

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19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高橋元秀

平成20年（2008）3月

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班

平成 19 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

大隈 邦夫 (財)化学及血清療法研究所 品質管理部長
黒澤 良和 藤田保健衛生大学総合医科学研究所 所長、教授
向本 雅郁 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科准教授
千葉 丈 東京理科大学基礎工学部 教授

研究協力者

寺野 剛 (財)化学及血清療法研究所 第一製造部部长
諸熊一則 (財)化学及血清療法研究所 第一製造部課長
中西喜彦 (財)化学及血清療法研究所 第一製造部
前田浩明 (財)化学及血清療法研究所 第一研究部室長
東 成見 藤田保健衛生大学 総合医科学研究所
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
大場浩美 東京理科大学 基礎工学部助手
相内 章 国立感染症研究所 感染病理部 協力研究員
前田仁孝 東京理科大学 基礎工学部大学院 基礎工学研究科
川瀬琢央 東京理科大学 基礎工学部大学院 基礎工学研究科
井田明里 東京理科大学 基礎工学部大学院 基礎工学研究科
石田 功 (株)キリン医薬カンパニー
小宮貴子 国立感染症研究所 細菌第二部 第三室
岩城正昭 国立感染症研究所 細菌第二部 第三室
山本明彦 国立感染症研究所 細菌第二部 第三室
見理 剛 国立感染症研究所 細菌第二部 第三室

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.	抗毒素製剤の効率的製造方法確立への取組み －ウマ抗毒素製剤の改良研究－	
	大隈邦夫	9
2.	免疫ヒトリンパ球から完全ヒト中和抗体作製の開発研究	
	黒澤良和	15
3.	ボツリヌス抗毒素製剤の評価法に関する研究	
	向本雅郁	21
4.	抗破傷風毒素ヒト組換えポリクローナル抗体製剤の開発	
	千葉 丈	29
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	35
IV.	研究成果の刊行物・別刷り	37

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金
(厚生労働省医薬品・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

現行のガスエソウマ抗毒素製剤の製造効率化、安全性確保として、製造工程で用いる材料中に BSE 混入の恐れのある原料の除去や変更を検討した結果、現行培地に優る組成は見いだせなかったが、同程度の毒素産生性であれば検討可能な組成を見いだした。ウマ免疫方法の検討結果では、従来法（基礎免疫：トキソイド、追加免疫：毒素）よりも、基礎・追加免疫のいずれもトキソイドを用いた方が高力価の血清が得られた。また、抗破傷風毒素ヒト組換えポリクローナル抗体製剤の開発では、EBV・ハイブリドーマ法および KM マウス利用により計 10 種のモノクローナル抗体を作製し、抗体の組み合わせにより顕著な中和活性の増強を確認した。また、A 型ボツリヌス神経毒素を頻回接種したマウスモノクローナル抗体のトキソイドとの反応性および中和エピトープの神経毒素分子上の位置を解析した。また、ABEF 型ボツリヌス毒素中和抗体を有するボランティアの成分血より抗体ライブラリーを作製し、パニング法でボツリヌス毒素に結合する多種類の抗体を単離し、そのうちで中和活性を有する 6 種類の抗体を得た。これら抗体は最低 4 種類のエピトープを認識する抗体群に分類された。なお、スクリーニング方法を免疫沈降法に変更して調製したポリクローン抗体はボツリヌス毒素を完全中和した。

分担研究者名

大隈邦夫 (財)化学及血清療法研究所
品質管理部長
千葉 丈 東京理科大学
基礎工学部 教授
黒沢良和 藤田保健衛生大学
総合医科学研究所長 教授
向本雅郁 大阪府立大学大学院
生命環境科学研究科准教授

A. 研究目的

ウイルス感染もしくは毒素性細菌が体内に侵入・増殖し産生した毒素を吸収すると、それを中和する能力を持つ抗体が産生される。この抗体が病気治療に役立っており、ガス壊疽、ジフテリア、ボツリヌス等の毒素性細菌感染症の治療や、ハブやマムシの毒へび咬症の治療に対してウマ抗毒素製剤が利用されてきた。海外においてもウマ抗毒素製剤は多方面の

治療に用いられているが、製造方法の改良は、投入する費用回収の採算性が乏しく、製造所による積極的な検討は事実上おこなわれていない。国有抗毒素製剤は市場性、経済性に乏しく、民間企業だけでは改良、開発が望めない製剤であるため、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。当該研究組織は、国内のウマ抗毒素製剤の製造所、ヒト型抗体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研究者で構成する。

ウマ抗毒素製剤の安定供給には、免疫原である毒素およびトキシノイドの十分な調達・確保(量・品質面)、ウマ免疫の効率化(有効率・高力価収量・低労力)、抗毒素精製の技術力向上(高品質・高収量その他)等、さまざまな課題がある。これらの問題点を少しずつでも解決していくことは、将来的には抗毒素製剤の効率的製造方法への改善へと繋がり、延いては国への大きな社会的貢献が期待出来る。また、ウマ抗毒素製剤は異種由来の蛋白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ため、現行ウマ抗毒素製造の具体的な改良点と対応策およびウマ血液由来製剤以外のヒト抗体の基礎研究が望まれている。また、組換えモノクローナル抗体を作製する技術の多くは、海外の企業などの特許が成立していることから、治療の対象として企業の採算に合うものでなければ開発が難しい状況にある。本研究の一部では、そのような技術は用いないで、過去に独自に開発をした

EBV-ハイブリドーマ法を用いてモノクローナル抗体を作製する点に特色と獨創性がある。また、破傷風毒素に対する強い中和活性を保有するボランティアを日本国内で見いだすことはほとんど不可能であるので、中国の研究所との共同研究で開発を目指している。

B. 研究方法

1. ウマ抗毒素製剤の改良：ウマ抗毒素製剤には化血研独自で製造法を開発した製剤(はぶ抗毒素・まむし抗毒素)と千葉県血清研究所から承継した製剤(ボツリヌス・ジフテリア抗毒素・ガスエそ抗毒素)がある。両者の製造法は製造許可申請時の方法で、製造工程が微妙に異なる。最終製剤の γ グロブリンの構成比を SDS-PAGE および HPLC で比較した。また、菌培養における培地は BSE 発生対象国の薬品等を使用しない方向である。ガスエそ抗毒素の培地に用いられている米国産牛由来原料の代替品を非発生国の試薬で検討した。

2. 抗破傷風毒素ヒト組換えポリクローナル抗体製剤の開発：ヒト抹消血 B 細胞由来の融合親株は TT1 (IgG1) と TT2 (IgG4) の二種類の抗体を産生する。TT1 抗体の破傷風毒素中和活性は、極めて低い中和活性であるが TT2 抗体の混合で完全に破傷風毒素を中和する。TT2 抗体を産生するハイブリドーマから γ 4 鎖遺伝子を、また、TT1 抗体を産生するハイブリドーマから γ 1 鎖遺伝子をクローニングした。また、それぞれのハイブリドーマから L 鎖の遺伝子をクローニングし、それぞれの組み合わせで機能的な IgG 抗体が形成されることを、それぞれの遺伝

子を共発現させることで確認した。TT2 抗体の γ 1 鎖遺伝子の Fc 配列と組み換えて TT2- γ 1 Fc 遺伝子を構築した。組換え TT1 および TT2、あるいは組換え TT2- γ 1 Fc 抗体はそれぞれの H 鎖と L 鎖遺伝子を 293 細胞に導入し、濃縮、精製した。それぞれの抗体はマウス中和試験で測定した。

3. ボツリヌス毒素に対する再現性に優れた効率的な評価法の確立：ハイブリドーマ培養上清および Protein G によりアフィニティー精製した 15 種類の抗体を使用した。A 型神経毒素として複合体毒素、神経毒素をホルマリンで不活化しトキソイド化した。神経毒素をトリプシンで消化し精製した重鎖、軽鎖、重鎖の C 末端側半分を大腸菌で発現後精製した組換え H 鎖 C 末端領域 (Hc) を抗体の検出用抗原とした。イムノブロットングは、泳動蛋白を転写後、ハイブリドーマ培養上清または精製 IgG で Immunoblotting を用い、2 次抗体は、ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG ヤギ抗体を用いた。ELISA の 2 次抗体にはペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG (H+L) を使用し、37°C 2 時間反応後、基質発色は 37°C 30 分、480nm の波長で測定した。中和試験は神経毒素と精製抗体を等量混合し、室温で 30 分反応後、マウスの腹腔内へ 0.5ml 接種した。死亡した時間をスコア化し、接種後 4 日間生存した場合を完全中和とした。免疫沈降法は精製抗体を結合した protein G sepharose に、NT または L 毒素を加え、その後 SDS サンプルバッファーを加え煮沸後、抗 A 型 NT ウサギポリクローナル IgG を用いてイムノブロットングにより毒素分子を

検出した。また、キメラ抗体遺伝子発現は E 型神経毒素の中和抗体産生ハイブリドーマの VH、VL 領域遺伝子を発現ベクターに組込んだ。得られたそれぞれのキメラ抗体 H 鎖及び L 鎖遺伝子発現ベクタープラスミドを等量混合した後、CHO-DG44 細胞へ Trans-IT LT-1 を用いてトランスフェクションした。

4. 免疫ヒトリンパ球から完全ヒト中和抗体作製の開発研究：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 3 L 相当の成分血を採取し、mRNA を抽出して H 鎖 L 鎖の V 領域を RT-PCR で個別に増幅して抗体ライブラリーを作製した。ニューロトキシンを抗原としてスクリーニングを行い、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後、タンパク質を調製しボツリヌス毒素中和活性を測定した。中和活性を示す抗体は IgG 型ヒト抗体に変換しマウス法で毒素中和活性を測定した。異なるエピトープを認識する複数種類のモノクローナル抗体を混合し、シナジー効果による毒素を完全中和能を確認した。

C. 研究結果

1. ウマ抗毒素製剤の改良：異なる製法で製造されたウマ抗毒素製剤中の免疫グロブリン構成 (IgG:F(ab')₂ の存在比) を分析した。従来品 (はぶ・まむし抗毒素) と承継品 (ガスエソ・ジフテリア・ボツリヌス抗毒素) で構成比に相違があり、従来品は whole-IgG を約 25% 含んでいた (承継品は F(ab')₂)。また、菌培養に用いる培地成分の検討として、ガスエソ抗毒素の BSE 対策課題である米国産牛由来原料へ

の切替えの可能性を検討した結果、原料を豪州産に切り替えること、又はブタ由来培地への変更が可能であった。

2. 抗破傷風毒素ヒト組換えポリクローナル抗体製剤の開発：ハイブリドーマの産生する TT1 抗体の中和活性がハイブリドーマの産生する TT2 抗体の添加によって、マウス中和試験で増強した。また、組換え TT2 抗体もハイブリドーマ由来 TT2 抗体とほとんど同じ増強活性を示した。TT2 抗体の Fc を γ 1 鎖由来の Fc に組換えた組換え TT2- γ 1 Fc の中和活性増強を比較した結果、組換え TT2- γ 1 Fc は野生型ハイブリドーマ由来 TT2 抗体および組換え TT2 抗体よりも強い増強効果を示した。これらの結果から、TT2 抗体による他の破傷風毒素中和抗体活性の増強作用は IgG4 アイソタイプに依存しないだけでなく、IgG の γ 1 H 鎖の Fc 部位がより有効に働く機構であることが明らかになった。

3. ボツリヌス毒素に対する再現性に優れた効率的な評価法を確立：A 型神経毒素に反応性のある 15 クローンについて ELISA とプロットイングによる検出の有無を調べた結果、ELISA でトキシドと強く反応するが NT との反応性は低いクローンは神経毒素分子のサブユニットとは全く反応しなかった。プロットイングにおいて検出されず、L 鎖と反応する等、性質の異なるクローンを確認した。また、中和活性を有するクローンは ELISA での NT や M 毒素との反応性と比較して、L 毒素に対しては極端に低かった。さらに、トキシドとの反応性が高く、L 鎖を認識するものも L 毒素との反応性が低かった。

免疫沈降法でのモノクローナル抗体の毒素分子との反応性の検討では、ELISA において L 毒素との反応性が非常に低かったクローンはいずれも免疫沈降法では NT、L 毒素のいずれとも反応しなかった。中和活性を有するクローンで免疫沈降で検出された 1 クローンは ELISA では L 毒素との反応性は低く、免疫沈降では NT と L 毒素で同程度の反応性を示した。免疫沈降法で検出されたいずれのクローンも NT と L 毒素の両方と同程度に反応した。

精製抗体の中和活性を試験した結果、培養上清で神経毒素を完全中和した 4 クローンにおいて、精製抗体では 1 クローンだけが神経毒素を完全中和した。他クローンは延命効果が見られたが死亡した。抗 E 型神経毒素マウスヒトキメラ抗体については E 型神経毒素に対して完全中和したクローンの VH、VL 遺伝子領域をヒト C 領域遺伝子と結合させ、発現ベクターに組み込み、CHO-DG44 細胞に導入した。現在、抗体産生細胞を選別するため、クローニングを行っている。

4. 免疫ヒトリンパ球から完全ヒト中和抗体作製の開発研究：中和抗体として単離した 4 種類の抗体を IgG 変換し、過去の 2 種類の抗体と合わせて合計 6 種類の IgG 抗体を調製した。生物学的製剤基準の乾燥ボツリヌスウマ抗毒素製剤の力価試験に準ずる完全中和試験を実施した結果、A 型ボツリヌス毒素の完全中和を確認した。さらに、最小限必要な抗体組み合わせとその最大効果を数種類の抗体の組み合わせで確認した結果、3 種類の抗体の組み合わせで約 12IU/mg 程度の中和能を確認した。また、6 種類の中和抗体の認識エピト

ープ解析をBiacoreを用いてが4カテゴリーに分類できた。

D. 考 察

1. 抗毒素製剤中の γ グロブリンの構成の調査で、従来品はF(ab')₂が約75%で、残り25%がwhole-IgGであったのに対し、承継品は全てF(ab')₂で構成されていた。抗毒素の製造工程には、副反応抑制の目的で、 γ グロブリンのFcを切断するためのペプシン消化工程がある。従来品と承継品では、精製工程中のペプシン消化条件が若干異なるため、両者の γ グロブリン構成比に差が生じていると考えられる。将来的には製法の一本化も考慮する必要がある。しかし、従来品・承継品共に、これまで臨床上の安全性には十分な実績があるため、Fcの有無による抗毒素の安定性と抗原との反応性(有効性)、更には製法上の安定性等を勘案しつつ慎重に進めるべきと考える。

現行製造工程中のBSE対策では米国産牛由来原料の切替をWelchii毒素製造時で検討した結果、現行培地に勝る代替培地を見いだせなかった。今後は培地から毒素産生阻害物質の除去方法の検討(熱負荷の影響)が必要である。また、本培養中にpHを制御することにより毒素産生向上に一定の成果が得られた。この効果原因究明は今後実施していくが、抗プロテアーゼII抗体を入手し、培養中pHとプロテアーゼIIによる毒素分解やpH制御による溶菌惹起効果と毒素量の関係も調査する必要がある。

2. 抗破傷風毒素ヒト組換えポリクローナル抗体製剤の開発：TT2抗体による他

の破傷風毒素中和モノクローナル抗体活性の増強作用はIgG4アイソタイプに依存しないだけでなく、IgGの γ 1H鎖のFc部位がより有効に働く機構であることが明らかになった。より多くの、抗破傷風毒素ヒトモノクローナル抗体パネルを作製し、TT1抗体などの γ 1鎖のFc部を改変して、より強い中和活性を持たせ、TT2- γ 1Fcを添加することにより中和活性を増強できれば、現行の抗破傷風ヒト免疫グロブリン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。

3. ボツリヌス毒素に対する再現性に優れた効率的な評価法を確立：精製モノクローナル抗体単独で強い中和活性を示すクローンが得られたが、プロテイングでは検出されないことから、毒素分子の高次構造を認識しているものとする。現抗毒素製剤において、このような抗体が多数含まれている場合は、中和活性が高く、質の高い製剤であると評価できる。ウマ抗毒素製剤中に今回得られた抗体と同じエピトープを認識する抗体がの定量化により、製剤の評価法における指標抗体になり得る可能性がある。また、トキシノイドと強く反応し、神経毒素との反応性が低いモノクローナル抗体はプロテイングと免疫沈降の両方で反応しないことが明らかとなった。ホルマリンでのトキシノイド化により毒素分子のチオール基が還元され高次構造が変化したエピトープをそれらの抗体が認識したと推測する。実製造のホルマリン不活性化工程でも高次構造の変化したエピトープが生じた結果、中和力価の減少が生じる可能性がある。

神経毒素と複合体毒素で ELISA の反応性が異なるクローンが数種類得られ、中には免疫沈降法では神経毒素と L 毒素に対し同様な沈降能があった。このことは従来報告されている ELISA が毒素の評価あるいはマウス中和価とは相関しないことを裏付ける成績である。

4. 免疫ヒトリンパ球から完全ヒト中和抗体作製の開発研究

単離した 6 種類の抗体を IgG 変換して完全中和試験を実施した。Biacore のエピトープ競合試験の結果で 4 カテゴリーに分類された抗体を各 1 種類ずつ混合することで最大のシナジー効果を発揮して A 型ボツリヌス毒素を完全に中和することに成功した。その中和価は、約 12IU/mg であった。現行の治療用乾燥ボツリヌスウマ抗毒素には A 型毒素抗体が 10000IU/vial 含まれており、この 4 種類の抗体で代替する場合は各抗体を約 210mg ずつの混合で同等の活性が得られることになる。今後、確立した中和抗体の組み合わせが A 毒素のサブタイプも十分な力価をもって中和可能か調べる必要がある。

E. 結論

1. ウマ抗毒素製剤の改良：従来品と承継品の γ グロブリンの構成比に相違があり、この相違は製造工程中のペプシン消化条件の違いによるものと考えられ、将来的には製法の一本化に向けた検討が必要である。米国産牛由来原料の代替品として、現行培地の原産国・豪州産牛への切替え、および牛成分を含まない豚由来培地への変更が対応策として実生産への方向性が

だされた。

2. 抗破傷風毒素ヒト組換えポリクローナル抗体製剤の開発：in vivo での破傷風毒素の中和には、マクロファージなどの Fc レセプターを介した IgG1 型抗体のオプソニン作用が重要である可能性が明らかになった。TT1 抗体 (IgG1) などの γ 1 鎖の Fc 部を改変して、より強い中和活性を持たせることができる可能性が初めて明確に示された。抗破傷風ヒト免疫グロブリン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。

3. ボツリヌス毒素に対する再現性に優れた効率的な評価法を確立：A 型神経毒素に対するモノクローナル抗体の性状解析の結果、トキシノイドとのみ反応するクローンや強い中和活性を有するクローンなど、評価法の指標抗体として使用できる数種類の抗体を選別できた。免疫学的評価法としては ELISA 法より免疫沈降法の方が優れていることが明らかとなった。E 型神経毒素に対するマウスキメラ抗体遺伝子のキメラ化が終了し、抗体発現のため、細胞への遺伝子導入を行った。

4. 免疫ヒトリンパ球から完全ヒト中和抗体作製の開発研究：合計 6 種類の中和能を有するモノクローナル抗体を獲得し、A 型ボツリヌス毒素を完全中和する組み合わせを見出すことに成功し、4 種の抗体混合による力価は約 12IU/mg であった。Biacore のエピトープ競合試験の結果も完全中和試験の結果を裏付ける結果となり、抗体の競合関係が明確となった。

F. 健康危害情報

わが国のウマ抗毒素製剤には、はぶ抗毒素、まむし抗毒素、ガスエソ抗毒素、ジフテリア抗毒素及びボツリヌス抗毒素の計5種類がある。当該研究班活動による事業を積極的に展開することにより、将来的にはこれらのウマ抗毒素製剤の効率的製造方法への改善が期待され、国の危機管理を含めた高品質な抗毒素の安定供給が成就され、大きな社会貢献となり得る。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Akira Ainai, Takuo Kawase, Akari Ida, Yoshitaka Maeda, Hiroyoshi Ohba, Yoshihisa Ikeda, Hiroko Sato, Motohide Takahashi and Joe Chiba. Renewal of EBV-hybridoma method: Efficient generation of recombinant fully human neutralizing IgG antibodies specific for tetanus toxin by use of tetroma cells. *Human Antibodies*. 15(4), 139-154, 2007
- 2) Iwaki M, Horiuchi Y, komiy T, Fukuda T, Arakawa Y and Takahashi M. Toxoid flocculation assay by laser light-scattering. *J of Immunological methods*. 318. 138-146. 2007
- 3) Kentaro Tsukamoto, Yuiko Kozai, Hideshi Ihara, Tomoko Kohda, Masafumi Mukamoto, Takao Tsuji and Shunji Kozaki (2008) Identification of the receptor-binding sites in the carboxyl-terminal half of the heavy chain of botulinum

neurotoxin types C and D *Microb Pathog* (in press)

2. 学会発表

- 1) Ainai A., Kawase T., Maeda Y., Ida A., Takahashi M., and Chiba J. Marked enhancement of weak neutralizing activities of IgG1 mAbs specific for tetanus toxin in vivo by the IgG4 mAbs with almost nonexistent neutralizing activity against the toxin. 13th International Symposium on Human Antibodies and Hybridomas Milan, Italy, Oct 29-31, 2007.
- 2) 梅田薫、幸田知子、向本雅郁、小崎俊司 (2007) B型乳児ボツリヌス症神経毒素遺伝子の解析 第54回毒素シンポジウム (大阪)
- 3) 幸田知子、居原秀、向本雅郁、小崎俊司 (2007) シナプトタグミンII発現PC12細胞を用いたボツリヌスB型神経毒素の作用機序の解明 第54回毒素シンポジウム (大阪)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許出願

「A型ボツリヌス毒素中和組成物及びヒト抗A型ボツリヌス毒素抗体」

出願番号 特願2008-017152

出願日 2008.1.29

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告書

抗毒素製剤の効率的製造方法確立への取組み -ウマ抗毒素製剤の改良研究-

分担研究者：

所 属 財団法人 化学及血清療法研究所
研究者 大隈 邦夫

研究要旨

現在、日本国内には5種類のウマ抗毒素製剤がある(はぶ抗毒素、まむし抗毒素、ガスエそ抗毒素、ジフテリア抗毒素及びボツリヌス抗毒素)。衛生環境の向上、ワクチンの普及および毒素性疾患に対する対症療法に進歩に伴い、国内における抗毒素製剤の需要が低くなっていることは否めない。しかしながら、抗毒素製剤は相対する毒素性疾患の非常に有効な治療法であることも確かであり、国民の生命を守る上で必要な医薬品の一つである。ただ、製剤の開発から数十年が経過しているが、安定供給、品質という観点から捉えれば残された課題は多い。2002年の千葉血清研究所の廃業に伴い、化血研がウマ抗毒素を製造する国内唯一の製造所となった。故に事実として、ここ数年間は抗毒素製剤の枯渇回避を最重要/最優先課題として取り組んでいる。また一方では、高品質な抗毒素製剤の供給も我々の重要な責務である。

そこで本研究では、抗毒素製剤の品質向上を果たすための足掛りとして、まずは現行使用の各種のウマ抗毒素の性状について比較分析した。また、昨年に引き続き、ウマ免疫用抗原製造時に使用の「米国産牛由来原料の切替え」についても検討した。

A. 研究目的

1. ウマ抗毒素製剤のγグロブリンに関する調査

現在、化血研では5種類の抗毒素を製造している。大きく2つに分類され、1つは従来から製造の蛇毒抗毒素(以下、従来品)で、もう1つは千葉血清研究所からの承継抗毒素(以下、承継品)である。前者ははぶ抗毒素とまむし抗毒素で、後者はガスエそ抗毒素、ジフテリア抗毒素及びボツリヌス抗毒素である。本分担研究では、若干製法の異なる両者の性状、特にγグロブリンの構成について比較分析した。現行製剤(従来品と承継品)におけるγグロブリンの相同性や相違性を認識することは、抗毒素製剤の生産の効率化や品質向上の足掛りとなるため、極めて重要である。

2. 米国産牛由来原料の代替品探索の検討

現在、ガスエそ抗毒素の免疫用抗原製造に用いている培地には、原材料に米国産牛肉が含まれている。2003年12月末、米国でBSE感染牛が報告されて以来、米国産牛由来原料を含む医薬品

に関しては法規制により、早急な原料の切替えが要求されている。これまで、Welchii菌をターゲットに現行培地(原材料に米国産牛由来成分を含む)と同等の菌発育性・毒素産生性を有し、かつ米国産牛由来原料を含まない代替培地候補品を探索してきたが、現行培地以上の毒素産生を有する培地を見出していない。本分担研究では、代替培地候補品を用いながら産生毒素量を向上させ得るようなWelchii菌培養の条件/手法について検討した。また昨年に続き、現行培地と同等の性能を持つ代替培地候補品の探索を実施した。

B. 研究方法及び結果

1. ウマ抗毒素製剤のγグロブリンに関する調査

(1) 製剤中のγグロブリン構成比の確認

従来品(はぶ抗毒素・まむし抗毒素)と承継品(ジフテリア抗毒素・ガスエそ抗毒素)のそれぞれについて、SDS-PAGEとHPLC分析により製剤中のγグロブリンの構成比を調査した(ボツリヌス抗毒素は製造

実績がなく調査の対象外とした)。

SDS-PAGE(非還元)の結果を図1に示した。対照としての、Purified Horse IgG(ICN社)は150KDa付近と250KDa以上の2箇所、またHorse IgG F(ab')₂(ROCKLAND社)は110KDa、70KDa、45KDa及び30KDa付近の4箇所に明瞭なバンドを認めた。本検討では分子量150KDa以上のバンドをwhole-IgGとし、150KDa未満の4バンドをF(ab')₂と特定した。この泳動像をデンストメリーによるスキャンで数値化することにより、whole-IgGとF(ab')₂の構成比を分析した。結果、承継品中のγグロブリンは全てF(ab')₂であったが(whole-IgGを検出せず)、従来品のγグロブリンの構成はF(ab')₂が約75%で、whole-IgGが約25%であった(表1)。

HPLCによる分析結果を表2に示した。対照のwhole-IgGは約17分にピークが出現した(もう一本出現の約14.6分のピークはwhole-IgG二量体と判断)。もう一つの対照のIgG F(ab')₂は約18分のピークとして溶出された。結果、承継品に含まれるγグロブリンはほぼ100%がF(ab')₂であった(whole-IgGの検出なし)。一方、従来品のγグロブリンの構成はF(ab')₂が約75%で、whole-IgGが約25%であった。このHPLC分析の結果は、先のSDS-PAGEの結果とほぼ一致した。

2. 米国産牛由来原料の代替品探索の検討

(1) 高毒素産生可能なWelchii菌培養法の検討

8種類の代替培地候補品から豚由来と植物(エンドウ豆)由来を候補品として選定した。各培地の調製は、現行培地の調製法に従い実施した。前培養用培地に*Clostridium perfringens* type A PB6K株を1/1000量植菌し、OD_{660nm}が1.0~2.0になるまで前培養した。この菌液を本培養用培地に吸光度で0.15に植付け約12時間本培養した。目視と吸光度での菌発育状況、本培養液の産生毒素量(卵黄法)と蛋白濃度を確認し評価した。

両選定品における産生毒素量は現行培地の50%であった。選定品による産生毒素量低下を補う目的で、培地滅菌時の培地成分への熱負荷の影響に着目し、培地滅菌を現行の高圧蒸気滅菌法からろ過滅菌法(0.2μm)に変更し検討した。現行培地では産生毒素量が2倍に上昇し良好な成績であったが、選定品ではろ過滅菌法の優位性はなく効果は認められなかった(表3)。

次に、本培養中のpHコントロールに着目し、培養開始から1.5時間後に水酸化ナトリウム溶液を添加し、培地のpHを7.0~9.0に簡易的に調整する手法も検討した。その結果、選定品の産生毒素量が豚由来培地で2.0倍に(現行培地と同等)、植物由来でも1.4倍に上昇した。しかし、簡易的pH制御により溶菌が進行し、培養上清の蛋白量も上昇し比活性は現行培地より悪い傾向となった(表4)。

(2) 米国産牛由来原料代替品(豪州産)の探索

現行培地に使用の、原料牛の原産国が豪州産に変更されたプロテオスペプトンを製造元より入手した。培地の調製は現行法に従い実施した。菌発育状況、産生毒素量、産生毒素のウマ抗毒素との反応性並びに培養上清中蛋白成分の分析/比較を行い評価した。代替品(豪州産)による菌の発育性と毒素産生性は現行品とほぼ同等に良好であった。産生毒素の抗原性は、ウマ抗毒素とのゲル内沈降反応において、代替品由来及び現行品由来の両毒素の間で差は確認されなかった(図2)。SDS-PAGE所見でも培養上清中の蛋白成分に差を認めなかった(図2)。

C. 考察

1. ウマ抗毒素製剤のγグロブリンに関する調査

抗毒素製剤中のγグロブリンの構成を調査した。従来品(はぶ抗毒素・まむし抗毒素)と承継品(ジフテリア抗毒素・ガスエソ抗毒素)ではγグロブリン構成比に相違があった。従来品はF(ab')₂が約75%で、残り25%がwhole-IgGであったのに対し、承継品は全てF(ab')₂で構成されていた。

ウマ抗毒素の製造工程には、副反応抑制の目的で、γグロブリンのFcを切断するためのペプシン消化工程がある。従来品と承継品では、精製工程中のペプシン消化条件が若干異なるため、両者のγグロブリン構成比に差が生じていると考えられた。

今回の調査では、ウマ抗毒素製剤のγグロブリン構成比に差が認められたが、製法の統一(ペプシン消化条件の一本化)は急ぐべきでないとする。従来品・承継品共に、これまで临床上の十分な実績があるため、Fcの有無による抗毒素の安定性と抗原との反応性(有効性)、更には製法上の安定性等を勘案しつつ慎重に進めるべきとする。

2. 米国産牛由来原料の代替品探索の検討

抗毒素製剤(ガスエソ)のBSE対策として、免疫

用抗原製造時に使用する米国産牛由来原料の切替えについて検討した。

Welchii 毒素の高毒素産生を目指し、ろ過滅菌法の導入を検討し、現行培地では良好な成績を示したものの、代替培地候補品では高毒素産生への効果はなかった。この理由は詳細には不明であるが、①代替培地候補品中の毒素産生阻害物質がろ過滅菌で除去出来ない、②熱負荷がないため代替培地候補品中の阻害物質自体も活性を保持している、③代替培地候補品中の毒素産生関与物質が現行培地よりも熱負荷の影響を受け難い、などが考えられる。おそらく、これらが複合的に関与し合い、毒素産生向上に結びつかなかった結果と推測された。

一方、本培養中の簡易的 pH 制御法は毒素産生向上に一定の成果を得た。Welchii 菌は培養中、数種のプロテアーゼを産生する。そのうちプロテアーゼ II は Welchii 毒素を分解し得る酵素として報告されている。今回の検討では、培養中の pH 制御がプロテアーゼ II の産生抑制もしくは活性抑制の結果として高毒素産生に繋がったと考えられた。今後は抗プロテアーゼ II 抗体を入手し、培養中 pH とプロテアーゼ II による毒素分解の関係を調査する必要がある。また pH 制御により、溶菌が惹起され培養上清中の蛋白量も増加し、比活性低下を伴うことも判明した。よって今後は、毒素精製面からの評価も検討する必要がある。

D. まとめ

1. 従来品と承継品で、 γ グロブリンの構成比に相違があった。従来品は whole-IgG を約 25% 含んでいた(承継品は $F(ab')_2$ のみ)。この相違は製造工程中のペプシン消化条件の違いによるものと考えられた。可能であれば、将来的には製法の一本化に向けた検討が必要である。

2. 米国産牛由来原料の代替品として良好な 2 つの培地を選定した。一つは緊急対応用としての、現行培地の原産国-豪州産牛への切替えによるものであり(培地成分及び培地製造法は現行と同じ)、もう一方は将来対応用としての、牛成分を含まない豚由来培地である。但し今回は、抗毒素の安定供給を第一義におき、免疫用抗原の製法や免疫法の変更を最小限に留める目的から、前者を代替培地の最有力候補品とした。

E. 研究発表

なし

レーン	検体名
1	分子量マーカー
2	—
3	Horse whole-IgG
4	Horse IgG F(ab') ₂
5	ウマ Albumin
6	まむし抗毒素 (Lot 24)
7	まむし抗毒素 (Lot 25)
8	はぶ抗毒素 (Lot 35)
9	ジフテリア抗毒素 (Lot 001)
10	ガスエソ-Welchii 抗毒素 (Lot W0601)
11	ガスエソ-VS 抗毒素 (Lot V0601)

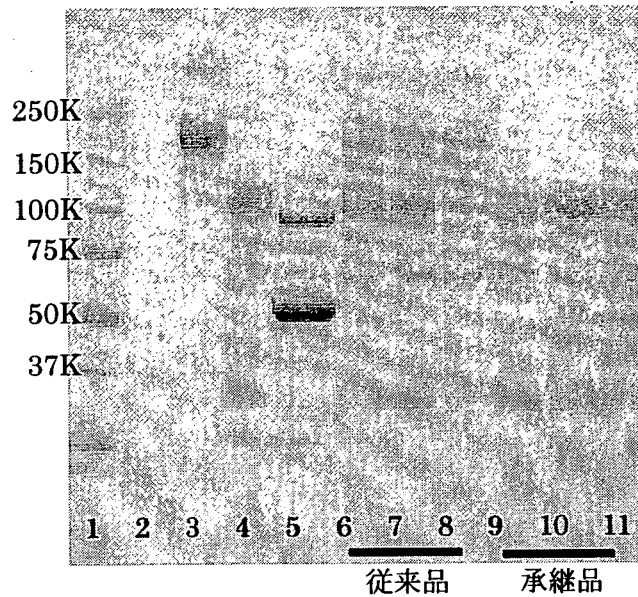


図 1. 抗毒素製剤の SDS-PAGE 分析の結果①(非還元)

表 1. 抗毒素製剤の SDS-PAGE 分析の結果②

分類	レーン番号	製剤名	SDS-PAGE (%)	
			whole-IgG	F(ab') ₂
(対照)	3	Horse whole-IgG	100	0
	4	Horse IgG F(ab') ₂	0	100
従来品	6	まむし抗毒素 (Lot 24)	23	77
	7	まむし抗毒素 (Lot 25)	24	76
	8	はぶ抗毒素 (Lot 35)	26	74
承継品	9	ジフテリア抗毒素 (Lot 001)	0	100
	10	ガスエソ-Welchii 抗毒素 (Lot W0601)	0	100
	11	ガスエソ-VS 抗毒素 (Lot V0601)	0	100

表 2. 抗毒素製剤の HPLC 分析の結果

分類	製剤名	Retention time (分)	HPLC(%)		
			whole-IgG	F(ab') ₂	その他
(対照)	Horse whole-IgG	14.6	98.0	0.0	2.0
		17.0			
	Horse IgG F(ab') ₂	18.1	0.0	96.0	4.0
従来品	まむし抗毒素 (Lot 24)	17.0	24.7	73.7	1.6
		18.3			
	まむし抗毒素 (Lot 25)	17.1	21.9	76.5	1.6
		18.6			
	はぶ抗毒素 (Lot 35)	17.0	22.3	75.1	2.6
		18.1			
	ジフテリア抗毒素 (Lot 001)	18.4	0.0	98.8	1.2
承継品	ガスエソ-Welchii抗毒素 (Lot W0601)	18.4	0.0	99.2	0.8
		18.2			
	ガスエソ-VS抗毒素 (Lot V0601)	18.2	0.0	97.8	2.2

表 3. 培地のろ過滅菌による菌発育・毒素産生への影響

培地の種類	滅菌方法	菌発育 (OD660)	毒素産生	蛋白濃度 (μg/mL)
			卵黄法 (Lv/mL)	
現行培地 ^{#1} (ブドウ糖・ペプトン)	高圧蒸気滅菌 (110°C15分)	4.7	1.6 ^{#1}	129
	ろ過滅菌 (0.2μm)	4.6	3.2	117
豚由来培地 (ミンペプトン)	高圧蒸気滅菌 (110°C15分)	5.1	1.6	127
	ろ過滅菌 (0.2μm)	5.4	1.6	124
植物由来培地 (ベジタブルペプトン)	高圧蒸気滅菌 (110°C15分)	4.8	2.2	155
	ろ過滅菌 (0.2μm)	5.5	2.2	144

#1, 現行培地にククトミトを含まないため、従来(3.2Lv/mL)よりも低毒素産生である。

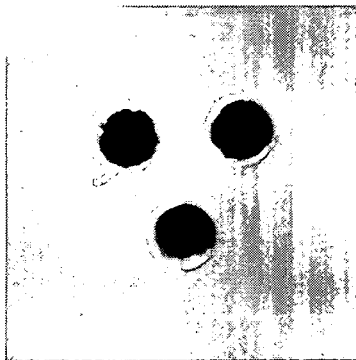
表 4. 菌培養中の簡易的 pH 制御による菌発育・毒素産生への影響

培地の種類	NaOH 添加 ^{#1} (pH 調整)	菌発育 (OD ₆₆₀)	毒素産生	蛋白濃度
			卵黄法 (Lv/mL)	(μ g/mL)
現行培地 ^{#2} (プロテオスペプトン)	なし	5.9	3.2	114
	あり	5.7	4.5	217
豚由来培地 ^{#3} (ミンペプトン)	なし	4.7	2.2	94
	あり	4.1	4.5	287
植物由来培地 ^{#3} (ベジタブルペプトン)	なし	4.8	1.6	165
	あり	5.5	2.2	250

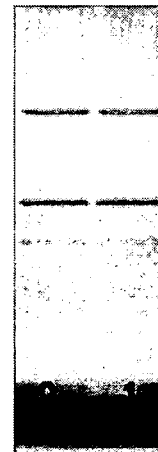
#1, 培養開始 1.5 時間後に NaOH を添加し、pH を 7.0~9.0 に調整。

#2, ろ過滅菌培地を使用(クックミートは含まない)。

#3, 高圧蒸気滅菌培地を使用(クックミートは含まない)。



(産生毒素のウマ抗毒素との反応性)



← Welchii 毒素
(43K)

(培養上清の SDS-PAGE 所見)

No.	検体名
1	米国产由来 Welchii 毒素(現行品)
2	豪州産由来 Welchii 毒素(代替品)
3	Welchii-ウマ抗毒素

図 2. 豪州産牛由来原料によるプロテオスペプトンの評価

厚生労働省科学研究補助金（医薬品・医薬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

免疫ヒトリンパ球から完全ヒト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 抗体プロジェクト研究室
研究協力者：東 成見 藤田保健衛生大学総合医科学研究所（株式会社抗体研究所）
高橋元秀 国立感染症研究所 細菌第二部
小崎俊司 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科

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。トキソイドに対するスクリーニングで単離した 2 種類の抗体が、ニューロトキシンに対するスクリーニングで単離した 4 種類の抗体が毒素中和能を示した。これら 6 種類の抗体を IgG 変換し、抗体タンパク質の調製が可能であった 5 種類の抗体を用いて混合によるシナジー効果を完全中和試験で評価した。抗体の組み合わせのベースは既にシナジー効果を発揮することが確認済みの BT-015 と BT-175 とした。ベース抗体に NT-320 を添加することで完全中和に成功し、更に NT-523 を添加することで最大の効果を発揮した（概算：12IU/mg）。本成果は特許出願した。

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産生される。この抗体が病気治癒に役立っており、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。とりわけ近年、特定の性質を示す抗体を有している献血ボランティアからの成分採血（リンパ球分画を多く含む 3L の血液に相当）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抗体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として、抗原に結合する抗体を多数単離し（第 II 段階）、個々のクローンの毒素中和活性を測定する（第 III 段階）。中和抗体は IgG 型抗体として大量調製し混合

することによりシナジー効果が観察され、ボツリヌス毒素を完全中和する組み合わせを見出す(第 IV 段階)戦略で研究を進める。

B. 研究方法

ボツリヌストキソ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。その後、ニューロトキシンを抗原としてスクリーニングを行い、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。単離した抗体は抗体タンパク質を調製し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。最終的には異なるエピトープを認識する複数種類のモノクローン抗体を混合し(オリゴクローン)、シナジー効果によってボツリヌス毒素を完全中和するか確認する。

C. 研究結果

本年度は研究目的に記載の戦略「第 IV 段階」達成を最大の目標として取り組んだ。

1. 中和抗体の評価1

平成18年度に新たな中和抗体として単離した4種類の抗体(NT-221, NT-320, NT-523, NT-539)をIgG変換した。既にIgG変換が完了している2種類の抗体(BT-015, BT-175)と合わせて合計6種類のIgG抗体を調製した。

NT-523, NT-539の精製量が僅かであった為に各抗体の濃度が一定にできない状況下ではあったが、全種類の抗体を混合して完

全中和試験(日本薬局方(局方)記載の生物学的製剤基準の乾燥ボツリヌスウマ抗毒素製剤の力価試験に準ずる)を実施した。6種類の抗体を混合することによりA型ボツリヌス毒素の完全中和に成功した。本研究班に於いてモノクローン抗体の組み合わせによる完全中和は初である(この段階では本当に必要な抗体の組み合わせは未確定)。

2. 中和抗体の評価2

中和抗体の評価1で完全中和に成功した事から、必要な組み合わせとその最大効果を確認する為に再度IgG抗体の調製したところ、NT-539を除く5種類の抗体が試験に必要な量を調製することができた。

5種類の抗体によるシナジー効果を確認する為の全組み合わせ(26通り)を実施する事は事実上不可能である。そこで既にシナジー効果を確認済みのBT-015とBT-175を組み合わせのベースとして、更にどの抗体(1~3種類)を添加することで完全中和に至るのか試験した(抗体の組み合わせを表1に示す)。試験に用いる抗体サンプルは各抗体濃度を1mg/mlに調製した後、等量を混合して作製した。完全中和試験の結果を表2に、結果の概略を以下に示す。

- ・BT-015とBT-175にNT-320を添加(サンプル6)若しくはNT-523を添加(サンプル7)することで完全中和に成功。NT-320を添加した場合、その効果は大きい。
- ・BT-015とBT-175にNT-320とNT-523を添加(サンプル4)することで最大の効果を発揮し、概算で12IU/mg程度。
- ・BT-015とBT-175NT-221を添加(サンプル5)した場合は完全中和せず(平成18年度に導き出した3抗体の競合関係(やや不明瞭である)からエピトープが競合