

0300867A

厚生労働科学研究費補助金  
医薬安全総合研究事業

病原微生物の増殖を阻害する  
人工ヒト免疫グロブリンの開発

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 井原征治  
平成16(2004)年3月

## 目次

### I. 総括研究報告要旨

病原微生物の増殖を阻害する人工ヒト免疫グロブリンの開発 2

井原征治

### II. 分担研究報告

1. HCMV の gB, gH に対するヒト抗体作製 3

井原征治

2. HCMV TRL11, UL119-118 に対するヒト抗体作製 11

錫谷達夫

3. 植物発現ベクターでの抗体大量生産 15

竹腰正隆

4. 熱帯熱マラリア原虫およびアメーバに対するヒト抗体作製 19

橘 裕司

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 23

IV. 研究成果の刊行物・別刷 24

厚生科学研究費補助金 (医薬安全総合研究事業)  
総括・分担 研究報告書

病原微生物の増殖を阻害する人工ヒト免疫グロブリンの開発

主任研究者 井原征治 東海大学医学部 助教授

**総括研究要旨** ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) と原虫の増殖を阻害する人工ヒト抗体の作成を目的とした。井原は、KM マウスを HCMV Towne 株ウイルス粒子、および HCMV 感染細胞で免疫して、ハイブリドーマ法で抗体産生細胞を得て、その中から HCMV を中和する IgG、IgM 抗体産生株を得た。これらの抗体は HCMV Towne 株を効率よく中和し、AD169 株も中和する。特異性は抗 gB 抗体であった。なお、抗 gH 抗体の分離は成功しなかった。錫谷は、日本国内で 20 株の HCMV を分離し、gB と gH 遺伝子の中和エピトープ領域を解析した。この結果、いずれの領域も 2 種の配列が存在する事を見いだした。この結果から、HCMV の抗体療法には少なくとも 4 種の抗体が必要となり、今後の研究指針となる。TRL11,UL119-118 の全遺伝子領域をクローニングし、この DNA を用いて KM マウスを DNA 免疫を行ったが、有為な抗体価上昇は見られなかった。今後は、バキュロウイルス発現系および HIV 発現系で組換えタンパク質を作製し、これで KM マウスを免疫する計画を立てている。竹腰は、タバコ浮遊細胞で抗体発現系を構築し、完全長の抗体の発現に成功した。培養条件を検討した結果、最適条件では 1 L の培養で精製抗体 1.6 mg を得た。植物で作製した抗体の諸性質を分析した結果、動物細胞で作ったものと変わらない活性を保持していた。したがって、組み換えヒト抗体の大量調整が必要な場合は、植物での調整が可能となったことになる。橘は、トランスジェニックマウスを熱帯熱マラリア原虫で免疫して、MSP-1 抗原に特異的に反応するハイブリドーマ株を分離した。これらの抗体は、抗原特異性は高い。しかし、赤血球進入阻止活性は認められなかった。

# 1. HCMV gB, gH に対するヒト抗体作製

主任研究者 井原征治 東海大学医学部 助教授

**研究要旨** ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) 感染症の治療に使用する異種動物のアミノ酸配列を含まない完全ヒトモノクローン抗体医薬品の作製を目的とする。抗体作製は、①精製 Towne 株ウイルス粒子、Towne 株感染細胞で KM マウス (ヒト染色体断片を有し、免疫によりヒト抗体を産生するマウス、キリンビールより供与) を免疫する方法、および②gB, gH 遺伝子を発現ベクターにクローニングして、この DNA を KM マウスへ導入する DNA 免疫を行った。①の方法で、抗体価の上昇後、ハイブリドーマ法で抗体産生細胞を作製した。約 1,600 株のハイブリドーマ細胞をスクリーニングした結果、HCMV Towne 株を中和する 1 株の IgG 産生細胞、3 株の IgM 抗体産生細胞を分離した。これらの細胞が分泌する抗体の特異性を調べた結果、gB タンパク質に特異的に反応した。②では抗体価の上昇は認められなかった。

## A. 研究目的

骨髄移植では、患者に超致死量の免疫抑制剤の投与と放射線の照射を行い、骨髄細胞を死滅させる。免疫能の枯渇により、患者は感染症を生じやすくなり、特に HCMV 感染症は患者の多くで発生し、HCMV 間質性肺炎は発症すると致命的な経過をたどることが多く、その治療は現在でも困難を極めている。

日本人は成人の 80~90% がすでに HCMV に感染している。そのため、患者の多くが潜在 HCMV を持ち、同時に、輸血によっても外来性の HCMV に曝露されやすく、HCMV 感染症が高率で発生する原因となる。HCMV 感染症には主にガンシクロビルが使用されるが、重大な副作用があるため、全例に予防措置として用いることはできず、間質性肺炎が予想される患者にのみ予防の目的で使用されている。間質性肺炎を発症した場合、致命率はガンシクロビル単独では 80%以上であったが、ガンシクロビルと

HCMV 高抗体価ガンマグロブリン製剤を併用すると 50%以下に改善され、抗 HCMV 中和抗体は間質性肺炎に有効である。しかし、ガンマグロブリン製剤中の中和抗体量は、全蛋白質に対しては少量と考えられること、また抗体価はロット間で差があり、かつ高価である、などの問題点がある。これらの問題点は、特異性に優れ中和活性の高い人工ヒト抗体を作成すれば解決できる。抗体医薬は、疾病を誘発する原因タンパク質に特異的に結合して機能を失活させ、その結果治療効果が発揮される。現在認可・販売されているヒト抗体医薬は世界で 10 種類ある。内訳は、キメラ抗体 4 種、ヒト化抗体 5 種、完全ヒト抗体 1 種である。キメラ抗体とヒト化抗体にはマウス配列が含まれるが、このため、ヒト抗マウス抗体が生ずる可能性は潜在的に存在すると思われる。従って、次世代の抗体医薬は完全ヒト抗体が中心となるであろう。この観点に立って、我々は抗 HCMV 完全ヒト抗体の作製を開始した。

本研究の最終目標は、骨髄移植で深刻な問題を引き起こす HCMV 感染症の予防と治療のために、HCMV の全ての中和エピトープに対する抗体を作製し、それらを混合して高力価で強力な HCMV 増殖抑制力を持つガンマグロブリン製剤を開発することである。

## B. 研究方法

異種動物の配列を含まない完全ヒトモノクローナル抗体の作製には、ヒト染色体断片を持ちヒト抗体を作る KM マウスを免疫してヒト抗体遺伝子の分離を行う。HCMV の中和エピトープは gB と gH にあることが知られている。また、gB には N 端に 1 カ所、C 端に 1 カ所、計 2 カ所の中和エピトープがある。また、gH では中和エピトープ領域のアミノ酸配列が異なる 2 種類の株 (Towne 株型と AD169 株型) が存在し、一方に対する抗体は他方には効果がない。従って、抗 gH 抗体は 2 種分離する必要がある。

### KM マウス

6~10 週齢の KM マウス (キリンビールより提供を受けた) を使用した。

### 免疫抗原

実験は 2 種の方法に分かれている。第 1 の方法では、KM マウスを免疫し、脾臓を使用しハイブリドーマ細胞を作製する方法である。第 2 には DNA による免疫を行い、抗体産生を誘発させる方法である。第 1 の方法では、精製 HCMV ウイルス粒子、HCMV 感染細胞を免疫抗原とした。第 2 では、gB (AD169 株)、gH (Towne, および AD169 株) 遺伝子から膜貫通部分を欠損させ、これを pBudCE4 ベクターにクロー

ニングし、KM マウス後肢に electroporation で DNA を浸透させた。なお各種抗原の調整は以下の通りである。

- ① HCMV Towne 株 精製ウイルス粒子。  
ヒト胎児肺細胞 (HEL) に HCMV Towne 株を moi 0.05 で感染し、Eagle MEM 2%FCS で置き換えた後に、5% CO<sub>2</sub> 培養器、37°C で培養を続ける。CPE が全面に広がった時点から 2 日目で培養上清を採取し、HCMV を蔗糖密度勾配遠心で精製する。この精製ウイルスで、KM マウスを免疫する。
- ② HEL に HCMV Towne 株を moi 10 で感染し、感染 7 日目に細胞を採取し、PBS に懸濁する。その後、超音波破碎機で細胞を処理し、これを免疫抗原とした。
- ③ gB, gH 遺伝子は膜貫通領域を欠損させたものをつくり、それを pBudCE4 発現ベクターにクローニングした (この部分は錫谷が担当)。gB, gH の中和エピトープ領域の 1 2 ないし 1 3 アミノ酸部分を pET32a ベクターにクローニングし、チオレドキシンと融合した形で発現・精製し、ELISA に使用した。

### 免疫

抗原を Freund complete adjuvant と混合し、KM マウスの両肩に各 100  $\mu$ l、計 200  $\mu$ l、抗原量はウイルス粒子で 40  $\mu$ g/匹、感染細胞が 100  $\mu$ g/匹、2 週間に 1 回の間隔で免疫した。抗体価の測定は、免疫後 7~10 日後に採血し行った。抗体価が十分上昇したマウスは、最後の免疫として抗原のみで免疫し、最終免疫後 4~7 日後に sacrifice し、脾臓 RNA を抽出して細胞融合 (第 1 実験) に使用した。

DNA 免疫は、KM マウスの後肢に DNA

液 20~50  $\mu$ l (20~50  $\mu$ g)、2 週間に 1 回の間隔で注入し、electroporation で細胞内に浸透させた。抗体価の測定は、免疫後 10 日後に採血し行った。

#### 抗体価の測定

採血した血液から血清を分取し、抗 HCMV 抗体価の上昇を ELISA 法で計測した。抗原としては、(1) HEL 非感染細胞抽出液、(2) HCMV 感染細胞抽出液、(3) 合成オリゴペプチド (中和エピトープとして同定されている領域 ; Towne 株 gB 64-84 アミノ酸(aas), 560-589aas, 600-630aas, また Towne 株および AD169 株の gH 28-48aas) を ELISA プレートに 1  $\mu$ g 塗布し使用した。

#### ハイブリドーマ細胞の作製

抗体価の上昇が確認された段階で、マウスから脾臓を摘出し、マウスミエローマ細胞 P3-X63-Ag8.653 細胞と細胞融合しハイブリドーマ細胞を作製した。その他の培養条件とスクリーニングは常法に従って行った。スクリーニングの時は DMEM 15% FCS で培養を行い、モノクローナル細胞にしたあとは、一部は無血清培地を使用した。

#### 免疫沈殿

HEL に Towne 株を moi 10 で感染し、感染後 72 時間後に培地をメチオニン不含に変え、

<sup>35</sup>S-メチオニンを加え 2 時間ラベルした。細胞をハーベストして可溶化処理し、その遠心上清に、分離した抗体を加え免疫沈殿を行った。4℃で 12 時間反応させた後に proteinG-spharose を加え、抗原-抗体複合物を回収した。電気泳動用サンプルバッファーを加えて煮沸して抗原を遊離させ、これを 10% SDS-PAGE で泳動した。ゲルを乾燥後、オートラジオグラフィーをして、

抗体が特異的に反応したタンパク質を同定した。

#### (倫理面への配慮)

血液提供者には人権に十分配慮し、研究内容を説明し、同意と承認を書面で得ている。本研究は、東海大学医学部倫理委員会の承認を得た。また部外者の委員による調査でも、「可」の判定を受けた。動物実験は、東海大学動物実験委員会の指針に基づいて実験計画書を提出し承認を得、また、動物の扱いは動物愛護の精神を理解し行っている。本研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守している。

#### 研究結果

**第 1 の実験** KM マウスを(a)精製 HCMV Towne 株ウイルス粒子、(b) HCMV Towne 株感染細胞で免疫した。その結果、免疫 3 回目で抗体価の上昇がみられ、その後の免疫で抗体価は上昇を続けた。抗体価が上昇したマウスは順次 sacrifice し、脾臓を摘出して、常法に従いマウスミエローマ細胞 P3-X63-Ag8.653 と細胞融合しハイブリドーマ細胞を作製した。融合した細胞を 1600 穴まいた。培養上清を分析した結果、約 200 穴が HCMV 抗原に陽性を示し、そのうち、特に ELISA 値の高い 20 穴を選び中和活性を測定した。その結果、4 穴に中和活性が認められた。各穴の細胞は、limiting dilution をして純化したモノクローナルハイブリドーマ細胞とした。これらの細胞が産生する抗体のサブクラスを分析した結果、IgM が 3 株、IgG が 1 株であった。

#### ウイルス中和実験

4 株の中和抗体から、IgM が 2 株 (クローン v14、v25)、IgG (クローン i69) を選び、中和活性をプラーク定量法により詳細

に分析した。その結果を表 1 に示す。

表 1.

モノクローナル抗体の抗 HCMV 中和活性

(a) Towne 株に対するプラーク阻害率

抗体濃度	v14	v25	i69
2 $\mu$ g/ml	75	71	43
0.5 $\mu$ g/ml	45	64	15

(b) AD169 株に対するプラーク阻害率

抗体濃度	v14	v25	i69
2 $\mu$ g/ml	35	50	19
0.5 $\mu$ g/ml	14	26	20

表 1 に示したとおり、この抗体クローンは Towne 株をよく中和する。同時に AD169 株も中和するが、Towne 株に比べて弱かった。

#### 抗体の特異性

3 株 (IgM 2 株: クローン v14、v25)、IgG : クローン i69) の対 HCMV 特異性を蛍光抗体染色法で検討した。HCMV は Towne 株、および AD169 株を使用した。その結果、非感染胎児肺細胞にはいずれのクローンも反応しないが、Towne 株および AD169 株感染細胞には反応し、核外に特異的な蛍光を観察した (図 1)。この反応は Towne 株、および AD169 株の両感染細胞で観察できた。つまり両株に共通な抗原を認識していることになる。

また、図 1 に示した細胞は感染 3 日目のものであるが、感染 24 時間の細胞でも蛍光は観察できる。感染 24 時間は、ウイルス増殖に関しては感染後期であり、従って、分離した抗体は感染後期のウイルス抗原に特異的であることも判明した。

さらに、核外あるいは細胞膜付近が染色さ

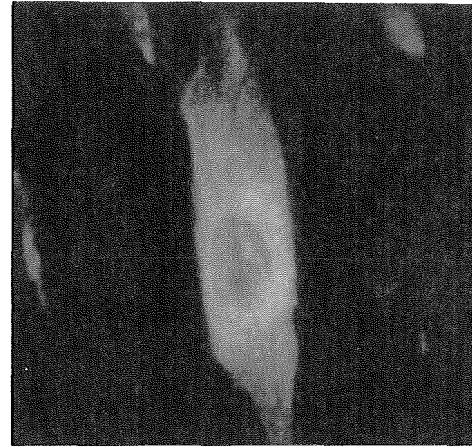


図 1. HCMV 感染細胞の蛍光抗体法による染色

れるが、この染色像は、感染前初期や感染初期の像とは異なるため、抗体が認識するタンパク質は感染後期に発現するタンパク質と推測できる。次に、抗体が認識する HCMV タンパク質の同定を試みた。ELISA では、gB、gH 関連合成オリゴペプチド、中和エピトープ部分とチオレドキシンの融合タンパク質など各種抗原を用意したが、抗体はこれらのいずれとも反応しなかった。また、Western blot 分析でも HCMV 感染細胞には反応するが、上記抗原のいずれとも反応しなかった。この結果ら、分離した抗体は conformational な抗体の可能性が考えられた。

そこで、免疫沈殿により抗体が特異的に反応するタンパク質の同定を行った。Towne 株感染 HEL 細胞を、感染 72 時間に  $^{35}$ S-メチオニンでラベルし、細胞の抽出物に v14、v25、i69 抗体を加え免疫沈殿を行った。Positive control として、抗 gB 抗体の TI-23 抗体 (帝人) を用いた。SDS-PAGE 泳動後オートラジオグラフィーをしたが、その結果を図 2 に示す。抗 gB 抗体の TI-23 は Towne 株感染細胞で 140kDa の gB を特異的に沈殿するが、非感染細胞には反応しない。一方、V14、v25、i69 はいずれも感染細胞で 140kDa のタンパク質を沈殿した。この結果、および、他の結果を総合して、

分離したヒト抗体は gB を認識する conformational な抗体と判断した。

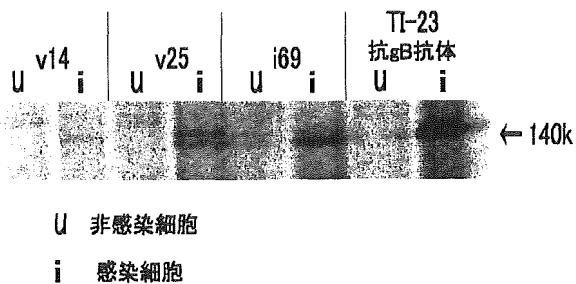


図2. 免疫沈殿法によるHCMV抗原の分析

**第2の実験** gB (AD169 株)、gH (Towne, および AD169 株)遺伝子から幕貫通部分を欠損させ、これを pBudCE4 ベクターにクローニングした。

このプラスミッドDNAを electroporation で KM マウス後肢に浸透させ、DNA 免疫を行った。しかし、DNA 免疫を 10 回行ったが、どの DNA に対しても有為な抗体価の上昇が見られなかった。この結果から、DNA 免疫法は KM マウスでは抗体産生を誘発しないと判断し、実験を中止した。

#### D. 考察

精製ウイルス粒子、ウイルス感染細胞で KM マウスを免疫し抗 gB 抗体の分離に成功した。しかし、目的の一つである抗 gH 抗体は、抗体価の上昇も検出できなかった。我々は精製ウイルス粒子やウイルス感染細胞以外にも、大腸菌で発現した各種組み換えタンパク質などで免疫したが、いずれも KM マウスには抗体の産生はみられなかった。また、MAP で免疫した場合は、抗体はできたものの、特異性が無かったり、特異性はあるが中和活性が全く無いものであった。これらの抗原の中には、Balb/c では容易に抗体が誘導されるものがある。こ

れらをまとめると、KM マウスは、ウイルス粒子や感染細胞では抗 gB 抗体を産生するが、大腸菌で作製した抗原では抗体を作らない。また同時に、KM マウスで産生した抗体は、ウイルス感染細胞には反応するが、大腸菌で作製した抗原には反応しない。エピトープを含む組み換えタンパク質で目的抗体を迅速に得られれば、研究は急速に進められる。以上のことから、KM マウスの免疫は、抗原の選択が特に重要なのではないかと考えられた。免疫に使用する抗原は糖鎖が付加していることが必要だったり、3次構造が特に重要な要素なのかもしれない。これらのことを考え、現在はバキュロウイルスと動物細胞の発現ベクターで組み換えタンパク質を調整しており、調製でき次第、KM マウスを免疫する予定である。免疫をした KM マウスの脾臓細胞を使用してハイブリドーマ細胞を作製したが、スクリーニングにより中和抗体産生株4株を分離した。本報告書では、その中の3クローンの分析結果を示した。DNA sequencing や抗体タンパク質の分析結果からこれらの抗体はヒト抗体である。いずれも中和活性が確認された。ただし、免疫抗原に使用した Towne 株は効率よく中和するが、抗原性の異なる AD169 株の中和は弱かった。

ELISA、蛍光抗体法、および免疫沈殿による分析を行った結果、分離した抗体は抗 gB 抗体であると断定した。HCMV gB には約 10 アミノ酸からなる中和エピトープが 2 箇所にある。分離した抗体は、Towne 株感染細胞の抽出物には、ELISA 法、Western blot 法、免疫沈殿で gB と特異的に反応するが、大腸菌で発現させた中和エピトープを含む組み換えタンパク質とはいずれの方法でも反応は確認できなかった。



これに関してはいくつかの作業仮説が考えられる。

1. 分離した抗体は linear な蛋白質は認識できず、conformational な蛋白質と反応する。
2. KM マウスはヒトの MHC とは異なるため、従来知られている中和エピトープのみからなるオリゴペプチドで免疫しても、誘導された抗体はこのうちの一部しか認識せず、かつ中和活性が認められないという結果を得ている。この事実から考えると、今回得られた中和クローンは、gB の中和エピトープ近辺のアミノ酸配列を認識している可能性があり、この場合 IgM 抗体は 5~6 量体を形成して巨大分子となり、その結果中和エピトープ部分をおおってしまう可能性が考えられる。この結果、中和活性が発揮されるとする考え方ができる。
3. 中和抗体を産生する v14 細胞から RNA を抽出し、RT-PCR で抗体遺伝子の Fab 領域をクローニングした。このプラスミッドを大腸菌に導入して Fab 抗体を誘導したが、案に相違してこれには HCMV 感染細胞に対する反応性は見られなかった。DNA sequencing の結果からは間違った読み枠はな区、タンパク質はできている。そこで考えられるのは、avidity の可能性である。IgM は上記通り巨大分子を形成し、その結果、単一分子の 2 万倍もの活性を示すことがあるとされる。Fab 分子で反応性を確認できなかったのは一量体であるからではないかと考えれば、上記の結果は説明できる。

今回、KM マウスを利用して、HCMV を中和するヒト抗体の作製に成功した。今後は、より強い中和活性を持ち、臨床の現場で使用しうる抗体の作製を目指していく。

## E. 結論

KM マウスを HCMV Towne 株のウイルス粒子および感染細胞で免疫しハイブリドーマ細胞を作製した。この中から、100 クローンを越す HCMV に特異的な抗体クローンを分離し、その中の約 20 クローンを分析した結果、HCMV を中和する活性を有するヒト IgM 抗体 3 クローン、IgG 抗体 1 クローンを分離した。これらの中和活性は、Towne 株に対しては強く、AD169 株に対しては弱かった。これらの抗体が認識するタンパク質は gB である。

以上、HCMV 感染症に対する抗体医薬の開発に第一歩を踏み出せたと考えている。

## F. 健康危険情報

該当無し。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Nagatsuka Y, Hara-Yokoyama M, Kasama T, Takekoshi M, Maeda F, Ihara S, Fujiwara S, Ohshima E, Ishii K, Kobayashi T, Shimizu K and Hirabayashi Y. Carbohydrate-dependent signaling from the phosphatidylinositol-based microdomain induces granulocytic differentiation of HL60 cells. Proc Natl Acad Sci USA., 100 (13):7454-7459, 2003

Tachibana, H., Watanabe, K., Cheng, X.-J., Tsukamoto, H., Kaneda, Y., Takeuchi, T., Ihara, S. and Petri, W. A., Jr. VH3 gene usage in neutralizing human antibodyies specific for the

*Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin heavy subunit. Infect. Immun., 71 (8): 4313-4319, 2003

Tachibana, H., Takekoshi, M., Cheng, X.-J., Nakata, Y., Takeuchi, T. and Ihara, S. Bacterial expression of a human monoclonal antibody-alkaline phosphatase conjugate specific for *Entamoeba histolytica*. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 11 (1): 216-218, 2004

## 2. 学会発表

坂本朋昭、竹腰正隆、前田史子、長瀬久美子、井原征治 抗HCMV抗体医薬を目指して  
第18回ヘルペスウイルス研究会 2003  
6/14 香川県 小豆島

Tachibana, H., Watanabe, K., Cheng, X.-J., Kaneda, Y., Takeuchi, T., Ihara, S. and Petri, W. A., Jr. Molecular characterization and expression of neutralizing human antibodies specific for the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin heavy subunit. 10th International Conference on Human Antibodies and Hybridomas. 2003 10

Tachibana, H., Takekoshi, M., Cheng, X.-J., Takeuchi, T. and Ihara, S. Bacterial expression of a human monoclonal antibody-alkaline phosphatase conjugate specific for *Entamoeba histolytica*. 10th International Conference on Human Antibodies and Hybridomas. 2003 10

Yasuko Nagatsuka, Masataka Takekoshi, Fumiko Maeda, Seiji Ihara, Kazufumi Shimizu and Yoshio Hirabayashi Stimulation with monovalent Fab fragment rGL-7 reconstructed from EBV-derived human monoclonal anti-i antibody mAb GL-2 induces granulocytic differentiation of HL60 cells via phosphatidylglucoside-based membrane domain. The 10th. International

Conference Human Antibodies and hybridomas 2003 10/8-10 Osaka

坂本朋昭、竹腰正隆、前田史子、長瀬久美子、井原征治 ヒトサイトメガロウイルス感染症の予防と治療を目的とした抗HCMV完全人工ヒト抗体の作製 第51回日本ウイルス学会学術集会 2003 10/29 京都

竹腰正隆、前田史子、坂本朋昭、長瀬久美子、井原征治 ヒトサイトメガロウイルスに対するヒト中和抗体遺伝子の分離の試み 第26回日本分子生物学会年会 2003 12/12 神戸

Tachibana, H., Takekoshi, M., Cheng, X.-J., Takeuchi, T. and Ihara, S. Bacterial expression of a human monoclonal antibody-alkaline phosphatase conjugate specific for *Entamoeba histolytica*. 11th International Congress on Infectious Diseases. 2004 3

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得（出願予定）  
植物細胞での抗HBs抗体の生産
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 2. HCMV TRL11,UL119-118 に対するヒト抗体作製

分担研究者 錫谷 達夫 福島県立医科大学 医学部 微生物学講座 教授

**研究要旨** サイトメガロウイルス（CMV）増殖で重要な役割を演ずる3種のタンパク質に注目し、これらに対する抗体作製をめざした。注目したのは（1）中和抗体の対象となる gB、および（2）gH、（3）抗体の作用を弱める2種の Fc receptor、である。

日本人から CMV 20 株を分離し、gB の中和エピトープ2カ所と gH 中和エピトープ1カ所の分析をした、その結果、いずれにも2つのタイプが存在した。従って、抗体療法は少なくとも2種以上の抗体をブレンドしなければ全ての株に対応できないことが判明した。

また、2種の Fc receptor（TRL11、UL119-118）遺伝子の膜貫通部分を欠如させ、大腸菌で発現させた。この結果、TRL11 は発現に成功した。そこで、このタンパクをKMマウスに免疫したが、抗体価の上昇は認められなかった。これらの receptor については、真核細胞発現系が必要と考えられた。

### 研究目的

ヘルペスウイルスの1種、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）は日本人成人で約70～80%が感染しているが、病原性は低く、通常は不顕性感染で特に問題は発生しない。しかし、臓器移植患者や AIDS 患者の様な免疫能が極度に低下した人の場合は致死的な日和見感染症を起こすウイルスである。また、300 の出生に1人の割合で垂直感染（胎児感染）が起こり、その10%の症例では奇形や聴覚障害を発症（先天性 CMV 感染症）することから、今後解決すべき主要な感染症の1つと考えられている。治療薬として CMV の増殖を抑制するガンシクロビルが用いられるが、副作用が強く、多くの問題が生ずる。そこで、安全な治療法として抗体療法が注目される。In vivo で CMV の増殖を抑制するには、中和抗体（抗 gB、gH 抗体）と抗 Fc receptor 抗体で

あると考えられ、これらの作製を目的に研究を開始した。

なお、CMV では、gB、gH に多様性があり、1つの株に対する抗体が全ての株に有効ではないことに注意すべきである。そこで本研究では、基礎研究からこれらの問題点の解決法を明らかにし、有効なヒト抗体を作製することを目的とした。

### B. 研究方法

1. サイトメガロウイルスの業室株は AD169 株、Towne 株、Davis 株、また臨床分離株 20 株を用いた。

2. gB、gH 遺伝子を PCR 法で増幅し、塩基配列を解析した。

3. PCR で gB、gH の中和エピトープを増幅し、pGEX ベクターにクローニングし GST との融合タンパクとして大腸菌で発現させた

後、アフィニティーカラムで精製した。

4. CMV の2つの Fc receptor (TRL11、UL119-118) の細胞外ドメイン領域を RT-PCR 法で増幅して pMAL-c2 ベクターに組み込み、大腸菌で Maltose 結合タンパクとの融合タンパクとして発現し、アフィニティーカラムで精製した。

5. TRL11 と UL119-118 遺伝子の receptor の細胞外ドメイン領域を PCR 法 (TRL11) , RT-PCR 法 (UL119-118) で増幅後、pBudCE4 発現ベクターに組み込んだ。このプラスミッド DNA を electroporation で KM マウス後肢に浸透させ、DNA 免疫を行った。

6. 大腸菌で発現し、精製したタンパクを 96-well plate に結合させ、ELISA を行った。

7. 大腸菌で発現し、精製したタンパクを KM マウスに接種し、免疫した。

### (倫理面への配慮)

血液提供者には人権に十分配慮し、研究内容を説明し、同意と承認を書面で得ている。本研究は、福島県立医科大学医学部倫理委員会の承認を得た。本研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守している。

## C. 研究結果と考察

### 1. gB 遺伝子の多型性 :

gB には4種の subgroup があり、各々は異なる抗原性を持つ可能性があるとして報告されている。そこで、臨床分離株 20 株を分離し多形成を調べた。その結果、Towne 株と同じ型の Group1 は 17 株、AD169 株と同じ Group2 は 0、Group3 は 3 株、Group4 は 0 であった。さらに gB 上のエピトープ領域である AD-1、AD-2 におけるアミノ酸配列の違いを比較した。AD-1 領域で Towne 株と AD169 株は同じアミノ酸配列であったが、臨床分離株の中

に 585 番目のアミノ酸が Ala から Val に、同時に 613 番目の Leu が Phe に置換された株が 3 株認められた。AD-2 に領域においては Towne 型と AD169 型の 2 種が約半数ずつ存在した。この結果は、3つの指標それぞれにおいて2種に区分できるウイルスが日本人に感染しており、いずれの抗原に対する抗体療法を確立するにしても、少なくとも2種類の抗体を作製しブレンドしなくてはならないことを示す。

### 2. gH 遺伝子の多型性 :

gH の中和エピトープを調べると、臨床分離株 20 株のうち 13 株は AD169 と同じ、7 株は Towne と同じであった。また、gB が Group3 に分類された 3 株の gH はすべて AD169 型であった。したがって、gH に対する抗体も少なくとも2種なければ全ウイルスには対応できない。

### 3. gB、gH、TRL11、UL119-118 遺伝子のクローニングと発現・精製 :

1, 2 の結果をふまえ、gB の中和エピトープ、AD-1 と AD-2、gH の中和エピトープの



計 3 つの遺伝子、それぞれ 2 タイプを pGEX 5X-3 ベクターにクローニングし、大腸菌で GST との融合蛋白として発現させた。それぞれをアフィニティークロマトグラフにて精製し、SDS-PAGE で解析したのが上図である。左から、GST、AD-2 の 2 つのタイプ、gH の 2 つのタイプで、AD-1 は不溶化したため精製できなかった。

Fc receptor TRL11 と UL119-118 遺伝子は

pMAL-c2 ベクターにクローニングし、maltose binding protein との融合タンパクとして大腸菌で発現させたが、TRL11 は発現（不溶性）したが、UL119-118 は発現しなかった。不溶化TRL11 タンパク質はを 8M 尿素で可溶化し、透析後、アフィニティーカラムで精製した。これを抗原としてKMマウスを免疫したが、抗体価の上昇は認められなかった。プラスミッド DNA を electroporation で KM マウス後肢に浸透させ、DNA 免疫を行った。しかし、10 回の DNA 免疫を行ったが、TRL11 と UL119-118 のいずれの DNA でも有為な抗体価の上昇が見られなかった。この結果から、DNA 免疫法は KM マウスでは抗体産生を誘発しないと判断し、実験を中止した。

#### 4. 中和エピトープによる ELISA 系作製：

3. で精製された抗原に対する抗体価を健康なボランティア 10 人より分離された血清を使って ELISA 法で測定した。AD-2 については総じて Towne, AD169 型両方の抗体を有しているものが多かったが、gH についてはどちらか一方、もしくは両方検出されない者が認められた。

#### D. 結論

日本人から分離される CMV の 3 カ所の中和エピトープには、それぞれ 2 つのタイプが存在し、抗体療法を確立するためには、少なくとも 2 種の抗体を作製し、混合して用いる必要性がありそうである。

大腸菌では native な形での Fc receptor の発現は困難であった。Baculovirus や HIV の発現系を使用し真核細胞で発現する必要があると思われた。

#### E. 健康危険情報

#### 該当なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表 【原著】

Suzutani T, Ogasawara M, Yoshida I, Azuma M, Knox YM. Anti-herpesvirus activity of an extract of *Ribes nigrum* L. *Phytother. Res.* 17: 120-122 (2003)

Suzutani T, Ishioka K, De Clercq E, Ishibashi K, Kaneko H, Kira T, Hashimoto K, Ogasawara M, Ohtani K, Wakamiya N, Saijo M. Differential mutation patterns in the thymidine kinase and DNA polymerase genes of herpes simplex virus type 1 clones passaged in the presence of acyclovir or penciclovir. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 1707-1713 (2003)

Hayashi K, Mori M, Knox YM, Suzutani T, Ogasawara M, Yoshida I, Hosokawa K, Tsukui A, Azuma M. Anti influenza virus activity of a red-fleshed potato anthocyanin. *Food Sci. Technol. Res.* 9: 242-244 (2003)

Murata M, Gouda C, Yano K, Kuroki S, Suzutani T, Katayama Y. Piezo electric sensor for endocrine-disrupting chemicals using receptor-cofactor interaction. *Anal. Sci.* 19: 1355-1357 (2003)

Kaneko H, Mori S, Suzuki O, Iida T, Shigeta S, Abe M, Ohno S, Aoki K, Suzutani T. The cotton rat model for adenovirus ocular infection: antiviral activity of cidofovir. *Antiviral Res.* 61: 63-66 (2004)

Yokota S, Yokosawa N, Okabayashi T, Suzutani T,

Miura S, Jimbow K, Fujii N. Induction of suppressor of cytokine signaling-3 by herpes simplex virus type 1 contributes suppression of interferon signaling pathway and replication of virus. *J. Virol.* in press (2004)

Koyano S, Suzutani T, Hirano Y, Araki A, Yagyu K, Muroto K, Inoue N, Fujieda K. Retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection by using dried umbilical cords. *Pediatr. Infect. Dis. J.* in press (2004)

#### 【総説】

錫谷 達夫. 単純ヘルペスウイルス感染症にワクチンは必要か? *東北のコロニー* 32: 7-11 (2003)

#### 2. 学会発表

森修一、茂田士郎、遠藤江美子、錫谷達夫. PEG-Interferon の抗ウイルス作用の検討 - In Vitro における各種抗ウイルス剤との併用効果を中心に - 第13回抗ウイルス化学療法研究会 津田沼 (2003)

西條政幸、錫谷達夫、森川茂、前田秋彦、倉根一郎. 2番目のメチオニンから翻訳されるチミジンリン酸化酵素を発現する単純ヘルペスウイルス1型の薬剤感受性. 第13回抗ウイルス化学療法研究会 津田沼 (2003)

錫谷達夫、石岡賢、Erik De Clercq、石橋啓、金子久俊、森修一、西條政幸. アシクロビル、ペンシクロビル存在下で継代培養した単純ヘルペスウイルス1型チミジンキナーゼ、

DNA ポリメラーゼ遺伝子内突然変異の解析. 第13回抗ウイルス化学療法研究会 津田沼 (2003)

橋本浩一、細矢光亮<sup>1)</sup>、金子久俊、錫谷達夫 ( <sup>1)</sup> 福島医科大学小児科) : Respiratory Syncytial Virus 感染マウスモデルにおける Prostaglandin I2 の RSV 感染症への影響. 第51回日本ウイルス学会、京都、2003

金子久俊、橋本浩一、林皓三郎<sup>1)</sup>、甲木和子<sup>2)</sup>、川名 尚<sup>3)</sup>、青木功喜<sup>4)</sup>、大野重昭<sup>5)</sup>、錫谷達夫 ( <sup>1)</sup> 神戸市環境保健研究所、<sup>2)</sup> 熊本県保健環境科学研究所、<sup>3)</sup> 帝京大学溝口病院産婦人科、<sup>4)</sup> 青木眼科、<sup>5)</sup> 北海道大学大学院視覚器病学分野) : 単純ヘルペスウイルス感染症における1型、2型混合感染の検討. 第51回日本ウイルス学会、京都、2003

錫谷達夫. サイトメガロウイルスの最近の話題. 第57回日本細菌学会東北支部総会、秋田市、2003

#### G 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金 (医薬安全総合研究事業)  
分担研究報告書

植物発現ベクターでの抗体大量生産

分担研究者 竹腰 正隆 東海大学 医学部 講師

**研究要旨** 組み換えヒト抗体の大量生産法を植物細胞で構築する問題に取り組んだ。植物発現ベクターに完全分子のヒト抗体遺伝子をクローニングし、たばこ浮遊細胞で培養した結果、1Lから精製抗体16mgを調製することができた。得られた抗体は親株であるB細胞産生抗体と抗体活性に差異が認められなかった。

**A. 研究目的**

組み換えヒト抗体を植物細胞で大量培養し、精製する方法を構築することを目的とする。抗体の生産は、現時点では動物培養細胞を利用して行われているが、この方法の欠点として大量培養が高価なこと、また培養に用いた牛血清由来成分からのBSE等の感染症の恐れがあることである。植物での抗体産生は、これらの欠点を回避できる。

**B. 研究方法**

我々が分離した抗HBs IgG抗体(CL4Mab抗体)産生ヒト細胞より、抗HBs抗体遺伝子をクローニングした。この遺伝子のシグナルペプチド領域、ターミネーター領域を植物のものに変え、植物発現ベクターにクローニングした。アグロバクテリウムを介してタバコ培養細胞BY-2に導入する。タバコ細胞を浮遊培養し、培地中および細胞内から抗HBs抗体を精製した。植物発現抗体とその親抗体(培養細胞産生CL4Mab抗体)と抗体活性の比較検討を行う。

アレキサンダー細胞はHBVに感染した人の肝臓から樹立された細胞株で、細胞表面にHBsが発現している。この細胞を使用して、第1に、抗体の親和性に関する分析をFACSで行い、第2に、アレキサンダー細胞に抗体

を反応させ、次に補体を加え細胞の傷害の程度をセルカウンティングキットを用いて測定した。

**(倫理面への配慮)**

血液提供者には人権に十分配慮し、研究内容を説明し、同意と承認を書面で得ている。本研究を説明し、同意と承認を書面で得ている。本研究は、東海大学医学部倫理委員会の承認を得た。また部外者の委員による調査でも、「可」の判定を受けた。本研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守している。

**C. 研究結果**

(1) タバコ浮遊細胞に抗HBs抗体遺伝子を導入した細胞を得た。この細胞では、培養上清および細胞の両方に抗HBs抗体

(B303)の産生が確認される。培養条件を検討した結果、最適条件では1Lの培養液、10日間で精製抗体16mgを調製された。精製抗体をSDS-PAGEで分析すると、親抗体

(CL4Mab)と同じ分子量を示し、希釈系列のELISAでは親抗体と同等の活性を示した。抗体の解離常数も両者で差はなかった。以上の結果より、植物細胞で産生されたB303は親株のCL4Mabと同じ性状を示すと



判断した。

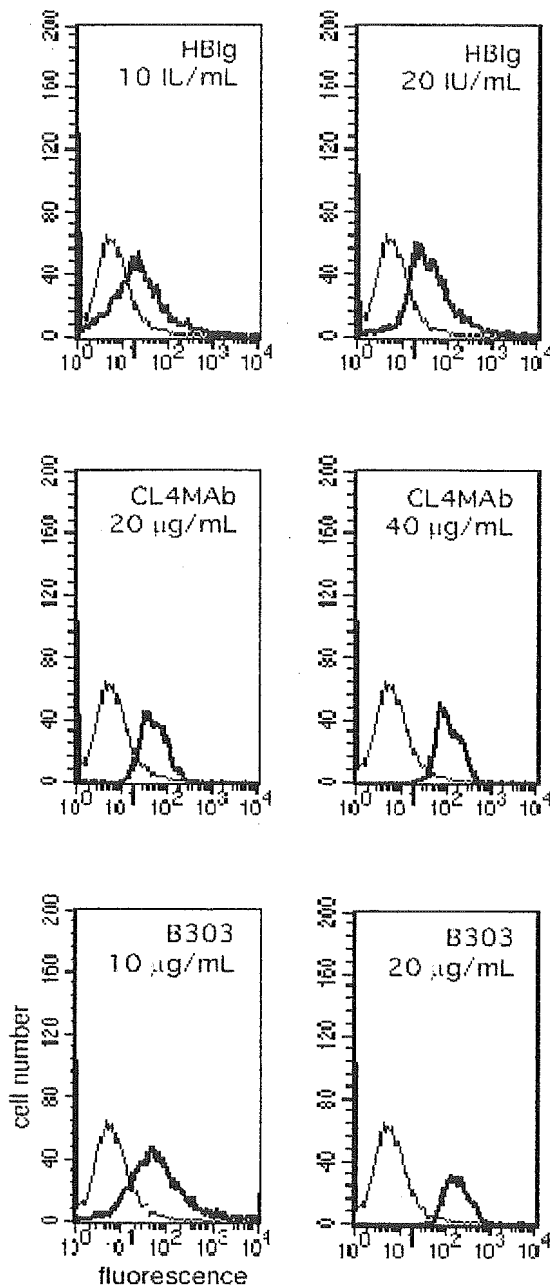


図 1. B303とCL4Mabの抗原親和性

また、ヒト抗体の大量調製が植物で可能であることが示された。

(2) 植物で作ったB303抗体の抗原に対する親和性を、動物細胞で産生された親株のCL4Mabと比較した。アレキサンダ

一細胞は細胞表面にHBsが発現しているが、このHBsに対するCL4MabとB303の反応性をFACSを用いて調べた。その結果を図1に示す。

ネガティブ抗体ではピークのシフトは見られない(図の薄い線)。これに対し、HBV感染治療に使われる高ガンマグロブリン製剤(HBIg)を10IU/mL反応させた場合には、ピークは右にシフトする。濃度を20IU/mLに高めると、シフトはさらに増大する。CL4Mab (20 µg/mL)でも同様のシフトが見られる。また、B303でもシフトがあり、CL4Mabと同程度のシフトは10 µg/mLの濃度でみられた。また、シフトには濃度依存性が見られる。この結果から、植物で産生した抗体は、親株のCL4Mabの示す特異性を保持していることが判明した。

(3) B303抗体の細胞障害活性を分析した。その結果を図2に示す。縦軸は細胞傷害死の割合を示している。ネガティブな抗体(TI-23)では補体依存性細胞障害はほとんど認められない。これに対し、高ガンマグロブリン製剤(HBIG)を5,10,20IU/mL使用した場合は、各々19%,26%,44%の細胞死が認められた。CL4MabとB303は10,20,40 µg/mLを使用したか、細胞障害活性は両者でほぼ同様であった。この結果から、B303は親株のCL4Mabと同等の補体依存性細胞障害活性を保持していることが判明した。

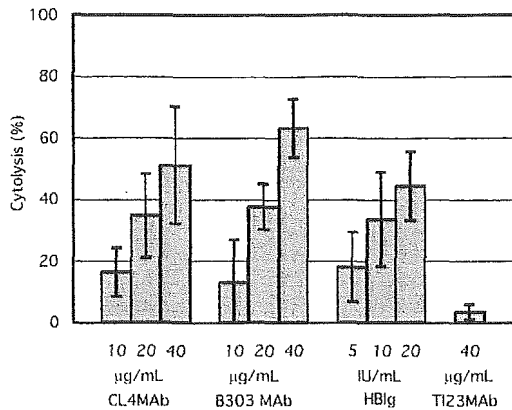


図 2 細胞障害活性の測定

#### D. 考察

完全分子のヒト抗体を、植物（カルス）浮遊細胞で発現させたが、産生量が多いこと、また抗体の回収・精製が非常に簡便であることなど利点が多く、同法でヒト抗体の大量生産が可能である。今後は、培地中への抗体の放出量を増大させる研究をすすめたい。また、植物では抗体分子の Fc 領域への糖鎖の付加の形式が動物細胞とは異なると言われているので、動物細胞の糖遺伝子を植物に導入するなどの改良を行いたい。

#### E. 結論

植物でヒト抗体の発現に成功した。この抗体 B303 は親株の CL4MAb と同じ抗体特異性を有していた。植物細胞での抗体産生量が多い。同法を使用して、HCMV 中和抗体の植物での産生を検討したい。

#### F. 健康危険情報

該当無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nagatsuka Y, Hara-Yokoyama M, Kasama T, Takekoshi M, Maeda F,

Ihara S, Fujiwara S, Ohshima E, Ishii K, Kobayashi T, Shimizu K and Hirabayashi Y. Carbohydrate-dependent signaling from the phosphatidylglucoside-based microdomain induces granulocytic differentiation of HL60 cells. Proc Natl Acad Sci USA., 100 (13):7454-7459, 2003

Tachibana, H., Watanabe, K., Cheng, X.-J., Tsukamoto, H., Kaneda, Y., Takeuchi, T., Ihara, S. and Petri, W. A., Jr. VH3 gene usage in neutralizing human antibodyies specific for the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin heavy subunit. Infect. Immun., 71 (8): 4313-4319, 2003

Tachibana, H., Takekoshi, M., Cheng, X.-J., Nakata, Y., Takeuchi, T. and Ihara, S. Bacterial expression of a human monoclonal antibody-alkaline phosphatase conjugate specific for *Entamoeba histolytica*. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 11 (1): 216-218, 2004

Yano, A., Maeda, F., and Takekoshi M. Transgenic tobacco cells producing the human monoclonal antibody to hepatitis B virus surface antigen. J. Med.Virol. in press

#### 学会発表

坂本朋昭、竹腰正隆、前田史子、長瀬久美子、井原征治 抗HCMV抗体医薬を目指して 第18回ヘルペスウイルス研究会 2003 6/14

香川県 小豆島

Tachibana, H., Watanabe, K., Cheng, X.-J., Kaneda, Y., Takeuchi, T., Ihara, S. and Petri, W. A., Jr. Molecular characterization and expression of neutralizing human antibodies specific for the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin heavy subunit. 10th International Conference on Human Antibodies and Hybridomas. 2003 10

Tachibana, H., Takekoshi, M., Cheng, X.-J., Takeuchi, T. and Ihara, S. Bacterial expression of a human monoclonal antibody-alkaline phosphatase conjugate specific for *Entamoeba histolytica*. 10th International Conference on Human Antibodies and Hybridomas. 2003 10

Yasuko Nagatsuka, Masataka Takekoshi, Fumiko Maeda, Seiji Ihara, Kazufumi Shimizu and Yoshio Hirabayashi Stimulation with monovalent Fab fragment rGL-7 reconstructed from EBV-derived human monoclonal anti-i antibody mAb GL-2 induces granulocytic differentiation of HL60 cells via phosphatidylglucoside-based membrane domain. The 10th. International Conference Human Antibodies and hybridomas 2003 10/8-10 Osaka

坂本朋昭、竹腰正隆、前田史子、長瀬久美子、井原征治 ヒトサイトメガロウイルス感染症の予防と治療を目的とした抗HCMV完全人工ヒト抗体の作製 第51回日本ウイルス学会学術集会 2003 10/29 京都

竹腰正隆、前田史子、坂本朋昭、長瀬久美子、井原征治 ヒトサイトメガロウイルスに対するヒト中和抗体遺伝子の分離の試み 第26回日本分子生物学会年会 2003 12/12 神戸

Tachibana, H., Takekoshi, M., Cheng, X.-J., Takeuchi, T. and Ihara, S. Bacterial expression of a human monoclonal antibody-alkaline phosphatase conjugate specific for *Entamoeba histolytica*. 11th International Congress on Infectious Diseases. 2004

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

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

熱帯熱マラリア原虫およびアメーバに対するヒト抗体作製

分担研究者 橘 裕司 東海大学医学部 助教授

**研究要旨** 寄生原虫症の予防や治療に応用できるようなヒトモノクローナル抗体の作製をめざし、熱帯熱マラリア患者由来の抗体遺伝子ライブラリーについて、新たに調製した組換え型原虫膜抗原を用い、スクリーニングを行った。陽性クローンが得られたが、他種原虫抗原にも反応し、熱帯熱マラリア原虫に対する特異性は認められなかった。一方、ハイブリドーマ法によるヒト抗体の作製を試み、熱帯熱マラリア原虫に反応する10種類のヒトモノクローナル抗体を得た。H鎖は2種類が $\mu$ で、他の8種類は $\gamma$ であり、L鎖はすべて $\kappa$ であった。特異性の検討を行ったところ、すべての抗体が熱帯熱マラリア原虫に特異的であると思われ、また、FCR3株とIndochina株のいずれとも反応した。これらのヒトモノクローナル抗体を熱帯熱マラリア原虫培養系に加え、赤血球への感染阻止効果について検討したが、有意な効果は認められなかった。

**A. 研究目的**

ハイブリドーマ法によって作製されたマウスモノクローナル抗体は、病原微生物の抗原解析や感染症の診断に大きな役割を果たし、さらにモデル動物では受動免疫によって感染を阻止できることが報告されている。しかし、マウス抗体はヒトにとって異種抗体であり、治療や予防のために投与することはできない。可変領域や超可変領域だけをマウス由来とするキメラ抗体やヒト化抗体においても、マウスのアミノ酸配列が含まれているためにヒトへの繰り返しの使用は難しい。また、マラリア患者リンパ球をEBウイルスで不死化することにより、抗マラリア原虫作用を発揮するヒトモノクローナル抗体を作製したという報告もあるが、継続して抗体を産生することはできなかった。

本分担研究は、特に寄生原虫症の治療や予

防に応用できる純粋なヒトモノクローナル抗体を作製することを目的として計画された。これまでに、赤痢アメーバに対し、患者リンパ球を出発材料として接着阻止活性のある特異的なヒトモノクローナル抗体を作製できている。さらに、抗体遺伝子の解析を行うとともに、それを人為的に改変することにより、親和性を10倍向上させることにも成功している。今年度は、新たに調製した組換え型熱帯熱マラリア原虫膜抗原を用い、患者抗体遺伝子ライブラリーからの抗熱帯熱マラリア原虫抗体の作製をめざした。また、ヒト抗体遺伝子導入マウスを用いて、ハイブリドーマ法によるヒト抗体の作製についても検討した。

**B. 研究方法**

熱帯熱マラリア原虫のゲノムDNAを用い、erythrocyte binding protein