

博士論文

やまかがしウマ抗毒素の開発と保存および応用  
に関する研究

Studies on the Development, Storage and  
Application of Equine Antivenom against  
Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*)

2022年6月

諸熊 一則

Kazunori Morokuma

## 目次

要旨	-----1
ABSTRACT	-----5
研究の背景（文献探索）	----11
1-1 やまかがしの分類と生態学的特徴	----11
1-1-1 やまかがしの分類	----11
1-1-2 やまかがしの生息域	----11
1-1-3 やまかがしの生活環と繁殖	----12
1-1-4 やまかがしの生態学的特徴	----13
1-1-5 やまかがしの毒牙と毒の作用	----14
1-2 やまかがし抗毒素	----15
1-3 やまかがし以外の国内の毒蛇咬傷と抗毒素療法 の現状	----15
1-3-1 はぶ咬傷とはぶウマ抗毒素	----16
1-3-2 まむし咬傷とまむしウマ抗毒素	----18
1-4 蛇毒を構成する成分と蛇毒の創薬への展開	----21
1-4-1 蛇毒の組成と種類	----21
1-4-2 蛇毒の創薬への応用	----23
1-5 研究の概要	----24
第1章 やまかがしウマ抗毒素の作製	----25
1-1 緒言	----25
1-2 材料および方法	----25
1-2-1 やまかがし毒の採取・調製	----25
1-2-2 ウマへの免疫	----28
1-2-3 中和試験(抗毒素価の測定方法)	----30
1-2-4 やまかがし抗毒素血清の精製	----31
1-3 成績	----32
1-3-1 やまかがし毒免疫による抗毒素価の上昇	----32
1-3-2 やまかがし抗毒素の品質評価	----32
1-4 考察	----34
第2章 やまかがしウマ抗毒素の安定性評価	----39
2-1 緒言	----39
2-2 材料および方法	----40
2-2-1 やまかがし抗毒素の安定性モニタリングの 実施時期	----40
2-2-2 やまかがし抗毒素の安定性モニタリング試験	----41
2-3 成績	----44
2-4 考察	----47
第3章 やまかがしウマ抗毒素の臨床評価事例	----50
3-1 緒言	----50
3-2 材料および方法	----52

3-2-1	やまかがしウマ抗毒素	----52
3-2-2	やまかがし咬傷治療例の調査方法	----52
3-3	成績（症例報告とまとめ）	----52
3-3-1	やまかがしウマ抗毒素の初回適用例	----52
3-3-2	やまかがしウマ抗毒素の2回目の適用例	----53
3-3-3	やまかがしウマ抗毒素のその後の適用例	----54
3-4	考察	----55
	総括	----61
	謝辞	----65
	引用文献	----67
	<b>Fig.および Table</b>	----73
	付録	----96
	主論文に関連する参考文献	----99

## 要旨

日本国内での稀な毒蛇咬傷例として、やまかがしのそれがある。やまかがし咬傷には重篤例もあるが、発生が少ないことから治療薬の開発は進まず、医薬品として承認された治療用の抗毒素は存在しない。そこで今回、やまかがし咬傷に視点を当て、治療薬としてのやまかがしウマ抗毒素を試験的に製造することを目的として研究を実施した。やまかがし抗毒素は、過去には家兎および山羊を免疫用動物として作製されている。これらの製剤は、緊急措置の治療に用いられ、その有効性が認められていた。しかしながら、これらの抗毒素は既に枯渇し、現在は存在しない。今回、ウマを免疫用動物として初めて用いて、新しいやまかがし抗毒素の試験的な製造を試みた。この新しい抗毒素は、緊急時の健康危機管理の観点から臨床研究の位置付けでの超法規的な使用を前提として備蓄されるものとなる。

第 1 章では、やまかがし抗毒素のウマを用いた初めての試験製造について述べた。約 500 匹のやまかがしから、毒素 11g を採取し、2 頭のウマにやまかがし毒の免疫を行った。抗毒素価の上昇を待って血清を採集し、市販のウマ抗毒素製剤に準拠した方法で免疫グロブリン画分を精製した。その後、

至適条件下で凍結乾燥させ、治療用の「乾燥やまかがしウマ抗毒素(Lot 0001)」1,369本を2000年に作製した。製剤の品質試験として実施した純度試験では、製剤中に免疫グロブリン( $\gamma$ -グロブリンと T-グロブリン)のみが含まれることが確認された。力価試験では、製剤1本が約13mgのやまかがし毒を中和することが確認された。抗凝固活性の定量試験では、製剤1本中に約4mgのやまかがし毒を中和する活性を含むことが確認された。また、その他の一般性状試験では、当製剤が市販のその他のウマ抗毒素製剤と同等の品質であることが確かめられた。故に、このやまかがしウマ抗毒素は咬傷患者の救命に必須の治療薬になり得る。

第2章では、作製日から長期経過した、やまかがしウマ抗毒素(Lot 0001)の品質保持について述べた。2021年にはやまかがしウマ抗毒素(Lot 0001)が、作製日から21年を経過する。このことから、長期間保存による製剤への影響を確認するため、経時的に品質試験を行った。その結果、性状確認試験、不溶性異物試験、浸透圧比試験、pH試験、たん白質含量試験、エンドトキシン試験および無菌試験については、製造直後の成績と比較して、2020年12月時点で変化を認めなかった。含湿度については、製造直後に比べて2020年では若干の上昇傾向がみられたが、上昇後でも規格内の低い値であった。

製剤の異常毒性否定試験および発熱試験においても、長期間保存による変化は認められなかった。製剤の力価試験についても、製造直後の力価が 2020 年において保持されていた。以上の成績から、やまかがしウマ抗毒素(Lot 0001)は、製造から 21 年が経過した現時点でも製剤として有効であると考えた。

第 3 章では、やまかがしウマ抗毒素(Lot 0001)が、緊急事態として発生したヒトやまかがし咬傷の重症例において使用された例について述べた。2000 年の試験製造以降、2001 年と 2011 年に 2 例の重篤なやまかがし咬傷患者に緊急避難的に当製剤が使用された。また、2017 年に発生した 2 例のやまかがし重症患者に対しても当製剤が使用された。その結果、すべての症例で治療は成功し、顕著な副反応もみられなかった。以上のように、やまかがしウマ抗毒素(Lot 0001)が患者の救命に寄与したことが確認された。2017 年の咬傷事例では、この時点で抗毒素は製造から既に 17 年が経過していたにもかかわらず、顕著な有効性が認められた。2017 年の治療例は製剤の長期保存後の品質安定性の事実を支持する事例である。

本研究の結論は次のとおりである。

1. やまかがし毒を免疫用抗原として用いて、国内初の「やまかがしウマ抗毒素(Lot 0001)」の 1,369 本を試験製造

した。本研究はやまかがしウマ抗毒素の作製について初めて示したものである。

2. やまかがしウマ抗毒素(Lot 0001)は、承認薬である他の抗毒素と同様に人用製剤としての品質を保有することが確認された。また、製剤 1 本は 4mg 以上のやまかがし毒を中和することが分かった。
3. やまかがしウマ抗毒素(Lot 0001)が、製造から 21 年を経過した 2021 年現在でも、概して、製造直後の品質を保持することが分かった。ウマ抗毒素が 20 年もの長期間保存出来る事実が本研究により初めて示された。
4. 2000 年の試験製造以降 17 年を経過したやまかがしウマ抗毒素(Lot 0001)が、やまかがし咬傷重篤患者に有効である事実が初めて示された。

以上のように、本研究の成果は、人命救助および日本の医療や蛇毒抗毒素療法の実現に貢献したものであり、本研究の社会的意義は大きいと考える。

## ABSTRACT

Bites by Yamakagashi, *Rhabdophis tigrinus* are rare in Japan. Although there are serious cases of *R. tigrinus* bites, the incidence is extremely low. Thus, development of therapeutic drugs commercially has not progressed, and no therapeutic antivenom has been approved as a pharmaceutical drug. We conducted a study with the primary objective of experimentally manufacturing the Yamakagashi equine antivenom as a therapeutic drug. In the past, antivenom against *R. tigrinus* was experimentally manufactured using rabbits and goats as animals for immunization. It has been reported that these antivenom were used for treatment as an emergency measure and was found to be effective. However, this antivenom has already been used up and no longer available. In this study, we produced a new lot of Yamakagashi antivenom using horses for the first time as immunization animals. This new antivenom was stockpiled on the premise of extrajudicial use in clinical research from the viewpoint of emergency health risk



management. This thesis consists of three chapters, in which the development, storage and application of the Equine antivenom against Yamakagashi (*R. tigrinus*) are described.

In Chapter 1, we described the new test-production of Yamakagashi equine antivenom. 11 g of Yamakagashi venom was extracted from about 500 heads of *R. tigrinus*, and two horses were immunized with the venom. Serum was collected after waiting for the antivenom titer to increase, and immunoglobulins were fractionated and purified by a method compliant with commercially available equine antivenom products. This was followed by lyophilization to produce 1,369 vials of "Freeze-dried Yamakagashi Antivenom, Equine (Lot 0001)" for therapeutic use in 2000. A purity test conducted as a quality control test of this product confirmed that only immunoglobulins ( $\gamma$ -globulin and T-globulin) were contained in the product. A potency test confirmed that one vial of the product neutralized about 13 mg of *R. tigrinus* venom. Quantitative testing of anticoagulant activity confirmed that each vial of the product could

neutralize the activity of about 4 mg of *R. tigrinus* venom. Other general tests confirmed that this product is comparable in quality to other horse antivenom products on the market. This Yamakagashi equine antivenom can be an indispensable therapeutic drug to save the life of bite patients by *R. tigrinus*.

In Chapter 2, we described the quality retention of the "Freeze-dried Yamakagashi Antivenom, Equine (Lot 0001)" after a long period of time from the date of production. In 2021, twenty-one years has passed since the Yamakagashi equine antivenom (Lot 0001) has been manufactured. Therefore, quality control tests were conducted over time to confirm the effect of long-term storage on this product. As a result, no particular changes were observed in the physical and chemical tests (property test including dissolution time, insoluble foreign matter test, osmotic pressure ratio test, test of pH, test for protein content, endotoxin test, and sterility test) as of December 2020, as compared to the results immediately after test-manufacturing. Although the moisture content tend to increase after manufacturing, it

was still much lower than the specified level, and thus conformed to the test. No changes were observed in test for freedom from abnormal toxicity and pyrogen test of the product after long-term storage. The potency test (anticoagulant activity) of the product also showed that the potency immediately after manufacture was sufficiently maintained in 2020. Based on the above results, we considered that Yamakagashi equine antivenom (Lot 0001) is still effective as a therapeutic drug even at 21 years after its production.

In Chapter 3, we summarized the cases in which the "Freeze-dried Yamakagashi Antivenom, Equine (Lot 0001)", as described in Chapter 1, was used in emergency situation in severe Yamakagashi bite patients. Since its test-production in 2000, the Yamakagashi equine antivenom has been used as an emergency drug in two serious cases of *R. tigrinus* bites in 2001 and 2011. Also, this product was used in two cases of severe Yamakagashi bite that occurred in 2017. As a result, these treatments with antivenom were successful in all cases, with no significant adverse reactions. As described above, it was

confirmed that the Yamakagashi equine antivenom (Lot 0001) contributed to saving the patient's life. In the 2017 bite case, the antivenom was found to be remarkably effective, even though the product had already been test-manufactured 17 years ago. The 2017 therapeutic cases proved the retention of the quality stability after long-term storage of the product.

The conclusions of this study are as follows.

- 1) 1,369 vials of Yamakagashi equine antivenom (Lot 0001) were test-manufactured for the first time in Japan, using *R. tigrinus* venom as an antigen for immunization. This study is the first to demonstrate the production of Yamakagashi equine antivenom.
- 2) Yamakagashi equine antivenom (Lot 0001) was found to possess the same quality as other approved antitoxins for human use. In addition, one vial of the product was found to neutralize more than 4 mg of *R. tigrinus* venom.
- 3) Yamakagashi equine antivenom (Lot 0001) was found to generally retain its immediate post-production quality even in 2021, that is, 21 years after

production. This equine antivenom could be stored for as long as 20 years was demonstrated for the first time.

- 4) Seventeen years after its test-production in 2000, the Yamakagashi equine antivenom (Lot 0001) was shown to be still effective in patients with severe cases of *R. tigrinus* bites, and thus demonstrating its life-saving efficacy.

As described above, the results of this study have contributed to the saving of lives and the development of medical care and snake antivenom therapy in Japan. The contribution of our study to science and society is deemed to be significant.

## 研究の背景（文献探索）

### 1-1 やまかがしの分類と生態学的特徴

#### 1-1-1 やまかがしの分類

蛇は、鱗状の皮膚より命名された爬虫綱 *Reptilia* の *Serpentes* 亜目に分類される。その下には *Scolecophidia* と *Alethinophidia* の 2 つの大きな下目があり、約 27 科に属する約 3,600 種の蛇が世界中に存在している (**Fig. 1**) (Mohamed *et al.*, 2019)。この系統図の中で、やまかがし (*Rhabdophis tigrinus*) は分類学上、ナミヘビ科 *Colubridae* に属し、以下の通りに分類されている。

動物界 *Animalia*

脊索動物門 *Chordata*

脊椎動物亜門 *Vertebrata*

爬虫綱 *Reptilia*

有鱗目 *Squamata*

ナミヘビ科 *Colubridae*

ユウダ亜科 *Natricinae*

ヤマカガシ属 *Rhabdophis*

ヤマカガシ *Rhabdophis tigrinus*

#### 1-1-2 やまかがしの生息域

やまかがし(*Rhabdophis tigrinus*)は中国や台湾の山岳地帯、韓国やロシアの南部沿海と日本の殆どの地域を含む東アジアに広く分布するナミヘビ科の蛇である(千石, 1983)。日本国内ではやまかがしは北海道を除くほぼ全域に生息しており、地域により体色の色彩変異が大きい(Fig. 2)。関東や東北地方の個体は赤と黒の斑紋が目立つが、近畿地方では赤色が薄かったり殆どない個体もあり、中国地方では青色型もみられる(鳥羽, 2002)。

やまかがし(*Rhabdophis tigrinus*)の地域変異に関して、Takeuchiらはやまかがしのミトコンドリア・チトクローム b 遺伝子の部分配列を解読し、種内系統の違いを解析されている(Takeuchi *et al.*, 2012)。その結果、これらの個体は何れも単一系統であり、日本に生息するやまかがし個体群のハプロタイプは大きく 2 つのクレード(Clade I, II)に分類され、パラパトリック種分化により形態学的特徴が急速に変化したものと推定された。

### 1-1-3 やまかがしの生活環と繁殖

やまかがしは明るい時間に活動することが多く、夜間は積極的には活動しない。冬場は土の下などで冬眠をし、寿命は自然環境下では 5 年程度と考えられている。生息に最適な温

度は 18～30℃である。カエルを主食とし、その他、魚、ドジョウ、オタマジャクシなどを食べる。他の蛇は敬遠するが、やまかがしは毒をもつヒキガエルを好んで捕食する。

やまかがしの繁殖時期としては、基本的に冬眠直前の秋頃に交尾を行う。稀に交尾の機会を逃したやまかがしが冬眠から覚めた春先に交尾する場合もある。妊娠した雌のやまかがしは夏に 10～20 個程度の卵を産卵する。産卵場所は石や落ち葉などの下で、卵の孵化には 30～50 日を要する。孵化後の幼蛇の体長は 20 cm 程度であるが、3 年程度で約 1m まで育つ(危険生物 MANIAX, 2017)。

#### 1-1-4 やまかがしの生態的特徴

やまかがしは全長 70～150 cm の大きさに成長し、日本に生息する蛇としては中型である。鱗は 1 枚 1 枚の隆起性が強く、触るとザラザラした手触り感がある。これはやまかがしが生活の中で水中を泳ぐ機会が多く、泳ぎに適した形態に進化したためと考えられている。やまかがしの頭部はまむしやはぶと異なり、三角形ではなく細い丸型を呈している。頸部には黄色の輪状模様があり、褐色地に黒・黄色・赤が交互に重なり鮮やかな体色をしている(Fig. 2)。特に若い個体でこの模様となる傾向が強い。しかし、やまかがしの模様には個体差・



地域差が強く、全体が黒褐色を呈したり、鱗に赤い模様がなかったり、黄色の輪状模様もない個体もあり、他の蛇との判別が困難な場合がある(鳥羽, 2002)。

#### 1-1-5 やまかがしの毒牙と毒の作用

やまかがしにはまむしのような管状の牙はなく、牙の付け根に分泌腺に繋がる管が開口しているため、浅く咬まれただけでは毒は殆ど注入されず、痛みや腫れが殆どないため、かつては無毒蛇と思われていた(**Fig. 3**)。しかし、近年、咬まれた後、血液凝固系に機能障害をおこし死に至った例が報告されている(Mori *et al.*, 1983; Ogawa and Sawai, 1986; Ueno *et al.*, 2021)。やまかがしの毒はプロトロンビンの活性化効果とフィブリノーゲンへも直接作用する弱いトロンビン様作用でプラズマに対する強い凝固活性を示す(**Fig. 4**)(Sakai *et al.*, 1983; 1990)。やまかがし毒のこれらの作用に関連し、やまかがし毒の注入によって誘発される全身性の持続的な出血傾向は、毒のもつこれらの凝固活性によって誘導される低フィブリノーゲン血症に起因することを示唆している(Sakai *et al.*, 1983; 1990)。

また、やまかがしには上記の本来の毒の他に、頸腺毒も保有している。やまかがしの頸部皮下に約 15 対の小さな腺が並

んでおり、この腺にヒキガエルの毒であるブフォタリンに類似した成分の毒がある。イタチやイヌに襲われたり、ヒトが棒で叩いたりした場合に、この毒腺が破れて毒が飛び散り眼に入る事故も起きている。毒には強い刺激があり、霧視、結膜充血、角膜浮腫や混濁などを引き起こす(堺, 2013)。

### 1-2 やまかがし抗毒素

やまかがし咬傷には重症例もあるが、国内での発生が極めて少ないこともあり、医薬品として承認された治療のための抗毒素は存在しない。しかし、このような現状に対し、1986年に家兎および山羊を免疫用動物としてやまかがし抗毒素が試験製造され、翌年の1987年に発生した重症やまかがし咬傷患者の2症例に対し、緊急措置として治療に用いられた経緯があり、やまかがし抗毒素の有効性が認められるとの報告がある(Kawamura *et al.*, 1986; Wakamatsu *et al.*, 1986; 若松・是枝, 1986; Kikuchi *et al.*, 1987; Kawamura *et al.*, 1989; Nomura *et al.*, 1989; Akimoto *et al.*, 1991)。その後、やまかがし抗毒素は作製されておらず、1998年にはこの抗毒素の枯渇が明らかとなった。

### 1-3 やまかがし以外の国内の毒蛇咬傷と抗毒素療法の現状

日本国内に生息する毒蛇には、やまかがしの他に、まむしとはぶの3種類があり、毒蛇咬傷としてはまむし咬傷とはぶ咬傷が一般的であり、極めて稀な発症例として、やまかがし咬傷がある。まむし咬傷およびはぶ咬傷に対しては、それぞれの毒素の中和を目的とした治療薬として、国内で認可承認された医薬品の「乾燥まむしウマ抗毒素」と「乾燥はぶウマ抗毒素」があり(厚生労働省, 2004a; 2004b)、どちらも医療現場への供給体制も整っている。

#### 1-3-1 はぶ咬傷とはぶウマ抗毒素

はぶは沖縄県の沖縄諸島と八重山諸島、および鹿児島県の奄美諸島の大島本島、トカラ諸島、加計呂麻島、与論島、請島と徳之島に生息している毒蛇である。はぶはクサリヘビ科マムシ亜科のハブ属に属し、ハブ (*Protobothrops flavoviridis*)、サキシマハブ (*Protobothrops elegans*)、トカラハブ (*Protobothrops tokarensis*)、ヒメハブ (*Ovophis okinavensis*)の4種類に分類され、その毒はすべて致死作用と出血作用を持っている(貞弘, 1965)。ハブおよびヒメハブは奄美、沖縄諸島に広く分布しているが、サキシマハブは八重山諸島に、トカラハブはトカラ諸島にのみ生息する。

はぶによる咬傷は、一般に受傷直後に感じる強烈な痛みか、

あるいは棒で打たれたような鈍痛を感じるとされている。咬傷部位は時間が経過するにつれて暗紫色に腫脹し、水疱の形成を見るに至る。腫脹が容易に回復しない場合は、局所の筋肉組織に壊死を起こす場合が多い。受傷後適切な治療がなされなかったり、注入毒量が多い場合は、患者はほぼ 24 時間以内にショック症状を呈して死亡する。あるいは、救命はできたとしても局所の軟組織が壊死に陥り、機能障害などの後遺症の原因となる(貞弘, 1994)。はぶ毒には致死毒と 2 種類の出血毒(HR I と HR II)が含まれている(Ohsaka *et al.*, 1960)。はぶ抗毒素はこれら 3 種類の毒素を中和することを指標として製造されている(厚生労働省, 2004b)。はぶ毒はこれらの毒以外にも筋肉の壊死を起こす因子(Chinzei, 1974)や腫脹活性を起こす因子(山川・他, 1973)等の存在も知られている。さらに多数の酵素が含まれており、色々な物質が相乗的に作用して毒作用を発揮すると考えられている。

近年のはぶ咬傷の発生は、沖縄県と鹿児島県を合せて年間 100～200 名の患者で推移し、年々減少傾向にある(鹿児島県, 2019)。はぶ咬傷で重要なのは生体内に注入された毒液の量である。はぶの毒液は毒牙の先端から注入されるのではない。毒液の注入口は毒牙先端の 3～4mm 奥部にある。したがって咬まれた場所によっては毒液が体内へ注入されない場合もあ

る。一方、複数回の咬傷を受けて大量の毒が注入される場合もある。

咬傷を受けた場合は先ず、毒を出来るだけ体外に出すことが重要である。咬傷を受けた局所の病変の進行が速いため、咬傷直後の応急処置や抗毒素注射までの時間が治療上の大きなポイントとなる。最近は道路事情がよくなり、患者が医療機関へ到着する時間が短縮され、初期治療が医師の手で適切に行われるようになってきているので、良好な治療結果が得られるようになってきている(鹿児島県, 2001)。

はぶ抗毒素は 1954 年に液状製剤として開発・導入され、その後 1965 年に凍結乾燥化がなされ、現在の剤形である乾燥はぶ抗毒素が使われるようになった(細菌製剤協会, 1996b)。現行のはぶウマ抗毒素ははぶ毒で免疫したウマの血清をペプシン処理後、硫酸分画によって精製したウマの免疫グロブリンに安定剤としてグルタミン酸ナトリウムを加えて凍結乾燥したものである。この抗毒素の有効期間は国家検定合格日から 10 年とされている(厚生労働省, 2004b)。

### 1-3-2 まむし咬傷とまむしウマ抗毒素

ニホンマムシはクサリヘビ科マムシ属ニホンマムシ(*Gloydius blomhoffii*)で日本固有の蛇であり、北海道、本州、

四国、九州に生息している毒蛇である。体長は 45～60cm で胴が太く、太短い体形をしている。

まむしは毒牙を 2 本持ち、咬傷時には牙痕からの出血が認められ、時に牙痕周囲に内出血が起こる。受傷 30 分後には疼痛を伴って受傷局所を中心とする腫脹が起こり、注入された毒量の多寡に応じて圧痛と共に進展する。腫脹の強い部分には次第に水疱形成が起こる。毒が局所のリンパ系や静脈系を介して全身に拡がると重症化し、複視、出血傾向、心筋障害、横紋筋融解による急性腎不全などの全身症状を引き起こし、時に致命的となる。死因としては急性腎不全が最も多い(湯浅・他, 1991)。死亡率は従来 0.1% 程度とされていたが(館野・他, 1964)、末広らは 155 例の自験例による死亡率を 1.3% と報告し(末広・他, 1986)、星野らは 616 例の症例を集計して死亡率を 1% と算出している(星野・他, 1998)。まむし咬傷による死亡ははぶに比べると亜急性で 3 日から 9 日の間に起こる(館野・他, 1964)。また、まむし咬傷であっても、毒牙が直接静脈に入った場合は腫れが軽くなることもあり、特に出血傾向の見られるケースでは、しばしばやまかがし咬傷と誤診されることもあるので、両者の鑑別には注意を要する(堺, 2013)。

まむし咬傷の症例数ははぶのような報告制度がないため不明である。しかし、全国調査による 2007 年におけるまむし咬

症発生件数の推定結果や、まむし咬傷の治療薬であるまむし抗毒素が毎年約 3,000 本出荷されている事実を考慮し、年間 3,000 例以上の咬傷患者が発生しているものと推測されている(塚・他, 2009)。

まむし咬傷の治療の原則は、はぶ咬傷の場合と同様である。局所の切開、洗浄と吸引による毒の排除、抗生物質・破傷風トキソイドおよび治療薬の投与である。治療薬にはまむし抗毒素とセファランチンが使われる(長谷川・高橋, 1952)。セファランチンはタマサキツズラフジの根茎から抽出されたアルカロイドであり、生体膜の安定化作用を持つことからまむし咬傷の対処療法薬として使用されることがある(矢埜・他, 1992; 中山・他, 1994; 小玉・他, 1994; 河内・他, 1995)。しかし、まむし咬傷の唯一の治療薬はまむし毒に対する中和作用を有するまむし抗毒素である。抗毒素の使用例では非使用例に比較して有意に全身症状の出現率が低く治療日数も短い(牧野, 1988)。また、抗毒素の使用によって死亡率を減少させ、治療成績を明らかに向上させている症例も報告されている(星野・他, 1998)。しかしながら、抗毒素の皮内反応陽転率は 41% もあり、抗毒素に対する即時反応は約 5% に見られ(真栄城, 1979)、はぶ抗毒素と同様に常にアナフィラキシーショックに対する準備をしておかなければならない。また、血清病

も 8～20%の割合で起こっている(星野・他, 1998; 真栄城, 1979)。抗毒素は可能な限り早期の投与が望ましいが、抗毒素の投与に当っては患者に対して副作用に関する事前の十分な説明が必要である。

まむし抗毒素は 1953 年から実用化された。はぶ抗毒素と同様、最初は液状製品で、1971 年から凍結乾燥製品を使用するようになり、1976 年からは凍結乾燥製品だけになった(細菌製剤協会, 1996a)。まむし抗毒素の製造方法もはぶ抗毒素と殆ど同じで、まむし毒で免疫したウマの血清をペプシン処理後、硫酸分画で精製したウマの免疫グロブリンであるまむし抗毒素に安定剤としてグルタミン酸ナトリウムを加えて凍結乾燥したものである。抗毒素の有効期間は国家検定合格日から 10 年である(厚生労働省, 2004a)。

#### 1-4 蛇毒を構成する成分と蛇毒の創薬への展開

##### 1-4-1 蛇毒の組成と種類

蛇毒は、一般的に牙と管が繋がった一対の特殊な外分泌毒腺から分泌されるカクテル状分泌物である。蛇毒は単一成分ではなく、毒性・生理活性のあるたん白質やペプチドが複雑に混ざり合ったものである。一個体の毒液中に約 100 種類の成分が存在することを示した報告もあり、毒液の乾燥重量の



90-95%以上が、これらのたん白質やペプチドであると考えられている。これらのたん白質の中には酵素活性を示すものもあれば、非酵素活性たん白質やペプチドもある (**Fig. 5**) (Mohamed *et al.*, 2019)。蛇毒に含まれるその他の成分には、ヌクレオシド、金属カチオン、炭水化物、超低分子量の遊離アミノ酸 および脂質があり、生物学的活性は低いとされている (Gopalakrishnakone and Inagaki, 2017)。

特に、蛇毒の一般的な酵素活性たん白質には、たん白質分解酵素 (Proteolytic enzymes)、アルギニンエステルヒドロラーゼ (Arginine ester hydrolases)、トロンビン様酵素 (Thrombin-like enzymes)、ヒアルロニダーゼ (Hyaluronidases)、ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (Phospholipase A<sub>2</sub>: PLA<sub>2</sub>)、アセチルコリンエステラーゼ (Acetylcholinesterase: AChE)、ヌクレアーゼ (Nucleases: RNase、DNase and Phosphodiesterase)、L-アミノ酸酸化酵素 (L-amino-Acid oxidase: LAAO) などがある (**Fig. 6**)。蛇毒はこれらの酵素の最も豊富な供給源として知られている (Kang *et al.*, 2011)。

また、蛇毒には、毒蛇の種類により様々な種類の毒がある。大別すると、次の 5 つに分類される (Cleveland Clinic, 2022)。

#### 1) Cytotoxins (細胞毒):

噛まれた場所に腫れと組織損傷を引き起こす。

2) Haemorrhagins (出血毒):

血管を破裂させる。

3) Anti-clotting agents (抗凝固活性毒):

血液凝固を阻害する。

4) Neurotoxins (神経毒):

神経系の麻痺などの障害を与える。

5) Myotoxins (筋毒素):

筋肉を破壊する。

#### 1-4-2 蛇毒の創薬への応用

動物のもつ毒は、外敵からの自己防衛手段として、また、獲物捕獲のための目標動物固定化用の武器として使用される。実際、動物毒は酵素活性および非酵素活性成分の複雑な混合物であり、特定の病態生理機能を有している。動物毒から単離されたたん白質やペプチドの毒成分は、主にイオンチャネル、膜受容体、止血系成分を標的とした活性中心を選択的に保有し、その親和性は極めて高い。動物毒の中でも、特に蛇毒は伝統的な中国医学において、何千年もの間、医療用素材として使用されてきた。そのため、蛇毒はそれぞれの成分が薬理活性を有するミニドラッグ・ライブラリーとみなすことができる。しかし、これらの蛇毒成分のうち、同定され特性

解析により薬効評価がなされているのは 0.01%未満である。例えば、Captopril® (Enalapril)、Integrilin® (Eptifibatide)、Aggrastat® (Tirofiban)は蛇毒由来の製剤であり、FDA によって医薬品として製造承認されている(**Table 1**)。これらの承認済み医薬品以外にも、多くの蛇毒成分を基にした製剤が様々な治療用途としての薬効の獲得を目指して、現在、非臨床試験や臨床試験が行われている(Bordon *et al.*, 2020)。これらの例は、蛇毒のもつ生理活性成分が創薬における新しい原理と薬理作用の解明を通して、今後、蛇毒がその貴重な供給源となり得る可能性を示している(**Fig. 6**)(Mohamed *et al.*, 2019)。

## 1-5 研究の概要

本学位論文では、下記の各章に挙げた項目に従って、やまかがしウマ抗毒素の試験製造およびやまかがし咬傷における抗毒素療法の現状と、その後のフォローを通じた研究全般の内容を詳細に述べる。

第1章 やまかがしウマ抗毒素の作製

第2章 やまかがしウマ抗毒素の安定性評価

第3章 やまかがしウマ抗毒素の臨床評価事例

総括では各章で得られた知見をまとめ、考察を加えた。

## 第 1 章 やまかがしウマ抗毒素の作製

### 1-1 緒言

やまかがし(*Rhabdophis tigrinus*)は東アジアに広く分布するナミヘビ科に属する有毒の蛇である。我が国ではやまかがしの咬傷による重度の症例で、致命的な転帰をとる症例が頻度は少ないものの定期的に発生している(**Table 2**, **Table 3**)(Hifumi *et al.*, 2014)。このような重篤な症例は 1 年に 1 件あるかないかであるが、過去には家兎および山羊を免疫用動物として試験製造されたやまかがし抗毒素が有効に使用されてきた(Kawamura *et al.*, 1989)。免疫用動物としては、山羊とウマが原血漿を多量に得られることからその候補に考えられたが、国内で製造している抗毒素はすべてウマ製剤であり、ヒトへの投与実績と人畜共通感染症の観点から、今回、我々はウマを免疫用動物として新たにやまかがし抗毒素を試験的に製造し、緊急時の健康危機管理の観点より、臨床研究の位置付けでの超法規的な使用を前提として備蓄に供することとした。

### 1-2 材料および方法

#### 1-2-1 やまかがし毒の採取・調製

やまかがしから毒を採取する方法は幾つか提案されているが(Hill and Mackessy, 1997)、やまかがしははぶやまむしのように管状の牙がないため、免疫用抗原としてのやまかがし毒の採取に当っては1匹の個体から繰返して採毒することができず、多くの蛇を捕獲し、毒腺であるドウベルノイ腺を切除する必要がある。やまかがしの毒は Sakaiらのドウベルノイ腺を摘出し抽出して採取する方法によった(Sakai *et al.*, 1983; Kawamura *et al.*, 1986; 1989; Morita *et al.*, 1988)。本州と九州において約500匹のやまかがしを捕獲し、1匹のやまかがしから左右2片のドウベルノイ腺を摘出し総重量約90gを確保した。摘出した毒腺は-80℃に凍結保管後、RO水(精製水)90mLを加え、乳鉢を用いて数回に分け磨砕し、10,000gで20分遠心し上清を採取した。沈渣に再度90mLのRO水(精製水)を加えて同様の操作を2-3回繰返し、集めた上清を抽出毒素液とした。これらの抽出毒素液を集めて小型凍結乾燥装置を用いて凍結乾燥後、90mLのRO水(精製水)に溶解し不溶性の粘液成分を10,000gで20分遠心除去し、再凍結乾燥して免疫用のやまかがし毒(生毒)11gを得た。

免疫用不活化毒の調製は、次のとおり行った。ホルマリン不活化毒は、やまかがし生毒(5mg/mL)100mLにL-リジン塩酸塩0.1gを加え、7日間隔で2回100v/v%ホルマリンを0.5mL

ずつ添加し 37°C 2 週間で無毒化して調製した。その後、透析膜 (Seamless Cellulose Tubing, VISKASE SALES CORPORATION, NH, USA) を用いて M/75 リン酸塩緩衝塩化ナトリウム (pH7.2) で透析し、余剰のホルマリンを除去した。調製した不活化毒は、ウサギ皮内試験でやまかがし毒による出血斑を認めず、マウス静脈内投与試験でも死亡例が認められなかったことから、残余毒性のないことを確認した。また、リポソーム処理トキソイドの調製は、dipalmitoyl phosphatidyl choline、dipalmitoyl phosphatidyl ethanolamine、cholesterol および dimyristoyl phosphatidyl glycerol で構成されたリポソームを用い (日本油脂株式会社、東京)、リポソームのアミノ基と抗原のアミノ基をグルタルアルデヒドで架橋する方法により行った (Uchida *et al.*, 1998)。具体的には、基礎免疫 1 回あたりに投与する抗原量の調製方法として、リポソーム 90mg とやまかがし生毒 5mg の懸濁液 2.5mL に、2.5% グルタルアルデヒド 0.5mL を滴下し、37°C で 30 分間攪拌した。次に、残余のアルデヒド基をブロックするために 3M glycine-NaOH (pH 7.2) 0.5mL を加え、4°C にて 1 晩静置した。リポソーム非結合のやまかがしトキソイドを Sepharose CL-4B カラム (ファルマシア株式会社、英国) で除去し、リポソーム結合トキソイド画分だけを集め免疫

用抗原とした。無毒化の確認は、前述のホルマリン不活化毒の場合と同様の方法で実施した。

#### 1-2-2 ウマへの免疫

調製した免疫用抗原を用い、市販のはぶ又はまむし抗毒素と同じ方法、またはリポソームで処理した抗原を用いる方法によって、各々1頭のサラブレッド(6歳(No.1313)・12歳(No.1319), 雌)を免疫した(作間, 2002)。なお、本研究は、KMバイオロジクス株式会社の動物実験倫理委員会の規定を遵守し、その審査を受けて実施した。免疫後、経時的に採血したウマ2頭の血清の抗毒素価は、ウサギ皮内試験による抗出血活性と正常ラット血漿を用いた *in vitro* 試験による抗凝固活性の両者の活性により測定した。

##### 1) 従来法による免疫(ウマ No.1313)

ホルマリン不活化やまかがし毒(5mg/mL)を同量の不完全フロインド・アジュバント(BACTO ADJUVANT INCOMPLETE FREUND, DIFCO LABORATORIES, DM, USA)と等量混合し免疫用抗原(2.5 mg/mL)を調製した。基礎免疫としてアジュバントを含む不活化毒 10 mLを1週間隔で2回背肋部に皮下注射し、1.5箇月後に追加免疫としてアジュバントを含まない不活化毒(5mg/mL)5mLを1週間隔で3回

皮下注射した。さらに、その 20 日後に 2 回目の追加免疫としてアジュバントを含まない生毒を 1mg から 5mg、10 mg、20 mg、50 mg、250 mg、500 mg(2 回)に増量しながら 8 回に亘り皮下投与により免疫した。免疫量はウマ個体の健康状態(注射局所の腫脹・硬結および発熱・歩行状況・動作・食欲・飲水・排泄物等の全身症状)および抗毒素価上昇の程度を観察しつつ適宜増量した。基礎免疫開始の 4 箇月目に抗毒素価の上昇を認めたため、免疫 5 箇月頃から 1 週間隔で 5L ずつ 4 回の部分採血を行い、全 20L の血液から約 9.0L の血清を得た。

## 2) リポソーム処理抗原による免疫(ウマ No.1319)

リポソーム処理やまかがしトキソイド(約 0.5mg/mL) 10 mL を基礎免疫として 1 週間隔で 3 回背肋部に皮下注射し、その 1 箇月後に追加免疫としてアジュバントを含まない生毒を 1mg から 10 mg、50 mg、250 mg、500mg(2 回)、1,000mg に増量しながら 7 回に亘り皮下投与により免疫した。免疫量はウマ個体の健康状態および抗毒素価上昇の程度を観察しつつ適宜増量した。抗毒素価は基礎免疫開始の 1 箇月目から徐々に上昇し始め、免疫 3 箇月目に急上昇したため、免疫 4 箇月頃から 1 週間隔で 5L ずつ 5 回の部分採血を行い、全 25L の血液より約 9.5L の血清を得た。



### 1-2-3 中和試験(抗毒素価の測定方法)

#### 1) 抗凝固活性の測定

抗凝固活性の測定は Sakai らの方法で行った(Sakai and Sawai, 1984; Kawamura *et al.*, 1989)。生理食塩液で至適濃度に希釈した抗毒素の希釈液 0.05mL と、濃度を変量したやまかがし毒 0.05mL を混合し、37°C で 30 分間加温処理した。次に、CaCl<sub>2</sub> 溶液 0.1mL を混合し、正常ラット血漿 0.1mL を添加した。試験対照として、変量したやまかがし毒と CaCl<sub>2</sub> 溶液を混合し、同様に正常ラット血漿を加えた。両者の凝固時間とやまかがし毒の濃度について用量反応線を求め、20 秒で凝固する毒素量を中和価として算出した(**Fig. 7**)。

#### 2) 抗出血活性の測定(ウサギ皮内試験)

抗出血活性の測定にはウサギ(日本白色種, 雌, 北山ラベス株式会社)14羽を用いた。体重 1.8~2.2kg のクリーンウサギを導入し、5~7 日間馴化後に試験に供した。動物実験は KM バイオロジクス株式会社の動物実験倫理委員会の規定を遵守し毎年審査を受けて実施した。やまかがし毒をウサギの背部の皮内に注射して約 10mm の出血斑を示す毒素量(1MHD)の 10 倍の毒素量と、抗毒素の希釈液を 2 倍階段希釈して等量混合し、室温で 1 時間静置後、混合液の 0.2mL をウサギの皮内に注射した。注射 18-24 時間後に判定し、やまかがし毒

の出血活性を中和した抗毒素希釈液の希釈倍数から抗毒素の中和価を算出した(**Fig. 8**)。

#### 1-2-4 やまかがし抗毒素血清の精製

やまかがし抗毒素の精製法は、市販のウマ抗毒素製剤と同等の品質を確保することを前提に、他抗毒素の製造に準じて行い、得られたウマの抗血清をペプシン処理後、硫酸分画で免疫グロブリンを精製することにより実施した(**Fig. 9**)。

ウマ 2 頭(No.1313 と No.1319)から合計 9 回の部分採血による血清を混合した。この粗血清 18.5 L に蒸留水を加え、蛋白量を 3% (pH4.2)に調整後、ペプシンを 0.1%の割合に加え、37℃で一晩静置した。この溶液を 2 mol/L HCl で pH4.5 に修正し、硫酸アンモニウムを終濃度 15%の割合に加え、56℃で 1 時間の非働化を行った。10,000g で 40 分遠心し上清を 1 mol/L NaOH で pH7.0 に修正し、硫酸アンモニウムを終濃度 20%の割合に追加した。10,000g で 40 分遠心した後の沈渣を蒸留水で溶解し、0.85%生理食塩液で透析し、グルタミン酸ナトリウム(2%)および生理食塩液(0.85%)を添加し 7.1L の免疫グロブリン溶液を得た。この溶液を 20mL 用バイアルに 5mL ずつ分注後、凍結乾燥を行い乾燥やまかがしウマ抗毒素(Lot 0001)1,369 本を作製した(**Fig. 10**)。

### 1-3 成績

#### 1-3-1 やまかがし毒免疫による抗毒素価の上昇

ウマ No.1313(従来免疫法)は、ホルマリン不活化毒の初回 2 回と追加 3 回の計 5 回の注射によって血中抗毒素価は緩やかに上昇したが、免疫用抗原をやまかがし生毒に変え、漸次増量して追加免疫した結果、抗毒素価は顕著に上昇した(**Fig. 11**)。また、ウマ No.1319(リポソーム処理抗原免疫法)は、3 回のリポソーム処理トキソイドの基礎免疫後、6 週後までは血中抗毒素価の上昇は認められなかったが、やまかがし生毒の漸次増量法による追加免疫で、生毒の 5 回目の注射頃から抗毒素価が急激に上昇した(**Fig. 12**)。最終的に得られた血中抗毒素価は、従来免疫法による結果とほぼ同等であった。

#### 1-3-2 やまかがし抗毒素の品質評価

##### 1) 抗毒素の精製度(純度試験)

##### ① セルロース・アセテート膜電気泳動

生物学的製剤基準 一般試験法「セルロース・アセテート膜電気泳動試験法」を準用して試験し、抗毒素の純度分析を行ったところ、粗血清にはアルブミン画分とグロブリン画分のピークが認められた。精製した抗毒素では、免疫グロブリン

( $\gamma$ -グロブリンと T-グロブリン)のピークのみが得られ、アルブミンの存在は認められなかった(**Fig. 13**)。

## ② 免疫電気泳動

生物学的製剤基準 一般試験法「免疫化学試験法」を準用して、抗ウマ血清ヤギ血清を用いた免疫電気泳動試験によって抗毒素の純度分析を行ったところ、粗血清は抗ウマ血清ヤギ血清に対し、ウマの血漿蛋白の殆どの反応帯を認めた。精製した抗毒素では、アルブミンに対する反応帯は認めず、免疫グロブリン( $\gamma$ -グロブリンと T-グロブリン)を主成分とした反応帯を認めるまでに精製されていることが確認された(**Fig. 14**)。

## ③ 抗毒素価測定

### (1) 抗凝固活性の測定

抗凝固活性を、正常ラット血漿を用いた *in vitro* 試験で測定した結果、やまかがし抗毒素製剤を蒸留水 10mL で溶解したその 1mL は、やまかがし毒 431 $\mu$ g を中和した。したがって、やまかがし抗毒素製剤 1 本中には、約 4mg のやまかがし毒を中和する活性を含むことが分かった。

### (2) 抗出血活性の測定

抗出血活性をウサギ皮内試験で測定した結果、やまかがし抗毒素製剤を蒸留水 5mL で溶解し、さらに 120 倍希釈した

その 1mL は、やまかがし毒 22.4 $\mu$ g を中和した。したがって、やまかがし抗毒素製剤 1 本中には、約 13mg のやまかがし毒を中和する活性を含むことが分かった。

#### ④ その他の試験

その他の一般性状試験として、他の乾燥ウマ抗毒素製剤の生物学的製剤基準に準拠した品質試験(含湿度試験、pH 試験、たん白質含量試験、無菌試験、異常毒性否定試験および発熱試験)を国立感染症研究所にて実施したところ、市販のウマ抗毒素製剤で規定された規格を全て満たし、市販された製剤と同等の品質であることが確かめられた(**Table 4**)(Association of Biologicals Manufacturers of Japan, 2006)。

### 1-4 考察

症状が重篤であるにも関わらず、我が国では極めて稀にしか発生しないことから、民間企業における開発が進まず、その供給体制が整備されていない毒蛇の咬傷、海洋生物の刺傷等に対する抗毒素が少なからず存在している(Nakai *et al.*, 2003)。やまかがしウマ抗毒素も海外に該当する製剤がないため諸外国から輸入ができず、我が国独自で開発する必要がある抗毒素のうちの一つであり、緊急時における治療法として、その開発および試験製造が求められている。日本国内では細

菌の産生する毒素が発症に重要な役割を演じているジフテリア、ガスエソおよびボツリヌスなどを原因とする疾患、又はまむし、はぶの咬傷の治療に、ウマ抗毒素が厚生労働省の製造販売承認を得て製造されている(作間, 2002; Association of Biologicals Manufacturers of Japan, 2006)。やまかがしの咬傷に際しては、過去において緊急避難的に用いることを前提に、研究用に家兎又は山羊免疫血清が作製されて、ヒトに用いられた経緯がある(Kawamura *et al.*, 1986; Wakamatsu *et al.*, 1986; 若松・是枝, 1986; Kikuchi *et al.*, 1987; Kawamura *et al.*, 1989; Nomura *et al.*, 1989; Akimoto *et al.*, 1991)。いずれも生物学的製剤の製造所で製造されたものではなく、地方衛生研究室の施設を利用して製造されたもので、無菌性、安全性等の品質管理方法・品質保証には問題が残っている。しかしながら、いずれの抗毒素でも血液凝固系の異常をきたしている患者への治療効果は顕著に高い。1987年に製造された乾燥ヤマカガシ山羊抗毒素(Lot3、財団法人日本蛇族学術研究所)のたん白窒素含量は4.226mgPN/mLで、この1mL中の力価は抗出血活性および抗凝固活性の両方において少なくとも2,028 $\mu$ gのやまかがし毒を中和することが確認されていた(比活性: 480 $\mu$ g-毒/mgPN)(Kawamura *et al.*, 1989)。この製剤の力価を、13年

後の 2000 年に再測定したところ、その 1mL は製造当初に比べ、約半量の 1,110 $\mu$ g のやまかがし毒を中和するまでに減弱していた(比活性：263 $\mu$ g-毒/mgPN)(塚,未発表)。

本研究で確保できた製剤の品質管理は、今日の生物学的製剤基準に掲載されている“乾燥はぶウマ抗毒素”および“乾燥まむしウマ抗毒素”の試験方法に準じて実施した(Association of Biologicals Manufacturers of Japan, 2006)。やまかがし毒およびやまかがし抗毒素の定量試験方法は、*in vivo* 法としてウサギ皮内試験、マウス尾静脈試験、*in vitro* 法は凝固活性を測定する方法が報告されている(Sakai and Sawai, 1984; Morita *et al.*, 1988; Kawamura *et al.*, 1989; Sakai *et al.*, 1990)。今回、データとして示していないが、上記の 3 試験法に関し、測定精度、再現性および感度について検討した結果、マウス尾静脈内注射による致死活性の定量では、致死活性の低用量群において、大きなバラツキのあることが認められた。これは、やまかがし毒はマウスでの感受性が低く、マウスの生死判定を指標に活性を測定する方法では感度が悪いことが影響し、かつ、毒素と抗毒素を混合して行う中和試験の場合において、さらにバラツキの程度が増大したと考えられた。したがって、免疫中のウマの免疫応答を測定する方法は、ウサギ皮内試験による抗出血活性と抗凝固活性の測定について

実施した。

今回実施したウマ 2 頭へのやまかがし毒による免疫には、それぞれ異なる剤形の免疫用抗原、すなわち、従来法によるホルマリン不活化やまかがし毒とリポソーム処理やまかがしトキソイドの 2 種類を使用した。異なる抗原で免疫された 2 頭のウマはともに、やまかがし毒に対する抗出血活性および抗凝固活性の両方の抗毒素価の上昇を認め、どちらも有効な免疫法であると考えられた。特に抗出血活性については、リポソーム処理トキソイドを免疫したウマの方が、より顕著に抗毒素価の上昇を認め、追加免疫 5 回目の接種で急激に上昇しておりより効果的であった。リポソーム処理抗原のアジュバント効果については、Naito らが破傷風トキソイドを抗原として用いて、マウスでの水酸化アルミニウム・アジュバントとの比較実験を行っている(Naito *et al.*, 1998)。水酸化アルミニウム・アジュバントは抗原特異的 IgG 抗体および抗原特異的 IgE 抗体の両者を高率に誘導したのに対して、リポソーム・アジュバントは抗原特異的 IgE 抗体産生を誘導せず、抗原特異的 IgG 抗体のみを水酸化アルミニウム・アジュバントと同程度に高く誘導した。すなわち、リポソーム処理抗原は免疫時の副反応原因の 1 つとされるアレルギー反応に関与する IgE 抗体の産生を誘導せず、抗原特異的 IgG 抗体のみを



高率に誘導する有効かつ安全な免疫法であることが示されている。ただし、現時点ではウマを用いた免疫実績としての例数が少ないため、今回のやまかがし毒による免疫法としてのリポソーム・アジュバント使用の有効性については、今後、データを蓄積した上で評価・検討する必要がある。

本研究の成績は *Jpn. J. Infect. Dis.*, **64**, 397-402 (2011) に掲載された (Morokuma *et al.*, 2011)。

## 第 2 章 やまかがしウマ抗毒素の安定性評価

### 2-1 緒言

やまかがし咬傷例は日本国内では多くはないが、その救命にやまかがし抗毒素は不可欠の治療薬である。第 1 章で先述したように、国内で初めてウマに免疫して造られたやまかがしウマ抗毒素(Lot 0001)は 2000 年に当時の厚生科学研究 厚生科学特別研究事業の抗毒素研究班で試験製造された未承認の製剤である。しかしながら、健康危機管理面から極めて貴重な抗毒素であるという理由で、現在も国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)研究事業による新しい抗毒素研究班にこの研究が引き継がれている。さらに、このやまかがしウマ抗毒素はこの研究班で保有され、現在も使用され続けている。

国内の既承認薬である他のウマ抗毒素製剤、即ち、はぶ抗毒素、まむし抗毒素、ボツリヌス抗毒素、ガスえそ抗毒素およびジフテリア抗毒素の有効期限は、すべて製造後 10 年とされている(Association of Biologicals Manufacturers of Japan, 2006)。これに対し、未承認薬である、本研究で開発されたやまかがしウマ抗毒素(Lot 0001)は 2000 年に試験製造されたものであり、本年の 2021 年度には製造後 21 年を迎える。未

承認のやまかがしウマ抗毒素について、今後もやまかがし咬傷の重症例が発生した際にはヒトへの投与の可能性があることから、当時の 2011 年度の厚生労働省の当該抗毒素研究事業において、このやまかがしウマ抗毒素が緊急避難的な臨床使用であっても、製剤の安定性に係る側面からの品質評価は必須であり、実施可能な最小限の範囲内においてその安全性・有効性を確認すべきとの判断がなされた。よって、2012 年度からはほぼ毎年度、当該製剤の貯法下(10℃以下)における現時点での製剤の品質確認として、特に安定性に係わる試験項目についての品質試験を行い、当該製剤の安定性モニタリング試験を実施することになった。

本製剤の備蓄期間中の安定性を確認するため、その力価試験、品質管理試験について、試験項目毎に試験実施の必要性を考慮しつつ試験を実施し、これまでに得られた一連の成績を **Table 5** に纏めた(Morokuma *et al.*, 2021)。結果の詳細については「2-3 成績」の項に述べる。

## 2-2 材料および方法

### 2-2-1 やまかがし抗毒素の安定性モニタリングの実施時期

やまかがしウマ抗毒素(Lot 0001)は 2000 年の試験製造直後の試験以降、2012 年度(製造後 12 年目)、2013 年度(同 13

年目)、2015年度(同15年目)から2020年度(同20年目)までは毎年その品質試験を実施した。

## 2-2-2 やまかがし抗毒素の安定性モニタリング試験

やまかがしウマ抗毒素(Lot 0001)の経時的安定性の確認を以下のとおり実施した。なお、各項目の試験は力価試験(抗凝固活性)を除き、すべてKMバイオロジクス株式会社にて実施した。

### 1) 性状確認試験(Property test)

生物学的製剤基準 通則(Association of Biologicals Manufacturers of Japan, 2006)を準用して試験を実施した。色調の試験は小分製品の直接の容器を白色の背景を用いて観察し、溶解後の溶液の澄明性を試験する場合は小分製品の容器を直接、白色又は黒色の背景を用いて観察した。その際、製剤の溶解時間も確認した。性状確認試験は2012年度以降、2014年度を除き毎年実施した。性状確認試験と同時に行う溶解時間の確認は2015年度のみ実施しなかった。

### 2) 含湿度試験(Test for moisture content)

生物学的製剤基準 一般試験法「含湿度測定法」を準用して試験した。含湿度試験は2012年度以降、2014年度を除き毎年実施した。

### 3) 不溶性異物試験 (Insoluble foreign matter test)

既承認のウマ抗毒素製剤の試験と同様に、日本薬局方 一般試験法「注射剤の不溶性異物検査法(第2法)」を準用して試験を実施した。容器の外部を清浄にし、異物が混入しないよう十分に注意して、注射用水を用いて溶解後、白色光源の直下で 2000～3750 lx の明るさの位置にて、肉眼で白黒それぞれの色の背景において約 5 秒ずつ観察した。不溶性異物試験は 2013 年度のみ実施した。

### 4) 浸透圧比試験 (Osmotic pressure ratio test)

日本薬局方 一般試験法「浸透圧測定法」を準用して試験を実施した。浸透圧比試験も 2013 年度のみ実施した。

### 5) pH 試験 (Test for pH)

生物学的製剤基準 一般試験法「pH 測定法」を準用して試験した。pH 試験は 2012 年度および 2013 年度に実施した。

### 6) たん白質含量試験 (Test for protein content)

生物学的製剤基準 一般試験法「たん白窒素定量法」を準用して試験を実施した。たん白質含量試験も 2012 年度および 2013 年度に実施した。

### 7) エンドトキシン試験 (Endotoxin test)

日本薬局方 一般試験法「エンドトキシン試験法」を準用した。エンドトキシン試験も 2012 年度および 2013 年度に実

施した。

#### 8) 無菌試験 (Sterility test)

既承認のウマ抗毒素製剤の試験と同様に、やまかがしウマ抗毒素はろ過可能な製品であることから、日本薬局方一般試験法「無菌試験法」の「メンブランフィルター法(MF法)」を準用して試験を実施した(局方MF法)。無菌試験も2012年度および2013年度に実施した。

#### 9) 異常毒性否定試験 (Test for freedom from abnormal toxicity)

生物学的製剤基準一般試験法「異常毒性否定試験法」を準用して試験を実施した(モルモット試験)。異常毒性否定試験は2012年度以降、2014年度を除き毎年実施した。

#### 10) 発熱試験 (Pyrogen test)

生物学的製剤基準一般試験法「発熱試験法」を準用して試験した。発熱試験は2012年度および2013年度に実施した。

#### 11) 力価試験(抗凝固活性)(Potency test (anticoagulant activity)) (「第1章 1-2 材料および方法 1-2-3 2) 抗凝固活性の定量」に記載の方法に同じ)

生理食塩液で至適濃度に希釈した抗毒素の希釈液 0.05mLと、濃度を変量したやまかがし毒素 0.05mLを混合し、37℃で30分間加温処理した。次に、CaCl<sub>2</sub>溶液 0.1mLを混合し、

正常ラット血漿 0.1mL を添加した。試験対照として、変量したやまかがし毒素と CaCl<sub>2</sub> 溶液を混合し、同様に正常ラット血漿を加えた。両者の凝固時間とやまかがし毒素濃度について用量反応線を求め、20 秒で凝固する毒素量を中和価として算出した (Sakai and Sawai, 1984; Kawamura *et al.*, 1989; Sakai *et al.*, 1990)。力価試験(抗凝固活性)は 2013 年度および 2017 年度に日本蛇族学術研究所にて実施した。

### 2-3 成績

やまかがし抗毒素の経時安定性試験の結果を以下の 1)～11)に示した (**Table 5**)。

#### 1) 性状確認試験 (Property, Dissolution time (Second))

2012 年度から 2014 年度を除き、2020 年度まで毎年実施された試験の結果は、すべて「淡黄色の乾燥製剤で、溶剤を加えるとき、淡黄色のわずかに白濁した液剤」であり、2000 年の製造直後の試験結果と同じであった。なお、溶解時間は製造直後が 79 秒であったのに対し、2013 年度の試験が 185 秒と比較的長かったものの、2012 年から直近の 2020 年の試験では 81～146 秒の間で推移しており、製剤の保存期間の経過とともに溶解時間が延長する傾向は認められなかった。

#### 2) 含湿度試験 (Moisture content (%))

含湿度は製造直後の 0.26% に対して、2012～2020 年度の試験が 0.35～0.73% で推移し、多少上昇傾向はあったが、すべて規格の 3.0% 以下の低い値であり、試験に適合した。

### 3) 不溶性異物試験(第 2 法)(Insoluble foreign matter)

2013 年度に実施した試験では、溶解後の製剤中に不溶性異物は認められず、試験に適合した。

### 4) 浸透圧比試験(Osmotic pressure ratio)

浸透圧比は 2000 年の製造直後の 1.25 に対して、試験を実施した 2013 年度が 1.19 であり、13 年の保存期間中も製剤に変化は認められなかった。

### 5) pH 試験(pH)

pH は 2012 年度が 7.18 であり、2013 年度も 7.12 であり、ともに 6.8～7.4 の規格に適合した。

### 6) たん白質含量試験(Protein content (mg/mL))

たん白質含量は製造直後(2000 年)の 29.8 mg/mL に対し、2012 年および 2013 年がそれぞれ 31.7mg/mL および 30.4 mg/mL であり、変化は認められなかった。

### 7) エンドトキシン試験(Endotoxin content (EU/mL))

エンドトキシン含量は 2012 年度および 2013 年度に実施した試験において、0.020EU/mL 以下でともに検出限界以下を維持しており、異常はなかった。



#### 8) 無菌試験(局方 MF 法)(Sterility)

2012 年度および 2013 年度に実施した試験で、ともに菌の発育を認めず、試験に適合した。

#### 9) 異常毒性否定試験(モルモット)(Test for freedom from abnormal toxicity)

2012 年度から 2020 年度までほぼ毎年実施した試験において、試験結果はいずれの動物も「異常を認めず」であり、すべて規格に適合した。

#### 10) 発熱試験(Pyrogen test (°C))

2012 年度および 2013 年度に実施した試験で、それぞれ家兎 3 羽の体温上昇の合計は 0.11°C および 0.12°C で、ともに陰性であり試験に適合した。

#### 11) 力価試験(抗凝固活性)(Potency test)

製剤の保存 13 年目(2013 年)および 17 年目(2017 年)の製剤 1 本の抗凝固活性を測定した結果、それぞれ 16.9mg および 15.6mg のやまかがし毒を中和することが確認された。2000 年の製造直後の力価(抗凝固活性)が、製剤 1 本でやまかがし毒 4mg を中和したことを踏まえれば、試験法のバラツキを考慮しても、製剤の保存期間中の力価の低下は認められなかった。

## 2-4 考察

やまかがし抗毒素は、過去に家兎および山羊を免疫用動物として用いて試験的に製造されてきた(Kawamura *et al.*, 1989)。これらの試験製造された抗毒素が、その製造から 13 年後に力価が半減していたという報告はあるが(倉田, 1999)、製剤の安定性に関する側面から長期に亘って追跡調査された報告はない。今回我々は、ウマを免疫用動物として用い、かつ市販のウマ抗毒素製剤の製法に準拠して作製したやまかがしウマ抗毒素(Lot 0001)が 2012 年度に製造から 12 年を経過することになったのを受けて、長期保存安定性と現時点における製剤の品質確認を目的として、経時的変化で特に影響を受け易い項目についての品質試験を行い、その安定性モニタリング試験を開始した。その結果、理化学試験のうち、性状確認試験(溶解時間を含む)、不溶性異物試験、浸透圧比試験、pH 試験、たん白質含量試験、エンドトキシン試験および無菌試験については、製造直後の成績と比較し、2020 年 12 月時点で特に変化は認められなかった。含湿度については製造直後より上昇傾向がみられたが(0.26%→0.73%)、規格の 3.0%以下の明らかに低い値であり試験に適合した。また、製剤の安全性側面からの動物試験、すなわち、異常動物否定試験および発熱試験においても、保存期間中での試験の成績に変化

はなく異常は認められなかった。加えて、製剤の有効性側面からの力価試験(抗凝固活性)についても、製造直後の力価が充分保持されており、製造から21年が経過した現時点でもこのやまかがしウマ抗毒素は有効な製剤であることが確認された。

前述のとおり、試験製造から既に21年を経た現在でも製剤の安全性・有効性は確認された。過去に、家兎および山羊に免疫して作製されたやまかがし抗毒素の力価が製造13年後に半減していたという報告と異なる結果が今回示された。このことに関して、過去の家兎または山羊の抗毒素は蛇族学術研究所の研究室内で実験的に試作されたものであり、我々の作製したやまかがし抗毒素(Lot 0001)とはその製法が異なり、市販のウマ抗毒素製剤の製法に準拠して作製されなかったことが主な要因の一つと考えられた。また、このやまかがしウマ抗毒素(Lot 0001)に関して、Hifumiらは日本蛇族学術研究所の2000年から2013年までの記録に基づいたやまかがし咬傷事例より、患者とその治療状況を遡及的に調査し纏めている(Hifumi *et al.*, 2014)。この14年間に9名のやまかがし咬傷患者が特定されており、患者はすべて男性で年齢の中央値は38歳(5~81歳)であった。入院時の播種性血管内凝固症候群(DIC)スコアの中央値は8(1~8)で極めて重篤と診断されて

いる。このうち抗毒素は 7 名の患者に投与されており、咬傷発生から抗毒素投与までの時間は平均 35 時間(5.5~60 時間)であり、明らかな副反応も認められていない。抗毒素を投与された 7 名はすべて生存し、投与されなかった患者の 1 名が DIC による頭蓋内出血で死亡している。過去、このような重症やまかがし咬傷事例の発生において、やまかがしウマ抗毒素の使用が患者の救命に寄与していることは明白であり、当該抗毒素の社会的有用性は極めて高いものといえる。しかしながら、今後の課題として、早急ではないにせよ、製剤の品質劣化の懸念もゼロではないことから、将来の本来あるべき姿を見据えて、次のロットのやまかがしウマ抗毒素を新たに作製し更新する時期にきているものと考えられた。

本研究の成績は *Tropical Biomedicine*, **38**, 111-118 (2021) に掲載された (Morokuma *et al.*, 2021)。

## 第 3 章 やまかがしウマ抗毒素の臨床評価事例

### 3-1 緒言

本論文に報告しているやまかがしウマ抗毒素は、ナミヘビ科の *Rhabdophis* 属の蛇のもつ毒に対する唯一の治療用抗毒素である。*Rhabdophis tigrinus*(やまかがし)による蛇咬傷の重症例は日本以外のアジア大陸では報告がない。日本でのやまかがし咬傷の発生頻度は低いものの重症例が発生しており、その大きな理由としては、やまかがしが北海道以外の日本全土に生息していることに加え、昔から土着の蛇としてもっぱら無毒蛇とされていたためであると考えられる。他方、中国では毒蛇咬傷の疫学研究が未だ途上であることも作用し、今後、中国での疫学調査が進む状況下において、*Rhabdophis* 属の毒蛇による重症咬傷患者が発生する可能性は高いものと考えられた。我々の研究は、このような蛇咬傷事例において、新規のウマ抗毒素による治療への応用と、ひいてはその開発・展開にとっても有益なものとなるを考える。*Rhabdophis tigrinus* と近縁の *Rhabdophis subminiatus* は東アジアに広く分布しており、後者のもつ毒は前者の毒と同様の症状をヒトに引き起こすことが知られている(Zotz *et al.*, 1991)。また、Komoriらは日本のやまかがし

し(*Rhabdophis tigrinus*)とアジア大陸全体に広く分布するやまかがし(*Rhabdophis lateralis*)の毒成分を調べ、その生物物理化学的性状を比較している(Komori *et al.*, 2017)。両者の毒にはマトリックスメタルプロテアーゼ(Matrix metalloproteinase)の合成基質に対する反応性など幾つかの違いを認めたが、どちらも高分子量画分にプロトロンビン活性化因子、またフィブリノーゲン分解活性を有するプロテアーゼ及びシステインリッチ分泌蛋白質(Cysteine-rich secretory protein: CRISP)の存在も見出され、毒抗原の共通性が確認されている。故に、今回の研究で試験製造され開発されたやまかがしウマ抗毒素は、過去に Kawamura らの試作した家兎抗毒素がマウス静脈内投与試験で *Rhabdophis subminiatus* の毒を中和した事実とも合わせ(Kawamura *et al.*, 1989)、*Rhabdophis subminiatus* や *Rhabdophis lateralis* による重度の咬傷患者の治療にも有効である可能性が考えられた。

本章では、第 1 章で試験製造された「乾燥やまかがしウマ抗毒素(Lot 0001)」が、2000 年以降に、緊急事態として発生した重症やまかがし咬傷患者に対して危機管理的に使用されたいくつかの症例をまとめ、私信として報告する。また、日本で発生のある他 2 種類の毒蛇咬傷(まむし・はぶ)とやまかがし

咬傷による臨床症状の相違点も併せて説明する。

## 3-2 材料および方法

### 3-2-1 やまかがしウマ抗毒素

第 1 章で試験製造された「乾燥やまかがしウマ抗毒素 (Lot 0001)」が、重症やまかがし咬傷患者の治療に使用された。

### 3-2-2 やまかがし咬傷治療例の調査方法

重症やまかがし咬傷患者の発生に合わせて、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) の抗毒素研究事業で立ち上げられた緊急ネットワークに所属する医師も含めた医療チームや当該臨床研究の関係者と協議・連携し、一連の情報共有を図りながら、治療患者の臨床結果をまとめ記述した。

## 3-3 成績 (症例報告とまとめ)

### 3-3-1 やまかがしウマ抗毒素の初回適用例

今回試験製造した乾燥やまかがしウマ抗毒素 (Lot 0001) は、製造した翌年 (2001 年) の 7 月に埼玉県で発生した、5 歳の男児の咬傷事例で医師と患者の合意のもとに使用され、顕著な効果が認められている (**Table 6**) (加藤・他, 2003)。本事例は、蛇に左第 2 指を咬まれた直後から、播種性血管内凝固症候群

(Disseminated Intravascular Coagulation: DIC)を生じ、咬傷部位からの出血、周囲の出血斑、第2指の腫脹、翌日には鼻出血が出現した。当初は“まむし咬症”が疑われ、まむしウマ抗毒素が投与されたが効果がなく、血液検査で凝固系に異常を示したため、血漿交換とともに、やまかがしウマ抗毒素が投与された。抗毒素投与の6時間後、血液検査値はすべて正常に復し、血液凝固も改善し、やまかがし抗毒素が著効した。

### 3-3-2 やまかがしウマ抗毒素の2回目の適用例

本ウマ抗毒素が使用された2例目のやまかがし咬傷事例は2005年8月に佐賀県で発生した(**Table 6**)(佐竹, 私信)。14歳の男児が自宅近辺で蛇を捕獲し遊んでいるときに右第3指を噛まれた。咬傷の約12時間後、患児は頭痛と咬傷部位からの持続的な出血傾向を示し、顕著な凝固系の異常からDICを発症した。咬傷周囲は出血に加え、斑状出血と指の腫脹が認められた。これらの臨床症状よりやまかがし咬傷と診断され、受傷24時間後にやまかがしウマ抗毒素1本が投与された。投与の30分後には持続的な出血も止まり、3時間後にはフィブリノーゲンを除きすべての血液検査値が正常化し、フィブリノーゲン値も翌朝には改善した。やまかがしウマ抗毒素(Lot 0001)が咬傷患者に使用された埼玉県と佐賀県の2症例とも



に副反応は認められていない(加藤・他, 2003; 佐竹, 私信)。

### 3-3-3 やまかがしウマ抗毒素のその後の適用例

その後も発生頻度は低いものの、やまかがし咬傷と診断された後、同様に緊急避難的にやまかがしウマ抗毒素を投与され軽快した患者の症例が数例報告されている(Hifumi *et al.*, 2014)。

直近では、2017年に続けて2例のやまかがし咬傷の重症例が発生している。1例目は同年7月25日に福岡県で発生した(**Table 7**)(麻生飯塚病院, 私信)。10歳の男児が昼間にやまかがしに5分程度咬まれ、夕方の血液検査でFDP(フィブリン/フィブリノーゲン分解産物)が70 $\mu$ g/mL、フィブリンノーゲンが100mg/dL程度でDICを併発し重症例と判断された。医師と患者の合意のもとに咬傷から約9時間後にやまかがし抗毒素が投与され、その後、血液像改善効果が認められ経過も安定し、同月29日に無事退院となった。2例目は同年7月29日に兵庫県で発生した(**Table 7**)(兵庫県立尼崎総合医療センター, 私信)。10歳の男児が夕刻に蛇に右手首を咬まれ、直ぐには病院に行かず帰宅した。帰ったあとも傷口から出血が止まらず、頭痛もあり夜になって再び病院へ搬送された。状況からやまかがし咬傷は考え難いとの医師の判断であったが、その

後の血液検査で FDP が 800 $\mu$ g/mL、フィブリノーゲンは測定感度以下であったため、急々にやまかがし咬症を疑い、厚生労働省管轄下の国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) の抗毒素研究事業で立ち上げられた緊急ネットワークによってやまかがし抗毒素が手配された。咬傷より約 15 時間後の翌朝に、医師と患者の合意のもとにやまかがし抗毒素が投与された。患者は一時、意識不明まで追込まれたが、やまかがし抗毒素の投与によって意識も回復し、8 月 2 日に無事に退院した。2017 年に発生したやまかがし咬傷のこの 2 例もやまかがし抗毒素が著効した結果と考える。

この 2 症例の重症患者に使用されたやまかがしウマ抗毒素 (Lot 0001) は、その時点で既に製造から 17 年を経過した製剤であった。結果として、製造後の保存 17 年目の製剤が緊急避難的に使用されたにもかかわらず、その有効性が顕著に認められたことから、2017 年の臨床研究における 2 例の症例は製剤の保存安定性を支える事実の一つと考えられた。

### 3-4 考察

抗毒素の効果は、以前の山羊免疫血清の場合でも、血液凝固系異常が観察されてからの抗毒素投与でも認められている (Wakamatsu *et al.*, 1986; 若松・是枝, 1986)。細菌毒素に対

するウマ抗毒素製剤であるジフテリア、ガスエソ疾患、ボツリヌス中毒に対しては、早期の治療が求められているが、本やまかがし抗毒素は、症状が出現してからの投与でも、出血・凝固系の機能異常に対しての効果は認められている。過去のやまかがし咬傷事例を回顧するとき、2017年に発生した最近の2症例を含めて、やまかがし抗毒素による治療が成功した事例はすべて咬傷後3日以内に抗毒素が投与されていた。やまかがし咬傷の治療に失敗した教訓的事例として、咬傷の5日後にやまかがし抗毒素が投与された、2006年8月発生のやまかがし咬傷の致命的事例がある(苅目, 私信)。この事例において、蛇咬傷患者を最初に治療した医師はやまかがし抗毒素の存在およびその入手の可能性を知らず、患者は症状改善がないまま病院を転院され、3番目の病院でやまかがし咬傷発生の連絡がAMED-抗毒素研究事業の緊急ネットワークに届いた。この連絡を受けたときには、患者は既にやまかがし毒による血液凝固系の異常でDICの進行によって脳出血を起こしており、やまかがし抗毒素の投与でも救命できなかった。このような症例を顧みると、やまかがし咬傷患者へのやまかがし抗毒素の早期投与は、投与が遅れた症例と比べてより効果的である可能性が推測された。

次に、このやまかがし咬傷の症状について、日本国内で発

生のある他の 2 種類の蛇毒咬傷の、まむし咬傷とはぶ咬傷における咬傷患者の臨床症状の違いを比較した (Table 8) (塚, 2013)。やまかがし咬傷は、毒の注入の有無にかかわらず咬まれても腫脹や痛みがなく、局所の炎症を認めないのが特徴である。これに対し、まむし咬傷では咬まれた後に痛みを伴い、受傷局所を中心に咬傷の程度により腫脹の大きな拡がりが見られる。はぶ咬傷では受傷直後に鈍痛を伴った強烈な痛みが出て、暗紫色を呈した腫脹が時間と共に広がる。水疱形成をみる場合もある。また、やまかがし咬傷とまむし咬傷はどちらも出血傾向が顕著であり、やまかがし咬傷はフィブリノーゲンの減少に伴う出血であり (のちに血小板も減少)、まむし咬傷は血小板の減少による出血である。はぶ咬傷も出血傾向を認めるが、全身症状というよりはむしろ受傷局所の溶血を伴った暗紫色の出血を呈することが多い。この他、やまかがし咬傷では全身症状として、ヘモグロビン尿、一過性の激しい頭痛、DIC、脳内出血、急性腎不全を認めるのに対し、まむし咬傷では急激な血圧低下、ミオグロビン尿、血尿、複視、急性腎不全、呼吸困難、心不全を起こす。はぶ咬傷では、受傷局所の軟組織の筋肉壊死を起こす場合が多く、毒の注入量が多い場合には 24 時間以内にショック症状から死に至ることもある。たとえ回復したとしても、機能障害により後遺症

が残る場合もある。死に至るまでの時間は毒の注入量によって異なり、一概には言えないが、はぶ、まむし、やまかがしの順に時間は短い。但し、重症やまかがし咬傷は毒の毒力が最も強いため、その後の処置が遅れば、死亡時間は早まり、致死率が最も高くなる。なお、毒蛇咬傷の診断という観点からは、はぶは沖縄と鹿児島島の離島にしか生息していないため、鑑別は比較的容易である。これに対し、やまかがしとまむしは生息域も殆ど重なっており、臨床症状も似通っていることから、蛇咬傷の診断には注意を要する必要がある。

次に、やまかがし抗毒素の課題として、現在、日本国内で承認されている蛇毒抗毒素のまむし抗毒素とはぶ抗毒素の2種類を含めて言及してみたい。これらの蛇毒抗毒素は何れもウマの血液を原料としたウマ製剤であることから、いかに精製度を上げたとしてもウマのグロブリンそのものがヒトにとって異種蛋白である以上、抗毒素の注射を受けたヒトはウマ血清に対して感作されることは避けられず、アナフィラキシーショックや血清病に対するリスクは常に残る(森・他, 1982)。この課題解決には、ヒトの献血血漿由来の抗毒素を作製するか、あるいは蛇毒を中和できるヒト型のモノクローナル抗体を開発する以外はない。前者としては、現行の既承認製剤にあるような抗破傷風人免疫グロブリンや米国で開発されてい

る抗ボツリヌス人免疫グロブリンと同じように高力価を持ったヒト血清を原料にして抗毒素製剤を造る方策があるが、蛇毒抗毒素に関してはヒト用に開発されたワクチンがないことから、ヒトにおける蛇毒抗毒素の力価を上げる方策はなく現実的でもないため、ヒト由来の抗毒素製剤を作製することは極めて難しい。

また、後者のヒト型モノクローナル抗体の開発・検討もなされているが、ウマ抗毒素製剤に代り実用化に供するためには、次に挙げるところの様々な課題があり、なかなか実用化には至っていない。治療薬として使えるだけの高い中和価をもつ抗体作製面での技術上の課題、大量生産を可能とする生産技術上の課題、患者数が少ないための臨床試験実施上の課題、及び商品化/製品化に当たっての採算面での課題等があり、特に使用数量が少ない製剤においては、その実用化に当たって採算性の克服が最大の問題となっている。また、蛇毒については、蛇毒のもつ多くの生理活性物質や酵素が複合して致死作用や各種毒性を示すため、ウマ抗毒素以上の効果をもつヒト型モノクローナル抗体の開発には多くの困難がある(盛根・他, 2016)。

したがって、今後、将来的にウマ製剤によらない治療薬としての蛇毒抗毒素を開発するためには、より副反応のないヒト

型モノクローナル抗体製剤の開発を目指して、上記に記載した幾つかの大きな課題を一つずつ解決しつつ対処し克服していく以外に方策はないものと考える。

## 総括

本研究では、国内で発生のある毒蛇咬傷のやまかがし咬傷の治療薬であるやまかがしウマ抗毒素を試験製造した。また、当該製剤の品質管理試験・力価試験を行い、安全性・有効性が確認されたことから、やまかがし咬傷患者へのやまかがしウマ抗毒素の緊急避難時の臨床応用が可能となった。また、この研究で作製したやまかがしウマ抗毒素を起点として、今後のやまかがし咬傷療法のあり方や進め方についての課題についても整理した。本論文の総括として、各章で得られた知見を以下にまとめ、考察を加えた。

本研究の結論は次のとおりである。

1. やまかがし毒を免疫用抗原として用いて、国内初の「やまかがしウマ抗毒素(Lot 0001)」の 1,369 本を試験製造した。本研究はやまかがしウマ抗毒素の作製について初めて示したものである。
2. やまかがしウマ抗毒素(Lot 0001)は、承認薬である他の抗毒素と同様に人用製剤としての品質を保有することが確認された。また、製剤 1 本は 4mg 以上のやまかがし毒を中和することが分かった。



3. やまかがしウマ抗毒素(Lot 0001)が、製造から 21 年を経過した 2021 年現在でも、概して、製造直後の品質を保持することが分かった。ウマ抗毒素が 20 年もの長期間保存出来る事実が本研究により初めて示された。
4. 2000 年の試験製造以降 17 年が経過したやまかがしウマ抗毒素(Lot 0001)が、やまかがし咬傷重篤患者に有効である事実が初めて示された。

以上のように、本研究の成果は、人命救助および日本の医療や蛇毒抗毒素療法の発展に貢献したものであり、本研究の社会的意義は大きいと考える。

今後の展望として、やまかがしウマ抗毒素には以下に挙げた幾つかの課題があり、今後、如何にして取り組み克服していくかを常に意識し、その模索を続けることが重要である。やまかがし抗毒素の作製には、ウマ免疫のためのやまかがし毒を相当量確保しなければならず、それには大量のやまかがしを生きたまま捕獲し、ドウベルノイ腺を摘出して抽出する必要がある。やまかがしの大量捕獲は動物福祉や生物資源保護の面からの懸念も大きい。将来的には、抗毒素の作製に必要なウマ免疫用抗原の確保として、生きたやまかがしからの

毒の回収によらず、遺伝子組換え操作による細胞培養技術等で人工的に創り出し確保する方策への転換に向けた試みとその可能性の模索が必要と考えられる。Postらは2020年に、目的の蛇毒を産生する毒腺細胞を用いたオルガノイド技術を応用して蛇毒を人工的に作出する手法を確立したことを既に報告している(Post *et al.*, 2020)。この蛇毒の毒腺オルガノイド技術を用いた抗毒素製剤製造への応用はまだ実用化には至っていないが、生物資源の保護や動物福祉面の課題を考えれば、やまかがしウマ抗毒素製造への応用と転換は将来的に必要な取り組みの一つと考えられた。

最後に、本研究では、日本国内で稀に発生する重篤なやまかがし咬傷において、その治療薬として、未承認製剤ではあるが、やまかがしウマ抗毒素を初めて開発した。また、このやまかがしウマ抗毒素は、2000年の製造以降、10数例の重篤なやまかがし咬傷患者に対し、緊急避難的に使用され、目立った副反応の報告もなく、患者の救命に寄与したことが確認されており、その有効性が証明されている。今後は、このやまかがしウマ抗毒素の承認薬への転換の方策を模索しつつ、将来的にはウマ製剤から脱却した、治療薬としてより副反応のないヒト型モノクローナル抗体製剤の開発を目指し

取り組んでいく必要があるものと考える。

本論文における研究成果の一部を以下に公表した。

1. Morokuma, K., Kobori, N., Fukuda, T., Uchida, T., Sakai, A., Toriba, M., Ohkuma, K., Nakai, K., Kurata, T. and Takahashi, M.: Experimental manufacture of equine antivenom against Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*). *Jpn. J. Infect. Dis.*, **64**, 397-402, 2011.  
(<https://www.niid.go.jp/niid/JJID/64/397.pdf>)

2. Morokuma, K., Matsumura, T., Yamamoto, A., Sakai, A., Hifumi, T., Ato, M. and Takahashi, M.: Evaluation of the stability of Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*) Equine Antivenom after 20 years storage. *Tropical Biomedicine*, **38**, 111-118, 2021.  
(<https://secureservercdn.net/72.167.241.180/114.7f7.myftpupload.com/files/Vol38No2/tb-38-2-042-Morokuma-K.pdf>)

## 謝辞

本論文は、KM バイオロジクス株式会社における研究業務のうち、特に抗毒素に関する一連の研究事業で得られた研究成果を基に纏めたものである。なお、新規のやまかがしウマ抗毒素製剤の試験製造は、1998-1999年度の厚生科学研究 厚生科学特別研究事業下の研究費(研究代表者:倉田)の支出を受けて実施したものである。また、やまかがしウマ抗毒素の経時的保存安定性に係る一連の評価検討、および次ロットのやまかがしウマ抗毒素の製造に向けたやまかがしの捕獲から毒腺摘出・毒抽出等の一連の作業は、2013-2014年度の厚生労働科学研究 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業および2015-2021年度の国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)研究 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業下の研究費(研究代表者:一二三)の支出を受けて実施されました。

本論文の作成にあたり、終始ご懇篤なるご指導とご教示を賜りました麻布大学獣医学部の田原口智士教授、黄鴻堅教授、平健介教授および麻布大学生命・環境科学部の栗林尚志教授に深く感謝いたします。

本研究は、KM バイオロジクス株式会社と国立感染症研究

所および日本蛇族学術研究所が協力して参画する厚生労働省(旧厚生省)又は国立研究開発法人 日本医療研究開発機構(AMED)管轄下における抗毒素全般の研究事業であることから、研究当初からご指導とご鞭撻を賜りました国立感染症研究所の高橋元秀名誉研究員、一般財団法人 日本蛇族学術研究所の故鳥羽通久前所長および堺淳所長代理に対し深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、研究の機会を与えて頂きました旧財団法人 化学及血清療法研究所の酒匂光郎元理事長に深く感謝いたします。

本研究の遂行に際して、ご指導とご協力を頂きました旧財団法人 化学及血清療法研究所の大隈邦夫元部長および KM バイオロジクス株式会社の山口優子研究員に深く感謝いたします。

最後に、本学位論文を纏める機会を与えて頂きました KM バイオロジクス株式会社の暖かいご配慮に心から感謝申し上げます。

## 引用文献

- Akimoto, R., Watanabe, Y., Sakai, A., Kawamura, Y. and Sawai, Y.: A case of defibrination syndrome due to Japanese colubrid snake, Yamakagashi, (*Rhabdophis tigrinus tigrinus*) bite, treated with antivenom. *Snake*, **23**, 36-39, 1991.
- Association of Biologicals Manufacturers of Japan: *Minimum Requirements for Biological Products of Japan*. Tokyo, Japan, 2006.
- Bordon, K., C., F., Cologna, C., T., Fornari-Baldo, E., C., Pinheiro-Junior, E., L., Cernil, F., A., Amorim, F., G., Anjolette, F., A., P., Cordeiro, F., A., Wiesel, G., A., Cardoso, I., A., Ferreira, I., G., Oliveira, I., S., Boldrini-Franca, J., Pucca, M., B., Baldo, M., A. and Arantes, E., C.: From animal poisons and venoms to medicines: Achievements, challenges and perspectives in drug discovery. *Frontiers in Pharmacology*, **11**, 1132, 1-29, 2020.  
(<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2020.01132/full>)
- Chinzei, H.: Isolation of myonecrotic factor from the venom of Habe (*Trimeresurus flavoviridis*). *Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **2**, 111-112, 1974.
- Cleveland Clinic: Snake bites. Ohio, United States of America, 2022.  
(<https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/15647-snake-bites>)
- Gopalakrishnakone, P. and Inagaki, H.: *Snake venoms*; Springer. Berlin, Germany, 2017.
- 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. and Kuroda, Y.: Clinical characteristics of Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*) bites: a national survey in Japan, 2000-2013. *Journal of Intensive Care*, **2**, 19, 2014.  
(<https://doi.org/10.1186/2052-0492-2-19>)
- Hill, R.E. and Mackessy, S.P.: Venom yields from several species of colubrid snakes and differential effects of ketamine. *Toxicon*, **35**,

- 671-678. 1997.
- Kang, T.S., Georgieva, D., Genov, N., Murakami, M.T., Sinha, M., Kumar, R.P., Kaur, P., Kumar, S., Dey, S., Sharma, S., Vrieling, A., Betzel, C., Takeda, S., Arni, R.K., Singh, T.P. and Kini, R.M.: Enzymatic toxins from snake venom: Structural characterization and mechanism of catalysis. *FEBS J.*, **278**, 4544-4576. 2011.  
(<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08115.x>)
- Kawamura, Y., Sakai, A. and Sawai, Y.: Studies of the pathogenesis of envenomation of the Japanese colubrid snake, Yamakagashi, *Rhabdophis tigrinus tigrinus* (BOIE). 3. Preparation of anti-Yamakagashi antivenom. *Snake*, **18**, 1-3, 1986.
- Kawamura, Y., Sawai, Y., Toriba, M., Hokama, Y., Sawai, A., Kouda, T., Kondo, T., Watanabe, M., Nozaki, M. and Tomihara, Y.: Study on the preparation of anti-Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*) rabbit and goat antivenom. *Snake*, **20**, 4-8, 1989.
- Kikuchi, H., Takamura, T., Ishii, M., Ichihara, T., Kawamura, Y. and Sawai, Y.: Study on the effectiveness of the Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*) antivenom. *Snake*, **19**, 95-98, 1987.
- Komori, Y., Hifumi T., Yamamoto A., Sakai, A., Ato, M., Sawabe, K. and Nikai, T.: Comparative study of biological activities of venom from colubrid snakes *Rhabdophis tigrinus* (Yamakagashi) and *Rhabdophis lateralis*. *Toxins*, **9**, 373-382, 2017.  
(<https://www.mdpi.com/2072-6651/9/11/373>)
- Mohamed, A.E.T., Soares, A.G., Stockand, J.D.: Snake Venoms in Drug Discovery: Valuable Therapeutic Tools for Life Saving. *Toxins*, **564**, 1-25, 2019.  
(<https://doi.org/10.3390/toxins11100564>)
- Mori, K., Hisa, S., Suzuki, S., Sugai, K., Sakai, H., Kikuchi, T., Hiwatashi, N., Shishido, H., Goto, Y. and Takahashi, T.: A case of defibrination syndrome due to snake (*Rhabdophis tigrinus*) bite. *The Japanese Journal of Clinical Hematology*, **24**, 256-262, 1983.

- Morita, T., Matsumoto, H., Iwanaga S., and Sakai, A.: A prothrombin activator found in *Rhabdophis tigrinus tigrinus* (Yamakagashi snake) venom. In H. Porkle and F.S. Markland, Jr., (ed.), *Hemostasis and Animal Venoms*, 55-66, 1988.
- Morokuma, K., Kobori, N., Fukuda, T., Uchida, T., Sakai, A., Toriba, M., Ohkuma, K., Nakai, K., Kurata, T. and Takahashi, M.: Experimental manufacture of equine antivenom against Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*). *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **64**, 397-402, 2011.  
(<https://www.niid.go.jp/niid/JJID/64/397.pdf>)
- Morokuma, K., Matsumura, T., Yamamoto, A., Sakai, A., Hifumi, T., Ato, M. and Takahashi, M.: Evaluation of the stability of Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*) Equine Antivenom after 20 years storage. *Tropical Biomedicine*, **38**, 111-118, 2021.  
(<https://securereservercdn.net/72.167.241.180/114.7f7.myftpupload.com/files/Vol38No2/tb-38-2-042-Morokuma-K.pdf>)
- Naito, S., Horino, A., Komiya, T., Fukuda, T., Takahashi, M., Ami, Y., Suzuki, Y., Oka, T., Ohkuma, K., Morokuma, K., Nakano, Y., Mori, M., Nishinohara, S., Komuro, K. and Uchida, T.: Induction of Protection against Tetanus Toxin in Mice by Tetanus Toxoid-Liposome Conjugate. *International Archives of Allergy and Immunology*, **116**, 215-219, 1998.
- Nakai, K., Takahashi, M. and Tomita, M.: The equine antitoxins supply system for biological poisons in Japan. *Toxicon*, **42**, 561-562, 2003.
- Nomura, T., Nagata, T., Kawamura, Y. and Sawai, Y.: A case of severe Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*) bite treated by antivenom. *Snake*, **21**, 85-86, 1989.
- Ogawa, H. and Sawai, Y.: Fatal bite of the Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*). *Snake*, **18**, 53-54, 1986.
- Ohsaka, A., Ikezawa, H., Kondo, H., Kondo, S. and Uchida, N.: Haemorrhagic activities of Habu snake venom, and their relations to lethal toxicity, proteolytic activities and other pathological activities. *British Journal of Experimental Pathology*, **41**, 478-486, 1960.
- Post, Y., Puschhof, J., Beumer, J., Kerckamp, H.M., Bakker, M.A.G., Slagboom, J., Barbanson, B., Wevers, N.R., Spijkers, X.M., Olivier, T., Kazandjian, T.D., Ainsworth, S., Iglesias, C.L., Wetering, W.J., Heinz, M.C., Ineveld, R.L., Kleef,

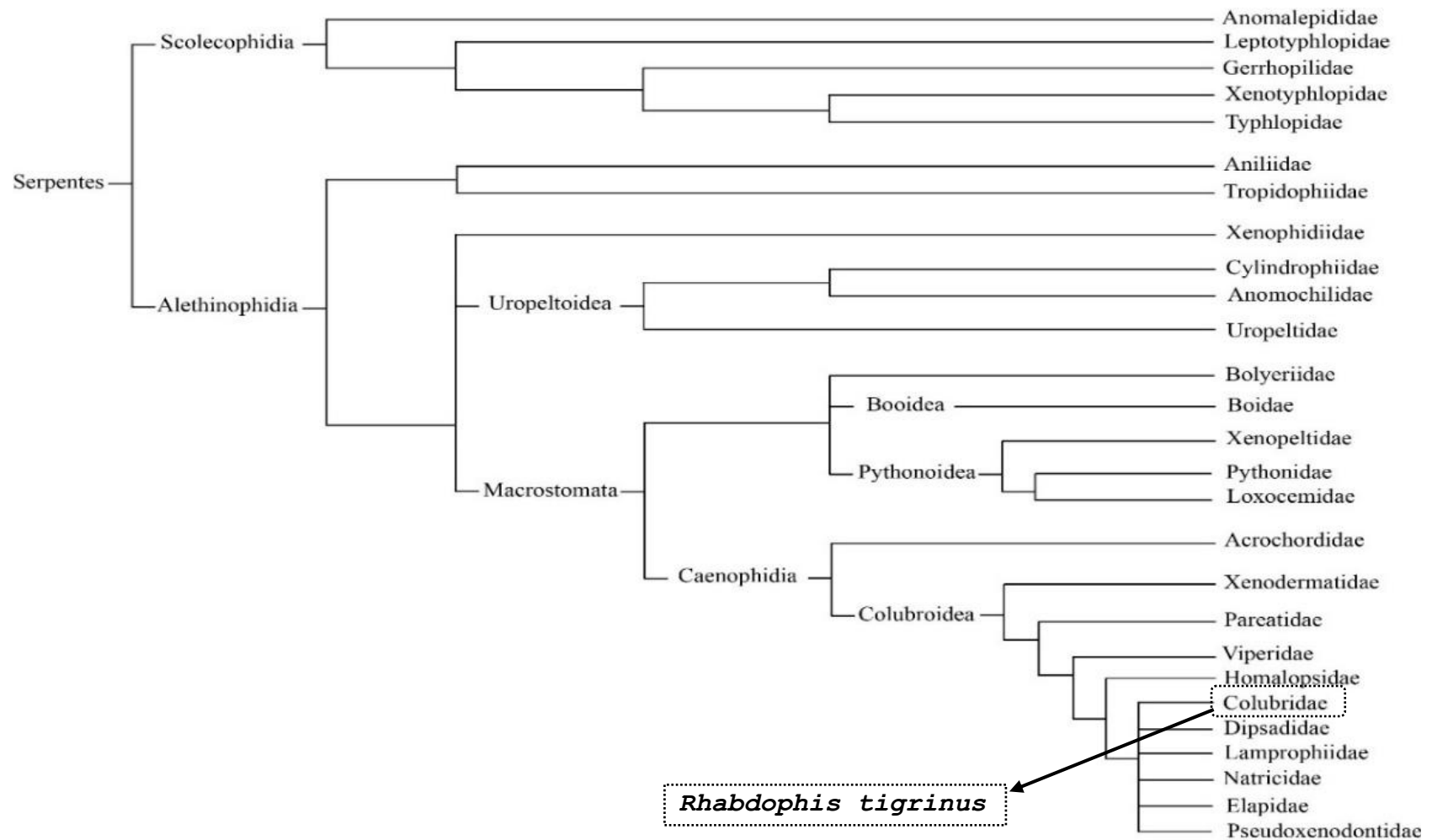


- R.G.D.M., Begthel, H., Korving, J., Bar-Ephraim, Y.E., Getreuer, W., Rios, A.C., Westerink, R.H.S., Snippert, H.J.G., Oudenaarden, A., Peters, P.J., Vonk, F.J., Kool, J., Richardson, M.K., Casewell, N.R. and Clevers, H.: Snake Venom Gland Organoids. *Cell*, **180**, 233-247. 2020.  
(<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.038>)
- Sakai, A., Honma, M. and Sawai, Y.: Studies on the pathogenesis of envenomation of the Japanese colubrid snake, Yamakagashi, *Rhabdophis tigrinus tigrinus* (BOIE). 1. Study on the toxicity of the venom. *Snake*, **15**, 7-13, 1983.
- Sakai, A. and Sawai, Y.: Studies of the pathogenesis of envenomation of Yamakagashi, *Rhabdophis tigrinus tigrinus* (BOIE). 2. Immunogenicity of the venom. *Snake*, **16**, 21-26, 1984.
- Sakai, A., Hatsuse, M. and Sawai, Y.: Study on the pathogenesis of envenomation by the Japanese colubrid snake, Yamakagashi, *Rhabdophis tigrinus tigrinus*. 4. Hematological and histological studies. *Snake*, **22**, 11-19, 1990.
- Takeuchi, H., Ota, H., OH, H. and Hikida, T.: Extensive genetic divergence in the East Asian natricine snake, *Rhabdophis tigrinus* (Serpentes: Colubridae), with special reference to prominent geographical differentiation of the mitochondrial cytochrome *b* gene in Japanese populations. *Biological Journal of the Linnean Society*, **105**, 395-408, 2012.  
(<https://academic.oup.com/biolinnean/article/105/2/395/2452601>)
- Uchida, T., Naito, S., Horino, A., Taneichi, M., Mizuguchi, J., Nakano, Y., Oka, T., Ookuma, K., Morokuma, K., Sakurai, S. and Komuro, K.: Ovalbumin coupled either with murine red blood cells or liposome induces IgG but not IgE antibody production. *Developments in Biological Standardization*, **92**, 353-363, 1998.
- Ueno, D., Shiino Y., Takahashi, J., Miyamoto, S. and Inoue, T.: A fatal case of traumatic brain injury with severe coagulopathy due to *Rhabdophis tigrinus* (yamakagashi) bites: a case report. *International Journal of Emergency Medicine*, **14**, 1-4, 2021.  
(<https://doi.org/10.1186/s12245-021-00402-4>)
- Wakamatsu, T., Kawamura, Y. and Sawai, Y.: A

- successful trial of Yamakagashi antivenom.  
*Snake*, **18**, 4-5, 1986.
- Zotz, R.B., Mebs, D., Hirche, H. and Paar, D.:  
Hemostatic changes due to the venom gland  
extract of the red-necked keelback snake  
(*Rhabdophis subminiatus*). *Toxicon*, **29**, 1501-  
1508, 1991.  
([https://doi.org/10.1016/0041-0101\(91\)90006-D](https://doi.org/10.1016/0041-0101(91)90006-D))
- 長谷川秀治, 高橋金弥: セファランチンによる毒蛇咬傷の治療. *最新医学*, **7**, 627-631, 1952.
- 星野和義, 村上雅一, 塩田摂成, 万木英一, 阿部重郎, 岸本宏之: マムシ咬傷 46 例の検討. *日本臨床外科学会誌*, **59**, 1754-1759, 1998.
- 鹿児島県: 平成 12 年度 ハブ対策事業の概要, 鹿児島県保健福祉部薬務課, 1-19, 2001.
- 鹿児島県: 平成 30 年度 ハブ対策事業の概要, 鹿児島県くらし保健福祉部薬務課, 1-32, 2019.
- 危険生物 MANIAX: ヤマカガシ, 2017.  
(<https://kiken.etc64.com/yamakagashi/>)
- 加藤正幸, 吉川周佐, 清原祥夫, 鈴木正, 土田哲也, 小濱雅則, 坪倉ひふみ, 三浦信之, 佐々木望: やまかがし咬症の 1 例. *皮膚臨床*, **45**, 133-136, 2003.
- 河内和宏, 沖田光昭, 繁本茂憲, 伊藤孝: マムシ咬傷 50 例の治療経験. *日本臨床外科学会誌*, **56**, 186-189, 1995.
- 小玉寿輝, 佐藤竜吾, 松永研一, 渡辺茂樹, 卜部省吾, 辛島賢二, 馴松義啓: マムシ咬傷の臨床的検討. *大分県医学会雑誌*, **12**, 158-161, 1994.
- 厚生労働省: 乾燥まむしウマ抗毒素(乾燥まむし抗毒素). *生物学的製剤基準*, 230-232, 2004a.  
(<https://www.niid.go.jp/niid/ja/mrbp.html>)
- 厚生労働省: 乾燥はぶウマ抗毒素(乾燥はぶ抗毒素). *生物学的製剤基準*, 136-138, 2004b.  
(<https://www.niid.go.jp/niid/ja/mrbp.html>).
- 倉田毅: 平成 11 年度 厚生科学研究 厚生科学特別研究事業 健康危機管理のための抗毒素の開発・備蓄システムの開発に関する研究. *厚生労働科学研究成果データベース*, 1, 1999.  
(<https://mhlw-grants.niph.go.jp/niph/search/NIDD00.do?resrchNum=199900043A>)
- 真栄城優夫: 毒蛇咬傷. *救急医学*, **3**, 1378-1383, 1979.
- 牧野正人: マムシ咬傷 114 例の検討. *日本臨床外科学会誌*, **49**, 1923-1928, 1988.
- 森真章: 日本産蛇毒類カラー写真図譜並びに日本産蛇毒咬傷の治療,

- p63, 医学書院(株), 東京, 1982.
- 盛根信也, 大城聡子, 泉水由美子, 久高潤: 抗ハブ毒ヒト抗毒素研究の概要について. *沖縄県衛生環境研究所報*, **50**, 57-61, 2016.  
(<https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/hoken/eiken/syoho/documents/50-p57-61.pdf>)
- 中山均, 幸村克喜, 阿部昌洋, 内田克之: 当院における蝮咬傷の実態. *新潟県立病院医学会誌*, **42**, 18-21, 1994.
- 貞弘省二: 蛇毒の免疫学的研究. 琉球列島のハブ属の毒の比較. *日本細菌学雑誌*, **20**, 21-26, 1965.
- 貞弘省二: はぶトキソイド. *ワクチンハンドブック*, 国立予防衛生研究所学友会編, 221-226, 丸善(株), 東京, 1994.
- 細菌製剤協会: まむし抗毒素. *五十年のあゆみ*, 165-166, 1996a.
- 細菌製剤協会: はぶ抗毒素. *五十年のあゆみ*, 167-168, 1996b.
- 堺淳, 瀧健治, 有吉孝一, 吉田彰彦: 全国調査による2007年におけるマムシ咬症発生件数の推定. *中毒研究*, **22**, 367-368, 2009.
- 堺淳: 蛇毒咬症(マムシ, ヤマカガシ)の診断と治療. *中毒研究*, **26**, 193-199, 2013.
- 作間晋: 抗毒素の現状. *化血研所報 黎明*, **11**, 19-33, 2002.
- 千石正一: ヤマカガシ. *原色/両生・爬虫類*, **2版**, 74-75, 社団法人家の光協会, 東京, 1983.
- 末広和長, 山下素弘, 大谷満, 阿方勉三, 上平敦, 増谷正人: マムシ咬傷155例の臨床的考察. *臨床外科*, **41**, 1819-1823, 1986.
- 館野功, 沢井芳男, 牧野正顕: マムシ咬症の現状, 特にその死因について. *日本医事新報*, **2095**, 12-21, 1964.
- 鳥羽通久: ヤマカガシ. *爬虫類・両生類 800種図鑑*, **第3版**, 324-325, ピーシーズ(株), 神奈川, 2002.
- 若松大, 是枝誠一郎: DICを惹起したヤマカガシ咬症例 本邦最初のヤマカガシ抗毒素使用例. *日本医事新報*, **3240**, 32-34, 1986.
- 山川雅延, 野崎真敏, 外間善治: ハブ(*Trimeresurus flavoviridis*)及びサキシマハブ(*Trimeresurus elegans*)毒の腫脹活性の定量的研究. *Snake*, **5**, 168-173, 1973.
- 矢埜正実, 矢野隆浪, 中村義人, 和気典雄, 井上正邦: マムシ咬傷の高度腫脹に対する減張切開の効果. *日本臨床外科学会誌*, **53**, 2243-2247, 1992.
- 湯浅繁一, 高橋則尋, 万代尚史, 松尾裕英: マムシ咬傷による急性腎不全. *日本臨床*, **49**, 1347-1353, 1991.

**Fig. および Table**



**Fig. 1. Phylogeny of snake species.**

(Source; Mohamed, 2019, <https://doi.org/10.3390/toxins11100564>)



Captured in Kanto, Tohoku region



Captured in Kinki region



Captured in Chugoku region



Captured Blackening type

**Fig. 2. Appearance (snake color variation) of Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*). Photos were referred from the pamphlet "Snake Identification and Diagnosis of Viper Snake Bite" created by the Health and Labor Sciences Research Project "Regulatory Science Research Project for Pharmaceuticals and Medical Devices" on 2011.**



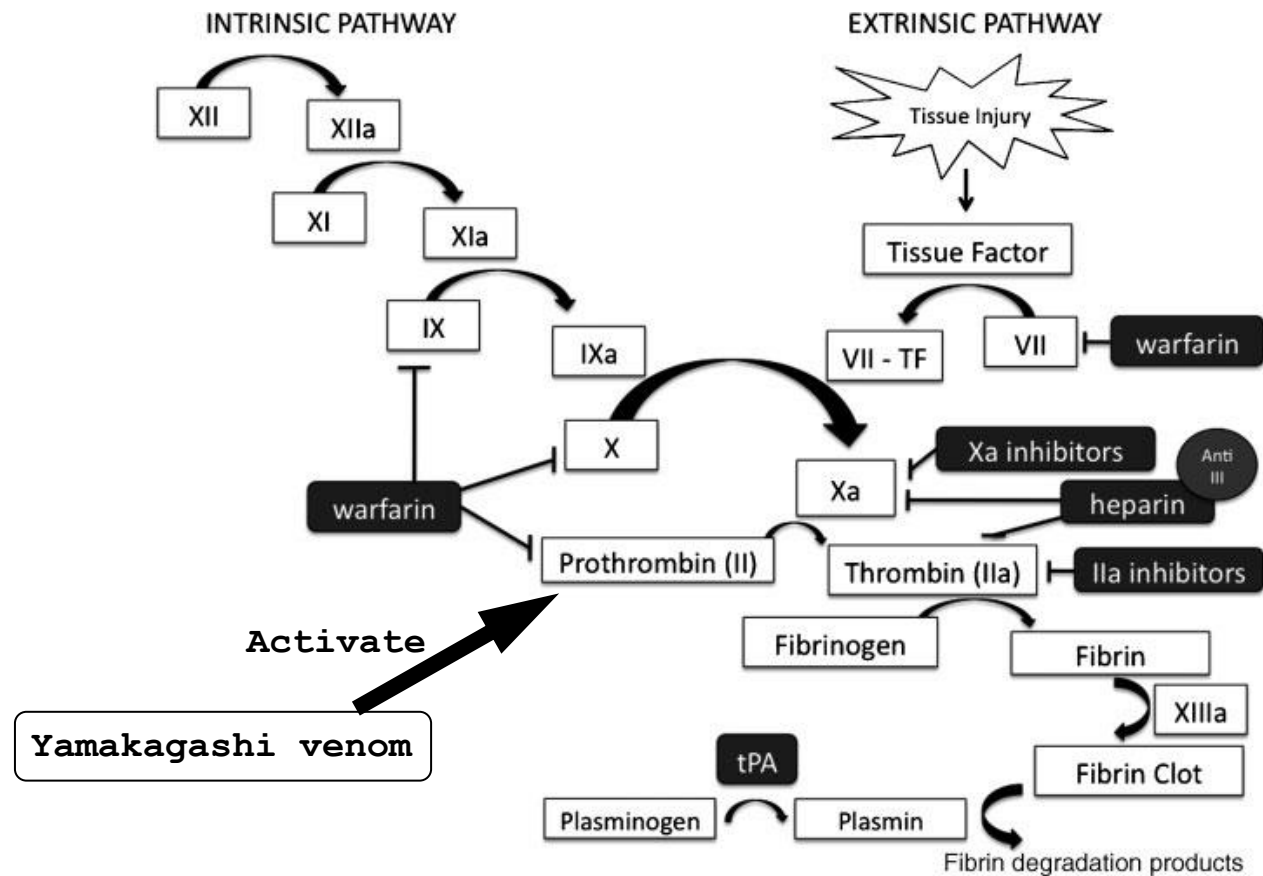
Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*)



Mamushi (*Gloydius blomhoffii*)

**Fig. 3. Difference between the fangs of Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*) and Mamushi (*Gloydius blomhoffii*).**

Based on the pamphlet "Snake Identification and Diagnosis of Viper Snake Bite" created by the Health and Labor Sciences Research Project "Regulatory Science Research Project for Pharmaceuticals and Medical Devices" on 2011. The Yamakagashi's fangs are not tubular like Mamushi's fangs, but are located slightly behind the mouth. The length of the fangs is short, about 2 mm. There is an opening of the Duvernoy's glands at the base of the fangs. The Mamushi's fangs are very fine, and if bitten, the wound becomes two stabs at approximately 1 cm intervals.

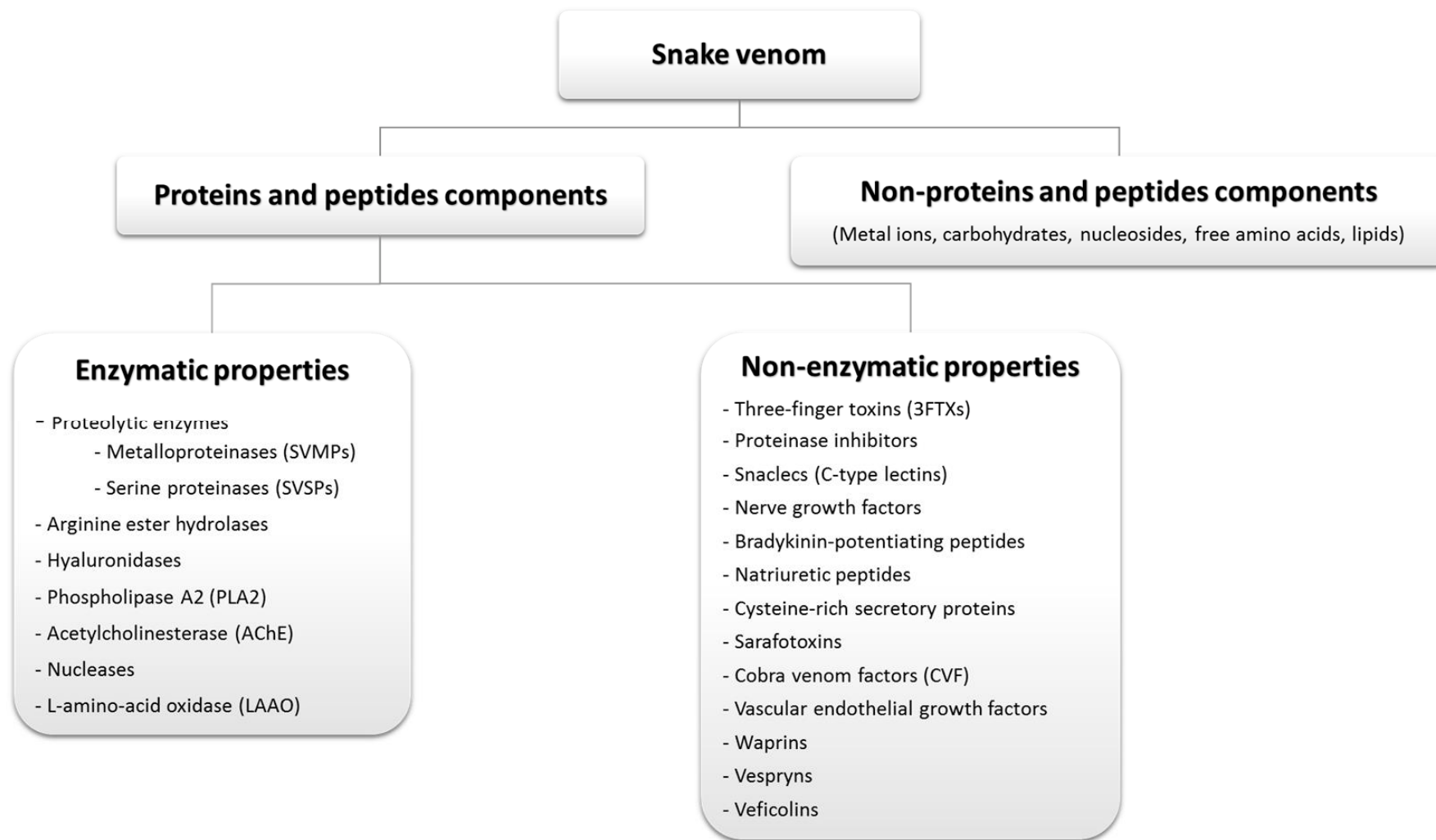


**Fig. 4. Elements of the coagulation cascade with anticoagulant and thrombolytic medication interactions.**

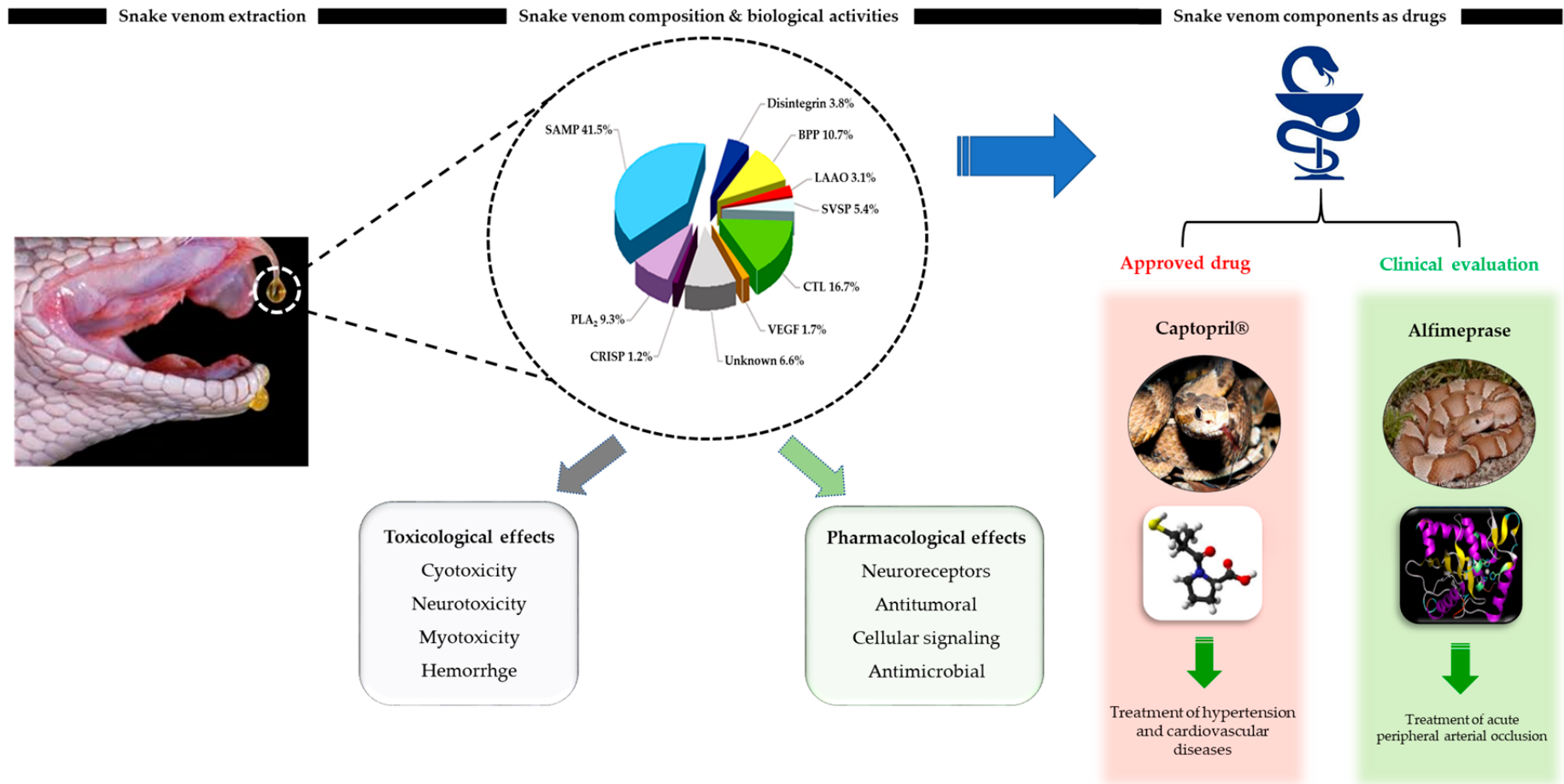
Warfarin inhibits biologic activation of factors II, VII, IX, and X as well as proteins C and S (not shown). Heparin binds with antithrombin III to primarily inhibit factors Xa and thrombin (IIa). Direct Xa and thrombin (IIa) inhibitors interact with their respective factors. Tissue plasminogen activator (tPA) acts in the fibrin clot lysis pathway. Yamakagashi venom has prothrombin (II)-activating properties.

(Source; Lazzaro, 2010, <https://www.researchgate.net/publication/49729901>)





**Fig. 5. Snake venom composition.**  
(Source; Mohamed, 2019, <https://doi.org/10.3390/toxins11100564>)



**Fig. 6.** A schematic representation of snake venoms, aiming to assess the significance of snake venoms as a resource of novel drugs.

Snake Venom Metalloproteinase (SVMP), Phospholipase A2 (PLA<sub>2</sub>), Cysteine-rich secretory protein (CRISP), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), C-type lectin-like toxin (CTL), Serine proteinase (SVSP), L-amino acid oxidase (LAAO), Bradykinin Potentiating Peptide (BPP).

(Source; Mohamed, 2019, <https://doi.org/10.3390/toxins11100564>)

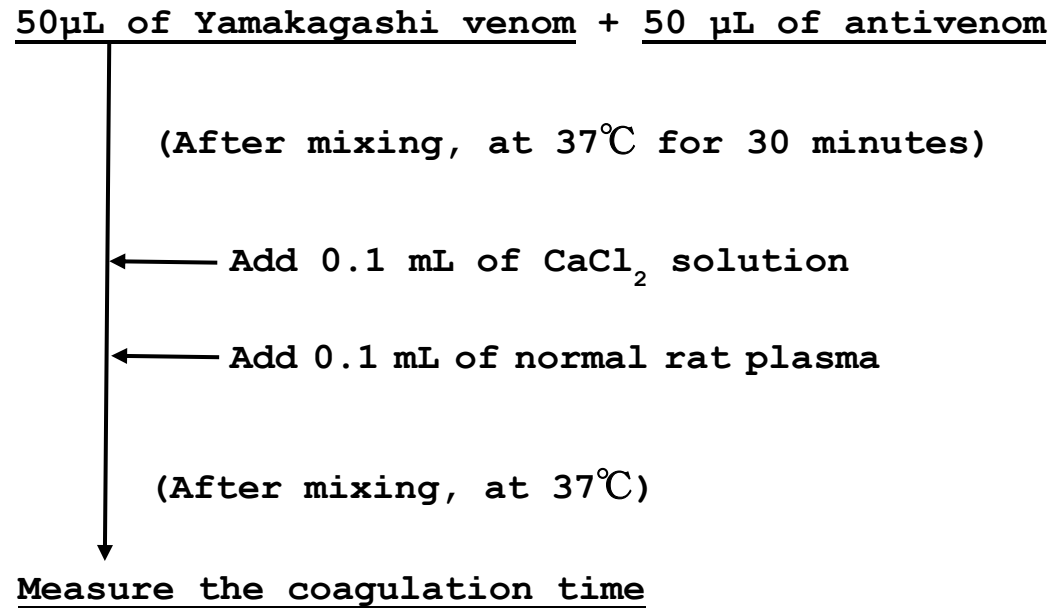


Fig. 7. Procedure for measuring anticoagulant activity of *Rhabdophis tigrinus* antivenom. The amount of venom that coagulates in 20 seconds is calculated from the dose-response line between the amount of venom and coagulation time. The neutralization titer (anticoagulant activity) of the antivenom is calculated from the difference between with the venom control.

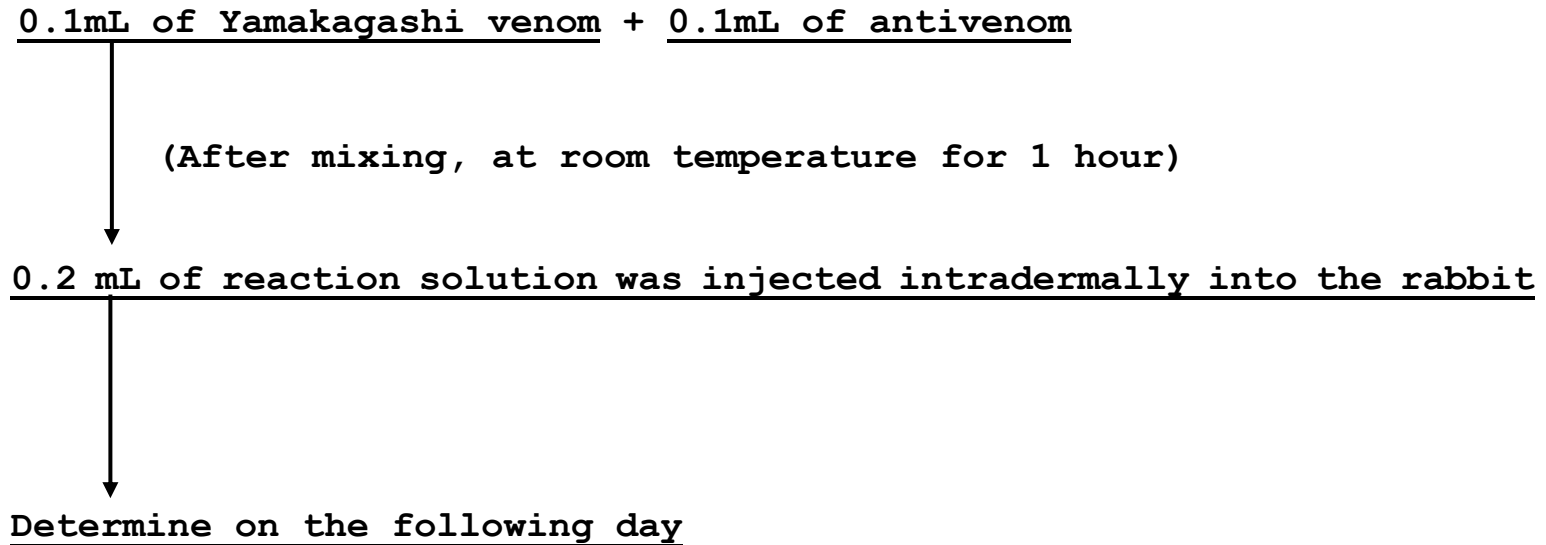
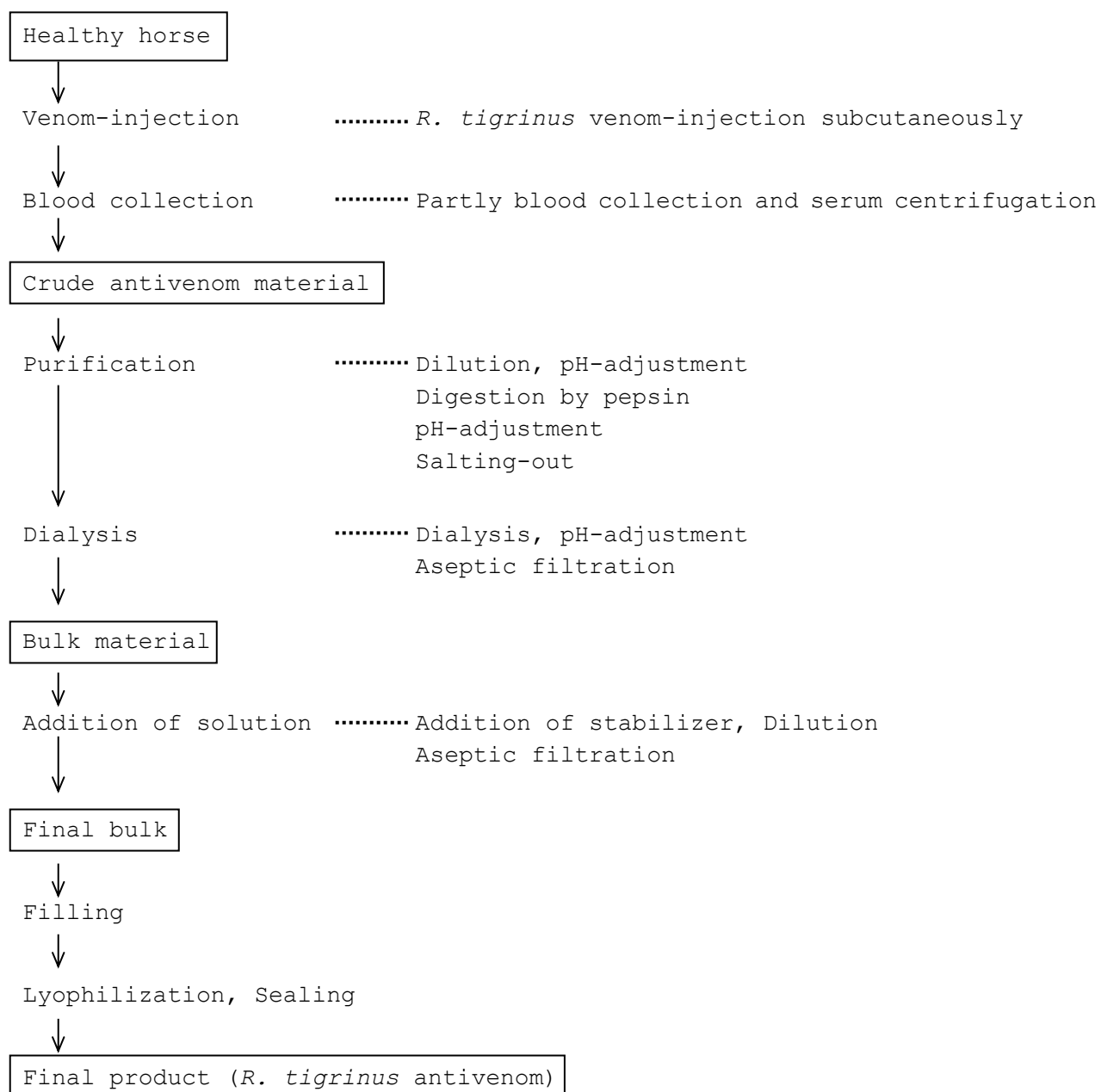


Fig. 8. Procedure for measuring antihemorrhagic activity (Rabbit intradermal test) of *Rhabdophis tigrinus* antivenom.

The neutralization titer (antihemorrhagic activity) of the antivenom was calculated from the highest dilution of the antivenom that neutralizes the hemorrhagic activity of venom (10 mm-hemorrhagic spots).



**Fig. 9. Procedure of purification of *Rhabdophis tigrinus* antivenom.**



Fig. 10. Original of Freeze-dried anti-Yamakagashi, Equine Antivenom (Lot 0001).

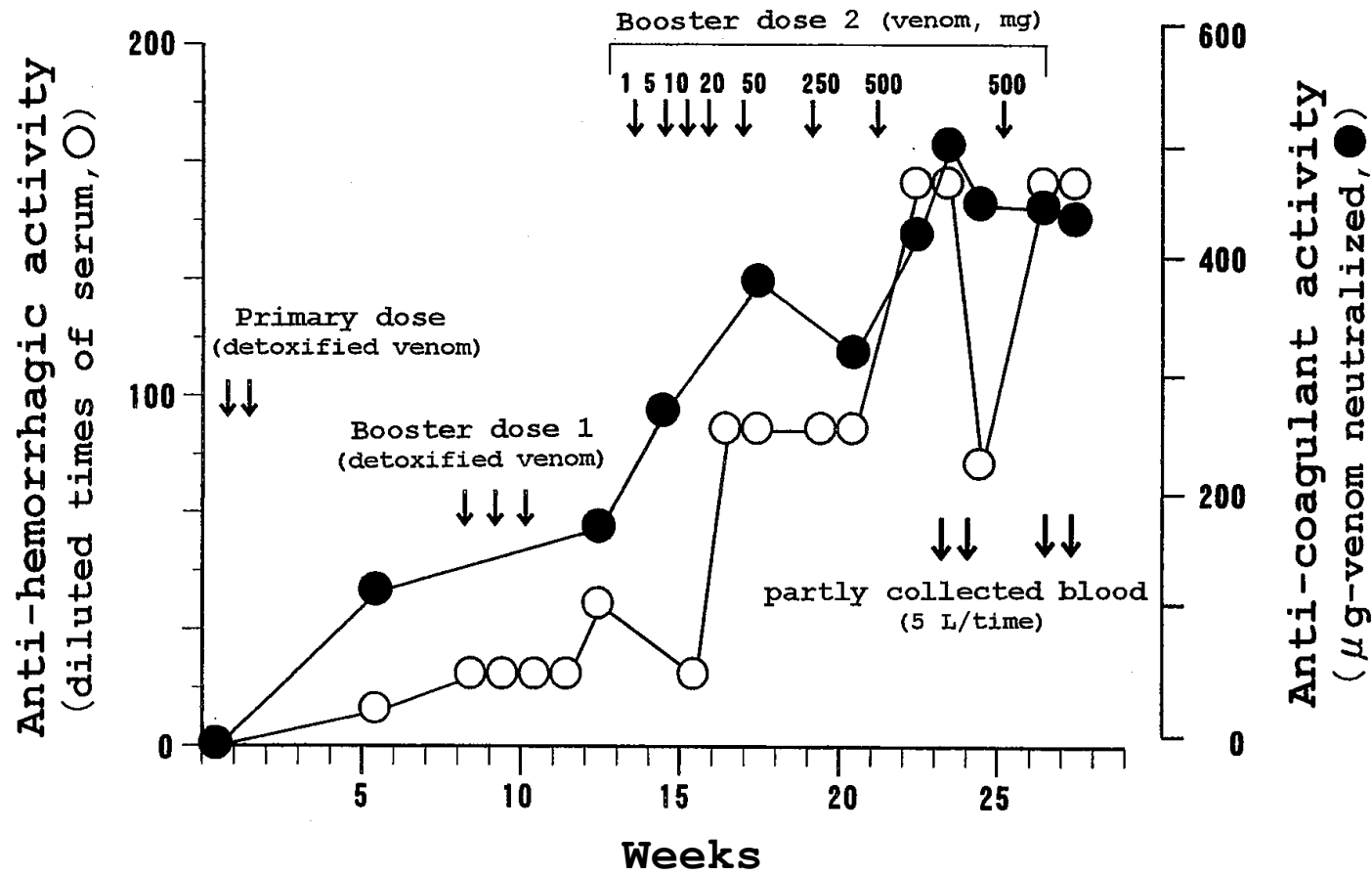


Fig. 11. Change of *Rhabdophis tigrinus* antivenom-titer in horse immunized by a conventional method (Number of horse is 1313.).

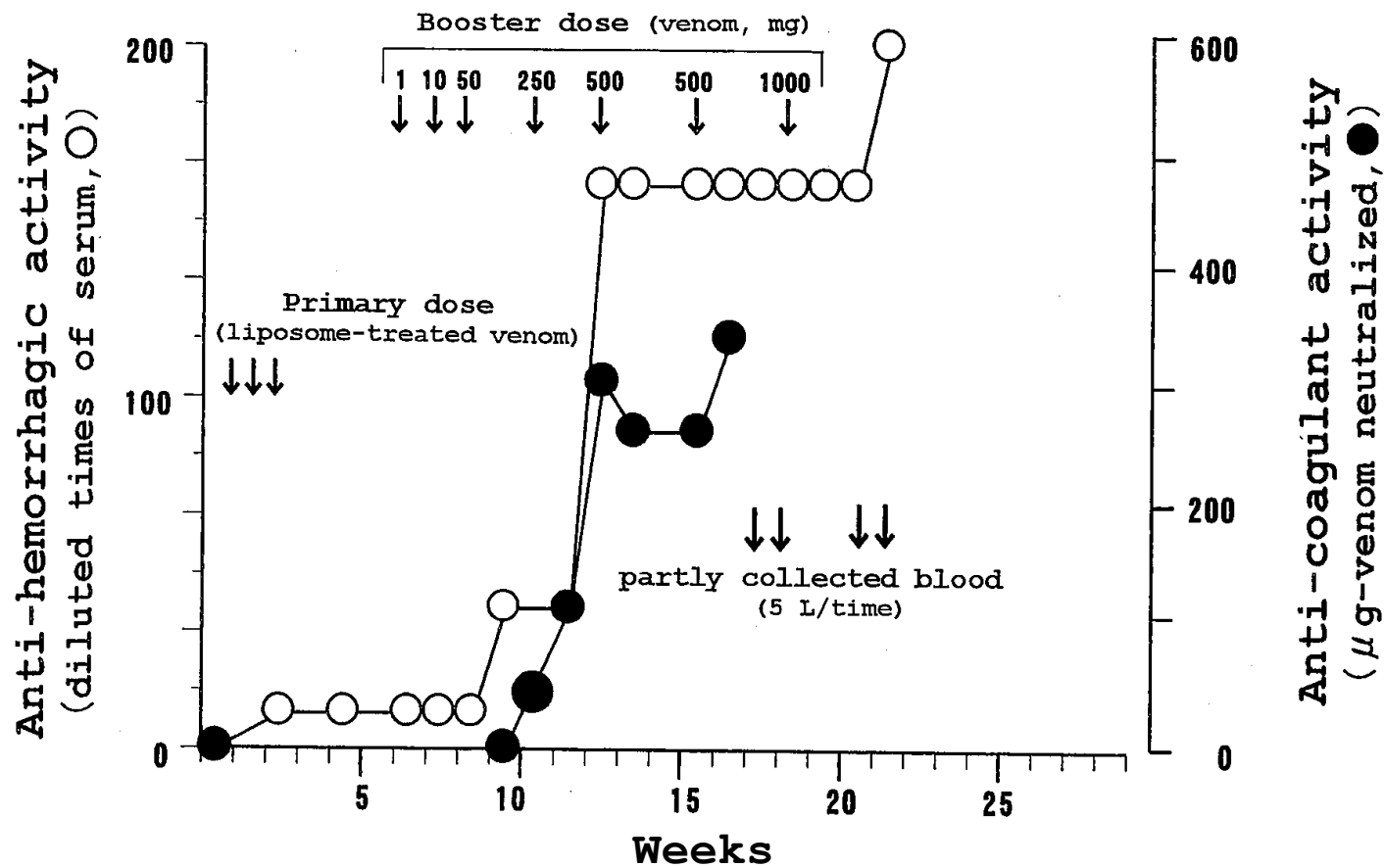


Fig. 12. Change of *Rhabdophis tigrinus* antivenom-titer in horse immunized by liposome-treated venom (Number of horse is 1319.).



(densitometry pattern)

Crude antivenom (serum), equine

*R. tigrinus* antivenom, equine

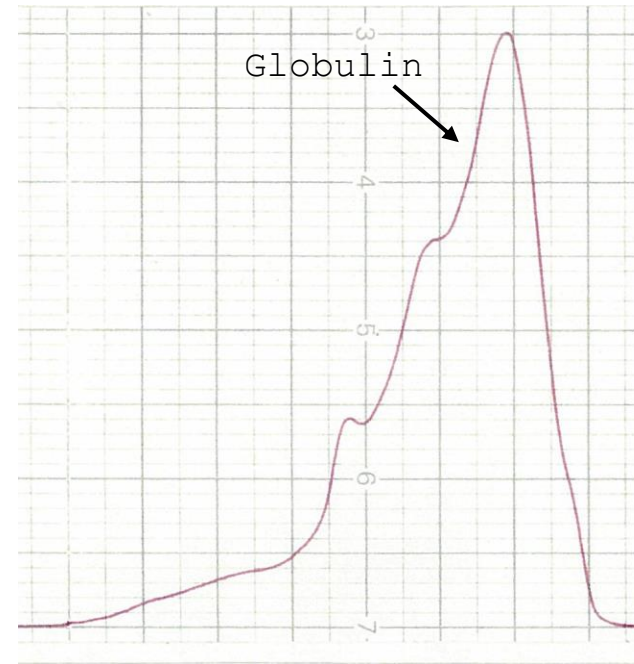
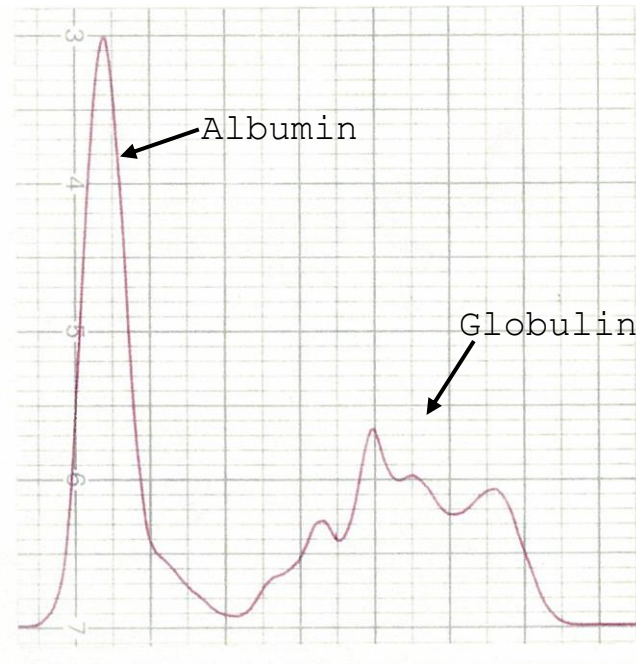
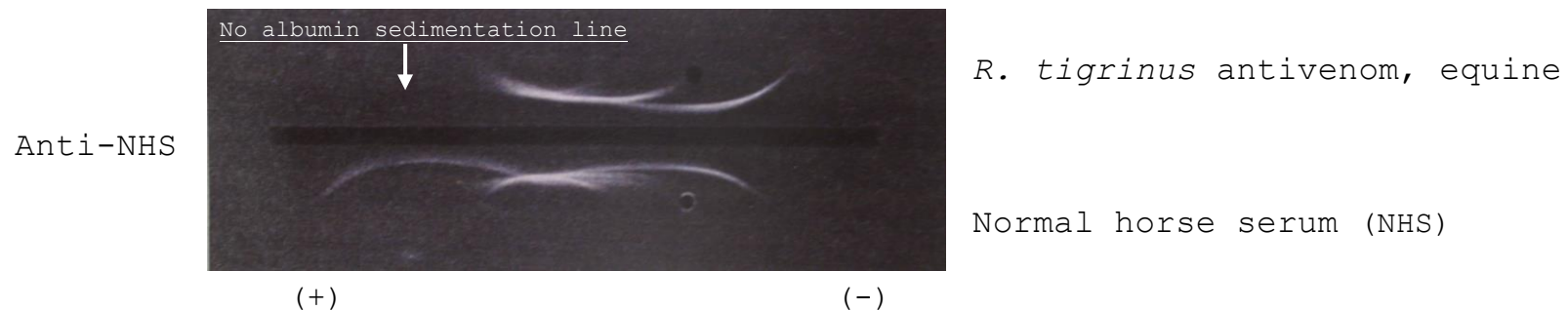


Fig. 13. Cellulose acetate membrane electrophoresis of *Rhabdophis tigrinus* antivenom. The purity analysis of the crude serum revealed the peaks of albumin and globulin, while the purified antivenom only showed immunoglobulins peaks ( $\gamma$ -globulin and T-globulin) without the evidence of albumin.



**Fig. 14.** Immunoelectrophoresis of *Rhabdophis tigrinus* antivenom. The normal horse serum (NHS) was almost completely composed of horse plasma proteins that reacted with the goat anti-(horse whole serum) antiserum. On the other hand, the *Rhabdophis tigrinus* antivenom was of high purity and only showed bands for immunoglobulins (g-globulin and T-globulin) with no albumin band.

**Table 1. Snake venom-based drugs in the market and in clinical trials.<sup>a</sup>**

Stage	Protein/Peptide	Lead source	Pharmacology	Indication
FDA Approved	Captopril®	<i>Bothrops jararaca</i>	Inhibiting angiotensin-converting enzyme.	Hypertension
	Aggrastat®(Tirofiban)	<i>Echis carinatus</i>	Glycoprotein IIb/IIIa inhibitors.	Heart attack
	Integrilin® (Eptifibatide)	<i>Sistrurus miliarus barbouri</i>	Glycoprotein (GP) IIb/IIIa inhibitors.	Acute coronary syndrome
	Defibrase®/Reptilase® (Batroxobin)	<i>Bothrops atrox</i> & <i>B. moojeni</i>	Converts fibrinogen into fibrin.	Stroke, pulmonary embolism, deep vein thrombosis and myocardial infarction
	Hemocoagulase®	<i>Bothrops atrox</i>	Catalyzes the coagulation of the blood.	Plastic surgery, abdominal surgery, and human vitrectomy
	Exanta®(Ximelagatran)	Cobra venom	Direct thrombin inhibitors.	Thromboembolic complications of atrial fibrillation
In clinical trials	Alfimeprase®	<i>Agkistrodon contortrix</i>	Thrombolytic activity.	Acute peripheral arterial occlusion
	Viprinex®(Ancrod)	<i>Agkistrodon rhodostoma</i>	Defibrinogenating agent.	Acute ischemic stroke

a, Source; Mohamed, 2019. (<https://doi.org/10.3390/toxins11100564>)

**Table 2. Past human cases of snake bite by Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*) in which antivenom had not been applied.**

Case no.	Outcome	Date <sup>1)</sup>	Victim		
			Age	Symptoms	Treatment
1	Fatal	1978. 09	61	Abnormal blood coagulation	Died 2 months later (Pulmonary edema).
2		1984. 09	14	DIC <sup>2)</sup> , Intracerebral hemorrhage, Severe headache	Died 10 days later (Intracerebral hemorrhage).
3		1993. 04	76	Systemic subcutaneous bleeding, DIC. Decreased blood pressure, Headache, Dyspnea	Died 62 hours later (Multiple organ failure).
4	Survive	1974. 04	12	DIC, Acute renal failure (→Chronic)	Long-term hemodialysis.
5		1980. 09	14	Systemic bleeding, DIC, Hematuria, Anuria, Acute renal failure (→ Chronic)	Platelet infusion, Hemodialysis. Fresh blood transfusion. Blood coagulation system normalized after 10 days.
6		1981. 08	61	Systemic bleeding, DIC, Acute renal failure, Brown urine, Oliguria	Peritoneal perfusion, Hemodialysis. Plasma exchange, Normalized after 28 days.
7		1983. 09	66	Systemic subcutaneous bleeding, DIC, Hematuria	Plasma exchange, Discharged after 55 days.
8		1993. 10	43	Systemic bleeding, Vomiting, Hematemesis, Oliguria, Hematuria, DIC, Acute renal failure	Plasma exchange, Concentrated red blood cell infusion. Hemodialysis, Normalized after 1 month.

1) Date victim was bitten by snake.

2) Disseminated Intravascular Clotting.

**Table 3. Past human cases of snake bite by Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*) in which antivenom injection had been conducted.**

Case no.	Date <sup>1)</sup>	Age	Symptoms	Victim	
				Antivenom <sup>2)</sup>	Treatment Progress
1	1985. 06	50	Systemic bleeding, DIC <sup>3)</sup> , Occult blood in urine (+++)	50 hours	Normalized after 5 days.
2	1986. 06	12	Bleeding tendency, DIC, Headache	31 hours	Appearance of allergic reaction. Discharged after 14 days.
3	1987. 06	20	Bleeding tendency, DIC	30 hours	Recovered after 4 days.
4	1987. 09	9	Bleeding tendency, DIC, Hematuria	44 hours	Complete recovery after 4 days.
5	1989. 05	40	Bleeding tendency, Abnormal blood coagulation, Hematuria	32 hours	Decrease in severity of symptoms.
6	1990. 10	6	Bleeding tendency, DIC	22 hours	Discharged after 4 days.
7 <sup>4)</sup>	1991. 08	67	Bleeding tendency, Hematuria	15 and 27 hours	Symptom severity decreased after 9 days.
8	1991. 09	52	Bleeding tendency, DIC, Acute renal failure, Hematemesis	6 days	Hemodialysis, Recovered after 25 days.
9	1995. 07	65	Bleeding tendency, DIC	2 days	Discharged after 7 days.
10	1996. 06	12	Bleeding tendency, DIC, Headache	4 days	Discharged after 10 days.
11	1997. 08	63	DIC	30 hours	Discharged after 11 days.

1) Date victim was bitten by snake.

2) Time from bitten to antivenom administration (injection) started.

3) Disseminated Intravascular Clotting.

4) Female.

**Table 4. Property test<sup>1)</sup> for Freeze-dried Yamakagashi Antivenom, Equine (Lot 0001).**

Item examined	Values		Results
	Present study	Normal range	
Moisture content	0.32%	3.0 % or less	passed
pH	7.10	6.8~7.4	passed
Protein content	30.8 mg/mL	—	passed
Sterility	No organisms	—	passed
Test for freedom from abnormal toxicity	Normal	—	passed
Pyrogen test	0.39°C <sup>2)</sup>	0.8°C or less	passed
Potency test:			
Anti-coagulant activity	Each vial neutralized 4 mg of venom.	—	—
Anti-hemorrhagic activity	Each vial neutralized 13 mg of venom.	—	—

1) General pharmaceutical properties as specified for other freeze-dried equine antivenom products in the Minimum Requirements for Biological Products of Japan was conducted.

2) Total increase in body temperature of the two rabbits used in the test.

**Table 5. Stability test for Yamakagashi Antivenom, Equine (Lot 0001) until 2020.**

Year tested (Years since manufacture)	2000 (0)	2012 (12th)	2013 (13th)	2015 (15th)	2016 (16th)	2017 (17th)	2018 (18th)	2019 (19th)	2020 (20th)
Property	Normal <sup>1)</sup>	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Dissolution time (Second)	79	81	185	- <sup>2)</sup>	107	114	146	133	91
Moisture content (%)	0.26	0.35	0.48	0.46	0.47	0.57	0.53	0.67	0.73
Insoluble foreign matter <sup>3)</sup>	pass	-	pass	-	-	-	-	-	-
Osmotic pressure ratio	1.25	-	1.19	-	-	-	-	-	-
pH	7.13	7.18	7.12	-	-	-	-	-	-
Protein content (mg/mL)	29.8	31.7	30.4	-	-	-	-	-	-
Endotoxin content (EU/mL)	<0.004	<0.020	0.020	-	-	-	-	-	-
Sterility <sup>4)</sup>	pass	pass	pass	-	-	-	-	-	-
Test for freedom from abnormal toxicity	pass	pass	pass	pass	pass	pass	pass	pass	pass
Pyrogen test (°C) <sup>5)</sup>	0.17	0.11	0.12	-	-	-	-	-	-
Potency test:									
Anti-coagulant activity (Wt. of venom) <sup>6)</sup>	4 mg	-	16.9 mg	-	-	15.6 mg	-	-	-

1) Pale yellow dry formulation, slightly yellowish liquid after dissolution.

2) Not tested.

3) "pass" means "Not recognized".

4) "pass" means that there are no organisms.

5) Total increase in body temperature of the 3 rabbits used in the test.

6) Weight of venom neutralized. The neutralizing antibody titer of antivenom was calculated as the dose of *R. tigrinus* venom inducing coagulation *in vitro* using normal rat plasma.

**Table 6. Past human cases of snake bite by Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*) in which Yamakagashi Antivenom, Equine (Lot 0001) had been administered.**

Case no.	Date <sup>1)</sup> (Time)	Location <sup>2)</sup>	Victim				Treatment	
			Age	Sex	Symptoms	Treatment		
						Antivenom	Progress	
1	2001.07.11 (08:30)	Saitama	5	Male	Bitten on left index finger, Bleeding tendency, Subcutaneous hemorrhage (next day), Nose bleeding, DIC <sup>3)</sup> , Suspecting Mamushi bite	Mamushi antivenom administered. Heparin and Fusan® administered. Plasma exchange. Bleeding tendency did not improve. Diagnosis of Yamakagashi bite. Yamakagashi antivenom administered after 2 days. Prednisolone was administered to prevent serum sickness.	Recovered after 2 days.	
2	2011.10.07 (16:40)	Nagasaki	38	Male	Bitten for one minute, Sever headache, Blood coagulation failure, Bleeding tendency, Brown urine, DIC, Diagnosis of Yamakagashi bite	Two vials of Yamakagashi antivenom administered after 7 hours. Antihistamine and steroid were pre- administered to prevent serum sickness.	Recovered next day. No adverse reactions.	

1) The time victim was bitten by snake.

2) Prefectures in Japan.

3) Disseminated Intravascular Clotting.



**Table 7. Human cases of snake bite by Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*) in which Yamakagashi Antivenom ,Equine (Lot 0001) after 17 years of manufacture had been administered.**

Case no.	Date <sup>1)</sup> (Time)	Location <sup>2)</sup>	Victim			Treatment	
			Age	Sex	Symptoms	Antivenom	Progress
1	2017.07.25 (02:30)	Fukuoka	10	Male	Bitten for 5 minutes, FDP <sup>3)</sup> was 70ug/mL, Fibrinogen was 100mg/dL (19:30), Serious DIC <sup>4)</sup> , Diagnosis of Yamakagashi bite	Thrombomodulin administered at 20:00. Yamakagashi antivenom administered at 23:00. Antihistamine and steroid were pre-administered to prevent serum sickness.	Discharged after 4 days.
2	2017.07.29 (18:30)	Hyogo	10	Male	Bitten on right wrist by a 60cm snake, Wounds continued to bleed, Headache, Yamakagashi bite not suspected at first, FDP was 800ug/mL, Fibrinogen was below sensitivity at 19:30 and 0:00, Diagnosis of Yamakagashi bite, Become unconscious	Yamakagashi antivenom administered after 16 hours. No adverse reactions.	Regained consciousness after administration of antivenom. Discharged after 4 days.

1) The time victim was bitten by snake.

2) Prefectures in Japan.

3) Fibrin Degradation Product.

4) Disseminated Intravascular Clotting.

**Table 8. Differences between Yamakagashi, Mamushi and Habu bites.<sup>a</sup>**

Symptoms	Viper bite		
	Yamakagashi bite	Severe Mamushi bite (Grade I, II, III)	Habu bite
Swelling	—	Local only~elbow and knee joints (Grade I, II, III)	Local only~elbow and knee joints (Grade I, II, III)
Pain	—	—~+	+++ (Dull pain)
Bleeding tendency	+++	+++	+(Hemolytic)
Appearance time	Several times ~ 1 day (Gum flesh, Injection site, Digestive tube, Bleeding spots)	Within a few hours (Injection site, Digestive tube, Bleeding spots)	Several times ~ 1 day
Abnormalities of the coagulation system, etc	Decreased fibrinogen Platelets later decreased Increased fibrinolytic activity	Platelets decrease in a few hours	—~+ (Admitted in severe cases)
Decreased blood pressure	—	Rapid (A few hours after the award)	+(Severe cases only)
Abnormal urine	Hemoglobinuria	Myoglobinuria, Hematuria	Hematuria (Severe cases only)
Other	Transient severe headache DIC Acute renal failure Hemorrhage	Diplopia Respiratory insufficiency Cardiac insufficiency Acute renal insufficiency	Local necrosis Blistering Dysfunction
Time to death	A few days to 10 days (Case of internal bleeding in the brain)	1~few days	With in 1day
Habitat	All of Japan except Hokkaido	All of Japan except Okinawa	Okinawa and Kagoshima islands

a, Modified from Sakai, 2013.

## 付録

### 参考情報（関連論文）

#### 1. 蛇咬傷の際の禁忌事項；

蛇咬傷の処置でやってはいけないことがある。蛇に噛まれるとヒトはパニックになり、不合理な行動をとることがある。蛇に噛まれた直後には以下の行動は避けるべきである。

- 1) 蛇を拾ったり、包んだり、殺したりしてはいけない。再び噛まれる可能性が高くなる。死んだ蛇でも噛まれることがある。
- 2) 止血バンドは使わない。
- 3) 傷口は切らない。
- 4) 毒を吸い出そうとしてはいけない。
- 5) 氷で冷やしたり、傷口を水で濡らしたりしてはいけない。
- 6) アルコール類を飲まない。
- 7) カフェイン入りの飲み物を飲まない。
- 8) イブプロフェン（アドビル®、アセトアミノフェン®）などの鎮痛剤を飲まない。

(<https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/15647-snake-bites>)

## 2. やまかがしやまむしに咬まれた時の対処法；

### 1) 咬まれた部位よりも中枢部を縛ってはいけない；

局所の組織損傷を起こすような毒蛇咬傷では、緊縛によって蛇毒を局所に留めることで損傷を大きくする危険性が高くなるため、緊縛は勧められていない。また、患者は細い紐などで血流を完全に止めるほど強く縛りすぎる 경우가多く、そのことによる悪影響も考えられる。

やまかがし咬傷では、短時間で医療機関に行けるようであれば縛る必要はない。まむし咬傷で、医療機関に行くまでにかなり時間がかかる場合には、包帯などで骨折時のように患部の前後を含めて広く巻いて固定するクレープバンデージ法が勧められる。但し、腫脹の拡がりにより圧迫が強くなるため、ときどきチェックして調節する必要がある。

### 2) 咬まれた部位の乱切開はしない；

排毒目的で、咬傷部位または数箇所切開が行われることがある。しかし、蛇毒にはヒアルロニダーゼが含まれており、その拡散吸収が速いため、医療機関での切開や吸収は殆ど効果が認められない。逆に、切開による治療日数の長期化がみられるため、切開は勧められない。

### 3) 抗毒素接種の必要性；

軽症では必要ない。但し、その診断が難しい場合も多く、受傷後数時間では重症化するか否かの判断ができないことが多い。ただ、高齢者では重症化の危険性が高く、死亡者の殆どが60歳以上であり、多くは抗毒素の未投与や遅れによるものである。

やまかがし咬傷では、フィブリノーゲンの減少や出血傾向がみられれば、抗毒素の投与は不可欠である。この場合、DIC(播種性血管内凝固症候群)、急性腎不全へと進行する危険性は高い。

まむし咬傷で、血管に毒が注入された症例での抗毒素は不可欠である。血小板数が1時間以内に1万以下まで減少するような場合には、全身性の出血、血圧の低下、心不全などにより1～2日で死に至ることもある。また、腫れの拡がりに伴って横紋筋融解を起こし、数日で急性腎不全を起こすケースもあるため、経時的な血液検査によりこれらの徴候がみられるようであれば、抗毒素により毒を中和し、その進行を止める必要がある。

何れの場合も、抗毒素投与前には必ず抗ヒスタミンとステロイドを投与し、抗毒素は30分～1時間かけて点滴静注する。

(堺淳：日本医事新報，4738，65-66，2015)

## 主論文に関連する参考文献

### 主論文を構成する参考論文

1. Morokuma, K., Kobori, N., Fukuda, T., Uchida, T., Sakai, A., Toriba, M., Ohkuma, K., Nakai, K., Kurata, T. and Takahashi, M.: Experimental manufacture of equine antivenom against Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*). *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **64**, 397-402, 2011.  
(<https://www.niid.go.jp/niid/JJID/64/397.pdf>.)
2. Morokuma, K., Matsumura, T., Yamamoto, A., Sakai, A., Hifumi, T., Ato, M. and Takahashi, M.: Evaluation of the stability of Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*) Equine Antivenom after 20 years storage. *Tropical Biomedicine*, **38**, 111-118, 2021.  
(<https://secureservercdn.net/72.167.241.180/114.7f7.myftpupload.com/files/Vol38No2/tb-38-2-042-Morokuma-K.pdf>)

### 関連する参考論文

1. 諸熊一則, 友清和彦, 高橋元秀: 蛇毒素成分の解析研究の現状および国内の毒蛇咬傷患者治療の実態. *熊本保健科学大学研究誌*, **19**, 1-17, 2022.
2. Hifumi, T., Sakai, A., Yamamoto, A., Morokuma, M., Otani, N., Takahashi, M. and Ato, M.: *Rhabdophis tigrinus* (Yamakagashi) Bites in Japan Over the Last 50 Years: A Retrospective Survey. *Frontiers in Public Health*, **9**, 1-6, 2022.
3. Hifumi, T., Yamamoto, A., Ato, M., Sawabe, K., Morokuma, K., Morine, N., Kondo, Y., Noda, E., Sakai, A., Takahashi, J. and Umezawa, K.: Clinical Serum Therapy: Benefits, Cautions, and Potential Applications. *Keio J. Med.* **66**, 57-64, 2017.
4. Hifumi, T., Yamamoto, A., Morokuma, K., Okada

- I., Kiriu, N., Ogasawara, T., Hasegawa, E., Kato, H., Inoue, J., Koido, Y. and Takahashi, M.: Clinical Efficacy of Antivenom and Cepharranthine for the Treatment of Mamushi (*Gloydius blomhoffii*) Bites in Tertiary Care Centers in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* **66**, 26-31, 2013.
5. Hifumi, T., Yamamoto, A., Morokuma, K., Ogasawara, T., Kiriu, N., Hasegawa, E., Inoue, J., Kato, H., Koido, Y. 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. Fukuda, T., Iwaki, M., Seung Hwa Hong, Ho Jung Oh, Zhu Wei, Morokuma, K., Ohkuma, K., Lei Dianliang, Arakawa, Y. and Takahashi, M.: Standardization of Regional Reference for Mamushi (*Gloydius blomhoffii*) Antivenom in Japan, Korea, and China. *Jpn. J. Infect. Dis.* **59**, 20-24, 2006.
7. Naito, S., Taneichi, M., Kato, H., Tanaka, Y., Ami, Y., Suzaki, Y., Mori, M., Nakano, Y., Yamamura, H., Morokuma, K., Ohkuma, K., Miyake, H., Kiniwa, M., Komuro, K. and Uchida, T.: Selective Inhibition of Systemic Anti-OVA IgE Production in Response to Oral Pre-Treatment with OVA-Liposome Conjugates. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **129**, 314-319, 2002.
8. Naito, S., Okada, Y., Takahashi, M., Kato, H., Taneichi, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Oka, T., Ohkuma, K., Morokuma, K., Onodera, H., Inoue, M., Takahashi, Y., Yamazaki, S., Kimura, H., Komuro, K. and Uchida, T.: Anti-Tetanus Toxoid Antibody Production and Protection against Lethal Doses of Tetanus Toxin in hu-PBL-SCID Mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **123**, 149-154, 2000.

9. Naito, S. Horino, A. Komiya, T. Fukuda, T. Takahashi, M. Ami, Y. Suzaki, Y. Oka, T. Ohkuma, K. Morokuma, K. Nakano, Y. Mori, M. Nishinohara, S. Komuro, K. and Uchida, T.: Induction of Protection against Tetanus Toxin in Mice by Tetanus Toxoid-Liposome Conjugate. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **116**, 215-219, 1998.
10. Uchida, T., Naito, S., Horino, A., Taneichi, M., Mizuguchi, J., Nakano, Y., Oka, T., Ohkuma, K., Morokuma, K., Sakurai, S. and Komuro, K.: Ovalbumin Coupled Either with Murine Red Blood Cells or Liposome Induces IgG but Not IgE Antibody Production. *Dev. Biol. Stand.* **92**, 353-363, 1998.

#### その他の参考文献

1. Asai, D., Fukuda, T., Morokuma, K., Funamoto, D., Yamaguchi, Y., Mori, T., Katayama, Y., Shibayama, K. and Nakashima, H.: Injectable Polypeptide Hydrogel Depot System for Assessment of the Immune Response-Inducing Efficacy of Sustained Antigen Release Alone. *Macromol. Biosci.* **19**, 1900167 (1-10), 2019.
2. Torii, Y., Sugimoto, N., Kohda, T., Kozaki, S., Morokuma, K., Horikawa, Y., Ginnaga, A., Yamamoto, A. and Takahashi, M.: Clinical Study of New Tetravalent (Type A, B, E, and F) Botulinum Toxoid Vaccine Derived from M Toxin in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* **70**, 423-429, 2017.
3. 山口優子, 諸熊一則, 目野郁子, 岡田賢司, 宮崎千明, 植田浩司: 北九州地方における看護学生 (1994~2011年入学) を対象とした百日咳, ジフテリア, 破傷風の血清疫学調査. *感染症誌*, **90**, 473-479, 2016.
4. 一二三亨, 高橋元秀, 諸熊一則, 吉岡早戸, 原口義座, 加藤宏, 小井土雄一, 本間正人: *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？ 日集中  
医誌, 17, 287-289, 2010.

5. Isaka, M., Zhao, Y., Nobusawa, E., Nakajima, S., Nakajima, K., Yasuda, Y., Matsui, H., Hasegawa, T., Maeyama, J., Morokuma, K., Ohkuma, K. and Tochikubo, K.: Protective Effect of Nasal Immunization of Influenza Virus Hemagglutinin with Recombinant Cholera Toxin B Subunit as a Mucosal Adjuvant in Mice. *Microbiol. Immunol.* **52**, 55-63, 2008.
6. Okada, K., Ueda, K., Morokuma, K., Kino, Y., Tokugawa, K. and Nishima, S.: Seroepidemiologic Study on Pertussis, Diphtheria, and Tetanus in the Fukuoka Area of Southern Japan: Seroprevalence among Persons 0-80 Years Old and Vaccination Program. *Jpn. J. Infect. Dis.* **57**, 67-71, 2004.
7. Maeyama, J., Isaka, M., Yasuda, Y., Matano, K., Morokuma, K., Ohkuma, K., Tochikubo, K., Yamamoto, S. and Goto, N.: Effects of Recombinant Cholera Toxin B Subunit (rCTB) on Cellular Immune Responses: Enhancement of Delayed-Type Hypersensitivity Following Intranasal Co-Administration of *Mycobacterium bovis*-BCG with rCTB. *Microbiol. Immunol.* **48**, 457-463, 2004.
8. Isaka, M., Komiya, T., Takahashi, M., Yasuda, Y., Taniguchi, T., Zhao, Y., Matano, K., Matsui, H., Maeyama, J., Morokuma, K., Ohkuma, K., Goto, N. and Tochikubo, K.: Recombinant Cholera Toxin B Subunit (rCTB) as a Mucosal Adjuvant Enhances Induction of Diphtheria and Tetanus Antitoxin Antibodies in Mice by Intranasal Administration with Diphtheria-Pertussis-Tetanus (DPT) Combination Vaccine. *Vaccine* **22**, 3061-3068, 2004.
9. Tochikubo, K., Isaka, M., Zhao, Y., Komiya, T.,

- Takahashi, M., Yasuda, Y., Taniguchi, T., Matano, K., Matsui, H., Maeyama, J., Morokuma, K., Ohkuma, K. and Goto, N.: Importance of Cholera Toxin B Subunit in Induction of Protective Immunity upon Intranasal Vaccination. *12<sup>th</sup> International Congress of Immunology and 4<sup>th</sup> Annual Conference of FOCIS*, 18-23, 2004.
10. Isaka, M., Yasuda, Y., Taniguchi, T., Kozuka, S., Matano, K., Maeyama, J., Morokuma, K., Ohkuma, K., Goto, N. and Tochikubo, K.: Mucosal and Systemic Antibody Responses against an Acellular Pertussis Vaccine in Mice after Intranasal Co-Administration with Recombinant Cholera Toxin B Subunit as an Adjuvant. *Vaccine* **21**, 1165-1173, 2003.
11. Yasuda, Y., Isaka, M., Taniguchi, T., Zhao, Y., Matano, K., Matsui, H., Morokuma, K., Maeyama, J., Ohkuma, K., Goto, N. and Tochikubo, K.: Frequent Nasal Administration of Recombinant Cholera Toxin B Subunit (rCTB) –Containing Tetanus and Diphtheria Toxioid Vaccines Induced Antigen-Specific Serum and Mucosal Immune Responses in the Presence of Anti-rCTB Antibodies. *Vaccine* **21**, 2954-2963, 2003.
12. Maeyama, J., Isaka, M., Yasuda, Y., Matano, K., Taniguchi, T., Morokuma, K., Ohkuma, K., Tochikubo, K. and Goto, N.: Effects of Recombinant Cholera Toxin B Subunit on IL-1 $\beta$  Production by Macrophages *In Vitro*. *Microbiol. Immunol.* **46**, 593-599, 2002.
13. Isaka, M., Yasuda, Y., Mizokami, M., Kozuka, S., Taniguchi, T., Matano, K., Maeyama, J., Mizuno, K., Morokuma, K., Ohkuma, K., Goto, N. and Tochikubo, K.: Mucosal Immunization against Hepatitis B Virus by Intranasal Co-Administration of Recombinant Hepatitis B Surface Antigen and Recombinant Cholera Toxin

- B Subunit as an Adjuvant. *Vaccine* **19**, 1460-1466, 2001.
14. Isaka, M., Yasuda, Y., Taniguchi, T., Kozuka, S., Matano, K., Maeyama, J., Morokuma, K., Ohkuma, K., Goto, N. and Tochikubo, K.: Comparison of Systemic and Mucosal Responses of Mice to Aluminium-Adsorbed Diphtheria Toxoid between Intranasal Administration and Subcutaneous Injection. *Nagoya Med. J.* **45**, 5-15, 2001.
15. 目野郁子, 岡田賢司, 山口優子, 諸熊一則, 大隈邦夫, 植田浩司: DTP三種混合ワクチン定期接種を受けた若年成人女性のジフテリア, 百日咳, 破傷風に対する抗体保有状況. *感染症誌*, **74**, 150-154, 2000.
16. Okada, K., Ueda, K., Morokuma, K., Fukushige, J. and Miyazaki, C.: Comparison of Antibody Titers in Eleven-to-Twelve-Year Old Japanese School Children Six Years after Administration of Acellular and Whole Cell Pertussis Vaccines Combined with Diphtheria-Tetanus Toxoids. *Pediatric Infectious Disease Journal* **17**, 1167-1169, 1998.
17. Aoyama, T., Kato, T., Takeuchi, Y., Kato, K., Morokuma, K. and Hirai, T.: Simple, Speedy, Sensitive, and Specific Serodiagnosis of Pertussis by Using a Particle Agglutination Test. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 1859-1861, 1997.
18. 諸熊一則, KPA法による迅速, 簡便なジフテリア, 破傷風抗毒素量の測定. *化血研所報 黎明*, **6**, 63-66, 1997.
19. Oka, T., Honda, T., Morokuma, K., Ginnaga, A., Ohkuma, K. and Sakoh, M.: Enhancing Effects of Pertussis Toxin B Oligomer on the Immunogenicity of Influenza Vaccine Administered Intranasally. *Vaccine* **12**, 1255-1258, 1994.

20. Morokuma, K., Ginnaga, A., Nishihara, T., Tsunoda, S., Furukawa, M., Aihara, K. and Sakoh, M.: Comparison of the Protective Effects of the Pertussis Acellular Vaccine with the Component Vaccine, which Have Different Amounts of Fimbriae, against the Experimental Aerosol Infection of Mice with *Bordetella pertussis*. *Dev. Biol. Stand.* **73**, 223-232, 1991.
21. Ginnaga, A., Morokuma, K., Furukawa, S., Shigaki, T., Katsuki, N., Aihara, K., Oka, T., Sakoh, M., Tamura, C. and Imaizumi, A.: Further Evaluation of the Pertussis Component Vaccine Produced by Apoceruloplasmin Affinity Chromatography. *Dev. Biol. Stand.* **73**, 233-241, 1991.
22. Ginnaga, A. Morokuma, K., Aihara, K., Sakoh, M., Imaizumi, A., Suzuki, Y., Sato, H., Sato, Y., Ueda, K., Sakai-Kuno, H. and Kimura, M.: Characterization and Clinical Study on the Acellular Pertussis Vaccine Produced by a Combination of Column Purified Pertussis Toxin and Filamentous Hemagglutinin. *Tokai. J. Exp. Clin. Med.* **13**, 59-69, 1988.