

厚生労働科学研究研究費補助金

医薬安全総合研究事業

救急治療薬としてのヒト抗体調製に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 黒澤 良和

平成16（2004）年4月

目次

I. 総括研究報告	
救急治療薬としてのヒト抗体調製に関する研究	
黒澤良和-----	1
II. 分担研究報告	
1. 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性状解析	
奥野良信-----	14
2. 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-----	20
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 30

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

救急治療薬としてのヒト抗体調製に関する研究

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

本研究プロジェクトは、治療に役立つヒト抗体開発を目的とした厚生労働省補助金事業として第 I 期：平成 9-11 年度、第 II 期：平成 12-14 年度に続いて第 III 期：平成 15-17 年度に実施されている。第 I 期は、「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」と題して、主任研究者グループ単独で実施した。数 10 名のヒト由来の B リンパ球を材料に 1000 億個の独立したクローンからなる抗体ライブラリー (AIMS と命名) を作製した。そしてそのライブラリーから様々な抗原に対する抗体を単離する技術開発に集中した。黒澤にとっては、それまで研究室で約 10 名程の研究者が様々なテーマの研究を行っていたのを、「抗体プロジェクト」に統一することにした時期でもあった。第 II 期には、「各種疾患の治療に役立つヒト抗体の単離調製」と題し、主任研究者以外に 5 人の分担研究者の参加を得て、役割分担を明確にした共同研究作業を行った。水痘帯状疱疹ウイルス (VZV)、インフルエンザウイルス、B 型肝炎ウイルス、ジフテリア毒素、破傷風毒素、ハブ毒素を対象とし、それぞれ治療目的で使用するのに十分な中和活性を示す IgG 型ヒト抗体単離調製を目標とした。対象ごとに抗原の調製—ライブラリーのスクリーニング—抗体の検定—IgG 抗体への変換と研究を進めた。幾つかの異なる対象を選んだことから AIMS ライブラリーに含まれる抗体の特徴、ファージディスプレイシステムの長所と短所、抗原の侵入によりヒト体内で成熟した抗体とナイーブ抗原に対する抗体の相違等、抗体に関する多くの情報およびスクリーニングのノウハウが蓄積された。B 型肝炎ウイルスを除く全ての対象に対して、ほぼ予定通りの優れた性能の抗体が得られた。この期間中に具体的に治療用抗体開発プロセスの検討を開始し、様々なレベルの特許問題の解決を迫られることになった。そこで同時に独自技術開発も進めた。第 III 期を開始する頃にはほぼ二種類の新技术開発にメドがたっていた。RT-PCR 法による抗体遺伝子の増幅に関する Winter II 特許およびファージディスプレイ系の抗体ライブ

ラリー作製の応用に関する McCafferty 特許を CAT 社が有しており、それに対抗する必要があった。目的とする抗体を産生する細胞を一細胞化してゲノム DNA より抗体遺伝子を単離する技術を開発し、更に細胞膜上に存在する全エピトープに対してファージ抗体ライブラリーを用いて抗体を網羅的に単離する技術開発にも成功した。そこで、第 III 期「救急治療薬としてのヒト抗体調製に関する研究」を立案するにあたっては、奥野良信博士と野崎真敏博士の参加を得て、インフルエンザとハブ毒を対象に選び、特許問題を克服しつつ治療用抗体の製剤化プロセスをより具体的に進めることにした。ファージディスプレイ系を用いた抗体ライブラリー作製に関して、CAT 社が包括的特許を有し非常に高いライセンス料を設定していることがこの技術の発展を阻害している。我々の場合、抗体創薬を目指しつつもアカデミックな側面を持ちながら研究を進めているために、現時点では CAT 社特許の制約を受けることなく技術開発を進めている。その過程で次に示す様々なことが明らかになってきた。

1. それぞれの抗体を産生する動物にとって、個体当たりの B リンパ球の総数が、いかなる分子機構をより強調した形で抗体多様性を作り出すかを定める際に大きな因子となっている。細胞融合を利用してモノクローン抗体を作製する技術はマウスの系で開発されたが、様々な点でマウスの特徴が生きている。
2. マウスに比べてヒトの免疫系を考えると、1000 倍のスケールに適合させながら進化している。ファージディスプレイ系は 10^{11} オーダーのクローンを扱えるために、ヒト抗体システムを *in vitro* で再構築するのに非常に適している。ヒトを対象として 30ml の末梢血を用いる限り、ヒトのごく一部を再現したにすぎない。一方、成分採血により血液 3L 相当のリンパ球 (10^9 オーダー) を用いると、ヒトの免疫系ほぼ全体が再構築できる。その場合、ファージディスプレイ系の使用は有効である。
3. ファージ抗体ライブラリーの使用には、スクリーニングのプロセスで様々なノウハウが必要となる。最も大きなポイントの一つは、抗体の使用目的に則した抗原の形状を良く考慮する必要があること。もう一つはファージ抗体を回収するには、スクリーニングに際して抗原抗体複合体を形成させるが、洗浄に際し多くの複合体が解離してしまうことをできるだけ避ける工夫をすることである。

いずれにしても、ファージディスプレイ系は CAT 社の特許有効期限 (2008 年および 2010 年) が切れた後に世界中で広範に利用されることになるのは間違いない。我々は、クロスライセンスに持ち込める独自技

術の開発に努力しながら、数多くの治療に役立つヒト抗体開発に全力を
挙げる。

分担研究者

奥野良信・大阪府立公衆衛生研究所・部長

野崎真敏・沖縄衛生研究所・部長

A. 研究目的

抗体は、ヒト体内でウイルスを中和し、病原菌が分泌する毒素を中和する生体防御機構で中心的役割を果たす分子である。健常人の場合、ウイルス感染に対して発病しても最終的に抗ウイルス中和抗体産生が誘導されて免疫力を持つこと、また幾つかのウイルス性疾患に対しては、ワクチンが開発されて予防効果を示していることから、ウイルス性疾患に対して抗体治療薬開発の必要性は必ずしも強く叫ばれてこなかった。しかし免疫抑制剤の使用を含めた治療途上での免疫不全状態の出現、高齢化に伴う免疫力の低下等によるウイルス性疾患の発病の頻出により、治療薬としての抗体開発が認識され始めている。病原菌が分泌する毒素に対しては、ヘビ毒等と共に長年トキソイドを用いて免疫することにより調製されたウマ抗血清が治療に使用されてきた。ウマ血清の使用は、その成分がウマ由来であることに起因する様々な副作用をもたらす。最近組換え DNA 技術開発の進展に伴いヒトモノクローン抗体作製が可能になった。そこで、治療薬としてのヒト抗体単離調製が世界的規模で進められている。本プロジェクトは厚生省高度先端医療研究事業「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」(平成 9-11 年度)、厚生労働省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」(平成 12-14 年度)の延長として実施される「救急治療薬としてのヒト抗体

調製に関する研究」(平成 15-17 年度)であり、日本に於いて治療用ヒト抗体を自在に調製する体制を構築し、具体的に治療薬として医療現場に供給することを目指している。

現在までに開発されたヒト抗体を作製する技術は大きく 2 種類に分けられる。一つはヒト抗体を産生するトランスジェニック動物作製である。最初 Abgenix 社がヒト抗体遺伝子領域を含む YAC クローンを用いてその作製に成功した。続いてキリンビール社が独自に開発した Trans Chromo 技術を用いて、ヒト抗体 H 鎖遺伝子のほぼ全領域を含むトランスジェニックマウスの作製に成功し、それを Medarex 社が YAC クローンを用いて作製したヒト抗体 κ 鎖遺伝子領域を含むマウスと掛け合わせて KM マウスというトランスジェニックマウスを作り出した。この二つのトランスジェニックマウスは、特許的にも独立した技術として認可されており、様々な治療用ヒト抗体開発に用いられている。もう一つの技術がヒト体内で発現している抗体の全レパートリーを RT-PCR 法を用いて *in vitro* で再構築し、それをファージディスプレイ系により巨大ライブラリー化する技術である。この技術は英国 MRC の G. Winter のグループおよび米国 Scripps の R. Lerner のグループが 1989-1995 年頃に競って開発した。最終的には RT-PCR による遺伝子増幅技術が Winter II 特許 (1989 年 11 月 13 日出願、1988 年 11 月 11 日優先日)、ファージディスプレイに関する McCafferty 特許 (1991 年 7 月 10 日出願、1990 年 7 月 10 日優先日) が最も有力な基本特許となり、それを英国 CAT (Cambridge Antibody Technology) 社が保有することになった。そのため、この技術は

特許が切れる 2008 年および 2010 年までは、他のグループが製品開発の目的で使用する場合に高額なライセンス料を支払う必要が生じた。更に組換え DNA 技術を用いて抗体を作製するには、Genetic 社が有する基本特許の制約を受け、加えて今までに開発された幾つかの抗体大量産生系も特許化されている。本プロジェクトで「日本に於いて治療用ヒト抗体を開発する体制を構築する」という場合には、このような特許問題の解決法も具体的視野に入れていなければならない。

III 期目にあたる本プロジェクトでは、解決すべき課題をより明確にするためにインフルエンザとハブ毒を対象を絞り、共同研究者として大阪公衆衛生研・奥野良信博士と沖縄県衛生環境研・野崎真敏博士が加わり、我々を含めた三チームで共同研究体制を組んだ。しかしながら、最終目標である「具体的に治療用ヒト抗体を市場に送り出す」には、様々な独自技術の開発および市場価値が高い抗体を具体的に作り出すことによつてのみ可能となるために柔軟かつ多角的に研究を推進することにした。

B. 研究方法

ヒトモノクローン抗体作製法 ヒト抗体単離法について我々は3種類の方法をとっている。抗体は、H鎖とL鎖が一組となって特定の抗原に結合する。H鎖の種類は膨大な数からなり、L鎖の種類は限られている。そこでヒトの *in vivo* 抗体レパートリーを反映した抗体ライブラリーを作製するに際しては、H鎖について充分大きなライブラリー(10^8 - 10^9 個の独立したクローン数からなる)を作り、L鎖については比較的小さなライブラリー(10^4 - 10^5)を作つて、その後両者を組み合わせて巨大なライブラリ

ー(10^{10} - 10^{11})を作る。数10名分のヒトBリンパ球を抗体遺伝子のソースとしてこのように作製したライブラリーは、そこで用いたヒトが持つ抗体レパートリー(それぞれの個人の免疫学的経歴に基づき形造られている)をほぼ忠実に反映している。抗体の *in vivo* レパートリーは、様々な抗原を広くカバーする巨大な「ナイーブレパートリー」と、感染等の原因で抗原に対して結合力を増し、ウイルス等に対しては強い中和力を示す「成熟した抗体レパートリー」からなる。主任研究者らが作製した AIMS ライブラリーは、この性質を示す抗体からなっており、その中からインフルエンザウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、ロタウイルス、ジフテリア毒素、破傷風毒素に対して強い中和活性を示す抗体が単離された。AIMS ライブラリーの性質から麻疹等他の幾つかのウイルス性疾患や百日咳毒素に対しても同様に治療目的に合致した中和抗体単離を期待できる。

ハブ毒(とりわけ出血因子 HR1 および HR2)や B 型肝炎ウイルスに対する中和抗体は AIMS ライブラリーから単離できなかつた。ハブ毒に関して、数10年にわたってハブの世話をしながらウマ抗血清調製のために使用するハブ毒を抽出することを職業としている人の協力が得られた。5回ハブにかまれた経験を持ち、そのうえ吸飲等によりハブ毒にさらされ続けた貴重な経験を有するその人の血清中には、強力なハブ毒中和活性が認められた。3Lの血液に相当するリンパ球画分(約 10^9 の B リンパ球を含む)を「成分採血」により供与され、それを用いて 1.3×10^{10} の独立したクローン数からなる抗体ライブラリーを作製した。ハブ毒中には HR1 および HR2 以外にも様々な成分を含むが、作製したライブラリー中にはそ

の殆ど全てに対する抗体が含まれる。ここで用いている「血清中に特定成分に対する抗体を含むヒトからの成分採血」→「抗体ライブラリーの作製」→「ライブラリーのスクリーニングによる標的成分に対する抗体の単離」という方針が我々が持つ第二の方法であり、目的とする性質をした抗体を確実に得られることが判明している。

CAT 社が有する特許との関連では、第一の方法はCAT 社の特許と大部分が重複しており(抗体の性能を高めるために様々な工夫を取り入れているが、そのような改良点は特許レベルではあまり重視されない)、第二の方法では、「成分採血をする点」が我々の独自アイデアだが、同じく CAT 社の特許の制約を受ける。そこで第三の方法の開発に挑んだ。非常に強い包括的特許が存在する場合には、それを回避する道を見出すのは容易ではない。特許所有者とライセンス契約を結ぶことが常道だが、CAT 社特許に関してはライセンス料が高額すぎて、ここで対象としている重要だがマーケットサイズの比較的小さな疾患に対する治療用抗体では薬剤として開発するにはペイできそうにない。その結果、たとえ我々が治療用抗体開発に成功しても具体的に製品化する製薬会社が登場することを期待できないことになる。そこで第三の方法開発をした。その方法は対象抗原を蛍光色素で標識し、その抗原に結合する抗体産生細胞を同定、分離(一細胞レベル)した後、ゲノム DNA から直接抗体遺伝子を単離する。更に大腸菌で抗体を発現して抗体結合能を確認する方法である。

インフルエンザウイルス中和抗体 既に単離したインフルエンザウイルス中和抗体に関しては、分担研究者の奥野良信博士の報告に詳

述されている。そこでここでは主任研究者の研究室で実施されているそれ以外のことを報告する。現在トリインフルエンザが猛威をふるっており、インフルエンザウイルスの人類に対する脅威は巨大である。にもかかわらずインフルエンザウイルスに対する治療用抗体作製の試みに関する話が伝わってこないのは、インフルエンザの特殊性にあると考えられる。インフルエンザの流行には、数10年に1度の頻度で発生する「pandemic」型の流行と、毎年起こる「epidemic」型の流行がある。pandemic 型の流行は、1918年スペイン風邪、1957年アジア風邪、1968年香港風邪が相当する。その際は、その時までヒトには感染せず他の動物種(ニワトリ)の間でのみ感染していた致死性の高いウイルスが変異を受けてヒトへの感染性を突然獲得し、ヒトには全く免疫力が備わっていなかったためにヒトの間で大流行したと考えられている。現在トリインフルエンザ(H5N1型)の大流行が社会問題化しているのもこのことが起こることが恐れられているからである。地震と同じで確実に起こることであり、それはインフルエンザウイルスが持つ高い感染力と強い致死性に起因する。「epidemic」に関してその原因は、「antigen-drift」と呼ばれるインフルエンザウイルスの中和エピトープを持つHA分子のアミノ酸配列の変異に基づく、毎年繰り返される抗原性の変化によりもたらされる。そこでたとえインフルエンザウイルス中和抗体の開発に成功しても、数年経てば効力を失うのではないかと推定されている。言い換えれば、薬の開発には最低でも数年要するので、開発した時は既に効力が無いのではないかと多くの人が考える。本研究では「antigen-drift」に強い、広く抗原特異性を示す中和抗体単離

を目指している。更に、antigen-drift の型を予見した次世代ワクチンの開発も目指す。

ハブ毒中和抗体 現在ウマ血清が治療に使われている様々な疾患を、ヒトモノクローン抗体に変更することは社会的要請の強い課題である。治療用にウマ血清を用いることは数10年の歴史があるが、ウマ由来物質をヒト血液中に注入することに伴う様々な副作用が存在し、それを避けるためヒト抗体に変更できれば良いに違いない。しかしこの変更を可能にするには、実に多くの課題が克服される必要がある。ヘビ毒に対するウマ抗血清に含まれている抗体は、多成分からなる抗原に対するポリクローン抗体である。加えて個々の毒素成分に対してすら、それぞれポリクローン抗体からなるはずである。抗原成分全体をトキシノイド化して、それを用いてヒトボランティアを免疫し、そのヒトの血清から調製したγグロブリン画分を製剤化すればその効能はウマ血清に似ている。しかし、これは倫理的見地からも望ましい方針ではあり得ない。モノクローン抗体として単離して調製する限り、先ず治療効果を見定める抗毒素の単離測定法から検討し直す必要がある。我々の研究グループで単離した抗ジフテリア毒素や抗破傷風毒素抗体の場合、抗原に対する結合定数は 10^{10}M^{-1} オーダーの極めて強い結合力を示すのに、中和活性をウマ抗血清に用いているユニットをそのまま当てはめると低い活性しか示さないことになり、治療効果を高めるには数グラムの抗体を患者に静注する必要があることになる。これはウマ抗血清とヒトモノクローン抗体を、同じ基準で中和活性を測定することから生じた見かけ上の問題と推定している。以上のような学問的困難性に加えて、政

策的問題もある。組換え DNA による産物を製剤化する場合には単一成分（モノクローン）であることが基本である。複数の成分をミックスして薬剤として用いるには、単独成分それぞれの効能を測定した後、ミックスした効果を別途証明する必要がある。それぞれの臨床試験に膨大な経費と年数を要することを考慮すると、モノクローン抗体をミックスしてオリゴクローン抗体もしくはポリクローン抗体として用いる方針が現実的でない状況下にあることがわかる。このような状況を打破する道も考え出す必要がある。

その他の対象 代表研究者の研究室では20年以上にわたって抗体と抗体遺伝子の研究を続けている。抗体ライブラリー(AIMS)を作製して(平成10年8月終了)それをスクリーニングすることにより抗体単離を開始してからでも5年半経過した。この研究プロジェクトには10名以上が取り組んでいるので、その長所と弱点、また問題克服の仕方も熟知するに至っている。ここで問題としているCAT社の特許(Winter II特許とMcCafferty特許)の存在と高額に設定されたライセンス料は、この分野の発展を大いに阻害している。抗体ライブラリーから優れた性能の抗体を単離する、および抗体ライブラリーの特性を生かして上手な利用法を開発するには、数多くのノウハウが必要である。CAT社の抗体ライブラリーに関して日本では2社がライセンスを取得したが、少し使用してそれ以上発展させることを放棄したと聞いている。我々の場合も、真に役立つ抗体取得に自身が持てるようになったのはここ1~2年のことであり、ライブラリー作製後3~4年の間は問題点が続出した。CAT社特許回避の目的でファージ以外に幾つものディ

スプレー系が発表されている。しかし現時点ではファージディスプレイに優る系はないようである。WinterII 特許が 2008 年 11 月に McCafferty 特許が 2010 年 7 月に切れることも視野に入れて、CAT 社にとってクロスライセンスを求めたくなる独自技術をこちら側で開発することも特許問題克服の選択肢の一つと考えられる。

C. 研究結果

抗体単離法の比較 特許問題を考慮せずに、純学問的に現在までに開発された様々な技術の中でヒト抗体単離法としてどれが一番優れているかを先ず比較する。細胞融合によるモノクローン抗体作製法の開発とその利用の華々しい成功は、ヒトへも応用され治療用モノクローン抗体が数多く開発されるに違いないという期待を抱かせた。しかし実際は、マウスでの成功を支えた条件の幾つかがヒトには当てはまらなかった。マウスの場合、目的とする抗原で動物を免疫し、抗体価が高まったところで殺して脾臓を摘出する。ヒトの場合は、目的とする抗体を血清中に有するヒトの末梢血を採取することがやっとならぬ。そしてマウスで脾臓細胞と融合させるパートナーであったミエローム細胞と同じように高率でハイブリドーマが得られるヒトミエローム株が樹立されなかった。20 年かかって最近 A. Karpas が成功した。ポイントはマウスのミエロームで株が短い doubling time で分裂するのに対し、ヒトのミエロームは 3~4 日がかかってやっとならぬ倍化することにその原因があったそうである。比較的 doubling time の短いミエローム株が樹立され、ヒトハイブリドーマ株作製が可能になったといっても今後とも細胞融合によるハイブリドーマ作製がヒト抗

体単離の主流になるとは思えない。最近の我々の研究結果では、免疫系を構成するリンパ球の総数が、作り得る抗体の種類に大きな影響を与えている。マウスは B リンパ球総数が 10^8 - 10^9 でヒトは 10^{11} - 10^{12} である。その結果マウス抗体の多様性は限られており、一方、細胞融合により 10^6 - 10^7 規模の融合株を作製したとしたら、そのかなりをカバーしたことになる。一方ヒトの場合は、多様性は巨大で、更に融合効率が悪い状況ではほんの一部しかカバーできない。つまりヒト体内で性能の良い抗体が作れていてもそれを産生している細胞を株化できる確率は低い。

この免疫系の容量という問題は、未だ多くの免疫学者によって認識されていない。このことを最も顕著に反映しているのは、抗体 H 鎖 CDRIII の多様性の度合いの高さである。我々は、ヒト抗体産生トランスジェニックマウスが総数 10^8 - 10^9 からなる B リンパ球集団という容量からなる免疫系である点からみて、元来 10^{11} - 10^{12} 細胞からなる系を用いて進化してできあがったヒト抗体産生システムで造られる抗体と、性能的に同等の抗体が本当に作れるのか注意深く見守っている。

ファージディスプレイ法の場合は、独立したクローンとして扱える抗体総数は約 10^{11} である。最初の頃、抗体ライブラリーは H 鎖と L 鎖それぞれを独立して増幅させた後、ランダムに組み合わせることから *in vivo* レポートリーを真に反映した抗体を単離することは困難であることを心配した。しかし実際は L 鎖レポートリーを数百クローンでほぼカバーできることがはっきりしてきた。更に「成熟した抗体レポートリー」に属する抗体を産生する細胞は相対的に数が多く、そこで H 鎖の抗体ライブラリーを充分大きく作り、L 鎖と組み

合わせた後は、更に大きく作れば *in vivo* レパートリーに匹敵する抗体レパートリーを構成するライブラリー (*in vivo* で存在した HL の組み合わせを再現した抗体が必ず含まれている) が作製できることがはっきりした。作製した抗体ライブラリーを構成する個々の抗体の性能に問題点がないことが判明してからは、得られた抗体に問題がある場合はスクリーニング法に起因することがはっきりしてきた。ファージディスプレイ法がモノクローン抗体作製技術として細胞融合より優る点が多いことは、マウスやラットを用いても示された。本プロジェクトとは別の目的の研究で、マウスやラットを抗原で免疫した後、脾臓から抗体ライブラリーを作製する。そのライブラリーの大きさをここで記述しているようなヒトと同じスケールにすると、免疫された動物集団の全抗体レパートリーを完全にカバーしている。ファージディスプレイ法の本質は、特定の抗原でスクリーニングすると、用いた抗原に物理的に結合するファージ抗体のみが回収される点である。そこで抗体の使用目的に合致した、換言すれば使用時に抗原抗体複合体が形成されるが、その抗原の立体構造を反映した抗原をスクリーニングに用いることが成功の秘訣である。我々は VZV に対する中和抗体単離に際して、精製した gH タンパク質をスクリーニングに用いた。VZV に対して最も高い中和力を示した抗体は ELISA による検定では精製 gH 分子に極めて弱い結合力しか示さない性質をしていた。この場合 AIMS ライブラリーに VZV に対する強い中和力を示す (成熟した) 抗体が元々含まれており、そしてその数も多かったからこの中和抗体の単離に成功したが、ナイーブ抗原に対する場合はそうはいかない。B の項で記した第一の方法および第

二の方法、両方ともにファージディスプレイ法を利用して抗体ライブラリーを作製する。この方法により性能の良い抗体を単離できることには自信を深めている。

CAT 社特許回避のための第三の方法について、問題が存在することが明らかになった。最初、対象抗原を蛍光標識してその抗原に結合する抗体産生細胞を一細胞として分離する訳だが、結局 10^8 - 10^9 種のスケールで存在する B リンパ細胞のごく一部を対象としているにすぎない。そのために、結合力の強い抗体が殆ど単離されてこない。成分採血を用いずに末梢血を用いて抗体ライブラリーを作製する場合は、その中間的結果が得られた。30ml 程度の末梢血から抗体ライブラリーを作ると、血液 3L 相当の成分血からとれた抗体の一部に相当する抗体が単離された。我々のグループの現段階での結論は、多数のリンパ球集団から 10^{11} 個規模の抗体ライブラリーを作る方法が最も信頼度が高く、それより優れた抗体作製法は未だ見出されていない。

抗インフルエンザウイルス抗体 インフルエンザワクチンを抗原として AIMS ライブラリーをスクリーニングすることにより、今まで 5 種類のインフルエンザ中和抗体を単離した (奥野報告参照)。スクリーニングに用いた型 (HA 分子に関して) のインフルエンザウイルス (ここでは A1 型とする) を中和抗体 (抗 A1 抗体) 存在下で一定期間培養すると、HA 遺伝子の中に変異が導入されて抗体による中和を受けない性質を獲得したウイルス株 (エスケープミュータント、ここでは A2 型とする) が生まれる。この現象がインフルエンザを特徴付ける antigen-drift を試験管内で再現したことになるのかは議論が分かれるが、本プロ

プロジェクトでは抗A1抗体に変異を導入することによって抗A2活性を獲得した抗体単離を試みた。この研究を実施しようと試みた理由は、我々の研究室で様々なステロイド分子に対して抗体の特異性の変換を目的として行った研究結果に基づいている。抗A2活性を新たに獲得した抗体は、多くの場合抗A1活性を保っている、と期待された。換言すれば、抗原特異性が広く、エスケープミュータントの出にくい抗体を作り出そうと考えた。多くの努力の結果、具体的には抗A1抗体に様々な程度の変異（この場合、抗原抗体複合体の立体構造は判明していないので、error-prone PCRによりV領域全体へ導入する変異の平均値を増減させることしかできない）を導入したが、抗A2活性を示す抗体を得られなかった。エスケープミュータントは、中和抗体の抗原特異性を決定する極めて重要な位置を占めるアミノ酸をbulkyな側鎖を持つものに変異させることにより物理的障害（steric hindrance）を与えることでエスケープすることが多く、抗体側も正にその接触部に相当するアミノ酸数個を相補的に凹化させる必要があると推定され、error-prone PCRのようなランダムな変異の導入ではこの目標を達成できなかったと解釈している。この課題について、インフルエンザウイルスでは古くから「original antigenic sin」と呼ばれる現象が知られており、全く別の角度から目標達成可能なことに気付いた。これについては「D. 考察」の項に記述する。

抗ハブ毒抗体 ハブ毒成分HR1に対して強い中和力を示すIgG型抗体単離調製を終了した（野崎報告参照）。そこで現在、ウマ抗血清が使用されている状況で、ヒトモノクローン抗体へ変更するためには如何に臨床試験を行う

ことが可能かについて検討を進めている。マムシ毒素、ボツリヌス毒素も同じ状況にあるが、臨床試験を行わない限り薬になり得ない。ウマ抗血清も、実際に治療に用いる際にはパイニンで分解してF(ab')₂化されている。但し、硫酸分画したのみで真にF(ab')₂のみで良いかは定かでない。我々の研究室でもF(ab')₂までは大腸菌産生系で調製できる。もしF(ab')₂で良いとなると、大腸菌産生系を用いてポリクローン抗体の形で調製可能であり、ウマ血清により近い画分を作れる。更にハブ毒は数多くの成分を含むので、抗HR1抗体および抗HR2抗体のみで十分な治療効果が得られるかも問題となっており、Phospholipase A2、L-Amino acid oxidase等に対する抗体を単離するかについても検討中である。いずれにしても現在沖縄でハブ毒治療に直接関わっている医師と相談しながら今後の方針をつめている。

その他の対象 「抗体単離法の比較」の項で記述したように「ファージディスプレイ法による抗体ライブラリー作製」を利用して抗体を単離する方法は、極めて優れており、現時点でCAT社特許が如何に障害になっているかがこれを用いた方法のより深化をはかる必要がある。CAT社の特許が終了したのち世界的にも爆発的に使用されることになるだろうが、その使用のノウハウを完全にマスターするのに数年かかる。今すぐにも研究を開始できる応用範囲を挙げるなら、(1)SARS治療用ヒト抗体開発：SARSウイルスに感染して発病したが完全に治癒した人も多数いる。彼らの中から成分献血に同意するボランティアがいるとすればSARSウイルスに対する強い中和抗体を単離できる可能性は高い。(2)トリインフルエ

ンザウイルス対策：現在トリインフルエンザに関しては、ウイルスそのものの研究が大部分である。ファージディスプレイを用いた抗体をモノクローン化する技術は、事実上、抗体を産生するどのような動物にも応用できる。そこでインフルエンザウイルスに感染したニワトリを含む様々な動物種の体内で産生される抗インフルエンザ中和抗体をモノクローン化できる。それを利用した様々な実験系を組み立てることが可能である。

CAT 社の特許対策としてクロスライセンスに持ち込む独自技術開発の点で、我々が行っている別のプロジェクトの結果を紹介する。通常、抗体ライブラリーは、何か特定の抗原に対する抗体を得るために用いる。今まで我々の研究室で作製して所有しているのは、数 10 名のヒト B リンパ球から作製した AIMS ライブラリー、肝癌摘出手術に際して同時に摘出された 4 名の脾臓（これは 20 数年前から冷凍保管されていたもの）をもとに作製したライブラリー、ハブ毒成分に対する高い中和力を有するヒト成分血から作製したライブラリー、様々なトキシノイドで免疫した経験を有する研究者の成分血から作製したライブラリーで、それぞれのリンパ球提供者が血清中に有する抗体の特性を利用すると優れた性能の抗体を単離できる。一方、ナイーブ抗原に対する抗体を網羅的に単離する抗体ライブラリーの使用法はないものか考えていた。

抗体ライブラリーは、スクリーニングする時に用いる抗原と物理的に相補的な関係があって複合体をつくる抗体が単離される。動物を免疫する際には、その物質の「免疫原性」が問題となり、更に抗原はプロセッシングを受けて呈示される。この点が両者で根本的に異なる。そこでどのような状況で抗体を使用

したいかを考えて、その上でその使用状況と同じ構造をした抗原をスクリーニングに用いればよいことに気付く。我々は「細胞と抗体ライブラリーをミックスして、細胞膜上で抗原抗体複合体を形成したファージ粒子を洗浄というステップを経ることなく細胞と共に単離する技術」開発に成功した。この技術を用いて肝癌細胞に結合する 800 種の抗体を単離し、その中から約 50 種が正常肝細胞は染色せず、肝癌細胞のみを選択的に染色することを見出した。この技術により癌治療用ヒト抗体単離が可能である。特許戦略については、我々が開発した技術の特許申請中で、更に今後同定する個々の癌特異抗原は我々の特許となる。CAT 社とクロスライセンスに持ち込む足がかりを得たと判断して交渉を開始している。

D. 考察

主任研究者が属する藤田保健衛生大学は、平成 15 年度に文部科学省の 21 世紀 COE プログラム（医学分野）で教育研究拠点に選ばれた。拠点の名称は、「超低侵襲標的化診断治療開発センター」で、厚生労働省の本プロジェクト推進の中で我々のグループが培ってきた抗体技術を用いた診断治療開発が、この COE プログラムで中心テーマの一つとなっている。そのために、現在専門分野を異にする様々な臨床医の協力が得られる環境整備が進んでいる。そこでこの項では、本プロジェクトが最初から掲げているテーマの現時点での位置付けと、より広い意味で治療用ヒト抗体の開発方針を議論する。その理由は、厚生労働省から我々が研究補助金を 9 年間（平成 9-17 年度）にわたって提供され続けている最大の理由は、「様々な疾患に対して治療用ヒト抗体を作製する技術開発を行い、そして具体的に製品化

する段階まで到達する」目標達成を期待されているからと考えるからである。

インフルエンザ治療用抗体開発 インフルエンザ治療薬として最近発売された「タミフル」は、ノイラミダーゼの阻害剤である。インフルエンザウイルスはシアル酸をレセプターとして HA（ヘマグルチニン）が結合し感染するが、細胞内で増殖したウイルス粒子が細胞から離脱する際にはノイラミダーゼがシアル酸を切断する。タミフルはこの段階を阻害する訳で、有効なのは感染一発病後、一定期間内である。インフルエンザウイルスを中和する能力を示す抗体は、HA 分子上 5ヶ所の中和エпитオプの 1 つに結合し、感染を阻止する。但し、1 ウイルス粒子あたり約 1,000 個存在する HA 分子に平均 30 個の抗体が結合すると中和し、更に「one-hit killing」の kinetics を示すことから、中和は「感染阻止」のみならず「ウイルスの不活化」を起こしていると推定している。驚くことに、「抗体によるウイルス中和の分子機構」に関する研究が非常に少ない（上記のことは古い研究が多く、最近の分子レベルでの解析技術が使われていない）。「HA とレセプターであるシアル酸との結合阻害が中和できる原因」と *a priori* に決めつけている感がある。いずれにしても 5ヶ所の中和エピトープそれぞれに対するヒトモノクローン抗体を作製し、ミックスして治療薬とすれば感染一発病のプロセスの一定段階までは治療効果を示すことが期待できる。本プロジェクトを開始した平成 15 年 4 月時点で、(1)antigen-drift に対抗できる広い抗原特異性を示す中和抗体の作製、(2)インフルエンザを発症した個人および集団の中に何種類のインフルエンザ中和抗体が存在するか、網羅的

に単離し、エスケープミュータントを得て antigen-drift を予測できるか解析すること、それによって次世代ワクチンを開発することを目指して掲げた。「C. 研究結果」の項で記述したように、中和抗体からエスケープしたミュータントを再度中和する抗体へ変換する技術開発は困難で（別の中和エピトープに対する抗体単離は容易）、更に 30ml 程度の末梢血中には患者が持つ中和抗体産生細胞の一部しか含まれないことが判明したので、同じ目標を達成できる全く新しい方針へ転換することにした。

インフルエンザに関して半世紀前から”original antigenic sin”と呼ばれる現象が知られている。通常のウイルス感染では、基本的には全く同じ性質のウイルスが何度も感染し、体内では「抗体の成熟」が起こり、そのウイルスを強く中和する抗体を産生する能力を獲得して免疫が成立する。それと比較してインフルエンザウイルスの場合は、antigen-drift が起こるために中和エピトープを持つ HA の配列が年々徐々に変わり抗原性が変化する。その抗原性の変化を $A \rightarrow A' \rightarrow A'' \rightarrow A'''$ と表現する。A に感染したヒトは抗 A 抗体を作る。そのヒトが再び A' に感染すると、抗 A' 抗体ではなく、抗 A 抗体産生が増強される。もし、そのヒトが A に感染した経験がなく A' の感染が初めての場合は、抗 A' 抗体を作る。これが original antigenic sin と呼ばれる現象の説明である。この原因として、最初に作られた抗 A 抗体が A に対する結合力よりは弱くても A' との交叉反応性 (cross-reactivity) を示し、A' が感染すると抗 A' 抗体を作り出す過程が動く前に抗 A 抗体を大量に作ってしまうことが背景にあると推定される。そこで本プロジェクトは 3 名の

小児科医師（30歳台、40歳台、50歳台）の協力を経て「成分採血」し、巨大な抗体ライブラリーを作製してそれぞれの医師の血液中に存在する全ての抗インフルエンザ中和抗体を単離することにした。インフルエンザウイルスに関しては、過去数10年分のワクチン株が保存されており、それぞれの抗体がどの年度のインフルエンザウイルスに対して中和活性を示すか相関関係を示せることになる。更にエスケープミュータントを単離して過去に実際に起こった antigen-drift のパターンの変化との関係も解析できる。この実験により本プロジェクトで掲げた上記目標に対する答が出せるはずである。

ハブ毒中和抗体 この研究は、現在ウマ血清が治療に用いられている抗毒素をヒト抗体に変更する最初の例として実現すると位置づけている。「C. 結果」の項に方針も示しているが、我々は同様にボツリヌス毒素も対象としている。そのためにはウマ血清の中で真に抗毒素活性を担っている抗体は幾つあるのかといった解析も必要かもしれない。ファージディスプレイ系は、ウマが対象でも中和抗体単離法として同様に応用可能である。

治療用ヒト抗体開発方針 平成15年12月18-19日に「抗体創薬の戦略」(Strategy for Development of Therapeutic Antibodies)と題した国際ワークショップを藤田保健衛生大学21世紀COEの事業として開催した。このワークショップでは、現在抗体創薬の対象となっている様々な疾患が話された。自然界で生体防御機構としての抗体は、第一義的には明らかにウイルスや病原菌感染によって引き起こされる感染症に向けられて進化した分子で

ある。その点からみて本プロジェクトで対象としているようにウイルスや病原菌が分泌する毒素、そしてヘビ毒素に対して強い中和活性を有するヒト抗体を単離調製して治療薬として用いることは理にかなっている。しかし現在、世界的規模で巨大製薬企業を中心として実施されている抗体創薬の標的は主として癌およびアレルギー等の自己免疫疾患である。更にタンパク質が凝集体を作ることが原因と考えられるアルツハイマー病やハンチントン病等もその標的と考えられている。我々の「抗体プロジェクト」では、様々な角度から抗体を用いた新しい技術開発に挑み、その総合力で特許問題解決も含めた治療薬開発を目指している。「癌治療薬としての抗体開発戦略」は既に触れたが、「抗体を抗原特異的シヤペロンとして用いる技術開発」にも成功しており、タンパク凝集形成反応を阻止する試薬にならないか検討を始めている。今後抗体を用いる分野はまだまだ飛躍的に拡大されると予想している。

E. 結論

本プロジェクトは治療薬としてのヒト抗体単離調製の技術開発および具体的に創薬プロセスを確立して実現するまでを目標に進めている。対象としてウイルス感染症、病原菌が分泌する毒素、ヘビ毒を選び、それぞれ臨床に使える十分に高い中和力を持つIgG型ヒト抗体の単離調製までを行う。抗体の単離調製それ自体については、ほぼ技術開発を終了しており、特許問題の解決を含めた創薬プロセスの確立に重きを置いている。そこでインフルエンザウイルスとハブ毒を主たる標的として研究を進めている。我々のように既に治療

薬になり得る各種ヒト抗体の単離に成功しており、その上で特許問題を解決しようとする場合には、我々自身の手で独自技術を開発しそれを権利として獲得した上で、それによって既存特許の所有者とクロスライセンスを結ぶことが有力な選択肢と考えられ、2種類の独自技術開発を行った。その過程で癌治療薬開発のための癌特異抗原同定法の確立と同時にヒト抗体単離法の開発に成功したことは、有力な武器となりつつある。ファージディスプレイ法を用いた治療用ヒト抗体単離は、CAT社が特許を独占しているため、世界的にあまり進んでいないが、我々の経験では現在までに開発された方法の中では最も優れた性能のヒト抗体を得る方法と判断している。ファージ抗体技術のより一般性の高い利用法の確立には様々な技術開発も含めたノウハウの蓄積が必要であり、特許の存在のために技術開発を遅らせてはならないと考えている。

F. 健康危険情報

本研究課題に関連し、現在までのところ該当する情報はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Higo-Moriguchi, Y. Akahori, Y. Iba, Y. Kurosawa, & K. Taniguchi, Isolation of human monoclonal antibodies that neutralize human rotavirus, *Journal of Virology*, 78, 3325-3332 (2004).
- 2) 黒澤良和 新規抗体療法の開発 血液・免疫・腫瘍、8, 231-235 (2003)
- 3) 黒澤良和 抗体をツールとした創薬および抗体創薬の戦略 *Drug Delivery System* 18(6) 528-535 (2003).

2. 学会発表

国際ワークショップを続けて2回開催し、そこで幾つかの発表を行った。

- 1) Role of Antibodies in Genome Science (December 16-17, 2003 開催)
 - (1) Yoshikazu Kurosawa, Development of technologies for comprehensive and systematic analyses of gene expression and function at protein level using antibodies, in Abstracts, pp.1-2.
 - (2) Yoshitaka Iba, Preparation of antibodies for comprehensive analyses of gene expression patterns at protein level during the development of *C.elegans*, in Abstracts, pp.3-4.
 - (3) Yasushi Akahori, Comprehensive isolation of antibodies against cell surface antigens, in Abstracts, pp.11-12.
 - (4) Kazuhiko Morino, Preparation of monoclonal antibodies through single cell isolation, in Abstracts, pp. 13-14.
- 2) Strategy for Development of Therapeutic Antibodies Science (December 18-19, 2003 開催)
 - (1) Yoshikazu Kurosawa, Antibodies as almighty molecules for targeted treatment, in Abstracts, 3.
 - (2) Atsushi Sugioka, Novel therapeutic antibodies against hepatocellular carcinoma, in Abstracts, 13.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

- ・「細胞表面抗原に対する抗体取得とその抗原同定」平成15年12月4日出願特願。2003-406554.
- ・「無細胞タンパク質合成系を利用したタンパク質の製造方法」平成15年12月4日出願。2003-406333.

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性状解析

分担研究者：	奥野良信	大阪府立公衆衛生研究所感染症部長
研究協力者：	鈴木定彦	鳥取大学医学部細菌学
	纈纈律子	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：ファージディスプレイ法により、5種類のインフルエンザウイルスに対する中和モノクローン抗体を得た。それらの性状を解析したところ、NC1はスクリーニングに用いたワクチン株だけを中和する特異性の高い抗体であり、一方、YA14はB型のワクチン株、流行株のほとんどのウイルスを中和するという広域反応性の抗体であった。今回、これら性状が極端に違う2種類の抗体を *in vitro*、*in vivo* の系で解析した。

A. 研究目的

ファージディスプレイ法により、現在までに5種類のインフルエンザウイルスに対して中和活性を有するヒトモノクローン抗体をクローニングした。種々のウイルス株に対する中和活性を調べると、抗体によってその反応性に違いがみられた。そのうち、Aソ連型（H1N1）のワクチン株（A/New Caledonia/20/99）を抗原として得た抗体（NC1）は株特異的に、またB型のワクチン株（B/Yamanashi/166/98）を抗原として得た抗体（B/YA14）は調べたほとんどの株を強く中和した。そこで、この2種類のユニークな抗体の性状を *in vitro*、*in vivo* の系で詳しく解析した。

B. 研究方法

ウイルス：抗体のクローニングのため現行の

ワクチン株の A/New Caledonia/20/99 (H1N1) と B/Yamanashi/166/98 を用いた。

NC1 の中和活性を調べるため、5種類の H1N1 のワクチン株 (A/New Caledonia/20/99、A/Beijing/262/95、A/Yamagata/32/89、A/Yamagata/120/86、A/Bangkok/10/83) に対して中和試験を行った。

B/YA14 の中和活性を調べるために、3種類の山形系統株 (B/Johannes Burg/5/99、B/Yamanashi/166/98、B/Mie/1/93) と 5種類のビクトリア系統株 (B/Shangdong/7/97、B/Tokyo/942/96、B/Victoria/2/87、B/Gifu/21/73、B/Lee/40) を用いて中和試験を行った。

流行株に対する B/YA14 の反応性を調べるため、2000/2001 のシーズンに患者より分離された 193 株と、01/02 シーズンに分離された 27 株を用いた。

ファージ抗体の単離と完全型 IgG への変換：
A/New Caledonia/20/99 (H1N1) と B/Yamanashi/166/98 のワクチン原液を用いて、AIMS 4 ファージライブラリーから型特異的に反応するファージ抗体の単離を行った。

完全型 IgG に変換するため、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 で増幅した (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)。次いで 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) で行った。

赤血球凝集阻止 (HI) 試験：HI 試験はマイクロプレートを用いた通常の方法で行った。

PAP 法による抗体の染色活性：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℃ 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。

エスケープミュータントの作製：NC1 と 1×10⁶FFU/ml の A/New Caledonia/20/99 (H1N1) を 1:1 の容量で混合し、30℃ で 1 時間反応させた。この中和反応液を発育鶏卵に接種し、35℃ で 60 時間インキュベートした。増殖してきたウイルスを採取し、NC1 に対する反応性を中和

試験等で調べた。B/YA14 についても B/Yamanashi/166/98 を用い、同様にしてエスケープミュータントを得た。

マウスを用いた NC1 の予防効果の検討：マウス (4 週齢の雌の Balb/c) に NC1 を腹腔内投与し、24 時間後に A/New Caledonia/20/99 (H1N1) を鼻腔内接種した。
(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) NC1 の性状解析

a. 中和活性

A/New Caledonia/20/99 に対する NC1 の中和活性を調べた (図 1)。

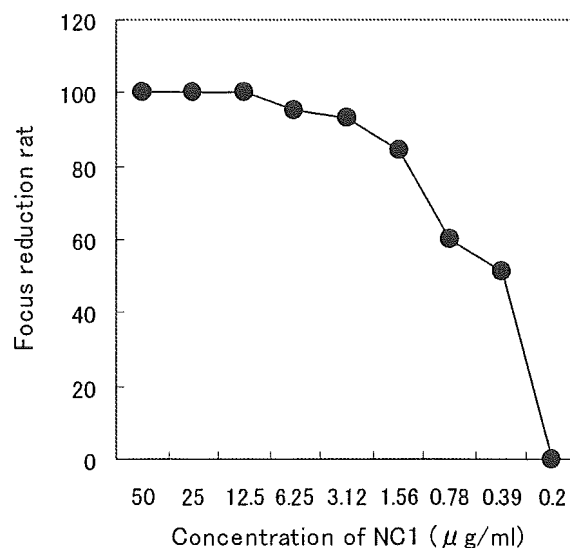


図 1. NC1 の A/New Caledonia/20/99 に対する中和カイネティクス

NC1 は A/New Caledonia/20/99 (H1N1) を強く中和し、3.12 μg/ml の濃度までは 100% 近く、0.39 μg/ml でも 50% 以上のフォーカス減少率を示した。しかし、他のワクチン株に対し

て全く中和活性はなかった。

b. NC1 の認識部位

免疫沈降法により NC1 が HA と結合することを明らかにした。次いで、NC1 が HA のどのエピトープを認識するのかを調べるため、A/New Caledonia/20/99 (H1N1) に対するエスケープミュータントをクローニングした。全部で 11 種類のミュータントが得られ、HI 試験により NC1 の反応性の低下を認めた。親株に対して 640 の HI 価を示した NC1 も、ミュータントに対しては 40 以下と低下していた。中でも 3 種類のミュータントは、10 以下と大幅な低下を示した。

これらミュータントの HA 遺伝子をシークエンスし、親株のそれと比較した。1~3ヶ所のアミノ酸の置換を認め、それらは HA の 144、201、211、315 番目に位置していた。315 番目は HA のレセプター結合部位から大きく離れ、NC1 の認識には無関係と考えられた。144、201、211 番目は、レセプター結合部位を形成するポケットの周囲に位置し、これらのアミノ酸の置換により NC1 が結合できなくなり、HI 活性あるいは中和活性が低下するものと推測された。

c. マウスにおける NC1 の予防効果

マウスを 4 つのグループに分け、NC1 の予防効果を調べた。それぞれのグループには 10~11 匹のマウスを使用し、NC1 をマウス 1 匹あたり 1 μ g、10 μ g、100 μ g とコントロールとして PBS だけを腹腔内投与した。24 時間後に A/New Caledonia/20/99 (H1N1) を鼻腔内接種して経目的に生存率を調べた (図 2)。

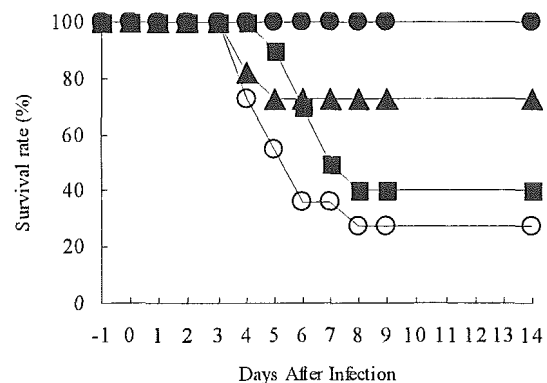


図 2. マウスにおける NC1 の予防効果。-1 日に NC1 を腹腔内投与し、0 日に A/New Caledonia/20/99 株を腹腔内接種した。マウス生存率を 14 日間モニターした。(●) NC1 100 μ g/mouse、(▲) NC1 10 μ g/mouse、(○) NC1 1 μ g/mouse、(■) Control(PBS)

(2) YA14 の性状解析

a. ワクチン株に対する中和活性

B 型インフルエンザウイルスには山形系統とビクトリア系統の 2 系統があり、各系統のワクチン株に対する YA14 の中和活性を調べた。

YA14 は、山形系統の 3 種類のワクチン株に対して強い中和活性を示した (図 3)。

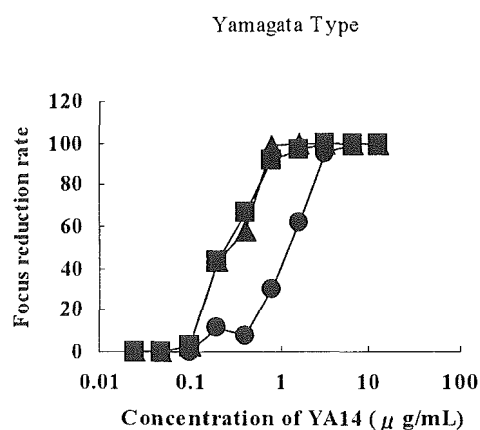


図 3. 3 種類の山形系統の B 型株に対する中和カインティクス。(●) B/Yamanashi/166/98、(▲) B/Johannes Burg/5/99、(■) B/Mie/1/93

一方、ビクトリア系統の5種類のワクチン株に対して、YA14はB/Gifu/21/73以外の4株を効率よく中和した。B/Gifu/21/73に対しては、ほとんど中和活性がなかった(図4)。

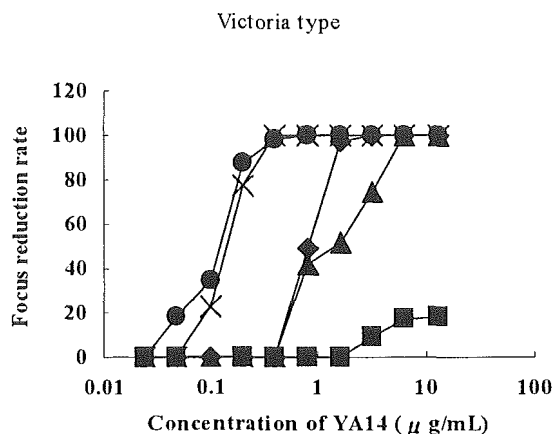


図4. 5種類のビクトリア系統のB型株に対する中和カインेटクス。(●)B/Lee/40、(▲)B/Victoria/2/87、(■)B/Gifu/21/73、(X)B/Tokyo/942/96、(◆)B/Shang dong/7/97

b. 新鮮分離株に対する染色および中和活性

2000/01シーズンと01/02シーズンに国内で分離されたB型に対するYA14の染色および中和活性を調べた。

2001/01シーズンに分離された193株を、山形系統に反応するマウスモノクローン抗体(3A12)とビクトリア系統に反応するマウスモノクローン抗体(9E10)を用いてPAP染色で系統解析した(表1)。

表1. 2000/2001シーズンに分離されたB型株のYA14に対する反応性

B type strains isolated in 2000/01		PAP staining with Mab				NT with YA14
		9F3	9E10	3A12	YA14	
Yamagata type	171	+	-	+	+	+
Yamagata type	11	+	-	+	+	not done
Victoria type	11	+	+	-	+	+
total	193	193	11	182	193	182

9F3はB型のNPに反応するマウスモノクローン抗体で、B型であればすべて反応する。

182株が山形系統、11株がビクトリア系統であることが証明され、YA14はPAP染色ですべての株と反応した。また、中和試験によりYA14は調べたすべての株を中和した。

2001/02シーズンに分離された27株についても、前シーズンと同じモノクローン抗体を用いて解析した(表2)。

表2. 2001/2002シーズンに分離されたB型株のYA14に対する反応性

B type strains isolated in 2001/02		PAP staining with Mab				NT with YA14
		9F3	9E10	3A12	YA14	
Yamagata type	1	+	-	+	+	+
Yamagata type	1	+	-	+	-	-
Victoria type	25	+	+	-	+	+
total	27	27	25	2	26	26

このシーズンに分離されたB型の大部分はビクトリア系統で、山形系統はわずか2株であった。そのうち1株はYA14とは反応せず、中和活性もなかった。

c. YA14の認識部位

YA14の認識部位を明らかにするため、B/Yamanashi/166/98とYA14と反応させ、中和に抵抗して増殖するエスケープミュータントを得た。4株のミュータントが得られ、それらのHA遺伝子のシーケンスを親株のそれと比較した(表3)。

表3. YA14に対するエスケープミュータントのアミノ酸置換部位

Strain	HI with YA14	nucleotide at position 500	amino acid at position 141
B/YA/166/98	160	G	Gly
B/YA/166/98-V2	<4	A	Glu
B/YA/166/98-V3	<4	A	Glu
B/YA/166/98-V4	<4	A	Glu
B/YA/166/98-V5	<4	A	Glu

ミュータント (V2、V3、V4、V5) は YA14 の HI 活性に抵抗し、すべて <4 であった。HI 遺伝子の塩基配列で、500 番目だけが G から A に置換し、アミノ酸では 141 番目が Gly から Glu の置換していた。この位置は、HA の頭部の側面に位置するループ部分に相当していた。

HA の 141 番目が YA14 の認識に重要であることが分かったので、各種ワクチン株に対する YA14 の HI 価と 141 番目のアミノ酸を比較した (表 4)。

表 4. ワクチン株における YA14 認識部位のアミノ酸

Strain	HI with YA14	amino acid at position 141
B/Yamanashi/166/98	160	Gly
B/Mie/1/93	160	Gly
B/Johannes Burg/5/99	160	Gly
B/Lee/40	ND	Gly
B/Gifu/21/73	<4	Arg
B/Victoria/2/87	ND	Gly
B/Tokyo/942/96	ND	Gly
B/Shang dong/7/97	40	Gly

HI 試験で、YA14 は B/Gifu/21/73 を除いて HI 活性を有し、141 番目のアミノ酸は Gly であった。一方、B/Gifu/21/73 だけは Arg で、このアミノ酸の違いが YA14 の HI 活性に対して抵抗性を賦与しているものと推測された。

分離株の中にも YA14 の中和活性に抵抗する株 (TT105) が存在したので、ビクトリア系統 (Vic) と山形系統 (Ya) から数株ずつ選び、それらに対する YA14 の中和活性と、141 番目のアミノ酸の種類を解析した (表 5)。

表 5. 2001/02 分離株における YA14 認識部位のアミノ酸

Strain	Type	NT with YA14	amino acid at position 141
B55	Vic	+	ND
B203	Vic	+	Gly
J325	Vic	+	Gly
RR62	Ya	+	Gly
TT105	Ya	-	Arg
B/Yamanashi/166/98	Ya	+	Gly
B/Gifu/21/73	Vic	-	Arg

分離株の TT105 とワクチン株の B/Gifu/21/73 は YA14 の中和抵抗性ウイルスであることが確認された。141 番目のアミノ酸は、中和感受性のウイルスは Gly であったが、中和抵抗性ウイルスは Arg とアミノ酸の違いが認められた。

D. 考察

インフルエンザウイルスの HA は動物の赤血球を凝集する能力を有するが、これは細胞に結合する機能でもある。この機能を阻害すると、ウイルスは赤血球を凝集できなくなり、細胞への感染は阻止される。中和抗体は HA に結合することでウイルスの感染を阻害し、発症阻止に最も有効に機能するものである。

しかし HA は変異が激しく、流行が毎年起こり、ワクチン株が数年おきに変わるのもこのためである。我々は以前、HA に共通中和エピソードが存在することを初めて発見し、ここを認識するマウスのモノクローン抗体を得た。この抗体は、HA の幹部の中間部に結合し、膜融合活性を阻害するユニークな抗体であった。HA