

総括研究報告書

1. 研究開発課題名： 特殊な血液製剤や遺伝子組換え製剤の製造等に関する研究
2. 研究開発代表者： 佐竹 正博（日本赤十字社 中央血液研究所 所長）
3. 研究開発の成果

国内で使用されている3種類の特殊免疫グロブリン製剤—抗HBs人免疫グロブリン（HBIG）・抗破傷風人免疫グロブリン・抗D人免疫グロブリン—はそれぞれ受動免疫によるB型肝炎ウイルスの感染防止・破傷風菌毒素（TT）中和作用による破傷風の症状軽減・RhD(-)母体のRhD(+)児妊娠による抗D抗体産生予防目的で使用されているが、これら特殊免疫グロブリン製剤の原料血漿の国内確保は極めて困難な状況にある。本研究は特殊免疫グロブリン製剤原料血漿国内自給への根本的解決策として、遺伝子組換え型特殊グロブリン製剤製造法を開発することを目的としている。具体的には、抗体遺伝子リソースを確実に確保するために以下の3通りの方法を実施する。①抗体保有献血者および研究協力職員末梢血B細胞からの目的抗体遺伝子単離、②血漿中抗体および既存抗体構造解析からの抗体アミノ酸配列決定と最適化、③免疫マウスB細胞由来の目的抗体遺伝子のヒト化。研究開発初年度である平成27年度においては、下記の通りそれぞれの方法の第一段階を完了した。

①高力価HBs抗体保有職員の自発的研究協力を募り、7名のHBVワクチン追加接種者からインフォームドコンセントを得て採血を行った。採取した全血からリンパ球を精製し、一部の細胞から抗体遺伝子単離のためのRT-PCRを行った。また、磁気ビーズ法を用いてリンパ球をIgG陽性メモリーB細胞へ精製し、単一メモリーB細胞からのplasma cellへの分化増殖培養条件を最適化した。さらに、HBs抗原特異的メモリーB細胞を分取するための組換え型HBs抗原を作成し、高力価HBs抗体保有研究協力者の血液で解析したところ、末梢血中IgG陽性メモリーB細胞の約1.3%にHBs抗原との結合が認められた。

②抗D抗体保有献血者数が当初予想をかなり下回ったこと、及び抗体力価から想定されるRhD反応性末梢メモリーB細胞頻度は極めて小さいことから、抗D抗体遺伝子同定のためには抗D陽性血漿からの抗体アミノ酸配列決定、及び既存の検査用抗Dモノクローナル抗体を用いた構造解析からのアミノ酸配列最適化を行うこととした。これらに必要な組換えRhDタンパク質を得るために、ヘアピン型PAタグ配列を付加したRhD発現ベクターを作成し、遺伝子導入培養細胞表面にRhDが発現することを、エピトープの異なる複数の検査用抗Dモノクローナル抗体、及びPAタグ抗体で確認した。

③破傷風菌毒素（TT）をマウスに免疫して脾臓細胞よりハイブリドーマを作製した。作製したハイブリドーマはTTを用いたELISAによって抗TT抗体を産生するものをスクリーニングし、34種類のハイブリドーマを得た。また、これらのハイブリドーマのRNAより抗体遺伝子をRT-PCRにより増幅し、34種類の抗TT抗体イムノグロブリン遺伝子の塩基配列を決定した。

上記方法で単離した抗体の機能解析を行うために、HBIGについてはヒト肝癌由来培養細胞株（HepG2）にヒトNTCP発現ベクターを導入し、ヒトNTCPを恒常的に発現する培養細胞株を樹立した。本細胞を用いてHBVの感染性を確認したところ、NTCP/HepG2での良好な感染性を認めた。また、ELISAで検出できないHBs変異株の責任アミノ酸配列を同定した。抗破傷風抗体については、抗TT活性を有する有効な抗体を確実に選別する方法について、これまでに報告されている国内外の情報を収集・整理し、準備を行なった。また、破傷風菌の培養を行なうための、適切な菌株の取得、施設設備の設営、およびプロトコルの作製を行なった。