

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

(タイ王国)

平成21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、これまで 28 名の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 11 株作製した。この中の 1 株はインフルエンザ B ウイルスを、また他の 1 株は豚由来新型インフルエンザ A ウイルス (H1N1pdm) を中和できる抗体を産生していた。一方、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 2 名からの血液を用いて、7 株の特異抗体産生株が作製できた。大阪大学生物工学国際交流センターでは、ヒト型単クローン抗体遺伝子のクローニングに関して、大阪大学の遺伝子組換え実験安全委員会の承認が得られ、インフルエンザ B ウイルスに対して中和活性を示すハイブリドーマ株からの IgG 遺伝子の可変領域のクローニングに着手した。

一方、タイでは、平成 21 年 8 月に研究をスタートした。タイ医科学局は、デングウイルス、インフルエンザウイルス、ボツリヌス毒素に対するヒト型抗体の作製を目指している。これまでに、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 2 株作製した。一方、マヒドン大学熱帯医学部では、幾つかの抗デングウイルス特異抗体産生ハイブリドーマ株が得られたが、その抗体の長期安定産生が認められていない。医科学局、マヒドン大学熱帯医学部ともに、設備の関係で細胞培養条件が安定していない。双方への実験室への機器の搬入が 2010 年 3 月に予定されており、その後改善されると考えられる。医科学局での、抗デングウイルスのヒト型単クローン抗体作製に関する倫理委員会からの承認に時間を要しており、まだ実験を実施できていない。また、ボツリヌス毒素に対しては実施前準備として、タイで蔓延している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が進行中である。しかし、2006 年当時のアウトブレイク時に採取したサンプルのボツリヌス毒素試験がこれまでに終わっていないことから、その遺伝子解析と並行する形で、マウスを用いた毒性試験を行い、1 サンプルに毒性が認められたので、この 1 サンプルの遺伝子解析を進めている。一方、タイ側独自プロジェクト（ボツリヌスウマ免疫血清の作製）を実施するにあたり、その実施担当者はトキソイドワクチン（日本から輸入）を接種する予定である。このワクチン接種が実施された場合を想定して、ワクチン接種を行った研究者からの血液を出発材料としてヒト型単クローン抗体を作製することについて、倫理委員会の承認が得られ、JICA プロジェクトの第 3 回 Working Group もしくは第 1 回 Joint Coordinate Committee において承認が得られた場合には、本格的に、ボツリヌス毒素に対するヒト型単クローン抗体の作成実験を開始する予定である。なお、このトキソイドワクチンは未承認のため、同タイ側独自プロジェクトにおいては、タイ側の責任で、タイで接種できる体制作りが整えられつつある。

一方、マヒドン大学理学部は、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の同定とその工業レベルの生産を目指している。これまでに、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で検討した。その結果、いくつかは、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。HPLCのタイへの搬入を待って、これらの粗抽出液の分画を行う予定である。

実験手技に関するトレーニングは、マヒドン大学熱帯医学部から2名が、医科学局から5名が大阪大学微生物病研究所へ派遣され、トレーニングを実施した。また、マヒドン大学理学部のメンバー1名のトレーニングは大阪大学生物工学国際交流センターにて実施した。

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、タイと韓国において集団発生が認められた食餌性ボツリヌス菌中毒症は、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、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、ボツリヌス菌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、ボツリヌスのトキシ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。また、場合により、これらの精製ウイルス粒子をコートしたELISAを行う。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、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る評価を行う。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。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ボツリヌス菌の型別を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行う。その後、これらの型に対するヒト型単クローン抗体の特異性スクリーニングをELISAにより行う。その有効性については実験動物を用いて判定する。

一方、タイ原産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うプロジェクトについては、まず植物由来病原微生物からの抽出物を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）にて分画し、得られるそれぞれの画分の示す抗デングウイルス活性（ウイルス増殖抑制活性）は 96 穴マイクロプレートを用いた簡便な手法により判定する。ウイルス増殖抑制効果が認められた画分については、細胞障害性がなく、デングウイルスに特異的な抑制効果を発揮することを確認する。さらに、この画分が新規機能物質であるかどうかについては、既存のデータベースとの対比により決定する。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工業レベルでの大量生産に適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

正式に JICA プロジェクトがスタートして半年以上経過したが、具体的な成果は未だほとんど得られていない。実験を開始するために必要な実験器具や機器のオーダーに向けた事務的な手続きを進め、現在、それらが搬入されるのを待っている状況である。これまでの経験では、細胞培養の環境が劣悪で、温度、pH 等が一定しておらず、また、しばしば細菌のコンタミネーションを引き起こした。

④カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)

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) にしたか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スタートした。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16-17日、タイにおいて“#1 Scientific Meeting”を開催し、双方の情報交換を行い、大変有意義であった。その後の双方の話し合いにより、半年ごとにこの Scientific Meeting を開催し、それぞれの研究グループの評価もこの会で行うことで意見が一致している(次回の#2 Scientific Meeting は、2010年5月を予定)。

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(あれば)

当初計画では、インフルエンザウイルスに関してブタ由来新型ウイルスは存在していなかったが、現在はインフルエンザウイルス患者の多くがこの新型に感染したものであるため、患者由来サンプル、新型インフルエンザワクチン接種者からの血液サンプルも用いている。また、SPYMEGを用いたヒト型抗体作製方法に加えて、ファージディスプレイ法を用いたヒト型単クローン抗体の作製を行う要望もタイ側からあったが、Working Group で話し合った結果、本 JICA プロジェクトとしてはこの手法を用いた分離法を行わないことになった。

3. 成果発表等

(1) 原著論文：国内 0 件、国際 0 件

(2) 特許出願：0 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

① 研究グループリーダー： 生田 和良（大阪大学・教授）

② 研究項目

(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効果と安全性に関する評価

(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効果と安全性に関する評価

(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効果と安全性に関する評価

(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

① 研究グループリーダー：生田 和良（大阪大学・教授）

仁平 卓也（大阪大学・教授）

② 研究項目

植物及び昆虫に由来する細菌等のタイ原産微生物から、抗デングウイルス活性を示す新規機能物質を探索し、その効果と安全性に関する評価をタイと日本研究者間の共同研究として進める