

201132010A・B

厚生労働科学研究 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

平成 21-23 年度 総合研究報告書

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山本 明彦

平成 24 年 (2012) 3 月

厚生労働科学研究 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

平成 21-23 年度 総合研究報告書

研究代表者 山本 明彦

平成 24 年 (2012) 3 月

医薬品・医療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班

平成 21-23 年度 研究組織

研究代表者

高橋元秀 国立感染症研究所 細菌第二部 第三室室長
山本明彦 国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官

研究分担者

大隈邦夫 (財) 化学及血清療法研究所 信頼性保証部門理事付
銀永明弘 (財) 化学及血清療法研究所 第一製造部次長
玉那覇康二 沖縄県衛生環境研究所 衛生科学班長
一二三亨 (独) 国立病院機構災害医療センター救命救急科
小崎俊司 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科長
鳥羽通久 (財) 日本蛇族学術研究所 所長
堺 淳 (財) 日本蛇族学術研究所 研究員
櫻井信豪 (独) 医薬品医療機器総合機構 品質管理部長
見理 剛 国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官
岩城正昭 国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官
山本明彦 国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官

研究協力者

鳥居恭司 (財) 化学及血清療法研究所 第一製造部
八木 翼 (財) 化学及血清療法研究所 第一製造部
志垣隆通 (財) 化学及血清療法研究所 病理部
堀川義兼 (財) 化学及血清療法研究所 品質管理部
久米田幸介 (財) 化学及血清療法研究所 品質管理部
諸熊一則 (財) 化学及血清療法研究所 品質管理部

渡辺 晋	(財) 日本蛇族学術研究所
幸田知子	大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科
向本雅郁	大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科
盛根信也	沖縄県衛生環境研究所 衛生科学班
寺田考紀	沖縄県衛生環境研究所 衛生科学班
松田聖子	沖縄県衛生環境研究所 衛生科学班
小宮貴子	国立感染症研究所 細菌第二部
小井土雄一	(独) 国立病院機構 災害医療センター救命救急科 部長
佐々木次雄	(独) 医薬品医療機器総合機構 品質管理部
高橋元秀	(独) 医薬品医療機器総合機構 品質管理部

目 次

	頁
I. 総合研究報告書	
抗毒素製剤の効率的製造方法の開発に関する研究	
研究代表者 山本 明彦	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	13
IV. 研究成果の刊行物・別刷り・資料.....	17
1. 資料	
1) ボツリヌスと神経毒素	
2) ボツリヌス毒素研究と将来展望	
3) WHO guidelines for the production control and regulation of snake antivenom immunoglobulins	
4) Epidemiology of prevention of vaccine-preventable diseases	
5) Immunisation against infectious disease	

I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究 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総合研究事業

総合研究報告書

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

研究責任者： 山本 明彦 国立感染症研究所 細菌第二部

研究要旨： WHO が示した蛇抗毒素のガイドライン（WHO-GL）に照らした蛇毒抗毒素製剤の検証、及びこの GL をモデルに国内で製造するウマ抗毒素製剤（ジフテリア、ボツリヌス等）の適応を検証した結果、以下の概要のとおりである。

1. 蛇毒抗毒素製剤の製造工程管理の検証では、(1)毒素供給元である蛇研および沖縄衛研における採毒する蛇の個別管理、採毒後の毒素管理等について製剤の品質に影響を与える各工程の手順を設けて記録を残すシステムを構築した。(2)抗毒素製造工程において製品品質に影響があり GL とのギャップの大きい項目である毒素受け入れ、ウイルスクリアランス、及び精製方法について検証し、対応策を具体化した。
2. 品質管理試験については、現在の品質管理試験は過去に実施した蛇毒の臨床作用と実験動物での基礎研究のもとに確立された試験方法である。しかし、現在実施している致死活性価と出血活性価の複数の力価試験を製品の品質試験法として必須項目とするか、WHO-GL の推奨する 1 試験対応への検討を行なった結果、研究班としてハブおよびマムシ抗毒素の力価試験には、致死活性価だけで実施する提言をすることとした。
3. 国内に生息する毒蛇に対応する抗毒素が供給されているかの検証では、マムシとハブ以外にヤマカガシの咬傷による死亡例が報告されている。これを受けて、過去に薬事法承認外製品として試験製造されたヤマカガシウマ抗毒素が臨床で効果報告があるため、現状の在庫調査を実施した結果、相当本数が 3 ケ所で保存されているが、10 年以上を経過しているために、安定性確認を含めて今後の対応を当局と検討することとした。

蛇毒素以外のウマ抗毒素製剤についての WHO-GL 適応の可能性を検証したが、製剤の元原料が異なり、化血研法は血清であり、千葉血清承継法は血漿である。したがって、採血、精製工程に関わる管理方法が異なるために、通常では薬事法の製造承認内容の一部変更を伴う対応が求められる。このため、国家備蓄品である当該製品の変更の必要性は当局と協議して対応することとした。

研究分担者

大隈邦夫	(財) 化学及血清療法研究所 信頼性保証部門理事付
銀永明弘	(財) 化学及血清療法研究所 第一製造部次長
玉那覇康二	沖縄県衛生環境研究所 衛生科学班長
一二三亨	(独) 国立病院機構災害医療センター救命救急科
小崎俊司	大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科長
見理 剛	国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官
岩城正昭	国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官
鳥羽通久	(財) 日本蛇族学術研究所 所長
堺 淳	(財) 日本蛇族学術研究所 研究員
櫻井信豪	(独) 医薬品医療機器総合機構 品質管理部長

研究協力者

鳥居恭司	(財) 化学及血清療法研究所 第一製造部
八木 翼	(財) 化学及血清療法研究所 第一製造部
志垣隆通	(財) 化学及血清療法研究所 病理部
堀川義兼	(財) 化学及血清療法研究所 品質管理部
久米田幸介	(財) 化学及血清療法研究所 品質管理部
諸熊一則	(財) 化学及血清療法研究所 品質管理部
渡辺 晋	(財) 日本蛇族学術研究所
幸田知子	大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科
向本雅郁	大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科
盛根信也	沖縄県衛生環境研究所 衛生科学班
寺田考紀	沖縄県衛生環境研究所 衛生科学班
松田聖子	沖縄県衛生環境研究所 衛生科学班
小宮貴子	国立感染症研究所 細菌第二部

小井土雄一 (独) 国立病院機構 災害医療センター救命救急科 部長
佐々木次雄 (独) 医薬品医療機器総合機構 品質管理部
高橋元秀 (独) 医薬品医療機器総合機構 品質管理部

A. 研究目的

ガス壊疽、ジフテリア、ボツリヌス等の毒素性細菌感染症の治療や、ハブやマムシの毒へび咬症の治療に対してウマ抗毒素製剤が利用されている。海外においてもウマ抗毒素製剤は多方面の治療に用いられているが、製造方法の改良は、投入する費用回収の採算性が乏しく、製造所による積極的な検討は事実上おこなわれていない。国有抗毒素製剤は市場性、経済性に乏しく、民間企業だけでは改良、開発が望めない製剤であるため、基礎研究、具体的な製剤化に関して、国の経済的、政策的な支援が必要である。

ウマ抗毒素製剤の安定供給には、免疫原である毒素およびトキシノイドの十分な調達・確保(量・品質面)、ウマ免疫の効率化(有効率・高力価収量・低労力)、抗毒素血清の精製の技術力向上(高品質・高収量化)等、さまざまな課題がある。これらの問題点を少しずつでも解決していくことは、将来的には抗毒素製剤の効率的製造方法への改善へと繋がり、延いては国への大きな社会的貢献が期待出来る。

WHO では医薬品に関する総括的な国際規制・ハーモナイズを討議する Expert Committee on Biological Standardization 会議 (ECBS) において、蛇毒ウマ抗毒素製剤の製造、品質管理及び規制方法に関する WHO ガイドライン (WHO-GL) が示し、検討することが示された。これを踏まえて、国内製剤の製造、品質管理及び規制方法にかかる問題点を整理し、WHO-GL に準拠

した方法を確立することを求められる。各国の規制当局や製造業者は、生産体制の GMP 適応範囲の見直し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を進めている。日本においても、規制当局が参考に資することができるよう、WHO-GL を踏まえた上述の規制を見直すための種々の検討を行う必要がある。

また、日本においては、生物学的製剤 GMP (Good Manufacturing Practices) の導入による施設改善等の必要性及びそれに伴う採算性の悪化により、過去に複数存在していたジフテリア抗毒素、マムシ抗毒素の国内製造所の多くは、当該製品の製造を中止している。その結果、現在国内では 1 社だけがウマ抗毒素製剤 (ジフテリア、破傷風、ボツリヌス、ガスえそ、ハブ、マムシ) の製造を行い、安定供給の社会的な責務を担っている。WGO-GL を踏まえた広範囲にわたる新技術による製造方法や品質試験法の改良開発を当該企業だけで行うには限界があり、適切な国内製造体制の確保と国内製造品の国際標準への対応を図るためには、調査・研究を推進する必要がある。

ジフテリア抗毒素の力価試験に用いる試験毒素は約 40 年前に培養・精製したものを保存して自然状態で安定化した標品が用いられている。ジフテリア毒素の安定性について、新規にトキシノイド製造用に培養した毒素を入手して活性を継時的に定量して、今

後の試験毒素の確保に必要な条件を検討する。

さらに、肝膿瘍からガスえそ菌が感染した患者に対してはウマ抗毒素製剤を使用することにより治療効果が得られるケースがある。しかし、一般的な創傷性ガスえそ疾患と異なるために医療現場で抗毒素製剤の存在を知らない、または製剤の適用範囲にあるかを迷うケースがあった。国有品である貴重なガスえそ抗毒素製剤の使用について医療現場での問題点を整理し、今後の治療と効率的利用の対応を図る。

B. 研究方法

当研究班は、国内のウマ抗毒素製剤の製造所、蛇抗毒素製剤の抗原供給元施設、製剤の国家品質管理検定所および抗毒素製剤の使用頻度の高い救急救命センターの代表者で組織している。研究開発の問題点を理解し、それらに対応可能な知識、技術基盤を有する産官学の研究者で構成している。国家品質管理と各国および WHO-GL の全体に係わる検証を国立感染症研究所の研究者が担当し、製造技術の改良と実製造への検証と製造工程中の品質管理法に関しては化学及血清療法研究所が担当し、蛇抗毒素製剤のウマ免疫用抗原としての蛇毒の WHO-GL 対応については日本蛇族学術研究所と沖縄県衛生研究所が担当し、ボツリヌス抗毒素を例として WHO-GL 対応は大阪府立大学を中心に化学及血清療法研究所、国立感染症研究所が担当する。

臨床現場での抗毒素製剤の利用状況調査は国立病院機構災害医療センターを中心に実施し、製造における GMP 適応の検証については医薬品医療機器総合機構を中心に検討する。

1. ハブ及びマムシウマ抗毒素の製造工程 (ペプシン消化工程) において、「日本薬局方参考情報」、「WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins」及び「血漿分画製剤のウイルスに対する安全性確保に関するガイドライン」の情報を元に、選択したモデルウイルス 3 種を用いてウイルス不活化の確認を試験する。また、WHO ガイドライン推奨のカプリル酸沈殿法による抗毒素精製に関して調査及び情報収集を行った。さらに、蛇毒の受入管理についても調査した。
2. ボツリヌス毒素は A-G 型の 7 型の毒素が知られており、各型には複数のサブタイプが存在することが近年明らかとなっている。現在製造されている 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。

3. WHO-GL の毒蛇の管理および毒素の管理方法の検証とともに、マムシおよびハブの飼育及び採毒に関する管理マニュアルの作成し、組織作りや教育訓練、職員研修法などの実施の必要性を検討した。また、乾燥ハブ粗毒のバッチ間の安定性試験を実施した。また、乾燥ハブ抗毒素に対する認識と実態把握のためのアンケートを実施した。
4. WHO-GL では抗毒素の市販後の有効性や安全性についての追跡調査を継続して実施することが推奨されている。マムシ抗毒素は全国的に発生がありながら抗毒素の使用実態把握がなかったため、全国 219 施設の救命救急センターに協力のもと実施した。その結果を基に治療に関する詳細調査として、抗毒素とセファランチンおよび、その他の治療法の有効性について 2 回目のアンケート調査を実施した。
5. 蛇毒抗毒素と生産工程上に共通点の多い蛇毒以外のジフテリア、ボツリヌス等の抗毒素製剤についても今後蛇毒抗毒素 WHO-GL の影響が及ぶことを見越して品質管理試験など中心に分析を試みた。

C. 研究結果

1. ハブウマ抗毒素において、ペプシン消化工程が有するウイルス不活化能力をモデル試験により評価した結果、使用した 3 種類のモデルウイルスにおいてウイルスクリアランスが認められた。これは文献によ

る調査結果と同様な成績を示した。従って、ペプシン消化工程が、本製剤のウイルス除去工程としても重要であることを確認した。抗毒素精製法として、カプリル酸沈殿法の有用性は確認した。また、蛇毒の受入管理については、現状分析と課題抽出まで行った。

2. サブタイプの異なる毒素と各型毒素に対する抗毒素の交差試験では以下の結果が得られた。現在の標準 A 型抗毒素は A1 毒素との間で得られる用量反応曲線と A2 毒素との反応曲線は異なることを確認した。また、A2 毒素由来の抗毒素と A1 毒素も同様に異なる反応曲線であった。このことは、抗毒素 1 単位がホモの毒素を中和する毒素活性 (LD_{50}) とヘテロの毒素では約 13 倍の違いが確認された。さらに標準 B 型抗毒素に対する国内分離サブタイプである B1、B2 及び B5 でその神経独力中和量は著しく異なった。
3. WHO-GL をモデルにハブの採毒マニュアルを作成した。沖縄ハブおよそ 200-300 個体からなる乾燥ハブ粗毒バッチの生物化学的性状の検査を実施し SDS-PAGE の泳動パターンは還元、非還元状態でバッチ間の差はみられなかった。またツシママムシの毒に対する現行の「乾燥まむしウマ抗毒素」の効果を確認するために、ツシママムシの毒の致死活性と出血活性を測定し、現製造の抗毒素に対する有効性を評価した。ツシママムシ毒の致死活性はニホンマムシ毒の約 1/2、出血活性は約 1/100 で

あった。現製造の抗毒素は、これらの活性を中和することを確認できたために、対馬におけるマムシ咬症対策は、特別な措置は必要ないことを確認した。さらに、蛇判別のためのパンフレットを作成した。

4. 救急センター219 施設の 2 回のアンケート調査の結果、抗毒素投与による副反応が 2.4%と低いこと、また、234 症例の治療における実態を得た。治療に関しては、抗毒素のみが、抗毒素+セファランチン、セファランチン、両方ともなしが集められた。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、それぞれの治療方法における入院日数を統計的に比較した。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 ($p=0.025$)。また、セファランチンの使用目的に抗毒素と同様の治療効果を求めている場合も確認された。
5. 蛇毒抗毒素の品質管理試験について、現状と WGL での規定とを比較した。日本においては抗致死活性に加えて、マムシ抗毒素製剤については抗出血活性をハブ抗毒素製剤についてはさらに抗出血 I, II 活性まで規定されているが、WGL では、どの蛇抗毒素についても抗致死活性のみでの品質管理を規定している相違があり、抗出血毒活性による品質管理を再考する必要がある。
6. 蛇毒抗毒素以外の製剤においては、

ウマ免疫用の抗原の調製・確保（培地作製、菌株の選定、毒素精製、ワクチン化等）は、実験室での工程管理が可能である。このことは GMP 上の管理が容易であり、生体由来原料としての問題を回避できる。一方、高度免疫血清が得られた後の作業工程は、蛇毒抗毒素製剤と同様な問題点と対応が必要であることを確認した。

D. 考 察

毒素サブタイプと該当する抗毒素の中和能の違いが確認されたことにより、ボツリヌス患者発生時には分離される菌株と産生する毒素サブタイプの解析は治療用抗毒素の有効性評価として重要な情報となる。現在、国内の食中毒患者発生は数年に 1 度、乳児ボツリヌス症は年間数例の報告となっている。患者発生時には地方衛生研究所を中心に病原体診断として毒素と菌の検出を患者および環境物で実施している。調査の結果、A 型については、毒素サブタイプとして A1 および A2 を産生する 2 種類の菌が分離されている。B 型については B1, B2 及び B5 のサブタイプを産生する菌が分離されている。食餌性ボツリヌス患者においては治療用の抗毒素が使用される場合が多いために、製造されている A1 毒素に対する A1 抗毒素の有効性の評価は、今後 慎重に見極めていく必要がある。

ハブの採取場所の区分や採毒記録簿を作成することにより、ハブ毒のト

レーサビリティが可能となった。採毒方法として 1 個体からの毒素量は少なく、品質試験は実際的でないために、200-300 個体の採毒でもバッチ毎の差は小さく、毒成分の個体差または地域差は平均化されると考えられる。

マムシ抗毒素およびセファランチンの使用実態および有効性判断をアンケート調査した結果、マムシ Grade 別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。抗毒素療法の有効性評価は、咬傷時の毒素の摂取量、咬傷部位、患者の年齢（抵抗性、基礎疾患）、咬傷後の治療までの時間等が期待される効果の要因となる。セファランチンの使用とその効果についても医師側の誤解もあり、マムシ咬傷の適切な治療マニュアル作成と啓蒙が必要である。

日本においては抗致死活性に加えて、マムシ抗毒素製剤については抗出血活性をハブ抗毒素製剤についてはさらに抗出血 I、II 活性まで規定されているが、WGL では、どの蛇抗毒素についても 1 つの主要な活性すなわち抗致死活性のみでの品質管理を規定していることから、抗出血毒活性による品質管理を再考する必要がある。

E. 結論

蛇毒ウマ抗毒素製剤の製造、品質管理及び規制方法に関する WHO ガイドラインに示された毒蛇の管理および採取毒素の品質管理方法について、国内の供給施設で検証した。毒蛇については、海外の供給施設が実施しているような蛇農場（Snake Farm）としてハードを整えることは、現状では供給組織の設立目的や運営・業務体系から実施することは多くの問題を解決する必要がある。また、採取した蛇毒の個体の健康管理と採毒記録等のソフトについては、マニュアル等の作成を含めて対応策が具体化された。

製造工程におけるウイルスクリアランスでは、実製造で実施しているペプシン消化工程でのウイルス不活化が機能していることを確認した。

ボツリヌスについては、患者治療に用いている抗毒素の製造に使用している免疫用毒素（トキシイド）はサブタイプ A1 であるが、サブタイプ A2 毒素との中和能が異なるため、今後 国内患者発生の際に分離される菌株と毒素型、および抗毒素療法を実施した場合の効果について注視することが必要である。

蛇毒抗毒素以外の抗毒素製剤についての WHO-GL 検証では、ウマ免疫用抗原の確保は製造所内での調達（菌培養と毒素精製）が可能となることから、他の生物学的製剤に適応した GMP 対応の経験が生かされるため、蛇毒抗毒素の WHO-GL 対応よりも比較的ソフト対

応は容易なことが予想される。

F. 健康危害情報

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) Umeda, K., Seto, Y., Kohda, T., Mukamoto, M., Kozaki, S.: A novel multiplex PCR method for *Clostridium botulinum* neurotoxin type A cluster typing. *Microbiol. Immunol.* 54: 308-312. 2010
- 3) 高橋元秀：クロストリジウム属菌感染症と抗毒素療法、日本集中治療医学会誌 17. 253-255. 2010
- 4) 一二三亨、高橋元秀、諸熊一則 他 6名： *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？ 日本集中治療医学会誌 17. 287-289. 2010
- 5) Hifumi, T., Yamamoto, A., Morokuma, K., Ogasawara, T., Kiriu, N., Hasegawa, E., Inoue, J., Kato, H., Koido, J., and Takahashi, M.: Surveillance of the Clinical Use of Mamushi (*Gloydius blomhoffii*) Antivenom in Tertiary Care

Centers in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 64, 373-376, 2011

- 6) Morokuma, K., Kobori, N., Fukuda, T., Uchida, T., Sakai, A., Toriba, M., Ohkuma, K., Nakai, K., Kurata, T., and Takahashi, T.: Experimental Manufacture of Equine Antivenom against Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*). *Jpn. J. Infect. Dis.*, 64, 397-402, 2011

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)
- 2) 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
- 3) Torii, Y., Shinmura, M., Takahashi, M., Kohda, T., Kozaki, S., Nakahira, S., and Ginnaga, A.: Immunological difference between botulinum toxin subtype A1 and A2 using polyclonal antibody. 7th International conference on Basic and Therapeutic Aspects of Botulinum and Tetanus Toxins (TOXINS2011).
- 4) 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, 金村剛宗, 長谷川栄寿, 加藤宏, 井上潤一, 小井土雄一, 高橋元秀、日本救急医学会 2011, 10, 18 東京

- | | |
|-------------------------|-----------|
| | なし |
| | 2. 実用新案登録 |
| | なし |
| H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む） | 3. その他 |
| | なし |
| 1. 特許出願 | |

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

英文雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Umeda, K., Seto, Y., Kohda, T., Mukamoto, M., Kozaki, S.	Genetic characterization of <i>Clostridium botulinum</i> associated with type B infant botulism in Japan.	J. Clin. Microbiol.	47	2720-2728	2009
Umeda, K., Seto, Y., Kohda, T., Mukamoto, M., Kozaki, S.	A novel multiplex PCR method for <i>Clostridium botulinum</i> neurotoxin type A cluster typing.	Microbiol Imuunol.	54	308-312	2010
Hifumi, T., Yamamoto, A., Morokuma, K., Ogasawara, T., Kiriu, N., Hasegawa, E., Inoue, J., Kato, H., Koido, J. and	Surveillance of the Clinical Use of Mamushi (<i>Gloydius blomhoffii</i>) Antivenom in Tertiary Care Centers in Japan.	Jpn. J. Infect. Dis.	64	373-376	2011
Morokuma, K., Kobori, N., Fukuda, T., Uchida, T., Sakai, A., Toriba, M., Ohkuma, K., Nakai, K., Kurata, T., and Takahashi, T.	Experimental Manufacture of Equine Antivenom against Yamakagashi (<i>Rhabdophis tigrinus</i>).	Jpn. J. Infect. Dis.	64	397-402	2011

邦文雑誌

高橋元秀	クロストリジウム属菌感染症と抗毒素療法	日本集中治療医学会誌	44(6)	253-255	2010
一二三亭、高橋元秀、諸熊一則 他	<i>Clostridium perfringens</i> 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？	日本集中治療医学会誌	17	287-289	2010
鳥羽通久、松尾加代子	日本産のヘビ類に寄生する吸虫類	爬虫両棲類学会報	16	70-78	2010

特許出願

III. 研究成果の刊行物・別刷り・資料

Genetic Characterization of *Clostridium botulinum* Associated with Type B Infant Botulism in Japan[∇]

Kaoru Umeda,^{1,2} Yoshiyuki Seto,² Tomoko Kohda,² Masafumi Mukamoto,² and Shunji Kozaki^{2*}

Department of Microbiology, Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, 8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan,¹ and Department of Veterinary Science, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, 1-58 Rinku Ourai Kita, Izumisano-shi, Osaka 598-0048, Japan²

Received 14 January 2009/Returned for modification 2 March 2009/Accepted 24 June 2009

The 15 proteolytic *Clostridium botulinum* type B strains, including 3 isolates associated with infant botulism in Japan, were genetically characterized by phylogenetic analysis of *boNT/B* gene sequences, genotyping, and determination of the *boNT/B* gene location by using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) for molecular epidemiological analysis of infant botulism in Japan. Strain Osaka05, isolated from a case in 2005, showed a unique *boNT/B* gene sequence and was considered to be a new BoNT/B subtype by phylogenetic analysis. Strain Osaka06, isolated from a case in 2006, was classified as the B2 subtype, the same as strain 111, isolated from a case in 1995. The five isolates associated with infant botulism in the United States were classified into the B1 subtype. Isolates from food samples in Japan were divided into the B1 and the B2 subtypes, although no relation with infant botulism was shown by PFGE genotyping. The results of PFGE and Southern blot hybridization with undigested DNA suggested that the *boNT/B* gene is located on large plasmids (approximately 150 kbp, 260 kbp, 275 kbp, or 280 kbp) in five strains belonging to three BoNT/B subtypes from various sources. The botulinum neurotoxin (BoNT) of Osaka05 was suggested to have an antigenicity different from the antigenicities of BoNT/B1 and BoNT/B2 by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay with the recombinant BoNT/B–C-terminal domain. We established a multiplex PCR assay for BoNT/B subtyping which will be useful for epidemiological studies of type B strains and the infectious diseases that they cause.

Infant botulism is neuromuscular paralysis caused by the botulinum neurotoxin (BoNT) produced in the intestines after the germination and outgrowth of ingested spores of *Clostridium botulinum*, which is an anaerobic spore-forming bacterium (7, 9). On the basis of the antigenic specificity of BoNT, *C. botulinum* strains are divided into seven serotypes (serotypes A to G), and the species has been separated into four groups (groups I to IV) by cultural characteristics (24). BoNT is encoded by an approximately 3.8-kb gene, which is preceded by several nontoxic component genes (17, 30). BoNT is released from the bacteria as a single polypeptide chain of 150 kDa and is cleaved by endogenous or exogenous proteases into a 50-kDa light chain and a 100-kDa heavy chain. The heavy chain contains two functional domains, the N-terminal domain (H_N) and the C-terminal domain (H_C). H_C can be further divided into two distinct subdomains: the N-terminal domain (H_{CN}) and the C-terminal domain (H_{CC}) (5, 38).

Recently, the subtype classification was confirmed by the diversity of the amino acid sequences within each serotype (13, 37). BoNT serotype A (BoNT/A) has been divided into four subtypes (subtypes A1, A2, A3, and A4) (2, 10). BoNT/B has been divided into three subtypes from type B group I (subtypes B1, B2, and B3), one subtype from group I bivalent strains that express another BoNT type, in addition to BoNT/B (bivalent), and one subtype from type B group II (nonpro-

teolytic) (13). BoNT/E has been divided into four subtypes from *C. botulinum* type E (subtypes E1, E2, E3, and E6) and two subtypes from BoNT/E-producing *C. butyricum* (subtypes E4 and E5) (6).

Since infant botulism was first recognized in the United States in 1976 (27, 31), it is now the most common disease caused by *C. botulinum*. This disease affects children up to 6 months old, but with rare exceptions it affects individuals of other ages. The symptoms are characterized by constipation, generalized weakness, and various neurological disorders (9). Cases represent a spectrum of disease, ranging from subclinical infection to the most fulminant form of the disease, which is unexpected sudden death (3). Almost all cases of infant botulism have been caused by proteolytic *C. botulinum* type A and B strains. Since the first occurrence of infant botulism in Japan caused by *C. botulinum* type A in 1986 (29), there have been 24 cases; 16 were caused by type A strains, 3 were caused by type B strains, 1 was caused by a type C strain, and 1 was caused by a *C. butyricum* strain producing BoNT/E. The types of toxin in the other three cases were not described (16). We previously indicated that the original BoNT/B2 produced by strain 111, which was isolated from the first case of type B infant botulism in Japan in 1995, showed antigenic and biological properties different from those of the authentic BoNT/B (B1) produced by strain Okra (15, 20, 22). Two additional cases of type B infant botulism with typical symptoms occurred in Osaka Prefecture in 2005 and 2006. We eventually isolated two proteolytic *C. botulinum* type B strains, designated Osaka05 and Osaka06, respectively.

In the study described here, to better understand the background of type B infant botulism, we determined the genetic characteristics of proteolytic *C. botulinum* type B isolates by

* Corresponding author. Present address: Department of Veterinary Science, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, 1-58 Rinku Ourai Kita, Izumisano-shi, Osaka 598-0048, Japan. Phone: 81-72-463-5690. Fax: 81-72-463-5691. E-mail: kozaki@center.osakafu-u.ac.jp.

[∇] Published ahead of print on 1 July 2009.