[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi* Vol.62, No.12, pp.1769~1776, 1988]

各種ウシ病原ウイルスに特異的なモノクローン抗体の作製

江藤 望, 村上浩紀, 永峰賢一, 山田耕路, 大村浩久
(九州大学農学部食糧化学工学科)

昭和63年7月4日受理

Production of Monoclonal Antibodies Specific to Viruses That Cause Bovine Diseases

Nozomu ETO, Hiroki MURAKAMI, Ken'ichi NAGAMINE,
Koji YAMADA and Hirohisa OMURA
*Department of Food Science and Technology, Faculty of
Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812*

HmLu-1 cells established from hamster lung tissue was found to grow in a serum-free medium indefinitely. This enabled to simplify the purification of bovine virus particles multiplied in the cells and come into the medium, since no serum proteins came to contaminate in the virus preparation. Partially purified virus particles were injected to BALB/c mice intraperitoneally to sensitize B-lymphocytes producing antibodies specific to the virus antigen. Spleen cells of the mice were then fused with a hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) sensitive mouse myeloma cell line, P3X63Ag8U1, using polyethyleneglycol. Hybridoma lines secreting monoclonal antibodies specific to each viruses were obtained and cloned. The cross reactivities of these monoclonal antibodies against akabane, ephemeral fever, ibaraki and chuzan viruses were examined. The combined use of these virus-specific monoclonal antibodies will facilitate rapid detection of virus-infected tissues and individuals.
(Received July 4, 1988)

現在の動物ウイルス用診断薬は、ポリクローン抗体使用に起因する非特異的反応や、感度の低さ等の問題点が指摘されている。動物ウイルスをより特異的かつ高感度に検出するためにはモノクローン抗体 (MoAb) の使用が好ましく、それによって特異抗原の検出・同定による診断が可能となるだけでなく、アフィニティークラムクロマトグラフィーによる特異抗原の精製、さらにこれを用いての抗体測定やコンポーネントワクチンの作出、ウイルス構成蛋白やその変異に関する研究、抗イディオタイプワクチンの作出等が可能となる。

アルボウイルスに属するアカパネウイルスは、ウシの流産、早産、死産および異常分娩を引き起こす流行性の病原ウイルスである。また、ラプトウイルス科に属するウシ流行熱ウイルスは、急性熱性の伝染病であるウシ流行熱を引き起こす。この疾病は感染率が高いが、その症状が激しい割には死亡率は低い。しかしながら、泌乳の減少や停止、肉質や産肉の低下などによる経済的損害は大きい⁽¹⁾。また、レオウイルス科のオルビウイルス属に

分類されるイバラキウイルスはウシにイバラキ病を引き起こす流行性病原ウイルスである。この疾病は口内炎、咽喉頭および食道の麻痺による嚥下障害を主徴とし、感染率が高く死亡率も高い⁽²⁾。これらの病原ウイルスの感染の有無、感染ウイルスの同定を迅速正確に行うことができれば畜産資源の有効利用の面からも価値が高い。このような意図のもとにウイルスを高感度かつ特異的に検出しうる MoAb の作製を試みた。

本研究では、ウシに重大な疾病を引き起こすアカパネウイルス、ウシ流行熱ウイルスおよびイバラキウイルスに反応する MoAb を得ることを目標とした。抗原ウイルスを大量に得るためには、ウイルスを培養細胞に感染増殖させた後、ウイルス液を回収することが一般的に行われている。その際、ウイルス宿主細胞を血清含有培地を用いて培養を行うと血清タンパク質が混入するため、純度の高いウイルス液の調製が困難である。そこでまず被感染細胞の無血清培養条件について検討し、無血清下に培養された細胞のウイルス感染性についても調べ

た。次いで得られたウイルスでマウスを感作させた後、特異抗体を分泌する脾リンパ球をハイブリドーマとして選別した。

材 料 と 方 法

1. 試薬類 基本合成培地にはダルベッコ変法イーグル (DME) 培地⁽³⁾とハム F 12 (F 12) 培地⁽⁴⁾の成分濃度をそれぞれ指定の 5% 増しにした培地を 1:1 の割合で混合した DME/F 12 (DF) 培地⁽⁵⁾を用いた。DF 培地 1 l 中には細菌の増殖防止のためペニシリン G カリウム (明治製薬) 10 万単位、ストレプトマイシン硫酸塩 (明治製薬) 0.1 g, 緩衝剤として HEPES (*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid, 同仁化学) 15 mM, pH 調節のために NaHCO_3 14 mM を添加した。成長因子としてインシュリン (Novo, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), トランスフェリン (Sigma, T-2252, 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$), エタノールアミン (和光純薬, 20 μM) および亜セレン酸ナトリウム (和光純薬, 25 nM) を配合した ITES⁽⁶⁾を用いた。ウシ胎児血清 (FCS) およびウシ新生児血清 (NBGS) は M. A. Bioproducts より購入した。

活性ウイルス粒子定量に用いたブラック法寒天添加維持培地は、アガロース ME (SeaKem) の 1% 溶液と 2 倍濃度の DF 培地を 40°C で保温し、使用直前に等量ずつ混合した。ニュートラルレッド添加維持培地は、0.25% ニュートラルレッド (和光純薬) 溶液、1% アガロース溶液および 5 倍濃度 DF をそれぞれ 40°C で保温し、使用直前に 3:5:2 の割合で混合して用いた。

ウイルス精製の際はトヨパール HW-50 カラム (東ソー, 16 mm×34 cm), MonoQ カラム (Pharmacia, HR 5/5) および TSKgel G 3000 SW カラム (東ソー, 7.5 mm×60 cm) を、また MoAb 精製の際は TSKgel G 4000 SW カラム (東ソー, 7.5 mm×60 cm) および HCA カラム A-7610+P-4001 (三井東圧化学, 7.6 mm×10 cm, 4.0 mm×1.0 cm) を Pharmacia FPLC システムあるいは東ソー液体クロマトシステムに接続して用いた。

免疫の際用いたフロイント完全アジュバント (FCA) および不完全アジュバント (FICA) は Difco より購入した。融合剤として用いた 50% ポリエチレングリコール (PEG) 溶液は、PEG 1000 (和光純薬) 1 g をオートクレーブ滅菌し 40°C に冷却した後 1 ml の DF 培地を加え調製した。ハイブリドーマ選別には、15% FCS を含む DF 培地にヒポキサンチン (和光純薬, 100 μM), アミノプテリン (Sigma, 0.4 μM), チミジン (和

光純薬, 16 μM) を添加した HAT 培地を用いた。またハイブリドーマの初期培養には HAT 培地よりアミノプテリンを除いた HT 培地を用いた。

酵素免疫測定法 (ELISA⁽⁷⁾) に関して以下の試薬を用いた。細胞固定剤として 0.006% グルタルアルデヒド含有生理リン酸緩衝液 (PBS⁽⁸⁾:GPBS), 洗浄剤として 0.05% Tween 20 含有 PBS 溶液 (TPBS), ブロッキング剤として 3% ウシ血清アルブミン (Armour Pharmaceutical, BSA) 含有 PBS 溶液 (3% BSA/PBS), 抗抗体の希釈用溶液として 1% BSA 含有 TPBS 溶液 (1% BSA/TPBS), 基質溶液として 0.06% H_2O_2 含有 0.2 M クエン酸緩衝液 (pH 4) と 0.6 mg/ml ABTS [*p*-2, 2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, 和光純薬] 水溶液を等量ずつ使用直前に混合したもの、反応停止液として 1.5% シュウ酸溶液を用いた。またペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Cat # 3211-0121, POD-anti IgG) および抗マウス IgM 抗体 (Cat # 3211-0201, POD-anti IgM) は Caple より購入した。EIA 用マイクロプレート用分光光度計は東洋測器 ETY-96 を用いた。

2. 細胞株およびウイルス ハイブリドーマ作製の親細胞は、BALB/c 系マウスミエローマ変異株 P 3 X 63 Ag 8 U 1 (P 3 U 1) 細胞⁽⁹⁾を用い、10% FCS 含有 DF 培地中で継代培養した。ウイルス増殖用の宿主細胞としてはハムスター胎児由来細胞株 HmLu-1 を用いた。この細胞株は当初 10% FCS を含む MEM 培地⁽¹⁰⁾中で継代されたが、後述するように血清および成長因子を含まない DF 培地中でも良好に増殖継代できることがわかった。したがって、本研究では無血清 DF (serum-free DF, SF-DF) 培地中で培養した HmLu-1 細胞を用いてウイルスを増殖させた。細胞はプラスチックシャーレに接種し、加湿した 5% CO_2 -95% 空気を通気した炭酸ガス恒温器中で培養した。

使用したウイルス株はアカパネウイルス OBE-1 株、ウシ流行熱ウイルス YHL 株およびイバラキウイルス No. 2 株である。これらのウイルスはいずれもワクチン用に作製された弱毒株で、ウシに対する感染性は持たないことが確認されたものである。

3. ウイルスの増殖 HmLu-1 細胞を 1×10^5 細胞/ml の割合で 90 mm シャーレに接種し、SF-DF 培地中で 2 日間培養した。培地除去後、SF-DF 培地に懸濁したウイルスを接種し、37°C で 90 分間保温した。細

胞に吸着していないウイルスを PBS で洗浄後, SF-DF 培地を添加し 37°C の炭酸ガス恒温器中で培養した. 経目的に培養液を回収し, 培地中の活性ウイルス粒子をブランク法により測定した.

4. 活性ウイルス粒子の定量 シャーレ (35 mm) に HmLu-1 細胞を 1×10^5 細胞/ml の割合で接種し 2 日間培養した. 次に SF-DF 培地で希釈したウイルス液 0.5 ml を, 培地を除去したシャーレに接種して 90 分間恒温器中で保温してウイルスを吸着させた. ウイルス液除去後, 寒天添加維持培地を 2 ml 加え寒天を固化させ, 37°C の炭酸ガス恒温器中で 2 日間培養した. 次にニュートラルレッド添加維持培地を 1 ml 重層し, 1 日後ブランク数を計測した.

5. ウイルスの精製 ウイルスを含む SF-DF 培地を $1000 \times g$, 5 分間遠心し, その上清から硫酸アンモニウム法 (80%, 0°C, 4 時間) によりウイルスを沈澱させ, 10 mM リン酸緩衝液 pH 7.3 (PB) で抽出した. このウイルス液を PB で平衡化したトヨパール HW-50 カラムで分画し素通り画分を回収した. このウイルス画分を PB で平衡化した Mono Q カラムにかけ, 吸着したウイルスは 0~1 M NaCl 濃度勾配を用いて溶出させた. さらに凍結乾燥を行った後 TSKgel G 3000 SW カラムにかけ濃縮と脱塩を行い精製ウイルス液を得た. ウイルス画分の溶出位置は HmLu-1 細胞に対する感染活性を観察することで決定した.

6. ハイブリドーマの作製⁽¹¹⁾ アカバネウイルス OBE-1 およびウシ流行熱ウイルス YHL においてはウイルス培養液を免疫原として用いた. またイバラキウイルス No. 2 においては精製ウイルスを免疫原とした. 初回の免疫は蛋白量 100 μ g の抗原に FCA を加え BALB/c マウスの腹腔に投与した. 3 週間後同量の抗原に FICA を加え腹腔に 2 回目の投与を行った. さらに 3 週間後 2 回目と同様に抗原を投与し 5 日後に細胞融合を行った. 融合には対数増殖期の P3U1 細胞を 1×10^7 個用いた. 一方リンパ球は, 免疫したマウスの脾臓を針で数回つつき孔を開けた後, 注射器で培地を脾臓の内部に注入して採取し, 1×10^8 個を融合に供した. P3U1 細胞懸濁液とリンパ球懸濁液をおのおの 50 ml 容遠心管にとり混合した後, $300 \times g$ で 5 分間遠心し上清を完全に除去した後, 50% PEG 溶液 1 ml をピペットの先で細胞ペレットを穏やかに攪拌しながら 1 分間かけて添加した. さらに, 遠心管の底を手で保温しながら 1 分間

遠心管をゆっくりと回し細胞ペレットに PEG をなじませた後, DF 培地 1 ml を添加し遠心管をゆっくりと回しながら 9 ml の DF 培地を 30 秒ごとに添加して PEG を希釈した. 細胞懸濁液を $300 \times g$ で 5 分間遠心し, 得られた細胞ペレットを 15% FCS 含有 DF 培地 100 ml に静かに懸濁し, 親細胞密度を 1.0×10^5 細胞/ml とした. この細胞懸濁液を 10 枚の 96 穴培養プレートに各穴 100 μ l ずつ分注し, 5% CO₂-7% O₂ を通気した 37°C の炭酸ガス恒温器内で培養した. 24 時間後, 2 倍濃度の HAT 培地を各穴に 100 μ l ずつ添加した. 以後, 3~4 日ごとに培養液 100 μ l を新しい HAT 培地 100 μ l と交換した. ハイブリドーマの出現が認められた穴については, 適宜 HAT 培地から HT 培地に切り換え, ハイブリドーマの増殖を促進させた. さらに, 十分なハイブリドーマの増殖が認められた穴については, その培養上清の抗体量および抗体のウイルスとの反応性を後述する ELISA 法により検定した. 目的とする抗体の分泌が認められたハイブリドーマは, 直ちに 48 穴培養プレートに移しスケールアップを行った. クローニングは限界希釈法により行った. フィーダー細胞は用いなかった.

7. 特異的モノクローン抗体の検出 生体内の抗体濃度は IgG, IgM が高いので, 得られる特異抗体は IgG および IgM の確率が高いと考えられた. そこで特異的 MoAb の検出には 2 次抗体としてペルオキシダーゼで標識された抗マウス IgG 抗体および抗マウス IgM 抗体を混合したものをを用いて以下に述べる ELISA 法により行った. アカバネウイルス OBE-1 を認識する MoAb 検出については OBE-1 感染 HmLu-1 細胞と非感染 HmLu-1 細胞を抗原とした. 96 穴培養プレートに HmLu-1 細胞を 1×10^5 細胞/ml で接種し, 37°C の 5% CO₂ 炭酸ガス恒温器内で培養した. 2 日後に 48 穴に OBE-1 株溶液を接種し, 2 日後 GPBS で細胞とウイルスを固定した. 細胞層を TPBS で 1 回洗浄した後, 非特異的吸着を防ぐため各穴に 350 μ l の 3% BSA/TPBS を添加し, 室温で 2 時間放置した. 溶液を捨て TPBS で 3 回洗浄後, 1 次抗体として, 1 種類のハイブリドーマの培養上清 50 μ l をウイルス感染細胞を固定した穴と非感染細胞を固定した穴に添加し, 37°C で 1 時間保温した. 培養上清を捨て TPBS で 3 回洗浄し 2 次抗体として POD-anti IgG および POD-anti IgM を 1% BSA/TPBS で 1000 倍に希釈し, 各穴に 100 μ l ずつ添加した. 37°C で 1 時間保温した後, 溶液を捨て TPBS

で4回洗浄した。最後に基質溶液を各穴に 100 μ l ずつ添加し、37°C で発色させた。15 分後、1.5% シュウ酸溶液を各穴に 100 μ l ずつ添加し反応を停止させた。ETY-96 を用いて、415 nm における吸光度を測定した。

イバラキウイルス No.2 とウシ流行熱ウイルス YHL については、精製ウイルスを抗原としアカバネウイルスに対する抗体を検出した場合と同様に POD-anti IgG 抗体と POD-anti IgM 抗体の混合物を用いて ELISA 法により行った。

得られた特異的 MoAb のクラスを ELISA 法により同定するとアカバネウイルスを認識する7種の MoAb はすべて IgG であり、イバラキウイルスを認識する3種の MoAb およびウシ流行熱ウイルスを認識する7種の MoAb はすべて IgM であった。これらの MoAb を産生するハイブリドーマを成長因子 ITES を添加した DF 培地 (ITES-DF) で無血清培養を行い、その培養上清から硫酸アンモニウム法 (50%, 0°C, 12 時間) により MoAb を沈澱させ 10 mM リン酸緩衝液 pH 6.7 で抽出した。これを TSKgel G 4000 SW カラムを用いたゲル濾過を行い抗アカバネウイルス MoAb は分子量約 150 K の IgG に相当する抗体画分を、抗イバラキウイルス MoAb および抗ウシ流行熱 MoAb は分子量約 900 K の IgM に相当する抗体画分を分取した。これらのものをそれぞれ HCA カラムで精製した⁽¹²⁾。精製 MoAb を Osborn の系⁽¹³⁾による SDS-PAGE にかける分子量を測定したところ、これらの MoAb の分子量は標準 IgG および IgM のそれらに一致した。以降の実験は HCA カラムで精製された抗体を用いて行った。

8. モノクローン抗体の特異性および交叉反応性の検定 抗原に対する特異性をウイルスの精製度による MoAb の反応性の向上により確認した。さらにアカバネウイルス OBE-1 に対する MoAb については、ウイルスを Laemmli⁽¹⁴⁾ の系による SDS-PAGE にかけた後ウェスタンブロット法⁽¹⁵⁾により確認した。またウシに対する病原ウイルスであるイバラキウイルス No.2 株、ウシ流行熱 YHL 株、アカバネウイルス OBE-1 株、中山ウイルス K-47 株の4種類を抗原として交叉反応性を ELISA 法により試験した。

結 果

1. HmLu-1 細胞の無血清培養とウイルス生産性

HmLu-1 細胞を 6×10^4 細胞/ml の割合で 35 mm

Table I. Culture Conditions of HmLu-1 Cells

Basal media	Additives	Doubling time (hr)	Final density (cells/ml)
DME	ITES	31	4.0×10^5
	Vitamin ^a	32	2.7×10^6
DME/F 12 (DF)	—	30	2.4×10^6
	ITES	30	2.5×10^6
	NBCS	25	2.8×10^6

^a Biotin, vitamin B₁₂.

Fig. 1. Growth Curves of Akabane Virus OBE-1 in SF-DF (O) and 10% NBCS-DF (●) Media.

のシャーレに接種し 10 日間培養を行った場合、基本合成培地 DME に成長因子 ITES を添加した ITES-DME 培地では細胞の到達密度は 4.0×10^5 細胞/ml に留まったのに対し、ITES-DF 培地では 2.5×10^6 細胞/ml にも達し、ITES-DF 培地は HmLu-1 細胞の栄養要求性を高度に満たしていることが示唆された。また DF 培地に NBCS を 10% 添加した NBCS-DF 培地と成長因子を含まない SF-DF 培地との比較を行った結果、倍加時間では NBCS-DF 培地のほうが若干短かったものの最終到達密度ではほぼ同等のレベルに達した (Table I)。さらに HmLu-1 細胞は SF-DF 培地中で 2 か月間にわたり、その増殖速度を低下させることなく継代が可能であった。これらの結果から HmLu-1 細胞は SF-DF 培地中で永続的に培養が可能であると考えられた。

HmLu-1 細胞のウイルスの生産性を NBCS-DF および SF-DF 培地についてアカバネウイルス OBE-1 を用いて比較した。血清培地中の HmLu-1 細胞にウイルスを感染させると、感染 1 日後には培養液中にウイルス活性が検出され、そのプラーク数は 10^7 であった。培養 2 日目には、その数は最大値に達し 10^8 となった。その後培養日数の経過とともに培養液中の活性ウイルス数は漸減し、5 日後には 10^6 になった (Fig. 1)。この活性ウイルス数の減少は血清中の不活性化物質によるものと考えられる。一方無血清培地中の細胞からのウイルスの生産経過は血清培地中のそれよりもほぼ 1 日遅れて 3 日後に最高値となった。その活性ウイルス数は血清培地中での場合と同様 10^8 であった。無血清培地中では培養日数とともにウイルスが不活化されることはなく、5 日後でも培養液中の活性ウイルス数は 10^8 を維持していた。無血清培地中で培養された HmLu-1 細胞に対してもウイルス感染が成立するのみならず、血清を含まないために純度の高いウイルス液がウイルスの失活を伴うことなく得られることが明らかとなった。以上の結果よりウイルスの生産には SF-DF 培地のほうが優れていることが明らかとなり、以後のウイルス培養には SF-DF 培地を用い感染後 3 日目にウイルスを回収した。

2. モノクローン抗体の特異性の検定

アカバネウイルス OBE-1 株、ウシ流行熱ウイルス YHL 株、イバラキウイルス No. 2 株の無血清培養上清あるいは精製ウイルスを抗原とし、BALB/c マウス腹腔投与した後、脾臓リンパ球とマウスミエローマ P3U1 細胞を PEG 法により融合しハイブリドーマを得た。使用した抗原はウイルス以外に HmLu-1 細胞由来の成分を含有している可能性があるので得られた MoAb のすべてがウイルスに特異的であるわけではない。MoAb がウイルスに特異的であることの確認は蛋白量を一定とした非感染 HmLu-1 細胞破碎液、ウイルスを含む培養上清、精製ウイルスに対して反応性が順次増加することを利用して行った。アカバネウイルス OBE-1 株と MoAb 4F-12 の場合を例として Table II に示した。おのおの画分の蛋白量 $3 \mu\text{g}$ 中のウイルス量と該当画分と結合した 4F-12 を ELISA 法で測定した場合の O. D. 値を示した。ウイルス含量と O. D. 値は対応しており、4F-12 が細胞成分には反応せずウイルスとのみ反応していることがわかる。また Fig. 2 に示したとおり 4F-12 はアカバネウイルス OBE-1 由来の分子量約 30 K の物質

Table II. Reactivity of Monoclonal Antibody 4F-12 against Various Preparations of Virus

Sample	O. D. (415 nm)
Lysate of HmLu-1 cells ^a	0.061
Supernatant of virus culture ^b	0.079
Purified virus ^c	0.594

^a Uninfected HmLu-1 cells were suspended in PBS and centrifuged at $1500 \times g$ after super-sonication.

^b Akabane virus was infected to HmLu-1 cells and was cultured for 2 days. Supernatant of virus culture was centrifuged at $1500 \times g$.

^c 80% ammonium sulfate precipitate of the above viral solution was gel-filtrated and then applied to anion exchange chromatography.

These samples were reacted with a monoclonal antibody 4F-12. The antibody bound to the samples was detected by ELISA using peroxidase conjugated anti mouse antibody (IgG) at 415 nm.

Fig. 2. Reactivity of Monoclonal Antibody 4F-12 against Akabane Virus OBE-1 Components. 1, Supernatant of Akabane virus OBE-1 culture; 2, supernatant of uninfected HmLu-1 cells culture; A, monoclonal antibody 4F-12; B, conventional mouse IgG.

に特異的に反応することが明らかとなった。また 8B-9, 8B-10, 8B-11, 1A-4, 2A-2, 5G-7 についても同様の結果が得られた。このことよりアカバネウイルス OBE-1 を免疫原として得られた 7 種の MoAb は同一のウイルス構成成分を認識していることが示唆された。

3. モノクローン抗体と各種ウイルスの反応性

上述の方法によってウイルスとの特異的反応性が確認

された MoAb のうち7つを選び4種のウシ病原ウイルスに対する交叉反応を求めた (Table III). Y-1 E 6-8, Y-1 A 9-11, Y-1 A 9-19 はウシ流行熱ウイルス YHL を免疫原とし, I-1 A 1, I-1 F 3 はイバラキウイルス No. 2 を免疫原とし, また 4 F-12 と 1 A-4 はアカバネウイルス OBE-1 を免疫原として得られた MoAb である. 4 F-12 と 1 A-4 は免疫原であるアカバネウイルス OBE-1 とのみ反応し, 他のウイルス株との交叉反応はなかった. また 1 A-4 は 4 F-12 と比較して強い反応性を有していた. I-1 A 1 および I-1 F 3 も免疫原であるイバラキウイルス No. 2 とのみ弱くではあるが特異的に反応した. Y-1 E 6-8 は免疫原であるウシ流行熱ウイルス YHL とのみ特異的にしかも強く反応した. また Y-1 A 9-11

および Y-1 A 9-19 は複数の抗原と反応した. このように各 MoAb は, その各ウイルスに対する反応性の違いから, おのおの異なる抗原決定基を認識していることが示唆された.

4. モノクローン抗体のウイルスに対する親和性

ウシ流行熱ウイルス YHL を抗原とした場合の Y-1 E 6-8, Y-1 A 9-19, Y-1 A 9-11 の親和性を Fig. 3 に示した. これら3つの抗体は同じウイルス構成成分を認識してはいるが, Y-1 E 6-8 は Y-1 A 9-19 および Y-1 A 9-11 よりもウシ流行熱ウイルス YHL に対して強い親和性を示した. また上述したように交叉反応性の点からも Y-1 E 6-8 は他の2つの抗体とは異なっており, Y-1 E 6-8 が認識している抗原決定基はウシ流行熱ウイルス YHL

Fig. 3. Dose-Response Curves of Monoclonal Antibodies Y-1 E 6-8 (▲), Y-1 A 9-19 (●) and Y-1 A 9-11 (■) against Antigen of Bovine Ephemeral Fever Virus YHL.

Fig. 4. Dose-Response Curves of Monoclonal Antibodies 1 A-4 (▲) and 4 F-12 (●) against Antigen of Akabane Virus OBE-1.

Table III. Reactivity of Monoclonal Antibodies against Various Viruses

Virus	MoAb						
	Y-1 E 6-8	Y-1 A 9-11	Y-1 A 9-19	I-1 A 1	I-1 F 3	4 F-12	1 A-4
Bovine ephemeral fever virus YHL	+++	+	+	-	-	-	-
Ibaraki virus No. 2	-	-	+	+	+	-	-
Akabane virus OBE-1	-	+	+	-	-	+	+++
Chuzan virus K-47	-	-	-	-	-	-	-

Monoclonal antibodies Y-1 E 6-8, Y-1 A 9-11 and Y-1 A 9-19 (IgM) are the product of hybridoma obtained by fusion of P 3 X 63 Ag 8 U 1 and mouse spleen cells immunized with bovine ephemeral fever virus YHL. The I-1 A 1 and I-1 F 3 (IgM) are derived from spleen cells immunized with Ibaraki virus No. 2. The 4 F-12 and 1 A-4 (IgG) are derived from spleen cells immunized with Akabane virus OBE-1.

に固有のものであることが示唆された。またアカパネウイルス OBE-1 を抗原とした場合の 1A-4 と 4F-12 の親和性を Fig. 4 に示した。この2つの MoAb はウェスタンブロット法により同じウイルス構成成分を認識していることが示唆されたが、抗原との反応性の強度は顕著に異なっていた。1A-4 は OBE-1 抗原に対して強い親和性を有しており、抗体濃度が低い場合でもウイルス抗原と特異的にしかも強く反応することが可能であり優秀な MoAb であると考えられる。

考 察

ウイルスワクチン製剤製造のためのウイルスは従来から血清含有培地中で増殖させた宿主細胞を用いて生産されてきた。しかし、この方法には2つの難点がある。その1つは細胞の培養に使用する血清中にそのウイルスに対する抗体が含まれていないことが必要なことである。もし使用する血清中に目的ウイルスに対する抗体が存在すればウイルスの増殖を阻害する。したがって使用する血清は、あらかじめ抗ウイルス抗体を含んでいないことを検定する必要がある。さらに大規模にウイルスを生産しようとする場合には当然多量の血清が必要となるが、抗ウイルス抗体を含んでいない血清、すなわちウイルスに感染していない個体の血清を多量に得ることは必ずしも容易ではない。第二に血清は物理化学的に性質の異なったタンパク質を大量に含んでいる。したがって血清含有培地からウイルスを精製するためには多くの操作を必要とし、ウイルスの回収量も少なくなる。現在のワクチン製剤は大なり小なり血清タンパク質（一般にはウシ由来）を含んでいる。このことは、このウイルス製剤をとくに異種動物に繰り返し投与する場合にはウシ血清タンパク質に基づく抗原抗体反応を惹起し、重大な障害となることがある。無血清培地で増殖させたウイルスから製造されるワクチン製剤にはこのような欠点はない。これらの点で無血清培地中でウイルスを生産することが強く望まれる。

われわれはこのために各種ウイルス生産に用いられる HmLu-1 細胞を無血清で培養する条件を検討した結果、この細胞が無血清 DF 培地中で旺盛に増殖することを見出した。この無血清培地中の HmLu-1 細胞のウイルス生産性を試験したところ、無血清培地中でウイルス量が最高値に達するための期間は血清培地中でのそれに比較して若干遅れるが生産されるウイルスの量は両培地間

で差が認められなかった。血清培地中ではウイルス量が最高値に達した後活性が低下した。これは血清培地中にウイルスを不活性化させる因子が存在していることを示している。このことはウイルス生産の行程管理のうえから不利な点となる。無血清培地を用いて純度の高いウイルスを生産する方法が確立されたことはワクチン製造に新たな局面を与えたといえるであろう。

アカパネウイルスを認識する7種の MoAb は分子量 150 K の IgG であり、イバラキウイルスを認識する3種の MoAb およびウシ流行熱ウイルスを認識する7種の MoAb は分子量 900 K の IgM であった。得られたもののうち7種の MoAb の各種ウイルス株に対する反応性を検討することにより、2種の MoAb がイバラキウイルス No. 2 と、また1種の MoAb がウシ流行熱ウイルス YHL と、さらに2種の MoAb がアカパネウイルス OBE-1 に対して選択的に反応することが明らかとなった。

一方、その他の MoAb は異なる2種以上のウイルス株とも反応するものであった。Y-1 A 9-11 についてはウシ流行熱ウイルス YHL およびアカパネウイルス OBE-1 に反応したがイバラキウイルス No. 2 および中山ウイルス K-47 には反応しないことから、この抗体はウシ流行熱ウイルス YHL とアカパネウイルス OBE-1 に共通した抗原に反応している可能性がある。また Y-1 A 9-19 も同様に YHL, No. 2, OBE-1 の3種に共通する抗原と反応している可能性がある。

さらにアカパネウイルス OBE-1 に対する MoAb 1A-4 およびウシ流行熱ウイルス YHL に対する MoAb Y-1 E 6-8 は免疫原に対し特異的にしかも強く反応するのでこれらのウイルスの特異的検出試薬として利用できる可能性が示唆された。

要 約

ウシのアカパネ、流行熱、イバラキ等の各ウイルスに反応する MoAb を分泌するハイブリドーマの作製を試みた。まず感作Bリンパ球を得るための抗原としてのウイルスを生産するために、宿主細胞である HmLu-1 細胞の無血清培養を試みた。その結果 SF-DF 培地によって血清添加培地とほぼ同様の増殖が可能であることを見出した。さらに無血清培地中で培養された HmLu-1 細胞に対してウイルス感染が成立するのみならず、血清を含まないために純度の高いウイルス液がウイルスの失活

を伴うことなく得られることが明らかとなった。次に、マウスミエローマ P3U1 細胞を親細胞として PEG 法によりハイブリドーマの作製を行った結果、アカバネウイルス OBE-1 株に対して 7 種、ウシ流行熱ウイルス YHL に対して 7 種、イバラキウイルス No.2 に対して 3 種の抗原に反応する MoAb が得られた。得られた MoAb のうち 7 種について、4 種（アカバネウイルス OBE-1, ウシ流行熱ウイルス YHL, イバラキウイルス No.2, 中山ウイルス K-47）のウシ病原ウイルスに対する交叉反応性を検討した結果、MoAb 1A-4 がアカバネウイルス OBE-1 に対して、また、MoAb Y-1E6-8 がウシ流行熱ウイルス YHL に対して特異的にしかも強く反応することが示唆された。

HmLu-1 細胞、ウイルス株を分与いただいた農林水産省家畜衛生試験場に深謝申し上げる。

- (1) 内藤元男：「畜産大辞典」，養賢堂，1978，p. 1109.
- (2) 中村良一，久米清治，酒井 保：「臨床獣医ハンドブック」，養賢堂，1979，p. 249.
- (3) H. J. Morton : *In Vitro*, **6**, 89 (1970).
- (4) R. G. Ham : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*

- A.*, **53**, 288 (1965).
- (5) D. Barnes and G. Sato : *Anal. Biochem.*, **102**, 255 (1980).
- (6) H. Murakami, H. Masui, G. Sato, N. Sueoka, T. Chow and T. Sueoka : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **79**, 1185 (1982).
- (7) J. Voller, D. Bidwell and A. Bartlett : "Manual of Clinical Immunology," ed. by N. R. Rose and H. Friedman, American Society for Microbiology, 1980, p. 359.
- (8) R. Dulbecco and M. Vogt : *J. Exp. Med.*, **99**, 167 (1954).
- (9) D. E. Yelton, B. A. Diamond, S. P. Kwan and M. D. Scharff : *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **81**, 1 (1979).
- (10) H. Eagle : *Science*, **130**, 432 (1959).
- (11) G. Galfre and C. Milstein : *Methods Enzymol.*, **73**, 3 (1981).
- (12) 飯野信二，山本久美子，村上浩紀，山田耕路，石垣恭市：組織培養研究，**7**，142 (1988).
- (13) K. Weber and M. Osborn : *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406 (1969).
- (14) U. K. Laemmli : *Nature*, **227**, 680 (1970).
- (15) H. Towbin, T. Staehelin and J. Gordon : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **76**, 4350 (1979).