

氏名(本籍)	諸 熊 一 則 (熊本県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第 442 号
学位授与年月日	令和 4 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 3 項該当
学位論文題名	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
論文審査委員	(主査) 田原口 智 士 (副査) 栗 林 尚 志 平 健 介 黄 鴻 堅

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【研究の背景】

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、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】やまかがしウマ抗毒素の作製

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】 やまかがしウマ抗毒素の安定性評価

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 年を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】 やまかがしウマ抗毒素の臨床評価事例

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 年から 2011 年の間に 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 年を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。

本研究の一部は、以下の学術論文に公表済みである。

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>)

## 論文審査の結果の要旨

### 1. 論文の内容

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、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。

本論文は3章から構成されている。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の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 年から 2011 年の間に、2 例の重篤なやまかがし咬傷患者に対して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、全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ことの必要性が示された。

## 2. 論文審査

### 1) テーマの立て方

日本国内での稀な毒蛇咬症例にやまかがし咬傷があり、重篤な症例もあるが発生が極めて少ないた

め、民間企業による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。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、緊急措置として治療に用いられ有効性が認められたとの報告がある。申請者はこのことに注目して、新たにウマを免疫用動物として用い、治療薬としての国内初のウマ抗毒素の試験製造を実施している。やまかがしウマ抗毒素の作製に当っては、既承認ウマ抗毒素の製造技術を調査し研究した上で、その作製に応用・展開しつつ、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使用を前提として備蓄に供することとしており、明確なテーマが設定され、各種検討項目も整理され示されている。

## 2) 研究の背景

やまかがしは北海道以外の日本全域に生息し、昔は毒蛇ではないとされていた。しかし、近年、咬傷により血液凝固系に機能障害をおこし死に至った例も報告されている。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。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とされている。過去に、日本蛇族学術研究所の研究者らが、家兎および山羊を免疫し、やまかがし抗毒素を実験的に作製し、緊急措置として、咬傷患者の治療に用い、有効性が認められたとの報告がある。このような背景から、申請者は本論文のテーマ選定に至り、先行研究の知見を整理し、目的と関連付けて活用し本研究を進めている。

## 3) 研究の方法

申請者は、先ず、第 1 章において、やまかがしウマ抗毒素を作製するために、やまかがしから採取された毒をウマに免疫して抗血清を得た。その後、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を精製した。やまかがしウマ抗毒素の品質試験として、純度試験（セルロース・アセテート膜電気泳動・免疫電気泳動）、力価試験（抗凝固活性試験）及びその他の一般性状試験を行い、その品質を確認している。第 2 章において、やまかがしウマ抗毒素は 2021 年に作製日から 21 年を経過することから、備蓄期間中の安定性を確認するために、経時的に製剤の品質試験を実施した。一般性状面からの性状確認試験、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を、安全性側面からの異常毒性否定試験および発熱試験を、有効性側面からの力価試験（抗凝固活性）を行っている。続いて、第 3 章では、やまかがしウマ抗毒素が、緊急事態として発生したヒトのやまかがし咬傷の重症例において使用された事例について記載した。当該製剤が使用された全ての症例でその効果が確認され、顕著な副反応もなく治療に成功し、患者の救命に寄与したことが示された。このように、ウマ抗毒素製剤に関する製法や品質試験の手法を応用して検討し、更に、当該製剤が使用された患者の咬傷事例も挙げ、目的とテーマに相応しい研究手法を用いて明確な解析の視点を示している。

#### 4) 研究の結果

第1章では、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。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。

第2章では、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。

第3章では、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。

#### 5) 考察と結論

本研究により、日本で初めて、重篤なやまかがし咬傷の治療薬として、未承認薬である「やまかがしウマ抗毒素」を開発し作製した。やまかがしウマ抗毒素は、作製された2000年以降、10数例の重篤なやまかがし咬傷患者に緊急避難的に使用され、目立った副反応もなく、患者の救命に寄与し、有効性も証明されている。また、ウマ抗毒素製剤として、世界で初めて、作製から20年の安定性が確認された。今後は、生物資源の保護や動物福祉の観点から、生きたやまかがし毒に頼らない、遺伝子工学技術で人工的に作り出した毒を用いたウマ抗毒素の開発研究も必要と考える。また、並行して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ながら、将来的にはウマ製剤から脱却した、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ことの必要性が示された。

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。

#### 6) 参考論文

適切な参考文献が、必要な数だけ引用されている。

### 3. 審査結果

本論文の内容と論文発表会での質疑に対する適切な回答を考慮すると、博士としての専門知識を十分に有することが認められ、また、本研究は、重篤なやまかがし咬傷に対する有用な治療法の提供という点で意義深い業績として高く評価できることから、博士(獣医学)の学位を授与するに相応しいと判定した。