

学 位 論 文 題 名

Mycoplasma hyopneumoniae の種特異抗原に関する研究

学位論文内容の要旨

豚マイコプラズマ肺炎は *Mycoplasma hyopneumoniae* によって惹起される代表的な豚の慢性呼吸器病である。本病は世界中に蔓延しており致死率は高くないものの、飼料効率の低下などにより甚大な経済的損失を養豚産業に与えている。従って、*M. hyopneumoniae* が本病の病原体として分離同定されて以来、診断法および予防法に関して世界中で研究されてきたが、未だ有効な方法が確立されていないのが現状である。この原因として、1) 本菌の培養がきわめて難しく、分離同定に長期間を要する、2) *in vitro* で培養するためには20%の血清の添加が必要で、集菌された菌体成分には培地成分の汚染が著しく、抗原分析が容易でない、3) 豚由来マイコプラズマ間の共通抗原性に起因する非特異反応の為に特異的な血清学的診断法を確立するのが難しい、などの点があげられる。

本研究では *M. hyopneumoniae* の特異的な抗原成分の特定と診断法および予防法への応用を目的として、本菌の抗原分析、*M. hyopneumoniae* 実験染豚の抗体応答の解析および本菌に対するモノクローナル抗体作出とその応用法について検討した。

Tween 20で可溶化された *M. hyopneumoniae* 成分の抗原性をウエスタンブロット法により解析した結果、分子量約96キログルトン (Kd)、76Kd、74Kd、70Kd、53Kd、46Kd、38Kd および34Kd の菌体成分が主要な抗原として豚に認識されることを明らかにした。また、これらの *M. hyopneumoniae* 抗原の中で74Kd と53Kd の2種類の抗原が他の豚由来マイコプラズマと交差反応性を有することも明らかにした。さらに、*M. hyopneumoniae* 実験感染豚における抗体応答の経時的分析において、感染豚は *M. hyopneumoniae* の76Kd と46Kd 抗原に対して強い抗体応答を示し、特に46Kd 抗原は *M. hyopneumoniae* の菌体表面に存在する抗原成分の中で最も強い免疫原性を有する特異抗原であることを明らかにした。次に、*M. hyopneumoniae* の種々の抗原に対するモノクローナル抗体の作製を試み、*M. hyopneumoniae* 46Kd 抗原に対するモノクローナル抗体の他に、*M. hyopneumoniae* を特異的に凝集するばかりでなく、その

発育を阻止するモノクローナル抗体の作出に成功した。この発育阻止抗体が認識する抗原は、免疫電顕法による解析、蛋白分解酵素処理および過ヨウ素酸処理、あるいはレクチンとの反応などから、*M. hyopneumoniae* の菌体表面の糖蛋白様物質であることが示唆された。さらに、*M. hyopneumoniae* 46Kd 抗原に対するモノクローナル抗体を用いたダブルサンドイッチ ELISA により本抗原に対する抗体のみを検出する特異性の高い血清学的診断法を開発した。一方、*M. hyopneumoniae* 凝集モノクローナル抗体を用いた分離菌株の簡易迅速同定法も確立した。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	清 水 悠紀臣
副 査	教 授	波 岡 茂 郎
副 査	教 授	橋 本 信 夫
副 査	教 授	小 沼 操

豚マイコプラズマ肺炎は、*Mycoplasma hyopneumoniae* による豚の慢性呼吸器病で、世界各国の豚の間に最も広く分布している感染病である。本病の致死率は高くないが、飼料効率の低下や二次感染の誘発等で養豚産業に甚大な被害を与えている。本病の診断及び予防法の開発に関しては世界中で精力的な研究が行われているにもかかわらず、未だ信頼できる方法が確立されていない。申請者は本病の診断法と予防法を開発するための基礎研究として、*M. hyopneumoniae* の抗原分析、実験感染豚の抗体応答、モノクローナル抗体の作出とその応用等について検討した。本論文は和文57頁から成り、参考論文5編を付している。

申請者はまず *M. hyopneumoniae* 菌体を Tween 20で可溶化し、菌体成分の抗原性をウェスタンブロット法によって調べた。その結果、分子量約96キログルトン(Kd)のほか、76、74、70、53、46、38、34Kd の分子量の菌体成分が主要抗原として存在し、感染豚はそれらの抗原を認識し免疫応答を起こしていることを明らかにした。またこれらの抗原の中で74および53Kd の2種類の抗原は他の豚由来のマイコプラズマと交差反応性を有し非特異反応の原因となっていることも明らかにした。

次に申請者は *M. hyopneumoniae* を実験感染させた豚の抗体応答を経時的に観察した結果、76Kd と46Kd 抗原に対して強い免疫応答を認め、なかでも菌体表面に存在する46Kd 抗原に対しては特に強い免疫応答を認めたことから、これは主要な免疫原性を有する特異抗原であると考

えた。

一方、申請者は *M. hyopneumoniae* の種々の抗原に対するモノクローナル抗体を作出し、そのなかの46Kd 抗原に対するモノクローナル抗体を用いてダブルサンドイッチ ELISA 法による特異抗体の検出について検討し、*M. hyopneumoniae* 感染豚摘出のための特異性の高い血清診断法を開発した。またこれとは別の *M. hyopneumoniae* を特異的に凝集するばかりでなく、発育阻止効果を示すモノクローナル抗体は免疫電顕法、蛋白分解酵素および過ヨウ素酸処理、レクチンとの反応性等の結果から *M. hyopneumoniae* の菌体表面に存在する糖蛋白様物質を認識することを明らかにした。この抗体の反応によって分離菌株の簡易迅速同定が可能となった。

以上の実験成績によって、申請者は *M. hyopneumoniae* の抗原の種類とそのなかで非特異反応の原因となる抗原を明らかにし、感染豚に対して最も強い免疫を誘導する特異抗原は46Kd 抗原であると決定した。これら *M. hyopneumoniae* の抗原に関する基礎的知見を基に、モノクローナル抗体の作出を試み、従来、非特異反応が原因となって開発が困難とされてきた、感染豚摘出のための血清診断法と分離菌株の簡易迅速同定法の確立に成功した。これらの研究によって養豚産業の最大の障害である豚マイコプラズマ肺炎の特異的血清診断が可能となり、本病の制圧と予防法開発への道が大きく拓かれた。よって審査員一同は森康行氏が博士（獣医学）の学位を受けるに十分な資格を有すると認めた。