

# 抗ハブ毒ヒト抗毒素研究の概要について

盛根信也・大城聡子・泉水由美子・久高潤

## Study of Habu antivenom based on human immunoglobulin: An overview

Nobuya MORINE, Akiko OSHIRO, Yumiko IZUMI and Jun KUDAKA

**要旨**：琉球列島におけるハブ類咬症件数は、沖縄と奄美地方を合わせおよそ年間 100 件にまで減少したが、ハブの存在は未だ住民及び訪れる観光客にとって脅威となっている。ハブ咬症治療には効果の高い「乾燥はぶウマ抗毒素」が使用されるが、アナフィラキシーショック等の発症のリスクから、人間の成分に近く安全な治療法が求められている。沖縄県衛生環境研究所ではヒトモノクローナル抗体によるヒト抗毒素の開発研究を目的に、遺伝子組換えマウスを用いたヒト抗体作製研究を実施した。ヒト血中成分に存在するハブ出血毒Ⅱを中和する成分を特定し、実用化方法の研究を進めてきた。ハブ主要毒成分に対するヒトモノクローナル抗体混合による試験では、現行はぶウマ抗毒素の生物学的製剤基準の抗致死価および抗出血Ⅰ価の値を満たし、またヒト血清を併用した過剰量のハブ粗毒に対するマウス抗致死の効果も確認できた。本稿では、抗毒素研究の経緯から進捗について概説する。

**Key word**:ハブ, 抗毒素, ヒト抗体, *Protobothrops flavoviridis*, Antivenom, Human immunoglobulin

### I 抗ハブ毒ヒト抗毒素研究の経緯

琉球列島には猛毒を有するハブ類が生息し、沖縄と奄美地方を合わせおよそ年間 100 件の被害が発生する。被害の大半は手足の先の咬症であり、野外での作業中や農作業中に多いが、屋内や屋敷内での被害例も報告される。

ハブ咬症治療には効果の高い「乾燥はぶウマ抗毒素」が使用され、受症後出来るだけ早期の投与が望ましいとされるが<sup>1)</sup>、原料がウマ血清由来のタンパクでありアナフィラキシーショック等の重篤な副作用の可能性から、必ずしも積極的な使用とはなっていない。

このような問題を解決するため人間の成分に近く副作用の危険性が少ない「ヒト型抗毒素」の研究を平成7年度より開始した。協和発酵キリン株式会社によってヒト抗体を産生する遺伝子組換えマウスが開発され、同社の協力の下に当該遺伝子組換えマウスを用いた抗ハブ毒ヒト抗体作製研究を実施し、得られた研究成果及び知見のハブ咬症治療への応用研究を行ってきた。

### II 研究方法

ハブ毒の主要な毒成分とされる出血性プロテアーゼ HR1A, HR1B, HR2a, HR2b は末梢血管系(毛細血管)に特異的に働き、血管壁を裏打ちする基底膜を、それらのプロテアーゼ活性により破壊し血管壁の完全性を失わせ血管内皮細胞間隙を開き、結果として血管透過性亢進を助長させ赤血球を血管外へ漏出させる<sup>2)</sup>。そのため出血を伴った腫脹が生じると考えられる。腫脹による体液の咬傷部位周囲への漏出により、尿量の減少、血圧低下に至り急性腎不全へと移行すると考えられる<sup>3)</sup>。重症例

では嘔吐、チアノーゼ、意識障害、血圧低下をきたし、重急性の経過で死亡する<sup>4)</sup>。そのためハブ咬症の治療には、重症化の引き金となる腫脹の要因である血管透過性の亢進に関わるハブ毒成分を抑えることが重要であると考えられる。

出血性プロテアーゼ HR1A, HR1B, HR2a, HR2b (乾燥はぶウマ抗毒素の生物学的製剤基準の致死毒: HR1A, HR1B, 出血Ⅰ毒:HR1A, HR1B, 出血Ⅱ毒:HR2a, HR2b に該当)以外にも血管透過性亢進に関わると考えられるハブ毒 H2-0 画分中<sup>5) 6)</sup>のキニン遊離酵素, ディスインテグリン, その他 PhospholipaseA2 やトロンビン様酵素, ヒアルロニダーゼ等多数の酵素を含み、ハブ咬症の症状はそれらの作用の総合と考えられる。それらのハブ毒成分の中で致死毒, 出血Ⅰ毒, 出血Ⅱ毒を中和できれば、実用的にはかなりの治療効果が期待されたことから、「乾燥はぶウマ抗毒素」は致死毒, 出血Ⅰ毒, 出血Ⅱ毒に対する十分な力価を持つように製造される<sup>7)</sup>。そのため抗ハブ毒ヒト抗毒素の実用化には、「乾燥はぶウマ抗毒素」の生物学的製剤基準に規定される致死毒, 出血Ⅰ毒, 出血Ⅱ毒の元となる4つの出血性プロテアーゼ HR1A, HR1B, HR2a, HR2b の生物学的作用を阻害するヒトモノクローナル抗体が必須条件と考え、ヒト抗体を産生する遺伝子組換えマウス由来のハイブリドーマを作製し、有効なヒトモノクローナル抗体を選び出した。

### III 結果

#### 1. 研究結果の概要

ハブ毒 HR1A 及び HR1B の出血Ⅰ毒作用を完全に抑え

る2種類の人モノクローナル抗体を作製した。それら抗体の塩基配列から抗体の重鎖と軽鎖の一次構造を推定し、遺伝子組み替えによる、動物細胞での抗体発現を確認した。またヒト組織への交差反応性試験(予備)を行い分析に供した各種組織に対する交差性が否定された。

ハブ毒 HR2a 及び HR2b の出血Ⅱ毒作用を抑えるヒトモノクローナル抗体は得られなかったが、ヒト血中の $\alpha$ 2マクログロブリンが HR2a と HR2b の出血Ⅱ毒作用を完全に抑えることが確認され、HR2a と HR2b を対象から外すこととなった。

HR1A 及び HR1B の出血Ⅰ毒作用を抑えるヒト抗体を混合し、マウス抗致死試験及びウサギ皮内接種試験(ウサギ皮内法)による試験を実施した結果、致死毒及び出血Ⅰ毒に対する高い中和効果を示し、「乾燥はぶウマ抗毒素」の生物学的製剤基準の抗致死価、抗出血Ⅰ価の値を満たす結果となった。さらに、HR1A および HR1B 中和ヒト抗体の混合にヒト血清を加え抗致死試験を行った結果、マウスを用いた実験では過剰のハブ粗毒に対する完全な抗致死作用が認められた。

\* (乾燥はぶウマ抗毒素の) 生物学的製剤基準は各試験毒を用いた抗致死、抗出血Ⅰ試験を行い、力価を求める事となっているが、ハブ粗毒に対する効果の基準は無い。

## 2. 各研究結果

(1) ハブ毒 HR1A の出血作用を中和するヒトモノクローナル抗体の作製

精製したハブ毒 HR1A を KM マウスに免疫し、抗体価の十分上昇した KM マウスの脾臓細胞と SP2/0 Ag14 とのハイブリドーマを作製した。作製した 300 以上のハイブリドーマから得られたヒトモノクローナル抗体を、ウサギ皮内法を用いたスクリーニングの結果 HR1A の出血活性の中和を示す抗体を 2 種類得た。そのうち、より強い効果を示したモノクローナル抗体はヒト IgG1 と確認され、H鎖および $\kappa$ 鎖の塩基配列を解析した<sup>9) 10)</sup>。

(2) ハブ毒 HR1B について

沖縄県産ハブは HR1B を持たないとされていたが、本研究中に沖縄産ハブ粗毒から HR1B が精製され、内部配列の分析結果と沖縄本島南部産ハブ毒線から HR1B の cDNA がクローニングされた事により、沖縄産ハブにも HR1B の存在が確認できた。そのため HR1B をヒトモノクローナル抗体作製の対象とした<sup>11)</sup>。

(3) ハブ毒 HR1B の出血作用を中和するヒトモノクローナル抗体の作製

HR1B は HR1A の 1.6 倍の毒性をもち、高濃度に含有する個体も存在することも考えられるため、抑えるべき対象としヒトモノクローナル抗体を作製した。作製した 595 株から合計 4 抗体に HR1B の出血作用の中和が認められた。そのうち、より強い効果を示し HR1B の出血を完全に中和した抗体はヒト IgG4 と確認され、H鎖および $\kappa$ 鎖の塩基配列を解析した。

またリコンビナント抗体を作製し HR1B の出血作用の完全な抑制(中和)を確認した<sup>12) ~15)</sup>。

(4) ハブ毒 HR2a 及び HR2b の出血作用を中和するヒトモノクローナル抗体の作製

平成 20 年度に KM(D) マウスを用いて作製した抗 HR2 ヒト抗体 204 株には、ウサギ皮内摂取試験により中和の有無の確認実験を行ったが確実に中和があると判断できる抗体は得られなかった。また平成 20 年度以前に作製した抗 HR2 抗体および抗 HR1 抗体(HR2 とプロテアーゼドメインが相同)の HR2 の出血活性に対する中和試験で 4 抗体に若干の中和が認められる結果であったが、再試験の結果十分な中和は無いと判断された。

(5) ヒト $\alpha$ 2マクログロブリンによるハブ出血毒 HR2 の出血作用の阻害

沖縄県と同様にハブが生息する鹿児島県奄美地方では、はぶ咬症の重症化を予防するはぶトキソイドの接種が過去に実施された。平成 3 年度に行われたトキソイド接種者のハブ毒(HR1,HR2)に対する抗体価および力価(中和力)に関する調査で、トキソイド接種者のみならず非接種者の血清も HR2 の出血作用を中和することがわかり、ヒト血液中に HR2 を中和する物質の存在が示唆された。ヒト $\alpha$ 2マクログロブリンと HR2 の複合体形成および HR2 の出血作用への影響を調べた結果、ヒト $\alpha$ 2マクログロブリンは HR2 と複合体を形成し、ウサギ皮内法による測定では HR2 の出血作用を完全に抑えた。この結果から当初ヒト抗体の作製対象であった HR2 を作製対象とから外した。ヒト血清中には抗出血Ⅱ活性が存在し、20MHD/dose 程度の出血Ⅱ活性を完全に阻止することが明らかになった<sup>16)</sup>。

(ヒトの $\alpha$ 2マクログロブリン量を体重 50 kg の女性で計算した場合、ハブ咬症 1 回で入る HR2 を阻害するために必要な $\alpha$ 2マクログロブリン量が 45 回分含まれる計算となる)

(6) 組織交差反応性試験

ハブ出血毒 HR1A および HR1B を中和するヒトモノクローナル抗体の、ヒトにおける組織交差反応性を評価するため、20 種類のヒト組織切片を用い試験を実施した。試験を行った両ヒトモノクローナル抗体はヒト組織に対して特異的な組織交差反応性は認められないと判断された<sup>17)</sup>。

(7) HR1A および HR1B 両中和モノクローナル抗体の抗致死価および抗出血 I 価について

沖縄ハブ抗毒素と沖縄試験毒素を实用標準として HR1A および HR1B 両中和モノクローナル抗体の抗 HR1 価 (抗出血 I 価) を調べた結果、それぞれの抗体単体での抗 HR1 価は低い、両抗体の混合により高い中和活性が生じた。

2 種混合ヒトモノクローナル抗体(蛋白濃度:21 mg/ml) は、現行の「はぶ抗毒素製剤基準」の試験法により、沖縄はぶ出血毒 I (10 TD/ml) および致死毒(10 TD/ml) に対する中和活性が、それぞれ、100 U/ml 程度ある結果となった。したがって、両抗体混合の蛋白濃度を 60 mg/ml 以上に調製すれば、沖縄はぶ毒の出血毒 I と致死毒活性に対して、それぞれ最終バルクの基準である 300 U/ml 以上の力価が得られるものと考えられる<sup>18)</sup>。

(8) ハブ粗毒に対するマウス抗致死試験

ヒトモノクローナル抗体混合およびヒト血清添加により、ハブ粗毒に対する致死作用を完全に抑え全数 (11 匹) 生存した。陰性コントロール群は 11 匹中 7 匹死亡した。本試験に使用したハブ粗毒量(1.5 LD<sub>50</sub>: 123 μg) を 50 kg のヒトに換算するとおよそ 13.6 回咬まれた毒量に相当する<sup>19)</sup>。

(9) ハブ粗毒を試験毒とした抗ハブ毒ヒト抗毒素と「乾燥はぶウマ抗毒素」の比較試験

ハブ粗毒を試験毒 (3 LD<sub>50</sub>) とした場合の効果は、「乾燥はぶウマ抗毒素」には及ばない結果となった。今後はヒト抗体量およびヒト血清量を増やし同等な抗致死作用を得られるか確認の必要がある、しかし腹腔への投与量、ヒト抗体およびヒト血清の調整濃度に限界があり、それらを解決する課題も残る。また投与経路を尾静脈で行う試験では、ヒト抗体およびヒト血清投与群が、粗毒のみ投与群よりも致死性が増し、ヒト血清をマウス尾静脈へ投与することで悪影響を与えている可能性がある。

これらの結果から十分な投与量、適切な投与経路など

適切な評価が行える動物実験系を構築する必要がある<sup>20) 21)</sup>。

## IV 考察

本研究において、ハブ主要毒成分に対するヒト抗体が複数得られ、構造・効果などの基礎データを得た。ハブ致死毒およびハブ出血 I 毒に対する中和作用を持つヒトモノクローナル抗体を作製し、またヒト血清中の α<sub>2</sub> マクログロブリンにより出血 II 毒 (HR2a,2b) の作用を抑えることを証明したことから、生物学的製剤基準の試験毒素に対する効果を満たした状態である。またマウスを用いた実験では、過剰のハブ粗毒に対する抗致死が認められた。

一方で臨床への応用へは各種ハブ毒成分の詳細なデータが得られるまで慎重に検討すべきとも考えられる。

ハブ咬症は血圧低下、コンパートメント症候群、ミオグロブリン尿、急性腎不全(ショックによる)、拘縮など、腫脹(腫れ)を起因として重症化へつなぐと考えられることから、ハブ致死毒、出血 I 毒、出血 II 毒など血管透過性の亢進に関わる毒成分を中和する「乾燥はぶウマ抗毒素」の生物学的製剤基準の考え方は理にかなっていると考えられる。

またハブ毒の詳細な研究により、沖縄産ハブと奄美産ハブとの毒成分の違いが明らかにされた。そのため抗ハブ毒ヒト抗毒素の効率的な開発研究には、沖縄及び奄美産ハブ毒の差異を考慮し両方に対応させる必要がある。

蛇毒抗毒素の製造及び品質管理に関する WHO のガイドラインでは、50% 効果量(ED<sub>50</sub>) の試験において 3-6 LD<sub>50</sub> の粗毒を試験毒として使用するとあり<sup>8)</sup>、高 LD<sub>50</sub> のハブ粗毒を試験毒とした場合、「ヒト抗体及びヒト血清混合」の効果は、現行はぶウマ抗毒素にはおよばないと予想される。その理由としては、ハブ粗毒量の増加に伴い、微量なその他の毒性成分が致死量に達するためと考えられる。ウマ抗毒素においても、ハブ粗毒量の増加にともないマウス抗致死の作用が観られなくなる現象が報告されている。実際のハブ咬症事例において、ヒトが 1.5 LD<sub>50</sub> (ハブ 1 咬みの粗毒量 22.54 mg, マウス 20 g を 50 kg のヒトに換算した場合 13.6 咬み分のハブ粗毒量に相当) に相当するハブ咬症を受ける事はあり得ず、1.5 LD<sub>50</sub> の粗毒に対するマウス抗致死効果であっても実際のハブ咬症には効果を発揮すると予想される。

表1. 抗HR1A・抗HR1Bヒトモノクローナル抗体の諸性質.

	抗HR1A抗体	抗HR1B抗体
中和対象毒	HR1A(致死・出血)	HR1B(致死・出血)
抗体構造の確認 (SDS電気泳動)	抗体の重鎖・軽鎖に該当する分子量5万、分子量2万5千のバンドがそれぞれ確認された	
クラス	ヒトIgG1	ヒトIgG4
一次構造 (cDNAによる推定)	重鎖: 472aa 軽鎖: 237aa	重鎖: 457aa 軽鎖: 236aa
ヒト組織に対する 交差性	以下の組織(20種類)に対する交差性は確認されない * 腎臓, 卵巣, 膵臓, 甲状腺, 大脳, 小脳, 肺, 脾臓, 子宮(内膜, 頸部), 乳房, 胎盤, 心臓, 皮膚, 骨格筋, 副腎, 胃, 小腸, 肝臓, 唾液腺	
抗致死作用(マウス)	Mix21mg/mlにて, 103(U/ml) *生物学的製剤基準(原液100U/ml)	
抗出血I作用	Mix7mg/mlにて, 100(U/ml)以上 *生物学的製剤基準(原液100U/ml)	

(H 鎖) (1574 bp)

1	ACCCAAAACCCACCCCTCCTTGGGAGAAATCCCTAGATCACAGCTCCTCACCATGGAC	60
61	TGGACCTGGAGCATCCCTTTCTGGTGGCAGCAGCAACAGGTGCCACCTCCAGGTTCAA	120
121	CTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCCTGGGCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAG	180
181	GCTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTTTGTTTTTTCAGCTGGTGGCAGACGGCCCTGGACAA	240
241	GGGCTTGAGTGGATGGATGGATCAGCGCTAACACTGGTAACACACACTATGCACAGAAG	300
301	TTTCAGGGCAGAGTCACTGACACAGACACATCCACAGCAGCCTACCTGGAGCTG	360
361	AGGAGCTGAGATCTGACGACAGGCGCTGATTAATCTGTGCGCAAGGGACTACGGTGGC	420
421	CTCTTTGACTACTGGGCGCAGGGAACCCCTGGTCAACGCTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGC	480
481	CCATCCGCTCTCCCTTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGACACAGCCGCGCTG	540
541	GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCGAACCCTGGTACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCC	600
601	CTGACAGCGGCGCTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTC	660
661	AGCAGCGTGGTACGCTGCCCTCCAGCAGCTTGGGACGAAAGCCTACACCTGCAACGTA	720
721	GATCAACAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAGATTGAGTCCAAATATGGTCCCCCA	780
781	TGCCCATCATGCCACCACTGAGTTCTGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCGCCCA	840
841	AAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTGACGTGCGTGGTGGTGGAC	900
901	GTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCACCTGGTACGTGGATGGCGTGGAGTGCAT	960
961	AATGCCAAGACAAGCCCGGGGAGGACAGTTCAACAGCAGTACCCTGTGGTCAAGGCTC	1020
1021	CTCACCGTCTGCACAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTCAAGTGAAGGCTCCAAC	1080
1081	AAAGGCTCCCGCTCCTCCTCAGAAACCACTCTCAAGCCAAAGGGCAGCCCGCAG	1140
1141	CCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG	1200
1201	ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTACCCAGCAGCAGTCCGCTGGAGTGGGAGAGCAATGGG	1260
1261	CAGCCGGAGAAACAATCAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTC	1320
1321	CTCTACAGCAGGCTAACCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGAAATGTCTTCTCATGC	1380
1381	TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACAGAAAGGCTCTCCTGTCTCTG	1440
1441	GGTAAATGATGTCAGGCGGCGCAAGCCCGCTCCCGGCTCTCAGGGTCTGGGCGAGG	1500
1501	ATGCTGGCAGTACCCTGTACATCTTCCAGCCAGCAGCATGGAATAAAGCACC	1560
1561	CACCACTGCCCTGG	1574

[k-1]

1	ATCTTAAAGAGGTTCTTCTCTGGATGTGGCATGAGCAAACTGACAAGTCAAGGCAG	60
61	GAAATGTCGCCATCACACTGATGGGTTCTGCTGCTGGGTTCCAGCCTCCAGGGG	120
121	TGAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGACTTTGAGTCTGTGACTCCAAGGAGAAAGTCA	180
181	CATCACCTGCCGGCCAATCAGAGCATTTGGTAGTAGCTTACACTGGTACCAGCAGAAAC	240
241	AGATCAGTCTCCAAGCTCCTCATCAAGATAGCTTCCAGTCTCTCAGGGTCCCTC	300
301	GGAGTTGAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTGAGGCTCACCATCAATAGCTGGAAG	360
361	TGAAGATGCTGCAGCTTACTGTATCAGAGTAGTAGTTACTACTTTCGGCGGAGG	420
421	GACCAAGGTGGAGATCAAAGAACTGTGGCTGGCAGCACTCTGCTTCTTCTCCCGCCAT	480
481	TGATGAGCAGTTGAAATCTGAACTGCCTCTGTGTTGTGGCTGCTGAATAACTTCTATCC	540
541	CAGAGAGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGA	600
601	GAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAGCTACAGCTCAGCAGCAGCCTGACGCT	660
661	GAGCAAGGACGACTACGAGAAACAAAGTCTAGGCTGGGAACTACCCATCAGGGCT	720
721	GAGCTCGCCGTCAACAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGAGGGGAGAAAGTCCGCCA	780
781	CCTGCTCCTCAGTTCACAGCTGACCCCTCCCATCCTTTGGCTCTGACCCCTTTTCCAC	840
841	AGGGGACCTACCCCTATTGGGCTCTCAGCTCATCTTCCAGCTACCCCTCCTCCTC	900
901	CTTGGCTTAAATATGCTAATGTTGGAGGAGAAATGAATAAAAGTGAATCTTTGC	960

(A) HR1-H 鎖 (1,419 bp)

1	ACCATGGACTGGACCTGGAGGCTCTTCTGCTTGGCTGTAGCTCCAGGTGCTCACTCCAGGTGACG	70
71	TGGTGCAGTCTGGGCTGAGGTGAAGAAGCCCTGGGCTCAGTGAAGTTTCTGCAAGGCATCTGGATA	140
141	CACITTCACCAGCTACTATATGCACTGGTGGCAGGCGCCCTGGACAAGGCTTGGTGGATGGGAAGA	210
211	ATGAACCTAGTGATGATAGCAAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCCCATGACCAAGGGACA	280
281	CGTCACGAGCAGCTAGCTAGATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACAGCGGCTATATTACTGTG	350
351	GAGGAGAGGACTCTGGTTCGGGAGTATTTCTTTGACTACTGGGCGAGGAAACCTGTCACCGTC	420
421	TCTCAGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCTGACCCCTCCTCCAAGAGCAGCTCGGGGCA	490
491	CAGCGGCCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGCAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTAGGGCG	560
561	CCTGACAGCGGGCTGCACACCTTCCCGGCTGCTCAGTCTCAGGACTACTCCTCCTCAGCAGCGTG	630
631	GTGACGCTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAACCCAGACCTAGATCTGCAAGCTGAATCACAAGCCAGCAACA	700
701	CCAAGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTGTGACAAAACCTCACACTGCCACCGTGGCCAGCC	770
771	TGACTCCTGGGGGACCGTCACTTCTCCTTCCCGCAAAACCCAGGACACCCCTCATGATCTCCGGG	840
841	ACCCCTGAGTGCATGCTGGTGGTGGCAGTGGCCAGAAAGCCCTGAGTCAAGTTCAACTGGTACG	910
911	TGGACGGGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCCGGGGAGGACAGTACAACAGCAGCAGTCCGCTG	980
981	GGTCAAGCTCCTCAGCCTGCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGATCAAGTGAAGTCTCCAAC	1050
1051	AAAGCCCTCCAGCCCATCGAAGAAACATCTCCAAGCAAGGGCAGCCCGGAGAACCCAGGCTG	1120
1121	ACACCTCAGCCCATCCCGGATGAGTGAAGCAAGCAGGCTCAGGCTGACTGCTGGTCAAAGGCT	1190
1191	CTATCCAGCAGCATCGGCTGGAGTGGGAGCAATGGGCGCCGGAGAACAACACTAAGAACCCAGCT	1260
1261	CCGCTGCTGAGCTCCGAGGCTCCTTCTCCTCAGCAAGCTCAGCCTGAGCAAGAGAGGTGGCAGC	1330
1331	AGGGGAACGCTTCTCATGCTCGGTGATGCATGAGGCTGCAACACCACTACAGCAGAGAGGCTCCTC	1400
1401	CCTGCTCCGGTAAATGA	1419

(B) HR1-L 鎖-κ 1 (714 bp)

1	AGCATGGACATGAGGTCGCCGCTCAGCTCCTGGGCTTCTGCTGCTGGCTCCAGGTGCCAGATGTG	70
71	CCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAAGTCACTTGGCG	140
141	GGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGAATTAGCCTGGTATCATCAGAAACCAGGAAAGCTCCTAAGCTCGT	210
211	ATCATGATGCTCCAGTGTGAAAGTGGGCTCCATCAAGTTCAAGCGGAGTGGATCTGGGACAGATT	280
281	TGACTCTCAGCATCAGCAGCTGACGCTGAAGATTTTGAAGTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTA	350
351	CCGCTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGTCAAAAGCACTGTGGCTGACCATCTGTCTTCTC	420
421	TCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCTGCTGTTGTGGCTGCTGAATAACTTCTATC	490
491	CCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGATAACGCCCTCAACTGGTAACTCCAGGAGAGTGTGAC	560
561	AGAGGAGCAGCAGGACAGCAGCTCAGGCTCAGCAGCAGCTGAGCTGAGCAAGAGAGTACGAG	630
631	AAACCAAAAGTCTACGCTGGAAATGCCCATCAGGGCTGAGCTGCGCGTCAACAAGAGGCTTCAACA	700
701	GGGAGAGTGTAG	714

図1. 抗HR1A中和ヒト抗体(外枠付)および抗HR1B中和ヒト抗体cDNAの塩基配列

V 参考文献・資料

- 添付文書 乾燥はぶウマ抗毒素 日本標準商品分類番号876331.
- 松田道生, 鈴木宏治(1994) 止血・血栓・線溶. 中外医薬社.
- 眞榮城優夫(1987) ハブ咬症の治療 ハブ咬症. 沖縄県ハブ対策研究会.
- 宮城良充, 野崎真敏(2007) ハブ咬症. 中毒研究, 20, 223-233.
- 山川雅延, 野崎真敏, 富原靖博(1983) ハブ毒精製画分(HR-1, HR-2, H2-0)の相互増強作用, 昭和57年度抗毒素研究報告書(I), 25-28.
- 野崎真敏, 山川雅延, 富原靖博(1983) 致死活性成分(H2-0)の精製の試み, 昭和57年度抗毒素研究報告書(I), 29-37.
- 国立感染症研究所 副所長 渡邊 治雄(2007) 生物学的製剤基準 解説,じほう.

- 8) World Health Organization (2010) WHO Guidelines for the production control and regulation of snake antivenom immunoglobulins.
- 9) Nobuya Morine, Seiko Matsuda, Koki Terada, Akira Eto, Isao Ishida, Hirosuke Oku (2008) Neutralizaion of hemorrhagic snake venom metalloproteinase HR1a from *Protobothrops flavoviridis* by human monoclonal antibody . *Toxicon* 51, 49-56.
- 10) 盛根信也, 上江洲由美子, 大城聡子 (2014) 沖縄はぶ (*Protobothrops flavoviridis*) 毒 HR1A 中和ヒトモノクローナル抗体 HR1a-0403035 の  $\kappa$  鎖の同定, 平成 25 年度抗毒素研究報告書, 沖縄県衛生環境研究所, 12-23.
- 11) Nobuya MORINE, Seiko MATUDA, Koki TERADA Hironori IWASAKI and Hirosuke OKU (2008) The Occurrence of HR1b in the Venom of the Snake Okinawa Habu(*Protobothrops flavoviridis*) , *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 72(2), 591-594.
- 12) 大城聡子, 松田聖子, 盛根信也(2012) 抗 HR1b ヒトモノクローナル抗体の HR1b 出血活性の中和実験(2), 平成 23 年度抗毒素研究報告書, 沖縄県衛生環境研究所, 3-10.
- 13) 松田聖子, 大城聡子, 盛根信也(2012) 中和活性のある抗 HR1b ヒトモノクローナル抗体の超可変領域の塩基配列確定及びアミノ酸配列の確定と 1012195 株の全塩基配列確定及びアミノ酸配列の推定, 平成 23 年度抗毒素研究報告書, 沖縄県衛生環境研究所, 11-34.
- 14) 宮城博俊, 盛根信也, 上江洲由美子, 大城聡子(2013) ハイブリドーマから精製した抗 HR1B 中和ヒト抗体における HR1B 吸着能をもつ Fab 領域の分離と構造解析, 平成 24 年度抗毒素研究報告書, 沖縄県衛生環境研究所, 6-13.
- 15) 上江洲由美子 宮城博俊 眞榮城徳之 大城聡子 盛根信也(2013) 遺伝子組換えによる抗ハブ毒 HR1B 中和ヒト抗体産生及び発現確認試験, 平成 24 年度抗毒素研究報告書, 沖縄県衛生環境研究所, 14-23.
- 16) 盛根信也(2010) ヒト  $\alpha$  2 マクログロブリンはハブ出血毒 HR 2 の出血作用を抑える, 平成 21 年度抗毒素研究報告書, 沖縄県衛生環境研究所, 8-9.
- 17) 盛根信也, 大城聡子, 上江洲由美子(2014) ハブ毒中和ヒトモノクローナル抗体のヒト組織における組織反応性予備試験 (概要) , 平成 25 年度抗毒素研究報告書, 沖縄県衛生環境研究所, 30-31.
- 18) 熊本保健科学大学 有働睦夫, 江藤 晶(2014) ヒト型抗ハブ毒ヒト抗毒素の開発, 平成 25 年度抗毒素研究報告書, 沖縄県衛生環境研究所, 24-29.
- 19) 盛根信也, 大城聡子, 上江洲由美子, 寺田考紀(2015) ハブ(*P.flavoviridis*)粗毒に対する抗 HR1 ヒトモノクローナル抗体混合とヒト血清添加によるマウス抗致死試験 (腹腔投与予備試験) , 平成 26 年度抗毒素研究報告書, 沖縄県衛生環境研究所, 3-5.
- 20) 大城聡子, 上江洲由美子, 盛根信也, 寺田考紀(2015) ハブ(*P.flavoviridis*)粗毒に対する抗 HR1 ヒトモノクローナル抗体混合とヒト血清類添加によるマウス抗致死試験 (腹腔投与) , 平成 26 年度抗毒素研究報告書, 沖縄県衛生環境研究所, 6-11.
- 21) 上江洲由美子, 大城聡子, 盛根信也(2015) ハブ (*P.flavoviridis*)粗毒に対する抗 HR1 ヒトモノクローナル抗体及びヒト血清混合試験液によるマウス抗致死試験 (尾静脈投与) , 平成 26 年度抗毒素研究報告書, 沖縄県衛生環境研究所, 12-16.