

(EBA) 175 の全長及び F2 ドメインをコードする遺伝子を PCR 増幅した。この遺伝子断片を発現ベクターに組み込んで大腸菌に導入し、組換え蛋白質を作製した。Inclusion body を回収し、refolding を行った。この組換え抗原を用い、熱帯熱マラリア患者由来の抗体遺伝子ライブラリーをコロニーブロット法でスクリーニングした。検出抗体には、患者血漿及びウサギで作製した抗 F2 抗体を用いた。2 次スクリーニングは ELISA と間接蛍光抗体法によって行った。特異性の検討には、赤痢アメーバの栄養型虫体及び組換え膜蛋白質を用いた。

熱帯熱マラリア原虫の組換え型 MSP-1 あるいは粗抽出抗原を、Freund のアジュバントとともに、ヒト抗体遺伝子導入マウスの腹腔に 3 回接種した。最終免疫の 4 日後に脾細胞を採取し、マウスミエローマ細胞と融合させた。培養上清を ELISA 及び間接蛍光抗体法でスクリーニングした。抗熱帯熱マラリア原虫抗体産生ハイブリドーマは、クローニング後、SCID マウスの腹腔に接種した。腹水を採取し、抗体を精製した。熱帯熱マラリア原虫の粗抗原や間接蛍光抗体法用の抗原は、FCR3 株と Indochina 株を培養して調製した。培養は、O 型ヒト赤血球とヒト血漿を用い、90%N<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub> 存在下で行った。ヒト血液は、湘南赤十字血液センターから、輸血等に使用できない血液を譲渡血として入手し、使用した。シゾントに同調させた熱帯熱マラリア原虫感染赤血球を回収して非感染赤血球に加え、培養液でヘマトクリット 5% に調整し、それに抗体を添加した。12 時間後に血球をスライドグラスに塗抹し、ギムザ染色後、検鏡によって輪状

体の数と感染赤血球の比率を計測した。

**(倫理面への配慮)** 患者リンパ球を用いる本研究計画については、東海大学医学部医の倫理委員会にて審査され、その承認の下に指針に従って実施された。動物実験は、東海大学医学部動物実験委員会の承認のもとに指針に従って実施した。また、ヒトの譲渡血液についても、献血血液であることに十分配慮し、指針に従って使用した。

## C. 研究結果

### 1. 患者リンパ球の抗体遺伝子に由来する抗熱帯熱マラリア原虫ヒト抗体の作製

熱帯熱マラリア患者のリンパ球に由来する抗体遺伝子ライブラリーについて、約  $3.8 \times 10^5$  クローンを 1 次スクリーニングしたところ、74 クローンが陽性反応を示した。2 次スクリーニングの結果、36 クローンは陽性であったが、これらすべての抗体が赤痢アメーバ抗原にも反応し、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。

### 2. ハイブリドーマ法による抗熱帯熱マラリア原虫ヒト抗体の作製

10 種類の抗熱帯熱マラリア原虫ヒトモノクローナル抗体産生ハイブリドーマをクローニングできた。これらの抗体のうち、H 鎖は 2 種類が  $\mu$  鎖で、他の 8 種類は  $\gamma$  鎖であり、L 鎖はすべて  $\kappa$  鎖であった。間接蛍光抗体法により、すべての抗体がマラリア原虫特異的に反応し、FCR3 株と Indochina 株の両株に反応することが確認された。1 種類の抗体は MSP-1 と強く反応した。また、これら

すべてのヒトモノクローナル抗体について、虫体の赤血球への侵入に対する効果を *in vitro* 系で検討したが、1mg/ml という高濃度においても、有意な抑制効果は認められなかった。

#### D. 考察

患者リンパ球由来の抗体作製に関しては、昨年度とは異なる表面抗原に注目し、組換え蛋白質を新たに調製して、抗体遺伝子ライブラリーをスクリーニングした。熱帯熱マラリア原虫抗原に反応する抗体が得られたが、昨年同様に種特異性は認められなかった。最近、マラリア原虫感染における非特異的な免疫反応の関与が指摘されており、多数の非特異的抗体クローンの存在はそのことに関係していると考えられる。

一方で、ヒト抗体遺伝子導入マウスを用いた系では、ハイブリドーマ法によって、特異的な抗体を作製できた。抗原虫作用に関して、今回検討した実験系では、中和による侵入阻止効果は認められなかったものの、補体や他の免疫細胞の関与により、虫体を傷害したり捕食したりできる可能性は残されている。今後、このような条件下での抗体の作用について検討する必要があると考えられる。

#### E. 結論

熱帯熱マラリア原虫に特異的に反応するヒトモノクローナル抗体が得られたが、これらの抗体には、虫体の赤血球への侵入に対する *in vitro* 系での中和活性は認められなかった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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

Tachibana, H., Cheng, X.-J., Masuda, G., Horiki, N. and Takeuchi, T. Evaluation of recombinant fragments of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin intermediate subunit for serodiagnosis of amebiasis. *J. Clin. Microbiol.*, 42 (3): in press, 2004

##### 1. 学会発表

Beck, D., Tachibana, H. and Petri, W. A., Jr. Structure and function of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc adherence lectin. 103rd General Meeting of the American Society for Microbiology. 2003年5月

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年10月

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年10月

Beck, D. L., Houpt, E., Tachibana, H. and Petri, W. A., Jr. The role of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin in adherence and cell killing. 52nd Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2003年

12月

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年3月

Tachibana, H., Cheng, X.-J., Masuda, G., Horiki, N. and Takeuchi, T. Evaluation of recombinant fragments of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin intermediate subunit for serodiagnosis of amebiasis. 11th International Congress on Infectious Diseases. 2004年3月

#### 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

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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 <i>Entamoeba histolytica</i> 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 <i>Entamoeba histolytica</i> .	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		2004

200300867A

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、P23の研究  
成果の刊行に関する一覧表をご参照ください。