

THE KANTO CHEMICAL CO., INC. Cica CHEMICAL TIMES

2015 No.3 (通巻237号)

ISSN 0285-2446

感染症四方山話(10):感染症研究との出会い(2)	菊池 賢	2
流体物理洗浄(2) 超音波洗浄	真田 俊之 渡部 正夫	8
免疫工学による免疫システム分子機構の解析 Ⅲ. タンパク質工学と細胞工学を有効に利用した抗体の作製	熊谷 善博	14
最近のトピックス		20



感染症四方山話(10): 感染症研究との出会い(2)

Various topics concerning infectious diseases (10) an encounter with infectious diseases research (2)

東京女子医科大学 感染症科 教授 菊池 賢
Ken Kikuchi, MD, PhD.(Professor)

Department of Infectious Diseases, Tokyo Women's Medical University

1. はじめに

2011年の感染症四方山話(3)で感染症研究との出会い、特に viridans group streptococci (VGS) との長い付き合いの始まりの話を書いた¹⁾。「おわりに」にあるように、これは編集部と続きを書く約束になっていたのだが、ずっと先延ばしにしていた。自慢出来るような研究成果を上げている訳でもなく、この内容を臆面もなく誌面に登場させるには、抵抗感があったのだ。しかし、感染症四方山話(9)が出てから休筆が続いていて、断れなくなった。

私とレンサ球菌との歩みで避けて通れないのが、Lancefieldレンサ球菌研究会である。この会は日本医科大学の大國教授、大阪大学歯学部 of 浜田教授、山梨医科大学の山田教授が世話人となり、特に若手研究者の育成を目的に「レンサ球菌談話会」として1992年に発足した。昨年からは歴史の長いレンサ球菌感染症研究会と一緒に、「レンサ球菌研究会」として発展を遂げている。この会は、当初、旅館などに泊まり込み、昼間は缶詰になって研究発表・激しいディスカッションを行う一方、夜はかなり羽目を外した宴会が延々と続き、繰り広げられた様々なエピソードは「この誌面ではとても書けない伝説」として語り継がれる、実に楽しい会であった。読者の方で、このあたりのエピソードを知りたい方は、レンサ球菌を研究テーマにしている50歳以上の研究者であれば、誰でもご存知だと思うので、お尋ねされたい。当時、滅茶苦茶をやっていた若手の研究仲間達は、ほとんどが教室を運営する責任者になっている。今、思い返してみても濃厚な凄いなメンバーであったと思う。私は1998年から参加しており、2013年には世話人と

して、研究会を主催させて頂く栄誉ある機会も得た。私のレンサ球菌の仕事はほとんどがこの会を通じて知り合った仲間と行ったものである。様々な成果を上げることができたが、私の役割は臨床と基礎のパイプ役を果たしたに過ぎない。今回、ここで取り上げる内容は、こうした数多くの共同研究者との共同作業で生み出されたことを、改めてご認識の上で、本稿を読んで頂きたいと思う。

2. *Streptococcus anginosus* groupと *Streptococcus intermedius* について

VGSは口腔内常在菌の最優位菌で、歯面に多い *Streptococcus sanguinis*, *S. gordonii* などの属する *S. mitis* group, 舌表面に多く見られる *S. salivarius* の属する *S. salivarius* group, 齲歯の原因として知られる *S. mutans* の属する *S. mutans* group, 嫌気環境を好み、歯周ポケットや扁桃腺窩などに見られる *S. anginosus* group (SAG) の4クレードから構成される¹⁾。SAGは *S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. intermedius* の3菌種5亜種から成り、以前、“*Streptococcus milleri*”, “*Streptococcus MG*”, “minute colony streptococci” などと呼ばれていたグループに相当する¹⁾。SAGはいずれもCO₂指向性(capnophilic)があり、嫌気要求性、栄養要求性も比較的高く、血液寒天培地上で観察されるコロニーが他のVGSに比べて小さい(minute colonyの由来)。このため、口腔-気道領域の検体だと、他の発育の良い菌のコロニーに隠れ、特に好気培養では検出するのが難しい。レンサ球菌の重要な鑑別点の溶血性も α , β , γ のいずれのタイプがあり、Lancefield血清型もA, C, Fかnon-typeを示すため、*S.*

pyogenes, *S. dysgalactiae*と間違えられることもある。普段、溶血性レンサ球菌以外のレンサ球菌同定に慣れていないと、SAGを臨床検体から適切に分離・同定するのはかなり経験を要する。私も最初は無菌部位以外からSAGを集めようとして、その難しさに辟易した。菌の分離は平板でのコロニーの顔つきを覚える事から始めるのだが、SAGの場合、兎に角、目がいく溶血性、コロニー性状がバラバラであり、他のVGSや溶血性レンサ球菌との区別も難しい。 γ レンサ球菌であれば*S. mutans*と、 β レンサ球菌であれば*S. agalactiae*, *S. pyogenes*などと区別しにくい。 α レンサ球菌のSAGは、はっきり言ってお手上げである。昔、VGSの同定方法の論文を投稿したとき、reviewerからのコメントで一番答えに窮したのが「SAGを検討しないのは何故か」であった²⁾。何のことはない、当時、検討に十分な数の分離株を集められなかったからである。唯一、役に立つのは平板を開けた時の臭いである。SAGはピルビン酸からジアセチルを産生し、特有のカaramel臭を示すため、純培養のように菌量が多いと気がつくが、口腔領域の検体だと他の菌が多数生えているので臭いで気がつくのは難しいだろう。また、SAGではマクロライド、テトラサイクリン、クリンダマイシン耐性を持つ菌株が存在することが知られているが、まだペニシリン耐性の報告はない。このような非常に多様な性質を示す一方、他のレンサ球菌と鑑別する適当な抗菌薬耐性も持たないので、選択培地の開発が極めて難しく、実際のSAGの分布、特に、健常部位での分布はまだよくわかっていないことが多く、検査室・研究者泣かせの菌である。しかし、これまでの我々の検討では、口腔領域だと*S. anginosus*は比較的口腔全域に広く分布し、*S. constellatus*は扁桃、*S. intermedius*は歯周ポケットのような嫌気度の高い環境に限定されることがわかってきた(投稿中)。我々はSAG3菌種の標準株の全ゲノム解析を行い、いくつか、他のレンサ球菌とは異なる代謝経路を見いだしたので、今後はこれを応用した選択培地の開発を考えている。

一方、SAGが引き起こす感染症としては化膿性病変を形成するのが特徴であり、脳膿瘍、肝膿瘍、膿胸などの深部膿瘍の原因となる¹⁾。VGSは感染性心内膜炎の起原因菌としてポピュラーであるが、SAGの頻度はそれほど高くない。しかし、SAGによる感染性心内膜炎は通常*S. mitis* group菌種によるものとは臨床像が際立って異なっている³⁾。弁上の疣贅形成よりは、弁輪部膿瘍、心

外膜炎など、やはり化膿性病変を作る傾向が強い。一部の膿瘍から分離されたSAGは図1に示すようにムコイド型を示す場合があり、膿瘍形成の際の白血球の貪食から免れる一因になっているのであろう。これは多発性肝膿瘍の患者から分離された株で、あらゆる抗菌薬に感受性を示していた。しかし、ムコイド基質が抗菌薬の透過性に影響したかどうかは定かではないが、行った全ての抗菌化学療法が無効だった。この症例では肝臓内に無数の蜂の巣状の膿瘍を形成していたため、ドレナージも出来ず、抗菌薬治療の限界を痛感させられた。

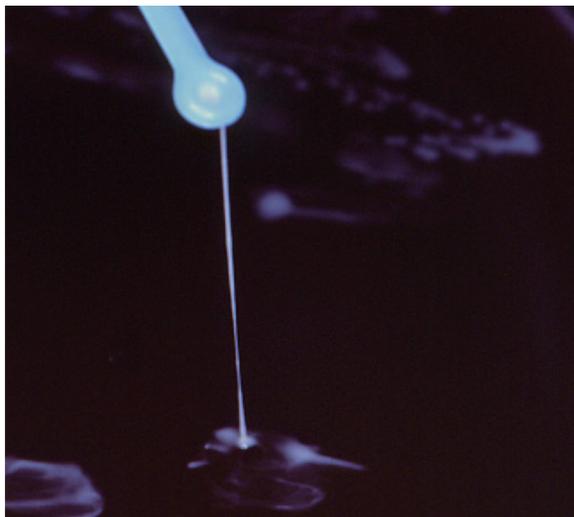
SAGは口腔が起源のことが多いため、膿瘍では*Prevotella*属、*Fusobacterium*属、*Peptostreptococcus*属などの口腔領域の嫌気性菌などの混合感染が多いが、*S. intermedius*はSAGの中では、深部膿瘍などから単独で分離される頻度が高く、病原性が最も高いと考えられている⁴⁾。その理由として挙げられるのが本菌を特徴づける毒素、intermedilysin(ILY)である。ILYは*Clostridium perfringens*のperfringosin O、*S. pneumoniae*のpneumolysin、*S. pyogenes*のstreptolysin O、*Listeria monocytogenes*のlisteriolysin O、*S. suis*のsulilysinなどに類似した膜孔形成性細胞溶解毒素であり、*S. anginosus* groupの残り2菌種を含む他の菌種からの検出は知られていない⁴⁾。ILYのターゲットはヒト型CD59(huCD59)で、霊長類以外の動物細胞にはほとんど毒性を発揮しないため、*S. intermedius*のほとんどは通常検査室で使用されるヒツジやウマ血液寒天培地上では溶血を示さない(γ 溶血性)⁵⁾。CD59は活性化補体から自己細胞を守るタンパクで、CD59への自己免疫により、活性化補体が容易に溶血するCD59欠損赤血球ができると発作性夜間血尿症(PNH)が起こる⁶⁾。全身性ループスエリテマトーデス(SLE)やシェーグレン症候群(SS)ではCD8+T細胞でCD59発現が減少し、これらの細胞は通常のCD59発現細胞に比してアポトーシスを起こし易く、病態と関与することが報告されている⁷⁾。

3. 原発性胆汁性肝硬変(PBC)との出会い

前述したLancefieldレンサ球菌研究会で徳島大学歯学部の弘田先生とSAGの雑談をしていたとき、「*S. intermedius*でマウスに歯周病を起こさせると、何故か肝臓の胆管周囲に炎症が起きるんですよ」という一言

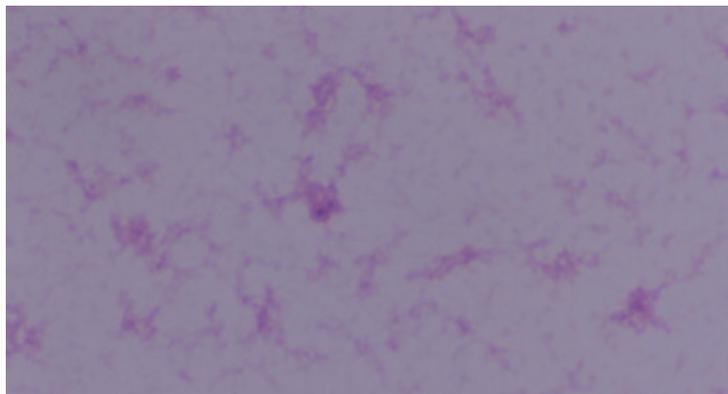
が、引っかけた。研究会から戻って、「動物実験してみたら面白いのだろうか。胆管周囲の炎症というと、原発性胆汁性肝硬変(primary biliary cirrhosis: PBC)だなあ。誰か消化器内科で興味を持っている人はいないかな?」と思い、研修の同期だった消化器内科の春田先生に電話してみた。PBCとは閉経後の中年女性に好発する肝内小胆管周囲の非化膿性炎症(慢性非化膿性破壊性胆管炎:chronic nonsuppurative destructive cholangitis CNSDC)を主病態とする原因不明の進行性疾患である⁸⁾。進行すると肝硬変から肝不全となり、肝移植しか治療の手だてのない難病だが、ほとんど進行のみられない患者(無症候性PBC)も存在する。1990年に特定疾患に指定され、医療費公費負担患者は15,000人程登録されており、毎年500~1,000名程の新規患者

が発症している⁸⁾。無症候性PBCは登録患者の4~5倍はいるものと想定されている。全くの偶然だったが、彼女はPBCの研究をしていて、PBCの肝組織を抗リボタイコ酸(LTA)抗体で染めると、胆管周囲の炎症部位が染色されることに気がついて、「LTAの起源を調べる方法はないか?」と私に連絡しようとしていたところだったのだ。図2にPBC患者と対照の慢性C型肝炎の抗LTA抗体による免疫染色像を示す⁹⁾。PBCでは小葉間胆管周囲に浸潤している細胞とその周囲の間質にLTAが染め出されているのがわかる。そこで「こういう話があるんだけど」と話すと、トントン拍子に事は進んだ。PBC患者の血清中のIgG, IgM, IgA classの抗LTA抗体の値を慢性C型肝炎(Chronic hepatitis C: CHC)、健常者血清と比較してみたところ、PBC患者ではIgM, IgA class

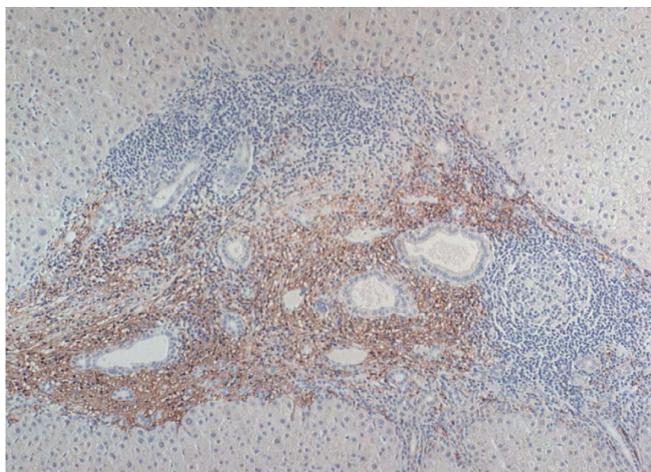


コロニー外観

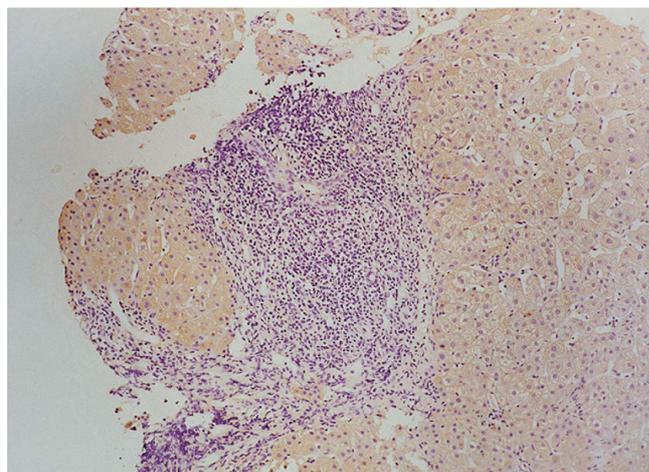
図1 ムコイド型*S. anginosus*株



莢膜染色(Hiss染色)像



PBC



慢性C型肝炎(CH-C)

図2 PBC患者と慢性C型肝炎(CH-C)患者肝臓組織の抗LTA抗体による免疫染色所見

の抗LTA抗体が有意に高値を示すことが確認できた⁹⁾。次にこのLTA酸が何のグラム陽性菌由来なのか調べるため、PBC患者血清の様々なグラム陽性菌に対する抗体価を測定することになった。図3に結果の一部を示す¹⁰⁾。様々なグラム陽性菌の中では、レンサ球菌との反応性が高く、特に*S. intermedius*の抗体価が他のレンサ球菌に対する抗体価よりも高いことが明らかとなった。

4. PBCの自己抗体の起源

PBC検査所見では肝胆道系酵素の上昇、IgM高値に加え、抗ミトコンドリア抗体が高率に(>90%)陽性になることから、自己免疫疾患と考えられている。抗ミトコンドリア抗体のエピトープはpyruvate dehydrogenase complex

(PDC)のE2, E3 binding protein, E1 α , E1 β , 2-oxoglutarate dehydrogenase complex(OGDC)E2, branched chain 2-oxo acid dehydrogenase complex(BCOADC)E2などで、PBCではPDC-E2抗体が最も高率に陽性となる。PBC患者ではこの他にも、抗gp210抗体、抗p62抗体、抗lamin B receptor抗体、抗sp100抗体、抗セントロメア抗体など、多種類の自己抗体が陽性になる^{4,8)}。これらのエピトープはPDC E2, gp210などで明らかになっているが、その分子相同性(molecular mimic)の対象となる微生物については今なお、特定に至っていない。これまでに、大腸菌、*Novosphingobium aromaticivorans*, *Propionibacterium acnes*, レトロウイルスなどの様々な微生物が候補にあげられたが、PBCの動物実験モデルなどによる直接的な証明はされていなかった⁴⁾。

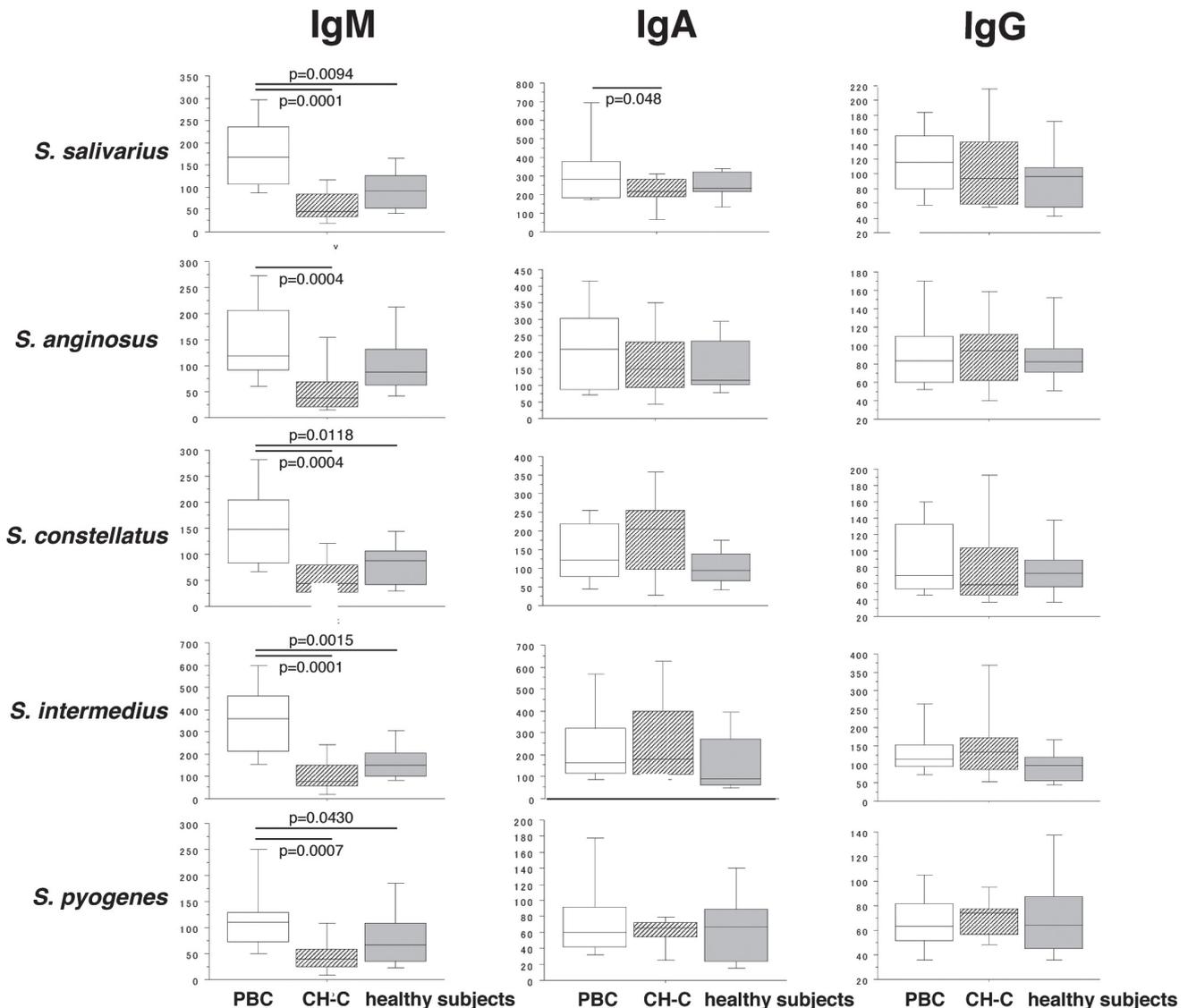


図3 PBC患者、慢性C型肝炎(CH-C)患者、健常者血清の各種レンサ球菌全菌体に対する抗体価

今回、PBC患者血清のレンサ球菌、特に*S. intermedius*の抗体価が高いことを見いだしたが、更にPBC患者血清では*S. intermedius* histone-like protein (Hlp)に対する抗体が高いこと、患者肝組織の免疫染色でPBC病変部位にHlpが検出されることから、*S. intermedius*の菌体成分、とりわけ、LTA、Hlpが⁸ molecular mimicとしてPBCの発症に関与していることが示唆された⁹⁾。

Hlpは菌種毎の保存性が極めて高い(種特異性が高い)RNA, 1本鎖、2本鎖DNA結合性タンパクであり、菌の生育には必須である。レンサ球菌では91アミノ酸から構成され、2量体を形成している¹¹⁾。細胞内でDNAの複製、転写調整、翻訳調整、ストレス応答などにかかわる一方、Hlpは細胞外にも放出され、細胞外放出DNAと共にバイオフィーム形成に寄与し、免疫細胞からの炎症性サイトカイン(IL-8, IL-1 β , TNF- α)の分泌を引き起こし、糸球体腎炎、リウマチ熱の病原因子としても知られている¹¹⁾。ところが、Hlpには抗ミトコンドリア抗体の抗原エピトープであるPDC-E2のEIETDK配列は含まれない。それではHlpは何と反応しているのであろうか。

5. PBC動物実験モデルの確立

先に*S. intermedius*はSAGの中でもかなり嫌気度の高いニッチな環境からしか分離されないことを説明した。その部位として、最も疑われるのが歯周病ポケットである。そこで、マウス歯肉に*S. intermedius*を週2回、8週間投与して歯周病モデルを作成し、肝臓にどのような変化が生じるのか調べてみた¹²⁾。驚くべきことに、*S. intermedius*は生菌でも加熱死菌でも典型的な肝臓小胆管周囲の非化膿性炎症像が観察され、投与終了20ヶ月後でもPBC様の病変は安定して検出された。肝組織では小胆管周囲の非化膿性炎症部位に一致して、免疫染色でHlpが検出された(図5)。まさにヒトPBCとそっくりの病態が再現された訳である。ここで更に大変興味深い事実が明らかになった。PBC患者にみられる抗gp210抗体は近年、PBCの予後予測因子として注目されている⁴⁾。PBC患者全体での陽性率は抗ミトコンドリア抗体に比べて低いが、抗gp210抗体陽性患者では陰性患者に比べ、肝硬変へ進展する症例の割合が高い⁴⁾。このマウスモデルで抗gp210抗体値の上昇がみられ、かつ、抗Hlp抗体はマウスのgp210と交差

反応することが明らかになった¹²⁾。ヒトgp210のエピトープと*S. intermedius*-Hlpの配列を比較すると、エピトープの共有が確認できたのである(図4)。しかし、何故、核膜孔を構成するタンパク核膜孔を構成するタンパクであるgp210に対する抗体がPBCで認められるのか。Susilowatiらは*S. intermedius*の産生するILYが胆管上皮細胞に作用すると、核内にカルシウム流入が起こり、nuclear factor of activated T cells 1(NFAT1)を活性化することで、細胞傷害をきたすことを報告した¹³⁾。胆管上皮細胞はCD59を高発現していることが知られており、ILYは細胞膜傷害のみならず、核膜傷害により核内タンパクの漏出を引き起こしたことにより、自己抗体獲得につながると想定された。また、このPBCモデルマウスの脾臓細胞をT細胞の欠如したRAG2^{-/-}マウスに移植すると、同じPBC様病変が移植マウスに再現された¹⁴⁾。これらの結果から、本モデルは優れたPBC動物実験モデルとして用いられるのではないかと考えている。おそらく、PBC発症に当たっては、閉経等で引き起こされるエストロゲン低下による免疫変化が前段階として存在し、発症の引き金となるイベントと炎症を継続させ、進行させる別々の複雑な経路が必要と推察される。

6. おわりに

PBCの molecular mimicに関して、候補になった微生物はレトロウイルスから、マイコプラズマ、グラム陰性菌、グラム陽性菌など、非常に多岐に渡る。PBC患者側の因子として、HLA-DQB1などのHLA領域、IL12/IL12Rシグナル伝達、TLR/TNA α -NH κ Bシグナル伝達、B細胞成熟分化、上皮細胞分化、アポトーシス、小胞体ストレス応答などの種々の遺伝子多型の影響が明らかにされている¹¹⁾。これらの点から考えても、PBCの発症要因は非常に複雑であり、疾患としての多様性を感じさせる。現在、我々はPBC患者、PBC以外の自己免疫疾患患者、コントロールで歯周病部位から検出されるSAGの比較解析を行っている。仮に、PBCの一部が*S. intermedius*の菌周の慢性炎症が原因で起きているとすれば、歯周病治療がPBCの予防・治療に直結する可能性が出てくる。今後はマイクロバイオーム解析を加えて、本研究を更に進めれば、新しい風景が見えてくるのではないかと期待している。

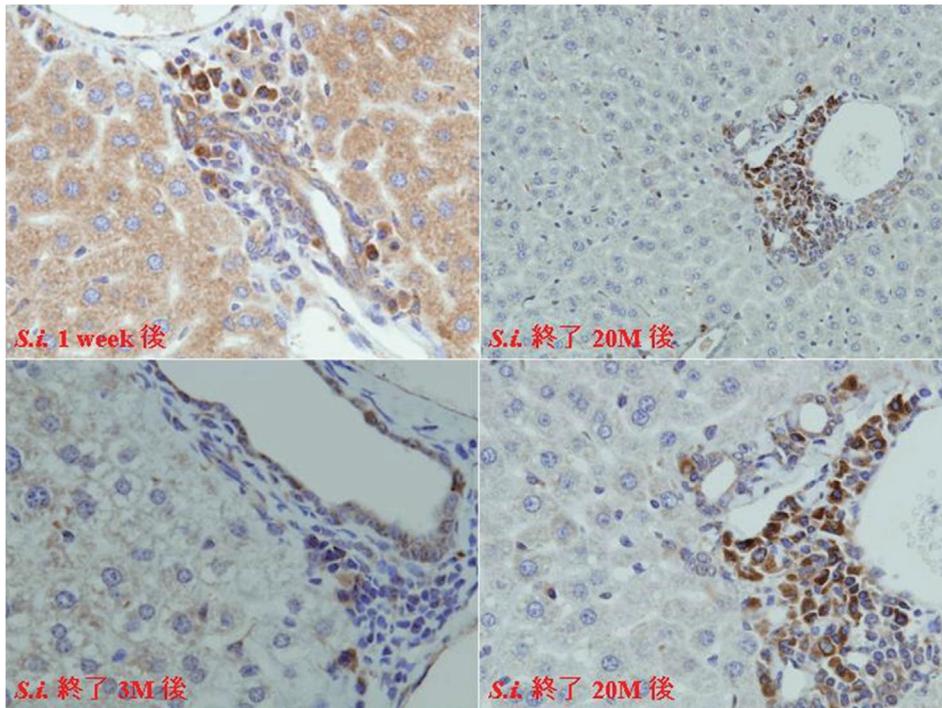


図4 マウスPBCモデルの非化膿性破壊性胆管炎病変の抗Hsp抗体による免疫染色所見

Hsp of *S. intermedius*
ARKGRNPQTGKEITI
ARKASPPSGLWSPAY
human gp210 epitope (1870-1884)

図5 *S. intermedius*-Hspとヒトgp210エピトープの比較

参考文献

- 1) 菊池賢. THE CHEMICAL TIMES. 2012, 224, 8-14.
- 2) Kikuchi, K.; Enari, T.; Totsuka, K.; Shimizu, K. J. Clin. Microbiol. 1995, 33 (5), 1215-1222.
- 3) Ko, T.; Mahara, K.; Ota, M.; Kato, Y.; Tobaru, T.; Takanashi, S.; Kikuchi, K.; Umemura, J.; Sumiyoshi, T.; Tomoike, H. Heart Lung. 2013, 42(5), 379-381.
- 4) 菊池賢. 化学療法の領域. 2011, 27(1), 71-78.
- 5) 長宗秀明. 日本細菌学雑誌. 2008, 63(3), 425-435.
- 6) Kim, D.D.; Song, W-C. Clin. Immunol. 2006, 118(2-3), 127-136.
- 7) Song, W-C. Autoimmunity. 2006, 39(5), 403-410.
- 8) 中村稔, 相葉佳洋, 小森敦正, 石橋大海. 医療. 2009, 63(6), 357-362.
- 9) Haruta, I, Hashimoto E, Kato Y, Kikuchi K, Kato H, Yagi J, Uchiyama T, Kobayashi M, Shiratori K. Autoimmunity. 2006, 39(2), 129-135.
- 10) Haruta, I.; Kikuchi, K.; Hashimoto, E.; Kato, H.; Hirota, K.; Kobayashi, M.; Miyake, Y.; Uchiyama, T.; Yagi, J.; Shiratori, K. Clin. Immunol. 2008, 127(2), 245-251.
- 11) 菊池賢. Bio Industry, 2015, 32(4), 20-24.
- 12) Haruta, I.; Kikuchi, K.; Hashimoto, E.; Nakamura, M.; Miyakawa, H.; Hirota, K.; Shibata, N.; Kato, H.; Arimura, Y.; Kato, Y.; Uchiyama, T.; Nagamune, H.; Kobayashi, M.; Miyake, Y.; Shiratori, K.; Yagi, J. Lab. Invest. 2010, 90, 577-588.
- 13) Susilowati, H.; Okamura, H.; Hirota, K.; Shono, M.; Yoshida, K.; Murakami, K.; Tabata, A.; Nagamune, H.; Haneji, T.; Miyake, Y. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2011, 404(1), 57-61.
- 14) Haruta, I.; Kikuchi, K.; Nakamura, M.; Hirota, K.; Kato, H.; Miyakawa, H.; Shibata, N.; Miyake, Y.; Hashimoto, E.; Shiratori, K.; Yagi, J. J. Clin. Immunol. 2012, 32(5), 1026-1037.

流体物理洗淨(2) 超音波洗淨

Physical Fluid Cleaning (2) Ultrasonic cleaning

静岡大学 学術院 工学領域 准教授 真田 俊之

Sanada Toshiyuki (Associate Professor)

College of Engineering, Academic Institute, Shizuoka University

北海道大学 大学院工学研究院 機械宇宙工学専攻 教授 渡部 正夫

Watanabe Masao (Professor)

Division of Mechanical and Space Engineering, Faculty of Engineering, Hokkaido University

1. はじめに

前回は流体物理洗淨の基本的概念について述べた。洗淨原理を理解することは機器を正しく扱うことにつながり非常に重要である。また様々な技術は、新たなメカニズムの解明によって進歩してきた¹⁾。今回と次回では個別の手法について、それぞれの原理に着目し紹介することとし、まずは超音波洗淨について述べる。異なる専門の方に、違った視点から超音波洗淨を眺めて頂けると幸いである。問題解決のプロセスとしてのアプローチ手法を増やすことができるためである。

超音波洗淨は幅広く利用されており、大学等の研究室等、小さなものを洗淨する際には欠かすことのできない装置であるにも関わらず、その原理は良く知られていない。最も身近な例として眼鏡の洗淨が挙げられるので、経験したことのある方も多いと思う。しかしこの超音波洗淨、実際に何が起きているのかはそれほど知られていない。例えば、超音波なのに何故「キーン」という高い音がするのであろうか? その鍵をにぎるのは気泡である。

音波が洗淨していると思われがちな超音波洗淨について、その原理を流体工学の視点から解説する。もちろんその全ては解明されておらず、現在も様々な研究が進められている。また後に詳細を述べるが、この泡が関与する現象についても、化学的視点、物理的視点から様々な論争が行われた。そのようなことが洗淨においても繰り返されないよう、超音波による物理的作用と洗淨液による化学的作用がうまく利用され、適切な洗淨が行われることを期待する。

2. 流体の基礎とキャビテーション

まずは、超音波の定義について述べる。音波は流体や固体中を伝わる波であり、圧力の疎密波、すなわち局所的に圧力が高くなったり、低くなったりする現象である。人間の耳に感じない振動数の大きな波のことを超音波と呼ぶ。そのため、振動数(周波数)が20kHzといった値を境に、それ以上の振動数の音波を超音波と呼ぶことが多い。

超音波を液体に照射すると何が起こるのだろうか? 液体は不思議な物質で、固体のように密度は高いが、分子は自由に動きまわることができる。一方で気体ほどバラバラではなく、ある程度分子間に引力が働いている。また、温度を上げると蒸発する。液体が蒸発する温度すなわち沸点は、飽和蒸気圧曲線を見れば良い。水の場合は大気圧(1013hPa)下で100℃で沸騰する。この沸騰現象と超音波照射が関係しているである。

飽和蒸気圧曲線(図1)を見ると、圧力が低い場合には沸点は下がる。これは良く知られた話であり、気圧の低い高い山の頂上ではカップラーメンが良くできなかったり、ご飯が半生状態になるのもこのためである。すなわち、より低い温度で沸騰してしまう。

それでは、常温で液体の圧力が低くなるとどうなるのであろうか? やはり液体が気体になる。このように液体の圧力が、その温度によって決まる蒸気圧より低くなり、蒸発する現象をキャビテーション(Cavitation)と呼ぶ(ここでは文献²⁾の定義で説明する。なお液体中の微小気泡との関連は後述する。)。キャビテーションは沸騰と同様に液相が気相へと相変化する現象である。定義は

研究者によって異なるが、沸騰を液体を加熱して液体の温度がその圧力の蒸発温度より高くなった際に起こる現象と定義すれば(図1①)、キャビテーションは、系の温度は一定で、圧力が下がったために起こる蒸発現象と言える(図1②)。

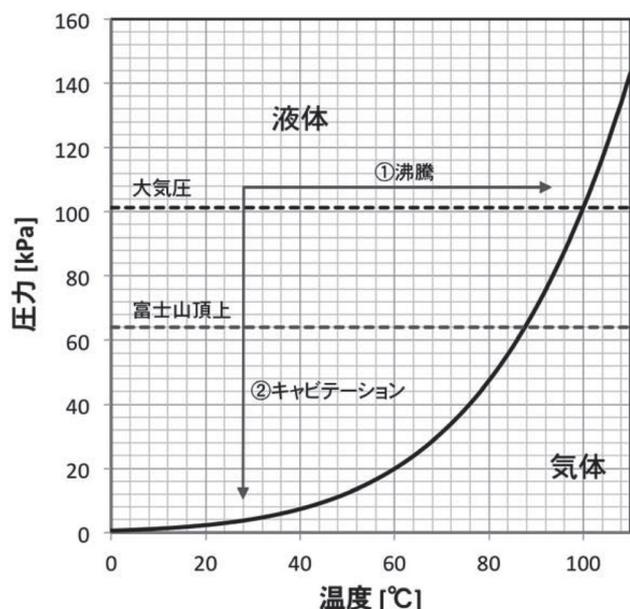


図1 飽和蒸気圧曲線、蒸発に至るプロセス

次に、流体中の圧力と流れについて簡単に紹介する。キャビテーションは、船舶など高速な流体機械では様々な問題を引き起こすが、なぜ常温で圧力が下がるのであろうか? 流体力学の有名なベルヌーイの定理がその訳を教えてくれる。この定理は様々な導出方法があり、状況により運動量保存則になったり、エネルギー保存則になったりする複雑な式であるが、簡単に言えば、圧力と速度の関係を示している。

$$p + \frac{1}{2}\rho V^2 = const$$

ここで、 p は圧力、 V は速度、 ρ は密度である。すなわち、速度が大きければその地点での圧力は下がるのである。例えば、前回の記事で紹介した粒子除去モデルのLiftingが良い例で、粒子の上を通過する流れが速い場合、その部分の圧力が下がり粒子が浮き上がるのである。飛行機に揚力が働くのも翼の上面の流れが下面より速いためであるし、変化球が曲がる仕組みも同様である。そのため、流れが局所的に速くなる回転機械の先端などでは圧力が下がりキャビテーションが発生してしまう。

キャビテーションが発生すると何が問題なのであろうか。それは、気泡の崩壊と関係している。気泡崩壊時には様々な複雑な現象が発生し、結果として表面を壊食(エロージョン)してしまう恐れがある。この壊食を起こすような強力な物理的作用を洗浄に利用する、というのが超音波洗浄である。そのため、キャビテーションの発生箇所では無く、崩壊する場所が重要となる。次に、超音波によって発生するキャビテーションについて紹介する。

3. 音響キャビテーション

前述したように、超音波は周波数の高い圧力の疎密波(縦波)である。そのため、液体中に照射すると、液体の圧力がその超音波の周期で変動する。その圧力変動に応じて気泡が生成され振動するのである。すなわち、圧力が下がり、例えば飽和蒸気圧を下回ると気泡が生成され膨張し、圧力が高くなると気泡は収縮する(図2)。一般的に超音波洗浄で使用されている周波数は数十から数百 kHzのものが多い。そのため、周期は0.1msecから0.01msecと非常に短い時間であるが、その短い時間で気泡が膨張収縮を繰り返している。ただし、この気泡の生成には様々な要因がある。まずはこの点に着目しよう。

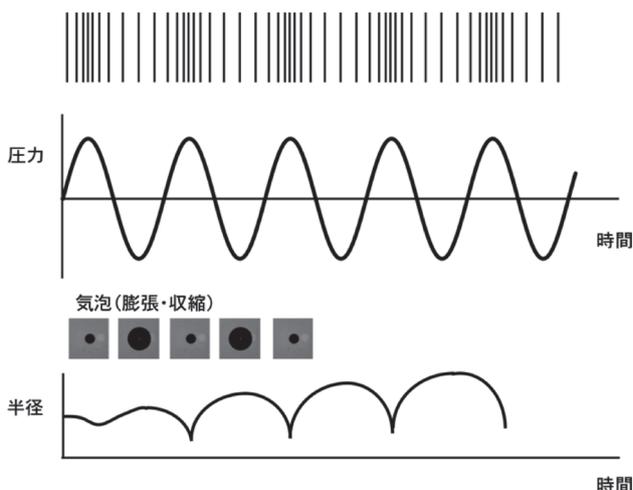


図2 超音波(音響)キャビテーション

液体中に気泡が存在する状況を考える。気泡の中身である気体は何であろうか? 前述したキャビテーションや沸騰の場合、液体が蒸発しているため、その液体の蒸気が主成分である。例えば液体が水の場合、水蒸

気である。それでは、キャビテーションと同様に減圧して気泡を生成する炭酸飲料はどうであろうか(研究者によってはこの現象もキャビテーションと呼ぶ)。液体にはその圧力に応じて気体を溶存させることができ(ヘンリーの法則)、減圧するとその気泡が生成される。そのため、二酸化炭素を溶けこませた炭酸飲料は、大気圧へと減圧することによって、その溶存気体が析出するのである。一方超音波によって生成される音響キャビテーションの場合、その両方の要素を検討する必要があり、現象を複雑にしている。すなわち、飽和蒸気圧を下回ることによる蒸発と、液体中に溶存している気体の析出の双方が発生することが一般的であり、気泡の中身は不凝縮気体と蒸気になる。ここで不凝縮気体とは、この条件下では凝縮しない空気などの気体のことを示す。

また気泡の生成についても注意が必要である。気泡の成長には核と呼ばれる微小気泡等が関連しており、その核生成には大きく2種類がある。固体表面などが核となる不均質核生成 (heterogeneous nucleation) と、明確な核生成部位のない均質核生成 (homogeneous nucleation) である。シャンパングラスを想像していただきたい。気泡は、グラスを拭く際に残されたわずかな繊維やグラスの傷部分からのみ発生する³⁾。すなわち限られた箇所からの気泡生成である、不均質核生成である。これは、中学校などの沸騰の実験で利用した沸騰石と同じ原理であり、過飽和の状態も非平衡ながら存在するためである。一方均質核生成は起こりにくい。例えば長時間保管し、気泡核が無くなったシャンパンの瓶の中では発泡は起こりにくい³⁾。そのため、脱気したような超純水では、同じエネルギーの超音波を照射しても水道水等と比較してキャビテーションは発生しにくい。

それでは、超音波のような高周波数でなぜ気泡は振動できるのだろうか? それには共振と呼ばれる振動現象が関係している。共振とは、振動体にその固有振動数と等しい振動を外部から加えたとき、非常に大きい振幅で振動する現象である。固有振動数は、ブランコで考えると分かりやすい。自分で漕ぐことのできない子供のブランコの振幅を大きくしようとすれば、その動きのタイミングに合わせて外力を加える必要がある。日本の洗濯機が、停止する前に大きく振動するのもこの共振現象である。一方で空気バネが存在するように、気泡内の空気も圧縮すると高圧になり反発し、振動する。断熱変化を仮

定し表面張力を無視した Minnaert Frequency と呼ばれる気泡の固有振動数 f_0 は次式で表される⁴⁾

$$f_0 = \frac{1}{2\pi R_0} \sqrt{\frac{3\gamma p_\infty}{\rho}}$$

ここで、 R_0 は気泡の平均径、 p_∞ は周囲液体の平均圧力、 γ は比熱比、 ρ は液体密度である。

空気の場合 ($\gamma=1.4$) で、液体を水、圧力を大気圧と仮定すれば、おおよそこの周波数と半径の積は

$$f_0 R_0 \approx 3 \text{ kHz mm}$$

となる⁴⁾。すなわち超音波の周波数を 50kHz, 100kHz, 1MHz とすれば、対応する気泡半径はそれぞれ 60 μm , 30 μm , 3 μm となり、液体中に存在する気泡核程度の大きさとなる。すなわち、この気泡振動の固有振動数が超音波の周波数と近いと振動を起こしやすいのである。なお、実際の気泡振動は、気泡の膨張や収縮の際に、気泡と液体の気液界面を通して熱や物質移動、相変化があり、さらに気泡内のミストの生成など、非常に複雑な現象となる。このような振動を詳細に調査した研究も数多く行われている。この気泡力学の詳細は文献を参照されたい⁵⁾。

4. エロージョン・コロージョン

次にキャビテーションによる気泡によって、なぜ船舶や流体機械など損傷を生じるのか、また音響キャビテーションによって、なぜ洗浄が可能なのか、その物理的作用について述べる。また超音波洗浄独特の高い「キーン」という音の発生理由も検討したい。

壊食 (エロージョン, erosion) とは、古くは河川の流れることによって川岸等が侵食を受けることなどを意味し、電気化学的腐食 (コロージョン, corrosion) は金属表面がイオンになって溶出することや酸素と反応し酸化物へと変化することである。しかし、船舶のプロペラや水車羽根による侵食が、壊食なのか腐食なのかは長い間論争があった。長い時間によって発生し、さらに海中での侵食には、純粋に2つの作用を分けることが困難だからである。アメリカ材料試験協会 (ASTM) のコロージョン委員会とエロージョン委員会では、規格用語としても統一が

なされておらず、双方の委員会にて意見の違いが見られるそうである⁶⁾。洗浄液を使用し、超音波を照射する超音波洗浄でも同様のことが予測される。

様々な研究者がキャビテーションの物理的作用のみでも壊食が発生することを実験や理論解析より明らかにしている。そこで、まず純粋な物理的作用を紹介したい。これは簡易的な超音波洗浄機とアルミホイルのみで簡単に実験できるため、ぜひ読者の皆様にも体験していただきたい。図3にその結果を示している。アルミホイルを数秒、超音波洗浄機に入れると非常に小さなピット(穴)が多数生成する。これが音響キャビテーションの物理的作用である。超音波洗浄機では、針のように細かな液体ジェットが表面を叩いて洗浄している。アルミホイルのように柔らかい物質の場合には変形、もしくは穴が開いてしまうのである。アルミホイルを数秒水に浸したのみで酸化や電気化学的反応が起こるとは考えにくい。そのためこれこそ純粋な物理的作用と言えよう。



図3 超音波洗浄機とアルミホイル

それでは、なぜ液体中で気泡が振動するとこのような穴がたくさん形成されるのであろうか？理由は大きく2つあり、そのキーワードは非線形振動と非球形崩壊という、2つの「非」が挙げられる。

まず非線形振動とは、気泡の振動(半径変化)が超音波の圧力の変化と完全に一致しないことである。図2の気泡径変化に着目すると、確かに圧力が増加すると気泡径は減少し、圧力が減少すると気泡径は増加する。しかし変化は圧力変化とは一致しない。これは、液体中で気泡が大きくなりやすく、一方で小さくなり易いためである。これは、様々な理由が挙げられるが、例えば密度が1000倍もある液体を押しつけながら成長(膨張)

するのは困難だが、逆に大きな密度を持つ液体が一旦加速を始めると収縮は容易なものとなる。図2の気泡径変化を注意深く観察すれば、気泡径が収縮する過程の最後は非常に速いことが分かる。もちろん、蒸発・凝縮、熱・物質移動等も発生するためそれほど容易な話ではない。いずれにせよ、気泡が収縮する際には周囲の液体が気泡中心へと高速で集まる。

なお、この非線形振動によって、気泡から照射する超音波とは異なる周波数の音が発生するために、超音波洗浄では高い音が聴こえるのである。すなわち、サブハーモニクスと呼ばれる超音波の周波数の半分などの周波数の音がする。なお雨の日や台所などで、液膜に液滴が衝突するとき発生する音も、この気泡振動に由来している⁷⁾。液滴が液面に衝突する音は非常に小さい。いずれにせよ、人間が超音波洗浄機で音を聴くことができるときには、音響キャビテーションが発生している。

次に、非球形崩壊について述べる。先ほど気泡が振動するという事は、周囲から高速で液体が集まること、また気泡は大きくなりやすく、小さくなり易いと述べた。この現象が壁面近傍で発生すると、非球形崩壊が発生する。気泡の周囲液体は気泡中心へ向けて集まろうとするが、壁面側からは液体が供給できないためである。その結果、壁面と反対側からのみ液体が気泡に向けて集まり、最終的に壁面に向けた高速な流れとなってしまう(図4)。これが図3で紹介した穴の生成メカニズムと考えられている。このように、高速な液体のジェットが衝突することによって局所的に高い物理的作用を表面へと及ぼす。このような視点に立てば、二流体ジェット洗浄などの液滴衝突エロージョンとキャビテーションエロージョンは同じ現象であるとも言える⁸⁾。

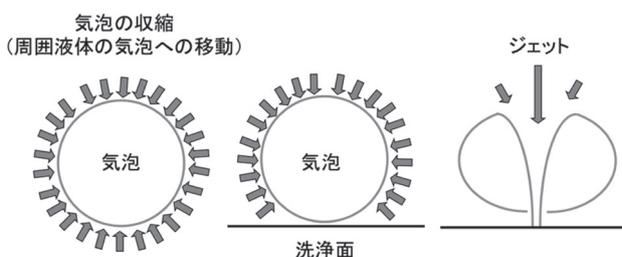


図4 気泡の非球形崩壊

音響キャビテーションの物理作用としては、その他の現象も知られている。前述したように、気泡は高速に崩

壊する。高速に気泡が崩壊することによって気泡内が高圧になり、周囲への衝撃波の発生も報告されている。衝撃波とは、爆発などによってできた大きな圧力変動で、不連続的な波面を有し、音よりも高速で伝わる波のことである。その衝撃波による物理的作用も考えられる。また衝撃波によって、気泡が崩壊すれば、さらに高速なジェットが生成されることも知られており、これらの要因が複合的に働き洗浄されていると考えることができる⁵⁾。

本当にそのような現象が発生しているのでしょうか？このような気泡振動や崩壊は、様々な分野で応用されており、現象は幅広い分野で確認されている。例えば、医療の現場で行われている結石破壊だが、結石の破壊には衝撃波と気泡の相互作用が重要な役割を果たしている⁹⁾。また気泡が高速で収縮する際には、気泡内が高圧・高温となり、プラズマ化して発光するソノルミネセンスも幅広く研究されており¹⁰⁾、その高音・高圧場を利用して新たな化学反応場を作るソノケミストリー¹¹⁾、さらに、気泡内高温高圧場で核融合を試みる研究者も存在する¹²⁾。ソノケミストリーと洗浄との融合は著者らの知る限り報告されて無いが、化学作用と物理作用を併用することができ、興味深い。

またメガソニックと呼ばれる、メガヘルツ帯の周波数の超音波を使用して洗浄する技術は、当初メガヘルツ帯なので音響キャビテーションは発生しないと言われていたが、様々な研究者によって、メガソニックであっても洗浄には気泡が関係していることが報告されている¹³⁾。また、医療用の超音波診断で使用される周波数帯がメガヘルツ帯であるため、医療用の血管造影(血管に気泡のようなマイクロカプセルを注射しその非線形振動を可視化する)に使用される超音波もメガヘルツ帯である。

このように気泡振動には様々な現象が隠されており、物理的に非常に興味深い。このような様々な気泡の面白い現象に関して書かれた文献¹⁴⁾を紹介しておく。

5. 超音波洗浄・洗浄のヒント

次に、このような音響キャビテーションと洗浄の関連について述べたい。洗浄で良く問題となるのは、洗浄のムラやダメージが挙げられる。例えば、Chemical Timesで紹介されている最先端半導体洗浄においても、キャビテーション崩壊と思われるピットが紹介されている¹⁵⁾。ど

のように対策すれば良いのであろうか。

まず、洗浄のムラについて述べる。まず、音響キャビテーションが洗浄の主たる原因の場合には、洗浄槽内の音圧分布が重要となる。すなわち音響キャビテーションが存在しないと、その物理的作用が発生しないためである。超音波は可聴域の音波に比べてその指向性は良い(すなわち真っ直ぐ進む)ものの、洗浄槽の形状や挿入された被洗物の影響を大きく受ける¹⁶⁾。そのため、洗浄対象物上で、できるだけ同程度の音圧が作用するようにする必要がある。その対策として、複数の周波数を組み合わせたり、振動子や被洗浄物の位置を移動させながら洗浄することが挙げられる。実際に図3で示したように、アルミホイル等を洗浄槽に入れれば、キャビテーションエロージョンの分布を見ることができ、この分布を参考にすれば良い。なお、これは物理的作用を利用した洗浄の良い点で、弱い材料を使用すれば、その物理的作用を可視化することができ、その作用を定量化できる。

次にダメージの対策、すなわち物理的作用の制御について検討する。この点は非常に困難を伴うが、音響キャビテーションが実に様々な因子の影響を受けて発生するため、逆にその様々な因子を利用すれば良い。文献⁵⁾によれば、キャビテーションエロージョンに及ぼす因子は多岐にわたり、液体因子のみを挙げても、温度、蒸気圧、音響インピーダンス、表面張力、粘度、圧縮性、腐食性(pH)が紹介されており、さらに、その際の流動因子(圧力など)や材料因子(弾性係数、硬さ、組織など)なども加わり、その組み合わせ全てを一般化することは困難である。そこでその一例を紹介しよう。

例えば、温度を変更すると何が起こるだろうか。温度が低い場合には、液体への気体の溶解度が大きい。一方温度が上昇すると蒸気圧が増す。このため気泡振動という観点から見れば、温度が低い場合には気体が、温度が高い場合には蒸気がクッションとなり気泡振動による衝撃力が弱まると予想されている。そのため、気体の溶解度が比較的小さく、蒸気圧がそれほど増加しない程度の温度でエロージョンが最大となる¹⁷⁾。このように、気泡の振動を増長もしくは阻害させるような因子を用いて制御すれば良い。

また、機能水と呼ばれる、液体に様々な気体を制御して溶けこませる手法も有効であろう。凹凸を持つ洗浄対

象物そのものが、不均質核生成の原因となり表面での激しい気泡振動が被洗淨物へのダメージとなる場合、予め気泡を溶かしこむことにより、均質核生成を促進して一定の音響キャビテーションによる物理的作用が期待できる。メガソニックと併用することで、様々な洗淨効果が報告されている¹⁸⁾。

一方、表面への物理的作用は、気泡崩壊時のジェットにも依存する。例えば、速度Vのジェットが弾性体に衝突する際に発生する圧力pは、以下の式で表される。

$$p = \frac{\rho_L C_L \rho_S C_S}{\rho_L C_L + \rho_S C_S} V$$

ここで、 ρC は音響インピーダンスと呼ばれ、添字のL、Sはそれぞれ液体、気体を意味する。液体のこの値が大きいほど衝撃圧力が増し、衝突する弾性体の値が小さいほど圧力は減少する。水銀のように音響インピーダンスが高い液体では、キャビテーション崩壊は深刻な問題となる¹⁹⁾。一方で、発生圧力を減らすために、あえて柔らかい(音響インピーダンスが小さな)材料を使用するという手も考えられる。

なお、近年では「ソフトなキャビテーション」と呼ばれる、音響キャビテーションを利用、もしくは簡易的に利用して、表面へのダメージを減らす試みも報告されている。例えば、予め気泡を存在させておいて、その気泡を振動させ、気泡の気液界面の移動を利用するもの^{20,21)}や、ある程度遠方で気泡を崩壊させその際の崩壊によって形成された流体の渦を用いた洗淨などが挙げられる。このように、気泡の崩壊は工夫次第で、強力な物理的作用から弱い物理的作用まで広い領域で利用できることが、今日、幅広い分野で超音波洗淨が利用されている原因だと思われる。

6. まとめ

今回、超音波洗淨の洗淨メカニズムについて紹介した。超音波によって生成された気泡振動が様々な現象を引き起こしていること、またどこから発生するか分からないこの気泡は、その制御が困難であることを述べた。一方で様々な因子の影響を受けるこの音響キャビテーションを制御できれば、洗淨の制御も可能になると予測する。読者に少しでも気づきがあれば幸いである。

参考文献

- 1) 山口栄一. “イノベーション 破壊と共鳴”. NTT出版. 2006, 312p.
- 2) Brennen, C.E. “Cavitation and Bubble Dynamics”. Oxford University Press. 1995.
- 3) ジェラルド・リジェ・ベレール. “シャンパン 泡の科学”. 立花峰夫訳. 白水社. 2007, 149p.
- 4) Leighton, T.G. “The Acoustic Bubble”. Academic Press. 1994, 640p.
- 5) 加藤洋治. “新版 キャビテーション 基礎と最近の進歩”. 横書店. 1999, 430p.
- 6) 松村昌信, 磯本良則, 矢吹彰広. “エロージョン・コロージョン入門”. 日本工業出版. 2005, 221p.
- 7) Prosperetti, A.; Oguz, H.N. Annual Review of Fluid Mechanics. 1993, 25, 577-602.
- 8) Field, J.E. Phys. Med. Biol. 1991, 36(11), 1475-1484.
- 9) Johnsen, E.; Colonius, T. J. Acoust. Soc. Am. 2008, 124(4), 2011-2020.
- 10) Brenner, M.P.; Hilgenfeldt, S.; Lohse, D. Rev. Mod. Phys. 2002, 74, 425-484.
- 11) Suslick, K.S. Science. 1990, 247(4949), 1439-1445.
- 12) Taleyarkhan, R.P.; West, C.D.; Cho, J.S.; Lahey Jr, R.T.; Nigmatulin, R.I.; Block, R.C. Science. 2002, 295(5561), 1868-1873.
- 13) Holsteyns, F.; Lee, K.T.; Graf, S.; Palmans, R.; Vereecke, G.; Mertens, P.W. Solid State Phenomena. 2005, 103-104, 159-162.
- 14) Lohse, D. Physics Today. 2003, 56, 36-42.
- 15) 富田寛. The Chemical Times. 2009, 213, 2-7.
- 16) 安藤英一, 加川幸雄. 電子情報通信学会論文誌 A. 1988, J71-A(5), 1079-1090.
- 17) 服部修次, 田中雄. 日本機械学会論文集 B編. 2002, 68(675), 130-136.
- 18) 角田光雄. “洗淨技術の展開, CMCテクニカルライブラリー269”. シーエムシー出版. 2007.
- 19) Takahira, H.; Kobayashi, K.; Matsuno, T. International Journal of Emerging Multidisciplinary Fluid Sciences. 2009, 1(2), 85-99.
- 20) Kim, W.; Kim, T-H.; Choi, J.; Kim, H-Y. Appl. Phys. Lett. 2009, 94(8), 081908.
- 21) Mettin, R.; Frommhold, P.E.; Xi, X.; Cegla, F.; Okorn-Schmidt, H.; Lippert, A.; Holsteyns, F. Solid State Phenomena. 2013, 195, 161-164.

免疫工学による免疫システム分子機構の解析

Analysis of molecular mechanisms in the immune system by immunoengineering

Ⅲ. タンパク質工学と細胞工学を有効に利用した抗体の作製

— Production of antibodies by efficient utilization of protein and cell engineering —

日本医科大学 医学部 医学科 微生物学・免疫学 熊谷 善博

Yoshihiro Kumagai

Department of Microbiology and Immunology, Nippon Medical School and Graduate School of Medicine, Tokyo, Japan

1. はじめに

このシリーズで紹介する免疫工学とは、免疫系の機能分子、担当細胞、個体を遺伝子工学、細胞工学、タンパク質工学、発生工学などの、いわゆる、生命に手を加える手法で免疫機構の解明を試みたり、疾病の治療アイデアを提供する学問を指しているが、下記の4回のシリーズのうち、第3回目として、Ⅲ. タンパク質工学と細胞工学を有効に利用した抗体の作製について紹介する。

- I. T細胞抗原レセプター遺伝子トランスジェニックマウスを用いたアレルギー発症機構の解析¹⁾
- II. T細胞抗原レセプター遺伝子トランスジェニックマウスを用いた免疫調節機構の解析
- Ⅲ. タンパク質工学と細胞工学を有効に利用した抗体の作製
- IV. エピトープ移植抗体 —タンパク質工学によるワクチンの創製—

KolerとMilstein¹⁾によって、初めて単一の形質細胞クローンに由来するヒツジ赤血球に対するモノクローナル抗体が細胞融合法で作製されて以来、40年近くの歳月が流れた。現在、様々なモノクローナル抗体が医学生物学の研究のみならず、治療用生物製剤としても多用され始めた。モノクローナル抗体の作製技術は、ほぼ確立されており、細胞融合と融合細胞の選択を基幹的な技術とするが、遺伝子工学、細胞工学、ならびに発生工学の技術を組み合わせて有機的に利用することにより、多様なモノクローナル抗体や関連融合タンパク質が

作製されている。このシリーズⅢでは、バイオテクノロジーを有効に利用して、単なるモノクローナル抗体の作製を超えた次世代技術ともいえる研究手法や作製手法を、筆者の研究例を中心に紹介する。

2. 遺伝子クローニングや遺伝子デザインによるモノクローナル抗体の作製: 抗体の遺伝子配列情報を用いたモノクローナル抗体の作製

細胞融合により作り出されたハイブリドーマ(Hybridoma)全てが、安定に大量のモノクローナル抗体を分泌してくれるわけではない。特定のハイブリドーマを選択株化した後も、ハイブリドーマは必ずしも安定ではない。筆者らは、マウス/マウスの同種間ハイブリドーマの一部、マウス/ラットのハイブリドーマ、マウス/アルメニアンハムスターのハイブリドーマ、ヒト/マウスのハイブリドーマ等のような異種間ハイブリドーマにおいて、脱分化や染色体消失等を主因とした、高頻度の低産生株化や無産生株化を経験している。このようなハイブリドーマによるモノクローナル抗体産生の欠点を克服する方法の1つがトランスフェクトーマによる抗体産生法である。

トランスフェクトーマの作製方法のついてはさまざまな方法が報告されてきた。細胞融合で作出したハイブリドーマ、低抗体産生株化したハイブリドーマ、あるいは、Epstein-Varr virusで株化した抗体産生ヒト形質細胞株などから抽出したDNAから、ゲノム遺伝子ライブラリーをファージやコスミドベクターで作製し、発現型の抗体ゲノム遺伝子を取得したのち、遺伝子導入に用いる古典的な方法は、煩雑で時間や高度な技術を要するため最

近では用いられなくなった。現在は、簡便な方法として遺伝子増幅法 (Polymerase Chain Reaction:PCR)を用いる方法が主流となっている。ただし、抗体遺伝子は複数かつ多様な遺伝子断片が遺伝子再構成のプロセスを経て発現されるため、PCRに利用するプライマーのデザインが肝要となる。

3. 作製方法の流れ

図1に、筆者が遂行してきた作製法のプロトコールを、図2、3に筆者の抗体遺伝子発現コンストラクトの一例^{2),3)}を示した。表1, 2, 3には、抗体遺伝子増幅に利用する5'プライマーと3'プライマーについての、膨大な

情報の中から、様々な抗体可変部遺伝子や定常部遺伝子に共用でき、なおかつ、抗体の遺伝子発現の転写翻訳の条件を満たし、試験管内抗体タンパク質産生に汎用性の高いものを、例示した。実際に作製を試みる場合に参考にしてもらいたい。ハイブリドーマの樹立成功した後、抗体の特性に手を加えたり、抗体骨格を含むキメラタンパク質の創製には有用な方法である。図4に、筆者が作製した抗DNP(2,4-dinitrophenyl)基に対するIgE抗体遺伝子を、抗体H鎖とL鎖の産生を欠落したSP2形質細胞腫に導入することにより樹立したしたトランスフェクターマの産生タンパク質の還元条件下二次元電気泳動パターンを示した。効率よく抗IgE抗体H鎖(図4右写真の楕円で囲んだ上部)とL鎖(楕円で囲んだ下部)が産生されていることがわかる。

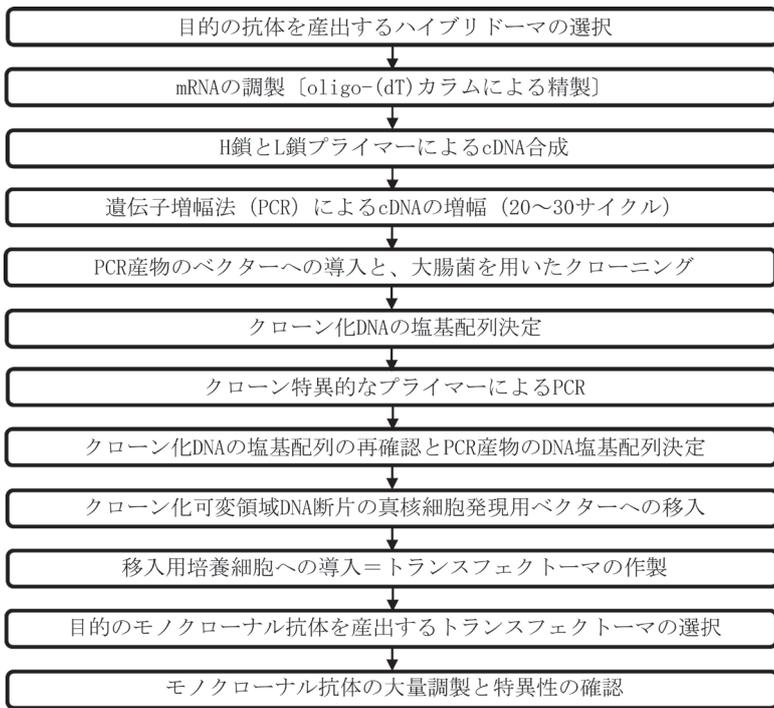


図1 遺伝子クローニングとトランスフェクターマを用いたモノクローナル抗体の作製

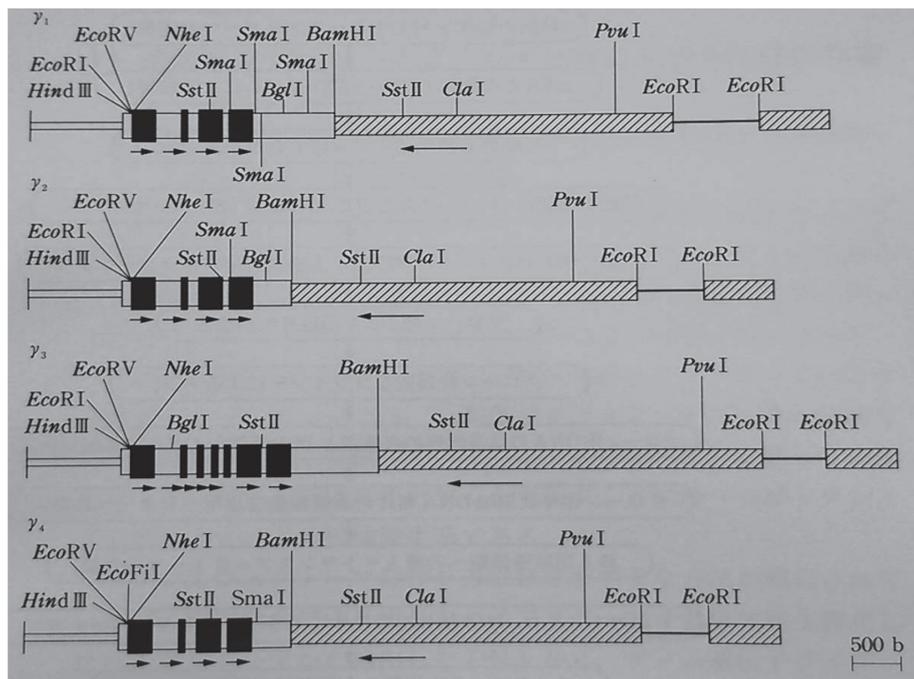


図2 ヒト抗体H鎖発現コンストラクトの例と制限酵素地図

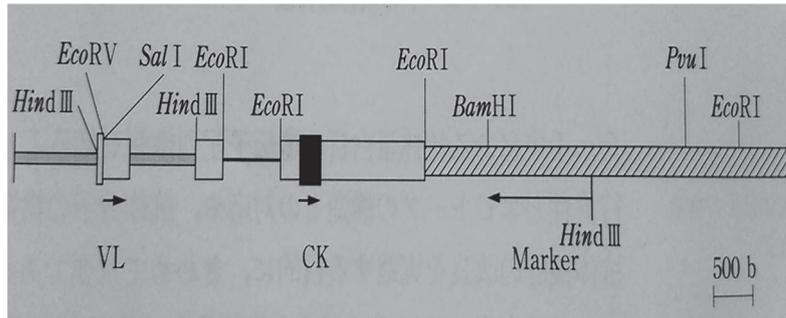


図3 マウスL鎖発現コンストラクトの例と制限酵素地図

表1 マウス抗体遺伝子のcDNA合成に利用する3'プライマーのDNA塩基配列²⁾

Immunoglobulin region	PCR primer	Primer sequence*
L chain C region	Oligo dT.R 1.XBA.H 3	5'-GCCGGAATTCTAGAAGC(T)17-3'
L chain C region	MCκAS.XBA**	5'-GCGTCTAGA AACTGGATGGTGG-GAGATGGA-3'
H chain V region	MgC.Ch 1 AS* ³	5'-AGGTCTAGAA(C/T)CTCCACACAC-AGG(A/G)(A/G)CCAGTGGATAGAC-3'

* : Degeneracies are indicated by alternative nucleotides at a single position. XbaI cloning site is underlined.
 ** : Designed to hybridize to sequences coding for amino acids 122 to 116 of the murine κC region.
 *³ : Antisense primer designed to hybridize to sequences coding for amino acids 130 to 120 in CH 1 of all murine immunoglobulins except IgG 3.

表2 遺伝子増幅用マウスH鎖可変部リーダー領域5'センスプライマー²⁾

PCR primer*	Primer sequence**
MLALT 1.RV	5'-GGGGATAT <u>CACCATG</u> GAGACAGACACACTCTGCTAT-3'
MLALT 2.RV	5'-GGGGATAT <u>CACCATG</u> GATTTTCAGGTGCAGATTTTCAG-3'
MLALT 3.RV	5'-GGGGATAT <u>CACCATG</u> (G/A)AGTCACA(G/T)AC(T/C)CAGGCTT(T/C)(G/A)TA-3'
MLALT 4.RV	5'-GGGGATAT <u>CACCATG</u> GAGG(G/T)CCCC(A/T)GCTCAG(C/T)T(C/T)CT(T/G)GG(G/A)-3'
MLALT 5.RV	5'-GGGGATAT <u>CACCATG</u> AAGTTGCCTGTTAGGCTGTTG-3'

* : Five primers designed to hybridize to the amino terminus of murine L chain leader sequences. All primers are used simultaneously to amplify unknown sequences.
 ** : EcoRV sites (underlined) are protected by the three 5'Gs. Ribosome binding sites are indicated in bold. Degeneracies are indicated by alternative nucleotides at a single position.

表3 遺伝子増幅用マウスL鎖可変部センスプライマー²⁾

PCR primer*	Primer sequence**
MHALT 1.RV	5'-GGGGATAT <u>CACCATG</u> (A/G)ATG(C/G)AGCTG(T/G)GT(C/A)AT(C/G)CTCTT-3'
MHALT 2.RV	5'-GGGGATAT <u>CACCATG</u> (A/G)ACTTCGGG(T/C)TGAGCT(T/G)GGTTTT-3'
MHALT 3.RV	5'-GGGGATAT <u>CACCATG</u> GCTGTCTTGGGGCTGCTCTTCT-3'

* : 3'primers designed to hybridize to the amino terminus of H chain leader sequences. All primers are used simultaneously to amplify unknown sequences.
 ** : EcoRV sites (underlined) are protected by the three 5'Gs. Ribosome binding sites are indicated in bold. Degeneracies are indicated by alternative nucleotides at a single position.

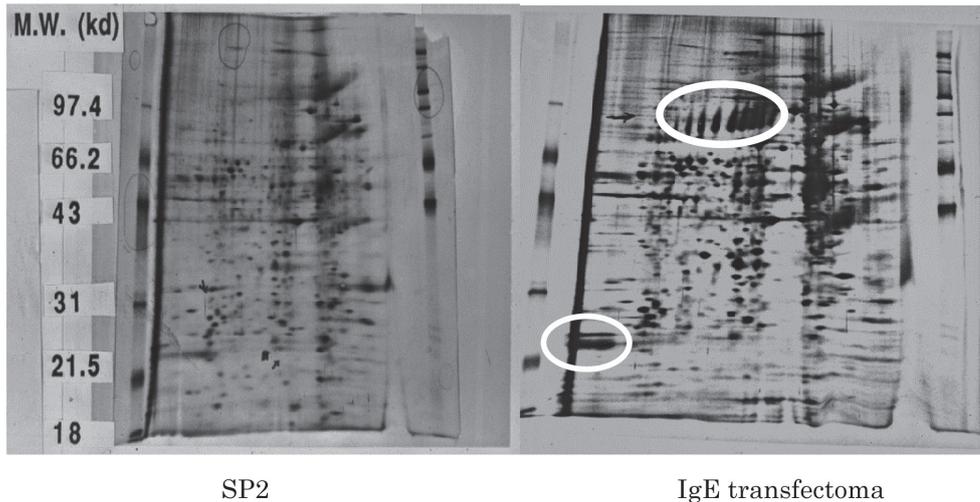


図4 IgE産生トランスフェクトマの作製
 抗DNP (2,4-dinitrophenyl) 基に対するIgE抗体遺伝子を遺伝子増幅法を組み合わせ作製し、抗体H鎖とL鎖の産生を欠落したSP2形質細胞腫に導入することにより樹立したトランスフェクトマの産生タンパク質の還元条件下2次元電気泳動パターンを示した。効率よく抗IgE抗体H鎖(図4右写真の精円で囲んだ上部)とL鎖(精円で囲んだ下部)が産生されていることがわかる。左の写真は、抗体H鎖とL鎖の産生を欠落したSP2形質細胞腫のタンパク質合成パターン。検出には、高感度銀染色を用いた。

4. 二重特異性抗体産生融合細胞(クアドリオーマ)の作製

IgMは成熟分子として5量体を形成し10個のエピトープ結合価を有する。2量体IgAは4個、IgGに代表される単量体抗体では2個のエピトープ結合価を有する。抗体の多価性を利用すると、抗体の特異性が複数の

抗原に対応した抗体を作製することができる。異なった抗体可変部を単分子抗体に発現させたのが、クアドリオーマ(Quadrioma)である。

目的は多種多様にあるが、ニーズに応じて、がん細胞と毒素の両方をリンクできる抗体や抗原とELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)用酵素の両方に反応する抗体などの報告がある⁴⁾。

クアドリオーマの選択方法には、図5に示した細胞再融合と薬剤選択を組み合わせた方法や、図6に示したフローサイトメリー(Flowcytometry)を用いた、2種の蛍光標識後、細胞を再融合して選択する方法がある。作製された抗体の分子種によって、イオン交換クロマ

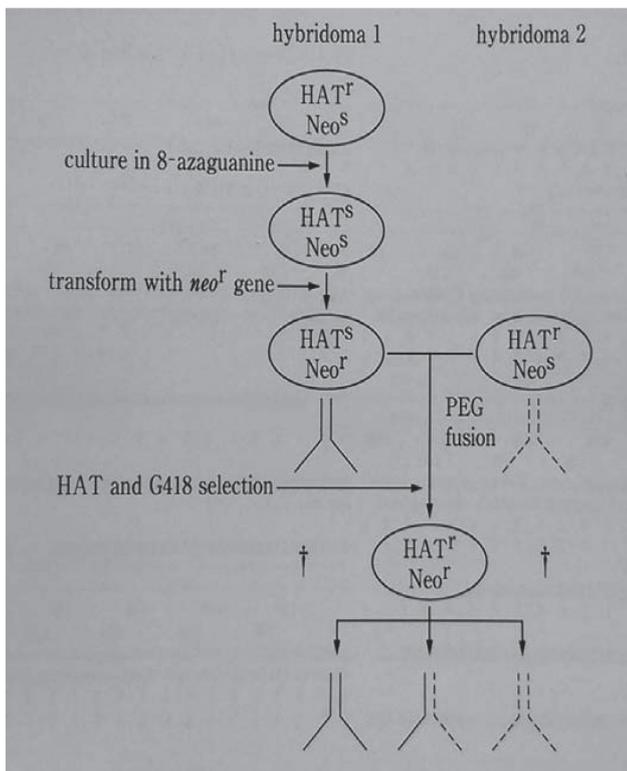


図5 2種のハイブリドーマの再融合と薬剤選択を利用したクアドリオーマの作製

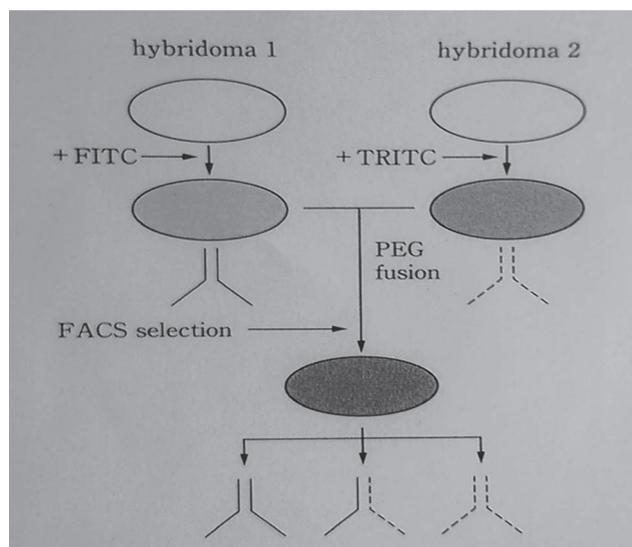


図6 フローサイトメリーを用いたクアドリオーマの選択

トグラフィー、逆相クロマトグラフィー、あるいは、親和性クロマトグラフィーを組み合わせた高速液体クロマトグラフィーにより、二重特異性抗体を精製できる。

5. モノクローナル抗体の利用:抗体分子の遺伝子改変とモノクローナル抗体を用いた分子標的治療

近年、抗体や抗体のキメラ分子を用いた分子標的治療が臨床治療の現場で多用され始めている。分子標的治療(targeted therapy)とは、特定の分子を標的として、その分子の機能や動態を制御する治療法である。抗体やキメラ抗体を用いる場合は、標的分子への高い特異性を利用し、リガンドとその受容体の反応を阻止する活性を、主に利用している。

目的は、ガン治療や炎症反応の治療などであるが、ガン細胞排除や炎症に関わる分子を特異的に抑えることを主目的とする。従来の多くの薬剤もその作用機序を探ると何らかの標的分子を持つが、分子標的治療は創薬や治療方法の設計段階から、分子標的を定めている点で大きく異なる。

20世紀初頭に抗破傷風毒素に代表される血清療法が開始されたが、破傷風毒素を標的とした抗体の毒素中和活性を利用していることから、現在の抗体活性を利用した分子標的療法の起源は、血清療法にあるといえる。血清から免疫グロブリンのみを精製して用いたものを免疫グロブリン製剤(第1世代抗体医薬品)と呼んでいるが、標的抗原特異性を有する抗体製剤が第2世代抗体医薬品として登場した。開発初期は、マウスモノクローナル抗体を利用していたが、マウスモノクローナル抗体はヒトに対して異物であるため、大量にヒトに投与すれば、HAMA(human anti-mouse antibody)が誘導され、血清病による強いアナフィラキシーを誘導するため、ヒト型モノクローナル抗体へ改変が遂行されてきた。製剤名の末尾に-**omab**と付くものはマウスモノクローナル抗体を意味し、-**ximab**と付くものは、抗体可変部はマウス抗体であるが、定常部はヒト抗体に改変してあるキメラ抗体である。可変部も定常部もヒト型である抗体は、末尾が-**zmab**と命名されている。

昨今、分子標的治療を目的とした生物製剤の約30%はモノクローナル抗体を骨格としたキメラ抗体や遺

伝子改変抗体で、現在、20種類近くの分子標的抗体ががん治療や抗炎症治療薬として使われている。ただし、患者と社会への経済的負担が多めで、製薬会社の経済的成功と医療上の社会的成功は全く別の問題である。それに加え、モノクローナル抗体による標的治療は、元々、このシリーズのIで紹介した免疫のパラダイム⁶⁾のバランスを大きく崩す本質を抱えており、副作用については長い時間軸を設定すればするほど未知数で、モノクローナル抗体による標的治療が、未来永劫に定着するかどうかについては懐疑を抱かざるを得ない。

6. おわりに

モノクローナル抗体作製技術の確立にノーベル賞が授与され¹⁾、臨床検査、研究、治療等さまざまな目的に汎用されている。免疫グロブリンは血中で安定性の高いタンパク質であり、標的特異性にのみならず、標的に対する持続的効果を発動することができる。これと対照的に、時を同じくした頃、試験管内実験では効果が確認できるアンチセンスDNAやアンチセンスRNAを用いた製剤は、標的細胞核への到達が不十分で、実用化への道のりは遠いと思われる。

一方、抗体関連製剤の開発は活況で、次世代モノクローナル抗体と呼ばれる、放射性同位体結合抗体や、標的特異性だけを重視し、抗体低上部が副次的に発動する補体結合反応や抗体依存性細胞障害活性等の生物活性をキャンセルした、抗体可変部位のみの単鎖抗体なども開発されつつある。

筆者も、可変部だけを持ち、標的に対し結合特異性のみを有する単鎖抗体(single chain antibody; scAb)や可溶性単鎖T細胞レセプター(single chain T Cell Receptor; scTCR)の作製に成功している(図7参照、未発表データ)。また、このシリーズの4回目として次回紹介するが、抗体の超可変部に様々なアミノ酸配列を導入し、モノクローナル抗体を抗原として作製し、ワクチンに利用するという次世代抗体(図8)も注目を集めている。

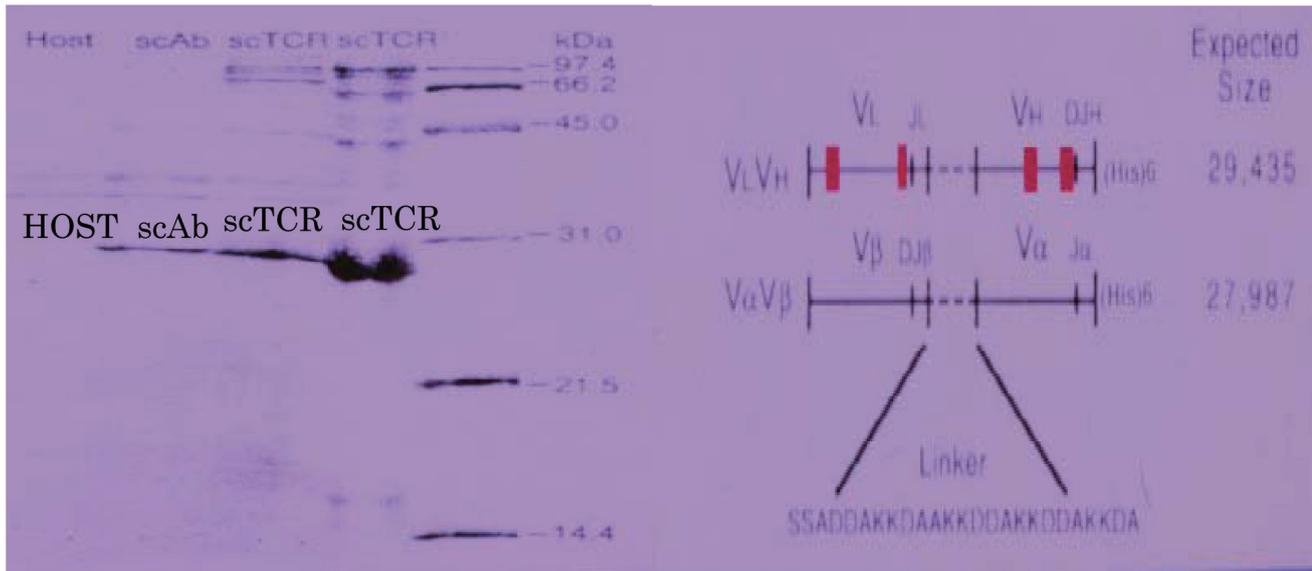


図7 可変部のみを有する単鎖抗体 (single chain antibody; scAb) や可溶性単鎖T細胞レセプター (single chain T Cell Receptor; scTCR) 抗体可変部や、T細胞レセプターα鎖、β鎖可変部を遺伝子増幅法により作製し、トランスフェクターマを作製する技術を組み合わせ、中央に自由度の高いリンカー (Linker) を人為的に組み込んだ単鎖分子を作製した。左図は、精製分子の電気泳動図 (クーマジーブリリアントブルー染色)、右図は、scAbとscTCRの構造模式図。

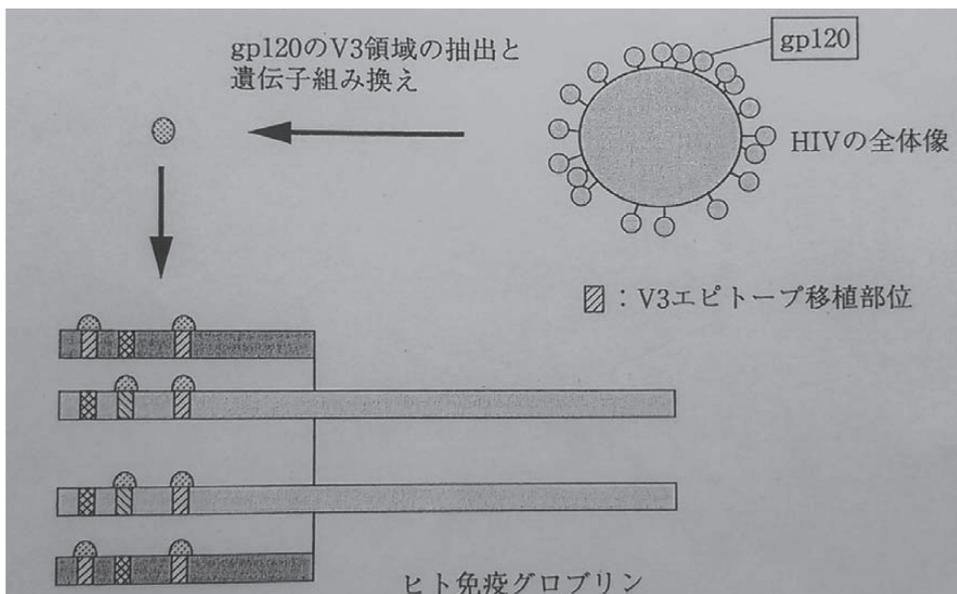


図8 エピトープ分子移植によるエイズワクチンの創製模式図⁸⁾

参考文献

- 1) Köhler, G.; Milstein, C. Nature, 1975, 256, 495-497.
- 2) 熊谷善博. 臨床消化器内科. 2001, 16(7), 815-823.
- 3) Kumagai, Y. Vaccines 94: Modern Approaches to New Vaccines Including Prevention of AIDS. Norrby, E., ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994, 9-14.
- 4) Kumagai, Y. Vaccines 96: Molecular Approaches to the Control of Infectious Diseases. Brown, F.; Norrby, E.; Burton, D.; Mekalanos, J. eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996, 283-288.
- 5) Fanger, M.W. Bispecific Antibodies (Molecular Biology Intelligence Unit). R.G. Landes, Austin, Tex, 1995, 110p.
- 6) Shin, D.S.; Ribas, A. Curr. Opin. Immunol., 2015, 33, 23-35.
- 7) Callahan, M.K.; Wolchok, J.D. J. Leukoc. Biol., 2013, 94, 41-53.
- 8) Kumagai, Y. J. Nippon Med. Sch., 2011, 78(2), 66-67.

最近のトピックス

多様化するβ-ラクタマーゼと検査試薬に関する一考 (2)

ペニシリン系、セフェム系、カルバペネム系抗菌薬などのβ-ラクタム系抗菌薬は様々な病原微生物に対する抗菌活性の強さと、ヒトに対する安全性の高さからもっとも汎用されている抗菌薬です。

しかしながら、カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*; CPE) はほぼ全てのβ-ラクタム系抗菌薬に高度耐性を示し、近年、本邦でもその主な耐性菌であるMBL (Metallo-β-lactamase) 産生菌の増加傾向が危惧されています。CPEはヒト腸内でも定着しやすい微生物であることから注意が必要とされます。MBL以外にも、KPC型β-lactamase、OXA型β-lactamaseなどの様々な耐性酵素を産生するCPEが世界を覆いつくそうとしています。

これら武装化した微生物の侵入を早期にキャッチし、感染対策をとるシステムの必要性はますます高まるものと考えられます。

CRE (Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*) の検査 (検出)

CPEとしては、肺炎桿菌が主な菌種で、大腸菌がそれに続きます。国内で検出されているCPEのほとんどはClass B型のMBLですが、米国ではClass A型 (KPC型) による流行が認められています。KPC型β-lactamaseはわが国においても症例報告があり、2010年にはインド渡航歴のある患者からNDM-1型MBL産生腸内細菌も分離されており、その後、渡航歴のない患者からも同β-lactamase産生株が分離されているため、今後の流行についても注意が必要と考えられます。そのような中、やや意味合いが異なりますが、平成26年9月19日の感染症法施行規則改正によって、CPEのうち、カルバペネム系抗菌薬に耐性を示すカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) 感染症が5類全数把握疾患に追加されました。

これらCREを検出するためには、まずは専用の選択分離培地によりCREをスクリーニングすることが必須です。近年、カルバペネム系抗菌薬を選択剤として用いた選択分離培地が利用できるようになり、さらに特殊酵素基質を利用することにより主要なCREを分離培地上で簡易鑑別できるようになりました。本手法を利用したクロモアガー KPC/ESBL分画培地 (図1) は、CREとESBL産生菌の検出を目的として開発され、優れた検出感度を有しています。

また、CRE疑いとして分離される菌株のなかには、AmpC産生と外膜透過性変異を伴うことによりカルバペネマーゼ産生を伴わずとも (CPEでない)、*in vitro* の薬剤感受性試験にてCREと判定される菌株も含まれます。本来であれば、その耐性化がCPEによるものか判断する必要があります。メロペネムを基剤とし、MBL阻害剤、KPC阻害剤、AmpC阻害剤を含有した4ディスク法によるカルバペネマーゼ鑑別ディスク (図2) は、これらCREを簡易鑑別する鑑別ディスクです^{2,3)}。本カルバペネマーゼ鑑別ディスクは、このような菌株も判別可能であり、クロモアガー KPC/ESBL分画培地とカルバペネマーゼ鑑別ディスクを組み合わせることにより、煩雑な検査の簡略化が期待されます (図3)。このような手法を用いることにより、様々な腸内細菌が存在するような検体 (特に便検体) から、積極的に耐性菌を検出できるようになり、アクティブサーベイランス等にも有用と考えられます (なお、OXA型やESBL産生と外膜透過性変異を伴う株については判定できないため、遺伝子検査に頼らざるを得ません)。

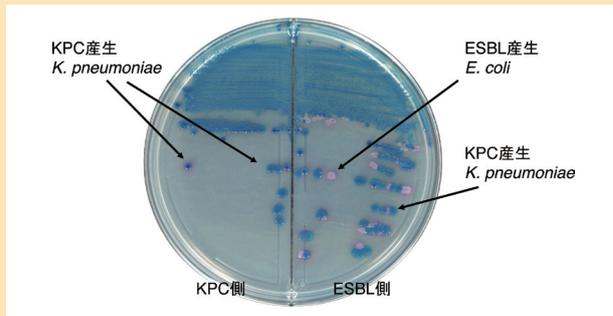


図1 クロモアガー KPC/ESBL分画培地上の各種耐性菌の発育所見

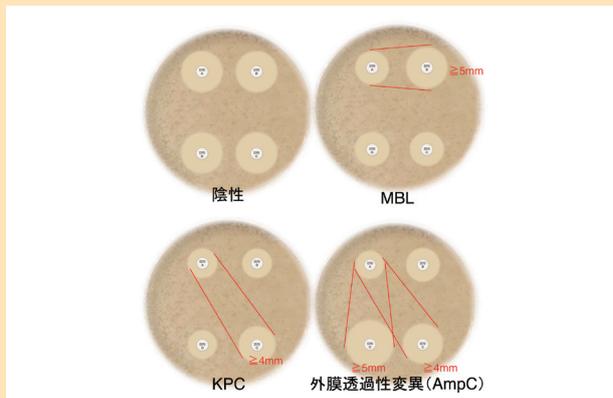


図2 カルバペネマーゼ鑑別ディスクにおける鑑別基準

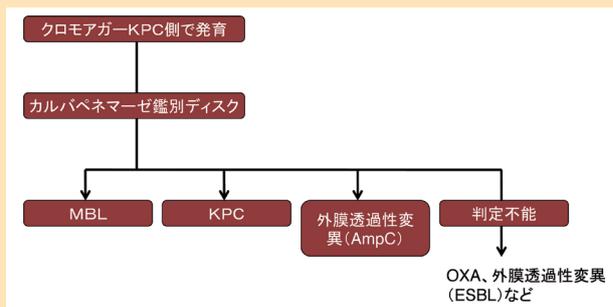


図3 CREの簡易鑑別スキーム

参考文献

- 吉川 耕平, 長川 隼也, 園田 美代子, 嶋谷 泰明, 竹田 真未, 木下 幸保. 日本臨床微生物学雑誌. 2014, 24 (1), 9-16.
- Doyle, D.; Peirano, G.; Lascols, C.; Lloyd, T.; Church, D.L.; Pitout, J.D.D. J. Clin. Microbiol. 2012, 50 (12), 3877-3800.
- Saito, R.; Koyano, S.; Dorin, M.; Higurashi, Y.; Misawa, Y.; Nagano, N.; Kaneko, T.; Moriya, K. J. Microbiol. Methods. 2015, 108, 45-48.