岡山医誌（1990）102，1267～1273

緑膿菌に対するヒト型モノクローナル抗体の作成とその臨床応用の可能性

岡山大学医学部麻酔・蘇生学教室（指導：小坂二度見教授）

小　林　洋　二

（平成2年8月29日受稿）

Key words：ヒト型モノクローナル抗体，緑膿菌，M型O抗原，オプソニン

緒　言

重症患者は免疫能も低下し日和見感染を始めとした感染症におちいりやすく，その致死率も高い[1]．当然，抗生剤による治療は試みられるが，緑膿菌（Pseudomonas aeruginosa）をはじめとした薬剤耐性菌による感染症の治療には難渋する[2]．このような薬剤耐性菌による重症感染症の場合，現在イムノグロブリン製剤の投与が行われることもある．しかしながら，イムノグロブリン製剤の起炎菌に対する特異性はほとんど認められず[3]，その治療効果は十分とは思われない．起炎菌に対する特異抗体が治療薬として効果的であることは動物実験で明らかであり[4,5]，起炎菌に対する特異抗体の利用が望まれる．

緑膿菌に対するマウス型のモノクローナル抗体やウサギのポリクローナル抗体は作成され検査に利用されている．しかしながら，マウスの抗体やウサギの抗体は人間にとって異物であるため，反復投与する必要性または可能性がある場合，治療薬としては利用できない．反復投与の必要性または可能性がある場合，治療薬として用いるための抗体は，人間にとって異物でないヒト型抗体でなければならない．本論文では，緑膿菌感染を起こした患者の白血球を用いて起炎菌に対するヒト型のモノクローナル抗体の作成に成功したので，*in vitro* でその抗体のオプソニン効果を検討し臨床応用の可能性を報告する．

対象と方法

1．細菌分離と同定

1）細菌検査

長期の寝たきり状態の患者褥瘡部より膿を無菌的に採取し，細菌検査を依頼した．この褥瘡部より分離同定された緑膿菌を起炎菌として実験に用いた．

2）起炎菌の血清型分類

Luria-Bertani 培地（1％ Bacto-tryptone, 0.5% Yeast extract, 1％ NaCl 溶液；pH7.5）で一晩37℃で振とう培養した起炎菌を，緑膿菌群別用免疫血清（デンカ生研株式会社）を用いて凝集反応により血清型を決定した．

2．ハイブリドーマの作成

1）培養条件

RPMI1640培地と Dulbecco 変法 Eagle 最小必須培地の1対1混合培地（RD培地，pH7.4）に5μg/mlのインシユリン，5μg/mlのトランスフェリン，10μMの2-メルカプトエタノール，10μMの2-アミノエタノールおよび1μMのセレニウムの5因子（5F）を補った培地を基本培地（RD＋5F）として細胞培養に用いた．培地の滅菌は，全て0.22μmのフィルターによって行った．培養は95％空気-5％二酸化炭素下，湿度85％以上，37℃にて行った．

2）白血球の調製

褥瘡培養より緑膿菌感染症が確認された患者の血液40mlを Mg^{2+}，Ca^{2+}を含まないダルベッコーのリン酸緩衝生理的食塩水（Phosphate-Bufferd Saline：PBS）で2倍に希釈し，その

各20mlをFicoll-Paque液（ファルマシア製）14mlに重層した後400×gにて30分間遠心し，白血球分画を調製した．この分画をPBSに再懸濁し300×gにて5分間遠心し，混入したFicoll-Paque液を取り除いた後，細胞融合に用いた．

3）細胞融合

細胞融合に用いるミエローマ細胞は，Gordon H. SatoおよびJ. Denry Sato両博士より分与いただいたWIL2-86細胞を用いた．5％牛胎児血清（Fetal Bovine Serum：FBS）を含むRD＋5F培地で培養した3.7×10^7個のWIL2-86細胞と3.7×10^7個の白血球を混合し，500×gにて5分間遠心した．上清を除き，沈殿した細胞に37％ポリエチレングリコール(分子量：1500)—15％ジメチルスルフォオキサイドのPBS溶液1mlを1分間かけて滴下した．37℃の水浴に1分間放置した後，40mlのPBSを3分間かけて滴下した．遠心により細胞をPBSで2回洗浄した後，WIL2-86細胞が1.2×10^5/mlになるようハイブリドーマ選択培地（100μMヒポキサンチン，40nMアミノプテリン，16μMチミジン，100nMウァバインおよび5％FBSを含む基本培地）に懸濁し，400μlづつ48穴プレートに接種した．4日から5日間ごとにウァバインを含まないハイブリドーマ選択培地で，ハイブリドーマがコロニーを形成するまで半量づつ培地交換を行った．

4）ハイブリドーマの選択

特異的抗体産生細胞は，酵素標識免疫定量法（Enzyme-Linked Immunosorbent Aaasy；ELISA）により選択した．起炎菌をLuria-Bertani培地で一晩37℃で振とう培養し，10,000×gにて5分間遠心洗浄した後，100mM炭酸緩衝液（pH9.6）中に620nmにおける吸光度が0.2になるように調製し，50μlづつ96穴ELISAプレート（Corning社製）に分注し1時間吸着させた．各々のウエルを100μlの1％牛血清アルブミン（Bovine Serum Albumin；BSA）を含む炭酸緩衝液で1時間ブロックした後，0.05％Tween-20を含むTris-Bufferd Saline（TBS：20mM Tris，500mM NaCl；pH7.5）で一回洗浄した．ウエルにハイブリドーマの上清を50μlづつ加え室温で45分間インキュベートした後，Tween20-TBSで3回洗浄した．その上に50μlのパーオキシデース結合抗ヒトIgG抗体溶液（DAKO社製，1％BSAを含むTBS溶液にて1000倍希釈して使用）を加え，室温で45分間インキュベートした．Tween20-TBSで3回洗浄した後，基質液（3mg/ml 4-メトキシ-1-ナフトールのメタノール溶液と0.018％ H_2O_2のTBS溶液の1：5混合溶液）を100μl加え，青く変色したものを選択した．

5）クローニング

ELISAで特異抗体の産生が確認されたハイブリドーマを，5％FBSを含むRD＋5F培地で限界希釈法によりクローニングした．1個のウエルに1個のコロニーが認められるものをELISAで選択した．

3．モノクローナル抗体の精製

血清中のイムノグロブリンの混入を防ぐ目的で，確立されたハイブリドーマを上記のRD＋5F培地に0.5mg/mlの牛血清アルブミンを補った無血清培地[6]で培養した．培養上清に35％飽和になるよう硫酸アンモニウムを加え，4℃で3時間攪拌した後，4℃において12,000×gにて20分間遠心した．沈査をPBSに対して一晩4℃で透析した後，IgGをprotein-Aカラム（Affi-Gel Protein A MAPSキット；Bio-Rad社）を用いてキットの精製方法に準じて精製した．

4．蛍光抗体による染色

起炎菌をLuria-Bertani培地で一晩37℃で振とう培養し，10,000×gにて5分間遠心した後，同量のPBSに懸濁した．その一滴をスライドグラスに落とし，メタノールで4°Cにおいて10分間固定した．PBSで洗浄した後，5μg/mlの特異的モノクローナル抗体あるいはコントロールとして5μg/mlのヒトイムノグロブリン製剤（サングロポール；三共株式会社）を加え室温で45分間培養した．PBSで洗浄した後，100倍希釈した蛍光色素（Fluoroscein isothiocyanate；FITC）結合抗ヒトIgG抗体（DAKO社）を加え室温で45分間培養した．PBSでの洗浄に続き，簡単に蒸留水で洗浄し乾燥させた後，暗室にて蛍光顕微鏡で観察した．

5．モノクローナル抗体のオプソニン効果の検討

貪食能の検査は健康成人の好中球を用いて，ケミルミネッセンス法[7,8]を用いて測定した．健康成人よりヘパリン加静脈血を採取し，その3.5mlを3.0mlのモノ-ポリ分離溶液（Flow Laboratories Inc.）に重層し，室温にて300×gにて30分間遠心した．好中球層を分離し，PBSで洗浄後，1×10^7個/mlになるようHEPES-生理食塩水（10mM HEPES，0.9% NaCl；pH7.4）に懸濁した．ルミノール（3-aminophthaloylhydrazine，東京化成工業）は0.01N NaOH溶液で1mMとなるよう溶解した後，HEPES-生理食塩水で5倍に希釈してルミノール溶液として用いた．起炎菌は，HEPES-生理食塩水で2回洗浄した後，620nmの濁度で1×10^8個/mlとなるようHEPES-生理食塩水に懸濁した．

ケミルミネッセンスは，ルミネッセンスリーダー（Aloka社製 B-120型）を用いて行った．測定容器に健康成人血漿100μl，好中球浮遊液100μl，ルミノール溶液100μlおよび200μg/mlの抗体溶液（今回作成したモノクローナル抗体またはヒトイムノグロブリン製剤；サングロポール）100μlを加えて37°Cにて2分間培養した後，起炎菌溶液100μlを加えて20分間発光量を測定した．

結　　果

患者より分離した細菌は，凝集反応より日本緑膿菌研究会の分類に基づくM型のO抗原を有する緑膿菌であった．

細胞融合法により起炎菌に対する特異的ヒト型モノクローナル抗体を産生する細胞，RY-5細胞を確立した．その細胞が分泌するIgGをRY-5 IgGと名付け，protein-Aカラムで精製し実験に用いた．RY-5 IgGが起炎菌に特異的に反応することを蛍光抗体法により確認した（図1a）．一方，ヒトイムノグロブリン製剤は起炎菌に対してほとんど特異性を示さなかった（図1b）．

図2にケミルミネッセンスの結果を示した．好中球等の貪食細胞は，貪食した細菌を殺すために活性酸素を産生するが，その活性酸素をルミノールという増光剤で処理して，発光量より貪食の程度を測定した．RY-5 IgGを加えた反応系では（図2a），起炎菌を加えるとともに好中球の貪食状態を示す発光が起こり約8分後に最高値を示し，徐々に発光量は減少した．一方，イムノグロブリン製剤を加えた場合は（図2b）RY-5 IgGに比べて2分程遅れて約10分後に最高値を示した．この実験を3回行い，その測定値を表1に示した．RY-5 IgGを加えた場合，

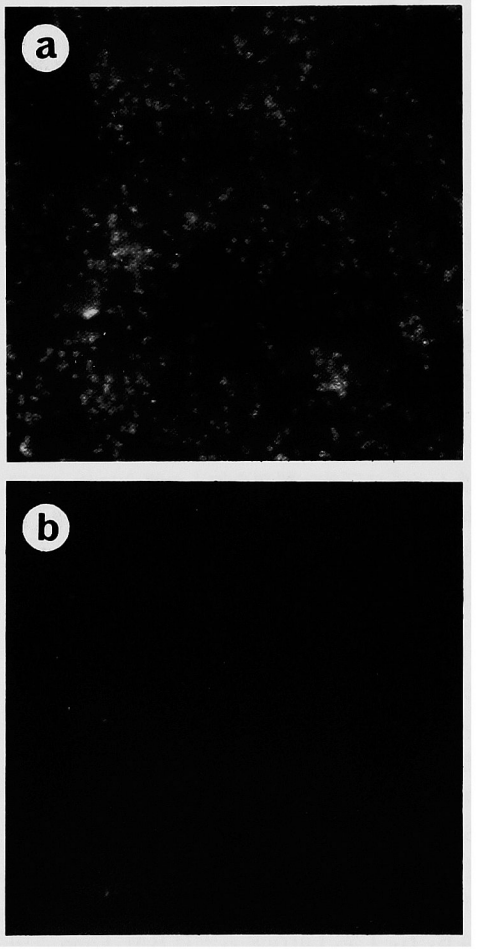

図1　蛍光抗体による染色
起炎菌をスライドグラス上に固定し，（a）起炎菌特異的モノクローナル抗体（RY-5 IgG）あるいは（b）コントロールとしてヒトイムノグロブリン製剤（サングロポール；三共株式会社）を加え，次に蛍光色素（FITC）結合抗ヒトIgG抗体を加え，蛍光顕微鏡で観察した．（400倍）

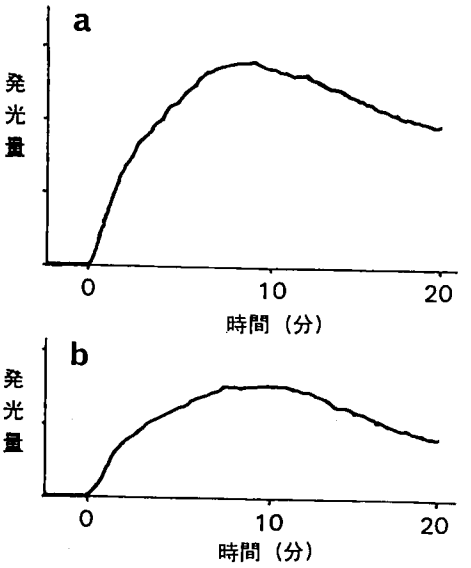

図2 好中球によるケミルミネッセンス
健康成人の好中球にルミノール，血漿および(a)起炎菌特異的モノクローナル抗体（RY-5 IgG)あるいは(b)コントロールとしてヒトイムノグロブリン製剤（サングロポール；三共株式会社）を加えて発光量を測定した．0分の時に起炎菌を加えた．

イムノグロブリン製剤を加えた場合に比べ面積比つまり総発光量で1.85倍高い値を示し，これは統計学的に有意な値（$p<0.005$）であった．

考 察

ここ数年，ヒト型モノクローナル抗体の作成が可能になり，一部の病原菌に対するヒト型モノクローナル抗体を分泌する細胞が確立されてきた[9]．緑膿菌に対するヒト型モノクローナル抗体もいくつかのグループによって確立された．Sawadaら[10]はA，B，E，G，I型のO抗原を有する緑膿菌に対するヒト型モノクローナル抗体の作成を報告している．また，Zweerinkら[11]はE，H，I型，Larrickら[12]はB型，Langら[13]はB，C，G，I型のO抗原に対する抗体作成を報告している．緑膿菌のO抗原は，現在AからNの14群に分類されているが，まとめてみると今までA，B，C，E，G，H，Iの7種類のO抗原に対してヒト型モノクローナル抗体が作られている．今回，著者はM型という今までとは異なるO抗原の緑膿菌に対するヒト型モノクローナル抗体 RY-5 IgG を作成することに成功した．ELISA により，この RY-5 IgG は他のM型抗原を有する緑膿菌（IID 5018株）を認識することより，M型のO抗原つまり糖鎖を認識しているものと推測される．

表1 ケミルミネッセンスによるオプソニン効果

	RY-5 IgG	イムノグロブリン製剤
実験 1	188.9	101.3
2	177.1	105.8
3	189.5	92.8
平均値	185.2	100.0
標準偏差	7.0	6.6

ケミルミネッセンス量は20分間の総量（面積）で表し，イムノグロブリン製剤によるケミルミネッセンス量の平均を100として表した．

14種の抗原性を有する緑膿菌に対して結合するヒト型モノクローナル抗体を作成しこれらのカクテル（混合物）を用意しておけば，どのような抗原型の緑膿菌感染でも効果的な治療が期待できる．著者の作成した RY-5 IgG がこのカクテルの1構成因子となるものと期待する．このような人為的な治療薬の開発は，人の血液から作られる製剤と異なりウィルス感染の心配もなく，より安全性の高いものと考えられる．さらには，現在社会問題となっている人の血液から作られるイムノグロブリン製剤の削減にも貢献するものと考える．

RY-5 IgG を *in vitro* の好中球殺菌能検査系に加えた場合，明らかに強い発光が認められた．好中球の発光と殺菌能との関係は Allen ら[14]が明らかにしており，この RY-5 IgG がオプソニンとして効果的であるつまり臨床的に有効であろうと考えられる．

また，ハイブリドーマの作成方法においても他の緑膿菌に対するヒト型モノクローナル抗体を作成したグループの方法とは異なる方法を用いた．Sawada ら[10]は患者の白血球または扁桃腺細胞を6日間培養した後，マウスのミエローマ細胞と細胞融合させハイブリドーマを確立させた．一般にマウスとヒトのように異種間のハイブリドーマは不安定で長期には生存し難いと

考えられている．Zweerink ら[11]はボランティアの白血球を Epstein-Barr ウィルスで形質転換させハイブリドーマを確立した．Larrick ら[12]は緑膿菌感染症患者の白血球を Epstein-Barr ウィルスで形質転換させ，さらに安定化させるためマウス・ヒト融合細胞と細胞融合をさせハイブリドーマを確立した．彼らは，確立までにおよそ60日を要している．Lang ら[13]は緑膿菌ワクチンを投与したボランティアの白血球を用いて Epstein-Barr ウィルスで形質転換させハイブリドーマを確立した．Epstein-Barr ウィルスは研究者にとって危険な上，ミエローマ細胞の長期安定化には適しておらず，あまり良い方法とは考えられない．著者は他のグループとは異なり，褥瘡培養の確認後患者の白血球を用いて，直接ヒトミエローマ細胞と融合させることによりハイブリドーマを確立させた．これはヒト・ヒトハイブリドーマなので安定していると考えられる．またクローニングを含めて約3週間余りという比較的短期間にハイブリドーマの作成に成功した．この方法を用いれば，緑膿菌に限らずどのような抗原性を持つ細菌でも慢性的に（4週間以上）感染症におちいりそうな患者を救済し得る可能性がある．不幸にして，白血球をいただいた患者さんは敗血症を引き起こしショック状態に陥り他界された．このRY-5 IgGが投与できていれば敗血症が防げた可能性もあり，残念である．

なお，緑膿菌の抗原型は，Homma，Fisher，Meitert らによりいろいろな分類方法が報告されている．混乱を避けるため日本緑膿菌研究会の分類方法に基づいた抗原型を本論文では採用した．Zweerink らの論文など[11,12,13]に採用されている抗原型も比較表[15]に基づいて日本緑膿菌研究会の分類に改めた．

結　　論

1．緑膿菌感染症の患者白血球とヒトミエローマ細胞とを細胞融合させ，起炎菌に特異的なヒト型モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを比較的短期間に確立できた．この方法を用いれば，どのような細菌による慢性的な感染症にも免疫学的治療を行うことができる可能性が示された．

2．このヒト型モノクローナル抗体は，今まで他のグループにより確立されたヒト型モノクローナル抗体とは異なりM型のO抗原を有する緑膿菌を認識していることが示された．

3．このヒト型モノクローナル抗体は，好中球の貪食能を高めるつまりオプソニン効果を持っており，臨床的に有効であろうことが示唆された．

稿を終えるに臨み，御指導御校閲を賜りました岡山大学医学部麻酔・蘇生学教室の小坂二度見教授に深謝いたします．また，終始直接の御指導御鞭撻をいただいた飯島義雄助手に謝意を表します．さらに御助言と御協力をいただいた岡山大学医学部麻酔・蘇生学教室の諸先生に心より御礼申し上げます．

文　　献

1）阿部晋也：多臓器不全患者の生体防御能に関する検討．ICU と CCU (1988) **12**, 211—221.

2）King A, Shannon K, Eykyn S and Phillips I：Reduced sensitivity of β-lactam antibiotics arising during ceftazidine treatment of Pseudomonas aeruginosa infections. J Antimicrob Chemother (1979) **10**, 187—194.

3）赤尾正樹，阿部晋也，小原　進，飯島義雄，小坂二度見：各種 r-グロブリン製剤の効果について（1）重症患者での検討．第4回日本集中治療医学会中国四国地方会抄録集 (1987) pp 36.

4）Pier GB, Sidberry HF and Sadoff JC：Protective immunity induced in mice by immunization with high-molecular-weight polysaccharide from Pseudomonas aeruginosa. Infect Immun (1978) **22**, 919—925.

5）Cryz SJ Jr, Furer E and Germanier R：Protection against Pseudomonas aeruginosa infection in a

murine burn wound sepsis model by passive transfer of antitoxin A, antielastase, and antilipopolysaccharide. Infect Immun (1983) **39**, 1072—1079.

6) Iijima Y, Fukushima T and Kosaka F : Involvement of transforming growth factor-α secreted by macrophages in metallothionein induction by endotoxin. Biochem Biophys Res Comm (1989) **164**, 114—118.

7) 赤尾正樹：重症患者の起炎菌に対する好中球殺菌能とB細胞機能に関する研究. 岡山医誌 (1988) **100**, 547—554.

8) 佐倉信夫 小林陽之助 臼井朋包：白血球殺菌能試験 C. Chemiluminescence. 月刊 Medical Technology 編 医歯薬出版 細胞性免疫機能検査のすべて (1985) 29—34.

9) Larrick JW and Bourla JM : Prospects for the therapeutic use of human monoclonal antibodies. J Biol Response Modif (1986) **5**, 379—393.

10) Sawada S, Kawamura T and Masuho Y : Immunoprotective human monoclonal antibodies against five major serotypes of Pseudomonus aeruginosa. J Gen Microbiol (1987) **133**, 3581—3590.

11) Zweerink HJ, Gammon MC, Hutchison CF, Jackson JJ, Lombardo D, Miner KM, Puckett JM, Sewell TJ and Sigal NH : Human monoclonal antibodies that protect mice against challenge with Pseudomonas aeruginosa. Infect Immun (1988) **56**, 1873—1879.

12) Larrick JW, Hart S, Lippman DS, Glembourtt M, Hsu Y-P and Moss RB : Generation and characterization of human monoclonal anti-Pseudomonas aeruginosa antibodies. Strelkauskas 編集 Human hybridomas : diagnostic and therapeutic applications. Marcel Dekker, Inc., New York p65—80.

13) Lang AB, Furer E, Larrick JW and Cryz SJ Jr : Isolation and characterization of a human monoclonal antibody that recognizes epitopes shared by Pseudomonas aeruginosa immunotype 1, 3, 4, and 6 lipopolysaccarides. Infect Immun (1989) **57**, 3851—3855.

14) Allen RC, Stjernholm RL and Steele RH : Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polyomorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. Biochem Biophys Res Comm (1972) **47**, 679—684.

15) Homma JY : Designation of the thirteen O-group antigens of Pseudomonas aeruginosa ; An amendment for the tentative proposal in 1976. Jpn J Exp Med (1982) **52**, 317—320.

A human monoclonal antibody against *Pseudomonas aeruginosa* and the possibility of its clinical use

Youji KOBAYASHI
Department of Anesthesiology and Resuscitology,
Okayama University Medical School,
Okayama 700, Japan
(Director : Prof. F. Kosaka)

A human monoclonal antibody (IgG) against *Pseudomonas aeruginosa* was established within 3 weeks after fusion of patient lymphocytes and human myeloma WIL2-86 cells. This method is useful in establishing human monoclonal antibodies for infectious bacteria of a variety of antigenicities and allows for use of such antibodies as immunotherapeutic drugs in chronically infected patients.

The opsonic effect of the monoclonal antibody we established was 1.8-fold higher than that of commercially available immunoglobulin drugs. Since the established human monoclonal antibody recognizes serotype M, which has not yet been produced, the antibody may be used as a part of immunotherapeutic drug "cocktail".