

II. 分担研究報告書

分担研究報告書

セアカゴケグモ抗毒素の製造（馬免疫計画の立案）

分担研究者 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
協力研究者 堀田晶、森繁美、持舘景太、竹森隆弘、宮津嘉信 同上

研究要旨 セアカゴケグモ抗毒素の製造にあたり、ウマ4頭を対象とした免疫計画を作成した。公知文献情報を基に国立感染症研究所において実施された基礎試験結果、及び化血研における抗毒素製剤製造実績を参考にして、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。

A. 研究目的

国内におけるセアカゴケグモの咬傷例は多くないため、国内での抗毒素製剤の開発は難しい。国内では、抗毒素を投与しないとまれではあるが重症化又は死亡する危険性があることから、海外より抗毒素を個人輸入して時々使用されている状況である。

H26年度は、海外からのセアカゴケグモ抗毒素の個人輸入が困難な状況であったことから、本研究班において日本国内でセアカゴケグモを採取し、抽出した毒素よりウマ抗毒素を試験製造し備蓄する計画が立案された。

この計画の中で化血研では、セアカゴケグモ毒素あるいはそのトキシイドを免疫用抗原としたウマ免疫について、免疫用抗原の調製条件及びウマ免疫方法を検討し、抗体産生性を比較すると共にセアカゴケグモウマ抗毒素を製造する。

B. 研究方法

(1)ウマ免疫条件の設定

これまでに日本国内でセアカゴケグモ抗原のウマ免疫の経験も報告も全くなかった。、Wiener らによる1961年の実験（Wiener, S., 'Red Back Spider Antivenene', The Medical Journal of Australia, vol. 2, 1961, pp. 41-44.）において、リン酸アルミニウムを混合した毒素を用いたウマ免疫によって680 U/mLの抗体価上昇が確認されている。

本研究では、国立感染症研究所においてセアカゴケグモ毒素及びトキシイドを用いてウサギに免疫し、得られた血清を用いた中和抗体価試験（基礎試験）を実施された。その結果、リン酸アルミニウム加毒素での

抗体価上昇は確認できなかったものの、オイルアジュバント（フロイントコンプリートアジュバント）を混合したトキシイドを用いた免疫において最も高い抗体価上昇が確認された。（なお、ウサギ免疫及び中和抗体価試験成績は他の分担研究者報告書を参照。）

本分担研究ではウマ免疫における抗体産生を効果的かつ効率的に行うことを目的として、上記の国立感染症研究所の基礎試験結果及び従来の化血研抗毒素製剤製造条件に基づき、4頭のウマに対して異なる免疫条件を設定した。

(2)セアカゴケグモ毒素の入手

セアカゴケグモ毒素約235 mgを、国立感染症研究所から平成27年1月16日に受領した。

受領した毒素の濃度は1.392 mg/mL、液量170 mL、総毒素量236 mgであった。毒素は受領後、当日中に-80°Cフリーザーに保管した。

(3)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

アルミニウムアジュバントについては、リン酸アルミニウムの他に化血研DPT製剤に使用している水酸化アルミニウムの使用可否を判断するため、セアカゴケグモ毒素に対する両アルミニウム塩の吸着率を評価した。

毒素に対する吸着率は、セアカゴケグモ毒素を10倍希釈した溶液（0.14 mg/mL）にアルミニウム塩を最終濃度1.5 mg/mL、及びpH5.0もしくはpH6.6となるように加え、懸濁後に遠心処理し（10,000×g, 5 min）、遠心上清及び懸濁前希釈液のたん白質含量（A_{280nm}）を比較することにより評価した。

(4)ウマの購入

セアカゴケグモ抗毒素の製造にあたり、ウマを購入した。ウマの健康状態は、体温、歩行状態、食欲、動作、飲水、及び排泄物の観察の結果、良好であることを確認した。

C. 結果

セアカゴケグモ毒素に対するアルミニウム塩の吸着率は、pH5.0では水酸化アルミニウムが95.9%及びリン酸アルミニウムが69.3%であり、pH6.6では水酸化アルミニウムが96.8%及びリン酸アルミニウムが80.3%であり、何れのpH条件においても水酸化ナトリウムがより高値であった(表1)。

また、セアカゴケグモ免疫用抗原のウマ免疫計画を表2のように立案した。

D. 考察

セアカゴケグモ毒素はタンパク質性毒素であることから、保存については以下の内容に留意する必要がある。

- ▶ 冷蔵保存は温度変化の影響を受けやすく、失活に繋がるリスクがある
- ▶ 低濃度で保存すると失活しやすいので、高濃度で保存することが望ましい
- ▶ グリセリンを加えずに凍結融解を繰り返すことは失活に繋がるリスクがある

グリセリン溶液下における凍結保存は長期安定であることが期待されるが、保存に関する予備実験が必要であり、適切ではないと考える。

従って、セアカゴケグモ毒素の保存条件は、安定的な凍結状態を保持できると考えられる-80℃凍結を選択した。なお、凍結融解の繰返しを防ぐため、毒素を受領した濃度のまま小分けし、シングルユースできる状態で保存した。

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。

なお、基礎免疫終了から追加免疫開始までの休止期間はWernerらの実験条件に基づき、9週間とした。

また、オイルアジュバントは化血研での抗毒素製剤製造において長期実績のあるフロイントインコンプリートアジュバント、アルミニウムアジュバントは吸着率が高値を示した水酸化アルミニウムを、それぞれ使用した。

(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)トキシイド免疫法(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シイドで定量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、トキシイドによる定量追加免疫を検討することとした。

(3)トキシイド免疫法(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、トキシイドによる増量追加免疫を検討することとした。

(4)トキシイド・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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. セアカゴケグモ毒素のアルミニウム塩吸着率評価

吸着条件	アルミニウムの種類	上清 A _{280nm}	上清液量 (mL)	吸着率(%)
pH5.0	水酸化アルミニウム	0.008	15.5	95.9
	リン酸アルミニウム	0.074	12.5	69.3
	コントロール	0.231	—	—
pH6.6	水酸化アルミニウム	0.006	15.0	96.8
	リン酸アルミニウム	0.048	12.2	80.3
	コントロール	0.231	—	—

吸着条件：毒素+アルミニウム塩混合液のpHを5.0（混合時）あるいは6.6（免疫時）の2条件に調整した。

表2. セアカゴケグモ免疫用抗原のウマ免疫計画

No.1 毒素免疫法

免疫回数	基礎免疫（毒素）						追加免疫（毒素）			
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4
免疫量 (mg)	0.01	0.05	0.1	0.3	0.8	2	1	2	3	6
アジュバント	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI	AI

No.2 トキソイド免疫法（定量追加免疫）

免疫回数	基礎免疫（トキソイド）			追加免疫（トキソイド）					
	1	2	3	1	2	3	4	5	6
免疫量 (mg)	3	3	3	3	3	3	3	3	3
アジュバント	FIA	FIA	FIA	FIA	FIA	FIA	FIA	FIA	FIA

No.3 トキソイド免疫法（増量追加免疫）

免疫回数	基礎免疫（トキソイド）			追加免疫（トキソイド）					
	1	2	3	1	2	3	4	5	6
免疫量 (mg)	3	3	3	1	2	3	6	12	24
アジュバント	FIA	FIA	FIA	FIA	FIA	FIA	FIA	FIA	—

No.4 トキソイド・毒素混合免疫法

免疫回数	基礎免疫（トキソイド）			追加免疫（毒素）					
	1	2	3	1	2	3	4	5	6
免疫量 (mg)	3	3	3	1	2	3	6	12	24
アジュバント	FIA	FIA	FIA	FIA	FIA	FIA	FIA	FIA	—

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

分担研究者 堺 淳 一般財団法人日本蛇族学術研究所 主任研究員
協力研究者 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

研究要旨

1999年に試作したヤマカガシ抗毒素は製造後15年が経過したが、昨年の検定では十分な中和力価があることがわかった。しかし、今後新たに抗毒素を製造する必要性が生じる可能性がある。ヤマカガシからの毒の採取は、ヘビから摘出した毒腺から抽出しなければならぬが、現在では国内のヤマカガシがかなり減少しており、免疫するための十分量のヘビ毒の採取が不可能である。そのためニホンヤマカガシと最も近縁のタイリクヤマカガシ（中国産）の毒で抗毒素を製造し、それがニホンヤマカガシの咬傷に使用できるかを検証するために、タイリクヤマカガシ毒の作用及び成分の比較を行った。

A. 研究目的

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を検証するために、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。

B. 研究方法

中国 Shanghai Serum Bio-Tech において、摘出したタイリクヤマカガシの毒腺から毒を抽出し、血液凝固活性を測定した。また、ニホンヤマカガシ抗毒素によるタイリクヤマカガシ毒の血液凝固作用に対する中和力価を測定した。

また、オーストラリアより輸入したタイパンとタイガースネークの抗毒素がニホンヤマカガシ毒の血液凝固作用を抑えるかどうかを調べた。

(倫理面の配慮)

C. 結果

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。

D. 考察

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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

分担研究報告書

セアカゴケグモ抗毒素血清作成のための毒液抽出

分担研究者 澤邊京子 昆虫医科学部・部長
協力研究者 向井俊彦・綿貫實 社法・大阪ペストコントロール協会
大石浩二・米正静男・平良常弘 西宮市環境衛生課
前川芳秀・小川浩平・伊澤晴彦・江尻寛子・糸川健太郎・津田良夫・
小林睦生 昆虫医科学部

研究要旨

セアカゴケグモは、1995年9月に大阪府高石市、次いで三重県四日市市の埋立地で初めて発見され、国内に侵入したことが報告された。その後、本種は国内での分布域を拡大させ、2014年までに国内37都府県でその定着が確認されている。セアカゴケグモの咬症例はこれまで84例（2014年は7例）が公表されているが、そのうち抗毒素血清を使用した例は6例であった。抗毒素血清は従来よりオーストラリアから輸入していたが、その輸出も限定的となったことで、国内に存在する抗毒素血清のほとんどがH26年度内に失効することが判明した。H26年度、国内に生息するセアカゴケグモを使用して独自にウマ抗毒素を試験製造し、備蓄する計画が立案された。

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。最終的に1ロット化し、タンパク量約236 mgと推定された毒素粗精製物を化学及血清療法研究所に発送した。次にウマ免疫用として使用される予定である。

A. 研究目的

セアカゴケグモは、1995年9月に大阪府高石市、次いで三重県四日市市で発見され、その後も国内での分布域を拡大させている。2014年には新たに7都県（愛媛、石川、福井、埼玉、東京、山梨、栃木）で初めて確認され、岩手県以南の合計37都府県に定着していることが明らかになった（昆虫情報処理研究会HP）（図1）。また、中国自動車道の広島県下のサービスエリア内で大量に発見されたことも大きく報道され、生息数の増加も危惧されている。

セアカゴケグモ咬症例は、1996年以降84例（2014年は7例）が公表されているが、そのうち抗毒素血清を使用した例は6例であった（図2）。セアカゴケグモは原産地のオーストラリアでは有毒種として知られ、治療用の抗毒素血清も使用されていることから、これまでオーストラリア産の抗毒素血清を輸入し使用してきた。しかし近年、オーストラリアからの輸出も限定的となったことから、国内に存在する抗毒素のほとんどがH26年度内に失効することが明らかになった。

そこで H26 年度、国内に生息するセアカゴケグモを使用して独自にウマ抗毒素を試験製造し、備蓄する計画が立案された。昆虫医科学部は、セアカゴケグモの捕獲と、毒腺の摘出、毒素の粗精製を担当した。

B. 研究方法

1. セアカゴケグモの捕獲

国内でもセアカゴケグモの生息数が多く、分布域も広いと思われる大阪府と兵庫県を候補地に選定した。両府県ともに、1995 年のセアカゴケグモ初発時から積極的に対策を行ってきており、捕獲の経験豊富な人材が招集できる面でも有望であった。

2014 年 6 月～12 月にかけて、大阪府内 480 箇所、西宮市近郊数箇所で、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°C 冷凍庫にて冷却殺虫した。冷凍庫に保管されたセアカゴケグモは、数回に分けて国立感染症研究所昆虫医科学部に冷凍輸送された。輸送途中の検体の融解を防ぐためにドライアイスを使用し、冷凍状態を保つことに留意した。

2. セアカゴケグモ毒腺の摘出と毒素の中出・粗精製

毒腺は厚い筋肉層に被われているため、牙を丁寧に掴み胴体から引き出し、冷却した生理食塩水の入ったホールグラスに移した(図 3)。100 対の毒腺を 1 ml の生理食塩水(大塚製薬)の入ったチューブ(2 ml タンパク吸着制御凍結保存チューブ、アシスト)に集め、 -80°C 冷凍庫で保管した。

すべての毒腺を摘出し、保管した後、各チューブに直径 4 mm のジルコニアビーズを 3 個入れ、TissueLyser II(QIAGEN)を用いて 25.0 1/S で 30 秒間破碎した。破碎した毒腺を入れたチューブは 10,000 rpm で 3 分間遠心した後、上清を 50 ml チューブ(プロテオセーブ SS 遠心管、住友ベークライト)

に回収した。さらに、沈渣に 1 ml の冷却した生理食塩水を加え、再度 25.0 1/S で 30 秒間破碎し、14,000 rpm で 15 分間遠心した。同様に上清を回収し、50 ml チューブに移した。回収するチューブは水中に置き、温度の上昇によるタンパク分解酵素の活性をできるだけ抑えることに留意した。

C. 研究結果

1. セアカゴケグモの捕獲

大阪府でのセアカゴケグモの捕獲に際して、大阪府環境衛生課に情報提供を依頼し、捕獲の許可を得た。大阪府、大阪市、堺市、豊中市等の行政の協力の下に大阪ペストコントロール協会員延べ 410 人が出動し、6 月下旬より合計 480 箇所で捕獲を行った。6 月～7 月中旬は台風等の影響もあり、実際に捕獲されるようになったのは 7 月下旬からであった。12 月上旬までに合計 10,186 頭が捕獲された。各月の捕獲数は以下のとおりである。

2014 年 7 月：	528 頭
8 月：	1,356 頭
9 月：	2,595 頭
10 月：	2,280 頭
11 月：	2,144 頭
12 月：	1,283 頭

西宮市においても同様に 6 月から捕獲を開始し、12 月まで継続した。西宮市近郊では合計 1,217 頭の雌グモが捕獲され、大阪府内で捕獲されたセアカゴケグモと合計して 11,524 頭になった。

捕獲の様子は、大阪ペストコントロール協会パンフレットで紹介された(別添)。

2. セアカゴケグモの毒腺摘出と毒素の粗精製

捕獲されたセアカゴケグモ 11,524 頭のうち 10,007 頭の雌を实体顕微鏡下で解剖し、毒腺を摘出した。約 100 本のチューブに分けて冷凍保存された毒腺からランダムに数本抜き取り、1 ロット化に先んじて毒素の

抽出と粗精製を行った。それらのタンパク量を定量したところ、1.5–2.5 mg/ml であることが分かった（国立感染症研究所免疫部より）。これより、最終的に1ロット化した毒素粗精製物のタンパク量が約 236 mg であると算出された。総量 170 ml の毒素粗生成物を1月中旬に化学及血清療法研究所に冷蔵発送した。そこでウマ免疫用として使用される予定である。

本作業は、昆虫医科学部の職員と大学院生を含む合計9名、外部協力者10名で遂行された。また、100頭（100対）のセアカゴケグモから毒腺を摘出するために、1人当たり1.5～2時間を要した。

D. 考察

国内でのセアカゴケグモ咬症例84例のうち、これまでに抗毒素血清を使用した例は6例と決して多くはない。一般的に、ゴケグモに咬まれた部位の皮膚の反応は特別強くなく、紅斑が生じない場合もあり、刺し口が1～2カ所認められる程度である。しかし、刺咬部以外での疼痛、悪心、嘔吐、異常な発汗、倦怠、感覚異常、発熱など多彩な症状も認められており、オーストラリアでは抗毒血清が市販される以前は死亡例も多数報告されていた。このようなことから、国内でも全身症状を起こす可能性のある咬症患者への投与が検討され、実際に処方されている。今後も血清の使用が予想されるため、国産のセアカゴケグモ抗毒素の試験製造と備蓄が計画されたことは妥当な選択である。

セアカゴケグモの捕獲に際しては、殺虫剤を使用せずに生け捕りし、冷凍殺虫する方法を提案した。通常は、殺虫目的で捕獲するため殺虫剤を使用するが多い。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。

また、捕虫瓶にセアカゴケグモを多数入れた場合は、共食いや毒液を吐き出す等、その後の作業に支障をきたすことが予想されたため、最寄りの事務所までの一時保管方法にも注意を払った。昆虫医科学部へのセアカゴケグモの輸送に際しては、輸送中の検体の融解を防ぐことが最も注意すべき事項であった。

セアカゴケグモ毒素の主成分である α -latrotoxinは、タンパク分解酵素によって失活することが知られている。そこで、当初は、毒腺摘出以降の作業にはTris-HClバッファーや酵素阻害剤の添加も検討したが、最終的にウマへの免疫を考慮し、生理食塩水で抽出することに決定した。そのため、室温での作業はできるだけ短時間にし、使用する生理食塩水や保存チューブは常に氷中に置くことを心がけた。幸い、ランダムに抜き出した保存チューブ内の毒素のタンパク量は1.5–2.5 mg/mlと算出され、分子量約130 kDの α -latrotoxinが分解されたことを示す電気泳動像も確認されなかったことから（前出、免疫部より）、毒性はある程度保持されていると推察された。

1ロット化に際しては、凍結・融解を繰り返さないこと、低温下での作業を行うことが重要であるため、作業は一日で終了させ、翌日には冷蔵状態のまま、化学及血清療法研究所に向けて発送した。

謝辞：セアカゴケグモ毒腺の摘出に際し、皆川ごみ（長崎大学熱帯医学研究所）、佐藤智美・益子玲於奈・山本恭平（明治大学農学部）各位からも多大なご協力をいただいた。ここに記して深謝する。

E. 結語

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。

次のステップとして、本品を化学及血清療法研究所においてウマへの免疫に使用されることになる。

F. 健康危機情報

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

なし

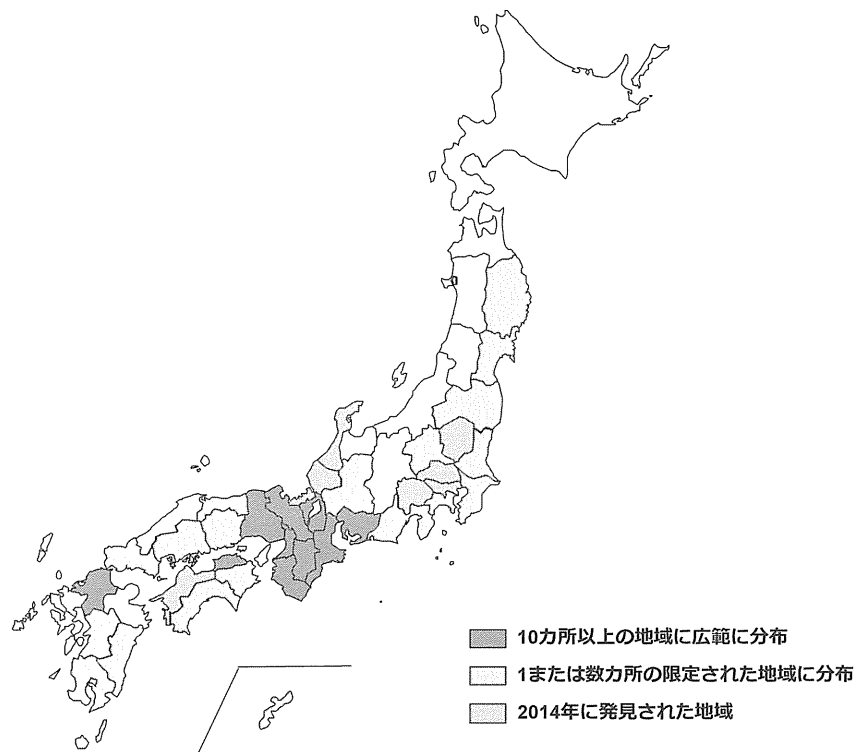


図1 セアカゴケグモの国内分布（～2014年）

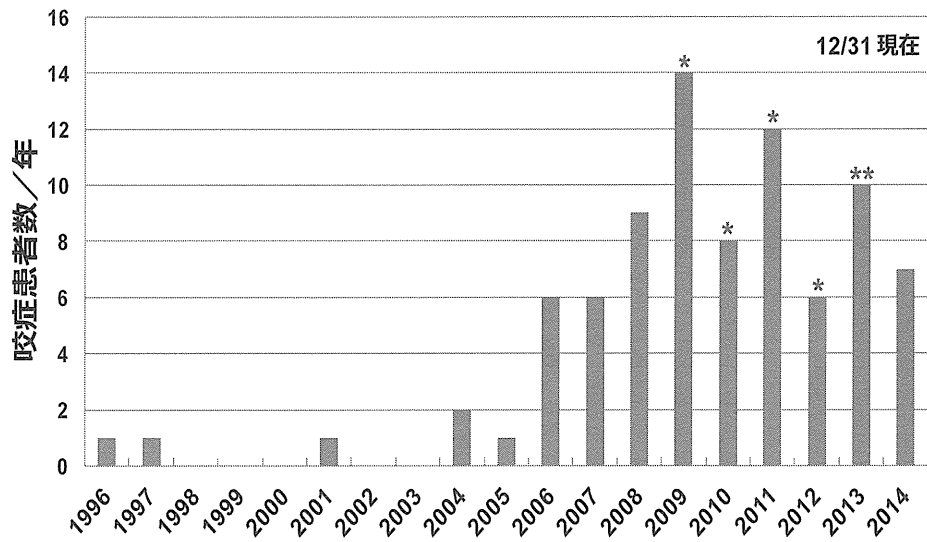


図2 セアカゴケグモ咬症患者の年別発生数
 (図中の*印は抗毒素血清を使用した症例数)

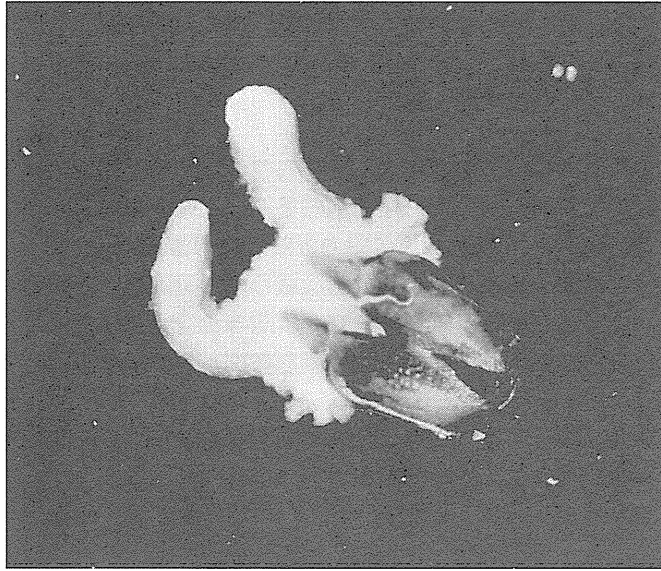


図3 セアカゴケグモの毒腺と牙



社団法人大阪府ベストコントロール協会

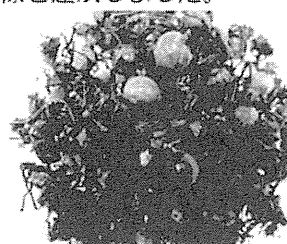
国産血清用セアカゴケグモ1万頭捕獲！



国立感染症研究所が国内で初めてセアカゴケグモの抗毒血清を製造することになり、大阪府で最初に発見され棲息数も多いことで、国立感染症研究所より当協会にセアカゴケグモ1万頭捕獲の協力依頼がありました。

この血清製造事業は国産初の画期的な取り組みであり、大阪府環境衛生課に情報提供のご協力を受け、当協会の創立50周年の記念事業としてセアカゴケグモ1万頭捕獲活動を展開し、多くの協会員が参加し捕獲目標を達成しました。

委託先	国立感染症研究所昆虫医科学部
採取期間	平成26年6月～11月
採取頭数	10,186頭
	出動480箇所、延べ410人
採取地域	公園・学校・住宅地の側溝等

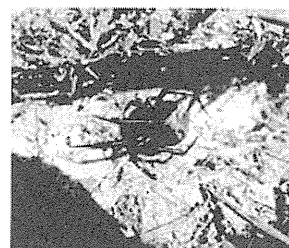


500頭の塊

捕獲活動

平成26年7月より、大阪府・大阪市・堺市・豊中市等行政の協力のもとにセアカゴケグモ1万頭捕獲活動を開始しましたが、台風8号の上陸など天候不順に悩まされ、本格的な捕獲活動は7月末からでした。

公的地域での捕獲活動には行政の承認・地域住民への周知が必要であり、行政訪問・説明会開催・パンフレット配布等を実施。準備したものは、薬剤(水性)、冷凍庫、発泡スチロール、手袋、身分証明書等です。



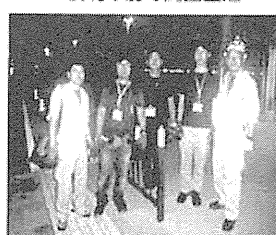
はち切れそうなお嬢

活動状況

炎天下、側溝の捕獲作業



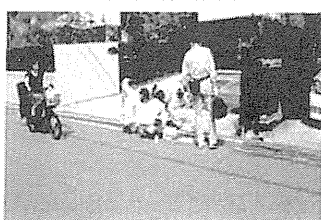
夜明け前の関西空港



採取したセアカを集める会員



住宅街の採取作業



2人1組で捕獲作業



セアカゴケグモ咬傷患者発生状況の把握

研究分担者 新井 智 国立感染症研究所感染症疫学センター

研究協力者 山岸拓也、池山優、青木啓太、大石和徳 同上

要約

セアカゴケグモは平成7年に国内で生息が、そして平成9年に国内初の咬傷事例が確認された。その後散発的に咬傷事例が報告されているが、その実態は不明である。そこで国内セアカゴケグモ咬傷事例について、医療機関へのアンケート調査による実態調査を行った。感染症発生動向調査の基幹定点医療機関470か所を対象に平成26年2月に実施し、279通の回答があった（回答割合63%）。セアカゴケグモ咬傷は4府県（山梨県、大阪府、奈良県、宮崎県）の4医療機関から14人の患者が報告され、地域、患者数ともに増加してきていた。入院患者は1名で、死亡者は確認されなかった。また、抗毒素使用者も確認されなかった。セアカゴケグモが確認される地域は拡大傾向にあり、今後患者数の増加が懸念される。抗毒素の備蓄及び国内の発生状況や治療に関して、継続的に報収集及び還元をしていく必要がある。

A 目的

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¹、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。

B 研究方法

アンケートを実施する前に、過去にセアカゴケグモ咬傷事例に遭遇した医療機関に事前インタビュー調査を実施した。

アンケート調査は、別紙2のアンケート用紙を用いた選択方式で、回答割合を上げるために単純な書式とした。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。回答医療機関と非回答医療機関の病床数の差はt検定を行い、有意水準0.05未満とした。集計および統計解析はStata 13を用いた。

C 研究成果

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。回答297医療機関の平均病床数は429（標準偏差15.8、範囲54-1295）であった。また、非回答173医療機関の平均病床数は432（標準偏差12.8、範囲54-1116）であり、両群の病床数に違いを認めなかった（ $p=0.91$ ）。

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（表）。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（図）。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。

D 考察

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²、発見地域が拡大しており³、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⁴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。

今回の結果では、セアカゴケグモの入院例は14例中1例のみで死亡例はなく、重症化は少ないというオーストラリアからの報告と同様であった^{5,6}。蔓延国であるオーストラリアでは年間少なくとも5000例の咬傷例が報告されているが⁶、死亡例は1950年以降報告されていない⁷。セアカゴケグモの毒素は α -ラトロトキシンで、抗血清によって中和可能である。通常、局所症状のみの場合、抗毒素接種を必要としない³。局所症状から全身症状への移行は比較的緩やかで、12時間以上かかる場合も多いとされている³。しかも、発症後1週間を経過した後も抗血清は有効とされている。国内におけるセアカゴケグモの生息域の拡大が確認されていることから、今後患者数の増加が予想されるが、発生地域への迅速な抗血清の供給体制を整備できれば必ずしも国内すべての地域で重症例に対応する必要性はなく、抗毒素は患者が発生している国内の限られた地域に保管しておけばよいと考えられる。抗毒素の使用に関しては、他のクモ毒の抗毒素で重篤な副反応が報告されていることもあり⁸、効果と不利益を秤にかけて慎重に検討する必要がある。

本研究の結果の解釈には制約がある。まず、クモ咬傷の診断は患者申告であり、クモの確認ができた症例はおらず、セアカゴケグモ咬傷は他のクモの咬傷であった可能性がある。また、全医療機関での調査ではないため、咬傷患者数はより多いと考えられ、本研究での報告数は過小評価である。

E 結論

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。

謝辞

本調査にご協力いただいた基幹定点医療機関の方々に感謝いたします。

参考文献

- 1)大阪府健康医療部 環境衛生課 生活衛生グループ 「セアカゴケグモについて」 http://www.pref.osaka.lg.jp/kankyoeisei/seaka/seaka_jiko_h09_h17.html
- 2) IASR Vol. 18, No. 9: 1997年9月号
- 3) 環境省外来生物対策室 「セアカゴケグモ・ハイイロゴケグモにご注意ください」 http://www.env.go.jp/nature/intro/5pr/files/r_gokegumo.pdf (2014年8月9日閲覧)
- 4) 大阪府 「セアカゴケグモによる咬傷にご注意ください! これまでの咬傷事例」 <http://www.pref.osaka.lg.jp/kankyoeisei/seaka/jiko.html> (2014年8月9日閲覧)
- 5) Isbister GK, Gray MR. Latrodectism: a prospective cohort study of bites by formally identified redback spiders. *Med J Aust.* 2003 Jul 21;179(2):88-91.
- 6) Isbister GK, White J. Clinical consequences of spider bites: recent advances in our understanding. *Toxicon.* 2004 Apr;43(5):477-92.
- 7) Braitberg G, Segal L. Spider bites - Assessment and management. *Aust Fam Physician.* 2009 Nov;38(11):862-7.
- 8) Isbister GK, Gray MR, Balit CR, et al. Funnel-web spider bite: a systematic review of recorded clinical cases. *Med J Aust.* 2005 Apr 18;182(8):407-11.

F 健康危機管理情報

なし

G 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H 知的所有権の出願・登録状況

なし

表

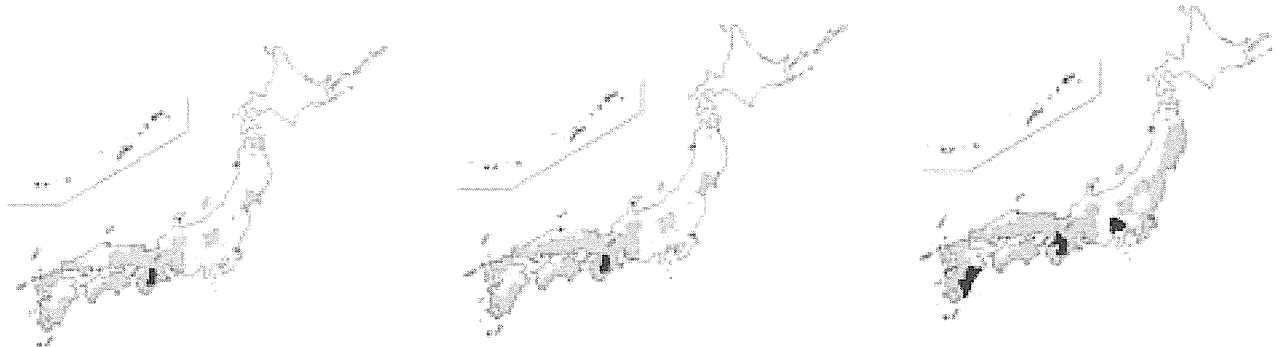
年	クモ咬傷		セアカゴケグモ咬傷		
	診療医療機関数	患者数	診療医療機関数	患者数	入院患者数
2011	6	12	1	3	1
2012	10	22	1	2	0
2013	12	25	4	9	0
総数	21	59	4	14	1



2011

2012

2013



ゼアカゴケグモ確認



ゼアカゴケグモ咬傷患者

	2011	2012	2013
ゼアカゴケグモ確認	21	23	29
ゼアカゴケグモ咬傷患者	1	1	3

ヤマカガシおよびセアカゴケグモ抗毒素の力価試験の開発

分担研究者 阿戸 学 国立感染症研究所免疫部・部長
協力研究者 松村 隆之 国立感染症研究所免疫部・主任研究官
協力研究者 山本 明彦 国立感染症研究所細菌第二部・主任研究官

研究要旨

【背景】セアカゴケグモ咬傷は、咬傷部の疼痛が主な症状であるが、その後の疼痛増強や全身に多彩な症状が認められることがある。治療は、対症療法とウマ抗毒素の投与であるが、我が国では抗毒素が薬事承認されていないので、製造元であるオーストラリア CSL 社から医師の個人輸入により、抗毒素の保管・投与が行われているのが実情である。しかし、国内への抗毒素輸入が必ずしも確実でないことから、国産抗毒素を製造し、その有効性を確認することになった。

【目的】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。

【方法】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、40 μ g の毒素と種々に希釈した抗毒素を混和して 1 時間静置し、マウスに静脈内投与して 10 日間生死を観察して抗毒素の力価を測定した。

【結果】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℃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 μ g 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。

【考察・結論】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。

A. 研究目的

セアカゴケグモ咬傷は、咬傷部の疼痛が主な症状であるが、その後の増強や、刺咬部以外での疼痛、悪心、嘔吐、異常な発汗、動悸、倦怠、不穏、筋攣縮、発熱など多彩な症状が認められることがある。その機序として、主成分である 130kDa の糖タンパク α -ラトロトキシン(α LT)が、ほ乳類の末梢神経細胞シナプス前膜に局在する LT 受容体に結合して、細胞内カルシウムイオンの流入を誘導し、神経末端からカテコールアミンやアセチルコリン等の神経伝達物質を過剰に放出させることに起因する。治療は、対症療法と抗毒素の投与であり、ウマにセアカゴケグモ毒素を免疫して作成されるセアカゴケグモ抗毒素血清が開発された 1956 年以降、オーストラリアでは死亡例は報告されていない。我が国では抗毒素は薬事承認されていないので、製造元であるオーストラリア CSL 社から医師の個人輸入

により、抗毒素の医療機関での保管・投与が行われているのが実情である。しかし、国内への抗毒素供給が必ずしも安定していないことから、臨床研究の一環として国産抗毒素を製造することになった。

本研究は、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。

B. 研究方法

粗毒各ロットの性状確認

研究班（分担研究者：沢辺京子・国立感染症研究所・昆虫医学部長）によって、我が国で採取されたセアカゴケグモの毒腺粗抽出物の性状分析として、種々の時期に抽出されたロットのタンパク含有量、主成分 α LT の量を解析した。

タンパク定量法：セアカゴケグモ毒素はウシ血清アル

ブミン(BSA) Protein Assay Kit (Thermo Scientific) を用いてタンパク定量を行った。

SDS-ポリアクリルアミドゲル泳動 (SDS-PAGE) : ゲル濃度が 10~20%グラジエントポリアクリルアミドゲルを使用し、各レーンにタンパク量 10 μg のサンプルを泳動した。ゲルのタンパク染色は Imperial Protein Stain (Thermo Scientific) を使用して行った。

イムノブロットイング : SDS-PAGE 後、泳動分離したタンパク質を Immobilon PVDF メンブレン (MILLIPORE) にトランスファーし、メンブレンを 5%BSA/0.01%Tween20/Tris 含有リン酸緩衝バッファー (TBS)にてブロッキングした。一次抗体として抗 αLT 抗体 (SIGMA) を 5%BSA/0.01%Tween20/TBS にて 2000 倍希釈、二次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗ラビット IgG 抗体 (GE Healthcare) を 5000 倍希釈にて使用した。ECL Western Blotting Detection System (GE Healthcare) を用いて化学発光後、Image Quant LAS-4000 (富士フイルム) にて分子量 130kDa の αLT を検出した。

セアカゴケグモ毒素によるマウス致死量の同定

過去の報告に基づき、性状が均一であると確認された粗毒抽出物をマウスに接種し、 LD_{50} を決定した。具体的には、セアカゴケグモ毒素をリン酸緩衝液 (Dulbecco's PBS, pH 7.2) で調製し、SPF 環境下で飼育された ddY 系統の 4 週齢メスマウス (日本 SLC) 1 匹あたり 14.4 μg 、12 μg 、10 μg 、8.3 μg 、6.9 μg の毒素 100 μl を尾静脈注射した (1 群 5 匹)。10 日間死亡率を観察し、プロビット法にて LD_{50} を算出した。

セアカゴケグモ抗毒素力価試験法の確立

セアカゴケグモ毒素 40 μg タンパク質相当量および抗毒素 RED BACK SPIDER ANTIVENOM (CSL) をリン酸緩衝液 (Dulbecco's PBS, pH 7.2) で調製して混和し、室温で 1 時間反応させた。抗毒素 (12U、4U、あるいは 1.2U [1 回目])、4U、3.2U、2.56U、2.048U、あるいは 1.638U [2 回目以降]) を含む混和物を、ddY マウス 1 匹あたり、100 μl を尾静脈注射した (1 群 3 匹)。10 日間死亡率を観察し、プロビット法にて抗毒素の力価を算出した。

(倫理面の配慮)

毒素を使用する実験は、国立感染症研究所戸山庁舎高度安全実験施設において、国立感染症研究所病原体等安全管理規程に従い実施した。動物実験は、動物実験委員会規程に従い、動物実験委員会の承認を得てから行った。

C. 結果

最初に、セアカゴケグモ毒素 4 ロット (140919、140930、141021、150115) についてタンパク定量を行い、140919 は 1.57 mg/mL、140930 は 1.95 mg/mL、

141021 は 2.52 mg/mL、150115 は 1.39 mg/mL と各ロット間でややばらつきがあることが判明した。そこで、各レーン 10 μg のタンパク質を SDS-PAGE 後、イムノブロットイングを行った。その結果、ロット間で、タンパク量に対する αLT の量にほとんど差は認められなかった。また、室温で 2 日保管した毒素、4°C で 4 週間保管した毒素、4°C で 12 週間保管した毒素についても同様に測定し、 αLT は室温および 4°C での保管に関して安定であることが示された (図 1、図 2)。

次にロット 141021 を用いて LD_{50} の測定を 3 回行った。投与 1 日目ですべての毒素投与群のマウスに閉眼が認められ、高用量投与群 (14.4 μg) では全身麻痺が認められた。投与 2~3 日目から低用量投与群 (8.3 μg 、6.9 μg) では回復傾向が認められた。10 日間死亡率を観察後、プロビット法にて LD_{50} を算出した結果、マウス 1 匹あたりの投与量として 1 回目 9.22588 μg 、2 回目 9.80604 μg 、3 回目 8.47505 μg (平均 9.16899 μg) となった。3 日間観察した際の LD_{50} は 1 回目 10.18692 μg 、2 回目 9.80604 μg 、3 回目 9.79609 μg (平均 9.929683 μg)、4 日間観察した際の LD_{50} は 1 回目 9.80604 μg 、2 回目 9.80604 μg 、3 回目 9.06266 μg (平均 9.558247 μg) となり、再現性が高かった。しかし、投与後死亡が 6 日後に認められることもあったため、 LD_{50} は少なくとも 7 日間観察後に決定した方がよいと考えられた (表 1)。

CSL の抗毒素について使用期限が 2015 年 8 月のロット (EXP 08/15) と、2013 年 9 月のロット (EXP 09/13) での力価試験を行った。添付文書の表示力価では、1U で 10 μg の毒素を中和できると記載されている。試験の結果、両者とも 4U の抗毒素で 40 μg の毒素 (ロット 141021) を完全中和することが示された。しかしながら、力価を計算したところ、EXP 09/13 は EXP 08/15 より 12%程度 の力価低下が認められた。中和試験においてもマウスの症状は 1 日目より閉眼、2.048U の抗毒素投与群では全身麻痺が認められ、死亡経緯は衰弱死であった。死亡が 5 日後まで長引くこともあり、 LD_{50} 決定試験の結果も踏まえ、少なくとも 7 日間は観察した方がよいと考えられた (表 2)。

D. 考察

マウスに対する LD_{50} の値は 0.20-0.90mg/kg と記載によってかなりの差がある。また、1996 年のセアカゴケグモ等対策専門家会議の報告書によると、大阪府公衆衛生研究所が行った毒性試験の報告によれば、捕獲したクモ 1 頭分の毒素がマウス LD_{50} に相当する。一方、専門家会議の毒性試験では、クモ 1 頭分の毒素はマウスに完全致死であった。また、オーストラリアより入手した毒素凍結乾燥品による致死毒性は 0.477 頭分であるとされた。本研究では、毒素量の基準を匹単位によらず、タンパク量にとした。その理由は、予

備試験においてロットごとのタンパク量とクモ頭数の相関が必ずしも一致せず、タンパク量が致死毒性と良い相関を示したという結果を考慮したためである。毒素の SDS-PAGE およびイムノブロット法による性状解析では、上記報告書とほぼ同程度の泳動パターンを示した。また、上記報告書では、輸入した毒素凍結乾燥品で毒性の低下と α LT の部分分解が認められた。本研究では抽出物の4℃での長期保管でも毒性は保たれており、将来的な毒素標準品の作成検討の際には、その保存方法について検討する必要があると思われる。

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。なお、CSL社の抗毒素の力価を本試験法で測定した結果、有効期限切れのバイアルは、期限内の抗毒素に比べて、若干の力価低下を認めたが、有効期限を1年4ヵ月過ぎて低下したのか、そもそもロット差によって力価が異なっていたのかは不明である。いずれにしても有効期限を過ぎてもある期間は表示力価が維持されることが判明した。

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。

E. 結論

- 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 μ g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。

F. 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. 2014. Clinical Characteristics of Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*) Bites: a National Survey in Japan, 2000-2013. *J Intensive Care*. 2:19.
2. Effect of antivenom therapy of *Rhabdophis tigrinus* (Yamakagashi snake) bites. 2014. Hifumi T, Sakai A, Yamamoto A, Murakawa M, Ato M, Shibayama K, Kato H, Koido Y, Inoue J, Abe Y, Kawakita K, Hagiike M, Ginnaga A, Kuroda Y. *J Intensive Care*. Jul 31;2(1):44.

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし