

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25年4月～平成26年3月

研究代表者：宇田泰三
(大分大学工学部・客員教授、兼
九州先端科学技術研究所・特別研究員)

§ 1 研究実施の概要

これまでの経緯と H25 年度の実施すべき研究内容と期待する成果(概略)：

研究代表者らが発見した「スーパー抗体酵素」(Antigenase)は、近年、世間的に注目を集めるようになっており、「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。

それは、ここ数年間での宇田チームの抗体酵研究は予想を越えるスピードで進展したからである。いよいよ「スーパー抗体酵素」(Antigenase)研究は結実期、収穫期へと移行する段階に到達した。

そこで、平成 25 年度は、世界的競争に突入する前に、Antigenase 研究の重要な部分をほとんど抑え、かつ、特許対策を世界戦略の視点から講じる必要がある。そのために遂行すべき研究実施項目を 8 つ挙げた。抗がん活性、抗ウイルス活性の *in vitro* および *in vivo* での検討は勿論のこと、Antigenase そのものの分子レベルでの解明を行い、物質特許として排他的権利の確保を目指す。

Antigenase 研究は「日本の独創技術」であり、この立場を「平成 25 年度で確固たるもの」にして行く、のが今年度目指す方向である。

(1) 実施概要

この堀池 CREST・宇田チームでは、将来の実用化を見据えて、完全ヒト型「スーパー抗体酵素」を効率的よく作製し、かつ、大量製造法にも目途をつけ、抗ウイルス、抗がん作用を有する革新的医薬品を創製する事が大きな目的である。

以下に、これまでに達成した技術、手法、成果等の実施概要を記す。

- 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 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。
- 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いう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。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

(先導的・独創的であり国際的に高く評価され、今後の科学技術に大きなインパクトを与える成果など)

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」が作製できる事を世界で最初に確立した。

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示した。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

(新産業の創出への手掛かりなど出口を見据えた基礎研究から、企業化開発の手前までを含め、科学技術イノベーションに大きく貢献する成果など)

1. 抗体酵素分子

概要:

ヒト型「スーパー抗体酵素」はヒト抗体の軽鎖部分であるために立体構造に多様性がある。これは、均一な品質、効率的な作製、大量の製造法上、すなわち、企業化する場合に非常な問題を含んでいる。本研究で、この点をクリアーでき、出口に向けた技術的イノベーションが出来たと言えよう。

§ 2. 研究構想

(1) 当初の研究構想

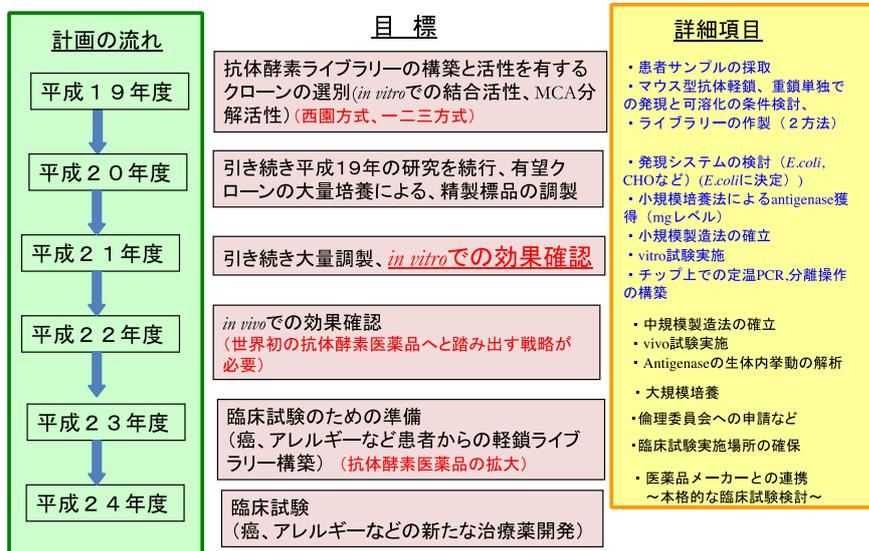
研究開始時に目指した目標の中、平成 25 年度は以下の 2 つの項目をそれぞれ確立することにより最終的にヒト型スーパー抗体酵素(Human Antigenase)を作製し実用化する事を目標とした。

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 ; 大量製造とモデルマウスへの投与実験

平成 19 年度の採択当初に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

目標達成のための年次計画



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。)

5

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 vivo 試験をおこない、*in 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来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、さらに、実施した。加えて、23-24 年度にはマウスを使ってのヒト型「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、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) 試験の段階でドロップアウトするケースが多いが、

本研究で開発したヒト型「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。

このように次々と新しい、かつ、興味ある結果が得られてきており、革新的な新薬創製という当初計画した以上の成果が期待できるために、上述した2つの項目に絞り、ヒト型「スーパー抗体酵素」の実用化に向けての研究に集中した。

(2) 新たに追加・修正など変更した研究構想

① 中間評価で受けた指摘や助言、それを踏まえて対応した結果について

「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。

中間評価での意見を一言でまとめると、「ターゲットは狂犬病とインフルエンザであり、ともに in vivo 試験を進めること」であった。

そこで、抗狂犬病ウイルス作用および抗インフルエンザウイルス作用についてマウスを用いて in vivo 実験に直ちに取り組んだ。

② 中間報告書 § 2. 当初の研究計画に対する進捗状況「(3) 今後の進め方、および研究成果の見通し」の記載事項に関し、研究を進めた結果について

上記の研究を進めた結果、下記に示す興味あるデータを得ることが出来た。

1. 抗狂犬病ウイルス作用

実験に使用したのは ddY マウス(♀:6 週齢)である。あらかじめ、狂犬病ウイルス(CVS 株)と抗体酵素(#18 クローン) を *in vitro* で反応させ、それをマウスの脳内に直接摂取する方法で(P3 実験室で実施)、マウスの生存率を検討した、その結果、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。

さらに、狂犬病ウイルスと抗体酵素を混合した直後にマウスへ投与し、さらにその抗体酵素のみを投与する(2 回投与)、というマウスを用いた治療実験を行ったところ、この手法でも抗体酵素#10 クローンは明らかに生存率を上昇させ、有効である事が証明された。

2. 抗インフルエンザウイルス作用

実験に使用したのは Balb/c マウス(♀:6 週齢)である。この場合も、あらかじめインフルエンザウイルス(H1N1;PR-8 株)と抗体酵素を混合して 48 時間 incubation し、その後マウスへの経鼻投与で試験を行った。その結果、抗体酵素 **22F6** クローンは顕著な抗インフルエンザウイルス作用を示し、死亡はゼロ匹、体重変化も軽微であり、コントロール群と比較して明らかな抗ウイルス作用を示した。

§ 3 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 宇田グループ I (大分大学)

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	平成 19 年 10 月～平成 25 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	平成 19 年 10 月～平成 24 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	平成 19 年 10 月～平成 25 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	平成 22 年 10 月～平成 24 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	平成 19 年 10 月～平成 25 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	平成 19 年 10 月～平成 24 年 3 月
倉内芳秋	大分大学工学部	助教	化学チップの合成	平成 21 年 4 月～平成 25 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	平成 19 年 10 月～平成 25 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	平成 20 年 4 月～平成 21 年 3 月
江頭直義	県立広島大学	教授	検出系の技術開発	平成 19 年 10 月～平成 25 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	平成 19 年 10 月～平成 25 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	平成 19 年 10 月～平成 20 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	平成 20 年 8 月～平成 22 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	平成 22 年 4 月～平成 25 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	平成 19 年 10 月～平成 21 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	平成 20 年 4 月～平成 21 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	平成 19 年 10 月～平成 20 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	平成 19 年 10 月～平成 20 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	平成 20 年 4 月～平成 22 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	平成 20 年 4 月～平成 22 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	平成 21 年 4 月～平成 22 年 3 月

藤本尚子	大分大学工学部	研究員 (ポスマス)	抗インフルエンザウイルス活性	平成 22 年 4 月～ 平成 26 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	平成 21 年 4 月～ 平成 23 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	平成 21 年 4 月～ 平成 23 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	平成 21 年 4 月～ 平成 23 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	平成 21 年 4 月～ 平成 23 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	平成 21 年 4 月～ 平成 23 年 3 月
園田沙理	大分大学工学研究科	大学院生	細胞培養	平成 23 年 4 月～ 平成 25 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	平成 23 年 4 月～ 平成 25 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	平成 23 年 4 月～ 平成 25 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	平成 23 年 4 月～ 平成 25 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	平成 23 年 4 月～ 平成 25 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	平成 23 年 4 月～ 平成 25 年 3 月
飯倉 陵	大分大学工学研究科	大学院生	BBB の実験	平成 23 年 4 月～ 平成 25 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	平成 23 年 4 月～ 平成 25 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	平成 23 年 4 月～ 平成 25 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	平成 24 年 4 月～ 平成 25 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	平成 24 年 4 月～ 平成 25 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	平成 24 年 4 月～ 平成 25 年 3 月
森山和基	大分大学工学研究科	大学院生	細胞培養	平成 24 年 4 月～ 平成 25 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	平成 24 年 4 月～ 平成 25 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	平成 24 年 4 月～ 平成 25 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	平成 24 年 4 月～ 平成 25 年 3 月
楠木智也	大分大学工学研究科	大学院生	抗がん作用	平成 25 年 4 月～ 平成 26 年 3 月
友岡 幸	大分大学工学研究科	大学院生	抗体酵素の精製条件の検討	平成 25 年 4 月～ 平成 26 年 3 月
山口美紗	大分大学工学研究科	大学院生	抗体酵素の遺伝子工学的改良	平成 25 年 4 月～ 平成 26 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	平成 22 年 4 月～ 平成 24 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	平成 22 年 4 月～ 平成 24 年 3 月
西頭恵梨	大分大学工学部	技術員	大量培養	平成 24 年 4 月～ 平成 26 年 3 月
秋吉裕子	大分大学工学部	実験補助員	抗体精製	平成 25 年 7 月～ 平成 26 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	平成 22 年 4 月～ 平成 24 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	平成 19 年 10 月～ 平成 22 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	平成 19 年 10 月～ 平成 21 年 3 月
佐知望美	大分大学	技術員 (ポスマス)	ライブラリーからの抗体酵素作製法	平成 20 年 4 月～ 平成 24 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	平成 20 年 4 月～ 平成 21 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	平成 20 年 5 月～ 平成 20 年 9 月
植木竜大	大分大学	研究員 (ポスドク)	タンパク質精製	平成 20 年 10 月～ 平成 21 年 9 月
本庄栄二郎	大分大学	研究員 (ポスドク)	タンパク質発現、精製、結晶化、構造解析	平成 21 年 4 月～ 平成 24 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	平成 20 年 10 月～ 平成 23 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	平成 22 年 4 月～ 平成 22 年 9 月
吉武 淳	大分大学	研究員 (ポスドク)	ライブラリーからの抗体酵素作製法	平成 20 年 4 月～ 平成 22 年 3 月

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) 抗体酵素の分子構造と活性に関する基礎的研究

項目 2 ; 大量製造とモデルマウスへの投与実験

- 1) 抗体軽鎖の単独発現
- 2) 分離・精製・透析条件の検討
- 3) 小規模培養
- 4) 大規模培養（および中規模培養）
- 5) vitro & vivo 試験

② 宇田グループ II(九州先端研)

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
山本竜広	(財)九州先端科学技術研究所	産学連携コーディネーター (九大客員准教授)	抗体酵素の化学的・生化学的検討	平成 25 年 4 月～ 平成 26 年 3 月
ポスマス	(財)九州先端科学技術研究所	研究補助員	抗体酵素の免疫学的検討	平成 25 年 11 月～ 平成 26 年 3 月

研究項目

- 1) 抗体酵素の分子構造と生化学的・免疫学的検討、
- 2) vivo 試験

国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について
米国テキサス大学ヒューストン校のメディカルセンター Sudhir Paul教授およびそのグループとは、適宜、抗体酵素に関する情報交換を行ったり、互いに訪問し合ってホットな話題を discussしている。(因みに、Paul教授は相沢CRESTのときの参加メンバーでもあった)

§ 4 研究実施内容及び成果

4. 1 ヒト型「スーパー抗体酵素」の効率的作製技術開発（宇田グループ I 大分大学）

4-1-1 ヒト型「スーパー抗体酵素」取得法

4-1-1-1 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 4-1-1-1 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。

4-1-1-2 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

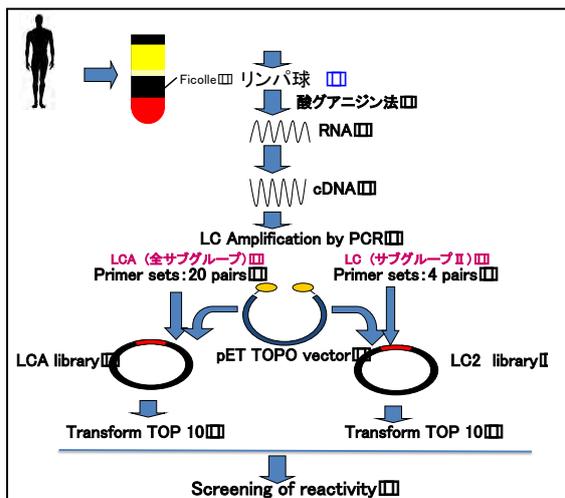


図 4 研 1-1-1 ヒト型抗体軽鎖遺伝子ライブラリーの作製法（全遺伝子増幅）

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 リーは⁵CFU、LC2 は 2.58 リーは⁴CFU 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。

4-1-1-3 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、合計で 18 クローン

表 4-1-1-3 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□□	A18b□□□	#7□□	A3/A19□□□	#13□□	A3/A19□□□
#2□□	A3/A19□□□	#8□□	A18b□□□	#14□□	A3/A19□□□
#3□□	A3/A19□□□	#9□□	A18b□□□	#15□□	A5□□□
#4□□	o11/o1□□□	#10□□	A18b□□□	#16□□	A17□□□
#5□□	A3/A19□□□	#11□□	A18b□□□	#18□□	A18b□□□
#6□□	A18b□□□	#12□□	A3/A19□□□	#19□□	A17□□□

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 4-1-1-3 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

4-1-1-4 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) のアミノ酸配列は全てヒト抗体軽鎖 (k 鎖) のサブグループ II に属する。その中で A18b に属するクローンは 7 個、A3/A19 に属するクローンは 6 個、A5 に属するクローンは 1 個、A17 に属するクローンは 2 個、そして O11/O1 に属するクローンは 1 個であった。

特に、A18b についてしてみると、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ツ組様残基構造を構築できないと推測された。これらの軽鎖可変領域 (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立体構造構築した結果を図 4-1-1-4 に示す (左上から #1(A), #6(B), #8(C), #9(D), #10(E), #11(F), #18(G))。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。

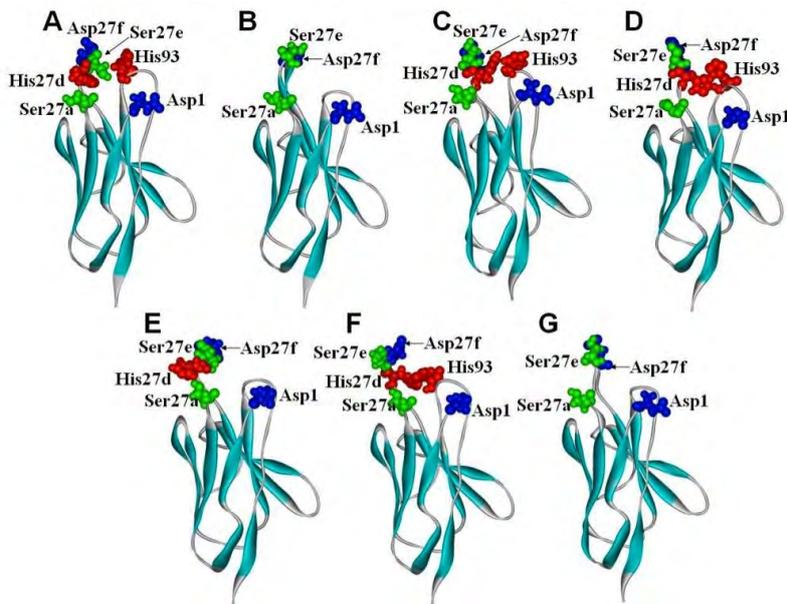


図 4-1-1-4 A18b に属するクローンの立体構造モデル
触媒三つ組み残基様構造を構築できる (Asp1, Ser27a, Ser27d, His27e, Asp27d, and His93) を示す。青が Asp, 赤が His, 緑が Ser ;

#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、触媒三つ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、触媒三つ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つ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つ組様残基構造を構築できない。

4-1-2 活性クローンの選別

上述したように、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」の活性クローンの選別は、まず最初に、抗体軽鎖の一次元配列および分子モデリングによる三次構造に基づいて行った。その結果、有力と思われた抗体計算に対して、下記に示すような酵素活性測定を行い、よりよい活性クローンを選別をした。アミダーゼ活性と各散文か活性のが機略を述べる。

4-1-2-1 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、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。

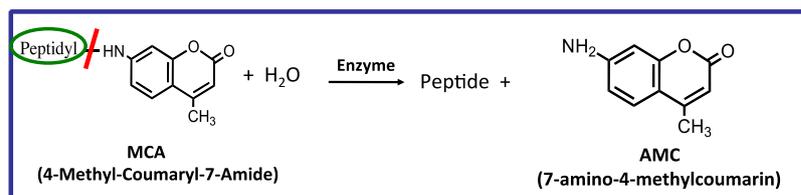


図 4-1-2-1 MCA ペプチド基質の加水分解による AMC の生成

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こと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。

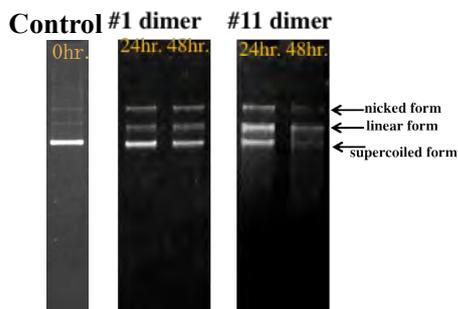
表 4-1-2-1 ヒト抗体酵素による合成基質ペプチド-MCA の見かけの反応速度

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

4-1-2-2 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 4-1-2-2 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 4-1-2-2



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 4-1-2-2 である。

図 4-1-2-2 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

4-2 *in vitro* でのヒト型「スーパー抗体酵素」の抗ウイルス、抗ガン活性試験

4-2-1 抗狂犬病ウイルス活性

本研究についての結論は前述の研究構想の中で触れたので、ここでは概略について記述する。詳細については平成 24 年度最終報告書を参照していただきたい。

4-2-1-1 狂犬病ウイルスについて：

狂犬病ウイルスの構造は、図 4-2-1-1 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、

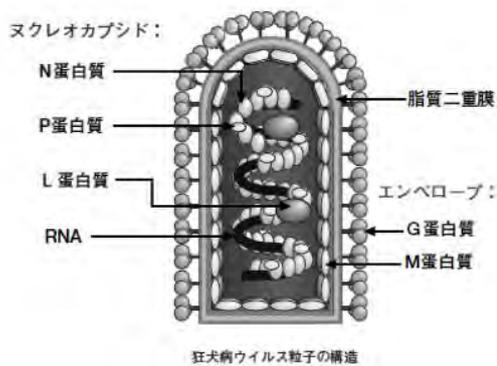


図 4-2-1-1 狂犬病ウイルスの構造

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 5 2 巻、第 1 号、21-25 (2002))

狂犬病ワクチン接種ボランティア

アからの白血球をもちいて抗体軽鎖をのライブラリーを作製し、そこからいくつかの抗体軽鎖遺伝子を大腸菌で発現させ、高純度に精製された抗体軽鎖タンパク質を得た。多くの *in vitro* 実験を行った後、狂犬病ウイルスの感染を顕著に抑制したヒト型「スーパー抗体酵素」#18 クローンを用いて以下の *in vivo* 実験を行った。

4-2-1-2 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

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。さらには、マウスを用いての治療実験も試みた結果、抗体酵素による治療効果が認められた。

4-2-2 抗インフルエンザウイルス活性

本研究についての結論も前述の研究構想の中で触れた。以下、概略について記述する。詳細については平成 24 年度最終報告書を参照していただきたい。

4-2-2-1 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と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、常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

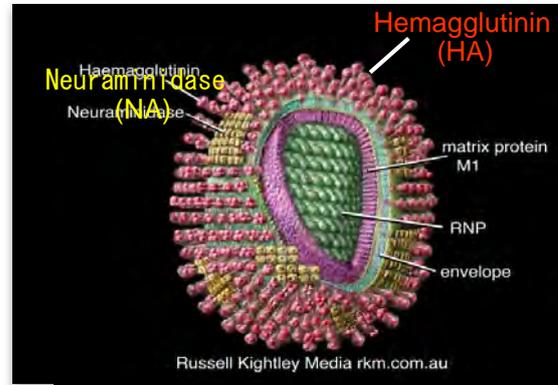
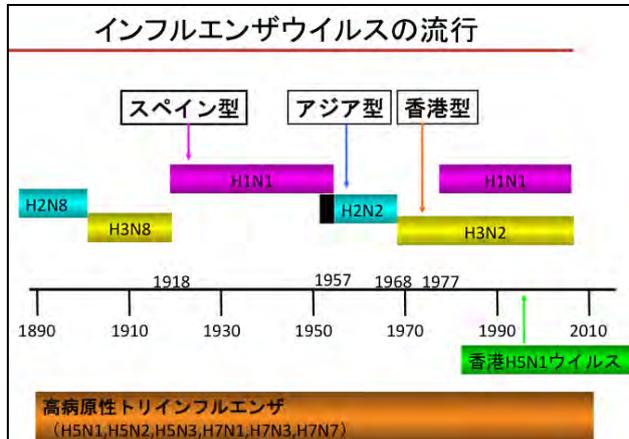


図 4-2-2-1b インフルエンザのウイルス模式図

図 4-2-2-1a 過去の流行とインフルエンザのタイプ

いる (図 4-2-2-1a)。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 or H と略)と Neuraminidase(NA or 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 4-2-2-1b)。

前述した抗体軽鎖ライブラリーから、やはり、抗体軽鎖遺伝子が大腸菌で発現させ、高純度に精製された抗体軽鎖タンパク質を用いて、多くの条件下で *in vitro* 実験を行った後、有望クローンについて *in vivo* 試験を行った。以下にその概略と結論を示す。

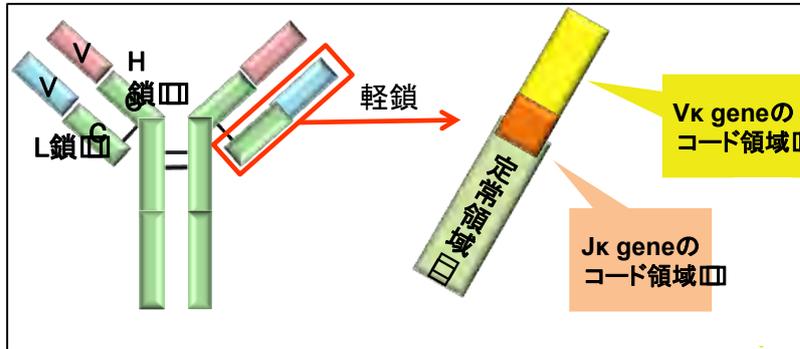
In vitro 試験ではずっと広島株を用いて検討を重ねてきた。しかしながら、この臨床株は、ヒトには感染するが、マウスには感染しない。そこで、広島株に感染するようにウイルスを順化(adaptation; ad と略)させ、これを順化型広島株として以下の *in vivo* 試験に用いて、より正確な実験を行った。この実験では、特に、インフルエンザウイルスと抗体酵素を混ぜてすぐに経鼻接種し、感染抑制が起こるかどうかの検討を行った。その結果、感染抑制を示すデータが得られた。

4. 4 大量製造とモデルマウスへの投与実験(*in vivo* 試験) (宇田グループ I 大分大学)

4-4-1 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

4-4-1-1 抗体軽鎖の単独発現および発現の困難さ

抗体の構造を図 4-4-1-1a に示す。抗体は重鎖(H鎖)および軽鎖(L鎖)がそれぞれ2本ずつ



存在し、重鎖と軽鎖がジスルフィド結合で結ばれてペアを作っている。本研究ではヒトの抗体軽鎖遺伝子のみをボランティアから取り出しているため、軽鎖全体がひとつのタンパク質として産生さえてくる。通常、抗体を重鎖(H鎖)と軽鎖(L鎖)に分離すると、疎水性表面が現れてきて、凝集体を作り、多くの場合遺伝子工学的に発現させてもインクルー

図 4-4-1-1a 抗体の構造と重鎖 (H 鎖)、軽鎖 (L 鎖)
軽鎖 (L 鎖) は定常領域に加えて、可変領域をコードする Vk gene と Jk gene からなる事を示す。

ジョンボディ (不溶体) として産生され、全く水溶液に溶けない、いわゆる、使い物にならない形で出てくる。

以下の実験では、この軽鎖全体を大腸菌あるいは哺乳細胞系で発現させた。

軽鎖の発現実験と大腸菌の有益性

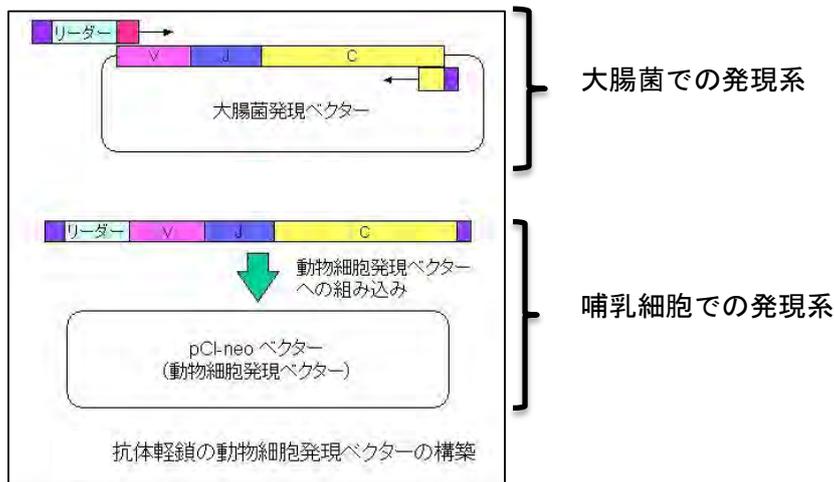


図 4-4-1-1b 本実験で試した 2 種類の発現系を示す

発現系としては哺乳細胞系および大腸菌の系を検討したが哺乳細胞を使ったケースでは大腸菌のケースに比べて100分の1程度の製造量しか得られないので、今後の実験には大量にサンプルが必要なことが予想されるため、大腸菌の系で発現させることに決定した。ただし、大

腸菌の発現系では、当然ながら、エンドトキシンの混入を考えて置かねばならない。

大腸菌を用いたの軽鎖単独発現の最適条件とインクルージョンボディの克服

大腸菌を用いた発現系を使用するときはプラスミドは pET21b(+), 大腸菌は BL21(DE3)pLysS が最も良い抗体軽鎖産生系であることを見いだした。

後述するが、この方法を用いることで、これまで 1.0 リットル培養で 0.1-0.3mg 程度しか得られなかった抗体軽鎖が約 50mg も得られ、これまでの数百倍の大量合成に成功した。この技術開発があったればこそ、抗狂犬病ウイルス活性、抗インフルエンザウイルス活性、さらには抗ガン活性試験へとつながった。

4-4-1-2 分離・精製条件の検討

抗体軽鎖の分離精製の決定的な手法についての報告はない。そこでいくつかの手法を実施して最適な方法を確立した。

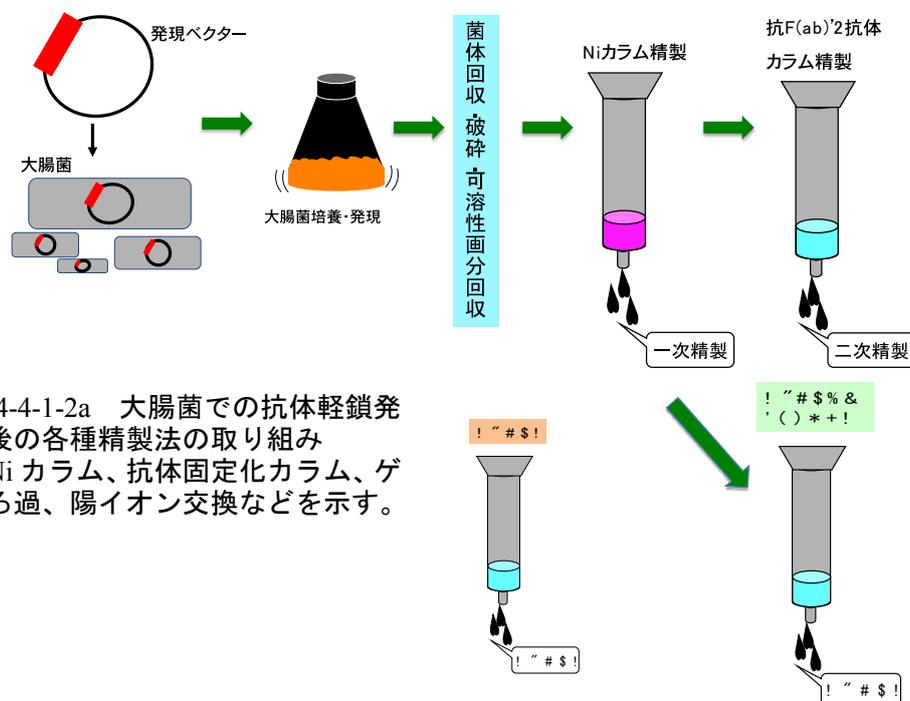


図 4-4-1-2a 大腸菌での抗体軽鎖発現後の各種精製法の取り組み
Ni カラム、抗体固定化カラム、ゲルろ過、陽イオン交換などを示す。

図 4-4-1-2a に示すように Ni カラム、抗体固定化カラム、ゲルろ過、陽イオン交換などいくつかの精製法とその順序を検討した、一次精製には Ni カラムを用いたアフィニティー精製、二次精製には陽イオン交換カラムを用いたイオン交換法が最適であることが分かり、精製法とその順序を確立した。後述するが、この方法で平均的に純度 95%以上の精製サンプルの供給が可能になった。

精製サンプルの純度(品質)

我々の開発した抗体軽鎖精製法により、大腸菌で発現させたいくつかの抗体軽鎖の純度を高感度解析として一般に認められている銀染色分析を実施した。



図 4-4-1-2b 発現させた各抗体軽鎖クローンの名称とアミノ酸配列 (可変領域および定常領域を含む抗体軽鎖全体)

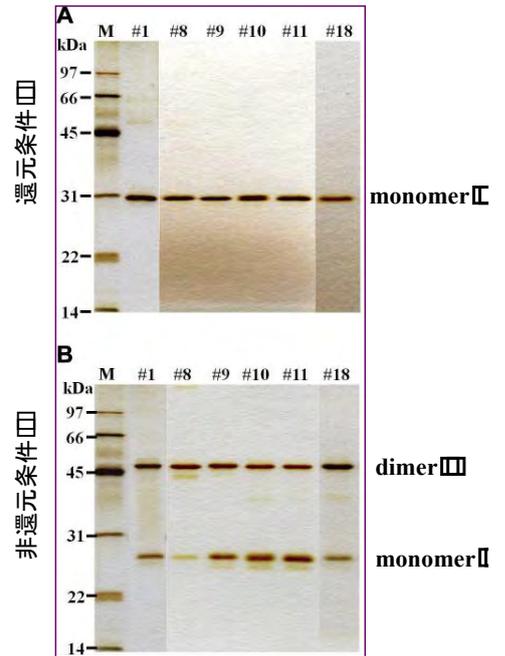


図 4-4-1-2c 抗体軽鎖の SDS-PAGE 後の銀染色像
目視では抗体酵素に相当するバンド以外に何も観察されない

ヒト型抗体軽鎖の分類で Subgroup II に属する中の、A18b に属する 7 種類の抗体軽鎖 (図 4-4-1-2b) を上述した手法で精製した結果、目視では抗体軽鎖に相当するバンド以外に何も観察されず、いずれのクローンも 95% 以上の高純度に精製されている事が判る (図 4-4-1-2c)。

4-4-1-3 小規模培養

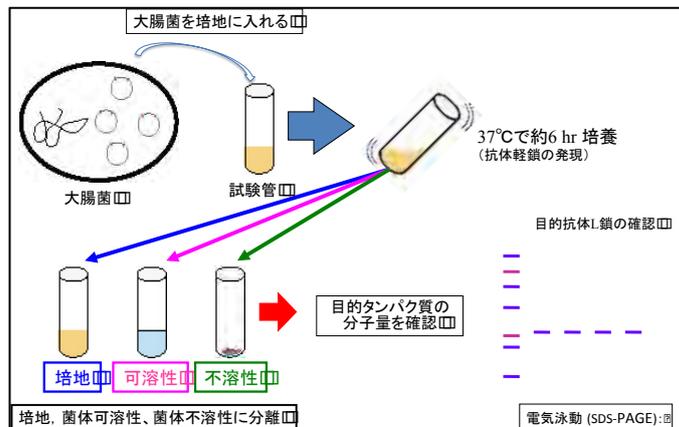


図 4-4-1-3 抗体軽鎖の小規模培養

通常の小規模培養は図 4-4-1-3 に示すように試験管を使って行っている。この小規模培養で、どのクローンが大腸菌内でどの程度発現しているか、また、可溶性にどの程度、あるいは不溶性にどの程度作られているかを判断する。また、この小規模実験で抗体酵素の最適発現条件を決定して、以下の中規模(1リットル程度)および大規模培養(数リットル以上)に応用した。

§ 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).
この論文は本プロジェクトが目指す抗体酵素の実用化に大きく近づく研究内容を含んでいる。即ち、ピロリ菌に対する抗体酵素が実際に菌を殺傷するだけでなく、ピロリ菌を胃内に感染させたマウスでも同菌の増殖を抗体酵素が明らかに阻害する結果であり、世界で最初の in vivo 実験である。
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. Factor VIII-hydrolyzing IgG in acquired and congenital hemophilia. 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, *FEBS Lett.*, **583**, 2565-2572(2009).
10. 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).

11. 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)
12. 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)
13. 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).
14. Emi Hifumi, Kyouhei Higashi and Taizo Uda, “Catalytic digestion of human TNF- α by antibody heavy chain”, *FEBS J*, **277**, 3823-3832(2010).
(human TNF- α は関節リュウマチや COPD などの自己免疫疾患に深く関わるサイトカインである。この分子を 10 時間以内でほぼ破壊する抗体酵素 (モノクローナル抗体重鎖) の作製に成功した)
15. 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)
16. 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** 卷(1), 9-13 (2010).
17. 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)
18. Takashi Matsumoto, Kentaro Yamada, Kazuko Noguchi, Kantou Nakajima, Kenzo Takada, Pakamat 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).
19. 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).
20. 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).

21. 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).

A 型インフルエンザのヘマグルチニンのある特定部位に対するマウス型モノクローナル抗体重鎖(JN1-2-H)がヘマグルチニンを分解するだけでなく、インフルエンザも破壊することが判った。実際、in vitro 試験を実施したところ重鎖の酵素作用によってカインフルエンザウイルスが感染性を失うことが判明した。

22. 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.

23. 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

24. 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.

25. 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.

26. Bharath Wootla, Olivier D. Christophe, Ankit Mahendra, Jordan D. Dimitrov, Yohann 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).

27. Emi Hifumi, Eijirou Honjo, Naoko Fujimoto, Mitsue Arakawa, Akira Nishizono, Taizo Uda: Biochemical features of a catalytic antibody light chain, 22F6, prepared from human lymphocytes, *FASEB J.* **26**, 1607-1615(2012).

胚細胞遺伝子群が Subgroup II に属するヒト型抗体酵素(軽鎖)をヒト白血球よりクローニングし、発現ベクターに入れて大腸菌で発現させ、可溶性画分を高純度に精製し、抗狂犬病ウイルス試験を in vitro および in vivo で実施した。その結果、#18 クローンほどちらでも有効性が認められ、世界初のヒト型抗体酵素として確立できた。

28. E. Hifumi, N. Fujimoto, M. Arakawa, E. Saito, S. Matsumoto, N. Kobayashi, T. Uda: Highly

efficient method of preparing human catalytic antibody light chains and their biological characteristics. *J. Biol. Chem.*, **288**, 19558-19568 (2013).

(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 (Part 2 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)学会発表(国際学会発表分)

1. 「招待講演」: 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. 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.
3. 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
4. 「招待講演」: 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
 5. 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)
 6. 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) (Poster)
 7. The 13th Asian Chemical Congress, Sep. 13-16, 2009 (Shanghai, China)
Rapid detection of influenza virus by an electrochemilumiscence sensor combiningan immunoliposome,
N. Egashira, M. Kushima, S. Takao, Y. Mitoma, E. Hifumi, T. Uda.
 8. 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
 9. Vaccine 3rd Global Congress (H21/10/3-10/7 Singapore)
「A pilot study on intradermal vaccination of Japanese rabies vaccine for pre-exposure immunization」 Nisizono A, Shiota S, Khawplod P, Ahmed K
 10. 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.
 11. 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. (Poster)
 12. Taizo Uda, Emi Hifumi, Akira Nishizono, “Prospect and preparation of human catalytic antibody”, PacifiChem 2010, Honolulu, 2010.12.15-20
 13. 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
 14. 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, 2010.4.14-1
 15. Naoko Fujimoto, Emi Hifumi, Taizo Uda, “Catalytic antibody against hemagglutinin molecule for Influenza virus A type”, PacifiChem 2010, Honolulu, 2010.12.15-20(Poster)
 16. 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(Poster)
 17. Masashi Kanda, Emi Hifumi, Taizo Uda, “Catalytic activity for some human antibody light chains using mutagenesis technique”, PacifiChem 2010, Honolulu, 2010.12.15-20 (Poster)
 18. 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 (Poster)
 19. Emi Hifumi, Kyohei Higashi, Taizo Uda, “Super catalytic antibody cleaving human TNFa”, PacifiChem 2010, Honolulu, 2010.12.15-20 (Poster)
 20. Akira Nishizono, “Development of rapid diagnosis for rabies based on the principle of immunochromatography and its utility in rabies-endemic countries”, Asia • Africa • REsearc Forum 2010, Hanoi, Vietnam, 2010.11.12
 21. 「招待講演」: 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
 22. 「招待講演」: 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)
23. 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
 24. 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))
 25. 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))
 26. 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) (Poster)
 27. 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) (Poster)
 28. 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
 29. 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
 30. Akira Nishizono, Kentaro Yamada, Ipeei 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
 31. 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 (Poster)
 32. 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 (Poster)
 33. 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. (Poster)
 34. 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. (Poster)
 35. 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.
 36. 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.
 37. 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.

38. Taizo Uda, Akira Nishizono, Emi Hifumi, Catalytic human antibody light chains (Antigenases) capable of suppressing the infection of rabies virus. World Biotechnology Congress 2013, Boston, USA, 2013 June 3-6.
39. Emi Hifumi, Sari Sonoda, Taizo Uda, Cytotoxic features of human antigenases (catalytic antibody light chains) against some cancer cells. World Biotechnology Congress 2013, Boston, USA, 2013 June 3-6.
40. Taizo Uda, Naoko Fujimoto, Emi Hifumi, Human antigenase as a nano molecule showing suppressive effect on influenza virus infection. International Soft Matter Conference 2013, Rome, Italy, 2013 September 15-19. (Poster)
41. Emi Hifumi, Sari Sonoda, Taizo Uda, Human antigenases (catalytic antibody light chains) exhibiting cell cytotoxicity against cancer cells. International Soft Matter Conference 2013, Rome, Italy, 2013 September 15-19. (Poster)
42. Taizo Uda, Akira Nishizono, Emi Hifumi, Catalytic human antibody light chains (Antigenases) capable of suppressing the infection of rabies virus. Conference on Antibody Engineering and Therapeutics (ABET) 2013, (Los Angels, December 8-10)(poster)
43. Emi Hifumi, Sari Sonoda, Taizo Uda, Characteristic Features of Human Catalytic Antibody Light Chains (Antigenases) Killing Some Kinds of Cancer Cells. Conference on Antibody Engineering and Therapeutics (ABET) 2013, (Los Angels, December 8-10)(poster)
44. Naoko Fujimoto, Emi Hifumi, Taizo Uda, Suppression of the Infection of Influenza Virus Type A by Human Catalytic Antibody Light Chains (Human Antigenases). Conference on Antibody Engineering and Therapeutics (ABET) 2013, (Los Angels, December 8-10)(poster)

(国内学会発表分)

平成19年度

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. 「招待講演」: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

平成20年度

1. 「招待講演」: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)
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 Pakamatz、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 (Poster)
 18. 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 (Poster)
 19. 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
 20. 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(2)、江頭直義、九島充幸、高尾信一、三苫好治、一二三恵美、宇田泰三
 21. 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 (Poster)

平成21年

1. 「招待講演」: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)
2. 「招待講演」: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)
3. 「依頼講演」:「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)
4. 「招待講演」: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)
5. 「招待講演」: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)

6. 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
7. 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
8. 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
伊波、池辺、緒方、井上、松本、三井、田中、K. Jeang、西園
9. 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
10. 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
11. 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
12. 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
13. 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 (Poster)
14. 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
15. 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
16. 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
17. 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
18. 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
19. 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
20. 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 クローンの諸性質
坂田、一二三、西園、宇田泰三
21. 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
22. 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
23. 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 クローンの発現と諸性質
岩男、一二三、西園、宇田
 24. 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 クローンの発現と諸性質
吉岡、一二三、西園、宇田
 25. 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 (Poster)
 26. 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 gene A18b と A3/A19 の発現と諸精製 ~、坂田、池上、清家、一二三、宇田 (Poster)
 27. 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 gene A17 についての免疫化学的検討 ~、神田、一二三、宇田 (Poster)
 28. 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 (Poster)
 29. 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 (Poster)
 30. 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 (Poster)
 31. 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 (Poster)
 32. 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 (Poster)
 33. 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 (Poster)
 34. 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
 35. 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
 36. 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
 37. 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
 38. 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

平成22年

1. 「招待講演」: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
2. 「招待講演」: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
3. 「招待講演」: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
4. 「招待講演」:一二三恵美、「スーパー抗体酵素(Antigenase)でウイルスを叩く」、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
5. 「招待講演」: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
6. 「招待講演」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
7. 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
8. 東教平・西頭恵梨・一二三恵美・宇田泰三、「TNF-alpha 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
9. 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
10. 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
11. 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
12. 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
13. 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
14. 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
15. 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
16. 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
17. 松本昂・Kamruddin 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
18. 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
19. 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 クロロ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(Poster)

20. 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(Poster)
21. 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(Poster)
22. 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(Poster)
23. 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
24. 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
25. 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(Poster)
26. 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(Poster)
27. 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(Poster)
28. 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).

平成23年

1. 「招待講演」: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
2. 「招待講演」: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
3. 「招待講演」:西園 晃、「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
4. 山田 健太郎, 野口 賀津子, 西園 晃「狂犬病ウイルス街上市毒 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
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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リゼーション (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)
9. 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 (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)
 10. 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)
 11. 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)
 12. 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)
 13. 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)(Poster)
 14. 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)(Poster)
 15. 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)(Poster)
 16. 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)(Poster)
 17. 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、生物学若手の会(甲府、平成23年7月16-17日)(Poster)
 18. 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~生物学若手の会(甲府、平成23年7月16-17日)(Poster)
 19. 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、生物学若手の会(甲府、平成23年7月16-17日)(Poster)
 20. 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、生物学若手の会(甲府、平成23年7月16-17日)(Poster)
 21. 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)(Poster)
 22. 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)(Poster)
 23. 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)
 24. 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)
 25. 一二三恵美、高本麻衣、廣田勝己、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)
 26. 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)

27. 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)
28. 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)

平成24年

1. 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)
2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 一二三恵美、西園晃、宇田泰三、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」、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)
6. 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)(Poster)
7. 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)
8. 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)(Poster)
9. 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 クロー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)(Poster)
10. 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)
11. 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)
12. 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)

平成25年

1. 「招待講演」: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・バイオフォーラム、((財)九州先端科学技術研究所、平成25年2月22日)
2. 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25年3月22-25日)
3. 園田沙理¹, 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25年3月22-25日)

4. 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25年3月22-25日)
5. 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25年3月22-25日)
6. 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25年3月22-25日)
7. 藤本尚子、一二三恵美、宇田泰三、インフルエンザウイルスの感染を抑制するヒト型「スーパー抗体酵素」(第23回バイオ高分子研究会(東工大・大岡山キャンパス、平成25年7月31日-8月1日))
8. 竹添文香、藤本尚子、一二三恵美、宇田泰三、インフルエンザウイルス (H1N1) のHA保存領域に対するrecombinant JN1-2 抗体重鎖の作製(東工大・大岡山キャンパス、平成25年7月31日-8月1日)(Poster)
9. 「招待講演」一二三恵美、抗体「鎖」の秘めたる機能～生理学的活性とその意義～(生体分子 若手コロキウム、東工大・すずかけ台キャンパス、平成25年8月29日)
10. 「招待講演」一二三恵美、抗体酵素 (Antigenase) の深遠な特徴と性質：革新的医薬品を目指しマウス型からヒト型へ (第7回バイオ関連シンポジウム、名古屋大学、平成25年9月27-29日)
11. 山口美沙・楠木智也・阿部竜也・一二三恵美・宇田泰三、ヒト型抗体酵素#1シリーズの生物学的活性の検討(第7回バイオ関連シンポジウム、名古屋大学、平成25年9月27-29日)(Poster)
12. 楠木智也・一二三恵美・宇田泰三、ヒト型スーパー抗体酵素(Antigenase)のがん細胞傷害性に関する研究(第7回バイオ関連シンポジウム、名古屋大学、平成25年9月27-29日)(Poster)
13. 松本 真吾・一二三 恵美・宇田 泰三、スーパー抗体酵素(antigenase)の構造多様性 (第94春季日本化学会年会 (名古屋大学)、平成26年3月27-30日))
14. 友岡幸・森山和基・楠木智也・藤本尚子・一二三恵美・宇田泰三、Subgroup II由来のヒト型抗体軽鎖の特徴 (第94春季日本化学会年会 (名古屋大学)、平成26年3月27-30日)) (Poster)

(4)知財出願

国内出願 (11 件)

(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
15. 産経新聞・1 面 インフル特効薬「前進」大分大チーム、ウイルス死滅のヒト型抗体酵素
開発 2013.7.6

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～

(6)成果展開事例

①実用化に向けての展開

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

6. 1 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
H19年10月10日	チーム内ミーティング	大分大学	3名	今後の自動合成装置開発の進め方についての打ち合わせ
H19年10月15日	チーム内ミーティング	大分大学	5名	CRESTでの主要3テーマの説明とこれらの今後の進め方についての意見交換と意思統一
H19年11月27日	チーム内ミーティング	大分大学	2名	抗体重鎖のクローニングと発現方法、および大量培養法について意見交換
H19年11月30日	チーム内ミーティング	県立広島大学	2名	検出システムの考え方と今後の取り組み方について打ち合わせ
H19年12月20日	チーム内ミーティング	大分大学	4名	自動合成装置について共同開発が可能かについて打ち合わせた。
H20年2月21日	チーム内ミーティング	大分大学	4名	各テーマの進捗状況と人員配置について
H20年3月6日	チーム内ミーティング	大分大学	8名	マイクロチップ用電気泳動装置を持ち込んで、実際にマイクロチップを使った電気泳動実験を行った。
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3月25日	チーム内ミーティング	大分大学	3名	狂犬病ウイルスに対する抗体軽鎖のライブラリー作成とその中の7クローンについてのBioactivity、さらにはこの7クローンから酵素活性をもつクローンの選別法について討論した。
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。
H20年6月23日 ～H20年6月24日	チーム内ミーティング	大分大学	5名	抗体軽鎖遺伝子のライブラリー、その発現タンパク質のアッセイ、精製法など詳細な点について議論
H20年7月25日	チーム内ミーティング	大分大学	10名	これまでの進捗状況および今後の進め方などについて打ち合わせ。また、旦野原キャンパスの一部を視察
H20年9月9日 ～ H20年9月10日	チーム内ミーティング	県立広島大学	4名	電解発光法の習得、抗体サンプルの持参、検出感の向上法などについて打ち合わせ
H20年9月24日	チーム内ミーティング	佐賀大学	3名	タンパク質の発現、精製法、結晶化などについて意見交換

H20年10月21日	チーム内ミーティング	大分大学	3名	抗体軽鎖の発現系、および条件などについて検討
H20年10月23日 ～ H20年10月24日	チーム内ミーティング	大分大学	6名	渡邊教授による宇田チーム・一般講演会を開催。先端医工学 C 見学、タンパク質の機能解析について打ち合わせ。抗体酵素についての進捗状況の話し合い
H20年11月2日	チーム内ミーティング	大分大学	4名	大腸菌とほ乳類細胞での発現の程度と進捗状況を打ち合わせ
H20年12月16日	チーム内ミーティング	大分大学	2名	進捗状況の把握
H21年3月20日 ～21日	チーム内ミーティング	大分大学	5名	特に「研究項目2」についての進捗状況と今後の計画、展開の仕方等について突っ込んだ議論を行った。
H21年4月9日	チーム内ミーティング	工学部	10名	抗体酵素の意義と今年度の計画および各自の取り組み方
H21年4月17日	チーム内ミーティング	大分大学	8名	議題:いかに早くヒト型抗体軽鎖(酵素)を評価系に持って行くか。
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8月3日	チーム内ミーティング	大分大学	15名	今年度の重要項目と目標値を宇田が説明し、各担当の教員、研究員、院生から昨年までの全てのデータと今後の計画について皆で議論した。
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サイズの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
H21年10月22日	チーム内ミーティング	大分大学	3名	ウイルスの感染を阻止した#1 クローンのバイオアッセイの説明と次ぎの1ヶ月の研究計画、さらに、将来の重要テーマなどについて議論
H21年11月20日 ～21日	チーム内ミーティング	県立広島大学	12名	今年度の成果発表を各人が行った。完全ヒト型抗体軽鎖について約 20 クローンが樹立できたこと、この抗体遺伝子の発現、精製法の検討が進展し、いくつかのクローンは酵素活性有していること、そして生物学的活性が存在することが紹介された、また、これに基いて、今後の計画についても話し合った。
H22年4月2日	チーム内ミーティング	大分大学	4名	これまでのデータの解析と今後の計画
H22年4月21日	チーム内ミーティング	INSERM,France (Dr. Kaveri Laboratory)	5名	INSERM での研究の進捗状況と宇田 G で作成した抗体酵素#1 の譲渡

H22年5月10日	チーム内ミーティング	大分大学	3名	狂犬病や日本脳炎ウイルスを含む各種ウイルスについての検討課題
H22年5月20日	チーム内ミーティング	大分大学	2名	現時点での成果説明と今後の対応
H22年6月9日	チーム内ミーティング	大分大学	14名	スーパー抗体酵素の意義とこれまでの成果状況報告、今後の研究予定方針の説明、新規メンバーの紹介など
H22年7月16日	チーム内ミーティング(非公開)	別府湾ロイヤルホテル	13名	今年度の重要項目と目標値を宇田が説明し、各担当の教員、研究員、院生から昨年までの全てのデータと今後の計画について皆で議論した。
H22年10月16日	チーム内ミーティング(非公開)	大分大学	3名	中間評価会での内容報告と今後の対応について
H22年10月19日	チーム内ミーティング(非公開)	大分大学	4名	血液脳関門についての話と実験手法について
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。
H22年11月20日	チーム内ミーティング	大分大学	3名	領域会議での意見を踏まえての今後の対応と BBB 透過性試験への取り組み方
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2月3-4日	チーム内ミーティング	長崎大学	5名	BBB 透過試験についての立ち会い実験 & 動物実験についての打ち合わせ
H23年2月21日	チーム内ミーティング	大分大学	5名	抗体酵素の基礎研究と応用展開について説明した。
H23年5月16日	チーム内ミーティング	大分大学	4名	抗体酵素の結晶化
H23年6月1日	チーム内ミーティング	大分大学	5名	研究進捗報告会
H23年7月4日	チーム内ミーティング	大分大学	3名	インフルの vivo 試験の進め方
H23年8月3日	チーム内ミーティング	大分大学	5名	研究進捗報告会
H23年8月8日	チーム内ミーティング	大分大学	3名	データの議論と vivo でのサンプル調製
H23年8月31日	チーム内ミーティング	大分大学	6名	研究進捗報告会

H23年9月1日 ～2日	講演会と打 合わせ	大分大学	20名	タンパク質の機能
H23年10月5日	チーム内ミー ティング	大分大学	7名	研究進捗報告会
H23年10月31日	チーム内ミー ティング	大分大学	6名	研究進捗報告会
H23年11月30日 ～12月1日	講演会と打 合わせ	大分大学 工学部	20名	ペプチド工学
H23年12月30日	チーム内ミー ティング	大分大学	4名	抗体酵素の結晶化
H24年1月25日	チーム内ミー ティング	大分大学	6名	研究進捗報告会
H24年2月28日	チーム内ミー ティング	大分大学	6名	研究進捗報告会
H24年4月13日	チーム内ミー ティング	大分大学	12名	研究進捗報告会
H24年5月18日	チーム内ミー ティング	大分大学	10名	研究進捗報告会
H24年6月15日	チーム内ミー ティング	大分大学	10名	研究進捗報告会
H24年7月13日	チーム内ミー ティング	大分大学	11名	研究進捗報告会
H24年9月1-2日	On site visit	大分大学	11名	研究進捗説明会
H24年9月26日	医学部との不 定期会議	大分大学	3名	打ち合わせ
H25年1月30日-2 月1日	展示会	東京ビッグサイト	4名	展示説明
H25年3月8日	チーム内ミー ティング	大分空会議室	8名	研究報告
H25年3月15日	チーム内ミー ティング	大分大学	4名	Prof. S. Kaveri との打ち合わせ
H25年3月18日	医学部との不 定期会議	大分大学		打ち合わせ
H25年3月19日	医学部との不 定期会議	大分大学		打ち合わせ
H25年3月27日	医学部との不 定期会議	大分大学		打ち合わせ
H25年5月8日	医学部との不 定期会議	大分大学		打ち合わせ
H25年5月21日	情報交換会議	九州大学&九州先 端研		研究報告と今後の進め方など

§ 7 最後に

宇田チームはクレストとしては比較的小チームで構成されており、「一点突破」型のスタイルと言える。「一点突破」とは当然、Antigenase (スーパー抗体酵素)研究にすべてを集中し、その意義と応用展開を計ることである。日本で生まれた独自技術を、どこを突破口として世界レベルに引き上げて行くかが宇田チームに課された宿題であった。

この実現のためには、ヒトの病気の治療あるいは予防が出来る Antigenase の作製であると考え、それまで行っていたマウス型から、ヒト型へ全面転換した。発想の全面転換は頭を切り換えれば出来るけれども、技術の全面転換は結構時間がかかる。

そこで、宇田研究室、一二三研究室では雇用した研究員や技術員は勿論のこと、学生を含めて Antigenase 研究に全員で集中した。まさに一点突破体制である。大きな予算を頂いている以上、「命がけの仕事」であることはリーダーとその周囲は十分に認識していた。

当初は3本の中心的課題を立てて実行したが、堀池総括から宇田チームの構成を考えれば、そのうちの1本を外して、2本に集中するようにとの助言を頂いた。「一点突破」型により特化することができ、今から思うとこの助言は大変貴重であった。開始から2年半で基礎技術と完全ヒト型 Antigenase の作製法、大量合成法に目途が立った。また、こうした基礎的技術が確立したお陰で、狂犬病ウイルスの感染を *in vitro* & *in vivo* で抑制する Antigenase を取得できた。この Antigenase はマウスを使った治療実験まで行い、成功したが、狂犬病患者が国内にいないので臨床には持って行けなかったのは残念である。

このテーマと併行して同じ技術を使えるインフルエンザウイルスの感染を抑制する Antigenase の開発にも取り組んでいたのが奏功した。*in vitro* & *in vivo* でインフルエンザウイルスの感染を顕著に抑制する Antigenase が見つかった。毒性のないことも判明したので、これは現在、マウスを使つての投与方法や投与量などの試験に入っており、臨床に向けて前進中である。

また、中間審査の後からは、網羅的解析が必要であるとの総括からの強い意見で、抗がん作用にも取り組んだ。研究室全員総掛かりの体制である。「熱い執念は鉄をも溶かす」ではないけれども、抗がん作用については意外であった。多くのクローン (取得した 20%) に何らかの抗癌活性が見つかった。何故、健常人の血液から採取した Antigenase (癌患者からでは無い) にこれだけ多くの確率で抗がん作用を発揮する Antigenase が存在するのだろうか? 狂犬病ウイルスなどは僅か 3%の確率でしかなかったのに――、である。我々の開発した Antigenase はヒト抗体軽鎖部分であるが、面白い事に抗体軽鎖は 0.1-1%程度、重鎖より多く作られている。何故、いつも軽鎖は重鎖より若干多く作られているのであろうか? 何故、抗がん作用を示す多くの軽鎖が存在するのか? 不思議である。恐らく解答は抗体の生成と出現時期まで遡らねばならないであろう。感染症は一気に何千万という命を奪うことがある。一方、癌は多くの人命は失われるが、インフルエンザや結核のように、種が短期間で絶滅するような危険性はない。即ち、現在の免疫系は主として悪性ウイルスや悪性細菌のような種の絶滅に対応して成熟してきた、と考えられる。微生物に対する生体防御機構と癌に対するそれとは基本的に異なっている可能性はないのか? 癌にはむしろ抗体軽鎖(Antigenase)の方がうまく対応出来はしないのか? という思いが最近強くなった。

「蟹にガン無し」と言われたり、サメやエイにほとんどガンが見つからないことは、免疫系が現在のように十分発達していない、あるいは、未成熟の時代にはガンは別な経路で取り



写真 研究室の忘年会
---時にはなごやかに---

り除かれていた可能性を示唆する。完全抗体の一部である軽鎖は、この小さな癌を取り除くために太古から(抗体が生成する以前つまりヤツメウナギより以前の時代)、地球上に存在し、今に至っていると考えられなくはないであろうか?我々の体内をいつも循環している抗体軽鎖に Antigenase として抗がん作用を有するものが生まれながらにして存在する事は、いずれにせよ、驚きである。ひょっとしたら太古の残骸であるかもしれない Antigenase は将来の安全な抗がん剤へと結びつくかもしれない。

5年半の研究期間であったけれども、前半で基礎的技術の開発、後半で抗ウイルス作用、抗がん作用を示す完全ヒト型 Antigenase を開発することができた。初めに述べたように「一点突破型」の体制と「やり抜かねば」とい姿勢があったればこそここまで辿り着けたと思える。全員が必死で取り組んだのと、堀池総括から「余計なことはするな」と注意をうけ、その環境に旨く導いてもらった事が大きい。研究は「広く深く」が理想的ではあるが、「一点突破型」体制もテーマによっては必要であろう。

本プロジェクトを進めるに当たり、堀池研究総括、池田主任調査員、評価委員、JST 知財部、研究推進部の方々には大変お世話になった。成果がなかなか出ないとき一部叱責も受けたが、暖かくも見つめてもらった。予算、助言、意見、有難い事ばかりが印象に残る。この場をお借りして衷心より御礼を申し上げたい。