

2Ep07 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 恵美^{1,3}, 宇田 泰三²
(¹ 大分大・先端医工学研究センター,² 大分大・工・応化,³ さきがけ研究・JST)

【背景・目的】A 型インフルエンザウイルスの感染は、hemagglutinin(HA) とヒト絨毛上皮細胞表面との結合によって始まる。A 型ウイルスでは HA に 6 種類の亜型 (H1~H16) が存在する。我々は、H1、H2、H3 および H5 に 共通する保存領域に対するモノクローナル抗体 (InfA series) の作製を行ったのでそれらの生化学的、免疫化学的そして酵素学的検討結果を報告する。【実験方法・結果】抗体はマウス腹水から、その重鎖・軽鎖はこれまでの方法で精製した。また、抗体軽鎖は pET20b(+) などに組み込んで大腸菌 BL21(DE3)pLysS で発現させたものを使用した。抗体の免疫学的性質は ELISA および western blot で、生化学的性質は ITC や 2 次元電気泳動画像解析 (Typhoon) を行って調べた。酵素活性試験は抗体を MCA 基質と混合し、温度 37℃ の条件下で行った。InfA-15 抗体およびその軽鎖・重鎖を用いてインフルエンザウイルスに対する western blot を行なったところ系統樹的に遠い H1N1、H3N2 共に明確に反応しており興味ある結果が得られた。発現 InfA15 抗体軽鎖 (rec InfA15L) はマウスから精製して得た抗体軽鎖よりも高い抗原特異性を示し、かつ、monomer よりも dimer を形成し易いことが分かった。MCA 基質分解試験では抗体精製後の透析濃度、保存条件の違いが触媒能力へ影響を与えることが示唆された。

Features and expression of monoclonal antibody (InfA-15) raised against highly conserved region of hemagglutinin molecule of influenza virus A type

○Emi HIFUMI^{1,3}, Taizo UDA²
(¹ Adv. Med. Eng. Research Center, Oita Univ., ² Dept. Appl. Chem., Fac. Eng., Oita Univ., ³ さきがけ研究・JST)

Key words influenza virus, monoclonal antibody, hemagglutinin

2Ep10 マルチターゲッティング法に基づく新規モノクローナル抗体作製法の開発

○古田 健二, 佐野 善忠, 湊元 幹太, 富田 昌弘
(三重大院・工・分子素材)

[目的] 本研究では、電気パルス (PEF: Pulsed Electric Field) 法に基づくモノクローナル抗体作製において最も重要なステップの 1 つである抗原による B 細胞選択に着目し、複数抗原によって同時感作されたマウス B 細胞を目的の各抗原によって選択後、ミエローマ細胞と選択的電気パルス融合を行い、複数抗原に対する同時マルチターゲッティングモノクローナル抗体作製法の開発を目的とした。
[実験方法及び結果] マウス腹腔内に複数抗原とアジュバントを混合した油中水型エマルジョンを注射し免疫化を行った。その後、マウスから無菌的に脾臓を取り出し、各抗原によって目的の B 細胞を選択した。ビオチン/アビジン間の強い親和力を利用してミエローマ細胞と架橋形成させ、両細胞に電気パルスを負荷して選択的に融合を行った。作製されたハイブリドーマを HAT 選択培地で培養後、上清に分泌される抗体を、ELISA 法を用いてアッセイを行い、各抗原に対する抗体価を決定した。その結果、同時に 3 種類の抗原に対する抗体産生ハイブリドーマ作製が可能となり、その抗原投与方法は別々でも同時でもハイブリドーマの作製効率に影響を与えないことが明らかになった。そこで、マウスの負担を配慮して同時に抗原を投与方法を用いて、4 種類の抗原に対する抗体産生ハイブリドーマ作製を明らかにすることができた。さらに、複数抗原によって同時感作された脾細胞から目的の 1 種類の抗原に対する抗体産生ハイブリドーマの選択的作製も可能であることが示された。

Multiple-targeting technique for simultaneous generation of novel monoclonal antibodies

○Kenji FURUTA, Yoshitada SANO, Kanta TSUMOTO,
Masahiro TOMITA
(Dept. Chem. Matrls., Grad. Sch. Eng., Mie Univ.)

Key words Hybridoma cell, Monoclonal antibody, Multiple-targeting, Pulsed electric field method

2Ep08 一細胞 RT-PCR と無細胞蛋白質合成による抗インフルエンザウイルスモノクローナル抗体の取得

○八幡 翔, 児島 孝明, 中野 秀雄
(名大院・生命農・生命技術)

【目的】モノクローナル抗体は近年、抗体医薬として注目を集めており、これまで抜本的な治療法が存在しなかった分野にも光明を与え始めている。本研究室では、SICREX 法 (Single-cell RT-PCR linked *in vitro* expression) という新規モノクローナル抗体取得法が開発されている。この方法は一細胞 RT-PCR と無細胞蛋白質合成を組み合わせることにより、マウスの脾臓やヒト末梢血のリンパ細胞からわずか 2 日で抗体が取得できる。本研究では、インフルエンザウイルスの表面蛋白質ヘマグルチニン (HA) ワクチンを抗原とし、この SICREX 法を用いてインフルエンザウイルスに対する抗体を取得することを目的とした。
【方法・結果】まず免疫性を与えたヒトの末梢血から抗原結合能を有する B 細胞を、磁性マイクロビーズを用いて選択的に単離する。そしてこれらの細胞を限界希釈し、1 ウェルあたり 1 細胞となるように分注し、一細胞逆転写 PCR および 2 段階の PCR により抗体の遺伝子を増幅する。次に無細胞蛋白質合成系での転写・翻訳反応に必要な配列を抗体遺伝子に付加し、無細胞蛋白質合成を行う。合成した抗体の結合性を ELISA で測定し、シグナルの高い遺伝子を取得する。以上が SICREX 法である。これまでに、HA ワクチンを用いてヒト末梢血から HA 結合能を有する B 細胞を単離し、一細胞由来の抗体遺伝子の増幅に成功している。現在、増幅できた抗体遺伝子を発現し、その評価を行っている。

Generation of monoclonal antibodies against influenza virus from single B cells using RT-PCR technique and *in vitro* expression

○Sho YAHATA, Takaaki KOJIMA, Hideo NAKANO
(GDept. Bioeng., Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

Key words monoclonal antibody, *in vitro* coupled transcription/translation, single-cell RT-PCR, hemagglutinin

2Ep11 疾病関連新規バイオマーカーに対するモノクローナル抗体作製法の開発

○深見 幹仁¹, 小河 彩葉¹, 湊元 幹太¹, 木下 憲明², 富田 昌弘¹
(¹ 三重大院・工・分子素材, ² 免疫生物研究所)

[目的] アルファ・フェトプロテイン (AFP) は糖タンパクであり、肝細胞ガン、肝炎、肝硬変などで血中濃度が上昇するが、肝細胞ガンに対する特異性は低い。しかし、ガン化によってフコースが付加されたフコース結合型 AFP は、肝細胞ガンに対して特異性が高く、肝細胞ガンの早期発見や、治療の効果判定に利用できる。そこで本研究では、フコース結合型 AFP の糖鎖構造を特異的に認識できるモノクローナル抗体作製法の開発を目的とした。
[実験方法及び結果] フコース結合型 AFP の糖鎖構造と類似した構造を有する IV グリカン (フコース含有ペプチド) をタンパク質と結合させたコンジュゲートを抗原として用いて、マウスの免疫化を行った後、電気パルス (PEF; Pulsed Electric Field) 法に基づく融合実験を行った。PEF 法とは、ビオチン化抗原を用いて目的の感作 B 細胞を選択後、ストレプトアビジンを介してビオチン化ミエローマ細胞と結合させ、電気パルスを負荷して両細胞を選択的に融合する方法である。IV グリカン (MSA (マウス血清アルブミン)) と結合させたものを抗原として用いた場合において、免疫化に成功した。PEF 法に基づき融合実験を行ったところ、目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが得られた。そのモノクローナル抗体の特異性・親和性は十分なものではなかったが、糖ペプチドに対するモノクローナル抗体作製の可能性が示唆された。

Efficient production of novel monoclonal antibodies against disease-related new biomarker

○Mikihito FUKAMI¹, Ayana OGAWA¹, Kanta TSUMOTO¹,
Noriaki KINOSHITA², Masahiro TOMITA¹
(¹ Dept. Chem. Matrls., Grad. Sch. Eng., Mie Univ., ² Immuno-Biol. Lab.)

Key words Alpha-fetoprotein, Biomarker, Monoclonal antibody, Pulsed electric field method