

20010074

厚生科学研究研究費補助金

高度先端医療研究事業

各種疾患の治療に役立つヒト抗体の単離調製に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 黒澤 良和

平成14（2002）年4月

目次

I. 総括研究報告	
各種疾患の治療に役立つヒト抗体の単離調製に関する研究-----	1
黒澤良和	
II. 分担研究報告	
1. 各種病原菌毒素に対するヒト中和モノクローン抗体の作製	
高橋元秀 -----	9
2. B型肝炎ウイルスに対するヒト中和モノクローン抗体の作製	
千葉 丈-----	13
3. 水痘ウイルスに対するヒト中和モノクローン抗体の作製	
白木公康-----	17
4. インフルエンザウイルスに対するヒト中和モノクローン抗体の作製	
奥野良信-----	20
5. ハブ毒に対するヒト中和モノクローン抗体の作製	
野崎真敏-----	27
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	34

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）

総括研究報告書

各種疾患の治療に役立つヒト抗体の単離調製

主任研究者 黒澤良和

藤田保健衛生大学総合医科学研究所・免疫学研究部門教授

研究要旨

本研究は、平成 9-11 年度 3 年間主任研究者のグループで進められた「人工抗体ライブラリーの作製とその利用法の開発に関する研究」の続編として立案され、実施されている。第 I 期の研究では数 10 名のヒト臨床材料から調製した mRNA を用いて、1,000 億種類の独立したクローンからなる抗体ライブラリー (AIMS) を作製した。ライブラリーは、ファージディスプレイ系を用いて作製されているので、対象とする抗原物質に結合する抗体がファージ抗体の形で単離され、同時にその抗体をコードする遺伝子も得られる。そこで、特定の抗原に対して結合するファージ抗体を単離した後、DNA 組換え技術を用いて、完全にヒト型の抗体として調製できる。抗体の本来の生物機能から考えて抗体が様々な疾患の治療に役立つであろうことは、容易に推定される。従来の方法では完全にヒト型の抗体を単離調製することは技術的に困難であったが、本研究で用いているファージディスプレイ法およびヒト抗体を産生するマウスが作製されたことにより、今後は多くのヒト抗体を単離大量調製する時代となる。本プロジェクトは、治療に役立つヒト抗体を具体的に単離調製することを目指して実施している。主任研究者（黒澤）と 5 人の分担研究者（高橋、千葉、白木、奥野、野崎）が、役割分担を明確にして共同作業として目標を達成する。対象疾患を選んだ後、分担研究者が抗原を調製し提供する。黒澤グループでは抗体ライブラリーをスクリーニングして抗原に結合するファージ抗体を多数単離して、Fab 型抗体を調製する。分担研究者が各クローンの中の中和活性を測定する。中和活性を示したクローンを、ヒト IgG 型抗体に作り直して調製する。中和活性を示す IgG 型ヒト抗体の調製完了までを本プロジェクトの目標とする。この方針に基づき、数種類の病原菌毒素、ウイルス、ヘビ毒を対象に中和抗体単離を実施した結果、様々なことが判明した。(1) ファージディスプレイ系を用いて抗体ライブラリーを作製する際に、H 鎖及び L 鎖を独立にライブラリー化した後ランダムに組み合わせるが、できあがったライブラリーは *in vivo* 抗体レパートリーを忠実に反映している。(2) そこで、インフルエンザウイルスやロタウイルス等、多くの人が頻繁に感染する疾患に対しては、強い中和活性を示す抗

体が、それぞれ数種得られた。この場合、IgG 型抗体に変換後も強い中和活性を有している。(3) ジフテリア毒素や破傷風毒素は AIMS ライブラリー作製に際して、B リンパ球を供与した人の中にワクチン接種を受けた人が含まれていたことが期待できる。また、水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) も多くの人が感染経験がある。そこで、AIMS ライブラリーの中に中和抗体が含まれることを期待した。Fab 型抗体レベルでは 3 疾患に対して中和活性を示すクローンをそれぞれ数種単離できた。抗ジフテリア毒素の場合は、IgG 型抗体に変換すると中和活性が弱まった。抗破傷風毒素抗体は、エピトープの異なる 2 種の抗体を混合して使用することにより、ほぼ完全な中和活性が得られた。抗 VZV 中和抗体は最初 Fab 型抗体に中和活性がみられ、IgG 型抗体に変換すると中和活性が失われたが、IgG 型抗体の不安定性に由来したらしく、大量に調製することで中和活性がみられた。B 型肝炎ウイルス (HBV) に対しては、中和活性を示す抗体は AIMS ライブラリーの中からは単離できなかつた。HBV キャリアで肝臓となって摘出された脾臓が 10 数年前より冷凍保存されており、その脾臓を用いて抗体ライブラリーを作製した。ハブ毒に関しても、AIMS ライブラリーから中和抗体は得られなかつた。そこでハブに数回咬まれた経験を持つ人から成分採血によりリンパ球画分を得て、現在抗体ライブラリー作製中である。最後の 2 例は、特定抗原に対する抗体を持つ人の協力を得て、その抗体をクローン化する方法を他の例にも応用できる形で確立することも目標にしている。以上のように、抗原の性質に応じて個別に対応することにより様々な疾患の治療薬としてのヒト抗体単離調製という本プロジェクトの目標達成へ向けて、順調に研究は展開されていると判断している。

分担研究者

高橋元秀 国立感染症研・細菌血液製剤部・室長

千葉 丈 東京理科大・基礎工学部・教授

奥野良信 大阪府立公衆衛生研・課長

白木公康 富山医科薬科大医学部・教授

野崎真敏 沖縄衛生研ハブ研究室・室長

A. 研究目的

ワクチン接種により予防可能な各種感染症であることは、病原菌の分泌する毒素及びウイルスに対して中和能力のある抗体が

ヒトの体で産生されることを示している。そこでその抗体を治療薬として準備しておけば、何らかの要因(抵抗力が弱っている、予防接種を受けていない、免疫抑制状態にある)で抗体を産生できず、その感染症にかかり発病した患者に投与することにより多大なる治療効果を期待できる。抗体はリウマチ等の自己免疫疾患の治療薬、一方で各種癌に対する治療薬等としても今後様々な形で開発されることが大いに期待されているが、その開発には様々な検討が必要である。本プロジェクトで対象としている疾

患の場合は、抗体の本来の生物学的機能そのものを反映した使用法を念頭に置いている。本プロジェクトを立案した時点では、AIMS ライブラリーの作製原理からみて、どのようにヒト体内の *in vivo* レパートリーが抗体ライブラリーの中に反映しているか明確でない点があった。抗体遺伝子は B 細胞分化過程で H 鎖に関して VHDJH、L 鎖に関して VLJL DNA 再編成を起こすことにより、一組の活性型 HL 遺伝子ができあがり、それが発現される。そこで個々の B リンパ球は 1 種類の抗体を作り、B 細胞集団全体で莫大な数の抗体からなる巨大レパートリーが作られている。そこで、抗原特異性という点からは HL 一組で意味を持つ。しかし抗体ライブラリー作製に際しては、H 鎖集団、L 鎖集団を独立に RT-PCR で増幅してライブラリー化し、それをランダムに組み合わせることで抗体ライブラリーを作る。そうすると抗体ライブラリーを構成するクローンは、一部のみが *in vivo* で元来機能していた HL 組み合わせを反映しており、大部分は *in vivo* にはなかった組み合わせでできた抗体となる。そこで AIMS ライブラリーからどのような性質の抗体が得られるか、実施してみないとわからなかった。

ファージディスプレイ系を用いて作製された抗体ライブラリーから、いかなる方法で使用目的に合致した性質を示すクローンを効率よく単離するかについては、様々な未解決の問題点が存在した。既に 20 年以上実績を持つ細胞融合によるモノクローン抗体作製技術と比較して、この技術の方は優れた性能を持つ抗体ライブラリー作製が報告されてから未だ数年しか経過していない。我々にとっても本技術に関して多くの改良

点、未開発部分があり、例えばスクリーニングする抗原としてどのような形状であることが好ましいか、スクリーニングはどのように行うのがよいか、単離した抗体について更に結合力を高める操作を加えるべきかどうか、そしてその具体的方法は。結合力と中和力の関係は。毒素を中和する、ウイルスを中和するのに必要な抗体の要件は。いかなる抗体大量生産系を用いるか。更に、最終的に作製したヒト抗体を治療薬として使用する際の既存特許との関係を如何に扱うかという practical な問題も障壁として残っている。そのような状況下にあって、治療に役立つヒト抗体単離に関する全ての問題を解決し、クリアしながら実際に治療薬としてのヒト抗体を作製する実例を作ることが本プロジェクトの最大目標である。

B. 研究方法

本プロジェクトは、各疾患ごとに分担研究者と主任研究者が任務分担をして共同研究を進める形で研究は行われている。平成 13 年度の実績では、具体的にジフテリア毒素、破傷風毒素について高橋グループ、B 型肝炎ウイルスについて千葉グループ、水痘帯状疱疹ウイルス及びサイトメガロウイルスについて白木グループ、インフルエンザウイルスについて奥野グループ、ハブ毒について野崎グループが抗原の調製及び黒澤グループが単離した抗体の検定を担当している。研究方法について各分担研究者の報告にその詳細が記載されているので、ここでは黒澤グループで行われている研究を中心に報告する。

抗体遺伝子のソース

本プロジェクト開始時点での抗体ソースは、

AIMS ライブラリーのみで、中和活性が弱い場合は、単離したクローンに変異を導入する予定であった。しかし、B 型肝炎ウイルスに関しては、ウイルスキャリアであった患者の脾臓が長期間冷凍保存されており、それを使用できることになった（千葉報告参照）。また、ハブ毒に関しては、長年ハブ飼育を担当して、その間に数回ハブに咬まれ、その結果、ハブ毒中和活性のある抗体を有している人の協力が得られることになった。そこで、それぞれのリンパ球より抗体ライブラリーを作製して、抗体遺伝子のソースとする。

抗体ライブラリーのスクリーニング

10^{10} ~ 10^{11} 個の独立したクローンからなる抗体ライブラリーから目的とする抗体を単離する方法は、現在のところ抗原物質に抗体を発現したファージが結合して複合体を形成することを利用する以外にない。最も頻繁に用いているのはパニング法である。具体的には Immunotube（ウェルでもよい）に抗原を付着させた後、多数のファージ粒子からなる抗体ライブラリーを混ぜて、抗原-抗体（ファージ粒子）複合体を形成させ、複合体を形成しないファージを洗い除いた後に抗原に結合したファージを回収する方法である。平成 13 年度に新しく採用したスクリーニング法は、次の通りである。抗インフルエンザウイルス抗体単離に関して、最初の頃は抗 NP 抗体ばかり単離された。これは抗原に用いているインフルエンザワクチンの中に占める NP の割合がヘマグチン (HA) に比べて高かったことに由来すると考えられた。そこでスクリーニングに際して、(1) 抗 NP 抗体を除く操作を挿入すること、および (2) NP は単純タンパク質である

が、HA は糖タンパク質であることを利用することにした。糖部分を特異的にビオチン化して、抗原-ファージ抗体複合体形成後、ストレプトアビジンビーズで回収した。抗 VZV 抗体単離に関しては、抗原として用いた gH に強い結合するが中和活性を示さない抗体を利用した。通常のパニング法ではプラスチックに付着した抗原の立体構造が一部変性している可能性がある。そこで、抗 gH 抗体をチューブに付着し、そこへ抗原 (gH) を混ぜ、サンドウィッチ法でスクリーニングする。この場合、チューブに付着させた抗体と異なるエпитープを認識する抗体単離が期待できる。

単離した抗体の性格付け

パニングを数回繰り返した後、ファージの回収率が高まる、and/or 回収したファージ全体を用いて ELISA を行うとその値が高まる、ことをメルクマールにして抗原に結合するファージ粒子を十分に濃縮できたと判断すると、ファージをクローン化して、個々のファージ毎に ELISA 法で抗原結合能を測定する。最初、数 10 個の抗原結合力を示すファージ抗体を単離調製し、その次のステップとして直接塩基配列決定により抗体を分類する。又は、直接中和活性を測定する。どちらを先に行うかの選択は、活性測定の容易さによって判断している。いずれにしても中和活性を示す異なる抗体をそれぞれを対象毎に少なくとも数種、インフルエンザのような例ではなるべく多数得ることを目標としている。

ファージ抗体からヒト抗体

得られた抗体は最初 Fab 型抗体の形をしている。H 鎖、L 鎖遺伝子両方ともそれぞれ VH 領域もしくは VL-CL 領域の両端にユニ

ークな制限酵素切断部位を配しているので、完全なヒト抗体をコードできる形に遺伝子レベルで変換するのは容易であり、そのためベクター構築は完了している。IgG 型ヒト抗体として調製された抗体の中和活性を確認して、本プロジェクトの目標は一通り達成したことになる。

C. 研究結果

各毒素、ウイルス中和抗体の単離状況は以下の通りである。

ジフテリア毒素

Fab 型抗体として単離され、中和活性を示すクローンについて、IgG 型に変換すると中和活性が失われるという問題点が存在した。しかし、新しくスクリーニングで得たクローンについて、中和活性は弱まるが認められる例を得た。そこで現在その中和活性で治療薬として有効であるか、それとも活性増強操作を加えるか、検討中である。

破傷風毒素

昨年度報告した 6 種の中和活性を示す抗体について詳細に解析した。その結果、エピトープの異なるクローンを組み合わせると完全な中和活性が観察された。この中和活性は Fab 型で見出されるので、F(ab')₂ 抗体を大腸菌で発現できるベクターを作製した。

水痘帯状疱疹ウイルス (VZV)

Fab 型抗体としては強い中和活性を示すが、IgG 型に変換すると中和活性が失われることが問題となっていた。我々の研究システムの場合、Fab-cp3 (cp3 はファージ膜タンパク cp3 の C 末側部分を指し、Fab 型抗体と融合している)、Fab-PP (P は protein A の Fc 結合ドメイン)、および IgG 型抗体

が available である。抗 VZV 抗体を得るために精製された gH タンパク質を抗原として用いているが、精製された gH、プラスチックに付着した gH、ウイルス粒子膜上の gH、ウイルスが感染した細胞の膜上に発現された gH と同じタンパク質であっても抗体に対してエピトープとなり得るかの点でかなり大きく異なる可能性があった。これは ELISA による結合活性測定では低いクローンが、強い中和活性を示す例ではっきり示された。結局、VZV 感染細胞の表面タンパクを特異的に染色できる性質を利用して、結合力が確認された IgG 型ヒト抗体に最終的に中和活性が認められた。

インフルエンザウイルス

本プロジェクトで対象としている疾患の中で、AIMS ライブラリーは抗インフルエンザ中和抗体を単離するのに極めて優れた性質であることがはっきりしてきた。インフルエンザウイルスは多くの人々が毎年のように感染し、その度に中和抗体を産生をしているはずだが、抗原性の点でその抗体から変異により逃れたウイルスが翌年流行する (antigen-drift) という性質をしている。本研究で得られた中和抗体の異なるウイルス株に対する中和力の強さを比較し、株特異性の高さと交叉性を解析すると、株特異性が高く中和力が強い例、および株特異性が広く (交叉性が強い)、中和力が中間となる例等、*in vivo* で機能している中和抗体の性質をそのまま反映したクローンが得られている。そこで、この抗体を用いて作られるエスケープミュータントは、自然に起こっている antigen-drift を試験管内で再現できる可能性を示す。

B 型肝炎ウイルス (HBV)

AIMS ライブラリーからは、中和活性を示す抗 HBV 抗体は得られなかったのが根本的に方針を変更して、新たに抗体ライブラリーを作製した（千葉報告参照）。

ハブ毒

ハブ毒に関して、抗ハブ毒中和抗体を有する人の協力を得て、成分採血を実施した。そこから現在新たに抗体ライブラリーを作製中である（野崎報告参照）。

D. 考察

本プロジェクトは幾つかの素過程からなり、一つ一つを実証しつつ改訂を加えながら最終的に治療に役立つヒト抗体の単離調製を可能にする全行程を一般性の高いものとして確立することを目指している。ヒト抗体を作製する方法として、ファージディスプレイ法を用いてヒトの体内で作られている、若しくは、作られる可能性がある抗体を *in vitro* で再構築する方法と、ヒト抗体を産生するマウスを利用する方法の2種類ある。我々は、前者の立場をとる。前者の場合も AIMS ライブラリーのような巨大レパートリーからなる単一のライブラリーをマスターソースとして用いる場合と、特定の抗原に対して強い結合（中和）活性を示す抗体を有しているヒトの末梢血を利用する場合がある。単離した抗体に遺伝子レベルで更に操作を加えて性能の改良をはかる方法の導入も考えられる。現在、我々はこの3通り全てを研究室の standard method として確立しつつある。

ライブラリーのスクリーニングの方法も改良する必要がある。ファージ抗体ライブラリーをスクリーニングするためには、抗原-ファージ抗体複合体をフリーファージ

と分けることが必要である。パニングはそのための手段だが、抗原にビオチンを結合させてアビジン-ビオチンの強い結合力を利用して抗原-抗体複合体を回収する方法を開発した。これは結合力に応じたスクリーニングも可能にすると期待される。更に抗原のビオチン化を工夫し、目的とする抗原に結合する抗体のみを選択的に濃縮できることをインフルエンザの例で示した。現在の AIMS ライブラリー利用上の問題点は、目的とする性質をした抗体が AIMS ライブラリーに含まれていないから生じているというよりは、目的とした性質とは異なるが、使用する抗原にそれなりに結合する多くのファージ抗体が存在するために必要な抗体が埋もれてしまっていることに起因することが多い。スクリーニング法の改良は急務である。

動物を抗原で免疫すると、通常 $10^8 \sim 10^{10} \text{M}^{-1}$ 程度の結合力を持つ抗体が産生されてくる。抗体の本来の役割である生体防御という点から、その程度の強い結合力が望ましい。*in vivo* に於いて弱い結合力（例えば $10^6 \sim 10^8 \text{M}^{-1}$ ）しか示さない抗体産生細胞が、変異の導入-細胞の選別を経て「成熟」した抗体を産生するようになる過程は、変異の導入と細胞の選別が完全にカップルしているから可能である。*in vitro* でそれを再現しようとする、変異の導入とクローンの選別を二行程に分けて実施せざるを得ない。そこで、変異の導入によって作り出した膨大な数の変異株の中に極めて低い確率でしか存在しないクローンの選別となって *in vitro* ほどうまくいかない。*in vivo* に於いて容易に行えていることが *in vitro* で極めて非能率的にしか再現できないとい

う事象は、かなり頻繁に見られる。とりわけランダム性の導入—その中から有効な変化を起こしたものを取り出すという場合がそれに相当する。そこで、*in vivo* を利用できる場合は、なるべくそれを利用した方が早道ということになるのかもしれない。

最後の段階が IgG 型ヒト抗体の調製である。最初主任研究者のグループでは H鎖 L鎖別々のプラスミド上に遺伝子を構築したため、得られた抗体産生形質転換株が不安定であった。そこで両方の遺伝子を単一のプラスミド DNA 上で容易に構築できる形に作り直すことによって安定に IgG ヒト抗体が産生できるようになった。

以上列記したようにファージディスプレイ系を用いて臨床に用いるヒト抗体を作製する全行程に関して、一通り問題点は出尽くし、その多くは解決した。

現在ファージディスプレイを基本とする技術に関して世界的にも様々なアプローチが提起されており、有効性の高いものと判断できる新技術については取り入れることにしている。治療薬としてのヒト抗体の実用化という観点で最後に残る最大の障壁は、極めて体系的かつ包括的内容を持つ既存特許の存在である。動物（ヒトを含む）体内で発現されている抗体遺伝子を *in vitro* で PCR 法により増幅して再構築すること (Winter II 特許)、及びファージディスプレイ系を用いて抗体ライブラリーを作製すること (McCafferty 特許)、組換え DNA 技術で抗体を発現すること (Genentech)、これらの技術は国際的に特許が成立している。我々の場合も最終段階で必ずこれら特許の制約を受けると予想される。そこで現時点から様々なステップに独自の工夫を導入し

ていく必要があると思って準備をしている。

E. 結論

本プロジェクトは「臨床に役立つヒト抗体単離」を目標に進められている。平成 9-11 年度に厚生科学研究費として「人工抗体ライブラリーの作製とその利用法の開発に関する研究」が行われ、本研究で用いている AIMS ライブラリーが作製された。平成 12-14 年度同じく厚生科学研究費として本プロジェクトが採用され、今回は 5 グループ（高橋、千葉、白木、奥野、野崎）の参加を得て、具体的に様々な毒素、ウイルスに対する中和抗体を単離し、それを治療薬として使用可能にする IgG 型ヒト抗体の形で調製することを行うことになった。作製したヒト抗体が治療薬として認可されるためには、更に大規模な研究一試験が必要となるが、それは次の段階と考えている。現在までの研究でインフルエンザウイルスに関しては治療に用いることが可能なレベルのヒト抗体単離調製が行われた。今後、antigen-drift を起こしたウイルス—そのウイルスの中和抗体単離という作業を繰り返して、次世代ワクチン及びそれに対する中和抗体をセットとして準備する。ジフテリア毒素および破傷風毒素に関しても、活性は弱いが IgG 型ヒト型中和抗体単離に成功した。抗 VZV 抗体も同レベルに到達した。そこで残る課題は特定の抗原に対して中和抗体を持つヒトがいる例の、その抗体のクローン化技術の確立である。いずれにしても世界的にマウス/ヒトキメラ抗体やヒト化抗体の時代は間もなく終了し、完全なヒト型抗体の時代に突入する。癌治療等での抗体への期待は高まったり低下したりを繰

り返しているが、今後異種タンパク固有の問題が払拭されるわけで、抗体の治療薬としての価値は高まることはあっても低くなることはない。

F. 研究発表

1. K.Morino, H.Katsumi, Y.Akahori, et al. Antibody fusions with fluorescent proteins: a versatile reagent for a profiling protein expression. *J. Immunol. Methods* 257, 175-184, 2001.
2. Y.Iba, C.Miyazaki & Y.Kurosawa: Two-step strategy for alteration of immunoglobulin specificity by in vitro mutagenesis. *Methods in Molecular*

Biology 178, Antibody phage display: Methods and protocols. (P.M.O'Brien and R.Aitken), Humana Press Inc., Totowa, JN pp259-267, 2002

3. 赤堀泰 抗体作製の新技术 血液・腫瘍科、44(3)、226-232. 2002 科学評論社

G. 知的所有権の取得状況

特許取得

「結合性分子の選択方法」

平成13年8月22日出願

「ラクダ抗体ライブラリーの作製方法」

平成13年9月13日出願

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）

分担研究報告書

各種病原菌毒素に対するヒト中和モノクローン抗体の作製

H12-血液-005

分担研究者 高橋 元秀 国立感染症研究所 細菌・血液製剤部

協力研究者 小宮 貴子 国立感染症研究所 細菌・血液製剤部
柿田 麻衣 藤田保健衛生大学 総合医学研究所

研究要旨

黒沢らにより作製されたヒト抗体ライブラリーからジフテリアまたは破傷風トキソイドに対する抗体を単離し、ELISA法で陽性となった抗体について、各々の毒素を特異的に中和する活性を含む抗体を昨年見いだした。これらジフテリアと破傷風の抗体（Fab）について、精製法と抗体型（IgG型等）の検討を行い、中和活性の増強が見られるかを試験した結果、破傷風は、いくつかの抗体は混合することによりマウスの麻痺・死亡を指標とした発症を遅延または完全に抑えることが可能となった。一方、ジフテリアに関しては単独でも中程度の中和活性を有する抗体が認められたが、2数種の混合によっても中和活性の上昇は認められなかった。

A. 研究目的

ジフテリア患者の治療に用いられるジフテリアウマ抗毒素製剤は、ヒトには異種な蛋白であるために使用に際して血清病の心配がある。また、破傷風患者に用いられる抗破傷風人免疫グロブリン製剤は、人の血液を原料とするために原料確保に限度があり、また血液由来の未知のウイルスや病原体の混入が問題となる。このような細菌毒素性疾患の治療や早期診断及び毒素の作用や解析の基礎研究のために、毒素の特定部位を認識する抗体を本ヒト抗体ライブラリーから選択する。本ライブラリーは現行予防接種法で推奨されている沈降精製百日せ

きジフテリア破傷風ワクチンを接種した年齢の個体が含まれることが予想されるために、これら3種類の毒素抗原に対する中和抗体の単離は比較的容易に出来ると考える。さらに、抗原として実施可能な細菌毒素としては、ジフテリア毒素、破傷風毒素の他に、ボツリヌス毒素（A～Gの7型）、及び腸管出血性大腸菌の産生するVero毒素（Vero Toxin 1とVero Toxin 2）を用いて、今後、各々の毒素を特異的に中和する抗体を単離する。

B. 研究方法

破傷風中和活性の確認・検出と高単位の

抗体調製：昨年度に実施して得られた中和抗体価を有する Fab を Fab-PP 型に変換し (PP=ProteinA Fc Binding Domain)、IgG カラムとニッケルカラムにより精製した。また、Fab' と F(ab')₂ の抗体を調製して、中和活性の測定を行った。試験方法は、昨年と同様に破傷風毒素のマウスに対する麻痺の出現と致死活性を指標として、抗体中の毒素を特異的に中和する抗毒素 (中和抗体) を定量的に測定する方法を用いた。

昨年度、中和能の見られた抗体または標準破傷風抗毒素を対数等間隔で希釈し、一定量の破傷風毒素を添加して 30 分後に混合液の 0.4ml をマウス後肢内股内に皮下注射した。標準品のマウスの死亡した用量と同じ反応が抗体のいずれの希釈倍数で見られるかを観察し、標準品に対する相対力価として推定した。なお、中和活性の認められた個々の抗体を各々組み合わせることにより中和活性が増強するかについても検討した。

ジフテリア中和抗毒素の検出と高単位の抗体調製：昨年度に実施して得られた中和抗体価を有する Fab について、IgG1 型に変換した。変換方法は H 鎖と L 鎖を別々の発現ベクターに導入する 2 ベクター法と H 鎖と L 鎖を同時に 1 つの発現ベクターに導入する 1 ベクター法を検討した。それぞれのベクタープラスミドを動物細胞にトランスフェクションし、ProteinG カラムで精製、培養細胞法で測定して中和活性の上昇を試験した。また、Fab-PP 型に変換し、IgG カラムとニッケルカラムにより精製した。ジフテリア抗毒素価の定量は、昨年と同様に Vero 細胞を用いた培養細胞法でおこなった。

(倫理面への配慮)

抗毒素価測定における実験動物の取り扱いについては、国立感染症研究所の規定に従い、年度ごとに実験計画書を提出・申請し、実験動物委員会の審査を経て実験を行った。実験に際しても動物愛護の精神を考慮し、使用動物数、安楽死処理等については適正に実施している。

C. 結果

破傷風中和抗毒素：昨年、多少でも中和活性の認められたものとシーケンス結果をもとに異なるエピトープを認識していると思われる抗体 TETM36, 43, 58, 66, 74, 81, および 91 について、ProteinA カラムで精製して得た各抗体を 2 種類混合する事により中和活性が上昇するか試験した。その結果、いずれも単独では完全な中和能が認められず、マウスは破傷風毒素特有の麻痺症状を呈した後、3 日前後で死亡した。しかし、TETK58 と他の抗体を組み合わせた場合は中和活性の上昇が認められた。しかしながら、TETK58 を 66 または 74 または 81 と組み合わせた場合は、マウスは全く麻痺の発症も見られず、さらに 60 日間の長期観察でも発症せず生残した。一方、TETK91 との組み合わせでは、マウスは注射 3 日後に発症し、5 日目には死亡した。

また、弱い中和能を有する TETK66 と TETK58 に微量の抗毒素価の抗破傷風ヒト免疫グロブリン (Tetanus human Immuno Globulin: TIG) を少量 (0.02 単位または 0.04 単位) 加えるか、または等価のウマ免疫グロブリン (Standard Tetanus horse antitoxin: ST) を添加し、発症防御効果が見られるか検討した。この中和価を有する

TIG または ST は単独ではマウスは発症して接種後 3 日目までに死亡した。作製した抗体 (TETK 66 または 58) とホモな蛋白である微量な TIG を添加すると、特に TETK 66 では顕著な発症防止効果が認められ、マウスは注射後 2 週間生存している (現在も観察中)。一方、等価の ST を加えた場合は、TETK66 では発症後の死亡日数が延長したが、TETK58 の場合は、ST の添加による発症・死亡時間の延長は認められなかった。

ジフテリア中和抗毒素：昨年度、スクリーニングして培養細胞法により中和抗体価を測定して中和活性の認められた 2 抗体 (Fab-cp3 型: DTD6 および 10) について、2 ベクター法を用いて IgG 型抗体を調製した。調製した抗体の中和活性を培養細胞法で測定した結果、IgG 型にする前には見られた中和活性は検出レベル以下 (0.0035 単位) となった。

また、スクリーニングの抗原をトキソイドから毒素に変更して得た DTD10 および DTD76 の大腸菌培養発現上清を常法に従い硫酸で濃縮後、ニッケルカラムで精製した標品 (1mg/ml) は、DTD10 では中和抗体価が 0.01 単位/ml、DTD76 では 5.66 単位/ml となった。さらに高い中和活性の認められた DTD76 を抗体の精製を (1) α -cp3 カラムまたは (2) IgG-ニッケルカラムおよび (3) 1 ベクター法で IgG 型に変換して ProteinG カラムで精製した標品の中和活性を測定した。その結果、それぞれ、1.89 単位/ml、04.72 単位/ml および <0.0037 単位/ml となった。なお、トキソイドを抗原としてスクリーニングして得た DTD4 (0.69 単位/ml) と DTD76

(0244 単位/ml) に対して、ジフテリア毒素を抗原として同様にスクリーニングして得た 16 種類の抗体をそれぞれ 2 種類の抗体に混合して中和試験を行った結果、顕著な中和活性の上昇は認められなかった。

D. 考察

破傷風については、TETK58 と他の抗体を組み合わせると完全中和が見られ、長期間の観察でもマウスは発症しないことが確認された。ヒト型モノクローナル抗体を試験的に作製した標品は、毒素-抗体混合液をマウスに注射後、数日間は発症しないで見かけ上、毒素を中和したように見えたが、2-3 週間後に突然発症し死亡することが報告されている。

今回のマウスは約 3 ヶ月間にわたり、破傷風特有な麻痺の発現は観察されないことを確認した。それぞれの抗体の認識するエピトープの解析、抗体の安定性および最終製剤となる場合の抗体型等についての検討を計画中である。

ジフテリアについては、今年度実施した精製法、抗体の型等の検討では、期待した効果は得られなかった。しかし、一つの抗体 (DTD76) では 1mg/ml の濃度において、5.66 単位/ml とジフテリアトキソイドを乳児に 2-3 回接種した後に得られる抗毒素価と等価の値が認められたことは、今後の実用化に期待できるものが得られたと考える。

E. 結論

ヒト抗体ライブラリーの中から単離した数種の抗体は、組み合わせにより破傷風毒素を完全に中和することが確認された。また、ジフテリア毒素を単独で中和する高い

力価の抗体（5.66 単位/ml）を単離した。
今後、得られている抗体との組み合わせに
よる中和活性の増強、力価の安定性等を試
験する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む）

該当無し

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）
分担研究報告書

B 型肝炎ウイルスに対するヒト中和モノクローン抗体の作製

H12-血液-005

分担研究者	千葉 丈	東京理科大学基礎工学部
協力研究者	赤堀 泰	藤田保健衛生大学総合医科学研究所
	大場 浩美	東京理科大学基礎工学部

研究要旨

黒沢・赤堀らによって作製されたヒト抗体ライブラリーAIMSは健常人の膨大な抗体レパートリーで構成されている。AIMSを用いることで、ワクチン接種などで免疫されたことのある抗原や、過去に感染して抗原刺激を受けた可能性のあるウイルス抗原などに対する抗体を発現するファージは容易に選択できる。しかしながら、肝炎ウイルスなどの病原体に対するアフィニティーの高い抗体は、健常人では存在がほとんど期待できない。AIMSライブラリーでは選択が困難である可能性の高いB型肝炎ウイルス（HBV）やC型肝炎ウイルス（HCV）の遺伝子産物に対するヒト抗体を単離する目的で、B型およびC型の肝がん患者や肝炎患者の脾細胞から抗体遺伝子を調製し、新たなヒト抗体ライブラリーAOCKを作製した。このAOCKライブラリーを用いることで、肝がんの原因ウイルスであるHBVとHCVの遺伝子産物に対してヒト抗体の単離ができるだけでなく、正常肝細胞が肝がんになることで発現が亢進する種々の肝がん関連抗原に対するヒト抗体の単離も可能になると考えられる。

A. 研究目的

各種疾患の治療に役立つヒト抗体を単離調製する目的で、ヒト抗体ファージディスプレイライブラリーであるAIMSライブラリーが赤堀・黒澤らにより作製され、有望な抗体を産生する多数のファージクローンが単離されている（黒澤良和；平成12年度報告書）。それらのファージクローンの単離の過程で、AIMSライブラリーの2重構

造が明らかになった。すなわち、AIMSライブラリー作製の出発材料となった小児を含む数10名の健常人の抗体レパートリーの中で、既に免疫されていた可能性の高い抗原に対する場合には、その抗原に対する抗体を発現するファージクローンが単離されやすく、免疫されたことのない抗原に対する場合には、その抗原に対する抗体を発現するファージクローンが単離されにくいと

いう明確な結果であった（黒澤良和；平成13年度報告）。ファージクローンの単離に用いられた抗原で、既にワクチンとして免疫されていた抗原はジフテリア毒素や破傷風毒素であり、感染によって免疫されていた可能性の高い抗原はインフルエンザウイルスなどである。これらの抗原に対しては治療に用いることのできる可能性のある多数の抗体が得られている。一度も感染をしたことがなく免疫されたことのない可能性の高い抗原として試験された抗原は、B型肝炎ウイルス（HBV）の表面抗原（HBs）で

B. C. 研究方法と結果

脾細胞とRNAの調製

HBV陽性の肝がん患者（1例）、HCV陽性の肝がん患者（2例）、HCV陽性の肝硬変患者（1例）の脾臓から調製されて、液体窒素中に凍結保存されていた脾細胞を実験に用いた。凍結脾細胞を融解し、MEM培地で洗浄後、直ちにRNAeasy Midiキット（QIAGEN社）を用いてトータルRNAを抽出し、精製した。994 μ gのトータルRNAが調製された。

ファージディスプレイライブラリーの構築

常法によりファージディスプレイライブラリーを構築した。作製の際にプライマーを変えて2種類のライブラリーを構築した。1) ミックスプライマーによるライブラリー作製

1. 140 μ gのトータルRNAをもとにして、ランダムプライマーを用いた逆転写酵素反応によってcDNAを合成した。

2. 1. を用いて、ミックスしたV_KプライマーとC_KプライマーとでPCRを行い、

あり、HBsに対する抗体を発現するファージクローンを単離することはできなかった。

AIMSライブラリーの2重構造をさらに詳細に検証するとともに、AIMSライブラリーでは選択が困難である可能性の高いB型肝炎ウイルス（HBV）やC型肝炎ウイルス（HCV）の遺伝子産物に対するヒト抗体を単離する目的で、B型およびC型の肝がん患者や肝炎患者の脾細胞から抗体遺伝子を調製し、新たなヒト抗体ライブラリーAOCKを作製した。

κ 鎖をコードするDNA断片を得た。これを抗体発現ベクター（pFCAH9-E8d）に組み込み、 8.7×10^7 のクローンからなる、 κ 鎖ライブラリーを得た。

3. 同様にしてV_LプライマーとC_LプライマーとでPCR反応を行い、 1.0×10^8 のクローンからなる、 λ 鎖ライブラリーを得た。

4. 2. 3. をミックスし、これをL鎖ベクターとした。

5. 1. を用いて、ミックスしたVHプライマーとJHプライマーとでPCRを行い、得られたDNA断片をVHクローニングベクターに組み込み、 1.0×10^{10} のVHライブラリーを得た。

6. 5. よりVH DNAを切り出して4. のL鎖ベクターの γ 1CHI上流に組み込み、 2.0×10^{10} のクローンからなる大腸菌ライブラリーを得た。

7. 6. にヘルパーファージK07を作用させてFab型抗体ファージライブラリーを得た。このライブラリーをAOCK_rライブラリーと命名した。

2) ファミリー別ライブラリーの作製
上記1)の方法で作製したライブラリーは、特定のファミリーの免疫グロブリン遺伝子だけが増幅し、それ以外のものが増幅していない可能性がある。それを避けるため、免疫グロブリン遺伝子をファミリー別に増幅させたライブラリーを作製した。

1. 上記1) 1. を用い、免疫グロブリン遺伝子ファミリーに特異的なV_k プライマーとC_k プライマーを用いてファミリーごとにPCRを行い、得られたDNA断片をミックスして、上記1) 2. と同様に抗体発現ベクターに組み込み、 1.0×10^8 のクローンからなるκ鎖ライブラリーを得た。

2. λライブラリーについても同様にファミリー別にPCRを行い、 1.0×10^8 からなるλ鎖ライブラリーを得た。

3. 1. 2. をミックスしてL鎖ベクターとした。

4. 1) 1. を用いて、ミックスのVHプライマーとJHプライマーとでPCRを行い、得られたDNA断片をVHクローニングベクターに組み込み、 1.8×10^{10} のVHライブラリーを得た。

5. 4. よりVH DNAを切り出して4. に組み込み、 3.0×10^{10} のクローンからなる大腸菌ライブラリーを得た。

6. 5. にヘルパーファージK07を作用させてFab型抗体ファージライブラリーを得た。このライブラリーをAOCKsライブラリーと命名した。

(倫理面への配慮)

肝硬変患者や肝がん患者で血小板破壊機能亢進による悪性の貧血がある場合に、その貧血を改善するために脾臓が摘出される

ことがある。1984年にそのようなケースで摘出され、廃棄された脾臓の一部の提供を受け、保存されていたものを本実験で用いた。本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(以下倫理指針)の施行(2001年4月1日)以前に提供されたC群試料(試料等の提供時に、研究に利用することの同意が与えられていない試料等)を用いる研究であるが、1)ヒトゲノム・遺伝子解析研究を目的としていないこと、2)。倫理指針施行以前に提供されたC群試料等の利用に関する細則で示された「提供を受けた患者は連結不可能匿名化されていることにより、提供者等に危険や不利益が及ぶ可能性のない場合」にあたることから本研究に利用できると判断できる。なお、本研究の一部は1985年から1999年に既に開始されていた実験を延長したものであるが、2002年度に設立される予定の東京理科大学倫理審査委員会(仮称)において事後審査による承認を受ける予定である。

D. 考察

AOCKrライブラリーとAOCKsライブラリーを用いて、慢性ウイルス性肝炎患者やウイルス性肝がん患者で持続して産生されているB型肝炎ウイルス(HBV)やC型肝炎ウイルス(HCV)の種々の遺伝子産物に対するヒト抗体を単離できるものと思われる。慢性肝炎や肝がん患者では、抗体応答がどのような遺伝子産物に対して持続しているかのクローンレベルでの解析が可能になる可能性が高い。その過程で、前年度までの研究で明らかになったAIMSライブラリーの2重構造についての上記の仮

説を検証することができるであろう。一方、得られた抗 HBs 抗体や抗 HCV Env 抗体の中から感染の阻止活性のあるものを選択することで、感染予防用の新たな免疫グロブリン製剤を作製できるものと思われる。また、ウイルス増殖に必須の産物に対する抗体を選択できれば、抗体をイントラボディーとして細胞内で発現させるウイルス性肝炎やウイルス性肝がんの遺伝子治療に応用できる可能性も高い。さらに、正常肝細胞が肝がんになることで発現が亢進する種々の肝がん関連抗原に対するヒト自己抗体の単離も可能になると考えられる。これらの中からがん治療のための抗体医薬候補が見つけることができるかもしれない。

E. 結論

B型およびC型の肝がん患者や肝炎患者

の脾細胞から抗体遺伝子を調製し、B型肝炎ウイルスやC型肝炎ウイルスの遺伝子産物に対するヒト抗体を単離できると期待できる新たなヒト抗体ライブラリー AOCKr と AOCKs を作製した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

2. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

該当無

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）
分担研究報告書

水痘ウイルスに対するヒト中和モノクローン抗体の作製

分担研究者 白木 公康 富山医科薬科大学医学部教授

研究要旨

水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）感染症の予防や治療に使用できる VZV に対する中和活性を有するヒト型抗体を作製することを目的として、中和反応の標的となる糖蛋白に対する中和活性の強いクローンを選択して、ヒト型抗体への変換を行っている。そして、本年度の研究事業においては、ここまでは3クローンであるが、水痘ウイルスを中和できるヒト型抗体クローンの樹立を行った。

水痘ウイルスに対する中和抗体は、水痘の予防軽症化が適応になることは海外の状況から明らかであるが、もう一つの疾患である帯状疱疹が適応疾患となり得るかについての検討も行った。そして、水痘ウイルス糖蛋白に対する抗体価をELISA法で測定し、中和抗体を測定した。そして、帯状疱疹病変の重症度と糖蛋白 gE:gI に対する抗体価の上昇が阻害されていた($p<0.05$)。また、急性期におかれ中和抗体価は、回復期のELISA価に比べ、低値を示した。このことから、帯状疱疹の急性期には糖蛋白のELISA価に比べて中和抗体は低いことと、重症例では病変部で抗体が消費されて抗体上昇が抑制されていることが示唆された

A. 研究目的

抗体によって予防あるいは治療できる感染症として VZV 感染症がある。移行抗体による新生児の水痘の感染防御と軽症化や ZIG（帯状疱疹回復期血清より作製した IgG 製剤）による水痘感染の予防等から明らかのように、本研究事業において、VZV に対する中和抗体を作製することは重要な目的の一つである。そして、帯状疱疹の経過における液性免疫・抗体の意義について検討した。

B. 研究方法

水痘ウイルスの中和の標的となる糖蛋白については、それぞれの3種の糖蛋白複合体（gB、gE:gI、gH:gL）に対するモノクローナル抗体を用いた抗体カラムを作製して、水痘生ワクチン岡株感染細胞抽出液より精製した。SDS-PAGEにより精製を確認して以下の検討に使用した。

中和活性を有する抗体の作製については、昨年度と同様に、中和活性が認められたクローン

については構造の変換・濃縮後、さらに、中和活性について検討した。

19名の帯状疱疹患者の急性期と回復期のペア血清を採取して、これら血清の水痘ウイルス糖蛋白に対する抗体価をELISAにより測定し、中和抗体の測定も行った。帯状疱疹の経過については、帯状疱疹の皮疹の重症度と病変の範囲から、帯状疱疹の重症度を定義した。

C. 研究結果

1. 中和活性を有するヒト型抗体の作製

昨年度作製した中和活性を有する抗体クローンについて、ヒト IgG1 抗体に変換したクローン VZV310、310-3C9H12、394-3D9H12、324-4E1 に水痘ウイルスの中和活性を認めた。今後これらのヒト型中和抗体についてその活性と性状について検討を行う予定である。

2. 帯状疱疹患者の抗体の変動

帯状疱疹患者では急性期には抗体価は低く、回復期の上昇するとされるが、今回検討した帯

状疱疹患者では一部に抗体価の低下を認めた。

ほとんどの症例では中和抗体価の上昇がみられたが、抗体価の上昇が悪い例を認められた。しかし、中和抗体の上昇にも関わらず、gE:gIにおいては19症例中6症例、gBにおいては5症例、gH:gLでは4症例、total lysateでは3症例で下降がみられた。この抗体価の上昇を認めなかった症例は、重症、もしくは広範囲症例に認めた。また上昇群は軽症例に多くみられた。そこで、重症例と軽症例および抗体価の変動との相関について検討したところ、gE:gIでは、軽症例ではgE:gI抗体価の上昇を認め、重症例ではgE:gI抗体価の減少を求めた ($p < 0.05$)。また、中和抗体価の回復期における各糖蛋白に対するELISAで検出できる抗体価と比較すると、急性期には、ELISAで測定できる抗体価に比べ、中和抗体の低下が著しいことが判明した。

以上のことから、重症化する場合にはgE:gIが重症・広範囲病変に消費されて血中抗体価が低下していることが考えられた。また、急性期には、ELISAで抗体が検出できるレベルにあるにもかかわらず、中和抗体が検出されなかった。すなわち中和に関係する抗体が急性期に消費されていると考えられた。

D. 考察

VZVに対する中和活性を有する抗体クローンを選択した。そして、ヒト型抗体の構造を有する抗体クローンが確立できた。

また、带状疱疹患者の急性期と回復期の血清中の各糖蛋白に対する抗体価と中和抗体価を測定して、带状疱疹の重症度と抗体価上昇の障害、ELISA価に比べての中和抗体価の低値を認めた。このことから、带状疱疹病変部で、抗体が消費されていることが考えられた。このことは、移行抗体やZIG (Zoster Immune Globulin) のように、水痘の感染阻止、軽症化が可能なように、十分な中和抗体が存在すれば、带状疱疹病変の広がりや抑制・軽症化が可能であることを示唆している。このように、ヒト型抗体の新しい適応の概念として、带状疱疹の軽症化を考慮すべきであると考察される。

E. 結論

人工抗体ライブラリーからVZVを中和できるヒト型抗体の構造を有する有用なクローンが確立できた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kamiyama T, Kurokawa M, Shiraki K. Characterization of the DNA polymerase gene of varicella-zoster viruses resistant to acyclovir. *Journal of General Virology* 82, 2761-2765, 2001.
2. Kamiya N, Asano Y, Yoshino J, Sasaki K, Honma Y, Kawase H, Yokochi T, Shiraki K, Tsuji T. Long-term persistence of cellular immunity to Oka vaccine virus induced by pernasal co-administration with *Escherichia coli* enterotoxin in mice. *Vaccine* 19, 3131-3136, 2001.
3. Shiraki K, Sato H, Yoshida Y, Yamamura J, Tsurita M, Kurokawa M, Kageyama S. Construction of Oka varicella vaccine expressing human immunodeficiency virus env antigen. *Journal of Medical Virology* 64, 96-103, 2001
4. Takahashi M, Kamiya H, Asano Y, Shiraki K, Baba K, Otsuka T, Hirota T, Yamanishi K. Immunization of the elderly to boost immunity against varicella-zoster virus (VZV) as assessed by VZV skin test reaction. *Archives of Virology (Suppl)* 17, 161-172, 2001.
5. Sasaki K, Asano Y, Honma Y, Kamiya N, Hnada T, Ichinose Y, Yokochi T, Shiraki K, Tsuji T. Adjuvant action of *Escherichia coli* enterotoxin for delayed type hypersensitivity to Oka varicella virus on pernasal co-administration in mice. *Vaccine* 19, 931-936, 2001

2. 学会発表

1. 松尾光馬, 峰咲幸哲, 本田まりこ, 新村眞人, 白木公康. ; 带状疱疹患者血清の