

琉球大学学術リポジトリ

[総説]ハブ(Probothrops flavoviridis)毒を中和するヒトモノクローナル抗体の開発

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 南方資源利用技術研究会 公開日: 2014-10-26 キーワード (Ja): ハブ, ヒトモノクローナル抗体, 出血性メタロプロテアーゼ キーワード (En): <i>Probothrops flavoviridis</i> , Human monoclonal antibody, Hemorrhagic metalloproteinase 作成者: 盛根, 信也, MORINE, Nobuya メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016632

総 説

ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) 毒を中和する ヒトモノクローナル抗体の開発

盛根 信也

沖縄県衛生環境研究所 衛生科学班

Development of human monoclonal antibody to neutralize hemorrhagic metalloproteinase from *Protobothrops flavoviridis* venom.

Nobuya MORINE

Department of Biological Sciences, Okinawa Prefectural Institute of Health and Environment

キーワード：ハブ、ヒトモノクローナル抗体、出血性メタロプロテアーゼ

Keywords : *Protobothrops flavoviridis*, Human monoclonal antibody, Hemorrhagic metalloproteinase

1. はじめに

亜熱帯に位置する沖縄県にはハブ (*Protobothrops flavoviridis*) 以前は *Trimeresurus flavoviridis*), サキシマハブ (*Protobothrops elegans*), ヒメハブ (*Ovophis okinavensis*) 等の毒蛇が生息し、住民は大きな脅威にさらされ続けてきた。1960年代には年間およそ500件以上の咬症事故が発生していたが、生活環境の変化に伴い咬症患者の数は減少傾向にある。しかし現在でも年間およそ100件の咬症事故が集落や農作地を中心に発生している(図1)。

ハブ咬傷による症状は出血、腫脹、壊死、血液凝固促進と血液凝固抑制等を起こし、ハブ毒を構成するプロテアーゼ、ホスホリパーゼ、トロンビン様酵素、ヒアルロニダーゼなどさまざまな酵素やペプチドの相互的な作用に起因すると考えられている¹⁾。さらに腫脹が進むと末梢循環不全に至り筋肉は壊死をおこし重症化する²⁾。

ハブ咬症患者の治療には一般名「乾燥はぶウマ抗

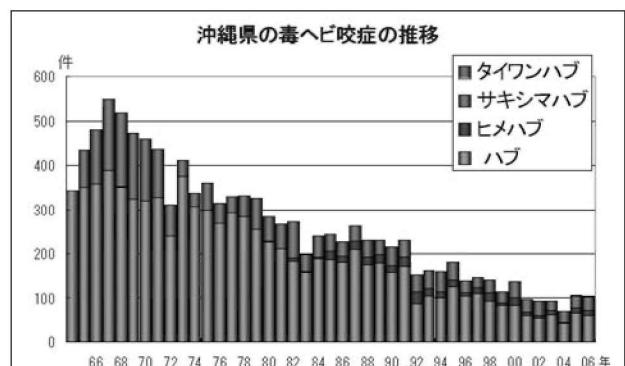


図1. 沖縄県の毒ヘビ咬症の推移

毒素」が使用されるが、沖縄県に生息する3種の毒蛇（ハブ、サキシマハブ、ヒメハブ）の毒は免疫学的に交叉し、3種いずれの蛇による咬症患者でも「乾燥はぶウマ抗毒素」による治療が可能である。過去10年間の平均では、ハブ咬症患者の約70%、サキシマハブ咬症患者の約10%、ヒメハブ咬症患者の約45%に「乾燥はぶウマ抗毒素」が使用されている。

「乾燥はぶウマ抗毒素」は優れた治療効果を有するがウマ血液由来の成分であることから、投与によ

り異種タンパクによる副作用が生じる。アナフィラキシーショック、発疹、搔痒感など軽重の血清病を加えると副作用の発生率は全接種者のおよそ24%に達する³⁾。また血清病は同種類の抗毒素を繰り返し使用することにより発生頻度が高まり症状も重くなる。沖縄県衛生環境研究所では「乾燥はぶウマ抗毒素」の複数回使用による副作用を回避する目的で、免疫動物を馬から山羊に換えた「ハブ山羊抗毒素」も試作した⁴⁾。しかし、これにも山羊由来の異種タンパク成分が含まれており、副作用の危険が伴うことは「はぶウマ抗毒素」と同様である。この様な理由から、動物血清の副作用を回避できるヒト抗体、または免疫原性を最低限に抑えたよりヒト抗体に近い抗毒素の作製が望まれてきた。当研究所ではこれまでに、マウスハイブリドーマ作製技術とヒト抗体産生マウス用いて副作用の危険性が少ない安全な抗毒素の開発を目的に、ハブ毒に対するヒト中和抗体の作製研究を試みてきた。ヒト抗体は本来ヒトの体内にある成分であるため、副作用の危険性が少なく、繰り返しの投与が可能であることや、治療の際に副反応の検査がいらないため症状の進行を早く抑えられる等の利点がある。その他、ヒト抗体作製に使用する抗体産生細胞は凍結により半永久的に保存でき、リコンビナント抗体のセルファクトリーでの製造が行えるため、品質の保証された抗毒素を安定して供給できる利点がある。

本報告はハブ毒の主要毒成分の1つである出血毒HR1aに対する中和ヒトモノクローナル抗体の作製について紹介する。

1. ヒト抗体の作製方法

これまでヒト（型化）抗体の作製には、マウス脾臓細胞とミエローマ細胞を融合させたハイブリドーマが産生するマウスモノクローナル抗体⁵⁾をヒト型に加工する方法により行ってきた。すなわち、マウス抗体の可変領域（抗原と結合する部位）以外を遺伝子工学的にヒト抗体の定常領域に換える方法（キメラ抗体）⁶⁾、またはマウス抗体可変領域の相補鎖決定領域（complementarity determining region : CDR）をヒト抗体の可変領域に移植する方法（CDRグラフト技術）⁷⁾などによる抗体治療薬がこれまでに開発されている。ヒトに対する抗原性を低減したヒト（型化）抗体はすでにガンやリウマチの

治療薬として販売使用されているが、これらヒト（型化）抗体もマウス抗体由来の部位が抗原となり、副作用を起こす例が報告されている⁸⁾。そのため、ハブ咬傷治療用抗毒素については副作用のない完全なヒト抗体であることが強く望まれてきた。

ヒト抗体を産生するハイブリドーマの作製については幾つかの技術的障壁があったが、2000年にキリンビール株式会社医薬カンパニー（現在の協和発酵キリン株式会社）がヒト抗体産生マウス（TCマウスTM）を開発し⁹⁾、さらに2002年には同社のTCマウスTMとMedarex社（米国）のHuMab Mouse^{®10)}との交配により改良型ヒト抗体産生マウス（KMマウスTM）が開発され¹¹⁾、これによってハイブリドーマ作製法により完全ヒト抗体を得る事が可能となった。

2. ハブ毒中の毒性成分

ハブ咬傷による症状は出血、腫脹、痛みが主な症状となる（図2）。その毒性の主因は出血因子とも呼ばれる出血性メタロプロテアーゼで末梢血管壁を裏打する基底膜を構成するマトリクスのコラーゲンやラミニンなどを分解する。その結果、血管壁の全体構造に変化をきたし、生じた内皮細胞間隙から血液が漏出し、腫脹へと症状が進行すると考えられている。ハブ毒出血性メタロプロテアーゼはヘビ毒Snake venom metalloproteinase (SVMP) ファミリーに属する。SVMPは、mRNAの翻訳産物、または成熟タンパク質の分子サイズに基づき、メタロプロテアーゼ領域のみを持っているP-Iクラス、メタロプロテアーゼ領域とディスインテグリン領域からなるP-IIクラス、P-IIクラスに加えてC末端側にシステインの豊富な領域を持つP-IIIクラス、

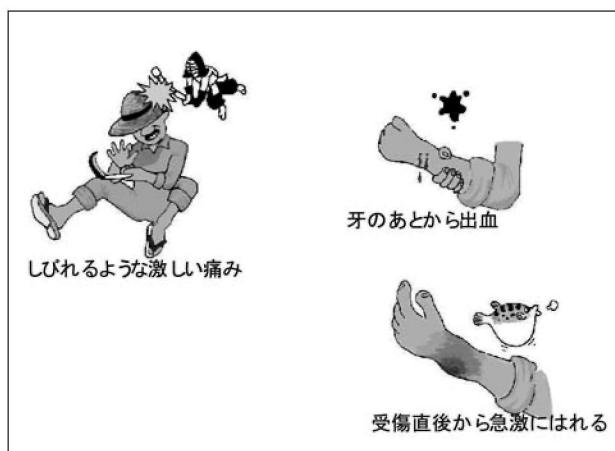


図2. ハブ咬傷の初期症状

P-III クラスのカルボキシル側にさらにレクチン領域がある P-IV クラスの4つに分類される¹²⁾。

1970年代に奄美産ハブ(*Probothrops flavoviridis*)毒から、分子量60,000の高分子量出血性メタロプロテアーゼ HR1a と HR1b (P-III クラス)、さらに分子量25,000の低分子量の出血性メタロプロテアーゼ HR2a と HR2b (P-I クラス) が精製され、その酵素化学的諸性質が明らかにされている^{13) 14)}。一方で沖縄諸島に生息する同種のハブ(*Probothrops flavoviridis*)にはこの4種類の出血性メタロプロテアーゼのうち HR1b のみが存在しないと報告されていたが¹⁵⁾、最近になって沖縄ハブ毒から HR1b が分離され、沖縄ハブにも4種類の出血性メタロプロテアーゼが存在する事が明らかになった。

HR1b がこれまで分離されなかった原因は沖縄ハブ毒の HR1b 含有量が極端に少ないことが考えられる。ハブ毒の HR1a および HR1b は低分子量の HR2a、HR2b よりも約10倍強い出血活性を示し、さらに HR1b は HR1a よりも約1.6倍強い出血活性を示すことが報告されている¹⁵⁾。従って、毒性の強さから HR1b はハブ毒中和抗体を作製する上で重要な成分として考えられる。

3. 抗ハブ毒ヒトモノクローナル抗体の作製

ハブ毒には4種類の出血性メタロプロテアーゼが存在しハブ毒出血性メタロプロテアーゼはその活性により末梢血管基底膜に作用して出血を起こす。抗体のハブ毒出血性メタロプロテアーゼへの結合部位を考えた場合、活性に影響の無い部位に抗体が結合した場合は、抗原-抗体複合体が食細胞に捕食されるまでの間活性を維持したまま毒性を発現する事になる。生体内への侵入から発症まで数時間以上かかる細菌やウイルスとは異なり、ハブ毒出血性メタロプロテアーゼはハブ毒の生体への侵入と同時に作用し始め、生体内分子を破壊する。従って、ハブ毒出血性メタロプロテアーゼの毒性を抑制するためには、その活性中心に影響を与え活性を直接抑える結合抗体が必要とされる。ハブ毒に対するヒト中和抗体作製については、4種類の出血性メタロプロテアーゼのうち毒性の強さと含有量の多さから、始めに HR1a の出血作用を中和するヒトモノクローナル抗体の作製から取りかかった。ヒト抗体の作製方法は抗原 (ここでは HR1a) をKMマウス (協和発酵キ

リン株式会社) に免疫し KM マウスの脾臓細胞をミエローマ (骨髄腫細胞) と融合し増殖能を持たせた細胞 (ハイブリドーマ) を作製した。次に目的のヒト抗体を産生するハイブリドーマを選別し培養後に分泌したヒトモノクローナル抗体を精製した (図3)。最終的に8匹のKMマウスを免疫し84株のヒトモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製した。

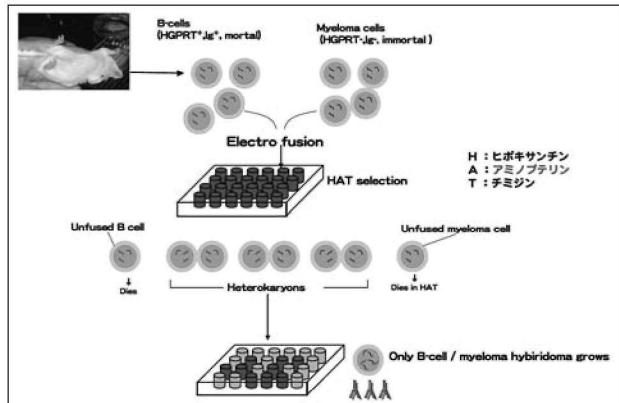


図3. モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製方法

4. 抗 HR1a ヒト抗体の出血性メタロプロテアーゼ HR1a への影響

抗 HR1a ヒト抗体の HR1a プロテアーゼ活性の阻害

作製したハイブリドーマ84株の産生するヒトモノクローナル抗体の HR1a プロテアーゼ活性および出血活性に対する影響を調べた。HR1a に対するヒト抗体84株の HR1a プロテアーゼ活性 (コラーゲンを基質とした) の阻害を調べた結果、23株の抗体が50%以上の阻害活性を有していた。その他の抗体は全くプロテアーゼ活性の阻害を示さなかった。プロテアーゼ活性を中和した23株のうち 7 株については90%以上の阻害が認められ、特に HR1a-7 についてはプロテアーゼ活性の完全な阻害が確認された。

抗 HR1a ヒト抗体の HR1a 出血活性の阻害

次に HR1a のプロテアーゼ活性を阻害する23抗体の HR1a 出血活性への影響をウサギ皮内法により調べた。ウサギ皮内法とは抗 HR1a ヒトモノクローナル抗体と HR1a を混合し、0.01M トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) で総反応液量100-200 μ l にし 5 °C で30分間反応させた後、日本白色ウサギの背皮に HR1a と各抗体の混合液を皮内接種し、24時間後に背皮の裏側から出血斑の大きさを測定することで出

血阻害の有無を判定する。この時、抗体による阻害があれば出血斑が減少あるいは消失する。出血活性の値は出血斑の縦と横の長さを乗算し求めた。各抗体の HR1a 出血阻害は HR1a のみで反応させた際の出血斑（乗算）の値を100%としてこれに対する相対値で表した。上記23株の抗体は HR1a のプロテアーゼ活性を50%以上阻害する抗体であるが、ウサギ皮内法による出血活性の阻害とは必ずしも相関しあらず、中和を予測する指標とはならないことを示唆した。

表1. ヒト抗体の HR1a のプロテアーゼ活性と出血活性への影響

Monoclonal Antibody	Isotype	%Inhibition	
		Proteolytic activity	Hemorrhagic activity
HR1a-1	IgG1	83.6	27.5
HR1a-2	IgG1	86.4	37.8
HR1a-3	IgG1	61.0	42.0
HR1a-4	IgG1	91.9	0.0
HR1a-5	IgG1	92.6	44.4
HR1a-6	IgG1	87.3	0.0
HR1a-7	IgG1	100.0	76.4
HR1a-8	IgG1	60.3	0.0
HR1a-9	IgG1	82.5	0.0
HR1a-10	IgG1	76.7	23.0
HR1a-11	IgG1	87.7	0.0
HR1a-12	IgG1	88.1	36.5
HR1a-13	IgG1	80.6	0.0
HR1a-14	IgG1	88.1	0.0
HR1a-15	IgG1, IgG4	99.3	31.0
HR1a-16	IgG1	71.3	18.5
HR1a-17	IgG1	85.1	23.5
HR1a-18	IgG1	62.4	85.6
HR1a-19	IgG1	92.1	0.0
HR1a-20	IgG1, IgG4	56.4	0.0
HR1a-21	IgG1	84.2	0.0
HR1a-22	IgG1	90.1	0.0
HR1a-23	IgG1	90.4	0.0

Data are mean of duplicate analysis.

ウサギ皮内法により測定した23抗体のうち明らかに出血活性を抑えた抗体は HR1a-7 と HR1a-18 の 2 抗体のみで、HR1a-18 については抗体量を増やすことで完全に出血作用を抑えることができた。(図4)

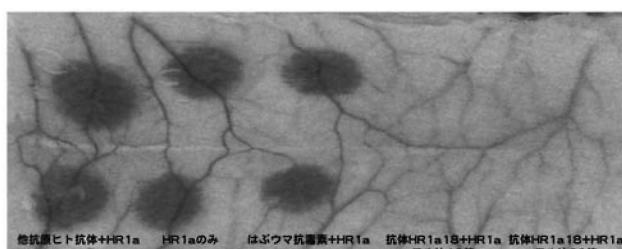


図4. 中和抗体のウサギ皮内法による出血抑制

各抗体はモル比で抗体量が約10倍になるように混合しはぶウマ抗毒素はモル比10倍の抗体 HR1a18 と同タンパク量を加えた

5. おわりに

ハブ毒の毒性は、それを構成するさまざまな酵素やペプチドの相互的な作用に起因する。通常ハブ咬傷の治療において、生体内に注入された毒量が少なく症状が軽い場合はアナフィラキシーショック等の副作用を考慮して「乾燥はぶウマ抗毒素」による治療は行われない。つまり、必ずしもハブ毒成分の全活性を消失させなくても治療効果は充分期待できると考えられる。ハブ毒の毒性のおよそ7割以上が出血性メタロプロテアーゼによるものと考えられており、そのため中和を目的としたヒト抗体作製はハブ毒成分中の出血性メタロプロテアーゼ（4種）について作製できれば治療効果は十分発揮できると考えている。実際に現行の「乾燥はぶウマ抗毒素」は、これら出血性メタロプロテアーゼによって生じる症状を抑えるように製造されている（抗致死価、抗出血I価、抗出血II価）。今回の研究で作製した中和ヒト抗体はハブ毒 HR1a による出血を100%抑制する能力をもっており、十分な治療効果をもつと考えられる。今後は残りの出血性メタロプロテアーゼに対する中和ヒト抗体を作製し、「乾燥はぶウマ抗毒素」と同等以上の効果を持つヒト抗毒素として完成させることを目標として考えている。

6. 参考文献

- 1) 鈴木宏治、松田道生。蛇毒酵素、インヒビター。止血・血栓・線溶 1994; 438-452.
- 2) 宮城良充、野崎真敏。ハブ咬症。中毒研究 2007; 20:223-233
- 3) 宮城良充、真栄城優夫。過去14年間のハブ咬症の統計的考察。中毒研究 1994; 7:147-152
- 4) 野崎真敏、富原靖博、山川雅延、香村昂男、瑞慶山良昭、川村善治、江藤晶、角田俊誠、岡徹也、酒匂光郎。山羊抗毒素の製造について。昭和62年度特殊抗毒素研究報告書 沖縄県公害衛生研究所 1988; 5-13
- 5) Kohler, G., and Milstein, C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-497 (1975).
- 6) Morrison, SL, Johnson, MJ, Herzenberg, LA, Oi, VT. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains

- with human constant region domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **81**, 6851-6855 (1984).
- 7) Roguska, MA, Pedersen, JT, Keddy, CA, Henry, AH, Searle, SJ, Lambert, JM, Goldmacher, VS, Blättler, WA, Rees, AR, Guild, BC. Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **91**, 969-973 (1994).
- 8) Ritter, G., Cohen, LS., Williams, C Jr., Richards, EC., Old, LJ., and Welt, S., Serological analysis of human anti-human antibody responses in colon cancer patients treated with repeated doses of humanized monoclonal antibody A33. *Cancer Res.* **61**, 6851-6859 (2001).
- 9) Tomizuka, K., Shinohara, T., Yoshida, H., Uejima, H., Ohguma, A., Tanaka, S., Sato, K., Oshimura, M., Ishida, I., Double transchromosomal mice: Maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and κ loci and expression of fully human antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**, 722 - 727 (2000).
- 10) Fishwild, DM., O'Donnell, SL., Bengoechea, T., Hudson, DV., Harding, F., Bernhard, SL., Jones, D., Kay, RM., Higgins, KM., Schramm, SR., and Lonberg, N., High-avidity human IgG kappa monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice. *Nat. Biotechnol.* **14**, 845-851(1996).
- 11) Ishida, I., Tomizuka, K., Yoshida, H., Tahara, T., Takahashi, N., Ohguma, A., Tanaka, S., Umehashi, M., Maeda, H., Nozaki, C., Halk, Ed., Lonberg, Nils., Production of human monoclonal and polyclonal antibodies in TransChromo (TC) animals. *Cloning Stem Cells* **4**, 91-102 (2002).
- 12) Bjarnason, J.B., Fox, J.W., Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol. Ther.* **62**, 325-372 (1994).
- 13) Takahashi, T., and Ohsaka, A., Purification and some properties of two hemorrhagic principles (HR2a and HR2b) in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*; Complete separation of the principles from proteolytic activity. *Biochim. Biophys. Acta* **207**, 65-75 (1970).
- 14) Omori-Satoh, T., and Sadahiro, S., Resolution of the major hemorrhagic component of *Trimeresurus Flavoviridis* venom into two parts. *Biochim. Biophys. Acta* **580**, 392-404 (1979).
- 15) Sadahiro, S., Omori-Satoh, T., Lack of a hemorrhagic principle in Habu snake venom, *Trimeresurus flavoviridis*, from the Okinawa Islands. *Toxicon* **18**, 366-368 (1980).