

Title	インフルエンザウイルス粒子表面上のノイラミニダーゼ・スパイクの分布に関する免疫電子顕微鏡的研究
Author(s)	天野, 拓之
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37966
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	あまのひろゆき 天野拓之
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 10159 号
学位授与年月日	平成 4 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科 病理系専攻
学位論文名	インフルエンザウイルス粒子表面上のノイラミニダーゼ・スパイクの分布に関する免疫電子顕微鏡的研究
論文審査委員	(主査) 教授 北村 幸彦 (副査) 教授 栗村 敬 教授 藤田 尚男

論文内容の要旨

(目 的)

A 型インフルエンザウイルスの表面スパイクには 2 種類の糖蛋白が存在し、それぞれ hemagglutinin (HA), neuraminidase (NA) と呼ばれる。2 種類の糖蛋白のうち多数を占める HA は一様に分布しているということで一致している。しかし、少数の NA は、均一に分布すると主張するもの、不連続にパッチを形成して分布するというものの二派に分かれる。前者は、ウイルス粒子をトリプシン処理して残ったスパイクを NA とみなして、これらが一様に分布していた事を根拠にしている。後者は、ウイルス粒子をモノクローナル抗体と反応させると、粒子上で数個のパッチをなして標識されるという免疫電顕法の結果を根拠とする。

本研究の目的は、NA の分布を免疫電子顕微鏡を使って調べ、どちらが正しいかを決定することである。

(材料ならびに方法)

〈材料〉A 型インフルエンザウイルス (PR 8 (H1N1), X 7 (H1N2)) を 10 日令孵化卵の尿將膜腔でふやした。HA, NA に対するモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を多くの方から提供していただいた (一次抗体)。標識二次抗体は一定の直径の金粒子を抱合している (二次抗体)。

〈ウイルス粒子の免疫電顕標識法〉コロジオン膜を張った 400 銅メッシュにウイルス浮遊液を載せ、ウイルス粒子を支持膜に吸着させる。つぎに 1 hr, 20°C の条件下で支持膜を 3%ゼラチン入り緩衝液の滴上に載せて、非特異反応のブロックを行う。充分洗浄する。そして一次抗体 (HA, NA に対する抗体) を適当な濃度 (30 倍程度) に希釈、その滴上に支持膜を置き、支持膜に吸着されたウイルス粒子と 1 hr,

20°Cの条件下で反応させ、十分に緩衝液で洗浄する。次の標識二次抗体を希釈、その滴上に支持膜を置く。1 hr, 20°Cの条件下でウイルス-抗体複合物を二次抗体で標識する。十分に洗浄する。ついで支持膜を0.2%酢酸ウラン溶液で電子染色し、直ちに電子顕微鏡観察を行う。

〈ウイルス粒子のトリプシン処理〉インフルエンザウイルスを高濃度トリプシンのもとで処理するとHAが選択的に破壊される一方、NAが保持されるウイルス粒子が得られる。まずウイルス濃縮液(約20000 HAU/ml)と同容量のトリプシン溶液(1 mg/ml)を混合し、37°Cで0~1 hr 反応させる。同量の反応阻害薬で反応を停止させる。こうして得られたウイルスのHA活性はそれぞれニワトリ赤血球の血球凝集を示す希釈倍数法で著明な低下を、NA活性はfetuin 基質法で不変のことを確認した。またSDS-PAGE法による蛋白分析でもHA蛋白の変性を確認した。

〈一次抗体の反応特異性〉抗NA, HA抗体の各々の抗原に対する特異性の確認は、電子顕微鏡によるウイルス粒子の直接確認で行った。例えば、抗N 2抗体の特異性はPR 8 (H1N1) が標識されず、X 7 (H1N2) が標識されるのを電子顕微鏡で直接観察した。

(成 績)

HAを標識する金粒子は均一に分布するウイルス粒子がパッチをなして分布する粒子よりも多く、PR 8, X 7ともポリクローナル、モノクローナル抗体で70%以上をしめていた。NAを標識する金粒子は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体で結果が異なっていた。前者では金粒子はほぼ均一に分布する(PR 8では73%, X 7でも73%)。後者では金粒子はパッチをなして分布する(PR 8では96%, X 7では97%)。

トリプシン処理ウイルス粒子のNAの免疫標識でも、このポリクローナル抗体とモノクローナル抗体との違いは同じように観察された。しかし、同処理ウイルスのHAの免疫標識では興味ある事実が判明した。処理前よりもスパイク密度はまばらで抗HA抗体でほとんど標識されなかったが、ウイルス表面上に残ったスパイクは均一に分布していた。

NAに対するモノクローナル抗体を数種類か全部で同時に標識するとポリクローナル抗体の場合と同じになるのではないかと考えた。PR 8ウイルスを標識した場合、2種類ではパッチをなして分布するウイルスが多いが(37/47=78%), 4種類では均一に分布する粒子が増えてくる(34/62=54%)。

(総 括)

本研究では、NAスパイクの標識パターンがポリクローナル抗体とモノクローナル抗体とでは異なることを示した。ポリクローナル抗体を使った免疫標識の結果(金粒子の均一な分布)がインフルエンザウイルスのNAスパイクの分布を正確に反映していることは、本研究で強く示唆されることである。第一の根拠は、トリプシン処理をうけたインフルエンザウイルス粒子の表面上に残ったスパイクはNAと考えられるが、これらが均一に分布していることである。第二の根拠は、数種類のモノクローナル抗体を用いたNA標識では種類を増やすほど、パッチをなして分布する粒子が減少し、均一に分布する粒子が増えることである。

私の主張するところは、ノイラミニダーゼ・スパイクもヘマグルチニン・スパイクと同様にウイルス粒子表面上に均一に分布するということであり、モノクローナル抗体による結果はartifactではないか

と考える。

モノクローナル抗体によりパッチをなして分布する理由を考察した。考えるに際し次の二つの仮説を設けた。第一に、ひとつの抗体分子はその立体障害のためにスパイク内の分子どうし間に結合せず、隣あったスパイク間に結合すること、第二に、ウイルスのエンベロップも流動モザイクモデルに従っており、抗体を介した再分布が起こると考える。モノクローナル抗体の場合、結合する抗原決定部位は一個であるから一種類の抗体の一方の結合手がその対応する抗原蛋白につき、もう一方の結合手がすぐ隣の抗原分子に結合する。金粒子を抱合した二次抗体は一次抗体によって再分布した抗原分子の“上から乗りかかるとなる”ところが、ポリクローナル抗体の場合結合する抗原決定部位は複数であるから、複数個の抗体分子が一個の抗原分子と結合し、さらにもう一方の結合手で隣の複数の抗原分子と結合することとなる。つまり、ポリクローナル抗体の場合には二次抗体が反応する前に NA 抗原どうしが一次抗体によってネットワークを作り、二次抗体が入ってきても NA 抗原の再分布が起こりにくいのではないか？しかし、HA のように多数を占める抗原蛋白が存在する場合には、その密な分布がモノクローナル抗体による再分布を阻止し、たとえ抗原の再分布が起こっても結果として変わった分布を示さないであろう。

論文審査の結果の要旨

インフルエンザ・ウイルスの表面スパイクには2種類の糖蛋白があり、ウイルスの細胞への吸着の際に働くヘマグルチニン (HA) の分布は均一であることについては一致をみているが、ウイルスの発芽の際に働くノイラミニダーゼ (NA) の分布については HA と同様に一様か、クラスターをなし一部に偏るか、説が定まらない。本研究では、この NA の分布を免疫電顕法を用いて調べ、ポリクローナル抗体による標識パターンは均一であるが、モノクローナル抗体による標識パターンは一部に偏っていることを見出した。さらに、トリプシン処理で HA を除去し、NA だけになったウイルス粒子では NA が均一に分布していることを明らかにした。つまり、モノクローナル抗体によって得られた所見は NA の再分布のための一種の人工産物と考えられた。地味な形態学の研究であるが、いままでの論争点の解決の手がかりを与える所見を含む点で、学位に値すると思われる。