

厚生労働科学研究研究費補助金

創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究

治療薬としてのヒトモノクローン抗体製剤化に関する研究

課題番号 H18 — 創薬 — 一般 — 024

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 黒澤 良和

平成20（2008）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----- 13
3. 抗サイトメガロウイルスヒト抗体を対象として	
	浅野喜造----- 18
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 22

厚生労働科学研究費補助金  
(創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究)  
総括研究報告書

治療薬としてのヒトモノクローン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費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。第 IV 期（平成 18-20 年度）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。

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。それを含めて単離した 9 種類のヒトモノクローン抗体のエピトープマッピングを実施した。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 抗体は単独でウイルスを中和し、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、gH 分子上に 6 ケ所の異なる中和エピトープが存在することが判明した。しかしながら、異なる中和エピトープを認識する抗体を組合せて用いても synergistic な効果は得られなかった。そこでモルモットを用いた感染モデル系で抗体のウイルス増殖への阻止効果を解析した。その結果、in vivo でのウイルス増殖

阻止効果が認められた。

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 gB 分子を抗原としてライブラリーをスクリーニングした。得られた 10 種類についてエピトープマッピングを行ったところ 3 種類に分類された。単独投与ではウィルスに対する中和活性は認められなかったが、補体共存下では強い中和活性が示された。

インフルエンザウィ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)。インフルエンザウィ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ィ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ィ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。結果的にヒト体内の中和抗体レパートリー全体像を明きかにすることに成功した。更に全ての H3 型ウィルスを中和できる抗体が存在することも判明した。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。

分担研究者

奥野良信・(財)阪大微生物学研究所・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 (VZIG) が市販されていたが、最近発売中止となった。しかし、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。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。1. 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。2. 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 特許と McCafferty 特許に如何に対処するかについてである。3. 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。

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、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るといけば synergistic な効果のある中和力が生まれるかをみる。さらに疾患モデル動物をもちいて、in vivo でのウイルス増殖阻止効果を調べる。

サイトメガロウイルスについては、血清中に強いウイルス中和活性を示す抗体価を持つドナーから成分採血で得た B リンパ球を材料に作製した巨大抗体ライブラリーをスクリーニングすることで抗体を得た。そこで我々の研究戦略が正しいとすれば、中和力を持つヒトモノクローン抗体が単離できるに違いない。この研究法の正しさを立証することも研究目標である。

A 型インフルエンザウイルスの 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イルスとして登場し、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 型ウイルスを中和できる抗体に関してヒト体内のレパートリーを明らかにすること、具体的には中和抗体がどの程度存在し、個々の抗体はどのような株特異性を示すかを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。

## 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、骨髄から 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。ヒト抗体を単離する抗体のソースとしてこのライブラリーを用いる場合、多くは抗原に対してナイーブである。一方、特定の抗原に対して特徴的な抗体を有することが判明している人が成分献血（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）に協力し、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含まれていることを期待できる。本プロジェクトでは、VZV に対する中和抗体は AIMS ライブラリーより単離した。VZV は生ワクチンが開発され多くの子供が接種し、更に水痘については感染発病の経験を持つヒトが多い。そこで AIMS ライブラリーの中に体内で成熟した抗体が多く含まれていることを期待できた。インフルエンザウイルス中和抗体の研究およびサイトメガロウイルスに関しては、“成分採血—抗体ライブラリー作製”の研究戦略を採ることにした。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、更にはウイルス中和力の有無を解析した。

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イ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イ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イルス粒子を用いた。

### C. 研究結果

#### VZV に対する中和抗体

研究結果は白木報告に詳しく記されている。gH を抗原とする抗体を単離し、既に強力な中和活性を示す抗体が 2 種類含まれていることを示した。それを含めて単離した 9 種類のヒトモノクローン抗体のエピトープマッピングを実施し、gH 分子上に 6 ケ所の異なる中和エピトープが存在することが判明した。しかしながら、異なる中和エピトープを認識する抗体を組合せて用いても synergistic な効果は得られなかった。そこでモルモットを用いた感染モデル系で抗体のウイルス増殖への阻止効果を解析した。その結果、in vivo でのウイルス増殖阻止効果が認められた。

#### サイトメガロウイルス中和抗体単離

サイトメガロウイルスは、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 gB

分子を抗原としてライブラリーをスクリーニングした。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) 抗体を 10 種類ほど単離した。それらは 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した。その結果、単独投与ではウィルスに対する中和活性は認められなかったが、補体共存下では強い中和活性が示された。

#### 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 (Y1) をスクリーニングした結果を記す。さらに Y 氏からは最初の 2004 年採血に加えて 2007 年にも再度採血しライブラリーを作製 (Y2) してスクリーニングした結果、得られたクローンの比較も可能となった。Y1 ライブラリーからは 12 種類の株を用いてスクリーニングを行い、総数 1142 クローンの抗 HA 抗体を取得した。H 鎖の塩基配列を決定したところ 153 種類に分類された。153 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。更に中和力も解析した。Y2 ライブラリーからは 5 種類の株を用いてスクリーニングし 269 クローンの抗 HA 抗体を得た。それらは 69 種類に分類された。得られた結果は、様々な極めて価値ある情報が含まれており、現在論文を投稿中である。

#### 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。それ以外にも Y1, Y2 ライブラリー及び A ライブラリーから得られたクローンの中に頻度は低い似た性質の抗体が含まれていることが判明し、それらのクローンが認識するエピトープの解析が喫緊の課題であることが浮き彫りにされた。

#### 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 (apheresis) 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 1 時間ほどを要するが、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  $10^9$  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) インフルエンザウイ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。

Apheresis により得た B リンパ球総数は約  $10^9$  でありそれで全体を反映したものかと

いう疑問があった。今回 2004 年に採血した B リンパ球に加えて、3 年後の 2007 年に採取した分についてもクローンを単離し、塩基配列を比較した結果、その多くがオーバーラップすることが判明した。このことは単離したクローンの解析でほぼ確実にレパートリーの全体像を解析したことになることの証拠と考えている。

#### HL 鎖組合せに関して

ファージディスプレイ法で得たクローンが *in vivo* の抗体レパートリーを正しく反映したものかという疑問が提起されている。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。インフルエンザ中和抗体の場合、H 鎖が同じで L 鎖が異なる多くのクローンが得られている。その結合力や中和力に関する株特異性は相互に良く似ており、H 鎖が同じ場合は同じクローンとして扱うことで体内のレパートリーを十分に反映しているという解釈で大きくは間違わないと考えている。

#### 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。最初に列記した問題点のうち、特許に関しては、特許期限がまもなく終了しようとしており、時間経過が問題の存在自身を消しつつある。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が、費用対効果の視点からはまだ説得力ある解決策は模索中である。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こそ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

##### VZV 中和抗体

既に単離してあった VZV 中和活性のあるモノクローン抗体について、in vitro のみならず、in vivo でも抗ウイルス増殖阻止活性を見出した。このことはこのヒトモノクローン抗体について、臨床試験開始に関するアカデミックなレベルでの障害はほぼ全てクリアしたことを意味する。

##### サイトメガロウイルス中和抗体

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。それらは 3 種類の異なるエピトープを認識するクローンとして分類可能だが、全て補体存在下で強いウイルス中和活性を示す。

##### インフルエンザウイルス中和抗体

H3N2 型インフルエンザウイ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、ウイルスを中和する能力を持つ抗体が存在していた。今後この抗体の認識するエピトープを明らかにすることにより、インフルエンザ予防薬及び治療薬開発の展望を開く。

#### F. 健康危険情報

該当事項なし

#### G. 研究発表

##### I. 論文発表

1. 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.* 79,852-862 (2007)
2. G. Kurosawa et al.( 30 authors ): Comprehensive screening for antigens expressed on carcinomas via isolation of human monoclonal antibodies that may be therapeutic. *Proc Natl Acad. Sci USA* (in press).

##### II. 学会発表

1. Y. Kurosawa. The repertoire of neutralizing monoclonal antibodies against H3N2 influenza viruses in human. Memorial International Workshop 2007/2008 for the 21<sup>st</sup> Century COE Program of Fujita Health University Jan. 23, 2008.

#### 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  
(創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究)  
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： 瀧澤律子 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

3名の小児科医より成分採血で得られたリンパ球を材料に、4種類の抗体ライブラリーを作製した。年代別に選択した12種類のA香港型(AH3)のインフルエンザワクチン株を抗原として、これらライブラリーから多数のヒト抗体をクローニングした。これら抗体の中和活性を、12種類のワクチン株に対して測定した。抗体の中和パターンから、中和抗体を誘導するワクチン株の抗原性は、3つの年代グループに分けられることを明らかにした。また、抗体の認識部位は、HAのA領域、B領域に集中していることを証明した。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

3名の小児科医より成分採血で得られたリンパ球を材料に、4種類の抗体ライブラリー(A、Y1、Y2、N)を作製し、H3N2ワクチン株を抗原として多数のヒト抗体をクローニングした。これら抗体を中和試験で詳細に解析し、ヒト体内で作られる中和抗体のレパートリーを、モノクローンレベルで明らかにした。

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H1N1ワクチン株、A/New Caledonia/20/99 (H1N1)を使用した。

## 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、Aライブラリー、Yライブラリー、Nライブラリーと名付けた。Yに関しては、2004年と2007年の2回成分採血し、それぞれY1ライブラリー、Y2ライブラリーとした。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。

## 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)、またはフェレット抗血清とワクチン株のウイルスを1:1で混合し、37°C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°C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°C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(Fab)の中和活性スペクトル(Fig.1)

これまでにクローニングされたヒト抗体(Fab)の各年代のワクチン株に対する中和活性スペクトルをまとめて示した。

大部分のヒト抗体は、パニングに用いたワクチン株だけでなく、近い年代のワクチン株も中和したが、全体的に一定のパターンが見られた。年代別に大きく3区分され、68年から73年、77年から93年、97年から04年と、それぞれの年代内では、中和パターンに共通性が見られた。これは、それぞれの年代内のワクチン株の抗原性は大きく違わないが、別の年代グループ間では、抗原性に大きな違いがあったことを示唆した。

### 2. エスケープミュータントのフェレット標準血清に対する反応性(Fig.2)

1996年から2006年までのワクチン株に対するフェレット標準血清を用いて、親株であるWyo/03株と異なるアミノ酸置換をエスケープミュータント4種のHI反応性を比較した。

Y159N、K145QおよびQ156Hのアミノ酸置換を有したエスケープミュータントにおいて、a-Wuh/95、a-Wyo/03に対する反応性が親株よりも8倍以上低下していた。このことから、これらのエスケープミュータントが有する1-2個のアミノ酸置換部位が、抗原変異に関与していることが示唆された。



た。

以上のことから、ヒト体内に存在する中和抗体のレパートリーは、採血時期を反映しており、新たに抗原変異した株に数年暴露される間に中和活性を有する抗体の割合が増加したことが示唆された。

**Fig.4 Comparison of clones isolated from two libraries constructed in 2004 and in 2007 ; Fab clones by panning with A/Wyoming/3/2003**

VH germline	N activity against wyc/03	Number of clones	
		Y1 (2004)	Y2 (2007)
<b>overlapping clones</b>			
VH2-26	-	2	4
VH4-39	-	4	2
VH1-69	-	6	1
<b>non-overlapping clones</b>			
other kinds	-	16	9
	+	8	17

#### D. 考察

成分採血で得られたリンパ球を材料に、ファージディスプレイ法を用いて多数の AH3 ワクチン株に対するヒト抗体のクローニングに成功した。これら抗体を中和試験で解析し、多くの新しい知見が得られた。

中和活性を有する抗体の大部分は、パニングに用いたワクチン株だけでなく、近い年代のワクチン株を中和した (Fig.1)。しかし、一部の抗体は、パニングに用いたワクチン株だけを中和し、株特異的なエピトープを認識するものと推測された。また、F005-126 のように、すべてのワクチン株を中和するユニークな抗体も得られた (昨年度報告)。全体的な中和活性スペクトルを見ると、抗体の反応性は大きく 3 つの年代に分かれた。68 年から 73 年の株を中和するもの、77 年から 93 年の株を中和するもの、97 年以降の株を中和するものの 3 グループである。AH3 は、73 年と 77 年の間、93 年と 97 年の間の 2 回、大きな抗原変異があったことを意味し、ヒトはそれら抗原変異に対応した抗体を作る能

力を獲得したと考えられる。

一部の抗体は Fab から IgG に変換し、これら IgG を用いて中和抵抗性変異株 (エスケープミュータント) を作製した。親株とエスケープミュータントのアミノ酸シーケンスを比較し、1~2 箇所のアミノ酸置換が中和抵抗性に関与していることが証明された (Fig.2)。今回は、フェレットの免疫抗血清が入手できたので、これららのエスケープミュータントに対する HI 活性 (中和活性に相当する) を測定した (Fig.2)。その結果、ポリクローナルレベルでも、1~2 箇所の特定のアミノ酸置換が、HI 活性の大幅な低下に関与することが明らかになった。このことは、動物が産生する抗体の種類は多くても、ある特定のエピトープに対する抗体だけが効率よく中和できることを意味していると考えられた。

A/Wyoming/3/2003 株を抗原としてパニングし、49 種類の抗体クローンが得られたので、これらの HA 上の認識部位を解析した (Fig.3)。4 種類のエスケープミュータントに対する中和活性を調べたところ、中和パターンに多様性がみられた。エスケープミュータントのアミノ酸置換部位が分かっているので、抗体が認識するエピトープに関わるアミノ酸が特定できた。それらエピトープは A あるいは B 領域に存在することが明らかになった。

3 年間の間隔をあけて同じ小児科医から得られた Y1 と Y2 ライブラリーを用い、それぞれから多数の抗体がクローニングされたので中和活性を比較検討した (Fig.4)。Y1 と Y2 に共通するクローンと、それぞれのライブラリーに特有のクローンが得られた。共通するクローン (overlapping clones) は、すべて中和活性を有していなかったが、各ライブラリー特有のクローン (non-overlapping clones) は、中和活性を有するものと有しないものに分類された。Y1 では中和活性を有しないクローンが優位であった

が、Y2 では中和活性を有するクローンが優位に単離された。これは、成分採血された小児科医が、3 年間の間に A/Wyoming/3/2003 類似の抗原性を有するインフルエンザウイルスに暴露され、中和抗体を産生する免疫担当細胞の比率が高くなった結果だと推測された。

#### E. 結論

インフルエンザワクチン株 (H3N2) に対して中和活性を示すヒト抗体の反応パターンを解析した。中和抗体を誘導するワクチン株の抗原性は、年代によって 3 つのグループに分けられることが明らかになった。

#### F. 研究発表

1. 奥野良信：インフルエンザワクチンの現状

と課題. Makoto (別冊)、140：1-7、2007

2. 奥野良信：インフルエンザを取り巻く治療・予防の現状と課題；インフルエンザワクチンの効果と問題. Prog.Med.、27：57-61、2007
3. 奥野良信：(新型) インフルエンザの現状と対策；新型インフルエンザに対する公衆衛生対策. 化学療法の領域、23 (12)：61-65、2007
4. 奥野良信：鳥インフルエンザ：インフルエンザウイルス概論. 臨床とウイルス、35(5)：409-415、2007

#### G. 知的財産権の出願、登録状況

なし。

厚生労働科学研究費補助金  
(創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究)  
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 医学薬学研究部 (医学) 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 が使用されてきたが近年製造中止となり、現在では治験薬として VariZIG が用いられているがこれも血清由来である。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。

上記の過程において、単離抗体のエピトープ認識の解析は今後の抗体開発において重要な情報を与えるものであるため、今回はそれについても報告する。また、複数の抗体をミックスした場合の効果についても検討したので、それについての報告も行う。

## 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—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）は特に強い活性を有することがこれまでの検討で明らかになっている。今回これらの中和抗体 6 クローンと、類似の 2 クローン（VH を 10 と同じとする 120, 192）についてそれぞれのエピトープ解析を行った。その方法は以下のとおりである。まず、VZV 感染細胞を準備し、これを pp 型各抗体にてブロッキングを行う。次に検出用の Avi-tag 型抗体を反応させ、洗浄したのち、Streptavidin-HRP を反応させ、最後に HRP による発色を行った。ブロッキング抗体と検出抗体とでエピトープが重なれば、HRP 発色が極めて弱くなるはずで、逆にエピトープが重ならないのであれば、強い発色を示すはずである。

異なる抗体をミックスした場合の virus 感染阻止効果試験は、従来の方法にて行った。すなわち、異なる抗体の組み合わせを準備し、これと単離 virus とを混ぜて静置したのち、HEL 細胞に感染させ、形成されるプラーク数をカウントした。

抗体の認識が ConA 認識と重なるかどうかについても実験を行った。ConA は 4 量体の比較的巨大な分子で、糖鎖に結合するこ

とが知られている。今回はまず ConA を反応させたのち、それぞれの抗体を反応させ、さらに蛍光抗体を反応させて、蛍光による発色をみた。

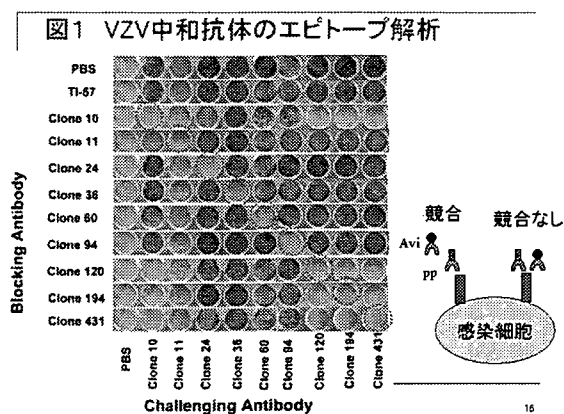
VZV は細胞間の接触によって感染し、プラークを形成する。単離された抗体がこの接触感染を阻止するかどうかについても試験を行った。数十プラークが形成される程度に virus を感染させ、これに各抗体を反応させてプラーク形成がどの程度阻止されるかを観察した。

さらに、クローン 24, 94 について IgG における疾患モデル動物に対する *in vivo* 試験において検定を行った。

## C. 結果

### ① エピトープ解析

図 1 に示すように、clone10, 120, 192, 431 は互いに競合し、エピトープが重なることを示している。他の抗体は競合が起きないので、エピトープ認識が異なると考えられる。これらのことから、少なくとも 6 つのエピトープが存在していることが示された。

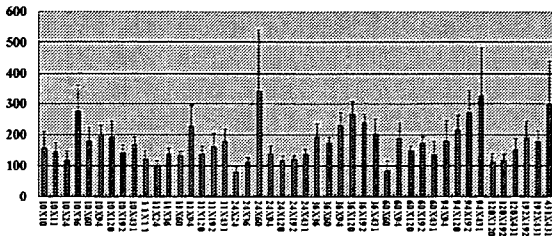


抗体をミックスした場合、プラーク数が大幅に減少するような効果はみられず、むしろ大部分の場合において中和の効果が減少



していた。すなわち、抗体の作用は相乗的ではなく相加的である「図2」。このことから、抗体の作用部位は1箇所と推定される。

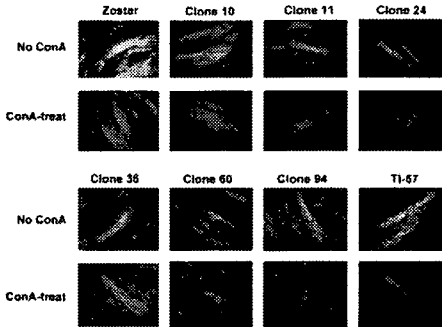
図2 Effect of Neutralizing activity by combination of two clones



異なった抗体クローンの組み合わせによって中和活性が上がる例はほとんどなく、抗体の作用は相乗的ではなく相加的と考えられる

ConA との競合試験「図3」。clone36 では蛍光が顕著には減少していないが、他の抗体については顕著な蛍光減少が見られ、ConA と抗体との間で競合が起こっていることが示された。

図3 抗体とConAとの競合試験

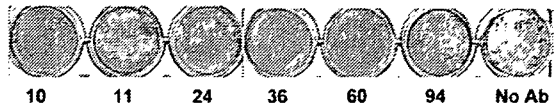


Clone36以外は明らかな競合が見られ、抗体は糖鎖を含む抗原認識を行っていることが示唆された

接触感染阻止試験「図4」。すべての抗体においてプラーク形成が阻止されており、VZV の細胞間感染の阻害効果があることが示唆された。

図4

Inhibition of cell-cell spread and plaque formation



抗体作用によりplaque形成が阻害されることから、これらの抗体がVZV virusの細胞間感染を阻止していることが示唆された

抗体遺伝子についての解析 (表1)。抗体の VH 遺伝子を germline と比較し、その変異を算出した。中和活性の極めて弱い clone11 は germline に変異が入っておらず、naïve 型抗体と推定される。ほかの抗体は高い変異が入っており、生体内での affinity maturation が起きたことを示唆している。特に中和活性の強かった clone24, 94 では CDR2, FW3 に変異がかたまっており、おそらくは CDR3 を含むこのあたりの認識が中和活性にとって重要であることを示唆している。

表1 VZV 中和抗体遺伝子(H鎖)の germline との変異率比較

H鎖mutationの頻度	Clone	germ	similarity	mutation	neutralize(nM)
		010	DP-51	91.724	24/291
	011	DP-10	100	0/296	low
	024	DP-35	90.169	29/296	3.0
	036	DP-67	90.816	25/294	400
	060	DP-49	90.444	28/294	25
	094	DP-46	92.150	21/294	0.12
	431	DP-50	93.898	18/296	200

H鎖部位別mutation	Clone	FW1	CDR1	FW2	CDR2	FW3
		010	9	6	2	1
	011	0	0	0	0	0
	024	3	5	4	9	8
	036	9	2	2	6	8
	060	3	3	4	11	7
	094	2	2	1	8	8
	431	1	2	1	10	4

中和活性の極めて低い clone10はnaïve抗体クローンと思われる。他の抗体クローンは18-29個のmutationが入っており生体内でのaffinity maturationを示唆している。活性の高かった24,94では後半部にmutationが集中しており、CDR3を含めたaffinity maturationの存在を示唆している

以上、クローン 10, 120, 192, 431 (10, 120, 192, は VH が同一) のエピトープは極めて近接していると考えられた。他のクローン(クローン 11, 24, 36, 60, 94) はホモでのみブロックがかかり、ヘテロではブロックされなかったことから、これらの抗体の認識エピトープは異なることが示された。エピトープ解析から、gH 上には少なくとも 6 種類のエピトープが存在していることが示された。さらに、中和活性が相乗的に作用しないことから、これらのエピトープは同一機能を有する domain を認識しているが示唆された。以上のことから、水痘ウイルス gH の中和の標的 domain は 1 カ所で、少なくとも 6 カ所のエピトープより構成されていることが示唆された。

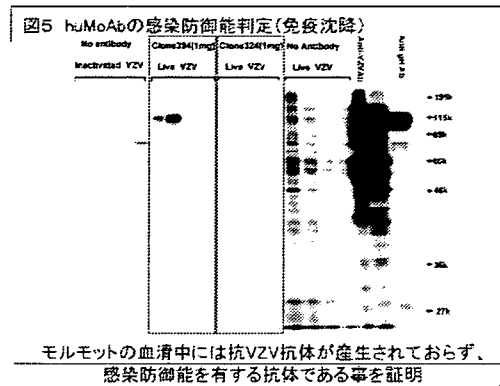
②疾患モデル動物に対する *in vivo* 試験において検定

ヒトでしか発症しない VZV ウイルスの *in vivo* 試験評価法としては、発症阻止を観察できる完全なモデル動物は無いとされる。代替としてモルモットへの経鼻感染により肺胞上皮に感染することを免疫組織染色にて確認したのち、VZV 感染の前後に被検抗体を投与し、一定期間の後モルモット血清中に産生される抗 VZV 抗体を免疫沈降にて検出し、その有無で抗体の感染および増殖阻止能力を判定した。

a. ヒト抗 VZV 抗体による感染防御

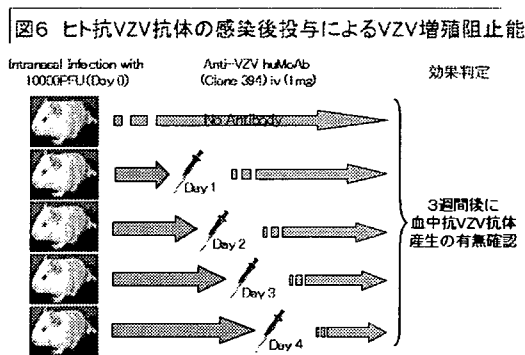
モルモットに静注にて抗体投与 (1mg) を行った 3 時間後に鼻腔へ VZV を 10, 000PFU 感染させ、3 週間後に血清採取し、抗 VZV 抗体を免疫沈降にて検出した。図 5 にあるように

いずれの個体 (n=4) も抗体投与無しと比較し明らかに抗 VZV 抗体の産生が無くなっており、感染防御能力が認められた。



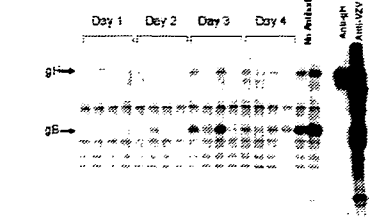
b. ヒト抗 VZV 抗体の感染後投与による VZV 増殖阻止能

モルモット鼻腔へ VZV を 10, 000PFU 感染させ、感染 1 日後にそれぞれの個体 (n=4) に静注にて抗体投与 (クローン 94 : 1mg) を行った。また、感染 2 日後・3 日後・4 日後にそれぞれ投与する群を設けた (図 6 参照)。



それぞれ感染から 3 週間後に血清採取し、抗 VZV 抗体を免疫沈降にて検出した。図 7 にあるように感染後 48 時間以内に抗体を投与すればウイルスの増殖阻止能力が認められた。

図7 huMoAbのVZV増殖阻止能の確認(免疫沈降)



Ab to gH	----	----	++++	++++
Ab to gB	----	----	++++	++++

感染後48時間以内に抗体を投与すれば  
ウイルスの増殖を阻止することが可能

E. 結論

取得した中和抗体のエピトープ認識が異なることから、VZV (gH) の中和エピトープは少なくとも6カ所有ることが判った。また、in vivo 試験において、VZV 感染および増殖阻止能力があることが判った。今後、臨床開発に向けた詳細な試験を行う予定である。

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, Journal of Medical Virology  
79:852-862 (2007)

2. 学会発表

厚生労働科学研究費補助金  
(創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究)  
分担研究報告書

治療薬としてのヒトモノクローン抗体製剤化に関する研究  
(抗サイトメガロウイルスヒト抗体を対象として)

分担研究者 浅野 喜造 藤田保健衛生大学 医学部  
研究協力者 吉川 哲史 藤田保健衛生大学医学部  
太田 茜 藤田保健衛生大学医学部

研究要旨

ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) 感染症は、近年増加傾向にある臓器移植患者あるいは AIDS 患者において重症化し問題となる。HCMV 感染症対策としては、γグロブリン製剤による重症化予防や抗ウイルス薬による治療が行われているが、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開発が望まれている。我々は、黒澤らが作製した、HCMV 抗体陽性健康成人の成分血由来ヒト抗体ライブラリーより、HCMV を中和するヒト抗体クローンを単離し、最終的には人工抗体による HCMV 感染症の新たな治療法の開発を目指している。

本研究では、HCMV の中和抗原のひとつ glycoprotein B(gB) に結合活性を示すヒト抗体クローンを多数単離し、そのうち少なくとも 3 種 (H05, H08, H14) の IgG 抗体は中和活性を示した。3 種以外の抗体の中和活性について、現在解析中である。今後中和抗体が複数得られれば、それらを混合した抗体カクテルの HCMV 中和活性および臨床応用の可能性を検討していく。

A. 研究目的

ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) は、乳幼児期に不顕性感染し、生涯にわたって潜伏感染する。免疫機能が正常な人では、初感染や再感染時に無症状に経過するが、近年増加傾向にある移植後患者あるいは AIDS 患者等の免疫機能が低下した患者における HCMV の再活性化や再感染は、重篤な症状を引き起こす。また、近年は日本でも若年者での抗体陽性率が低下しており、妊婦の初感染に伴う先天性 CMV 感染症のリスクも懸念されている。現在は、抗ウイ

ルス薬であるガンシクロビル(GCV)等による治療、あるいはγグロブリン製剤による重症化の予防が行なわれている。しかしながら、抗ウイルス薬には骨髄抑制や腎毒性といった副作用があることに加え、耐性株の出現も多数報告されている。一方、γグロブリン製剤は血液製剤であり、未知の病原体混入のリスクは完全に払拭できない。このような状況から、HCMV 感染症の新たな治療薬が強く望まれている。本事業では、HCMV 感染症の予防あるいは治療薬となりうる人工のヒトモノクローナル抗体の製剤化を