

ボツリヌス毒素等取扱者の予防接種予診票

接種を受ける人の氏名： _____

生年月日： _____年 _____月 _____日生 （満 _____歳） 性別（男・女）

住 所： _____

診察前の体温： _____度 _____分

質問事項	回答欄	医師記入欄
1. 今日受ける予防接種について説明を受け、理解できましたか。	はい・いいえ	
2. 今日、身体に具合の悪いところがありますか。 あれば、具体的に症状を書いて下さい。 ()	はい・いいえ	
3. 最近1ヶ月以内に病気にかかりましたか。 病名 ()	はい・いいえ	
4. 心臓疾患、呼吸器疾患、糖尿病、高血圧などの慢性の持病が ありますか 病名 () その病気を診て貰っている医師に今日の予防接種を受けて 良いと言われましたか。	はい・いいえ はい・いいえ	
5. 薬や薬品で皮膚に発疹が出たり、身体のが具合が悪くなった事 がありますか。 薬、薬品の名称 ()	はい・いいえ	
6. これまでに予防接種を受けて身体のが具合が悪くなった事が ありますか。 予防接種の種類 ()	はい・いいえ	
7. 今日の予防接種について質問がありますか。	はい・いいえ	

血清採取と抗毒素価測定の同意書

この試験トキソイドの使用にあたり、下記の件にご協力願えれば幸いです。
血清中の抗毒素価を測定（接種の前・後）を実施したいと考えておりますので、採血を承諾いただけると幸いです。

採取時期

- | | |
|--------------|--------------------------|
| 1. トキソイド接種直前 | 血清量 4～5 ml（血清にして-20℃に保存） |
| 2. 接種後 4～5 週 | 血清量 4～5 ml（血清にして-20℃に保存） |

1, 2 をペアにして下記に連絡の上、送付して下さい。

送付先： 国立感染症研究所
細菌・血液製剤部 細菌製剤第3室
〒206-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1
Tel: 042-561-0771 (Ext. 544)
Fax: 042-561-7173

同 意 書

ボツリヌストキソイド接種にあたり、接種前、後の血清中の抗毒素価を測定することに同意し、血液採取を承諾します。

平成 _____ 年 _____ 月 _____ 日

氏 名（本人自筆）： _____

立会者（接種医師）： _____

ヒト型モノクローナル抗体の作製に関する研究

小崎 俊司 大阪府立大学大学院農学生命科学研究科 獣医疫学講座 教授
共同研究者 向本 雅郁 大阪府立大学大学院農学生命科学研究科 獣医免疫学講座 講師

ボツリヌストキソイド（4価；A、B、E、F型）を免疫したボツリヌス毒素研究従事者より得られたリンパ球を用いてA型毒素に対して中和能を有するヒト型モノクローナルを作製した。今年度は、得られた3種のモノクローナル抗体における毒素分子上の認識領域を解析し、精製抗体を用いた毒素中和試験を行った。Immunoblotting では、毒素分子重鎖、軽鎖いずれに対しても特異バンドは検出されなかった。このことは、いずれのモノクローナル抗体も毒素分子の高次構造を認識している可能性が考えられる。毒素中和能に関しては、マウスを用いた実験において、単独で高い中和能を持つ抗体と単独よりむしろ2種類の抗体を混合した方がより高い中和能が得られる抗体が存在した。また、毒素との結合量に関しても抗体の種類によって違いが見られた。これらの結果より、今回得られた3種のモノクローナル抗体は、異なった抗原決定基を認識していると考えられる。今後、高純度の精製抗体を作製することにより、ヒトに対して臨床応用可能な抗体を有するのかをさらに検討する予定である。

A. 研究目的

ボツリヌス中毒は、グラム陽性有芽胞性のボツリヌス菌が産生する蛋白性毒素を経口的に接種することにより起こる食餌性中毒と、一歳未満の乳児の腸管内で芽胞が発芽、増殖し、その際産生される毒素により起こる乳児ボツリヌス症に大別される。いずれの中毒においても、毒素は末梢の興奮性シナプスに作用し、神経伝達物質の遊離を阻害することにより弛緩性麻痺を引き起こす。ボツリヌス中毒は他の細菌性食中毒と比べ発生例は稀であるが、致死率がきわめて高く、我が国ではヒトの食餌性中毒事例が報告されているA、B、E、F型に対して治療用馬抗毒素が常備されている。しかしながら、乳児ボツリヌス症においてはアナフィラキシー等のアレルギー反応を回避するために異種蛋白由来の抗体による治療はなされていないのが現状である。この危険性は成人の中毒における治療においても同様であり、馬抗毒素に代わるより安全で、高い中和力価を持つ抗体の開発が望まれている。

本研究では上述した目的を達成するためにボツリヌス菌および毒素を対象にしている研究者のバイオハザード対策として調製したトキソイドで免疫したドナーより採取したリンパ球を用いてヒト型モノクローナル抗体の作成を試みた。

B. 研究方法

(1) 抗ボツリヌス毒素ヒト型モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作成

平成10および11年度本研究報告書で報告したように、4価(A、B、E、F型)のボツリヌストキソイドを免疫したドナーより採取した末梢血リンパ球とヒト/マウスヘテロミエロームであるRF-S1株を細胞融合した。ELISAによるスクリーニングおよび限界希釈法でのクローニングによりA型、B型、E型毒素を認識するヒト型モノクローナル抗体を作製した。なお、今回の実験で用いたリンパ球は、複数のボツリヌス毒素関連の研究従事者より供給されたものであり、最終的に用いるサンプルの由来等については一切公表しない。また上記目的のため使用することについては供給者にすでに承諾を得ている。

(2) Immunoblotting

7.5%ゲルにA型精製毒素を2ME処理後1レーンあたり0.2 μ gアプライし、SDS-PAGEを行った。泳動蛋白をニトロセルロース膜に転写した後、ハイブリドーマ培養上清でImmunoblottingを行った。2次抗体は、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgGヤギ抗体(1:1000)、発色基質は4-chloro-1-naphtolを用いた。

(3) モノクローナル抗体の精製

細胞数が 2×10^6 / ml になるまで 1%FCS 加 UC medium 103 培地で培養したハイブリドーマ培養上清を回収し、硫酸塩析による濃縮を行った。さらに Protein A アフィニティクロマトグラフィーを用いて IgG 分画を精製した。

(4) 中和試験

ボツリヌス毒素 (200ipLD_{50} / ml) とハイブリドーマ培養上清を等量混合し、室温で 30 分反応させた後、マウスの腹腔内へ 0.5ml 接種した。毒素を培地のみと混合したサンプルをコントロールとし、コントロールが死亡した時点における、試験群の臨床症状をスコアで示した。

C. 研究結果

(1) ヒト型モノクローナル抗体による毒素蛋白の認識領域の解析

作製した抗毒素モノクローナル抗体が毒素分子の重鎖、軽鎖いずれを認識しているかを解析した。A型毒素を認識し中和能を有する 3 クローン (Mu-4D8, Ib-3H5, To-2H3)、中和能を有さない 1 クローン (To-12B10) さらに A 型、B 型両方を認識し中和能を示さない 2 クローン (Mu-2G3, To-2F6) について immunoblotting を行った (図 1)。その結果、毒素中和能を有さない To-12B10、Mu-2G3、To-2F6 の 3 クローンはいずれも重鎖を認識していた。一方、中和能を示す Mu-4D8、Ib-3H5、To-2H3 は、immunoblotting において重鎖、軽鎖いずれに対しても反応しなかった。

(2) 精製モノクローナル抗体の毒素中和能

ハイブリドーマ培養上清での毒素中和試験の結果、A型毒素に対して中和能があった 3 クローン (Mu-4D8, Ib-3H5, To-2H3) について精製抗体を作製し、それぞれ単独あるいは混合した時の毒素中和活性について検討した (表 1)。Mu-4D8 は、蛋白量 $250 \mu\text{g}$ では、完全中和はしなかったが A 型毒素接種マウスに対して強い延命効果が見られた。蛋白量 $125 \mu\text{g}$ においても延命効果が見られたが、その程度は $250 \mu\text{g}$ と比較して低かった。To-2H3 は、いずれの濃度においても Mu-4D8 と比較して強い延命効果を示し、完全中和した個体もみられた。Ib-2H3 はいずれの濃度においても中和活性は低度であった。次に、これら 3 種類のモノクローナル抗体を混合し中和試験を行った。Mu-4D8 と Ib-3H5 (それぞれ $125 \mu\text{g}$) の組み合わせでは、それぞれその濃度で単独で用いた場合より高い中和活性が見られた。Mu-4D8 と To-2H3 および Ib-3H5 と To-2H3 の組み合わせでは、それぞれ単独で用いたときと同程度かそれ以下の中和活性しか示さなかった。3 種類のモノクローナル抗体をすべて混合 (それぞれ $80 \mu\text{g}$) したときは、ほとんど中和活性は見られなかった。

(3) 精製モノクローナル抗体と ELISA 抗体価の関係

モノクローナル抗体それぞれの蛋白量と ELISA 抗体価すなわち抗原への結合量の関係を解析した (図 2)。毒素を中和した濃度である $250 \mu\text{g}/\text{ml}$ では、抗体価 (OD 値) は Mu-4D8 で 0.903、To-2H3 で 1.911、Ib-3H5 で 0.423 で、To-2H3 は Mu-4D8 の約 2 倍、Ib-3H5 の約 4.5 倍の結合量であった。この結果は、毒素中和能の強さと相関していた。

D. 考察

A型毒素を中和する 3 クローンのモノクローナル抗体が認識する毒素分子領域は、immunoblotting では検出できなかった。これまでの研究結果においては、中和活性を持つマウスモノクローナル抗体では、ほとんどが重鎖上に抗原決定基が存在していた。このことから、今回のヒト型モノクローナル抗体は A 型毒素分子の重鎖側の高次構造を認識している可能性が考えられる。今後これらモノクローナル抗体の抗原決定基に関しては、精製抗体を用いたエピトープマッピング等により明らかにしていく予定である。

精製抗体を用いた中和試験の結果、培養上清を用いたときと同様に To-2H3 は高い毒素中和活性を持つことがわかった。この To-2H3 は、他の 2 クローンと比較して蛋白量で比較した時、ELISA 価は非常に高かった。このことは、To-2H3 が産生する抗体は、他の抗体と比較して毒素との結合力 (avidity) が強いことを示している。したがって、この結合力の強さが、毒素中和能の強さを反映させていると考え

られる。一方、Mu-4D8 と Ih-3H5 を混合したとき、ELISA 値は、Mu-4D8 や Ih-3H5 単独よりも低かったが、中和活性は強かった。このことは、To-2H3 と異なり、これら 2 つの抗体はそれぞれ異なるエピトープを認識することにより強力に、毒素活性を阻害したと考えられる。

今回用いた精製抗体は、1%FCS を含む無血清培地で培養した上清から得られたものである。前年度の報告書にも記載したように完全な無血清培地での培養は、細胞の増殖および抗体産生量の点から非常に困難であった。そこで十分な抗体量が得られる最低 FCS 濃度として 1%FCS を加えた培地より抗体を回収した。Protein A は、FCS 中に含まれるウシ IgG との結合力は弱く、相当程度のウシ IgG を除去することができるが 100%除去することはできない。したがって、今回用いた精製ヒト型モノクローナル抗体にはウシ IgG が残存している。今後、ヒトへの臨床応用のためには、このウシ IgG を完全に除去する必要がある。この 1 つの方法として毒素をカップリングしたアフィニティクロマトグラフィーが有効ではないかと思われる。今後、この方法を用いて培養上清より高純度の精製ヒト型モノクローナル抗体を作製し、マウスを用いた正確な中和力価を測定することにより臨床応用可能な抗体を作製していく予定である。

E. 結論

A 型毒素に対して中和能を持つヒトモノクローナル抗体は 3 種類とも毒素の高次構造を認識する抗体である可能性が示唆された。これら 3 種のモノクローナル抗体のうち To-2H3 は単独で強い中和活性が認められたが、Mu-4D8 と Ih-3H5 は両者を混合することによりはじめて強い中和能を発揮することができた。したがって、これらのモノクローナル抗体を高純度で精製し、単独あるいは混合することにより、臨床応用可能な抗体を得ることができると考える。

F. 研究発表

発表論文

1. Kohda, T., Y. Kamata and S. Kozaki (2000) Endocytosis of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin into rat brain synaptosomes. *J. Vet. Med. Sci.* 62, 1133-1138.
2. Wang, X., T. Karasawa, T. Maegawa, S. Kozaki, K. Tsukamoto, S. Nakamura (2000) Comparative analysis of nontoxigenic and neurotoxigenic *Clostridium butyricum* by molecular typing methods. *Jpn. Pharmacol. Ther.* 28, 999-1004.
3. Wang, X., T. Maegawa, T. Karasawa, S. Kozaki, K. Tsukamoto, Y. Gyobu, K. Yamakawa, K. Oguma, Y. Sakaguchi, S. Nakamura (2000) Genetic analysis of type E Botulinum toxin-producing *Clostridium butyricum* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4992-4997.

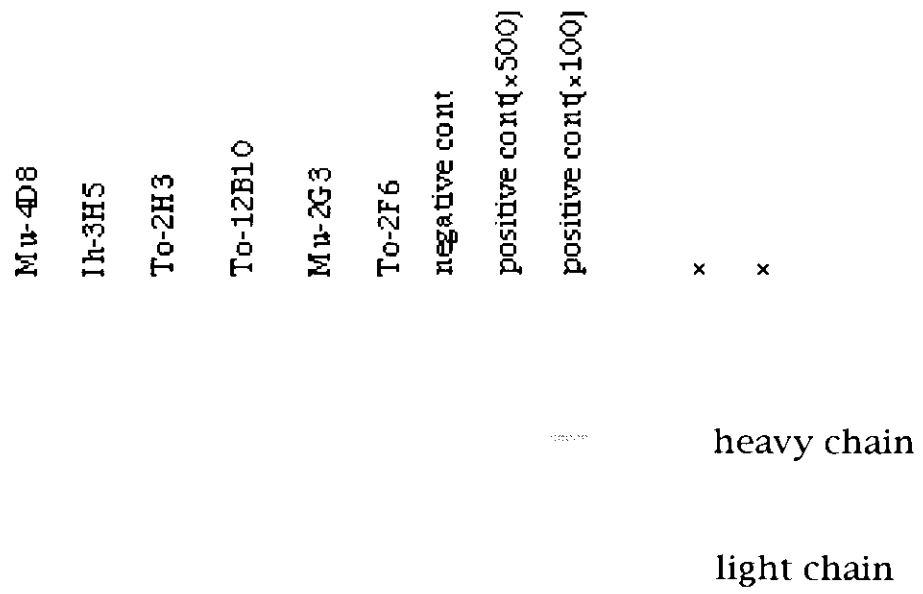


図1. ハイブリドーマ培養上清を用いたimmunoblotting

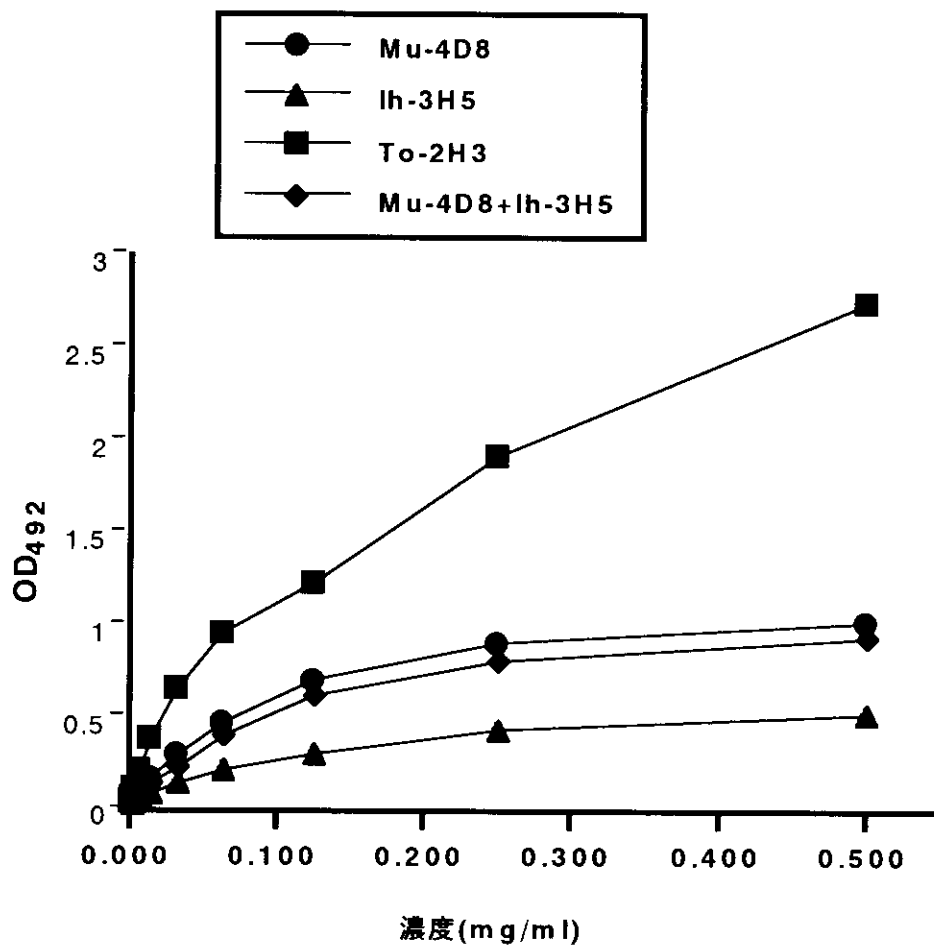


図2. 抗体濃度とELISA抗体価の関係

表 1 . 精製抗体の中和力価

clone name	exp.1	exp.2
Mu-4D8 (250µg/ml)	++*	+++
(125µg/ml)	+	+
Ih-3H5 (250µg/ml)	+	+
(125µg/ml)	-	-
To-2H3 (250µg/ml)	+++	+++
(125µg/ml)	++	++
Mu-4D8+Ih-3H5 (125µg/ml)	++	+++
Mu-4D8+To-2H3 (125µg/ml)	-	+
Ih-3H5+To-2H3 (125µg/ml)	-	+
Mu+Ih+To (80µg/ml)	ND	+
Human IgG (250µg/ml)	-	-

*毒素を培地のみと混合したサンプルをマウスへ接種し、マウスが死亡した時点での試験群の臨床症状をスコアで示した。

- ; コントロール死亡時とほぼ同時に死亡

+ ; 動きが緩慢で強い腹式呼吸

++ ; 腹部の陥没 (軽い腹式呼吸)

+++ ; 無症状

厚生科学研究補助金（新興・再興感染症研究事業）
（分担）研究報告書

ボツリヌス毒素と類縁の破傷風毒素の抗毒素をモデルとした
ヒト型組換え抗毒素抗体作成に関する研究

（分担）研究者 松田 守弘 甲子園大学 栄養学部 教授
協力研究者 渡邊 優子 甲子園大学 栄養学部
片平 じゅん 大阪大学 微生物病研究所
堀口 安彦 大阪大学 微生物病研究所
亀井 優徳 森永製菓研究所

研究要旨 毒素性感染症であるボツリヌス中毒の救命には抗毒素療法が必須である。しかし、ボツリヌス中毒に対する抗毒素としては、現在世界中でヒトに異種タンパク質であるウマ抗毒素しか実用されていない。ヒト型モノクローナル抗毒素は、血清病、供給源の制限や供給源からのウイルス感染のおそれがないため、新しい重要な抗毒素療法剤として、ボツリヌス抗毒素についても望まれているが、一般にマウス型モノクローナル抗体と異なり、ヒト型モノクローナル抗体は実用化できる条件を充たすハイブリドーマを作成することが困難で、ボツリヌス抗毒素抗体もその例外ではない。私たちは、ボツリヌス毒素の類縁である破傷風毒素の抗毒素について、安定して高中和性ヒト型抗毒素を産生するハイブリドーマを世界に先駆けて作成することができた。本研究では、これをヒト型抗毒素のモデルとしてとり上げ、現行のものより、より容易かつ安全、経済的に作成し、実用化することを目的として、このハイブリドーマから高中和性ヒト型抗毒素抗体の重鎖および軽鎖の可変部領域遺伝子をクローニングし、それらを連結して、一本鎖の組換え抗体フラグメントとして非動物細胞である大腸菌の特殊な菌株に発現させることを試みた。その結果、毒素と特異的に結合する一本鎖組換え抗体フラグメントを作成することができ、さらに、マウス毒性試験によってその中和活性を独自の信頼性のある方法で有意な活性としてはじめ示すことに成功した。その結果に基づいてこの産生を増強する条件、その精製法を検討した。

A. 研究目的

ボツリヌス中毒は、最も典型的な毒素性感染症の一つで、しかも細菌性食中毒のうちでも最も致命率が高く、その救命には抗毒素療法が著効を奏し、必須である。

ジフテリア、破傷風について世界で最初の抗毒素血清療法（ウマ抗毒素製品を使用）が始められて100年以上になる。しかしボツリヌス中毒に対しては、ジフテリアやガス壊疽、蛇毒の場合と同

じく、まだウマ抗毒素しか実用されていない。ウマ抗毒素は、ヒトにとって異種タンパク質であり、血清病などの副作用反応の危険がある。そこで、破傷風に対すると同じく、副作用のより少ない、より安全な抗毒素として、ヒトに安全に注射できるトキシイドをつくり、それで免疫したヒトの血清から調製した、ヒトに同種タンパク質である抗ボツリヌス・ヒト免疫グロブリンG (IgG) 製剤が望まれるが、現行の破傷風IgGと同じく、次に

述べる理由で実用化は進められていないのが現状である。

一般に、ヒト抗毒素免疫グロブリン製剤は、同種のヒトタンパク質であるという点ではウマ抗毒素製剤より優れているが、ヒトの免疫血清を供給源としているため供給に限度があり、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という制約がある。

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、免疫療法剤としての潜在的な有用性が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、同種タンパク質であ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ひろく実用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) 十分実用化に値する。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

要があり、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な方法 (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 はポリクローナ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 [(V_H, V_L (G6 の場合は軽鎖が κ なので V κ)] 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 4, 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い。本研究では、これらのモノクローナル抗体のうちまず最も中和活性が高い 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活性ヒト型組換え (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し、さらに、その中和活性、産生至適条件を調べ、精製を試みた。

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 Welschof 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 (V_H 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 μg 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 (V_H, V_κ) 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 μM の forward 並びに reverse 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 (L1-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'-CACGACGACGTTGTAACGAC-3') および M13 reverse primer (5'-GGATAACAATTCACACAGG-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 V_H, V_K 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。 V_H, V_K 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 (図 5) 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 5)。

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-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 (図 5) 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 (図 5)。(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 (TG 1 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 (図 6)。(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 TG 1 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 (図 6)。得られたファージを TG 1 株に再感染させ、同様のパンニングを計 3 回繰り返して、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 (図 6)、以下の実験に供した。

7. 可溶性抗破傷風一本鎖組換え抗体フラグメント (ScFv) の培養上清中への発現 (分泌)

培養上清中への ScFv の分泌の経時的変化は以下のようにして測定した。大腸菌 HB2151 株を pScFv-G6 ファージを感染させ、アンピシリン耐性をマーカーとして pCANTAB 5E-G6 が導入された HB2151 株を選択した。同菌を 25ml の 2XYT 培地中、 37°C で培養し、 OD_{600} が 0.4 に達した時 IPTG を終濃度 1mM になるように加えて培養、発現誘導後、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)の発現と細胞内局在

YTAG 培地で前培養後、ファージ pScFv-G6 を導入した大腸菌 HB2151 株を 300 ml の 2XYT 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。集めた菌体を培養液の 1/10 容の 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。沈渣は細胞質画分と同容量の 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、培養液の 1/10 容の 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。

9. 可溶性抗破傷風一本鎖組換え抗体フラグメントの精製

ファージ pScFv-G6 に感染した大腸菌 HB2151 株を 3 liter の 2XYT 培地で上述の 8. 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 が回収される硫酸画分を同定した。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。ELISA で同定した ScFv を含む同様の画分をプールし、Toyopal SP イオン交換カラムを用いてさらに精製を試みた。

10. MAb-G6 の重鎖可変部領域 (V_H) と軽鎖可変部領域 (V_K) を linker (L) でつなぐ順序を逆にした一本鎖組換え抗体 ScFv-G6 (H-L-K) 発現ファージミド pCANTAB 5E-G6 (H-L-K) の構築

上述の 5. の場合 [pCANTAB 5E-G6 (K-L-H) (図 5)] と同様にして構築し pCANTAB 5E-G6 (H-L-K) と名づけた (図 8)。ついで上述の 6., 7., 8. の方法に従ってその発現を調べた。

11. pCANTAB 5E-G6 からの pQE-60 プラスミドによる ScFv-G6 発現プラスミドの構築

pCANTAB 5E ファージミドに組込んだ ScFv-G6 DNA に Nco I および Bam HI の制限酵素切断部位を付加するために pCANTAB 5E-G6 を鋳型に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。単離した cDNA 断片を pQE-60 プラスミドに導入し、pQE-60-G6 と名づけた (図 9)。

12. 毒素中和活性の測定

培養上清または細胞質画分の各硫酸画分を破傷風試験毒素(国立感染症研究所より分与)と混合(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 0.1~0.4ml ずつ左上腿内側にエーテル麻酔下で、筋肉内注射をし、症状の進行状況を症状のスコア(図 10)で読み取ることによ

って中和活性を調べた。破傷風発症マウスの観察は出来るだけ物理的的刺激を避け、痙性麻痺下でも摂食、摂水ができるように工夫した。抗毒素中和活性の標準として抗破傷風ヒト免疫グロブリン製剤（テタノブリン，ミドリ十字）の 1/200～1/2000IU を用いた。

13. 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 に示したそれぞれ 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 V_{H3} 、 V_{K-1} サブグループに属することが明らかとなった(図 11,12)。

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。まず、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-G6 遺伝子の細胞内外への発現

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 (g 3 signal, 図 7, 8)、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 (33～48 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-G6 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-G6 の発現を調べた。その結果、ScFv-G6 は主に細胞内の細胞質画分に培養上清の約 5 倍含まれることが分かった (図 13)。

4. 抗破傷風ヒト型 ScFv-G6 遺伝子の量的発現

(1) MA6-G6 の重鎖可変部領域 (V_H) と軽鎖可変部領域 (V_L) を種々の長さの linker でつなぐ順序をかえた一本鎖組換え抗体 ScFv-G6 遺伝子の発現量を Anti-E tag を用いたウェスタンブロットティングで調べた結果 (図 14) に示すように重鎖可変部領域を N 末端側に配置した H-L-K 型の遺伝子発現量がいずれもその順序を逆にした K-L-H 型よりもはるかに多く、しかも H-L-K 型のうちではリンカーの繰り返し配列が 1 回の L1 の発現量が最も多く K-L-H 型の数倍の発現が得られ、2 回 (L2)、3 回繰り返し配列の順に発現量が減少した。破傷風トキソイドを抗原とした ELISA 法の結果 (表 4) でも同様の結果が得られた。

(2) pQE-60-G6 プラスミドベクターを用いた発現

pCANTAB 5E ファージミドを用いファージディスプレイ法で一本鎖抗体 ScFv-G6 遺伝子をクローニングすることができたのでこれを他のプラスミドベクターに導入して発現の量的増強があるか試みた。

pQE 発現用の菌株 *E. coli* M15[pREP4]を用いた QIA 発現系で発現を調べたが、ELISA 法およびウェスタンブロットティングのいずれによっても ScFv-G6 を検出することは

できなかった。

5. 細胞質画分に含まれる ScFv-G6 の精製

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-G6 をウェスタンブロット法により検出した。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 (図 15)。

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 5)。

6. 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試験毒素と産生された 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た。その場合まず毒素の変量 (図 16) 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 (図 17、18) 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た。

その結果、ScFv-G6 画分を加えず毒素だけの場合や ScFv 遺伝子を導入していない場合 (図 18) と異なり、添加毒素量に応じて (図 16) 死亡時間の変化がみられ、ScFv 画分の添加用量に依存して毒素活性の中和がみられ、症状の進行が著明に

抑制され、毒素対照では 10MLD の毒素量で 34 時間で死亡するところ、致死時間が用量によって 200 時間にも延長した (図 17、18)。

ScFv-G6 標品のうちでは、リンカーの最も短い L1 標品が、また K-L-H 標品より H-L-K 標品が ELISA による特異的抗原結合活性の結果と同様、より高い中和活性を示した。

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、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。さらに新しい組換え体をつくることにより、その毒素中和活性を調べ、その遺伝子発現を増強、その産物が確実に中和活性をもつことをはじめて明確に示すことができた。

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明確な報告はない。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、出発材料が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 リンパ球であるので、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を明確にとらえることができ、さらに量産に向かって成果を得たことは、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。また本研究の結果、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 (図 20) と定量的に比較することによって明確に評価できることが期待される。最近、酵母 *Pichia* である種の ScFv の高発現系が報告されているので、実用への量産化の可能性がさらに大きくなった。

今後、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いけば、抗ボツリヌスヒト型一本鎖組換え抗毒素抗体を実用化できる道につながる。

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。その発現量を増強させ、産物の精製を進め、産物が抗原特異的結合するだけでなく、明確に毒素中和活性をもつことを示すことができた。

以上の結果は、破傷風類縁のボツリヌス毒素の治療に必須のボツリヌス抗毒素のヒト型組換え抗体の実用化への道を開くものである。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsuda, M., M. Takahashi, D-LLei 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) 松田守弘、渡辺優子：破傷風とその治療・予防のためのヒト型モノクローナル抗体、*BIO Clinica* 16 (1) : 39-43, 2001

2. 学会発表

- 1) Matsuda, M., J. Katahira, M. Kamei, S. Hashizume, 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, October 12-15, Pattaya, Thailand, Oct. 12-15, 1999.
- 3) 渡辺優子、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
- 4) Matsuda, M., Watanabe, Y., Katahira, J., Horiguchi, Y., Kamei, M.: Expression in *E. coli* of anti-tetanus human single-chain

antibody fragment with toxin-neutralizing activity.

13th World Congress on Animal Plant and Microbial Toxins September 18-22, 2000, Paris, France

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 8-19409

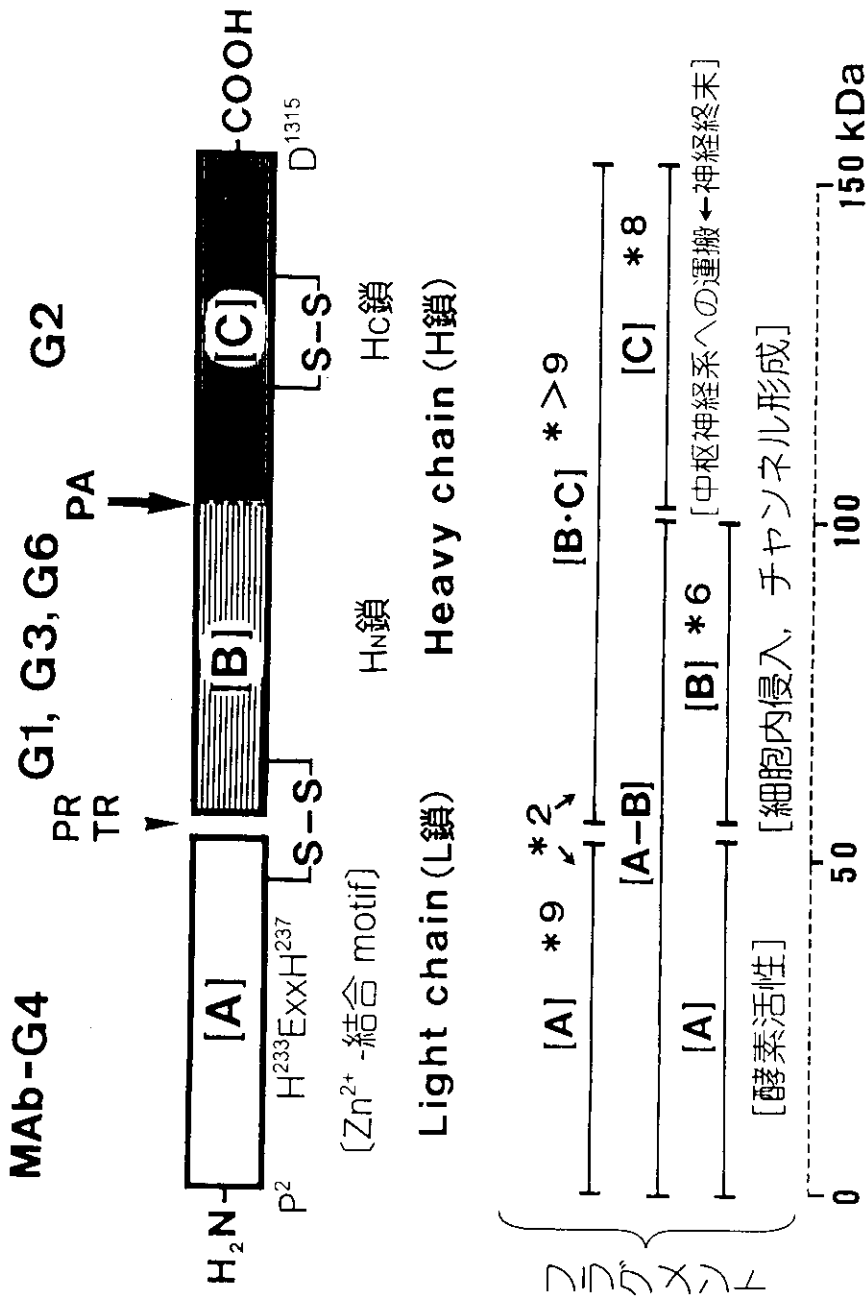


図1 破傷風毒素(二本鎖からなる「菌体外」毒素)の[A-B·C]3部分分子モデル

ドメイン構造と機能 *はエピトープ数(これまでの報告)

矢印[▼・↓]は、一本鎖の菌体内毒素がそれぞれ穏やかなトリプシン処理(TR), 内在性のプロテアーゼ(PR), または/パイン処理(PA)で切断される部分を示す。

ヒト型モノクローナル抗体(MAb-G1, 2, 3, 4, 6)に対するエピトープ(抗原決定基)の破傷風毒素分子(ボツリヌス毒素と相同)上で局在を示す。

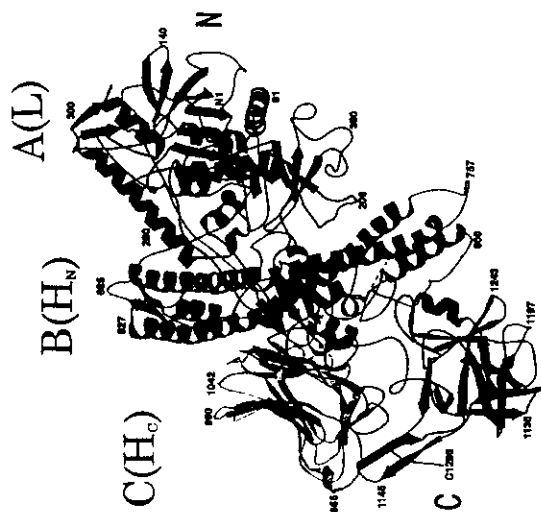


図2 ボツリヌス毒素の立体構造、サブユニット (L, H_N, H_C)
構造と相同の破傷風毒素のサブユニット (A, B, C)