

- 24) 橋本浩一、細矢光亮、石橋啓、金子久俊、
錫谷達夫 PGI₂ 合成酵素の遺伝子多型
と RSV 感染重症化との関連 第 54 回日
本ウイルス学会学術集会 名古屋
2006 年 11 月 19-21 日
- 25) 錫谷達夫 先天性サイトメガロウイル
ス感染による聴覚障害 平成 16 年度病
診連携懇談会 福島 2004 年
- 26) 錫谷達夫 移植後サイトメガロウイル
ス感染症の発症病理 第 10 回福島移植
フォーラム 福島 2004 年
- 27) 錫谷達夫 感染症予防対策 福島県国
保地域医療学会 福島 2004 年
- 28) 橋本浩一 乳幼児・小児のぜんそくと R
S ウイルス感染症—最近の知見を中心
— 個別予防接種及び個別乳幼児検診第
2 回受託講習会 郡山 2004 年
- 29) 橋本浩一 最近のウイルス性呼吸器疾
患の話題 郡山呼吸器疾患勉強会 郡山
2004 年
- 30) 錫谷達夫 ヘルペスウイルスのインタ
ーフェロン抵抗性 第 14 回抗ウイルス
化学療法研究会 名古屋 2004 年
- 31) 橋本浩一 R S ウイルス感染とアレル
ギー反応における新たな知見 第 41 回
日本小児アレルギー学会シンポジウム
東京 2004 年
- 32) 錫谷達夫 サイトメガロウイルス感染
症のはなし みちのくウイルス塾 仙台
2005 年
- 33) 錫谷達夫 単純ヘルペスウイルスの免
疫回避機能と潜伏感染 南大阪眼科勉強
会 大阪 2005 年
- 34) 橋本浩一 気管支喘息と R S ウイルス
第 13 回 BM アレルギー研究会 郡山市
2005 年
- 35) 橋本浩一 ウイルス感染と気管支喘息
—最近の知見 第 18 回日本アレルギー学
会春季臨床大会 東京 2005 年

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

図1. RSV感染は宿主細胞のSOCS1、SOCS3、
CIS遺伝子の発現を増加させる

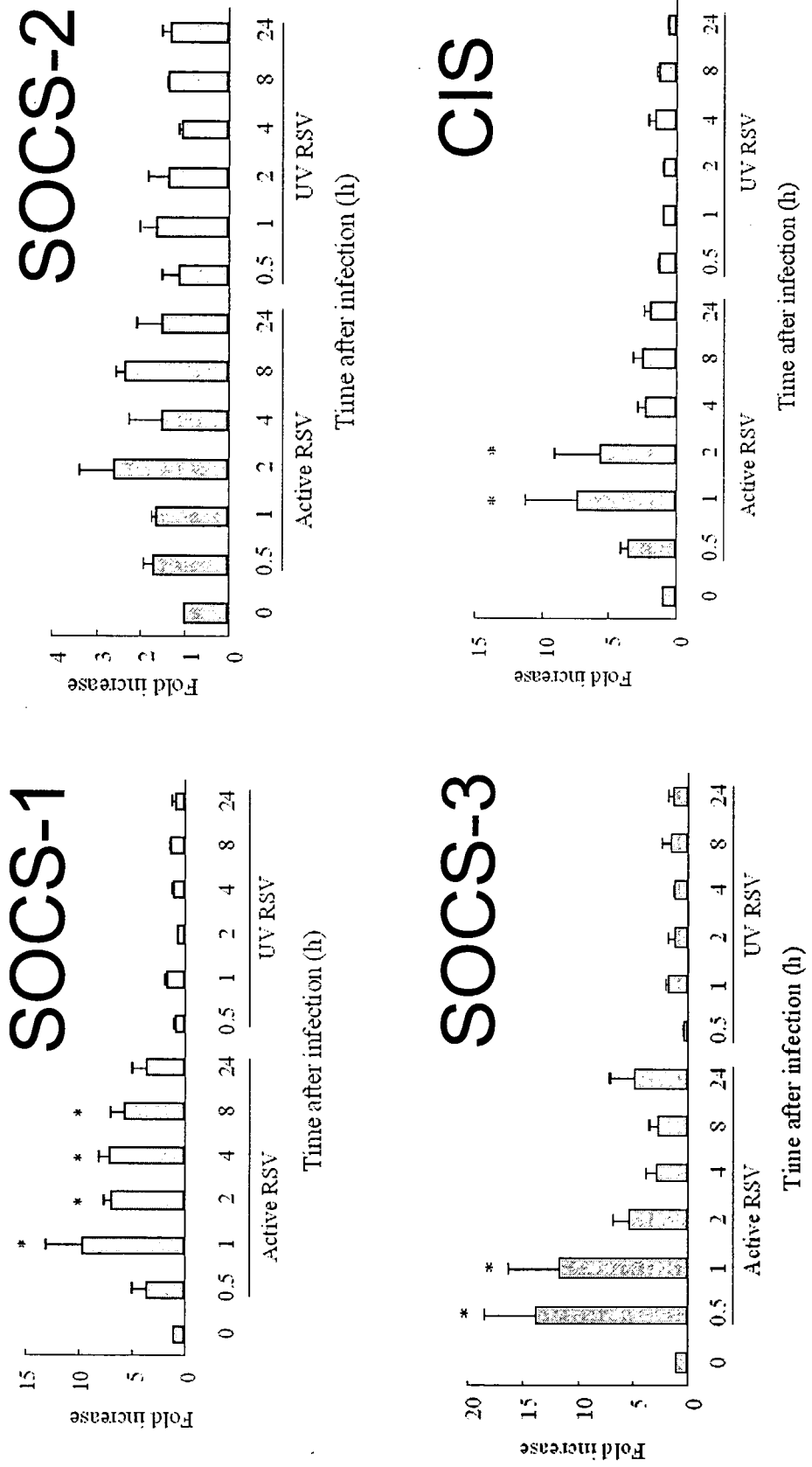


図2. PGI₂合成酵素の遺伝子型分布

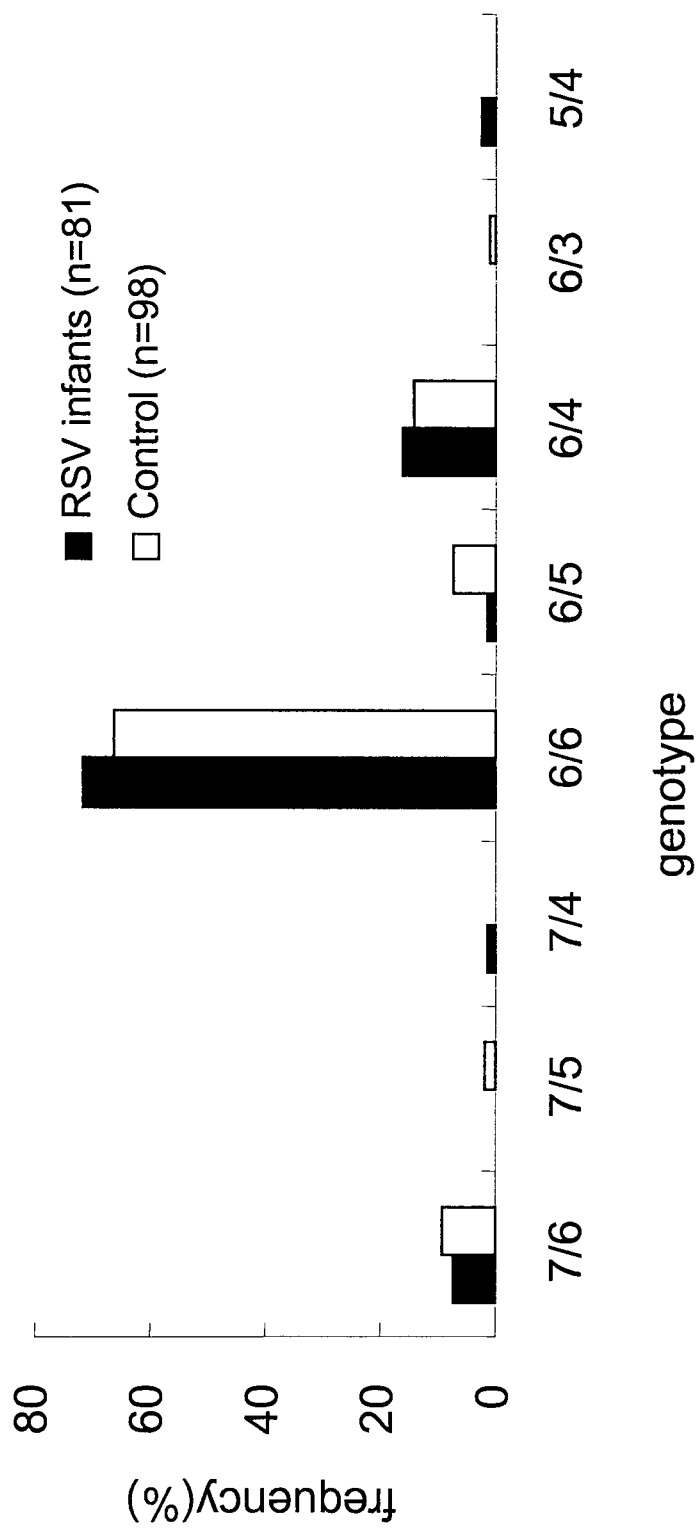
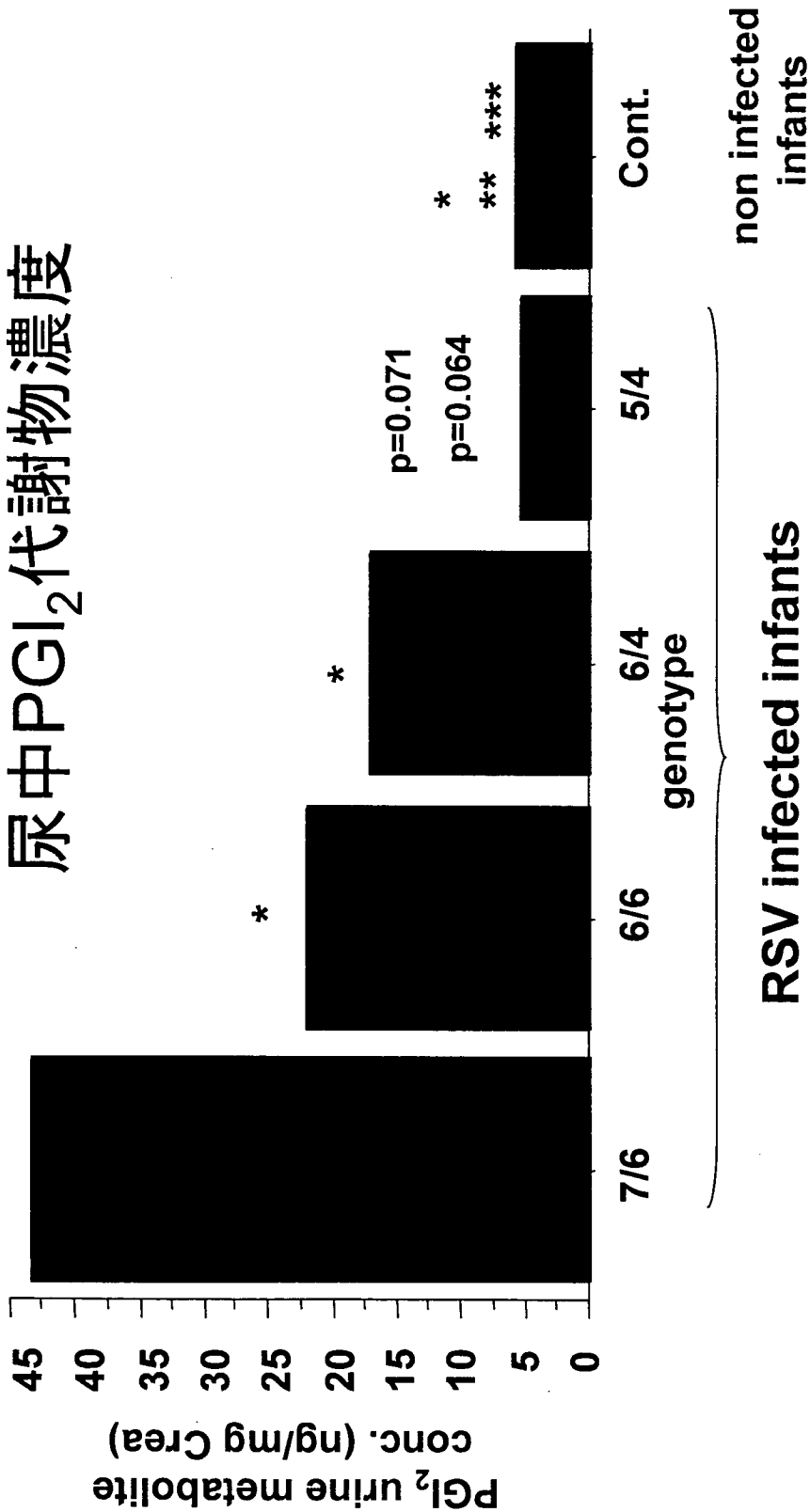
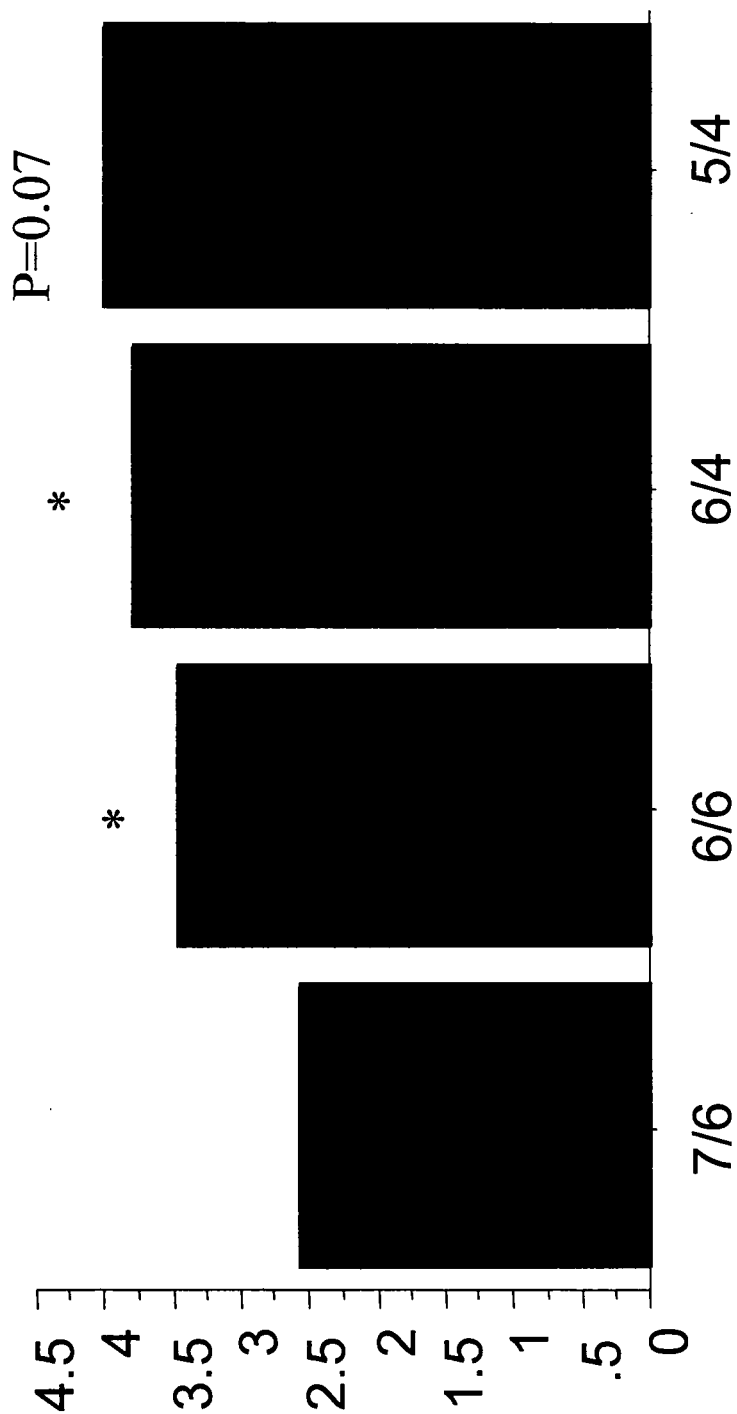


図3. RSV感染患児の入院時における
尿中PGI₂代謝物濃度



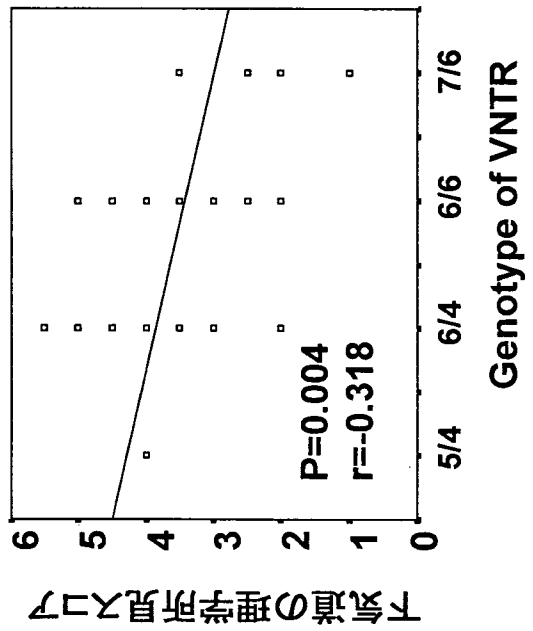
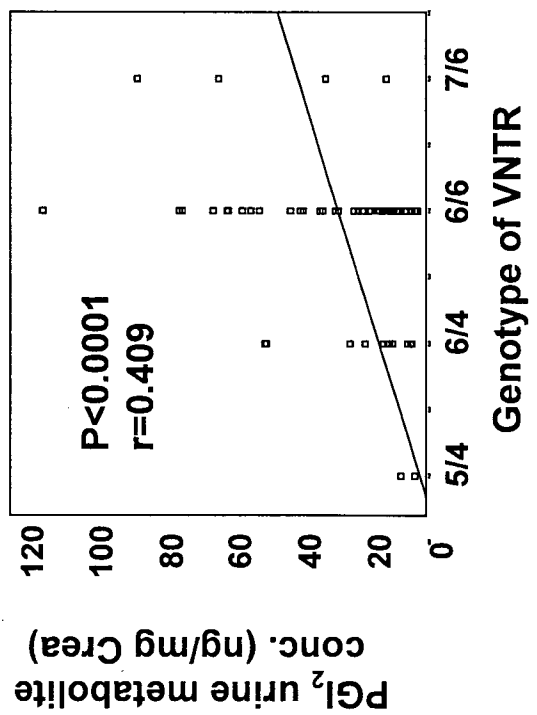
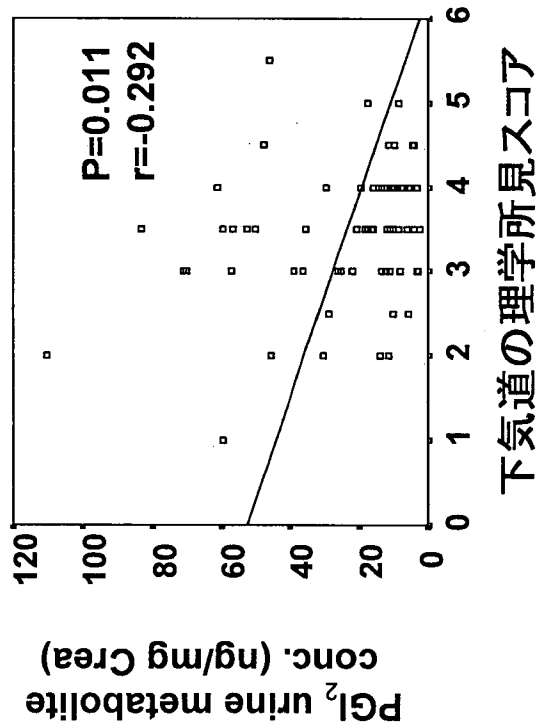
* , p<0.05 compared to the group of 7/6
 ** , p<0.01 compared to the group of 6/6
 *** , p=0.01 compared to the group of 6/4

図4. PGI₂合成酵素の遺伝子型と
下気道の理学所見スコアの関連



*: p<0.05, compared to the group of 7/6

図5. それぞれの因子との相関



狂犬病ウイルス中和モノクローナル抗体の樹立をめざした取り組み
ーヒト γ 1/ κ ライブラリーの構築からヒト型モノクローナル
Fab 抗体と完全型 IgG1 抗体の作成ー

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）

協力研究者：山城哲（長崎大学 国際戦略本部）

安藤忠助（大分大学 医学部 感染分子病態制御講座）

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、より高度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ァ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、2種類のヒト抗体 Fab ライブラリー (RV-1 と RV-2) 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。RV-1 ライブラリーの 1440 クローンから 1 個の特異的 Fab クローン (GD2D12)、RV-2 ライブラリーの 300 クローンの中から 2 個の特異的 Fab クローン (TC3G7, TC1A10) 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いた。さらに、これらのうち TC3G7 と TC1A10 の 2 つのクローンを完全 IgG 化し、その反応性を検討した。

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、ヒトの場合いったん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・ライブラリー法およびファージディスプレイ法を組み合わせること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。今回の研究では、高力価の狂犬病ウイルス中和抗体能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 を発現するための抗体遺伝子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、さらに完全型の IgG 抗体に変換することに成功した。

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、および HEP-Flury 株(attenuated strain)、街上毒 1088 株(street strain)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。HEP-Flury 株は中和活性の評価、1088 株は中和活性の評価とマウスを用いた *in vivo* での中和試験のために用いた。

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、化血研製)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-paque gradient を用いた比重遠心法にて単核球を分離し、単核球より得られた mRNA から oligo dT プライマーを用いて 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 germ line 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 があらかじめクローニングされているベクター 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 ファージミドライブラリー上にヒト 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。(RV-1 ライブラリー)

同様に最も高い中和抗体価の上昇が見られた1名(図1の volunteer 1: ▲)のリンパ球から、上記と同様の方法に則りベクターpComb3Hを用いてファージライブラリーを作成し、RV-2 ライブラリーとした。

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 の培養液にヘルパーファージ VCS M13 を感染させることによりファージ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 回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 にて誘導後、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 RFFIT 法にて行い、血清中和抗体価は RV 感染細胞によるフォーカス数を 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 virion 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 標品の抗原特異性

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 にて抗 RV G 特異的モノクローナル抗体または抗 RV N 特異的モノクローナル抗体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 領域の塩基配列を蛍光ジデオキシチェンターミネーターサイクルシーケンスキットを用いて自動 DNA シーケンサーで行った。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。

11) マウスを用いた *in vivo* での Fab 標品の中和活性の評価

街上毒 1088 株を Balb/c マウスの足底から 25µl 4LD50 接種し、4 時間後に 180µg/ml に調整した Fab TC3G7, TC1A10 を 50µl 同側の大腿筋肉内に投与し、その後の生死を観察した。

12) Fab 抗体の完全 IgG 化と精製

感染型の IgG を得る目的で、Fab TC3G7 と TC1A10 の V_K と C_K、および V_H と C_{H1} の DNA 断片を改めて別個にベクター pFabCMV に挿入し、G418 存在下で約 21 日間培養し、生存してきた細胞を選別し

た。培養上清中に得られた IgG を Protein G あるいは Protein A カラムで精製し、各種 RV 株感染マウス神経芽細胞腫 NA 細胞に感染させ、FITC 標識抗ヒト IgG (H+L) を 2 次抗体として反応させた。また 7) と同様の中和試験を行った。

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 1)。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。うち 1 名は boost 接種により非常に高い抗体価の誘導が認められた。(図 1 ▲)

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 を鋳型として 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(図 2)、pComb3X phagemid vector または pComb3H phagemid vector 上にヒト Fab ライブラリーを構築した。ライブラリーはそれぞれ 7.0×10^7 , 2.0×10^8 *E.coli* transformants のサイズであった。

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 RV 西ヶ原株 virion 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。RV-1 ライブラリーからは無作為に 1,440 クローン、RV-2 ライブラリーからは無作為に 300 クローンを選別し、抗原を用いたパンニングを行った。その結果、RV-1 ライブラリーからは 15 クローン、RV-2 ライブラリーからは 60 クローンが可溶性 Fab 産生クローンとして選別された。これらクローンの Fab 抗体を含む大腸菌抽出液に関して RV に対する ELISA 値が高値であったクローン 12 (RV-1 ライブラリーからは 4 クローン、RV-2 ライブ

ラリーからは 8 クローン)についてさらに詳細に解析を行った。

4) 選別した Fab 標品の RV 中和活性評価
選別された 12 クローンの Fab 抗体を含む大腸菌抽出液(Fab 標品)について、Fab 産生量の安定性と収量を検討し、さらに各種代表的 RV の株 (HEP-Flury, CVS, 1088) に対するウイルス中和活性の評価を行った。その結果、西ヶ原株 RV ビリオンまたは西ヶ原株精製 RV G 蛋白に対してパンニングを行った RV-1 ライブラリーから Fab 標品 GD2D12、ワクチン抗原を用いてパンニングを行った RV-2 ライブラリーから Fab 標品 TC3G7, TC1A10 が得られた。Fab 標品 GD2D12 は HEP-Flury 株に対しては全く中和活性を示さなかったが、CVS 株と 1088 株には FRNT50 値でそれぞれ $0.46 \mu\text{g/ml}$ と $8.6 \mu\text{g/ml}$ の中和活性を示した。また Fab 標品 TC3G7, TC1A10 については、HEP-Flur 株では $2.7 \mu\text{g/ml}$ と $100 \mu\text{g/ml}$ 以上、CVS 株に対しては $8.9 \mu\text{g/ml}$ と $100 \mu\text{g/ml}$ 以上、1088 株に対しては $11.4 \mu\text{g/ml}$ と $3.7 \mu\text{g/ml}$ であった。特に TC3G7 は検討した全てのウイルスの株に対して *in vitro* での中和活性を示した (表 1) (図 3)。

5) Fab 抗体のアミノ酸配列

RV-1 ライブラリーから樹立された 2 つの陽性 Fab クローン EP5G3 (data not shown) と GD2D12 についてそ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_κ は V_κIII family、GD2D12 の V_κ は V_κII family 由来と推測された。

6) 選別 Fab 標品の RV binding capacity と中和活性を示す Fab 標品の antigen specificity 免疫共沈法による検討では、RV 中和活性を示した Fab 標品 GD2D12, TC3G7, TC1A10 は抗 RV N 蛋白 monoclonal antibody には認識されず(図 5 A lane 4 と図 5 B lanes 11, 12)、抗 RV G 蛋白 monoclonal antibody によって認識される(図 5 A lane 2 と図 5 B lanes 7, 8) 67-kDa の蛋白と反応することより、これら 3 種類の Fab は RV G 蛋白を認識することが推測された。

7) マウスを用いた *in vivo* での Fab 標品の中和活性の評価 (図 6)

In vitro で中和活性を示した Fab のうち、大量培養による精製が可能であった TC3G7 と TC1A10 について、マウスを用いて RV 街上毒 1088 株の末梢 Challenge 感染後に Fab を投与し、その感染阻止効果を検討した。その結果 PBS を対照とした場合 11 日後には全てのマウスが死亡したが、Fab 抗体を投与した群では 20%

(2/10 TC1A10), 10% (1/10 TC3G7)とわずかながら生存率の向上が認められた。

8) Fab 抗体の完全 IgG 化と精製 (図 7、8, 9)

図 7 A に示す発現ベクター-pFabCMV に TC3G7 と TC1A10 クローンの V_κ と V_H をそれぞれ挿入し、CHO 細胞にトランスフェクトし G418 存在下で約 21 日間培養し、生存してきた細胞を選別した。G418 存在下で生存可能な細胞は抗ヒト IgG を用いた Immunofluorescence test で殆ど全ての細胞で IgG の発現が確認された(図 7 B)。得られた培養上清は non-reducing の状態では SDS-PAGE 解析で分子量約 150,000 に単一なバンドとして確認でき、2-mercaptoethanol 存在下では IgG の H 鎖、L 鎖に相当する 2 本土のバンドを確認した(図 8)。次に CVS, HEP-Flury, ERA, 1088 のそれぞれの RV を NA 細胞に感染させ、発現したウイルス蛋白に対する完全型ヒト IgG 抗体の反応性について抗ヒト IgG を用いた Immunofluorescence test で確認した。その結果 IgG TC3G7 は検討した全てのウイルスに反応していた。一方 IgG 1A10 はいずれにも反応が見られなかった。(図 9)

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。

ライブラリーのソースとなったボランティアの末梢血リンパ球は、複数（6名）由来の RV-1 と単一ボランティア由来の RV-2 から構築されたが、最終的には RV-2 ライブラリーからより効率的に中和活性クローンの選択が可能であった。この事実は、より抗体価の高い個体、つまり過免疫を充分に行う、または感染直後の時期のリンパ球を用いた方が、効率的な選別ができることを示唆している。

また *in vitro* で中和活性を示した Fab を用いて、マウスでの *in vivo* 感染阻止効果を検討したところ、十分な効果は認められなかった。これより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たため、中和活性を有する Fab の V_H と V_K 領域を哺乳細胞発現系に移管し、完全型のヒト IgG 分子として回収することにした。最終的には IgG 3G7 は広く RV 感染

細胞に反応することが確認でき、今後 *in vitro*, *in vivo* での感染抑制効果の確認を行う必要があると考えられた。一方 Fab の段階でウイルス中和活性の認められた Fab 1A10 は、完全型 IgG 分子に変換したことで RV 感染細胞への反応性が消失した。不完全な IgG 分子が形成されたためなのか、原因は不明である。

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 (10^9) 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能が高いクローンをさらに数多く選別し、検討を進める必要があるとともに、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。

さらに現在 Fab のクローニングから IgG への変換等の過程を経ずに、より直接的に迅速に中和活性を有するクローンを選択する目的で、EBV トランスフォーメーションを利用したヒト型抗体の作成にも着手し、よりアフィニティーの高い IgG, IgM 型抗体の作出に向けた試みも開始している。今後

このようにして得られた狂犬病ウイルスに対するモノクローナル抗体が、暴露後治療の有用な治療ツールになるように今後も研究を続けていきたい。

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、完全型の IgG に変換することができた。今後さらに複数のクローンを分離し、狂犬病暴露後治療に使用可能な抗体製剤のカクテルを作成していくことが最終的な目標となる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Men R, Yamashiro T, Goncalvez AP, Wernly C, Schofield DJ, Emerson SU, Purcell RH, Lai CJ. 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 (2004)

2) Ando T, Yamashiro T, Sonoda YT, Mannen K, Nishizono A. Construction of human Fab library and isolation of monoclonal Fabs with rabies virus neutralizing ability. *Microbiology and Immunology* 49: 311-322 (2005)

3) Pakamatz K, Inoue K, Shoji Y, Wilde H, Ubol S, Nishizono A, Kurane I, Morimoto K. 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 (2005)

4) Khawplod P, Shoji Y, Ubol S, Mitmoonpitak C, Wilde H, Nishizono A, Kurane I, Morimoto K. Genetic analysis of dog rabies viruses circulating in Bangkok. *Infect. Genet. Evol.* 6: 235-240 (2005)

5) Yamagata J, Ahmed K, Pakamatz K. Y. Mannen K, Xuyen D. K, Loi H. H, Dung N.V, A. Nishizono, Molecular epidemiology of rabies in Vietnam. *Microbiology and Immunology* (in submission)

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

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. Kyoto, December 2004,

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

5) 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 那覇 2005 年 7 月

6) 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 横浜 2005 年 11 月

7) 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, San Francisco, July 2005

8) 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, Palo Alto, CA, July 2005

H. 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)

図表説明

図1 リンパ球供血者の血清中狂犬病ウイルス中和抗体価の推移 (RFITT法)

6名の供血者の狂犬病ワクチン(化血研製)2回接種後の抗体価の推移。6名全員を用いてRV-1、最も高い抗体価が推移した1名(▲)からRV-2ライブラリーを得た。

図2 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3 CVS感染CER細胞に対するFab TC3G7とTC1A10の反応性

TC1A10は100 μ g/ml、TC3G7は12.5 μ g/mlであらかじめCVSと1時間インキュベーション後にCER細胞に感染させ、24時間後に抗Nモノクローナル抗体にてImmunofluorescent testを行った。

図4 狂犬病ウイルス中和活性を有するヒトFabクローン(EP5G3, GD2D12)のV κ (A), V λ (B)領域のアミノ酸配列

図5 確立された3種類のヒト型Fab分子が認識するRV抗原特異性

得られたFab 2D12, 3G7, 1A10をRVビリオン蛋白とインキュベート後、Protein G-Sepharoseに結合させた抗ヒトFab抗体で免疫沈降。その後沈降物をSDS-PAGEで分離後、抗RVGまたは抗RVNマウスモノクローナル抗体とウェスタンブロット反応させた。

いずれも抗RVGと特異的反応を示し、得られたFabはRVのG蛋白を認識していた。

図6 ヒト型Fab分子投与による狂犬病ウイルス街上毒1088株に対する防御効果(マウス生存率)

Balb/cマウスの足底から4LD50のRV1088株を末梢感染させ、その後同側の大腿筋にFab、ヒト抗血清、PBSを投与し、マウスの生存率を追跡した。

図7 Fabから完全型IgG分子への変換(A)完全型IgG変換のためのベクターの構築図

(B)CHO細胞で発現しているヒト型IgG3G7(FITC標識抗ヒトIgG(H+L))を2次抗体としたImmunofluorescent test

図8 完全型IgG抗体3G7の大量培養による精製

IgG3G7を発現するCHO細胞の大量培養から得られた上清を濃縮精製し、SDS-PAGEにて解析。

図9 完全型抗体IgG3G7と1A10の狂犬病ウイルス株間との反応性

完全型抗体に変換したIgG3G7と1A10のRV CVS, HEP-Flury, ERA, 1088株に対する反応性。FITC標識抗ヒトIgG(H+L)を2次抗体としたImmunofluorescent test。

表1

50% focus reduction neutralizing test (FRNT₅₀)
determined by RFFIT

Fab	Phage Library	HEP Flury	CVS	1088
GD2D12	RV-1	>100	0.46	8.6
TC3G7	RV-2	2.7	8.9	11.4
TC1A10	RV-2	>100	>100	3.7

µg/mL

図1 リンパ球供血者の血清中狂犬病ウイルス中和抗体価の推移(RFITT法)

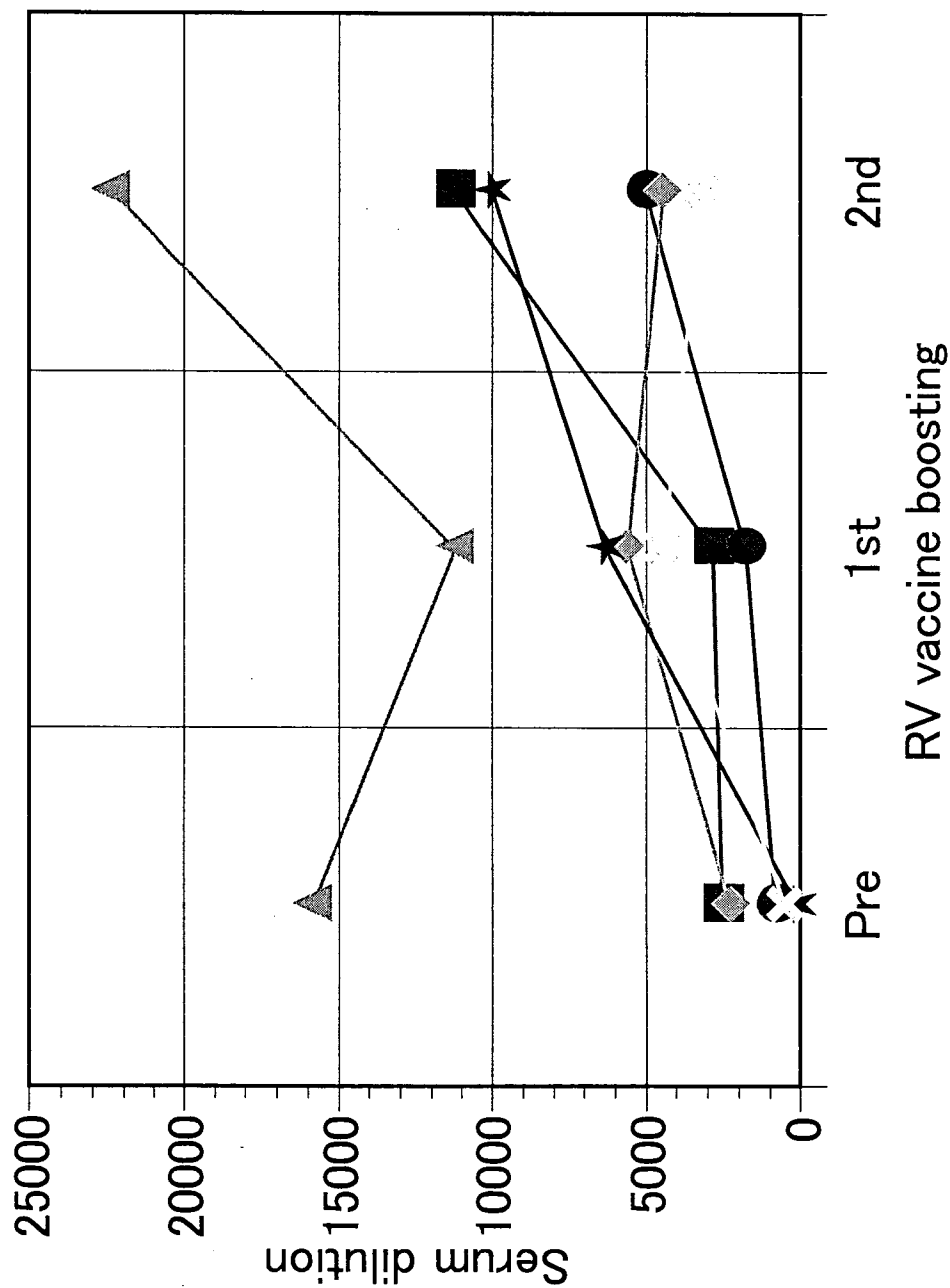


図2 ヒトFabコード領域のファージミドベクター-pCom3Xへの挿入と構築の概略

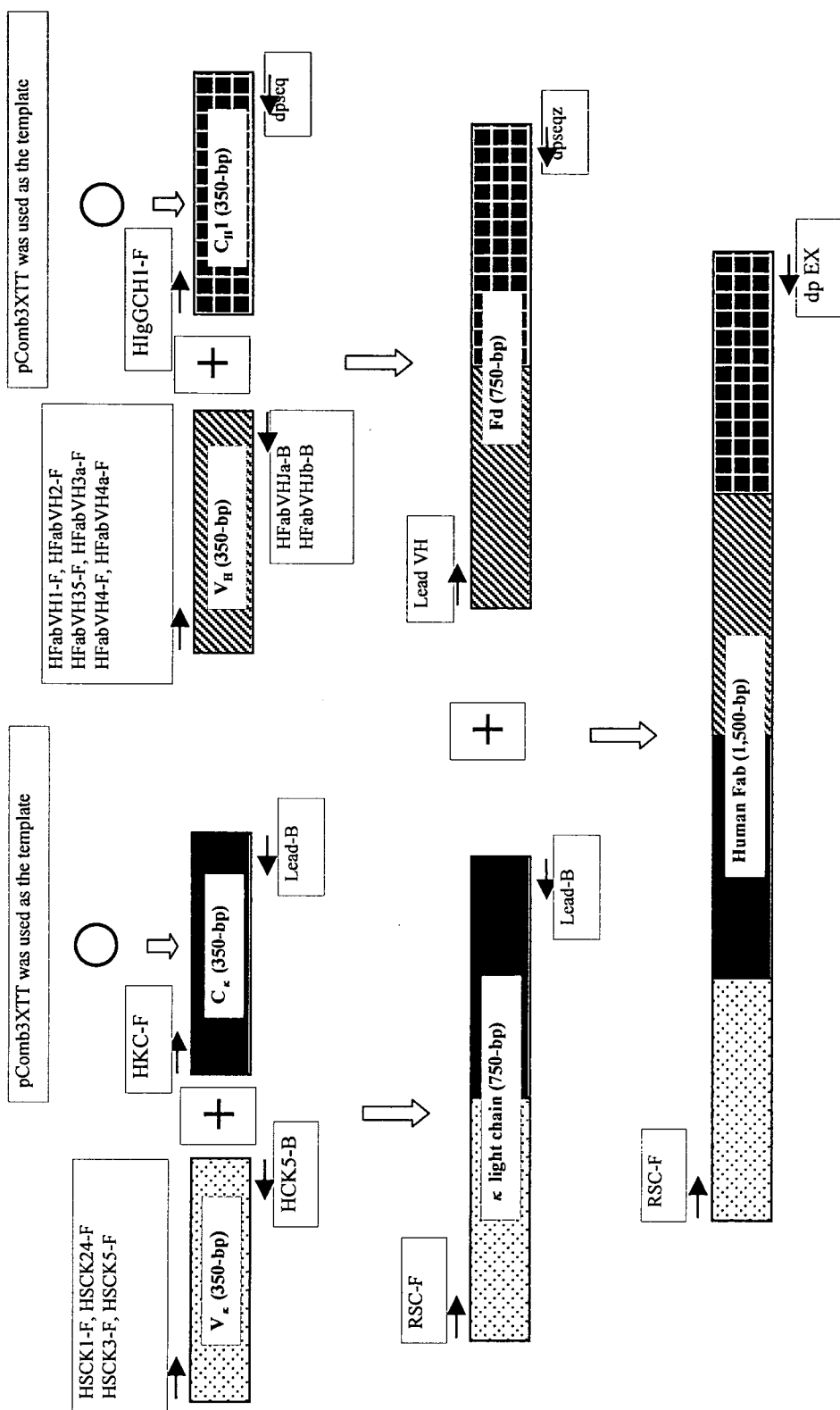


図3 RV中和活性を有するFabクローンのCVS感染CER細胞に対する抑制効果

