

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

救急治療薬としてのヒト抗体調製に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 黒澤 良和

平成17（2005）年4月

目次

I. 総括研究報告

救急治療薬としてのヒト抗体調製に関する研究 黒澤良和----- 1

II. 分担研究報告

1. インフルエンザウイルスと A 群溶血性連鎖球菌の重感染による劇症化に
対するヒト中和モノクローナル抗体の有効性 奥野良信----- 9

2. ハブ毒に対するヒト中和モノクローン抗体の作製
野崎真敏-----14

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 24

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
総括研究報告書

救急治療薬としてのヒト抗体調製に関する研究

主任研究者 黒澤良和

藤田保健衛生大学総合医科学研究所・教授

研究要旨

本研究プロジェクトは、治療に役立つヒト抗体開発を目的とした厚生労働省補助金事業として実施されている。抗体は、体内に侵入した様々な毒素を中和し、また病原性ウイルスを中和する能力を有する強力な生体防御分子である。従来からもガスエソ毒素、ジフテリア毒素、ボツリヌス毒素、ハブ毒、まむし毒素に対しては、ウマに対してトキソイドで免疫して調製した抗毒素が治療薬として用いられている。更に、献血（若しくは売血）の血清画分より、抗破傷風毒素免疫グロブリン、抗B型肝炎ウイルス(HBV)免疫グロブリンが調製され市販されている。ウマ抗血清は、ウマ由来分子を人体に与えることに伴う副作用の問題が、また人血清を材料とした免疫グロブリン製剤は既知および未知のウイルス混入の危険が常につきまとい、人工的に作製したヒトモノクローン抗体でそれを全て置き換えることへの期待は大きい。更には、抗体が治療薬となり得る多くの疾患に対してヒト抗体を単離調製する技術開発が求められていた。本研究プロジェクトは、そのような社会的要請に応えるべく技術開発を行いながら目標を達成するために実施されている。

第I期：平成9-11年度、第II期：平成12-14年度に続いて、第III期：平成15-17年度と実施され、既にプロジェクト開始後8年を経過しようとしている。

第I期は、抗体ライブラリーの作製およびそのスクリーニング法の開発に費やされた。数10名のボランティアから提供されたBリンパ球に富む様々な臨床材料を用いて、1000億個の独立したクローンからなるファージ抗体ライブラリー(AIMSと命名)を作製した。作製後6年半経過した現在からみても、AIMSライブラリーの性能（含まれる抗体の多様性の高さ、抗体を発見したファージが占める率の高さ、単離される抗体の性能等から判断）は、世界最高ランクに位置する。AIMSライブラリー作製後様々な抗原に対する抗体単離を試みた。「パニング法を用いると、そこで使用した抗原分子に対して特異的に結合する抗体が必ず複

数種類単離できる」というのが第 I 期で到達した結論である。第 I 期では、得られた抗体の質を問える段階まで研究は進んでいなかった。第 II 期に入り幾つかのグループと共同研究体制を組んだ。この段階では、抗体に求める性質として抗原に結合するのみならず、ウイルス中和活性や毒素中和活性を示すかが主要な課題となった。更に、最初 Fab-cp3 (抗体の Fab 部分にファージ粒子由来の cp3 が融合した形) として得られる分子を IgG に変換して、大量調製し、臨床目的 (治療薬として) に充分使用可能な能力を持つかが課題となった。様々な問題が噴出して紆余曲折したが、最終的に幾つかの対象に対しては、高い性能を示す抗体が得られた。第 II 期の成果は非常に大きかった。(1) 体内に含まれる抗体は、抗原の侵入と関係なく作られるナイーブレパートリーと、特定抗原 (感染等により刺激を受けた抗原) に対して成熟した抗体集団からなるが、「ファージディスプレイ系を用いて作製した AIMS ライブラリーは、*in vivo* 抗体レパートリーを完全に反映している」ことが判明した。この場合、抗体ライブラリーのサイズが十分に大きいこと (10^{10} – 10^{11}) が重要である。(2) 特定の性質をした抗体を有するヒトがボランティアとして協力してくれる状況があれば、「成分採血という手段」でそのヒトの大量の B リンパ球 (10^9 程度) が入手できて、抗体ライブラリー作製を通して、そのヒトが持つ抗体レパートリーを忠実に反映した抗体セットを *in vitro* で再構築できることがわかり、またそのための技術を完全に習得したこともその後の研究に幅を持たせた点で大きい。(現在、主任研究者のグループでは、様々な特徴を持つ抗体ライブラリーを AIMS ライブラリー以外に 9 組保有している)。(3) 抗体ライブラリーをスクリーニングして得られる抗体は、用いる抗原とそこに存在する抗体との間で複合体が形成されるかどうか、物理的相補性の有無によって単離されるかが決定された結果である。更にその抗体のライブラリーの中での存在頻度と、目的とする抗原の特定エピートの濃度にスクリーニング結果は大きく影響される。我々が抗体ライブラリーを自在に使いこなせるようになっていくのは、この平衡反応から予測される当たり前のことを自覚した結果である。我々にとってこの認識は重要なことであり、目的とする性質をした抗体を得るために、どのライブラリーを使うべきか、どのような抗原を調製すべきか考える根拠となった。第 III 期を開始するにあたり、対象をインフルエンザウイルスとハブ毒に絞ったのは、「他の疾患に対する抗体単離について技術的問題は既に解決した」と判断したからである。インフルエンザは、antigen-drift が起こって抗原性が毎年変化する。そこでインフルエンザに対する抗体に求められる性

質は、治療薬として成立するのかが課題であった。この点について平成 15 年度で行った試みは正しくなかった。しかし平成 16 年度に得た結果は極めて有望である。この点は、考案の項で議論する。ハブ毒に関しては既に第 II 期で出血因子 HR1 に対する強い中和活性を示す抗体を得ている。そこで臨床試験開始へ向けて、いかなる条件を充たせばよいのか。その道筋を確立することを目標として対象に選んだ。更にハブ毒は多数の因子を含み、ウマ血清のように未知因子も含んだ多数の成分に対してポリクローン抗体として調製し、それが特効薬となったために認可されたという長い歴史を持つ治療薬を、現在のように認可されるには様々な厳しい条件をクリアーする必要のあるヒトモノクローン抗体で置き換える作業に起こり得る問題点を洗い出すことも目的である。この点についても考案の項で議論する。

分担研究者

奥野良信・大阪府立公衆衛生研究所・部長
野崎真敏・沖縄衛生環境研究所・部長

A. 研究目的

エイズウイルス (HIV) や C 型肝炎ウイルス (HCV) 以外の多くのウイルス感染症は、ワクチン接種で発症を予防できる。ワクチン接種は、その大部分の例で抗体産生を誘導し、その抗体が侵入してくるウイルスに結合して細胞への感染を阻止するため予防効果を示す。体の中でウイルス感染細胞数がある段階を越えると発症するが、ウイルス数の更なる増大を防ぎ、ウイルス感染細胞から未感染細胞へのウイルスの移行過程を阻止することで発症したのちも治療効果を期待できる。健常人の場合、ウイルス感染一発症を起こしても最終的に抗ウイルス中和抗体の大量産生が誘導され、またウイルス感染細胞に対する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が出現し、治癒する。しかし、免疫抑制剤の使用を含めた治療途上での免疫不全状態の出現、高齢化に伴う免疫力の低下等によるウイルス性疾患の発病の頻出により、治療

薬としての抗体開発の重要性が認識されつつある。更に最近、SARS やトリインフルエンザウイルス等の宿主動物種の壁を越えた新興・再興感染症が大きな社会問題化しており、ウイルスを対象とするヒト抗体治療薬開発技術を確認し、具体的に治療薬として整備されることが重要と考えられる。

病原菌が分泌する毒素およびヘビ毒素等に対してウマ抗毒素が使用されるようになったのは、古い歴史を持つ。その有効性と同時に多くの副作用を伴うことも知られている。現在、主任研究者らの用いているファージディスプレイ法およびヒト抗体を作るトランスジェニックマウス法等、様々な抗原に対してヒト抗体を作製する技術が開発され、抗 D (Rho) 抗体も含めて完全なヒト抗体を作製する高いニーズがある。ヒトモノクローン抗体は、一度作製すると抗原側の性質が変化しない限り、半永久的に薬として調製可能である。また、長期保管も可能で、危機管理対策上からの大量備蓄を実施できる。

主任研究者らは III 期 8 年にわたる本プロジェクトを実施する中で、ファージディスプ

レー法を最も中心的な基盤技術とし、多くの共同研究者、更に多くの献血ボランティアの協力を得て、様々な病原性ウイルス、病原菌が分泌する毒素、ヘビ毒素に対する治療薬としての抗体調製技術を開発すると同時に、具体的にヒト抗体の単離調製に成功した。プロジェクト期間は残り1年であるが、当初の目標はほぼ達成しつつある。更にファージディスプレイ系を用いて作製した抗体ライブラリーがもたらす情報は、研究開始段階では想像できなかった貴重な情報を与えつつある。それは従来のワクチンの概念にも変更を迫る内容を含んでいる。本プロジェクトの第III期はインフルエンザウイルス中和抗体およびハブ毒中和抗体に的を絞っているが、具体的に治療現場で用いられるヒト抗体を作り出す最終目標達成の実現という点では、それ以外の疾患に対する抗体も対象としている。

B. 研究方法

本プロジェクトで採用しているファージディスプレイ系を用いて作製した抗体ライブラリーを治療用抗体のソースとする方法では、(1)ライブラリースクリーニングに用いる抗原の調製、(2)いかなるライブラリーを用いるかの選択、(3)スクリーニングの実施、(4)単離した抗体の検定、(5)IgG型ヒト抗体への変換と調製、(6)前臨床試験に相当する様々な解析、(7)GMP、GCPレベルでのヒト抗体の大量調製—臨床試験と進む。研究は共同研究体制を構築して実施され、主任研究者の研究室は、(2)(3)(5)を主として担当し、共同研究者が(1)(4)を担当し、更に臨床医が加わって(6)(7)を進めることとなる。

プロジェクト第I期に、主任研究者の研究室でAIMSライブラリーと名付けた巨大抗体ラ

イブラリーを作製し、第II期にかけて水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)、インフルエンザウイルス、B型肝炎ウイルス(HBV)、ロタウイルス、ジフテリア毒素、破傷風毒素、ハブ毒を対象として中和抗体単離を試みた。その結果、AIMSライブラリーの中からVZV、ロタウイルス、ジフテリア毒素に対しては治療薬として十分な能力を示すヒト抗体単離に成功した。これらについては上記(1)-(5)を終了し、研究は(6)(7)のステージに進んでいる。ハブ毒中和抗体単離を進める中で、「特定の性質をした抗体を血清中に有するヒトがボランティアとして成分献血に協力してくれると、抗体ライブラリーを作製してその抗体をモノクローン化する技術開発」に成功した。これは、AIMSライブラリーを抗体ソースとする例とは異なる全く新しい局面を開くことになった。

VZVの中和抗体単離の例では、精製したウイルスタンパクgHを抗原としてスクリーニングし、得られた抗体に関してELISAでは低い抗原結合を示す抗体の中にウイルス中和力では最も強い抗体があることに気付いた。このことは、ウイルス粒子上の分子と、精製した分子では立体構造上に何らかの差があることを反映した結果と考えられた。そこでウイルスや毒素に対して中和抗体を得るには、抗体使用時の対象抗原がとっているであろう物理的性状をした抗原をスクリーニングに用いるのがベストという考えに到達した。一方、別の研究から膜上に発現した全ての分子に対して、網羅的に多数の抗体を同時に単離する方法の確立に成功した。この両方を組み合わせると、今後ウイルスに対する中和抗体を単離する場合に、ウイルス粒子自身を抗原として用いるか、ウイルスを構成する中和エピトープを持つ分子を細胞膜上に強制発現させて、生きた

細胞を抗原としてスクリーニングすることにより対象分子に対する抗体をとると強い中和活性を示す抗体がより容易に単離できるであろうという結論となった。

本プロジェクトでは、第 III 期にインフルエンザウイルスとハブ毒を対象とした。第 II 期に於いて、AIMS ライブラリーからインフルエンザウイルスに対する中和抗体を 5 種類単離するのに成功した。その意味では、上記 1-5 を終了し、6 のステージの研究が奥野博士によって進められているが(奥野報告参照)、インフルエンザでは毎年 antigen-drift が起こるために、治療薬開発には抗原性の変化の影響を受けにくい抗体単離が必要となる。平成 15 年度では、「中和抗体単離」→「エスケープミュータント単離」→「抗体への変異の導入で更なる中和力の獲得」という方針で、抗原の変化に対応しようとしたが、成功しなかった(昨年度報告書)。そこで方針を変更して平成 16 年度には、3 名の小児科医(60 歳、45 歳、30 歳)の協力を得て、巨大抗体ライブラリーを作製し、その中から抗インフルエンザ抗体を単離することとしたところ、極めて有望な結果が得られた。

ヘビ毒には実に多くの成分が含まれている。第 II 期の研究で出血因子 HR1、HR2 に対する抗体単離を行い、とりわけ HR1 に対する強力な中和抗体単離に成功した。今回さらに phospholipaseA2 と [TAME]-esterase に対する抗体単離も実施した。それぞれの成分に対して、どのような抗体を準備し、どのような条件を整えば臨床試験を実施できるのか、検討を開始する必要がある。

C. 研究結果

世代の異なる 3 名の小児科医の血液を用いた

ライブラリーの作製

昨年度の報告書で議論したが、3L の血液に相当する成分採血をし、それを出発材料に 10^{10} - 10^{11} の独立したクローンからなる十分に大きい抗体ライブラリーを正しく作製すれば、リンパ球供与者の体内の抗体レパートリーを忠実に反映した抗体セットを持つライブラリーができる。小児科医は日々感染症患者と接しており、様々な抗原で免疫され続けている。インフルエンザは、数 10 年に 1 回起こる pandemic な大流行と、毎年繰り返される antigen-drift に基づく epidemic な流行を起こす。そこで現在 60 歳(Dr. A)、45 歳(Dr. Y)、30 歳(Dr. N)3 名の小児科医の協力を得て、巨大抗体ライブラリーを作製することとした。その結果、Dr. A から 1.46×10^{11} 、Dr. Y から 1.55×10^{10} 、Dr. N から 2.85×10^{10} の独立したクローンからなる 3 組のライブラリーを作製した。Dr. A および Dr. Y は、ウイルス感染症を専門としており、様々な感染性ウイルスに対してどのような中和抗体を有しているかについて、得られる結果が興味深い。

インフルエンザ中和抗体

3 組の抗体ライブラリーを用いて 1968 年の A/Aichi/2/68 株(1968 年に香港風邪として大流行した時の代表的株)及び 2004 年度にワクチン株として選ばれた A/Wyoming/3/2003 を抗原にしてスクリーニングした。この研究は、開始されたばかりなので詳細の報告は今後発表する論文および次年度の報告書にまわすが、概略を示す。

1. 3 名共、A/Wyoming/3/2003 に対して極めて多種多様な中和抗体を有している。A/Wyoming/3/2003 を抗原として得られた中和抗体の中に A/Aichi/2/68 を中和できるものは含まれない。

2. A/Aichi/2/68 を抗原として単離された抗体の種類は、Dr. A>Dr. Y > Dr. Nであったが、Dr. A から得られた抗体の中には A/Aichi/2/68 株のみならず A/Wyoming/3/2003 を中和できるものもある頻度で含まれている。

以上の結果は、この 3 組の抗体ライブラリーから得られる抗体を今後徹底的に解析すれば、様々な重要な知見が得られるであろうこと（考察で論じる）、また長期にわたって（1968 年→2003 年）antigen-drift が起こり続けたにもかかわらず中和しつづけることができる抗体の存在（治療薬候補になり得る）、またワクチン株の考え方にも影響を与えること（antigen-drift に影響されない抗体産生を誘導できるワクチンを開発すべきではないか）を示唆している。

ハブ毒に対する抗体

数 10 年にわたってハブ毒調製にかかわった K 氏の協力を得て作製した抗体ライブラリーから出血因子 HR1 に対する強力な中和抗体を既に単離している。この抗体は沖縄ハブの HR1 のみならず奄美ハブの HR1 に対しても強い反応性を示した。本年度は、phospholipase2 に対する抗体 13 種類、及び [TAME]-エステラーゼに対する抗体を 8 種類単離した。更に主任研究者の研究室では、「ヒト抗体大量産生系の導入」をはかっており、HR1 に対する中和抗体については大量生産株 (CHO 細胞をベースとした) の確立を行っている。それを用いてどのような条件を整えれば臨床試験を開始できるか、関係機関との協議を開始した。

D. 考察

過去 8 年間の研究により病原性ウイルス、病原菌の分泌する毒素、ヘビ毒等に対して治

療用ヒト抗体を単離調製しようとするれば、ほぼ work するであろうと期待できる研究戦略をたてられるようになった。人類が抱える最大課題であるエイズ (HIV)、C 型肝炎ウイルス、結核、マラリア等に対しては、ワクチンの有効性も判明しておらず現時点では抗体治療の対象とは考えにくい。

様々なヘルペスウイルス等

VZV やサイトメガロウイルスのようなヘルペスウイルスは、多くのヒトが罹患しており、健常人といえども多くの場合中和抗体を有している。そのことを反映してロタウイルスも含めて AIMS ライブラリーの中に優れた性能の抗体が入っていた。中和エピトープを持つファージ粒子構成分子を精製して抗原として用いる、ウイルス粒子自身を抗原として用いる等、パニング法で既に中和抗体を得た。今後の方針としては、中和エピトープを持つ分子を細胞膜上に強制発現させて細胞自身を抗原とした抗体単離が可能となっている

SARS ウイルスの場合

日本人にとって SARS ウイルスはナイーブ抗原である。そこで抗 SARS 抗体を有するボランティアの協力は期待できない。SARS ウイルスの研究は世界的に進んでおり、S タンパクが中和エピトープを持つことがわかっている。他のグループの結果から判断して S タンパクがナイーブ抗原だといっても AIMS ライブラリーの中に S タンパクに対するかなり強い結合力を示す抗体が含まれることを期待できることから、S タンパクを強制発現させた細胞を抗原として AIMS ライブラリーをスクリーニングすることにより SARS 中和抗体の単離を十分に期待できる。

多くのウイルス性疾患は、以上の 2 例のどちらかに該当する。問題はインフルエンザで

ある。

インフルエンザウイルスの場合

インフルエンザウイルスは、毎年のように抗原性が変化することを特徴とする。薬として開発するには、臨床試験も含めた長期間に及ぶ研究を必要とし、その間に抗原性が変化することを恐れて製薬会社は抗体治療薬開発を対象とした研究を行っていない。我々は昨年度、特定の中和抗体に対するウイルスからエスケープミュータントを単離し、更に中和抗体に変異を導入することによってそのエスケープミュータントを再度中和する能力を獲得できないか試みた。これに成功するなら抗原性の変化に対応できるワイドな中和様式をとる抗体があり得ると期待したからである。この考えは誤っていた。一度抗体からエスケープしたウイルスは、その抗体に変異を導入しても、容易には見出されない。今年度の研究で、A/Aichi/2/68株を抗原として小児科医(Dr. A)から作製した抗体ライブラリーをスクリーニングすると A/Aichi/2/68/のみならず A/Wyoming/3/2003 を中和する能力のある抗体が含まれていることがわかった。40年近い時を経て、更に極めて多くのアミノ酸配列に違いがある両株を中和できる抗体とはどのようなもので、その中和エピトープはどこにあるのか。インフルエンザのHA分子中に知られている5ヶ所の中和エピトープはマウスモノクローン抗体を用いて同定された部位である。我々が行っている解析法は、世界的にも全く新しいものであり、ここで得られる成果は全て新知見である。ヒトの体内の免疫系を直接解析する方が研究者の頭の中で思いつくアイデアより遙かに豊かで優れた結果をもたらすという実感を与えてくれる。

病原菌が分泌する毒素

毒素の多くに対してトキシイドを用いたワクチンによる予防法およびウマ抗毒素血清療法が成立している。この場合は、トキシイドで免疫した献血ボランティアの協力で作製した抗体ライブラリーを用いる方針が成立する。へび毒治療用抗体

へび毒は多くの成分を含む。その中でどの成分を抑えれば症状を軽減できるのかがポイントとなる。ウマ抗血清を調製する際にはそれを気にせず実施してきた。ウマ抗血清での力価測定の基準を、ヒトモノクローン抗体の力価測定に際しどのように換算するのも議論する必要がある。現在出血因子HR1、HR2、phospholipase2、[TAME]-エステラーゼの4種因子に対する中和抗体単離を進めており、それが揃ったところで治療薬にするために必要な条件を明確化する予定である。

E. 結論

第I期(平成9-11年度)、第II期(平成12-14年度)、第III期(平成15-17年度)と続いた本プロジェクトもあと1年を残すのみで、大詰めに迎えている。様々なウイルス性疾患に対して治療用ヒト抗体を単離する目標は、一部達成し、これから行うべき対象についても技術的問題は解決している。今後GMP、GCPレベルでのヒト抗体大量調製と臨床試験の実施に向けた体制づくりを開始する必要がある。antigen-driftのために治療薬開発が困難と予想されたインフルエンザについて、解決の糸口を得た。平成17年度に大きな展開が期待できる。病原菌が分泌する毒素に対する中和抗体単離についても技術的問題は解決している。従来からの力価の検定は抗血清ポリクローン抗体を用いていたので、モノクローン抗体との換算をいかに行うかが今後の課題で

あろう。ヘビ毒についてウマ抗血清を如何にヒトモノクローン抗体に置き換えるか、どのような条件が充たされたときに臨床試験を実施できるか、具体的かつ実践的な真剣な議論が必要と考える。

我々の研究によりファージライブラリー系を用いて作製した抗体ライブラリーから治療目的を充たすヒト抗体単離は確実に成功することが証明されたと判断している。如何にGMP、GCPレベルのヒト抗体大量調製を実現(これに多額の資金が必要)し、どのような環境を整備して臨床試験を行うか、その段階を押し進めるステージに研究が到達したと判断している。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

I. 論文発表

1. K.Higo-Moriguchi, Y.Akahori, Y.Iba, Y.Kurosawa, & K.Taniguchi: Isolation of human monoclonal antibodies neutralizing rotaviruses. *J. Virol.* 78, 3325-3332 (2004).

2. A. Ideno, M.Furutani, T.Iwabuchi, T.Iida, Y. Iba, Y. Kurosawa, H. Sakuraba, T. Ohshima, Y. Kawarabayashi, & T.Maruyama: Expression of foreign proteins in Escherichia coli by fusing with an archaeal F506 binding protein. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 99-105 (2004).
3. S.Hidaka, Y.Akahori, & Y. Kurosawa: Dendrodendritic electrical synapses between mammalian retinal ganglion cells. *J. Neurosci.* 17, 10553-10567 (2004).

II. 学会発表

1. 黒澤良和 「感染症および癌治療薬としてのヒト抗体」 人工血液を作る(5)、 於：慶応大学北里講堂、平成17年2月11日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

細胞表面抗原に対する抗体取得とその抗原同定
特願 2003-406554、
平成15年12月4日出願

インフルエンザウイルスと A 群溶血性連鎖球菌の重感染による劇症化に
対するヒト中和モノクローナル抗体の有効性

分担研究者： 奥野良信 大阪府立公衆衛生研究所感染症部長
研究協力者： 高橋和郎 大阪府立公衆衛生研究所ウイルス課
鈴木定彦 鳥取大学医学部細菌学

研究要旨： インフルエンザウイルスと A 群溶血性連鎖球菌（GAS）をマウスに重感染させると、劇症化して短時間に全てのマウスが死亡することを報告した（J. Virol. 77:4104-4112. 2003.）。今回、重感染マウスにヒト中和モノクローナル抗体を予防目的で投与し、その有効性を検討した。一定濃度以上の抗体を投与すると全てのマウスが生存し、抗体に予防効果のあることを確認した。

A. 研究目的

マウスに致死量以下の A 型インフルエンザウイルスを感染させ、さらに致死量以下の A 群溶血性連鎖球菌（以下、GAS）を重感染させたとき、大部分のマウスは致死的となり、この重感染モデルは劇症型溶連菌感染症の 1 つのモデルとなる。本研究では、この重篤化をヒト型抗インフルエンザウイルスモノクローナル抗体が阻止するか否かを検討することを目的とする。

B. 研究方法

ウイルス： A/New Caledonia/20/99 (H1N1) を用いた。

マウス感染モデル： Balb/c マウス（雌、6 週齢）にインフルエンザウイルス、A/New Caledonia/20/99 を 2500、500、100、20FFU それぞれ 10 匹ずつ感染させ、経時的に生存率を算出した。

マウス重感染モデル：モデル確立のための

感染量の決定。上述同様に Balb/c マウスに致死量以下の A/New Caledonia/20/99 を感染させ、その 2 日後、GAS (STT.1) をそれぞれ 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 CFU (Colony Forming Unit) 感染させ、経時的に生存率を算出し、的確な GAS 感染量を決定した。

NC1 による重感染発症抑制試験：Balb/c マウス（雌、6 週齢）10 匹ずつに、NC1 をそれぞれ 100、30、10 μ g/0.5ml PBS(コントロールは 0.5ml PBS)腹腔内投与し、翌日、A/New Caledonia/20/99 を 20FFU/マウス経鼻接種し、2 日後 STT.1 を 10^6 CFU 経鼻接種した。2 週間観察し生存率を算出した。

肺中ウイルス量および各種臓器中の溶連菌の菌数の決定：重感染後 3 日目に種々の臓器を摘出し、ホモゲナイザーですりつぶし、小片を低速遠心で除去した。肺中インフルエンザウイルスの力価は、マイクロ中和抗体価測定法（J. Clin. Microbiol. 28:1308-1313. 1990.）により決定した。すなわち、MEM 培

地で段階希釈したホモジェネートを MDCK 細胞に感染させ、18 時間後に抗インフルエンザウイルス特異抗体で染色される感染フォーカス数 (FFU) を測定し力価とした。各種臓器中の GAS の菌数の決定はホモジェネートを段階希釈し、T H Y 寒天培地で増殖させ菌数を算出した。

(倫理面への配慮)

動物実験は当研究所の動物実験指針に従い、動物に無用な苦痛を与えないように配慮して適正に行った。

C. 研究結果

(1) マウス感染モデルにおけるインフルエンザウイルス量の決定

Balb/c マウス (雌、6 週齢) にインフルエンザウイルス、A/New Caledonia/20/99 を 2500、500、100、20FFU それぞれ 10 匹ずつ感染させ、経口的に 14 日まで観察し生存率を算出した。500FFU では生存率 0%であったが、100FFU、20FFU ではそれぞれ 80%、100%であった。よって、以後の重感染モデルでは、20FFU のインフルエンザウイルスを用いた。

(2) マウス重感染モデルの確立

既報の如くマウス重感染モデル確立のために、Balb/c マウスに 20FFU の A/New Caledonia/20/99 を感染させ、その 2 日後、GAS (STT.1) をそれぞれ 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 CFU (Colony Forming Unit) 感染させ、経口的に生存率を算出した。 10^5 では全例生存し、 10^6 では生存率は 20%、 10^7 、 10^8 では共に 0%であった。ゆえに、以後の重感染モデルでは 10^6 CFU の溶連菌を用いた。

(3) NC1 による重感染発症抑制試験

Balb/c マウス 10 匹ずつに、NC1 をそれぞれ 100、30、10 μ g/0.5ml 腹腔内投与し、24 時間後に A/New Caledonia/20/99 を 20FFU/マウス経鼻接種し、2 日後 STT.1 を 10^6 CFU 経鼻接種し、経口的に 2 週間観察し生存率を算出した (図 1)。

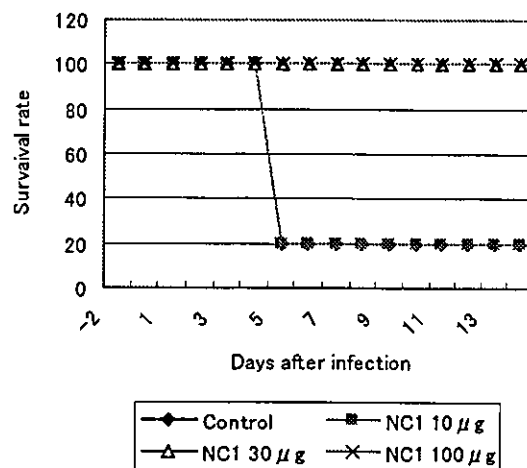


図 1. マウスにおける NC1 の重感染劇症化阻止効果

その結果、NC1 の 100 および 30 μ g の前投与は致死的重感染を防御しマウスは全例生存した。

(4) 肺中インフルエンザウイルス量

5 匹のマウスに重感染させ、3 日目に肺中のインフルエンザウイルスの力価を測定した。図 2 に示すように NC1 非投与群では平均肺中ウイルス量は 2.5×10^5 FFU/肺であったが、NC1 投与群では検出限界である 200FFU 以下であり、ウイルスの増殖は高度に抑制されていた。

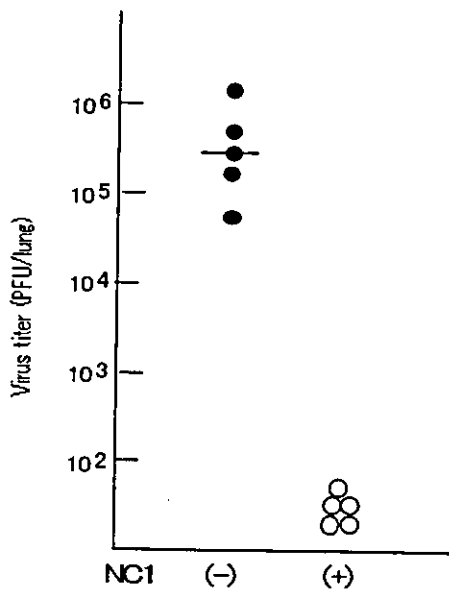


図2. 肺中インフルエンザウイルス量
 (5) 各種臓器中の GAS の菌数の決定
 (4) と同様に3日目に、肺、肝臓、腎臓、脾臓中の GAS 数を測定した。図3に示すように、NC1 非投与群では臓器あたりの平均菌数はそれぞれ、 8.3×10^4 、 6.3×10^2 、54CFU であり、一方、NC1 投与群ではそれぞれ 60、32、0、0CFU であり、肺、肝臓では有意差が認められた。

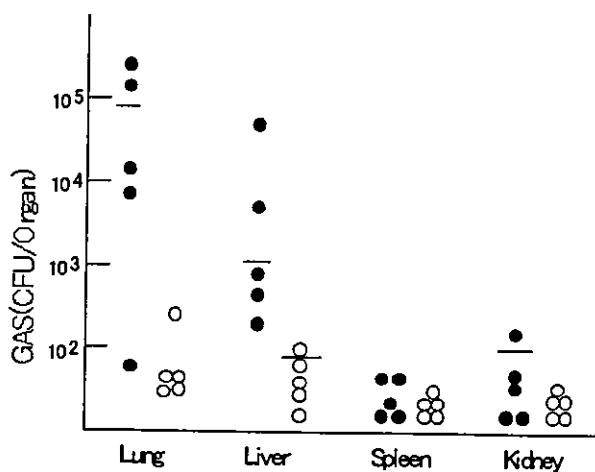


図3. 各臓器中の GAS の菌数

D. 考察

インフルエンザは一般に予後の良い軽症の感染症であるが、高齢者や乳幼児、あるいは基礎疾患を有する人が重篤な経過を辿ることがある。この重症化の要因として大きく2つに分けられる。一つは、インフルエンザウイルス感染そのものが重症化に関わるもので、代表的なものとして高齢者のインフルエンザ肺炎が挙げられる。もう一つは、インフルエンザウイルスと他の病原体との複合要因によって重症化するものである。その多くは細菌が関与し、インフルエンザウイルスの感染が引き金となって細菌増殖が急速に進み、肺炎などの重篤な症状を示すものである。検出される細菌としては、インフルエンザ菌、肺炎球菌、ブドウ球菌、レンサ球菌などがある。スペインかぜ当時、インフルエンザウイルスは発見されておらず、急激に症状が悪化し死亡した犠牲者の大部分から大量の細菌が検出されたため、インフルエンザは細菌感染症と考えられていた。特に検出される頻度の高い細菌があり、これをインフルエンザ菌と名づけた。

A 群溶血性連鎖球菌 (GAS) は、様々な化膿性疾患を起こすばかりでなく、リウマチ熱、糸球体腎炎、しょう紅熱などの全身性疾患の原因ともなる。さらに重篤な疾患として劇症型 A 群連鎖球菌感染症があり、通称「人喰いバクテリア」として恐れられている。筋肉壊死を示すのが特徴で、短時間で急激に症状が悪化し、致命率は非常に高い。スペインかぜ当時、多くの壊死性筋膜炎を伴ったインフルエンザ患者の報告があり、GAS が関与した可能性が高い。疫学的にみても、劇症型 A 群連鎖球菌感染症の発生時期はインフルエンザの流行時期とも重なり、この疾患にインフルエンザウイルス感染の関与が疑われる。

劇症型 A 群連鎖球菌感染症の動物モデルを

作るのは困難で、マウスに経気道的に GAS を感染させても全く症状を示すことはなかった。最近我々は、マウスにインフルエンザウイルスを感染させ、次いで GAS を経鼻的に投与することにより、世界で初めて劇症型 A 群連鎖球菌感染症のモデルを作ることに成功した。一部のマウスには壊死性筋膜炎を認め、この疾患の本態を研究するのに有用なモデルであると考えている。

以前の研究では、マウス抗 A 型インフルエンザウイルスモノクローナル抗体（1 mg、静脈投与）の前投与が生存率を 20%（コントロールマウス抗体の投与）から 75% に有意に改善させることを示した。今回の研究では、ヒト型モノクローナル抗体がマウスの重感染モデルで全例生存させたこと、また、投与量が 100 あるいは 30 μ g でも十分防御したことが新たに確認された。図 2, 3 の結果よりヒト型モノクローナル抗体が肺でのウイルスの増殖を顕著に抑制し、溶連菌の各臓器での増殖を抑制することにより致死的重感染を防御したと考えられる。

以上の成績は、インフルエンザウイルスと細菌の重感染によって起こる劇症化に対し、ヒト型モノクローナル抗体が有効であることを示したものである。高齢者の細菌が関与する致死的重感染や、新型インフルエンザによる重篤化に対する予防のため、ヒト型モノクローナル抗体を用いるのは一つの選択肢と考えられる。

E. 結論

インフルエンザウイルスと A 群溶血性連鎖球菌を重感染させたマウスにヒト型モノクローナル抗体を予防目的で投与し、抗体の抗致死作用を証明した。

F. 研究発表

1. Nakagawa, N., Kubota, R., Maeda, A., and Okuno, Y. Influenza B virus victoria group with a new glycosylation site was epidemic in Japan in the 2002-2003 season. *J. Clin. Microbiol.*42:3295-3297. 2004.
2. Okamoto, S., Kawabata, S., Fujitaka, H., Uehira, T., Okuno, Y., Hamada, S. Vaccination with formalin-inactivated influenza vaccine protects mice against lethal influenza *Streptococcus pyogenes* superinfection. *Vaccine* 22:2887-2893. 2004.
3. Kumagai, T., Nagai, K., Okui, T., Tsutsumi, H., Nagata, N., Yano, S., Nakayama, T., Okuno, Y., Kamiya, H. Poor immune responses to influenza vaccination in infants. *Vaccine* 22:3404-3410. 2004.
4. Kase, T., Morikawa, S., Okuno, Y., Maeda, A., Baba, K. Reinfection with antigenically similar influenza virus observed at a pediatric clinic in Osaka from December 1998 to April 2002. *Proceedings of the International Congress on Options for the control of influenza V.* 304-307. 2004.
5. Okamoto, S., Kawabata, S., Nakagawa, I., Okuno, Y., Goto, T., Sano, K., and Hamada, S. A model of invasive type of *Streptococcus pyogenes* infection after intranasal superinfection in influenza A virus-infected mice. *Proceedings of the International Congress on Options for the control of influenza V.* 733-736. 2004.
6. Okamoto, S., Kawabata, S., Terao, Y.,

- Fujitaka, H., Okuno, Y., Hamada, S. The *Streptococcus pyogenes* capsule is required for adhesion of bacteria to virus-infected alveolar epithelial cells and lethal bacteria-viral superinfection. *Infect. Immun.* 72:6068-6075. 2004.
7. 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
 8. 奥野良信：ワクチン学入門—予防接種で免疫ができるまで—。小児内科、377-381、2004
 9. 奥野良信：SARSを考慮した今冬のインフルエンザ対策について。Sysmex Journal、26：106-113、2004
 10. 奥野良信：インフルエンザの脅威。臨床病理レビュー特集号129：93-101、2004
 11. 奥野良信：インフルエンザ生ワクチン。総合臨床、53(6)：1866-1870、2004
 12. 奥野良信：海外に必要なワクチン—その他の海外に必要なワクチン—。小児科診療、67 (11)：1961-1965、2004

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュトリーサイエンス総合研究事業）

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

糸数清正 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ハブ毒中の主要な出血因子である HR1 を良好に中和する抗体クローンが 3 種得られている。HR2 についても ELISA で反応する抗体クローンが多数分離されているが、HR2 の出血作用を中和する抗体クローンは未だ得られていない。今年度は、新たに受症時の腫脹作用に係わっていると思われる Phospholipase A2 と TAME esterase に対する抗体クローンの単離を試みた。

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はないが、アナフィラキシーショックや即発性の血清病が起こる場合もあるので、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ヒト抗体作製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。Phospholipase A2 (PLA2) や TAME esterase (TAME) 活性を測定するための基質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) PLA2 の精製

PLA2 の精製は、Sephacryl S-200 High Resolution と SP Sepharose fast flow を組み合わせて行った。活性測定の基質には、4-nitro-3(octanoyloxy)benzoic acid を使用した。

(4) TAME の精製

TAME の精製は、Sephacryl S-200 High Resolution と SP Sepharose fast flow を組み合わせて行った。活性測定の基質には、合成基質 Pro-Phe-Arg-MCA を使用した。

2. 抗体価の測定

(1) 抗 TAME 活性の測定 (酵素活性の阻害)

TAME (0.1mg/ml) 5ul に抗 TAME 抗体 0~50ul を加え PBS で総量を 55ul に調整し 4°C, 30min 反応させた。反応後同混合液に 1mM 合成基質 (Pro-Phe-Arg-MCA) 290ul を加え蛍光光度計をタイムスキャンモードにし

て、励起波長 380nm, 蛍光波長 460nm で単位時間あたりの蛍光光度の増加量を測定した。反応は室温で蛍光光度計用のセルを使用して行った。

(2) 細胞毒性試験

細胞毒性試験は、Hep-2 (ヒト・咽頭癌)、RD-18S (ヒト・横紋筋腫)、LLCMK2 (サル・腎上皮細胞)、HeLa (ヒト・子宮頸部癌)、VeroE6 (アフリカミドリザル・腎癌) の 5 種類の細胞を使用し表 1 の方法で行った。

(3) 抗 PLA2 活性の測定 (細胞変性作用の抑制)

96 ウェルの U プレートに PLA2 希釈液 25ul と抗 PLA2 抗体 25ul を混合して室温で 1 時間反応させた後、同プレートに細胞調整液 100ul を接種して細胞が中心に集まらないようにプレートミキサーで弱めに攪拌し、1~2 日後に細胞変性効果 (CPE) を観察した。

3. 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面分を採取した。次に Ficoll を用いた遠心分離により赤血球を除去し 4×10^6 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。

4. 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。

5. ELISA による抗 PLA2, 抗 TAME の測定

精製 PLA2, TAME でコーティングされた EIA/RIA Stripwell Plate (Corning: CatNo. 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 H₂SO₄ で反応を停止させて ABS₄₉₂ を測定した。

6. 動物による中和試験

(1) 試験毒素

ア. 沖縄ハブ毒 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て沖縄ハブ毒 HR1 試験毒素とした。

イ. 奄美ハブ毒 HR1 試験毒素

沖縄ハブと同様に、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、最初に溶出する画分を限外濾過濃縮して奄美ハブ毒 HR1 試験毒素とした。

ウ. 沖縄ハブ・奄美ハブ HR2 試験毒素

Sephacryl S-200HR によるゲル濾過で 2 番目に溶出した画分を 10mM, pH=6.8 Phosphate buffer で平衡化した SP

Sephacryl S-200HR (4.5 \times 27cm) に加え、NaCl を 0 \rightarrow 0.5M まで直線的に上昇させ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。沖縄ハブ毒 HR2 試験毒素と奄美ハブ毒 HR2 試験毒素は別々に作製した。

(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。

(3) 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 0.2 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 10 mm の出血斑を作る毒量を 1 MHD とした。

(4) 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)を等量づつ混合、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。

(5) 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 匹を使用した。

(5) 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)を等量づつ混合、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じた。

(6) 各種抗毒素の抗体価

組み合わせ中和試験にはLot19、Lot23、Lot11、Lot22の4種の抗毒素を使用した。Lot19は沖縄ハブ毒精製HR1免疫、Lot23は沖縄ハブ毒精製HR2免疫、Lot11は沖縄ハブ粗毒免疫、Lot22は奄美ハブ粗毒免疫抗毒素である。各抗毒素の抗体価は表2のとおり。

C. 実験結果

1. 抗TAME抗毒素の中和試験(酵素活性の阻害)

ELISAで強く反応した抗TAME抗毒素8検体の酵素活性阻害作用を調べた。結果を表3に示す。

対照の治療用ハブ抗毒素は酵素活性を良好に阻害したが、抗体ライブラリーから分離された抗TAME抗毒素では活性の阻害作用は殆ど認められなかった。1つの抗原分子に数種の活性エピトープが存在することも考えられるので、蛍光光度にわずかな減少が認められたTAME-010, 035, 086については、それぞれの抗体を組み合わせ再度中和試験を行いたい。なお、ネガティブコントロールにはジフテリア抗毒素を使用した。

2. 抗PLA2抗毒素の中和試験(細胞毒性の抑制)

(1) PLA2, TAMEの各種細胞に対する感受性調査

各種細胞のPLA2とTAMEに対する感受性の調査を行った。感受性試験には、

Hep-2(ヒト・咽頭癌)、RD-18Sヒト・横紋筋腫)、LLCMK2(サル・腎上皮細胞)、HeLa(ヒト・子宮頸部癌)、VeroE6(アフリカミドリザル・腎癌)の5種類の細胞を使用した。結果を表4に示す。

PLA2はLLCMK2, HeLa, VeroE6の3種の細胞に強い細胞毒性を示したが、TAMEに対して強い感受性を示すのはVeroE6細胞だけだった。

(2) 治療用ハブ抗毒素の細胞変性抑制試験

PLA2とTAMEに対して強い感受性を示すVeroE6細胞を用いて、治療用ハブ抗毒素の細胞変性抑制作用を調べた。結果を表5に示す。

TAMEは濃度が低く中和領域が狭くなったが、PLA2では抗原30倍希釈と抗毒素100倍希釈でも中和反応が観察できた。これを濃度で計算すると、抗原0.1mg/mlと抗体0.1mg/mlの中和反応がVeroE6では観察が可能であった。

(3) 被検抗毒素の細胞変性抑制試験

VeroE6細胞を用いて抗体ライブラリーから分離された抗PLA2抗体13種の細胞変性抑制試験を行った。結果を表6に示す。

表から明らかのように、被検抗毒素は抗原コントロールよりむしろ強い細胞変性効果(CPE)を示し、細胞変性を抑制する効果は全く認められなかった。しかし、後日行った被検抗毒素だけの試験でも同様なCPEが観察されたので、被検抗毒素の溶解液がCPEを誘発したものであると思われる。抗毒素の溶解液を細胞培養専用のPBS(-)に調整した後に改めて細胞変性抑制試験を実施したい。

3. 動物を用いた中和試験

(1) 各抗毒素の沖縄ハブ粗毒に対する中和試験(マウス筋注)

沖縄ハブ粗毒と抗毒素を試験管で混合し室温で1時間反応させた後、同混合液0.1mlをマウスの大腿筋に接種して24時間後の局

所の症状を観察した。接種量中に抗毒素が 50ul、毒素が 100ug, 30ug 含まれるように調整した。結果を表 7 に示す。

毒素だけを接種した場合には 30ug でも大腿筋全域に激しい出血を認めたが、抗毒素接種群では出血反応は殆ど認められず、精製 HR1 だけで免疫した Lot19 でも沖縄ハブ粗毒の出血作用を完全に中和した。ハブ毒の中には 2 つの出血因子 (HR1, HR2) があり HR1 はマウスとウサギの両方で出血作用を示すが、HR2 が出血作用を示すのはウサギだけである。今回の実験で抗 HR1 だけの Lot19 が粗毒の出血作用を完全に抑えたのは、HR2 が中和されずに残っていても HR2 はマウスに対しては出血作用を示さないからである。

(2) 各種抗毒素の沖縄ハブ粗毒に対する中和試験 (ウサギ皮内)

(1) と同様に調整した毒素・抗毒素混合液 0.2ml を除毛した白色ウサギの皮内に接種し、24 時間後に麻酔死させて皮膚の裏側から出血斑の大きさを観察した。結果を表 8 に示す。

沖縄ハブまたは奄美ハブ粗毒免疫で作製した抗毒素 Lot11 と Lot22 は沖縄ハブ粗毒の出血作用を比較的良好に中和したが、Lot19 (沖縄ハブ HR1 免疫) と Lot23 (沖縄ハブ HR2 免疫) では、粗毒だけ接種した場合と殆ど差はなかった。Lot19 では HR2 が、また Lot23 では HR1 が中和されず遊離の状態が残っているためと思われる。

そのことを確認するために、Lot19, Lot11, Lot22 の各抗毒素に抗 HR2 抗毒素 Lot23 を混ぜて沖縄ハブ粗毒に対する中和試験を行った。結果を表 9 に示す。

Lot19 では粗毒の出血斑が完全に中和され、また Lot11 と Lot22 でも一部中和できなかったところが完全に中和された。Lot23 の混合によって Lot11 と Lot22 の出血斑が完全に中和されたのは、HR1 に比べて HR2 は免疫

原性が低く、粗毒で免疫した場合でも産生する抗体の絶対量が少ないからである。

D. 考察

世界には約 2,900 種のヘビが生息し、そのうちの約 500 種が毒蛇と云われている。これらの毒蛇による年間罹患率や死亡率は統計上表れるのが病院で治療した比較的重症者が多いので評価するのは難しいが、年間 50 万人以上の毒蛇咬症が発生し、このうち約 4 万人が死亡していると推計されている。

我が国の咬症を起こす毒蛇はハブ (サキシマハブ、ヒメハブを含む)、マムシ、ヤマカガシの 3 種で、年間の咬症者数はハブが約 150 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、準備されている抗毒素は免疫されたウマの血清から造られた抗毒素なので、異種タンパクによる副作用懸念して投与を躊躇し重症化させてしまうことも少なくない。幸い沖縄と鹿児島県の奄美地方では、ハブ咬症に対しては日常的に抗毒素が使用されており、最近では死亡する事例は殆どないが、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 5~10 人の死亡者が発生している。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ている。

今年度は新たに受傷時の腫脹作用に係わっていると思われる PLA2 と TAME に対する抗体産生クローンの単離を試み、ELISA で抗