

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 26 年 2 月 3 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659115

研究課題名（和文）次世代ハイブリドーマテクノロジーの高感度ウイルス診断への応用

研究課題名（英文）Highly sensitive diagnosis for virus based on next generation of hybridoma technology

研究代表者

富田 昌弘 (TOMITA MASAHIRO)

三重大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：20183494

研究成果の概要（和文）：

3種のインフルエンザウイルスA新型（H1N1）、Aソ連型（H1N1）、A香港型（H3N2）のそれぞれ（亜型）をマウスに投与して免疫化を行った。マウス抗血清を調製して、HI（赤血球凝集抑制）試験法に基づき各抗血清の亜型特異性を検証した。その結果、3種の抗血清は各亜型特異性を有していた。そこで、次世代ハイブリドーマテクノロジーを利用したモノクローナル抗体作製を検討した。その結果、幾つかの目的のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを得ることができた。

研究成果の概要（英文）：

Three different types of influenza virus such as A/California/07/2009(H1N1), A/Brisbane/59/2007(H1N1) and A/Uruguay/716/2007(H3N2) were employed for immunization. As a result, each anti-serum indicated specificity to its own type of influenza virus by hemagglutination inhibition (HI) test. Selective production of monoclonal antibodies was carried out by use of next generation of hybridoma technology and some promising hybridoma cells secreting aimed monoclonal antibodies were obtained.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	0	1,300,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	420,000	3,120,000

研究分野：抗体工学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：インフルエンザウイルス、電気パルス融合、ハイブリドーマテクノロジー、バイオチン/アビジン架橋、モノクローナル抗体、B細胞選択、ELISA法、HI試験法

1. 研究開始当初の背景

毎年流行するインフルエンザウイルスには、主としてA型とB型があり、A型はヘマ

グルチニン（HまたはHA）とノイラミニダーゼ（N）の組み合わせにより亜型に細分される。A型インフルエンザのうち、いわゆる新

型インフルエンザはH1N1、季節性インフルエンザのAソ連型はH1N1、A香港型はH3N2、今後流行が危惧される高病原性鳥インフルエンザウイルスはH5N1である。2008～2009年に日本で流行したAソ連型の9割以上が治療薬タミフルに耐性であり(H21.1.16付厚生労働省報告)、亜型の同定は治療方針決定の上でも非常に重要である。イムノクロマト法を用いた現在のインフルエンザ簡易検出法では、A型とB型の区別は可能であるが、亜型の同定は不可能である。本申請における次世代ハイブリドーマテクノロジーは、従来のPEG(ポリエチレングリコール)法と比べて40倍もの高い融合効率が実現できる優位性を持つことをすでに実証している(特許出願済:富田 国際特開W02004/078964, 国際特願PCT/JP2004/006298, USA特願10/547,810)。

私達は、次世代ハイブリドーマテクノロジーを用いて、アルツハイマー病関連タンパク質であるプレセニリン1のペプチド配列に対する特異的モノクローナル抗体作製にも成功している。さらに、低分子量抗原のため従来法ではその作製が困難とされている環境ホルモンに対しても本法の有用性が実証されている。因みに、この方法で得られたモノクローナル抗体は、従来法の10～1000倍(親和定数 $K_a=10^9\sim 10^{11}M$)もの高親和性(高感度)を示す結果も得ており、研究を進めるための基盤は整備されている。

2. 研究の目的

現在、幅広く利用されている抗原抗体反応に基づくインフルエンザ簡易検出法は、迅速にインフルエンザウイルス感染の有無を検出できる優れた方法である。しかし、現行法の特異性は必ずしも完全ではないため、A型インフルエンザウイルスの亜型(例えば、新型ウイルスとソ連型ウイルス)の同定は不可能である。それを補うため、遺伝子診断による最終的な同定が必要となる。遺伝子診断は非常に特異性が高い方法であるが、簡易検出法に比べて時間がかかり、限られた施設でしか行えない欠点がある。そこで、本研究では、次世代ハイブリドーマテクノロジーに基づき、今までにない高性能モノクローナル抗体を作製し、現在のところ困難であるとされている、簡易検出法によるインフルエンザウイルス亜型の短時間かつ高感度診断を目指した。

3. 研究の方法

(1) マウスの免疫化

ホルマリン固定された3種のA型インフルエンザウイルス(抗原)の各々を完全フロイドアジュバントと混和して油中水型エマルジョンを調製し、生体内免疫法に基づきマウス腹腔内に投与した。各インフルエンザウイルスは、MDCK(イヌ腎臓尿細管上皮細胞由来)細胞に感染したものを利用した。初回免疫の1～2週間後、抗原と不完全フロイドアジュバントとのエマルジョンを再度マウス腹腔内に注射した。この操作を数回繰り返した後、マウス眼窩静脈叢から採血を行い、血清中の抗体価を測定した。さらに、免疫抗原として、3種のインフルエンザウイルス由来タンパク質のヘマグルチニンも用いた。

(2) B細胞選択のためのビオチン-ウイルスコンジュゲートの調製

NHS(*N*-hydroxysuccinimidyl)-ビオチンと各インフルエンザウイルス懸濁液を混合し、37℃で20～30分間ローテーションを行うことによってウイルスタンパク質のリシン残基をビオチン化し、ビオチン-ウイルスコンジュゲートを作製した。また、インフルエンザウイルスタンパク質であるヘマグルチニンのビオチン化も同様な方法で行った。

(3) 次世代ハイブリドーマテクノロジーに基づくモノクローナル抗体作製(図1)

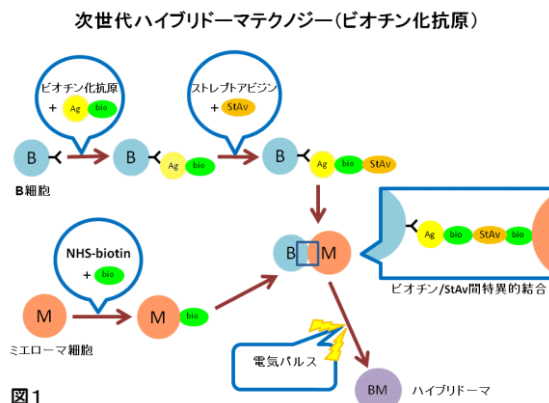


図1

ビオチン化抗原(インフルエンザウイルスおよびヘマグルチニン)を用いて、免疫後のマウスから調製された脾細胞懸濁液中の目的の感作B細胞を選択した。その後、ビオチン/アビジン架橋を用いてミエローマ細胞と架橋形成させ、架橋形成された細胞複合体に対して、直流矩形波の高電圧電気パルスを負荷して選択的融合を行い、抗原特異的高性能モノクローナル抗体を作製した。

(4) 抗血清(ポリクローナル抗体)および取得モノクローナル抗体の特異性の検証

3種の抗血清および新規法によって作製されたモノクローナル抗体に対して、HI(赤血球凝集抑制)試験法、ELISA(酵素免疫測定法)法およびWestern blotting(イムノブロット)法を行い、A型インフルエンザウイルスに分類される新型、ソ連型、香港型に対す

る交差反応性を検証した。

(5) ウイルス特異的エピトープ配列の検索

既に配列が既知となっている A 新型、A ソ連型および A 香港型由来のヘマグルチニン、ノイラミニダーゼ等の一次構造に基づいた検索を行い、A 新型特異的なエピトープ（抗原決定基）配列を構築した。今後の流行に対応するため、近年の流行株類似であるウイルス株について検討した。Immune Epitope DATABASE および Influenza Research Database に基づき主として下記のウイルス株について解析した。

- [A/California/04/2009(H1N1) (A 新型)],
- [A/California/07/2009(H1N1) (A 新型)],
- [A/Brisbane/59/2007(H1N1) (A ソ連型)],
- [A/Uruguay/716/2007(H3N2) (A 香港型)].

最終的に、11 残基および 17 残基のペプチド配列を決定した。

(6) B 細胞選択のためのストレプトアビジン-エピトープ配列コンジュゲートの調製

リシン残基およびシステイン残基と特異的な共有結合を形成できるクロスリンカーである、MBS (*m*-maleimidobenzoyl *N*-hydroxysuccinimide) とストレプトアビジンを混合し、ストレプトアビジンのリシン残基を利用してストレプトアビジン-MBS を作製した。このとき、ストレプトアビジンのシステイン残基は分子内でジスルフィド結合 (-S-S-) を形成しているため反応には与らない。次に、上記(5)で構築されたエピトープ配列の C 末端にシステイン残基が導入されたペプチド (11 および 17 残基) とストレプトアビジン-MBS を反応させ、ストレプトアビジン-MBS-エピトープ配列コンジュゲートを得た。

(7) 次世代ハイブリドーマテクノロジーに基づくモノクローナル抗体作製 (図 2)

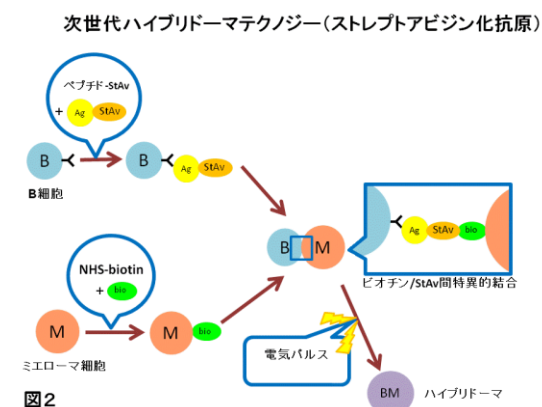


図 2

ストレプトアビジン-MBS-エピトープ（ペプチド）配列コンジュゲートを用いて、目的の感作 B 細胞を選択し、B 細胞-抗原（エピ

トープ）-ストレプトアビジン複合体を得るために、上記コンジュゲートの検証を行った。

まず、ビオチンとの結合性を確認するため、コンジュゲートを 96 穴プレートに添加後、ビオチン化タンパク質（例えばビオチン-牛血清アルブミン）と牛血清アルブミンに対する抗血清を用いて行った。一方、コンジュゲートの抗原性の確認には、A 新型インフルエンザウイルスおよびそのヘマグルチニンによって免疫化された抗血清を用いた。

検証後、ビオチン化ミエローマ細胞と結合させて B 細胞-ペプチド-ストレプトアビジン-ビオチン-ミエローマ細胞複合体を形成させ、上述(3)に準じて高性能モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製を予定した。

4. 研究成果

3 種のインフルエンザウイルス A 新型 (H1N1)、A ソ連型 (H1N1)、A 香港型 (H3N2) のそれぞれをマウスに免疫化後、血清中のポリクローナル抗体の特異性を検証した。この実験のポイントは、各インフルエンザウイルスに対する高性能モノクローナル抗体を作製するためには、目的のインフルエンザウイルスに対して特異的な抗体産生 B 細胞の分化、成熟が不可欠である。3 種のインフルエンザウイルスは、多くの共通のエピトープ（抗原決定基）を有している可能性が高いため、各々特異的なエピトープを認識する抗体が産生されているかの確認が必要である。

そこで、HI 試験法と ELISA 法に基づき特異性の検証を行った。HI 試験法の原理は、インフルエンザウイルスのタンパク質であるヘマグルチニンが、赤血球凝集能を有することを利用したアッセイ法である。図 3 にその原理を示す。

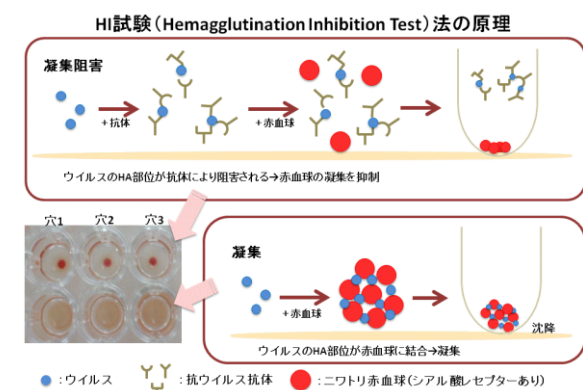


図 3

HI 試験法において、ヘマグルチニン特異抗体がインフルエンザウイルスのヘマグルチニンに結合するとその赤血球凝集能が阻害され、穴 1 ~ 穴 3 の上部に示される丸底に沈

殿したワンスポットの赤血球が確認される。一方、抗体が結合していないインフルエンザウイルスは、赤血球凝集作用を持つため、穴1～穴3の下部の様な赤血球の凝集体が形成される。その形状はあたかも赤血球がウェル内に分散したかのように見える。

そこで、MDCK 感染 A 新型インフルエンザウイルスによって免疫化を行った抗血清（ポリクローナル抗体）を用いて HI 試験を行った。その結果、A 新型インフルエンザウイルスの赤血球凝集作用が 640 倍希釈の抗血清存在下において阻害された（図 4）。一方、A ソ連型および A 香港型インフルエンザの赤血球凝集能は、40 倍希釈抗血清においても全く阻害されなかった。すなわち、A 新型インフルエンザウイルスのヘマグルチニンに対して特異的な抗体が産生されている事実が強く示唆された。さらに、A 新型インフルエンザウイルスのヘマグルチニンを免疫抗原とした場合は、その阻害作用がより一層強くなり、4096 倍希釈の抗血清存在下においても、赤血球凝集能の特異的な阻害を認めることができた（図 4）。

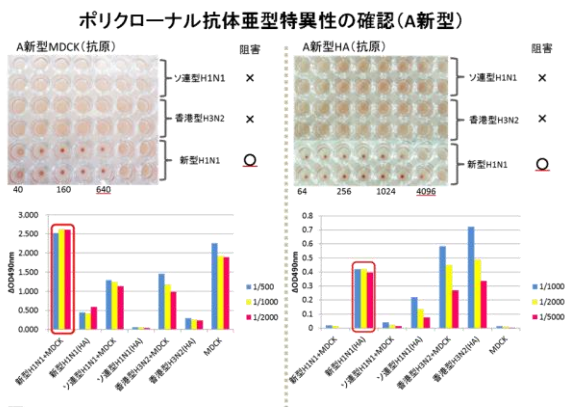


図4

一方、ELISA 法（図 4 下段）においては、A 新型インフルエンザウイルスに対する抗血清は、A ソ連型と A 香港型（ソ連型 < 香港型）とも交差反応性を示した。これらの結果から、A 新型は、A ソ連型および A 香港型と共通エピトープを有するが、A 新型ヘマグルチニンの特異的なエピトープを認識する抗体産生 B 細胞が分化、成熟している事実が示された。

各亜型特異的赤血球凝集阻害は、A ソ連型および A 香港型に対する各々の抗血清を用いた HI 試験法においても、A 新型と同様な特異的抗体産生 B 細胞の存在が示された（図 5）。

そこで、次世代ハイブリドーマテクノロジー（図 1）に基づくモノクローナル抗体作製実験を行った。A 新型、A ソ連型、A 香港型の 3 種の MDCK 感染のインフルエンザウイルスおよびヘマグルチニンを免疫抗原として用いた。ここで、MDCK 感染インフルエンザウイルスを用いた場合、MDCK に対する抗体産生 B 細胞

インフルエンザウイルスに対する HI 試験法のまとめ

PAb 亜型特異性			
抗血清\ヘマグルチニン	新型	ソ連型	香港型
新型H1N1 + MDCK	○ 640倍	×	×
新型H1N1(HA)	○ 4096倍	×	×
ソ連型H1N1 + MDCK	×	○ 160倍	×
ソ連型H1N1(HA)	×	○ 2560倍	×
香港型H3N2 + MDCK	×	×	○ 512倍
香港型H3N2(HA)	△	×	○ 512倍

(○:阻害あり, ×:阻害なし)

それぞれの亜型(3種類)に対する特異性を確認

図5

胞が産生されるため、それを排除し、さらに、目的のインフルエンザ特異抗体産生 B 細胞を選択する目的で、ビオチン化ヘマグルチニンを用いた。ヘマグルチニンを免疫抗原として用いた場合も、目的の B 細胞選択にビオチン化ヘマグルチニンを使用した。その結果、幾つかの目的のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを得ることができた。今後、限界希釈法に基づくクロニングと特異性の検証を行う予定でいる。

また、A 新型インフルエンザウイルス特異的なペプチド配列に基づくモノクローナル抗体作製も試みた（図 2）。この場合、ペプチド-MBS-ストレプトアビジンを B 細胞選択のコンジュゲートとして用いるため、まず、その検証を行った。

その結果、上記コンジュゲートのビオチン結合能を確認することができた。しかし、MDCK 感染 A 新型ウイルスおよび A 新型ヘマグルチニンに対するマウス抗血清との交差反応性は示さなかった。現在のところ、この理由は判明していない。しかし、今後、A ソ連型、A 香港型由来の抗血清との反応性の確認、さらに、ペプチドのみを ELISA 抗原として用いる系に基づく検討を行い、解明したいと考えている。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 9 件）

- ① Katsuya Kato, Masakazu Nishida, Kimiyasu Ito, Masahiro Tomita: Characterization of silica particles prepared via urease-catalyzed urea hydrolysis and activity of urease in

- sol-gel silica matrix. *Applied Surface Science*, Accepted (2012) 査読有
- ② Toru Orita, Masahiro Tomita, Megumi Harada, Katsuya Kato: Binding activity of avidin to the biotin within mesoporous silica materials for bioanalytical applications. *Analytical Biochemistry*, 425, 1-9 (2012) 査読有
- ③ Toru Orita, Masahiro Tomita, Takao Saito, Masakazu Nishida, Katsuya Kato: Immobilization of cholesterol esterase in mesoporous silica materials and its hydrolytic activity toward diethyl phthalate. *Materials Science and Engineering C*, 32, 718-724 (2012) 査読有
- ④ Kanta Tsumoto, Masahiro Oohashi, Masahiro Tomita: Monitoring of membrane collapse and enzymatic reaction with single giant liposomes embedded in agarose gel. *Colloid and Polymer Science*, 289, 1337-1346 (2011) 査読有
- ⑤ Kanta Tsumoto, Yuki Nakamura, Mina Yamazoe, Masahiro Tomita: Giant liposomes as microcapsules with large trapping volumes: Downsizing through various membrane filters and analysis with a calcein quenching method. *Micro-Nano Mechatronics and Human Science, MHS 2011 Micro-Nano Global COE (2011)*, 439-444 (2011) 査読有
- ⑥ Masahiro Tomita, Kanta Tsumoto: Hybridoma technologies for antibody production. *Immunotherapy*, 3, 371-380 (2011) 査読有
- ⑦ Toru Orita, Katsuya Kato, Masahiro Tomita: Immobilization of antibodies on mesoporous silica materials and their binding abilities to antigens. *Journal of the Ceramic Society of Japan*, 119, 238-245 (2011) 査読有
- ⑧ Toru Orita, Masahiro Tomita, Katsuya Kato: Regulation of cellular responses to macroporous inorganic films prepared by the inverse-opal method. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84, 187-197 (2011) 査読有
- ⑨ Masahiro Tomita, Kanta Tsumoto: New hybridoma technology based on antigen-specific immunoglobulin receptors. *FEBS Journal*, Suppl. 1, 50 (2011) 査読無
- [学会発表] (計43件)
- ① 富田昌弘: 次世代ハイブリドーマテクノロジーの開発と応用. 第11回名古屋駅前イノベーション技術シーズ発表会(招待講演)、2012年3月8日、名古屋駅前イノベーション
- ② 富田昌弘: 次世代ハイブリドーマテクノロジーの開発. 第34回日本分子生物学会年会、2011年12月13日、パシフィコ横浜
- ③ Yoshiharu Asaoka: Selective affinity purification of human IgG by a recombinant human FcγRI. International Symposium for Sustainability by Engineering at MIU (IS² EMU 2011), 2011年12月2日、三重大学
- ④ Kanta Tsumoto: Giant liposomes as microcapsules with large trapping volumes: Downsizing through various membrane filters and analysis with a calcein quenching method. IEEE 2011 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science, MHS 2011 Micro-Nano Global COE (2011), 2011年11月8日、名古屋大学
- ⑤ Masahiro Tomita: New hybridoma technologies for producing monoclonal antibodies. The 16th International Conference on Human Antibodies & Hybridomas, 2011年11月8日、Cannes, France
- ⑥ 小畑晴香: マルチターゲットニングモノクローナル抗体作製技術の開発. 第84回日本生化学会大会、2011年9月23日、国立京都国際会館
- ⑦ 織田康行: 医療に応用可能な受容体タンパク質の立体構造特異的モノクローナル抗体作製技術の確立. 第84回日本生化学会大会、2011年9月23日、国立京都国際会館
- ⑧ 安川智之: 誘電泳動による粒子配列パターンの拡張と細胞表面抗原検出への応用. 日本分析化学会第60年会、2011年9月16日、名古屋大学
- ⑨ 富田昌弘: 海洋微量物質の同時検出を目指した連続的モノクローナル抗体作製技術の開発. 第14回マリンバイオテクノロジー学会大会、2011年5月28日、静岡県コンベンションアーツセンター
- ⑩ 織田康行: 受容体タンパク質の立体構造特異的モノクローナル抗体作製技術の開発. 第75回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム、2011年5月28日、静岡県立大学
- ⑪ 大嶋利征: DNA免疫法に基づく立体構造認識モノクローナル抗体の選択的作製法の開発. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会、2010年12月7日、

- 神戸ポートアイランド
- ⑫ 早川智也：ハプテン抗原特異的高性能モノクローナル抗体作製技術の開発. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会、2010年12月7日、神戸ポートアイランド
 - ⑬ Masahiro Tomita: New hybridoma technology based on antigen-specific immunoglobulin receptors. 35th FEBS Congress, 2010年6月30日, Gothenburg, Sweden
 - ⑭ 小畑晴香：ペプチド抗原に対する特異的モノクローナル抗体作製技術の開発. 第74回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム、2010年5月29日、名古屋大学医学部
 - ⑮ Masahiro Tomita: The next generation of hybridoma technology. The 15th International Conference on Human Antibodies & Hybridomas, 2010年4月16日, Porto, Portugal

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：微生物の迅速診断を可能とする特異抗体の高効率作製法
発明者：富田昌弘
権利者：国立大学法人三重大学
種類：特許
番号：特願 2013-209093 (特願 2012-222032 の国内優先権主張出願)
出願年月日：2013年10月4日 (基礎出願日 2012年10月4日)
国内外の別：国内

○取得状況(計1件)

名称：細胞膜タンパク質の立体構造を認識する抗体を産生するハイブリドーマの作製方法
発明者：富田昌弘、松葉隆雄
権利者：株式会社三重ティーエルオー、東ソー株式会社
種類：特許
番号：特許第4599527号
取得年月日：2010年10月8日
国内外の別：国内

〔その他〕

新聞、オンライン掲載

- ① 富田昌弘、東ソー(株)：抗体医薬 効率的な作製法開発. 産経新聞 掲載日 2011年2月9日

- ② 富田昌弘、東ソー(株)：がん治療薬開発に期待. 読売新聞 ONLINE 掲載日 2011年2月4日
- ③ 富田昌弘、東ソー(株)：「抗体医薬」作製法で特許. 読売新聞 掲載日 2011年2月2日
- ④ 富田昌弘、東ソー(株)：抗体医薬の作製法開発. がん治療の副作用軽減. 伊勢新聞 掲載日 2011年2月2日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 昌弘 (TOMITA MASAHIRO)
三重大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：20183494

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 研究協力者

赤地 重宏 (AKACHI SHIGEHIRO)
研究者番号：登録なし