

厚生科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書

ヒト型抗体の作製に関する研究
—沈降ボツリヌス毒素の試作について—

分担研究者 高橋元秀 国立感染症研究所 細菌・血液製剤部
協力研究者 小崎俊司 大阪府立大学農学部
川口清二郎 千葉県血清研究所

研究要旨

食餌性ボツリヌス患者の治療にウマ抗毒素製剤が用いられ効果を上げている。しかし、ウマの血清を原材料としているこの製剤は、ヒトにはヘテロな蛋白であるため使用に際してアナフィラキシーが心配される。バイオテクノロジーを駆使したヒト型の製剤による安全性の高い製剤の開発が望まれている。このためには、ボツリヌス毒素を特異的に認識するヒトの免疫血清(リンパ球等)が必要となる。現行の治療用ボツリヌス多価抗毒素と同様な A,B,E 及び F 型毒素を精製し、破傷風トキソイドの製造法を準拠して、フォルマリンで無毒化したトキソイドを作製し、ヒトに接種可能な安全性の高いトキソイドの試作を行った。

A. 研究目的

ボツリヌス症はボツリヌス菌が産生する神経毒素によりおこる重篤で死亡率の高い疾病である。ボツリヌスは特異的な神経症状が現れ、弱視、複視、眼瞼下垂、瞳孔散大および対光反射の遅延などの神経症状が現れ、これと相前後して発生障害、咽頭麻痺による嚥下困難、口渇などが現れる。また、運動神経麻痺のため握力の低下、四肢の脱力感及び歩行困難となる。さらに、膨満、腹痛及び便秘が現れ、重症では呼吸筋の麻痺による呼吸失調で窒息死する。

これら毒素は、産生する菌と抗原性の違いにより、A～G型に分けられる。また、ヒトの感染・発病機序の違いにより、食餌性ボツリヌ

ス、乳児ボツリヌス及び創傷性ボツリヌスに大別される。

国内の過去の事例は、主として E 型毒素による中毒が報告されていた。1950年から1990年の間に約100件発生し、発症患者数は約500名に及んでいる。そのうち、1969年宮崎県でキャビアを原因食とする B 型、1976年東京都 A 型(原因食特定できず)、1984年熊本県”からし蓮根”による A 型、同年栃木県 B 型(原因食特定できず)毒素によるもの以外は、E 型ボツリヌス食中毒で北海道と東北地方に多発している。また、乳児ボツリヌス症は米国で1976年にはじめて確認され、国内では1986年に初発事例が報告されて以来、十数例の患者が確認

されている。これら乳児ボツリヌスでは、症状が緩慢なこと、患者が乳児であるため抗毒素療法はほとんど行われていない。その理由に、現在使用しているボツリヌス抗毒素はウマ血清由来であること、患者が生後間もない乳児であること、死亡率が低いことによると考えられる。しかし、ヒト型モノクローナル抗体が治療用に開発されれば、食餌性ボツリヌスの治療ばかりでなく、乳児ボツリヌスに対しても汎用な抗毒素療法が行えることが期待できる。我々は、これら製剤の開発を目的に、ジフテリア、破傷風等の予防に効果をあげているヒト用のトキシイドを試作し、上記市販製剤の品質管理に用いられている生物学製剤基準を準拠して、物理化学的な試験と実験動物を用いる安全性と有効性の試験を実施した。

B. 研究方法

使用菌株

1. *Clostridium botulinum* type A-62
2. *Clostridium botulinum* type B-Lamanna
3. *Clostridium botulinum* type E-35396
4. *Clostridium botulinum* type F-Langeland

培地・菌培養・毒素精製

Type A と B は 2% peptone (ミクニ)、0.5% glucose (和光製薬)、0.5% yeast extract (Difco) 及び 0.025% Na-thioglycolate (関東化学) を pH7.0 に調整後、110 °C 20 分間高圧蒸気滅菌した。Type E は上記組成で pH7.0 に、又、Type F は yeast extract を 1.0% に変更して調整した。

各の菌株を接種後、3～5日間 35 °C で培養した菌液を酸沈殿、プロタミン処理、硫酸塩析及びイオン交換クロマトグラフィー (CM Sephadex, Sp Sephadex) とゲル濾過 (Toyo-pearl HW55) を行い、精製毒素を得た。精製毒素として、Type A は LL と L、Type

B は L、Type E と F は M 毒素である。各型毒素の性状は、別紙 1-1 に示した。

毒素の無毒化

部分精製した各々の毒素は、別紙 1-2 に示す方法で無毒化した。

また、無毒化試験は別紙 1-3 に示した。

トキシイドの調整

各型トキシイドの性状は別紙 1-4 に示した。

また、多価トキシイド Lot.3 の組成を 1-5 に示した。

分注本数、試験使用内訳及び在庫本数を 1-6 に示した。

トキシイドの安全性試験

(1) 無菌試験

最終小分け製品を任意に 20 本抜き取り、生物学的基準一般試験法の無菌試験を実施した。

(2) 異常毒性否定試験

最終小分け製品を任意に 16 本抜き取り、トキシイド 5ml を 2 匹のモルモットの腹腔内注射し、特に異常を生じないことを観察した。

(3) 無毒化試験

最終小分け製品を任意に 20 本抜き取り、トキシイド 5ml を 4 匹のモルモットの腹腔内注射し、ボツリヌス毒素による麻痺等の症状の発現が観察されないことを確認した。

(4) 化学試験

最終小分け製品を任意に 32 または 35 本抜き取り、タンパク窒素、アルミニウム含量及びホルマリン含量を測定した。

トキシイドの有効性試験

最終小分け製品を任意に 18 本抜き取り、以下の方法でトキシイドの力価を測定した。

(1) 血中抗毒素価測定法

免疫したモルモット血清中の中和抗毒素価を

マウスを用いた致死を指標とする測定方法

(2) 毒素攻撃法

上記免疫モルモットを一部採血した後、ボツリヌス毒素をモルモットに直接攻撃する方法によって、試験した。

C. 結果

小分けトキシノイドの試験

1. 化学試験結果

千葉血清研究所の成績を別紙1-7-(1)に示し、国立感染症研究所の成績を別紙2-1に示した。

2. 安全性試験

- (1) 無菌試験の成績を紙2-2に示した。
- (2) 異常毒性否定試験の成績を別紙1-7-(2)に示した。
- (3) 無毒化試験の成績を別紙2-3に示した。

3. 有効性試験

- (1) 血中抗毒素価測定結果を別紙1-7-(3)-①に示した。
- (2) 毒素攻撃法の成績を別紙1-7-(3)-②に示した。

D. 考察

各ボツリヌス菌を大量培養し、毒素をイオン交換とゲル濾過法により精製し、ホルマリンを添加して無毒化した。無毒化した個々のトキシノイドは破傷風トキシノイドの生物学的製剤基準に従い毒性試験と有効性試験を行った結果、満足の得られる成績を得た。各々のトキシノイドをタンパク量を一定に混合し、アルミニウムゲルと混合した沈降多価トキシノイドを調整した。混合多価トキシノイドも同様の試験を行い、満足のいく成績が得られた。現在、研究者に接種し、副反応と免疫応答を調査しているが、沈降破傷風トキシノイドに比べて、局所の反応には大差ない

結果が得られている。免疫した血清中から特異リンパ球を得て細胞融合する作業は現在進行中である。近い将来、高力価の抗体を産生する融合株が得られることを確信している。

また、細菌毒素の作用の研究は、国内の大学、研究所において積極的に進められており、あるものは市販化されている。例としてボツリヌス毒素は斜視、ジストニアの治療に用いられている。毒素の製剤化が進む一方、研究室内のバイオセフティー対策も求められる。本トキシノイドはこのような研究者にとって、ボツリヌス毒素に対する防衛的手段としても有用であると考え

E 結論

ヒトを免疫するための沈降多価(A,B,E 及 F 型)ボツリヌストキシノイドを試作した。トキシノイドの安全性と有効性の確認試験を行った結果、現行の破傷風トキシノイドと比較して大きな差は認められなかった。

現在、このトキシノイドで免疫したヒト血清中のボツリヌス毒素に特異的なリンパ球とマウスーヒトミエローム細胞を用いた細胞融合法によるヒト型モノクローナル抗体の作製を行っている。

F. 研究発表

1. 論文発表

今年度はなし

2. 学会発表

今年度はなし

- 2) 30日目の検体を0.5mlずつ4匹のマウスの腹腔内に注射し22日間観察：異常なし
- 3) 透析終了後10日目の検体を3mlずつ2匹のモルモットの腹腔内に注射し44日間観察：異常なし
- 4) 毒性復帰試験は、M/60 PBS (pH 6.0) で4倍に希釈し37℃に20日間静置した検体を5mlずつ4匹のモルモットの腹腔内に注射し51日間観察：
 B, E, F型 異常なし
 A型 5日目頃より発症し6日目と7日目に1匹ずつ死亡し再無毒化へ
- 2回目のA型の毒性復帰試験は、上記と同様の方法で実施し36日間観察：異常なし

4. 各型トキソイドの性状

型	mg PN/ml	mg/ml	ホルムアルデヒド%	チメロサル%	pH	液量ml	総蛋白量mg
A	0.021	0.131	0.005	0.011	5.87	56	7.34
B	0.022	0.138	0.005	0.011	5.91	65	8.97
E	0.022	0.138	0.005	0.011	5.91	78	10.76
F	0.024	0.150	0.005	0.012	5.89	78	11.70

5. Lot 3 のバルク編成

A型トキソイド	50 ml	}	278.6 ml
B型トキソイド	50 ml		
E型トキソイド	50 ml		
F型トキソイド	50 ml		
アルミニウム塩 (水酸化アルミゲル 2mg/ml pH6.83)	42 ml		
1%チメロサル	0.6 ml		
0.017M酢酸塩緩衝塩化ナトリウム液 (pH6.5)	36 ml		

6. Lot 3 の分注本数及び小分製品の試験内訳並びに在庫本数

分注本数：0.7ml/バイアル 351本

試験本数：165本

BOTULINAL TOXOID Lot. 3
 (quadrivalent; types A,
 B, E & F) '97 Dec. 22
 Chiba Serum Inst., Japan

千葉県血清研究所	
化学試験	35本
異常毒性否定試験	16本
有効性試験	18本
国立感染症研究所	
化学試験	32本
無菌試験	20本
無毒化試験	44本

在庫本数：186本

7. 小分製品試験成績

1) 化学試験

	mg PN/ml	mg/ml	ホルムアルデヒド%	チメロサル%	pH	アルミニウムmg/ml	浸透圧
Lot 3	0.016	0.100	—	0.011	5.67	0.21	325

2) 異常毒性否定試験

モルモット2匹(348g, 344g)にそれぞれ5mlずつ腹腔内に注射し7日間観察
: 異常なし

異常毒性否定試験 1

注射年月日 平成10年3月11日

判定年月日 平成10年3月18日 (腹腔内 5ml)

	モルモット 番号	注射時の 体 重	注 射 後 (日) の 体 重				観 察 期 間 中 の 所 見	判 定
			1	2	3	7		
検 体	1-シ	348 g	344 g	356 g	361 g	412 g	異常なし	適 合
	1-ハナ セ	344 g	350 g	348 g	354 g	394 g	異常なし	
	平均	346 g	347 g	352 g	358 g	403 g		
対 照	1-ハナ	320 g	330 g	338 g	348 g	376 g	異常なし	
	1-ナシ	324 g	334 g	338 g	339 g	370 g	異常なし	
	平均	322 g	332 g	338 g	344 g	373 g		
統計学的所見			対照群と比較して、1%以下の危険率で異常は認められなかった。					

3) 有効性試験

Lot 3 及び単独トキソイド (A, B, E 及び F を Lot 3 相当量に作製したもの) を原液、2 及び 4 倍希釈し、1 群 5 匹のモルモットに 2 週間隔で 0.4ml ずつ皮下注射した。2 回注射後 3 週目に採血しその 3 日後に 10 モルモット腹腔内 LD₅₀ (50 マウス腹腔内 LD₅₀ 相当) の毒素で攻撃し 3 週間観察：異常なし

① 血中抗毒素価測定法

1 群 5 匹の血清をプールし 1.4 倍連続段階希釈し、L+/20 レベルでマウスの腹腔内に注射し抗毒素価を測定 (1 用量に 2 匹)

		血 中 抗 毒 素 価		
		IU/ml		
		トキソイド希釈		
		1 倍	2 倍	4 倍
Lot 3	A	16.0	13.6	4.8
	B	5.6	1.4	0.7
	E	3.4	1.4	0.4
	F	4.0	2.0	1.2
単独	A	46.9	16.0	16.0
	B	9.4	2.3	2.3
	E	4.2	2.5	3.0
	F	14.4	13.3	5.0

② 毒素攻撃法

イ. Lot 3 免疫 - A, B, E, F 混合毒素攻撃

注射年月日 平成10年2月20日

判定年月日

平成10年2月27日

(腹腔内 1ml)

免疫	ロット 番号	注射時の 体 重	7日後の 体 重	観察期間中の所見
Lot 3 × 1	1-ハナ	652 g	680 g	異常なし
	1-ケビ	610 g	640 g	異常なし
	1-セ	590 g	620 g	異常なし
	1-シ	566 g	608 g	異常なし
	1-ナシ	668 g	710 g	異常なし
	平均	617 g	652 g	
Lot 3 × 2	2-ハナ	666 g	704 g	異常なし
	2-ケビ	622 g	648 g	異常なし
	2-セ	648 g	680 g	異常なし
	2-シ	630 g	668 g	異常なし
	2-ナシ	—	—	採血時死亡
	平均	642 g	675 g	
Lot 3 × 4	3-ハナ	676 g	722 g	異常なし
	3-ケビ	572 g	614 g	異常なし
	3-セ	630 g	668 g	異常なし
	3-シ	630 g	668 g	異常なし
	3-ナシ	528 g	544 g	異常なし
	平均	607 g	643 g	

ロ. A型トキソイド免疫 - A型毒素攻撃

注射年月日 平成10年2月20日

判定年月日

平成10年2月27日

(腹腔内 1ml)

免 疫	モルモ ット 番号	注射時の 体 重	7日後の 体 重	観察期間中の所見
A 型 × 1	4-ハナ	666 g	662 g	異常なし
	4-ケビ	620 g	660 g	異常なし
	4-セ	514 g	552 g	異常なし
	4-リ	640 g	670 g	異常なし
	4-ナシ	566 g	608 g	異常なし
	平均	601 g	630 g	
A 型 × 2	5-ハナ	580 g	620 g	異常なし
	5-ケビ	658 g	700 g	異常なし
	5-セ	590 g	622 g	異常なし
	5-リ	502 g	520 g	異常なし
	5-ナシ	530 g	560 g	異常なし
	平均	572 g	604 g	
A 型 × 4	6-ハナ	614 g	640 g	異常なし
	6-ケビ	560 g	594 g	異常なし
	6-セ	686 g	730 g	異常なし
	6-リ	628 g	646 g	異常なし
	6-ナシ	600 g	632 g	異常なし
	平均	618 g	648 g	

ハ. B型トキソイド免疫-B型毒素攻撃

注射年月日 平成10年2月20日

判定年月日

平成10年2月27日

(腹腔内 1ml)

免 疫	モルモット 番号	注射時の 体 重	7日後の 体 重	観察期間中の所見
B型 × 1	7-ハナ	524 g	536 g	異常なし
	7-ケビ	634 g	674 g	異常なし
	7-セ	588 g	600 g	異常なし
	7-シリ	600 g	666 g	異常なし
	7-ナシ	676 g	714 g	異常なし
	平均	604 g	638 g	
B型 × 2	8-ハナ	600 g	618 g	異常なし
	8-ケビ	—	—	採血時死亡
	8-セ	570 g	580 g	異常なし
	8-シリ	564 g	594 g	異常なし
	8-ナシ	644 g	670 g	異常なし
	平均	595 g	616 g	
B型 × 4	9-ハナ	538 g	570 g	異常なし
	9-ケビ	578 g	612 g	異常なし
	9-セ	588 g	604 g	異常なし
	9-シリ	618 g	650 g	異常なし
	9-ナシ	608 g	622 g	異常なし
	平均	586 g	612 g	

二. E型トキソイド免疫-E型毒素攻撃

注射年月日 平成10年2月20日

判定年月日

平成10年2月27日




(腹腔内 1ml)

免 疫	モルモット 番 号	注射時の 体 重	7日後の 体 重	観察期間中の所見
E 型 × 1	10-ハナ	596 g	640 g	異常なし
	10-ケビ	560 g	602 g	異常なし
	10-セ	624 g	662 g	異常なし
	10-シ	550 g	590 g	異常なし
	10-ナシ	636 g	674 g	異常なし
	平 均	593 g	634 g	
E 型 × 2	11-ハナ	630 g	656 g	異常なし
	11-ケビ	636 g	680 g	異常なし
	11-セ	640 g	698 g	異常なし
	11-シ	576 g	618 g	異常なし
	11-ナシ	630 g	676 g	異常なし
	平 均	622 g	666 g	
E 型 × 4	12-ハナ	586 g	612 g	異常なし
	12-ケビ	522 g	552 g	異常なし
	12-セ	586 g	616 g	異常なし
	12-シ	586 g	630 g	異常なし
	12-ナシ	528 g	544 g	異常なし
	平 均	562 g	591 g	

ホ. F型トキソイド免疫-F型毒素攻撃




注射年月日 平成10年2月20日 判定年月日 平成10年2月27日 (腹腔内 1ml)

	モルモット 番 号	注射時の 体 重	7日後の 体 重	観察期間中の所見
F 型 × 1	13-ハナ	650 g	674 g	異常なし
	13-ケビ	558 g	582 g	異常なし
	13-セ	556 g	586 g	異常なし
	13-シリ	644 g	658 g	異常なし
	13-ナシ	676 g	724 g	異常なし
	平 均	617 g	645 g	
F 型 × 2	14-ハナ	580 g	600 g	異常なし
	14-ケビ	670 g	696 g	異常なし
	14-セ	536 g	556 g	異常なし
	14-シリ	610 g	650 g	異常なし
	14-ナシ	660 g	700 g	異常なし
	平 均	611 g	640 g	
F 型 × 4	15-ハナ	630 g	674 g	異常なし
	15-ケビ	646 g	690 g	異常なし
	15-セ	608 g	640 g	異常なし
	15-シリ	—	—	採血時死亡
	15-ナシ	—	—	採血時死亡
	平 均	628 g	668 g	

ポツリヌストキソイド		化学試験成績	
検 定 番 号	依 頼 試 験		
製 造 所 名			
製 造 番 号			
含 湿 度			
p H	5.81		
たん白質含量	総たん白質 106.49ug/ml		
	凝固性たん白質		
たん白窒素含量			
アルミニウム含量	0.237mg/ml		
フェノール含量			
チメロサル含量	0.01079%		
ホルムアルデヒド含量	0.00059%		
クエン酸ナトリウム含量	mg/凝固性たん白質g		
試験終了年月日	部 長	室 長	試験責任者
1998.4.3			

無菌試験成績

1 XXX XX

受付番号		品名	ボツリヌストキノイド		
ロット番号		製造所名	国立感染症研究所		
室受理日	98年3月5日	判定日	98年3月25日	室長印	部長印
判定	適	陽性率	/		
記事					
					

接種日	移植日											
	1		0.5		1		0.5		1		0.5	
観察日 接種量 容器 種類 番号	1	0.5	1	0.5	1	0.5	1	0.5	1	0.5	1	0.5
1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

備考

2	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

3	接種日	月	日	平板移植	月	日
	集落観察	月	日(—)	集落観案	月	日(—)

ボツリヌストキソイド 検定記録

(敏傷風トキソイドト関係ナ)

国立予防衛生研究所

(10年間保存)

検定番号	(B.F.:)
受付年月日	
製造者	千葉県血清研究所
製造番号	(B.F.:)
製造総量	ml
	0.5 ml × 351 本
製造年月日	

試 験 項 目	判 定 年 月 日	結 果
アルミニウム 含量試験	10.4.3	0.237 mg/ml 適
ホルムアルデヒド 含量試験	10.4.3	0.00059 % 適
無菌試験 (1)	10.3.25	適
異常毒性否定 試験 (1)		
無毒化試験	10.4.22	適
力価試験		IU/ml
備 考		(自家試験記録) IU/ml

部 長	室 長	一次判定者
判 定		
判定年月日		

無毒化試験 (5℃)

注射年月日 **10.4.1**

5ml S.C.

無毒化試験 (37℃ 20日) March 12 ~ April 1 '98

注射年月日 **10.4.1**

5ml S.C.

観察日	動 物 番 号					観察日	動 物 番 号				
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
0	381	380	384			0	374	390	364		
2	393	392	389			2	396	403	374		
4.5	412	422	419			4.5	420	432	390		
6	433	434	434			6	421	433	400		
8	434	440	442			8	434	450	407		
10	459	430	452			10	438	476	424		
21	514	470	539			21	485	538	487		
備 考						備 考					

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

（分担）研究報告書

ヒト型モノクローナル抗体の作製に関する研究

（分担）研究者 小崎 俊司 大阪府立大学農学部 獣医公衆衛生学講座 助教授

研究要旨 ボツリヌス中毒の治療用馬抗毒素に代わる高力価で安全性の高いヒト型モノクローナル抗体の作成を目的として、ボツリヌストキソイド（4価；A, B, E, F型）を抗原にボツリヌス毒素研究従事者を対象に免疫を行い、そこから得られたリンパ球をヒト・マウスのヘテロミエロームと細胞融合することによりヒト型モノクローナル産生ハイブリドーマの樹立を試みた。種々の方法を検討した結果、採取したリンパ球を *in vitro* で刺激後使用するよりも、採取直後にヘレロミエロームと細胞融合する方が抗体産生細胞の出現率が高いことがわかった。中和活性をもつモノクローナル抗体産生細胞を得るためには、ELISA により調べた抗体価と実際の中和抗体価を併用して選別したドナーから得られたリンパ球を用いることが必要条件であると考えられた。

A. 研究目的

ボツリヌス中毒はグラム陽性有芽胞性のボツリヌス菌が産生する蛋白性毒素を経口的に摂取することにより起こる食餌性中毒と、一歳未満の乳児の腸管内で芽胞が発芽、増殖し、その際産生される毒素により起こる乳児ボツリヌス症に大別される。いずれの中毒においても、毒素は末梢の興奮性シナプスに作用し、神経伝達物質の遊離を阻害することにより弛緩性麻痺を引き起こす。ボツリヌス中毒は他の細菌性食中毒と比べ発生例は稀であるが、致死率が極めて高く、我が国ではヒトの食餌性中毒事例が報告されているA, B, E, F型に対する治療用馬抗毒素が常備されている。しかしながら、

乳児ボツリヌス症においてはアナフィラキシー等のアレルギー反応を回避するために異種蛋白由来の抗体による治療はなされていないのが現状である。この危険性は成人の中毒における治療においても同様であり、馬抗毒素に変わるより安全で、高い中和力価を持つ抗体の開発が望まれている。

本研究では上述した目的を達成するためにボツリヌス菌および毒素を対象にしている研究者のバイオハザード対策に調製したトキソイドで免疫したドナーより採取したリンパ球を用いてヒト型モノクローナル抗体の作成を試みた。

B. 研究方法

（1）ボツリヌストキソイドの免疫

破傷風トキソイドの力価検定、安全性等に準拠した方法で作成した4価(A、B、E、F型)のボツリヌストキソイドを1ヵ月間隔で2~5回上腕筋肉内に接種した。

(2) ヒトリンパ球の調製

最終免疫10、12日後または1ヵ月後にヘパリン加末梢血(15ml)を採取した。E-RDF培地(GIBCO)で2倍に希釈した後、Ficoll Hypaque上に重層し1,500 rpm 30 min 比重遠心を行った。中間層に存在するリンパ球を回収し、E-RDF培地で2回洗浄後、細胞数を計測し細胞融合用リンパ球として用いた。

(3) 細胞融合

細胞融合はすでに破傷風毒素で樹立されたヒト型モノクローナル抗体の作成法に準じた方法(方法1)とマウスモノクローナル抗体で一般的に行われている方法(方法2)の2通りで検討した。なお、親細胞はヒト・マウスのヘテロミエロームであるRF-S1株を用いた。

(方法1) 分離したリンパ球を15%FCS/E-RDF培地で 5×10^5 /mlの細胞密度に調整しpokeweed mitogen(1:10,000)およびボツリヌス毒素(A、B型 5 ng/ml)とともに24穴プレートに1 mlずつ分注し、37°Cで培養した。5日間培養後、リンパ球を回収し、リンパ球とRF-S1を2:1の比率で混合した後、1000

rpm 10 min 遠心し上清を除去した。50%ポリエチレングリコールを1 ml 加え、続いてE-RDF培地を10 ml 加えた。遠心後、親細胞が 2×10^5 /mlになるように15%FCS/E-RDF培地に細胞を懸濁した後、96穴プレートに100 μ l ずつ分注した。翌日、100 μ l のHAT培地を加えた。1週間後、HAT培地で半量(100 μ l)培地交換を行った。2週間後、コロニーができたウェルの培地を回収し(100 μ l)、スクリーニングを行った。

(方法2) 最終免疫10日後に採取したリンパ球に直ちに50%ポリエチレングリコールを加え、以後方法1と同様の方法で細胞融合を行った。

(4) スクリーニング

ボツリヌス毒素(A、B型 各5 μ l/ml)をコートしたプレートを用い、常法に従いELISA法により行った。対照にはリンパ球を採取したドナーの血清(1:5,000 および1:10,000)を用いた。

(5) クローニング

限界希釈法により行い、培地は15%FCS/E-RDF/5%Briclone/HT培地を用いた。なおフィーダー細胞は用いなかった。

C. 研究結果

(1) トキソイド免疫後の抗ボツリヌス毒素抗体価

最終免疫後、採取したドナーの血清に

おける A, B, E, F 各毒素に対する ELISA 抗体価は表 1 に示す通りである。

(2) ハイブリドーマ形成率および抗体産生陽性クローン出現率(表 2)

4 回免疫後 A 型および B 型に対して抗体価が高かったドナー (Mu) より免疫後 10 日目に採取したリンパ球を用いて方法 1 で細胞融合を行った。その結果、126 ウェル中 113 ウェルでコロニーが観察された。そのうち、対照と同程度の抗体価を示したウェルは、A 型で 2 ウェル、B 型で 1 ウェルであった。しかしながらこれらのいずれも毒素に対する中和活性はみられなかった(表 2、1)。免疫後 1 カ月目に採取したリンパ球に関しては 292 ウェル中 224 ウェルでコロニーが観察されたが、抗体陽性ハイブリドーマは見られなかった(表 2、2)。

5 回免疫後 10 日後にドナー (Mu) から採取したリンパ球を用いて方法 2 により細胞融合を行った結果、372 ウェル中 346 ウェルでコロニーが観察され、そのうち抗体陽性クローンは A 型で 4 クローン、B 型で 2 クローンであった(表 2、3)。さらに 12 日後にもドナー (Mu) よりリンパ球を採取し同様の方法で細胞融合を行った結果、600 ウェル中 528 ウェルでコロニーが観察され、スクリーニングの結果、A 型は 6 ウェル、B 型は 5 ウェルで抗体陽性であった(表 2、4)。し

かしながら 10 日目、12 日目いずれのリンパ球からの抗体陽性ハイブリドーマにおいても毒素中和活性を持つクローンは得られなかった。

3 回免疫後 12 日後にドナー (Ih) より採取し、同様の方法により細胞融合を行った結果、342 ウェル中 315 ウェルでコロニーが観察され、そのうち抗体陽性ハイブリドーマは A 型で 5 クローン、B 型で 4 クローンであった。そのうち A 型に対して 2 クローンが毒素中和活性を持つ抗体を産生していた。一方 B 型に対しては、いずれのクローンの抗体も中和活性を持っていなかった(表 2、5)。

すべての抗体産生クローンについて、1 回目のクローニングを行い、ELISA によりスクリーニングを行った結果、十分な抗体産生能を要しているクローン(A 型、7; B 型、3)について、現在さらに 2 回目のクローニングを行っている。

D. 考察

方法 1 において毒素抗体産生ハイブリドーマの形成率が低い理由として、リンパ球調製後の 5 日間培養で、生存率においては顕著な低下はみられないものの、PWM や毒素による細胞の誘導 (活性化) がうまく起こっていないことが原因である可能性が考えられる。従って、方法 2 のようにリンパ球調製後、直ちに細胞融合を行ったほうがより多くの毒素抗体産生

ハイブリドーマを得ることができると思われる。

毒素抗体産生ハイブリドーマを得るためには、少なくとも血清中の抗体価 (ELISA) が $2^{10} \sim 2^{12}$ に達している必要がある。そのためには、トキソイドによる免疫を 3 回以上することが必要であると思われる。中和抗体産生ハイブリドーマに関しては、今回、ELISA 価ではむしろ低いドナーから採取したリンパ球より得ることができた。この結果は、以前から指摘されているように ELISA 価と実際の中和抗体価間で厳密な相関性が無いことと一致する。したがって、数多くの中和抗体産生ハイブリドーマを得るためには、ELISA による抗体価だけでなく中和抗体価を持つドナー由来のリンパ球を使用することが有効であると思われる。現在、ドナーの血清中の中和抗体価の測定を行っている。

E. 結論

ボツリヌストキソイドで 5 回または 3 回免疫後、10 日および 12 日後に採取したリンパ球をヒト・マウスのヘテロミエロームである RF-S1 株と細胞融合させた。その結果、A 型毒素抗体産生ハイブリドーマが合計 17 クローン、B 型毒素抗体産生ハイブリドーマを 12 クローン得ることができた。そのうち A 型毒素抗体産生ハイブリドーマでは、2 クローン

から中和活性を持つ抗体が産生されていることがわかった。B 型毒素に関しては今まで中和抗体を産生するハイブリドーマは得られていないが、さらに免疫回数を増やし、さらに他のドナー由来のリンパ球を用いることにより中和抗体を産生するクローンを得ることは可能であると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kozaki, S., Kamata, Y., Nishiki, T., Kakinuma, H., Maruyama, H., Takahashi, H., Karasawa, T., Yamakawa, K., and Nakamura, S.: Characterization of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin associated with infant botulism in Japan. *Infect. Immun.* 66:4811-4816, 1998.

表 1. トキソイド免疫後の血清 ELISA 抗体価

ドナー No	ELISA Titer (\log_2)			
	A	B	E	F
Mu (5) ^a	15	14	12	15
Oh (3)	15	13	11	14
Si (3)	15	14	11	14
Yo (2)	13	12	11	13
Ih (3)	12	10	11	13
Tu (3)	12	12	10	12
Na (3)	11	13	10	10
Fu (3)	11	11	12	12
It (2)	11	10	10	12
Ka (2)	<6	<6	<6	7
Hi (2)	9	11	9	11
Ot (2)	8	9	12	14
De (2)	11	9	<6	13
To (2)	8	9	<6	11
TK (3)	8	11	13	15

^a 免疫回数