

平成 30 年 1 月 15 日

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 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
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

研究開発課題名 : (日本語) 抗毒素の品質管理及び抗毒素を使用した治療法に関する研究
(英語) Quality control and clinical study of antitoxins

研究開発担当者 (日本語) 一二三 亨

所属 役職 氏名 : (英語) Kagawa University Hospital, Emergency Medical Center, Toru Hifumi

実施期間 : 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 11 月 30 日

分担研究 (日本語) ヤマカガシ抗毒素、セアカゴケグモ抗毒素の力価試験、品質管理試験
開発課題名 : (英語) Potency and quality control test for yamakagashi and red back spider antitoxins.

研究開発分担者 (日本語) 諸熊 一則

所属 役職 氏名 : (英語) The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute (KAKETSUKEN) Kazunori Morokuma

分担研究 (日本語) ヤマカガシ毒の性状解析

開発課題名 : (英語) Characterization of *Rhabdophis tigrinus* (Yamakagashi) venom

研究開発分担者 (日本語) 名城大学 薬学部 教授 二改 俊章

所属 役職 氏名 : (英語) Faculty of Pharmacy, Meijo University, Professor, Toshiaki Nikai

研究開発分担者 (日本語) 名城大学 薬学部 准教授 小森 由美子

所属 役職 氏名 : (英語) Faculty of Pharmacy, Meijo University, Associate professor, Yumiko Komori

II. 成果の概要（総括研究報告）

1. ヤマカガシ抗毒素を用いた臨床研究

ヤマカガシ抗毒素を使用した臨床研究を行うための倫理委員会承認、新たな臨床研究保険の加入を経て臨床研究を開始した。これにより、ヤマカガシ抗毒素の配備施設が日本蛇族学術研究所（群馬県）と化学及び血清療法研究所（熊本県）の2施設から災害医療センター（東京）、東海大学医学部付属病院（神奈川）、東京ベイ市川医療センター（千葉）、山口県立総合医療センター（山口）、高知医療センター（高知県）、香川大学医学部付属病院（香川県）の6医療機関を加えて、日本全体に数時間以内でヤマカガシ抗毒素を供給できる体制を強固なものとした。また緊急性が極めて高いため、新たに研究開発者が24時間365日体制で対応するネットワークを整備した。平成28年度のヤマカガシ咬傷は9例が確認されているが、ヤマカガシ抗毒素投与が必要な重症例はなかった。平成28年度にヤマカガシ抗毒素の品質評価試験、力価測定を行い、その品質に問題がないことを確認しているが、ヤマカガシ抗毒素は2000年に製造されたものであることから継続的に今後の対応について検討していくこととなった。その一端として、ヤマカガシ毒の毒性分析を行い、中国産ヤマカガシ毒との比較検討を行った。

2. セアカゴケグモ抗毒素を用いた臨床研究

まずオーストラリアから輸入しているセアカゴケグモ抗毒素が2016年6月末で使用期限切れとなるため、新たに使用期限が2017年12月までのセアカゴケグモ抗毒素をオーストラリア CSL社から10バイアル購入した。さらに臨床研究を行うための倫理委員会申請を修正した上で承認、新たに平成32年3月31日までの臨床研究保険の加入し、臨床研究を開始する体制を整備した。災害医療センター（東京）、東海大学医学部付属病院（神奈川）、東京ベイ市川医療センター（千葉）、大阪府立急性期総合医療センター（大阪）、山口県立総合医療センター（山口）、北九州市立八幡病院（北九州）、福岡市民病院（福岡）、香川大学医学部付属病院（香川県）に新たなセアカゴケグモ抗毒素を配備し、24時間365日体制でのネットワークを強固なものとした。それに並行してセアカゴケグモ抗毒素の安定的な供給を行うために、国産化で製造したセアカゴケグモ抗毒素の臨床使用に向けてGLP適合非臨床試験を立案し、その一部を行った。

3. セアカゴケグモ抗毒素が著効した一例

2016年8月に福岡で発生した34歳、男性のセアカゴケグモ咬傷では、ステロイド、麻薬を含む鎮痛剤で効果がなかったが、本臨床研究のもとセアカゴケグモ抗毒素投与によって症状が著明に改善した。抗毒素投与に伴う副作用を認めなかった。本症例が、本研究班発足後の初めての抗毒素投与症例であった。

4. セアカゴケグモの捕獲と毒液の粗精製

約 5,000 頭のセアカゴケグモを捕獲した。その後、国立感染症研究所において、アップデートされた毒素精製プロトコールに従い、粗精製を行った。そのうちの 100 頭分の粗毒は、新日本科学安全性研究所（鹿児島市）において性状解析に使用された。1 ロット化された残り 4,900 頭相当分の総毒素量は 161.9 mg、タンパク濃度は 1.652 mg/ml と算出された（国立感染症研究所・免疫部より）。前回 2015 年に試作した粗毒の濃度は 1.392 mg/ml であったが、本年度の粗毒はそれよりも高い回収量であった。

5. 国産化セアカゴケグモ抗毒素の GLP 準拠非臨床試験

AMED より年度末に追加交付金を受けて、GLP 適合の非臨床試験を計画し実施した。今年度には、1) 力価試験法検討試験、2) 特性バリデーション試験、3) 特性及び安定性試験 4) 投与液安定性試験、及び 5) 局所刺激性試験の 5 つの試験を計画し、1) 力価試験法検討試験、2) 特性バリデーション試験の 2 つの試験について年度内（平成 29 年 3 月迄）に終了した。

6. ヤマカガシ抗毒素、セアカゴケグモ抗毒素の力価試験、品質管理試験

2000 年に厚生労働研究班によって作成されたヤマカガシ抗毒素は製造から 16 年を経過し、製造後の品質の担保のために以前の研究班で 3 年に 1 度の抗毒素の力価測定を実施する計画を立案した。この計画に従って本抗毒素が実用に耐えるものかを確認するために、今年度はヤマカガシ抗毒素について品質管理試験として力価試験を実施した。具体的にはウサギの背部皮膚に、階段希釈したヤマカガシ抗毒素と一定量のヤマカガシ毒素を混合し室温で 1 時間反応させたのちに、皮内投与しその 24 時間後に現れる出血斑を測定することで、ヤマカガシ抗毒素によるヤマカガシ毒素の出血活性の中和能を測定した。ヤマカガシ抗毒素の濃度に依存して、混合したヤマカガシ毒素の出血活性が中和される。過去に実施した同様の中和活性測定結果と今回の結果を比較することで、抗毒素の力価の減衰度を確認した。この結果、ヤマカガシ抗毒素の抗出血活性は特に減衰している結果とはならなかった。本試験の結果からは、ヤマカガシ抗毒素のヤマカガシ毒素の中和活性は保たれており、今後も使用可能であることが推察された。来年度に、ヤマカガシ抗毒素の血液凝固活性中和試験を実施して、この抗毒素によるヤマカガシ毒素の中和能を確認する予定である。

製造後 1 年目のセアカゴケグモ抗毒素については、力価試験を行い、定められた力価を維持しており、有効性を保持していることが確認された。

7. その他

ヤマカガシ咬傷、セアカゴケグモ咬傷を実際に診療する機会が多い救急医向けに診療指針を作成した。平成 29 年度中には公表予定である。

1. Clinical study evaluating the effectiveness and safety of Yamakagashi antitoxin

This research program was approved by the institutional review board of Kagawa University Hospital, and we have renewed our clinical research insurance. Yamakagashi antitoxin is stored at two institutions [the Japan Snake Center (Gunma) and the Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute (Kumamoto)] and six hospitals [the National Hospital Organization Disaster Medical Center (Tokyo), Tokai University Hospital (Kanagawa), Tokyo Bay Urayasu Ichikawa Medical Center (Chiba), Yamaguchi Prefectural Grand Medical Center (Yamaguchi), Kochi Health Science Center (Kochi), and Kagawa University Hospital (Kagawa)]. Our clinical research team is available 24 h a day, 7 days a week, and 365 days a year, to ensure that antitoxin is available for the injured patients. Nine cases of Yamakagashi bites were observed, but no severe cases were encountered between April 2016 to March 2017. We evaluated and confirmed the quality and safety of the Yamakagashi antitoxin; however, because the antitoxin was produced in 2000, we will continue the discussion regarding the production of new antitoxins. Accordingly, the snake venom found in China and that found in Japan were compared in a laboratory study.

2. Clinical study evaluating the effectiveness and safety of red-back spider antitoxin

Our research group obtained 10 vials of the new red-back spider (RBS) antitoxin, which expires in December 2017, for emergency use from the Commonwealth Serum Laboratories in Australia. This research program was approved by the institutional review board of Kagawa University Hospital, and we renewed our clinical research insurance. RBS antitoxin is stored at the National Hospital Organization Disaster Medical Center (Tokyo), Tokai University Hospital (Kanagawa), Tokyo Bay Urayasu Ichikawa Medical Center (Chiba), Osaka General Medical Center (Osaka), Yamaguchi Prefectural Grand Medical Center (Yamaguchi), Kitakyushu Municipal Yahata Hospital (Kitakyushu), Fukuoka City Hospital (Fukuoka), and Kagawa University Hospital (Kagawa). Thus, our clinical research group is available 24 h a day, 7 days a week, and 365 days a year, to ensure that antitoxin is available to patients. Our research group started the non-clinical study regulated by good laboratory practice to organize and maintain the clinical use of domestically manufactured RBS antitoxin.

3. Good recovery in a case of red-back spider bite treated with its antitoxin

A 34-year-old man with no significant past medical history was bitten on his right thigh by a red-back spider (RBS). Severe pain developed immediately, and he consulted a doctor at a

local clinic. A steroid and a fentanyl were administered, but the pain did not improve. The patient's severe pain improved immediately after the administration of the RBS antitoxin. This was the first case treated successfully with RBS antitoxin.

4. Collection and production of crude toxin of redback spider

Five thousand of redback spider were collected, and crude production was carried out based on the protocol in the National Institute of Infectious Diseases, NIID. Crude toxins extracted from 100 redback spider were examined in the Shin Nippon Biomedical Laboratories (Kagoshima city). A total amount of toxin extracted from 4900 redback spider was 161.9 mg, and its protein concentration was calculated as 1.652 mg/ml, which was higher than that produced in 2015.

5. Domestically produced GLP-compliant non-clinical trial of red-back spider antivenom

We received additional grants from AMED at the end of the fiscal year and planned and implemented a non-clinical study conforming to GLP. In this fiscal year, we planned five tests: (1) potency test method examination test, (2) characteristic validation test, (3) characteristic and stability test (4) administration solution stability test, and (5) local irritation test, two tests such as 1) Titer test method examination test, 2) Characteristic validation test, were completed within the fiscal year (until March 2018).

6. Potency test and quality control test of both Yamakagashi antivenom and Red-back spider antivenom.

In this fiscal year, the Yamakagashi antivenom prepared by the Health Labor Research Group in 2000 was passed 16 years from the manufacture, and the antitoxin titer once every three years in the previous research group to ensure the quality after production A plan was planned to carry out the measurement. In accordance with this plan, in order to confirm whether this antitoxin can withstand practical use, this year we conducted a potency test as a quality control test for Yamakagashi antivenom. Specifically, by admixing the Yamakagashi antivenom that had been subjected to stepwise dilution with a certain amount of Yamakagashi toxin on the back skin of a rabbit, allowing it to react at room temperature for 1 hour, then measuring the bleeding cluster appearing 24 hours after that, And the neutralizing ability of bleeding activity of Yamakagashi toxin by Yamakagashi antitoxin was measured. Depending on the concentration of Yamakagashi antitoxin, the hemorrhagic activity of the mixed Yamagashita toxin is neutralized. By comparing the results of similar

neutralization activity performed in the past with the results of this time, attenuation of antitoxin potency was confirmed. As a result, anti-hemorrhagic activity of Yamakagashi antitoxin did not result in a particularly damped effect. From the results of this study, the neutralizing activity of Yamakagashi antitoxin of Yamakagashi antitoxin was preserved and it was inferred that it could be used in the future. In the next fiscal year, we will conduct blood coagulation activity neutralization test of Yamakagashi antitoxin to confirm the neutralizing ability of Yamagishita toxin by this antitoxin. Potency test of antivenom for redback spider bites was completed, and its efficacy was confirmed.

7. Miscellaneous

Clinical decisions regarding Yamakagashi and red-back spider bites have been written in a textbook for emergency physicians. It will be published in the winter of 2018.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 2件、国際誌 2件）

1. Hifumi T, Yamamoto A, Ato M, Sawabe K, Morokuma K, Morine N, Kondo Y, Noda E, Sakai A, Takahashi J, Umezawa K. Clinical serum therapy: Benefits, cautions, and potential applications. The Keio Journal of Medicine. 2017. <http://doi.org/10.2302/kjm.2016-0017-IR>.
2. Hifumi T, Okazaki T, Manabe A, Hamaya H, Egawa S, Fujimi S, Yamamoto A, Koido Y, Abe Y, Kawakita K, Umezawa K, Kuroda Y. A national survey examining recognition, demand for antivenom, and overall level of preparedness for redback spider bites in Japan. Acute Med Surg. 2016 Apr 18;3(4):310-314.
3. 一二三亭, 節足動物刺症. 今日の治療指針. 2017. 152-153.
4. Yamagishi T, Arai S, Hifumi T, Sawabe K, Yamamoto A, Shibayama K, Ato A, Taki H, Goka K, Oishi K. Expanding distribution of red back spiders and bites in Japan from 2011 to 2013. Medical Entomology and Zoology. 2016. 67(4), 219-221.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. セアカゴケグモ咬傷に対する抗毒素療法の現状と課題, 口頭, 一二三亭, 山本明彦, 河北賢哉, 黒田泰弘, 第38回日本中毒学会総会, 2016/07/23, 国内.
2. セアカゴケグモ毒素の採取と粗精製、毒素の性状について, 口頭, 沢辺京子, 益子玲於奈, 前川芳秀, 糸川健太郎, 佐藤智美, 伊澤晴彦, 松村隆之, 阿戸学, 山本明彦, 一二三亭, 第38回日本中毒学会総会, 2016/07/23, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 蛇毒咬傷について、一二三亭、第 44 回日本集中治療医学会総会 教育講演, 2017/03/09, 国内

(4) 特許出願

該当なし

(様式10)

【16fk0108116j0101】
平成 29 年 5 月 31 日

平成 28 年度医療研究開発推進事業費補助金
(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)
成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 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
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

補助事業課題名： (日本語) 抗毒素の品質管理及び抗毒素を使用した治療法に関する研究
(英語) Quality control and clinical study of antitoxins

補助事業担当者 (日本語) 国立感染症研究所・昆虫医科学部・部長・沢辺京子
所属 役職 氏名： (英語) National Institute of Infectious Diseases, Department of Medical Entomology,
Director, Kyoko Sawabe

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究課題名： (日本語) セアカゴケグモの分布と咬傷の実態把握、セアカゴケグモの捕獲と
毒液の粗精製

II. 成果の概要（総括研究報告）

補助事業代表者： 国立大学法人香川大学医学部附属病院・究明救急センター助教・一二三亭
総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

（1） 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 0 件）

1. Hifumi T, Yamamoto A, Ato M, Sawabe K, Morokuma K, Morine N, Kondo Y, Noda E, Sakai A, Takahashi J, Umezawaq K. Clinical serum therapy: Benefits, cautions, and potential applications. The Keio Journal of Medicine. 2017. <http://doi.org/10.2302/kjm.2016-0017-IR>.

2. Yamagishi T, Arai S, Hifumi T, Sawabe K, Yamamoto A, Shibayama K, Ato A, Taki H, Goka K, Oishi K. Expanding distribution of red back spiders and bites in Japan from 2011 to 2013. Medical Entomology and Zoology. 2016. 67(4), 219-221.

（2） 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. セアカゴケグモ毒素の採取と粗精製、毒素の性状について、口頭、沢辺京子、益子玲於奈、前川芳秀、糸川健太郎、佐藤智美、伊澤晴彦、松村隆之、阿戸学、山本明彦、一二三亭、第 38 回日本中毒学会総会、2016/07/23、国内。

（3）「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 衛生害虫に関する最近の話題、沢辺京子、第 52 回ねずみ衛生害虫駆除技術研修会、2016/12/07、国内。

（4）特許出願

該当なし

(様式10)

【16fk0108116j0201】
平成 29 年 5 月 31 日

平成 28 年度医療研究開発推進事業費補助金
(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)
成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 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
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

補助事業課題名 : (日本語) 抗毒素の品質管理及び抗毒素を使用した治療法に関する研究
(英語) Quality control and clinical study of antitoxins

補助事業担当者 (日本語) 免疫部・部・阿戸 学
所属役職氏名 : (英語) Department of Immunology・Director・Manabu Ato

実施期間 : 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要（総括研究報告）

補助事業代表者：香川大学医学部附属病院・救命救急センター・一三三 亨 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 3 件）

1. Hifumi T, Yamamoto A, Ato M, Sawabe K, Morokuma K, Morine N, Kondo Y, Noda E, Sakai A, Takahashi J, Umezawa K. Clinical Serum Therapy-benefits, cautions, and potential applications. Keio J Med. In press.
2. Oh H, Shin J, Ato M, Ma X, Williams D, Han K, Kim JY, Kang H, Jung K, Hanada K, Ochiai M, Van Hung PV, Parka S, Ahna C. The First Meeting of the National Control Laboratories for Vaccines and Biologicals in the Western Pacific in 2016. Osong Public Health Res Perspect 2017;8(1):91-103. doi.org/10.24171/j.phrp.2017.8.1.13
3. Yamagishi T, Arai S, Hifumi T, Sawabe K, Yamamoto A, Shibayama K, Ato M, Ginnaga A, Taki H Goka K, Oishi K. Expanding distributions of red back spiders and bites in Japan from 2011 to 2013. Med Entomol Zool. 2016 ;67(4), 219-221.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
なし

(4) 特許出願
なし

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金

(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) 成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 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
(英語) Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

補助事業課題名： (日本語) 抗毒素の品質管理及び抗毒素を使用した治療法に関する研究
(英語) Quality control and clinical study of antitoxins

補助事業担当者 (日本語) 国立感染症研究所・バイオセーフティ管理室・主任研究官・山本明彦
所属 役職 氏名： (英語) Akihiko Yamamoto, Senior researcher, Division of Biosafety Control
and Research, National Institute of Infectious Diseases

実施期間： 平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 11月 30日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

補助事業代表者：香川大学医学部附属病院・救命救急センター・一二三 亨 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 2 件)

1. HIFUMI T, OKAZAKI T, MANABE A, HAMAYA H, EGAWA S, FUJIMI S, YAMAMOTO A, KOIDO Y, ABE Y, KAWAKITA K, UMEZAWA K, KURODA Y: A national survey examining recognition, demand for antivenom, and overall level of preparedness for redback spider bites in Japan. Japanese Association for Acute Medicine. 2016, 3(4), 310-314.

2. YAMAGIAHI T, ARAI S, HIFUMI T, SAWABE K, YAMAMOTO A, SHIBAYAMA K, ATO M, TAKI H, GOKA K and OISHI K: Expanding distributions of red back spiders and bites in Japan from 2011 to 2013、Medical Entomology and Zoology, 2016, 67(4), 219-221.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. セアカゴケグモ抗毒素の製造と非臨床試験, 口頭, 山本明彦, 沢辺京子, 阿戸 学, 二改俊章, 一二三 亨, 第 38 回日本中毒学会総会, 2016/07/23, 国内.
2. ヤマカガシ (*Rhabdophis tigrinus*) 毒中の血液凝固因子の精製と性質, ポスター, 永田 彩加, 二改 俊章, 堺 淳, 山本 明彦, 一二三 亨, 小森 由美子, 日本薬学会 137 年会, 2017/03/25, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願