

表 3-1. ウマ抗毒素製剤のウイルス・クリアランス・データの報告例

モデルウイルス	ゲノム	外被	ペプシン条件	ウイルス低減率 ^{#3}
West Nile Virus ^{#1} (馬由来)	ss-RNA	(+)	pH3.2, 60分	>4.0 log ₁₀
Sindbis Virus ^{#1}	ss-RNA	(+)	pH3.2, 60分	>4.0 log ₁₀
Pseudorabies Virus ^{#2}	ds-DNA	(+)	pH3.3, 60分	5.1 log ₁₀
Vesicular Stomatitis Virus ^{#2} (馬由来)	ss-RNA	(+)	pH3.3, 20分	>4.5 log ₁₀
Bovine Virus Diarrhoea Virus ^{#2}	ss-RNA	(+)	pH3.3, 60分	1.7 log ₁₀
Encephalomyocarditis Virus ^{#2}	ss-RNA	(-)	pH3.3, 60分	2.5-5.7 log ₁₀

#1, Lazar et al., 2002 からの引用。

#2, Burnouf et al., 2007 からの引用。

#3, 「4.0 log₁₀以上」が不活化の判断基準(目安として)。

表 3-2. 当所のウマ抗毒素製剤のペプシン消化条件

製剤	蛋白濃度 (mg/mL)	pH	温度(°C)	時間
従来品(まむし・はぶ)	30	4.2	37	18-24
承継品(カスエソ・ホヅリス・シフリア)	30	3.2	37	1-10
海外のウマ抗毒素 ^{#1}	60-90	3.1-3.3	30-37	0.6-24

#1, 「表 3-1」の引用文献中に示されている条件。

DRAFT

厚生労働科学研究費補助金 研究班
 (医薬品・医療機器等レギュレーション総合研究事業)
 班長 高橋 元秀
 (国立感染症研究所 細菌第二部第3室長)

「まむしウマ抗毒素」の使用実態に関するアンケート

1. 経験されたまむし咬傷の症例数は何例ありましたか？
- | | |
|--------|------------------|
| 平成20年度 | 過去2年間(平成18・19年度) |
| 例 | 例 |
2. 「まむし咬傷」としての診断の根拠となった事象は何でしたか(重複回答可)？
- 番号を○でお囲み下さい
- | | | |
|----------------|--------------|----------------|
| 1. 蛇(マムシ)の特定 | 2. 受傷痕(噛み傷) | 3. 専門家の意見(蛇咬傷) |
| 4. 患者の申告(問診等) | 5. 局所症状(腫脹等) | 6. 全身の症状 |
| 7. 血液生化学等検査値異常 | 8. その他() | |
3. 上記1.の症例中、まむしウマ抗毒素を使用した症例数は？
- | | |
|--------|------------------|
| 平成20年度 | 過去2年間(平成18・19年度) |
| 例 | 例 |
4. まむしウマ抗毒素は注文して、速やかに入手できましたか？
- 何れかを○でお囲み下さい
- | | | |
|--------------|---------|-------|
| 支障なし | やや支障あり* | 入手困難* |
| (*この場合の理由:) | | |
5. まむしウマ抗毒素の1症例当りの平均的な使用本数は？
- | | |
|--------|------------------|
| 平成20年度 | 過去2年間(平成18・19年度) |
| 本 | 本 |
6. まむしウマ抗毒素を院内在庫として常備されていますか？
- | | |
|----------|------------|
| ○でお囲み下さい | ありの場合(およそ) |
| なし あり | 本 |
7. 経験されたまむし咬傷例(抗毒素使用の有無に拘らず)の転帰と例数について教えてください？
- | | | |
|---------------|--------|------------------|
| | 平成20年度 | 過去2年間(平成18・19年度) |
| 回復 | 例 | 例 |
| 何らかの後遺症を残す... | 例 | 例 |
| 死亡 | 例 | 例 |
| その他 | 例 | 例 |
8. まむしウマ抗毒素使用の症例において、通常、受傷から抗毒素使用までの時間はどのくらいでしたか(重複回答可)？
- 番号を○でお囲み下さい
- | | | | |
|--------------|-----------|------------|-----------|
| 受傷～投与まで..... | 1. 1時間以内 | 2. 1～3時間 | 3. 3～6時間 |
| | 4. 6～12時間 | 5. 12～48時間 | 6. 48時間以上 |
| | 7. その他() | | |
9. 3年間(平成18～20年度)のまむしウマ抗毒素使用による、副作用としての血清病の発生はありましたか？
また、血清病の重篤な症例数とその転帰について教えてください？
- | | | |
|------|----------|------------------------------------|
| 血清病* | 重篤な血清病** | 重篤な血清病の転帰 |
| 例 | 例 | 回復 後遺症あり 死亡 不明
(例)(例)(例)(例) |
- *血清病とは：まむしウマ抗毒素等の投与に当り、ウマ血清に対して発現するショック、アナフィラキシー様症状(血圧降下、喉頭浮腫、呼吸困難等)及びその他の過敏症を総称する症状のこと。
 **重篤度の判断：重篤：死亡・障害。死亡・障害につながる恐れ。副作用治療のための入院又は入院期間の延長。
 上記に準じて重篤。後世代における先天性の疾病又は異常。
 重篤でない：上記に該当しないもの(症状が軽く、容易に治癒する)。
10. まむし咬傷例にまむしウマ抗毒素以外で使用された代表的な治療薬があれば教えてください(重複回答可)？
- | | |
|------------|-----------|
| 1. セファランチン | 2. その他() |
|------------|-----------|
11. まむし咬傷例にまむしウマ抗毒素を使用された経験において、抗毒素は治療に有効であったと考えますか？
- 何れか1つを選択下さい
- | | |
|-------------------------|-------------|
| 1. 重症・軽症の区別なく有効 | 2. 重症例にのみ有効 |
| 3. 効果を期待できない(考えられる理由:) | |
| 4. その他() | |
12. まむし咬傷に際し、まむしウマ抗毒素の使用は必要と考えますか？
- 何れか1つを選択下さい
- | | |
|------------------------|-------------|
| 1. まむし咬傷には欠かせない | 2. 重症例にのみ使用 |
| 3. 代替薬で治療(血清病等の副作用を考慮) | |
| 4. その他() | |
- ★記入者
- ご芳名 _____
- (連絡先) ご施設 _____
- ご住所 _____ (〒 -)
- TEL/FAX TEL: _____ /FAX: _____
- e-mail _____ @ _____

*アンケート調査にご協力頂き、誠に有難うございました。
 頂きました情報は、本研究班の事業活動においてのみ使用させていただきます。

2008年9月 日

医療機関各位

DRAFT

厚生労働科学研究費補助金 研究班
(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)
班長 高橋 元秀
(国立感染症研究所 細菌第二部第3室長)

「まむしウマ抗毒素の使用実態調査」のお願い

謹啓

時下ますますご清栄のこととお慶び申し上げます。

平素より、多大なるご協力を頂き、御礼申し上げます。

さて、国内のまむし咬傷に関してですが、まむし咬傷は保健所及び厚生労働省への届出システムがないために、咬傷患者の実数は不明です。但し、まむしウマ抗毒素の販売量(使用/未使用の内訳は不明)から推測しますと、実態は不明ながら年間 2000~3000 件程度の発生が考えられています。まむし咬傷後の重症例には緊急的な抗毒素療法が最も有効な治療方法で、まむしウマ抗毒素は安定的、かつ迅速な医療機関への提供が欠かせない医薬品であると認識しています。

一方で、まむしウマ抗毒素の生産量は年間 3000 本程度で、僅かではあります年々減ってきているのが現状です。他方、(財)蛇族学術研究所の調査によりますと、まむし咬傷患者の約 20 人が死亡しているとの情報もあり、咬傷患者の実態や治療に関する情報は不十分です。

抗毒素製剤の、このような性質を鑑み、平成 18 年度より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)研究事業において、「抗毒素製剤の効率的製造方法の開発に関する研究」が 3 年間の計画で発足し、研究班が組織されています。この研究において、まむしウマ抗毒素の医療機関における使用実態を把握することで、製剤の有効性と安全性並びに供給についても評価することを目的に、調査をお願い申し上げます。

つきましては、今回、製造メーカー・販売会社の協力を得て、“まむし咬傷の発生数”及び“抗毒素の使用実態”等を把握するため、当該医薬品を納入頂いた医療機関を対象としたアンケート調査にご協力頂きたく存じます。

ご多用のところお手数とは存じますが、今後のまむしウマ抗毒素の適正使用や安全性向上のための研究であることをご理解頂き、別紙のアンケート調査票にご記入の上、「11 月末日まで」にご返送頂きますよう、ご協力をお願い申し上げます。

謹白

厚生労働科学研究班 事務局
担当 山本明彦(E-mail:yama-aki@nih.go.jp)
国立感染症研究所 細菌第二部第3室
〒208-0011 武蔵村山市学園 4-7-1
TEL:042-561-0771 /FAX:042-561-7173

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

抗ボツリヌス毒素中和抗体単離を例とした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

研究分担者：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 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。昨年度まではA型ボツリヌス毒素に対する中和抗体のスクリーニングを行い、A1型毒素を完全中和できる抗体の組合せを見出すことができ、区切りがついた。この経験を生かして今年度はB型ボツリヌス毒素のニューロトキシンを抗原に、中和抗体の取得を試みた。これまでに取得した24種類の抗体を取得して中和試験を実施中である。

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毒素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）。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スティック効果が観察され、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）、シナジスティック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

昨年度までA型ボツリヌス毒素に対する完全中和できる抗体の組合せ探索を実施し、毒素を完全中和できる組合せを見出すことに成功し、区切りがついた。本年度は対象抗原をB型ボツリヌス毒素へと移行し、これまでの経験に基づいて短期間に目的の中和抗体群を取得することを目指した。

1. スクリーニング1

B型ボツリヌスニューロトキシンを抗原にパニング法でスクリーニングを実施した。3rdスクリーニング後にoutput/input比の上昇が見られたことから、190クローンをELISAにて評価し、67クローンがELISAポジティブと判断した。抗体の遺伝子配列を解析したところ、61クローンが解析可能であり、15種類の抗体が含まれていた。抗体タンパク質を調製し、マウスを用いた中和試験を実施中である。

2. スクリーニング2

更にスクリーニングを継続し、4thスクリーニングを実施した。ELISAにて結合活性を評価したところ、184クローンがELISAポジティブと判断した。抗体の遺伝子配列を解析したところ、164クローンが解析可能であり、スクリーニング1で得られた抗体とその配列を比較したところ、

新規抗体が 9 種類の含まれていた。抗体タンパク質を調製し、こちらにもマウスを用いた中和試験を実施中である。

D. 考察

昨年度まで実施した A 型ボツリヌス毒素中和抗体単離の経験から得られたインフォメーション（スクリーニングに用いる抗原、中和抗体によるエピトープマスク・スクリーニング法、エピトープ競合の確認など）を頼りに、B 型ボツリヌス毒素のニューロトキシン大してスクリーニングを実施し、結合抗体を合計 24 種類単離した。中和活性に関する情報が得られれば、エピトープマスク・スクリーニング法により新規結合抗体の単離を実施することになる。

サンプル調製に時間が必要であること、調製した抗体の評価にもある程度時間が必要であることから、この報告書作成時点で中和活性の有無という成果を示しきることはできていない。しかし、遺伝子配列の解析結果から特異的に結合する抗体の濃縮過程は成功しており、献血ボランティアの体内に存在した結合抗体を濃縮することに成功していることから、評価中の抗体に多種類の中和抗体が含まれていれば、新規開発対象の入り口段階として昨年度までの経験が生かされたと言える。以降の開発も昨年度までの経験を生かして工夫していくことで開発期間の短縮に繋がっていくと思われる。

E. 結論

本研究班での取り組みを通じて、ヒト体内に存在する目的の性能を発揮する抗

体を如何に効率よく取得するか模索してきた。本研究班で扱ったボツリヌス毒素中和抗体の単離は、インフルエンザワクチン接種の様な、十分に抗体価が上昇しているドナーより抗体産生細胞を取得するのは異なり、研究者本人を守るために作製されたテストワクチンを接種しても十分な抗体価の上昇が認められないという悪条件の中から目的の中和抗体を取得するというものであった。

そこで我々は単なる末梢からの採血によりソース（抗体産生細胞）を取得するのではなく、ドナーより成分採血によって提供を受ける（成分採血を採用することで、ドナーへの負担が比較的軽く大量に且つ効率よく抗体産生細胞を取得できることが重要な要素である）ことで、悪条件を克服し、ファージディスプレイ法により抗体ライブラリーを作製することで、目的の抗体を取得することを考案した。

昨年度までの A 型ボツリヌス毒素中和抗体の単離に関する研究を通じて蓄積したノウハウを生かし、今年度は B 型ボツリヌス毒素中和抗体の単離を実施した。短期間であったことで十分な成果を上げられたかの検証はできていないが、これまでの解析結果からスクリーニングは成功していると考えられ、開発ストラテジーは固りつつあると言えよう。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

論文発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

「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」を国際出願した。

国際出願番号 PCT/JP2009/000250

出願日 2009. 1. 23

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

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

研究分担者

向本雅郁 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科

研究協力者

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：前研究班で作出した抗A型およびE型神経毒素キメラ抗体産生細胞のクローニングを行い抗体産生量の高いクローンを選別しキメラ抗体を精製した。抗A型神経毒素キメラ抗体では、2種類の異なるマウスハイブリドーマクローン由来のH鎖およびL鎖を用いて作製したキメラ抗体1 μ g/mlで40LD₅₀/mlの神経毒素を中和できるクローンが得られた。抗E型神経毒素キメラ抗体ではマウスモノクローナル抗体で完全中和したクローンから作製したキメラ抗体と同様の高い中和活性と結合活性をもつクローンを得ることができた。マウスーヒトキメラ抗体は今後ウマ抗毒素に代わる安全で有効な抗毒素製剤となりうることが示された。

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。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。

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。乳児ボ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。

今年度は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前研究班より継続して行っている、遺伝子組換え技術を利用した抗ボツリヌス神経毒素マウス-ヒトキメラ抗体の抗毒素製剤としての有効性についてマウス中和試験を指標に評価した。

B. 研究方法

(1) キメラ抗体産生細胞の作製

前研究班で得られたA型およびE型に対するキメラ抗体H鎖及びL鎖遺伝子発現プラスミドをCHO-DG44細胞に

トランスフェクションし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。

(2) キメラ抗体の精製

各キメラ抗体産生クローンをCHO細胞用無血清培地であるEX-CELL™302 (SAFC Biosciences製)とHEK293細胞用無血清培地であるEX-CELL™293 (SAFC Biosciences製)を等量混合した培地を用いて大量培養し、培養上清を回収した。Protein G結合カラムを用いて常法によりキメラIgGを精製した。

(3) ELISA

ボツリヌス毒素との結合活性は神経毒素(0.5μg/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次抗体にはペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG(H+L)(1:5000, Bio-Rad)を用い、基質はオルソフェニレンジアミンを使用し、OD₄₉₀で吸光度を測定した。反応は基質反応以外全て37℃2時間で行った。基質の発色反応は37℃30分で行った。

エピトープ解析のための競合ELISAは上記と同様の抗原をコートしたプレートを用い、マウスモノクローナル抗体(2.5μg/ml)を1次抗体とし反応させた後、ビオチン標識したマウスモノクローナル抗体(2.5μg/ml)を37℃2時間反応させた。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識アビチン(1:5000, Bio-Rad)を37℃1時間反応させ、基

質はオルソフェニレンジアミンを使用した。

(4) 中和試験

40 LD₅₀/ml の A 型および E 型神経毒素と 10, 5, 1 μg/ml に希釈した精製キメラ IgG 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。PBS と神経毒素を混合したサンプルをコントロールとし、接種 4 日後にマウスの生死を判定した。各群でマウスはそれぞれ 5 匹ずつ使用した。

(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) 抗 A 型神経毒素キメラ抗体作製候補マウスモノクローナル抗体のエピトープ解析

中和活性を有し、キメラ化の候補として選定したマウスモノクローナル抗体 4 株 (2-4, 2-5, 9-4, B1) が認識するエピトープの相同性を競合 ELISA で調べた (表 1)。2-4 と 2-5 の組み合わせで、いずれのクローンを 1 次抗体とした時にも著しい吸光度の減少が観察された。その他の組み合わせでは減少は軽微であった。

(2) 抗 A 型神経毒素キメラ抗体の中和活性と結合活性

抗 A 型神経毒素マウスモノクローナル抗体である 2-4, 2-5, 9-4, B1 由来キメラ抗体 (AC24, AC25, AC94, ACB1) の中

和活性をマウス中和法により調べた

(表 2)。AC24 では 10 μg/ml で 5 匹中 3 匹が生存したが、5 μg/ml では 1 匹しか生存しなかった。その他のキメラ抗体では 10 μg/ml で 1, 2 匹の生存が見られたが 5 μg/ml ではすべてのマウスが死亡した。AC24, AC94, ACB1 の 3 種類の抗体を 1/3 量ずつ混合したサンプルでも中和活性は低かった。

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。これらの抗体の中和活性を調べたところ、AC24 の H 鎖と AC94 の L 鎖を有する AC2494 で高い中和活性を示した。5 μg/ml では 5 匹中 5 匹すべてが生存し、1 μg/ml でも 4 匹が生存した。他の交換クローンでは特に高い中和活性を示さなかった。

ELISA により結合活性を調べた結果、いずれのキメラ抗体も高い結合活性を保持していた (表 3)。

(3) 抗 E 型神経毒素キメラ抗体の中和活性と結合活性

抗 E 型マウスモノクローナル抗体を産生するクローンの中から最も高い中和活性を有するクローン (9-4) より抗 A 型抗体と同様の方法で作製し精製したキメラ抗体 (EC94) の中和活性をマウス中和法により調べた。40LD₅₀/ml E 型神経毒素に対してキメラ抗体 (EC94) 5 μg/ml ではマウス 5 匹全てが生存し、完全中和が確認された。

抗体 $1\mu\text{g/ml}$ では5匹中2匹が死亡した。マウスモノクローナル抗体(9-4)における中和力価とほとんど変わらなかった(表4)。ELISAによる結合活性はA型神経毒素に対する抗A型キメラ抗体の場合と比較して、低かったが、マウスモノクローナル抗体の場合と同程度であった(表5)。H鎖にA型キメラ抗体(AC24)、L鎖にE型キメラ抗体(EC24)を用いた交換抗体(EC2494)およびその逆(EC9424)ではA型、E型両神経毒素に対して全く中和活性を示さなかった。一方、結合活性はA型、E型両神経毒素に対してH鎖、L鎖ホモ抗体に比べて低かったが、十分な結合能力を有していた(表5)。

D. 考察

1種類のモノクローナル抗体より、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モノクローナル抗体を混合したときの方が、毒素の中和能が高いといわれており、実際、ボツリヌスA型毒素ではその傾向が高い。今回作製したキメラ抗体においても1種類の抗体では十分な中和活性を発揮できなかった。しかし、興味あることに唯一H鎖をAC24、L鎖をAC94由来の抗体遺伝子より作製したキメラ抗体(AC2494)はA型神経毒素に対して高い中和力価を保持していた。毒素への結合に関しても元のキメラ抗体であるAC24やAC94と同程度の活性を保有していた。前研究班において毒素への結合活性がAC24のH鎖にあることを証明した。この場合、通常L

鎖はエピトープを含む周辺領域の高次構造を保持し、H鎖のエピトープへの結合の安定性を保持していると考えられる。AC24よりAC2494の方が高い中和活性を示したことからL鎖の抗原保持能力がAC94の方がAC24に比べて高く、安定してエピトープ周辺の高次構造を保持できるものと考えられる。動物にトキシドや神経毒素を免疫したときに得られるA型毒素抗体の中にはAC2494のような1つのクローンで毒素を完全中和する抗体が産生されにくい可能性が考えられる。抗血清はポリクローナル抗体であるため複数のエピトープに抗体が結合することで毒素を中和することができる。AC2494のように天然の抗体クローンには存在しにくい抗体を遺伝子組み換えで複数のクローンから作製することでより効率の高い抗体が作製できることが可能であることが今回の研究で明らかとなった。

E型毒素に対しては前回の研究班において多数の中和活性を有するモノクローナル抗体を得ることができた。その中から中和活性の高い1クローンを選別し、キメラ抗体を作製した。キメラ抗体(EC94)もマウスモノクローナル抗体(9-4)と同程度の中和活性と結合活性を有していた。抗体がボツリヌス毒素を中和するためには毒素の受容体結合領域や酵素活性中心に結合する必要がある。A型とE型に対する中和抗体の活性の違いは抗原である毒素のアミノ酸配列や高次構造によるエピトープの違いや毒素を捕捉

する抗体の質の違いによるものと考えられる。

今回、A、E両型に対する実用可能な中和能を有するマウス-ヒトキメラ抗体を作製することができた。さらに安全性を高めるには完全ヒト化抗体に変換する必要があるが、この手法はすでに確立されており、いつでも変換可能である。このような組み換えヒト化抗体が実用化されれば、ウマ抗毒素製剤で問題となるアナフィラキシーを回避することができ、抗原の大量調製が不必要になり、抗原製造時の危険性を回避することが可能となる。

E. 結論

前研究班で作製した抗Aおよび抗E型マウス-ヒトキメラ抗体産生クローンより精製抗体を調製し、マウス中和法により中和力価を調べた。抗A型毒素キメラ抗体では2種類の異なるマウスハイブリドマクロン由来のH鎖およびL鎖を用いて作製したキメラ抗体で高い中和活性を示した。抗E型毒素キメラ抗体ではマウスモノクローナル抗体で完全中和したクローンから作製したキメラ抗体でマウスモノクローナル抗体と同様の高い中和活性を持つクローンを得ることができた。これらの結果よりマウス-ヒトキメラ抗体が今後、ウマ抗毒素に代わる安全で有効な抗毒素製剤となることが示された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tsukamoto, K., Kozai, Y., Ihara, H., Kohda, T., Mukamoto, M., Tsuji, T., Kozaki, S. Identification of the receptor-binding sites in the carboxyl-terminal half of the heavy chain of botulinum neurotoxin types C and D. *Micro. Pathog.* 44:484-493 (2008)

2. 学会発表

1) Tomoko, K., Ida, T., Ihara, H., Mukamoto, M., Kozaki, S. Functional analysis of synaptotagmin II as a receptor for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin. 第8回あわじしま感染症・免疫フォーラム (2008)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許出願

【公開番号】特開 2007-274924 (平成19年10月25日公開) 【名称】抗E型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. 競合ELISAによるマウスモノクローナル抗体のエピトープ解析

一次抗体 (2.5 μ g/ml)	ビオチン化抗体 (2.5 μ g/ml)			
	AC24	AC25	AC94	ACB1
2-4	0.135	0.202	1.284	0.737
2-5	0.223	0.110	1.095	0.815
9-4	0.925	0.785	0.314	0.962
B-1	0.563	0.513	1.002	0.114
PBS	1.362	1.192	1.625	0.985

表2. 抗A型毒素キメラ抗体のマウス中和活性

	精製IgG (μ g/ml)		
	10	5	1
AC24	3/5	1/5	
AC25	2/5	0/5	
AC94	2/5	0/5	
ACB1	1/5	0/5	
AC24+AC94+ACB1	1/5	0/5	
AC2494	5/5	5/5	4/5
AC9424	1/5	0/5	
AC2425	2/5	0/5	
AC2524	2/5	0/5	

接種毒素量: 10LD₅₀/mouse

表3. 抗A型毒素キメラ抗体のELISA価

	精製IgG (ng/ml)	
	100	50
AC24	2.763	1.897
AC25	1.588	1.325
AC94	2.495	1.030
ACB1	>3.500	2.919
AC2494	2.141	1.497
AC9424	2.372	1.461
AC2425	1.874	1.067
AC2524	2.138	1.176

表4. 抗E型キメラ抗体のマウス中和活性

	精製IgG (μ g/ml)		
	10	5	1
9-4(マウスmAb)	5/5	5/5	4/5
EC94(キメラAb)	5/5	5/5	3/5
E型神経毒素			
EC2494	0/5		
EC9424	0/5		
A型神経毒素			
EC2494	0/5		
EC9424	0/5		

接種毒素量: 10LD₅₀/mouse

EC2494: H鎖 AC24 L鎖 EC94
 EC9424: H鎖 EC94 L鎖 AC24

表5. 抗E型キメラ抗体のELISA価

	精製IgG (ng/ml)	
	100	50
9-4(マウスmAb)	1.263	0.852
EC94(キメラAb)	1.136	0.843
E型神経毒素		
EC2494	0.987	0.543
EC9424	1.163	0.781
A型神経毒素		
EC2494	1.888	1.253
EC9424	1.361	0.844

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュレ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

「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」

研究分担者 千葉 丈 東京理科大学基礎工学部
研究協力者 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：これまでに（平成18年度報告）、ヒトの抗体遺伝子を含む人工染色体を有し、マウス自身の抗体遺伝子の発現は完全に抑制されているKMマウス（協和発酵キリン）を用いて破傷風毒素を中和するヒト抗体を産生する数種類のハイブリドーマの作製に成功している。しかし、これらのハイブリドーマが産生する抗破傷風毒素モノクローナル抗体は、単独での毒素中和能が低かった。そこで、本研究では毒素中和能がより高く、これまで得られた抗体とはエピトープの異なる多種のモノクローナル抗体パネルの作製を目指した。

KMマウスを破傷風トキソイドあるいは毒素で免疫し、中和抗体活性の高いマウスの脾細胞を用いてハイブリドーマを選択し、中和抗体を産生するハイブリドーマを *in vivo* 中和活性で選択した。その結果、破傷風毒素を中和する7クローンのIgG産生ハイブリドーマが樹立された。7種類の破傷風中和ヒト抗体のうち5種類は破傷風毒素上のHcフラグメントを認識して中和を誘導していることが明らかになった。これらの中和抗体は、毒素の細胞への結合を直接阻害すると考えられる。また、これらの抗体は、EBVハイブリドーマ法によってこれまでに作製されている中和抗体（TT1, TT2）とは異なる破傷風毒素Hc断片上に存在するエピトープを認識した。これらの中和抗体は新たな抗体パネルとして有用であると思われる。さらに、TT1とTT2を混合したときにTT1の中和活性が促進されたと同じように、これらの中和抗体を複数混合することで、単独時よりも中和能が増強されることがわかった。抗毒素製剤に匹敵する中和能をもったオリゴクローナル製剤の開発が可能になったと思われる。

A. 研究の目的

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(オリゴ)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、EBV・ハイブリドーマ法により、二種類の抗体TT1とTT2を樹立した。TT1抗体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。この中和活性における増強機構をさらに解析するために、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、平成18年度までに8種類の破傷風毒素中和完全ヒト抗体を作製した。しかし、これらのハイブリドーマが産生する抗破傷風毒素モノクローナル抗体は、単独での毒素中和能が低かった。そこで、本研究では毒素中和能がより高く、これまで得られた抗体とはエピトープの異なる多種のモノクローナル抗体パネルの作製を目指した。

B. 研究方法

ヒトの抗体遺伝子を含む人工染色体を有し、マウス自身の抗体遺伝子の発現は完全に抑制されているKMマウス(協発酵キリン)を免疫に用いた。

KMマウスに破傷風トキシノイドあるいは破傷風毒素を繰り返し投与して免疫した。免疫後、血清の破傷風毒素に対する抗体価をELISAでモニターし、中和抗体活性はddYマウスを用いたin vivo中和試験で定量した。血清の中和抗体活性の高いマウスの脾細胞を用いて、SP2/0とのハイブリドーマを作製し、抗破傷風毒素抗体産生ハイブリドーマをELISAで選択し、その中から、さらに中和抗体産生ハイブリドーマをin vivo中和試験で選択し、破傷風毒素を中和するヒト抗体パネルを作製した。これらの中和抗体が破傷風毒素上のどの部分を認識しているかを調べるために、大腸菌内で発現させた破傷風毒素のLおよびHeフラグメントへの結合性を解析した。また、BIACOREを用いた競合解析で、これらの中和抗体は互いに異なるエピトープを認識するかを調べた。さらに、中和抗体パネルを用いて、それらのいくつかを組み合わせることで、中和活性の増大が起こるかどうかを、ddYマウスを用いた中和試験で定量し、検討した。

(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

中和活性の高いモノクローナル抗体を作製するために、KMマウスを破傷風毒素で免疫し、毒素に結合する

抗体を産生するハイブリドーマを選択し（75クローン）、さらに *in vivo* 中和活性で培養上清をスクリーニングして、破傷風毒素を中和するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを樹立した。

このハイブリドーマの産生する7種類の破傷風中和ヒト抗体のうち5種類は破傷風毒素上の Hc フラグメントを認識して中和を誘導していることが明らかになった。Hc フラグメントは、破傷風毒素が神経細胞へ結合する際に重要な部位である。Hc フラグメントに反応性の中和抗体は、毒素が細胞へ結合することを直接阻害することで、中和能を発揮していると推測される。

さらに、7種類の中和抗体のほとんどが異なる中和エピトープを認識していることがBIACOREを用いた競合解析で確認された。それらのエピトープと、EBV-ハイブリドーマ法で樹立されたTT1とTT2のエピトープとの関係をまとめると、TT1(3E8、1F3、8G3)、TT2、4G8(5B8)の大きく3つのグループに分けられた(図1)。これらの中和抗体は今まで得られていた抗体とは異なるエピトープを認識して中和することが明らかになり、新たな中和抗体パネルとしての有用性が示された。これらの抗体およびTT2抗体の混合中和試験によって、単独時よりも少量の抗体で毒素の完全中和を可能にすることができた(図2)。

D. 考察

破傷風毒素を中和するヒトモノク

ローナル抗体の作製は、ヒト抗体の作製が試み始めた1980年代から成功の報告がなされてきたが、それぞれの報告は1-2クローンの抗体であり、エピトープ解析まで実施している例はなかった。本実験で得られたこれらの中和抗体とTT1およびTT2抗体を加えた10クローンのヒトIgG抗体パネルは、少数ではあるが、これらの解析を可能にする初めての抗体パネルになる。さらに、これらの抗体の混合中和試験によって、単独時よりも少量の抗体で毒素の完全中和を可能にすることができた。このことから、本研究で得られたTT1およびTT2抗体を加えた10クローンの中和抗体パネルを用いて、さらに複数の抗体の組み合わせを試すことで、今後、抗毒素製剤に匹敵する中和能をもったオリゴクローナル製剤の実現が期待される。

E. 結論

破傷風毒素を中和するヒトIgG1抗体の新たなパネル(7クローン)を、KMマウスを用いて作製した。これらの抗体は、EBVハイブリドーマ法によってこれまでに作製されている中和抗体(TT1、TT2)とは異なる破傷風毒素Hc断片上に存在するエピトープを認識した。TT1とTT2を混合したときに中和能が活性化されたと同じように、これらの中和抗体を複数混合することで、単独時よりも中和能が増強されることがわかった。抗毒素製剤に匹敵する中和能をもったオリゴクローナル製剤の開発が可能になった。

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

なし

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

各抗体は異なる中和エピトープを認識する
Analyte

		Hc結合性						
		1F3	4G8	5B8	3E8	8G3	TT1	TT2
capture	Hc結合性	1F3	○	○	○	○	×	○
	4G8	○	○	×	○	○	○	○
	5B8	○	×	○	○	○	○	○
	3E8	○	○	○	○	○	×	○
	8G3	×	○	○	○	○	○	○
	TT1	○	○	○	○	○	○	○
	TT2	○	○	○	○	○	○	○

○: 競合しない(エピトープが異なる)

×: 競合する(エピトープが近接)

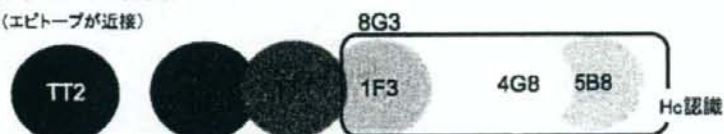
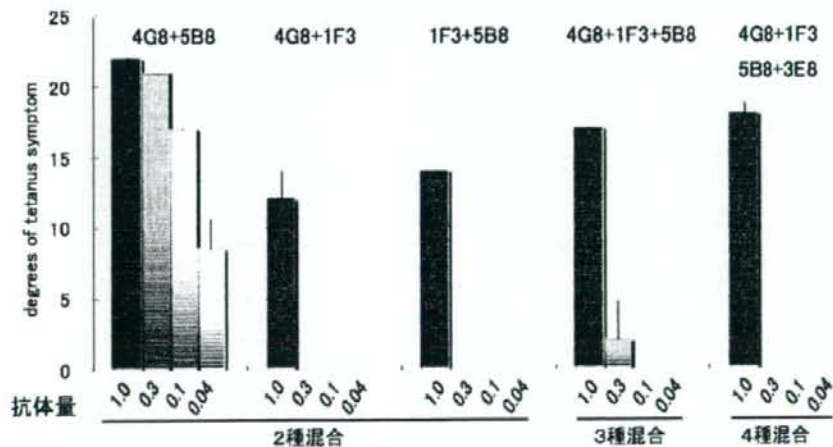


図1 破傷風毒素中和抗体のエピトープ

エピトープの違うものを混合することで中和能は増強する



各抗体は、単体で1 μ g程度の投与をしたときに完全中和しないことが確認されている。

エピトープの近接する抗体の組み合わせでは少しの中和能の上昇しか見られないが、まったくエピトープの異なる抗体を混合することにより中和能の増強が引き起こる

図2 モノクローナル抗体混合による中和活性の増強