

厚生科学研究 研究費補助金

医薬品等医療技術リスク評価研究事業

抗毒素製剤の効率的製造方法の開発に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高橋元秀

平成16年（2004）3月

厚生科学研究 研究費補助金 医薬安全総合 研究事業

安定供給に向けた国内外の抗毒素製剤の品質管理に関する研究班

平成15年度 研究組織

主任研究者（班長）

高橋 元秀 国立感染症研究所 細菌第二部 第三室長

分担研究者

佐々木 次雄 国立感染症研究所 細菌第二部 第二室長
千葉 丈 東京理科大学 基礎工学部 教授
野崎 周英 (財)化学及血清療法研究所 第一研究部 室長
向本 雅郁 大阪府立大学大学院農学生命科学研究科 助教授

研究協力者

岩城正昭 国立感染症研究所 細菌第二部 第三室
小宮貴子 国立感染症研究所 細菌第二部 第三室
福田 靖 国立感染症研究所 細菌第二部 第三室
小崎俊司 大阪府立大学大学院農学生命科学研究科教授
前田浩明 (財)化学及血清療法研究所 第一研究部
大隈邦夫 (財)化学及血清療法研究所 第一製造部長
原川哲博 (財)化学及血清療法研究所 研究推進室
大場浩美 東京理科大学 基礎工学部助手
相内 章 東京理科大学 基礎工学部大学院博士課程
石田 功 キリン医薬カンパニー

目 次

	頁
I. 総括研究報告書	
抗毒素製剤の効率的製造方法の開発に関する研究	
班長 高橋 元秀	1
II. 分担研究報告書	
1. DNA 免疫法によるトランスクロモマウスを用いたヒト型 ポリクローナル抗体の開発研究	
千葉 丈	7
2. マウス抗毒素モノクローナル抗体のヒト化に関する開発研究	
野崎周英	13
3. 遺伝的特性の高いヒト型モノクローナル抗体作製の開発研究 —抗ボツリヌス神経毒素ヒト型モノクローナル抗体の作製—	
向本雅郁	21
4. 各抗体の品質管理試験としての安全性に関する研究	
佐々木次雄	29
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	37
IV. 資 料	51

厚生労働科学研究 研究費補助金
(医薬品等医療技術リスク評価研究事業)

総括研究報告書

抗毒素製剤の効率的製造方法の開発に関する研究

主任研究者 高橋 元秀 国立感染症研究所

研究要旨

毒素性細菌の感染症に対して毒素を特異的に中和する抗毒素療法がおこなわれている。この製剤はトキシイドや毒素を用いて高度に免疫したウマの免疫グロブリン画分を製剤化したもので、副作用が心配される生物学的製剤であり、患者への投与に際して臨床医は使用の判断が遅れる場合もある。ウマ抗毒素製剤に替わるヒト化（型）抗体の製造開発を目的として、安全性、生産性の問題を解決し、短期間で大量の製剤を安定して供給するために、現在医薬品等のヒト型抗体の開発に用いられている複数の手法で基礎的研究を行った。初年度に得られた成果は、(1)トランスクロモマウスの開発系では、破傷風またはジフテリアトキシイドを接種したマウスの血清中には、両者に対する IgG の誘導が確認され、いずれも毒素中和能を有し、破傷風の抗体は、毒素の重鎖に強く反応することが確認された。(2)マウスーヒトキメラ抗体の開発系では、ボツリヌスA型菌を培養後、精製した神経毒素をトキシイド化してマウスに接種した。得られたハイブリドーマは毒素と結合する6クローンの抗体を産生した。この抗体は、いずれもA型毒素の中和活性を示した。3クローンは毒素の重鎖と反応し、他3クローンは重鎖、軽鎖ともに反応しないことが確認された。(3)ヒトモノクローナル抗体の開発系では、試作ボツリヌストキシイドを免疫して得たヒトリンパ球とヒト・マウスミエローマを細胞融合後に保存していたハイブリドーマは、A型毒素に対して中和能を有する3クローンが得られた。この抗体はA型毒素の重鎖、軽鎖とも反応しなかった。各々の抗体を組み合わせるにより中和活性が上昇する場合と低下する場合が確認された。(4)種々の方法によりヒト型（化）抗体を開発、製造する場合には製剤の安全性確保が重要となる。今回、ウイルス安全性評価について、国内外の規制基準、ガイドラインを調査し、バイテク製剤の安全性バリデーションに必要な案件を整理した。

分担研究者名

千葉 丈	東京理科大基礎工学部 教授
野崎周英	(財)化学及血清療法研究所 第一研究部 室長
向本雅郁	大阪府立大学大学院農学生命科学研究科 助教授
佐々木次雄	国立感染症研究所 細菌第二部 室長

A. 研究目的

千葉県血清研究所の廃業に伴い当該研究所が製造していた国家買上品のボツリヌスウマ抗毒素、ガスエソウマ抗毒素、ジフテリアウマ抗毒素製剤の製造は、(財)化学及血清療法研究所に承継されることとなった。従来、化血研では、はぶウマ抗毒素、まむしウマ抗毒素を製造しており、今後は国内で生産されるすべてのウマ抗毒素製剤を製造することとなった。本ウマ製剤をヒトの治療に用いる際には、ウマの血清または血漿を粗材料としていることにより、動物生体由来の未知の病原体及び異種たん白の投与による血清病が心配されている。また、ウマ製剤の製造工程には、ウマ免疫用抗原の作製(菌の培養、毒素の精製、トキシノイド化)、ウマの高度免疫、抗毒素血清の精製・製剤化および各工程の品質管理試験等に要する製造期間は、1ヶ年以上を必要とする。本研究班では、現行のウマ抗毒素抗体であるボツリヌスウマ抗毒素(A,B,E及びF型の4種の抗体)、ガスエソウマ抗毒素(*C.perfringens*, *C.septicum*, *C.oedimatiens*の3種の抗体)、ジフテリアウマ抗毒素製剤に替わるヒト型抗体の開発を目指し、短期間で大量の製剤を製造するための基礎的研究を行うものである。特に、ボツリヌス毒素は生物化学兵器としてバイオテロに使用されることも懸念されており、緊急時に適当な予防策はない。そのため、毒素を中和する抗毒素抗体による治療は不可欠と考える。ヒト化マウスモノクローナル抗体やハイブリドーマ法により作製された完全ヒトモノクローナル抗体などと、染色体改変(ヒト抗体産生)マウスを用いて作製されたポリクローナル抗体の毒素中和能を比較する。これら基礎的研究の成果により、短期間で大量の製剤を恒常的に製造するための基盤整理を行うものである。

B. 研究方法

(1)千葉分担研究者は、石田ら(キリン医薬カンパニー)が生産するトランスクロモマウス(Transchromosomal-Mice:TCマウス又はKMマウス)に現行ヒトの予防に用いられている破傷風及びジフテリアトキシノイドを接種した。KMマウスは、ヒト抗体産生遺伝子を保有し、マウスの抗体産生遺伝子がノックアウトされているために、免疫して得られた抗体は、人間の作る抗体と同様な多様性を持つ。破傷風及びジフテリアトキシノイド注射後のマウスは、中和活性を有する抗体を産生するか検討する。さらに、中和能を有する抗体の中和抗体認識部分を解析し、自身らが開発したDNA免疫法により、ヒト型抗毒素抗体の製剤化への基礎研究を行なう。

(2)野崎分担研究者は、各毒素抗原をマウスに免疫し、常法に従ってハイブリドーマを作製し、決定したマウス抗毒素モノクローナル抗体V領域のアミノ酸配列を基にコンピュータ上でマウス抗毒素モノクローナル抗体V領域の立体構造モデルを作製する。各CDR部分に影響を与えそうなFR部分のアミノ酸を調べ、ヒト抗体V領域のアミノ酸配列と比較して、最終的な移植アミノ酸を決定する。これらの移植アミノ酸をコードするDNA配列をヒトV領域遺伝子に導入してヒト化抗毒素モノクローナル抗体V領域遺伝子を作製する。適当な発現プロモーターと抗体定常領域遺伝子を持った発現ベクターに組み込み、適当な宿主細胞に導入して発現させる。さらに、医薬品として用いるためには高産生株取得が必要なために、dhfr等の遺伝子増幅系を用いて高産生株を確立する。本年度は、向本分担研究者の支援を受けて、精製したボツリヌスA型神経毒素をトキシノイド化し、マウスに免疫後、得られたリンパ球を基に、定法に従い抗A型神経毒素単クローン抗体を産生するハイブリドーマ

を作製した。その後、ハイブリドーマより産生される単クローン抗体の中和力価を測定し、さらにイムブロッティングによる毒素の検出感度を指標に最適な抗体を産生するクローンを選別した。

(3)向本分担研究者は、試作したボツリヌストキソイドを実験従事者に免疫して得たリンパ球をヒト・マウスのヘテロミエローマである RF-S1 株を親細胞とし常法に従ってハイブリドーマを作製した。A 型ボツリヌス神経毒素を抗原とした ELISA 法により抗体産生細胞のスクリーニングを行い、抗毒素抗体産生細胞については、マウスを用いて中和試験を行った。本ハイブリドーマの産生するモノクローナル抗体の性状解析は未実施のまま、数年前に保存されていた。今回、ハイブリドーマを再び培養し、産生される抗体の中和能等について解析した。さらに、中和抗体産生能が高いクローンは、無血清培地を用いて大量培養を行い、アフィニティークロマトグラフィー等を用いて精製を行う。なお、精製モノクローナル抗体と毒素との競合結合阻害実験により抗体の結合力 (avidity) をウマ抗毒素血清と比較し、治療用抗体としての実用化の可能性を評価する。

(4)佐々木分担研究者は、現行のウマ抗毒素製剤から特異性が高いモノクローナル抗体に置き換える時に不可欠である安全性バリデーションの法規制、試験方法等を調査した。なかでも、これらバイテク製剤の安全性確保に関する国内外のウイルバリデーション実施規制動向について調査、情報を整理した。

C. 結果

(1) 千葉分担研究者は、トランスクロモマウスを用いたヒト型ポリクローナル抗体の作製として、破傷風トキソイドを KM マウス又は BALB/c マウスに接種した結果、マウスの血清中には破

傷風毒素と結合するヒト IgG 抗体の産生が確認された。KM マウスの抗体は、毒素の重鎖に反応し、BALB/c マウスの抗体は重鎖と軽鎖の両方に反応した。両抗体は、破傷風毒素の中和活性を示したが、KM マウスの産生した抗体の中和活性は、BALB/c マウスの抗体に比べて、約 1/10 であることが確認された。ジフテリアトキソイドを接種した KM マウスおよび BALB/c マウスともに、三種混合ワクチン接種ヒト血清 (陽性コントロール) 同様の反応性を示した。産生された抗体のジフテリア毒素の中和能は、破傷風と同様に BALB/c マウスの方が、約 10 倍高いことが確認された。

(2)野崎分担研究者は、マウスモノクローナル抗体の作製のために、A 型菌を培養後、LL 型 (分子量約 60 または 90 万) の毒素から凝集素を除去した M 型 (分子量約 30 万) 毒素区分を得た。さらに精製して毒素作用のある神経毒素 (約 15 万) だけを精製調整した。精製毒素はホルマリンで不活化してトキソイドとし、マウスを免疫した。トキソイド免疫後の抗ボツリヌス A 型神経毒素の ELISA 抗体価は有意に上昇したため、定法に従い細胞融合を行った。抗体陽性ハイブリドーマの中で、マウスの中和試験では、6 クローンに中和活性が見られ、うち毒素を完全に中和する 3 クローンが得られた。これらクローンの抗体は、ボツリヌス毒素の分子量約 10 万の重鎖と反応することが、イムブロッティング法により確認された。

(3)向本分担研究者は、ボツリヌストキソイドで免疫したヒトリンパ球をヒト・マウスヘテロミエローマと細胞融合後に、保存されていたハイブリドーマについて、以下の結果を得た。ELISA によるスクリーニングで A 型あるいは B 型毒素に対する抗体産生の認められたクローンについて、マウスによる中和活性の有無を調べた。その結果、A 型毒素にだけ中和活性を持つ 3 クロー

ン (A-4D8、B-3H5、D-3H3) が得られた。これらクローンは、単独では弱い中和活性を示し、A-4D8 と B-3H5 の組み合わせではマウス試験での完全中和が見られた。しかし、3種の組み合わせでは、単独の場合よりも弱い中和能となった。また、上記3クローンについて、イムノブロットング法により毒素の反応性を検討した結果、いずれのクローンも毒素の重鎖、軽鎖に反応しなかった。

(4)佐々木分担：モノクローナル抗体を含むバイテク製剤の安全性確保に対する国内外の規制動向が整理された。国内の関連資料は、平成12年2月の医薬審第329号「ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価について」、平成12年7月の医薬審第873号「生物薬品（バイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）製造用細胞基剤の由来、調製及び特性解析について」、および平成15年5月の厚生労働省告示第210号「生物由来原料基準」、日局参考情報「生物薬品のウイルス安全性確保の基本要件」等が規制の根幹をなす資料であった。バイオ医薬品の申請・許可を実施している国家機関は、欧州ではロンドンにある欧州医薬品審査庁（The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products）でEU加盟国（現在の加盟国15ヶ国、2004年5月からは25ヶ国）を包括的に実施している。米国では、FDAの示すガイドライン CBER/Points to consider in the manufacture and testing of monoclonal antibody products for human use (1997)、が有用なことが示された。

(5)ウマ抗毒素製剤の製造状況：従来、化血研で製造していた2品目のウマ抗毒素に（はぶ抗毒素、まむし抗毒素）、千葉県血清研究所から承継した3品目（ボツリヌス、ガスエソ、ジフテリア）のウマ抗毒素を加えて、国内のウマ抗

毒素製剤はすべて化血研で製造されることとなった。ボツリヌス、ガスエソ抗毒素製造のために必要な免疫用抗原の調整施設、免疫馬の収容施設等について整備がおこなわれ、2003年12月に阿蘇支所の改築、改善が終了した（別添参考資料）。千葉血清廃業以前に国内で製造していたウマ抗毒素製剤の供給、備蓄については、施設の面では確保可能な体制となった。しかし、製剤の原材料であるウマ免疫血清（血漿）中の力価は、同一製剤に含まれる抗原の違いにより、異なることが知られている。例えば、ガスエソ抗毒素に含まれる *C.perfringens*、*C.novyi*、*C.septicum* の各毒素抗原に対する力価の上がりは、従来 *C.perfringens* は悪く、*C.septicum* は良いと言われている。そのため、今後新たに開始される承継品目の免疫用の抗原調整、ウマの免疫等の製造上の問題が予想される。なお、まむしウマ抗毒素については、国内の複数の製造所が製造していたが、特に製造量の多かった武田が製造中止となり、化血研への増産が求められている。上述の側面からも、バイテク技術を応用したウマ等の免疫グロブリン製剤でない、ヒト型（化）抗体による技術開発が求められる。

海外のウマ抗毒素製剤の製造状況としては、中国の上海生物製剤研究所では数種の蛇毒抗毒素製剤を製造している。製造所の本体は、上海市の中心部に位置しており、ウマ免疫等の施設は約20Km離れた郊外に位置している。中国国内でもGMP体制の導入による当局の指導もあり、現在老朽化した馬房や採血施設を改築中である。また、ボツリヌス、ジフテリア、破傷風ウマ抗毒素等を製造している蘭州生物製剤研究所では、ウマの管理棟と採血、血清処理施設の改築を終えている。製造工程中の血清の処理および精製方法については、製造認可承認の変更に要する

手続きが必要で旧態依然の方法を変更しないで実施している。

D. 考 察

沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン注射後に誘導される抗体は、破傷風毒素の重鎖(分子量約10万)に反応するものが多いと報告されている。毒素の重鎖は、毒素と細胞との結合および中枢神経細胞のシナプス終末内に侵入する機能を有する。KMマウスで産生された中和活性を有する抗体は、ヒトの抗体と同様に重鎖に結合する性状であるため、KMマウスの抗体産生レパートリーは正常と考えられる。従って、単独で高い抗毒素抗体価を有するモノクローナル抗体が得られるか、あるいは2-3種類の抗体を組み合わせることにより毒素を完全に中和することができれば、この手法によるヒト型抗体の臨床応用が期待できる。

抗ボツリヌスA型神経毒素マウス-ヒトキメラ抗体の作出に当たり、第一段階であるA型毒素の中和能を有する6クローンのマウス抗体が得られたことにより、マウス抗体遺伝子を調整する段階へと進んだ。本抗体は中和認識部位の一次構造を認識していると考えられる。ボツリヌス毒素の重鎖は、毒性発現に関連する一連の作用のうちで、受容体への結合、細胞内移行および細胞内活性発現の担っている重要な部分ある。現在、この3抗体を用いてV領域アミノ酸配列を基にコンピュータ上でマウス抗毒素モノクローナル抗体V領域の立体構造モデルを検討中である。最終的にはマウス-ヒトキメラ抗体の樹立が目標となる。分担研究者の所属する化血研では、マウス-ヒトキメラ抗体の開発として、HIV患者の治療を目的とした研究開発がおこなわれ、現在国外で治験中である。従って、本手法により先行している抗HIVマウス-ヒトキメラ抗体の安全性、有効性の評価お

よび特許に関する問題点が整理されることは、現在実施しているボツリヌス抗体の開発に有益な情報をもたらす。

ヒト・マウスヘテロミエロマ細胞とヒトリンパ球による細胞融合法の進捗は、ボツリヌスA型毒素に対する3クローンの抗体は、2種類の混合により毒素を完全中和した。このことから、2種類のクローンは毒素の中和に関連する異なる抗原決定基を認識することにより、毒素活性を阻害したと考えられる。保存ハイブリドーマの安定性として、過去に行ったスクリーニングでは陽性クローンが多かったものの、今回は減少している。親細胞として用いたRF-S1は、他のヒトミエロマ細胞と比較して抗体産生能は高い反面、ヒト抗体の脱落が起こることが報告されている。今回報告と同様な減少が認められたが、中和能を有するクローンが取れているために、このハイブリドーマより可変領域遺伝子をクローニングし、さらに中和活性の高い抗体を作製する方法を検討する必要がある。

バイテク製剤の開発、製剤化においては安全性確保としてウイルスの安全性バリデーションが重要である。国内外の規制当局の指針、ガイドラインが調査できたことにより、本ヒト型抗体の基礎的研究における注意点、発展性を照合しながら展開する必要性が求められる。

E. 結 論

現在市販されて抗毒素製剤は、ウマ免疫グロブリン由来製剤であり、数種の製剤が国内数社の製造所により数年前までは製造されていた。しかし、きわめて稀にしか発生しないため製剤の使用頻度が少なく、さらにGMP対応施設の充実が近年求められており、企業として採算が見合わないために数年前より製造を廃止する企業が多くなった。また、千葉血清は廃業に追い込まれた

ために、国内では化血研だけですべての製剤を製造することとなった。今年度から、化血研では承継した製剤については新規施設の立ち上げが終了し、増産が必要な製剤の製造計画・体制の調整も終了し、実製造がおこなわれている。一方、ウマ抗毒素製剤の供給体制については、経済性から鑑みると海外から輸入することが容易な手段と考えられる。しかし、ウマ抗毒素製剤を製造する海外の企業も、現在、生物学的製剤への導入が進められている GMP 対応に苦慮している。少なくとも国内で製造している製剤よりも品質の良い製剤を輸入ことは困難である。このような状況下、効率的に抗毒素を製造し、備蓄体制の充実を計るには、医薬品の開発分野で先行しているバイテク技術の応用が考えられる。複数の手法により安全なヒト型（化）抗体の安定的且つ大量生産を目標に基礎的な研究を3年計画で開始した。

F. 健康危険情報

ボツリヌス毒素によるバイオテロ対策として、十分量の治療用抗毒素の国内備蓄を整えることは急務である。現行のボツリヌスウマ製剤は、ボツリヌス食中毒の治療を目的とした備蓄量であり、バイオテロ時の多数の患者に対して対応は困難である。本基礎研究の成果を実製造として、スケールアップする技法、新しい薬剤としての製造認可承認においては、薬事法規制外の医薬品としての対応が必要である。

G. 研究発表

(分担研究者分は各分担報告に記載)

1. 論文発表

- 1) Kiyohito Nakai, Motohide Takahashi and Motowo Tomita : The equine antitoxins supply system for biological poisons in Japan. *Toxicon* Vol. 42, (5), 561-562, 2003

- 2) Akio Hatanaka, Atsunobu Tsunoda, Makoto Okamoto, Kenji Ooe, Akira Nakamura, Masashi Miyakoshi, Takako Komiya, and Motohide Takahashi. : *Corynebacterium ulcerans* Diphtheria in Japan. *Emerging Infectious Diseases Journal* Vol. 9, No. 6, 752-753, 2003

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）

抗毒素製剤の効率的製造方法の開発に関する研究（15200901）

分担研究報告

「トランスクロモマウスを用いたヒト型ポリクローナル抗体の開発研究」

分担研究者	千葉 丈	東京理科大学基礎工学部
協力研究者	高橋元秀	国立感染症研究所細菌第2部
	石田 功	キリン医薬カンパニー

要旨：トランスクロモマウス（KM マウス；キリンビールが開発）はヒトの主要な抗体遺伝子群を保有し、マウスの抗体遺伝子がロックアウトされている。乳幼児の免疫に用いられている破傷風トキソイドで KM マウスを免疫すると血清にどのようなヒト抗体が産生されるかを検証した。免疫された KM マウスの血清に破傷風毒素に対する高力価のヒト IgG 抗体が証明された。また、その抗破傷風毒素抗体は破傷風毒素の H 鎖に強く反応し、L 鎖にはほとんど反応しなかった。小児のプール血清中の抗破傷風毒素抗体も破傷風毒素の H 鎖に強く反応し、L 鎖にはほとんど反応しないことから、KM マウスで機能するヒト抗体レパートリーが正常人のそれと遜色ない可能性が示された。ジフテリアトキソイドで免疫された KM マウスでもジフテリア毒素に対する高力価のヒト IgG 抗体が証明された。調製できる量には限界があるものの、KM マウスを免疫して調製された抗血清からヒト IgG 抗体を精製することで、現行のウマ抗毒素製剤に代替しうる安全なヒト抗毒素製剤を調製できる可能性が高い。

A. 研究の目的

現行のウマ抗毒素製剤に代替しうるヒト抗毒素製剤の作製技術の確立を最終目的とする。ヒト抗毒素製剤を開発するにあたって、ヒト抗体の作製技術として次の要件を満たす必要があると思われる。

1) 毒素の中和活性が、複数のエピトープを認識する種々の抗体が結合することによって促進されることが知られているので、現行のウマ抗毒素製剤と同様にポ

リクローナル抗体であることが望ましい。

2) さらに、そのポリクローナル抗体は、毒素を中和した後にオプソニン作用によって速やかに毒素を分解することのできる完全型の IgG 抗体であることが望ましい。この2つの要件を満たすヒト抗体の作製技術としては、現在のところ、ヒトの抗体遺伝子群を人工染色体として有するトランスジェニック動物（トランスクロモ動物；キリン医薬カンパニーが開発）

を用いた方法が最も適した技術であると
考えられる。そのようなトランスクロモ
動物を免疫して得られた抗血清には、ヒ
トの作る抗体と同様の多様性を持つポリ
クローナル IgG 抗体が産生されることが
期待できる。これまで、そのようなトラ
ンスクロモ動物としてマウス (KM マウス)
(文献 1) およびウシが開発されている
(文献 2)。本研究では、KM マウスを用い
て、ヒト抗毒素製剤の開発におけるヒト
抗体遺伝子をもつトランスジェニック動
物の有用性を検証した。

B. 研究方法

KM マウスはヒト抗体遺伝子を保有し、
マウス抗体遺伝子の機能がノックアウト
されている。ヒト抗体遺伝子を保有して
いることが確認された KM マウスおよびマ
ウスの MHC 遺伝子のバックグラウンドを
BALB/c マウスと同じにした KM (D) マウス
を実験に用いた。乳幼児の免疫に用いら
れている沈降型および液状型の破傷風ト
キソイドで KM あるいは KM (D) マウスを免
疫し、血清にどのようなヒト抗体が産生
されるかを調べた。血清中の抗破傷風毒
素ヒト IgG 抗体は ELISA 法によって定量
し、ウエスタンブロッティング法によっ
て、破傷風毒素を構成する H 鎖と L 鎖の
どちらに反応するのかを調べた。比較す
るヒトの抗破傷風毒素血清として、プー
ルされた幼児の血清を用いた。また、
BALB/c マウスを同じ破傷風トキソイドで
免疫し、血清中の抗破傷風毒素マウス IgG
抗体を定量し、破傷風毒素を構成する H
鎖と L 鎖との反応性を KM あるいは KM (D)
マウスの抗体と比較した。ジフテリアト

キソイドを用いて同様の実験を行った。

(倫理面への配慮)

マウスの取り扱いには動物保護に配
慮し、東京理科大学実験動物委員会規
定を遵守して行われた。

C. 研究結果

破傷風トキソイドで免疫された KM ある
いは KM (D) マウスの血清に破傷風毒素に
対するヒト IgG 抗体が証明された。その
血清の抗体価は比較に用いられた BALB/c
マウスの 1/10 であったが、十分に高
いものであった (図 1)。また、その抗破
傷風毒素抗体は破傷風毒素の H 鎖に強く
反応し、L 鎖にはほとんど反応しなかつた
(図 2)。ジフテリアトキソイドで免疫さ
れた KM あるいは KM (D) マウスでもジフテ
リア毒素に対する高力価のヒト IgG 抗体
が証明された。その抗体価は BALB/c マウ
スの 1/10 であった (図 3)。

D. 考察

KM マウスに誘導された抗破傷風毒素
抗体は破傷風毒素の H 鎖に強く反応し、L
鎖にはほとんど反応せず、3 種混合ワク
チンで免疫されている小児のプール血清
中の抗破傷風毒素抗体も破傷風毒素の H
鎖に強く反応し、L 鎖にはほとんど反応し
ないことから、KM マウスで機能するヒト
抗体レパートリーが正常人のそれと遜色
ないと思われる。調製できる量には限界
があるものの、KM マウスを免疫して調製
された抗血清からヒト IgG 抗体を精製す
ることで、現行のウマ抗毒素製剤に代替
しうる安全なヒト抗毒素製剤を調製でき

る可能性が高い。将来的には、すでに開発されているヒト抗体遺伝子をもつトランスクロモウシを用いることで量の問題は解決できる可能性がある。

E. 結論

現行のウマ抗毒素製剤に代替しうるヒト抗毒素製剤の作製技術として、ヒト抗体遺伝子をもつトランスジェニック動物が有用であることが示された。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

「ハイブリドーマ法を用いたヒト抗体産生細胞からの EBV ゲノムの排除」

（出願準備中）

2. 実用新案登録

なし

3. その他

文献

- 1) Tomizuka K, Ishida I. et al. (2000) Proc, Proc Natl Acad Sci U S A. 18;97(2):722-7.
- 2) Kuroiwa Y, Ishida I, et al. (2002) Nat Biotechnol. 20(9):889-94.

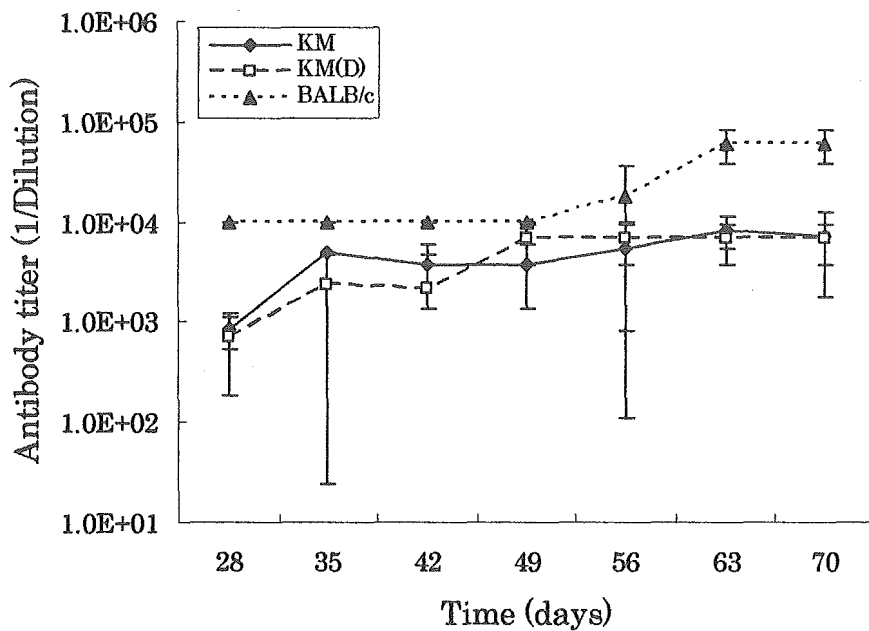


図 1. 破傷風トキソイド免疫群の抗体価

マウス血清を $1/10^2$ 、 $1/5 \cdot 10^2$ 、 $1/10^3$ 、 $1/5 \cdot 10^3$ 、 $1/10^4$ 、 $1/5 \cdot 10^4$ 、 $1/10^5$ 、 $1/5 \cdot 10^5$ 、 $1/10^6$ に希釈し、破傷風トキソイド特異的な ELISA を行った。陽性コントロールとして用いた $1/10^3$ 希釈の三種混合ワクチン接種幼児ヒト血清の吸光度が約 1.0 のとき、0.100 以上を陽性と判断し、そのときの希釈倍率を縦軸にとり抗体価とした。

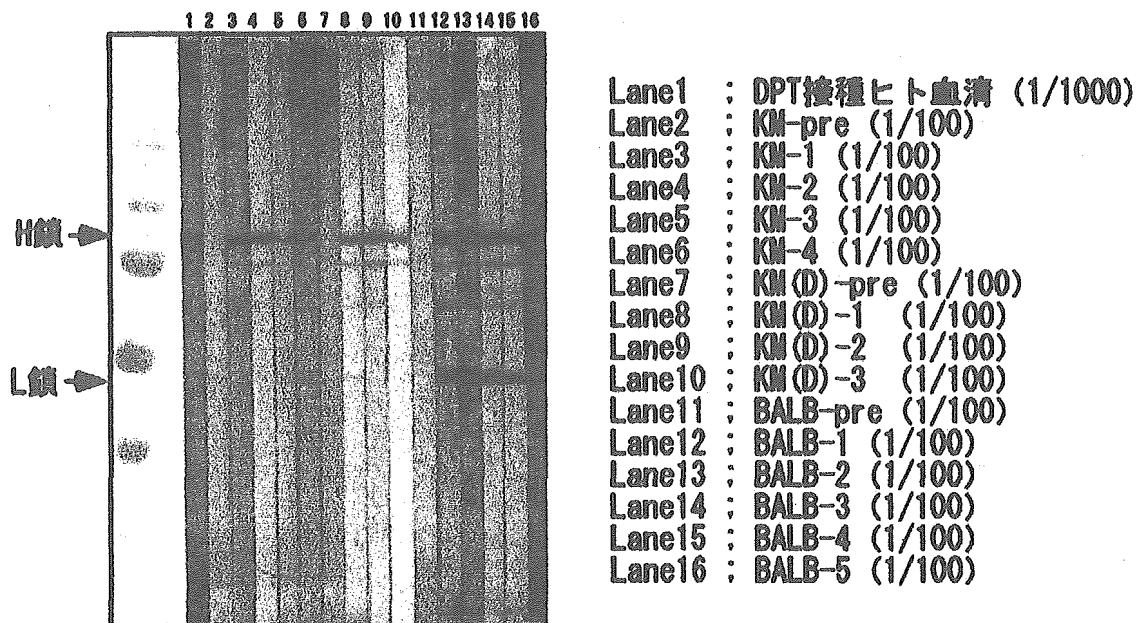


図 2. 破傷風毒素に対する血清の反応性

精製破傷風毒素を還元条件で SDS-PAGE により H 鎖と L 鎖に分離・泳動後、PDVF メンブレンに転写した。その後、1/100 希釈した 70 日目の血清を短冊上にしたメンブレンに反応させ、KM および KM(D)マウスは抗ヒト免疫グロブリン抗体、BALB/c マウスは抗マウス免疫グロブリン抗体にて検出した。

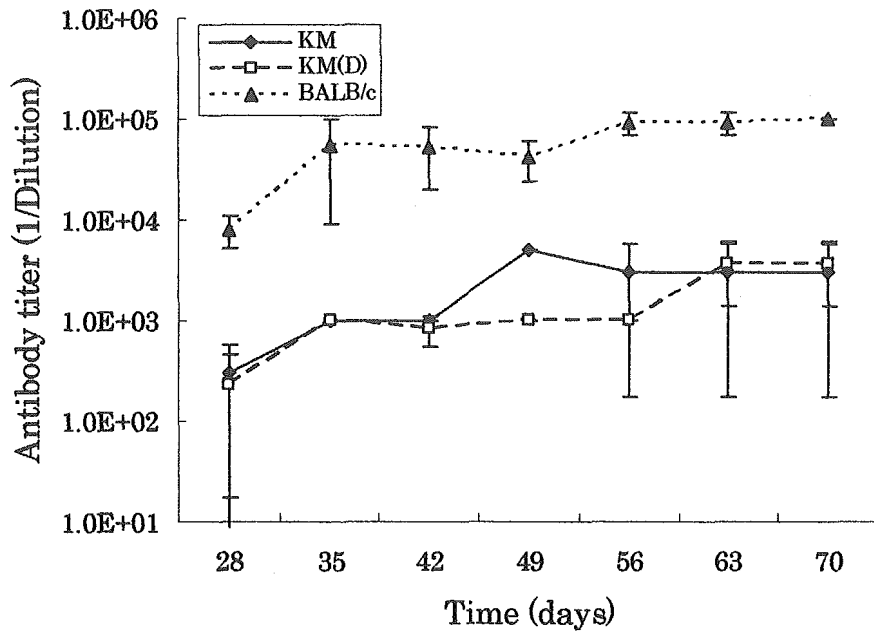


図3. ジフテリアトキソイド免疫群の抗体価

マウス血清を $1/10^2$ 、 $1/5 \cdot 10^2$ 、 $1/10^3$ 、 $1/5 \cdot 10^3$ 、 $1/10^4$ 、 $1/5 \cdot 10^4$ 、 $1/10^5$ 、 $1/5 \cdot 10^5$ 、 $1/10^6$ に希釈し、ジフテリアトキソイド特異的な ELISA を行った。陽性コントロールとして用いた $1/10^3$ 希釈の三種混合ワクチン接種幼児ヒト血清の吸光度が約 1.0 のとき、0.100 以上を陽性と判断し、そのときの希釈倍率を縦軸にとり抗体価とした。

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）

抗毒素製剤の効率的製造方法の開発に関する研究（15200901）

分担研究報告

「抗ボツリヌス神経毒素マウス抗体ヒト化のためのマウス単クローン抗体産生
ハイブリドーマの作成」

分担研究者 野崎周英 財団法人 化学及血清療法研究所
向本雅郁 大阪府立大学学大学院農学生命科学研究科
協力研究者 前田浩明 財団法人 化学及血清療法研究所
小崎俊司 大阪府立大学学大学院農学生命科学研究科

要旨：ボツリヌス中毒患者の治療には現在、ウマ抗毒素製剤が用いられている。ウマ血清を原材料としているこの製剤は、ヒトには異種蛋白であるため、アナフィラキシー等のアレルギー反応を引き起こす危険性がある。ウマ抗毒素に代わるより安全で、高い中和力価を持つ抗毒素製剤の開発が望まれている。そこで、遺伝子組換え技術を利用した抗毒素マウス-ヒトキメラ抗体の作製を試みた。今年度は、抗ボツリヌス神経毒素マウス-ヒトキメラ抗体のV領域に相当するマウス抗体遺伝子を調製するため、食中毒事例として最も多いA型に焦点を絞り、抗A型神経毒素マウス単クローン抗体を産生するハイブリドーマの作製を行った。ハイブリドーマより産生される単クローン抗体の中和力価を指標に最適なクローンを選択した。

A. 研究の目的

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抗ボツリヌス神経毒素組換えマウス-ヒトキメラ抗体の作成を試みた。今年度は食中毒事例として最も多いA型に焦点を絞り、キメラ抗体のV領域に相当するマウス抗体遺伝子を調製するため、抗A型神経毒素単クローン抗体を産生するハイブリドーマの作製を行った。ハイブリドーマより産生される単クローン抗体の中和力価およびイムノブロットィングによる毒素の検出感度を指標に最適な抗体を産生するクローンを選別した。

B. 研究方法

(1) 抗原の調製

治療用ボツリヌス抗毒素の作製時に使用されている *C. botulinum* type A 62A 株より精製したA型神経毒素をホルマリンで不活化したトキシイドを抗原に用いた。

(2) トキシイドの免疫

上記のトキシイドと Freund's Complete Adjuvant を等量混合しマウス1匹当たり毒素蛋白量で 0.25mg を腹腔内に接種した。初回免疫後、4および8週目に Freund's Incomplete Adjuvant を用いて同量を追加免疫し

た。10日後部分採血を行い、ELISAにより抗体価を測定した。

(3) 細胞融合

ELISA 抗体価が 500,000 倍以上のマウスにおいて順次、A型神経毒素 ($10 \mu\text{g}/\text{マウス}$; $10^6\text{LD}_{50}/\text{マウス}$) を腹腔内に投与した。3-4日後、脾細胞を調製し、ポリエチレングリコール法によりミエローマ細胞 (P3U1) と細胞融合を行った。

(4) スクリーニング (ELISA)

A型神経毒素 ($0.5 \mu\text{g}/\text{well}$) をコートしたプレートを用い、ブロッキングには 0.2%BSA、2次抗体にはペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG(H+L) (1:5000, BioRad)、基質はオルソフェニレンジアミンを使用した。反応は基質反応以外全て 37°C 2時間で行った。基質の発色反応は 37°C 30分で行った。

(5) スクリーニング (中和試験)

ボツリヌス毒素 ($200\text{ipLD}_{50}/\text{ml}$) 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。

(6) クローニング

限界希釈法により中和活性のある抗体を産生しているハイブリドーマのクローニングを2-3回行った。

(7) イムノブロットィング

7.5%ゲルにA型精製毒素を2ME処理後1レーンあたり $0.2 \mu\text{g}$ アプライし、SDS-PAGEを行った。泳動蛋白をニトロ

セルロース膜に転写した後、ハイブリドーマ培養上清で Immunoblotting を行った。2次抗体は、ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG ヤギ抗体(1:3000)、発色基質は 4-chloro-1-naphtol を用いた。

(倫理面への配慮)

C. 研究結果

トキソイド免疫後の抗ボツリヌス A 型神経毒素の ELISA 抗体価は 3 回の免疫でマウス 5 匹中 4 匹が 100,000 倍以上に上昇していた。このうち 2 匹を用いて細胞融合を行った。その結果、抗体陽性ハイブリドーマが 37 クローン得られた(表 1)。これら 37 クローンについて産生する抗体の毒素中和活性を調べたところ 13 クローンについて、コントロールと比較して延命あるいは症状の緩和が観察された。このうち 6 クローンについては症状の緩和が著しく、特に 3 クローン(2-4, 2-5, 9-4)については毒素を完全中和した。

中和活性のある 13 クローンの抗体についてイムノブロットィングによる毒素との反応性を検討したところ、3 クローン(2-2, 4-3, 9-4)がいずれも神経毒素重鎖と反応した(図 1)。他のクローンの抗体は重鎖、軽鎖のいずれとも反応しなかった。

以上の結果からマウス-ヒトキメラ抗体用のハイブリドーマとして中和活性の高い 6 クローンを選定した(表 2)。この 6 クローンの中でも特にイムノブロットィングによる毒素

検出が可能である 2 クローン(4-3, 9-4)について、現在、抗体遺伝子のクローニングを行っている。

D. 考察

治療効果の高い抗毒素製剤を作製するためには、毒素中和活性の高い抗体を用いることが必須である。マウス-ヒトキメラ抗体において、毒素と直接結合する V 領域はマウス由来であることから、中和能の高い単クローン抗体を産生するマウスハイブリドーマを選別するということが重要である。今回、中和試験において完全中和するクローンを 3 クローン得ることができた。したがって、これらのクローンより得られる V 領域遺伝子を基に作製したマウス-ヒトキメラ抗体は十分治療効果の高い抗毒素製剤になりうると考えられる。

抗毒素製剤の評価方法を考慮に入れた場合、イムノブロットィングで毒素を検出できるということ、抗体の 1 つの条件となる。今回毒素を完全中和した 3 クローンのうち 1 クローンはイムノブロットィングにおいて毒素を検出することが可能であった。このことからこのクローンをマウス-ヒトキメラ抗体の第一候補とすることが適当であると考えられる。イムノブロットィングで検出可能であるということはこの抗体が中和エpiteope の一次構造を認識していることを示している。この中和エpiteope を明らかにすることにより、ペプチドワクチンのような将来的により安

全性の高いワクチンを製造することが可能になる。

1種類の単クローン抗体より、個々の中和活性は低くとも異なるエpitepを認識する複数の単クローン抗体を混合したときの方が、毒素の中和能が高いという報告がある。複数のキメラ抗体を混合した製剤を作製するということを考慮に入れ、完全中和した3クローン以外に完全中和しなかったが比較的中和活性の高い別の3クローンもキメラ抗体作成用のハイブリドーマ候補になり得ると考えられる。複数の抗体を混合した場合の中和活性については今後解析する予定である。

E. 結論

ボツリヌスA型トキソイドを免疫することによって得られた抗A型神経毒素単クローン抗体のうち3クローンが毒素を完全中和した。さらに完全中和しなかったが比較的中和活性の高い3クローンを含め、計6クローンをマウス-ヒトキメラ抗体の候補として選別した。今後、これらのクローンよりV領域遺伝子をクローニングし、キメラ抗体を作製していく予定である。

F. 健康危機情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Ihara H, Kohda T, Morimoto F, Tsukamoto K, Karasawa T, Nakamura S,

Mukamoto M, and Kozaki S (2003) Sequence of the gene for Clostridium Botulinum type B neurotoxin associated with infant botulism, expression of the C-terminal half of heavy chain and its binding activity. BBA-Gene Structure and Expression. 1625:19-26.

2. 学会発表

Kohda T, Ihara H, Seto Y, Mukamoto M, and Kozaki S (2003) Mutational analysis of binding site for receptor recognition domain of Clostridium botulinum type B neurotoxin. 11th European Conference on Bacterial Protein Toxin, Czech Republic

Tsukamoto K, Takeuchi K, Kohda T, Mukamoto M, Kozaki S (2003) Detection of a putative protein toxin for Clostridium botulinum type D neurotoxin. 11th European Conference on Bacterial Protein Toxin, Czech Republic

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

提言

最も安全性の高い抗毒素製剤は、ヒ

ト抗体である。今回作製するマウス-ヒトキメラ抗体によって得られた解析結果を基に、将来的には、ヒト型単クローン抗体を利用した、組換えヒト型抗体を作製することが必要である
と考える。

文献