

■ 研究課題名

カイコバキュロウイルスによる犬フィラリア診断薬の開発及び感染防御抗体の解析

■ 研究の目的

イヌフィラリア虫は脱皮ごとに抗原が異なるため、従来の方法では、的確な診断薬の作製は難しい。そこで遺伝子工学的手法を用いて、有望な抗原遺伝子を網羅的に探索し、新たなカイコ培養細胞・バキュロウイルス発現系を構築して、この抗原に基づく単クローン抗体から新たな診断薬の開発を目指す。本研究により、イヌフィラリア虫の遺伝子構成が解明されるとともに、我が国ではじめて単クローン抗体診断薬の開発技術が確立される。

■ 研究項目・実施体制（◎は技術コーディネーター）

- ①カイコ培養細胞系の性状維持管理と増殖・感染条件の解明
（◎今西重雄 / 独立行政法人 農業生物資源研究所）
- ②犬フィラリアの遺伝子ライブラリー作製と抗原遺伝子の解析
（中垣和英 / 学校法人 日本獣医生命科学大学）
- ③犬フィラリア関連遺伝子組換えバキュロウイルスの作出と発現確認
（馬嶋 景 / 株式会社バキュロテクノロジーズ）
- ④バキュロウイルス発現系によるフィラリア関連分子発現と分子構造機能解析
（武内恒成 / 国立大学法人 新潟大学）
- ⑤犬フィラリア関連遺伝子産物の大量発現、精製、抗体作製、キット構築
（吉田芳哉 / 株式会社シマ研究所）
- ⑥犬フィラリアの感染確認および感染防御検討とキット評価
（野上貞雄 / 学校法人 日本大学）



今西重雄

■ 研究の内容・主要な成果

- ①新規に開発した無血清・無タンパク質培養液 (SH-Ke117) で安定培養ができるカイコ胚由来培養細胞株を作出した。本細胞株と新たに開発した高密度培養装置、並びに絹フィブリン多孔質樹脂またはその組換えフィブリン多孔質樹脂を組み合わせて、組換えタンパク質の発現に優れたシステムを構築した。
- ②イヌフィラリア幼虫由来の cDNA ライブラリーを作製した。
- ③cDNA を網羅的に培養細胞に発現させて、目的遺伝子の探索ができるシステムを構築した。
- ④細胞膜に発現した標的抗原と機能抗体とを同定できるハイスループットシステムを構築した。
- ⑤イヌフィラリア症の診断に有効な単クローン抗体を見出し、ELISA 検出系で実用性の確証を得た。

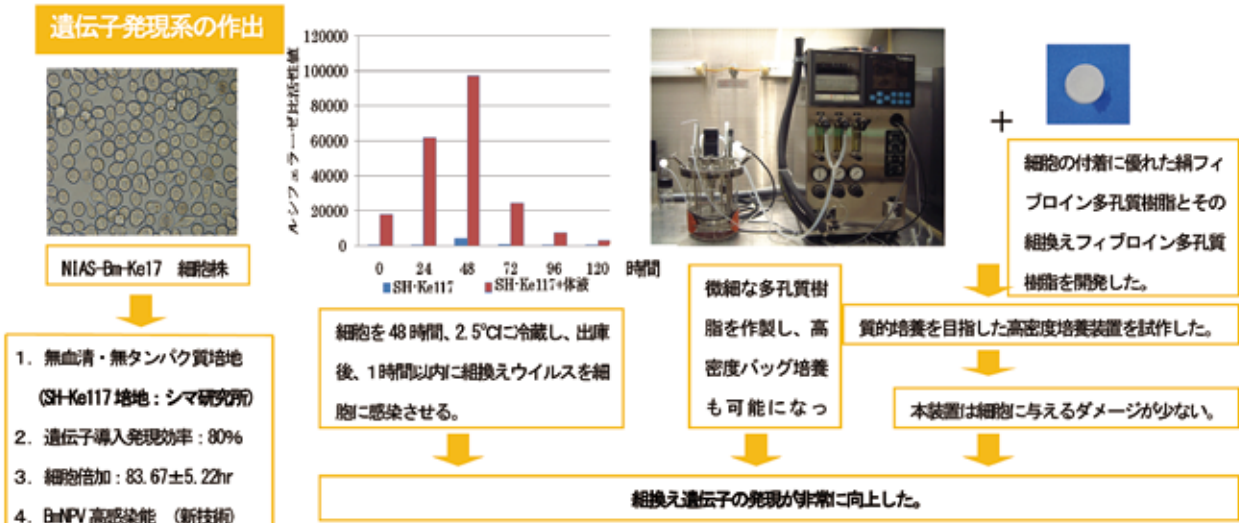
■ 今後の展開方向・見込まれる波及効果

- ① cDNA ライブラリーの網羅的発現系の利用により、有用遺伝子の探索とこれに次ぐ有用タンパク質の大量生産のバイオ事業の創出が可能になると期待される。
- ②新たな開発にめどがついたイヌフィラリア抗原検出キットは従来品に比べより精度の高い製品を安価に市場に供給できる可能性がある。

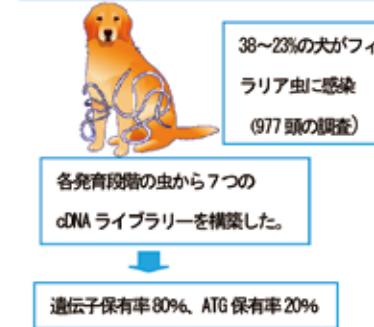
■ 公表した主な特許・論文

- ①特願2009-200187、特願2009-193674：無血清培養ができるカイコ培養細胞株の作出およびその利用。農業生物資源研究所、シマ研究所、新潟大学
- ②Horiuchi, M. et al. Structural basis for the antiproliferative activity of the Tob-hCaf1 complex. J. Biol. Chem. 284: (19),13244-13255 (2009)
- ③Nozumi, M. et al. Identification of functional marker proteins in the mammalian growth cone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106: 17211-17216 (2009)
- ④関根ら. 培養バッグを用いた簡便かつ効率的な単クローン抗体の生産. 生物工学会誌. 第87巻 第9号 437-441. 2009
- ⑤Imanishi, S. et al. Serum-free culture of an embryonic cell line from *Bombyx mori* and reinforcement of susceptibility of a recombinant BmNPV by cooling. In Vitro. Cell. Dev. Biol.-Animal. On line. (2012)

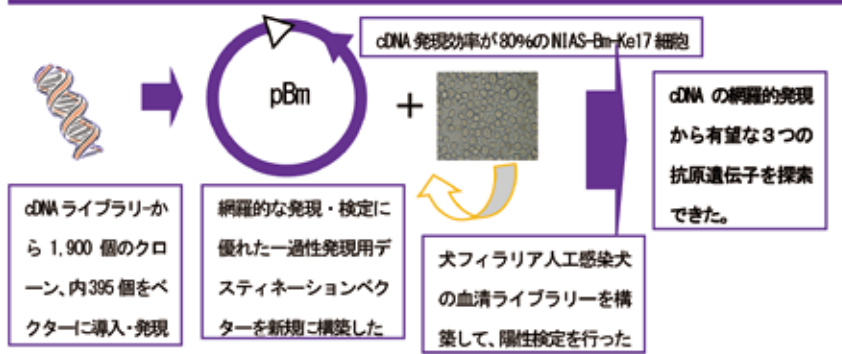
■ 研究成果の具体的図表



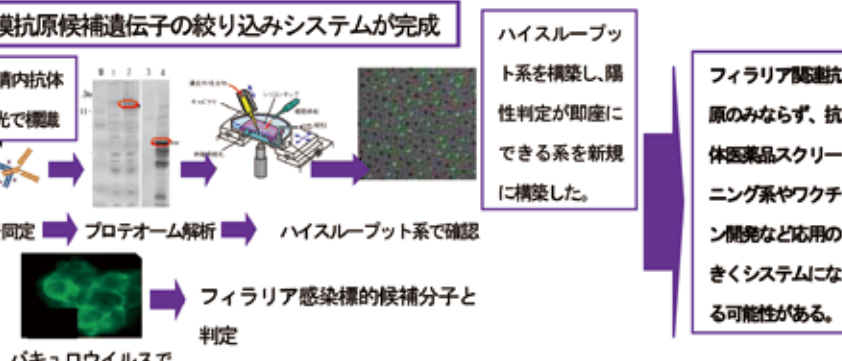
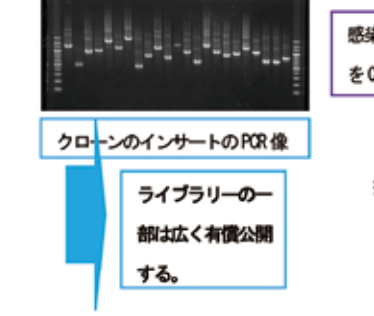
犬フィラリア幼虫の cDNA ライブラリーの構築



cDNA ライブラリーの解析、発現と有望抗原から単クローン抗体の作製



膜抗原候補遺伝子の絞り込みシステムが完成



フィラリア症診断薬の開発

クローンNo.	OD490/620
A	0.087
B	0.137
C	0.152
D	2.664
E	0.305
F	0.622
G	0.111
H	0.148
上清なし	0.066

フィラリア虫体破碎抽出抗原を固相化したプレートで陽性単クローン抗体の吸光度を測定し、No. D を確定。

