

## 大分医科大学感染分子病態制御講座（微生物学）

西園 晃

(e-mail a24zono@oita-med.ac.jp)

### はじめに

大分医科大学微生物学講座は、平成12年の講座改編により感染分子病態制御講座と名称を変更した。本講座は三舟求真人現副学長が初代の教授として昭和55年に開講し、平成11年4月に西園が二代教授として就任し現在に至っている。当教室の研究テーマは初代においては狂犬病ウイルス感染の発症病理機構、特にウイルス感染時の免疫応答と病態との解明に力を注いできた。狂犬病は既に本邦で最後の報告がなされてから40年以上が経過し、我が国が世界でも数少ない狂犬病の清浄国となって久しい。しかし昨今の疾病のグローバル化に伴い狂犬病も再び我が国において re-emerging ウイルス感染症として再興する可能性がある。このためにも狂犬病研究の火を絶やすことなく継承することは必要であろうと考えている。

本学には微生物学関連の講座として、自講座と主に寄生虫感染を扱う旧感染予防医学講座の2講座があるが、細菌学とウイルス学の講義・実習、研究は開学以来われわれが一手に担当してきた。本学でも一昨年からチュートリアル方式を全面的に取り入れ、これまでの系統講義中心の形式が臓器別・機能別の教育形式に改められ、細菌学、ウイルス学は「病原体・感染・免疫」というチュートリアルコースの一環として行われている。講義時間の大幅短縮と学生自身が自ら学ぶ姿勢の涵養を図る試みだが、まだまだ暗中模索の面も多く、教官一同より良いものを目指して日々努力している。研究面では現在のところ狂犬病ウイルスのみに限らず、広く病原微生物（細菌、ウイルス）の感染とその発症機構、および特異抗体を用いた感染予防・治療法の確立に関する研究、免疫応答に関する研究と幅広い。現在は教授（西園）、助教授（山城）、助手（園田、中島）、大学院生が6名、研究員が3名と本学の基礎講座のなかでも大所帯である。細菌ではヘリコバクター・ピロリ菌感染が研究の中心を占め、種々の動物モデル（ニホンザル、スナネズミ、マウス）を用いた感染実験から発病機構の解明と予防法の開発をテーマとしている。ウイルスでは狂犬病ウイルスを主にとりあげ、発症病理機構を司る病原体側の因子と感染防御に関わる免疫応答について解析を行ってきた。教官のうち中島助手は国立感染研が主催する実地疫学専門家（FETP）の日本で第1期生としての研修を受け、帰分後も全国、世界各地で発生する感染症のアウトブレイクの調査に走り回っている。つい先日にも SARS の調査で香港から戻ったばかりである。

教室の具体的な研究テーマは以下のごとくである。

1. ヘリコバクター・ピロリ菌に関して
  - (1) ピロリ菌に対する予防的および治療的ワクチンの開発（種々の感染モデル動物を用いたアプローチ）
  - (2) ピロリ菌の外膜タンパクの遺伝子多型と抗原変異成立のメカニズム解析（新規外膜蛋白の同定と多様性発現のメカニズム解析）

### 2. 狂犬病ウイルスに関して

- (1) 抗核タンパク抗体によるウイルス増殖抑制機構の研究
- (2) アジア地域（ベトナム、フィリピン、タイ）における分子疫学調査
3. ファージディスプレイ法を用いた中和単クローン性抗体の分離（狂犬病、デング熱、日本脳炎などに対するヒト型中和抗体の作成）
4. 感染症疫学情報の監視、評価とアウトブレイクに対する疫学調査と拡大予防に対する対処

そのなかで今回は教室の山城助教授が中心となって進められているファージディスプレイ法を用いたウイルス感染症に対するヒト型単クローン性中和抗体の分離、なかでも抗狂犬病ウイルスヒト型抗体作成の試みを当教室の研究活動の一例として紹介する。

### 狂犬病の重要性

狂犬病は狂犬病ウイルスにより引き起こされる致死性の人獣共通感染症で、全ての温血動物が感受性を有し感染しうる。世界的に見れば狂犬病の常在していない国は日本、北欧諸国、英国、アイスランド、オーストラリア、ニュージーランドなどごく一部のみで、これらを除き全世界に常在している。ヨーロッパ諸国や北米ではイヌやネコに対する狂犬病対策により、これらの動物からの発生はほとんど見られないが、森林地帯に住む野生動物には発生が見られ（森林型狂犬病）、キツネ、オオカミ、スカンク、アライグマ、コウモリなどがその宿主となる。特にコウモリは古典的狂犬病ウイルスと類似のウイルスを保有するだけでなく、コウモリによる狂犬病の発症例が世界的にも散発的に報告されており狂犬病保有動物として重要な位置にある。一方アジア、アフリカ、中南米諸国では、主に都市部のイヌの間での狂犬病が主たる流行の形態で（都市型狂犬病）、ヒトは狂犬病の犬に咬まれて発症することがほとんどである。狂犬病ウイルスは家畜以外の野生動物にも感受性があることが、自然界におけるこの疾患の根絶の困難さを物語っている。

WHO により報告された1997年の世界における狂犬病による死亡者数の報告によれば、現在でも約30,000~50,000人が推定で死亡しているとされるが、なかでもその95%以上はアジアに集中しており、特にインド、バングラデシュなどがその大部分を占めている。

一方我が国では、1957年に最後の犠牲者が出てからほぼ半世紀近くが経過した（その間の1例の輸入例を除いて）。しかし狂犬病常在地域は世界中に数多く、常在地で感染、ペット動物からの感染、検疫を紛れて不法に入国した動物からの感染など、我々が再びこの疾患に遭遇する可能性は大いにありと考えられる。特に侵淫地域であるアジア各国で、いまだに狂犬病は流行を続けているという認識を新たにすることが重要であり、狂犬病ウイルスを題材としたウイルス感染による発症病理メカニズムの解明も前任の時代からの引き続いた本教室のテーマの一つとして今後も継続していく予定である。

### 組み換え単クローン性抗体 (mAb) の開発

1975年にマウスのハイブリドーマを用いた単クローン性抗体 (mAb) が開発され、生物科学の発展に大いに貢献したが、臨床への応用では当初期待されたほど研究が進まなかった。ヒト型ハイブリドーマなどを用いたヒト型 mAb の確立も試みられているが、十分な実用化には至って無いのが現状である。分子生物学的手法を用いる事によりハイブリドーマによらない組み換え型単クローン性抗体 (リコンビナント mAb) の産生が可能となった。それらが、いわゆるハイブリドーマ mAb と異なる点は、治療用製剤としての応用が視野に入る事、目的に応じたカスタマイズが可能なる事などであろう。治療用抗体として求められる性質は、1) 目的抗原と効果的に結合する事、2) それ自体の抗原性が低い事、3) 半減期が長い事、4) 大量に産生できる事などである。リコンビナント mAb は多くの研究施設でその可能性が検討されている。例として最小の抗原結合部位のみを有したもの、多価型の抗原結合部位を有したもの、IgG と IgA を組み合わせ分泌型にしたもの、異種動物間でのキメラや humanization を施したものなどがあげられる。一方その産生系として大腸菌を用いる方法、培養細胞を用いる方法、植物 (タバコやバナナなど) に産生させる方法、トランスジェニックマウスに産生させる方法などが研究されている。欧米ではすでに多くのリコンビナント mAb が臨床治験に供されている。感染症に関係した抗体以外にも、自己免疫疾患に対する mAb、悪性腫瘍に対する mAb などが臨床治験に供されている。

### 狂犬病に対する中和抗体の分離の試み

病原体に対する抗体 (特に中和抗体) を充分持つ動物およびヒトからコンビナトリアルライブラリー法で抗体ライブラリーを作製し、ファージディスプレイ法を用いて抗原特異的な抗体 Fab 産生クローンを効率良く選別する事が可能となった。現在

試みている方法を要約すると、狂犬病ワクチンを複数回にわたり過免疫したボランティアから採血した抗体産生形質細胞から mRNA を分離し、抗体の直接抗原結合領域 (CDR) をはさむ部分に特異的なプライマーを用いた RT-PCR 法で Fab に相当する部分を  $V_H$  領域、 $V_L$  領域別に増幅し、ファージミドベクターに組み込んで多様性を高度に保持した抗体ライブラリーとする。ヘルパーファージの存在下に Fab を発現させ、免疫した抗原 (ワクチン抗原、大量培養して濃縮した狂犬病ウイルスなど) を用いて特異 Fab 産生クローンを濃縮および選別し、目的 Fab を大腸菌体内で大量に発現させる。免疫学的活性を十分に検索した後、Fc 部分を含んだ発現ベクターに組み込み、培養細胞により完全型 IgG として発現させる。さらにこれらを用いたマウスでの中和試験を行うことで、中和活性のあるヒト型抗体として確立する。現在狂犬病保有動物からの咬傷を受けた場合は、直ちに曝露後ワクチンを接種して発病を予防することが必要だが、咬傷部位が頭部に近かったり、深い受傷の場合はヒト型グロブリンの同時投与も WHO からは推奨されている。しかし国内には同グロブリンの備蓄は皆無であり、また侵淫国においてもヒト型グロブリンの入手は非常な困難を極める。このような方法でヒト型抗体が大量に作成されれば、途上国などでも有効に使用出来る可能性が広がるものと考えられる。

### おわりに

感染症は病原体と宿主のせめぎ合いの過程で見られる病態である。病原体は宿主内での維持・増殖をはかり、宿主側は免疫を中心とする生体防御機構で対応する事となる。本教室の幅の広い研究の内容はそれらの事象をそれぞれの立場から観察するのに適しているものと思われる。今後とも若い力を結集して着実にそれらの事象を観察していけたらと思っている。