

戦略的創造研究推進事業 CREST

研究領域:「ナノ科学を基盤とした革新的製造技術の
創成」

研究課題:「高機能分子「スーパー抗体酵素」の自動合成装置
と大量合成」

研究終了報告書

研究期間 平成19年10月～平成25年3月

研究代表者:宇田泰三
(大分大学工学部・客員教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

研究代表者らが発見した「スーパー抗体酵素」は、近年、世間的に注目を集めるようになっていた。そして、「スーパー抗体酵素」の実用化への期待が急速に高まってきた。そこで本プロジェクトでは、「スーパー抗体酵素」を本格的に実用化し、ヒトに投与するため、これまでのようにマウスに免疫してから作製するマウス型「スーパー抗体酵素」でなく、新しい考え方や手法を取り入れてヒト型「スーパー抗体酵素」を開発することを大目標として取り組むと共に、生体内での生理学的意義についても研究を行った。

宇田チーム:

目的とする抗原をマウスには免疫できても、ヒトには免疫できない。そこでヒト型「スーパー抗体酵素」はワクチン接種者やインフルエンザ罹患者などから提供された白血球からヒト型の抗体軽鎖ライブラリーを作製し、そこから特徴あるヒト型「スーパー抗体酵素」を探し出す、という手法を採った。以下に計画に従って行った項目を示し概説する。

1) ヒト型抗体軽鎖遺伝子ライブラリーの作製

ヒトボランティアからの血液を Ficoll pack で白血球を分離し、そこから RNA を抽出後、逆転写反応により cDNA に変換した。この cDNA を template にして、Vk germline の subgroup II のみが特異的に増幅できるプライマーを設計して PCR により増幅させ、得られた遺伝子を TOPO ベクターに組み込んでヒト抗体軽鎖遺伝子ライブラリーを作製した。

2) ヒト型抗体軽鎖遺伝子の発現

得られたクローン(抗体軽鎖遺伝子)を順次、発現ベクター(pET, pIg or pCI)に挿入し、大腸菌(BL21)や哺乳細胞系(HEK293F)での発現を試みた。大腸菌での発現は培地、可溶性および不溶性画分で目的タンパク質が認められた。

3) ヒト型抗体軽鎖遺伝子のタンパク質としての高純度精製

高純度精製のために本研究では、最終的に第1段階で Ni-NTA カラムクロマトグラフィーを、第2段階で陽イオン交換クロマトグラフィーを通すと言う2段階精製法で高純度に、大量に精製する方法を確立した。

4) ヒト型抗体軽鎖遺伝子の酵素活性とヒト型「スーパー抗体酵素」

アミダーゼ活性についてはヒト型「スーパー抗体酵素」は合成基質である QAR-MCA を広く分解するがそれ以外の合成基質では分解速度は遅く、APA-MCA については全く分解を示さなかった。ヒト型「スーパー抗体酵素」はトリプシン様活性を示し、エラスターゼ様活性は存在しないことが示された。

核酸分解活性については、プラスミド pBR322 を基質に用いて DNA 分解活性を調べた。A18b クローンはどのクローンも DNA 分解活性を示した。反応液中に Mg イオンが存在しないとこの分解反応は進行しない。

5) ヒト型「スーパー抗体酵素」の抗狂犬病ウイルス活性

国際標準法に準拠して狂犬病ウイルスに対する *in vitro* での抗ウイルス活性を検討した。#1 クローンで若干、#18 クローンではかなり強く、ウイルス増殖抑制を示した。*In vivo* ではマウスの脳に直接ウイルスと抗体酵素を摂取する方法で#18 クローンを使って試験した結果、抗体酵素濃度依存的に顕著な感染抑制作用を示した。引き続いて行った治療実験においてもヒト型「スーパー抗体酵素」が有意な差で効果を示した。

6) ヒト型「スーパー抗体酵素」の抗インフルエンザウイルス活性

in vitro で MDCK 細胞を使って検討した結果、試験したヒト型「スーパー抗体酵素の中ではクローンがインフルエンザ感染抑制能を示した。*In vivo* では H1N1(PR8 株)が感染するマウスに経鼻接種する方法で各種抗体酵素クローンを試験した結果、クローンが顕著に感染を抑制していた。

7) ヒト型「スーパー抗体酵素」の抗ガン活性

肺ガン、胃ガン、膵臓ガン、卵巣ガン、白血病細胞などに対するガン細胞傷害性を *in vitro* で調べた。その結果、いくつかクローンがガン細胞傷害性を示し顕著な増殖抑制を見せた。

8) ヒト型「スーパー抗体酵素」の安全性試験

単回尾静脈投与急性毒性試験、単回経口投与毒性試験、単回腹腔内投与急性毒性試験、7日間反復投与毒性試験、単回静脈内投与毒性試験(観察期間28日間)のいずれにおいても毒性は認められなかった。なお、静注(尾静脈)では毒性は無かった。

Kaveri チーム:

ヒト型抗体酵素の生理学的意義:

敗血症患者からのヒト型の天然型抗体酵素(ポリクローナル)の取得に加え、別な患者からの直接採取によるヒト型モノクローナル抗体(IgG)を得る事に成功した。また、敗血症や Waldenstörn マクログロブリン血症患者などの自己免疫患者からの血清から IgG や IgM の抗体を分離し、その酵素活性を検討した。患者血清では約10%が Factor VIII を分解した。こうした自己免疫疾患患者のなかには Factor VIII を分解する抗体酵素が自然に産生されており、この場合にはより病状を悪化させる方向に作用しているので、抗体酵素阻害剤を開発すれば新しい薬が開発可能である。

(2) 顕著な成果

1. ヒト型「スーパー抗体酵素」作製法の確立

概要:ヒト白血球から RNA を抽出後、逆転写反応により cDNA に変換し、この cDNA を template にして、germline gene subgroup II を特異的に増幅することで、高い確率でヒト型「スーパー抗体酵素」が作製できる。

2. 抗ウイルス活性を有するヒト型「スーパー抗体酵素」の開発

概要:抗体酵素ライブラリーからの数十以上の発現タンパク質を用いて試験した結果、狂犬病に有効なヒト型「スーパー抗体酵素」やインフルエンザウイルスに有効なヒト型「スーパー抗体酵素」が見出された。これらのウイルスについては動物実験までおこなったが、顕著な感染抑制能をしめした。

3. 抗ガン活性を有するヒト型「スーパー抗体酵素」の開発

概要:ある種のヒト型「スーパー抗体酵素」クローンはいくつかのガン細胞株に対して顕著な細胞傷害性をしめし、なかにはシスプラチンを凌ぐほどの作用を示した。ヒト型「スーパー抗体酵素」は生体内で毒性が無いことを考えると、次世代の抗ガン剤として大いに期待できる。

§ 2. 研究構想

(1) 当初の研究構想

研究開始時に目指した目標は、以下の3つの項目をそれぞれ確立することにより最終的にヒト型スーパー抗体酵素(Human Antigenase)を作製し実用化する事であった。

項目1;ヒト型「スーパー抗体酵素」の効率的作製技術開発

項目2;自動合成装置のための要素技術開発

項目3;大量製造とモデルマウスへの投与実験

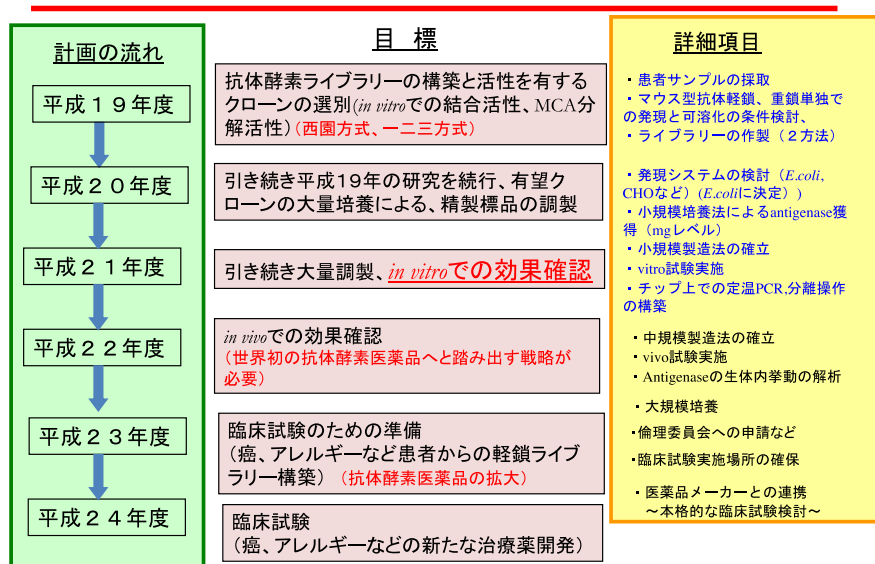
上記目標を達成するために当初立てた年次計画表は以下の通りである。19年度、20年度でヒト型「スーパー抗体酵素」を作製し(狂犬病ウイルスがターゲット)、いくつかの有望クローンを見出す事であった。併行して、ヒト型「スーパー抗体酵素」の大量合成法を開発し、次の、in vitro および in vivo 試験に回すだけのサンプル量を確保する事であった。この当初数年間の目標を達成しないことにはその後の計画は全てダメになるという大事な位置づけの課題であったが、ほぼ目標通りこなせた。21年度、22年度で狂犬病ウイルスに対する効能試験に入ったが、インフルエンザウイルスに対する効果も試験することができた。(本実験は大量の高純度サンプルを作るところが律速であり、サンプルさえあれば、効能試験は結構こなせるという性質のものである。決して余分な処にエネルギーを割いているわけでは無い。この点は常に、研究総括から指摘された。)

後述するが、22年度からは vivo 試験に本格的に取り組んだ。狂犬病ウイルスは株によっては感染を引き起こすので非常に危険であり、実験室的には HEP 株を用いた。感染実験は CVS 株という P3 レベルが必要な株を用いて実験した。HEP 株で vitro でおこない、CVS 株で vivo の感染実験となるので株間の違いが出てきてデータが取れない不安があったが、 vitro と vivo の実験結果はうまく対応した。vivo のデータが取れたので、第1相試験に向けて進もうとしたが、思わぬ落とし穴があった。試験するヒト型「スーパー抗体酵素」を GMP 基準のものにしないと、試験ができないのである。GMP 基準のサンプル製造は依頼すれば、1回当たり1-3億円がかかる。これ以上は製薬企業が全面的に参入してこないと進められない。

このテーマと併行してインフルエンザウイルスをターゲットにヒト型「スーパー抗体酵素」のスクリーニングを実施した。そこから有望な数クローンが見つかった。これらは in vitro および in vivo で顕著な感染抑制効果を示した(中間評価では vivo の試験を実施するように強く求められた:中間評価意見を参照)。23年度からはガンなどもターゲットに入れる計画であったので、各種のガン細胞を用いてヒト型「スーパー抗体酵素」のスクリーニングも実施した。驚くことに、ヒト型「スーパー抗体酵素」の構造制御を行う事で、シスプラチンを凌ほどの抗ガン作用を示すクローンが in vitro で見出された。

加えて、23年度からはヒト型「スーパー抗体酵素」の安全性試験に着手した。その結果、経口投与、

目標達成のための年次計画



5

腹腔内投与、静脈内投与、反復投与などの試験において全く毒性がない事が判った。多くの低分子医薬品が毒性(安全性)試験の段階で drop out するケースが多いが、ヒト型「スーパー抗体酵素」は毒性の無いことが現段階ではっきりしてきて、効能さえあれば次世代の新薬として大いに期待できることが判明した。

本チームは比較的小さいチームであるために、研究の効率を更に上げるべく、項目1と項目3のヒト型「スーパー抗体酵素」の作製と効能解明に集中することになったため、項目2については中間報告以降エフォートを落とした。

(2)新たに追加・修正など変更した研究構想
上記で、中間評価における意見を入れた形で纏めた。

「中間評価意見概要」:

1. 本チームは比較的小規模の研究体制であり、プロジェクトの研究内容・目標を実現可能な疾病項目に絞り、その項目に求められる抗体が臨床上でも有用であることを示す事が重要であり、少しでも早く臨床試験を目指した前臨床の in vivo 試験を進めるべきであろう。
2. 研究が目指す独創的なコンセプトは世界的なレベルの成果をあげられる可能性が期待される。そのためには有効性(臨床試験の検討も含む)の実証による評価が不可欠である。本チームは当初から、狂犬病を第一の目標としており、既に細胞レベルでは感染抑制を確認している。対象を絞ることを考えれば、狂犬病とインフルエンザで充分であろう。その場合、後半の重点課題である in vivo 試験はかなり困難なことであり、それを克服する方法を見いだせるかにかかっている。他方、やはり学術的な観点からの研究は不可欠であり、基礎をきちんと固めることは大事にして欲しい。その結果、スーパー酵素の概念が定着出来ればさらにその意義は大きい。

§ 3 研究実施体制

①宇田グループ(「スーパー抗体酵素」の基礎と応用に関する研究)

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
宇田泰三	大分大学工学部	教授	抗体酵素の効率的作製技術開発と研究全体の統括	H19年10月~H25年3月
西園 晃	大分大学医学部	教授	感染モデルでの実験ならびに臨床実験	H19年10月~H24年3月
一二三恵美	大分大学全学研究推進機構	教授	抗体酵素の作製と性質解析	H19年10月~H25年3月
万年和明	大分大学全学研究推進機構	准教授	狂犬病ウイルスの試験と抗体酵素の培養	H22年10月~H24年3月
井上高教	大分大学工学部	准教授	遺伝子分離精製の要素技術開発	H19年10月~H25年3月
伊波英克	大分大学医学部	准教授	大量製造法の確立	H19年10月~H24年3月
倉内芳秋	大分大学工学部	助教	化学チップの合成	H21年4月~H25年3月
通阪栄一	山口大学工学部	准教授	遺伝子反応系の要素技術開発	H19年10月~H25年3月
国分修三	大分大学工学部	技官	酵素活性の最適条件検討	H20年4月~H21年3月
江頭直義	県立広島大学	教授	検出系の技術開発	H19年10月~H25年3月
荒川満枝	大分大学医学部	准教授	ライブラリーの構築と活性クローン選択法	H19年10月~H25年3月
後藤和代	大分大学総合科学C	助教	in vitro でのバイオアッセイ	H19年10月~H20年7月
山田健太郎	大分大学総合科学C	助教	in vitro でのバイオアッセイ	H20年8月~H22年9月
林 毅	別府大学食物栄養科学部	助教	発現用ホストの探索と発現の効率化	H22年4月~H25年3月
足立克也	大分大学工学研究科	大学院生	ヒト型遺伝子の増幅と発現	H19年10月~H21年3月
吉田沙希	大分大学医学系研究科	大学院生	天然型抗体酵素の探索と取得	H20年4月~H21年3月
町元雄太	大分大学工学研究科	大学院生	活性と構造解析	H19年10月~H20年3月
加藤法弘	大分大学工学研究科	大学院生	最適発現系の探索	H19年10月~H20年3月
石田和也	大分大学工学研究科	大学院生	抗体および抗体酵素の取得とセンシング	H20年4月~H22年3月
東 教平	大分大学工学研究科	大学院生	新規抗体酵素の探索	H20年4月~H22年3月
藤本尚子	大分大学工学研究科	大学院生	抗体酵素の活性発現機構の解明	H21年4月~H22年3月
藤本尚子	大分大学	ポスマス	インフルエンザのアッセイ	H22年4月~H25年3月

神田真志	大分大学工学研究科	大学院生	遺伝子工学的手法による抗体酵素の改変	H21年4月~H23年3月
坂田寛幸	大分大学工学研究科	大学院生	抗体酵素の発現と精製、活性測定	H21年4月~H23年3月
河脇弘和	大分大学工学研究科	大学院生	抗体酵素の発現と作用機構の解析	H21年4月~H23年3月
吉田 稔	大分大学工学研究科	大学院生	化学チップを用いた分離・回収	H21年4月~H23年3月
九島充幸	県立広島大学総合学術研究科	大学院生	高感度センシング法の開発	H21年4月~H23年3月
園田沙理	大分大学工学研究科	大学院生	細胞培養	H23年4月~H25年3月
岩村隆暢	大分大学工学研究科	大学院生	ヒト型抗体遺伝子のクローニング	H23年4月~H25年3月
高本麻衣	大分大学工学研究科	大学院生	抗体酵素の発現と精製	H23年4月~H25年3月
笹野 泰通	大分大学工学研究科	大学院生	抗体酵素の発現と性質の解明	H23年4月~H25年3月
森口智尋	大分大学工学研究科	大学院生	核酸分解活性	H23年4月~H25年3月
長谷川裕晃	大分大学工学研究科	大学院生	ヒト型抗体遺伝子のクローニングと発現	H23年4月~H25年3月
飯倉 陵	大分大学工学研究科	大学院生	BBBの実験	H23年4月~H25年3月
廣田勝巳	大分大学工学研究科	大学院生	抗体酵素の精製と性質の解明	H23年4月~H25年3月
宮崎陽文	大分大学工学研究科	大学院生	抗体酵素の組み換え	H23年4月~H25年3月
伊東千陽	大分大学工学研究科	大学院生	核酸分解活性	H24年4月~H25年3月
小野将来	大分大学工学研究科	大学院生	抗体酵素の精製	H24年4月~H25年3月
松本真吾	大分大学工学研究科	大学院生	抗体酵素の精製	H24年4月~H25年3月
森山和基	大分大学工学研究科	大学院生	細胞培養	H24年4月~H25年3月
竹元しおり	大分大学工学研究科	大学院生	抗体酵素ライブラリー	H24年4月~H25年3月
竹添文香	大分大学工学研究科	大学院生	抗体重鎖酵素	H24年4月~H25年3月
渡邊愛美	大分大学工学研究科	大学院生	細胞培養と抗体酵素ライブラリー	H24年4月~H25年3月
石橋尚幸	大分大学工学研究科	大学院生	抗体酵素の発現と培養	H22年4月~H24年3月
西頭恵梨	大分大学工学研究科	大学院生	新機抗体酵素の開発	H22年4月~H24年3月
西頭恵梨	大分大学	ポスマス	大量培養	H24年4月~H25年3月

八尋隆明	大分大学医学系 研究科	大学院 生	ウイルスに対する抗体酵素	H22年4月~H24年3月
井上邦光	大分大学医学系 研究科	大学院 生	狂犬病ウイルスの培養と抗原決定	H19年10月~H22年3月
松本 昂	大分大学医学系 研究科	大学院 生	モデルマウスでの治療効果実験	H19年10月~H21年3月
佐知望美	大分大学	ポスマス	ライブラリーからの抗体酵素作製法	H20年4月~H24年3月
清家麗奈	大分大学	技術員 (ポスマス)	抗体酵素の培養と精製	H20年4月~H21年3月
鳥飼明里	大分大学	技術員 (ポスマス)	タンパク質精製と効率的作製法の要素技術開発	H20年5月~H20年9月
植木竜大	大分大学	ポスドク	タンパク質精製	H20年10月~H21年9月
本庄栄二郎	大分大学	ポスドク	タンパク質発現、精製、結晶化、構造解析	H21年4月~H24年3月
小笠原美紀	県立広島大学	研究補助員	センシング研究の実験補助	H20年10月~H23年3月
野口賀津子	大分大学	研究補助員	狂犬病ウイルスに対する評価	H22年4月~H22年9月
吉武 淳	大分大学	ポスドク	ライブラリーからの抗体酵素作製法	H20年4月~H22年3月

②研究項目

項目1; ヒト型「スーパー抗体酵素」の効率的作製技術開発

- 1) ワクチン接種ボランティアからの軽鎖ライブラリーの構築
- 2) 活性クローンの選別
- 3) 抗体酵素の **folding** 条件の検討
- 4) 構造と活性の基礎的研究

項目2; 自動合成装置のための要素技術開発

- 1) ヒト伝子の直接増幅
- 2) 遺伝子増幅反応、切断反応と分離
- 3) 活性測定検出系の検討

項目3; 大量製造とモデルマウスへの投与実験

- 1) 抗体軽鎖あるいは重鎖遺伝子の単独発現
- 2) 分離・精製・透析条件の検討
- 3) 小規模培養および中規模培養
- 4) 大規模培養
- 5) **vitro & vivo** 試験

(2) Kaveri グループ (抗体酵素の生理的意義の解明)

①研究参加者

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
Srini Kaveri	INSERM	Prof. & Direct.	抗体酵素の生理的意義の解明	H19年10月～H25年3月
Sebastien Lacroix-Desmazes	INSERM	Research Associate	抗体酵素の生理的意義の解明	H19年10月～H25年3月

②研究項目

項目4; 抗体酵素の体内動態

- 1) Natural polyclonal human catalytic antibodies
- 2) Preparation of modified immunoglobulins
- 3) Therapeutic potential of catalytic and of modified antibodies
- 4) Experimental models of sepsis

§ 4 研究実施内容及び成果

4.1 大分大学 宇田グループ

(1)研究実施内容及び成果

4-1 ヒト型「スーパー抗体酵素」取得法

4-1-1 マウス型とヒト型

マウス型スーパー抗体酵素を得るには目的の抗原を免疫し、力価が上昇してきた段階で、ポリエチレングリコールを用いての細胞融合法によりモノクローナル抗体を取得する。次いでハイブリドーマのRNAを抽出し、cDNAに変換後、塩基配列を決定し、そこから推定されたアミノ酸配列を使って抗体の立体構造を分子モデリングで求め、セリンプロテアーゼ様触媒三ツ組様残基構造を取り得るクローンを選択することで高確率でスーパー抗体酵素を得ていた。しかしながら、ヒト型を得るのにヒトに勝手に希望する抗原を免疫する事はできない。そこでマウス型「スーパー抗体酵素」を遺伝子レベルまで遡りその性質を調べ、それをヒトの場合に適用してみた。遺伝子レベルで見た場合のマウス型とヒト型の関係を以下に概説する。

マウス型の場合：

触媒三ツ組残基様構造を有すると思われるマウス由来のV_κ germlineについて、V_κ germlineの同定を進めた。触媒三ツ組残基様構造を持つ28株の軽鎖が由来していたのは、表4-1-1に示す様に94種類のgermlineのうち、bb1,cr1,bl1,cv1,cs1,bd2,bj2,bi2,hf24の僅かに9種類であった。中でもcr1とbb1に由来する

株の割合が高く、germlineには明らかな偏りがあった。これらの触媒三ツ組残基様構造を持つ株とgermlineのアミノ酸配列を比較すると、驚くべき事に28株中の26株

(germlineとして7種類)はgermlineに由来するアミノ酸残基によって触媒三ツ組残基を構築していると推定された。これは、酵素活性を持つ抗体が遺伝子レベルで用意されていた。germlineにコードされている触媒三ツ組残基様構造を調べてみると、特に存在率の高いアミノ酸配置は、Asp1, Ser27a,

表 4-1-1 Thiebe らによる V_κ germline の分類

CDR1 のアミノ酸残基数	germline
10	kk4, kn4, km4, ar4, ko4, aa4, al4, aq4, am4, at4, ap4, af4, 4-50, ac4, kb4, an4 (16 種類)
11	cb9, cf9, ba9, bv9, cw9, cj9, cy9, ce9, cp9, aj38c, gm33, gn33, gr32, if11, rf, 12-41, 12-44, 12-46, 12-38, fl12, ci12, bt20, bw20, 19-13, 19-23, 19-14, 19-15, 19-17, 19-25, 19-32, 19-20, 19-29, dv-36, 23-43, 23-45, 23-39, 23-37, 23-48 (38 種類)
12	ad4, ai4, ae4, ah4, 4-51, kj4, ag4, kh4, ay4, kf4 (10 種類)
15	21-1, 21-2, 21-9, 21-3, 21-4, 21-5, 21-10, 21-12, 21-7 (9 種類)
16	bb1, cr1, bl1, cv1, cs1, bd2, bj2, bi2, he24, hf24, hg24 (11 種類)
17	8-19, 8-28, 8-27, 8-30, 8-21, 8-24, 8-34, 8-16, 22-33 (9 種類)

*Thibe R, Schanble KF et al, Eur J Immunol, 29(7), 2072-2081(1999)

表 4-1-2 基準を満たす V_κ生殖系列遺伝子

V _κ germline gene*	Name of subgroup**	Numbers of the light chain *** (rate)
A30	Subgroup I	1 (0.2%)
L22		0
A1	Subgroup II	0
A2		1 (0.2%)
A3/A19		13 (2.6%)
A5		0
A7		0
A17		4 (0.8%)
A18		2 (0.4%)
A23	2 (0.4%)	
A10/A26	Subgroup VI	0
Total		23 (4.6%)

His93より成る構造である。これは、bd2に加えてbb1, cr1, cs1, bl1, bj2と、合計6種類のgermlineに存在すると推定された。すなわち、マウス型スーパー抗体酵素はgermlineの段階で、ある特別なタイプのgeneに集中している事が判明した。

ヒト型の場合:

上述したように、マウス型スーパー抗体酵素はある特別な V・生殖系列遺伝子に属している例えば、bb1, cr1, bl1, bd2 などに偏在しており、それらは生来、セリンプロテアーゼ様触媒三つ組様残基を高い確率で encode している。この結果に基づいて同じ概念をヒトのケースに適用したところ、IgBLAST において登録された 502 種類のヒト型抗体軽鎖の DNA 配列を分子モデリングにより調べた。すると、セリンプロテアーゼ様触媒三つ組み残基を高い確率でエンコードする可能性を持っているのはサブグループ II に属しているヒト型抗体軽鎖 Vk 生殖系列遺伝子であった(表 4-1-2)。分子モデリングでは、His(Cα) と Ser(Cα)間が 5-9 Å, His(Cα)と Asp(Cα)間が 6-13Å である事を基準にサブグループ I-VI の属する合計 502 種類について検索した。その結果、調査した 502 個の軽鎖(カッパ&ラムダ)のうちの 23 個が標準を満たしていた。それをまとめたのが表1である。サブグループは I-VI まで存在するが、触媒三つ組様残基構造を持つと考えられるものはサブグループ II に集中していた。生殖系列遺伝子(A1, A2, 3/A19, A5, A7, A17, A18, および A23)に触媒作用の機能を備えている可能性が高いことを示唆している。

ヒト抗体軽鎖遺伝子の取得

ヒトの場合にはマウスと違って勝手に抗原を免疫する事はできない。そこで、この実験では狂犬病ウイルスをワクチンとして免疫しているボランティアの血液を図 4-1-1 のように採取し、そこから遺伝子工学的にヒト抗体軽鎖遺伝子を取得した。

ヒトボランティアからの血液を Ficoll pack で白血球を分離し、そこから RNA を抽出後、逆転写反応により cDNA に変換した。この cDNA を template にして、前述した subgroupII のみが特異的に増幅できるプライマーを設計して PCR により増幅させ、得られた遺伝子を TOPO ベクターに組み込んでヒト抗体軽鎖遺伝子ライブラリーを作製した。

実際にはこのライブラリーから、ひとつはヒト抗体軽鎖遺伝子を発現用ベクターに組み換え、タンパク質として発現後、狂犬病ウイルスに親和性を示すものをスクリーニングする、ふたつめはランダムに選んで発現させ、そこから酵素活性を示すものを選択する、というふたつの方法でヒト型抗体酵素の作製に取り組んだ。

4-1-2 全ヒト型・型軽鎖遺伝子増幅

ヒトボランティアの末梢リンパ球から抗体遺伝子の cDNA を作成し、ライブラリー作成のための鋳型とした。軽鎖の多様性を確保するため、報告されているヒト抗体遺伝子の軽鎖部分の遺伝子配列情報を元に、これらのすべてを網羅的に増幅できるようなプライマー配列を設計した。このプライマーと上述の鋳型を用いて、PCR 法により軽鎖遺伝子断片を増幅し、大腸菌発現ベクターに挿入し、LCA ライブラリーを構築した。さらに触媒三つ組様アミノ酸残基を分子内に有し、酵素活性を持つ可能性が高いとされる軽鎖が属する germline のサブグループ 2 のみに対応する LC2 ライブラリーを構築した(図 4-1-1)。

2 つのライブラリーそれぞれについて大腸菌を形質転換し、目的の軽鎖を効率良く発現させてランダムに選んだ約 800 クローンをスクリー

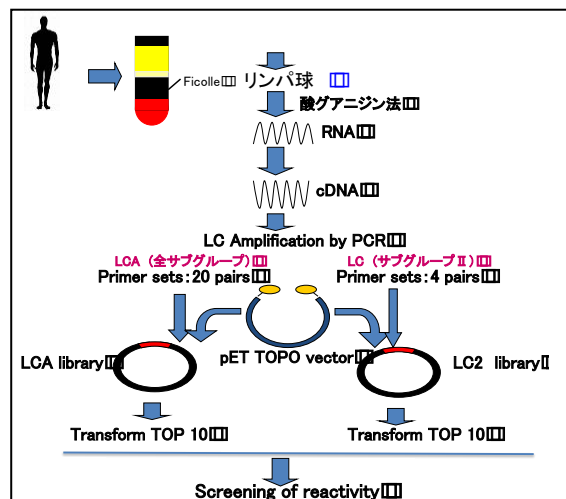


図 4-1-1 ヒト型抗体軽鎖遺伝子ライブラリーの作製法 (全遺伝子増幅)

ニングした。第1スクリーニングではELISA系を用いて、軽鎖発現と狂犬病ウイルスへの結合活性を有するクローンをLCAとLC2ライブラリーからそれぞれ20クローン、23クローンを選択した。さらに、培養のスケールを上げ、2段階目のスクリーニングを行い、それぞれ3クローン(LCA)、4クローン(LC2)を選別した。これら7クローンの塩基配列を確定しアミノ酸配列を推定し、軽鎖サブグループおよびgermlineを確定すると共に、培養スケールを上げHisタグを利用して精製し、狂犬病ウイルス抗原との親和性を調べた。

その結果LCAライブラリーは 1.35×10^5 CFU、LC2は 2.58×10^4 CFUのサイズがあり、十分に多様性を有していると考えられた。それぞれのライブラリーより400クローンをランダムに選んで合計800クローンをスケールアップしながら3段階のスクリーニングにかけたところ、有望なクローンがLCAライブラリーより3クローン、LC2ライブラリーより4クローンが選別できた(1B8, 2C2, 2H9, 22F6, 23D4, 23F1, 24A5)。このなかで酵素活性を潜在的に持ち得る22F6, 23D4, 23F1の3クローンについて、後の実験に使用した。

4-1-3 ヒト型抗体軽鎖遺伝子 germline gene Subgroup II の特異的遺伝子増幅

ヒト・ボランティアの血液から白血球を分離し、total RNAを抽出後、抗体軽鎖をコードしているcDNAを合成した。ここからSubgroup II遺伝子に特異的に反応する2種類の組み合わせのプライマーを設計して、2段階(semi nested)PCR法を用いて目的とする抗体軽鎖のみを増幅させ、それぞれをTOPO vectorにクローニングしたところ、合計

表 4-1-3 Subgroup II を特異的に増幅させて取得したヒト抗体軽鎖クローン

	由来germline		由来germline		由来germline
#1	<i>A18b</i>	#7	<i>A3/A19</i>	#13	<i>A3/A19</i>
#2	<i>A3/A19</i>	#8	<i>A18b</i>	#14	<i>A3/A19</i>
#3	<i>A3/A19</i>	#9	<i>A18b</i>	#15	<i>A5</i>
#4	<i>o11/o1</i>	#10	<i>A18b</i>	#16	<i>A17</i>
#5	<i>A3/A19</i>	#11	<i>A18b</i>	#18	<i>A18b</i>
#6	<i>A18b</i>	#12	<i>A3/A19</i>	#19	<i>A17</i>

で18クローンが得られた(大腸菌はTOP10)。興味あることにこれら18クローンのうち17クローン(#1, #2, #3, #4, #5, #6, #7, #8, #9, #10, #11, #12, #13, #14, #15, #16, #18 and #19)がsubgroup IIに属しており、効率的にsubgroup IIだけを増幅させる手法を確立した。それらを纏めたのが表4-1-3である。

増幅した抗体軽鎖DNAはTOPOベクターに挿入し、大腸菌DH5aで形質転換した。寒天プレートから、20(#1-#20)のクローンをランダムに選択した。その中の2つのクローン(#17と#20)はDNAサイズが750bpより小さかったので除外した。#3クローンはCDR-3における7-10個のヌクレオチドが欠失していたので、これも除外した。#5クローンは302番目のヌクレオチドが欠失していたけれども、これは点変異導入により修理した。最終的に17個のクローン(#3と#17を除く#1から#19)を得た。正しい軽鎖シーケンスをエンコードしている生殖系列遺伝子はすべてサブグループIIに属していた。17種類のクローンの中で7種類の生殖系列遺伝子がA18bであり、6種類がA3/A19、2種類がA17、そして1種類がA5とO11/O1であった。

4-1-4 ヒト抗体軽鎖遺伝子のアミノ酸配列と分子モデリング

上記のcDNA配列から推測された17個の軽鎖のVドメイン(V-J領域)のアミノ酸配列を図4-1-2(a-e)に示す。サブグループIIのA18b(7つのクローン)、A3/A19(6つのクローン)、A5(1つのクローン)、A17(2つのクローン)、およびO11/O1(1つのクローン)に分類して示した。

特に、A18bについてみてみると、5種類の軽鎖(#1、#8、#9、#10、および#11)がHis27dを所有していた。しかしながら、2種類の軽鎖(#6と#18)にはHisが存在しなかった。このために、後者の2種類のヒト抗体軽鎖にはHisが欠けているためにセリンプロテアーゼ様の触媒三つ組様残基構造を構築できないと推測される。

一方、興味深いことに、#1軽鎖は maturation の過程で起きた2つのユニークなヒスチジン残基(His41とHis44)を有していた。

Vドメインのアミノ酸配列を使って分子モデリングにより各ヒト型抗体軽鎖の立体構造を構築した結果を図4-1-3に示す。

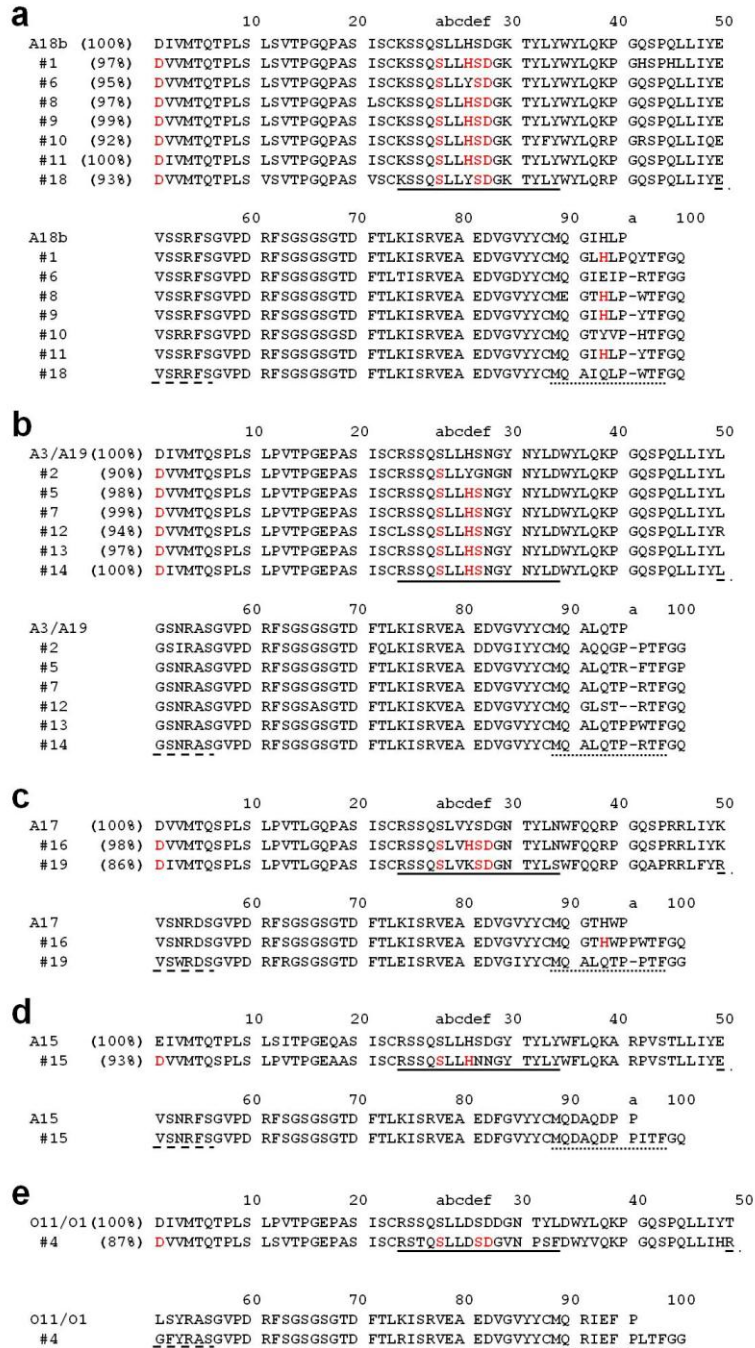


図4-1-2 Subgroup II に特異的に反応する primer より得られたクローンのV領域のアミノ酸配列
A18b (a), A3/A19 (b), A17 (c), A5 (d), 011/01 (e). 各グループの一番上の配列はそれぞれのンセンス配列；触媒三つ組み残基様構造を構築できるSer-27a (or Ser-27e), His27d (or His93)は赤字で示す；下線はCDRである

#11軽鎖のアミノ酸配列の中で、Ser27a(またはSer27e)、His27d(またはHis93)、およびAsp1(またはAsp27f)は、触媒三ツ組様残基構造の構築に関与していると考えられる。#8、#9、および#10軽鎖はこれらのアミノ酸配列を持っているので、触媒三ツ組様残基構造の構築が可能である。一方、#1軽鎖の場合には触媒三ツ組様残基構造を構築するための多くのアミノ酸残基が存在する。#6と#18軽鎖は可変領域にヒスチジン残基がなく、セリンプロテアーゼ様の触媒三ツ組様残基構造を構築できない。

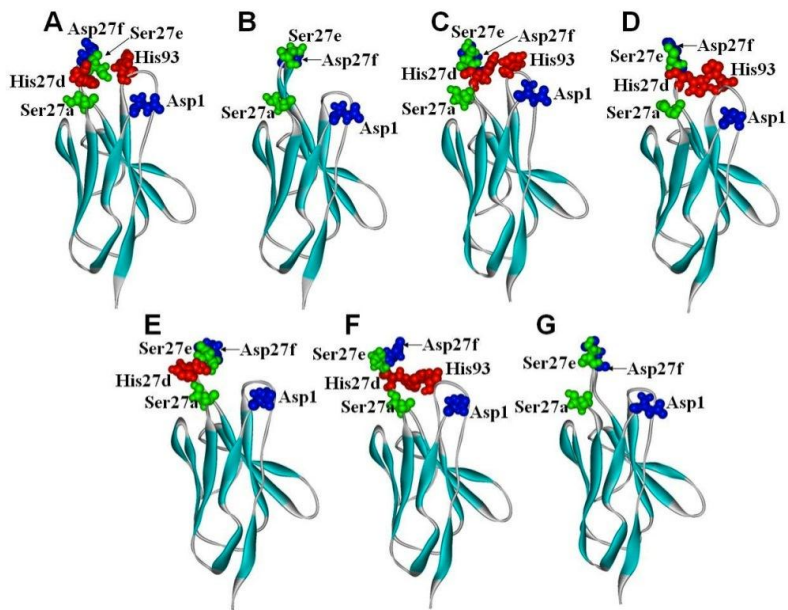


図 4-1-3 A18b に属するクローンの立体構造モデル
触媒三ツ組み残基様構造を構築できる (Asp1, Ser27a, Ser27d, His27e, Asp27d, and His93) を示す。青が Asp, 赤が His, 緑が Ser ;

4-2 ヒト型抗体軽鎖遺伝子の発現

4-2-1 大腸菌での発現

図 4-2-1 に本研究で使用した発現用ベクター pET-20b(+) の構造と抗体軽鎖遺伝子を挿入したマルチクローニングサイト(MCS)と用いた制限酵素を示す。図 4-2-2 には MCS を含む T7 promoter から T7 terminator までの概略を示した。本実験では抗体酵素遺伝子の C-末端に His-tag を導入し、これを用いて粗精製を行った。ヒト抗体軽鎖をコードしている DNA を含んでいる pCR-Blunt TOPO ベクターは、規制酵素 NcoI と XhoI によって消化した。その DNA 断片は、発現ベクトル pET20b(+) (Novagen) の同じ制限酵素を使って、MCS に挿入し、大腸菌 BL21(DE3)pLysS (Novagen) で形質転換した。形質転換体は、100 mg/ml のアンピシリンを含む 1 リットルの LB 培地で、37° C 培養した。次いで、0.01mM の isopropyl- β -thiogalactopyranoside (IPTG) を添加し 20° C で 20h (和光、日本) で培養した。

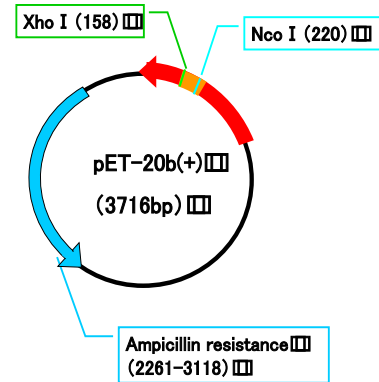


図 4-2-1 発現用ベクター pET-20b(+) の構造と利用する制限酵素サイト

4-2-2 哺乳細胞系での発現

pET-20b(+) cloning/expression region



図 4-2-2 抗体酵素遺伝子の構造と His-tag

図 4-2-3 の方法で PCR を行い、得られた PCR 産物を切り出し・精製した後、動物細胞発現ベクターである pCI-neo ベクター (Promega 社製) に組み込みこんだ。抗体軽鎖発現系にはヒト胎児腎細胞由来である HEK-293 細胞を無血清培地で順化した FreeStyle-293F 細胞 (Invitrogen 社製) を用いた。pET-23D の軽鎖遺伝子を動物発現ベクターである pCI-Leader-23D4 に組み換え、FreeStyle-293F 細胞にトランスフェクト後、経時的に細胞および細胞培養上清を回収し、Western Blotting 法により抗体軽鎖の発現を確認した。その結果、細胞溶解液中、培養上清中双方において経時的な抗体軽鎖の発現が認められた。抗体軽鎖は細胞内と比較して培養液中に多く認められ、培養液中での総タンパク質量における抗体軽鎖の割合は培養 4-5 日目がピークであった。結論からいうと、今回の手法で抗体軽鎖の動物細胞による発現系を確立することができた。

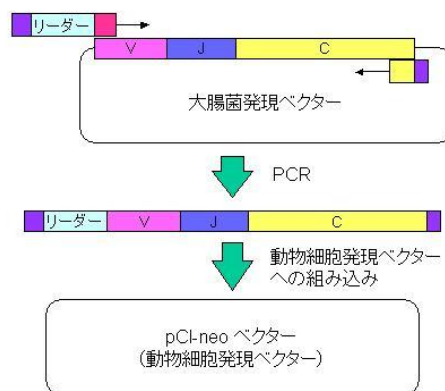


図 4-2-3 抗体軽鎖の動物細胞発現ベクター

4-3 ヒト型抗体軽鎖遺伝子のタンパク質としての発現と高純度精製

Subgroup II の germline gene (胚細胞遺伝子) を特異的に増幅させるのに2つの手法(A 法および B 法)を用いた結果、最終的にそれぞれ、17クローンおよび7クローンを取得した。そして、これらのクローン (抗体軽鎖遺伝子) を順次、発現ベクター (pET, pIlg or pCI) に挿入し、大腸菌 (BL21) や哺乳細胞系 (HEK293F) での発現を試みた。大腸菌での発現は培地、可溶性および不溶性画分で目的タンパク質が認められた。図 4-3-1 に培地で発現された目的タンパク質の SDS-PAGE およびその Western blot の結果を示す。この結果より、ヒト型抗体軽鎖が約 31kDa 付近に産生されているのが判る。この大腸菌の系では 100mL 培養で数 mg~10 mg 程度の発現したヒト型抗体軽鎖が得られた。また、哺乳細胞系では量的に大腸菌の 1/10 あるいはそれ以下の量であったが発現を確認した。今後、生物学的活性試験 (バイオアッセイ) を行うにあたり、哺乳細胞系では目的とする量の抗体軽鎖が得られない事が判明した。

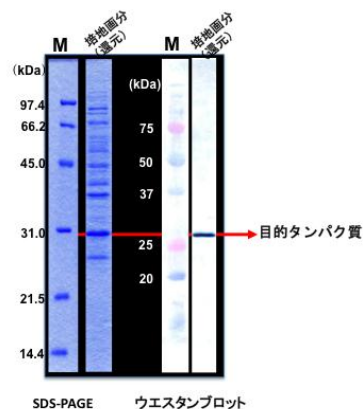


図 4-3-1 発現タンパク質の SDS-PAGE (CBB 染色) と Western blot

4-3-1 抗体カラムから Ni-NTA カラム精製

次に発現させたヒト型抗体軽鎖の精製方法を検討した。いくつかの手法があるがここでは抗体カラムによる一次精製、これに続いて行う His-tag を利用したニッケルカラム精製について述べる。培地あるいは可溶性画分に発現させた目的タンパク質はヒト型抗体 F(ab)2 に対するヒツジ製の抗体をゲルに結合させることにより作製した抗体アフィニティーカラムを用いて一次精製を行い、引き続き通常のニッケルカラムを用いての二次精製を行った。結果を図 4-3-2 に示す。銀染色を行

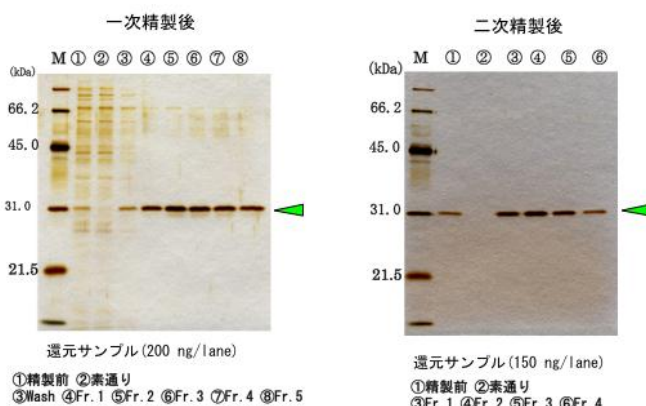


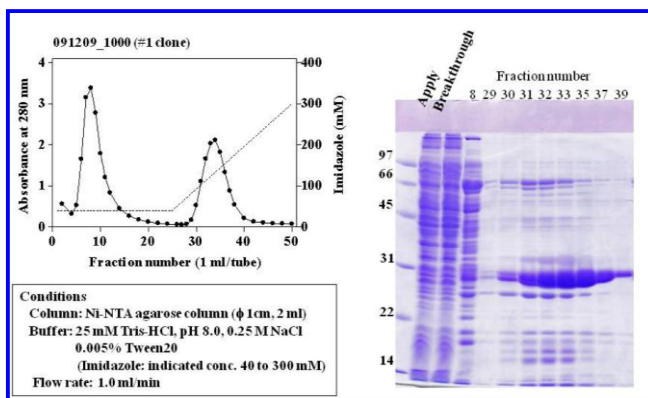
図 4-3-2 発現させたヒト型抗体軽鎖の一次精製および二次精製後の SDS-PAGE (銀染色)

っても一次精製だけでかなりきれいに精製できていることが判る。これにさらに二次精製を行うと目的タンパク質(矢印で示す)以外にはほとんど狭雑タンパク質が見られず高純度に精製されていることが判る。

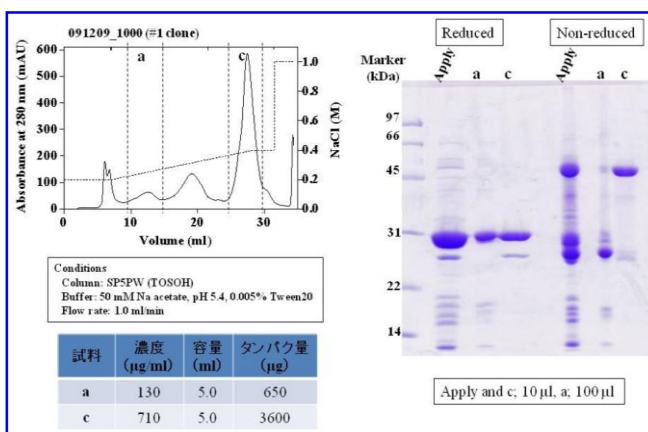
抗体カラムを使用するケースは多々見られるが、カラムに固定化する抗体の値段、固定量そして得られる精製サンプルの獲得量などを考慮すれば実験室的には可能でも、実用化する際に大量合成が必要となり、この目的には不向きであると考えられる。

4-3-2 Ni-NTA カラムから陽イオン交換カラム精製

一例として、#1クローンの wild type を発現させて、大腸菌からの可溶性画分について精製した様子を図 4-3-3 に示す。精製は菌体回収後、超音波破碎を経て可溶性画分のみを取り出し、His-tag を利用したニッケルカラム精製してから陽イオンクロマトグラフィーに掛けるという、2段階精製法を採用した。この場合には、Ni-NTA カラムでは単量体がかなり獲得できているが、純度的に不十分である。次に、これを陽イオンカラムに通すとかなりきれいな2量体が取得できる(一番右端の「c」のレーン)。取得量も1リットル培養で数 mg あり、抗体カラムを取り入れる場合にくらべ、量的および値段的に有利である。



Ni-NTA カラムクロマトグラム及び SDS-PAGE 分析



陽イオンクロマトグラム及び SDS-PAGE 分析

図 4-3-3 発現した抗体軽鎖の2段階精製とその純度 Ni-NTA カラムでかなり精製されているが、陽イオン交換クロマトグラフィーに通すと高純度サンプルが得られた。

4-4 ヒト型抗体軽鎖遺伝子の酵素活性とヒト型「スーパー抗体酵素」

4-4-1 アミダーゼ活性

抗体軽鎖のペプチド結合切断活性試験(アミダーゼ活性試験)には、このための合成基質としてよく知られている 4-Methyl-Coumaryl-7-amide(MCA)を用いた。この合成基質の構造とその反応を図 4-4-1 に示す。1-4 種類のペプチドが並んだ C 末側に MCA が結合しており、酵素などによりペプチド-MCA 間のペプチド結合が切断(加水分解)されるのをモニターできる。

本稿では表 4-1-3 の A18b に含まれる各クローンについてアミダーゼ活性を調べた結果について述べる。高純度に精製された単量体および2量体を含むヒト型抗体軽鎖を、合成基質であるペプチド-MCA と混合し、アミダーゼ活性を試験した。結果を表 4-4-1 に示す。#1、#8、#9、#10、#11、および#18 は Gln-Ala-Arg (QAR)-MCA のペプチド結合をターンオーバー値 0.099-0.14/h で、

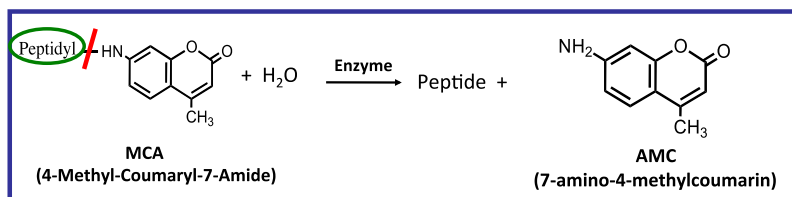


図 4-4-1 MCA ペプチド基質の加水分解による AMC の生成

Val-Pro-Arg (VPR)-MCA,を 0.082-0.10/h のターンオーバー値で、切断した。すべての抗体軽鎖が弱いながらも Glu-Ala-Arg (EAR)-MCA (0.026-0.074/h)と Glu-Lys-Lys (EKK)- MCA (0.011-0.077/h)に対して分解活性を示した。

これらの軽鎖は非常に低い活性でbenzyl-Arg (Bz-R)-MCAおよび K-MCAを切断したが、Ala-Pro-Ala (APA)-MCA (elastase-like substrate)は全く分解しなかった。従って、#6を除いて、抗体軽鎖は同様な基質特異性を持っていた。一方で、可変領域にヒスチジン残基を持たない事から予想されるように、#6軽鎖はかなりQAR-MCAに対して低い活性しか示さなかった。ところが、興味深いことに、#6と同様に、#18軽鎖はヒスチジン残基を全く持たないけれども、他のアクティブな軽鎖と同等のターンオーバー値で合成基質QAR-MCAを加水分解した。

表 4-4-1 ヒト抗体酵素による合成基質ペプチド-MCA の見かけの反応速度

Light chain	Peptide hydrolysis activity (hour ⁻¹)			
	QAR-MCA	VPR-MCA	EAR-MCA	EKK-MCA
#1	0.14	0.10	0.074	0.011
#6	>0.01	n.d.	0.026	0.035
#8	0.099	0.082	0.063	0.062
#9	0.12	0.094	0.062	0.063
#10	0.13	0.10	0.067	0.077
#11	0.14	0.10	0.068	0.073
#18	0.12	0.10	0.074	0.071

*n.d.: not determined

4-4-2 核酸分解活性

これまでの研究で DNA や RNA などの核酸を分解する抗体酵素が、特に、自己免疫疾患患者の中に存在する事が報告されている。本研究で取得したヒト型抗体軽鎖が、そのような核酸分解活性を有するのかどうか検討した。基質にはプラスミド pBR322 を大腸菌で形質転換して培養し、そこから高純度に調製したものを使用した。図 4-4-2 に典型的な核酸分解活性試験の結果を示す。通常、プラスミド pBR322 は **supercoiled form** をしており、図 4-4-2 の電気泳動図では、反応時間が0時間ではこの form のみが観察される。ところが、この **supercoiled form** とヒト抗体酵素を混ぜて反応すると、プラスミド pBR322 のリン酸ジエステル結合が加水分解され、2本鎖の1本に切れ目が入った **nicked form**、さらにもう一本の鎖に切断が起こり、環状から直線状になった **linear form** へと移行する。その様子を示したのが図 4-4-2 である。

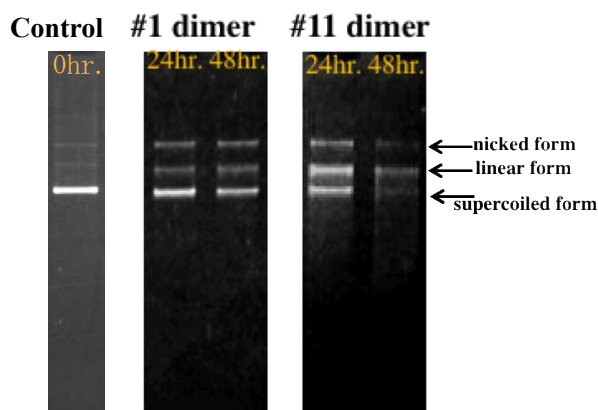


図 4-4-2 germline gene A18b に由来する#1 および#11 クローン(dimer)による核酸分解の様子

4-5 抗狂犬病ウイルス活性

4-5-1 狂犬病ウイルスについての説明:

狂犬病ウイルスの構造は、図 4-5-1 に示すように、大砲の弾の様な形をしていて、エンベロープの外側に糖タンパク質 G が存在し、M タンパク質が仲立ちとなって内側にゲノムをつなぎ止めている。内部タンパク質としては N,P,L タンパク質などが知られている。通常、狂犬病ウイルスに感染した動物に咬まれると狂犬病ウイルスが体内に侵入し、傷口の付近の筋肉から神経末端に入って中枢神経を遡って脳に到達する。発症するとほぼ 100%が死亡する。予防法については咬まれたあとの暴

露後免疫と咬まれる前の暴露前免疫がある。暴露後免疫は第1回目のワクチンをDay1として3, 7, 14日にワクチンを接種する。(万年和明、「4.ラブドウイルス」、ウイルス、第52巻、第1号、21-25(2002))

4-5-2 *in vitro*での抗狂犬病ウイルス試験

国際標準法に準拠して狂犬病ウイルスに対する抗ウイルス活性を検討した。図4-5-2に示すように蛍光法で行い、フォーカス(focus)の形成(forming)された数(unit)を、あらかじめ混合し反応させた抗体酵素がどの程度抑制したかで判断した(フォーカスの数をffuと表示する)。1フォーカスが1ウイルス由来と考えればよい。図4-5-2で出現フォーカス数が少ないほど抗ウイルス活性が強いことを意味する。最初に#1クローン(germline: A18b)について検討したが、事前にエンベロープを有する狂犬病ウイルスが、長時間抗体酵素とのみ接触している温度条件下で、ウイルスが受ける「感染性の低下」との相関関係を調べた。その結果、抗体酵素は10~50時間で目に見える効果を発揮するので、適切な培養温度は20~25℃であると結論した。

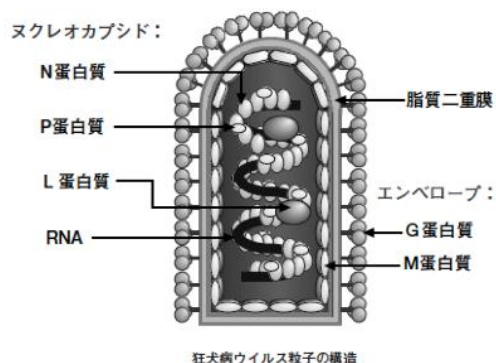


図4-5-1 狂犬病ウイルスの構造

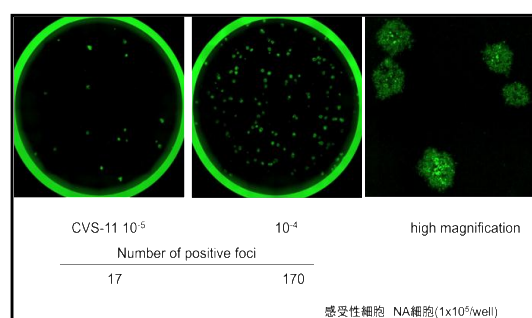


図4-5-2 狂犬病ウイルス(CVS-11株)感染によるFocusの形成

4-5-3 ヒト型抗体酵素による細胞膜融解性

将来において、発現させたヒト型抗体軽鎖が細胞膜を溶解させるような強い副作用を持つものかどうか、赤血球浮遊液を用いて溶血活性の有無について検討を行った。その結果、図4-5-3に示すように、ヒト型抗体軽鎖を添加することによる、溶血反応は認められず、我々が使用するヒト型抗体軽鎖が非特異的に細胞膜を傷害する可能性は低く、この面からの副作用はないと考えられた。



図4-5-3 ヒト型抗体酵素による細胞膜融解性試験

4-5-4 各種抗体酵素のクローンの*in vitro*での抗狂犬病ウイルス活性の検討

狂犬病ウイルスには *in vitro* 実験用、*vivo* 実験用などいくつかのウイルス株が存在する。本研究では、通常の実験室で取り扱えるHEP株に加えて、P3以上での取り扱いが要求されるCVS株を用いて実験を行った。動物への感染実験ではHEP株は感染を起こさないため使用できないが、CVS株は感染が成立する株である。

HEP株:

発現・精製したヒト型抗体軽鎖の抗狂犬病ウイルス活性を*in vitro*で評価し、動物実験へ進めるクローンをスクリーニングすることを目的として実験した。抗狂犬病ウイルス活性については、感染ウイルスにより培養細胞に出現した感染フォーカスの抑制数で評価してきた。即ち、あらかじめ軽鎖分子を添加しない条件下(ウイルスコントロール)でウイルスを25℃の下24あるいは48時間置き、この条件下での残存ウイルスの感染価を計測しこれを100%とする対照群に対し、軽鎖分子の添加に

より感染フォーカス数がどの程度に変化したかを%として表わす Focus Reduction Neutralization Test (FRNT)である。なるべく多くの抗体軽鎖サンプルを評価したいこと、さらにサンプル量の軽減化も図りたい等の理由から、今年度は 96 穴のマイクロプレートを利用した評価系を確立した。ウイルスは狂犬病ウイルス HEP 株を使用し、最適な感受性細胞として Na (C1300)株を用いて FRNT を行った。フォーカスは、細胞固定後、蛍光標識した抗狂犬病ウイルス単クローン抗体で染色し蛍光顕微鏡下で計数した。その結果、10 種類のクローンについて、48 時間の反応で効果が期待できる効果が得られた(表 4-5-1)。そのうち 24 時間の反応でも効果があったものは、2クローン(#4C220A, #18)であった。

表 4-5-1 狂犬病ウイルス (HEP 株) 活性を示した抗体軽鎖

Clone	終濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	24h反応				48h反応				in vivo	
		1回目 (%FFU)	1回目 誤差	2回目 (%FFU)	2回目 誤差	1回目 (%FFU)	1回目 誤差	2回目 (%FFU)	2回目 誤差		
Donor A	C89	40	92%	12%	91%	12%	69%	16%	67%	17%	
	C29	40	100%	18%	96%	23%	59%	12%	72%	9%	
	23F1 (C220A)	287	143%	4%	137%	9%	64%	28%	55%	8%	効果なし
		57.4	151%	3%	143%	11%	33%	9%	50%	6%	
	23D4 (C220A)	11.48	113%	15%	119%	6%	40%	6%	52%	7%	効果なし
		244	103%	16%	88%	10%	47%	9%	70%	5%	
		48.8	73%	9%	89%	13%	29%	2%	55%	3%	
		9.76	71%	1%	82%	6%	29%	8%	52%	9%	
	22F6 (C220A)	1.952	42%	17%	97%	4%	28%	2%	53%	8%	効果なし
		31.6	90%	2%	75%	4%	58%	8%	76%	5%	
Donor B	#2	6.72	104%	6%	78%	3%	67%	15%	60%	1%	効果なし
		43.8	75%	5%	83%	2%	42%	8%	52%	6%	
	#4 (C220A)	8.76	53%	4%	61%	12%	39%	12%	60%	9%	やや効果あり
		1.752	53%	7%	102%	12%	41%	12%	55%	3%	
	#4	34	95%	8%	113%	5%	71%	3%	73%	5%	
	#11	14.2	138%	9%	114%	15%	67%	2%	73%	3%	やや効果あり
	#18	59.25	37%	5%	49%	8%	24%	2%	28%	8%	効果あり

CVS 株:

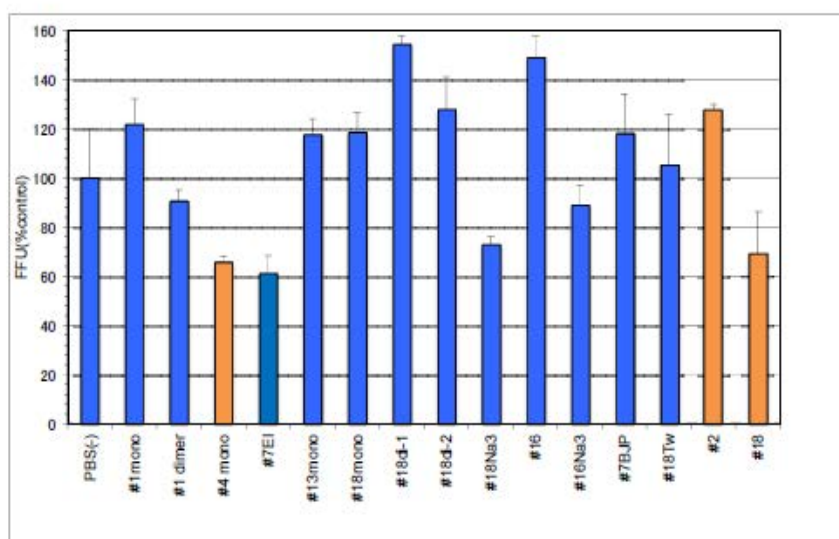


図 4-5-4 ヒト型抗体酵素による狂犬病ウイルス (CVS 株) に対する増殖抑制効果

大腸菌発現後精製した抗体軽鎖と狂犬病ウイルスCVS株(約100 ffu/well)を25°C, 24時間反応後NA細胞に感染させ、フォーカス形成抑制の割合を%reductionで示したもの

これまでに発現・精製したヒト型抗体軽鎖のいくつかの、狂犬病ウイルス CVS 株に対するウイルス増殖抑制活性について検討したところ図 4-5-4 のように示す結果となった。#4 monomer と#18 が強いウイルス増殖抑制活性を示した。

一方で、#18d-1 や#16 の抑制活性が 100%を越えるようなクローンも見られた。これについての理由は良く判らない。また、全く抑制活性の見られなかったクローンがいくつか存在した。

また、前述した A18b に属するクローンについて同様な実験を実施した。その結果を図 4-5-5 に示す。

#1 クローンで若干、#18 クローンではかなり強く、ウイルス増殖抑制を示し、in vitro 試験でも再現性の有る結果となった。そこで次の、マウスを使った in vivo 試験では#18 クローンについて詳細に調べることにした。この時、ウイルス増殖抑制活性がなく、かつ、大量に作製が可能な#2 クローンを選び、#18 クローンの比較対象とした。

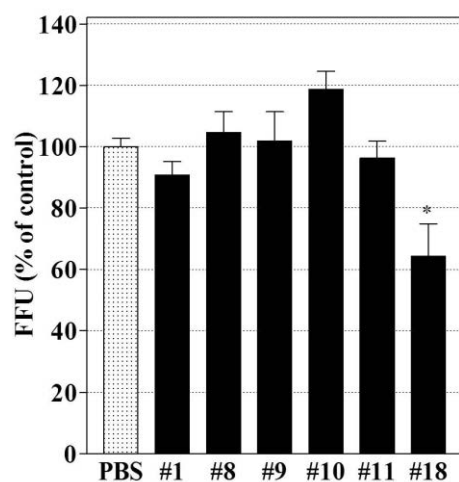


図 4-5-5 Subgroup II 18b に A18b に属するクローンの抗狂犬病ウイルス活性 (in vitro 試験)

4-5-5 マウスを用いた抗体酵素の in vivo での抗狂犬病ウイルス活性の検討

マウスを用いた in vivo における抗体酵素の抗狂犬病ウイルス活性の評価は以下のようにして行った(図 4-5-6)。

使用した狂犬病ウイルスは、CVS株で乳飲みマウス脳内で3代継代し、その後マウス神経芽腫細胞株(NA細胞)で1代継代したものをを用いた (lot. CVS-SMB3N1)。ウイルスの感染力価は 3.3×10^7 FFU/ml で、ウイルスの希釈液には 10%-FCS EMEM 培養液を用いた。

その後このウイルスと抗体酵素を *in vitro* で反応させた。抗体酵素と反応させるウイルス量は、あらかじめ *in vitro* のウイルス中和実験の結果を元に、予備実験を行い以下のように算定した。6,600 ffu/ml のウイルスと等量の PBS を混和し、抗体酵素反応条件と同じ 25°C, 24 時間反応させたものをマウス脳内接種するとその致死率は 50% であり、抗体酵素の反応条件を元に戻すと 6,600 ffu/ml のウイルスが 1LD50 に相

当することが分かり、マウスを完全に死滅させるウイルス量として 4LD50、即ち 26,400 ffu/ml のウイルスを実験には使用することとした。実際には、#18 (5 mg/ml)、#2 (4.9 mg/ml)、#4 C220A (5.9 mg/ml)、および陽性対照として ERIG [Equine rabies immunoglobulin, 2 IU/ml (抗狂犬病ポリクローナル抗体)、陰性対照として PBS (-)] を、26,400 ffu/ml に希釈したウイルスストック (lot. CVS-SMB3N1) と 1:1 でエッペンチューブ内において 25°C のヒートブロックで 24 時間反応させた。その後、マイクロシリンジと二段針を用いて、麻酔下のマウス脳内に 1 匹あたり 0.03ml 接種し、投与後 14 日間マウスの生存を観察し、致命率 (生存率) を評価した。

その結果、図 4-5-7 のように #18 では観察期間 14 日間の後も 55.6% のマウスが生残した。一方 *in vitro* で抗ウイルス活性の認められた #4 monomer(C220A) は、マウス接種においてはその有効性は認められず、陰性対照とした #2 と同様その致死率は 100% であった。

次に #18 の抗ウイルス活性が濃度依存的なものであ

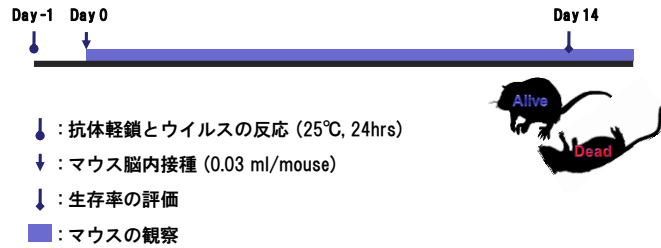


図 4-5-6 in vivo での抗狂犬病ウイルス活性試験の投与スケジュール

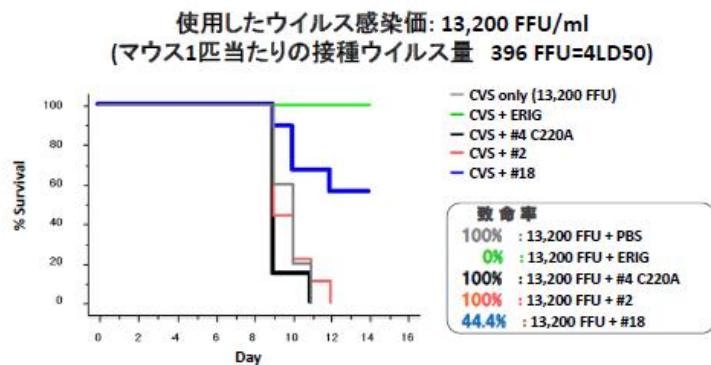
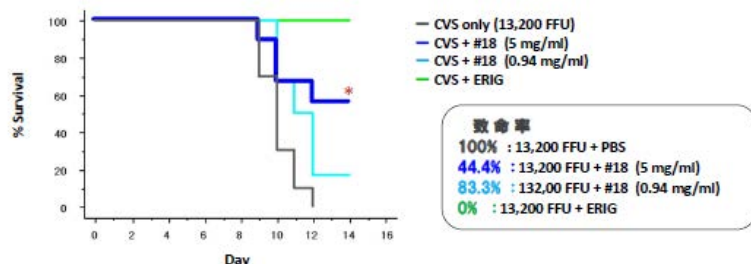


図 4-5-7 ヒト型抗体酵素と狂犬病ウイルス (CVS 株) 反応物の脳内接種後のマウス生存率 (サンプル #18, #2, #4C220A について)



* p value (Log-rank test) = 0.0073, CVS only vs. CVS+ #18 (5mg/ml)

図 4-5-8 抗体酵素濃度依存性 (#18 クローン)

るかを確認するために、抗体軽鎖#18の大量培養原液(濃度 0.94mg/ml)を濃縮することで5mg/mlの抗体酵素を用意し、同様の実験条件で狂犬病ウイルスと反応させ、マウス脳内に接種して、その後14日間の観察を行った。その結果、図4-5-8のように、最終的な致命率44.4%(生残率55.6%)となり、対照としたPBSとウイルスを反応させた群と比較して、 $p=0.0073$ で有意差を認めその有効性を確認することができた。

結論として、大量培養されたヒト型抗体酵素の抗ウイルス活性を *in vitro* で確認し、その後マウスの感染モデル系を用いることでもその活性を確認でき、*in vivo* でも効果的な抗狂犬病ウイルス活性を示すことが明らかになった。

4-6 抗インフルエンザウイルス活性

4-6-1「スーパー抗体酵素」の抗インフルエンザウイルス活性

インフルエンザウイルスについて:

インフルエンザウイルスはよく知られているように、毎年流行を繰り返す人類に取ってやっかいなウイルスである。1918年に世界的に大流行したスペイン風邪は世界で数千万人が死亡したとされ、つねに引き合いに出される。スペイン風邪以外にも、これまでにアジア風邪、香港風邪というように

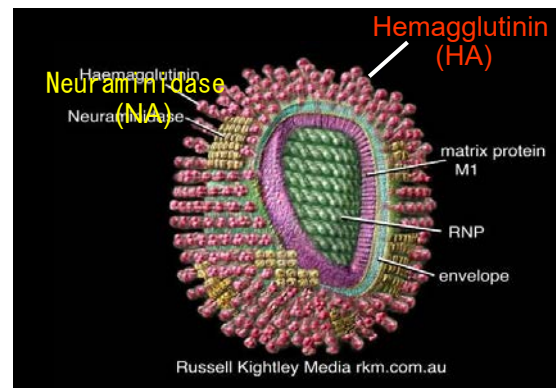
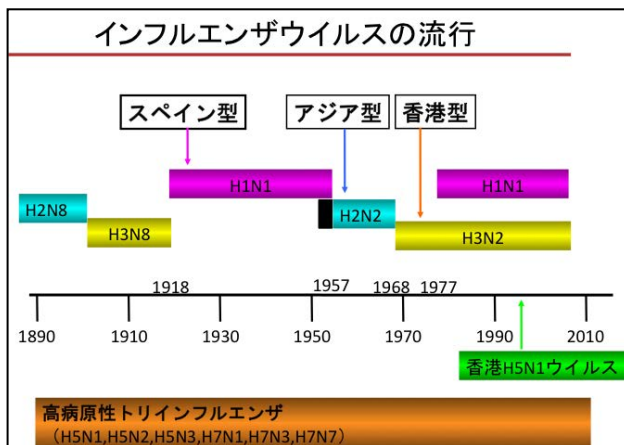


図 4-6-1 過去の流行とインフルエンザのタイプ

世界的流行を重ねてきており、それぞれ数十万人、数万人が死亡している(図4-6-1)。最近では、高病原性の鳥インフルエンザの動向が注視されている。インフルエンザウイルスが流行を繰り返すのは、ウイルスの膜上に存在するタンパク質で、それぞれ感染および増殖に必須な Hemagglutinin と Neuraminidase に頻繁に変異が入るためである。上図にも示したが Hemagglutinin(HA と略)と Neuraminidase(N と略)のそれぞれ 19 種類と 9 種類が見出されており、その組み合わせ、例えば H1N1 のタイプがスペイン風邪を引き起こした。アジア風邪は H2N2 型、香港風邪は H3N2 型である。因みに高病原性鳥インフルエンザは H5N1 などが主体である。つまり、感染に必須なタンパク質である Hemagglutinin が重要な役割を演じている(図4-6-2)。

Hemagglutinin は図4-6-3に示すような構造を取っている。同図は Hemagglutinin の3量体を示しているが膜状ではこの形態で存在している。黄色の部分が HA1、赤色の部分が HA2 と言われ、Hemagglutinin 単量体はこの2つのドメインで構成されている。変異が頻繁に入ると言われている Hemagglutinin 分子でも、面白いことに、太古の昔より変異が非常に入り難い領域が存在する。HA2 ドメインで言えば GITNKNVNSVIEK である。この配列には変異が入り難く保存領域と呼ばれている。興味ある事にウイルスが体内に侵入したとき、この配列に対する抗体はほとんど産生されない。ウイルスにしてみればこの配列に対する抗体が産生されると致命的となるからである。この配列領域は Hemagglutinin タンパク質の内部に一部埋もれており、抗体が産生し難い構造となっている(図4-6-4)。しかしながら、この保存領域を特異的に破壊する「スーパー抗体酵素」が作製でき

ば毎年変化するインフルエンザウイルスに対抗する手段として大きな意義がある。以下に述べる JN1-2-H はそのために開発されたマウス型「スーパー抗体酵素」である。



図 4-6-3 Hemagglutinin の 3 量体構造

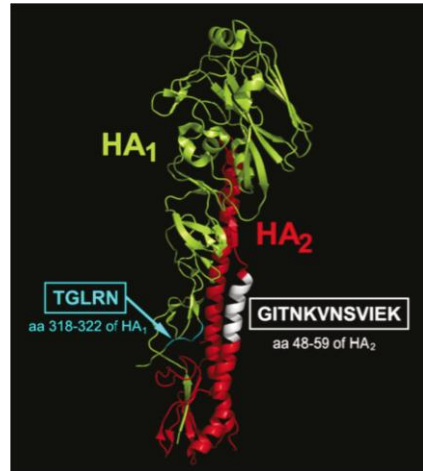


図 4-6-4 Hemagglutinin の単量体構造と保存領域

4-6-2 Hemagglutinin の保存領域を破壊するマウス型「スーパー抗体酵素」JN1-2-H

抗原設計: インフルエンザウイルス H1N1 および H2N2 に共通に存在する Hemagglutinin の HA1

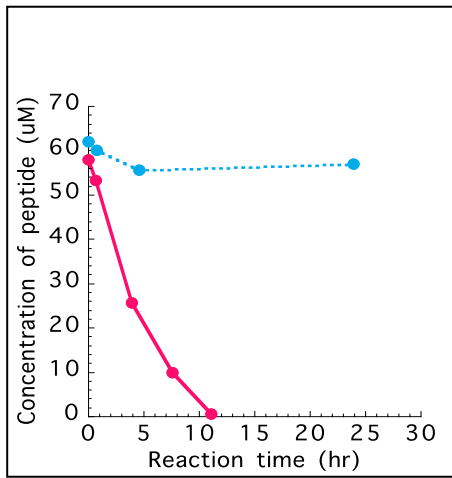


図 4-6-5 JN1-2-H による抗原ペプチドの加水分解反応

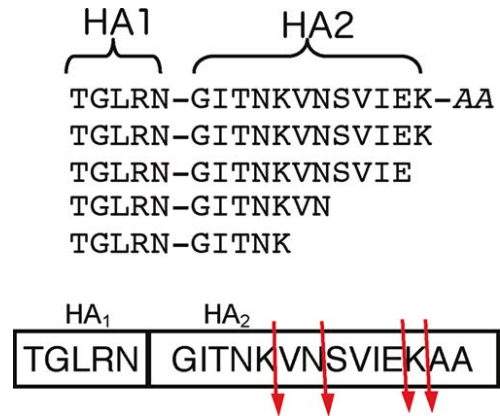


図 4-6-7 抗原ペプチドの開裂部位

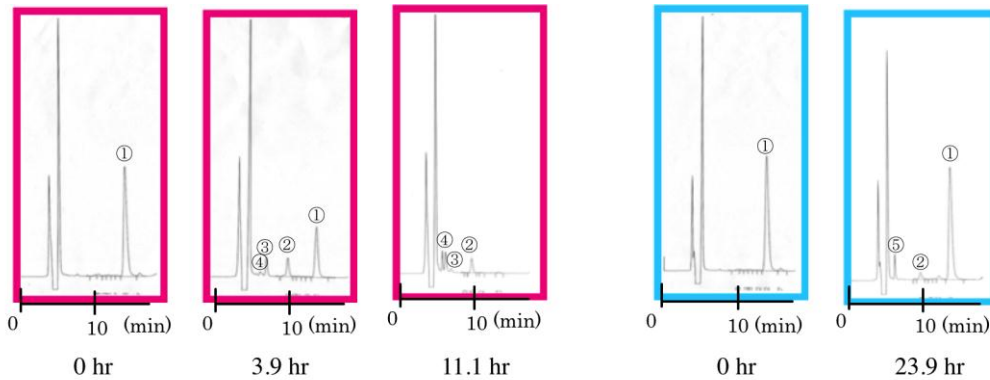


図 4-6-6 JN1-2-H による抗原ペプチドの加水分解反応の経時変化 (HPLC) による解析

ドメインから TGLRN の保存配列を、また、同 HA2 ドメインから上述した GITNKVNSVIEK 配列を選び、これらを結合した TGLRNGITNKVNSVIEKAA をマウスに免疫する抗原ペプチドとして合成した (図 4-6-4 参照)。このペプチドの C 末端に human IgG を化学的に結合させてマウスに免疫し、通常の細胞融合法によりモノクローナル抗体を得た。このなかの JN1-2 モノクローナル抗体は予想通り、H1N1 や H2N2 に反応したが、H3N1 には反応しなかった。次に、JN1-2 モノクローナル抗体 (JN1-2-mAb と略記) を軽鎖と重鎖に分離したところ重鎖 (JN1-2-H と略記) 側に抗原ペプチドを分解 (加水分解) する能力のある事が判った (図 4-6-5)。図 4-6-5 は抗原ペプチド TGLRNGITNKVNSVIEKAA (60・M) が JN1-2-H (0.4・M) によって分解されている様子を HPLC で調べた結果である (反応温度 25°C)。両者を混合後、約 12 時間で抗原ペプチド (赤いライン) が完全に分解されていることが判る。因みに、JN1-2-H を混ぜなかった場合 (青の点線) には分解はほとんど起こっていない。分解の変化を 1hr, 3,hr, 11,2 hr で見たのが図 4-6-6 である。JN1-2-H を加えない場合 (青枠) と比べ、TGLRNGITNKVNSVIEKAA の相当するピーク①が消失し、新たにピーク②、③、④が現れている。これは抗原ペプチド TGLRNGITNKVNSVIEKAA が図 4-6-7 のように切断された結果である。

この抗原ペプチド TGLRNGITNKVNSVIEKAA 分解反応を動力学的に求めたところ (図 4-6-8)、Michaelis-Menten 式に従い、 k_{cat} が 26.2/min、 K_m が 1.36×10^{-4} M、触媒効率 $k_{cat}/K_m = 1.93 \times 10^5$ /M/min となった。この分解反応は明らかに酵素反応である。

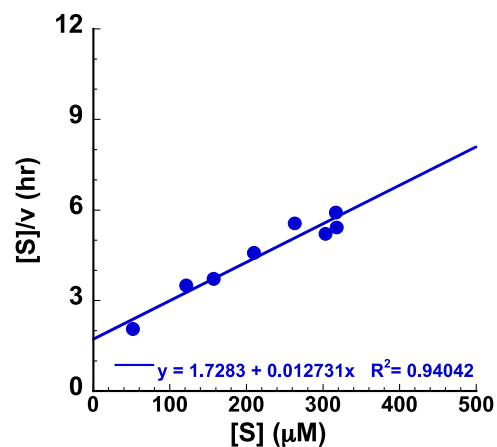


図 4-6-8 抗原ペプチド分解反応の動力学

4-6-2 JN1-2-H の立体構造

抗体産生細胞から mRNA を抽出し、cDNA に変換後、JN1-2-H の塩基配列を決定した。そこから推定されるアミノ酸配列を使って、分子モデリングを構築し、どのアミノ酸残基が触媒活性サイトになっているかを探った。その結果、His35 と Ser94 との間の Ca の距離は 6.78 Å、His35 と Asp72 とのそれは 14.56 Å であった。それで、JN1-2-H の場合には His35、Asp54、Ser94 が触媒三つ組み残基様構造を取るものと推定された。

4-6-3 JN1-2-H による HA2 ドメインの分解

上述したように、抗原ペプチド TGLRNGITNKVNSVIEKAA を分解することが判明したので、HA2 ドメインを遺伝子工学的に発現させて、これを用いて JN1-2-H が HA2 ドメインを分解するかどうかの検討を行った。その結果を図 4-6-9 に示す。

分解反応は、71 nM のビオチン化 rHA2 (ビオチン rHA2) と 0.4・M の JN1-2-H と混合し、rHA2 の分解をリン酸緩衝液 (pH 6.5)、25°C で行った。反応の様子は、SDS-PAGE 後、POD で標識したストレプトアビジンを反応させることで Western blot を行い、追跡した。

図 4-6-9 に示すように、ビオチン rHA2 の分解の時間経過は 0、4、8、12、21、26、36、および 48 時間で行った。この時の SDS-PAGE は非還元条件下で行

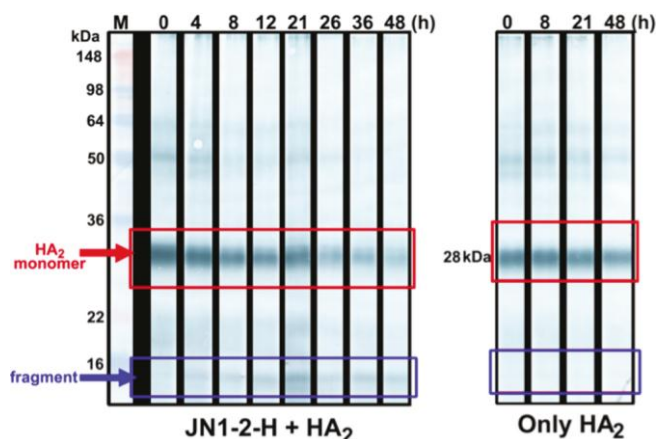


図 4-6-9 Hemmagglutinin HA₂ ドメインの分解の経時変化

った。反応時間 0hr では、28kDa に rHA2 のバンドが強く検出されている。このバンドは 48 時間まで反応させると薄くなっている。一方で、対照実験における 28kDa のバンドはほとんど反応時間 0hr から 48hr の間に変化していない。
 ビオチン rHA2 と JN1-2-H の混合したとき、反応時間 4hr から 15kDa バンドが現れ始め、20-30hr で明確に検出されている。この 15kD のバンドは rHA2 から生成されたフラグメントと考えられる。基質特異性を調べるために、JN1-2-H(0.2・M)と BSA および HSA(0.3・M)を混合した(上記の実験と同一の条件の下で)。BSA および HAS に対する分解活性を追跡したが、BSA と HAS どちらも分解は見られなかった。
 この実験に加えて、BSA 50・Mと JN1-2-H 0.2・M の条件でも行ったが分解は全く見られなかった。従って、JN1-2-H はある程度の抗原特異性を有していることが判明した。

4-6-4 JN1-2-Hによるインフルエンザウイルスの分解

上記の実験で JN1-2-H は HA2ドメインを分解することが判ったので、次にインフルエンザウイルスを用いて、インフルエンザウイルスが持つ HA2 ドメインを分解するかを調べた。実験はウイルスライゼートを使用し、反応時間ごとにサンプルを一部取り、Western blot により反応を追跡した。Western blot で使用した抗体は PODラベルした JN1-1 mAb(JN1-2 mAb でない)を使った。結果は図 4-6-10 に示す。

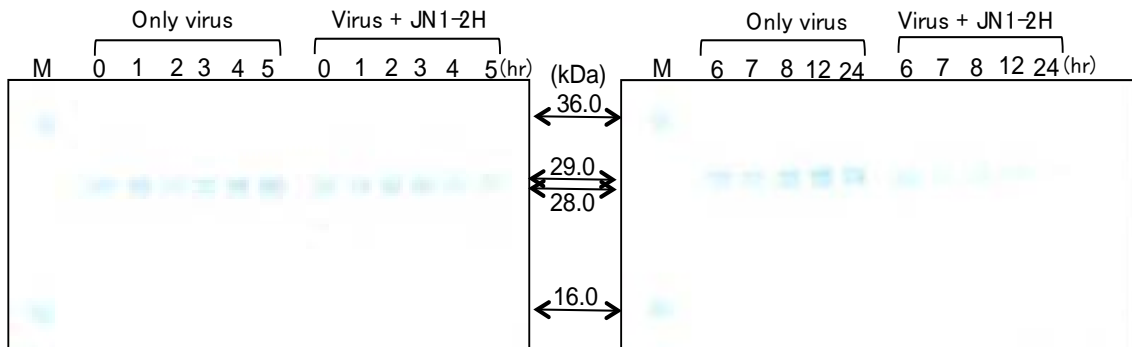


図 4-6-10 JN1-2-H によるインフルエンザウイルスの直接分解の経時変化
 HA2 ドメインが経時的に分解されている様子が判る

約 28 と 29 の kDa に HA2ドメインに対応したバンドを検出した。ウイルス(H1N1)と JN1-2-H の混合物の反応で、反応時間約 5hr で、JN1-2-H を入れたサンプルのバンドは薄くなり始め、24 時間ではバンドがほとんど消失している。一方、対照実験では 24hr 後もバンドははっきりと観察された。

4-6-5 インフルエンザウイルスの *in vitro* での感染試験

本研究では A/広島/37/2001(H1N1)と B/広島/22/2001 のインフルエンザウイルスを使用した。

この実験の前に、インフルエンザウイルスは高温で感染性を失うので、いくつかの反応条件(温度:4℃、10℃、20℃、27℃、および 37℃;時間:0、1、3、8、24、48、72、168、および 240hr)を調べた。その結

表 4-6-1 JN1-2 mAb および JN1-2-H による中和反応

Catalytic antibody or mAb	Virus strain	Neutralization factor* (dilution of catalytic antibody or mAb)	Concentration (mM)
JN1-2-H	A/Hiroshima/37/2001(H1N1)	4	0.35
	B/Hiroshima/22/2001	<2	>0.70
JN1-2-mAb	A/Hiroshima/37/200(H1N1)	<2	>0.65 (/ligand)

*50% inhibition for the infection of influenza virus

果、37°Cの反応ではウイルスは急速に感染性を失った。逆に、4°Cと10°Cの反応では240hrでもウイルスの感染性は余り失われてなかった。

インフルエンザウイルスの感染性の損失とJN1-2-H(JN1-2-Hの触媒作用は低温で減少する)の触媒活性を考慮すると、最も適切な反応温度は、20°Cと決定した。

表4-6-1は完全抗体(JN1-2 mAb)または抗体酵素(JN1-2-H)についてインフルエンザウイルスに対する中和活性を評価したものである。

JN1-2-Hは最小濃度0.35・MにおいてインフルエンザウイルスA型(H1N1)の感染を50%抑制している。しかし、インフルエンザウイルスB型にたいしては全く抑制効果を示していない。

また、完全抗体であるJN1-2 mAbはインフルエンザウイルスA型(H1N1)の感染を抑制しなかったことから、JN1-2-Hによる感染抑制はHA2ドメインを分解して感染抑制を起こしていると考えられる。

表 4-6-2 JN1-2-H による感染ウイルス数への効果

Influenza virus	Antibodies	Concentration of antibody (mg/mL)	Numbers of virus (PFU/0.2 mL)			Degree of suppression of infectivity (%)
			Initially prepared virus (PFU/0.2 mL)	Incubation at 20°C for 48hr		
				without antibodies	with antibodies	
Type A (H1N1)	No antibody (Control)	0	5 x 10 ³	1.3 x 10 ³ (+2.8 x 10 ²)*		—
		0	5 x 10 ²	1.7 x 10 ² (+3.5 x 10) [*]		—
	JN1-2-H	25	5 x 10 ³	1.3 x 10 ³ (+2.8 x 10 ²)*	7.5 x 10 ² (+3.5 x 10 ²)	42.3
		25	5 x 10 ²	1.7 x 10 ² (+3.5 x 10) [*]	5.5 x 10 ¹ (+7.1 x 10 ⁰)	67.6
		2.5	5 x 10 ³	1.3 x 10 ³ (+2.8 x 10 ²)*	1.3 x 10 ³ (+2.1 x 10 ²)	0
		2.5	5 x 10 ²	1.7 x 10 ² (+3.5 x 10) [*]	1.2 x 10 ² (+2.8 x 10 ¹)	29.4

*These values were used as a standard to calculate the degree of infectivity. Each assay was performed with n = 2.

次に、さらに正確性を求めるために、追加実験をおこない、表4-6-2の結果を得た。

JN1-2-Hの系と比較するために、JN1-2-Hの存在しないコントロールとして5 x 10³または5 x 10² PFU/0.2 mLのウイルスを準備し、これをもとにJN1-2-Hと混合した場合の値を計算した。

JN1-2-Hの25・g/mLを5 x 10³(PFU/0.2 mL)のウイルスと混合した時に、1.3 x 10³から7.5 x 10² PFUへと半減した。ウイルス量が5 x 10² PFUの場合には、1.7 x 10² to 5.5 x 10¹ PFUへと1/3に減少した。

一方、JN1-2-Hが2.5・g/mLの時には、わずかな効果が観察された。このように、JN1-2-Hはインフルエンザウイルスとの接触でウイルスの感染性を消失させていることが判る。

4-7 抗ガン活性について

4-7-1 ヒト型「スーパー抗体酵素」クローンの抗ガン活性

「スーパー抗体酵素」の特徴は、抗体のように分子認識能が高く、かつ、酵素のように抗原を加水分解し、機能を「スーパー抗体酵素」単独で消失させるという、高機能分子である。従って、上述した抗ウイルス活

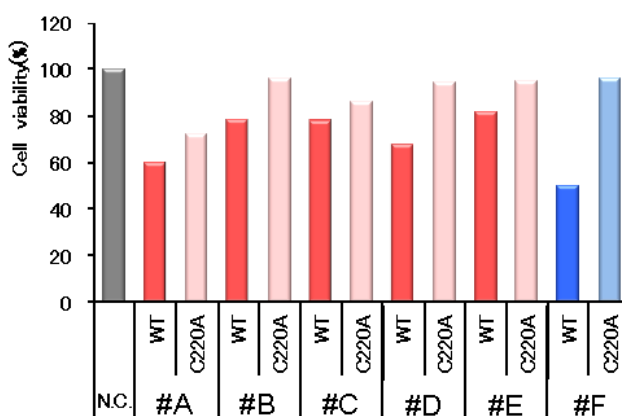


図 4-7-1 肺ガン細胞 (A549 細胞) に対する各種抗体酵素のガン細胞傷害性

性だけでなく、抗体酵素クローンによっては「スーパー抗体酵素」自身で、ガン細胞を攻撃破壊する事が出来る可能性がある。抗体(抗体医薬を含む)のように補体、マクロファージ、NK細胞、単球などを用いなくても、抗原排除が可能であることは、「スーパー抗体酵素」の大きな特徴である。もしこうした抗ガン活性がヒト型「スーパー抗体酵素」にあれば、次世代の革新的な抗ガン剤として期待できる。

因みに、抗体医薬として有名な「ハーセプチン」は乳癌に効果的な薬であるが、今やその売上高はこの一品で年間 5000 億円である。これを開発した企業の利益は甚大なものがあり、世界の製薬企業が抗体医薬の開発に参入しているのが現状である。「スーパー抗体酵素」は抗体医薬品を凌ぐ性能が期待されており、本研究では各種のガン細胞株を用いて実験したのでその結果を以下に示す。

4-7-2 抗ガン作用について (*in vitro* 試験)

いくつかのヒト型「スーパー抗体酵素」は肺ガンや卵巣癌などに対して非常に強い抗ガン作用を示している。下記に述べる *in vitro* 試験では各種ガン細胞の培地にヒト型「スーパー抗体酵素」を適当量添加し、48 時間後に WST アッセイする事により細胞傷害性を評価した結果である。

4-7-2-1 肺ガン細胞傷害性

図 4-7-1 および図 4-7-2 は肺ガン細胞 (A549 細胞) に対して各種ヒト型「スーパー抗体酵素」の試験を行ったものである。グラフの縦軸はガン細胞の生存率で、横軸は試験した「スーパー抗体酵素」のクローン名である。棒グラフの高さが低いほど傷害性(抗ガン作用)が強い。横軸左側から2番目に示している PBS は negative control であり、同軸右側2つは抗ガン剤として有名な cisplatin である。この試験した「スーパー抗体酵素」の中では#H クローンが高い肺ガン細胞傷害性を示し、その強さは cisplatin に匹敵するほどである。また、正常細胞に対する毒性も少ないのが特徴である。

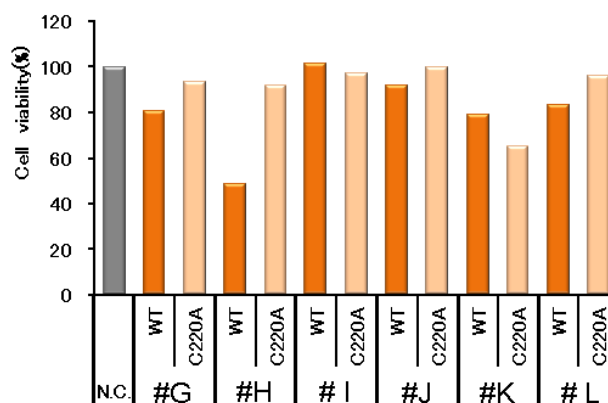


図 4-7-2 肺ガン細胞 (A549 細胞) に対する傷害性

4-8 安全性試験

ヒト型「スーパー抗体酵素」の安全性試験

「スーパー抗体酵素」は抗体軽鎖であり、元来、我々が体内に持っているために毒性は出ないと予測される。そこで、マウス (Balb/c マウス、メス、6週齢) を用いた毒性試験を実施した。

4-8-1 単回尾静脈投与急性毒性試験

ヒト型「スーパー抗体酵素」について、マウスに単回尾静脈内投与した際の急性毒性を明らかにすることを目的とし、雌 BALB/cN Sea マウスに対して、ヒト型「スーパー抗体酵素」溶液 (タンパク質濃度: 1.66 mg/mL) を 0, 100, 300・L/匹で単回尾静脈内投与し、投与後 7 日間の経過観察を行い、

1) 死亡状況及び死亡率、2) 一般状態観察、3) 体重変化、4) 剖検から抗体酵素の毒性を評価した (表 4-8-1)。その結果、最高投与量においても顕著な毒性は確認されなかった。(表 4-8-2, 4-8-3)

そこで、マウスへの投与量の増加を目的として、スーパー抗体酵素溶液を限外ろ過法にて約 10 倍まで濃縮し、マウスに単回尾静脈内投与した際の急性毒性についても同様に評価した。その結果、投与量を上げてもスーパー抗体酵素に顕著な毒性は確認されなかった。

以上のことから、今回検討した投与量及び投与方法では、スーパー抗体酵素はマウスに対して顕著な毒性を示さないことが確認された。

表 4-8-1 試験の条件

投与用量 (mg/kg/day)	投与容量 (mL/kg/day)	濃度 (mg/mL)	群名称	動物数 (動物番号)
0.0	15	0.00	Group-1	3 (1 - 3)
8.3	5	1.66	Group-2	3 (4 - 6)
24.9	15	1.66	Group-3	3 (7 - 9)

表 4-8-2 死亡状況及び死亡率

投与用量 (mg/kg)	観察 動物数	投与後日数								総死亡 動物数	死亡率 (%)
		0	1	2	3	4	5	6	7		
0	3	0*	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8.3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24.9	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*. 死亡動物数
死亡率 = 総死亡動物数 / 観察動物数 × 100.

表 4-8-3 一般観察状態

投与用量 (mg/kg)	所見	投与後日数									
		0	1	2	3	4	5	6	7		
0	異常なし	3 / 3*	3 / 3	3 / 3	3 / 3	3 / 3	3 / 3	3 / 3	3 / 3	3 / 3	3 / 3
8.3	異常なし	3 / 3	3 / 3	3 / 3	3 / 3	3 / 3	3 / 3	3 / 3	3 / 3	3 / 3	3 / 3
24.9	異常なし	3 / 3	3 / 3	3 / 3	3 / 3	3 / 3	3 / 3	3 / 3	3 / 3	3 / 3	3 / 3

* 所見が得られた動物数 / 総観察動物数

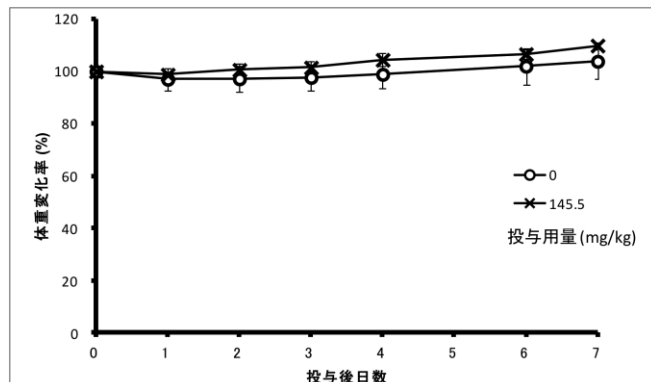


図 4-8-1 最大濃度 (145.5mg/kg) を投与したときのマウスの体重変化

次に、どこまで投与量を上げると異常が見られるかを調べるために、現時点で作製可能な最大濃度(145.5mg/kg)を調製して同様の実験を行った、その時のデータの一部を示す(図 4-8-1)。1週間の経過中および経過後もコントロールと比較して何ら異常は認められない。結論として、BALB/cN Sea マウスにスーパー抗体酵素の 145.1 mg/kg/day を最大用量として単回静脈内投与したところ、死亡はみられなかった。また、体重、剖検においても、被験物質投与に起因すると考えられる異常はみられなかった。

(2)研究成果の今後期待される展開

今後の展開見込:

「スーパー抗体酵素」は、抗体のように分子認識能が高く、かつ、酵素のように抗原のペプチド結合を加水分解し、抗原に機能を「スーパー抗体酵素」単独で消失させるという特徴を持つ、高機能分子である。従って、抗体(抗体医薬を含む)のように補体、マクロファージ、NK細胞、単球などを抗原排除に必要とせず(ADCC 作用)、「スーパー抗体酵素」単独で抗原を無力化できる。このことは、分子標的薬として世界的に開発が行われている抗体医薬を凌ぐ事が期待され、本邦からの革新的医薬品として世界展開が望める。

想定される科学技術や社会への波及効果:

「スーパー抗体酵素」が実用化された時の、科学技術や社会への影響は実に大きい。「スーパー抗体酵素」は分子標的薬で有り、例えば、抗ガン剤について言えば、効能/毒性という総合評価を見た場合、現在の抗ガン剤を凌ぐと思われる。ヒト型「スーパー抗体酵素」に毒性が無い事を実証したのは大きい。有効な「スーパー抗体酵素」が開発できれば、新規な分子標的薬としてガン患者(各種)が救われるばかりでなく、抗インフルエンザウイルス薬としても、タミフルの機能とは異なる(感染をそのものを防ぐ)新薬として大きな社会的貢献をする事になる。

このように多くのガン患者やインフルエンザの予防と治療というように、病気で苦しむ患者や、苦しみを事前に取り除くことで、社会的貢献度は大である。

一方、「スーパー抗体酵素」としての新薬開発は、今の研究スピードで行けば日本が世界最初となる。このために世界特許の取得を目指している。抗体医薬として有名な「ハーセプチン」は乳癌に効果的な薬であるが、今やその売上高はこの一品で年間 5000 億円である。これを開発した企業の利益は甚大なものがあり、世界の製薬企業が抗体医薬の開発に参入しているのが現状である。「スーパー抗体酵素」は抗体医薬品を凌ぐ性能が期待されており、本邦の企業がこの分野に参入すれば大きな利益を生む事になるし、安価に製造できれば医療費の低減に大きく貢献でき、その経済的効果は大きい。

「スーパー抗体酵素」は抗体医薬品のような高額医療ではなく、誰でもが受けられる安価で、かつ、効果の高い治療、子供へのインフルエンザウイルスの感染防御など面白い効果が期待される。

4. 2 INSERM Kaveri グループ

(1)研究実施内容及び成果

Kaveri group による自己免疫疾患患者におけるヒト型抗体酵素の生理学的意義:

目的:「スーパー抗体酵素」の体内動態の解析が主たる狙いである。そのために、患者血清、尿あるいは IVIg から天然型のヒト抗体酵素を取り出し、その生理学的意義を解明する。

研究内容と成果:

- 1) アプロチニン固定化セファロース(アプロチニンはセリンプロテアーゼの阻害剤:これは一種のアフィニティー精製である)を用いて健常人の血清を対象に、このカラムに結合した IgG と

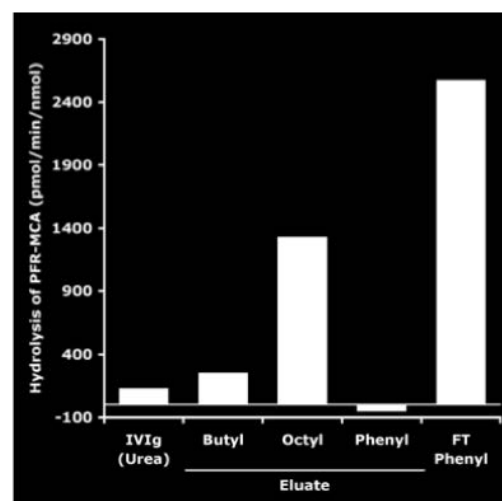


図4. 2-1 IVIGから取得したIgG の PFR-MCAに対する加水分解活性

結合しない IgG を較べたところ、カラムに結合した IgG において強い酵素活性が見られた(活性は peptidyl-MCA のひとつである PFR-MCA 合成基質を用いた)。本法で使用したアフィニティー精製で得られるサンプルは凝集を起こしやすい(これは宇田チームのヒト型抗体酵素の性質と同じである)。そこで、セファロース上にブチル、オクチル、フェニルと疎水性カラムを作製し”Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC)”という手法で IgG の分離・回収を行った。そして酵素活性を PFR-MCA 合成基質分解反応で調べた。その結果を図 4.2-1 に示しているが、フェニル/セファロースで精製したものが非常に高い活性を示し、割合を計算すると IgG 中の 1%程度であった。即ち、非常に少量の高活性な抗体酵素が生理的な現象に関与していることになる(宇田コメント:先の実験で述べた#1 クローン/Ishibashi は精製途中で凝集を起こしたサンプルであり、非常に高いアミダーゼ活性を有していた。同じ現象が KaveriGroup からも見出されている。再現性よく同じ状態のサンプル調製法を確立しなければならない)。

- 2) 天然型抗体酵素として IVIG の他にも polyclonal な IgG や IgM あるいは monoclonal な IgG や IgM の取得を患者血清(敗血症 or Waldenström's マクログロブリン血症など)から分離した。49 人の Waldenström's マクログロブリン血症患者からの IgM は試験した peptidyl-MCA 合成基質 (IIW, F-, A-, R-, QAR-, AR-, K-, LLVW-, EAR-, KA-, IEG-, EKK-)の中で、QAR-MCA と EAR-MCA を強く分解した(宇田コメント:宇田チームで発現させた抗体酵素でも QAR-MCA 基質がほとんどの場合で加水分解を受けていたが、同じような結果が、患者から分離した抗体酵素の場合でも得られている)。
- 3) 天然型抗体酵素を使った敗血症の in vivo 試験

大腸菌を使って敗血症にさせたマウスに polyclonal な天然型抗体酵素を投与したところ、図 4.2-2 に示す結果となった。

敗血症モデルは 0.5 ml の大腸菌 ((WF+) 株:1x10⁹ cells/ml)を投与して作製した。使用した polyclonal な IgG(pIgG)は Fe(II) イオンで処理したものと処理しないもので行った。投与量は 30 mg/kg である。その結果、図 4.2-2 に示すように Fe(II) イオン処理の pIgG からは死んだマウスはいなく、コントロール(PBS)や Fe(II) イオン処理しない pIgG では敗血症でマウスが死亡し、Fe(II) イオン処理 pIgG が敗血症の治療に有効であることが示された。

(宇田コメント:なぜ Fe(II) イオン処理 pIgG が有効で、そうでないのが無効のかは不明である。宇田グループのヒト型「スーパー抗体酵素」で同様な条件で試したが、効果は認められなかった。宇田グループでは前述したように、これに変わる革新的とも言える方法を見出した。これが研究室内で異なる人が行っても同様の結果となった。)

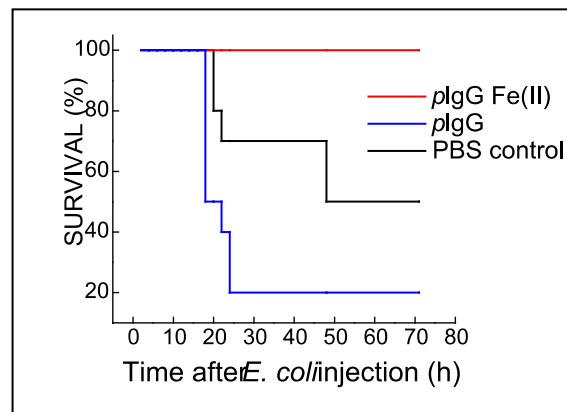


図 4.2-2 天然型抗体酵素を使った敗血症の in vivo 試験

(2)研究成果の今後期待される展開

自己免疫疾患は治りにくいとされている。その原因のひとつが悪性に働く抗体酵素を産生していることにある。従って、酵素活性を抑制する阻害剤の開発が今後の新薬開発として取り組む課題である。また、理由は不明であるが、Fe(II)処理の抗血清が敗血症の治療に有効であると思われ、こうした視点からの新薬も期待される。

§ 5 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内誌 2件、国際誌 26件)

宇田グループ

1. Attomole detection of hemagglutinin molecule of influenza virus by combining an electrochemiluminescence sensor with a immunoliposome that encapsulates a Ru complex. N. Egashira, S. Morita, E. Hifumi, Y. Mitoma, T. Uda, *Anal. Chem.*, **80**, 4020-4025(2008).
2. Emi Hifumi, Fumiko Morihara, Kenji Hatiuchi, Takuro Okuda, Akira Nishizono and Taizo Uda, Catalytic features and eradication ability of antibody light chain UA15-L against *H. pylori*, *J. Biol. Chem.*, **283**(2), 899-907(2008).
3. Rapid detection of BSA protein by electrochemiluminescence sensor combining an immunoliposome which encapsulates a Ru complex, N. Egashira, T. Hirata, E. Hifumi, T. Ohta, T. Uda, *Electrochemistry*, **76**, 579-582(2008).
4. A simple and rapid immunochromatographic test kit for rabies diagnosis. Nishizono A, Khawplod P, Ahmed K, Goto K, Shiota S, Mifune K, Yasui T, Takayama K, Kobayashi Y, Mannen K, Tepsumethanon V, Mitmoonpitak C, Inoue S, Morimoto K. *Microbiol Immunol.* 2008; **52**(4):243-9.
5. A pilot study on intradermal vaccination of Japanese rabies vaccine for pre-exposure immunization. Shiota S, Khawplod P, Ahmed K, Mifune K, Nishizono A. *Vaccine.* 2008 Sep 26:6441-6444.
6. Highly sensitive detection of influenza virus hemagglutinin by electrochemiluminescence using immunoliposome, N. Egashira, S. Morita, Y. Mitoma, E. Hifumi, T. Uda, *ECS Transactions*, **16**(11)115-121(2008).
7. ウイルス 1 粒子の超高感度計測に向けて、江頭直義、一二三恵美、宇田泰三、マテリアルインテグレーション、**21**(5)294-298(2008).
8. Wootla B, Rao DN, Friboulet A, Uda T, Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV. 2009. Varied immune response to FVIII: presence of proteolytic antibodies directed to factor VIII in different human pathologies. *Clin Rev Allergy Immunol.* **37**(2): 97-104(2009).
9. Hirano S, Etoh T, Okunaga R, Shibata K, Ohta M, Nishizono A, Kitano S. Reovirus inhibits the peritoneal dissemination of pancreatic cancer cells in an immunocompetent animal model. *Oncol Rep.* **21**(6):1381-1384(2009).
10. Shiota S, Mannen K, Matsumoto T, Yamada K, Yasui T, Takayama K, Kobayashi Y, Khawplod P, Gotoh K, Ahmed K, Iha H, Nishizono A. Development and evaluation of a rapid neutralizing antibody test for rabies. *J Virol Methods.* **161**(1): 58-62(2009)
11. Mitui MT, Bozdayi G, Dalgic B, Bostanci I, Nishizono A, Ahmed K. Molecular characterization of a human group C rotavirus detected first in Turkey. *Virus Genes.* **39**:157-164(2009)
12. Inoue K, Shiota S, Yamada K, Gotoh K, Suganuma M, Fujioka T, Ahmed K, Iha H, Nishizono A. Evaluation of a new tumor necrosis factor- α -inducing membrane protein of *Helicobacter pylori* as a prophylactic vaccine antigen. *Helicobacter.* **14**: 135-143(2009).
13. Emi Hifumi, Kyouhei Higashi and Taizo Uda, "Catalytic digestion of human TNF- α by antibody heavy chain", *FEBS J*, **277**, 3823-3832(2010).
14. Emi Hifumi, Naoko Fujimoto, Kazuya Ishida, Hirokazu Kawawaki and Taizo Uda, "Characteristic features of InfA-15 monoclonal antibody recognizing H1, H3 and H5 subtypes of hemagglutinin of influenza virus A type", *J. Biosci. Bioeng.*, **109**(6), 598-608(2010) (DOI: 10.1016/j.jbiosc.2009.11.020)
15. 塩田星児, Kamruddin Ahmed, 三舟求真人, 西園晃, "日本製狂犬病ワクチン皮内接種法による曝露前免疫の有効性の検討", *感染症学会雑誌*, **84** 巻(1), 9-13 (2010).

16. Kamruddin Ahmed, Selim Ahmed, Marcelo Takahiro Mitui, Aminur Rahman, Luthful Kabir, Abdul Hannan, Akira Nishizono and Osamu Nakagomi. "Molecular characterization of VP7 gene of human rotaviruses from Bangladesh", *Virus Genes*, **40**(3), 347-356(2010) (DOI: 10.1007/s11262-010-0463-x)
17. Takashi Matsumoto, Kentaro Yamada, Kazuko Noguchi, Kantou Nakajima, Kenzo Takada, Pakamatz Khawplod and Akira Nishizono. "Isolation and characterization of novel human monoclonal antibodies possessing neutralizing ability against rabies virus", *Microbiol Immunol.*, **54** (11), 673-683(2010).
18. B. Wootla, A. Mahendra, J. D. Dimitrov, A. Friboulet, A. Borel-Derlon, D. N. Rao, T. Uda, J-Y Borg, J. Bayry, S. V. Kaveri, S. Lacroix-Desmazes, "Factor VIII-hydrolyzing IgG in acquired and congenital hemophilia", *FEBS Lett.*, **583**, 2565-2572(2009).
19. Moazzem Hossain, Tania Bulbul, Kamruddin Ahmed, Ziauddin Ahmed, Mohammad Salimuzzaman, Mohammad Shahidul Haque, Ajmat Ali, Shohrab Hossain, Kentaro Yamada, Kazuhiko Moji and Akira Nishizono. "Five year (January 2004 – December 2008) surveillance on animal bite and rabies vaccine utilization in the Infectious Disease Hospital, Dhaka, Bangladesh", *Vaccine.*, **29**, 1036-1040(2011).
20. Emi Hifumi, Shinnichi Takao, Naoko Fujimoto, Taizo Uda, Catalytic and biochemical features of a monoclonal antibody heavy chain, JN1-2, raised against a synthetic peptide with hemagglutinin molecule of influenza virus, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**(38), 15015-24(2011).
21. Takashi Matsumoto, Kamruddin Ahmed, Omala Wimalaratne, Kentaro Yamada, Susilakanthi Nanayakkara, Devika Perera, Dushantha Karunanayake, Akira Nishizono. Whole genome analysis of a human rabies virus from Sri Lanka. *Arch Virol.* 2011 156: 659-669.
22. Takashi Matsumoto, Kamruddin Ahmed, Omala Wimalaratne, Susilakanthi Nanayakkara, Devika Perera, Dushantha Karunanayake, and Akira Nishizono: Novel sylvatic rabies virus variant in endangered golden palm civet, Sri Lanka. *Emerg Infect Dis.* 2011 17(12): 2346-2349
23. Moazzem Hossain, Kamruddin Ahmed, Tania Bulbul, Sohrab Hossain, Rahman A, Nezam Uddin Biswas, Akira Nishizono: Human rabies in rural Bangladesh. *Epidemiol Infect.* 2011 Dec 20:1-8.
24. Kentaro Yamada, Chun-Ho Park, Kazuko Noguchi, Daisuke Kojima, Tatsuya Kubo, Naoyuki Komiya, Takashi Matsumoto, Marcelo Takahiro Mitui, Kamruddin Ahmed, Kinjiro Morimoto, Satoshi Inoue, Akira Nishizono: Serial passage of a street rabies virus in mouse neuroblastoma cells resulted in attenuation: Potential role of the additional N-glycosylation of a viral glycoprotein in the reduced pathogenicity of street rabies virus. *Virus Res.* 2012 165: 34-45.
25. Bharath Wootla, Olivier D. Christophe, Ankit Mahendra, Jordan D. Dimitrov, Johann Repesse, Veronique Ollivier, Alain Friboulet, Annie Borel-Derlon, Herve Levesque, Jeanne-Yvonne Borg, Sebastien Andre, Jagadeesh Bayry, Thierry Calvez, Srinivas V. Kaveri, Sebastien Lacroix-Desmazes, Proteolytic antibodies activate factor IX in patients with acquired hemophilia, *Blood*, **117**, 2252-2264(2011).
26. Emi Hifumi, Eijirou Honjo, Naoko Fujimoto, Mitsue Arakawa, Akira Nishizono, Taizo Uda: Highly efficient method of preparing human catalytic antibody light chains and their biological characteristics. *FASEB J.* **26**, 1607-1615(2012).

(2)その他の著作物

総説

1. 「感染症の検出と克服」～抗体とスーパー抗体酵素の展開～
一二三恵美、化学と工業 10月号、986-988(2009).
2. 神経系の再興感染症と輸入感染症 狂犬病 *Brain and Nerve*(神経研究の進歩). 西園 晃、61(2), 135-144 (2009).
3. 「胃癌予防とリスクファクター「*H. pylori*」発癌の分子メカニズム(1)総論」、西園 晃、臨床消化器内科 124(4), 401-403(2009).
4. 最近注目される微生物-その臨床的意義と検査法(Part2 ウイルス)「イムノクロマトキットによる狂犬病の迅速簡便検査法」、山田 健太郎、西園 晃、臨床と微生物, 36(3), 263-267(2009).
5. Ankit Mahendra, Se´verine Padiolleau-Lefevre⁵, Srinivas V. Kaveri, Se´bastien Lacroix-Desmazes, Do proteolytic antibodies complete the panoply of the autoimmune response in acquired haemophilia A?, *British Journal of Haematology*, 156, 3-12(2011)

著書

1. 江頭直義、一二三恵美、宇田泰三
先進化学センサ、第3章第3節担当、pp307-311、2008年6月電気化学会化学センサ研究会編(ティー・アイ・シー発行)
2. 「感染症と発がん」、伊波 英克、藤岡 利生、西園 晃、跡見裕監修、「がん診療 update」日本医師会雑誌特別号、(2009).
3. 江頭直義・阪口利文、「バイオチップ実用化ハンドブック」化学発光、pp74-80, NTS、2010年4月8日
4. 西園 晃:カラー版 ミムス微生物学初版(分担翻訳)、p260-324, 西村書店 2012

(3) 国際学会発表及び主要な国内学会発表

①招待講演 (国内会議 17件、国際会議4件)

(国内会議)

- 1.第3回産業用酵素シンポジウム、「アンチゲナーゼの機能と応用」 産業総合研究所・九大農学部主催(九州大学国際ホール) (2008.3.7) 一二三恵美
- 2.高機能分子「アンチゲナーゼ(スーパー抗体酵素)」の目指すもの 宇田泰三(第24回日本DDS学会、2008.6.30 東京)
- 3.医療診断分野におけるナノバイオ技術～スーパー抗体酵素～、宇田泰三 大阪工研協会 第78回ニューフロンティア材料部会例会(大阪、平成21年7月14日)
- 4.スーパー抗体酵素(Antigenase)の機能と応用 一二三恵美、第33回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム(平成21年9月10日-12日、唐津シーサイドホテル)
- 5.「スーパー抗体酵素の最近の研究」、一二三恵美、高分子討論会、(熊本大学、2009.9.16-18)
- 6.触媒・酵素・抗体の共通点と違いについて～スーパー抗体酵素の発見とその後の展開～ 宇田泰三、触媒学会 第104回触媒討論会 (宮崎大学、平成21年)
- 7.リポソームと電解発光法を組合わせた超高感度(atto mole)検出 江頭直義(バイオ高分子研究会、2009.9.18-19 熊本)
- 8.一二三恵美、「Antigenase が人生を変えた!?!」、生物工学若手研究者の集い、倉敷シーサイドホテル、平成22年7月3日
- 9.一二三恵美、「ヒト型 Antigenase の設計と創製」、高分子討論会、札幌、平成22年9月16日
- 10.一二三恵美、「スーパー抗体酵素(Antigenase)による標的分子の狙い撃ち -HIV, *H. pylori*, Influenza virusを例にして-」、第42回日本臨床検査自動分析学会、神戸、平成22年10月9日

11. 一二三恵美、「スーパー抗体酵素(Antigenase)でウィルスを叩く」、G-COE 生体関連科学セミナー、名古屋大学、平成 22 年 11 月 16 日
12. 宇田泰三、「高機能分子“スーパー抗体酵素”について」、研究開発技術交流会、宮崎シーガイア、平成22年10月29日
13. 「完全ヒト型スーパー抗体酵素(Human Antigenase)の取得方法とその性質」、日本バイオマテリアル学会・九州ブロックキックオフミーティング、九州大学医学部百年講堂、平成23年3月23日
14. 宇田泰三、「完全ヒト型スーパー抗体酵素(Human Antigenase)の取得方法とその性質」、日本バイオマテリアル学会・九州ブロックキックオフミーティング、九州大学医学部百年講堂、平成23年3月23日
15. 西園 晃、「狂犬病について」 和歌山県獣医師会 狂犬病予防等に関する研修会 2011.2.28 和歌山県民文化会館
16. 「ヒトの狂犬病と最新の狂犬病研究の話題」 大分県獣医師会 平成 23 年度狂犬病対策講習会 2012.2.19 大分県教育会館
17. 宇田泰三、「ナノバイオ材料」としての「スーパー抗体酵素」、第1回 ISIT ナノ・バイオフィオーラム、((財)九州先端科学技術研究所、平成25年2月22日)

(国際会議)

1. Perspectives of catalytic antibodies targeting crucial antigens relating to the cause of infectious diseases, T. Uda, E. Hifumi (Protein and Peptide Conference 2008, Shenzhen, China, April 22-24, 2008)
2. First ilmmpa Indonesia international seminar on science and technology 2009 (Key note lecture: Oct. 24-25,2009 Bukittinggi, West sumatera, Indonesia). Highly sensitive detection of influenza virus hemagglutinin by electrochemi- luminescence, N. Egashira, S. Morita, E. Hifumi, T. Uda
3. Akira Nishizono, Kentaro Yamada, Naoto Ito, Satoshi Inoue, Chun-Ho Park Pathogenesis and immune evasion of rabies virus in the mouse infection model 45th Joint Working Conference on immunology and Viral Diseases US-Japan Cooperative Medical Science Program June 20-22,2011 Stanford University Palo Alto, CA
4. Taizo Uda and Emi Hifumi, Preparation and features of Human antigenase (catalytic antibodies), Research Seminar for Department of Pathology of University of Texas-Houston (April 15, 2011)

②口頭発表(国内会議 85 件、国際会議 20 件)

(国内会議)

1. 2007 年日本化学会西日本大会(平成 19 年 11 月 10-11 日、岡山大学)インフルエンザウイルスヘマグルチニンの新規電解発光分析 江頭直義、森田慎一、三苫好治、一二三恵美、宇田泰三
2. 第3回バイオ関連化学合同シンポジウム (2008.9.20, 東京) ヒト型抗体酵素の創製に向けて、宇田泰三、一二三恵美、西園晃
3. 日本化学会第89春季年会(2009.3.27-31, 船橋) インフルエンザウイルスのヘマグルチニンの保存領域に対するモノクローナル抗体を用いた ELISA、石田和也、一二三恵美、宇田泰三
4. 日本化学会第89春季年会(2009.3.27-31, 船橋) インフルエンザウイルスヘマグルチニンに対するモノクローナル抗体 Inf-A 抗体シリーズの生化学的性質、藤本尚子、一二三恵美、宇田泰三
5. 日本化学会第89春季年会(2009.3.27-31, 船橋) TNF α に対する IgM モノクローナル抗体 ETNF series の酵素活性の検討、東 教平、一二三恵美、宇田泰三
6. 日本化学会第89春季年会(2009.3.27-31, 船橋) インフルエンザウイルスヘマグルチニン

- に対するモノクローナル抗体 Inf-A-15 軽鎖の発現、八尋隆明、一二三恵美
7. 日本化学会第89春季年会(2009.3.27-31, 船橋) ヒト型抗体軽鎖 germline gene A3/19 #7 クローンの作製と諸性質、坂田寛幸、一二三恵美、宇田泰三
 8. 日本化学会第89春季年会(2009.3.27-31, 船橋) ヒト型抗体軽鎖 germline gene A18b の作製と諸性質、池上大河、一二三恵美、宇田泰三
 9. 日本化学会第89春季年会(2009.3.27-31, 船橋) ヒト型抗体軽鎖 germline gene A17 #16 クローンの作製と諸性質、神田真志、一二三恵美、宇田泰三
 10. 日本化学会第89春季年会(2009.3.27-31, 船橋) インフルエンザウイルスヘマグルチニンに対するモノクローナル抗体 Inf-A 抗体シリーズの物理化学的性質、河脇弘和、藤本尚子、一二三恵美、宇田泰三
 11. 日米医学協力計画・第 42 回日米合同ウイルス性疾患専門部会(平成 20 年 5 月 26 日～28 日 長崎市)
 12. Kazuyo Goto : Possible role of dendritic cell in the transmission of rabies virus
 13. 第 7 回みちのくウイルス塾(日本ウイルス学会後援)(平成 20 年 7 月 19 日～20 日仙台市) 西園 晃: 狂犬病ウイルス
 14. 第 45 回日本ウイルス学会九州支部総会(平成 20 年 10 月 3 日～4 日 熊本市) 塩田星児、後藤和代、西園 晃: 狂犬病ウイルス感染成立における樹状細胞の役割とワクチン効果
 15. 第 56 回日本ウイルス学会(平成 20 年 10 月 26 日～28 日 岡山市) 塩田星児、松本 昂、Khawplod Pakamat, 後藤和代、Kamruddin Ahmed、万年和明、三舟求真、西園 晃: 狂犬病中和抗体価迅速測定キットの開発とその評価
 16. 第 12 回日本ワクチン学会(平成 20 年 11 月 8 日～9 日 熊本市) 塩田星児、Kamruddin Ahmed、万年和明、三舟求真、西園 晃: 狂犬病中和抗体価迅速測定キットの開発とその評価
 17. 第54回ポーラグラフィー及び電気化学討論会、(平成 20 年 11 月 23 日、熊本) イムノリポソームと電解発光を組み合わせた新規手法によるインフルエンザウイルスの検出、江頭直義、森田慎一、高尾信一、一二三恵美、宇田泰三
 18. 日本化学会第89春季年会、(平成21年3月 船橋) 電解発光内封リポソームを用いるインフルエンザウイルスの迅速検出(2)、江頭直義、九島充幸、高尾信一、三苦好治、一二三恵美、宇田泰三
 19. 第 83 回日本感染症学会総会 (平成 21 年 4 月 23-24 日 東京) 狂犬病中和抗体価迅速測定キットの開発とその評価、塩田、万年、西園
 20. 第19回バイオ高分子研究会(東大先端研、平成21年7月29-30日) 「完全ヒト型スーパー抗体酵素の作製に向けて」宇田、一二三
 21. 第 46 回日本ウイルス学会九州支部総会 (平成 21 年 9 月 4-5 佐賀) 新規 Tax 結合性蛋白質 Tax1bp1 の自然免疫系における役割と ATL 細胞内での動態
 22. 第 46 回日本ウイルス学会九州支部総会 (平成 21 年 9 月 4-5 佐賀) 抗狂犬病ウイルスヒト型モノクローナル抗体の作成とその性状解析 松本、山田、高田、西園
 23. 第46回日本ウイルス学会九州支部総会 (平成 21 年 9 月 4-5 佐賀) Molecular analysis of genes encoding the NSP4, VP4, VP6, and VP7 of unique human group C rotavirus first detected in Turkey M.T.Mitui, A.Nishizono, K.Ahmed
 24. 平成21年度生物工学会(名古屋大学、平成21年9月23-25日) 「スーパー抗体酵素」(Antigenase)の創製～完全ヒト型配列の確立に向けて～ 宇田、一二三
 25. 平成21年度生物工学会(名古屋大学、平成21年9月23-25日) A 型インフルエンザウイルスのヘマグルチニン(HA)高度保存領域に反応するモノクローナル抗体 InfA-15 の性質と発現、一二三、宇田
 26. バイオテクノロジー部会(九州大学:平成21年9月13-15日) 重要な A 型インフルエンザウイルスに反応する抗体の作製とその性質 一二三、藤本、石田、河脇、宇田
 27. 第 68 回日本癌学会 (平成 21 年 10 月 1-3 日) 東京 TAX1BP1 の生理的機能と ATL 細胞内での挙動 伊波、池辺、中原、松本、三井、西園

- 28.第 57 回日本ウイルス学会 (平成 21 年 10 月 25-27 日 東京)ATL における炎症病態と Tax1bp1 の機能相関性 伊波, 池辺, 井上, 松本, 三井, 緒方, 田中, K. Jeang, 西園
- 29.第 57 回日本ウイルス学会 (平成 21 年 10 月 25-27 日 東京)抗狂犬病ウイルスヒト型モノクローナル抗体の作成 松本, 山田, 高田, 西園
- 30.日本化学会第90春季年会 (2009.3.26-29, 東大阪)ヒト型抗体軽鎖の発現系の改良、佐藤、坂田、一二三、西園、宇田
- 31.日本化学会第90春季年会 (2009.3.26-29, 東大阪) ヒト型抗体軽鎖の germline gene A3/A19 への変異導入と諸性質 神田、石橋、一二三、宇田
- 32.日本化学会第90春季年会 (2009.3.26-29, 東大阪) ヒト型抗体軽鎖の germline gene A3/A19 #7 クロンの諸性質 坂田、一二三、西園、宇田泰三
- 33.日本化学会第90春季年会 (2009.3.26-29, 東大阪) インフルエンザウイルスヘマグルチニンに対するモノクローナル抗体 InfA-15 軽鎖の発現と諸性質 八尋、藤本、一二三、宇田
- 34.日本化学会第90春季年会 (2009.3.26-29, 東大阪) インフルエンザウイルスのヘマグルチニンに対する JN1-2 抗体の緒性質と発現 河脇、一二三、宇田
- 35.日本化学会第90春季年会 (2009.3.26-29, 東大阪) ヒト型抗体軽鎖の germline gene A3/A19 #13 クロンの発現と諸性質 岩男、一二三、西園、宇田
- 36.日本化学会第90春季年会 (2009.3.26-29, 東大阪) ヒト型抗体軽鎖の germline gene A18b #6 クロンの発現と諸性質 吉岡、一二三、西園、宇田
- 37.第 13 回日本がん分子標的治療学会 H21/6/25-6/26 徳島市、可食農水由来 NF- κ B 制御成分による抗 ATL 効果とその作用機序」、伊波
- 38.第 50 回日本熱帯医学会 H21/10/22-23 那覇市「スリランカにおける狂犬病ウイルス迅速抗原診断キットの有用性と分子系統学的解析」松本 昂, 山田 健太郎, アハメド カムルディン, 西園 晃
- 39.第 50 回日本熱帯医学会 H21/10/22-23 那覇市「ロタウイルス遺伝子型:香港、スリランカ、トルコ株に G3 と G9 タイピングによるプライマーミスマッチング」三井 マルセロ 孝広, アハメド カムルディン, 西園 晃
- 40.第 57 回日本ウイルス学会 21/10/25-27 東京都「スリランカにおける狂犬病ウイルスの診断とその分子系統学的解析」松本 昂, 山田 健太郎, Ahmed Kamruddin, 西園 晃
- 41.第 57 回日本ウイルス学会 21/10/25-27 東京都「Molecular analysis of genes encoding the NSP4, VP4, VP6, and VP7 of unique human group C rotavirus first detected in Turkey」三井 孝広, 西園 晃, アハメド カムルディン
- 42.佐藤真季・一二三恵美・西園晃・宇田泰三、「ヒト型抗体軽鎖の発現系の改良」、第90春季日本化学会年会、大阪(近畿大学)、平成22年3月26-29日
43. 東教平・西頭恵梨・一二三恵美・宇田泰三、「TNF- α に対するモノクローナル抗体 ETNF series の酵素活性」、第90春季日本化学会年会、大阪(近畿大学)、平成22年3月26-29日
- 44.八尋隆明・藤本尚子・一二三恵美・宇田泰三、「インフルエンザウイルスヘマグルチニンに対するモノクローナル抗体 InfA-15 軽鎖の発現と諸性質」、第90春季日本化学会年会、大阪(近畿大学)、平成22年3月26-29日
- 45.吉岡智美・一二三恵美・西園晃・宇田泰三、「ヒト型抗体軽鎖#6 クロンの発現と諸性質」、第90春季日本化学会年会、大阪(近畿大学)、平成22年3月26-29日
- 46.坂田寛幸・一二三恵美・西園晃・宇田泰三、「ヒト型抗体軽鎖の germline gene A3/A19 #7 クロンの諸性質」、第90春季日本化学会年会、大阪(近畿大学)、平成22年3月26-29日
- 47.神田真志・石橋尚幸・一二三恵美・宇田泰三、「ヒト型抗体酵素の germline gene A3/A19 への変異導入と諸性質8, ヒト型抗体軽鎖の germline gene A18b の作製と諸性質」、第90春季日本化学会年会、大阪(近畿大学)、平成22年3月26-29日
- 48.一二三恵美・本庄栄二郎・山田健太郎・西園晃・宇田泰三、「ヒト型抗体酵素の作製とその効果」、第19回バイオ高分子研究会、東大先端研、平成 22 年 7 月 28-29 日
- 49.松本昂、Kamruddin Ahmed, Narapati Dahal, Karma Rinzin, 西園晃、「ブータンにお

- ける狂犬病の分子疫学的解析」、第 47 回日本ウイルス学会九州支部総会、宮崎、平成 22 年 9 月 3 日
50. 山田健太郎・野口賀津子・松本昂・三井孝広・アハメド カムルディン・西園晃、「狂犬病ウイルス街上毒のMNA細胞での連続継代による末梢感染性減弱変異株の樹立」、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島市、平成 22 年 11 月 8 日
 51. 渡辺一平・西園晃、「狂犬病ウイルス中和抗体価迅速検査キットの有用性」、第 14 回日本ワクチン学会学術集会、東京都、平成 22 年 12 月 12 日
 52. 松本昂・Kamuruddin Ahmed, Omala Wimalaratne・山田健太郎・Susilakanthi Nanayakkara, Devika Perera・西園晃、「スリランカにおける狂犬病ウイルスの全ゲノム配列の決定とそれに基づく分子疫学的解析」、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島市、平成 22 年 11 月 9 日
 53. 松本昂・Dushantha Karunanayake, 小林 祐司・Omala Wimalaratne, Susilakanthi Nanayakkara, Devika Perera, Kamruddin Ahmed・西園 晃、「1999 年から 2009 年までのスリランカにおける狂犬病の調査」、第 51 回日本熱帯医学会大会、仙台市、平成 22 年 12 月 3 日
 54. 宇田泰三・坂田寛幸・神田真志・吉岡智美・岩男奈々・一二三恵美、「完全ヒト型抗体軽鎖の germline gene (subgroup II) に由来するクローンの発現とその性質」、平成 22 年度生物工学会、宮崎シーガイア、平成 22 年 10 月 27-29 日
 55. 一二三恵美・東教平・宇田泰三、「TNF-alpha に対する抗体酵素 ETNF-12 および-13 の検討」、平成 22 年度生物工学会、宮崎シーガイア、平成 22 年 10 月 27-29 日
 56. 吉田稔・井上高教・倉内芳秋、「マイクロチャンネルプレートを用いた抗原抗体反応装置の開発 II」、日本分析化学会第 59 年会(2010.9.15).
 57. 山田 健太郎, 野口 賀津子, 西園 晃「狂犬病ウイルス街上毒 G タンパク質における N 型糖鎖の追加は細胞からのウイルス粒子の放出を促進する」第 48 回日本ウイルス学会九州支部総会 北九州市 2011.8.26-27
 58. 松本 昂, Kamruddin Ahmed, Moazzem Hossain, Khondoker Mahabuba Jamil, Mohammad Azmat Ali, Sohrab Hossain, Shakawet Hossain, Aminul Islam, Nasir Uddin, 西園 晃「バングラデシュにおける狂犬病の分子疫学的解析」第 48 回日本ウイルス学会九州支部総会 北九州市 2011.8.26-27
 59. 西園 晃, 渡辺 一平 「狂犬病ワクチン接種前後のウイルス中和抗体価を定性的・半定量的に測定できるイムノクロマト法の開発とその大規模評価」第81回日本感染症学会西日本地方会学術集会 北九州市 2011.10.6-8
 60. 松本 昂, Ahmed Kamruddin, Wimalaretne Omala, Nanayakkara Susilakanthi, Perera Devika, Karunanayake Dushantha, 西園 晃「スリランカにおける森林型狂犬病 Identification of novel sylvatic rabies virus variant in endangered golden palm civit in Sri Lanka.」第 52 回日本熱帯医学会大会 東京都 2011.11.4-6
 61. 高本 麻衣, 廣田 勝己, 本庄 栄二郎, 一二三 恵美, 宇田 泰三, ヒト型抗体軽鎖の高純度精製とキャラクターゼーション (第91春季日本化学会年会(横浜(神奈川大学横浜キャンパス)、平成23年3月26-29日)
 62. 笹野泰通, 廣田勝己, 高本麻衣, 一二三恵美, 宇田泰三, ヒト型スーパー抗体酵素の各種酵素活性性能 (第91春季日本化学会年会(横浜(神奈川大学横浜キャンパス)、平成23年3月26-29日)
 63. 森口智尋, 廣田勝己, 高本麻衣, 本庄英二郎, 一二三恵美, 宇田泰三, ヒト型抗体酵素の DNA 分解活性に 関する研究(I) (第91春季日本化学会年会(横浜(神奈川大学横浜キャンパス)、平成23年3月26-29日)
 64. 藤本尚子, 八尋隆明, 一二三恵美, 宇田泰三, A 型インフルエンザウイルスヘマグルチニンに対する InfA-15 抗体の活性評価 (第91春季日本化学会年会 (横浜(神奈川大学横浜キャンパス)、平成23年3月26-29日)
 65. 飯倉 陵 1, 園田 沙理, 本庄 栄二郎, 一二三 恵美, 宇田 泰三, ヒト型抗体酵素の細

- 胞傷害性に関する研究 (第91春季日本化学会年会(横浜(神奈川大学横浜キャンパス)、平成23年3月26-29日)
66. 一二三恵美、藤本尚子、本庄栄二郎、宇田泰三 「新型医薬品を指向したヒト型抗体酵素の作製～いくつかの特徴的なクローンについて～」 第20回バイオ高分子シンポジウム(東大先端研、平成23年7月25-26日)
 67. 本庄栄二郎、一二三恵美、西園晃、宇田泰三、ヒト生殖細胞系列(germline) 遺伝子由来抗体軽鎖の発現・精製および抗体酵素としての性質、日本生化学会(京都国際会館、平成23年9月21-24日)
 68. 一二三恵美、高本麻衣、廣田勝巳、本庄栄二郎、宇田泰三、完全ヒト型抗体軽鎖の高純度精製と抗体酵素活性、日本生物工学会(東京農工大学、平成23年9月26-28日)
 69. 藤本尚子、一二三恵美、宇田泰三、インフルエンザウイルス(A型)のヘマグルチニンに対するInfA-15 抗体の抗体酵素としての性質、日本生物工学会(東京農工大学、平成23年9月26-28日)
 70. 森口智尋、廣田勝巳、高本麻衣、本庄栄二郎、一二三恵美、宇田泰三、ヒト型抗体酵素のDNA 分解活性に関する研究(II)、日本生物工学会(東京農工大学、平成23年9月26-28日)
 71. 飯倉 陵、園田 沙理、一二三恵美、宇田泰三、各種ヒト型抗体酵素の細胞傷害性と特異性、日本生物工学会(東京農工大学、平成23年9月26-28日)
 72. 伊東千陽・森口千尋・一二三恵美・宇田泰三、ヒト型「スーパー型抗体酵素」による核酸分解活性と動力学的検討、第92春季日本化学会年会(神奈川:慶応義塾大学日吉キャンパス、平成24年3月25-28日)
 73. 園田沙理・飯倉陵・本庄栄二郎・一二三恵美・宇田泰三、ヒト型抗体酵素の癌細胞傷害性に関する研究、第92春季日本化学会年会(神奈川:慶応義塾大学日吉キャンパス、平成24年3月25-28日)
 74. 長谷川裕晃・一二三恵美・宇田泰三、ヒト型抗体酵素遺伝子の発現と生化学的性質について ～Subgroup III～、(神奈川:慶応義塾大学日吉キャンパス、平成24年3月25-28日)
 75. 藤本尚子・一二三恵美・宇田泰三、A 型インフルエンザウイルスに有効な ヒト型抗体酵素 Antigenase(神奈川:慶応義塾大学日吉キャンパス、平成24年3月25-28日)
 76. 一二三恵美、西園晃、宇田泰三、 狂犬病ウィルスの感染を抑制するヒト型「スーパー抗体酵素」、第21回バイオ高分子研究会(東大先端研、平成24年6月25-26日)
 77. 藤本尚子 1,3・高本麻衣 1・西頭恵梨 1・一二三恵美 2,3・宇田泰三、A 型インフルエンザウイルスに有効なヒト型抗体酵素の性質、第15回バイオテクノロジー部会(北海道大学、平成24年9月6-8日)
 78. 笹野泰通、藤本尚子、渡辺愛美、一二三恵美、宇田泰三、新たなヒト型抗体酵素遺伝子ライブラリーの作製及びスクリーニング～Germline gene Subgroup II～、第64回日本生物工学会(神戸国際会議場、2012,10.23-26)
 79. 竹添 文香、一二三恵美、宇田泰三、A 型インフルエンザウイルスの HA に対する JN1-2 抗体重鎖の遺伝子工学的作製、第64回日本生物工学会(神戸国際会議場、2012,10.23-26)
 80. 森山和基、飯倉陵、園田沙理、一二三恵美、宇田泰三、ヒト型抗体軽鎖の細胞傷害性、第64回日本生物工学会(神戸国際会議場、2012,10.23-26)
 81. 一二三恵美、藤本尚子、宇田泰三、スーパー抗体酵素(Antigenase)の生理学的活性と生成機構、(第93 春季日本化学会年会、立命館大学びわこ・くさつキャンパス、平成23年3月22-25日)
 82. 園田沙理、一二三恵美、宇田泰三、ヒト型抗体軽鎖の A549(肺胞上皮がん細胞)に対する細胞傷害性、(第93 春季日本化学会年会、立命館大学びわこ・くさつキャンパス、平成23年3月22-25日)
 83. 渡辺愛美、一二三恵美、宇田泰三、ヒト型抗体軽鎖ライブラリーの作製と癌細胞傷害性に関する研究、(第93 春季日本化学会年会、立命館大学びわこ・くさつキャンパス、平成23年3月22-25日)

84. 楠木智也、園田沙理、小野将来、一二三恵美、宇田泰三、ヒト型スーパー抗体酵素 (Antigenase) によるガン細胞傷害性の検討、(第93 春季日本化学会年会、立命館大学びわこ・くさつキャンパス、平成23年3月22-25日)
85. 竹添文香、藤本尚子、一二三恵美、宇田泰三、A 型インフルエンザウイルスの H に対する JN1-2 抗体重鎖の反応性、(第93 春季日本化学会年会、立命館大学びわこ・くさつキャンパス、平成23年3月22-25日)

(国際会議)

1. International Congress of Virology (2008.8.10~15.Turkey) K. Ahmed, P. Khawplod, A. Nishizono : A Simple and Rapid Immunochromatographic Test Kit for The Diagnosis of Rabies.
2. Pacific Rim Meeting on electrochemical and solid-state science, (Honolulu, Oct. 12-17, 2008) Highly sensitive detection of influenza virus hemagglutinin by lectrochemiluminescence using immunoliposome, N. Egashira, S. Morita, Y. Mitoma, E. Hifumi, T. Uda
3. Perspectives of “Super catalytic antibodies (Antigenase)” for prevention from the infection of influenza virus type A, T. Uda, E. Hifumi, The 3rd International Conference on Influenza Vaccine for the World (FRANCE, Cannes, 2009. 4. 27-30)
4. The 13th Asian Chemical Congress, Sep. 13-16, 2009 (Shanghai, China) Rapid detection of influenza virus by an electrochemiluminescence sensor combining an immunoliposome, N. Egashira, M. Kushima, S. Takao, Y. Mitoma, E. Hifumi, T. Uda.
5. The 14th International conference on HTLV H21/6/29-7/6 Brazil 「Tax1BP1 in ATL cells」Iha H, Nishizono A, Ikebe E, Peloponese J, Jeang K, Nakagawa-Motohara M, Ogata M, Yedavalli V R
6. Vaccine 3rd Global Congress (H21/10/3-10/7 Singapore) 「A pilot study on intradermal vaccination of Japanese rabies vaccine for pre-exposure immunization」Nishizono A, Shiota S, Khawplod P, Ahmed K
7. Preparation of human antibody light chain possessing catalytic activity. Taizo Uda, Emi Hifumi, Akira Nishizono, The 15th International Conference on Human Antibodies & Hybridomas, Portugal, Porto, 2010.4.14-16.
8. Taizo Uda, Emi Hifumi, Akira Nishizono, “Prospect and preparation of human catalytic antibody”, PacifiChem 2010, Honolulu, 2010.12.15-20
9. Akira Nishizono, “Development of rapid diagnosis for rabies based on the principle of immunochromatography and its utility in rabies-endemic countries” Emerging and Re-emerging Vector-borne and Zoonotic Viral Infectious Diseases in Southeast Asia meeting, Hanoi, Vietnam, 2010.9.9-10
10. Emi Hifumi, Akira Nishizono, Taizo Uda, “Expression and purification method of human antibody light chains showing amidase activity”, The 15th International Conference on Human Antibodies & Hybridomas, Portugal, Porto, 2010.4.14-16
11. Akira Nishizono, “Development of rapid diagnosis for rabies based on the principle of immunochromatography and its utility in rabies-endemic countries”, Asia・Africa・REseacr Forum 2010, Hanoi, Vietnam, 2010.11.12
12. Kentaro Yamada, Kazuko Noguchi, Takashi Matsumoto, Takahiro M Mitsui, Kamruddin Ahmed, Akira Nishizono. “A Candidate for a Viral Element Related to Street Rabies Virus Pathogenicity Following Peripheral Infection.” 15th International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS2011), Sapporo 2011 Sep 11-16
13. Emi Hifumi, Taizo Uda. Cytotoxicity of human antibody light chains against cancer cells (The 16th International Conference on Human Antibodies & Hybridomas (Cannes, France, December 7-9, 2011))
14. Taizo Uda, Akira Nishizono, Emi Hifumi, Catalytic human antibody light chains

- showing anti-virus activity (The 16th International Conference on Human Antibodies & Hybridomas (Cannes, France, December 7-9, 2011))
15. Takashi Matsumoto, Kamruddin Ahmed, Moazzem Hossain, Khondoker Mahabuba Jamil, Mohammad Azmat Ali, Sohrab Hossain, Shakawet Hossain, Aminul Islam, Nasir Uddin, Akira Nishizono. "Prevalence of Arctic-Like Rabies in Bangladesh." 15th International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS2011), Sapporo 2011 Sep 11-16
 16. Kamruddin Ahmed, Omala Wimalaratne, Narapati Dahal, Pakamat Khawplod, Susilakanthi Karunanayake, Takashi Matsumoto, Akira Nishizono. "Development and Evaluation of a Rapid Immunochromatographic Test for the Direct Detection of Rabies Virus in Brain Samples from Humans and Animals." 15th International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS2011), Sapporo 2011 Sep 11-16
 17. Akira Nishizono, Kentaro Yamada, Ippei Watanabe, Futoshi Hasebe, Nguyen Thi Thu Thuy, Le Thi Quynh Mai, Dang Tuan Dat. "Lyssavirus infection of bats in northern Vietnam and seroprevalence of anti-rabies neutralizing antibodies of individuals in Vietnam." Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections, Kobe, 2012 January 11-12, 2012
 18. Taizo Uda, Akira Nishizono, Emi Hifumi, Development of catalytic human antibody light chains (Antigenases) showing suppression of rabies virus infection. The 17th International Conference on Human Antibodies and Hybridomas, Florida, USA, 2012 November 7-9.
 19. Emi Hifumi, Taizo Uda, Human antibody light chains (antigenases) showing cytotoxicity against cancer cells. The 17th International Conference on Human Antibodies and Hybridomas, Florida, USA, 2012 November 7-9.
 20. Naoko Fujimoto, Emi Hifumi, Taizo Uda, Biological features of human catalytic antibody light chains showing suppressive effect on influenza virus infection. The 17th International Conference on Human Antibodies and Hybridomas, Florida, USA, 2012 November 7-9.

③ポスター発表(国内会議 33件、国際会議 13件)
(国内会議)

1. 第45回化学関連支部九州大会、(平成20年7月5日、北九州市) ルテニウム錯体内封イムノリポソームを用いるBSAタンパクの迅速検出、大田 民、矢隅由紀、宇田泰三、江頭直義
2. 第45回化学関連支部九州大会、(平成20年7月5日、北九州市) ルテニウム錯体内封イムノリポソームを用いるインフルエンザウイルスの迅速検出、九島充幸、濱岡利恒、高尾信一、一二三恵美、宇田泰三、江頭直義
3. 第3回バイオ関連化学合同シンポジウム関連・若手の会、(2008.9.17, 東京) 酵素活性の視点から見たIgM抗体の意味～サイトカインTNF- α に対する天然型抗体酵素の探索～ 東教平、一二三 恵美、宇田 泰三
4. バイオテクノロジー部会(九州大学:平成21年9月13—15日) 完全なヒト型配列をもつ「スーパー抗体酵素」(Antigenase)、一二三、坂田、神田、植木、清家、西園、宇田
5. 第46回化学関連支部合同九州大会(北九州国際会議場、平成21年7月11日)インフルエンザウイルスヘマグルチニンに対するInfA-15抗体軽鎖の効率的な発現と精製、八尋、一二三)
6. 第46回化学関連支部合同九州大会(北九州国際会議場、平成21年7月11日)ヒト型スーパー抗体酵素の創製に向けて(I)～germline geneA18bとA3/A19の発現と諸精製～、坂田、池上、清家、一二三、宇田
7. 第46回化学関連支部合同九州大会(北九州国際会議場、平成21年7月11日)ヒト型スーパー抗体酵素の創製に向けて(II)～germline gene A17についての免疫化学的検討～、神田、一二三、宇田

- 8.第46回化学関連支部合同九州大会(北九州国際会議場、平成21年7月11日)全てのインフルエンザウイルス A 型の HA に対する抗体の ELISA などへの応用、石田、一二三、宇田
- 9.第46回化学関連支部合同九州大会(北九州国際会議場、平成21年7月11日)インフルエンザウイルスの HA に対するモノクローナル抗体 Inf-A series の配列と諸性質の解明、河脇、一二三、宇田
- 10.第46回化学関連支部合同九州大会(北九州国際会議場、平成21年7月11日)インフルエンザウイルスヘマグルチニンに対する InfA 抗体の免疫化学的性質の解析、藤本、一二三、宇田
- 11.第33回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム(平成21年9月10日—12日、唐津シーサイドホテル)ヒト型スーパー抗体酵素の創製に向けて(I)～germline gene A17 についての免疫学的及び化学的性質～ 神田、清家、一二三、宇田
- 12.第33回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム(平成21年9月10日—12日、唐津シーサイドホテル)インフルエンザウイルスの HA に対するモノクローナル抗体 Inf-A series の配列と諸性質の解明、河脇、藤本、一二三、宇田
- 13.第33回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム(平成21年9月10日—12日、唐津シーサイドホテル)ヒト型スーパー抗体酵素の創製に向けて(I)～germline gene A18b と A3/A19 の発現と諸性質～ 坂田、池上、清家、一二三、宇田
- 14.坂田寛幸・一二三恵美・宇田泰三、「ヒト型抗体軽鎖の germline gene A3/A19 の#7 クローンの発現と生化学的性質」、第 47 回化学関連支部合同九州大会、北九州国際会議場、平成 22 年 7 月 10 日
- 15.坂田寛幸・一二三恵美・宇田泰三、「ヒト型抗体軽鎖の germline gene A3/A19 の#7 クローンの発現と生化学的性質」、第 47 回化学関連支部合同九州大会、北九州国際会議場、平成 22 年 7 月 10 日
- 16.一二三恵美・東教平・宇田泰三、「TNF-a に対する抗体酵素の基礎的研究」、第 47 回化学関連支部合同九州大会、北九州国際会議場、平成 22 年 7 月 10 日
- 17.藤本尚子・一二三恵美・宇田泰三、「A 型インフルエンザウイルスヘマグルチニンに対するモノクローナル抗体 InfA シリーズのキャラクタリゼーション」、第 47 回化学関連支部合同九州大会、北九州国際会議場、平成 22 年 7 月 10 日
- 18.吉田稔・井上高教・倉内芳秋、「マイクロチャンネルプレートを用いた抗原抗体反応装置の開発—PCR法によるDNA増幅—」、第 47 回化学関連支部合同九州大会、北九州国際会議場、平成 22 年 7 月 10 日
- 19.内達也・三苫好治・宇田泰三・江頭直義、「リポソームの内包率と電解発光強度に与える資質組成の影響」、第 47 回化学関連支部合同九州大会、北九州国際会議場、平成 22 年 7 月 10 日
- 20.大木充幸・三苫好治・宇田泰三・江頭直義、「イムノリポソームと電解発光を組み合わせた新規タンパク検出法の展開」、第 47 回化学関連支部合同九州大会、北九州国際会議場、平成 22 年 7 月 10 日
- 21.園田沙理、飯倉 陵、本庄栄二郎、一二三恵美、宇田泰三、「完全ヒト型抗体酵素の作製とガン細胞傷害性に関する研究」、第 60 回高分子学会 (大阪、大阪国際会議場、平成 23 年 5 月 25 日～27 日)
- 22.廣田 勝己、高本 麻衣、本庄栄二郎、一二三恵美、宇田泰三、高純度ヒト型抗体軽鎖の作製と酵素的性質、第 60 回高分子学会 (大阪、大阪国際会議場、平成 23 年 5 月 25 日～27 日)
- 23.石橋尚幸、高尾信一、一二三恵美、宇田泰三、「酵素活性をもつヒト型抗体軽鎖の探索～ A18b gene (#1 クローン)の発現、精製、諸性質の検討～」、第48回化学関連支部合同九州大会(北九州国際会議場、平成23年7月9日)
- 24.西頭恵梨、本庄栄二郎、荒川満枝、高尾信一、一二三恵美、宇田泰三、「抗ウイルス活性を有するヒト型「スーパー抗体酵素」の探索、第48回化学関連支部合同九州大会(北九州国際会議場、平成23年7月9日)

25. 笹野泰通, 藤本尚子, 一二三恵美, 宇田泰三, ヒト型スーパー抗体酵素 (Antigenase) の各種酵素活性, 生物工学若手の会 (甲府、平成23年7月 16-17 日)
26. 長谷川裕晃, 一二三恵美, 宇田泰三, ヒト型抗体酵素遺伝子ライブラリーの作製 ～ Subgroup I & III について～生物工学若手の会 (甲府、平成23年7月 16-17 日) (Poster)
27. 飯倉陵, 園田沙理, 一二三恵美, 宇田泰三, 各種ヒト型抗体酵素の細胞傷害性、生物工学若手の会 (甲府、平成23年7月 16-17 日)
28. 廣田勝己, 高本麻衣, 本庄栄二郎, 一二三恵美, 宇田泰三, 高純度ヒト型抗体軽鎖の精製と酵素的性質、生物工学若手の会 (甲府、平成23年7月 16-17 日)
29. 森口智尋, 一二三恵美, 宇田泰三「核酸分解活性を有するヒト型抗体酵素の探索」、第20回バイオ高分子研究会 (東大先端研、平成23年7月25-26日)
30. 長谷川裕晃, 一二三恵美, 宇田泰三 「ヒト型抗体酵素遺伝子ライブラリーの作製 (I) ～ Subgroup I & III について」 第20回バイオ高分子研究会 (東大先端研、平成23年7月25-26日)
31. 渡辺 愛美, 一二三 恵美, 宇田 泰三、「ヒト型抗体酵素遺伝子ライブラリーの作製～胚細胞遺伝子群 Subgroup II からの効率的作製法」、第21回バイオ高分子研究会 (東大先端研、平成24年6月25-26日)
32. 飯倉陵・園田沙理, 一二三恵美, 宇田泰三、ヒト型抗体酵素が示す癌細胞傷害性とその特異性、第15回バイオテクノロジー部会 (北海道大学、平成24年9月6-8日)
33. 松本真吾 1・園田沙理 1・一二三恵美 2,3・宇田泰三、ヒト型「スーパー抗体酵素」#1 クロウンの野生型および変異型による肺胞上皮癌細胞 A549 への傷害活性、第15回バイオテクノロジー部会 (北海道大学、平成24年9月6-8日)

(国際会議)

1. A characteristic monoclonal antibody against hemagglutinin molecule of influenza virus A type. Emi Hifumi, Taizo Uda, The 3rd International Conference on Influenza Vaccine for the World (FRANCE, Cannes, 2009. 4. 27-30)
2. Expression and purification method of human antibody light chains showing amidase activity. Emi Hifumi, Akira Nishizono, Taizo Uda, The 15th International Conference on Human Antibodies & Hybridomas, Portugal, Porto, 2010.4.14-16.
3. Naoko Fujimoto, Emi Hifumi, Taizo Uda, "Catalytic antibody against hemagglutinin molecule for Influenza virus A type", PacifiChem 2010, Honolulu, 2010.12.15-20
4. Eijiro Honjo, Emi Hifumi, Akira Nishizono, Taizo Uda, "Catalytic human antibody light chain suppressing infection of several viruses", PacifiChem 2010, Honolulu, 2010.12.15-20
5. Masashi Kanda, Emi Hifumi, Taizo Uda, "Catalytic activity for some human antibody light chains using mutagenesis technique", PacifiChem 2010, Honolulu, 2010.12.15-20
6. Hiroyuki Sakata, Emi Hifumi, Taizo Uda, "Catalytic features of germline gene A3/A19 of human kappa light chains", PacifiChem 2010, Honolulu, 2010.12.15-20
7. Emi Hifumi, Kyohei Higashi, Taizo Uda, "Super catalytic antibody cleaving human TNFa", PacifiChem 2010, Honolulu, 2010.12.15-20
8. Emi Hifumi, Naoko Fujimoto, Taka-aki Yahiro, Taizo Uda, Immunological and catalytic features of InfA-15 mAb and the light chain raised against hemagglutinin molecule for Influenza virus A type (American Society for Biochemistry and Molecular Biology (ASBMB) at Experimental Biology 2011 - Washington, DC, April 9-13 2011)
9. Taizo Uda, Eijiro Honjo, Emi Hifumi, Effective preparation method of human catalytic antibody light chains (American Society for Biochemistry and Molecular Biology (ASBMB) at Experimental Biology 2011 - Washington, DC, April 9-13 2011)
10. Taizo Uda, Emi Hifumi, Biological features of human catalytic antibody light

chains showing anti-cancer activity, American Society for Biochemistry and Molecular Biology (ASBMB) at Experimental Biology 2012 – San Diego, April 21-25, 2012

11. Emi Hifumi, Naoko Fujimoto, Taizo Uda, Catalytic and Biological Features of Human Light Chains Suppressing of Infection of Influenza Virus A Type, American Society for Biochemistry and Molecular Biology (ASBMB) at Experimental Biology 2012 – San Diego, April 21-25, 2012)
12. Taizo Uda, Emi Hifumi, Preparation of a new molecule, “Super catalytic antibodies (Antigenase)” to prevent from the infection of influenza virus. The 4th International Conference and Exhibition on Influenza Vaccines for the World, Valencia, Spain, 2012, October 9-12.
13. Emi Hifumi, Naoko Fujimoto, Taizo Uda, Human catalytic light chain capable of suppressing the infection of influenza virus. The 4th International Conference and Exhibition on Influenza Vaccines for the World, Valencia, Spain, 2012, October 9-12.

(4)知財出願

①国内出願 (10 件)

1. 発明の名称:リポソーム組成物及びその製造方法並びにそれを用いたアナライトの分析方法
発明者:岡村大輔、村山隆亮、江頭直義
出願人:パナソニック株式会社、県立広島大学
出願日:平成 21 年 7 月 27 日
出願番号 特願 2009-174390
2. 発明の名称:狂犬病ウイルスに対するヒト抗体ならびにその医薬組成物
発明者:高田賢蔵、中島款冬、西園晃
出願人:株式会社 イーベック、大分大学
出願日:平成 21 年 10 月 17 日
出願番号 特願 2009-199962
3. 発明の名称:狂犬病ウイルスに対するヒト抗体ならびにその組成物
発明者:高田賢蔵、中島款冬、西園晃
出願人:株式会社 イーベック、大分大学
出願日:平成 21 年 9 月 30 日
出願番号 特願 2009-226721
4. 発明の名称:A 型インフルエンザウイルスのヘマグルチニン保存領域に反応する抗体
発明者:一二三恵美、宇田泰三
出願人:科学技術振興機構
出願日:平成 22 年 2 月 5 日
出願番号 特願 2010- 35021
5. 発明の名称:プライマーセット、ポリヌクレオチドの製造方法およびポリペプチドの製造方法
発明者:一二三恵美、宇田泰三
出願人:科学技術振興機構
出願日:平成 22 年 2 月 19 日
出願番号 特願 2010- 34998

6. 発明の名称:酵素活性をもつヒト型抗体軽鎖の取得方法および配列
発明者:宇田泰三、一二三恵美、西園晃
出願人:科学技術振興機構
出願日:平成22年2月5日
出願番号 特願 2010- 35021
7. 発明の名称:抗ウイルス剤および抗体酵素
発明者:宇田泰三、西園晃、一二三恵美、荒川満枝
出願人:科学技術振興機構
出願日:平22年4月13日
出願番号特願 2010-092461
8. 発明の名称:PCR用反応器具、PCR用反応キット、PCR用反応器具の製造方法、
及び核酸増幅方法
発明者:宇田泰三、一二三恵美、井上高教
出願人:科学技術振興機構
出願日:平22年5月20日
出願番号 特願 2010-116255
9. 発明の名称:抗インフルエンザ組成物
発明者:宇田泰三、一二三恵美、荒川満枝
出願人:(独)科学技術振興機構
出願日:平成23年10月31日
出願番号:特願 2011-239443
10. 発明の名称:抗がん剤
発明者:宇田泰三、一二三恵美
出願人:(独)科学技術振興機構
出願日:平成24年3月9日
出願番号:特願 2012-052334

②海外出願 (2件)

1. 発明の名称:PCT 特許出願「抗ウイルス活性を有するヒト型抗体酵素」
発明者:宇田泰三、一二三恵美、西園晃、荒川満枝
出願人:(独)科学技術振興機構
出願日:平成23年2月21日
出願番号: PCT/JP2011/053752、(米国出願番号 13/579,529)(EPC 出願番号
11744803.5) 日本特許成立(平成25年1月29日)
出願国:米国、英国、仏国、独国、日本
2. 発明の名称:PCT 特許出願「抗がん剤」
発明者:宇田泰三、一二三恵美
出願人:(独)科学技術振興機構
出願日:平成25年3月5日
出願番号: PCT/JP2013/55927
出願国:米国、英国、仏国、独国、韓国、日本(予定)

(5)受賞等

① 受賞

学生のポスター賞(受賞者:九島充幸)を受賞
(第45回化学関連支部合同九州大会、2008年7月5日、北九州国際会議場)

② 新聞報道

1. 大分合同新聞(平成19年11月13日) 世界初「ヒト型」開発へ弾み
2. 毎日新聞(平成19年12月2日) スーパー抗体酵素を研究
3. 読売新聞(平成19年12月14日)
4. 読売新聞(平成20年4月5日) キーパーソン、「夢の薬」悪玉狙い撃ち
5. 大分合同新聞(平成20年5月12日夕刊) 異物破壊のスーパー抗体酵素
6. 大分合同新聞(平成21年3月7日) 朝刊一面の「東西南北」で紹介
7. 西日本新聞・朝刊1面 インフルウイルス破壊に成功 2011.9.28
8. 朝日新聞・朝刊・社会面 インフル破壊酵素 2011.9.29
9. 毎日新聞・朝刊・社会総合面 インフル抗体酵素 2011.9.29
10. 大分合同新聞・社会面 インフルウイルス無力化 2011.9.29
11. 西日本新聞・朝刊1面 ウイルスを標的のスーパー抗体酵素「ヒト型」世界初開発 2012.2.26
12. 読売新聞・朝刊・地域面 ヒト型スーパー抗体酵素開発 2012.2.28 [2012.2.29には全国版]
13. 毎日新聞・朝刊・社会総合面 狂犬病治療に光 2012.2.28
14. 大分合同新聞・社会面 ヒト型作製成功 2012.2.28

③ その他

1. Yahoo トップニュース 2012.2.28
2. NHK、2012.2.27 20:45～
3. テレビ大分(TOS) 2012.2.28 18:30～
4. OBS 大分放送 2012.3.12 18:30～

②社会還元的な展開活動

- ・高大連携(出前講義):
大分大学と舞鶴高校との高大連携で高校生約50名と担当教員3名にスーパー抗体酵素の意義と応用面を説明した(於大分大学、平成25年2月11日)。
- ・オープンキャンパス:
大分市内の高校生(数十名)を対象に抗体酵素の説明と抗体産生細胞の顕微鏡観察を行った(於大分大学、平成23年8月10日)。
- ・子供サイエンス:
小学生および親御さんを相手にタンパク質の面白さを実験を交えて理解してもらう教育を終日行った(於大分大学、平成21年7月26日、平成22年8月4日、平成24年8月8日)。
- ・男女共同参画推進:
女性研究者キャリアモデル提示講演会において「スーパー抗体酵素(Antigenase)の機能と応用～新規な抗体医薬を目指して」と題して、女性研究者の意識向上に努める講演を行った(於東京工業大学、平成21年11月12日)。

§ 6 研究期間中の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
H20年3月14日	チーム内ミーティングと講演会	大分大学	20名	チーム内ミーティングおよび講演会を実施した。内容は「ヒト型抗体ライブラリーの作成法」についてである。
H20年4月25日 ～ H20年5月2日	宇田Gおよび Kaveri Gによる合同ミーティングおよび一般講演会	大分大学	50名	これまでの研究状況と今後の取り組み方について打ち合わせした。また、4教授による一般向けの講演会を実施し、約70名が参加した。
H21年5月25日	CREST 講演会	大分大学	60名	若手研究者による、最新のバイオテクノロジー研究について細胞工学、遺伝子工学、タンパク質工学的な視点からの紹介を行った。
H21年10月6日	CREST 講演会	大分大学	50名	MEMS 技術など微細加工技術を用いて、ガラスやシリコンに mm サイズの流路や機能部品を加工し、化学分析を行う μ TAS デバイスへの取り組みを紹介。また、デバイスの開発と化学分析、生体成分分析、細胞解析などへの応用例を解説
H22年10月21日	CREST 講演会	大分大学	65名	DNA の構造、細胞内への導入方法、その医学的応用など DNA 工学の面からの最新の研究を紹介
H22年11月18日	CREST 講演会	107 教室	60名	インフルエンザウイルスの基礎から最近の高病原性鳥型までの紹介、さらには、該ウイルスの検出法、予防法などについて説明。
H23年1月31日	CREST 講演会	大分大学	70名	最近の DNA 工学について基礎から応用までを説明。特に光の関与した構造変化とその性質に深く言及。
H23年9月1日 ～2日	講演会	大分大学	20名	タンパク質の機能
H23年11月30日 ～12月1日	講演会	大分大学工学部	20名	ペプチド工学
H25年1月30日 -2月1日	展示会 (Nanotech 2013)	東京ビッグサイト	4名	抗体酵素研究状況の展示説明

§ 7 結び

研究代表者らが「スーパー抗体酵素」を研究室で見出したのが 1996 年の年明けであった。当初、抗体軽鎖が抗原を分解しているという常識では考えられない現象であったので、再現性とあらゆる

角度から検証を行ったため、学会発表までに 2 年半を要した。結論的には、「天然に出来てくる抗体には生まれながらにして抗原を分解する能力を備えたものが存在する」という説である。こうした発見は国内では、賛同者よりも批判者が多いだろうと思って、第 1 回の発表は海外で行った。海外での発表ではパスツール研究所の M. Zouali や Texas 大学の S.Paul たちの目にとまり高い評価を受けた。国内での発表は、案の定、厳しく批判する人たちがいた。批判者が居ようが、賛同者が居まいが、真実はひとつである。

2001 年から始まった相沢 CREST では、マウスを使って目的の抗原を免疫し、モノクローナル抗体を作製して、その中から酵素活性を有する抗体軽鎖あるいは抗体重鎖を単離して来た。この手法でいくつかの面白い「スーパー抗体酵素」を作製することが出来た。この研究を通じて、「スーパー抗体酵素」は世間に知られるようになったが、所詮はマウスを使って作製しているので、ヒトへは投与できない。

2007 年から始まった本 CREST (堀池 CREST) でヒト型「スーパー抗体酵素」の作製にゼロから取り組んだ。マウスとヒトでは作製方法を全面的に変更する必要があった。

そこで、以下に示す 3 本の柱を立てて取り組んだ。

1. ヒト型「スーパー抗体酵素」の効率的作製技術開発
2. 大量製造とモデルマウスへの投与実験
3. 自動合成装置のための要素技術開発

最初の目標である狂犬病ウイルスの感染を抑制するヒト型「スーパー抗体酵素」を探索することに成功し、この抗体酵素は *in vitro* だけでなく、*in vivo* 試験でも顕著に狂犬病ウイルスの感染を抑制する事を実証した。また、抗インフルエンザウイルス活性を有するクローンも見出すことができ、これについても *in vitro* および *in vivo* 試験を実施し良好な成績を得た。さらには、強い抗ガン活性を有するクローンの発掘にも成功した。こうした実験には大量の抗体酵素を必要とするが、実験を始めた当初は 1mg のヒト型「スーパー抗体酵素」を取得するのがやっとであったが、最終年度には 1.0 から 2.0 リットル培養で、高純度品を 30-60mg も取得する方法の開発にも成功した。これがマウスへの投与実験を可能にした。

このようにヒト型「スーパー抗体酵素」の探索、クローンの特定、抗ウイルス作用、抗ガン作用さらには立体構造の制御という視点から、抗体酵素研究は大きく進展したと信じている。この研究を通じて、革新的医薬品として実用に向けて大きく踏み出すことが出来た。これらは当初計画項目の 1 および 2 である、項目 3 については、ナノバイオ材料製造の視点、研究テーマのプライオリティーの順序などから、研究総括とも相談し途中の段階で中止した。

ヒト型「スーパー抗体酵素」のスクリーニングでは、多くの時間と人手がかかるので不安であったが、5 年間で思った以上にうまく行った。もともと我々の身体の中で「スーパー抗体酵素」が自然に作られているのだから、考えて見れば当たり前であるが、生きる上での恒常性に拘わる生体防御に関連した抗原には、それに反応する抗体酵素が存在しているのである。狂犬病ワクチンやインフルエンザワクチンを行ったヒトからはそれらに対する抗体酵素が、抗体の何%かの割合で存在していると思われる。また、抗体酵素を適切に構造制御することにより、非常に強いガン細胞傷害性を示す「スーパー抗体酵素」も見つかった。これらは全てヒト型であり、ヒトへの投与が可能である。特に、ヒト型「スーパー抗体酵素」がマウスを使った安全性試験で全く異常が見られなかった事は、今後、医薬品として開発するのに大きな意義を持つ。

将来の、画期的な医薬品となりえるタンパク質はいろんなところで研究され、国内の大学・研究機関で多くの候補物質をかかえていると思われるが、実用化に進むためには GMP に準拠したサンプル作りが必要である。これには莫大な費用がかかるため、CREST の予算でも、到底、GMP サンプル(タンパク質)は作れない。政府あるいは JST は全国に解放された GMP 設備を作り、世界に先駆けた医薬品開発を日本からどんどん出せるシステムを作って頂きたい。

最後に、本研究を推進するにあたり、貴重な助言と指導を頂いた堀池靖浩研究統括に心より感謝申し上げます。また、JST の事務所の池田調査員には報告書、特許、会議資料など、多くの作業をお願いし随分助けて頂きました。アドバイザーの先生方からも貴重な助言を頂きました。ここに厚く御礼申し上げます。