

度があり、かつ肝炎やAIDSなどのウイルス感染の危険の可能性を排除しなければならない。

これに対して、能動免疫後の、抗体産生能をもつ末梢血Bリンパ球と増殖性をもつミエローマ細胞とを融合させたハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体は、これらの危険がないこと、試験管内で培養することができるので供給源に制限がないことなどの利点があり、すぐれた効力をもつ抗体を産生するハイブリドーマ・クローン細胞を試験管内で培養することによって産生したモノクローナル抗体は、その潜在的な有用性は実験的にこれまでマウスモノクローナル抗体によって十分示されてきた。そこでモノクローナル抗体をヒトに実用化するため、異種タンパク質であるマウスモノクローナル抗体にかわるヒト型モノクローナル抗体の実用化が切望されている。しかし、まだ実用化されたものは破傷風抗毒素を含めてほとんどない。

ヒトモノクローナル抗体は、一般にマウスモノクローナル抗体と異なり、ハイブリドーマを作る段階でも融合効率がわるく、かつ融合細胞による抗体産生性が不安定で、実用化に適した十分効力ある抗体を安定して産生するハイブリドーマを得ることは難しい。ヒトのモノクローナル抗体を産生するためのモデル系としては、ヒトに安全に注射できかつ有益である抗原として実用製品化されている破傷風トキソイドが用いられ、毒素-抗毒素反応がよく研究されているのでその有効性を定量的に評価できる抗破傷風モノクローナル抗毒素抗体がモデルとしてとり上げられ、これまで数多くの研究が国内外でなされてきた。ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体をヒトに実用化するためには (1)ヒト型抗体であるこ

とが必要であることはもちろんのことであるが、その他 (2)ハイブリドーマが安定して抗体を十分量産生し、(3)無血清培地で産生できて、しかも(4)産生された抗体が高い中和活性をもち、(5)容易に精製できることなどが基礎的な必要条件となる。しかし、これまでこれらの条件をすべて満たすハイブリドーマは得られていなかった。私たちは、*in vitro* 抗原刺激や私たちが開発した高率に融合して安定したハイブリドーマをつくるための親細胞株を含め、考えられるあらゆる最適条件をとり入れて、世界に先駆けてこれらの条件を満たす5株のハイブリドーマ株 (G1, 2, 3, 4, 6) を樹立することに成功した (表1、図1)。これらのモノクローナル抗体 (MAb - G1, 2, 3, 4, 6) は、破傷風毒素分子の3つの機能的ドメイン[A](G4)、[B](G6, G1, G3)および[C](G2)をそれぞれ認識する (表1、図1, 2)。(ボツリヌス毒素と破傷風毒素の相同ドメインを図2に示す)

私たちが開発したこれらのハイブリドーマが産生するヒト型モノクローナル抗体の中和活性は非常に高く (表1) 十分実用化に価する。しかし、動物細胞を用いてヒトに注射できる製品を作成するには、産生に設備、備品、培地などに高額のコストがかかるだけでなく、産生に用いる動物細胞に内在するウイルスないしウイルス顆粒、ウイルス核酸の混在などを避けるため、外注機関による高額のコスト、多くの段階での検定要件に合格する必要がある、実用化にもっていくまでに、高額のコストと時間がかかる。

最近、(1)免疫グロブリンを産生する細胞からmRNAを抽出して逆転写酵素PCR法によって抗体可変部領域 (図3) の遺伝子をクローニングす

る一般的方法(図4)が開発され、破傷風トキソイドで高度に免疫をしたヒトの末梢血Bリンパ球(PBL)にも応用されているが、PBLはポリクロナールな細胞なので高い中和活性をもつ抗体遺伝子を得る確率が極めて低い。しかし、私たちが樹立した高中和性ヒト型モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を出発材料としてこの方法を用いればヒト型の高中和性抗体の可変部領域遺伝子を必ずとらえることができる。さらに最近、(2)抗体の重鎖および軽鎖可変部遺伝子[(VH、VL(G6の場合は軽鎖が κ なので VK)]を適当なリンカーで連結して、ファージディスプレイ法によってファージ表面に発現させて特異的に吸着、濃縮して目的とする組換え一本鎖抗体フラグメント(ScFv)のDNAをクローニングし、それを用いて可溶性リコンビナント抗体として特定の大腸菌に発現させる方法が報告されている。

そこで、本研究では、これまでの私たちの研究成果を基礎として、これらの新しい方法を導入(図5,6)して、簡便、経済的にヒト型抗体をヒトに実用化するため、高中和性ヒト型組換え抗体として作成することを目的とした。すなわち新しい方法を私たちのハイブリドーマのうち毒素分子の中間ドメイン(標的部位結合ドメイン)を認識する抗体を産生するG6株に応用して組換え一本鎖抗体フラグメントを作成し、私たちが開発した再現性があり信頼できるモノクローナル抗体の毒素中和活性測定法によって抗毒素価を定量評価すれば、他の研究室でヒト末梢血リンパ球から出発して試みているのと異なり、ヒトに注射できる高中和性ヒト型組換え抗体を作成することができる可能性ははるかに高く、一方、モデルとして一本鎖組換え抗体フラグメントの分子あ

たりの中和活性をそれに対応する抗体全分子の比活性と定量的に比較することによって一本鎖組換え抗体フラグメントの、効率すなわち有用性も明確に評価できる。本研究では、これらのモノクローナル抗体のうちまずMAb-G6をとりあげ、抗毒素が毒素中和能を発揮するための抗体の抗原である毒素に特異的に結合する活性を担う可変部領域に対応する遺伝子(DNA断片)をクローニングし、その塩基配列から可変部領域をとらえていることを一次構造から明確にし、それを用いて高中和性ヒト型組換え(リコンビナント)抗体として抗毒素を *in vitro* で動物細胞の助けなしに大腸菌で産生することを試みた。

B. 研究方法

1. 細胞培養

抗破傷風ヒト型モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞株 RF0810 (G6) は、20%ウシ胎児血清または1 liter 当たり10mgのトランスフェリン、0.0043mgの亜セレン酸ナトリウム、1.53mgのエタノールアミン、5mgのインスリンを添加したダルベッコ変法イーグル培地中、37°C、5%CO₂の環境下で培養した。

2. 総RNA回収

対数増殖期にあり、モノクローナル抗体を産生しているハイブリドーマ細胞株G6細胞の10⁷個をリン酸緩衝生理食塩水で、洗浄後、RNAの回収に供した。総RNAの回収は、QuickPrep Total RNA Extraction Kit (Pharmacia社)を用いて行った。

3. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR): ハイブリドーマG6株が産生するヒト型モノクローナル抗体

(MAB-G6) の軽鎖、重鎖の可変部領域をコードする cDNA の単離

私たちは抗破傷風モノクローナル抗体 MAb-G6 が、IgG₁ サブクラスに属し、 κ 軽鎖を持つことを明らかにした。そこで Welschhof らの方法により RT-PCR を行った。PCR にはヒト IgG の κ 軽鎖のアミノ酸 1 から 10 番目 (κ シリーズプライマー)、 γ 重鎖のアミノ酸 1 から 7 番目 (VH シリーズプライマー) をコードする塩基配列を含むオリゴヌクレオチドをフォワードプライマーとして、また κ 軽鎖のアミノ酸 109 から 116 番目 (Kappa CL プライマー)、 γ 重鎖のアミノ酸 115 から 121 番目 (IgG プライマー) に相当する塩基配列を含むオリゴヌクレオチドをリバースプライマー (表 2) として用い、MAb-G6 を産生するハイブリドーマ RF 0810 株より回収した総 RNA 1 μ g を鋳型として reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) を行い、重鎖、軽鎖の可変部領域 (VH, VK) をコードする cDNA 断片を単離した (図 5)。

RT-PCR は、Superscript II reverse transcriptase (GIBCO - BRL 社) を用い、50 mM Tris - HCl (pH 8.3)、40 mM KCl、6 mM MgCl₂、1 mM DTT、0.75 mM dNTP、200 unit Superscript II reverse transcriptase を含む反応液中で 45°C、1 時間反応させて第一鎖を合成した。沸騰水中に 10 分間放置し、逆転写酵素を失活させた後、終濃度 1 μ M の forward 並びに back primer と混合し、Expand Long Template PCR System (Boehringer Mannheim 社) を用いて、PCR を行い [50 mM Tris - HCl (pH 9.2)、16 mM (NH₄)₂SO₄、1.75 mM MgCl₂、0.35 mM dNTP を含む反応液中、94°C 30 秒、55°C 60 秒、68°C 30 秒を 1 サイクルとし、35 サイクル]、重鎖 cDNA、軽鎖 cDNA

を増幅した。以下の遺伝子組換え操作は、大腸菌 DH-5 α 株を用い、常法に従った。

増幅した各 cDNA の末端は、T4 DNA polymerase (宝酒造株式会社) を用いて平滑化した後、T4 polynucleotide kinase (宝酒造株式会社) を用いてリン酸化し、EcoRV (New England Biolab 社) で切断した後、*E. coli* alkaline phosphatase (宝酒造株式会社) を用いて脱リン酸化を行い、pBluescript SK⁻ (Stratagene 社) ベクターに導入した (図 5)。

4. 塩基配列の決定とアミノ酸配列の解析

pBluescript SK⁻ にサブクローニングした軽鎖、重鎖の cDNA クローンの塩基配列は各 cDNA 断片の塩基配列は、dideoxy chain termination 法で、Fluorescent Labelled primer cycle sequencing kit (Amersham 社) によりシーケンス反応を行った後、自動シーケンサー (LI-COR 社、DNA Sequencer Model 4000) を用いて解析し、決定した。シーケンス反応は、M13 forward primer (5' -CACGACGACGTTGTAAAACGAC-3') および M13 reverse primer (5' -GGATAACAATTTAC-ACAGG-3') を用いて sense 並びに anti-sense 鎖の両方について行い確認した。抗体アミノ酸配列のホモロジーは Kabat のデータベースで検討した。塩基配列および各塩基配列から予想されるアミノ酸配列は、GENETYX-MAC (Version 8.0、ソフトウェア開発株式会社) にて解析した。また抗体遺伝子検索プログラム AbCheck を用いて、各クローンのアミノ酸配列が、Kabat のデータベースに掲載されている抗体のアミノ酸配列に対するホモロジーを有するか検討し、得られたクローンが抗体遺伝子の可変部領域を含むことを確認した。

5. 抗破傷風ヒト型組換え一本鎖抗体フラグメント (ScFv)発現ファージミドの構築

pBluescript SK- vector に組み込んだ VH, VK の cDNA 断片にそれぞれ Sac I と Not I, Sfi I と Mlu I の制限酵素切断部位を付加するため、上述の3. で得たプラスミドを鋳型とし、各制限酵素による認識配列を含んだプライマーを用いて再度 PCR を行った。

増幅した cDNA 断片を上述 3.と同様の方法で pBluescript SK- に導入し、それぞれの認識配列が付加されたことを DNA シークエンシングにより確認した。VH, VK をコードする cDNA 断片は、各プラスミドから Sac I と NotI および Sfi I と Mlu I の二重消化により単離した。単離した cDNA 断片をオリゴヌクレオチドリンカーとともに pCANTAB 5E ファージミド (図7) に導入し (図5)、pCANTAB 5E-G6 と名づけた (図6)。

得られた pCANTAB 5E-G6 は、以下の目的に適した特徴を有する。(i) Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser という配列を軽鎖と重鎖の間にリンカーとして配置することにより、抗原に結合する際に軽鎖と重鎖が比較的効率よく折りたたまれることが期待される。(ii)精製途中での検出を容易にするために、E-タグと呼ばれるエピトープタグ配列が ScFv の C 末端側に付加される。(iii)E-タグ配列直後のアンバー翻訳停止コドン (TAG) は、大腸菌のアンバーサプレッサー株 (TG1 株) においては翻訳停止コドンとして認識されず、さらに下流のファージ外被タンパク (gene 3 産物) との融合タンパクとして翻訳され、ヘルパーファージの感染により、ScFv を外被表面に提示したファージが培養上清中に産生される。(iv)一方、非サプレッサー株 (HB2151 株) においては、ScFv は可溶性

抗体として、大腸菌体内あるいは培養上清中に産生される (図6)。

6. 抗破傷風一本鎖組換え抗体フラグメント (ScFv)を発現するファージの選択

pCANTAB 5E-G6 で形質転換した大腸菌 TG1 株へ、ヘルパーファージ K07 を感染させた。外被タンパクとの融合タンパクとして抗破傷風 ScFv を表面に発現しているファージを破傷風トキソイド (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) をコートしたプラスチックシャーレを用いたパンニング法により培養上清中から特異的に集めた。得られたファージを TG1 株に再感染させ、同様のパンニングを計3回繰り返し、ScFv 発現ファージを濃縮した。さらにこのファージ・プールより 24 クローンを無作為に選択し、破傷風トキソイドへの結合活性が高いファージクローン (pScFv-G6 と命名) を ELISA 法により同定し、以下の実験に供した (図6)。

7. 可溶性抗破傷風一本鎖組換え抗体フラグメント (ScFv)の発現

培養上清中への ScFv の分泌のタイムコースは以下のようにして測定した。大腸菌 HB2151 株を pScFv-G6 あるいはヘルパーファージに感染させ、25ml の 2×YT 培地中、37°C で培養した。培養上清を表3に示す各時間において 1ml ずつ採取し、遠心により菌体を取り除いた後、破傷風トキソイドを抗原として用いた ELISA 法により、培養上清中の破傷風トキソイド結合活性を測定した。

8. 可溶性抗破傷風一本鎖組換え抗体フラグメント (ScFv)の発現と精製

ファージ pScFv-G6 に感染した大腸菌 HB2151 株

を 300 ml の 2×YT 培地中で OD₆₀₀ が 0.4 になるまで 30°C で培養した。IPTG を終濃度 1 mM になるように加え 30°C、3.5 時間培養し、抗破傷風 ScFv の発現を誘導した。培養後菌体を含んだ培養液を 2 分し、一方の培養液から 3,000 rpm、10 分間の遠心で菌体を集め、培養上清と菌体の画分に分画した。集めた菌体を Lysis buffer (10 mM Na₂HPO₄, 10 mM EGTA, 10 mM EDTA, 30 mM NaCl, 10 mM β-mercaptoethanol, 0.25% Tween 20) で懸濁して超音波破碎した後、12,000 rpm で 20 分間遠心し、上清を細胞質画分とした。沈渣は urea buffer (8 M urea, 20 mM Tris-HCl pH 8.0) で溶解し、封入体画分として用いた。残り半分の培養液から遠心分離により回収した菌体は、5 mM MgSO₄ で懸濁して浸透圧ショックにより菌体を破碎し、8,000rpm で 10 分間遠心した後、上清を periplasm 画分として使用した。各画分に含まれる ScFv の量を抗 E-タグ抗体を用いた ELISA およびウェスタンブロット法により定量したところ、細胞質画分に最も多く可溶性の ScFv が検出されたので、細胞質画分を材料として以下のように精製を試みた。

ファージ pScFv-G6 に感染した大腸菌 HB2151 株を 3 liter の 2×YT 培地で上述の 7. と同様の方法で培養、発現誘導し細胞質画分を得た。細胞質画分を 30%、55%、90%飽和で順次硫酸沈殿させ、抗 E-タグ抗体を用いた ELISA 法により、ScFv が回収される画分を同定した。ScFv を多く含む 30-55 %硫酸画分を 2.5 M urea を含む 0.1 M クエン酸-リン酸緩衝液 (pH 5.0) で溶解し、Sephadex G-75 カラム (1.5 x 90 cm) でゲルろ過を行った。同様に ELISA で同定した ScFv を含む画分をプールし、Toyopal SP イオン交換カラムを用いてさら

に精製を行った。

9. 毒素中和活性の測定

培養上清の各硫酸画分を標準破傷風毒素(国立感染症研究所より分与)と混合(注射後マウスあたり毒素が 10~300 MLD になるように)、37°C 一時間インキュベートした後、マウス ddy 雌 18~22g に 0.1ml ずつ右上腿内側に筋肉内注射をし、症状の進行状況を症状のスコア(図 8)で読み取ることによって中和活性を調べた。

10. その他の方法

ELISA、ウェスタンブロット法は常法によって行った。タンパク量は Bradford の方法に従い測定した。

C. 研究結果

1. モノクローナル抗体 MAb-G6 の重鎖、軽鎖の可変部領域の cDNA クローニング

G6 の重鎖、軽鎖について、表 2 に示した 3 通りの組み合わせのプライマーを用いて RT-PCR 法を行い、それぞれの可変部領域をコードする cDNA を得た。DNA シークエンシングを行い抗体アミノ酸配列のデータベースとのアミノ酸配列の比較を行ったところ、G6 の重鎖、軽鎖はそれぞれ Kabat の分類の VH3、Vk1 サブグループに属することが明らかとなった(図 9,10)。

2. ヒト型モノクローナル抗体 MAb-G6 の軽鎖、重鎖の可変部領域を含む 1 本鎖組換え抗体フラグメント (ScFv) の発現

得られた重鎖、軽鎖の可変部領域からなる一本鎖組換え抗体フラグメントが、モノクローナル抗

体 MAb-G6 の全分子と同様に特異的抗原結合能を有しているかを明らかにするために、MAb-G6 の軽鎖、重鎖をリンカー配列を介してタンデムに配置した 1 本鎖抗体 (ScFv) の発現ベクター pCANTAB 5E-G6 を構築した。pCANTAB 5E-G6 で形質転換した大腸菌 TG1 株にヘルパーファージを感染させ、培養上清中に放出された抗破傷風 ScFv 発現ファージをパンニング法により濃縮した。さらに任意の 24 クローンについて、破傷風トキソイドへの結合能を ELISA により測定し、結合能の最も高かったクローン (pScFv-G6) に関してさらに解析を進めた(図 6)。

pScFv-G6 を大腸菌 HB2151 株に感染させ、可溶性 ScFv の発現を試みた。ここでは、回収の容易な培養上清中の ScFv について、ELISA 法により種々の抗原に対する結合特異性を検討した。その結果、表 3 に示すように ScFv は調べた抗原のうち、破傷風トキソイドを特異的に認識することが明らかとなった。

3. 抗破傷風ヒト型 ScFv の大量発現とその発現産物 (ScFv-G6) 精製

pCANTAB 5E-G6 では、ファージ外被タンパク g3p 由来の分泌シグナルが、ScFv の N 末端側に付加される構造になっているため、原理的には産生された ScFv が、培養上清中に分泌されることが期待される。実際、上述のように培養上清中に、破傷風トキソイド結合活性が検出された。しかしながら、経時的に培養上清中の破傷風トキソイド結合活性を定量したところ、培養開始後、活性が検出されるまでに非常に長い時間を要することが明らかとなった(表 3)。分泌シグナルが付加されているにもかかわらず、効率よく培養上清中に分泌

されず、菌体の細胞質や periplasm 中に蓄積されることは、種々のリコンビナントタンパク質の発現系において、これまでしばしば報告されている。MAb-G6 の ScFv が、大腸菌菌体の細胞質、封入体、periplasm 画分および培養上清のいずれに多く含まれるかを確認するために、ScFv 発現大腸菌を分画し、抗 E-タグ抗体を用いた ELISA およびウェスタンブロット法により、各画分における ScFv の発現を確認した。その結果、ScFv は主に細胞質画分に蓄積していた。そこで細胞質画分に含まれる ScFv の精製を試みた。まず大腸菌細胞質粗抽出液を硫酸 30、55 および 90%飽和度で段階的に沈殿させ、各画分に含まれる ScFv をウェスタンブロット法により検出した(図 11)。その結果、ScFv は主に 30-55 %飽和画分に得られることが明らかとなった。次に 30-55 %飽和画分を Sephadex G-75 を用いたゲルろ過によりさらに分画した。ScFv は分子量約 26kDa の位置に単一のピークとして溶出された。さらにゲルろ過のピーク画分をイオン交換カラム Toyopal-SP により精製した。これら一連の精製により、サンプル中の ScFv の比活性は約 10 倍に上昇した(表 4)。

4. 抗破傷風ヒト型一本鎖組換え抗体フラグメントの毒素中和活性

マウスに対する毒性の中和活性をまず標準毒素と産生された ScFv-G6 を含む培養上清の各硫酸画分を試験管内で反応させた後、マウスに注射して症状の進行が阻止されるか、ベクターだけを導入した大腸菌培養上清の硫酸濃縮画分を対照として調べつつある。その場合まず毒素の変量と ScFv-G6 画分の一定量との混合物について、ついで毒素の一定量と ScFv-G6 画分の変量との混合

物について中和活性を毒素だけを注射したマウスの症状進行、死亡時間と比較して検討しつつある。

D. 考察

以上の結果、高中和活性をもつ抗破傷風ヒト型モノクローナル抗毒素をモデルとして、それを産生するハイブリドーマ G6 株細胞を出発材料として、ヒト型一本鎖組換え抗毒素フラグメント (ScFv) の作成を試み、毒素と特異的に結合する ScFv を大腸菌培養で得ることに成功した。その毒素中和活性を検討しつつある。

最近、抗破傷風ヒト型抗毒素の一本鎖組換え抗毒素フラグメントの大腸菌での作成、その産物の抗原結合活性の報告はあるが、本研究でのように高中和活性抗体産生細胞を出発材料としていないし、その産物の毒素中和活性についての報告はない。また一本鎖組換え抗体を CHO 細胞で産生させて、その毒素中和活性を調べた報告があるが、中和活性を定量的に扱っていないし、その場合は、出発材料は低中和活性の抗毒素抗体しか産生していない免疫後のヒト末梢血 B リンパ球であるのと、高中和活性は期待できない。本研究において、私たちは高中和活性をもつヒト型抗毒素抗体を産生しているハイブリドーマ株を出発材料としているので、一本鎖組換え抗体を大腸菌を用いて動物細胞の助けなしに作成できたことは、大きな意義があるだけでなく、その産物の高中和活性が期待できることは、安全で経済的な、かつ有効な組換え抗体の実用化に大きく前進できたといえる。また本研究では、定量的に扱える破傷風抗毒素をモデルとして、種々の毒素やウイルス抗体で盛んに試みられているのと異なり、一本鎖組換

え抗毒素抗体フラグメントの実際の有効性がその基となる抗体全分子の活性と定量的に比較することによって明確に評価できる。

現在、これらの点を考慮して、作成物分子の中和比活性、治療効果、予防効果へと研究を進めており、今後、抗ボツリヌスヒト型一本鎖組換え抗毒素抗体へと研究を進展させる道が開けてきた。現在、モデル系としての VH-VL ScFv を含む種々の組換え抗体、それらの発現量を増強させる系の開発にも研究を進めている。

E. 結論

高中和活性 抗破傷風ヒト型抗毒素抗体産生ハイブリドーマを出発材料とし、ヒト型組換え抗毒素抗体のモデルとして、抗体の重鎖、軽鎖の可変部領域からなる一本鎖組換え抗体を大腸菌で発現させることができた。産物の精製を進め、抗原特異的結合することを明らかにすることができた。その作成物の中和活性についても有望な結果を得つつある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsuda, M., M. Takahashi, D-L. Lei and N. Sugimoto : Improved vaccines and treatments of tetanus on the basis of the structure and function of the tetanus toxin molecule, to reduce tetanus deaths to zero. In H. S. Tranter(ed.), Biomedical Aspects of Clostridial Neurotoxins. Proceeding of International Conference Oxford. CAMR pp.22~29, 1999.

2. 学会発表

- 1) Matsuda, M., J. Katahira, M. Kamei, S. Hashimoto, and N. Sugimoto: Molecular cloning and sequencing of the variable region genes of the heavy and light chains of human anti-tetanus monoclonal antibody MAb-G6 with high neutralizing activity., *Toxicon*. 36(9) 1254, 1998.
- 2) Matsuda, M., M. Katahira, M. Kamei, S. Hashizume: Immunology of tetanus toxin-Anti-tetanus, immunogenic toxin fragments and human monoclonal antibodies., 5th Asia-Pacific Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins Plenary Lecture Abstr. p.32, Pattaya, Thailand, Oct. 12-15, 1999.
- 3) 渡邊優子、片平じゅん、堀口安彦、松田守弘: 高中和性抗破傷風ヒト型一本鎖組換え抗体フラグメントの発現系の構築、第 73 回日本細菌学会総会 (札幌)、2000 年 5 月 29 日~31 日 (予定)

G. 知的所有権の取得状況

1. 新技術に係る工業所有権 抗体DNA、
発明者 松田守弘 亀井優徳、出願者 松田守弘他 森永製菓(株)、平成8年7月5日、
整理番号 KP960089 平 8-194095

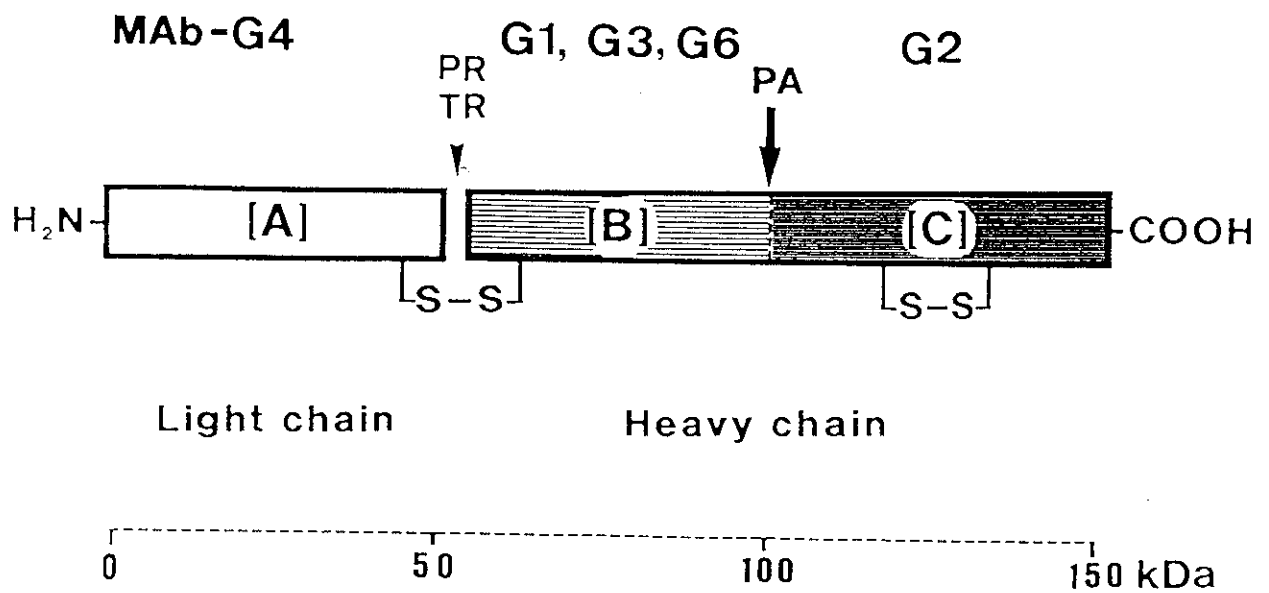


図1 破傷風毒素のサブユニット構造と(A - B・C)とヒト型モノクローナル抗体 MAb-G4, G1, 3, 6 および G2 に対する毒素分子上でのエピトープの局在

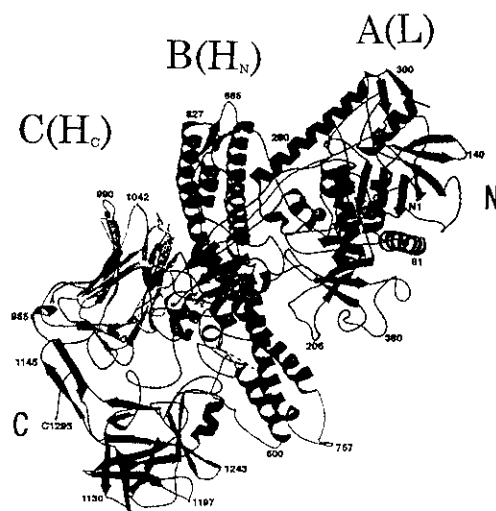


図2 ボツリヌス毒素の立体構造、サブユニット (L, H_N, H_c) 構造と相同の破傷風毒素のサブユニット (A, B, C)

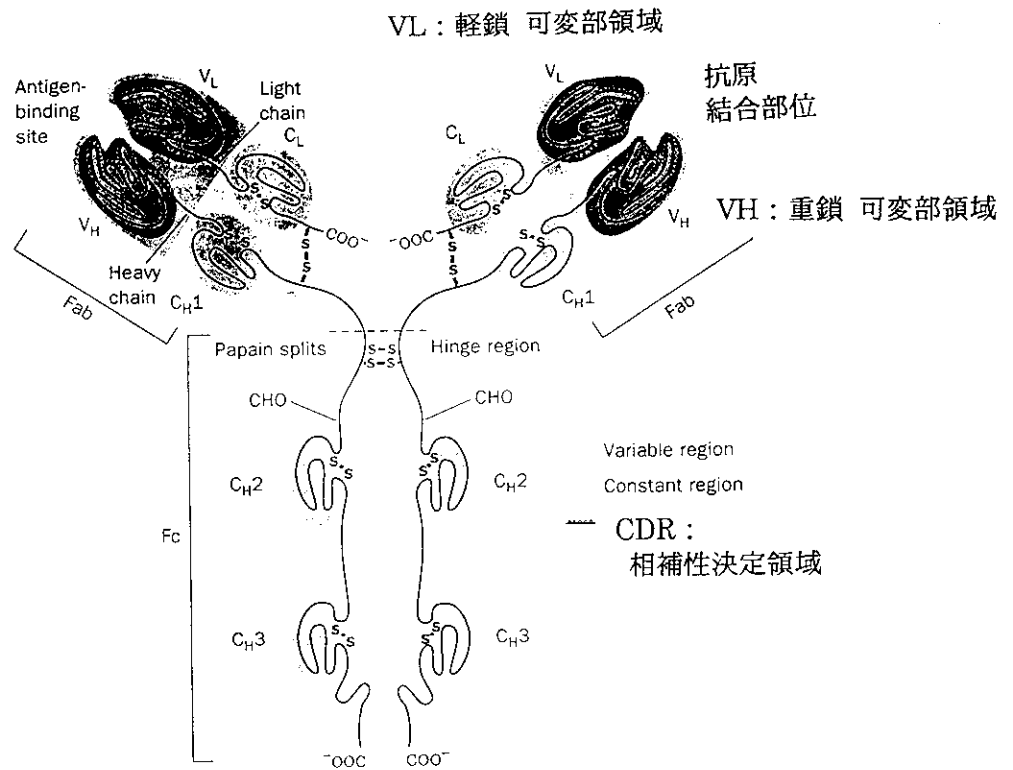


図3 抗体（免疫グロブリン G, IgG）分子のドメイン構造

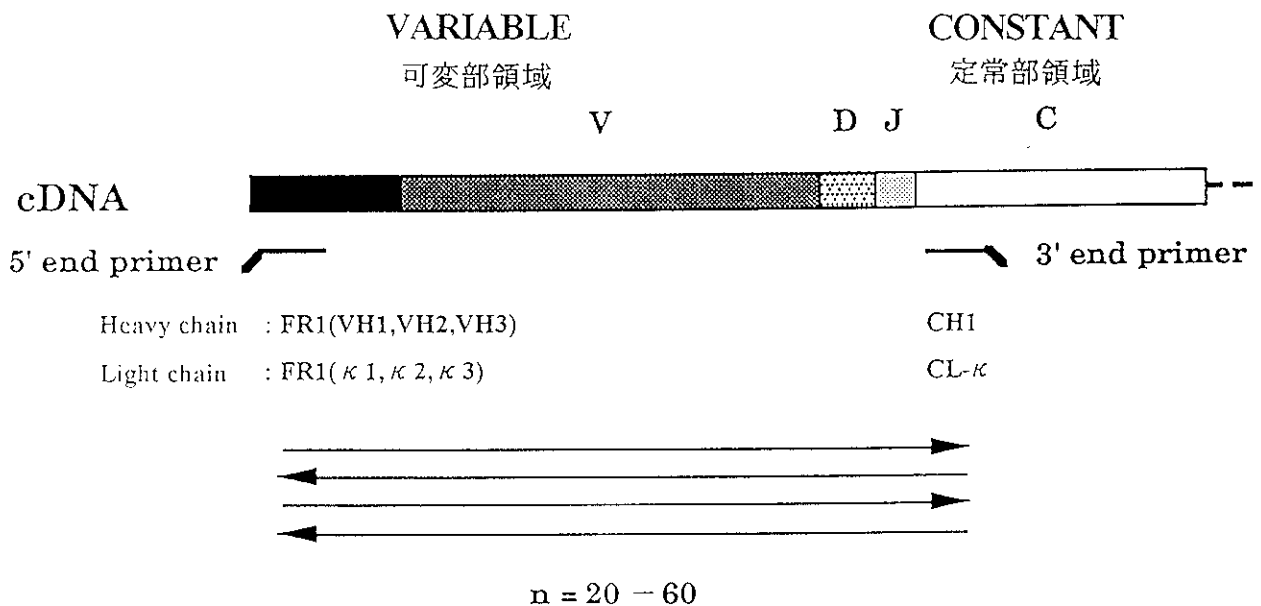


図4 ヒト免疫グロブリン産生細胞から、抗体の重鎖、軽鎖の可変部領域をコードする遺伝子（DNA断片：V_H, V_L）をクローニングする方法

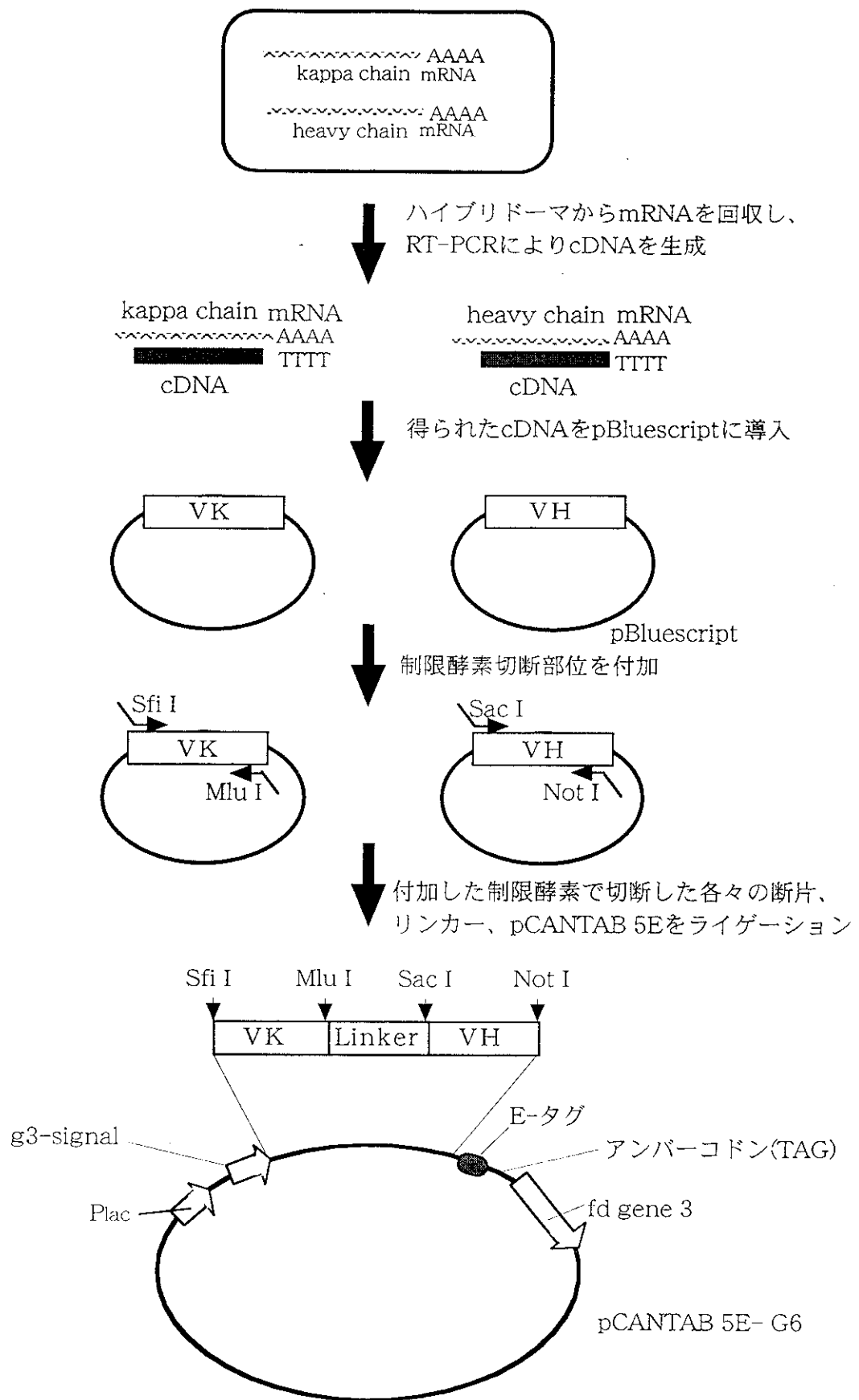


図5 ファージミド pCANTAB 5E-G6 の構築

non-suppressor大腸菌株TG1の形質転換、K07ヘルパーファージの感染
抗破傷風ScFv発現ファージの産生

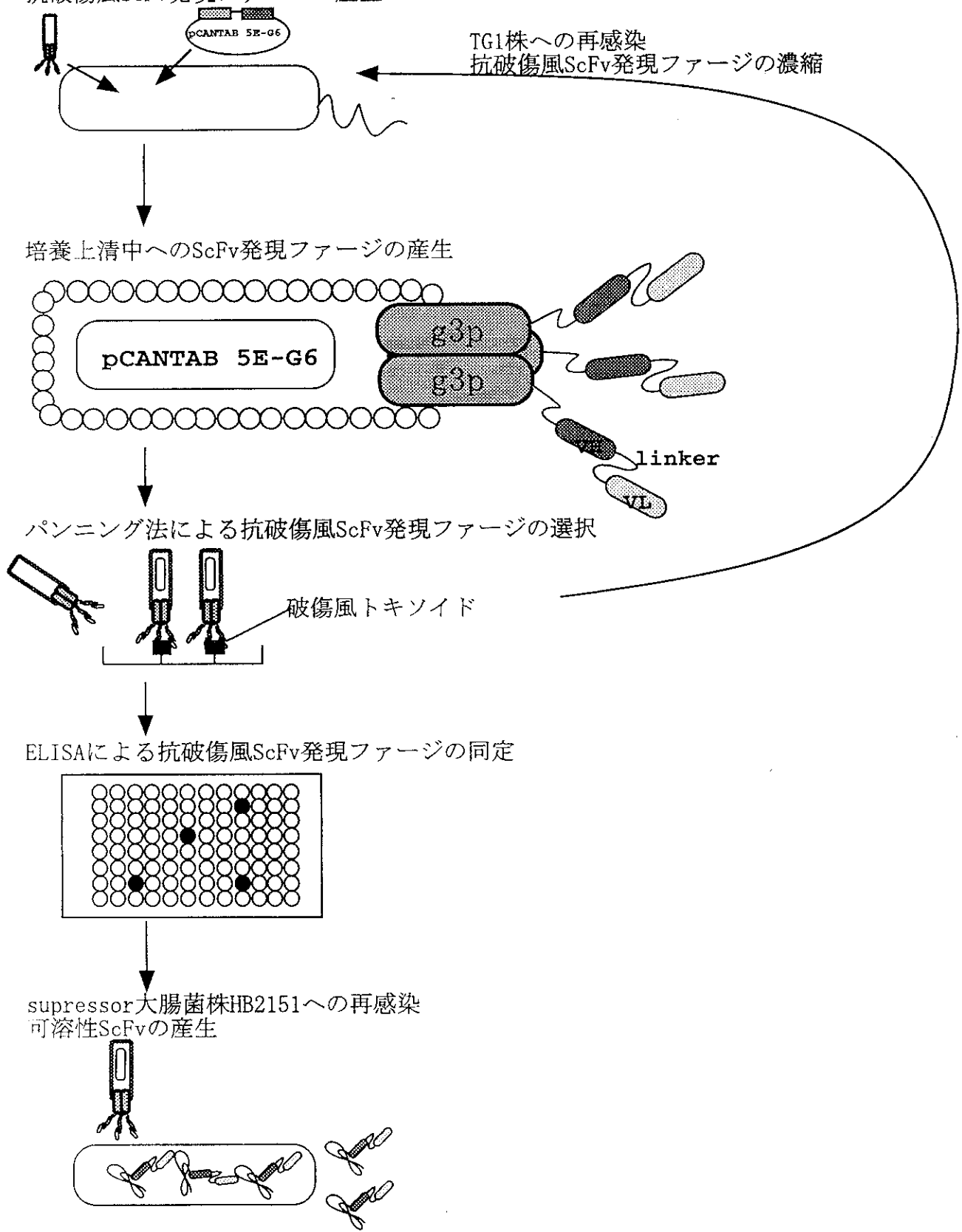


図6 抗破傷風一本鎖組換え抗体フラグメント (ScFv) 発現ファージの構築

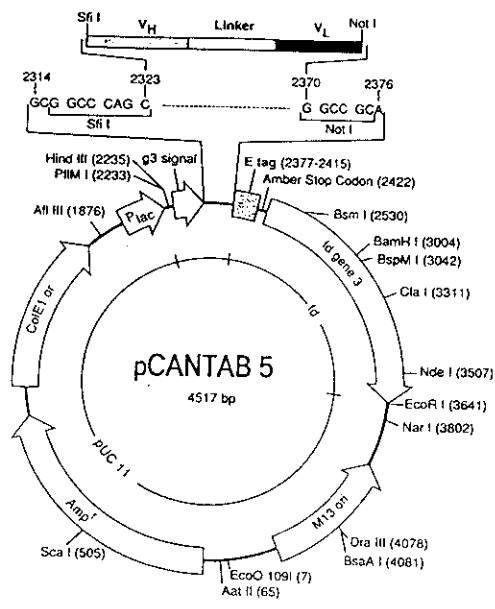


図7 pCANTAB 5 E ファージミドベクター

0: NO SYMPTOM

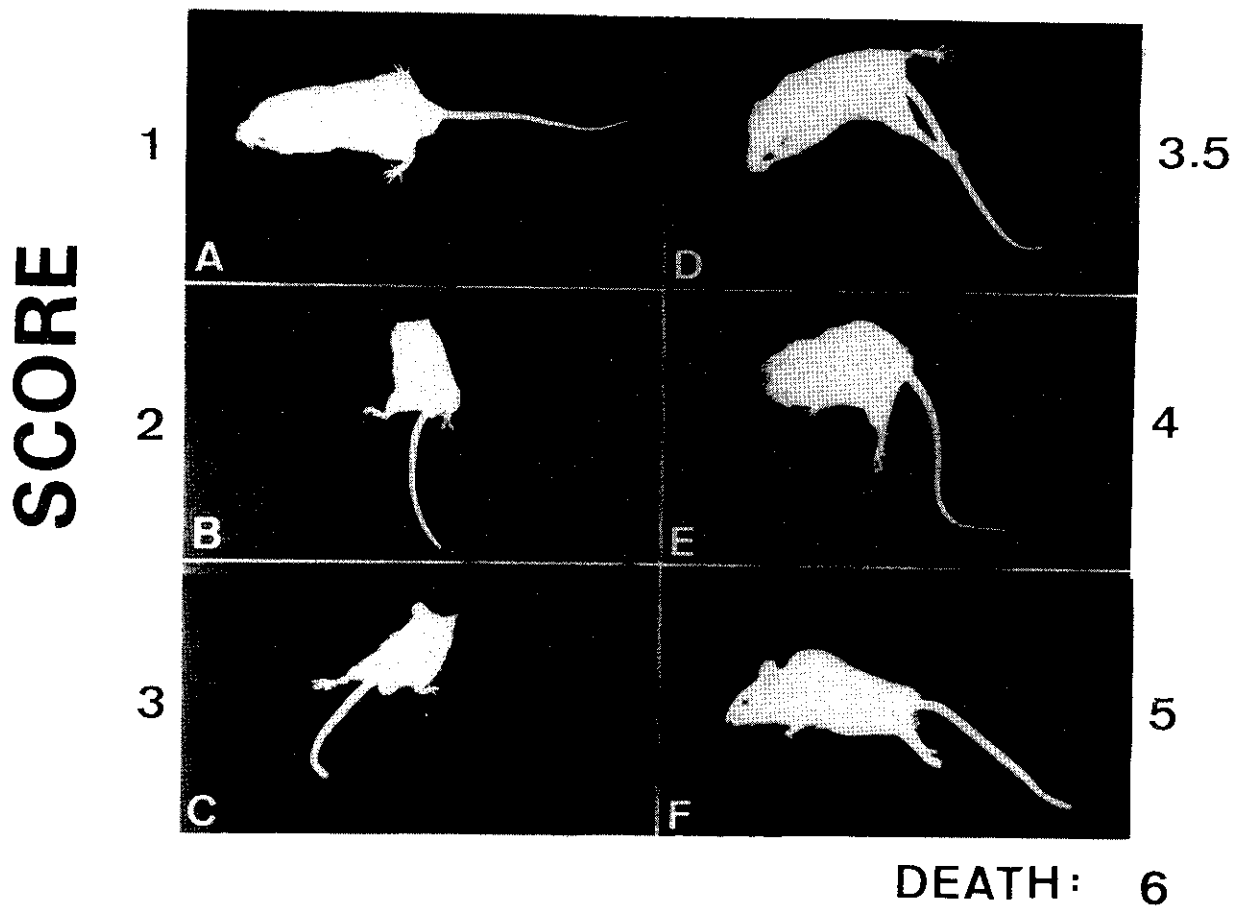


図8 毒性試験のための症状スコア

G6-Heavy Chain (H chain) subgroup VH3

FR1

1 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTTTGGTACAGCCGGGGGGTCCCTGAGACTC 60
 E V Q L V E S G G L V Q P G G S L R L

61 TCATGTGCAGCCCTCTGGATTACCTTTGACCCGCTATGCCATGAGCTGGGTCCCGCAGGCT 120
 S C A A S G F / T F D R Y A M S / W V R Q A
 22 CDR1 CDR2

121 CCAGGGAAGGACTGGAGTGGGTCTCAGGCATTAGTCGTAGTGTGAAACCACATACTAC 180
 P G K G L E W V S / G I S R S G E T T Y Y
 FR2

181 GCAGACTCCGTGAAGGCGCGGTTCAACCATCTCCAGAGACAGCTCCAAGAACACCGTGTAT 240
 A D S V K G / R F T I S R D S S K N T V Y
 FR3

241 CTGGAATGAATAGCCTCAGAGGGGAGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGCAGGA 300
 L E M N S L R G E D T A V Y C A K / A G
 96 CDR3 FR4

301 AAGCAGTGGTTGGCCCTTATTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAGCCCTGGTCAACCCTC 360
 K Q W L A S Y Y F D Y / W G Q G A L V T V
 FR4

361 TCCGCCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTC 390
 S A / A S T K G P S V

図9 抗破傷風ヒト型モノクローナル抗体 MAb-G 6
 の重鎖可変部領域の塩基配列
 と推定アミノ酸配列

G6-kappa chain (L chain)

subgroup $V_{\kappa-1}$

	FRI	
1	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTGTGTCTCCAGGGGAGAGCCACC	60
	D I V M T Q S P A T L S V S P G E R A T	
	FR1← CDR1	
61	CTCTCCTGTCCGGCCAGTCAGAGTGTGGCACCAACTTAGCC/TGGTACCAACAGAAACCT	120
	L S C / R A S Q S V G T N L A / W Y Q Q K P	
	FR2← CDR2	
121	GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCGCAGCC	180
	G Q A P R L L I Y / G A S T R A T / G I A A	
	FR3	
181	AGGTTTCAGTGGCAGTGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCAATCAGCAGCCCTGCAGTCT	240
	R F S G S G S G T E F T L T I S S L Q S	
	FR3← CDR3	
241	GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCCAGCAGTACAGTGGCTCCACAGACTTTCCGGC	300
	E D F A V Y Y C / Q Q Y S D W P P Q T / F G	
	FR4← constant	
301	GGAGGGACCAAGGTAGAGATCAGACCGAACTGTGGCTGCACCAATCTGTCTTC	351
	G G T K V E I R R T / V A A P S V F	

図10 抗破傷風ヒト型モノクローナル抗体 MAb-G 6
の軽鎖可変部領域の塩基配列と
推定アミノ酸配列

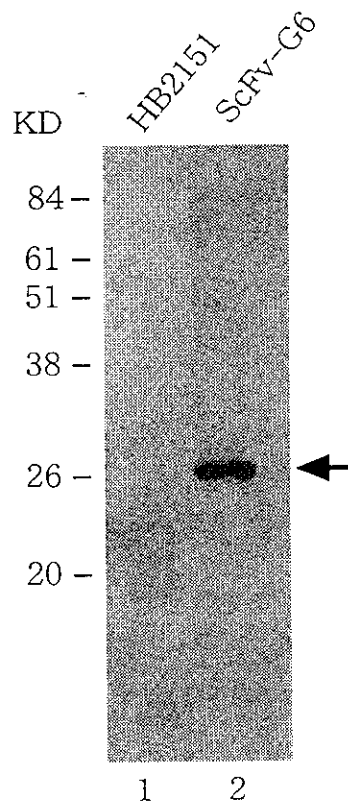


図 11 抗破傷風一本鎖抗体の発現

大腸菌HB2151株に抗破傷風一本鎖抗体発現ファージ ScFv-G6を感染させた。2×YT 培地中30度、3.5時間培養後、細胞質画分を調整した。細胞質画分を硫酸沈澱 (30-55% 飽和画分)した後 12.5% SDS-PAGEで分離し、PVDF膜に転写した。検出はペルオキシダーゼ標識抗E-タグ抗体を用いて行った。

レーン1にはファージ非感染のHB2151株を同様に処理して得られた画分を泳動し、陰性対照とした。

表 1 抗破傷風ヒト型モノクローナル抗体の特性と毒素中和活性

MAb	Domain	Ig class		Minimum survival dose (μg IgG)	IU per 70 μg Ig	Ratio (Routine / Present)
		H-chain	L-chain			
G4	[A]	$\gamma 1$	κ	2.8	0.3	1
G1	[B]	$\gamma 1$	λ	0.89	1	3
G3	[B]	$\gamma 1$	λ	2.8	0.3	3
G6	[B]	$\gamma 1$	κ	0.028	30	30
G2	[C]	$\gamma 1$	λ	0.089	10	9
Mixtur of MAbs [G1,2,3,4,6]	[A],[B],[C]			0.028	30	1

Minimum survival dose (MSD) against 20 MLD of toxin.

表 3 組み換え 1 本鎖抗体(ScFv-G6)の培養上清への分泌の経時的変化

	0	3	9.5	33	48hrs
Tet.toxioid	0.134	0.494	1.379	3.351	3.594
CPE	0.123	0.131	0.160	0.150	0.119
BSA	0.024	0.039	0.040	0.051	0.052

pScFv-G6 感染大腸菌株 HB2151 を 2×YT 培地中、30°C で培養した。表中の各時間において 0.1ml の培養上清を採取し、遠心により菌体を除去した後、上清中に含まれる各抗原に対する結合活性を ELISA により測定した。

抗原として、Tetanus toxoid (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), *Clostridium perfringens* enterotoxin (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), BSA (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を使用した。2次抗体として ヘルオキシダーゼ標識抗 E-タグ抗体、基質としてオルトフェニレンジアミン (OPD) を使用し、OD 492nm の吸光度を測定した。

表2 PCR用プライマー

軽鎖フォワードプライマー (アミノ酸1から10番目)	κ1	5'-GACATCSWGATGACCCAGTCTCC-3'
	κ2	5'-GATAATTGTGATGACYCAGWCTCCACTCT-3'
	κ3	5'-GAAATTGTRWTGACRCAGTCTCCA-3'
軽鎖リバースプライマー (アミノ酸109から116番目)	Kappa CL	5'-GAAGACAGATGGTGCCAGCCACAGT-3'
重鎖フォワードプライマー (アミノ酸1から7番目)	VH1	5'-SAGGTGCAGCTGGTGCAGTCT-3'
	VH2	5'-CAGGTRCAGCTGCAGSAGTC-3'
	VH3	5'-GAGGTGCAGCTGKTGGAGTCT-3'
重鎖リバースプライマー (アミノ酸115から121番目)	IgG	5'-GACSGATGGGCCCTTGGTGA-3'

略号の説明：S；G,C、Y；C,T、W；A,T、R；A,G、K；T,Cの縮重を示す。

表 4 精製過程による抗破傷風ScFv活性

	タンパク量(μ g)	ELISA OD	比活性
細胞質画分	2.5	1.462	5.9×10^{-1}
30-55% 硫酸沈澱	2.5	1.536	6.1×10^{-1}
ゲルろ過	0.3	1.117	3.7
イオン交換	0.3	1.850	6.2

ScFvG6感染HB2151株を終濃度1mMのIPTGを含む2×YTで3.5時間培養し、破傷風一本鎖抗体の発現を誘導した。培養後、菌体を集めLysis bufferに懸濁し、超音波破碎後の上清(細胞質画分)を硫酸沈澱、Sephadex G-75を用いたゲルろ過、Toyopal SPを用いたイオン交換クロマトグラフィーにより、精製し、各画分に含まれる抗破傷風トキソイド活性を表2に示したELISA法により測定した。各画分タンパク量1 μ gあたりのELISA OD値を比活性として示した。

19990447

p.66-71 は雑誌／図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

Improved vaccines and treatments of tetanus on the basis of the structure and function of the tetanus molecule to reduce tetanus deaths to zero

Morihiro Matsuda, Motohide Takahashi, Dian-Liang Lei, Jun Katahira and Nakaba Sugimoto

H.S. Tranter (ed.), Biomedical Aspects of Clostridial Neurotoxins. Proceedings of International conference Oxford. CAMR pp.22-29, 1999