

VNA 産生 EBV 形質転換 B 細胞のスクリーニングとクローニング

EBV による不死化後、形質転換された細胞は 2-3 週間、96 穴プレートにより培養し、3-4 日毎に培地を交換した。細胞が完全に増殖した後、培養上清を集めスクリーニングに用いた。EBV 形質転換細胞ウェルから計 5,380 の培養上清を得て、CVS 株に対する中和活性を RFFIT によりスクリーニングした。CVS の増殖を完全に抑制した陽性ウェルを限界希釈法によりクローニングした。この手順を最低 2 回繰り返し単クローンとして樹立した。

樹立した HuMAbs の生化学的な性状解析

樹立した HuMAbs の抗原に対する解離平衡定数 (K_d) は VeroRab ワクチンを用いて、50% 最大結合を示す抗体濃度から Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いて算出された。即ち、PBS で 100 $\mu\text{g/ml}$ に希釈した VeroRab 溶液を 96 穴プレートに固相した。PBS-T (0.1% Tween-20) で段階希釈した HuMAb を加え 37°C で 1 時間反応させた。PBS-T で洗浄後、二次抗体として POD 標識されたヒツジ抗ヒト IgG (MP Biomedicals, OH, USA) もしくは、POD 標識されたヒツジ抗ヒト IgA+G+M (Kirkegaard & Perry Laboratories, MD, USA) を用い 37°C、1 時間反応させた。最後に、BD OptEIA (BD Bioscience-Discovery Labware, NJ, USA) を加え、マイクロプレートリーダーにより O.D 450nm の値を測定した。

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) は Laemmli らによる方法をもとに行った。イムノブロット解析のた

めに Mock 感染細胞と CVS 株感染細胞はサンプルバッファー (62.5mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 25% glycerol, 0.1% bromophenol blue) で溶解し、メルカプトエタノールで処理し変性させた。試料は 12% SDS-PAGE にて泳動した。泳動後、分離された蛋白はフッ化ポリビニリデン (PVDF) 膜に転写し、スキムミルクでブロッキングした。PVDF 膜は、HuMAb と 4°C で一晩反応した。TBS-T (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7.6, 0.1% Tween-20) で 3 回洗浄後、POD 標識ヒツジ抗ヒト IgG 抗体もしくは、POD 標識ヒツジ抗ヒト IgA+G+M 抗体と 4°C で 4 時間反応した。PVDF 膜は ECL kit-WB detection system (GE Healthcare, Little Chalfont, England) で処理し、X 線フィルムに露光した。

RABV 粒子に対する補体依存的な溶解

RABV 粒子に対する補体依存的な溶解 (virolysis) を確認するため、100 TCID₅₀ の CVS 株と 2 段階希釈した HuMAbs を 0.3% モルモット補体存在下もしくは非存在下で反応させた。37°C で 90 分間反応させ、残存する感染性のあるウイルス数を TCID₅₀ 法で決定した。比較のため、我々の研究室に保存され、中和活性を有する抗狂犬病 G 蛋白に対するマウス MAb, RV44 (IgG1), 8-8 (IgG2a) と 4-12 (IgG1) を使用した。

HuMAb 耐性変異株の構築と Antigenic site の解析

樹立された HuMAb により認識される中和エピトープを明らかにするために、我々は、HuMAb に対する耐性変異株を作成した。2,000 FFU/ml の CVS 株と中和

力価が 1-3 IU/ml の HuMAb とを 37°C で 90 分間反応後、この反応液を単層培養した Chick embryo-related (CER)細胞に接種した。37°C、5%CO₂ で 1 時間反応後、ウイルスと抗体を除去し、10%FSC-MEM /1% Agarose (Seaplaque, Lonza Rockland, Inc., Rockland, ME, USA)の重層培地にて 37°C、5%CO₂ で培養した。培養数日後、単一プラックから耐性株を単離し、BHK-21 細胞にて 37°C、5%CO₂ で 3 日間増殖した。この操作を数回繰り返し、親株と比較し HuMAb に対して耐性のあったものを選択し、使用まで-80°Cにて保存した。

耐性変異株のウイルス RNA は単一プラックに由来する感染細胞から Isogen (Nippongene, Toyama, Japan)を用いて抽出し、cDNA は Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) Reverse Transcriptase によって oligo dT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いて合成した。G 蛋白 ORF 上の変異部位を明らかにするため、それぞれの cDNA を PCR 法にて増殖した。使用したプライマーは [N terminal fragment; Sense primer: 5'-ATC ACT TGT TTA CCT CTG GAG-3'/ Anti sense primer: 5'-ACT TAT ACA GGC CTC TTT CAT C-3', Internal fragment; Sense primer: 5'-TAT AAC TGG AAG ATG GCC GGT G-3'/ Anti sense primer: 5'-ACT CCA TAT GTT GCT GGA G-3', C terminal fragment; Sense primer: 5'-CCA TCA TGA CCA CCA AGT C-3'/ Anti sense primer: 5'-GGC CTT CAC AGT CTG ATC TC-3'] である。それぞれの PCR 産物は QIAquick PCR purification kit もしくは Gel extraction kit (QIAGEN, MD,

USA)で精製・抽出し、BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied biosystems, CA, USA)で反応後、塩基配列は Applied Biosystems 3130 genetic analyzer (Applied biosystems)によって解析した。

マウスチャレンジ試験

段階希釈した HuMAb は等量の CVS 株脳乳剤 (約 500 LD₅₀)と 90 分間反応させた。反応後、反応液 (0.3 ml/mouse)は 6 週齢の雌 ddY マウス (各群 n=10, Kyudo, Fukuoka, Japan)に脳内接種し、14 日間その生死を観察した。比較対照として、段階希釈した ERIG 処理した CVS 株脳乳剤も上述の方法によりマウスに接種した。この研究は大分大学の倫理委員会の承認を得て行った。

【研究結果】

RABV 中和抗体の樹立と性状解析

VNA 産生 EBV 形質転換 B 細胞のスクリーニングは、培養上清を用いて RFFIT によりスクリーニングした (Table 1)。実験 1 では、ボランティア 1 から得られた PBL を用い、最初のスクリーニングで 1,320 の中、11 ウェルが VNA 陽性であった。しかし、クローニング中に抗体活性が消失し、抗体の産生を維持することができなかった。ボランティア 2 は高い VNA 値を示したにもかかわらず (7.30 IU/ml)、その PBL の形質転換効率は非常に低く、陽性細胞を得ることができなかった (実験 2)。最終的に、再度ボランティア 1 から得た 3,850 ウェルの EBV 形質転換 B 細胞のうち 2 つの陽性ウェルを抗体産生陽性ウェルとしてスクリーニングし、2 回の限界希釈法によってクローニングし、最終

的に2つのVNA産生クローンを樹立した(No.254と4D4)。

HuMAb No.254はIgG3型で軽鎖のアイソタイプは λ であった。培養上清中の濃度は0.6 mg/mlであった。4D4はIgM型(μ)で軽鎖のアイソタイプは κ であった。培養上清中の濃度は4 μ g/mlであった。No.254のKd値は 3.7×10^{-7} M, 4D4は 2×10^{-8} Mであった(Fig.1)。イムノプロット解析の結果, どちらのMAbもCVS株のG蛋白とは反応せず(data not shown), No.254と4D4は構造エピトープを認識している可能性が示された。

その他狂犬病ウイルスに対するHuMAbsの中和力価

一般的にPEPの際には, 狂犬病の発症を防ぐにはVNA値だけではなく, RABVを幅広く中和できることが, その抗体に求められる。樹立されたモノクローナル抗体の中和能を評価するため, 我々はいくつかのRABV固定毒株に対する中和力価を決定した。それぞれのHuMAbの中和力価を算出するためWHO国際標準と比較し, mgあたりのIUを求めた。No.254の培養上清中の中和活性はCVS, ERA, HEP-FluryとNishigahara株それぞれに対して, 33.3 IU/mg, 264.2 IU/mg, 209.8 IU/mgそして209.8 IU/mgであった。4D4の培養上清中の中和力価はCVS株に対して125 IU/mg, Nishigahara株に対して1.0 IU/mgであった(Table 2)。しかし, もっとも高い濃度の4D4と反応させた場合においてもERAとHEP-Fluryに対するその中和活性を算出することはできなかった。

No.254および4D4によって認識され

るAntigenic siteの同定

No.254および4D4が認識する抗原エピトープを同定するため, 我々は中和耐性変異株を作成した。CVS株はNo.254もしくは4D4と反応させBHK-21細胞にて培養し, プラッククローニングを数回繰り返した。最終的に3つのNo.254耐性クローンと2つの4D4耐性クローンを得た。これら耐性変異株のG遺伝子塩基配列をダイレクトシーケンスにて決定したところ, 得られたクローンはそれぞれ同一の塩基配列であった。Fig.2にRABVのG蛋白上の主なAntigenic siteとNo.254と4D4耐性変異株の推定アミノ酸配列を示す。これら耐性変異株をそれぞれNo.254es, 4D4esと名づけた。No.254esはG蛋白上の198番目のアミノ酸がリジンからグルタミン酸に置換しており(Lys198 to Glu198), これはAntigenic site IIに位置していた。4D4esは242番目のアミノ酸がAla242からVal242に置換していた。4D4の中和エピトープはAntigenic site IとVIの間に位置していた。

樹立したHuMAbsのin vitroにおける中和活性の性状解析

5倍段階希釈したNo.254(16 μ g/ml)もしくは4D4(4 μ g/ml)を2,000 FFU/mlのCVS株と反応させ, 反応液を単層培養したNA細胞にそれぞれ接種した。In vitroにおけるHuMAbの中和力価はFRNT₅₀により求めた。CVS株に対するFRNT₅₀はNo.254が68 ng/mlで4D4は30 ng/mlであった(Fig.3)。臨床において受傷部位へのRIGの浸潤は, 直接的にウイルスを中和するだけではなく, 補体の活性化を介したvirolysisをも起こしうる。補体活性化の点においてはIgGとIgMはその他のイ

ムノグロブリンに比べ優れていることがよく知られている。Table 3 では、ウイルス中和に対する補体の影響を、補体処理後、残存した CVS 株の感染力をモルモット補体存在下もしくは非存在下とで比較することで測定した。No.245 の TCID₅₀ に必要な抗体濃度は、補体存在下では 0.016 µg/ml あったのに対して、補体非存在下では同程度の virolysis が起こるのに必要な抗体濃度が 5 倍高い濃度であった。No.254 とは異なり、中和活性を有するその他マウス MAb, RV44 (IgG1), 8-8 (IgG2a) と 4-12 (IgG1) は、補体を加えたことによる virolysis の増強は確認できなかった。4D4 は IgM 型であるにもかかわらず、補体依存性の virolysis の増強が確認されなかった。

***In vivo* マウスチャレンジ試験**

Fig.4 に示すように、500 LD₅₀ の CVS 株を脳内接種したマウスは投与 4 日後から徐々に死亡し、投与 10 日後には全てのマウスが死亡した。しかし、CVS 株と ERIG (最終濃度 1 IU/ml) とを反応させたものでは RABV 投与でも 70% の生存率を示し、これは ERIG 濃度に依存していた。HuMAb No.254 処理群では、抗体濃度に依存したマウス生存率を示した。2 IU/ml の No.254 と 500 LD₅₀ の CVS 株の反応液を接種した群では投与 7 日目までマウスは死亡しなかった。投与 8 日目に最初のマウス死亡し、その後は徐々に生存率が低下した。最終的なマウス死亡率は 50% であった。ERIG 同様に 2 IU の HuMAb を致死量の CVS 株脳乳剤に処理しているにもかかわらず、ERIG に比べ、マウス生存率は低かった。これは、No.254 が G 蛋白上のひとつの Antigenic site しか認識し

ないからであると考えられた。

4D4 は抗体濃度が低く (おおよそ 4 µg/ml), 4D4 処理した CVS 投与群では接種後、効果的な生存期間の延長は確認できなかった。

Discussion

狂犬病は予防が可能にもかかわらず、WHO の報告によると世界中で年間約 55,000 人もの人が命を落としている。推定によると、その 85% にあたる 31,000 人はアジア諸国におけるものとされている。狂犬病による死亡数を減少させるには、ワクチンや RIG 投与を含む PEP、動物の管理と狂犬病に対する意識・教育に関わる経済負担が大きく影響する。いくつかの国ではその生物学的特性、財政的な利点により狂犬病の根絶に成功している。近年、アジア諸国における研究によると、PEP を受ける患者は、その死亡者数の 400-1,000 倍にもあたるとも言われている。現在、HRIG と ERIG は狂犬病動物から曝露を受けた場合に受動免疫を賦与する目的で投与されている。これら RIG には、血液由来成分であるが故に血清病や生産量の問題が付いてまわる。

RABV G 蛋白を中和する MAb はこれらの問題の解決し、RIG の代替品として使用可能である。しかし、ここで最も重要なことは狂犬病が致死的な疾患であること考慮すべき点である。万が一、MAb が抗原エピトープに一致しない場合やウイルスを中和できない場合、命取りになりかねない。それ故、PEP に使用される抗体にはすべての G 蛋白上の Antigenic site を包括し、かついかなる街上毒株の RABV に対しても反応性があることが必要である。このような状況下で、もっとも期待さ

れる戦略は既知のエピトープを認識する数種のMAbを含むカクテルを作成することである。Dietzscholdらによって報告されたHuMAbはRABVを幅広く中和できることが期待されている。この抗体は安定した抗体産生能を得るため、RABVワクチン接種ボランティアのEBVトランスフォーマントとマウス骨髄細胞腫細胞株のヘテロハイブリドーマにより樹立された。この抗体(MAb57)はSO57と改名され、のちにPER.C6発現システムに改良され、最終的にヒトIgG1型のCR57抗体と名付けられた。CR57はリニア構造を認識し、G蛋白上のAntigenic site Iをエピトープとして認識する。一方で、Kramerらはファージディスプレイ法によりRABVワクチン接種ボランティアからsingle-fragment of variable chain (scFv)ライブラリーを構築した。彼らは21のscFvクローニングし、それらを完全型のヒトIgG1型に変換した。最終的に、このうちのCR4098と名付けられた抗体は26株中24株の幅広い街上市毒株のRABVを認識できた。CR4098に対する耐性変異株を用いた解析により、この認識エピトープはAntigenic site IIIであることが示された。これらHuMAbCR57/CR4098のカクテルは代表的な26株の街上市毒株のRABVを中和できた。さらに、街上市毒株を感染させたSyrian hamstersにCR57/CR4098を投与すると、濃度依存的にその生存率を維持した。最近、Phase Iの臨床試験が米国とインドで行われ、その安全性と耐容性が評価された。

以前、我々は効果的な治療の開発のため、RABVワクチン接種ボランティアから得たFabライブラリーとファージディスプレイ法を組み合わせることによりヒト

FabとIgG抗体を樹立する試みを行った。しかしながら、*in vitro*および*in vivo*において十分に中和能を示す抗体は得られなかった。そこで、今回我々は、RABV中和能を有する完全型の抗体の単離を試み、EBVトランスフォーメーション法を用いてRABVに対して中和活性のあるHuMAbの樹立に成功した。また、この抗体は、これまでに報告されている抗体とは異なるAntigenic siteを認識することが明らかとなった。

ウイルス粒子の外被蛋白に存在する抗原部位は抗体のみならず、宿主分子の細胞受容体とも相互作用する。先行研究によると、RABV G蛋白に対するマウス由来のMAbは、ほとんどの場合がAntigenic site II (70%)、次にsite III(20%)を認識することが報告されたい。Antigenic site IIはG蛋白上の2つの別々の部位を繋ぐ構造をとることが予想されている(Fig. 2)。特に、代表的な耐性変異株の主なアミノ酸の置換はAntigenic site IIの前半部34-42番目と後半部198-200番目に位置する。これまで、これら耐性変異株の198番目のアミノ酸の変異にはリジンからグルタミン酸もしくはメチオニンに置換されたものが報告されている。今回得られたNo.254に対する耐性変異株は198番目のアミノ酸がリジンからグルタミン酸に置換していた。イムノプロット解析によりNo.254と4D4は、どのRABVのG蛋白とも反応しないことから、これらのHuMAbはG蛋白の高次構造を認識すると予想された。更なるHuMAb耐性変異株のエピトープ解析によってNo.254の認識エピトープはG蛋白上のAntigenic site II(親水性に富む領域)の198番目のアミノ酸であると明らかとなった。Antigenic

site II は Genotype 1 の RABV において保存性が高く (Fig.5A), 特に 198 番目のアミノ酸はその他リッサウイルスにおいても保存されている (Fig.5B)。それ故, このような Antigenic site II を認識する MAb は RABV の中和に有用であり, No.254 は広い範囲の RABV に効果があると予想される。

一方, 4D4 によって認識される Antigenic site は 242 番目のアミノ酸に位置し, これは G 蛋白上の Antigenic site I と VI の間に位置する新規のエピトープ (疎水性に富む領域) であった。G 蛋白の 333 番目のアミノ酸の変異は致死性に関与することがよく知られているが, それとは別に, Nishigahara 株の 164-303 番目のアミノ酸は神経毒性に関与するもうひとつの重要な部位であり, とりわけ 242, 255 と 268 番目のアミノ酸はその病原性の増強に関与している。我々は No.254 と同様, 4D4 は PEP にとって有用であると期待している, 望ましい PEP にはいくつかの MAb をカクテル製剤として混合し組み合わせることが必要だと考える。

EBV 形質転換細胞由来の HuMAb は EB ウイルスの混入の危険性があるため抗体医薬品として実用的な臨床への応用にはふさわしくない。その上, EBV 形質転換細胞は完全なクローニング後に, しばしばその抗体産生能が低下してしまうこともある。そこで, 我々は, 安定的で抗体産生能を高く維持するために真核生物の発現システムによってそれを構築することに取り組んでいる。予備には No.254 と 4D4 の V_H と V_L をクローニングし, 真核細胞ベクターにてサブクローニングし, CHO 細胞へ遺伝子導入を試みた。最終的に No.254 は元の IgG3 から IgG1 へ変換

され, 高い産生能を示した (2.0 mg/ml)。 (data not shown) 4D4 の性状は, G 蛋白上の新規の Antigenic site を認識していることから特徴的であった。しかしながら, その活性は実用化するには不十分であった。 *In vitro* における抗体産生濃度はとても低く, 補体依存的な中和活性の増強は確認できなかった。4D4 を産生している EBV トランスフォーマントは完全型の 5 量体 IgM を発現できないことなどが原因のひとつとして考えられる。加えて, IgM は咬傷部への透過性が低い可能性があり, IgM から IgG へ転換する必要があるかもしれない。

結論として, 我々は EBV 形質転換細胞を用いて 2 つの新規の HuMAb を樹立した。 HuMAb No. 254 は G 蛋白の Antigenic site II を認識し, マウスにおいて ERIG と同程度の効果があった。 HuMAb 4D4 は G 蛋白上の新規の Antigenic site を認識していた。これらのことは, PEP において, より幅広い RABV を中和するために多種多様な MAb が有用であることを示している。

Table 1. Backgrounds of blood donors

Exp.	Donor	History of Vaccination	VNA titer	Number of positive well producing VNA (%)
1	A (Japanese, male, 49-year-old)	PCEC-K (HEP-Flury strain)	1.77 IU/ml	11/1,302 (0.8)
2	B (Thai, female, 46-year-old)	VeroRab: PVRV (PM strain) Rabipur: PCEC (LEP-Flury strain)	7.30 IU/ml	10/228 (0)
3	A (Japanese, male, 49-year-old)	PCEC-K (HEP-Flury strain)	1.77 IU/ml	2/3,850 (0.05)

VNA: Rabies virus Neutralizing antibody

Table 2. Neutralizing ability of huMAbs against RABV strains

	CVS	ERA	HEP -Flury	Nishigahara
No. 254	33.3	264.2	209.8	209.8
4D4	125	—	—	1

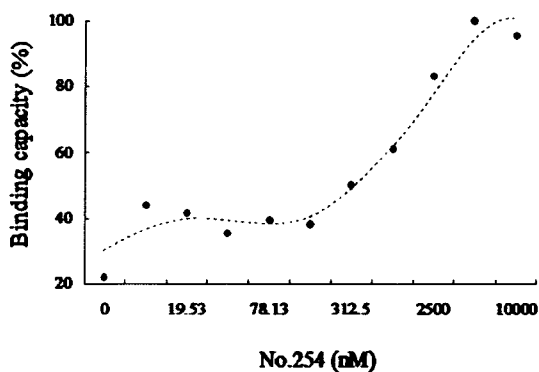
Compared with the WHO international standards and expressed as International Unit (IU/ mg)

Table 3. Effect of complement on the neutralization of RABV infectivity

	Human MAb		Murine MAb		
	254 (IgG3)	4D4 (IgM)	RV44 (IgG1)	8-8 (IgG2a)	4 -12 (IgG1)
Complement -	0.08	0.067	1.04	15.6	0.04
Complement +	0.016	0.04	0.67	7.8	0.025

Figure 1

A



B

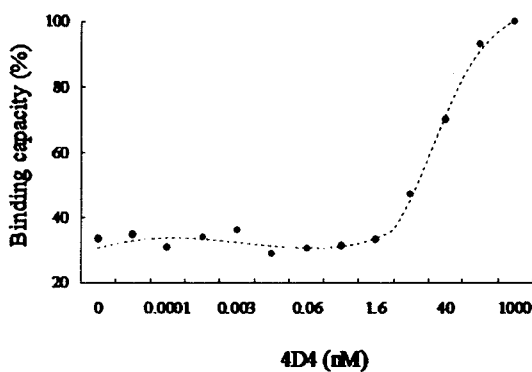


Figure 2

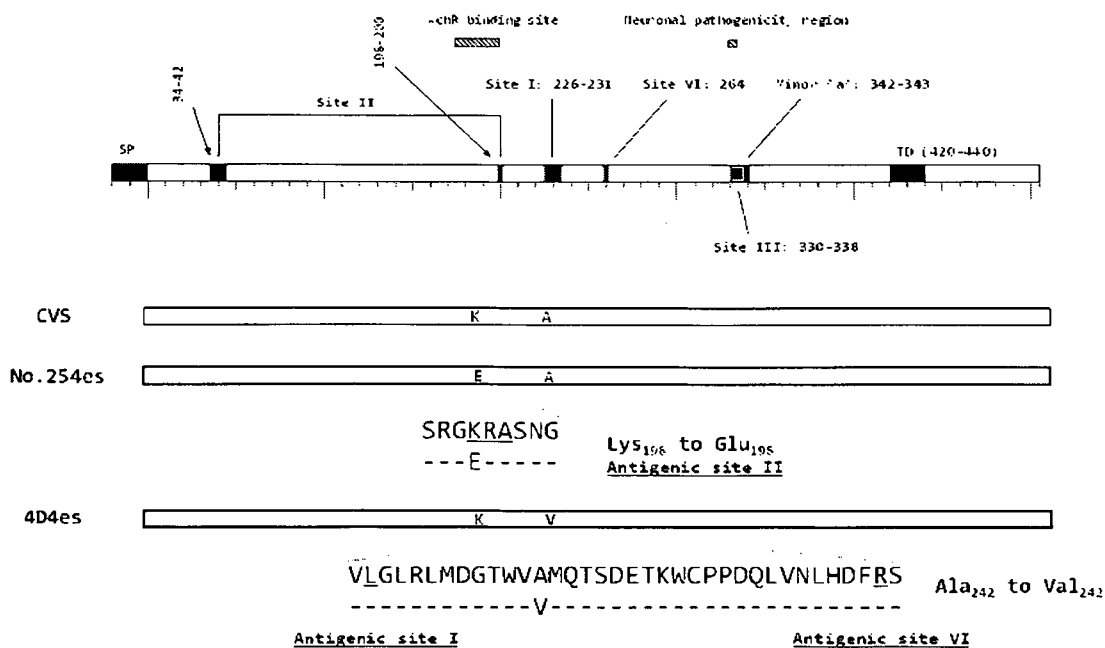


Figure 3

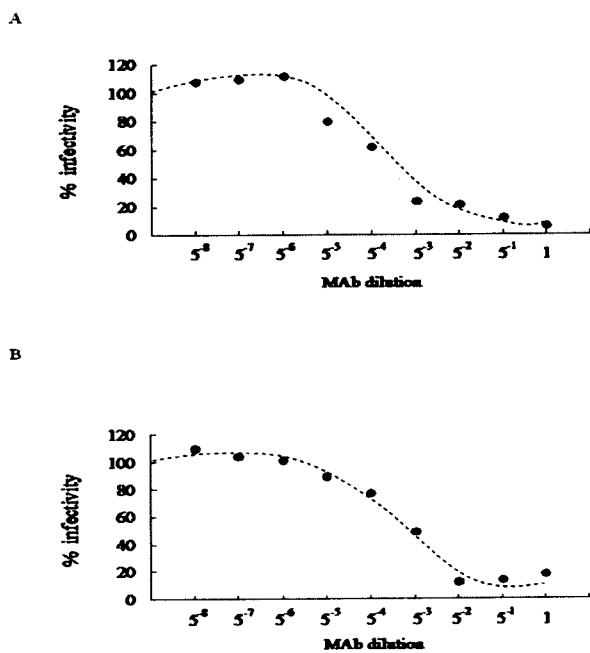


Figure 4

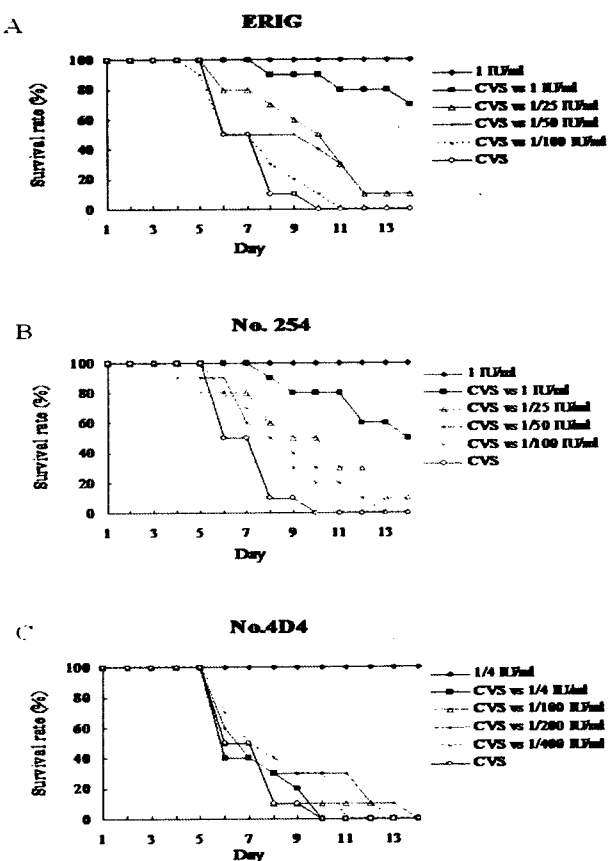


Figure 5A. Amino acid sequence of antigenic site II and spanning from 232 to 241 aa region in RABV isolates.

Country/ Host/ Year/ Accession #	Antigenic site II		Ala242
	34-42aa	198-200aa	232-241aa
CVS (Parent strain)	GCTNLSGFS	KRA	GLRLMDGTWVAMQTSD
Escape mutant strain	-----	E--	-----V-----
China Dog_DQ849072	-----	---	-----I----
South Korea_DQ076103	-----	---	-----
Thailand Human_AY219000	-----	---	-----A-I----
Malaysia Human_AF325487	-----	---	-----A-I----
Myanmar Dog 1999_EU086129	-----	---	-----A-I----
Vietnam Dog 2001_EU086159	-----	---	-----A-I----
Philippines Dog 2004_EU086155	-----	---	-----A-I----
Laos Dog 1999_EU086152	-----	---	-----A-I----
Indonesia Dog 2001 AB115921	-----	---	-----L----
India Human EF437215	-----	---	-----
India Dog 1999_AY987478	-----	---	-----N
Sri Lanka Dog_EU086156	-----	---	-----A-I----
Nepal Dog 1998_EU086153	-----	---	-----
Afghanistan Dog_2004_EU086128	-----	---	-----
Morocco Human_AF325469	-----	---	-----
Iran Human_AF325472	-----	---	-----
Poland Human_AF325465	-----	---	-----
Hungary Human_AF325462	-----	---	-----
France Fox 1991_AF401286	-----	---	-----
Nigeria Human_AF325479	-----	---	-----
Cameroon Dog_FJ545675	-----	---	-----R----
Cote d'Ivoire Dog_FJ545684	-----	---	-----R----
Canada Arcticfox_RVU11736	-----	---	-----
Brazil Human_AB110657	-----	---	-----
Brazil Fox_AB247437	-----	---	----V----I---A--
Brazil Bat_AB247428	-----	-K-	-----SI-----
SHBRV Silver-haired bat_RVU52946	---S-----	-K-	-----SI-----

Figure 5B. Amino acid sequence of antigenic site II and spanning from 232 to 241 aa region in Lyssaviruses.

Genotype	Strain/ Accession #	Antigenic site II		Ala242
		34-42aa	198-200aa	232-241aa
1	CVS (Parent strain)	GCTNLSGFS	KRA	GLRLMDGTWVAMQTSD
	Escape mutant strain	-----	E--	-----V-----
2	Lagos bat virus_EU293110	--GTS-V--	-KS	----F----ISFTRPE
3	Mokola_NC006429	--NAE-S-T	-K-	-I--F----SFTKP-
4	Duvenhage virus_EU293119	---T-TP--	-K-	-----S--SLPQVN
5	EBLV1_NC_009527	---T-TP--	-K-	-M-----S--SL-KTE
6	EBLV2_NC_009528	---T-TV--	-K-	-M-----S--SI-NH-
7	Aravan virus_EF614259	---T-TA--	-K-	-----S--SL-KTE
	Irkut virus_EF614260	---T-TA-N	-K-	-M-----S--SL-RA-
	Khujand lyssavirus_EF614261	---T-----	---	-----S--SI-NHE
	ABLV NC_003243	---S-----	-K-	----L--S--SI-NHE
	WCBV_EF614258	Y--TE-SIT	-LV	-I--V----MSFRY-E

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shiota S, Mannen K, Matsumoto T, Yamada K, Yasui T, Takayama K, Kobayashi Y, Khawplod P, Gotoh K, Ahmed K, Iha H, Nishizono A

Development and evaluation of a rapid neutralizing antibody test for rabies. *Journal of Virological Methods*, 2009 ; 161 : 58-62

2. 総説

西園 晃：神経系の再興感染症と輸入感染症 狂犬病 Brain and Nerve (神経研究の進歩). 61(2), 135-144, 2009

山田 健太郎, 西園 晃：最近注目される微生物・その臨床的意義と検査法 (Part 2 ウイルス) 「イムノクロマトキットによる狂犬病の迅速簡便検査法」, *臨床と微生物*, 36(3), 263-267, 2009

3. 著書

西園 晃：ラブドウイルス科「狂犬病」, *標準微生物学* 第10版, 医学書院(編集:平松 啓一, 中込 治), 466-468, 2009/10/08

4. 学会発表

H21/4/23-4/24 東京都

第83回日本感染症学会総会

塩田 星児, 万年 和明, 西園 晃,
「狂犬病中和抗体価迅速測定キット

の開発とその評価」

H21/9/4-9/5 佐賀市

第46回日本ウイルス学会九州支部総会

松本 昂, 山田 健太郎, 高田 賢蔵,
西園 晃, 「抗狂犬病ウイルスヒト型モノクローナル抗体の作成とその性状解析」

H21/10/3-10/7 シンガポール

Vaccine 3rd Global Congress

Nishizono A, Shiota S, Khawplod P, Ahmed K 「A pilot study on intradermal vaccination of Japanese rabies vaccine for pre-exposure immunization」

H21/10/22-23 那覇市

第50回日本熱帯医学会

松本 昂, 山田 健太郎, アハメド カムルディン, 西園 晃 「スリランカにおける狂犬病ウイルス迅速抗原診断キットの有用性と分子系統学的解析」

H21/10/25-27 東京都

第57回日本ウイルス学会

松本 昂, 山田 健太郎, 高田 賢蔵,
西園 晃 「抗狂犬病ウイルスヒト型モノクローナル抗体の作成」

松本 昂, 山田 健太郎, Ahmed Kamruddin, 西園 晃 「スリランカにおける狂犬病ウイルスの診断とその分子系統学的解析」

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願 2009-199962 狂犬病ウイルスに
対するヒト抗体ならびにその医薬組
成物

特願 2009-226721 狂犬病ウイルスに
対するヒト抗体ならびにその組成物

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

.....

狂犬病の診断法確立に関する研究

研究分担者： 井上 智 国立感染症研究所獣医科学部 室長
研究協力者： 朴 天鎬 北里大学獣医病理学研究室 助教授
研究協力者： 野口 章 国立感染症研究所獣医科学部 主任研究官
研究協力者： 小嶋大亮 北里大学獣医病理学研究室
研究協力者： Bazartseren BOLDBAATAR 国立感染症研究所獣医科学部
研究協力者： 杉浦尚子 国立感染症研究所獣医科学部

研究要旨：

狂犬病は、ラブドウイルス科、リッサウイルス属、狂犬病ウイルスを原因とするウイルス性の人獣共通感染症（動物由来感染症）である。毎年、世界中で 55,000 人が死亡しており、そのほとんどはアジア・アフリカ等の開発途上国である。狂犬病は、ヒトを含む全てのほ乳類に感染可能であり、長い潜伏期の後に重篤な急性脳脊髄炎を呈してほぼ 100%死亡する感染症である。感染後、数ヶ月に及ぶ潜伏期間のあいだ血中に狂犬病ウイルスは検出されずウイルスに対する特異抗体も死の直前まで産生されない。したがって、狂犬病ウイルスに感染した宿主の潜伏期間中及び発病初期の特徴的な臨床症状を解析するモデル実験を確立して感染初期における診断法を開発することは、狂犬病の早期診断を可能にして疑い患者と親族や医療関係者に対する迅速な公衆衛生的初期対応と適切な予防的ワクチン接種を可能にすることとなる。本報告では、狂犬病ウイルス（CVS11 株）を C57BL/6J マウスの右後肢下腿三頭筋に末梢感染させて後肢麻痺を伴う致死性の脳炎を発病させることに成功した。下腿の麻痺はウイルス接種側で顕著であり、麻痺症状の主因は大脳に見られたアポトーシス病変よりも脊髄で顕著な壊死性病変に起因することが組織病理学的検索によって強く示唆された。

A. 研究目的

狂犬病は、ヒトを含む全てのほ乳類に感染可能であり、長い潜伏期の後に重篤な急性脳脊髄炎を呈してほぼ100%死亡する感染症である。感染後、数ヶ月に及ぶ潜伏期間のあいだ血中に狂犬病ウイルスは検出されず、ウイルスに対する特異抗体も死の直前まで産生されない。したがって、狂犬病ウイルスに感染した宿主の潜伏期間中及び発病初期の特徴的な臨床症状を解析する実験モデルを確立して感染初期における診断法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

ウイルス・マウス・接種方法： 実験にはマウス神経芽腫細胞(MNA細胞)で増やしたCVS-11株をPBS(-)で希釈して 10^7 FFUをC57BL/6J(雌、6週齢、SLC, Inc, Shizuoka, Japan)のマウスの右下腿三頭筋に接種した。接種後は、神経症状について観察を行い2, 3, 4, 5, 7, 9, 11日目に3匹ずつ安楽死させて各臓器を採材した。全ての実験は国立感染症研究所(感染研)のBSL2施設内で、バイオセーフティおよび動物実験委員会で定められた規定に準拠して行われた。

解剖・組織採取： 安楽死させたマウスは0.1 M PBS で調整した4% paraformaldehydeにより還流固定後に解剖を行った。骨組織はK-CX (Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka Japan)で脱カルシウムを行った。脊髄はC3-4、T1-3、L1-2、S1-3の部位について組織標本作製した。パラフィン包埋した病理組織標本は3 μ mの切片にして定法に従ってヘマトキシリン(HE)染色、免疫組織染色、TUNEL染色等を行

った。

免疫組織： ウイルス抗原は感染研獣医科学部で作出した狂犬病ウイルス抗原に特異的に反応する抗-P蛋白抗体および抗-N蛋白抗体を用いてLSAB法(Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan)によって染色を行った。また、同様に抗-GFAP抗体(Nichirei)によりアストログリア、抗-Iba1抗体(Wako, Osaka, Japan)によりマクログリア、抗-CD3抗体(DAKO, Kyoto, Japan)によりT細胞、抗-CD20抗体(Spring Bioscience, Fremont, CA, U.S.A.)によりB細胞の染色を行った。標的抗原の可視化をDABで行った後に抗原の局在をヘマトキシリン染色で容易にした。

TUNEL染色： アポトーシスによるDNAの断片化をTUNEL法で確認した。脱パラフィンを行った組織切片を20 mg/mlのproteinase-Kで15分間処理の後に37°CにおいてTdTと fluorescein-dUTPを含む50 μ lのTUNEL液 (Chemicon, Temecula, CA, USA)に1時間反応させた。組織標本はヘマトキシリン染色を行ってTUNEL反応の確認を容易にした。

重染色法： TUNEL法と免疫組織の重染色によりアポトーシスと抗原の局在を確認した。TUNEL法の可視化をDABで行い、その後に各抗原をHistofine® Simple Stain AP (Nichirei)とHistofine® New Fuchsin (Nichirei)を用いて染色した。三重染色の発色では、抗-P抗体をNew Fuchsin、抗-Iba1抗体をBCIP/NBT基質 (DAKO)、抗-GFAP抗体をDABによって可視化した。また、組織中の核をヘマトキシリン染色して光学顕微鏡下での細胞内局在等の確認を容易にした。

電子顕微鏡： 4% paraformaldehyde (pH 7.4) で固定された脊髄および背根神経節を光学顕微鏡 (SMZ-10, Nikon, Tokyo, Japan) 下で再採材して0.5% glutaraldehydeで再固定を行った。各組織片 (~1mm立方) を3個作製して1% buffered osmium tetroxideを浸潤して epoxy resinに包埋、~70 nm厚の切片にしてからuranyl acetateとlead citrateで染色を行って電子顕微鏡 (H-700, Hitachi, Tokyo, Japan) による観察を行った。

TUNEL・免疫染色陽性細胞の計数： ウイルス接種後3、5、9日目の頸部脊髄組織について全てのTUNEL陽性細胞と免疫染色で陽性となった抗原 (cleaved caspase-3、P蛋白、Iba1、GFAP、CD3) が確認された細胞を計数した。

C. 研究結果

感染マウスの臨床症状と解剖所見： マウスでは接種5日後に後肢に麻痺が観察された。接種8日後には大腿四頭筋にも麻痺が見られて、11日目には死亡した。実験期間中および各臓器採材マウスにおいて特に解剖病理学的な著変は観察されなかった。

組織・免疫組織所見： 接種5日後に髄膜下へのリンパ球浸潤、脊髄灰白質に脳内血管周囲性の単核球集簇が軽微に観察された。また、背根神経節の細胞に核濃縮と細胞質の変性所見が見られ、その周囲にときおり単核細胞が観察された (図1)。接種7日目にはミクログリアの増加と病変の拡大、神経細胞にアポトーシス様もしくは壊死所見が見られ、神経細胞の食食像もみられた。組織病巣の神経細胞質にはウイルス抗原が必ず陽性であった。ウイルス抗原は

接種4日後から腰部脊髄および同部位の背根神経節で観察されるようになり、経時的に脊髄上行性にウイルス抗原が各神経細胞の樹状突起や軸索中で見られた (図2)。

アポトーシス： TUNEL法とcleaved caspase-3 (CC3) 抗体TUNELによりアポトーシスの局在を確認した。接種5日目にCC3陽性細胞が髄膜と脊髄の白質 (図3) と脊髄背根に見られた。アポトーシス陽性細胞は感染の進行とともに増加した。しかしながら、脊髄・背根神経節の神経細胞では接種9日目においてもTUNELとCC3は陰性であった。

重染色法： TUNELと他の抗体の局在を重染色によって調べた。脊髄においてはT細胞と少数のミクログリアがアポトーシス陽性であった (図4)。背根神経節のT細胞でもアポトーシス陽性が観察されたが神経細胞はいずれも陰性であった。全てのマウスの背根神経節でIba1抗体とGFAP抗体は陰性であった。

ミクログリアとアストログリア： 抗-Iba1抗体でミクログリア、抗-GFAP抗体でアストログリアを染め分けた (表1)。Iba1抗体陽性細胞は接種3日目から5日目にかけて脊髄の灰白質で有意に増加しており、接種11日目には計数ができないほど増加した。ミクログリアは単桿状から樹状もしくはアメーバ様の形状を示した (図5)。接種2日目までは少数のGFAP陽性細胞が脊髄中心管髄膜下に見られたが、接種5日目にはアストログリアが白質深部に伸展しており灰白質に多数の原形質型アストログリアが観察された。感染の進行に合わせてGFAP陽性細胞は増加して、接種9日目には樹状に分枝した形態を示した。脊髄におけるミク

ログリアとアストログリアの局在は三重染色（抗-P 抗体、抗-Iba1 抗体、抗-GFAP 抗体）によって明瞭となった（図 6）。血管周囲と背根神経節周囲には若干の CD3 陽性 T 細胞が見られたが感染の進行に合わせて増加した。抗-CD20 抗体陽性細胞は観察されなかった。

電子顕微鏡観察： ウイルス粒子とさまざまな基質が脊髄灰白質神経細胞の核周囲と背根神経節細胞に観察された（図 7）。細胞内に見られる基質は円形もしくは卵形であり顆粒・管状の核蛋白構造が見られ、増加した粗面小胞体（Nissl bodies）、核周囲小器官や細胞の辺縁に位置していた。ウイルス粒子は神経節細胞の細胞質内膜から出芽していた（図 8）。

また、ウイルス粒子と基質はミエリン鞘のある軸索の細胞質膜にも観察されたが核蛋白様構造は見られなかった（図 9）。非神経細胞やグリア細胞にウイルス粒子は見られなかった。ほとんどの神経細胞は接種 5 日目まで著変無しであったが、接種 7 日目から脊髄の神経細胞と背根神経節細胞で細胞病理学的変化が観察された。一方、感染した神経細胞と背根神経節細胞周囲の単核球でアポトーシス、明瞭なクロマチン、核の断片化などが認められた（図 10）。

D. 考察

固定毒株（CVS-11 strain）を C57BL/6J マウスの末梢筋肉内に接種して脊髄病変を病理組織学的に検索したところ、接種 4 日目からウイルス抗原が脊髄の神経細胞と背根神経節細胞で見られるようになり、電子顕微鏡で感染細胞の細胞質と軸索内に核蛋白と成熟ウイルス粒子が認められた。接種 5 日目には、脊髄の中心

管および微小血管、髄膜周囲にリンパ球の浸潤が観察された。

接種 3 日目から抗-Iba1 抗体、接種 5 日目から抗-GFAP 抗体が陽性となる細胞が有意に増加し、マイクログリアの形態変化が顕著に見られた。接種 7 日目にアポトーシスが TUNEL 法によって脊髄と背根神経節で観察された。

今回、我々は重染色を利用してほとんどの T 細胞と少数のマイクログリアがアポトーシスとなる事を明らかにした。一方、アストログリアとウイルスの感染した神経細胞ではアポトーシスは見られなかった。したがって、狂犬病ウイルスを末梢感染させたマウスの脊髄では感染した神経細胞はアポトーシスではなく壊死の転機を取ることが示唆された。このことは、C57BL/6J マウスに感染した CVS-11 の病理発生にグリア細胞の増加と形態変化が関与していると考えられた。

E. 結論

本報告では、狂犬病ウイルス（CVS11 株）を C57BL/6J マウスの右後肢下腿三頭筋に末梢感染させて後躯麻痺を伴う致死性の脳炎を発病させることに成功した。下腿の麻痺はウイルス接種側で顕著であり、麻痺症状の主因は脳に見られたアポトーシス病変よりも脊髄で顕著な壊死性病変に起因することが組織病理学的検索によって強く示唆された。

狂犬病は、ヒトを含む全てのほ乳類に感染可能であり、長い潜伏期の後に重篤な急性脳脊髄炎を呈してほぼ 100% 死亡する感染症である。感染後、数ヶ月に及ぶ潜伏期間のあいだ血中に狂犬病ウイルスは検出されずウイルスに対す

る特異抗体も死の直前まで産生されない。

したがって、狂犬病ウイルスに感染した宿主の潜伏期間中及び発病初期の特徴的な臨床症状を明らかにできる実験モデルを確立してその診断法を開発することは、狂犬病の疑われた患者および濃厚接触者である親族や医療関係者等の暴露リスク者等に対する迅速な公衆衛生対応と適切な予防的ワクチン接種を可能にして狂犬病に対する公衆衛生行政に大いに寄与するものと期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kojima D., Chun-Ho P., Yusuke S., Inoue S., Noguchi A. and Toshifumi O. 2008. Pathology of the Spinal Cord of C57BL/6J Mice Infected with Rabies Virus (CVS-11 Strain). *J. Vet. Med. Sci.* 71:319-324.

Inoue S., Boldbaatar B., Sugiura N., Noguchi A., and Park C.-H. 2009. Rabies. In: *Animal Viruses* (Maeda A., ed.). RESEARCH SIGNPOST. (in press).

Tobiume M., Sato Y., Katano H., Nakajima N., Tanaka K., Noguchi A., Inoue S., Hasegawa H., Iwasa Y., Tanaka J., Hayashi H., Yoshida S., Kurane I., and Sata T. (2009) Rabies virus dissemination in neural tissues of autopsy

cases due to rabies imported into Japan from the Philippines: immunohistochemistry.

Pathol. Int. 59:555-66.

2. 学会発表

小嶋大亮、朴 天鎬、辻川真太郎、小原慶子、野口 章、小山田敏文、井上 智。狂犬病ウイルス (CVS-11) を脳内接種した BALB/c マウスの脳脊髄に関する病理学的研究。第 147 回日本獣医学会学術集会、2009、4 月、宇都宮市、栃木県

Boldbaatar Bazartseren, Naoko Sugiura, Jun Ryan C. Orbina, Catalino Demetria, Akira Noguchi, Mary Elizabeth Miranda, Akio Yamada, Satoshi Inoue. Rapid detection of street rabies virus by RT-LAMP。第 147 回日本獣医学会学術集会、2009、4 月、宇都宮市、栃木県

小嶋大亮、朴 天鎬、小原慶子、杉浦尚子、Boldbaatar Bazartseren、佐藤 豪、野口 章、畑井 仁、小山田敏文、井上 智。狂犬病ウイルス (CVS-11) を後肢筋肉内に接種した C57BL/6J およびヌードマウスの脊髄に関する比較病理学的研究。第 148 回日本獣医学会学術集会、2009、9 月、鳥取市、鳥取県

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Table 1. The mean numbers of positive cells for each primary antibody and for TUNEL assays in the cervical spinal cord in mice infected with CVS-11 strain rabies virus.

Days postinoculation	2 days (<i>n</i> = 3)	5 days (<i>n</i> = 3)	9 days (<i>n</i> = 3)
Anti-P	0	11	24
Anti-Iba1	28	204	443
Anti-GFAP [#]	10	48	239
TUNEL	ND	34	74
Anti-CD3	0	19	44
Anti-cleaved caspase-3	0	4	10

[#]Astroglia of protoplasmic type only.

ND: not detected.

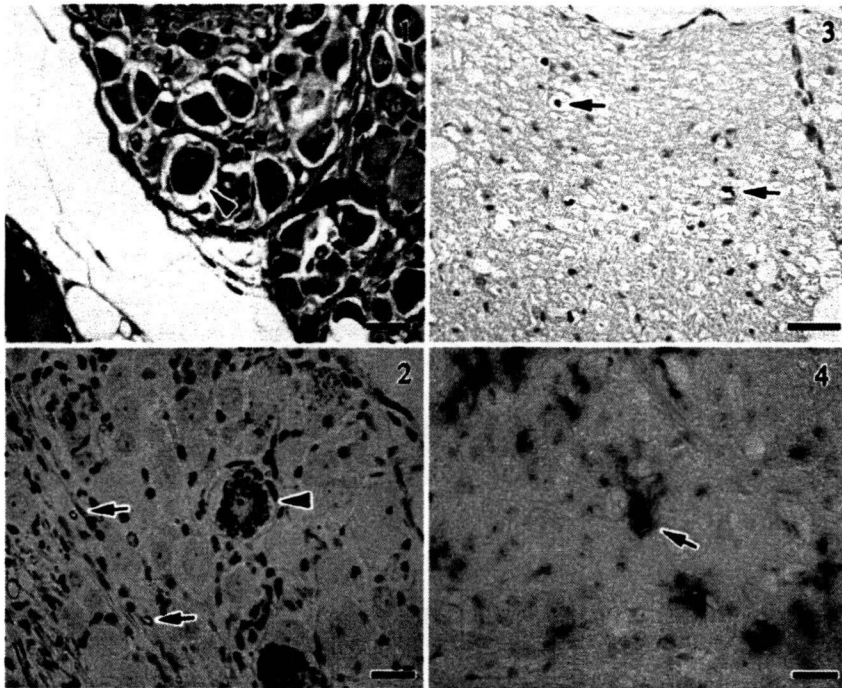


Fig. 1. Nuclear pyknosis and dark cytoplasm (arrowhead) were observed in the dorsal root spinal ganglion cells at 9 days PI. Hematoxylin and eosin staining. Bar = 20 μ m.

Fig. 2. Viral antigens were detected in the cytoplasm (arrowhead) and axon of dorsal root spinal ganglion cells (arrows) at 5 days PI. Immunohistochemistry (anti-N antibody). Bar = 20 μ m.

Fig. 3. Cleaved caspase-3 immunopositive cells were observed in the white matter of spinal cords (arrows) at 9 days PI. Immunohistochemistry. Bar = 30 μ m.

Fig. 4. Microglial cells (arrow) in the spinal cord were positively stained both with TUNEL (brown) and with anti-Iba1 antibody (red) at 7 days PI. Double staining. Bar = 20 μ m.