

3rdスクリーニング（磁気ビーズ）ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体 HR2-310、HR2-016a については過剰に加えても HR2 のプロテアーゼ活性を阻害しなかった。しかしモノクローナル抗体 HR2-310 と HR2-016a を混合したものについては

HR2a に若干の阻害が確認できた。HR2 プロテアーゼ活性の阻害の確認できた抗体 4th スクリーニングポリクローナル抗体は HR2 との重量比 1 : 10 で約 80% の阻害率であった。

表 1. 中和実験に使用した抗 HR2 ヒト抗体サンプルとタンパク濃度

3rd スクリーニングポリクローナル抗体	4mg/ml
4th スクリーニングポリクローナル抗体	0.4mg/ml
3rd スクリーニング（磁気ビーズ）ポリクローナル抗体	3mg/ml
モノクローナル抗体 HR2-310	1mg/ml
モノクローナル抗体 HR2-016a	1mg/ml

表 2. HR2a と HR2b の濃度

精製 HR2a	2.6mg/ml
精製 HR2b	2.6mg/ml

考察

今回 5 つのサンプルおよびモノクローナル抗体混合による中和実験を行ったが、HR2 のプロテアーゼ活性に対する明らかな阻害がみられたのは 4th スクリーニングポリクローナル抗体のみであった。今後のモノクロ化によってモノクローナル中和抗体が得られると考えられるが、スクリーニング途中のポリクローナル抗体であることから複数抗体による中和活性の可能性も考えられる。そのためモノクロ化によって中和活性が無くなる可能性も否定できない。その際は抗 HR2 活性を発揮できるモノクローナル抗体の組み合わせについて調べていく必要がある

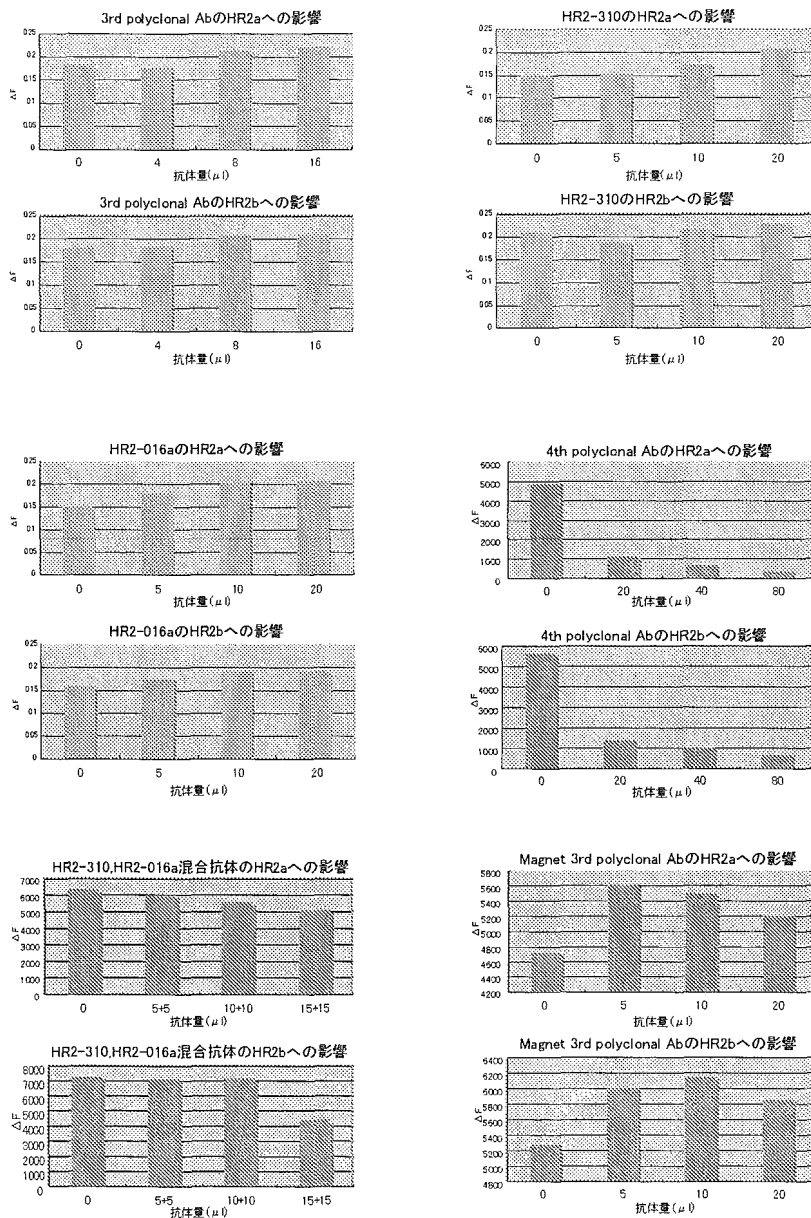
だろう。

今後 HR2 に対して中和活性を有する抗体クローンを単離する作業を行うが、正常ヒト血清にはウサギ皮内法を用いた中和実験では HR2 の出血作用を抑える成分があることが分かっており、前回得られた抗 HR1 抗体と組み合わせることでの粗毒に対する中和作用を調べるなど、治療を目的とした抗毒素に HR2 中和抗体が必要か否かについても検討が必要と考えられる。また、ハブ毒はいろいろなタンパクや酵素の混合物で、HR1,HR2 以外にもプロテアーゼ、ホスホリパーゼ、アミノ酸オキシダーゼなど炎症反応に関連する酵素が数多く含まれて

いるので、今後はこれら HR1,HR2 以外の
酵素に対する抗体作成が必要か検討する必

要があると考えられる。

図1.各抗HRヒト抗体のHR2プロテアーゼ活性への影響



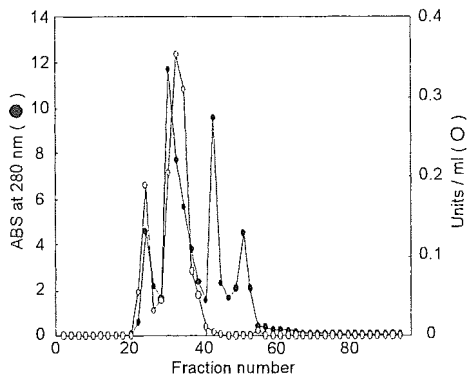


Fig. 1. Gel filtration chromatogram of HR2 from the venom of *Timeresurus fravovildis* on Sephacryl S-200 HR.

Column: Sephacryl S-200 High Resolution (2×90 cm)
 Buffer: 0.01 M CaCl₂ in 0.01 M Tris-HCl (pH 8.0)
 Flow: 6.1 ml / hour 8 ml / tube
 Sample: 10% Okinawa habu venom solution (10 ml)

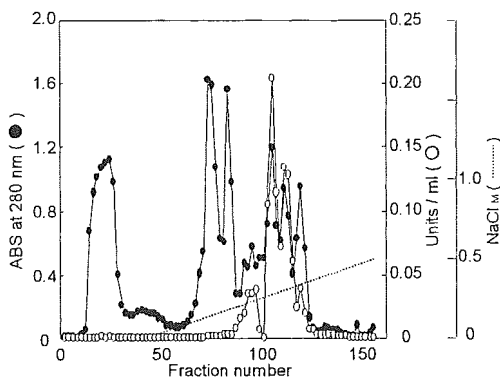


Fig. 2. Cation exchange chromatogram of a low molecular weight fraction with protease activity from gel filtration on Sephacryl S-200 HR of the venom of the *T. fravovildis*.

Column: SP Sepharose Fast Flow (4.5×15 cm)
 Buffer: 0.01 M CaCl₂ in 0.01 M Tris-HCl (pH 8.0) gradient total 1000 ml
 Flow: 22.8 ml / hour 10 ml / tube
 Sample: Low molecular weight fraction with protease activity from gel filtration (fraction No. 27~38 in Fig. 1)

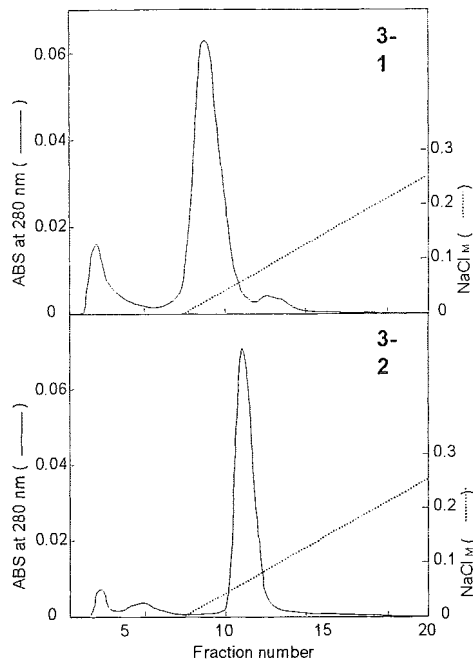


Fig. 3. Cation exchange chromatogram of fraction with protease activity from cation exchange chromatography on SP Sepharose FF.

Column: POROS S/20 (10×100 mm)
 Buffer: 0.01 M CaCl₂ in 0.01 M Tris-HCl (pH 8.0)
 Flow: 10 ml / min 5 ml / tube
 Sample: Fraction with protease activity from SP Sepharose FF chromatography (3-1: fraction No. 101~107 in Fig. 2, 3-2: fraction No. 108~114 in Fig. 2)

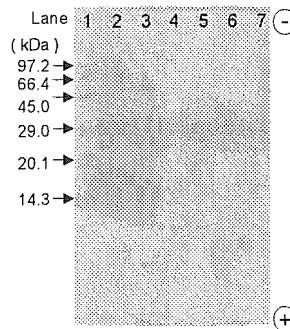


Fig. 4. SDS Polyacrylamide gel electrophoresis.

Lane 1: Marker protein
 Lane 2: Crude Habu venom
 Lane 3: Low molecular weight fraction with protease activity from gel filtration (fraction No. 27~38 in Fig. 1)
 Lane 4: Fraction with protease activity from SP Sepharose FF chromatography (fraction No. 101~107 in Fig. 2)
 Lane 5: Purified HR2 from peak1 of SP Sepharose FF column chromatography
 Lane 6: Purified HR2 from peak2 of SP Sepharose FF column chromatography

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
M.Sato, et al.	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
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
N. Nakagawa, et al.	Variation of the conserved neutralizing epitope in influenza B virus Victoria group isolated in Japan.	J. Clin. Microbiol.	43	4212 -4214	2005
T. Kase, et al.	Isolation of influenza virus type AH3 from a traveler returning from Vietnam in July 2005 in Osaka, Japan.	JJID	58(6)	395-396	2005
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
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
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
高橋和郎、他	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	6(3)	1-11	2005