

ニワトリモノクローナル抗体ものがたり

松田治男（免疫生物学）

はじめに

学術的側面からニワトリに出会ったのは、学生時代（1967年）の家畜病理学実験でのニワトリのリンパ性白血病（lymphoid leukosis）の病理実習が最初であった。その後、大学院時代（1970 - 1975年）は、一貫してニワトリB細胞の分化・成熟に関わる基礎免疫学研究に携わった。大学院時代のニワトリ免疫学研究での私なりの大発見は、B細胞の一次免疫臓器としてのファブリキウス嚢（Bursa of Fabricius）内に抗原をある理由があり直接投与することで、成鶏を凌ぐ抗体産生を誘導出来たことである。それも、手のひらに乗るヒヨコで...である。単純な驚きとともに、何故?...から、本格的な研究が始まった。退官する日まで、一時期を除いてニワトリ免疫研究を継続できたことは、今になって思えば、これほど幸せなことではないとも思える。

今では、ニワトリモノクローナル抗体といえば、すぐ私の名前が上るようだが、ニワトリモノクローナル抗体研究は、最初はほんの遊び心で始めたものであった。本格的なニワトリモノクローナル抗体研究は、科研費がん特別研究（1）（今はない、いわゆるがん特1）でスタートしたもので、この科研費の研究期間で研究が成功しなかったことが、私を何が何でもという気にさせた。

ここでは、私のニワトリモノクローナル抗体研究を回顧しつつ、ニワトリモノクローナル抗体がより広く活用されていくことを願いながら書きとめることにする。

因縁の国際ウイルス学会

1983年、仙台で国際ウイルス学会が開催された。開催都市に仙台が選定されたのは、わが国で発見されウイルスHVJ（Hemagglutination virus of Japan）が関係していた。HVJは、国際的に不評の命名で、国名がつくウイルスは他にはないためである。HVJはSendai virusとも呼ばれ、国際的には後者の名の方が通っている。

この国際学会に、私の遊び心の研究成果を発表した。ニワトリにやっかいな流行性のがんをもたらす鶏網内皮症ウイルスを用いて、ニワトリ抗体産生細胞を形質転換させ、モノクローナル抗体産生細胞株を樹立したという報告である。1975年に英国の二人の研究者によって、細胞融合法によるモノクローナル抗体作製法の発表の約8年後のことである。

仙台での国際ウイルス学会が因縁の学会であったというのは、この学会では喧々諤々の議論伯仲の会場であり、そこではカリフォルニア大のPrusiner博士によるプリオン説が発表されており、タンパク質が病原体でこれが増殖（正確には増加）するはずがないという反対意見が大半を占めていたのを思い出す。その時は、まさか自分がプリオン病の研究に入っていくとは思いませんでした。

ニワトリモノクローナル抗体研究秘話

博士課程を修了後、大阪大学微生物病研究所で研究生そして助手を経験した。縁あって、ここでもニワトリであった。ヒトEBV（Epstein Barr virus）によるバーキットリンパ腫症のanimal modelとしてニワトリを採用し、EBVと同一科に分類されるマレック病ウイルスMDV（Marek's disease virus）によるマレック病というニワトリのリンパ腫に関わるがん免疫研究に従事した。病原微生物の最先端研究が行われていた微生物病研究所の環境下で、ほ乳動物（ヒト、マウス）B細胞、T細胞、マクロファージ等々、免疫系の細胞群をin vitroで培養して研究が進められ、大きな成果を挙げている現場を直接目にする事になり、ニワトリ免疫学研究との溝を大きく感じた。これが契機で、ニワトリT、B細胞株を使った基礎研究をいずれはしたいものだと思うようになった。幾つかの大学の医学部のウイルス学の助手をしながら、辿り着いた広島大学での最初の

研究は、ニワトリT細胞株が産生する未知のたんぱく質についての研究であった。このたんぱく質については、何代にもわたって研究室の学生・院生がその機能・正体を解析し、最終的に福永君がその正体を明らかにした。

先述したがん特1の頃の院生であった井関君がニワトリモノクローナル抗体作製研究の基礎を築いた。次いで、その後輩である西中君がthymidine kinase欠損の細胞融合用のニワトリ細胞株の作製に成功して、ようやく細胞融合によるニワトリモノクローナル抗体作製法が確立された(1)。その後、博士課程の朝岡君ががん特1での目的であったN-glycolylneuraminic acid (NeuGc) に特異的なモノクローナル抗体の作製を世界で初めて成功させた(2)。

NeuGcの不思議

NeuGcを少し説明しておこう。NeuGcは糖鎖非還元末端にあるシアル酸である。健康なニワトリと健康な人を除くほとんど全ての動物がシアル酸として持っており、多くの動物はNeuGcとN-acetylneuraminic acid (NeuAc) を持っている。

Hanganutziu-Deicher抗原(HD抗原)という異好性抗原がある。感作をしていないにもかかわらず、体内に検出される抗体があり、そのような抗体を異好性抗体と呼び、それに対応する抗原を異好性抗原という。歴史的に古い事象であるが、ジフテリア抗毒素血清療法を受けた患者の血液の中に、感作もしていないヒツジ赤血球(SRBC)に対する抗体が検出された(3,4)。HD抗原はSRBC上に発現している抗原であり、当時はその本体が不明であった。

HD抗原がNeuGcであることは1970年代の後半になって明らかにされた。HD抗原に関わる研究の多くは、わが国の研究者によって行われた。移植治療が広く行われている現在は、種々の優れた免疫抑制剤が拒否反応を抑えるために活用されているが、免疫抑制剤として抗リンパ球血清が使われた時期があった。ジフテリア抗毒素血清療法と同様に、抗リンパ球血清を投与されたヒトの血液中に抗SRBC抗体(HD抗体)が検出され、HD抗原の正体が異種動物血清に由来することが予測され、生化学的解析の後、HD抗原の本体がNeuGcであることが明らかにされた。1980年代には、異種血清療法を受けていない主としてがん患者の血液中にHD抗体が検出されるようになり、種々のがん組織が調べられ、がん細胞表面にNeuGcが発現していることが明らかにされた。このような背景から、NeuGc特異的なモノクローナル抗体があればヒトのがんを診断できると予測し、上述のがん特1の研究班が立ち上げられた。モノクローナル抗体といえば、マウスであるが、NeuGcを自己分子としてもつマウスでは抗NeuGc抗体は作れない。自己分子としてNeuGcを持たないニワトリかヒトでモノクローナル抗体を作るしかなかった。当時、ニワトリモノクローナル抗体を作製する技術が無かったことから、その研究班で私がニワトリモノクローナル抗体作製技術を開発し、NeuGc特異的なモノクローナル抗体を作る任に当たった。残念ながら、その班の研究期間内では技術開発にまでは至らなかった。

上述のとおり、その後、私たちはニワトリモノクローナル抗体作製技術を開発するとともに、念願のNeuGc特異的なモノクローナル抗体の作製にも成功した。私のニワトリモノクローナル抗体ものがたりは、NeuGc特異的なモノクローナル抗体が完成した時点で終了の筈であったが、諸外国からのニワトリモノクローナル抗体技術の問い合わせが次々と舞い込み、問い合わせは現在も断続的に続いている。

何故、ニワトリなのか？

ニワトリモノクローナル抗体に関心のある研究者は、マウスで作製できない抗体をニワトリでと考えたようだった。当時、私はニワトリを用いて特殊な抗体を作製することは全く念頭に無かった。諸外国の研究者に刺激されて、改めてニワトリについて考え始めた。ニワトリの抗体産生能力が優れていることは経験的に知ってはいたが、鳥類はほ乳類より下等であり、免疫能力もおおのずとほ乳類より劣るものと単純に信じていた。

現在、私は鳥類の進化について詳しく調べている。その内容の詳細は割愛するが鳥類と哺乳類は約3億年前に各々異なる進化の道を歩んでいること、恐竜が絶滅した後、しばらく地球は鳥類の世界であったことも分かってきた。

私の持論だが、生物の生体防御能力は、その生物が子孫を残すことが出来る、そのような防御能力を備えておればよい。鳥類とほ乳類を行動学レベルで比較すると、翼をもつ鳥類はほ乳類よりもより広範囲な行動

域を持つことが容易に想像できる。それだけ多様な病原体と遭遇する機会が多く、それに対応できる生体防御能力を持つ進化がなければならぬと想像した。鳥類と比較して、2本足の人間の行動範囲は極めて狭く、遭遇する病原体も限定されることになる。それぞれの動物は、各々の行動範囲内で遭遇する病原体に抵抗する能力を備えておれば、子孫を残すことができるのである。すなわち、鳥類はほ乳類よりも高度な生体防御能力を保持しないと子孫を残せないことになり、実際、研究室で蓄積されたニワトリ抗体についての膨大なデータは、ニワトリの方が実験動物としてのマウスやウサギよりも抗体産生性において優れていたのだ。

進化を意識すると、新たな発想ができる。一般にモノクローナル抗体を作製する時には、何の疑いもなくマウスを用いて作製する。仮にヒト生体分子を抗原として抗体作製をする場合も、誰しもがマウスを使うが、時に何度試しても良い抗体を作製できないことを経験する。ヒトとマウスはいずれもほ乳類であり、ほ乳類というくくりで考えると近縁なのである。調べるヒトの生体分子がタンパク質である場合は、まずそのアミノ酸配列をマウスと比較し、相同性を調べたのちに、マウスに免疫することが妥当かどうかを決定すべきである。私たちは、ヒトの重要な生体タンパク質群について、マウス、ニワトリとの相同性を比較した。予想したとおりヒト・マウス間は相同性が高く、ヒト・ニワトリ間は低かった。Mammalian-conserved molecules (哺乳類相同分子) を抗原として、モノクローナル抗体を作製するなら迷わずニワトリを用いるべきであり、そこに『何故、ニワトリなのか?』の答えを見出した。さらに、数多ある鳥類の中で『何故、ニワトリなのか?』についての答えもあるが、ここでは割愛する。

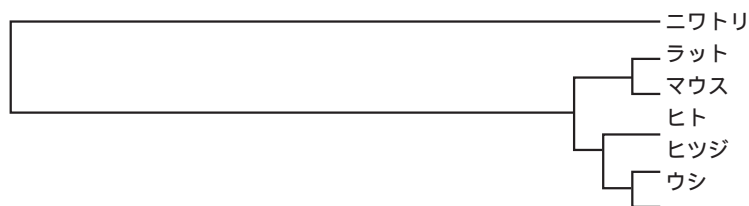
因縁のプリオンとの遭遇

1985年に英国で牛海綿状脳症BSE (bovine spongiform encephalopathy) が発見され、一時世界的なパニックが起きた。さらにより大きなパニックは、BSE牛由来食品からヒトへの感染が指摘されたことであろう。対岸の火事として見ていたわが国で、パニックが突然起こったのは2001年の秋であり、BSEの初発例が千葉県で発見されたのである。1980年代後半において、当時の家畜衛生試験場(現、動物衛生研究所)は、ヨーロッパでのBSEの広がりを受けて、「プリオン病の病態発生機構の解析」の大掛かりな研究班を立ち上げた。これは、英国のBSEの国内侵入に対応できるあらゆる体制を整えることを念頭にされたものであったが、ほとんどの班員は、わが国にBSEが起こるとは予想だにしていなかった。私がプリオン病研究に関わったのは、この研究班が立ち上がる前々年のことで、国内のプリオン研究者との獣医学会での立ち話で、「松田さん、プリオンタンパク質(PrP) 特異的でない抗体が少ないんだよ」の言葉がきっかけであった。詳しく話を聞くうちに、PrPは上述のMammalian-conserved moleculesの一つであることから、ニワトリを用いればいい抗体が作れると思った。実際、上記の研究班の中で多様なPrP特異的モノクローナル抗体を作製することに成功した。6年間続いたその研究班のさなかに、まさかの国内でのBSE発生が起こってしまった。PrP特異的モノクローナル抗体については、さらなる改良を重ね、BSEやヤコブ病診断に応用可能な組換え抗体(Ab3-15と命名)の作製に成功した(5)。

上記のBSE研究班員であった国内のヒトプリオン病の研究者である北本博士(東北大)から声がかかり、厚生科研の特定疾患対策研究事業「遅発性ウイルス感染に関する調査研究班」の研究協力者として入り、その後班員となった。「プリオン」という言葉が定着してはいたが、この研究班では、それまでの長きにわたる慣習からプリオン病を「遅発性ウイルス感染症」の中に入れてきたままだ。この研究班は長い歴史のある調査研究班で、現在では「プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班」となり現在も継続しており、私は平成9年から一時期を除いて現在も班員で研究を続ける機会を得ている。

ニワトリで作製する抗PrP抗体の特徴は、ニワトリを用いたが故に広くほ乳類間で保存されたPrPの共通抗原決定基を認識するものであり、ウシのBSEをはじめヒツジのScrapie、ヒトのCJD(ヤコブ病)等の診断に活用できるものであった。もちろん、ウシ、ヒツジ、ヒト等の固有のPrPを認識する抗体も作製可能であった。PrP特異抗体作製において、ニワトリ故の特性が見事に証明された。

PrP研究で実証されたMammalian-conserved moleculesをターゲットとした抗体作製は、その多くで成功を収め、現在はCJDの生前診断が可能な抗体作製にも成功している。ちなみに、図1に、プリオン遺伝子の系統樹と動物間の相同性を示した。この系統樹をつぶさに眺めれば、まさしく鳥類とほ乳類の進化の違いを如実に示しているといえないだろうか。



プリオンタンパク遺伝子の系統樹

プリオンタンパクのアミノ酸相同性 (%)						
	ニワトリ	マウス	ラット	ヒト	ヒツジ	ウシ
ニワトリ	-	37.5	37.5	39.7	40.3	40.3
マウス	37.5	-	95.7	87.5	87.5	84.4

図1. プリオンタンパク遺伝子の系統樹と動物間相同性

ニワトリ抗体のヒトへの応用

近年、抗体医薬がその安全性から、多くの製薬会社がしのぎを削って研究開発を進めている。マウスの抗体をヒト化したもの、ヒト抗体そのもの、マウス・ヒトキメラ抗体等々、その種類は多岐にわたる。ニワトリ抗体の有用性を意識して、ニワトリ抗体をヒトの抗体薬として開発のための基礎研究も行った。ニワトリ抗体を直接ヒトには投与できないことから、まずニワトリ・ヒトキメラ抗体を手始めに、最終的にはニワトリ抗体のヒト化技術も開発した(6)。いずれ、私たちが作製したニワトリ抗体由来ヒト化抗体が実際にヒトに投与される日が来るかもしれないが、許認可までの長い年月考えると私の存命中にそれが可能となるのかどうか...

終わりに

「たかがニワトリ、されどニワトリ」であった。ニワトリの基礎免疫学研究を長く続けていた若いころ、マイナーな研究から日の目を見る研究に方向転換を図ることを何度か考えた。その間、国内の鳥類免疫学領域の研究者が、一人、二人と他の研究領域に移って行った。中には、後は宜しくと貴重な試料を私に託していった研究者もいた。私が、生物圏科学研究科で免疫生物学研究室を立ち上げた頃には、国内に鳥類免疫学を主流で行っている研究室は私たちのみになってしまった。ちなみに、インターネットで「免疫生物学」を調べると、国内に免疫生物学研究室が何と多い事かと驚くが、この名をもつ研究室を最初に立ち上げたのはわが生物圏科学研究科であったことをここに記しておきたい。

最後に、広島大学での鳥類免疫学ことにニワトリモノクローナル抗体研究には、数多くの学生、院生達、そしてポストドク研究員達が関わってくれた。ここに感謝の意を表して筆をおく。

文 献

1. Nishinaka, S., Matsuda, H. and Murata, M (1989) *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 89, 416.
2. Asaoka, H., Nishinaka, S., Wakamiya, N., Matsuda, H. and Murata, M. (1992) *Immunol. Lett.*, 32, 91.
3. Hanganutziu, M. (1924) *Soc. Biol.*, 91, 1457.
4. Deicher, H. (1926) *Z. Hyg.*, 106, 561.
5. Miyamoto, K., Shimamoto, T., Aosasa, M., Kimura, S., Nakamura, N., Okubo, Y., Yokoyama, T., Horiuchi, H., Furusawa, S. and Matsuda, H. *Biologicals*, 35, 31.
6. Nishibori, N., Horiuchi, H., Furusawa, S. and Matsuda, H. (2006) *Mol. Immunol.*, 43, 634.