

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医薬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

分担研究報告書

標準抗毒素ならびに自家標準 A2 抗毒素を用いた A1 毒素及び A2 毒素の
免疫学的反応性の検討

研究分担者

銀永 明弘 一般財団法人 化学及血清療法研究所 第一製造部
大隈 邦夫 一般財団法人 化学及血清療法研究所 信頼性保証部門担当理事付

研究協力者

鳥居 恭司 一般財団法人 化学及血清療法研究所 第一製造部

研究要旨

A 型ボツリヌス抗毒素は A1 毒素を用いて製造されている。サブタイプの異なる各種毒素に対する抗毒素の反応性はモノクローナル抗体では報告されており、A1 毒素を用いて作製されたモノクローナル抗体の A2 毒素に対する反応性は、A1 毒素に対するより数倍～数百倍低いと報告されている。現在、抗毒素検定で用いられている標準 A 型抗毒素の A1 毒素あるいは A2 毒素に対する反応性を比較した。また、A2 毒素をウマに免疫し、その抗毒素血清を精製して自家標準 A2 抗毒素を製造し、A1 毒素あるいは A2 毒素に対する反応性について比較した。その結果、A 型抗毒素は毒素に対する反応性がサブタイプ間で顕著に異なることが示された。サブタイプ間での抗体価比較及び毒素の免疫原性比較を行う場合は、各サブタイプの抗毒素が必要であると考えられた。

A. 研究目的

A 型ボツリヌス菌は、産生する毒素のアミノ酸配列の違いから A1～A5 までの 5 種類のサブタイプがある。サブタイプの異なる各種毒素に対する抗毒素の反応性はモノクローナル抗体では報告されており、A1 毒素を用いて作製されたモノクローナル抗体の A2 毒素に対する反応性は、A1 毒素に対するより数倍～数百倍低いと報告されている。ポリクローナル抗体である標準 A 型抗毒素でも同様の結果が得られた場合、標

準 A 型抗毒素を用いた各種サブタイプの抗毒素の抗体価比較などにおいて、不都合を生じると予想される。

このため今回、標準 A 型抗毒素の A1 毒素あるいは A2 毒素に対する反応性を比較した。また、A2 毒素をウマに免疫し、その抗毒素血清を精製して自家標準 A2 抗毒素を製造し、A1 毒素あるいは A2 毒素に対する反応性について比較した。

B. 研究方法

抗毒素は標準 A 型抗毒素(国立感染症研究所)、ウマ A1 及び A2 抗毒素(いずれも F(ab)'₂)、ウサギ A1 及び A2 型抗毒素血清を使用した。

試験毒素はボツリヌス菌 A 型 62A 株 (A1 型) 及び Chiba-H 株 (A2 型) を培養・精製して得られた神経毒素 (NTX) を使用した。

抗体価測定は抗毒素と毒素を混合し、室温で反応させた後にマウスの腹腔内に投与し投与後 4 日の生死により累積死亡率を算出して、標準抗毒素との相対力価で抗体価を算出した。

1. ウサギ及びウマの A1 及び A2 抗毒素に対する各毒素の反応性

ウサギ及びウマの A1 及び A2 抗毒素に対する A1 あるいは A2 毒素の反応性を調べるために、標準 A 型抗毒素との相対力価から各抗毒素の抗体価を算出した。

2. 自家標準 A2 抗毒素の単位付け

A2 毒素に対する反応性の高い抗毒素を作製するため、自家標準 A2 抗毒素を製造した。製造方法は A1 抗毒素に準拠して行い、免疫グロブリンを F(ab)'₂ に精製した。

3. 標準 A 型抗毒素及び自家標準 A2 抗毒素の中和曲線

自家標準 A2 抗毒素の反応性を知るため、A1 あるいは A2 毒素の 10、100 及び 1000 マウス ip LD₅₀ (LD₅₀)/mL を中和する自家標準 A2 抗毒素量を測定した。対照として標準 A 型抗毒素も同様に測定した。

C. 研究結果 及び D. 考察

1. ウサギあるいはウマの A1 及び A2 抗毒素に対する各毒素の反応性

標準 A 型抗毒素との相対力価からウサギ及びウマの A1 及び A2 抗毒素の抗体価を算出した。抗 A1 毒素の抗体価は A1NTX を、抗 A2 毒素の抗体価は A2NTX をそれぞれ試験毒素に用いて求めた。その結果、A1 抗毒素においては、抗 A1 毒素及び抗 A2 毒素の抗体価がそれぞれほぼ同じ値となったのに対し、A2 抗毒素においては、A2 毒素に対する抗体価が、A1 毒素に対する抗体価の 4~9 倍の値となった (表 1)。

抗毒素の抗体価は標準 A 型抗毒素の相対力価で算出していることから、毒素間での抗体価の違いは、参照品である標準 A 型抗毒素の各毒素に対する反応性に違いが原因ではないかと考え、各毒素を標準 A 型抗毒素をはじめとする A1 抗毒素と反応させ、それらの結合価を算出した。その結果、A1 抗毒素に対する A2 毒素の結合量は、A1 毒素の結合量の 3~4%であることが明らかとなり、A1 抗毒素は A2 毒素と反応しにくいことが示された (表 2)。

2. 自家標準 A2 抗毒素の単位付け

標準 A 型抗毒素及び A1 抗毒素は A2 毒素と交差反応はあるが反応性が低いことが明らかとなった。

A2 毒素に対する反応性の高い抗毒素を作製するため、自家標準 A2 抗毒素を作製した。この自家標準 A2 抗毒素の単位付けは、標準 A 型抗毒素の国際単位の設定方法に倣い、免疫毒素である A2 毒素を約 1 万 LD₅₀ の毒素と反応させてマウスに投与し、50%死亡する抗毒素量を 1 単位と設定した。

3. 標準 A 型抗毒素及び自家標準 A2 抗毒素の中和曲線

自家標準 A2 抗毒素の反応性を知るため、A1 あるいは A2 毒素の 10、100 及び 1000 LD₅₀/mL を中和する A2 抗毒素量を測定した。対照として標準 A 型抗毒素も同様に測定した。単位は標準 A 型抗毒素は国際単位で算出し、自家標準 A2 抗毒素は上記で設定した単位で算出した。

標準 A 型抗毒素と各試験毒素の反応は 10~1000 LD₅₀/mL の範囲内で中和曲線が直線となることが示された。また、標準 A 型抗毒素及び各試験毒素の反応の中和曲線を平行線検定すると平行性が認められ、各毒素の反応比は 13.47 となった。これは、標準 A 型抗毒素を A2 毒素と反応させた場合、A1 毒素と反応するよりも毒素を中和するのに抗毒素量が約 13 倍必要であることを示している (図 1A)。

自家標準 A2 抗毒素及び各試験毒素との反応は試験毒素 10~1000 LD₅₀/mL において中和曲線が直線になった。標準 A 型抗毒素と異なり、自家標準 A2 抗毒素及び各試験毒素の反応の中和曲線は平行性がなく、試験毒素量が多くなるに従い、A1 毒

素を中和するには A2 毒素を中和するよりも多くの抗毒素量を必要とすることが示された(図 1B)。

E. まとめ

A 型毒素に対する抗毒素はサブタイプ間で反応性が顕著に異なることが示された。サブタイプ間での抗体価比較及び毒素の免疫原性比較を行う場合は、各サブタイプの抗毒素が必要であり、各抗毒素の単位はそれぞれ同じ量の免疫された毒素を中和するものに設定する必要がある。

F. 研究発表

なし

表 1. ウサギ及びウマの A1 及び A2 抗毒素に対する各毒素の反応性

抗毒素	抗体価(単位/mL)	
	A1毒素	A2毒素
ウサギ		
A1抗血清①	768	783
②	159	99
A2抗血清①	5541	23820
②	3943	37767
ウマ		
A1抗毒素①	1261	1771
②	4718	4962
A2抗血清①	856	5492
②	578	4551

表 2. ウサギ及びウマの A1 及び A2 抗毒素に対する各毒素の結合価

抗毒素	結合価(L ₅₀) (ng)	
	A1毒素	A2毒素
ウサギ		
A1抗血清①	130	4.4
②	79	2.8
ウマ		
標準A型抗毒素	142	5.0
A1抗毒素	142	4.6

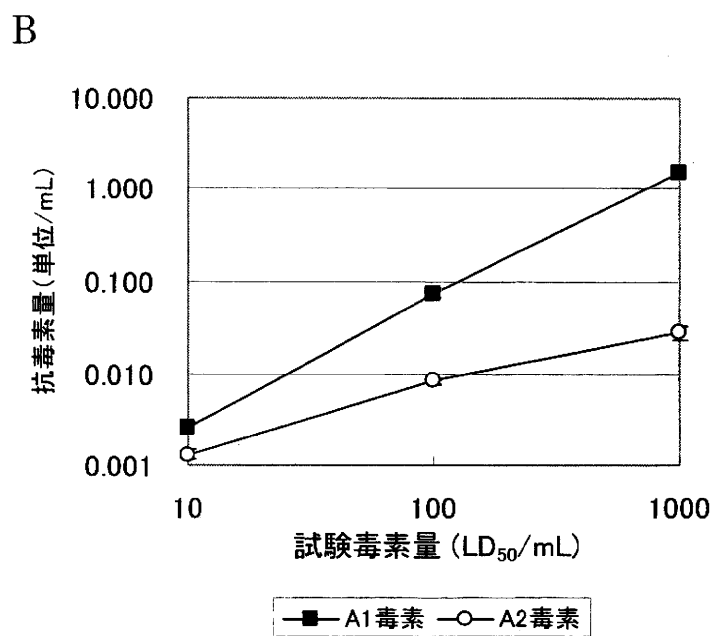
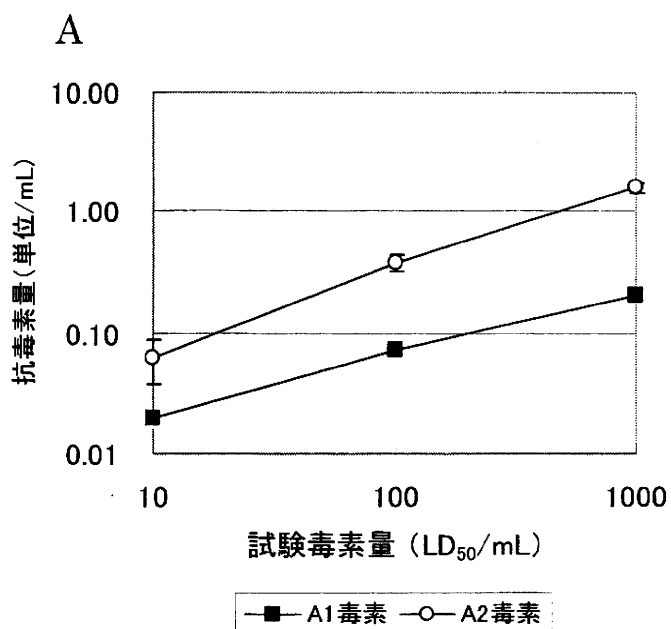


図 1. 標準 A 型抗毒素及び自家標準 A2 抗毒素の中和曲線

A : 標準 A 型抗毒素の中和曲線 B : 自家標準 A2 抗毒素の中和曲線

※A は国際単位、B は自家標準 A2 抗毒素の単位付けで設定した単位で表した。

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

分担研究報告書

ハブ及び毒素のGMP対応検証究

研究分担者

玉那覇康二 沖縄県衛生環境研究所衛生科学班長

研究協力者

盛根信也 沖縄県衛生環境研究所衛生科学班主任研究員

寺田考紀 沖縄県衛生環境研究所衛生科学班研究員

研究要旨：WHOではウマ抗毒素製剤の製造、品質管理及び規制のガイドラインを2008年に初めて作成し国際的に生産体制のGMP適応範囲や迷入ウイルス除去及びウイルスバリデーション等の新たな品質管理手法の導入が進められている。沖縄県は乾燥はぶウマ抗毒素の原材料としてハブ毒を製造所に提供している。このため、原材料としてのWHOのガイドライン(WHOGL)への対応の検証を行い、国内製造品の国際標準への対応を図るものである。

A. 研究の目的

乾燥はぶウマ抗毒素の製造には、ウマ免疫用抗原調整、数回の免疫、血清の精製および品質管理等に長期間を要し、大量の製剤の備蓄は困難である。

また、WHOGLに適応させるためにも、原材料としてハブ毒の品質管理を明確にすることにより、日本における生物医薬品管理体制の信頼性保証、安全性の確保を図ることを目的とする。

B. 研究方法

(1) ハブの咬傷患者の治療には、蛇抗毒素製剤(乾燥ハブ抗毒素)を使用している。

乾燥ハブ抗毒素のウマ免疫には沖縄で捕獲されたハブの毒を用いているため、WHOGLを踏まえた規制を念頭に置いて沖縄県で採取したハブの取り扱いに関する検討を行う。

(2) ハブの飼育及びハブ毒の採毒方法、生物化学的性状について、WHOGLに基づいた、衛生的な取り扱い、管理に関する検討を行う。

(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

21年度の計画において、蛇抗毒素製剤のWHOG L対応の検討を行った結果、22年度の研究計画は、ハブ採取に関する管理マニュアルの作成を行った。

また、乾燥ハブ毒バッチ間の生物化学的性状の差についての安定性試験を行い、ハブ毒の管理・品質を確認した。

(1) WHOG Lに準じた採毒用ハブの管理マニュアルを作成し、採毒方法をフローチャートで示した(図1別添)。

生ハブの搬入時に外傷や外部寄生虫、動きや形態の異常の有無、栄養状態等をチェックし、異常の無い個体のみ採毒用として収容する。

異常の無い個体はそれぞれ大部屋ゲージ、個別ゲージに収容し、採毒に用いる個体は、優先して個別ゲージを使用した。大部屋ゲージは採取期間、採取場所(地域)毎に分けて、トレースが出来るようにした。

また、個別ゲージは1日~1週間保管して、採毒日と共に個体情報として

採取年月日、採取場所(市町村)、性別を明記して採毒時に記録簿に記入をする。

野外実験で使用するハブは、野外実験施設内の個別ゲージに入庫日、採取場所、個体番号、性別、頭胴長の記録を行う。

採毒に関する注意事項としては、採毒に用いる個体は、採集場所及び性別が偏らないよう配慮する。

一回の採毒には10~20個体を用いる。採毒毎に遠心分離、予備凍結、凍結乾燥を行う。凍結乾燥後、年度ごと一つの容器に移し、デシケータ内にて室温の保管する等、操作方法を画像によりフローチャートによって示した。

(2) ハブ毒原材料の品質管理については、乾燥ハブ毒バッチ間の生物化学的性状の差について試験を行った。

WHOG L (7章 Snake venom preparation and storage)によると、へび毒の成分構成の個体差と地域差を考慮するために、免疫用毒は十分な個体数(20から50個体を下回らない数)の毒へびから採毒が必要である。

沖縄県で採毒されたハブ毒は、半数致死量(LD50: $\mu\text{g}/20\text{g}$ マウス)とタンパク濃度の個体差が大きい(図2)。

沖縄県衛生環境研究所では年度(バッチ)毎におよそ200-300個体のハブから採毒し、乾燥ハブ毒を保管している。

今回は乾燥ハブ毒の生物化学的性状差を比較し、200-300個体からの採毒がバッチ毎に平均化したものになっているか調査した。

生物化学的性状の検査は、WHOガイドライン（8章 3CHARACTERIZATION OF VENOM BATCHES）の試験項目（毒活性を除く）により行った。

試験には平成18年、17年、10年、9年および平成2年の乾燥ハブ毒を用いた。各年度の乾燥ハブ毒は緩衝液（10mM TrisHCl, 10mM CaCl₂ pH8.0）にて50mg/mlに調整し、15,000xgの10分間の遠心分離にて不溶性物質を除き試験サンプルとした。

乾燥ハブ毒溶液のタンパク量をブラッドフォード法にて測定した結果、乾燥ハブ毒1mg中に含まれるタンパク量は0.55mgから0.59mgであった（図3）。

次に各乾燥ハブ毒のSDS-PAGEの電気泳動パターンは還元と非還元状態において、それぞれバンドの位置と太さがほぼ一致し（図4）、また液クロによるサイズ排除クロマトグラフィー（ゲル濾過）では各ピークの保持時間と高さもほぼ同様の溶出パターンであった。タンパク量当たりの酵素活性（プロテアーゼ）は1.79から2.4(x1,000 Δ/min)と若干の差がみられた（図5）。

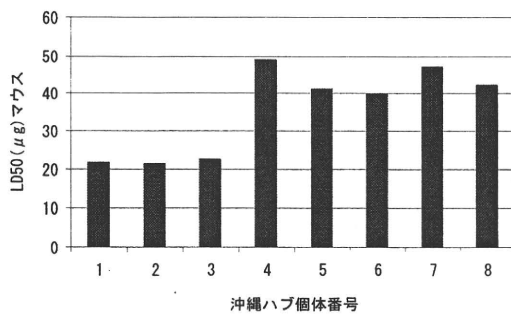
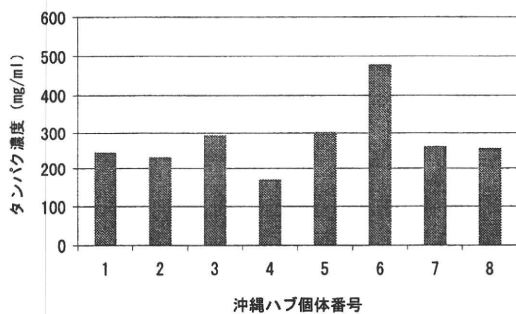


図2. 沖縄ハブ個体毎のタンパク濃度とマウス半数致死量. (平成14年度 抗毒素研究報告書 沖縄県衛生環境研究所より)

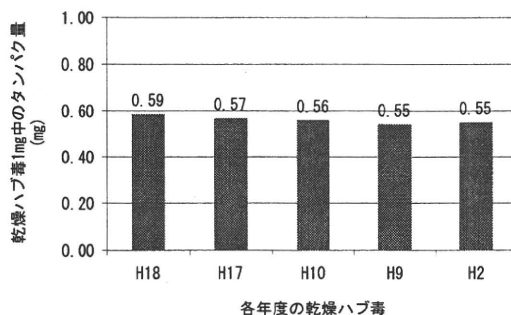


図3. 乾燥ハブ毒のタンパク量.

乾燥ハブ毒溶液 50mg/ml をブラッドフォード法にて測定しタンパク量を求めた

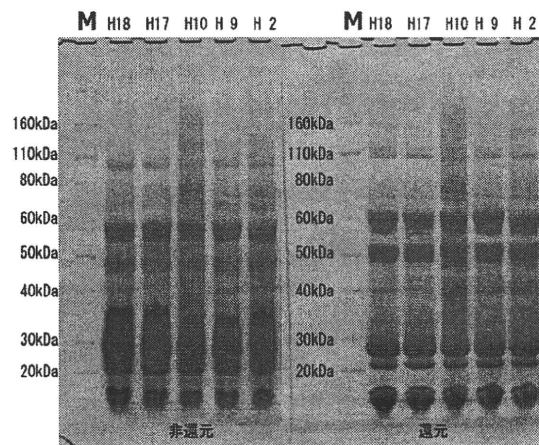


図4. 乾燥ハブ毒のSDS-PAGEの泳動パターン

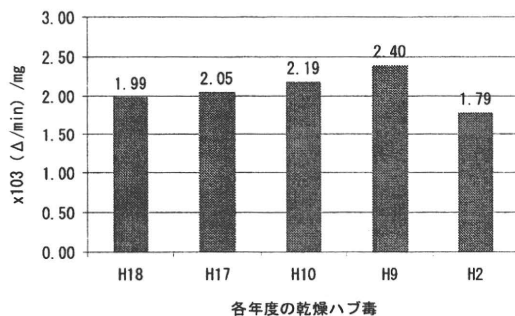


図5. 乾燥ハブ毒のプロテアーゼ活性.

消光性蛍光ペプチド基質 255 μl に各試料の 500 倍希釈液を 15 μl 混合し励起波長 340、測定波長 440nm にて単位時間あたりの蛍光強度の増加量から求めた。

D. 考察

WHOG L に適合した蛇毒抗毒素製剤の原材料の確保を図るために、生ハブより採毒する課程において採毒用ハブ管理マニュアルを作成してハブ毒の品質管理を行った。

ハブ毒原材料となる生ハブの健康状態（動きや形態、外傷、寄生虫等）、を確認し、採毒を行うための個別ゲージと大部屋ゲージに区別した。

健康状態については、ストレス、ウイルス等の状況を把握するために衛生的な施設で保管を行っている。

採毒は一週間以上、個別ゲージに保管したハブを用いた。ハブ毒を採取するためにハブ毒採取記録簿に個体情報（採毒日、種、ゲージ番号、入庫日、採取場所、性別、健康状態、性別、個体番号等）を記録する。記録することにより、ハブ毒原材料のトレーサビリ

ティ履歴を確認することが出来る。

また、採毒の作業工程を画像によってフローチャートで示すことにより解りやすいようにした。

ハブ毒原材料の品質管理については、乾燥ハブ毒バッチの年度毎の生物化学的性状について試験を行った。その結果、タンパク量、SDS-PAGE、サイズ排除クロマト、酵素活性において、ほぼ同様な結果を示したことから、200 から 300 個体からの採毒によってハブ毒の成分構成が均一化し、バッチ間の生物化学的性状の差が小さくなったと考えられた。

現在、乾燥ハブ毒の保存を室温保存から冷蔵保存への変更を検討中であるが、今回の結果から室温保存（20-25℃）でも十分と考えられる。製造一年未満の乾燥ハブ毒を含め実験し検証したい。

E. 結論

WHOG 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を行い、採毒用ハブ管理マニュアルを作成した。

また、ハブ毒採取記録簿を作成することにより、ハブの採毒マニュアルの検討を行い、毒の「原材料トレース」が出来るような原材料保管・管理をおこなった。

ハブ毒原材料の品質管理については、免疫用ハブ毒の採毒個体数は多くても 200 から 300 個体数で乾燥ハブ毒の成分は均一化され個体差と地域差が考慮されると考えられた。

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対応について」の検
討会や調査研究を進めることにより
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）**

1. 特許所得：なし
2. 実用新案登録；なし
3. その他：なし

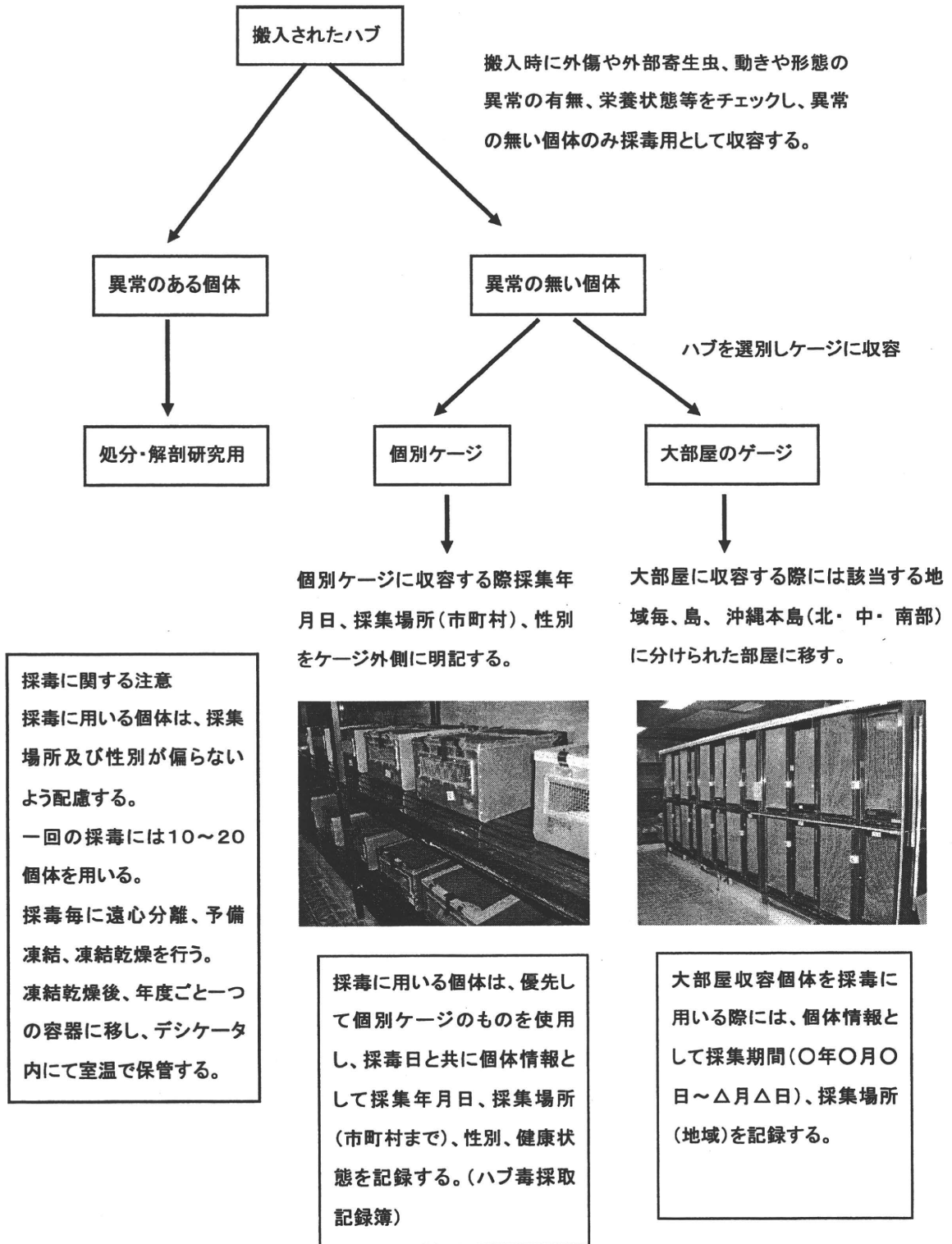


図1. 採毒用ハブの管理マニュアルのフローチャート

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・品質管理応用に関する研究

分担研究報告

抗毒素製剤の臨床での使用実態調査
ーマムシ抗毒素製剤使用アンケート解析 IIー

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

山本 明彦

国立感染症研究所・細菌第二部

協力研究者

全国219病院の救急救命センター

研究要旨: マムシ抗毒素製剤の使用調査として第2回アンケートを実施した。

調査期間を1年とし、抗毒素、抗毒素+セファランチン、セファランチン、その他の治療法の中でどの治療がより有効なのかを調査した。結果はまだ解析の途中であるが、各群で入院日数や転帰に有意差は認めなかった。しかし、各群でマムシ咬傷の程度を表すマムシGradeにばらつきがあり、それらの因子を調整した統計方法でのより詳細な再解析が必要である。

ガス壊疽抗毒素の臨床での啓蒙活動は、解説論文掲載には至ったが、実際の使用例がなく、今後の症例の蓄積と有効性の検討が必要である。

I. マムシ抗毒素製剤の使用調査 (2回目
)

A. 研究目的

抗蛇毒製剤のうちマムシ抗毒素の市販

後調査の現状については、全国的に発生
がありながら症例の実態の把握がなされ
ていないという事情がある。そこで、第
一年度に本研究班でできる範囲でマムシ
咬傷に関するアンケートを実施した。

独立行政法人国立病院機構災害医療センターの小井土先生の協力のもとに、全国219施設の救命救急センターに協力を要請した。問い合わせた内容としては、過去3年間におけるマムシ咬傷の症例数とその治療に対するマムシ抗毒素製剤の使用状況およびその副反応や製剤に関する医師の印象などをアンケートした。

その結果から、少なくとも問い合わせた全国の救命救急センターにおいて、毎年400例前後のマムシ咬傷が発生し、その60%にマムシ抗毒素が使用され、その副作用は、2.4%で、かつ軽症のみであった。治療法については、一部の回答者からマムシ毒素の中和活性を有しないセファランチンを第一選択とした症例の回答が寄せられた。

もちろん、アンケートではマムシ抗毒素の有効性、必要性に関しては、多くの医師が有効、必要と回答を寄せた。しかし、このアンケートでは副反応の発生が2.4%と低いことは明らかとなったが、個々の症例の詳細な治療経過などについての回答を求めなかったために、客観的にマムシ抗毒素が、マムシ咬傷患者に対しての有効性を証明できなかった。また、セファランチンを第一選択薬として用いた予後についても明らかではない。回答の少数意見の中には、マムシ抗毒素の使用は必要ない、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た。この意見は、アンケート結果の学会発表の際にも出された。

このような状況から、WGLに規定される市販後調査でのマムシ抗毒素の有効性評

価の意味からも第一年目のアンケートでは不十分と判断された。そこで、第2回アンケート調査を立案した。今回のアンケート調査にて抗毒素、セファランチンがそれぞれ本当に有効かどうかを後ろ向きに評価することを目的とした。また、引き続き抗毒素製剤の、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

マムシ咬傷に対するアンケート調査（第2回目）を全国救命救急センター219施設を対象として、平成22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。配布したアンケート用紙を図1に示した。

調査内容としては、調査期間を1年間に絞ってマムシ咬傷の個々の症例について、抗毒素、抗毒素+セファランチン、セファランチン、その他の治療法の有効性を調査するために、患者の既往症や年齢性別、その重症度を示すGlade、具体的な治療処置、治癒経過と予後、受傷時の血液値など詳細な記録を尋ねる形式とした。また、セファランチンへの意識調査と抗毒素の複数回投与の実例も尋ねた。

C. 研究結果

全国救命救急センター219施設に協力を依頼して配布し、114施設（52.1%）から回収した。マムシ咬傷は、234症例の治

療詳細が回収された。受傷患者の平均年齢は57±24歳、男女数は、男性148名、女性86名であった。咬傷の程度を表すマムシGradeはI 65名、II 74名、III 52名、IV 33名、V 5名であった。

来院時のWBCと重症度の関係は、マムシGradeが重症になるにつれて白血球数が高い傾向がみられた(図2)。

治療方法に関しては、抗毒素のみが85例、抗毒素+セファランチンが26例、セファランチンが28例、両方ともなしが69例、その他が23例であった。すべての症例で転帰は軽快しており、入院日数での比較では、それぞれの治療方法において有意差は認めなかった。(図3)

セファランチンに対する認識調査においては、①毒素を中和が3名②抗毒素の代替薬が3名③マムシ咬傷の第1選択薬が2名④よくわからないが19名⑤その他が13名であった。

D. 考 察

1回目のアンケートにおいて、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、今回のアンケート調査に至った。

今回のアンケートでは、マムシ咬傷のすべてが軽快していたため、抗毒素、抗毒素+セファランチン、セファランチン、その他のどの治療法が最も有効なのかに

についての検討は非常に困難であった。入院日数を効果の一つの指標とした場合の検討では、有意な差は認めなかった。しかし、各治療群で重症度が異なるため、明確な結論は得られていない。各種の統計法にて検定を行ったが、重症度の調整をした分析が今後の課題である。

一方、セファランチンに対する認識では、20%が誤った認識をしており、またわからないを含めると約7割が適当な認識をしていないことが判明した。セファランチンについては、そのものの説明を救急医学会を通じて今後展開していく必要がある。

E. 結 論

第2回目のアンケートにより、マムシ咬傷に対して、抗毒素、抗毒素+セファランチン、セファランチン、その他の治療法を行った症例の詳細が回収された。現在のところ各群において明確な差を認めず、今後統計方法を再検討して、さらなる解析を行う予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

まむしウマ抗毒素製剤の救命救急センターでの使用実態調査 一二三亨, 山本明彦, 井上潤一, 加藤宏, 小井土雄一, 高橋元秀日本救急医学会 2010,10,9 東

京

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許出願

なし

2. 実用新案登録

なし

II ガス壊疽ウマ抗毒素製剤の臨床での啓蒙活動

A. 研究目的

ガス壊疽ウマ抗毒素製剤の認知度が臨床医に低いため、その使用数が少ない。そのため抗毒素を臨床医に様々な媒体を通じて啓蒙する。

B. 研究方法

ガス壊疽治療を主に担当する集中治療医に啓蒙するために、日本集中治療医学会誌にガス壊疽抗毒素の解説論文を投稿した。

C. 研究結果

日本集中治療医学会誌に掲載された。

D. 考察

日本集中治療医学会誌に掲載されたこ

図 1

とにより、ガス壊疽に対して抗毒素を使用する認識は高まったと言える。しかし、実際の使用報告は当院をはじめとして学会報告もない。今後の使用症例の蓄積が必要であり、その後にはその有効性の検討が必要になる。

E. 結論

ガス壊疽抗毒素の臨床使用と症例の蓄積が今後は重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Clostridium perfringens 感染患者に対する治療用ウマ抗毒素製剤の存在を知っていますか？一二三亭, 高橋元秀, 諸熊一則, 吉岡早戸, 原口義座, 加藤宏, 小井土雄一, 本間正人, 日集中医誌 2010;17:287-9.

医療機関各位

独立行政法人 国立病院機構
 災害医療センター救命救急センター部長 小井土 雄一
 厚生労働科学研究費補助金 研究班
 (医薬品・医療機器等レギュラリーサイエンス総合研究事業)
 研究代表者 高橋 元秀
 (国立感染症研究所 細菌第二部第3室長)

「まむしウマ抗毒素」の使用実態に関するアンケートII

昨年アンケートに御協力頂き、誠に有難うございました。アンケート結果より、まむし抗毒素の副作用は2.4%で、どれも軽症であることが分かりました。治療法の実態として、セファランチンを第一選択とした症例が17症例あることも分り(3%)、このアンケート調査で抗毒素とセファランチンの真の有効性を、後ろ向きに評価したいと思ひます。つきましては、御多忙ながら大変恐れ入りますが、御協力をお願い申し上げます。

1 2009年11月1日から2010年10月30日の一年間におきまして、まむし咬傷の治療症例数をお書きください。

()例

1例以上とお答えいただいた施設に、その詳細について具体的にお伺ひいたします。

2 症例

項目	症例1	症例2	症例3	症例4	症例5	症例6	症例7	症例8	症例9	症例10
年齢										
性別										
既往歴(肝硬変、DMなど)										
マムシGrade (I~V)										

マムシGrade I:受傷局所のみ腫脹、II:手足または足首まで、III:肘または膝関節まで、IV:一肢全体に及ぶ、V:一肢を越える腫脹または全身症状を伴うもの

可能であれば血液所見の記入をお願いいたします

来院時 WBC										
Ht										
Plt										
CK										
BUN										
Cre										
LDH										

治療内容(1-4のうち一つに○をしてください)※副作用は、なし、軽症、重症のうちの一つを選んでください

1.抗毒素投与										
2.セファランチンと抗毒素併用										
3.セファランチン投与										
4.抗毒素、セファランチンともに使用せず										
副作用(なし、軽症、重症)										
局所処置(切開などあればその内容)										

経過 ※退院時転帰は軽快、転院、死亡のうちの一つを選んでください

腫脹の最大範囲(マムシGrade)										
ICU入院日数										
入院日数										
退院時転帰(軽快、転院、死亡)										
その他の特記事項										

3 セファランチンに対する先生の御認識は以下の内のどれでしょうか？

①毒素を中和 ②抗毒素の代替薬 ③マムシ咬傷の第1選択薬 ④よくわからない ⑤その他()

4 今までにまむしウマ抗毒素の複数回使用による、副作用としての血清病の発生はありましたか？ ()例

ご芳名 _____
 ご施設 _____
 ご住所 (〒 -) _____
 TEL/FAX _____ /FAX: _____
 e-mail _____ @ _____

(ご住所等のゴム印をお持ちでしたら空欄に捺印で結構です)

* アンケート調査にご協力頂き、誠に有難うございました。

頂きました情報は、本研究班の事業活動においてのみ使用させていただきます。

図 2

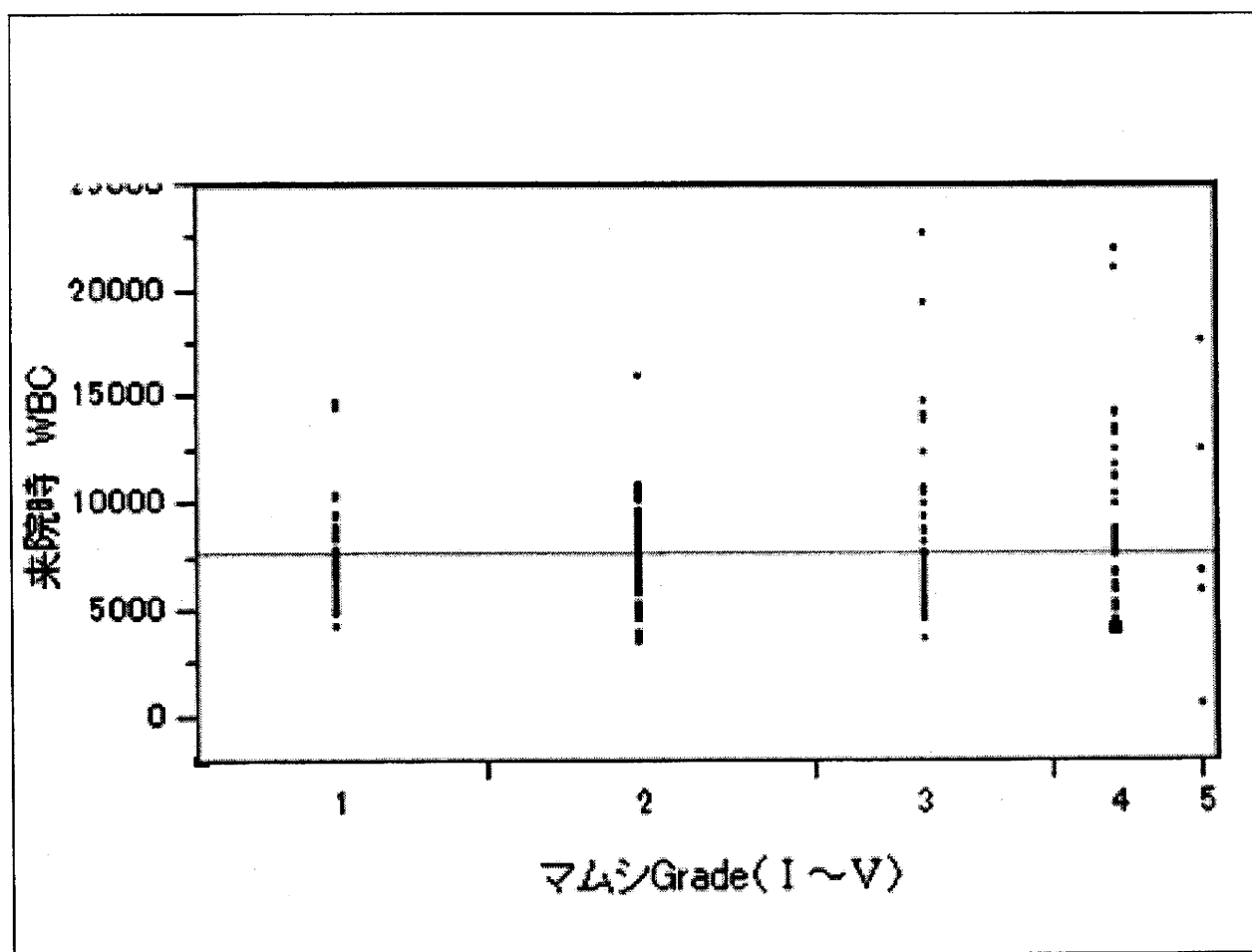


図3

	症例数	入院日数 (平均)
抗毒素	85	5.32941
抗毒素+セファランチン	26	4.69231
セファランチン	28	5.57143
抗毒素なしかつ セファランチンなし	69	5.62319
その他	23	4.30435

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

平成 22 年度 WHO ガイドライン改正等に伴う、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

乳児ボツリヌス症由来 B 型菌 Osaka05 株の産生する神経毒素の性状

研究分担者

小崎俊司 大阪府立大学学大学院生命環境科学研究科

研究協力者

向本雅郁 大阪府立大学学大学院生命環境科学研究科

幸田知子 大阪府立大学学大学院生命環境科学研究科

要旨： 乳児ボツリヌス症由来菌 Osaka05 株の産生する神経毒素を初めて精製した。Osaka05 株は、既報の食餌性ボツリヌス症由来 Okra 株および乳児ボツリヌス症由来菌 111 株と比較して高いトリプシン様酵素活性を有していた。Osaka05 株由来神経毒素は Okra 株由来神経毒素と異なる毒素活性、抗原性を有していた。

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する。菌は産生する神経毒素(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 30 kDa(M 毒素), 50 kDa (L 毒素), 90 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。BoNT 遺伝子(*bont*)塩基配列や BoNT 抗原性の解析が進められ、A, B, C, D および E 型毒素は同一株間で BoNT のアミノ酸配列が異

なることから、複数のタイプに分類される。BoNT/B は第 I 群 B 型菌産生毒素が 4 種類(B1, B2, B3, B4)、第 II 群 B 型菌産生毒素(Nonproteolytic)、B 型以外の毒素遺伝子を保有する B 型菌 (Ab, Ba, Bf など)産生毒素(Bivalent)に分類されている。2005 年に大阪府内で発生した乳児ボツリヌス症患者から分離された B 型菌 Osaka05 株はパルスフィールドゲル電気泳動を用いた疫学的解析や *bont/B* 遺伝子の分子系統解析により、これまで報告された BoNT/B とは相同性が低く、既報の BoNT/B サブタイプには属さないことが報告され、現在 B5 サブタイプとして分類されている。本研究では Osaka05 株

の産生する BoNT を初めて精製し、その性状をこれまで報告されている食餌性ボツリヌス症由来 Okra 株(B1 サブタイプ) および乳児ボツリヌス症由来 111 株(B2 サブタイプ)と比較した。

B. 研究方法

(1) BoNT/B の精製

B 型菌 (Osaka05 株, Okra 株および 111 株) から既報の方法に従い複合体毒素 (M 毒素, L 毒素) を精製した。BoNT/B の精製には AKTA システム (Purifier, GE ヘルスケア) を用いた。複合体毒素を 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) に透析した後、同緩衝液で平衡化した RESOURCE Q カラムに添加し、0 から 0.3 M 食塩濃度勾配で溶出した。BoNT/B 分画を集め濃縮した後、毒素活性と純度を調べた。BoNT/B は 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) に透析し、 -80°C で保存した。

(2) 毒力の測定

毒素溶液の毒力測定はマウス静脈内注射法で行った。適当な濃度に希釈した毒素 0.1 ml を静脈内に投与し死亡するまでの時間を測定した。この際、毒力 (腹腔内 LD_{50}) の対数と致死時間の対数間で直線的な相関が成立することから、この関係をもとに標準曲線を作製し毒素量 (腹腔内 LD_{50}/mg) を算出した。

(3) ELISA

トキシド化した BoNT/Osaka05 をウサギに免疫し得た血清から、カプリル酸法により IgG 分画を精製した。Osaka05 株, Okra 株および 111 株の BoNT/B ($0.5 \mu\text{g}/\text{well}$) をコートしたプレートを用いて

ウサギ抗 BoNT/Osaka05 IgG の各 BoNT/B に対する反応性を調べた。プレートのブロッキングには 0.2% (w/v) ウシ血清アルブミン、2次抗体にはペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG (H+L) (1:10,000, Bio-Rad) を用い、基質は *o*-フェニレンジアミンを使用し、 OD_{490} で吸光度を測定した。反応は基質反応以外全て 37°C 2 時間で行った。基質の発色反応は 37°C 30 分で行った。

(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) BoNT/Osaka05 の精製および毒素活性

既報の方法に従い、Osaka05 株から複合体毒素および BoNT を精製し、電気泳動による純度検定を行った。BoNT/Osaka05 は還元条件下で、BoNT の構成分子である軽鎖 (50 kDa) と重鎖 (100 kDa) に分離していた。マウスに対する致死活性は BoNT/Osaka05 が $3.5 \times 10^7 \text{ LD}_{50}/\text{mg}$ であり、BoNT/Okra ($1.2 \times 10^8 \text{ LD}_{50}/\text{mg}$) に比べて低く、BoNT/111 ($1.7 \times 10^7 \text{ LD}_{50}/\text{mg}$) より高かった。

(2) ウサギ抗 BoNT/Osaka05 IgG の BoNT/Okra および BoNT/111 に対する反応性

ELISA により BoNT/Osaka05 は BoNT/Okra と異なる抗原性を有していたが、BoNT/111 との間に反応性の違い