

図3 抗体（免疫グロブリン G, IgG）分子のドメイン構造と  
 軽鎖および重鎖の可変部領域（V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>）からなる抗原結合部位

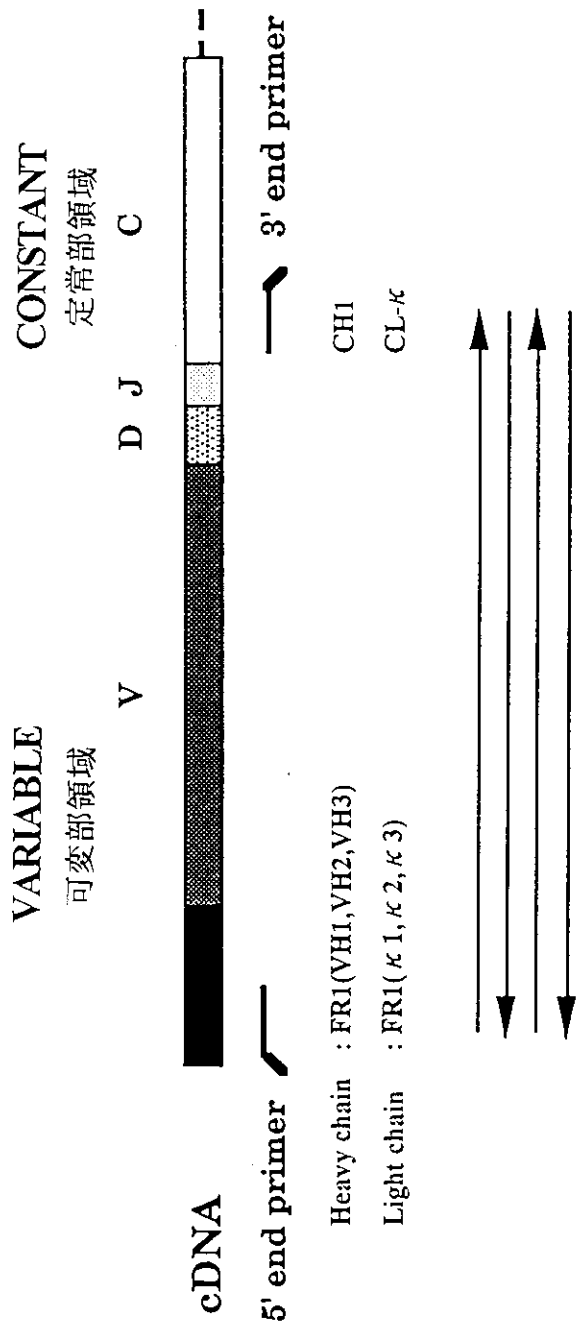


図 4 ヒト免疫グロブリン産生細胞から、抗体の重鎖、軽鎖の可変部領域をコードする遺伝子 (DNA 断片:  $V_H, V_L$ ) をクローニングする方法

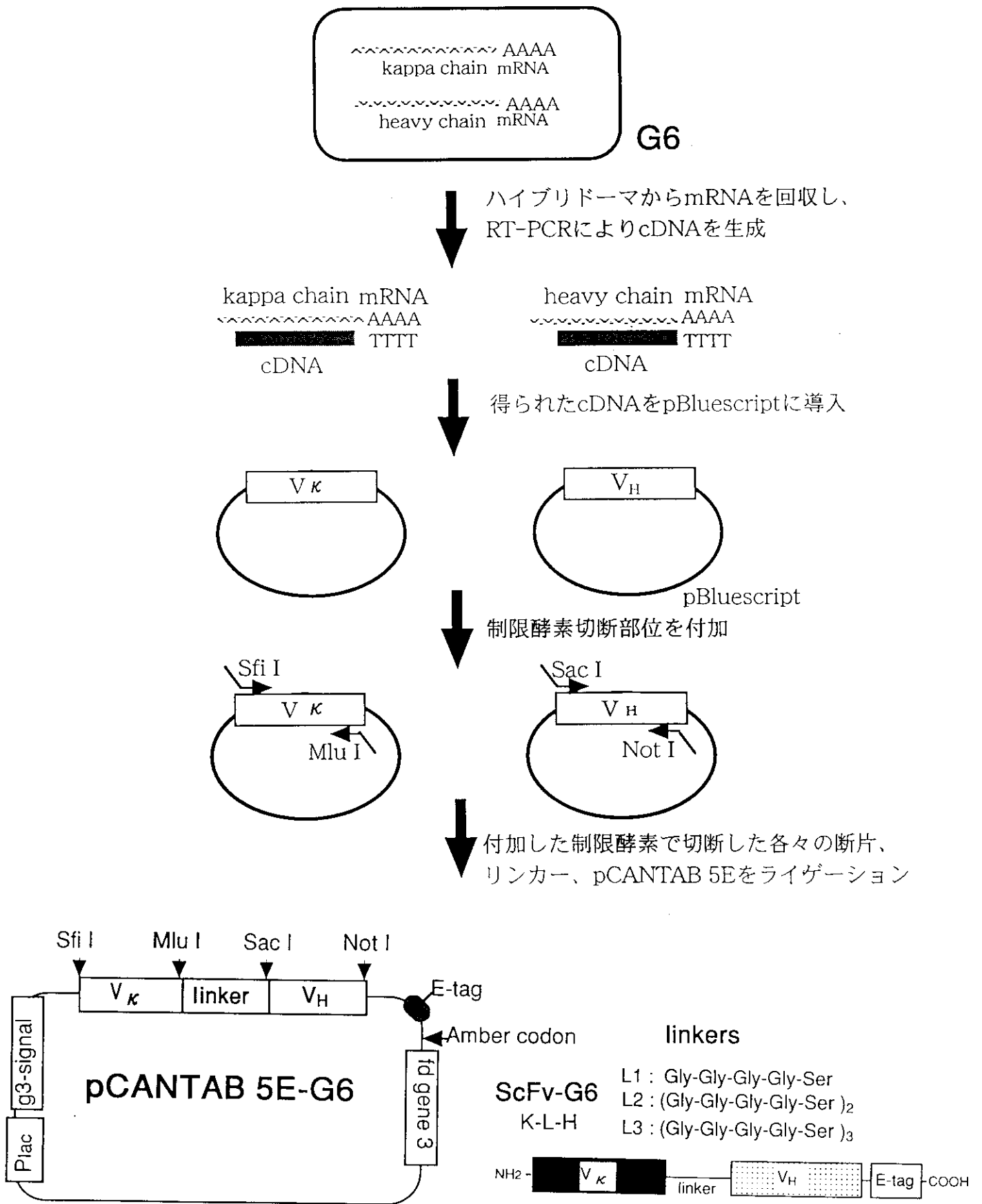


図 5 抗破傷風一本鎖組換え抗体フラグメント (ScFv-G6) 発現のためのファージミド pCANTAB 5E-G6 の構築

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

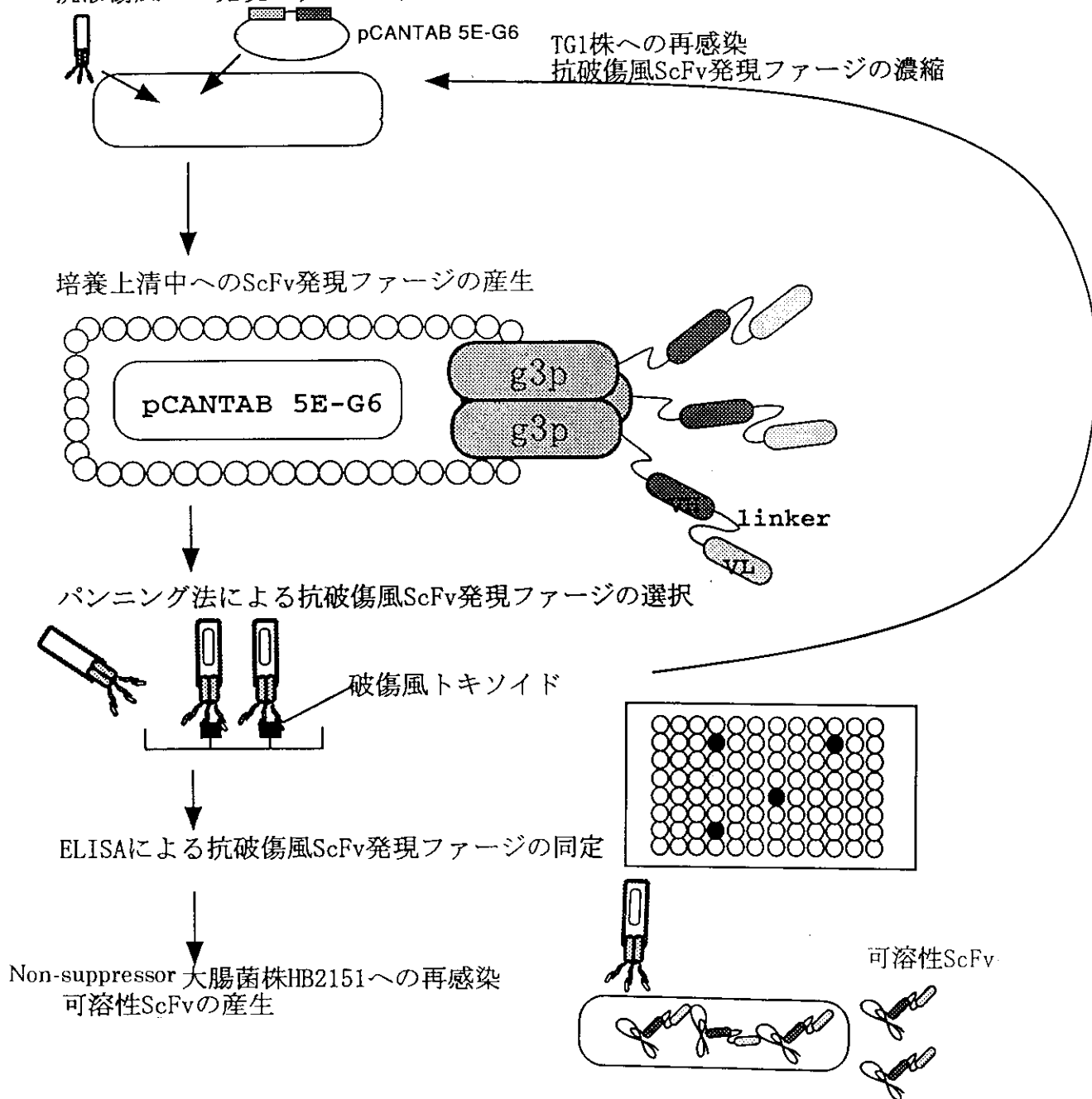


図6 抗破傷風一本鎖組換え抗体フラグメント (ScFv-G6) 発現ファージの構築と可溶性 ScFv の産生

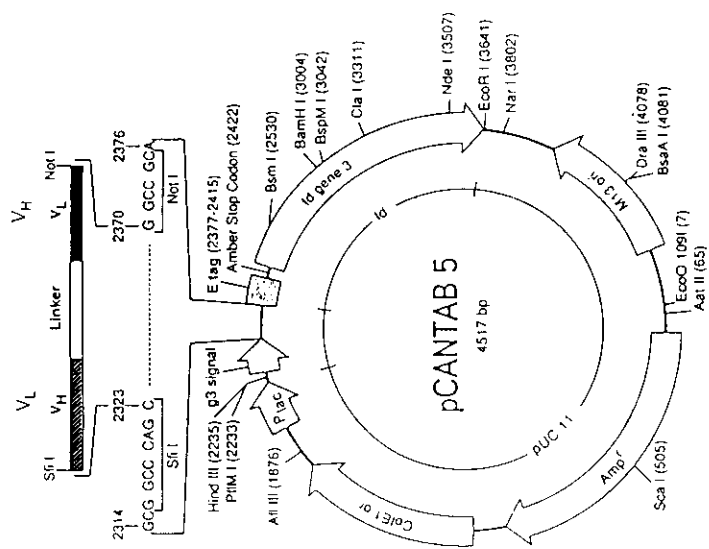
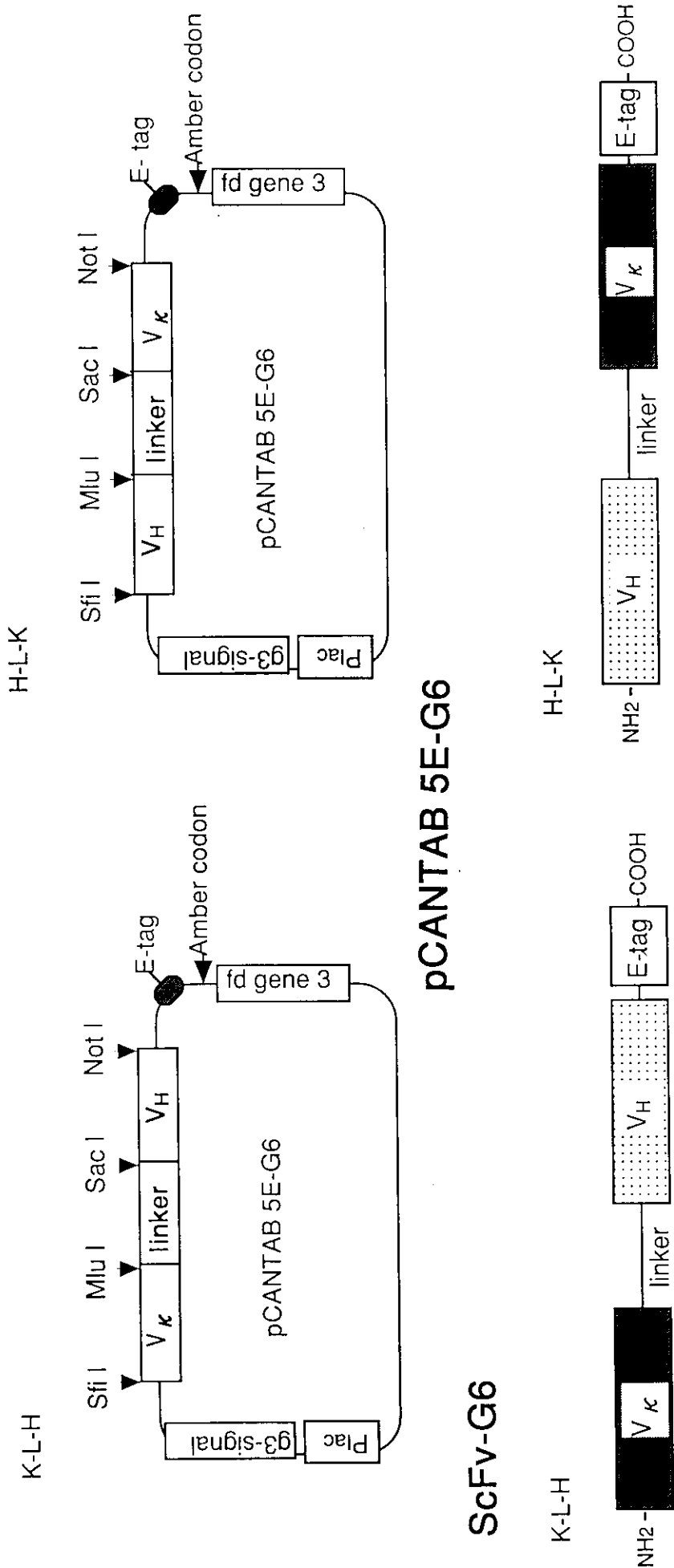


図7 pCANTAB 5E ファージミドベクター

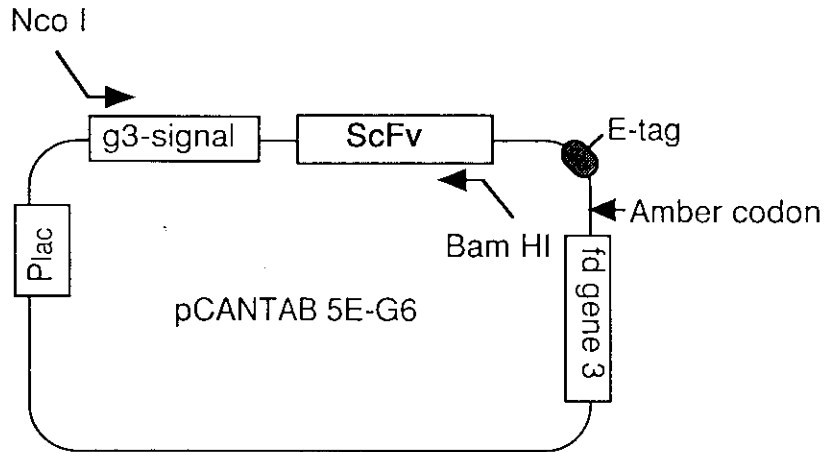


### Amino acid sequences of linkers

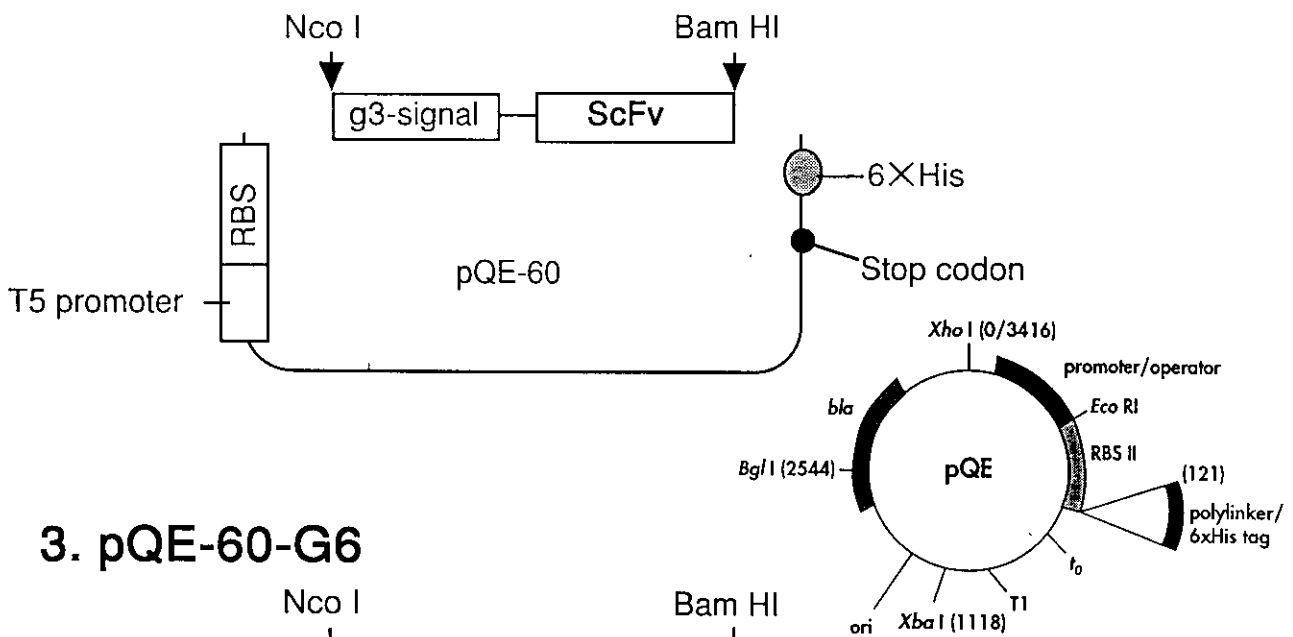
- L1 : Gly-Gly-Gly-Ser
- L2 : (Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>2</sub>
- L3 : (Gly-Gly-Gly-Ser)<sub>3</sub>

図8 重鎖可変部領域 (V<sub>H</sub>) と軽鎖可変部領域 (V $\kappa$ ) を長さの異なるリンカー (L1, L2, または L3) で順序をかえてつないだ一本鎖抗体フラグメント ScFv (K-L-H および H-L-K) として発現する ファージミド pCANTAB 5E-G6 (H-L-K) および pCANTAB 5E-G6 (K-L-H) の構築

# 1. PCR amplification



# 2. Ligation



# 3. pQE-60-G6

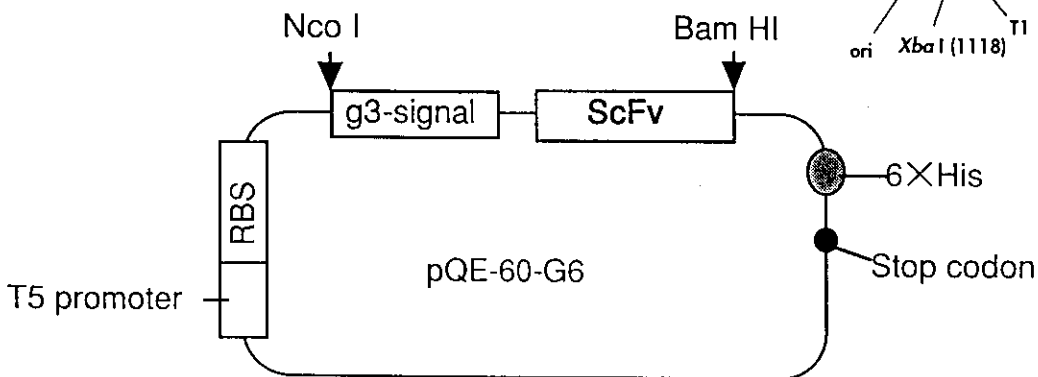
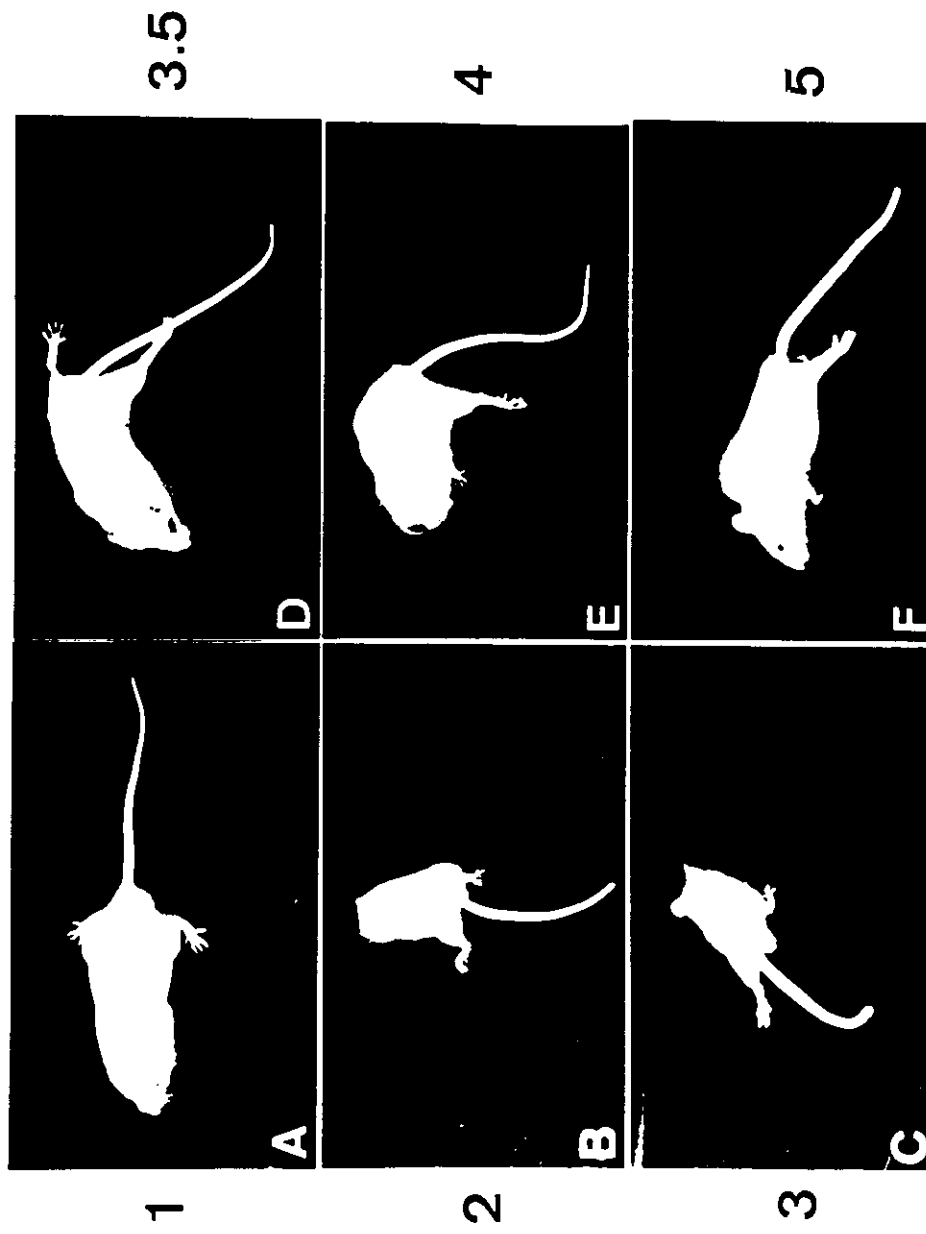


図9 一本鎖抗体フラグメント ScFv-G6 遺伝子を組込んだ  
 プラスミド pQE-60-G6 の構築  
 (6 残基の His タグ配列を C 末端側にもつ)

0: NO SYMPTOM

# SCORE

重症度点数 (スコア)



DEATH: 6

図 10 毒性試験のための症状スコア

(スコア: 無症状, 0 ~ 死亡, 6)



G6-Heavy Chain (H chain)

subgroup VH3

|     |   |     |
|-----|---|-----|
|     | FRI   |     |
| 1   | GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGTTTGGTACAGCCGGGGGGTCCCTGAGACTC    | 60  |
|     | E V Q L V E S G G L V Q P G G S L R L                         |     |
|     | FRI <sup>+</sup> CDR1   |     |
| 61  | TCATGTGCAGCCTCTGGATTACACCTTTGACCGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT | 120 |
|     | S C A A S G F / T F D R Y A M S / W V R Q A                   |     |
|     | 22 FRI <sup>+</sup> CDR2                                      |     |
| 121 | CCAGGAAGGACTGGAGTGGTCTCAGGCATTAGTCGTAGTGGTGAACACATACTAC       | 180 |
|     | P G K G L E W V S / G I S R S G E T T Y Y                     |     |
|     | FRI <sup>+</sup> FR3  |     |
| 181 | GCAGACTCCGTGAAGGCCGGTTCCACCATCTCCAGAGACAGCTCCAAGAACAACGGTGTAT | 240 |
|     | A D S V K G / R F T I S R D S S K N T V Y                     |     |
|     | FRI <sup>+</sup> FR3 <sup>+</sup>                             |     |
| 241 | CTGGAATGAATAGCCTCAGAGGCGGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGCAGGA  | 300 |
|     | L E M N S L R G E D T A V Y Y C A K / A G                     |     |
|     | 96 CDR3   |     |
| 301 | AAGCAGTGGTTGGCCCTTATTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAGCCCTGGTCCACCCTC  | 360 |
|     | K Q W L A S Y Y F D Y / W G Q G A L V T V                     |     |
|     | FRI <sup>+</sup> constant                                     |     |
| 361 | TCCGCCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTC                                  | 390 |
|     | S A / A S T K G P S V   |     |

図 11 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

```

FR1
1  GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTCTCCAGGGGAGAGCCACC 60
  D I V M T Q S P A T L S V S P G E R A T
FR2
61  CTCTCCCTGTCGGGCCAGTCAGAGTGTGGCACCAACTAGCCTGGTACCACAGAAACCT 120
  L S C / R A S Q S V G T N L A / W Y Q Q K P
FR3
121  GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCGCAGCC 180
  G Q A P R L L I Y / G A S T R A T / G I A A
FR4
181  AGGTTTCAGTGGCAGTGGGCTCTGGACAGAGTTCACCTCACCATCAGCCAGCCCTGCAGTCT 240
  R F S G S G S G T E F T L T I S S L Q S
FR5
241  GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTTCAGCAGTACAGTGACTGGCCCTCCACAGACITTCGGC 300
  E D F A V Y Y C / Q Q Y S D W P P Q T / F G
FR6
301  GGAGGGACCAAGGTAGAGATCAGACGAACTGTGGCTGCACCACCTGTCTTC 351
  G G T K V E I R R T / V A A P S V F

```

図 12 抗破傷風ヒト型モノクローナル抗体 MAb-G 6  
の軽鎖可変領域の塩基配列と  
推定アミノ酸配列

HB2151/G6-ScFv      HB2151

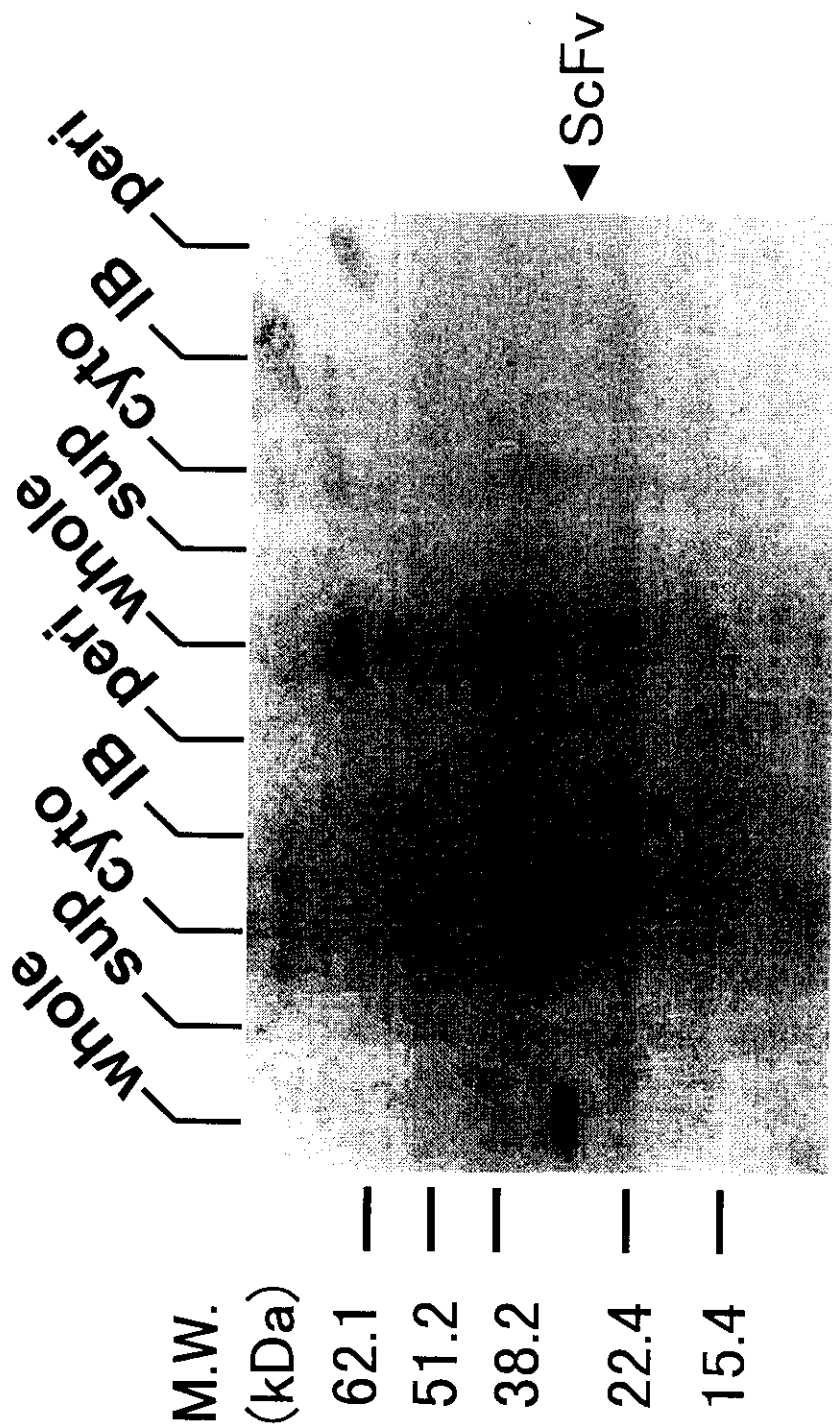
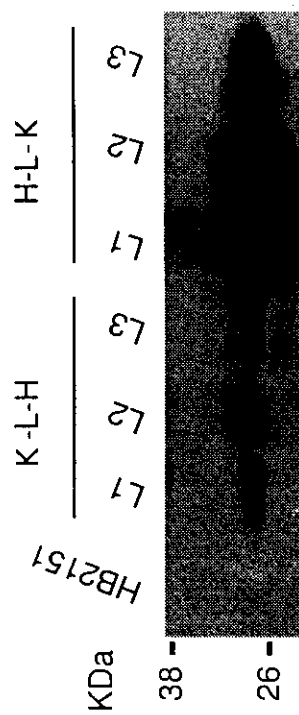


図 13 抗破傷風一本鎖抗体 ScFv-G6 発現の細胞内局在 (anti-E tag によるウエスタンブローディング)  
 一本鎖抗体 ScFv-G6 遺伝子を導入した大腸菌 (HB2151/G6-ScFv 株) および  
 導入していない大腸菌 (HB2151/株)

whole, 全菌体, 音波抽出液; sup, 培養上清; cyto, 菌細胞質画分;  
 IB, inclusion body (封入体); peri, ペリプラズム画分

図 14 重鎖可変部領域 (V<sub>H</sub>) と軽鎖可変部領域 (V<sub>K</sub>) を長さの異なるリンカー (L1, L2, または L3) で順序をかえてつないだ一本鎖抗体フラグメント ScFv-G6 (K-L-H および H-L-K) の非サブレッサー大腸菌株 HB2151 での発現 (抗 E tag によるウエスタンブロットティング)



リンカー : L1, GGGGS ; L2, (GGGGS)<sub>2</sub> ; L3, (GGGGS)<sub>3</sub>

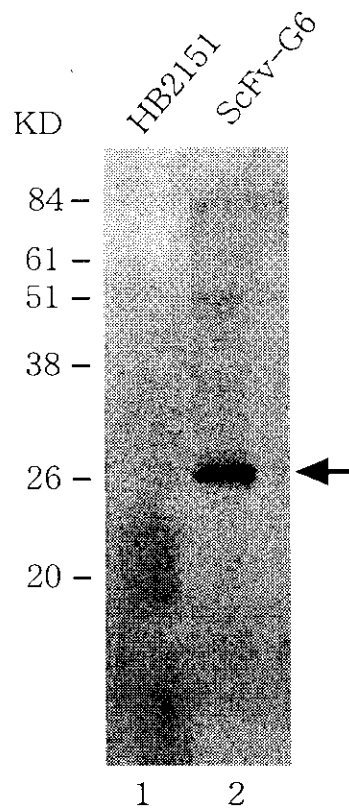


図 15 抗破傷風一本鎖抗体の発現

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。

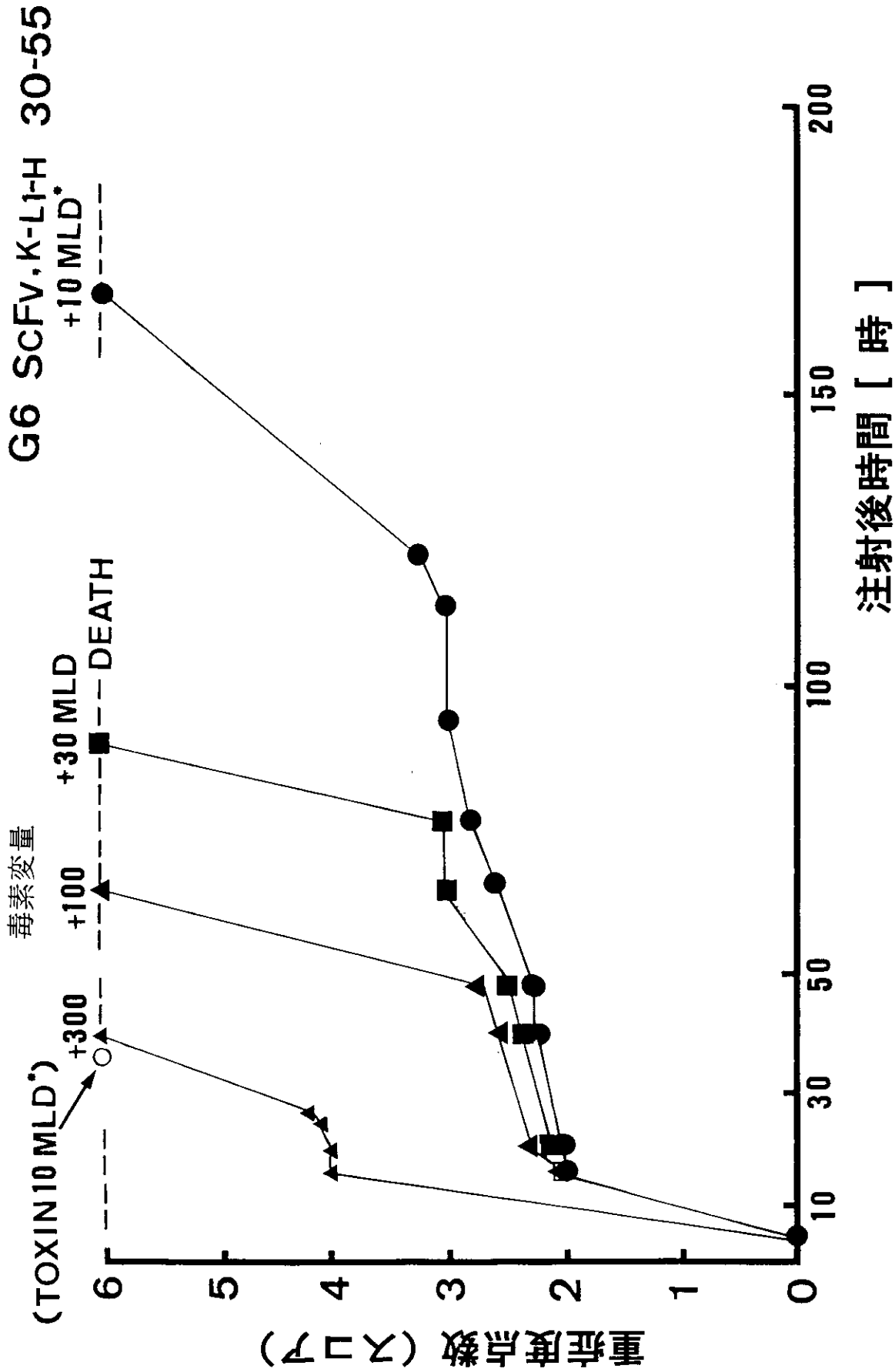


図 16 抗破傷風ヒト型モノクローナル抗毒素 MAb-G6 の一本鎖組換え抗体フラグメント(ScFv)  
 [培養上清の硫酸 30~55%飽和画分] による毒素中和反応 (ddy マウス ♀ 18~22 g)

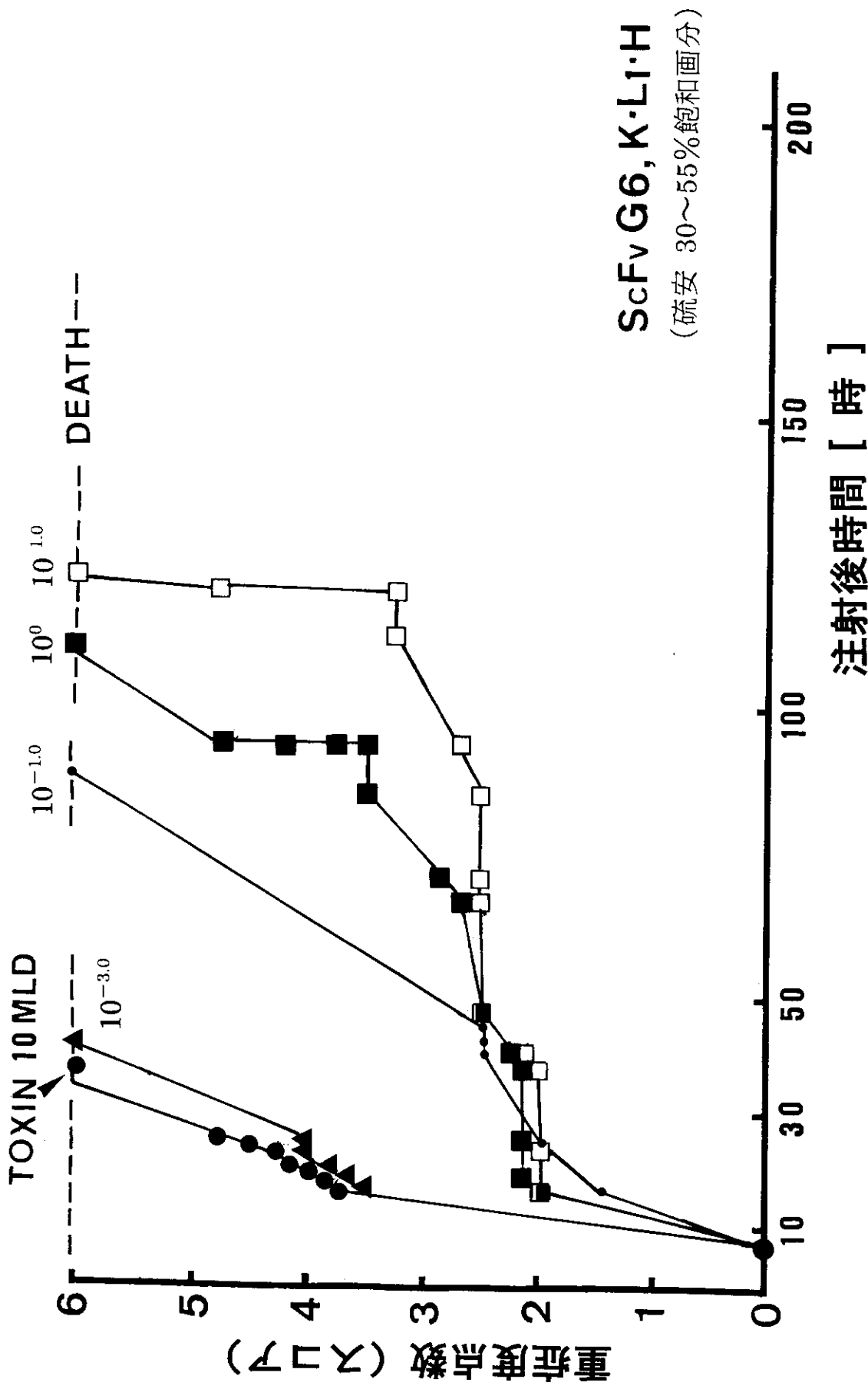


図 17 抗破傷風ヒト型モノクローナル抗毒素 MAb-G6 の一本鎖抗体フラグメント ScFv-G6 (K-L1-H) の細胞質画分の毒素中和反応 (ddY マウス ♀ 18~22g)

超音波破碎抽出液の細胞質画分を  $10^0$  希釈とし  $10^{-3.0} \sim 10^{1.0}$  倍用量を 10MLD の毒素と混合し  $37^\circ\text{C}$  1 時間インキュベートした混合物を注射した後の破傷風症状 (スコア: 無症状, 0~死亡, 6)

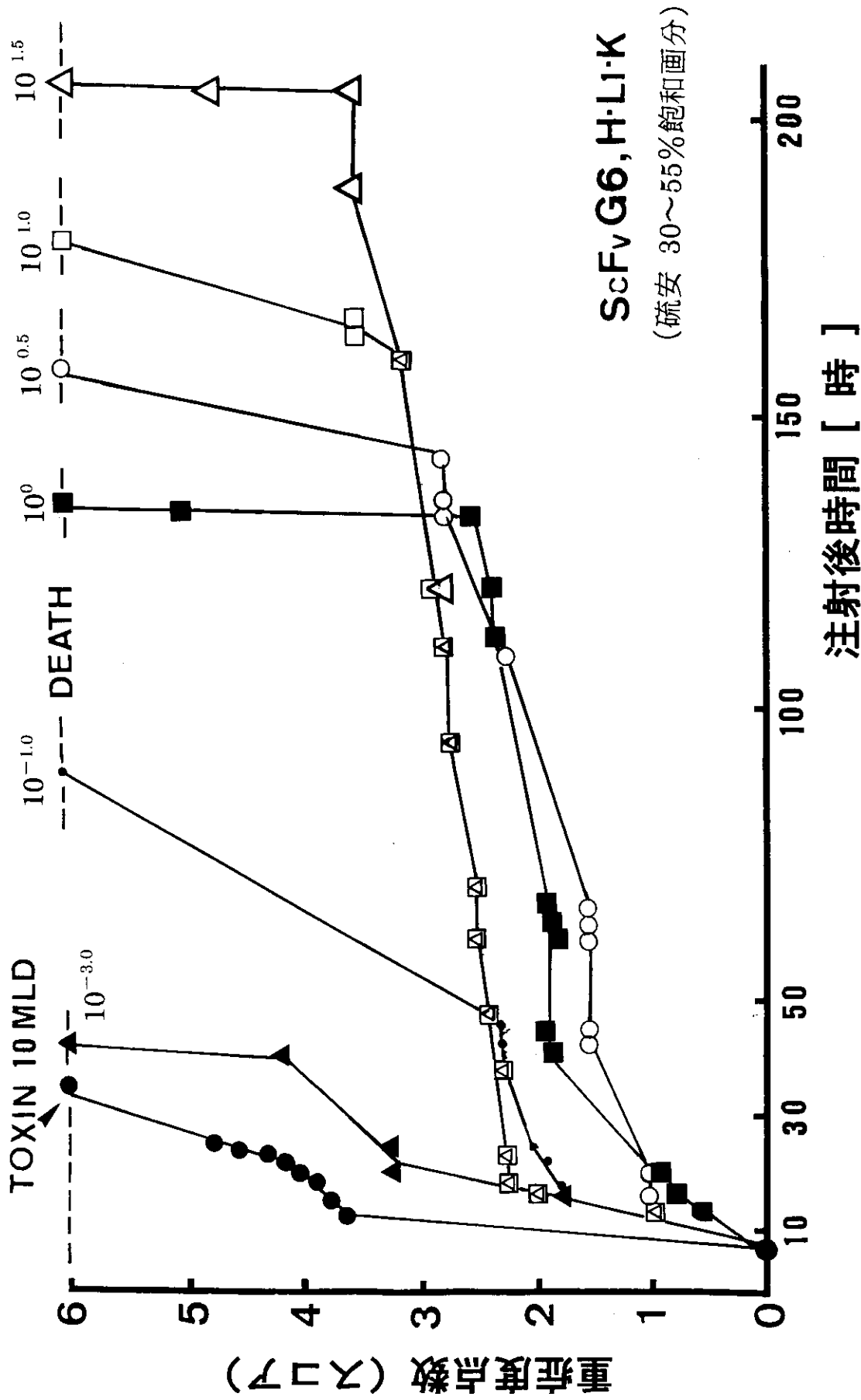


図 18 抗破傷風ヒト型モノクローナル抗毒素 MAb-G6 の一本鎖抗体フラグメント ScFv-G6 (H-L2-K) の細胞質画分の毒素中和反応 (ddy マウス ♀ 18~22g)

超音波破碎抽出液の細胞質画分を  $10^0$  希釈とし  $10^{-3.0} \sim 10^{-1.5}$  倍用量を 10MLD の毒素と混合し  $37^\circ\text{C}$  1 時間インキュベートした混合物を注射した後の破傷風症状 (スコア: 無症状, 0~死亡, 6)



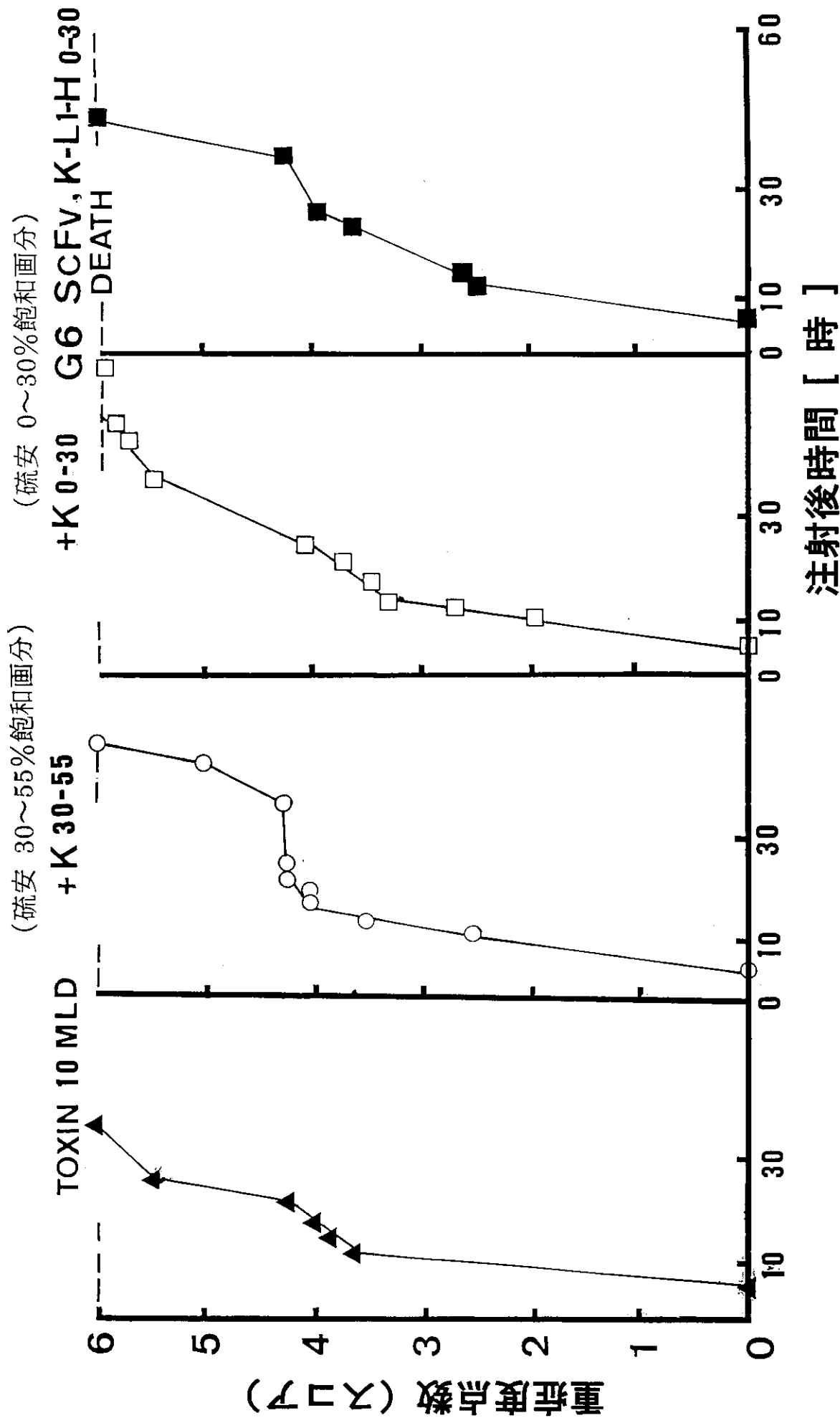


図 19 抗破傷風ヒト型モノクローナル抗毒素 MAb-G6 の一本鎖組換え抗体フラグメント (ScFv) および K, pScFv-G6 遺伝子を導入していない対照培養上清による毒素(10 MLD)中和反応 (ddY マウス ♀ 18~22 g) [培養上清の硫安 0~30%および 30~55%飽和画分]

# MAB G6

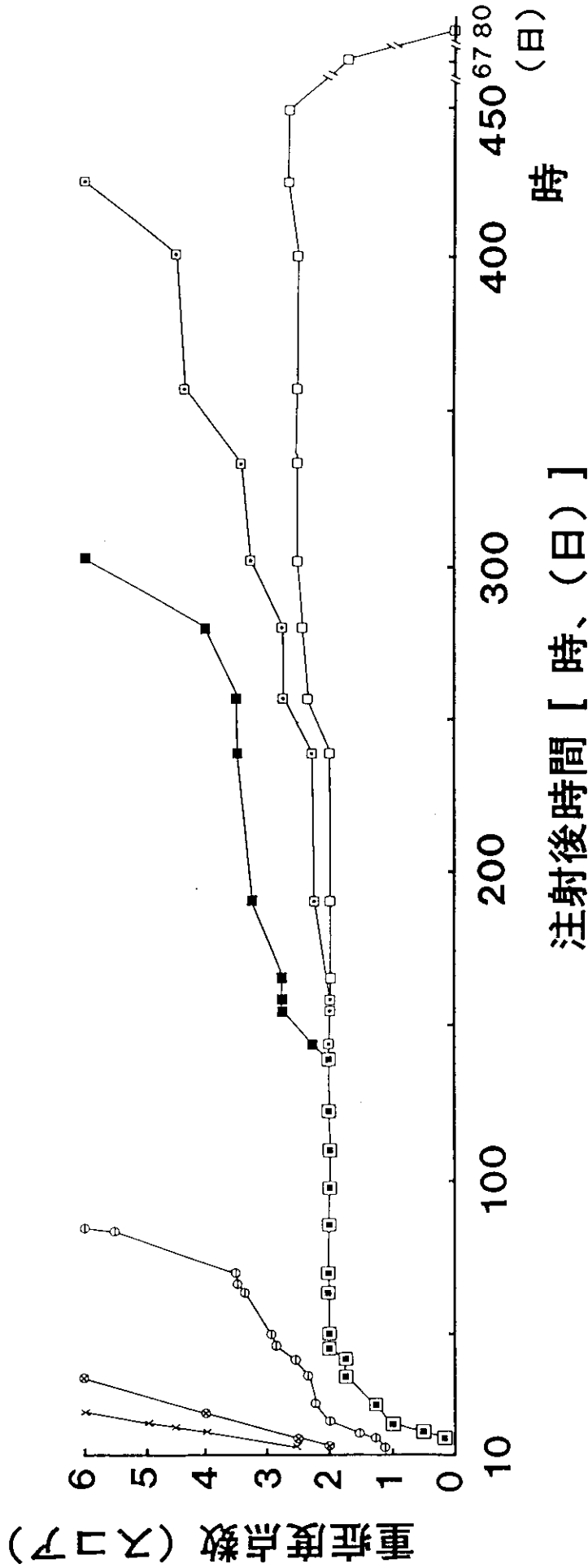


図 20 毒素 (20 MLD) とモノクローナル抗体 MA b-G6 の混合物をマウスに注射した後の破傷風症状 (スコア: 無症状, 0 ~ 死亡, 6) の進行パターン 抗体 IgG 用量は、× ~ □ へ  $10^{0.5}$  段階で増量

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

| 抗体<br>(MAb)                        | ドメイン                  | Ig クラス |    | K <sub>a</sub><br>× 10 <sup>10</sup> M <sup>-1</sup> | 最小生残量(MSD)<br>(μg IgG) | 中和活性<br>(IU/70μg) | 比 | 〔従来の方法<br>現方法〕 |
|------------------------------------|-----------------------|--------|----|--|------------------------|-------------------|---|----------------|
|                                    |                       | H鎖     | L鎖 |  |                        |                   |   |                |
| G4                                 | [A] (L)               | γ 1    | κ  | 14   | 2.8                    | 0.3               |   | 1              |
| G1                                 | [B]                   | γ 1    | λ  | 8.3  | 0.89                   | 1                 |   | 3              |
| G3                                 | [B] (H <sub>N</sub> ) | γ 1    | λ  | 2.9  | 2.8                    | 0.3               |   | 3              |
| G6                                 | [B]                   | γ 1    | κ  | 10   | 0.028                  | 30                |   | 30             |
| G2                                 | [C] (He)              | γ 1    | λ  | 11   | 0.089                  | 10                |   | 9              |
| 等量混合物 [A],[B],[C]<br>[G1,2,3,4,6,] |                       |        |    |  | 0.028                  | 30                |   | 1              |

Minimum survival dose(MSD) : 20MLD の毒素に対して生き残らせるための最小の抗体量

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℃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 (1μg/ml), *Clostridium perfringens* enterotoxin (1μg/ml), BSA (2μg/ml) を使用した。2次抗体として ペ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<br>(アミノ酸1から10番目)   | κ1       | 5'-GACATCSWGATGACCCAGTCTCC-3'      |
|                                 | κ2       | 5'-GATATTGTGATGACYCAGWCTCCACTCT-3' |
|                                 | κ3       | 5'-GAAATTGTRWTGACRCAGTCTCCA-3'     |
| 軽鎖リバースプライマー<br>(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<br>(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<br>(アミノ酸115から121番目) | IgG      | 5'-GACSGATGGGCCCTTGGTGGA-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。