

図10. F004-136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	-
VD1-1	40	20	<10	K145Q
VD1-2	40	20	<10	K145Q
VD1-3	80	40	<10	K145Q

(1:10=0.0 μg/mL)

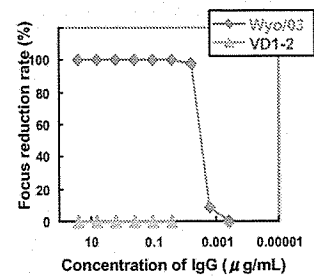


図11. F002-005およびF004-104に対する中和抵抗性変異株のアミノ酸置換部位におけるH3N2 ワクチン株のアミノ酸配列

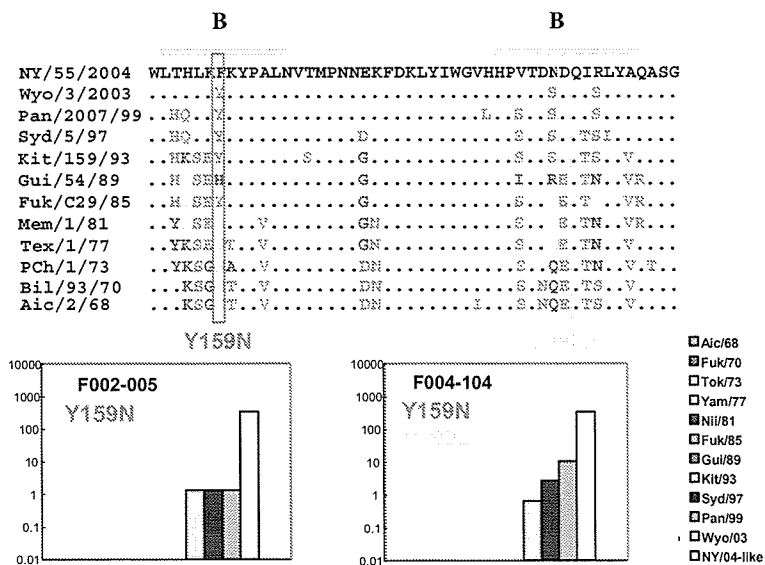


図12. F004-136に対する中和抵抗性変異株のアミノ酸置換部位におけるH3N2 ワクチン株のアミノ酸配列

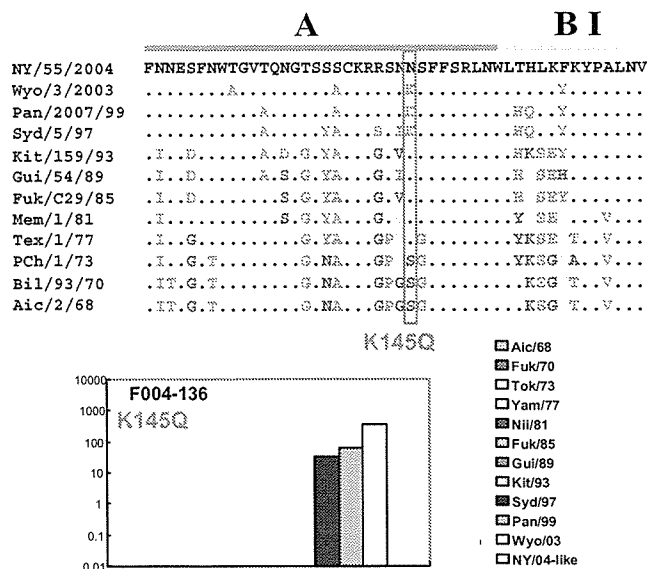
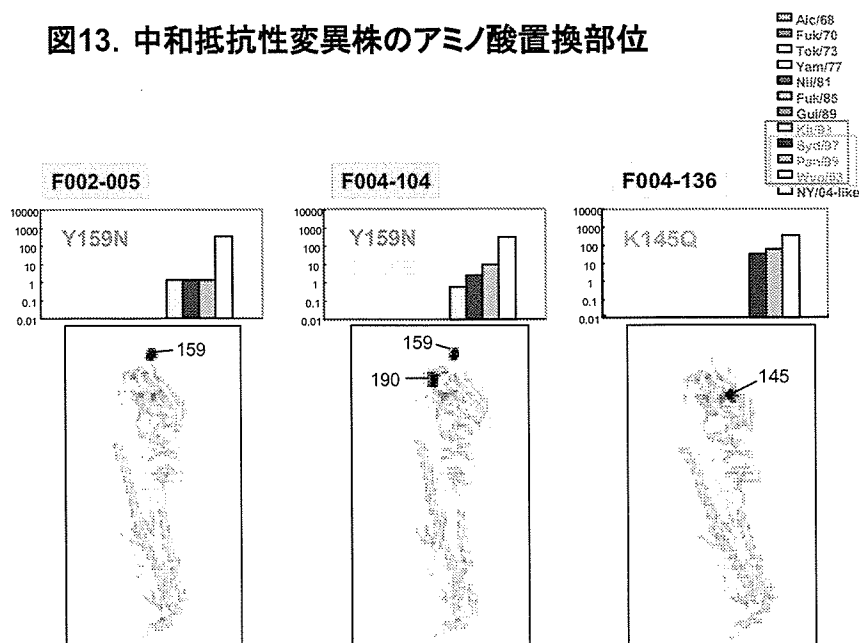


図13. 中和抵抗性変異株のアミノ酸置換部位



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

抗 VZV 治療用ヒト抗体の臨床試験

分担研究者 白木 公康 富山大学医学部ウイルス学
協力研究者 赤堀 泰 藤田保健衛生大学総合医科学研究所
協力研究者 鈴木 和宏 藤田保健衛生大学総合医科学研究所

研究要旨

今回、これまでに取得された水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV) に対する中和活性を有するヒト型抗体の性状について、最も治療効果を示す抗体を様々な試験により選び出す解析を行ったので報告する。

研究目的

水痘は非常に伝染力が強く、未感染母体から新生児への感染、また免疫不全者にとっての感染は重篤となることが知られている。さらに、骨髄・臓器移植時や化学療法治療時の VZV 感染重篤化はリスクファクターの 1 つである。新生児水痘は死亡率が約 30% とされ、ハイリスク患者への感染予防及び軽症化のために、米国では帯状疱疹回復期血清由来の VZIG が使用されている。このように、高力価免疫グロブリンの有効性が示されているが、ヒト血清由来である点は、改善されるべきであり、わが国にはそのような貴重な血清を得るシステムはない。本事業で得られた成果である「VZV に対する中和活性を有するヒト型抗体産生システム」は VZIG を代替するのに十分な活性を有している。抗ウイルス薬が一般使用されるようになった現在でも、VZV の予防治療には VZV 高力価の免疫グロブリン製剤を用い

ることが期待されており、その応用範囲は広いと考える。

本研究の目的は単離した中和抗体について製剤化する道筋をつけることである。これまでの研究で VZV に対し中和活性を有する抗体クローンを複数単離し、それらに関する IgG 抗体産生系を樹立できた。今期の研究は最も治療効果を示す抗体を選び出すとともに、疾患モデル動物に対して薬効を示すことで臨床試験開始の条件整備を行うことを目標としている。

B. 研究方法

本研究は白木グループが VZV の中和の標的である抗原 (特に gH) の調製、抗体の中和活性の検討を担当し、抗体ライブラリのスクリーニング、ヒト抗体への変換と発現一調製を黒澤グループが担当するという分担で実施された。

これまでの研究において取得された VZV 中和抗体 6 クローン

(クローン No. :10, 24, 36, 60, 94, 431) は *in vitro* 実験において中和活性として十分な能力を持っていること、またその内 2 クローン (24・94) は強い活性であることがこれまでの検討で明らかになっている。

しかしながら、最も適切な中和活性をもつ抗体クローンがこれらのクローンであるかどうかの検討が必要と考えられた。即ち、適切な VH-VL の組み合わせが得られていない可能性がある。その検討にあたっては、既に得られた VH に対して、VL を組み合わせなおす必要がある。また、そのスクリーニング方法をこれまでは固相化した精製 gH 糖タンパクを抗原として使用してきたが、その立体構造は細胞膜上に発現しているものとは異なることが指摘されており、このことについても検討を加える必要性が生じた。

これらの問題点を検討するため、我々は以下に述べる実験を行った。即ち、まず、得られた VH は十分に生理的機能を有すると考え、これらと VL ライブラリーを組み合わせなおして VL シャフルライブラリーを作製し、ついで、これについての ICOS 法を用いたスクリーニングを行った。

ICOS 法は黒澤グループが開発した細胞膜上の様々なエピトープに対し、結合力の高い抗体を取得する方法で、生細胞に対しファージ抗体を反応させたのち、有機溶媒を用いた洗浄を行う方法である。これまでの実験から、細胞膜上抗原を認識する抗体が効率良くとれることが確認されている。今回の実験では、標的中和エピトープ (gH 抗原) を膜上に発現している VZV 感染細胞を

用いてスクリーニングを行い、多数の抗体クローンを得た。

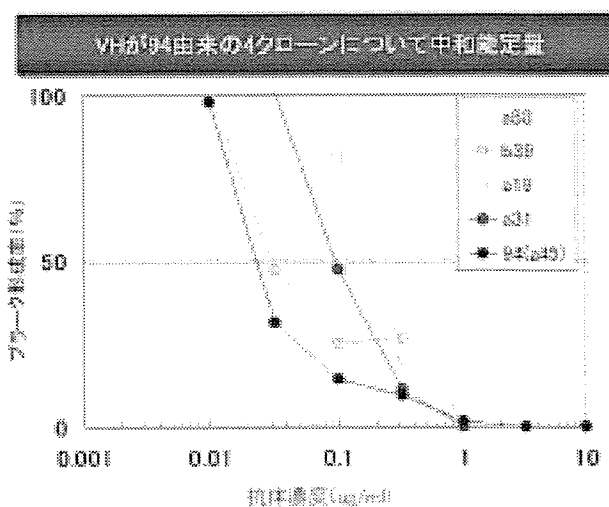
このようにして得られた抗体クローンとその元となった抗体クローンの中和能を比較してベストなクローンを選定し、疾患モデル試験および臨床試験に使用することとした。

C. 結果

VL シャッフルライブラリーを用いた VZV 感染細胞に対するスクリーニングの結果得られた新規 23 クローンについて行った中和試験で VZV に対する中和能がみられた 7 クローンについてそれぞれの元となったクローンとの比較となる定量試験を行った結果について①～②に示す。

① VH が 94 由来の a19, a31, a88, b39 について

4 クローンともほぼ 94 (a45) と同じ濃度で中和することが解った (IC₅₀=0.05ug/ml)



② VH が 10 由来の a44 について定量試験を行った。a44 は 10 と比較し約 30 倍の中和能の上昇が観察された。

調製後、疾患モデル動物に対する *in vivo* 試験において検定を行う。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

K. Suzuki, Y. Akahori, Y. Asano, Y. Kurosawa & K. Shiraki, Isolation of therapeutic human monoclonal antibodies for Varicella-Zoster virus and the effect of light chains the neutralizing activity, J. Med. Virol. (in press)

2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

研究要旨

HCMV 抗体陽性健康成人 B リンパ球から確立したファージ抗体ライブラリーを用いて、HCMV 精製ビリオン、HCMV gB の膜外領域（gB 654）蛋白に親和性を持つ抗体クローンを濃縮した。得られたクローンについて、V_H、V_L領域のシーケンスを行い 14 種類に分類した。さらに分類された各 A.研究目的

ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）感染症には抗ウイルス薬による治療に加え γ グロブリン製剤を用いた発症予防が行なわれているが、それらは副作用や感染性病原体の混入といったリスクを完全に払拭することは難しく、より安全で効果の高い新たな治療法の確立が望まれている。我々は、個人の保有する抗体レパートリーをほぼ完全に再現したヒト抗体ライブラリーを用いて、HCMV を中和する完全ヒトモノクローナル抗体の単離を試みた。

B.研究方法

血清が HCMV 中和活性を有する小児科医のボランティア 1 名から採取した B リンパ球を用いて、抗体の Fab 部分を繊維状ファージに提示させたファージ抗体ライブラリーを作製した。このライブラリーを用いて、異なる 2 種の抗原(a: HCMV virion、b: HCMV envelope 構成タンパク gB の膜外領域 gB654) に親和性を示す抗体クローンをそれぞれ生物学的に濃縮（パニング）した。抗原に親和性を示したクローンについて、はじめに V_H および V_L の塩基配列を決定して分類した。つぎに各分類グループ代表クローンの Fab 抗体を用いて、結合力測定および中和活性測定実験を行なった。gB654 に対する各クローンの結合力（K_D）および抗体間の認識部位の競合関係について、Biacore3000(Biacore 社)を用いて調べた。

クローンの中から 4 種類について Biacore3000 を用いて抗原との結合力を解析した結果、gB654 に対して 10⁻⁹~10⁻¹⁰ (M) という強い結合力を示した。また、これら 4 種の抗体間の競合実験により、少なくとも異なる 3 箇所の epitope が gB654 中に存在することが示唆された。

抗体の中和活性は plaque reduction 法により検討した。

C.研究結果

作製した Fab 抗体ライブラリーのサイズは 1.46×10¹¹ であった。HCMV virion および gB654 を抗原とした各々のスクリーニングによって単離した抗 HCMV 抗体候補クローンは、アミノ酸配列により最終的に 14 種の候補グループに分類した。そのうち 4 種に関して、gB654 に対する結合力（K_D）を測定したところ、10⁻⁹~10⁻¹⁰ (M) という強い結合力を示した。また、これら 4 種の抗体間の競合実験により、少なくとも異なる 3 箇所の epitope が gB654 中に存在することが示唆された。ところが、これら 4 種についていずれも十分な中和活性が認められなかった。

D.考察

今回主に解析した 4 種のクローンについては、抗原に対する結合力が非常に強いにもかかわらず中和活性は示さなかった。その原因として、抗体が IgG 型でなく Fab 型であることが考えられる。今後、各クローンの IgG 化を進め、IgG 抗体の中和活性について検討したい。

G.研究発表

1.論文発表
該当無し

2.学会発表

第 54 回日本ウイルス学会（名古屋）にて発表

H.知的財産権の出願・登録状況
該当せず

研究協力者

吉川哲史、太田 茜

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
N. Nakagawa, J.Suzuoki, R.Kubota (R.Koketsu), S.Kobatake, Y.Okuno	Discovery of the neutralizing epitope common to influenza B virus Victoria group isolates in Japan	J. Clin. Microbiol.	44	1564-1566	2006
M.Kamada, T.Nagai, T.Kumagai, M.Igarashi, T.Ihara, T.Okafuji, et al.	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
M.Ito, M.Watanabe, N.Nakagawa, T.Ihara, Y.Okuno	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
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		