

地球規模課題対応国際科学技術協力

(感染症研究分野「開発途上国のニーズを踏まえた感染症対策研究」領域)

デング出血熱等に対するヒト型抗体による治療法の開発と新規薬剤候補 物質の探索

(タイ)

平成 23 年度実施報告書

代表者：生田 和良

大阪大学 微生物病研究所・教授

<平成 20 年度採択>

1. プロジェクト全体の実施の概要

鳥インフルエンザのような新興感染症や、デング熱・デング出血熱、ボツリヌス中毒症などの再興感染症の対策は世界的に緊要な課題である。本プロジェクトの目的は、タイの研究グループとの連携により、これら感染症に対する対策研究(デング、インフルエンザ、ボツリヌス中毒症に有効と考えられるヒト型抗体の作製およびタイ原産微生物に由来する抗デングウイルス活性を示す機能物質の同定とその工業レベルの生産)を展開し、地球規模での感染症対策に寄与することにある。

平成21年4月以降、大阪大学微生物病研究所で、インフルエンザワクチン接種ボランティアから採取した血液を用いて、インフルエンザウイルスに特異的なヒト型単クローン抗体を産生するハイブリドーマを作製してきた。その中には、インフルエンザ B ウイルスや豚由来新型インフルエンザ A ウイルス(H1N1 pdm)を中和できる抗体が含まれていた。そこで、平成 22 年度は、それらの認識エピトープ領域の同定を行ってきた。また、ボツリヌス毒素トキソイドワクチンを接種したボランティアおよびインフルエンザ患者からの血液を用いて特異抗体産生ハイブリドーマ株を分離してきた。平成 22 年度～平成 23 年度は、それらの活性評価に関してマウスを用いた実験を中心に行ってきた。大阪大学生物工学国際交流センターおよび大阪大学医学系研究科保健学専攻では、それぞれインフルエンザウイルスおよびボツリヌス毒素に対して得られたヒト型単クローン抗体の遺伝子クローニングを進めてきた。

一方、タイでは、平成21年 8 月に研究をスタートし、医科学局ではデングウイルスおよびインフルエンザウイルスに対するヒト型抗体の作製とボツリヌス中毒症アウトブレイク時(2010 年に 3 回)のサンプルからの菌分離と毒素の遺伝子型のタイピングを、一方マヒドン大学熱帯医学部ではデングウイルスに対するヒト型抗体の作製を実施してきた。

特異抗体産生ヒト型抗体産生ハイブリドーマ株の作製効率は極めて低く、ウイルス中和活性の認められるヒト型抗体作製には至っていなかったが、平成 22 年度上期に日本からの専門員を派遣し、SPYMEG 細胞を用いたハイブリドーマ作製法に関するトレーニングを、医科学局とマヒドン大学熱帯医学部からの 19 名の参加を得て実施した。その後も引き続き、マヒドン大学熱帯医学部で実際の患者(20 歳以上の成人)血液サンプルを用いた実験を日本からの専門員とタイ研究員と共に精力的に行ってきた。当初は、患者の回復期から特異抗体が多く得られると予想していたが、デングの急性期患者からのサンプルで極めて多くの特異抗体産生ハイブリドーマ株が分離できたのに対し、同患者の回復期からのサンプルでは数株のみの作製、という予想とは逆の結果が得られた。その後も、別の患者の急性期由来血液を用いた場合には高率に得られること、回復期由来サンプルを用いた場合には低い、という顕著な違いを確認した。その後、得られたハイブリドーマ株の性状解析を行い、これまでの 136 株の抗デングウイルスヒト型抗体の内、本プロジェクトの対象となり得る、デングウイルス 1 型～4 型を共に強く中和できるものとして 20 株を同定した。今後はこの 20 株について詳細な比較解析を行い評価し、ベストの候補についてその抗体遺伝子のクローニングとその発現を実施する予定である。

医科学局では、平成 22 年度下期にインフルエンザウイルスに対する特異抗体産生ハイブリドーマを作製できた。そこで、平成 23 年度はそれらの中のウイルス中和活性の有無について検討した。新型インフルエンザウイルス H1N1 pdm に対してのみに中和能を示すヒト型単クローン抗体 3 株、季節性 H1N1 および新型 H1N1 pdm の両方に対して中和能を示すヒト型単クローン抗体 2 株が作製できた。一方、医科学局における抗デングウイルスのヒト型単クローン抗体の作製について、22 名の患者(小児)由来血液サンプルを用いてハイブリドーマ作製実験を行い、これまでに、13 株のウイルス中和活性陽性の抗デングウイルス特異的なヒト型単クローン抗体が分離できた。平成 23 年度下期は、これまでに得られたヒト型単クローン抗体

の中和能を測定し、デングウイルス 1 型～4 型を共に強く中和できるものとして 20 株を同定した。

医科学局でのボツリヌス毒素に対する研究課題は、タイでアウトブレイクを発生させたボツリヌスのタイプを決定するための遺伝子解析の実験を行うことである。タイのアウトブレイクは、2006 年に 1 回（この時のタイプは A 型）、2010 年に 3 回（ランパン、メーホーソン、サラブリ）発生し、後者に由来するサンプル内ボツリヌス毒素の遺伝子解析を進め、F 型（菌株の分離には不成功）、A 型、B 型であることを明らかにした。A 型株については、大阪府立大学・国立感染症研究所で研修を行うことにより詳細な情報収集を行った。一方、タイ側では日本で作製されているトキシイドワクチン（未承認）の接種について倫理委員会の承認が得られなかったため、わが国での研修として、ワクチン接種済の日本人ドナーからの血液サンプルを用いて、抗ボツリヌス毒素ヒト型単クローン抗体の作製を行い、数株のハイブリドーマ株の作製に成功した。これらをタイに移送し、その性状解析をタイで実施している。

一方、マヒドン大学理学部は、タイ原産植物、昆虫、土壌由来微生物の抽出物内からの、デングウイルス感染症に有効と考えられる抗デングウイルス活性を示す機能物質を同定しその生産性増強を目指している。高速液体クロマトグラフィー（HPLC）分画前の粗抽出サンプルをマヒドン大学理学部で作製し、それらの抗デングウイルス活性と細胞毒性活性について大阪大学微生物病研究所および医科学局で検討し、これまでに植物由来 6 種および昆虫に由来する 2 種に、抗デングウイルス活性と考えられる活性を認めることができた。また、大阪大学生物工学国際交流センターでこれら粗抽出サンプルの HPLC 分画を進めているが、分画後の成分においても抗デング活性を示す成分同定には至っておらず、更なる分画が必要である。

2. 研究グループ別の実施内容

① 研究のねらい

タイ王国は人口 6100 万人で日本の約 1/2 倍、面積は 51 万 km² で日本の約 1.4 倍の国である。新興感染症の出現がしばしば認められる東南アジアに位置し、熱帯性気候である。感染症分野における研究者は、周辺国に比べ比較的高いレベルにあり、タイは開発途上国の多い同地域における指導的立場にある。デング熱やデング出血熱などのデングウイルス感染症は熱帯地域において、年間 5 千万人が感染し、25 万人の重症化例をみる、世界的に重要な蚊媒介性の疾患である。しかし、未だ有効な治療法が確立されていない疾患である。また、肺炎を併発しやすい高齢者や、稀に脳炎や脳症を併発する場合がある幼児にとってインフルエンザも重要な疾患である。インフルエンザ・パンデミックを引き起こすことが危惧されている鳥インフルエンザウイルスも、世界的な対応が迫られている緊要課題である。一方、2006 年および 2010 年、タイにおいて集団発生が認められた食餌性ボツリヌス中毒症は、その治療に必要とされるボツリヌス抗毒素製剤の国内備蓄がなく、アウトブレイク発生のたびにその確保にあたって世界各国に供給支援を依頼した経緯がある。

本プロジェクトの目的は、タイにおいて重要なデング、インフルエンザ、ボツリヌス中毒症に有効なヒト型単クローン抗体を作製すること、またデング疾患に有効なタイ原産微生物由来機能物質を同定することである。これらの一連の研究過程を通して、本プロジェクトに参加しているタイ側研究グループのレベル向上を目指すと共に、タイにおいて、ひいては地球規模での感染症対策に寄与することである。

② 研究実施方法

ヒト型単クローン中和抗体の作製方法として、デングおよびインフルエンザ患者の急性期および回復期

からの末梢血単核球、また、インフルエンザワクチン接種者、ボツリヌスのトキソイドワクチン接種者からの末梢血単核球を用いる。方法は、(株)医学生物学研究所が開発したフュージョンパートナー細胞である SPYMEG を用いる。デングウイルスとインフルエンザウイルスに対する特異抗体産生のスクリーニングは、これらウイルスの感染細胞を用いた蛍光抗体法を用いる。安定して特異抗体の産生が認められたハイブリドーマクローンについては、その産生抗体の評価を、培養細胞を用いたウイルス中和試験によって行う。中和活性の認められたものについては、さらにマウスを用いた動物実験により、その安全性と有効性に関する評価を行う。これらの評価を経て有望と判断された単クローン抗体候補については、その IgG 遺伝子の可変領域の遺伝子クローニングを行い、哺乳細胞で発現したその組換え IgG についてもマウスを用いて評価し、その後にサルを用いた評価実験へと進める。一方、ボツリヌス毒素については、まずタイ国内で蔓延している型を ELISA および PCR による遺伝子増幅とその増幅後の遺伝子配列決定により型別する。さらに、これらの型の中和に有効なヒト型単クローン抗体の作製を行う。

一方、タイ原産植物、昆虫および土壌に由来する病原微生物から抽出した物質の中から、デング出血熱に対して有効性が認められる機能物質の探索を行う。まず、植物、昆虫さらに土壌由来病原微生物(それぞれの菌株を5種類の異なる培養液で増殖させたもの)について、それぞれの粗抽出物における抗デングウイルス活性(ウイルス増殖抑制活性)および細胞毒性活性について 96 穴マイクロプレートを用いた簡便な手法により評価し、この過程で強い抗デング活性が認められ、細胞毒性活性が無い、もしくはほとんど認められないものについて、HPLC による分画を行う。分画された各画分について同様のアッセイを行い、抗デングウイルス活性を示す、既知あるいは新規の機能物質の構造同定を行う。有力と考えられる候補については、生合成遺伝子改変や制御系の人為的制御を通して生産性を増強した生産菌を育種する計画である。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

デングウイルスに対するヒト型単クローン抗体が多数作製でき、また抗インフルエンザウイルスについても中和活性を示す単クローン抗体が作製でき、それらの性状解析が順調に進んでいる。一方、ボツリヌスについては、タイと日本で役割分担する研究課題が確定した。このように、デングウイルスおよびインフルエンザウイルスに対するヒト型単クローン抗体の作製に関しては順調に進んでいるが、ボツリヌス毒素に対するヒト型単クローン抗体の作製、および抗デングウイルス活性を示す機能物質の探索に関しては、当初予定していた研究計画からかなりの遅れをとっており、今後積極的に進めていく必要がある。

④カウンターパートへの技術移転の状況

実験手技に関して、タイのそれぞれの研究機関において Standard Operation Protocol (SOP) にしたがった説明を行うと共に、議論を深めるためのミーティング、および日本側研究者によるデモンストレーションを行いながら実施する計画で進めている。この点を、日本とタイ側の研究者メンバー間で徹底させるために、2009 年 11 月に“第1回 Scientific Meeting”を実施し、これまでに半年毎計5回行ってきた。回を重ねるごとに意欲的な発言が行われるようになってきている。2011 年 7 月に実施した第4回 Scientific Meeting では、日タイ間の知財に関する意識を一致させるために、国際的な知財関係に関わる専門家を招いてセミナーも同時に開催することができた。このときの議論から、デングウイルスに対するヒト型単クローン抗体の作製とそのウイルス中和機能に関して、マヒドン大学熱帯医学部の成果、医科学局の成果をそれぞれ独立した形で、米国に provisional patent application の形で申請した。1年後には、双方の成果を1つの形にまとめた PCT

出願を行うことで了解が得られている。また、JICA 中間評価実施期間中の2012年1月には第5回 Scientific Meeting を開催し、残る期間にそれぞれの分野で何を実施しどこまでの成果を上げるのかについて議論した。

⑤当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況
平成 22 度下期には、特になし。

3. 成果発表等

(1) 原著論文発表

- ① 本年度発表総数(国内 0件、国際 2件)
- ② 本プロジェクト期間累積件数(国内 0件、海外 2件)
- ③ 論文詳細情報

Mizuike R, Sasaki T, Baba K, Iwamoto H, Shibai Y, Kosaka M, Kubota-Koketsu R, Yang CS, Du A, Sakudo A, Tsujikawa M, Yunoki M, and Ikuta K. Development of two types of rapid diagnostic test kits to detect the hemagglutinin or nucleoprotein of the swine-origin pandemic influenza A virus H1N1. *Clinical and Vaccine Immunology* 18:494-499, 2011.

Puiprom O, Yamashita A, Sasayama M, Limkittikul K, Boonha K, Jittmitraphap A, Leungwutiwong P, Kurosu T, Ranmasoota P, and Ikuta K. Co-existence of major and minor viral populations from two different origins in patients secondarily infected with dengue virus serotype 2 in Bangkok. *Biochem Biophys Res Commun* 413, 136-142, 2011.

(2) 特許出願

- ① 本年度特許出願内訳(国内 0件、海外 0件、特許出願した発明数 3件)
- ② 本プロジェクト期間累積件数(国内 0件、海外 3件)

4. プロジェクト実施体制

(1)「デング、インフルエンザ、ボツリヌス中毒症に有効なヒト型単クローン抗体の作製」グループ(研究題目)

- ①研究者グループリーダー名： 日本側 生田和良 (大阪大学・教授)
相手国側 Pathom Sawanpanyalert (医科学局・所長)
Pongrama Ramasoota (マヒドン大学熱帯医学部・准教授)

②研究項目

- (1-1) Preparation of human MAb against dengue virus and the evaluation of effectiveness and safety
- (1-2) Preparation of human MAb against influenza virus and the evaluation of effectiveness and safety
- (1-3) Preparation of human MAb against botulinum toxin and the evaluation of effectiveness and safety

- 1) ハイブリドーマ作製技術
- 2) デングウイルス特異抗原検出に関するスクリーニング法
- 3) インフルエンザウイルス特異抗原検出に関するスクリーニング法
- 4) IgG精製方法
- 5) IgGの可変領域のクローニング法、組換え IgG 構築法、およびその哺乳細胞での発現法
- 6) ボツリヌス毒素に関する毒性試験法

(2)「デング感染症に有効なタイ原産微生物由来機能物質の同定」グループ(研究題目)

- ①研究者グループリーダー名： 日本側 生田和良 (大阪大学・教授)
仁平卓也 (大阪大学・教授)

相手国側 Pathom Sawanpanyalert (医科学局・所長)

Pongrama Ramasoota (マヒドン大学熱帯医学部・准教授)

Watanalai Panbangred (マヒドン大学理学部・教授)

②研究項目

(2) Novel bioactive compounds against dengue virus are explored from Thai natural microorganisms, including plant- and insect-derived bacteria, and evaluated their effectiveness and safety in collaboration between Thai and Japanese researchers.

以上