

図 1. ロット 140919、140930 および 141021 のイムノブロッティング

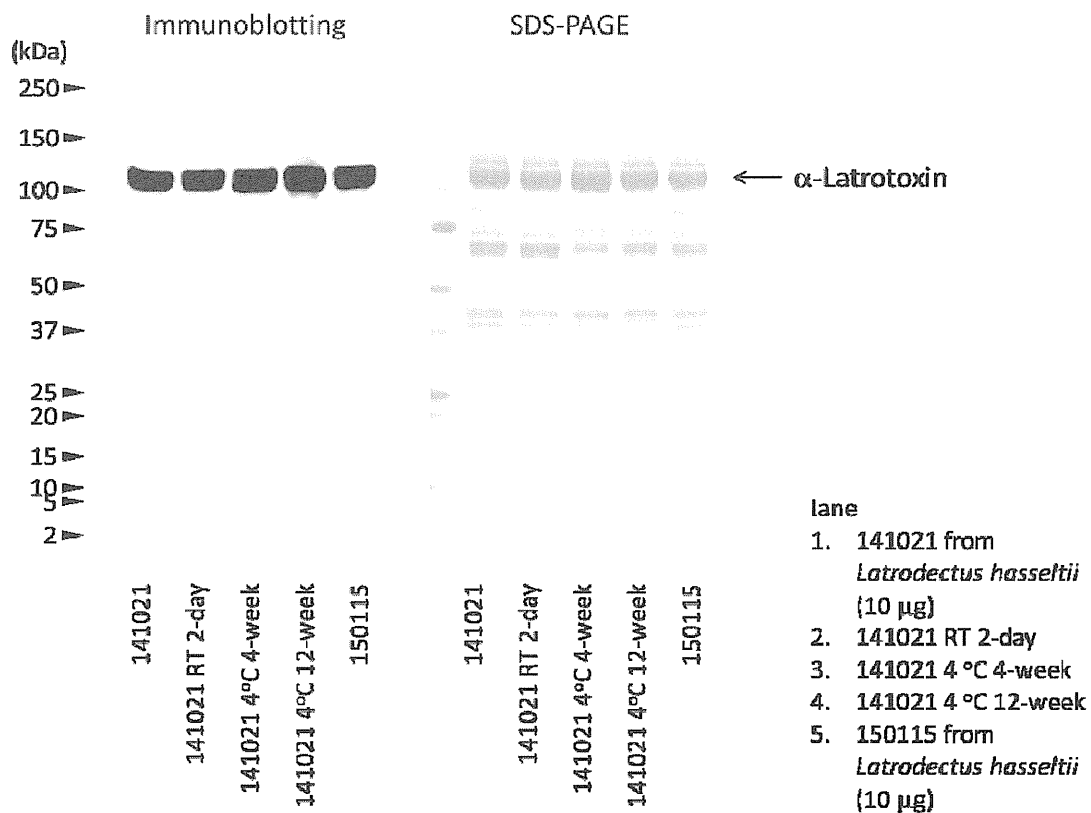


図 2. ロット 141021 および 150115 のイムノブロッティングと SDS-PAGE

表1. セアカゴケグモ毒素毒性試験の結果
<141021 (1回目)>

毒素量	1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日	死亡数/供試数
14.4ug		1	3	1							5/5
12ug		0	3	2							5/5
10ug		0	1	1	1	1	1				5/5
8.3ug		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
6.9ug		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

<141021 (2回目)>

毒素量	1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日	死亡数/供試数
14.4ug		0	3	2							5/5
12ug		0	3	2							5/5
10ug		0	2	1	0	0	0	0	0	0	3/5
8.3ug		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
6.9ug		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

<141021 (3回目)>

毒素量	1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日	死亡数/供試数
14.4ug		0	3	2							5/5
12ug		0	1	2	1	0	1				5/5
10ug		0	1	2	0	1	0	0	0	0	4/5
8.3ug		0	1	1	1	0	0	0	0	0	3/5
6.9ug		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

表2. セアカゴケグモ抗毒素力価試験の結果

<EXP 08/15 (1回目)>

抗毒素量	毒素量	1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日	死亡数/供試数
12U	40ug		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3
4U	40ug		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3
1.2U	40ug		0	2	1							3/3

<EXP 08/15 (2回目)>

抗毒素量	毒素量	1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日	死亡数/供試数
4U	40ug		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3
3.2U	40ug		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3
2.56U	40ug		0	0	1	2						3/3
2.048U	40ug		0	0	1	2						3/3
1.638U	40ug		1	2								3/3

<EXP 08/15 (3回目)>

抗毒素量	毒素量	1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日	死亡数/供試数
4U	40ug		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3
3.2U	40ug		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3
2.56U	40ug		0	1	1	0	1					3/3
2.048U	40ug		0	0	1	2						3/3
1.638U	40ug		0	0	3							3/3

<EXP 09/13 (EXP 08/15 の3回目と同時実験)>

抗毒素量	毒素量	1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日	9日	10日	死亡数/供試数
4U	40ug		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3
3.2U	40ug		0	0	1	1	0	0	0	0	0	2/3
2.56U	40ug		0	1	2							3/3
2.048U	40ug		0	2	0	0	1					3/3
1.638U	40ug		0	2	0	1						3/3

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

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

分担研究者 山本 明彦 国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官
分担研究者 柴山 恵吾 国立感染症研究所 細菌第二部 部長

研究要旨

国内でのウマでのセアカゴケグモ抗毒素製造の免疫条件検討のため、ウサギに1) 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、2) 無処置毒素とオイルアジュバントの組み合わせ、3) 無処置毒素とリン酸アルミニウムアジュバントの組み合わせの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高い抗体価を得た。また、経年劣化が想定されるヤマカガシ抗毒素の代替品としてヤマカガシと同様の毒素活性を持つ毒蛇に対する抗毒素製剤 BioCSL 社の TAIPAN ANTIVENOM 及び TIGER SNAKE ANTIVENOM について検討した。その結果、抗出血活性の中和能の成績からヤマカガシ抗毒素の代替抗毒素として、不適當であった。

I. セアカゴケグモ抗毒素（ウサギを用いた）試験免疫の検討

A. 研究目的

本研究班の目的は、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について、臨床研究にてその実証的データを得ることである。セアカゴケグモではオーストラリアの BioCSL 社の承認薬を医師による個人輸入を行って治療がなされていた。しかし、BioCSL 社からの輸入がストップして、輸入再開が困難になるような状況もあり、セアカゴケグモ抗毒素のオーストラリアからの個人輸入依存するのではなく、国内での抗毒素の製造を本年度より計画し、実行することとなった。

当初、オーストラリア BioCSL 社製から抗毒素製造や品質管理試験に関する情報を得るように努めたが、BioCSL 社からは協力を拒絶されたために、公表された文献情報から免疫計画やの品質管理試験を計画した。

ウマでのセアカゴケグモ抗毒素製造の免疫条件検討のため、セアカゴケグモ抗毒素のウサギでの免疫試験を実施した。具体的には3種類の免疫方法を用いた。

1) 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、2) 無処置毒素とオイルアジュバントの組み合わせ、3) 無処置毒素とリン酸アルミニウムアジュバントの組み合わせである。3種類の免疫方法で免疫したウサギから採血を行い、そのセアカゴケグモ毒素中和抗体価から免疫方法を評価した。

B. 研究方法

1. 抗原の作成

1) セアカゴケグモ粗毒素

日本国内各地で採取したセアカゴケグモ雌より毒腺を採取しホモジナイズして生理食塩水に浮遊させたものを使用した。

2) フォルマリン不活化

一部のセアカゴケグモ粗毒素溶液に 0.5%の割合でフォルマリン原液を加えてゆっくりと混和し、5°Cで7日間反応させた。その後、さらに0.5%の割合でフォルマリン原液を加えてゆっくりと混和し、37°Cで14日間反応させ濃度を調整して抗原溶液とした。

3) アジュバント

オイルアジュバントとリン酸アルミニウムの2種類のアジュバントを用いた。

2. ウサギでの免疫

ウサギの免疫は、以下の3種類の免疫方法でそれぞれ2頭の背部皮下に投与した。

1) 通常抗毒素の製造に用いられている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を行った。0、7日目にフォルマリン不活化毒素とオイルアジュバントで免疫し、部分採血を行った。さらに49、56及び63日目にフォルマリン不活化毒素だけで免疫し70日目に2回目の採血を行った。

2) 無処置毒素とオイルアジュバントの組み合わせでは、0、14日目にアジュバントと無処置毒素で免疫し、

21 日目に部分採血を行った。さらに 28 日目に無処置毒素だけで免疫し 35 日目に 2 回目の採血を行った。

3) 無処置毒素とリン酸アルミニウムアジュバントの組み合わせでは、0、14 日目にアジュバントと無処置毒素で免疫し、21 日目に部分採血を行った。さらに 28 日目に無処置毒素だけで免疫し 35 日目に 2 回目の採血を行った。

3. 中和抗毒素価測定

セアカゴケグモの標準抗毒素が国内に存在しないため力価が明記されている BioSCL 社セアカゴケグモ抗毒素製剤を標準抗毒素として用いた。標準抗毒素を 5 段階に希釈して、セアカゴケグモ毒素量を一定濃度 (4LD50) して等量混合し室温で 1 時間反応させて 1 群 3 匹のマウスに静脈投与した。投与後 10 日間マウスの症状や生死を観察することで中和試験を実施した。免疫したウサギの血清は、5 倍、25 倍、125 倍の 3 段階に希釈しておおよその抗体価を求め、高い抗体価を示したのものについてより希釈間隔を 1.5 倍まで狭めて再度実施して中和抗毒素価を測定した。

4. 統計処理

抗体と毒素の混合物を投与された各群のマウスで観察された生死数をプロビット法にて統計的に処理して中和抗毒素価を算出した。

(倫理面の配慮)

必要な動物実験については、国立感染症研究所の動物実験委員会の承認を申請し、承認を得て行った。(承認番号：114097)

C. 結果

表 1 にウサギでのセアカゴケグモ毒素を用いた免疫と中和抗体測定結果をまとめた。1) 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は、採血 1 回目では 32.3、118.9U/ml で、採血 2 回目では 94.6、134.3U/ml の中和抗毒素が得られた。2) 無処置毒素とオイルアジュバントの組み合わせでは、採血 1 回目ではそれぞれ 2 頭のウサギが 32.3、32.3U/ml で、採血 2 回目では 1.1、1.1U/ml の中和抗毒素が得られた。3) 無処置毒素とリン酸アルミニウムアジュバントの組み合わせで、採血 1 回目では 32.3、1.1U/ml で、採血 2 回目では 1.1、1.1U/ml の中和抗毒素が得られた。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。

D. 考察

セアカゴケグモ抗毒素の製造に関しては、BioCSL 社からは協力を拒絶されたために、公表された文献情報から免疫計画やの品質管理試験を計画することになった。そのため、今回のウサギでの試験的な免疫試験実施に当たって、ウサギでのセアカゴケグモ抗毒素作成に関する 1956 年と 1961 年に発表された Dr. Saul の論文 (1, 2) を参照した。免疫方法 3) の無処置毒素とリン酸アルミニウムアジュバントの組み合わせでの免疫はこの文献の通りに実施したものである。一方、日本におけるウマ抗毒素製剤は現在化血研が唯一の製造会社である。化血研での抗毒素製造には、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による免疫が実施されているため、1) の免疫方法を採用した。2) の免疫方法は 1) と 3) を合わせた折衷案である。ウサギでのセアカゴケグモでの免疫方法を記された文献の通りの 3) の方法では抗体上昇が得られなかった。一方、1) の化血研での方法に基づいた免疫方法では、2 回のアジュバント添加での免疫で一定の抗体上昇を得て、さらに 3 回のフォルマリン不活化毒素の免疫でより高い抗体価が得られた。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。

今後、今回のウサギでの予備検討結果をもとにウマでの抗毒素製造に向けての免疫が実施される予定である。

E. 結論

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。

II. ヤマカガシ抗毒素代替品の検討

A. 研究目的

2000 年に製造されたヤマカガシ抗毒素は、昨年度の本分担研究においてそのウサギ出血活性の中和能において 13 年後も安定であることが確認された。しかし、今後経時変化による品質低下は否めない。第二ロットの製造計画が未定である現状から、他国の承認薬でヤマカガシと同様の毒素活性を持つ毒蛇に対する抗毒素製剤の輸入などの今後の体制つくりのための情報収集を行った。

まずオーストラリアやニューギニア地域に生息する Tiger Snake や Taipan がヤマカガシと同様の毒性を持ち、

同国 BioCSL 社にてこの蛇の抗毒素を製造しているとの情報を得て、個人輸入を行った。輸入した抗毒素とヤマカガシ試験毒素を用いてウサギ出血活性を指標に中和試験を実施しヤマカガシ抗毒素とその中和活性を比較して代替品として使用の可能性について検討した。

B. 研究方法

1. ヤマカガシ代替抗毒素の検討のための抗毒素候補

1) TAIPAN ANTIVENOM : CSL Biotherapies Pty Ltd 、12,000U/40.8ml/vial

2) TIGER SNAKE ANTIVENOM : CSL Biotherapies Pty Ltd 、3,000U/9.89ml/vial

3) ヤマカガシ抗毒素 lot1 20ml/vial

4) ヤマカガシ試験毒素 lot1 80,000MHD/vial, 11.2mg タンパク量

2. ヤマカガシ毒素中和試験

試験に供する抗毒素を、それぞれの vial を原液として、1, 3, 9, 27, 81 及び 243 倍に希釈して、最も安定な出血斑形成結果を示す 568MHD のヤマカガシ試験毒素と等量混合し、室温で 1 時間反応させる。ウサギ 2 頭の背部を剃毛し毒素抗毒素反応物を 0.2ml ずつ皮内投与し 24 時間後に背部に形成される出血斑の長径と短径を測定する。

得られた出血斑の長径と短径平均値を、ヤマカガシ抗毒素の力価を 1 として平行線定量法にて統計計算して、被験抗毒素のヤマカガシ抗出血価を算出する。

(倫理面の配慮)

必要な動物実験については、国立感染症研究所の動物実験委員会の承認を申請し、承認を得て行った。(承認番号：114097)

C. 結果

ヤマカガシ抗毒素代替抗毒素候補品の抗出血価試験を行った結果を表 2 に示す。陽性対照のヤマカガシ抗毒素の抗出血活性は、昨年実施した測定結果と同様の結果となった。一方、ヤマカガシ抗毒素代替抗毒素候補品の TAIPAN ANTIVENOM 及び TIGER SNAKE ANTIVENOM では、出血活性の完全中和は原液のみであった。さらに 3 倍階段希釈したこれらの抗毒素は全く中和活性を示さなかった。ヤマカガシ抗毒素を標準として、代替抗毒素の力価を平行線定量法にて算出したところ、TAIPAN ANTIVENOM では、0.114 (95% 信頼限界 0.091-0.142) 及び TIGER SNAKE ANTIVENOM は 0.120 (95% 信頼限界 ; 0.095-0.150) と算出された。

D. 考察

ヤマカガシと同様の毒性を持つ毒蛇の抗毒素製剤である BioCSL 社の TAIPAN ANTIVENOM 及び TIGER SNAKE ANTIVENOM について、ヤマカガシ抗毒素の代替抗毒素としての可能性を検討した。

これらの抗毒素の中和活性を測定したところ、それぞれ、ヤマカガシ抗毒素の 1/8.8、1/8.3 の中和能力を示した。これらの中和能は 1vial の容量から検討してみると、ヤマカガシ抗毒素が 20ml/vial でこれらの候補抗毒素がそれぞれ、40.8ml および 9.89ml である。通常ヤマカガシ咬傷治療には、1vial を点滴静注していることから、同様の中和活性を得るには、TAIPAN ANTIVENOM では 4.4 本分に相当し、TIGER SNAKE ANTIVENOM では 16.6 本分に相当するため現実の治療には無理がある。さらに個人輸入して判明したが、これらの抗毒素は、その価格がそれぞれ 36 万円、12 万円と高価である。

これらの抗毒素は価格が高く輸入にも時間を要し、さらにヤマカガシ毒素に対する出血毒性の中和活性はヤマカガシ抗毒素の 1/6 程度であることから、代替抗毒素としてヤマカガシ咬傷の治療に用いることは有用ではないと考察される。

E. 結論

BioCSL 社の TAIPAN ANTIVENOM 及び TIGER SNAKE ANTIVENOM は、抗出血活性の中和能の成績からヤマカガシ抗毒素の代替抗毒素として、不適當である。

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

F. 参考文献

1. Wiener S. The Australian Red Back Spider (*Lactrodectus hasselti*): I. Preparation of antiserum by the use of venom adsorbed on aluminium phosphate. Medical Journal of Australia 1956; 739-742
2. Wiener S. Redback spider bite in Australia: an analysis of 167 cases. Medical Journal of Australia 1961; 48: 44-49.

表1. セアカゴケグモ抗毒素免疫（ウサギでの成績）

番号	免疫方法	中和抗毒素価(U/ml)	
		採血1回目	採血2回目
1	フォルマリン不活化毒素とオイルアジュバント	32.3 (13.8-67.5)、 118.9 (57.9-278.6)	94.6 (64.3-131.1)、 134.3 (101.9-177.2)
2	無処置毒素とオイルアジュバント	32.3 (13.8-67.5)、 32.3 (13.8-67.5)	1.1、1.1
3	無処置毒素とリン酸アルミニウムアジュバント	32.3 (13.8-67.5)、 1.1	1.1、1.1

表2. ヤマカガシ抗毒素代替抗毒素候補品の力価試験成績（ウサギ出血活性の中和による）

抗毒素濃度 (希釈倍 数)	試験毒素 (MHD/反 応)	ヤマカガシ抗毒素		Tiger Snake antivenom		Taipan antivenom	
		1	2	1	2	1	2
1	568	ND	ND	0	0	0	0
1	568	ND	ND	0	0	0	0
3	568	0	0	13.5	21	12	20
3	568	0	0	14.5	21.5	17.5	21
9	568	0	0	17.5	20	16.5	20.5
9	568	0	0	16	19	18	20.5
27	568	17	18	19	20.5	18.5	19.5
27	568	15.5	15.5	18.5	18.5	19.5	22.5
81	568	17.5	19.5	19.5	23	19	19
81	568	18.5	18	19	20.5	20.5	19.5
243	568	18.5	23.5	21.5	21	18.5	21
243	568	22	20.5	15	22	16.5	19

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

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

分担研究者 黒田泰弘 香川大学医学部附属病院 救命救急センター 救命救急センター長

研究要旨

香川県周囲（四国）におけるヤマカガシおよびセアカゴケグモ咬傷発生に対する緊急治療体制の構築のため、それぞれの抗毒素を香川大学医学部附属病院救命救急センターに保管し、実使用に備えている。咬傷発生時の抗毒素の効果および合併症は、来年度（最終年度）において検討予定である。

A. 研究目的

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、および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、これら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が目的である。

国内におけるヤマカガシ、セアカゴケグモの咬傷例は少ない。したがって、企業は収益性の問題等から抗毒素製剤の国内開発には消極的であり、これらの抗毒素は国内未承認薬である。ヤマカガシ咬傷の場合は抗毒素を投与しないと死亡に至る危険性があり、また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る。以上より、それらの抗毒素を臨床研究の枠組みにおいて24時間・365日体制で安定供給することは極めて重要である。またセアカゴケグモ咬傷はその分布が急激に香川県内においても広がっており、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の意義も大きいと考える。

香川県周囲におけるその対応は極めて重要であり、香川大学医学部附属病院救命救急センターがその責務を担う。

B. 研究方法

香川大学医学部附属病院救命救急センターの倫理委員会での承認を受けた後に、病院内の薬剤部協力を得て、ヤマカガシおよびセアカゴケグモ抗毒素を配備した。

緊急時に対応するため、救命救急スタッフに本臨床研究の詳細を周知徹底した。

C. 結果

本年度は、ヤマカガシ抗毒素、およびセアカゴケグモ抗毒素を実際に使用した症例はなかった。しかし、緊急時の体制を整備したことにより、今後24時間、365日体制で香川県医療圏でのセアカゴケグモおよびヤマカガシ咬傷事例に対して緊急対応が可能である。

D. 考察

セアカゴケグモについては、香川県内では09年度に坂出、丸亀の両市で初めて発見されている。12年度には東かがわ市、小豆島町でも見つかかり、3市町で134匹を確認した。13年度はさらに拡散し、10月末時点で、さぬき、三豊、土庄の2市1町を加えた7市町にまで広がった。香川県におけるセアカゴケグモ咬傷に対する対策は、その必要性が極めて高いものとなった。行政においても、四国行政評価支局は、県内での生息域が急速に広がっているにもかかわらず対策が不十分として、国の関係機関に対し「市町との連携や県民への周知を強化してほしい」などと改善策を求めている。

ヤマカガシ咬傷患者は現在非常に少なくなっている。しかし、今回の香川大学医学部附属病院救命救急センターへのヤマカガシ抗毒素が配備される以前は、群馬県の蛇族学術研究所からヤマカガシ抗毒素を取り寄せており、緊急時の対応という意味合いからは不十分であった。今回の香川大学医学部附属病院救命救急センターでのヤマカガシ、およびセアカゴケグモ抗毒素の保管は、香川県医療圏で緊急時対応が完結するという意味で極めて重要な意義がある。

来年度（最終年度）は、抗毒素の投与症例にてその詳細（効果・合併症など）を検証する予定である。

E. 結論

香川県を中心とした医療圏におけるセアカゴケグ

モおよびヤマカガシ咬傷事例に対して24時間、365日体制で緊急対応する体制を構築した。最終年度はその効果を検討する。

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: 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) Silva A, 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, Kiriu 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: Potentially fatal coagulopathy secondary to yamakagashi (Rhabdophis tigrinus) bites that completely recovered with antivenom administration. *Acute Med Surg*, in press. Article first published online: 8 AUG 2014
DOI: 10.1002/ams2.69

(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) Hifumi T, Yamamoto A, Sakai A, Abe Y, Kawakita K, Hagiike M, Kuroda Y, Koido Y. Clinical characteristics of Yamakagashi (Rhabdophis tigrinus) bites: Results from a national survey, 2000-2013. The 14th Joint Scientific Congress of JSICM and KSCCM. Kyoto Feb 28, 2014

3) 一二三亭、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

4) 一二三亭、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

5) 一二三亭、山本明彦、境淳、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

6) 一二三亭、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

7) 一二三亭、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

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

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

分担研究者 小井土雄一 災害医療センター救命救急センター 臨床研究部長・救命救急センター長

研究要旨

ヤマカガシ抗毒素、およびセアカゴケグモ抗毒素を災害医療センター内に保管し、首都圏での傷病発生に対して緊急的に対応できる体制を構築した。
ヤマカガシ抗毒素、およびセアカゴケグモ抗毒素を実際に使用した症例はないため、最終年度には実際の投与症例にてその詳細を検証していく予定である。

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。

国内におけるヤマカガシ、セアカゴケグモの咬傷例は多くないため、企業は収益性の問題等から抗毒素製剤の国内開発には消極的である。そのため、両抗毒素は国内未承認薬である。ヤマカガシ咬傷の場合は抗毒素を投与しないと死亡に至る危険性があり、また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ることから、それらの抗毒素を臨床研究の枠組みにおいて24時間体制で安定供給することは極めて重要である。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の意義も大きいと考える。

首都圏は人口も多く、その対応は極めて重要であり、災害医療センターがその責務を担う。

B. 研究方法

災害医療センターの倫理委員会での承認を受けた後に、病院内の薬剤部協力を得て、ヤマカガシおよびセアカゴケグモ抗毒素を配備した。

緊急時に対応するため、救命救急スタッフに本臨床研究の詳細を周知徹底した。

C. 結果

本年度は、ヤマカガシ抗毒素、およびセアカゴケグモ抗毒素を実際に使用した症例は認めなかった。しかし、緊急時の体制を整備したことにより、今後24時間、365日体制で首都圏でのセアカゴケグモおよびヤマカガシ咬傷事例に対して対応する。

D. 考察

2014年9月25日に三鷹市でセアカゴケグモが発見され、東京都でのセアカゴケグモ咬傷に対する対策は、その必要性が極めて高いものとなった。東京都下でのセアカゴケグモ咬傷患者は発生していないが、その対策は非常に重要である。

またヤマカガシは東京都内でも多摩地域を中心に生息しており、咬傷患者も確認されている。しかし、今回の災害医療センターへのヤマカガシ抗毒素の配備以前は、群馬県の蛇族学術研究所からヤマカガシ抗毒素を取り寄せており、緊急時の対応という意味合いからは不十分であった。今回の災害医療センターでのヤマカガシ、およびセアカゴケグモ抗毒素の保管は、首都圏での緊急時の対応という意味合いからは極めて重要な意義があると考えられる。

最終年度は、実際の投与症例にてその詳細を検証していく予定である。

E. 結論

今後24時間、365日体制で首都圏でのセアカゴケグモおよびヤマカガシ咬傷事例に対して対応する体制を構築した。最終年度はその効果を検討する。

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: 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, Kiriu 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

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

1. 英文雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	2	19	2014
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	2	44	2014
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	2	43	2014
Hifumi T, Fujimi S, Yamagishi T, Arai S, Sawabe K, Yamamoto A, Ato M, Shibayama K, Ginnaga A, Kiriu 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	2	62	2014
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	3	7	2015

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

IV. 研究成果の刊行物・別刷り・資料

RESEARCH

Open Access

Clinical characteristics of yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*) bites: a national survey in Japan, 2000–2013

Toru Hifumi^{1*}, Atsushi Sakai², Akihiko Yamamoto³, Masahiro Murakawa⁴, Manabu Ato⁵, Keigo Shibayama³, Akihiko Ginnaga⁶, Hiroshi Kato⁷, Yuichi Koido⁷, Junichi Inoue⁸, Yuko Abe¹, Kenya Kawakita¹, Masanobu Hagiike¹ and Yasuhiro Kuroda¹

Abstract

Background: Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*) is a species of pit viper present throughout Russia and Eastern Asia. Although *R. tigrinus* venom is known to induce life-threatening hemorrhagic symptoms, the clinical characteristics and effective treatment of *R. tigrinus* bites remain unknown. The present study aimed to clarify these issues.

Methods: Records in the Japan Snake Institute between 2000 and 2013 were retrospectively investigated. The following were determined: patient characteristics, coagulation and fibrinolytic system abnormalities, effect of antivenom treatment, and outcomes.

Results: Nine patients (all males; median age, 38 years) with *R. tigrinus* bites were identified. On admission, the median levels of fibrinogen and fibrinogen degradation products, and platelet counts were 50 mg/dL, 295 µg/mL, and 107,000/mm³, respectively. The median (minimum–maximum) disseminated intravascular coagulation (DIC) score defined by the Japanese Association of Acute Medicine was 8 (1–8). Antivenom was administered to seven patients, with a median interval of 35 h between bite and antivenom administration. All patients treated with antivenom survived, and the in-hospital mortality rate was 11%.

Conclusions: Patients with *R. tigrinus* bites presented with DIC of a fibrinolytic phenotype, which can result in life-threatening injury unless appropriate antivenom and DIC treatment are provided.

Keywords: Yamakagashi, *Rhabdophis tigrinus*, Antivenom, Disseminated intravascular coagulation, Fibrinolytic phenotype

Background

Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*) is a species of pit viper. It is present throughout Russia and Eastern Asia, including China, Taiwan, Korea, and Japan, but excluding Ryukyu Islands [1]. *R. tigrinus* venom is known to induce life-threatening hemorrhagic symptoms similar to those of the rattlesnake and other crotaline snakes [2-4]. However, the clinical characteristics and effective treatment of *R. tigrinus* bites remain unknown.

R. tigrinus antivenom was traditionally manufactured by the immunization of rabbits and goats. However,

because of low supply, manufacture has more recently been based on immunizing horses and is supported by Health Science Grants (1998–1999) from the Ministry of Health, Labour and Welfare in 2000 [1]. In addition, the management of *R. tigrinus* bites in intensive care has progressed dramatically in this century [5].

This study aimed to elucidate the clinical characteristics of *R. tigrinus* bites and to clarify the effectiveness of antivenom treatment.

Methods

The Japan Snake Institute records were retrospectively investigated for the period between January 1, 2000 and November 30, 2013. The study was approved by the institutional review board at the National Disaster Medical Center.

* Correspondence: hifumitoru@gmail.com

¹Emergency Medical Center, Kagawa University Hospital, Toru Hifumi; 1750-1 Ikenobe, Miki, Kita, Kagawa 761-0793, Japan

Full list of author information is available at the end of the article

Diagnosis of *R. tigrinus* bites

No definite diagnostic criteria exist. Diagnosis of *R. tigrinus* bites required lots of experience of clinical practice. Compared with Mamushi (*Gloydius blomhoffii*) bites, no apparent edema or pain is typically observed at the bite site [6]. However, *R. tigrinus* venom induces a fatal coagulopathy, which results in extensive hemorrhage [7]. Laboratory data usually show severe hypofibrinogenemia, which is considered both a sensitive and a specific diagnostic marker [6]. The disseminated intravascular coagulation (DIC) diagnostic criteria for critically ill patients were used, as outlined by the Japanese Association of Acute Medicine (JAAM criteria) [8]; DIC was defined as a total score of ≥ 4 .

Treatment of *R. tigrinus* bites

Fibrinogen levels <100 mg/dL are considered appropriate for antivenom administration in clinical practice. The antivenom used against *R. tigrinus* bites was experimentally manufactured and was effective against bites by snakes belonging to the genus *Rhabdophis* [1]. In total, 1,369 vials were produced and stored at two institutes: the Japan Snake Institute (Gunma) and Kaketsuken (Kumamoto).

Severe adverse effects refer to anaphylactic shock in which the patient was at risk of death because of antivenom administration.

In clinical practice, physicians managing patients with snake bites usually ask for the assistance of the Japan Snake Institute, where diagnosis is confirmed according to laboratory data and clinical symptoms. Antivenom is then dispatched to the treating physician by police car throughout Japan, other than in the Kyusyu region. In the Kyusyu region, Kaketsuken supplies antivenom to the physicians in the presence of the patient. Antivenom is supplied only by these two institutes. Clinical data was

routinely collected, and all cases of *R. tigrinus* bites were recorded in the Japan Snake Institute.

Data collection

The following parameters were recorded: age, gender, comorbidities, laboratory data, and DIC score, as well as treatment-related factors, including the adverse effects of antivenom, and the outcome at hospital discharge.

Results

Over the 14-year study period, nine patients were identified; the patient characteristics are summarized in Table 1. The area where *R. tigrinus* bites were reported was limited to four regions: Kanto, Chubu, Shikoku, and Kyusyu (Figure 1). All nine patients were male, with a median age of 38 years (5–81).

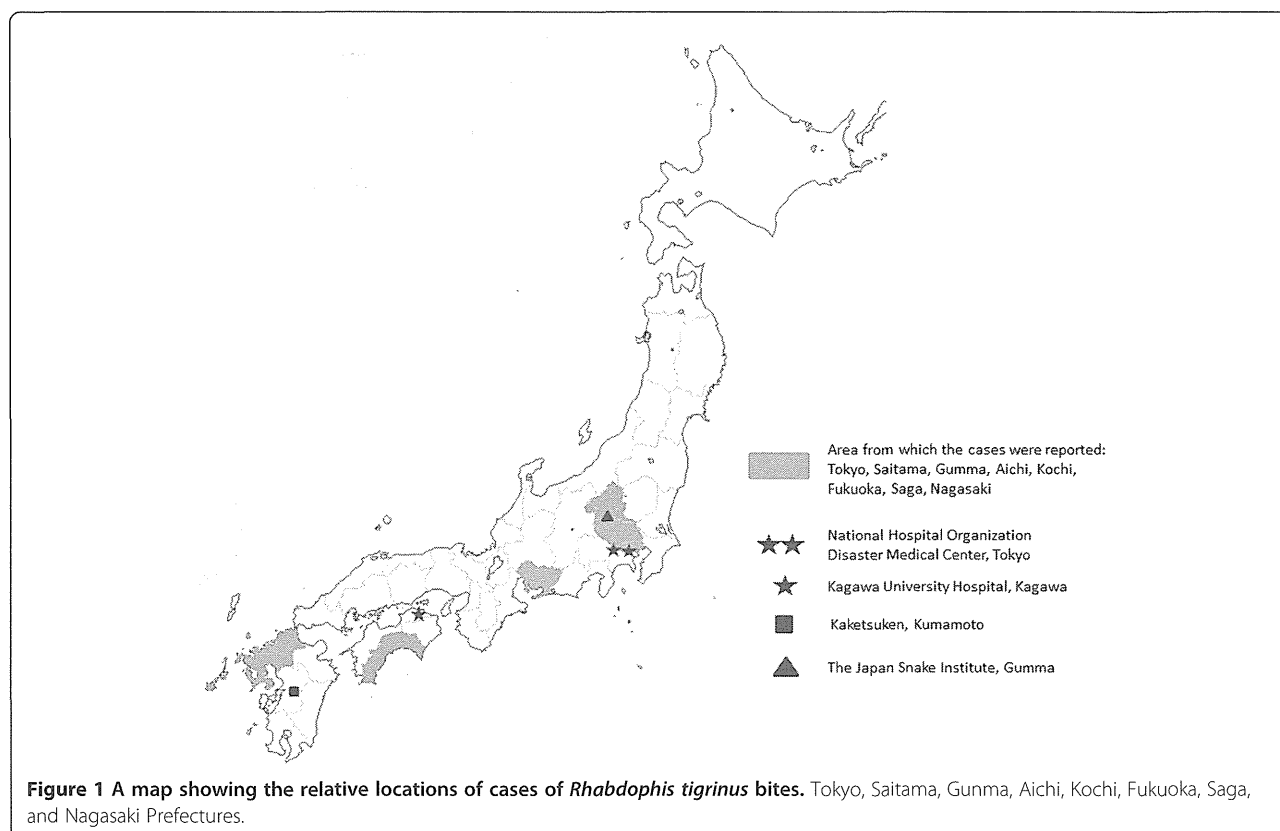
On admission, the median levels of fibrinogen and fibrinogen degradation products (FDP) and platelet counts were 50 mg/dL, 295 $\mu\text{g/mL}$, and 107,000/ mm^3 , respectively. The median (minimum–maximum) DIC score was 8 (1–8) (Table 1). Antivenom was administered to seven patients, and the median interval between bite and antivenom administration was 35 h; no apparent adverse effects were observed. DIC was treated using clotting factor replacement with fresh frozen plasma (FFP) and protease inhibitors in three patients (Table 2). All patients treated with antivenom survived. However, the in-hospital mortality rate was 11% for all patients because a patient who did not receive antivenom died.

Case 1 (a 54-year-old man) with severe liver cirrhosis survived without administering antivenom. He had been bitten on his right hand by *R. tigrinus*. Initially, he demonstrated decreased platelet counts and fibrinogen levels without increased FDP levels. He was closely followed up, and both platelet counts and fibrinogen levels were

Table 1 Characteristics of patients with *Rhabdophis tigrinus* bites and laboratory data on admission

Case	Area	Age	Gender	Comorbidities	WBC (/ mm^3)	Plt ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	Fibrinogen (mg/dL)	PT-INR	FDP ($\mu\text{g/mL}$)	DIC score
1	Tokyo	54	M	LC	3,500	10.7	189	1.08	3.5	1
2	Fukuoka	75	M	DM,HT	17,300	1.8	50	2.62	271.5	8
3	Nagasaki	38	M	None	10,000	12.5	34.8	ODL	ODL	3
4	Saga	13	M	None	8,300	7.3	30	ODL	393	8
5	Fukuoka	40	M	None	9,840	19.8	50	8	592	5
6	Aichi	13	M	None	11,300	13.1	25	3.8	453	8
7	Gunma	37	M	None	10,100	3.9	30	2.81	295	8
8	Saitama	5	M	MR	25,800	22	50	7.46	209	5
9	Kochi	81	M	None	6,330	7.2	50	2.71	262	8
Summary		38 (5–81)	Male, 100%		10,000 (3,500–25,800)	10.7 (1.8–22)	50 (25–189)	3.8 (1.08–ODL)	295 (3.5–ODL)	8 (1–8)

Age, WBC, Plt, Fibrinogen, PT-INR, FDP, and DIC scores are expressed as median (minimum–maximum). WBC, white blood cell; Plt, platelet count; PT-INR, prothrombin time international ratio; FDP, fibrinogen degradation products; DIC, disseminated intravascular coagulation; ODL, over detection limit; LC, liver cirrhosis; DM, diabetes mellitus; HT, hypertension.



not decreased on the second day of admission, which was considered to be caused by lower venom adsorption. Decreased platelet counts and fibrinogen levels on admission were caused by severe liver cirrhosis.

Case 2 (a 75-year-old man) died because of intracranial hemorrhage caused by DIC. He had been bitten on his left hand by a small snake and presented to the local

clinic the next day with bleeding from the bite site. He was referred to the general hospital for further treatment and admitted without antivenom therapy. Two days after the bite, he developed disturbance of consciousness (Glasgow coma scale, 3) with 7-mm pupil dilation. Intracranial hemorrhage (bilateral acute epidural hemorrhage and subcortical hemorrhage) with cerebral herniation

Table 2 Treatment details and outcome

Case	Gabexate mesilate/ nafamostat mesilate	FFP	RCC	<i>R. tigrinus</i> antivenom	Time interval between getting yamakagashi bites and antivenom administration (h)	Adverse effects related with antivenom	Severe adverse effects	ICU days	Hospital days	Outcome
1	No	No	No	No				2	2	Survival
2	No	Yes	Yes	No				6	6	Dead
3	No	No	No	Yes	5.5	No	No	2	4	Survival
4	Yes	No	No	Yes	24	No	No	0	6	Survival
5	No	No	No	Yes	28	No	No	0	6	Survival
6	No	No	No	Yes	35	No	No	0	7	Survival
7	No	No	No	Yes	35	No	No	2	4	Survival
8	Yes	Yes	Yes	Yes	60	No	No	0	14	Survival
9	Yes	Yes	No	Yes	60	No	No	0	6	Survival
Summary	Yes, 33%	Yes, 33%	Yes, 22%	Yes, 78%	35 (5.5–60)	Yes, 0%	Yes, 0%	0 (0–6)	6 (2–14)	Survival, 89%

Data are expressed as median (minimum–maximum) for the length of time from Yamakagashi bite to antivenom administration, ICU days, and hospital days. FFP, fresh frozen plasma; RCC, red cell concrete.

was revealed by computed tomography. Severe hypofibrinogenemia (50 mg/dL) also developed, and *R. tigrinus* was ultimately considered the definitive diagnosis. Antivenom was not administered at this late stage because of irreversible brain dysfunction. The patient died 8 days after the *R. tigrinus* bite.

Discussion

In the present study, we demonstrated the clinical characteristics of *R. tigrinus* bites that were effectively treated with antivenom administration and provided an outline of an untreated case. Compared with the incidence of Mamushi bites estimated, which is approximately 1,000 cases annually [9], the incidence of *R. tigrinus* bites is extremely rare; however, there is a possibility that mild cases without severe coagulopathy like case 1 were not reported and that some physicians may have diagnosed *R. tigrinus* bites as nonvenomous [1]. Case 2 presented in this report may serve as a reminder of the risks of such an approach and of the need for a high index of suspicion.

R. tigrinus venom shows strong plasma coagulant activity, with prothrombin activating effects and weak thrombin-like effects [10]. Once *R. tigrinus* venom is absorbed into the circulation, it activates prothrombin and thereby excessive coagulation. Disseminated fibrin formation ensues and fibrinolysis is activated, resulting in hypofibrinogenemia and increased FDP levels [10,11]. The current survey revealed that *R. tigrinus* bites caused severe DIC with a fibrinolytic phenotype. Based on the current data, it appears that following bites, *R. tigrinus* antivenom administration and appropriate DIC treatment can lead to complete recovery, even in the presence of severe DIC [12,13].

Several days from *R. tigrinus* bites were required to administer antivenom in the present survey because of both the inconvenient supply of antivenom and the delays in diagnosis. Compared with the more common Mamushi bites, which are typically rapidly progressive, there appears to be a longer therapeutic window for administering *R. tigrinus* antivenom [14,15]. DIC with the fibrinolytic phenotype is usually not accompanied with multiple organ dysfunction, and hemorrhage is the major concern. The excessive fibrino/fibrinogenolysis without fibrin formation and life-threatening bleeding are contributed by the expression of tissue plasminogen activator (t-PA) [16,17]. Excess t-PA is secondarily induced by hypoperfusion in severe traumatic injury [16] and hypoxia [18,19]. *R. tigrinus* may therefore have neither a t-PA effect in itself [6] nor induce excessive t-PA. Indeed, patients in the present study did not develop severe hypoperfusion at any stage during hospitalization, including the period before the administration of *R. tigrinus* antivenom. Therefore, antivenom was considered

effective beyond the initial acute phase. Further study is required to evaluate the indications and proper timing of antivenom administration on the basis of the mechanism described.

Adverse reactions to antivenom were negligible. Although the numbers in this survey are too low to make an assessment, the adverse reaction rate may be lower than the 2.4%–9% rate observed with Mamushi antivenom [9,20]. However, since both *R. tigrinus* and Mamushi antivenom are manufactured by immunizing horses, we should remain vigilant to the risk of adverse events such as anaphylaxis and serum sickness disease [21]. The great concern with current *R. tigrinus* bite treatment is that although the antivenom is effective, it is only experimentally manufactured by regional health laboratories [1]. Therefore, the sterility and safety are not guaranteed [1]. The Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan has launched a research group to evaluate the safety and efficacy of antivenom and to organize and maintain information on *R. tigrinus* bites in 2013. Two hospitals have been selected as specialist centers for *R. tigrinus* bite treatment: The National Hospital Organization Disaster Medical Center, Tokyo and Kagawa University Hospital, Kagawa. Clinical characteristics and treatment details, including the adverse effects of antivenom, are recorded for all cases and analyzed to ensure proper safety. In addition, patients with *R. tigrinus* bites are covered by clinical research insurance to provide compensation in the event of adverse effects resulting from antivenom administration.

There are many limitations to this study. A major limitation is the fact that many cases remain undiagnosed or misdiagnosed because of the unfamiliar symptoms presented by this rare snakebite. In addition, we did not obtain specific clinical details, including coagulation markers, which would have been beneficial. Finally, as this was a retrospective analysis, the details of DIC were not obtained, such as the level of soluble fibrin and plasminogen activator inhibitor and treatment.

Conclusions

R. tigrinus bites are rare in clinical practice but demonstrated DIC with the fibrinolytic phenotype, which can result in life-threatening injury unless appropriate antivenom and DIC treatment are provided. Throughout the at-risk Asian countries, critical care physicians should be aware of this injury and its treatment.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

TH, AS, AY, YA, and YK collected the patient data. TH, MM, AG, HK, YK, JI, YA, KK, and MH treated patients. TH wrote the manuscript. MA, KS, and YK revised and edited the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This study was supported by Health Science Grants (2013–2015) from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

Author details

¹Emergency Medical Center, Kagawa University Hospital, Toru Hifumi; 1750-1 Ikenobe, Miki, Kita, Kagawa 761-0793, Japan. ²Japan Snake Institute, 3318 Yabutsuka, Ota, Gunma 379-2301, Japan. ³Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Disease, Gakuen 4-7-1, Musashimurayama-shi, Tokyo 208-0011, Japan. ⁴Department of Internal Medicine, Kaizuka Hospital, Hakosaki 7-7-27 Higashi-kuFukuoka 812-0053, Japan. ⁵Department of Immunology, National Institute of Infectious Disease, Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan. ⁶The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute (KAKETSUKEN), 1-6-1 Okubo, Kita-ku, Kumamoto-shi, Kumamoto 860-8568, Japan. ⁷Division of Critical Care Medicine and Trauma, National Hospital Organization Disaster Medical Center, 3256 Midori-cho, Tachikawa, Tokyo 190-0014, Japan. ⁸Division of Critical Care Medicine and Trauma, Yamanashi Prefectural Central Hospital, 1-1-1 Fujimi, Kofu, Yamanashi 400-8506, Japan.

Received: 21 December 2013 Accepted: 21 February 2014
Published: 6 March 2014

References

- Morokuma K, Kobori N, Fukuda T, Uchida T, Sakai A, Toriba M, Ohkuma K, Nakai K, Kurata T, Takahashi M: **Experimental manufacture of equine antivenom against yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*)**. *Jpn J Infect Dis* 2011, **64**:397–402.
- Mori K, Hisa S, Suzuki S, Sugai K, Sakai H, Kikuchi T, Hiwatashi N, Shishido H, Goto Y, Takahashi T: **A case of severe defibrination syndrome due to snake (*Rhabdophis tigrinus*) bite**. *Rinsho ketsueki* 1983, **24**:256–262.
- Tanen D, Ruha A, Graeme K, Curry S: **Epidemiology and hospital course of rattlesnake envenomations cared for at a tertiary referral center in Central Arizona**. *Acad Emerg Med* 2001, **8**:177–182.
- Boyer LV, Seifert SA, Clark RF, McNally JT, Williams SR, Nordt SP, Walter FG, Dart RC: **Recurrent and persistent coagulopathy following pit viper envenomation**. *Arch Internal Med* 1999, **159**:706–710.
- Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, Gea-Banacloche J, Keh D, Marshall JC, Parker MM, Ramsay G, Zimmerman JL, Vincent JL, Levy MM, Surviving Sepsis Campaign Management Guidelines Committee: **Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock**. *Crit Care Med* 2004, **32**:858–873.
- Sakai A: **Clinical feature of envenomation by the snake, Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*)**. *Chudoku kenkyu* 2007, **20**:235–243.
- Sakai AHM, Sawai Y: **Study on the pathogenesis of envenomation by the Japanese colubrid snake, Yamakagashi, *Rhabdophis tigrinus***. *Snake* 1990, **22**:11–19.
- Gando S, Iba T, Eguchi Y, Ohtomo Y, Okamoto K, Koseki K, Mayumi T, Murata A, Ikeda T, Ishikura H, Ueyama M, Ogura H, Kushimoto S, Saitoh D, Endo S, Shimazaki S, Japanese Association for Acute Medicine Disseminated Intravascular Coagulation (JAAM DIC) Study Group: **A multicenter, prospective validation of disseminated intravascular coagulation diagnostic criteria for critically ill patients: comparing current criteria**. *Crit Care Med* 2006, **34**:625–631.
- 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*) antivenom in tertiary care centers in Japan**. *Jpn J Infectious Dis* 2011, **64**:373–376.
- Komori K, Konishi M, Maruta Y, Toriba M, Sakai A, Matsuda A, Hori T, Nakatani M, Minamino N, Akizawa T: **Characterization of a novel metalloproteinase in Duvernoy's gland of *Rhabdophis tigrinus tigrinus***. *J Toxicoll Sci* 2006, **31**:157–168.
- Gando S: **Acute coagulopathy of trauma shock and coagulopathy of trauma: a rebuttal. You are now going down the wrong path**. *J Trauma* 2009, **67**:381–383.
- Kato MTS, Kiyohara Y: **A case of Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*) bite**. *Rinsho Derma* 2003, **45**:133–136.
- Brown SG, Caruso N, Borland ML, McCoubrie DL, Celenza A, Isbister GK: **Clotting factor replacement and recovery from snake venom-induced consumptive coagulopathy**. *Intensive Care Med* 2009, **35**:1532–1538.
- Fujita MYS, Kawamura Y, Tsuruta R, Kasaoka S, Okabayashi K, Maekawa T: **Viper (*agkistrodon halys blomhoffii* "Mamushi") bite with remarkable thrombocytopenia**. *JJAAM* 2005, **16**:126–130.
- Nakamura KIN, Murakami M, Ogawa Y, Momii S: **A case of acute renal and respiratory failure due to mamushi bite**. *JJAAM* 2010, **21**:843–848.
- Sawamura A, Hayakawa M, Gando S, Kubota N, Sugano M, Wada T, Katabami K: **Disseminated intravascular coagulation with a fibrinolytic phenotype at an early phase of trauma predicts mortality**. *Thrombosis Res* 2009, **124**:608–613.
- Mangum M, Venable RH, Boatwright JD, Cocke TB: **Hypoxia: a stimulus for tissue plasminogen activator release in humans?** *Aviat Space Environ Med* 1987, **58**:1093–1096.
- Bartsch P, Haeberli A, Hauser K, Gubser A, Straub PW: **Fibrinogenolysis in the absence of fibrin formation in severe hypobaric hypoxia**. *Aviat Space Environ Med* 1988, **59**:428–432.
- O'Brodovich HM, Andrew M, Gray GW, Coates G: **Hypoxia alters blood coagulation during acute decompression in humans**. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 1984, **56**:666–670.
- Hifumi T, Yamamoto A, Morokuma K, Okada I, Kiriu N, Ogasawara T, Hasegawa E, Kato H, Inoue J, Koido Y, Takahashi M: **Clinical efficacy of antivenom and cephazolin for the treatment of Mamushi (*Gloydius blomhoffii*) bites in tertiary care centers in Japan**. *Jpn J Infect Dis* 2013, **66**:26–31.
- Dart RC, McNally J: **Efficacy, safety, and use of snake antivenoms in the United States**. *Ann Emerg Med* 2001, **37**:181–188.
- General overview of research projects.

doi:10.1186/2052-0492-2-19

Cite this article as: Hifumi et al.: Clinical characteristics of yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*) bites: a national survey in Japan, 2000–2013. *Journal of Intensive Care* 2014 **2**:19.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



RESEARCH

Open Access

Effect of antivenom therapy of *Rhabdophis tigrinus* (Yamakagashi snake) bites

Toru Hifumi^{1*}, Atsushi Sakai², Akihiko Yamamoto³, Masahiro Murakawa⁴, Manabu Ato⁵, Keigo Shibayama³, Hiroshi Kato⁶, Yuichi Koido⁶, Junichi Inoue⁷, Yuko Abe¹, Kenya Kawakita¹, Masanobu Hagiike¹, Akihiko Ginnaga⁸ and Yasuhiro Kuroda¹

Abstract

Background: *Rhabdophis tigrinus* (Yamakagashi snake) is a rear-fanged colubrid snake present throughout Russia and Asia. Its venom induces life-threatening hemorrhagic symptoms and severe disseminated intravascular coagulation with a fibrinolytic phenotype.

R. tigrinus antivenom manufactured by the immunization of horses to neutralize the venom has the risk of adverse events such as anaphylaxis and serum sickness disease. It should be used when benefit is greater than the risk of adverse effects; however, its efficacy has not been well evaluated.

Although our previous survey of nine cases demonstrated that seven of all cases treated with antivenom survived, the clinical characteristics and prognosis without antivenom administration remained unclear. We assumed that *R. tigrinus* antivenom administration overlaps self-recovery with supportive care. We aimed to determine the association between antivenom administration and outcome with further analyzed cases.

Methods: We retrospectively reviewed the records of the Japan Snake Institute between January 1, 1973 and December 31, 2013. Antivenom and without antivenom groups were compared with regard to baseline demographic features, treatment-related factors, and outcomes.

Results: In total, 34 patients were analyzed (97% male, median age 37.5 years). Twenty-five patients were further examined from our previous study. On admission, the median levels of fibrinogen and fibrinogen degradation products were 35 mg/dL and 200 µg/mL, respectively, and platelet counts were 107,000/mm³. The median disseminated intravascular coagulation score (defined by the Japanese Association of Acute Medicine) was 5. Antivenom was administered to 19 patients, with a median interval of 32 h between bite and antivenom administration. The in-hospital mortality rate was 12%. In univariate analysis, baseline characteristics and laboratory data were not significantly different between the antivenom and without antivenom groups. Hospital mortality in the antivenom group was significantly better than that in the without antivenom group (0% vs. 26.7%, $P = 0.03$). Moreover, the number of patients developing renal failure requiring hemodialysis was significantly lower in the antivenom group (5.3% vs. 40.0%, $P = 0.03$).

Conclusions: In our small retrospective study, antivenom administration was likely to be effective in the management of *R. tigrinus* bites. Apparently, further research is required to confirm its efficacy.

Keywords: Yamakagashi, *Rhabdophis tigrinus*, Antivenom

* Correspondence: hifumitoru@gmail.com

¹Emergency Medical Center, Kagawa University Hospital, 1750-1 Ikenobe, Miki Kita, Kagawa 761-0793, Japan

Full list of author information is available at the end of the article