

分担研究報告書

抗イディオタイプ抗体によるシンドビスウイルスの細胞への感染阻害

主任研究者：倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第1部）

協力研究者：奴久妻聡（神戸市環境保健研究所 寄生体部）

奴久妻智代子（神戸市環境保健研究所 寄生体部）

研究要旨 ウイルスが細胞表面のレセプターに結合することが感染成立の最初のステップである。それゆえに、ウイルスのレセプターへの結合を阻害することは感染防御の有効な治療のひとつといえる。我々は広範な宿主域を有するシンドビスウイルス(以下、SIN と略す)の感染を防御するため、SIN 中和能を有するマウス単クローン抗体(MAb49)を抗原として抗イディオタイプ抗体(以下、 $\alpha$ -Ids と略す)を作製し、ニワトリ胎児線維芽細胞(以下、CEF細胞と略す)、BHK細胞およびCOS細胞へのウイルス吸着およびプラーク形成阻害を binding assay と plaque reduction assay にて検討した。その結果、 $\alpha$ -Idsとして4B9、4F4、5E2、4F5の4クローンが得られ、これらのクローンの中で4B9、4F4および4F5ではCEF細胞に対してのみ濃度依存性にプラーク形成阻害がみられたが、5E2ではすべての細胞で同様に阻害がみられた。さらに、4B9と4F4の組み合わせで plaque reduction assay を行ったところ、単独のクローンに比べて感染阻害能が増強された。以上のことから、本研究で作製された $\alpha$ -Idsはシンドビスウイルスの細胞への感染を阻害する有用な治療薬となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

ウイルス感染症の治療は過去に種々の試みがなされているにもかかわらず、現在でも非常に困難をきわめている。しかし、ウイルス感染の最初のステップはウイルスの細胞表面のレセプターへの結合であり、この結合を阻害できればウイルス感染の予防や治療につな

がる。SINはアルファウイルスの一種であり、ヒトに感染すると発熱、頭痛、関節痛および発疹を引き起こす。SINは細胞での増殖が良好であることから培養細胞での感染阻害実験が短期間にしかも容易に行うことが可能である利点がある。本研究はSIN中和能を有するマウス単クローン抗体(MAb49)を

抗原として作製した $\alpha$ -Idsを用いて、細胞へのウイルス吸着およびプラーク形成阻害を検討した。

## B. 材料と方法

Balb/c マウスの免疫には、SIN 中和能を有するマウス単クローン抗体 (MAb49 ; E2 蛋白を抗原とする) を keyhole limpet hemocyanin conjugates として用いた。ウイルスには SIN の HR、Wt および AR339 の 3 株を、また細胞には CEF 細胞、BHK 細胞および COS 細胞を使用した。ハイブリドーマの一次スクリーニングには CEF 細胞の膜蛋白を抗原とした LAB-ELISA (Fig.1) を、二次スクリーニングには CEF の初代培養細胞を用いた plaque reduction assay を行った。plaque reduction assay は monolayer の細胞に  $\alpha$ -Ids 250 $\mu$ l を室温で 90 分間反応させ、ウイルス液 200 PFU を室温で 60 分間感染させた後、1%アガロース含有 MEM を重層した。プラークをカウントするために neutralred で一昼夜染色した。CEF 膜タンパクは SEAT buffer に懸濁した細胞をホモジナイザーにて破碎後、遠心操作により精製した。ウイルスのラベルは SIN を BHK 細胞に感染後、protein labeling mix の培養液へ添加し、15~20 時間後の培養上清を 10~40% ショ糖密度勾配に重層後、遠心操作によりウイルスを精製した。 $\alpha$ -Ids を用いた細胞へのウイルス吸着およびプラーク形成阻害は binding assay と plaque reduction assay を行った。binding assay は 96

穴プレートに 4 劫一昼夜吸着させた精製した細胞膜タンパク 100ng に  $\alpha$ -Ids 100 $\mu$ l を氷中で 60 分間反応させた後、35S でラベルしたウイルス液 30 $\mu$ l を氷中で 2 時間反応させた。RI のカウントは free のウイルスを PBS の洗浄により除去し、膜タンパクに吸着したウイルスを 0.5% SDS で溶解後、液体シンチレーションカウンターによる測定した。

(倫理面への配慮) 本研究においては、ヒトおよび動物検体は使用していない。

## C. 研究結果

### 1. $\alpha$ -Ids のスクリーニング

LAB-ELISA を用いた一次スクリーニングにより、850 個のハイブリドーマのうち 111 個が陽性を示した。この 111 個について plaque reduction assay を行ったところ、CEF 膜タンパクに結合し、かつウイルス感染を阻害するものは 18 個であった。これをクローニングして 4 種類の  $\alpha$ -Ids (4B9 : IgM、4F5 : IgM、4F4 : IgG1、5E2 : IgM) を得た。

### 2. $\alpha$ -Ids を用いたプラーク形成阻害

4B9、4F5 および 4F4 では、用いたすべての SIN 株について CEF 細胞ではプラーク形成阻害がみられたが ( $\alpha$ -Ids 濃度 125 $\mu$ g で阻害率 20~55%)、BHK 細胞および COS 細胞では阻害はみられなかった (Fig.2,3,5)。一方、5E2 では CEF 細胞に限らず、BIHK 細胞および COS 細胞においてもプラーク形成阻害が認められた (Fig.4)。

### 3. $\alpha$ -Igs を用いたウイルス吸着阻害

CEF 細胞を用いて HR 株の阻害を検討した結果、4B9 と 4F4 ではおよそ 100%、4F5 と 5E2 では 70%の阻害がみられたが（いずれも  $\alpha$ -Igs 濃度 1000 $\mu$ g/ml）、control 群でも 40%近い阻害があり、吸着阻害は 4B9 と 4F4 では 60%、4F5 と 5E2 では 30%と断した (Fig.6)。また、4B9 と BHK 細胞および COS 細胞の組み合わせでは CEF 細胞のような顕著な阻害効果は認められなかったのに対して、5E2 と BHK 細胞の組み合わせでは抗体が高濃度になると CEF 細胞と同等の阻害効果を示した (Fig.7)。

### 4. $\alpha$ -Igs の組み合わせによるプラーク形成阻害能の増強

最も抗体価の高い 4B9 にその他 3 種類の  $\alpha$ -Igs をトータルのタンパク量は統一してそれぞれミックスし、CEF 細胞を用いて HR 株の阻害を 4B9 単独の場合と比較したところ、4F4 との組み合わせでは 4B9 単独よりもプラーク形成阻害率が増加した (Fig.8)。

### D. 考察

ウイルス感染の最初のステップはウイルスの細胞表面のレセプターへの結合であり、この結合を阻害できればウイルス感染の予防や治療につながる。本研究では SIN 中和能を有するマウス単クローン抗体 (MAb49) を抗原として作製した  $\alpha$ -Igs を用いて、細胞へのウイルス吸着およびプラーク形成阻害

を検討したところ、感染を阻害する有用なクローンが 4 個得られた。さらに、4B9 と 4F4 の組み合わせでは 4B9 単独よりもプラーク形成阻害能が増強した。SIN の抗イデオタイプ抗体については、Wang らにより 63kDa の膜タンパクに結合するポリクローナル抗体 ( $\alpha$ -Igs49) が作製されている。 $\alpha$ -Igs49 を用いた吸着阻害率は 100 $\mu$ g の濃度で 50%、プラーク形成阻害率は 125 $\mu$ g の濃度で 40%であった。本研究で作製した 4 クローンの中で 4B9 が  $\alpha$ -Igs49 と同等な阻害率を示した。今後、培養細胞での阻害効果が個体レベルでの感染防御に反映するかをマウスを用いた感染実験で検討する必要があると思われる。

### E. 結論

本研究で得られた 4B9、4F4、5E2、4F5 の 4 クローンはすべて感染阻害効果がみられ、さらに、4B9 と 4F4 の組み合わせで単独のクローンに比べて感染阻害能が増強されたことから、シンドビスウイルスの細胞への感染を阻害する有用な治療薬となる可能性が示唆された。

### F. 健康危機管理情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 学会発表

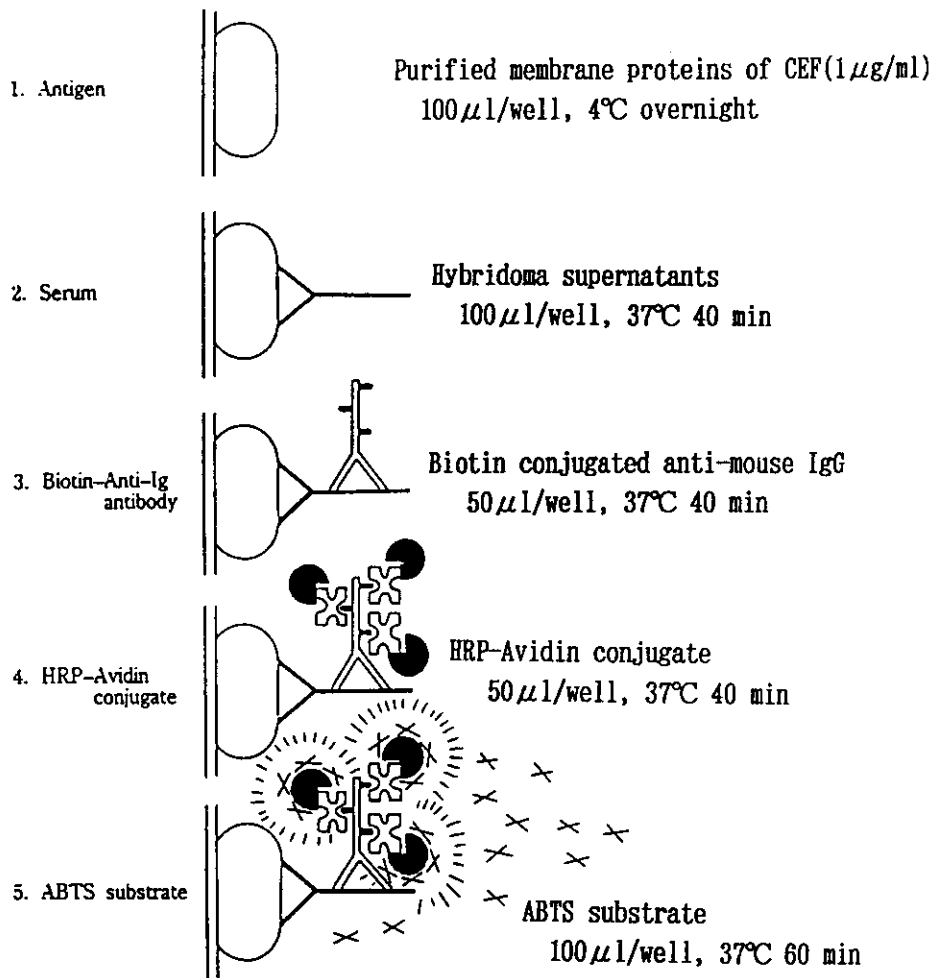
奴久妻聡 一、奴久妻智代子：シンドビスウイルスレセプタータンパクの N 末端アミノ酸分析とその問題点. 第 7

回トガ、フラビ、ペスチウイルス研究会 (2000).

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

<Screening of hybridoma supernatants 1>

LAB-ELISA



---

850 hybridoma supernatant samples  
↓  
111 positive samples  
(The cut-off titer for positive antibody was set at the degree of negative control well + 0.1)  
↓  
The 2nd screening

Fig.1

Fig.2

Plaque reduction assay -4B9(IgM)-

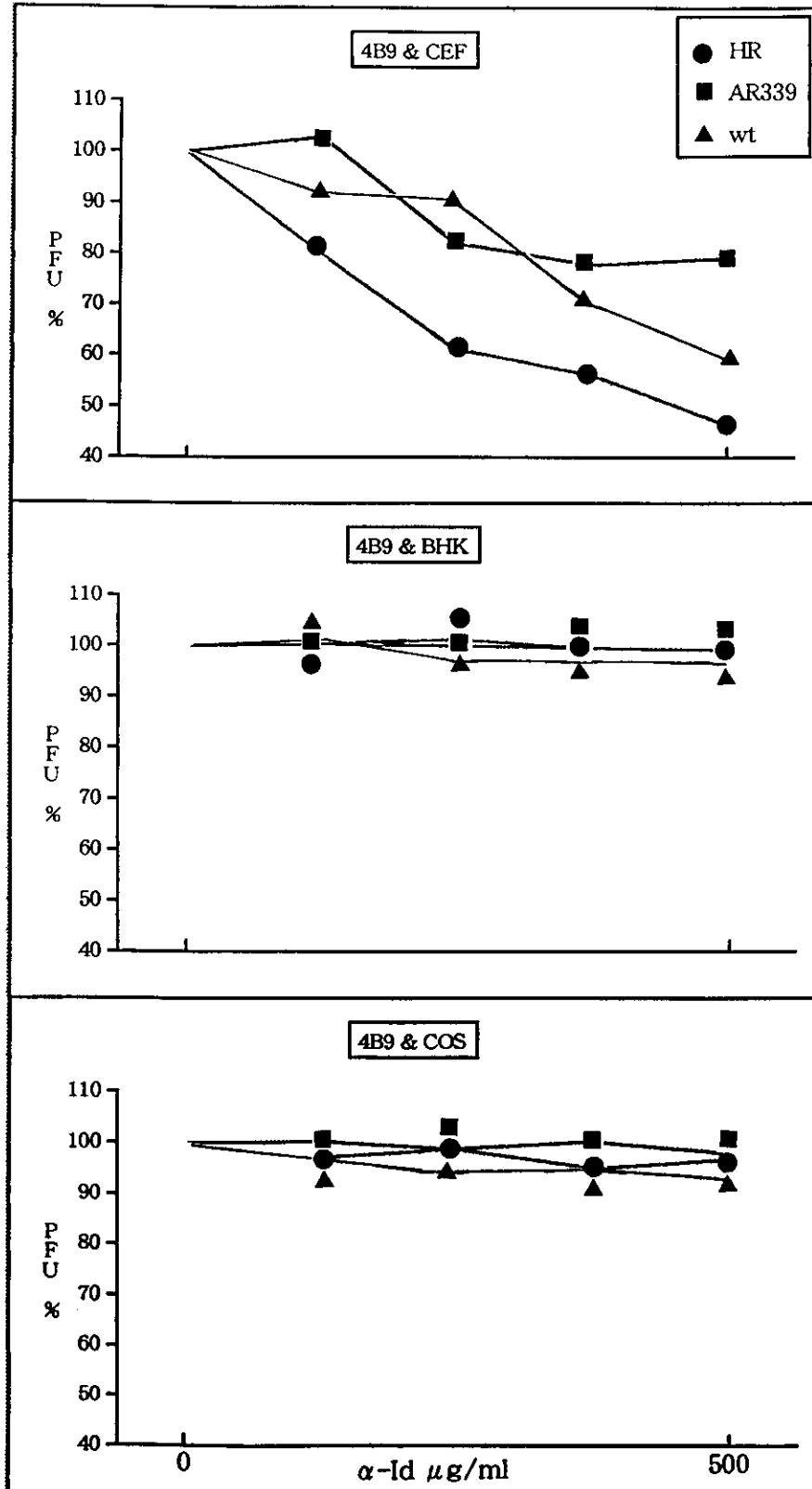


Fig.3

# Plaque reduction assay -4F5(IgM)-

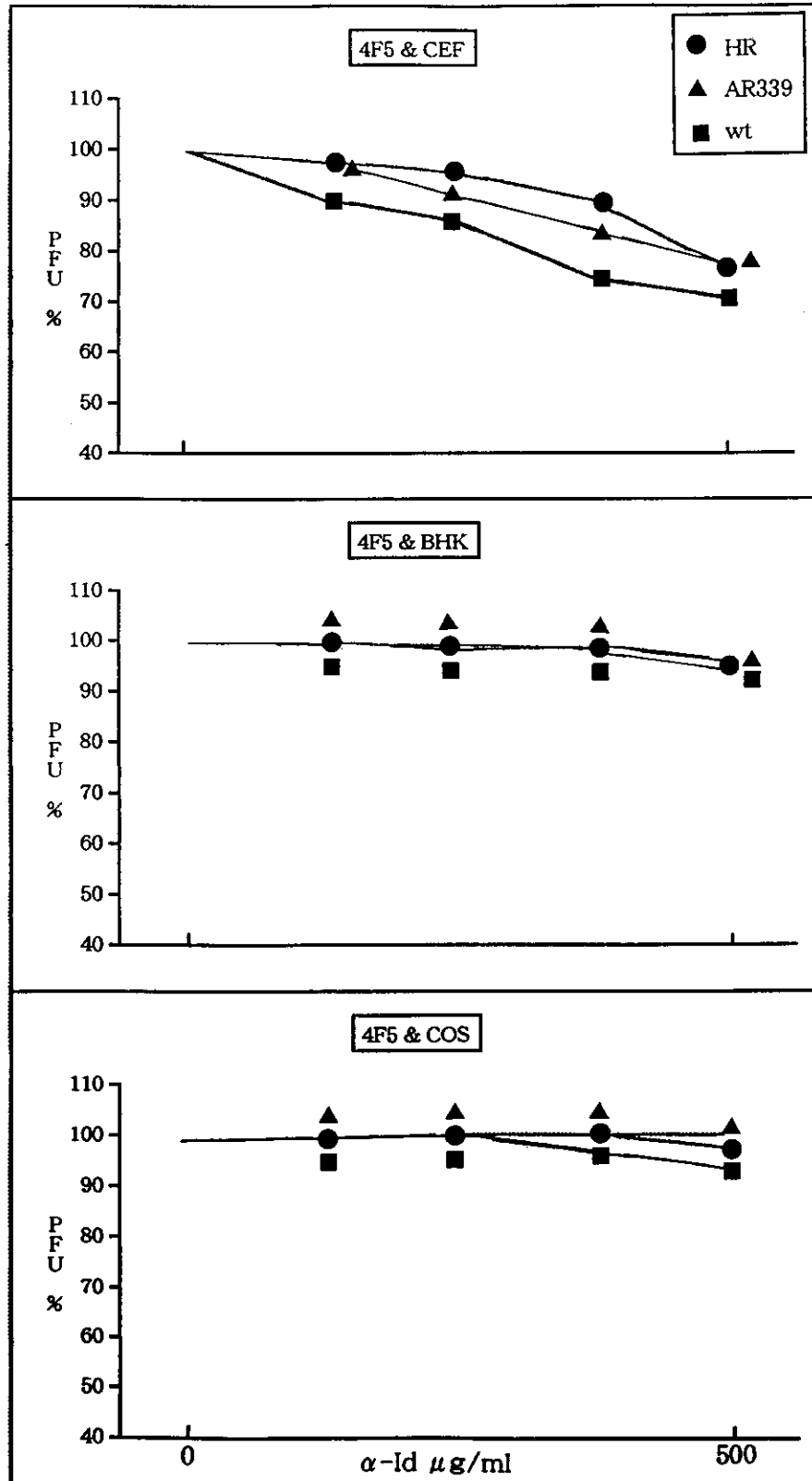


Fig.4

Plaque reduction assay -5E2(IgM)-

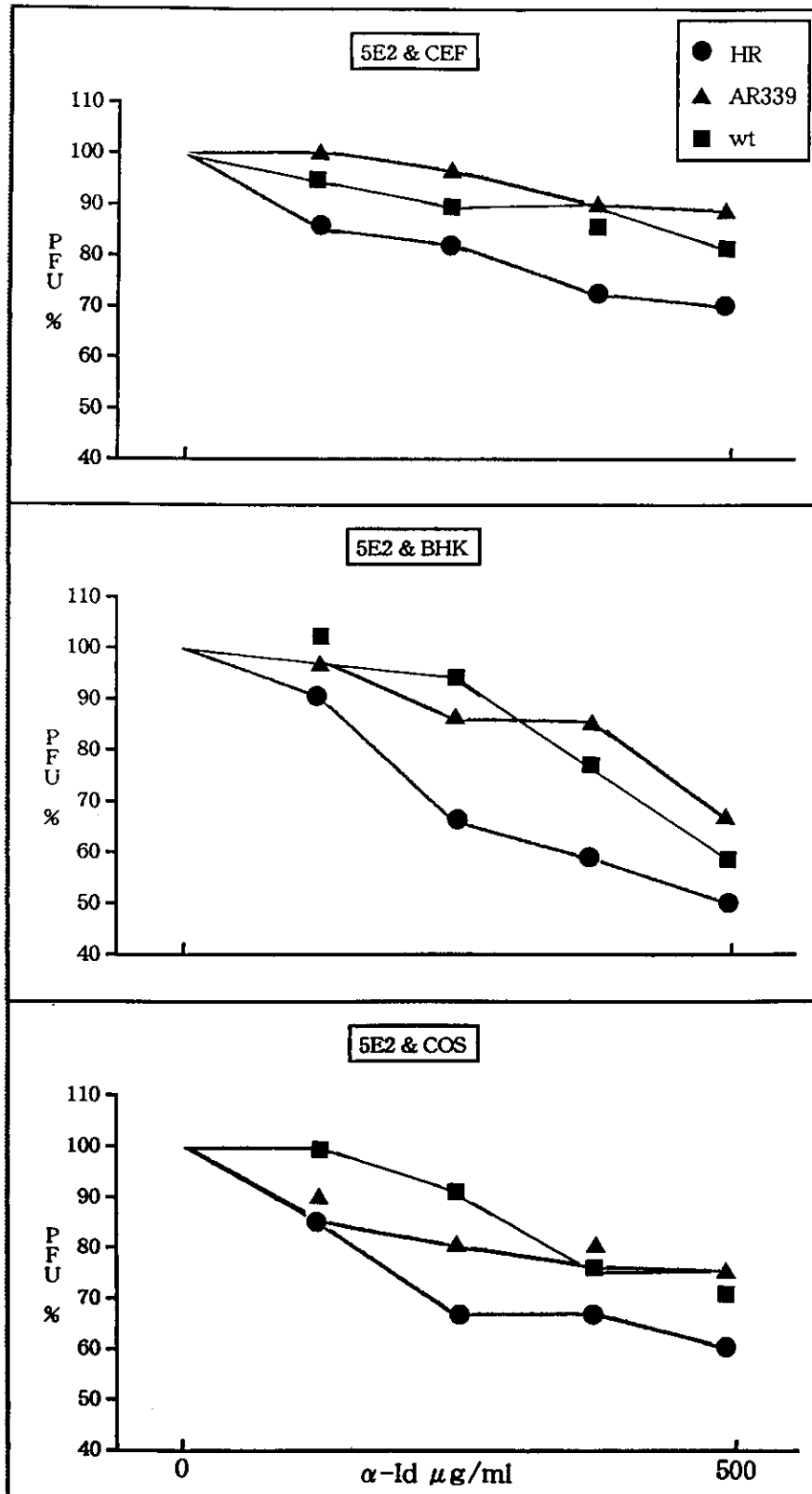




Fig.5

Plaque reduction assay -4F4(IgG<sub>1</sub>)-

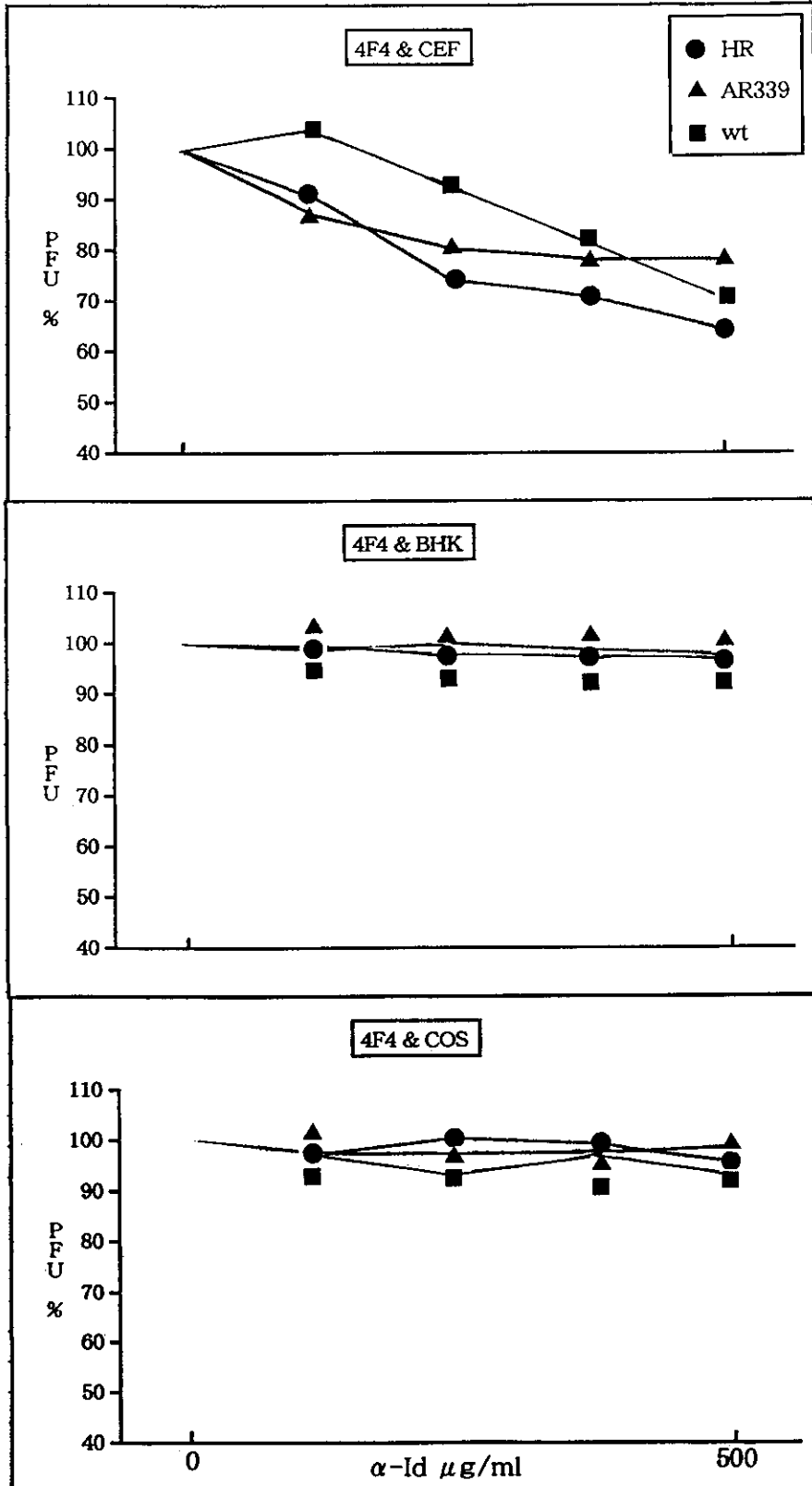


Fig.6

### Binding assay - $\alpha$ -Ids-

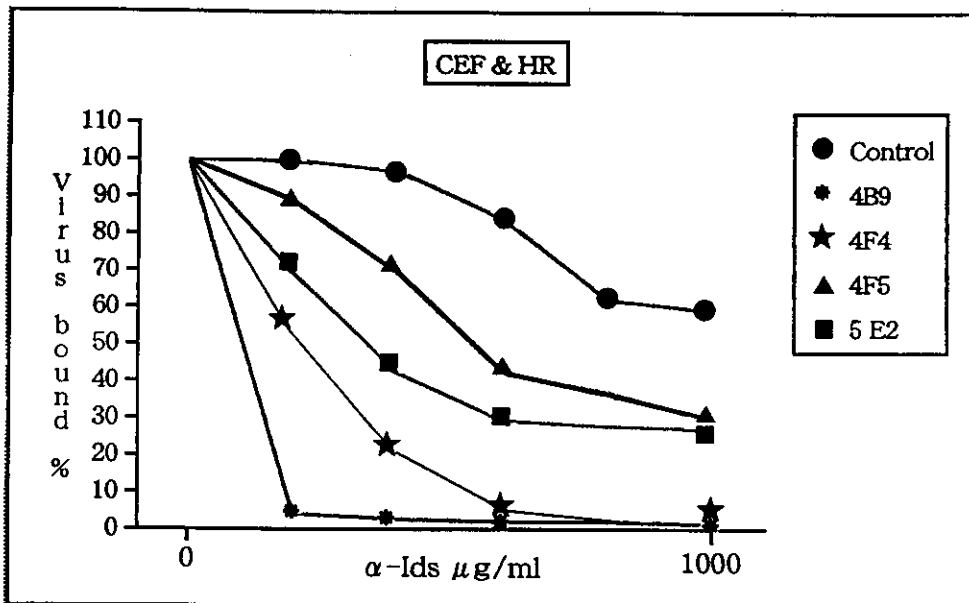


Fig.7

Binding assay -Cells-

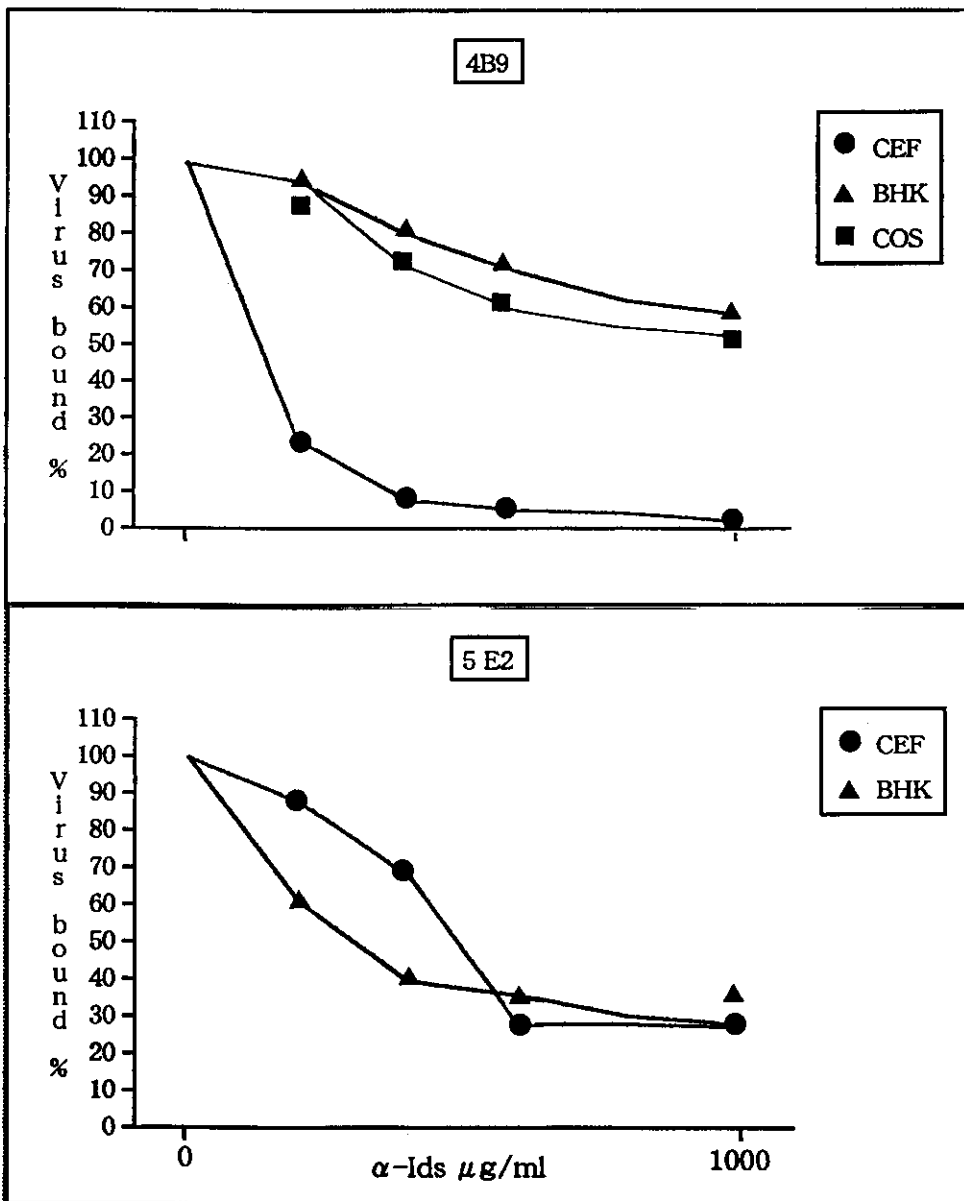


Fig.8  
 Plaque reduction assay -Mixed  $\alpha$ -lds-

