

し、相乗効果が得られなかったことが理由と考えられる)

本研究班で完全中和に必要なモノクローン抗体の組み合わせ(オリゴクローン)とその力価を算出することに初めて成功した。

3. 中和抗体のエピトープ解析

平成18年度にBiacoreを用いて6種類の中和抗体の認識エピトープが4カテゴリーに分類できることが示唆される結果が得られた。但し、BT-015, BT-175 と NT-221 の間の関係は不明瞭であった。

そこで、これらの抗体の競合関係を明確にすべく、再度Biacoreを実施した。その結果、平成18年度に予想した結果(BT-015 と NT-221 が同一エピトープ若しくは近傍、BT-175 単独)とは異なり、BT-015 単独、BT-175 と NT-221 が同一エピトープ若しくは近傍という明確な結果が得られた(図)。

Biacoreによるエピトープ競合試験結果は、中和抗体の評価2の各サンプルに於ける完全中和試験結果を支持する分類となった(4カテゴリーに分類された抗体を1種類ずつ混合する事で最大の効果を発揮)。

D. 考察

平成18年度までに単離した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。その活性は、乾燥ボツリヌスウマ抗毒素製剤の力価試験法による評価で、まだ概算の段階ではあるが12IU/mgであった。現行の治療用乾燥ボツリヌスウマ抗毒素(A, B, E, F 4種混合)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ずつ混合することで同等の活性が得られることになる。

E. 結論

ボツリヌス毒素中和抗体を保持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た。合計6種類の中和能を有するモノクローン抗体を獲得し、中和能のシナジー効果を発揮し、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、最大の活性は概算で12IU/mgであった(BT-015, BT-175, NT-320, NT-523の4種類混合の場合)。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。

現行の治療用乾燥ボツリヌスウマ抗毒素(A, B, E, F 4種混合)に含まれるA型毒素抗体が10000IU/vialであることから、4種類の抗体で代替する場合、各抗体を約210mgずつ混合することで同等の活性が得られる。ウマ抗毒素製剤はその製法の特性上、毒素の中和に関係ないグロブリン画分がその大部分を占めていることを考慮すれば、1グラム未満の抗体でA型抗毒素を代替できるのであれば、非常にリーズナブルである。

現段階ではヒト抗体による代替はA型抗毒素部分のみであるが、本研究を通じて蓄積した抗体単離方法のノウハウを駆使することで、作製した抗体ライブラリーからB, E, F型ボツリヌス毒素に対する中和抗体単離することは可能であろう。それを実現す

ることで、現行のウマ抗毒素製剤よりも安全且つ安定的に供給可能なボツリヌス毒素治療薬の提供に貢献できるものとする（大人の食中毒やバイオテロ対策に貢献できることは勿論のことであるが、ウマ抗毒素製剤投与時の副反応による生命の危険から現在は対処療法に頼る以外方法のない小児での食中毒発症時の治療では特に有効な手段となろう）。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

論文発表

なし

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

表1 抗体の組み合わせ

サンプル1	サンプル2	サンプル3	サンプル4	サンプル5	サンプル6	サンプル7
5種類混合	4種類混合	4種類混合	4種類混合	3種類混合	3種類混合	3種類混合
BT-015	BT-015	BT-015	BT-015	BT-015	BT-015	BT-015
BT-175	BT-175	BT-175	BT-175	BT-175	BT-175	BT-175
NT-221	NT-221	NT-221	NT-320	NT-221	NT-320	NT-523
NT-320	NT-320	NT-523	NT-523			
NT-523						

表2 中和抗体の組み合わせによる完全中和試験の結果

L+/20レベル

		LD ₅₀ /V ₅₀ TD ₅₀ /V ₅₀				4TD: D ₅₀				LD ₅₀ /4TD			
		60000				1120				280			
		28 10(280)											
凍結乾燥ポフリス試験液A型		TypeA				30 x 104LD ₅₀ /ml				28 10(280)			
		BAOS01は1 mlのPBSで溶解				0.2				3			
						5.4				27			
										0.5 ml. Lp. hy			

No.	日本製薬品	PBS	Toxin	体重													
	AT 0.5 IU/ml			1	2	3	6	7	8	9	10	13	15	17	21		
1	0.47g	0.30	0.33	0.63	14.9	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++
2					15.5	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
3		0.28	0.36	0.63	16.2	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
4		0.25	0.38	0.63	16.0	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
5		0.23	0.40	0.63	15.5	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
					16.3	+	d										
					15.8	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
					16.3	+++	+++	d									
		0.21	0.42	0.63	15.8	d											

No.	東映株	PBS	Toxin	体重													
				0.0	1	2	3	6	7	8	9	11	13	15	17	21	
6	サンプル1				15.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	1x	0.25	0.38	0.63	16.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	2x	0.25	0.38	0.63	16.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	3x	0.25	0.38	0.63	16.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	27x	0.25	0.38	0.63	15.8	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
					15.0	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
					16.5	d											
					17.0	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
					16.8	d											
		0.25	0.38	0.63	15.4	d											

No.	東映株	PBS	Toxin	体重													
				0.0	1	2	3	6	7	8	9	11	13	15	17	21	
11	サンプル2				17.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	1x	0.25	0.38	0.63	15.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	2x	0.25	0.38	0.63	16.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	3x	0.25	0.38	0.63	15.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	27x	0.25	0.38	0.63	17.2	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
					15.5	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
					16.1	++	d										
					16.7	+++	d										
					16.1	++	++	d									
		0.25	0.38	0.63	14.9	+++	+++	d									

No.	東映株	PBS	Toxin	体重													
				0.0	1	2	3	6	7	8	9	11	13	15	17	21	
16	サンプル3				15.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	1x	0.25	0.38	0.63	16.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	2x	0.25	0.38	0.63	16.1	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
19	3x	0.25	0.38	0.63	16.1	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
20	27x	0.25	0.38	0.63	16.1	+++	d										
					15.0	d											
					16.2	++	++	d									
					17.3	d											
		0.25	0.38	0.63	14.7	d											

No.	東映株	PBS	Toxin	体重													
				0.0	1	2	3	6	7	8	9	11	13	15	17	21	
21	サンプル4				15.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	1x	0.25	0.38	0.63	15.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	2x	0.25	0.38	0.63	15.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	3x	0.25	0.38	0.63	16.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	27x	0.25	0.38	0.63	15.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
					16.7	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
					15.8	++	d										
					13.4	d											
		0.25	0.38	0.63	16.9	d											

No.	東映株	PBS	Toxin	体重													
				0.0	1	2	3	6	7	8	9	11	13	15	17	21	
26	サンプル5				15.3	+++	d										
27	1x	0.25	0.38	0.63	15.7	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28	2x	0.25	0.38	0.63	14.8	d											
29	3x	0.25	0.38	0.63	16.6	d											
30	27x	0.25	0.38	0.63	15.8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
					16.8	d											
					16.1	d											
					16.1	d											
					15.9	d											
		0.25	0.38	0.63	15.5	d											

No.	東映株	PBS	Toxin	体重													
				0.0	1	2	3	6	7	8	9	11	13	15	17	21	
31	サンプル6				15.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	1x	0.25	0.38	0.63	14.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	2x	0.25	0.38	0.63	16.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	3x	0.25	0.38	0.63	15.9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	27x	0.25	0.38	0.63	16.7	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
					16.1	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
					16.2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
					15.0	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
					16.5	d											
		0.25	0.38	0.63	15.5	+++	+++	d									

No.	東映株	PBS	Toxin	体重													
				0.0	1	2	3	6	7	8	9	11	13	15	17	21	
36	サンプル7				16.7	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
37	1x	0.25	0.38	0.63	16.1	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
38	2x	0.25	0.38	0.63	16.4	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
39	3x	0.25	0.38	0.63	16.1	d											
40	27x	0.25	0.38	0.63	15.4	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+
					16.2	+++	d										
					16.0	d											
					14.9	d											
					15.6	d											
		0.25	0.38	0.63	17.3	d											

コントロール

サンプル1

サンプル2

サンプル3

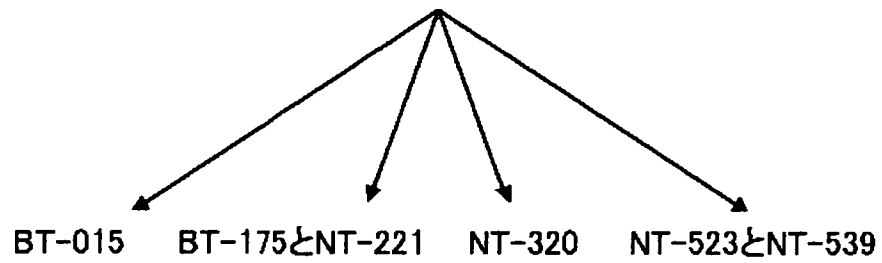
サンプル4

サンプル5

サンプル6

サンプル7

BT-015, BT-175, NT-221, NT-320, NT-523, NT-539



4カテゴリーに分類

図 6 種類の中和抗体のエピトープ分類

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療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

分担研究報告

「ボツリヌス抗毒素製剤の評価法に関する研究」

分担研究者 向本雅郁 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科
協力研究者 小崎俊司 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科
幸田知子 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科
前田浩明 (財)化学及び血清療法研究所

要旨： ボツリヌス抗毒素製剤の免疫学的評価法を確立するための基礎的データ集積を目的として、昨年度に作製したモノクローナル抗体について性状解析を行った。今回解析した 15 種類のモノクローナル抗体の中に、トキシイドとのみ非常に強く反応するクローンが 2 種類存在していた。これらはいずれも中和活性を有しておらず、抗毒素製剤中にも含まれている可能性は高く、このような抗体は抗毒素製剤の品質を低下させる可能性が示唆された。ELISA 法と免疫沈降法で抗体の反応性は異なった結果を示した。抗原を固層化する ELISA 法では、毒素分子の構造が崩れ、正確な評価が行えないことを示している。単独で A 型神経毒素に対して非常に強い中和活性を有するクローンを得ることができた。この抗体は今後の抗毒素製剤の評価における指標抗体となりうる可能性がある。前研究班から継続しているマウスーヒトキメラ抗体の作製では、E 型神経毒素を中和するマウス抗体遺伝子をクローニングし、キメラ抗体を得るため、細胞へのトランスフェクションを行った。

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。ボツリヌス抗毒素製剤の作製のために用いられている免疫原はボツリヌス菌を大量培養することによって毒素を抽出・精製するため、多大な労力と費用が必要であり、製造者はバイオセーフティーの観点から常に危険に曝されている。また、製造された毒素やトキシノイドの製造ロットごとにおける品質のバラツキ等も抗毒素製剤の安定供給という観点からも改善される余地が残っている。このような抗毒素製剤製造時における諸問題を解決するために、現行の抗毒素製造における免疫原としてのトキシノイドおよび毒素の効率性ならびに有効性を免疫学的手法により評価する方法を確立する。将来的には、合成ペプチドあるいは組換えサブユニットを免疫原としたバイオセーフティーに配慮した抗毒素製剤の作製法を模索するための基礎的研究を行う。今年度は作成した A 型神経毒素に対するモノクローナル抗体の性状解析を昨年度に引き続き行うとともに、抗毒素製剤および免疫原の評価法について検討した。さらに、前研究班より継続して行っているウマ抗毒素に変わるより安全で、高

い中和力価を持つ抗毒素製剤として、E 型神経毒素に対するマウスーヒトキメラ抗体の作製を試みた。

B. 研究方法

(1) 抗 A 型神経毒素モノクローナル抗体

昨年度作製したモノクローナル抗体のうち、A 型神経毒素中和活性の有無に関わらずサブクラスが IgG である抗体 15 種類について、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抗体を以下の実験に使用した。

(2) A 型神経毒素

複合体毒素 (L 毒素, M 毒素)、神経毒素 (NT) は *C. botulinum* type A 62A 株より精製した。トキシノイドは神経毒素を常法によりホルマリンで不活化し調製した。神経毒素をトリプシンで消化し精製した重鎖 (H 鎖) および軽鎖 (L 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) も抗体の検出用抗原として用いた。

(3) イムノブロッティング

7.5%アクリルアミドゲルに神経毒素を DTT 処理後 1 レーンあたり 0.2 μ g アプライし、SDS-PAGE を行った。泳動蛋白をニトロセルロース膜に転写した後、ハイブリドーマ培養上清または精製 IgG で Immunoblotting を行った。2 次抗体は、ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG ヤギ抗体 (1:3000)、発色基質は 4-chloro-1-naphtol を用いた。

(4) ELISA

等モルになるように調製した抗原 (NT; $0.5 \mu\text{g}/\text{well}$, L 毒素; $1.7 \mu\text{g}/\text{well}$, M 毒素; $1.0 \mu\text{g}/\text{well}$, H 鎖; $0.33 \mu\text{g}/\text{well}$, L 鎖; $0.17 \mu\text{g}/\text{well}$, Hc; $0.17 \mu\text{g}/\text{well}$) を ELISA プレート (Flexible Plate, BD Falcon) にコーティングし、ブロッキングには 0.2% BSA、2 次抗体にはペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG (H+L) ($1:5000$, BioRad)、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。結果は 480nm の波長で測定した時の吸光度で示した。

(5) 中和試験

神経毒素 ($200\text{ipLD}_{50}/\text{ml}$) と精製抗体 ($40 \mu\text{g}/\text{ml}$) を 0.5 ml ずつ等量混合し、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。毒素ノミを接種したマウスをコントロールとし、コントロールが死亡した時点を 0 時間として、試験群の死亡した時間をスコアで示した。接種後、4 日間観察し、その時点でマウスが生存した場合を完全中和とした。

(6) 免疫沈降法

精製モノクローナル抗体 ($60 \mu\text{g}/\text{ml}$) $100 \mu\text{l}$ に 10% protein G sepharose (GE) $15 \mu\text{l}$ を加え、 4°C で 1 時間反応後、PBS(-) で 3 回遠心洗浄することで、protein G に未吸着の抗体を除去した。抗体が結合した protein G sepharose を 20mM Phosphate buffer (PB, pH 6.0) - 0.15M NaCl $100 \mu\text{l}$ に浮遊させ後、

NT ($0.6 \mu\text{g}$) または L 毒素 ($2 \mu\text{g}$) を加え、 4°C 1 時間反応させた。 20mM PB (pH 6.0) - 0.15M NaCl で 3 回遠心洗浄した後、沈殿した protein G sepharose に SDS サンプルバッファーを $20 \mu\text{l}$ 加え、3 分間煮沸後、 7.5% SDS-PAGE を行った後、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ティングにより毒素分子を検出した。その他のイムノブロッティングの条件は上記 (3) と同様。

(7) キメラ抗体遺伝子発現プラスミドの構築

前研究班で作製した E 型神経毒素に対して中和活性を有するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ (9-4) より 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。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 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た。

(倫理面への配慮)

マウスの取扱いは大阪府立大学動物実験指針および同動物実験細則に基づいて倫理面に配慮して行った。

C. 研究結果

1. 評価法に使用可能な抗体の選別

(1) モノクローナル抗体の各種毒素分子との反応性

A 型神経毒素と反応するモノクローナル抗体(IgG)を産生するハイブリドーマ 15 クローンについて ELISA による神経毒素、トキソイド、神経毒素のサブユニット (L 鎖、H 鎖、Hc) との反応性とブロットィングによる検出の有無について調べた (図 1)。ELISA においてトキソイドと強く反応するが NT との反応性は低いクローンは 2 クローン存在した (1D4, 13D9)。1D4 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。ブロットィングにおいて、1D4 は検出されなかったが、13D9 は L 鎖と反応した。この結果は ELISA の結果とも一致していた。昨年度の結果から、毒素中和活性を有する 4 クローン (1D2, 2F11, 3D8, 4E8) はいずれもブロットィングでは検出されなかった。ELISA における反応性では、いずれのクローンもトキソイドとの反応性は NT と比較して低かった。

15 クローンの培養上清について、複合体毒素との反応性を ELISA を用いて調べた (図 2)。中和活性を有する 1D2 と 4E8 は 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。また、トキソイドとの反応性が高く、L 鎖を認識する 13D9 も L 毒素と

の反応性が低かった。

(2) 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

ELISA やブロットィングでは蛋白分子の立体構造が変化して、溶液中での構造を保持していない。そこで、本来の構造を維持した状態での抗体との反応性を調べるため、免疫沈降法を用いて NT と L 毒素との反応性を調べた (図 3)。ELISA において L 毒素との反応性が非常に低かった 3 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は 4E8 のみ免疫沈降で検出された。このクローンは ELISA では L 毒素との反応性は低かったが、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。

(3) 精製抗体の中和活性

ハイブリドーマ培養上清が神経毒素に対して中和活性を示したクローンについてアフィニティー精製抗体での毒素中和活性を調べた (表 1)。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 1D2 のみ神経毒素を完全中和した。その他のクローンは延命が見られたがいずれも対照群が死亡後 24 時間以内に死亡した。

2. 抗 E 型神経毒素マウスーヒトキメラ抗体

前研究班で作製した E 型神経毒素に対するモノクローナル抗体の中から E

型神経毒素に対して完全中和したクローン (9-4) (平成 17 年度報告書) 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。

D. 考察

治療効果の高い抗毒素製剤を作製するためには、毒素中和活性の高い抗体を用いることが必須である。そのためにはより多くの中和抗体が産生できる免疫原 (トキシイドや毒素) を用いることであり、毒素中和に関わるエпитープを明らかにすることは、効率的に抗毒素製剤を製造する上で非常に重要な要素である。これまで、A 型神経毒素に対する中和抗体は単独では神経毒素を完全中和することができず、複数の中和抗体を混合してはじめて完全中和すると考えられている。また、神経毒素を中和するメカニズムについてもまだ明らかになっていない。今回、精製モノクローナル抗体において、単独で非常に強い中和活性を示すクローンが得られた。この抗体はブロッティ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考えられ、エпитープの決定は困難であると思われる。しかしながら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。そのためには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含まれているかを定量化することができれば、抗毒素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。

トキシイドと強く反応し、神経毒素との反応性が低いモノクローナル抗体はブロッティングだけでなく免疫沈降によっても反応しなかった。このことはホルマリンでのトキシイド化によって毒素分子のチオール基が還元されたことで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ていると考えられる。実際の製造過程においても、ホルマリン不活性化工程でこのような高次構造が変化したエピトープができ、その結果、中和力価の減少が生じる可能性がある。また、最初の 2 回をトキシイドで免疫し、以後 20 回も神経毒素で免疫したにも関わらず、トキシイドに対する抗体が容易に産生されるということは、以下に最初の免疫が重要であることを示している。

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た。これらのクローンの中には免疫沈降法では神経毒素と L 毒素に対して同程度沈降させる能力があった。このことは ELISA が毒素の評価あるいはマウス中和反応の代替には不向きであることを示している。来年度は免疫沈降法を用いて、今回調べなかったモノクローナル抗体全てについて、神経毒素とは反応するが複合体毒素とは反応しない抗体、特に中和抗体が存在するかを調べ、その抗体と同じエピト

ブを認識する抗体の抗毒素製剤の中和活性への影響を解析する。さらに、A 型ボツリヌス菌の株間での神経毒素および複合体毒素との指標となる抗体の反応性の違いについて検討する予定である。

抗E型神経毒素マウスーヒトキメラ抗体については、マウスモノクローナル抗体でA型とは異なり、1種類の抗体で完全中和できるクローンを得、そのクローンを基にキメラ抗体を作製した。したがって、キメラ抗体でもE型神経毒素を完全中和する可能性が高い。今後はE型キメラ抗体産生細胞のクローニングを行い、精製抗体を作製し、中和力価を測定する予定である。

E. 結論

精製モノクローナル抗体で単独でA型神経毒素を中和できる抗体を得ることができた。この抗体は抗毒素製剤の評価法に利用できる可能性がある。抗体の反応性の評価法として免疫沈降法はELISAより毒素分子の立体構造を維持した状態で反応させることができるためより精度が高い評価法となりうる可能性がある。抗E型神経毒素マウスーヒトキメラ抗体作出のためのキメラ化および産生細胞へのトランスフェクションが完了した。今後、クローニングを行い、キメラ抗体を評価する。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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) 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)

2) 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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

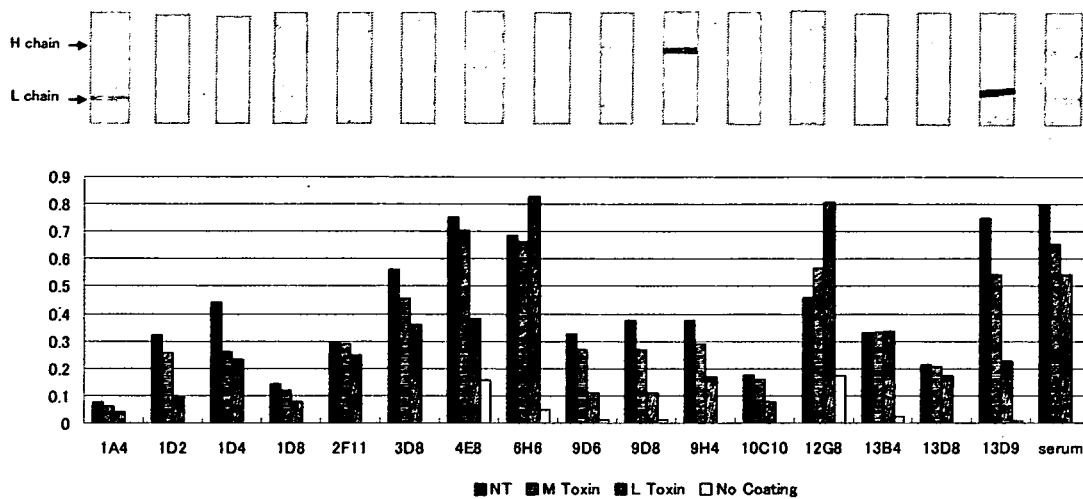


図 1. モノクローナル抗体による抗原認識領域

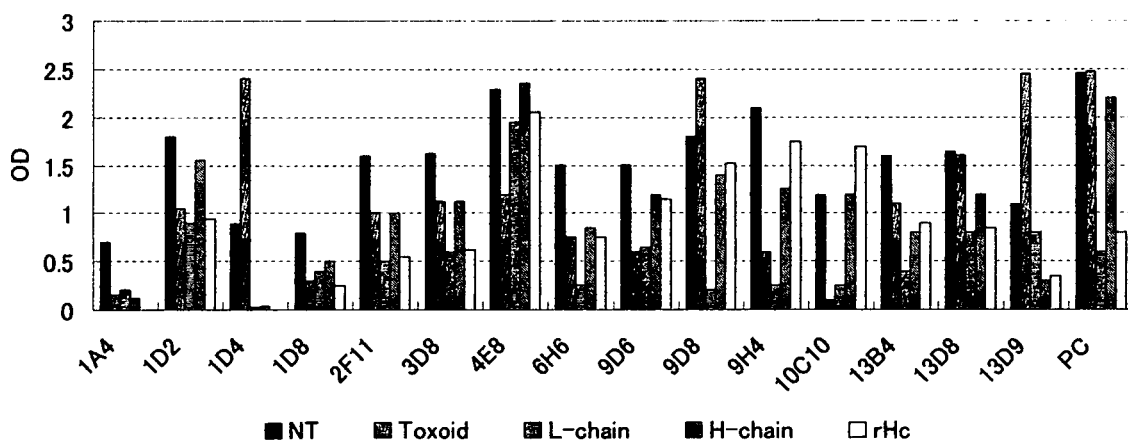


図 2. モノクローナル抗体の複合体毒素との反応性

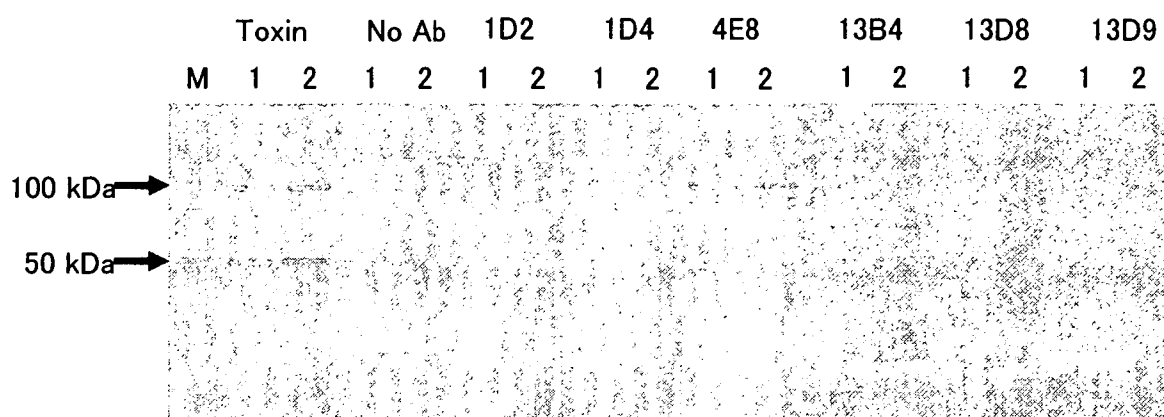


図 3. 免疫沈降法による毒素分子の検出

表 1. 精製抗体による A 型神経毒素に対する中和活性

クローン No.	スコア
1D2	+++
2F11	+
3D8	+
4E8	++

50 LD₅₀ の BoNT/A のみを接種したマウス死亡時間との差
 3 時間以内 - ; 3~6 時間 + ; 6~12 時間 ++ ; 12 時間以上 +++

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

「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」

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：我々は、これまでに、独自に改良した EBV-ハイブリドーマ法によって2種類の完全型抗破傷風毒素ヒトモノクローナル抗体と（TT1 および TT2）を作製し、さらに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 12 種類の完全型抗破傷風毒素ヒトモノクローナル抗体を作製してきた。その過程で、TT1 抗体（IgG1）の有する弱い破傷風毒素中和活性が、ほとんど中和活性を持たない TT2 抗体（IgG4）と組み合わせてその等量を毒素に作用させることによって *in vivo* で著しく増強されることを見いだした。さらに、上記の 10 種類の完全型抗破傷風毒素中和抗体パネルを用いて、それぞれと TT2 抗体の組み合わせによる中和活性の増強効果を検討したところ、興味深いことに、いくつかの組み合わせにおいても TT2 抗体の添加によって中和活性が著しく増強されることが同様に観察された。TT2 抗体のアイソタイプが IgG4 であり、IgG4 抗体の機能はほとんど解明されていないので、本年度は TT2 抗体による抗毒素中和活性の増強が IgG4 アイソタイプに依存した反応であるかどうかについて、TT2 の Fc 部を IgG1 に置換した組換え抗体を調製して検討した。TT2 の Fc 部を IgG1 に置換した組換え抗体（TT2- γ 1Fc）が野生型の TT2 抗体（IgG4）よりも強い中和抗体増強活性を示したことから、中和活性の増強作用は IgG4 アイソタイプに依存しないだけでなく、IgG の γ 4 H 鎖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、TT2- γ 1Fc を添加することにより、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。

A. 研究の目的

我が国における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減少したが、感染が成立した場合の致死率は依然として高い。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。破傷風急性感染時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製剤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。我々はこれまでに、今までは適切な融合親株が存在しないことから困難とされたヒト抹消血 B 細胞からのハイブリドーマ作製を、融合親株 6JC5.2 を利用した EBV-ハイブリドーマ法として改良・確立した。この方法により、二種類の抗体 TT1 と TT2 を樹立した。TT1 抗体（IgG1）が示す部分的な破傷風毒素中和活性は、極めて低い中和活性を示す TT2 抗体（IgG4）の等量混合により飛躍的に増強され完全に破傷風毒素を中和した。さらに、キリン医薬カンパニーにより開発された KM マウスを利用し抗破傷風毒素ヒト抗体パネルの作製を行い、昨年度までに 12 種類の抗体を作製した。また、上記の 10 種類の完全型抗破傷風毒素中和抗

体パネルを用いて、それぞれと TT2 抗体の組み合わせによる中和活性の増強効果を検討したところ、興味深いことに、いくつかの組み合わせにおいても TT2 抗体の添加によって中和活性が著しく増強されることが同様に観察された。TT2 抗体のアイソタイプが IgG4 であり、IgG4 抗体の機能はほとんど解明されていないので、本年度は TT2 抗体による抗毒素中和活性の増強が IgG4 アイソタイプに依存した反応であるかどうかについて、TT2 の Fc 部を IgG1 に置換した組換え抗体を調製して検討した。

B. 研究方法

TT2 抗体（IgG4）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（IgG1）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機能的な 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（IgG4）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、培養上清から濃縮、精製した。

それぞれの組換え抗体およびハイブリドーマの産生する抗体の破傷風

毒素の *in vivo* 中和試験によって、中和活性の増強効果を測定した。

(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、国立感染症研究所および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

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、劇的に増強されるという現象が追試によって再現された (図 1)。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 $\gamma 1$ 鎖由来の Fc に組換えた組換え TT2- $\gamma 1$ Fc の中和活性増強を比較したところ、組換え TT2- $\gamma 1$ 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 (図 1) 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 $\gamma 1$ 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。マクロファージなどの Fc レセプターを介したオプソニン作用が *in vivo* での破傷風毒素の中和に重要であることを示していると考えられる。

D. 考察

本研究の結果、*in vivo* での破傷風毒素の中和にマクロファージなどの Fc レセプターを介したオプソニン作用が重要である可能性が強く示唆された。TT1 抗体などの $\gamma 1$ 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かもしれない。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、TT2- $\gamma 1$ Fc を添加することにより、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。

E. 結論

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 $\gamma 1$ 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。マクロファージなどの Fc レセプターを介したオプソニン作用が *in vivo* での破傷風毒素の中和に重要であることを示していると考えられる。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 $\gamma 1$ 鎖の Fc 部を改変して、より強い中和活性を持たせ、TT2- $\gamma 1$ Fc 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。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

1.論文発表

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 (2006), 139-154.

2.学会発表

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.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

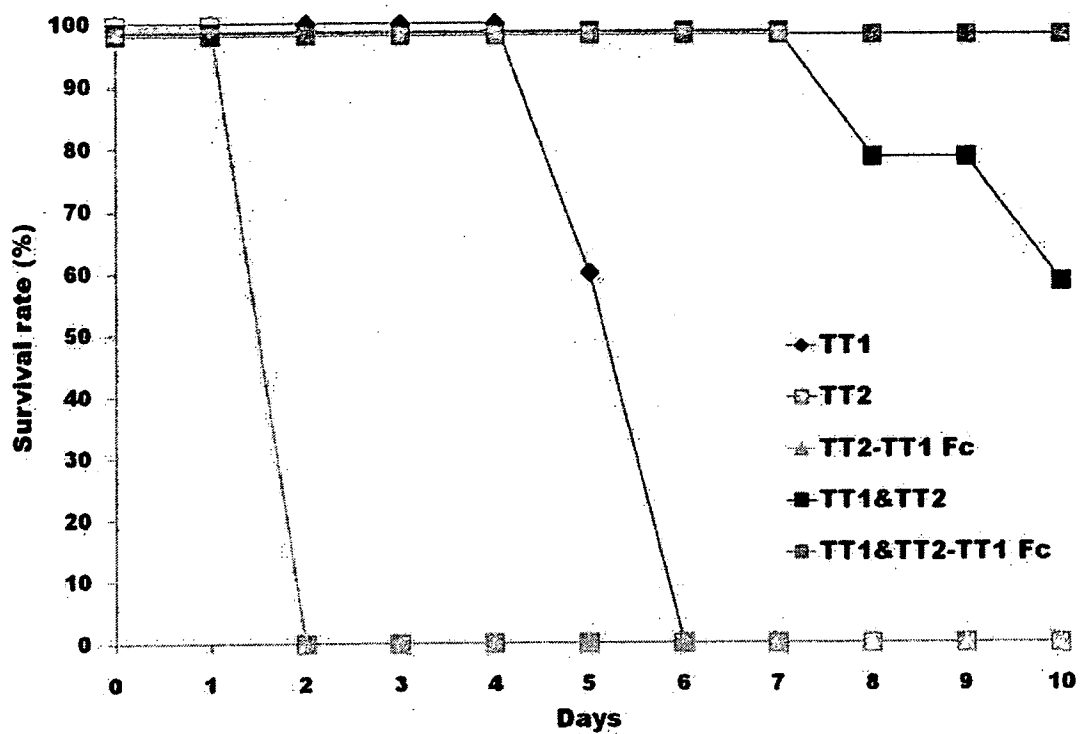
1. 特許 なし

実用新案登録 なし

2. その他

⊠ 1

Neutralization of TeNT by H-chain chimeric mAbs



III. 研究成果の刊行に関する一覧表

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
Akira Ainai, Takuo Kawase, Akari Ida, Yoshitaka Maeda, Hiroyoshi Ohba, Yoshihisa Ikeda, Hiroko Sato, Motohide Takahashi and Joe	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
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
Kentaro Tsukamoto, Yuiko Kozai, Hideshi Ihara, Tomoko Kohda, Masafumi Mukamoto, Takao Tsuji and Shunji Kozaki	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	2008

IV. 研究成果の刊行物・別刷り