




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第451号	氏名	松本 昂
審査委員会委員	主査氏名	横山 繁生 	
	副査氏名	平松 和史 	
	副査氏名	万年 和明 	
論文題目： Isolation and characterization of novel human monoclonal antibodies possessing neutralizing ability against rabies virus (狂犬病ウイルス中和活性を有するヒト型モノクローナル抗体の作製とその特徴)			
論文掲載誌名： Microbiology and Immunology			
論文要旨： <p>狂犬病は、発症すれば有効な治療法のない致死性ウイルス感染症で、アジア・アフリカ諸国を中心に年間死亡数は55,000人に上る。ウイルス暴露時にはワクチン接種やグロブリン製剤の投与が行われるが、現在使用されているグロブリン製剤には安全性と安定供給の点で問題がある。本研究では、より安全かつ安定供給につながる可能性のあるヒト型モノクローナル抗体(MAb)を作製し、その特性および抗ウイルス効果について述べている。</p> <p>まず、狂犬病ウイルスのワクチン接種歴があるボランティアの末梢血よりBリンパ球を分離した。得られたリンパ球をEBウイルスで不死化させ、培養上清のウイルス中和活性をRFFIT法で測定した。2種類の中和抗体産生クローンが得られ、各クローンの免疫グロブリン遺伝子をCHO細胞に導入し、恒常発現する2種の培養株(No. 254と4D4)を樹立した。なお、中和耐性変異株を作成して検討したエピトープ部位は、No. 254がG蛋白II、4D4がIとIVの抗原決定部位の間に存在する未報告の部位であった。</p> <p>No. 254はIgG3, Kd値 3.7×10^{-7} M, 50%感染フォーカス抑制濃度 68 ng/ml, 狂犬病ウイルス固定株であるCVS, ERA, HEP-Flury, および西ヶ原株に対する中和力価はそれぞれ, 33.3 IU/mg, 264.2 IU/mg, 209.8 IU/mg, 209.8 IU/mgであった。また、補体依存性抗ウイルス活性も高値を示し、マウスの <i>in vivo</i> challenge test ではウマ血清と同程度の生存率を示した。一方、4D4はIgM, Kd値 2×10^{-8} M, 50%感染フォーカス抑制濃度 30 ng/ml, 中和力価はCVS株で125 IU/mg, 西ヶ原株1 IU/mgであった。CVS株に対する中和力価は高いものの、補体依存性抗ウイルス活性は認めなかった。</p> <p>本論文は、狂犬病ウイルスに対するヒト型MAbを作製し、その特性を検索したもので、より安全なヒト免疫グロブリン製剤の安定供給にも繋がる可能性のある研究である。よって、審査員の合議により学位論文に値すると判定した。</p>			

学 位 論 文 要 旨

氏名 松本 昂

論 文 題 目

Isolation and characterization of novel human monoclonal antibodies possessing
neutralizing ability against rabies virus.

(狂犬病ウイルス中和活性を有するヒト型モノクローナル抗体の作成と性状解析)

要 旨

【背景と目的】狂犬病は狂犬病動物に咬まれることで感染し、発症するとほぼ 100%死亡する致死性のウイルス感染症である。全世界における狂犬病による年間の死亡数は、およそ 55,000 人と推測されその多くはアジア・アフリカ諸国に集中している。狂犬病ウイルスはラブドウイルス科リッサウイルス属に属し、マイナスセンスの 1 本鎖 RNA とそれにコードされる 5 つのウイルス蛋白質からなる。その感染および発症予防には、ウイルスのエンベロープ蛋白質である Glycoprotein (G 蛋白質) に対する中和抗体が重要な役割を果たしている。WHO が分類するカテゴリー III の重篤な狂犬病ウイルスの曝露時には、組織培養型狂犬病ワクチンの接種に加えて抗狂犬病抗体製剤 (RIG) の投与が曝露後治療法として推奨されている。現在、RIG としてウマ血清 (ERIG) とヒト免疫グロブリン (HRIG) とが使用可能だが、安全性や安定的な供給に限界があり、より安全性の高いヒト型モノクローナル抗体 (MAb) を *in vitro* で大量に作成することが求められている。そこで、Epstein-Barr (EB) ウイルストランスフォーメーション法をもとに抗狂犬病ヒト型 MAb を作成しその性状解析を行った。

【材料と方法】ボランティアの末梢血リンパ球はフィコール法を用い分離した。その後、CD2 抗体固相カラム (Dynal)を用いてネガティブセレクションにより B 細胞を分離し、EB ウイルスを感染させ不死化させた。その後、トランスフォーマント培養上清を用いて RFFIT 法によりウイルス中和活性を測定し、陽性クローンの選別を行った。その後、中和抗体を産生する陽性クローンの免疫グロブリン遺伝子を CHO 細胞に導入し恒常発現系を構築した。これらヒト型 MAb の認識エピトープを決定するため、それぞれのヒト型 MAb に対する中和耐性変異株を作成し、ダイレクトシーケンス法によってそのアミノ酸置換部位を決定した。さらに、ddY マウスを用いて *in vivo* での中和活性について検討するためマウス感染阻止試験を行った。

【結果と考察】総計 1,824 ウェルの不死化 B 細胞培養上清をスクリーニングし、最終的に 2 種類のヒト型 MAb (No.254 と 4D4)を確立することができた。No.254 は IgG3 抗体で、 Kd 値は $3.7 \times 10^{-7} M$ であった。また、狂犬病ウイルス固定株である CVS, ERA, HEP-Flury, および西ヶ原株に対する中和力価はそれぞれ、33.3 IU/mg, 264.2 IU/mg, 209.8 IU/mg, および 209.8 IU/mg であった。4D4 は IgM 抗体で、 Kd 値は $2 \times 10^{-8} M$ であり、その中和力価は CVS 株に対して 125 IU/mg、西ヶ原株に対しては 1 IU/mg であった。それぞれのヒト型 MAb 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 の中和耐性変異株の G 蛋白質では Lys₁₉₈ が Glu₁₉₈ に変異しており、これは Antigenic site II に位置していた。一方、4D4 では Ala₂₄₂ が Val₂₄₂ に変異していた。*In vitro* における 50%感染フォーカス抑制濃度は、No.254 では 68 ng/ml, 4D4 では 30 ng/ml であった。また、No.254 の補体依存的な抗ウイルス活性は、他のマウス MAb と比較し高い値を示した。さらに、No.254 は *in vivo* でのマウス感染阻止試験において、ERIG と同程度のマウス生存率を示した。一方、4D4 は CVS 株に対して 125 IU/mg と強いウイルス中和活性を持つものの、補体依存的な抗ウイルス活性は他のマウス MAb と同程度の活性を示した。

【まとめ】EB ウイルストランスフォーメーション法をもとに、狂犬病ウイルスに対するヒト型 MAb を確立できた。今後は、さらに中和活性の強いクローンを複数選別し、樹立することが臨床応用上必要であると考えられる。