

厚生科学研究 研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス
総合研究事業

抗毒素製剤の効率的製造方法の開発に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高橋元秀

平成17年（2005）3月

厚生科学研究 研究費補助金 医薬安全総合 研究事業

安定供給に向けた国内外の抗毒素製剤の品質管理に関する研究班

平成16年度 研究組織

主任研究者

高橋 元秀 国立感染症研究所 細菌第二部 第三室長

分担研究者

野崎 周英	(財) 化学及血清療法研究所 第一研究部 室長
向本 雅郁	大阪府立大学大学院農学生命科学研究科 助教授
千葉 丈	東京理科大学 基礎工学部 教授
佐々木 次雄	国立感染症研究所 細菌第二部 第二室長
岩城 正昭	国立感染症研究所 細菌第二部 第三室

研究協力者

小宮貴子	国立感染症研究所 細菌第二部 第三室
福田 靖	国立感染症研究所 細菌第二部 第三室
小崎俊司	大阪府立大学大学院農学生命科学研究科教授
幸田知子	大阪府立大学大学院農学生命科学研究科
前田浩明	(財) 化学及血清療法研究所 第一研究部
大隈邦夫	(財) 化学及血清療法研究所 第一製造部長
原川哲博	(財) 化学及血清療法研究所 研究推進室
大場浩美	東京理科大学 基礎工学部助手
相内 章	東京理科大学 基礎工学部大学院博士課程
石田 功	(株) キリン医薬カンパニー

目 次

	頁
I. 総括研究報告書	
抗毒素製剤の効率的製造方法の開発に関する研究	
主任研究者 高橋 元秀	1
II. 分担研究報告書	
1. マウス抗毒素モノクローナル抗体のヒト化に関する開発研究 野崎周英・向本雅郁	9
2. 免疫ヒトリンパ球からヒト型中和抗体作製の開発研究 黒澤良和	23
3. DNA 免疫法によるトランスクロモマウスを用いたヒト型 ポリクローナル抗体の開発研究 千葉 丈	27
4. 各抗体の品質管理試験としての安全性に関する研究 佐々木次雄	31
5. 海外のヒト型抗体の製造研究進展調査 岩城正昭	39
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	45

厚生労働科学研究 研究費補助金
(医薬品等医療技術リスク評価研究事業)

総括研究報告書

抗毒素製剤の効率的製造方法の開発に関する研究

主任研究者 高橋 元秀 国立感染症研究所

研究要旨

ウマ抗毒素製剤に替わるヒト化(型)抗体の製造開発を目的として、有効性、安全性および生産性の確保を念頭に短期間で大量の製剤を安定供給するために、複数の手法で基礎的研究を行った。今年度の主な成果は、(1) 昨年度に作製した抗A型神経毒素マウスモノクローナル抗体4種の抗体H鎖L鎖可変(VH、VL)領域遺伝子のアミノ酸配列を比較した。V領域遺伝子をヒト定常(C)領域遺伝子と結合させ、発現ベクターに組み込み、CHO細胞に導入してキメラ抗体産生細胞を作製した。得られた培養上清中の4種のキメラ抗体は毒素と結合し中和活性を示した。これらキメラ抗体の中から将来の抗毒素製剤を構成する抗A型抗毒素に対する候補抗体を選定する。(2) ボツリヌス毒素注射後、免疫を獲得したボランティアから3Lの血液に相当する成分血液を採取し、 1.3×10^{10} のクローンからなる抗体ライブラリーを作製した。抗原に結合する抗体を数10種類単離し毒素中和活性を測定した。中和活性を示したものについてIgG型抗体に変換中である。(3) ヒト抗体を誘導するKMマウスを用いて抗ジフテリア毒素ヒトモノクローナル抗体パネルを作製した。DTに対するヒト中和抗体のエピトープの主要なものは、細胞結合活性のあるGTBに存在するが、酵素活性のあるGTAにも中和エピトープが存在することが証明された。今後、複数のモノクローナル抗体を組み合わせにより、より有効な抗体の調整を検討する。(4) ボツリヌス毒素に対するヒト型モノクローナル抗体製剤の製剤化段階に必要な安全性及び有効性評価方法を確立するために、国内外の関連製剤の認可承認、または品質管理に関する情報を収集・分析した。今後開発する製剤については、有効性は動物を用いた前臨床試験である程度明らかにできる可能性がある。しかし、臨床試験においては健常者を用いた第一相試験は可能であるが、第二相、第三相試験の実施は、わが国では困難なことが予想された。(5) 国内外のヒト型抗毒素製剤の製造状況を調査した結果、国内では、破傷風抗毒素だけがウマ製剤からヒト血液由来製剤の移行が行われているが、その他の製剤では、依然としてウマ製剤である。海外も同様な傾向が見られるが、ボツリヌス抗毒素とジフテリア抗毒素については、ヒト血漿由来製剤を製造している国もあった。また、英国NIBSCの抗毒素品質管理体制を調査した結果、実験動物の使用匹数を減らす、または使用しない代替法への研究開発が積極的であった。

分担研究者名

野崎周英	(財)化学及血清療法研究所 第一研究部 室長
向本雅郁	大阪府立大学大学院農学生命科学研究科 助教授
黒澤良和	藤田保健衛生大学総合医科学研究所
千葉 丈	東京理科大基礎工学部 教授
佐々木次雄	国立感染症研究所 細菌第二部 室長
岩城正昭	国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官

A. 研究目的

毒素性細菌の感染症のうち、ボツリヌス症、ガスエソ疾患、ジフテリアの治療にはウマ抗毒素製剤が用いられている。この製剤は、国家買上品として供給されており、(財)化学及血清療法研究所で製造される。化血研では、従来、はぶウマ抗毒素、まむしウマ抗毒素も製造しており、今後は国内で生産されるすべてのウマ抗毒素製剤を製造することとなる。本ウマ製剤をヒトの治療に用いる際には、ウマの血清または血漿を粗材料としているため、動物血液由来の未知の病原体及び異種たん白の投与による血清病が心配されている。また、ウマ製剤の製造工程には、ウマ免疫用抗原の作製(菌の培養、毒素の精製、トキシノイド化)、ウマの高度免疫、抗毒素血清の精製・製剤化および各工程の品質管理試験等に要する製造期間は、1ヶ年以上を必要とする。本研究班では、現行のウマ抗毒素抗体であるボツリヌスウマ抗毒素(A,B,E及びF型の4種の抗体)、ガスエソウマ抗毒素(*C. perfringens*, *C. septicum*, *C. oedimatiens*の3種の抗体)およびジフテリアウマ抗毒素製剤に替わるヒト型抗体の開発を目指し、短期間で大量の製剤を製造するための基礎的研究を行うものである。特に、ボツリヌス毒素はバイオテロに使用されることも警告されており、緊急時に適当な予防策はない。そのため、毒素を中和する抗毒素抗体による治療は不可欠と考える。ヒト化マウスモノクローナル抗体やハ

イブリドーマ法により作製された完全ヒトモノクローナル抗体などと、染色体改変(ヒト抗体産生)マウスを用いて作製されたポリクローナル抗体の有効性を毒素中和能による比較検討を行う。さらに、国際的に認可されているこの種の製剤の安全性確保についても検証する。これら基礎的研究の成果により、短期間で大量の製剤を恒常的に製造するための基盤整理を行うものである。

B. 研究方法

(1)野崎、向本分担研究者:マウスモノクローナル抗体 V 領域遺伝子は、RT-PCR 法によって単離した。ハイブリドーマより QuickPrep micro mRNA Purification Kit (Amersham Bioscience)を用いて mRNA を抽出し、Superscript II 逆転写酵素(Invitrogen)による cDNA 合成を行って、これをテンプレートとし、Kozak 配列および必要なスプライシングシグナル、酵素 site (HindIII, BamHI) などを持ったプライマーを VH、VL 領域遺伝子用にそれぞれの V 領域及び J 領域のサブグループ毎に作製し、Advantage HF-2 PCR Kit(BD Bioscience)を用いて当該キットのプロトコールに従って PCR 反応を行った。得られた PCR 増幅バンドを、TA クローニングキット (Invitrogen) を用いてクローニングし、その核酸塩基配列の決定を ABI PRISM310 Genetic Analyzer (PE バイオシステムズ) を用いて行った。このようにして得た VH、VL 領域遺伝子を HindIII と BamHI(TAKARA)で消化し、

それぞれを、発現ベクターである CAG- γ 1、CAG-1 κ (J. Immunol., 167, 3266, 2001) に組み込み、キメラ抗体発現ベクターを構築した。CAG- γ 1 は、ヒト抗体 C 領域 γ 1 鎖の遺伝子及び選択マーカーとしてのネオマイシン耐性遺伝子 (neor) を持ち、CAG- κ はヒト抗体 C 領域 κ 鎖の遺伝子及び選択マーカーとしてのジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (dhfr) を持っている。得られたそれぞれのキメラ抗体 H 鎖及び L 鎖遺伝子発現プラスミドを等量混合し PvuI 消化により線状化した後、CHO-DG44 細胞へ Trans-IT LT-1 (Mirus) を用いてトランスフェクションし、300nM MTX、0.5mg/ml G418、10%透析 FBS を含む YMM 培地 (化血研自家製培地) でセレクションを行った。得られた形質転換細胞の中から抗体産生量の高い細胞をスクリーニングし、次いで限界希釈法によるクローニングを行って各キメラ抗体産生クローンを得た。

上記培養上清中に含まれるキメラ抗体の濃度は、ヤギ由来抗ヒト IgG Fc 抗体 (CAPPEL) とプロテイン A-HRP (ZYMED 社) を用いたサンドイッチ ELISA 法により測定した。この際、市販のヒト IgG1 抗体 (Biogenesis) の希釈系列を作製し、それを標準試料とした。毒素結合活性は A 型神経毒素 (0.5 μ g/well) をコートしたプレートを用いて測定した。ブロッキングには 0.2% BSA、2 次抗体にはペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG(H+L)(1:5000, BioRad)、基質はオルソフェニレンジアミンを使用した。反応は基質反応以外全て 37°C 2 時間で行った。基質の発色反応は 37°C 30 分で行った。中和試験は、ボツリヌス毒素と培養上清を等量混合し、室温で 30 分反応させた後、マウスの腹腔内へ 0.5ml 接種した。毒素を培地のみと混合したサンプルをコントロールとし、コントロールが死亡した時点における、試験群の臨床症状をスコアで示した。

イムノブロットリングは、7.5%ゲルに A 型精製毒素を 2ME 処理後 1 レーンあたり 0.2 μ g アプライし、SDS-PAGE を行った。泳動蛋白をニトロセルロース膜に転写した後、培養上清と反応させた。2 次抗体は、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG ヤギ抗体(1:3000)、発色基質は 4-chloro-1-naphtol を用いた。

(2) 千葉分担研究者：研究協力者の石田ら (キリン医薬カンパニー) が生産するヒト抗体産生遺伝子を保有し、マウスの抗体産生遺伝子がノックアウトされているトランスクロモマウス (Transchromosomal-Mice:KM マウス) に現行ヒトの予防に用いられているジフテリアトキソイドを接種した。KM マウスに沈降型ジフテリアトキソイドを、基礎免疫として 2 週間隔で 3 回皮下注射し、その後、追加免疫として液状型のジフテリアトキソイドとフロインド不完全アジュバントとのエマルジョンを 2 週間隔で 3 回、皮下注射した。高いジフテリア抗毒素が検出されたマウスに 50 μ g の液状型ジフテリアトキソイドを腹腔に投与して、4 日後に脾細胞を用いてハイブリドーマを作製した。血清中あるいは培養上清中の抗ジフテリア毒素ヒト IgG 抗体はジフテリア毒素を抗原として用いた ELISA 法によって定量した。得られた抗体は、ジフテリア毒素を構成する A 鎖 (DTA) と B 鎖 (DTB) のどちらに反応するかはウエスタンブロットリング法で試験した。培養上清中のジフテリア毒素中和抗体は、Vero 細胞を用いたカラーチェンジ法で検出・定量した。

(3) 黒澤分担研究者：ボツリヌストキソイドによって免疫された献血ボランティアからその抗血清の中に含まれる抗ボツリヌス毒素抗体をすべて確実にクローン化する技術を開発し、そして治療用ヒト抗体として確立することを目的とする。そのために、ボツリヌストキソイドで免疫した献血ボランティア

より 3L 相当の成分血 (1×10^9 細胞) を採取し、mRNA を抽出して抗体 H 鎖 L 鎖の V 領域を RT-PCR で個別に増幅して充分大きなサイズの抗体ライブラリーを作製する。そのうちボツリヌストキソイド、更にはニュートロキシンを抗原にしてスクリーニングし、抗原に結合する多数の抗体を単離する。得られた抗体は塩基配列を決定して分類する。それぞれの抗体のボツリヌス毒素中和活性を測定する。中和活性を示した抗体は IgG 型ヒト抗体に変換して調製する。

(4)佐々木分担研究者：本研究班ではできるだけヒト由来蛋白に近い抗毒素製剤の開発を目指している。日米欧規制当局から出ているバイテク製剤や動物由来原料を用いる医薬品の製造に適用される各種ガイドラインやこれら製剤のウイルス安全性に関する国際シンポジウムでの規制当局者並びに関係企業者の講演内容、更に 2003 年に FDA に認可されたボツリヌス抗毒素製剤の許可申請に提出された資料等を参考に、研究班で現在作成中のボツリヌスに対するヒト型モノクローナル抗体製剤の製剤化段階に必要な安全性及び有効性評価情報を以下の内容について整理した。

(5)岩城分担研究者：抗毒素製剤は、毒素に起因する細菌性疾患および蛇毒などの動物毒による疾患の治療に用いられる。抗毒素製剤は伝統的にウマ等の動物をトキソイドまたは毒素で免疫して得られる血漿または血清から生産され、疾患の治療に効果をあげてきた。一方で、ヒトにとって異種動物であるウマの血液成分をヒトに投与することにより血清病が起こることが懸念され、ヒト血漿由来製剤が開発された。本研究では、従来ウマ血漿由来製剤に比べてより安全なヒト血漿由来製剤への国内外での移行状況を調査した。また、品質管理体制について、animal welfare

に配慮した *in vitro* ボツリヌス抗毒素価測定法について英国の NCL である NIBSC での研究の進展を調査した。国内破傷風抗毒素製剤のウマ由来からヒト由来への移行に関しては、国立感染症研究所における国家検定のための資料等を参考にして集計を行なった。海外の抗毒素製剤については、過去に作製した「抗毒素データベース」および各国 NCL の web サイトから情報を収集した。なお、英国 NIBSC 訪問・調査は、2004 年 6 月に行なった。

C. 結果

(1)野崎、向本分担研究者：マウスーヒトキメラ抗体の開発系として、昨年度は抗 A 型神経毒素マウスモノクローナル抗体 4 種(2-4、2-5、9-4、B1)の抗体 H 鎖 L 鎖可変(VH、VL)領域遺伝子をそれぞれ単離した。この抗体について、V 領域のアミノ酸配列を比較した結果、2-4 と 2-5 の VL 領域で CDR3 内の 1 アミノ酸に違いが認められた。他の VH、VL 領域での相同性は認められなかった。これらの V 領域遺伝子をヒト定常(C)領域遺伝子と結合させ、発現ベクターに組み込み、CHO 細胞に導入してキメラ抗体産生細胞を作製した。細胞の培養上清中のキメラ抗体(AC24、AC25、AC94、ACB1)は期待通りに毒素と結合し、中和活性を示した(AC25 は未確認)。また、1 つは毒素 L 鎖認識の抗体である可能性が示唆された。以上の結果より、これらのキメラ抗体の中から将来の抗毒素製剤を構成する抗 A 型抗毒素に対する候補抗体を選定することが可能になった。

(2)黒澤分担研究者：ヒト抗体ライブラリーの作製として、ボツリヌストキソイドで免疫されたボランティアから採血した総数 1×10^9 の細胞から mRNA を抽出し、RT-PCR 法で抗体遺伝子を増幅させたのち抗体ライブラリーを作製した。抗体の H 鎖については 7.1×10^9 、L

鎖については 5.9×10^8 、 λ 鎖については 5.1×10^8 であった。それぞれを組み合わせで作製した抗体ライブラリーのサイズは 1.3×10^{10} であった。抗体ライブラリーのスクリーニング方法は、2方法で行い、最初はトキシドを抗原にスクリーニングした。得られた抗体の多くは無毒成分に結合するものであった。この手法で得られた抗体でブロックして更にスクリーニングして総計 20 種類のクローンが得られた。2 番目の方法として、ボツリヌス毒素の構成成分中の無毒成分を含まないニューロトキシンを抗原にスクリーニングして総計 46 種類のクローンを入手した。それぞれのスクリーニング方法で得られたクローンの中和活性測定は、マウスを用いた毒素—抗毒素中和試験を実施した。現在まで得られた抗体の中で中和活性を示したものは、BT-015、BT-047、BT-058、BT-175 の 4 種類であった。上述の方法で得られるクローンは Fab-cp3 抗体として単離されるために、BT-015 については IgG 型に変換し、大量発現を実施している。

(3)千葉分担研究者：ジフテリアトキシドで免疫された KM マウスのジフテリア毒素に対するヒト IgG モノクローナル抗体が得られた。21 クローンの内の 3 クローンの免疫グロブリンアイソタイプが IgG3・k であり、残りは IgG1・k であった。ジフテリア毒素は酵素活性を有する A 鎖 (DTA) と細胞結合活性を有する B 鎖 (DTB) から構成されている。ウェスタンブロッティングによる解析の結果、21 クローンの内の 5 クローンの抗体の認識するエピトープは GTA に存在し、残りの 16 クローンの抗体のエピトープは GTB に存在することが明らかになった。それぞれの抗体の中和活性を *in vitro* で調べたところ、9 クローンの培養上清に有意の中和活性が認められ、その中の 4 クローン (8F9、3G8、8E8、4G9) に特に強い中和活性

が証明された。強い中和活性を示した 4 クローンの内の 3 クローン (3G8、8E8、4G9) のエピトープは GTA に存在し、1 クローンのエピトープは GTB に存在していた。

(4)佐々木分担研究者：種々の方法によりヒト型 (化) 抗体を開発、製造する場合には製剤の安全性確保が重要となる。研究班で現在作成中のボツリヌスに対するヒト型モノクローナル抗体製剤の製剤化段階に必要な安全性及び有効性評価方法を確立するために、国内外の関連製剤の認可承認、または品質管理に関する情報を収集・分析した。今後開発する製剤については、有効性は動物を用いた前臨床試験である程度明らかにできる可能性がある。しかし、臨床試験においては健常者を用いた第一相試験 (安全性評価) は可能であるが、患者群を対象にせざるをえない第二相、第三相試験の実施は、わが国では困難なことが予想された。

(5)岩城分担研究者：国内外のヒト型抗毒素製剤の製造状況を調査した。国内では、破傷風抗毒素に関しては 1970 年代から 1980 年代にかけてウマ製剤からヒト製剤の移行が行なわれ、現在では全てのロットがヒト血漿由来製剤である。一方その他の製剤 (ジフテリア、ボツリヌス、ガス壊疽、まむし、はぶ) では全ロットがウマ製剤のままである。海外ではさらに移行が遅れていて、20ヶ国以上で生産されている製剤のうち、製剤数でみて破傷風抗毒素の約 40%、ボツリヌス抗毒素の 10%以下、ジフテリア抗毒素の 5%以下がヒト血漿由来である他はほとんどがウマ由来製剤であった。また、国外での抗毒素の品質管理体制を調査するため、英国の National Control Laboratory である NIBSC (National Institute of Biologicals Safety and Control) を訪問し、特にボツリヌス抗毒素の品質管理法について調査した。その結果、欧州では実験動物

の使用に関する規制が強く、実験動物の使用匹数を減らす、または使用しない代替法として *in vitro* 法の研究開発が積極的に行われている。マウスを用いる方法では、動物の苦痛を軽減するために *in vivo* の非致死による局所麻痺アッセイ法が基準にも適用されている。また、*in vitro* 法では、マウス *ex vivo* 横隔膜神経麻痺法、酵素活性阻害法およびラット初代培養脊髄神経細胞法などについての研究が行なわれていた。これらはすべて抗毒素の中和抗体価測定法であり、今後、国際的な標準法としての検討も進められることが予想された。

D. 考 察

ウマ抗毒素に替わるヒト型の抗体（モノクローナル抗体を含む）の製剤化のための基礎研究を最新の複数の手法により行い、より早期に有効性と安全性の確認された標品を作りだし、実用化への具体的な方策を作り上げることを目指している。近年の遺伝子工学・細胞工学・生殖工学の進歩とともにヒト型抗体を作製することが可能になり、乳ガン治療を目的とした抗体などは、多数の患者に用いられ企業の経済効果が期待できるために、抗体医薬品として民間企業の独自の研究・開発によって製剤化されている。これら手法で抗毒素ヒト型抗体を作製できれば、ウマ抗毒素製剤に比べて安全な抗体を、短期間で大量に製剤化することが可能となる。しかしながら、ウマ抗毒素製剤は市場性、経済性に乏しく、民間企業では改良開発が望めない製剤のために、基礎研究、具体的な製剤化に関して、国の経済的、政策的な支援が必要である。当該研究組織は、国内で現在、ヒト型製剤の研究開発の問題点を理解し、それらに対応可能な知識、技術基盤を有する産官学の担当者で構成されている。従って、ヒト型抗毒素抗体の

製剤化を可能とする基礎研究を短期間で実施でき、ウマ抗毒素に替わるヒト型抗毒素抗体の製剤化の基盤が確立できるものと期待される。

特に、米国のバイオテロ以降、各国ではボツリヌス毒素の対応として、ウマ抗毒素製剤の調達が急務となっている。しかし、ウマ抗毒素の製造にあっては、各国とも十分な製造体制が取れていないことにより、ヒト型抗体の開発研究が精力的に行われている。分担研究者の所属する化血研では、マウスーヒトキメラ抗体の開発として、HIV 患者の治療を目的とした研究開発がおこなわれ、現在国外で治験中である。ボツリヌス毒素の重鎖は、毒性発現に関連する一連の作用のうちで、受容体への結合、細胞内移行および細胞内活性発現の担っている重要な部分ある。我々はこれら毒素作用を抑制する活性を有する3種の抗体を用いてV領域アミノ酸配列を基にコンピュータ上でマウス抗毒素モノクローナル抗体V領域の立体構造モデルを作製中である。最終的にはマウスーヒトキメラ抗体の樹立が目標となる。従って、本手法により先行している抗HIVマウスーヒトキメラ抗体の安全性、有効性の評価および特許に関する問題点が克服されることにより、現在実施しているボツリヌス抗体の開発に有益な情報をもたらすことが期待される。

E. 結 論

ボツリヌス毒素に対するヒト化（型）抗体の作出にあっては、今年度より、「マウス抗毒素モノクローナル抗体のヒト化」及び「免疫ヒトリンパ球からヒト型中和抗体作製」の2法に集中して有効な抗体を作製することとした。本年度までに得られた結果では、両方法ともに中和能を有する数種の抗体が得られている。また、ジフテリア毒素に対するヒト中和抗体のエピトープの

主要なものは、細胞結合活性のある GTB に存在するが、酵素活性のある GTA にも中和エピトープが存在することが証明された。しかし、モノクローンで十分な中和能が得られていない。従って、ボツリヌス、ジフテリアともに、中和エピトープに対する複数のモノクローナル抗体を組み合わせることによって、現行のウマ抗毒素製剤に代替しうる有効で、安全なヒト抗体を調製できるものとする。

F. 健康危険情報

ボツリヌス毒素によるバイオテロ対策として、十分量の治療用抗毒素の国内備蓄を整えることは急務である。現行のボツリヌスウマ製剤は、ボツリヌス食中毒の治療を目的とした備蓄量であり、バイオテロ時の多数の患者に対して対応は困難である。本基礎研究の成果を実製造として、スケールアップする技法、新しい薬剤としての製造認可承認においては、薬事法規制外の医薬品としての対応が必要である。

G. 研究発表

(分担研究者分は各分担報告に記載)

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）

抗毒素製剤の効率的製造方法の開発に関する研究（15200901）

分担研究報告

「抗ボツリヌス神経毒素ヒト（キメラ）化モノクローナル抗体の作製」

分担研究者 野崎周英 財団法人 化学及血清療法研究所
向本雅郁 大阪府立大学学大学院農学生命科学研究科
協力研究者 前田浩明 財団法人 化学及血清療法研究所
小崎俊司 大阪府立大学学大学院農学生命科学研究科

要旨：ボツリヌス中毒症治療用のウマ抗毒素製剤（抗A、B、E、F型抗毒素を含有）には副作用の危険性があるため、より安全で高い中和力価を持つ抗毒素製剤が望まれている。本年度は、昨年度に作製した抗A型神経毒素マウスモノクローナル抗体4種（2-4、2-5、9-4、B1）の抗体H鎖L鎖可変（VH、VL）領域遺伝子をそれぞれクローニングした。得られたV領域のアミノ酸配列を比較した結果、2-4と2-5のVL領域でCDR3内で1個のアミノ酸しか変わらないことが分かった。その他のVH、VL領域での相同性はなかった。これらのV領域遺伝子をヒト定常（C）領域遺伝子と結合させ、発現ベクターに組み込み、CHO細胞に導入してキメラ抗体産生細胞を作製した。得られた培養上清中のキメラ抗体（AC24、AC25、AC94、ACB1）は期待通りに毒素と結合し、中和活性を示した（AC25は未確認）。また、AC24は毒素L鎖認識の抗体である可能性が示唆された。これらの結果より、これらのキメラ抗体の中から将来の抗毒素製剤を構成する抗A型抗毒素に対する候補抗体を選定することが可能になった。

A. 研究の目的

ボツリヌス中毒は、グラム陽性芽胞性のボツリヌス菌が産生する蛋白性毒素を経口的に接種することにより起こる食餌性中毒と、一歳未満の乳

児の腸管内で芽胞が発芽、増殖し、その際産生される毒素により起こる乳児ボツリヌス症に大別される。いずれの中毒においても、毒素は末梢の興奮性シナプスに作用し、神経伝達物質の

遊離を阻害することにより弛緩性麻痺を引き起こす。ボツリヌス中毒は他の細菌性食中毒と比べ発生例は稀であるが、致死率がきわめて高い。我が国ではヒトの食餌性中毒事例が報告されている A、B、E、F 型に対して治療用ウマ抗毒素製剤が常備されている。ウマ血清を原材料としているこの製剤は、ヒトには異種蛋白であるため、アナフィラキシー等のアレルギー反応を引き起こす危険性がある。乳児ボツリヌス症においてはこのアレルギー反応を回避するために異種蛋白由来の抗体による治療はなされていないのが現状である。この危険性は成人の中毒における治療においても同様であり、ウマ抗毒素に代わるより安全で、高い中和力価を持つ抗毒素製剤の開発が望まれている。

本研究では上述した目的を達成するために遺伝子組換え技術を利用した抗ボツリヌス神経毒素マウス-ヒトキメラ抗体の作製を試みた。昨年度は、抗ボツリヌス神経毒素マウス-ヒトキメラ抗体の V 領域に相当するマウス抗体遺伝子を調製するため、食中毒事例として最も多い A 型に焦点を絞り、抗 A 型神経毒素マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製を行った。今年度は、これらのマウスモノクローナル抗体の V 領域遺伝子をクローニングし、ヒト C 領域遺伝子と結合させ、発現ベクターに組み込んでキメラ抗体産生 CHO 細胞の作製を行った。

B. 研究方法

(1) V 領域遺伝子クローニング

マウスモノクローナル抗体 V 領域遺伝子は、RT-PCR 法によって単離した。ハイブリドーマより QuickPrep micro mRNA Purification Kit (Amersham Bioscience) を用いて mRNA を抽出し、Superscript II 逆転写酵素 (Invitrogen) による cDNA 合成を行って、これをテンプレートとし、Kozak 配列および必要なスプライシングシグナル、酵素 site (HindIII, BamHI) などを持ったプライマーを VH、VL 領域遺伝子用にそれぞれの V 領域及び J 領域のサブグループ毎に作製し、Advantage HF-2 PCR Kit (BD Bioscience) を用いて当該キットのプロトコールに従って PCR 反応を行った。得られた PCR 増幅バンドを、TA クローニングキット (Invitrogen) を用いてクローニングし、その核酸塩基配列の決定を ABI PRISM310 Genetic Analyzer (PE バイオシステムズ) を用いて行った。

(2) キメラ抗体遺伝子発現プラスミドの構築

このようにして得た VH、VL 領域遺伝子を HindIII と BamHI (TAKARA) で消化し、それぞれを、発現ベクターである CAG- γ 1、CAG-1 κ (J. Immunol., 167, 3266, 2001) に組み込み、キメラ抗体発現ベクターを構築した。CAG- γ 1 は、ヒト抗体 C 領域 γ 1 鎖の遺伝子及び選択マーカーとしてのネオマイシン耐性遺伝子 (neo^r) を持ち、CAG- κ はヒト抗体 C 領域 κ 鎖の遺伝子及び

選択マーカーとしてのジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (dhfr) を持っている。

(3) キメラ抗体産生細胞の作製

得られたそれぞれのキメラ抗体H鎖及びL鎖遺伝子発現プラスミドを等量混合しPvuI消化により線状化した後、CHO-DG44細胞へTrans-IT LT-1 (Mirus)を用いてトランスフェクションし、300nM MTX、0.5mg/ml G418、10%透析FBSを含むYMM培地(化血研自家製培地)でセレクションを行った。得られた形質転換細胞の中から抗体産生量の高い細胞をスクリーニングし、次いで限界希釈法によるクローニングを行って各キメラ抗体産生クローンを得た。

(4) ELISA

上記培養上清中に含まれるキメラ抗体の濃度は、ヤギ由来抗ヒトIgG Fc抗体 (CAPPEL) とプロテイン A-HRP (ZYMED社) を用いたサンドイッチELISA法により測定した。この際、市販のヒトIgG1抗体 (Biogenesis) の希釈系列を作製し、それを標準試料とした。

毒素結合活性はA型神経毒素 (0.5 μ g/well) をコートしたプレートを用いて測定した。ブロッキングには0.2%BSA、2次抗体にはペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG (H+L) (1:5000, BioRad)、基質はオルソフェニレンジアミンを使用した。反応は基質反応以外全て37°C2時間で行った。基質の発色反応は37°C30分で行った。

(5) 中和試験

ボツリヌス毒素と培養上清を等量

混合し、室温で30分反応させた後、マウスの腹腔内へ0.5ml接種した。毒素を培地のみと混合したサンプルをコントロールとし、コントロールが死亡した時点における、試験群の臨床症状をスコアで示した。

(6) イムノブロットティング

7.5%ゲルにA型精製毒素を2ME処理後1レーンあたり0.2 μ gアプライし、SDS-PAGEを行った。泳動蛋白をニトロセルロース膜に転写した後、培養上清と反応させた。2次抗体は、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgGヤギ抗体 (1:3000)、発色基質は4-chloro-1-naphtolを用いた。

(倫理面への配慮)

マウスの取扱いは動物保護に配慮し、動物倫理規定を遵守して行われた。

C. 研究結果

抗A型神経毒素マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ4種(2-4、2-5、9-4、B1)よりmRNAを抽出し、cDNA合成を行って、これをテンプレートとしてサブグループ毎に作製したV領域及びJ領域プライマーにてPCRを行った。その結果、VH、VL領域それぞれにPCR増幅バンドが複数検出された。その中からサイズの既知のVH、VL領域のcDNA遺伝子と一致しているバンドを選び、その核酸塩基配列を決定した。これらの複数のバンドから、開始コドンからJ領域までV領域内で正しいオープンリーディングフレームを取る遺伝子を選んだ結

果、それぞれのハイブリドーマ毎に一对の VH、VL 領域遺伝子の組み合わせが得られた。その核酸塩基及びアミノ酸配列を図 1～8 にそれぞれ示す。また、各 VH 領域及び VL 領域のアミノ酸配列について相同性を比較したところ、VH 領域間では相同性は認められなかったが (図 9)、VL 領域については 2-4 と 2-5 において 1 個のアミノ酸 (CDR3) のみ違いがみられた (図 10)。

これらの V 領域遺伝子をヒト抗体の C 領域遺伝子と結合させ、発現ベクターに組み込み、CHO-DG44 細胞に導入した。最終的にクローン化後、4 種のキメラ抗体産生細胞 (9-4、B1、2-4、2-5 由来の AC94、ACB1、AC24、AC25) を得た。これらの細胞の培養上清中のボツリヌス毒素中和キメラモノクローナル抗体 (抗体濃度は 20～100 $\mu\text{g/ml}$) は ELISA によって期待通りに毒素と結合することが示され (図 11)、さらにイムノブロッティングによる毒素との反応性を検討したところ、AC94 は神経毒素重鎖と AC24 は軽鎖と反応していることが示唆された (図 12、13)。AC25 及び ACB1 はいずれも明確な毒素結合活性は確認できなかった。

また、各培養上清中の毒素中和活性を調べたところ、表 1 に示すように AC94、ACB1、AC24 はコントロールと比較して延命あるいは症状の緩和が観察された (AC25 は未確認)。今後これらのキメラ抗体を培養上清より精製し、さらに詳細な活性評価を行う予定である。

D. 考察

抗 A 型神経毒素に対する 4 種類のマウス中和モノクローナル抗体の V 領域遺伝子を PCR クローニングにより単離し、そのアミノ酸配列を明らかにした。これらの抗体のエピトープは明らかでは無いが、少なくとも VH 領域が 4 種類とも全く異なることから (図 9)、異なるエピトープを認識している可能性がある。一方 VL 鎖に関しては 2-4 及び 2-5 が CDR3 内の 1 個のアミノ酸 (Arg-Tyr の変化) が異なるだけで、後は全く同じアミノ酸配列を持っていた。それぞれの抗体にとって、この 1 個のアミノ酸がどの程度抗原結合能へ貢献しているか興味を持たれる。もし、このアミノ酸の重要度がそれほどでもない場合には、2-4 と 2-5 抗体の両方の特異性を併せ持つ二重特異性抗体分子 (抗体分子の 2 つの V 領域の内、一つが 2-4 由来、もう一つが 2-5 由来の特異性を持つ抗体) が作製できる可能性があり、2-4 と 2-5 抗体のエピトープが異なった場合には、より中和能力の高い抗体となる可能性もある。さらに、医薬品を製造する観点から見ても、二種類の抗体を一つの細胞で製造することが出来るので、非常に効率的である。次年度にはこのような観点からもこれらの抗体の評価を行いたいと考えている。

今回、得られたキメラ抗体の性状を培養上清レベルで評価した。神経毒素との結合性はいずれのキメラ抗体でも認められたが、イムノプロットによる反応性評価では、マウスモノクロー

ナル抗体と同様に AC94 が H 鎖結合性を示した。AC25 と ACB1 はいずれも結合活性は認められなかった。AC24 については、L 鎖に強く反応するパターンが得られたが、マウスモノクローナル抗体での結合活性は確認できておらず、今回使用した濃度が高濃度(～100 μ g/ml)域であったために確認できた活性かも知れない。

今回作製したキメラ抗体では、AC25 を除き中和活性を確認している。AC25 に関しては今回用いた抗体量が少ないために中和活性を確認できなかったと思われる。

A 型毒素に対するキメラ抗体作製はこの 4 種で終了し、次年度では、得られた 4 種のキメラ抗体を精製して、その詳細な活性評価を検討する予定である。また、新たに E 型毒素に対するマウス中和抗体をキメラ化し、抗毒素製剤の構成成分の抗体種類を増やす計画である。

E. 結論

前年度に得られた抗ボツリヌス A 型神経毒素モノクローナル抗体 4 種から V 領域遺伝子をクローニングし、キメラ抗体を作製した。いずれのキメラ抗体も毒素に対して結合し、AC25 以外のキメラ抗体については中和活性も確認された。このことより、将来の抗毒素製剤を構成する抗 A 型抗毒素に対する候補抗体を選定することが可能になった。また、2-4 と 2-5 抗体

の VL 領域が CDR3 内の一アミノ酸を除いて全く同一であったために、次年度に二重特異性抗体分子の評価も行っていく予定である。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

勢戸幸路、幸田知子、向本雅郁、小崎俊司 (2004) ボツリヌス B 型毒素の受容体認識に関与するアミノ酸の同定：結合親和性の異なる Hc 構造との関係 第 77 回日本細菌学会 (大阪)

塚本健太郎、竹内くみこ、幸田知子、向本雅郁、小崎俊司 (2004) ボツリヌス C 型神経毒素と糖脂質およびリン脂質との相互作用について 第 51 回毒素シンポジウム (長崎)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

「新規な抗毒素抗体遺伝子」として出願準備中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
TCGAAGCTTGCCGCCACCATGGCTGTCTTGGGGCTGCTCTTCTGCCTGGTGACATTCCCAAGCTGTGTCTATCCCAGGT
HindIII Kozak  METAlaValLeuGlyLeuLeuPheCysLeuValThrPheProSerCysValLeuSerGlnVal
      90      100     110     120     130     140     150     160
GCAGCTGAAGCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACCTGCACAGTCTCTGGTTTCTCAT
GlnLeuLysGlnSerGlyProGlyLeuValGlnProSerGlnSerLeuSerIleThrCysThrValSerGlyPheSerLeu
      170     180     190     200     210     220     230     240
TAACTAGCTATGGTGTACACTGGGTTCGCCAGTCTCCAGGAAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTGATATGGAGTGGTGGGA
ThrSerTyrGlyValHisTrpValArgGlnSerProGlyLysGlyLeuGluTrpLeuGlyValIleTrpSerGlyGly
      250     260     270     280     290     300     310     320
AGCACAGACTATAATGCAGCTTTCATATCCAGACTGAGCATCAGCAAGGACAATCCAAGAGCCAAGTTTCTTTAAAAT
SerThrAspTyrAsnAlaAlaPheIleSerArgLeuSerIleSerLysAspAsnSerLysSerGlnValPhePheLysMET
      330     340     350     360     370     380     390     400
GAACAGTCTGCAAGCTAATGACACAGCCATATATTACTGTGCCAGAAAAGAGGGTTACTACGGCTACAACCTATGCTATGG
AsnSerLeuGlnAlaAsnAspThrAlaIleTyrTyrCysAlaArgLysArgGlyTyrTyrGlyTyrAsnTyrAlaMETAsp
      410     420     430     440     450     460
ACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACAGTCTCCTCAGGTGAGTGGATCCAGATCTTC
TyrTrpGlyGlnGlyThrSerValThrValSerSer      BamHI  BglIII

```

図 1. 9-4 抗体の VH 領域の核酸塩基配列とアミノ酸配列

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
CCGAAGCTTGCCGCCACCATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAATATCCAG
HindIII Kozak  METAspPheGlnValGlnIlePheSerPheLeuLeuIleSerAlaSerValIleIleSerArg
      90      100     110     120     130     140     150     160
AGGACAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCA
GlyGlnIleValLeuThrGlnSerProAlaIleMETSerAlaSerProGlyGluLysValThrMETThrCysSerAlaSer
      170     180     190     200     210     220     230     240
GCTCAAGTGAAGTTACATGCACCTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGATTATGACACATCCAAA
SerSerValSerTyrMETHisTrpTyrGlnGlnLysSerGlyThrSerProLysArgTrpIleTyrAspThrSerLys
      250     260     270     280     290     300     310     320
CTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGC
LeuAlaSerGlyValProAlaArgPheSerGlySerGlySerGlyThrSerTyrSerLeuThrIleSerSerMETGluAla
      330     340     350     360     370     380     390     400
TGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAATAA
GluAspAlaAlaThrTyrTyrCysGlnGlnTrpSerSerAsnProTyrThrPheGlyGlyGlyThrLysLeuGluIleLys
      410     420
AACGTAAGTGGATCCAGATCTAG
BamHI  BglIII

```

図 2. 9-4 抗体の VL 領域の核酸塩基配列とアミノ酸配列


```

      10      20      30      40      50      60      70      80
TCGAAGCTTGCCGCCACCATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCCTTGTCTTATTTTAAAAGGTGCCAGTGTGATGT
  HindIII Kozak METAspSerArgLeuAsnLeuValPheLeuValLeuIleLeuLysGlyValGlnCysAspVal
      90     100     110     120     130     140     150     160
GCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCGAAACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTT
  GlnLeuValGluSerGlyGlyGlyLeuValGlnProGlyGlySerArgLysLeuSerCysAlaAlaSerGlyPheThrPhe
      170     180     190     200     210     220     230     240
TCAGTAGCTTTGGAATGCACTGGGTTTCGTCAGGCTCCAGAGAAGGGGCTGGAGTGGTCCGATACATTAGTAGTGGCAGT
  SerSerPheGlyMETHisTrpValArgGlnAlaProGluLysGlyLeuGluTrpValAlaTyrIleSerSerGlySer
      250     260     270     280     290     300     310     320
AGTACCATCTACTATGCAGACACAGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATCCCAAGAACCCTGTTCTCTGCA
  SerThrIleTyrTyrAlaAspThrValLysGlyArgPheThrIleSerArgAspAsnProLysAsnThrLeuPheLeuGln
      330     340     350     360     370     380     390     400
AATGACCAGTCTAAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGAAAGGGTTTTGGCATTGATTACTACGGTAGTA
  METThrSerLeuArgSerGluAspThrAlaMETTyrTyrCysAlaArgLysGlyPheGlyIleAspTyrTyrGlySerSer
      410     420     430     440     450     460     470     480
GCTTTGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACAGTCTCCTCAGGTGAGTGGATCCAGATCTTC
  PheAlaMETAspTyrTrpGlyGlnGlyThrSerValThrValSerSer      BamHI  BglII

```

図 3. B1 抗体の VH 領域の核酸塩基配列とアミノ酸配列

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
TCGAAGCTTGCCGCCACCATGAGGTTCCAGGTTCCAGGTTCTGGGGCTTCTTCTGCTCTGGATATCAGGTGCCAGTGTGA
  HindIII Kozak METArgPheGlnValGlnValLeuGlyLeuLeuLeuLeuTrpIleSerGlyAlaGlnCysAsp
      90     100     110     120     130     140     150     160
TGTCAGATAACCCAGTCTCCATCTTATCTTGTGTCATCTCCTGGAGAAACCATTACTATTAATTGCAGGGCAAGTAAGA
  ValGlnIleThrGlnSerProSerTyrLeuAlaAlaSerProGlyGluThrIleThrIleAsnCysArgAlaSerLysSer
      170     180     190     200     210     220     230     240
GCATTAGCAAATATTTAGCCTGGTATCAAGAGAAACCTGGGAAACTAATAAGCTTCTTACTACTCTGGATCCACTTTG
  IleSerLysTyrLeuAlaTrpTyrGlnGluLysProGlyLysThrAsnLysLeuLeuIleTyrSerGlySerThrLeu
      250     260     270     280     290     300     310     320
CAATCTGGAATTCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACTCTCACCATCAGTAGCCTGGAGCCTGA
  GlnSerGlyIleProSerArgPheSerGlySerGlySerGlyThrAspPheThrLeuThrIleSerSerLeuGluProGlu
      330     340     350     360     370     380     390     400
AGATTTTGCAATGTATTACTGTCAACAGCATAATGAATACCCGTACACGTTCCGAGGGGGACCAAGCTGGAATAAAAC
  AspPheAlaMETTyrTyrCysGlnGlnHisAsnGluTyrProTyrThrPheGlyGlyGlyThrLysLeuGluIleLys
      410     420
GTAAGTGGATCCAGATCTAG
  BamHI  BglII

```

図 4. B1 抗体の VL 領域の核酸塩基配列とアミノ酸配列

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
TCGAAGCTTGCCGCCACCATGAAGTTGTGGTTGAACTGGATTTTCCTTGTAACACTTTTAAATGGTATCCAGTGTGAGGT
HindIII Kozak  METLysLeuTrpLeuAsnTrpIlePheLeuValThrLeuLeuAsnGlyIleGlnCysGluVal
      90     100     110     120     130     140     150     160
GAAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAACTTCTGGGTTCACCT
LysLeuValGluSerGlyGlyGlyLeuValGlnProGlyGlySerLeuArgLeuSerCysAlaThrSerGlyPheThrPhe
      170     180     190     200     210     220     230     240
TCACTGATTACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGCCTCCAGGAAAGGCACTTGAGTGGTTGGGTTTTATTAGAAAACAAAGCT
ThrAspTyrTyrMETSerTrpValArgGlnProProGlyLysAlaLeuGluTrpLeuGlyPheIleArgAsnLysAla
      250     260     270     280     290     300     310     320
AATGGTTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTCGGTTCACCATCTCCAGAGATAATCCCAAAGCATCCTCTA
AsnGlyTyrThrThrGluTyrSerAlaSerValLysGlyArgPheThrIleSerArgAspAsnSerGlnSerIleLeuTyr
      330     340     350     360     370     380     390     400
TCTTCAAATGAACACCCTGAGAGCTGAGGACAGTGCCACTTATTACTGTGCAAGAGATGGGGGGTACTTTGACTACTGGG
LeuGlnMETAsnThrLeuArgAlaGluAspSerAlaThrTyrTyrCysAlaArgAspGlyGlyTyrPheAspTyrTrpGly
      410     420     430     440     450
GCCAAGGCACCACTCTCACAGTTTCCTCAGGTGAGTGGATCCAGATCTTC
GlnGlyThrThrLeuThrValSerSer      BamHI BglII

```

図 5. 2-4 抗体の VH 領域の核酸塩基配列とアミノ酸配列

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
TGGAAGCTTGCCGCCACCATGGAATCACAGGCCAGGTCTTCCTCTCCCTGCTGCTCTGGGTATCTGGTACCTGTGGGAA
HindIII Kozak  METGluSerGlnAlaGlnValPheLeuSerLeuLeuLeuTrpValSerGlyThrCysGlyAsn
      90     100     110     120     130     140     150     160
CATTATGATGACACAGTCCGCATCATCTCTGGCTGTGTCTGCAGGAGAAAAGGTCACTATGAGCTGTAAGTCCAGTCAAA
IleMETMETThrGlnSerProSerSerLeuAlaValSerAlaGlyGluLysValThrMETSerCysLysSerSerGlnSer
      170     180     190     200     210     220     230     240
GTGTTTTATACAGTTCAAATCAGAAGAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATC
ValLeuTyrSerSerAsnGlnLysAsnTyrLeuAlaTrpTyrGlnGlnLysProGlyGlnSerProLysLeuIle
      250     260     270     280     290     300     310     320
TACTGGCATCCACTAGGGAATCTGGTGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTCTTACCAT
TyrTrpAlaSerThrArgGluSerGlyValProAspArgPheThrGlySerGlySerGlyThrAspPheThrLeuThrIle
      330     340     350     360     370     380     390     400
CAGCAGTGTACAAGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTATCAATACCTCTCCTCGCGGACGTTCCGGTGGAGGCCA
SerSerValGlnAlaGluAspLeuAlaValTyrTyrCysHisGlnTyrLeuSerSerArgThrPheGlyGlyGlyThrLys
      410     420     430
AGCTGAAATCAAACGTAAGTGGATCCAGATCTAG
LeuGluIleLys      BamHI BglII

```

図 6. 2-4 抗体の VL 領域の核酸塩基配列とアミノ酸配列

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
TTCGAAGCTTGCCGCCACCATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTCTCCTGTCAGTAACTACAGGTGCCACTCTGAGG
HindIII Kozak METGluTrpSerTrpValPheLeuPheLeuLeuSerValThrThrGlyValHisSerGluVal
      90     100     110     120     130     140     150     160
TCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGACCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCA
GlnLeuGlnGlnSerGlyProAspLeuValLysProGlyAlaSerValLysIleSerCysLysAlaSerGlyTyrSer
      170     180     190     200     210     220     230     240
TTCAGTGGTACTACTACATGCACCTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAGAGCCTTGAGTGGATTGGACGTGTTAATCCTAACA
PheThrGlyTyrTyrMETHisTrpValLysGlnSerHisGlyLysSerLeuGluTrpIleGlyArgValAsnProAsnAsn
      250     260     270     280     290     300     310     320
TGGTGGTACTAGCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCATATTAAGTGTAGACAAGTCCAGCACAGCCTACATGG
GlyGlyThrSerTyrAsnGlnLysPheLysGlyLysAlaIleLeuThrValAspLysSerSerSerThrAlaTyrMETGlu
      330     340     350     360     370     380     390     400
AGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGTCCCCTACTACGGTAGTAGCTACAGACTGG
LeuArgSerLeuThrSerGluAspSerAlaValTyrTyrCysAlaSerProProThrThrValValAlaThrAspTrp
      410     420     430     440     450     460     470
TACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCAGGTCACAGTTTCTCAGGTGAGTGGATCCAGATCTTC
TyrPheAspValTrpGlyAlaGlyThrThrValThrValSerSer BamHI BglII

```

図 7. 2-5 抗体の VH 領域の核酸塩基配列とアミノ酸配列

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
TGGAAAGCTTGCCGCCACCATGGATTACAGGCCAGGTCTCCTCTCCTGCTGCTCTGGGTATCTGGTACCTGTGGGAA
HindIII Kozak METAspSerGlnAlaGlnValPheLeuSerLeuLeuLeuTrpValSerGlyThrCysGlyAsn
      90     100     110     120     130     140     150     160
CATTATGATGACACAGTCGCCATCATCTCTGGCTGTGTCTGCAGGAGAAAAGGTCATATGAGCTGTAAGTCCAGTCAAA
IleMETMETThrGlnSerProSerSerLeuAlaValSerAlaGlyGluLysValThrMETSerCysLysSerSerGlnSer
      170     180     190     200     210     220     230     240
GTGTTTTATACAGTTCAAATCAGAAGAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATC
ValLeuTyrSerSerAsnGlnLysAsnTyrLeuAlaTrpTyrGlnGlnLysProGlyGlnSerProLysLeuLeuIle
      250     260     270     280     290     300     310     320
TACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGTGCCTGTATGCTTACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTACTCTTACCAT
TyrTrpAlaSerThrArgGluSerGlyValProAspArgPheThrGlySerGlySerGlyThrAspPheThrLeuThrIle
      330     340     350     360     370     380     390     400
CAGCAGTGTACAAGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTATCAATACCTCTCCTCGTACACGTTCCGAGGGGGACCA
SerSerValGlnAlaGluAspLeuAlaValTyrTyrCysHisGlnTyrLeuSerSerTyrThrPheGlyGlyGlyThrLys
      410     420     430
AGCTGGAATCAAACGTAAGTGGATCCAGATCTAG
LeuGluIleLys BamHI BglII

```

図 8. 2-5 抗体の VL 領域の核酸塩基配列とアミノ酸配列

