

学位論文題名

Studies on the antibody-forming cell responses  
in mice infected with Japanese encephalitis virus  
and related flaviviruses.

（日本脳炎ウイルスとフラビウイルス感染マウスにおける  
抗体産生細胞の免疫応答に関する研究）

学位論文内容の要旨

日本脳炎（JE）ウイルスは、ヒトとウマには脳炎、またブタには異常産を起こす東アジアの代表的な人畜共通伝染病の病原体である。本ウイルスは蚊によって媒介され、フラビウイルス科フラビウイルス属に属する。フラビウイルスは自然界で感受性脊椎動物宿主と媒介節足動物との間で感染環を形成するもので、トガウイルス科やブニヤウイルス科と並んで節足動物媒介性（アルボ）ウイルス群の主要メンバーである。本ウイルス群は世界各地の自然条件に適応して分化しながら地方病的に分布し、またヒトや動物に対する病原性や病勢の上でも著しく多様なウイルス種から構成されている。現在フラビウイルス属では血清学的交差反応性によって68種類のウイルスが知られている。

これまでの地理医学的調査では、同一個体が幾種類ものフラビウイルスに感染するような極めて浸淫度の高い流行地の存在が知られている。このため異なったフラビウイルスの再感染や混合感染は、交差反応によって血清診断の判定を誤らせるばかりでなく、デング熱ウイルスの再感染で見られるような重篤な出血熱やショック症状等の原因となり得るものである。

従来からフラビウイルスの中和や発症防御には液性免疫が主役を演ずるとされ、特にウイルスのエンベロープタンパクに対する中和抗体と感染細胞表面に発現する非構造タンパク（NS<sub>1</sub>）に対する抗体の重要性が指摘されていた。しかし *in vivo* でのフラビウイルスに対する抗体産生機構、特にフラビウイルス間の抗原交差に関してB細胞レベルでの詳細な検討はほとんどなされていない。

これまで抗体産生細胞を検出するための方法として Jerne の溶血ブラック形成法が知られ、広く活用されてきた。この方法は補体結合性抗体を産生する細胞に抗原感作赤血球を加え、溶血の有無を指標にして抗体産生細胞を検出するものである。しかし本法では抗原と赤血球の結合反応の再現性、感作赤血球の保存性、抗体のアイソタイプの鑑別あるいは非補体結合性抗体の検出など多岐にわたる問題点が指摘され、これらの解決のために、ポリスチレンプレートの表面に固相化した抗原を用いた ELISPOT 法または ELISA・ブラック法が考案された。しかしこれらの方法では大量の精製抗原を必要とするため、ウイルスを感染させた培養細胞をそのまま固定して抗原とする手法が最近考案された。すなわちここではウイルス感染動物の脾臓を摘出して脾細胞を培養し、抗体産生細胞から分泌された抗体を免疫組織化学的手法により染色して個々の抗体産生細胞をスポットとして検出する方法が取られている。

本研究では JE ウイルスあるいは各種フラビウイルス感染マウスにおける抗原特異的な B 細胞免疫応答を解明する目的で、まずウイルス感染細胞を抗原とし、JE ウイルス感染マウスに出現した抗原に特異的な IgM あるいは IgG 抗体を分泌する細胞を定量できる抗体産生細胞検出 (AFC) 法を確立した。また血清反応で広く認められているフラビウイルス間の交差反応性を B 細胞レベルで解析するために、AFC 法を用いて経時的な抗体産生細胞の出現状況ならびに異なるフラビウイルスがマウスに前後して感染した場合の免疫の記憶と交差反応の発現状況について検討した。

AFC 法では、感染細胞上に充分量のウイルス抗原が保存されていることが重要なため、まず抗原発現量が最大となるような各種の固定法を比較検討した。その結果、バラホルムアルデヒド・リジン・過ヨウ素酸緩衝液による細胞固定法が JE ウイルス抗原の保存に最適なことが判明した。また本固定液は他の幾つかの固定液と比べ非特異反応が最も低かった。

次に抗体産生細胞検出用の抗原を作製するための至適条件を得るために JE ウイルス感染細胞の培養時間、個々の抗体産生細胞の性状について検討した。すなわち JE ウイルス抗原は BGM 細胞では感染後 8 時間目から出現し、26 時間目で最高となった。このため AFC 法における抗原プレートの作製にはウイルス接種後 26 時間目の感染細胞を使用した。これにより抗原プレートに加えた脾細胞数と JE 特異的 IgG または IgM 抗体を産生する細胞スポット数の間には脾細胞数が過剰の場合を除いて高い相関が認められた。また脾細胞をサイクロヘキシミドで前処理することにより抗体産生細胞のスポット形成数が 70% も減少したことから、本 AFC 法では活性化している抗体産

生細胞を検出していることが示唆された。

4種類の免疫組織化学的手法を用いて感染細胞上に発現されたウイルス抗原とB細胞から分泌された抗体との間の抗原抗体反応の検出感度の比較を行ったところ、アビジン・ビオチン・コンプレックス(ABC)法の検出感度が最も高く、次いでパーオキシダーゼ・抗パーオキシターゼ法、パーオキシターゼ・間接法およびパーオキシターゼ・直接法の順で低下した。従って本報ではABC法を標準法として採用した。

次に異なったフラビウウイルスの感染細胞間の共通抗原の発現状況を細胞種、接種ウイルス濃度や感染細胞の培養時間を種々変えて検討した。BHK-21細胞では供試されたすべてのフラビウウイルスで抗原の良好な発現が見られた。またいずれのウイルスでも感染の多重度(m.o.i.)を6以上で接種した場合、細胞種に関係なく良好なウイルス抗原の発現が見られた。

さらにマウスに対する接種ウイルス量と免疫応答との関係を調べたところ、高濃度のウイルス液を接種した場合は初感染後5日目で既にIgG産生細胞とIgM産生細胞の検出数がほぼ等しく、IgM-IgGのクラス変換の発現していることが明らかとなった。また2次応答におけるIgG抗体産生細胞のアイソタイプはIgG-2aとIgG-2bが主体で、IgG-1は僅かで、IgG-3は非常に少なかった。さらにマウスに哺乳動物細胞由来のウイルスと蚊の細胞由来のウイルスを接種して抗体産生細胞の出現状況を比較したところ、前者の細胞数の方が後者より多く、より強い免疫原性を備えていることが判明した。

次に異なるフラビウウイルス間のB細胞レベルでの反応の特異性を検討した。IgMとIgGのいずれの抗体産生細胞でも同じ血清群に属するフラビウウイルス間では強い交差反応性が認められたのに対し、異なる血清群のウイルスでは交差反応性が低く、またアルファウイルスのゲタウイルスに対する反応は全く認められなかった。

マウスにJE-JaGAR-01株を感染させた後、2週間目に他のフラビウウイルスを接種し、追加免疫によるフラビウウイルスの共通抗原の記憶状況を検討した。すなわち異なるフラビウウイルスを再接種した場合、まず共通抗原に対する免疫応答が免疫記憶細胞を刺激し、共通抗原によるウイルスの追加免疫と同じような効果が発現した。またAFC法により検出された抗体産生細胞数は追加免疫に用いたヘテロのウイルスに対するものよりも初回免疫に用いたホモウイルスに対するものの方がはるかに多く、初回免疫の抗原に対してより強く反応することが判明した。

これらの成績からAFC法は*in vivo*でのフラビウウイルス感染に際して発現するB細胞レベルでの免疫応答を定量測定するための極めて優れた手法で

あることが判明した。さらに本法によりJEウイルス感染マウスにおけるウイルス特異的な抗体産生細胞の出現時期と持続期間が明かとなったばかりでなく、フラビウイルス間の交差反応性をもとに初感染と再感染の免疫記憶細胞の応答に関しても基礎的な相違点が明らかにされた。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 橋 本 信 夫  
副 査 教 授 清 水 悠 紀 臣  
副 査 教 授 小 沼 操  
副 査 助 教 授 高 島 郁 夫

学 位 論 文 題 名

Studies on the antibody-forming cell responses  
in mice infected with Japanese encephalitis virus  
and related flaviviruses.

(日本脳炎ウイルスとフラビウイルス感染マウスにおける  
抗体産生細胞の免疫応答に関する研究)

フラビウイルス属は日本脳炎ウイルスなど、抗原性、病原性や宿主域などの異なる様々なウイルスから構成され、世界各地に広く分布しているが、いずれも吸血性節足動物媒介性で属特異的な共通抗原を保有する。フラビウイルスの中和や感染防禦には液性免疫が主役を演ずるとされ、これまで数多くの研究がなされているが、B細胞レベルでの免疫応答に関する研究は乏しい。

申請者は *in vivo* における抗体産生細胞の定量法として antibody forming cell assay (AFC法) を開発し、フラビウイルス感染マウスにおける特異抗体産生細胞の動態とB細胞レベルでのフラビウイルス間の交差反応性について検討した。

まず、AFC法を確立するための種々の基礎条件を検討し、抗原としてウイルス感染後24時間目のBGM細胞をパラフォルムアルデヒド・リジン・過沃素酸緩衝液で固定したものを使用した。AFC法による抗体産生細胞の検出は、固相化抗原細胞に感染マウス由来の脾臓細胞を加えて培養し、アビジン・ビオチンコンプレックス法により免疫組織化学的に特異抗体産生細胞を染色して行った。

高濃度の日本脳炎ウイルス液を接種されたマウスでは、5日目からIgMとIgGの2種類の抗体産生細胞が共に検出され、感染早期からIgM-IgGクラス変換の発現していることが判明した。またマウスにおけるB細胞レベルでのフラビウイルス属の交差反応性はIgMとIgGのいずれの抗体産生細胞でも同一血清群内では強く、異った血清群間では弱かった。さらに、日本脳炎ウイルス接種マウスに異なるフラビウイルスを追加接種した場合、追加接種したヘテロウイルスに対するよりも初回接種ウイルスにより強く反応した。このことは、最初の抗原刺激に対する免疫記憶が共通抗原の追加接種によって呼び起こされたものと考えられ、フラビウイルスの免疫応答にも抗原原罪説の当てはまることが明らかとなった。

以上のようにAFC法の開発によって、B細胞レベルでのフラビウイルスの免疫応答の測定が可能となり、*in vivo*における抗体産生細胞の動態について多くの知見が得られた。よって審査員一同は申請者ガルシア・ガルシア・ホアン氏が博士(獣医学)の学位を受ける資格を有するものと認めた。