

原に強く反応する抗 PLA2 抗体クローン 13 種類と抗 TAME 抗体クローン 8 種類を得た。抗 PLA2 抗体については細胞変性抑制作用で、また抗 TAME 抗体については酵素活性阻害作用で中和作用の有無を調べたが、中和活性を有する抗体クローンは見つからなかった。PLA2 や TAME などの酵素については中和作用の有無を調べる公定法が無く今回は細胞変性抑制作用と酵素活性阻害作用で測定したが、特に細胞変性抑制試験では抗体溶解液の調整が悪く溶解液だけで CPE を起こし、抗体の有無を観察することはできなかった。次年度はこれら酵素類に対する簡易な抗体測定を検討する必要がある。

すでに良好な抗体クローンが分離されている HR1 (出血因子 1) は HR2 (出血因子 2) と並ぶハブ毒中の主要な毒性因子で、治療用抗毒素の力価を測定する時も HR1 と HR2 に対する中和作用を測定している。特に HR1 は抗出血価と抗致死価の両方の測定に使用されるハブ毒中の最も重要な毒性因子で、マウス、ラット、ウサギ、モルモットのいずれに対しても強い出血作用を示すが、HR2 の接種で顕著な出血作用を示すのはウサギ、モルモットで、マウス、ラットでは出血作用は殆ど認めず、HR2 の出血作用は動物の種類によって大きな差がある。

今年度は精製された HR1 と HR2 を別々に免疫して造った抗 HR1 抗毒素と抗 HR2 抗毒素を単独または組み合わせて沖縄ハブ粗毒に対する中和試験を行った。その結果、マウスの出血作用は抗 HR1 抗毒素だけでも良好に中和したが、ウサギの出血作用を中和するには抗 HR2 抗毒素との組み合わせが必要だった。

正常ヒト血清中にも僅かではあるが HR2 の出血活性を抑える作用があるので、抗 HR1 抗毒素の希釈に正常ヒト血清を使用して粗毒に対する中和試験を行ったが、出血斑は毒素単独よりもむしろ大きくなり、期待する結果

は得られなかった。

すでに作製されている HR1 に対する抗体だけで治療に使用できるレベルの抗毒素を作製するのは難しいと思われるので、次年度はすでに単離されている数種の HR2 抗体を組み合わせて HR2 の出血活性を効果的に中和する抗毒素の作製を目指したい。また、腫脹などの反応を惹き起こす酵素に対する抗体クローンの単離し、更にバランスの良い抗毒素の開発を図りたい。

#### E. まとめ

副作用の危険が少ない「抗ハブ毒ヒト抗毒素」の作製を目的に、ハブの咬まれた経験を持つ献血ボランティアから成分献血で単核球画分を回収し、抗体ライブラリーを作製してハブ毒中の主要な毒性因子に対する中和抗体の単離を試みた。

(1) 成分血 ( $2 \times 10^9$  cells) から作製したライブラリーのサイズは、VH :  $1.5 \times 10^9$ 、 $\kappa$  :  $2.7 \times 10^8$ 、 $\lambda$  :  $8.8 \times 10^7$  であり、これらを組合わせて作製した抗体ライブラリーのサイズは  $1.3 \times 10^{10}$  だった。

(2) HR1, HR2 を抗原としてスクリーニングを行った結果、HR1 の出血作用を良好に中和する抗体クローンは単離したが、HR2 を中和する抗体クローンは未だ単離されていない。

(3) 新たに腫脹作用に関連すると思われる酵素 (PLA2, TAME) に対する抗体クローンの単離を試みたが、抗体価測定法の未整備などもありこれらの酵素活性を中和する抗体クローンは単離できなかった。

(4) HR1 と HR2 免疫で試験的に作製した抗 HR1 抗毒素と抗 HR2 抗毒素を組み合わせるとハブ粗毒に対する中和試験を行ったところ、マウスの出血作用は抗 HR1 抗毒素だけで良好に中和できたが、ウサギの出血作用を中和するには抗 HR2 抗毒素との混合が必要だった。

(5) 正常ヒト血清には HR2 の出血活性を

抑える作用があるので、抗 HR1 抗毒素に正常に行ったが、期待する結果は得られなかった。  
ヒト血清を混合して粗毒に対する中和試験を

表 1. 細胞毒性試験プロトコール

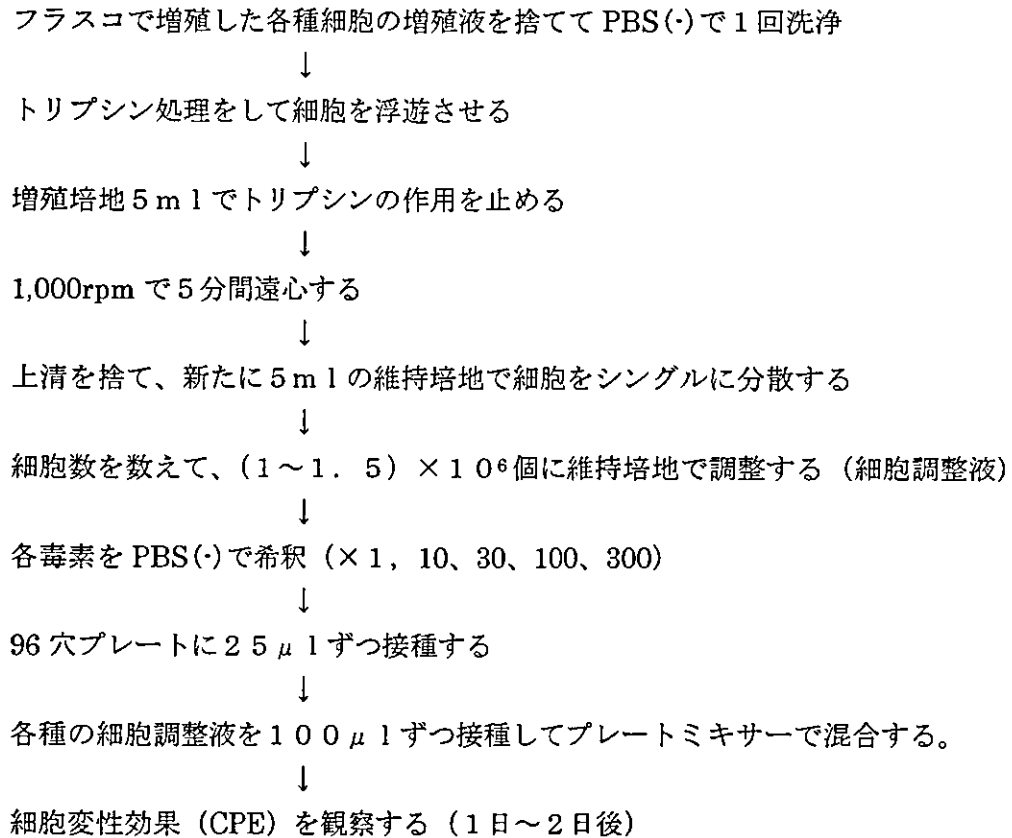


表 2. 各種抗毒素の抗体価 (抗 HR1, HR2 : 沖縄・奄美)

抗毒素	免疫抗原	沖縄ハブ		奄美ハブ	
		抗 HR 価	抗 HR2 価	抗 HR 価	抗 HR2 価
Lot 19	沖縄 HR 1	1,000		500	nd
Lot 23	沖縄 HR 2	nd		nd	3,000
Lot 11	沖縄粗毒	200		350	250
Lot 22	奄美粗毒	100		300	250

表3. 抗 TAME 抗毒素の中和試験 (酵素活性の阻害)

抗体量 ( $\mu$ l)	0	5	10	20	50
TAME004 (0.25mg/ml)	23.86	18.37	20.32		18.75
TAME009 (0.50mg/ml)	23.86	18.00	23.30		28.28
TAME010 (0.25mg/ml)	23.86	19.00	20.00		16.75
TAME035 (0.25mg/ml)	23.86	18.00	20.00		15.39
TAME041 (1.50mg/ml)	23.86	18.00	20.00		17.12
TAME055 (0.50mg/ml)	23.86	20.00	23.00		20.00
TAME068 (0.50mg/ml)	23.86	20.00	22.36		21.00
TAME086 (0.25mg/ml)	23.86	17.64	18.00		15.00
ハブ抗毒素 (11mg/ml)	18.00		7.50	5.20	0.95
ジフテリア抗毒素 (13mg/ml)	18.00		20.54	23.91	21.38

単位 : D/min

測定法 : TAMEsterase + 抗 TAME 抗体  $\rightarrow$  4°C, 30min  
 $\rightarrow$  基質  $\rightarrow$  蛍光測定 (0/min : 1 分間の蛍光の増加量)

表4. 各種細胞の PLA2, TAME に対する感受性 (2日後)

毒素名 : PLA2

細胞名/希釈数	$\times 1$	$\times 10$	$\times 30$	$\times 100$	$\times 300$
HEP2	+++	+			
RD-18S	+				
LLCMK2	+++	++	+	+	
HeLa	+++	+++	++		
VeroE6	++++	++++	++		

毒素名 : TAME

細胞名/希釈数	$\times 1$	$\times 10$	$\times 30$	$\times 100$	$\times 300$
HEP2					
RD-18S	+				
LLCMK2					
HeLa	+++	+			
VeroE6	++++	++++	+++	++	

CPE ランク

+ (25% CPE)    ++ (50% CPE)    +++ (75% CPE)    ++++ (100% CPE)

表5. 治療用抗毒素の TAME, PLA2 に対する中和作用

抗原名：TAME、使用細胞：VeroE6

抗原/ 抗体	×1	×10 <sup>-1</sup>	×10 <sup>-2</sup>	×10 <sup>-3</sup>	×10 <sup>-4</sup>	×10 <sup>-5</sup>	抗原コン トロール
×1	+	++	++	++	++	++	++
×10							
×30							
×100							
×300							

抗原名：PLA2、使用細胞：VeroE6

抗原/ 抗体	×1	×10 <sup>-1</sup>	×10 <sup>-2</sup>	×10 <sup>-3</sup>	×10 <sup>-4</sup>	×10 <sup>-5</sup>	抗原コン トロール
×1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
×10		++	++	++	++	++	++
×30			+	++	++	++	+
×100							
×300							

表6. 被検抗毒素の細胞変性抑制試験

使用抗体：ファージ抗体（抗原名：PLA2、TAME）

使用細胞：VeroE6（7×10<sup>5</sup>個）

抗原/ 抗体	抗原コン トロール	1	2	3	4	5	6
×10	++	++	++	+++	++	++++	+++
×30	+	+	++	++	+	+++	++
7	8	9	10	11	12	13	細胞コ ントロ ール
++++	+++	+++	++	+++	+++	+++	-
++++	+	++	++	++	+++	+	-

01: PLA2-004, 02: PLA2-014, 03: PLA2-015, 04: PLA2-008, 05: PLA2-018,  
06: PLA2-040, 07: PLA2-059, 08: PLA2-022, 09: PLA2-067, 10: PLA2-088,  
11: PLA2-093, 12: PLA2-068, 13: PLA2-094

表7. 各種抗毒素の沖縄ハブ粗毒に対する中和試験 (マウス筋注)

毒素/ 抗毒素	Lot 19 抗沖縄粗毒	Lot 22 抗奄美粗毒	Lot 19 抗 HR1	対照 沖縄ハブ粗毒
100 $\mu$ g	-	-	-	+++
30 $\mu$ g	-	-	-	+++

表8. 各種抗毒素の沖縄ハブ粗毒に対する中和作用

	Lot 19 (x 10)	Lot 23 (x 5)	Lot 11 (x 5)	Lot 22 (x 5)	毒のみ
x 1	25	25	20	20	25
x 3	25	25	-	-	25
x 10	25	25	-	-	25

表9. 混合抗毒素の沖縄ハブ粗毒に対する中和作用

	Lot19+23 (x5) (x20)	Lot11+23 (x5) (x20)	Lot22+23 (x5) (x20)	Lot 23 x20
x 1	-	-	-	15
x 3	-	-	-	-
x 10	-	-	-	-

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
K.Higo-Moriguchi, et al.	Isolation of human monoclonal antibodies neutralizing rotaviruses	J. Virol.	78	3325-3332	2004
A.Ideno., et al	Expression of foreign proteins in Escherichia coli by fusing with an archaeal F506 binding protein.	Appl. Microbiol. Biotechnol.	64	99-105	2004
S.Hidaka, et al.	Dendrodendritic electrical synapses between mammalian retinal ganglion cells.	J. Neurosci.	17	10553-10567	2004
N. Nakagawa, et al.	Influenza B virus victoria group with a new glycosylation site was epidemic in Japan in the 2002-2003 season.	J. Clin. Microbiol.	42	3295 -3297	2004
S. Okamoto, et al.	Vaccination with formalin-inactivated influenza vaccine protects mice against lethal influenza <i>Streptococcus pyogenes</i> superinfection	Vaccine	22	2887-2893.	2004
T. Kumagai, et al.	Poor immune responses to influenza vaccination in infants	Vaccine	22	3404-3410	2004
S. Okamoto, et al.	The <i>Streptococcus pyogenes</i> capsule is required for adhesion of bacteria to virus-infected alveolar epithelial cells and lethal bacteria-viral superinfection	Infect. Immunol.	72	6068-6075	2004