

研究種目：基盤研究（B）  
研究期間：2007年～2010年  
課題番号：19406016

研究課題名（和文） 抗狂犬病ヒト型単クローン抗体カクテルのアジアにおけるフィールドトライアル

研究課題名（英文） Field trial of human monoclonal antibody cocktails possessing neutralizing ability against rabies virus in Asia

研究代表者

西園 晃（NISHIZONO AKIRA）

大分大学・医学部・教授

研究者番号：70218155

研究代表者の専門分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：615

キーワード：狂犬病、ヒト型単クローン抗体、曝露後治療、アジア

### 1. 研究計画の概要

狂犬病は致死率 100%の人獣共通ウイルス感染症である。現在で 50,000 人近くが全世界で死亡しているとされ、95%以上はアジアに集中している。特にインド、東南アジアなどが多くを占める。日本国内では既に 50 年近く国内発生は無いが、昨年 36 年ぶりの輸入例が報告され今後の再興が懸念される。

本研究は EB ウイルストランスフォーメーション法を基礎に作成された、ウイルス中和活性を有するヒト型抗狂犬病単クローン抗体のカクテル製剤を、世界中の狂犬病犠牲者の曝露後治療に使用することを最終的な目的とする。このため最大の侵淫地であるアジアにおける曝露後治療の現状把握、特に現在使用されている血清由来グロブリン製剤の需給状況の調査を行う。同時に狂犬病ウイルス中和活性を有する複数のヒト型単クローン抗体を単離、精製、大量培養し、臨床での使用に準じたクオリティーまで高める。最終的に抗狂犬病グロブリンの入手が困難で、曝露後治療の恩恵にあずかれない、主にアジアの狂犬病侵淫国犠牲者への国際標準治療体制作りを行う。

### 2. 研究の進捗状況

狂犬病ワクチン接種による過免疫ボランティアのリンパ球から、EB ウイルストランスフォーメーション法により中和活性を有する抗狂犬病ヒト型単クローン抗体を樹立することに成功し、その性状解析を行った。EBV トランスフォーマントの上清 1,824 well をウイルス中和試験（RFFIT 法）により狂犬病ウイルス CVS 株に対する中和活性でスクリーニングし、最終的に 2 種類のヒト型単ク

ローン（No.254 と No.4D4）を確立することができた。その後、抗体産生免疫グロブリン遺伝子を CHO 細胞に導入し、抗体産生能力を安定化させた。No.254 は IgG3 型の抗体で CVS 株に対する中和能力は 33.3 IU/ mg で、IgG1 に変換したものでは 25.05 IU/ mg (Kd 値 =  $3.7 \times 10^{-7}$  M) であった。No.254 は狂犬病ウイルス実験室株（CVS, ERA, HEP-Flury, 西ヶ原株）を効果的に中和することができた。No.4D4 は IgM 型の抗体で CVS 株に対する中和能力は 125 IU/ mg であった。それぞれの単クローンについて中和耐性変異株を作成し、塩基配列を決定したところ、No.254 (IgG1 型) の中和耐性変異株の G タンパク質は 198 番目のアミノ酸が Lys から Glu に変異しており、これは Antigenic site II に位置していた。一方、No.4D4 では 242 番目が Ala から Val に変異していた（新規なエピトープ）。*In vitro* における中和試験（50 %FR フォーカス減少率）の結果、No.254 の 50 %FR は 0.32  $\mu$ g/ ml, No.4D4 では 15.05 ng/ ml であった。さらに、No.254 はマウスを用いた *in vivo* での中和試験において、標準グロブリン製剤と同程度のマウス生存率を示した。

### 3. 現在までの達成度

② おおむね順調に進展している

4 年間の全計画で、既に 2 種類の抗体を樹立し、論文発表と知財の確保を行うことができた。今後さらに複数の単クローン抗体を得る試みも進行中で、研究はおおむね順調に進展している。

### 4. 今後の研究の推進方策

今後はより血清中の中和力価が高いボラ

ンティアのBリンパ球から抗体ライブラリーを構築し、様々なエピトープに対する単クローン抗体をカクテルとして曝露後治療に使用するためにも、さらに複数の単クローンを樹立することなどが必要であると考えられ、最終年度はこれを推し進めるとともに、アジア侵淫地域での利用に向けた検討も進めてゆきたい。

#### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. 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. 査読有, 161, 2009, 58-62
2. Shiota S, Khawplod P, Ahmed K, Mifune K, Nishizono A. A pilot study on intradermal vaccination of Japanese rabies vaccine for pre-exposure immunization. Vaccine. 査読有, 26, 2008, 6441- 6444
3. Nishizono A, Khawplod P, Ahmed K, Goto K, Shiota S, Mifune K, Yasui T, Takayama K, Kobayashi Y, Mannen K, Tepsumethanon V, Mitmoonpitak C, Inoue S, Morimoto K, A simple and rapid immunochromatographic test kit for rabies diagnosis. Microbiol. Immunol. 査読有, 52, 2008, 243 -249
4. Arakawa M, Yamashiro T, Uechi G, Tadano M, Nishizono A, Construction of Human Fab( $\gamma$ 1/ $\kappa$ )Library and Identification of Human Monoclonal Fab Possessing Neutralizing Potency against Japanese Encephalitis Virus. Microbiol. Immunol. 査読有, 51, 2007, 617- 625
5. Yamagata J, Ahmed K, Khawplod P, Mannen K, Xuyen DK, Loi HH, Dung NV, Nishizono A, Molecular Epidemiology of Rabies in Vietnam. Microbiol. Immunol. 査読有, 51(9), 2007, 833-840

[学会発表] (計 5 件)

1. 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, 第 57 回日本ウイルス学会, 2009 年 10 月 25 日, 東京都

2. Nishizono A, Shiota S, Khawplod P, Ahmed K, A pilot study on intradermal vaccination of Japanese rabies vaccine for pre-exposure immunization, 3<sup>rd</sup> Vaccine Global Congress, 2009 年 10 月 3 日, シンガポール
3. Ahmed K, Khawplod P, Nishizono A, A Simple and Rapid Immunochromatographic Test Kit for The Diagnosis of Rabies, 14<sup>th</sup> International Congress of Virology (IUMS), 2008 年 8 月 11 日, トルコ
4. 塩田 星児, Ahmed K, 三舟 求真人, 狂犬病ウイルス迅速診断キットの開発とその評価, 第 82 回 日本感染症学会総会 2008 年 4 月 18 日, 松江市
5. 塩田 星児, Khawplod P, 後藤 和代, 伊波 英克, Ahmed K, 三舟 求真人, 西園 晃, 日本製狂犬病ワクチンの皮内接種法の検討, 第 11 回日本ワクチン学会 2007 年 12 月 8 日, 横浜市

[図書] (計 1 件)

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

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

1. 名称: 特許権  
発明者: 高田賢蔵、中島款冬、西園 晃  
権利者: (株) イーバック、国立大学法人 大分大学  
番号: 2009-226721 号  
出願年月日: 平成 21 年 9 月 30 日  
国内外の別: 国内
2. 名称: 特許権  
発明者: 高田賢蔵、中島款冬、西園 晃  
権利者: (株) イーバック、国立大学法人 大分大学  
番号: 2009-199962 号  
出願年月日: 平成 21 年 8 月 31 日  
国内外の別: 国内
3. 名称: 特許権  
発明者: 西園 晃  
権利者: 国立大学法人 大分大学  
番号: 2102008JP  
出願年月日: 平成 20 年 9 月 29 日  
国内外の別: 国内