

Title	Detection of circulating Asian H5N1 viruses by a newly established monoclonal antibody
Author(s)	阿娜日瓦
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49874
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

論文内容の要旨

[目的]

高病原性鳥インフルエンザH5N1ウイルスは抗原変異が高速で起こり、従来のH5型ウイルスに対する抗体では新たに発生したウイルスを検出できない可能性がある。実際に1997年で分離されたA/Hong Kong/156/97に対するモノクローナル抗体は、2003年に分離されたA/Hong Kong/213/2003を認識しない (T. Horimoto, Vet. Med. Sci. 66, 303-305) ことから、現在世界で流行が拡大しているAsian-H5N1ウイルスに対する、迅速、簡単な検出方法が必要である。

[材料と方法]

Formarin処理後のA/crow/Kyoto/53/2004をBALB/cマウスへ免疫(計3回)、3回目の免疫後、マウスの脾臓とミエローム細胞と融合させ、96穴にHAT培地で二週間培養し、蛍光抗体で一次スクリーニングを行い、得られた陽性細胞を細胞クロニングして、さらに二週間後に二次スクリーニングで抗体産生細胞を選択した。以上の方法により、高病原性鳥インフルエンザH5N1ウイルスに対するモノクローナル抗体を得られた。

[結果]

最近アジアで流行し、ヒトに重篤な呼吸器疾患を引き起こしている高病原性鳥インフルエンザH5N1ウイルス (A/crow/Kyoto/53/2004株) に対する5種類の抗HAモノクローナル抗体 (3C11, 3H4, 3H12, 4C12, 4G6) を作成した。そのうち、中和活性がある抗HA抗体 (3C11, 3H4, 3H12, 4C12) は、免疫蛍光検定法 (IFA) によりH5ウイルス (H5N1, H5N2, H5N3) と反応し、イムノブロットングにおいても反応することから1次配列を認識する抗体であることが示唆された。またこの4種類エピトープマッピングの解析の結果では、エピトープが272~342aaの間を認識することが分かった。一方、4G6はH5N1-HAと反応するが、近縁のH5N2とH5N3ウイルスとは反応しなかった。エピトープマッピング解析を行った結果、4G6抗体はH5N1-HAの59番目のAsp (Asp59) を認識し、Asian-H5N1ウイルス以外のH5ウイルスに共通するSer59を認識しないことを明らかにした。

[総括]

Asp59は現在ユーラシア、アフリカ大陸で流行しているH5N1ウイルスの97%以上に見られることから、4G6を用いた診断系はアジア発のヒトに致死性の疾患を引き起こすH5ウイルスの特異的同定に有効であると考えられる。実際、4G6を用いたAntigen-capture ELISAにより、現在広範囲に流行しているClade2型のH5N1 (A/chicken/Egypt/CL-61/2007) を感染ニワトリ肺より直接検出することに成功した。

論文審査の結果の要旨

最近アジアで流行し、ヒトに重篤な呼吸器疾患を引き起こしている高病原性鳥インフルエンザH5N1ウイルスに特異に反応する5種類の抗HAモノクローナル抗体 (3C11, 3H4, 3H12, 4C12, 4G6) を作成した。免疫原としては我が国で分離されたH5N1 (A/crow/Kyoto/53/2004株) のウイルス粒子を用いた。そのうち、4G6を除く4クローンは感染阻害効果を有する中和抗体であった。一方、4G6はH5N1-HAと反応するが、近縁のH5N2とH5N3ウイルスとは反応しなかった。エピトープマッピング解析を行った結果、4G6抗体はH5N1-HAのAsp59を認識し、他のH5ウイルスに共通するSer59を認識しないことが明らかになった。Asp59は現在ユーラシア、アフリカ大陸で流行しているH5N1ウイルスの97%以上に見られることから、4G6を用いた診断系はアジア発の、ヒトに致死性の疾患を引き起こすH5ウイルスの特異的同定に有効であると考えられる。実際、4G6を用いたAntigen-capture ELISAにより、新型ウイルスへ変化することが危惧されるClade2型のH5N1 (A/chicken/Egypt/CL-61/2007) を感染ニワトリ肺より直接検出することに成功した。以上、本研究は学位の授与に値すると考えられる。

【24】

氏名	阿 娜 日 瓦
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 2 2 7 3 3 号
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科予防環境医学専攻
学位論文名	Detection of circulating Asian H5N1 viruses by a newly established monoclonal antibody (高病原性鳥インフルエンザ H5N1 ウイルスに対するモノクローナル抗体の作製と診断法への応用)
論文審査委員	(主査) 教授 生田 和良 (副査) 教授 松浦 善治 教授 塩田 達雄