

厚生労働科学研究研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュトリーサイエンス総合研究事業

治療薬としてのヒト抗体製剤化に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 黒澤 良和

平成19（2007）年4月

目次

I. 総括研究報告

治療薬としてのヒト抗体調製に関する研究

黒澤良和----- 1

II. 分担研究報告

1. インフルエンザワクチン株を用いたヒトモノクローン抗体の性状解析

奥野良信----- 8

2. 抗 VZV 治療用ヒト抗体の臨床試験

白木公康----- 21

3. ヒトサイトメガロウイルス抗体を対象として

浅野喜造----- 25

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 27

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
総括研究報告書

治療薬としてのヒト抗体製剤化に関する研究

主任研究者 黒澤良和
藤田保健衛生大学総合医科学研究所・教授

研究要旨

本プロジェクトは、感染症を中心とした各種疾患に対して治療に役立つヒトモノクローン抗体開発を目的とする厚生労働科学研究補助金事業として実施されている。第 I 期（平成 9-11 年度）においてはファージディスプレイ系を用いたヒト抗体ライブラリーの作製、様々な抗原に対するスクリーニング法の確立を主たる目標とした。第 II 期（平成 12-14 年度）には、数名の共同研究者の参加を得て、VZV、インフルエンザウイルス、B 型肝炎ウイルス、ジフテリア毒素、破傷風毒素、ハブ毒に対する中和抗体単離を目標とした。B 型肝炎ウイルス以外については、それぞれ強い中和活性を有する抗体単離に成功した。第 III 期（平成 15-17 年度）には、特定の性質をした抗体を血清中に有するヒトがボランティアとして成分献血（リンパ球を多く含む単核球画分を集める）に協力する条件下で、巨大抗体ライブラリーを作製し、目的とする性質をした抗体をクローン化する技術導入に成功し、インフルエンザウイルス及びハブ毒中和抗体の研究に集中した。本年度は第 IV 期（平成 18-20 年度）の初年度に相当する。第 IV 期では、インフルエンザウイルス、VZV、サイトメガロウイルスを対象として、治療薬としてのヒトモノクローン抗体製剤化を具体的に目指し、それに伴い解決すべき問題点を明確化し、解決方法を見出すことを目標に掲げた。

インフルエンザウイルスが抗体により中和されるエピトープは、ヘマグルチニン(HA)分子上にある。中和抗体存在の影響下で HA 分子のアミノ酸配列は毎年少しずつ変化し、そのため抗原性も変化する (antigenic drift)。インフルエンザウイルスに対する抗体治療薬開発を目標とした場合は、この抗原性の変化が障害となっている。折角治療用抗体を開発しても、すぐに中和できないウイルス株が登場すると予想されるからである。一方に於いて、それではヒト体内にはインフルエンザウイルスに対するどのような性質をした中和抗体が何種類存在するかという根本

的な疑問について、モノクローン抗体レベルで解析した報告はない。そこで本研究では、H3N2 型ウィルスを対象としてヒト体内に存在する中和抗体レパートリーを徹底的に解析することにした。これは現在世界的に問題となっている高病原性の H5N1 型トリインフルエンザウィルスがヒトからヒトに感染できる新型ウィルスに変わって登場し、パンデミック型大流行を引き起こす可能性に対して、いかなる抗体を準備すべきかについてのモデルとなる。具体的には、H5 型ウィルスに共通に存在する (antigenic drift で変化できない) エピトープを見出す先例となり得る。

VZV に対しては、既に強力な中和活性を示す抗体を 2 種類単離することに成功している。VZV の場合 gH 及び gB 分子に中和エピトープが存在することが判明している。抗 gH 抗体は単独でウィルスを中和し、抗 gB 抗体は補体の存在下で中和力を示す。我々は gH を抗原とする中和抗体を単離しているが、本格的に製剤化に取り組むに際して、どのクローンを用いるべきか決定する必要がある。そこで弱い中和活性を示すクローンも含めて、L 鎖シャリングを行い、最も強い中和活性を示すクローンを得る。そのうち中和エピトープを解析し、異なる中和エピトープを認識する抗体を組合せて用いると synergistic な効果が得られるか解析することにした。サイトメガロウィルスは、治療用中和抗体開発が期待されており、我々が既に抗体ライブラリー作製を完了している B リンパ球提供者者の血清中には高い抗体価の中和活性が認められている対象である。そこで先ずウィルス中和抗体単離を目指すこととした。

分担研究者

奥野良信・大阪府立公衆衛生研究所・副所長

白木公康・富山大学医学部・教授

浅野喜造・藤田保健衛生大学医学部・教授

A. 研究目的

抗体は生体内でウィルスや病原菌に対する最も強力な生体防御分子として機能しており、それを薬剤として用いることは当然可能であると予想される。しかしながら、現在市販されている感染症に対する治療用抗体は、RSV(respiratory syncytial virus)

に対するもののみである。インフルエンザウィルスに対しては antigenic drift が起こることが治療用抗体開発にとって障壁となっている。そこで antigenic drift の影響を受けにくい中和エピトープに結合して中和する抗体の開発が望まれる。VZV の場合は、VZV を中和する抗体価の高い血清から調製された γ -グロブリン製剤が市販されている。このことは抗体投与に治療効果があることを示しており、中和活性を示すモノクローン抗体を治療薬として開発できる可能性が高い。その γ -グロブリン製剤は

販売中止が決定しており（安定して抗体価の高い抗血清を入手することが困難なため）、今後ヒトモノクローン抗体開発が期待されている。サイトメガロウイルス中和抗体は、既に開発を試みたグループが存在するが、製剤化に到達する前に断念したという経緯がある。

抗体製剤の開発を考える場合に、性質が異なる三つの課題がある。どのような目的で抗体を投与するかであるが、病気発症後治療薬として投与する場合と、流行している際や、免疫力が低下している状況下で予防薬として投与する場合がある。いずれの場合にしてもどのような性質を持つ抗体ならば効果を示すかを明らかにする必要がある。第二の課題は、我々が用いているファージ抗体技術は、英国 CAT 社（現在アストラゼネカ社が買収した）の有する WinterII 特許（抗体遺伝子をコードした mRNA を鋳型として RT-PCR で増幅する技術）と McCafferty 特許（ファージディスプレイ系により抗体ファージライブラリーを作る技術）に如何に対処するかについてである。第三の課題は、製剤化にとって欠かせない臨床試験を実施するために、巨額の資金が必要となるが、いかにして製薬企業の協力を得るかが問題となる。癌やアレルギー疾患の場合は多数の患者が存在し、開発費に多額の費用を要しても充分 pay できると予想されるのに対して、ここで対象とするウイルス性疾患の市場規模が充分大きいと判断できるかにかかっている。本厚生労働省研究では、主として第 I 課題を対象とすることとし、主任研究者のグループでは、第 II、第 III 課題について別途解決の道を模索している。

A 型インフルエンザウィルスの HA 分子は、16 種類のサブグループに分けられる。20 世紀には、H1、H2、H3 の 3 種類がヒトからヒトへ感染する新型ウィルスとして登場し、パンデミック型流行を引き起こした。その後それぞれ人類の中に定着し、毎年流行を繰り返した。現在流行しているのは、1968 年香港風邪としてパンデミックを起こした H3N2 型が最も有力な株である。そこで本研究では、H3 型ウィルスを中和できる抗体がヒト対内にはどの程度存在し、個々の抗体はどのような株特異性を示すか網羅的に解析することとした。その中から多くの株（1968 年から現在に至る）を広く中和できる抗体を選び出し、そのエピトープを解析した後、製剤化するのが研究戦略である。

VZV に対しては、既に 2 種類の強い中和活性を示すクローンと、それ以外に弱い中和活性を示す 6 種類のクローンの単離に成功している。そこで全てのクローンについて H 鎖を固定したまま L 鎖をシャッフルしてライブラリーを作り、最も強い中和活性をしたクローンを単離し直す。それぞれのクローンの中和エピトープを解析して、エピトープの異なる抗体を組み合わせれば synergistic な効果のある中和力が生まれるかをみる。その上で、製剤化を試みるという戦略をとることにした。

サイトメガロウィルスについては、中和活性を示す抗体を得ること自体が最初の目標である。

B. 研究方法

本研究プロジェクトでは、第 I 期に AIMS ライブラリーを作製した。AIMS ライブラリーは、数 10 名のボランティアに由来する臍

帯血、扁桃、末梢血、骨髓から mRNA を分離し、それを用いて作製した約 1000 億個の独立したクローンからなる巨大抗体ライブラリーである。第 II 期から第 III 期にかけてインフルエンザウィルスに対する抗体単離を試みたが、総数 5 種類の中和抗体が得られたのみである。単離した大多数のクローンは NP（ウィルス核タンパク）に対する抗体であった。AIMS ライブラリーからハブ毒中和抗体が全く得られないことから、長年にわたってハブ毒を精製し（ウマ抗血清調製に用いるため）、更に 5 回ハブに咬まれた経験のある人が成分献血（単核球画分のみを分離して、赤血球を全て体内に戻す採血法）を申し出た。その成分血から抗体ライブラリーを作製すると、そのライブラリーの中に目的とする抗体が必ず含まれていることが判明した。そこでこの研究戦略をインフルエンザウィルス中和抗体の研究に応用することにした。小児科医は多くの感染症患者に日々接している。換言すれば、heavily immunized の状態にある。そこで年齢の異なる 3 名の小児科医の協力を得て、それぞれの人より 3L の血液相当分の成分血を採取し、3 種類の巨大抗体ライブラリーを作製した。抗原としては 1968 年から 2004 年に至る H3N2 型ワクチン株を 12 種類準備し（阪大微研の協力による）、(3 種類のライブラリー)×(12 種類の抗原)=36 通りの組合せで大々的にスクリーニングを行った。得られたクローンについては、12 種類の抗原に対する結合性の有無、更にはウィルス中和力の有無を解析した。

VZV については、AIMS ライブラリーから既に中和力のある抗体 8 種類を単離している。そこで H 鎖としてはその 8 種類を用い

て、L 鎖は巨大遺伝子集団のままランダムに組み合わせて（シャッフリング）ライブラリーを作製し、VZV 感染細胞（細胞膜上に gH 分子を発現する）を抗原に ICOS 法（細胞膜上分子に対する抗体単離法として主任研究者のグループで独自に開発した新技術）で結合力の強い（ウィルス中和力が高いと期待できる）抗 gH 抗体を取り直すことにした。

上記抗体ライブラリーを作製した 3 名の小児科医の中で、その血清がとりわけ高いサイトメガロウィルス中和抗体価を示した医師から作製したライブラリーを用いて抗サイトメガロウィルス中和抗体を単離することにした。抗原としては DNA 組換え株を用いて調製した gB タンパク質および不活化したサイトメガロウィルス粒子を用いた。

C. 研究結果

H3N2 型インフルエンザウィルスに対する中和抗体レパートリー解析

3 種類の抗体ライブラリーのうち、抗 NP 抗体含有率の低かった Y ライブラリーをスクリーニングした結果を記す。12 種類の株を用いて合計 21 回のスクリーニングを行い、総数 5,088 クローンを単離した。その中で抗 HA 抗体と判断されたものは 1,550 種類存在した。H 鎖の塩基配列を決定したところ 291 種類に分類された。本研究では H 鎖が同じで L 鎖が異なるクローンは同一クローンとして取り扱った。291 種類全てのクローンについて、12 種類のウィルス株由来の HA 分子に対する結合力を ELISA で体系的に解析した。更に中和力も解析した（一部は実施中である）。様々な極めて価値ある情報が含まれており、現在論文を執筆中である。

H3N2 型インフルエンザ株全てを中和できる抗体単離

成分献血に協力した 3 名の医師の中で一番若い人は 1974 年に誕生している。そこで香港風邪が大流行した 1968 年には存在しなかった (1968 年の株で免疫されていない) ことになる。この医師の血液を用いて 1968 年株および 1970 年株を抗原にスクリーニングした結果、極めて興味深いクローンが 1 種類単離された。奥野報告に詳述されているが、その株は 1968 年株から 2004 年に至る 12 株全てに結合し、中和できる。

VZV の L 鎖シャッフルクローン

白木報告に詳しく記されているが、シャッフル前から強い中和力を示していた 2 クローンについては、L 鎖シャッフルライブラリーからも結局最初と同じ組合せのクローンが最も強い中和力を示した。弱い中和活性しか示さなかった 1 クローンについて、シャッフル後、中和力の高まったクローンの単離に成功した。

サイトメガロウィルス中和抗体単離

浅野報告にある通り、gB 抗原に強く結合する (Kd 値 0.1nM オーダー) 抗体が 10 種類ほど単離されている。BIAcore を用いたエピトープ解析により、3 つの異なる領域に結合するクローンに分類できることが判明した。Fab 型抗体ではウィルス中和活性を示さないために、現在 IgG 型抗体に変換して解析中である。

D. 考察

ファージ抗体ライブラリー作製技術は、

15 年ほど前に開発された。細胞融合によるモノクローン抗体作製技術は 30 年以上前に確立して、その有用性は広く知られている。しかしヒトの場合、様々な問題点が未だ克服されておらず、ファージ抗体ライブラリーの応用が新しい局面を切り開くと予想された。一方で、ファージ抗体ライブラリーの場合は、H 鎖と L 鎖をそれぞれ増幅したのちランダムに組合せるので、生体内で本来存在した抗体の H 鎖 L 鎖の組合せを必ずしも反映しないという問題点が当初より指摘されていた。更にライブラリーをスクリーニングするプロセスは、抗原とファージ抗体が結合するかどうかによって抗体を単離するものであり、体内で起こる免疫現象とは全く異質のものである。主任研究者らのグループでは、ヒト抗体ライブラリー作製を開始してからほぼ 10 年ほど経過し、ファージ抗体ライブラリー技術の長所と短所を詳細に理解するところとなった。

成分血を用いた抗体ライブラリー作製

通常の献血システムで末梢血 200ml を採取するとリンパ球総数は多くて 10^8 程度である。ヒト体内に存在するリンパ球総数が 10^{12} であると仮定すると 0.01% にすぎない。更に問題なのは、血液中を流れるリンパ球は、かなり片寄った性質をしている可能性がある。本プロジェクトで採用した成分採血では、一度体外に取り出した血液を遠心分離で単核球画分 (多くのリンパ球を含む) を取り出したのち、体内へ戻すために多くのリンパ球 (我々は 3L 血液相当分を採取) を扱える。更にこの採血には約 1 時間ほど要するが、その間、血管中にリンパ管の方からリンパ球がもれ出してくるので、結果

として体内全体の population を反映したリンパ球集団約 10^9 個程度を対象にすることが可能になる。更に主任研究者のグループではその細胞集団から H 鎖として 10^9 個、H と L を組み合わせて 10^{11} 個という莫大な数の独立したクローン数からなる抗体ライブラリー作製技術が確立している。そのため本プロジェクト実施が可能となった。今回 A 型 (H3N2 型) インフルエンザウィルスに対する中和抗体レパートリーを 3 名の小児科医の協力を得て徹底的に解析し、この方法の有効性が示されると同時に、極めて貴重な数多くの情報が得られた。

HL 鎖組合せに関して

抗体の抗原結合部位は、H 鎖と L 鎖が会合して作られる。抗原抗体複合体の立体構造に関する X 線結晶解析は、多くの場合、接触面は H 鎖が 60%、L 鎖が 40%程度を占めるという結果を与えている。そこで H 鎖と L 鎖の組合せは、抗原特異性決定の上で明らかに重要である。一方で抗体の多様性への貢献度という視点からは、H 鎖は独立して分化した B リンパ球では事実上全てその配列が異なるが、L 鎖は数百種類でほぼ全体をカバーする程度と全く異なる。そこで抗原特異性は、先ず大きく H 鎖で決定され、しかし L 鎖の貢献も重要ということになる。今回実施した L 鎖シャッフリングはこの考え方に基づく。更に対象抗原 (gH タンパク質) を膜上に発現した細胞を用いて ICOS 法によりクローン単離を行った。L 鎖シャッフリングにより、結合力の高まったものが、1 種類であるが単離できた。これは L 鎖シャッフリングという戦略の正しさを示すが、一方で得られたクローン数が少なすぎる気

もする。この点について ICOS 法の有効性が証明されているのは scFv 型抗体をファージ粒子に発現させた場合であり、今回は Fab 型抗体を用いている。今後更なる検討が必要と思われる。

抗体製剤化に向けて

第 4 期を迎えた本プロジェクトは、明らかに製剤化に踏み出す時期に到達している。製剤化した場合、明らかに治療に有効であると期待できる高い質の抗体も幾つか単離できている。研究目的の項目で記述した三つの課題全てをクリアして初めて製剤化が可能となるので、今後とも臨床試験実施の方策を模索する。

E. 結論

インフルエンザウィルス中和抗体

H3N2 型インフルエンザウィルスに対してヒト体内でどのような中和抗体レパートリーが形成されているか明らかにした。その中で 1968 年から現在に至る全ての H3 分子に対して結合し、ウィルスを中和する能力を持つ抗体が存在していた。

VZV 中和抗体

既に VZV 中和活性のあるモノクローン抗体について、H 鎖を固定して L 鎖シャッフリングを行い作製したライブラリーから、抗原結合力とウィルス中和力の高まった抗体を 1 種類単離することに成功した。

サイトメガロウィルス中和抗体

gB タンパク質に強く結合するヒトモノクローン抗体を 10 種類単離することに成功した。そのウィルス中和力を検討中である。

F. 健康危険情報
該当事項なし

G. 研究発表

I. 論文発表

1. M.Kakita, T.Takahashi, T.Komiya, Y.Iba, T.Tsuji, Y.Kurosawa & M.Takahashi: Isolation of a human monoclonal antibody with strong neutralizing activities against diphtheria toxin. *Infect Immun.* 74, 3682-3683 (2006)
2. K.Suzuki, Y.Akahori, Y.Asano, Y.Kurosawa & K.shiraki: Isolation of therapeutic human

monoclonal antibodies for Varicella-Zoster virus and the effects of light chains on the neutralizing activity. *J. Med. Virol.* (in press)

II. 学会発表

1. Y. Kurosawa. In vivo antibody repertoire against influenza viruses. The sixth JSPS Science Forum in Stockholm. Karolinska Institute, Stockholm, Sweden March 3, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当事項なし

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書

インフルエンザワクチン株を用いたヒトモノクローン抗体の性状解析

分担研究者： 奥野良信 大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者： 瀬瀬律子 大阪府立公衆衛生研究所
中川直子 神戸市環境保健研究所
岡田 潤 藤田保健衛生大学総合医科学研究所

研究要旨：A 香港型 (AH3) のインフルエンザワクチン株を抗原として得られたヒトモノクローン抗体の一部を Fab から完全型 IgG に変換し、中和活性の測定やエピトープ解析等で抗体の性状を調べた。1 種類の抗体 (F005-126) は 12 種類のワクチン株をすべて中和し、この研究システムでインフルエンザウイルスの抗原変異に対抗できる抗体がクローニングできることを示した。他の 3 種類の抗体は最近のワクチン株を効率よく中和し、エピトープ解析で HA のレセプター結合部位の近傍を認識するのを明らかにした。この研究成果は、将来のインフルエンザワクチンの改良、開発に有用な情報を提供するものと期待された。

A. 研究目的

昨年度の本研究事業により、A 香港型 (AH3) のインフルエンザワクチン株を抗原とし、ファージディスプレイ法により、多数のヒトモノクローン抗体を得た。本年度はこれら抗体の一部を完全型 IgG に変換し、これらの性状をウイルス学的に解析した。

B. 研究方法

1. ウイルス

抗体のクローニングと、クローニングされた抗体の性状を解析するため、AH3 の過去から現在に至る以下の 12 種類のワクチン株を用いた。

- ① A/Aichi/2/68 (H3N2)
 - ② A/Fukuoka/1/70 (H3N2)
 - ③ A/Tokyo/6/73 (H3N2)
 - ④ A/Yamanashi/2/77 (H3N2)
 - ⑤ A/Niigata/102/81 (H3N2)
 - ⑥ A/Fukuoka/C29/85 (H3N2)
 - ⑦ A/Guizhou/54/89 (H3N2)
 - ⑧ A/Kitakyushu/159/93 (H3N2)
 - ⑨ A/Sydney/5/97 (H3N2)
 - ⑩ A/Panama/2007/99 (H3N2)
 - ⑪ A/Wyoming/3/2003 (H3N2)
 - ⑫ A/New York/55/2004 (H3N2)
- コントロールとして現行の H1N1 ワクチン株、A/New Caledonia/20/99 (H1N1) も使用した。

2. ワクチン株に対するヒトモノクローン抗体の単離

3名の小児科医、A（1944生）、Y（1964生）、N（1974生）より成分採血でリンパ球を採取し、それぞれの抗体ライブラリーを作製した。12種類のH3N2ワクチン株を抗原とし、各ライブラリーよりファージディスプレイ法でインフルエンザウイルスに対するヒトモノクローン抗体を得た。

これら Fab 抗体を大腸菌で大量培養し、Fab-cp3 の形状で濃縮したものを原液として生物活性を解析した。一部の抗体については完全型 IgG に変換し、中和活性等を測定した。

3. 中和試験

フォーカス減少を指標としたマイクロ中和抗体価測定法（Okuno, Y., et al. J. Clin. Microbiol. 28:1308-1313, 1990）により実施した。

階段希釈したヒト型抗体（Fab あるいは IgG）とワクチン株のウイルスを 1:1 で混合し、37℃で 1 時間反応させて中和した。この反応液を MDCK 細胞に感染させ、中和から逃れた残存ウイルスで形成されるフォーカスを PAP 法で染色し、フォーカス減少率を求めた。

4. 赤血球凝集阻止（HI）試験

HI 試験はマイクロプレートを用いた通常の方法で行った。

5. 中和抵抗性変異株の作製

ヒト型抗体（IgG）と各ワクチン株を 1:1 の容量で混合し、37℃で 1 時間反応させた。この中和反応液を MDCK 細胞に感染させ、37℃で 72 時間インキュベートした。増殖してきたウイルスを採取し、各ワクチン株に対する反応性を中和試験等で調べた。各抗

体の中和活性に強く抵抗するウイルスを選択し、中和抵抗性変異株を得た。

C. 研究結果

1. クローニングされたヒト抗体（表 1）

今年度はワクチン株を抗原として得られたヒト抗体（Fab）、合計 169 個の抗体の中和活性と HI 活性を解析した。12 種類の抗原に対してヒト抗体が作製されたが、多くのクローンが得られた 7 種類の抗原に対するヒト抗体について調べた。中和活性、HI 活性とも有する抗体が 107 個と全体の 63% と主流を占め、HI 活性を有しないが中和活性を示したのが 16 個存在した。両活性ともに有しないのが 32 個存在したが、Fab の活性を測定しているの、IgG に変換すると活性が上昇し、中和活性を示すものが出てくる可能性は十分にあると考える。

2. ヒト抗体、クローン F005-126 の中和活性

A/Aichi/2/68 (H3N2) を抗原として N ライブラリーから得られた F005-126 は興味ある抗体で、A/Aichi/2/68 だけでなく、調べたすべての H3N2 ワクチン株に対して反応した。そこで、12 種類のワクチン株に対する F005-126 (IgG) の中和活性を中和カイネティクスで調べた（図 1）。

F005-126 の中和活性は、程度の差はあれすべてのワクチン株を中和した。A/Aichi/2/68 に近い年代のワクチン株だけでなく、最近のワクチン株の A/Wyoming/3/2003 や A/New York/55/2004 を効率よく中和した。

次いで F005-126 の IgG と Fab-pp の中和カイネティクスを比較した（図 2）。50% フォーカス減少を指標にすると、IgG は

Fab-pp よりも 1,000 倍以上の中和活性を示した。

3. F005-126 の HA における認識部位

A/Aichi/2/68 または A/Wyoming/3/2003 を F005-126 存在下で増殖させ、中和抵抗性変異株を作製した。得られた中和抵抗性変異株は A/Aichi/2/68 あるいは A/Wyoming/3/2003 に対して弱い中和抵抗性しか示さなかった (図 3)。親株と中和抵抗性変異株の HA 遺伝子を比較し、133 番目または 285 番目のアミノ酸が置換していた。

各ワクチン株の HA のアミノ酸配列を比較し、中和活性との相関を検討した (図 4)。285 番目のアミノ酸はすべて N であったが、133 番目は 4 種類が N 以外のアミノ酸であった。F005-126 は、これら 4 種類のワクチン株に対する中和活性は弱かった。中和抵抗性変異株と同じアミノ酸置換を示した A/Kitakyushu/159/93 に対する F005-126 の中和活性は、特に弱かった。

これら置換部位の HA 構造上の位置は、133 番目がレセプター結合部位に近い抗原サイト A であったが、285 番目は HA 頭部の下部に位置し、133 番目とは離れていた。

4. 3 種類のヒト抗体、クローン F002-005、F004-104、F004-136 の中和活性

A/Wyoming/3/2003 を抗原としてクローニングされた 3 種類の抗体を IgG に変換し、中和カインेटクスを調べた (図 5、図 6)。F002-005 は A/Wyoming/3/2003、A/Panama/2007/99、A/Sydney/5/97、A/Kitakyushu/159/93 の 4 種類のワクチン株を中和したが、ホモの A/Wyoming/3/2003 に対して最も強い中和活性を示した (図 5)。F004-104 も 4 種類

のワクチン株を中和した。これら 4 種類のワクチン株に対する中和活性に大きな違いは認められなかった (図 5)。F004-136 は A/Wyoming/3/2003、A/Panama/2007/99、A/Sydney/5/97 の 3 種類のワクチン株をほぼ同程度に中和した (図 6)。

次いで 3 種類の抗体の IgG と Fab-pp の中和カインेटクスを比較した (図 7)。いずれの抗体も、IgG と Fab-pp の中和活性には極めて大きな違いが認められた。特に F004-136 は、50% フォーカス減少を指標にすると、IgG は Fab-pp よりも 10,000 倍以上の中和活性を示した。

5. F002-005、F004-104、F004-136 の HA における認識部位

A/Wyoming/3/2003 をそれぞれの抗体存在下で増殖させ、中和抵抗性変異株を作製した。得られた中和抵抗性変異株の HA 遺伝子をシークエンスし、アミノ酸配列を親株と比較した。

F002-005 に対する中和抵抗性変異株、9 種類はすべて A/Wyoming/3/2003 に対し HI 活性を消失し、中和活性も示さなかった (図 8)。アミノ酸置換は、唯一 159 番目に起こっていた。

F004-104 に対する中和抵抗性変異株、8 種類はすべて A/Wyoming/3/2003 に対し HI 活性を消失し、中和活性も示さなかった (図 9)。アミノ酸置換は、159 番目と 190 番目の 2 ケ所に起こっていた。

F004-136 に対する中和抵抗性変異株、3 種類はすべて A/Wyoming/3/2003 に対し HI 活性を消失し、中和活性も示さなかった (図 10)。アミノ酸置換は、唯一 145 番目に起こっていた。

6. F002-005 と F004-104 が認識するアミ

ノ酸置換部位の解析

F002-005 と F004-104 によってアミノ酸置換が生じた 159 番目と 190 番目のアミノ酸を解析するため、12 種類のワクチン株の HA のアミノ酸配列を比較した (図 11)。F002-005 と F004-104 が中和活性を示した 4 種類のワクチン株 (A/Wyoming/3/2003、A/Panama/2007/99、A/Sydney/5/97、A/Kitakyushu/159/93) の 159 番目と 190 番目は同じアミノ酸 (Y と D) であったが、中和されなかった他のワクチン株のアミノ酸は中和抵抗性変異株と同様に別のアミノ酸であった。

7. F004-136 が認識するアミノ酸置換部位の解析

F004-136 によってアミノ酸置換が生じた 145 番目のアミノ酸を解析するため、12 種類のワクチン株の HA のアミノ酸配列を比較した (図 12)。F004-136 が中和活性を示した 3 種類のワクチン株 (A/Wyoming/3/2003、A/Panama/2007/99、A/Sydney/5/97) の 145 番目のアミノ酸は同じアミノ酸 (K) であったが、中和されなかった他のワクチン株のアミノ酸は中和抵抗性変異株と同様に別のアミノ酸であった。

8. F002-005、F004-104、F004-136 の HA 立体構造上の認識部位

3 種類の抗体が認識すると考えられるアミノ酸置換部位を、HA の立体構造上にプロットしてみた (図 13)。

159 番目と 190 番目は、HA のレセプター結合部位近傍の抗原サイト B であり、145 番目は、ループといわれる抗原サイト A であった。

D. 考察

今年度は成分採血により作製された抗体ライブラリーよりクローニングされた多数のヒト抗体の性状を解析し、一部の抗体については Fab から完全型 IgG に変換した。次いで IgG の中和活性、認識部位について解析した。

抗体クローン、F005-126 は H3N2 の 12 種類のワクチン株をすべて中和するという興味ある抗体であった。クローニングに用いた最も古い年代のワクチン株である A/Aichi/2/68 だけでなく、最近のワクチン株である A/Wyoming/3/2003 や A/New York/55/2004 を効率よく中和したのは、この抗体が H3N2 に共通に保存されている中和エピトープを認識していると考えられた。そこで中和抵抗性変異株を作製し、抗体の認識部位を解析した。しかし、変異株は抗体によって十分には中和されなかった。2 ヶ所のアミノ酸置換部位が同定されたが、置換が中和の抵抗に強く影響を与えるものではなかった。

最近のワクチン株を特異的に中和する 3 種類の抗体 (F002-005、F004-104、F004-136) を IgG に変換し解析した。これら抗体は最近のワクチン株に対し強い中和活性を示したが、それ以外のワクチン株を全く中和しなかった。完全に中和に抵抗する変異株が得られ、アミノ酸シーケンスにより抗体の認識部位が同定された。認識部位は HA 構造上のサイト A と B に存在し、これら部位が中和抗体を誘導するのに強い免疫原性を有すると示唆された。

ELISA 等の反応性から推測すると、クローニングされた多くの抗体は先に述べた 3 種類の抗体と同様に、サイト A あるいは B

を認識していると考えられた。マウスのモノクローン抗体による研究では、サイト A から E までの 5 ケ所が知られている。ヒト抗体がレセプター結合部位に近いサイト A と B を集中して認識しているのは、ヒトの免疫系がこれら部位だけに對し特異的に反應するのか、あるいは抗体のスクリーニング法がバイアスをかけているのか興味ある点である。

今年度の研究で 2 つの成果が得られた。一つは、今回のシステムにより多くのインフルエンザウイルスを幅広く中和する抗体をクローニングできることが示されたことで、将来はこれら抗体が、予防、治療に使用されることが期待される。もう一つは、ヒト抗体のエピトープ解析により、ヒトの免疫系は HA の特定のエピトープを優位に認識して中和抗体を誘導する可能性が示されたことである。これは、有効性の高いインフルエンザワクチンを改良、開発するのに有用な情報を提供するものと考えられる。

E. 結論

HA に対するヒト抗体の性状を中和カインेटィクスとエピトープ解析で調べ、多数のワクチン株を中和する抗体が存在することを明らかにした。抗体が認識する部位は、HA のレセプター結合部位の近傍に集中していた。

F. 研究発表

1. Nakagawa, N., Suzuoki, J., Kubota, R. (Koketsu, R.), Kobatake, S., Okuno, Y. Discovery of the neutralizing epitope common to influenza B virus Victoria group isolates in Japan. J. Clin. Microbiol. 44:1564-1566. 2006.
2. Kamada, M., Nagai, T., Kumagai, T., Igarashi, M., Ihara, T., Okafuji, T., Ochiai, H., Sakiyama, H., Shimomura, K., Suzuki, E., Torigoe, S., Miyazaki, C., Miyata, A., Yuri, K., Ito, Y., Nakayama, T., Kase, T., Okuno, Y. Efficacy of inactivated trivalent influenza vaccine in alleviating the febrile illness of culture-confirmed influenza in children in the 2000-2001 influenza season. Vaccine 24:3618-3623. 2006.
3. Ito, M., Watanabe, M., Nakagawa, N., Ihara, T., Okuno, Y. Rapid detection and typing of influenza A and B by loop-mediated isothermal amplification: Comparison with immunochromatography and virus isolation. J. Virol. Methods 135:272-275. 2006.
4. 奥野良信：2006-2007 インフルエンザ対策；ワクチンの効果と副反応。総合臨床、55(12)：2794-2799、2006
5. 奥野良信：鳥インフルエンザから新型インフルエンザへ。Sysmex Journal、29：17-25、2006
6. 奥野良信：インフルエンザ（高病原性鳥インフルエンザを除く）（分担執筆）。新感染症学・下、p311-314、日本臨床 65 巻、2007

なし。

G. 知的財産権の出願、登録状況

表1. 生物活性を測定したFab-cp3のクローン数

	HI + NT +	HI - NT +	HI + NT -	HI - NT -	Total
Aichi/2/68	9	1	0	3	13
Fukuoka/C29/85	3	4	0	4	11
Kitakyusyu/159/93	4	2	0	0	6
Sydney/5/97	35	2	9	1	47
Panama/2007/99	38	5	1	2	46
Wyoming/3/2003	17	2	3	10	32
New York/55/2004	1	0	1	12	14
Total	107	16	14	32	169

図1. F005-126 完全型IgGのH3N2 ワクチン株に対する中和活性

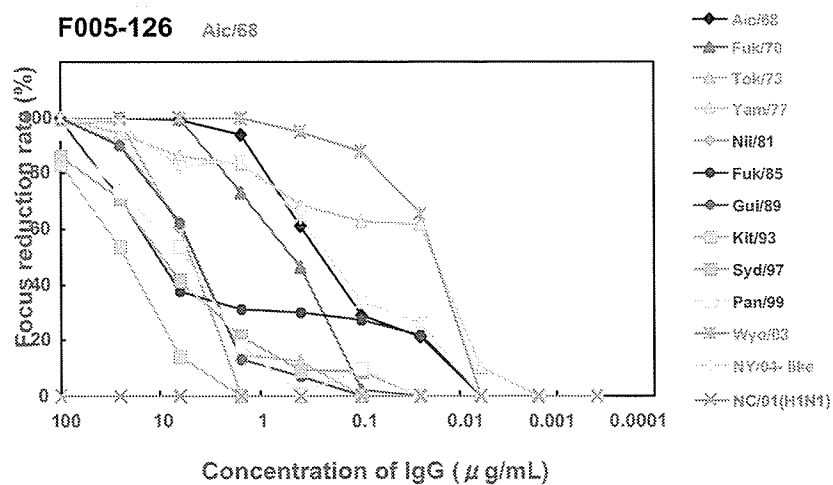


図2. F005-126 完全型IgGと Fab-ppの
A/Aichi/2/68(H3N2) 株 に対する中和活性の比較

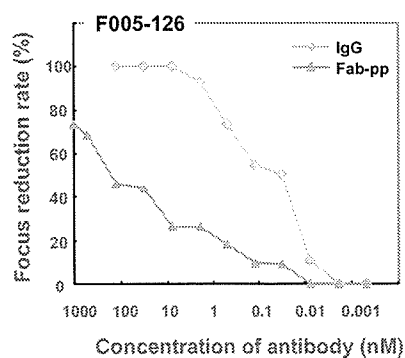


図3. F005-126完全型IgGに対する中和抵抗性変異株

Escape mutants	Focus reduction rate (%) with Fab-cp3(1:2)	amino acid substitution of HA1 region
Aic/68	88.1	*
VA1-1	0	N285Y
Wyo/03	39.6	*
VA2-1	0	N133D
VA2-2	0	nd
VA2-3	0	nd
VA2-4	30.7	*
VA2-5	0	nd
VA2-6	0	N133D

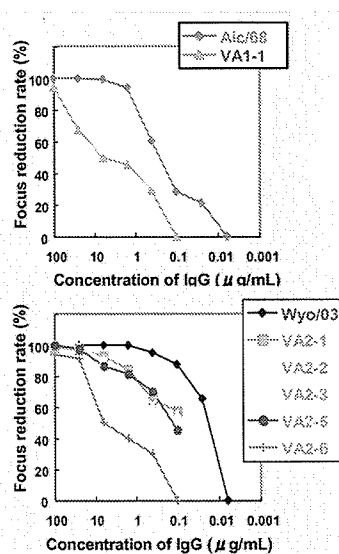


図4. F005-126に対する中和抵抗性変異株のアミノ酸置換部位と
H3N2 ワクチン株のアミノ酸配列

	A	B	C
NY/55/2004	FNNESFNWTGVTONGTSSCKRRSNNSFFSRNLNWLTHLKPKYPALNV		PIGKCNSECITPNSGISIPNDKPPQNVNRITYGACPRY
Wyo/3/2003	A.....K.....Y.....	Y.....	
Pan/2007/99	A.....Y.....KQ.....F	KQ.....F	
Syd/5/97	A.....YA.....S.YV.....	KQ.....F	
Kit/159/93	I.....D.....A.....G.YA.....G.V.....	NKSEY.....	T.SF.....
Gui/54/89	I.....D.....A.....S.G.YA.....G.F.....	A.SHH.....	T.S.....
Fuk/C29/85	I.....D.....A.....S.G.YA.....G.V.....	H.SEX.....	T.S.....
Mem/1/81	I.....D.....A.....S.G.YA.....G.....	Y.SE.....	T.S.....
Tex/1/77	I.....G.....I.....G.YA.....GP.G.....	YKSE.T.V.....	T.S.....
PCh/1/73	I.....G.T.....I.....G.NA.....GP.SG.....	YKSG.A.V.....	T.I.....
Bil/93/70	I.....G.T.....I.....G.NA.....GPGSG.....	KSG.T.V.....	DT.I.....
Aic/2/68	I.....G.T.....I.....G.NA.....GPGSG.....	KSG.T.V.....	DT.I.....

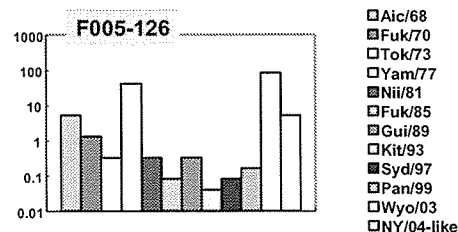


図5. F002-005およびF004-104 完全型IgGの
H3N2 ワクチン株に対する中和活性

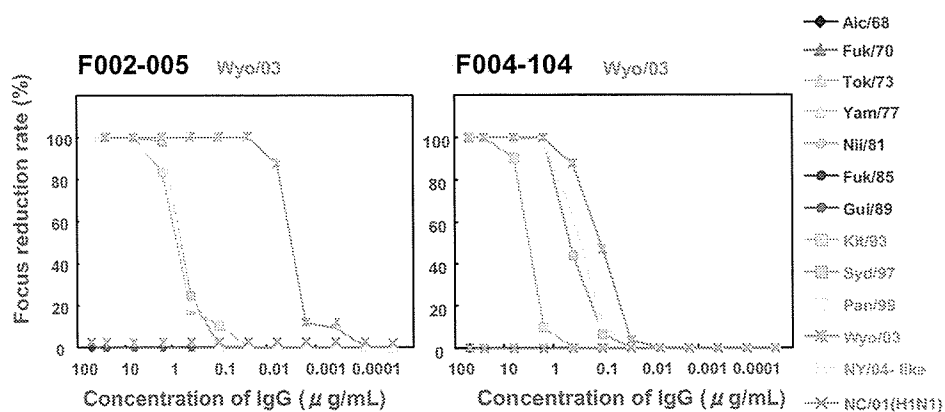


図6. F004-136 完全型IgGのH3N2 ワクチン株に対する中和活性

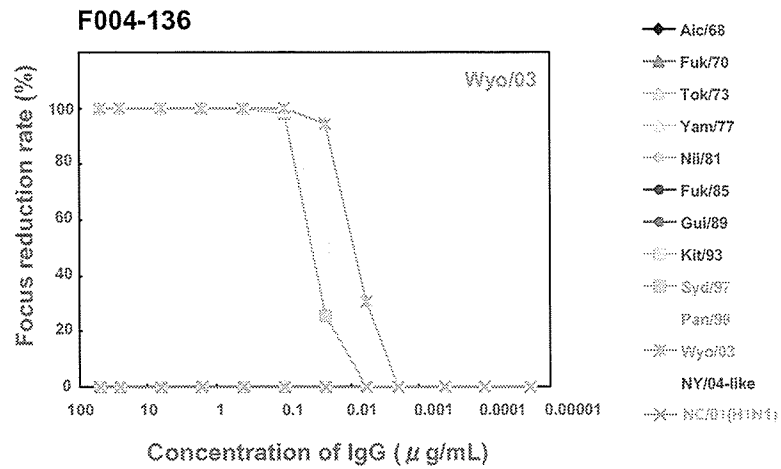


図7. 完全型IgGとFab-ppの
A/Aichi/2/68(H3N2) 株 に対する中和活性の比較

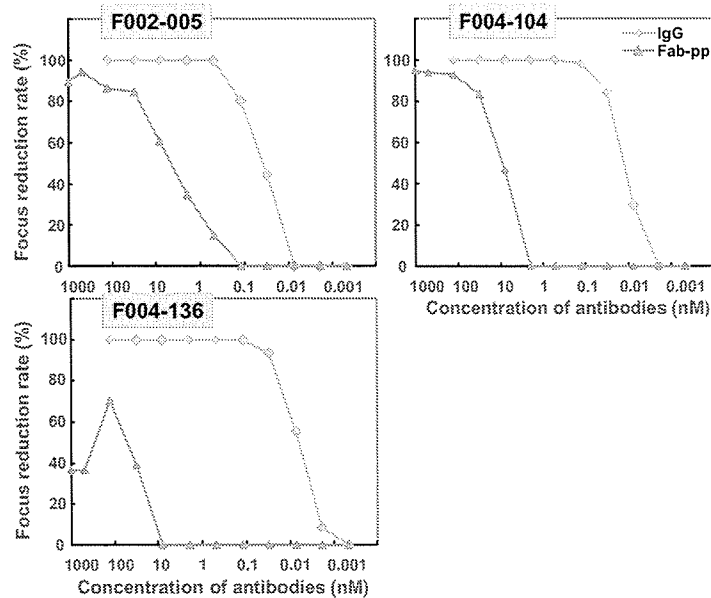


図8. F002-005完全型IgGに対する中和抵抗性変異株

escape mutants	HI titers			amino acid Substitution of HA1 region
	F002-005	F004-104	F004-136	
A/Wyo/3/03	40	10	160	—
VB1-1	<10	<10	160	Y159N
VB2-1	<10	<10	160	nd
VB2-2	<10	<10	320	nd
VB2-3	<10	<10	320	nd
VB2-4	<10	<10	160	nd
VB2-5	<10	<10	160	nd
VB2-6	<10	<10	160	nd
VB2-7	<10	<10	80	nd
VB2-8	<10	<10	160	nd

(1:10=5.0 μg/mL)

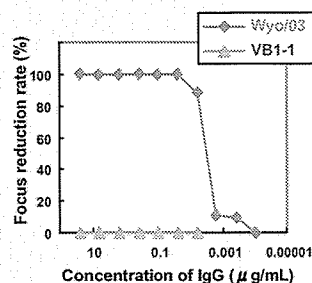


図9. F004-104完全型IgGに対する中和抵抗性変異株

escape mutants	HI titers			amino acid substitution of HA1 region
	F002-005	F004-104	F004-136	
A/Wyo/3/03	40	10	160	—
VC1-1	<10	<10	160	Y159N
VC1-2	<10	<10	80	Y159N
VC1-3	<10	<10	160	Y159N
VC1-4	<10	<10	160	Y159N
VC2-1	10	<10	80	D190E
VC2-2	80	<10	80	D190E
VC2-3	<10	<10	160	nd
VC2-4	80	<10	160	D190E

(1:10=5.0 μg/mL)

