



モノクロナール抗体による日本住血吸虫の虫卵周囲沈降反応に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-23 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小林, 富美恵 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1308

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 31号	学位授与年月日	昭和62年10月16日
氏 名	小 林 富美恵		
論文題目	モノクロナール抗体による日本在血吸虫の虫卵周囲沈降反応に関する研究		

論文の内容の要旨

〔目的〕

虫卵周囲沈降(COP)反応は、住血吸虫感染患者血清と住血吸虫卵との保温によりその卵殻周囲に生ずる沈降反応である。住血吸虫症における主要な障害は、虫卵の宿主組織内介在による肉芽腫形成によるものであることから、虫卵に含まれる種々の抗原物質の生化学的性状や免疫学的特異性を明らかにすることは、本症の発症機序を解明する上で極めて重要である。特に、COP反応に関与する抗原についての研究は、上記の他に、免疫診断学的に有用な抗原に関する情報をも与え得ると思われる。そこで本研究では、COP反応に関与する抗原の性状を明らかにする目的で、日本住血吸虫卵に対してCOP反応を起こすモノクローナル抗体を作製し、その標的抗原の性状解析を行った。

〔方法〕

日本住血吸虫の可溶性虫卵抗原を免疫したマウスの脾細胞と、マウスミエローマ細胞(NS-1)との細胞融合により、日本住血吸虫卵に対してCOP反応が陽性である4種のモノクローナル抗体—1C3(IgM)、2B8(IgG1)、2C4(IgG3)、3D10(IgM)—を作製し、実験に用いた。COP反応では、虫卵懸濁液にモノクローナル抗体を加え、37℃で24-96時間保温後、卵殻周囲の沈降物を観察した。モノクローナル抗体の性状の解析はオクタロニー法、酵素抗体法(ELISA)で行い、標的抗原の性状は、SDS電気泳動法、immunoblot法、inhibition-ELISA法、および、蛍光抗体法により解析した。また、標的抗原の特異性を調べるために、日本住血吸虫の虫卵抗原、ミランジウム抗原、ふ化液、成虫抗原の他、マノンソン住血吸虫の虫卵抗原、成虫抗原を調製し、実験に用いた。

〔結果〕

得られた4種のモノクローナル抗体は、日本住血吸虫に対するCOP反応で強い活性を示した。これらのうち2B8、2C4抗体についてinhibition-ELISA法で解析するとそれらの標的抗原は、虫卵内容がミランジウムにまで发育した成熟虫卵に含まれておりミランジウムとふ化液の双方に存在するが、特に、ふ化液での抗原濃度がより高いことが明らかとなった。また、日本住血吸虫の雌成虫、雄成虫には、いずれにも、これらの標的抗原と交叉する成分は含まれていなかったが、マノンソン住血吸虫の虫卵抗原には強い交叉反応性が認められ、その成虫抗原にも交叉反応性が認められた。一方、これらの2B8、2C4抗体が認識する日本住血吸虫卵中の抗原は、いずれも、分子量145,000で、ConA吸着性の糖タンパク質であった。間接蛍光抗体法による標的抗原の局在性の解析では、特に、虫卵内のミランジウムと卵殻の間に強い蛍光が認められ、ミランジウム内では局所的な蛍光が多く認められた。

〔考察〕

2B8、2C4抗体が認識する標的抗原は、日本住血吸虫の成熟虫卵に含まれていたが、成虫には雌雄のいずれにも存在しなかった。雌成虫はその体内に未成熟虫卵を内蔵することから、標的抗原は産卵後の虫卵に発現される物質であると考えられる。また、蛍光抗体法でミランジウム—卵殻間に認められた強い反応や、ふ化液における高濃度分布は、これらの標的抗原が分泌性抗原であり、感染宿主体内での虫卵性病変に関与する可能性を示唆した。さらに、これらの標的抗原は、Tracy & Mahmoudによって肺肉芽腫形成モデル実験法を用いて同定された病理関連抗原(gpl)に、その分子量およびPAS染色性が極めて類似しており、おそらく同一物質であろうと考えられた。これらCOP反応陽性のモノクローナル抗体は、日本住血吸虫症における病理関連抗原の精製・同定に有用である他、肉芽腫形成・退縮機構の解明に役立つ可能性があると思われる。

論文審査の結果の要旨

住血吸虫症の診断法のなかでも、虫卵周囲沈降(circumoval precipitin; COP)反応は簡便性と特異性が高い免疫血清学的診断法として広く応用されている。しかし、この反応を惹起する抗原の物理化学的性状と特異性および組織内での虫卵性肉芽腫形成との関連性などについては十分な知見が得られていないところである。

そこで、本申請者は、COP関連抗原を認識するモノクローナル抗体(mAb)を作製し、それを用いてCOP関連抗原の性状を解析しようとした。

まず、日本住血吸虫(*Schistosoma japonicum*; Sj)の虫卵の可溶性抗原により、BALB/cマウスを過免疫し、その脾細胞とNS-1ミエローマ細胞とのハイブリドーマを作製し、虫卵抗原に対しCOP反応を起こす抗体を産生するクローンを選別し、4種類のmAb, 1C3(IgM), 2B8(IgG₁), 2C4(IgG₃), 3D10(IgM)を得た。これらのmAbと各種の住血吸虫抗原を用いて、COP反応, SDS-電気泳動, 酵素抗体法(ELISA), inhibition-ELISA, Immunoblot法, 蛍光抗体法により抗体の性状, 対応抗原の性状と特異性および局在性などを解析し、次のような結果を得た。

1. 2B8と2C4はSjの虫卵と強いCOP反応を起こした。
2. 両mAbの認識する対応抗原は、いずれもSjの成熟虫卵内の孵化液に高濃度に認められた。分子量はいずれも145,000ダルトンでConA吸着性糖蛋白質であった。
3. 対応抗原は、Sj感染マウス肝内の虫卵では、卵殻とミラシジウムの間の領域およびミラシジウム内では穿刺腺に分化する腺構造に選択的に局在した。
4. inhibitory ELISAにおける結合阻止活性は、同種雄と雌成虫抗原には認められない。しかし、マンソン住血吸虫抗原と同虫卵可溶性抗原に認められ、その交叉反応性が示唆された。

以上の論文内容に対して質疑応答がなされた結果、次のような本論文の特徴、評価点および問題点が指摘された。

1. 申請者が本研究で用いた材料と方法は研究目的を解明する上で、おおむね適切である。
2. Sjの虫卵とCOP反応に関連する抗原を特異的に認識するmAb(とくに2B8, 2C4)を作成することに成功し、それを用いて対応抗原の性状と局在性を明らかにしたことは、COP反応の発現と肉芽腫形成・退縮の機序を解明する上で基礎的情報を提供するとともに、今後の研究の発展が期待されるものとして高く評価された。
3. しかし、次のような若干の問題点が指摘された。
 - 1) 既報のCOP関連抗原(7 week antigen, gp1など)との性状の異同を明確にすべきである。
 - 2) 2B8あるいは2C4と他の各種住血吸虫抗原との交叉反応性を検索し、種特異性か虫卵の穿刺腺分泌因子特異性かを明確にする。
 - 3) 虫卵の成熟過程における対応抗原のエピトープの構成、特にエピトープに関連する糖鎖構造を明らかにする。
 - 4) COP反応における型分類の意味を明らかにする。
 - 5) mAbの虫卵前処置による肉芽腫形成阻止の検索。

以上の問題点に対して申請者はおおむね適切な解答をおこない、残された問題については今後さらに追及する旨の解答がなされた。

以上の審査の結果、本審査委員会は本論文が学位授与に値する十分な内容をそなえているものと、全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	教授	山下	昭			
	副査	教授	菅野	剛史	副査	教授	佐野基人
	副査	教授	西村	頤治	副査	講師	池田靖