

検討を行う。

(3) WHOGLに対応できる組織作りの検討を行い、教育訓練を推進する。  
(倫理面への配慮)

マウス、ウサギ、ハブの取扱いは沖縄県衛生環境研究所動物実験実施規定第5条に基づき、動物実験が動物愛護の観点から適正に実施されるように倫理面に配慮して行った。

### C. 研究結果

(1) 21年度の研究計画は、蛇抗毒素製剤のWHOGL対応の検証として、ハブの飼育方法及びハブ毒の採毒方法についてWHOGLを踏まえ①毒蛇の採取情報の明確化。(地域・大きさ・年齢・分類等) ②捕獲後の検疫、倫理的に適切な飼育、給餌や取扱法の検討③採毒した毒蛇のトレーサビリティの検討④採毒した毒液の保存方法の検討⑤採毒した毒液ロットの毒力の同等性についてどのように現状と比較して改善できるのかを検討した。

当研究所で扱うハブは、ハブ毒を抗毒素製剤の原材料としてGMP製造所に提供している。

また、当研究所で抗ハブ毒ヒト抗体研究を行うためにハブ毒を使用している。

そのため、ハブ毒採取に用いるハブや抗ハブ毒ヒト抗体研究に用いるマウス、ウサギについては、WHOGLの中で原材料や実験動物として用いるための指針が示されている。今回の研究では、WHOGLを踏まえた動物

の適正な取り扱いに関する検討を行った。その結果、実験動物の実施に関する研究所内の基本的な考えが示されていないために、WHOGLを考慮に入れた動物実験実施規程を設定し、動物実験委員会を設置した(図1)。

実験動物を扱う責任者は、倫理的に適切な飼育、管理、給餌や取扱い方法を動物実験計画書に記載して、動物実験委員会において審議し、所長に報告する。所長は、動物実験に委員会の報告を基に動物実験の承認を行う。動物実験実施規程のフローチャートを図2に示す。

沖縄県衛生環境研究所動物実験実施規程の第12条(実験動物の飼育管理等)は「動物飼育の施設・設備、飼育条件及び輸送する場合の条件は、実験動物及び動物福祉の観点から適切なものでなければならない。

実験担当者は、適切な施設・設備の維持管理に努めるとともに、搬入から実験終了時までの期間、実験動物の状態を常に観察し、必要に応じて適切な処置を施さなければならない。また実験動物への適切な給餌、給水等の飼育管理を行わなければならない。」と定められている。WHOGLを考慮した飼育環境を改善するために、これまで職員が行っていたハブ飼育施設の清掃については、専門清掃業者に月1回の清掃委託を行い、飼育環境面での衛生的な配慮を行った。

また、動物の死体処理は、これまで当研究所で焼却廃棄を行ってきたが、病原菌の感染や汚染を防ぐために廃

棄業者に委託した。

WHOGLに基づいた、ハブ毒の採毒方法の検討については、衛生的な取り扱い及び管理に関する、沖縄県衛生環境研究所動物実験実施規程、第11条（実験動物の検収及び検疫）において「実験責任者は、実験動物の搬入に当たって、研究所の職員及び他の実験動物への感染又は汚染を防止するために、決められた場所で実験動物の健康状態等に関する検収及び検疫を行わなければならない。」と規定されている。

それで、研究所内に搬入されたハブは、搬入時に外傷や寄生虫、動きや形態の異常の有無、栄養状態等をチェックし、異常のない個体のみ、個別ゲージに収容して検疫を行い、採取日、場所、性別を記録することとした（図3）。

採毒方法の手順は、優先的に個別ゲージに飼育しているハブからハンドリングで採毒する。採毒液は遠心分離器（2200rpm×10min）で分離した上澄み液を予備凍結して、真空凍結乾燥機で乾燥粗毒として年度毎にデシケーターで室温に保管する。（図4）

採毒に用いる個体は、採取場所及び性別が偏らないように配慮して、1回の採毒には10～20個体を用いる。

WHOGLに対応できる組織作りを行うために研究所内の職員、関係者に対して「動物実験実施規程」「ハブ及び毒素のGMP対応検証」の研究会を行い、教育訓練を推進した。

#### D. 考察

WHOGLにおいては蛇抗毒素製剤のすべての過程にGMP適合性を求めている。また当研究所においてもハブ毒原材料の安全性確保、品質保証、毒の安定性が求められている。

現在行われているハブの飼育、採毒、保管についてGMP対応に準じた取り扱いが行われているのかを検討して、改善すべき点については、研究所内の「動物実験実施規程」を制定して「動物実験委員会」の中で審議を行ない、ハブの搬入時、飼育環境、ハブ毒採取方法について問題点を浮き彫りにした。

その改善点として、飼育清掃や死体処理については、業務の合間に職員が行っていることを、記録や目に見える実績に残すことを検討した結果、業者に委託をすることとした。

今年度の研究において検討した、採毒手順のマニュアル、搬入時のハブ毒採取記録簿を用いて、平成22年度に実施し、再評価を行う予定である。

当研究所が製造所に提供する「ハブ毒」は、乾燥状態で常温保管している。

ハブ毒受け入れ製造所は「ハブ毒は冷蔵保管が望ましい」との要望があり、採毒手順マニュアルに冷蔵保管を検討することとした。

ハブ毒の毒力試験については、当研究所はこれまで試験を行っていない。

ハブ毒受け入れ製造所は、搬入時に毒力試験を実地している。そのため、提供側と受け入れ側の両方において毒力の同等性を確認し、ハブ毒の品質を保証するために、試験の実施に向け

た準備をすることとした。

また、ハブ毒原材料として提供しているハブ毒成分を分離精製して提供することについては、受け入れ製造所の調整を行い検討することとした。

1. 特許所得：なし
2. 実用新案登録；なし
3. その他：なし

#### E. 結論

WHOGLを踏まえた規制を念頭に置いたハブの取り扱いに関する検討については、研究所内に動物実験委員会を設置し、動物実験実施規程を制定した。これにより採毒に使用したハブの死体処理、ハブの飼育管理を明確に規定した。ハブの飼育場所は専門清掃業者に委託し、死体処理についても委託業者で処理を行った。

WHOGLに基づいた、ハブ毒の採毒方法については、ハブの採毒マニュアルの検討を行い、ハブ毒採取記録簿を用いて「原材料トレース」が出来るように原材料保管・管理のシステムを考慮した。

WHOGLに対応できる組織作り、教育訓練を推進は、研究所内において「ハブ毒のGMP対応検証について」の教育訓練を研究所員に行った。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

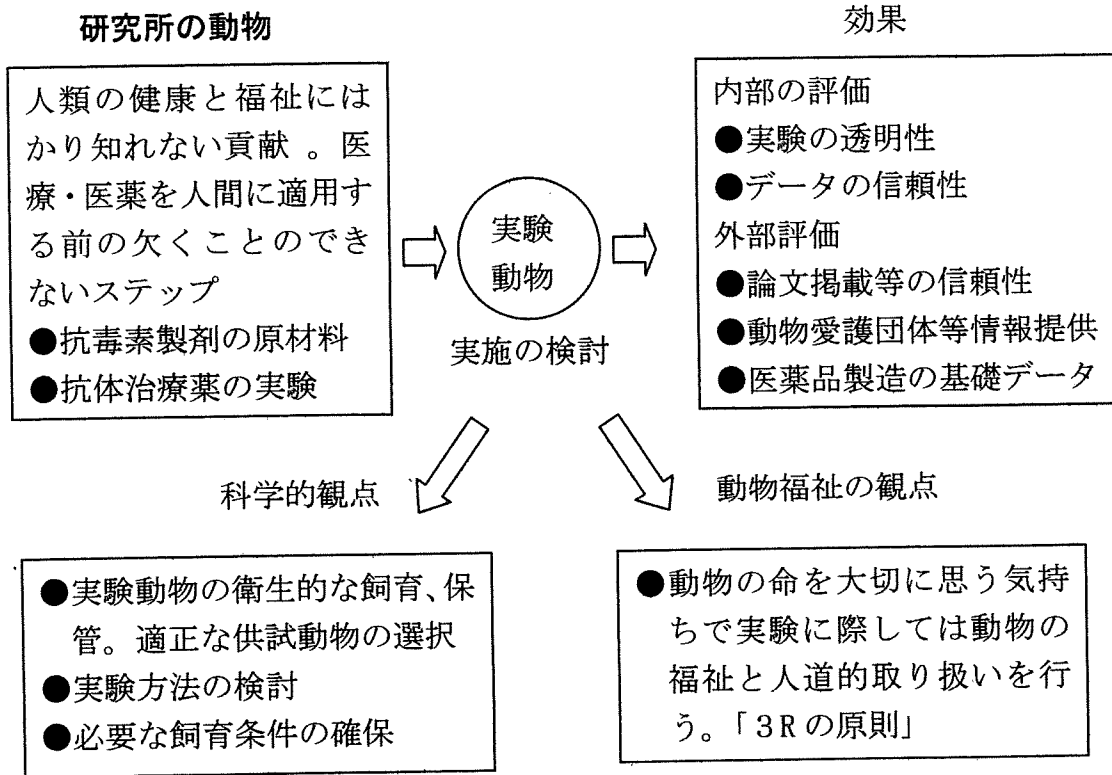


図1. 研究所内の動物に関するWHOGLに対する検討

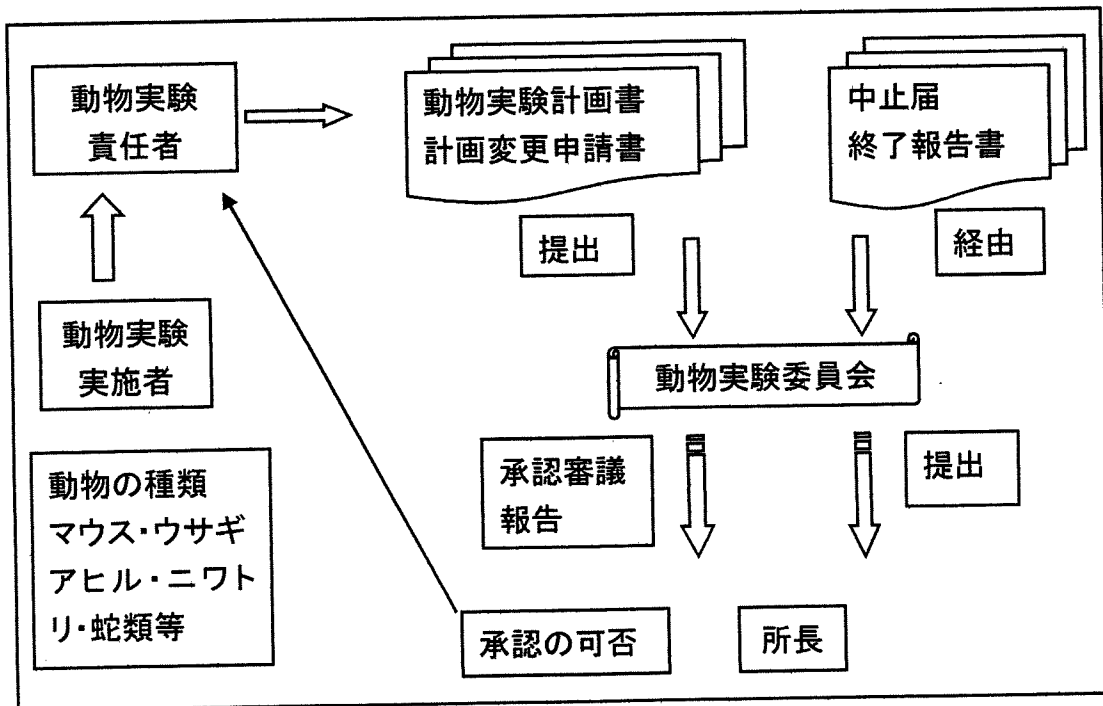


図2. 動物実験実施規程のフローチャート

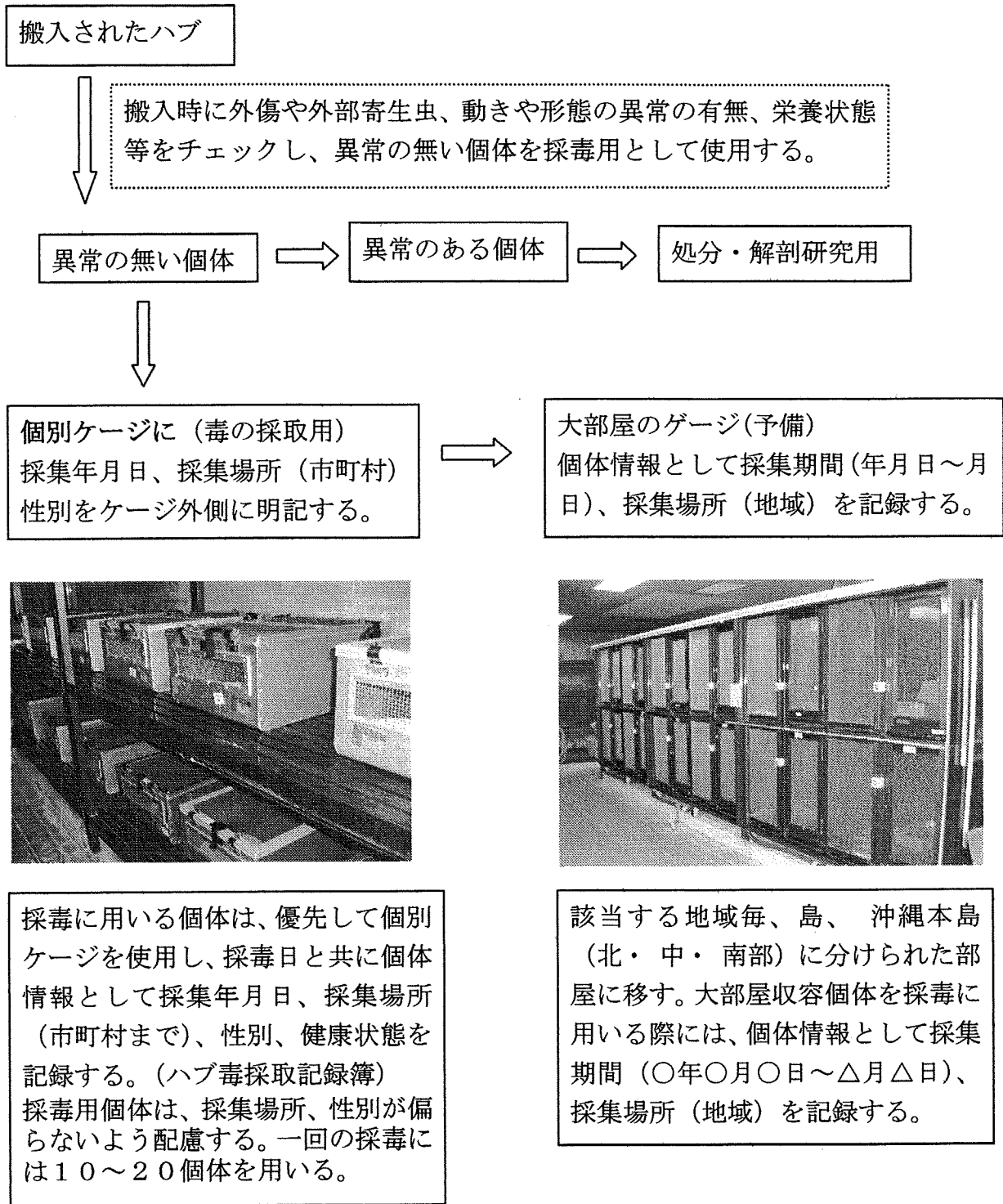


図3. ハブ搬入時のゲージ収容フローチャート

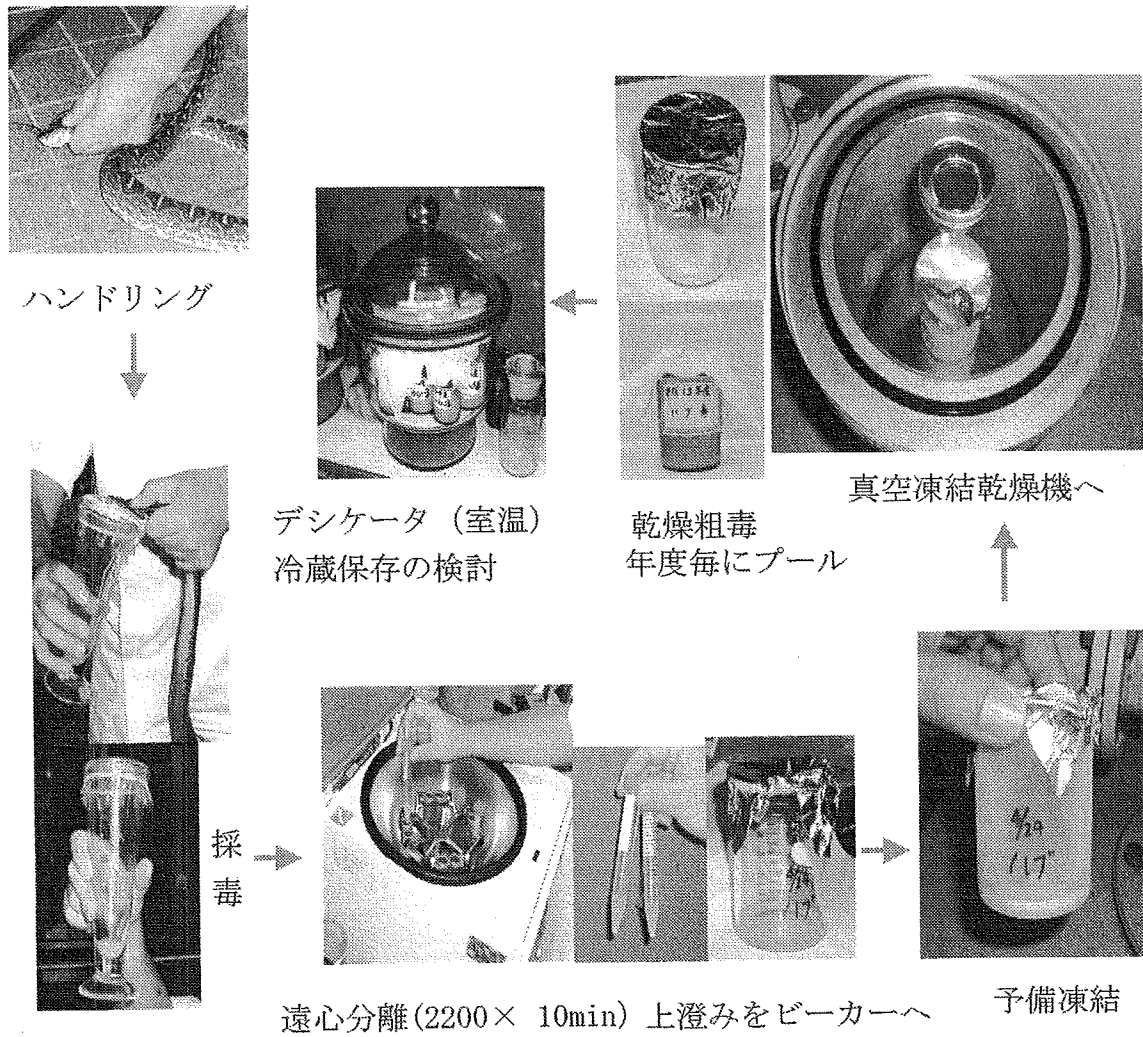


図4. 採毒方法の手順

厚生労働科学研究費補助金  
医薬品・医療器等レギュラトリーサイエンス研究事業

蛇毒抗毒素に関するWHOガイドライン改訂等に伴う、  
抗毒素製剤等の効率的製造・品質管理対応に関する研究

分担研究報告書

抗毒素製剤の臨床での使用実態調査

研究分担者 一二三 亨 独立行政法人国立病院機構 災害医療センター 救命救急科

研究協力者 小井土雄一 独立行政法人国立病院機構 災害医療センター 救命救急科  
山本明彦、高橋元秀 国立感染症研究所 細菌第二部 細菌第二部

研究要旨

まむし抗毒素製剤の使用調査として、まむし咬傷患者数、抗毒素製剤の使用数、副作用、また転帰を全国救命救急センター219施設にアンケート調査を施行した。

まむし咬傷治療例は3年間で574症例であり死亡は2例であった。抗毒素は44%に投与され、抗毒素使用症例の2.4%に副作用を認めたが、重篤な症状は認められない。

抗毒素の有効性を評価するためには、まずは投与群対非投与群で入院日数、副反応、転帰の比較また、投与症例の重症度、投与までの時間の比較などより詳細な追加研究が必要である。

A. 研究目的

国内のまむし咬傷は保健所及び厚生労働省への届出システムがないために、咬傷患者の実数は不明である。但し、まむしウマ抗毒素の販売量(使用/未使用の内訳は不明)から推測すると、実態は不明ながら年間2000～3000件程度の発生が推測されている。

まむし咬傷後の重症例には緊急的な抗毒素療法が最も有効な治療方法で、まむしウマ抗毒素は安定的、かつ迅速な医療機関への提供が欠かせない医薬品であると認識している。

一方で、まむしウマ抗毒素の生産量は年間

3000本程度で、僅かではあるが年々減ってきているのが現状である。他方、(財)蛇族学術研究所の調査によると、まむし咬傷患者の約20人が死亡しているとの情報もあり、咬傷患者の実態や治療に関する情報は不十分である。

抗毒素製剤の、まむしウマ抗毒素の医療機関における使用実態を把握することで、製剤の有効性と安全性並びに供給についても評価することを目的に調査を行った。

B. 研究方法

まむし咬傷に対するアンケート調査を全国救命救急センター219施設を対象として、

平成 21 年 10 月に山本明彦（感染症研究所細菌第 2 部）、高橋元秀（感染症研究所細菌第 2 部）、小井土雄一（災害医療センター救命救急科）の連名で行った。アンケート内容を図 1a, b に示す。調査期間は平成 18 年度から 20 年度の 3 年間とした。

（倫理面への配慮）

アンケートの内容は国立病院機構 災害医療センター内倫理委員会の規定に沿うものである。

### C. 研究結果

全国救命救急センター 219 施設に配布し、108 施設（49.3%）から回収した。まむし咬傷治療例は 574 例でその転帰は回復が 569 例、後遺症 3 例、死亡 2 例であった。（平成 18～20 年度）

回答施設 108 施設のうち、マムシ咬傷を実際に治療した症例があるのが 67 施設であった。そのうち、52 施設（78%）が抗毒素を使用していた。

まむし咬傷に対して抗毒素の投与を行っている救命救急センターは 0 例が 41 施設あり、15 症例（年間 5 症例程度）程度の施設と、それよりも多い施設の 3 つに大きく分かれた。（図 2）

抗毒素使用の使用症例は 253 例（44%）であった。そのうち副作用の報告は重篤 2 例を含む 6 例（2.4%）であった。これら 2 例はいずれも佐賀県唐津赤十字からの報告であり、再度確認したところ、アナフィラキシー反応であり、すぐに回復したとのことであり、最終的に重篤な副作用は 0 例と判断した。

抗毒素以外の治療薬について（特にセファランチンについて）であるが、セファランチンを投与したのは 52 施設で、偶然にも抗毒素投与施設数に一致していた。しかし、投与症例の重症度は不明ではあるが、抗毒

素を投与せずに、セファランチンのみの投与が 17 症例あった。その詳細については今回のアンケートでは不明である。

まむし抗毒素の有効性については、軽症・重症の区別なく有効、重症例に有効を合計すると 46%が有効であると回答している。しかし、その他が約 13%あり、はっきりと必要なし、エビデンスがないため評価できない、調査が必要などの意見があった。（図 3）

まむし抗毒素の必要性については、まむし咬傷には欠かせない、また重症例のみの使用を合計すると約 7 割が必要と回答しているが、6%のその他の中には、エビデンスがないため評価ができない、最近数十年使用していないため評価できないといった回答があった。（図 4）

### D. 考 察

まむし咬傷の総数は、3 年間で 574 症例であった。この数値からは年間のまむし咬傷数を推定することは困難である。抗毒素については、重篤な副作用の報告が結果的にはなかったということが今後の臨床での使用に新たな流れを生み出す可能性が示唆された。

抗毒素の有効性、必要性に関しては、多くの識者が有効、必要と判断されたが、それは主観の域を超えていない。中には、必要ない、またエビデンスがないため判断できないという意見もみられ、エビデンス重視の現行の医療社会から考えて詳細な調査がもう一度必要であることが認識された。今回の研究の限界としては、当然ではあるがまむし咬傷患者すべてが救命救急センターに救急搬送されてくるわけではなく、またアンケート自体の回収率を上げるために内容を簡潔にしたため、より詳細な追加の



研究が必要となる。

具体的には、抗毒素の有効性を評価するためのより詳細な研究に対しては、まずは後ろ向きコホート研究の形で、投与群対非投与群で入院日数、副反応、転帰の比較を行ったり、投与症例の重症度、投与までの時間の調査が必要である。

さらに抗毒素療法以外の治療、特にセファランチンについては、まずその効果に対する臨床医への認識、理解度調査、また啓蒙活動を学会活動や論文の執筆を通じて行う必要がある。

昨今の救急事情からもへび咬傷、とくにまむし咬傷は一般病院への救急搬送が困難になりつつあり、今後は救命救急センターの役割が大きくなると推測する。

#### E. 結 論

まむし咬傷治療例は3年間で574症例であり死亡は2例であった。抗毒素は44%に投与され、抗毒素使用症例の2.4%に副作用を認めたが、重篤な症状は認められない。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

なし

実用新案登録

なし

図1a

「まむしウマ抗毒素」の使用実態に関するアンケート

1. 経験されたまむし咬傷の症例数は何例ありましたか？
2. 「まむし咬傷」としての診断の根拠となった事象は何でした？
3. 上記1. の症例中、まむしウマ抗毒素を使用した症例数は？
4. まむしウマ抗毒素は注文して、速やかに入手できましたか？
5. まむしウマ抗毒素の1症例当りの平均的な使用本数は？
6. まむしウマ抗毒素を院内在庫として常備されていますか？
7. 経験されたまむし咬傷例（抗毒素使用の有無に拘らず）の転帰と例数について教えてください？
8. まむしウマ抗毒素使用の症例において、受傷から抗毒素使用までの時間はどのくらいでしたか？
9. 3年間（平成18～20年度）のまむしウマ抗毒素使用による、副作用としての血清病の発生はありましたか？ また、血清病の重篤な症例数とその転帰について教えてください？

図1b

血清病とは：まむしウマ抗毒素等の投与に当り、ウマ血清に対して発現するショック、アナフィラキシー様症状（血圧降下、喉頭浮腫、呼吸困難等）及びその他の過敏症を総称する症状のこと。 \*\*重篤度の判断：重篤：死亡。障害。死亡・障害につながる恐れ。副作用治療のための入院又は入院期間の延長上記に準じて重篤。後世代における先天性の疾病又は異常。

10. まむし咬傷例にまむしウマ抗毒素以外で使用された代表的な治療薬があれば教えてください 1. セファランチン 2. その他
11. まむし咬傷例にまむしウマ抗毒素を使用した経験において、抗毒素は治療に有効であったと考えますか？ 何れか1つを選択下さい 1. 重症・軽症の区別なく有効 2. 重症例にのみ有効 3. 効果を期待できない（考えられる理由：） 4. その他
12. まむし咬傷に際し、まむしウマ抗毒素の使用は必要ですか？
  1. まむし咬傷には欠かせない
  2. 重症例にのみ使用
  3. 代替薬で治療（血清病等の副作用を考慮）
  4. その他

図 2

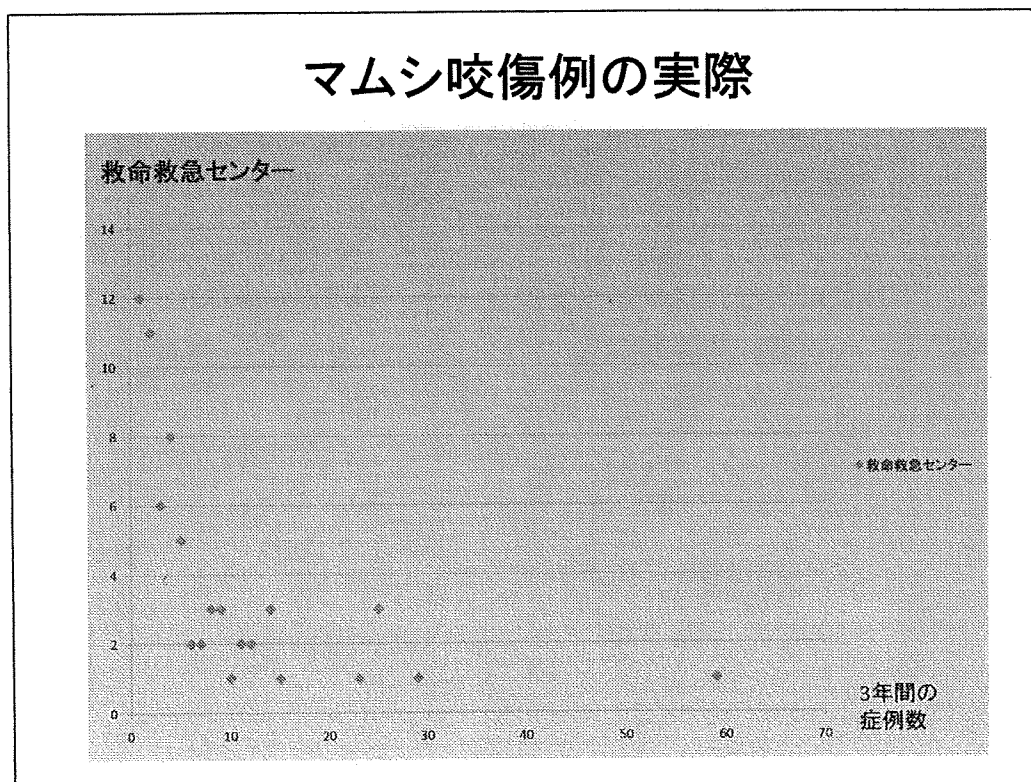


図 3

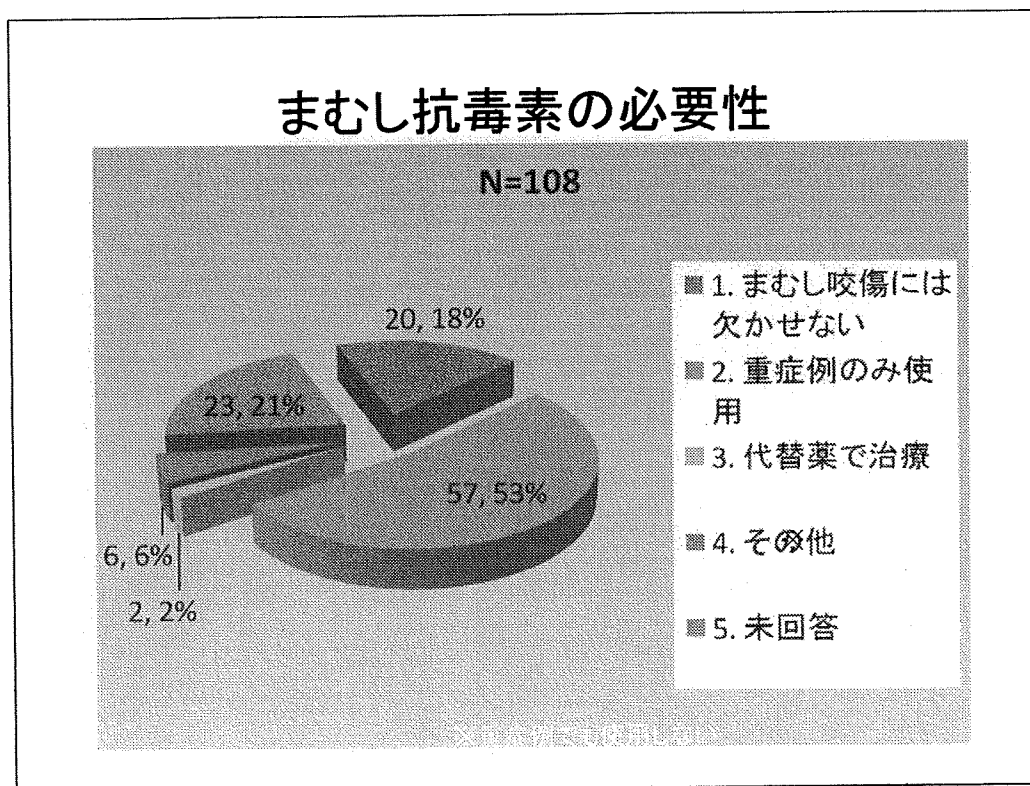
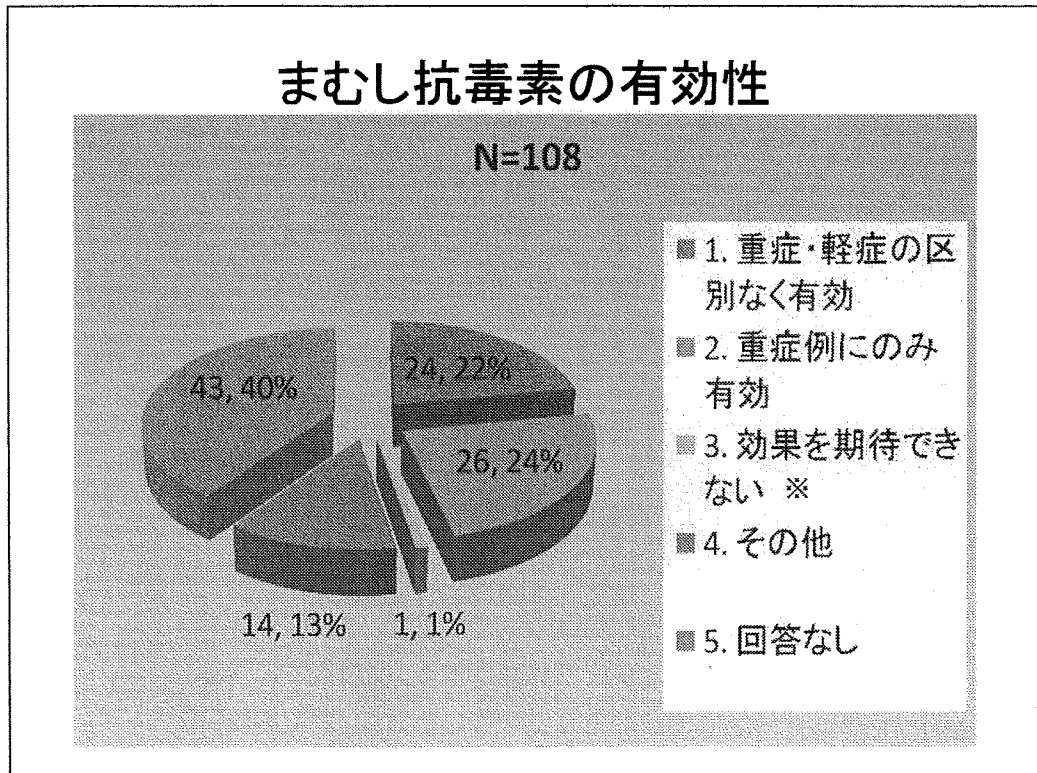


図 4



厚生労働科学研究費補助金  
医薬品・医療器等レギュラトリーサイエンス研究事業

蛇毒抗毒素に関するWHOガイドライン改訂等に伴う、  
抗毒素製剤等の効率的製造・品質管理対応に関する研究

分担研究報告

ボツリヌス神経毒素中和能を有するモノクローナル抗体の特徴

研究分担者

小崎俊司 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科

研究協力者

向本雅郁 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科

幸田知子 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科

要旨: トキソイドで基礎免疫した後、BoNT で複数回追加免疫を行うことにより、トキソイドのみを抗原としたときにはない BoNT に対する新たな抗体を得ることができた。BoNT A1 特異的な  $H_N$  領域に中和に関わるエピトープが存在した。L 鎖認識 mAb は、毒素のサブタイプや複合体構造の有無に関わらず、常に神経毒素と反応するのに対し、 $H_N$  および  $H_C$  認識 mAb の一部は、複合体毒素と反応しないことから、無毒成分は BoNT の重鎖 C 末端および N 末端の一部を覆うように結合していることが予想された。表面プラズモン共鳴による BoNT A1 サブタイプと各ドメインを認識する mAb の親和性は、pH6.0の方が pH7.5 よりも高いことがわかった。

A. 研究の目的

ボツリヌス菌は、グラム陽性偏性嫌気性で芽胞を形成し、産生する神経毒素(BoNT)の抗原性の違いにより、A-G型に分類される。ボツリヌス毒素は培養液中では、分子量約 150 kDa の BoNT と無毒成分との複合体として存在し、分子量 300 kDa (M 毒素), 500 kDa (L 毒素), 900 kDa (LL 毒素)を形成して

いる。A 型菌は 3 種類の毒素を B, C, D 型菌は L と M 毒素を E, F 型菌は M 毒素のみを G 型菌は L 毒素のみを産生する。最近、各型の BoNT の遺伝子配列全長の系統解析が行われ、A 型は 4 つ、B 型が 4 つ、E 型は 6 つのサブタイプに分類された。A1 サブタイプには A 型標準株や食中毒由来株が多く、A2 サブタイプはヨーロッパで分離され

た菌株や日本での乳児ボツリヌス症由来菌株が含まれる。A型標準株と乳児ボツリヌス症由来菌株は、塩基配列だけでなく、抗原性が異なることも報告されている。中和抗体に関する研究は、毒素をホルマリンで無毒化したトキシイドを免疫し、作製した抗体を用いて行われてきた。しかし、トキシイド化による毒素の立体構造の変化が考えられ、毒素に対する全ての抗体が産生されているとは限らない。今年度はA型BoNTのトキシイドでマウスを基礎免疫し、その後BoNTで複数回追加免疫後、得られたmAbのBoNTおよび複合体毒素に対する反応性を調べた。

## B. 研究方法

### (1) mAbの作製と精製

マウスにA型(A1サブタイプ)BoNTのトキシイドを2週間毎に3回基礎免疫し、中和抗体を確認後、1週間毎に1~16  $\mu\text{g}$ のBoNTを段階的に増やし5回の追加免疫を実施した。Boosterには10  $\mu\text{g}$ のBoNTを接種し、3日後に常法に従いfusionを行った。各mAb産生クローンを無血清培地ASF104(KYOKUTO)で大量培養し、培養上清を回収した。Protein G結合カラムを用いてIgGを精製した。

### (2) ELISA

A型BoNT(A1およびA2サブタイプ)とトキシイド(0.6  $\mu\text{g}/\text{well}$ )をコートしたプレートを用いて測定した。ブロッキングには1% Skim milk、2次抗体にはペルオキシダーゼ標識抗マ

ウスIgG(H+L)(1:2500, Bio-Rad)を用い、基質は5-アミノサリチル酸を使用し、OD<sub>450</sub>で吸光度を測定した。反応は基質反応以外全て37°C2時間で行った。基質の発色反応は37°C45分で行った。

ビオチン標識mAbはA型(A1サブタイプ)BoNTをコートしたプレート(0.1  $\mu\text{g}/\text{well}$ )と反応後、ペルオキシダーゼ標識アビジン(1:10000, Bio-Rad)を使用し、オルソフェニレンジアミンを基質としたときのOD<sub>490</sub>値が1.0となるように希釈した。エピトープ解析のための競合ELISAには、希釈済みのビオチン標識mAbと未標識のmAb(ビオチン標識mAbの100倍濃度)とを等量混合後、BoNTをコートしたプレートに添加し、ペルオキシダーゼ標識アビジン(1:10000, Bio-Rad)、オルソフェニレンジアミンを反応後、OD<sub>490</sub>で吸光度を測定した。

### (3) Immunoblotting

A型BoNT(A1サブタイプ, 1  $\mu\text{g}/\text{lane}$ )またはリコンビナント重鎖C末端領域(H<sub>C</sub>, 0.3  $\mu\text{g}/\text{lane}$ )、またはパパイン処理したBoNT(1  $\mu\text{g}/\text{lane}$ )を還元条件下で定法に従いSDS-PAGE後、PVDFメンブランに転写した。ブロッキングには5% Skim milkを使用し、4°C一晩静置した。各mAbと室温1時間反応させ、2次抗体はペルオキシダーゼ標識マウスIgG(H+L)(1:3000, Bio-Rad)を用い、発色基質にジアミノベンチジン(DAB)を使用した。

### (4) 中和試験

40 LD<sub>50</sub>/mlのA型(A1サブタイ

プ)BoNT にゼラチン緩衝液で希釈した mAb (10  $\mu$ g/ml) を等量混合し、室温で 30 分反応させた後、マウスの腹腔内へ 0.5 ml 接種した。ゼラチン緩衝液と BoNT を混合したサンプルをコントロールとし、接種 4 日後にマウスの生死を判定した。

(5) 免疫沈降を用いた mAb の BoNT への結合活性

複合体毒素の活性を維持するために全ての反応は酸性緩衝液(20 mM リン酸緩衝液, pH6.0-0.15 M NaCl)で行った。20% スラリーの Protein G sepharose に mAb を添加し、ローテーターを用いて 4°C60 分反応させ、Protein G sepharose を遠心し、3 回洗浄後、mAb-Protein G sepharose を回収した。さらに同モル数の異なるサイズをもつ 3 つの A 型毒素 BoNT, M, L を mAb-Protein G sepharose に添加し、ローテーターを用いて 4°C60 分反応させた。3 回洗浄後、A 型毒素-mAb-Protein G sepharose を回収し、SDS-PAGE 後、A 型 BoNT のポリクローナル抗体を用いた immunoblotting により、毒素の有無を調べた。

(5) 表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance : SPR)を用いた mAb と BoNT の相互作用の解析

あらかじめウサギ由来抗マウス IgG 抗体 (抗リガンド抗体) をセンサーチップ表面に固定化し、mAb (リガンド) をセンサーチップ表に補足するキャプチャー法を用いた。BoNT(アナライト)と mAb の相互作用は、ランニング緩衝液(10 mM HEPES-0.15 M

NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% Tween 20), pH6.0 または 7.4 を用い Biacore X100 で測定した。アナライトの希釈もランニング緩衝液で行った。相互作用は、データ解析ソフトウェア (BIAevaluation) を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

マウスの取扱いは大阪府立大学動物実験指針および同動物実験細則に基づいて倫理面に配慮して行った。

## C. 研究結果

(1) 抗 A 型 BoNT mAb の性状

Immunoblotting により各 mAb は BoNT を構成する各ドメイン軽 (L) 鎖、 $H_N$  および  $H_C$  それぞれを認識する抗体に分類され、中和活性を有する抗体も存在した。同じ認識ドメイン内で、各 mAb の競合 ELISA によるエピトープの相同性を調べ、認識部位が異なる mAb のみを選んだ。ELISA による 3 種類の抗原 (A1 及び A2BoNT, BoNT A1 トキシノイド) に対する反応性を調べたところ、L 鎖認識抗体は 3 種類の全ての抗原に反応し、 $H_N$  認識抗体には BoNT A2 サブタイプとは反応せず、A1 サブタイプのみ反応する抗体が存在した。 $H_C$  認識抗体には BoNT A2 サブタイプにも A1 トキシノイドにも反応せず BoNT A1 サブタイプ特異的に反応する抗体が存在した (表 1)。

(2) 酸性条件下における抗 A 型 BoNT mAb の毒素への結合活性

L 鎖認識 mAb は BoNT, M, L 毒素と反応し、 $H_N$  および  $H_C$  認識 mAb は全て BoNT

と反応するが、一部の mAb は M および L 毒素とは反応しなかった (表 2)。

(3) 抗 A 型 BoNT mAb と BoNT の カイネティック解析

Biacore X100 を用いて、代表的な L 鎖および H<sub>N</sub>, H<sub>C</sub> 認識の mAb と BoNT(A1 サブタイプ)の親和性を比較したところ、解離定数(KD)は、ランニング緩衝液の pH が 6.0 の方が 7.4 よりも低いことから、親和性が高いことがわかった (表 3)。

#### D. 考察

毒素の抗体の作製には毒素のトキシソイド化したものが抗原として用いられるが、今回トキシソイドで基礎免疫した後、BoNT で複数回追加免疫を行うことにより、トキシソイドのみを抗原としたときにはない BoNT に対する新たな抗体を得た。BoNT の中和能を有する抗体には、L 鎖および H<sub>C</sub> を認識する抗体が多く報告されている。BoNT A1 サブタイプに特異的で H<sub>N</sub> を認識する抗体が中和能を有することから、BoNT A1 特異的な H<sub>N</sub> 領域に中和に関わるエピトープが存在することが初めてわかった。L 鎖認識 mAb は、毒素のサブタイプや複合体構造の有無に関わらず、常に神経毒素と反応するのに対し、H<sub>N</sub> および H<sub>C</sub> 認識 mAb の一部は、複合体毒素と反応しないことから、無毒成分は BoNT の重鎖 C 末端および N 末端の一部を覆うように結合していることが予想された。SPR による BoNT A1 サブタイプと L 鎖および H<sub>N</sub>, H<sub>C</sub> 認識の mAb との相互作用をランニング buffer の

pH6.0 と pH7.4 で比較したところ、解離速度定数(Kd)よりも結合速度定数(Ka)の差が大きいことから、pH6.0 の方が親和性 (KD=Kd/Ka) は高くなかった。アナライトに用いた BoNT A1 サブタイプと mAb との結合性は BoNT A1 サブタイプの等電点と一致する 6.0 の方が安定することかわかった。また今回 SPR 解析に用いた mAb は無毒成分により覆われている BoNT の H<sub>C</sub> や H<sub>N</sub> を認識することが予想されたことから、pH の変化に伴う無毒成分と BoNT の解離をリアルタイムでモニタリングできるツールとして用いることができると考えられる。

#### E. 結論

トキシソイドで基礎免疫した後、BoNT で複数回追加免疫を行うことにより、トキシソイドのみを抗原としたときにはない BoNT に対する新たな抗体を得ることができた。BoNT A1 特異的な H<sub>N</sub> 領域に中和に関わるエピトープが存在した。L 鎖認識 mAb は、毒素のサブタイプや複合体構造の有無に関わらず、常に神経毒素と反応するのに対し、H<sub>N</sub> および H<sub>C</sub> 認識 mAb の一部は、複合体毒素と反応しないことから、無毒成分は BoNT の重鎖 C 末端および N 末端の一部を覆うように結合していることが予想された。表面プラズモン共鳴による BoNT A1 サブタイプと各ドメインを認識する mAb の親和性は、pH6.0 の方が pH7.5 よりも高いことがわかった。

#### F. 健康危機情報



特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Umeda, K., Seto, Y., Kohda, T., Mukamoto, M., Kozaki, S. Genetic characterization of *Clostridium botulinum* associated with type B infant botulism in Japan. J. Clin. Microbiol, 47: 2720-2728 (2009)

2. 学会発表

1) 趙海洋、中村佳司、幸田知子、向

本雅郁、小崎俊司 ボツリヌス神経毒素中和能を有するモノクローナル抗体の性状 第62回日本細菌学会関西支部総会 (2009)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許出願

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

表1. モノクローナル抗体の性状

mAb	OD450			Immunoblotting	Neutralization	Subclass
	BoNT/A1	BoNT/A2	Toxoid/A1			
5C7	0.554	0.219	0.131	H <sub>C</sub>	-	IgG1
6D9	0.565	0.235	0.151	H <sub>C</sub>	++	IgG1
4E4	0.967	0.005	0.002	H <sub>C</sub>	-	IgG2a
9A3	0.643	0.040	0.051	H <sub>C</sub>	++	IgG1
1B12	0.748	0.372	0.505	H <sub>N</sub>	++	IgG1
8G11	0.986	0.838	0.766	H <sub>N</sub>	±	IgG1
10H3	0.725	0.090	0.453	H <sub>N</sub>	++	IgG1
11H12	0.704	0.077	0.477	H <sub>N</sub>	±	IgG1
14D9	0.986	0.622	0.648	H <sub>N</sub>	+	IgG2b
1F11	0.953	0.404	0.853	H <sub>N</sub>	++	IgG1
5A6	0.923	0.163	0.823	H <sub>N</sub>	±	IgG1
10F4	0.984	0.220	0.839	H <sub>N</sub>	+	IgG1
12H7	0.813	0.447	0.732	H <sub>N</sub>	±	IgG1
1D4	0.879	0.795	0.787	L	±	IgG1
1E2	0.741	0.820	0.725	L	+	IgG1
2F8	0.750	0.828	0.713	L	±	IgG1
4E7	0.772	0.662	0.767	L	++	IgG1
7F9	1.076	1.033	0.928	L	+	IgG2a
8E10	0.836	0.869	0.789	L	-	IgG1
10E10	0.970	0.979	0.898	L	±	IgG2a

表2. 弱酸性条件下でのモノクローナル抗体の毒素への結合

mAb	Immunoprecipitation			Immunoblotting
	BoNT/A1	M toxin	L toxin	
5C7	+	+	+	H <sub>C</sub>
6D9	+	+	+	H <sub>C</sub>
4E4	+	-	-	H <sub>C</sub>
9A3	+	-	-	H <sub>C</sub>
1B12	+	-	-	H <sub>N</sub>
8G11	+	-	-	H <sub>N</sub>
10H3	+	-	-	H <sub>N</sub>
11H12	+	-	-	H <sub>N</sub>
14D9	+	-	-	H <sub>N</sub>
1F11	+	+	+	H <sub>N</sub>
5A6	+	+	+	H <sub>N</sub>
10F4	+	+	+	H <sub>N</sub>
12H7	+	+	+	H <sub>N</sub>
1D4	+	+	+	L
1E2	+	+	+	L
2F8	+	+	+	L
4E7	+	+	+	L
7F9	+	+	+	L
8E10	+	+	+	L
10E10	+	+	+	L

表3. モノクローナル抗体とボツリヌス神経毒素 (A1サブタイプ) とのカイネティクス

Antibody (immunoblotting)	pH	KD (M)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)
1E2 (Light chain)	6.0	$1.66 \times 10^{-10}$	$6.78 \times 10^5$	$1.13 \times 10^{-4}$
	7.4	$4.28 \times 10^{-10}$	$4.55 \times 10^5$	$1.91 \times 10^{-4}$
1B12 (Heavy chain, H <sub>N</sub> )	6.0	$3.43 \times 10^{-11}$	$6.66 \times 10^5$	$2.28 \times 10^{-5}$
	7.4	$3.60 \times 10^{-11}$	$3.80 \times 10^5$	$1.37 \times 10^{-5}$
9A3 (Heavy chain, H <sub>C</sub> )	6.0	$2.31 \times 10^{-12}$	$4.54 \times 10^5$	$1.05 \times 10^{-5}$
	7.4	$5.26 \times 10^{-12}$	$2.36 \times 10^6$	$1.24 \times 10^{-5}$

厚生労働科学研究費補助金  
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

蛇毒抗毒素に関するWHOガイドライン改訂等に伴う、抗毒素製剤等の効率的  
製造・品質管理対応に関する研究

分担研究報告

WHOガイドラインの検証及びマムシ抗毒素製剤使用アンケート解析

研究分担者

山本明彦 国立感染症研究所・細菌第二部

協力研究者

一二三 亨 独立行政法人 国立病院機構 災害医療センター  
救命救急科

要旨： 第一年度に当たる平成21年度は、WHOガイドラインの概要と特徴をまとめた。そして、わが国の蛇毒素採取2箇所と抗毒素製造所1箇所の現状を調査し、蛇を個別管理し、蛇毒を採取し、免疫動物であるウマを選択して免疫し、抗毒素製剤の製造をして、配布し市販後調査までの全工程にGMPの導入を想定した場合に取り組むべき具体的な改善点を指摘した。さらに、本年度行われたマムシ抗毒素の市販後調査としてのアンケートの意義を述べ、その結果からマムシ咬傷治療にセファランチンの使用している点について、目的外使用である点を指摘した。治療には、特異的な毒素中和作用のあるマムシ抗毒素使用の必要性を論じ、セファランチンの使用は、その特性から蜂などを含めたアレルギー全般への適用である点を示した。

I. WHOへび抗毒素ガイドラインの検証

平成20年秋にWHOへび抗毒素ガイドライン案(資料1)が各国のへび抗毒素製剤の製造所やその品質管理を受け持つ監督機関に提示された。そして、同年10月13日から17日にジュネーブで開催されたWHOのECBSにて議論された(資

料2)。ハブ及びマムシの2種類の蛇抗毒素を製造し使用している我が国の現状について、このガイドラインに規定された内容の検証を目的とした。

このガイドラインは、大枠以下のような内容であった。1) 蛇抗毒素製剤は、生産性が低く、発展途上国での製造と使用が多く、安価で安全性を担保しなければ

ならないという特徴を持つが、これに他の生物学製剤で導入が進んでいる品質保証制度を適用することの妥当性について述べ、2)ヘビ、毒素、免疫動物のウマ、ウマ血漿の採取、その後の分画標品の製造過程のすべてについて、GMP準拠の品質管理試験、組織、構造設備や文書管理などまでの適用を求めている。さらに、原料から各製造工程のウイルス混入への安全確保とプロセスバリデーションを要求している。3)有効性のある製剤の製造法と同種の毒蛇の生息域内での特異性の確認法や、4)治療に用いた抗毒素製剤とヘビの種類の特定期法について述べている。5)最後に抗毒素製剤市販後の有効性と安全性の調査の必要性を指摘している。

WHO ガイドラインには詳細な記載があるが、特に毒蛇の飼育管理から蛇毒の生産について、以下の具体的なポイントがあげられる。1) 蛇毒を採取する個々の毒蛇の採取地域や大きさ年齢などを明確にし、2) 使用する個々の毒蛇は分類学上詳細に判明していること。3) 毒蛇は、十分訓練を受けた飼育員によって獣医学的及び倫理的に適切な飼育、給餌や取扱法を実施され、その取扱方法はすべて文書に記載されたとおりに行うこと。4) 病気に罹患した毒蛇からの採毒は避け、5) 採取した蛇毒ロットは、採毒した個々の毒蛇にまでさかのぼることができること(トレーサビリティ)が求められ、6) 採毒した毒液は速やかに凍結し、7) 保存のために凍結乾燥すること。8)最後に同種の毒蛇から

採毒した各毒液ロットは、同等性が確認できることが求められている。

わが国での蛇毒に対する抗毒素製剤の製造所は、財団法人化学及血清療法研究所(化血研)1社である。一方、蛇毒を生産し、化血研に納入しているところは、沖縄ハブ毒については、沖縄衛生環境研究所で、奄美ハブ毒及びマムシ毒については、日本蛇族学術研究所である。この3機関の協力を得て、現状を調査した。

まず、免疫源であるヘビ毒は、ハブ抗毒素用に、沖縄ハブ毒、奄美ハブ毒の2種、さらにマムシ毒の3種類である。その採毒は、自家繁殖した蛇ではなく主に捕獲した蛇から行っている。どの蛇毒も採毒し、直ちに凍結乾燥しバイアル封入している。そして、3~5年に一度の割合で、5~10gの量を化血研に提出している。このように、ヘビの種類の特定期法から採毒、凍結乾燥などの工程は、ガイドラインに沿ったものであるが、採毒用のヘビは個別飼育を行っていないために、個々のヘビの健康管理、採取した毒のトレーサビリティ及び蛇毒のロットごとの同等性を保障するための品質管理試験の実施にGMPに沿った改善すべき問題点が存在することが判明した。このような状況の中で、ハブに関しては、採毒用のヘビを個別飼育して検疫し、健康状態の確認と毒液のトレーサビリティの確保が検討されている。また、GMP準拠のためには、作業の文書による管理の導入が求められるが、このような文書整備に関しても整備を始