

静注用免疫グロブリン製剤の Panton-Valentine leukocidin 中和抗体価に関する検討

田中 純¹⁾・平山 文博¹⁾・柳瀬さゆり¹⁾・宇野 修正¹⁾
中江 孝¹⁾・上園 昭人¹⁾・花木 秀明²⁾

¹⁾ 日本血液製剤機構中央研究所*

²⁾ 北里大学感染制御研究センター

受付日：2018年4月12日 受理日：2018年6月14日

Panton-Valentine leukocidin (PVL) は、Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) を含む黄色ブドウ球菌が産生する生理活性の強い毒素である。一方、静注用免疫グロブリン製剤 (IVIg) は、毒素中和作用が認められている数少ない薬剤の一つであり、われわれはこれまでの研究において本邦で製造された IVIg がヒト血液中においても PVL の細胞傷害活性を中和することを示している。しかしながら、世界各地で製造販売されている IVIg は、原料血漿はもちろん製造方法も異なることから、完全に同一の製剤とはいえない。そこで今回われわれは、製造年代または製剤の違いにおける IVIg の PVL 中和抗体価の比較を行った。IVIg は、国内外で販売されているインタクト型液状製剤を使用した。加えて、年次推移の検討においては、1990年から2015年までに本邦で製造された製剤 (18 lots) を使用した。PVL 中和抗体価は、二倍階段希釈法により算出した。その結果、測定したすべての IVIg が高値の PVL 中和抗体価を示した。また、製造年代および製剤によって、その抗体価に顕著な違いは認められなかった。これらのことから、PVL に起因する重症感染症に対して、IVIg は製剤間の差異なく抗菌薬療法の補助的作用が期待できる。

Key words: intravenous immunoglobulin (IVIg), Panton-Valentine leukocidin (PVL), neutralizing antibody titer, antitoxin, MRSA

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) は、1961年に初めて報告されてから現在にいたるまで、薬剤耐性を示す主要な院内感染菌の一つである。しかしながら、1997年から2000年にかけて、米国において新型の MRSA が報告され¹⁾、現在では従前の型を hospital-acquired MRSA (HA-MRSA) と呼称するのに対し、新型 MRSA は community-acquired MRSA (CA-MRSA) と別称されている。また CA-MRSA は、Panton-Valentine leukocidin (PVL) を主に産生することも知られている。PVL とは、1932年に Panton と Valentine によって初めて報告された毒素であり²⁾、重篤化した

場合は敗血症、壊死性肺炎または骨髄炎など強い生理活性を示す。

一方、静注用免疫グロブリン製剤 (IVIg) は、感染症から自己免疫疾患まで幅広い有効性を示すマルチファンクショナルな薬剤であり、特に感染症領域においては、抗菌作用に加え毒素中和作用も示すことが知られている。われわれは以前の研究において、本邦で製造された IVIg がヒト血液中においても PVL の細胞傷害活性を濃度依存的に中和することを報告した³⁾。この他にも、全血から単離した好中球に対する PVL の細胞傷害活性に対して IVIg が中和作用を示した報告^{4,5)}や実際の臨床現場における

*神戸市中央区港島南町 1-5-2 神戸キメックセンタービル 8 階

Table 1. Comparison of the PVL-neutralizing antibody titers obtained in response to different IVIg formulations. Five types of IVIg formulations manufactured in different countries were used. The antibody titer of the 10% formulation was calculated as 5%

Products	Lot	PVL-neutralizing antibody titer
IVIg A (Foreign manufacture)	1	32
	2	32
	3	32
IVIg B (Foreign manufacture)	1	64
	2	64
	3	32
IVIg C (Foreign manufacture)	1	32
	2	32
IVIg D (Foreign manufacture)	1	64
IVIg E (Domestic manufacture)	1	64

著効例の報告^{6,7)}はあるものの、IVIg 中の PVL 中和抗体価を製剤間やその年次推移で比較した報告はない。そこで今回われわれは、製造年代や製造業者の異なる IVIg を用いて、それぞれの PVL 中和抗体価の比較を行った。

本研究は、一般社団法人日本血液製剤機構のヒト組織研究倫理委員会および遺伝子組換え実験安全委員会の承認を受けた研究計画に基づき実施した。IVIg は、国内外で販売されているインタクト型液状製剤を使用した。各製剤の測定は、2014 年から 2016 年に販売された IVIg を用いて 2016 年に実施した。抗体価の年次推移の検討においては、本邦で製造された IVIg のうち、1990 年から 2000 年 (3 lots) または 2005 年、2010 年および 2015 年にそれぞれ製造された各 5 lots の合計 18 lots の製剤を用いた。また、本試験では以前の報告³⁾と同様の方法で調製したりコンピナント PVL を使用した。即ち、北里大学病院にて同意のもとに取得した臨床分離株から産生された PVL のゲノム DNA を用いて、PVL 毒素を構成する 2 成分のリコンビナント蛋白質 (rLukS-PV および rLukF-PV) を調製した。抗体価は、前述のリコンビナント PVL と段階希釈した IVIg を反応させた検体中の残留 PVL を市販の PVL 測定キットを用いて測定し、抗体価は二倍階段希釈法により算出した。またすべての製剤の値は、5% 製剤に換算して表記した。

国内外で販売されている IVIg の PVL 中和抗体

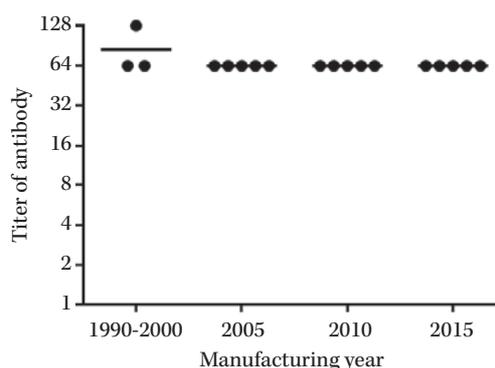


Fig. 1. PVL-neutralizing antibody titers of Japanese IVIg formulations manufactured in 1990 to 2000, 2005, 2010 and 2015. Points represent the PVL-neutralizing titers obtained in response to each IVIg lot, and lines represent the mean titers. Each neutralizing antibody titers are expressed as the reciprocal of the highest two-fold serial dilutions causing >90% neutralization. Results are representative of three or more independent measurements.

価を測定したところ、すべての製品の値が 32 または 64 と高値であった (Table 1)。本試験における測定値は、二倍階段希釈法により算出したものであるため、その差は一管であり測定誤差範囲内であると考えられた。つまり、IVIg の PVL 中和抗体価は異なる製剤間で顕著な違いはないことが示された。本邦の IVIg 中の PVL 中和抗体価の年次推移に関しては、2000 年までに製造された IVIg のうち、1 lot のみ 128 と高値を示したものの、その他すべての年代に製造された製剤は、64 であった (Fig. 1)。年次推移に関する検討では、冷蔵保存した IVIg を用いたが、その測定値は現行製剤と顕著な差異は認められなかった。つまり、本邦における IVIg の PVL 中和抗体価は 1990 年代から大きく変化していないことが示唆された。以上の結果から、PVL 中和抗体価には年代および製剤による差異は少ないことが示された。

今回評価した IVIg は、すべて同程度の PVL 中和抗体価を有していた。IVIg は数千人以上のプール血漿から製造されるため、そのうち極少数が高抗体価であったとしても、全体としては平均化されてしまう。われわれは、以前に行った日本人 11 名、米国人 8 名を対象とした調査では、米国および本邦の健康人の半数以上が高値の PVL 中和抗体価を有していることを示した³⁾。一方で、北米、欧州また

は本邦等におけるPVL産生菌の発生頻度は異なっていることに加え、年次的な流行傾向も一定ではない。つまり、健常人がPVLに曝露される機会は地域や年次で異なるため、曝露に起因した特異抗体の獲得頻度も一定ではないと考えられる。PVL中和抗体価がすべて同程度であった理由として、以下の二つの可能性が考えられる。最初に、PVLの成分のうちLukF-PVはガンマヘモリジンの成分と同一成分であり、残りの一つであるLukS-PVもHlgC、HlgA、LukMまたはLukEといった黄色ブドウ球菌が産生する他の毒素の遺伝子配列と高い相同性⁸⁾や蛋白構造の類似性⁹⁾が報告されている。そのため、それら他の毒素に対する特異抗体がPVLに対しても中和抗体として作用する可能性が考えられる。次に、本邦の若年健常人の多発性嚢胞(multiple furuncles)中にPVL遺伝子陽性黄色ブドウ球菌が高割合(10%以上)で存在しているとの報告¹⁰⁾もある。つまり、重症感染症を発症していない健常人も一定割合でPVLに曝露されており、その結果特異抗体を獲得しているという可能性も考えられる。以上のようなことが推察されるものの、詳細な理由についてはさらなる検討が必要である。

健常人プール血漿から製造されるIVIg中に高濃度のPVL中和抗体が含有されている明確な理由は不明であるが、われわれはIVIgがヒト血液中のPVLに対して生理活性を示すことを確認している³⁾。加えて、PVLを産生するCA-MRSA重症感染症に対してIVIg療法が著効を示すことも報告されている^{6,7)}。よってIVIgは、PVLに起因した重症感染症に対して製造年代や製剤にかかわらず、抗菌薬療法の補助的作用が期待できる。

利益相反自己申告：著者田中純、平山文博、柳瀬さゆり、宇野修正、中江孝および上園昭人は、IVIgの製造法人の職員である。花木秀明においては、申告すべきものなし。

文献

- 1) From the Centers for Disease Control and Prevention. Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*—Minnesota and North Dakota, 1997-1999. *JAMA* 1999; 282: 1123-5
- 2) Pantou P N, Valentine F C O: Staphylococcal toxin. *Lancet* 1932; 219: 506-8
- 3) Tanaka J, Hirayama F, Yanase S, Uno S, Nakae T, Kamizono A, et al: Effective concentration of intravenous immunoglobulin for neutralizing Pantou-Valentine leukocidin in human blood. *J Infect Chemother* 2018; 24: 383-8
- 4) Gauduchon V, Cozon G, Vandenesch F, Genestier A L, Eyssade N, Peyrol S, et al: Neutralization of *Staphylococcus aureus* Pantou Valentine leukocidin by intravenous immunoglobulin in vitro. *J Infect Dis* 2004; 189: 346-53
- 5) Diep B A, Le V T, Badiou C, Le H N, Pinheiro M G, Duong A H, et al: IVIG-mediated protection against necrotizing pneumonia caused by MRSA. *Sci Transl Med* 2016; 8: 357ra124
- 6) Hampson F G, Hancock S W, Primhak R A: Disseminated sepsis due to a Pantou-Valentine leukocidin producing strain of community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and use of intravenous immunoglobulin therapy. *Arch Dis Child* 2006; 91: 201
- 7) Salliot C, Zeller V, Puechal X, Manceron V, Sire S, Varache N, et al: Pantou-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* infections: Report of 4 French cases. *Scand J Infect Dis* 2006; 38: 192-5
- 8) Karazum H, Adhikari R P, Sarwar J, Devi V S, Abaandou L, Haudenschild C, et al: Structurally designed attenuated subunit vaccines for *S. Aureus* LukS-PV and LukF-PV confer protection in a mouse bacteremia model. *PLoS One* 2013; 8: e65384
- 9) Gouaux E, Hobaugh M, Song L: Alpha-hemolysin, gamma-hemolysin, and leukocidin from *Staphylococcus aureus*: Distant in sequence but similar in structure. *Protein Sci* 1997; 6: 2631-5
- 10) Yamasaki O, Kaneko J, Morizane S, Akiyama H, Arata J, Narita S, et al: The association between *Staphylococcus aureus* strains carrying Pantou-Valentine leukocidin genes and the development of deep-seated follicular infection. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 381-5

Comparison of the Panton-Valentine leukocidin neutralizing antibody titers obtained in response to administration of different formulations and different age of manufacture of intravenous immunoglobulin

Jun Tanaka¹⁾, Fumihito Hirayama¹⁾, Sayuri Yanase¹⁾, Shusei Uno¹⁾,
Takashi Nakae¹⁾, Akihito Kamizono¹⁾ and Hideaki Hanaki²⁾

¹⁾ Central Research Laboratory, Japan Blood Products Organization, 8F Kobe KIMEC Center Building, 1-5-2 Minatojima-minamimachi, Chuo-ku, Kobe, Hyogo, Japan

²⁾ Research Center for Anti-infectious Drugs, Kitasato University

Panton-Valentine leukocidin (PVL) often causes severe invasive infections; however, antitoxin drugs against PVL are scarcely available. Intravenous immunoglobulin (IVIg) possesses antitoxin activity. We previously showed that IVIg neutralized PVL cytotoxicity in human whole blood. However, studies comparing the PVL-neutralizing antibody titers obtained in response to administration of different formulations of IVIg and IVIg preparations differing in age of manufacture are still lacking. In this study, we measured the PVL-neutralizing antibody titers obtained following domestic and imported IVIg and Japanese IVIg formulations manufactured in 1990 to 2000, 2005, 2010 and 2015. We showed that all the IVIg preparations elicited strong PVL-neutralizing antibody responses, with no remarkable differences in the titers depending on the country of manufacture or the age of manufacture. Thus, our results suggest that IVIg is effective against infectious diseases caused by PVL, irrespective of the type of formulation used.