

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 SILA-ON Daorung

論 文 題 目

Study on Immunological Detection of Swine Influenza Virus

Using Rabbit Monoclonal Antibody

(ウサギモノクローナル抗体を用いた Swine Influenza Virus の免疫  
検出に関する研究)

論文審査担当者

主 査 名古屋大学教授 中野 秀雄

委 員 名古屋大学教授 北島 健

委 員 名古屋大学教授 大蔵 聡

委 員 名古屋大学准教授 岩崎 雄吾

委 員 名古屋大学講師 兒島 孝明

## 論文審査の結果の要旨

Sila-on Daorungは、単一B細胞からPCRと無細胞タンパク質合成系により、モノクローナル抗体を作製する手法であるEcobody技術を用いて、Swine Influenza Virusに対するウサギモノクローナル抗体を作製し、同ウイルスに対する免疫検出系の開発を行った。以下にその要旨を記載する。

サンドイッチ酵素免疫測定法 (Sandwich-ELISA) は、固定化抗体と検出抗体とで抗原を挟んで検出する免疫測定法である。特異性や感度に優れ、唾液、粘液、尿またはその他の分泌物などのサンプルに含まれる抗原を検出できるため、ヒトおよび動物の病原性疾患の標準的な診断法として幅広く用いられている。実用化されている同キットのほとんどは、固定化と検出抗体として、それぞれモノクローナル抗体 (mAb) とポリクローナル抗体と (pAb) を用いている。しかしながら、pAbの使用は、交差反応の増大がおりやすく、また pAb 製造の再現性が悪いという欠点がある。そのため常に性能が一定している mAb を両方に用いる Dual mAb Sandwich ELISA が望まれているが、mAb 作製技術として一般的なハイブリドーマ法では、2種類の動物種から mAb を作らなければならない、実現性は極めて低かった。

Ecobody 技術は、単一 B 細胞から抗体遺伝子を増幅し、無細胞タンパク質合成系を用いて抗原結合断片 (Fab) 抗体として合成するシステムであり、用いる動物種を問わず、迅速に Fab を取得できるという特徴がある。学位申請者は、この Ecobody 技術を用いて Dual mAb Sandwich ELISA を構築することを試みた。検出対象として、畜産業に多大な経済的損失を引き起こすだけでなく、ヒトに伝染する可能性のある豚インフルエンザウイルス (SIV) を選び、マウスよりも特異性の高い抗体を作製できるウサギから mAb を使用した検出系の開発を目指した。

まず、抗原特異的 B 細胞を産生するために、SIV ワクチンをウサギに免疫し、抗体価が上昇したことを確認した後、その末梢血から SIV に結合する B 細胞を、磁気ビーズを用いて細胞マイクロピッカーにより単離した。各細胞の免疫グロブリン mRNA を RT-PCR および PCR で個別に増幅し、得られた DNA に T7 プロモーターおよび T7 ターミネーターを付加することで、大腸菌の無細胞タンパク質合成系 (CFPS) で発現可能な抗原結合断片 (Fab) 遺伝子を PCR により構築した。CFPS で合成された Fab の結合活性を ELISA によって測定したところ、取得した 55 種類の Fab のすべてが、SIV に対して結合活性を有することを示した。

Sandwich-ELISA では、2つの抗体によって抗原を捕捉するため、固定化抗体および検出抗体として2つの抗体が必要であり、またそれらが別個の分子として認識されなければならない。そこで同じ Fab 遺伝子に対して2つの異なるペプチドタグ、6xHis タグと PA タグをコードする DNA 断片を PCR により結合し、CFPS を持ちいて Fab-6x His と Fab-PA の2種類の Fab タンパク質を調製した。固定化と検出

でどちらのタグを付加した Fab を用いるべきかを mAb sandwich-ELISA で調べ、検出用として Fab-PA、固定化用として Fab-6xHis の組み合わせが最適であることを示した。さらに 4 種の Fab-6xHis と 4 種の Fab-PA を組み合わせて、mAb sandwich-ELISA の系で、最も低濃度の SIV を検出できる Fab のペアを選択した。

次に検出感度を高めるため、固定化される Fab 量の増大と Fab の精製を試みた。CFPS により Fab を合成し、それぞれのタグに対するアフィニティーを利用して部分精製をおこなった。最適な Fab ペアを使用した mAb サンドイッチ ELISA では、最終的に 0.5 ng の SIV が検出できるアッセイ系を構築した。この検出限界の値は、固定化抗体および検出抗体として、HRP 標識抗 SIV 核タンパク質マウス mAb とウサギ pAb を用いて構築された Sandwich-ELISA の検出限界と、ほぼ同等であった。

Ecobody テクノロジーによって探索・合成したウサギ Fab は、Dual mAb Sandwich-ELISA 免疫検出キットの作製に適用できることを示した。確立した手法は、ウサギの免疫確立から非常に短時間でアッセイ系の確立が可能であり、パンデミック対策としても有望である。また一度構築すれば安定して再生産可能である他、アッセイキット構築のために犠牲となる動物の頭数も僅かであるなど、従来法に比べて様々な利点がある。

以上のように Sila-on Daorung は、従来とは全く異なる手法でウサギモノクローナル抗体の作出と合成を行い、それを SIV 検出キット作製に応用することに成功した。

本研究によって得られた成果は、今後の抗体の科学およびその応用技術に寄与するところが大きい。よって本委員会は本論分が博士(農学)の学論文として十分価値あるものと認め、論文審査に合格と判定した。