

1993 年以後に分離された 3 株に対する中和活性は高く、6.25 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で 100% のウイルスを中和した。

(6) YA14 の中和活性

YA14 の完全型 IgG の中和活性を調べるため、B 型の 4 種類のワクチン株に対して中和カイネティクスを見た。この抗体は、4 種類すべての株を同程度に強く (1.63 $\mu\text{g/ml}$ の濃度までほぼ 100%) 中和した。

(7) YA14 の野外ウイルス株に対する反応性

YA14 がワクチン株に対して幅広い中和活性を有していたので、この性質が野外の流行株についても同様か否かを調べた。インフルエンザウイルスの B 型には山形タイプとビクトリアタイプという抗原性が非常に違う 2 つの系統がある。2000/2001 のシーズンに全国で分離された山形タイプ 171 株とビクトリアタイプ 11 株に対して YA14 の染色活性と中和活性を検討した。その結果、YA14 はすべての株に対して染色活性、中和活性とも有していた。

(8) YA14 に対するエスケープミュータントの作製と認識部位の同定

YA14 を B/Yamanashi/166/98 に反応させ、YA14 の中和活性に抵抗する 4 種類のエスケープミュータントを得た。これらの HA 遺伝子をシークエンスしたところ、すべて HA の 141 番目のアミノ酸が Gly から Glu に置換していた。この部位は、HA の頭部の側面にあるループに位置し、YA14 はここを認識していると考えられた。

(9) マウスにおける NC1 の予防効果

NC1 をマウス 1 匹あたりそれぞれ 100 μg 、10 μg 、1 μg 投与し、1 日後に致死量の A/New Caledonia/20/99 (H1N1) でチャレンジした。PBS だけを投与したコントロール

のマウスは 40% の生存率であったが、100 μg を投与したグループは 100%、10 μg を投与したグループは 70% の生存率で、有意な予防効果が認められた。1 μg 投与したグループはコントロールのグループの生存率と差がなく、予防効果はなかった。

D. 考察

7 種類のヒト型モノクローン抗体が得られ、5 種類の抗体について解析し、興味ある知見を得た。

2 種類の抗体 (NC1、SY47) は、スクリーニングに用いたウイルスだけを中和する株特異的な抗体であった。一方、H3N2 に対する 2 種類の抗体 (SY39、PA129) は、程度の差はあれ多くのワクチン株を中和した。エスケープミュータントを作製して NC1 と PA129 の認識部位を調べたところ、HA の先端部にあるレセプター結合部位の近傍に存在することが明らかになった (平成 13 年度本報告書)。

B 型に対する抗体、YA14 はユニークな性質を有していた。ワクチン株を含め調べたすべての流行株を中和し、今まで報告されたことのない抗体であった。我々が現在まで作製したマウスのモノクローン抗体は、山形タイプかビクトリアタイプのどちらかだけを中和するものであった。2 つのタイプは HA の抗原性が大きく違い、両タイプに共通する中和エピトープは知られていなかった。PA14 は、初めて B 型に共通中和エピトープが存在することを明らかにしたものである。

YA14 のエスケープミュータントを作製して解析し、この抗体は HA の頭部の側面にあるループ部位を認識していることを証明した。この部位は抗原変異がよく起こ

る場所で、ここに共通中和エピトープが存在するとは意外であった。

ヒト型抗体の予防効果を調べるため、マウスにNC1を腹腔内投与してチャレンジテストを行なった。1匹あたり100 μ gを投与すると高い予防効果が認められ、ヒトへの応用も十分に可能と考えられた。

ファージディスプレイ法により、インフルエンザウイルスに対するヒト型の中和抗体が得られ、しかもそれらが非常にバラエティーのあることが分かった。今後は、これら抗体の実用化に向けての検討やウイルスの抗原解析への活用を考え、この研究を更に発展させたい。

E. 結論

インフルエンザウイルスに対する7種類のヒト中和モノクローン抗体が得られた。これら抗体が示す性質はバラエティーがあり、株特異的な中和活性を示すものから、調べたすべてのウイルスを中和するものまで様々であった。

F. 研究発表

(1) 論文発表

1. Morishima, T., Togashi, T., Yokota, S., Okuno, Y., Miyazaki, C., Tashiro, M., and Okabe, N. Encephalitis and encephalopathy associated with an influenza epidemic in Japan. Clin. Infect. Dis. 35:512-517. 2002.
2. Okamoto, S., Kawabata, S., Nakagawa, I., Okuno, Y., Goto, T., Sano, K., and Hamada, S. Influenza A virus-infected hosts boost an invasive type of *Streptococcus pyogenes* infection in mice. J.

Virol. 77: 2003. (in press)

3. Nakagawa, N., Kubota, R., Nakagawa, T., Okuno, Y. Neutralizing epitopes specific for influenza B virus Yamagata group strains are in the "Loop". J. Gen. Virol. 84:709-713. 2003. (in press)
4. 奥野良信：インフルエンザウイルスの分離・同定. インフルエンザ、3(4)：49-53、2002
5. 奥野良信、馬場宏一：小児のインフルエンザに対する医師と保護者の意識調査. 日本医事新報、4095：27-32、2002
6. 奥野良信、中川直子、加瀬哲男、森川佐依子、馬場宏一、山本威久、岡藤輝男、岡本健治、和田和夫：A型、B型の鑑別が可能なインフルエンザ迅速診断キット「ポクテム インフルエンザ A/B」の評価. 医学と薬学、48：895-904、2002

(2) 学会発表

1. 加瀬哲男、森川佐依子、奥野良信、馬場宏一：RT-PCR と RFLP を用いた Victoria 系統 B 型インフルエンザウイルスの検出. 第 43 回日本臨床ウイルス学会、秋田 (2002. 6)
2. 加瀬哲男、森川佐依子、奥野良信、馬場宏一、前田章子：市中 1 小児科で過去流行 4 シーズン中にみられた同一血清型インフルエンザウイルスの再感染. 第 50 回日本ウイルス学会総会、札幌市 (2002. 10)
3. 中川直子、前田章子、久保田律子、奥野良信：B 型インフルエンザウイルス Victoria タイプの抗原性変異の解析. 第 50 回日本ウイルス学会総会、札幌市 (2002. 10)

4. 熊谷卓司、永井和重、古川秀嗣、長田伸夫、奥井登代、伊木繁雄、矢野昭起、中山哲夫、奥野良信、堤裕幸：乳幼児のインフルエンザワクチン接種における特異的免疫反応。第6回日本ワクチン学会学術集会、千葉市（2002. 11）
 5. 鎌田誠、永井崇雄、熊谷卓司、庵原敏昭、岡藤輝夫、落合仁、崎山弘、鈴木英太郎、鳥越貞義、宮田章子、中山哲夫、奥野良信。小児におけるインフルエンザワクチンの軽症化効果の検証。第6回日本ワクチン学会学術集会、千葉市（2002. 11）
- G. 知的所有権の取得状況
該当無し

厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

ハブ毒の調製と抗体の検定

分担研究者：野崎真敏（沖縄県衛生環境研究所）

研究協力者：東 成見（藤田保健衛生大学総合医科学研究所）

研究要旨

副作用の危険が少ない「抗ハブ毒ヒト抗毒素」の作製を目的に、ハブ毒に対する中和抗体の存在が確認された献血ボランティアから成分献血で単核球画分を回収した。次に抗体の germline に特異的なプライマーを用いて得た cDNA から light chain 全長を kappa 鎖、lambda 鎖をそれぞれを増幅し、ファージ抗体用のベクターに組み込んで、light chain ライブラリーを作製した。VH も同様に増幅を行い、一旦別のベクターに入れて VH ライブラリーを作製した。そこから VH を切り出して kappa 鎖、lambda 鎖を各々等量ずつ混ぜた light chain ライブラリーに組み込み、抗ハブ毒抗体ライブラリーを作製した。作製したライブラリーから抗 HR1 抗体 9 クローンが得られ、その中には明らかに HR1 を中和するものが 4 種存在し、3 種類で HR1 に対する中和抗体を認めた。抗 HR2 抗体については 50 クローンが得られたが、現在のところ中和活性を示す抗体は単離されていない。

A. 研究目的

現行の抗ハブ毒ウマ抗毒素はハブ咬症患者の治療に優れた治療効果を発揮するが、免疫されたウマの血液成分すなわち人間以外の動物の血清タンパクを大量に接種するために、異種蛋白による副作用がかなりの頻度で発生する。アナフィラキシーショック、発疹、搔痒感など軽重すべての副作用を加えると全接種者の 10~15%にも達する。

これらの大部分は注射 1 週間～ 10 日後に起こる遅延型の血清病であり特に治療の必要もないが、稀にアナフィラキシーショックや即発性の血清病が起こることがあるので、抗毒素を使用する際は酸素吸入やアドレナリン、ステロイドを準備するなど、細心の注意が必要である。

沖縄県では、副作用の危険が少ない「抗ハブ毒ヒト抗毒素」の作製を目的に、ヒト抗体を産生するように遺伝子が組換えられ

たマウスを用いて研究を進めているが、本プロジェクトでは更に安全性が高いヒト由来の「完全ヒト抗毒素」の作製を目的に、ハブに 5 度咬まれた経験を持つ献血ボランティアから成分献血で単核球画分を回収し、抗体ライブラリーを作製してハブ毒中の主要な毒性因子に対する中和抗体の単離を試みた。

B. 材料と方法

1. 試験毒素の精製

(1) 試薬

試験毒素を精製するためのクロマト用ゲル (Sephacryl S-200 High Resolution, Chelating Sepharose Fast Flow, SP Sepharose Fast Flow) は Aersham Pharmacia Biotech 社の製品を使用した。プロテアーゼ活性を測定するための基質である消光性蛍光ペプチドはペプチド研究所で合成したものを使用

し、他の試薬は(株)ナカライテスクの特級試薬を使用した。

(2) タンパク量の測定

タンパク量は、BSA をスタンダードとした UV 法(280nm)と PIERCE 社の BCA Protein Assay Kit を用いた BCA 法で測定した。吸光度は、分光光度計(日立-4000)とマイクロウェルプレートリーダー MRX (DYNEX 社)で測定した。

(3) プロテアーゼ活性の測定

1) 消光性蛍光ペプチドを用いたプロテアーゼ活性の測定

酵素活性の測定は、溶出画分 50ul に合成基質 (Nma-Ser-Pro-Met-Leu (Dnp) -NH₂) 20uM を含む 0.1M, pH=8.5 Tris HCl buffer 850ul を加え、蛍光光度計をタイムスキャンモードにし、励起波長 340nm、測定波長 440nm で単位時間あたりの増加量を測定した。反応には蛍光光度計用のセルを使用し室温で行った。1 unit は 1 分間に 1uM の基質を分解する酵素量とした。1unit=(20nm × dF% × 0.9)/1ml × 100% × 1min/ml

2) アゾカゼインを用いたプロテアーゼ活性の測定

1.5ml マイクロチューブに溶出画分 50ul と 1.5%Azocasein (0.2M, Tris-HCl buffer

pH=8.5) 300ul を加え、37 °C 30min. incubate した後 10% TCA (トリクロル酢酸) 300ul 加えて反応を停止させ、12,000rpm. 5min.遠心して上清 200ul を 96well プレートに移し 405nm で吸光度を測定した。

2. 抗体ライブラリーの作製

ハブ咬症歴があり 2 種類 (HR1, HR2) の抗原に対し十分な抗体価を有している献血ボランティア (表 1) から成分採血により 3L の血液に相当する単核球画分を採取した。次に Ficoll を用いた遠心分離により赤血球を除去し 4×10^9 cells の単核球から得た cDNA から light chain 全長を、kappa 鎖、lambda 鎖それぞれ増幅し、ファージ抗体用のベクターに組込んで、light chain ライブラリーを作製した。作製したライブラリーのサイズは、 κ ライブラリーが 2.7×10^8 、 λ ライブラリーが 8.8×10^7 であった。

VH も同様に増幅を行い、一旦別のベクターに入れてから VH ライブラリーを作製した。得られた VH ライブラリーのサイズは 1.5×10^9 であった。そこから VH を切り出し、 κ 、 λ ライブラリーを等量混ぜたライブラリーに組み込んで 1.3×10^{10} の抗ハブ毒抗体ライブラリーを作製した。

表 1. 献血ボランティアの咬症歴

No.	氏名	抗体の有無		備 考
		ELISA	ウサギ皮内法	
1	T.K	有	有	1970 年ハブに右手第 2 指咬まれる。抗毒素使用 1973 年ハブに左手第 1 指咬まれる。抗毒素使用せず 1974 年ハブに左手第 1 指咬まれる。抗毒素使用せず 1981 年ハブに左手第 2 指咬まれる。抗毒素使用 1984 年ハブに左手第 3,4,5 指咬まれる。抗毒素使用 1964 年以降、乾燥毒の取扱中にハブ毒の微粉末を鼻から吸入。粘膜からの刺激が追加免疫になっている模様

3. 抗体のスクリーニング

抗原を固相化したマイクロカップと抗体ライブラリーを反応させ、非結合ファージを洗浄除去した後カップから特異的ファージを溶出して大腸菌に感染させファージを増殖させた。

4. ELISA による抗 HR1, 抗 HR2 の測定

精製 HR1, HR2 でコーティングされた EIA/RIA Stripwell Plate (Corning: Cat. No. 2593) の各ウェルに培養上清 100ul を加えて反応させた後、1st AB: α -cp3 PoAb (rabbit IgG, 2.5 μ g/ml, PBS, MBL)、2nd AB: α -rabbit IgG-HRP (\times 5,000, PBS, MBL Code:458, Lot:342) を用いて抗原抗体反応を行った。基質に OPD を用いて 5min. 発色させた後、2N H₂SO₄ で反応を停止させて ABS₄₉₂ を測定した。

5. 抗毒素の中和実験

(1) 出血作用の測定 (写真3)

M/60, pH=7.0 PBS (0.15 NaCl) で 3 倍間隔に希釈した毒素液 0.2 ml を脱毛した白色ウサギ (体重約 3Kg) の背皮皮内に接種、24 時間後に麻酔死させて皮膚を剥離し、皮膚の裏側から出血斑の大きさ (直径) を計測した。

出血活性の強さは最小出血量 (MHD: Minimum Hemorrhagic Dose) で現し、ウサギの皮内に直径 10mm の出血斑を作る毒量を 1 MHD とする。

(2) 抗出血作用の測定

試験毒素と抗毒素 (標準抗毒素・被検抗毒素) を等量ずつ混合、室温で 1 時間以上反応させた後、同混合液 0.2ml を出血活性の測定の時と同様にウサギの皮内に接種して 24 時間後の出血斑の大きさを計測した。力価は標準抗毒素に対する相対力価を算出した。

(3) 致死活性の測定

M/60, pH=7.0 PBS で 1.5 倍間隔に希釈した毒素液 0.1 ml をマウス (4~5 週令) の尾静脈に接種し、24 時間後の生死を観察した。LD₅₀ は Reed & Muench 法または Probit 法で計算した。マウスの接種匹数は、Leed & Muench 法で 1 群 4~5 匹、Probit 法で 1 群 8~10 匹を目安とする。

(4) 抗致死価の測定

試験毒素と抗毒素 (標準抗毒素・被検抗毒素) を等量ずつ混合、室温で 1 時間以上反応させた後、同混合液 0.2ml を致死活性の測定の時と同様にマウスの尾静脈に接種して 24 時間後の生死を観察した。なお、マウスの接種匹数と ED₅₀ の算出は致死活性の測定に準ずる。

C. 実験結果

1. 試験毒素の精製

(1) Sephacryl S-200HR によるハブ粗毒のゲル濾過

乾燥ハブ毒 (平成 10 年採毒) 1g を 10mM, pH=6.8 phosphate buffer 13.5ml に溶解し、不溶物を 8,000rpm, 10min. 遠心除去した後同 buffer で平衡化した Sephacryl S-200HR カラム (2.6 \times 90cm) でゲル濾過を行った。結果を Fig1 に示す。

溶出する順に fra-1~3 とすると、先に溶出する高分子の fra1 (tube No. 24~30) が HR1、fra-2 (tube No. 31~40) が HR-2 に相当する画分である。各画分のプロテアーゼ活性 (アゾカゼイン基質) を測定した結果、fra-1 と fra-2 に強いプロテアーゼ活性を認めた。

fra-1 (HR1) はプールして金属キレートアフィニティクロマトグラフィー、fra2 (HR2) はイオン交換クロマトグラフィーで更に精製を行った。

(2) Chelating Sepharose FF による HR1 のアフィニティクロマトグラフィー

Sephacryl S-200HR によるゲル濾過で得られた fra-1 を 10mM, pH=6.8 phosphate buffer (1mM Imidazol + 0.5M NaCl) で平衡化した Chelating Sepharose Fast Flow (1.5 × 5cm) に加え非吸着画分を十分に溶出させた後、0 → 30mM Imidazol まで linear gradient を行った。結果を fig2 に示す。

アゾカゼインを基質としたプロテアーゼ活性は吸着、非吸着のいずれの画分にも認められたが、消光性蛍光ペプチドを基質としたプロテアーゼ活性を示すのは吸着画分だけだった。吸着画分は HR1 に相当するもので、消光性蛍光ペプチドを基質としたプロテアーゼ活性も同時に有するので、今回の精製実験では消光性蛍光ペプチドを基質としたプロテアーゼ活性を指標とし、出血活性の測定は最終評品についてのみ行った。吸着画分は pool して HR1 抗体のスクリーニングや中和実験の試験毒素とした。

(3) SP Sepharose FF による HR2 のイオン交換クロマトグラフィー

Sephacryl S-200HR によるゲル濾過で得られた fra-2 を 10mM, pH=6.8 Phosphate buffer で平衡化した SP Sepharose Fast Flow (4.5 × 27cm) に加え、0 → 0.5M NaCl まで linear gradient を行った。結果を fig3 に示す。

それぞれの fraction をウサギの皮内に接種した結果、tube No. 203~215 に強い出血活性を認めたので、同 fraction を pool して HR2 抗体のスクリーニングや中和実験の試験毒素とした。

2. ELISA による結合活性の調査

抗ハブ毒抗体ライブラリーから作製した抗毒素の結合活性の有無を ELISA で調べた結果、HR1 と反応するクローンが 9 種類、HR2 と反応するクローンが 50 種類得られた。そのうち HR1 と特に強く反応す

る 5 クローン (HR1-007, HR1-013, HR1-022, HR1-035, HR1-046) と HR2 と強く反応する 3 クローン (HR2-345, HR2-310, HR2-318) についてはウサギ皮内接種法で中和抗体の有無を調べた。

3. ウサギ皮内法による中和活性の測定

(1) 中和実験-1

ELISA で強く反応した HR1 クローン 5 種類と HR2 クローン 1 種類について中和実験を行った。HR2 の残りの 2 クローン (HR2-345, HR2-310) については予備実験で中和作用が認められなかったため、今回の実験では省いた。

1) 中和実験に使用した抗毒素のタンパク濃度は下記のとおりである。

- ① HR1-007 抗毒素 : 10.1mg/ml
- ② HR1-013 抗毒素 : 5.8mg/ml
- ③ HR1-022 抗毒素 : 3.2 "
- ④ HR1-035 抗毒素 : 5.2 "
- ⑤ HR1-046 抗毒素 : 9.0 "
- ⑥ HR2-318 抗毒素 : 400ug/ml

2) 試験毒素は、注射量 0.2ml が直径 13~14mm の出血斑を示すように、HR1 試験毒素 (28mg/m) を 10 倍に、HR2 試験毒素 (0.36mg/ml) を 5 倍に希釈して使用した。

3) 中和反応は抗毒素と試験毒素を下記の割合で混合、室温で 1 時間反応させた後、同混合液 0.2~0.4ml をウサギの背皮皮内に接種した。

- ① 007 抗毒素 (0.2ml) + HR1 (0.1ml) = 0.3ml
- ② 013 抗毒素 (0.3ml) + HR1 (0.1ml) = 0.4ml
- ③ 022 抗毒素 (0.3ml) + HR1 (0.1ml) = 0.4ml
- ④ 035 抗毒素 (0.3ml) + HR1 (0.1ml) = 0.4ml
- ⑤ 046 抗毒素 (0.3ml) + HR1 (0.1ml) = 0.4ml
- ⑥ 318 抗毒素 (0.1ml) + HR2 (0.1ml) = 0.2ml

中和実験の結果を表 2 に示す。

HR1-007, HR1-035, HR1-046 の 3 種の抗毒素は HR1 の出血作用を良好に中和したが、HR1-013 と HR1-022 は HR1 の出血作

用を中和することができなかった。

予備実験では HR1-013 も中和作用を示したが、今回の実験では試験毒素の毒力を高くしたので測定レベルに達しなかった。

(2) 中和実験-2 (写真4)

実験-1 で中和作用を認めた抗毒素検体については、標準抗毒素に対する相対力価の測定を行った。

試験毒素は中和実験-1 と同じものを使用し、標準抗毒素は国立感染症研究所(感染研)から分与されたものを使用した。

1) 中和反応は抗毒素と試験毒素を下記の割合で混合して行った。

- ① 007 (0.02) + 生食 (0.08) + HR1 (0.1) = 0.2
 (0.05) + 生食 (0.05) + HR1 (0.1) = 0.2
 (0.10) + 生食 () + HR1 (0.1) = 0.2
 (0.20) + 生食 () + HR1 (0.1) = 0.2
- ② 013 (0.30) + 生食 () + HR1 (0.1) = 0.4
- ③ 022 (0.30) + 生食 () + HR1 (0.1) = 0.4

④ 035 (0.10) + 生食 () + HR1 (0.1) = 0.2
 (0.20) + 生食 () + HR1 (0.1) = 0.3

⑤ 046 (0.10) + 生食 () + HR1 (0.1) = 0.2
 (0.20) + 生食 () + HR1 (0.1) = 0.3

⑥ 標準抗毒素は、注射量 (0.20ml) 中に、10.0u, 5.0u, 1.0, 0.5u が含まれるように調整した。

結果を表3に示す。

表からも明らかのように、HR1-007 の 0.02ml は標準抗毒素 10u と同程度に HR1 を中和し、ml 当たりの抗体価に換算すると 500u/ml だった。これを治療用抗毒素の力価基準である 330u./40mg/ml に換算すると 2,000u./ml で、HR1-007 は抗 HR1 価に限れば現行抗毒素の 6.1 倍の抗体価を有していた。

HR1-035 の 0.10ml は標準抗毒素 5u と同程度の HR1 を中和し、これを製剤基準の 40mg/ml に換算すると 385u./ml で現行抗毒素の 1.2 倍だった。

表2. 被検抗毒素の中和実験-1

	蛋白量		
	mg	HR-1	HR-2
HR1-007	2.02	—	14.0
HR1-013	1.74	15.0	13.0
HR1-022	0.96	16.0	13.0
HR1-035	1.56	—	13.0
HR1-046	2.70	—	13.0
HR2-318	0.04		13.0 11.0

表3. 被検抗毒素の中和実験-2

u./ml	10	5	1.0	0.5	
標準抗毒素	11.0	13.0	15.0	15.0	
被検抗毒素 (ml)	0.02	0.05	0.10	0.20	0.30
HR1-007	11.0	±	—	—	
HR1-013					15.0
HR1-022					17.0
HR1-035			13.0	11.0	
HR1-046			12.0	±	

HR1-046 の 0.10ml は標準抗毒素の 7.5u と同程度の HR1 を中和し、これを製剤基準の 40mg/ml に換算すると 333u./ml で現行抗毒素とほぼ同じだった。

HR1-013, HR1-022 については実験-1 と同様に中和作用を示さなかった。

D. 考察

世界には約 2,900 種のヘビが生息しうちの約 500 種が毒蛇で、これらによる咬症事故が年間 50 万件以上発生、約 4 万人が死亡すると云われている。我が国に分布する毒蛇はそのうちの 3 種、ハブ(サキシマハブ、ヒメハブを含む)、マムシ、ヤマカガシで、年間の咬症者数はハブが約 170 人(沖縄県と鹿児島県の奄美地方)、マムシが約 500 人で、ヤマカガシによる有毒咬症は数年に 1 人と非常に少ない。

我が国ではいずれの毒蛇に対しても専用の抗毒素が準備されているが、免疫されたウマから造られたウマ血清由来の抗毒素なので、異種タンパクの接種による副作用を懸念して、抗毒素は使用せず対症療法で治療する場合も少なくないようである。沖縄県と鹿児島県の奄美地方では、症状が中等度以上の患者に対しては積極的に抗毒素が使用され死亡者は殆ど発生していないが、ハブに比べて臨床症状が軽いマムシでは毎年 5~10 人の死亡者が発生している。マムシ咬症患者の治療についてはハブ咬症のように詳しい調査資料がないので推測の域を出ないが、副作用への懸念から抗毒素が有効に活用されていないように思われる。

従って本プロジェクトでは、副作用の危険が少ない「抗ハブ毒ヒト抗毒素」の作製を目的に、ハブに 5 度咬まれた経験を持つ献血ボランティアから成分献血で単核球画分を回収し、抗体ライブラリーを作製してハブ毒中の主要な毒性因子に対する中和抗体の単離を試みた。

作製された抗体ライブラリーから抗原結合ファージ抗体のスクリーニングを行った結果、抗 HR1 抗体 9 クローンと抗 HR2 抗体 50 クローンを得た。抗 HR1 抗体については 3 種類が HR1 の出血作用を良好に中和し、特に HR1-007 についてはタンパク濃度当りの抗 HR1 価が現行抗毒素の約 6 倍もあった。しかし HR2 に対しては中和活性を有する抗体クローンは単離されなかった。

今回クローン回収に使用した HR1, HR2 はハブ毒中の主要な毒性因子で、治療用抗毒素も HR1 と HR2 に対する中和作用を確認することになっている。特に HR1 は抗出血・抗致死の両方価を測定する時の基準毒に使用されるハブ毒中の最も重要な毒性因子で、マウス、ウサギのいずれに対しても強い出血作用を示す。しかし HR2 の出血活性は動物種で大きく異なり、ウサギでは出血を起こすが、マウスでは出血は殆ど起こさない。正常ヒト血清中にも僅かではあるが HR2 の出血活性を抑える作用があるので、HR2 はマウスと同様にヒトに対しても強い毒作用は示さないのかも知れない。

今回の中和実験では、抗 HR1 価が最も高い HR1-007 がハブ粗毒の出血活性を中和できるかどうかについても調べたが、ウサギの皮内では HR1 と HR2 の両毒素によって出血作用が起こるので、HR1 に対する抗体だけで粗毒の出血作用を抑えることはできなかった。過去に HR1 と HR2 の抗体を別々に作製して中和実験を行ったことがあるが、その時も HR1 または HR2 単独では粗毒の出血作用を中和することはできず、粗毒の出血作用を中和するには HR1 と HR2 に対する抗体を適量ずつ混ぜ合わせる必要があった。

作製された抗体ライブラリーから HR2 に対して中和活性を有する抗体クローンを

単離する作業を更に続けて行くが、正常ヒト血清にはウサギ皮内で HR2 の出血作用を僅かではあるが抑える作用があるので、これを抗 HR1 活性が非常に強い HR1-007 と組合わせて粗毒に対する中和作用を調べるなど、治療を目的とする抗毒素に HR2 抗体が必要か否かについても検討を試みたい。

また、ハブ毒はいろいろなタンパク質や酵素の混合物で、HR1, HR2 以外にもプロテアーゼ、ホスホリパーゼ、L-アミノオキシダーゼなど炎症反応に関連する酵素が数種含まれているので、今後はこれら HR1, HR2 以外の酵素に対する抗体が必要か否かについても検討する必要がある。

E. まとめ

副作用の危険が少ない「抗ハブ毒ヒト抗毒素」の作製を目的に、ハブに5度咬まれ

た経験を持つ献血ボランティアから成分献血で単核球画分を回収し、抗体ライブラリーを作製してハブ毒中の主要な毒性因子に対する中和抗体の単離を試みた。

(1) 成分血 (2×10^9 cells) から作製したライブラリーのサイズは $VH : 1.5 \times 10^9$ 、 $\kappa : 2.7 \times 10^8$ 、 $\lambda : 8.8 \times 10^7$ であり、これらを組合わせて作製した抗体ライブラリーのサイズは 1.3×10^{10} だった。

(2) HR1, HR2 を抗原としてスクリーニングを行った結果、抗 HR1 抗体 9 クローンと抗 HR2 抗体 50 クローンを得た。抗 HR1 抗体については3種類が HR1 の出血作用を良好に中和し、特に HR1-007 についてはタンパク濃度当りの抗 HR1 価が現行抗毒素の6倍もあった。しかし HR2 に対しては中和活性を有する抗体クローンは単離されなかった。

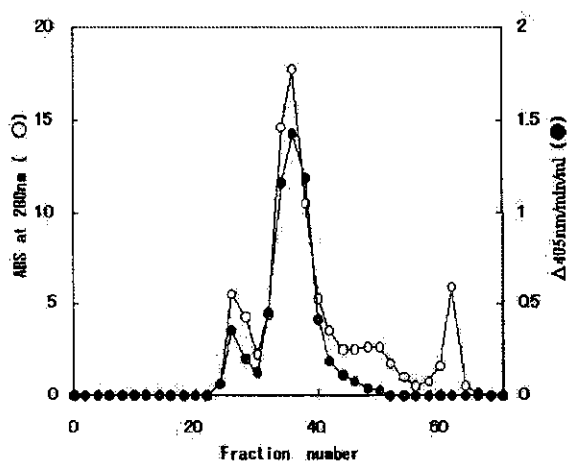


Fig 3. SP Sepharose FF Chromatography of HR2 from gel filtration on Sephacryl S-200 HR of the venom of the *T. flavoviridis*

Column : SP Sepharose FF (4.5x27cm)

BufferA: 10mM Phosphate buffer pH6.8,

BufferB: BufferA + 0.5M NaCl linear gradient total 2,000ml

Flow :60ml/hour 5ml/tube

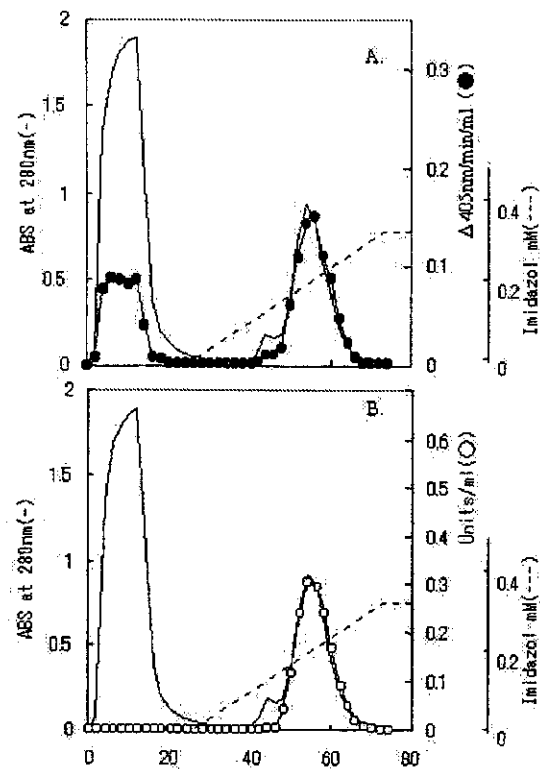


Fig 2. Metal Chelate affinity Chromatography of a high molecule weight fraction with protease activity from gel filtration on Sephacryl S-200 HR of the venom of the *T. flavovilidis*

Column : Chelating Sepharose FF (4.5x15cm)

Buffer : 10mM Phosphate buffer pH6.8,

(1mM Imidazol, 0.5M NaCl)

10mM Phosphate buffer pH6.8,

(30mM Imidazol, 0.5M NaCl linear gradient)

total 200ml

Flow :60ml/hour 5ml/tube

Substrate: A. Azo casein

B. Fluorescence-Quenching peptide

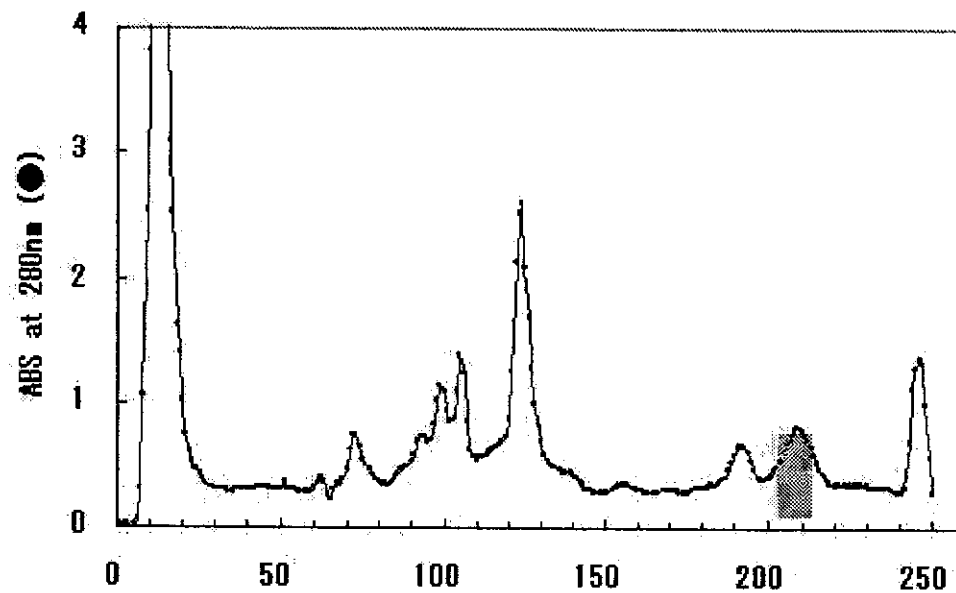


Fig 3. SP Sepharose FF Chromatography of HR2 from gel filtration on Sephacryl S-200 HR of the venom of the *T. flavovilidis*

Column : SP Sepharose FF (4.5x27cm)

BufferA: 10mM Phosphate buffer pH6.8,

BufferB: BufferA + 0.5M NaCl linear gradient

total 2,000ml

Flow :60ml/hour 5ml/tube

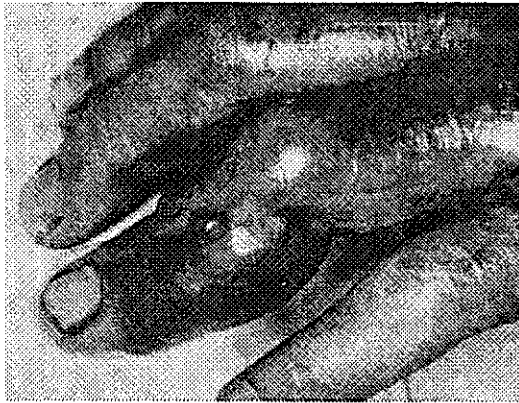


写真1. ハブ咬症患者

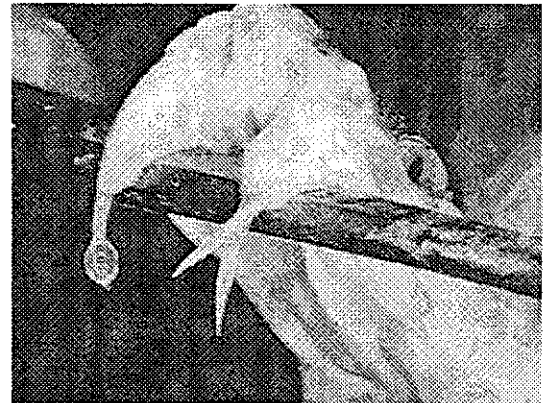
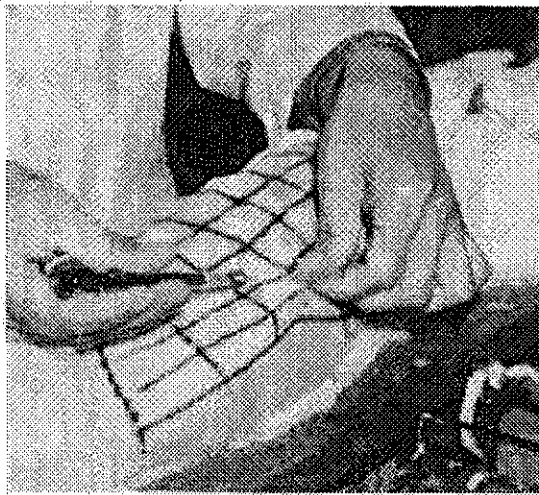
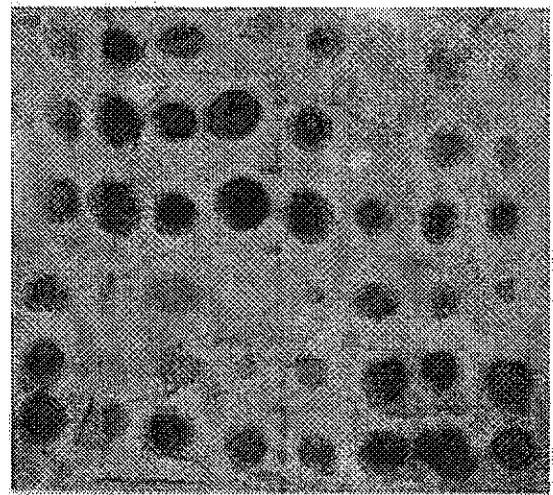


写真2. ハブの牙



ウサギ皮内に注射

写真3. ウサギ皮内法による抗出血価の測定



皮膚の裏側から出血斑を観察

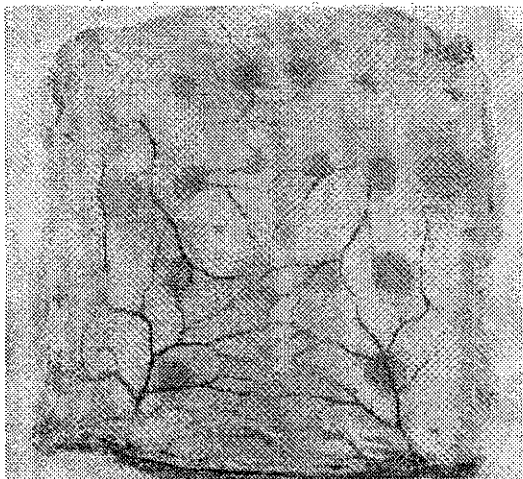


写真4. ファージライブラリーから単離された抗体の中和実験

(標準) (007) (035) (標準)

	10u.	0.02ml	0.10ml	10u.	
	11×11	11×11	13×13	11×11	
(013)	5u.	0.05ml	0.20ml	5u.	(022)
0.3ml					0.3ml
15×15	13×13	±	11×11	13×13	17×17
	1.0u.	0.10ml	(048)	1.0u.	
	15×15	—	0.1ml	15×15	
			12×12		
	0.5u.	0.20	(046)	0.5u.	
	15×15	—	0.20ml	15×15	
			±		

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
A. Ideno, M. Furutani, Y. Iba, Y. Kurosawa & T. Maruyama	FK506 binding protein from the hyperthermophilic archaeon <i>Pyrococcus horikoshi</i> suppresses the aggregation of proteins in <i>Escherichia coli</i> .	Appl. Environ. Microbiol.	68	464-469	2002
伊庭善孝	抗体作製の新技术	癌の臨床	48(2)	55-66	2002
森野和彦	抗体作製の新技术	Hematology Frontier	12(7)	65-71	2002
Morishima, T., et al.	Encephalitis and encephalopathy associated with an influenza epidemic in Japan.	Clin. Infect. Dis.	35	512-517	2002
Okamoto, S., et al.	Influenza A virus-infected hosts boost an invasive type of <i>Streptococcus pyogenes</i> infection in mice.	J. Virol	77	in press	2002
Nakagawa, N., et al.	Neutralizing epitopes specific for influenza B virus Yamagata group strains are in the "Loop".	J. Gen. Virol.	84	709-713	2002
奥野良信	インフルエンザウイルスの分離・同定	インフルエンザ	3(4)	49 - 53	2002
奥野良信、馬場宏 —	小児のインフルエンザに対する医師と保護者の意識調査	日本医事新報	4095	27-32	2002
奥野良信、他	A型、B型の鑑別が可能なインフルエンザ迅速診断キット「ポクテム インフルエンザ A/B」の評価	医学と薬学	48	895-904	2002