

VZV糖蛋白 (gB, gH:gL, gE:gI) に対する抗体価とその臨床症状. 第42回日本臨床ウイルス学会, 2001, 6, 名古屋.

2. 松尾光馬, 本田まりこ, 新村真人, 白木公

康. : 带状疱疹患者の水痘糖蛋白 (gE:gI, gB, gH:gL) に対する抗体価の推移とその重症度. 第49回日本ウイルス学会総会, 2001, 11, 大阪.

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）

分担研究報告書

インフルエンザウイルスに対するヒト中和モノクローン抗体の作製

分担研究者：	奥野良信	大阪府立公衆衛生研究所ウイルス課長
研究協力者：	鈴木定彦	大阪府立公衆衛生研究所病理課主任研究員
	中川直子	神戸市環境保健研究所
	廣野ゆかり	藤田保健衛生大学総合医科学研究所
	鈴木和宏	藤田保健衛生大学総合医科学研究所
	赤堀 泰	藤田保健衛生大学総合医科学研究所

研究要旨：Aソ連型（H1N1）、A香港型（H3N2）、B型のインフルエンザウイルスのワクチン株を抗原として、ファージ抗体ライブラリーからインフルエンザウイルスのHAに対するヒト型モノクロナール抗体の作製を行ない、5種類のファージ抗体をクローニングした。これらの抗体を完全型IgGに変換し、各ワクチン株に対する反応性を調べた。すべての抗体が中和活性を有し、中には多くのワクチン株を幅広く中和するものもあった。Aソ連型とA香港型のそれぞれ1種類の抗体に対するエスケープミュータントを作製し、認識部位の決定を行なった。それらの抗体は、HAのレセプター結合部位の近傍に存在するエピトープを認識することを明らかにした。

A. 研究目的

前年度は、ファージ抗体ライブラリーからインフルエンザウイルスのHAに対するヒト型モノクロナール抗体を3種類クローニングした。今年度は、新しいスクリーニング法を導入して新しい抗体の単離を試みた。得られたファージ抗体は完全型IgGに変換し、生物活性を測定した。それらのIgGに対するエスケープミュータントをクローニングし、抗体の認識部位の同定を行なった。多数のヒト型モノクロナール抗体と、それらに対するエスケープミュータントを作製し、将来出現するであろう変異ウイルスの予測にも役立てたいと考えて研究を行なった。変異ウイルスは将来のワクチン候

補株となり、それに対するヒト型モノクロナール抗体は将来の治療用抗体となることが期待された。

B. 研究方法

ウイルス：本研究では、主にインフルエンザウイルスのワクチン株を用いた。それぞれのワクチン株とそれらが使用されたシーズンに関して表1にまとめた。

ワクチンを用いたファージ抗体の単離：ワクチン原液を用いて、AIMS4ファージライブラリーからインフルエンザウイルスに反応するファージ抗体の単離を行った。

HAに対する抗体だけを単離するため、NPには存在せずHAに存在する糖鎖を利用す

る方法を考案した。抗原糖鎖にビオチンを結合させ、これにファージライブラリーを反応させた。得られたビオチン化抗原・抗体ファージの複合物をストレプトアビジンマグネットビーズに反応させ、HA に対するファージ抗体をスクリーニングした。

回収したファージの増幅：大腸菌 DH12S に、上記の過程で得た抗原結合ファージを加えて感染させた。次に感染した大腸菌にさらにヘルパーファージを感染させ、振とう培養することでヘルパーファージが感染した大腸菌を選択した。培養後、培養液を遠心分離して菌体を沈殿させ、上清を回収した。上清にポリエチレングリコール溶液を加え、遠心分離して沈殿させることによりファージを回収した。

中和試験：フォーカス減少を指標としたマイクロ中和抗体価測定法 (Okuno, Y., et al. J. Clin. Microbiol. 28:1308-1313, 1990) を用いた。MDCK 細胞を 96 穴平底マイクロプレートに分注し、モノレイヤーシートを形成するように培養した。次の日、96 穴丸底マイクロプレートに MEM 培地で希釈した抗体とウイルス液を混合し、37°C で 1 時間反応させて中和した。この中和反応液を前日から用意した 96 穴中の MDCK 細胞に感染させ、37°C で 30 分間吸着させた。感染後、トリプシンを含んだ維持培地 (MEM と 0.5% の tragacanth gum を混合したもの) を加え、37°C で 24 時間培養した。培養後、100% エタノールで固定し、PAP 法で感染細胞の集団 (フォーカス) を染色した。PAP 法では、一次抗体に A 型インフルエンザウイルスの NP に対するマウスモノクローナル抗体、二次抗体に抗マウス IgG ウサギ抗体、三次抗体に抗ウサギ IgG ヤギ抗体、四次抗体にペルオキシダーゼ・ウサギ抗ペル

オキシダーゼ (PAP) complex を順次反応させた後、 H_2O_2 とベンチジンをういて細胞内のウイルス抗原を発色させた。フォーカス数は実体顕微鏡下でカウントし、中和活性の強さは、コントロールのフォーカス数に対するフォーカス減少率で求めた。

染色試験：インフルエンザウイルスの各株を MDCK 細胞に感染させ、24 時間後に固定し、使用時まで -30°C に保存した。感染細胞の染色は、完全型 IgG を一次抗体として反応させ、二次抗体には抗ヒト IgG (H+L) ウサギ IgG、三次抗体には抗ウサギ IgG ヤギ抗体、四次抗体にペルオキシダーゼ・ウサギ抗ペルオキシダーゼ (PAP) complex を順次反応させた後、 H_2O_2 とベンチジンをういて細胞内のウイルス抗原を発色させた。染色価は、感染細胞の染色が確認できる一次抗体の最大希釈倍数で表した。

ファージ抗体から完全型 IgG への変換：

V_H-C_L 遺伝子のそれぞれ両側に制限酵素サイ

トを付加し、PCR を増幅した (第 1 段階)。次いで、その産物を完全な H 鎖と L 鎖をコードできる遺伝子型に変換した中間ベクターに挿入した (第 2 段階)。それから Sal I -Not I 切断し、蛋白発現ベクター (pCMV) に挿入した (第 3 段階)。このベクターを哺乳動物細胞にトランスフェクトし、完全型 IgG を発現させた。大量の IgG を得るためには、ベクターに pNOW-GKT を用いた。

C. 研究結果

(1) A ソ連型 (H1N1) に対するヒト型モノクローナル抗体、NC1 の性状

前年度の研究で、A/ニューカレドニア/20/99 (H1N1) に対するファージ抗体 (Fab) が 1 クローン得られ (NC1)、この抗体が中

和活性を有することを報告した（平成 12 年度報告書、表 7）。この抗体遺伝子から完全型 IgG を 2 クローン（2E4、1A4）作製し、中和活性を測定した（図 1）。原液（2E4:OD280nm=0.334、1A4:OD280nm=0.278）の 10 倍希釈で 100% 近くのウイルスが中和され、抗体濃度に応じた中和活性を示した。

NCI の IgG 遺伝子を高発現ベクターの pNOW-GKT に挿入して CHO 細胞で大量発現させ、得られた 4 クローン（1、2、4、5）のニューカレドニア株に対する中和活性を調べた（図 2）。どのクローンも同程度の中和活性を有し、25 μ g の濃度でほぼ 100% のウイルスが中和された。

NCI の交差反応性を調べるため、最も強い中和活性を示した IgG クローン（4B1.5）を用いて各ワクチン株に対して中和試験を行なった（図 3）。4B1.5 はニューカレドニア株を強く中和したが、他のワクチン株を全く中和せず、株特異的な中和活性を示す抗体であることがわかった。

（2） A 香港型（H3N2）のパナマ株に対するヒト型モノクロナール抗体、PA129 の性状

2000/2001 シーズンよりワクチン株に指定された A/パナマ/2007/99（H3N2）を抗原として、中和活性を有するフェージ抗体が 1 種類（PA129）クローニングされた。PA129 の Fab の中和活性を、各ウイルス株に対して調べた（図 4）。この抗体は、ホモのパナマ株だけでなく、パナマ株の前のワクチン株であるシドニー株も原液で中和した。しかし、当然ではあるが H1N1 のニューカレドニア株を中和しなかった。この抗体は、パナマ株と同じ抗原性を示す野外株（11-3238）をパナマ株以上に強く中和したのは興味ある点である。

パナマ株に感染させた MDCK 細胞の培養液中に PA129（Fab）を添加し、上清中のウイルス価を経日的に測定した（図 5）。感染 2 日後にウイルス価がピークに達し、PA129 の 10 倍希釈で有意な増殖抑制がみられた。

PA129 の完全型 IgG を 2 クローン（2C3D3、1D7H3）作製し、H3N2 のワクチン株に対する中和活性を測定した（図 6）。2 種類のクローンともホモのパナマ株だけでなく、シドニー株を同程度以上に中和した。パナマ株から年代を遡るにしたがって中和の程度は弱くなったが、北九州株に対する中和活性はパナマ株に対するものと大きな違いはなかった。北九州株が分離された 1993 年から 2002 年の現在まで、PA129 が認識する H3N2 の HA のエピトープは保存されていると考えられた。

（3） A 香港型（H3N2）のシドニー株に対するヒト型モノクロナール抗体、SY39 と SY47 の性状

1998/99 と 1999/2000 の 2 シーズンのワクチン株である A/シドニー/5/97（H3N2）を抗原として、中和活性を有するフェージ抗体が 2 種類（SY39、SY47）クローニングされた（前年度報告書、表 7 参照）。

SY39 の完全型 IgG を 3 クローン（2A7F8、2B8D3、2C7C10）作製し、H3N2 のワクチン株に対する中和活性を測定した（図 7）。これらの抗体はホモのシドニー株だけでなく、それ以前の 3 種類のワクチン株に対してほぼ同程度の中和活性を示した。しかし、パナマ株に対しては低い中和活性しか示さなかった。SY39 が認識する H3N2 の HA のエピトープは、福岡株が分離された 1985 年からシドニー株が分離された 1997 年の間は保存されていたと考えられる。シドニー株に対して最も高い中和活性を示した 2C7C10

は、北九州株以前のワクチン株に対して中和試験を実施しなかったが、それらのワクチン株に反応することを染色試験で証明した（表2）。

SY47の完全型IgGを3クローン(2F9D4、2D1G5、1G11E1)作製し、H3N2のワクチン株に対する中和活性を測定した(図8)。これらの抗体はホモのシドニー株だけに対して中和活性を示した。SY47はシドニー株のHAだけに存在する株特異的なエピトープを認識していると考えられた。シドニー株に最も強い中和活性を示した1G11E1は、染色試験でもシドニー株だけに特異的に反応した(表2)。

(4) B型の山梨株に対するヒト型モノクローナル抗体、B/YA14の性状

2000/2001シーズンのB型のワクチン株、B/山梨/166/98を抗原として、中和活性を有するファージ抗体を1種類(B/YA14)クローニングした。B/YA14の完全型IgGを8クローン(1B5H2、1C9G6、1H9F7、1D11F12、2D1E3 2A2E4、2C7E7、2D12F12)作製し、B/山梨/166/98と同じ抗原性を示すB/三重/1/93に対する中和活性を測定した(図9)。すべてのIgGが強い中和活性を示したが、特に2C7E7の活性が強かった。

(5) NCIとPA129の完全型IgGに対するエスケープミュータントの作製と認識部位の同定

NCIの完全型IgGのクローンで高い中和活性を示す4B1.5をニューカレドニア株に反応させ、抗体の中和活性に抵抗して増殖してきたエスケープミュータントの生物活性を調べた(表3)。12種類のミュータントが得られ、HI試験で4B1.5に対する反応性が大幅に低下していた。4B1.5は親株のA/NC/20/99(H1N1)に対し650のHI価を示し

たが、ミュータントに対しては1/10以下のHI活性しか示さなかった。フェレットにニューカレドニア株を免疫して作製したポリクローナル抗体、anti-NCのミュータントに対するHI活性も低下していたが4B1.5程には強くなかった。クローンの4・5は特に強い抵抗性を示し、中和試験においてもこれが確認された。

NCIの認識部位を同定するため、親株のA/NC/20/99(H1N1)とミュータントクローンのHA遺伝子をシーケンスし、アミノ酸配列の違いを検討した(表3)。4ヶ所のアミノ酸置換部位を認めたが、HA構造上、315番目のアミノ酸は抗体認識には関係がないと考えられた。144、201、211の3ヶ所が中和抵抗性に関係していると推測され、特に144と211のアミノ酸置換が抵抗性の賦与に関与していた。クローンの中にはアミノ酸置換部位のアミノ酸の種類が違う2種類が混ざっているものがあり、マイナーな方のアミノ酸を()内に示した。クローン4・5だけが211に変異を認め、144と211のダブルミューテーションが強い中和抵抗性に関わっていると考えられた。144のアミノ酸置換により、新たに糖鎖付加が起こり、これが中和抗体からのエスケープに影響を与えている可能性もある。

これらアミノ酸置換部位をHAの立体構造上に示した(図10)。HAが細胞側のレセプターであるシアル酸と結合するレセプター結合部位はHAの先端にあり、ポケット状のこの部位を取り囲むようにアミノ酸の置換が起こっていた。すなわち、NCIはこれらのアミノ酸が関与する構造に結合し、中和を起こすと推測された。HAの構造はA香港型(H3N2)で報告されており、()内の数字はA香港型におけるアミノ酸部位で

ある。

PA129 の完全型 IgG に対するエスケープミュータントを数種類得た。親株のパナマ株とエスケープミュータントをシークエンスし、アミノ酸配列を比較した。すべてのミュータントは、190 番目のアミノ酸だけに置換が起こっていた (図 11)。この位置はレセプター結合部位に近接し、PA129 はこのアミノ酸が関与する構造に結合して中和を起こすと推測された。

D. 考察

ワクチン株を抗原としたファージディスプレイ法で、5 種類のファージ抗体 (Fab) が得られた。A/ニューカレドニア/20/99 (H1N1) に対して 1 種類 (NC1)、A/パナマ/2007/99 (H3N2) に対して 1 種類 (PA129)、A/シドニー/5/97 (H3N2) に対して 2 種類 (SY39、SY47)、B/山梨/166/98 に対して 1 種類 (B/YA14) であった。これら Fab 遺伝子を基にして完全型 IgG を多数クローニングした。

NC1 の完全型 IgG はニューカレドニア株だけを特異的に中和し、他のワクチン株をまったく中和しなかった (図 3)。エスケープミュータントの解析で、NC1 は HA のレセプター結合部位に近接した位置を認識していると推測された (図 10)。したがって、NC1 の認識部位は変異を起こしやすく、これが NC1 の株特異性に反映したと考えられた。

PA129 の完全型 IgG はパナマ株だけでなく、他のワクチン株も中和した (図 6)。特に、1993 年に分離された北九州株から 1999 年に分離されたパナマ株までほぼ同程度に中和し、PA129 が認識するエピトープはこの期間内で保存されていることがわかった。

エスケープミュータントによる解析で、PA129 は HA の先端部を認識していることが明らかになった (図 11)。

シドニー株に対して 2 種類のファージ抗体が得られ、完全型 IgG に変換した後で H3N2 の各ワクチン株に対する中和活性を調べた (図 7、8)。SY39 はパナマ株に対する中和活性は低かったが、それ以外のワクチン株に対しても、ホモのシドニー株に対するのとほぼ同程度の中和活性を示した。一方、SY47 はシドニー株のみに反応し、他のワクチン株に対してはまったく中和活性を示さなかった。以上の結果は、SY39 は H3N2 に共通する保存されたエピトープを認識し、SY37 はシドニー株だけに存在する株特異的なエピトープを認識していることを意味している。今後は、それぞれの抗体に対するエスケープミュータントを作製し、アミノ酸配列を決定して認識部位を確定する必要があると考えている。

B 型に対するファージ抗体、B/YA14 の完全型 IgG を多数クローニングし、三重株に対する中和活性を調べた (図 9)。いずれも強い中和活性を示したが、他のワクチン株に対する反応性を調べるのが今後の課題である。

前年度は、従来のパニング法では株特異性のない NP 抗体のみが単離されてきたので、別の亜型のウイルス抗原による吸収操作を加えることで初めて中和活性を有する HA に対するファージ抗体を得ることができた。しかし、さらに効率よく目的の抗体を単離するため、今年度はストレプトアビジンマグネットビーズとビオチン化抗原を用いたスクリーニング法を確立した。今後はこの方法で HA に対するファージ抗体を多数クローニングし、完全型 IgG に変換して

生物活性の測定を行ない、更に認識部位を決定してエピトープマッピングを実施したい。

E. 結論

ファージディスプレイ法を応用して、インフルエンザウイルスの HA に対するヒト型モノクローナル抗体が5種類得られた。これらを完全型 IgG に変換し、ワクチン株に対する反応性を調べた。すべての抗体が中和活性を有していた。2種類の抗体に対してはエスケープミュータントを作製し、それぞれの抗体の認識部位を同定した。

F. 研究発表

(1) 論文発表

1. Nakagawa, N., Kubota, R., Nakagawa, T., and Okuno, Y. Antigenic variants with amino acid deletions clarify a neutralizing epitope specific for influenza B virus Victoria group strains. *J. Gen. Virol.* 82:2169-2172. 2001.
 2. Nakagawa, N., Kubota, R., Morikawa, S., Nakagawa, T., Baba, K., and Okuno, Y. Characterization of new epidemic strains of influenza B virus by using neutralizing monoclonal antibodies. *J. Med. Virol.* 65:745-750. 2001.
 3. 奥野良信：高齢者のインフルエンザ予防策（一週一話）。日本医事新報、4040：85、2001
 4. 奥野良信：インフルエンザの疫学と変異。小児感染免疫、13(4)：355-358、2001
 5. 奥野良信：インフルエンザウイルス（分担執筆）。感染症研究のいま（大阪大学新世紀セミナー）（本田武司、生田和良、堀井俊宏編）、p. 51 - 57、大阪大学出版会、2001
- ##### (2) 学会発表
1. 弓指孝博、木村朝昭、奥野良信：高齢者におけるインフルエンザワクチン接種後の HI および中和抗体の経時的推移について。第42回日本臨床ウイルス学会、名古屋（2001、6）
 2. 岡本成史、川端重忠、中川一路、奥野良信、浜田茂幸：インフルエンザウイルス及び A 群レンサ球菌により引き起こされる劇症型感染症の発症とそのメカニズム。第49回日本ウイルス学会総会、大阪市（2001、11）
 3. 廣野ゆかり、鈴木和宏、赤堀 泰、黒澤良和、久保田律子、鈴木定彦、奥野良信：インフルエンザウイルスに対するヒト型モノクローナル抗体の作製。第49回日本ウイルス学会総会、大阪市（2001、11）
 4. 齋藤紀幸、安岐昌子、一口 毅、天辻康夫、馬場宏一、森川佐依子、加瀬哲男、奥野良信：インフルエンザ A/B 検出迅速診断キットの開発。第49回日本ウイルス学会総会、大阪市（2001、11）
 5. 加瀬哲男、森川佐依子、奥野良信、馬場宏一：2000/2001 年シーズンを通しての1小児科におけるインフルエンザの観察。第49回日本ウイルス学会総会、大阪市（2001、11）
 6. 中川直子、奴久妻聡一、呉 笑山、中川俊正、奥野良信、林皓三郎：B 型インフルエンザウイルス Yamagata タイプの抗原性変異の解析。第49回日本ウイルス学会総会、大阪市（2001、11）
 7. 奥野良信：インフルエンザの疫学とウ

- イルス変異. 第33回日本小児感染症学会、山口県宇部市 (2001、11)
8. 池田 優、森口直彦、磯川貞之、吉岡加寿夫、片岡 知、加瀬哲男、奥野良信：インフルエンザワクチン接種にもかかわらずインフルエンザ脳症をきたした一例. 第33回日本小児感染症学会、山口県宇部市 (2001、11)
9. 因田祥子、森島恒雄、富樫武弘、水口雅、横田俊平、田代真人、岡部信彦、奥野良信、宮崎千明：インフルエンザ脳炎・脳症全国調査－検査所見を中心に－ (インフルエンザ脳炎・脳症研究班. 第33回日本小児感染症学会、山口県宇部市 (2001、11)

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）

分担研究報告書

ハブ毒の調整と抗体の検定

分担研究者 沖縄県衛生環境研究所 野崎真敏

研究要旨

沖縄県では陸海に分布する毒性生物刺咬症事故に対応するために、ハブ、タイコブラ、台湾ハブ、ウミヘビ、クラゲ、オコゼ、毒グモ、中国マムシなど8種の抗毒素を備蓄しているが、これらの抗毒素はウマやヒツジに免疫して造られたものなであり患者の体質によっては重篤な副作用を起こすことがあるので、副作用の危険が少ない治療薬への改良が望まれている。特に年間100本以上が使用されるハブ抗毒素においては、副作用の危険が少ない治療薬への改良が強く望まれており、県独自でもヒト抗体を造るように遺伝子が組み換えられたマウスを用いて「抗ハブ毒ヒト抗毒素の研究」が進められている。本研究班はヒト由来のファージディスプレイ系で各種疾患の治療に役立つ「完全なるヒト抗体の作製」を目指しているが、ここでは5回もハブに咬まれた経験があり、僅かではあるが中和抗体を持つことが確認され、研究用として末梢リンパ球の提供も行った研究員の血清から抗体成分の分離精製を試みた。

A. 研究目的

亜熱帯に位置する沖縄県の陸海にはハブ、ハブクラゲなどの猛毒を持った生物が多種生息し、昨年は毒蛇による咬症事故が97件、海洋生物による刺咬症事故が345件発生した。これら毒性生物による刺咬症患者の治療に対応するために沖縄県では、はぶ抗毒素、タイコブラ抗毒素、台湾ハブ抗毒素、ウミヘビ抗毒素、立方クラゲ抗毒素、オコゼ抗毒素、セアカゴケグモ抗毒素、中国マムシ抗毒素を備蓄しているが、これらの抗毒素はウマに免疫して造られた抗毒素なので、患者の体質によっては異種蛋白による副作用がかなりの頻度で発生する。アナフィラキシーショック、発疹、搔痒感など軽重全ての副作用を加える

と、血清病の発生頻度は全使用者の10～15%にも達する。

これらの大部分は注射1週間～10日後に起こる遅延型の血清病であり特に治療の必要はないが、まれにアナフィラキシーショックや即発性の血清病を起こすことがあるので、抗毒素を使用する際は酸素吸入やアドレナリン、ステロイドを準備するなど細心の注意を払う必要である。

このようなことから沖縄県では、副作用の危険が少ない抗ハブ毒ヒト抗毒素の開発を目的に「ヒト抗体を産生するように遺伝子が組み換えられたマウス」を用いてヒト抗体の作製を試みているが、ここでは更に安全性が高

い「完全なヒト由来の抗ハブ毒ヒト抗毒素」の開発を目指して、ハブ毒に対して僅かではあるが中和抗体を有する研究員の血清を精製し抗体成分の分離を試みた。

B. 材料と方法

1. ハブ試験毒素

中和実験や ELISA 用プレートにコーティングする毒素の精製は下記の方法で行った。

まず、沖縄本島で捕獲されたハブ (*Trimeresurus flavoviridis*) の毒素を Sephadex G-100 (Pharmacia) によるゲル濾過で出血因子-1 (HR-1) と出血因子-2 (HR-2) に分離し、次に HR-1 は Protein pak G-DEAE (Waters) で、HR-2 は Protein pak G-SP (Waters) で HPLC を行い、精製 HR-1 と精製 HR-2 を得た。

ELISA 用プレートのコーティングは HR-1、HR-2 のいずれの毒素も 50ug/ml に希釈して使用した。また試験毒素の出血活性は HR-1 が 1 MHD=0.05ug、HR-2 が 1 MHD=0.04ug になるように調整した。

2. 出血活性の測定

出血活性の測定は近藤 (1960) のウサギ皮内注射法で行った。すなわち脱毛した白色ウサギの背皮皮内に 3 倍間隔の 5 段階に希釈した毒素液を 0.2ml ずつ注射し、24 時間後に屠殺して皮膚の裏側から出血斑の直径を計測した。直径 10mm の出血斑を示す毒量を 1 MHD (Minimum Hemorrhagic Dose : 最小出血量) とした。

3. 抗出血作用の観察

3 倍間隔の 5 段階に希釈した試験毒素に等

量の被検血清を混合して 1~2 時間室温で反応させた後、同混合液 0.2 ml を 2 と同様にウサギの皮内に注射、24 時間後に屠殺して皮膚の裏側から出血斑の大きさを計測し、毒素のみを注射した対照と比較した。

4. ELISA による抗体価の測定

ELISA には精製 HR-1、HR-2 でコーティングされたプレート (Corning) を使用し、酵素標識抗体にはペルオキシダーゼ標識抗ヒトポリバレンティムノグロブリンヤギ抗体 (Sigma) を、基質液には TMBM-100 (Mos) を使用した。遮光下で十分に反応させた後、1.0N 硫酸で反応を停止させ、450nm で吸光度を測定した。

5. ハブ咬症患者の調査

ハブ咬症患者の治療を行った病院または診療所から保健所・薬務衛生課・衛生環境研究所に送られて来る調査表をハブ研究室で集計・解析した。

6. 血清の精製

血清中にハブ毒に対する抗体を有する研究員から採血を行い、常法により遠心分離された血清の一部を陰イオン交換カラム (TSK gel DEAE-5PW: 7.5x75mm; TOSOH) で HPLC を行った。

C. 結果と考察

1. 沖縄県の毒蛇咬症者の発生状況 (図 1, 図 2)

沖縄県の毒蛇咬症者の数は 1967 年の 554 人をピークに急速に減少して来たが、1992 年以降は減少の速度が鈍化し最近では 120~130 人で推移している。最近の受症者の数を人口比

にすると 10,000 人に 1 人の割合で、庭先や畑
など通常の生活の中で偶発的に咬まれる場合

図 2 は 1993～2000 年の 8 年間に咬まれた
1,157 人を咬まれた場所別に分類したもので

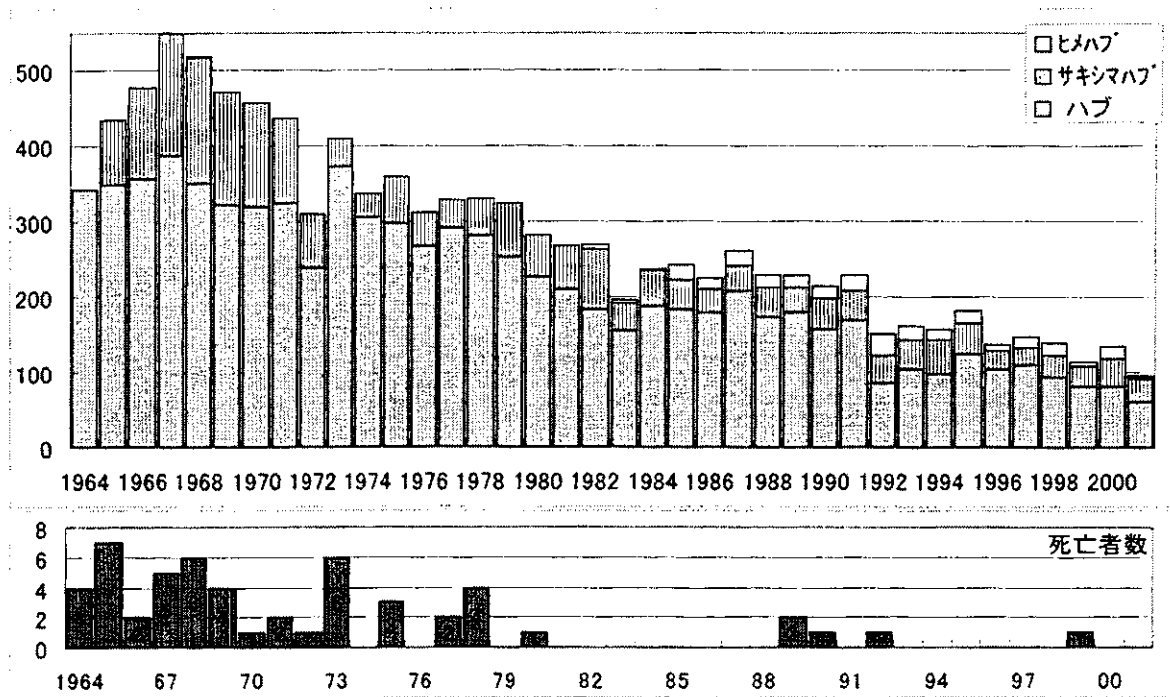


図 1. ハブ咬症患者の推移

が多く、生活圏からハブを一掃する方法を開
発しない限り受症者の数を更に減らすのは困
難と思われる。1980 年以前は毎年数人の死亡
者が発生していたが、治療用抗毒素の普及や
救急医療体制の整備により最近では死亡事故
は殆どなく、重篤な後遺症を残す例も極めて
稀となった。

ある。畑が 438 人 (37.9%) と最も多く、つづい
て屋敷内の 291 人 (25.2%)、道路と山林・草地
の 129 人 (11.1%)、屋内の 84 人 (7.3%)、その
他の 62 人 (5.3%)、不明の 24 人 (2.1%) の順で、
ハブが高密度に生息していると思われる山
林・原野での事故は少なく、県民が普通に暮
らしている屋内・屋敷内、畑・農道での事故
が全咬症の 80%以上を占めていた。

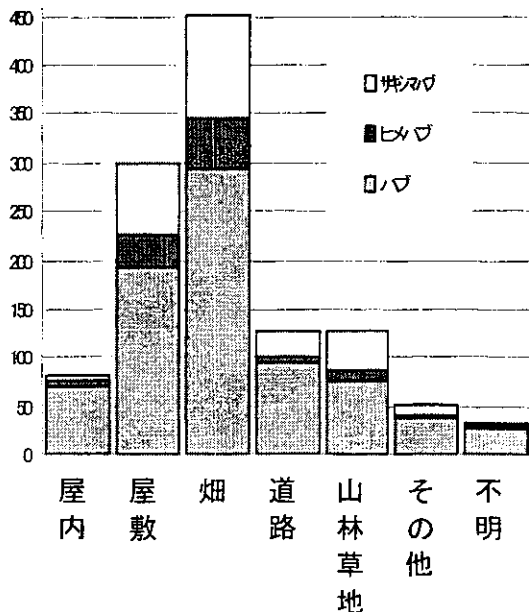


図 2 場所別ハブ咬症('93～2000)

2001 年の咬症者の数は集計中であるが現在
のところ 97 人で、疫学調査を開始して以来始
めて患者の数が 100 人以下になることが予想
される。気象や生活環境の変化、人口動態な
ど急激に減少した要因を早急に調査したい。

2. 抗毒素の備蓄と使用状況

沖縄県では、県が公費で毎年「乾燥はぶ抗
毒素(化血研) 100～130 本」を購入、保健所を
経由して地域の医療機関に無償で配布してい
る。

沖縄県にはハブ、サキシマハブ、ヒメハブの3種の人畜に被害を及ぼす毒蛇が生息しているが、毒性が類似し免疫学的にも交叉することが明らかにされているので、どの蛇に咬まれても「乾燥はぶ抗毒素」で治療が行われている。過去8年間(1992~1999年)の抗毒素

表1. はぶ抗毒素の使用状況(平成4~11年)

抗毒素(ml)	0	10	20	30	40	50	60	80	100	120	不明	計	%
ハブ患者数 (%)	234 30.0	5 0.6	378 48.5	3 0.4	91 11.7	2 0.2	34 4.4	7 0.9	14 1.8	2 0.2	10 1.3	780	68.7
サキシマハブ患者数 (%)	234 87.9	2 0.7	18 6.7	4 1.4				1 0.7				7	266 9.4
ヒメハブ患者数 (%)	66 53.7	46 36		3 2.46		4 3.31	1 0.83					2	121 44.6

の使用状況を表1に示す。

最も毒性が強いハブ咬症患者の治療では、780人中536人(68.7%)に抗毒素が使用されていた。抗毒素の使用量は1本(20ml)が48.5%と最も多く、つづいて2本(40ml)が11.7%、3本(60ml)が4.4%の順で、5本(100ml)以上使用された例も16件(2.1%)あった。

サキシマハブ咬症患者の治療では、266人中25人(9.4%)に抗毒素が使用されていた。1998と99年に抗毒素使用の割合が増えたのは、離島の診療所にも抗毒素が常時備蓄されるようになり使用し易くなったからである。サキシマハブ咬症患者の治療に抗毒素を使用するのは離島や僻地の診療所が主で、ハブに比べて小型で毒性も弱いサキシマハブ咬症の治療には、治療経験が豊富な県立八重山病院の医師は一般に使用しない。

ヒメハブ咬症患者の治療では、121人中53人(44.6%)に抗毒素が使用されていた。ヒメハブは成蛇でも約40cmとサキシマハブより更

に小さく毒性も弱いので、特に重篤でない限り抗毒素を使用する必要はないと考えられているが、ハブと同じ地域に分布し、受症直後には咬まれた蛇の種類が特定出来ない場合も多いので、念のため抗毒素が投与されたものと思われる。沖縄県では殆ど全ての医療機関に「乾燥はぶ抗毒素」が配備されており、ハブ咬症患者の治療には特に軽症の人を除き抗毒素が使用される。

マムシ咬症患者の治療では、異種蛋白の接種による副作用の発生を懸念して「乾燥まむし抗毒素」を使用しないケースも多いようであるが、厚生労働省の人口動態調査では毒蛇咬症によって毎年10人前後の死亡者が発生(その殆どはマムシ咬症によるものと思われる)しており、マムシ咬症患者の治療においても症状が中等度以上の患者には、酸素吸入やアドレナリン、ステロイドを準備するなど副作用が発生した時への対応を十分に整えながら抗毒素を積極的に投与した方がよいと思う。

抗毒素が使用された615人について血清病などの副作用の有無を調査したところ、アナフィラキシーショックなどの重篤な副作用は1例も認められなかったが、発赤や蕁麻疹などの軽い血清病は10~15%に見られた。

表3. 沖縄県の抗毒素の備蓄状況

品名	本数	製造所
乾燥はぶ抗毒素	106	化学及び血清療法研究所
乾燥コブラ抗毒素	8	タイ赤十字社
乾燥タイワンハブ抗毒素	19	台湾予防医学研究所
液状ウミヘビ抗毒素	1	オーストラリアCSL社
液状立方クラゲ抗毒素	22	オーストラリアCSL社
液状オコゼ抗毒素	17	オーストラリアCSL社
液状セアカゴケグモ抗毒素	5	オーストラリアCSL社
液状中国マムシ抗毒素	3	中国上海研究所

(平成14年3月20日)

沖縄県では 10 年程前に飼養施設から逃げ出したと思われるタイコブラとタイワンハブが本島北部のパイン畑や農道で捕獲された。タイコブラはその後見つからないがタイワンハブは世代交代も行いすでに定着しているようであり、非常時に備えて「乾燥タイコブラ抗毒素(タイ赤十字社)と乾燥タイワンハブ抗毒素(台湾予防医学研究所)」を衛生環境研究所で備蓄している。また、海にもウミヘビやハブクラゲ(立方クラゲ)、オニダルマオコゼ、ウンパチイソギンチャクなどの強い毒を持った生物が多種生息し、年間 300~400 件の刺咬傷事故が発生するので、ウミヘビ抗毒素、クラゲ抗毒素、オコゼ抗毒素をオーストラリア CSL 社から取り寄せ衛生環境研究所に備蓄している。しかし、これら外国で製造された抗毒素は医師が個人的に輸入する形態をとっているため、治療に使用する時は患者に十分に説明を行った後「抗毒素の使用に関する同意書(表 3)」が作成できるように準備を進めている。また抗毒素を使用する際の説明文(表 4)も準備中である。

抗毒素使用同意書(案)

県立病院長 殿

私は担当医: _____ から以下の説明を受けました。

1. 抗毒素使用の必要性について。
2. 抗毒素の副作用について。
(抗毒素製剤の安全性を保つための検査や管理は充分に行われているが、動物(ウマ)の血漿から造られた製品なのでアナフィラキシーショックや発疹・リンパ腺炎・関節痛・発熱などの副作用の危険性が存在すること)
3. 抗毒素に代わる治療法について。

上記について質問する機会を与えられた上で説明を受け、治療に必要なことが十分に理解しましたので抗毒素の使用に同意致します。

平成 _____ 年 _____ 月 _____ 日

患者氏名 _____ ○印

代理人(続柄: _____) _____ ○印

住所 _____

(注) 代理人欄は、本人が未成年者または署名できない場合などに記入

オコゼ抗毒素使用に関する説明文(案) 県立病院

1. 患者への説明
 - (1) 患者の状況・治療方針と抗毒素使用の必要性について。
 - (2) 抗毒素の効果について。
 - (3) 抗毒素の副作用について(具体的に説明する。)
2. 抗毒素の投与量・投与方法・効果
抗毒素の用量は刺傷の傷の数より決める。

1~2ヶ所	1アンプル	2,000単位
3~4ヶ所	2アンプル	4,000単位
5ヶ所以上	3アンプル	6,000単位

 大人も子供も同じ量を投与する。
通常は筋肉注射を行い、重症の場合は1.0倍に希釈して静脈注射を行う。
抗毒素は、オコゼ刺傷によって起こる激しい痛みや腫脹・壊死などの局所症状及び全身症状を軽減する。
3. 抗毒素を使用する時の注意
 - (1) 抗毒素はオコゼに刺されて全身に刺傷症状を示す患者もしくは重症の腫脹と痛みがあり、通常の救急処置では効果がない患者に使用する。
アレルギー疾患の既往歴がある患者または過去に抗毒素の投与を受けたことがある患者に使用する時は注意を要する。
 - (2) 本抗毒素は動物(ウマ)の血漿から造られたものであるため、患者の体質によってはアナフィラキシーショックや発疹・リンパ腺炎・関節痛・発熱などの副作用を伴うことがある。したがって、抗毒素での治療には予めアドレナリン0.1%液が入った注射器を準備する。
アナフィラキシーショックでは顔面蒼白、頻脈、蕁麻疹、喉頭浮腫・気管支痙攣による咳や呼吸困難等の症状と徴候がみられる。
 - (3) アナフィラキシーショックが起こった場合には直ちに抗毒素の投与を中止し、酸素吸入をしてアドレナリン0.1%液を筋肉内に注射する。

注射量(筋肉内注射)

大	人: 50kg未満	0.25ml (0.1%液)
	50~100kg	0.50ml (0.1%液)
	100kg以上	0.75ml (0.1%液)

12歳以下の小児: 0.01%液を年令あたり0.25ml投与。
最初の筋注で症状が好転しない時は、0.01%に希釈した同量のアドレナリン液を徐々に静注する。症状に応じて5分毎に換り返す。
重症の場合は、抗ヒスタミン剤とコルチコステロイドの静注の併用も効果があるが、アドレナリンにより運動性である。
- (4) 抗毒素投与後8~13日経過後に遅延性の血清症が起こることがある。
発熱・発疹・関節痛・リンパ腺痛などが一般的で、重症の時はコルチコステロイドで治療を行う。

- 4. その他の治療
オコゼの毒は不安定なので患部を温湯(40~45℃)に浸すと痛みが軽減する。刺傷部位周辺への局所麻酔剤の注射は痛みを軽減する効果がある。

3. 血清の精製

ハブに5回も咬まれ、また40年に亘って乾燥粉末毒の取り扱いを行っている研究員の血清が、ウサギ皮内注射法でハブ毒の主要な毒性因子であるHR-1とHR-2の出血作用を僅かではあるが中和することを昨年の報告書で紹介したが、本年度は同血清から抗体成分の精製を試みた。

TSK gel DEAE-5PW (7.5x75mm):TOSOHによるHPLCで精製を行った。溶出条件と結果は図3に示す。溶出する順にfra-1⁻⁵とすると、HR-2でコーティングされたプレートではfra-1が強く発色したが、HR-1でコーティングされたプレートではfra-3が最も強く発色した。溶出する位置から判断するとfra-1がγ-globulin、fra-2, 3がβ-globulin、fra-4がalbumin、fra-5がα-globulinに相当するものと思われる。ヒト血清の場合、抗体成分

の大部分は fra-1 の γ -globulin に溶出されるのが一般的であるが、今回の実験では HR-2 に対する抗体は fra-1 の γ -globulin に多く含まれていたが、HR-1 に対する抗体はむしろ β -globulin の方に多く含まれているようであった。しかし一度だけの結果で判断するのは危険であり、後日再度実験を行い抗体の行方を確かめたい。

D. まとめ

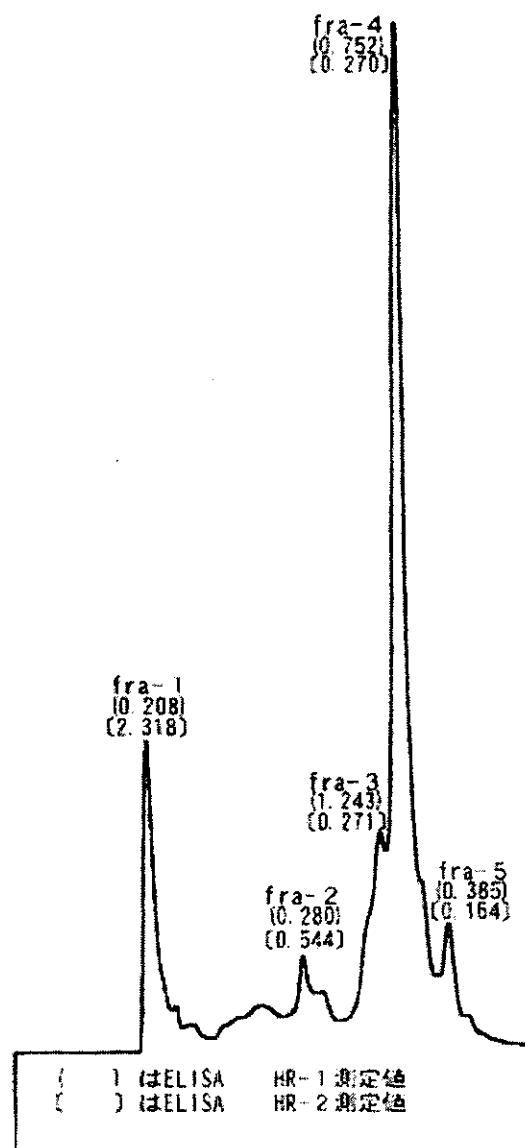


図3. ヒト血清のHPLC

Sample: ヒト血清 200 μ l
 Columu: TSK gel DEAE-5Pw (7.5 \times 7.5mm)
 Buf. A: 10mM, pH=7.0 PBS
 Buf. B: +0.5M NaCl
 Flow: 1.0ml/min

1. 毒蛇咬症患者の数は1992年以降120~130人で推移していたが、2001年は97人で疫学調査を開始して以来始めて患者の数が100人を割った。現在気象や生活環境の変化、人口動態など、急激に減少した要因を調査中である。
2. 沖縄県では特に軽症の人を除く約60%の患者に「乾燥はぶ抗毒素」が投与され、その殆どが後遺症もなく完全に治癒していた。抗毒素の投与により10~15%に血清病が発生するが、アナフィラキシーショックなどの重篤な副作用は最近は発生していない。
3. 沖縄県では「乾燥はぶ抗毒素」以外に、非常用として「乾燥タイコブラ抗毒素、乾燥タイワンハブ抗毒素、液状中国マムシ抗毒素、液状ウミヘビ抗毒素、液状立方クラゲ抗毒素、液状オコゼ抗毒素、液状セアカゴケグモ抗毒素」を備蓄している。
4. ハブに5回も咬まれ、また40年に亘って乾燥粉末毒を取り扱い、血清中に中和抗体を持っていることが確認されている職員の血清をイオン交換HPLCで精製した結果、ELISA法でHR-2は α -globulin、HR-1は β -globulinに相当するfractionに強い抗体反応を認めた。

E. 参考文献

- (1) Kondo, H. Kondo, S. Ikezawa, H. Murata, R. and Ohsaka, A.: Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. Japan J. Med. Sci. Biol. 13, 43-51, 1960
- (2) Omori-Satoh, T. Ohsaka, A. Kondo, S. Kondo, H.: A simple and rapid method for separating two hemorrhagic principles in

the venom of *Trimeresurus flavoviridis*.

Toxicon, 5, 17

(3) Takahashi, T and Ohsaka, A. :
Purification and some properties of two
hemorrhagic principles (HR-2a and HR-2b) in
the venom of *Trimeresurus flavoviridis* ;
complete separation of the principle from

preteolytic activity. Biochim. Biophys.
Acta. 207, 65-75, 1970

(4) Omori-Sato, T. : Purification and some
properties of hemorrhagic principle I in
the venom of *Trimeresurus flavoviridis*.
Biochem. Biophys. Acta. 207, 65, 1970

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
赤堀泰	抗体作製の新技术	血液・腫瘍科	44 (3)	226-232	2002
K.Morino, et al.	Antibody fusions with fluorescent proteins: a versatile reagent for a profiling protein expression	J. Immunol. Methods	257	175-184	2001
Kamiyama T, T. et al.	Characterization of the DNA polymerase gene of varicella-zoster viruses resistant to acyclovir	J. General Virology	82	2761-2765	2001
Kamiya N, et al.	Long-term persistence of cellular immunity to Oka vaccine virus induced by pernasal co-administration with <i>Escherichia coli</i> enterotoxin in mice	Vaccine	19	3131-3136	2001
Shiraki K, et al.	Construction of Oka varicella vaccine expressing human immunodeficiency virus env antigen.	J. Medical Virology	64	96-103	2001
Takahashi M, et al.	Immunization of the elderly to boost immunity against varicella-zoster virus (VZV) as assessed by VZV skin test reaction	Archives of Virology	Suppl 17	161-172	2001
Sasaki K., et al.	Adjuvant action of <i>Escherichia coli</i> enterotoxin for delayed type hypersensitivity to Oka varicella virus on pernasal co-administration in mice.	Vaccine	19	931-936	2001
Nakagawa, N., et al.	Antigenic variants with amino acid deletions clarify a neutralizing epitope specific for influenza B virus Victoria group strains.	J. Gen. Virol	82	2169-2172	2001

Nakagawa. N. et .al.	Characterization of new epidemic strains of influenza B virus by using neutralizing monoclonal antibodies.	J. Med. Virol	65	745-750	2001
奥野良信	高齢者のインフルエンザ予防策 (一週一話)	日本医事 新報	4040	85	2001
奥野良信	ンフルエンザの疫学と変異	小児感染 免疫	13(4)	355-358	2001

本

Y. Iba. et al	Two-step strategy for alteration of immunoglobulin specificity by in vitro mutagenesis	Methods in Molecular Biology	in	259-267	2001
奥野良信	インフルエンザウイルス(分担執筆). 感染症研究のいま	大阪大学出版会		51 - 57	2001