The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	水痘ウイルス蛋白に対するmonoclonal抗体産生細胞の樹立とそれを用いてウイルス蛋白の解析
Author(s)	奥野, 寿臣
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33335
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【7】

氏名・(本籍)	奥野寿臣（おくの としおみ）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 5980 号
学位授与の日付	昭和58年3月25日
学位授与の要件	医学研究科 病理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**水痘ウイルス蛋白に対するmonoclonal抗体産生細胞の樹立とそれを用いてウイルス蛋白の解析**
論文審査委員	(主査) 教授 高橋 理明 (副査) 教授 深井孝之助 教授 加藤 四郎

論文内容の要旨

〔目　的〕

ヘルペスウイルス科に属す水痘ウイルス（VZV）は，初感染時には水痘を発症せしめ，その後知覚神経節に潜伏し，加令などの免疫力低下の際に再活性化されて帯状疱疹を起こすことが知られている。しかし，ＶＺＶの特異的な性質（細胞依存性が強い，多量のウイルスを得ることが困難である）のため，その性状は今だよくわかっていなかったが，最近になり，ＶＺＶは約30コの蛋白より構成され，そのうち約６コの糖蛋白を含むことが示された。そこで我々はそれらの糖蛋白に対するhybridomaの確立を試み，そのmonoclonal抗体を用いてさらに詳細な解析を進める目的で本研究を始めた。

〔方法ならびに成績〕

1．Virus及び細胞：VZV河口株を中和テスト及び免疫抗原として用いた。細胞は人胎児線維芽細胞（HuEF）を用いた。

2．マウス：BALB/C　マウス

3．マウス Myeloma細胞：sp2/0-Ag14細胞（sp2）（BALB/C由来，抗体非産生株）

4．免疫法：VZV感染HuEFのextractと完全フロインドアジュバントを１：１で混合したものの0.5mℓをマウス腹腔内へ接種。１ケ月後extractのみ0.5mℓ腹腔内へ追加接種し，その３日後にspleen cellを調整した。

5．Hybridomaの形成‥sp2細胞とspleen cellをPolyethylene glycol 4000で融合の後，HAT培地で選択した。

6．抗体産生細胞のScreening：間接蛍光抗体法で行った。

7．Cloning：限界希釈法を用いた。

8．Immunoprecipitation：〔^{35}S〕Methionine又は〔^{3}H〕Glucosamineでlabelした感染細胞のextractとmonoclonal抗体とを混合してProtein Aで沈降させ，ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）を行った。

9．Pulse-Chaseテスト：〔^{35}S〕Methionineで15分pulse labelし，別に1時間と4時間chase labelした感染細胞のextractを上記の方法でimmunoprecipitateした。

10．感染細胞表面のウイルス抗原解析法：感染細胞表面の蛋白を^{125}Iでlabelし，immunoprecipitateした。

11．ウイルスエンベロープの蛋白解析法：〔^{35}S〕でlabelされたエンベロープ蛋白をimmunoprecipitateした。

12．感染細胞培養上清中のウイルス抗原解析法：〔^{35}S〕でlabelされたウイルス蛋白を，それぞれのmonoclonal抗体カラムにapplyして溶出させた。

13．中和テスト：monoclonal抗体とVZVを混合したもの，又はそれにモルモットの補体を加えたものをHuEFに接種し，プラックを数えた。

Hybridomaの樹立

最終的に27cloneの抗VZV抗体産生Hybridomaを樹立した。それらは間接蛍光抗体法により，感染細胞の核に主として蛍光を発するもの12clone（Nグループ），細胞質に主として蛍光を発するもの15clone（Cグループ）に分けられた。

抗体特異性

Cグループのhybridoma 15 cloneについてimmunoprecipitateを行った結果，3cloneはいかなるウイルス蛋白とも反応しなかった。残りの12cloneはその反応する蛋白により3つのグループに分けられた。C—Ⅰグループは94000（94K），83Kと，C—Ⅱグループは94K，83K，55Kと，C—Ⅲグループは116K，106K，64Kと反応した。そしてこれらはすべて糖蛋白であった。

Pulse-Chaseテスト

C—Ⅰグループでは15分パルスで75Kが出現し，83K，94Kへと大きくなり，C—Ⅱでは49Kが55Kに75Kが83K，94Kへと，C—Ⅲでは106Kから116Kへ上がり，64Kへと小さくなった。

感染細胞表面及びウイルスエンベロープのウイルス

感染細胞表面においては，C—Ⅰグループは94K，83K，C—Ⅱは94K，83K，55K，45K，C—Ⅲは64Kが見い出された。エンベロープにはC—Ⅰグループでは94K，83K，80K，C—Ⅱは94～80Kの付近と55K，C—Ⅲは64Kのみが見られた。

感染細胞培養上清中のウイルス抗原

C—Ⅱグループのみウイルス抗原，すなわち45Kの蛋白と反応した。

生物学的活性

補体非存在下ではどのグループも中和能を示さなかったが，補体添加によりC—Ⅰのみ中和活性を示した。

〔総　　括〕

本研究ではhybridomaを用いることによってVZV特異蛋白の細胞内での動態が一部明らかになった。すなわちC－Ⅰグループの認識する蛋白（gp2に相当）については，75Kの蛋白が糖付加を受けて83K，94Kとなり，それらが最終産物として感染細胞表面，ウイルスエンベロープにくみこまれることが判明した。同様に，C－Ⅱグループが主として反応する蛋白（gp5に相当）は49Kが55Kへ糖付加を受けて，その55Kの蛋白が最終産物として出現し，C－Ⅲの場合の蛋白（gp3に相当）は106Kから116Kへと糖付加を受け，cleavageされて64Kの最終産物になるものと思われる。さらに，gp5の場合，感染細胞表面あるいはその付近で55Kが45Kになり培養上清中に分泌されるものと思われる。

生物学的活性については，それのみでは中和活性を示すものはなかったが，補体添加により活性が出現した。すなわち，C－Ⅰグループの認識抗原決定基は少なくともウイルスエンベロープ表面に露出しており，それにより補体依存性の中和が起ったものと考えられる。

論文の審査結果の要旨

本論文は水痘ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体産生細胞株を樹立しそれを用いて水痘ウイルス抗原特にウイルス糖蛋白の合成，processingを研究したものである。水痘ウイルスは細胞親和性が強くその取扱いが困難で従来ウイルス蛋白の動態については殆で解析されていなかった。本研究により水痘ウイルス蛋白のうち特に免疫反応と密接な関係がある糖蛋白の動態が明らかになったことは水痘ウイルスの基礎臨床両面の研究の進展に貢献するところが大きいと思われる。