

(II):H09,H14, (III):H02, H03, H04, H08)に分類できた。

表 1. gB654 に対する抗原親和力

VH	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)
H02	8.1×10^5	4.7×10^{-4}	0.58
H03	1.3×10^5	1.0×10^{-3}	8.5
H04	7.9×10^4	3.7×10^{-4}	4.7
H05	8.2×10^5	7.6×10^{-4}	9.3
H08	2.5×10^5	1.8×10^{-4}	0.73
H09	8.9×10^4	5.7×10^{-4}	6.5
H14	1.2×10^6	6.5×10^{-4}	0.53

2) 中和活性解析

本研究で得られた 14 種の抗体は、Fab が 1 価の Fab-cp3 型あるいは Fab-PP 型抗体では中和活性を示さなかった。そこで、7 種(H02, H03, H04, H05, H08, H09, H14)のクローンについて遺伝子組換え操作により IgG₁ 型抗体を作製し、中和活性を評価した。その結果、7 種の IgG 抗体は顕著な中和活性を示さなかった。

次に、本研究で得られた IgG 抗体は補体要求性である可能性が考えられたため、補体成分を加えて中和試験を行ったところ、3 種(H05, H08, H14)抗体は、補体依存的に中和活性を示した。そのうち、H05 および H14 抗体の中和活性曲線を図 1 に示す。

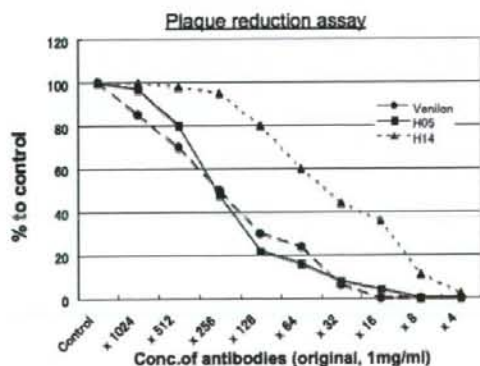


図 1. 補体依存的中和活性 (H05, H14)

図 1. に示した結果より、50%プラーク抑制濃度 (IC₅₀) は、4.34 μg/ml (H05 抗体)、 32.3 μg/ml (H14 抗体) であった。

Strains	C	Concentration of antibody						
		x16	x32	x64	x128	x256	x512	x1024
93R	++++	-	-	-	+	+	++	++
91S	++++	-	-	-	-	+	+	++
Towne	++++	+	+	+	+	++	+++	++++

++++: Indicate >90% CPE
 +++: Indicate 80-90% CPE
 ++: Indicate 30-50% CPE
 +: Indicate 10-20% CPE
 -: No CPE

表 2. H05 抗体の中和活性 (臨床分離株 91S, 93R)

次に、臨床分離株に対しても、同様の中和活性を示すかを検討した。臨床分離株は、抗サイトメガロウイルス薬であるガンシクロビル (GCV) 感受性株である 91S、および GCV 耐性株である 93R を用いた。いずれも補体成分を加えた場合の中和活性結果を表 2. に示した。"C" 列は、抗体を加えないコントロールの結果であり、細胞変性効果 (CPE) がほぼ全ての細胞で認められた。しかしながら、x16-x1024 まで抗体を希釈して用いた場合、CPE は全く見られないうち、もしくは顕著に抑制されていた。すなわち、H05 IgG 抗体は、臨床分離株にも同様の中和活性を示した。

3) 感染細胞における感染拡大抑制効果

HCMV は、培養細胞に低 MOI (0.01PFU/cell 以下) で感染させると、感染細胞から周囲の非感染細胞に cell-to-cell に感染が拡大する。そこで、既に感染した細胞に抗体を加えた場合に、cell-cell 感染の拡大が阻害されるかについて検討した。感染成立後、図 2. に示す希釈率で抗体を培養液に添加し、感染から 8 日後の培養上清中のウイルス力価を測定した。抗体を加えない場合のウイルス力価は 2.0×10^4 であったが、32 倍希釈でも、H14 抗体で 50% 以下、H05 抗体は 10% 以下に減少した。

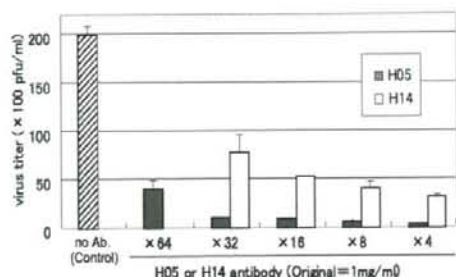


図 2. 感染細胞における抑制効果

4) ドラッグデリバリーシステム(DDS)への応用にむけて

本研究で得た抗 HCMV ヒト抗体を、抗体治療のみならず、従来もしくは新規の抗ウイルス薬の標的化治療に役立てたいと考えている。感染細胞およびウイルスに多数発現している gB は、抗 HCMV 薬の標的化ターゲットには最適である。本研究で得た抗体はいずれも gB に強い結合活性を示し(表 1)、これを利用する。具体的には、薬剤を内包して運ぶキャリアーと本抗体の抗原認識部位を含む Fab 型あるいは scFv 型抗体を共有結合リンカーで接続する。現在は、リンカーと結合させるための抗体を遺伝子操作によって作製している段階であり、今後の実験によって、DDS への応用の可能性を探っていきたい。

D. 考察

本研究で得た 107 クローンのうち、少なくとも 3 種(H05, H08, H14)は補体依存的中和活性

を示す抗体であった。そのうち、H05 抗体は、GCV 感受性/耐性の臨床分離株に対しても、中和活性を示した。また、感染細胞に対する感染拡大を抑制する効果も認められた。今後は、H05 抗体を抗体治療に応用するための *in vivo* 実験を含めた検討を行う。

本研究では、1 人の成分血から作製した大規模ヒト抗体ライブラリーより、*in vitro* において中和活性と感染拡大抑制効果を示す抗体クローンを複数単離することができた。すなわち、本抗体ライブラリーは、保有する独立クローンが約 10^9 であり、非常に多様な種類の抗体を単離するには優れたライブラリーであると言える。従って、他の中和抗原の組換えタンパク等を用いれば、新規の抗 HCMV 抗体クローンを単離できる可能性は十分にあると考えられる。今後は、多種多様な抗体クローンの単離と、DDS を含めた多面的な応用方法の検討をすすめていく。

G. 研究発表

1. 論文発表

Journal of Clinical Microbiology 投稿中

2. 学会発表

第 56 回日本ウイルス学会 (岡山) にて発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当せず

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
Y.Akahori, K.Suzuki, T.Daikoku, M.Iwai, Y.Yoshida, Y.Asano, <u>Y.Kurosawa and K. Shiraki</u>	Characterization of Neutralizing Epitopes of Varicella-Zoster Virus Glycoprotein H,	<i>J. Virol.</i>	83	2020- 2024	2009
Ueda M., Yamate M., Anariwa D., Daidoji T., <u>Okuno Y.</u> , Ikuta K. and Nakaya T	Maturation efficiency of viral glycoproteins in the ER impacts the production of influenza A virus.	Virus Research	136	91-97	2008