

200808006B

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業：政策創薬総合研究事業

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 H 18 — 創薬 — 一般 — 024

平成 18 - 20 年度 総合研究報告書

研究代表者 黒澤 良和

平成 21 (2009) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告		
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		
黒澤良和	-----	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	10
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	11

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・免疫学研究部門・教授

研究要旨

本研究は、様々な疾患に対する治療薬としてのヒトモノクローン抗体を開発する目標を掲げて平成9年度から実施されている。第Ⅰ期（平成9・11年度）は、高度先端医療研究事業として研究課題「人工抗体ライブラリーの作製とその利用法開発」を行った。第Ⅱ期（平成12・14年度）は、高度先端医療研究事業、3年目から医薬安全総合研究事業として研究課題「各種疾患の治療に役立つヒト抗体の単離調製」を実施した。第Ⅲ期（平成15・17年度）には、医薬安全総合研究事業、2年目から医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合事業として「救急治療薬としてのヒト抗体調製に関する研究」を実施した。第Ⅳ期（平成18・20年度）には、医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合事業、2年目から創薬基盤推進研究事業として「治療薬としてのモノクローン抗体製剤化に関する研究」を行った。12年間にわたるプロジェクトであったが、主任研究者にとっては本プロジェクトに採用されたことをキッカケとして、研究室のプロジェクトをそれまでの基礎研究から応用研究へ大きく転換することとなった。

ボランティアから末梢血、臍帯血、扁桃、骨髄、脾臓等、Bリンパ細胞に富む臓器の提供を受け、mRNAを抽出した後、RT-PCR法で免疫グロブリンV領域遺伝子を増幅し、ファージディスプレイ系を用いて巨大なヒト抗体ライブラリーを作製する。それをヒト抗体のソースとしてスクリーニングし、様々なヒトモノクローン抗体を単離する。これが我々の基本技術であるが、この技術は1990年代初期に開発されまもなく20年経過しようとしているが、この技術を用いて薬として認可された例は未だRSV(respiratory syncytial virus)に対するシナジストとTNF α に対する抗体で関節リウマチの治療薬ヒューミラの二例のみである。

我々は12年間にわたって厚労省研究費の支援をうけたことにより、本技術に関しては世界的に見ても最も上手に使いこなし、更に最も様々な

性質のヒトモノクローン抗体の単離取得に成功したグループのひとつであると総括しているが、本厚生労働省研究費が本年度をもって一旦終了することもあり、この報告書では本技術（ファージ抗体ライブラリー作製を通したヒトモノクローン抗体単離技術）の長所と限界について総括する。

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、様々な生体分子に特異的かつ強固に結合するタンパク質分子であり、病原菌やウイルスに対する最も強力な生体防御分子として、進化上、円口類と軟骨魚のあいだで登場した。治療薬として使用された歴史も実に長い。様々な病原菌毒素、蛇毒素等に対する”特効薬”として馬抗血清は未だに使用されている。1975年にケラーとミルシュタインにより細胞融合によりモノクローン抗体作製技術が開発されて以降、抗体の用途は爆発的に広がった。癌に特異的に発現した分子（癌特異抗原）を標的にした”ミサイル療法”がとえられ、癌治療用抗体の開発が試みられた。初期の試みは全て失敗したが、その間にV領域をマウス由来、C領域をヒト由来とする”キメラ抗体作製技術”が開発された。続いて、V領域の中でも抗原結合部位に相当する CDR (complementarity-determining regions) のみをマウス由来、それ以外をヒト由来とする”ヒト化抗体作製技術”が開発され、抗体を薬としてヒト体内に投与しても、抗体が異種動物由来であることに基づく副作用が軽減されることになった。この2種類の技術は1980年代中ごろに開発されたが、1980年代終わりから1990年代初めにかけて、ヒトモノクローン

抗体を作る画期的な技術が開発された。ひとつは、ヒト抗体遺伝子を持つトランスジェニックマウスの作製である。さらに大腸菌中で正しい立体構造を示す抗体分子の発現に成功、PCR法を抗体V領域遺伝子の増幅に用いる、そしてファージディスプレイ系を用いて抗体ライブラリーを作製するという三種類の基本技術を組み合わせ”ヒト抗体ファージライブラリーの作製技術”が開発された。この技術開発は、ヒトモノクローン抗体を作ることを可能にし、様々な疾患に対して治療用抗体が続々と開発されることを予測させた。主任研究者らは、抗体に様々な変異を導入し抗原抗体反応を解析するために、ファージディスプレイ法の導入を図った。平成9年(1997)に厚生省(当時)が本プロジェクト研究を”人工血液”として募集し、主任研究者が採択されたことから、治療用ヒト抗体開発に本格的に取り組むこととなった、平成9年8月末のことである。

本プロジェクトでは、様々な疾患(主として感染症)に対する治療用ヒト抗体単離調製を可能にするために次の基本技術の導入及び開発を行った。ヒト抗体ライブラリー作製技術の導入、ライブラリースクリーニング技術の開発、単離抗体検定法の開発、ヒトモノクローン抗体大量調製技術導入、12年にわたるプロジェクトの展開でほぼ全ての工程は満足行く形で実施できるようになった。

B. 方法と結果

巨大なヒトモノクローン抗体作製技術

抗体は重(H)鎖と軽(L)鎖からできており、H鎖は遺伝子レベルでは、 V_H , D, J_H という3種類の断片化された遺伝子にコードされている。L鎖の方は、 V_L , J_L 2種類の遺伝子にコードされている。抗体V領域の多様性はこの断片化され、それぞれ複数化された遺伝子の組み合わせで作り出される。すでに全ての遺伝子配列が決定されていることから、作り出される抗体の配列は予測可能に見えるが、DNA断片の結合部位でヌクレオチドの部分切除が起こること、さらに V_H -D, D- J_H 結合部でランダムヌクレオチドの挿入が起こることから、実際の抗体V領域の配列は、独立に分化して生じるBリンパ球では全て異なると考えてよい。このことは重要であり、その結果マウスとヒトの抗体レパートリーを比較すると、(ほとんどの研究者には自覚されていないが)ヒトがBリンパ球の総数においてマウスより1000倍ほど多いことが大きな意味を持つてくる。個体で比較すれば、ヒトはマウスより1000倍ほど多様な抗体を作る能力がある。

抗体ライブラリー作製に際して、抗体V領域の多様なレパートリーをいかに構築するかに関して大きく”ヒト体内レパートリーを写し取る戦略”と”semi syntheticな配列を導入する戦略”が採用されている。主任研究者の経験では、semi syntheticな配列には無駄が多い(抗原結合力のない配列が高頻度に出来る)と思っている。V領域は抗原と結合力を持つことが重要であり、やたら多様な配列であつたら良いわけではない。

ヒトボランティア由来のBリンパ細胞を抗体V領域の配列のソースとすると、どの臓器を用いると優れたレパートリーの交代ライブラリが作れるかが問題になる。ボランティアとして協力を得られる場合、末梢血、負担が大変だが骨

髄、手術で摘出される(informed consentを含む手続きの上で)臓器として、扁桃、脾臓があり、そして臍帯血が考えられる。倫理的問題がクリアできた場合は、fetal liverも理論的にはあり得る。発表された論文から、この全てが使われた実績がある。主任研究者のグループが作製したAIMS(antibodies intended for multiple screenings)ライブラリーの場合、25名分の臍帯血、20名分の扁桃、2名の末梢血、1名の骨髄を集めて、その全てのBリンパ球を一緒にして用いられた。どれが一番優れたソースになるかpredictionは現在の知識では不可能である。

mRNAを抽出したのちRT-PCRでV領域遺伝子をH鎖L鎖ごとに増幅する。その後ファージディスプレイ発現ベクターの中にランダムに組み入れるが、作製する V_H 遺伝子群 V_L 遺伝子群の独立したクローン数、更にHとLを組み合わせて作製する抗体ライブラリーの独立したクローン数が極めて重要である。

主任研究者の意見では、最初に用いるBリンパ球自身の数にもよるが、それが 10^9 - 10^{11} と十分大きかった場合、 V_H ライブラリーの大きさはおなじく 10^9 - 10^{10} と十分大きくするべきであり、 V_L については 10^6 程度で十分であり(実際には数百種類でほとんどをカバーする)、重要なのはHとLを組み合わせた抗体ライブラリーのクローン数が 10^{10} - 10^{11} と更に大きいことである。最近の結果で、われわれのAIMSライブラリーから得られるヒトモノクローン抗体の性能(抗原結合力や様々なエピトープに結合する抗体が含まれること)の良さが認められ、それは何故かと理由を問われるが、ここで記した数値のほぼ全ての最大値を満たした形で作成したという答え以外に真の理由は定かでない。

ライブラリースクリーニング法

特定の抗原に対して特異的に結合し、更に高い結合力 (K_d 値でみて $nM-0.1nM$ オーダー) を示すクローンを得ようとする場合、まずそのような性質のクローンがスクリーニングするライブラリーに含まれていなければ決して単離出来ないことは自明である。AIMS ライブラリーの場合、独立した 10^{11} 個のクローンから構成されている。そこで標的抗原との関係で、目的とする性質の抗体が AIMS ライブラリーの中にどの程度の頻度で存在すると期待できるかを考える必要がある。ライブラリーをスクリーニングして抗体を単離するには、典型的なパニング法を例にすれば、抗原をプラスチックチューブもしくはプラスチックウェルに付着させたのち、抗体を発現したファージ粒子 (抗体ライブラリー) を混ぜて抗原抗体複合体を形成させ、洗浄してフリーファージを除いた後、複合体からファージ抗体 (ファージ粒子) を回収する。このスクリーニング操作を数回繰り返す。加えるファージ総数を 10^{14} 個用いれば、もし 10^{11} 個のクローンの中に一個しか存在しなかったクローンならば、それぞれのクローンを 1000 個加えたことになる。抗原抗体反応は平衡反応であるので、結合力が十分強ければ、そのような条件下でも回収で切る (クローン化できる) ことを期待できる。

最初、主任研究者らはそのように考えていたが、ファージ抗体ライブラリーをスクリーニングするにはさまざまな問題が起こりうることに気付いた。これは多かれ少なかれ、本技術を用いている全てのグループが経験している。パニング法で得られる抗体が、実に特定のクローンに偏っており、また結合力が低い (例えば K_d 値で見て μM から $0.1 \mu M$ 程度) ものが多い。この程度の K_d 値ならば、平衡反応の原理から考えて、抗原と結合を作る時間は長くて数十秒

程度であり、スクリーニング中にはずれてしまうはずである。そこでパニング法で単離されてくるクローンは、最初は抗原抗体複合体を作っていたがそのあと非特異的な吸着反応を起こしたものが大多数を占めていると考えるに至った。(もちろん証明されたわけではない)。

その結果、対象とする抗原の性質及び単離した抗体に求められる性質によって、抗体のソースとして用いる抗体ライブラリーを使い分け、またスクリーニング法も幾つか開発して使い分けることにした。

細胞膜上に存在する分子 (例えば癌特異抗原) を標的抗原として、それに結合する抗体 (癌治療用抗体) を得たい場合などは、抗体のソースとしては、AIMS ライブラリーでよいがスクリーニング法としてパニング法は適さない。そこで ICOS (isolation of antigen/antibody complexes through organic solvent) と名づけたスクリーニング法を開発した。一方、ウイルス中和抗体のように標的抗原に結合するのみならず、生物活性も必要な抗体を得たい場合、その抗原に対してナイーブな関係にある抗体の存在しか AIMS ライブラリーの中に存在を期待できない場合は、新たに抗体ライブラリーを作成することとした。

様々なヘルペスウイルスやインフルエンザウイルスに小児は良く感染して発病する。そこで小児科医は、このようなウイルス感染者に接触する機会も多く、その意味で heavily immunized の状態にあると期待できる。同様な意味で、様々な病原菌の分泌する毒素の対しては、トキシノイドで頻繁に免疫した経歴を持つ毒素研究ものがある。蛇毒 (とりわけハブ毒) に関しては、馬抗血清取得のため、蛇を飼育して蛇毒を分離調製する技術者がいる。このような人たちは、体の中に優れた中和活性を示す抗体

を有していると考えられた。その中和抗体を産生するBリンパ球が体のどこにいるかについて定かではないが、apheresisにより3リットル程度の有核細胞画分を採取すると10⁹程度のBリンパ球を採取できた。これを用いて上記した原則に基づき巨大抗体ライブラリーを作製する。このようにして作製した抗体ライブラリ中には、AIMSライブラリーとは大きく異なり、標的抗原に結合し、目的の生物活性を持つ抗体が高い頻度で存在する。そうするとスクリーニング法としてパニング法で十分である。

抗体の検定法の開発

ファージ抗体はスクリーニング途上は集団として扱うが、最後はファージミッド感染大腸菌としてピックアップするので最初からモノクローン抗体として扱うことになる。ピックアップしたクローンは、スクリーニングに用いた抗原に対するELISAで抗原に結合する抗体であることを確認したのちHL両鎖の塩基配列を決定する。AIMSライブラリーの場合、ファージ粒子上に発現する抗体の形としてFab型とsingle-chain Fv (scFv)型を準備しているが、本プロジェクト(感染症に対する治療用ヒト抗体の単離)では、すべてFab型を用いた。塩基配列に基づきクローンを分類する。そして各クローンについてウイルスが標的ならば、その中和活性(ウイルス粒子と抗体を混ぜることによりウイルスの感染力が失われるかどうか)を測定する。病原菌毒素が標的の場合は、中和活性は毒性が失われるかどうかで判定した。蛇毒の場合は、標的毒素因子が出血因子なのでその活性を阻害できるかがメルクマールである。ファージ抗体の場合、まずFab分子がファージ膜上タンパク質であるcp3分子(正確にはそのC端側半分)と融合した形で発現されており、ヘルパーファージを加え

ないで大腸菌を培養することにより培養液からFab-cp3分子として回収できる。Fab-cp3分子を含む培養上清(多くの夾雑物を含む状態)で生物活性が測定可能な場合と、精製したのち測定すべき対象に分かれる。Fab-cp3型抗体は、容易にFab-PP型抗体に変換できるようになっている。ここでPはProteinAの中のFc結合ドメイン一個を示している。Fab-PP型抗体はIgGカラムを用いて容易に精製できる。Fab型抗体は一価であり、通常抗体は二価であるが、本研究で対象としたウイルスや毒素は全て一価抗体の状態で中和活性を示した。二価にすることにより中和活性が変化しない場合と、数百から数千倍になる例(インフルエンザウイルス中和抗体の場合)があった。その違いは、中和活性が生まれる分子機構の差に由来すると推定された。

<病原菌毒素中和抗体>

AIMSライブラリー作製に際しては、手術で摘出した扁桃(20名分)が抗体遺伝子ソースとして含まれておりその提供者の多くが小児である。ジフテリア、破傷風、百日咳毒素に対しては、三種混合ワクチンが使用されており、これらの毒素に対する中和抗体がAIMSライブラリーに含まれていることは大いに期待できた。中和活性は、抗血清の検定に国際標準としても使われている動物(マウス)を用いた測定法が使われた。ジフテリア、破傷風両方ともに中和抗体単離に成功した。とりわけジフテリアに関しては一種類のIgG型抗体が、治療用抗体としても十分に強力であると判断できる活性を示した。

この病原菌毒素中和抗体の研究を通じて判明した事実には、結合できる(きわめて強い結合力)数多くの抗体の中で、中和力を示すものはごくわずかであるが、その活性は非常に強かった。中和活性を示すものと示さないものの差が何に

由来するか定かでない。

<ハブ毒中和抗体>

ハブやマムシに関しては、未だに馬抗血清が”特効薬”として使われている。それをヒトモノクローン抗体に将来的には換えたいという期待があり、ハブ毒出血因子 (HR1、HR2) に対する中和抗体単離を試みた。最初 AIMS ライブラリーを抗体ソースとした。AIMS ライブラリー作製に際して、Bリンパ球の提供を受けた人たちの経歴を考えても、その中の抗体はハブ毒に対しては完全にナイーブであると予想された。結局、中和抗体単離は不可能であった。ところが、馬抗血清調製のため多くのハブを数十年にわたって飼育しハブ毒素を分離精製し続け、更には生涯に5回ハブに咬まれた経験のあるヒトが、自分の血液を抗体ソースとして用いるべきだと申し出た。ここで特定の個人から apheresis による大量B細胞の採取、巨大抗体ライブラリーの作製、その個人が血液中に持つ特殊な性質の抗体のモノクローン抗体としての単離というアイデアが生まれた。この抗体単離戦略は画期的なものであり見事に当たった。ハブ毒出血因子 HR1 に対して強い阻害効果を示すモノクローン抗体の単離調製に成功した。

<各種ウイルス中和抗体>

最初 AIMS ライブラリーを抗体ソースにして中和抗体単離を試みたウイルスは、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)、インフルエンザウイルス、B型肝炎ウイルス、本厚生省研究費の対象ではなかったがロタウイルスである。それぞれ異なる結果を得て、我々にとってはファージ抗体ライブラリーの利用法についての様々な情報を得る良い経験となった。

VZV については、ウイルス膜上タンパクであ

り中和エпитープがあることが知られた gH 及び gB タンパク質のうち gH タンパク質を精製して抗原として用いた。結局、単離した 9 種類の抗 gH 抗体の中で 2 種類が非常に強いウイルス中和活性を示した。この研究で最も手間取ったステップは、gH タンパク質がウイルス粒子を破壊して可溶化した段階でその立体構造が変化することに由来した。そのためスクリーニングに際して抗原として用いたにも関わらず、gH 分子との結合性の解析が容易に進まなかった。結局 AIMS ライブラリーの中に強い中和活性を示す抗体が含まれていたことが幸いした。単離した VZV に対する二種類の抗体は治療用抗体としての十分な活性を示すと判断している。

ロタウイルスに対して強い中和活性を示すモノクローン抗体も AIMS ライブラリーの中から単離された。

B型肝炎ウイルスに対する中和抗体の単離には失敗した。AIMS ライブラリーの中にそのような抗体は含まれていなかった可能性が高い。この過程でB型肝炎から肝臓になり手術で摘出した脾臓（古くは肝臓摘出に際して脾臓も摘出された。その脾臓が長く冷凍保存されていた）から巨大抗体ライブラリーを作製したが、そのライブラリーからも抗B型肝炎ウイルス中和抗体は単離出来なかった。

インフルエンザウイルス中和抗体単離の努力はきわめて精力的に行ったが、単離した数百種類の抗体のほとんどすべてが抗 NP(nuclear protein)抗体であることが判明した。結局5個のみがヘマグルチニン(HA)に対する抗体単離に成功し、それらは全て強いウイルス中和活性を示した。この経験がその後大規模に行われたインフルエンザ中和抗体単離に大いに役立った。

<apheresis による大量のBリンパ球採取とい

う戦略>

主任研究者の研究室では、本プロジェクトと同時並行で「癌治療用抗体開発プロジェクト」が展開されている。そこでファージ抗体ライブラリーを抗体のソースとする研究戦略の長所と限界が次々と明らかになってきた。癌治療用抗体の標的である癌特異抗原は、ヒト由来タンパク質分子であり、癌で異常かつ大量に発現しているといっても、どこかの正常組織で発現している分子である。その意味で、元来自分のタンパクに対する抗体がヒトB細胞集団を抗体遺伝子ソースとして作製した抗体ライブラリーに含まれるか、更に含まれるとしても標的抗原に対してナイーブである抗体が十分に強い結合活性を持ちうるかという疑問が存在した。得られた結果は、ヒトB細胞集団（ナイーブ抗体レパートリー）のなかにヒトタンパク質に対する抗体は含まれており、またライブラリーサイズが十分に大きく、スクリーニング法が適当であれば、結合力が十分高い抗体を単離出来ることを示した。

一方、ウイルス中和抗体のように生物学的能力を含めると事情はまったく異なる。ファージ抗体ライブラリーをスクリーニングして抗体を得る原理は、その抗体が抗原として用いた分子に結合するかどうかだけが条件である。一方、ウイルスが抗体結合により中和されるかは、生物現象であり、明らかに体内で抗体は選別されている。

そのことがもっとも顕著に示されたのはインフルエンザウイルスに対する中和抗体単離実験であった。AIMSライブラリーからインフルエンザウイルス中和抗体を単離する試みは2-3年間様々な工夫をしながら続けたが、圧倒的な数存在する抗NP抗体にはばまれた。

ところが apheresis を用いる戦略に気付い

た後、小児科医の強力を得てウイルス中和抗体単離を開始すると数百種類のウイルス中和抗体単離が一挙に可能になった。これはヒト体内におけるインフルエンザウイルス中和抗体レパートリー解明と、またすべてのH3N2型ウイルスを中和できるヒトモノクローン抗体単離につながった。

C. 考察

1975年にケラーとミルスタインによって細胞融合によるモノクローン抗体作製法が発表された後、その技術は瞬間に世界中に広がり、また技術自身も改良が加えられて、実に精巧な技術となった。ファージディスプレイ技術を用いて抗体ライブラリーを作製し、それを抗体のソースとして様々なモノクローン抗体を単離調製することもそのような経過をたどると考えられた。実際はそうっていない。10数名の研究者を引き連れて、ここ10数年のわたってこの技術を使って様々なモノクローン抗体単離を行ってきた主任研究者から見ると、まず大きく3点ほどを指摘することが出来る。

まずは基本特許の存在とそのライセンス料金が高額に設定されていることである。本技術には、RT-PCR法により抗体V領域遺伝子を増幅する段階が入る。この技術は、WinterII特許と呼ばれる基本特許が存在する。（ただし1989年に申請でまもなく切れる。）そしてファージディスプレイ技術を用いてライブラリー化するにはMcCafferty特許で押さえられた技術が必要である（1991年に申請）。

それ以外に巨大な抗体ライブラリーを作製し維持することに関して、その規模を大きいままいかに保つかの困難性を挙げられる。主任研究者らは、ヒト抗体では 10^{10} - 10^{11} の独立

したクローン数からなるライブラリーを作製し、またその多様性を保ち続ける必要性を感じているが、もし研究室が大学院生を中心にして運営されているとすればこの条件を充たすことが実に向かない。これだけ多数の独立したクローンを扱うとなると、たとえばそのライブラリーが 10^6 の多様性を持っているか、または 10^{11} しかないかすら試すことすら困難であり一度作製した後それをキープしチェックする手段はない。唯一ライブラリーを保存する方法はDNAとしてであり、大腸菌をランスフェクションして時に応じて巨大ライブラリーを再生するのみである。質が悪くなくてもそれに気付くのに長期を要する。

世の中には幾つかの抗体ライブラリーが回っている。そこで「私のグループでも抗体ライブラリーは少し研究しました」という研究者は結構存在する。抗体ライブラリーを入手し、何かの抗原に対してスクリーニングすると、その抗原に結合する抗体はほぼ確実に単離できる。最初喜び、具体的に試してみてもその性能の悪さに失望してやめる。抗体に関しては、多くの研究者がマウスを免疫して得られた極めて性能の良いモノクローン抗体を使用した経験があり、それと比較する。抗体ライブラリーを使いこなし、マウスモノクローン抗体では得られない性能の抗体を単離するには様々なノウハウが必要である。

まもなくファージディスプレイ技術を用いた抗体ライブラリー作製を妨げていた特許が期限切れを迎えて、やはり多くのグループが使用できるようになると予測される。この報告書で総括したように、その長所と限界を熟知しマウスモノクローン抗体には出来ない目標を正しく設定した場合、本技術は間違いなく革命的な技術である。

D. 展望

本プロジェクトは、主として感染症に対して治療用ヒトモノクローン抗体を単離調製することを目標に掲げ手展開された。以上総括したように、性能としてはジフテリア、VZV、ハブ毒ですでに成功し、可能性のレベルまで広げれば、破傷風、ロタウイルス、サイトメガロウイルス、ボツリヌス毒素、インフルエンザウイルスに対する治療用抗体となりうるヒトモノクローン抗体の単離に成功している。特許問題は時間が解決するとして、今後の臨床試験実施も含めた創薬プロセスに多額の費用が必要で、それに引き換え市場規模が開発費に見合うほど大きく無いという問題に関してである。

抗体を数百グラムオーダーGMP(good manufacturing practice)レベルで調製することだけに絞れば、実はそれほど巨額が必要なのではなく数千万円規模で出来る。その資金を調達する必要がある。また候補抗体が実は元来ヒト体内に存在した抗体であることを考慮すれば、副作用のリスクはきわめて低い。そこで大学もしくは公的研究機関の医師主導で最初は臨床研究として、その効果を確かめる。現在の創薬プロセスは成功確率が極めて低い状態で、あまりに多くの費用をかけながら進められている。一個の薬の開発を成功させるのに平均 1300 億円かかっている現状は異常である。その開発費が全て新薬にかぶせられるから新薬が高騰する。この悪循環が繰り返されている。この状況を打破するためにも大学発で廉価の薬を作る成功例を生み出す必要がある。

E. 論文発表

1. K.Higo-Moriguchi, Y.Akahori, Y.Iba, Y.Kurosawa, & K.Taniguchi, Isolation of human monoclonal antibodies neutralizing rotaviruses. *J. Virol.* 78, 3325-3332 (2004).
2. 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)
3. 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)
4. G. Kurosawa, Y. Akahori, M. Morita, M. Sumitomo, N. Sato, C. Muramatsu, K. Eguchi, K. Matsuda, A. Takasaki, M. Tanaka, Y. Iba, S. Hamada-Tsutsumi, Y. Ukai, M. Shiraishi, K. Suzuki, M. Kurosawa, S. Fujiyama, N. Takahashi, R. Kato, Y. Mizoguchi, M. Shamoto, H. Tsuda, M.Sugiura, Y. Hattori¹, S. Miyakawa, R. Shiroki, K. Hoshinaga, N. Hayashi, A. Sugioka and Y. Kurosawa, Comprehensive screening for antigens overexpressed on carcinomas via isolation of human mAbs that may be therapeutic *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 105, 7287-7292 (2008)
5. Y. Akahori, G. Kurosawa, M. Sumitomo, M. Morita, C. Muramatsu, K. Eguchi, M. Tanaka, K. Suzuki, M. Sugiura, Y. Iba, A. Sugioka and Y. Kurosawa, Isolation of antigen/antibody complexes through organic solvent (ICOS) method. *BBRC.* 378, 832-835 (2009)
6. Y. Akahori, K. Suzuki, T. Daikoku, M. Iwai, Y. Yoshida, Y. Asano, Y. Kurosawa and K. Shiraki, Characterization of neutralizing epitopes of Varicella-Zoster virus glycoprotein H. *J. Virol.* 83, 2020-2024 (2009)
- F. 知的所有権の取得状況
 1. 特許取得
特に該当なし

雑誌

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, et al.	Isolation of a human monoclonal antibody with strong neutralizing activities against diphtheria toxin	Infect Immun	74	3682-3683	2006
N. Nakagawa, et.al.	Discovery of the neutralizing epitope common to influenza B virus Victoria group isolates in Japan	J. Clin. Microbiol.	44	1564-1566	2006
M.Kamada, 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, et al.	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, et al.	Isolation of therapeutic human monoclonal antibodies for Varicella-Zoster virus and the effects of light chains on the neutralizing activity	<i>J. Med. Virol.</i>	79	852-862	2007
G. Kurosawa et al. (30 authors)	Comprehensive screening for antigens expressed on carcinomas via isolation of human monoclonal antibodies that may be therapeutic	<i>Proc Natl Acad. Sci USA</i>	105	7287-7292	2008
Y. Asano	Clinicopathologic understanding and control of Varicella-Zoster virus infection	Vaccine	26	6487-6490	2008
Y. Akahori, et al.	Characterization of neutralizing epitopes of Varicella-Zoster virus glycoprotein H	J. Virol.	83	2020-2024	2009

Discovery of the Neutralizing Epitope Common to Influenza B Virus Victoria Group Isolates in Japan

Naoko Nakagawa,^{1*} Jun Suzuki,² Ritsuko Kubota,³ Shinzo Kobatake,² and Yoshinobu Okuno³

Department of Microbiology, Kobe Institute of Health, 4-6, Minatojima-nakamachi, Chuo-ku, Kobe 650-0046, Japan¹;
Diagnostics Research Laboratories, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 6-1, Takada-cho, Amagasaki 661-0963, Japan²;
and Department of Infectious Diseases, Osaka Prefectural Institute of Public Health,
3-69, 1-Chome, Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan³

Received 2 December 2005/Returned for modification 24 January 2006/Accepted 13 February 2006

Monoclonal antibody 9B2 possesses hemagglutination inhibition activity against all the 2002/2003 influenza B virus Victoria group isolates in Kobe, Japan, as well as representative strains isolated between 1987 and 1997. The 9B2 epitope localizes three-dimensionally in the vicinity of antigenic site A of the hemagglutinin molecule, and amino acid substitutions in this region affected the binding of 9B2.

Influenza B virus, along with influenza A virus H1 and H3 subtypes, is a causative agent of influenza epidemics in humans. Influenza B virus strains isolated since the mid-1980s are divided into two large lineages in a phylogenetic tree: one group is represented by B/Victoria/2/87, and the other is represented by B/Yamagata/16/88 (2). The B/Victoria group was predominant in the 1980s, while B/Yamagata became predominant in the early 1990s (2, 5, 6, 13, 15, 19). In the 1996/1997 season, there was a B/Victoria epidemic in Japan after almost 10 years' absence of the strain. Then, the next one was in the 2002/2003 season (8, 11, 12). The antigenicities of B/Victoria isolates in these seasons were distinct from those of the isolates in the mid-1980s. The first variants appeared in the 1996/1997 season with an extra oligosaccharide chain near the receptor binding region, and they became predominant in the 2002/2003 season (11). Then, the second variants appeared with variation in the conserved epitope of B/Victoria isolates, at the "tip" of the hemagglutinin (HA) molecule (12). The "tip" consists of the antigenic site of influenza AH3 virus HA, previously defined as site B. Site B and site A (a protruding loop region) of the HA molecule have been reported to be the highly immunodominant regions of influenza A and B viruses (1, 17). We developed monoclonal antibodies (MAbs) 10B8 and 10D7, whose epitopes had been conserved at site B of B/Victoria isolates since the mid-1980s until the 1996/1997 season (7, 9). However, the 2002/2003 isolates in Kobe, Japan, were divided into three groups according to their reactivities to 10B8 and 10D7. The first group, represented by B/Kobe/1/2003, was of the classical variety, which reacted to 10B8 and 10D7. The second group, represented by B/Kobe/2/2003, reacted to 10D7 but not to 10B8 and showed an amino acid substitution at site B (D164E). There was one isolate, B/Kobe/28/2003, which did not react either to 10B8 or to 10D7. It showed another amino acid substitution at site B (N165K) (12) (Fig. 1).

We obtained MAb 9B2, which has hemagglutination inhibition (HI) activity against all the 2002/2003 B/Victoria isolates,

and investigated the common neutralizing epitopes among them.

Virus strains B/Kobe/1/2003, B/Kobe/2/2003, and B/Kobe/28/2003 were isolated from clinical specimens. Nucleotide sequences for the HA gene were previously reported (DDBJ accession no. AB081570, AB126836, and AB126841, respectively) (12). B/Victoria/2/87, B/Nagasaki/1/87, B/Aichi/5/88, B/Guangdong/5/94, and B/Shangdong/7/97 were utilized as representative B/Victoria strains, while B/HongKong/22/89, B/Mie/1/93, and B/Yamanashi/166/98 were utilized as representative B/Yamagata strains. MAb 9B2 was obtained by immunizing mice with B/Kobe/28/2003. Ascitic fluids of mice injected with hybridoma cells were used as sources of MAbs. Human sera, collected from three individual adults after the 2002/2003 season, were utilized. The results of HI tests are expressed as the reciprocal of antibody dilution (14). Escape mutants were induced by incubating virus with 9B2, by a modification of the method previously described (1, 4, 10). The nucleotide sequences of the escape mutants were analyzed as described previously (8–12).

MAb 9B2 has HI activity against all the 2002/2003 isolates, as well as the representative B/Victoria isolates (Fig. 1). In order to examine the 9B2 epitope, escape mutants were induced. Two mutants (B/Kobe/1/2003-V51 and -V52) (DDBJ accession no. AB232144 and AB232145, respectively) were induced by incubating a classical strain, B/Kobe/1/2003, with 9B2. In HI tests, they reacted to 10B8 and 10D7 as a parental strain but did not react to 9B2. In addition, four mutants (B/Kobe/28/2003-V1 through -V4) (DDBJ accession no. AB232146 through AB232149, respectively) were induced by incubating an N165K variant, B/Kobe/28/2003, with 9B2. They did not react to any of the three MAbs in the HI tests. Between two parental strains, B/Kobe/1/2003 and B/Kobe/28/2003, there was only one amino acid difference (N165K) in the HA1 region (12). B/Kobe/1/2003-V51 and B/Kobe/28/2003-V1 showed the same single amino acid substitution (N75D), while B/Kobe/1/2003-V52 showed another single amino acid substitution (P77T). The others had double amino acid substitutions: B/Kobe/28/2003-V2 had R118G and H122R, V3 had N75D and R118G, and V4 had N75D and H116R. The HI titers of the variants against human sera were four to eight times lower than those of their parental strains. The

* Corresponding author. Mailing address: Department of Microbiology, Kobe Institute of Health, 4-6, Minatojima-nakamachi, Chuo-ku, Kobe 650-0046, Japan. Phone: 81-78-302-6260. Fax: 81-78-302-0894. E-mail: nknkgw@h2.dion.ne.jp.

	9B2 Epitope	"Tip"	HI Titers					
			9B2	10B8	10D7	Human	Sera	
B/Kobe/1/2003	75 77 116 122 163 170	N I P H I R L S T H N D N N K T A T	12800	12800	800	320	80	80
B/Kobe/1/2003-V51	D - - - - -	- - - - -	<100	12800	800	80	20	20
B/Kobe/1/2003-V52	- - - - -	- - - - -	<100	12800	1600	80	20	20
B/Kobe/28/2003	- - - - -	- - - - -	25600	<100	<100	640	80	80
B/Kobe/28/2003-V1	D - - - - -	- - - - -	<100	<100	<100	80	20	10
B/Kobe/28/2003-V2	- - - G - - R - - K - - - -	- - - - -	<100	<100	<100	150	10	20
B/Kobe/28/2003-V3	D - - - - -	- - - - -	<100	<100	<100	80	10	10
B/Kobe/28/2003-V4	D - - R - - - -	- - - - -	<100	<100	<100	80	10	10
B/Kobe/2/2003	- - - R - - - N - - E - - - -	- - - - -	3200	<100	800	640	160	160
B/Victoria/2/87	T - - - - -	- - - - -	12800	12800	1600			
B/Nagasaki/1/87	T - - - - -	- - - - -	12800	25600	1600			
B/Aichi/5/88	T - - - G - - - N - - - -	- - - - -	12800	12800	1600			
B/Guangdong/5/94	- - - - -	- - - - -	12800	12800	1600			
B/Shangdong/7/97	- - - - -	- - - - -	12800	12800	800			
B/Yamagata strains								
B/HongKong/22/89	T T - - - - Q - del - del - - -	- - - - -	<100	<100	<100			
B/Mie/1/93	T T - - - - Q - del - del - - -	- - - - -	<100	<100	<100			
B/Yamanashi/166/98	T T - - - - Q - del - del - - -	- - - - -	<100	<100	<100			

FIG. 1. Comparison of deduced amino acid sequences of the HA1 region and HI titers of the clinical isolates. Sequences of amino acid residues of the 9B2 epitope and the "tip" are shown. These sequences are compared with those of B/Kobe/1/2003. The results of HI tests are expressed as the reciprocal of antibody dilution (14). "del" means an amino acid deletion.

amino acid substitutions at the 9B2 epitope modulated the viral antigenicities.

The amino acid sequences of the HA1 molecule of the influenza B virus were compared to those of A/Aichi/2/68 and numbered according to the A/Aichi/2/68 sequence for ease of reference to the structure of the AH3 HA molecule (1, 3). Thus, amino acid 75 is referred to as 78, 77 as 80, 116 as 121, 118 as 123, and 122 as 125. Figure 2 shows the three-dimensional structure of the influenza A virus H3 HA molecule, as determined by Wilson et al. (18). Recently, Tung et al. (16) reported with their energy-minimized predicted structure that the overall shape of the influenza A virus HA molecule is preserved in that of influenza B virus. Thus, though the identified amino acid substitutions of influenza B virus are predicted based only on the sequence alignments, it is speculated that all the above amino acid residues are situated three-dimensionally close to site A, though they do not belong to site A. With influenza AH3 virus HA, four antigenic sites (A to D) were reported in the HA1 molecule. In addition, the substitutions of other amino acid residues with naturally occurring variants were reported at the same time. They include the residues 78, 83, 122, and 126. These residues were suggested to form the additional antigenic sites such as site E and affect site A (17). In contrast, only two immunodominant antigenic sites, site A and site B, have been discussed with regard to influenza B virus (1, 9, 10). It is noteworthy that the 9B2 epitope did not belong to either of the above antigenic sites.

Nucleotide sequences of representative strains were obtained from the DDBJ database, and amino acid residues at the 9B2 epitope (75 to 77 and 116 to 122) and the "tip" (163 to 170) are shown in Fig. 1. Though some B/Victoria isolates show one or two amino acid differences at the 9B2 epitope, all reacted to 9B2 to the same degree, as well as to 10B8 and 10D7, while B/Yamagata isolates did not react to any of the antibodies. Thus, the epitopes have been conserved in B/Victoria since the mid-1980s but not in B/Yamagata. Now, it should be noted that D164E variants represented by B/Kobe/

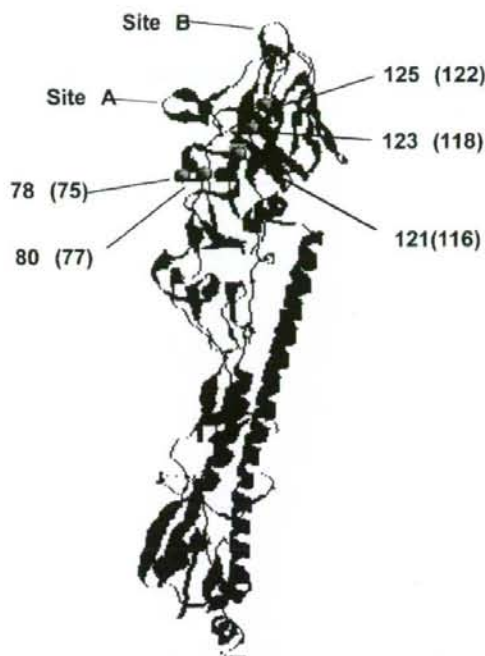


FIG. 2. Three-dimensional model of the influenza A virus HA molecule. The data for the secondary structure of the HA molecule of A/Aichi/2/68 (code 2VIU) were obtained through the Internet with Rasmol software. A view of the HA molecule from the front is shown. Residues 78, 80, 121, 123, and 125 are marked. Numbers in parentheses show the residues of influenza B virus which correspond to the above residues of influenza A virus.

2/2003 reacted to 9B2 with four-times-lower HI titers. They showed two amino acid differences (H116R and T121N), and it is suggested that the established human immunity began to induce naturally occurring escape mutants. With another amino acid substitution, viral antigenicities will be further affected. The mutants may appear as new variants in future epidemics. Then, the scale of the epidemics will be positively modulated. This information will be of benefit to the management of public health, especially from the point of view of selecting suitable strains for vaccines.

We thank T. Iwamoto (Kobe Institute of Health) for valuable advice in sequencing.

REFERENCES

- Berton, M. T., C. W. Naeve, and R. G. Webster. 1984. Antigenic structure of the influenza B virus hemagglutinin: nucleotide sequence analysis of antigenic variants selected with monoclonal antibodies. *J. Virol.* 52:919-927.
- Kanegae, Y., S. Sugita, A. Endo, M. Ishida, S. Senya, K. Osako, K. Nerome, and A. Oya. 1990. Evolutionary pattern of the hemagglutinin gene of influenza B viruses isolated in Japan: cocirculating lineages in the same epidemic season. *J. Virol.* 64:2860-2865.
- Krystal, M., R. M. Elliot, E. W. Benz, Jr., J. F. Young, and P. Palese. 1982. Evolution of influenza A and B viruses: conservation of structural features in the hemagglutinin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:4800-4804.
- Lambkin, R., L. McLain, S. E. Jones, S. L. Aldridge, and N. J. Dimmock. 1994. Neutralization escape mutants of type A influenza virus are readily

- selected by antisera from mice immunized with whole virus: a possible mechanism for antigenic drift. *J. Gen. Virol.* **75**:3493-3502.
5. Lindstrom, S. E., Y. Hiromoto, H. Nishimura, T. Saito, R. Nerome, and K. Nerome. 1999. Comparative analysis of evolutionary mechanisms of the hemagglutinin and three internal protein genes of influenza B virus: multiple cocirculating lineages and frequent reassortment of the NP, M, and NS genes. *J. Virol.* **73**:4413-4426.
 6. McCullers, J. A., G. C. Wang, S. He, and R. Webster. 1999. Reassortment and insertion-deletion are strategies for the evolution of influenza B viruses in nature. *J. Virol.* **73**:7343-7348.
 7. Nakagawa, N., A. Maeda, T. Kase, R. Kubota, and Y. Okuno. 1999. Rapid detection and identification of two lineages of influenza B strains with monoclonal antibodies. *J. Virol. Methods* **79**:113-120.
 8. Nakagawa, N., R. Kubota, A. Maeda, T. Nakagawa, and Y. Okuno. 2000. Heterogeneity of influenza B virus strains in one epidemic season differentiated by monoclonal antibodies and nucleotide sequences. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3467-3469.
 9. Nakagawa, N., R. Kubota, T. Nakagawa, and Y. Okuno. 2001. Antigenic variants with amino acid deletions clarify a neutralizing epitope specific for influenza B virus Victoria group strains. *J. Gen. Virol.* **82**:2169-2172.
 10. Nakagawa, N., R. Kubota, T. Nakagawa, and Y. Okuno. 2003. Neutralizing epitopes specific for influenza B virus Yamagata group strains are in the "loop." *J. Gen. Virol.* **84**:769-773.
 11. Nakagawa, N., R. Kubota, A. Maeda, and Y. Okuno. 2004. Influenza B virus Victoria group with a new glycosylation site was epidemic in Japan in the 2002-2003 season. *J. Clin. Microbiol.* **42**:3295-3297.
 12. Nakagawa, N., R. Kubota, and Y. Okuno. 2005. Variation of the conserved neutralizing epitope in influenza B virus Victoria group isolates in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **43**:4212-4214.
 13. Nerome, R., Y. Hiromoto, S. Sugita, N. Tanabe, M. Ishida, M. Matsumoto, S. E. Lindstrom, T. Takahashi, and K. Nerome. 1998. Evolutionary characteristics of influenza B virus since its first isolation in 1940: dynamic circulation of deletion and insertion mechanism. *Arch. Virol.* **143**:1569-1583.
 14. Okuno, Y., K. Tanaka, K. Baba, A. Maeda, N. Kunita, and S. Ueda. 1990. Rapid focus reduction neutralization test of influenza A and B viruses in microtiter system. *J. Clin. Microbiol.* **28**:1308-1313.
 15. Rota, P., T. R. Wallis, M. W. Harmon, J. S. Rota, A. P. Kendal, and K. Nerome. 1990. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. *Virology* **175**:59-68.
 16. Tung, C.-S., J. L. Goodman, H. Lu, and C. A. Macken. 2004. Homology model of the structure of influenza B virus HA1. *J. Gen. Virol.* **85**:3249-3259.
 17. Wiley, D. C., I. A. Wilson, and J. J. Skehel. 1981. Structural identification of the antibody-binding of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature (London)* **289**:373-378.
 18. Wilson, I. A., J. J. Skehel, and D. C. Wiley. 1981. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3Å resolution. *Nature (London)* **289**:366-373.
 19. Yamashita, M., M. Krystal, W. M. Fitch, and P. Palese. 1988. Influenza B virus evolution: co-circulating lineages and comparison of evolutionary pattern with those of influenza A and C viruses. *Virology* **163**:112-122.

Short communication

Rapid detection and typing of influenza A and B by loop-mediated isothermal amplification: Comparison with immunochromatography and virus isolation

Masahiro Ito^{a,*}, Masahiro Watanabe^b, Naoko Nakagawa^a,
Toshiaki Ihara^c, Yoshinobu Okuno^d

^a *Kobe Institute of Health, 4-6 Minatogima-nakamachi, Chuo-ku, Kobe 650-0046 Japan*

^b *Suzuka Children's Clinic, 1-652 Akinaga-cho, Suzuka 510-0258, Japan*

^c *Department of Pediatrics, Mie National Hospital, 357 Kubota-cho, Tsu 514-0124, Japan*

^d *Osaka Prefectural Institute of Public Health, 1-3-69 Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan*

Received 19 December 2005; received in revised form 3 March 2006; accepted 7 March 2006

Available online 17 April 2006

Abstract

A reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay was established for the detection of influenza A virus H1 and H3 subtype strains and influenza B virus strains specifically. The total procedure from RNA extraction to virus typing was completed within 3 h. In terms of specificity, the representative AH1, AH3 and B strains were detected only by strain-specific primers respectively. No cross-detection was observed. In terms of sensitivity, virus was detected at a minimum concentration of 10 ffu/ml. Eighty-three nasopharyngeal aspirates obtained from children diagnosed clinically with influenza were tested by the RT-LAMP assay, along with commercially available immunochromatography rapid diagnostic tests and by virus isolation. Virus was isolated from 78 samples (94%) and the subtype was determined by the hemagglutination inhibition test. Although it took at least 3 days, the detection sensitivity was the best of the three methods. With two rapid assays, the detection sensitivity of the RT-LAMP assay (85.5%) was higher than that of immunochromatography tests (75.9%). In addition, the RT-LAMP assay can be used to differentiate emerging influenza virus subtypes by selecting appropriate primer sets.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Influenza virus; Loop-mediated isothermal amplification (LAMP); Immunochromatography test; Virus isolation

Influenza is an important infectious disease that is responsible for considerable morbidity and mortality in elderly and compromised individuals and others (Choi and Thacker, 1981a, b). In addition, influenza encephalopathy kills infants within 1 or 2 days after onset when they are not appropriately treated (Morishima et al., 2002). It has been reported that neuraminidase inhibitor, Oseltamivir, was effective when administered within 24 h after onset of fever (Kawai et al., 2003). Thus, rapid and sensitive diagnostic tools are required. Once diagnosed, Oseltamivir is administered. Although virus isolation from clinical specimens is a good standard method, it takes at least 3 days before virus detection and typing. Immunochromatography rapid diagnostic tests are easy to undertake at the bedside and it takes

only half an hour to reach a diagnosis. However, the sensitivity is not sufficient, especially when used within 12 h after fever onset (Hata et al., 2004). Therefore, the reverse transcriptase (RT)—loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay was applied for the detection of influenza virus. LAMP is a novel nucleic acid amplification method in which reagents react under isothermal conditions with high specificity, efficiency and rapidity (Notomi et al., 2000). The specificity is extremely high because four primers are used recognizing six distinct regions on the target DNA. It is faster than the polymerase chain reaction because amplification is carried out under isothermal conditions. LAMP has been used for rapid diagnosis of infectious agents, bacteria such as *Mycobacterium tuberculosis* (Iwamoto et al., 2003) and DNA viruses such as herpes viruses (Ihira et al., 2004; Okamoto et al., 2004). RT-LAMP has been used for the detection of RNA viruses such as the SARS virus (Fujino et al., 2005; Thai et al., 2004).

* Corresponding author. Tel.: +81 78 302 6195; fax: +81 78 302 0894.
E-mail address: masahiro_ito@office.city.kobe.jp (M. Ito).

RT-LAMP was applied for the detection of influenza virus A subtype 1 (AH1), subtype 3 (AH3) and influenza B virus (B). The total procedure was completed within 3 h. A/Beijing/262/95, A/NewCaledonia/201/99, A/Kobe/39/02 and A/Kobe/42/02 were utilized as AH1; A/Panama/2007/93, A/Sydney/51/97, A/Kobe/40/02 and A/Kobe/97/03 were used as AH3; B/Kobe/1/03, B/Kobe/1/04 and B/Kobe/2/04 were used as B. RNA was extracted from 140 μ l of virus stock with a QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN), and the pellet was suspended in 60 μ l of distilled water. Five microliter was subjected to RT-LAMP. The RT-LAMP primers were designed in the HA region of AH1 (A/Kobe/42/02) and AH3 (A/Kobe/186/04), and the NP region of B (B/Shangdong/77/99) by a software program for LAMP primer design (Eiken Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan). The sequences of the primer pairs were as follows, AH1: (F3)GCTACCATGCCAACAACACT, (B3)AGGACCATGATTCCTTGG, (FIP)CTGTCTCAATGAGGTGACAGAGCGACACTGTTGACACAGTAC, (BIP)AGCCCCACTACAATTGGGTATTTCGATCTGGGTTCC, AH3: AH3(F3)AGAGTTCCTCAACAGGTGGA, (B3)GGATGAGGCAACTAGTGACC, (FIP)AGCCATCACACTGAGGTCTCGGACAGTCCCTCATCAGA, (BIP)TTTGTGAACGCAGCAAAGCCTGAGGCATAATCCGGCACATC, B: (F3)ACGGTATCAACACTGGGACA, (B3)TGCGGGTCTGTTTCTTTTGG, (FIP)GCAAGGGTTGCTGGTCTGATGAATTGACAAAGCACCGGAGA, (BIP)CCCACCGAGCAACAAACGAACCCGACATCAGCTTCACTGC. For the RT-LAMP reaction, a LAMP mixture was made in 25 μ l of reaction mixture containing 40 pmol (each) of FIP and BIP, 5 pmol (each) of F3 and B3, 1.4 mM of each deoxynucleoside triphosphate, 0.8 M betatine, 20 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 8 mM MgSO₄, 0.1% Tween 20, 0.5U of AMV reverse transcriptase, 8U of Bst DNA polymerase, and 5 μ l of sample RNA. The reaction mixture was incubated at 63 °C with the real-time turbidimeter LA320-C. Within 60 min, AH1 strains turned positive with AH1 primers, AH3 strains with AH3 primers and B strains with B primers, respectively. No cross-detection was observed (Fig. 1A–C). Next, the titration assay was performed. Focus forming units (ffu) were determined by peroxidase-anti-peroxidase staining methods as described previously (Nakagawa et al., 1999; Okuno et al., 1990). The virus containing 1×10^6 ffu/ml was diluted to 10-fold serially, and subjected to RT-LAMP. Virus was detected at a minimal concentration of 10 ffu/ml (Fig. 2).

Finally, clinical specimens were tested. There were influenza AH3 and B epidemics in the 2004/2005 season in Japan. Nasopharyngeal aspirates were collected from 83 patients (46 boys and 37 girls), who were between 6 months and 11 years old (mean: 6.7 years old). They were outpatients at the Suzuka Children's Clinic, and were diagnosed clinically with influenza, based on symptoms including high fever, malaise, nonproductive cough and sore throat. Nasopharyngeal aspirates were tested immediately with the Capillia Flu A+B (Becton, Dickinson, Tokyo, Japan) for the immunochromatography test. The aspirates were then diluted three times with Eagle's minimal essential medium, centrifuged at 3000 rpm for 30 min. One hundred and forty microliter of the supernatant was subjected to RNA

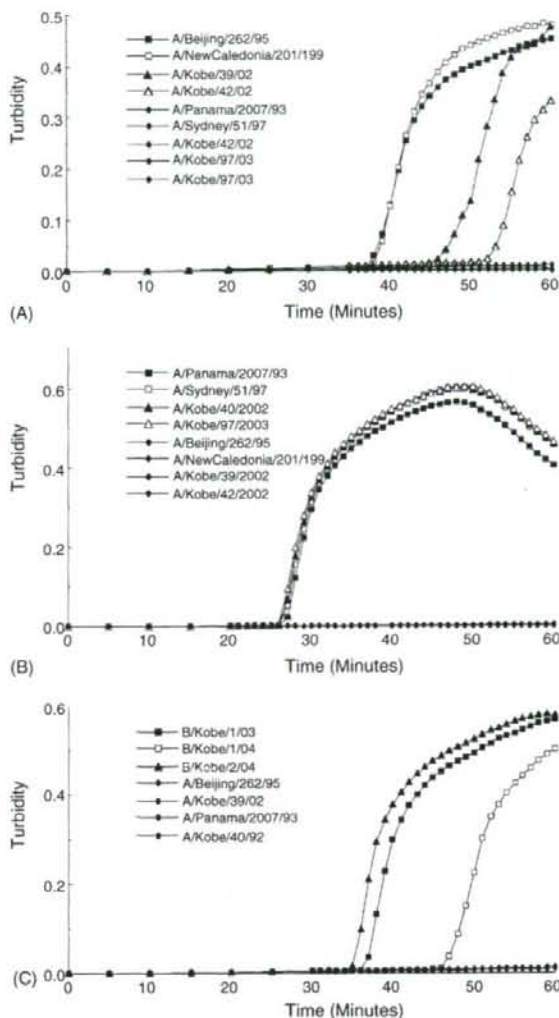


Fig. 1. Influenza virus detection by RT-LAMP. Turbidity caused by the existence of magnesium pyrophosphate, the amplification by-products was detected by the real-time turbidimeter LA320-C (Y-axis). X-axis shows time (min). (A) Detection of AH1. Four AH1 strains and 4 AH3 strains were subjected to RT-LAMP using primers specific for AH1. (B) Detection of AH3. Four AH1 strains and 4 AH3 strains were subjected to RT-LAMP using primers specific for AH3. (C) Detection of B. Three B strains, 2 AH1 strains and 2 AH3 strains were subjected to RT-LAMP using primers specific for B.

extraction for RT-LAMP, while 300 μ l of supernatants were inoculated on Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells in 24-well plates and incubated at 35 °C. When cytopathic effects were observed, the supernatants were harvested and HI tests were undertaken in order to identify the virus subtypes. The results of 83 samples are shown in Table 1. Detection was highest by virus isolation (78 samples, 94%), followed by RT-LAMP (71 samples, 85.5%) and the lowest was with the immunochromatography test (63 samples, 75.9%). Of the 20 samples, which were negative by the immunochromatography test, 10 were

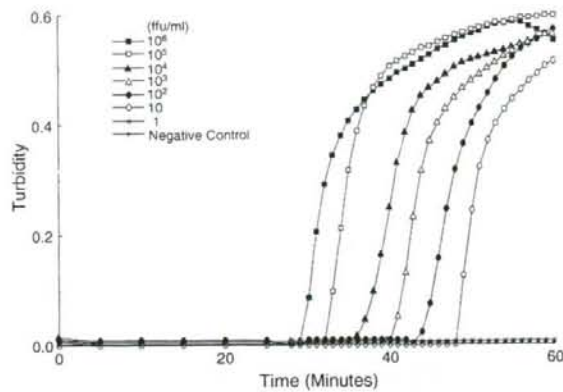


Fig. 2. Influenza virus detection by RT-LAMP. Sensitivity in the detection of AH3. 1×10^6 ffu/ml of AH3 was diluted 10-fold serially, and subjected to RT-LAMP. Minimum essential medium was used as negative control.

detected as positive (3 influenza AH3 and 7 B) by RT-LAMP and 16 (5 AH3 and 11 B) were detected as positive by virus isolation. Four samples were negative by all three methods. To the contrary, one positive sample in the immunochromatography test were detected as negative by RT-LAMP and virus isolation, and the possibility of a false positive case was taken into consideration. Of the 12 samples, which were negative by RT-LAMP, 7 (3 AH3 and 4 B) were positive by virus isolation (data not shown). RT-LAMP AH3 positive samples were all detected AH3 positive by virus isolation, and RT-LAMP B positive samples were all detected B positive by virus isolation. No false positive reactions or no cross-detection reactions were observed. RT-LAMP was more sensitive and specific than the immunochromatography test.

Thus, RT-LAMP was demonstrated to be a rapid, sensitive and reliable diagnostic method. In addition, influenza virus detection and subtyping were performed simultaneously by RT-LAMP. In the observation period at the Suzuka Children's Clinic, only influenza AH3 and B were detected from the specimens. However, if there were any AH1-infected patient during an AH3 epidemic, it would be easy to distinguish him by RT-LAMP. Recently, the number of global travelers has increased rapidly. When the patients in the clinic are diagnosed as influenza A-positive by the immunochromatography test, and were found to have just returned from the countries where human avian

Table 1

The results of the immunochromatography test (IC), RT-LAMP and virus isolation of 83 nasal aspirates

	Total	RT-LAMP		Virus isolation			
		Positive	Negative	Positive		Negative	
				AH3	B		AH3
IC A positive	27	25	0	2	26	0	1
IC B positive	36	0	36	0	0	36	0
IC negative	20	3	7	10	5	11	4
Total	83	28	43	12	31	47	5

influenza cases have been reported, rapid virus subtyping is essentially required. In this case, RT-LAMP serves as a useful method. Furthermore, influenza infection caused by new virus subtypes such as AH5 or AH9 may emerge at any time (Tran et al., 2004; Ungchusak et al., 2005), and RT-LAMP is applicable for the detection of other subtypes. Thus, RT-LAMP has the advantage of not only being a rapid and sensitive diagnostic method for influenza virus, but it also serves as a rapid virus subtyping tool.

References

- Choi, K., Thacker, S.B., 1981a. An evaluation of influenza mortality surveillance, 1962–1979. I. Time series forecasts of expected pneumonia and influenza death. *Am. J. Epidemiol.* 113, 215–226.
- Choi, K., Thacker, S.B., 1981b. An evaluation of influenza mortality surveillance, 1962–1979. II. Percentage of pneumonia and influenza deaths as an indicator of influenza activity. *Am. J. Epidemiol.* 113, 227–235.
- Fujino, M., Yoshida, N., Yamaguchi, S., Hosaka, N., Ota, Y., Notomi, T., Nakayama, T., 2005. A simple method for the detection of measles virus genome by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *J. Med. Virol.* 76, 406–413.
- Hata, A., Asada, J., Mizumoto, H., Uematsu, A., Takahara, T., Iida, M., Yoshida, T., Nagafuji, H., Hata, D., 2004. Appropriate use of rapid diagnostic testing for influenza. *J.J.A. Inf. D.* 78, 846–852.
- Ihira, M., Yoshikawa, T., Enomoto, Y., Akimoto, S., Ohashi, M., Suga, S., Nishimura, N., Ozaki, T., Nishiyama, Y., Notomi, T., Ohta, Y., Asano, Y., 2004. Rapid diagnosis of human herpesvirus 6 infection by a novel DNA amplification method, loop-mediated isothermal amplification. *J. Clin. Microbiol.* 42, 140–145.
- Iwamoto, T., Sonobe, T., Hayashi, K., 2003. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex, *M. Avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2616–2622.
- Kawai, N., Iwaki, T., Kawashima, I., Satoh, T., Tsuchimoto, T., Shigematsu, T., Kondoh, K., Maeda, T., Hirotsu, N., Kunishima, O., Kashiwagi, S., 2003. Effectiveness of Oseltamivir on influenza and influencing factors: age of patients, type of influenza virus and timing of initial administration. *J.J.A. Inf. D.* 77, 423–429.
- Morishima, T., Togashi, T., Yokota, S., Okuno, Y., Miyazaki, C., Tashiro, M., Okabe, N., Collaborative Study Group on Influenza-Associated Encephalopathy in Japan, 2002. Encephalitis and encephalopathy associated with an influenza epidemic in Japan. *Clin. Infect. Dis.* 35, 512–517.
- Nakagawa, N., Maeda, A., Kase, T., Kubota, R., Okuno, Y., 1999. Rapid detection and identification of two lineages of influenza B strains with monoclonal antibodies. *J. Virol. Methods* 79, 113–120.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28, e63.
- Okamoto, S., Yoshikawa, T., Ihira, M., Suzuki, K., Shimokata, K., Nishiyama, Y., Asano, Y., 2004. Rapid detection of varicella-zoster virus infection by a loop-mediated isothermal amplification method. *J. Med. Virol.* 74, 677–682.
- Okuno, Y., Tanaka, K., Baba, K., Maeda, A., Kunita, N., Ueda, S., 1990. Rapid focus reduction neutralization test of influenza A and B viruses in microtiter system. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1308–1313.
- Thai, H.T.C., Le, M.Q., Vuong, C.D., Parida, M., Minekawa, H., Notomi, T., Hasebe, F., Morita, K., 2004. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification of method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1956–1961.
- Tran, T.H., Nguyen, T.L., Nguyen, T.D., Luong, T.S., Pham, P.M., Nguyen, V.C., Pham, T.S., Vo, C.D., Le, T.Q., Ngo, T.T., Dao, B.K., Le, P.P., Nguyen, T.T., Hoang, T.L., Cao, V.T., Le, T.G., Nguyen, D.T., Le, H.N.,

Nguyen, K.T., Le, H.S., Le, V.T., Christine, D., Tran, T.T., de Jong, M., Schltz, C., Cheng, P., Lim, W., Horby, P., Farra, J., the World Health Organization International Avian Influenza Investigative Team, 2004. Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *N. Engl. J. Med.* 350, 1179–1188.

Ungchusak, K., Auewarakul, P., Dowell, S.F., Kiphatat, R., Auwanit, W., Puthavathana, P., Uiprasertkul, M., Boonnak, K., Pittayawonganon, C., Cox, N.J., Zaki, S.R., Thawatsupha, P., Chittaganpitch, M., Khontong, R., Simmerman, J.M., Chunsuttiwat, S., 2005. Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1). *N. Engl. J. Med.* 352, 333–340.

Isolation of Therapeutic Human Monoclonal Antibodies for Varicella-Zoster Virus and the Effect of Light Chains on the Neutralizing Activity

Kazuhiro Suzuki,^{1,2} Yasushi Akahori,² Yoshizo Asano,³ Yoshikazu Kurosawa,² and Kimiyasu Shiraki^{4*†}

¹Institute for Antibodies Ltd., Toyooka, Aichi, Japan

²Institute for Comprehensive Medical Science, School of Medicine, Fujita Health University, Toyooka, Aichi, Japan

³Department of Pediatrics, School of Medicine, Fujita Health University, Toyooka, Aichi, Japan

⁴Department of Virology, University of Toyama, Sugitani, Toyama, Japan

Therapeutic antibodies against varicella-zoster virus (VZV) were isolated from a combinatorial library of human antibodies using a phage-display system. Purified gH:gL was used to screen the library, and approximately 300 clones were isolated. Eight kinds of Fab-cp3-fused molecules (clones 10, 24, 36, 60, 94, 120, 192, and 431) neutralized viral infectivity. After conversion of Fab-cp3 antibodies to the Fab-protein A form, the concentrations of antibodies showing 50% inhibition of plaque formation ranged from 0.12 to 400 nM. Clones 10, 24, 94, 120 and 431 neutralized wild strains without showing strain specificity and were further converted to human IgG₁. Two clones (24 and 94) were confirmed to react with gH:gL and VZV-infected cells. IgG of clone 94 prevented spreading of infected cells. Thus these antibodies exhibited the typical phenotype of anti-gH antibody. Next the contribution of light (L) chains to neutralizing activity was analyzed by comparing the effect of L chain of clones 10, 120, and 192 with the identical heavy chain on their neutralizing activity. The L chain in the Fab form of clone 94 was replaced by L chains of clones 10, 24, 36, and 60 and the neutralizing activity of these replaced antibodies was weaker than that of the prototype clone 94. When the kappa-L chain of clone 94 was replaced by the lambda-L chain of clone 24, this antibody possessed neutralizing activity despite the kappa-lambda class change. Thus, human antibody library against VZV-gH has been established and characterized the role of the L chain in VZV-neutralizing activity to engineering further an antibody with stronger neutralizing activity. **J. Med. Virol. 79:852–862, 2007.**

© 2007 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: varicella-zoster virus; human; monoclonal antibody; antibody; neutralization

INTRODUCTION

Interest in passive antibody therapy has been growing since development of various technologies to produce genetically modified antibody molecules [Brekke and Sandlie, 2003; Waldmann, 2003; Casadevall et al., 2004]. In the case of infectious diseases, however, only one monoclonal antibody, named Palivizumab, against a respiratory syncytial virus (RSV) has been approved by the U.S. Food and Drug Administration [Johnson et al., 1997]. Passive immunization has proved to be effective against various infectious diseases and has been used for a long time. However, all antibody preparations are derived from the serum of immunized animals or immune human donors. Because such sera are composed of various antibodies against many epitopes on the target, rigorous clinical examinations are required to develop monoclonal antibodies for clinical purposes. In the present study, human monoclonal antibodies have been isolated for therapeutic use against varicella-zoster virus (VZV).

Varicella is a benign and uncomplicated disease in healthy children but a life-threatening illness in

[†]Professor and Chairman.

*Correspondence to: Kimiyasu Shiraki, Department of Virology, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan. E-mail: kshiraki@med.u-toyama.ac.jp

Accepted 31 January 2007

DOI 10.1002/jmv.20838

Published online in Wiley InterScience

(www.interscience.wiley.com)