

地球規模課題対応国際科学技術協力(SATREPS)

感染症研究分野「感染症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

(タイ王国)

終了報告書

期間 平成21年4月～平成25年7月

代表者氏名: 生田和良
(大阪大学 微生物病研究所 教授)

§ 1 プロジェクト実施の概要

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単クローン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探索)を展開し、地球規模での感染症対策に寄与することにあつた。ヒト型単クローン抗体の作製には、(株)医学生物学研究所(MBL)製のフュージョンパートナー細胞である SPYMEG を用いた細胞融合法を用いた。

デングウイルスに対するヒト型抗体は、タイのデング患者由来血液サンプルを用いて作製した。タイの保健省医科学局の研究グループおよびマヒドン大学熱帯医学部の研究グループとの連携によりそれぞれ独立して進めてきた。その結果、マヒドン大学熱帯医学部との共同研究として、136 株が作製できた。その多くはデングウイルスに 2 回目に感染した患者(20 歳以上の成人)の急性期由来血液サンプルから得られたもの(4 名の急性期患者から 121 株、5 名の回復期患者から 15 株)であり、しかも急性期由来株の中には、デングウイルス 1 型～4 型のいずれも強く中和できる活性を持つ抗体が多く含まれていた。このような高い中和活性を示す上位 20 株について抗体遺伝子のクローニングを実施し、その詳細な性状解析を行った。一方、保健省医科学局との共同研究として、22 名のデング小児患者由来血液サンプルを同じ手法を用いてハイブリドーマ作製を実施し、8 名の患者サンプルより 43 株の抗デングウイルス抗体の作製に成功し、この内、22 株はデングウイルス 1 型～4 型のいずれも強く中和できる活性を持っていること、その内の 8 株は抗体遺伝子のクローニングも実施した。これらマヒドン大学熱帯医学部および保健省医科学局に由来する単クローン抗体に関する成果は、2011 年 9 月にそれぞれ別々に米国に仮出願を行い、2012 年 9 月に、両者の成果をまとめた形で PCT 出願を行った(マヒドン大学熱帯医学部は 136 株、保健省医科学局は 10 株についての内容)。また、マヒドン大学熱帯医学部との共同研究として得られた成果は論文としてまとめ報告(BBRC)し、さらに現在も、さらなる詳細な性状解析に関する成果を論文としてまとめた。現在、マヒドン大学熱帯医学部由来抗体から 2 株、さらにタイ保健省医科学局由来抗体から 1 株を抗体医薬開発に有望な候補と考え、JST 追加予算によるマーモセットを用いた *in vivo* 評価実験を行い、予防法と治療法の両方においてウイルス増殖抑制効果のあることが確認できた。

インフルエンザウイルスに対するヒト型抗体は、日本とタイ(保健省医科学局)でそれぞれ独立して、SPYMEG を用いる同手法を用いて進めてきた。日本では、ワクチン接種ボランティア 30 名およびインフルエンザ患者 2 名に由来する血液サンプルを用いて作製を試みたところ、ワクチン接種ボランティアから 11 株が、患者から 36 株が得られた。これらについて解析を進めた結果、これまでに以下の成果を得た。

- ① インフルエンザ B ウイルスは、Yamagata lineage と Victoria lineage に大きく分かれるが、これら両方の lineage に含まれるウイルス株を広く中和できるヒト型単クローン抗体が得られた。これら抗体の認識エピトープを同定したところ、新たなエピトープを認識していることが判明し、2012 年 1 月に米国仮出願を行い、2013 年 1 月に PCT 出願を行った。また、この成果は論文としてまとめ、投稿し、PLoS Pathogens に受理された。
- ② ワクチン接種ボランティアに由来する抗体で、豚由来インフルエンザ A ウイルス(H1N1pdm)を中和できる抗体が含まれていた。そこで、それらの認識エピトープ領域の同定を行ったところ、このエピトープはウイルス中和に関わる中心的な領域と思われ、徐々にエスケープするウイルス集団の割合が上昇することが判明し、治療抗体の候補としてはふさわしくないことが判明した。そこで、特許申請は行わずに、論文としてまとめ、PLoS One に投稿し、Minor Revision との結果を受け、現在、再投稿中である。
- ③ 豚由来インフルエンザ A ウイルス(H1N1pdm)に感染した患者に由来する抗体で、このウイルスのみならず、季節性インフルエンザウイルス H1N1 および鳥インフルエンザウイルス

H5N1 や H9N2 など、インフルエンザ A ウイルスの Group I に属するウイルスを広く中和するが、H3N2 や H7N7 などの Group II に属するウイルスに対しては中和しない抗体が 2 株得られた。類似の抗体に関する報告は他の研究グループからも既に行われているが、これまでの解析では、認識エピトープ領域はこれまでの報告と類似の領域であるが、各種変異体との反応性テストから、反応性に影響を与えるアミノ酸置換はこれまでの報告の抗体とは明確に異なっていることが判明し、新規のエピトープの認識したヒト型単クローン抗体である可能性が高くなってきた。この違いは、これまでの報告のいずれもがファージディスプレイ法で作製されたもので、私たちの細胞融合法と異なることに依っているのではないかと考えられる。今後、この抗体に関して特許申請を行った上で論文として報告する予定である。

- ④ 豚由来インフルエンザ A ウイルス(H1N1pdm)に感染した患者に由来する抗体で、このウイルスのみならず、季節性インフルエンザウイルスH1N1 との交差性は認められ、双方のウイルスを中和する抗体が1株得られた。しかし、③とは異なり、H5N1 や H9N2 など、インフルエンザ A ウイルスの Group I に属する他のウイルスに対する反応性は認められない。

一方、タイの保健省医科学局においても、抗インフルエンザウイルス抗体作製が独自に進められており、これまでにワクチン接種ボランティアおよびインフルエンザ患者由来血液サンプルを用いて作製されてきた。これまでの解析により、日本で得られている上記④に類似の性状を示す抗体が 2 株得られており、これらの抗体の認識エピトープの同定が進むと双方の成果をまとめ、その結果が新規のエピトープ認識で会った場合には特許申請を行ったうえで、共著論文として発表する予定である。

ボツリヌス毒素に対するヒト型抗体に関しては、主に日本側で作製が試みられた。ボツリヌス毒素のトキソイドワクチンを接種した日本人ボランティアからの血液サンプルを用いて、ボツリヌス毒素を中和できる特異抗体を 4 株作製してきた。これらは、ボツリヌス毒素 A 型と結合できる抗体1株(M3B10)、B 型毒素と結合できる抗体3株(S-1、M-2、M-4)であるが、この内、M-2 と M-4 を組み合わせた場合には相乗効果が認められ、極めて高い中和活性を発揮することが明らかになった。これら抗体の遺伝子クローニングは既に終了している。これらの成果は、2012 年 9 月に米国への仮出願を行い、現在その PCT 出願の準備を進めると共に、論文としてまとめている状況である。一方、タイ人研究者により、日本での実習時に日本人のワクチン接種ドナーからの血液を用いて、ボツリヌス毒素に特異的なヒト型単クローン抗体産生ハイブリドーマ数株の作製に成功した。医科学局の希望により、それらの産物をタイに移送後、リクローニングを試みたが、ELISA において A 型および B 型毒素に反応する抗体は得られなかった。

一方、タイ保健省医科学局でのボツリヌス毒素に対する研究課題は、タイでのボツリヌス中毒症のアウトブレイクに由来するボツリヌス毒素の遺伝子タイプを決定するために、その遺伝子解析を中心に行うこととなった。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、サラブリ地域)のアウトブレイクがあったが、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(B)型、B 型であることを明らかにした。また、サラブリ由来の菌がサブタイプ A1 (NTCT 2916 株 = 100% identity) およびサブタイプ B1 (Iwate 株 = 99.6% identity) 遺伝子、メーホーソン由来の菌がサブタイプ B2 (111 株 = 96% identity) 遺伝子を持つことが明らかとなった。これら遺伝子解析は大阪府立大学との共同研究として実施してきたものであり、共著論文としてまとめ、PLoS One に投稿し、Revision との結果を受け、現在、再投稿中である。

マヒドン大学理学部では、タイ原産の土壌、植物、昆虫に由来する微生物(これまでに 209 の Actinomyces 株)を分離し、これらを各種培養液で培養し、370 の粗抽出サンプルを作製した。これらサンプルの抗デングウイルス活性をアッセイし、活性が認められた場合には、その高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により分画し、抗デングウイルス活性を示し、細胞毒性の無い機能物質の化学構造を明らかにすることを目指してきた。粗抽出サンプルをマヒドン大学理

学部で調製し、それらの抗 Dengue 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保健省医科学局で検討し、これまでに土壌(150 株)、植物(29 株)および昆虫(30 株)に由来する Actinomyces 培養液より、それぞれ 88、145、137 の計 370 種類の粗抽出サンプルを作製し、それらを用いてスクリーニングを行ったところ、25 種類の粗抽出サンプルが高い抗 Dengue ウイルス活性(>80%のウイルス増殖抑制)と低い細胞毒性(>80%の細胞の生き残り)を、8 種類の粗抽出サンプルが高い抗 Dengue ウイルス活性(>80%のウイルス増殖抑制)と高い細胞毒性(<80%の細胞の生き残り)を認めた。その内、4種類の粗抽出サンプルについて HPLC 分画を行い、抗 Dengue ウイルス活性を示す成分の同定を試みてきた。しかし、細胞毒性が無く、高い抗 Dengue ウイルス活性を示す物質の同定とその化学構造の決定にまで進めることができたものは、これまでに無い。

§ 2. プロジェクト構想(および構想計画に対する達成状況)

(1) 当初のプロジェクト構想

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。

Dengue 熱や Dengue 出血熱などの Dengue 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 Dengue、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 Dengue 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った。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った。

② 研究実施方法

ヒト型単クローン中和抗体の作製は、Dengue 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や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と、MBLが開発したフュージョンパートナー細胞である SPYMEGとの細胞融合法により行った。Dengue 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た。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った。これらの in vitro 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、さらに種々の評価実験を進めた。また、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した。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っ

た。

一方、タイ原産土壌、植物および昆虫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った。まず、土壌、植物さらに昆虫に由来する病原微生物(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ウイルス活性が認められ、細胞毒性活性が無い、もしくはほとんど認められなかったものについて、HPLC による分画を行った。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の確認、既知あるいは新規の機能物質であるかの決定を行い、それらの化学構造の同定を行う計画であったが、まだ、細胞毒性が無く、強い抗デングウイルスを示す新規と考えられる候補が同定できたが、その完全な構造決定にまでは至っていない。

(2) 新たに追加・修正など変更したプロジェクト構想

デングウイルスに対するヒト型単クローン抗体の作製は、当初患者の回復期からの血液サンプルを用いる計画であった。ところが、マヒドン大学熱帯医学部の倫理委員会に申請した際、患者の回復期には既に患者は退院しており、血液サンプル入手が大変なので、患者の急性期(入院中)からのサンプリングも検討して欲しいとの提案があった。そこで、回復期と共に急性期にある患者由来血液サンプルについてもハイブリドーマ作製を試みた。予想に反して、極めて多くの特異抗体産生ハイブリドーマ株が急性期から作製でき、回復期からはごく一部であった。この結果は、今回の血液サンプル入手元であるデング患者のほとんどが、2 回目のデングウイルス(1 回目とは異なる血清型)の感染によって発症したものであったことが、高い分離率に導いたと考えられる。実際、近年の免疫学においてホットな領域である、メモリー細胞の種類とその経時的変化に関する新たな知見、すなわち未熟抗体産生細胞が占める末梢血単核球の割合がブースト刺激からほぼ 1 週目にピークがあるという情報と一致する結果であった。そこで、インフルエンザウイルスやボツリヌス毒素に対するヒト型単クローン抗体作製時においても、この経験を生かし、ワクチンもしくはトキソイド接種後またインフルエンザ患者発症のほぼ 1 週目の血液サンプルを用いることが有効であることを、隔月のワーキンググループにおいて議論し、徹底した。

一方、タイ保健省医科学局におけるボツリヌス毒素に対するヒト型単クローン抗体の作製は、日本で開発されたトキソイドワクチン(日本においても、この分野で活躍している研究者の安全のために開発されたもので、未承認の製品)が、タイ人研究者に接種することがタイ FDA の承認が得られなかったために、計画を変更し、タイでは、アウトブレイクの原因となっているボツリヌス毒素の遺伝子型解析を行うことを中心課題とし、ヒト型抗体は日本人研究者によって作製する計画に変更した。

実験手技に関しては、タイのそれぞれの研究機関において Standard Operation Protocol (SOP) に従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きた。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 7 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た。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。このときの議論に従って、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、保健省医科学局の成果をそれぞれ独立した形で、2011 年 9 月に米国に仮出願し、2012 年 9 月に双方の成果を一つの形に

まとめたPCT出願を行った。また、2013年2月に行われた終了時評価と合わせて、2月18日に最終となる第7回 Scientific Meeting を開催した。

(3) 活動実施スケジュール (実績)

(Plan of Operation に実績のバーチャートを線引きしたもの)

- ① Human monoclonal antibodies (MAb) against dengue hemorrhagic fever, influenza and botulism are pared and evaluated their effectiveness and safety in collaboration between Thai and Japanese researchers.

1-1) 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評価

デング熱およびデング出血熱患者(マヒドン大学熱帯医学部との共同研究では成人タイ人患者、また保健省医科学局との共同研究では小児タイ人患者)に由来する血液サンプルを用いて、デングウイルスのいずれの血清型(1型~4型)ウイルスにも特異的に反応するヒト型単クローン抗体を作製した。また、そのウイルス中和活性およびAntibody-dependent enhancement (ADE)活性を評価した。マヒドン大学熱帯医学部では予定通りのスケジュールで進んだが、保健省医科学局では予定よりかなり遅れた。しかし、期限内に得られた抗体の活性評価に関する実験も、最終的には終わることができた。これらの単クローン抗体の内、抗体医薬としての開発が有望と考えられる抗体株に関しては、その抗体IgG遺伝子のクローニング、組換えIgGの再構成、そしてその発現と発現物の評価を実施した。この内、最も有望と考えられるマヒドン大学熱帯医学部由来の2株、保健省医科学局由来の1株については、マーモセットを用いた治療効果に関する実験を実施した。その結果、ウイルス接種の前後で抗体を導入することにより、その予防および治療効果を確認することができた。

一方、これらヒト型中和抗体に関する詳細なin vivo評価を行ううえで、小型の動物モデルの開発が必須であった。そこで、これまで、デングウイルスの複製が認められるマウス実験系の開発に関して試行錯誤を行ってきた。その結果、インターフェロン α 、 β 、 γ のレセプターを欠損させたマウス(IFN- $\alpha\beta\gamma$ R KOマウス)において、デングウイルスの複製が認められたこと、さらにデングウイルスの近縁の日本脳炎ウイルス遺伝子を背景に、デングウイルスのウイルス粒子表面蛋白であるエンベロープ(E)および膜(prM)蛋白遺伝子を組換えたウイルスを作製し、このウイルスを接種した上記欠損マウスでは、このウイルスの複製率が有意に高くなっており、致死的事であることが明らかになった。このウイルスとIFN- $\alpha\beta\gamma$ R KOマウスを用い、マウス単クローン抗体による感染予防効果を検定し、抗体による防御効果を評価できる系であることを確認した。さらにある一定濃度の抗体を移入すると、致死性が早まることを確認した。この効果は、非常に狭い範囲の抗体濃度で起こっており、抗体依存性感染増強(ADE)と類似の効果と考えられる。この系を用いて、本プロジェクトで得られたヒト型単クローン抗体のin vivo評価として、ヒト型抗体による予防効果を検討している。

1-2) 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とその評価

インフルエンザワクチン接種ボランティアおよびインフルエンザ患者の血液サンプルを用いて、日本とタイでそれぞれ独自にヒト型単クローン抗体の作製を試みた。これまでに、日本では、インフルエンザBウイルス(Yamagata lineageとVictoria lineageに大きく分かれる)の両方のlineageに含まれるウイルス株を広く中和できるヒト型単クローン抗体、豚由来インフルエンザAウイルス(H1N1 pdm)を中和できる抗体、またGroup Iに属するウイルス(H1N1 pdm、季節性H1N1、H5N1、H9N2)を広く中和するヒト型単クローン抗体を作製した。抗体医薬として開発するうえで有望と考えられるヒト型単クローン抗体株に関しては、マウスを用いた予防、治療効果に関する実験を実施した。

一方、タイの保健省医科学局においても、抗インフルエンザウイルス抗体作製が独自に進められており、これまでにワクチン接種ボランティアおよびインフルエンザ患者由来血液サン

プルを用いて作製されてきた。これまでの解析により、日本で得られている上記のGroup IIに共通して中和活性を示す抗体に類似の性状を示す抗体を作製した。

これら抗体に関しては、IgG遺伝子のクローニング、組換えIgGの再構成、そしてその発現と発現物の評価を実施した。

以上、日本の進捗はほぼ予定通りであったが、タイの保健省医科学局ではスタートするまでにかなりの時間を要した。また、得られたヒト型単クローン抗体の評価に関する実験には、広い知識と手技が必要となり、日本からの専門家の派遣、日本での研修を行ってきたが、予定通りには進んでおらず、当初のスケジュールから遅れが生じているものの、幾つかの有望なヒト型単クローン抗体の作製に成功し、それらの解析を進めている。

1-3) ボツリヌス毒素に対するヒト型単クローン抗体の作製とその評価

ボツリヌス毒素のトキソイドワクチンを接種した日本人ボランティアからの血液サンプルを用いて、日本で、ボツリヌス毒素を中和できる特異抗体を作製してきた。これらは、ボツリヌス毒素A型とB型を中和できるものが含まれていた。そこで、これら抗体のIgG遺伝子のクローニングを実施した。また、マウスを用いたボツリヌス毒素の中和活性評価実験を実施した。日本においては、ほぼ予定通りのスケジュールで進捗している。

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.

マヒドン大学理学部では、タイ原産土壌、植物、昆虫由来微生物の抽出物内からの、 Dengue ウイルス感染症に有効と考えられる抗 Dengue ウイルス活性を示す機能物質の同定を目指してきた。大阪大学微生物病研究所で抗 Dengue ウイルスアッセイ系の開発を行い、これをタイへ技術移転し、タイの保健省医科学局で、マヒドン大学理学部で調製した微生物の粗抽出物に対するアッセイを実施した。その後、抗 Dengue ウイルス活性が認められた粗抽出サンプルについて、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分画をマヒドン大学理学部、大阪大学生物工学国際交流センターで実施している。このように、タイ原産土壌、植物、昆虫由来微生物の、抗 Dengue ウイルス活性を示す粗抽出物の同定までは予想通りのスケジュールで行うことができたが、その後の HPLC による分画や、抗 Dengue 活性を示す成分を同定する過程に、予定していた以上に時間を要している。

③ The system on research and pharmaceutical affairs of bioproducts is streamlined.

実験室の整備、SOP 作成、隔月ごとの Working Group 開催、monthly report 作成、年次計画等に関しては計画通り実施し、独自に開設したホームページにこれらの情報を蓄積し、登録メンバーのみが閲覧できるシステムを構築し、得られた情報の共有を図った。また、臨床応用ができるように製薬会社への説明等もスタートしている。

§3 プロジェクト実施体制・投入実績

3.1. 実施体制

①研究参加者

グループ1

【日本側】

氏名	所属	役職 (身分)	研究参加期間			
			開始		終了	
			年	月	年	月
生田 和良	大阪大学	教授	2008	10	2013	3
黒須 剛	大阪大学	助教	2009	8	2013	3
渡邊 洋平	大阪大学	助教	2008	10	2013	3
瀬藤 律子	(財)阪大微生物病研究会	研究員	2008	10	2013	3
Promsin Masrinoul	大阪大学	大学院生	2008	10	2011	3
Anariwa Du	大阪大学	特任研究員	2009	4	2010	3
佐々木 正大	大阪大学	特任研究員	2009	12	2011	3
		特任助教	2011	4	2013	3
安木 真世	大阪大学	特任研究員	2010	4	2011	3
		特任助教	2011	4	2012	2
	大阪府立大学	助教	2012	3	2013	3
Juan Fernando Arias Morales	大阪大学	特任研究員	2010	4	2011	3
浅井 あづさ	大阪大学	特任助教	2011	4	2013	3
水池 理佳	大阪大学	大学院生	2010	11	2011	3

Supraanee Phanthanawiboon	大阪大学	大学院生	2011	5	2013	3
李 永剛	大阪大学	特任研究員	2011	7	2013	3
堀口 安彦	大阪大学	教授	2008	10	2013	3
大石 和徳	大阪大学	特任教授	2008	10	2013	3
中屋 隆明	大阪大学	特任准教授	2008	10	2013	3
藤永 由佳子	大阪大学	特任准教授	2008	10	2013	3
		特任教授			2013	3
松村 拓大	大阪大学	特任研究員	2009	4	2013	3
		特任助教			2013	3
平井 到	大阪大学	准教授	2010	4	2013	3
小崎 俊司	大阪府立大学	教授	2009	4	2013	3
高橋 元秀	国立感染症 研究所	室長	2009	8	2013	3
藤山 和仁	大阪大学	教授	2008	10	2013	3
三崎 亮	大阪大学	助教	2010	7	2013	3
福良 奈津子	大阪大学	大学院生	2010	7	2013	3
増蘭 夕紀子	大阪大学	大学院生	2012	6	2013	3
久原 基樹	(株)医学生 物学研究所	グループリーダ ー	2008	10	2011	3
小野 健一郎	(株)医学生 物学研究所	グループリーダ ー	2011	4	2013	3
百田 匡寿	(株)医学生 物学研究所	研究員	2009	11	2013	3

【相手国側】

氏名	所属	役職 (身分)	研究参加期間			
			開始		終了	
			年	月	年	月
Pathom Sawanpanyalert	保健省 医科学局	所長	2009	8	2013	3
Surapee Anantapreecha	保健省 医科学局	上級研究員	2009	8	2013	3
Atchareeya A-neugoonpipat	保健省 医科学局	研究員	2009	8	2013	3
Pattarin Pawatsilpa	保健省 医科学局	研究員	2009	12	2013	3
Aree Thattiyaphong	保健省 医科学局	上級研究員	2009	8	2013	3
Navakanit Sachanonta	保健省 医科学局	上級研究員	2009	8	2013	3
Virat Sumeteewatamakul	保健省 医科学局	研究員	2009	12	2013	3
Waridha Sa-nguanruang	保健省 医科学局	研究員	2009	12	2013	3
Somchai Sa-ing-kaew	保健省 医科学局	研究員	2009	12	2013	3
Panadda Dhepakson	保健省 医科学局	研究員	2009	8	2013	3
Apichai Prachasupsap	保健省 医科学局	研究員	2009	8	2013	3
Naphatsawan Boonsathorn	保健省 医科学局	研究員	2009	8	2013	3
Malinee Chittaganpitch	保健省 医科学局	研究員	2009	8	2013	3
Sumolrat Panthong	保健省 医科学局	研究員	2009	8	2013	3
Watoo Phrompittayarat	保健省 医科学局	研究員	2009	8	2013	3
Piyada Wangroongsarb	保健省 医科学局	上級研究員	2009	8	2013	3
Chutima Chitapraserisin	保健省 医科学局	研究員	2009	8	2013	3

Jotika Boon-Long	保健省 医科学局	上級研究員	2009	8	2013	3
Pongrama Ramasoota	マヒドン大学 熱帯医学部	准教授	2009	8	2013	3
Kriengsak Limkittikul	マヒドン大学 熱帯医学部	助教	2009	8	2013	3
Weerapong Phumratana	マヒドン大学 熱帯医学部	助教	2009	8	2013	3
Pannamas Manee Karn	マヒドン大学 熱帯医学部	レクチャラー	2009	8	2013	3
Pornsawan Luergwuttivong	マヒドン大学 熱帯医学部	レクチャラー	2009	8	2013	3
Akanitt Jittmittraphap	マヒドン大学 熱帯医学部	レクチャラー	2009	8	2013	3
Sarunya Kaewpraseert	マヒドン大学 熱帯医学部	レクチャラー	2009	12	2013	3
Urai Chaisri	マヒドン大学 熱帯医学部	助教	2009	12	2013	3
Natthanej Luplerdlop	マヒドン大学 熱帯医学部	レクチャラー	2009	8	2013	3
Pratap Singhasivanon	マヒドン大学 熱帯医学部	学部長	2009	8	2013	3

グループ 2

【日本側】

氏名	所属	役職 (身分)	研究参加期間			
			開始		終了	
			年	月	年	月
生田 和良	大阪大学	教授	2008	10	2013	3
黒須 剛	大阪大学	助教	2009	8	2013	3
佐々木 正大	大阪大学	特任研究員	2009	12	2011	3
		特任助教	2011	4	2013	3
Sabar Pumbudi	大阪大学	大学院生	2010	10	2013	3

仁平 卓也	大阪大学	教授	2008	10	2013	3
木下 浩	大阪大学	助教	2008	10	2013	3
木谷 茂	大阪大学	助教	2008	10	2013	3
五十嵐 康弘	富山県立大学	教授	2009	4	2013	3

【相手国側】

氏名	所属	役職 (身分)	研究参加期間			
			開始		終了	
			年	月	年	月
Pathom Sawanpanyalert	保健省 医科学局	所長	2009	8	2013	3
Surapee Anantapreecha	保健省 医科学局	上級研究員	2009	8	2013	3
Atchareeya A-neugoonpipat	保健省 医科学局	研究員	2009	8	2013	3
Jotika Boon-Long	保健省 医科学局	上級研究員	2009	8	2013	3
Pongrama Ramasoota	マヒドン大学 熱帯医学部	准教授	2009	8	2013	3
Pornsawan Luergwuttiwong	マヒドン大学 熱帯医学部	レクチャラー	2009	8	2013	3
Akanitt Jittmittraphap	マヒドン大学 熱帯医学部	レクチャラー	2009	8	2013	3
Pratap Singhasivanon	マヒドン大学 熱帯医学部	学部長	2009	8	2013	3
WatanaLai Panbangred	マヒドン大学 熱帯医学部	教授	2009	8	2013	3
Ousana Boonlucksanawong	マヒドン大学 理学部	研究員	2009	8	2013	3
Weeraya Janpaisaeng	マヒドン大学 理学部	研究員	2009	8	2013	3
Mayura Janhom	マヒドン大学 理学部	研究員	2009	8	2013	3

§ 4 プロジェクト実施内容及び成果

4.0 プロジェクト全体

(1) グループを統合した全体の成果

本プロジェクトでは、タイの研究グループとの連携により、タイで重要な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単クローン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探索)を展開し、地球規模での感染症対策に寄与することにあつた。

これまで、日本側とタイ側の研究チーム間の連携により、デング成人患者やデング小児患者からの血液サンプル、インフルエンザワクチン接種ボランティアやインフルエンザ患者からの血液サンプル、ボツリヌストキソイドワクチン接種ボランティアからの血液サンプルを用いて、それぞれデングウイルス、インフルエンザウイルス、ボツリヌス毒素に特異的なヒト型単クローン抗体の作製を行ってきた。その結果、いずれにおいても、それぞれの標的に対して高力価の中和活性を示す抗体の作製に成功した。

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年度以降、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作製し、これまでそれらの活性評価の検討を行ってきた。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、プロジェクト開始当初、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家を派遣し、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、ハイブリドーマの作製効率が上昇し、以下のような抗体作製の成功につながった。

マヒドン大学熱帯医学部では、デング患者(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家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、という予期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のサンプル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、その後の詳細な性状解析の対象として選択した。それらの抗体を精製し、抗体濃度を考慮した各種性状解析を行ったところ、特に免疫蛍光染色法(IFA)での反応性が強くかつ中和能の高い抗体を3株選出した。一方、20株全てについて、抗体遺伝子のクローニングを行い、CDR領域の遺伝子の決定を行った。一部の遺伝子に関しては、CHO細胞やHEK293T細胞での発現系により抗体の産生を行い、デングウイルスへのIFAおよび中和反応性が元の抗体と同等であることを確認した。

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 年度以降は、それらのウイルス中和活性について検討した。新型インフルエンザウイルス H1N1pdm および季節性 H1N1 に中和能を示すヒト型単クローン抗体 2 株を作製した。一方、医科学局における抗 Dengue 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、8 名の患者より 43 株の抗 Dengue ウイルス特異的ヒト型単クローン抗体産生ハイブリドーマの作製を行った。培養上清を用いた中和試験を行ったところ、Dengue ウイルス 1 型～4 型の全ての型に対し、80%以上中和能を示す抗体が 22 株を同定した。その内 8 株は抗体遺伝子のクローニングが終了した。

医科学局でのボツリヌス毒素に対する研究課題は、タイのアウトブレイクに由来するボツリヌス毒素遺伝子型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)認められ、これらアウトブレイク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(B)型、B 型であることを明らかにした。また、サラブリ由来の菌がサブタイプ A1 (NTCT 2916 株 = 100% identity) およびサブタイプ B1 (Iwate 株 = 99.6% identity) 遺伝子、メーホーソン由来の菌がサブタイプ B2 (111 株 = 96% identity) 遺伝子を持つことが明らかとなった。一方、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。これらをタイ側へ移送し、リクローニングを試みたが、ELISA において A 型および B 型毒素に反応する抗体は得られなかった。

以上のヒト型単クローン抗体のうち、Dengue ウイルスに対するヒト型単クローン抗体に関しては本プロジェクト開始時には報告がなされていなかったものの、現在までに 8 報の報告がある。それらのいずれもが、Dengue 患者の回復期もしくは数年を経た患者に由来する血液細胞を用い、EB ウイルス感染により不死化させることにより作製されたものである。E 蛋白を認識した抗体と prM 蛋白を認識した抗体がほぼ同数得られ、prM 蛋白を認識した抗体は中和活性が低く、逆に ADE 現象を引き起こしやすい抗体が多かったというのが、これまでの他のグループからの報告論文の結論である。一方、私たちの成果は、回復期よりも急性期に由来血液細胞を用いて、新たに日本の企業 (MBL) により開発されたフュージョンパートナー細胞 (SPYMEG) との細胞融合法を用いて、長期間の安定な抗体産生ハイブリドーマ株を樹立し、産生抗体の多くが E 蛋白を認識しており、prM 蛋白認識のものは少なかった。さらに、E 蛋白認識抗体のほとんどは中和活性が強く、その多くが 1 型～4 型のいずれの血清型ウイルスに対しても強い中和活性を示す傾向があった。このように、宿主が免疫応答を通じてウイルスと闘っている急性期は、まさに臨床症状が現れている時期であり、この時期に由来する血液細胞を用いて作製した単クローン抗体は、患者の免疫病態機序を解明するうえでも有用であるばかりでなく、回復期由来抗体より顕著に広域性の中和活性を示すことから、抗体医薬開発候補として非常に有用なものであると考える。また、インフルエンザウイルスに対しても、インフルエンザ B ウイルスを広く中和できる抗体の作製は世界で初めてのケースであり、PLoS Pathogens に受理された。インフルエンザ A ウイルスを広く中和する抗体に関しては幾つか報告されているが、同様な性質の中和活性を示す抗体は、私たちのグループにおいても日本とタイでそれぞれ独自に作製している。特に、これら抗体は、H1N1pdm 患者の血液を用いて作製し、高病原性鳥インフルエンザウイルス H5N1 をも中和するものであり、今後の解析により、その重要性が増す可能性がある。一方、ボツリヌス毒素に対するヒト型単クローン抗体も、世界の多くの研究グループにより取り組まれている課題であるが、私たちの研究グループは、特に、B 型を高率に中和できる抗体の作製に成功している。

一方、マヒドン大学理学部は、タイ原産土壌、植物、昆虫由来微生物の抽出物内からの、Dengue ウイルス感染症に有効と考えられる抗 Dengue ウイルス活性を示す機能物質の同定を目指してきた。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 Dengue 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、これまでに土壌、植物および昆虫に由来する Actinomyces 培養液より 370 種類の粗抽出サンプルを作製し、それらを用いてスクリーニングを行ったところ、25 種類の粗抽出サンプルが高い抗 Dengue ウイルス活性および低い細胞毒性を認めた。その内、4 種類の粗抽出サンプルについて大量培養を行い、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、抗 Dengue 活性を示す成分の同定を試みてきた。現在までのところ、細胞毒性が無く、高い抗 Dengue ウイルス活性を示す新規機能物質が認められた。この物質の完全な化学構造の決定を急いでいる。

(2) 今後期待される効果

ヒト型単クローン中和抗体は、これまで主として悪性腫瘍等に対する開発が進められてきたが、SARS など致死率が高い急性の感染症においても有効であることが確かめられたことから、急激に感染症に対してもヒト型中和抗体の開発が進められるようになった。実際にヒトに投与できる利点を持っており、現在の確な治療法が無い疾患や、薬剤の効果が限定的または HIV のように治療薬は有効でも耐性株出現が問題となっている疾患等においても有望視され、世界的に開発が進められている。現在までのところ、HIV、単純ヘルペスウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、RSウイルス、EBウイルス、サイトメガロウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、Dengue ウイルス、エボラウイルス、ロタウイルス等に対する研究・開発が進行中であるが、すでに臨床応用が実現しているものは RSウイルスのみである。この RSウイルスに対するヒト型抗体は、気管支や肺、心臓疾患を持つ乳児や未熟児など、RSウイルス感染による症状悪化の危険性を持っている場合の感染予防法として実用化されている。

ヒト型抗体の開発方法として、①マウスで得られた単クローン抗体のヒト型化法、②ファージディスプレイによる遺伝子クローニング法、③EBウイルスによる不死化法、④ヒト抗体産生細胞の細胞融合法が挙げられる。本プロジェクトでは、MBL が新しく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④の方法で効率良く作製するものであり、他の方法で得られなかったものを作製できる可能性があると考えられる。

現在、マウスやサルを用いた *in vivo* 評価を実施しており、この評価により、有効性と安全性が確認されれば、実用化への道が拓けると考えている。これまで、数社の国内外の製薬会社への情報公開を実施し、いずれの企業からも高い関心が示されているが、実際に開発を行うという意思表示はまだ得られていない。

一方、微生物に由来する機能性物質を感染症に対する治療剤とする手法は、抗生物質の多くの成功例に代表されるように、今なお世界中で探索が続いている一般的な手法である。これまでの多くは、製薬メーカーを中心として探索されてきた経緯から、非病原性の土壌微生物からの探索に留まっていたが、本プロジェクトでは、タイ原産の植物内生放線菌や昆虫病原性糸状菌など従来探索されてこなかった微生物群を対象として、Dengue 熱・出血熱など地球規模で問題となっている疾病に有効な活性をスクリーニングし、生合成遺伝子改変や制御系の人為的制御を通じて生産菌を育種する、これまでに無いアプローチであり、新規の有効な機能性物質を見出す可能性が高い分野である。Dengue ウイルスの複製を抑制する活性が高く、しかも細胞毒性が極めて低い機能性物質が同定できれば、インフルエンザで実用化しているように、Dengue に対するウイルス剤として実用化される可能性が極めて高い。Dengue の場合には、1 回目に感染した血清型ウイルスとは異なる血清型ウイルスに 2 回目に感染すると、1 回目の感染時に誘導されていた抗 Dengue ウイルス抗体のメモリー細胞を刺激することにより、急激に抗体を誘導し、これが 2 回目に感染した Dengue ウイルスと複合体を形成し、通常では感染しにくいと考えられるマクロファージにも、その細胞表面の Fc レセプターを介して感染を可能にしてしまう、いわゆる ADE 現象が知られ、これが Dengue の重症化を招く原因であるとの仮説が存在する。この点が、これまでワクチン開発の障害になっており、実際、これまで実用化したワ

クチンは存在しない。このような状況下で、抗 Dengue として機能する薬剤の開発が期待されている。

以上、日本とタイによる協調的な役割分担による二国間連携を成功させ、今後もタイ側が中心となって臨床化に向けた開発研究が継続されれば、タイ政府の感染症戦略の中核的な存在であると認識され、タイばかりではなく、その周辺諸国への波及効果は計りしれず、東南アジアへの渡航者のみならずわが国の安全・安心に対する貢献は大きい。

4. 1 Preparation of human MAbs against dengue virus and the evaluation of effectiveness and safety (大阪大学微生物病研究所、大阪大学生物工学センター、タイ保健省医科学局、マヒドン大学熱帯医学部)

(1) 研究実施内容及び成果

《実施方法》

本プロジェクトでは、抗体医薬として使用可能な Dengue ウイルス感染症に対するヒト型中和抗体の作製を目的として行った。実施手法としては、タイ保健省医科学局およびマヒドン大学熱帯医学部各々にて倫理委員会の承認を得た後、各々の機関で患者血液検体の収集を行った。それらの血液から PBMC を分離し、MBL により提供をされたヒト型抗体産生の為のフュージョンパートナー細胞である SPYMEG 細胞との細胞融合を行った。それらの融合細胞を培養の後、IFA により一次スクリーニングを行い、抗体産生細胞を含む細胞群の選択を行った。得られた抗体産生細胞群は限界希釈法によりクローニングを行い、得られたクローン細胞の産生する抗体について、IFA による二次スクリーニングを行い、特異抗体を産生しているクローン細胞株を選択した。得られた抗体産生細胞株の培養上清を用いて、1 型から 4 型までの Dengue ウイルスを用い、これら全ての血清型ウイルスに対する反応性の検討を IFA により実施すると共に、各々のウイルス型に対する中和能の検討を行った。また、それらの抗体のアイソタイプに関しての検討も既存のヒト型抗体アイソタイプキットを用いて実施した。その結果、Dengue ウイルスの全ての血清型に強い中和能を示す抗体を見出した。そこで、これら抗体産生株の精製抗体を用いた IFA 反応検出限界値、中和試験、ADE 試験、新生仔マウス及びマーモセットを用いた抗体評価検討等を行った。また、抗体の認識エピトープの同定も行った。

実験室レベルで得られたハイブリドーマは GMP 等の製薬基準を満たしていないことから、これらの抗体産生細胞由来の抗体は直接治療薬として応用することはできず、抗体の遺伝子情報を読み、その情報を基に製薬基準下にてその遺伝子発現を行うことにより創薬化されることを想定している。また、抗体の特許申請に際しても抗体の担保として遺伝子情報が必要であることから、得られたハイブリドーマの遺伝子解析を行い、産生される抗体の CDR 遺伝子配列の読み込み、およびそれらの遺伝子を用いた培養細胞での組換え IgG の発現を行い、元のヒト型単クローン抗体の性状との類似性についても確認した。

Dengue ウイルスに対する医薬品の開発においては、動物実験による評価系が限られている点が問題となっている。今までに新生仔マウスを用いた評価系およびアカゲザルやマーモセットを用いた評価系が報告されているものの、新生仔マウスの系は Dengue ウイルス感染症の病態を示さないことから、本評価系としては不十分である。一方、アカゲザルやマーモセットを用いた評価系は非常に高額であることから、開発された医薬品の評価をスクリーニング的に行うことは難しい。そこで、本プロジェクトでは Dengue ウイルスに対する医薬品の評価をマウスで行う為に、新たなモデル系の確立を検討してきた。

《実施内容・成果》

1) マヒドン大学熱帯医学部との共同研究

マヒドン大学熱帯医学部では、延べ 9 名の患者(4 名の急性期、5 名の回復期)より検体の採取を行い、ハイブリドーマの作製を行った。全ての患者が 2 回目のデングウイルス感染例であった。また、急性期の患者の血清を用いた解析により、これら 4 名の急性期患者はいずれも 2 型のデングウイルスに感染したものであった。136 クローンの抗デングウイルスヒト型抗体産生のハイブリドーマの作製に成功した。これらのクローンの中和能を検討したところ、20 クローンで全ての血清型のデングウイルスに対し、強い中和能(培養上清を用いた場合に、85%以上の増殖抑制を示すもの)を示した。また、これらのクローンの作製の過程において、急性期(発症後 1 週間前後)由来の検体で作製したハイブリドーマは、回復期(発症後 2 週間前後)由来の検体で作製したハイブリドーマに比較して、ハイブリドーマ数、広域な血清型に対する反応性を有する割合、中和能を有する抗体の割合、および広域な血清型に対する中和能を有する割合が高いことが示された。また、急性期由来の検体で作製したハイブリドーマ抗体の標的蛋白質は、多くが E 蛋白質を認識していることを見出し、論文として報告を行った(BBRC)。強い中和能を有する 20 クローンについて、ハイブリドーマを基に抗体の遺伝子解析を行い、CDR 領域の配列の決定を行った。さらに、一部の配列に関しては細胞発現系にて抗体の産生を行い、発現抗体が中和能を維持していることを確認した。これら 20 クローンの詳細な性状解析に関して、論文として報告を行った(Antiviral Research)。

2) タイ保健省医科学局との共同研究

デング患者(小児)からの血液サンプルを用いて、デングウイルス特異的抗体を産生しているハイブリドーマ株が 43 株分離でき、このうち 22 株がデングウイルスの 1 型~4 型のいずれも強く中和できる活性(ハイブリドーマ株の培養上清液で 80%以上のウイルス増殖抑制能)を示すことが明らかになり、これらのヒト型単クローン抗体について、パテント申請を行った。現在、論文投稿のための準備を進めている。

3) 大阪大学微生物病研究所及び大阪大学生物工学センター

デングウイルスに対するヒト型単クローン抗体の性状解析のために、C、prM、E、NS1 蛋白質をほ乳動物細胞で発現するベクターを作製した。抗体の評価のため、ウイルス中和アッセイ系、ADE アッセイ系を開発した。In vivo での抗体の評価を行うためのモデル動物として、各種マウスの入手、JEV(日本脳炎ウイルス)との組換えウイルス(デングウイルスの prM および E 蛋白質を発現)の作製等を行ってきた。一方、タイのマヒドン大学熱帯医学部にて作製された抗デングウイルス抗体のうち、強い中和能を有する 20 クローンについて、精製抗体を作製して詳細解析を行った。その結果、中和能およびウイルスとの反応性の強い抗体を用いて検討を行ったところ、新生仔マウスを用いた評価で 1 µg/head の投与でウイルス感染の完全な抑制効果を認めた。20 クローンに関して ADE 活性の検討を行ったところ、全ての抗体で ADE を示した。しかしながら、ADE の要因としては抗体の Fc 部位と感染細胞の Fc receptor との関連が示唆されていることから、抗体の Fc 部位を取り除き、F(ab)₂' 化したところ、中和能はほぼ維持したまま、ADE 活性を抑制することができた。また、これら 20 クローンのエピトープ解析を行ったところ、多くはデングウイルス E 蛋白質上のドメイン II 領域に存在する Fusion loop 近傍を認識する抗体であることが確認できた。また、1 株のヒト型中和単クローン抗体の有効性について、アカゲザルを用いて評価を行った。さらに、最も有望と考えられた、マヒドン大学熱帯医学部からの 2 株、医科学局からの 1 株について、JST からの追加予算により、筑波の基盤研究所霊長類センターにおいて in vivo 評価を実施した。また、デング患者のウイルス血漿の時期特定に有効な、イムノクロマト迅速診断キットの作製を、日本の企業(アル

フレッサ・ファーマ社)の協力を得て、本プロジェクトで得られた、1型から4型ウイルスのいずれとも反応性が認められる抗E抗体を用いて開発を進めている。

《カウンターパートへの技術移転の状況》

本プロジェクトを通じ、ほぼ全ての工程を日本およびタイで行えるような技術移転を行った。プロジェクトの研修事業を通じ、抗 Dengue ウイルス抗体作製およびその解析のためにタイ保健省医科学局より延べ 10 名およびマヒドン大学より延べ 8 名の研修を受け入れた。その上、得られた抗体の遺伝子解析技術の取得のため、それぞれの機関より 4 名及び 1 名の研修を受け入れた。また、2010 年 5 月より 2 カ月間、日本・タイ感染症共同研究センターを利用し、SPYMEG 細胞を用いたハイブリドーマ作製法のワークショップを開催した。本ワークショップは、タイ保健省から 10 名、マヒドン大学熱帯医学部より 9 名の参加者を得て、実施した。

《成果の位置づけや類似研究との比較》

私たちが平成 21 年に SATREPS 事業を始めた段階では、Dengue ウイルスに対するヒト型単クローン抗体の報告は皆無であったが、その後現在までに抗 Dengue ヒト型単クローン抗体については、私たち以外に 5 グループからの報告がある (Schieffelin et al., *Virology J.* 7:28, 2010; Dejnirattisai et al., *Science* 328:745-748, 2010; Beltramello et al., *Cell Host & Microbe* 8:271-283, 2010; de Alwis et al., *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5:e1188, 2011; Teoh et al., *Sci. Transl. Med.* 4: 139ra83, 2012)。全て回復期もしくはそれ以降に得られた検体を用いて行っており、その結果、血清学的交差性を示す強い中和抗体の報告はされていない。

マウス単クローン抗体の研究では、強い中和能を有する抗体は Receptor binding site である E 蛋白のドメイン III 領域をエピトープとする血清型特異的抗体であり、ドメイン II の Fusion loop 近傍に認識する抗体は血清学的交差性を示すものの中和能が弱いことが示されていた (Lin et al., *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6:e1447, 2012)。

最近、マウスとヒトでは、Dengue ウイルスに対するエピトープが異なる点に注目した内容が総説等で発表されるようになってきている (Wahala et al., *Viruses* 23:2374-2395, 2011)。この違いの原因は、Dengue ウイルスの 1 つの血清型で数回にわたり、過免疫した後にハイブリドーマ株を作製するマウスの場合と異なって、ヒト(患者)では 1 回目の感染を受けた患者の回復期、もしくは 2 回目の感染 (1 回目とは異なる血清型ウイルスでの感染)を受けた患者の急性期および回復期からの血液細胞を用いて作製することにあると考えられる。特に、後者の 2 回目感染例は、通常のマウス単クローン抗体作製時に行われる免疫法とは異なり、このような場合には 1 回目に感染したウイルスで作製されていた免疫細胞 (メモリー B 細胞) が、2 回目のウイルスに感染を受けた際に急激な刺激 (ブースト) となり、一過性に 1 回目と 2 回目のウイルスに共通するエピトープを認識する抗体を大量に産生することになる。したがって、2 回目感染患者の急性期にはこのような交差性中和抗体を大量に産生する細胞が存在するが、2 回目感染でもその後の回復期になってしまうとそのような交差性中和抗体を産生する細胞はほとんどなくなってしまう、血清型特異的、または部分的に交差する中和抗体が存在するに過ぎないと考えられる。

(2) 研究成果の今後期待される効果

Dengue ウイルス感染症に対する対応は、現段階においては対症療法や蚊の駆除を行うだけであり、根本的な治療法や予防法が存在せず、その開発が求められている。本研究で得られた抗体は治療薬候補として非常に有望であると思われる。今後、製薬企業等の共同研究により抗体医薬としての製薬化を目指す。一方、本研究で得られた抗体や知見等に関しては、今後の Dengue 感染症の撲滅の為の研究のシードとして応用

することも可能であると思われる。例えば、本抗体のエピトープの解析、およびその領域の免疫誘導能の検討を行うことで、将来、デングウイルス感染症の発症メカニズムの解明、およびデングウイルスの感染による重症デング疾患を予防できるワクチン開発への応用等が期待される。

4. 2 Preparation of human MAb against influenza virus and the evaluation of effectiveness and safety (大阪大学微生物病研究所、タイ保健省医科学局)

(1)研究実施内容及び成果

《実施方法》

本プロジェクトでは、抗体医薬として使用可能なインフルエンザウイルス感染症に対するヒト型単クローン中和抗体の作製を目的として行った。実施手法としては、タイ保健省医科学局および大阪大学微生物病研究所の各々にて倫理委員会の承認を得た後、各々の機関で患者血液検体の収集を行った。それらの血液からPBMCを分離し、MBL社製のフュージョンパートナー細胞 SPYMEG との細胞融合を行った。それらの融合細胞を培養の後、IFAにより一次スクリーニングを行い、抗体産生細胞を含む細胞群の選択を行った。得られた抗体産生細胞群は限界希釈法によりクローニングを行い、IFAによる二次スクリーニングを行い、抗体産生細胞を選択した。得られた抗体産生細胞の培養上清を用いて、A型およびB型の種々の実験室株を用いた全ての型に対する反応性の検討をIFAにより確認すると共に、各々のウイルスに対する中和能の検討を行った。また、それらの抗体のアイソタイプに関しての検討も既存のヒト型抗体アイソタイプングキットを用いて検討を行った。インフルエンザウイルスに対する中和能が認められたヒト型単クローン抗体株について、精製抗体を用いたIFA反応検出限界値、中和試験、抗原-抗体間の相互作用に関するピアコアを用いた検討、マウスを用いたIn vivo試験等の抗体評価検討等を行った。また、抗体のエピトープの検討も行った。また、実験室レベルで得られたハイブリドーマはGMP等の製薬基準を満たしていないことから、これらの抗体産生細胞由来の抗体は直接治療薬として応用することはできず、抗体の遺伝子情報を読み、その情報を基に製薬基準下にてその遺伝子発現を行うことにより創薬化されることを想定している。また、抗体の特許申請に際しても抗体の担保として遺伝子情報が必要であることから、得られたハイブリドーマの遺伝子解析を行い、産生される抗体のCDR遺伝子配列の読み込み、およびそれらの遺伝子を用いた培養細胞での組換えIgGの産生を行い、元のヒト型単クローン抗体の性状との類似性の確認を行った。

《実施内容・成果》

1) タイ保健省医科学局との共同研究

タイ保健省医科学局において、これまでにインフルエンザ患者からの血液を用いて、インフルエンザウイルスの新型H1N1pdmを特異的に中和するヒト型単クローン抗体、および季節性H1N1、新型H1N1pdm、およびH5N1を交差中和するヒト型単クローン抗体産生が作製できた。

2) 大阪大学微生物病研究所および大阪大学生物工学センター

インフルエンザワクチン(季節性インフルエンザワクチン、高病原性鳥インフルエンザプレパンデミックワクチン、豚由来新型インフルエンザワクチン)を接種したドナー30名からの血液を用いて、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産生ハイブリドーマ11株を分離した。また、インフルエンザウイルス感染患者2名(豚由来新型インフルエンザウイルスH1N1pdm感染1名と季節性インフルエンザウイルスH3N2感

染1名)の血液を用い、新たに36株の抗インフルエンザ抗体産生ハイブリドーマを作製した。ワクチン接種者由来ハイブリドーマのうち、インフルエンザBウイルスに特異的な中和抗体は広くインフルエンザ B ウイルスを中和し、またウイルスヘマグルチニン蛋白質の高保存領域であるアミノ酸番号315～324がエピトープに含まれることが明らかとなった。さらに、マウスにおける治療効果を確認し、特許の申請を行った。また、これらの成果は論文としてPLoS Pathogensに受理された。また、抗新型インフルエンザウイルス(H1N1pdm)中和抗体においてはhemagglutinin inhibition (HI)活性が認められたこと、ならびにエスケープミュータントのシーケンス解析の結果から、同じくHA蛋白質の受容体結合部位に位置する抗原決定基Sbがエピトープに含まれることが明らかとなった。2009年12月の日本での臨床ウイルス分離株に対する中和アッセイでは一部の株が本抗体認識領域に変異が認められ、中和エスケープ株であった。また、2011年1月の日本での臨床分離株ではこのエスケープ株の割合が増していることが判明した。これらの知見は、論文として投稿中である。これらインフルエンザBウイルスと新型インフルエンザウイルスを中和できる抗体については、IgG遺伝子の遺伝子解析を完了している。さらに、H1N1pdm感染患者からの血液を用いて作製したヒト型単クローン抗体2株は、季節性H1N1、新型H1N1pdm、さらにH5N1やH9N2の鳥インフルエンザウイルスなど、いわゆるGroup Iに属するインフルエンザAウイルスを広く中和できることが明らかとなり、現在、これらの抗体の性状解析を進めている。また、豚由来新型インフルエンザ患者の特定化のための迅速診断キットの開発にも関わった。

《カウンターパートへの技術移転の状況》

本プロジェクトを通じ、ほぼ全ての工程を日本およびタイで行えるような技術移転を行った。プロジェクトの研修事業を通じ、抗インフルエンザウイルス抗体作製およびその解析のためにタイ保健省医科学局より延べ3名、及び抗体遺伝子解析のために延べ4名の研修を受け入れた。また、2010年5月より2カ月間、日本・タイ感染症共同研究センターを利用し、SPYMEG細胞を用いたハイブリドーマ作製法のワークショップを開催した。本ワークショップには、タイ保健省から10名、マヒドン大学熱帯医学部より9名の参加者があった。

《成果の位置づけや類似研究との比較》

本プロジェクトが開始後、抗インフルエンザヒト型抗体に関しては新規知見として、インフルエンザHAのStem領域を認識する広域反応性抗体が多数報告された(Ekiert et al., 2009, Sui et al., 2009, Burioni et al., 2010, Clementi et al., 2011, Burioni et al., 2010, De Marco et al., 2012, Ekiert et al., 2011, Corti et al., 2011, Hu et al., 2012, Dreyfus et al., 2012)。私たちの作製した抗体も、これまでの解析の結果では、これまでの報告例と同様にHAステムの α -helix領域を認識していることが判明しているが、これまでの報告で用いているアミノ酸置換をしたHAとの反応性では明確な違いが認められた。今後、抗体医薬としての創薬化を視野に入れて早急に詳細解析を進める必要がある。

(2)研究成果の今後期待される効果

抗体医薬としての創薬を考えるうえで、今まで私たちが作製した抗体は非常に有望な候補となる可能性がある。今後、製薬企業等の共同研究により抗体医薬としての製薬化を目指す。一方、本研究で得られた抗体や知見等に関しては、今後のインフルエンザ感染症のコントロールの為に研究のシードとして応用することも可能であると思われる。例えば、本抗体のエピトープの解析およびその領域の免疫誘導能の検討を行う

ことで、ウイルス感染症の発症メカニズムの解明およびインフルエンザウイルスに対するメモリー免疫細胞のエピトープ刺激ワクチン開発への応用等が将来的には期待される。

4. 3 Preparation of human MAbs against botulinum toxin and the evaluation of effectiveness and safety (大阪大学微生物病研究所、タイ保健省医科学局)

(1) 研究実施内容及び成果

《実施方法》

本研究は、抗体医薬として使用可能なボツリヌス毒素に対するヒト型中和単クローン抗体の作製を目的とし、タイ保健省医科学局および大阪大学微生物病研究所との共同研究を行った。当初の予定では、ボツリヌス菌の研究者用のみ承認を受けているボツリヌス毒素キソイドワクチンを日本およびタイにてボランティアに接種後、その血液検体を用いてハイブリドーマ作製を行う予定であった。しかしながら、大阪大学微生物病研究所の倫理委員会からの承認は得られたものの、タイ保健省医科学局およびタイ FDA による倫理委員会の承認が得られなかった。そこで、本研究では、日本において、ワクチン接種ボランティアからの血液検体を用いた抗ボツリヌス毒素中和抗体産生ハイブリドーマの作製を行い、タイにおいては、①タイのボツリヌス中毒症アウトブレイクの起原菌の詳細な解析、②タイの環境中に存在する Clostridium 属菌の疫学調査を主体に検討を行った。

抗ボツリヌス毒素中和抗体産生ハイブリドーマ作製法は、ワクチン接種ボランティアより血液検体の収集を行ない、PBMC を分離し、MBL 社製のフュージョンパートナー細胞 SPYMEG との細胞融合を行った。それらの融合細胞を培養の後、ボツリヌス毒素をコーティングしたプレートを用いて ELISA 法により一次スクリーニングを行い、抗体産生細胞を含む細胞群の選択を行った。得られた抗体産生細胞群は限界希釈法によりクローニングを行い、ELISA による二次スクリーニングを行い、抗体産生細胞を選択した。精製抗体を用いて、マウスを用いたボツリヌス毒素に対する中和試験を行った。また、抗体のエピトープの検討も行っている。また、実験室レベルで得られたハイブリドーマは GMP 等の製薬基準を満たしていないことから、これらの抗体産生細胞由来の抗体は直接治療薬として応用することはできず、抗体の遺伝子情報を読み、その情報を基に製薬基準下にてその遺伝子発現を行うことにより創薬化されることを想定している。また、抗体の特許申請に際しても抗体の担保として遺伝子情報が必要であることから、得られたハイブリドーマの遺伝子解析を行い、産生される抗体の CDR 遺伝子配列の読み込み、およびそれらの遺伝子を用いた培養細胞での組換え IgG の産生を行い、元のヒト型単クローン抗体の性状との類似性確認を行った。一方、タイ保健省医科学局では、タイでアウトブレイクに由来するボツリヌス菌の遺伝子型別を PCR 法やパルスフィールド法にて解析を行った。また、アウトブレイクの見られた地域での土壌を収集し、Clostridium 属菌の分離を行い、ボツリヌス菌の同定を試みた。

《実施内容・成果》

1) タイ保健省医科学局との共同研究

タイでのアウトブレイクに由来するボツリヌス毒素のタイプを決定するための遺伝子解析を行った。2006 年のアウトブレイクの毒素タイプは A 型、2010 年のアウトブレイク 3 回(ランパン、メーホーソン、サラブリ)は、F 型(菌株の分離には不成功)、A(B)型、B 型であった。また、サラブリ由来の菌がサブタイプ A1 (NTCT 2916 株 = 100% identity) およびサブタイプ B1 (Iwate 株 = 99.6% identity) 遺伝子、メーホーソン由来の菌がサブタイプ B2 (111 株 = 96% identity) 遺伝子を持つことが明らかとなった。また、タイ人研究

者により、日本での実習時に日本人のワクチン接種ドナーからの血液を用いて、ボツリヌス毒素に特異的なヒト型単クローン抗体産生ハイブリドーマ数株を作製し、タイに移送後、リクローニングを試みたが、ELISA において A 型および B 型毒素に反応する抗体は得られなかった。一方、土壌中の Clostridium 属菌の疫学調査では、150 種類以上の土壌検体を収集したものの、ボツリヌス菌の分離はできなかった。

2) 大阪大学微生物病研究所

ボツリヌス毒素ワクチンを接種したボランティアからの PBMC を用いて、ELISA によりボツリヌス毒素と反応する特異抗体 (IgG) を産生するハイブリドーマを 4 株分離できた。マウスを用いた中和活性試験の結果から、1 株は A 型毒素を、残る 3 株は B 型毒素を中和する活性が認められた。特に、B 型毒素を中和できる 2 株を混合した場合には相乗効果が観察され、極めて強い中和活性を示した。これは食餌性ボツリヌス中毒症のマウスモデル系においても同様の強い相乗効果が認められ、少量の抗体で中和できることが明らかになった。本件についても、米国へ特許の仮出願を行った

《カウンターパートへの技術移転の状況》

本プロジェクトでは、当初の計画ではタイでもハイブリドーマの作製を行う予定であったことから、プロジェクトの研修事業を通じ、抗ボツリヌス毒素抗体作製およびその解析のため、また、アウトブレイクを引き起こしたボツリヌス毒素の遺伝子解析の技術取得のために延べ 3 名の研修員を受け入れ、技術移転を行った。

《成果の位置づけや類似研究との比較》

ボツリヌス毒素に対する治療としては、馬由来の抗毒素が使用されてきたが、馬由来であることからアナフィラキシー等の副作用を引き起こす可能性が高い。そのため、単クローン抗体の作製には注目されてきた。これまでに、馬抗毒素由来の単クローン抗体を用いた治療薬がアメリカで承認を受けている (MMWR 2010; 59:299)。一方、より安全性の高めるために、キメラリコンビナントヒト型抗体 (Nowakowski et al., 2002)、合成ヒト型一本鎖抗体ライブラリーより合成された抗体 (Yu et al., 2009) などが報告されている。また、Adekar らにより、ボツリヌス A 型毒素に対するヒト型単クローン抗体の作製が報告されている (Adekar et al., 2008)。また、Garcia-Rodriguez らによりボツリヌス A 型および B 型を中和する広域反応性ヒト型単クローン抗体の作製も報告された (Garcia-Rodriguez et al., 2010)。ボツリヌス菌によるアウトブレイクは、A、B、E、F 型が起因することから、広域反応性単クローン抗体もしくは複数の単クローン抗体を混合したポリクローン抗体として使用する必要がある。上記のようなヒト型抗ボツリヌス毒素抗体の報告はあるものの、まだ全ての型を治療できる抗体の作製は成功していない。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究では、ボツリヌス毒素 B 型に対するヒト型中和単クローン抗体の作製に成功した。上述のように A 型に対するヒト型中和単クローン抗体の作製は既に報告されていることから、同様な手法により E 型および F 型中和単クローン抗体の作製を行ない、カクテル化することにより、馬抗毒素に代わる新たな治療薬として使用可能であると思われる。

4. 4 Novel bioactive compounds against dengue virus and explored from Thai natural microorganisms, including plant- and insect-derived bacteria, and evaluated their effectiveness and safety in collaboration between Thai and Japanese (マヒドン大学理学部、大阪大学生物工学センター、タイ保健省医科学局、マヒドン大学熱帯医学部、大阪大学微生物病研究所)

(1)研究実施内容及び成果

《実施方法》

タイ原産土壌、植物および昆虫に由来する微生物(それぞれ 150、29、30 株)から抽出した粗抽出液(それぞれ 88、145、137 の計 370 抽出液)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った。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た。また、この過程で強い抗デング活性(Focus-formation assay によるウイルス増殖抑制率)が認められ、細胞毒性活性(MTT アッセイ)が無い、もしくはほとんど認められないものについて、有機溶媒による抽出、固相カラムによる分画、さらに多段階の逆相 HPLC による分画を行い、各画分について抗デングウイルス活性を指標として精製を行った。

《実施内容・成果》

マヒドン大学理学部において、370 種類の粗抽出検体のスクリーニングにより、高い抗デング活性(>80%のウイルス増殖抑制活性)を示し、細胞毒性が弱い(>80%の細胞生き残り)抽出液 25 種類、また高い抗デング活性(>80%のウイルス増殖抑制活性)を示し、細胞毒性も強い(<80%の細胞生き残り)抽出液 8 種類が存在した。そこで、これらの内、HPLC(Seppak C18 column)により 5 分画に分画し、それぞれの分画についてスクリーニングを実施し、抗デングウイルス活性を示す機能物質を同定し、その化学構造を明らかにすることを試みてきた。また、富山県立大学の五十嵐教授との共同研究として、HPLC 分画で出現した各ピークが既知のものであるのか、また新規のものであるのかに関する検討も行った。大量培養後の粗抽出検体の HPLC 分画について抗デング活性が示唆されたピークを優先精製標的として選択し、精製、構造決定を行った結果、これまでに次の4サンプルに関する解析結果が得られている。

①植物由来の Microbiospora 株 PB005 から既知物質である 3-formylindole が同定できたが、溶解性が悪く、抗デングウイルス活性の確認ができなかった。

②植物由来の Streptomyces 株 PB013 は細胞毒性活性が無く、抗デングウイルスは 25.6%であったが、その化学構造決定は現在進行形である。

③植物由来の Streptomyces 株 PB017 は、高い抗デングウイルス活性(>98%のウイルス増殖抑制)が認められた。しかし、細胞毒性も強く、現在、その細胞毒性活性が消失もしくは極めて低く、しかも高い抗デングウイルス活性化が認められる物質の同定をめざし、分画を進めている。

④土壌由来の Streptomyces 株 SB001 および SOB145 は新規機能物質であったが、抗デング活性が確認できなかった。

⑤以上の候補以外にも、2 種類の分画に関しては、プロテアーゼ(NS2B-NS3)抑制アッセイにより、高い抑制効果を示していることから、さらなる追試および構造決定を行っている。

《カウンターパートへの技術移転の状況》

現在まで行っているスクリーニング法はウイルスの複製を阻害する物質を探索する方法である。この方法はウイルス複製全体の過程を対象とするため、広く薬剤を探索する目的にかなう方法である。阻害剤スクリーニングの別の方法として、ウイルス複製の特定のステップを対象に阻害活性を検索する方法がある。デングウイルスの場合、複製に必須であるプロテアーゼへの阻害剤は、抗ウイルス薬として有効であると考えられる。私たちは、既にこの系を確立していたため、タイ保健省とマヒドン大学理学部へ技術移

転を行った。タイ保健省から述べ1名およびマヒドン大学理学部から述べ4名の研修を受け入れた。

《成果の位置づけや類似研究との比較》

タイ産微生物を対象とした抗 Dengue 活性物質のスクリーニング、化合物同定は従来全く知られておらず、今回の結果からタイ産微生物が高い生産能力を有することが判明した。限られた時間内でリード化合物となる化合物1種を得るに至っていることから、今後スクリーニングを継続することで、より多様なリード化合物を獲得できることが期待される。

(2)研究成果の今後期待される効果

プロテアーゼを対象にしたスクリーニングは、一度系を樹立すれば簡便で、薬剤の作用点が明らかな方法である。また細胞膜透過性を考慮しない方法である。現在までのスクリーニング法とは異なるアプローチを加えることで、効率化を図れることが期待される。

§ 5 成果発表等

(1)原著論文発表

1. 著者、論文タイトル、掲載誌 巻、号、発行年
1. 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.
2. Puiprom O, Yamashita A, Sasayama M, Limkittikul K, Boonha K, Jittmitrathap A, Leuangwutiwong P, Kurosu T, Ramasoota 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.
3. Setthapramote C, Sasaki T, Puiprom O, Limkittikul K, Pitaksajjakul P, Pipattanaboon C, Sasayama M, Leuangwutiwong P, Phumratanaprapin W, Chamnachanan S, Kusolsuk T, Jittmitrathap A, Asai A, Arias JF, Hirai I, Kuhara M, Okuno Y, Kurosu T, Ramasoota P, Ikuta K. Human monoclonal antibodies to neutralize all dengue virus serotypes using lymphocytes from patients at acute phase of the secondary infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 423:867-872, 2012.
4. Sasaki T, Kubota-Koketsu R, Takei M, Hagihara T, Iwamoto S, Murao T, Sawami K, Fukae D, Nakamura M, Nagata E, Kawakami A, Mitsubayashi Y, Ohno M, Uehara Y, Fukukawa T, Kanai Y, Kosaka M, Ikuta K. Reliability of a newly-developed immunochromatography diagnostic kit for pandemic influenza A/H1N1pdm virus: Implications for drug administration. *PLoS One* 7: e50670, 2012.
5. Yasugi M, Kubota-Koketsu R, Yamashita A, Kawashita N, Du A, Sasaki T, Nishimura M, Misaki R, Kuhara M, Boonsathorn N, Fujiyama K, Okuno Y, Nakaya T, Ikuta K. Human monoclonal antibodies broadly neutralizing against influenza B virus. *PLoS Pathogens* 9: e1003150, 2013.
6. Sasaki T, Setthapramote C, Kurosua T, Nishimura M, Asaia M, Omokoko M, Pipattanaboon C, Pitaksajjakul P, Limkittikul K, Subchareon A, Chaichana P, Okabayashi T, Hiraia I, Leuangwutiwong P, Misaki R, Fujiyama K, Ono K, Okuno Y, Ramasoota P, and Ikuta K.: Dengue virus neutralization and antibody-dependent enhancement activities of human monoclonal antibodies derived from dengue patients at acute phase of secondary infection. *Antiviral Research* 98: 423-431, 2013.

7. Inoue, Y., Kubota-Koketsu, R., Ideno, S., Nakamura, H., Ono, K., Okuno, Y., and Ikuta, K.: Induction of anti-influenza immunity by modified GFP carrying hemagglutinin-derived epitope structure. *J. Biol. Chem.* 288: 4981-4990, 2013.
8. Pipatthanaboon, C., Sasaki, T., Nishimura, M., Setthapramote, C., Pitaksajakul, P., Leuangwutiwong, P., Limkittikul, K., Puiprom, O., Sasayama, M., Chaichana, P., Okabayashi, T., Kurosu, T., Ramasoota, P., and Ikuta, K.: Japanese encephalitis virus reactivity of human monoclonal antibodies prepared with lymphocytes from dengue patients at acute phase of the secondary infection with dengue virus. *Biologics*, In press.
9. 亀岡正典, 佐々木正大: タイにおける J-GRID 及び SATREPS 研究活動について, 2013. ウイルス, In press.
10. Wangroongsarb, P., Kohda, T., Jittaprasartsin, C., Suthivarakom, K., Kamthlang, T., Umeda, K., Sawanpanyalert, P., Kozaki, S., and Ikuta, K.: Molecular characterization of *Clostridium botulinum* isolates from Foodborne Outbreaks in Thailand, 2010. *PLoS One*, Revision.
11. Yasugi, M., Kubota-Koketsu, R., Yamashita, A., Kawashita, N., Du, A., Misaki, R., Kuhara, M., Boonsathorn, N., Fujiyama, K., Okuno, Y., Nakaya, T., and Ikuta, K.: Emerging antigenic variants at the antigenic site Sb in pandemic (H1N1) 2009 influenza virus in Japan detected by a human monoclonal antibody. *PLoS One*, Revision.
12. Nishimura, M., Sasaki, T., Ohori, Y., Oki, H., Pipattanaboon, C., Yamashita, A., Hirai, I., Okabayashi, T., Kurosu, T., Leuangwutiwong, P., Ono, K., Yasunaga, T., Okubo, T., Ramasoota, P., and Ikuta, K.: Highly variable recognition of dengue virus envelope domain II as complex-type neutralization epitopes for human monoclonal antibodies derived from patients at the acute phase of secondary infection. In preparation.
13. Pipattanaboon, C., Nishimura, M., Sasaki, T., Ohori, Y., Hirai, I., Leuangwutiwong, P., Ramasoota, P., and Ikuta, K.: Heterogeneous epitopes recognized by secondarily-infected acute-phase dengue patient-derived human monoclonal antibodies against the first domain II of dengue virus envelope protein. In preparation.
14. Thattiyaphong, A., Anantapreecha, S., A-nuegoonpipat, A., Dhepakson, P., Prachasuphap, A., Prawatsilpa, P., Sasaki, T., Kuhara, M., Okuno, Y., Sawanpanyalert, P., and Ikuta, K.: Human monoclonal antibodies to neutralize all serotypes of dengue virus using peripheral blood lymphocytes from infant patients. In preparation.
15. Yamashita, A., Kawashita, N., Li, YG, Sasaki, T., Tao, R., Yang, P., Ramasoota, P., and Ikuta, K.: Human neutralizing epitope in the envelope domain II of dengue virus recognizing by dengue patients shows dynamic conformational change after fusion process. In preparation.
16. Pan, Y., Sasaki, T., Inoue, Y., Yasugi, M., Ramadhany, R., Kubota-Koketsu, R., Boonsathorn, N., Ono, K., Okuno, Y., and Ikuta, K.: Human monoclonal antibodies prepared with the peripheral blood lymphocytes from a patient infected with influenza virus H1N1 (2009) show neutralization of group I influenza virus including highly pathogenic avian influenza virus H5N1. In preparation.

17. Chaichana, P., Sasayama, M., Okabayashi, T., Puiprom, O., Sasaki, T., Ramasoota, P., Kurosu, T., Ikuta, K.: Antibody-dependent enhancement in vitro using the virus and antibody materials derived from dengue patients. In preparation.

② 開発したテキスト・マニュアル類

ホームページ(http://virology.biken.osaka-u.ac.jp/JICA_JST_HP/index.html)を作成し、本プロジェクトに参加しているメンバー間で Username、Password 付きで情報交換している。マニュアル・教本、配布物、Monthly report、ミーティングの議事録などもアップロードしている。

(3) その他の著作物(総説、書籍など)

- ① 詳細情報(著者名、タイトル、掲載誌もしくは書籍(誌名、巻、号、発表年)などを発行日順に記載して下さい。)

(4) 国際学会発表及び主要な国内学会発表

- ① 招待講演 (国内会議 4件、国際会議 5件)

1. 発表者(所属)、タイトル、学会名、場所、月日

1. Kazuyoshi Ikuta (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University), Human neutralization epitope at the conserved regions on hemagglutinin of influenza A viruses H3N2, H1N1 and H5N1: Implication for human MAb recognition, Joint International Tropical Medicine Meeting 2009, Bangkok, Thailand, December 3-4, 2009.
2. Kazuyoshi Ikuta (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University), Human neutralization epitope at the conserved regions on hemagglutinin of influenza A virus: Implication for human MAb recognition, The 8th China-Japan International Conference of Virology, Harbin, China, July 4-7, 2010.
3. Kazuyoshi Ikuta (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University), Development of diagnostic and therapeutic products of murine and human monoclonal antibodies against influenza virus, 3rd International Conference of Virology, Egyptian Society of Virology, Keynote Speaker, Cairo University Conference Center, Cairo, Egypt, November 24-25, 2010.
4. Pratap Singhasivanon (Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University), 特別講演 : Dengue epidemiology, research on vaccine trial and therapeutic development in Thailand, The 60th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Osaka, Japan, November 13-15, 2012.
5. 安木真世(大阪大学微生物病研究所, 平成24年4月より大阪府立大学獣医学部)、教育セミナー : 完全ヒト型抗ウイルス中和抗体の単離 及び その解析と応用 ~ 新規ヒトフュージョンパートナー細胞 SPYMEG を用いて~ SPYMEG を用いた完全ヒト型抗ウイルス中和抗体の作製~評価例、第60回日本ウイルス学会学術集会、2012、大阪、November 13-15、2012.
6. 黒須剛(大阪大学微生物病研究所)、シンポジウム2 : 熱帯感染症 : 治療法開発のための Dengue ウイルス感染マウスモデル、第60回日本ウイルス学会学術集会、2012、大阪、November 13-15、2012.
7. 佐々木正大(大阪大学微生物病研究所)、シンポジウム5 : 海外拠点におけるウイルス感染症研究 : タイにおける J-GRID および SATREPS 研究活動について、第60回日本ウイルス学会学術集会、2012、大阪、November 13-15、2012.
8. Kazuyoshi Ikuta (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University), Potential candidate for the development of therapeutic antibody against dengue illness,

Indonesia-Japan Innovation Convention 2012, Bundon, Indonesia, November 30-December 2, 2012.

9. Kazuyoshi Ikuta (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University), Human monoclonal antibodies to neutralize all dengue virus serotypes, Joint International Tropical Medicine Meeting 2012, Bangkok, Thailand, December 12-14, 2012.

② 口頭発表 (国内会議 6件、国際会議 17件)

1. 発表者(所属)、タイトル、学会名、場所、月日

1. Kazuyoshi Ikuta (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University), Development of diagnostic and therapeutic products of antibodies against tropical infectious diseases, Joint International Tropical Medicine Meeting 2010, Bangkok, Thailand, December 1-3, 2010.
2. Ritsuko Kubota-Koketsu (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University), Human neutralizing monoclonal antibodies against influenza, Joint International Tropical Medicine Meeting 2010, Bangkok, Thailand, December 1-3, 2010.
3. Mayo Yasugi (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University), neutralizing human monoclonal antibody against influenza B virus from a vaccinated donor, Joint International Tropical Medicine Meeting 2010, Bangkok, Thailand, December 1-3, 2010.
4. Tadahiro Sasaki (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University), Development of rapid diagnostic test kit for pandemic H1N1 2009, Joint International Tropical Medicine Meeting 2010, Bangkok, Thailand, December 1-3, 2010.
5. Takeshi Kurosu (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University), Possible effect of quasispecies to strategy against dengue virus, Joint International Tropical Medicine Meeting 2010, Bangkok, Thailand, December 1-3, 2010.
6. Promsin Masrinoul (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University), Protection against lethal infection with dengue virus by anti-NS1 murine monoclonal antibodies, Joint International Tropical Medicine Meeting 2010, Bangkok, Thailand, December 1-3, 2010.
7. Tadahiro Sasaki (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University), Mahidol-Osaka JICA project: training course for the preparation of hybridoma producing human monoclonal antibodies against dengue virus and influenza virus, Joint International Tropical Medicine Meeting 2010, Bangkok, Thailand, December 1-3, 2010.
8. Chayanee Setthapramote (Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University), Human monoclonal antibody preparation against dengue patients using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from dengue patients at acute and convalescent phases, Joint International Tropical Medicine Meeting 2010, Bangkok, Thailand, December 1-3, 2010.
9. Pannamthip Pitaksajjakul (Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University), Mimotope analysis for mapping of epitope recognized by human monoclonal antibodies against dengue virus using random peptide display library, Joint International Tropical Medicine Meeting 2010, Bangkok, Thailand, December 1-3, 2010.
10. Ikuta K, Most of MAbs prepared with the PBMCs from Thai patients at acute phase of the secondary dengue-virus infection neutralize all four serotypes of dengue virus, Joint International Tropical Medicine Meeting 2011, Bangkok, Thailand, December 1-3, 2011.
11. Chayanee Setthapramote (Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University), The effective production of human monoclonal antibodies against all dengue serotypes using hybridoma technique, Joint International Tropical Medicine Meeting 2011, Bangkok, Thailand, December 1-3, 2011.

12. Mayo Yasugi (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University), Use of a human monoclonal antibody to detect emerging antigenic variants at the antigenic site sb in pandemic (H1N1) 2009 influenza virus in Japan, Joint International Tropical Medicine Meeting 2011, Bangkok, Thailand, December 1-3, 2011.
13. 佐々木正大 (大阪大学微生物病研究所)、抗体医薬開発を目的としたデングウイルス感染症に対する抗デングヒト型単クローン抗体の作製、第60回日本ウイルス学会学術集会、2012、大阪、November 13-15、2012.
14. 西村光広 (大阪大学微生物病研究所)、抗デングウイルス抗体とエンベロープ蛋白質との相互作用解析、第60回日本ウイルス学会学術集会、2012、大阪、November 13-15、2012
15. Omokoko Magot, Analysis of antibodies against dengue virus NS1 derived from mouse and dengue virus infected patients, The 60th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Osaka, Japan, November 13-15, 2012.
16. Sabar Pambudi, Identification of a novel inhibitor against dengue virus NS2B/NS3 protease by a structure-based study, The 60th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Osaka, Japan, November 13-15, 2012.
17. 金井祐太 (大阪大学微生物病研究所)、インフルエンザウイルスに対して広い反応性を示すヒト型モノクローナル抗体の分離、第60回日本ウイルス学会学術集会、2012、大阪、November 13-15, 2012.
18. 佐々木薫 (大阪大学微生物病研究所)、ボツリヌス神経毒素を中和するヒト型モノクローナル抗体の作製、第65回日本細菌学会関西支部総会・学術講演会、2012、神戸、November 17、2012
19. Pannamthip Pitaksajjakul, Surachet Benjathummarak, Hathairat Hananantachai, Kazuhito Fujiyama, Ryo Misaki, Tadahiro Sasaki, Kazuyoshi Ikuta, Pongrama Ramasoota, Cloning and expression of recombinant IgG of neutralizing human monoclonal antibody against dengue virus, Joint International Tropical Medicine Meeting 2012, Bangkok, Thailand, December 12-14, 2012.
20. Surachet Benjathummarak, Chayanee Setthapramote, Tadahiro Sasaki, Kazuyoshi Ikuta, Pongrama Ramasoota, Pannamthip Pitaksajjakul, Cloning and expression of a SCFV antibody generated from neutralizing human monoclonal antibody against dengue virus, Joint International Tropical Medicine Meeting 2012, Bangkok, Thailand, December 12-14, 2012.
21. Sujitra Keadsanti, Chayanee Setthapramote, Pannamthip Pitaksajjakul, Tadahiro Sasaki, Kazuyoshi Ikuta, Atsushi Yamanaka, Eiji Konishi, Pongrama Ramasoota, Epitope mapping of neutralizing human monoclonal antibody against dengue virus using escape mutant strategy, Joint International Tropical Medicine Meeting 2012, Bangkok, Thailand, December 12-14, 2012.
22. Chayanee Setthapramote, Pannamthip Pitaksajjakul, Tadahiro Sasaki, Kazuyoshi Ikuta, Pongrama Ramasoota, Validation of neutralizing human monoclonal antibodies against all four dengue virus serotypes of clinical isolates, Joint International Tropical Medicine Meeting 2012, Bangkok, Thailand, December 12-14, 2012.
23. Piyada Wangroongsarb, Tomoko Khoda, Chutima Jittaprasartsin, Kurin Suthivarakom, Thanitchi Kamthalang, Kaoru Umeda, Pathom Sawanpanyalert, Kazuyoshi Ikuta, Shunji Kozaki, Food-borne botulism in Thailand, 2010, Joint International Tropical Medicine Meeting 2012, Bangkok, Thailand, December 12-14, 2012.

③ ポスター発表 (国内会議 7件、国際会議 6件)

1. 発表者(所属)、タイトル、学会名、場所、月日

1. 佐々木正大 (大阪大学微生物病研究所)、新型インフルエンザ特異的マウス単クローン抗体の作成および簡易テストキットへの応用およびその評価、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010、徳島、November 7-9、2010
2. Sasaki T, Setthapramote C, Puiprom O, Sasayama M, Limkittikul K, Pitsksajjakul P, Pipattanaboon C, Kuhara M, Kurosu T, Ramasoota P, and Ikuta K. Preparation of human monoclonal antibodies against dengue virus using PBMCs derived from dengue-infected patients at acute phase and convalescent phase. XV International Congress of Virology 11-16 September 2011, Sapporo, Japan.
3. Kurosu T, Pambudi S, Magot O, Khamlert C, Phanthanawiboon S, Anantapreecha S, and Ikuta K. Infection of mouse cells with dengue virus and Japanese encephalitis virus. XV International Congress of Virology 11-16 September 2011, Sapporo, Japan.
4. Yamashita A, Puiprom O, Sasayama M, Limkittikul K, Boonha K, Jittmitrathap A, Leaungwutiwong P, Kurosu T, Ramasoota, and Ikuta K. Co-existence of major and minor viral populations with two different origins in the same patients who secondarily infected with dengue virus serotype 2 in Bangkok in 2010. XV International Congress of Virology 11-16 September 2011, Sapporo, Japan.
5. Yasugi M, Du A, Kawashita N, Koketsu R, Nakaya T, Kuhara M, Boonsathorn N, Sawanpanyalert P, and Ikuta K. Epitope mapping of human monoclonal antibody neutralizing 2009 pandemic influenza A virus. XV International Congress of Virology 11-16 September 2011, Sapporo, Japan.
6. Matsumura T., A Du (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University), Sugawara Y., Kohda T., Takahashi M., Kozaki S., Ikuta K., Fujinaga Y. Development of human monoclonal antibodies against type A botulinum neurotoxin, The 47th Interagency Botulism Research Coordinating Committee (IBRCC), Atlanta, USA, November 1-5, 2011.
7. 浅井あづさ (大阪大学微生物病研究所)、ヒトとマウスにおけるデングウイルスの感染細胞の同定と感染機序の解析、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012、大阪、November 13-15、2012
8. Supranee Phanthanawiboon (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University), Construction and characterization of chimeric virus from dengue type 4 infectious clones, The 60th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Osaka, Japan, November 13-15, 2012.
9. 山下明史 (大阪大学微生物病研究所)、デングウイルスを中和するヒト型モノクローナル抗体の認識エピトープ領域の配列保存性について、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012、大阪、November 13-15、2012
10. 川下理日人 (大阪大学大学院薬学研究科)、蛋白質間ドッキングシミュレーションを用いたデングウイルスエンベロープ蛋白質と認識ヒト型単クローン抗体との相互作用解析、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012、大阪、November 13-15、2012
11. 潘洋 (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University), Broad neutralizing monoclonal antibodies against influenza viruses, The 60th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Osaka, Japan, November 13-15, 2012.
12. Matsumura T. (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University), Sasaki K., Sugawara Y., Kohda T., Takahashi M., Kozaki S., Ikuta K., Fujinaga Y., Preparation and characterization of human monoclonal antibodies against type B botulinum neurotoxin, 49th Interagency Botulism Research Coordinating Committee (IBRCC), Baltimore, USA, September 4 – 7, 2012.
13. Matsumura T. (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University), Sasaki K., Sugawara Y., Kohda T., Takahashi M., Kozaki S., Ikuta K., Fujinaga Y., Development of

human monoclonal antibodies against botulinum neurotoxin, 第 85 回日本生化学会大会
福岡 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡、December 14 – 16, 2012.

(5)知財出願

①国内出願 (1 件)

1. ≪ 発明の名称、発明者、出願人、出願日、出願番号 ≫
 1. Dengue-Virus Serotype Neutralizing Antibodies, Chayanee Setthapramote, Sasaki Tadahiro, Motoki Kuhara, Pongrama Ramasoota, Aree Thattiyaphong, Surapee Anantapreecha, Pathom Sawanpanyalert, Yoshinobu Okuno, Kazuyoshi Ikuta, Atchareeya A-nuegoonpipat, Panadda Dhepakson, Apichai Prachasuphap, September 7, 2012, PCT application No. PCT/JP2012/005699. (欧米の各国、アセアン諸国、中国等への各国移行手続き中)
 2. Human Monoclonal Antibodies Broadly Protective against Influenza B Virus and methods of using the same, Mayo Yasugi, Motoki Kuhara, Jotika Boon-Long, Kazuhito Fujiyama, Ritsuko Koketsu, Kazuyoshi Ikuta. January 31, 2013. PCT application No. PCT/JP2013/000538.

②海外出願 (5 件)

1. ≪ 発明の名称、発明者、出願人、出願日、出願番号、出願国 ≫
 1. Efficient Preparation of Human Monoclonal Antibodies to Neutralize All Serotypes of Dengue Virus Using Peripheral Blood Lymphocytes, Chayanee Sthapramote, Tadahiro Sasaki, Motoki Kuhara, Yoshinobu Okuno, Pongrama Ramasoota, Kazuyoshi Ikuta, September 9, 2011, 米国仮出願 出願番号 61/532,605 号
 2. Human Monoclonal Antibodies to Neutralize All Serotypes of Dengue Virus Using Peripheral Blood Lymphocytes from Infant Patients, Aree Thattiyaphong, Surapee Anantapreecha, Tadahiro Sasaki, Motoki Kuhara, Yoshinobu Okuno, Pathom Sawanpanyalert, Kazuyoshi Ikuta, Atchareeya A-nuegoonpipat, Panadda Dhepakson, Apichai Prachasuphap, Pattarin Prawatsilpa, September 9, 2011, 米国仮出願 出願番号 61/532,671 号
 3. Human Monoclonal Antibodies Broadly Protective against Influenza B Virus, Mayo Yasugi, Motoki Kuhara, Jotika Boon-Long, Kazuhito Fujiyama, Ritsuko Koketsu, Kazuyoshi Ikuta, January 31, 2012, 米国仮出願 出願番号 61/592,657 号
 4. Epitope-based vaccine with dengue virus domain II immunogens derived from the recognition region by dengue patients' peripheral blood lymphocyte-derived human monoclonal antibodies showing neutralization of all four serotypes of dengue virus, Kazuyoshi Ikuta, Tadahiro Sasaki, Mitsuhiro Nishimura, Takeshi Kurosu, Itaru Hirai, Akifumi Yamashita, Shota Nakamura, Norihito Kawashita, Chonlatip Papattanaboon, Pannamthip Pitaksajjakul, Pornsawan Leuangwutiwong, Tamaki Okabayashi, Ken-ichiro Ono, Yoshinobu Okuno, Pongrama Ramasoota, October 25, 2012, 米国仮出願 出願番号 61/718,266 号
 5. Binding / neutralizing human monoclonal antibodies against botulinum neurotoxin type A or type B, Takuhiro Matsumura, Yukako Fujinaga, Kazuyoshi

Ikuta, Tomoko Kohda, Shunji Kozaki, Ryo Misaki, Kazuhito Fujiyama, Ken-ichiro Ono, Piyada Wangroongsarb, August 31, 2012, 米国仮出願 出願番号 61/695,318 号

③その他の知的財産権

他に記載すべき知的財産権があればご記入下さい。(実用新案 意匠 プログラム著作権 等)

(6)受賞・報道等

“受賞や新聞報道等について、具体的に記入してください。”

① 受賞

② マスコミ(新聞・TV等)報道(プレス発表をした場合にはその概要もお書き下さい。)

A)朝日新聞2013年6月6日朝刊、「共同研究で途上国支援」と題する記事で、SATREPS事業での本プロジェクトの内容が紹介され、得られた成果は途上国ばかりではなく日本の国益にもなること、しかし、SATREPS事業そのものの課題として期間や知財交渉に課題もあり、今後、日本の科学技術の優位性を保ちつつ、どのように科学技術外交を進めていくのかを戦略的に考えていかなければならない、と提案された。

B)タイにおいて、タイの製薬会社を招聘し、本プロジェクトで得られたヒト型単クローン抗体についての企業説明会「Joint Information Meeting on the JST-JICA Project (SATREPS) for "The Project for Research and Development of Therapeutic Products against Infectious Diseases, Especially Dengue Virus Infection"」を平成25年6月11日に開催し、一緒に臨床サイドへの実用化を目指したいと訴えた。この時に受けた取材内容が、読売新聞2013年6月19日(アジア版)に紹介された。

C) タイでのプレス発表の内容: “**The Project for Research and Development of Therapeutic Products against Infectious Diseases, especially Dengue Virus Infection**” (15 July 2009–14 July 2013): “The Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University has collaborated with the Japanese research group (the International Center for Biotechnology, Osaka University; Medical & Biological Laboratories, Co., Ltd.) and Thai research group (the Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health; Faculty of Tropical Medicine and Faculty of Science, Mahidol University), under the support of Japan Science and Technology Agency (JST) of Japan, Japan International Cooperation Agency (JICA) of Japan and the Thai Government, on the research against infectious diseases that are important in tropical countries, i.e., dengue, influenza, and botulism. We have aimed at preparing human monoclonal antibodies (HuMAbs) for the last four years and could obtain the HuMAbs that seem to be globally useful as “therapeutic antibodies” against the above-described infectious diseases. In particular, dengue virus induces a mosquito-borne disease and dengue disease is posing increasing global public health concerns. Around 50 million people are infected with this virus per year in tropical countries and 250,000 infected people become severe cases. However, there are no established preventive and therapeutic methods. We have aimed at preparing HuMAbs using Thai dengue patient-derived peripheral blood lymphocytes that we can expect their efficacy to inhibit the replication of all four serotypes of dengue virus. Recently, most of developing countries highly restrict research resources such as viruses to be brought out to other countries. Therefore, it might be of great significance not only to Thailand but also to Japan because many of her people

visit ASEAN countries and therefore increased number of visitors infected with dengue virus infection is reported recently. We have prepared the useful products against this threat after implementation of the bilateral collaboration in Thailand. In this project, we also succeeded to prepare HuMAbs against influenza virus and botulinum toxin with blood samples from patients and/or vaccinated healthy volunteers that we can show their significant efficacies to reduce virus infectivity and neurotoxicity, respectively. We are now planning to expand this project to the next step to apply them to the clinical field as “therapeutic antibodies” by collaboration with pharmaceutical companies. In addition, we are also planning to apply many of the HuMAbs obtained in this project to the basic field of research to understand the mechanism of diseases induced by the battle between virus and antibodies in patients (immunopathogenicity).

In our project, we have searched for bioactive compounds from bacteria, Actinomycetes, which are found in soil, on plants and insects in Thailand with inhibitory action against dengue virus. We have found one such bioactive compound that shows anti-dengue virus effects. Unlike the human monoclonal antibodies, the bioactive compound has a longer pathway to be developed into medicine for the treatment of dengue virus infection.]

以上の発表を受けて、A)タイの新聞 Thairath、B)日本の共同通信において、「日本タイ共同研究チームによる、デング抗体医薬の開発に関して紹介された。

③ その他

(7)成果展開事例

①実用化に向けての展開

≪SATREPS の成果として得られた成果が、企業との共同開発、特許実施許諾、ノウハウ供与契約、サンプル提供等、技術移転や実用化に向けた展開、あるいはJSTやNEDOなどの実用化プログラムに展開しましたら、記載例を参考にご記入ください。また、記載に当たり却って成果の実施に障害となる部分は、出願番号まで書かずに特許〇件とだけ記載するあるいは非公開例に記載するなど、障害にならないようお気をつけ下さい。さらに、相手国内における成果の展開の事例があれば併せて記載してください。≫

それぞれの分野の成果において、国内の幾つかの企業との共同研究成果として、共同出願、共著論文として発表してきた。現在、本プロジェクトにより生まれた知財についての情報公開を開始し、臨床応用に向けた活動を開始した。

<公開可能なもの>

① 社会実装(研究成果の社会還元)への展開活動

本プロジェクトの目的であるデングや新型インフルエンザ(H1N1pdm)の患者からの血液サンプルを得るため、患者の迅速診断のためのイムノクロマトキットを、日本のキットメーカーと共同開発し、それぞれ製品化した。今後、わが国のインフルエンザ診断のように、タイにおいてもこれら感染症における迅速診断法の普及が実現することを期待している。

§6 プロジェクト期間中の主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

① “ワークショップ、シンポジウム、小中高での特別授業、地域での講演、研究機関の一般公開での講演、その他チーム内ミーティング（主なもの）を行った場合、月日、名称、場所、参加人数、目的や内容などを記入。”

なお、チーム内ミーティング等、一般公開でないものは、名称のあとに（非公開）と記載して下さい。

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2009年8月4日	Kick-off Meeting	医科学局 (タイ)	約30名	本プロジェクトをスタートするに当たり、関係者間で各分野における準備状況、今後の研究の進め方、タイ側と日本側間の連携方法、トレーニング等について確認した。
2009年9月15日	Meeting on Collaboration Research Agreement (CRA)	医科学局 (タイ)	18名	本プロジェクトの進め方、得られた際の成果の発表の仕方、知財に関するパテント出願等に関して話し合い、確認した。
2009年11月13日	#1 Working Group	医科学局 (タイ)	20名	本プロジェクトに参加している研究グループがそれぞれの進捗状況を発表し、問題等を整理、確認した。
2009年11月16-17日	#1 Scientific Meeting	Richmond Hotel (タイ)	約31名	本プロジェクトに参加するタイ側と日本側の研究者が参加し、それぞれの分野の双方のグループが進捗状況を発表。翌日に、分野ごとに分かれて、細かい技術的な情報交換を行った。
2010年1月18日	#2 Working Group	マヒドン大学熱帯医学部 (タイ)	20名	本プロジェクトに参加している研究グループがそれぞれの進捗状況を発表し、問題等を整理、確認した。
2010年4月1日	#3 Working Group	医科学局 (タイ)	26名	本プロジェクトに参加している研究グループがそれぞれの進捗状況を発表し、問題等を整理、確認した。
2010年4月2日	#1 JCC	医科学局 (タイ)	22名	2009年度のプロジェクト活動のレビュー及び2010年度活動計画の確認をした。
2010年5月17日	#4 Working Group	医科学局 (タイ)	33名	本プロジェクトに参加している研究グループがそれぞれの進捗状況を発表し、問題等を整理、確認した。

2010年7月 29日	#2 Scientific Meeting	Siam City Hotel (タイ)	45名	本プロジェクトに参加するタイ側と日本側の研究者が参加し、それぞれの分野の双方のグループが進捗状況を発表。分野ごとに分かれて、細かい技術的な情報交換を行った。
2010年7月 30日	#2 JCC	医科学局 (タイ)	12名	2010年度活動計画の確認をした。
2010年10月 20日	#6 Working Group	マヒドン大学 (タイ)	24名	本プロジェクトに参加している研究グループがそれぞれの進捗状況を発表し、問題等を整理、確認した。
2010年12月 1日	#7 Working Group	医科学局 (タイ)	19名	本プロジェクトに参加している研究グループがそれぞれの進捗状況を発表し、問題等を整理、確認した。
2011年1月 13日、14日	#3 Scientific Meeting	Siam City Hotel (タイ)	59名	本プロジェクトに参加するタイ側と日本側の研究者が参加し、それぞれの分野の双方のグループが進捗状況を発表。分野ごとに分かれて、細かい技術的な情報交換を行った。
2011年2月 24日	#8 Working Group	医科学局 (タイ)	19人	本プロジェクトに参加している研究グループがそれぞれの進捗状況を発表し、問題等を整理、確認した。
2011年4月 26日	#9 Working Group	医科学局 (タイ)	20人	同上
2011年6月 23日	#10 Working Group	マヒドン大学 (タイ)	24人	同上
2011年7月 28日、29日	#4 Scientific Meeting	Westin Grande Sukhumvit Hotel (タイ)	60人	本プロジェクトに参加するタイ側と日本側の研究者が参加し、それぞれの分野の双方のグループが進捗状況を発表。分野ごとに分かれて、細かい技術的な情報交換を行った。
2011年8月 26日	#11 Working Group	医科学局 (タイ)	17人	本プロジェクトに参加している研究グループがそれぞれの進捗状況を発表し、問題等を整理、確認した。
2011年12月 21日	#12 Working Group	医科学局 (タイ)	21人	同上
2012年1月 24日	#5 Scientific Meeting	Westin Grande	70人	本プロジェクトに参加するタイ側と日本側の研究者が参

		Sukhumvit Hotel (タイ)		加し、それぞれの分野の双方のグループが進捗状況を発表。特に今回は中間評価調査団メンバーがオブザーバー参加した。
2012年1月27日	#3 JCC	医科学局 (タイ)	27人	中間評価調査団から評価結果の報告がされるとともに、ミニッツ(協議議事録)の署名を行った。
2012年3月2日	#13 Working Group	マヒドン大学 (タイ)	23人	本プロジェクトに参加している研究グループがそれぞれの進捗状況を発表し、問題等を整理、確認した。
2012年5月16日	#14 Working Group	医科学局 (タイ)	23人	本プロジェクトに参加している研究グループがそれぞれの進捗状況を発表し、問題等を整理、確認した。
2012年7月18日	#6 Scientific Meeting	Westin Grande Sukhumvit Hotel (タイ)	61人	本プロジェクトに参加するタイ側と日本側の研究者が参加し、それぞれの分野の双方のグループが進捗状況を発表。
2012年7月19日	#15 Working Group	Westin Grande Sukhumvit Hotel (タイ)	35人	本プロジェクトに参加している研究グループがそれぞれの進捗状況を発表し、問題等を整理、確認した。
2012年9月25日	#16 Working Group	マヒドン大学 (タイ)	25人	本プロジェクトに参加している研究グループがそれぞれの進捗状況を発表し、問題等を整理、確認した。
2012年12月11日	#17 Working Group	医科学局 (タイ)	19人	同上
2013年2月1日	#18 Working Group	医科学局 (タイ)	18人	本プロジェクトに参加している研究グループがそれぞれの進捗状況を発表し、問題等を整理、確認した。また、終了時評価調査団来訪に対する対処方針について確認した。
2013年2月18日	#7 Scientific Meeting	Westin Grande Sukhumvit Hotel (タイ)	55人	本プロジェクトに参加するタイ側と日本側の研究者が参加し、それぞれの分野の双方のグループが進捗状況を発表。特に今回は終了時評価調査団メンバーがオブザーバー参加した
2013年	#19 Working Group	医科学局	16人	終了時評価調査団来訪以

5月8日		(タイ)		降の進捗の確認と7月のプロジェクト終了までの日程について確認した。
------	--	------	--	-----------------------------------

② 合同調整委員会開催記録
(開催日、出席者、議題、協議概要等)

年月日	出席者	議題	概要
キック・オフ・ミーティング 2009年 8月4日	於:医科学局 <Thai side> Dr.Manit (Project Director) Dr.Pathom, Dr.Jotika, Dr.Pongrama, Prof.Watanalai 他 <Japan side> Mr.Onishi(JICA), Mr.Ito Prof.Ikuta, Mr.Yamashita 他 全30名	JST/JICA プロジェクト活動開始にあたっての確認事項	本プロジェクトをスタートするに当たり、関係者間で各分野における準備状況、今後の研究の進め方、タイ側と日本側間の連携方法、トレーニング等について確認した。
第1回 JCC の開催 2010年 4月2日	於:医科学局 <Thai side> Dr.Pathom(Project Manager) Dr.Jotika, Dr.Pongrama, Prof. Watanalai,他 <Japanese side> Mr.M.Yamashita (EOJ) Mr.Tanaka(JICA) Mr.Ito(JICA), Prof.Ikuta, Mr.Yamashita 他 全22名	○2009年度のプロジェクト活動報告 ○2010年度活動計画の承認	左記アジェンダに沿って2009年度活動実績の報告及び2010年度活動計画の確認を行った。
第2回 JCC の開催 2010年 7月30日	於:医科学局 <Thai side> Dr.Pathom, Dr.Jotika Dr.Surapee, Dr.Piyada <Japanese side> Dr.Kurata, Prof.Kozaki Dr.Takahashi, Prof.Ikuta Dr.Fujinag, Dr.Hirai, Mr.Terashita(JST), MR.Yamashita(EOJ)	ボツリヌス関係活動計画の修正・確認について	タイ側のボツリヌス関係研究活動の内容について、現状を確認するとともに、今後の活動計画について、再度日本側関係者及びタイ側関係者で確認した。

	Mr.Ito, MrYamashita 全 14 名		
第 3 回 JCC の開催 2012 年 1 月 27 日	於:医科学局 <Thai side> Dr.Boonchai, Dr.Pathom, Dr.Jotika, Dr.Pongrama 他 <Japanese side> Dr.Ushio, Dr.Yamanishi, Mr.Sato, Dr.Hatsu, Mr.Abe, Dr.Inoue (Mission Team), Mr.Ishikawa(EOJ) Prof.Ikuta,Dr.Sasaki Mr.Ito, MrYamashita 他全 27 名	○中間評価報告	中間評価調査団からプロジェクト関係者へ評価結果の報告を行うとともに、協議議事録(ミニッツ)のサインングを行った。
第 4 回 JCC の開催 2013 年 2 月 22 日	<Thai side> Dr.Jotika Dr.Surapee,Dr.Piyada Dr.Pongrama <Japanese side> Dr.Fukuda,Dr.Hatsu Mr.Abe, Dr.Inoue (Mission Team) Prof.Ikuta,Mt Iijima Mr.Yamashita 他 全 21 名	○終了時評価報告	終了時評価調査団からプロジェクト関係者へ評価結果の報告を行うとともに、協議議事録(ミニッツ)のサインングを行った。
第 5 回 JCC の開催 2013 年 7 月 10 日	<Thai side> Dr.Niphon(DG DMSc) Dr.Somchai,Dr.Jotika Dr.Surapee,Dr.Aree, Dr.Piyada (NIH) Dr.Pongrama Prof.Watanalai (Mahidol U.) Ms. Somsuan Ms. Siwalee (TICA) <Japanese side> Prof.Ikuta,Dr.Fujinaga Dr.Kurosu,Dr.Sasaki (Osaka U.) Dr.Kurat,Mr.Mizuma, Dr.Hatsu (JST) Mr.Abe,Mr.Ikeda, Mr.Kinoshita Mr.Iijima (JICA)	○プロジェクトの最終報告 及びプロジェクトの研究 成果のプレスリリース	プロジェクト終了に伴い、JCC のメンバーに対してプロジェクトから最終報告を行った。 また、本会議の後に、特別セッションとして、プロジェクトの研究成果を広く内外に広報するために、日本・タイ双方のメディア関係者に対してプレス・リリース及びプレスカンファレンスを実施した。

	Mr.Yamashita 他 全 39 名		
--	--------------------------	--	--

§ 7 国際共同研究実施上の課題とそれを克服するための工夫、教訓など

(1) 共同研究全体

- プロジェクト全体の現状と課題、相手国側研究機関の状況と問題点、プロジェクト関連分野の現状と課題。

共同研究のカウンターパートは、タイの保健省医科学局が代表機関となり、他にマヒドン大学の熱帯医学部と理学部が参加している。当初は、デングウイルスに対するヒト型単クローン中和抗体に関する課題についてはマヒドン大学熱帯医学部で実施し、医科学局ではインフルエンザウイルスとボツリヌス毒素に対するヒト型単クローン中和抗体に関する課題を実施する予定であった。しかし、医科学局の強い希望で、デングウイルスに対する単クローン抗体作製についても医科学局で実施することになり、最も重要視しているデング抗体に関する課題はタイの2機関で競争する形となった。両機関ともに、倫理委員会を持ち、患者サンプル入手ルートを持っているので、実験は順調に双方で進められた。

マヒドン大学熱帯医学部では、JICAプロジェクトのための共同研究実験室スペースを新たに確保し、JICA 予算で購入した機器とマヒドン大学熱帯医学部からサポートされた機器を搬入することで充実した実験施設に仕上がっている。一方、保健省医科学局ではデンググループ、インフルエンザグループ、ボツリヌスグループがそれぞれの実験室に機器を購入し、それぞれのグループ内の設備を充実させた。したがって、日本からの専門家にとってもマヒドン大学熱帯医学部の JICA 施設がトレーニングや共同研究を実施しやすい環境となっている。実際、デングウイルスに対する単クローン抗体の作製とその性状解析は、日本側との共同研究の形で効率良く進捗し、ワーキンググループでもパテント出願、論文作製の可能性が早い段階で行われていた。このワーキンググループを通して情報を共有してきたことから、その波及効果として、医科学局でも日本人専門家派遣の要望があり、こちらにおいても効率良くヒト型単クローン抗体の作製が進む結果となった。ただ、パテント出願に関しては、それぞれの機関ごとに申請したいということで意見が一致したので、得られている単クローン抗体が、マヒドン大学熱帯医学部では計 136 株について、一方保健省医科学局では計 2 株について、いずれもタイ側：日本側の持分比を 50:50 として、同じ日に、同様に米国仮出願という形で出願を行った。1年後の 2012 年 9 月には、これらの株に関する蓄積情報を追加し、1つの形で PCT 出願することができた。ただ、医科学局は、共同開発したヒト型単クローン抗体の日本側への分与がこれまで困難であったため、日本側がマヒドン大学熱帯医学部由来抗体と同様な手法での性状解析を十分に進めることができていない。

- 各種課題を踏まえ、研究プロジェクトの妥当性・有効性・効率性・自立発展性・インパクトを高めるために実際に行った工夫。

隔月ごとに開催したワーキンググループにおいて、できるだけ多くの情報についてそれぞれの機関から発言し、有効な情報は共有するように努めた。また、6 か月ごとに開催した Scientific Meeting は、参加している研究者メンバーのほぼ全員による発表を基本として継続してきた。これにより、徐々に競争意識が高まり、最終的に質の高い抗体クローン株の作製に意欲的になってきた。

- プロジェクトの自立発展性向上のために、今後相手国(研究機関・研究者)が取り組む必要のある事項。

作製してきたそれぞれの分野のヒト型単クローン抗体株や機能物質などのシードを、臨床応用、また論文にするためには、幅広い分野の基礎的な研究を遂行できるだけの基礎的な知識や技術に関する実力を身に着ける必要がある。

(2) 研究グループ/研究題目 1. マヒドン大学熱帯医学部

- ・ 相手国側研究機関との共同研究実施状況と問題点、その問題点を克服するための工夫、今後への活用。

教員メンバーは講義等の雑務で忙しくしており、研究には、それまでほとんど未経験の大学院生(修士課程、博士課程)が中心となって担当することになり、専門家として派遣した日本人研究者によるトレーニングが必須であった。ただ、大学院生の中にはきわめて貪欲に何でも吸収してやろうとする意欲的な学生がおり、逆に成果を上げる結果につながった。

- ・ 類似プロジェクト、類似分野への今後の協力実施にあたっての教訓、提言等。
大学との共同研究を実施する場合には、大学院生を最初から教育することにより、意欲的な研究を行い、成果につなげることが重要なアプローチと考える。

(3) 研究グループ/研究題目 2. 保健省医科学局

- ・ 相手国側研究機関との共同研究実施状況と問題点、その問題点を克服するための工夫、今後への活用。

研究者メンバーの多くは、日本側への要求は極めて強いが、共同研究に精力的に参加する姿勢は乏しい。ただ、予想以上に、パテント申請や論文発表に関しては貪欲で、それぞれの研究者の関与に関する自己主張が強かった。

- ・ 類似プロジェクト、類似分野への今後の協力実施にあたっての教訓、提言等。
パテント申請や論文発表に向けての流れを描きながら、それぞれの研究者の研究意欲を高めていく流れが重要と感じている。

(4) 研究グループ/研究題目 2. マヒドン大学理学部

- ・ 相手国側研究機関との共同研究実施状況と問題点、その問題点を克服するための工夫、今後への活用。

研究者メンバーの多くは極めてプライドが高く、日本側への研究費増についての要求も激しかった。ただ、研究実績の乏しかった分野については、その担当研究グループが自ら進んで貪欲に何でも実施していくという意欲が少なかったためと感じている。

- ・ 類似プロジェクト、類似分野への今後の協力実施にあたっての教訓、提言等。
マヒドン大学理学の研究分野は、タイ原産の土壌、植物、昆虫からの微生物を収集し、その抽出物の作製と、HPLC 分画、化学構造解明に限定した。ウイルス学的なアッセイ等に関しては、他の機関に依頼した。やはり、ウイルス学的な分野も合わせて担当すべきであったと感じている。

§8 結び

《研究の目標等から見た達成度、得られた成果の意義等の自己評価、今後の研究の展開、研究代表者としてのプロジェクト運営について(チーム全体の研究遂行、研究費の使い方、若手研究者の育成等)、その他 SATREPS に対する意見、要望を自由に記入してください。また、公開して良い研究室の雰囲気や伝わるようなメンバーの集合写真、実験室や作製した主な研

究設備のスナップ写真等あれば添付してください。≫

本プロジェクトでは、デングウイルス、インフルエンザウイルス、およびボツリヌス毒素に対するヒト型単クローン中和抗体の作製とその評価が主な目的で、これらに関してはほぼ達成したと考えている。また、タイ原産微生物抽出物からの、抗デング活性機能物質の探索に関してはいくつかの候補の分画を同定するところまで進めることができているが、既知、新規に関わらず、まだ本研究の目標である、その有効成分の化学構造を同定するまでには至っていない。

いずれも、臨床サイドへの実用化が期待されるが、いずれの場合においても世界的な製薬メーカーによる開発が必要である。そのためには、得られた成果であるシードに関する情報公開を積極的に進める必要である。

今回、熱帯地域の感染症の代表であるデング疾患を中心課題にし、タイ側と日本側を 50:50 の精神で進めていくことで双方が合意したうえでこれまで進めてきたが、実際には、タイ側の日本側への要求が大きく、自ら進んで進める意欲はかなり限定的であった。ただ、外国人研究員派遣に関してはかなり意欲的で、却って日本側研究者の負担が大きくなった。

SATREPS プロジェクトを進めていくうえで、JST では論文等による研究成果が、一方 JICA では人材育成や決められた計画に従った予算執行が重要視されていると感じられ、両者での評価に見解の違いがあるよう思われた。また、タイ側の研究が中心となって実験を実施し、第1著者としてまとめた論文において、その投稿にかかる費用が JICA 予算では支払えないなど、JICA 予算で支払える枠の制限に疑問を感じるがあった。また、知財に係るタイ側との交渉においては、研究者が全面に出て対応せざるを得なかったため、今後は大学の知財部の強化、さらには JST、JICA も含めて知財交渉に係る支援体制について検討してほしい。

若手研究者育成の観点から、本プロジェクトは双方の国で有効であったと考えている。ただ、タイ国との技術協定上、JICA 専門家ステータスが得られなかったため、外国籍の研究者を派遣することができなかった。

本プロジェクトの立ち上げ時の機材調達に際し、タイ研究者サイドが個々の機器に対して得た見積もりによる入札を期待したが、JICA により、それらをまとめた形による入札が採られ、結局入札が成立せずに、結局機器の搬入に大幅な遅延が生じた。機器の搬入は、プロジェクトを始める際に重要な要素になるので、研究者サイドと十分な打ち合わせを行ったうえで入札に臨むよう期待される。

本プロジェクトに関わっているタイと日本の研究者メンバー間で、得られた成果(情報)の共有することを重要視し、6か月ごとの Scientific Meeting を開催してきたが、その際に、実際に実験を担当した若手研究者全員により発表されることを基本とした。そのために、回を重ねるごとにそれぞれのメンバーによる熱意が伝わってくるようになり、このような工夫の重要性が認識された。

最後に、本プロジェクトでは、科技案件の調整員が特に、経理関係に明るく、常に研究者サイドに立った、予算執行案を提案できる人材であり、しかも、カウンターパートのいずれのメンバーからも信頼が厚く、したがって、日本人研究者がタイに派遣していない期間においてもタイ研究者との調整が完璧に行えることが、双方の研究者にとって大きな助けになった。

写真1:マヒドン大学熱帯医学部に設置した JICA 研究室の様子



写真2:日本での研修の様子



§9 PDM の変遷 (該当する場合)

(当初 PDM から終了までのすべての改訂 PDM および PDM 改訂経緯の解説)

ボツリヌス毒素に対するヒト型単クローン抗体の作製に関しては、ボランティアへのトキシイドワクチン(未承認)の接種が必須であった。日本側では、研究者が安全に研究を実施するためにも自らの希望でワクチンを接種している。そこで、インフォームドコンセントが得られたワクチン接種者からの血液を用いて、ヒト型単クローン抗体の作製を行った。一方、タイでは、このワクチンを日本からの分与を受け、タイ側でワクチン接種に関する責任体制を整備したうえで開始することになっていた。しかし、最終的には整備することができなかった。

当初は、括弧付けで、ボツリヌス毒素に対するヒト型単クローン抗体の作製を計画していたが、これを日本においてのみ実施する形に変更した。