

に血中から排除されるのは、細網内皮系の細胞に吸着するなどの理由によると思われる。JEV と異なり、DENV2 の特徴と考えられる。しかし、ddY 系統のマウスでは少なくとも 3 分までは比較的高いレベルのウイルス量が保たれ、短い時間ではあるが、この時間帯が中和抗体によるウイルスの排除を評価するために用いることができた。

ウイルス注入前の中和抗体価が高い群（グループ 2）では、中程度の群（グループ 1）より防御効果が高かった。また、個体差がある程度認められるが、平均血中ウイルス量で比較すると中和抗体価が中程度の群（グループ 1）と非免疫群（グループ 3）では有意差が認められるため、中程度の中和抗体は血中ウイルスの排除に働いていることが考えられる。

デングウイルスによる攻撃からの防御を評価できる動物は、現在のところサルのみである。そして、防御の指標として主に血中ウイルス量の低下が用いられてきた。しかし、前臨床段階のワクチン評価に用いる霊長類としては有用であるが、試作ワクチンの第 1 段階の試験に用いる動物モデルとしては適さない。

マウス尾静脈からの投与にはある程度の技術が必要であるが、この方法により比較的簡便にワクチンの防御効果を評価できる。本研究により、ウイルスの静脈内投与後のウイルス血症レベルの比較が、デングワクチンの防御効果を評価するためのモデルになりうることが示された。

E. 結論

マウスモデルを用いてデングワクチンの防御効力を評価する方法として、ウイルスを静脈内に投与した後にウイルス血症レベルを比較することは有用である。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Eiji Konishi, Mizue Shoda and Takashi Kondo: Analysis of yearly changes in levels of antibodies to Japanese encephalitis virus nonstructural 1

protein in racehorses in central Japan shows high levels of natural virus activity still exist. *Vaccine* 24, 516-524, 2005

Eiji Konishi, Saori Kosugi, and Jun-ichi Imoto: Dengue tetravalent DNA vaccine inducing neutralizing antibody and anamnestic responses to four serotypes in mice. *Vaccine*, in press

Tomohiro Ishikawa and Eiji Konishi: Mosquito Cells Infected with Japanese Encephalitis Virus Release Slowly-Sedimenting Hemagglutinin Particles in Association with Intracellular Formation of Smooth Membrane Structures. *Microbiol. Immunol.*, in press.

Eiji Konishi, Mizue Shoda, Seigo Yamamoto, Satoru Arai, Keiko Tanaka-Taya, and Nobuhiko Okabe: Natural infection with Japanese encephalitis virus among inhabitants of Japan: A nationwide survey of antibodies against nonstructural 1 protein. *Vaccine*, in press

小西英二: 日本脳炎。Clinical Neuroscience 7 巻、784-785 頁、2005

小西英二: 日本脳炎。Modern Physician 25 巻、591-594 頁、2005

小西英二: 日本脳炎。小児科診療 68 巻、2128-2132 頁、2005

小西英二: 日本脳炎の臨床と疫学。日本臨床 63 巻、2138-2142 頁、2005

小西英二: 日本脳炎ワクチンに関する最近の話題。防菌防黴、34 巻、2006、印刷中

小西英二: 日本脳炎ウイルスの不顕性感染。小児科 47 巻、2006、印刷中

小西英二: 日本脳炎ワクチン接種の問題。クリニカル プラクティス 25 巻、2006、印刷中

2. 学会発表

Eiji Konishi, Saori Kosugi and Jun-ichi Imoto: Development of a dengue tetravalent DNA vaccine and its evaluation in mice. Thirty-Ninth Joint Viral Diseases Panel Meeting US-Japan Collaborative Medical Sciences Program, Palo Alto 2005

石川知弘、Peter W. Mason、田島茂、根路銘令子、高崎智彦、倉根一郎、小西英二：最近の日本脳炎ウイルス分離株に見られる3'-非翻訳領域の欠失が誘導する培養細胞でのウイルス増殖抑制。第40回日本脳炎ウイルス生態学研究会（2005）。

井本淳一、小西英二：フラビウイルス DNA ワクチン及びタンパクワクチンの混合投与：デングウイルスと日本脳炎ウイルスのマウスにおける交差免疫原性。第40回日本脳炎ウイルス生態学研究会（2005）。

山中敦史、小西英二：抗体依存性感染増強及び／または中和活性を示すマウス抗デング2型ウイルスモノクローナル抗体の解析。第40回日本脳炎ウイルス生態学研究会（2005）。

小西英二：ウエストナイル熱。日本防菌防黴学会第32回年次大会（2005）。

石川知弘、高崎智彦、倉根一郎、小西英二：ウエストナイルウイルス感染症に対するDNAワクチンのマウスにおける評価。第9

回日本ワクチン学会学術集会（2005）。

松永貞一、小西英二：東京都葛飾区の一診療所の患者からみた同地域における日本脳炎ウイルス不顕性自然感染の可能性に関する考察。第9回日本ワクチン学会学術集会（2005）。

石川知弘、田島茂、根路銘令子、高崎智彦、倉根一郎、小西英二：最近の日本脳炎ウイルス分離株に見られる3'-非翻訳領域の欠失が引き起こす培養細胞におけるウイルス増殖抑制。第53回日本ウイルス学会学術集会（2005）。

井本淳一、小西英二：タンパクワクチンとの混合投与によるデング4価DNAワクチンのマウスにおける免疫原性の上昇。第53回日本ウイルス学会学術集会（2005）。

山中敦史、小杉紗織、小西英二：マウス抗デング2型及び4型ウイルスモノクローナル抗体における抗体依存性感染増強と中和活性の関係。第53回日本ウイルス学会学術集会（2005）。

奴久妻聡一、小杉紗織、小西英二：デングウイルスに対するモノクローナル抗体可変領域のアミノ酸配列の解析。第53回日本ウイルス学会学術集会（2005）。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 防御実験に用いたマウスの免疫原

グループ ^a	pcD1ME	pcD2ME	pcD3ME	pcD4ME	pcDNA3	JEVAX	EP
1	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg	-	1/10 dose	-
2	25 µg	25 µg	25 µg	25 µg	-	-	150 ng
3	-	-	-	-	73 µg ^b	-	-

^a 1群6匹の4週齢の雄ddYマウスに13週間隔で2回免疫した。

^b 非免疫群には、4価DNAワクチンに含まれると等しいモル数のCpGアジュバント配列が含まれるように、73 µgのpcDNA3ベクターを接種した。

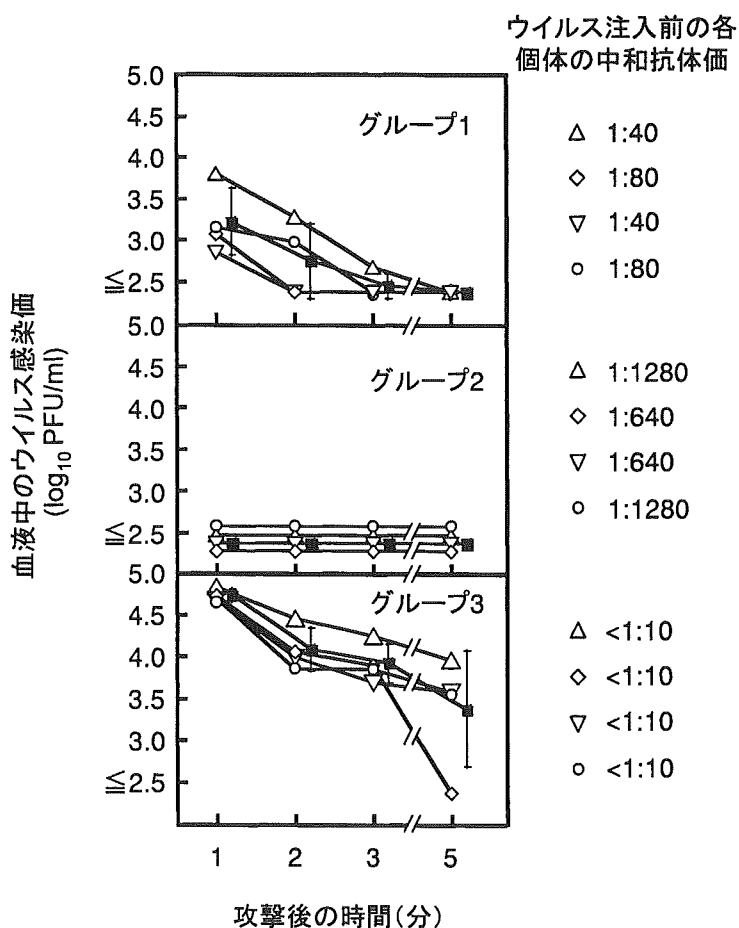


図1. ウイルス注入後のウイルス血症レベルの時間的推移。1群4匹のマウスに 3.5×10^6 PFU の DENV2 を尾静脈から投与した後、経時的に採血して血中ウイルス量を調べた。個体別にウイルス量の変化を示し、4匹の平均値を黒四角で示す（誤差棒はSD）。また、注入前の各個体の中和抗体価を、それぞれのパネルの右に示す。

厚生労働科学研究費補助金(国際医学協力研究事業)
分担研究報告書
ウイルス感染症の診断、疫学および予防に関する研究

ロタウイルス感染症の分子疫学

分担研究者 中込治 長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨:

ロタウイルスに感染しても胃腸炎の症状の程度はさまざまであるが、重症度の違いにロタウイルス株の違いが関係しているかどうかには議論が多い。本研究では分子疫学の立場からポリアクリルアミドゲル上での電気泳動パターンであるelectropherotypeを詳細に調べ、これによりロタウイルス株を定義した上で、ロタウイルス株と胃腸炎の重症度の解析を行った。

1986年1月から1996年12月まで10年間におけるロタウイルスの11流行シーズンに、秋田県の地方中核病院を急性胃腸炎の治療のために受診した小児の便検体からゲノム核酸を抽出し、電気泳動を行いそのelectropherotypeによりウイルス株を決定した。胃腸炎の重症度は、外来受診のみの中重度群と入院治療を要した重症群の2群に分類した。

ロタウイルス陽性の1906便検体中、763検体(外来275、入院488)のelectropherotypeを決定した。この期間中に同定できたelectropherotypeの種類すなわち、ロタウイルス株は77株であった。11の流行期中6流行期では単一の株が、また、残る5流行期では2株の株がdominant strainとして、外来および入院患者に共通に見られた。より検出頻度の少ない株も含めると外来および入院患者に共通に見られた株の割合は80~96%であり、地域の小児が一樣に同じようなロタウイルス株に暴露されているという前提が成り立つと思われた。そこで、各流行期に外来と入院の分布に差が認められるかどうか χ^2 乗検定を行ったところ、どの流行期にあっても有意な差は認められなかった。また、ロタウイルスのG血清型やRNAパターン(short or long)と下痢症の重症度との関係についてもmultiple logistic regression analysisにより解析したが有意な関係は認められなかった。

長期間にわたり多数の株について解析したが、どの流行期においても、ある特定の株が入院患者あるいは外来患者に有意に多く検出されるという傾向を見出すことはできなかったことから、小児の間で流行しているロタウイルスの株の間にはその病原性に大きな違いがないと思われた。

A. 研究目的

ロタウイルスは乳幼児の重症下痢症の原因としてもっとも重要な病原体である。その一方で、ロタウイルスに感染しても胃腸炎の症状の程度はさまざまであり、重症下痢症となって入院する確率は約50人に1人である。ところでこのような感染の結果生じる重症度の違いにロタウイルス株の違いが関係しているかどうかには議論が多い。本研究では分子疫学の立場からポリアクリルアミドゲル上での電気泳動パターンであるelectropherotypeを詳細に調べ、これによりロタウイルス株を定義した上で、ロタウイルス株と胃腸炎の重症度の解析を行った。

B. 研究方法

1986年1月から1996年12月まで10年間におけるロタウイルスの11流行シーズンに、秋田県の地方中核病院を急性胃腸炎の治療のために受診した小児の便検体を材料とした。ラテックス凝集反応によるロタウイルス抗原検出法によって陽性となった便検体からロタウイルスゲノム核酸を抽出した。これを10%のポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE)で分離、そのパターンであるelectropherotypeをもとに、ロタウイルス株を同定した。

胃腸炎の重症度は、外来受診のみの中重度群と入院治療を要した重症群の2群に分類した。

(倫理面への配慮)

個人に遡及できないように配慮したArchival specimensである。

C. 研究結果

ラテックス凝集反応によってロタウイルス抗

原陽性の1,906の便検体中、763検体(外来275、入院488)についてelectropherotypeを決定することができた。流行期中6流行期では単一の株が、また、残る5流行期では2株の株がdominant strainとして、外来および入院患者に共通に見られた。より検出頻度の少ない株も含めると外来および入院患者に共通に見られた株の割合は80~96%であり、地域の小児が一律に同じようなロタウイルス株に暴露されているという前提が成り立つと思われた。

そこで、各流行期に外来と入院の分布に差が認められるかどうか χ^2 乗検定を行ったところ、どの流行期にあっても有意な差は認められなかった(Table 1)。また、ロタウイルスのG血清型やRNAパターン(short or long)と下痢症の重症度との関係についてもmultiple logistic regression analysisにより解析したが有意な関係は認められなかった(Table 2)。

D. 考察

10年間にわたり多数の株について解析したが、どの流行期においても、ある特定の株が入院患者あるいは外来患者に有意に多く検出されるという傾向を見出すことはできなかった。このことから、小児の間で流行しているロタウイルスの株の間にはその病原性に大きな違いがないと思われた。

E. 結論

ロタウイルスに感染しても胃腸炎の症状の程度はさまざまであるが、これは感染するウイルス株の違いよりも宿主側の因子がより関連していると考えられる。

F. 健康危険情報

とくに該当するものはない。

TABLE 1 Distribution of rotavirus strains among inpatients and outpatients with acute diarrhea, according to the epidemic season of rotavirus, Honjo City, Akita, Japan, 1986-1997

Season	Inpatients	Outpatients	P-value
86-87	22 ^a LH1, 6 LH4, 8 LH3, 1 LH2, 1 LH5, 1 LH6	7 LH1, 6 LH4, 2 LH6, 1 LH9	0.23 ^b
87-88	21 LH9, 15 LH13, 3 LH10, 2 SH2, 1 LH11, 1 LH12, 1 LH7, 1 LH8, 1 SH1	18 LH13, 8 LH9, 4 LH8, 1 LHO1	0.08 ^c
88-89	16 LH14, 4 LH15, 2 LH13, 2 LH16, 1 LH8, 1 SH3, 1 SH4	20 LH14, 5 LH15, 5 SH3, 2 LHO4, 2 LH13, 1 LHO2, 1 LHO3	0.77 ^c
89-90	18 LH17, 6 SH5	13 LH17, 3 SH5, 2 LHO6, 1 LHO5, 1 LHO7, 1 LHO8	0.34 ^c
90-91	34 SH6, 1 LH18, 1 LH19, 1 LH20, 1 LH21, 1 LH22	19 SH6, 6 LH18, 2 LH20	0.09 ^c
91-92	14 LH22, 12 LH24, 5 LH28, 3 LH26, 2 LH18, 1 LH23, 1 LH25, 1 LH27, 1 SH7	10 LH24, 4 LH22, 2 LH28 2 SHO1, 1 LH18, 1 LH25, 1 LH26, 1 SHO2	0.31 ^c
92-93	34 LH31, 8 LH28, 5 LH29, 2 SH8, 1 LH30, 1 SH9	22 LH31, 7 LH28, 4 LH29, 3 SHO3, 2 SH9, 1 LH22, 1 LH24, 1 LHO9	0.20 ^c
93-94	42 LH32, 17 SH10, 8 LH35 5 LH34, 4 SH11, 1 LH33, 1 LH36, 1 LH37, 1 LH38, 1 SH12	9 LH32, 8 SH10, 5 SH11	0.33 ^c
94-95	72 LH37, 4 LH40, 2 LH39, 1 LH41, 1 LH42, 1 LH43, 1 LH44	30 LH37, 3 LH40, 1 LH42	1.00 ^b
95-96	20 LH45, 12 LH43, 5 LH46 3 LH50, 1 LH47, 1 LH48, 1 LH49	7 LH45, 5 LH43, 1 LH46 1 LHO10	0.68 ^b
96-97	16 LH51	10 LH51, 1 LHO11	0.41 ^b

^a The number of rotavirus-positive stool specimens that possessed a distinct electropherotype. In this case, electropherotype LH1.

^b by Fisher's exact test.

^c by Chi-square test.

TABLE 2 3 Association between G-serotype of rotaviruses and hospitalization in patients with acute diarrhea, Akita, Japan, 1986-1997

G-serotypes	Inpatients		Outpatients				OR ^b (95% CI)	OR ^c (95% CI)
	No.	(%)	(%) ^a	No.	(%)	(%) ^a		
G1	375	76.8	76.2	207	75.3	74.8	1.0	1.0
G2	71	14.6	14.9	47	17.1	18.3	0.83 (0.56-1.3)	0.77 (0.45-1.3)
G3	10	2.1	2.4	4	1.5	1.3	1.4 (0.46-5.1)	2.2 (0.68-8.2)
G4	26	5.3	5.5	10	3.6	3.6	1.4 (0.70-3.2)	2.0 (0.85-5.1)
NT	6	1.2	1.1	7	2.6	2.0	0.47 (0.15-1.4)	0.46 (0.14-1.5)
Long	417	85.5	85.1	227	82.5	81.4	1.0	
Short	71	14.6	14.9	48	17.5	18.6	0.81 (0.54-1.2)	0.71 (0.41-1.2)
Total	488	100	100	275	100	100		

^a Proportion standardized for rotavirus season.

^b Crude odds ratio of hospitalization (reference=G1 or long RNA pattern).

^c Odds ratio of hospitalization adjusted for rotavirus season.

CI, confidence interval; NT, not typed.

G. 研究発表(原著論文によるものに限る)

(1)国内 2件

論文発表 なし

学会発表

1. 内田隆一, 横尾美智代, アハメド・カムルデイン, 中込とよ子, 中込治: ネパールにおけるロタウイルス下痢症の分子疫学: 第53回日本ウイルス学会学術集会 11月, 横浜
2. 中込とよ子, 中込治: ロタウイルス株間の病原性の違いに関する分子疫学的解析: 第53回日本ウイルス学会学術集会, 11月, 横浜

(2)国外6件

論文発表

1. Nakagomi T, Nakagomi O, Takahashi Y, Enoki M, Suzuki T, Kilgore PE. Incidence and burden of rotavirus gastroenteritis in Japan as estimated from a prospective sentinel hospital study. *Journal of Infectious Diseases* 192: S106-S110, 2005.
2. Nakagomi T, Nakagomi O. Rotavirus antigenemia in children with encephalopathy accompanied by rotavirus gastroenteritis. *Archives of Virology* 150: 1927-1931, 2005
3. Ahmed K, Nakagomi T, Nakagomi O. Isolation and molecular characterization of a naturally-occurring NSP5 reassortant of group A rotavirus of serotype G2P[4] with a long RNA pattern. *Journal of Medical Virology* 77: 323-330, 2005
4. Teodoroff TA, Tsunemitsu H, Okamoto K, Katsuda K, Kohmoto M, Kawashima K, Nakagomi T, Nakagomi O. Predominance

of porcine rotavirus G9 in Japanese piglets with diarrhea: close relationship of their VP7 genes with those of recent human G9 strains. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 1377-1384, 2005

5. Hirakata Y, Arisawa K, Nishio O, Nakagomi O. Multiprefectural spread of gastroenteritis outbreaks attributable to a single genogroup II norovirus strain from a tourist restaurant in Nagasaki, Japan. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 1093-1098., 2005

学会発表

1. Nakagomi T, Nakagomi O, Nakajima H: The relationship of rotavirus strains circulating among children and adults as determined by their electropherotypes. The Thirteenth International Congress of Virology, San Francisco, USA, July, 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

厚生科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）

分担研究報告書

ウイルス性感染症の診断、疫学および予防に関する研究

ヒト Fab ライブラリーの構築と狂犬病ウイルス中和 モノクローナル Fab 抗体の選別

分担研究者 西園晃（大分大学医学部感染分子病態制御講座 教授）

研究要旨

狂犬病ウイルスの曝露後にはその咬傷の程度に応じて能動免疫（ワクチン）の投与と、より重篤な曝露の際には受動免疫（グロブリン）の同時投与が推奨されている。しかし抗狂犬病グロブリン製剤は全世界的にも全く品薄で、その供給には以前より限界が指摘されている。コンビナトリアル・ライブラリー法およびフェージディスプレイ法を組み合わせることにより狂犬病ワクチン接種後のヒトボランティア末梢血リンパ球から、ヒト抗体 Fab ライブラリーを構築し、狂犬病ウイルスを特異的に中和する能力のある Fab クローンを選択した。総計 132 クローンの中から 2 個の特異的 Fab クローン (EP5G3, GD2D12) が選別できた。これらはいずれも狂犬病ウイルスの G 蛋白を認識し、高いウイルス中和能力を示しており、本手法を用いることで、*in vitro* で中和活性を有するヒト型抗体を効率よく選別できることが明らかになった。

A. 研究目的

狂犬病は全ての哺乳類に感染しうる人畜共通感染症であり、ひとたび発症するとその致死率はほぼ 100% である。全世界における狂犬病による年間死者数はおよそ 40,000 から 70,000 と推測され (WHO)、その多くはアジア、アフリカといった発展途上国に集中している。WHO は高度（カテゴリー III）の狂犬病ウイルス (RV) 曝露後には直ちにワクチン接種と抗狂犬

病抗体製剤 (RIG) 投与を推奨しており、適切に行われれば有効な治療 (予防) とされているが、現在 RIG として使用されているウマ血清およびヒト抗免疫グロブリンは高価で安定的な供給に限界があり、副反応、未知のウイルス感染症など問題点が多く、世界的には十分な治療を受けられず死亡する人の数は相変わらず減少していない。

現在、コンビナトリアル・ライブラリ

一法およびファージディスプレイ法を組み合わせるによりヒト抗体ライブラリーから感染性疾患の治療に有効なヒト抗体を選別することが可能となり、既にいくつかの報告がなされている。今回高い狂犬病ウイルス中和抗体価を有するボランティアの末梢血リンパ球を用いてヒト Fab ライブラリーを構築し、その中から狂犬病ウイルス中和活性を有するヒト Fab を分離したので報告する。

B. 研究方法

1) ウイルス

狂犬病ウイルス西ヶ原株及び challenge virus standard (CVS)株は当教室にストックしているものを用いた。西ヶ原株はパニング、Glycoprotein (RV G 蛋白)の精製、ELISA 用抗原として用いた。CVS 株は中和活性の評価および免疫沈降反応の抗原として用いた。

2) RV G 蛋白精製

RV G 蛋白は RV 西ヶ原株から 2% octyl- β -(+)-glucopyranoside を用いて定法に則り精製した。

3) ボランティア 6 名の狂犬病不活化ワクチンを用いた追加免疫

大分大学医学部倫理委員会によって承認後、書面による十分な説明と同意のもとに、過去に狂犬病ワクチンの接種歴がある 6 名の健康成人に対して市販の狂犬病ウイルス不活化ワクチン(HEP Flury 株、

化血研)を用いて追加免疫を行った。添付書類に記載されている量を 2 週間おきに 2 回皮下に接種し、接種前、接種後 2 週間経過後に 6 名のボランティアの RV(西ヶ原株)に対する中和抗体価を rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT)によって測定した。

4) ヒト V_H/κ Fab ライブラリーの構築

それぞれのボランティアから 100ml の末梢血を採取後 Ficoll-Hypaque gradient を用いた遠心法にてリンパ球を分離し、リンパ球より得られた mRNA から cDNA を合成した。 κ 鎖可変領域(V_κ)および重鎖可変領域(V_H)の DNA 断片を、報告されている V_κ および V_H を全てカバーする primer set を用いて PCR 法にて増幅した。また、 κ 鎖定常領域(C_κ)および Fd region (C_{H1})の DNA 断片も同様に各種 primer set を用いてヒト Fab がクローニングされた vector pComb3XTT を鋳型として PCR 法にて増幅した。 V_κ と C_κ および V_H と C_{H1} の DNA 断片から overlap PCR 法にて κ 軽鎖および重鎖 DNA 産物を合成した。最終的に κ 軽鎖および重鎖 DNA 産物を overlap PCR 法にて full-length Fab PCR 産物とし、pComb3X phagemid vector 上にヒト Fab ライブラリーを構築した。full-length Fab PCR 産物を含む pComb3X にて *E.coli* XL1-Blue を電気穿孔法にてトランスフォーメーションした。

5) ファージライブラリーのパンニング

(生物学的濃縮)

全長 Fab PCR 産物を含む pComb3X にてトランスフォーメーションされた *E.coli* XL1-Blue の培養液に helper phage VCS M13 を感染させることにより phage ライブラリーに変換した。ELISA plate に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。この選択された 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

選択した 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')₂ 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')₂ 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 (#4-2: 岐阜大学源教授より分与)または anti-RV N-protein specific monoclonal antibody (#8-1: 岐阜大学源教授より分与)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_k 、 V_H 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)。このよう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 / κ)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_k , 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_k , C_H1) は pComb3XTT を template として PCR 法にて増幅した。 κ 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_k , 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 7.0×10^7 *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 に直接固層化した西ヶ原株 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 に直接固層化した精製 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')₂ 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_H に関してはどちらも V_HIII family 由来と推測されたが EP5G3 の V_K は V_KIII family、GD2D12 の V_K は V_KII 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* 49: 311-322.
- 2) Khawplod P, Shoji Y, Ubol S, Mitmoonpitak C, Wilde H, Nishizono A, Kurane I, Morimoto K. (2005) Genetic analysis of dog rabies viruses circulating in Bangkok. *Infect Genet Evol.* 2005 Jul
- 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. 学会発表

- 1) 安藤忠助, 山城哲, 西園晃. コンビナトリアル・ライブラリーを用いた抗狂犬病ウイルス中和ヒトモノクローナル Fab抗体の作成およびその評価 第42回日本ウイルス学会九州支部総会学 2005年7月 那覇
- 2) 山城哲, 安藤忠助, 西園晃. 抗狂犬病ウイルス中和ヒトモノクローナル Fab抗体の作製と完全型 IgG1抗体への変換 第53回日本ウイルス学会学術集会 2005年11月 横浜
- 3) Yamashiro T, Ando T, Nishizono A. Construction of human Fab libraries and isolation of a panel of monoclonal antibodies with rabies virus neutralizing ability. XIII International Congress of Virology. 2005 July San Francisco
- 4) Nishizono A, Yamashiro T. Isolation and synthesis of a panel of human monoclonal Fab antibodies with rabies virus neutralizing ability from human combinatorial Fab libraries. XXXIX United State-Japan Cooperative Medical Science Program. July 2005, Palo Alto, CA

3. 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)

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') ₂ [†]
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')₂ 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

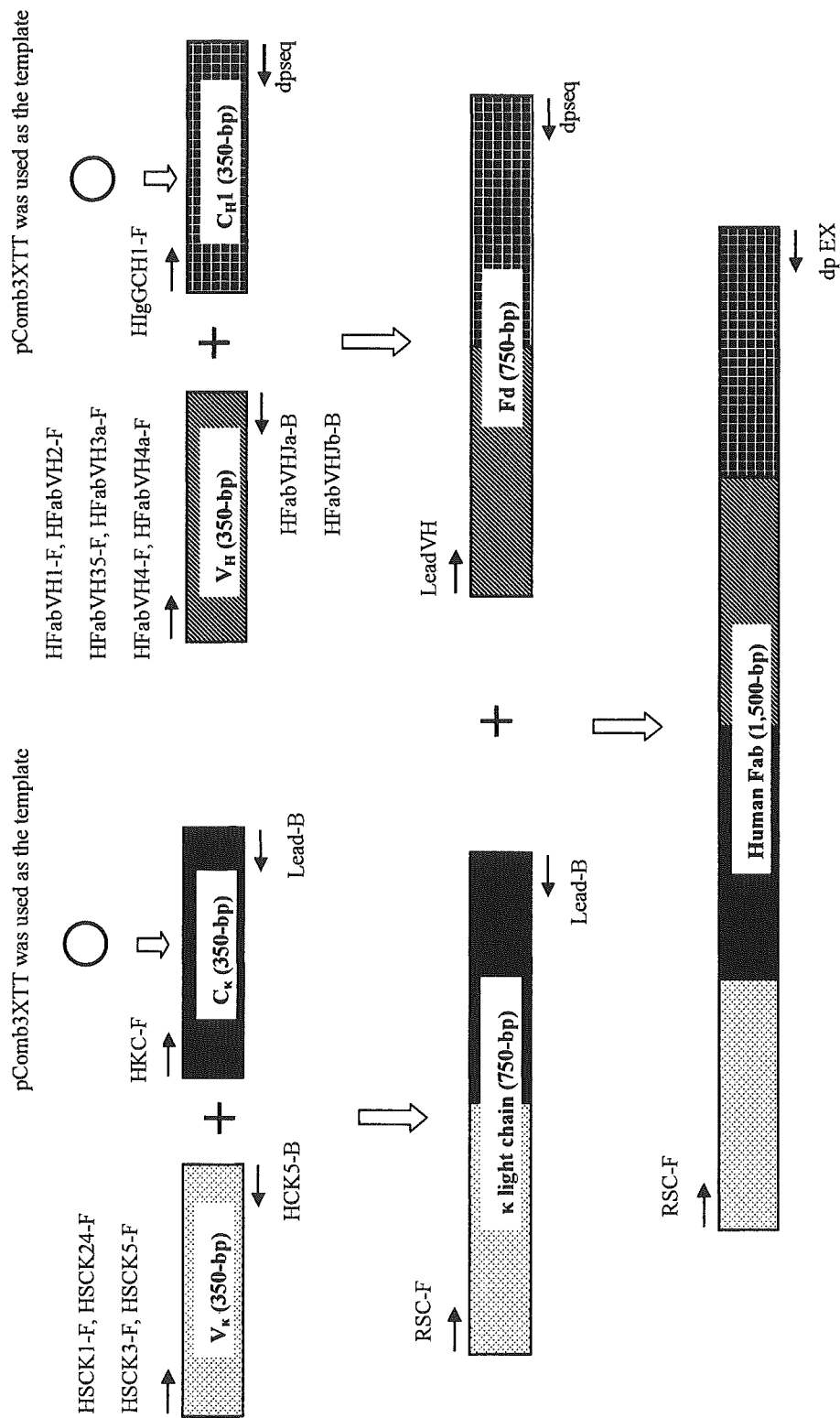


図2 ポランティア血清の狂犬病ウイルス中和抗体(VNA)価の上昇プロフィール
 (BHK-21細胞を用いたRapid fluorescent focus reduction assayによる)

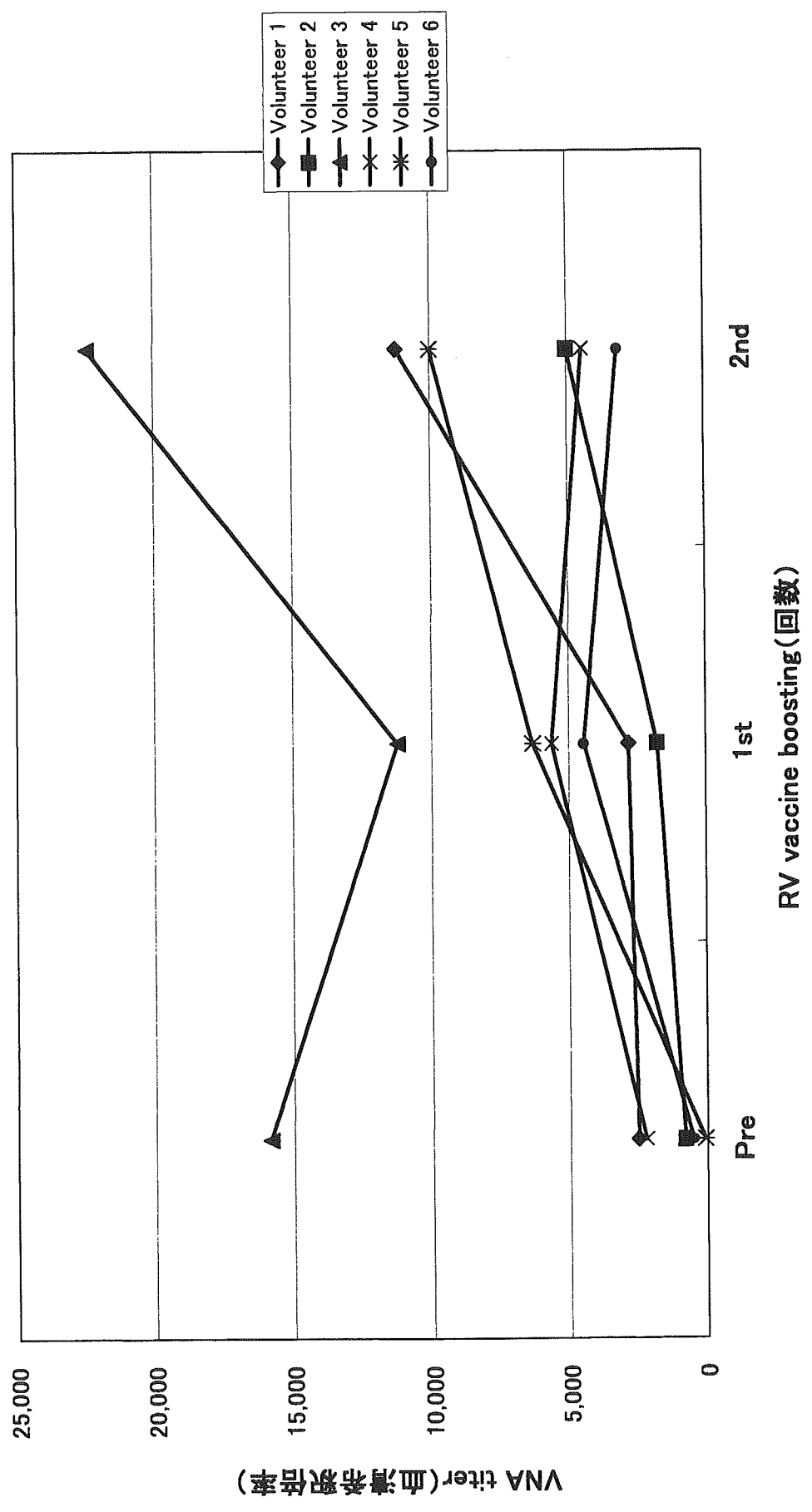
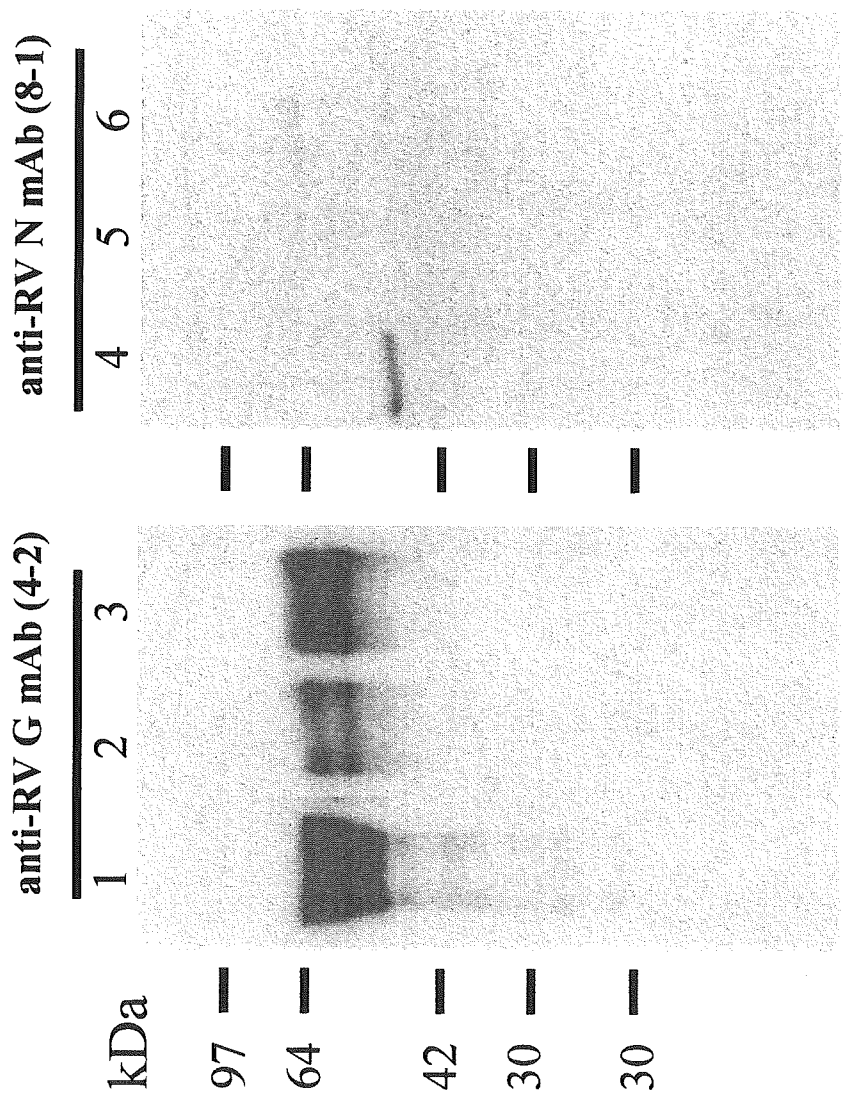


図3 免疫共沈反応によるヒトFabが認識する狂犬病ウイルス構成蛋白の解析



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・(A), VH (B)領域のアミノ酸配列

(A)							
	FR1	CDR1	FR2	CDR2			
EP5G3	--VMTQSPATLSLSPGERA TLSC	<u>RASQSVRNYLA</u>	WYQQKPGQAPRLIY	<u>GASN RAT</u>			
GD2D12	EL.....LS·PVTL·QP·SI··	<u>·S···LIHS NGNTYLN</u>	·F··R···S··R···	<u>KV·D ·DS</u>			
	FR3	CDR3	FR4				
EP5G3	GIPARFSGSG SGTDFLTISSLEPEDFAVYY	<u>CQQR SDWPLS</u>	FGQGTKLEIKRT				
GD2D12	·V·D·····K··RV·A·VG···	<u>·L·GTH··RI</u>	·····				
(B)							
	FR1	CDR1	FR2	CDR2			
EP5G3	GPAWEVPEITLPVQPLDSPSV	<u>AMACT</u>	GVRQAPGKGLEWVA	<u>VISYDGSNKYYADSVKKG</u>			
GD2D12	VVQPGRSLR·SCAASGFTFS	<u>SY·MH</u>	W·····	·····			
	FR3	CDR3	FR4				
EP5G3	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	<u>AKDSNS GSYAHDLGY----</u>	WGQGTLVTV-				
GD2D12	R·····	<u>·R·KALAAARGYYYYGTDV</u>	·····	·····			