

Title	Establishment of stable mouse/human-human hybrid cell lines producing large amounts of anti-tetanus human monoclonal antibodies with high neutralizing activity
Author(s)	亀井, 優徳
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/37839
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	亀井優徳
博士の専攻分野 の名称	博士（医学）
学位記番号	第 10013 号
学位授与年月日	平成 4 年 2 月 4 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Establishment of stable mouse/human-human hybrid cell lines producing large amounts of anti-tetanus human monoclonal antibodies with high neutralizing activity (高い中和活性を持つ抗破傷風ヒト型モノクローナル抗体を、安定して大量に産生するマウス/ヒト-ヒト ハイブリドーマ株の樹立)
論文審査委員	(主査) 教授 松田 守弘 (副査) 教授 上田 重晴 教授 本田 武司

論文内容の要旨

〔目的〕

破傷風の治療には、抗毒素血清療法が発見されて以来まず抗破傷風ウマポリクローナル抗体が用いられてきた。しかし、ウマ抗毒素はヒトにとって異種蛋白であり血清病などの好ましくない副反応を起こすので近年、ヒトの抗毒素ポリクローナル抗体が実用化され、治療だけでなく未免疫者の受傷時の破傷風予防にも広く用いられている。しかしながら、ヒト抗毒素ポリクローナル抗体は、ヒトの血液製剤であり、その供給量に限界があり、またウイルスの混入の可能性などの問題がある。そこでこれらの問題点を解決するために、ヒト型モノクローナル抗毒抗体の開発が試みられている。そのためには、まず少なくとも(1)ヒト型で(2)高い毒素中和能をもつモノクローナル抗体(MAb)を(3)安定して(4)大量に(5)無血清培地で産生するようなハイブリドーマを得ることが必要である。しかしこれらの条件をすべて満足するハイブリドーマは得られていなかった。本研究では、これらの条件を充たすハイブリドーマを得ることにはじめて成功し、これらのハイブリドーマが産生するMAbの性状を調べ破傷風に対する治療および予防の効果を調べた。

〔方法ならびに成績〕

1. ハイブリドーマの作製

沈降破傷風トキソイド（阪大微研会製）で免疫した健常人ボランティアの末梢血から密度勾配遠心法により分離したリンパ球を、細胞融合を行う前に抗原（破傷風トキソイド，5ng/ml）とポークウィードマイトージェンを加え5日間抗原刺激を行い、親細胞であるマウス/ヒトのヘテロミエ

ローマ, SHM D-33またはRF-S1と, ポリエチレングリコールを用いて細胞融合を行った。常法にしたがってHAT培地によりハイブリドーマを選択し, 限界希釈法により少なくとも3回クローニングを行った。抗破傷風抗体を産生しているハイブリドーマの選択は酵素免疫法により行った。

2. ハイブリドーマの培養および抗体生産

破傷風毒素と反応するMAbを産生する5株(G1, G2, G3, G4およびG6株)のハイブリドーマを得た。それらは無血清培地でも十分に増殖し, 培養上清中に10~20 µg/mlの抗体を産生した。また, 500 mlの培養槽を持つ高密度還流培養装置で5~6 mg/日の抗体が得られた。

3. モノクローナル抗体の性状

1) 5種類のMAbのサブクラスを酵素免疫法を用いて調べたところ, 全てIgG1であった。

2) 破傷風毒素およびフラグメントを用いて酵素免疫法とウェスタンブロッティングを行った結果, MAb-G4はフラグメント[A], MAb-G1, G3およびG6はフラグメント[B], MAb-G2はフラグメント[C]を認識し, 各MAbの破傷風毒素に対する親和力は, MAb-G3は $2.9 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$, 他の4種類の抗体は全て約 10^{11}M^{-1} と非常に高い親和力を持つことが明らかとなった。

3) モノクローナル抗体の毒素中和活性

MAbを段階希釈した後, 試験毒素と混合し37°Cで1時間インキュベートした後, OF1マウスの後肢に筋注した。症状の進行はスコア法により詳しく観察した。5種類のMAbはそれぞれ単独で, 十分量では, マウスを救うことができた。それ以下の量ではそれぞれ特異な中和パターンを示し, ポリクローナル抗毒素抗体とは著しく異なり, 遅い中毒発現や96時間よりもはるかに遅い死亡を起こした。中和活性の定量は, 国際単位(IU)既知のヒト抗毒素ポリクローナル抗体(テタノブリン, ミドリ十字社製)と最小生存量を比較することにより行った。中和活性は, MAb-G2とG6が特に高く, それぞれ4.3 IU/100 µg IgGおよび1.4 IU/100 µg IgGであった。またMAbを組み合わせることにより中和活性は増加し相乗効果がみられた。

4) モノクローナル抗体の精製とその破傷風の予防治療効果

これらのMAbは, プロテインA-セルロフエインカラムとMono Sカラムで容易に, しかも高度に精製することができ, 精製MAbは, OF1マウスを用いた毒素攻撃実験で予防および治療効果を示した。

(総括)

1. 破傷風毒素を特異的に中和するMAbを安定にしかも無血清培地中でも大量に産生するハイブリドーマ5株を樹立した。
2. これらのMAbはすべてIgG1で, 非常に高い親和力を持ち, MAb-G4は破傷風毒素のフラグメント[A], MAb-G1, G3およびG6はフラグメント[B]そしてMAb-G2はフラグメント[C]を認識した。
3. ポリクローナル抗毒素抗体との比較から, MAbによる中和の特徴を明らかにし, それに基づいて信頼できる中和活性の定量が出来た。得られたMAbは高い中和活性を持ち, またMAbを組合わ

せて使用することにより中和活性の相乗効果がみられた。

以上の結果、ヒト破傷風の予防治療に有用なヒト型 MAAb が得られた。

論文審査の結果の要旨

破傷風の治療には抗毒素療法の見聞以来長い間、ウマのポリクローナルな抗毒素血清が用いられていたが、現在、先進工業国では homologous なヒトのポリクローナル抗毒素 IgG 製剤におきかえられている。しかし、後者にも、血液製剤としての供給源の制限やウイルス感染の可能性などの問題がある。本研究は、これらの問題点を克服するために、高い毒素中和活性をもつ抗破傷風ヒト型モノクローナル抗体を安定して大量に産生し、ヒトの破傷風の治療、予防に実用化できる条件を備えたハイブリドーマ株5株を樹立することにはじめて成功したものである。本研究ではさらに、これらのハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体の産生条件、性状を調べ、毒素中和反応を定量的に解析し、重要な新見解をも得た。したがって本研究は学位に十分値する。