

20050110/A

厚生労働科学研究研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュトリーサイエンス総合研究事業

救急治療薬としてのヒト抗体調製に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 黒澤 良和

平成18（2006）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. インフルエンザワクチン株を用いたヒトモノクローン抗体の性状解析	
	奥野良信----- 8
2. ハブ出血毒 HR2 の精製とプロテアーゼ活性を用いた HR2 中和抗体のスクリーニングについて	
	盛根信也----- 16
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 22

厚生労働科学研究費補助金（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）
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

本プロジェクトは、各種疾患に対して治療に役立つヒトモノクローン抗体開発を目的とする厚生労働科学研究費補助金事業として実施されている。第 I 期：平成 9-11 年度、第 II 期：平成 12-14 年度、第 III 期：平成 15-17 年度と 9 年にわたって継続して研究し、本報告書は第 III 期最終年度の成果について主として記述する。抗体は、体内に侵入した様々な毒素を中和し、また病原性ウイルスを中和する能力を有する強力な生体防御分子である。そこで従来からもガス壊疽毒素、ジフテリア毒素、ボツリヌス毒素、破傷風毒素、ハブ毒、マムシ毒に対しては、ウマに対してトキソイドで免疫して調製した抗毒素が治療薬として用いられている。ウマ抗血清は、ウマ成分であることによる様々な副作用（血清病等）があり、これをヒト抗体に置換したいという強いニーズがある。研究代表者らは、ジフテリア毒素については、既に非常に強い毒素中和活性を示すモノクローン抗体を 1 種類得ている（第 II 期の成果）。一方、へび毒の場合、毒素の中には多種類の成分が含まれるために、その中どの成分を中和すれば十分な治療効果が得られるのか明確でない。しかし、ハブ毒では出血因子 HR1 及び HR2 が単離同定されており、本プロジェクトではこの 2 種類の成分を中和する抗体単離を目標とした。HR1 に対しては強い中和活性を示すヒトモノクローン抗体の単離に既に成功しており、平成 17 年度は、HR2 に対する中和抗体単離を集中的に進めることにした。得られた結果は、HR2 を中和するには複数の抗体を組み合わせる必要がある可能性を示した。世界的にみても病原性ウイルスに対して今までに開発されたモノクローン抗体は、RSV (Respiratory syncytial virus) のみである。ウイルスに感染し高い中和抗体価を示すヒト血清を選んで調製された γ グロブリン製剤が、サイトメガロウイルス、狂犬病ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス (VZV)、B 型肝炎ウイルスに対して市販されている。このような製剤は薬害エイズの問題に代表されるように、不特定多数のヒト血清を材料としているこ

とに伴う危険が常に存在する。研究代表者らは VZV に対して強い中和活性を示すモノクローン抗体を 2 種類単離しており(第 II 期の成果)、臨床試験開始へ向けた準備を進めている。本研究プロジェクトでは、現在大きな社会問題となっているトリインフルエンザウイルス対策も視野に入れて、ヒト体内にインフルエンザウイルスに対するどのような中和抗体が存在するのかを明らかにすることを目標に研究を実施した。

分担研究者

奥野良信・大阪府立公衆衛生研究所・副所長
盛根信也・沖縄衛生環境研究所・研究員

A. 研究目的

ヒト体内で抗体がウイルス感染による発症防止や治癒に働いている以上、ウイルスを中和するモノクローン抗体を単離調製すれば、それが予防薬や治療薬となり得ることは当然予想できる。1975 年に細胞融合を用いたモノクローン抗体作製法が開発され、直後には様々な疾患に対する治療薬が次々と作られると予想された。しかし最初マウス由来の抗体であることが問題(マウス抗体に対する抗体産生が誘導される)となり、それを解決するために V 領域のみをマウス由来として他の部分はヒト由来とするキメラ抗体作製技術が開発された。更には V 領域の中で抗原結合部を形成する CDR (complementarity-determining region)のみをマウス由来として残りの全ての部分をヒト由来とするヒト化抗体作製技術も開発された。現在までに市販されている治療用抗体は以上の 2 方法のいずれかを用いている。最近ではファージディスプレイ系を用いたヒト抗体ライブラリー作製技術の開発およびヒト抗体を産生するトランスジェニックマウスの作製により、完全なヒト抗体を単離調製することが可能になった。本プロジェク

トはヒト抗体ライブラリー作製技術の改良—ライブラリースクリーニング法の開発を通して、各種疾患に対する治療用ヒトモノクローン抗体を開発することが目的である。対象疾患として病原性ウイルス、病原菌の分泌する毒素、ヘビ毒を選んでいる。第 II 期で抗体単離を終了した疾患(ジフテリア毒素、破傷風毒素、VZV)及び他の研究費で実施しているもの(SARS ウイルス、ボツリヌス毒素)を別として、本プロジェクトではハブ毒およびインフルエンザウイルスを対象疾患とした。

ハブ毒は出血因子 HR1 及び HR2 を中和するヒト抗体単離を目標としているが、HR1 を中和する抗体については昨年度までに単離調製に成功しているため、平成 17 年度は HR2 を中心に研究を進めることにした。

抗インフルエンザウイルス抗体については、第 I 期、第 II 期を通しても実施し、総計 5 種類のインフルエンザウイルス中和抗体単離に成功している。毎年インフルエンザには多くのヒトが感染—発病し、現在我が国では毎年 4 千万人の人がワクチン接種を受けている。更に H5N1 型のトリインフルエンザウイルスがヒトからヒトに感染する能力を獲得して新型ウイルスとなり、大流行(pandemic)を起こすことが心配されている。にもかかわらず、ワクチン接種により、またはウイルス感染によりヒト体内にどのような(ウイルス粒子のどこ

を認識する)、どれくらいの(何種類の)抗体が産生されるのかについてモノクローン抗体レベルでは全く研究が行われていない。研究代表者らは、ハブ毒中和抗体単離を目標とした研究を実施する中で、献血ボランティアが成分(リンパ球を含む単核球画分)献血に協力してくれれば3L血液相当のリンパ球(10^9 程度)を採取し、それを材料に抗体ライブラリー(H鎖として 10^9 のクローン数、H-L鎖として 10^{11} のクローン数からなる)を作製することにより、その中に献血者の *in vivo* 抗体レパートリーを十分に反映させることができることを見出した。そこで本プロジェクトでは、現在流行しているH3N2型インフルエンザウイルスに対して、どのような中和抗体が体の中に産生されているかその全体像を明らかにすることにした。この研究は、H5N1型トリインフルエンザウイルスがヒトからヒトへ感染する新型ウイルスに変化した際、どのようなワクチンを準備してヒトに接種すればどのような抗体が産生されるか解析するモデルともなる。

B. 研究方法

長年にわたる経験から得た知識であるが、抗体ライブラリーから抗体を得ようとする場合に考慮すべき重要な点が幾つかある。最初、一体何を目的として抗体を単離するかを明確にする。抗原を用いてライブラリーをスクリーニングすると、用いた抗原に結合する抗体は何種類(多種類)か必ず単離できる。しかし、その中に使用目的に合致した性質を示す抗体が含まれる確率は低い。その問題点を克服するためのノウハウと表現すべきファージ抗体ライブラリーの長所と短所を熟知した研究グループは少ない。本プロジェクトの場合、

ハブ毒に関しては、ウマ抗血清調製に用いるハブ毒素の抽出を長年にわたって実施したヒト(彼は何百匹ものハブを常時飼育しており、ハブ毒を抽出し、更に生涯に5回咬まれた経験を持つ)が献血ボランティアとなって採取したリンパ球を材料にして作製した抗体ライブラリーを抗体のソースとして用いている。そのためにライブラリーの中に出血因子HR1とHR2に強く結合する抗体が多数含まれていることは保証されていた。そこで精製したHR1とHR2を抗原としてパニング法によりHR1及びHR2に結合する抗体を多種類単離する。問題となるのはその中に毒素中和活性を示すものがどの程度存在するかであり、そもそもモノクローンレベルで毒素中和能力を示す抗体が存在するか、それとも複数共存して初めて中和活性を示すかであった。平成16年度までの研究で抗HR1抗体としてはHR1の毒性を中和するモノクローン抗体が単離できた。抗HR2抗体については、HR2に結合してもHR2の毒性を中和できない抗体しか見出されていなかった。

インフルエンザウイルスに対する中和抗体の研究には、小児科医の協力を得ることにした。小児科医は日々感染症に罹患した患者と接触している。とりわけインフルエンザは、多数の患者が毎年発症し、更にウイルスは空気感染するためにインフルエンザウイルスに対し小児科医は *heavily immunized* の状態にあると推定される。インフルエンザウイルスの特徴は、中和エピトープを有するヘマグルチニン(HA)分子のアミノ酸配列に変異を導入することを通して毎年抗原性が変化(*antigenic drift*)する点にある。そこで本プロジェクトでは、1968年に大流行(*pandemic*)を起こした香港風邪の原因ウイル

スに始まり現在に至るまで流行している H3N2 型ウイルスに対して、1968 年から 2004 年に至る間に単離調製されたワクチン株 12 種類を抗原として用いることにした。また小児科医としては年齢の異なる 3 名（1944 年生、1964 年生、1974 年生）の協力を得た。3 名のリンパ球から作製した 3 種類の抗体ライブラリーを 12 種の抗原を用いてスクリーニングし（総計 36 通りの組合せ）、1968 年から 2004 年に至る H3N2 型ウイルスに対する抗体を全て得ることが目標である。単離した抗体についてはどの年代のウイルスを中和するか、その抗原特異性の分布を先ず明らかにすることにした。

C. 研究結果

ハブ毒に対する抗体単離

本プロジェクトは主任研究者の研究室で抗体ライブラリーの作製、抗体の単離を実施し、分担研究者の研究グループが抗原の調製、単離した抗体の毒素中和活性を測定するという分業体制で進めた。送付されてきた HR2 抗原は SDS-PAGE による解析で 40 kDa、25 kDa（主バンド）、20 kDa と 3 成分含まれていたため、MS/MS 解析でそれぞれの成分を同定した。その結果 40 kDa の分子は vascular apoptosis-inducing protein（ハブ）、25kDa の分子が Hemorrhagic metalloprotease（HR2）、20 kDa の分子は flavocetin-a（ハブ）であると判明した。HR2 が主成分であるため、そのままスクリーニングに用いた。通常のパニング法により 51 種類の抗 HR2 抗体を取得した。更に偏って多く取得される抗体（3 種類）を用いて抗原をマスク（エピトープブロッキング）することにより更に 10 種類の抗体を得た。盛根の報告に詳細が記されているが、これら 61 種類の抗体は全て HR2 の毒性を中和することができ

なかった。抗体ライブラリー作製に際し、B リンパ球を提供したボランティアの血清には明らかに強い HR2 中和力を示す抗体が含まれる。そして我々の用いている抗体ライブラリー作製技術に従えば、ライブラリーの中にその中和力を示した抗体が含まれているはずである。HR1 では単独のモノクローン抗体が毒素中和力を示す例があったので HR2 でも当然そうなると考えたが、HR2 では中和力を示すためには複数の抗体の存在が必要である可能性があった。そこで 4 回のパニングを繰り返して得た抗体集団をそのままポリクローン抗体のまま中和試験を実施したところ、強い中和活性が認められた（盛根報告参照）。今後治療薬とするために、この中から中和活性に必要な最少の抗体の組み合わせを見つけることが重要である。

H3N2 型インフルエンザウイルスに対する抗体単離

平成 16 年度に 3 名の小児科医 Dr. A（1944 年生）、Dr. Y（1964 年生）、Dr. N（1974 年生）から成分血を採取し、3 組の巨大な抗体ライブラリー作製を実施した。そして 1968 年の A/Aichi/2/68 株および 2004 年度のワクチン株である A/Wyoming/3/2003 を抗原としたスクリーニングを実施した。インフルエンザウイルスに対する抗体については、AIMS ライブラリー[数 10 名のリンパ球提供者（臍帯血、扁桃、骨髓、末梢血）から作製したもの]を用いた数年にわたる研究で 5 種類の中和活性を示す抗体を単離するのがやっとであった。それが今回作製したライブラリーを用いると数多くの抗体が得られることが判明したために、平成 17 年度になって藤田保健衛生大学医学部の 21 世紀 COE プログラム「超低侵襲標的化診断治療開発センター」の中心テーマの一つとして実施す

ることを決定し、3名のCOE研究支援者が本プロジェクトへ全面的に参加することとなった。そのために、3組の抗体ライブラリーx12種類の抗原の組合せで大々的スクリーニングが繰り返された（現在も続いている）。既に総計7,390個のクローンが単離され、317種類のウイルス中和抗体が単離されている。そのクローン全てについて12種類の抗原どれを中和するか、体系的な解析が進められている。解析途中であるがその生物活性については分担研究者である奥野の報告書に詳細に書かれている。本研究により3名の小児科医の体の中に存在する抗H3N2型インフルエンザウイルス中和抗体の *in vivo* レポートリーの全体像を明らかにできる。

D. 考察

本プロジェクトは、病原性ウイルス、病原菌が分泌する毒素、へビ毒等に対して治療薬としてのヒト抗体を単離調製する技術開発を行い、更に具体的に治療用ヒト抗体を開発することを目的に進められている。ここで対象としている疾患の多くは、具体的に罹患—治療した経験を有する、そのために体の中にウイルスや毒素に対する強い中和活性を示す抗体を有するヒトがいる例が多い。そのようなヒトがボランティアとして成分献血に協力してくれる場合は、そのリンパ球(10⁹程度)を用いて抗体ライブラリーを作製し、その中から該当する抗体をモノクローン化すると優れた性能を示す抗体が確実に得られることが明確になってきた。

病原性ウイルスの場合

今までに開発されて市販されている抗ウイルスモノクローン抗体は、RSVに対するものだけである。HIVに対しては数多くの報告があるが、

臨床試験の成績は芳しくない。VZV、B型肝炎ウイルス、麻疹、おたふく風邪等は、今後治療用抗体が開発されるであろうし、我々の場合VZVは既に候補抗体の単離に成功している。得られた結果が示すことは、ウイルスに対して中和する能力のある抗体は、単一のモノクローン抗体で充分有効に機能する。

平成17年度にはH3N2型インフルエンザウイルスに対する抗体単離に集中した。3名の小児科医のリンパ球から作製した抗体ライブラリーを徹底的にスクリーニングすることにより、ヒト体内では一体何種類ぐらいの抗体を産生しているのか、次第に全体像が明らかになりつつある。更にH3N2型ウイルスは1968年から既に37年以上にわたって antigenic drift を起こしつつ流行を続けている。1968年の株にしか中和できない抗体から1968年から2004年に至る全ての株を中和できるものまで、一人あたり10-200種類の抗体を産生しているようである。今後それぞれの抗体がどのような抗原特異性を示し、またどのような中和エピトープを認識しているかが明らかになる中で、この研究の価値が明確になる。とりわけ広い抗原特異性を示す抗体が治療薬になり得るかも大きな焦点となる。抗体の場合、ワクチン接種によって産生誘導される抗体と感染—発症により治療に役立った抗体の間で定性的な差があるのではないかという根本問題に対する解答を得られるかもしれない。このことは現在社会問題化しているH5N1型トリインフルエンザがやがてヒトからヒトへ感染す新型ウイルスとなり、pandemicを起こすであろうことに対して、ワクチン開発、更には抗体を前もって準備することの意義についても有効な答を得る必要がある。

病原菌が分泌する毒素に対して

生体防御分子としての抗体は、通常はポリクローン抗体として機能している。ウイルスを中和する抗体の場合は、ウイルスの感染能を失わせる等によりウイルスを失活させる例があり、モノクローン抗体で充分有効であるが、病原菌毒素はどうであろうか。代表者らが得ているデータは、ジフテリア毒素に対しては単独で強い毒素中和活性を示すモノクローン抗体単離に成功した。一方、破傷風毒素、ボツリヌス毒素は、結合活性は充分高くても (Kd 値で 0.1nM オーダー)、中和活性はモノクローン抗体レベルであまり高いものは得られていない。発表されている論文でも異なるエピトープを認識する複数の抗体が存在しないと完全中和はできないという記述がある。治療用抗体開発には一層の工夫が必要である。

へび毒に対して

病原菌が分泌する毒素は、それぞれ単一タンパク質であり、標的細胞への吸着—侵入—毒素作用の全過程が明らかにされており、抗体によって中和するために必要な条件も解析し易い。蛇毒には多くの成分が含まれるために状況は単純でない。しかしハブ毒の場合、毒素の主成分である出血因子 HR1、HR2 が同定されていたのでそれを中和することを目標に掲げた。更に HR1 及び HR2 に対する強力な中和抗体を有するヒトの協力が得られるという特殊な状況があり、我々が作製した抗体ライブラリーは世界にこれしか存在しないものである。HR1 に対してはモノクローン抗体が充分強い中和活性を示した。そこで HR2 に対しても当然モノクローン抗体で中和効果を期待したが、状況はより複雑なようである。今後抗体が毒素を中和するとはどのような条件を満たした時なのか、解析を進める中で治療用ヒト抗体開発が本当に可能か検討する。

本プロジェクトを開始して 9 年経過し、治療用ヒト抗体を開発するとはどういうことかがその道筋が明らかになりつつある。折角強い中和活性を示す抗体を単離しても、臨床試験という最終関門を通過しないと治療薬としては認可されない。患者数の少ない疾患に対しては、臨床試験を行う十分な数の被験者を得にくいという問題がある。このような様々な問題も今後解決する必要がある。

E. 結論

ハブ毒に対しては、出血因子 HR1 に対する強い中和活性を示すモノクローン抗体単離成功に続いて、HR2 に対しては中和活性を得るのに複数の抗体の関与が必要らしいという結論が得られた。治療薬とするには必要な抗体の種類は少ないほど実現可能である。HR2 中和に必要な抗体の種類と組合せを明確にする必要がある。

H3N2 型インフルエンザウイルスに対して、3 名の小児科医の中でどのような中和抗体がどの位の数存在するか、全体像が明らかにされつつある。これは病原性ウイルスに対して体内ではどのような抗体が準備されるかについての初めての完全な情報を与えることになる極めて重要な研究であり、完全にやり遂げる覚悟で実施している。この研究の延長には、H3N1 型トリインフルエンザがヒトからヒトへ感染する新型ウイルスになる前に、予防もしくは治療に役立つヒト抗体を準備するという人類にとって緊急課題への解答も与えることになる。

F. 健康危険情報

該当事項なし

- G. 研究発表
- I. 論文発表
1. M.Sato, R. Iwaya, K. Ogihara, R. Sawahata, H. Kitani, J. Chiba, Y. Kurosawa & K. Sekikawa: Intrabodies against the EVH1 domain of Wiskott-Aldrich syndrome protein inhibit T cell receptor signaling in transgenic mice T cells. *FEBS J.* 272, 6131-6144 (2005).
 2. 黒澤良和: 血液代替物としての治療用ヒト抗体の開発. *人工血液* 13, 13-21 (2005).
 3. J. Okada. How many kinds and what kinds of antibodies that neutralize H3N2 type of influenza virus are present in the human body? The third international workshop of Fujita Health University 21st century COE. "Can monoclonal antibodies regulate flu?" Nagoya, Feb. 24-25, 2006.
- II. 学会発表
1. 黒澤良和 「感染症および癌治療薬としてのヒト抗体」人工血液を作る(6)、於：日本科学未来館、平成18年2月11日
 2. Y.Kurosawa. What can we do? Rationale for our antibody technology. The third international workshop of Fujita Health University 21st century COE. "Can monoclonal antibodies regulate flu?" Nagoya, Feb. 24-25, 2006.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
抗IGSF4抗体及びその利用
特願 2005-54624、
平成17年2月28日出願

厚生労働科学研究費補助金（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）
分担研究報告書

インフルエンザワクチン株を用いたヒト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
研究協力者： 纈纈律子 大阪府立公衆衛生研究所
岡田 潤 藤田保健衛生大学総合医科学研究所

研究要旨：成分採血の材料から作製されたヒト抗体ライブラリーより、ファージディスプレイ法で H3N2 のインフルエンザワクチン株を抗原として多数のヒトモノクローン抗体を単離した。これら抗体の 6 種類のワクチン株に対する生物活性を、ELISA、HI 試験、染色試験、中和試験で測定した。ほとんどの抗体が HA を認識し、それら抗体の大部分が中和活性を有していた。得られた抗体にはバラエティーがあり、ホモのワクチン株だけを中和するものから多くのワクチン株を中和できるものまで様々であった。IgG に変換して解析した 2 個の抗体のうち、1 個は H3N2 が初めて登場した 1968 年から現在のワクチン株まですべて中和し、予防、治療に有用な抗体と考えられた。

A. 研究目的

3 名の小児科医から成分採血によりリンパ球を採取し、それぞれの抗体ライブラリーを作製した。A 香港型 (AH3) のインフルエンザワクチン株を抗原とし、ファージディスプレイ法により、それら抗体ライブラリーから多数のヒトモノクローン抗体を得た。これら抗体の性状を免疫学的、ウイルス学的に解析し、ヒト体内で産生される抗体の多様性について調べた。

B. 研究方法

1. ウイルス

抗体のクローニングと、クローニングされた抗体の性状を解析するため、AH3 の過去から現在に至る以下の 12 種類のワクチン株を用いた。

- ① A/Aichi/2/68 (H3N2)
- ② A/Fukuoka/1/70 (H3N2)
- ③ A/Tokyo/6/73 (H3N2)
- ④ A/Yamanashi/2/77 (H3N2)
- ⑤ A/Niigata/102/81 (H3N2)
- ⑥ A/Fukuoka/C29/85 (H3N2)
- ⑦ A/Guizhou/54/89 (H3N2)
- ⑧ A/Kitakyushu/159/93 (H3N2)
- ⑨ A/Sydney/5/97 (H3N2)
- ⑩ A/Panama/2007/99 (H3N2)
- ⑪ A/Wyoming/3/2003 (H3N2)
- ⑫ A/New York/55/2004 (H3N2)

コントロールとして現行の H1N1 ワクチン株、A/New Caledonia/20/99 (H1N1) も使用した。

2. ワクチン株に対するヒトモノクローン抗体の単離

3名の小児科医、A (1944 生)、Y (1964 生)、N (1974 生) より成分採血でリンパ球を採取し、それぞれの抗体ライブラリーを作製した。12種類のH3N2ワクチン株を抗原とし、各ライブラリーよりファージディスプレイ法でインフルエンザウイルスに対するヒトモノクローン抗体を得た。

これら Fab 抗体を大腸菌で大量培養し、培養上清を約 10 倍に濃縮したものを原液として生物活性を解析した。

3. 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) により実施した。

2倍に希釈した Fab とワクチン株のウイルスを 1:1 で混合し、37°C で 1 時間反応させて中和した。この反応液を MDCK 細胞に感染させ、中和から逃れた残存ウイルスで形成されるフォーカスを PAP 法で染色し、フォーカス減少率を求めた。

4. 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。

5. 染色試験

ワクチン株を MDCK 細胞に感染させ、24 時間後に固定し、使用時まで -30°C に保存した。感染細胞の染色は、ヒト抗体 (Fab) 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。

細胞内のウイルス抗原を明瞭に染色でき

る抗体の希釈倍率を染色価とした。

6. ウェスタンブロット法

ワクチン抗原を用い SDS-PAGE を行った。その後、ゲルを 80V で 1 時間、PVDF へ Blotting した。その PVDF に各ヒトモノクローン抗体を反応させた後、POD-anti Human IgG(H+L) (Zymed) を 1:1000 で反応させた。検出は、Protein ditector™ TMB Western Blot Kit (KPL, Inc. Gaithersburg USA) を用いた。

C. 研究結果

1. 性状解析に供されたヒト抗体の総数 (表 1)

ワクチン株を抗原として得られたヒト抗体 (Fab) のクローンの中で、生物活性を詳細に解析したのは合計 159 個であった。12 種類の抗原に対してヒト抗体が作製されたが、多くのクローンが得られた 6 種類の抗原に対するヒト抗体について解析した。中和活性、HI 活性とも有する抗体が 114 個と全体の 72% と主流を占め、HI 活性を有しないが中和活性を示したのが 19 個存在した。両活性ともに有しないのが 26 個存在したが、Fab の活性を測定しているため、IgG に変換すると活性が上昇し、中和活性を示すものが出てくる可能性は十分にある。

2. ヒト抗体が認識する蛋白の確認

HA 蛋白をターゲットにヒト抗体をクローニングしているが、ワクチン抗原中には HA 以外のウイルス蛋白が含まれ、得られた抗体がどの蛋白を認識しているのか調べる必要がある。そこで、ウェスタンブロット法によりヒト抗体の認識蛋白を同定した。図 1 は抗原に A/Sydney/5/97 を用いた一例で、大部分の抗体が HA を認識していることを

証明した。

3. A/Aichi/2/68 (H3N2) を抗原として得られたヒト抗体の性状解析

得られた Fab 抗体の各種ワクチン株に対する反応性を ELISA で調べた (図 2)。大部分の抗体は Y ラブラリーから得られ、A ライブラリー、N ライブラリーから得られたものは少数であった。ELISA での反応性は、強陽性 (+++), 中等度陽性 (++) 弱陽性 (+), 陰性 (-) で示した。

Y ライブラリーから得られた抗体は、大部分がホモの A/Aichi/2/68 だけに強く反応した。N ライブラリーから得られた F005-126 は興味ある抗体で、A/Aichi/2/68 だけでなく、調べたすべての H3N2 ワクチン株に対して反応した。A ライブラリーから得られた 2 種類の抗体 (F001-109、F001-148) は、H3N2 のワクチン株だけでなく A/New Caledonia/20/99 (H1N1) にも反応し、HA ではなく、A 型インフルエンザウイルス共通に存在する蛋白を認識していると推測された。

これら抗体の中で、反応性の異なった 5 種類の抗体を選び、各ワクチン株に対する生物活性を ELISA、HI 試験、染色試験、中和試験で測定した (図 3)。F003-144 は得られた抗体の大部分を占める典型的な抗体で、ホモの A/Aichi/2/68 だけに対し、強い ELISA 活性、HI 活性、染色活性、中和活性を示した。F003-114 は ELISA で A/Aichi/2/68 だけでなく、A/Fukuoka/1/70 にも弱く反応したが、染色活性、中和活性は A/Aichi/2/68 に対してだけ認め、F003-144 に近い性質の抗体であった。F001-135 は、ELISA で A/Aichi/2/68 だけでなく、A/Sydney/5/97 にも弱く反応した。

しかし、HI 活性、中和活性を認めず、HA に対する親和力の弱い抗体だと推測された。

F005-126 は HI 活性を有しないにもかかわらず、ELISA、染色試験、中和試験で多くのワクチン株に反応し、広域反応性中和抗体として有用な抗体である可能性が示された。この抗体を IgG に変換して更に詳細に解析したので、その結果は後で紹介する。F001-109 は HI 活性、中和活性を有さず、ELISA、染色試験でほとんどすべてのワクチン株に反応した。ウエスタンブロット法によりこの抗体の認識蛋白を同定したところ、予想通り NP に対する抗体であった。

4. A/Sydney/5/97 (H3N2) を抗原として得られたヒト抗体の性状解析

A ライブラリーと Y ライブラリーより多数の抗体が得られた (図 4)。これら抗体の多くは、A/Sydney/5/97 だけでなく、それ以後のワクチン株である A/Panama/2007/99、A/Wyoming/3/2003 にも ELISA で交差反応性を示した。この中から代表的な 5 種類の株を選び、生物活性を解析した (図 5)。

F010-073 は ELISA でホモの A/Sydney/5/97 だけに反応したが、染色試験で A/Kitakyushu/159/93 にも若干反応した。しかし、HI 活性は認めず、中和活性は A/Sydney/5/97 だけに認めた。F010-082 は ELISA、HI 試験、染色試験、中和試験の結果が良く一致した抗体で、A/Sydney/5/97 と A/Panama/2007/99 の両株に活性を示した。F010-020 と F010-009 の抗体の性質は良く似ており、HI 活性を有し、A/Sydney/5/97 だけでなく、このワクチン株前後の A/Kitakyushu/159/93、A/Panama/2007/99、A/Wyoming/3/2003 に

対しても中和活性を示した。F010-071 も前の 2 種類の抗体と大きな違いはないが、A/Kitakyushu/159/93 に対する中和活性は認めなかった。

5. A/Panama/2007/99 (H3N2) を抗原として得られたヒト抗体の性状解析

A ライブラリーと Y ライブラリーから抗体が得られたが、後者の方がかなり多かった (図 6)。大部分の抗体が、A/Panama/2007/99 だけでなく、前後のワクチン株とも反応し、更に一部の抗体は A/Sydney/5/97 以前の古いワクチン株とも反応した。特徴ある抗体を選び、それらの生物活性を詳細に調べた (図 7)。

F008-065 はホモの A/Panama/2007/99 に弱く反応したが、染色試験、中和試験においてもこの型に対してだけ特異的に反応した。しかし、HI 活性は示さなかった。F008-013 は HI 活性を有し、ELISA、染色試験、中和試験で A/Panama/2007/99 と A/Sydney/5/97 に対し活性を示した。F008-090 は HI 活性を示さず、ELISA、染色試験で A/Panama/2007/99 と前後のワクチン株にも反応したが、中和活性は A/Wyoming/3/2003 に対する方が高いという興味ある抗体であった。

F008-055 と F008-056 は良く似た反応性を示した。A/Kitakyushu/159/93 から A/Wyoming/3/2003 までのワクチン株に対する強い中和活性を示し、これら抗体は 10 年以上に渡り保存されている HA の中和エピトープを認識していると考えられた。F008-057 は A/Panama/2007/99 以前のワクチン株にも幅広く反応する抗体で、HI 活性を認めなかったが、A/Fukuoka/C29/85 から A/Panama/2007/99 まで ELISA、染色

試験、中和試験で活性を認めた。

6. A/Wyoming/3/2003 (H3N2) を抗原として得られたヒト抗体の性状解析

A、Y、N すべてのライブラリーから抗体が得られた (図 8)。それらはバラエティーに富んでおり、A/Wyoming/3/2003 に特異的に反応する抗体や、A/Aichi/2/68 から最近のワクチン株まで幅広く反応する抗体が得られた。その中から代表的な 6 種類の抗体を選択し、生物活性を調べた (図 9)。

F004-016 は ELISA で A/Wyoming/3/2003 だけに活性を示したが、HI 活性、中和活性とも認めず、染色試験で弱く反応しただけであった。HA に対する親和力が弱い抗体と考えられた。F006-127 は、ELISA では A/Sydney/5/97、A/Panama/2007/99、A/Wyoming/3/2003 に反応したが、染色活性、中和活性は A/Wyoming/3/2003 に特異的であった。F006-131 は HI 活性を有し、最近の 3 種類のワクチン株に対し、ELISA、染色試験、中和試験で活性を認めた。F004-130 も F006-131 と類似の反応性を示したが、A/Sydney/5/97 に対する中和活性は極めて弱かった。

F004-008 は ELISA で多くのワクチン株に対し反応した。しかし、HI 活性を有せず、A/Wyoming/3/2003 にだけ中和活性を示した。この抗体は、HA の共通エピトープを認識するが、親和力は弱いと考えられた。F002-005 は HI 活性を有し、最近の 4 種類のワクチン株に対して、ELISA、染色試験、中和試験で強い反応性を示した。この抗体は、4 種類のワクチン株に共通する中和エピトープと強く結合すると推測された。

7. ヒト抗体 (IgG) の中和活性の解析

多種類のワクチン株を中和する興味ある抗体 (F002-005、F005-126) を IgG に変換し、それぞれのワクチン株に対する中和カイネティクスを測定した (図 10)。

F002-005 は、Fab での性状解析で最近の 4 種類のワクチン株を強く中和したが (図 9)、IgG においても 4 株に対してほぼ同程度に中和した。1 μ g/ml の濃度でも、ほぼ 100% のウイルスを中和した。F005-126 は、Fab での性状解析で A/Aichi/2/68 と A/Wyoming/3/2003 を強く中和し、他のワクチン株に対しては弱いか中和活性を認めなかった (図 3)。しかし、IgG に変換すると調べたすべてのワクチン株を中和した。ホモの A/Aichi/2/68 に対する中和活性とその他のワクチン株に対する中和活性には差を認めた。

D. 考察

昨年度までは、AIMS ライブラリーを用いてインフルエンザウイルスに対するヒトモノクローン抗体を単離したが、中和活性を有する抗体は 5 クローン得られただけであった。今年度は、成分採血により作製された抗体ライブラリーより多数のヒト抗体がクローニングされたので、中和活性を中心にそれら抗体の性状を解析した。

現在、インフルエンザの流行を起こしているのは A 型の H1N1、H3N2 と B 型の 3 種類であるが、最も感染力、病原性が強いのが AH3 (H3N2) で、しかも抗原変異を頻繁に起こすためヒトは何度も暴露を受けている。そこで、今年度は AH3 が最初に登場した 1968 年のワクチン株から、最も新しいワクチン株までの 12 種類を抗原としてヒト抗体をクローニングしたところ、非常

に多様な中和抗体が得られた。今回は、6 種類のワクチン株を抗原として得られた 159 個のヒト抗体について性状解析した (表 1)。

解析したヒト抗体のほとんどが HA を認識し、しかもその大部分が中和活性を有していた。この事実はマウスのモノクローン抗体を用いた研究からも推測されることで、HA がいかに強い免疫原性を示すかを反映したものと考えられる。個々のヒト抗体の中和活性には多様性があり、ホモのワクチン株だけを中和するものから、多数のワクチン株を中和するものまで様々であった。今回は Fab の中和活性を測定したが、さらに詳細に解析するためには IgG に変換する必要がある。HA に対する抗体の場合、IgG は Fab の 100 倍から 1000 倍の活性を示すからである。

強い中和活性を有し、多くのワクチン株を中和する 2 つの抗体 (F002-005、F005-126) を IgG に変換して中和カイネティクスで解析した (図 10)。F002-005 は最近の 4 種類のワクチン株を同程度に強く中和し、HI 活性も有していたので、HA の頭部に存在する共通中和エピトープを認識していると考えられた。すなわち、この抗体は HA が細胞のレセプターに結合するのを阻害してウイルスの感染を阻止したものと推測された。一方、F005-126 は、程度の差はあれ調べたすべてのワクチン株を中和した。しかし HI 活性は示さず、HA の幹部に存在する膜融合活性をこの抗体は阻害して中和を起こした可能性が高い。我々は以前、マウスのモノクローン抗体の一つ (C179) が HI 活性を示さず、幹部にある共通中和エピトープを認識して膜融合を阻害し、ウ

ウイルスを中和したことを報告した。
F005-126はC179とよく似た性状を示している
ので、両者が認識するエピトープは極めて近い位置にある可能性がある。このような抗体は治療、予防に用いるのに有望と考えられるので、F005-126の認識部位の特定を急ぎたい。

今後は、更に多くのHAに対するヒト抗体をクローニングし、ヒトの体内で産生されるインフルエンザウイルスに対する抗体レパートリーを解析する。また、中和活性を有する抗体に対するエスケープミュータントを作製してエピトープマッピングを行い、ヒト抗体のHA構造上の認識部位を明らかにする。これら情報は、インフルエンザワクチンの改良に役立つと考えられ、さらに一部の抗体については予防、治療に適用できるか否かを動物実験等で解析する予定である。

E. 結論

新たに作製した抗体ライブラリーより、インフルエンザワクチン株を抗原として多数のHAに対するヒトモノクローン抗体を得た。これら抗体の性状を免疫学的、ウイルス学的に解析し、ヒトはインフルエンザウイルスに対し、バラエティーのあるヒトモノクローン抗体を産生していることを明らかにした。

F. 研究発表

1. Nakagawa, N., Kubota, R., and Okuno, Y. Variation of the conserved neutralizing epitope in influenza B virus Victoria group isolated in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 43:4212-4214. 2005.
2. Kase, T., Morikawa, S., Okuno, Y., Ito, F., Taniguchi, K. Isolation of influenza virus type AH3 from a traveler returning from Vietnam in July 2005 in Osaka, Japan. *JJID* 58(6):395-396. 2005.
3. 奥野良信：世界のインフルエンザ何が変わってきたのか。総合臨床、54(2)：234-238、2005
4. 奥野良信：インフルエンザウイルスについて。チャイルドヘルス、8(11)：4-6、2005
5. 高橋和郎、奥野良信：インフルエンザワクチンの効果と新しいワクチン。医薬ジャーナル、41(12)：124-128、2005
6. 高橋和郎、加瀬哲男、森川佐依子、岡本健治、浜本芳彦、馬場宏一、奥野良信：A型、B型の鑑別が可能なインフルエンザ迅速診断キット改良型「ポクテムインフルエンザA/B」の評価。Sysmex Journal Web Vol.6 No.3 1-11, 2005

G. 知的財産権の出願、登録状況

なし。

表1. 性状解析されたヒトモノクローン抗体の総数

	HI +	HI -	HI -	Total
	NT +	NT +	NT -	
Aichi/2/68	9	1	6	16
Fukuoka/C29/65	3	4	4	11
Kitakyusyu/159/93	2	4	0	6
Sydney/5/97	43	2	2	47
Panama/2007/99	38	2	6	46
Wyoming/3/2003	19	6	8	33
Total	114	19	26	159

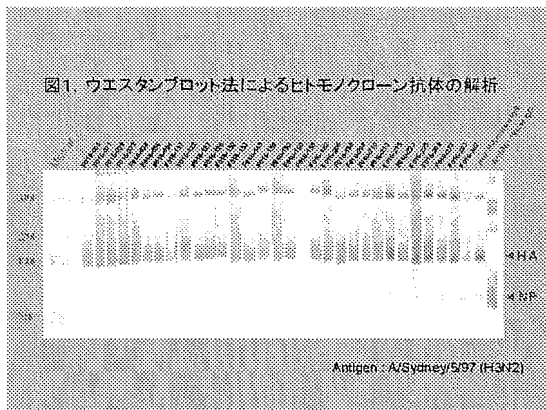


図2. A/Aichi/2/68 (H3N2) を抗原として得られたヒトモノクローン抗体の ELISA 活性

A/Aichi/2/68		Aichi/2/68	Fukuoka/C29/65	Kitakyusyu/159/93	Sydney/5/97	Panama/2007/99	Wyoming/3/2003	New Castles/2009
▶	F003-104	A	-	-	-	-	-	-
▶	F003-105	A	-	-	-	-	-	-
▶	F003-106	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-107	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-108	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-109	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-110	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-111	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-112	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-113	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-114	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-115	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-116	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-117	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-118	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-119	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-120	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-121	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-122	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-123	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-124	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-125	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-126	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-127	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-128	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-129	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-130	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-131	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-132	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-133	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-134	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-135	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-136	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-137	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-138	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-139	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-140	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-141	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-142	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-143	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-144	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-145	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-146	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-147	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-148	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-149	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-150	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-151	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-152	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-153	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-154	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-155	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-156	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-157	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-158	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-159	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-160	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-161	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-162	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-163	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-164	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-165	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-166	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-167	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-168	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-169	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-170	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-171	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-172	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-173	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-174	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-175	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-176	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-177	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-178	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-179	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-180	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-181	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-182	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-183	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-184	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-185	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-186	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-187	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-188	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-189	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-190	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-191	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-192	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-193	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-194	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-195	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-196	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-197	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-198	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-199	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-200	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-201	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-202	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-203	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-204	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-205	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-206	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-207	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-208	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-209	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-210	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-211	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-212	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-213	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-214	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-215	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-216	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-217	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-218	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-219	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-220	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-221	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-222	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-223	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-224	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-225	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-226	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-227	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-228	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-229	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-230	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-231	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-232	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-233	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-234	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-235	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-236	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-237	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-238	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-239	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-240	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-241	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-242	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-243	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-244	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-245	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-246	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-247	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-248	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-249	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-250	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-251	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-252	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-253	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-254	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-255	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-256	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-257	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-258	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-259	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-260	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-261	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-262	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-263	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-264	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-265	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-266	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-267	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-268	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-269	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-270	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-271	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-272	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-273	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-274	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-275	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-276	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-277	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-278	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-279	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-280	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-281	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-282	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-283	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-284	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-285	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-286	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-287	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-288	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-289	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-290	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-291	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-292	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-293	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-294	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-295	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-296	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-297	Y	-	-	-	-	-	-
▶	F003-298	Y	-	-	-	-		

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

ハブ出血毒 HR2 の精製とプロテアーゼ活性を用いた HR2 中和抗体の
スクリーニングについて

分担研究者：盛根信也（沖縄県衛生環境研究所）
研究協力者：東 成見（藤田保健衛生大学総合医科学研究所）
松田聖子（沖縄県衛生環境研究所）
下地真紀子（沖縄県衛生環境研究所）

研究要旨

副作用の危険の少ない『抗ハブ毒ヒト抗毒素』の作製を目的に、ハブ毒に対する中和抗体の存在が確認された献血ボランティアから得られた成分献血で、単核球成分由来の抗体ライブラリーを作製し今までにハブ毒中の出血毒 HR1 に対する中和抗体 3 種類を得る事が出来た。しかし抗 HR2 抗体については現在のところ中和活性を示す抗体は単離されていない。

ハブ毒成分中には HR1 に代表される出血性プロテアーゼ、ホスホリパーゼ、キニン遊離酵素である TAME エステラーゼ等の毒成分が存在するが、ハブ毒成分中の毒性の 70% を出血性プロテアーゼ HR1 と HR2 で占めることから HR2 に対する中和抗体を得ることが臨床試験への必須条件と考えられる。そのためハブ毒 HR2 の出血作用を中和する抗体の検索を行う事を目的に今回研究を行った。ハブ毒 HR1 および HR2 はプロテアーゼ活性を有しておりその活性で動物末梢血管の基底膜のコラーゲンやラミニンに作用し出血を起こさせる作用をもつ。

その事から HR2 のプロテアーゼ活性を抑える事が出来れば出血作用を抑える事が出来ると考えられるため、本来 HR1 および HR2 の中和確認の試験はウサギ等を用いた動物実験で行うが、今回は HR2 のプロテアーゼ活性の阻害を観察する事で HR2 中和ヒト抗体のスクリーニングを行った。

A. 研究目的

現行の抗ハブ毒ウマ抗毒素はハブ咬傷患者の治療に優れた治療効果を発揮するが、免疫されたウマの血液成分すなわち人間以外の動物の血清タンパクを大量に接種するために異種タンパクによる副作用が、かなり

の頻度で発生する。アナフィラキシーショック、発しんなどの軽重すべての副作用を加えると全接種者の 10 から 15% に達する。これらの大部分は注射 1 週間から 10 日後に起こる遅延性の血清病であり特に治療の必要も無いが、稀にアナフィラキシーショッ

クや即発性の血清病が起こることがあるため、抗毒素を使用する際は酸素吸入やアドレナリン、ステロイドを準備するなど細心の注意が必要である。

沖縄県では、副作用の危険性が少ない「抗ハブ毒ヒト抗毒素」の作製を目的に、ヒト抗体を産生するように遺伝子が組換えられたマウスを用いて研究を進めているが、本プロジェクトでは更に安全性の高いヒト由来の「完全ヒト抗毒素」の作製を目的にハブに5度咬まれた経験をも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、個体ライブラリーを作製してハブ毒の主要な毒性成分に対する中和抗体の単離を試みた。

B.材料と方法

試験毒素の精製

ハブ毒 HR2 の精製

(1)試薬

ハブ毒 HR2 の精製に用いたクロマト用ゲル

Sephacryl S-200 High Resolution, Sp sepharose FF はアマシャムバイオサイエンス社の製品、POROS S/20 カラムはアプライドバイオサイエンス社の製品を使用した。プロテアーゼ活性を測定するための基質には消光性蛍光ペプチドを使用し、文献(Hiroyuki Takeya (1993) J.Biochem.113, 473-483)をもとにペプチド研で合成した。

Casein BODIPY FL Conjugate はインビトロジェン社より購入。その他の試薬は特級試薬を使用した。

(2)タンパク量の測定

タンパク量は BSA をスタンダードとした UV 法と PIERCE 社の BCA Protein Assay

Kit を用いた BCA 法で測定した。吸光度は分光光度計(日立-4000)とマイクロプレートリーダーMRX(DYNEX 社)で測定した。

(3)プロテアーゼ活性の測定

1) 消光性蛍光ペプチドを用いたプロテアーゼ活性の測定

酵素活性の測定は、溶出画分 15 μ l に基質 Nma-Ser-Pro-Met-Leu(Dnp)rr-NH₂ を 20 μ M 含む 0.1M Tris HCl buffer pH8.5 を 255 μ l 加え、蛍光光度計をタイムスキャンモードにし、励起波長 340nm 蛍光波長 440nm で 2 分間測定し、単位時間あたりの蛍光の増加を測定した。反応には蛍光光度計用のセルを使用し室温で行った。

2) Casein BODIPY FL Conjugate 基質を用いたプロテアーゼ活性の測定

酵素活性の測定には蛍光プレートリーダー(バリオスキャン、サーモバイオアナリシス)を用い、9 6 Well プレートの 1 Well に HR2 溶液と 0.1M Tris HCl buffer pH8.5 で 25 μ l とし、0.01mg/ml BODIPY FL casein 0.1M TrisHCl pH8.0 を 750 μ l 加え反応を開始、励起 485nm, 蛍光 530nm で 1 分毎に蛍光光度を測定 60 分間行い、直線的に増加する 60 秒あたりの傾きをプロテアーゼ活性の値とした。

(4) 抗 HR2 ヒト抗体の HR2 プロテアーゼ活性阻害の測定

抗 HR2 ヒト抗体のプロテアーゼ活性の阻害試験の基質には Casein BODIPY FL Conjugate を用い 96Well プレートの 1 Well に HR2 溶液と抗 HR2 ヒト抗体を加え 0.1M Tris HCl buffer pH8.5 で 25 μ l にし、

室温で5分間抗原と抗体を反応させる。次に0.01mg/ml BODIPY FL casein 0.1M Tris HCl pH8.0を750 μ l加え反応をスタート1分毎に蛍光光度を測定し60分間行った。蛍光光度の増加の傾きをHR2のみのコントロールと比較することでプロテアーゼ活性阻害の確認を行った。

実験結果

1. 試験毒素の精製

1) Sephacryl S-200HRによるハブ粗毒のゲル濾過

乾燥ハブ毒(平成9年度採取)1gを10mM CaCl₂を含む10mM Tris HCl buffer pH8.0 10mlに溶解し不溶性物質を8000rpm 20min遠心分離後、同bufferで平衡化したSephacryl S-200HRカラム(2.6 \times 90cm)でゲル濾過を行った(Fig1)。溶出ピークfra(20-30)がHR1画分でfra(32-40)がHR2画分に相当し、HR2画分のfra(32-40)を集め次にSp Sepharose FFによる陽イオン交換クロマトグラフィーを行った。

2) Sp Sepharose Fast Flowによる陽イオン交換クロマトグラフィー

Sephacryl S-200HRによるゲル濾過で得られたHR2画分を10mM CaCl₂を含む10mM Tris HCl buffer pH8.0で平衡化したSp Sepharose Fast Flow(2.6 \times 30cm)にアプライ。同bufferで不溶性画分を十分に洗浄後、トータル1Lのグラジエント(0-0.5M NaCl)で溶出を行った。消光性蛍光ペプチドを基質としたプロテアーゼ活性のあるピーク2つそれぞれ前半をHR2a、後半のピークをHR2bとした(Fig2)。

3) POROS S/20による陽イオン交換クロマトグラフィー

Sp Sepharose FFのHR2a, HR2b画分をPOROS S/20カラムでそれぞれ最終的に単一に精製した(Fig3)。SDS-PAGEの結果でもそれぞれシングルバンドであった(fig4)。これら精製HR2abを用い抗HR2ヒト抗体のプロテアーゼ活性阻害について測定を行った。

2. HR2プロテアーゼ活性を用いた抗HR2ヒト抗体の中和活性試験

ハブ咬傷既往歴者のリンパ球由来抗体ライブラリーからスクリーニングした抗HR2抗体のHR2に対するプロテアーゼ活性阻害の試験を行った。HR2は精製HR2a, HR2bそれぞれで行い、抗体量はHR2に対して分子数で過剰になるように加え反応を行った。

1) 中和反応はHR2a(2.6mg/ml)を3 μ lに各量の抗体溶液と0.1M Tris HCl buffer pH8.5で25 μ lとし、室温で5分間抗原と抗体を反応させる。次に0.01mg/ml BODIPY FL casein 0.1M Tris HCl pH8.0を750 μ l加え反応をスタート1分毎に蛍光光度を測定し60分間行った。蛍光光度の増加の傾きを観ることでプロテアーゼ活性阻害の確認を行った。HR2b(2.9mg/ml)についても同様に行った。

中和実験の結果を図1に示す

今回の5つの抗HR2ヒト抗体サンプルについてHR2のプロテアーゼ活性を明らかに阻害した抗体は4thスクリーニングポリクローナル抗体のみで、その他3rdスクリーニングポリクローナル抗体、