

残り 30%が可溶性であった。両方とも精製可能であり、それを抗原としてラットを免疫すると、その抗血清は多くの場合に、免疫染色用試薬として有効であることを国立遺伝研の小原グループは示していた。ファージ抗体ライブラリーの使用と、動物を抗原で免疫する過程を経て産生される抗体の間で差が生じる原因はどこにあるか。両方の実験でまったく同じ構造の抗原を用いている。ファージ抗体の場合、用いた抗原そのままの形でファージ抗体が結合する(抗原抗体複合体を形成する)かどうかのみが、抗体単離の条件となる。

一方、動物を抗原で免疫した場合には、その動物にとってその抗原が生物学的に免疫原性(immunogenicity)を持つかということが重要であり、さらに抗体産生が誘導されるプロセスで、その抗原がさまざまなプロセッシングを受けることが示されている。たとえば、不溶性物質がそのままの形で抗原となることは考えにくい。免疫を有効に行うには、通常アジュバンドとともに抗原を与える(抗原を油と混合してエマルジョンにする)。そこで、プロセッシングされた抗原はある一定の立体構造をとり、それがナチュラルな蛋白の構造を反映する場合を含むと期待できる。それが免疫した動物の抗血清が、検出試薬として有効であった根拠である。

筆者らは方針を大転換し、抗原で動物を免疫することにした。免疫された動物の抗血清を試薬として用いるとともに、脾臓を摘出し、その mRNA から抗体ライブラリーを作製してモノクローン抗体を得る方法を採用した。動物としてマウスおよびラットを用いた。いままでに行われた抗体遺伝子座の解析結果からみてマウスとラットは同等である。そこで抗体の多様性に代表されるレパートリーの大きさに差があると予想していなかった。しかしマウスとラットは体の大きさが異なり、Bリンパ球総数はマウスが 10^8 オーダーであるのに対し、ラットは 10^9 オーダーである。約 150 アミノ酸残基からなるポリペプチド鎖を抗原としたときに、何種類の抗体産生が誘導されて、またその抗体のなかに、免疫染色で試薬として有効に機能するものが含まれる確率に差があることが明らかになってきた。ラットから得られる抗体の種類がマウスから得られるものより数倍多い。

この結論は、当然のことだったのかもしれない。なんとなく感じていたこと(同じ抗原で数匹のマウスを免疫してモノクローン抗体を得ようとする、同系マウスであっても個体差間があるという経験)が定量的に実証された。“免疫系は巨大な数の抗体をつくり出すシステムだが、実際の動物個体はその一部を使って生体防御をしており、それでもウイルスや毒素を中和するには十分である”。

もう一つの教訓は、抗原が利用できる限り、動物を抗原として得られる抗体の性質はすぐれており、それと比較して、AIMSのような巨大なクローン数からなる抗体ライブラリーであっても、ナイーブ抗原に対しては性能のよい(抗原結合力の強い)抗体を得るのは容易でない。本プロジェクトの目的である多数の抗原に対する免疫染色が与えた情報についての総括は、別途論文として発表する(伊庭ら、伊藤ら、論文準備中)。

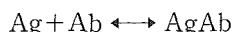
網羅的抗体単離——未知抗原に対して

前述したように、抗原が既知である場合に、換言すれば精製抗原が利用可能な条件下では、その抗原で動物を免疫することにより抗体を調製する選択肢がすぐれている。それでは巨大なレパートリーサイズの抗体ライブラリーの有効な利用対象はなにであろうか。この課題を考えているときに、さまざまな抗原に対して抗体ライブラリーをスクリーニングする経験を通して、一見すると欠点と思える特徴が浮かび上がっていた。そこに新しい道を開く鍵があった。

1. 抗体ライブラリーのパニング法によるスクリーニングによって得られる抗体は、特定のクローンに片寄る傾向がある。ただし、独立して実施したスクリーニングで得られるクローンの種類は、必ずしも重複しない。
2. 用いる抗原濃度を下げるとか、洗浄時間や回数を多くするなどの工夫をしても、抗原結合力が強いクローンが必ずしも濃縮されてこない。

この二つの問題は、ファージ抗体ライブラリーを扱っているグループにとって、必ず経験している。

その原因を探っていくと、用いた抗原に対してファージ抗体がどのようにして回収されるかが推定できるようになる。まず、抗原抗体反応は平衡反応である。そこで



に示される関係があり、

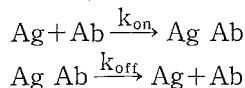
$$\frac{[\text{AgAb}]}{[\text{Ag}][\text{Ab}]} = K_A$$

が成立する。筆者らが用いている AIMS ライブラリーは、1,000 億種 (10^{11}) のクローンから構成されているので、たとえ総数 10^{14} のファージを用いても個々のクローンの濃度は非常に低い。つまり $[\text{Ag}] \gg [\text{Ab}]$ という条件下で実験を行っていることになる。

$$\frac{[\text{AgAb}]}{[\text{Ab}]} = K_A [\text{Ag}] = K_A [\text{Ag}]_0 \dots\dots\dots (1)$$

この式(1)はなにを意味するかというと、ライブラリーのなかにその抗原に対して結合する抗体が含まれていても、複合体を形成しているもの $[\text{AgAb}]$ と、抗体がフリーの状態であるもの $[\text{Ab}]$ の比は $K_A [\text{Ag}]_0$ によって決まる。つまり複合体を形成しないファージは回収されない。スクリーニングは、複合体を形成しなかったファージを捨てるプロセスでもある。このことは上記(1)の問題点が生じる理由を説明している。パニングの最初の段階で回収に成功したクローンのみが、どんどん濃縮される(結果として片寄ったクローンが得られる)。

上記式(1)が示すことは、 K_A が大きいほど、つまり結合力が大きいほど回収率が高まることを意味するはずである。しかし結果はそうならない。そこで平衡反応を反応速度論的に考察し直している。平衡状態にあるということは、



という両方向の反応が拮抗している状態を指す。パニング法によるスクリーニングは、複合体を形成しなかったファージを除く“洗浄”という段階が入る。洗浄する段階では事実上 $[\text{Ab}]$ (複合体を形成していないフリーファージ) = 0 となる。すると理論的に走りうる反応は解離反応のみとなり、

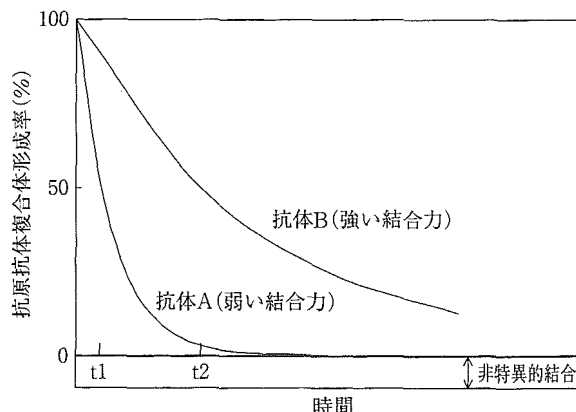


図2 抗原抗体複合体が時間とともに一次解離曲線に従って解離する模式図

k_{off} 値に従って半減期 (t_1 および t_2) が決まる。実際には、非特異的結合がある頻度で起こることを示している。

$$-\frac{d[\text{AgAb}]}{dt} = k_{\text{off}} [\text{AgAb}]$$

で示される単純な一次解離式に従う。この式に従えば、半減期 $T_{1/2} = 0.693/k_{\text{off}}$ で複合体からファージは離れていく。その状況を図2に示すが、もしこの単純な式に従うならば、結合力の強いクローンを濃縮することは実験的に容易であるはずである。

実際のパニングではそうっていない。もし $0.693/k_{\text{off}}$ を半減期として複合体が解離しているならば、 K_A 値が $10^6 \sim 10^7 \text{M}^{-1}$ 程度のファージ抗体は回収されないはずである。筆者らはさまざまな系で k_{on} と k_{off} 値を実測しているが、 k_{on} は $10^5 \text{mol}^{-1} \text{sec}^{-1}$ オーダーである例が多く³⁾、その値からみて k_{off} が $10^{-1} \sim 10^{-2} \text{sec}^{-1}$ と推定される。そうすると洗浄を繰り返す、または時間をかけると複合体は破壊される。しかし、回収されるクローンの多くは $10^{-6} \sim 10^7 \text{M}^{-1}$ の解離定数を持つクローンが圧倒的に多い。この現象を説明する理由として、ファージ抗体は抗原抗体複合体をつくるが、それと同時にファージ粒子は一定頻度(速度)でパニングの際用いているチューブに非特異吸着を起こす。つまり、図2で示すように下駄を履いた状態をつくる。パニングで何度か洗浄したのち回収されてくるファージは、抗原抗体反応+非特異的吸着を起こしたものと考えると、観察される現象を説明できる。明らかに抗原と結合できないファージも、パニングのプロセスである頻度で必ず回収されてくることからこの解釈は妥当であると

思われる。パニングにより抗原抗体複合体を形成するファージを単離できる根拠は、複合体を形成したファージが相対的に長時間非特異的吸着を起こす状態にとどまっているからである。

このように考えると解決すべき課題はみえてくる。“さまざまな未知抗原に対して網羅的に抗体を単離したい”という目標を達成できなかった理由は、AIMS ライブラリーのなかに十分多様な抗体が含まれていないからではなく、スクリーニング方法がまずいからであった。最近、筆者の研究室の赤堀は、細胞上に存在する多くのエピトープに対して、結合する抗体を網羅的に単離する方法を開発した(論文準備中)。その方法では、抗原抗体複合体を形成したファージ粒子を、“洗浄”という段階を経ずに、直接単離する工夫を行った。その威力は絶大である。たとえば、癌細胞自身を抗原として抗体を単離すれば、費やす労力の程度に応じて数百～数千種類の抗体を単離できる。もし癌細胞の膜上に存在し、正常細胞の膜上に存在しないエピトープが存在すれば(癌特異抗原)、それを認識する抗体が必ずそのなかに含まれていることになる。癌治療用抗体単離のストラテジーがおのずから開けてくる。

展 望

本稿では筆者の研究室で行われている未発表のデータに基づき、その考え方の基礎を示した。具体的データに乏しく理論的考察が多いので、読者に

とって理解しにくい点も含まれていたであろう。しかし、筆者らは今後“抗体をツールとした創薬”および“抗体創薬”は確実に展開されていくと確信している。

筆者が属する大学では、平成 15 年度から開始された 21 世紀 COE プログラムの医学分野で、“超低侵襲標的化診断治療開発センター”構想を提案し、採択された。“抗体”はここでいう“標的化治療”を実施するための中心分子である。

文 献

- 1) Seetharaman S, Zivarts M, Sudarsan N, Breaker RR : Immobilized RNA switches for the analysis of complex chemical and biological mixtures. *Nature Biotechnol* 19 : 336-341, 2001.
- 2) McConnell SJ, Kendall ML, Reilly TM, Hoess RH : Constrained peptide libraries as a tool for finding mimotopes. *Gene* 151 : 115-118, 1994.
- 3) Ito W, Yasui H, Kurosawa Y : Mutations in the CDRs do not cause differences in free energy during the process of formation of an activated complex between antibody and protein antigen. *J Mol Biol* 248 : 729-732, 1995.
- 4) Melchers F et al. : The surrogate light chain in B cell development. *Immunol Today* 14 : 60-68, 1993.
- 5) Xu JL, Davis MM : Diversity in the CDR 3 region of VH is sufficient for most antibody specificities. *Immunity* 13 : 37-45, 2000.
- 6) Kurosawa Y, Tonegawa S : Organization, structure and assembly of immunoglobulin heavy-chain diversity DNA segments. *J Exp Med* 155 : 201-218, 1982.
- 7) Ichihara Y, Matsuoka H, Kurosawa Y : Organization of human immunoglobulin heavy chain diversity gene loci. *EMBO J* 7 : 4141-4150, 1988.
- 8) Akahori Y et al. : Construction and characterization of antibody libraries : isolation of therapeutic human antibodies and application to functional genomics. (投稿中)
- 9) Neuberger MS et al. : Monitoring and interpreting the intrinsic features of somatic hypermutation. *Immunol Rev* 162 : 107-116, 1998.

1 新規抗体療法の開発

①抗腫瘍ヒト抗体の単離調製戦略

黒澤 良和*

Key Sentences

- ①癌細胞と正常細胞では発現している遺伝子に転写レベル、および翻訳レベルで大きな相違があることが見出されている。
- ②DNA マイクロアレイやプロテオミクスに使われるハイスループットな解析を可能にする最新技術の利用が癌細胞の特徴を明らかにしつつある。
- ③免疫系を癌治療に利用する方法の開発では細胞性免疫の機能向上が現在は主流である。
- ④ハーセプチン®やリツキサン®といった抗腫瘍抗体の治療薬としての成功が、新しい抗体開発に大きなインパクトを与えた。
- ⑤ヒト抗体ライブラリーを利用した抗腫瘍ヒト抗体の開発が可能である。

Key Words

癌特異抗原, ヒト抗体ライブラリー, ファージディスプレイ系, 癌治療用抗体, プロテオミクス

はじめに

免疫系を癌治療に用いる方法の開発は古くて新しい研究テーマである。とりわけ抗体の場合は、遺伝子増幅により Her 2 を異常発現した乳癌に対する抗体治療薬ハーセプチン®の劇的な治療効果が極めて大きなインパクトを与えた。現在、組換え DNA 技術の発展を利用して様々な抗原に対して特異的に結合するヒト抗体をほぼ自由に単離作製できるようになった。本文では、いかなる

研究戦略を用いて抗腫瘍ヒト抗体を単離することが可能か、またどのような試みが行われているかについて論ずる。

この命題を考える時に、2つのことが根本的に重要である。①癌細胞が正常細胞と物質レベルでどのように異なるのか、②免疫系は、ヒト体内で癌細胞と正常細胞の相違を識別して癌細胞の除去に機能しているか。

Strategy for isolation of human antibodies specific against tumor antigens

* KUROSAWA Yoshikazu : 藤田保健衛生大学総合医科研究所免疫学研究部門教授

癌細胞と正常細胞の物質的相違

ゲノムプロジェクトの大規模な展開の中でヒトゲノムの塩基配列決定が終了し、ヒトが有する全遺伝子について一次配列情報の推定が可能になった。そこで癌細胞と正常細胞中で発現している遺伝子について mRNA レベルで定性的かつ定量的相違を明らかにする目的で網羅的な解析が進められている。とりわけ DNA マイクロアレイ法²¹⁾および SAGE (serial analysis of gene expression) 法²²⁾というハイスループットな解析法が開発され、多くの癌細胞に適用されて癌細胞では正常細胞と明らかに質的にも量的にも異なる転写パターンが観察されている²³⁻²⁵⁾。しかし免疫系を癌治療に応用しようという立場からは、mRNA ではなく翻訳された蛋白質レベル(翻訳後修飾も含めた)での差が重要で、実用化するにはそれを免疫系が認識できる形で相違を見出し得るにかかっている。プロテオミクスの代表的技術である二次元電気泳動法によりスポットの差として識別できる相違に関して情報を数多く蓄積することが重要であるが、すべての蛋白質を対象にできているわけではないという技術的問題に加えて、対象とし得る癌細胞および蛋白質を解析に必要なだけ十分に得ることが困難であることが多いという量的問題を克服できていない。

癌患者の血液成分を用いるアプローチ

免疫系が細胞の癌化を監視(immunosurveillance)しており、その監視をくぐり抜けて生き残った場合に限り、癌は発症するという古典的概念はほぼ否定されている。しかし最近の高精度の解析技術を用いた研究結果によれば、細胞の癌化に伴い細胞内で多くの変化が起こり、MHC クラス I やクラス II 分子上に呈示されるオリゴペプチドセットの変化を通してキラー T 細胞(CTL)やヘルパー細胞が認識できるようになることを示すデータは多い⁶⁾。質量分析器の性能の飛躍的向上は、多くの癌特異抗原の検出を可能にした⁷⁾。現在、癌治療法開発を目指す免疫学者の多くは、癌細胞の殺し屋として CTL に

その役目を求めている⁸⁾。

SEREX (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) 法⁹⁾の開発は、癌患者の抗血清中に患者癌細胞の様々な成分に対する抗体が含まれていることを示した。

以上に記述したことをまとめると、細胞の癌化に伴い細胞内では mRNA レベルにとどまらず蛋白質レベルでも非常に大きな質的および量的変化が起きている。そしてその変化は MHC 分子を介してオリゴペプチドの形で外に対して呈示され、癌化した細胞で合成される成分は細胞性免疫(cellular immunity)のみならず液性免疫(humoral immunity)レベルでも免疫原性(immunogenicity)を有している。しかしその存在が検出される CTL および癌抗原に対する抗体の両者とも癌細胞を殺すのに十分でない。癌細胞側にも免疫系の攻撃からエスケープする様々な防御態勢が備わっている¹⁰⁾。

抗体単離のしくみ

免疫系を用いて癌細胞を殺そうとする立場は大きく 2 つに分かれる。体が持つ癌を監視し、見つけ出し、殺す作用を高め、積極的に援助しようという戦略⁶⁾と、普通の状態では起こらない人工的な方法を用いる戦略である。癌細胞上に発現した分子を標的とし、それに特異的に結合するヒト抗体を作製してそれを癌治療薬とする。具体的には抗原抗体複合体形成を引き金として機能する補体系、Fc レセプターを持つ貪食細胞群、ADCC 作用を持つ細胞群等の働きで、癌細胞を殺すという立場は最も straight-forward なアプローチにみえる。この最も単純な戦略がハーセプチン®とリツキサン®(抗 CD 20 抗体)では成功している。問題は、そのような抗体が認識できる癌特異抗原が存在するのか、またそれを如何にすれば発見できるかである。

抗体が、癌細胞の膜上に発現した抗原に特異的に結合することを引き金に、癌細胞を殺す癌治療薬開発を例に克服すべき課題を以下に議論する。

①通常 1 個の細胞は平均 5,000 ~ 10,000 種の遺伝子を

表1 癌治療用抗体スクリーニングの戦略

第1段階 癌細胞膜上に存在する数多くのエピトープに対する抗体の網羅的単離
第2段階 免疫組織染色法により癌細胞を染色するが、正常細胞は染色しない抗体の選別
第3段階 癌細胞特異的に結合する抗体によって認識されたエピトープの同定
第4段階 癌特異抗体による癌細胞生育の抑制効果もしくは致死効果の判定

発現しているが、その中で5%程度が膜蛋白質であると見積もられている。翻訳後修飾も考慮すれば、細胞上に抗体によって別の抗原として認識し得るエピトープは1,000～2,000種存在し得る。癌細胞と正常細胞を比較した際に、癌細胞にのみ存在、もしくは量的に大過剰存在するエピトープがあっても不思議ではない。ただしその場合、対象としている癌細胞が由来した正常細胞と比較することになるが、見かけ上の癌特異抗原を見出したとしても全く性質の異なる別の正常細胞でその抗原が発現していることはあり得る。

②DNAマイクロアレイを用いた解析や2Dゲルを中心とするプロテオミクスから得られる癌細胞と正常細胞の相違に関する莫大な情報に基づき、対象抗原を絞り込む作業は広範に実施されている。

しかし、ここでは癌治療に直接結びつく抗体-抗原単離の可能性を考えることにする。現在、ファージディスプレイ系を代表とする様々なディスプレイ系を用いて抗体ライブラリーを作製することが可能になった。抗体ライブラリーを用いて癌特異的に発現する分子で、抗体によってアクセス可能なエピトープを見つけ出すことが可能であろうか。

抗体ライブラリーの性質

ファージディスプレイ系、リボソームディスプレイ系、大腸菌や酵母の膜上でのディスプレイ系等の原理はすべて、粒子や細胞上に抗体を発現させ、その抗体をコードする遺伝子を物理的に共存(リンク)させることである。

抗原に結合させて抗体を回収すると遺伝子も同時に入手できる。それぞれの系に長所と短所があるが、ファージディスプレイ系が最も操作が容易で広範に用いられている。さらに約 10^{11} 個の独立したクローンを持つライブラリーを維持、使用できる。巨大な数からなる抗体レパートリーを構築するために、

- ①動物(ヒトを含めて)体内で発現した抗体遺伝子をRT-PCR法で増幅し、*in vivo*レパートリーを反映した抗体セットを作る¹¹⁾。
- ②すべてのgermline V遺伝子とJ遺伝子を用いてさらに結合部にランダム配列を挿入することにより巨大なレパートリーを作る¹²⁾。
- ③抗原特異性を決定する上で重要な貢献をする部位を選んで、人為的に多種類の配列を導入して多様な抗体セットを作る¹³⁾。

という3つの方針がある。それぞれ長所と欠点がある。抗体ライブラリーを用いた筆者らの長年にわたる経験から次のように結論している。

- a. いずれの方法を用いて作製したライブラリーも $10^6 \sim 10^{11}$ の独立したクローンを有し、正しく設計されて、defectiveなクローン(抗体を発現していない)の率を極力小さくする工夫が施されているならば、ライブラリー中の抗体がカバーする抗原の種類は十分に多様である。
- b. 抗原結合力について K_A 値で、 $10^6 \sim 10^7 M^{-1}$ が弱く、 $10^9 \sim 10^{10} M^{-1}$ が強いと判断するならば、多くのエピトープに対して弱い結合力を示す抗体は種類も数も多く含まれ、高い結合力を示す抗体の存在は、

特殊な例(*in vivo*で抗体の成熟を起こしたクローンが含まれる)を除き期待しないで研究をデザインした方がよい。(これはスクリーニングの仕方の問題も含んでいる)

抗体ライブラリースクリーニング上の問題

莫大な数のクローン数からなる巨大な抗体ライブラリーを作製し、それを抗体のマスターソースとして様々な抗原に対して抗体を単離しているグループが、抗体ライブラリー法の問題点として経験することは次のことである。

- ①スクリーニングに用いる抗原に対してライブラリーの中には数多くの抗体が含まれているにもかかわらず、特定のクローンが片寄って単離される傾向がある。
- ②抗体の結合力が弱いクローンが多数存在する状況の中では、結合力が強いクローンが少数含まれていても後者のクローンを単離するのは容易でない。

筆者らは、癌治療用抗体スクリーニングの戦略を表1に示すように考え実施している。ここで挙げた2つの問題は、第1段階の目標達成上克服すべき課題である。もし抗体ライブラリーの性能が悪くて、作製したライブラリーの中に元来様々なエピトープに対する抗体が含まれなければ解決すべき課題前の話である。しかしながら多くの抗原をスクリーニングした経験から、これはライブラリーの性能の問題ではなく、スクリーニングの問題と考えている。例えば、筆者らの抗体ライブラリー(AIMS)の場合に、それぞれの癌細胞に対して結合する抗体が数万種類入っており、それが数千種類のエピトープを認識できると推定しても誇張した話とは考えていない。抗原-抗体反応は平衡反応であり、もしファージ抗体が抗原に結合する理由が、抗原-抗体複合体形成のみに依存しているならば、スクリーニングに必要な洗浄する段階の調節によって複合体の形成と破壊を濃度や時間でコントロールできるはずだが、そうっていない。問題克服の鍵はこの辺にあるというのがわれわれの意見である。

工夫すべき点

一度数多くの癌細胞に結合する抗体を単離できれば表1の第2段階に進むが、そこに技術的問題はない。第3段階は、マスマスペクトロメーターを中心とする最近の機器の性能向上が役立つだろう。プロテオミクスでいわれている課題と同等である¹⁴⁾。そこで最も工夫すべき点は、上述した見かけ上の癌特異抗原への第4段階での対処となるかもしれない。癌とそれが由来した正常細胞の間では顕著な差がみられるが、広く体全体の組織を調べれば癌特異抗原というのは見かけ上にすぎない例である。そのような場合に抗体を全身投与するのではなく、癌細胞が存在する部位に何らかの手段を用いて標的化した形で抗体を投与する技術開発が可能かもしれない。このような工夫を通して、癌治療用抗体は開発されるのではないか。現在、この分野は間違いなく激烈な競争下にある。

文 献

- 1) DeRisi J, Penland L, Brown PO, et al : Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* 14 : 457-460, 1996
- 2) Velculescu VE, Zhang L, Kinzler KW, et al : Serial analysis of gene expression. *Science* 270 : 484-487, 1995
- 3) Liotta L, Petricoin E : Molecular profiling of human cancer. *Nat Rev Genet* 1 : 48-56, 2000
- 4) Croix BS, Rago C, Velculescu V, et al : Genes expressed in human tumor endothelium. *Science* 289 : 1197-1202, 2000
- 5) Ross DT, Scherf U, Eisen MB, et al : Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet* 24 : 227-235, 2000
- 6) Rosenberg SA : Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 411 : 380-384, 2001
- 7) Rosenberg SA : A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* 10 : 281-287, 1999
- 8) Smyth MJ, Goldfrey DI, Trapani JA : A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2 : 293-299, 2001
- 9) Sahin U, Tureci O, Schmitt H, et al : Human neoplasms

- elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci USA* **92** : 11810-11813, 1995
- 10) Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, et al : Cancer immunoeediting : from immuno-surveillance to tumor escape. *Nat Immunol* **3** : 991-998, 2002
 - 11) Vaughan TJ, Williams AJ, Pritchard K, et al : Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat Biotechnol* **14** : 309-314, 1996
 - 12) Griffiths AD, Williams SC, Hartley O, et al : Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J* **13** : 3245-3260, 1994
 - 13) Knappik A, Ge L, Honegger A, et al : Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol* **296** : 57-86, 2000
 - 14) Yarmush ML, Jayaraman A : Advances in proteomic technologies. *Annu Rev Biomed Eng* **4** : 349-373, 2002

Isolation of Human Monoclonal Antibodies That Neutralize Human Rotavirus

Kyoko Higo-Moriguchi,^{1*} Yasushi Akahori,² Yoshitaka Iba,²
Yoshikazu Kurosawa,² and Koki Taniguchi¹

Department of Virology and Parasitology¹ and Institute for Comprehensive Medical Science,² Fujita Health University School of Medicine, Toyoake, Aichi 470-1192, Japan

Received 10 July 2003/Accepted 2 December 2003

A human antibody library constructed by utilizing a phage display system was used for the isolation of human antibodies with neutralizing activity specific for human rotavirus. In the library, the Fab form of an antibody fused to truncated cp3 is expressed on the phage surface. Purified virions of strain KU (G1 serotype and P[8] genotype) were used as antigen. Twelve different clones were isolated. Based on their amino acid sequences, they were classified into three groups. Three representative clones—1-2H, 2-3E, and 2-11G—were characterized. Enzyme-linked immunosorbent assay with virus-like particles (VLP-VP2/6 and VLP-VP2/6/7) and recombinant VP4 protein produced from baculovirus recombinants indicated that 1-2H and 2-3E bind to VP4 and that 2-11G binds to VP7. The neutralization epitope recognized by each of the three human antibodies might be human specific, since all of the antigenic mutants resistant to mouse monoclonal neutralizing antibodies previously prepared were neutralized by the human antibodies obtained here. After conversion from the Fab form of an antibody into immunoglobulin G1, the neutralizing activities of these three clones toward various human rotavirus strains were examined. The 1-2H antibody exhibited neutralizing activity toward human rotaviruses with either the P[4] or P[8] genotype. Similarly, the 2-3E antibody showed cross-reactivity against HRVs with the P[6], as well as the P[8] genotype. In contrast, the 2-11G antibody neutralized only human rotaviruses with the G1 serotype. The concentration of antibodies required for 50% neutralization ranged from 0.8 to 20 µg/ml.

Rotavirus is the major cause of severe acute gastroenteritis among infants and young children. Rotavirus infection is life-threatening in developing countries, resulting in 500,000 to 600,000 deaths annually (33). In developed countries, rotavirus infections lead to a high disease burden with considerable medical expense due to the high morbidity. Furthermore, adults, particularly the elderly, are also affected by rotavirus infection (34, 39), and immunocompromised children and adults develop persistent rotavirus diarrhea (12, 42, 43). Thus, vaccination is thought to be the best way to reduce severe rotavirus gastroenteritis worldwide. Tetravalent rhesus rotavirus (RRV) human reassortant vaccine comprising RRV and three RRV-based monoreassortants carrying the VP7 genes from G1, G2, and G4 human rotaviruses (HRVs) was developed (25), and 1.5 million doses of this vaccine had been administered to infants by the end of May 1999 in the United States. However, the vaccine was withdrawn due to the occurrence of gut intussusception, which appeared to be epidemiologically linked to vaccine application (5, 38). Moreover, even if a safe and effective rotavirus vaccine is developed, vaccination would be less effective in immunocompromised patients.

Rotaviruses have two outer capsid proteins, viral protein 4 (VP4) and VP7, encoded on RNA segment 4 and RNA segment 7, 8, or 9, depending on the strain, respectively (19). VP4 and VP7 are known to induce neutralizing antibodies (Abs) in the sera and stools of infected patients, and they are relevant

to protection against rotavirus infection (14, 18, 41, 45–47, 51). It is well known that the rotavirus G serotypes and P genotypes defined by VP7 and VP4, respectively, exhibit diversity. A total of 15 G serotypes and 22 P genotypes have been described (11). Although the majority of HRVs prevailing worldwide have G1, G2, G3, or G4 as the G serotype, and P[4] or P[8] as the P genotype, at least 10 G and 10 P types have been reported on HRVs (8). Recently, a number of HRV strains with unusual G or P types and rare combinations of G and P types have been detected worldwide. For example, G9 is increasing rapidly. In contrast, both VP4 and VP7 carry heterotypic (cross-reactive) neutralization epitopes, which are thought to be related to heterotypic protection (29, 30, 45–47, 49). An individual can be repeatedly infected with various strains of HRVs, suggesting that he or she has broadly and strongly effective Abs to HRVs. Although the validity of passive immunization remains unclear (17), oral administration of cross-reactive human immunoglobulins could be one of the measures for both prophylaxis and therapy for HRV diseases.

The natural repertoire formed in the human body should be composed of two different types of Abs. One type, which forms a naive repertoire, should show a wide range of antigen (Ag) specificity, the Ab binding avidity of each Ab being low in general. The other type, which is raised against specific Ags by immunization, should show a narrow range of specificity, the Ab binding avidity of each Ab being strong. In the present study, we used the Ab library called AIMS4 constructed from the B lymphocyte-rich tissues of a few dozen patients. Since this library is human-derived and rotavirus infection is considered to be very common worldwide, we expected that the Ab

* Corresponding author. Mailing address: Department of Virology and Parasitology, Fujita Health University School of Medicine, Toyoake, Aichi 470-1192, Japan. Phone: 81-562-93-2486. Fax: 81-562-93-4008. E-mail: khigo@fujita-hu.ac.jp.

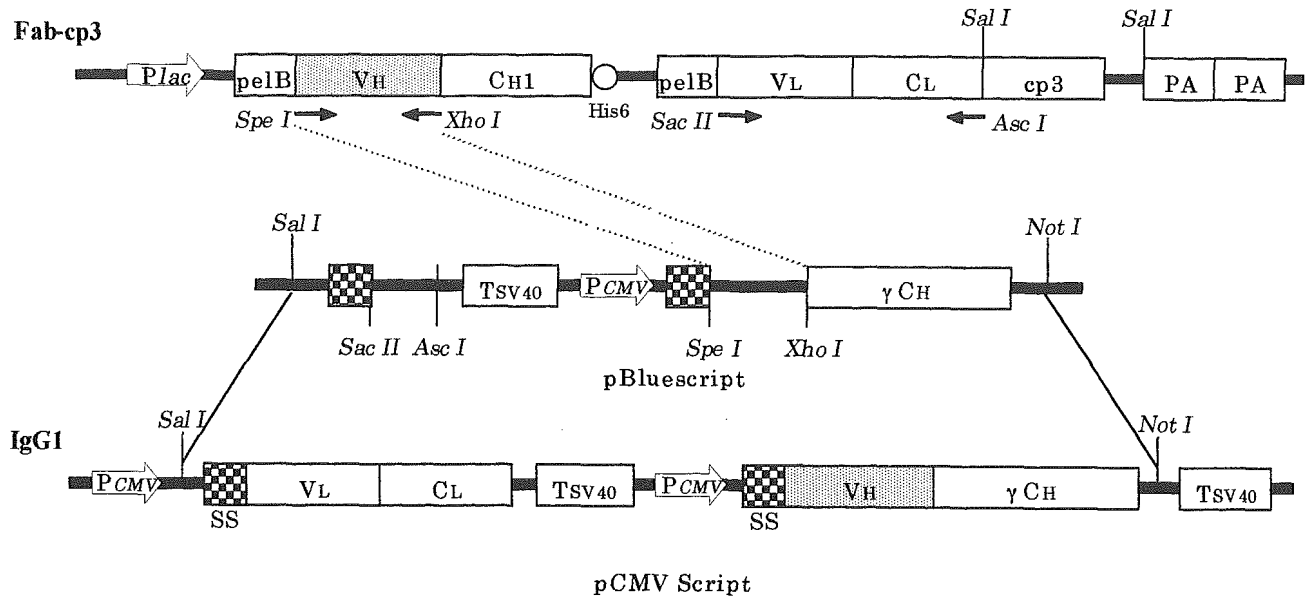


FIG. 1. Scheme for the conversion of a phage Ab (Fab-cp3) to an human IgG1. The V_H and the $V_L C_L$ regions were amplified by PCR with the proper primers listed in Table 1, followed by subcloning into the proper restriction enzyme sites to construct an IgG1 cassette. The IgG1 cassette was then cloned into expression vector pCMVScript. *Plac*, *lac* promoter; *pelB*, *pelB* leader sequence; C_H1 , the first H-chain constant domain of human IgG1; His6, His tag-encoding part; cp3, truncated cp3; PA, Fc-binding domain of protein A; Tsv40, simian virus 40 terminator; P_{CMV} , cytomegalovirus promoter; γC_H , human γC_H domain; SS, signal sequence.

repertoire formed in AIMS4 should reflect a variety of rotavirus-specific Abs acquired through natural exposure. It would be interesting to directly explore the Ab repertoire of humans. In particular, comparison of the neutralization epitopes recognized by humans and mice would be useful for understanding the immune response against rotavirus infection in humans.

We describe here the successful isolation of anti-VP4 cross-reactive Abs and an anti-VP7 G1-specific Ab with neutralizing activities toward rotaviruses.

MATERIALS AND METHODS

Viruses. The following HRV strains and reassortants were used for the present study: KU (G1P[8]), Wa (G1P[8]), M37 (G1P[6]), K8 (G1P[9]), S2 (G2P[4]), 1076 (G2P[6]), YO (G3P[8]), McN13 (G3P[6]), AU-1 (G3P[9]), Hosokawa (G4P[8]), 69M (G8P[10]), WI61 (G9P[8]), L26 (G12P[4]), and two bovine strain UK-based single gene-reassortants, UK/Wa (G1P[5]) and UK/DS1 (G2P[5]), carrying the VP7 gene from HRV strains Wa and DS1, respectively (32). Eleven antigenic KU mutants resistant to each of 11 neutralizing mouse monoclonal Abs (MAbs) were also used in the present study: six (V-YO-1E6, V-ST-1F2, V-YO-1S3, V-YO-2C2, V-KU-4D7, and V-KU-6B11) and five (V-KU-3C7, V-YO-4C2, V-KU-5H1, V-KU-6A11, and V-KU4) mutants have been prepared by cultivating strain KU in the presence of anti-VP4 cross-reactive neutralizing MAbs and anti-VP7 G1-specific neutralizing MAbs, respectively (45, 47). Virus propagation and purification were carried out as described previously (49). Unless otherwise stated, the culture fluids of MA104 cells infected with rotaviruses were used for the assays.

Preparation of virus-like particles (VLPs) and recombinant VP4. Construction of the artificial VLP of HRV KU origin is described elsewhere (K. Taniguchi et al., unpublished data). Briefly, the reverse transcription-PCR products of the VP2, VP4, VP6, and VP7 genes of human strain KU were cloned into a TA cloning vector, pCRII (Invitrogen, San Diego, Calif.), to generate pKU-VP2, pKU-VP4, pKU-VP6, and pKU-VP7. After digestion with restriction enzymes, the fragments were ligated into transfer vector pVL1392 to yield pVL1392/KU-VP2, -VP4, -VP6, and -VP7. Sf9 cells were coinfecting with linearized wild-type *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus DNA (PharMingen) and either pVL1392/KU-VP2, -VP4, -VP6, or -VP7 by the Lipofectin-mediated method. The baculovirus recombinants thus obtained were used for preparation of recombinant VP4, VLP-VP2/6, and VLP-VP2/6/7 in Tn5 cells.

Ab library. Abs were isolated from the Abs library called AIMS4, which was constructed in Y. Kurosawa's laboratory. In brief, B lymphocyte-rich fractions of human tissues such as tonsils, umbilical cord blood, peripheral blood, and bone marrow were used as gene sources of Abs (35; Y. Akahori et al., unpublished data). Using a phage-display system, the Fab form of an Ab fused to a truncated cp3 (Fab-cp3) was expressed on the phage surface. The library is composed of 10^{11} independently established clones, and it has been shown that >70% of the phages express Abs.

Screening of the library. Selection of phages exhibiting rotavirus (strain KU)-binding activity was performed by a panning method that was essentially the same as that described previously (20, 27). The immunotubes (Nunc-Immuno-modules Polysorp) were coated with 200 μ g of a purified KU virion/ml in phosphate-buffered saline containing 100 μ g of Ca^{2+} and Mg^{2+} /ml [PBS(+)] overnight at 4°C. After a blocking step with 2% skim milk, a solution of phages (10^{14} CFU) was added to each tube, followed by incubation at room temperature for 2 h. The unbound clones were washed out four times with PBS(+). Bound phages were eluted with 0.1 M triethylamine (pH 12.3), and the eluent was then immediately neutralized with 1 M Tris-HCl (pH 6.8). *E. coli* DH12S cells cultured in 2xYT medium were infected with the eluted phages, precipitated by centrifugation, and then resuspended in 2xYT containing 1% glucose and 100 μ g of ampicillin/ml, followed by superinfection with helper phages and further cultivation under kanamycin-selective conditions (70 μ g/ml) in order to replicate phage clones harboring KU-reactive Abs. The phage clones obtained through this process were used for the next round of panning. The input titers of the phages and the number of washings with PBS(+) were 1.06×10^{13} and 8 for the second panning and 3.46×10^{13} and 16 for the third panning, respectively. After the third round of panning, DH12S cells infected with the selected phages were spread on LB plates containing 1% glucose and 100 μ g of ampicillin/ml and incubated at 30°C overnight.

Preparation of various forms of Abs. The individual clones of *E. coli* infected with phages were grown in 2xYT medium containing 0.1% glucose and 100 μ g of ampicillin/ml. After the addition of 1 mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside), the Fab-cp3 molecules were initially accumulated in the periplasm of *E. coli* and then gradually secreted and/or released into the culture medium (crude Fab-cp3). On average, 1 μ g of Fab-cp3 molecules/ml is present in the culture fluid. The Fab-cp3 molecules can be purified with anti-cp3 MAb-conjugated Sepharose beads. After isolation of phage particles, the gene encoding an Fab-cp3 molecule can be easily converted into another gene encoding an Fab-PP (P denotes a single Fc-binding domain of protein A) form of Ab by digestion with SalI followed by self-ligation (Fig. 1) (22). The Fab-PP molecules can be purified

TABLE 1. Oligonucleotide primers used for the conversion of phage antibodies (Fab-cp3) to human IgG1

Primer	Orientation ^a	Sequence
1-2HVH	F	5'-TTCCTCCTACTAGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCCTGTCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG-3'
	R	5'-GGTGGAGGCACTCGAGACGGTGACCAGGGTTC-3'
1-2HVLCL	F	5'-CTACTCTGGCTCCGCGGTGCCAGACAGTCTGTGTGACGCAGCCG-3'
	R	5'-TCGACTGGCGCGCCCTATGAACATCTCTGTAGGGGCCACTGTCTTC-3'
2-3EVH	F	5'-TTCCTCCTACTAGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCCTGTCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG-3'
	R	5'-GGTGGAGGCACTCGAGACGGTGACCATTGTCC-3'
2-3EVLCL	F	5'-CTACTCTGGCTCCGCGGTGCCAGAGAAACGACACTCACGCAGTCT-3'
	R	5'-TCGACTGGCGCGCCCTAACACTCTCCCCTGTGAAGCTCTTTGTG-3'
2-11GVH	F	5'-TTCCTCCTACTAGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCCTGTCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG-3'
	R	5'-GGTGGAGGCACTCGAGACGGTGACCCTGGTCC-3'
2-11GVLCL	F	5'-CTACTCTGGCTCCGCGGTGCCAGAGAAACGACACTCACGCAGTCT-3'
	R	5'-TCGACTGGCGCGCCCTAACACTCTCCCCTGTGAAGCTCTTTGTG-3'

^a F, forward; R, reverse. SpeI, XhoI, SacII, and AscI sites are underlined.

with an immunoglobulin G (IgG)-conjugated column. For conversion of an Fab to a human IgG1, the variable heavy-chain region (V_H) and the variable and constant light-chain region ($V_L C_L$) of an Fab fragment were amplified by PCR (15 cycles of amplification at 94°C for 2 min, 55°C for 2 min, and 72°C for 2 min) with primers designed for each clone (Table 1). After digestion with SpeI and XhoI for the V_H region and SacII and AscI for the $V_L C_L$ region, the PCR products were subcloned into an IgG1 construction vector. The constructed IgG1 cassette was further cloned into the pCMV-Script expression vector (Fig. 1) (Akahori et al., unpublished). Expression of IgG1 molecules was performed by transfection of the IgG1 expression vectors into CHO-K1 cells by using GenePORTER (Gene Therapy Systems), which allows production and/or secretion of a whole human IgG1 type of Ab in culture fluid.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). To determine the reactivity to or titer of the Abs for strain KU, immunoplates (96-well; Nalgen Nunc International) were coated with highly purified virions (500 ng/well) suspended in PBS(+) for 1 day at 4°C. After a blocking treatment with 5% bovine serum albumin in PBS(+), the plates were washed with PBS(+). For the reactivity study, the plates were then incubated with 50 ng of purified Fab-cp3 in PBS(+) at 4°C overnight. For the titration study, the plates were then incubated with serial dilutions of purified IgG1-formed Abs ranging from 0.01 to 5,000 ng/well in PBS(+) at 4°C overnight. In both cases, after the plates had been washed with PBS(+), a 1:2,500 dilution of peroxidase-conjugated goat anti-human IgG (H+L chain; MBL) was added to each well. One optical density at 492 nm (OD₄₉₂) unit was defined as the Ab concentration at which the OD₄₉₂ reading was 1.0. To identify virus proteins recognized by the isolated Abs, the immunoplates were coated with 500 ng of purified Fab-cp3 at 4°C overnight, followed by blocking with 5% BSA in PBS(+). Then, unpurified VLPs or recombinant VP4 in the culture supernatant were added. After incubation at 4°C overnight and additional washing with PBS(+), 50 µl of 1:4,500 diluted rabbit anti-HRV antiserum (a mixture of 1:1,500 diluted rabbit anti-KU, anti-AK13, and anti-YO antiserum) was added to each well, followed by incubation at 4°C for 1 day. After the plates had been washed with PBS(+), a 1:2,500 dilution of peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (H+L chain; MBL) was added to each well. In all cases, the reactivity of the Abs to Ags was assessed after addition of the substrate.

Assay for virus-neutralizing activity. Screening of crude Fab-cp3 Abs for preliminary selection as to neutralizing activity and determination of the titers of the purified Abs against HRVs or antigenic mutants were determined by the fluorescent focus reduction (FF) method. A total of 25 µl of crude Fab-cp3 or purified Abs in PBS(+) at various concentrations (0.4 to 20 µg/ml) was mixed with an equal volume of virus suspension containing 3.6×10^4 to 14.4×10^4 focus-forming units in Eagle minimum essential medium, followed by reaction at 37°C for 1 h. Aliquots (50 µl) of the mixtures of Abs and viruses were inoculated onto MA104 cells in 96-well culture plates and, after an additional 1 h of incubation at 37°C, 100 µl of fresh Eagle minimum essential medium was added, followed by 16 to 18 h cultivation at 37°C. Fixation in the cold (-80°C), and reaction with the first and second Abs were performed as described previously (49). The neutralization assays were performed in duplicate and at least twice.

Sequence analysis. The nucleotide sequences of V_L and V_H regions were determined with an ABI Prism 320 genetic analyzer by using a BigDye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems). The T7 primer (5'-TGTAATAC GACTCACTATAG-3') and the huCH1J primer (5'-ATTAATAAGAGCTAT CCCGG-3') were used for V_H and V_L sequencing, respectively.

Nucleotide sequence accession numbers. The nucleotide sequence data for the HRV neutralizing Abs reported in the present study have been submitted to the DDBJ database and were assigned the following accession numbers: AB114449 (for 1-2H H chain), AB114450 (2-1D H chain), AB114451 (2-2D H chain), AB114452 (2-3E H chain), AB114453 (2-4F H chain), AB114455 (2-7G H chain), AB114456 (2-9B H chain), AB114457 (2-9D H chain), AB114458 (2-11G H chain), AB114459 (2-12B H chain), AB114460 (3-1G H chain), AB114461 (4-3-C H chain), AB114461 (1-2H L chain), AB114462 (2-1D L chain), AB114463 (2-2D L chain), AB114464 (2-3E L chain), AB114465 (2-4F L chain), AB114466 (2-7G L chain), AB114467 (2-9B L chain), AB114468 (2-9D L chain), AB114469 (2-11G L chain), AB114470 (2-12B L chain), AB114471 (3-1G L chain), and AB114472 (4-3C L chain).

RESULTS

Isolation of Fab forms of Abs with neutralizing activities toward HRVs. After three rounds of panning, the recovered phages were used to infect *E. coli*, which was spread on plates containing ampicillin without infection with helper phages. We picked up 321 colonies and cultured them in 96-well plates. The supernatants, crude Fab-cp3, were directly subjected to analysis of neutralizing activities by means of the FF assay. Among the 321 clones analyzed, 24 appeared to exhibit neutralizing activities toward rotavirus strain KU.

Amino acid sequences of Fab H and L chains. In order to confirm the successful selection of phages with Fab-cp3 specific to strain KU and also to classify the 24 clones, we determined the sequences of variable regions of both their H and L chains. Some redundants were included in the 24 clones (Fig. 2), indicating the specific and successful selection and enrichment of KU-reactive phage Abs. The amino acid sequences of the H chains could be divided into 7 clones and the L chains could be divided into 16 clones (Fig. 2). As a result, 16 of the 24 clones were found to be independent.

Neutralizing activity of the purified Fab fragments. Since the use of crude Fab-cp3 in the FF assay gave ambiguous

Heavy chains		CDR1	CDR2	CDR3			
	1	20	40	60	80	90	110
1H	EVQLVESGGGVQPG	GRSLRLSCAASGFTFSS	YDMWWRQVITGKGLEWAGI	GS	AHDTVYPDSV	VKGRFTI SRDIAKNSM	MLQNSLRAGDTAVYHCVRSP. . . RHVSDRRGMDVWGKGTITVTVSS
2H ⁽²⁾	EVQLVESGGGVQPG	GRSLRLSCAASGFTFSS	YDMWWRQVITGKGLEWAGI	GS	AHDTVYPDSV	VKGRFTI SRDIAKNSM	MLQNSLRAGDTAVYHCVRSP. . . RHVSDRRGMDVWGKGTITVTVSS
3H	EVQLVESGGGVQPG	GRSLRLSCAASGFTFSS	YDMWWRQVITGKGLEWAVI	YDGSNKIYADS	VKGRFTI	SRDIAKNSM	MLQNSLRAGDTAVYHCVRSP. . . RHVSDRRGMDVWGKGTITVTVSS
4H ⁽¹⁰⁾	EVQLVESGAEVKKP	GASVKVSKASGYTFS	HYVI	NWRQAPQGLE	YMGIT	DPSGGRTIYAQK	QGRFTMTRDITSTSTVYME LSGLRSDDTAVYYCARE. CPDSS TALFLWGQGLTVTVSS
5H ⁽⁴⁾	QVQLVQSGAEVKKP	GASVKVSKASGYTFS	HYVI	NWRQAPQGLE	YMGIT	DPSGGRTIYAQK	QGRFTMTRDITSTSTVYME LSGLRSDDTAVYYCARE. CPDSS TALFLWGQGLTVTVSS
6H ⁽¹⁾	QVQLVQSGAEVKKP	GASVKVSKASGYTFS	HYVI	NWRQAPQGLE	YMGIT	DPSGGRTIYAQK	QGRFTMTRDITSTSTVYME LSGLRSDDTAVYYCARE. CPDSS TALFLWGQGLTVTVSS
7H	QVQLVQSGAEVKKP	GASVKVSKASGYTFS	HYVI	NWRQAPQGLE	YMGIT	DPSGGRTIYAQK	QGRFTMTRDITSTSTVYME LSGLRSDDTAVYYCARE. CPDSS TALFLWGQGLTVTVSS

Light chains		CDR1	CDR2	CDR3			
	1	20	40	60	80	100	
1L ⁽¹⁾	ETTLTQSPATLSV	SPGERATLSCRASQSV. .	SSN	LAWWQQKPGQAP	RLLI	YGASTRATG	IPARFSGSGGTFTLTISSLQSEDFAVYYCQVYNNWPLYTFGGGKLVDIKR
2L	ETTLTQSPATLSV	SPGERATLSCRASQSV. .	SSN	LAWWQQKPGQAP	RLLI	YGASTRATG	IPARFSGSGGTFTLTISSLQSEDFAVYYCQVYNNWPLYTFGGGKLVDIKR
3L	EVLTQSPGTL	SLSPGERATLSCRASQSV. .	SSS	YLAWWQQKPGQAP	RLLI	YGASSRATG	IPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQVYNNWPLYTFGGGKLVDIKR
4L	EVLTQSPGTL	SLSPGERATLSCRASQSV. .	SSS	YLAWWQQKPGQAP	RLLI	YGASSRATG	IPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQVYNNWPLYTFGGGKLVDIKR
5L	EVLTQSPGTL	SLSPGERATLSCRASQSV. .	SSS	YLAWWQQKPGQAP	RLLI	YGASSRATG	IPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQVYNNWPLYTFGGGKLVDIKR
6L ⁽¹⁾	HVLTQPPS	VSGAPGQRVTI	SCIGSSNI	GAGYDVHWQQLP	GTAPKLLI	YGNSNRPSGVP	DRFSGSKGTSASLAI TGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGVFGGGKLVTLG
7L ⁽¹⁾	QSVLTQPPS	VSGAPGQRVTI	SCIGSSNI	GAGYDVHWQQLP	GTAPKLLI	YGNSNRPSGVP	DRFSGSKGTSASLAI TGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGVFGGGKLVTLG
8L ⁽¹⁾	QSVLTQPPS	VSGAPGQRVTI	SCIGSSNI	GAGYDVHWQQLP	GTAPKLLI	YGNSNRPSGVP	DRFSGSKGTSASLAI TGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGVFGGGKLVTLG
9L ⁽⁴⁾	QSVLTQPPS	VSGAPGQRVTI	SCIGSSNI	GAGYDVHWQQLP	GTAPKLLI	YGNSNRPSGVP	DRFSGSKGTSASLAI TGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGVFGGGKLVTLG
10L	QSVLTQPPS	VSGAPGQRVTI	SCIGSSNI	GAGYDVHWQQLP	GTAPKLLI	YGNSNRPSGVP	DRFSGSKGTSASLAI TGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGVFGGGKLVTLG
11L	QSVLTQPPS	VSGAPGQRVTI	SCIGSSNI	GAGYDVHWQQLP	GTAPKLLI	YGNSNRPSGVP	DRFSGSKGTSASLAI TGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGVFGGGKLVTLG
12L	QSVLTQPPS	VSGAPGQRVTI	SCIGSSNI	GAGYDVHWQQLP	GTAPKLLI	YGNSNRPSGVP	DRFSGSKGTSASLAI TGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGVFGGGKLVTLG
13L	QSVLTQPPS	VSGAPGQRVTI	SCIGSSNI	GAGYDVHWQQLP	GTAPKLLI	YGNSNRPSGVP	DRFSGSKGTSASLAI TGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGVFGGGKLVTLG
14L	QSVLTQPPS	VSGAPGQRVAI	SCIGSSNI	GAGYDVHWQQLP	GTAPKLLI	YGNSNRPSGVP	DRFSGSKGTSASLAI TGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGVFGGGKLVTLG
15L	QSVLTQPPS	VSAAPGQKVTI	SCS	GSSNI	GSNY	VS	WVWQQLP GTAPKLLIYDNNKRPSPGIPDRFSGSKGTSATLGI TGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGVFGGGKLVTLG
16L	QSVLTQPPS	VSAAPGQKVTI	SCS	GSSNI	GSNY	VS	WVWQQLP GTAPKLLIYDNNKRPSPGIPDRFSGSKGTSATLGI TGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGVFGGGKLVTLG

FIG. 2. Amino acid sequences of variable regions of the H and L chains of Abs that appeared to exhibit neutralizing activities toward strain KU. The sequences of CDRs are shown in boldface. Numbers in parentheses indicate number of redundant clones found among the 24 Abs analyzed, with 16 Abs being independent. The combinations of H and L chains in the independent Abs are indicated in Table 2. The numbering of amino acid positions is according to the method of Kabat et al. (23).

results due to contaminants in the *E. coli* culture supernatant, the Fab-cp3 coding phagemid DNAs of the 16 independent clones (2-7G, 3-1G, 2-9D, 2-4F, 2-9B, 1-2H, 4-3C, 2-12B, 2-2D, 2-3E, 2-1D, 2-11G, 1-8A, 2-2G, 2-5G, and 1-4D) were reconstructed to produce Fab-PP fragments (Fig. 1) to facilitate purification. After purification by means of affinity selection, their neutralizing activities toward strain KU were assessed by FF assay. Except for 1-4D, 1-8A, 2-2G, and 2-5G, we could detect the neutralizing activity against strain KU (Table 2). Although the Ag-binding site of each Ab is formed by amino acid residues in the six complementarity-determining regions (CDRs) of the H and L chains, the contribution of CDR3 of the H chain to Ag specificity is greatest among them in a usual case, especially that to protein Ags (21). Judging from this, the two H chains, 4H and 5H, are essentially the same (Fig. 2), and the 12 clones exhibiting the neutralizing activities toward KU could be classified into three groups (Table 2). We finally selected 1-2H, 2-3E, and 2-11G as representative clones of the three group, and further investigations were carried out on these three.

Virus proteins recognized by Abs. The reactivity of the three representative Fab fragments was examined by means of ELISA, their specific reactivity with strain KU being shown (Fig. 3A). Although an isolated VP4 molecule could expose its neutralizing epitope on the surface, VP7 exposed its epitope only when the molecule was embedded in inner proteins VP2 and VP6 (49). Therefore, we prepared two kinds of VLP, VLP-V2/6 and VLP-2/6/7, and recombinant VP4. As shown in Fig. 3B, the targeted virus protein of 1-2H and 2-3E was found to be VP4, and that of 2-11G was found to be VP7. A Western blot analysis to confirm the ELISA results was unsuccessful (data not shown).

Neutralizing activities toward various HRV strains. After conversion of the Fab form into an IgG1 Ab, we analyzed the neutralizing activities of the three Abs against 13 HRVs by means of the FF assay (Table 3). The 1-2H Ab neutralized 7 strains—S2, L26, KU, Wa, YO, Hosokawa, and WI61—all of which exhibited either P[4] or P[8] type specificity on VP4. The 2-3E Ab showed neutralizing activities toward 8 strains—M37,

TABLE 2. Neutralization activity of Fab-PP forms of Abs to strain KU

Clone (<i>n</i>) ^a	H chain	L chain	Antibody concn (μg/ml) ^b
2-7G (1)	4H	6L	1.6
3-1G (1)		7L	8.0
2-9D (4)		9L	1.6
2-4F		10L	1.6
2-9B		12L	1.6
1-2H	5H	13L	1.6
4-3C (1)		8L	1.6
2-12B		11L	1.6
2-2D		14L	1.6
2-3E (1)	2H	1L	1.6
2-1D		15L	1.6
2-11G	1H	2L	1.6
1-8A	3H	5L	>40.0
2-2G	6H	4L	>40.0
2-5G		3L	>40.0
1-4D	7H	16L	>40.0

^a *n* = number of redundant clones found among the 24 clones analyzed.
^b Concentration of antibodies required for a 50% reduction of the fluorescent focus in the FF assay.

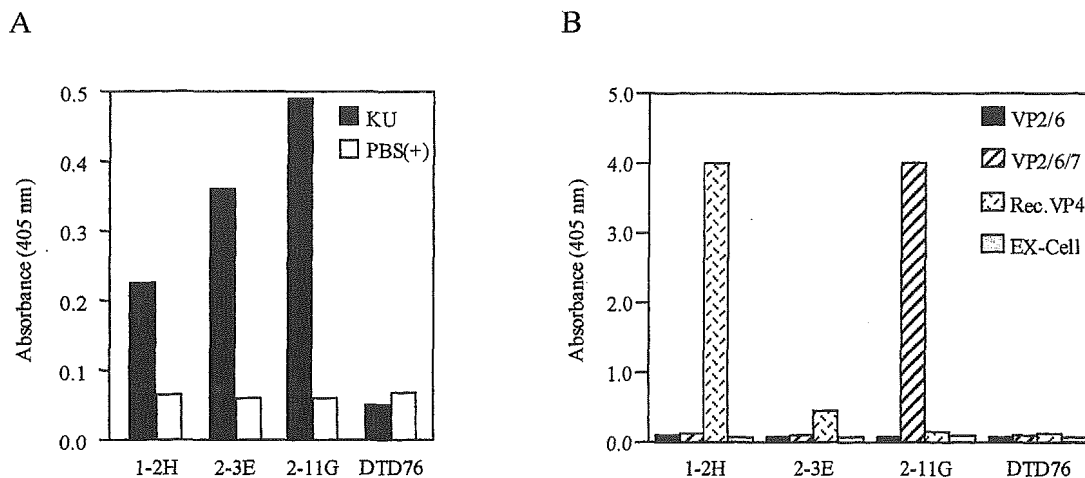


FIG. 3. ELISA of the three Abs (purified Fab-cp3 forms). (A) Reactivities of the three Abs to strain KU. Purified virions suspended in PBS(+) were used as Ags. (B) Virus proteins directed by the three Abs. The culture fluids of Tn5 cells containing VLP-VP2/6, VLP-VP2/6/7, or recombinant VP4 were used as Ags. EX-Cell was the culture medium of Tn5. DTD76 is anti-diphtheria toxin Ab isolated from AIMS4, which was used as a negative control. VP2/6, VLPs constructed with VP2 and VP6; VP2/6/7, VLPs constructed with VP2, VP6, and VP7; Rec.VP4, recombinant VP4.

1076, McN13, KU, Wa, YO, Hosokawa, and WI61—all of which are classified as either a P[6] or P[8] virus strain. The 2-11G Ab reacted with four strains—M37, KU, Wa, and K8—all of which are G1 strains. The conclusion that the 2-11G Ab reacts with VP7 with the G1 serotype was further supported by using two VP7 single gene reassortants, UK/Wa and UK/DS1. The former has VP7 of G1 and VP4 of P[5] specificity, and the latter has VP7 of G2 and VP4 of P[5] specificity. The 2-11G Ab neutralized only the former strain. Of the 13 HRVs examined, 11 were neutralized by any of the three Abs. The concentration of Abs required for 50% neutralization ranged from 0.8 to 20 µg/ml, which corresponds to 5.3 to 133 nM.

Neutralizing activities toward antigenic mutants. We also examined the neutralizing activities of the three representative Abs isolated in the present study with the mouse MAb-resistant mutants prepared in our previous studies (45–47). All of the three Abs of the Fab-cp3 form turned out to neutralize all of the mutants examined (Table 4). The concentration of the each Ab required for 50% reduction of the fluorescent focus in the FF assay was <1.6 µg/ml.

Titers of the Abs to strain KU. We determined the titers of three Abs (IgG1 form) to strain KU by ELISA (Fig. 4). All three Abs showed dose-dependent binding. There was no correlation between the absorbance density and the neutralizing activity of each Ab. The values for one OD₄₉₂ unit for the 1-2H, 2-3E, and 2-11G Abs were 0.70, 0.75, and 1.8 µg/ml, respectively.

DISCUSSION

Ab libraries constructed with a means of a phage-display system are convenient for the rapid isolation of Abs specific for various Ags (2, 27, 31, 44, 52). Recently, several recombinant human Fab fragments exhibiting neutralizing activity toward viruses such as human immunodeficiency virus types 1 and 2, Ebola virus, measles virus, Puumala virus, and respiratory syncytial virus were prepared by means of a phage display system (1, 3, 6, 7, 28, 37, 50). Since the amount of surface proteins with

neutralization epitopes on viruses is small and the immunogenicity of inner proteins is quite high, it is generally much more difficult to obtain MABs with neutralizing capacity than non-neutralizing MABs. This requires some modifications of the panning and/or screening processes. For example, blockade of a common, nonneutralizing epitope with a representative Fab has been used in panning assays to isolate respiratory syncytial virus-neutralizing human MABs (50). In the present study, we used highly purified virion for panning and directly screened numerous clones by means of rapid microneutralization FF tests, which have been found to be very efficient for screening neutralizing MABs with common mouse hybridoma technology (49).

We used HRV strain KU as the Ag for panning, since strain KU exhibits representative G1 and P[8] specificity, which is the

TABLE 3. Neutralization of HRVs and reassortants by purified human IgG1s

Strain	P genotype	G serotype	Antibody concn (µg/ml) ^a		
			1-2H	2-3E	2-11G
S2	P[4]	G2	4–20	>20	>20
L26	P[4]	G12	0.8	>20	>20
M37	P[6]	G1	>20	4	0.8
1076	P[6]	G2	>20	4	>20
McN13	P[6]	G3	>20	4	>20
KU	P[8]	G1	8	1.6	0.4
Wa	P[8]	G1	4	4	4–20
YO	P[8]	G3	8	1.6	>8
Hosokawa	P[8]	G4	4	0.8	>20
WI61	P[8]	G9	4–20	0.8–4	>20
AU-1	P[9]	G3	>20	>20	>20
K8	P[9]	G1	>20	>20	4
69M	P[10]	G8	>20	>20	>20
UK/Wa	P[5]	G1	>20	>20	4
UK/DS-1	P[5]	G2	>20	>20	>20

^a Antibody concentration that reduced the fluorescent focus count by >50% in the neutralization test (FF assay).

TABLE 4. Neutralization activity of purified antibodies (cp3 form) to antigenic variants

Strain	Mutant protein	No. of virus-infected cells with: ^a											
		1-2H at:			2-3E at:			2-11G at:			DTD76 at:		
		1.6 μ g/ml	8 μ g/ml	40 μ g/ml	1.6 μ g/ml	8 μ g/ml	40 μ g/ml	1.6 μ g/ml	8 μ g/ml	40 μ g/ml	1.6 μ g/ml	8 μ g/ml	40 μ g/ml
V-1E6	VP4	63	69	60	4	2	1	14	2	14	296	378	358
V-1F2	VP4	64	76	43	45	108	21	10	5	1	350	462	368
V-1S3	VP4	31	32	19	127	91	18	26	9	4	312	302	304
V-2C2	VP4	87	46	56	9	3	4	16	0	2	296	342	344
V-4D7	VP4	68	13	12	6	1	0	35	3	4	396	222	354
V-6B11	VP4	21	17	11	8	63	4	3	1	0	212	324	240
V-3C7	VP7	121	123	81	14	17	11	19	3	2	482	532	554
V-4C2	VP7	96	87	120	20	9	5	23	2	3	596	660	656
V-5H1	VP7	146	156	90	13	4	4	46	1	1	372	395	355
V-6A11	VP7	57	84	79	57	23	27	24	8	6	425	554	564
V-KU4	VP7	47	22	14	3	4	0	6	0	3	206	186	206
KU	-	26	15	13	3	3	3	52	3	5	282	300	305

^a That is, the numbers of virus-infected cells detected by the FF method (see Materials and Methods). Virus-positive cells in a one-ninth area of one well of a 96-well tissue culture plate were counted. Results are presented as the means for two independent experiments performed in duplicate.

most prevalent HRV serotype worldwide (24), and since the neutralization epitopes on VP4 and VP7 of the strain have well been characterized by using mouse MAbs (36, 45, 47, 49). The three human Abs characterized (1-2H, 2-3E, and 2-11G) are specific to P[8], P[4]; P[8], P[6]; and G1 HRVs, respectively. In particular, the former two are broadly reactive with a wide spectrum of HRVs. Since a total of 15 G serotypes have been defined for rotavirus and at least 10 G serotypes have been isolated from humans, it is desirable to prepare such broadly reactive heterotypic Abs for therapeutic purposes. The reactivity of the three Abs covered most HRV strains, and they indeed neutralized 11 of the 13 HRVs examined. In previous studies, an Ab response to cross-reactive neutralization epi-

topes (YO-2C2 epitopes) was observed much more frequently in schoolchildren and adults than in infants (13, 48). Since the library was constructed from the tissues of adults, who would have been repeatedly infected with HRVs with distinct serotypes and would have immunological memory for cross-reactive neutralization epitopes, cross-reactive Abs may have been readily selected in the present study. In other words, a cross-reactive immune response should be common in the immune system in humans, particularly in adults, infected with rotaviruses.

A number of murine MAbs have been prepared for rotaviruses by means of conventional hybridoma technology. Although many of them were directed to the inner protein VP6,

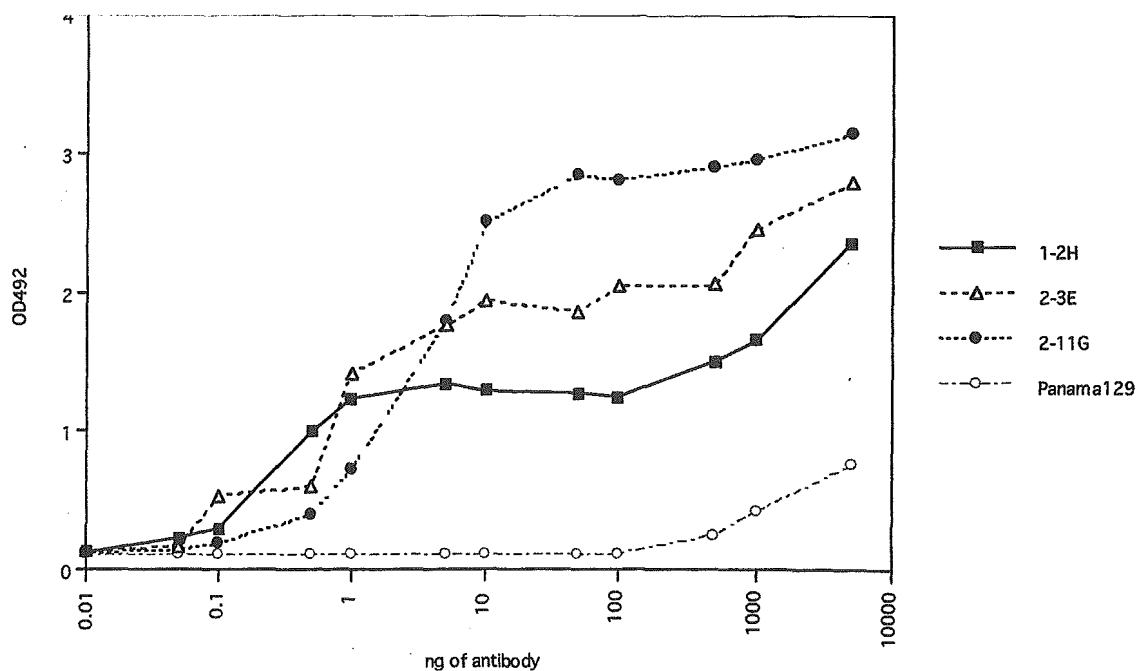


FIG. 4. Abs titration curves on ELISA. The reactivities between purified IgG1-formed Abs and purified virions of strain KU were assessed. The assay was performed in duplicate, and the mean data are plotted. Panama129 is the IgG1-formed anti-influenza virus Ab isolated from the AIMS4 library and converted to the IgG1 form as described in Materials and Methods.

some were directed to VP7 and VP4. However, the number of neutralizing MABs with heterotypic specificity was limited. In particular, ones directed to HRVs were few; i.e., there was only one to VP7 and seven to VP4 (26, 36, 45–47, 49). They have been useful for the analysis of heterotypic neutralization epitopes on VP7 and VP4. By analyzing the mutants resistant to each of the neutralizing mouse MABs directed to VP4 or VP7 of HRVs, critical amino acids in the neutralization epitopes have been identified (29, 45, 46). It has been shown that the cross-reactive neutralization epitopes on VP4 are the 305th, 385th, 392nd, 428th, 433rd, and 439th amino acid residues (26, 46, 47) and that the G1-specific epitopes on VP7 are the 94th and 96th residues (45). Furthermore, by means of neutralization tests on various combinations of MAB-resistant mutants and MABs, operational maps of the neutralization epitopes have been constructed (26, 36). We examined the reactivities of the three human Abs isolated in the present study with the MAB-resistant mutants prepared in our previous studies (45–47): mutants resistant to anti-VP4 MABs (YO-2C2, KU-6B11, YO-1S3, ST-1F2, KU-4D7, and YO-1E6) and mutants resistant to anti-VP7 MABs (KU-2, KU-4, KU-3C7, KU5H1, KU-6A11, and YO-4C2). These three Abs turned out to neutralize all of the mutants examined (Table 4). This finding strongly suggests that the human Abs isolated in the present study recognize neutralization epitopes distinct from those recognized by mouse MABs obtained to date. These results could have been predicted, since the specificity showed by the human Abs, such as 1-2H Ab to P[4] and P[8] and 2-3E Ab to P[6] and P[8], had not been shown by mouse MABs isolated to date. These results imply that the cross-reactive neutralization epitopes recognized by humans, in particular adults, infected with rotaviruses and by mice immunized with rotaviruses are quite distinct. We are now attempting to prepare mutants resistant to each human Ab for analysis of the neutralization epitopes recognized by them.

The mechanism of protective immunity against rotavirus infection has not been well elucidated. Both humoral and cellular immunity are likely to be involved in the protection from rotavirus infection (11, 24, 40). The mucosal Ab response has been believed to be effective for such protection. Furthermore, passive immunity has also been found to be effective (40). Maternal transfer of anti-rotavirus immunoglobulins protects babies from rotavirus infection. Oral administration of bovine immunoglobulins, mouse MABs, and human immunoglobulins has been found to be effective for protecting suckling mice from rotavirus infection (9, 30, 41). In addition, therapeutic reports on the passive immunity of children with rotavirus diarrhea have also been published. Guarino et al. reported that the oral administration of human serum immunoglobulins to children with rotavirus-induced diarrhea resulted in a faster recovery from the disease (15), even though the children were immunocompromised due to human immunodeficiency virus infection (16). In contrast, there have also been reports showing no clinical effect of oral administration of bovine immunoglobulins for prophylaxis or therapy for HRV infection (4, 10). We are now examining a mouse model to determine whether the human MABs prepared in the present study are effective and practically relevant to immunotherapy and/or prophylaxis for diseases caused by rotavirus.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Yukari Hirono, Mai Kakita, and Kazuhiro Suzuki for technical suggestions.

This study was supported in part by a grant for Research on Pharmaceutical and Medical Safety from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan to Y.K. and by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan to K.T.

REFERENCES

- Barbas, C. F., III, E. Bjorling, F. Chiodi, N. Dunlop, D. Cababa, T. M. Jones, S. L. Zebedee, M. A. A. Persson, P. L. Nara, E. Norrby, and D. R. Burton. 1992. Recombinant human Fab fragments neutralize human type 1 immunodeficiency virus in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9339–9343.
- Barbas, C. F., III, A. S. Kang, R. A. Lerner, and S. J. Benkovic. 1991. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978–7982.
- Björling, E., E. von Garrelts, A. Morner, M. Ehnlund, and M. A. A. Persson. 1999. Human neutralizing immunodeficiency virus type 2-specific Fab molecules generated by phage display. *J. Gen. Virol.* 80:1987–1993.
- Brunser, O., J. Espinoza, G. Figueroa, M. Araya, E. Spencer, H. Hilpert, H. Link-Amster, and H. Brussow. 1992. Field trial of an infant formula containing anti-rotavirus and anti-*Escherichia coli* milk antibodies from hyper-immunized cows. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 15:63–72.
- Cale, C. M., and N. J. Klein. 2002. The link between rotavirus vaccination and intussusception: implications for vaccine strategies. *Gut* 50:11–12.
- de Carvalho Nicacio, C., Å. Lundkvist, K. B. Sjölander, A. Plyusnin, E. M. Salonen, and E. Björling. 2000. A neutralizing recombinant human antibody Fab fragment against Puumala hantavirus. *J. Med. Virol.* 60:446–454.
- de Carvalho Nicacio, C., R. A. Williamson, P. W. H. I. Parren, Å. Lundkvist, D. R. Burton, and E. Björling. 2002. Neutralizing human Fab fragments against measles virus recovered by phage display. *J. Virol.* 76:251–258.
- Desselberger, U., M. Iturriza-Gómara, and J. J. Gray. 2000. Rotavirus epidemiology and surveillance. *Novartis Found. Symp.* 238:125–152.
- Ebina, T., A. Sato, K. Umezū, N. Ishida, S. Ohyama, A. Ohizumi, K. Aikawa, S. Katagiri, N. Katsushima, and A. Imai. 1983. Prevention of rotavirus infection by cow colostrum antibody against human rotaviruses. *Lancet* ii: 1029–1030.
- Ebina, T., A. Sato, K. Umezū, N. Ishida, S. Ohyama, A. Oizumi, K. Aikawa, S. Katagiri, N. Katsushima, and A. Imai. 1985. Prevention of rotavirus infection by oral administration of cow colostrum containing anti-human rotavirus antibody. *Med. Microbiol. Immunol.* 174:177–185.
- Estes, M. K. 2001. Rotaviruses and their replication, p. 1747–1786. *In* D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 4th ed. Lippincott/The Williams & Wilkins Co., Philadelphia, Pa.
- Gilger, M. A., D. O. Matson, M. E. Conner, H. M. Rosenblatt, M. J. Finegold, and M. K. Estes. 1992. Extraintestinal rotavirus infections in children with immunodeficiency. *J. Pediatr.* 120:912–917.
- Green, K. Y., K. Taniguchi, E. R. Mackow, and A. Z. Kapikian. 1990. Homotypic and heterotypic epitope-specific antibody responses in adult and infant rotavirus vaccines: implications for vaccine development. *J. Infect. Dis.* 161:667–679.
- Greenberg, H. B., J. Valdesuso, K. van Wyke, K. Midthun, M. Walsh, V. McAuliffe, R. G. Wyatt, A. R. Kalica, J. Flores, and Y. Hoshino. 1983. Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. *J. Virol.* 47:267–275.
- Guarino, A., R. B. Canani, S. Russo, F. Albano, M. B. Canani, F. M. Ruggeri, G. Donelli, and A. Rubino. 1994. Oral immunoglobulins for treatment of acute rotaviral gastroenteritis. *Pediatrics* 93:12–16.
- Guarino, A., S. Russo, A. Castaldo, M. I. Spagnuolo, L. Tarallo, and A. Rubino. 1996. Passive immunotherapy for rotavirus-induced diarrhoea in children with HIV infection. *AIDS* 10:1176–1178.
- Hammarström, L. 1999. Passive immunity against rotavirus in infants. *Acta Paediatr. Suppl.* 430:127–132.
- Hoshino, Y., L. J. Saif, M. M. Sereno, R. M. Chanock, and A. Z. Kapikian. 1988. Infection immunity of piglets to either VP3 or VP7 outer capsid protein confers resistance to challenge with a virulent rotavirus bearing the corresponding antigen. *J. Virol.* 62:744–748.
- Hoshino, Y., M. M. Sereno, K. Midthun, J. Flores, A. Z. Kapikian, and R. M. Chanock. 1985. Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8701–8704.
- Iba, Y., W. Ito, and Y. Kurosawa. 1997. Expression vectors for the introduction of highly diverged sequences into the six complementarity-determining regions of an antibody. *Gene* 194:35–46.
- Ichihara, Y., H. Matsuoka, and Y. Kurosawa. 1988. Organization of human immunoglobulin heavy chain diversity gene loci. *EMBO J.* 7:4141–4150.
- Ito, W., and Y. Kurosawa. 1993. Development of an artificial antibody system with multiple valency using an Fv fragment fused to a fragment of protein A. *J. Biol. Chem.* 268:20668–20675.

23. Kabat, E. A., T. T. Wu, H. M. Perry, K. S. Gottesman, and C. Foeller. 1991. Sequences of proteins of immunological interest. National Institutes of Health, Bethesda, Md.
24. Kapikian, A. Z., Y. Hoshino, and R. M. Chanock. 2001. Rotaviruses, p. 1787–1833. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 4th ed. Lippincott/The Williams & Wilkins Co., Philadelphia, Pa.
25. Kapikian, A. Z., Y. Hoshino, R. M. Chanock, and I. Pérez-Schael. 1996. Efficacy of a quadrivalent rhesus rotavirus-based human rotavirus vaccine aimed at preventing severe rotavirus diarrhea in infants and young children. *J. Infect. Dis.* 174(Suppl. 1):S65–S72.
26. Kobayashi, N., K. Taniguchi, and S. Urasawa. 1990. Identification of operationally overlapping and independent cross-reactive neutralization regions on human rotavirus VP4. *J. Gen. Virol.* 71:2615–2623.
27. Marks, J. D., H. R. Hoogenboom, T. P. Bonnert, J. McCafferty, A. D. Griffiths, and G. Winter. 1991. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.* 222:581–597.
28. Maruyama, T., L. L. Rodroquez, P. B. Jahring, A. Sanchez, A. S. Khan, S. T. Nichol, C. J. Peters, P. W. H. I. Parren, and D. R. Burton. 1999. Ebola virus can be effectively neutralized by antibody produced in natural human infection. *J. Virol.* 73:6024–6030.
29. Matsui, S. M., E. R. Mackow, and H. B. Greenberg. 1989. Molecular determinant of rotavirus neutralization and protection. *Adv. Virus Res.* 36:181–214.
30. Matsui, S. M., P. A. Offit, P. T. Vo, E. R. Mackow, D. A. Benfield, R. D. Shaw, L. Padilla-Noriega, and H. B. Greenberg. 1989. Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies to the heterotypic neutralization domain of VP7 and the VP8 fragment of VP4. *J. Clin. Microbiol.* 27:780–782.
31. McCafferty, J., A. D. Griffiths, G. Winter, and D. J. Chiswell. 1990. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348:552–554.
32. Midthun, K., Y. Hoshino, A. Z. Kapikian, and R. M. Chanock. 1986. Single gene substitution rotavirus reassortants containing the major neutralization protein (VP7) of human rotavirus serotype 4. *J. Clin. Microbiol.* 24:822–826.
33. Miller, M. A., and L. McCann. 2000. Policy analysis of the use of hepatitis B, *Haemophilus influenzae* type B-, *Streptococcus pneumoniae*-conjugate, and rotavirus vaccines in national immunization schedules. *Health Econ.* 9:19–35.
34. Mori, I., K. Matsumoto, K. Sugimoto, M. Kimura, N. Daimon, T. Yokochi, and Y. Kimura. 2002. Prolonged shedding of rotavirus in a geriatric inpatient. *J. Med. Virol.* 67:613–615.
35. Morino, K., H. Katsumi, Y. Akahori, Y. Iba, M. Shinohara, Y. Ukai, Y. Kohara, and Y. Kurosawa. 2001. Antibody fusions with fluorescent proteins: a versatile reagent for profiling protein expression. *J. Immunol. Methods* 257:175–184.
36. Morita, Y., K. Taniguchi, T. Urasawa, and S. Urasawa. 1988. Analysis of serotype-specific neutralization epitopes on VP7 of human rotavirus by the use of neutralizing monoclonal antibodies and antigenic variants. *J. Gen. Virol.* 69:451–458.
37. Moulard, M., S. K. Phogat, Y. Shu, A. F. Labrijn, X. Xiao, J. M. Binley, M. Zhang, I. A. Sidorov, C. C. Broder, J. Robinson, P. W. H. I. Parren, D. R. Burton, and D. S. Dimitrov. 2002. Broadly cross-reactive HIV-1-neutralizing human monoclonal Fab selected for binding to gp120-CD4-CCR5 complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:6913–6918.
38. Murphy, T. V., P. M. Gargiullo, M. S. Massoudi, D. B. Nelson, A. O. Jumaan, C. A. Okoro, L. R. Zanardi, S. Setia, E. Fair, C. W. LeBaron, M. Wharton, and J. R. Livingood. 2001. For the rotavirus intussusception investigation team: intussusception among infants given an oral rotavirus vaccine. *N. Engl. J. Med.* 344:564–572.
39. Nakajima, H., T. Nakagomi, T. Kamisawa, N. Sakaki, K. Muramoto, T. Mikami, H. Nara, and O. Nakagomi. 2001. Winter seasonality and rotavirus diarrhoea in adults. *Lancet* 357:1950.
40. Offit, P. A. 1996. Host factors associated with protection against rotavirus disease: the skies are clearing. *J. Infect. Dis.* 174(Suppl. 1):S59–S64.
41. Offit, P. A., R. D. Shaw, and H. B. Greenberg. 1986. Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies to surface proteins VP3 and VP7. *J. Virol.* 58:700–703.
42. Pedley, S., F. Hundley, I. Chrystie, M. A. McCrae, and U. Desselberger. 1984. The genomes of rotaviruses isolated from chronically infected immunodeficient children. *J. Gen. Virol.* 65:1141–1150.
43. Peigue-Lafeuille, H., C. Henquell, M. Chambon, N. Gazuy, C. De Champs, and R. Cluzel. 1991. Nosocomial rotavirus infections in adult renal transplant recipients. *J. Hosp. Infect.* 18:67–70.
44. Sheets, M. D., P. Amersdorfer, R. Finner, P. Sargent, E. Lindquist, R. Schier, G. Hemingsen, C. Wong, J. C. Gerhart, and J. D. Marks. 1998. Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6157–6162.
45. Taniguchi, K., Y. Hoshino, K. Nishikawa, K. Y. Green, W. L. Maloy, Y. Morita, S. Urasawa, A. Z. Kapikian, R. M. Chanock, and M. Gorziglia. 1988. Cross-reactive and serotype-specific neutralization epitopes on VP7 of human rotavirus: nucleotide sequence analysis of antigenic mutants selected with monoclonal antibodies. *J. Virol.* 62:1870–1874.
46. Taniguchi, K., W. L. Maloy, K. Nishikawa, K. Y. Green, Y. Hoshino, S. Urasawa, A. Z. Kapikian, R. M. Chanock, and M. Gorziglia. 1988. Identification of cross-reactive and serotype 2-specific neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus. *J. Virol.* 62:2421–2426.
47. Taniguchi, K., Y. Morita, T. Urasawa, and S. Urasawa. 1987. Cross-reactive neutralization epitopes on VP3 of human rotavirus: analysis with monoclonal antibodies and antigenic variants. *J. Virol.* 61:1726–1730.
48. Taniguchi, K., T. Urasawa, N. Kobayashi, M. U. Ahmed, N. Adachi, S. Chiba, and S. Urasawa. 1991. Antibody response to serotype-specific and cross-reactive neutralization epitopes on VP4 and VP7 after rotavirus infection or vaccination. *J. Clin. Microbiol.* 29:483–487.
49. Taniguchi, K., S. Urasawa, and T. Urasawa. 1985. Preparation and characterization of neutralizing monoclonal antibodies with different reactivity patterns to human rotaviruses. *J. Gen. Virol.* 66:1045–1053.
50. Tsui, P., M. A. Tornetta, R. S. Ames, B. C. Bankosky, S. Griego, C. Silverman, T. Porter, G. Moore, and R. W. Sweet. 1996. Isolation of a neutralizing human RSV antibody from a dominant, non-neutralizing immune repertoire by epitope-blocked panning. *J. Immunol.* 157:772–780.
51. Ward, R. L., D. R. Knowlton, G. M. Schiff, Y. Hoshino, and H. B. Greenberg. 1988. Relative concentrations of serum neutralizing antibody to VP3 and VP7 proteins in adults infected with a human rotavirus. *J. Virol.* 62:1543–1549.
52. Winter, G., A. D. Griffiths, R. E. Hawkins, and H. R. Hoogenboom. 1994. Making antibodies by phage display technology. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 433–455.

血液代替物としての治療用ヒト抗体の開発

Development of Therapeutic Human Antibodies against Various Diseases as Blood Substitutes

黒澤良和

Yoshikazu Kurosawa

和文抄録

組換えDNA技術の進歩により、様々な疾患に対する治療薬としてヒト抗体を単離調製することが可能となった。筆者らは厚生労働省の研究費による人工血液開発研究として「臨床に役立つヒト抗体開発研究」を実施している。具体的には、ファージディスプレイ系を用いた抗体ライブラリー作製を基盤技術として、ウイルス感染症（VZV、インフルエンザウイルス、ロタウイルス）に対してはウイルスを中和する能力のある抗体単離、病原菌毒素（ジフテリア毒素、破傷風毒素、ボツリヌス毒素）に対しては毒素中和抗体、さらにハブ毒中和抗体の単離調製に成功した。単離調製した抗体に関しては、臨床試験を開始すべき段階に達している。一方、細胞膜上に存在する多数の抗原分子に対して網羅的に抗体を単離する技術開発に成功し、その結果癌特異抗原の同定とそれに対する治療用ヒト抗体の同時単離が可能となった。本文では、我々が行っている様々な疾患に対する治療用ヒト抗体単離に関して、研究開発過程の総括及び現状紹介を行う。

Abstract

Recent progress in DNA recombinant technology allows us to prepare therapeutic antibodies against various diseases. We have been working on the project "Development of therapeutic antibodies against infectious diseases" which has been supported by a grant for Research on Pharmaceutical and Medical Safety from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan. By using a phage-display technology, we made various antibody libraries. From them we have already isolated human antibodies against viruses (VZV, influenza virus and rotavirus), bacterial toxins (diphtheria toxin, tetanus toxin and botulinum toxin) and snake venom (habu toxin). In all the cases, isolated antibodies show strong neutralizing activities and we could start clinical examinations. We also succeeded to develop a new method by which we can comprehensively isolate antibodies against virtually all the epitopes present on the cell surface. Using this technology, we have been performing a big project "Isolation of therapeutic antibodies against various cancers". In this review, I summarize a history of our research and discuss the present status of our project.

Keywords

artificial antibodies, antibody libraries, therapeutic antibodies, infectious diseases, cancers

はじめに

厚生労働省（当時厚生省）が平成9年度から高度先端医療研究事業として人工血液開発研究を対象に補助金交付を開始した。研究分野は1. 人工赤血球（酵素運搬）、2. 人工血小板（止血）、3. 人工免疫グロブリンであった。筆者の研究グループは、この事業（分野3）を推進することとなり7年以上にわたって「臨床に役立つヒト抗体開発研究」を実施している。血

液代替物として考えた時に、赤血球及び血小板と抗体は開発内容が大きく異なっている。前者は、健常人血液中の赤血球や血小板の機能をいかに正確に代替し得るものを作り出すかが求められる。後者では対象疾患があり、治療薬として有効に機能する抗体を疾患ごとに作製することが必要となる。抗体は元来生体防御分子であり、病原菌もしくは病原菌が分泌する毒素、そしてウイルスに対して特異的（選択的）に結合し、結果として

藤田保健衛生大学総合医科学研究所免疫学研究部門・教授 〒470-1192 愛知県豊明市春掛町田楽ヶ窪1-98

Yoshikazu Kurosawa, Ph.D

論文受付 2004年11月29日 論文受理 2004年12月16日

殺傷（中和）し最終的に体内から除去する。健康人は、感染後一度発病することはあっても免疫系が機能し、抗体産生が誘導されて治癒する。そこで感染症に対しては、治療薬として抗体開発を目指すより、発症予防を目的にワクチン開発を行うことが主流であり、事実有効である。しかし臓器移植が広く行われ、その際免疫抑制剤が使用されることを含めて、免疫機能が低下した状態にある患者数が増加し、抗体治療薬開発への期待が高まっている。更に、現在特定の毒素に対する特効薬として治療に用いられている抗血清がウマ血清であり、それをヒト抗体に変換する社会的要請もある。

抗体は、抗原に対して $10^9 \sim 10^{10} M^{-1}$ オーダーの強い結合力を示す。この結合力は、血液（5L）中に当該抗体が7.5-75mg分泌されれば、対象となる抗原分子99%が抗体と結合している状態を作り出せることを意味する。抗体が持つこの高い特異性と強い結合力が注目され、更に1975年に細胞融合を用いたモノクローン抗体作製技術が開発されて様々な分子に特異的に結合する抗体を自在に作製できるようになり、抗体は本来の生体防御分子としてではなく、研究試薬として広く利用されることになった¹⁾。

モノクローン抗体作製が可能となってから、癌を中心として抗体を用いた治療薬開発が広範に試みられた。最近になるまでヒトモノクローン抗体作製は困難であったが、マウス/ヒトキメラ抗体、ヒト化抗体とタンパク分子全体でなるべくヒト由来部分を多くした抗体作製技術も開発された^{2,3)}。20年以上の長い挫折を繰り返した後、乳癌に対するハーセプチン、Bリンパ腫に対するリツキサンという画期的抗体治療薬が開発された。組換えDNA技術の発展の中で完全ヒト抗体作製も可能となり、製薬企業により現在開発されている薬の20%が抗体であると言われている。本総説では、筆者のグループで得た結果および経験に基づき、様々な疾患に対する抗体治療開発の現状を総括し展望を記述する。

抗体分子と抗体遺伝子

抗体は2本の重（H）鎖と2本の軽（L）鎖からなるタンパク質分子である。それぞれ90-110個のアミノ酸残基からなる球状構造（免疫グロブリンホールド）をしたドメインが数珠状につながっている。L鎖は2個のドメインからなり、H鎖は2個のドメインに続いてヒンジ領域があり、更に2個のドメインがつながっている。両鎖のN末端に位置するドメインは、アミノ酸配列が多様であるために可変（V）領域と呼ばれ、HL両鎖のVドメインが抗原結合部に相当する。C末端側はアミノ酸配列が一定であるために定常（C）領域と呼ばれる。各Vドメインは、2面の β シートが向き合った立体構造をしており、ループ部分に相当する3箇所、HL両鎖で計6箇所が凸凹構造をした抗原結合面を作り出す。この部分が抗原相補性決定領域（complementarity-determining regionを略してCDR1, 2, 3）と呼ばれている。CDR領域は長さが一定でない場合も含めて多様なアミノ酸配列をしている。その結果、CDRが作り出す立体構造の多様性の総数は莫大になる。様々な形をした抗原に対して、抗体が特異的に結合する能力を示す理由は、莫大な数の抗

体が存在する結果、相補的な関係にある抗原と抗体が様々な結合力（ファンデルワールス力、水素結合、疎水結合、クーロン力）を通して強固な複合体を形成するためである。

抗体は1本のポリペプチド鎖内にアミノ酸配列が多様なV領域と一定の配列をしたC領域を持つ特徴的な分子である。抗体遺伝子座では、動物進化の中で獲得された様々な機構を導入して、様々な抗原に選択的にかつ強い結合力を示す分子を作り出す。抗体が持つべき特徴は、1.多様な抗原に対して選択的（特異的）かつ強固に結合できる、2.抗体が対応すべき抗原は、予め決まっていない。換言すれば、生物界で全く新しい分子が出現しても、それと特異的に結合する抗体が存在する、3.抗原が外来分子であるか、自分自身の分子であるか区別する能力を持つ、という3点に集約できる。この点に関して本小文で詳細を説明できないが、免疫システムの真髄であり、治療薬としての抗体を開発する上でこの特徴を理解することが肝心である。V領域の多様性を作り出すために、V領域をコードする遺伝子は断片化（L鎖で V_L , J_L 遺伝子、H鎖で V_H , D , J_H 遺伝子）され、更にそれぞれ多数化し多様化された⁴⁾。そこで抗体L鎖は、DNA再編成により1組の V_L と J_L 遺伝子が選ばれて $V_L J_L$ 結合が作られる（図1）。抗原結合部位の多様化という視点からは、DNA再編成により作り出されるCDRのアミノ酸配列の種類が問題である。詳細は省くが、ヒトの場合、L鎖が作り出すレパートリー総数は数百種類と考えてよい。

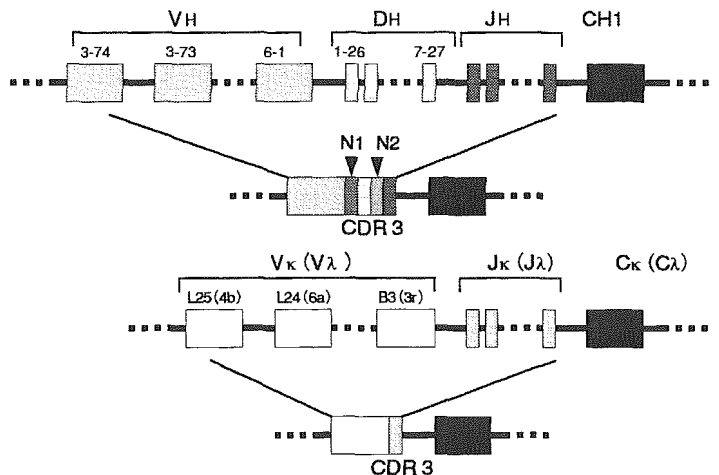


図1. 抗体遺伝子のDNA再編成を示す模式図
DNAの切断再結合が起こる部分は、抗体V領域のCDR3をコードする領域に相当する。

H鎖はV, J遺伝子に加えてD遺伝子が存在するのでレパートリーは更に大きいと予想されるが、実際は遺伝子総数の問題よりDNA組換え機構の相違がより重要である（図2）。D- J_H , V_H -D結合をつくるに際して、末端配列の部分切除（これはL鎖でも見られる）に加えてDNA末端添加酵素（TdT）がN（ヌクレオチドの略）と呼ばれるランダム配列の挿入を行う。鋳型を持たないランダム配列合成は、全生物現象の中でT細胞レセプターと抗体（この分子は進化的に兄弟）のTdTによるこの反応

しか知られていない。結果としてできあがるH鎖V領域レパートリー総数は、造血幹細胞から“独立して分化した”Bリンパ球の総数に匹敵するほど巨大になる。

抗体遺伝子座で起こる以上の分子機構は、未知抗原も含めた多様な抗原に対応する巨大レパートリーを作り出す目標を達成するのに適している。しかし、作り出した抗体群の中に個々の抗原に対応して高い結合力を示す抗体が含まれるかは偶然であり、そのことを必然的にするために体細胞突然変異機構を別途準備している。

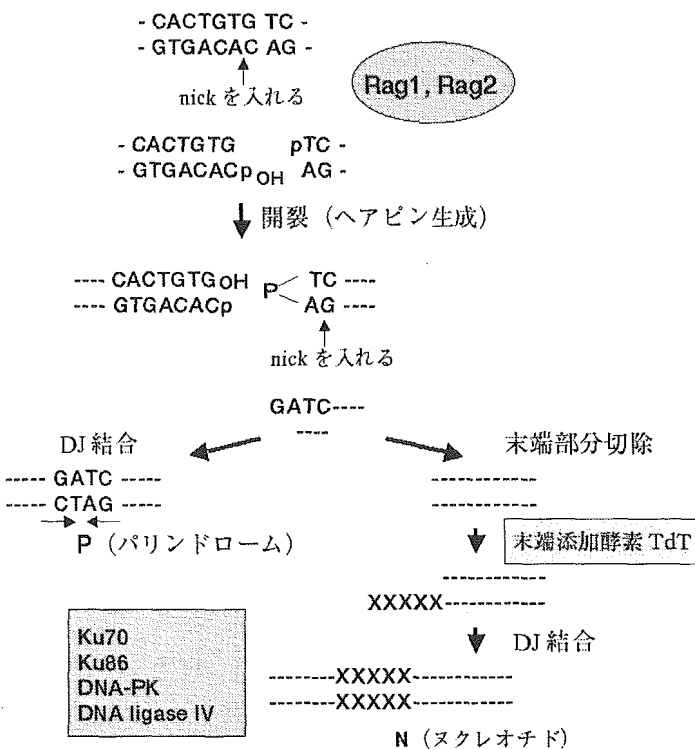


図2. V(D)J DNA再編成過程の模式図
H鎖のD遺伝子とJ遺伝子間でD-J結合が作られる過程を例に示す。L鎖のVLJL結合ではTdTによるランダム配列(N)の挿入は起こらない。

in vivo抗体レパートリーとその二重性

ヒト個体あたりBリンパ球総数は、 10^{11} - 10^{12} と見積もられる。そこで抗体は、アミノ酸配列が異なる場合“異なる抗体”と判断するなら 10^9 種類程度存在するであろう。通常Bリンパ球は比較的短い半減期（2～3週）でturn-overを繰り返しているの、厳密な意味では単一個体中でも抗体の種類は変化している。「充分巨大である」ことがエッセンスである。このような抗体レパートリーは、抗原の存在と無関係に作られているので“ナイーブレパートリー”と呼ばれる。病原菌やウイルス（外来抗原）の侵入が起こると免疫応答が起こる。体液性免疫の最終段階は当該抗原に強固に結合するIgG型抗体の大量分泌である。その結果、外来抗原は除去され、更にその成熟抗体（体細胞突然変異と抗体産生細胞の選別により当該抗原に対する親和力を増した抗体）を産生するB細胞が記憶細胞として残る。突然変異は基本的にはランダムプロセスなので、親和力が増した抗体

産生細胞の選別機構が存在するから意味を持つ。感染症に罹患した後、その治療過程で出現する中和抗体を大量に産生する形質細胞や記憶細胞が作り出す抗体レパートリーは、“成熟抗体レパートリー”と呼ばれる。このレパートリーは、個々人の免疫学的経歴に大きく依存する。様々な疾患に対して如何にして治療薬となり得る抗体を単離するかについて、in vivoで見られるこの抗体レパートリーの二重性を考慮する必要がある。in vivoで成熟した抗体の性質は、ウイルスや毒素の中和力からみて非常に優れており、感染症に対して患者の体内で治療に貢献した抗体そのものに匹敵する性能の抗体をin vitroで人工的に作り出すには多大な労力を必要とする。一方、癌特異抗原に対して特別に成熟を起こした抗体が患者体内に存在する証拠はない。

様々なモノクローン抗体単離の技術

治療用抗体単離の前に、より一般的議論から始める。様々な分子（主としてタンパク質）に対して特異的に結合する抗体を入手したいというニーズは高い。混合物の中で標的分子を選択的に同定する試薬として抗体は最も優れており、一般性も高い。精製抗原を有しており、それに対して動物が免疫原性（immunogenicity）を示すという条件を充たせば、動物を抗原で免疫することによりポリクローン抗体の形で抗血清が得られる。最近筆者らは、その抗原の中の抗体によって認識される構造（エピトープ）が幾つあり、それぞれのエピトープに対して何種類の抗体が産生されるかは動物の免疫容量（具体的には、個体あたりのBリンパ球の総数）に大きく影響されることに気付いた。当然のごとくウサギ>ラット>マウスの順である。抗血清の中に含まれる抗体をモノクローン化したい時、従来法では脾臓細胞を癌細胞と融合してハイブリドーマを確立した後、目的とした性質の抗体を分泌している細胞を選別してクローン化する。未だ広く一般化されて使われている訳ではないが、脾臓細胞からファージ抗体ライブラリーを作製した後、スクリーニングにより目的とする性質の抗体を単離することも可能である。この方法は、動物種を問わずに適用できる。ニワトリ、ヒトを含めて抗体をつくる全脊椎動物種で可能である。

細胞融合によるモノクローン抗体作製技術をヒトに応用できないか、多くのグループが試みた。最近ヒトで細胞融合可能なミエローマ株を確立したKarpasによれば、マウスでハイブリドーマ作製が可能になった原因の一つは、M.Potterが確立したmineral oilを腹腔に注入してミエローマの発生を誘発する技術（MOPCと呼ばれたミエローマ株）で得られた細胞は、真の形質細胞（小胞体が非常に発達している）ではなく、細胞分裂速度が速い。一方、通常のヒトミエローマは増殖速度が数倍遅く、そのことが細胞融合株を得にくい真の原因だったと報告している⁵¹。

より一般的に考えるならば、ある性質をした抗体が動物の血清中に存在するとすれば、その抗体を産生した抗体産生細胞も存在する。対象とする抗原で動物を免疫する操作は、使用者にとって都合の良い性質をしたその抗原に対する抗体を動物の中に作り出す過程であり、その抗体産生細胞の存在数を高める効果をもたらす。モノクローン抗体を作製することは、その細胞

を如何に効率的に不死化して選別するかの問題である。最近、セルソーターを用いて1個の細胞を分別する技術が確立している。蛍光標識抗原を用いてその抗原に結合する抗体産生細胞を1細胞化したのち、EBウイルスで不死化する、または、one cell PCR法で抗体遺伝子を単離することが可能になった。筆者らは後者の技術を確認したが、性能の良い（結合力の強い）抗体を得られていない。この経験を通して筆者は以下のように考えるようになった。モノクローン抗体を得る技術は既に数多くある。細胞融合によりマウスモノクローン抗体を得る技術が一般化し大成功している理由は、抗原で免疫した動物（マウス）の体内で、その抗原に対する性能の良い抗体を産生している細胞数が全Bリンパ細胞（ 10^8 - 10^9 ）の中で占める率が十分に高く、プラクティカルな意味で細胞融合により不死化可能な細胞（この総数は限られているはずである）の中に含まれているからである。その点からみて、ヒトのようにマウスの1000倍以上の免疫容量を持つ免疫系を対象としてマウスと同じ細胞融合法で性能の良い抗体をモノクローン化可能であろうか。まして、セルソーターで1細胞化した場合は、実際は全Bリンパ細胞のほんの一部を対象にしているにすぎないのではないか。上記方法で結合力の低い抗体しか得られなかったのはそのためであろう。それと比較して、 10^{10} - 10^{11} の独立したクローンを対象にできる抗体ライブラリー技術は、in vivoでのヒト抗体レパートリーをカバーするのに適している。そこで問題は、十分に大きな抗体ライブラリーを作製した後、如何にして目的とする性質の抗体を得るか、スクリーニング法の開発が重要である。

治療用抗体単離戦略（総論）

既に 10^8 を超える治療用抗体が市場に出ているが、全てキメラ抗体かヒト化抗体である。ヒト抗体を作るには、ヒト抗体を作るトランスジェニックマウス（Abgenix社およびキリンとMedarex社共同開発）を用いる⁶⁾、またはファージヒト抗体ライブラリー（CAT社がWinterII特許およびMcCafferty特許と呼ばれる基本特許を有している）を用いる必要がある（図3）⁷⁾。両技術とも確立して既に10年以上経過している。これらの技術を用いて作製されたヒト抗体が、既に臨床試験の最終段階に達している例も幾つかあると報告されている。筆者は、将来的に

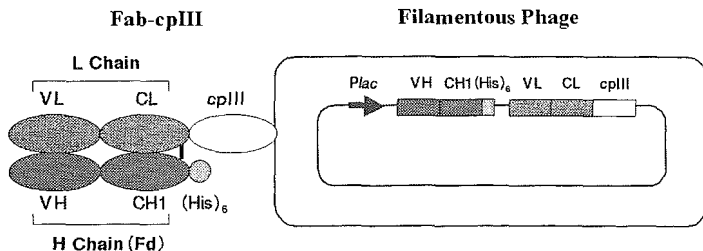


図3. ファージ抗体の模式図

M13ファージのような線状ファージを用いて粒子を構成するタンパク質（cpIIIを用いることが多い）と抗体（ここではFab型を例に示す。VH-リンカー-VLからなるsingle-chain Fv抗体が使われる）を融合させて抗体を発現させる。ファージゲノムが抗体遺伝子を有するので1個のファージが1個の抗体産生細胞に相当する。

は治療用抗体が全てヒト抗体として単離調製されることになるかと予想している。しかし一方で、そこまで一般化された方法にするには、未解決の技術が残っていると感じている。その点についてこの節で議論する。

抗原で免疫した後、動物体内で成熟抗体が作られるプロセスは実に優れている。これは変異の導入と親和力の高まった抗体産生細胞の選別がカップルしていることにより可能となる。in vitroでこのプロセスを再現するのは非常に困難である。（in vitroでは変異の導入とクローンの選別を別々に実施しなければならない。）そこでヒト抗体を作るトランスジェニックマウスを用いると、優れた性能の治療用抗体作製が可能に思える。しかし個体あたり 10^8 - 10^9 のBリンパ球から構成されるマウス免疫系が1000倍以上のBリンパ球を持つヒト免疫系をどの程度反映したものになるか、筆者は非常に興味を持っている。とりわけ抗体V領域の中で最も多様性の高いH鎖CDR3がマウスとヒトとは大いに異なる。D遺伝子の数と配列の多様性、更にN配列の平均鎖長も両者で大きく異なり、結果としてマウスでは多様性の程度はヒトと比べて低い⁸⁾。逆に言えば、マウスではCDR3の多様性を高めても結局それを生かし切れない。

既に記述したが、血清中に優れた性能の抗体が存在すれば抗体ライブラリー作製を通してモノクローン化できる。ヒトを対象とした場合に、抗体保有者がボランティアとして成分採血に協力してくれるとこれが可能となる。筆者らのグループでは血液3L相当（ 10^{10} 程度のリンパ球を含む）を得て、 10^{10} - 10^{11} の独立したクローンからなる抗体ライブラリーを作製して目的を達成している。この方法を広く用いようとした際に未だはっきりしていない点は、ウイルスや病原菌毒素に関してワクチン接種により誘導されてくる抗体と、実際に感染した結果作られる抗体が同質かどうかについてである。通常の感染では、抗原濃度が感染後次第に高くなり、抗体の出現と共にピークを過ぎて減少する。通常のワクチン接種では、最初から高濃度であり次第に減少する。免疫応答系の成立プロセスを考えた時に、全く同じレスポンスが起こる訳ではないと予想される。ウイルス生ワクチンが不活化ワクチンより有効な点もこのことの反映と推定される。

筆者の研究室では、数10名のボランティアのBリンパ球に富む組織（臍帯血、扁桃、骨髄、末梢血）から作製した巨大なヒト抗体ライブラリー（antibodies for intended multiple screeningを略してAIMSと名付けた）を利用して既に数多くの抗原に対する抗体を単離している。このような一つの巨大な抗体ライブラリーを、様々な抗原に対する抗体のマスターソースとして利用する方法についても各論の中で記述する。

治療用抗体単離（各論）

1. 感染症（ウイルス）

筆者らは、今までに水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）、インフルエンザウイルス、ロタウイルス、B型肝炎ウイルスの中和抗体単離を試みた。その経験に基づいてウイルス感染症に対する治療薬もしくは予防薬としての抗体単離法を論じる。ウイルスは宿主となる細胞と同じ細胞膜に取り囲まれてウイルス粒子を