

10 20 30 40 50 60 70 80
 TCGAAGCTT GCCGCCACCATGAAC TTTGGGCTGAGCTTGATTTTCCTTGCCTTGT TTTAAAAGGTGCCAGTGTGAAGT
 HindIII Kozak METAsnPheGlyLeuSerLeuIlePheLeuValLeuValLeuLysGlyValGlnCysGluVal
 90 100 110 120 130 140 150 160
 TAATCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAGGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTT
 AsnLeuValGluSerGlyGlyGlyLeuValArgProGlyGlySerLeuLysLeuSerCysAlaAlaSerGlyPheThrPhe
 170 180 190 200 210 220 230 240
 TCAGTGACTATGCCATGTCTGGGTTCGCCAAATTCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTCACATCCATTAGTACTGATGGT
 SerAspTyrAlaMETSerTrpValArgGlnIleProGluLysArgLeuGluTrpValThrSerIleSerThrAspGly
 250 260 270 280 290 300 310 320
 GACACCTACTATCCAGACAATGTGAGGGGCCGATTCACCGTCTCTAGAGATAATGCCAGGAACATCTGTACCTGCCAAAT
 AspThrTyrTyrProAspAsnValArgGlyArgPheThrValSerArgAspAsnAlaArgAsnIleLeuTyrLeuGlnMET
 330 340 350 360 370 380 390 400
 GAGCAGTCTGAGGTCTGAAGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGAGGGGGGAGTCATTTCTACTGGGGTCAAGGAGCC
 SerSerLeuArgSerGluAspThrAlaMETTyrTyrCysAlaArgGlyGlySerHisPheTyrTrpGlyGlnGlyAla
 410 420 430 440
 TCAGTCACTGTCTCTGCAGGTGAGTGGATCCAGATCTTC
 SerValThrValSerAla BamHI BglIII

図 1. 抗 E 型毒素中和 9-4 抗体の VH 領域の核酸塩基配列とアミノ酸配列

10 20 30 40 50 60 70 80
 TTGGAAGCTT GCCGCCACCATGAGGGCCCTGCACAGTTTTTTGGAATCTTGTGTCTGGTTTCCAGGTATCAAATGTGA
 HindIII Kozak METArgAlaProAlaGlnPhePheGlyIleLeuLeuPheTrpPheProGlyIleLysCysAsp
 90 100 110 120 130 140 150 160
 CATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTCCATGTATACATCTCTAGGAGAGAGAGTCACTATCACTGCAAGGCCAGTCAGG
 IleLysMETThrGlnSerProSerSerMETTyrThrSerLeuGlyGluArgValThrIleThrCysLysAlaSerGlnAla
 170 180 190 200 210 220 230 240
 CCATTAATAGCTATTTAAGTTGGTTCAGCAGAAACCAGGGAAATCTCCTAAGACCCTGATCTATCGTGCAAACAGATTG
 IleAsnSerTyrLeuSerTrpPheGlnGlnLysProGlyLysSerProLysThrLeuIleTyrArgAlaAsnArgLeu
 250 260 270 280 290 300 310 320
 GTAGATGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGCAAGATTTTCTCTCACCATCAGCAGCCTGGACTATGA
 ValAspGlyValProSerArgPheSerGlySerGlySerGlyGlnAspPheSerLeuThrIleSerSerLeuAspTyrGlu
 330 340 350 360 370 380 390 400
 AGATATGGGAATTTATTATTGTCTACAGTATGATGAGTTCCGCTCACGTTCCGGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAC
 AspMETGlyIleTyrTyrCysLeuGlnTyrAspGluPheProLeuThrPheGlyAlaGlyThrLysLeuGluLeuLys
 410 420
 GTAAGTGGATCCAGATCTAG
 BamHI BglIII

図 2. 抗 E 型毒素中和 9-4 抗体の VL 領域の核酸塩基配列とアミノ酸配列

A2-4VH	1:MKLWLNWIF-LVTLLNG-IQCEVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFTDYMSWVRQ	58
A2-5VH	1:MEWSWVFLFLSVTTG--VHSEVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSFTGYMHVVKQ	58
A9-4VH	1:MAV-LGLLFCLVTFP-SCVLSQVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTSYGVHVVRQ	58
AB1VH	1:MDSRLNLVF-LVLILKG-VQCDVQLVESGGGLVQPGGSRKLSAASGFTFSSFGMHVVRQ	58
E9-4VH	1:MNFGLSLIF-LVLVLKG-VQCEVNLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSDYMSWVRQ	58
	* . . * * * * . * * . * * . * * . * * . . . * * . *	
A2-4VH	59:PPGKALEWLGFI RNKANGYTTE-YSASVKGRFTISRDNQSILYLQMNTRAE DSATYYC	117
A2-5VH	59:SHGKSLEWIGRVNPNNGGTS- YNQKF--KGKAILTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYC	115
A9-4VH	59:SPGKGLEWLGVIWSSGS-TDYNAAFIS-RLS--ISKDNSKQVFFKMNSLQANDTAIYYC	114
AB1VH	59:APEKGLEWVAYISSGSS--T-IYYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSED TAMYYC	115
E9-4VH	59:IPEKRLEWVTSISTDGD--T--YYPDNVRGRFTVSRDNARNILYLQMSL RSED TAMYYC	114
	. . * * * * * * * * * * * * * * * * *	
A2-4VH	118:ARDGG-----YF--DYWGQGTTLTVSS	137
A2-5VH	116:ASPPTTVVAT--DWYFDVWGAGTTVTVSS	142
A9-4VH	115:ARKRGY---YGYNAMDYWGQGTSVTVSS	140
AB1VH	116:ARKGFGIDYYGSSFAMDYWGQGTSVTVSS	144
E9-4VH	115:ARGGS--HF-----YWGQGASVTVSA	133
	* * * * * . . * * * * . . * * * * . . * * * * . . * * * * .	

図3. 抗ボツリヌス毒素マウス抗体 VH 領域のアミノ酸配列比較

A2-4VL	1:MESQAQVFLSLL-LWVSGT-CGNIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKNY	58
A2-5VL	1:MDSQAQVFLSLL-LWVSGT-CGNIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKNY	58
A9-4VL	1:MDFQVQIFSFLLISASV I I SRGQIVLTQSPA I MSASPGEKVTMTCSASSSVS-----Y	53
AB1VL	1:MRFQVQVL-GLLLWISGAQC-DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKS--IS---K-Y	52
E9-4VL	1:MRAPAQFFGILLFWFPGIKC--DIKMTQSPSSMYTSLGERVTITCKASQAIN-----S-Y	52
	* . . * . . * * * * * * . . * * * * . * * * *	
A2-4VL	59:LAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLT I SSVQAEDLAVYYCHQYL	118
A2-5VL	59:LAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLT I SSVQAEDLAVYYCHQYL	118
A9-4VL	54:MHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLT I SSMEAEDAATYYCQQWS	113
AB1VL	53:LAWYQEKPGKTNKLLIYSGSTLQSGIPSRFSGSGSGTDFLT I SSLPEPDFAMYYCQQHN	112
E9-4VL	53:LSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVP SRFSGSGSGQDFSLT I SSLDYEDMGIYYCLQYD	112
	. . * * * * . * . * * *	
A2-4VL	119:SSR-TFGGGTKLEIK	132
A2-5VL	119:SSY-TFGGGTKLEIK	132
A9-4VL	114:SNPYTFGGGTKLEIK	128
AB1VL	113:EYPYTFGGGTKLEIK	127
E9-4VL	113:EFPLTFGAGTKLELK	127
	. . *	

図4. 抗ボツリヌス毒素マウス抗体 VL 領域のアミノ酸配列比較

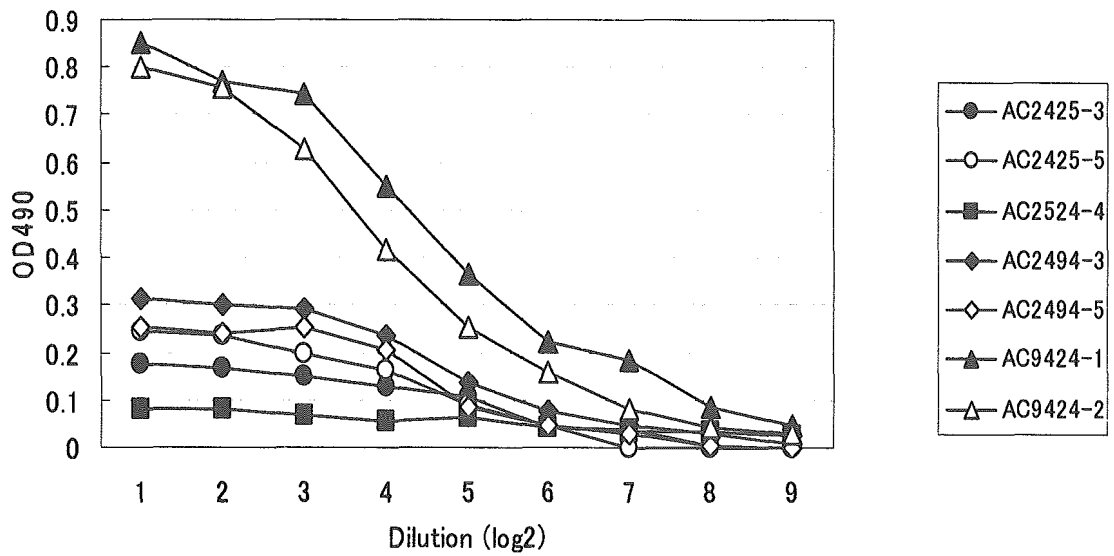


図5. 各キメラ抗体のボツリヌス毒素結合活性

表2. 各培養上清中のキメラ抗体のボツリヌス毒素中和活性

抗体	H鎖由来	L鎖由来	抗体濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	score
AC2425-3	AC24	AC25	14.9	+++
AC2425-5	AC24	AC25	20.5	+++
AC2524-4	AC25	AC24	18.5	+++
AC2494-3	AC24	AC94	25.5	++
AC2494-5	AC24	AC94	40.5	-
AC9424-1	AC94	AC24	20.4	+
AC9424-2	AC94	AC24	16.7	++
培地	-	-	0	-

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
 + 12時間以内
 ++ 24時間以内
 +++ 完全中和

	抗体	H鎖		
		AC24	AC25	AC94
L鎖	AC24	○	○	△
		○	△	◎
	AC25	○	○	-
		○	△	-
	AC94	△	-	○
		○	-	◎

図6. H鎖L鎖シャッフル抗A型毒素中和キメラ抗体の抗体活性のまとめ
 上段：中和活性、下段：結合活性
 △○◎の順で活性が強くなる、- 未実施

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

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で総数 1×10^9 の細胞）を採血し、 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。トキソイドに対してスクリーニングを行い、46種類の抗原結合抗体を取得した。中和試験の結果、その中の2種類が毒素中和能を示した。単離した2種類の抗体をIgGに変換し、中和試験を実施した。2種類の抗体を混合することによって中和能の増強は観察されたが、完全中和には至らなかった。更にニューロトキシンを抗原として更にスクリーニングを行い72種類の新規抗原結合抗体を獲得した。その毒素中和能は現在解析中である。

A. 研究目的

ウイルス感染もしくは病原菌毒素が体内に侵入すると、それを中和する能力を持つ抗体が出現する。この抗体が病気治療に役立っており、従来よりガス壊疽、ジフテリア、ボツリヌス等の病原菌毒素、更にハブやマムシのヘビ毒素に対してウマ抗血清が抗毒素製剤として利用されてきた。ウマ抗血清は異種由来のため血清病等の問題があり、これをヒトモノクローン抗体に変換したいという強い社会的ニーズが存在する。分担研究者らはここ数年にわたってファージディスプレイ技術を用いた抗体ライブラリー作製を実施し、その中から使用目的に合致した性質を示す様々な抗体単離法を開発してきた。とりわけ最近、特定の性質を

した抗体を有している献血ボランティアからの成分採血（リンパ球画分を多く含む3L血液相当）により得た細胞を用いて巨大ライブラリーを作製し、そこから目的とする抗体をモノクローン化する技術開発に成功した。そこで本研究では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、それを用いて抗体ライブラリーを作製する（第I段階）、ボツリヌストキソイド及びニューロトキシンを抗原にして抗原に結合する抗体を多数単離し（第2段階）、個々のクローンの毒素中和活性を測定する（第3段階）。中和抗体はIgG型抗体として大量調製する（第4段階）戦略で研究を進めた。

B. 研究方法

ボツリヌス毒素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する。そのうち、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し、再度ボツリヌス毒素中和活性を測定する。

C. 研究結果

1. 抗体の中和活性

平成16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。

2. 抗体ライブラリーのスクリーニング

平成16年度のスクリーニングを継続して実施したところ、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（BT-015、BT175）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。

3. 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（BT-015、BT-175）についてIgG変換し、大量調製を実施した。

4. IgG型抗体の中和活性

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。抗体単独ではその中和活性は非常に弱いですが、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。

D. 考察

今回抗体のソースとなった献血者の抗血清は、強いボツリヌス毒素中和活性を示す。本研究ではその血清中に含まれるボツリヌス毒素に結合する抗体のかなりの部分をモノクローン抗体として単離したはずである。これらモノクローン抗体が単独では、中和活性を示すものが殆どない。この見かけ上の矛盾は、毒素中和プロセスでの抗血清（ポリクローン抗体）とモノクローン抗体の差の反映である可能性が高い。そこで今後、ボツリヌス毒素が標的細胞に結合し、細胞内に取り込まれていく過程のどのエピトープに対してどのような抗体が存在すれば中和できるのか、詳細に解析することにより治療薬を開発する。

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、抗体を混ぜることによって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。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

I. 論文発表

1. M.Sato, R.Iwaya, K.Ogihara, R.Sawahata, H. Kitani, J. Chiba, Y. Kurosawa, K. Sekikawa, Intrabodies against EVH1 domain of wiskott-Aldrich syndrome protein inhibit T cell receptor signaling in transgenic mice T cells. FEBS J. (2005) 272, 6131-6144.
2. 血液代謝物としての治療用ヒト抗体の開発、黒澤良和、人工血液、13、13-21(2005)

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の開発状況」 人工血液を作る(6)、 於：日本科学未来館、平成 18 年 2 月 11 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

抗 IGSF4 抗体及びその利用
特願 2005-54624、

平成 17 年 2 月 28 日出願

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

「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：完全型ヒト抗体を産生するトランスクロモマウス (KM マウス) を用いて、抗破傷風毒素ヒトモノクローナル抗体のパネルを作製し、それぞれの抗体の毒素中和活性を検討した。作製された12クローンの抗破傷風毒素モノクローナル抗体の8クローンの抗体に中和活性が証明され、その2クローンの中和活性は、我々がこれまでに作製した抗破傷風毒素モノクローナル抗体 (TT2) を混合することによって顕著に促進されることが明らかになった。より大規模な抗破傷風毒素中和ヒトモノクローナル抗体パネルを作製し、TT2 などの適当な抗体を組み合わせることによって、現行のヒト血清から調製されている抗破傷風毒素製剤に代替しうる安全なヒト抗破傷風毒素製剤を調製できるものと思われる。

A. 研究の目的

我が国では、1991 年以降の破傷風の報告患者数は、ジフテリア・百日咳・破傷風混合ワクチン (DTP) の定期予防接種により、1 年間に 30 ～50 人に止まっているが、依然として致死率が高い (20～50%) 感染症である。また、新生児破傷風は 1995 年の報告を最後に、我が国では報告されていないが、世界の新生児の主要な死亡原因の一つとなっている。破傷風の治療にはヒト血清から調製された抗破傷風免疫グロブリン (TIG) が用いられて

いるが、ウイルスなどの混入の危険性を回避するために、破傷風毒素を中和するモノクローナル抗体製剤、あるいは、いくつかのモノクローナル抗体を組み合わせたポリクローナル抗体製剤を開発することが望まれている。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が開発した 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。本年度は、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、ハイブリドーマを作製し、破傷風毒素に対するヒト抗体のパネルを調製して、それらの抗体の中和活性を検討した。

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 マウスあるいはその亜系である 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破傷風トキソイドを1週おきに3回、皮下に投与し、その後、液状型の破傷風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。血中に高い抗破傷風トキソイド抗体が検出されたマウスに50 μ g の液状型破傷風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破傷風毒素ヒト IgG 抗体は破傷風トキソイドあるいは破傷風毒素を抗原として用いた ELISA 法によって定量した。また、それぞれの抗体の活性がウエスタンブロッティング法によっても検出できるかどうかを SDS-PAGE で分離した破傷風毒素を用いて調べた。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。

(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 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が作製された(表1)。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。ウエスタンブロッ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を用いた致死試験で調べたところ、8クローンの抗体に有意の中和活性が認められた。興味深いことに、その中の中程度の中和活性を示した2クローンの抗体(5F10と6D7)のどちらかと、我々がこれまですでに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(TT2抗体 IgG4 \cdot κ)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(表2)。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。

D. 考察

破傷風毒素（トキソイド）で免疫されたヒトの末梢血中に抗破傷風毒素抗体産生細胞が存在することから、破傷風毒素に対するヒトモノクローナル抗体の作製は、ヒトモノクローナル抗体作製法の開発モデルとしてこれまで多くの研究室で行われてきており、いくつかの成功の報告がある。しかしながら、それらの報告の多くは再現されておらず、抗破傷風毒素ヒトモノクローナル抗体を臨床で利用できるようにはなっていない。本研究では、最近開発された KM マウスを免疫することによって、破傷風毒素に対するヒトの抗体応答を誘導できたことから（平成15年度報告）、免疫マウスの脾細胞を用いてハイブリドーマを作製し、抗破傷風毒素パネル（12種）を調製して、それぞれの抗体の毒素中和活性を解析した。

本研究で作製された2種の抗破傷風毒素モノクローナル抗体（5F10 と 6D7）は、それらの抗体単独では弱い中和活性であったが、我々がこれまでに作製していた抗破傷風毒素モノクローナル抗体（TT2：これ自身でも弱い中和活性を有する）と共に作用させると顕著に中和活性が促進されることが明らかになった。これまでのいくつかの報告でも、破傷風毒素に対するモノクローナル抗体は、単独では完全中和をするような中和活性を示すことはないが、他のエピトープと作用させることで完全中和も可能になることが知られているので、この現象は抗

毒素ポリクローナル抗体による毒素中和の基本的な作用機序であると考えられる。これらの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TIGを代替しうる安全なヒト抗破傷風毒素製剤を調製できるものと思われる。

E. 結論

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が調製された。複数の抗破傷風毒素モノクローナル抗体を組み合わせることによって、顕著な中和活性が観察されたので、より大規模の抗破傷風毒素ヒトモノクローナル抗体パネルを作製して、中和抗体をさらに選択し、それらを組み合わせることによって現行のTIGに代替しうる安全なヒト抗破傷風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

相内 章、前田 仁孝、永坂 真也、川瀬 琢央、大場 浩美、佐藤 博子、高橋 元秀、千葉 丈：中和活性のない抗破傷風毒素モノクローナル抗体による中和活性の増強。第28回日本分子生物学会。平成17年12月。福岡。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 特願2005-152858「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」
2. 実用新案登録 なし
 3. その他

Table 1. 抗破傷風毒素ヒトモノクローナル抗体の活性とアイソタイプ

Clone	ELISA	WB	Neutralization	Ab production [μ g/mL]	Isotype	
					H Chain	L Chain
14C2	++	-	+++	> 8.00	γ 1	κ
10B2	+++	-	++	0.86	γ 1	κ
4B11-2	+++	-	+	2.79	γ 1	κ
5F10	+++	-	+	> 8.00	γ 1	κ
6D7	+++	-	+	2.90	γ 1	κ
1F8	+	-	+/-	> 8.00	γ 1	κ
7G3	+++	-	+/-	0.44	γ 4	κ
13F6	++	-	+/-	1.67	γ 1	κ
4B11-1	+	-	-	3.57	μ	κ
6C8	+	-	-	> 8.00	μ	κ
7C8	+	-	-	5.09	ND	κ
16F10	+	-	-	> 8.00	ND	κ

ND, Not determined

Table 2. 破傷風毒素中和活性

Ab Name	day													
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
PBS(-)		--	+++	d										
TT2		-	-	-	+/-	+		-	-	-	----	全---		d
6D7		-	+	-	-	-		-	d					
6D7+TT2		-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
5F10		-	+++	全+	全-	d								
5F10+TT2		-	-	全+	全+	d								

ddYマウス1匹あたり 2 LD₅₀ の破傷風毒素と 6 μg の抗体を混合し、抗原抗体複合体をマウス大腿部皮下に投与し発症の程度を観察した。なお、一群二匹で中和試験を行った。症状は局所的な破傷風の症状の程度で示し、「-」は軽症、「+」は歩行障害が現れる程度、「++」(「+++」)は末期の症状である。なお、「全」は全身性の破傷風症状(立毛、呼吸亢進等)を呈した場合に付記した。

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 (H15-リスク-035)

分担研究報告書

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 (国立感染症研究所)

A. 研究目的

第1年度：“中国におけるワクチンの品質管理“DPTワクチンを例に”、第2年度：“抗毒素製剤の安全性評価”、第3年度：“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”と新しく製造／輸入承認申請の可能性のある抗毒素製剤と毒素や芽胞形成菌を用いて製造される医薬品について研究を重ねてきた。最終年度(第3年度)は、1) 芽胞形成菌を医薬品製造に用いる場合に必要な要件(特にハード面)について、日米間で比較し、現状の製造技術を踏まえて、必要要件を規制当局に提案する、2) 一部芽胞形成菌(炭疽菌、ボツリヌス菌)は生物テロ対策上、その取扱い強化の方向にあり、これらの芽胞形成菌を用いて医薬品を製造する場合の国内外の規制について整理することに研究の主眼を置いた。

B. 研究方法

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要件との違いを浮き彫りにし、今後あるべき規制要件を提案する。

C. 研究経過

省令GMP改正作業時(平成15年)、無菌製造、バイオセーフティ対策については当時の監視指導・麻薬対策課の担当官と数多くの意見交換をしてきた。その中で、感染廃棄物の敷地内焼却処分の見直しなど、多くのことを解決してきたが、芽胞形成菌の取扱い施設要件については手付かずの状態であった。最近、生物テロ対策の一環より、厚生労働省、経済産業省、文部科学省、農林水産省の4省庁合同で、生物テロを未然に防止するために、使用される恐れのある病原体等(病原微生物及び毒素)の適正な管理体制の確立を目指している。現在、ヒト用医薬品原料として用いられている芽胞形成菌には、炭疽菌(*Bacillus anthracis*)、ボツリヌス菌(*Clostridium botulinum*)、破傷風菌(*Clostridium tetani*)、ガス壊

疽菌(*C. perfringens*, *C. septicum*, *C. oedematiens*, *C. histolyticum*)などがあ。これら病原体取扱い施設のあり方について、国内のワクチンメーカーの現状を考慮に入れつつ、米国FDAの規制状況と比較検討した。

D. 考察

芽胞取扱い施設に対するFDA規制は、21 CFR 600.11に規定されており、以前は芽胞形成菌を完全に分離された施設、又は構造壁で完全に仕切られた施設で取り扱い、かつ保存しなければならなかった。また、他の区域との交差汚染を防ぐために、芽胞形成菌取扱い施設の出入り口は専用とし、芽胞形成菌の取扱いに用いる器具器械等も専用としていた。製造のために、器具器械等を他の区域に搬送する場合には、芽胞が他の区域に漏出しないような防御措置を講じていた。しかし、2003年12月30日、緩和改定案に対してパブコメを求め(68 FR 75116)、2004年5月14日、改定告示、2004年6月1日より規制緩和が有効になった(69 FR 26768)。基本は、封じ込め設備があれば専用施設は不要とし、芽胞形成菌取扱い施設及び器具器械等も洗浄、滅菌が十分バリデートされていれば他の製剤製造にも使用可能とした(ただし、同時製造は認めない)。規制緩和の背景には、将来、医薬品を製造するにあたって、芽胞形成菌の見直しが予想されることであった。例えば、1) 発芽欠損株の使用、2) 芽胞非形成株を用いての組み換え蛋白発現(炭疽菌、ボツリヌス菌、破傷風菌等の第二世代ワクチンは、組み換え蛋白を使用する可能性あり)などがあげられた。

一方、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。

E. 結論

有芽胞病原菌取り扱い施設要件を整理したところ、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ので、現行省令

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。

F. 研究発表

なし

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

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

H17年度:高橋班資料

研究目的

- 芽胞形成菌を医薬品製造に用いる場合に必要要件(特にハード面)について、日米間で比較し、現状を踏まえて要件緩和を規制当局に提案する。
- 一部芽胞形成菌(炭疽菌、ボツリヌス菌)は生物テロ対策上、その取扱い強化の方向にある。これらの芽胞形成菌を用いて医薬品を製造する場合の国内外の規制について整理する。

“バイオハザード”の定義 CDC/USA

- An agent of biological origin that has the capacity to produce deleterious effects on humans, i.e. microorganisms, toxins and allergens derived from those organisms; and allergens and toxins derived from higher plants and animals.
- ヒトに危害を及ぼす能力を有する生物起源体で、例えば微生物や微生物由来の毒素やアレルゲン、植物や動物由来の毒素やアレルゲンを指す。

バイオセーフティとバイオセキュリティ

- **バイオセーフティとは**
 - 病原体や毒素への偶発的な曝露、あるいは事故によるそれらへの拡散防止のための封じ込めの原理・技術・実践である。
- **バイオセキュリティとは**
 - 病原体や毒素の紛失、盗難、悪用、流用、あるいは意図的な拡散を防止するために準備する施設及び個人に対する保安対策である。

テロの未然防止に関する行動計画

- 生物テロを未然に防止するために、使用される恐れのある病原体等(病原微生物及び毒素)の適正な管理体制の確立。
- 厚生労働省、経済産業省、文部科学省、農林水産省

病原体等の適正な管理体制の確立

- 一種病原体等(痘そうウイルス等): 国又は政令で定める法人のみ使用、輸入、所持、譲渡し及び譲受けが可能。
- 二種病原体等(炭疽菌等): 試験研究等の目的で厚生労働大臣の許可を受けた場合に、使用、輸入、所持、譲渡し及び譲受けが可能。
- 三種病原体等(多剤耐性結核菌等): 事前規制はないが、その使用等する病原体等の種類、使用方法等について事後届出。
- 四種病原体等(コレラ菌等): 事前規制なし

病原体等の適正な管理体制の確立 追加要件

- 病原体等に応じた施設基準、使用、保管、運搬、滅菌等の基準の遵守
- 輸送規制、病原体等取扱規程の作成(四種病原体等を除く)
- 厚生労働大臣による報告徴収、立入検査、基準適合命令等

医薬品製造に用いられる芽胞形成菌

- 炭疽菌(*Bacillus anthracis*)
- ボツリヌス菌(*Clostridium botulinum*)
- 破傷風菌(*Clostridium tetani*)
- ガス壊疽菌(*C. perfringens*, *C. septicum*, *C. oedematiens*, *C. histolyticum*)

芽胞取扱い施設に対するFDA規制

以前(21 CFR 600.11)

- 芽胞形成菌は完全に分離された施設、又は構造壁で完全に仕切られた施設で取り扱い、かつ保存する。
- 他の区域との交差汚染を防ぐために、芽胞形成菌取扱い施設の出入り口は専用とする。
- 芽胞形成菌の取扱いに用いる器具器械等は専用とする。製造のために、器具器械等を他の区域に搬送する場合には、芽胞が他の区域に漏出しないような防御措置を講ずる。

芽胞形成菌取扱い施設要件の緩和

- 2003年12月30日:緩和改定案に対してパブコメを求めた(68 FR 75116)
- 2004年5月14日:改定告示、2004年6月1日より有効(69 FR 26768)
- 封じ込め設備があれば専用施設は不要
- 芽胞形成菌取扱い施設及び器具器械等も洗浄、滅菌が十分バリデートされていれば他の製剤製造に使用可(ただし、同時製造は認めない)

規制緩和背景

- 将来、医薬品を製造するにあたって、芽胞形成菌の見直しが予想される。例えば、
- 1) 発芽欠損株の使用
- 2) 芽胞非形成株を用いての組み換え蛋白発現(炭疽菌、ボツリヌス菌、破傷風菌等の第二世代ワクチンは、組み換え蛋白を使用する可能性あり)

薬局等構造設備規則

微生物取扱い作業所

- 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。

薬局等構造設備規則 空気処理システム

- (1) 微生物等による製品等の汚染を防止するために適切な構造のものであること。
- (2) 病原性を持つ微生物等を取り扱う場合においては、当該微生物等の空気拡散を防止するために適切な構造のものであること。
- (3) 病原性を持つ微生物等を取り扱う区域から排出される空気を、高性能エアフィルターにより当該微生物等を除去した後排出する構造のものであること。
- (4) 病原性を持つ微生物等が漏出するおそれのある作業室から排出される空気を再循環させない構造のものであること。ただし、(3)に規定する構造により当該微生物等が十分除去されており、かつ、再循環させることがやむを得ないと認められるときは、この限りでない。

非専用施設での芽胞形成菌使用

- 建物: 二重構造(エアロックシステム)の作業員の出入り口及び材料等の受渡しパスボックス
- 空調施設: ワンウエイ方式(禁空気循環)、作業区域の陰圧管理、排気にはHEPAフィルターを使用、他の空調排気口とは離す
- 装置: 専用使用が望ましいが、装置・器材等を他の医薬品製造に使用する場合には、バリデートされた方法で洗浄、除染、滅菌を実施
- 付属器材や管理物品(ペン、日誌、ビペット、ガラス機器等)の廃棄方法や除染方法の確立
- 作業員の動線とガウニング: ワンウエイ方式、芽胞形成菌を使用した区域から他の区域に移動する場合には、シャワーを浴びてから清潔な衣類に交換

非専用施設での芽胞形成菌使用

- 材料の移動: 他の区域を汚染させないように除染した容器を使用、これが不可能な場合には適切な消毒方法で容器表面を除染できる一連のエアロックパスボックスを使用
- 滅菌・消毒: 高圧蒸気滅菌、SIP、ガスチャンバーを用いる場合には、芽胞形成菌が不活化されることをバリデートする
- チャンバー: 芽胞形成菌を不活化するチャンバーを他の製剤の製造に使用してはならない
- 装置等の洗浄、除染: 移動不可能な大きな装置はバリデートされた方法での洗浄(NaOH使用等)を実施
- 廃棄物: 一次袋に入れ、袋の外側を消毒し、それをバイオハザードバックに入れ、エアロックシステムの手前のパスボックスに移し、次いで外側にいる人が二重バックの外側を消毒し、当該区域から出す。廃棄方法については、連邦又は各州の廃棄物・環境規則等に準拠すること。

キャンペーン製造

- 芽胞形成菌を取り扱った施設で別の医薬品を製造する場合には、当該施設に存在するもの全てについて、徹底的な除染(滅菌)及び洗浄を行うこと。更に、除染(滅菌)、洗浄、環境モニタリング、器具・器械等の移動については、広範なバリデーションを実施すること。
- 製造エリアの除染には、二酸化塩素や過酸化水素などのガス使用を考慮すること。

環境モニタリング

- 芽胞形成菌を検出するための適切な環境モニタリングプログラムを確立すること。
- 芽胞形成菌を用いての製造では、各製造シフトの開始時、途中、終了時、並びにキャンペーン製造終了時に、隣接した区域でモニタリングする。
- 隣接区域とは、封じ込め施設のドア付近、窓や他の開放部分を指す。
- キャンペーン製造終了時には、マトリックス手法を用いて、広範なモニタリングを実施する。

生物兵器監視対象細菌 BWC/AD HOC GROUP/56-1

- *Bacillus anthracis*
- *Brucella abortus*
- *Brucella melitensis*
- *Brucella suis*
- *Burkholderia mallei*
- *Burkholderia pseudomallei*
- *Francisella tularensis*
- *Yersinia pestis*
- *Coxiella burnetii*
- *Rickettsia prowazekii*
- *Rickettsia rickettsii*

生物兵器監視対象細菌性毒素 BWC/AD HOC GROUP/56-1

- ボツリヌス毒素
- ガス壊疽 (*C. perfringens*) 毒素
- 黄色ブドウ球菌毒素
- 志賀毒素

BW開発に対する抑制上、取扱い可能な微生物量

- $K = d \times 1000 \times b/a$
- K: 施設内に持ち込み可能な微生物量 (ED_{50})
- a: 微生物のeffective dose (ED_{50}) (cells)
- b: 生物材料中の微生物濃度 (cells/mL)
- d: 施設内に持ち込む生物材料の最大量 (kg)

- $M = K \times ED_{50}/C \times 1,000$
- M: 施設内で一度に取扱い可能な生物材料量 (kg)
- C: 生物材料中の微生物濃度 (cells/mL)

毒素 (LD₅₀ < 1 μg/kg)

- グループ1 毒素
 - ボツリヌス毒素
 - 志賀毒素
 - 破傷風毒素
- 5mg以上を使用する場合には、宣言が必要

BW開発に対する抑制上、取扱い可能な毒素量

- $m = b \times a / c \times 1,000$
- m: 許容可能な毒素を含む生物材料量 (kg)
- a: 100kg量当たりの毒素のED₅₀ (μg)
- b: 施設に保存可能な毒素量 (ED₅₀)
- c: 生物材料中の毒素量 (μg/mL)
- 例: ボツリヌス毒素
 - a=100 μg、b=300 ED₅₀、c=10 μg/mL
 - $m = 300 \times 100 / 10 \times 1,000 = 3 \text{ kg}$

微生物	実験動物	感染方法	効果量 (cells)
<i>Bacillus anthracis</i>	White mice	皮下	10
	Guinea pigs	皮下	30
<i>Brucella</i> spp.	White mice	皮下	5~20
<i>Chlamydia psittaci</i>	Chicken embryo		1,000
<i>Clostridium botulinum</i>			
<i>Francisella tularensis</i>	White mice	皮下	1~10
<i>Pseudomonas mallei</i>	Golden hamsters	皮下	10~100
<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	White mice	皮下	10
	Golden hamsters	皮下	10
	Guinea pigs	皮下	10
<i>Yersinia pestis</i>	Rats	皮下	5
	White mice	皮下	15
<i>Coxiella burnetii</i>			
<i>Rickettsia prowazekii</i>			
<i>Rickettsia rickettsii</i>			

改正提案

- 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。
- “有芽胞病原菌”については、FDA並みに規制を緩和することを提案する。