

## 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

##### 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

松田聖子 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「乾燥はぶウマ抗毒素」を使用している。

「乾燥はぶウマ抗毒素」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、WH

OG L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、ハブの取扱いは平成 20 年度に制定された、沖縄県衛生環境研究所動物実験実施規程(以下実施規程)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

平成 21 年度の研究は、蛇抗毒素製剤のWHOGL対応の検証として、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 捕獲後毒蛇の検疫、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力価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。

平成 22 年度の研究は、ハブ採取に関する管理マニュアルの作成と「乾燥はぶ毒」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、ハブの品質・管理を確認した。

平成 23 年度の研究計画は、3 年間の研究のまとめとして、ハブの飼育及び採毒に関する衛生管理マニュアル

の指針の作成を行い、「乾燥はぶウマ抗毒素」の原材料としての品質の確保を図った。

また、WHOGLに対応できる組織作りを推進するために「乾燥はぶウマ抗毒素」の使用等についてのアンケート調査を行い、病院等の実態把握を行った。

(1) WHOGLに準じたハブの飼育及び採毒に関する衛生管理マニュアルを作成し、採毒用ハブの管理指針マニュアルフローチャートを別添 1 に示した。

ハブの搬入時には、実施規程第 11 条(実験動物の検収及び検疫)の指針に基づき感染又は汚染を防止するために、決められた場所で、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し検収及び検疫を行なう。

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する。

実施規程第 12 条(実験動物の飼育管理等)の指針に基づき動物飼育の施設・設備、飼育条件は、動物福祉の観点から適切に対処し、維持管理に努め給餌、給水等の飼育管理を行う。

大部屋ゲージは採取期間、採取場所(地域)毎に分類して、情報の追跡が出来るようにした。

個別ゲージのハブは 1 日～1 週間保管して健康状態を観察し、採毒時には個体情報として、採毒日時、採取年月

日、採取場所(市町村)、性別をハブ毒採取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して、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保管する。

(2) WHOGLに対応できる組織作りを推進するために「乾燥はぶウマ抗毒素」の使用状況等についてのアンケート調査を行い、病院等の実態把握を行った。

沖縄県のハブ類咬傷件数は、昭和47年前の500人台をピークに減少を続けており、ここ10年では100件前後の咬傷件数となっている。死亡者は99年の1名以降発生はない(別添図1)。

沖縄県内でハブ咬傷治療患者を治療した医療施設には、受傷場所や受傷動機、受傷部位、応急処置の有無や治療等についての項目が記された調査票の提出をお願いしている。

この調査票をもとに2003年から2009年までの間、医療施設におけるハブ類咬傷治療において、どれくらいの割合で抗毒素による治療を行っているか集計した(図2)。

ハブ、台湾ハブは半分以上において抗毒素が使用され、ヒメハブは

1/3、サキシマハブは1/10、総計は4割弱となっている。

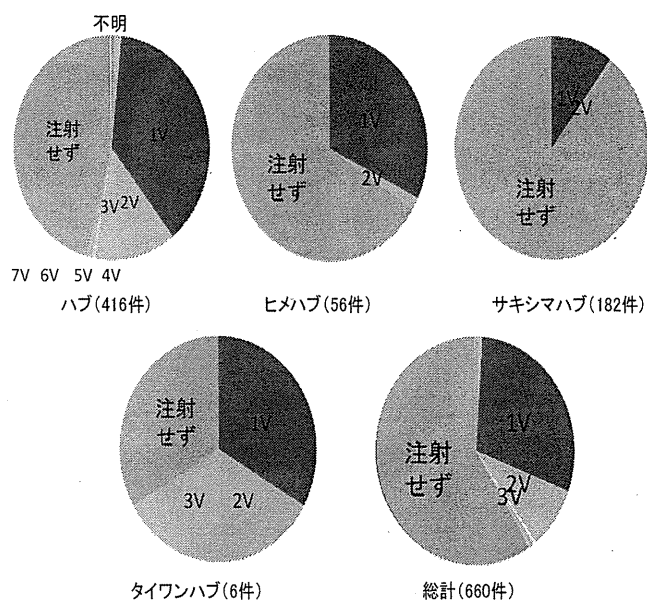


図2. ハブ咬傷における抗毒素治療状況

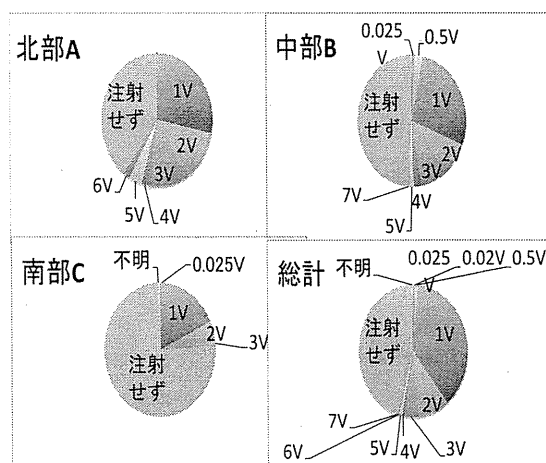


図3. 医療施設別はぶ抗毒素使用状況

比較的咬症件数の多い医療施設別に使用状況を見ても、抗毒素の使用に差があることがわかる(図3)。

医療施設により抗毒素の使用に差があったことから、比較的咬症患者の報告の多い医療施設26施設にアンケートを送付し、20施設より回答が得

られた。また、1 医療施設で複数の医師から回答を得たため、回答総数は 25 となった。県内医療施設 20 施設のアンケート調査の概要を示す。

ハブ咬傷患者の治療に抗毒素を使用したかの有無については、約半数が使用していた（図 4）。

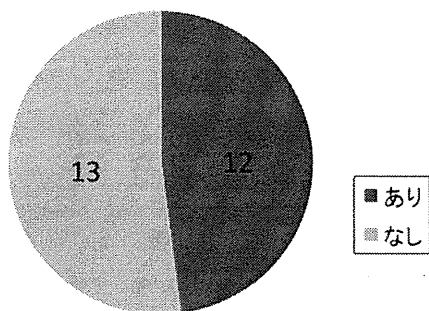


図 4. 抗毒素の使用について

抗毒素を使用したことがあると回答した 12 施設の使用方法については、添付文書に沿ってと答えた施設が半数以上の 7、院内治療指針に沿った施設が 4、論文を参考に院内治療指針に沿った施設が 1 であった（図 5）。

抗毒素を使用しなかったと回答した 13 施設の不使用の理由については、副作用が心配は 1、代替治療で十分 6、その他 6 であった。

その他の理由は症状が軽かったため、抗毒素使用のリスクが高いと判断し使用しなかった、ハブ咬傷かどうか確信がなかった等であった（図 6）。

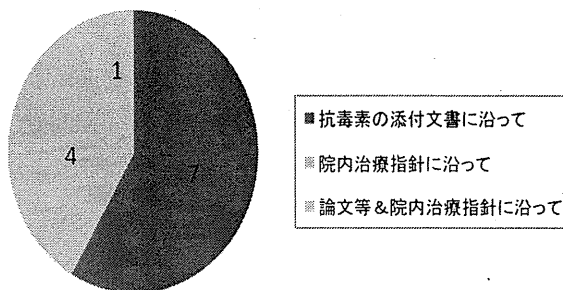


図 5. 抗毒素の使用方法  
(使用有と回答した施設)

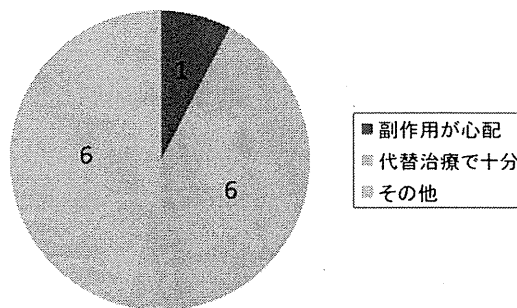


図 6. 抗毒素不使用の理由  
(使用無と回答した施設)

まむし咬症で治療方法にセファランチンの投与が報告されている。

ハブ咬症での投与について使用したことがある、もしくはその検討をしたことがあると答えた医療施設は 24 施設中 2 施設であった（図 7）。

セファランチンは、試験管内でよくマムシ毒を中和するが、動物実験では殆ど抗蛇毒効果が認められない。

人体におけるセファランチンの抗蛇毒効果は不十分と評価されている。

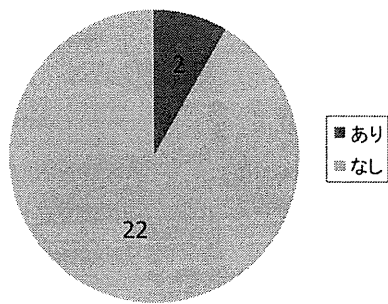


図7.セファランチン使用もしくは検討の有無

このアンケート調査により比較的咬症患者の多い病院でも抗毒素を使用したことのある施設は半数程度だった。

抗毒素の使用に関して院内治療指針を用いている施設は40%ほどであった。

#### D. 考察

WHOGL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は、生ハブより採毒する過程において品質を保つ必要がある。

沖縄県衛生環境研究所動物実験実施規程を制定し、生ハブの搬入から採毒までの指針マニュアルを作成した。

生ハブの検収及び検疫は実施規程11条に基づき健康状態(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、実施規程12条にある飼育管理等によりストレス、ウイルス、栄養状態、傷等の状況を把握するために衛生的な施設で保管を行い観察した。

採毒は一週間以上、個別ゲージに保管し健康状態の良いハブを用いた。

ハブ毒を採取した後は、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)を記録して、ハブ毒原材料のトレーサビリティ履歴を確立した。

また、採毒の作業工程は画像の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。

ハブ毒原材料の保管管理については、平成22年度にWHOGL(7章 Snake venom preparation and storage)により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。

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。

乾燥ハブ毒の生物化学的性状差を比較するために、年度ごとの200-300個体からの採毒がバッチ毎に平均化しているのかを、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。

乾燥ハブ毒各年度の重量あたりのタンパク量、プロテアーゼ活性、SDS-PAGEの泳動パターンから劣化は確認されずその結果から、乾燥ハブ毒の保管はデシケーターでの室温保存(20-25℃)でも十分であると考えられた。

WHOGLに対応できる組織作りの一環として、ハブ咬傷患者の多い医

療施設 26 箇所にアンケートを送付した。

回収率は 20 施設で 77%であった。

乾燥はぶウマ抗毒素を治療として、使用したことがある施設は約半数であった。

抗毒素不使用の施設の理由は代替治療で十分と答えた施設が約半数で、咬傷にあってから早めの受診、治療が行われていること、ハブ咬傷の治療にあたる未経験なスタッフが増えていることによる不使用が示唆された。

また、ハブの種類によって毒量や強さが違うために、サキシマハブ咬傷においては、血清病のリスクが高いため原則使用しない方針としている医療施設があった。

副作用があることで投与をなるべく避ける医療施設もあった。

乾燥はぶウマ抗毒素を使用している医療施設の治療方法については、約 60%が抗毒素に添付されている文書に沿った方法であった。

残りの約 40%については、病院内の治療方針が定められていた。

治療指針を作成した経緯については、抗毒素の添付文書の投与基準の不透明さによったり、患部の腫脹の程度を見て抗毒素投与する基準を定めたり、これまでハブ咬傷患者を治療した経験ある医療施設が多くみられた。

このアンケート調査によりハブ咬傷における治療方法としての乾燥はぶウマ抗毒素の実態が把握できた。

ハブ咬傷に対する治療については、多くの医療施設が乾燥はぶウマ抗毒

素の使用方法を含め、咬傷治療のスタンダードプロトコル、副反応の少ない抗毒素の使用を望んでいた。

これらの要望にどのように応えることが出来るかをこれから検討していきたい。

## E. 結論

(1) WHOGL を念頭に沖縄県衛生環境研究所動物実験実施規程を制定し、ハブの取り扱いに関する検証を行った。

(2) 採毒用ハブ管理指針マニュアルを作成した。

(3) ハブ毒採取時には採取記録簿を作成することにより、毒の「原材料トレース」が出来るような管理システムを構築した。

(4) ハブ毒原材料の保存については、デシケーター室温保存 (20-25°C) で毒の安定性、品質の確保が保たれた。

(5) デシケーター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ないと考えられた。

(6) WHOGL に対応できる組織作り、教育訓練の推進は、研究所職員に対してハブ原材料 GMP に対する研究発表を行なった。

また、抗毒素を扱うグループにおいて「抗毒素製剤の GMP 対応」の勉強会を行ない組織作りを強化した。

さらに、医療施設等のアンケート調査を行うことにより乾燥はぶウマ抗毒素の使用実態を把握した。

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





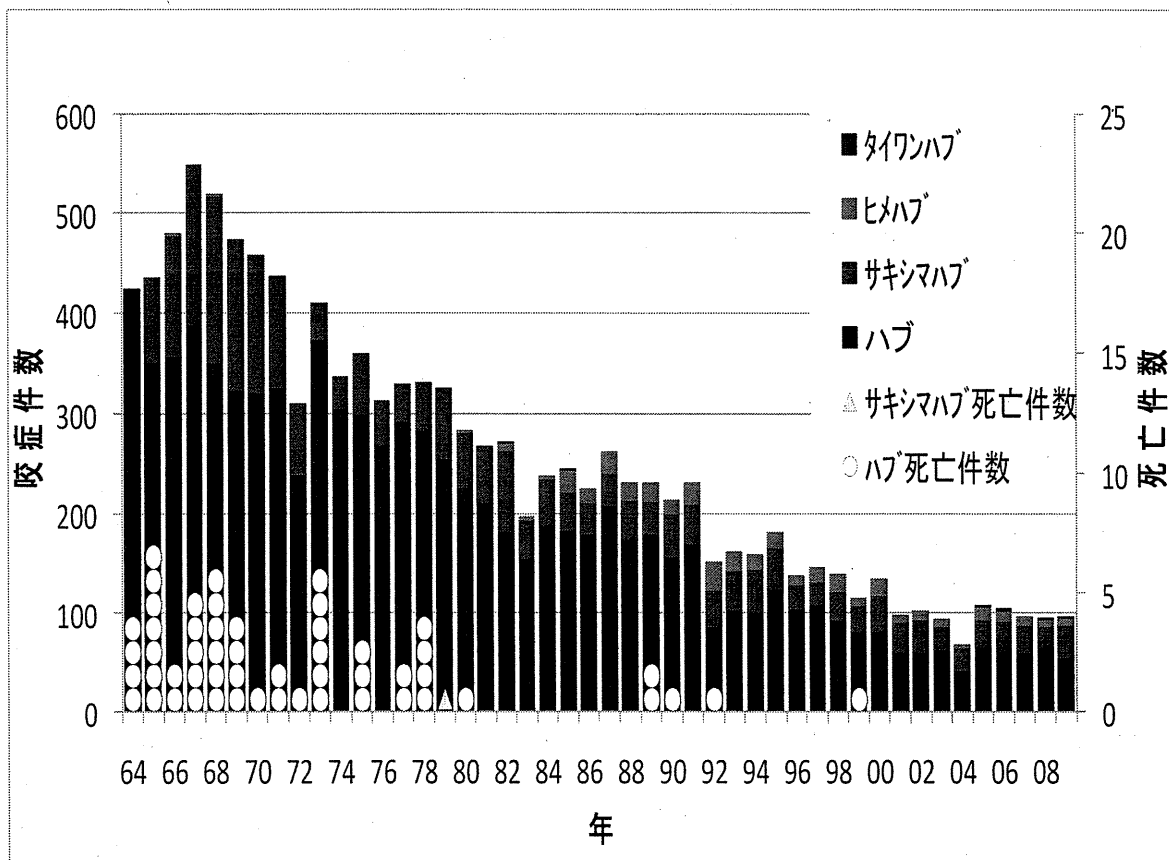


図 1 .

沖縄県のハブ類咬傷件数の推移

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

マムシ抗毒素製剤使用アンケート解析 II

研究分担者

一三三 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

協力研究者

山本 明彦 国立感染症研究所・細菌第二部  
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  
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が、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再解析が必要と判断され、重症度をマムシgrade I, IIとII I, IVに分けて再検討した。

ガス壊疽抗毒素の臨床での啓蒙活動は、米国集中治療医学会(Society of Critical Care Medicine; SCCM)に参加して情報収集と共に啓蒙活動を行った。

I. マムシ抗毒素製剤の使用調査(2回目)  
の再検討

を用いて後ろ向きに再評価することを  
目的とした。

A. 研究目的

平成22年度の第2回アンケート調査  
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、各種統計方法

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。アンケート内容を図1に示す。

調査期間は平成21年10月1日から22年9月30日の1年間とした。

### C. 結果

114施設（52.1%）から回収した。234症例の治療詳細が回収された。

年齢 $57 \pm 24$ 歳，男性148名，女性86名。

マムシGradeはI 65名，II 74名，III 52名，IV 33名，V 5名，不明5名であった。

治療に関しては，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71例，その他が23例，詳細不明24例であった（表1）。

すべての症例で転帰は軽快していたので，マムシGrade I, IIとIII, IVとに分けて，抗毒素群，抗毒素+セファランチン群，セファランチン群をそれぞれの治療方法における入院日数を，Fisher'sの直接確率計算法で比較した。マムシGrade I, IIでは有意差が認められなかったが，マムシGrade III, IVでは，抗毒素投与群はセファランチン投与群に比較して有意に入院日数の短縮を認めた（ $p=0.025$ ）（図2, 3, 4参照）。

### D. 考察

2回目のアンケートでは，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が，各治療群で重症度が異なるため，明確な結論は得られなかった。

そこで今回の再検討ではまむしgrade I, IIとIII, IVとの軽症と重症に分けることとした。

マムシGrade別に入院日数を効果の一つの指標とした検討では，マムシ咬傷の程度の重篤なIII, IVでは，抗毒素投与群はセファランチン投与群に比較して有意に入院日数の短縮を認めた。

これは従来から唱えられている重症例には抗毒素を投与すべきということをサポートするものである。

今後，軽症例については本当に必要なかどうかを再検討する必要があるが，臨床の場面でもっとも難しいのは一見軽症そうにみえても重症化する場合である。軽症と判断して重症化した後に抗毒素が投与された報告は散見される。

重症化の指標として来院時の血小板やCK値が報告されているが，重症化の予測が困難である現状をふまえると，オーバーリアージで抗毒素を投与していく必要がある。

### E. まとめ

第2回目のアンケートの再検討により，マムシGrade別に入院日数を効果の一つの指標とした検討では，マムシ咬傷の程度の重篤なIII, IVでは，抗毒素投与群はセファランチン投与群に比較して有意に入院日数の短縮を認めた。今後さらに詳細な検討を加える予定である。

### F. 研究発表

#### 学会発表

まむし咬傷の臨床像と治療薬の有効性に関する調査報告 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 2011, 10, 18 東京

#### 論文発表

Hifumi T, Yamamoto A, Morokuma K, Ogasawara T, Kiriu N, Hasegawa E, Inoue J, Kato H, Koido Y, Takahashi M. Surveillance of the Clinical Use of Mamushi (*Gloydius blomhoffii*)

## II. ガス壊疽抗毒素について米国集中治療医学会 (Society of Critical Care Medicine) に参加しての情報収集と啓蒙活動について

### A. 研究目的

内因性のガス壊疽に対してガス壊疽抗毒素の有効性について言及してきたが、その使用症例が2年経過しても本邦ではないため、米国国際学会でガス壊疽抗毒素の臨床使用について情報収集と啓蒙活動を行った。

### B. 研究方法

米国集中治療医学会 (SCCM) で、内因性ガス壊疽についての症例報告があり、学会会場でガス壊疽抗毒素使用について議論した。

### C. 結果

米国では、ガス壊疽抗毒素は臨床使用されておらず、非特異的な $\gamma$ グロブリンの大量使用のみであった。発表症例も短時間に血管内溶血を来して死亡していた。

### D. 考察

米国では、ガス壊疽抗毒素の臨床使用はされておらず、ガス壊疽抗毒素の有効性を評価するのは本邦に課せられた課題であると結論付けられた。今後症例の蓄積が必要である。

### E. まとめ

今後もガス壊疽抗毒素使用症例を蓄積してその有効性を検討していく。

### F. 研究発表

なし。

表1. 第2回マムシアンケート

平成22年11月1日

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・医療機器等レギュト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、何れも軽症であることが分かりました。治療の実態として、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います。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いいたします。

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: 手首または足首まで, III: 肘または膝関節まで, IV: 一肢全体に及ぶ, V: 一肢を超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 まむし Grade III, IV の治療法と入院期間の関係 (抗毒素と抗毒素+セファランチン)

	Length of hospital stay ≧ 8 days	Length of hospital stay ≦ 7 days	total	
Antivenom	5	27	32	
CEP+Antivenom	1	17	18	
Total	6	44	50	P=0.29

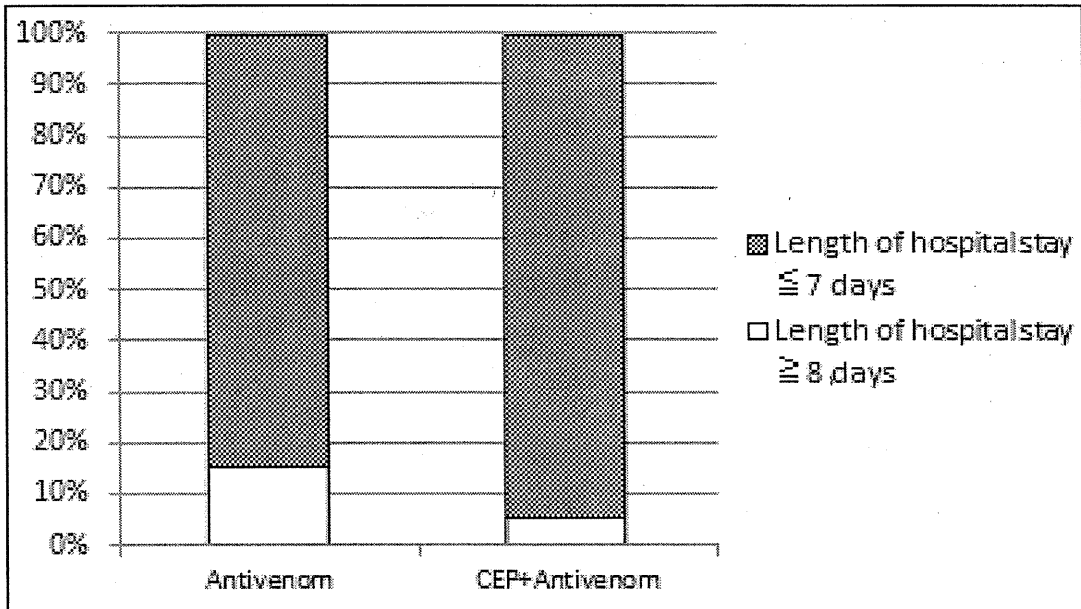


図3 まむし Grade III, IV の治療法と入院期間の関係(セファランチンと抗毒素)

	Length of hospital stay ≧ 8 days	Length of hospital stay ≦ 7 days	total	
CEP+Antivenom	1	17	18	
CEP	5	4	9	
Total	6	21	27	P=0.008

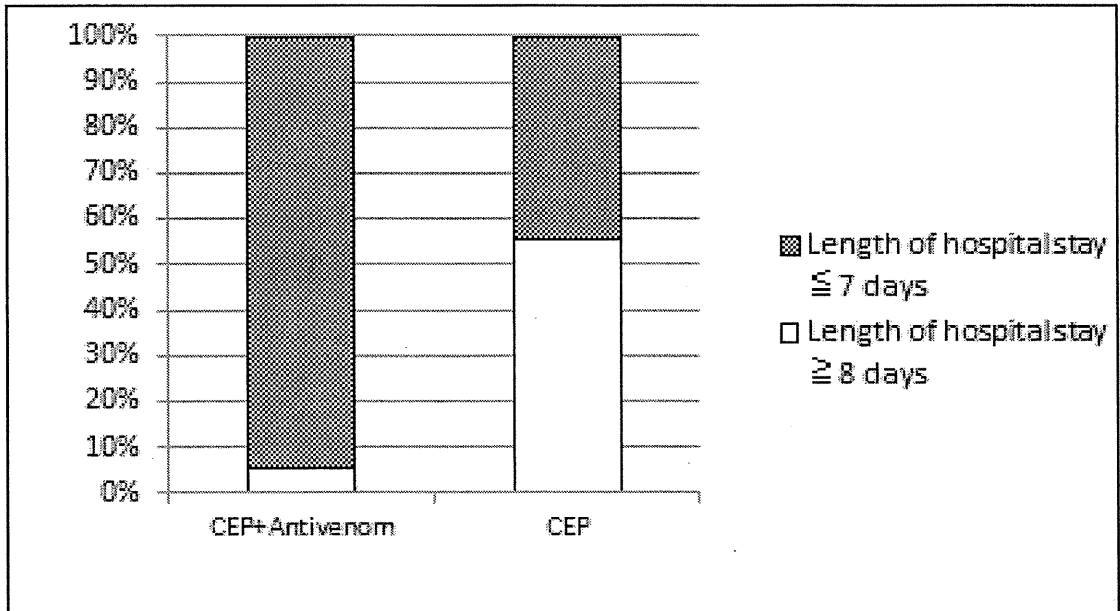


図4 まむし Grade III, IV の治療法と入院期間の関係 (セファランチンとセファランチン+抗毒素)

	Length of hospital stay ≧ 8 days	Length of hospital stay ≦ 7 days	total	
CEP+Antivenom	1	17	18	
CEP	5	4	9	
Total	6	21	27	P=0.008

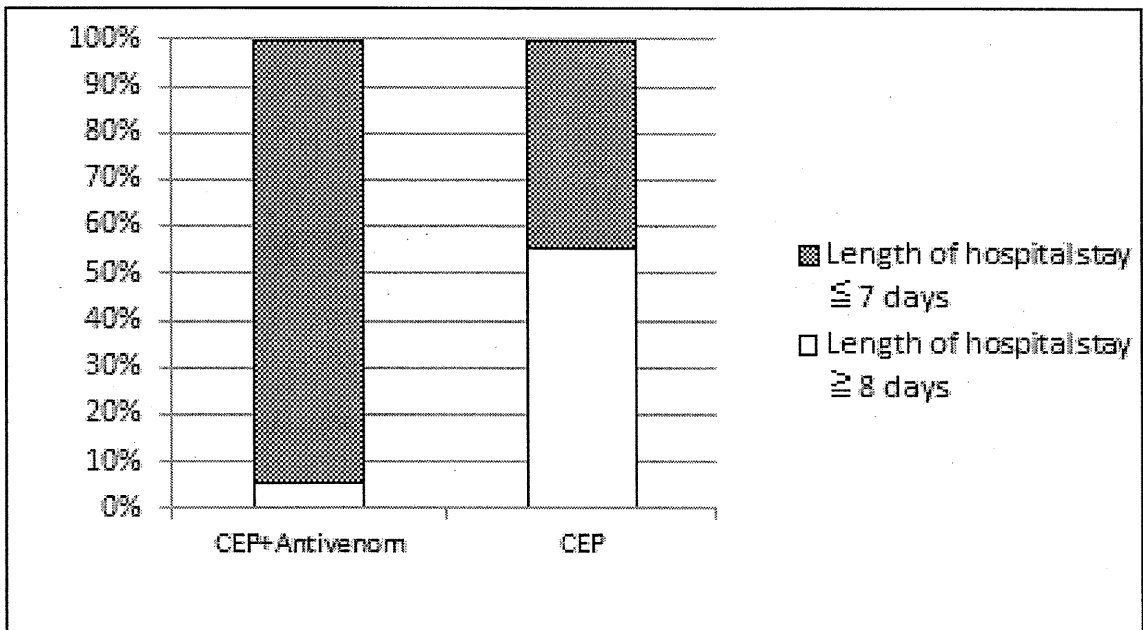




表1 セファランチン, 抗毒素, セファランチン+抗毒素, それ以外での背景の比較

Variable	Cepharanthine (n=28)	Antivenom (n=85)	Cepharanthine + antivenom (n=26)	Neither cepharanthine nor antivenom (n=71)	P value
Age (years), mean $\pm$ SD	60.1 $\pm$ 4.3	59.7 $\pm$ 2.5	55.0 $\pm$ 4.4	57.3 $\pm$ 2.7	0.74
Sex (male), N (%)	20 (71)	47 (55)	16 (62)	45 (63)	0.45
Comorbid illness, N (%)	11 (55)	34 (40)	11 (42)	42 (59)	
Mamushi grade					
I, N (%)	11	19	2	34	
II, N (%)	9	32	7	16	
III, N (%)	6	19	11	9	
IV, N (%)	2	14	6	8	
V, N (%)	0	1	0	4	
Laboratory value					
WBC (/mm <sup>3</sup> ), mean $\pm$ SD	7064 $\pm$ 594	6930 $\pm$ 343	7918 $\pm$ 617	7643 $\pm$ 379	0.37
PLT ( $\times 10^4$ /mm <sup>3</sup> ), mean $\pm$ SD	18.2 $\pm$ 1.4	21.1 $\pm$ 0.8	20.9 $\pm$ 1.4	21.4 $\pm$ 0.8	0.22
Hct (mg/dl), mean $\pm$ SD	40.3 $\pm$ 1.1	40.4 $\pm$ 0.6	41.0 $\pm$ 1.1	40.1 $\pm$ 0.7	0.91
CK (IU/L), mean $\pm$ SD	1589 $\pm$ 1251	976 $\pm$ 704	1397 $\pm$ 1251	1898 $\pm$ 810	0.86
BUN (mg/dl), mean $\pm$ SD	15.8 $\pm$ 1.9	17.6 $\pm$ 1.0	15.7 $\pm$ 1.9	16.3 $\pm$ 1.2	0.71
Cre (mg/dl), mean $\pm$ SD	0.77 $\pm$ 0.12	0.71 $\pm$ 0.07	0.70 $\pm$ 0.46	0.82 $\pm$ 0.08	0.69
LDH (IU/L), mean $\pm$ SD	295 $\pm$ 43	246 $\pm$ 24	246 $\pm$ 44	294 $\pm$ 27	0.50
Outcome					
Length of hospital stay (days), median (IQR)	5.6 $\pm$ 1.0	5.3 $\pm$ 0.6	4.7 $\pm$ 1.0	5.6 $\pm$ 0.6	0.89

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 23 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

現行ボツリヌス抗毒素製剤の有効性に関して

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

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

要旨： 現在、診断用・治療用として使用されているボツリヌス A 型および B 型標準抗毒素の有効性について、国内で発生した 2 種類の A 型サブタイプ(A1, A2)、3 種類の B 型サブタイプ(B1, B2, B5)精製神経毒素に対する免疫学的反応性を検討した。一定量の標準抗毒素が中和力価は、免疫毒素である A1 および B1 神経毒素に対し、サブタイプが異なる神経毒素の方が低いことが分かった。また表面プラズモン共鳴解析により、サブタイプ間での中和反応の差を反応速度定数として算出した。

A. 研究の目的

ボツリヌス菌は、グラム陽性偏性嫌気性菌で芽胞を形成し、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。各型の BoNT 遺伝子(*bont*)配列全長の系統解析が行われ、A 型は 4 種類(A1, A2, A3, A4)、B 型は 5 種類(B1, B2, B3, B4, B5)、E 型は 6 種類(E1, E2, E3, E4, E5, E6)のサブタイプに分類されている。A 型 BoNT (BoNT/A)では、A1 サブタイプは 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。BoNT/B では、B1 サブタイプは主に米国で分離された菌株が多く、標準株や食中毒由来株が含まれ、B2 サブタイプは主にヨーロッパで分離された菌株が多く、日本での乳児ボツリヌス症由来菌株が含まれる。また、2005 年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 株はデータベース上のどの配列とも一致せず、系統解析の結果、B2 サブタイプ、B3 サブタイプとも異なる新たなサブタイプに分類されることが示唆され、現在 B5 サブタイプとして分類されている。

現在国内で診断用・治療用として用いられている標準抗毒素は各型の標準株である A1 および B1 サブタイプを抗原として作製されており、国内で発生した標準株以外のサブタイプに分類される神経毒素との反応性については、詳細に調べられていない。本研究では日本で発生した A 型菌および B 型菌が産生する複数のサブタイプ神経毒素と現在用いられているボツリヌス抗毒素製剤の免疫学的反応性について検討を行った。

## B. 研究方法

### (1) 標準抗毒素の中和力価測定

既報の方法で精製した A1 サブタイプ(62A 株)BoNT および A2 サブタイプ(Chiba-H 株)BoNT の毒素活性(ipLD<sub>50</sub>/ml)をマウス静脈内注射法により測定した。各サブタイプ BoNT/A

の希釈倍率は予備実験の後、A1 サブタイプ BoNT は 8,000, 4,000, 2,000, 1,000 ipLD<sub>50</sub>/ml の 4 段階、A2 サブタイプ BoNT は 1,000, 500, 250, 125 ipLD<sub>50</sub>/ml の 4 段階と決定した。標準 A 型抗毒素(千葉血清)を 0.8 IU/ml に希釈し、各毒素の希釈液と等量混合後、一時間室温で静置した。

標準 B 型抗毒素(千葉血清)の中和力価測定には、既報の方法で精製した B1(Okra 株), B2(111 株), B5(Osaka05 株)の 3 つのサブタイプの BoNT/B を用いた。各サブタイプ BoNT/B の毒素活性をマウス静脈内注射法により測定後、予備実験を行い、希釈倍率を以下のように決定した。B1 サブタイプ BoNT は 16,000, 8,000, 4,000, 2,000 ipLD<sub>50</sub>/ml の 4 段階、B2 サブタイプ BoNT は 1,000, 500, 250, 125 ipLD<sub>50</sub>/ml の 4 段階、B5 サブタイプ BoNT は 8,000, 4,000, 2,000, 1,000 ipLD<sub>50</sub>/ml の 4 段階とした。標準 B 型抗毒素(千葉血清)を 0.8 IU/ml に希釈し、各毒素の希釈液と等量混合後、一時間室温で静置した。

体重約 20 g のマウス 4 匹を一群として、各混合液の 0.5 ml を腹腔内に注射して 3 日間マウスの生死を観察した。標準抗毒素を中和するために必要な毒素量(ipLD<sub>50</sub>/ml) は Reed & Muench 法により算出し、L+5 として表した。

### (2) 標準 A 型抗毒素および自家標準 A2 抗毒素の A1・A2 サブタイプ BoNT に対する親和性

標準 A 型抗毒素(国立感染症研究所 (Lot. 1)および化血研自家標準 A2 抗毒素 F(ab)'<sub>2</sub> をリガンドとしてセンサーチップ CM5(GE healthcare)にアミノカップリング法により結合させた。アナライトとして、100 nM から 5 段階希釈した A1 または A2 神経毒素を添加し、相互作用を HBS-EP+ (10 mM HEPES-0.15 M NaCl- 3 mM EDTA-0.05% Surfactant P 20)をランニング緩衝液として用い、表面プラズモン共鳴を Biacore X100(GE healthcare)でモニターした。リガンドとアナライトの相互作用は、あらかじめプログラムされた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) 標準抗毒素の各型サブタイプに対する中和力価

標準 A 型抗毒素 0.8 IU/ml に対し、A1 および A2 サブタイプそれぞれの神経毒素の中和力価は 5,660, 790 ipLD<sub>50</sub>/ml であった。標準 B 型抗毒素 0.8 IU/ml に対し、B1, B2 および B5 サブタイプそれぞれの神経毒素の中和力価は 11,314, 707 および 5,040 ipLD<sub>50</sub>/ml であった(図 1)。

#### (2) 標準 A 型抗毒素、自家標準 A1 および A2 抗毒素の A1・A2 サブ

#### タイプ BoNT に対する親和性

表面プラズモン共鳴で得た結果から、結合速度定数( $k_a$ )、解離速度定数( $k_d$ )および解離定数( $K_D=k_d/k_a$ )を算出した。標準 A 型抗毒素に対し、免疫毒素である A1 サブタイプ BoNT は、A2 サブタイプ BoNT よりも解離定数が低値を示したことから、親和性が高いことが明らかになった。また、A2 サブタイプ BoNT は A1 サブタイプ BoNT よりも標準 A 型抗毒素に結合する速度が遅く、解離しやすい傾向があることがわかった。自家標準 A 型抗毒素は、免疫毒素である A2 サブタイプ BoNT は、A1 サブタイプ BoNT よりも解離定数が低値を示したことから、親和性が高いことが明らかになった。また、A1 サブタイプ BoNT は A2 サブタイプ BoNT よりも自家標準 A2 抗毒素に結合する速度が速く、解離しやすい傾向があった(図 2)。

### D. 考察

同一型毒素内での毒素遺伝子の変異とそれに伴う抗原性の変化は、毒素型を決定するための *in vitro* 検出法や PCR 法に影響を与えることが予想される。本研究では、現在用いられている A 型および B 型標準抗毒素の有効性を調べるために、BoNT 中和力価をサブタイプ間で比較した。標準抗毒素は抗原毒素である A1 または B1 サブタイプに対し、異なるサブタイプ BoNT の中和力価が A 型では A2 サブタイプが 14%、B 型では B2 サブタイプが 6%、B5 サブタイプが 45%と低くなった。また表面