

## 論文の内容の要旨

農学国際専攻

平成 12 年度博士課程進学

氏 名 林 砂緒

指導教官名 大塚 治城

論文題目 Cytolytic and virus neutralizing natural IgM antibodies  
in normal swine serum

(ブタ血清中に存在する細胞溶解能及びウイルス中和能を有する  
自然抗体 IgM に関する研究)

動物は特定の病原体に感染したことがなくても、その病原体に対する自然抗体 (natural antibody) を有することがある。自然抗体のアイソタイプは主として IgM であるが、その実体についてはあまり解明されていない。自然抗体 IgM は B1 細胞で産生され、補体系古典経路の活性化を強く促す。幼マウスでは検出されず成マウスになると検出される自然抗体もあり、成長過程でなんらかの抗原物質にさらされることで他の病原体と交差反応するような自然抗体がいつのまにか産生されている場合もある。自然抗体の例として知られているのが、ブタからヒトへの異種移植の際の超急性拒否反応に関与する anti-Gal 抗体である。ブタの臓器をヒトに移植すると、ブタ細胞膜に発現する Gal $\alpha$ 1-3Gal エピトープに、ヒト血清中の自然抗体 anti-Gal 抗体が結合し、補体系古典経路が活性化され、ブタ臓器の血管内皮細胞の破壊、移植片壊死が起こる。また、小児のガンとして知られる Neuroblastoma(NB)の自然治癒例も、血清中の抗 NB 自然抗体 IgM が補体系古典経路を活性化し、腫瘍を退縮させるためであると報告されている。本研究では、SPF ブタ血清中に

抗ウサギ細胞自然抗体 IgM が存在することを発見した。また、この抗体が補体系の宿主特異性や異種赤血球の凝集反応に関与すること、ヘルペスウイルスの異種間への伝播を抑制する障壁となることを示唆する結果を得た。研究論文は以下の3章より構成される。

## 第1章 非免疫ブタ血清中に存在する豚オーエスキー病ウイルス (PRV) を中和する宿主特異的な自然抗体 IgM についての研究

アルファヘルペスウイルス亜科に属するウイルスでは、増殖させる細胞種の違いにより、非免疫血清に対する感受性が異なるという現象が見られた。例えば、SPF ブタ血清に対し、同種のブタ腎由来 CPK 細胞で増殖させた豚オーエスキー病ウイルス (PRV) は抵抗性を示すが、異種であるウサギ腎由来 RK13 細胞で増殖させた PRV は感受性を示し中和されてしまう。またこの PRV 中和能はブタ血清を 56°C30 分間加熱すると失われることから、補体系が関与していると考えられる。さらに、このような感受性の違いは、血清中にウイルスを増殖させるために用いた細胞に対する自然抗体 IgM を持つかどうかで決まることが示唆された。ヘルペスウイルスは細胞から出芽する際に、感染細胞の細胞膜の一部をエンベロープとして最外殻にまとうことが報告されており、ウイルスの血清に対する感受性が、増殖に用いた細胞と血清との関係とほぼ一致することから、第2章では SPF ブタ血清とウイルス増殖に用いたウサギ腎由来 RK13 細胞との関係について詳細に調べた。

## 第2章 非免疫ブタ血清中に存在するウサギ RK13 細胞の溶解を引き起こす自然抗体 IgM についての研究

ウサギ腎由来 RK13 細胞は SPF ブタ血清により cell lysis を起こす。補体系は、抗体を介する古典経路と補体分子のみで活性化される第二経路に分けられるが、EGTA によってカルシウムイオンをキレートし、古典経路を遮断したブタ血清では、ウサギ RK13 細胞に cell lysis を起こす能力が失われた。SPF 血清であるにも関わらず、抗体を必要とする古典経路を介して RK13 細胞に cell lysis を起こすことから、このブタ血清は RK13 細胞に対する抗体を持つことが推測される。ゲル濾過によるブタ血清の分画、抗ブタ IgM 抗体による

競合阻害などのデータより、SPFブタ血清中には抗 RK13 細胞自然抗体 IgM が存在することが確認された。*In vitro* では PrV は様々な細胞株に感染するが、実際にはヒトなど異種間での水平感染は起こりにくい。このような感染防御のメカニズムには、ウイルスのエンベロープタンパク質に対する自然抗体 IgM を介した補体系古典経路の活性化が関与すると考えられる。第3章では RK13 細胞のような上皮系細胞以外でも同様の現象が見られるかどうかを、同種であるウサギ血球系の細胞を使って調べた。

### 第3章 ブタ血清中に存在するウサギ赤血球の溶血と凝集を引き起こす自然抗体 IgM についての研究

SPF ブタ血清はウサギ赤血球を溶血させる。一般に、異種血清による赤血球の溶血反応は、抗体の関与しない補体系第二経路による膜障害性複合体 (MAC) の形成が原因であると考えられている。本研究でもブタ血清の補体系第二経路によってウサギ赤血球が溶血することが確認されたが、その反応にはウサギ赤血球膜に特異的に結合する自然抗体 IgM が必要であることが示唆された。ブタ血清は、抗ブタ IgM 抗体による競合阻害、あるいは IgM 抗体の除去によりウサギ赤血球の溶血能を失ったこと、また、赤血球膜上に発現する抗ウサギ赤血球 IgM エピトープを検出したことから IgM 抗体の関与が考えられる。自然抗体が補体系の第二経路活性化に働くという報告は今までほとんどなく、重要な知見であると考えられる。

4℃で補体系の活性化を起こさない条件下において、ウサギ赤血球をブタ血清にさらすと、ウサギ赤血球は溶血を起こさず、凝集を起こした。しかし、同個体のウサギ血清や IgM 抗体を除去したブタ血清では凝集は見られなかった。ブタ血清から分画した IgM 抗体や非動化ブタ血清にも赤血球凝集作用が見られたことから、非免疫ブタ血清中には 56℃30 分間の熱処理によって不活化しない赤血球凝集能を持つ自然抗体 IgM が存在することが示唆された。

以上は、自然抗体と細胞の溶解、ウイルスの中和、赤血球の溶血と凝集のメカニズムに対して有用な結果であり、また、ヘルペスウイルスの異種間での伝播を抑制するための新たな知見であると考えられる。