

|              |   |
|--------------|---|
| 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          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/33335">https://hdl.handle.net/11094/33335</a>   |
| 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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。 |

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

## 【7】

|         |   |
|---------|---|
| 氏名・(本籍) | 奥野寿臣  |
| 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<br>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<br>とそれをういてウイルス蛋白の解析 |
| 論文審査委員  | (主査)<br>教授 高橋 理明<br>(副査)<br>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、加齢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ヶ月後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 : [<sup>35</sup>S] Methionine 又は [<sup>3</sup>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 : [<sup>35</sup>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 <sup>125</sup>I で label し、immunoprecipitate した。
11. ウイルスエンベロープの蛋白解析法 : [<sup>35</sup>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 : [<sup>35</sup>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、ブラックを数えた。

#### Hybridoma の樹立

最終的に 27 clone 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 12 clone (N グループ)、細胞質に主として蛍光を発するもの 15 clone (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、3 clone はいかなるウイルス蛋白とも反応しなかった。残りの 12 clone 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ど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。