

厚生労働科学研究 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

抗毒素製剤の効率的製造方法の開発に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高橋元秀

平成18年（2006）3月

厚生労働科学研究 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

抗毒素製剤の効率的製造方法の開発に関する研究

平成17年度 研究組織

主任研究者

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

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 生命環境科学研究科 助教授
黒澤 良和 藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 教授
千葉 丈 東京理科大学 基礎工学部 教授
佐々木 次雄 国立感染症研究所 細菌第二部 第二室長
岩城 正昭 国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官

研究協力者

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 生命環境科学研究科 教授
幸田知子 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科
東 成見 藤田保健衛生大学 総合医科学研究所
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
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 (株)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	
主任研究者 高橋 元秀	1
II. 分担研究報告書	
1. 抗ボツリヌス神経毒素ヒト（キメラ）化モノクローナル 抗体の作製 野崎周英・向本雅郁	9
2. 免疫ヒトリンパ球からヒト型中和抗体作製の開発研究 黒澤良和	21
3. 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	25
4. 医薬品製造に用いられる芽胞形成細菌及び毒素の安全性管理 佐々木次雄	31
5. レーザー粒径測定型血小板凝集計を用いたフロキュラシオン 測定系の開発 岩城正昭	41
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	45
IV. 研究成果の刊行物・別刷	47

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究 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

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

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、有効性、安全性および生産性の確保を念頭に短期間で大量の製剤を安定供給するために、複数の手法で基礎的研究を行った。今年度の主な成果は、(1) マウスーヒトキメラ抗体の開発系では、ボツリヌス抗E型神経毒素を完全中和するマウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製を行い、完全中和するマウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマより mRNA を抽出し、cDNA 合成を行い、これをテンプレートとしてサブグループ毎に作製したV領域及びJ領域プライマーにてPCRを行った結果、VH、VL 領域それぞれにPCR増幅バンドが複数検出され、その核酸塩基配列を決定した。さらに、昨年作製したボツリヌス抗A型キメラ抗体についてH鎖L鎖のシャッフル発現実験を行った結果、いずれの組み合わせでも結合活性、中和活性が認められた。(2) 試作したボツリヌストキソイドで免疫したヒトリンパ球より抗体ライブラリーを作製してモノクローナル抗体を単離した。現在までに得られた46種類の抗体中2種類に中和抗体が含まれ、それをIgG型ヒト抗体に変換して中和活性を測定した結果、2種類の抗体の混合により中和能の増強が確認されたが、完全中和には至らなかった。(3) トランスクロモマウスでの開発系では、抗破傷風毒素(TT)ヒトモノクローナル抗体のパネルを作製し、毒素中和活性を検討した。21クローンの抗TT mAbの5クローンの抗体に弱い中和活性が証明され、その2クローンの中和活性は、中和活性を持たない抗TTモノクローナル抗体(TT2)を混合することにより顕著に促進されることが明らかになった。(4) ウマ抗毒素工程中で有芽胞形成菌である数種のクロストリジウム属菌が使用されるため、医薬品製造に必要な要件(特にハード面)について日米間で比較した。また、生物テロ対策上、規制が求められている芽胞形成菌を用いて医薬品を製造する場合の国内外関連規制を整理した。(5) 抗毒素製剤の品質管理に抗原または抗体の測定法にフロキュレーション法が用いられる。従来は抗原抗体複合体物を肉眼で観察しているが、複合体の形成をレーザー粒径測定型デバイスを用いることで、自動化測定による客観性、測定時間の短縮および測定結果の数値化・統計処理による高い定量性を達成することができた。

分担研究者名

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 生命環境科学研究科 助教授
黒澤良和	藤田保健衛生大学総合医科学研究所 教授
千葉 丈	東京理科大学 基礎工学部 教授
佐々木次雄	国立感染症研究所 細菌第二部 室長
岩城正昭	国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官

A. 研究目的

毒素性細菌の感染症のうち、ボツリヌス症、ガスえそ疾患、ジフテリアの治療にはウマ抗毒素製剤が用いられている。この製剤は、国家買上品として供給されており、(財)化学及血清療法研究所で製造される。化血研では、従来、はぶウマ抗毒素、まむしウマ抗毒素も製造しており、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る。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ため、動物血液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)および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、ボツリヌス毒素はバイオテロに使用されることも警告されており、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有効性を毒素中和能による比較検討を行う。さらに、国際的に認可されているこの種の製剤の安全性確保についても検証する。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) 野崎、向本分担研究者：マウスーヒトキメラ抗体の開発系では、*C. botulinum* type E より精製したボツリヌス E 型神経毒素をホルマリンで不活化したトキシイドを定法に従い数匹のマウスに注射後、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と細胞融合を行い、スクリーニングは ELISA 及び中和試験にて行った。マウスモノクローナル抗体 V 領域遺伝子は、RT-PCR 法によって単離した。ハイブリドーマより mRNA を抽出し、cDNA 合成によりテンプレートを得た。Kozak 配列および必要なスプライシングシグナル、酵素 site などを持ったプライマーを VH、VL 領域遺伝子用にそれぞれの V 領域及び J 領域のサブグループ毎に作製し PCR 反応を行った。得られた PCR 増幅バンドを、TA クローニングキットを用いてクローニングし、その核酸塩基配列の決定を ABI PRISM310 Genetic Analyzer を用いて行った。このようにして得た VH、VL 領域遺伝子を HindIII と BamHI で消化し、それぞれを、発現ベクターに組み込み、キメラ抗体発現ベクターを構築した。得られたそれぞれのキメラ抗体 H 鎖及び L 鎖遺伝

子発現プラスミドを等量混合し線状化した後、トランスフェクションし YMM 培地でセレクションを行った。得られた形質転換細胞の中から抗体産生量の高い細胞をスクリーニング、クローニングを行って各キメラ抗体産生クローンを得た。ボツリヌス毒素との結合活性は神経毒素をコートしたプレートを用いてサンドイッチ ELISA 法により測定した。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。

(2)千葉分担研究者：ヒト抗体遺伝子を保有していることが確認された KM マウスあるいはその亜系である KM(D)マウスを実験に用いた。沈降破傷風トキシノイドを1週間隔で3回、皮下注射後、液状破傷風トキシノ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週間隔で3回皮下注射した。血中に高い抗破傷風トキシノイド抗体が検出されたマウスは 50 μ g の液状破傷風トキシノイドを腹腔内追加注射した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破傷風毒素ヒト IgG 抗体は ELISA 法によって定量した。また、それぞれの抗体の活性はウエスタンブロッティング法でも検討した。破傷風毒素中和抗体は、ddY マウスを用いた *in vivo* 法で検出・定量した。

(3)黒澤分担研究者：ボツリヌストキシノイドで免疫した献血ボランティアより 3L 相当の成分血 (1×10^9 細胞) を採取し、mRNA を抽出して H 鎖 L 鎖の V 領域を RT-PCR で個別に増幅して十分大きなサイズの抗体ライブラリーを作製した。ニューロト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した。得られた抗体は塩基配列を決定して分類した。それぞれの抗体のボツリヌス毒素中和活性をマウス法で測定した。中和活性を

示した抗体は IgG 型ヒト抗体に変換して調製し、再度ボツリヌス毒素中和活性を測定した。

(4)佐々木分担研究者：平成 16 年に改正された省令 GMP、関連 ISO 規格、FDA ガイドライン、PIC/S ガイドライン等を参考に、芽胞形成菌に関する取扱い規制を整理した。特に、芽胞形成菌取扱い施設に対する FDA 要件と日本の省令 GMP 要件との違いを明確化し、今後あるべき規制要件を提案する。

(5)岩城分担研究者：抗毒素を用いた品質管理法には、抗原や抗体の定量法の改良が求められる。抗原・抗体反応法でトキシノイドなどの抗原量を定量するフロキュラシオン法について検討した。フロキュラシオンにより生じた抗原抗体複合体の形成を測定するデバイスとして、レーザー粒径測定型血小板凝集計を用いた。トキシノイドは国内二社から供与されたジフテリアトキシノイドを抗毒素はフロキュラシオン用国内参照ジフテリア抗毒素を用いた。

一定濃度のトキシノイド溶液に様々な濃度の抗毒素溶液を加えて凝集計内でインキュベーションしながら、直径 9 μ m 以上の抗原抗体複合体粒子の数を毎秒測定しコンピューターに記録し、統計学的解析をおこなった。

C. 結果

(1)野崎、向本分担研究者：抗ボツリヌス E 型神経毒素中和抗体の作製では、免疫した 5 匹の Balb/c マウスのうち高い ELISA 価を示した 1 匹を用いて細胞融合を行った。その結果、E 型神経毒素に対する抗体陽性ハイブリドーマが 46 クローン得られ、さらに比較的抗体価の高いクローンを 20 クローン選別し、産生する抗体の毒素中和活性を調べた。その結果、E 型神経毒素を完全中和する抗体を産生するハイブリドーマが 10 クローン、神経毒素のみを接種した対照マウスと比較して延命あるいは症状の

緩和が見られたクローンが 6 クローン得られた。また、E 型神経毒素を完全中和するマウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマについては V 領域及び J 領域プライマーにて PCR を行った結果、VH、VL 領域それぞれに PCR 増幅バンドが複数検出された。既知の VH、VL 領域の cDNA 遺伝子と一致しているバンドを選び、その核酸塩基配列を決定した。これらの複数のバンドから、開始コドンから J 領域まで V 領域内で正しいオープンリーディングフレームを取る遺伝子を選んだ結果、それぞれのハイブリドーマ毎に一对の VH、VL 領域遺伝子の組み合わせが得られた。また、これらの V 領域をこれまで得られている抗 A 型毒素抗体の VH 領域及び VL 領域のアミノ酸配列について相同性を比較したところ、相同性は認められなかった。

抗ボツリヌス A 神経毒素中和キメラのうち、AC25、AC94 のそれぞれと AC24 と H 鎖 L 鎖遺伝子の交換発現実験を行った。それぞれの組合せ H 鎖 L 鎖遺伝子発現ベクターを、CHO-DG44 細胞に導入し、新たに 4 種のキメラ抗体産生細胞を得た。これらの細胞の培養上清中のキメラ抗体の毒素結合能を ELISA によって調べたところ、いずれの抗体も毒素と結合することが示され、特に、AC9424 は強い結合活性を示した。また、各培養上清中の毒素中和活性を調べたところ、表 2 に示すように AC2425、AC2524 は強い中和活性を示し、AC2494、AC9424 は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。

(2)黒澤分担研究者：前年度にニューロトキシンを抗原としてスクリーニングを実施し獲得した 40 種類の抗体について中和試験を実施したが中和抗体は含まれていなかった。さらに、再スクリーニングを実施したところ、新規抗体を 7 種類取得した。これまでに取得した中和抗体が偏って得られた為、スク

リーニングでこれらの抗体がこれ以上単離されない工夫を施した。2 種類の抗体タンパク質を精製し、ニューロトキシンのエピトープをマスクして再度スクリーニングを実施したところ、更に 25 種類の新規抗体を取得した。現在、32 種類の抗体について中和試験を実施している。本研究では最初 Fab-cp3 抗体として単離される。そこで取得した中和抗体のうち、エピトープが異なると考えられる 2 種類の抗体)について IgG 変換し、大量調製を実施した。調製した 2 種類の IgG 型抗体を用いて中和試験を実施した結果、抗体単独ではその中和活性は非常に弱い、2 種類の抗体を混合することで作用の増強が確認された。しかし、ボツリヌス毒素を完全に中和するには至らなかった。

(3)千葉分担研究者：破傷風トキソイドで免疫された KM マウスの脾細胞を用いて、破傷風毒素に対する 12 のハイブリドーマクローンに由来するヒト IgG モノクローナル抗体のパネルを作製された。12 クローンの内の 2 クローンのハイブリドーマ由来の抗体の H 鎖免疫グロブリンアイソタイプは IgG3 と IgM であり、残りのすべては IgG1 であった。また L 鎖はすべて κ 鎖であった。ウェスタンブロットティングによる解析を行ったところ、すべての抗体で結合活性が検出されなかったため、すべてのモノクローナル抗体は破傷風毒素の立体構造を認識するものと思われる。それぞれの抗体の中和活性についてマウス中和試験の結果、8 クローンの抗体に有意の中和活性が認められた。そのうち、中程度の中和活性を示す 2 クローンの抗体は EBV-ハイブリドーマ法で作製していた抗破傷風毒素ヒトモノクローナル抗体を 1 : 1 で混合すると、それぞれが単独の場合に示す中和活性よりも、顕著に中和活性が促進された。また、それぞれの抗体の認識するエピトープは異なることが競合 ELISA で証

明された。

(4)佐々木分担研究者：日本では省令 GMP の薬局等構造設備規則に、「作業所のうち、病原性を持つ微生物等を取り扱う区域は、適切な陰圧管理を行うために必要な構造及び設備を有すること。作業所のうち、感染性を持つ微生物等を取り扱う区域は、当該区域で使用した器具の洗浄、消毒及び滅菌のための設備並びに廃液等の処理のための設備を有すること」。「作業所のうち、製造に使用する痘そう病原体、急性灰白髄炎病原体、有芽胞病原菌又は結核菌を取り扱う室及び器具器械は、製品の種類ごとに専用であること」としており、有芽胞病原菌は専用施設で扱わなければならない。現在は、アイソレータや P3 施設が構造設備学的にも充実しており、有芽胞病原菌取り扱い施設を構造的に専用施設にする必要はない。省令 GMP に規定されている「作業所のうち、製造に使用する痘そう病原体、急性灰白髄炎病原体、有芽胞病原菌又は結核菌を取り扱う室及び器具器械は、製品の種類ごとに専用であること」から少なくとも有芽胞病原菌取り扱い施設は、規制対象から外すことを提案する。

(5)岩城分担研究者：抗原抗体複合体の検出は、約 25 Lf/ml のトキシイド 25 u/ml の抗毒素濃度を混合し、直径 9 μ m から 34 μ m の粒子を測定した結果、37 $^{\circ}$ C でインキュベーション開始後約 4 分から複合体粒子が検出され始め、以後約 2 分間、抗原抗体複合体である粒子数は直線的に増加し、繰り返し測定結果もよく一致していた。また、25 u/ml \pm 10%、 \pm 25% の抗毒素溶液と約 25 Lf/ml のトキシイドを混合してそれぞれ測定を行なったところ、抗毒素濃度が 25 u/ml から離れるに従って複合体の形成が遅れた。従って、本検出系を用いてトキシイド抗原量の定量的測定が可能であることが示唆された。さらに、粒

子数が直線的に増加する範囲内に閾値 (50000 粒子) を設定し、それぞれの粒子数増加曲線において、5 段階の閾値に達するまでの時間を測定し、抗毒素濃度と時間をそれぞれ横軸と縦軸に対数目盛でプロットしたところ、回帰曲線に放物線の当てはめが可能であった。またこの放物線回帰への当てはめの妥当性を分散分析により確認した。この回帰曲線の極小値を与える濃度の抗毒素がトキシイドと最適比を構成することを用いてトキシイド抗原量の定量を行なったところ、現行法とよく一致する結果が得られた。

D. 考 察

マウスーヒトキメラ抗体の開発系では、ボツリヌス E 型神経毒素に対する抗体作製を本年度実施し、毒素を完全中和するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマが 10 クローン得られた。しかし、昨年から継続している A 型では単独クローンでは完全中和するクローンが得られず、2 種類を混合した時に初めて毒素を完全中和した。この抗 A と抗 E 中和抗体の質あるいは産生能の違いについては、毒素の構造、トキシイド免疫で誘導される抗体の違い、いくつかの理由が考えられるが、今後の課題である。また、単クローン抗体だけでは十分な中和能がえられないことは、本研究班の分担研究者が取り組んでいる「ヒトリンパ球より抗体ライブラリーを作製してヒトモノクローン抗体の作製」および「ヒト抗体を誘導するトランスクロモマウスの系」でも同様な結果が得られた。単クローン抗体作製の過去の報告でも毒素中和には中和活性が低くとも異なるエピトープを認識する複数の単クローン抗体の混合により高い中和能を導くことが言われている。これは、中和力の強い実用的なキメラまたはヒト抗体製剤を開発するためには、1 種類の単クローン中和抗体だけでは限界

があり、毒素を認識する数種の抗体の組み合わせが必要となる恐れがある。この問題解決には、毒素中和活性を示す抗体側の認識部位を特定することで、少なくとも中和能は低いが、結合活性の強い抗体との組み合わせ等の検討が考えられる。

ボツリヌス、ガスエソ抗毒素の製造には、菌の培養が伴うために有芽胞菌の構造設備等の要件が求められる。しかし、米国等ではハードの要件が緩和されソフトで対応する傾向にあるが、国内の要件は未だに厳しい。有芽胞病原菌取り扱い施設要件を整理した結果、施設は構造壁で仕切った専用施設にする必要はなく、他の製剤製造施設内にアイソレータやP3施設を設置することで、十分であることが分かった。現行省令 GMP の規定では「作業所のうち、製造に使用する痘そう病原体、急性灰白髄炎病原体、有芽胞病原菌又は結核菌を取り扱う室及び器具器械は、製品の種類ごとに専用であること」と記載されている。従って、研究班として、少なくとも有芽胞病原菌取り扱い施設は、規制対象から外すことを提案する。

レーザー粒計測定型血小板凝集計を用いたフロキュラシオン測定系は、現行法は国際的な標準法として長年位置づけられていたが、得られた成績は客観性に乏しく、精度も劣っていたが、改良されないうちに今日に至った。しかしながら、その数値はワクチン製造および品質管理上で重要な指標となっている。今回、測定を自動化し、成績は統計学的解析方法を導入したために精度の高い結果が導かれている。本法を国内外における抗毒素の実生産の品質管理に用いることを検証することにより、製造および品質管理の向上に大きく貢献することが期待される。

E. 結 論

抗 E ボツリヌス毒素中和マウスモノ

クローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製を行い、そのうちの 9-4 抗体の VH 及び VL 領域遺伝子を PCR 法によりクローニングし、抗 E 神経毒素中和キメラ抗体作製が可能になった。昨年度作製した抗 A 型神経毒素キメラ抗体について、AC24, AC25, AC94 由来の H 鎖と AC24 由来の L 鎖を持ったミックスキメラ抗体が 1 個の細胞で産生可能であることが示され、複数のキメラ抗体の混合製剤に比べて、開発時、製造時に低コストになる可能性が示唆された。

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。そのうち、エピトープの異なると思われる 2 種類の抗体について IgG 型に変換して中和試験を実施したところ、抗体を組み合わせ混合することで抗体単独よりも作用の増強が確認されたが、毒素の完全中和には至らなかった。

抗破傷風毒素ヒトモノクローナル抗体パネル (12 種) から 8 種の中和モノクローナル抗体を調製した。複数の抗破傷風毒素モノクローナル抗体の組み合わせにより、顕著な中和活性が観察された。

抗毒素がツールとして品質管理に広く応用されているにもかかわらず、その利用方法が 80 年前と基本的に変わらぬ「フロキュラシオン測定系」の改良に成功した。この成果は国内外の抗毒素製造および品質管理の発展に大いに期待される。

F. 健康危険情報

平成 18 年 3 月中旬にタイ国北部において 150 名以上のボツリヌス食中毒患者が確認された。仏教徒の年祭に集まった約 200 人が共通の昼食 (原因食はタケノコ) を喫食した。うち 152 人が吐

き気、腹痛等の症状を訴え、100人が入院し治療を受けた。しかし、タイ国ではボツリヌス抗毒素製剤を製造していないために、WHOによりボツリヌス抗毒素の提供呼びかけにより、UK, USA (CDC), カナダ (Sanofi-Pasteur) 及び日本から緊急供与された。日本からは23本が持ち込まれ、投与された8名中6名は、12時間後に症状の改善が確認された。ボツリヌス毒素による多数の食中毒患者や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。また、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も考慮する必要がある。

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

なし

2. 学会発表

塚本健太郎、幸田知子、向本雅郁、小崎俊司 ボツリヌス D 型神経毒素はガングリオシド非依存的に作用する。
日本細菌学会 2005年4月(東京)

H. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

【出願番号】特願 2005-110393 (平成17年4月6日出願) 【名称】組換え抗ボツリヌス神経毒素抗体 【発明者】前田浩明、向本雅郁、幸田知子、小崎俊司、高橋元秀

【出願番号】特願 2005-152858 【名称】抗原特異的ヒト抗体を産生する B 細胞からの EBV ゲノムの除去 【発明者】千葉 丈

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

II. 分担研究報告書

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)

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ヒト (キメラ) 化モノクローナル抗体の作製」

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 大阪府立大学大学院農学生命科学研究科

要旨：ボツリヌス中毒症治療用のウマ抗毒素製剤 (抗 A、B、E、F 型抗毒素を含有) には副作用の危険性があるため、より安全で高い中和力価を持つ抗毒素製剤が望まれている。本年度は、昨年度に続き、抗 E ボツリヌス毒素中和マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製を行い、その中の 9-4 抗体の VH 及び VL 領域遺伝子を PCR 法によりクローニングした。さらに、昨年度作製した抗 A 型神経毒素キメラ抗体について、VL 領域間の相同性が高い AC24 と AC25 の H 鎖 L 鎖の交換を行った。その結果、結合活性、中和活性とも認められた。さらに、ほとんど相同性のない AC24 と AC94 の H 鎖 L 鎖を交換した場合でも、弱い中和活性と結合活性が認められた。以上の結果より、AC24, AC25, AC94 由来の H 鎖と AC24 由来の L 鎖を持ったミックスキメラ抗体が 1 個の細胞で産生可能であることが示され、複数のキメラ抗体の混合製剤に比べて低コストになる可能性が示唆された。

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い。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 型に対して治療用ウマ抗毒素製剤が常備されている。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。乳児ポツリヌス症においてはこ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、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。

本研究では上述した目的を達成するために遺伝子組換え技術を利用した抗ポツリヌス神経毒素マウス-ヒトキメラ抗体の作製を試みた。初年度は、抗ポ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 型神経毒素マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製を行った。昨年度は、これらのマウスモノクローナル抗体の V 領域遺伝子をクローニングし、ヒト C 領域遺伝子と結合させ、発現ベクターに組み込んでキメラ抗体産生 CHO 細胞の作製を行った。本年度は、我が国で発生事例の多い E 型に着目し、抗 E 型神経毒素マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製を行い、その

うち 9-4 抗体に関する V 領域遺伝子をクローニングした。さらに、昨年度作製した抗 A 型神経毒素キメラ抗体 3 種 (AC24、AC25、AC94) について、製造時のコストダウンのための検討を行った。

B. 研究方法

(1) 抗原の調製

治療用ポツリヌス抗毒素の作製時に使用されている *C. botulinum* type E 35396 株より精製した E 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、神経毒素 ($10 \mu\text{g}/\text{マウス}$; $10^5\text{LD}_{50}/\text{マウス}$) を静脈内より投与した。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。スクリーニングは、後述の ELISA 及び中和試験にて行った。

(4) 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。

(5) V領域遺伝子クローニング

マウスモノクローナル抗体V領域遺伝子は、RT-PCR法によって単離した。ハイブリドーマより QuickPrep micro mRNA Purification Kit (Amersham Bioscience) を用いて mRNA を抽出し、Superscript II 逆転写酵素 (Invitrogen) による cDNA 合成を行って、これをテンプレートとし、Kozak 配列および必要なプライミングシグナル、酵素 site (HindIII、BamHI) などを持ったプライマーを VH、VL 領域遺伝子用にそれぞれの V 領域及び J 領域のサブグループ毎に作製し、Advantage HF-2 PCR Kit (BD Bioscience) を用いて当該キットのプロトコールに従って PCR 反応を行った。得られた PCR 増幅バンドを、TA クローニングキット (Invitrogen) を用いてクローニングし、その核酸塩基配列の決定を ABI PRISM310 Genetic Analyzer (PE バイオシステムズ) を用いて行った。

(6) キメラ抗体遺伝子発現プラスミドの構築

このようにして得た VH、VL 領域遺伝子を HindIII と BamHI (TAKARA) で消化し、それぞれを、発現ベクターである CAG- γ 1、CAG- κ (J. Immunol., 167, 3266, 2001) に組み込み、キメラ抗体発現ベクターを構築した。CAG- γ 1 は、ヒト抗体 C 領域 γ 1 鎖の遺伝子及び選択マーカーとしてのネオマイシン耐性遺伝子 (neo^r) を持ち、CAG- κ はヒト抗体 C 領域 κ 鎖の遺伝子及び選択マーカーとしてのジヒドロ葉酸

還元酵素遺伝子 (dhfr) を持っている。

(7) キメラ抗体産生細胞の作製

得られたそれぞれのキメラ抗体 H 鎖及び L 鎖遺伝子発現プラスミドを等量混合し PvuI 消化により線状化した後、CHO-DG44 細胞へ Trans-IT LT-1 (Mirus) を用いてトランスフェクションし、300nM MTX、0.5mg/ml G418、10% 透析 FBS を含む YMM 培地 (化血研自家製培地) でセレクションを行った。得られた形質転換細胞の中から抗体産生量の高い細胞をスクリーニングし、次いで限界希釈法によるクローニングを行って各キメラ抗体産生クローンを得た。

(8) ELISA

ボツリヌス毒素との結合活性は神経毒素 (0.5 μ g/well) をコートしたプレートを用いて測定した。ブロッキングには 0.2% BSA、2 次抗体にはマウス抗体の場合、ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG (H+L) (1:5000, BioRad) を、キメラ抗体の場合ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG (H+L) (1:5000, BioRad) を用い、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。

キメラ抗体の濃度は、ヤギ由来抗ヒト IgG Fc 抗体 (CAPPEL) とヤギ由来抗 (h) Ig trivalent-HRP (ZYMED 社) を用いたサンドイッチ ELISA 法により測定した。この際、市販のヒト IgG1 抗体 (Biogenesis) の希釈系列を作製し、それを標準試料とした。

(9) 中和試験

ボツリヌス毒素と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。

(倫理面への配慮)

マウスの取扱いは動物保護に配慮し、動物倫理規定を遵守して行われた。

C. 研究結果

(1) 抗 E 神経毒素中和抗体

5 匹の Balb/c マウスにおいて 3 回のトキシイド免疫後の抗ボツリヌス E 型神経毒素の ELISA 抗体価はいずれのマウスにおいても 500,000 倍以上に上昇していた。このうち 1 匹を用いて細胞融合を行った。その結果、E 型神経毒素に対する抗体陽性ハイブリドーマが 46 クローン得られた。これら 46 クローンの内、比較的抗体価の高いクローンを 20 クローン選別し、産生する抗体の毒素中和活性を調べた。その結果、E 型神経毒素を完全中和する抗体を産生するハイブリドーマが 10 クローン、神経毒素のみを接種した対照マウスと比較して延命あるいは症状の緩和が見られたクローンを 6 クローン得られた。(表 1)

E 型神経毒素を完全中和するマウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ (9-4) より mRNA を抽出し、cDNA 合成を行って、これをテンプレートとしてサブグループ毎に作製した V

領域及び J 領域プライマーにて PCR を行った。その結果、VH、VL 領域それぞれに PCR 増幅バンドが複数検出された。その中からサイズの既知の VH、VL 領域の cDNA 遺伝子と一致しているバンドを選び、その核酸塩基配列を決定した。これらの複数のバンドから、開始コドンから J 領域まで V 領域内で正しいオープンリーディングフレームを取る遺伝子を選んだ結果、それぞれのハイブリドーマ毎に 1 対の VH、VL 領域遺伝子の組み合わせが得られた。その核酸塩基及びアミノ酸配列を図 1、2 にそれぞれ示す。また、これらの V 領域をこれまで得られている抗 A 型毒素抗体の VH 領域及び VL 領域のアミノ酸配列について相同性を比較したところ、相同性は認められなかった (図 3、4)。

(2) 抗 A 神経毒素中和抗体

抗 A 神経毒素中和キメラのうち、AC25、AC94 のそれぞれと AC24 と H 鎖 L 鎖遺伝子の交換発現実験を行った。それぞれの組合せ H 鎖 L 鎖遺伝子発現ベクターを、CHO-DG44 細胞に導入し、新たに 4 種のキメラ抗体産生細胞 (AC2425、AC2524、AC2494、AC9424) を得た。これらの細胞の培養上清中のキメラ抗体 (抗体濃度 14.9~40.5 μ g/ml) の毒素結合能を ELISA によって調べたところ、いずれの抗体も毒素と結合することが示された (図 5)。特に、AC9424 は強い結合活性を示した。また、各培養上清中の毒素中和活性を調べたところ、表 2 に示すように AC2425、AC2524 は強い中和活性を示し、

AC2494, AC9424 は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。

D. 考察

E 型神経毒素を完全中和するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマが 10 クローン得られた。A 型では完全中和するクローンが得られず、2 種類を混合した時に初めて毒素を完全中和した。この抗 A と抗 E 中和抗体の質あるいは産生能の違いについては、今回明らかにすることができなかったが、いくつかの理由が考えられる。毒素を完全中和するには、細胞の受容体に結合する領域を認識する抗体が最も効果的であると考えられる。ボツリヌス神経毒素の受容体への結合領域についてはまだ完全に解明されていないが、1 次構造ではなく高次的な構造として受容体に結合すると考えられている。A 型神経毒素において、ポリクローナルな抗体では完全中和することから、モノクローナルな抗体ではその領域を完全に包含することが出来ない可能性が考えられる。また、ホルマリン処理することによって、その領域に構造変化を起こし、その結果、受容体結合領域に対する抗体が出来にくいかもしれない。今後は、トキシイドのみでの免疫ではなく、トキシイドでの免疫後に神経毒素での免疫を数回行うことにより単独で完全中和する抗体が作成できるかを検討する必要がある。

抗 E 型神経毒素に対するマウス中和

モノクローナル抗体のうち 1 種 (9-4) の V 領域遺伝子を PCR クローニングし、そのアミノ酸配列を明らかにした。これまでに得られた抗 A 型神経毒素に対する 4 種類のマウス中和モノクローナル抗体の V 領域とはほとんど相同性が認められず、抗体の V 領域のアミノ酸配列からエピトープの類似性などを議論することは出来なかった。

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ピトープ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。このような知見から、中和力の強い実用的なキメラ抗体製剤を開発するためには、1 種類の中和抗体だけでは限界があるかも知れない。複数のキメラ抗体を混合した製剤を想定した場合、問題になるのは開発や製造のコストである。1 つの細胞が 1 つの抗体を産生し、それらを混合する場合、前述のコストはその抗体数に比例して増大する。

昨年、作製した抗 A 神経毒素中和キメラ抗体のうち AC24 及び AC25 抗体の VL 鎖に関して CDR3 内の 1 個のアミノ酸 (Arg-Tyr の変化) が異なるだけで、後は全く同じアミノ酸配列を持っていた。もし、このアミノ酸がそれほど重要でない場合には、AC24 と AC25 抗体の H 鎖と AC24 か AC25 抗体のどちらかの L 鎖を組み合わせることにより、両方の特異性を併せ持つ二重特異性抗体分子が作製できる。さらに、医薬品を製造する観点から見ても、二種類の抗体を一つの細胞で製造すること

が出来るので、コスト低減につながる。今年度、AC24 と AC25 抗体の H 鎖 L 鎖交換を行ったところ、そのいずれの場合も毒素結合能と中和活性を保持していた (図 6)。

さらに驚いたことに、ほとんど相同性のない AC24 と AC94 の H 鎖 L 鎖を交換した場合でも、弱い中和活性と結合活性が認められた (図 6)。H 鎖を AC94、L 鎖を AC24 からなる AC9424 抗体の結合活性は AC94 の結合活性と同じぐらい非常に強いものであった。一方、L 鎖を AC94、H 鎖を AC24 からなる AC2494 抗体の結合活性は AC24 抗体と同程度の抗原結合活性であった。これらの結果から、ボツリヌス毒素中和活性を持つ抗体の結合活性、中和活性は主に VH 領域に依存していると推定された。

以上の結果より、H 鎖として AC24、AC25、AC94 由来を、L 鎖として AC24 由来を持ったミックスキメラ抗体が 1 個の細胞で産生可能であると考えられ、これら 3 種類の抗体を混合した場合と同様に中和力価の向上が期待できる。さらに、3 種の抗体の混合製剤よりも、開発時や製造時に低コストになる可能性が示唆された。

E. 結論

抗 E ボツリヌス毒素中和マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製を行い、その中の 9-4 抗体の VH 及び VL 領域遺伝子を PCR 法によりクローニングし、抗 E 神経毒素中和キメラ抗体作製が可能になった。

昨年度作製した抗 A 型神経毒素キメ

ラ抗体について、AC24、AC25、AC94 由来の H 鎖と AC24 由来の L 鎖を持ったミックスキメラ抗体が 1 個の細胞で産生可能であることが示され、複数のキメラ抗体の混合製剤に比べて、開発時、製造時に低コストになる可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsukamoto K, Kohda T, Mukamoto M, Takeuchi K, Ihara H, Saito M and Kozaki S (2005) Binding of Clostridium botulinum type C and D neurotoxins to ganglioside and phospholipids: novel insight into the receptor for clostridial neurotoxins. *J. Biol. Chem.* 280:35164-35171.
- 2) Takeda M, Tsukamoto K, Kohda T, Matsui M, Mukamoto M and Kozaki S (2005) Characterization of the neurotoxin produced by isolates associated with avian botulism. *Avian Dis.* 49:376-381.
- 3) Arimitsu H, Lee J, Sakaguchi Y, Hayakawa Y, Hayashi M, Nakamura M, Takai H, Lin S, Mukamoto M, Murphy T and Oguma K (2004) Vaccination with

recombinant whole heavy chain fragments of *Clostridium botulinum* type C and D neurotoxins. Clin. Diagnos. Lab. Immunol. 11:496-502.

2. 学会発表

1) 塚本健太郎、幸田知子、向本雅郁、小崎俊司 ボツリヌスD型神経毒素はガングリオシド非依存的に作用する。日本細菌学会 2005年 4月(東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許出願

【出願番号】特願 2005-110393 (平成17年4月6日出願) 【名称】組換え抗ボツリヌス神経毒素抗体 【発明者】前田浩明、向本雅郁、幸田知子、小崎俊司、高橋元秀

2. 実用新案登録

なし

3. その他

表1. ハイブリドーマ培養上清の毒素中和活性

clone No	12 h	15 h	20 h	24 h	36 h
1-7	-	-	d		
1-9	-	-	-	-	-
2-5	-	-	-	-	-
2-7	d				
2-8	-	-	-	-	-
3-2	-	-	d		
3-3	d				
3-4	-	-	-	-	-
5-7	d				
6-1	+++	d			
7-8	-	-	d		
8-2	-	-	-	-	-
9-4	-	-	-	-	-
9-5	-	-	-	-	-
9-6	d				
9-8	-	-	-	-	-
10-1	++	d			
10-3	+	d			
10-6	-	-	-	-	-
10-9	-	-	-	-	-
medium	d				

死亡； d、症状の程度； +++>++>+、無症状； -