

厚生労働科学研究研究費補助金

医薬安全総合研究事業

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 黒澤 良和

平成15（2003）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. ジフテリア毒素及び破傷風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、千葉 丈 -----	8
2. 水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)に対するヒト中和モノクローン抗体の作製	
白木公康-----	12
3. 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-----	16
4. 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-----	22

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	31
---------------------------	----

厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

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・教授

研究要旨

本研究は各種疾患の治療に役立つヒト抗体を単離調製することを目的に実施されている。ヒト体内で発現されている事実上全ての抗体遺伝子を、RT-PCR法を用いて増幅し回収できるようになったこと、およびファージディスプレイ法を用いた莫大な数のクローンからなる抗体ライブラリー作製法が開発され、様々な抗原に対するヒト抗体の単離調製が可能になったという技術的背景がある。主任研究者らは厚生労働省の「人工血液」事業第Ⅰ期（平成9-11年度）に1000億種の抗体からなるAIMSライブラリー作製に成功し、第Ⅱ期（平成12-14年度）で様々な疾患に対処できる治療用抗体開発を目指した。具体的には(a)ジフテリア毒素、(b)破傷風毒素、(c)水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)、(d)インフルエンザウイルス、(e)B型肝炎ウイルス、(f)ハブ毒である。研究方針は以下の通りである。分担研究者が、それぞれの疾患の中和エピトープを持つ抗原を調製して主任研究者に提供する。主任研究者のグループはAIMSライブラリーをスクリーニングして抗原に結合する抗体を多数単離し分担研究者に送付する。分担研究者は個々のクローンの生物活性（毒素中和活性およびウイルス中和活性）を測定する。中和活性が見られたクローンについて、主任研究者のグループでIgG型ヒト抗体に変換し大量調製を実施し、治療に必要な抗体量を見積もるまで個々の対象に対して達成することが本研究プロジェクトの課題である。

本プロジェクトは3年計画（平成12-14年度）で実施されているので、平成14年度は最終年度に相当した。ここでは平成13年度までの総括と平成14年度の結果をまとめる。(a)ジフテリア毒素については、中和活性を示す抗体がすでに4種類得られていた。しかし十分な治療効果を期待するには、相当量の抗体が必要になると予想されたので、具体的に個々の抗体の結合力を測定すること、また毒素が細胞を殺す一連のプロセスの中でどの段階を阻害することに

よって中和効果を示しているかを解析した。(b)破傷風毒素についても同様の状況下にあった。中和活性を示す抗体が 5 種類得られていたが、どれも単独では完全中和を達成できなかった。そこで個々の抗体の結合力を測定すると共に、抗体の用い方の検討、具体的にはエピトープの異なる抗体を混合して用いることにした。結果は単離調製したジフテリア毒素中和抗体及び破傷風毒素中和抗体は治療薬として充分機能する性質を有していることを示した。

VZV 中和抗体について、平成 13 年度までに強い中和活性を示す 2 種類の抗体および弱い中和活性を示す 5 種類の抗体が単離されていた。しかし二つの問題が存在していた。中和エピトープを持つ gH タンパク質を抗原として AIMS ライブラリーをスクリーニングして抗体を単離したが、得られた抗体、とりわけウイルス中和活性を示す抗体の抗原結合力が ELISA による測定では非常に小さいことであった。更に我々の系では最初 Fab-cp3 型抗体を調製するのだが、IgG 型抗体に変換するとウイルス中和活性が失われてしまうという結果であった。平成 14 年度の研究で、この両方の問題を解決した。gH タンパク質はウイルス粒子の膜上に発現するタンパク質であると同時に、VZV 感染細胞の膜上にも発現している。そこで VZV 感染細胞を用いて、抗体がそれを免疫染色するか直接確認することにした。結果は positive であり、中和活性を示す抗体はウイルス粒子や細胞膜上に存在する gH 分子に強固に結合する能力を持つことを示した。精製した gH 分子を ELISA で用いる場合には、プラスチック表面に付着する際にかなり大きな立体構造変化が起きており、そのために見かけ上 ELISA での結合力が低くなってしまったと推定された。IgG 型抗体に変換すると中和活性が失われるという問題は、IgG 抗体を充分大量に生産し精製することで解決した。前回は少量しか生産できなかったので、精製途上失活していたと思われる。

インフルエンザウイルス中和抗体に関しては、平成 13 年度末までに 7 種類の中和抗体単離を完了していた。A. ロシア型 (H1N1) に対しては、A. New Caledonia 株を用いて 1 種類 NC1 抗体を、A. 香港型 (H3N2) については A. Sydney 株を用いて 2 種類 SY39 抗体、SY47 抗体、更に A. Panama 株を用いて 3 種類 PA129 抗体、PA2DI 抗体、PAZEI 抗体、B 型については B. 山梨株を用いて 1 種類 B/YA14 抗体を単離した。この 7 種の抗体の性質を詳細に解析した結果は、奥野報告に書かれている。インフルエンザウイルス中和抗体単離技術を具体的な治療や予防に生かすには antigen-drift に対応できる利用法を開発する必要がある。

る。antigen-drift のパターンを前もって予測した新世代ワクチン作製技術の開発および抗原特異性を人工的にワイドにして antigen-drift が起こっても充分中和効果を発揮できる抗体の開発を計画している。VZV とインフルエンザウイルスに見られるように、多くの人が感染し、中和抗体を有している疾患については、AIMS ライブラリーは十分に優れた抗体ソースであることが示された。サイトメガロウイルス(CMV)、麻疹、HSV、RSV 等はこの範疇に属し、中和抗体単離の対象になると考えている。

平成 13 年度までの研究で中和抗体の単離に成功していなかった疾患は、HBV とハブ毒である。結果からみて両方とも中和活性を示す抗体が AIMS ライブラリーに含まれていることを期待しにくかった。HBV の場合、レコンビナントワクチンが予防効果を発揮することから、ウイルスを抗体で中和することが可能なはずである。本研究では HBV に感染し、肝癌を発症した患者で 10 数年前に手術を行い、その際に摘出されて保存されていた脾臓を材料とすることにした。抗体ライブラリーを作製してスクリーニングを行った。現在までに中和抗体が得られていないので、この方針が正しいかどうかは判断できていない。

ハブ毒中和抗体単離については極めて明快な結果が得られた。ハブを飼育しハブ毒を抽出する仕事に数 10 年間従事していた人で、生涯に 5 回ハブに咬まれ、さらにハブ毒粉末を吸引する機会も多いと予想される人の協力を得ることができた。その人の抗血清は、ハブ毒中和活性を示すことがわかっていたが、3L の血液に相当するリンパ球を成分採血で得て、それより抗体ライブラリーを作製した。ハブ毒には HR1、HR2 という出血因子が含まれるが、HR1 に対して強い中和効果を示す抗体単離に成功した。

以上のように本プロジェクト最終年度にほぼ初期の目標を達成した。しかしこの成果を製剤化に結びつけるには特許問題（ここで用いた技術は、包括的内容を持つ既存特許の制約を受けること）を解決する必要がある。そして我々自身の手で独自技術の開発も同時に実施し、特許申請段階まで到達した。今後この新技術で同様の性質を示す抗体を単離し直して製剤化を実現する。

分担研究者
高橋元秀・国立感染症研究所・室長
白木公康・富山薬科大学・教授

奥野良信・大阪府立公衆衛生研究所・課長
千葉 丈・東京理科大学・教授
野崎真敏・沖縄衛生研究所・部長

A. 研究目的

本研究は、(a)ジフテリア毒素、(b)破傷風毒素、(c)水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)、(d)インフルエンザウイルス、(e)B型肝炎ウイルス(HBV)、(f)ハブ毒に対して中和する能力のあるヒト抗体を単離調製し、具体的に治療薬として開発することが目標である。更にこの過程を通してヒト抗体作製技術を開発し、抗体によって治療効果が認められる様々な疾患に対して治療用抗体作製を可能にする技術を提供する。

B. 研究方法

平成13年までの研究で、(a)ジフテリア毒素、(b)破傷風毒素、(c)VZV、(d)インフルエンザウイルスに対する中和抗体がAIMSライブラリーより単離されていた。平成14年度には、ジフテリア毒素中和抗体、破傷風毒素中和抗体についてBIAcoreを用いて結合力を測定した。ジフテリア毒素中和抗体は、毒素作用のどの段階を阻害しているかを解析することにした。ジフテリア毒素や破傷風毒素はトキシノイド(毒素をホルマリン処理してある)を用いてライブラリーをスクリーニングしていたが、トキシノイドを抗原としたスクリーニングを行い、トキシノイドの場合と結果を比較することにした。VZVの抗原結合力に関しては、VZV感染細胞を用いて直接細胞膜上のgHタンパク質を染色することによって解析することにした。更に抗体がgHに結合することは³⁵S-メチオニンで標識したVZV感染細胞から抗原を免疫沈降させることで確認することにした。インフルエンザウイルス中和抗体については、既に単離した7種類の抗体の特性を解析した。具体的には、様々なインフルエンザ株に対す

る特異性、中和エピトープの解析、中和力の測定である。

(e)HBV中和抗体単離のために、中和抗体を有していると推定される手術除去脾臓を用いて新しく抗体ライブラリーを作製した。(f)ハブ毒中和抗体単離に関しては、ハブ毒中和抗体を有するボランティアの人の協力を得て成分採血(リンパ球画分)を実施し、抗体ライブラリーを作製し、スクリーニングした。

(倫理面への配慮)

肝臓癌摘出手術で同時に摘出された脾臓は、10数年前に実施、保存されていたものである。患者本人の許可を得ることは不可能であり、大学倫理委員会の許可のみを得た。ハブ毒中和抗体単離のための成分採血に際しては、提供者がこの研究の意義を理解しており、本人の同意及び大学倫理委員会の許可を得た後、本学医師によって実施された。

C. 研究結果

ジフテリア毒素中和抗体

4種類の中和抗体(DTD4、DTD8、DTD10、DTD76)のうち、DTD4とDTD76はジフテリア毒素フラグメントB(レセプターに結合する)を認識し、DTD8とDTD10はフラグメントA(酵素活性を持つ)を認識する。4種の抗体全て毒素が細胞膜レセプターに結合する過程を阻害する。4種類の抗体は $K_d=1.29 \times 10^{-9} \sim 3.55 \times 10^{-10} \text{M}$ という強い結合力を示す。Fab-cp3型抗体で835~9,450 IU/g、IgG型抗体で215~1,573 IU/gを示した。

破傷風毒素中和抗体

5種類の中和抗体(TET36、TET58、TET66、TET74、TET81)が単離されており、全て K_d 値が 10^{-9}M 以下の強い結合力を示した。それぞれ

単独では完全中和（致死量の毒素を与えたマウスが 30 日以上生存）を示さないが、TET58 と他の抗体（TET66、TET74、TET81）の 1 種類を組み合わせると完全中和が見られた。

VZV 中和抗体

VZV に対して強い中和活性を示す 2 種類の抗体（No. 24、No. 94）及び弱い中和活性を示す 4 種類の抗体（No. 10、No. 36、No. 60、No. 43）が単離されている。それぞれ ELISA では強い結合力を示さないが、VZV 感染細胞上に発現された gH 分子を強く免疫染色できる。さらに ^{35}S -メチオニンで標識した VZV 感染細胞から gH タンパク質を免疫沈降させることができた。治療薬として患者あたり数 mg の IgG 抗体を投与するだけで充分治療効果を期待できると判定した。

インフルエンザウイルス中和抗体

7 種類のインフルエンザウイルス中和抗体を単離した。インフルエンザウイルスは毎年少しずつ HA や NA のアミノ酸配列を変化させながら抗原性を変化させている（antigen-drift）。単離した抗体がどの株を中和するかについては奥野報告に詳しく書かれている。

HBV 中和抗体

HBV 感染により肝臓癌になった人が HBV に対する強い中和抗体を有するか、我々のケースでは確認できていない。しかし 10 数年前に行われた摘出手術の際に同時に除かれた脾臓が保存されており、それを用いて抗体ライブラリーを作製した。しかし、中和抗体単離には成功していない。

ハブ毒中和抗体

ハブ毒の出血因子 HR1 および HR2 に対して強く結合するヒト抗体を単離した。その中で HR1 に対する抗体は、HR1 の出血作用を阻害す

る性質を有した。

以上のように HBV 以外については、治療薬となり得るヒト抗体の単離調製に成功した。

D. 考察

ヒトの体内で、抗体は 1 億種類ぐらい作られている。H 鎖における $V_{H}DJ_{H}$ 、L 鎖における $V_{L}J_{L}$ という DNA 再編成が起こることで極めて多様な配列が作り出される。そのような様々な配列を持つ抗体の全セットが抗体のナインブパートリーを形造っている。このナインブパートリーの中の抗体がどのような性質の抗原を認識する能力があるかについて、基本的には極めて幅広く、ある一定の立体的大きさの範囲内で「あらゆる立体構造」と表現できるだろう。しかし、逆に広いことは浅いことを内包する。ホスホリルコリン (PC) とカリボ多糖 (LPS) といった進化的に選別を受けたに違いない抗原物質を除くと、多くの抗原に対して抗体はナインブであり、その点で結合力 K_a は $10^6 \sim 10^7 \text{M}^{-1}$ 程度のものが多い。強い抗原結合力は、抗原の体内への侵入（人為的には抗原（ワクチン等）による免疫）後に起こる変異の導入と抗原結合力の増加に基づく選別によって獲得される（抗体の成熟と呼ばれる）。高い抗原結合力として K_a は、 $10^9 \sim 10^{10} \text{M}^{-1}$ 程度になる。このような強い結合力を示す抗体は、抗原による免疫というプロセスを経た集団なので、そのレパートリーサイズは当然小さく、しかし深いことになる。このように抗体は体内で大きく性質の異なる二つの集団より成り立っている。

AIMS ライブラリーは、ヒトの体内で発現されている抗体集団を用いて H 鎖についてはなるべく多数増幅させてライブラリー化し、L 鎖についてもライブラリー化した後、2 つの集

団をランダムに組み合わせて作製した。そこでそのような抗体集団が生体内の抗体集団とどのような関係にあるかが問題であった。1万種類の抗体を構成しているのが1万種類のH鎖と1万種類のL鎖だと仮定したら、理論的には1億種類の組み合わせを作って初めて最初の1万種類を完全にカバーできることになる。もし抗体レパートリーがそのようなものだとすると、抗体ライブラリー中の抗体の大部分は、本来ヒト体内で機能していた抗体とはHL両鎖の組み合わせ方の点で異なることになる。

本研究を通して得た結論は、そのような疑念は杞憂に過ぎないことを意味する。ヒト生体内でワクチン接種やウイルス感染などにより免疫されていた対象は、確実にAIMSライブラリーの中に含まれた抗体でカバーされ、正にヒト体内で働いていた抗体そのものがクローン化された。一方、AIMSライブラリーにとっては、ナイーブ抗原である対象には強い結合力を示す抗体の存在を期待できないことも判明した。その点、ハブで得られた成果は大きい。今まである抗原に対して中和抗体等役に立つ抗体を持つことが判っている人がボランティアとして協力を申し出ても、末梢血を一体どの程度供与してもらえば、目的とする抗体をクローン化できるの判っていなかった。3L血液相当の成分採血（リンパ球）は、献血者にそれほど大きな負担がかかる事ではない。そして本研究で採用した方針に従えば確実にクローン化できることを示した。ハブに5回咬まれたといっても1984年が最後である。抗血清中に見られる抗体を産生しているBリンパ細胞がどこかに局在しているのか、末梢血中に一様に分布しているのか、といった点はあまりはっきりしていない。しかし、成分採

血を通して確実にその抗体産生細胞を入手可能で、そしてクローン化可能である。この情報は極めて重要である。今後、対象疾患を広げるに際して、要件は二つある。

1. 対象疾患（ウイルス、毒素等）にとって中和エピトープを含む抗原が利用可能である。
2. その対象に対する抗体（中和反応能力を持つ）を産生している細胞を有する人の協力が得られる。

この条件が揃えば、確実にその抗体をクローン化できる。我々が特許問題を題解決するべく新たに開発した技術にとっても、この2条件が揃うことが必須である。

E. 結論

主任研究者のグループで作成したヒト抗体ライブラリー(AIMS)より、(a)ジフテリア毒素中和抗体、(b)破傷風毒素中和抗体、(c)VZV中和抗体、(d)インフルエンザウイルス中和抗体、ロタウイルス中和抗体単離調製に成功した。それぞれ治療用抗体としての充分高い抗原結合力及び中和力を示した。

ハブ毒に対する中和抗体を持つ人の協力を得て、成分採血を行い、抗体ライブラリーを作製した後、ハブ毒中和抗体の単離調製に成功した。これは応用範囲の広い方法である。

以上は、PCR法及びファージディスプレイ法を用いて実施したが、既存特許の制約を回避できるよう、目的とする抗体を産生する細胞を1細胞として単離する新技術を開発した。今後この方法で上記と同じ性質を示す抗体を単離し直し、製剤化する。

F. 健康危険情報

本研究課題に関連しては今のところありま

せん。一般論としてですが、今問題となっている重症急性呼吸器症候群(SARS)について、その抗原(ウイルス)のアミノ酸配列が判明し、感染して回復期にある患者の末梢血10mlぐらいが利用可能であれば、我々の方法で中和抗体単離が可能であると予想されます。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) A. Ideno, M. Furutani, Y. Iba, Y. Kurosawa & T. Maruyama. FK506 binding protein from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshi* suppresses the aggregation of proteins in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 68, 464-469 (2002)
- 2) 伊庭善孝 抗体作製の新技术 癌の臨床 48(2), 55-66 (2002)
- 3) 森野和彦 抗体作製の新技术 Hematology Frontier 12(7), 65-71 (2002)

2. 学会発表

- 1) 本多俊生、赤堀泰、黒澤良和 「ラクダH鎖単独抗体のライブラリー作製とレパートリーの解析」第25回日本分子生物学会 2002年12月11-14日 横浜
- 2) 赤堀泰、伊庭善孝、他「ヒト抗体ライブラリーAIMSの構築とその臨床治療への応用」第25回日本分子生物学会 2002年12月11-14日 横浜
- 3) 柿田麻衣、鈴木和宏、他「ヒト抗体ライブラリーからのジフテリア毒素中和抗体の単離」第25回日本分子生物学会 2002年12月11-14日 横浜

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
「抗体作製方法」平成15年3月31日出願。特願2003-96505

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

各種疾患の治療に役立つヒト抗体の単離調製

H12-医薬-011

分担研究者 高橋 元秀 国立感染症研究所 細菌第二部
千葉 丈 東京理科大学 基礎工学部

協力研究者 小宮貴子 国立感染症研究所 細菌第二部
柿田麻衣 藤田保健衛生大学 総合医科学研究所
高橋 剛 藤田保健衛生大学 医学部 微生物学
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

黒沢らにより作製されたヒト抗体ライブラリー（AIMS4）から、ジフテリアまたは破傷風トキソイドを抗原としてELISA法でスクリーニングし、陽性となった抗体について、ジフテリア毒素に対する中和抗体を単離し、これらの抗体としての機能解析を行った。AIMS4からジフテリア毒素に対する中和抗体が3クローン得られ、これらの抗体の機能解析をBIAcoreとWesternBlottingを用いておこなった。また、得られた抗体は毒素発現機構の細胞表面上のレセプターに毒素が結合するのを阻害することがわかった。破傷風毒素に対する中和抗体を単離し、F(ab')₂型、IgG型に変換しそれぞれ中和活性を測定した結果、毒素によるマウスの発症時間の遅延は認められたが、完全に毒素を中和する抗体は見いだせなかった。

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、このうち2種類のジフテリアおよび破傷風毒素抗原に対する中和活性を有する抗体の単離を目的とする。

B. 研究方法

1. ジフテリア毒素に対する抗体

(1) Fab-cp3 型抗体の発現上清中に

Vero 培養細胞法で中和活性が認められたジフテリア毒素に対する抗体 DTD4、10 および 76 をそれぞれ IgG 型に変換した場合の力価を測定した。

(2) ジフテリア毒素に対する中和抗体が含まれないヒト血清(陰性血清)を中和抗体の確認されている3種類のIgG型抗体に添加した場合、抗体価の上昇が認められるかを試験した。

(3) ジフテリア毒素の細胞への発現機構は、①毒素が細胞表面上のレセプターに結合する(受容体への結合)、②毒素が細胞内の小胞エンドソームに取り込まれる、③毒素がエンドソームの内部で構造変化を起こし、細胞質内に通過すること(活性部位の細胞質ゾルへの移行)、および④ペプチド伸長因子をADPリボシル化する毒素の酵素活性の段階がある。得られた抗体がどの段階でジフテリア毒素を阻害するのか、PVDFメンブレンに還元したジフテリア毒素を泳動し、これらの抗体を反応させ検討した。

(4) タンパク合成阻害効果の検出による中和活性の測定として、毒素をあらかじめ抗体とともに混合した後、Vero細胞に2時間作用させた。細胞のタンパク合成能の測定は毒素作用後[3H]-ロイシンを取り込ませ、放射活性を測定した。

(5) 毒素結合性の測定として、毒素受容体を高発現させた Vero-H 細胞に対し、あらかじめ抗体とともに混合した 125I 標識した毒素を 4°C で 8 時間作用させた。非特異的な結合を洗浄により除き、細胞表面上に残存する放射活性を測定した。

2. 破傷風毒素に対する抗体：

(1) AIMS4 から単離した破傷風毒素に対する数種の抗体を Fab-PP 型に変換するとともに、個々の抗体を混合することにより中和活性が上昇するかを検討した。

(2) 中和活性を有する抗体をヘテロの F(ab)₂ 型に変換し、大腸菌で発現する系を検討し、得られた抗体の中和活性を調べた。

(3) 抗体のスクリーニングに用いる抗原により得られる抗体の性状に差があるか、毒素または毒素をホルマリン処理して無毒化したトキシイドで比較検討した。

(4) 不完全な中和活性が認められた TET58 と 66 を 1 ベクター法にて IgG 型に変換すること、および抗体の組み合わせにより中和活性の上昇が認められるかを試験した。

(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

1. ジフテリア毒素に対する抗体：

(1) Fab-cp3 型で中和活性が認められた DTD4, 10 および 76 抗体をそれぞれ IgG 型に変換した結果、それぞれ 0.944、0.236 および 0.118 単位/ml であった。

(2) ジフテリア抗毒素陰性血清と中和活性を確認した 3 種類の抗体に添加した結果、DTD4 については若干の活性上昇が見られたが、DTD10、76 はほとんど抗体価の上昇が認められなかった。

(3) ジフテリア毒素の細胞への作用は、PVDF メンブレンに還元したジフテリア毒素を泳動し、これらの抗体を反応させたところ DTD4、76 はジフテリア毒素の細胞結合部位であるフラグメント B に結合し、DTD10 は酵素活性部位を有するフラグメント A に結合した。ピアコアを使ってこれらの抗体の抗原と相互作用の Kinetics データを検討した結果、DTD4、10 および 76 のいずれの抗体も KD 値が 10^{-9} M 以上の高い値が得られた。また、得られた抗体は細胞表面上のレセプターに毒素が結合するのを抗体が阻害することがわかった。

(4) タンパク合成阻害効果の検出による中和活性を測定した結果、抗体を毒素の

1000 倍量 (モル比) 用いた場合、毒素により 10% まで低下した細胞のタンパク合成能を、毒素の fragment B を認識する DTD4, 76 は 80~90% 程度、fragment A を認識する DTD8, 10 は 65% 回復させた。(5) 毒素結合性を測定した結果、毒素の結合性を DTD4, 76 は 20% 程度、DTD8, 10 は 50% に減少させた。

2. 破傷風毒素に対する抗体：

(1) Fab-PP 型に変換した抗体のうち、2 種類のクローンを組み合わせることによって(クローン名：TET58 と TET66) 完全な中和活性が確認され、マウスは約 1 ヶ月生存した。

(2) 中和活性を有する抗体をヘテロの F(ab')₂ 型に変換し、大腸菌で発現する系を確立したが、得られた抗体の中和活性はかえって減少した。

(3) 抗体のスクリーニングに用いる抗原が毒素を用いた場合とトキシノイドを用いた場合を比較検討した結果、単離された抗体の Sequence は、ほぼ同様であった。

(4) 不完全な中和活性が認められた TET58 と 66 を 1 ペクター法にて IgG 型に変換し、さらに抗体を混合した結果、中和活性の上昇は認められなかった。

D. 考察

毒素結合性を測定した結果、得られた抗体は結合性を減少させ、タンパク合成能の中和活性の傾向と類似していることが確認された。受容体結合部位を含む fragment B を認識する抗体は、fragment A を認識する抗体に比べ中和活性および結合阻害活性が高いことから、中和活性

の本質は主に毒素の受容体への結合を阻害することにあると考えられた。

スクリーニングに使用する抗原がトキソイドでもトキシンでも得られる抗体に影響ないことを確認した。トキソイドは毒素をホルマリン処理により無毒化したもので、ホルマリン処理によって蛋白構造が大きく変化し、得られる抗体に影響を及ぼすのではないかと考え、抗原を毒素とトキソイドで比較した結果、単離された抗体の Sequence は、ほぼ同じであった。

TET58 と 66 を 1 ベクター法にて IgG 型に変換し、マウスに投与したが、10 日前後でマウスは死亡し、さらに抗体を組み合わせても中和活性の増強は見られなかった。通常モノクローナル抗体を投与した場合でも、複数の抗体を組み合わせたときに中和活性は上昇することもあり、この点についても検討も必要と考える。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

論文発表

なし

2. 学会発表

(1) 高橋 剛、柿田麻衣、鈴木和宏、森野和彦、辻 孝雄、黒澤良和、小宮貴子、高橋元秀 「ヒト抗体ライブラリーからクローニングされた抗ジフテリア毒素中和抗体の検定」 第 25 回日本分子生物学会 2002 年 12 月 11 日・14 日 パシフィコ横浜

(2) 柿田麻衣、鈴木和宏、高橋剛、森野和彦、黒澤良和、小宮貴子、高橋元秀 「ヒト抗体ライブラリーからのジフテリア毒素中和抗体の単離」 第 25 回日本分子生物学会 2002 年 12 月 11 日・14 日 パシフィコ横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況

発明の名称：抗体ライブラリー、

出願番号：特願 2000-50543、

国際出願番号：PCT/JP01/01298、

国際公開番号：WO 01/62907

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

各種疾患の治療に役立つヒト抗体の単離調製

分担研究者 白木 公康 富山医科薬科大学医学部ウイルス学
協力研究者 鈴木 和宏 藤田保健衛生大学総合医科学研究所

研究要旨

今回、ファージディスプレイ法で黒澤らにより作製された抗体ライブラリー(AIMS)から水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV) に対するヒト型抗体のクローニングを行い、得られた VZV に対する中和活性を有するヒト型抗体産生システムを確立し、その性状についての解析を行ったので報告する。

A. 研究目的

水痘は非常に伝染力が強く、未感染母体から新生児への感染、また免疫不全者にとっての感染は重篤となることが知られている。さらに、骨髄・臓器移植時や化学療法治療時の VZV 感染重篤化はリスクファクターの 1 つである。新生児水痘は死亡率が約 30% とされ、ハイリスク患者への感染予防及び軽症化のために、米国では帯状疱疹回復期血清由来の VZIG が使用されている。このように、高力価免疫グロブリンの有効性が示されているが、ヒト血清由来である点は、改善されるべきであり、わが国にはそのような貴重な血清を得るシステムはない。本事業で得られた成果である「VZV に対する中和活性を有するヒト型抗体産生システム」は VZIG を代替するのに十分な活性を有している。抗ウイルス薬が一般使用されるようになった現在でも、VZV の予防治療には VZV 高力価の免疫グロブリン製剤を用いることが期待されており、その応用範囲は広いと考える。本研究の目的はそのような中和抗体を単離することである。AIMS ライブラリーは VZV に罹患後、治癒し

た際に産生された中和抗体が含まれることが期待されるので、十分な中和活性を有する抗体産生系を樹立できたので、そこで産生された抗体の性状解析を行った。

B. 研究方法

本研究は白木グループが VZV の中和の標的である抗原（特に gH）の調製、抗体の中和活性の検討を担当し、抗体ライブラリーのスクリーニング、ヒト抗体への変換と発現—調製を黒澤グループが担当するという分担で実施された。

C. 結果 抗原には VZV 表面糖タンパクで中和標的タンパクの 1 種である gH の精製物を準備した。それを用いて抗体ライブラリーのスクリーニングを行った結果、数百個の抗 gH 抗体クローンが得られ、その中には明らかに VZV ウイルスを中和するものが 8 種類存在していた。内 3 種類では帯状疱疹回復期の抗体価に相当する非常に高い中和活性が認められた。これら 3 種類(310, 324, 394)のクローンは H 鎖遺伝子が VH3 family に属

するクローンであるがその配列は大きく異なっていた。

さらに、活性の強かった3クローンの遺伝子を完全ヒト型IgGに変換、培養細胞にて発現・調製し中和試験を行ったところ、2種類(324, 394)のものについては高い中和活性が示された(図1)。

この結果は、これらをモノクローナル抗体として治療用に用いると1個体当たりmg単位で十分な中和活性であることを示す。

さらに株特異性についての検討も行った。中和試験にはOkaワクチン株が用いられたのであるが、臨床サンプルより得られた8種類の野生株について、これら2種類の抗体の中和活性を検討した。その結果、上記2種類の抗体について、いずれの株においても高い中和活性を示した。従ってこれらの抗体は臨床において非常に高い汎用性を有する抗体であることが示された。

次にこれらの抗体の認識抗原についての検討を行った。水痘の感染細胞を³⁵S-メチオニンで標識して、免疫沈降法(immunoprecipitation)で今回取得したIgG型中和抗体が認識する抗原が何であるか確認した(写真1)。コントロールの血清、TI-50で見られる110kDaのgHタンパクを394及び324は沈降させることからこれらの抗体の認識する抗原はgHであることが示された。

D. 考察

今回取得された2種類の中和抗体は、VZVに罹患後、治癒の段階において体内で産生された中和抗体そのものであると考えられ、臨床でのVZV感染症の予防と治療において非常に有用な中和抗体を得ることができた。

E. 結論

1. VZVの精製gH分子を抗原としてヒト抗体ライブラリーよりgH結合活性を示す抗体クローンを数10種類単離した(Fab-cp3型抗体)。そのうち8種類には明らかなVZV中和活性があり、うち3種はたいへん強い中和能を有していた。

2. それらをヒトIgG型抗体に変換し、動物細胞中で大量発現・精製した後、ウイルス中和力を測定した。1L当たり150μgの抗体で50%中和活性を示す強い中和力があり、さらに野生株に対しても同等の中和力を示し、治療薬として十分な能力があると判断できた。

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

2002年10月16日 第50回日本ウイルス学会学術総会

ヒト抗体ライブラリーからの水痘・帯状疱疹ウイルス中和抗体の単離

鈴木和宏、赤堀泰、黒澤良和、浅野喜造、白木公康

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

「抗体ライブラリー」

特願2000-50543

PCT/JP01/01298

「結合性分子の選択方法」

特願2001-252154

図 1 : IgG 型中和抗体の希釈曲線

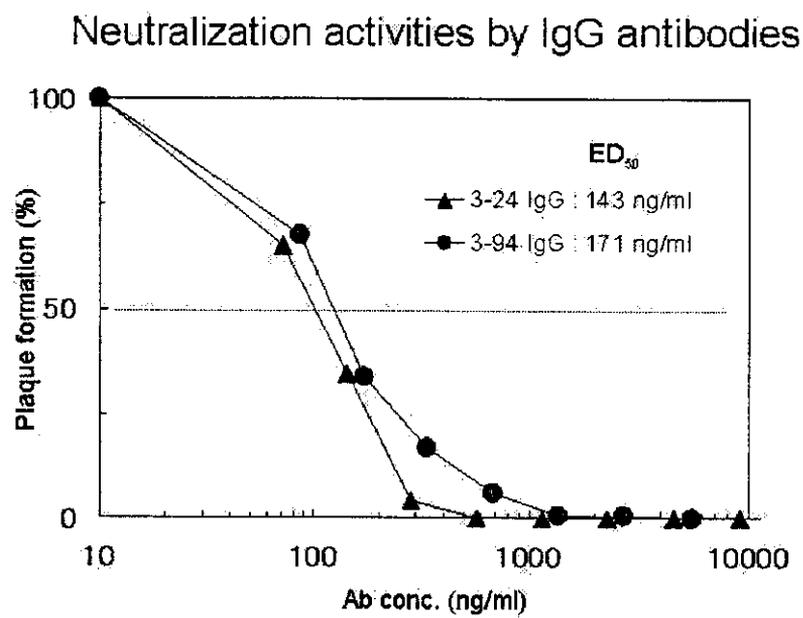
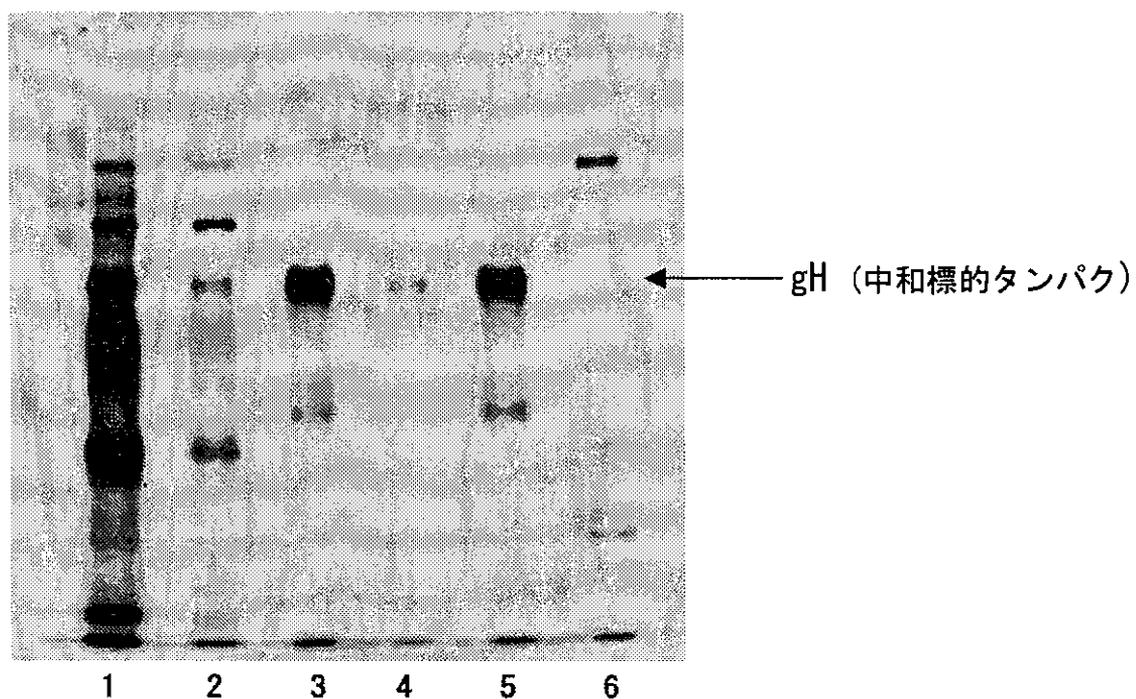


写真1：免疫沈降法(immunoprecipitation)



- 1: モルモット免疫血清
- 2: 帯状疱疹回復期血清
- 3: T1-50 (VZV中和抗体ポジコン)
- 4: 394 IgG (中和活性高)
- 5: 324 IgG (中和活性高)
- 6: 310 IgG (中和活性極めて微弱)

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

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

分担研究者： 奥野良信 大阪府立公衆衛生研究所ウイルス課長
研究協力者： 鈴木定彦 大阪府立公衆衛生研究所病理課主任研究員
瀬瀬律子 大阪府立公衆衛生研究所ウイルス課
中川直子 神戸市環境保健研究所
廣野ゆかり 藤田保健衛生大学総合医科学研究所
鈴木和宏 藤田保健衛生大学総合医科学研究所
赤堀 泰 藤田保健衛生大学総合医科学研究所

研究要旨：

インフルエンザウイルスに対する7種類のヒト中和モノクローン抗体が得られ、そのうち5種類の抗体について中和活性等を解析した。Aソ連型（H1N1）に対する1種類の抗体（NC1）と、A香港型（H3N2）に対する1種類の抗体（SY47）はクローニングに用いたワクチン株だけを中和した。一方、H3N2に対する2種類の抗体（SY39、PA129）は、多くのワクチン株を中和した。B型に対する抗体（YA14）は、多くのワクチン株だけでなく調べたすべての流行株を中和するというユニークな抗体であった。YA14の認識部位は、HAの頭部のループ上にあった。NC1をマウスに投与してチャレンジテストを行ない、この抗体に予防効果のあることを証明した。

A. 研究目的

インフルエンザは患者数、死亡者数を考えると最も重要な感染症の一つで、その対策は緊急の課題である。予防、治療のためにインフルエンザワクチン、抗インフルエンザ薬が使用されているが、必ずしも満足すべき成績が得られていない。そこで、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を作製し、実用化に向けての研究を行なった。

現在まで7種類の抗体が得られ、完全型IgGに変換した。これら抗体の中和活性を

種々のインフルエンザウイルスを用いて詳細に解析した。一部の抗体については、マウスに投与して予防効果を検討した。

B. 研究方法

ウイルス：抗体の性状を調べるために用いたワクチン株は、Aソ連型（H1N1）が5種類（A/New Caledonia/20/99、A/Beijing/262/95、A/Yamagata/32/89、A/Yamagata/120/86、A/Bangkok/10/83）、A香港型（H3N2）が5種類（A/Panama/2007/99、A/Sydney/5/97、

A/Kitakyushu/159/93、A/Shichuan/2/87、A/Fukuoka/C29/85)、B型が4種類(B/Johannes Burg/5/99、B/Yamanashi/166/98、B/Shangdong/7/97、B/Mie/1/93)であった。

B型に対する抗体、B/YA14の流行株に対する反応性を調べるため、2000/2001シーズンに全国の医療機関より送られ、当研究所で分離したB型182株を用いた。

ワクチンを用いたファージ抗体の単離：ワクチン原液を用いて、AIMS4ファージライブラリーからインフルエンザウイルスに反応するファージ抗体の単離を行った。

HAに対する抗体だけを単離するため、NPには存在せずHAに存在する糖鎖を利用する方法を考案した。抗原糖鎖にビオチンを結合させ、これにファージライブラリーを反応させた。得られたビオチン化抗原・抗体ファージの複合物をストレプトアビジンマグネットビーズに反応させ、HAに対するファージ抗体をスクリーニングした。

回収したファージの増幅：大腸菌DH12Sに、上記の過程で得た抗原結合ファージを加えて感染させた。次に感染した大腸菌にさらにヘルパーファージを感染させ、振とう培養することでヘルパーファージが感染した大腸菌を選択した。培養後、培養液を遠心分離して菌体を沈殿させ、上清を回収した。上清にポリエチレングリコール溶液を加え、遠心分離して沈殿させることによりファージを回収した。

ファージ抗体から完全型IgGへの変換： V_H - C_L 遺伝子のそれぞれ両側に制限酵素サイトを付加し、PCRを増幅した(第1段階)。次いで、その産物を完全なH鎖とL鎖をコードできる遺伝子型に変換した中間ベクタ

ーに挿入した(第2段階)。それからSal I-Not I切断し、蛋白発現ベクター(pCMV)に挿入した(第3段階)。このベクターを哺乳動物細胞にトランスフェクトし、完全型IgGを発現させた。大量のIgGを得るためには、ベクターにpNOW-GKTを用いた。

中和試験：フォーカス減少を指標としたマイクロ中和抗体価測定法(Okuno, Y., et al. J. Clin. Microbiol. 28:1308-1313, 1990)を用いた。MDCK細胞を96穴平底マイクロプレートに分注し、モノレイヤーシートを形成するように培養した。次の日、96穴丸底マイクロプレートにMEM培地で希釈した抗体とウイルス液を混合し、37°Cで1時間反応させて中和した。この中和反応液を前日から用意した96穴中のMDCK細胞に感染させ、37°Cで30分間吸着させた。感染後、トリプシンを含んだ維持培地を加え、37°Cで24時間培養した。培養後、100%エタノールで固定し、PAP法で感染細胞の集団(フォーカス)を染色した。PAP法では、一次抗体にA型またはB型インフルエンザウイルスのNPに対するマウスモノクローナル抗体、二次抗体に抗マウスIgGウサギ抗体、三次抗体に抗ウサギIgGヤギ抗体、四次抗体にペルオキシダーゼ・ウサギ抗ペルオキシダーゼ(PAP) complexを順次反応させた後、 H_2O_2 とベンチジンをを用いて細胞内のウイルス抗原を発色させた。フォーカス数は実体顕微鏡下でカウントし、中和活性の強さは、コントロールのフォーカス数に対するフォーカス減少率で求めた。

染色試験：インフルエンザウイルスの各株をMDCK細胞に感染させ、24時間後に固定し、使用時まで-30°Cに保存した。感染細胞の染色は、完全型IgGを一次抗体とし

て反応させ、二次抗体には抗ヒト IgG (H +L) ウサギ IgG、三次抗体には抗ウサギ IgG ヤギ抗体、四次抗体にペルオキシダーゼ・ウサギ抗ペルオキシダーゼ (PAP) complex を順次反応させた後、H₂O₂ とベンチジンを用いて細胞内のウイルス抗原を発色させた。

マウス感染実験: 4 週齢の雌 Balb/c マウスに、1 匹あたりそれぞれ 100 μ g、10 μ g、1 μ g の A/New Caledonia/20/99 (H1N1) に対するヒト型モノクローン抗体 (NC1) と PBS を腹腔内投与し、24 時間後に致死量の A/New Caledonia/20/99 のウイルス液を経鼻感染させた。感染 14 日後まで生存率をモニターした。

(倫理面への配慮)

動物実験は当研究所の動物実験指針に従い、動物に無用な苦痛を与えないように配慮して適正に行った。

C. 研究結果

(1) インフルエンザウイルスの HA に対するヒトモノクローン抗体

インフルエンザワクチンの原液を抗原として、7 種類のヒト型抗体を作製した。A/New Caledonia/20/99 (H1N1) に対して 1 種類 (NC1)、A/Sydney/5./97 (H3N2) に対して 2 種類 (SY39、SY47)、A/Panama/2007/99 (H3N2) に対して 3 種類 (PA129、PA2D1、PA2E1)、B/Yamanashi/166/98 に対して 1 種類 (YA14) が得られた。

これら抗体とクローニングに用いたワクチン抗原との immunoprecipitation を行ない、すべての抗体が HA を認識することを証明した。このうち、NC1、SY47、SY39、PA129、YA14 の 5 種類の抗体について解析

した。

(2) NC1 の中和活性

NC1 の完全型 IgG の中和活性を調べるため、H1N1 の 5 種類のワクチン株に対して中和カイネティクスを見た。この抗体はホモの A/New Caledonia/20/99 (H1N1) を強く中和した (3.12 μ g/ml の濃度までほぼ 100%) が、他の株をまったく中和しなかった。

(3) SY47 の中和活性

SY47 の完全型 IgG の中和活性を調べるため、H3N2 の 5 種類のワクチン株に対して中和カイネティクスを見た。この抗体はホモの A/Sydney/5./97 (H3N2) を強く中和した (6.25 μ g/ml の濃度までほぼ 100%) が、他の株をまったく中和しなかった。

(4) SY39 の中和活性

SY39 の完全型 IgG の中和活性を調べるため、H3N2 の 5 種類のワクチン株に対して中和カイネティクスを見た。この抗体はホモの A/Sydney/5./97 (H3N2) だけでなく、他の 4 種類のワクチン株も中和した。ただし、現行のワクチン株である A/Panama/2007/99 (H3N2) に対しては中和活性は弱く、50 μ g/ml の濃度でやっと 100% 近くのウイルスを中和する程度であった。他のワクチン株に対しては、6.25 μ g/ml 以上の濃度でほぼ 100% のウイルスを中和した。

(5) PA129 の中和活性

PA129 の完全型 IgG の中和活性を調べるため、H3N2 の 5 種類のワクチン株に対して中和カイネティクスを見た。この抗体はホモの A/Panama/2007/99 (H3N2) だけでなく、他の 4 種類のワクチン株も中和した。ただし、1987 年以前に分離されたワクチン株、A/Shichuan/2/87、A/Fukuoka/C29/85 に対しては非常に弱い中和活性しかなかった。