタンパク質免疫注射を実施した 8 群では、脱尿素 (0 M) 状態で免疫注射を実施した 7 群と比べると卵黄中の抗体価は低くなった (図 3.4 (VIII・VII))。これは抗原タンパク質の立体構造の差異に起因するだけでなく、抗原液に含まれる高濃度の尿素が免疫応答に影響し、抗体産生を妨げた可能性も考えられる。

3. DNA 免疫法とタンパク質免疫法の比較

従来法のタンパク質免疫法として、0 M (脱尿素) または 4 M 尿素存在下の rRV-N を抗原とした 7・8 群では、一部の個体で強い炎症が起こったものの、FCA を併用して DNA 免疫を実施した 3・4 群のような産卵率の低下はみられなかった。これは、従来法であるタンパク質免疫では、追加免疫において結核菌の死菌を含まない FIA をアジュバントとして用いているためであると考えられる。過剰な免疫反応により起きる産卵の停止や産卵率の低下は、IgY 抗体を卵黄から得る本方法において大きな問題となる。産卵率の低下が起きず、かつ高い抗体価の IgY を安定的に誘導できる点はタンパク質免疫法の利点であると言える。

なお、抗体価が最高値となる時期とその持続期間が DNA 免疫法とタンパク質免疫法により異なる傾向がみられたが、これは抗原を直接接種する従来法と、一度体内で抗原となるタンパク質を発現させる DNA 免疫法の作用機序の違いによるものであると思われる。筋肉内に注射したプラスミド DNA からのタンパク質発現は 1 年半に亘って維持されることがマウスで確認されており⁴⁵⁾、近年開発が進められている DNA ワクチンでは、非ヒト霊長類の血中特異的抗体価を 1 年間維持したという報告もある⁵⁷⁾。本研究においても、DNA 免疫で最も抗体価が上昇した個体 (図 3.4 (IV)) については、タンパク質免疫法と比較すると免疫持続効果が比較的長く維持することが示唆され、これは DNA 免疫法の特筆すべき利点の

一つであると考えられる。一方、本研究においては DNA 免疫法で最も抗体価が上昇した 2・4 群 (図 3.4 (II・IV)) であっても、高い抗体価が誘導されたのは各 1 羽ずつであり、産卵鶏の個体差が大きかった。従って、確実な抗体産生を行うには複数の個体に対する免疫注射が必要である。この点は飼育コストの面において DNA 免疫法の不利な点であり、今後の改良が望まれる。

結語

本研究において、産卵鶏に DNA 免疫法を実施するにはアジュバントで免疫前刺激を行うこと (アジュバント前投与 DNA 免疫法) でより高い抗体価を有する IgY 抗体を得られることが明らかとなった。また、特異的抗体が誘導される個体の割合は従来法であるタンパク質免疫法に劣るものの、高純度に精製した IgY 抗体 (100 µg/mL) では ELISA を用いた評価で、アジュバント前投与 DNA 免疫法でもタンパク質免疫法と同様に十分な抗体価を示した (図 3.6)。今後、抗体の特異性や結合力に関する比較は必要であるが、遺伝子組換えタンパク質は調製が煩雑で困難であることを加味すると、比較的調製が容易で保存もしやすいプラスミド DNA を用いるという点は DNA 免疫法の大きな利点である。また、免疫動物として産卵鶏を用いてその鶏卵卵黄から特異的 IgY を調製できる点は動物福祉の観点からも好ましく、筋肉も大きいため免疫注射が実施しやすいというメリットも挙げられる。

なお、第二章では DNA 免疫を 8 回に渡り行い、かつアジュバント (FCA・λ-カラギーナン) を併用することで、全ての個体で抗体価が上昇した。一方で、本章で実施した免疫前刺激と DNA 免疫の組み合わせ (アジュバント前投与 DNA 免疫法) により抗体価が上昇した個体は 3 羽中 1 羽のみであった。これは、免疫前刺激を行ったとしても、4 回のプラスミド DNA の注射では筋肉で発現する抗原タンパクの量が不足しており、免疫前刺激を実施していても抗原に対する免疫応答の惹起に至らなかった個体が多かった為であるとも考えられる。しかしながら、これらの実験に使った産卵鶏はあくまでも鶏卵生産用の鶏であり、同じボリスブラウン種であってもロットが異なると免疫応答に差が出る可能性もあるため、第二章と第三章の免疫結果を単純に比較できるわけではない。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ることができる DNA 免疫法の開発が必要である。

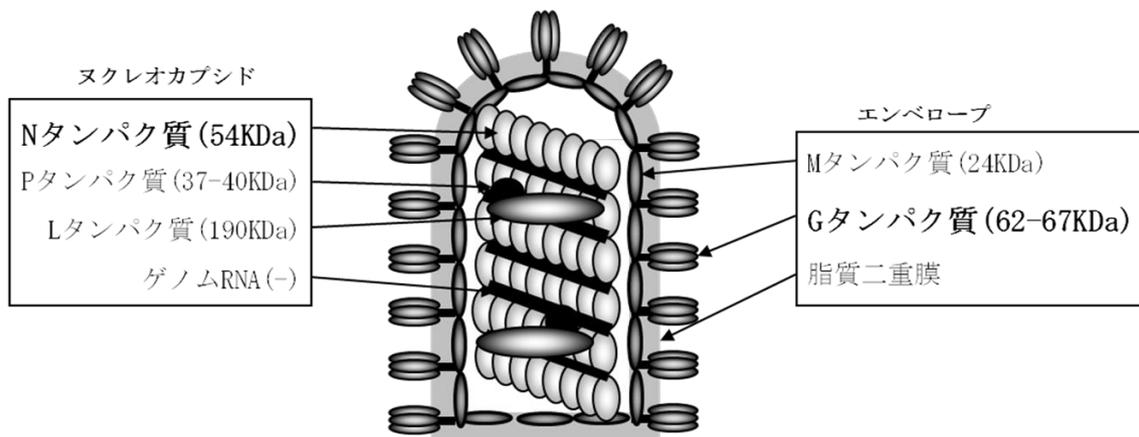


図 3.1 狂犬病ウイルスの構造

出典：日本臨床 63 巻 増刊号 5 臨床免疫学（下）-基礎研究の進歩と最新の臨床- 臨床編 IX. ワクチンによる免疫療法 狂犬病ワクチン 森本金次郎, 伊藤（高山）睦代 日本臨床社 2005 年

表 3.1 各群の免疫条件

	n	プラスミドDNA または 組換えタンパク質	アジュバント	アジュバントによる 免疫前刺激
1群:pcDNA-N with λ -Carra	3	pcDNA-N	2% λ -カラギーナン	-
2群:pcDNA-N with λ -Carra +免疫前刺激	3	pcDNA-N	2% λ -カラギーナン	有り
3群:pcDNA-N with FCA	3	pcDNA-N	FCA	-
4群:pcDNA-N with FCA +免疫前刺激	3	pcDNA-N	FCA	有り
5群: pcDNA-N	3	pcDNA-N	-	-
6群: Control	3	-	-	-
7群: rRV-N in 0M Urea	3	rRV-N (in 0M Urea)	FCA/FIA	-
8群: rRV-N in 4M Urea	3	rRV-N (in 4M Urea)	FCA/FIA	-

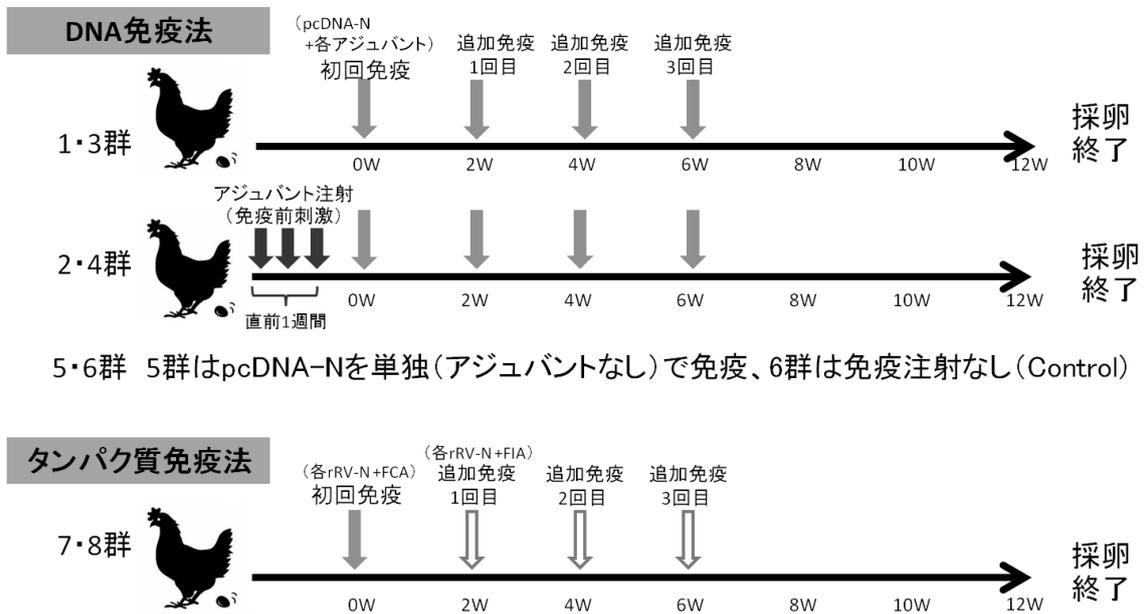


図 3.2 免疫スケジュール

表 3.2 各個体における炎症の程度*

個体識別番号	1群			2群			3群			4群			5群			6群			7群			8群		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
4 week	0	0	0	1	1	2	1	3	3	2	3	3+	1	1	0	0	0	0	2	3	2	1	2	2
6 week	0+	1	1	0+	1	2	2	3	3	2	3+	3+	0	0	0	0	0	0	1	2	3	1	2	2+

* 「炎症なし」は0点、「わずかに変異あり」は1点、「炎症あり」は2点、「強い炎症あり」は3点として評価を行った。各評価点の中間点とする場合は「+」を付加して区別した。評価は注射直前に、2名で実施した。



図 3.3 炎症度の評価における代表的な個体

4・6週目の免疫注射直前に各個体の炎症の程度を観察した。代表的な個体の写真を示す。炎症の程度は、発赤・発熱・怒張・皮膚の荒れ具合の程度や、水泡の有無により総合的に判断を行った。

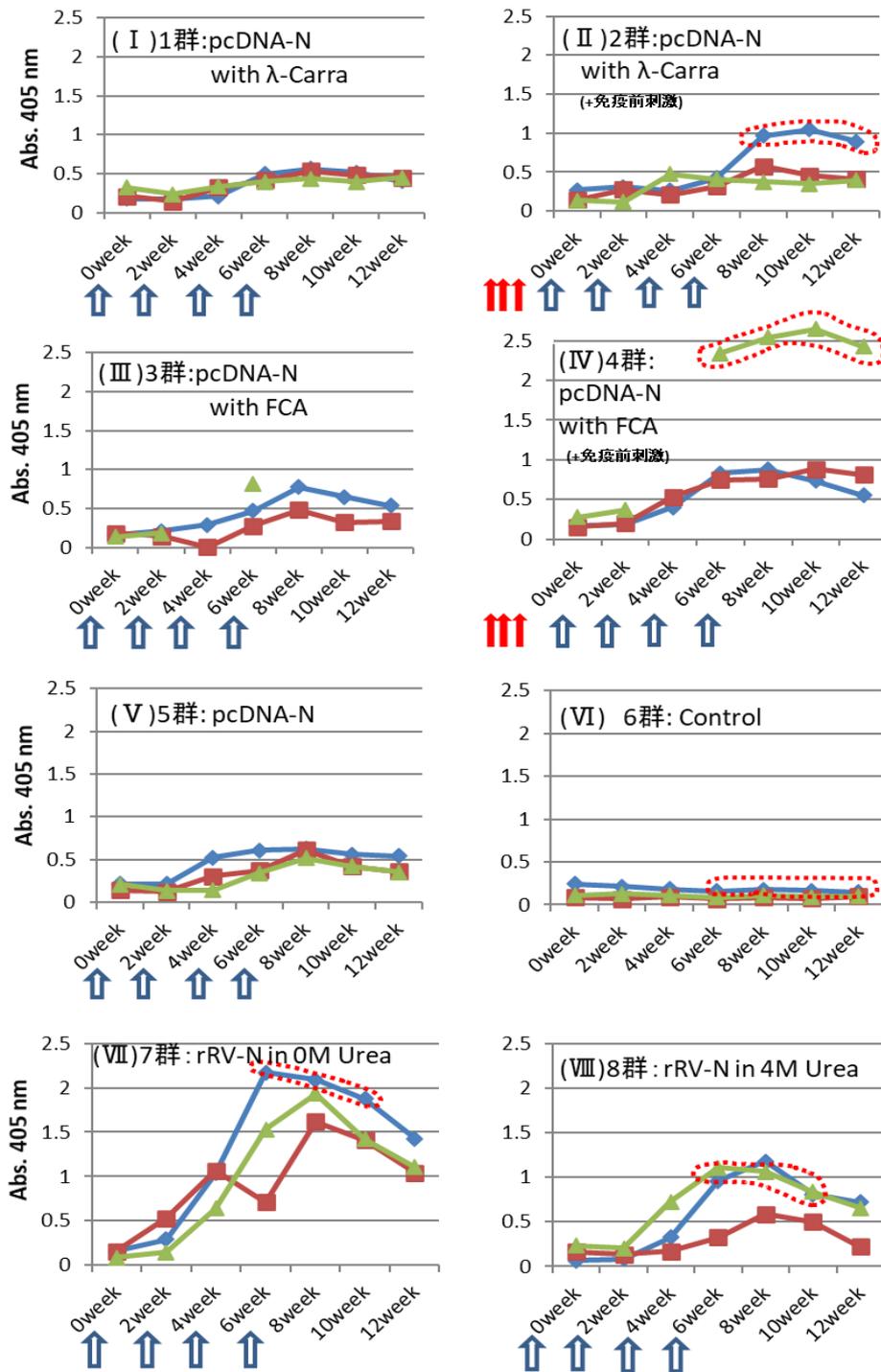


図 3.4 卵黄中の IgY 抗体価の推移

初回注射の週を 0 週目とし、1~8 群における各個体別の IgY 抗体価の変化を I-VIII に示す。なお、酵素反応時間は I-VI では 20 分、VII-VIII では 15 分とした。↑ は各アジュバントによる免疫前刺激を示し、↑ は pcDNA-N とアジュバントもしくは rRV-N とアジュバントの注射を示している。○ で囲んだ期間の凍結卵黄を用いて IgY 精製を実施した。

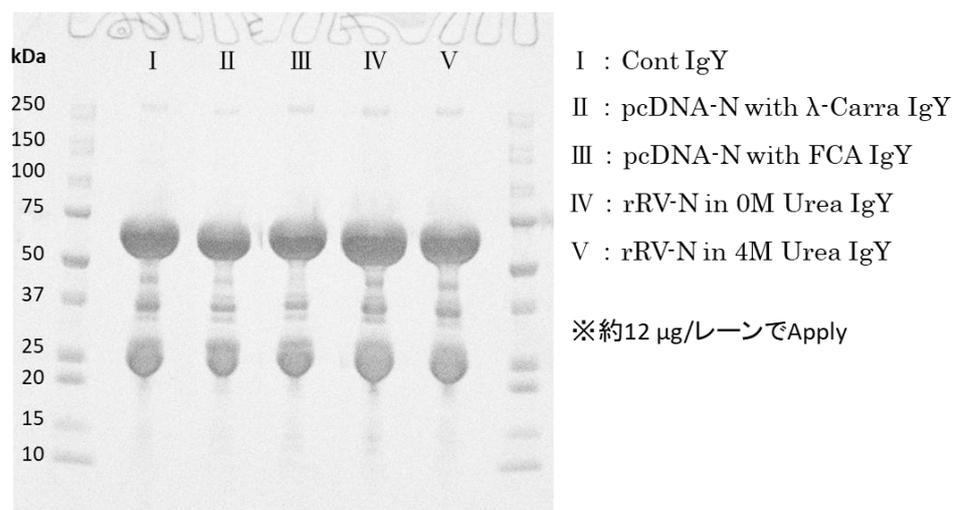


図 3.5 精製 IgY 抗体の SDS-PAGE

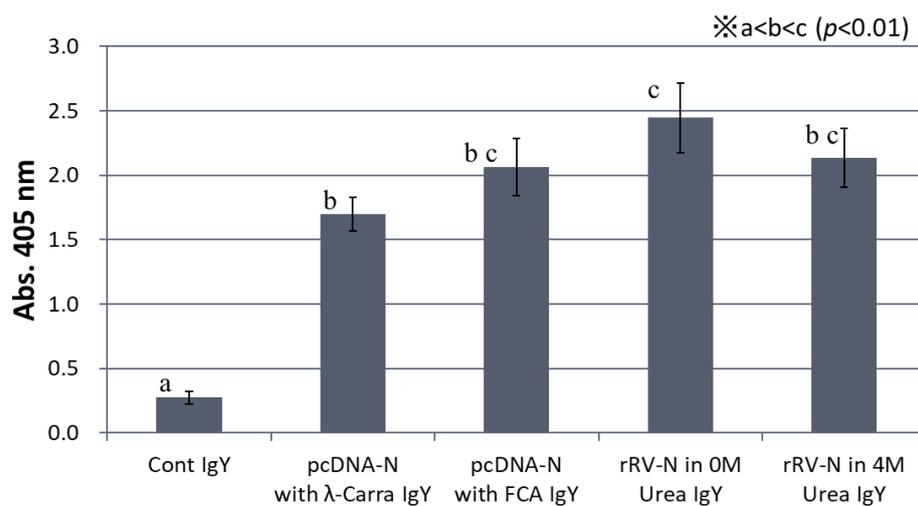


図 3.6 ワクチン中 RV-N と精製 IgY の抗体価 (ELISA)

狂犬病ウイルスワクチンを固相化抗原とした場合の各精製 IgY の ELISA 値 (抗体価) を示す。各精製 IgY (一次抗体) は 100 μ g/mL の濃度で用いた。なお、図中の異なる文字は統計学的に有意な差 ($p<0.01$) であることを示す ($n=3$)。

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

要約

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力について詳細に検討を行った。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) では、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°C, 30 分) した狂犬病ワクチンを用いた ELISA および Dot Blot の結果から、DNA 免疫法で調製した IgY 抗体はタンパク質免疫法で調製した IgY 抗体と比較して変性抗原に対する結合力が弱く、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。

I. 緒言

第三章では、DNA 免疫法にアジュバントを用いた免疫前刺激を組み合わせる免疫方法 (アジュバント前投与 DNA 免疫法) とタンパク質免疫法により狂犬病ウイルス核 (N) タンパク質 (RV-N) に対する IgY 抗体を調製した。第四章においては、実際の狂犬病検査の一つとして利用されている免疫組織化学 (IHC: Immunohistochemistry) 染色法⁵⁸⁾において、調製した特異的 IgY 抗体が狂犬病ウイルスを検出することが可能であるかを検討し、さらに各 IgY 抗体の抗原特異性についてより詳細に検討することを目的とした。

II. 材料および方法

1. 試料および試薬

狂犬病ウイルス組織培養不活化ワクチン (以下ワクチンと表記) は KM バイオロジクス (Japan) から入手した。一般的な試薬については、特級試薬を使用した。分析に用いた精製 IgY は第三章にてアジュバント前投与 DNA 免疫法で調製した pcDNA-N with λ -Carra IgY と pcDNA-N with FCA IgY、タンパク質免疫法で調製した rRV-N in 0M Urea IgY と rRV-N in 4M Urea IgY、無免疫で調製した Cont IgY の 5 種であり、推定純度は 86.7%~90.1%であった。

2. 抗体濃度と ELISA での反応性

各精製 IgY 抗体を 0.1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度に希釈し、一次抗体として ELISA に供した。ELISA の固層化抗原にはワクチンの 10 倍希釈液 (50 $\mu\text{L}/\text{well}$) を使用し、二次抗体には ALP 標識 Rabbit 抗 Chicken/Turkey IgY(H+L)抗体 (Abnova, Taiwan) (100 $\mu\text{L}/\text{well}$) を使用した。基質 (1 mg/mL *p*-ニトロフェニルリン酸 2Na 水溶液 [pH 9.5]) で発色 (37°C, 10 分) させた後、Abs. 405 nm の吸光度を測定した。

3. 免疫組織化学染色法 (以下、IHC)

狂犬病の犬の脳を用いた標準法 (間接蛍光抗体法)²¹⁾により陽性が確認されたパラフィン切片を脱パラフィン後、再水和し、ヒストファイブ抗原賦活化液 pH 9 (Nichirei Biosciences, Japan) でマイクロウェーブ 170W の熱処理により抗原を賦活化した後、3% 過酸化水素メタノール (室温, 20 分) で内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。さらに 10%正常ヤギ血清 (Nichirei Biosciences, Japan) でブロッキングを実施した (室温, 60 分)。一次抗体として、500 倍に希釈した各種抗原特異的 IgY 抗体 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を 4°C で一晩反応させた。10 mM phosphate Buffer +150 mM NaCl 溶液 (pH 7.4, 以下 PBS) で洗浄後、二次抗体として Anti-Chicken IgY(IgG) (Sigma Aldrich, Japan) を 1,000 倍希釈し、室温で 30 分間反応させた。続いて PBS で洗浄後、3-3'-diaminobenzidine (Nichirei Biosciences) で発色させ、Hematoxylin で対比染色を施した。最後に疎水化処理を行い、Clear Plus (ファルマ, Japan) に浸漬後、ProLong®Gold 褪色防止用封入剤 (MolecularProbes, USA) で封入し光学顕微鏡 (倍率 400 倍) で観察した。

なお、この IHC の操作と判定は北里大学獣医学部の朴天鎬准教授に実施していただいた。

4. 変性抗原と精製 IgY 抗体の反応性 (ELISA)

狂犬病ウイルスワクチンを変性させた状態で固相化抗原として用い、各種精製抗体との反応性を検討した。狂犬病ウイルスワクチン (KMB) は未処理 (I : Vaccine)、60°C で 30 分加熱処理 (II : Heated Vaccine)、10%ホルマリン処理 (III : Formalin treated Vaccine)、10%ホルマリン処理後 60°C で 30 分加熱処理 (IV : Formalin treated + Heated Vaccine) の 4 種類を用意した。これら 4 種の抗原溶液をそれぞれ原液 (市販ワクチン、総タンパク質 0.72 mg/mL 含有) の 10 倍希釈となるように、コーティング Buffer (pH 9.6) で希釈し、さらに 10 倍希釈を 3 回繰り返し 100、1,000、10,000 倍希釈液とした。これらを 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で ELISA 用プレートに固相化し、ELISA を実施した。なお、一次抗体の濃度は 10

μg/mL とし、二次抗体は ALP 標識 Rabbit 抗-Chicken/Turkey IgY(H+L) (Abnova) の 4,000 倍希釈液を用いた。1 mg/mL 基質 (*p*-ニトロフェニルリン酸 2Na) 溶液で発色させ (37°C, 反応時間 10 分)、Abs. 405 nm の吸光度を測定した。

5. 変性抗原と精製 IgY 抗体の反応性 (Dot Blot)

各種変性抗原と精製 IgY 抗体の反応性を Dot Blot でも検討した。各種抗原は上記の ELISA で用いた (変性) 抗原溶液を利用した。4 種の抗原溶液をそれぞれ原液 (ワクチン) の 2, 20, 200 倍希釈液となるように PBS と混合した。各種/各濃度の抗原溶液を 5 μL/dot で浸水処理した PVDF 膜 (BIO-RAD, USA) にブロットし、Dot Blot に供した。ブロッキング剤として Blocking One (Nacalai Tesque, Japan) を用いた。各種一次抗体 (精製 IgY 抗体) は 10 μg/mL で用い、二次抗体は HLP 標識抗 IgY ウサギ IgG (Sigma-Aldrich, USA) の 10,000 倍希釈液を用いた。免疫複合体を Chemi-Lumi OneUltra (Nacalai Tesque) で染色し、LuminoGraph I (ATTO) を用いて化学発光を測定した。

III. 結果

1. IgY 濃度と抗原との反応性 (ELISA)

精製 IgY 抗体の濃度を 0.1~100 μg/mL とした場合における ELISA の結果を図 4.1 に示す。IgY 抗体の濃度が 100 μg/mL では、各抗原特異的 IgY 抗体で Abs. 405 nm は約 1.6~2.5 となったが、10 μg/mL ではその差が大きくなり、値が高い順に rRV-N in 0M Urea IgY、pcDNA-N with FCA IgY、rRV-N in 4M Urea IgY、pcDNA-N with λ-Carra IgY となった。1 μg/mL の濃度では rRV-N in 0M Urea IgY は約 0.7 まで吸光度が上昇したが、その他の IgY ではほとんど反応しなかった (0.5 以下)。

2. IHC による脳組織中のウイルス検出

狂犬病ウイルス感染犬の脳切片 (海馬) を用いた IHC の染色結果を図 4.2 に示す。アジュバント前投与 DNA 免疫法で調製した特異的 IgY 抗体 2 種 (pcDNA-N with λ-Carra IgY・pcDNA-N with FCA IgY) では脳切片中のウイルス抗原は検出されなかった (図 4.2 (II・III))。一方、タンパク質免疫法で調製した抗体 2 種 (rRV-N in 0M Urea IgY・rRV-N in 4M Urea IgY) ではウイルス抗原が検出され、特に rRV-N in 0M Urea IgY でより良好な染色結果が得られた (図 4.2 (IV・V))。

3. 変性抗原に対する精製 IgY 抗体の反応性 (ELISA)

ワクチン (未変性)、60°C,30min 加熱処理ワクチン、10%ホルマリン処理ワクチン、ホルマリン処理後 60°C,30min 加熱処理ワクチンのそれぞれと各種 IgY 抗体の ELISA における反応性を図 4.3 に示す。未変性のワクチンに対しては、固層化する際の希釈倍率が 10 倍 (F10) から 100 倍 (F100) となると、pcDNA-N with λ -Carra IgY および pcDNA-N with FCA IgY では吸光度 Abs. 405 nm が約 1/3 に低下したが、rRV-N in 0M Urea IgY および rRV-N in 4M Urea IgY では値は大きく変化しなかった (図 4.3 (I))。

また、各固相化ワクチンの希釈倍率が 10 倍 (F10) の場合に注目すると、pcDNA-N with λ -Carra IgY および pcDNA-N with FCA IgY は未変性ワクチン (図 4.3 (I)) と比較して熱処理 (図 4.3 (II))、ホルマリン処理 (図 4.3 (III))、ホルマリン処理+加熱処理 (図 4.3 (IV)) により抗原との反応性が低下した。一方で rRV-N in 0M Urea IgY および rRV-N in 4M Urea IgY でも各処理により反応性は低下したものの、最も強い変性状態であるホルマリン処理+加熱処理を施したワクチン (図 4.3 (IV)) に対しても約 1.2 以上の高い吸光度を示した。

4. 変性抗原に対する精製 IgY 抗体の反応性 (Dot Blot)

前述の ELISA と同様の変性処理を施した抗原 (ワクチン) に対する、各種 IgY 抗体の反応性を Dot Blot でも検討した。その結果を図 4.4 に示す。pcDNA-N with λ -Carra IgY および pcDNA-N with FCA IgY では各抗原の最低濃度 (0.0036 mg/mL) ではスポットが確認できず、またホルマリン処理+加熱処理ワクチン (IV) では最大濃度 (0.36 mg/mL) でも反応が弱かった (図 4.4 (B・C))。一方、rRV-N in 0M Urea IgY および rRV-N in 4M Urea IgY では未変性 (I)、加熱処理 (II)、ホルマリン処理ワクチン (III) においては最低濃度 (0.0036 mg/mL) でもスポットが検出された (図 4.4 (D・E))。なお rRV-N in 4M Urea IgY については、ホルマリン処理+加熱処理ワクチン (IV) に対する反応は微弱であった (図 4.4 (E の最右列))。

IV. 考察

1. DNA 免疫法により調製した IgY 抗体の特徴

第四章では、第三章でアジュバント前投与 DNA 免疫法により調製した IgY 抗体 (pcDNA-N with λ -Carra IgY・pcDNA-N with FCA IgY) と従来法であるタンパク質免

疫法で調製した IgY 抗体 (rRV-N in 0M Urea IgY・rRV-N in 4M Urea IgY) を用いて ELISA・IHC・Dot Blot を行い、抗原との反応性を比較した。

まず、ワクチン (未変性抗原) に対する反応性を ELISA で比較した結果 (図 4.1) において、特に pcDNA-N with FCA IgY では少なくとも rRV-N in 4M Urea IgY と同じか、もしくはそれ以上の吸光度を示し、狂犬病検査で一次抗体として利用可能であることが期待された。しかしながら、5 種の IgY 抗体を狂犬病陽性検体 (イヌの脳切片) の IHC に一次抗体として使用した結果 (図 4.2)、脳切片中のウイルス凝集体 (ネグリ小体) を染色できたのは従来のタンパク質免疫法で調製した 2 種の IgY のみであり、アジュバント前投与 DNA 免疫法で調製した IgY については検体中のウイルス抗原を検出することができなかった。この理由として、本研究においてアジュバント前投与 DNA 免疫法で調製した IgY 抗体は「①変性抗原に対して結合力が弱い」「② (単純に) 特異的抗体価が低い」のどちらか、もしくはその両方であると考えられた。

そこで、ELISA と Dot Blot で、変性抗原に対する反応性および固層化/プロットする抗原量が少ない場合の反応性についても検討した。なお、処理前の狂犬病ワクチンはワクチン株 (狂犬病ウイルス固定毒西ヶ原株) を HmLu 細胞で増殖させ、 β -プロピオラクトンでウイルス不活化処理した後に精製したものであり⁵⁹⁾、含まれるウイルス粒子とウイルスタンパク質は未変性の状態であると考えられる。本研究においてこの未変性タンパク質 (ワクチン) を加熱処理 (60°C で 30 分) や 10%ホルマリン処理もしくはその両方を実施することで、アジュバント前投与 DNA 免疫法で調製した IgY (pcDNA-N with λ -Carra IgY・pcDNA-N with FCA IgY) では変性抗原に対する反応性が顕著に低下することが確認された (図 4.3・図 4.4)。従って、アジュバント前投与 DNA 免疫法で今回調製した IgY はタンパク質免疫法で調製した IgY に比べ、抗原タンパク質の構造に変化が加わった場合に抗原を認識しにくいことが示唆された。IHC に用いたサンプル (脳切片) は 10%ホルマリンによる固定や脱パラフィンを行う際の加熱処理 (60°C で 30 分加熱)、抗原賦活化のための加熱処理 (マイクロウェーブ 170W で 10 分) 等の工程を経て調製されるため、これらの工程で脳切片中の抗原タンパク質 (RV-N) が変性し、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 (図 4.2 (II・III)) 可能性が考えられる。なお、本来ホルマリンにより固定化された組織切片は、本実験でも実施した様にマイクロウェーブ処理 (もしくは酵素処理) によって、固定によりマスクされたエピトープを再度露出させる処理 (抗原賦活化) が実施されるが、pcDNA-N with λ -Carra IgY および pcDNA-N with FCA IgY ではこの処理を行っても IHC でウイルスを検出することができ

なかった。これは上記処理を行うことで抗原賦活化をしても pcDNA-N with λ -Carra IgY・pcDNA-N with FCA IgY が認識可能なエピトープを完全な形で再露出させることができなかつた為であると考ええる。さらに、上述の様に、加熱（マイクロウェーブ）による抗原賦活化処理は抗原タンパク質の変性を促進し、むしろ DNA 免疫法で作成した IgY による脳切片中のウイルス検出を困難にする結果となった可能性も考えられる。

また、アジュバント前投与 DNA 免疫法で調製した IgY (pcDNA-N with λ -Carra IgY・pcDNA-N with FCA IgY) では、未変性抗原（ワクチン）に対しても、固層化/ブロットする抗原濃度が低下すると反応性が大きく低下した（図 4.3 (I), 図 4.4 (B・C それぞれ最左列)）。このことから、タンパク質免疫法で調製した IgY 抗体と比較すると DNA 免疫法で調製した IgY は未変性抗原に対する結合力（抗体価）も低く、十分な抗原量がある場合にはタンパク質免疫法で調製した IgY と同等の ELISA 反応性を示すが（図 4.1）、抗原量が少ない場合にはその存在を検出できないと考えられ、この点も IHC でウイルス抗原が検出できなかった理由の一つであると考えられる。

なお、第二章で DNA 免疫を 8 回実施して調製した抗 RV-N IgY を用い、狂犬病ウイルス感染犬の脳切片を IHC で染色した結果、これらの IgY 抗体でも抗原タンパク質を検出することはできなかつた（データ未掲載）。また、ホルマリン処理後+加熱処理ワクチンを検出抗原として利用した ELISA と Dot Blot では、抗原との反応性が著しく低下した（データ未掲載）。

以上の結果から、DNA 免疫法で調製した IgY 抗体はタンパク質で調製した IgY 抗体と比較して、変性抗原に対する結合力および（未変性抗原に対する）特異的抗体価がそれぞれ低いために IHC で抗原を検出できなかつたと結論付けられた。DNA 免疫法による IgY 抗体の誘導法にはプラスミドベクターにニワトリサイトカイン遺伝子を導入する方法^{12, 14)}や金粒子で修飾する方法¹¹⁾、CpG ODNs (CpG オリゴデオキシヌクレオチド) を同時注射する方法^{10, 60)}が報告されているが、現在のところ検査試薬や中和抗体の調製法として確立された方法はない。DNA 免疫でより高い抗体価を有する IgY 抗体の調製法の開発が今後の課題として残された。なお、DNA 免疫法の特徴として動物体内で発現したタンパク質抗原の、ネイティブな立体構造上のエピトープを認識する抗体が得られる^{8,9,61)}という利点があるが、一方で変性した抗原タンパク質には反応性が著しく低下することが本研究で確認された。従って、たとえネイティブな（未変性の）抗原に対しては高い抗体価を示す抗体が調製できても、抗原がホルマリンや加熱処理等で変性する IHC などの免疫学的実験法においては、抗原を検出することが難しい可能性がある。むしろ、未変性状態のタンパ

ク質を標的とした検出法（例：フローサイトメトリー等）やウイルス感染を防止する中和抗体としての利用法に着目すべきであることが示唆された。

2. タンパク質免疫法で調製した IgY 抗体の特徴

タンパク質免疫法で調製した二種類の IgY についてはそれぞれ IHC でウイルス抗原を検出することに成功し、先行研究²³⁾の再現性が確認された。rRV-N in 4M Urea IgY については、第三章に記載した通り 4 M尿素による変性状態で免疫注射を実施したが、この方法でも IHC で抗原タンパクを染色可能な IgY 抗体を得ることができた。そのウイルス抗原に対する反応性は、今回実施したすべての免疫学的実験法（ELISA・IHC・Dot Blot）で rRV-N in 0M Urea IgY より低かったが、免疫注射に用いる抗原液に高濃度（4 M）で尿素が含まれていても、強い抗体価を有し、ホルマリンや熱処理により変性した抗原も検出可能な IgY が誘導できることが示された。

従来の免疫方法であるタンパク質免疫法は抗原タンパク質を調製するために組換え遺伝子の発現誘導や組換えタンパク質の精製など、熟練を要する高度な技術と多くの時間を必要とするが、産卵鶏に高い確率で特異的抗体を誘導することが可能であり、またその免疫鶏卵の卵黄から調製した IgY 抗体は高い抗体価を有し、さらに変性抗原も高い感度で検出可能であることが示された。DNA 免疫法と比較して高い確率で高抗体価を有する IgY が誘導できる理由は、免疫応答を惹起するために最低限必要な抗原量より多くの抗原タンパク質を用いて免疫注射が行われた為であり、変性抗原も認識可能である理由は注射時の抗原タンパク質が既に変性していたため、変性部位をエピトープとする抗体も多く誘導された為であると思われる。

結語

第四章では、DNA 免疫法およびタンパク質免疫法で調製した IgY 抗体の抗体価と変性抗原に対する反応性について検討を行った。抗原が充分量存在する場合には DNA 免疫法で調製した IgY 抗体は ELISA や Dot Blot で抗原を認識したが、抗原量が低下すると反応性が低下し、また、抗原が変性するとタンパク質免疫法で調製した IgY と比較して顕著に抗原との結合力が弱くなることが示された。またこの IgY 抗体は、狂犬病ウイルス検査で実施される動物の脳切片を使った免疫組織化学染色（IHC）において、ウイルス抗原を認識しなかった。これらの結果から、DNA 免疫法にアジュバントを用いた免疫前刺激を組み合わせるアジュバント前投与 DNA 免疫法により、ELISA で高い抗体価を有する IgY 抗

体が調製できたものの、それら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の検出が難しく、また未変性抗原に対しても抗体価が低い事が示された。今後、より抗体価を高めるため、免疫法のさらなる改良が求められる。また、未変性状態の抗原タンパク質をより強く認識するという特徴を生かすため、DNA 免疫法で調製する IgY 抗体の活用法についても検討を行う必要がある。

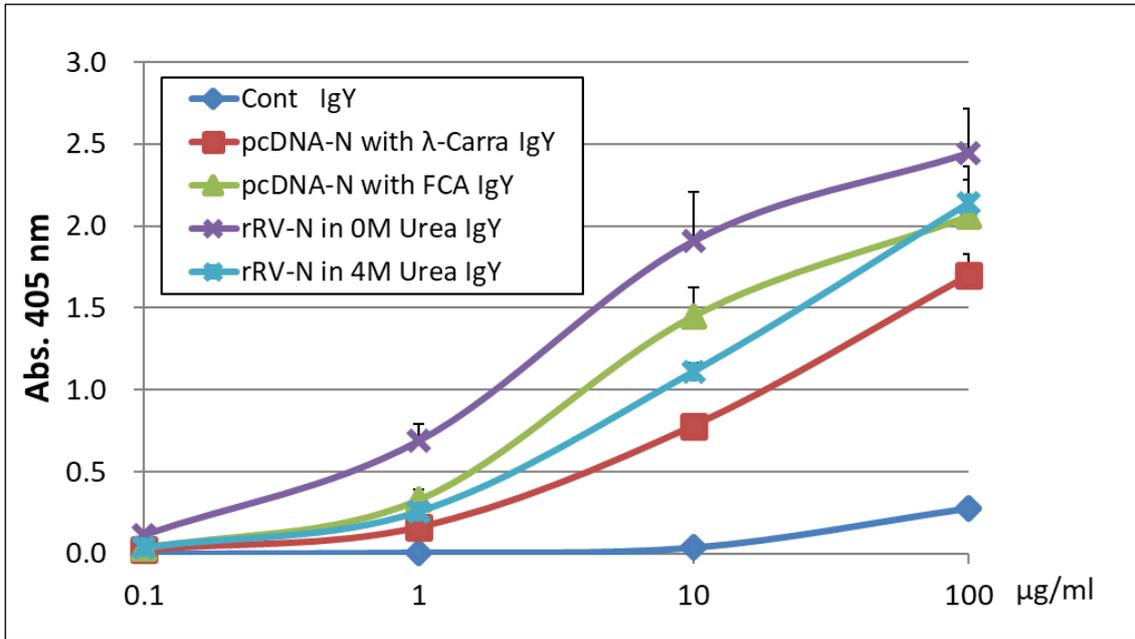
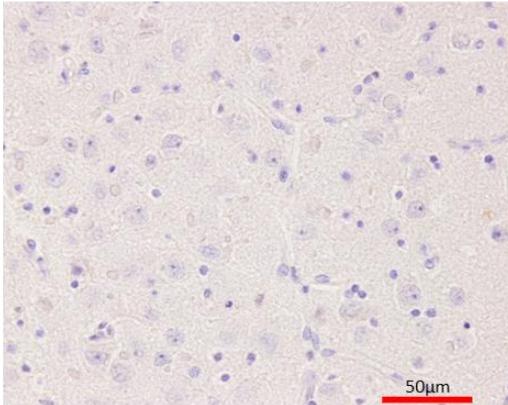


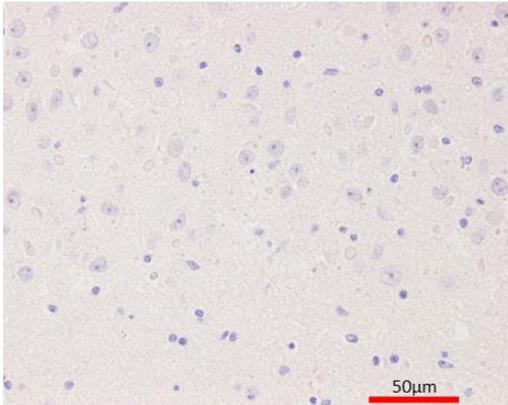
図 4.1 濃度別各種 IgY 抗体の抗原の検出 (ELISA, n=3)

固相化抗原にワクチンの 10 倍希釈液を用いて実施した ELISA の結果を示す (平均±標準偏差)。横軸は各種 IgY 抗体 (一次抗体) の濃度を示す。

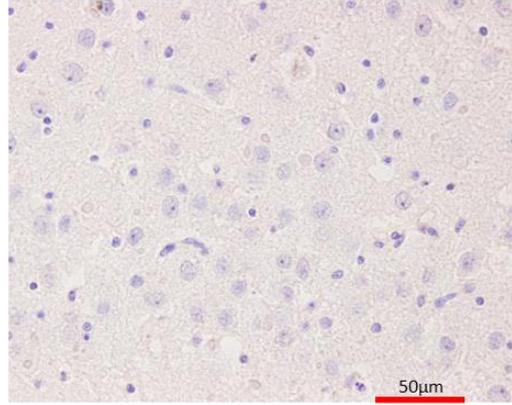
I . Cont IgY



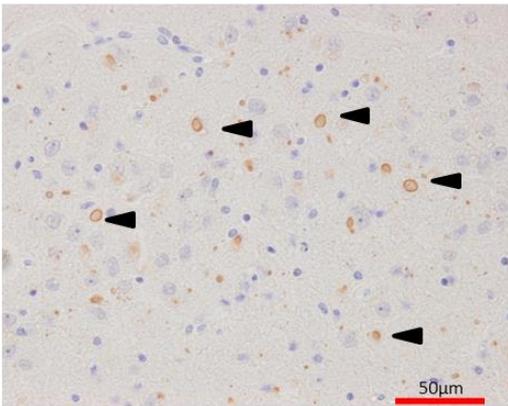
II . pcDNA-N with λCarra IgY



III . pcDNA-N with FCA IgY



IV . rRV-N in 0M Urea IgY



V . rRV-N in 4M Urea IgY

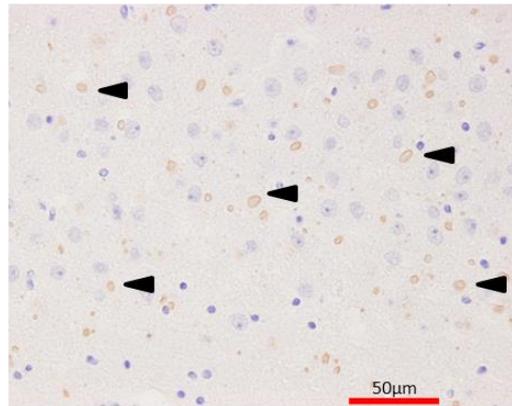


図 4.2 免疫組織化学 (IHC) 染色法による狂犬病ウイルスの検出

狂犬病感染犬の脳切片 (海馬, ホルマリン処理済み) をサンプルとして IHC に供し、光学顕微鏡 (400 倍) で観察を行った。狂犬病ウイルスの凝集体 (ネグリ小体) は ◀ で示すように、赤く染色されている。

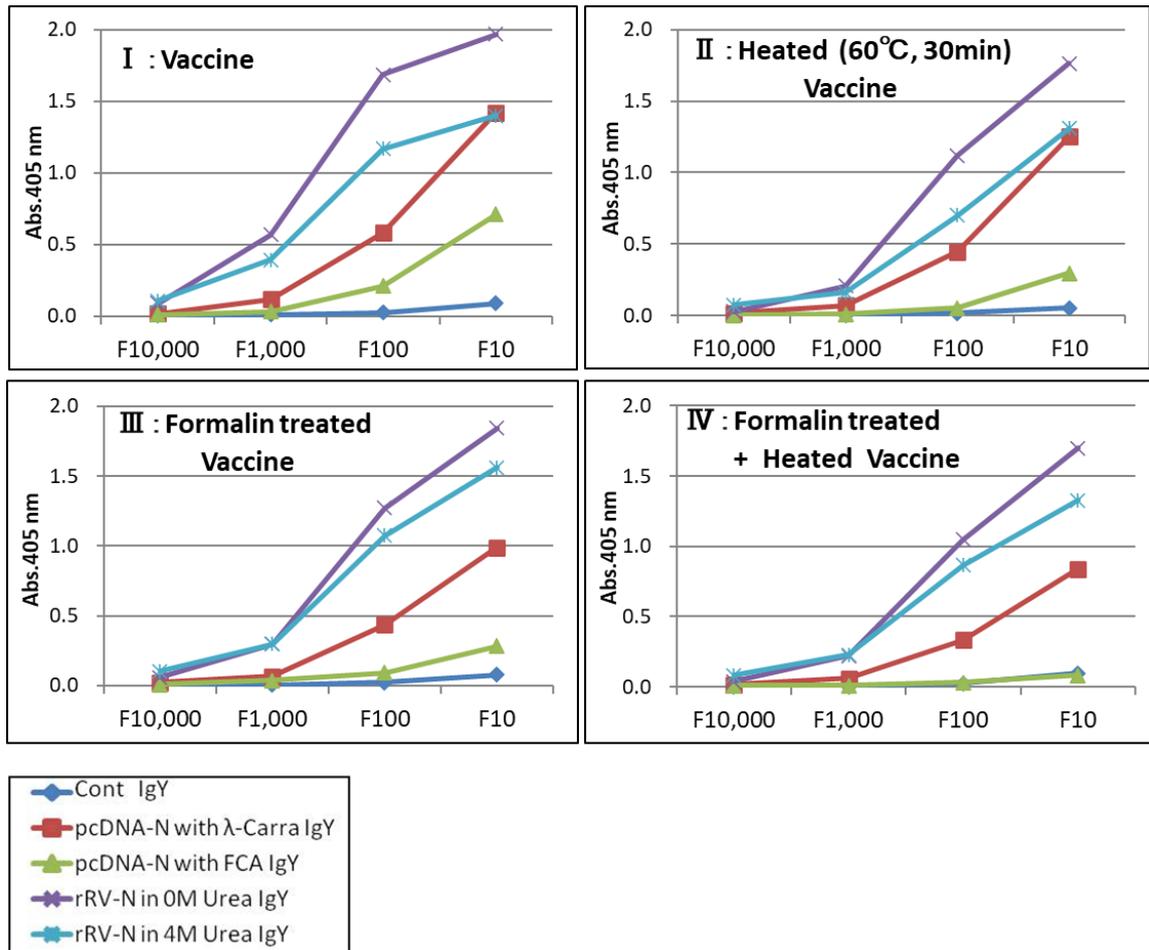


図 4.3 ELISA における変性抗原と各種 IgY 抗体の結合力の評価

第三章で精製した各種抗 RV-N IgY 抗体と未処理 (I)、加熱処理 (II)、ホルマリン処理 (III)、ホルマリン処理+加熱処理 (IV) を施した抗原との結合力を ELISA における抗原濃度を変えた反応性を指標に測定した。横軸は固相化抗原の希釈倍率 (ワクチン原液から 10 倍 (F10), 100 倍 (F100), 1,000 倍 (F1,000), 10,000 倍 (F10,000) 希釈) を示す。

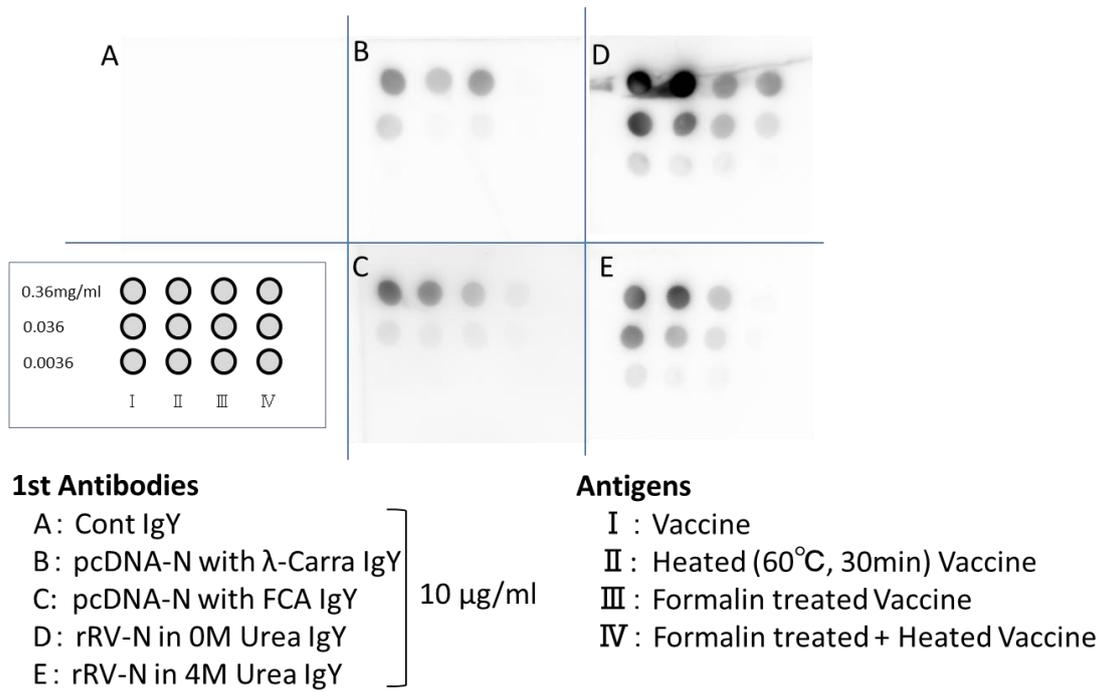


図 4.4 Dot Blot における変性抗原と各種 IgY 抗体の結合力の評価

第三章で精製した各種抗 RV-N IgY 抗体と未処理 (I)、加熱処理 (II)、ホルマリン処理 (III)、ホルマリン処理+加熱処理 (IV) を施した抗原との結合力を Dot Blot における抗原濃度を変えた反応性を指標に測定した。

総括

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頻用される FCA や FIA に加え、 λ -カラギーナンのアジュバントとしての活用、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 IgY 抗体の誘導とその精製 IgY 抗体の特性を検討した。これらの改良を加えた IgY 抗体調製法により、検査や研究・医療の現場で必要となる多様な特異的抗体を IgY 抗体として、より簡単にかつ大量に調製する方法の開発を目指した。

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 抗体を調製し、その *S. aureus* 増殖抑制効果について検討した。その結果、産卵鶏に対して FIA をアジュバントとして用いて調製した抗 *S. aureus* IgY で *S. aureus* の増殖抑制効果が確認され、その特異的 IgY 抗体含有率は 18.1%であった。 λ -カラギーナンはアジュバント効果を示したが、*S. aureus* の増殖を抑制しなかった。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 を利用する必要があることが示唆された。

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 抗体を調製した。また、組換えプラスミド DNA を単独で注射する方法に加え、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について検討を行った。2 週間毎に計 8 回の免疫注射を行った結果、RV-N 組換えプラスミド DNA (pcDNA-N) の単独注射では 2 羽中 1 羽で卵黄抗体価が上昇し、pcDNA-N に加えアジュバントとして FCA または λ -カラギーナンを併用した群では全個体で卵黄抗体価が上昇した。また、水溶性増粘多糖類である λ -カラギーナンの併用により、FCA に匹敵するアジュバント効果が得られた。Cont IgY を除く各精製 IgY は ELISA・Western Blot・Dot Blot で RV-N を検出できた。以上の結果より、DNA 免疫法で λ -カラギーナンや FCA をアジュバントとして併用することにより抗 RV-N IgY 抗体が得られ、これらは一次抗体として RV-N の検出に利用できることが示された。

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抗 RV-N IgY 抗体が調製可能か検討した。また、卵黄中の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、組換えプラスミド DNA 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。第三章において、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、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。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 免疫法を研究開発することにより、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を鶏卵卵黄から調製できる可能性がある。

第四章では、第三章で調製した各種抗 RV-N IgY 抗体を使用し、DNA 免疫法と通常のタンパク質免疫法で調製した IgY 抗体の特異的抗体価と、変性抗原に対する反応性について詳細に検討を行った。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) では、タンパク質免疫法で調製した抗 RV-N IgY 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 2 種で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°C, 30 分) した狂犬病ワクチンを用いた ELISA および Dot Blot の結果から、DNA 免疫法で調製した IgY 抗体はタンパク質免疫法で調製した IgY 抗体と比較して変性抗原に対する結合力が弱く、(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。

第一章から第四章で、特筆すべき点は以下の 5 つである。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た。②新規のアジュバントとして、食品添加物である λ -カラギーナンが抗体活性を上昇させることが示された。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。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較して抗体誘導に有用であることが示唆された。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力が弱く、また未変性抗原に対しても抗体価が低いことが明らかとなった。

IgY 抗体調製法は実験施設の規模等が限られる場合でも、研究や検査に必要な特異的抗体の調製が可能となる方法である。より簡易に IgY 抗体の調製を実施するための手掛かりと、より幅広い活用に向けた課題が示された。

参考文献

- 1) H. Hatta *et al.*: Egg yolk antibody IgY and its application. *In: Hen eggs: their basic and applied science* (Yamamoto T, Juneja LR, Hatta H, and Kim M eds.). pp.151-178. CRC Press. Boca Raton, FL, USA. 1996.
- 2) H. Hatta *et al.*: A novel isolation method for hen egg yolk antibody, "IgY". *Agricultural and Biological Chemistry*, **54**. 2531-2535 (1990)
- 3) H. F. Stils Jr.: Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR Journal*, **46**. 280-293 (2005)
- 4) M. A. Liu: DNA vaccines: a review. *Journal of Internal Medicine*, **253**. 402-410 (2003)
- 5) M. Lim *et al.*: Engineered nanodelivery systems to improve DNA vaccine technologies. *Pharmaceutics*, **12**. 30 (2020)
- 6) R. S. Chambers and A. J. Stephen: High-level generation of polyclonal antibodies by genetic immunization. *Nature Biotechnology*, **21**. 1088-1092 (2003)
- 7) M. K. Bates *et al.*: Genetic immunization for antibody generation in research animals by intravenous delivery of plasmid DNA. *Biotechniques*, **40**. 199-208 (2006)
- 8) 小林岳史: DNA 免疫法による抗体の作製. *生物工学*, **86**. 384-386 (2008)
- 9) 小林岳史ら: DNA 免疫法による抗体作製技術. *ファルマシア*, **48**. 301-304 (2012)
- 10) Y. Lu *et al.*: Passive protection of shrimp against white spot syndrome virus (WSSV) using specific antibody from egg yolk of chickens immunized with inactivated virus or a WSSV-DNA vaccine. *Fish & Shellfish Immunology*, **25**. 604-610 (2008)
- 11) P. T. Witkowski *et al.*: Gene gun-supported DNA immunisation of chicken for

straightforward production of poxvirus-specific IgY antibodies. *Journal of Immunological Methods*, **341**. 146-153 (2009)

12) P. M. Sawant *et al.*: Immunomodulation of bivalent Newcastle disease DNA vaccine induced immune response by co-delivery of chicken IFN- γ and IL-4 genes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **144**. 36-44 (2011)

13) G. N. Brujeni and D. Gharibi: Development of DNA-designed avian IgY antibodies for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal cattle. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **167**. 14-23 (2012)

14) S. H. Cho *et al.*: A plasmid DNA encoding chicken interleukin-6 and *Escherichia coli* K88 fimbrial protein FaeG stimulates the production of anti-K88 fimbrial antibodies in chickens. *Poultry Science*, **83**. 1973-1978 (2004)

15) L. Niederstadt *et al.*: Stimulation of IgY responses in gene gun immunized laying hens by combined administration of vector DNA coding for the target antigen Botulinum toxin A1 and for avian cytokine adjuvants. *Journal of Immunological Methods*, **382**. 58-67 (2012)

16) G. N. Brujeni *et al.*: Development of DNA-designed avian IgY antibodies for quantitative determination of bovine interferon-gamma. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **163**. 338-345 (2011)

17) N. Katoh *et al.*: Clinical practice guidelines for the management of atopic dermatitis 2018. *Journal of Dermatology*, **46**. 1053-1101 (2019)

18) 森本金次郎, 伊藤 (高山) 睦代: -基礎研究の進歩と最新の臨床- 臨床編 IX. ワクチンによる免疫療法 狂犬病ワクチン. *日本臨床*, **63**. 増刊号 5. 654-658 (2005)

- 19) T. Hemachudha *et al.*: Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges. *The Lancet Neurology*, **1**. 101-109 (2002)
- 20) T. Hemachudha *et al.*: Human rabies: neuropathogenesis, diagnosis, and management. *The Lancet Neurology*, **12**. 498-513 (2013)
- 21) C. E. Rupprecht *et al.*: Rabies re-examined. *The Lancet Infectious Diseases*, **2**. 327-343 (2002)
- 22) World Health Organization: Zero by 30: The global strategic plan to end human deaths from dog-mediated rabies by 2030. (2018)
- 23) Y. Motoi *et al.*: Detection of rabies-specific antigens by egg yolk antibody (IgY) to the recombinant rabies virus proteins produced in *Escherichia coli*. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **58**. 115-118 (2005)
- 24) D. Y. M. Leung *et al.*: New insights into atopic dermatitis. *Journal of Clinical Investigation*, **113**. 651-657 (2004)
- 25) J. M. Spergel and A. S. Paller: Atopic dermatitis and the atopic march. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **112**. 118-127 (2003)
- 26) B. S. Baker: The role of microorganisms in atopic dermatitis. *Clinical & Experimental Immunology*, **144**. 1-9 (2006)
- 27) J. J. Leyden *et al.*: *Staphylococcus aureus* in the lesions of atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology*, **90**. 525-525 (1974)
- 28) T. Kobayashi *et al.*: Dysbiosis and *Staphylococcus aureus* colonization drives inflammation in atopic dermatitis. *Immunity*, **42**. 756-766 (2015)

- 29) H. H. Kong *et al.*: Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Research*, **22**. 850-859 (2012)
- 30) Y. Sugita-konishi *et al.*: Immune functions of immunoglobulin Y isolated from egg yolk of hens immunized with various infectious bacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **60**. 886-888 (1996)
- 31) H. Hatta *et al.*: Passive immunization against dental plaque formation in humans: effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to *Streptococcus mutants*. *Caries Research*, **31**. 268-274 (1997)
- 32) E. N. Lee *et al.*: In vitro studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. *Poultry Science*, **81**. 632-641 (2002)
- 33) H. H. Sunwoo *et al.*: Growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (IgY) on *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Science*, **67**. 1486-1494 (2002)
- 34) J. Necas and L. Bartosikova: Carrageenan: a review. *Veterinari Medicina*, **58**. 187-205 (2013)
- 35) C. J. Morris: Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. In: Inflammation protocols (P. G. Winyard and D. A. Willoughby eds.). *Methods in Molecular Biology*, vol 225 pp.115-121. Humana Press. Totowa, NJ, US. 2003.
- 36) F. R. F. Silva *et al.*: Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: action of major types of commercial carrageenans. *Carbohydrate Polymers*, **79**. 26-33 (2010)

- 37) N. M. K. Ito *et al.*: Carrageenan-induced acute inflammatory response in chicks. *Research in Veterinary Science*, **46**. 192-195 (1989)
- 38) J. T. Roach and K. J. Sufka: Characterization of the chick carrageenan response. *Brain Research*, **994**. 216-225 (2003)
- 39) M. G. Elfaki *et al.*: Sequential intracoelomic and intrabursal immunization of chickens with inactivated *Mycoplasma gallisepticum* bacterin and iota carrageenan adjuvant. *Vaccine*, **10**. 655-662 (1992)
- 40) M. G. Elfaki *et al.*: Protection against airsacculitis with sequential systemic and local immunization of chickens using killed *Mycoplasma gallisepticum* bacterin with iota carrageenan adjuvant. *Vaccine*, **11**. 311-317. (1993)
- 41) J. S. Gallagher and E. W. Voss Jr.: Molecular weight of a purified chicken antibody. *Immunochemistry*, **6**. 199-206 (1969)
- 42) U. K. Laemmli: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**. 680-685 (1970)
- 43) M. Shimizu *et al.*: Serum and egg antibody responses in chickens to *Escherichia coli*. *Agricultural and Biological Chemistry*, **53**. 3233-3238 (1989)
- 44) J. Lin *et al.*: Inhibition of in vitro growth of coliform bacteria by a monoclonal antibody directed against ferric enterobactin receptor FepA. *Journal of Dairy Science*, **81**. 1267-1274 (1998)
- 45) J. A. Wolff *et al.*: Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Human Molecular Genetics*, **1**. 363-369 (1992)
- 46) R. R. MacGregor *et al.*: First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of

- human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response. *Journal of Infectious Diseases*, **178**. 92-100 (1998)
- 47) T. P. Le *et al.*: Safety, tolerability and humoral immune responses after intramuscular administration of a malaria DNA vaccine to healthy adult volunteers. *Vaccine*, **18**. 1893-1901 (2000)
- 48) Y. Zhao *et al.*: Biosafety of the plasmid pcDNA3-1E of *Eimeria acervulina* in chicken. *Experimental Parasitology*, **133**. 231-236 (2013)
- 49) T. R. F. Smith *et al.*: Immunogenicity of a DNA vaccine candidate for COVID-19. *Nature Communications*, **11**. 2601 (2020)
- 50) A.R. Fooks *et al.*: Rabies. *Nature Reviews Disease Primers*, **3**. 17091 (2017)
- 51) World Health Organization, Rabies vaccines and immunoglobulins: WHO position: Summary of 2017 updates. WHO/CDS/NTD/NZD/2018.04. (2018)
- 52) H. Wilde *et al.*: Postexposure treatment of rabies infection: can it be done without immunoglobulin?. *Clinical Infectious Diseases*, **34**. 477-480 (2002)
- 53) Y. Motoi *et al.*: Production of rabies neutralizing antibody in hen's eggs using a part of the G protein expressed in *Escherichia coli*. *Vaccine*, **23**. 3026-3032 (2005)
- 54) S. N. Madhusudana *et al.*: Evaluation of a direct rapid immunohistochemical test (dRIT) for rapid diagnosis of rabies in animals and humans. *Virologica Sinica*, **27**. 299-302 (2012)
- 55) N. Kubo *et al.*: A comparative study on egg yolk IgY production with different adjuvants and their inhibitory effects on *Staphylococcus aureus*. *Journal of Poultry Science*, **58**. 192-199 (2021)

- 56) N. Kubo *et al.*: Preparation of anti-rabies virus N protein IgYs by DNA Immunization of hens using different types of adjuvants. *Journal of Poultry Science*, 0210053 (2022 年 4 月発行予定)
- 57) A. Patel *et al.*: Protective efficacy and long-term immunogenicity in cynomolgus macaques by Ebola virus glycoprotein synthetic DNA vaccines. *The Journal of Infectious Diseases*, **219**. 544-555 (2019)
- 58) L. T. Stein Rech *et al.*: Immunohistochemical study of rabies virus within the central nervous system of domestic and wildlife species. *Veterinary Pathology*, **47**. 630-633 (2010)
- 59) KM バイオロジクス, 狂犬病 TC ワクチン「KMB」(一般名称: 狂犬病組織培養不活性化ワクチン (シード)) 使用説明書, 2018 年 7 月改定 (19 版)
- 60) Y. Lu *et al.*: Passive immunization of crayfish (*Procambarus clarkia*) with chicken egg yolk immunoglobulin (IgY) against white spot syndrome virus (WSSV). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **159**. 750-758 (2009)
- 61) S. Liu *et al.*: DNA immunization as a technology platform for monoclonal antibody induction. *Emerging Microbes & Infections*, **5**. 1-12 (2016)

利益相反

利益相反に相当する事項は無い。

公表

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

Nanase Kubo, Mari Nishii, Mayuko Osada-Oka and Hajime Hatta.

A Comparative Study on Egg Yolk IgY Production with Different Adjuvants and their Inhibitory Effects on *Staphylococcus aureus*. The Journal of Poultry Science, 2021, 58(3):192-199. 【査読あり】

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～

Nanase Kubo, Mari Nishii, Satoshi Inoue, Akira Noguchi and Hajime Hatta.

Preparation of Anti-Rabies Virus N Protein IgYs by DNA Immunization of Hens Using Different Types of Adjuvants. The Journal of Poultry Science (2022 年 4 月発行予定) 【査読あり】

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～

久保七彩, 上羽智恵美, 門間敬子, 井上智, 野口章, 八田一. 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～. 京都女子大学食物学会誌, 2021, 76:17-24. 【査読あり】

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

Nanase Kubo, Park Chun-ho, Chiemi Ueba, Satoshi Inoue, Akira Noguchi and

Hajime Hatta. Comparative study of anti-rabies virus nucleoprotein IgY prepared by adjuvant-pre-injected DNA immunization and protein immunization (投稿準備中)

要旨

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抗 RV-N 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°C, 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 抗体はタンパク質免疫法で調製した IgY 抗体と比較して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力が顕著に弱く、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。

謝辞

本論文は著者が京都女子大学大学院家政学研究科博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものであり、博士学位論文を提出するにあたり多くの方々のご指導とご協力をいただきました。

まず、同研究科食品第二研究室の八田一教授には研究の初期から博士課程修了までの間、終始ご指導、ご鞭撻をいただきました。また、指導教授として基礎的な実験手技から研究に対する姿勢まで幅広くご指導いただきました。ここに深謝の意を表します。誠にありがとうございました。

京都府農林水産部農村振興課の西井真理博士、京都府立農林水産技術センター畜産センターの上羽智恵美さんと同センターの皆様にはニワトリへの免疫実験を全面的にご支援いただきました。京都女子大学家政学部の門間敬子教授には大腸菌を用いた組換えタンパク質の調製方法についてご指導いただきました。元京都府中小企業技術センターの上野栄義博士には学部生の頃より、様々な基礎的な実験手技をご指導いただきました。京都府立大学生命環境学部の岡真優子准教授には黄色ブドウ球菌死菌を提供していただき、IgY 抗体の黄色ブドウ球菌増殖抑制試験の実施に際してご支援いただきました。ここに深謝申し上げます。

国立感染症研究所獣医科学部の井上智先生と野口章先生には、狂犬病ウイルス核タンパク質組換えプラスミド DNA を提供していただき、また有益なご助言を多数いただきました。特に井上先生には、本研究を実施する機会をいただき、また終始研究をご支援いただきました。厚く御礼申し上げます。

北里大学獣医学部の朴天鎬准教授には免疫組織化学染色 (IHC) についてご教授いただき、狂犬病ウイルス感染犬の脳切片を用いて IHC を実施していただきました。また、元北里大学獣医学部の志和希博士にも、IHC の実施に際して多大なるご支援とご協力をいただきました。厚く御礼申し上げます。

京都女子大学大学院家政学研究科博士後期課程の赤嶺百子さんと魚谷奈央さんには公私ともに支えていただきました。ありがとうございました。突然進学を決めた私を温かく見守ってくれた家族にも感謝の意を表します。誠にありがとうございました。

2021年12月2日

久保 七彩