

氏 名 (本籍) 貴 田 岡 せつ 子

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 第 1 6 6 9 号

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 6 0 年 2 月 2 7 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 5 0 年 3 月
 東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目 Study on Human Rotavirus Hemagglutinin.
 (ヒトロタウィルス赤血球凝集素に関する研究)

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 今 野 多 助 教 授 多 田 啓 也

 教 授 山 根 績

論文内容要旨

1. ヒトロタウィルスによる赤血球凝集反応

目 的

ウシ及びサルロタウィルスについては赤血球凝集素 (HA) 及びそれに対する特異的な赤血球凝集抑制 (HAI) 反応が存在することは知られていたが、ヒトロタウィルス (HRV) においては、これまで確認されていなかった。HRV の培養細胞での継代が可能となった要因の 1 つであるトリプシン (Tr) の作用にも着目し、培地中に Tr 添加及び無添加の条件下で増殖した HRV につき、ヒトを含めた種々の動物血球を用いて HA 反応を検索し、HRV の HA-HAI 系の解析を行ない、その血清学的意義を明らかにすることを目的とした。

材 料 と 方 法

ウィルスは下痢症患者便より MA 104 細胞を用いて分離した HRV の KUN 株 (血清型 2, 亜群 1), MO 株 (血清型 3, 亜群 2), 米国 NIH より分与された Wa 株 (血清型 1, 亜群 2) を用いた。MA 104 細胞を 10% FCS 加 Eagle の MEM で培養し、単層培養となった時、無血清 MEM 培地に置換し、翌日 Tr 存在下で増殖したウィルス液を MOI 2.5 にて接種。37°C 1 時間吸着後、PBS にて 2 回、MEM にて 1 回洗滌し、その後 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Tr を含むまたは含まない MEM にて 37°C 24 時間培養後、凍結融解、フルオロカーボン処理し、上清を被検ウィルス抗原液とした。また CsCl 密度差勾配遠心法による各々の分画につき HA 反応を試みた。同時に電顕観察を行なった。HA 反応はマイクロタイター法を用いた。0.1% ウシ血清アルブミン、0.005% ゼラチンを含むペロナール緩衝液を希釈液とした。血球はヒト O 型赤血球、モルモット、ラット、ウサギ、ウシ、アフリカミドリザルについては 0.5% 浮遊液を、ガチョウ、ニワトリ、1 日令ヒヨコについては 0.2% 浮遊液を用いた。ウィルス抗原 50 μl を 2 倍段階希釈し、各々の血球浮遊液を 50 μl 加え、4°C 60 分、室温 30 分反応の後判定した。HAI 反応を患者ペア血清、抗 Wa, MO, KUN 免疫ウサギ血清について行なった。非特異的抑制物質の除去には、カオリン法、アクリノール法、ショ糖密度差勾配遠心法を行なった。16 HAU/ ml のウィルス抗原液 25 μl を段階希釈血清 25 μl に加え、室温 1 時間反応後、0.2% 1 日令ヒヨコ固定赤血球を 50 μl 加えた。ウィルスの感染価測定は間接蛍光抗体法を行なった。一次抗体には抗 MO 免疫ウサギ血清、二次抗体には FITC 標識抗ウサギ γ G ヤギ血清を用いた。

結 果 と 考 察

Tr 未処理の Wa, KUN, MO 株のみいずれも 1 日令ヒヨコ及びガチョウ血球を凝集した。HA 価は 32~128 HAU/ ml だった。反応最適温度及び pH は 4°C, pH 6.6 だった。-PBS を

希釈液とした場合にはHA反応はみとめられなかった。CsCl 密度差勾配遠心法によりHA は二重殻構造（外殻）を有する完全粒子にのみみとめられ、ウィルス外殻にHAは存在すると思われた。Tr 未処理HRVを試験管内でTr 処理を行なうとHA 活性は減少、消失し、逆に感染性が発現し増加を示した。Tr 処理ウィルスによるウサギ免疫血清はHAI 活性を有していたが型特異性をみとめず、その中和抗体に比し低かった。またヒト回復期血清にHAI 活性はみとめず、その診断的有用性は今回の系では否定的であった。

2. ヒトロタウィルス赤血球凝集素に対する単クローン抗体

目 的

サルロタウィルスのHAはRNA第4分節の産物であるVp 3に存在し、またこの蛋白はTr によってcleavageをうける蛋白で、感染性及びTr 感受性に関しても重要視されている。また中和活性はVp 7にあるといわれていたが、単クローン抗体による検索からVp 3にHAと同時に中和活性が存在するのではないかといわれている。そこでHRVのHAの生物学的性質をさらに明らかにするためにHAI 活性を有する単クローン抗体(MAb)の作成及び検索を試みた。

材 料 と 方 法

Tr 未処理KUN株を免疫原とした。BALB/Cマウスを免疫しその脾細胞マウスミエローマ細胞株のSP 210 Ag 14とのハイブリドーマを50%ポリエチレングリコール4,000を用いて作製し、HAI 活性を有する抗体産生MAbを得た。HAI 反応は前記の方法にて、中和反応は蛍光抗体法を用い50% reductionを示す値で表わした。

結 果 及 び 考 察

screeningを行なった215クローン中3クローンがHAI 陽性を示した。それぞれの免疫グロブリンクラスはIgG 2b, IgM, IgG 3だった。培養上清のHAI 活性は免疫したKUN株特異的で、それぞれ×800, ×640, ×256だった。また同様にKUN株特異的中和活性を有しており、Tr 未処理、処理ウィルスの両方に反応した。以上の成績から、HA-HAI系を用いた新しいHRVの分類が可能となり、あわせてHA、感染性、中和間の相互関係及び生物学的意義に重要な示唆を与えるものと考えた。

審 査 結 果 の 要 旨

ヒトロタウイルス (HRV) が赤血球凝集素 (HA) 活性を有することを始めて明らかにした研究である。一般にロタウイルスの培養細胞による継代増殖はトリブシン (Tr) によって亢進する。最近確立された HRV の MA104 細胞を用いた培養増殖の際には Tr の添加が重要で、継代培養では必須である。このことから、それまでの HRV の HA の検索は Tr 処理ウイルスを用いて行われた。著者らは Tr 無添加メジウムで MA104 細胞を用いて増殖 (一段増殖) した HRV を精製し、その粒子のみが HA 活性を有し、一日ビナとガチョウ赤血球を凝集することを発見した。ヒト O 型血球、モルモット、ラット、ウサギ、ウシ、アフリカミドリザルなどの赤血球の凝集はない。血清型の異なる HRV、Wa、KUN、MO 株の HA 価は 32-128 倍であったが、Tr 処理を行うとすみやかに濃度に比例して HA 活性を消失し、逆に感染性が出現し、増加することが明らかにされた。

さらに、HRV の HA の性状を解明する目的で、HA に対する特異的単クローン抗体の作成を試み、特異的 HAI 活性を有する 3 つのハイブリドーマを得た。培養上清の HAI 活性は免疫した KUN 株特異的で、他の Wa や MO 株とは反応しない。さらに、得られた単クローン抗体は HAI 活性のみならず中和活性を有することが明らかにされた。

以上の研究内容は独創的で、HRA の HA の発見、HA の Tr 感受性と感染性との関連性の解明、さらに、HAI 活性を有する単クローン抗体の作成と、その中和活性の証明などいずれも著者独自の業績であり、得られた成績は HRV の血清学的、ウイルス学的性状解明に重要であるのみでなく、HRV の予防、ワクチン開発に重要な示唆を与えるものと思われる。従って、本研究は学位授与に相当するものである。