

のスクリーニングは、モルモット IFN- $\gamma$ を発現させた 293T細胞を用いた間接蛍光抗体法により行った。

### (2) ナチュラル抗原を用いてのモルモット IFN- $\gamma$ に対するモノクローナル抗体の作製

モルモット IFN- $\gamma$  遺伝子をヒト抗体の Fc 部分と fusion させ、その C 末端にヒスチジンタグを付加し、そのモルモット IFN- $\gamma$  遺伝子カセットを哺乳類細胞発現ベクター (pCAGGS) にクローニングした。作製したベクターを 293T 細胞に導入し、その培養上清を回収し、Ni-NTA を用いて、モルモット IFN- $\gamma$  タンパク質の精製を行った。

### (3) モルモット IFN- $\gamma$ に対するモノクローナル抗体を用いたモルモット IFN- $\gamma$ の測定の試み (Elispot 法)

PBS 或いは不活化した水痘帯状疱疹ウイルスを免疫したモルモット脾臓より、単核球を分離し、上記のモルモット IFN- $\gamma$  抗体をコートした 96 穴メンブレンプレートに単核球を加え、PHA あるいは水痘抗原を添加した。37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で 40 時間培養した後、プレートを洗浄し、IFN- $\gamma$  分泌細胞数をスポットとして計測した。条件検討のため、モルモット IFN- $\gamma$  を発現させた細胞を用いて、同様の実験を行った (ただし、PHA などの刺激物は添加していない)。

#### (倫理面への配慮)

本研究は神戸大学で行った。本研究に関する遺伝子組換え実験および動物実験は、当該研究機関における遺伝子組換え実験安全委員会および動物実験委員会の承認を得ている。

## C. 研究結果

### (1) 大腸菌由来抗原を用いて異なるエピトープを認識するモルモット IFN- $\gamma$ 抗体の作製に成功

IFN- $\gamma$  Elispot 法では、異なるエピトープを認識する抗体が必要である。我々は大腸菌由来抗原を用いて、4 クローンのモルモット IFN- $\gamma$  ハイブリドーマの樹立に成功した。それらのハイブリドーマから産生された抗体のエピトープを調べるために、部分欠損したモルモット IFN- $\gamma$  遺伝子が発現した細胞を用いて、間接蛍光抗体法を行ったところ、うち 1 つの抗体のエピトープがモルモット IFN- $\gamma$  の N 末端側に、残りの 3 つは C 末端側にあることが明らかとなった。このことから、少なくとも、2 種類以上のエピトープを認識する抗体の作製に成功した。

### (2) モルモット IFN- $\gamma$ を発現させたヒト由来細胞を用いた Elispot 実験

上記で作製した抗体が IFN- $\gamma$  Elispot 法に使用できるか否かを調べるため、モルモット IFN- $\gamma$  を発現させた細胞を用いて、IFN- $\gamma$  Elispot 実験を行った。その結果、モルモット IFN- $\gamma$  発現細胞を用いたサンプルでは、モルモット IFN- $\gamma$  を発現しない細胞に比べ、明らかにスポット数が上昇していた (図 1)。

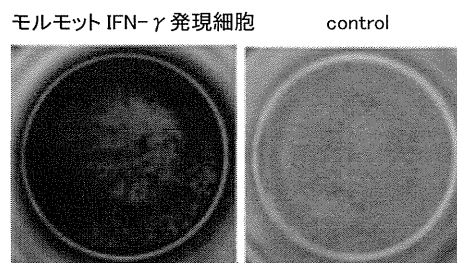


図 1 モルモット IFN- $\gamma$  発現細胞での Elispot spot 数の上昇

### (3) PHA 刺激による Elispot 数の上昇

次に PBS を接種したモルモット脾臓細胞を用いて、IFN- $\gamma$  Elispot 実験を行った。その結果、PHA 刺激により、IFN- $\gamma$  を分泌した細胞数は PHA の刺激がない細胞に比べて上昇していた (図 2)。

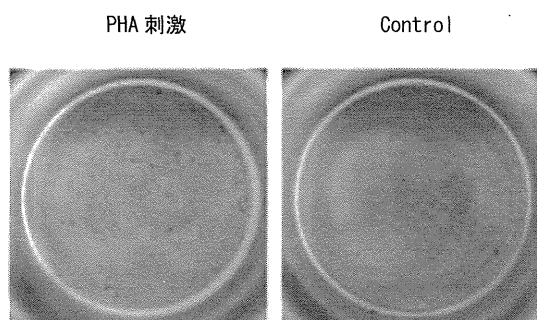


図 2 PHA 刺激による Elispot spot 数の上昇

### (4) 水痘抗原刺激による Elispot スポット数の変化

UV 不活化した水痘帯状疱疹ウイルスを免疫したモルモットから分離した単核球を、水痘抗原を用いて刺激し、Elispot 実験を行った。その結果、コントロールと比べ、有意なスポット数の上昇は認められなかった (図 3)

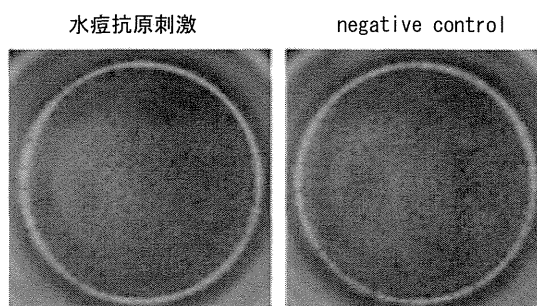


図 3 水痘抗原刺激による Elispot spot 数の上昇がみられなかった

### (5) ナチュラルフォームのモルモット IFN- $\gamma$ の作製および精製に成功

上記の結果より、より感度がよい抗体の作製が必要であると考えられたため、ナチュラルフォームのモルモット IFN- $\gamma$  を認識する抗体の作製を試みた。我々はタグ付きのモルモット IFN- $\gamma$  遺伝子を哺乳類細胞発現ベクターに挿入し、作製したベクターを哺乳類細胞である 293T 細胞に導入した。その細胞の培養上清中からモルモット IFN- $\gamma$  タンパク質の精製にも成功した (図 4)。

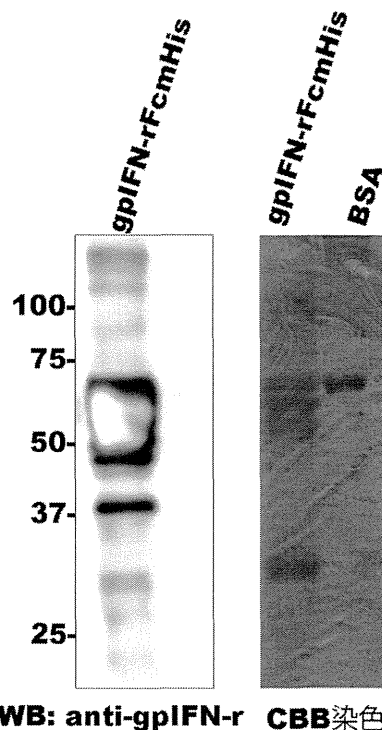


図 4 哺乳類細胞からモルモット IFN- $\gamma$  抗原の精製に成功

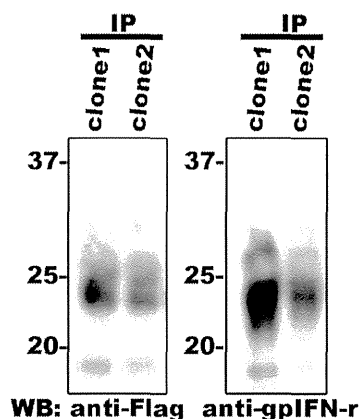
### (6) 哺乳類細胞由来抗原を用いてモルモット IFN- $\gamma$ 抗体の作製に成功

哺乳類細胞由来モルモット IFN- $\gamma$  タンパク質を精製し、マウスに免疫した。免疫したマウスのリンパ節を用いて 2 クローンのモルモット IFN- $\gamma$

抗体を産生するハイブリドーマを樹立した。

#### (7) 作製した抗体がナチュラルフォームのモルモット IFN- $\gamma$ を認識

我々は作製した抗体が哺乳類の細胞で発現させたモルモット IFN- $\gamma$  を認識するか否かを調べるため、免疫沈降実験を行った。その結果、今回作製した抗体はモルモット IFN- $\gamma$  を認識した (図 5)



※免疫沈降の実験には Flag タグ付きのモルモット IFN- $\gamma$  を発現させた細胞を用いた。

図 5 モルモット IFN- $\gamma$  抗体は哺乳類細胞由来モルモット IFN- $\gamma$  を認識

#### (8) ナチュラルフォームのモルモット IFN- $\gamma$ 抗原を用いて作製した抗体の Elispot 法への応用

作製した抗体を用いて、Elispot 法で PHA の刺激によって産生されたモルモット IFN- $\gamma$  を測定したところ、spot の検出が確認されたが、コントロールと比べ、大幅な spot 数の上昇は認められなかった。

#### D. 考察

今回、我々はモルモット IFN- $\gamma$  Elispot 法の開発を試みた。大腸菌で発現させた抗原から作製した抗体を用いて構築した Elispot 実験系では、モルモット IFN- $\gamma$  発現細胞および PHA で刺激したモルモット細胞での Elispot スポット数の上昇が認められたが、不活化した水痘带状疱疹ウイルスを免疫したモルモットから分離した単核球を用い、水痘抗原で刺激したモルモット細胞の Elispot スポット数の上昇は認められなかった。また、PHA で刺激したモルモット細胞での Elispot スポット数の上昇はモルモット IFN- $\gamma$  発現細胞での上昇と比べて上昇幅が低く、これらのことからより感度がよい Elispot システムの開発が望ましいと考えられたため、我々は哺乳類の細胞を用いたモルモット IFN- $\gamma$  遺伝子の発現およびタンパク質精製を試み、それらを用いて、モルモット IFN- $\gamma$  抗体の作製にも成功した。作製した抗体は哺乳類の細胞で発現させたモルモット IFN- $\gamma$  を認識することも確認された。さらにこれらの抗体を用いて IFN- $\gamma$  Elispot 法を試みたところ、PHA 刺激した細胞において spot の検出に成功したが、本実験に関しては更なる抗体の作製を含め実験条件の再検討が必要であると考えられる。

#### E. 結論

複数のモルモット IFN- $\gamma$  モノクローナル抗体の作製に成功した。感度のよいモルモット IFN- $\gamma$  Elispot 法の開発には更なる実験条件等の検討が必要である。

G. 研究発表

1.論文発表

特記すべきことなし

2.学会発表

特記すべきことなし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特記すべきことなし

2. 実用新案登録

特記すべきことなし

3. その他

特記すべきことなし

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	特記事項なし						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
村上宏起 森 康子	総説 グローバル感染症 3. 多価生ワクチン — 現 行の水痘生ワクチンをベ ースとして	最新医学	第69巻 第4号	810-818	2014年4月
Murakami K, Mori Y.	Use of a current varicella vaccine as a live polyvalent vaccine vector	Vaccine			印刷中

