

[総説]

## 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

諸熊一則 友清和彦 高橋元秀\*

Recent advances in snake venom analyses and the treatment of snake bites in Japan

Kazunori MOROKUMA, Kazuhiko TOMOKIYO, Motohide TAKAHASHI

### 要旨

国内外に生息する毒蛇による咬傷患者は重篤な報告例が多く、毒蛇咬傷は感染症対策と同様に公衆衛生上の重要な課題である。蛇毒の成分には多種類の酵素、インヒビター等のタンパク質・ペプチド成分が含まれており、異なる作用物質の混在は、咬傷後は複雑な病態として現れることになる。このことが適切で有効な治療法の開発の妨げとなっており、毒蛇咬傷に対する新規治療用医薬品の開発が急がれる所以である。近年、急速に発展しているタンパク質工学的、分子生物学的分析手法は、蛇毒成分の構造分析、作用解析において多くの成果をもたらしている。本項では、蛇毒成分解析の現状を先行論文のプロテオーム解析結果や毒素成分の構造を整理し、特に血液凝固系に関連した毒成分については解析を追加した。また、ハブ、マムシ及びヤマカガシの国内咬傷被害の実情と咬傷患者への一般的な治療法であるウマ抗毒素製剤の導入や歴史的背景を含めて概説する。さらに抗毒素製剤の品質管理と今後の課題に関して概説する。

キーワード：蛇毒，ウマ抗毒素製剤，構造解析，咬傷

### はじめに

世界で毎年450~540万人がヘビ咬傷の被害に遭い、この内180~270万人が臨床症状を呈し、8.1万人~13.8万人が死に至っているとWHOは報告している<sup>1)</sup>。特にインド、東南アジアや南アメリカおよび中近東では、生息する有毒蛇の種類は多く、咬傷被害の重篤度が高く死亡者数も多い。予後も悪く、咬傷局所の障害や後遺症による社会復帰が困難な場合もあり社会問題化している。未整備な治療体制が理由であるが、咬傷患者に適切で有効な抗毒素療法が行われていない事実も重視すべきであろう。検査試薬・医薬品開発研究における蛇毒の有用性は周知の事実であり、その特性解析の重要性は高い。一方で、各蛇固有の多種類の毒成分の網羅的解析は適切な治療法

の選択、有効性の高い抗毒素製剤の開発の上でも重要である。国内ではマムシ (*Gloydius blomhoffii*) とハブ (*Protobothrops flavoviridis*) 咬傷の治療用にウマに毒素を免疫し、その血清中の抗体画分から抗毒素製剤が供給されている。一方で国内に生息するヤマカガシ (*Rhabdophis tigrinus*) は致命的な毒素を有しているが、咬傷患者の救命目的で緊急用のウマ抗毒素が研究班で試作製造されている段階にある。

本稿では、蛇とその毒素、および動物種の表記は、一般的にカタカナで「ハブ」「ハブ毒」「ウマ」と記される。治療用抗毒素製剤は第十八改正日本薬局の記載で「乾燥はぶウマ抗毒素」となっているが、本稿では「はぶ」を「ハブ」に統一してあらわした。

所属

生物毒素・抗毒素共同研究講座

責任著者：takahashi@kumamoto-hsu.ac.jp

## 1. 蛇毒成分解析の現状

検査試薬・医薬品開発研究における蛇毒の有用性は周知の事実であり、その特性解析の重要性は高い。一方で、各蛇固有の多種類の毒成分の網羅的解析は適切な治療法の選択、有効性の高い抗毒素製剤の開発の上でも重要である。以下、蛇毒成分解析の現状を概説する。

### 1.1 蛇毒成分のプロテオーム解析の現状

毒蛇類は上顎骨に左右1対の毒牙があり、それぞれが毒腺に連絡している。毒液の通路が溝状で溝牙を形成するものと、溝縁が閉じて管状になり管牙になっているものがある。www.reptile-database.orgによれば、毒蛇は大きく3つの族に分類される。1) *Atractaspidinae* (モールバイパー亜科, 24種, 主にアフリカ, 中東に生息), 2) *Elapidae* (コブラ科, 391種, 北半球, 南半球問わず, 熱帯地方に生息) と 3) *Viperidae* (クサリヘビ科, 370種, 熱帯から亜熱帯に生息するも温帯や亜寒帯に生息する種もいる)。 *Viperidae* の主要な亜族は, *Viperinae* (クサリヘビ亜科, 101種) と *Crotalinae* (マムシ亜科, 263種) 2種である。

蛇毒は異なるタンパク質の混合物であるが、多くの毒素は毒素アイソフォームを構成している。毒成分の研究は、毒腺中の mRNA の配列分析を主体とするトランスクリプトミクス解析と、蛇毒成分のタンパク質のそのものを液体クロマトグラフィーと質量分析を駆使して解析するプロテオミクス手法により、過去10年で大きな進歩を遂げている。近年の蛇毒プロテオーム解析の現状は Tasoulis T 等の総説<sup>2)</sup>にまとめられており、以下に引用し解説する。

各種データベースより、*Elapidae* の42種、*Viperinae* の20種、*Crotalinae* の65種の蛇毒成分の解析が確認できている。全体で59種類の毒成分が同定されたが、主要成分は、フォスホリパーゼ A2 (PLA2; phospholipase A2), 蛇毒金属プロテアーゼ (SVMP; snake venom metallo-proteinase), 蛇毒セリン型プロテアーゼ (SVSP; snake venom serine protease) と 3FTx (three finger toxins) の4種である。PLA2 は生体膜主要成分のグリセロリン脂質の sn-2 位のエステル結合を加水分解する酵素の総称である。3FTx は神経毒の主成分として知られ、アセチルコリン受容体やさまざまなチャネルタンパク質に特異的に作用する60アミノ酸残基のペプチドであり、3本指を下向きにたてたような構

造が特徴である。SVMP, SVSP は筆者等の研究分野に近い血液凝固系に関連した毒成分であり、1,3項において例を挙げて詳述する。

解析の結果を概括すると、*Elapidae* (42種) では3FTx の構成比率55.9%と際立ち、続いて PLA2 が29.5%であった。毒成分の90%以上が10種のタンパク質で構成されており、毒成分の多様性は後述の2種に比べて低い (図1 A-a)。 *Viperinae* (20種), *Crotalinae* (65種) の毒成分は PLA2, SVSP, SVMP の3成分が60%以上占めているのが特徴である (図1 A-b, c)。また、解析が終了している日本国内と近隣国に生息しているクサリヘビ科の3種の蛇毒の毒成分に関して言及したい。マムシ属 *Gloydius brevicauda* (短尾マムシ; 中国・韓国に生息) では毒成分の64.4%が SVMP であり、25%が PLA2 であった<sup>3)</sup> (図1 B-a)。ヤマハブ属 *Ovophis okinavensis* (ヒメハブ; 体長30-80cm, 奄美群島, 沖縄諸島に生息, 見た目はマムシに近い) は、驚くことに93.1%が SVSP であり (図1 B-b), ハブ属 *Protobothrops flavoviridis* (ホンハブ; 体長1-1.2m, 奄美群島, 沖縄諸島に生息) は、PLA2 が55.5%を占め、SVMP 17.3%, SVSP 11.8%であった<sup>4)</sup> (図1 B-c)。同じクサリヘビ科の3種が全く異なった成分割合を示すことは非常に興味深い。特に生息域が同じであるヒメハブとホンハブの主要毒成分の相違は異なった生活環の中で餌となる対象動物の違いがもたらしたものと推察される。

### 1.2 蛇毒成分の構造解析の現状

蛇毒の構造解析は、毒性発現のメカニズム、標的タンパク質との分子間相互作用の解明を目指して、現在も活発に行われている。歴史的には、1970年代に57種の神経毒や細胞毒の一次・二次構造解析が行われ、三次元 (3D) 構造解析は、1978年に神経毒の X 線回折が報告され<sup>5)</sup>、1981年に Protein Data Bank (PDB) に PDB ID: 1NXB (curarimimetic neurotoxin) として登録された。その後、X 線結晶構造解析、NMR の手法により解析数は大幅に増加した。

Ojieda PG 等によれば、2018年までに、2244種の蛇毒タンパク質 (含むペプチド) のうち X 線結晶構造解析により410種、NMR 解析により100種の蛇毒タンパク質の 3D 構造が解かれており、これらの解析データに基づき37種のモデル分析がなされている (表1)<sup>6)</sup>。

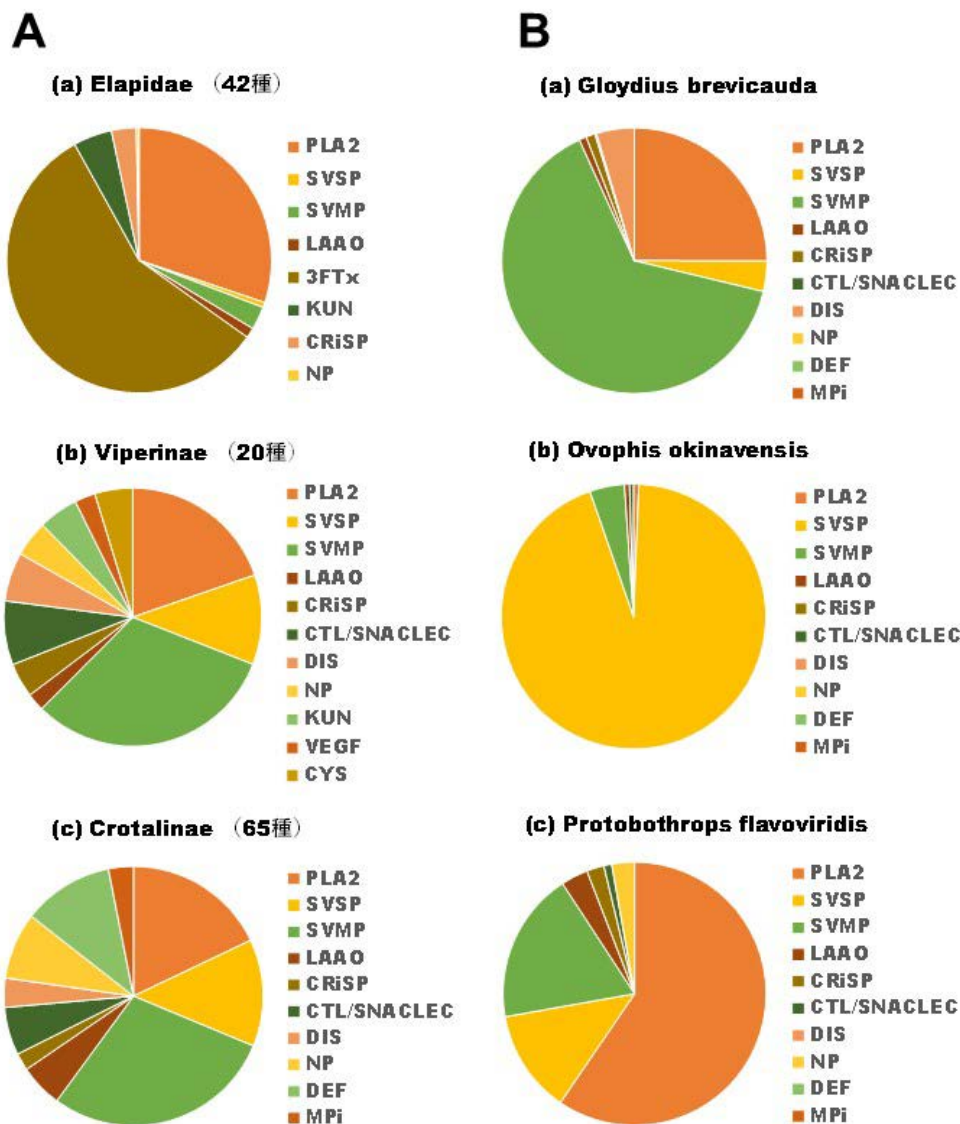


図1 毒蛇毒成分の相対的な割合

図1 Aa~cは *Elapidae* (コブラ科), *Viperinae* (クサリヘビ科), *Crotalinae* (マムシ亜科) の毒液に含まれる毒性成分の割合を示している。図1 B a~cは国内に生息する3種の毒蛇, *Gloydius brevicauda* (中国, 韓国マムシ), *Ovophis okinavensis* (ヒメハブ), *Protobothrops flavoviridis* (ホンハブ) の毒成分の解析結果を示す。各成分の略称を以下に記す。PLA2, ホスホリパーゼ A 2; SVSP, 蛇毒セリンプロテアーゼ; SVMP, 蛇毒金属プロテアーゼ; LAAO, L-アミノ酸オキシダーゼ; 3FTx, three-finger toxin; KUN, kunitz タイプペプチド; CRiSP, システインリッチ分泌タンパク質; CTL/SNACLEC, Cタイプ・レクチン/Cタイプ・レクチン様タンパク質; DIS, デイスインテグリン; NP, ナトリウム利尿ペプチド; DEF, デイフェンシン; CYS, シスタチン; VEGF, 血管内皮成長因子; MPI, 金属プロテアーゼインヒビター。〔文献1より引用し改変〕

### 1.3 主要蛇毒成分の分子構造特性

クサリヘビ科毒蛇の蛇毒の主成分は PLA2, SVMP, SVSP であり, その生理作用は, 出血性腫脹, 赤血球の溶血, 血栓形成, 血管収縮, 壊死, 血圧降下と

解される。中でも血液凝固系に関連した作用は標的因子が明確であり, 作用機作の研究も詳細に行われている。本項では, 代表的な SVMP として, インド, 東南アジアに広く生息するクサリヘビ科 *Daboia*

表1 蛇毒成分の3D構造解析の状況〔文献6より引用し改変〕

Snake Venom Protein Family	Entries	3D Structure		
		X-ray	NMR	Model
5'-nucleotidase	3			
AB hydrolase superfamily, lipase family	2			
AVIT (prokineticin)	1		1	
Bradykinin-potentiating peptide	65	2		
Cathelicidin	10		1	
Complement C3 homolog	5	5		
CRISP	66	9		
Crotamine-myotoxin	17	1	2	
Cystatin	17			
Desintegrin	33	5	5	
Endothelin/sarafotoxin	6		3	
Flavin monoamine oxidase (L-amino acid oxidase)	51	9		
Glycosyl hydrolase 56 (hyaluronidase)	9			
Multicopper oxidase	3	1		
Natriuretic peptide	55	2	1	
NGF-beta	38	1		
Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase	2			
Ohanin/vespryn	4			
PDGF/VEGF growth factor	20	2		
Peptidase S1 (serine protease)	202	11		4
Phospholipase A2	469	187		2
Phospholipase B-like	2			
pHpG (metalloprotease inhibitor)	8			
Snaclec(C-type lectin-like protein)	172	60		2
Snake three-finger toxin	505	65	65	18
TCTP (translationally controlled tumor protein)	3			
True venom lectin (C-type lectin)	44	2		8
Type-B carboxylesterase/lipase	2	1		
Venom, Kunitz-type	143	8	6	
Venom metalloproteinase (M12B)	255	39	16	3
Not in a family	12			
Total	2224	410	100	37

*russelli* から単離された RVV-X (russell's viper venom factor X activator), SVSP として北米に生息するマムシ亜科 *Agkistrodon contortrix contortrix* より単離されたトロンボモジュリン (TM) 非依存性プロテイン C (PC) 活性化酵素 ACC-C (protein C activator from *A. contortrix contortrix* venom) を取り上げ、その立体構造と毒性発現 (凝固亢進と凝固抑制) の機作を著者等の洞察を交えて解説する。

### 1) RVV-X

血液凝固反応は血小板血栓形成反応と共に進行し、生体防御反応の一端を担っている。トロンビン産生と引き続くフィブリンクロット形成が反応の主体であり、止血栓が形成され出血は停止するが、一部の蛇毒プロテアーゼはそのシステムを破壊し生体を死

に至らしめる。血液凝固第 X 因子 (FX) は、接触因子を起点とする内因系凝固系と組織因子 (TF) を起点とする外因系凝固系の結節点を血液凝固第 IX 因子 (FIX) と共に形成しているが、クサリヘビ科の持つ RVV-X は FIX と FX を特異的に認識し、血液凝固を強制的に促進させる。血液凝固系システムは主にセリン型酵素によるカスケード反応であるが、RVV-X 自身は金属プロテアーゼである。

ヒトにおいて血液凝固系に関連する金属プロテアーゼは血小板表面に存在する GPIb を shedding (細胞外領域の加水分解遊離) する ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) 17 や、von Willebrand factor を分解する ADAMTS (ADAM with thrombospondin motifs) 13 等が知られているが、プロテアーゼ反応を主体とする凝固カスケード

に直接的に関与しているわけではない。ADAMファミリーは膜タンパク質であり、細胞外領域、細胞膜貫通領域と細胞内領域の3つのパーツで構成されているが、細胞外領域はSVMPと類似性を有している。ADAMの細胞外領域は、N末から、金属プロテアーゼ(M)領域、ディスインテグリン(disintegrin:D)領域、システインリッチ(cysteine rich:C)領域、EGF(epidermal growth factor)領域(ADAM10, 17は保有しない)からなる。C領域には基質認識を決定するHVR(hyper variable region)が存在する。

一方、蛇毒由来のSVMPは以下のように分類されている。

- ・P-I : M領域のみからなるSVMP
- ・P-II : M領域とD領域で構成
- ・P-III : MD領域とそれに続くC領域で構成
- ・P-III dimer : MDC領域からなるP-IIIのダイマー
- ・P-IV : MDC領域とCLP(C type lectin like proteins)様構造を持つ2本の軽鎖からなる三量体

凝固反応を外因的要因にて活性化する場合、金属プロテアーゼによる凝固系の亢進(生体防御系の破壊)は血漿中の非特異的プロテアーゼインヒビターである $\alpha 2$ マクログロブリン( $\alpha 2$ M)のトラップ網を潜り抜ければ、 $\alpha 1$ プロテアーゼインヒビター( $\alpha 1$ PI)等のセリプロテアーゼインヒビター(セルピン)による阻害からエスケープできる点で合目的ともいえる。

RVV-XはSVMP分類P-IVに属するが、その単離精製、一次構造解析は武谷、森田、岩永等<sup>7)</sup>の業績によるものである。その後、3D構造は2009年に武田等によって解かれている(PDB ID: 2E3X)<sup>8)</sup>。以下、武田等の報告を元に解説したい。図2AにRVV-Xの立体構造を表示したが、前述のように、構造はMDC領域の重鎖と、A領域(LA)、B領域(LB)からなる軽鎖から構成されている(構造詳細は図2レジェンド参照)。金属プロテアーゼ触媒部位には $Zn^{2+}$ が配位し、D領域に5つ、軽鎖領域に1つの $Ca^{2+}$ が配位している(図2A右図)。金属プロテアーゼの触媒部位は、M領域内の触媒部位コンセンサス配列(<sup>145</sup>HEXXHXXGXXHD)中の3つのヒスチジン残基側鎖が $Zn^{2+}$ のリガンドとなり、活性触媒基のグルタミン酸残基側鎖(<sup>146</sup>E)を活性化している(図2A左図)。図からは基質認識部位であるHVRは触媒部位に近接した位置にあること

がわかる。武田等はHVRがFX、FIXの活性化ペプチド(activation peptide; AP)領域を認識しているものと推定している<sup>8)</sup>。RVV-Xの軽鎖A領域(LA)とB領域(LB)の機能は先に報告された*Deinagkistrodon acutus*(百歩蛇)由来のFX-bp(FX-binding protein)との相同性から説明されている<sup>8)</sup>。FX-bpはA領域とB領域の2つの領域から構成されており、FXのGla( $\alpha$ -carboxyglutamic acid)領域(FX-Gla)と強い親和性を示す。図2Bでは、水野等によって解かれたFX-Gla/FX-bp複合体(PDB ID: 1IOD)<sup>9)</sup>と、RVV-XのLA、LB領域の3D構造を重ね書き表示している。構造類似性は機能類似性を示唆するものであるが、A領域、B領域の対応領域アミノ酸は配列の相同性は14.0%、45.9%であり、B領域の相同性が高い(筆者等の解析による)。

RVV-Xの基質(FX)認識は、RVV-X軽鎖へのFX-Gla領域の結合、HVRへのFX-AP領域の結合、最後に加水分解領域の活性基への誘導の3段階で進むものと推定される。

## 2) ACC-C

ACC-Cは凝固制御因子であるプロテインCをTM非依存的に特異的に活性化する特徴を有しており、1987年、1988年に単離精製され<sup>10) 11)</sup>、2005年にMurakami MT等により3D構造が解かれている(PDB ID: 1AIQ)<sup>12)</sup>。RVV-Xの項で説明したように、血液凝固系は内因系凝固と外因系凝固と2つの経路でトロンビン産生へと向かい、フィブリノーゲンからフィブリノペプチドAを遊離させ、フィブリンクロット形成へと進む。トロンビンは各種凝固因子の活性化酵素でもあり、血液凝固第XI因子(FXI)へのfeedback activationは内因系凝固の増幅において極めて重要である。一方で、トロンビンは血管内皮細胞上のTMに結合しPCを活性化し、活性化された活性化型PC(APC)はプロテインS(PS)と共役し、第VIII因子(FVIII)、第V因子(FV)を加水分解し不活化する。つまり、PCは血栓形成のブレーキ役を務めていることになる。ACC-Cはトロンビン様構造をとっているが、TM非依存的にPCを活性化するため、出血毒に位置づけられよう。

トロンビンは多様な生理活性を有する酵素であり、その生理活性は基質認識の多様性から生まれるが、

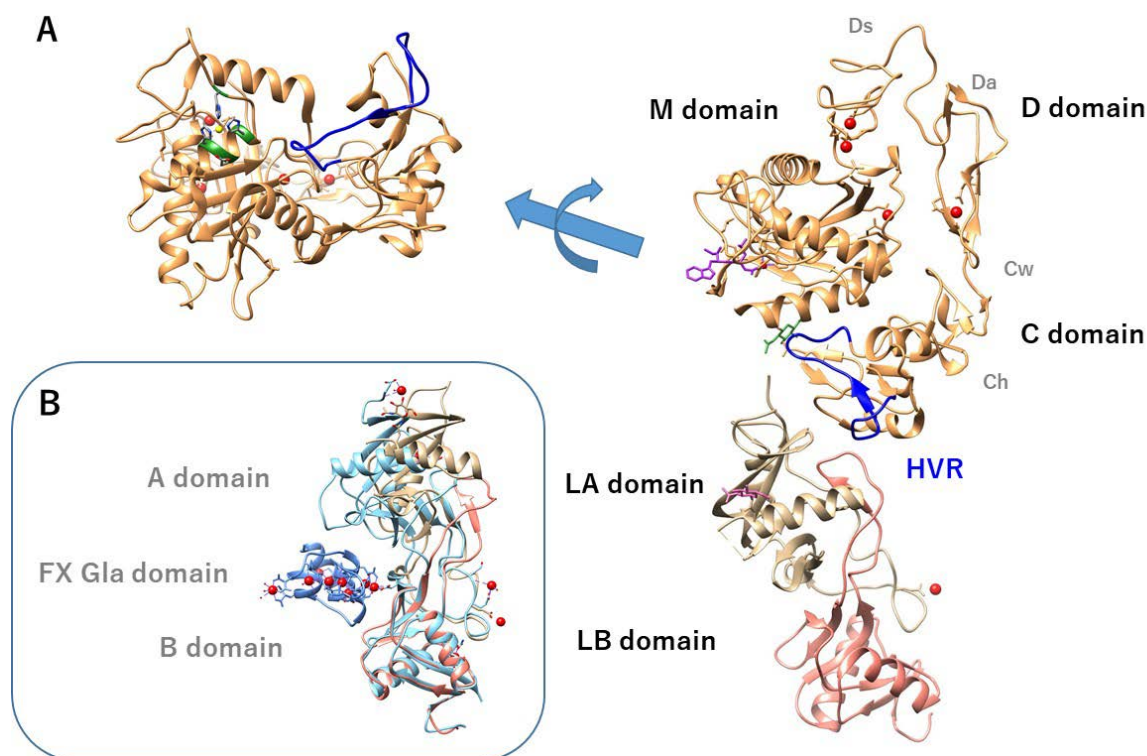


図2 RVV-Xの構造特性とFX-bpとの構造機能類似性

A図ではRVV-X (PDB ID: 2E3X)の3D構造を記す。右図はRVV-X全体構造を示しており、重鎖はM (金属プロテアーゼ) 領域, D (ディスインテグリン) 領域 (Ds (shoulder), Da (arm)), C (システインリッチ) 領域 (Cw (wrist), Ch (hand), HVR (hyper variable region)), 軽鎖はA領域 (LA) とB領域 (LB) からなる。A左図にM領域の表示角度を変え、インヒビターGM6 (紫色) を非表示とし触媒部位を示した。金属プロテアーゼ触媒部位のコンセンサス配列 ( $^{145}\text{HEXXHXXGXXHD}$ ) 内のヒスチジン (H), グルタミン酸 (E) の骨格を緑色にて表示した。3つのH側鎖が $\text{Zn}^{2+}$  (黄色球) に配位し、手前のE側鎖が触媒基として機能しているものと推察される。B図はFX-Gla領域/FX-bp複合体 (PDB ID: 1IOD: FX-Gla領域 淡紫色, FX-bp シアン色) とRVV-X軽鎖を重ね書きしたものである。A, B図共に詳細は本文を参照されたし。3D構造は文献8, 9を参照し、構造表示・解析にはUCSF Chimera 1.15を使用した。

構造的には2つのアニオンバイディングエキソサイトと疎水性ポケットがその役割を担っている<sup>13)</sup>。基質認識においては基質のC末側を認識するサイトとしてエキソサイト1 (フィブリノーゲンA $\alpha$ 鎖, TMの第5EGFドメイン, PARs (protease activatable receptors), ヒルジンC末領域等への結合), N末側を認識するサイトとしてエキソサイト2 (高分子量ヘパリン (アンチトロンビン結合型), プロトロンビン-フラグメント2等に結合) が存在する (エキソサイトの配置は図3A, B-aを参照されたい)。

では、トロンビンとACC-Cではどのような構造の相違があるのだろうか。以下、筆者等の考察を交えて解説したい。トロンビンとACC-Cのアミノ酸配列の相同性は28.5% (筆者等の解析による) あり、

図3Aに示すように両タンパク質の分子骨格は近似している。一方で、分子下半球では、ACC-Cはトロンビンの機能モジュール (エキソサイト1) 形成に必要な塩基性アミノ酸が大きく欠失している (図3A右図)。表面荷電分布を見ると両酵素の違いはより鮮明になる (図3B-a, b)。PCの活性化は血管内細胞膜にアンカリングしているTMの第4EGF領域がPCに結合し、血管内皮上にPCを濃縮し、更にトロンビンも第5EGFドメインに結合し、酵素・基質反応を促進する<sup>13)</sup>。PCは、AP切断サイトC末側5残基先にKMTRR配列からなるプラス荷電クラスターを有しており、この領域が電荷的にトロンビンのエキソサイト1との結合を阻害しているが、TMはエキソサイト1のマイナス荷電をキャンセル

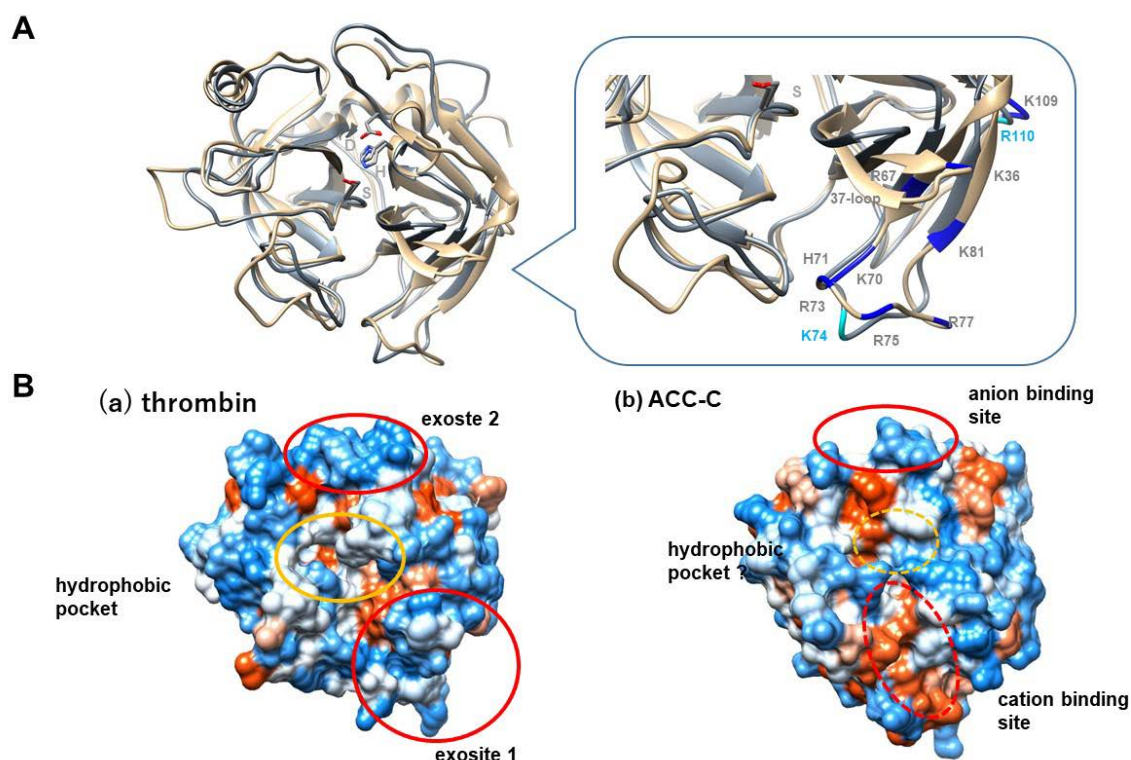


図3 トロンビンと ACC-C の構造比較

A 図ではトロンビン (PDB ID: 1 ABJ, 淡茶色) と ACC-C (PDB ID: 1 AIQ, 淡黒色) の構造を重ね書きし、触媒基の catalytic triad, アスパラギン酸 (D), ヒスチジン (H), セリン (S) 側鎖は機能表示している。トロンビンのエキソサイト 1 を構成する塩基性アミノ酸 (リジン (K), H, アルギニン (R), 青色表示) の位置, ACC-C の当該相同配列中の同アミノ酸 (K, R, シアン色表示) を右図に示した (アミノ酸残基番号は文献13に従う)。ACC-C は 37-loop がトロンビンに比べて短く、トロンビンのエキソサイト 1 構造に関与する 9 個の塩基性アミノ酸の位置に、2 個のアミノ酸 (K74, R110) しかアラインできていない。B 図はトロンビン (a) と ACC-C (b) の表面荷電を示しており、赤がマイナス荷電, 青がプラス荷電, 白が中性表面を示している。ACC-C 下半球に明瞭なプラス荷電クラスター構造が確認され、カチオンバインディングエキソサイトとしての機能が想定される。3D 構造は文献12を参照し、構造表示・解析には UCSF Chimera 1.15 を使用した。

する作用を有している<sup>13) 14)</sup>。更に、トロビンの触媒部位近傍の疎水性領域は PC との結合を促進させている。では、ACC-C の構造はどうであろうか。図 3B-b に示すように、トロンビン構造と比較すると疎水性ポケットは不明瞭であるが、トロンビン・エキソサイト 2 に相当するアニオンバインディングサイトは確認できる。一方で、トロンビンのエキソサイト 1 に相当する領域の荷電はマイナスになっており、カチオンバインディングサイトの形成が示唆される。この領域では PC の KMTRR プラス荷電クラスターとの親和性が促進される可能性が高い。ACC-C の機能的特徴である TM 非依存的 PC 活性化反応を理解する上で役立つ知見になりうるだろう。ACC-C のような SVSP がトロンビン構造を模倣し、

セルピンからの阻害を潜り抜けつつ、どのように凝固指向性から、出血指向性に移行したのかは進化学的にも興味深いところである。

以上、本項では、各種蛇毒のプロテオーム解析の現状を解説し、代表的な SVMP と SVSP 構造解析の結果を例示した。前述のように、国内蛇毒ホンハブ、ヒメハブのプロテオーム解析は終了しているが、他の国内蛇毒、サキシマハブ (*Protobothrops elegans*)、トカラハブ (*Protobothrops tokarensis*)、ニホンマムシ、ヤマカガシの毒成分の解析は不十分な状況にある。各種抗毒素製剤の代替性、品質管理、より有効性の高い抗毒素製剤開発の観点において各種蛇毒成分の詳細解析の意義は大きい。

## 2. 蛇毒咬傷への対応と抗毒素製剤の現状と課題

前項において蛇毒成分の現状分析に関して概括したが、本項では、日本国内に生息し患者発生報告のあるハブ、マムシおよびヤマカガシ咬傷について治療用のウマ抗毒素製剤を中心に歴史的背景を含めて解説する。

ここ数年の咬傷患者数は減少傾向にあることは公衆衛生上望ましいことである。さらに咬傷患者の治療は医療技術の発展による外科的治療や対症療法による治療例が多くなり、抗毒素使用例は稀になっている。国内で使用されている抗毒素はウマの免疫グロブリン製剤であり、人にとっては異種タンパクとして血清病やアナフィラキシーの心配がある。一般的に受傷・発症の初期に投与することで治療効果が高いといわれているため、重篤化するまえに適切診断による抗毒素利用の適否判断が望まれる。ウマ抗毒素製剤から人抗体製剤の開発も進められているが、毒素中には多くの生物活性を有する成分が含まれており、これらの活性成分に対する抗体産生の難しさにより研究開発の道半ばである<sup>15)</sup>。

### 2.1 ハブ咬傷の現状と患者の治療対応

ハブは沖縄県の沖縄諸島と八重山諸島、および鹿児島県の南西諸島の奄美諸島や徳之島等に生息している。沖縄諸島で主要なハブ属はホンハブ、サキシマハブ、ヒメハブであり、奄美諸島ではホンハブ、ヒメハブが主に確認されている<sup>16) 17)</sup>。

ハブ咬傷患者数については沖縄県と鹿児島県の衛生研究所の年報等で咬傷数や抗毒素投与例について調べることが可能である。両県ともにハブ咬傷患者を確認した医療機関から所轄の保健所に報告する患者情報だけでなく、ハブ対策事業として年間捕獲されたハブの統計情報も公開されている。沖縄県では咬傷蛇の種類、月別件数、患者情報等の詳細を公表している。2019年の集計ではタイワンハブ (*Protobothrops mucrosquamatus*) を含む4種のハブにより55件の咬傷事例があり、ホンハブによる庭を含む屋敷内での報告が多い。最近の死亡事例はなく、例年と大きな変化はないとの報告である<sup>17) 18)</sup>。また、沖縄県衛生環境研究所では過去39年間のハブ咬傷の事例について、詳細分析した報告がある。1977~2015年間の患者の症状、治療した病院別、詳細な治療方法、ハブの種類(ホンハブ、サキシマハブ、ヒメハブ)、年代3区分(1977-1987、1988-

2000、2001-2015)等の多くの情報・要因に対して膨大な解析を行っている。ここでは現時点の報告されている最後の資料を示す<sup>19)</sup>。

ハブ毒素をセファデックス G-100ゲルろ過(カラムクロマトグラフィー)で精製すると出血活性(Hemorrhagic activity:ウサギ皮内試験)を有する異なる2つのタンパク画分であるHR(Hemorrhagic)1とHR(Hemorrhagic)2が確認されている<sup>20)</sup>。HR1とHR2は物理化学的性状や免疫学的性状が異なること、易熱性であり、酸性域、EDTAおよびシステイン等で失活する。HR1には出血活性以外に強い致死活性(マウス尾静脈試験)を有する。精製した出血因子としてプロテアーゼ活性(カゼイン基質)が確認されている。また、HR1もHR2も再精製により2つの成分に分かれ、HR1Aと1Bは分子量約60,000の酸性糖タンパク質であり、HR2aと2bは分子量約20,000の塩基性タンパク質であることも確認されている<sup>21)</sup>。

北里柴三郎がドイツのコッホ研究所でジフテリア抗毒素の開発研究に成果をあげ、1852年に帰国することでハブ抗毒素の開発研究は開始される。1904年に内務省所管の国立伝染病研究所が芝白金台に設立され、翌年からハブ抗毒素血清の製造が開始された記録が残っている<sup>22)</sup>。現在は当時の液状から凍結乾燥製剤となり「乾燥ハブウマ抗毒素」が熊本県のKMバイオロジクスで製造販売されている。

乾燥ハブウマ抗毒素(ハブ抗毒素)は健康なハブから採取されたハブ毒およびホルマリン処理したハプトキソイドをウマに高度免疫して得られたウマの血清をペプシン処理後、硫酸分画によって精製する。精製後のウマの免疫グロブリンには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する(図4)。ハブ抗毒素の品質管理は、生物学的製剤基準において、原液の試験の他に、小分製品の試験として含湿度試験、pH試験、タンパク質含量試験、無菌試験、異常毒性否定試験、発熱試験及び力価試験が規定されている<sup>23)</sup>。

ハブ抗毒素の人への有効性を外挿するために動物を用いた力価試験が行われている。毒素に含まれている様々な活性を持つタンパク質や酵素により、咬傷後には局所性や全身性に出血や壊死を引き起こすと考えられる。毒素を分画するとマウスに致死をおこす画分とウサギの皮膚・皮内に出血をおこす異なる性状の2画分(HRI, HRII)が得られる。した



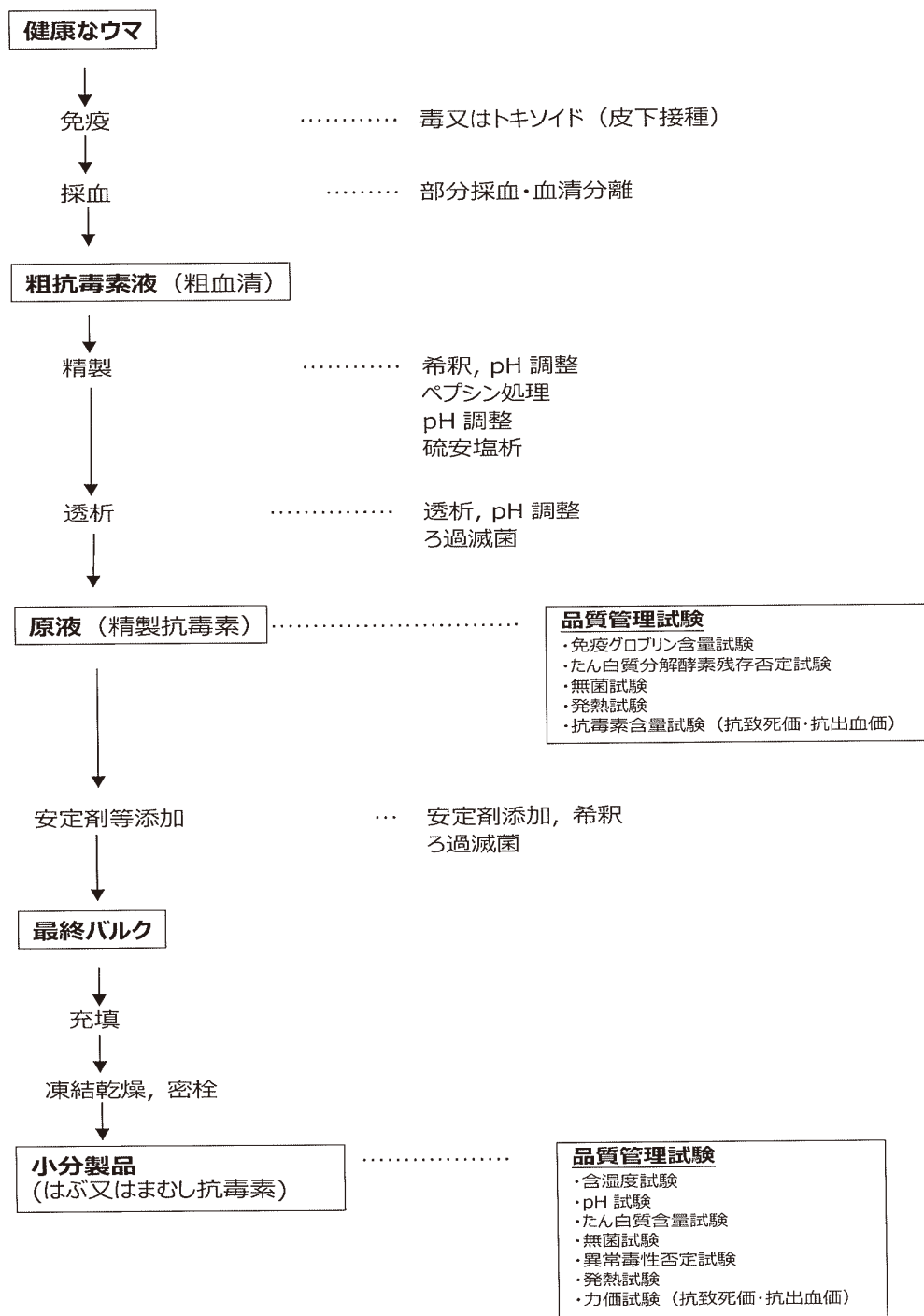


図4 ハブウマ抗毒素とマムシウマ抗毒素の製造フロー図

がって抗毒素中には上記3成分を中和できる抗毒素抗体が含まれる必要があると考えられ、品質試験が行われている。抗毒素製剤の品質規格を示す生物学的製剤基準の試験法では、この3成分の試験法の詳細が記載され、製造所および国立感染症研究所で安全性と有効性の品質を確認して市場に出荷されている。有効性を確認する力価試験では1mL中に抗致死価、抗出血I価のそれぞれが300単位以上含むこと

となっている。なお、ハブ抗毒素の出血性金属プロテアーゼHR2はヒト $\alpha$ 2Mにより阻害される。従って人の体内に存在する $\alpha$ 2MとHR2を混合すると、毒素中和試験法であるウサギ皮膚皮内法による試験でHR2の出血活性を抑えられる<sup>20)</sup>。人は血清中の $\alpha$ 2Mにより約20MHD (minimum hemorrhagic dose, 最小出血量)の出血IIの活性を不活化することになる。この科学的な根拠が示されたことにより、上述

の生物学的剤基準で求められていたハブ抗毒素製剤の抗出血活性の抗 HRII 活性の定量試験が削除された。毒素の解析研究がもたらした医薬品の品質管理の改善への貢献の一つである。なお、現在の製剤ではサキシマハブとヒメハブに含まれる毒の出血活性は中和されるが、致死活性は完全中和できないといわれている。各ハブ毒成分の解析では異なるタンパク解析が知られてきており、今後抗毒素と毒素成分の交差性を含めた解析が待たれている<sup>25)</sup>。

ハブ咬傷後のハブ抗毒素の投与は病院において医師によって行われる。主な農作業等の野外活動の咬傷の場所から医療機関までの移動には時間を要する。1960年代から患者の治療には限界があることが憂慮され（特に壊死）、毒素性細菌感染症患者に用いられていたトキシイドの研究開発が行われた。国立予防衛生研究所（現在の感染症研究所）と千葉県血清研究所の研究で前述3成分を精製したのち、広く医薬品として製法が確立していた沈降破傷風トキシイド等の製造工程に準じて沈降ハブトキシイドが製剤化された<sup>26) 27)</sup>。1965年に薬事法に伴う製造販売の認可がされ、生物製剤基準に試験法等が定められ、千葉県血清研究所で製造が行われた。1970年には鹿児島県のハブ対策事業の一環として奄美諸島の一部の住民に接種されている。2001年に千葉血清の廃業に伴い、トキシイドの明らかな有効性評価が得られないこと、同じハブが生息する沖縄県では利用されないこと等を理由に、その後の製造は行われていない。

## 2.2 マムシ咬傷の現状と患者の治療対応

マムシはクサリヘビ科マムシ属ニホンマムシで北海道、本州、四国、九州に生息している毒蛇である。同種のマムシは韓国、中国、ロシア等に分布している。

マムシ抗毒素は1953年から実用化され、ハブ抗毒素と同様、開発当初は液状製品であったが、1971年からは凍結乾燥製品に変更され、1976年からは凍結乾燥製品だけになった<sup>28)</sup>。乾燥マムシウマ抗毒素（マムシ抗毒素）の製造方法は、ウマ免疫用抗原にマムシ毒を使用する以外は、ハブ抗毒素と殆ど同様である（図4）。品質管理試験項目は、ハブ抗毒素と同様に生物学的剤基準における原液と小分製品の試験で厳格に規定されている。

マムシ咬傷の治療に関しては、1950年代から日本医師会雑誌、中毒学会等の医療現場に携わる医師・

研究者から継続してマムシ抗毒素とセファランチンの治療効果、それらの利用の必要性に関する比較分析の報告がある。マムシ咬傷後の治療には患者の年齢、咬傷後の経過時間、症状の程度が異なるために標準的な治療の設定は困難と考える。現在医療は施設や技術の進歩により多様化もすすみ、最終的には患者に向き合う医師の判断が重要となる。

医薬品保証の側面からは、マムシ抗毒素とセファランチンは日本薬局方の医薬品として効能・効果が異なることは明らかである。蛇毒素には多くの生物活性を示す成分が含まれるために症状や病態により、両者の併用使用だけでなく、他の既存医薬品の利用による治療効果も含めて総合的な医療を実施することも重要である。抗毒素投与後に心配されるアナフィラキシーや血清病の副作用の低減のために、エピネフリン、抗ヒスタミン剤、副腎皮質ステロイド剤の投与が行われている。重篤な患者に対しては抗毒素の使用を治療の初期段階で判断して救命に継げることが期待される。アルカロイドであるセファランチンには、抗毒素のもつ毒素中和能はないが、疼痛の緩和、抗炎症作用等の効果があることが報告されている。

医療現場では両者の治療効果・利点を科学的に理解して用いることが期待される。過去5年間にも研究者が患者症状と治療方法を解析した10以上の報告がある。マムシ抗毒素を第一選択として使用する施設、抗毒素とセファランチンの複合投与を行う施設、または抗毒素は投与しない施設も存在する。今日でもマムシ咬傷の診断と治療の難しさを示しているものであり、いくつかの報告を以下に示す。

辻本らは咬傷時に抗毒素とセファランチンを使用しなかった咬傷患者38症例（7年間集積）に対して輸液療法と対症療法だけで治療効果が得られたことを報告している。更に、彼らは過去の報告例について抗毒素、輸血、抗菌薬などの治療適応を整理し、適切な治療基準作成の必要性を提言している<sup>29)</sup>。一二三らは、マムシ抗毒素とセファランチンの有効性評価を234例（114ヶ所）の咬傷事例について国内三次医療センターを対象に実施した。患者治療にセファランチン、抗毒素、両者使用、および両者とも使用しない4グループ間で比較分析している。年齢、性別、基礎疾患、検査室での測定、入院期間、およびマムシ咬傷のグレード等を指標に分析し、患者の入院期間は重症例では抗毒素投与群はセファランチ

ン投与群より有意に短く、軽症例では有意差は認められなかったとしている<sup>30)</sup>。野田らは11年間の咬傷患者46症例を分析した結果、抗毒素投与が咬傷後6時間未満の場合は6時間以上に比べて、平均在院日数が短期間であること示した。また、初診時の血液生化学検査の結果分析では、AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase), CK (creatinase) 値は腫脹Grade分類と相関することにより、血液検査と経過観察の必要性を報告している<sup>31)</sup>。吉峯らは67例の咬傷患者の治療と予後を分析した。66例は入院加療を必要とし、平均入院期間は6.8日であり入院期間は腫脹の大きさと相関した。腎臓機能障害を3例で確認し、脳幹出血で1名が死亡した。抗毒素の投与は28例で実施したが、入院期間に差は見られなかった。なお、抗毒素投与後の副作用は3例あり、2名は膨麻疹、1例はアナフィラキシーショックを認めている。セファランチン投与43例・非投与23例で、投与群は最大腫脹の程度が大きく、入院期間が有意に長い結果が報告されている<sup>32)</sup>。坂脇らは18名の咬傷患者の解析結果を報告している。抗毒素は11例、セファランチンは3例に投与したが、抗毒素投与と腫脹ピーク日数、入院日数、入院後の全身症状に有意差は認められていない<sup>33)</sup>。

蛇毒の成分、咬傷部位および注入毒素量により症状の程度は異なるため、咬傷の重篤性を考慮した治療が求められる。マムシ咬傷療法における抗毒素の使用に当っては、抗毒素の副反応による医療過誤の訴訟を避けるためにも蓄積されている科学的エビデンスに基づく措置が必要である。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。

マムシ咬傷だけでなく、毒蛇咬傷についての患者情報や蛇の特定法、症状や病態については、国内で唯一の蛇族の研究所として約40年以上の活動実績を有する研究者によるガイドがあるので参考とされたい<sup>34)</sup>。国内の毒蛇と咬傷の実態、毒素の作用と病態、応急処置と医療現場の治療、さらに抗毒素療法についても幅広く解説している。約20年前に作成された資料であるが、当時の蛇毒治療の専門家の意見もふくめ適切な考察を行っている。毒蛇との接触が多い林業、農業に従事する方は是非一読されることをお勧めする。抗毒素治療に関しては、ハブ咬傷後の局

所の壊死、時にある神経障害による社会復帰への障害はないが、マムシ咬傷による患者の死亡に対しては訴訟問題の例もあり、重篤性へのリスク評価による抗毒素の投与を推奨している。

## 2.3 ヤマカガシ咬傷の現状と患者の治療対応

日本国内で稀に発生する毒蛇咬傷として、ヤマカガシの咬傷がある。国内での発生が極めて少ないことから企業における医薬品としての開発は進まず、治療のために厚生労働大臣に承認された抗毒素は現在も存在しない。ヤマカガシ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有毒の蛇である(図5)<sup>35)</sup>。ヤマカガシは北海道を除くほぼ全域に生息している。ヤマカガシにはマムシ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、一瞬咬まれただけでは毒は殆ど注入されない。毒が注入されても痛みや腫れが殆どないため、かつては無毒蛇とされていた。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<sup>36)</sup>。ヤマカガシ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を有し、プラズマに対する強い凝固活性を示し、咬傷患者は低フィブリノーゲン血症を引き起こす<sup>37)</sup>。従って、救命にはヤマカガシ抗毒素が不可欠である。また、小森らは日本に生息するヤマカガシとアジア大陸全体に広く分布するヤマカガシ(*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<sup>38)</sup>。両者の毒にはマトリックス金属プロテアーゼの合成基質に対する反応性など幾つか違いを認めたが、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タンパク質(CRISP)の存在も見出され、毒抗原の共通性が確認されている。

ヤマカガシ抗毒素は過去には家兎及び山羊を免疫動物として用い試験的に製造されてきたが<sup>39)</sup>、2000年に当時の厚生科学研究特別研究事業の抗毒素研究班において、初めてウマを免疫動物に用いてヤマカガシ抗毒素(Lot 0001)が試験製造された(図6)<sup>40)</sup>。この抗毒素は国内承認を受けていない未承認薬ではあるが、咬傷患者にとっては極めて貴重な治療薬である。そのため、この研究は今日の国立



図5 ヤマカガシ (*R. tigrinus*) の外観

(厚生労働科学研究費補助金「医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業」下の研究班で作成されたパンフレット「へびの判別と毒蛇咬症の診断, 2012年」からの引用)

A



B

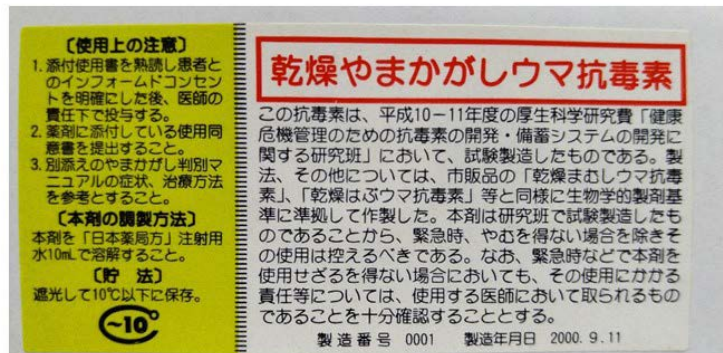


図6 乾燥やまかがしウマ抗毒素 (Lot 0001)

小分剤の写真 (A 図) とラベリング (B 図) を示す。ラベリングには、“使用上の注意”, “調整方法”と“貯法”を黄色地に黒字で表記し, 白地に赤枠・赤字にて“乾燥やまかがしウマ抗毒素”と記載し, 製法と使用上の責任に関して記述してある。

表2 乾燥やまかがしウマ抗毒素 (Lot 0001) の安定性モニタリング試験 (2020年現在) (文献43より引用)

Item	Test year / (Years since manufacture)	2,000 (0)	2,012 (12 <sup>th</sup> )	2,013 (13 <sup>th</sup> )	2,015 (15 <sup>th</sup> )	2,016 (16 <sup>th</sup> )	2,017 (17 <sup>th</sup> )	2,018 (18 <sup>th</sup> )	2,019 (19 <sup>th</sup> )	2,020 (20 <sup>th</sup> )
Property	Pale yellow dry Formulation, Slightly yellowish liquid after dissolution	same as 2000	same as 2000	same as 2000	same as 2000	same as 2000	same as 2000	same as 2000	same as 2000	same as 2000
Moisture content (%)		0.26	0.35	0.48	0.46	0.47	0.57	0.53	0.67	0.73
Insoluble foreign matter	Not admitted (pass)	pass	pass	pass	pass	pass	pass	pass	pass	pass
Dissolution time (Second)		79	81	185	107	114	146	133	123	
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	No organisms (pass)	pass	pass	pass	pass	pass	pass	pass	pass	pass
Test for freedom from abnormal toxicity	Normal (pass)	pass	pass	pass	pass	pass	pass	pass	pass	pass
Pyrogen test (°C [three rabbits])		0.17	0.11	0.12	-	-	-	-	-	-
Potency test										
· Anti-coagulant activity <sup>#1</sup>	Neutralized 4mg of venom	-	Neutralized 16.9mg of venom	-	-	Neutralized 15.6mg of venom	-	-	-	-
· Anti-hemorrhagic activity <sup>#2</sup>	Neutralized 13mg of venom	-	-	-	-	-	-	-	-	-

a, Performed at the KM Biologics Co., Ltd..

#1, Performed at the Japan Snake Institute (JSI).

#2, Performed at the National Institute of Infectious Diseases (NIID).

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引き継がれ、同時にこの抗毒素も同研究班に継承・管理され、今でも使用され続けている。一二三らは一般財団法人日本蛇族学術研究所の2000年から2013年までの記録をもとに確認されたヤマカガシ咬傷事例について、患者及びその治療状況等を遡及的に調査し纏めている<sup>41)</sup>。この14年間に9名のヤマカガシ咬傷患者が特定されており、患者は全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) であった。このうちヤマカガシ抗毒素は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 (55~60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名は全て生存し、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。

今日ヤマカガシ抗毒素は、患者救命の必要性より、厚生労働省管轄の研究事業による臨床研究の位置付けで、治療に当たった医師と患者本人の同意の基で使用されている。本製剤は2021年度には製造後21年を迎えることから、備蓄期間中の安定性を確認するためにその品質管理試験を毎年実施している。これまでに実施された試験の結果を表2に示す。実施した試験は全て製造直後の成績と比べ大きな変化は

なく、備蓄期間中の安定性が確認されている<sup>42)</sup>。しかしながら、将来的には品質の劣化も懸念されるため、下に示すAMED研究事業の抗毒素研究班において次ロットの製造について検討中である。

本研究でのヤマカガシ抗毒素の経時的保存安定性に係る一連の評価検討は、2013-14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及び2015-21年度の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研究費の支援を受けて実施している<sup>43)</sup>。本抗毒素は前述のように公的資金を活用した研究班に属する医薬品規制、抗毒素製造と品質管理および医療現場の医師が専門的立場で試作製造した研究成果物である。ヤマカガシの咬傷事故はきわめて稀に発生するため、患者の救命には緊急性、迅速性の対応を図る必要があり、本抗毒素を国内数ヶ所に配置している。また、研究班では、ヤマカガシを含む毒蛇の咬傷発生時に患者が蛇の種類を特定することが難しいこと、咬傷部位や症状の程度から抗毒素投与の可否判断が必要なこと、投与が必要と判断された場合の抗毒素の投与方法や治療の基本的な方法の解説が医療現場に必要なこと等、様々な課題への対応につきその必要性が議論された。将来的には更なる整備が必要であるが、研究班活動の一貫として、班員の医師が毒蛇咬傷に際して患者を適切かつ速やかに救命すること

を目標にホームページを開設し、これらの情報提供とその啓蒙を行っている。<https://www.serum-therapy.com/>

### おわりに

蛇毒抗毒素の開発の歴史は古く、1905年に国立伝染病研究所が抗ハブ毒血清の開発に成功し製造が開始されたとの報告が残されている。国立伝染病研究所から国家検定業務が移管された国立予防衛生研究所（予研）の年報によれば、1948年度に化学部における抗ハブ毒血清中のタンパク質量の検定・検査として1949年2月に1件の提出があり合格している。1949年度は23件の検査提出に対して20件が合格し、1950年度には2件が提出され合格している。それ以降の記録では蛇毒抗毒素として記載されており、ハブ抗毒素とマムシ抗毒素が単独で示されている記録は年報では見当たらない。1965年の予研の記録には、マムシ抗毒素が品質試験用の標準品として、参照品のリストにマムシ試験用毒素、常用標準抗毒素、試験用ハブ毒素が記載されている。ハブ抗毒素の検定記録では液状品は1949年から1970年まで、凍結乾燥品は1971年以降に提出の記録がある。液状マムシ抗毒素の検定実績は最初に1971年に9件受理され11件の合格となり、1974年まで検定提出がある。1972年以降は凍結乾燥品に置き換わり、現在に至っている。なお、マムシ抗毒素の製造は当時のワクチン製造6所社（武田薬品（株）、千葉血清研究所、北里研究所、デンカ生研、化血研、阪大微研）が行っていたが、ウマ飼育のための牧場管理、経済性に乏しいこと等を理由に、現在では化血研の事業を承継したKMバイオロジクスだけが社会的責任の観点から製造している状況である。

WHOは蛇毒抗毒素の製造と品質管理の向上と統一を目的に2010年に最初のガイドラインをリリースし、2017年にその詳細な内容を発出している<sup>44) 45)</sup>。さらに、ワクチン等の製造所が品質確認された製品を国際的に販売する枠組みとして実施している事前認証制度（Pre Qualified System）の導入のために製造所査察チームの組織化を検討した<sup>46)</sup>。この制度を普及させることにより、製造所は一定の品質の製品を継続的に製造するためのハードとソフトを構築することで、認証された製造所から出荷する安全で有効な抗毒素を患者に投与できることとなる。またWHOは抗毒素製造におけるウマ免疫用蛇毒素の品

質確保も重要視しており、野外で捕獲した有毒蛇の健康チェックと採毒後の毒素の品質確認の必要性を求めている。さらに、動物愛護の側面から捕獲した蛇は採毒後、一定期間経過後、自然・野外に戻すことも推奨しており、製造所にとっては解決すべき新たな問題も生じている。

本稿でも解説したように、近年の蛇毒素成分の解析研究は目覚ましく発展しており、蛇毒素の医薬品としての開発・利用も進んでいる。また、オランダの研究チームは毒蛇の毒腺を人工的に培養し高品質の毒素を安定的に作出するオルガノイドの構築に成功した<sup>47)</sup>。この技術は自然界の有毒蛇を捕獲して毒素を採取する危険な作業から解放されるばかりでなく、WHOが推進する実験動物の愛護に対する精神にも適応している。

### 引用文献

- 1) [https://www.who.int/health-topics/snakebite#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/snakebite#tab=tab_1) (2021年8月30日検索)
- 2) Tasoulis T, Isbister GK: Review and Database of Snake Venom Proteomes. *Toxins*, 9: 290-313, 2017.
- 3) Gao JF, Wang J, He Y, et al: Proteomic and biochemical analyses of short-tailed pit viper (*Gloydius brevicaudus*) venom: age-related variation and composition-activity correlation. *J Proteomics*, 105: 307-322, 2014.
- 4) Aird SD, Watanabe Y, Villar-Briones A, et al: Quantitative high-throughput profiling of snake venom gland transcriptomes and proteomes (*Ovophis okinavensis* and *Protobothrops flavoviridis*). *BMC Genomics*, 14: 790, 2013.
- 5) Tsernoglou D, Petsko GA, Hudson RA: Structure and function of snake venom curarimimetic neurotoxins. *Mol Pharmacol*, 14: 710-716, 1978.
- 6) Ojeda PG, Ramirez O, Alzate-Morales J, et al: Computational Studies of Snake Venom Toxins. *Toxins*, 10: 8-32, 2018.
- 7) Takeya H, Nishida S, Miyata T, et al: Coagulation factor X activating enzyme from Russell's viper venom (RVV-X). A novel

- metalloproteinase with disintegrin (platelet aggregation inhibitor) -like and C-type lectin-like domains. *J Biol Chem*, 267 : 14109-14117, 1992.
- 8) Takeda S, Igarashi T, Mori H: Crystal structure of RVV-X: An example of evolutionary gain of specificity by ADAM proteinases. *FEBS Lett*, 581 : 5859-5864, 2007.
- 9) Mizuno H, Fujimoto Z, Atoda H, et al: Crystal structure of an anticoagulant protein in complex with the Gla domain of factor X. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 : 7230-7234, 2001.
- 10) Kisiel W, Kondo S, Smith KJ, et al: Characterization of a protein C activator from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom. *J Biol Chem*, 262 : 12607-12613, 1987.
- 11) Meier J, Adler C, Stocker K: Isoelectric focusing of Protac, the protein C activator from copperhead (*Agkistrodon contortrix*) venom: a note on experimental problems. *Toxicon*, 26 : 218-221, 1988.
- 12) Murakami MT, Arni RK: Thrombomodulin-independent Activation of Protein C and Specificity of Hemostatically Active Snake Venom Serine Proteinases CRYSTAL STRUCTURES OF NATIVE AND INHIBITED *AGKISTRODON CONTORTRIX CONTORTRIX* PROTEIN C ACTIVATOR. *J Biol Chem*, 280 : 39309-39315, 2005.
- 13) 鈴木宏治: トロンビンの機能モジュール. *日本血栓止血学会誌*, 27 : 563-574, 2016.
- 14) Bock PE, Panizzi P, Verhamme IM: Exosites in the substrate specificity of blood coagulation reactions. *J Thromb Haemost*, 5 (Suppl. 1) : 81-94, 2007.
- 15) 盛根信也, 大城聡子, 泉水由美子, 他: 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.
- 16) 沖縄県保健医療部衛生環境研究所衛生生物班: 6. ハブの被害. ハブに気をつけよう. *沖縄県ホーム*. 暮らし・環境. 2021. <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/hoken/eiken/eisei/habutop.html> (令和3年11月20日検索)
- 17) 鹿児島県地域振興局・大島支庁: 暮らし・環境, ハブ情報. 2021. <http://www.pref.kagoshima.jp/aq04/chiiki/oshima/kurashi/habu-joho.html> (令和3年11月20日検索)
- 18) 福地斉志, 喜屋武向子: 沖縄県における令和元年(2019年)の毒蛇咬症. *沖縄県衛生環境研究所*. 2019. <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/hoken/eiken/eisei/habunohigai2.html> (令和3年11月20日検索)
- 19) 盛根信也, 西村昌彦, 泉水由美子, 他: 沖縄県における1977-2015年の間のハブ類咬症の症状ならびに治療の様式7—受傷経験, 受傷経験, 被咬回数, 牙痕数の影響. *沖縄県衛生環境研究所報*, 52 : B7-1-20, 2018.
- 20) Ohsaka A, Ikezawa H, Kondo H, et al: Haemorrhagic activities of Habu snake venom, and their relations to lethal toxicity, proteolytic activities and other pathological activities. *Br J Exp Pathol*, 41 : 478-486, 1960.
- 21) Takeya H, Arakawa M, Miyata T, et al: Primary Structure of 112-Proteinase, a Non-Hemorrhagic Metalloproteinase, Isolated from the Venom of the Habu Snake, *Trimeresurus flavoviridis*. *J. Biochem*, 106 : 151-157, 1989
- 22) 国立国会図書館デジタルコレクション: 東京帝国大学五十年史下巻, 東京帝国大学出版. 1932. <https://dl.ndl.go.jp/infondljp/pid/1453613?contentNo=8> (令和3年11月20日検索)
- 23) 国立感染症研究所: 乾燥まむしウマ抗毒素, 厚生労働省告示第155号, 生物学的製剤基準. 203-205. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/mrbp.html> (令和3年11月20日検索)
- 24) Morine N, Matsuda S, Izumi Y, et al: The Protobothrops flavoviridis Hemorrhagic Metalloproteinase HR2 Is Inhibited by Human Alpha 2-Macroglobulin. *Jpn J Infect Dis*, 71 : 286-290, 2018.
- 25) 国立予防衛生研究所細菌第二部: 豫研二十年のあゆみ. 国立予防衛生研究所(編). 9-16, 1967.
- 26) Murata RFukushima Immune response of man to Habu-venom toxoid, HIDEO FUKUSHIMA. *Jpn J Med Sci Biol*, 34 : 4.197-

- 212, 1981.
- 27) 貞弘省二：ハプトキシイド。ワクチンハンドブック。221-226。国立予防衛生研究所編。丸善株式会社。1994。
- 28) 作間晋：抗毒素の現状，化学及血清療法研究所報黎明，11：19-33, 2002。  
<https://www.kaketsuken.org/rei/book11/html5.html#page=27>
- 29) 辻本登志英，千代孝夫，小谷祐樹，他：抗毒素血清投与を行わなかったマムシ咬傷38症例の検討，日本救急医学会雑誌，28：2。48-54。2017。
- 30) Hifumi T, Yamamoto A, Morokuma K, et al: Clinical efficacy of antivenom and cepharanthine for the treatment of Mamushi (*Gloydius blomhoffii*) bites in tertiary care centers in Japan. *Jpn J Infect Dis*, 66 : 26-31. 2013
- 31) 野田慶太，秋山直美，井清司：マムシ咬症における抗毒素の早期投与と在院日数との関連—46症例の解析—。中毒研究，30：25-30，2017。
- 32) 吉峯宗大，瀬山厚司，菅淳他，他：マムシ咬傷67例の検討。山口県日農医誌，68：4。468-474，2019。
- 33) 坂脇園子，越前栄次朗，野田昇，他：当院におけるマムシ咬傷18例の検討。函医誌。42：1，2018。
- 34) 堺淳，森口一，鳥羽通久：フィールドワーカーのために毒蛇咬症ガイド。爬虫両棲類学会報。2002 (2) : 75-92. 2002.
- 35) 千石正一：ヤマカガシ。原色／両生・爬虫類，2版，社団法人家の光協会，74-75，1983。
- 36) Ogawa H, Sawai Y: Fatal bite of the Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*). *Snake*, 18 : 53-54, 1986.
- 37) Sakai A, Hatsuse M, Sawai Y: Study on the pathogenesis of envenomation by the Japanese colubrid snake, Yamakagashi, *Rhabdophis tigrinus*. 4. Hematological and histological studies. *Snake*, 22 : 11-19, 1990.
- 38) Komori Y, Hifumi T, Yamamoto A, et al: Comparative study of biological activities of venom from colubrid snakes *Rhabdophis tigrinus* (Yamakagashi) and *Rhabdophis lateralis*. *Toxins*, 9 : 373-382, 2017.
- 39) Kawamura Y, Sawai Y, Toriba M, et al: Study on the preparation of anti-Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*) rabbit and goat antivenom. *Snake*, 20 : 4-8, 1989.
- 40) Morokuma K, Kobori N, Fukuda T, et al: Experimental manufacture of equine antivenom against Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*). *Jpn J Infect Dis*, 64 : 397-402, 2011.
- 41) Hifumi T, Sakai A, Yamamoto A, et al: Clinical characteristics of Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*) bites: a national survey in Japan. *J Intensive Care*, 2 : 2000-2013, 2014.
- 42) Morokuma K, Matsumura T, Yamamoto A, et al: Evaluation of the stability of Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*) Equine Antivenom after 20 years storage. *Tropical Biomedicine*, 38 : 111-118, 2021.
- 43) 阿戸学研究代表者：抗毒素製剤の高品質化，及び抗毒素製剤を用いた治療体制に資する研究。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。2019-2021。
- 44) WHO : Technical Report Series: Annex 2. Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. No. 964, 2010.
- 45) WHO : Technical Report Series, 1004 :Annex 5. Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. Replacement of Annex 2 of WHO Technical Report Series, No. 964. 2017
- 46) WHO : Briefing Workshop on Prequalification of Snake Antivenom Immunoglobulins. 5 -7 November 2019.
- 47) Post Y, Puschhof J, Beumer J, et al: Snake Venom Gland Organoids. *Cell*, 180 : 233-246, 2020.

(令和3年11月26日受理)



## Recent advances in snake venom analyses and the treatment of snake bites in Japan

Kazunori MOROKUMA, Kazuhiko TOMOKIYO and Motohide TAKAHASHI

### Abstract

Mamushi (*Gloydius blomhoffii*) and Habu (*Protobothrops flavoviridis*) are venomous snakes in Japan, and anti-venom products have been developed for the treatment of bites by these snakes. Many serious snake bite cases are caused by poisonous snakes from overseas, such as Southeast Asia and sub-Saharan African countries. Snake bites have become a public health crisis, similar to serious infectious diseases, because of the difficulties associated with the rehabilitation of these patients. Snake venoms contain many different types of proteins and peptides, including enzymes, inhibitors, and agonists. The mixture of these active substances results in a complex pathological condition in snake bite patients, which hinders the development of appropriate and effective treatments. Therefore, there is an urgent need not only to improve the quality of horse anti-venoms, but also to develop new therapeutic agents for snake bites. In recent years, rapid progress in protein engineering and molecular biological analytical methods have contributed to structural and pathological analyses of snake venom components. Recent advances in snake venom analyses, treatment strategies for snake bites, quality control of anti-venomous products, and future challenges are discussed herein.