



Title	ヒトマンナン結合蛋白の抗インフルエンザウイルス効果に関する研究
Author(s)	加瀬, 哲男
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41058
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

氏 名	か せ てつ お 加 瀬 哲 男
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 3 7 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 9 年 8 月 4 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	ヒトマンナン結合蛋白の抗インフルエンザウイルス効果に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 上 田 重 晴 (副査) 教 授 山 西 弘 一 教 授 木 下 タ ロ ウ

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

インフルエンザに対する感染防御は、インフルエンザウイルスの表在糖蛋白であるヘマグルチニン (HA) とニューラミニダーゼ (NA) に対する免疫が主であると考えられる。しかしながら、インフルエンザウイルスの表面抗原は変異率が高く、このことが免疫による感染防御能を低くしている。一方、嚙乳動物の血清にはインフルエンザウイルスに対するインヒビターの存在が古くから知られており、その中の β インヒビターは、血清レクチンであることが明らかにされた。このレクチンは糖鎖認識部位とコラーゲン構造をもち、ヒト、ウシ、ウサギ、マウスのマンナン結合蛋白 (MBP) や、ウシコングルチニン (BKg) などが含まれる。近年、MBP は抗体非依存性補体活性を担ったり、オプソニンとして働き、基礎免疫に重要な役割を果たしていることが報告された。また、BKg やマウス MBP に抗インフルエンザウイルス活性があることや、モルモット MBP が補体経路を利用してインフルエンザウイルスを不活化することが示された。

今回、ヒト血清中に微量存在するヒト MBP のインフルエンザウイルスに対する役割を明らかにすることを目的として、このレクチンの抗ウイルス活性を検討した。

[方法ならびに成績]

1) ヒト MBP の精製

ヒト MBP は、ヒト血清よりマンナン-アガロースカラムで単離し、SDS-PAGE で単独バンドであることを確かめた。

2) 赤血球凝集抑制 (HI) 試験

HI 試験は96穴マイクロプレートで、0.5%ニワトリ赤血球を用いた標準法で行った。インフルエンザウイルス実験室株、A/Suita/1/89(H1N1), A/Ibaraki/1/90 (H3N2)等は HI を示す最小濃度 (HI 価) が、 $1 \mu\text{g/ml}$ 以下でヒト MBP に対して感受性であった。大阪府下で1990年から95年に分離された新鮮分離株67株 (H3N2 型60株と H1N1 型7株) では、HI 価は $0.31 \pm 0.67 \mu\text{g/ml}$ で、その95%はヒト MBP に感受性であった。このヒト MBP の HI 活性は、マンノ

ースや EDTA の添加により阻害された。

3) 中和試験

中和試験は A/Ibaraki/1/90 (H3N2) を用いて行った。すなわち 100 focus forming units (FFU) のウイルスとヒト MBP を等量混合し、MDCK 細胞に接種して、24 時間培養した。その後、免疫化学染色して、ウイルス感染 focus を数えてウイルス感染価を求めた。ヒト MBP の A/Ibaraki/1/90 (H3N2) に対する中和価 (50% 以上の FFU を減少させる最小濃度) は $0.3 \mu\text{g/ml}$ であり、この活性は EDTA やマンノース、さらには抗ヒト MBP 抗体によって抑制された。

4) MBP 解離試験

インフルエンザウイルスとヒト MBP を混合して反応させたのち、EDTA を加え、MBP を解離させてから赤血球凝集性とウイルス感染価を測定した。MBP が解離したウイルスは赤血球凝集能と感染性を復活させた。

5) 感染拡大阻止効果

MDCK 細胞にインフルエンザウイルスを接種後、ヒト MBP を含むゲル状メディウムを重層して、3 日間培養したのち、免疫化学染色した。ウイルス感染領域は、MBP の濃度依存的に減少し、ヒト MBP $0.5 \mu\text{g/ml}$ では、その感染領域は 20% 以下になった。マンノースの添加は、この感染拡大阻止効果を抑制した。

6) ヒト MBP のウイルス糖蛋白への結合性

インフルエンザウイルス感染細胞にヒト MBP を反応させ、レクチン染色した。ヒト MBP は感染細胞のみに結合し、染色像がみられ、非感染細胞やマンノース存在下では染色されなかった。

また、インフルエンザウイルスを SDS-PAGE で電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写し、レクチンブロットを行った。ヒト MBP はインフルエンザウイルスの HA 蛋白と NA 蛋白に結合した。

[総括]

本研究では、ヒト血清よりヒト MBP を単離精製し、インフルエンザウイルスに対する抗ウイルス活性について検討した。その結果、ヒト MBP はそれ単独で、ヒト正常血清濃度 ($1-2 \mu\text{g/ml}$) より低い濃度で、インフルエンザウイルスの赤血球凝集能を阻害 (HI 活性) し、またウイルスが培養細胞に吸着するのを阻害 (中和活性) した。さらに、インフルエンザウイルスが培養細胞に感染後、ヒト MBP は、ゲル状メディウムに添加することにより、ウイルスの感染領域を有意に減少せしめた (感染拡大阻止活性)。それらの作用機序については、ヒト MBP がインフルエンザウイルスの膜蛋白であるヘマグルチニン (HA) やニューラミニダーゼ (NA) に結合し、ウイルスが血球や細胞上のレセプターに結合するのを阻害する可能性が考えられた。また、この阻害効果は、可逆性の反応であり、ヒト MBP は、直接的にはウイルス傷害活性を持たなかった。

論文審査の結果の要旨

ヒト血清中のマンナン結合蛋白 (MBP) は、オプソニンや抗体非依存性補体活性を担うなど、基礎免疫において重要な働きをすることは推測されているが、直接的な抗ウイルス活性を調べた報告はない。この論文では、ヒト正常血清中に微量存在する MBP が、*in vitro* でインフルエンザ A 型ウイルスに対して、赤血球凝集抑制活性および中和活性があることを示し、また感染細胞からインフルエンザウイルスが隣接する細胞に感染拡大していくのを阻止する活性があることを示している。この活性はヒト MBP が、インフルエンザウイルスの表在糖蛋白であるヘマグルチニンやニューラミニダーゼに結合することによっておこる MBP 単独の本来の性質と考えられる。このような蛋白質の抗ウイルス活性を明らかにしたことは、ヒトにおける複雑な感染防御機構の 1 つを説明し、また、将来的には抗ウイルス薬の開発の端緒になるものとして、学位の授与に値するものとする。