

直接固層化した西ヶ原株 RV virion または 35 mm tissue culture dish に直接固層化した精製 RV G 蛋白を 3% nonfat powdered milk/PBS(-)にてブロック後、ファージライブラリーを affinity binding によりパンニングした。5 cycles のパンニングを行い溶出したファージ溶液を *E.coli* XL1-Blue に感染させ phagemid DNA を精製した。この選別された phagemid DNA にて nonsuppressor *E.coli* top 10 をトランスフォーメーションし、可溶性 Fab を産生させ ELISA 法にて目的のクローンを選別した。

#### 6) 可溶性 Fab 産生クローンの選別

選別した phagemid DNA にてトランスフォーメーションされた nonsuppressor *E.coli* top 10 を 1 クローンずつ無作為に pick up し IPTG にて induce 後、培養上清をヤギ抗ヒト IgG F(ab')<sub>2</sub> を抗原とした ELISA 法にて可溶性 Fab 産生クローンを選別した。可溶性 Fab 産生クローンのペリプラスムを超音波破碎して大腸菌抽出液(Fab 標品)を作成した。

#### 7) RV 中和試験

ボランティア 6 名の RV に対する血清中和抗体価は BHK-21 細胞と RV 西ヶ原株を用いて rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT)法にて行い、血清中和抗体価は RV 感染細胞による focus 数を 50%減少させる血清希釈倍数で示した。また Fab 標品の中和活性は chicken embryo related

(CER)細胞と RV CVS 株を用いて RFFIT 法にて行い、RV 感染細胞によるフォーカス数によって中和活性を評価した。

#### 8) 選別した Fab 標品の RV-binding capacity

ELISA plate 上に直接固層化した西ヶ原株 RV ビリオンまたは 35 mm tissue culture dish に直接固層化した精製 RV G 蛋白に対する選別 Fab 標品の結合能を ELISA 法にて評価し、ボランティア血清及び BSA を用いた場合の値と比較した。

#### 9) 中和活性を示す Fab 標品の antigen specificity

Fab 標品の認識する RV タンパクは免疫共沈法にて推測した。RV CVS 株と Fab 標品を反応後、抗ヒト IgG F(ab')<sub>2</sub> を加え、抗原抗体複合物を protein G conjugated-sepharose beads で回収し非還元化状態下に SDS-PAGE で分離し、Western blotting にて Anti-RV G-protein specific monoclonal antibody または anti-RV N-protein specific monoclonal antibody を用いて抗原抗体複合物中に含まれるタンパク質を推測した。

#### 10) Fab の塩基配列の決定

Fab の V<sub>K</sub>、V<sub>H</sub> 領域の塩基配列を Fluorescence Dideoxynucleotide Terminator Cycle Sequencing kit を用いて自動 DNA シークエンサーで行った。Software Vector

NTI で解析を行い、DNAPLOT software program にてデータベース上のヒト Ig ホモログを検索した。

## C. 研究結果

### 1) ボランティア 6 名の RV に対する血清中和抗体価

6 名の血清中の狂犬病中和抗体価は BHK-21 細胞を用いた西ヶ原株における RFFIT 法にて測定した。2 回の狂犬病ワクチン接種後、ボランティアの血清抗体価（最後のワクチン接種から 2 週間後）は 3162 から 22387 にまで上昇し、ワクチン接種前よりも 1.4 から 100 倍高値になっていた(図 2)。この様な血清抗体価は狂犬病ウイルス中和抗体を得るための Fab ライブラリー構築には十分な値と判断した。

### 2) ヒト Fab ( $V_H$ - $C_H$ / $\kappa$ )ライブラリーの構築

約 350-bp の軽鎖及び重鎖の可変領域部 ( $V_\kappa$ ,  $V_H$ ) DNA 産物を PCR 法にて増幅、また約 350-bp の軽鎖及び重鎖の定常領域部 ( $C_\kappa$ ,  $C_H1$ ) は pComb3XTT を template として PCR 法にて増幅した。 $\kappa$  軽鎖および Fd 部は上記 DNA 産物を用いた overlap PCR にていずれも 750-bp の DNA 産物として構築した。さらに  $C_\kappa$ ,  $C_H1$  を用いた overlap PCR にて 1500-bp の全長 Fab DNA 産物を構築し、pComb3X phagemid vector 上にヒト Fab ライブラリーを構築した。ライブラリーはおよそ  $7.0 \times 10^7$  *E. coli* transformants のサイズであった(図 1)。

### 3) ファージライブラリーのパンニング (生物学的濃縮)

まず構築したファージライブラリーを ELISA plate に直接固着化した西ヶ原株 RV ビリオンに対して 5 cycles のパンニングを行い、抗原特異的 Fab 発現クローンを濃縮した。又同様に RVG タンパク特異 Fab 発現クローンを濃縮する目的で構築したファージライブラリーを 35mm tissue culture dish に直接固着化した精製 RVG タンパクに対して 5 cycles のパンニングを行い、抗原特異的 Fab 発現クローンを濃縮した。パンニングによって濃縮されたそれぞれのファージミドは可溶性 Fab を発現させるために nonsuppressor *E. coli* top 10 に別々に感染させスクリーニングを行った。西ヶ原株 RV ビリオンに対してパンニングを行ったライブラリーからは 20 クローン、精製 RVG 蛋白に対してパンニングを行ったライブラリーからは 112 クローンが可溶性 Fab 産生クローンとして選別された。これら 132 クローンの Fab 抗体を含む大腸菌抽出液に関して抗ヒト IgG F(ab')<sub>2</sub> に対する ELISA 値が高値であった 15 クローンについて RV 中和活性評価を行った。

4) 選別した Fab 標品の RV 中和活性評価  
選別された 15 クローンの Fab 抗体を含む大腸菌抽出液(Fab 標品)について CVS 株に対する狂犬病ウイルス中和活性評価を行った。西ヶ原株 RV ビリオンに対してパンニングを行ったライブラリーから得ら

れた Fab 標品 EP5G3 は 2 倍希釈で 76%、4 倍希釈で 20%の CVS 感染 focus を減少させた。精製 RV G 蛋白に対してパンニングを行ったライブラリーから得られた Fab 標品 GD2D12 は 2 倍希釈で 57%、4 倍希釈で 41%の CVS 感染フォーカスを減少させた(表 1)。ELISA 法にて RV 非特異的な Fab 標品 Di6D3 等や RV specific な Fab 標品 EP1C6(表 2)等を含む残りの 13 クローンの Fab 標品は CVS 株に対する中和活性を示さなかった (図 5)。

#### 5) 選別 Fab 標品の RV binding capacity と中和活性を示す Fab 標品の antigen specificity

中和活性を示さない Fab 標品 EP1C6 の RV ビリオン(西ヶ原株) に対する ELISA 値は高値であったのに対して、RV 中和活性を示した Fab 標品 EP5G3 と GD2D12 は 0.8 以下であった(表 2)。また精製 RV G 蛋白に対する ELISA 値はいずれの Fab 標品も 0.2 であった。

免疫共沈法では RV 中和活性を示した Fab 標品 EP5G3 と GD2D12 は抗 RV N 蛋白 monoclonal antibody には認識されず(図 3, lane 5 and lane 6)、抗 RV G 蛋白 monoclonal antibody によって認識される(図 3, lane 2 and lane 3) 67-kDa の蛋白と反応することより、これら 2 つの Fab は RV G 蛋白を認識することが推測された。

#### 6) Fab 抗体のアミノ酸配列

RV 中和活性を示した Fab EP5G3 と

GD2D12 の塩基配列を決定することでアミノ酸配列を推測し、比較検討した。抗原との結合に特に関係あるとされる重鎖の complementary-determining region 3 (CDR3) と CDR1 は 2 クローン間でアミノ酸配列は大きく異なっていたが、CDR2 は同じものであった(図 4)。また Fab EP5G3 と GD2D12 の V<sub>H</sub> に関してはどちらも V<sub>H</sub>III family 由来と推測されたが EP5G3 の V<sub>κ</sub> は V<sub>κ</sub>III family、GD2D12 の V<sub>κ</sub> は V<sub>κ</sub>II family 由来と推測された。

#### D. 考察

本研究ではワクチン追加接種後のボランティアの末梢血リンパ球からヒト Fab ライブラリーを構築し、ファージディスプレイ法を用いてその中から *in vitro* で狂犬病ウイルス中和活性を示す Fab を選別した。これまでの報告ではヒトのナイーブライブラリーから生物学的活性を有する Fab 抗体を選別するには、巨大ライブラリーが必要とされていた。しかし我々の構築したライブラリーはこれまでの報告と比較するとライブラリーのサイズは中等度のものであったが、immune library であり疾患特異的リンパ球および mRNA を効率的に利用できることで狂犬病ウイルス中和活性を有する Fab を選別することが可能であった。今後はさらに狂犬病ウイルス中和活性が高いクローンをさらに選別し、また選別したクローンについて Fc 部分を有する完全型の IgG 分子に変換し、補体活性化能やオプソニン活性

化能を高めた分子を作成しさらなる評価を行うことが必要であると考えられる。

## E. 結論

ファージディスプレイ法を用いて狂犬病ウイルスに対して中和活性を有するヒト型 Fab 抗体の作成に成功した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Ando T., Yamashiro T, Sonoda YT, Mannen K, Nishizono A. (2005) Construction of human Fab library and isolation of monoclonal Fabs with rabies virus neutralizing ability. *Microbiology and Immunology* (in press)

2) Men R, Yamashiro T, Goncalvez AP, Wernly C, Schofield DJ, Emerson SU, Purcell RH, Lai CJ. (2004) Identification of chimpanzee Fab fragments by repertoire cloning and production of a full-length humanized immunoglobulin G1 antibody that is highly efficient for neutralization of dengue type 4 virus. *Journal of Virology* 78: 4665-74.

3) Pakamatz K, Inoue K, Shoji Y, Wilde H, Ubol S, Nishizono A, Kurane I, Morimoto K. (2005) A novel rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for rabies virus using a recombinant rabies virus visualizing a green fluorescent protein. *Journal of Immunological Methods* 125: 35-40.

### 2. 知的財産権の出願・登録状況

「狂犬病ウイルスを効果的に中和するヒト抗体」(特願 2004-332680)

### 3. 学会発表

1) 安藤忠助, 山城哲, 西園晃. コンビナトリアル・ライブラリー法を用いたヒト抗狂犬病ウイルス中和 Fab 抗体の作成 第 52 回日本ウイルス学会学術集会 2004 年 11 月 横浜

2) 安藤忠助, 山城哲, 西園晃. コンビナトリアル・ライブラリー法を用いたヒト抗狂犬病ウイルス中和 Fab 抗体の作成 第 8 回日本ワクチン学会学術集会 2004 年 10 月 札幌

3) Yamashiro T, Ando T, Nishizono A. Construction of human  $\gamma 1/\kappa$  library and isolation of monoclonal Fabs with rabies virus neutralizing ability. Fortieth Anniversary United State-Japan Cooperative Medical Science Program. December 2004, Kyoto

4) Nishizono A. Molecular epidemiology of rabies isolates in Southern Vietnam. 21<sup>st</sup> COE program Nagasaki Symposium on tropical and emerging infectious diseases and JSPS workshop on infectious diseases in Vietnam November 2004, Nagasak

表 1 Fab 標品の狂犬病ウイルス中和活性

Reagent	Dilution	Focus counts (% reduction) *
Virus control	--	46
RV vaccinated serum control	1:1024	0 (100)
Fab preparations:		
Di6D3 †	1:2	58 (0)
EP1C6 ‡	1:2	51 (0)
EP5G3	1:2	11 (76)
	1:4	37 (20)
GD2D12	1:2	20 (57)
	1:4	27 (41)

Rapid fluorescent focus inhibition tests (RFFIT) using strain CVS (challenge virus standard) were performed. Data shown in focus counts are the average of duplicated tests. The Fab preparation EP5G3 and GD2D12 was expressed and prepared from a clone isolated from the phage pool panned against RV virions and the purified RVG-protein, respectively.

\* % reduction was calculated as (number of foci of virus control - number of foci in each reaction) / number of foci of virus control.

† Human Fab preparation that did not bind to RV was used. Di6D3 was selected from the same library.

‡ Human Fab preparation that bound to RV shown in ELISA was used.

表 2 精製狂犬病ウイルス G 蛋白に対する Fab 標品の結合活性

Fab preparation	ELISA titer* to:		
	RV virion	purified RVG-protein	anti-human F(ab') <sub>2</sub> †
Di6D3 ‡	0	0	2.2
EP1C6	2.1	0.2	2.4
EP5G3	0.8	0.2	2.4
GD2D12	0.2	0.2	1.8

\* All ELISA titers are presented as (titer of each sample)-(the titer of negative control). Bovine Serum Albumin (500 µg/mL) was used as the negative control in each ELISA reaction.

† Reactivity to anti-human F(ab')<sub>2</sub> was determined to confirm the amount of soluble Fab in each preparation.

‡ Human Fab preparation that did not bind to RV was used. Di6D3 was selected from the same library.

図1 ヒト Fab コード領域のファージミドベクター-pCom3X への挿入と構築の概略

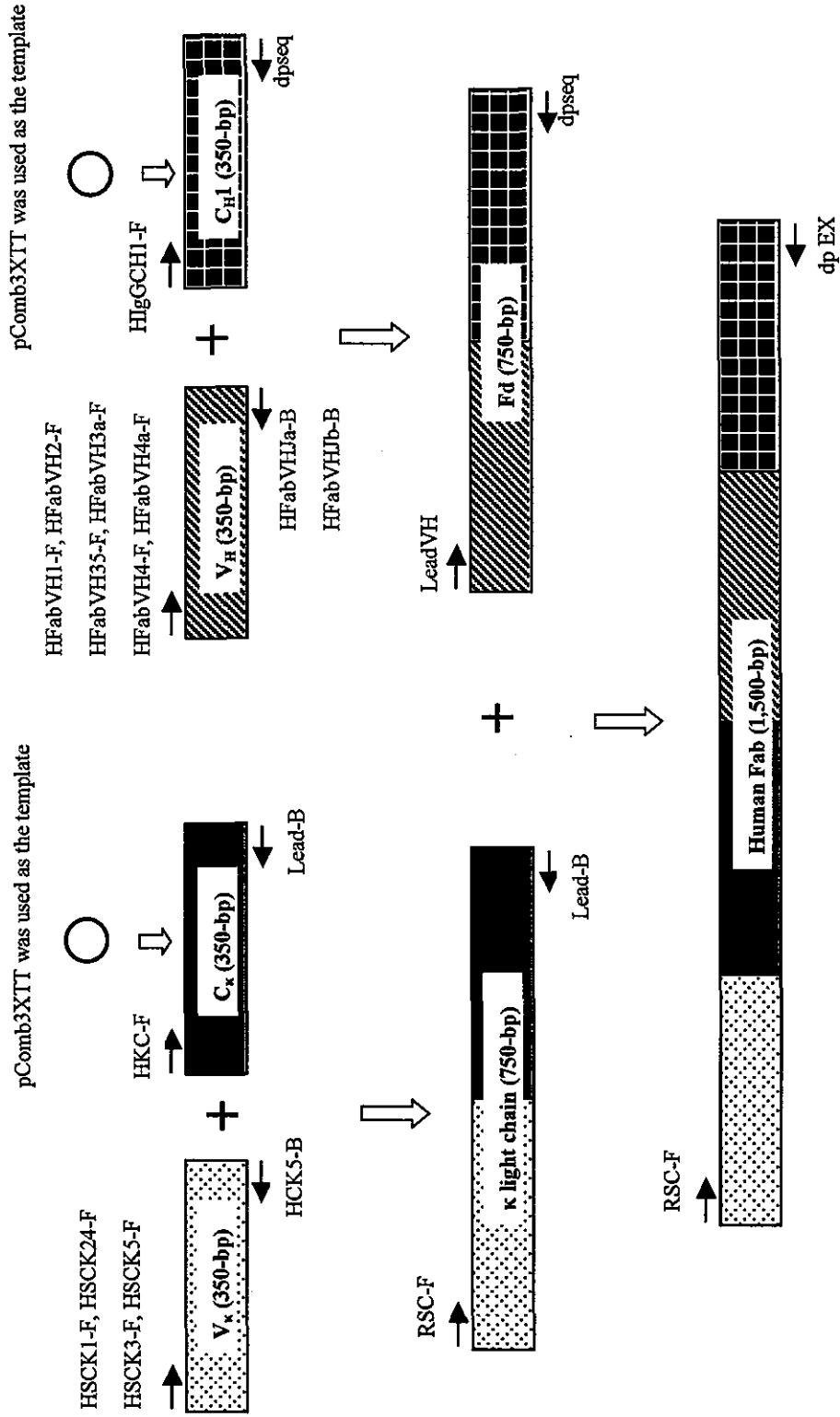


図2 ポランテア血清の狂犬病ウイルス中和抗体(VNA)価の上昇プロフィール  
 (BHK-21細胞を用いたRapid fluorescent focus reduction assayによる)

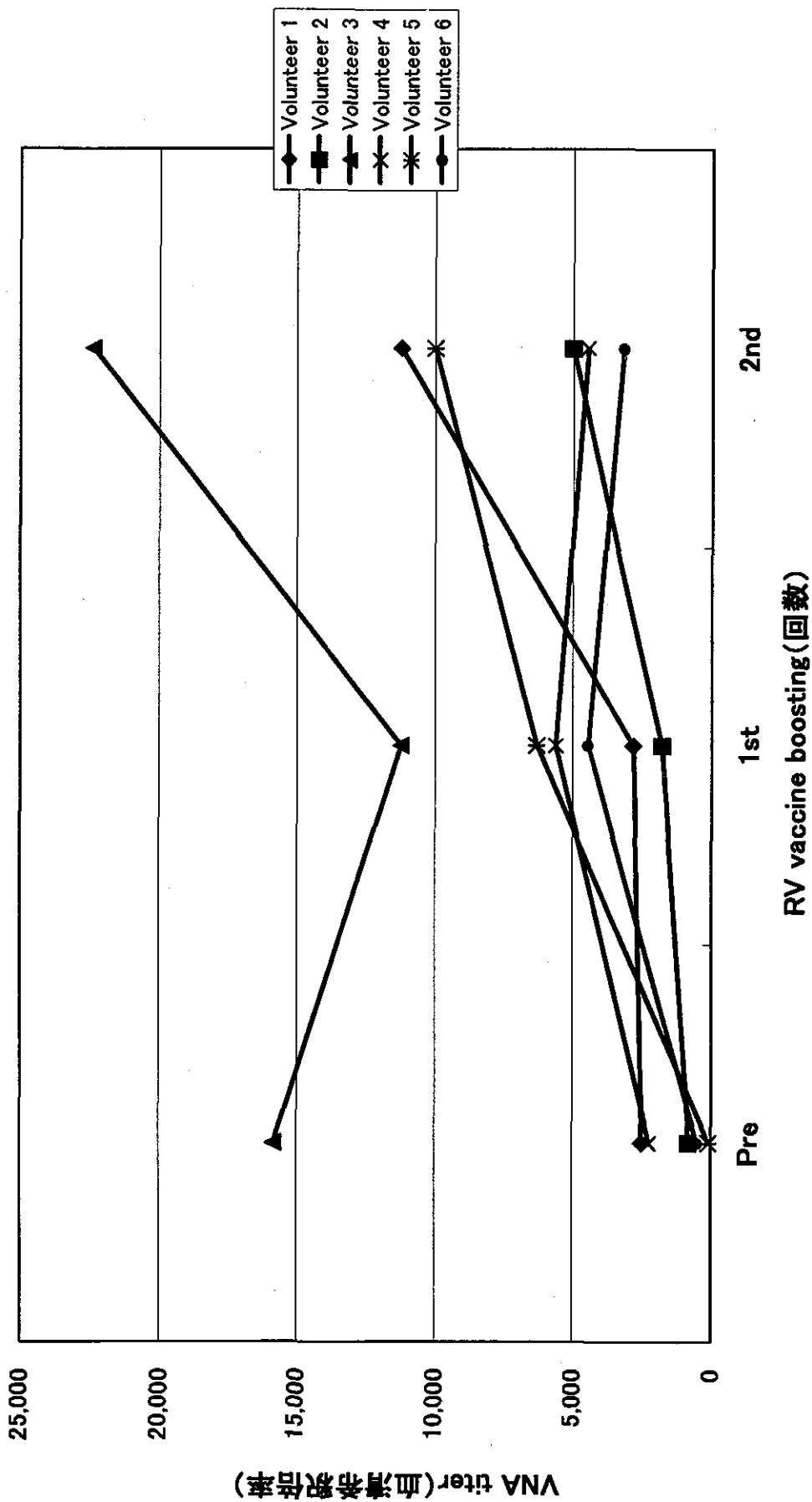
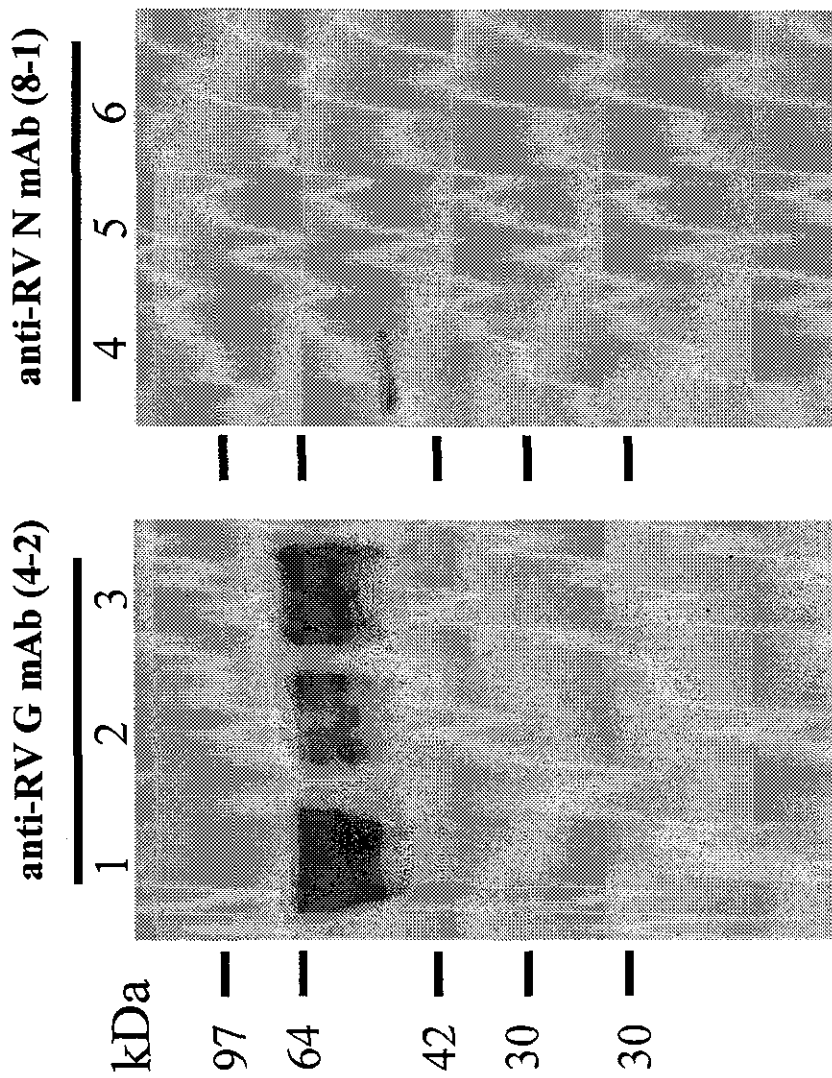




図3 免疫共沈反応によるヒトFabが認識する狂犬病ウイルス構成蛋白の解析



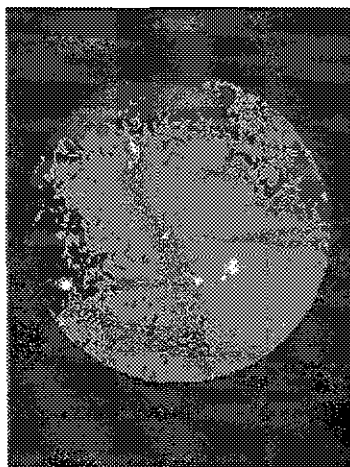
Lane 1 & 4: CVS only, lane 2 & 5: Fab GD2D12, lane 3 & 6: Fab EP5G3

図4 狂犬病ウイルス中和活性を有するヒトFabクローン (EP5G3GD2D12) の V<sub>H</sub> (A), V<sub>H</sub> (B) 領域のアミノ酸配列

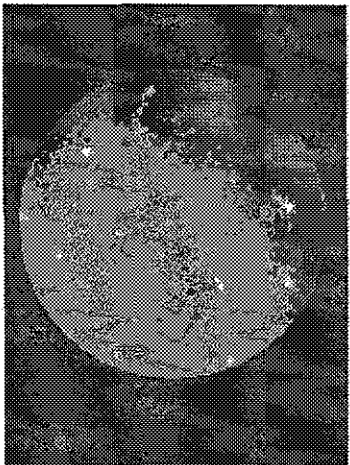
(A)								
	FR1	CDR1	FR2	CDR2				
EP5G3	--VMTQSPATLSLSPGERA TLSC	<u>RASQSVRN</u> YLA	WYQKPGQAPRLLIY	<u>GASN</u> RAI				
GD2D12	EL.....LS·PVTL·QP·SI··	<u>·S···LIHS</u> NGNTYLN	·F··R···S··R···	<u>KV·D·DS</u>				
	FR3	CDR3	FR4					
EP5G3	GI PARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYY	<u>CQQR</u> SDWPLS	FGQGTKLEIKR T					
GD2D12	·V·D···········K·RV·A·VG···	<u>·L·GTH·RT</u>	················					
(B)								
	FR1	CDR1	FR2	CDR2				
EP5G3	GPAWEVPETLPVQPLDSPSV	<u>AMACT</u>	GVRQAPGKLEWVA	<u>VISYDGS</u> NKYADSVK <u>G</u>				
GD2D12	VVQPGRSLR·SCAASGFTFS	<u>SY·MH</u>	W················	··················				
	FR3	CDR3	FR4					
EP5G3	RFTI SRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYC	<u>AKDSNS</u> GSY YAHDLG Y- - -	WGQGTLVTV-					
GD2D12	R····························	<u>·R·KALAA</u> R RGY Y Y YGTDV	················	················				

図5 ヒトFabによる代表的なウイルス増殖抑制のIFA像

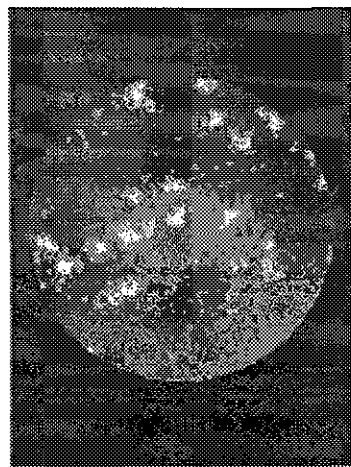
EP5G3 (1:2)



GD2D12 (1:2)



Virus only



RV-vaccinated serum (1:1024)

