

Table 3 Sensitivities and specificities of latex coupled with rabbit IgG

Toxin type	Titer(100ng/ml) with latex coupled		
	A. T. -A	A. T. -B	A. T. -E
Type A	1:32 (3ng/ml) <sup>1)</sup>	-	-
Type B	-	1:4 (25ng/ml) <sup>2)</sup>	-
Type E	-	-	1:4 (25ng/ml) <sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> 75pg/25 $\mu$ l, <sup>2)</sup> 625pg/25 $\mu$ l, <sup>3)</sup> 625pg/ $\mu$ l

Table 4 Relationship between RPLA titer and mouse lethality of culture supernatant

Toxin type	RPLA titer	Lethality
Type A	1:2,000	20,000 MLD/ml
Type B	1:400	2,000 MLD/ml
Type E	1:4,000	40,000*MLD/ml

\*After treatment with trypsin

Cross reaction titer between type E toxin and type F toxin was 1:2.

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

—試作沈降多価(A,B,E及びF型)ボツリヌストキソイドのヒトの免疫応答—

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、向本雅都 大阪府立大学農学部  
徳丸洋一、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あげている。しかし、ウマ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安全性の高いヒト型製剤の開発に向けて、ボツリヌス毒素を特異的に認識するヒトリンパ球作製のために、ボツリヌス A,B,E 及び F 型毒素を精製し、フォルマリンで無毒化したトキソイドを作製した。本トキソイドをヒトに接種した結果、問題となる副反応は見られず、良好な免疫応答が得られた。

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。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特異的な神経症状が現れ、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。

国内のボツリヌス発症事例は、1950年から1990年の間に約100件発生し、発症患者数は約500名の報告がある。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）及び 1998 年東京都“グリーンオリーブ”による B 型毒素以外は、E 型毒素による食中毒で北海道と東北地方で多発している。1962 年には E 型ボツリヌスウマ抗毒素の製造が開始され、ほとんどの中毒患者に投与され、患者の呼吸困難を軽減する効果が認められている。現在は E 型単独と多価（A,B,E 及び F 型混合）抗毒素が市販されている。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、17 例の患者が確認されている。乳児ボツリヌス症は、症状が緩慢なこと、現在使用しているボツリヌス抗毒素製剤はウマ血清由来であること、死亡率が低いこと及び患者が生後間もない乳児であることにより、抗毒素療法はほとんど行われていない。しかし、ヒト型モノクロナー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、第 1 段階として現在ジフテリア、破傷風の予防に用いられているトキシノイドワクチンと同様な手法でトキシノイドを試作し、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、安全性と有効性について検討した。本年は品質確認された本トキシノイドのヒトの有効性を抗毒素価の定量で試験した。

## B. 研究方法

初年度試作して実験動物で安全性と有効性を確認した沈降多価ボツリヌストキシノイドを用いて、ボツリヌス毒素の研究に携わる研究者に接種した。ELISA 及びマウス中和試験法により血中抗毒素価を測定してトキシノイドの有効性を確認した。トキシノイド接種は総数 15 名の研究者に行った。11 名には 4 - 5 週間隔で 2 - 3 回注射した後、3 - 4 週目に採血した群と初回 - 2 回注射間隔は 4 週、2 - 3 回注射間隔は 13 週でおこなった 4 名の血清中の A,B,E 及び F 型抗毒素抗体をそれぞれ定量した。ELISA による抗毒素価の測定方法：抗原の吸着は、96 穴プレートの各 well に A,B,E 及び F 型ボツリヌス毒素を 100  $\mu$ l (1  $\mu$ g 濃度) 加え 37°C 2 時間処理した。Tween20 (0.05% 濃度) 添加 PBS で 5 回洗浄後、BSA (3% 濃度) 添加 PBS を 200  $\mu$ l 加え 4°C 一晩静置後、5 回洗浄した。2 倍階段希釈した血清を 100  $\mu$ l 加え、室温で 2 時間処理した後、peroxidase 結合抗ヒト IgG (ウサギ血清) を 100  $\mu$ l 添加した。2 時間反応させた後に 0.8mg/ml 濃度の 5-aminosalicylic acid, 0.05% H<sub>2</sub>O; 9:1 を添加し 45 分室温で処理した後、マイクロプレートリーダー (450nm 波長) で測定した。判定は、陰性対照血清 (健康人血清) の測定値の 2 倍の OD 値を示す最高希釈倍数を求めた。マウス中和法による抗毒素価の測定方法：採血した血清とそれぞれに対応する標準抗毒素を用いた。各標準品 (国内標準品) を

希釈して0.25ml中に0.032, 0.04, 0.05, 0.063及び0.08単位を含む5段階希釈を作り、ヒト血清も同様に希釈した。それぞれの抗毒素に対応する試験毒素を希釈して0.25ml中に約10MLD (Minimum Lethal Dose: 最小致死量) の毒素量を含む液を調整した。標準抗毒素の希釈と血清の希釈液のそれぞれと各毒素の希釈液を等量ずつ取り、混合後1時間室温で静置した。体重約16gのマウス4匹を1群として、各混合液の0.5mlを腹腔内に注射して3日間マウスの生死を観察した。得られた成績は、標準抗毒素価に対する相対力価(単位)として求めた。

### C. 結果

ELISAによる抗毒素価の測定結果(表1、表2):それぞれの血清について、抗毒素価を測定した結果、免疫間隔による抗毒素価の差は認められなかった。3回注射した10名のA型毒素に対する結合価は、1名は $\text{Log}_2$ の $<6$ 以下であったが、他9名は11-13(平均12.2)の範囲を示し、B型は8-14(平均11.2)、E型は6-13(平均9.2)及びF型は10-15(平均12.1)であった。また、2回注射した5名のうち1名は各型の抗体価は測定限界には至らなかったが、残りの4名のそれぞれの平均値は、A型は10.8、B型は10.0、E型は9.8及びF型は12.8であり、E型に対する値が比較的、F型に対する値が高い傾向にあった。なお、接種回数が5回以上の研究者(接種間隔不明)のそれぞれの値は、11,12,13及び14であった。

中和法による抗毒素価の測定結果(表3)  
:マウス法による中和抗毒素抗体の測定

は、1名が2回、11名が3回及び1名が5回注射後の血清を用いた。その結果、血清1ml中の抗毒素抗体価は2回注射ではA型が0.4単位、B型が0.4単位であった。なお、E型、F型について血清量が不足に測定できなかった。3回注射ではA型は0.1-8.9単位(平均1.6単位)、B型は測定レベル以下(0.1単位)が4名、他の9名は0.2-0.8単位(平均0.48単位)であった。EとF型については、血清量が確保できた6名について測定した結果、E型は0.4-3.2単位(平均1.2単位)、F型は0.3-1.6単位(平均0.92単位)であった。なお、接種回数が5回以上の1名の研究者のそれぞれの値は、4.0, 2.0, 16.0及び5.6単位であった。また、トキシイド注射後の抗毒素価の消長を調べるために、採血できた4名について3回注射後9ヶ月目の試験成績を表4に示した。各型の抗毒素とも3回注射後2週の値に比べ、約1/10程度低下していた。

ELISA価とマウス中和価について、3回注射後の各型で得られた値を解析した結果、A、B、E及びF型の相関係数は、ほぼ0.7であった。解析に用いた成績が1回の試験結果であること、マウス中和価の成績が全数揃っていないことを考慮に入れて評価すると両測定値には多少の相関関係が認められた。しかし、中和価(マウス法)の代替測定法としてELISAの実用化には、検体例数、測定回数を増やした試験の検討が必要と思われる。

### D. 考察

沈降ボツリヌストキシイドをヒトに注射後の抗毒素抗体価を測定した結果、破傷風

トキソイド、ジフテリアトキソイドと同様に、各型毒素に対する中和抗毒素（マウス法）はおおむね満足し得る値を示した。また、接種後の異常な全身的臨床像、局所の重大な反応も認められなかった。

一般的にヒト接種後のワクチンの効果を評価する方法は、ワクチン接種後に感染・発症を抑制するか、または、或る疾病における既知の感染・発症防御抗原に対する特異的抗体の上昇・獲得が問われる。

通常、破傷風、ジフテリアの発症防御には 0.01 単位が必要といわれており、そのレベルの抗毒素を能動免疫した実験動物に毒素攻撃をした成績は、昨年得られた本トキソイドの力価試験成績と等価であると思われる。実験室の研究者が暴露される毒素量を推測・予測することは条件が異なるので困難である。しかし、ボツリヌス症の診断に関わる検査や分子生物学的解析の研究で取り扱う菌・毒素量は少量なため、本トキソイドの免疫で突発事故の発症抑制効果は十分期待できる。

さらに、ヒト型のモノクローナル抗毒素抗体を作製するためにヒト免疫用抗原として有効に利用し、ボツリヌス毒素に対するリンパ球を回収し、細胞融合の検討中である。

## E 結論

試作した多価ボツリヌストキソイドをヒトに接種した結果、局所の軽度な腫脹、発赤は観察されたが、重大な副反応は認められなかった。トキソイド3回注射後の血清

について、各毒素型に対する抗毒素価を ELISA 法及びマウス中和試験法で定量した結果、注射回数に伴い良好な抗毒素抗体の産生が確認できた。ボツリヌス症の診断やボツリヌス菌・毒素の基礎研究における事故を想定した場合、発症防御を十分期待できる抗毒素抗体値である。

また、本トキソイドを注射したヒトのリンパ球とマウスーヒトミエローマ細胞を融合し、ボツリヌス毒素に特異的なヒト型モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの樹立に役立っている。

## F. 研究発表

### 1. 学会発表

1) 高橋元秀、長岡芳昭、小崎俊司  
「都内で発生したグリーンオリーブによる B 型ボツリヌス患者へのウマ抗毒素治療について」第 72 回日本細菌学会総会、東京、日本細菌学会誌 54、P 198 (1999)

2) 宮原倫子、木全直樹、三和奈緒子、樋口千恵子、久保和雄、阿岸鉄三、高橋元秀、二瓶宏  
「免疫吸着法により症状が改善したボツリヌス中毒神経障害患者の一例」日本透析医学会、横浜 (1999.6.)

表1. トキソイド注射後の抗体価(ELISA法)

氏名	*1	A	B	E	F
Muka	4-3w	15*2	14	12	15
Ooya	3-3w	15	13	11	14
Shin	3-3w	15	14	11	14
Yoshi	2-3w	13	12	11	13
Iga	3-3w	12	10	11	13
Tubo	3-3w	12	12	10	12
Naka	3-3w	11	13	10	10
Furu	3-3w	11	11	12	12
Ito	3-2w	11	10	6	12
Kawa	3-2w	<6	8	6	10
Dega	3-2w	12	10	8	11
Tori	3-2w	11	10	7	13
Toku	5-27w	11	12	13	14

表3. トキソイド注射後の中和抗毒素価(マウス法)

氏名	*1	A	B	E	F
Muka	4-3w	0.7*3	0.2	0.4	0.3
Ooya	3-3w	0.4	0.4	ND	ND
Shin	3-3w	0.4	<0.1	ND	ND
Yoshi	2-3w	0.4	0.4	ND	ND
Iga	3-3w	0.2	<0.05	ND	ND
Tubo	3-3w	0.2	<0.2	ND	ND
Naka	3-3w	0.3	<0.1	ND	ND
Furu	3-3w	0.1	0.1	ND	ND
Ito	3-2w	1.6	0.6	0.4	1.6
Kawa	3-2w	1.1	0.8	0.4	0.8
Dega	3-2w	8.9	0.8	3.2	0.8
Tori	3-2w	2.3	0.6	1.6	1.1
Toku	5-27w	4.0	2.0	16.0	5.6

表2. トキソイド2回注射後の抗体価(ELISA法)

氏名	*1	A	B	E	F
Ito	2-4w	11	10	10	12
Kawa	2-4w	<6	<6	<6	7
Dega	2-4w	11	9	9	13
Tori	2-6w	8	9	<6	11
Toku	4-32w	11	11	13	15

表4. トキソイド注射後の中和抗毒素価の消長(マウス法)

氏名	*1	A	B	E	F
Ito	3-42w	0.1	0.1	0.1	0.1
Kawa	3-42w	0.1	<0.03	0.1	<0.04
Dega	3-42w	0.7	0.1	0.4	0.1
Tori	3-42w	0.1	0.1	0.2	0.1

\*1:注射回数-採血時期 \*2:log<sub>2</sub> \*3:単位/ml

# 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 獣医疫学講座 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を作成するため、ボツリヌストキソイド（4価；A、B、E、F型）を抗原としてボツリヌス毒素の研究従事者を対象に免疫を行った。そこから得られたリンパ球をヒト・マウス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抗体産生ハイブリドーマの樹立を試みたところ、A型毒素を認識しさらに毒素中和活性を持つ抗体を産生するハイブリドーマを3クローン得た。B型、E型については中和能を持つクローンは得ることができなかった。高純度の抗体を得るため、無血清培地での培養を試みた結果、3クローン中1クローンがFCS濃度1%以下で増殖能および中和抗体産生能を保持していた。以上の結果から、異種蛋白の混入を最小限に抑えられた高純度で、高い中和力価を持つヒト型モノクローナル抗体の作成および臨床応用への可能性が示唆された。

共同研究者 向本 雅郁  
大阪府立大学農学部  
獣医免疫学講座 助手

#### 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接種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、致死率がきわめて高く、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型に対して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、馬抗毒素に代わるより安全で、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として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)抗ボツリヌス毒素ヒト型モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作成

a) ボツリヌストキソイドの免疫

4価(A、B、E、F型)のボツリヌストキソイドを1カ月間隔で3～5回筋肉内に接種した。

b) ヒトリンパ球の調整

ドナーより最終免疫7～10日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1,500rpm 30min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。

#### c) 細胞融合

細胞融合はマウスモノクローナル抗体作製において一般的に行われている方法を用いた。なお、親細胞はヒト/マウスのヘテロミエローマである RF-S1 株を用いた。採取したリンパ球と RF-S1 を 2 : 1 の比率で混合した後、1000rpm 10min 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 10ml 加えた。遠心後、親細胞が  $2 \times 10^5$  /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  $\mu$ l ずつ分注した。翌日、100  $\mu$ l の HAT 培地を加えた。1週間後、HAT 培地で半量 (100  $\mu$ l) 培地交換を行った。2週間後、コロニーを形成したウェルの培地を回収し (100  $\mu$ l)、スクリーニングを行った。

#### e) スクリーニング

スクリーニングは、ボツリヌス毒素 (A、B、E 型 各 5  $\mu$ g/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 (1:5000) を用いた。

#### f) クローニング

クローニングは限界希釈法により行い、培地は 15%FCS/E-RDF/5%Briclonc/HT 培地を用いた。

#### (2) 中和試験

ボツリヌス毒素 (200ipLD<sub>50</sub>/ml) とハイブリドーマ培養上清を等量混合し、室温で 30分反応させた後、マウスの腹腔内へ 0.5ml 接種した。毒素を培地のみと混合したサンプルをコントロールとし、コントロールが死亡した時点における、試験群の臨床症状をスコアで示した。

#### (3) 無血清培地への置換

15%FCS/E-RDF 培地を 10 日間隔で半量ずつ市販の無血清培地に置換し、FCS 濃度が 1%以下になった時点で、完全無血清培地に置き換えた。FCS 濃度を下げていく際、細胞の増殖能の低下または抗体産生量の減少が顕著に見られたときは、その

時点で再クローニングを行い、増殖および抗体産生が良好なクローンを選別し、さらに血清濃度を下げた。

#### C. 研究結果

#### (1) 抗体産生陽性クローンの毒素中和能

1回目のスクリーニングにおいて、対照に用いた血清 (1:5000) より高い抗体価を示したクローンは、A型で 21 クローン、B型で 17 クローン、E型で 6 クローンあった。それらを陽性クローンとして2回目のクローニングを行った。1回目または2回目のスクリーニングのいずれかにおいて中和能が見られたクローンおよび抗体価が比較的高いクローンについてさらにクローニングを行った (表 1)。その結果、常に抗体価が安定し且つ中和能を持つクローンが A 型を認識するハイブリドーマ中で 3 クローン得られた。B および E 型については全く得られなかった。特に B 型を認識するクローン中、1回目のスクリーニングで中和能が見られたクローンにおいて、2回目のスクリーニングで抗体価の減少が著しかった。A 型と B 型の両方を認識するクローンも 3 クローン得られたが、いずれも抗体価は高いものの中和能は全く見られなかった。A 型に対して中和活性を持つ 3 クローンについて 5 回のクローニングを行うことにより単クローン化された細胞であることが確認された。

#### (2) 抗体価と中和能の関係

A 型に対して中和能を持つ 3 クローン (Mu-4D8, Ih-3H5, To-2H3) について抗体価と中和能の関係を検討した (図 2)。中和活性の強いクローンである To-2H3 では ELISA の OD 値が 0.780 以上で中和能が見られたのに対して 0.520 以下では毒素を中和しなかった。Mu-4D8 では 0.487 で弱いながらも中和能が見られたが、0.432 では見られなかった。Ih-3H5 では、OD 値はいずれも 0.4 以下であり、この抗体価においては中和能は見られなかった。



### (3)ハイブリドーマの無血清培地での培養

無血清培地での培養を試みるため、数種類の無血清培地でその適正を検討した。その結果 UC メディウム 103 (ニッスイ) を用いたとき、最もハイブリドーマの増殖が良好であった。この培地を用いて、FCS濃度を徐々に落としていった結果、Mu-4D8 において FCS 濃度 1% 以下でも抗体産生量および中和能は 15% FCS 存在下と同程度に維持されていた (図 1)。一方、Ih-3H5 および To-2H3 では FCS 濃度が 3% 以下になった時点で、細胞増殖能および抗体産生量が極端に減少した。

#### D. 考察

A 型において得られた 3 クローンは、その程度に差はあるがいずれも A 型ボツリヌス毒素を中和する抗体を産生していた。このことは、これらのクローンが産生するヒト型モノクローナル抗体は毒素の中和に関わる抗原決定基を認識していることを示している。中和の程度の差は、産生する抗体量に依存している可能性があり、いずれのクローンも抗体産生量が増加するような検討を加えることにより、さらに高い中和能を持つことができると思われる。今回、1 クローン (Mu-4D8) においてクローニングを繰り返すことにより無血清培地を用いて FCS 濃度 1% 以下で培養することが可能になった。他の 2 クローンについても同様の方法を用いることにより同程度の FCS 濃度での培養は可能であると考えられる。したがって、臨床応用のための精製ヒトモノクローナル抗体を調製する際に、異種蛋白の混入は最小限に抑えられるものと思われる。

今回用いた実験系において、1 回目のスクリーニングでは A、B 型とも抗体陽性クローンを多数得たが、2 回目のスクリーニングではその数が極端に減少した。親細胞として用いたヒト/マウスヘテロミエローマである RF-S1 は、他のヒトミエローマ細胞と比較して抗体産生能は高い反面、ヒト抗体特に入鎖遺伝子の脱落が起こる

ことが報告されている。ヒト抗体の多くは軽鎖が入鎖であることから、今回のクローニングによる抗体産生クローンの減少は入鎖遺伝子の脱落によるのかもしれない。しかしながら、他のミエローマを用いた場合、RF-S1 に比べ抗体産生能が低く、その結果、中和活性を有する抗体産生細胞の出現が低くなることから RF-S1 は現時点では親細胞としては最良のものであると思われる。

現在、他の 2 クローン (Ih-3H5、To-2H3) についても FCS 濃度が 1% 以下になるようにクローニングを行っており、その後、抗体を精製し中和抗体価の測定を行う予定である。さらにこれらのモノクローナル抗体を混合した、より高い中和活性を持つヒト型抗毒素の調製に向けた検討を行う予定である。

#### E. 結論

A 型毒素に対して中和能を持つヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを 3 クローン得ることができた。これらのハイブリドーマは FCS 濃度 1% 以下でも増殖能および中和抗体産生能を保持できることが明らかとなった。したがって、これらのモノクローナル抗体を精製し、高純度で抗力価の抗体を得ることにより臨床応用は可能であると思われる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kamata, Y., R. Tahara, and S. Kozaki (2000) Difference in hydrophobicity between botulinum type B activated and non-activated neurotoxin under low pH conditions. *Toxicon*, in press

##### 2. 学会発表

小崎俊司、木村紀代、向本雅都、塚本健太郎、森本文宏、居原秀 (1999) ボツリヌス B 型毒素受容体シナプトタグミン II 分子の毒素認識に関与するアミノ酸の同定 第 46 回毒素シンポジウム

表 1. ハイブリドーマ培養上清中の抗ボツリヌス毒素 ELISA 抗体価と毒素中和能

Type A screening

clone	1st		2nd		3rd		4th		5th	
	ELISA	中和能	ELISA	中和能	ELISA	中和能	ELISA	中和能	ELISA	中和能
Mu-4D8	0.133	d	0.168	+++	0.214	-	0.234	+++	0.233	++
-9F3	0.161	d	0.264	-	0.225	d				
Ih-1F7	0.790	+++	0.242	+++	0.261	d				
-3A9	0.123	+++	0.224	d	0.204	d				
-3H5	0.285	d	0.511	+++	0.413	+	0.223	+++	0.246	+++
Si-2C5	0.409	+++	0.336	+++	0.420	d				
-3G8	0.685	+++	0.218	d	0.436	d				
-5H4	0.473	+++	0.318	d						
To-2B2	0.236	++	0.949	d						
-2H3	0.215	-	0.362	+	0.563	+	0.344	-	0.780	±
-6D6	0.182	+++	0.353	d						
-12B10	0.208	+++	0.148	d						

Type B screening

clone	1st		2nd		3rd	
	ELISA	中和能	ELISA	中和能	ELISA	中和能
Ih-2C4	0.104	d	0.118	+++	0.250	d
-3F8	0.145	d	0.206	+++	0.156	d
Si-1D9	0.326	d	0.159	d		
-2C11	0.411	d	0.192	d		
-3A12	0.600	-	0.156	d	0.172	d
-3C8	0.764	+++	0.224	d	0.128	d
To-6F9	0.679	d	0.384	d	0.330	d
-10D4	0.915	-	0.215	d	0.189	d

Type A & B screening

		1st		2nd		3rd	
clone		ELISA	中和能	ELISA	中和能	ELISA	中和能
Mu-2G3	A	3.128	d	2.988	d	3.048	d
	B	1.934	d	1.923	d	1.852	d
To-2F6	A	1.269	d	1.395	d	1.051	d
	B	0.941	d	1.484	d	1.201	d
-14B11	A	0.250	d	0.396	d	0.405	d
	B	0.176	d	0.428	d	0.426	d

Type E screening

		1st		2nd	
clone		ELISA	中和能	ELISA	中和能
To-1F8		0.243	d	0.162	d
-1G5		0.264	d	0.124	d

表2. ハイブリドーマの抗ボツリヌス毒素（A型）抗体産生量と中和能の関係

clone name	ELISA OD	中和能
Mu-4D8	0.487	+++
	0.432	d
Ih-3H5	0.396	d
	0.375	d
To-2H3	1.375	+
	0.780	++
	0.520	d
	0.438	d

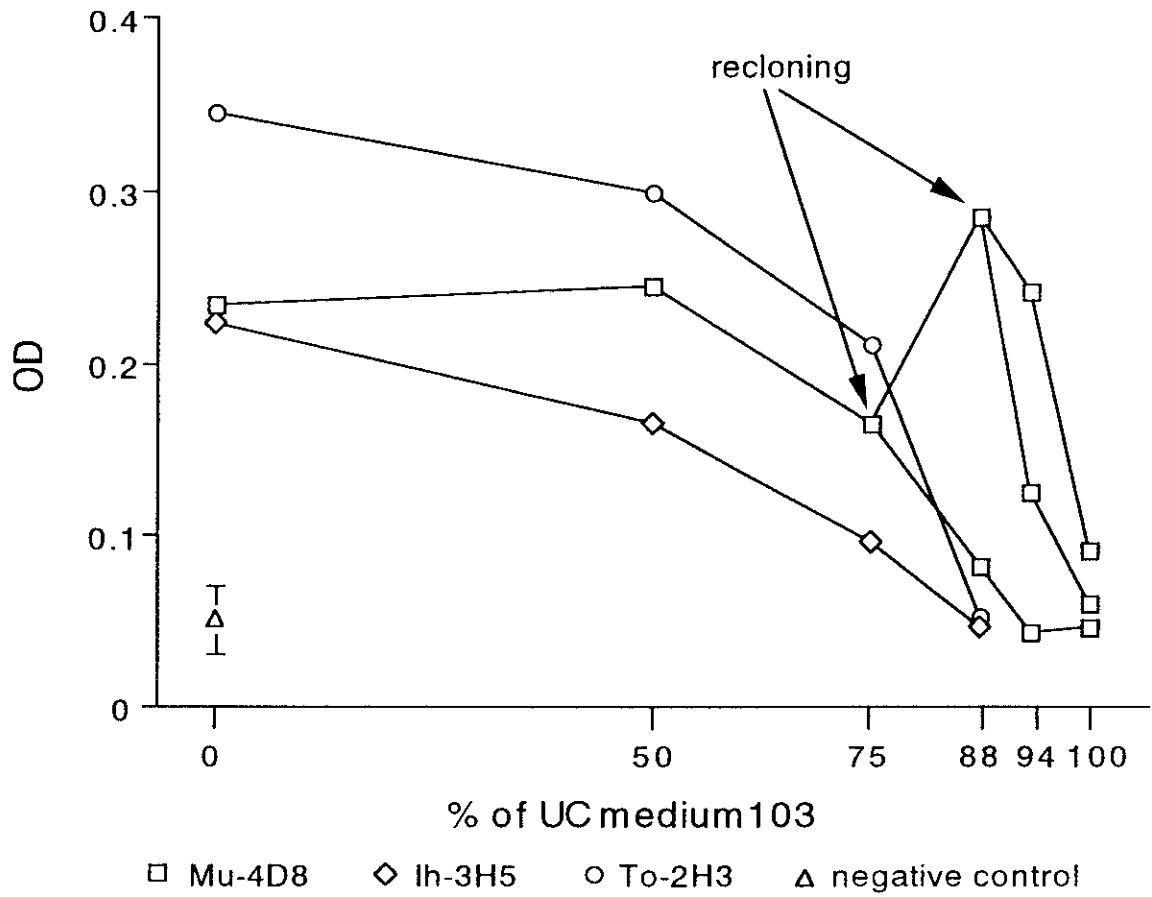


図1. 無血清培地への置換による抗体産生量の変化

# 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

### ボツリヌスC型、D型中毒に対するワクチンに関する研究

主任研究者 小熊 恵二 岡山大学・医学部・細菌学講座・教授

協力研究者	藤永 由佳子	岡山大学医学部
	井上 薫	〃
	横田 憲治	〃
	ナズラマホモテイ	〃
	有満 秀幸	〃
	阪口 義彦	〃

#### 研究要旨

昨年私達はボツリヌスC型神経毒素に結合している無毒成分をマウスに経鼻免疫すると、腸管洗浄液中に無毒成分に対するIgGとIgAが上昇し、最小経口致死量（マウスの腹腔内接種では、 $1 \times 10^4$ MLD程に相当する）の4倍量のC型、D型毒素のチャレンジを予防できることを確認した。今回、A型、C型のHAの各サブコンポーネントをGST融合蛋白質として人工合成し、それらの赤血球や腸管上皮細胞への結合性を調べたところ、1) A型、C型、いずれにおいても、HA1とHA3bが両細胞に対して結合する、2) A型はHA1を主に介して、ガラクトースを含む糖鎖に、C型はHA3を介してシアル酸に結合する、ということが判明した。

#### A. 研究目的

ボツリヌスC型、D型毒素はトリヤウシに中毒をきたす。C型、D型の神経毒素の抗原構造は複雑であるが神経毒素に結合している無毒成分はほとんど同一である。無毒成分には赤血球凝集活性を示すもの（HA）と示さないものが存在するが、HAは赤血球のみならず腸上皮細胞に高い親和性で結合するため、毒素の吸収を効率よくさせる。本研究では無毒成分に対する腸管免疫を亢進させ中毒の予防に利用することを考えている。昨年マウスを用いた経鼻免疫の結果から、HAを含む無毒成分のみの免疫でも、C型、D型両方の毒素の経口チャレンジをある程度防御することが判明した。

HAはHA1（～33kDa）、HA2（～17kDa）、HA3a（～23kDa）、HA3b（～53kDa）のサブコンポーネントより成るが、今回は、A型とC型の各サブコン

ポーネントをGST融合蛋白質として大腸菌を用いて合成し、これらをモルモットの腸上皮細胞の切片やヒト赤血球より抽出した糖蛋白や糖脂質に反応させ、どのサブコンポーネントが腸上皮細胞や赤血球に結合するのかを、またそのレセプターは何であるかを決定した。

#### B. 研究方法

##### 1) A型、C型毒素の精製

A型菌の19Sおよび16S毒素は菌の培養上清から既報（Inoue K., et al. Infect. Immun. 64: 1589-1594, 1996）に従い精製した。C型菌の16S毒素は菌の培養上清を60%飽和の硫酸アンモニウムで分画した後、SP-Toyopearl 650Mによる陽イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過を順次行い、精製した。

##### 2) HAサブコンポーネントの作製

それぞれのサブコンポーネントに対するプライマーを作成し、PCR法にてボツ

リヌスc-st phage DNAより、各HAサブコンポーネントのコード領域を増幅した。増幅産物を *Bam*H Iと *Sal* Iで処理し、pGEX5X-3(Pharmacia)の *Bam*H Iと *Sal* I部位に組み込み、大腸菌DH5  $\alpha$  に導入した。培地にIPTGを添加し25Cで16時間培養することによりリコンビナント蛋白質を発現させ、菌体の超音波破碎物より glutathione affinity columnを用いて常法に従い精製を行った。

### 3) 腸上皮細胞との結合性

モルモットの小腸上部を4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋した後、5  $\mu$ mの切片を作製した。試料を切片に滴下し、室温で1時間静地した後、PBSで洗浄し(10分ずつ6回)、組織に結合した蛋白質を酵素抗体法(ABC法)による免疫組織染色により観察した。一時抗体として、抗C型無毒成分ポリクローナル抗体、抗A型HAポリクローナル抗体あるいは抗GSTポリクローナル抗体を用いた。

### 4) 赤血球との結合性

試料(100  $\mu$ g/ml)を96穴のマイクロタイタープレートへ50  $\mu$ lずつ入れて、室温で2時間静地し、試料(蛋白質)をプレートに結合させた。PBSで洗浄後、1%BSAでブロッキング(室温で2時間)を行い、1%ヒト赤血球を100  $\mu$ l添加し室温で30分静地する。PBSで6回洗浄後、接着した赤血球に蒸留水50  $\mu$ lを加えて溶血させ、ヘモグロビンの吸光度(405 nm)を測定した。

(倫理面への配慮)

乳児より便を採取する際には、担当医より親に十分な説明をして頂き、承諾を得ている。動物実験は本学の動物委員会の許可を得、全て規定通りに行っている。

## C. 研究結果

### 1) A型、C型毒素の腸上皮細胞および赤血球への結合性

A型、C型毒素の腸上皮細胞と赤血球への結合性は異なっていたが、それぞれの毒素の腸上皮細胞と赤血球への結合性は同一であった。即ちC型毒素の腸上皮細胞および赤血球への結合性は、両細胞をシアリダーゼ処理あるいはプロテアーゼ処理することにより激減した。他方、ヒト赤血球から抽出した糖脂質および糖蛋白質への結合性を解析したところ、C型毒素は糖脂質ではGM3やSPGに、糖蛋白質ではグライコホリンに結合した。これらはシアル酸を多量に含む物質であることが知られており、これらの糖脂質、糖蛋白質に対するC型毒素の結合性はシアリダーゼ処理により激減した。

一方、A型毒素の腸上皮細胞および赤血球への結合性はシアリダーゼ処理による影響を受けなかった。A型毒素の両細胞への結合はラクトース、ガラクトースにより阻害された。A型毒素は糖脂質ではPGに、糖蛋白質では末端にシアル酸が結合していないN結合型糖鎖を有する糖蛋白質に結合することが判明した。赤血球から抽出した糖蛋白質に対する結合を調べた結果、A型毒素もC型毒素と同様にグライコホリンに結合した。さらに、A型毒素の赤血球に対する結合は精製グライコホリン(購入したもの)によって阻害された。

### 2) HAサブコンポーネントの腸上皮細胞への結合性

A型、C型いずれにおいても、HA1とHA3bが腸上皮細胞に結合したが、HA2とHA3aの結合は認められなかった。さらにA型、C型いずれにおいてもHA3bの結合性は腸上皮細胞をシアリダーゼ処理すると激減した。これに対し、A型、C型のHA1の結合性はシアリダーゼ処理による影響を受けなかった。

#### C. D. 研究結果、考察

以上のことより、1) A型、C型、いずれにおいても、HA1とHA3bが両細胞に対して結合する、2) A型はHA1を主に介して、ガラクトースを含む糖鎖に、C型はHA3を介してシアル酸に結合する、ということが判明した。毒素の結合性は細胞をプロテアーゼ処理すると減少したことから、レセプターは糖脂質よりも糖蛋白質が重要であると推察される。特に赤血球の場合はA型：C型毒素とも赤血球膜に多量に存在するグライコホリンに結合するが、A型はガラクトースを末端を持つN結合型糖鎖に、C型はシアル酸を末端を持つ糖鎖に結合すると推察された。

A型毒素はHA1を介して、ボツリヌスC型毒素はHA3bを介して腸上皮細胞や赤血球に結合していることが推察された。どちらの型のHAサブコンポーネントも糖鎖に対する特異性は類似しているにも関わらず、progenitor toxinが示す結合特異性が異なっているのは、progenitor toxinの高次構造の違いにより分子の表面に露出しているサブコンポーネントが異なっているか、progenitor toxinを形成しているHAサブコンポーネントのいずれかがプロセッシングを受けることによって糖鎖への結合に必要とされるdomainを失っていることなどが予想される。

昨年のデータではHA1およびHA3bの免疫ではあまり経口毒性に対して抵抗性が上昇しなかったが、今後投与方法などを変えることによりHA1やHA3bがワクチンとして利用できるかを検討したい。

#### E. 結論

A型、C型のHAの各サブコンポーネントをGST融合蛋白質として人工合成し、それらの赤血球や腸管上皮細胞への結合性を調べたところ、1) A型、C型、いずれにおいても、HA1とHA3bが両細胞に対して結合する、2) A型はHA1を主に介して、ガラクトースを含む糖鎖に、C型はHA3を介してシアル酸に結合する、ということが判明した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Inoue, K., Y. Fujinaga, K. Honke, K. Yokota, T. Ikeda, T. Ohyama, K. Takeshi, T. Watanabe, K. Inoue, and K. Oguma. Characterization of hemagglutinin activity of *Clostridium botulinum* type C and D 16S toxins, and one subcomponent of HA (HA1). *Microbiol.* 145: 2533-2542, 1999.
- 2) Watanabe, T. Y. Sagane, H. Kouguchi, H. Sunagawa, K. Inoue, Y. Fujinaga, K. Oguma, and T. Ohyama. Molecular composition of progenitor toxin produced by *Clostridium botulinum* type C strain 6813. *J. Protein Chemistry.* 18: 753-760, 1999.
- 2) Fujinaga, Y. K. Inoue, T. Nomura, J. Sasaki, J. C. Marvaud, M. R. Popoff, S. Kozaki, and K. Oguma. Identification and characterization of functional subunits of *Clostridium botulinum* type A progenitor toxin involved in binding to intestinal microvilli and erythrocytes. *FEBS Lett.* 467: 179-183, 2000.



- 3) Oguma, K., Inoue, K., Fujinaga, Y., Yokota, K., Watanabe, T., Ohshima, T., Takeshi, K., and Inoue, K. Structure and function of *Clostridium botulinum* progenitor toxin. J. Toxicol.-Toxin Reviews 18:17-34, 1999.
- 4) Oguma, K., Y. Fujinaga, K. Inoue, K. Tomochika, T. Watanabe, K. Takeshi, T. Ohshima and K. Inoue. Structure and function of progenitor toxins produced by *Clostridium botulinum* type A, C, D, and E. p. 35-40, In Howard S Tranter (ed.) : Oxford (UK) Conference 1996 8th -11th July : Biomedical Aspects of Clostridial Neurotoxins. 1999.
- 5) Oguma, K., Fujinaga, Y., Inoue, K., and Yokota K. Botulism: Mechanisms of pathogenesis and toxin synthesis in *Clostridium botulinum*. p.273-293. In Linz J. E., Bhatnagar D., Stein M. A., and Cary J. W. (eds). : Microbial foodborne diseases: Mechanisms of pathogenesis and toxin synthesis. ; Technomic Publishing Co., Inc., (USA). 1999.

## 2. 学会発表

- 1) K. Oguma, K. Inoue, Y. Fujinaga, K. Yokota, N. Maphomaty, T. Tsuji, L. Hughes, and R. Hirst. Nontoxic components associated with *C. botulinum* type C neurotoxin can be used as vaccine against both type C and D food-borne botulism. IXth International Congress of Bacteriology & Applied Microbiology. (IUMS) Sydney, Australia. (1999. 8. 16-20)

- 2) K. Oguma, K. Inoue, Y. Fujinaga, A. Arimitsu, K. Yokota, Y. Sakaguchi, N. Maphomaty, and T. Tsuji. Significance of the nontoxic components associated with *Clostridium botulinum* neurotoxins. International Conference 1999: Basic and Therapeutic Aspects of Botulinum and Tetanus Toxins. Florida, USA. (1999. 11. 15-19)
- 3) 井上薫, 藤永由佳子, 横田憲治, ナズラマホモテイ, 渡部俊弘, 武士甲一, 大山徹, 井上勝弘, 小熊恵二 ボツリヌスprogenitor toxin無毒成分の構造と機能の解析 第46回毒素シンポジウム岩手 (1999)
- 4) ナズラマホモテイ, 井上薫, 藤永由佳子, 有満秀幸, 阪口義彦, 長町榮子, 小熊恵二 ボツリヌスC型菌の産生する赤血球凝集素に対するモノクローナル抗体の作製とその性状 第52回中国・四国支部会, 日本細菌誌 54 (1999)
- 5) 井上薫, 藤永由佳子, 渡部俊弘, 武士甲一, 大山徹, 小熊恵二 ボツリヌスA型progenitor toxin HA成分の糖鎖に対する結合 第72回日本生化学会大会 (1999. 10. 6~9)
- 6) 小熊恵二 ボツリヌス中毒; その基礎と臨床 第69回日本感染症学会西日本地方会総会 (1999. 11. 25~26)
- 7) 円谷悦造, 塚本義則, 小熊恵二 ボツリヌス菌およびカンピロバクターに対する食酢の抗菌作用 第20回先端技術演会 (第3回共同研究成果報告会) (1999. 11. 26)

8) 小熊恵二 ボツリヌスProgenitor  
toxinの構造と機能 長崎大学熱帯医  
学研究所研究集会「細菌感染メカニ  
ズムの分子生物学的解析」  
(1999. 12. 10)

19990447

p.41-45 は雑誌／図書等に掲載された論文となりますので  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

Identification and characterization of functional subunits of  
*Clostridium botulinum* type A progenitor toxin involved in  
binding to intestinal microvilli and erythrocytes

Yukako Fujinaga, Kaoru Inoue, Takako Nomura, Junzo Sasaki,  
Jean C. Marvaud, Michel R. Popoff, Shunji Kozaki, Keiji Oguma  
FEBS Letters. 467: 179-183, 2000

厚生科学研究補助金（新興・再興感染症研究事業）  
（分担）研究報告書

ボツリヌス毒素と類縁の破傷風毒素の抗毒素をモデルとした  
ヒト型組換え抗毒素抗体作成に関する研究

（分担）研究者 松田 守弘 甲子園大学 栄養学部 教授

協力研究者 渡邊 優子 甲子園大学 栄養学部

片平 じゅん 大阪大学 微生物病研究所

堀口 安彦 大阪大学 微生物病研究所

亀井 優徳 森永製菓研究所

研究要旨 毒素性感染症であるボツリヌス中毒の救命には抗毒素療法が必須である。しかし、ボツリヌス中毒に対しては、現在世界中で異種タンパク質であるウマ抗毒素しかない。ヒト型モノクローナル抗毒素は、血清病、供給源の制限や供給源からのウイルス感染のおそれがないため、新しい重要な抗毒素療法剤として望まれており、ボツリヌス抗毒素についても開発研究が進められているが、一般にマウス型モノクローナル抗体と異なり、ヒト型モノクローナル抗体は実用化できる条件を充たすハイブリドーマを作成することが困難で、ボツリヌス抗毒素抗体もその例外ではない。私たちは、ボツリヌス毒素の類縁である破傷風毒素の抗毒素について、安定して高中和性ヒト型抗毒素を産生するハイブリドーマを世界に先駆けて作成することができた。そこで、これをヒト型抗毒素のモデルとしてとり上げ、実用化をさらに進めるために、このハイブリドーマから高中和性ヒト型抗毒素抗体の重鎖および軽鎖の変換領域遺伝子をクローニングし、それらを連結して、一本鎖の組換え抗体フラグメントとして大腸菌の特殊な菌株に発現させることを試みた。その結果、毒素と特異的に結合する一本鎖組換え抗体フラグメントを作成することができた。さらに、マウス毒性試験によってその中和活性について研究を進めている。

A. 研究目的

ボツリヌス中毒は、最も典型的な毒素性感染症の一つで、細菌性食中毒のうちで最も致命率が高く、その救命には抗毒素療法が著効を奏し、必須である。

ジフテリア、破傷風について世界で最初の抗毒素血清療法（ウマ抗毒素製品を使用）が始められて100年以上になる。しかしボツリヌス中毒に対しては、ジフテリアやガス壊疽、蛇毒の場合と同じく、まだウマ抗毒素しか実用されていない。ウ

マ抗毒素は、ヒトにとって異種タンパク質であり、血清病などの副作用反応の危険がある。そこで、破傷風に対すると同じく、副作用のより少ない、より安全な抗毒素として、ヒトに安全に注射できるトキシドをつくりそれで免疫したヒトの血清から調製した、ヒトに同種タンパク質である抗ボツリヌス・ヒト免疫グロブリンG製剤の開発が考えられる。

しかし、ヒト抗毒素免疫グロブリン製剤は、ヒトの免疫血清を供給源としているため供給に限