

インフルエンザウイルスに対するダチョウ抗体作製 と有効利用への試み



大阪府立大学・獣医解剖学教室
足立和英、高間健太郎、尾崎真由美、
福田恵子、遠藤惟佐子、塚本康浩

ウイルスの不活化に抗体を利用する方法

メリット

化学的な方法に比べて安全性が高い。
物理的な方法に比べて特異性の高い。
即効性に優れている。

特定のウイルスを瞬時に不活化できる。

デメリット

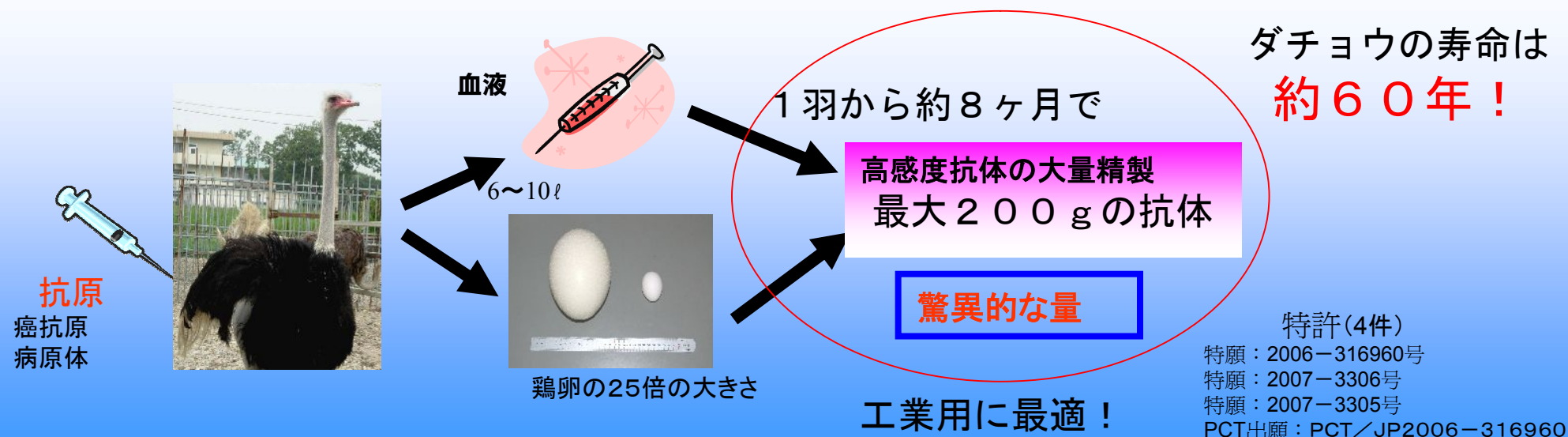
抗体は従来の製法では高価。

工業的な利用には適さない。

“ダチョウ”を用いて安価で大量生産が容易な抗体作製法の開発

ダチョウ抗体のメリット

- ◆ 哺乳類と遺伝的にかけ離れているため、これまで開発不可能であった抗体が作製可能
- ◆ 血液とタマゴから大量の抗体が採取可能(特に卵黄1個からIgY2gの回収が可能)
- ◆ 超高感度
- ◆ 生産コストが低い(私たちは産業廃棄物であるモヤシで飼育しています)



抗インフルエンザ抗体大量作製法の開発

① インフルエンザウイルスHA抗原の免疫

A型 : A/ニューカレドニア/20/99(H1N1)

A/広島/52/2005(H3N2)

B型 : B/マレーシア/2506/2004

H5リコンビナントタンパク(H5N1ベトナム株)

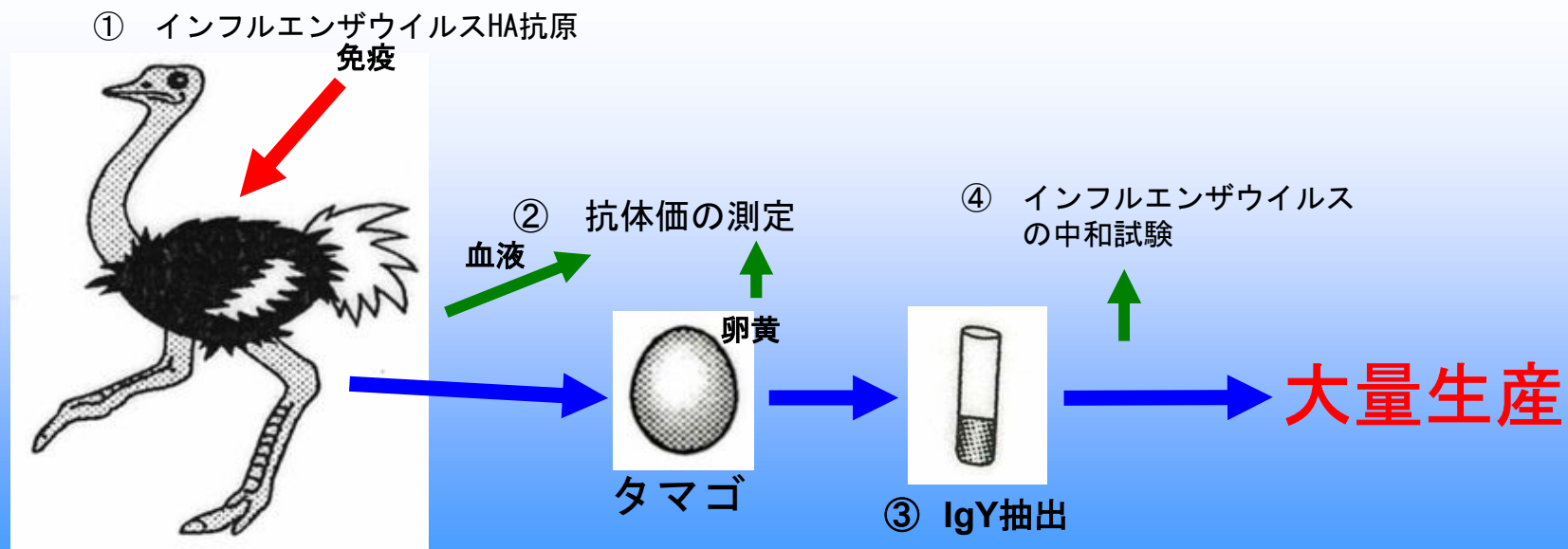
② 血液・卵黄中の抗体価の測定

ELISA

寒天ゲル内沈降反応

③ IgYの大量抽出

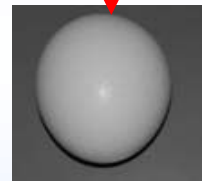
④ インフルエンザウイルスの中和試験



方法と結果



メスのダチョウ



タマゴ

卵黄液の採取

インフルエンザHA抗原

- ・A/ニューカレドニア/20/99(H1N1) 30 μ g
- ・A/広島/52/2005(H3N2) 30 μ g
- ・B/マレーシア/2506/2004 30 μ g

H5リコンビナントタンパク

- ・H5N1(ベトナム株由来) 50 μ g

隔週免疫した

血液

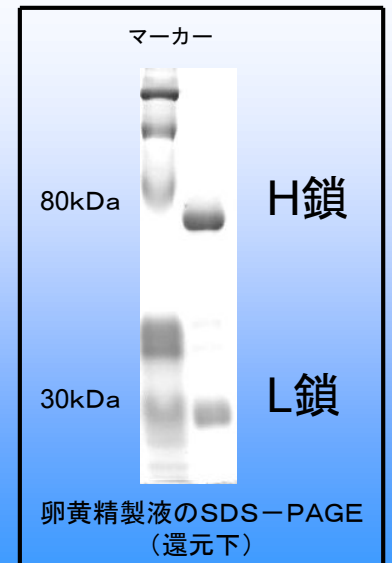


抗体価のチェック
ELISA ゲル沈

1個の卵黄から2gの
ダチョウIgYを精製

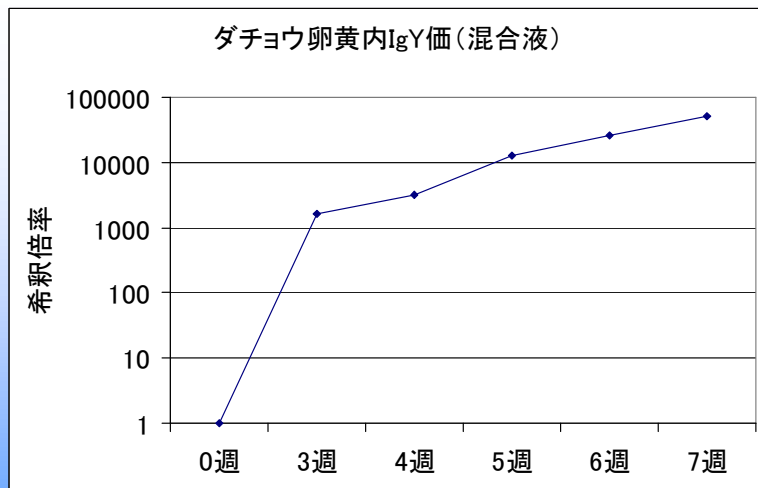
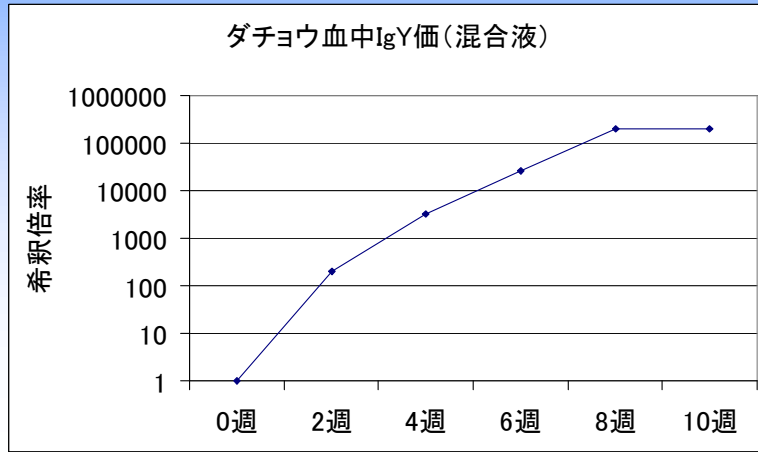


IgYの精製
脱塩・濃縮



抗ヒトインフルエンザ・ダチョウ抗体力価

ELISA 3種混合



ゲル沈

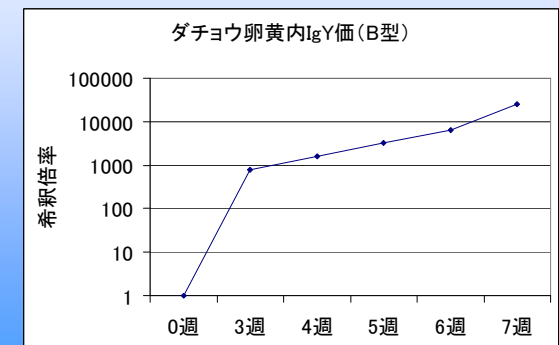
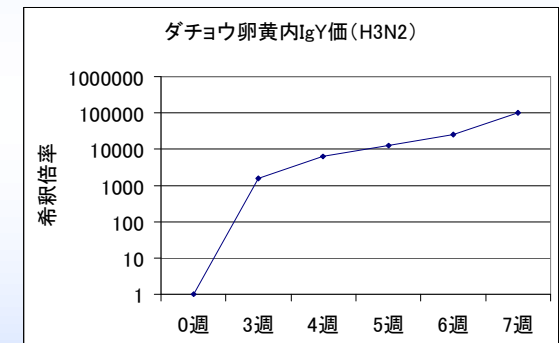
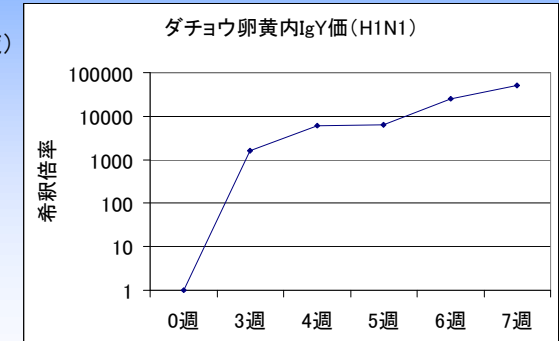


- 1: 抗原(混合液)
- 2: PBS
- 3: 0週目血清
- 4: 2週目血清
- 5: 4週目血清
- 6: 6週目血清
- 7: 8週目血清



- 1: 抗原(混合液)
- 2: PBS
- 3: 0週目卵黄IgY
- 4: 3週目卵黄IgY
- 5: 4週目卵黄IgY
- 6: 5週目卵黄IgY
- 7: 6週目卵黄IgY

ELISA A型 (H1、H3) B型

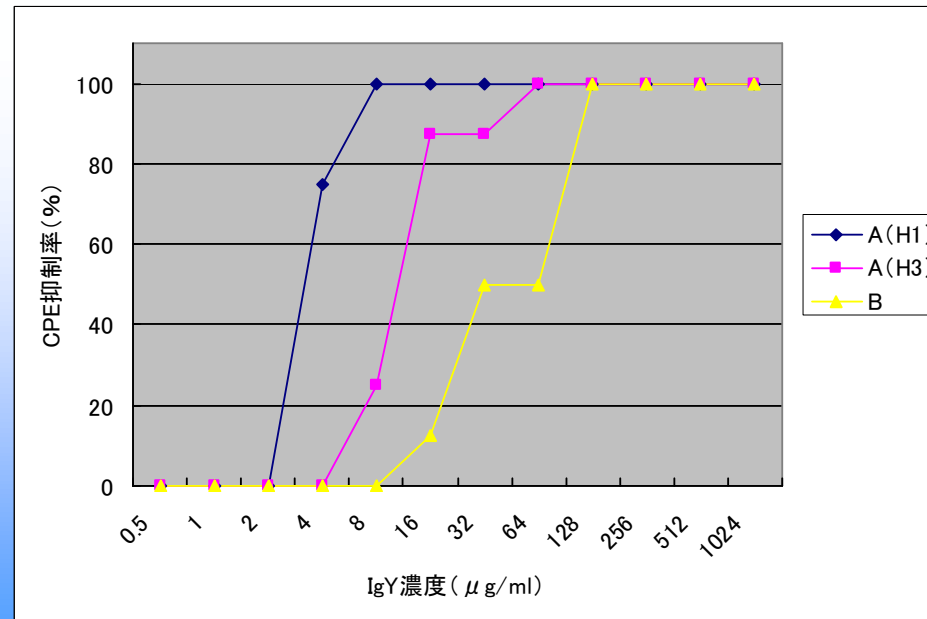


抗ヒトインフルエンザ・ダチョウ抗体中和試験 (MDCK培養細胞)

CPE発現数

IgY濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	50%感染抑制
A(H1) [CPE/well]	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	2/8	8/8	8/8	8/8	<u>2.64 $\mu\text{g/ml}$</u>
A(H3) [CPE/well]	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	1/8	1/8	6/8	8/8	8/8	8/8	8/8	<u>8.88 $\mu\text{g/ml}$</u>
B [CPE/well]	0/8	0/8	0/8	0/8	4/8	4/8	7/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	<u>32.56 $\mu\text{g/ml}$</u>

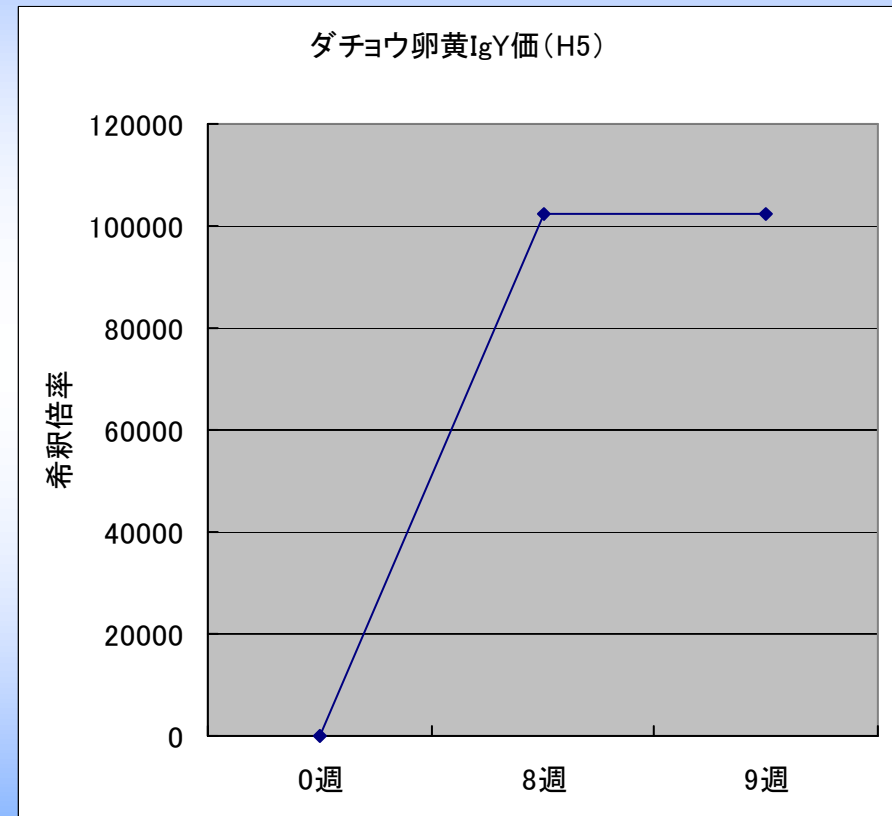
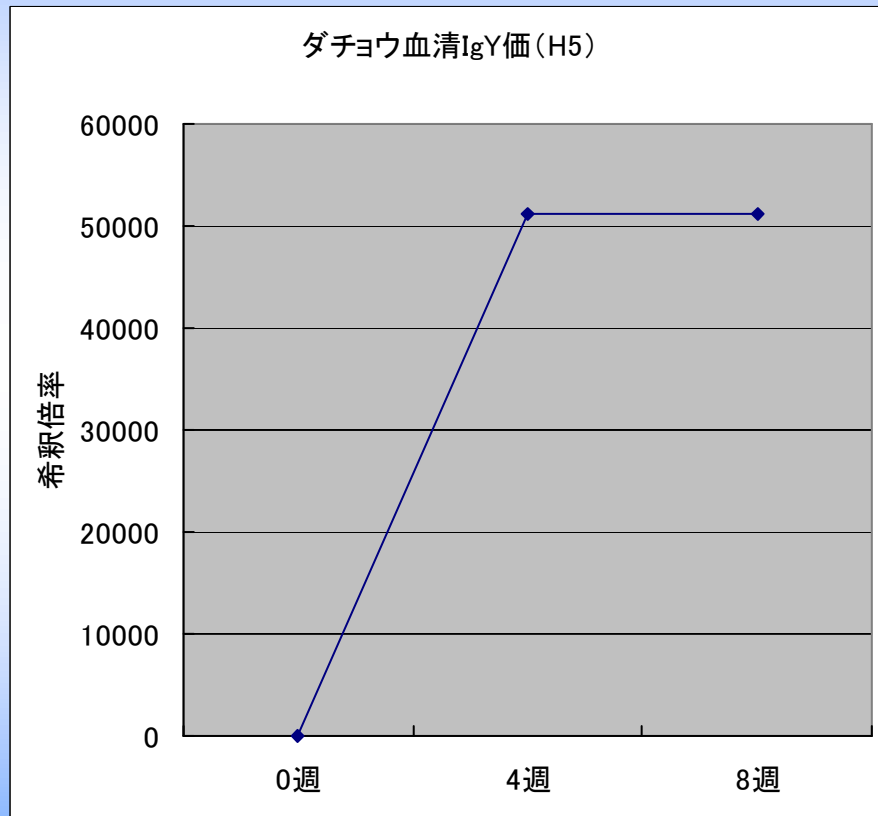
CPE発現抑制率



抗鳥インフルエンザ・ダチョウ抗体力価

ELISA

H5リコンビナントタンパク

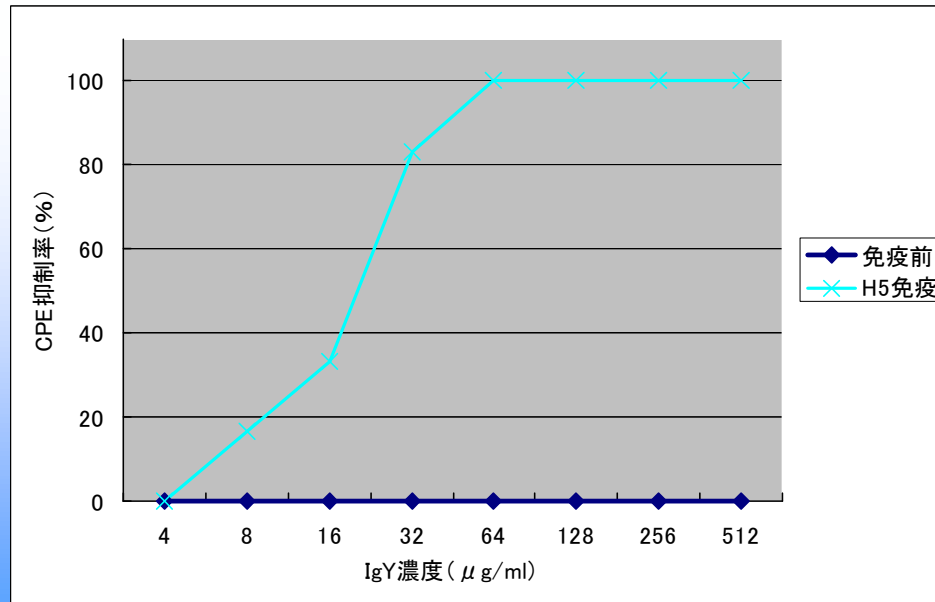


抗鳥インフルエンザ・ダチョウ抗体中和試験(MDCK培養細胞)

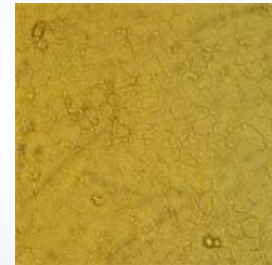
CPE発現数

IgY濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	512	256	128	64	32	16	8	4	50%感染抑制
免疫前(CPE/well)	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	-
H5免疫(CPE/well)	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6	2/6	5/6	6/6	<u>8.88 $\mu\text{g/ml}$</u>

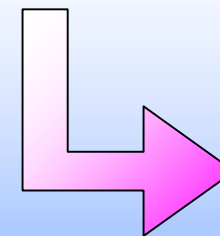
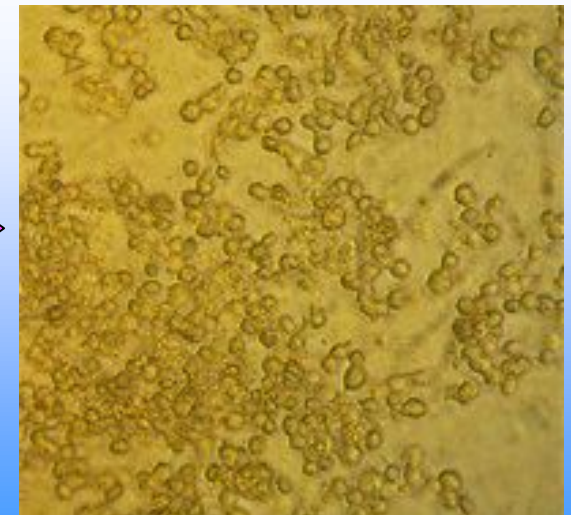
CPE発現抑制率



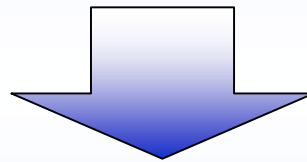
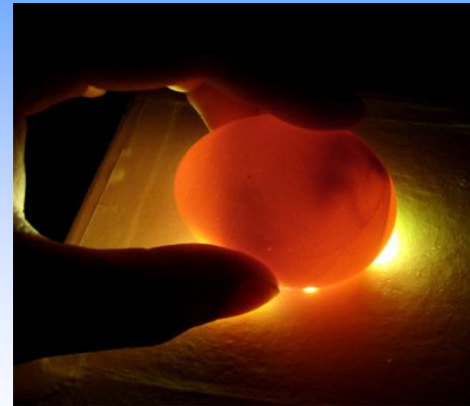
正常MDCK細胞



CPE発現MDCK細胞



抗鳥インフルエンザ・ダチョウ抗体中和試験(発育鶏卵)



生存



死亡

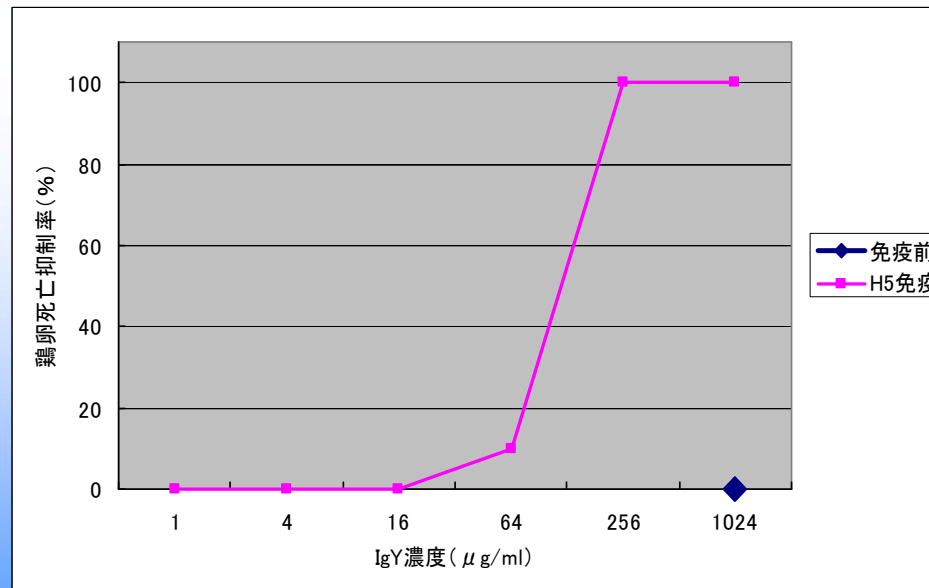


抗鳥インフルエンザ・ダチョウ抗体中和試験(発育鶏卵)

発育鶏卵死亡数

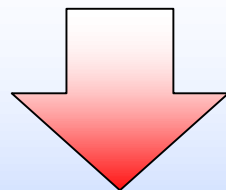
IgY濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	1024	256	64	16	4	1	50%感染抑制
免疫前(死亡数/総数)	5/5	-	-	-	-	-	-
H5免疫(死亡数/総数)	0/10	0/10	9/10	10/10	10/10	10/10	<u>84.45 $\mu\text{g/ml}$</u>

発育鶏卵死亡抑制率



結論

- ・ ダチョウにインフルエンザ抗原を接種すると、卵黄から容易に大量の抗体精製が可能
- ・ インフルエンザHA 3種混合抗原〔A型（H1、H3）、B型〕を接種したダチョウの卵黄から精製されたIgYはヒト由来のインフルエンザウイルス臨床株の感染性を抑制した
- ・ 鳥インフルエンザ〔H5N1〕リコンビナントタンパクを接種したダチョウの卵黄IgYは、高病原性鳥インフルエンザウイルス（H5N1）の感染性を抑制した

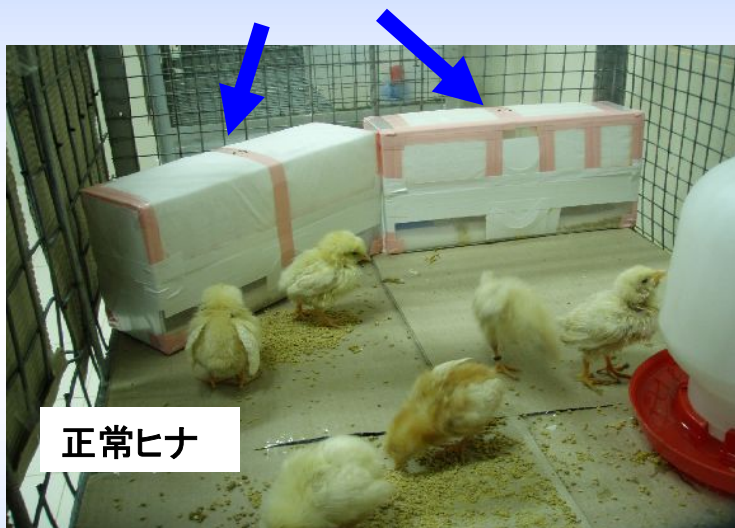


これら2種の抗体を混合することにより、既存のヒトインフルエンザに対して、さらに高病原性鳥インフルエンザ（H5N1）の両方に対する感染予防に応用可能

鶏を用いた空気感染実験によるダチョウ抗体フィルターの検証

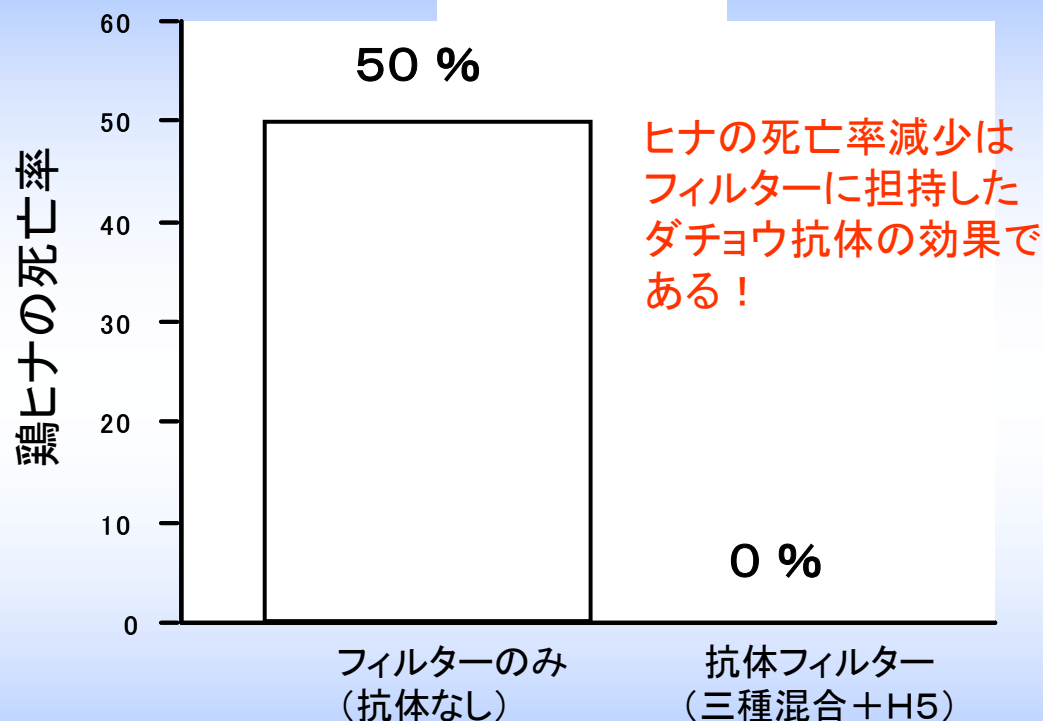
ダチョウ抗体フィルターは高病原性鳥インフルエンザウイルスの空気感染をシャットアウトしました。

H5N1感染ヒナをフィルターボックス内で飼育



BSL3施設での実験風景

H5N1感染鶏から非感染鶏への感染実験



H5N1感染ヒナ(10^7 EID₅₀ウイルス液を鼻腔内接種)をフィルターボックス内、その周りに非感染ヒナを多数飼育した。混合飼育4日間でのヒナの死亡率を算出した。

- フィルターボックス:
- ①抗体なしのフィルター
 - ②3種混合とH5蛋白を免疫したダチョウIgYを担持したフィルター