

ダチョウ卵黄を用いた高病原性鳥インフルエンザウイルス不活化抗体の工業的大量作製の試み  
 塚本康浩<sup>1</sup>、高間健太郎<sup>1</sup>、並木秀男<sup>2</sup>、横田恭子<sup>3</sup>、足立和英<sup>1</sup>  
 (1大阪府立大学・獣医学専攻、2早稲田大学・教育総合科学学術院、3国立感染症・免疫部)

背景と目的

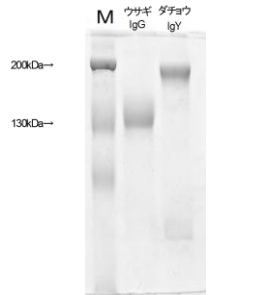


私たちはダチョウを用いて、有用抗体の低コスト・大量作製法の開発に成功しました。

- ダチョウ抗体のメリット**
- ◆ これまで開発不可能であった抗体が作製可能!
  - ◆ 卵黄から大量の抗体が採取可能
  - ◆ 高感度
  - ◆ 生産コストが低い。
  - ◆ 1羽から大量に抗体が採取出来るため、ロット間差が少ない。

1羽のダチョウから年間400gの卵黄抗体 (IgY) の精製が可能です。

抗体の工業的な使用に適する。



卵黄抽出IgYのSDS-PAGE

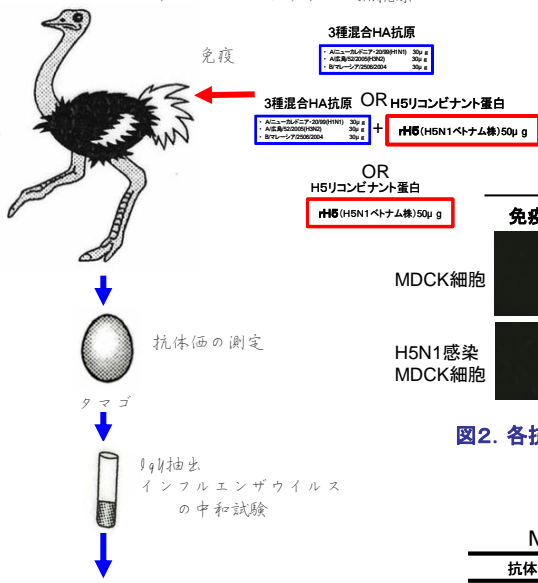
本研究では、ダチョウの抗体作製法により高病原性鳥インフルエンザ中和抗体の大量作製を行う。

表1. インフルエンザウイルスHA抗原に対するダチョウIgY力価

| ダチョウIgY抗体<br>(下記の抗原を免疫) | 抗体原液濃度 | 各抗原に対するIgY抗体価 (ELISA) |        |        |       |
|-------------------------|--------|-----------------------|--------|--------|-------|
|                         |        | H1N1                  | H3N2   | B      | H5N1  |
| 免疫前 IgY                 | 2mg/mL | < 400                 | < 400  | < 400  | < 400 |
| 3種混合HA(H1,H3,B)         | 2mg/mL | 102400                | 204800 | 102400 | < 400 |
| 3種混合HA(H1,H3,B)+rH5     | 2mg/mL | 102400                | 204800 | 102400 | 51200 |
| rH5                     | 2mg/mL | 800                   | 1600   | 800    | 51200 |

方法と結果

インフルエンザウイルスHA抗原



インフルエンザウイルス感染防止用素材の開発

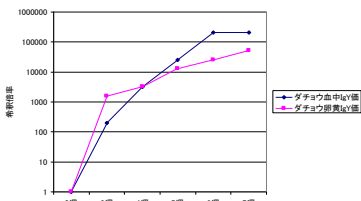


図1. 血中IgY及び卵黄IgY価

3種混合HAに対するダチョウIgY (3種混合HAを免疫)の抗体価の変化 (ELISA)。免疫前IgYの2倍以上のOD値を示す最高倍率を表示。

ダチョウ抗体

|              | 免疫前 IgY | 3種 HA | 3種 HA+rH5 | rH5 |
|--------------|---------|-------|-----------|-----|
| MDCK細胞       | 無感染     | 無感染   | 感染        | 感染  |
| H5N1感染MDCK細胞 | 無感染     | 感染    | 感染        | 感染  |

図2. 各抗体を用いたH5N1感染細胞の免疫蛍光抗体法

表2. インフルエンザウイルス野外出株に対する中和試験

| インフルエンザウイルス野外出株 | 中和活性価 (50%感染抑制値) |
|-----------------|------------------|
| A型 (H1N1)       | 2.0 µg/mL        |
| A型 (H3N2)       | 6.7 µg/mL        |
| B型              | 24.4 µg/mL       |

3種HA抗原を免疫したダチョウIgYの中和活性能をインフルエンザ患者より分離したA型H1N1、A型H3N2、B型の野外出株を用いて検証した。(協力機関:大阪府立公衆衛生研究所)

表3. 高病原性鳥インフルエンザウイルスH5N1に対する中和活性

| MDCK     |                        | 発育鶏胚     |                      |
|----------|------------------------|----------|----------------------|
| 抗体       | H5N1に対する中和活性価 (MDCK細胞) | 抗体       | H5N1に対する中和活性価 (発育鶏胚) |
| 免疫前IgY   | 測定不能 (>514 µg/mL)      | 免疫前 Ig Y | 測定不能 (>768 µg/mL)    |
| 3種HA+rH5 | 58.1 µg/mL             | r H 5    | 63.4 µg/mL           |
| rH5      | 6.7 µg/mL              |          |                      |

100TCID<sub>50</sub>に対する50%感染抑制値として表示

100EID<sub>50</sub>に対する50%感染抑制値として表示

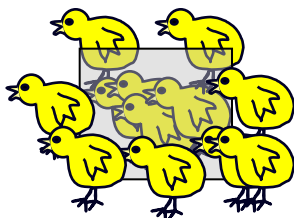


図3. 高病原性鳥インフルエンザウイルスH5N1の鳥→鳥の感染実験

ダチョウ抗体 (3種HA+rH5) を担持した不織布で作製したケージにH5N1感染ヒナを入れ、その周りに正常ヒナを多数飼育した。3日後の周囲ヒナの死亡率を算出した。H5N1感染ヒナ: 鼻腔内に10<sup>7.7</sup> TCID<sub>50</sub>のウイルス液を接種。鶏の感染実験はインドネシア国内のBSL3施設にて実施した。(協力機関: インドネシアボゴール農業大学 (Dr. Ekowatti))  
 ダチョウ抗体の担持により鶏-鶏の感染が防止された。

表4. ダチョウ抗体のH5N1感染防止効果 (応用例) 抗体担持不織布

|                        | 周囲ヒナの死亡率 |
|------------------------|----------|
| 不織布のみ                  | 50 %     |
| ダチョウ抗体担持不織布 (3種HA+rH5) | 0 %      |

現在、莫大な量のH5N1に対する中和抗体の作製に成功し、新型インフルエンザウイルス対応の感染・拡散防止用素材 (マスクやフィルター) の開発などの工業的実用化をはかっている。

# 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

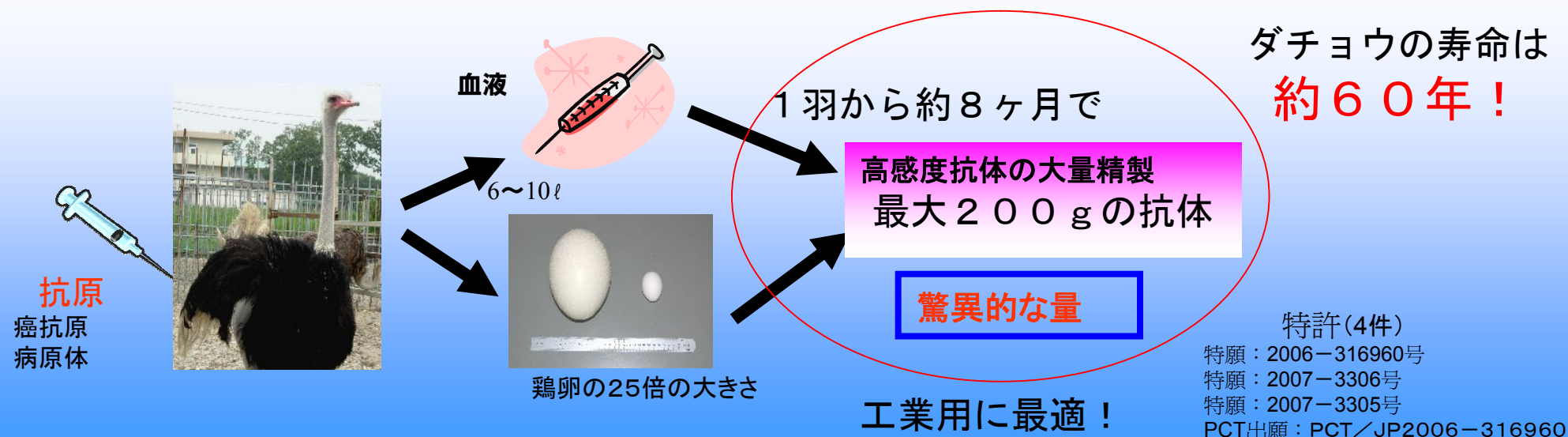
抗体は従来の製法では高価。

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

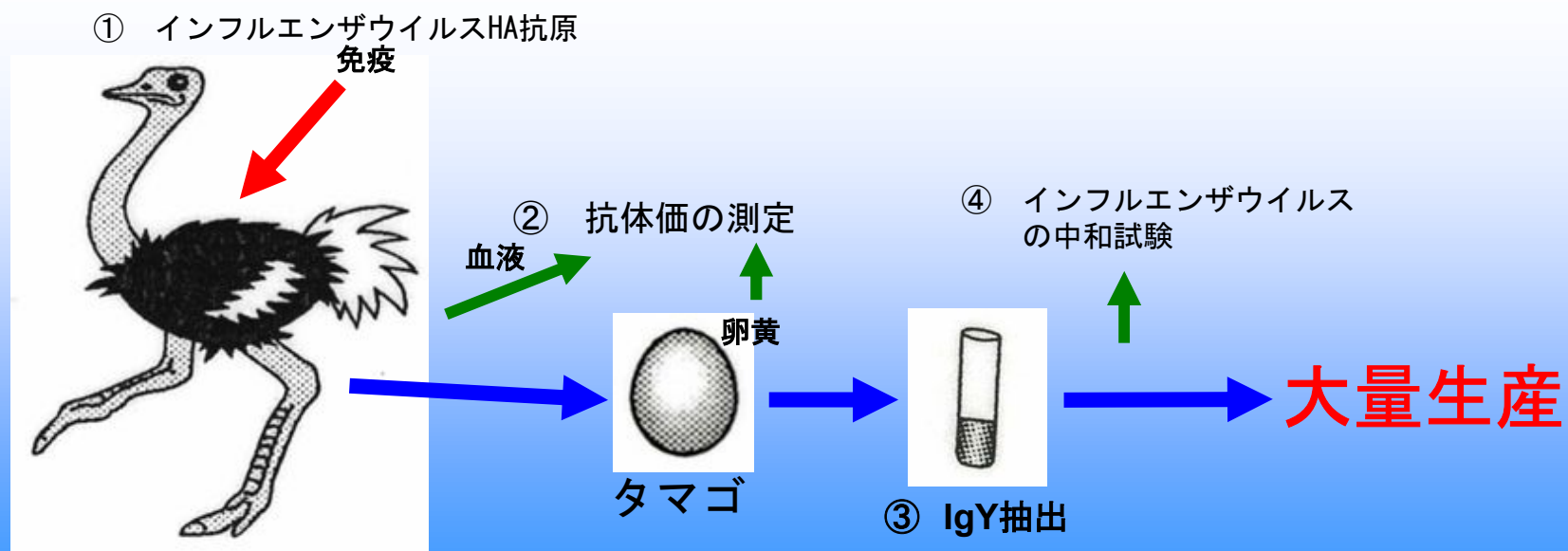
A型 : A/ニューカレドニア/20/99(H1N1)  
A/広島/52/2005(H3N2)  
B型 : B/マレーシア/2506/2004  
H5リコンビナントタンパク(H5N1ベトナム株)

## ② 血液・卵黄中の抗体価の測定

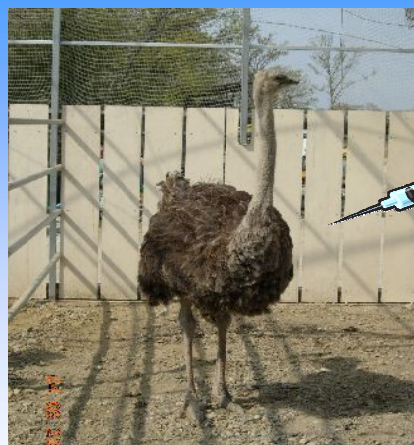
ELISA  
寒天ゲル内沈降反応

## ③ IgYの大量抽出

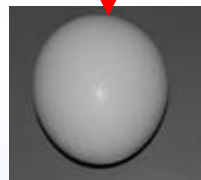
## ④ インフルエンザウイルスの中和試験



# 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

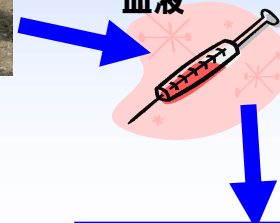
- ・A/ニューカレドニア/20/99(H1N1) 30  $\mu$ g
- ・A/広島/52/2005(H3N2) 30  $\mu$ g
- ・B/マレーシア/2506/2004 30  $\mu$ g

## H5リコンビナントタンパク

- ・H5N1(ベトナム株由来) 50  $\mu$ g

隔週免疫した

血液

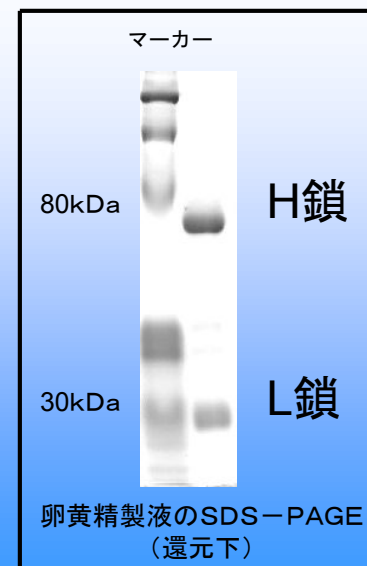


抗体価のチェック  
ELISA      ゲル沈

1個の卵黄から2gの  
ダチョウIgYを精製

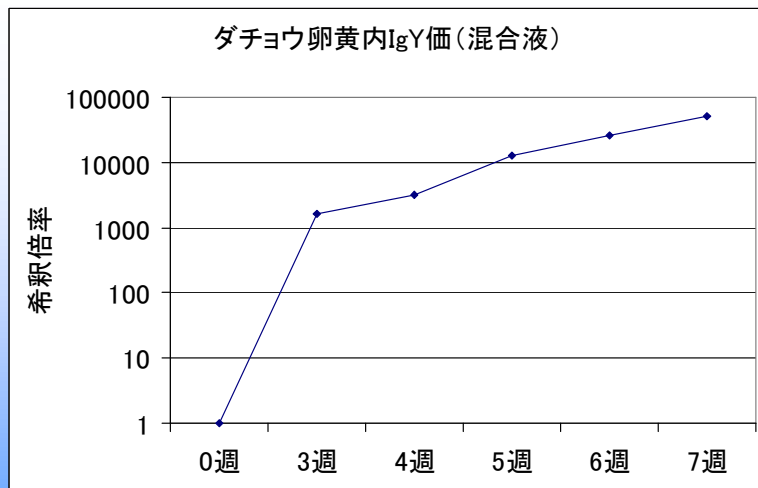
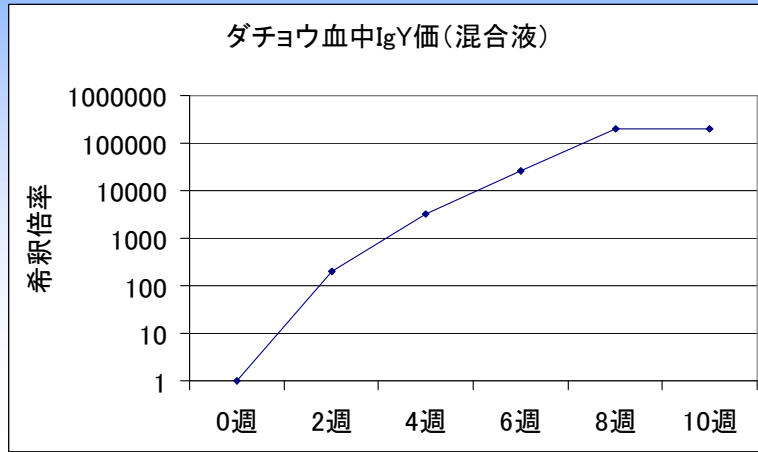


IgYの精製  
脱塩・濃縮



# 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

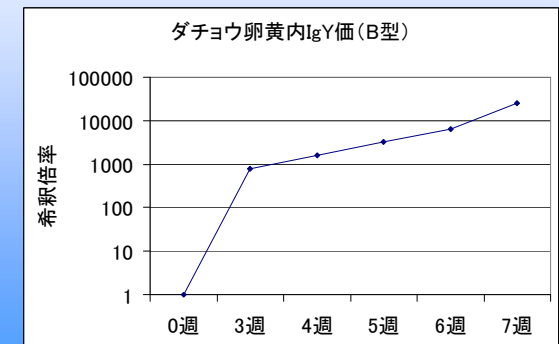
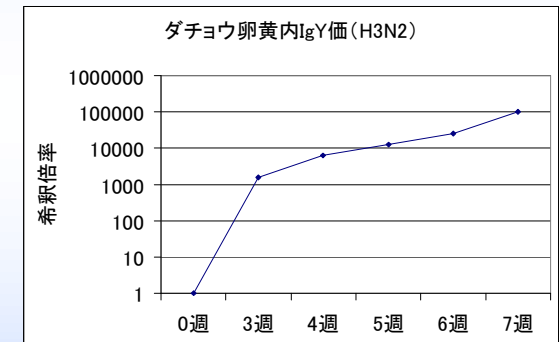
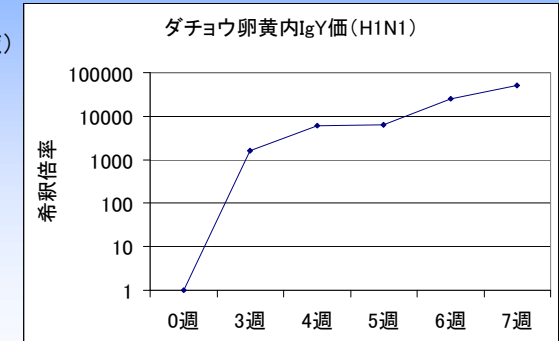


- 1: 抗原(混合液)
- 2: PBS
- 3: 0週目血清
- 4: 2週目血清
- 5: 4週目血清
- 6: 6週目血清
- 7: 8週目血清



- 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

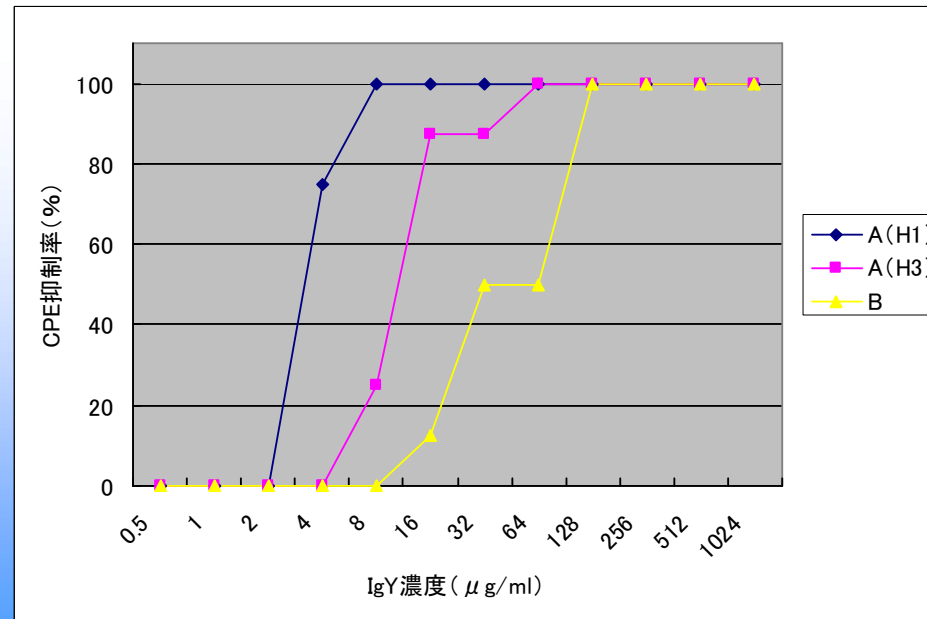


# 抗ヒトインフルエンザ・ダチョウ抗体中和試験 (MDCK培養細胞)

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 <math>\mu\text{g/ml}</math></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 <math>\mu\text{g/ml}</math></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 <math>\mu\text{g/ml}</math></u> |

CPE発現抑制率

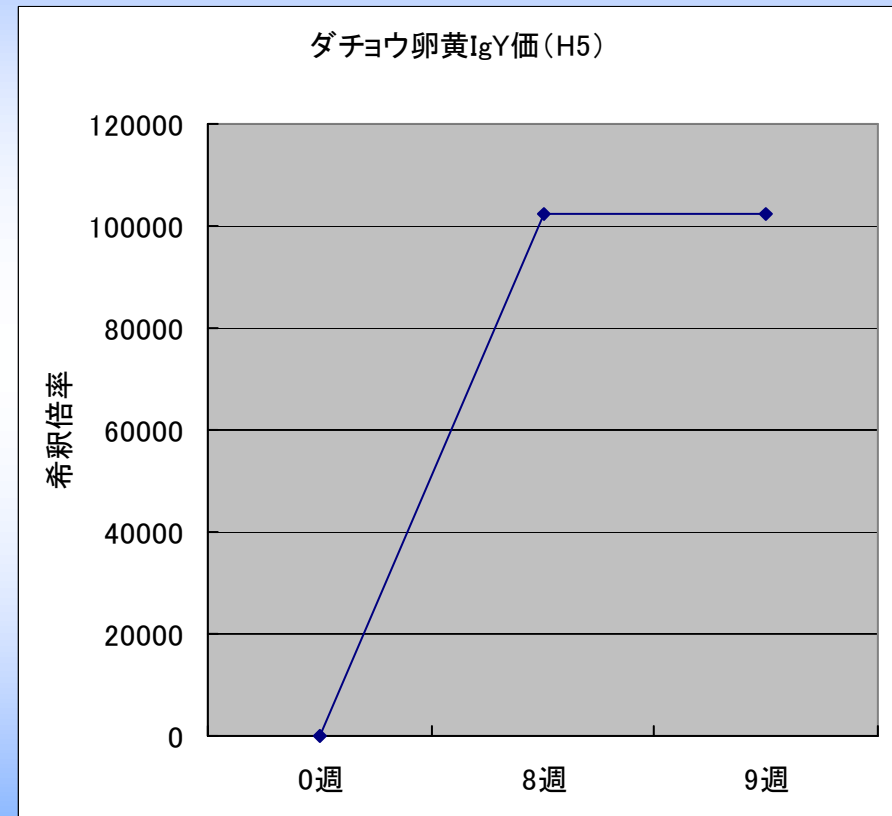
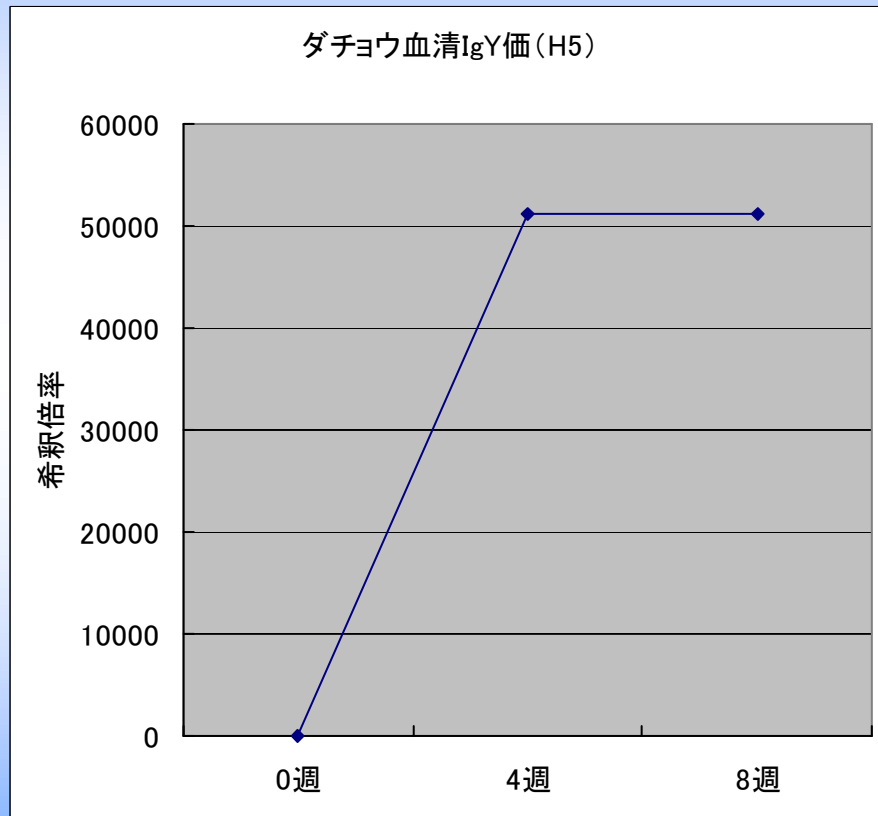




# 抗鳥インフルエンザ・ダチョウ抗体力価

ELISA

H5リコンビナントタンパク

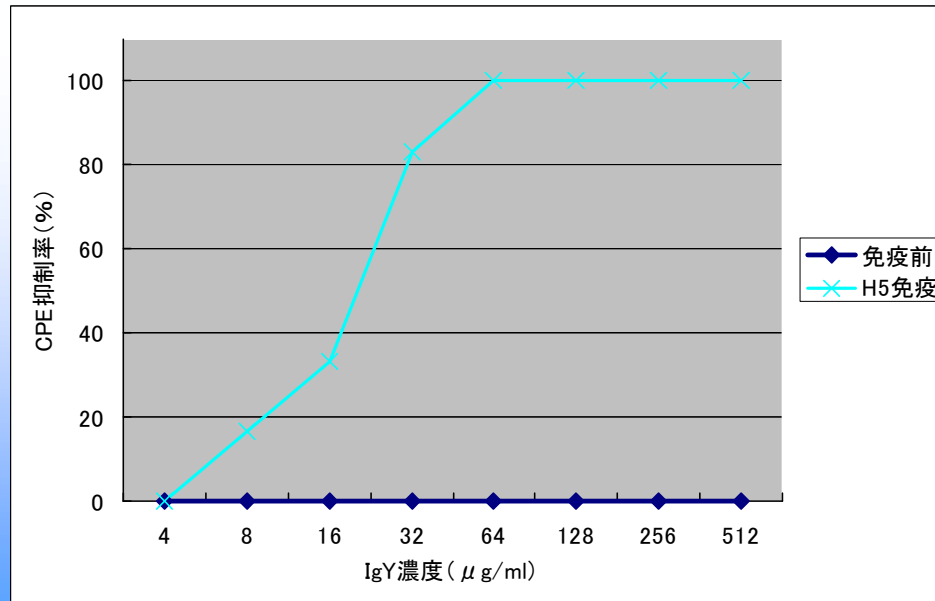


# 抗鳥インフルエンザ・ダチョウ抗体中和試験(MDCK培養細胞)

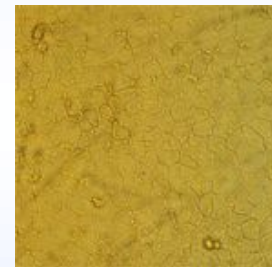
CPE発現数

| IgY濃度 (μg/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 μg/ml</u> |

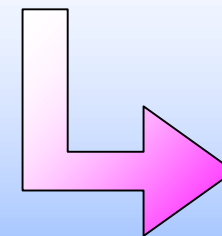
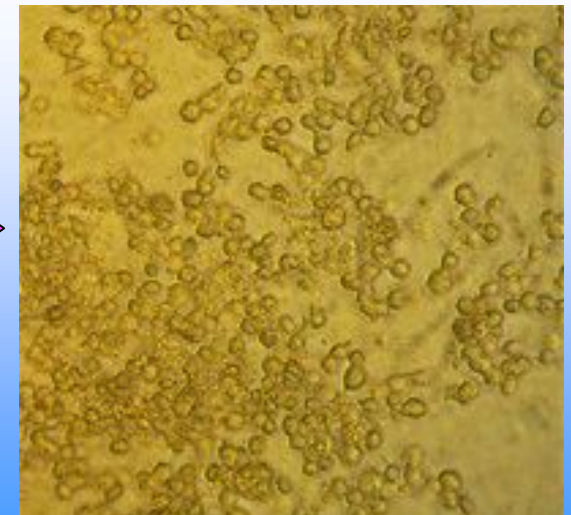
CPE発現抑制率



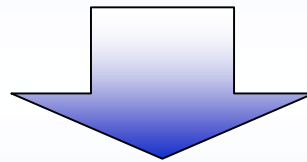
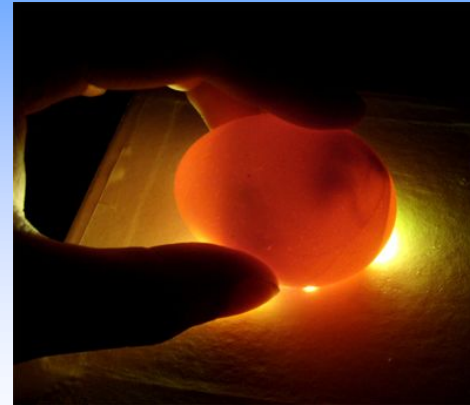
正常MDCK細胞



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

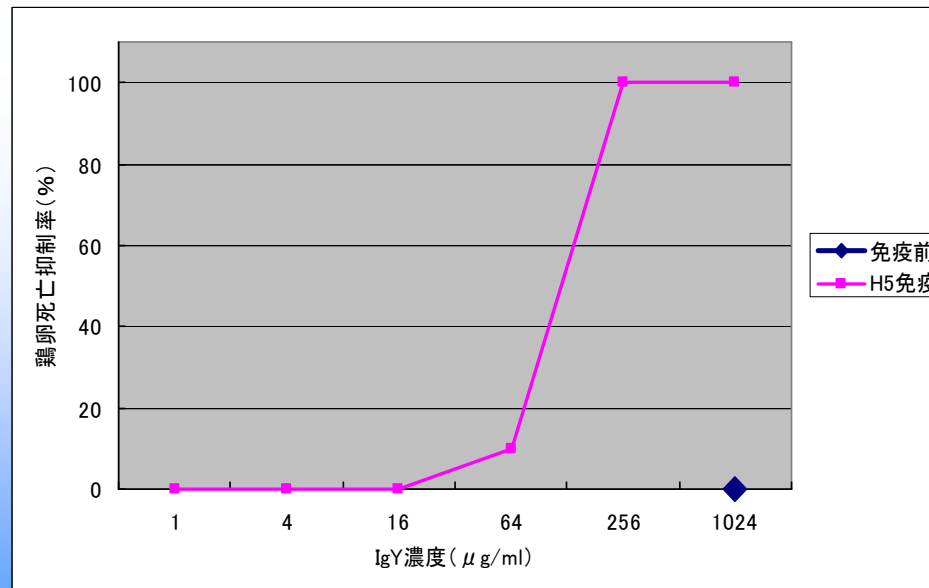


# 抗鳥インフルエンザ・ダチョウ抗体中和試験(発育鶏卵)

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 <math>\mu\text{g/ml}</math></u> |

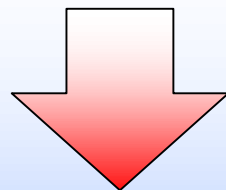
発育鶏卵死亡抑制率



## 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