

学 位 論 文 題 名

Induction of antibodies against pathogenic microbes
with anti-idiotypic antibodies

(抗イディオタイプ抗体による病原微生物に対する抗体の誘導)

学位論文内容の要旨

免疫ネットワーク仮説によれば、生体の免疫反応の調節は、イディオタイプ (Id) - 抗 Id の複雑な細胞間相互作用によって恒常性が維持されており、抗体のイディオトープがパラトープ内にあった場合、これに対する抗 Id 抗体はパラトープと相補的構造を持ち、パラトープが特異的に結合する抗原エピトープと相同あるいは類似構造「インターナルイメージ」を持つことになると考えられている。この仮説によれば、B および T リンパ球は抗 Id 抗体によって外来抗原を投与することなく病原微生物に対する免疫を誘導することを示唆しており、現在では、Id 操作をすることによって細菌、原虫およびウイルスに対する液性・細胞性免疫を誘導することができるという実験成績が報告されつつある。したがって、病原微生物の防御抗原に対する抗体によってインターナルイメージを持つ抗 Id 抗体を誘導し得れば、抗原の代用として抗体分子を使用することができ、安全性および特異性の高い新しいタイプのワクチンとして感染症予防に用いることも可能と思われる。そこで、申請者は、新しいタイプの Id ワクチンの開発を目的とし、抗 Id 抗体による病原微生物に対する免疫誘導の検討を進めた。

最初に、ニューカッスル病ウイルス (NDV) の防御抗原であるヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ (HN) に対するモノクローナル抗体 (MAb) を用いて抗 Id 抗体を誘導し、この抗 Id 抗体による同系マウスとニワトリにおける抗・抗 Id 抗体 (抗ウイルス抗体) を誘導することによって抗ウイルス病ワクチンの開発の可能性を検討した。まず、精製 MAb とリポ多糖体 (LPS) を共重合し、マウスに免疫することにより抗 Id 抗体の誘導を試みた。その結果、接種量、接種回数に比例し血清中の抗 Id 抗体価は上昇し、ウイルスと MAb の結合反応は、抗 Id 抗体によってほぼ 100% 阻害された。また、抗 Id 抗体と MAb との結合反応は、ウイルスと MAb 結合反応を阻害する活性を持つウサギ、ニワトリおよびマウスの抗 NDV 血清によって阻害された。この結果から、抗 Id 抗体中には NDV 抗原のインターナルイメージが存在することが明らかと

なった。さらに、精製ポリクロナール抗 Id 抗体の免疫により抗・抗 Id 抗体の誘導を試みた。その結果、誘導された抗・抗 Id 血清中には、NDV のヘマグルニチン (HA) に対する抗体が検出された。以上のように、MAb-LPS 重合物の接種によって同系抗 Id 抗体を容易に誘導でき、この抗 Id 抗体の免疫によって誘導された抗・抗 Id 抗体中には、抗 NDV 抗体が検出されることが明らかとなった。次に抗 Id 抗体で免疫したニワトリにおける防御効果を検討した。その結果、5 羽中 3 羽に抗 NDV 抗体 (HI 抗体) が検出され、これらの 3 羽のうち 2 羽が強毒 NDV の攻撃に対して防御した。このことから、抗 Id 抗体で NDV に対する免疫を誘導することにより防御効果が得られることが明らかとなった。

次に、牛の小型ピロプラズマ病の病原寄生体である *Theileria sergenti* (*T. sergenti*) 膜表面 32 キロダルトン蛋白質 (P 32) に対するマウス MAb を用いてモノクローナル抗 Id 抗体を作出し、マウス及び牛における抗 Id 抗体の免疫による抗・抗 Id 抗体 (抗原虫抗体) の誘導と抗原虫病ワクチン開発の可能性について検討を行った。まず、細胞融合により、*T. sergenti* の P 32 に対する MAb (Ts-MAb) のパレートに対するモノクローナル抗 Id 抗体産生ハイブリドーマを得た。間接蛍光抗体法 (IFA) により 3 株のハイブリドーマ (1E1, 4C4, 4F11) の産生する抗体が、*T. sergenti* 抗原に対するインターナルイメージを保持していることが確認された。これらのハイブリドーマが産生する抗 Id 抗体は、*T. sergenti* と Ts-MAb の結合反応を 100% 阻害した。また、抗 Id 抗体と Ts-MAb の結合反応は、*T. sergenti* と Ts-MAb との結合反応を阻害する活性を持つウシおよびマウスの抗 *T. sergenti* 血清によって阻害された。この結果から、これらの抗 Id 抗体中には P 32 抗原のインターナルイメージが存在することが明らかとなった。また、精製抗 Id 抗体と油性アジュバントを調製し、マウスに免疫することにより抗・抗 Id 抗体の誘導を試みた。その結果、誘導された抗・抗 Id 抗体血清中には、*T. sergenti* に対する抗体が検出され、いずれの抗 Id 抗体においても接種回数に比例して抗・抗 Id 抗体価は上昇することが明らかとなった。次に、精製 Fab-fragment (1E1) 抗体と油性アジュバントを調製し、牛に免疫することにより抗・抗 Id 抗体の誘導を試みた。その結果、誘導された抗・抗 Id 抗体血清中には *T. sergenti* に対する抗体が検出され、接種回数に比例して抗・抗 Id 抗体価は上昇することが明らかとなった。最も高い抗体価を示した 1 頭の牛に対し、*T. sergenti* 感染血液を静脈内接種で攻撃したが十分な発症防御効果は認められなかった。以上のように、試作した Id ワクチンの防御効果能については不十分であったが、細胞融合により作出されたモノクローナル抗 Id 抗体中にはインターナルイメージが含まれ、この抗体の免疫によって誘導された抗・抗 Id 抗体中には、抗 *T. sergenti* 抗体が検出され、生体における Id-抗 Id 反応による免

疫ネットワークが働いていることが明らかとなった。

今回の実験は、ウイルス抗原や原虫抗原に対する MAb を用いて、抗 Id 抗体を誘導し、そのインターナルイメージを用いて Id 操作することによって病原微生物に対する抗体産生を誘導した。NDV の感染防御において、抗 Id 抗体で誘導した抗体で防御効果が得られることが明らかとなったが、*T. sergenti* 感染防御においては、誘導した抗体のみでは防御は困難であり、防御には細胞性免疫の関与も示唆された。

抗 Id 抗体を外来抗原の代用として使用するこの方法は、今までにない全く新しいタイプの Id ワクチン開発の基礎的、実験的モデルとなりうるものであり、安全性および特異性の高いワクチンとして病原微生物の感染防御機構の解明するうえでも、その有用性が明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	小 沼	操
副 査	教 授	清 水	悠紀臣
副 査	教 授	佐 藤	文 昭
副 査	助教授	杉 本	千 尋

免疫ネットワーク仮説によれば、生体の免疫反応の調節は、イディオタイプ (Id) - 抗 Id の複雑な細胞間相互作用によって恒常性が維持されており、抗体のイディオトープがパラトープ内にあった場合、これに対する抗 Id 抗体はパラトープと相補的構造を持ち、パラトープが特異的に結合する抗原エピトープと相同あるいは類似の構造、インターナルイメージを持つことになると考えられている。したがって、病原微生物の防御抗原に対する抗体の免疫によりインターナルイメージを持つ抗 Id 抗体を誘導し得れば、抗原の代用として抗体分子を使用することができ、安全でかつ特異性の高い新しいタイプのワクチンとして用いることも可能である。

申請者は、新しいタイプの Id ワクチンの開発を目的とし、抗 Id 抗体による病原微生物に対する免疫誘導を検討し、本論文にまとめた。本論文は英文48頁からなり、参考論文12編を付している。

最初に、ニューカッスル病ウイルス (NDV) の防御抗原であるヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ蛋白に対するモノクローナル抗体 (MAb) を用いて抗 Id 抗体を誘導し、この抗 Id 抗体

による同系マウスとニワトリにおける抗・抗 Id 抗体（抗ウイルス抗体）を誘導することによって抗ウイルス病ワクチンの開発の可能性を検討した。まず、精製 MAb とリポ多糖体（LPS）を共重合し、マウスに免疫することにより抗 Id 抗体の誘導を試みた。その結果、接種量、接種回数に比例し血清中の抗 Id 抗体価は上昇し、ウイルスと MAb の結合反応は、抗 Id 抗体によってほぼ100%阻害された。また、抗 Id 抗体と MAb との結合反応は、ウイルスと MAb 結合反応を阻害する活性を持つウサギ、ニワトリおよびマウスの抗 NDV 血清によって阻害された。この結果から、抗 Id 抗体中には NDV 抗原のインターナルイメージが存在することが明らかとなった。さらに、精製ポリクロナール抗 Id 抗体の面により抗・抗 Id 抗体の誘導を試みた。その結果、誘導された抗・抗 Id 血清中には、NDV のヘマグルニチン（HA）に対する抗体が検出された。以上のように、MAb-LPS 重合物の接種によって抗 Id 抗体を容易に誘導でき、この抗 Id 抗体の免疫によって誘導された抗・抗 Id 抗体中には、抗 NDV 抗体が検出されることが明らかとなった。そこで抗 Id 抗体で免疫したニワトリにおける防御効果を検討した。その結果、5羽中3羽に抗 NDV 抗体（HI 抗体）が検出され、これらの3羽のうち2羽が強毒 NDV の攻撃に対して防御した。このことから、抗 Id 抗体で NDV に対する免疫を誘導することにより防御効果が得られることが明らかとなった。

次に、牛の小型ピロプラズマ病の病原体である *Theileria sergenti* (*T. sergenti*) を用い、抗 Id 抗体による抗原虫病ワクチン開発の可能性について検討を行った。まず、細胞融合により、*T. sergenti* 表面の32キロダルトン蛋白質（P32）に対する MAb（Ts-MAb）のパラトープに対するモノクローナル抗 Id 抗体産生ハイブリドーマを得た。間接蛍光抗体法により3株のハイブリドーマ（1E1, 4C4, 4F11）の産生する抗体が、*T. sergenti* 抗原に対するインターナルイメージを保持していることが確認された。これらのハイブリドーマが産生する抗 Id 抗体は、*T. sergenti* と Ts-MAb の結合反応を100%阻害した。また、抗 Id 抗体と Ts-MAb の結合反応は、*T. sergenti* と Ts-MAb との結合反応を阻害する活性を持つウシおよびマウスの抗 *T. sergenti* 血清によって阻害された。この結果から、これらの抗 Id 抗体中にはP32抗原のインターナルイメージが存在することが明らかとなった。また、精製抗 Id 抗体と油性アジュバントでマウスに免疫することにより抗・抗 Id 抗体の誘導された。誘導された誘導された抗・抗 Id 抗体血清中には、*T. sergenti* に対する抗体が検出され、抗・抗 Id 抗体価は、接種回数に比例して上昇した。精製 Fab-fragment（1E1）抗体と油性アジュバントを調製し、牛に免疫したところ、抗 Id 抗体が誘導され、その血清中には *T. sergenti* に対する抗体が検出された。抗 Id 抗体価は、抗 Id 抗体の接種回数に比例して上昇した。最も高い抗体価を示した1頭のウシに対し、

T. sergenti 感染血液を静脈内接種で攻撃したが十分な発症防御効果は認められなかった。
T. sergenti 感染防御試験においては、誘導した抗体のみでは防御は困難であり、防御には細胞性免疫の関与も示唆された。

以上の成績は、ウイルス抗原や原虫抗原に対する MAb を用いて、抗 Id 抗体を誘導し、そのインターナルイメージを用いて Id 操作することによって病原微生物に対する抗体産生を誘導できることを示している。この研究は、抗 Id 抗体を微生物抗原の代用として使用する全く新しいタイプの Id ワクチン開発にとって重要な知見を提供するものである。よって審査員一同は、田中雅之氏が博士（獣医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。