

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3666872号

(P3666872)

(45) 発行日 平成17年6月29日(2005.6.29)

(24) 登録日 平成17年4月15日(2005.4.15)

(51) Int. Cl.⁷

A 6 1 K 39/395

F I

A 6 1 K 39/395 A D Q A

A 6 1 K 39/395 D

請求項の数 13 (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願平4-508627	(73) 特許権者	503402220
(86) (22) 出願日	平成4年4月24日(1992.4.24)		セラピューティック・アンティボディーズ
(65) 公表番号	特表平6-506928		・インコーポレイテッド
(43) 公表日	平成6年8月4日(1994.8.4)		イギリス国ダイフェッド エスエー44
(86) 国際出願番号	PCT/GB1992/000761		5ジュー, ランディサル, フォストラソル
(87) 国際公開番号	W01992/019280		, ブリーンワウン・ファーム(無番地)
(87) 国際公開日	平成4年11月12日(1992.11.12)	(74) 代理人	100081514
審査請求日	平成10年12月18日(1998.12.18)		弁理士 酒井 一
審判番号	不服2003-21234(P2003-21234/J1)	(72) 発明者	スミス, ダモン, チャールズ
審判請求日	平成15年10月31日(2003.10.31)		イギリス国 エセックス シーオー1 1
(31) 優先権主張番号	9109478.9		ユーダブリュー, コルチェスター, キャッ
(32) 優先日	平成3年5月2日(1991.5.2)		スルロード・7
(33) 優先権主張国	英国(GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗毒抗体組成物、その調製方法及びその用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

異なる毒液に対して産生された少なくとも二種の抗血清の混合物を含む抗毒抗体組成物であって、前記混合物は、複数の動物のそれぞれを異なる完全な毒液で免疫して、異なる完全な毒液に対し惹起された複数の成分抗血清を産生し、前記成分抗血清を混合してなるものであることを特徴とする抗毒抗体組成物。

【請求項2】

各成分抗血清がモノスペシフィック抗毒抗体である、請求項1記載の抗毒抗体組成物。

【請求項3】

各抗血清が、完全血清のIgGの部分分解によって得られたF(ab')₂またはF(ab)₂フラグメントを含む、請求項1または2記載の抗毒抗体組成物。

【請求項4】

各抗血清がヒツジの抗血清である、請求項1～3のいずれかの項に記載の抗毒抗体組成物。

【請求項5】

各抗血清が、その毒液に対して各抗血清が作製される当該特定の毒をもつ動物によって咬まれた人の特定地域における頻度およびその毒性に相関した割合で含まれる、請求項1～4のいずれかの項に記載の抗毒抗体組成物。

【請求項6】

各成分抗血清が、その毒液に対して各抗血清が作製される毒をもつ動物の特定の種または

20

亜種によって咬まれた人の特定地域における相対頻度に正比例して含まれる、請求項 5 記載の抗毒抗体組成物。

【請求項 7】

各抗血清が蛇毒に対して作製される、請求項 1 ~ 6 のいずれかの項に記載の抗毒抗体組成物。

【請求項 8】

各抗血清がガラガラヘビの完全な毒液に対して産生される、請求項 7 記載の抗毒抗体組成物。

【請求項 9】

前記ガラガラヘビがマムシ属のピシボロウス (*Agkistrodon piscivorous*)、響尾蛇属のアダマンテウス (*Crotalus adamanteus*)、アトロックス (*Crotalus atrox*) 及びスクツラツス (*Crotalus scutulatus*) からなる群より選択される 2 以上である 請求項 8 記載の抗毒抗体組成物。

10

【請求項 10】

複数の動物のそれぞれを異なる完全な毒液で免疫して、異なる完全な毒液に対し惹起された複数の成分抗血清を産生し、前記成分抗血清を混合することを含む、異なる完全な毒液に対して産生された少なくとも二種の抗血清の混合物を含む抗毒抗体組成物の調製方法。

【請求項 11】

請求項 1 から 9 のいずれかの項に記載の抗毒抗体組成物の有効量を、医薬的に許容できる担体、希釈剤または賦形剤と組み合わせて含む医薬組成物。

20

【請求項 12】

毒液の影響を受けている、ヒト以外の動物である患者に、請求項 1 から 9 のいずれかの項に記載の抗毒抗体組成物を有効量で投与することを含む、毒液を中和する方法。

【請求項 13】

(a) 請求項 1 から 9 のいずれかの項に記載の抗毒抗体組成物と、
(b) 当該抗毒抗体組成物を体内に注射するための手段とを含む、ヒトまたは動物体に抗毒抗体組成物を投与するためのキット。

【発明の詳細な説明】

本発明は、抗毒抗体およびその製造方法に関する。より具体的には、本発明は抗蛇毒抗体およびその製造方法に関する。

30

蛇、アメリカドクトカゲ、クモおよびミツバチを含む多くの動物が、ヒトにとって危険な毒液を産出する。例えば、全世界で毎年およそ 100 万人が毒蛇に咬まれている。概算では、このうちの数十万人が死亡し、他の 30 万人は何らかの形の障害を死ぬまで負うことになる。これは、世界のある地域の詳細な記録がないので、おそらく少なく見積もられた総数であろう。

本来は獲物の捕獲または防御的役割のために産生される蛇毒は、50 成分以上の複雑な生物学的混合物である。蛇の咬み傷によって獲物が死ぬのは、種々の神経毒、心臓毒 (細胞毒とも呼ばれる)、凝固因子、および単独または相乗的に作用するその他の物質によってもたらされる呼吸不全または循環不全による。蛇毒はまた多くの酵素を含み、これらは、獲物に注入されると組織の消化を開始する。毒液は、したがって生命維持に必須の過程、例えば神経および筋機能、心臓の働き、血液循環並びに膜透過性に影響を与えるようになっている物質を含んでいる。蛇毒のほとんどの構成成分は蛋白であるが、低分子量化合物、例えばペプチド、ヌクレオチドおよび金属イオンもまた存在する (1)。

40

毒蛇は 4 つの主な科、山棟蛇科 (*Colubridae*)、クサリヘ

表 1. 1 毒蛇の分類

綱：	爬虫綱 (爬虫類) [Reptilla]
目：	有鱗目 (ヘビおよびトカゲ類) [Squamata]
亜目：	蛇亜目 (ヘビ類) [Serpentes]
下目：	アレシノフィジア (メガネヘビ) [Alethinophidia]
上科：	山棟蛇上科 (高等ヘビ) [Colubroidea]

科	亜科	族
山棟蛇科 [Colubridae] (コルブリッド スネーク) [Colubrid Snakes]	ナクトリシネ (ナクトリシン水蛇) [Natricinae] [Natricine Water Snakes] ジスフォルジネ (アフリカ後牙ヘビ) [Dispholidinae] [African Rear-Fanged Snakes] アトルクタスピジネ (ニセクサリヘビ) [Atractaspidinae] [Burrowing False Vipers]	
眼鏡蛇科 [Elapidae] (パラティン エレクター) [Palatine Erectors]	ブンガリネ (コブラ) [Bungarinae]	ブンガリニ (クレイト) [Bungarini] [Kraits] ナジニ (コブラ) [Najini]
	エラピネ [Elapinae]	エラピニ (アメリカサンゴヘビ) [Elapini] [American Coral] マチコリニ (アジアサンゴヘビ) [Maticorini] [Asian Coral] ラチカウジニ (シークレイト) [Laticaudini] [Sea Kraits]
海蛇科 [Hydroph- iidae]	オキシウラニネ (南洋州毒蛇) [Oxyuraninae]	
(パラティン ドラッカー) [Palatine Draggers]	ヒドロフィーネ [Hydrophiinae] (真性ウミヘビ)	エファロフィニ [Ephalophini] ヒドレラピニ [Hydrelapini] アイピスリニ [Aipysurini] ヒドロフィイニ [Hydrophiini]

10

20

30

40

クサリヘビ科 [Viperidae] (クサリヘビ) [Vipers]	クサリヘビ亜科 [Viperinae] (無ピットクサリヘビ) [Pitless Vipers]	ビプリニ (真性クサリヘビ) [Viprini] アゼミオピニ (フィーのクサリヘビ) [Azemiopini] [Fea's Viper] カウシニ (ヨーロッパクサリヘビ) [Causini] [Night Adders]	10
	マムシ亜科 [Crotalinae] (有ピットクサリヘビ) [Pit Vipers]	ラチェシニ (ブッシュマスター) [Lachesini] [Bushmasters] マムシ族 (胎生有ピットクサリヘビ) [Crotalini][Viviparous Pit Vipers]	10

表1. 2 マムシ亜科の分類と地理的分布

族	属	生息地	20
ラチェシニ [Lachesini]	ラチェシス (ブッシュマスター) [Lachesis] [Bushmasters]	中央及び南アメリカ	20
マムシ族 [Crotalini]	響尾蛇属 (ガラガラヘビ) [Crotalus]	北、中央及び南アメリカ	30
	シスツルルス [Sistrurus] (北アメリカ産蝮蛇、アメリカ産小蝮) [Massaugas and pigmy rattlesnakes]	北アメリカ	40
	ボトロプス [Bothrops] (新世界有ピットクサリヘビ) [New World pit vipers]	中央及び北アメリカ	30
	ハブ属 [Trimeresurus] (アジア有ピットクサリヘビ) [Asiatic pit vipers]	アジアおよび北アメリカ	40
	ヒプナレ [Hypnale]	アジア	40
	マムシ属 (モカシン) [Agkistrodon] [Moccasin]	北アメリカ、東南ヨー ロッパ、及びアジア	40

ビ科 (Viperidae)、海蛇科 (Hydrophidae) および眼鏡蛇科 (Elapidae) に分類される (2)。これらの蛇の分類は表1. 1および表1. 2に記載する。アメリカ大陸に固有のガラガラヘビは、マムシ亜科 (Crotalinae)、響尾蛇属 (Crotalus) またはシスツルルス属 (Sistrurus) (ガラガラヘビ)、蝮蛇属 (Bothrops)、マムシ属 (Agkistrodon) およびハブ属 (Trimeresurus) として知られている、クサリヘビ科の亜科の毒蛇の仲間である。これら二属のガラガラヘビは、さらに種および亜種に分類される。これらの蛇は、顔面にある熱感知器官、ピットを持つために、「有ピットクサリヘビ (pit vipers)」とも呼ば

れるが、それらの最も際立った特色は、攻撃時のガラガラという音で、それによって他のすべての蛇と区別される。

それぞれの種および亜種は、北および南アメリカにおいて明瞭に異なる地理的分布を示している。ガラガラヘビのそれぞれの種の毒液は、すべてのガラガラヘビに共通の成分、より小グループについてのみ共通の成分、または単一種もしくは単一亜種に特異的な成分を含む(3)。

抗毒抗体は、蛇毒を投与量を増加させながら注射することによって、毒液の毒性にたいして免疫を生じた動物の血清または血清の部分精製抗体分画である。

抗毒抗体の科学的研究は、ヘンリー・シーウェル(Henry Sewell)(5)の研究で1887年に始まり、今世紀まで続いている。現在、非常に多くの、多岐にわたるモノスペシフィックおよびポリスペシフィック抗毒抗体が、世界中で生産されている。

10

本明細書で使用されているように、「モノスペシフィック抗毒抗体」という用語は、毒を分泌する動物の単一種または単一亜種の毒液に対して産生された抗毒抗体を指す。「ポリスペシフィック抗毒抗体」という用語は、毒を分泌する動物の異なる種または異なる亜種の2つ以上の毒液の混合物に対して産生された抗毒抗体を指す。

本明細書では、また別の表現として同様に使用される「一価」および「多価」抗血清という用語を使用することによって生じる混乱を避けるために、モノスペシフィックおよびポリスペシフィック抗血清という用語が使用されている。この用語を用いるのは、「価数」という用語が、抗体または抗体の分解産物が有する結合部位数を表すために免疫学者によって使用されるからである。したがってIgG分子は二価で、一方、ただ一個の結合部位をもつFab断片(フラグメント)は一価である。抗血清を表すときに「スペシフィック」という用語を使用すれば、混乱は一切生じない。

20

シーウェルの先駆的研究では、ハトにガラガラヘビの毒液を致死量未満の投与量で接種し、続いて、もし初回に注射したならば致死となる量を越える水準まで増加させた投与量を注射した。したがって、この鳥は毒液に対して抵抗性を獲得したことが明らかになった。

1889年には、カウフマン(Kaufmann)(6)が、ヨーロッパの蛇、ビペラ・ベルス(Viper a berus)を用いて同様な結果を得、1892年には、コブラ毒を用いてサイゴンで研究していたカルメット(Calmette)(7)が、毒液を注射するというプロトコールで抵抗性を付与することができるということを報告した。しかし、免疫動物の血液と毒液とを混合することによって別の動物に抵抗性を最初に付与したのはカンタック(Kanthack)(8)

30

で、彼は蛇毒の致死量に対する抵抗性を明らかにした。カルメットの基本的スケジュールは、毒液(通常コブラ毒)による頻回、反復、徐々に増量する投与量に動物を慣らすことである。彼は、16カ月以上の期間にわたって免疫したウマは、当該毒液の致死量の80倍に耐えることを発見した。彼は、また、これらのウマから得た血液に由来する抗毒抗体は、ウサギに適用したとき20000ユニットの中和効果を有する、すなわち、その血清1mlがウサギ20000gに必要な毒液の最少致死量を中和することができることを示した。

最もよく知られた抗毒抗体は、液状または乾燥形で調製されたウマ血清グロブリンの精製濃縮物である。抗毒抗体は、モノスペシフィック抗毒抗体を製造するためには単一の毒液で、ポリスペシフィック抗毒抗体を製造するためには多くの毒液の混合物で免疫したウマから得られる。ほとんどのタイプの蛇毒中毒の治療のための抗毒抗体が調製されている。製造方法は、前世紀の草分け時代からほとんど変化していない。免疫ウマ血清は、通常は硫酸アンモニウムを用いてグロブリン分画を沈殿させる大ざっぱな精製工程を経るが、ある場合には、これが最終生成物の形態である。この形態の抗毒抗体は、重大な血清反応を起こすので、主としてそのような免疫反応に関与する免疫グロブリンのFc部分を除去するためにペプシン分解を用いることが知られている。

40

特異的毒液の有害な影響および見せかけの無害な影響の両方を中和することについての既知の抗毒抗体の効果は、大いに变化する可能性があり、さらに多くの要因によって左右される。これらの要因のうちで最も重要なものは、抗毒抗体の特異性、産生された抗体の力価および最終生成物の濃縮度または精製度である。

50

一般に、抗毒抗体が特異的であればあるほど、攻撃的毒液を中和する可能性は大きい。単一の毒液に対して産生されたモノスペシフィック抗毒抗体は、したがって同種の毒液に対して最も有効である。しかし、そのような抗毒抗体は、攻撃したヘビの種または亜種が同定されたときの、ヘビの咬み傷の治療にのみ有効である。攻撃したヘビが同定できていないとき、通常「野外」での場合はこれであるが、抗毒抗体が未同定の蛇の毒液に対しても有効である可能性を高めるためには、一連の異なる毒液に対して産生されたポリスペシフィック抗毒抗体が好ましい。しかし、慣用的なポリスペシフィック抗毒抗体は、モノスペシフィック抗毒抗体の特異性を欠き、したがって、毒液の薬理活性を中和するうえで効果が少ない。

出願人は、異なる毒液に対して別々に産生された異なる抗血清の混合物を含む抗毒抗体（本明細書中では「混合モノスペシフィック抗毒抗体」を指す）は、一連の毒液に対して単一抗血清を産生することによって調製された慣用のポリスペシフィック抗毒抗体よりも毒液の薬理活性をより有効に中和するが、ポリスペシフィック抗毒抗体の広範な特異性は保持しているという、予期し得ない驚くべき発見を為した。

本発明の第一の特徴によれば、異なる毒液に対して産生された少なくとも二種の異なる抗血清の混合物を含む抗毒抗体が提供される。

異なる抗血清の混合物を含む抗毒抗体は慣用のポリスペシフィック抗毒抗体よりも有効で、その理由は、前者は、毒液の低分子量成分および/または低免疫原性成分に対する抗体をより高い割合で含んでいるからであろうと考えられている。

蛇毒は、蛋白質、ヌクレオチドおよび金属イオンの複雑な多成分混合物である。これらの成分は、分子量、抗原性の度合いおよび毒液中の濃度において異なっている。抗血清を産生するために動物に毒液を注射すると、多数の抗体集団が産生されるであろう。産生された抗体の濃度および親和性は、さまざまな基準、例えば成分表面の抗原決定基の数、各抗原決定基の免疫原性、各成分の濃度にしたがって変化するのである。毒液（例えばガラガラヘビ毒を含む）の致死的神経毒成分は、しばしば、低濃度でのみ存在する低分子量で免疫原性の低い成分を含んでいる。そのような成分はほとんど高力価の抗体を誘発しないであろう。

この問題は、低濃度、低分子量および低免疫原性成分が高免疫原性成分によってさらに希釈されている毒液の混合物を含む免疫混合物を用いてポリスペシフィック抗毒抗体を製造するために、一層悪化すると考えられる。したがって、ポリスペシフィック抗毒抗体の産生によって、いくつかの成分に対する抗体が存在しないか、またはそれらの効果が無視される程度の低濃度である抗毒抗体しか得られない。

対照的に、本発明の混合モノスペシフィック抗毒抗体は、別々の群の動物で異なる毒液に対して産生された抗血清の混合物を含む。別々に抗血清を産生することによって、各抗血清について利用できる可能な抗体集団の数は同じであるが、免疫原の抗原決定基の数は極めて少なくなる。したがって、そのような成分抗血清は、低分子量、低免疫原性成分に対する防御抗体を、ポリスペシフィック抗毒抗体より高い割合で含んでいると考えられる。混合モノスペシフィック抗血清を製造するためにモノスペシフィック抗血清を組み合わせることによって、モノスペシフィック血清のすべての構成集団を有し、したがってより高い防御を付与するが、抗毒抗体の交差反応性が最大となるというポリスペシフィック抗毒抗体の利点もまた有する抗毒抗体を得ることができる。

本発明の混合モノスペシフィック抗毒抗体の各成分抗毒抗体は、それ自体モノスペシフィック抗毒抗体またはポリスペシフィック抗毒抗体でもよいということは理解しえよう。例えば、混合モノスペシフィック抗毒抗体は、毒液 A + B に対して産生されたポリスペシフィック抗毒抗体と毒液 C に対して産生されたモノスペシフィック抗毒抗体との混合物を含んでもよい。

好ましくは、各成分抗毒抗体はモノスペシフィック抗毒抗体である。例えば、混合モノスペシフィック抗毒抗体は、毒液 A, B および C に対して産生されたモノスペシフィック抗毒抗体の混合物を含んでもよい。

混合モノスペシフィック抗毒抗体を含む抗血清は、いずれの適切な割合で混合してもよい

10

20

30

40

50

。好ましくは、混合モノスペシフィック抗毒抗体は、当該モノスペシフィック抗毒抗体を用いようとする地域にとって適切な割合で混合された抗血清を含む。このような「逃え」の混合モノスペシフィック抗毒抗体を製造するときに考慮し得る要因は、特定の地域内の特定の毒をもつ動物の個体数、分布、習性および毒性である。

混合モノスペシフィック抗毒抗体の組成は、毒をもつ動物の特定の種または亜種によって、特定の地域で咬まれた人を統計的に分析することによって決定することができる。好ましくは、混合モノスペシフィック抗毒抗体の各成分抗血清は、その毒液に対して抗血清が作られた当該有毒動物の特定の種または亜種によって、特定の地域で咬まれた人の相対頻度に正比例して含まれる。

例えば、ダイヤモンドガラガラヘビは、ヒガシダイヤモンドガラガラヘビ(*C. adamanteus*) およびニシダイヤモンドガラガラヘビ(*C. atrox*)として知られる二つの地理的タイプに分類される。混合モノスペシフィック抗毒抗体は、したがって特定の地域のヘビに供されるように製造することができる。したがって、その地域に見いだされないヘビに対する抗血清を包含することは、いずれの生成物の有効性も薄める可能性が有り、必要ではない。逃え抗毒抗体を製造することができるために、その地方のヘビの咬み傷のタイプについて統計的に補うことによって、攻撃したヘビについての情報をもたずに本発明の混合モノスペシフィック抗毒抗体を、同種のモノスペシフィック抗毒抗体の有効性に近づけ、または改良させることができる。

抗毒抗体を含む抗血清は、いずれの適切な動物、例えばマウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ロバまたはウマによっても作ることができる。好ましくは、抗血清はヒツジで作られる。ヒツジでの抗血清の産生は、ウマで抗血清を産生する従来の方法より特に利点がある。その理由は、ヒツジで作製した抗血清は、抗毒抗体を投与されるヒトまたは動物に望ましくない免疫血清反応を引き起こす、特に免疫原性のあるウマ抗血清の I g G および I g G (T) 成分のいずれも含まないからである。

抗毒抗体を含む抗血清は完全な抗血清でもよい。好ましくは、抗血清は、部分的に分解して F (a b ')₂ または F (a b) フラグメントとされたものでもよい。F c フラグメントの除去は、抗毒抗体に対する患者の免疫反応を減少させるうえで利点がある。抗体フラグメントの調製は、慣用的な技術、例えばペプシンまたはパイン分解 (1 5) によって実施してもよい。

抗毒抗体を含む抗血清は、ヘビ、アメリカドクトカゲ、クモおよびミツパチを含むいずれの毒をもつ動物の毒液に対しても産生できる。抗毒抗体は1タイプの動物の毒液に対して得られた抗血清、例えば異なる種または亜種のヘビの毒液に対して得られた抗血清を含んでいてもよい。また、抗毒抗体は動物のタイプを越えて毒液に対して得られた抗血清を含んでもよい。好ましくは、毒液はヘビ毒である。より好ましくは、毒液はガラガラヘビの毒液である。

各抗血清を作製する毒液は、完全な毒液、部分精製毒液または毒液の一つもしくは二つ以上の選択成分を含む。好ましくは、毒液は完全な毒液を含んでもよい。

本発明の第二の特徴に従えば、本発明の第一の特徴に従った抗毒抗体の調製方法が提供される。当該方法は、少なくとも二つの異なる抗血清を混合することを含む。

本発明の第三の特徴に従えば、本発明の第一の特徴に従った抗毒抗体の有効量を、医薬的に許容できる担体、希釈剤または賦形剤と組み合わせて含む医薬組成物が提供される。好ましくは、医薬組成物は、患者に非経口投与するためのものが適切である。より好ましくは、医薬組成物は、静脈注射用が適切である。

本発明の第四の特徴に従えば、毒液を中和する方法が提供される。当該方法は、毒液の影響を受けている患者に、本発明の第一の特徴に従った抗毒抗体の有効量を投与することを含む。

本発明の第五の特徴に従えば、

(a) 本発明の第一の特徴に従った抗毒抗体と、

(b) 体内に抗毒抗体を注射するための手段

とを含むヒトまたは動物体に抗毒抗体を投与するためのキットが提供される。

10

20

30

40

50

本発明は、以下の通りの図面を参照して実施例によって以下に詳述される。

図1は、四種のマムシ毒の1 μ gのホスフェートA2活性を示す。

図2は、1 μ gのマムシ毒のホスホリパーゼA2活性の50%を中和するために必要な抗毒抗体の量を示す。

本発明は単なる例示のために実施例を用いて詳述しており、本発明の範囲内で細部の改変が可能であることは理解されるところであろう。

実験

1. 抗毒抗体の調製

抗毒抗体は、シドゥキ(Sidki)ら(11)の慣用的な免疫スケジュールに従い、十匹のウェルシュ系雑種の雌羊の一群を毒液で免疫することによって製造された。免疫用毒液は、アリゾナ大学のラッセル教授(Prof. F. Russell)によって提供された。毒液は、同一種の多数のヘビから集めた。年齢および地理的分布の異なる個体が含まれ、1年間に渡って毒液が集められた。これらの要因は毒液の組成に影響することが知られており、したがって、抗毒抗体の効果的な産生に重要である。当該群から血液(~300ml)を月単位で集め、ためておく。18時間4 \times で血餅を生成させた後、血清を吸引した。

週	免疫日	免疫原(mg/羊)	サンプリング日	
0	一次免疫	0.5		
1				
2			サンプル1	20
3				
4	再免疫1	1.0		
5				
6			サンプル2	
7				
8	再免疫2	2.0		
9				
10			採血1	30
11				
12	再免疫3	4.0		
13				
14			採血2	
15				
16	再免疫4	4.0		
17				
18			採血3	
19				40
20	再免疫5	4.0		

IgG濃縮物は、硫酸ナトリウム沈殿によって抗血清プールから生成する。続いて抗血清プールの硫酸ナトリウム沈殿によって免疫グロブリン分画を部分精製する。抗血清と等しい容積の36%硫酸ナトリウムとを混合し、生じた混合物を室温で1.5時間攪拌し、免疫グロブリンを沈殿させる。3500rpmで60分間遠心分離させた後、ペレットを18%硫酸ナトリウムで二度洗浄し、続いて最終ペレットをリン酸緩衝溶液(PBS)で最初の抗血清プールの容積と等しい容積に再調製する。その後溶液を20容のPBSに対して透析し、生成物を必要となるまで4 \times で保存する。

当該生成物は、サンプルの正確な蛋白濃度を決定するためにマイクロケルダール法(14)による分析に付してもよい。所望の場合には、 $F(ab')_2$ および $F(ab)$ を生成するためにこのIgGの分解をそれぞれペプシンまたはパインを用いて実施してもよい。これらの生成物をまた、効力が維持されていることを確認するために、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(13)、マイクロケルダール、およびELISA(12)で分析してもよい。

2. 抗毒抗体のin vitro比較

2.1 序説

蛇毒は、蛋白、金属イオンおよびヌクレオチドの多成分混合物である。ある特定の毒液の厳密な性状は、いずれもその蛇の遺伝型に固有であるが、いくつかの共通蛋白は存在する

10

。そのような共通蛋白の1つは、酵素ホスホリパーゼA₂(PLA₂)である。この酵素は、本来、体脂肪の分解に参与するが、例えば細胞崩壊(脂肪の加水分解の崩壊産物を介して)および神経毒(該酵素の薬理的活性部位によって仲介される)等のその他の多くの活性を有するであろう。

マムシまたはガラガラヘビの毒液中のPLA₂活性は、簡単な比色分析を用いて評価することができる。PLA₂は脂肪を加水分解し、脂肪酸およびグリセロールを生じ、その分析系のpHの低下をもたらす。

PLA₂ + 脂肪 - - - - - 脂肪酸 + グリセロール

pHのこの低下は、この系に着色したpHインジケータを取り入れることによってモニターできる。

20

2.2 PLA₂活性評価

以下のアッセーは、特定の毒液のホスホリパーゼA₂活性(PLA₂, EC3.1.1.4)をモニターするために用いることができる。活性は、リン脂質基質(ホスファチジルコリン、シグマケミカルカンパニー社製、製品番号P-9671)からの遊離脂肪酸の離脱を、pHインジケータ(クレゾールレッド、シグマケミカル社製、製品番号C-9877)を用いて測定することによって評価する。

アッセー用緩衝液:

1. 100 mM NaCl

2. 100 mM KCl

3. 10 mM CaCl₂

30

すべての試薬の純度は試薬級である。

日常的なアッセーについては、上記の溶液を500mlつくり、希水酸化ナトリウム溶液を用いてpHを8.6とする。

インジケータ調製:

10mgのクレゾールレッド(ナトリウム塩、シグマ、製品番号C-9877)をアッセー用緩衝液(10ml)に溶かし、容器は錫箔で包む。

基質液調製:

ホスファチジルコリン(卵黄囊タイプXV-Eを1.2g、60%、L-形、シグマ、NO.P-9671)をメタノール(1ml)に溶かし、この溶液をアッセー用緩衝液で10mlとする(最終濃度120mg/ml)。この溶液は、各実験セット毎に新しく調製する。

40

方法:

凍結乾燥させた一価の粗毒液を、最終濃度10μg/mlとなるように蒸留水に溶かす。日常的には10mlの毒液溶液を各実験セット毎に調製する。続いて基質溶液を以下の方法で作製する:

1mlの新しく調製した脂質懸濁液に25mlのアッセー用緩衝液を、続いて0.3mlのトリトンX-100(BDH, No.30632)を加える。透明になるまで十分に溶液を攪拌する。希水酸化ナトリウムを用いてpH8.6に調整する。調製したインジケータ溶液1mlを加え、アッセー用緩衝液で、この基質溶液の最終容積を30mlとする。(基質溶液の色は赤くなるはずであるが、そうでない場合はアッセー用緩衝液のpHを調べる必要が

50

ある)。この溶液もまた銀箔で覆わなければならない。

プラスチック製の3mlキュベットに入れた基質溶液2.8mlに100 μ lのアッセー用緩衝液を加え、OD_{573nm}を測定する。100 μ lの毒液溶液を加え、ストップウォッチをスタートさせる。一切のバックグラウンドpH低下をモニターするために、2.8mlの基質溶液および100 μ lのアッセー用緩衝液の入った第二のキュベットに、さらに100 μ lのアッセー用緩衝液を加える。これは、アッセー用キュベットと同時に進行させる。30分の間1分毎に読み取りを行う。その後、コントロールサンプルのバックグラウンドpH低下を考慮し、この値を毒液の添加によって生じた値から差し引き、時間に対するODのグラフを作製する。続いて標準化したコントロールの読みのパーセントとして、これらの読みを表す。

10

2.3 中和試験

中和実験は、関連抗血清のIgGカットを用いて実施する。これらの調製物は完全抗血清の塩沈殿(18%硫酸ナトリウム、25、1.5時間)によって得られる。

これらの実験に用いるアッセー用および基質用緩衝液は、上記の実験のものと同じである。

アッセー用緩衝液中の抗毒抗体の10倍希釈(ストック溶液)を続いて2倍希釈でさらに希釈し、100 μ l容量を100 μ lの特異的毒液溶液(10 μ g/ml)に加える。さらにサンプルを2セット用意し、バックグラウンドpH低下(200 μ lアッセー用緩衝液)、および全加水分解(100 μ lのアッセー用緩衝液および100 μ lの毒液溶液)をモニターする。サンプルを続いて室温で30分間インキュベートする。この間に、基質溶液を作製し、そのpHを調べる。

20

その後、基質溶液の2.8ml容量の0時間ODを測定する。これは、200 μ lの毒液/抗血清溶液を添加する直前(30分間のインキュベーション期間後)に実施する。さらに室温で15分インキュベートし、続いてODを読む。上記に記載したように、その後結果を処理し、毒液誘発加水分解の中和%として表す。

結果

上記のアッセーは四種のガラガラヘビの毒液を用いて実施した。これらは、マムシ属のピシボロウス(*A. piscivorus*)、並びに響尾蛇属のアダマンテウス(*C. adamanteus*)、アトロックス(*C. atrox*)およびスクツラツス(*C. scutulatus*)である。

図1は、各毒液は有効なPLA2酵素を含み、活性の順は、ピシボロウス(*A. piscivorus*) > アダマンテウス(*C. adamanteus*) = スクツラツス(*C. scutulatus*) > アトロックス(*C. atrox*)であることを示している。上記の抗毒抗体のPLA2中和能が続いて確認された。

30

中和実験は混合モノスペシフィック抗毒抗体を用いて実施した。この抗毒抗体は、ピシボロウス(*A. piscivorus*)、アダマンテウス(*C. adamanteus*)、アトロックス(*C. atrox*)およびスクツラツス(*C. scutulatus*)の毒液に対して四群の雌羊を免疫して得られたモノスペシフィックIgGの等濃度溶液を等容量混合して作製した。濃度は窒素分析のケルダール法で決定し、適量のPBSを添加して等しくした。

コントロール中和実験は、各毒液に対して産生されたモノスペシフィック抗毒抗体および1:1:1:1で混合した毒液に対して産生されたポリスペシフィック抗毒抗体を用いて実施した。コントロール実験では、毒液源、免疫法、精製および試験手順も合わせて、混合モノスペシフィック抗毒抗体実験と全く同一のプロトコールを用いた。

40

結果は図2に示すが、これは、毒液のPLA2活性の中和については、混合モノスペシフィック抗毒抗体は対応するポリスペシフィック抗血清より強いが、または同等の効能を有することを示している。実際、調べた4種の毒液のうち3種については、極めて少ない抗毒抗体が50%中和を達成するために必要であった。

さらに、混合モノスペシフィック抗毒抗体はまた、同種のモノスペシフィック抗毒抗体と同じか、または強い効能を有し、これは、混合モノスペシフィック抗毒抗体は高度の交差反応性をもつことを示している。

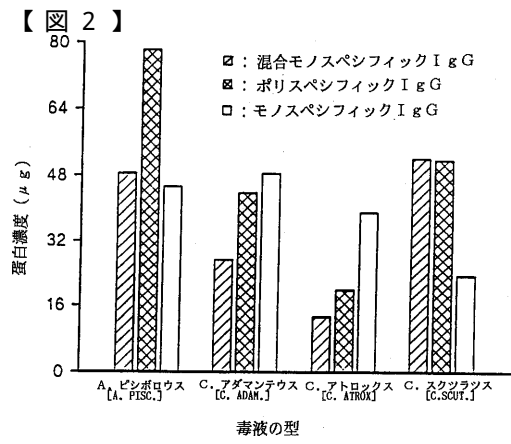
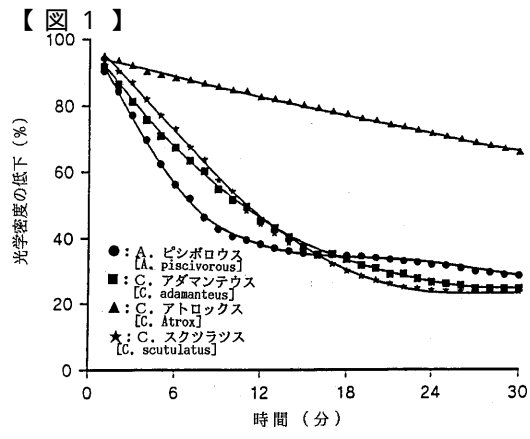
これらの結果によって、PLA2中和の場合には、混合モノスペシフィック抗血清は、そ

50

のポリスペシフィック対応物よりも有効であるという驚くべき結論に達した。

参考文献

1. Karlsson, E. (1979) Chemistry of protein toxins in snake venoms. In "Snake Venoms" Chapter 5, Handbook of Experimental Pharmacology No. 5 edited by C.Y. Lee. Springer-Verlag, New York.
2. Tu, A.T. (1982) "Rattlesnake Venoms, Their Action and Treatment." Chapter 1. Marcel Dekker Inc. New York.
3. Russell, F. E. (1983) Snake Venom Poisoning. Second Edition. Great Neck. New York. 10
5. Sewall, H. (1887) Experiments on the Preventative Inoculation of Snake Venom. J.Physiol., 8, 203.
6. Kaufman, M. (1886) Du Venom Vipere, Masson Paris.
7. Calmette, A. (1892) Etude Experimentale du Venin de Naja. tripuians, Ann. Institut Pasteur., 6, 160.
8. Kanthack, A. A. (1897) Report on Snake Venom in its Prophylactic Relation with Poisons of the Same and Other Sorts.Rep. Med. Local Govt. Bd., 1895-6, London 20
9. Calmette, J. (1907) Les Venins, Animaux et la Serotherapie Antivenimeuse. Masson, Paris.
11. Sidki, A. M. Al Abdullah, I.H. and Rowell, F. J. (1987) Quinine Directly determined in Serum or Urine by Separation Fluoriummunoassay. Clin. Chem. 33, 463.
12. Theakston, R.D.G. (1983) The application of Immunoassay Techniques Including Elisa, to Snake Venom Research. Toxicon., 21, No. 3, 352. 30
13. Laemlli, U. (1970) Nature, 227, 680.
14. Grimble, G.K. (1990) Clin. Lab. Practice. 39, No. 4, 71.
15. Lamoyi E. and Nisonoff A. (1983) J. Immunol. Meth., 56, 235. Porter R.R. (1959) Biochem. J., 73, 119. 40



フロントページの続き

合議体

審判長 森田 ひとみ

審判官 亀田 宏之

審判官 齋藤 恵

- (56)参考文献 TOXICON, VOL. 24, NO. 7, (1986), p. 669 - 678
CHEMICAL ABSTRACTS, VOL. 86, NO. 23, (1977), p. 12
9, ABSTRACT NO. 166171g
米国特許第4806346号明細書

- (58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
A61K39/395