

2014-20050A

厚生労働科学研究 研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症
研究事業

抗毒素の品質管理及び抗毒素を使用した
治療法に関する研究

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 一二三 亨

平成27年(2015)3月

厚生労働科学研究 研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症
研究事業

抗毒素の品質管理及び抗毒素を使用した
治療法に関する研究

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 一二三 亨

平成27年(2015)3月

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

抗毒素の品質管理及び抗毒素を使用した治療法に関する研究班

平成 26 年度 研究組織

研究代表者

一 二 三 亨 香川大学医学部附属病院 救命救急センター

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
堺 淳	(財)日本蛇族学術研究所 主任研究員
澤邊京子	国立感染症研究所昆虫医科学部 昆虫医科学部 部長
新井 智	国立感染症研究所 感染症疫学センター 主任研究官
阿戸 学	国立感染症研究所 免疫部 部長
柴山恵吾	国立感染症研究所 細菌第二部 部長
山本明彦	国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官
黒田泰弘	香川大学医学部附属病院 救命救急センター 教授
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 部長

研究協力者

高橋元秀	独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 品質管理部
山岸拓也	国立感染症研究所 感染症疫学センター 主任研究官
池山 優	国立感染症研究所 感染症疫学センター
青木啓太	国立感染症研究所 感染症疫学センター
大石和徳	国立感染症研究所 感染症疫学センター
岸川政信	福岡市民病院 救急部 部長
藤見 聡	大阪府立急性期総合医療センター 高度救命救急センター 主任部長
松村隆之	国立感染症研究所免疫部 主任研究官
梅澤和夫	東海大学 救急医学 講師
村川昌弘	貝塚病院 副院長
二改俊彰	名城大学薬学部 教授
小森由美子	名城大学薬学部 准教授
堀田 晶	一般財団法人 化学及血清療法研究所
森繁 美	一般財団法人 化学及血清療法研究所
持舘景太	一般財団法人 化学及血清療法研究所
竹森隆弘	一般財団法人 化学及血清療法研究所
宮津嘉信	一般財団法人 化学及血清療法研究所
向井俊彦	一般社団法人 大阪府ペストコントロール協会
綿貫 實	一般社団法人 大阪ペストコントロール協会
大石浩二	西宮市環境衛生課
米正静男	西宮市環境衛生課

平良常弘	西宮市環境衛生課	
前川芳秀	国立感染症研究所	昆虫医科学部
小川浩平	国立感染症研究所	昆虫医科学部
伊澤晴彦	国立感染症研究所	昆虫医科学部
江尻寛子	国立感染症研究所	昆虫医科学部
糸川健太郎	国立感染症研究所	昆虫医科学部
津田良夫	国立感染症研究所	昆虫医科学部
小林睦生	国立感染症研究所	昆虫医科学部

目 次

	頁
I. 総括研究報告書	
抗毒素の品質管理及び抗毒素を使用した治療法に関する研究	
研究代表者 一二三 亨	1
II. 分担研究報告書	
1. セアカゴケグモ抗毒素の製造（馬免疫計画の立案）	
銀永 明弘	15
2. ニホンヤマカガシ毒とタイリクヤマカガシ（中国産）毒の血液凝固作用の比較、及びニホンヤマカガシ抗毒素による交差中和の検証	
堺 淳	18
3. セアカゴケグモ抗毒素血清作成のための毒液抽出	
澤邊 京子.....	20
4. セアカゴケグモ咬傷患者発生状況の把握	
新井 智.....	27
5. ヤマカガシ及びセアカゴケグモ抗毒素の力価試験の開発	
阿戸 学.....	31
6. ヤマカガシ及びセアカゴケグモ抗毒素の力価試験、品質管理試験	
山本 明彦.....	36
7. ヤヤマカガシ及びセアカゴケグモ咬傷に対する抗毒素治療体制の構築	
黒田 泰弘.....	40
8. ヤマカガシ及びセアカゴケグモ抗毒素を用いた臨床研究の実施	
小井土 雄一.....	42

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	45
IV. 研究成果の刊行物・別刷り・資料.....	47
1. 資料	
1) セアカゴケグモ事務連絡	
2) セアカゴケグモ咬傷治療 factsheetv8	

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究 研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症
研究事業

総括研究報告書

抗毒素の品質管理及び抗毒素を使用した治療法に関する研究

主任研究者 一二三 亨 香川大学医学部附属病院 救命救急センター

研究要旨： 2000年に厚生労働研究班によって作製されたヤマカガシ抗毒素とオーストラリアより研究班担当者が個人輸入したセアカゴケグモ抗毒素を用いて臨床研究を行い、実証的データを分析し、その安全性と有効性について検証した結果、以下の概要のとおりである。

1. ヤマカガシ抗毒素を用いた臨床研究については、まずヤマカガシ抗毒素の品質評価試験、力価測定を行い、さらにヤマカガシ抗毒素を使用した臨床研究を行うための倫理委員会承認、保険の加入、臨床研究を開始した。これにより、ヤマカガシ抗毒素の配備施設が群馬県と熊本県の2施設から東京都、神奈川県、香川県、高知県の4医療機関を加えて、日本全体に数時間以内でヤマカガシ抗毒素を供給できる体制を整備した。また緊急性が極めて高いため、研究班内に24時間体制での連絡体制を整備した。

さらに、過去40年間の本邦でのヤマカガシ症例の臨床像を検討し、その病態を明らかにして誌上報告した。ヤマカガシ抗毒素は凍結乾燥品としての使用期限（10年間）をすでに超過していることから第二次ヤマカガシ抗毒素製造計画の可能性について検討している段階である。

2. セアカゴケグモ抗毒素を用いた臨床研究については、まずセアカゴケグモ抗毒素を使用した臨床研究を行うための倫理委員会承認、保険の加入、臨床研究を開始する体制を整備した。セアカゴケ

グモ抗毒素のオーストラリアからの輸入が制限されたために、輸入可能な抗毒素を研究班で個人輸入し、臨床研究を開始した。緊急時に対応するために、行政に24時間体制で対応可能な研究班の連絡先を伝達し、セアカゴケグモ抗毒素を過去咬傷事例が報告されている地域と首都圏を中心に大阪府、福岡県、東京都、神奈川県、香川県に配備し、体制を整備した。

それに並行してセアカゴケグモ抗毒素の安定的な供給を行うために、国産化セアカゴケグモ抗毒素製造計画を立案し、製造を開始した。毒の採取、力価試験の開発を行い、2015年には馬への免疫化を行い、2015年度中には製剤化が完成する予定である。さらに過去5年間の本邦でのセアカゴケグモ咬傷の臨床像を解析し、誌上報告した。

行政への貢献として、福岡市、大阪府、香川県、北九州市主催の勉強会に参加し、啓発活動を行った。

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
堺 淳	一般財団法人日本蛇族学術研究所 主任研究員
澤邊京子	国立感染症研究所昆虫医科学部 衛生昆虫学 部長
新井 智	国立感染症研究所 感染症疫学センター 主任研究官
阿戸 学	国立感染症研究所 免疫部 部長
柴山恵吾	国立感染症研究所 細菌第二部 部長
山本明彦	国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官
黒田泰弘	香川大学医学部附属病院 救命救急センター 教授
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 部長

研究協力者

高橋元秀	独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 品質管理部
山岸拓也	国立感染症研究所 感染症疫学センター 主任研究官
池山 優	国立感染症研究所 感染症疫学センター
青木啓太	国立感染症研究所 感染症疫学センター
大石和徳	国立感染症研究所 感染症疫学センター
岸川政信	福岡市民病院 救急部 部長

藤見 聡	大阪府立急性期総合医療センター 高度救命救急センター 主任部長
松村隆之	国立感染症研究所免疫部 主任研究官
梅澤和夫	東海大学 救急医学 講師
村川昌弘	貝塚病院 副院長
二改俊彰	名城大学薬学部 教授
小森由美子	名城大学薬学部 准教授
堀田 晶	一般財団法人 化学及血清療法研究所
森繁 美	一般財団法人 化学及血清療法研究所
持舘景太	一般財団法人 化学及血清療法研究所
竹森隆弘	一般財団法人 化学及血清療法研究所
宮津嘉信	一般財団法人 化学及血清療法研究所
向井俊彦	一般社団法人 大阪府ペストコントロール協会
綿貫 實	一般社団法人 大阪ペストコントロール協会
大石浩二	西宮市環境衛生課
米正静男	西宮市環境衛生課
平良常弘	西宮市環境衛生課
前川芳秀	国立感染症研究所 昆虫医科学部
小川浩平	国立感染症研究所 昆虫医科学部
伊澤晴彦	国立感染症研究所 昆虫医科学部
江尻寛子	国立感染症研究所 昆虫医科学部
糸川健太郎	国立感染症研究所 昆虫医科学部
津田良夫	国立感染症研究所 昆虫医科学部
小林睦生	国立感染症研究所 昆虫医科学部

A. 研究目的

本研究の目的は、2000年に厚生労働研究班によって作製されたヤマカガシ抗毒素とオーストラリアより研究班担当者が個人輸入したセアカゴケグモ抗毒素を安定的に供給することで国民の健康に直接貢献するとともに、それぞれの咬傷受傷者へ投与することでの実証的データを用いてヤマカガシ抗毒素およびセアカゴケグモ抗毒素の安全性と有効性を明らかにすることにある。

1. ヤマカガシ抗毒素を用いた臨床研究

ヤマカガシ抗毒素は未承認薬のため、臨床研究でのみ使用が可能である。

ヤマカガシ咬傷は抗毒素を投与しないと死亡に至る危険性があることから、抗毒素を臨床研究の枠組みを通じて 24 時間体制で安定供給することと抗毒素の安全性と有効性を評価することを目的とした。

2. ヤマカガシ咬傷過去 40 年間(1973 年～2013 年)の臨床像の詳細調査とファクトシートの作成

ヤマカガシ咬傷患者数は少ないため、その臨床像の詳細や抗毒素を含む治療法の有効性は不明であった。今回初めてその臨床像を明らかにするため大規模な調査を行い、その結果を基にファクトシートを作成することを目的とした。

3. ニホンヤマカガシ毒とタイリクヤマカガシ（中国産）毒の血液凝固作用の比較、及びニホンヤマカガシ抗毒素による交差中和の検証

日本産ヤマカガシに対する抗毒素の製造

に際し、本邦ではヤマカガシ生息数が減少していることから、その毒の採取は現実的には困難である。そのため、その代替策として中国産タイリクヤマカガシの毒を代わりの抗原として使用できるかどうか検証する。さらにニホンヤマカガシと類似の血液凝固作用を持つオーストラリア産コブラ科のヘビであるタイパンとタイガースネークの抗毒素がヤマカガシ咬傷治療に用いることができるかを検証した。

4. セアカゴケグモ抗毒素の力価試験

国内で採取されたセアカゴケグモより抽出された粗毒の性状確認を行い、国産抗毒素製造に必須な抗毒素の力価試験を確立することを目的とする。

5. セアカゴケグモ抗毒素の製造

力価試験、実際のウマへの免疫に十分なセアカゴケグモの毒を採取し、試験免疫の検討を経て、実際のウマに免疫を行い、セアカゴケグモ抗毒素を製造することを目的とする。

6. セアカゴケグモ抗毒素を用いた臨床研究

セアカゴケグモ抗毒素はオーストラリアからの輸入が制限されている現状では、研究班が代表して輸入し、臨床研究を通じて安定供給することを目的とする。さらにセアカゴケグモ咬傷の場合は抗毒素を投与しないと重症化する危険性があり、またセアカゴケグモ咬傷はその分布が急激に国内で広がっており、社会問題となっているため本研究班からの正確な情報提供を行う。

7. セアカゴケグモ咬傷患者数把握のための調査（基本調査）

平成 7 年に国内でセアカゴケグモの生息が確認され、平成 9 年に咬傷事例が確認されたことから、国内においてもセアカゴケグモによる咬傷対策の必要性が明らかになった。その後、昆虫情報処理研究会による咬傷事例の収集が行われているものの、国内の咬傷事例の総数がどのくらいであるか不明な点も多い。そこで、今回、本研究班の中で医療機関を対象にしたアンケート調査を行い、その実態把握に努めた。

8. セアカゴケグモ咬傷患者数把握のための調査（詳細調査）

国内におけるセアカゴケグモ咬傷の詳細な臨床像は不明であり、その臨床像を明らかにするためにアンケート調査を施行した。

9. 行政への直接的貢献

平成 25 年度の反省から行政への貢献を積極的に行うことを目的とした。

B. 研究方法

1. ヤマカガシ抗毒素を用いた臨床研究

ヤマカガシ抗毒素を使用した臨床研究を行うための倫理委員会承認、保険の加入、臨床研究を開始した。これによりヤマカガシ抗毒素の配備施設が群馬県と熊本県の 2 施設から東京都、神奈川県、香川県、高知県の 4 医療機関を加えて、日本全体に数時間以内でヤマカガシ抗毒素を供給できる体制を整備した。また緊急性が極めて高いため、研究班内に 24 時間体制での連絡体制を整備した。

具体的には、主治医から蛇咬傷などで相

談をうけた日本蛇族研究所堺研究員がヤマカガシ咬傷と判断し、ヤマカガシ抗毒素の投与が必要と判断した場合には研究班代表者一二三に連絡する。その時点で患者の状態と地理的条件を考慮し、東京都、神奈川県、香川県、高知県の 4 医療機関に患者搬送が可能な場合には転院搬送する。不可能な場合や主治医が治療の継続を望む場合には、東京都、神奈川県、香川県、高知県の 4 医療機関が遠隔処方し、あるいは日本蛇族研究所（群馬）ないし化学及び血清療法研究所（以下化血研とする）（熊本）から病院に抗毒素を搬送する。主治医は、本臨床研究を説明し、抗毒素使用承諾書を取得後に患者に抗毒素を投与する。主治医は抗毒素使用登録書、治療報告書を一二三に送る。有害事象発生時には有害事象報告書を一二三まで送る。

臨床研究の開始にあたっては、抗毒素使用承諾書、抗毒素使用登録書、治療報告書、有害事象報告書の記載が必要である。後日、主治医は当研究班の研究協力者として参加する。

2. ヤマカガシ咬傷過去 40 年間(1973 年～2013 年)の臨床像の詳細調査とファクトシートの作成

日本蛇族研究所の記録を 1973 年 1 月 1 日から 2013 年 12 月 31 日までの 40 年間で後方視的に調査し、ヤマカガシ咬傷の臨床的特徴とその治療法について調査した。結果を基にファクトシートを作成した。

3. ニホンヤマカガシ毒とタイリクヤマカガシ（中国産）毒の血液凝固作用の比較、及びニホンヤマカガシ抗毒素による交差中和の検証

日本産ヤマカガシに対する抗毒素の製造

に際し、中国産タイリクヤマカガシの毒を代替りの抗原として使用できるかどうか検証するために、ニホンヤマカガシ毒の主な作用である血液凝固作用について比較を行った。さらにニホンヤマカガシと類似の血液凝固作用を持つオーストラリア産コブラ科のヘビであるタイパンとタイガースネークの抗毒素がヤマカガシ咬傷治療に用いることができるかを検証した。

4. セアカゴケグモ抗毒素の力価試験

セアカゴケグモ毒素のタンパク含有量を測定し、毒素の主成分である α -ラトロトキシンの割合と安定性について SDS-PAGE とウエスタンブロッティング法で確認した。次に、常法に従い、種々の毒素量をマウスに投与して、10日間生死を観察して LD₅₀ を算出した。さらに抗毒素の力価を測定した。

5. セアカゴケグモ抗毒素の製造

毒液抽出:2014年6月～12月にかけて、大阪府内480箇所、西宮市近郊数箇所、雌グモの捕獲を行った。捕獲に際しては、できるだけ殺虫剤を使用せずにピンセットを使用し、あるいは手袋をした手指で生け捕りし、-20℃冷凍庫にて冷却殺虫した。

ウサギを用いた試験免疫の検討:ウサギを用いて試験免疫の検討を行った。

馬免疫計画の立案:馬免疫条件の設定、毒の入手、アルミニウムアジュバントのセアカゴケグモ毒素吸着性能評価、ウマの購入を行った。

6. セアカゴケグモ抗毒素を用いた臨床研究

まずセアカゴケグモ抗毒素を使用した臨床研究を行うための倫理委員会承認、保険の加入、臨床研究を開始する体制を整備した。セアカゴケグモ抗毒素のオーストラリアからの輸入が制限されたために、輸入可能な抗毒素を研究班で個人輸入し、臨床研

究を開始した。

7. セアカゴケグモ咬傷患者数把握のための調査（基本調査）

対象医療機関は感染症発生動向調査事業の470基幹定点医療機関（平成25年10月現在）を対象に実施した。なお、基幹定点医療機関は患者を300人以上収容する施設を有し、内科及び外科を標榜している病院で、2次医療圏域毎に1か所以上とされており、各地方自治体により定められている。平成26年1月に配布し、回収は同3月までとした。

8. セアカゴケグモ咬傷患者数把握のための調査（詳細調査）

2009年1月1日から2013年12月31日までの5年間を対象期間として、セアカゴケグモ咬傷アンケート基本調査でセアカゴケグモ咬傷事例ありと報告していた4施設とセアカゴケグモ抗毒素をもともと保管していた7施設を対象として詳細アンケート調査を施行した。

9. 行政への直接的貢献

行政への直接的な貢献をするために、積極的にセアカゴケグモ咬傷の勉強会に参加し、情報提供・意見交換した。

C. 研究結果

1. ヤマカガシ抗毒素を用いた臨床研究

平成25年10月1日より臨床研究を開始した。平成26年度の該当症例は5症例であった。（5月3日、千葉、男性。8月27日、山口、19歳男性。9月7日、奈良、15歳男性。9月28日、岡山、11歳女児。10月3日、群馬、9歳男児。）すべて無毒咬傷と判断され、抗毒素を投与した症例は認めなかった。

2. ヤマカガシ咬傷過去 40 年間(1973 年～2013 年)の臨床像の詳細調査とファクトシートの作成

1973 年から 2013 年において、34 症例のヤマカガシ咬傷が特定された(33 名が男性、年齢の中央値: 37.5 歳) 来院時のフィブリノーゲン値、血小板数、FDP 値の中央値はそれぞれ 35 mg/dL, 107,000 /mm³, 200 µg/mL であった。急性期 DIC スコアは 5(中央値)点であった。抗毒素は 19 症例に投与され、咬傷を負ってから抗毒素投与までに要した時間の中央値は 32 時間であった。院内死亡率は 12% であった。抗毒素投与群は非投与群に比べて、死亡率(0% vs. 26.7%, P = 0.03)や透析を必要とする腎機能障害の発生率(5.3% vs. 40.0%, P = 0.03)が有意に低かった。この結果を基にファクトシートを作成した。

3. ニホンヤマカガシ毒とタイリクヤマカガシ(中国産)毒の血液凝固作用の比較、及びニホンヤマカガシ抗毒素による交差中和の検証

抽出したタイリクヤマカガシ毒もニホンヤマカガシ毒と同様に強い血液凝固活性を持つことがわかった。その活性比から求めた毒は 304mg/16 匹、1 匹平均 19mg であり、これは日本産ヤマカガシから抽出した毒量と比べても十分な収量であった。脱塩後、吸光度より求めたタンパク量をもとにして血液凝固活性を測定したところ、ニホンヤマカガシとほぼ同等の血液凝固活性を持つことが分かった。

さらに、このタイリクヤマカガシ毒に対するニホンヤマカガシ抗毒素の血液凝固活性の中和力価は、ニホンヤマカガシ毒に対する中和力価とほぼ同等であることが示された。HPLC の溶出パターンは少し違いがみられ、SDS-PAGE では高分子部分にパターンの違いがみられた。

タイパン及びタイガースネーク抗毒素による日本産ヤマカガシ毒の血液凝固作用に対する中和作用は認められたが、力価はかなり低かった。

4. ヤマカガシ抗毒素の力価試験

毒素の主成分である α-ラトロトキシンはどのロットでも良好の保存されており、室温または 4°C での長期間の保管にも安定であることが判明した。一般的な試験を準用して毒素の LD₅₀ を算定した所、平均 9.16899 µg であった。確立した力価試験に基づき有効期限が過ぎた抗毒素の力価を測定した所、両者とも有効期限を過ぎても表示力価を維持していることが確認された。

5. セアカゴケグモ抗毒素の製造

毒液抽出: 大阪ペストコントロール協会および西宮市環境衛生課の協力の下、大阪府内で 10,186 頭、西宮市近郊で 1,217 頭の合計 11,524 頭の雌グモが捕獲された。国立感染症研究所昆虫医科学部においてそのうちの 10,007 雌を解剖し、個別に摘出した毒腺から毒素を抽出、粗精製を行い 1 ロット化した。一部の毒素を用いてタンパク量を定量したところ、1.5–2.5 mg/ml であった。

ウサギを用いた試験免疫の検討: 3 種類の免疫方法を変えてウサギでのセアカゴケグモ毒素に対する抗体産生を中和試験の測定で実施したところ、フォルマリン不活化毒素とオイルアジュバントの組み合わせでの免疫が最も高い抗体価を得た。

馬免疫計画の立案: 毒素あるいはトキシイドにアジュバントとしてアルミニウムアジュバント又はオイルアジュバントを混合した 4 条件のウマ免疫計画を立案した。

6. セアカゴケグモ抗毒素を用いた臨床研究

まず 2014 年 8 月にセアカゴケグモ抗毒

素 10 アンプル(品質保証期限 2015 年 8 月)を入手した。緊急時に対応するために、行政に 24 時間体制で対応可能な研究班の連絡先を伝達し、セアカゴケグモ抗毒素を過去咬傷事例が報告されている地域と首都圏を中心に大阪府、福岡県、東京都、神奈川県、香川県に配備し、体制を整備した。

それに並行してセアカゴケグモ抗毒素の安定的な供給を行うために、国産化セアカゴケグモ抗毒素製造計画を立案し、製造を開始した。

さらに 2015 年 2 月にセアカゴケグモ抗毒素 15 アンプル(品質保証期限 2016 年 6 月 24 日)をオーストラリアより輸入した。

実際の咬傷事例については、9 月 18 日(歌山労災病院)、10 月 3 日(姫路赤十字)、10 月 4 日(大阪吹田市民病院)にそれぞれセアカゴケグモ咬傷患者を診察した医師より研究班に連絡があった。3 患者ともに抗毒素投与基準である全身症状を呈していたため、抗毒素の投与が検討されたが、保管場所が関西地区では大阪府立急性期総合医療センターのみであり、患者の転院搬送に時間を要することから、結果的に抗毒素投与は行われなかった。

7. セアカゴケグモ咬傷患者数把握のための調査(基本調査)

質問紙は 297 医療機関から回収され、回答割合は 63%(297/470)であった。都道府県別の回答割合は 33%から 100%まで開きがあった。種類を特定しないクモ咬傷に関しては、3 年間の診療医療機関数は 21 であり、患者数は 59 人であった。診療医療機関数、患者数とも年々増加しており、地域的にも広がってきていた。セアカゴケグモ咬傷に関しては、3 年間の診療医療機関数

は 4 であり、患者数は 14 人であった。診療医療機関数、患者数は 2013 年に増加していた。入院例は患者 14 人中 1 人だけであり、死亡例はいなかった。患者に対し抗毒素を使用した医療機関は無かった。

8. セアカゴケグモ咬傷患者数把握のための調査(詳細調査)

5 年間で 28 症例が特定された。大阪、奈良、福岡に咬傷事例は限局していた。セアカゴケグモ抗毒素は 6 症例に使用され、死亡症例は認めなかった。全身症状を呈した 18 症例と局所症状のみの 10 症例を年齢、性別、咬傷部位、血液所見で比較したが、明らかな差を認めなかった。セアカゴケグモ抗毒素を投与した 6 症例のうち、アナフィラキシー予防薬の全投与を受けていた 4 症例はすべて副反応を認めなかったが、残る 2 症例のうち 1 症例は顔面の発赤を認めた。また 6 症例のうち 4 症例について明らかな症状の改善を認めた。

9. 行政への直接的貢献

北九州市(7 月 25 日)、香川県(8 月 6 日)、大阪府(9 月 2 日)、福岡市(9 月 26 日)にセアカゴケグモ咬傷の勉強会に参加した。

D. 考 察

1. ヤマカガシ抗毒素を用いた臨床研究

臨床医におけるヤマカガシ咬傷の認識を高めるために、本臨床研究の啓発目的として、各種学会発表、誌上発表を積極的に行ったが、結果として抗毒素投与を必要とするヤマカガシ咬傷例認めなかった。

ヤマカガシ抗毒素の配備施設が群馬県と熊本県の 2 施設から東京都、神奈川県、香川県、高知県の 4 医療機関を加えて、日本

全体に数時間でヤマカガシ抗毒素を供給できる体制を整備した。また緊急性が極めて高いため、研究班内に 24 時間体制での連絡体制を整備し、万全の体制を構築した。

2. ヤマカガシ咬傷過去 40 年間(1973 年～2013 年)の臨床像の詳細調査とファクトシートの作成

ヤマカガシ咬傷は線溶亢進型 DIC を呈する致死性疾患であるが、抗毒素の投与により効果的に治療されていたことが確認された。ヤマカガシ咬傷と診断し、DIC を呈している場合には、抗毒素を速やかに投与する必要がある、原因不明の線溶亢進型 DIC を診た場合には、ヤマカガシ咬傷を原因のひとつに考えたほうがよいと臨床医に啓発していくこととした。

3. ニホンヤマカガシ毒とタイリクヤマカガシ（中国産）毒の血液凝固作用の比較、及びニホンヤマカガシ抗毒素による交差中和の検証

毒の作用、及び交差中和の結果から、日本産ヤマカガシの抗毒素を製造するにあたり、中国産タイリクヤマカガシの毒を代替りの抗原として使用することが可能であると考えられた。タイリクヤマカガシが 200 匹以上集められれば、ウマ 2 頭の免疫が可能であると考えられる。

ヤマカガシと類似の血液凝固作用（プロトロンビン活性化作用）をもつタイパンとタイガースネークの抗毒素は、ヤマカガシ抗毒素の代用品としては使用できないと考えられる。

4. ヤマカガシ抗毒素の力価試験

セアカゴケグモ抗毒素に対する力価試験を確立した。また、毒素は長期間安定して毒性を維持することが判明した。本研究で確立された力価試験は、再現性、反復性に優れており、セアカゴケグモ抗毒素の品質試験として有用であると考えられる。

ゴケグモ類は様々な種類があるが、ほ乳類に対する毒素の主成分は α LT で、その構造は類似している。また、ゴケグモ抗毒素は他種の毒素にも中和力価を保持するといわれている。我が国には既にハイイロゴケグモの生息が確認されており、国際的な物流の増加に伴って、他のゴケグモ類の侵入が危惧される。今後、本研究で作成される抗毒素が他のゴケグモ毒素に対しても有効性を持つかどうかを確認することが、今後の課題と思われる。

5. セアカゴケグモ抗毒素の製造

毒液抽出：通常は、殺虫目的で捕獲するため殺虫剤を使用する人が多い。しかし、タンパク毒を抽出するためには、殺虫剤に含まれる化学物質の混入をできるだけ排除する必要があると考えた。セアカゴケグモの潜み場所にはピンセットや手指が届かない場所も多いことから、本法での捕獲は当初は非常に困難であった。

ウサギを用いた試験免疫の検討：化血研で実施してきた抗毒素製造方法に基づいた方法でウサギでの一定の免疫効果を得られたことから、ウマでの免疫も同様の方法が実施可能背あることが示唆された。

馬免疫計画の立案：各ウマ免疫条件は下記(1)～(4)に示す根拠に基づき設定した。

(1)毒素免疫法

公知文献における免疫法を引用し、国立

感染症研究所の基礎試験結果を加味し、追加免疫回数は4回とした。

なお、文献ではアジュバントとしてリン酸アルミニウムを使用していたが、事前検討においてリン酸アルミニウムよりも高い毒素吸着性能を示した水酸化アルミニウムを使用することとした。

(2)トキソイド免疫法（定量追加免疫）

化血研における従来の抗毒素製造条件を参考として、基礎免疫回数はトキソイドで定量3回、免疫量は3mgと一定量に設定した。国立感染症研究所の基礎試験の結果を基に、トキソイドによる定量追加免疫を検討することとした。

(3)トキソイド免疫法（増量追加免疫）

化血研における抗毒素製造では、追加免疫での免疫量を回数毎に増量している。国立感染症研究所の基礎試験の結果、及び化血研製造実績に基づき、トキソイドによる増量追加免疫を検討することとした。

(4)トキソイド・毒素混合免疫法

化血研における蛇毒の抗毒素製造では、追加免疫に毒素を使用しており、免疫量を回数毎に増量している。この化血研実績に基づき、毒素による増量追加免疫を検討することとした。

6. セアカゴケグモ抗毒素を用いた臨床研究

実際のセアカゴケグモ咬傷事例が発生し、全身症状を呈していたために抗毒素投与が検討された。しかし、現状では非常に限られた医療機関にしか抗毒素が配備でき

ておらず、実際の使用においては困難な状況である。

国産化抗毒素が完成した後は、効果的な抗毒素投与が行えるようにするために、保管医療機関を大幅に増加することを検討している。

7. セアカゴケグモ咬傷患者数把握のための調査（基本調査）

アンケート調査を実施した3年間において、セアカゴケグモ患者の発生は増加しており、かつ地理的に広がってきていた。セアカゴケグモは1995年に大阪で初めて確認されて以降、発見地域が拡大しており、これは今回判明した患者発生の拡大傾向と一致している。今回調査したのは都道府県が定める基幹定点医療機関を対象にしており、必ずしも国内発生患者の総数を示していない。実際、大阪府が収集している咬傷事例の症例は今回の調査には含まれていなかった。ただし、質問紙に関しては各地域から万遍なく回答が得られており、かつ受け入れられる回収率で検出されたことから、サンプリング上のバイアスは少なく、地理的な広がりや患者の増加傾向は国内の現状を正しく反映していると考えられた。

8. セアカゴケグモ咬傷患者数把握のための調査（詳細調査）

大阪、奈良、福岡でセアカゴケグモ咬傷患者を認め、福岡、関西地区に限局していた。またセアカゴケグモ抗毒素は6症例に投与されていたが、患者の希望によって2症例は投与されており、明確な投与基準を定める必要がある。またその効果については、全身症状を認めた18症例のうち、抗毒素を投与されたのは4症例であり、効果の

評価にはさらなる調査が必要である。

9. 行政への直接的貢献

直接行政の関係者と意見交換することによって、顔の見える関係になったことにより、今後のセアカゴケグモ咬傷患者発生時の対応がより円滑に測れることが期待された。

E. 結論

1. ヤマカガシ抗毒素を用いた臨床研究

平成 25 年 10 月 1 日より臨床研究を開始した。抗毒素投与症例数が 0 であったため、まず第一例目を慎重に行う予定である。年間の目標数は 5 症例（抗毒素投与症例）である。

2. ヤマカガシ咬傷過去 40 年間(1973 年～2013 年)の臨床像の詳細調査とファクトシートの作成

ヤマカガシ咬傷に対してヤマカガシ抗毒素は有用である。また、ファクトシートを作成した。

3. ニホンヤマカガシ毒とタイリクヤマカガシ（中国産）毒の血液凝固作用の比較、及びニホンヤマカガシ抗毒素による交差中和の検証

新たに日本産ヤマカガシの抗毒素を製造するために中国産タイリクヤマカガシの毒を用いても、日本産ヤマカガシ咬傷治療に十分有効な抗毒素ができる可能性が示された。

4. ヤマカガシ抗毒素の力価試験

セアカゴケグモ毒素抽出物はタンパク質量を基準とした場合、品質上均一であり、長期間毒性を保持することが判明した。

セアカゴケグモ毒素の毒性試験の結果、4 週齢 ddY メスマウスの LD₅₀ は 9.16899 µg であった。

セアカゴケグモ抗毒素の力価試験を確立し、既存抗毒素の力価を確認した。

5. セアカゴケグモ抗毒素の製造

毒液抽出：大阪府内で 10,186 頭、西宮市近郊で 1,217 頭の合計 11,402 頭の雌グモを捕獲した。そのうち、10,307 の雌を解剖し、個別に摘出した毒腺から毒液を抽出した。その後、毒素の粗精製を行い、1 ロット化した毒素粗精製物のタンパク量は約 236 mg と算出された。

ウサギを用いた試験免疫の検討：セアカゴケグモ抗毒素の試験製造の目的でウサギに 3 種類の免疫方法で免疫した結果、フォルマリン不活化毒素とオイルアジュバントの組み合わせでの免疫が最も良い成績であった。

馬免疫計画の立案：セアカゴケグモ免疫用抗原のウマ免疫計画を作成したことにより、ウマ免疫スケジュール、及び抗体価測定スケジュールが概ね確定した。

6. セアカゴケグモ抗毒素を用いた臨床研究

セアカゴケグモ抗毒素をオーストラリアから輸入した。3 例のセアカゴケグモ咬傷に対してセアカゴケグモ抗毒素の投与が検討されたが、結果として投与症例は認めなかった。

7. セアカゴケグモ咬傷患者数把握のための調査（基本調査）

セアカゴケグモ咬傷は重症化することは少ないが、国内で地理的に広がってきてい

る。今後も患者は増えることが予想され、国内で抗毒素の備蓄を含む診療体制を整えておく必要がある。

8. セアカゴケグモ咬傷患者数把握のための調査（詳細調査）

セアカゴケグモ抗毒素は前投薬によって安全に投与される。

セアカゴケグモ抗毒素の効果を評価するにはさらなる調査が必要である。

9. 行政への直接的貢献

セアカゴケグモ勉強会に4回参加して情報交換した。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Hifumi T, Sakai A, Yamamoto A, Murakawa M, Ato M, Shibayama K, Ginnaga A, Kato H, Koido Y, Inoue J, Abe Y, Kawakita K, Hagiike M, Kuroda Y: Clinical characteristics of yamakagashi(Rhabdophis tigrinus) bites: a national survey in Japan, 2000–2013. *Journal of Intensive Care* 2014, 2:19.

(2) Hifumi T, Sakai A, Yamamoto A, Murakawa M, Ato A, Shibayama K, Kato H, Koido Y, Inoue J, Abe Y, Kawakita K, Hagiike M, Ginnaga A, Kuroda Y: Effect of antivenom therapy of Rhabdophis tigrinus (Yamakagashi snake) bites. *Journal of Intensive Care* 2014, 2:44.

(3) Anjana S, Hifumi T, Sakai A,

Yamamoto A, Murakawa M, Ato M, Shibayama K, Ginnaga A, Kato K, Koido Y, Inoue J, Abe Y, Kawakita K, Hagiike M, Kuroda Y. Rhabdophis tigrinus is not a pit viper but its bites result in venom-induced consumptive coagulopathy similar to many viper bites. *Journal of Intensive Care* 2014, 2:43.

(4) Hifumi T, Fujimi S, Yamagishi T, Arai S, Sawabe K, Yamamoto A, Ato M, Shibayama K, Ginnaga A, Kiri N, Kato H, Koido Y, Inoue J, Kishikawa M, Abe Y, Kawakita K, Hagiike M, Kuroda Y: Clinical characteristics of redback spider bites. *Journal of Intensive Care* 2014, 2:62.

(5) Hifumi T, Murakawa M, Sakai A, Ginnaga A, Yamamoto A, Kato H, Koido Y, Kawakita K, Hagiike M, Kuroda Y: A case of potentially fatal coagulopathy secondary to yamakagashi (Rhabdophis tigrinus) bites that completely recovered with antivenom administration. *Acute Med Surg, in press.*

(6) Hifumi T, Taki H, Yamamoto A, Ato M, Koido Y, Kuroda Y: Update of antivenom supply for redback spider bites in Japan. *Journal of Intensive Care* 2015, 3:7

2. 学会発表

1) Hifumi T, Yamamoto A, Sakai A, Kawakita K, Kuroda Y, Koido Y. Snakebite dose cause disseminated intravascular coagulation 44th SCCM Critical Care Congress 2015, 1, 18 Phoenix, USA

2)一三三亭、黒田泰弘 ヤマカガシ咬傷の臨床的特徴：2001年から2013年までの全国調査結果 日本麻酔科学会第61回学術集会。横浜 2014年5月16日

3)一三三亭、切詰和孝、原田彰雄、濱谷英幸、篠原奈都代、高野耕志郎、阿部祐子、小川大輔、河北賢哉、萩池昌信、黒田泰弘 ヤマカガシ咬傷 第30回日本救急医学会中国四国地方会 高知 2014年5月24日

4)一三三亭、山本明彦、堺淳、小井土雄一、河北賢哉、萩池昌信、黒田泰弘 ヤマカガシ咬傷(2000-2013) 第17回日本臨床救急医学会学術集会 自治医大 2014年5月31日

5)一三三亭、堺淳、山本明彦、阿戸学、阿部祐子、河北賢哉、小井土雄一、萩池昌信、黒田泰弘 ヤマカガシ咬傷の治療の検討(1973年—2013年までの検討) 第36回日本中毒学会 2014年7月25日 東京

6)一三三亭、堺淳、山本明彦、濱谷英幸、篠原奈都代、高野耕志郎、阿部祐子、小川大輔、河北賢哉、萩池昌信、黒田泰弘 ヤマカガシ咬傷の治療における抗毒素の有効性(1973-2013) 第42回日本救急医学会総会・学術集会 福岡 2014年10月28日

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
なし