The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | HVJ　HN蛋白に対するモノクロナル抗体の分離と，HVJのもつ生物学的機能に対するこの抗体の効果 |
| Author(s) | 三浦，直行 |
| Citation | 大阪大学，1982，博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/33271 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【21】

| | |
|---|---|
| 氏名・(本籍) | 三浦直行 |
| 学位の種類 | 医学博士 |
| 学位記番号 | 第 5617 号 |
| 学位授与の日付 | 昭和57年3月25日 |
| 学位授与の要件 | 医学研究科 病理系専攻<br>学位規則第5条第1項該当 |
| 学位論文題目 | **HVJ HN蛋白に対するモノクロナル抗体の分離と，HVJのもつ生物学的機能に対するこの抗体の効果** |
| 論文審査委員 | (主査)教授 岡田 善雄<br>(副査)教授 井上 公蔵 教授 深井孝之助 |

## 論文内容の要旨

〔目 的〕

HVJ表面のHN蛋白（分子量約69,000）とF蛋白（分子量約65,000）はウイルスと細胞の初期反応に重要な役割を果たしている。HN蛋白の機能をさらに知るために，ハイブリドーマを作製し，HVJ HN蛋白に対するモノクロナル抗体の分離を試みた。さらに，これを用いて，HVJのもつ種々の生物学的機能に対する効果を検討した。

〔方法ならびに成績〕

ハイブリドーマの作製：超音波処理したHVJ 0.3mgをcomplete Freund's adjuvantにけん濁し，BALB/cマウス腹腔内に初回免疫した。1ケ月後，マウス尾静脈より同量のHVJを注射した。追加免疫3日後に，マウスより脾細胞を調製し，脾細胞$10^8$個とSP2/0細胞$10^7$個を50%ポリエチレングリコール4000（半井化学），15% DMSOにより細胞融合させ，96ウェルプレートを用いてHAT選択培地にて培養した。193ウェルのうち，細胞増殖を示したのは150ウェルあった。培養上清中の抗体活性は，精製HN蛋白を吸着させたマイクロタイタープレートを用いた固相ラジオイムノアッセイ法により調べた。目的とする抗体活性陽性のものは，0.24 %軟寒天法にてクローニングを2回以上おこない，細胞系統を確立した。

抗体の精製：得られたクローン化細胞$2\times10^6$個をPristane処理したマウス腹腔内に注射して，7～10日後に高濃度のモノクロナル抗体を含んだ腹水を得た。抗体はHN蛋白を結合させたSepharose 4B，又は，Protein A-Sepharose CL-4Bを用いたaffinity chromatographyにより精製した。

抗体の抗原特異性：抗体の抗原特異性は，$^{35}$S-メチオニンでラベルしたHVJを1%Nonidet P-40,

0.5MKCl, 10mM Tris-HCl pH 8.3で可溶化したものを抗原として免疫沈降させ，SDS-PAGE後，オートラジオグラムをつくり，再確認した。2種の抗体（HN－1，HN－2抗体）は，HN蛋白にのみ結合し，他のHVJ構成蛋白には反応しなかった。

この2種のモノクロナル抗体を用いて，HVJの種々の生物活性に対する効果を検討し，次の結果を得た。コントロール抗体として，同様にして得られたモノクロナル抗NP抗体を用いた。なお，NP蛋白はHVJ粒子内部に存在する蛋白である。

1．2つの抗体はHN蛋白への結合をお互いに阻害しなかった。

2．HN－1抗体は，HVJによる赤血球凝集活性および高分子基質を用いた場合ノイラミニダーゼ活性を阻害した。低分子基質を用いた場合ノイラミニダーゼ活性を阻害しなかった。又，HN－1抗体が結合したHVJは細胞に吸着できなかった。さらに，HN－1抗体は，HVJによる細胞融合および溶血を完全に阻止した。

3．HN－2抗体は，赤血球凝集活性およびノイラミニダーゼ活性を阻害しなかった。又，HN－2抗体が結合したHVJは，コントロールと同程度細胞に吸着でき，しかも37℃においても早く遊離することはなかった。さらに，HN－2抗体はHVJによる細胞融合および溶血を完全に阻止した。

4．ジフテリア毒素のフラグメントAを含み表面にHVJスパイクをもつリポゾームのL細胞に対する細胞毒性をHN－1，HN－2抗体は阻害した。

〔総　括〕

1．HVJに対するハイブリドーマを作製し，HN蛋白に対するモノクロナル抗体を2種得た。

2．HN－1抗体は，HVJのもつ赤血球凝集活性を阻害したが，HN－2抗体はまったく阻害しなかった。

3．HN－1抗体は，ウイルスと細胞の結合を阻害することにより，HVJによる膜融合を阻害した。

4．HN－2抗体は，ウイルスと細胞の結合以後の段階で膜融合過程を阻害した。

## 論文の審査結果の要旨

本研究では，モノクロナル抗体を蛋白質の構造と機能を知る手段として用いている。HVJ表面に存在するHN蛋白上の異るエピトープに対する2種の抗体（HN蛋白の細胞レセプターへの結合部位付近に対する抗体と，それ以外の部位に対する抗体）を用いて，HN蛋白の機能の解析をしている。その結果，レセプター結合部位以外の部位の役割の重要性が示唆されており，本研究は高く評価できる。