

は構造上、頭部と幹部に分かれ、頭部の先端にはポケット状になったレセプター結合部位が存在する。インフルエンザウイルスが細胞に感染する最初のステップは、細胞側のレセプターとウイルス側のレセプター結合部位との結合で、中和抗体の大部分は頭部を認識してこの反応を阻害する。

中和エピトープの大部分はHAの頭部の5ヶ所に集中している。NC1はレセプター結合部位の近傍を認識し、YA14はHA側面のループ部分を認識した。これらの部位は強い抗原性を示す所で、抗原変異も起こりやすい。ところが、NC1はA/New Caledonia/20/99だけを中和する非常に特異性の高い抗体であるが、YA14は大部分のウイルスを中和する広域反応性の抗体であった。B型のループ部分に保存性の高いエピトープの存在することが証明された。

YA14は、ワクチン株のB/Gifu/21/73と流行株のTT105を中和しなかった。これらの株と中和される株のアミノ酸を比較すると、141番目にアミノ酸置換が起こっていた。すなわち、B型の141番目はYA14の認識にとって重要な役割を担っていることが明らかにされた。

インフルエンザは世界的大流行を起こす唯一の感染症で、最近では鳥インフルエンザなどが問題となっている。ワクチンの有効性は限界があり、また抗インフルエンザ薬も供給が追いつかない可能性が高い。ヒト中和モノクローン抗体は重症化を防ぐのに極めて有効で、ワクチンや抗インフルエンザ薬を相補できるものと考えられる。ファージディスプレイ法によってバラエティーのある中和モノクローン抗体が得られたので、さらに多くの抗体をクローニングすれば、新しい流行型に対応した抗体が準備できるものと期待される。また、それら抗体に対するエスケープミュータントは、将来の流行株を反映したものと考えられ、次世代ワクチンの開発

にも役立つと思われる。

E. 結論

H1N1に対するヒト型抗体、NC1は株特異的な中和活性を示し、HAのレセプター結合部位の近傍のエピトープを認識した。B型に対する抗体、YA14はほとんどのB型ウイルスを中和し、HAのループにある高度に保存されたエピトープを認識した。

F. 研究発表

1. 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.* 77:4104-4112. 2003.
2. 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.* 84:769-773. 2003.
3. 奥野良信：インフルエンザの検査とワクチン. *臨床病理*, 51(3)：268-273, 2003
4. 奥野良信：インフルエンザの治療：アマンタジン. *総合臨床*, 52(10)：2797-2801, 2003
5. 奥野良信：次のパンデミックの予測とその対策. *大阪保険医雑誌*, 442：9-13, 2003
6. 奥野良信：インフルエンザの歴史と展望. *治療*, 85：3139-3144, 2003
7. 奥野良信：インフルエンザ (分担執筆). *感染症診療・投薬ガイド*, p. 160-166, 総合臨床. 2003
8. 奥野良信：インフルエンザの疫学、サーベイランス (国内). *最新医学*, 59：42-47, 2004

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

ハブ毒に対するヒト中和モノクローン抗体の作製

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

盛根信也 沖縄県衛生環境研究所

松田聖子 沖縄県衛生環境研究所

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 鎖各等量ずつ混ぜた 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得られた抗 HR1Fab 抗体のうち明らかに HR1 を中和する 3 種類については IgG 型に変換したが、IgG 型にしても Fab 型と同程度の中和活性を示し IgG への変換による抗体への影響はなかった。しかしライブラリーから沖縄ハブ HR1 で分離した抗体は、Fab 型、IgG 型のいずれも分類上同一種の奄美ハブ HR1 の出血作用は全く中和できなかった。抗 HR2 抗体については ELISA で強く反応する 4 クローンについて中和試験を行ったがいずれも中和作用を示さず、抗 HR2 については今年度も中和活性を有する抗体は単離することができなかったが、ヒト正常血清には HR2 の出血活性を抑制する作用が 10~20u./ml 相当含まれているので、治療を目的としたヒト抗毒素に HR2 に対する抗体が必要かどうかについて確かめる方法を検討する必要がある。

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、掻痒感など軽重すべての副作用を加えると全使用者の 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

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 回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ている。

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・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。 $1\text{unit}=(20\text{nm} \times \text{dF}\% \times 0.9)/1\text{ml} \times 100\% \times 1\text{min}/\text{ml}$

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 bufer 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、12,000ipm. 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HVライブラリーを作製した。得られたHV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、 1.3×10^{10} の抗ハブ毒抗体ライブラリーを作製した。

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. ファージ抗体から完全型 IgG への変換

VH-CL 遺伝子のそれぞれ両側に制限酵素サイトを付加し、PCR で増幅した(第1段階)。次いで、その産物を完全な H 鎖と L 鎖をコードできる遺伝子型に変換した中間ベクターに挿入した(第2段階)。それから Sal I-Not I 切断し、蛋白発現ベクター(pCMV)に挿入した(第3段階)。このベクターを哺乳動物細胞にトランスフェクトし、完全型 IgG を発現させた。大量の IgG を得るためには、ベクターに pNOW-GKT を用いた。

5. 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 -mouse Fab (rabbit IgG, $\times 2,000$, PBS)、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 H_2SO_4 で反応を停止させて ABS₄₉₂ を測定した。

6. 中和試験

(1) 試験毒素

ア. 沖縄ハブ HR1 試験毒素

乾燥沖縄ハブ毒を 10mM, pH=6.8 phosphate buffer に溶解して不溶物を 8,000rpm, 10min. で遠心除去した後、同 buffer で平衡化された Sephacryl S-200HR カラム (2.6 \times 90cm) でゲル濾過を行い、最初に溶出する画分を限外濾過濃縮した後 10mM, pH=6.8 phosphate buffer (1.0mM, Imidazol+0.5M NaCl) で平衡化された Chelating Sepharose Fast Flow (1.5 \times 5cm) に加え金属アフィニティークロマトを行った。starting buffer である 10mM,

pH=6.8 phosphate buffer で非吸着画分を十分に溶出させた後、Imidasol を 0 \rightarrow 30mM まで直線的に上昇させ、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吸着画分を沖縄ハブ毒 HR1 試験毒素とした。ハブ毒には HR1a と HR1b があるが、本試験毒素は HR1a だけと思われる。

イ. 奄美ハブ HR1 試験毒素

乾燥奄美ハブ毒を Sephacryl S-200HR カラム (2.6 \times 90cm) でゲル濾過を行い、最初に溶出する分子量が大きい画分を限外濾過濃縮して奄美ハブ毒 HR1 試験毒素とした。今回中和試験に使用した奄美ハブ毒 HR1 はゲル濾過による精製だけで、金属アフィニティークロマトによる再精製は行っていない。本試験毒素には HR1a, HR1b の両方が含まれている。

ウ. 沖縄ハブ・奄美ハブ HR2 試験毒素

Sephacryl S-200HR カラムによるゲル濾過で 2 番目に溶出する画分を 10mM, pH=6.8 phosphate buffer で平衡化した SP Sepharose Fast Flow (4.5 \times 27cm) に加え、NaCl を 0 \rightarrow 0.5M まで直線的に上昇させてウサギの皮内接種で強い出血活性を示す画分を HR2 試験毒素とした。両試験毒素には HR2a と HR2b が含まれている。

(2) 標準抗毒素

力価を測定する際の基準となる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。同抗毒素は奄美ハブ粗毒で免疫されたウマの血清をペプシンで F(ab)² にした抗体グロブリンを硫酸塩析法で精製したものである。

7. 抗毒素の中和試験

(1) 出血作用の測定

M/60, pH=7.0 PBS (0.15 NaCl) で3倍間隔に希釈した毒素液 0.2ml 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 10 mm 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。

C. 実験結果

1. 被検抗毒素(Fab 型)の HR1 に対する中和試験(表 1)

ELISA で HR1 に強く反応しウサギ皮内法による予備試験で中和作用を示した抗毒素 5 検体については、標準抗毒素に対する相対力価を測定した。

(1) 被検抗毒素のタンパク濃度は

下記のとおり。

- 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 "

(2) 標準抗毒素は感染研から分与されたものを使用し、接種量(0.2~0.3ml)中に抗体が 10.0u., 5.0u., 1.0u., 0.5u. 含まれるように調整した。

(3) 試験毒素は抗体の分離に使用した沖繩ハブ HR1(0.28mg/ml)を、接種量中に直径 13~14mm の出血斑を示す毒量が含まれるように、生食で 10 倍に希釈して使用した。

(4) 中和試験では抗毒素と試験毒素を下記の割合に混合した。

生食 HR1

- ① 007(0.02ml)+(0.08ml)+(0.1ml)=0.2ml
(0.05ml)+(0.05ml)+(0.1ml)=0.2ml
(0.10ml)+(0.00ml)+(0.1ml)=0.2ml
(0.20ml)+(")+(0.1ml)=0.3ml
- ② 013(0.30ml)+(")+(0.1ml)=0.4ml
- ③ 022(0.30ml)+(")+(0.1ml)=0.4ml
- ④ 035(0.10ml)+(")+(0.1ml)=0.2ml
(0.20ml)+(")+(0.1ml)=0.3ml
- ⑤ 046(0.10ml)+(")+(0.1ml)=0.2ml
(0.20ml)+(")+(0.1ml)=0.3ml
- ⑥ 標準抗毒素では、10.0u., 5.0u., 1.0u., 0.5u. と HR1(0.1ml)を混合した。

結果を表 1 に示す。

HR1-007 の 0.02ml は標準抗毒素 10u と同程度に HR1 を中和した。これは ml 当たり 500u になり、治療用抗毒素の力価基準(330u./40mg/ml)に換算すると 2,000u./ml で 007 の HR1 に対する抗体価は現行抗毒素の 6.1 倍であった。

HR1-035 の 0.10ml は標準抗毒素 5u と同程度の HR1 を中和した。これは 50u./ml に相当し製剤基準の 40mg/ml に換算すると 385u./ml で現行抗毒素の 1.2 倍だった。

HR1-046 の 0.10ml は標準抗毒素の 7.5u と同程度の HR1 を中和した。これは 75u./ml に相当し、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 については中和作用を示さなかった。

2. 被検抗毒素(IgG 型)の HR1 に対する中和試験(表 2)

Fab 型で強い中和活性を示した抗毒素については IgG 型に変換して、変換による中和活性への影響を調べた。

(1) 被検抗毒素のタンパク濃度は下記の

とおり。

① HR1-007(IgG)抗毒素：5.00mg/ml

② HR1-035(IgG)抗毒素：0.75mg/ml

③ HR1-046(IgG)抗毒素：0.75mg/ml

(2) 標準抗毒素は感染研から分与されたものを使用し、接種量中に抗体価が 10.0u., 5.0u., 1.0u., 0.5u.含まれるように調整した。

(3) 試験毒素は抗体の分離に使用した沖縄ハブ HR1(0.28mg/ml)と奄美 HR1(25TD/ml)を使用して両毒素に対する中和作用を比較した。中和試験では両毒素の出血活性が同程度になるように、沖縄ハブ HR1 は生食で 20 倍に、奄美ハブ HR1 は 10 倍に希釈して使用した。

(4) 中和試験では毒素と抗毒素を下記の割合に混合した。

生食 HR1

① 007(0.01ml)+(0.20ml)+沖(0.1ml)=0.31ml
(0.02ml)+(0.20ml)+沖(0.1ml)=0.32ml
(0.05ml)+(0.15ml)+沖(0.1ml)=0.30ml
(0.10ml)+(0.10ml)+奄(0.1ml)=0.30ml

② 035(0.10ml)+(0.10ml)+沖(0.1ml)=0.30ml

③ 046(0.10ml)+(0.10ml)+沖(0.1ml)=0.30ml

④標準抗毒素では、10.0u., 5.0u., 1.0u., 0.5u.と HR1(0.1ml)を混合した。

結果を表 2 に示す。

HR1-007(IgG)の 0.01~0.02ml は標準抗毒素 10u.と同程度に沖縄ハブ HR1 の出血活性を中和した。これは ml 当り 500u.に相当し、治療用抗毒素の力価基準に換算すると 4,000u./ml で、HR1-007(IgG)は現行抗毒素の 12.2 倍の抗 HR1 価を有していた。しかし、分類上同一種と云われている奄美ハブの HR1 の出血活性は全く中和しなかった。

HR1-035(IgG)と HR1-046(IgG)も沖縄ハブ HR1 の出血活性を良好に中和したが、奄美ハブ HR1 の出血作用は中和しなかった。HR1-035 と HR1-046 のについては、材料が少なく抗毒素 0.10ml の one point で中

和試験を行ったので、今回の結果からは力価を算出することができなかった。

3. 被検抗毒素(Fab 型)の HR2 に対する中和試験(表 3)

ELISA で HR2 に強く反応した抗毒素 4 検体については、ウサギ皮内法で中和試験を行った。

(1) 被検抗毒素のタンパク濃度は下記のとおり。

① HR2-097(Fab)抗毒素：0.25mg/ml

② HR2-099(Fab)抗毒素：0.10mg/ml

③ HR2-124(Fab)抗毒素：0.10mg/ml

④ HR2-135(Fab)抗毒素：2.00mg/ml

(2) 標準抗毒素は感染研から分与されたものを使用し、接種量(0.2~0.3ml)中に抗 HR2 価が 10.0u., 5.0u., 1.0u., 0.5u.含まれるように調整した。

(3) 試験毒素には抗体の分離に使用した沖縄 HR2 を使用すべきであるが、在庫がなかったので今回の中和試験では奄美 HR2(25TD/ml)を生食で 10 倍に希釈して使用した。

(4) 中和試験では抗毒素と毒素を下記の割合に混合した。

被検抗毒素 奄 HR2

① HR2-097(Fab)(0.20ml)+(0.1ml)=0.3ml

② HR2-099(Fab)(0.20ml)+(0.1ml)=0.3ml

③ HR2-124(Fab)(0.20ml)+(0.1ml)=0.3ml

④ HR2-135(Fab)(0.20ml)+(0.1ml)=0.3ml

(5) 標準抗毒素は、10.0u., 5.0u., 1.0u., 0.5u.と HR2(0.1ml)を混合した。

結果を表 3 に示すが、表からも明らかのように出血斑の大きさは毒素だけのコントロールと同じで、HR2-097, -099, -124, -135 のいずれの抗毒素も奄美ハブ毒 HR2 の出血活性を全く中和できなかった。沖縄ハブ HR1 を良好に中和する HR1 抗体でも奄美ハブ HR1 は全く中和できなかったため、HR2 についても沖縄ハブ毒由来の HR2 を

準備し改めて中和試験を行いたい。

4. 正常ヒト血清の HR2 に対する 中和試験 (表 4)

正常ヒト血清には HR2 の出血活性を抑える作用のあることがすでに明らかにされているが、今回はハブとの接触期間が異なる当研究所スタッフから血清の提供を受け、それぞれの血清の HR2 に対する抑制作用について確認試験を行った。

結果を表 4 に示す。

今回リンパ球の提供を受けた献血ボランティアは勿論、35 年ハブやハブ毒と接触したスタッフやハブとの接触期間が 2 ヶ月未満のスタッフの血清も HR2 の出血作用を完全に抑えた。今回は標準抗毒素を同時に接種しなかったので抗体価を算出ことはできないが、過去に行った実験では正常ヒト血清は 10~20u./ml 相当分の抗 HR2 作用を有していた。

5. HR2 毒の動物種による

感受性の違い (表 5)

HR1 と HR2 (奄美ハブ毒から分離されたものを使用) の動物種による感受性の違いを調べるために、ウサギの皮内とマウスの大腿筋に HR1 と HR2 を接種し、翌日麻酔死させて接種部位の病変を比較した。

結果を表 5 に示す。

ウサギに対しては HR1, HR2 のいずれも同程度の出血活性を示したが、マウスに対する出血作用は両毒素間で大きく異なり、HR1 は強い出血作用を示したが HR2 は殆ど出血を示さず、HR2 の出血活性は動物種によって大きく異なっていた。また両者に対して出血作用を示す HR1 では、ウサギ皮内注の方がマウス筋注より 10 倍程感度が高かった。

D. 考察

世界には約 2,900 種のへびが生息しそのうちの約 500 種が毒蛇で、これらの毒蛇による咬症者が年間 50 万人以上発生、約 4 万人が死亡していると云われている。

我が国には人畜に被害を起こす毒蛇がハブ(サキシマハブ、ヒメハブを含む)、マムシ、ヤマカガシの 3 種分布し、年間の咬症者数はハブが約 160 人(沖縄県と鹿児島県の奄美地方)、マムシが約 1,000 人で、ヤマカガシは数年に 1 人程度である。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、これらの抗毒素は免疫されたウマの血清から造られたウマ型抗毒素なので、異種タンパクによる副作用の発生を懸念し投与のタイミングを逸することも少なくない。幸い沖縄と鹿児島県の奄美地方では、中等度以上の患者に対しては積極的にハブ抗毒素の静注が行われ最近では死亡する事例は殆んど発生しないが、マムシ咬症ではハブより臨床症状が軽いにも係わらず毎年 10 人以上の死亡者が発生している(表 6, 7)。マムシ咬症については詳しい疫学資料がないので推測の域を出ないが、副作用の発生を懸念して抗毒素を使用しなかったものと思われる。

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」の開発を目的に、ハブに 5 回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ている。

今年度は昨年 Fab 型で中和作用を示すことが確認された抗体を IgG 型に変換し、IgG 型への変換による中和活性への影響について調べた。IgG 型に変換しても中和活性への影響は全くなく Fab 型の時と同程度に沖縄ハブ毒由来の HR1 を中和したが、奄美ハブ毒由来 HR1 の出血活性に対しては中和作用を全く示さなかった。奄美ハブ

HR1 の出血活性に対しては Fab 型でも IgG 型と同様に中和できなかった。奄美ハブ毒には HR1a と HR1b が含まれているが、沖縄ハブ毒は HR1a だけで HR1b は含まれていないと云われている。今回の中和試験に使用した抗体は沖縄ハブ毒から精製した HR1(奄美ハブの HR1a に相当か)でライブラリーから分離したものであるが、中和試験に使用した奄美 HR1 試験毒素は HR1a と HR1b が混合したものなので、中和できないのは、奄美ハブ毒の HR1b が原因と思われる。しかし、最近行った精製実験でライブラリーから抗体を単離する時に使用している沖縄ハブ HR1 からイオン交換 FPLC で HR1b らしきものが分離されたので、沖縄ハブ毒にも奄美ハブ毒と同様に HR1a,b が存在するのかもしれない。次年度はそれぞれの抗原を単離しライブラリーから対応する中和抗体を分離して、交叉中和試験を行う予定である。

HR2 に対する抗体については今年度も 4 種を単離して中和活性を調べたが、今回も中和作用を示すものは見つからなかった。今回の中和試験では沖縄ハブ毒由来の HR2 試験毒素の在庫がなく、止むを得ず奄美ハブ毒由来の HR2 試験毒素を使用した。抗体の分離に使用した抗原は奄美ハブ HR2 なので、沖縄ハブ HR2 試験毒素を早急に準備し改めて中和作用を行いたい。また HR1 と同じように奄美、沖縄のいずれのハブ毒にも HR2a,b があるので、それぞれの毒素を単離し対応する抗体をライブラリーから分離して、交叉中和試験を行いたい。

今回クローン回収に使用した HR1(出血因子 1)と HR2(出血因子 2)はハブ毒中の主要な毒性因子で、治療用抗毒素の力価を測定する時も HR1 と HR2 に対する中和作用を測定している。特に HR1 は抗出血価と抗致死価の両方の測定に使用されるハブ

毒中の最も重要な毒性因子で、マウス、ラット、ウサギ、モルモットのいずれに対しても強い出血作用を示すが、HR2 の接種で顕著な出血作用を示すのはウサギ、モルモットで、マウス、ラットでは出血作用は殆ど認めず、HR2 の出血作用は動物の種類によって大きく異なる。また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、マウス、ラットと同様に HR2 はヒト対しても強い毒性は示さないのかも知れない。

今回の中和実験では、最も抗 HR1 価が高い HR1-007 がハブ粗毒の出血作用を中和できるかどうかについても調べたが、ハブ粗毒をウサギの皮内に接種した場合出血作用は HR1 と HR2 の両方で起こるので、HR1 に対する抗体だけで粗毒の出血作用を抑えるのは困難だった。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 と HR2 の抗体を適量ずつ混ぜ合わせれば粗毒の出血活性を良好に中和したが、HR1 または HR2 単独では粗毒の出血作用を中和することは出来なかった。

抗 HR1 作用が非常に高い HR1-007 の希釈液に抗 HR2 作用を有する正常ヒト血清を使用して粗毒に対する中和作用を調べるなど、抗ハブ毒ヒト抗体の作製に HR2 を中和するクローンの分離が必要かどうかの検討も必要と思われる。ヒトと同様に HR2 の出血活性に抵抗性を示すマウスやラットを使って治療実験を行うことも検討したい。

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誘発する酵素が多種含まれているので、HR1, HR2 以外の主要な因子に対する中和抗体の分離についても準備を進めている。

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回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: 1.5×10^9 、 κ : 2.7×10^8 、 λ : 8.8×10^7 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、結合活性を有するクローンとして、HR1: 9 クローン、HR2: 69 クローンを得た。強い結合活性を有するクローンは HR1: 5 種類、HR2: 4 種類であった。

(3) Fab 型で強い中和活性を有する3種類の HR1 抗体 (HR1-007, 035, 046) については、IgG 型に変換して中和活性への影響を調べたが、Fab 型の時と同様に沖縄ハブ HR1 の出血作用を良好に中和した。特に HR1-007 (IgG) については現行抗毒素の約 12 倍の抗 HR1 価を有していた。しかし、沖縄ハブ HR1 で分離した3種類の HR1 中和抗体はいずれも奄美ハブ HR1 の出血活性を全く中和せず、両ハブは分類上は同一種であるが毒素の組

成には微妙に異なっているようであった。HR2 については、今年度も中和活性を有する抗体クローンは単離されなかった。

F. 参考文献

(1) Kondo, H., Kondo S., Ikezawa H., Murata R. and Ohsaka A.: Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom.

Japan J. Med. Sci. Biol. 13, 43-51 1960

(2) Omori-Satoh T., Ohsaka A., Kondo S. and Kondo H.: A simple and rapid method for separating two hemorrhagic principles in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*.:

Toxicon, 5, 17

(3) Takahashi T. and Ohsaka A.: Purification and some properties of two hemorrhagic principles (HR2a and HR2b) in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*; complete separation of the principle from proteolytic activity.

Biochem. Biophys. Acta. 207, 65-75, 1970

(4) Omori-Sato, T.: Purification and some properties of hemorrhagic principle 1 in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*.

Biochem. Biophys. Acta. 207, 65, 1970

(5) Kishimoto M. and Takahashi T.: Molecular cloning of HR1a and HR1b, high molecular hemorrhagic factors from *Trimeresurus flavoviridis* venom.

Toxicon, 40(9) 1369-1375, 2002

表 1. 被検抗毒素 (Fab 型) の HR1 に対する中和試験

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	±	

(表中の数字は出血斑の直径：単位 mm)

表 2. 被検抗毒素 (IgG 型) の HR1 に対する中和試験

u./ml	10.0	5.0	1.0	0.5	
標準抗毒素	—	14.0	16.0	16.0	
被検抗毒素 (ml)	0.01	0.02	0.05	0.10	
HR1-007	11.0	11.0	—	—	沖縄 HR1 試験毒素
〃				16.0	奄美 HR1 試験毒素
HR1-035				—	沖縄 HR1 試験毒素
〃				16.0	奄美 HR1 試験毒素
HR1-046				—	沖縄 HR1 試験毒素
〃				16.0	奄美 HR1 試験毒素
試験毒素のみ	沖縄 HR1		奄美 HR1		
	16.0		16.0		

(表中の数字は出血斑の直径：単位 mm)

表 3. 被検抗毒素 (Fab 型) の HR2 に対する中和試験

u./ml	10.0	5.0	1.0	0.5	
標準抗毒素	—	12.0	15.0	15.0	
被検抗毒素 (ml)	0.02	0.05	0.10	0.20	
HR2-097				13.0	奄美 HR2 試験毒素
HR2-099				15.0	奄美 HR2 試験毒素
HR2-124				15.0	奄美 HR2 試験毒素
HR2-135				15.0	奄美 HR2 試験毒素
試験毒素のみ	奄美 HR2				
	15.0				

(表中の数字は出血斑の直径：単位 mm)

表4. 正常ヒト血清のHR2に対する中和試験

被検血清	× 1	× 2	被検血清	× 1	× 2
K.T.(40年)	—	—	S.M.(1月)	—	—
M.N.(35年)	—	—	R.M.(5月)	—	—
N.M.(3年)	—	—	Y.O.(5月)	—	—
K.T.(2年)	—	—	Habu Serum	—	—
試験毒素のみ	× 15	× 50	× 150		
	15.0	11.0	—		

(表中の数字は出血斑の直径：単位 mm)

表5. HR2 毒の動物種による感受性の違い

毒素	動物種	× 1	× 3	× 10	× 30	× 100	× 300	接種量
HR1	ウサギ			16.0	14.0	12.0	10.0	0.2ml/head 皮内注
	マウス	+3	+3	+2	+1	—	—	0.1ml/head 筋肉注
HR2	ウサギ			16.0	14.0	12.0	10.0	0.2ml/head 皮内注
	マウス	+1	—	—	—	—	—	0.1ml/head 筋肉注

(ウサギの列 出血斑の直径：単位 mm)

(マウスの列 +3：大腿部全域が出血、 +2：大腿部 1/2 が出血、
+1：大腿部に僅かの出血、—：出血を認めず)

表6. はぶ抗毒素の使用状況

抗毒素(ml)	0	10	20	30	40	50	60	80	100	120	不明	計	%
ハブ患者	234	5	378	3	91	2	34	7	14	2	10	780	68.7
%	30.0	0.6	48.5	0.4	11.7	0.2	4.4	0.9	1.8	0.2	1.3		
サキシマ患者	234	2	18		4			1			7	266	9.4
%	87.9	0.7	6.7		1.4			0.7			2.6		
ヒメハブ患者	66		46		3		4	1			2	121	44.6
%	53.7		38.0		2.5		3.3	0.8			1.7		

表7. 毒蛇による死亡者数 (日本)

種類	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99
マムシ	22	12	18	13	10	11	17	7	9	11	11	8	13	12	10	10	17
ヤマカガシ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ハブ(沖縄)	0	0	0	0	0	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
ハブ(奄美)	0	0	1	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0

(厚生省人口動態統計より改変)

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
K. Higo-Moriguchi, Y. Akahori, Y. Iba, Y. Kurosawa, & K. Taniguchi.	Isolation of human monoclonal antibodies that neutralize human rotavirus.	J. Virol.	78	3325-3332	2004
黒澤良和	新規抗体療法の開発	血液・免疫・腫瘍	8	231-235	2003
黒澤良和	抗体をツールとした創薬および抗体創薬の戦略	Drug Delivery System	18(6)	528-535	2003
Okamoto, S., Kawabata, S., Nakagawa, I., Okuno, Y., Goto, T., Sano, K.. & Hamada, S.	Influenza A virus-infected hosts boost an invasive type of <i>Streptococcus pyogenes</i> infection in mice.	J. Virol.	77	4104-4112	2003
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	769-773	2003
奥野良信	インフルエンザの検査とワクチン	臨床病理	51	268-273	2003
奥野良信	インフルエンザの治療:アマンタジン	総合臨床	52	2797-2801	2003
奥野良信	次のパンデミックの予測とその対策	大阪保険医雑誌	442	9~13	2003
奥野良信	インフルエンザ:感染症診療・投薬ガイド	総合臨床	増刊号	160-166	2003
奥野良信	インフルエンザの歴史と展望	治療	85	3139-3144	2003
奥野良信	インフルエンザの疫学、サーベイランス (国内)	最新医学	59	42-47	2004