

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18-20年度 総合研究報告書  
平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高橋元秀

平成21年(2009)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18-20年度 総合研究報告書

研究代表者 高橋元秀

平成21年(2009)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 18-20 年度 研究組織

##### 研究代表者

高橋 元秀 国立感染症研究所 細菌第二部 第三室長

##### 研究分担者

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 雅都 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  
山本明彦 国立感染症研究所 細菌第二部 第三室

##### 協力研究者

千北一興 (財) 化学及血清療法研究所 第一製造部部长  
銀永明弘 (財) 化学及血清療法研究所 第一製造部次長  
諸熊一則 (財) 化学及血清療法研究所 第一製造部  
中西喜彦 (財) 化学及血清療法研究所 第一製造部  
八木 翼 (財) 化学及血清療法研究所 第一製造部  
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  
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  
岩城正昭 国立感染症研究所 細菌第二部 第三室  
小宮貴子 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	
研究代表者 高橋 元秀 .....	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	49
III. 研究成果の刊行物・別刷り .....	53

# I. 総合研究報告書



## 厚生労働科学研究補助金

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

研究責任者： 高橋元秀 国立感染症研究所 細菌第二部

##### 研究要旨

ジフテリア、破傷風、ボツリヌス、ガスエソ疾患である毒素性細菌による感染症とハブ、マムシ咬傷の治療に用いられているウマ抗毒素製剤の効率的な製造方法の改良・検討をおこなった。また、ウマ抗毒素の次世代製剤の開発として、現行の有効性確認試験として標準化されている毒素中和法を用いて、中和活性を示すヒトモノクローン抗体の単離・調整法の確立を目指した。

1. ウマ抗毒素製造方法の改良では、免疫用抗原製造工程の BSE 対策、免疫の効率化としてウマ免疫の再検討、製剤中の免疫グロブリン (IgG:F(ab)/2 の比) 定量による純度の評価、ウィルス除去対策への取組みとペプシン消化による不活化作用効果およびまむしウマ抗毒素の治療実態調査の検討を実施した。

2. ボツリヌス患者の治療用ヒト抗体単離を目標として、ボツリヌストキソイド接種後の人の B リンパ球から、 $1.3 \times 10^{10}$  のクローンからなる抗体ライブラリーを作製し、A 型ボツリヌストキソイド又はニューロトキシンを抗原にスクリーニングを実施し、6 種類の中和抗体を獲得し、エピトープ分類で 4 つのカテゴリーに分類した。3 種類の抗体の混合により A 型毒素は完全中和し、さらに 4 種類の抗体を混合・組み合わせで最大活性 (12IU/mg) を示した (特許出願)。さらに、同手法により B 型ボツリヌス毒素中和抗体の単離も実施した。

3. ヒト化抗体作製ではボツリヌス毒素を中和する抗 A 型神経毒素キメラ抗体を検討した。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において、A 型毒素を指標にして約 50 種類のモノクローナル抗体の性状解析を行った。トキソイドだけと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可能な数種類の抗体を選別した。免疫学的評価法の検討結果では高次構造を維持した状態で測定可能な免疫沈降法は、ELISA 法よりも優れていた。得られた抗体は、抗毒素製造に用いるトキソイドや毒素あるいは抗毒素の評価に有用であり、より精度管理された抗毒素製剤の製造が期待される。

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を目ざして、KM マウスを用いて毒素中和活性のある組換えヒトモノクローナル抗体を作製した。1-2 年年度で確立した EBV-ハイブリドーマ法で作製された中和抗体を促進するモノクローナル抗体を組み合わせるなどして、現行のテタノグロブリンと同等の活性を持つオリゴクローナル製剤の開発を目指した。

5. 抗毒素の力価定量法の検討として、抗破傷風人免疫グロブリンの力価定量法を検討した結果、現行生物学的製剤基準の試験期間は短縮の可能性があり、今後の製造所の試験成績を含めて解析し、基準変更を目指すこととなった。また、ヘビ抗毒素製剤の WHO ガイドラインへの適合性を日本及び台湾の調査結果では、両国ともガイドラインを満たす十分な製造、品質管理体制ではないことがあきらかとなった。

#### 研究分担者

大隈邦夫 財団法人 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 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 文 東京理科大学 基礎工学部 教授  
山本明彦 国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官

#### 研究協力者

千北一興 (財) 化学及血清療法研究所 第一製造部部长  
銀永明弘 (財) 化学及血清療法研究所 第一製造部次長  
諸熊一則 (財) 化学及血清療法研究所 第一製造部  
中西喜彦 (財) 化学及血清療法研究所 第一製造部  
八木 翼 (財) 化学及血清療法研究所 第一製造部  
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  
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  
岩城正昭 国立感染症研究所 細菌第二部 第三室  
小宮貴子 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



## A. 研究目的

現行のウマ抗毒素製剤（ジフテリア、破傷風、ボツリヌス、ガスエソ、ハブ、マムシ）の製造方法は、薬事法で定められた手順に則り、構造設備の基準に適合し、安全性と有効性を担保した製造手順、評価法を審査する製造認可承認制度が採用・実施されている。一方、品質保証の重要性が社会的に認識され、生物学的製剤 GMP (Good Manufacturing Practices) の導入に伴う施設の充実・改善指摘により、国内では、嘗ては複数の製造所で製造していたジフテリア抗毒素、マムシ抗毒素は、経済的な採算性が乏しいために 1 社が製造するだけとなり、最終的にはすべてのウマ抗毒素製剤は 1 社が製造・供給することとなった。すべての製造承認は 50 年以前の製造技術・方法で認可されているために、新技術による製造方法や品質試験法の改良開発を企業だけで行うのは限界があり、抗原の調整、ウマの免疫方法、血清の精製方法等について、基礎研究の技術基盤を備えた専門家による効率的な製造方法の検討をおこなう。また、治療薬として使われているウマ抗毒素と比較して標準化されている毒素中和能を確認する試験法を用いて、それに匹敵する抗毒素中和活性を示すヒトモノクローン抗体の単離調製法を可能な毒素について確立する。黒澤らはジフテリア毒素に対する中和抗体を示す抗体 1 種の単離調製に、千葉らは破傷風毒素に対する中和抗体を、また大隈、向本らは A または E 型ボツリヌス毒素に対する抗体の調整に成功しており、これを製品化するモデルとして検討する。

本研究班では、以下の専門領域ごとに研究活動を実施した。

1. 効率的な製造方法の改良として大隈らは、(1) 米国産牛由来原料(培地)の除去検討として、現在、ガスエソ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。しかし、現行の当該培地の変更に際しては、菌の発育や毒素産生に大きな影響を及ぼす可能性がある。従って、免疫用抗原の安定生産、更にはガスエソ抗毒素製剤の安定供給に困難が生じる。現在までに得られた現行培地での菌発育性・毒素産生性に関するデータをもとに、代替培地への検討をおこなう。多くのウマ製剤の中で第一段階として、ガスエソ抗毒素の成分中の *Clostridium perfringens*(Welchii 菌)及び *C. septicum*(VS 菌)について現行培地(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への切替を目的として実施した。(2) ガスエソ抗原の至適ウマ免疫法の確立の検討は、数十年前に開発されて以来、ガス壊疽、特に Welchii 抗原においては高力価の抗毒素を得ることは非常に困難との報告がある。これまでも様々な研究機関で、高力価の抗毒素を得るべく、抗原性状と免疫手法の両面から幾多の研究があるが、安定的に高い力価を得る免疫法は確立されていない。高力価の血清を得るためのガスエソ抗原の至適ウマ免疫法の確立を目ざし、Welchii 及び



VS 抗原免疫法としてアジュバントと追加免疫時の抗原(トキソイド・毒素)量の条件検討を行った。

(3)ウマ抗毒素製剤のγグロブリンに関する調査：現在製造する5種類の抗毒素製剤は化血研古来の製造法(従来品)と千葉血清研究所から承継(承継品)した方法で製造される。前者ははぶ抗毒素とまむし抗毒素で、後者はカスエそ抗毒素、シフテリア抗毒素及びホトツツス抗毒素である。今回、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。

(4)ウマ抗毒素製剤のウイルス除去対策への取組み：2008年、蛇毒抗毒素製剤の製造・品質及び規制に関するWHOガイドラインが検討されている。生産体制のGMP適応範囲の見直しや迷入ウイルス除去・ウイルス不活性化等の新たな品質管理手法の導入が要求されている。抗毒素製剤のペプトン消化工程におけるウイルス・クリアランスに関するデータ取得に向けた調査を実施する。

(5)まむし抗毒素の使用実態調査への取組み：まむし咬傷は、保健所・厚労省への届出システムがなく、咬傷患者の実数は不明である。抗毒素の販売量から2,000～3,000件/年の発生が考えられ、まむし咬傷による死亡数は20～100件/年と推測されている。重症例には、緊急的な抗毒素療法が最も有効であるが、その使用実態は不明である。本分担研究では、国内のまむし咬傷とその治療実態の解明を目的に、抗毒素使用に関するアンケート調査方法を検

討した。

2. 黒澤らは、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)、ボツリヌス毒素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する(第IV段階)戦略で研究を進めた。

3. 向本らは、前研究班からの継続として安全で効率的な抗毒素製剤となりうる抗A型およびE型ボツリヌス毒素マウス-ヒトキメラ抗体を作出し、中和活性を指標に有効性を評価する。多大な労力と費用、製造者への危険が伴う、ボツリヌス毒素に対する抗毒素製剤製造の効率性および製品の有効性を評価するためにモノクローナル抗体を利用した評価法の確立を目指した。具体的には、トキソイドで免疫後、毒素を複数回免疫することによって得られるマウスモノクローナル抗

体のうち、中和活性を有し、毒素とは反応するがトキシイドとは反応しない抗体を選別した。この抗体が認識する毒素分子上の領域を特定し、その合成ペプチドを抗原として用いることで安定した抗毒素製剤の評価法を検討した。合成ペプチドを免疫原として用いることにより、従来のトキシイドと比較して、安全で、効率的且つ高い効果が得られる抗毒素製剤を将来的に作成するための基礎的研究を行った。トキシイドには反応せず毒素にのみ反応するマウスモノクローナル抗体が認識する毒素分子上の領域を特定することにより、その領域を指標とした新たな評価法を確立することでより効率的製造方法の開発が期待される。

4. 千葉らは、抗破傷風毒素ヒト組換えポリクローナル抗体製剤を開発することを最終目標として、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)を用いて毒素中和活性のある組換えヒトモノクローナル抗体を作製する。その抗体と、これまでに確立したEBV-ハイブリドーマ法で作製された中和抗体を促進するモノクローナル抗体を組み合わせるなどして、現行のテタノグロブリンと同等の活性を持つポリ(オリゴ)クローナル製剤の開発を目指した。

5. 山本は、抗破傷風人免疫グロブリンの力価測定のための、マウスの観察期間の短縮の可能性を確認する具体的な方法として、抗破傷風人免疫グロブリン50検体分の力価試験結果を検証した。観察期

間を4日、3日および2日と短縮した時の、標準品および検体それぞれのマウスの生死数から、プロビット法による統計処理を行って力価を算出し、通常行っている5日間の観察から算出された力価と比較した。算出された力価の比較には、対応する2つの力価を二元配置し、その相関曲線及び相関係数とその危険率を算出した。

## B. 研究方法

1: ウマ抗毒素製剤の改良にあつては、細菌毒素製剤は菌培養、毒素精製、不活化条件を検討し、免疫原性の高い抗原調整を計った。また、ウマ免疫におけるアジュバント、免疫期間、トキシイドと毒素免疫等、高力価の血清を得る条件の再検討をおこなった。さらに、ウマ血清の精製による非活性の高いグロブリンを回収した。なお、製造に伴う新しい品質試験法の検討も実施した。

2. 研究者自らが試作したボツリヌストキシイドで免疫した献血ボランティア(高橋)より3L相当の成分血液からBリンパ球から( $1 \times 10^{10}$ 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した。その後、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した。得られた抗体は塩基配列を決定し、それぞれの抗体のボツリヌス毒素中和活性を測定した。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、再度ボツリヌス毒素中和活性を測定した。



3. 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た。無血清培地で培養し、培養上清より Protein G 結合からカラムを用いてキメラ IgG を精製した。精製キメラ IgG を用いて中和活性をマウス中和法で、結合活性を ELISA 法により評価した。

トキシノイドで免疫後、神経毒素を複数回免疫することによって得られる多数のマウスモノクローナル抗体を用いて、中和活性、ELISA による毒素およびトキシノイドとの反応性、免疫プロットングや免疫沈降法による認識領域の決定等により抗体を分別した。これによりポリクローナル抗体であるウマ抗毒素製造における有効性の指標となる抗体を選別した。

4. 破傷風毒素を中和するヒト抗体の作製では、KM マウス（協和発酵キリン）を免疫に用い、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 で選択した。その中から、さらに中和抗体産生ハイブリドーマを選択し、破傷風毒素を中和するヒト抗体パネルを作製した。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、中和活性が増強するかを ddY マウスを用いた中和試験で定量した。

## C. 研究結果

### 1. 効率的な製造方法の改良

(1) 免疫原製造上の課題であるガスエソ抗毒素の BSE 対策では、米国産牛由来原料の代替品探索の検討を行い、良好な 2 つの培地を選定した。一つは現行培地の原産国-豪州産牛への切替えによるものであり、もう一方は牛成分を含まない豚由来培地である。具体的には、①Welchii 抗原については米国産牛由来プロテオスペプトンを豪州産に変更し、米国産牛由来クックミートは未使用とした。②VS 抗原でも米国産牛由来プロテオスペプトンを豪州産に変更した。切替えの可能性を生産規模で検証し、代替培地への変更は問題ないことを確認した。今後、薬事法上の所定の手続を経て、生産実施へと移行していく予定である。

(2) ガスエソ抗原のウマ免疫においては、基礎免疫の重要性が明らかとなった。特に、VS 抗原において顕著で、基礎免疫後の抗毒素価が高いほど、追加免疫時の抗毒素価の急上昇はより高い傾向にあった。基礎免疫時の不完全ポイントアジュバントの使用は、抗毒素価上昇においてより効果的であった。Welchii 抗原も同様の傾向はあるが、従来法との間に顕著な差は認められなかった。

(3) 従来品と承継品で、γグロブリンの構成比に相違が認められた。従来品は約 75% が F(ab')<sub>2</sub> で、約 25% が whole-IgG であったのに対し、承継品は全て F(ab')<sub>2</sub> であった。

(4) ウマ免疫γグロブリンのウイルス除去対策への取り組みとして、文献等の報告事例を調査し、ペプシン消化は我々の条件と対比し、ウイルス不活化への寄与が確認された。

(5) 国内のまむし抗毒素の使用実態を知るためにアンケート調査については、アンケート案を作成した。

2. 治療用ヒト抗体単離の研究結果では、

(1) 抗 A 型ボツリヌス毒素中和抗体の単離：第 I 期である平成 17 年度までに単離した多数の抗体には A 型ボツリヌス毒素中和抗体が 6 種類存在していることが判明した。Biacore によりエピトープ競合関係を確認した結果、4 種類に分類された。6 種類の中和抗体の IgG 型抗体を調製し、複数種類混合して完全中和試験でシナジスティック効果を確認した結果、3 種類の抗体の混合で完全中和を確認した。さらに 4 種類の抗体 (BT-015, BT-175, NT-320, NT-523) を混合することで最大の活性 (標準抗血清との比活性で 12 IU/mg) を示した。この 4 種類は Biacore により解析したエピトープ競合関係を反映し、4 カテゴリーに属する抗体を 1 種類ずつ混合することで最大効果を発揮した。

(2) A 型ボツリヌス毒素の subtype に対する中和能確認：単離した中和抗体は A1 型の毒素を完全中和する。A 型はその他に subtype (A2-A4) が存在し、それらを完全に中和することでウマ抗毒素を代替品となる。代表的な subtype である A2 毒素に対して完全中和試験を実施した。ELISA による A2 毒素に対する反応性を確認した結果、単離した中和抗体の一部に反応性の低下が観察され、完全中和試験で最大の効果を発揮した 4 抗体の組合せでの subtype に対する中和活性の低下が予想された。そこで、4 抗体のうち、ELISA で結合活性が低下し且つエピトープが競合

する中和抗体が存在する NT-523 を反応性低下が観察されなかった NT-539 へと置き換え、完全中和する抗体の組合せ変更を想定して試験を実施した。その結果、明確な完全中和は確認できなかったが、抗体の組合せの変更により中和作用の明確な増強は確認できた。

3. 抗ボツリヌス 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において 1  $\mu$ g/ml の濃度で 40 LD<sub>50</sub>/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で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 型神経毒素を指標にして、約 50 種類のモノクローナル抗体の性状解析を行った結果、トキシ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 法より高次構造を維持した状態で測定できる免疫沈降法の方が実際の反応に近く、優れていることが明らかとなった。これらの抗体を免疫原であるトキシドや毒素あるいは抗毒素の評価に用いることで、有効性の高い抗毒素製剤の効率的な製造が可能になる。

4. すでに確立した EBV-ハイブリドーマ法



を用いて作製した破傷風毒素を中和する2種類の組み換えヒト抗体 (TT1; IgG1 と TT2; IgG4) を用いて、TT1 抗体 (IgG1) の有する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) と組み合わせると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。TT2 の Fc 部を IgG1 に置換した組換え抗体 (TT2- $\gamma$ 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  $\gamma$  1 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。また、破傷風毒素を中和するヒト IgG 抗体のパネル (平成18年の12クローンと平成20年度の7クローン; 計19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を確認した。

5. 抗毒素の力価定量法の検討として、抗破傷風人免疫グロブリンの力価定量法を検討した結果、現行生物学的製剤基準の試験期間は短縮の可能性があり、今後の製造所の試験成績を含めて解析し、基準変更を目指すこととなった。また、ヘビ抗毒素製剤の WHO ガイドラインへの適合性を日本及び台湾の状況調査の結果、

両国ともガイドラインを満たす十分な製造、品質管理体制ではないことがあきらかとなった。

#### D. 考察

1. 効率的な製造方法の改良について活動では、(3)従来品と承継品で、 $\gamma$ グロブリンの構成比に相違が認められたが、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。しかし、どちらも臨床上的の十分な実績があり、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、今後、慎重に対処すべきと考える。

(4)ウマ免疫グロブリンのウイルス除去対策へペプシン消化は文献上でウイルス不活化作用があることが確認されたことにより、今後、チャレンジャー・ウイルスを選定し、具体的な検討計画を立案し、抗毒素製造工程におけるウイルス・クリアランスの調査を推進することが必要である。

(5)国内のまむし抗毒素の使用実態を知るためのアンケート調査は今年度までに実施には至らなかった。その理由として、どのような機関、組織を利用して配布するか、回収と分析および結果の反映をどのように還元するか等の問題点の整理が困難であった。これら方法については、救急救命センターの担当医と相談してアンケート調査を具体化することで次年度対応を予定している。

2. 治療用ヒト抗体単離の研究では、ウイルス感染もしくは病原菌毒素が体内に侵入することにより、毒素を中和する能

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。

(1) A型ボツリヌス毒素中和抗体単離では、  
A1毒素に対して6種類の中和抗体を獲得  
し、Biacore等でエピトープが4カテゴリー  
に分類できた。組合せによるシナジス  
ティック効果を確認した結果、完全中和  
可能な組合せを見出すことに成功し、そ  
の最大比活性は12IU/mgであった。  
SubtypeであるA2毒素に対して明確な完  
全中和は確認できなかったものの、可能  
性のある結果であった。

(2) B型ボツリヌス毒素中和抗体単離では、  
合計12種類の中和抗体を獲得し、先行取  
得した4種類の抗体に関してはエピトープ  
が3カテゴリーに分類できた。組合せ  
によるシナジスティック効果を確認した  
結果、3種類の抗体を10mg/ml溶液で等量  
混合することで完全中和する可能性がある  
結果を得た。シナジスティック効果を  
考慮すれば、更に異なるエピトープの中  
和抗体を単離して組み合わせればその活  
性は一段と上昇し、治療用途として妥  
当な抗体濃度での完全中和に到達するであ  
らう。

ウマ抗毒素製剤からヒトモノクローン抗  
体への開発移行における障害の考察とし  
て、人体に影響を与えるボツリヌス毒素  
は4つのserotype (A, B, E, F) が知ら

れており、更にsubtypeも存在する。ウ  
マ抗毒素製剤は4つの代表される毒素を  
ウマに免疫して作製したポリクローン抗  
体(モノクローン抗体の巨大な集団)で  
ある。その為、特異性の強い抗体、subtype  
に共通なエピトープに対する抗体、特異  
性が甘いことで反応する抗体などが含ま  
れることで全てをカバーしうる。それを  
安全なヒト抗体などのモノクローン抗体  
で代替化するのは容易ではない。単離し  
たあるsubtypeに中和活性を示す抗体を  
affinity maturation技術により改変し  
て別なsubtypeへの結合性・中和活性を  
増強させる方法(JD Marksら)も考えら  
れるが、場合によっては全てのsubtype  
に対してスクリーニングを行い、毒素毎  
に至適な中和抗体の組合せを構築する必  
要もある。安定供給、安全性の面では飛  
躍的に高まるが、何れにせよその開発に  
要する時間・費用は莫大なものとなる。  
長く地道な作業による代替化は、国の多  
大なるバックアップなくして成し得ない。

本研究班で開発した抗体の実用化には  
解決しなくてはならない課題が山積して  
いる。

- ・本件で該当するのはファージディスプレイ関連特許であるが、本件に代表される関連特許の丸抱えによる莫大な特許費用・マイルストーンの要求、或いは特許のライセンスアウトを拒む企業政策が、医薬品開発での高い壁となっている点。
- ・ボツリヌス症など超希少疾患の治療薬開発・より安全な医薬品代替化に、国策として企業-国家の関係構築が必要ではないか(医薬品開発には莫大な開



発コストが必要となることから、企業は売上が見込めない疾患の医薬品開発が殆ど行われないのが現状である。生命を守る安全な医薬品を国民に提供するには国策による医薬品開発から販売までの間の補助が不可欠と言える)。また上記特許問題との兼ね合いをどうつけるか。

- ・今回見出したボツリヌス毒素中和抗体の様な複数のモノクローン抗体を組み合わせ使用しなくては効果を発揮しない(オリゴクローン抗体)抗体医薬品の承認体制が整備されていない。
- ・安全性を考慮したウマ抗毒素製剤からの切り替えを目標に開発を実施しても、超希少且つ緊急性を要する重篤な疾患のため、安全性・効果を確認する臨床試験の実施が困難である。

我々は問題を提起するとともに、国の関与も含めた解決策を模索していく必要がある。

3. A型神経毒素に対するモノクローナル抗体ではこれまで1クローン単独で毒素を完全中和する抗体がなかなか得られなかった。今回、遺伝子組み換えを利用することで異なるクローン由来のH鎖とL鎖の組み合わせで非常に高い中和活性を有する抗体を作製することができた。今後、さらに多くのクローンからの抗体遺伝子の組み合わせを用いることでより有効な抗体が得られることが期待される。E型に対する抗体は1クローンから得られた抗体で十分利用できることが明らかとなった。マウス-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。

4. 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。本研究では、EBV-ハイブリドーマ法で確立された2クローンだけでなく、KMマウスを用いて計19クローンの破傷風毒素を中和するIgG抗体のパネルが始めて作製され、エピトープ解析による毒素の中和機構の解析が可能になった。

その過程で、IgGのアイソタイプの中ではIgG1( $\gamma 1$ H鎖が)が毒素の中和により有効であることがわかった。また、さらに、新たに作製された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確認された。それら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。以上のことから本実験で得られた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部分を認識して中和を誘導できることより、新たな抗体パネルとしての有用性が示された。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、本研究で得られた中和抗体パネルのうち、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。これにより、ボランティアの血液を用いたテタノグロブリンよりも未知ウイルスによる感染の危険性がなく、安定した中和活性

を持つ組み換えポリクローナル抗体製剤を開発でき、開発途上国などでの乳児破傷風などの治療に貢献することが期待される。

5. 今回解析に用いた 50 検体分の力価試験値は、ヒト及びウマ由来の 2 種類の標準品を用いた試験値が含まれている。また、抗破傷風人免疫グロブリン製剤は、その剤形が乾燥、液状及びポリエチレングリコール処理と 3 種類存在し、5つの製造所により生産されている。このような分割できる群ごとに、観察期間を短縮して計算される力価を比較した。その結果、観察日数は 5 日から 4 日であれば力価に及ぼす影響が無いことが確認された。今後は製造所の試験結果の提出協力を元に多くのお成績を解析して、生物学的製剤の改正を目標に研究する方針である。また、蛇毒抗毒素の製造と品質管理方法等の WHO ガイドラインへの適応調査を日本及び台湾に関して調査した結果、両国ともに GMP に即した管理は原材料の蛇にまで及んでいない。台湾では 3 種類の蛇抗毒素を CDC が製造しているが、その効果を測定するための試験方法は、マウス致死活性の中和試験を行っている。しかし、試験に際しては、標準抗毒素、標準毒素を用いていないために、安定した製剤が製造を目指す場合は、WHO ガイドラインが示す国家検定期間の標準品作製が必要である。

## E. 結論

1. ウマ抗毒素製造方法の改良では、免疫用抗原製造工程の BSE 対策がすすみ、

免疫効率化として免疫法の再検討により高い力価の抗体を得る方向が確認でき、製剤中の免疫グロブリン(IgG:F(ab)/2 の比)定量法を導入することで異なる製法での純度評価が可能となり、さらにウィルス除去対策への取組みが具体化策が示された。

2. ボツリヌス人抗体の作製では、抗体のソースとなったドナーの血清中の中和抗体価は高力価ではなかったが、ボツリヌス毒素に対して中和活性を示す抗体産生細胞を取り出してライブラリー化した。単離した A 型ボツリヌス毒素を中和するモノクローン抗体は、特定の中和抗体同士を組み合わせることで完全なる中和活性を再現することに成功した。このことは、本研究の「目的の性質を示す抗体を保有する 1 名のドナーから成分採血による抗体産生細胞の獲得→抗体ライブラリー作製→スクリーニング→単離抗体の活性評価・抗体の組合せ決定」という一連のストラテジーを達成した。

3. 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において  $1 \mu\text{g/ml}$  の濃度で 40 LD<sub>50/ml</sub> 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で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。

4. 破傷風毒素を中和するヒト IgG1 抗体



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 の混合により単独時よりも中和能が増強されることを確認した。ヒト血液由来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に利用が期待される。

5. 抗破傷風人免疫グロブリンの力価定量法を検討した結果、現行生物学的製剤基準の試験期間は短縮の可能性があり、今後の製造所の試験成績を含めて解析し、基準変更を目指すこととなった。また、ヘビ抗毒素製剤の WHO ガイドラインへの適合性を日本及び台湾の状況調査の結果、両国ともガイドラインを満たす十分な製造、品質管理体制ではないことがあきらかとなった。

#### F. 健康危険情報

該当事項なし

#### G. 研究発表

1. Kohda, T., Ihara, H., Seto, Y., Tsutsuki, H., Mukamoto, M., Kozaki, S. Differential contribution of the residues in C-terminal half of the heavy chain of botulinum neurotoxin type B to its binding to the ganglioside GT1b and the synaptotagmin 2/GT1b complex. *Microb. Pathog.* 42:72-79 (2007)

2. 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)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願

抗E型ボツリヌス神経毒素抗体

公開番号 特開 2007-274924

公開日 平成 19 年 10 月 25 日

発明者: 前田浩明、向本雅郁、幸田知子、小崎俊司、高橋元秀

組換え抗ボツリヌス神経毒素抗体

公開番号 特開 2008-07122

公開日 平成 19 年 1 月 25 日

発明者: 前田浩明、向本雅郁、幸田知子、小崎俊司、高橋元秀

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

国際出願番号 PCT/JP2009/000250

出願日 2009. 1. 23

発明者: 東 成見、高橋元秀、小崎俊司、幸田知子、黒澤良和、黒澤仁

その他：2008年3月に開催された以下のWHO会議の内容を要約した報告書を資料として残した。

WHO Bi-Regional Workshop on

Production, Control and Regulation of Antivenoms Jakarta, Indonesia, 26-30 May 2008 (DRAFT)

WHO主催の蛇毒抗毒素の製造・品質管理及び規制に  
関するワークショップ報告書

WHO Bi-Regional Workshop on  
Production, Control and Regulation of Antivenoms

開催場所：Jakarta, Indonesia,

開催日時：26・30 May 2008

国立感染症研究所

高橋元秀

(財)蛇属学術研究所

鳥羽通久

セッション I

アジア太平洋地域において、抗毒素の調製を考慮されるべき主な蛇毒

1. 被害が出ている毒蛇の種と抗毒素の対応関係の重要性

毒物学者や抗毒素製造者は、爬虫類学者と密接な連携を保ち、新しい分類学的な知見等について、対応できる態勢をとっておくべきである。抗毒素製造者は、臨床的に重要な毒蛇に対して適切な抗毒素を製造しなければならないが、分布の限られた種についても十分配慮すべきであり、また、種によっては毒の組成に地理的な違いがある場合があるので、毒を集めるためのヘビの同定をきちんとしなければならない。

2. 地域内各国の重要な毒蛇について、順次紹介したが、ガイドラインの試案に比べれば多少改善されていた。しかし依拠する文献が不十分であり、参加者からの修正コメントが多かった。

3. 今後の課題

免疫的交叉性が不明確な種が多いので、抗毒素の対象となる種ばかりでなく、近縁種や近縁属の種の毒に対する中和活性も明らかにしておくべきである。

抗毒素の力価試験や毒の同定のために、いつでも参照できるような確実に同定された標準的なヘビ毒のコレクションを整備するべきである。

セッション II

ヘビ毒とその組み合わせの設計と調製

1. ヘビ毒とその混合物の調製

1) どこまでの範囲のヘビ毒を扱うか

まず、その地域において医学的に重要な種を優先するが、咬症は少なくても重症になるような種もあり、その場合既存の抗毒素がどこまでそれらの種をカバーできるか検討し、必要な場合には抗毒素の開発も視野に入れる。

2) 毒蛇の種が多い場合、どの種の毒で免疫するか



1つの地域に重要な種は1種だけで、あとはその抗毒素で治療できる場合には、当然 単価血清で十分であるが、重要な種が複数いる場合には、単価血清をそろえるか多価血清にするかは、抗毒素を設計する上で重要な問題である。多価血清の場合でもコブラ科とクサリヘビ科を混ぜている場合もあるが、北米や中南米では科を分けて作成しており、そのほうが高い力価の抗毒素が作成できる。

各国の担当部局は、その国の毒蛇相と咬症実態を調査して、適切な抗毒素を製造するか、輸入する場合にはその国にあった抗毒素を選定して行う必要がある。また、重要な種の毒の標本を備えて抗毒素の力価テストやその他の比較研究に供するようにすべきである。

### 3) ヘビ毒の調製

ヘビ毒を集めるためには、採毒を行うためのヘビの飼育場の運営が必要になる。飼育場には獣医が常駐するのが望ましく、病気のヘビからの採毒は避ける。新しく入ったヘビは最初は検疫室に収容し、寄生虫等を取り除いて健康状態を確認してから、一般飼育室へ移す。個々のヘビは個別のケージに収容し、爬虫類学者によって正確に同定された種名、産地と共にラベルを作って、ケージに添付する。ケージの一部に金網を使用する場合には、特に胎生のヘビにおいては、生まれた子ヘビでも脱出できない穴のサイズが必要になる。

毒ヘビの飼育と採毒作業については、職員の十分な訓練が必要になるが、技術的な面ばかりでなく、毒の性質や咬まれたときの対処法までを十分に教育する。理想的には、毒ヘビを扱う場合、必ず2人以上で行うようにする。

保護具としては、実験着の着用が必要であるが、手袋はほとんど使われていないのが実情で、必ずしも薦められない。

採毒にあたっては、同種、同産地、同じくらいの大さのヘビを集めて採毒し、1つのバッチを構成する。採毒した毒は、すぐに凍結し、凍結乾燥して、上記データと使ったヘビの頭数、日付を付けて冷蔵庫に保存する。使ったヘビの一部は、将来遡ってチェックできるように、死後標本として保存する。

毒成分に地理的な変異があることを考えると、免疫に使う毒は、できるだけ広い範囲から集めるのが良い。

## 2. 毒の品質管理

何かエラーが起きたときのために、トレーサビリティを確保しておくのは、非常に重要である。毒の個々のバッチには、ヘビの学名と産地を必ず添付し、必要に応じて使ったヘビの数や採毒の日付が分かるようにしておく。

同じ種の同じ産地の毒は、いつどのように採毒したものも、同じ品質でなければならず、そのためには、適宜下記の方法でその品質をチェックする。たとえば、毒の標品のタンパク質濃度、代表的な酵素の酵素活性、SDS-PAGEの泳動パターンやHPLCなどの分画パターンなどをチェックできるようにする。

## セッション III