

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15-17年度 総合研究報告書

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 15 - 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. 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. 研究成果の刊行に関する一覧表	9
III. 研究成果の刊行物・別刷	11

I. 総合研究報告書

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)

総合研究報告書

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。3年間の主な成果は、(1)マウスーヒトキメラ抗体の開発系では、トキソイド免疫により得たボツリヌス毒素の中和活性を有するマウスモノクローナル抗体からヒト型抗体の作製をおこなった。抗ボツリヌス A 型と E 型毒素に関して、各々の毒素に対して部分または完全中和する抗体の作出が可能となった。(2)ボツリヌストキソイドをヒトに接種後、採取したリンパ球から抗体ライブラリーを作製して、ヒト型抗体の作製に関しても、複数の抗体を組み合わせることにより、ボツリヌス A 型毒素を特異的に中和する抗体を作製した。(3)完全型ヒト抗体を産生するトランスクロモマウスを用いた系では、破傷風毒素とジフテリア毒素に対するヒトモノクローナル抗体のパネルを初めて作製し、それぞれの毒素の中和抗体が証明された。(4)抗毒素製剤の安全性評価の国際基準比較、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、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の規制を調査した。(5)さらに、国内・国外のヒト型抗毒素製剤の製造状況とウマ抗毒素の品質管理体制を調査した。また、抗毒素を生物製剤の品質管理のツールとして用いるフロキュレーション法の改良を行ない、従来の肉眼観察法に比べ、レーザー粒径測定法を用いた場合は高い客観性と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
千葉 丈	東京理科大基礎工学部 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。向本分担研究者は、精製したボツリヌスA型神経毒素をトキシド化し、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。

(2)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。

(3) 黒澤分担研究者：ボツリヌストキソ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、治療用ヒト抗体として確立することを目的としている。そのために、ボツリヌストキソ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した。そののちボツリヌストキソイド、更にはボツリヌス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は標準法であるマウス中和試験法で定量した。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、最終的に中和能を確認した。

(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。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。

また、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。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。さらに、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：従来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外での移行状況を調査した。また、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。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集計を行なった。海外の抗毒素製剤については、過去に作製した「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。なお、英国 NIBSC 訪問・調査は、2004 年 6 月に行なった。また、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ている。抗原・抗体反応法でトキソイドまたは抗毒素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。トキソイドは国内二社から供与されたジフテリアトキソ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。一定濃度のトキソ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 $9 \mu\text{m}$ 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

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時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。3年間の主な成果は、(1) マウスーヒトキメラ抗体の開発系では、安全で高い中和力価を持つボツリヌス中毒症治療用抗体製剤を目指して、トキシド免疫によって13種の抗A型神経毒素中和マウス抗体と10種の抗E型完全中和抗体を得た。この中から抗A型抗体4種と抗E型抗体1種のV領域遺伝子を単離し、5種のキメラ抗体を作製した。さらにH鎖L鎖シャッフリング発現実験の結果からミックスキメラ抗体が1個の細胞で産生可能であり、中和力価の向上と開発及び製造時のコスト低減になる可能性が示唆された。(2) ボツリヌストキシドで免疫することにより、血中に高い抗ボツリヌス毒素中和活性を示す抗体を有する献血ボランティアより3Lの血液に含まれるリンパ球に相当する成分血(1×10^9)を採取し、巨大抗体ライブラリー(VH: 7.1×10^9 , κ : 5.9×10^8 , λ : 5.1×10^8 , それを組み合わせ Fab: 1.3×10^{10})を作製した。トキシドを抗原にスクリーニングを行い、46種類の抗BT抗体を単離した。その中の2種類がボツリヌス毒素に対する中和活性を示した。単離した2種類の抗体をヒト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り中和能の増強は認められたが完全中和には至っていない。ニューロトキシンを抗原にして新たにライブラリーをスクリーニングして総計72種類の抗BT抗体を単離した。そのうち40種類については中和活性が認められず、残り32種類の中和活性を測定中である。(3) 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、小規模ではあるが、破傷風毒素(TT)とジフテリア毒素(DT)に対するヒトモノクローナル抗体のパネルを初めて作製することができた。それらの中には、それぞれの毒素の中和抗体が証明され、抗TT中和活性では、我々がこれまでに作製した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って中和活性が顕著に促進されることが明らかになった。より大規模な抗毒素中和ヒトモノクローナル抗体パネルを作製し、適当な抗体を組み合わせることによって、現行の抗TTヒト抗体製剤や抗DTウマ抗体製剤に代替しうる安全なヒト抗体製剤を調製できるものと思われる。(4) 佐々木班員は、抗毒素製剤の安全性評価、国内外の関連製剤の認可承認、または品質管理に関し調査し、今後開発する製剤の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可能性がある。しかし、臨床試験においては健常者を用いた第一相試験は可能であるが、第二相、第三相試験の実施は、わが国では困難なことが予想された。また、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については、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している。

(5) 岩城班員は、国内外のヒト型抗毒素製剤の製造状況を調査した結果、国内では、破傷風抗毒素だけがウマ製剤からヒト血液由来製剤の移行が行われて

いるが、その他の製剤では、依然としてウマ製剤である。海外も同様な傾向が見られるが、ボツリヌス抗毒素とジフテリア抗毒素については、ヒト血漿由来製剤を製造している国もあった。また、英国 NIBSC の抗毒素品質管理体制を調査した結果、実験動物の使用匹数を減らす、または使用しない代替法への研究開発が積極的であることを示した。また、抗毒素を生物製剤の品質管理のツールとして用いるフロキュレーション法の改良を行なった。従来肉眼観察法に比べ、本年度報告したレーザ粒子径測定法では高い客観性と高い定量性を達成した。

D. 考 察

ウマ抗毒素に替わるヒト型の抗体の製剤化のための基礎研究を最新の複数の手法により行い、より早期に有効性と安全性の確認された標品を作りだし、実用化への具体的な方策を上げることを目指している。近年の遺伝子工学・細胞工学・生殖工学の進歩とともにヒト型抗体を作製することが可能になり、乳ガン治療を目的とした抗体などは、多数の患者に用いられ企業の経済効果が期待できるために、抗体医薬品として民間企業の独自の研究・開発によって製剤化されている。これら手法で抗毒素ヒト型抗体を作製できれば、ウマ抗毒素製剤に比べて安全な抗体を、短期間で大量に製剤化することが可能となる。しかしながら、ウマ抗毒素製剤は市場性、経済性に乏しく、民間企業では改良開発が望めない製剤のために、基礎研究、具体的な製剤化に関して、国の経済的、政策的な支援が必要である。国内で現在、ヒト型製剤の研究開発の問題点を理解し、それらに対応可能な知識、技術基盤を有する産官学の担当者で当班員は構成されている。従って、ヒト型抗毒素抗体の製剤化を可能とする基礎研究を短期間で実施で

き、ウマ抗毒素に替わるヒト型抗毒素抗体の製剤化の基盤が確立できるものと期待された。特に、米国のバイオテロ以降、各国ではボツリヌス毒素の対応として、ウマ抗毒素製剤の調達が急務となっている。しかし、ウマ抗毒素の製造にあっては、各国とも十分な製造体制が取れていないことにより、ヒト型抗体の開発研究が精力的に行われている。分担研究者の所属する化血研では、マウスー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。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。我々はこれら毒素作用を抑制する活性を有する数種の抗体を用いて 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の作製を試み、この中から抗 A 型抗体 4 種と抗 E 型抗体 1 種の V 領域遺伝子を単離し、5 種のキメラ抗体を作製した。さらに H 鎖 L 鎖シャッフリング発現実験の結果から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を確認した。このことは、今後、治験、製造承認申請等において予想されるライセンス料、開発及び製造時のコスト低減につながり、大量生産系への進展を加速することが期待される。

E. 結 論

(1) マウスーヒトキメラ抗体の開発系では、マウスにトキシドを接種して得たボツリヌス毒素の中和活性を有するモノクローナル抗体をヒト型抗体にする系では、ボツリヌス A 型と E 型に関して、各々の毒素に対して部分または完全中和する抗体の作出が可能となった。(2) ボツリヌス毒素をヒトに接種後、採取したリンパ球から抗

体ライブラリーを作製して、ヒト型抗体を作製に関しても、複数の抗体を組み合わせるにより、ボツリヌス A 型毒素を特異的に中和する抗体を作製した。(3) 完全型ヒト抗体を産生するトランスクロモマウスを用いた系では、破傷風毒素とジフテリア毒素に対するヒトモノクローナル抗体のパネルを初めて作製し、それぞれの毒素の中和抗体が証明された。(4) 近隣諸国のワクチンの品質管理を DPT ワクチンを例に調査するとともに、抗毒素製剤の安全性評価の国際基準比較、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および新しく製造／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調査・研究した。(5) さらに、国内・国外のヒト型抗毒素製剤の製造状況を調査する一方、英国 NIBSC を訪問し国外での抗毒素の品質管理体制を調査した。抗毒素を生物製剤の品質管理のツールとして用いるフロキュラシオン法の改良を行なった。従来の肉眼観察法に比べ、本年度報告したレーザー粒径測定法では高い客観性と高い定量性を達成することができた。

F. 健康危険情報

平成 18 年 3 月に 14 日にタイ国北部 Nan 県において 100 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 325 人のうち約 200 人が共通の昼食を喫食した。うち 152 人が吐き気、腹痛等のボツリヌス症状を訴え、100 人が入院し治療をうけた。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ている。

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、十分量の現行治療用ボツリヌスウマ抗毒素の国内備蓄を整えることは急務である。さらに、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

別紙 研究成果の刊行物集のとおり

2. 学会発表

(1) 岩城正昭、猪股夢乃、小宮貴子、高橋元秀. ジフテリア菌 20kDa antigen の菌体内局在性。第 78 回日本細菌学会総会、2005 年 4 月、東京。

(2) 小宮貴子、瀬戸幸路、岩城正昭、福田靖、小崎俊司、高橋元秀. 国内で分離された *Corynebacterium ulcerans* の産生する毒素について。第 78 回日本細菌学会総会、2005 年 4 月、東京。

(3) 福田靖、岩城正昭、小宮貴子、高橋元秀. 破傷風毒素構造遺伝子の塩基配列の比較。第 78 回日本細菌学会総会、2005 年 4 月、東京。

(4) Iwaki, M., Nagata, N., Saegusa, T., Inomata, Y., Komiya, T. and Takahashi, M. Intradermal infection model for nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae*. 12th European Meeting on Bacterial Protein Toxins, June 2005, Canterbury (United Kingdom).

(5) Iwaki, M., Nagata, N., Saegusa, T., Inomata, Y., Komiya, T., Arakawa, Y. and Takahashi, M. A mouse intradermal model for *Corynebacterium diphtheriae* infection. 5th Awaji International Forum on Infection and Immunity. September 2005, Hyogo (Japan).

(6) 岩城正昭、堀内善信、小宮貴子、福田靖、荒川宜親、高橋元秀. 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アッセイ系の構築。第 9 回日本ワクチン学会学術集会、2005 年 10 月、大阪。

(7) 福田靖、岩城正昭、小宮貴子、荒川宜親、高橋元秀. ヘモフィルスインフルエンザ B 型菌ワクチンに含まれる破傷風トキソイドの免疫原性の検討。第 9 回日本ワクチン学会学術集会、2005 年 10 月、大阪。

(8) 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)

(9) 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)、日本科学未来館、平成 18 年 2 月 11 日

(10) 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

葉 丈、相内 章

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

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 2003-406554 (平成 15 年 12 月 4 日出願) 【名称】細胞表面抗原に対する抗体取得とその抗原同定
【発明者】黒澤良和

【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

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Nakai K., Takahashi M and Tomita M	The equine antitoxins supply system for biological poisons in Japan	Toxicon	42	561-562	2003
Ihara H, Kohda T, Morimoto F, Tsukamoto K, Karasawa T, Nakamura S, Mukamoto M, and Kozaki S	Sequence of the gene for <i>Clostridium Botulinum</i> 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	2003
Akio Hatanaka, Atsunobu Tsunoda, Makoto Okamoto, Kenji Ooe, Akira Nakamura, Masashi Miyakoshi, Takako Komiya, and Motohide Takahashi	<i>Corynebacterium ulcerans</i> Diphtheria in Japan	Emerging Infectious Diseases Journal	Vol.9 No.6	752-753	2003
黒澤良和	抗体をツールとした創薬および抗体創薬の戦略	Drug Delivery System	18(6)	528-535	2003
Fukuda T, Iwaki M, Komiya T, Arakawa Y and Takahashi M.	Attempt to Curtail the Observation Periods of Mice in the Tetanus Vaccine Potency Tests	Japanese Journal of Infectious Diseases	57	257-259	2004
K.Higo-Moriguchi, Y.Akahori, Y.Iba, Y.Kurosawa, & K.Taniguchi	Isolation of Human Monoclonal Antibodies That Neutralize Humam Rotavirus	J. Virol	78	3325-3332	2004
Matsuoka M. and Sasaki T.	Inactivation of Macrolides by Producers and Pathogens	Current Drug Targets- Infectious Disorders.	4(3)	217-240	2004
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	Characterization and Molecular Analysis of Macrolide-Resistant <i>Mycoplasma pneumoniae</i> Clinical Isolates Obtained in Japan	Antimicrob. Agents Chemother.	48(12)	4624-4630	2004
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	Use of Fluorescent-Protein Tagging to Determine the Subcellular Localization of <i>Mycoplasma pneumoniae</i> Proteins Encoded by the Cytadherence Regulatory Locus	J. Bacteriol.,	186(20)	6944-6955	2004

佐々木次雄	第14改正日本薬局方収載の微生物関連試験法設定と現場での適用	技術情報協会編		149-162	2004
上寺祐之、重松宏、馬場善三、熊田直人、佐々木次雄	EBMに基づいて速効解決 洗浄・消毒・滅菌のポイント209 滅菌バリデーションのポイント	Infection Control		231-235	2004
Tsukamoto K, Kohda T, Mukamoto M, Takeuchi K, Ihara H, Saito M and Kozaki S	Binding of <i>Clostridium botulinum</i> type C and D Neurotoxins to Ganglioside and Phospholipids: Novel insight into the receptor for clostridial neurotoxins	J. Biol. Chem.	280:	35164-35171	2005
Arimitsu H, Lee J, Sakaguchi Y, Hayakawa Y, Hayashi M, Nakamura M, Takai H, Lin S, Mukamoto M, Murphy T and Oguma	Vaccination with Recombinant Whole Heavy Chain Fragments of <i>Clostridium botulinum</i> Type C and D Neurotoxins	Lab. Immunol.	11:00	496-502.	2004
Takeda M, Tsukamoto K, Kohda T, Matsui M, Mukamoto M and Kozaki S	Characterization of the Neurotoxin Produced by Isolates Associated with Avian Botulism	Avian Dis.	49:	376-381	2005
Sato R., Iwaya R., Ogihara K., Sawahata R., Kitani H., Chiba J., Kurosawa Y. and Sekikawa K.	Intrabodies against the EVH1 domain of Wiskott-Aldrich syndrome protein inhibit T cell receptor signaling in transgenic mice T cells	FEBS J.	272	6131-6144	2005
黒澤良和	血液代替物としての治療用ヒト抗体の開発	人工血液	13(1)	13-21	2005
佐々木次雄編	ISO規格準拠医療機器の滅菌及び滅菌保証	日本規格協会		21-54	2005
Fukuda T., Iwaki M., Hong,SH, Oh,HJ., Zhu,W., Morokuma,K., Ohkuma,K., Lei, D., Arakawa,Y and Takahashi,M.	Standardization of Regional Reference for Mamushi(<i>Gloydius blomhoffii</i>) Antivenom in Japan, Korea, and China	Jpn.J.Infect Dis.	59	20-24	2006
Suzuki S.,Yamazaki T.,Narita M.,Okazaki N.,Suzuku I.,Andoh T.,Matsuoka M.,Kennri T.,Arakawa Y. and Sasaki T.	Clinical Evaluation of Macrolide-Resistant <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Antimicrob. Agents Chemother.	50	709-712	2006
Seki N.,Sasaki T.,Sawabe K.,Sasaki T.,Matsuoka M.,Arakawa Y.,Marui E..and Kobayashi M.	Epidemiological Studies on <i>Bartonella quintana</i> Infections among Homeless People in Tokyo,Japan	Jpn.J.Infect Dis.	59	31-35	2006

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷



Short communication

The equine antitoxins supply system for biological poisons in JapanKiyohito Nakai^{a,*}, Motohide Takahashi^b, Motowo Tomita^a^a*Department of Physiological Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences, Showa University, 1-5-8 Hatanodai Shinagawa-ku, Tokyo 142-8555, Japan*^b*Department of Bacterial Pathogenesis and Infection Control, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1, Gakuen Musashi murayama-shi, Tokyo, 208-0011 Japan*

Received 22 April 2003; accepted 24 July 2003

Abstract

Recently, the equine antitoxin supply in Japan has sharply decreased; then it is apparent that a stable supply produced solely by private industry cannot be relied upon. The Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW), therefore, purchases vaccines and equine antitoxins from manufacturers who could not otherwise independently provide an adequate antitoxin supply to hospitals. This supply system is called the 'Kokuyu vaccine system.' Under this system, MHLW purchases, stores and distributes vaccines and antitoxins to hospitals. This system has worked efficiently and effectively so far and may be a good model for establishing a stable antitoxin supply system in other countries.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Equine antitoxin; Stable supply system; Ministry of Health, Labor and Welfare; Kokuyu vaccine system

Equine antitoxin still plays a major role in the treatment of diseases caused by bacterial and animal toxins, even in highly developed countries like Japan. However, the need for equine antitoxins has been decreasing because of improving public health conditions as well as the separation of wild animal and human populations. As a result, the supply of equine antitoxins in Japan has sharply decreased, and it is apparent that a stable supply produced solely by private industry cannot be relied upon. In addition, because our modern transportation system allows for unexpected cases of inadvertent contact with imported venomous animals, the availability of equine antitoxin to the patients is limited. In Japan, the Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW) purchases vaccines and equine antitoxins from manufacturers who could not otherwise independently

provide an adequate antitoxin supply to hospitals. This supply system is called the 'Kokuyu vaccine system.' Under this system, MHLW purchases, stores, and distributes vaccines and antitoxins to hospitals. This system also maintains specific manufacturing techniques and skills for manufacturing vaccines and antitoxins, which should be preserved for emergency situations.

Table 1 lists the equine antitoxins currently available in Japan. Of these seven antitoxins, three (gas gangrene equine antitoxin, diphtheria equine antitoxin (freeze-dried) and botulism equine antitoxin (freeze-dried)) are Kokuyu vaccines, whereas, Mamushi (*Gloydius blomhoffii*) equine antitoxin (freeze-dried) and Habu (*Protobothrops flavoviridis*) venom equine antitoxin (freeze-dried) are supplied commercially.

When an incident that requires the use of an antitoxin occurs, the hospital makes a request to MHLW via the pharmaceutical affairs division of prefectural government. MHLW then orders the local storage facility to supply the vaccine or antitoxin to the hospital requesting the antitoxin. Fig. 1 illustrates the operation of

* Corresponding author. Pharmaceuticals and Medical Devices Evaluation Center, National Institute of Health Sciences, Ministry of Health, Labor and Welfare 3-8-21, Toranomon, Minato-ku, Tokyo, Japan. Tel.: +81-3-5403-1411; fax: +81-3-5403-1417.

E-mail address: nakai@nihs.go.jp (K. Nakai).

Table 1
Antitoxins in Japan

Antitoxins	Manufacturer	Kokuyu vaccine
Gas gangrene equine antitoxin	Chiba-Serum Institute ^a	Yes
Botulism E type equine antitoxin (freeze-dried)	Chiba-Serum Institute ^a	Yes
Botulism A, B, E and F type equine antitoxin (freeze-dried)	Chiba-Serum Institute ^a	Yes
Diphtheria equine antitoxin (freeze-dried)	Chiba-Serum Institute ^a	Yes
Mamushi equine antitoxin (freeze-dried)	The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute	No
Habu-venom equine antitoxin (freeze-dried)	The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute	No
Yamakagashi equine antitoxin ^b	Research group on Health Science Research Grants	No

^a The Chiba-Serum Institute has closed their business since October 2002, and their manufacturing approvals and licenses are handed over to The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute.

^b Yamakagashi equine antitoxin has not yet been approved by MHLW. It is currently produced by an MHLW-funded research group and can only be used in emergency situations under the assumption that the individual treated is entirely responsible for any problems arising from its use.

the Kokuyu vaccine supply system. In practice, however, many different situations may occur and flexibility of action is essential to ensure reliable access to the antitoxin supply. For this reason, an emergency communications system has been created to ensure that the Kokuyu vaccine can be delivered efficiently. In addition, prefectural governments also purchase Kokuyu vaccines from MHLW and store them within their regions in order to provide a ready supply in emergencies.

Several investigations of the stocks of antitoxins, even in the guidance for stocking the antitoxin has been published, indicate that the stock of antitoxins in most hospitals was inadequate (Chyka and Conner, 1994; Dart et al., 1996; Spoerke et al., 1987; Teresi and King, 1999; Woolf and Chrisanthus, 1997). Furthermore, Ong et al. (2000) from Taipei reported hospitals cannot continue to stock venom antitoxins because of the extremely limited demand and they should be supplied to the hospitals as government-ordered purchases. From these reports, therefore, a system in which the stock of antitoxins is maintained in a central location and delivered to the hospitals in emergency situations should be considered.

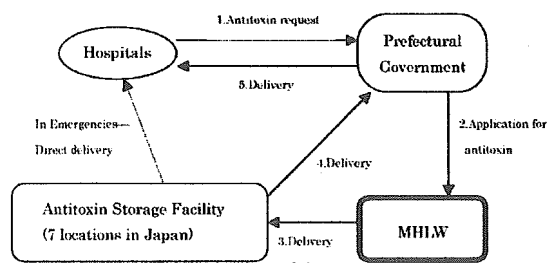


Fig. 1. Kokuyu vaccine supply system

MHLW has exclusive control over purchasing, stocking and supplying of some antitoxins using the Kokuyu vaccine system. Although the cost of the Kokuyu vaccine system is almost 55 million yen (\$458,000 US) per year (\$1.00 = ¥120), it is a much more cost-efficient than having individual hospitals maintain their own antitoxin stocks. Therefore, the Kokuyu vaccine system appears to be the method, and other countries may take into account to ensure a stable supply of antitoxins in the future. However, it should be noted that antitoxins for treating biological poisonings and for treating chemical poisonings are different because there is usually a longer time available for treating biological poisons. It also considered that relative to countries with less developed transport systems, Japan should be able to readily supply antitoxins to all of parts of Japan.

References

- Chyka, P.A., Conner, H.G., 1994. Availability of antidotes in rural and urban hospitals in Tennessee. *Am. J. Hosp. Pharm.* 51 (10), 1346–1348.
- Dart, R.C., Stark, Y., Fulton, B., Koziol-McLain, J., Lowenstein, S.R., 1996. Insufficient stocking of poisoning antidotes in hospital pharmacies. *JAMA* 276, 1508–1510.
- Ong, H.C., Yang, C.C., Deng, J.F., 2000. Inadequate stocking of antidotes in Taiwan: is it a serious problem? *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 38 (1), 21–28.
- Spoerke, D.G., Spoerke, S.E., Rumack, B.H., 1987. International opinion concerning indications, safety and availability of poison centre antidotes and treatment. *Hum. Toxicol.* 6 (5), 361–364.
- Teresi, W.M., King, W.D., 1999. Survey of the stocking of poison antidotes in Alabama hospitals. *South. Med. J.* 92 (12), 1151–1156.
- Woolf, A.D., Chrisanthus, K., 1997. On-site availability of selected antidotes: results of a survey of Massachusetts hospitals. *Am. J. Emerg. Med.* 15 (1), 62–66.

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

Hideshi Ihara^{a,b}, Tomoko Kohda^{b,c}, Fumihiro Morimoto^a, Kentaro Tsukamoto^c,
Tadahiro Karasawa^d, Shinichi Nakamura^d, Masafumi Mukamoto^{b,c}, Shunji Kozaki^{b,c,*}

^aDepartment of Earth and Life Sciences, College of Integrated Arts and Sciences, Osaka Prefecture University, Sakai, Osaka, Japan

^bResearch Institute for Advanced Science and Technology, Osaka Prefecture University, Sakai, Osaka, Japan

^cDepartment of Veterinary Science, Graduate School of Agriculture and Biological Sciences, Osaka Prefecture University, Sakai, Osaka, Japan

^dDepartment of Bacteriology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, Ishikawa, Japan

Received 16 May 2002; received in revised form 20 August 2002; accepted 23 September 2002

Abstract

Previously, we demonstrated that the neurotoxin of strain 111 (111/NT) associated with type B infant botulism showed antigenic and biological properties different from that (Okra/NT) produced by a foodborne botulism-related strain, Okra. In this study, the neurotoxin genes of 111/NT and Okra/NT were amplified and the sequences determined. The nucleotide sequences of the genes for both neurotoxins possessed an open reading frame of 3873 bp that encoded 1291 amino acids. The identities of nucleotide sequences and amino acid sequences were 97.6% and 95.7%, respectively. The ratio of nonsynonymous to synonymous substitutions was 0.47. The amino acid substitutions between 111/NT and Okra/NT occurred mainly in the domain of the C-terminal half of heavy chain (H_C) responsible for binding to its receptor complex of protein and ganglioside. To characterize the binding capability of the H_C , recombinant genes for the H_C and two hybrid H_C in which one half of Okra/NT was replaced by the homologous half of 111/NT were constructed and expressed in *Escherichia coli*. The binding activity of the recombinant H_C of 111/NT to the protein receptor synaptotagmin II, in the presence of ganglioside GT1b, was 4.2-fold less than Okra/NT, consistent with the corresponding two NTs. The use of hybrid H_C revealed that mutation of 23 residues in carboxy terminal half of H_C (1029–1291) of Okra/NT could be attributed to the lower binding activity of 111/NT and thus the differences in binding affinity between the two BoNT/B.

© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: *Clostridium botulinum*; Infant botulism; Neurotoxin; Expression; Binding

1. Introduction

Clostridium botulinum produces a highly potent neurotoxin (BoNT), which acts on nerve ending to inhibit neurotransmitter release [1]. The toxin is classified into seven serotypes (A–G) [2,3]. BoNT is synthesized as single chain polypeptides with a molecular mass of approximately 150 kDa, and is converted into an active form that is composed of two chains—heavy (100 kDa) and light (50 kDa). The light chain is responsible for the zinc-endoprotease activity,

which acts on soluble-*N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) proteins, such as synaptobrevin, syntaxin and SNAP-25. Cleavage of any of these proteins prior to SNARE bundle formation inhibits neurotransmitter release at the neuromuscular junction, leading to flaccid paralysis. The heavy chain contains two functional domains. The amino terminal part (H_N) is involved in the translocation of the L chain into the cytosol and the carboxy-terminal portion (H_C) plays a role in interaction with the receptor [4]. Recent studies on the crystal structure of TeNT, BoNT/A and BoNT/B provided direct evidence that the H_C is divided into two subdomains [5–7].

To date, all types of the BoNT gene sequences have been determined. The toxins exhibit significant sequence similarity and structural relationships [8]. Sequence alignments

* Corresponding author. Department of Veterinary Science, Graduate School of Agriculture and Biological Sciences, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Sakai, Osaka 599-8531, Japan. Tel.: +81-72-254-9504; fax: +81-72-254-9499.

E-mail address: kozaki@center.osakafu-u.ac.jp (S. Kozaki).

