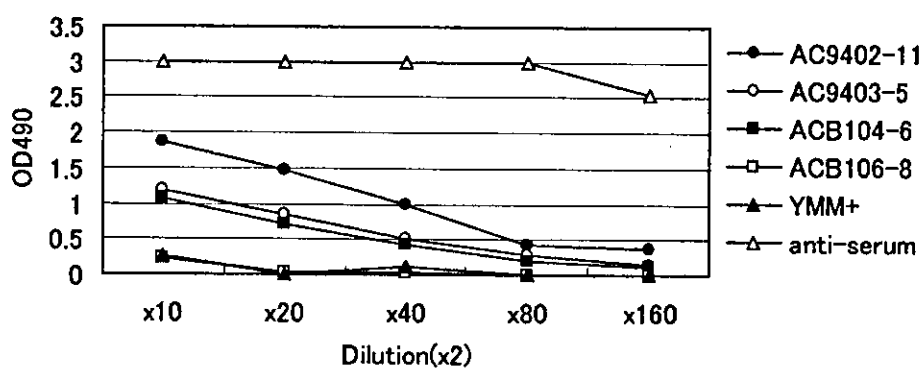
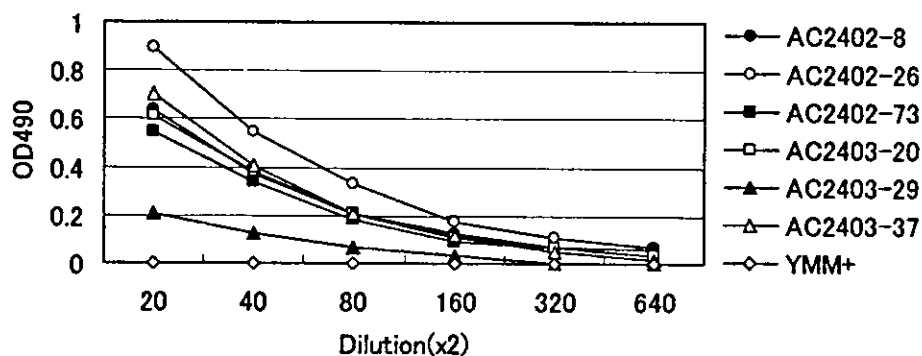


(A) AC94 & ACB1



(B) AC24



(C) AC25

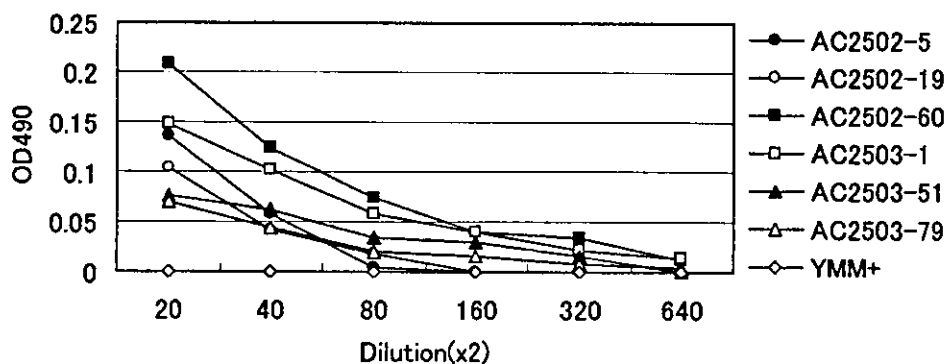


図 1 1. 各キメラ抗体のボツリヌス毒素結合活性

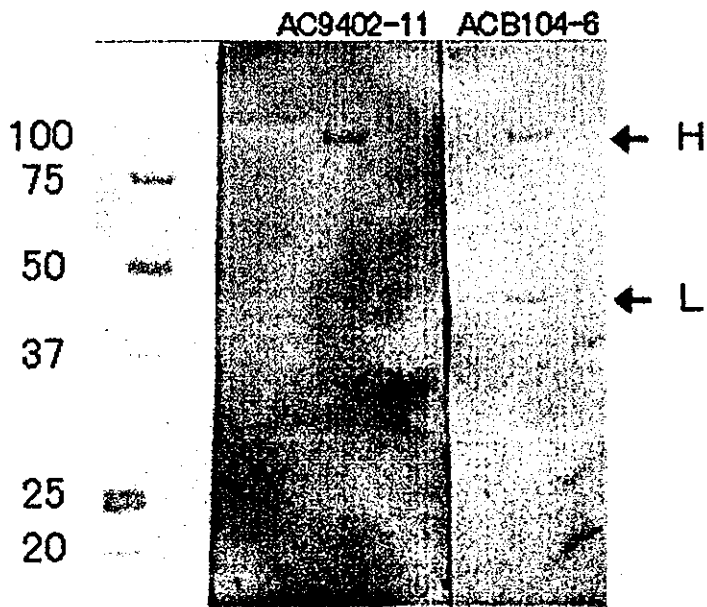


図12. イムノプロットによるAC94、ACB1抗体のボツリヌス毒素への反応性

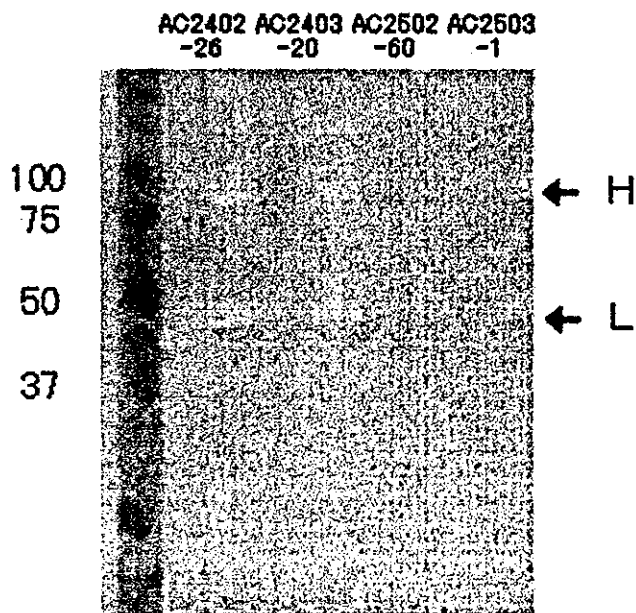


図13. イムノプロットによるAC24、AC25抗体のボツリヌス毒素への反応性

表 1. 各キメラ抗体のボツリヌス毒素中和活性

Clone No.	NT	score	備考
AC9402-11	40LD50	++	接種後 24~30 時間で死亡
AC9403-5	40LD50	+	

ACB104-6	40LD50	++	接種後 19 時間で死亡
ACB106-8	40LD50	+	

AC2402-26	25LD50	+++	完全中和
AC2403-20	25LD50	+	

AC2502-60	25LD50	-	
AC2502-1	25LD50	-	

判定 毒素のみ接種したマウスの死亡時間との差

- 3 時間以内
- + 6 時間以内
- ++ 1 2 時間以内
- +++ 2 4 時間以上

分担研究報告書

免疫ヒトリンパ球からヒト型中和抗体作製の開発研究

分担研究者： 黒澤良和 藤田保健衛生大学総合医科学研究所

研究協力者： 東 成見 藤田保健衛生大学総合医科学研究所

高橋元秀 国立感染症研究所 細菌第二部

小崎俊司 大阪府立大学 農学生命科学研究科

研究要旨

分担研究者らは、数 10 名のドナー由来 B リンパ球を用いて約 1000 億個の独立したクローンからなる抗体ライブラリー(AIMS)を作製した。AIMS ライブラリーより様々なウイルスや毒素に対する治療用抗体単離を実施したが、感染やワクチン接種により特定の毒素等に対して強力な中和活性を示す抗体を有するヒトが協力してくれる場合には、そのヒトの B リンパ球を用いて別途抗体ライブラリーを作製してモノクローン抗体を単離した方がより確実に中和抗体が得られる可能性が示された。現在、様々な毒素に対する治療薬としてウマ抗血清が用いられている。本研究は、ボツリヌス毒素を例に、ボツリヌス毒素治療用ヒト抗体単離調製を目標に実施する。ボツリヌストキソイドによる免疫を獲得している高橋が B リンパ球ドナーとなり、3L の血液に相当する成分血（リンパ球を多数含む画分）を採取し、 1.3×10^{10} のクローンからなる抗体ライブラリーを作製した。抗原に結合する抗体を数 10 種類単離し、それぞれの毒素中和活性を測定した。中和活性を示したものについて次々と IgG 型抗体に変換しつつある。この方法により治療用抗体が単離できれば、極めて応用力の高い技術であり、他の毒素等に対する治療用抗体を全てヒトモノクローン抗体として調製できることを示す。

A. 研究目的

ウイルス感染もしくは病原菌毒素が体内に進入すると、それを中和する能力を持つ抗体が出現する。血清中に抗体が分泌されていることは、その抗体産生細胞が体内のどこかに存在することを意味する。細胞融合によるモノクローン抗体作製法は、このことを利用しているが、ヒトの場合、様々な技術上の問題からマウスの系ほど一般性の高い方法が確立していなかった。ファージディスプレイ法を用いた抗体ライブラリー

作製技術の開発が、状況を一変させた。多数の B リンパ球から mRNA を抽出し、そこに存在する抗体 H 鎖と L 鎖の V 遺伝子をそれぞれ RT-PCR 法により増幅させる。そののちランダムに組み合わせて抗体を発現するファージ粒子の集団として抗体レパートリーを *in vitro* で再構築することが可能となった。ヒトの体内に 10^9 種類の抗体が存在したとして、この方法によりファージ粒子集団の中に同じ種類の抗体をすべて含む状況を再現できるであろうか。抗体は

H鎖とL鎖が一組になって一定の抗原結合特異性を決定する。一方、H鎖もL鎖も高い多様性を示すので、H鎖集団とL鎖集団をそれぞれ増幅させたのち、ランダムに組み合わせたのでは *in vivo* の組み合わせを反映した抗体はほんの一部にすぎないと危惧された。しかし、事実はそうでなかった。まず抗体の抗原特異性を決定する上で、H鎖の貢献度が大きく、さらに多様性の度合いはH鎖が遙かに大きい。そこで *in vivo* における 10^9 種類の抗体といった場合、H鎖としては 10^9 オーダー分だけ増幅する必要がある。一方、L鎖は、確かに特異性決定に重要な貢献をする。しかしその多様性の度合いは相対的に低く、事実上数百種類でほぼ全体をおおう。そのため、H鎖とL鎖を組み合わせた際に 10^{11} オーダーの独立したクローンとすれば *in vivo* の抗体レパートリーはほぼ完全に覆うことになる。さらに重要な点は、抗体レパートリーの二重性である。H鎖におけるVDJ、DNA再編成、L鎖におけるVJ再編成、加えてHL鎖の会合は元々ランダムプロセスである。つまり抗体のナイーブレパートリーはランダムな組み合わせによる産物である。一方、特定の抗原侵入により免疫応答が起こり、その結果としての成熟した抗体からなるレパートリーの方は、その抗体産生細胞数が相対的に増加している。そのため作製された抗体ライブラリーの中に、成熟レパートリーはほぼ完全に内包され、一方ナイーブレパートリーは *in vivo* と完全には同じでないが十分に多様な抗原に対応できるように多様な抗体からなるという性質は保たれる。分担者らは8年近くに及ぶ抗体ライブラリー作製—そのスクリーニングを経験す

る中で、その特性（長所と欠点）をほぼ完全に理解するに至った。最も重要なポイントは、 10^{10} - 10^{11} オーダーの独立したクローンからなる抗体ライブラリーを確実に作製できること、作製後ライブラリーを扱う中でその多様性を維持し続けること、目的とした性質を持つ抗体のスクリーニング法を的確に用いることである。

本研究では、トキシノイドによって免疫された献血ボランティアからその抗血清の中に含まれる抗ボツリヌス毒素抗体をすべて確実にクローン化する技術を開発し、そして治療用ヒト抗体として確立することである。

B. 研究方法

ボツリヌストキシノイドで免疫した献血ボランティア（高橋）より3L相当の成分血（ 1×10^9 細胞）を採取し、mRNAを抽出して抗体H鎖L鎖のV領域をRT-PCRで個別に増幅して充分大きなサイズの抗体ライブラリーを作製する。そのうちボツリヌストキシノイド、更にはニュートロキシンを抗原にしてスクリーニングし、抗原に結合する多数の抗体を単離する。得られた抗体は塩基配列を決定して分類する。それぞれの抗体のボツリヌス毒素中和活性を測定する。中和活性を示した抗体はIgG型ヒト抗体に変換して調製する。

C. 研究結果

1. 抗体ライブラリーの作製

総数 1×10^9 の細胞から mRNA を抽出し、RT-PCR 法で抗体遺伝子を増幅させたのちライブラリーを作製した。H鎖について 7.1×10^8 、L鎖については 5.9×10^8 、λ鎖

5.1 x 10⁸であった。それを組み合わせて作製した抗体ライブラリーのサイズは 1.3 x 10¹⁰である。

2. 抗体ライブラリーのスクリーニング

最初、トキシドを抗原にスクリーニングした。得られた抗体の多くは無毒成分に結合するものであった。最初得られた抗体でブロックして更にスクリーニングして総計 20 種類のクローンが得られた。次に小崎が調製した無毒成分を含まないニューロトキシンを抗原にスクリーニングして総計 46 種類のクローンを入手した。

3. 抗体の中和活性測定

現在まで得られた抗体の中で中和活性を示したものは、BT-015、BT-047、BT-058、BT-175 の 4 種類であった

4. IgG 型抗体の大量調製

本研究では最初 Fab-cp3 抗体として単離される。そこで BT-015 については IgG 型に変換し、大量発現を実施している。

D. 考察

現在ウマ抗血清が治療薬として使われている各種毒素（ボツリヌス毒素、ジフテリア毒素、ガス壊疽毒素、ハブ毒素、マムシ毒素）及びヒト血清より調製された抗体製剤の対象（破傷風毒素、B 型肝炎、D(Rho) 抗原）を組換え技術により作製したヒトモノクローン抗体で置換できるかが問われている。分担者らの研究室では AIMS ライブラリーからジフテリア毒素、破傷風毒素については既に中和抗体単離に成功している。ハブ毒については、本プロジェクトで用いていると同様の特定ボランティアの成分血から中和抗体単離に成功した。ボツリヌス毒素について現在までに得られているデー

タは、この方法の有効性を示唆しており、残り 1 年で IgG 型中和抗体の単離と治療薬として十分な活性を示す抗体の調製更にはそのエピトープ解析を実施する。

E. 結論

ボツリヌス毒素中和抗体を持つボランティアの成分血より抗体ライブラリーを作製し、それをスクリーニングしてボツリヌス毒素に結合する多数の抗体を単離した。その中の 4 種類が毒素中和活性を示した。

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

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ノックアウトされている。そのため、KM マウスを免疫するとヒト抗体が産生される。本研究では、古くから臨床に用いられてきたにもかかわらず不明であった抗ジフテリア毒素中和抗体が認識する中和エピトープについて、KM マウスを用いて検討した。乳幼児の免疫に用いられているジフテリアトキソイドで KM マウスを免疫した。高力価の抗ジフテリア毒素抗体が誘導された KM マウスの脾細胞を用いて、抗ジフテリア毒素ヒトモノクローナル抗体パネルを作製し、それぞれの抗体のジフテリア毒素サブユニットとの反応性とジフテリア毒素中和活性との相関性を調べた。ジフテリア毒素は酵素活性を有する A 鎖（DTA）と細胞結合活性を有する B 鎖（DTB）から構成されている。調製されたヒトモノクローナル抗体パネルの中で、DTB に結合する抗体のすべてに強い中和活性がみられた。また、DTA に結合する抗体の多くのものにも中和活性が認められたが、一部のものには中和活性が認められなかった。それらの主要中和エピトープに対する複数のモノクローナル抗体を組み合わせることによって、現行のウマ抗ジフテリア毒素製剤に代替しうる安全なヒト抗ジフテリア毒素製剤を調製できると思われる。

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ためのヒト抗体の作製技術として現在最も進んでいる技術として、キリン医薬カンパニーの開発した KM マウスがある。KM

マウス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ノックアウトされている。そのため、KM マウスを免疫するとヒト抗体が産生されるため、この方法を用いて効率よくヒト抗毒素製剤を開発できる可能性がある。ウマ抗毒素製剤として、ほぼ100年にわたって使

用されてきたものに北里柴三郎のウマ抗ジフテリア毒素製剤がある。歴史のある製剤であるが、これまで、ヒトの免疫系の認識する中和抗体のエピトープの解析や、ウマ抗ジフテリア毒素製剤に含まれる中和抗体の認識するエピトープの解析はほとんど行われていない。そのため、ウマ抗毒素製剤を代替するヒト抗毒素製剤を開発する際に、本来、どのようなエピトープに対するヒト抗体ができていれば中和活性の高い抗毒素製剤になりうるのか、また、どのようなエピトープに対する抗体が含まれていれば代替ができるのか不明であった。本年度の研究では、乳幼児の免疫に用いられているジフテリアトキソイドでKMマウスを免疫して、抗ジフテリア毒素ヒトモノクローナル抗体パネルを作製し、それぞれの抗体のジフテリア毒素サブユニットとの反応性とジフテリア毒素中和活性との相関性を調べた。

B. 研究方法

ヒト抗体遺伝子を保有していることが確認されたKMマウスを実験に用いた。乳幼児の免疫に用いられている沈降型ジフテリアトキソイドを2週おきに3回、皮下に投与し、その後、液状型のジフテリアトキソイドとフロインド不完全アジュバントとのエマルジョンを2週おきに3回、皮下に投与した。血中に高い抗ジフテリアトキソイド抗体が検出されたマウスに50 μ gの液状型ジフテリアトキソイドを腹腔に投与して、4日後に脾細胞を用いてハイブリドーマを作製した。血清中あるいは培養上清中の抗ジフテリア

毒素ヒトIgG抗体はジフテリア毒素を抗原として用いたELISA法によって定量し、ジフテリア毒素を構成するA鎖(DTA)とB鎖(DTB)のどちらに反応するかはウェスタンブロッティング法によって調べた。培養上清中のジフテリア毒素中和抗体は、Vero細胞を用いたカラーチェンジ法で検出・定量した。

(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

ジフテリアトキソイドで免疫されたKMマウスを用いて、ジフテリア毒素に対するヒトIgGモノクローナル抗体のパネルが作製された(表1)。21クローンの内の3クローンの免疫グロブリンアイソタイプがIgG3 \cdot kであり、残りはIgG1 \cdot kであった。ウェスタンブロッティングによる解析の結果、21クローンの内の5クローンの抗体の認識するエピトープはGTAに存在し、残りの16クローンの抗体のエピトープはGTBに存在することが明らかになった。それぞれの抗体の中和活性をin vitroで調べたところ、9クローンの培養上清に有意の中和活性が認められ、その中の4クローン(8F9、3G8、8E8、4G9)に特に強い中和活性が証明された。強い中和活性を示した4クローンの内の3クローン(3G8、8E8、4G9)のエピトープはGTAに存在し、1クローンのエピトープはGTBに存在していた。

D. 考察

ウマ抗ジフテリア毒素製剤は100年にもわたって臨床に用いられてきたが、製剤に含まれる中和抗体の実態はほとんど明らかになっていない。その一つの理由は、ヒトの完全型の抗体を作製する技術がこれまで確立されていなかったことによると思われる。最近開発されたKMマウスを免疫することによって、ジフテリア毒素に対するヒトの抗体応答を誘導できることから、ジフテリア毒素の中和エピトープを解析することが可能になった。

モノクローナル抗体のパネルの解析から、KMマウスに誘導される抗ジフテリア毒素抗体は、ジフテリア毒素のDTBに対して結合するものが多いと思われる。しかしながら、DTBに結合する抗体の中で強い中和活性を示すものは16クローンの中の1クローン(8F9)だけであり、3クローンの抗体が弱い中和活性を示し、12クローンの抗体はほとんど中和活性を示さなかった。一方、ジフテリア毒素のDTBに対して結合する抗体のクローンは5クローンと少なかったものの、すべてのクローンの抗体が中和活性を示し、3クローン(3G8、8E8、4G9)の抗体は強い中和活性を示した。一般に、細菌毒素の中和は細胞結合活性のあるサブユニットに対して抗体が結合することによるといわれているが、本研究によって初めて、ジフテリア毒素に対するヒト中和抗体のエピトープの主要なものは、細胞結合活性のあるGTBに存在するが、酵素活性のあるGTAにも中和エピトープが存在することが証明された。これらの中和エピトープに対する複数のモノクローナル抗体

を組み合わせることによって、現行のウマ抗ジフテリア毒素製剤に代替しうる安全なヒト抗ジフテリア毒素製剤を調製できるものと思われる。

E. 結論

ジフテリア毒素に対するヒト中和抗体のエピトープの主要なものは、細胞結合活性のあるGTBに存在するが、酵素活性のあるGTAにも中和エピトープが存在することが証明された。これらの中和エピトープに対する複数のモノクローナル抗体を組み合わせることによって、現行のウマ抗ジフテリア毒素製剤に代替しうる安全なヒト抗ジフテリア毒素製剤を調製できるものと思われる。

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

永坂 真也、相内 章、林 隆也、那覇 彰子、関根 綾子、大場 浩美、高橋 元秀、石田 功、千葉 丈：KMマウスを利用した抗細菌毒素ヒト抗体の作製。第27回日本分子生物学会。平成16年12月。神戸。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

表1 ヒト抗ジフテリアモノクローナル抗体の反応性と中和活性

Clone	WB	ELISA	Isotype		Neutralization
			H Chain	L Chain	
10G7	Whole + DTA	+	ND	K	-
4E10	Whole + DTA	+++	γ1	K	-
<u>5E5</u>	Whole + DTA	+++	γ1	K	+
5E11	Whole + DTA	+++	γ1	K	+ / -
6D5	Whole + DTA	++	γ1	K	+ / -
<u>8E9</u>	Whole + DTA	+++	γ1	K	+++
8F11	Whole + DTA	+++	γ1	K	+ / -
9F4	Whole + DTA	++	γ1	K	+ / -
<u>9E5</u>	Whole + DTA	+++	γ1	K	++
6C11	Whole + DTA	+++	γ1	K	+ / -
6B9	Whole + DTA	+++	γ1	K	+ / -
2F3	Whole + DTA	+++	γ1	K	+ / -
6C9	Whole + DTA	+	ND	K	-
9B5	Whole + DTA	+	ND	K	+ / -
2F2	Whole + DTA	++	γ4	K	-
<u>3B4</u>	Whole + DTA	+++	γ1	K	++
<u>3E4</u>	Whole + DTB	++	γ1	K	++
<u>3G8</u>	Whole + DTB	++	γ4	K	+++
<u>4E11</u>	Whole + DTB	++	γ1	K	+
<u>8E8</u>	Whole + DTB	++	γ1	K	+++
<u>4G9</u>	DTB	+	γ4	K	+++

ND : Not Detected

有意な中和活性が検出されたクローンをアンダーラインで示した。Whole+DTA: トリプシン処理したジフテリア毒素の分解されなかったものと DTA の両方にエピトープが存在する。 Whole+DTB: ジフテリア毒素の分解されなかったものと DTB の両方にエピトープが存在する。 DTB: トリプシン処理したジフテリア毒素の分解されなかったものにはエピトープは存在せず、DTB にだけエピトープが存在する。

分担研究報告書

抗毒素製剤の安全性評価に関する調査

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

研究要旨：本研究班では、ウマで作製している抗毒素製剤を安全なヒト型モノクローナル抗体製剤にすることを主な目的としている。そこで、確立しつつあるモノクローナル抗体を製剤化する上で必要なバリデーションデータと方法等について調べた。また、米国 FDA に認可されたボツリヌス抗毒素製剤における安全性及び力価評価も参考資料に加えた。

A. 研究目的

1890 年に Behring と北里がウマで作製した抗毒素を用いた血清療法を考案してから 1 世紀以上にわたり、世界的に種々のウマ抗毒素製剤（ジフテリア、破傷風、ガス壊疽、ボツリヌス、狂犬病、ヘビ等に対して）が用いられてきた。ウマ血清はヒトにとって異種蛋白であり、アレルギーを引き起こすことが多いため、緊急避難的にしか使われていない。そこで、本研究班ではできるだけヒト由来蛋白に近い抗毒素製剤の開発を目指している。その候補製剤として、ボツリヌス毒素を中和するヒト型モノクローナル抗体確立の目処がつきつつある。製剤化する上での安全性、有効性評価の方法について、日米欧の関連規格や 2003 年に FDA に認可されたボツリヌス抗毒素製剤を例に要点をまとめた。

B. 研究方法

日米欧規制当局から出ているバイテク製剤や動物由来原料を用いる医薬品の製造に適用される各種ガイドラインやこれら製剤のウイルス安全性に関する国際シンポジウムでの規制当局者並びに関係企業者の講演内容、更に 2003 年に FDA に認可されたボ

ツリヌス抗毒素製剤の許可申請に提出された資料等を参考に、研究班で現在作成中のボツリヌスに対するヒト型モノクローナル抗体製剤の製剤化段階に必要な安全性及び有効性評価情報を整理した。

C. 研究経過

以下の内容について調査研究を行った。

1) 静注用ヒト免疫グロブリン製剤の安全性に関する FDA の見解、2) 米国で認可された抗ボツリヌスヒト免疫グロブリン（BabyBIG）製剤の安全性及び有効性評価、3) EUにおける生物製剤／バイテク製剤のウイルスバリデーションの現状、4) BSE/vCJD 問題等について調査し、ボツリヌスに対するヒト型モノクローナル抗体製剤の製剤化段階に必要な安全性及び有効性評価情報を整理した。

D. 考察

1) 静注用ヒト免疫グロブリン製剤の安全性に関する FDA の見解

FDA は、IGIV 製剤投与による腎臓、心臓、肺、中枢神経、皮膚血管系の副反応報告に関心を抱いており、全ての IGIV 製剤企業に注意を促す通知（Letter to

Manufacturers Immune Globulin Intravenous (Human) (IGIV) Required Updates to Product Labeling (FDA: October 16, 2003) を出している。静注用ヒト免疫グロブリン製剤は、以下の副反応を引き起こすことがあり、当該製剤の投与時及び投与後、患者の経過について注意を払うよう促している。ヒト型モノクローナル製剤を用いた場合にもこのような副反応が起こる可能性はあり、投与時及び投与後には注意を要する。

- －呼吸器：無呼吸、急性呼吸促迫症候群、TRALI、低酸素血症、肺浮腫、呼吸困難、他
- －心臓血管：急性心停止、血栓症、血管収縮、他
- －神経：昏睡、意識喪失、発作、振戦、他
- －皮膚：SJS、皮膚剥離、多形成紅疹、他
- －血液：汎血球減少症、白血球減少症、溶血、他
- －全身：発熱、硬直
- －筋肉：背中の痛み
- －胃腸：肝機能不全、腹痛

2) 米国で認可された抗ボツリヌスヒト免疫グロブリン (BabyBIG) 製剤の安全性及び有効性評価方法

本製剤はカリフォルニア州の保健局が 1 歳児未満の毒素型 A 又は B による乳児ボツリヌス患者に使用することを目的に米国企業に製造を依頼したものである。凍結乾燥製剤であり、溶解後 2 時間以内に投与を開始し、4 時間以内に投与を終了することになっている (投与速度は、25mg/kg/hr)。

- －製法：ボランティアに 5 価 (A~E) ボツリヌストキソイドを免疫し、A 型及び B 型毒素に対する中和抗体価の高い血漿をプー

ル後、Cohn の低温エタノール分画で精製、UF 濃縮で蛋白濃度 4.5%以上にする。これをウイルス除去ろ過 (75nm x 1 段→35nm x 2 段) し、次いで 1% Triton X-100/0.3% TNBP で処理後、クロマト法で処理溶媒を除去した。無菌ろ過後、凍結乾燥した製剤である。

－性状：凍結乾燥品 (100±20mg 免疫グロブリン)、使用時、2mL の WFI で溶解。構成は、5%免疫グロブリン (IgG 純度>90%、少量の IgA と IgM が混入)、1%アルブミン、5%蔗糖、0.02M リン酸緩衝液。力価は、抗毒素 A 型≥15 IU/mL、抗毒素 B 型≥4 IU/mL で防腐剤は不含。

－ウイルスバリデーション：エンベロープウイルス 4 種、非エンベロープウイルス 2 種を用い、エタノール分画法、ナノろ過、有機溶媒・界面活性剤法でウイルスの不活化、除去能を評価した。エンベロープを有するウイルスでは LRV>13 を示したが、エンベロープを有しないウイルスでは、エタノールによる不活化とウイルスろ過膜による処理が重要であることを示している (表 1)。

－力価：A 型抗毒素≥15 IU/mL、B 型抗毒素≥4 IU/mL (1 IU はマウス腹腔に接種したボツリヌス毒素の 10,000LD₅₀ 相当量を指す)。C, D, E に対する抗毒素力価は測定しなかった。下記に患者血清中の力価推移を示す。無処理のポリクローナル抗体の性もあり、抗体の半減期は、約 4 週間と長い (表 2)。

－臨床治験：129 名の乳児ボツリヌス患者 (122 名は実験室診断で確定) を二重盲検法で評価した。129 名中 65 名には BabyBIG を投与、64 名にはプラセボを投与した。更

に、乳児ボツリヌス患者以外の乳児 293 名で BabyBIG の安全性評価を行った。

その結果、以下の結果が得られ、BabyBIG 投与群に顕著な病状回復が認められた。

—平均入院期間: プラセボ投与群 (5.7 週)、BabyBIG 投与群 (2.6 週) : $p < 0.0001$

—ICU 滞在期間: プラセボ投与群 (3.6 週)、BabyBIG 投与群 (1.3 週) : $p < 0.01$

—人工呼吸器装着期間: プラセボ投与群 (2.4 週)、BabyBIG 投与群 (0.7 週) : $p < 0.05$

—人工流動食期間: プラセボ投与群 (10.0 週)、BabyBIG 投与群 (3.6 週) : $p < 0.01$

また、臨床治験における発疹出現率を調べたところ、BabyBIG 接種前と接種後で何らち外はなかった (表 3)。

3) EU における生物製剤/バイテク製剤のウイルスバリデーションの現状

欧米で使用しているガイドラインには以下のものがあり、特に ICH ガイドラインがウイルス除去及び不活化に関する日米欧共通の要求指針といえる。

ICH : Q5A: Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin, 4-Mar-1997、Q5D: Derivation and Characterization of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products, 16-Jul-1997

WHO: WHO Technical Report Series 878, 1998 (adopted 1996), Annex 1: Requirements for the use of animal cells as In Vitro substrates for the production of biologicals

EU : CPMP/BWP/268/95: Note for

Guidance on Virus Validation Studies: The design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses、CPMP/BWP/1793/02: Note for Guidance on the Use of Bovine Serum in the Manufacture of Human Biological Medicinal Products

USA : CBER Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use, 28-Feb-1997、CBER/CDER Guidance for Industry: Monoclonal Antibodies Used as Reagents in Drug Manufacturing, Mar-2001.

日本 : ICH Q5A adopted in 2000: PMSB/ELD Notification No. 329、Notification No. 1314, 26-Dec-2000: Quality and safety of drugs etc., manufactured with materials derived from human and animal origin、Notification 1046, 10-Jul-2001: Information on the handling of application forms for partial changes relating to securing the quality and safety of drugs, etc., manufactured from components of human or animal origin as a raw material

EU で 1995～2003 年に認可されたバイテク製剤 71 品目の発現宿主細胞を表 4 に、実際にウイルスバリデーションに用いたウイルスの株数を表 5 に示す。通常、4 種類を用いるが、3 種類使用が一番多かった (図 1)。

4) BSE/vCJD 問題等についての調査

狂牛病は、日本においても深刻な問題であり、ウシ由来製品については厳しい管理が求められている。その一因として、狂牛病感染牛の脳を健康な牛に飼料として投与すると極少量で狂牛病を発症することが実験的に確認されていることにある。

実験によると、各 15 頭の牛に飼料として異なる量の BSE 感染牛脳を投与した場合、

- 0.1g : 3 頭が 55、57、62 月目に BSE を発症

- 0.01g : 1 頭が 71 月目に BSE を発症

- 0.001g : 1 頭が 69 月目に BSE を発症

これらの実験的データよりも狂牛病脳の感染力は強いので、BSE 管理は非常に重要な課題である。日米欧から出されている狂牛病関連の主なガイドラインには以下のものがある。

EU : EMEA/410/01Rev.2: Note for Guidance on Minimizing the Risk of transmitting Animal Spongiform Encephalopathies via Human or Veterinary Medicinal Products

USA : FDA Letters to Manufacturers

WHO : Guidelines on Transmissible Spongiform Encephalopathies in Relation to Biological and Pharmaceutical Products

日本 : PFSSB Notification No. 0705001: Standards for raw materials of biological origin

2004 年末までに世界から報告された狂牛病発生数を表 6 に示す。

クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) は従来、中年以降に発生し、発症率は人口百万人に約 1 名とされていたが、近年、脳神

経外科手術に使用する「乾燥ヒト脳硬膜」の移植による CJD 感染が問題になった。しかし、1997 年、英国において BSE 由来と考えられる新変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 (nvCJD) が報告されてから、2005 年 1 月時点で世界中から 165 例の nvCJD が報告されている。

- 英国 : 147 例を確認、5 例が可能性あり。

- フランス : 9 例、イタリア : 1 例、カナダ :

1 例、米国 : 1 例、アイルランド : 1 例。

英国では 2000 年がピーク (28 例)、2003 年 (18 例)、2004 年 (8 例確認、5 例可能性あり)。540~11,000 名が vCJD の潜伏期間にあるとも予想されている。

E. 結論

研究班で現在作成中のボツリヌスに対するヒト型モノクローナル抗体製剤の製剤化段階に必要な安全性及び有効性評価情報を整理した。有効性は、動物を用いた前臨床試験である程度明らかにできるが、臨床試験は健常者を用いた第一相試験 (安全性評価) は可能であるが、患者群を対象にせざるをえない第二相、第三相試験の実施は、わが国では難しいものがある。前臨床試験で抗毒素製剤としての目処がいたら、臨床試験及び製剤化は米国企業等に任せた方が良いかもしれない。

F. 研究発表

1) Matsuoka M. and Sasaki T.: Inactivation of macrolides by producers and pathogens. *Current Drug Targets-Infectious Disorders*, 2004; 4 (3): 217-240.

2) Matsuoka M., Narita M., Okazaki N., Ohya H., Yamazaki T., Ouchi K., Suzuki I.,

Andoh T., Kenri T., Sasaki Y., Horino A., Shintani M., Arakawa A. and Sasaki T.: Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48 (12): 4624-4630.

3) Kenri T., Seto S., Horino A., Sasaki Y., Sasaki T. and Miyata M.: Use of fluorescent-protein tagging to determine the subcellular localization of *Mycoplasma pneumoniae* proteins encoded by the cytoadherence regulatory locus. *J. Bacteriol.*, 2004; 186 (20): 6944-6955.

4) 佐々木次雄：第 14 改正日本薬局方非無菌医薬品の微生物学的品質特性とその要件, p.65-81, 技術情報協会編, 2004.

5) 佐々木次雄：第 14 改正日本薬局方無菌試験法, p.149-162, 技術情報協会編, 2004.

6) 佐々木次雄：日本薬局方 15 局へ向けての新しい考え方, *PDA Journal of GMP and Validation in Japan*, 6(1): 38-45, 2004.

7) 佐々木次雄：滅菌技術, パラメトリックリリースの動向を聞く, *Pharm Tech Japan* 20: 1999-2000, 2004.

8) 佐々木次雄：製薬用水の国際調和, 今後の展開について, *Pharm Tech Japan* 20: 2505-2510, 2004.

9) 上寺祐之, 重松宏, 馬場善三, 熊田直人, 佐々木次雄, 滅菌バリデーションのポイント, *Infection Control* 231-235, 2004.

10) Kunio Kawamura and Hiroshi Abe: A Novel Approach to the Statistical Evaluation of Media Fill Test by the Difference from No Contamination Data, *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, Vol. 58, No. 6, pp. 309- 320. (2004) .

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表 1. BabyBIG 製剤のウイルスバリデーション

プロセス	平均 Log reduction					
	エンベロープウイルス (サイズ nm)				非エンベロープウイルス (サイズ nm)	
	Sindbis (60-70)	HIV-1 (80-100)	PRV (120-200)	BVDV (40-60)	MEMV (22-30)	FCV (35-39)
エタノール分画法	6.6	>9.44	>10.37	6.25	4.06	N.D.
ナノろ過	≥6.84	N.D.	N.D.	≥5.4	N.D.	≥6.92
有機溶媒・界面活性剤	N.D.	>4.51	>5.53	>4.85	0.57	N.D.
累積 Log Red.	≥13.44	>13.95	>15.9	≥16.5	4.63	≥6.92

表 2. BabyBIG 製剤の患者での力価推移

経過時間	力価 (Lot 1)	力価 (Lot 2)
	mIU/mL (平均±S.D.)	
1 日目	N.D.	537.1±213.4
2 週目	106.7±44.6	192.2±71.2
4 週目	90.0±39.2	155.5±56.7
8 週目	54.9±22.8	96.0±33.2
1 2 週目	26.0±20.5	61.4±32.3
1 6 週目	15.6±10.4	33.0±22.3
2 0 週目	7.6±6.6	19.3±14.1

表 3. BabyBIG 製剤の臨床試験における発赤発生率

投与前後における観察日	RCT		OLS
	プラセボ (N=64)	BabyBIG (N=65)	プラセボ (N=64)
N (%)			
前 5 日目	0 (0)	1 (2)	6 (2)
前 4 日目	2 (3)	1 (2)	5 (2)
前 3 日目	3 (5)	4 (6)	6 (2)
前 2 日目	5 (8)	2 (3)	22 (8)
前 1 日目	4 (6)	11 (17)	28 (10)
	5 (8)	9 (14)	32 (11)
	2 (3)	9 (14)	39 (13)
後 1 日目	2 (3)	1 (2)	18 (6)
後 2 日目	1 (2)	2 (3)	13 (4)
後 3 日目	3 (5)	0 (0)	7 (2)
後 4 日目	1 (2)	2 (3)	11 (4)
後 5 日目	2 (3)	0 (0)	5 (2)

表4. EUで1995～2003年に認可されたバイテク製剤71品目の発現宿主細胞。

産生細胞	認可製品数
大腸菌	22
サッカロマイセス	13
CHO細胞	23
他の動物細胞、腹水	9
ヒト細胞	4

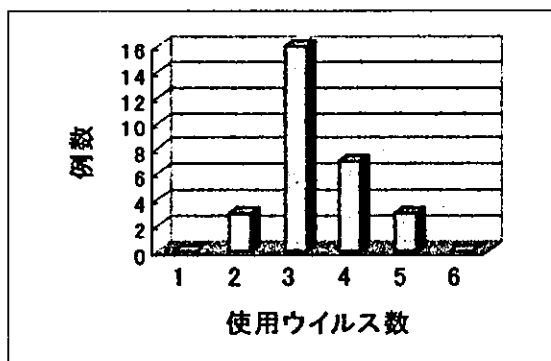
表5. EUガイドラインが推奨するウイルスと実際にウイルスバリデーションに使用したウイルス種。

ウイルス	ガイドライン推奨ウイルス	実際に用いたウイルス
大型DNAウイルス	Herpes virus	Pseudorabies virus (15) Herpes simplex virus (7)
エンベロープ型RNAウイルス	Parainfluenza/Influenza virus Murine retrovirus Sindbis virus	Murine retrovirus (29) Parainfluenza virus (5) BVDV (4)
非エンベロープ型ウイルス	SV40 Poliovirus Animal parvovirus	Reovirus 3 (16) SV40 (13) Poliovirus (10) MVM (11) Bovine/porcine parvovirus (3)

表6. 世界での狂牛病発生報告数

国	事例数
英国	184,089
アイルランド	1,479
ポルトガル	933
フランス	926
スペイン	509
スイス	455
ドイツ	357
他の欧州国	399
日本	14
カンダ+アメリカ	4

図1. ウイルスバリデーションに用いたウイルスの株数。



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)

分担研究報告書

「抗毒素製剤の効率的製造方法の開発に関する研究」

分担課題名「海外のヒト型抗体の製造研究進展調査」

分担研究者 岩城正昭 国立感染症研究所細菌第二部主任研究官

研究要旨：抗毒素製剤は伝統的にウマ等の動物を免疫して作製されている。これら動物由来の抗毒素はヒトに用いた場合に「血清病」を引き起こす危険がある。血清病の懸念を回避するため、より安全と考えられているヒト血漿由来製剤やヒト型 recombinant 製剤などのヒト型製剤への移行が求められている。そこで国内・国外のヒト型抗毒素製剤の製造状況を調査した。また、国外での抗毒素の品質管理体制を調査するため、英国の National Control Laboratory である NIBSC (National Institute of Biologicals Safety and Control) を訪問し、実験動物を使わない抗毒素の力価試験法についての研究の現状を調査した。

A. 研究目的

抗毒素製剤は、毒素に起因する細菌性疾患（破傷風、ジフテリア、ボツリヌス、ガス壊疽）および蛇毒などの動物毒による疾患の治療に用いられる。抗毒素製剤は伝統的にウマ等の動物をトキソイドまたは毒素で免疫して得られる血漿または血清から生産され、疾患の治療に効果をあげてきた。一方で、ヒトにとって異種動物であるウマの血液成分をヒトに投与することにより血清病が起こることが懸念され、ヒト血漿由来製剤が開発された。本研究では、従来のウマ血漿由来製剤に比べてより安全なヒト血漿由来製剤への国内・海外での移行状況を調査し、効率的なヒト型抗毒素製剤製造法

の開発が急務であることを示した。次に、そのために必要な品質管理体制について、animal welfare に配慮した in vitro ボツリヌス抗毒素価測定法について英国の NCL である NIBSC での研究の進展を調査した。

B. 研究方法

国内破傷風抗毒素製剤のウマ由来からヒト由来への移行に関しては、国立感染症研究所における国家検定のための資料等を参考にして集計を行なった。海外の抗毒素製剤については、昨年度本研究班で作製した「抗毒素データベース」および各国 NCL の web サイトから情報を収集

した。英国 NIBSC 訪問は、2004 年 6 月に行なった。

C. 研究結果

1. 国内および海外における抗毒素製剤のウマ由来製剤からヒト由来製剤への移行

国内における破傷風抗毒素製剤は、1970年代まではウマ由来製剤が主であったが、70年代から80年代にかけてヒト由来製剤に移行した(図1)。品質の面から見ると、ウマ製剤に比べヒト製剤の国家検定合格率は著しく向上した(data not shown)。現在国内では(1)抗破傷風人免疫グロブリン、(2)乾燥抗破傷風人免疫グロブリン、(3)ポリエチレングリコール処理抗破傷風人免疫グロブリン、(4)乾燥ポリエチレングリコール処理抗破傷風人免疫グロブリンの4種の剤型が、安定的に供給されている。また、破傷風以外の国内の抗毒素製剤はすべてウマ由来である。

海外では(表1)、調べた限りにおいては、ヒト由来への移行が最も進んでいる破傷風抗毒素製剤でも、依然としてウマ由来製剤が使用されている例が多く見られ、製剤の種類でみて62%がウマ由来であった(生産量についてはデータが得られなかった)。先進国ではヒト由来製剤が比較的多く生産され、逆に発展途上国においてウマ由来製剤が多く生産される傾向がみられた(data not shown)。一方で、国内ではヒト由来製剤が生産されていないジフテリア抗毒素、ボツリヌス抗毒素(乳児ボツリヌス治療用)について、海外では1種類ずつの製剤が生産

されていた。これは、それぞれの製剤種類数に対する割合としては4%と6%に相当した。

2. 抗毒素の in vivo 力価試験法の開発状況

抗毒素の力価試験には一般に、実験動物を使った中和試験法が用いられる(国内では、生物学的製剤基準に収載されている全ての抗毒素で、動物を用いた力価試験を行なうよう定められている)。近年 animal welfare が重視され、抗毒素の力価試験においても、毒素攻撃による苦痛を動物に与えないよう、代替法を開発することが求められている。これは新規のヒト型抗毒素を開発し効率良く生産する上でも必須の技術である。そこでこの分野で先進的な研究が行なわれている英国 NCL である NIBSC を訪問し、現行の動物試験に替わる新規力価試験法、特にボツリヌス抗毒素の力価試験法についての情報を入手した。NIBSC では、(1)マウス in vivo 非致死局所麻痺アッセイ(検出限界 1 mIU/ml)、(2)マウス ex vivo 横隔膜神経麻痺アッセイ(0.4 mIU/ml)、(3)in vitro 酵素活性阻害アッセイ(10 mIU/ml)、(4)ラット初代培養脊髄神経細胞アッセイ(10 mIU/ml)について研究が行なわれていた。これらはすべて抗毒素の中和抗体価を測定するための方法である。このうち(3)は唯一、全く実験動物を使わない完全 in vitro 中和抗体価測定法である。感度は他の方法に比べて高いとはいえないが、今後の改良によっては期待できる方法であろう。また、中和抗体価ではなく結合抗体価を測定する ELISA 法につい