

機関番号：17501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2010

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

研究成果の概要（和文）：

狂犬病は狂犬病動物から咬まれることでウイルス感染が成立する致死性のウイルス性脳炎で、多くの発展途上国において重大な公衆衛生問題である。重度の曝露を受けた場合には、ワクチンと同時にヒトもしくはウマグロブリン製剤の投与が必須であるが、その供給に限界があること、副作用の危険性や高いコストなどが浸淫国では問題である。今回、グロブリン製剤に代替可能な2種類(No.254と4D4)の新たなヒト型単クローン抗体を、ワクチン接種過免疫ドナーからEBウイルストランスフォーメーション法により樹立した。No.254はサブクラスがIgG3であり、固定毒のCVS株、ERA株、HEP-Flury株、西ヶ原株を効果的に中和した。さらに耐性変異株のG蛋白推定アミノ酸配列解析ではAntigenic site IIに位置する非常に保存性の高いアミノ酸(Lys198)が変異していた。No.254のCVS株に対する50%フォーカス抑制率は68 ng/ml、解離平衡定数は 3.7×10^{-7} Mで補体活性を有していた。またNo.254は*in vivo*マウスチャレンジ試験で効果的な中和活性を示した。他方4D4は、サブクラスがIgMでCVS株と西ヶ原株を中和した。4D4に対する耐性変異株の推定アミノ酸配列は、親株と比較するとAla242が変異しており、神経毒性に関与する新規の認識部位が予想された。これら狂犬病ウイルスに対するヒト型単クローンは、将来アジアなどでの曝露後治療に使用できることが期待された。

研究成果の概要（英文）：

Rabies is a fatal viral encephalitis transmitted by exposure to the bite of rabid animals. Although human and equine rabies immunoglobulins are indispensable pharmacological agents for severe bite exposure, as is vaccine, several disadvantages including limited supply, adverse reactions, and high cost hamper their wide application in developing countries. We established two novel human monoclonal antibodies (MAbs) that neutralize rabies virus from vaccinated hyperimmune donors using the Epstein-Barr virus transformation method. One MAb (No. 254) was subclass IgG3, which effectively neutralized fixed rabies viruses of CVS, ERA, HEP-Flury, and Nishigahara strains and recognized a well-conserved epitope located in antigenic site II of the rabies virus glycoprotein. No. 254 possessed 68 ng/ml of 50% focus reduction neutralizing activity against CVS, 3.7×10^{-7} M of the dissociation equilibrium constant, and the enhancing effect of complement-dependent virolysis. In addition, No. 254 showed effective neutralization potency *in vivo* by the mouse challenge test. The other 4D4 was subclass IgM, showing neutralizing activity against CVS and Nishigahara strains and recognized a novel epitope located between antigenic sites I and VI, which is associated with the neurovirulence of rabies. Both human MAbs against rabies are expected to be utilized as a tool for future post-exposure prophylaxis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	8,500,000	2,550,000	11,050,000

研究分野：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. 研究開始当初の背景

本研究は EB ウイルストランスフォーメーション法を用いて作成した、ヒト型抗狂犬病モノクローナル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モノクローナル抗体を単離、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. 研究の目的

狂犬病はラブドウイルス科リッサウイルス属の狂犬病ウイルス(RABV)によって引き起こされる致死性のウイルス脳炎である。狂犬病は感染した家畜や野生動物の唾液によって伝播される。全世界で推定年間約 55,000 人が狂犬病によって亡くなっており、そのほとんどがアジアとアフリカに集中している。ヒトでの潜伏期間の目安は 20~90 日間であるが、2-3 日以内や 1 年以上の場合もある。臨床症状が現れると有効な治療法がなく致死率は 100%である。それ故曝露後ワクチンを繰り返し行うことが狂犬病の疑われる動物に咬まれた場合の唯一の発症予防手段である。特に WHO の定める Category III にあたる重度な曝露を受けた場合は、咬傷の洗浄とワクチン接種に加え抗狂犬病ウイルスグロブリン製剤(RIG)の投与を含む曝露後治療(PEP)が推奨されている。曝露後できるだけ早急に RIG を投与することは、RABV に対する免疫の活性化を待たずに受動免疫を付与することができ、重度曝露時の対処法として必要不可欠である。

すでに臨床応用されている RIG はヒト由来(HRIG)とウマ由来(ERIG)の RIG がある。両者共に RABV ワクチンを接種した過免疫のヒトもしくはウマの血清から得られる。HRIG はその供給に限界があるだけでなく、高価でもある。ERIG も供給には限界があり、まれにアナフィラキシーなどの副反応を伴う。ヒト由来の RIG はその他の種から得た MAb に比べ利点が多い。ヒト由来の MAb (HuMAb)には解決すべき問題があるものの世界的な RIG 不足を解消できるもの期待される。

RABV の Glycoprotein (G) 蛋白は、ウイルス粒子表面から突き出るホモ三量体構造の 1 型の膜糖蛋白である。G 蛋白はウイ

ルス粒子の宿主細胞への吸着作用を担う反面、RABV に対する宿主抵抗性を賦与する物質となる。先行研究から G 蛋白抗原構造が決定され、主に 2 つの構造的な Antigenic site II と III を含む 8 つの Antigenic site, I-VI, minor site a と GI が同定された。現行の RIG はポリクローナル抗体であり、ウイルス中和に必要な G 蛋白上の全ての Antigenic site を包含している。PEP に使用される抗体の特性として全ての Antigenic site を包含することで、すべての RABV を中和することが必要である。近年様々な技術を用いて、いくつかの RABV に対する HuMAb が樹立されたが、Antigenic site I と III を認識するものしか得られていない。よって HuMAb カクテルを発展させるために、RABV の中和のために必要なその他の Antigenic site を認識する HuMAb を準備する必要がある。

本研究においては RABV を中和できる新規の HuMAb を樹立することを目的とし、*in vitro* および *in vivo* でそれらの中和活性を評価し、狂犬病侵淫地での曝露後治療に資する製剤の開発を目指した。

3. 研究の方法

ヒト B リンパ球の調整と EB ウイルストランスフォーメーション

ヒト B 細胞は研究室で RABV を取り扱っている健康な 2 人の末梢血から採取された。ドナー A は複数回の Purified chick embryo cell (PCEC) ワクチン(化血研、Kumamoto, Japan)接種を受けている。ドナー B も RABV を取り扱う研究者で、ベロ細胞培養ワクチンもしくは鶏線維芽細胞ワクチンを複数回接種している。両ドナーは RABV に対する高い中和抗体価 (VNA) を保つため、毎年ブースター接種をしている。両ドナーとも 1 ドースの鶏線維芽細胞ワクチンを皮下より接種し、その後 14 日目に血清中和抗体価を測定し、十分な抗体価を確認した (A= 1.77 IU/ml, B= 7.30 IU/ml)。この研究は大分大学の倫理委員会の承認を得て行われた。

末梢単核球細胞 (PBLs) は全血から Ficoll-Paque を用いて分離した。B リンパ球は磁気ビーズ標識された anti-CD2 抗体を用いて分離した。CD-2 陰性細胞は前駆 B 細胞として回収し、既知の EBV トランスフォーメーション法により不死化した。1×10⁶ の B リンパ球は形質転換効率 (TD₅₀) が 10⁴ 程度になるよう 1 ml の B95-8 (EBV 産生細胞株) の培養液に懸濁し、37°C で 2 時間培養した。感染後、細胞は培養液で 2 回洗浄し 96 穴プレートに 1×10⁴ cell/well で分散し、37°C のインキュベーターで培養した。

ウイルスとウイルス力価測定

Challenge virus standard (CVS) 株は BHK-21 細胞株で培養した。その他の RABV 株、ERA 株、HEP-Flury 株と Nishigahara 株は単 BHK-21 細胞、もしくはマウス神経芽細胞腫 (NA) 細胞によって培養した。マウスチャレンジ試験のため、CVS 株を BALB/c マウスの脳内で増殖させ、20% 脳乳剤上清として調整した。

ウイルス力価を測定するため、10 段階希釈した CVS を 24 穴プレートにて単層培養した NA 細胞に感染させ、37°C で培養した。感染 72 時間後、4% パラフォルムアルデヒドで細胞を固定した。細胞を固定後、メタノールを加え、FITC 標識抗狂犬病 N 蛋白特異的単クローン抗体と 37°C、45 分間反応し、蛍光顕微鏡で観察し focus forming units/ml (FFU/ml) を算出した。同様に 96 穴プレートに単層培養した BHK-21 細胞に 10 段階希釈した CVS 株を感染させ 37°C で培養した。24 時間後、90% アセトンで固定し、独立した 8 well の感染細胞を観察し tissue culture infectious dose (TCID)₅₀ を求めた。

RFFIT と 50% focus reduction neutralizing test (FRNT₅₀) の測定

96 穴プレートにて、形質転換細胞の培養上清 (50 μ l) と等量の 2% FCS-MEM で希釈された CVS 株 (100TCID₅₀) とを混ぜ 37°C、90 分反応後、BHK-21 細胞 (1x10⁵ cell/well) をそれぞれのウェルに加え 24 時間培養した。最後に細胞を 90% アセトンで固定し、FITC-RABV N MAbs と 37°C、45 分間反応させ、蛍光顕微鏡で観察した。樹立された RABV に対するクローンの CVS、ERA、HEP-Flury と Nishigahara 株に対する中和力価 (国際標準単位: IU) の決定のため、WHO の国際標準品と比較し、Spearman-Kärber 法により算出した。

段階希釈した HuMAb (0.1 ml) と等量の CVS 株 (2000 FFU/ml) とを 37°C で 90 分間反応させ、この反応液を 24 穴プレートで単層培養した NA 細胞にて 1 時間培養した。培養後、上清を取り除き、PBS で洗浄後、10% FCS-MEM/ 1% メチルセルロース培地にて 3 日間培養した。その後、4% パラフォルムアルデヒドで細胞を固定し、上述の方法で FFU を求め、FRNT₅₀ を算出した。

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、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。

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*) は狂犬病ワクチンを用いて、50% 最大結合を示す抗体濃度から ELISA を用いて算出された。即ち、PBS で 100 μ g/ml に希釈したワクチン抗原溶液を 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、標識されたヒツジ抗ヒト IgA+G+M を用い 37°C、1 時間反応させた。最後に酵素発色を行い、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。

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、非存在下で反応させ、残存する感染性ウイルス数を TCID₅₀ 法で決定した。比較対照として抗狂犬病 G 蛋白に対するマウス MAbs, 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、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、単層培養した 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、1% アガロースを重層後、単一ブラックから耐性株を単離し、親株と比較し HuMAb に対して耐性のものを選択した。

耐性変異株のウイルスから全 RNA 抽出し、oligo dT を用い cDNA 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に、それぞれの cDNA を PCR 法にて増幅した。増幅された PCR 産物を精製・抽出し、塩基配列を決定した。

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) と反応後、反応液 (0.3 ml/mouse) を 6 週齢の雌 ddY マウス (各群 n=10) 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 株脳乳剤も同様マウスに接種した。この研究は学内倫理委員会の承認を得て行った。

4. 研究成果

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。最終的に 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 μg/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。イムノブロット解析の結果、どちらの MAb も CVS 株の G 蛋白とは反応せず、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

樹立された HuMAb の中和能を評価するため、いくつかの RABV 固定毒株に対する中和力価を決定し、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 (表 1)。

表 1. 狂犬病ウイルスに対するヒト型モノクローナル抗体の中和活性

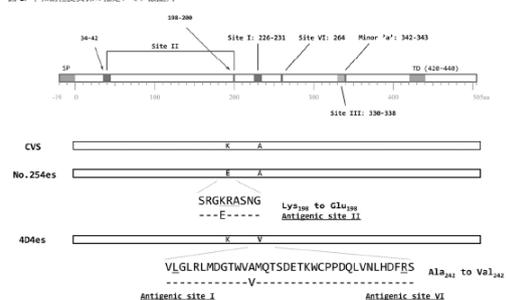
	CVS	ERA	HEP-Flury	Nishigahara
No.254	33.3	264.2	209.8	209.8
4D4	125	—	—	1

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

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、次に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、ブラッククローニングを数回繰り返した。図 1 に RABV の G 蛋白上の主な Antigenic

図 1. 中和耐性変異株の推定アミノ酸配列



site と No.254 と 4D4 耐性変異株 (No. 254es, 4D4es) のうち、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)、

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 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 もしくは 4D4 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。

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 も起こしうる。表 2 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。

表 2. 補体存在下、もしくは非存在下におけるウイルス中和活性

	Human MAbs		Murine MAbs		
	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

In vivo マウスチャレンジ試験

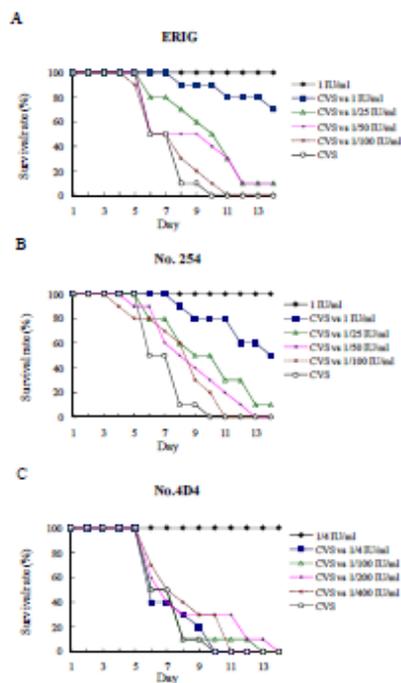
図 2 に示すように、500 LD₅₀ の CVS 株を脳内接種したマウスは投与 10 日後には全てのマウスが死亡した。しかし CVS 株と ERIG (最終濃度 1 IU/ml) とを反応させたものでは RABV 投与でも 70% の生存率を示し、これは ERIG 濃度に依存していた。HuMAb No.254 処理群では、抗体濃度に依存したマウス生存率を示した。2 IU/ml の No.254 と 500 LD₅₀ の CVS 株の反応液を接種した群では、最終的なマウス死亡率は 50% であった。

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。

【考察】

WHO の報告では世界中で年間約 55,000 人もの人が狂犬病で命を落としており、その 85% はアジア諸国が占めている。狂犬病による死亡数を減少させるには、PEP の徹底、動物の管理と狂犬病に対する意識・教育が大きく影響する。近年アジア諸国では、PEP を受ける患者は、その死者数の 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

図 2. マウスチャレンジ試験



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残る。

RABV G 蛋白を中和する MAb はこれらの問題を解決し、RIG の代替品として使用可能である。しかし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せずウイルスを中和できない場合は致命的となる。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 を包含し、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。この場合、もっとも期待されるの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。

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ている。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(図 1)。今回得られた No.254 に対する耐性変異株は、Antigenic site II 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いた。Antigenic site II は Genotype 1 の RABV において保存性が高く(表 3)、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(data not shown)。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であった。

表 3. 各狂犬病ウイルス株における抗原エピトープの比較

Country/Host/Year/Accession #	Antigenic site II		Ala242
	34-42aa	198-200aa	232-241aa
CVS (Parent strain)	GCTNLSGFS	KRA	GLRLMDGTWAMQTS
Escape mutant strain	-----	E--	-----V-----
China Dog_DQ840072	-----	---	-----E---
South Korea_DQ076103	-----	---	-----A-I---
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	-----	---	-----N---
India Dog 1999_AY987478	-----	---	-----A-I---
Sri Lanka Dog_EU086156	-----	---	-----A-I---
Nepal Dog 1999_EU086153	-----	---	-----A-I---
Afghanistan Dog_2004_EU086128	-----	---	-----A-I---
Morocco Human_AF325469	-----	---	-----A-I---
Iran Human_AF325472	-----	---	-----A-I---
Poland Human_AF325465	-----	---	-----A-I---
Hungary Human_AF325462	-----	---	-----A-I---
France Fox 1991_AF401286	-----	---	-----A-I---
Nigeria Human_AF325470	-----	---	-----A-I---
Cameroon Dog_FJ545675	-----	---	-----R---
Ivory Coast Dog_FJ545684	-----	---	-----R---
Canada Arctic Fox_RVU11736	-----	---	-----A-I---
Brazil Human_AB110657	-----	---	-----A-I---
Brazil Fox_AB247437	-----	---	-----V-I--A-
Brazil Bat_AB247428	-----	-K-	-----S-I---
SHBRV Silver-haired Bat_RVU52046	---S---	-K-	-----S-I---

今回 EBV 形質転換細胞を用いて 2 つの新規の HuMAb を樹立することができた。

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。

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、今後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. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Matsumoto T, Ahmed K, Yamada K, Nishizono A, et al. Whole genome analysis of a human rabies virus from Sri Lanka. *Arch Virol*. 2011 156: 659-669
2. Hossain M, Ahmed K, Yamada K, , Nishizono A, et al. Five year (January 2004 – December 2008) surveillance on animal bite and rabies vaccine utilization in the Infectious Disease Hospital, Dhaka, Bangladesh. *Vaccine*. 2011 29: 1036-1040
3. Matsumoto T, Yamada K, Nishizono A, et al. Isolation and characterization of novel human monoclonal antibodies possessing neutralizing ability against rabies virus. *Microbiol Immunol*. 査読有, 2010 54 (11): 673-683

4. 塩田星児、Kamruddin Ahmed、西園晃 日本製狂犬病ワクチン皮内接種法による曝露前免疫の有効性の検討. **感染症学会雑誌**. 2010, 84 巻(1): 9-13
 5. 狂犬病 (特集: 神経系の再興感染症と輸入感染症) 西園晃 **Brain and Nerve**, 61(2), 135-144, 2009
 6. Shiota S, Yamada K, Ahmed K, Nishizono A, et al. Development and evaluation of a rapid neutralizing antibody test for rabies. **Journal of Virological Methods**. 161, 2009, 58-62
 7. Shiota S, Ahmed K, Nishizono A et al. A pilot study on intradermal vaccination of Japanese rabies vaccine for pre-exposure immunization. **Vaccine**. 26, 2008, 6441-6444
 8. Nishizono A, Ahmed K, et al. A simple and rapid immunochromatographic test kit for rabies diagnosis. **Microbiol. Immunol.** 52, 2008, 243 -249
 9. Yamagata J, Ahmed K, Nishizono A et al. Molecular epidemiology of rabies in Vietnam. **Microbiol. Immunol.** 51, 2007, 833-840
- [学会発表] (計 5 件)
1. 松本昂, 山田健太郎, Ahmed K, 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, 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, 3rd Vaccine Global Congress, 2009 年 10 月, 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, 14th International Congress of Virology, 2008 年 8 月, トルコ
 4. 塩田星児, Ahmed K, 西園晃. 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, 松江市
 5. 塩田星児, Ahmed K, 西園晃 他. 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, 横浜市

[図書] (計 2 件)

1. 西園晃 (編集: 東匡伸, 小熊恵二, 堀田博), 南江堂, ラブドウイルス科, シンプル微生物学 改訂第 5 版, 2011, 294-297
2. 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 2 件)

1. 名称: 特許権
発明者: 高田賢蔵、中島敦冬、西園晃
権利者: (株) イーベック、国立大学
法人大分大学
番号: 特開 2011-50269
公開年月日: 平成 23 年 3 月 17 日
国内外の別: 国内
2. 名称: 特許権
発明者: 西園晃、万年和明、小林行治、
安井健人
権利者: (株) アドテック、国立大学
法人大分大学
番号: 特開 2010-85126
公開年月日: 平成 22 年 4 月 15 日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.oita-u.ac.jp/biseibut/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西園晃 (Akira Nishizono)
大分大学・医学部・教授
研究者番号: 70218155

(2) 研究分担者

アハメド カムルディン (Ahmed
Kamruddin)
大分大学・全学研究推進機構・准教授
研究者番号: 00398140

(3) 連携研究者

山田健太郎 (Kentaro Yamada)
大分大学・全学研究推進機構・助教
研究者番号: 70458280 (H19~22 年)

(4) 連携研究者

仙波和代 (Kazuyo Senba)
大分大学・全学研究推進機構・助教
研究者番号: 30381031 (H19 のみ)