

Title	単純ヘルペスウイルスGlycoprotein Dによるヘルペス性角膜炎の予防効果について
Author(s)	井上, 幸次
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35279
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	井 上 幸 次
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 7679 号
学位授与の日付	昭和62年3月26日
学位授与の要件	医学研究科外科系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	単純ヘルペスウイルスGlycoprotein Dによるヘルペス性角膜炎の 予防効果について
論文審査委員	(主査) 教授 眞鍋 禮三 (副査) 教授 加藤 四郎 教授 高橋 理明

論文内容の要旨

[目 的]

単純ヘルペスウイルス(HSV)によるヘルペス性角膜炎は、三叉神経節に潜伏感染したHSVが再活性化することによって再発を繰り返し、角膜実質内に浮腫と混濁を生じ(実質型角膜ヘルペス)、著明な視力低下をひき起こす。現在、その治療は抗ウイルス剤、ステロイドなどによる対症的なもので、予防的、根本的治療はいまだ成されていない。一方、近年、HSV膜抗原による種々のワクチンの開発が試みられているが、ヘルペス性角膜炎に対する効果についてはあまり検討されていない。今回、HSVの膜抗原の一つであるglycoprotein D(gD)を精製して、その予防効果をマウスのヘルペス性角膜炎モデルにおいて明らかにするとともに、その際に誘導される種々の免疫学的パラメーターの役割についても検討を加える。

[方 法]

1. 抗gDモノクローナル抗体産生細胞の樹立: HSV感染Vero細胞の可溶化分画で免疫したBALB/cマウスの脾細胞とSp-2細胞のハイブリドーマを作成し、immunoprecipitation法により、抗gD抗体産生細胞を同定して、6株を得た。
2. gDの精製: 上記モノクローナル抗体をcoupleさせたCNBr-activated sepharose 4Bを用いてHSV感染HEp-2細胞の可溶化分画よりaffinity chromatographyにてgDを精製した。
3. マウスのヘルペス性角膜炎に対する予防効果: 6~8週齢の雌のBALB/cマウスに、gDを20 μ g \times 3回腹腔内投与し、最終投与後1週目に、ヘルペス臨床分離株(河村株)を1.7~8.5 $\times 10^5$ PFU/eyeにて角膜接種した。感染後1~10日目及び14日目に角膜炎の状態を細隙灯顕微鏡にて観察し、上

皮性及び実質性病変をスコア化してコントロールと比較した。また、抗gDモノクローナル抗体を腹腔内投与したマウスについても同様の感染と角膜炎の観察を行った。

4. 組織中のウイルス力価の算定：感染後3, 5, 7日目の角膜, 角膜以外の眼球, 三叉神経節, 中脳を摘出し, 乳鉢あるいはhomogenizerにてhomogenizeした後, 30秒間超音波処理を行って, その遠心上清中のウイルス力価を求めた。
5. 中和抗体価の測定：プラーク減少法にて, プラーク数をコントロールの50%以下にする血清の最高希釈度を中和抗体価とした。
6. CDAC, ADCC, CTLの測定：3者とも⁵¹Cr-release法によった。CDAC, ADCCはHSV感染L929細胞をtargetとし, 兎補体, ヒトのリンパ球を各々加えた。CTLはgD免疫マウスの脾細胞をeffectorとし, HSV感染3T3細胞をtargetとした。
7. DTHの測定：熱不活化HSV抗原を一側のマウス耳背側に, 非感染細胞処理抗原を他側に, 各々10 μ l注射し, 24時間後, 耳厚をmicrometerにて測定し, その差を求めた。
8. ペプシン処理モノクローナル抗体の作成：モノクローナル抗体を20時間ペプシン処理した後, sephadex G-100を通して, そのvoid volume fractionを集めた。Fc部分が切断されているか否かは, Ouchterlony法にて確認した。

[成績]

1. gD免疫群では実質性病変の発生が抑制され, 上皮性病変も軽減していた。また, コントロール群では, 多くのマウスが, ヘルペス性脳炎にて死亡したが, 免疫群は全例生存した。
2. gD免疫群では, コントロール群に比して, 各組織におけるウイルス力価が著しく低下していた。
3. gD免疫群では, 中和抗体価(2~64倍)と, CDAC(50 \pm 14%)が上昇しており, 各々コントロール群(2倍以下, 0.71 \pm 3.1%)とのあいだに有意差を認めた(P<0.01)が, ADCC, CTL, DTHには有意な上昇を認めなかった。
4. 抗モノクローナル抗体のうち, 中和能は高いが, CDAC, ADCC能の低いM1, 及びその逆に中和能は低いが, CDAC, ADCC能の高いM12を移入した後, 角膜にHSVを感染させた所, M1, M12ともに実質性病変を抑制した。そして, M1はFc部分を失っても, その効果を保ったのに対して, M12ではFc部分を失うとその能力を失った。

[総括]

1. gDをマウスに免疫することによって中和及びCDACを主体とする液性免疫が誘導され, ウイルスの各組織内への拡がりや実質性角膜炎の発生が抑制された。
2. gDに対する中和反応やCDACがHSVに対する防御機構の上で重要な役割を果たしていることは, モノクローナル抗体の移入によって確認された。
3. gDにより誘導される免疫は予防的見地から見て, まだ, 不完全なものであるが, 今後のヘルペスワクチンとしての可能性が示唆された。

論文の審査結果の要旨

本研究は、単純ヘルペスウイルスの膜抗原の一つである Glycoprotein D を単離し、これでマウスを免疫することによって、失明につながる実質型角膜ヘルペスの発生が抑制されることを示している。これは、角膜におけるヘルペス性病変に対して、subunit vaccine が有効に働いていることを示す最初の報告である。また、その免疫の際に誘導される液性免疫、細胞性免疫についても詳細に検討しており、中和、CDAC の 2 つが誘導されることを確認し、更には、各々の機能を有した抗体の投与のみで、実質性病後の発生を抑制することを確認している。実質性病変の発生を抑制するのに、単一のタンパクに対する特定の液性免疫のみで可能であることを示した意義は大きく、また、Glycoprotein D そのものも、今後、更に subunit vaccine としての利用を考えることができると思われる。以上の点から、本研究は学位に値する業績と認められる。