

に準じて実施した。標準エンドトキシンは日本薬局方エンドトキシン標準品 (*Escherichia coli* UKT-B 株由来) を注射用蒸留水 (大塚製薬) で溶解し、0.3, 0.075, 0.01875, 0.0046875 EU/ml となるように 4 倍希釈系列を作製し測定に用いた。抗毒素検体は各々注射用蒸留水で 4 倍、16 倍、64 倍の希釈系列を作製し測定に用いた。また抗毒素の反応干渉因子を調べるため、検体に添加されたエンドトキシン濃度が抗毒素原液に換算したときに 1.0 EU/ml となるように標準エンドトキシンを添加し、エンドトキシン添加抗毒素検体を上記と同様の希釈系列で作製し測定に用いた。エンドトキシンの測定は、エンドトキシン特異試薬のエンドスペー (生化学工業) によるカインティックー比色法を用い定法 (資料) に従い実施した。エンドトキシン量は、用量および測定値 (mAbs/min) の対数変換値を用いて、平行線定量法により標準エンドトキシンに対する相対値として求め、エンドトキシン単位 (endotoxin unit, EU)/ml で表した。上記試験により得られた成績をもとに、抗毒素へのエンドトキシン試験適用の可能性の検討、これら抗毒素の臨床における発熱性の評価を試みた。

C. 研究結果

1. エンドトキシン試験適用の検討

今回、試験した抗毒素のうち、ヤマカガシ抗毒素、立方クラゲ抗毒素そしてオコゼ抗毒素のエンドトキシン試験により測定されたエンドトキシン添加抗毒素 (添加検体) のエンドトキシン含量は、エンドトキシン無添加抗毒素 (無添加検体) つまり抗毒素中のエンドトキシン含量が差し引かれていない状態で、4 倍希釈液から得られる計算値がそれぞれ 0.313, 0.583, 0.223 EU/ml とエンドトキシン試験に対して強い阻害を示

したため (図 1)、これらの抗毒素中のエンドトキシン含量の測定には 16 倍希釈と 64 倍希釈の測定値を用いて計算した。他の抗毒素についてはエンドトキシン試験に対する阻害作用は認められず、4 倍、16 倍、64 倍希釈すべての測定値を用いて計算が可能であることがわかった (表 1)。

以上の結果から得られた希釈検体の測定値を用いて計算した各々の抗毒素の添加エンドトキシンの回収率を表 1 の添加回収率に示した。立方クラゲ抗毒素、ウミヘビ抗毒素でそれぞれ 59.7%、52.0%と比較的強い反応阻害が認められたが、日本薬局方のエンドトキシン試験に規定された反応干渉因子試験で許容される添加回収率は 50 - 200%であり、今回、試験した抗毒素の回収率はすべてこの範囲内であることから、抗毒素へのエンドトキシン試験の適用は可能であると考えられた。

2. 抗毒素のエンドトキシン含量の評価

抗毒素中のエンドトキシン含量は、表 1 のエンドトキシン無添加検体の結果に示したが、これらの抗毒素には比較的強くエンドトキシン試験を阻害するものが存在したため、各々のエンドトキシン量は、得られた添加回収率を用いて補正した抗毒素中のエンドトキシン含量として評価することとした。

今回、試験した抗毒素中のエンドトキシン含量は、0.027 - 0.264 EU/ml で各抗毒素間で最大約 10 倍の差が認められたが、著しくエンドトキシン含量が高く品質の劣る抗毒素は存在しなかった。ただし、臨床における発熱との関係の評価するには、単位容量当たりのエンドトキシン含量だけではなく治療に用いられる抗毒素の用量を考慮に入れる必要があるため、抗毒素 1 本中の容量と添付文章に記載された治療で用いられる使用量を参考にして、実際の治療で投

与される用量の抗毒素中に含まれるエンドトキシン量を計算した。表2に示したように、実際に治療で使用される抗毒素中に含まれるエンドトキシン量は 0.099 - 111.99EU と非常に広範囲であった。ただしウミヘビ抗毒素を除く抗毒素では 0.099 - 3.168EU といずれも非常に低含量であった。ウミヘビ抗毒素についても、添付文書の記載によると最大 10 アンプルを必要とするケースもあるが、大部分の患者は 3 ないし 4 アンプルの抗毒素が投与されることから、ウミヘビ抗毒素では通常 3.507 - 44.79EU 程度のエンドトキシンを含む抗毒素が投与されると考えられた。

D. 考察

本研究で試験した抗毒素へのエンドトキシン試験適用の可能性については、ヤマカガシ抗毒素、立方クラゲ抗毒素そしてウミヘビ抗毒素の高濃度（4倍希釈）検体でエンドトキシン試験への強い阻害作用が認められた。しかし、これらの抗毒素はいずれも 16倍希釈と 64倍希釈の検体では阻害作用は減弱され、局方エンドトキシン試験に規定されている反応干渉因子試験に示される許容範囲内の添加回収が得られたことから、抗毒素検体の希釈の調整をおこなう等で、今回、試験した8種の抗毒素へのエンドトキシン試験の適用は可能であると考えられた。しかしながら、50%程度の低回収率を示す抗毒素が存在するため、規格値を設定する際にはこのことを考慮に入れた検討が必要である。

今回、エンドトキシン試験により測定された抗毒素中のエンドトキシン含量（添加回収率を用いた補正值 EU/ml）には最大で 10倍程度の差が認められたが、高度にエンドトキシン汚染が認められる抗毒素は存在しなかった。昨年、国内で試験製造され

たヤマカガシ抗毒素はエンドトキシン含量が最も低濃度であった。

また本研究ではこれらのエンドトキシン含量を用いて、臨床でこれら抗毒素が使用された場合の安全性（発熱性）評価の検討をおこなった。エンドトキシンに対する発熱応答は動物種によって差がみられ、ヒトは最も高く、ヒトに大腸菌エンドトキシン（*E. coli* O113株由来）を静脈注射した例では 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 ng/kg のエンドトキシンの投与により、それぞれ 37.3, 38.0, 38.0, 38.4, 38.7℃の発熱が見られ、発熱を起こしうる最少エンドトキシン量は 0.1 - 0.5ng/kg であると予測されている（文献1）。ここで *E. coli* O113株由来エンドトキシンと日局標準エンドトキシンの重量当たりのリムルス活性と発熱活性が同程度であると仮定すると、日局標準エンドトキシンは 6,500EU/μg であることから、発熱を起こす最少エンドトキシン量は 0.65 - 3.25 EU/kg であり、小児（20kg）、成人（60kg）に発熱を起こしうる最少エンドトキシン量はそれぞれ 13.0 - 65.0, 39.0 - 195.0EU と見積もられる。したがって、ウミヘビ抗毒素を除く抗毒素では治療で使用される抗毒素中に含まれるエンドトキシン量が 0.099 - 3.168EU と低値であることから、これらの抗毒素によって発熱がおこる可能性はきわめて低いと考えられた。これに対しウミヘビ抗毒素は、今回試験された抗毒素の中ではエンドトキシン含量が多く治療において用いられる使用量が多いため、投与量によっては発熱を起こしうるエンドトキシン量が含まれていると考えられた。

現在、国内で製造・販売されている抗毒素は生物学的製剤基準により発熱試験が適用されている。しかし、発熱試験は多くのウサギを必要とすること、精度、再現性及び感度の点において問題を含んでいる。ウサギの体温が注射前体温に比べ 0.6℃以上

上昇するものを発熱活性陽性とする、標準エンドトキシンは 20EU/kg で発熱活性陽性を示すとされている（文献2）。抗毒素に適用される発熱試験ではウサギに 3.0ml/kg で投与されることから、発熱試験で陽性を示すエンドトキシン量は 6.7EU/ml となりエンドトキシン試験と比較して感度が著しく劣る。本研究で実施した測定法によるエンドトキシンの検出限界は約 0.005EU/ml であり、16 倍希釈液により検体を測定した場合で約 0.08EU/ml の検出感度が得られる。前述したように、単位容量当たりのエンドトキシン量がたとえ少量であっても、多量の投与を必要とする抗毒素では、治療においては発熱を起こしうるエンドトキシン量となってしまう。したがって、品質管理試験には可能な限り感度に優れた試験法が用いられることが望ましい。

E. 結論

1. 本研究で試験された7種の輸入抗毒素と国内で試験製造されたヤマカガシ抗毒素の品質を保証する試験法の1つとして、再現性および感度等に優れたエンドトキシン試験の適用を検討した。これらの抗毒素中にはエンドトキシン試験に対して強い阻害作用を示すものが認められたが、すべての抗毒素において検体の希釈を調整し測定することで、阻害作用が反応干渉因子試験の許容範囲内となりエンドトキシン試験の適用は可能であると考えられた。

2. 今回、試験した抗毒素中のエンドトキシン含量は 0.027 - 0.264EU/ml と評価され、著しいエンドトキシン汚染が認められた抗毒素は存在しなかった。しかしながら、ウミヘビ抗毒素は治療で用いられる使用量が多く、大量に投与された場合には発熱を起こす可能性があると考えられた。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況考察

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

文献

1. R.J. Elin et al. Properties of Reference *Escherichia coli* Endotoxin and Its Phthalylated Derivative in Humans, *The Journal of Infectious Diseases* 1981; 144 (4): 329-36
2. 藤原博他. エンドトキシン特異的リムルス試薬による血液製剤中のエンドトキシン量の測定とウサギ発熱曲線との関連性, *薬学雑誌* 1990; 110 (5): 332-40

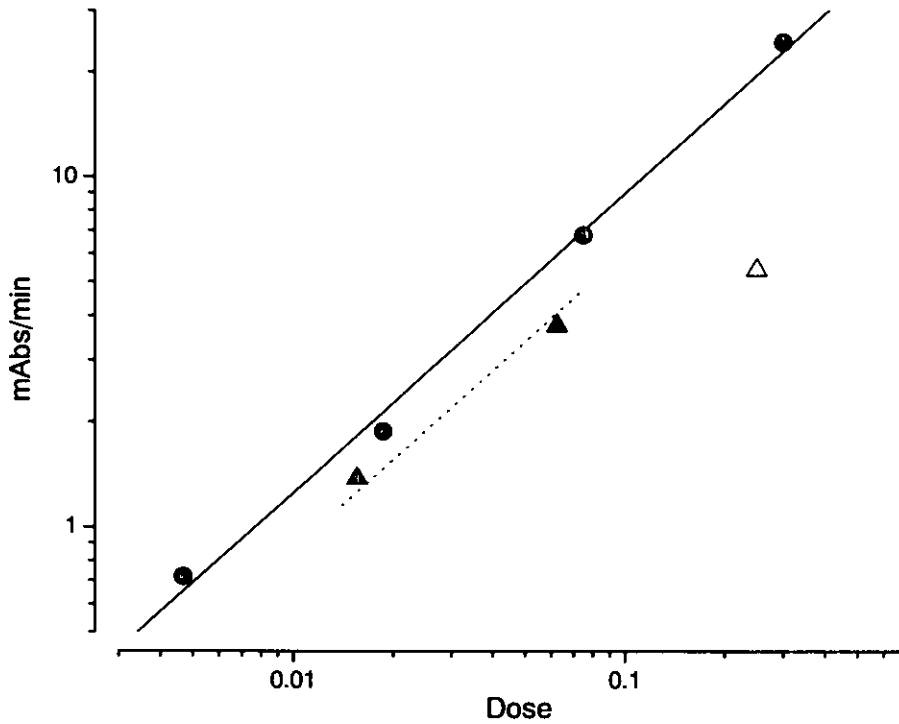


図1 エンドトキシン試験に阻害作用を示す抗毒素例

●:標準エンドトキシン ▲:ウミヘビ抗毒素(64, 16倍希釈)
 △:ウミヘビ抗毒素(4倍希釈)
 ウミヘビ抗毒素には標準エンドトキシンを添加し測定

表1 各種抗毒素のエンドトキシン試験測定結果

抗毒素	エンドトキシン無添加検体†			エンドトキシン添加検体†				添加 回収率	エンドトキシン 含量(補正值)†	
	64倍希釈	16倍希釈	4倍希釈	結果	64倍希釈	16倍希釈	4倍希釈			結果
ヤマカガシ		0.018		0.018	0.751	0.622	0.313 *	0.679	66.1%	0.027
台湾ハブ			0.029	0.029	0.927	0.870	0.807	0.871	84.2%	0.034
まむし			0.078	0.078	0.939	0.978	0.882	0.935	85.7%	0.092
セアカゴケグモ		0.087	0.062	0.071	0.736	0.753	0.894	0.787	71.6%	0.099
立方クラゲ	0.188	0.142		0.158	0.773	0.738	0.583 *	0.755	59.7%	0.264
オコゼ		0.135	0.110	0.120	0.975	1.037	0.885	0.968	84.8%	0.142
ウミヘビ	0.169	0.102		0.121	0.718	0.582	0.223 *	0.641	52.0%	0.234
コブラ			0.020	0.020	0.779	0.748	0.732	0.754	73.4%	0.027

†: 平行線定量法により標準エンドトキシンとの比較から計算された相対値(EU/ml)

*: エンドトキシン試験に強い阻害を示すため計算から除外した値

表2 抗毒素治療で用いられる投与量中に含まれるエンドトキシン量の評価

抗毒素	単位/本	1本の液量 (ml)	使用量 (本)	小児の 使用量	エンドトキシン 含量(EU/ml)*	エンドトキシン量 (EU)†
ヤマカガシ		10	1		0.027	0.266
台湾ハブ	1,000 以上	10	1	倍量	0.034	0.340 - 0.680
まむし	6,000	20	1/3-5/3	同量	0.092	0.610 - 3.052
セアカゴケグモ	500	1.0-1.5	1-3	同量	0.099	0.099 - 0.446
立方クラゲ	20,000	1.5-4	1-3	同量	0.264	0.396 - 3.168
オコゼ	2,000	1.5-3.51‡	1-3	同量	0.142	0.213 - 1.494
ウミヘビ	1,000	15-47.9‡	1-10	同量	0.234	3.507 - 111.987
コブラ		10	2-4		0.027	0.534 - 1.068

*: 表1で算出された抗毒素中のエンドトキシン含量の補正值

†: 治療で用いられる投与量の抗毒素中に含まれるエンドトキシン量

‡: 添付文書に記載された液量より多い液量が含まれていた抗毒素

エンドスペシー® ES-50Mセット トキシカラー® LS-50Mセット トキシカラー DIA-MPセット

エンドトキシン試験法は、グラム陰性菌由来のエンドトキシン (Et) がカプトガニ (*Limulus polyphemus* または *Tachypleus tridentatus* など) の血球抽出成分 LAL (Limulus Amebocyte Lysate) を活性化し、ゲル化を引き起こす反応に基づいています。この反応は逐次的な酵素反応によって起こることから、酵素による合成基質の加水分解により生ずる発色を指標とした比色法が開発されました。

エンドスペシー® ES-50Mセットおよびトキシカラー® LS-50Mセットは、比色法によるエンドトキシン定量のための試薬セットで、カプトガニ血球抽出液 (ライセート) と発色合成基質 (Boc-Leu-Gly-Arg-pNA) を構成成分とした LAL 試薬、LAL 試薬溶解用の緩衝液および蒸留水 (Et, β-グルカンフリー) より構成されています。

エンドスペシー® ES-50Mセットは、偽陽性物質 [(1→3)-β-D-グルカン構造を有するものとして、真菌多糖、セルロース系分離膜の洗浄液等] と反応することなく、エンドトキシンにのみ特異的に反応するように構築されています。

トキシカラー® LS-50Mセットは、エンドトキシンに反応する C 因子系と (1→3)-β-D-グルカンに反応する G 因子系を有しますが、検体中に (1→3)-β-D-グルカン構造を有する偽陽性物質が含まれないことが確認された場合*、偽陽性物質の存在が問題とされない場合は、廉価な本セットの使用をお勧めします。

* (1→3)-β-D-グルカンの測定には弊社のファンギテック® G テスト MK または ファンギテック® G テスト TE の使用を推奨します。

〔特長〕

- ・第13改正日本薬局方エンドトキシン試験法に準拠した測定が可能です。
- ・エンドトキシンの高感度測定ができます。
- ・マイクロプレートを用いたカイネティック-比色法とエンドポイント-比色法のいずれの測定法にも使用できます。
- ・エンドスペシー® ES-50Mセットは、エンドトキシンにのみ特異的に反応します。
- ・多検体測定に便利なマルチタイプ包装となっております。

〔必要な器具〕

Et, β-グルカンフリー器具

器具	推奨器具名
シリンジ	トキシベットデイスベンサーシリンジ
チップ	トキシベットサンプラーチップ
マイクロプレート	トキシベットプレート 96F
アルミ箔	乾熱滅菌アルミ箔

その他の必要器具

器具	推奨器具名
マイクロプレートリーダー	ウエルリーダー SK601
ホットプレート*	ホットプレート CT-961
プレートミキサー*	
試験管ミキサー	

*ウエルリーダー SK601 を使用する場合は必要ありません。

〔セットの内容〕

010152 エンドスペシー® ES-50Mセット*	50回用
③緩衝液	2.8mL×1本
④LAL試薬 (C系ライセート)	1本
⑤蒸留水 (Et, β-グルカンフリー)	2.8mL×1本

*エンドトキシン特異的

010132 トキシカラー® LS-50Mセット	50回用
③緩衝液	2.8mL×1本
④LAL試薬	1本
⑤蒸留水 (Et, β-グルカンフリー)	2.8mL×1本

010140 トキシカラー® DIA-MPセット**	100回用
⑤蒸留水 (Et, β-グルカンフリー) (試薬⑨溶解用)	2.8mL×2本
⑦塩酸溶液 (試薬⑧溶解用)	2.8mL×2本
⑧亜硝酸ナトリウム	1.16mg×2本
⑨スルファミン酸アンモニウム (アミド硫酸アンモニウム)	8.4mg×2本
⑩N-(1-ナフチル)エチレンジアミン二塩酸塩	1.96mg×2本
⑪N-メチル-2-ピロリドン溶液 (試薬⑩溶解用)	2.8mL×2本

**マイクロプレートを用いたエンドポイント-比色法で使用

〔貯法・有効期限〕

貯法：2～8℃遮光保存 (禁・凍結)

有効期限：外箱に記載

〔別売品〕

010055 トキシカラー® Et-1セット

010056 トキシカラー® Et-2セット

〔試薬の調製〕

LAL試薬の調製：

エンドスペシー® ES-50Mセットまたはトキシカラー® LS-50Mセットの④LAL試薬のバイアルに③緩衝液の全量 (2.8mL) をシリンジ (Et, β-グルカンフリー) 等で加え、アルミ箔 (乾熱滅菌済み) で蓋をし、泡立たないように混和溶解します (試験管ミキサーは泡立ちを起こす原因となるので使用しないで下さい)。LAL試薬は使用前に調製し、完全に溶解していることを確認して下さい (通常2～3分間で溶解します。白濁が消え、透明の溶液になります)。

標準液の調製：

トキシカラー® Et-1 (または Et-2) セットの⑥標準品のバイアルに⑤蒸留水 (Et, β-グルカンフリー) の全量 (2.8mL) をシリンジ (Et, β-グルカンフリー) 等で加え、アルミ箔 (Et, β-グルカンフリー) を被せ、アルミ箔に液が触れないよう注意して、試験管ミキサーで少なくとも10秒間激しく撹拌します (使用前に再度激しく撹拌)。

標準液の濃度：

ラベルに表示された数値 (ロットによって異なる) がそのまま標準液の濃度になります。

標準液の保存：

標準液を保存する場合にはアルミ箔(Et, β -グルカンフリー)を被せ、その周りをパラフィルムで封をして2~8℃で保存して下さい。少なくとも2週間は安定です。さらに長期に保存する場合は-20℃以下で保存して下さい。1カ月間安定です。凍結融解の繰り返しは避けて下さい。

第十三改正日本薬局方に基づくエンドトキシン試験には、標準品として、日本薬局方エンドトキシン標準品をご使用下さい。

ブランク：

⑤蒸留水(Et, β -グルカンフリー)をそのままブランクとして使用します。

ジアゾカップリング試薬の調製：

トキシカラー[®]DIA-MPセットの⑧亜硝酸ナトリウムのバイアルに⑦塩酸溶液の全量(2.8mL)を、⑨スルファミン酸アンモニウムのバイアルに⑤蒸留水(Et, β -グルカンフリー)の全量(2.8mL)を、⑩N-(1-ナフチル)エチレンジアミン二塩酸塩のバイアルに⑪N-メチル-2-ピロリドン溶液の全量(2.8mL)を転倒して加え混和溶解させ、⑧液、⑨液、⑩液を調製します。

ジアゾカップリング試薬溶液の保存：

溶解したジアゾカップリング試薬は遮光、2~8℃保存で1週間、-20℃以下の凍結保存で少なくとも1カ月間安定です。

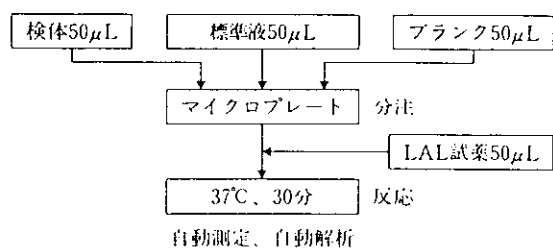
〔予備試験〕

第十三改正日本薬局方エンドトキシン試験法の予備試験(検量線の信頼性の確認および反応干渉因子試験)に関しては、「エンドトキシン試験法Q&A集1997年(生化学工業発行)」をご参考下さい。

〔操作法例〕

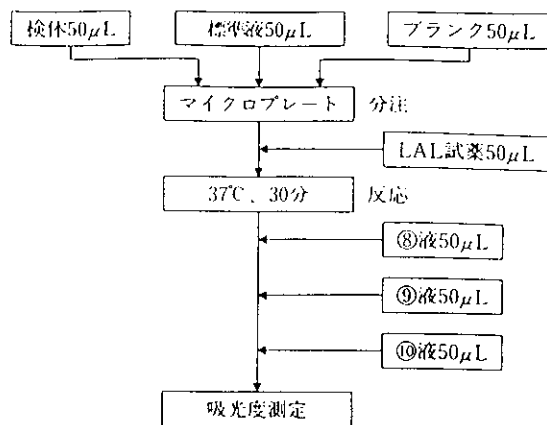
I. マイクロプレートを用いたカイネティック-比色法

1. 検体、標準液(希釈系列)およびブランクのそれぞれ50 μ Lをマイクロプレート(Et, β -グルカンフリー)のウェルにチップ(Et, β -グルカンフリー)等で分注します。
2. 調製したLAL試薬をシリンジ(Et, β -グルカンフリー)等で検体、標準液、ブランクが分注されたウェルにそれぞれ50 μ L加えます。
3. マイクロプレートに蓋を被せ、ウェルリーダーSK601にセットします。攪拌(1分間)後、加温および測定が開始されます(測定波長405nm(対照波長492nm)、37℃、30分間反応での吸光度の経時変化率(mAbs/min)を測定)。



II. マイクロプレートを用いたエンドポイント-比色法

1. 検体、標準液(Et-1標準液希釈系列)およびブランクのそれぞれ50 μ Lをマイクロプレート(Et, β -グルカンフリー)のウェルにチップ(Et, β -グルカンフリー)等で分注します。
2. 調製したLAL試薬をシリンジ(Et, β -グルカンフリー)等で検体、標準液、ブランクが分注されたウェルにそれぞれ50 μ L加えます。
3. マイクロプレートに蓋を被せ、プレートミキサーで攪拌後、ホットプレートCT-961等で37℃、30分間加温します。
4. 加温終了後、トキシカラー-DIA-MPセットより調製した⑧液を各ウェルに50 μ Lずつ添加し、マイクロプレートを1分振とうします。次に、⑨液を各ウェルに50 μ Lずつ添加し、マイクロプレートを1分振とうします。最後に⑩液を各ウェルに50 μ Lずつ添加し、マイクロプレートを1分振とうします。なお、この操作はEt, β -グルカンフリーの必要はありません。
5. ウェルリーダーSK601等にマイクロプレートをセットし、545nm(対照波長630nm)で吸光度を測定します。



〔ブランク値〕

カイネティック-比色法：吸光度変化率 1.0mAbs/min以下
エンドポイント-比色法：吸光度 0.1以下

〔使用上または取り扱い上の注意〕

この添付文書をよく読んでから使用して下さい。

1. 本セットは、すべて研究用または試験用試薬であり、医薬品その他の目的にはご使用になれませんのでご注意ください。
2. 添付文書に記載された使用方法に従って使用して下さい。記載された使用方法、使用目的以外での使用は保証致しかねます。
3. 使用期限を過ぎた試薬は使用しないで下さい。
4. トキシカラー-DIA-MPセットには塩酸溶液(1mol/L)および亜硝酸ナトリウムを使用していますので、取扱に注意して下さい。亜硝酸ナトリウムは消防法等で酸化性物質に指定されています。製品安全データシート(MSDS)を準備しておりますのでご請求下さい。
5. 試薬が誤って目や口に入った場合には、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当等を受けて下さい。
6. 試薬の開封後は、なるべく早く使用し、保存する場合は封をして指定の貯蔵方法で保存して下さい。一度溶解したLAL試薬の保存については品質を保証致しかねます。
7. 容器、付属品等の転用は保証致しかねます。

〔文 献〕

- 1) 宇佐美博幸：昭医会誌, 45 : 789-798, 1985
- 2) Obayashi, T. et al : *Clin. Chim. Acta*, 149 : 55-65, 1985
- 3) Takada, H. et al : *Eur. J. Biochem.*, 175 : 573-580, 1988
- 4) Tanaka, S. & Iwanaga, S. : limulus test for detecting bacterial endotoxins. *Methods in Enzymology*, 223 : 358-364, 1993
- 5) 田中重則, ほか：人工臓器, 23 : 1165-1173, 1994
- 6) 田中重則：透析液エンドトキシンがよくわかる本, 竹沢真喜編, 東京医学社, pp.15-44, 1995
- 7) 森田廣幸, ほか：防菌防微誌, 24 : 467-475, 1996
- 8) 田村弘志, ほか：エンドトキシン測定法の進歩, 第1回日本エンドトキシン研究会事務局, pp.12-18, 1996
- 9) 渡邊真紀, ほか：臨床透析別冊, 12 : 149-158, 1996
- 10) Yamamoto, C. & Kim, S.T. : *Nephrology*, 2 : 429-434, 1996
- 11) 今村公亮, ほか：臨床透析別冊, 12 : 159-164, 1996
- 12) 全成泰編：実践的アプローチ, 透析液水質管理 & オンラインHDF, メディカルレビュー社, pp.30-52, 1996
- 13) 安武山美, ほか：臨床透析, 13 : 759-763, 1997



製造発売元

生化学工業株式会社

〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目1-5
Tel.03-3270-0536 Fax.03-3242-5335

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

抗毒素の安全性に関する研究及び台湾における抗毒素の調査研究

分担研究者 後藤 紀久 国立感染症研究所 安全性研究部

研究要旨

安定供給に向けた国内外の抗毒素製剤の品質管理に関する研究の一環として、今年度は三種の蛇抗毒素製剤に関して、安全性試験としてのウサギ発熱試験とモルモット異常毒性否定試験を実施した。また、国外の抗毒素製造及び品質管理施設として、台湾行政院衛生署疾病管制局と同薬物食品検驗局を訪問し、調査した。

どの製剤も日本の生物学的製剤基準に基づく両試験に適合した。台湾では製造、品質管理、GMP そして生物製剤製造の国から民間への移管の進捗状況等についての調査を行った。

A. 研究目的

海外で製造されている種々の治療用抗毒素（抗毒素製剤）の安全性及び有効性を国内の品質管理基準により評価しておくことは緊急時に治療を目的として、これら抗毒素を輸入し、使用する場合に重要である。

海外から入手した蛇抗毒素（中国まむし抗毒素、台湾はぶ抗毒素）及び厚生科学特別研究事業に於て試験製造されたやまかがし抗毒素について、一般試験法の安全性試験を実施する。更に、台湾での抗毒素事情の調査研究を行う。

B. 研究方法

発熱試験及び異常毒性否定試験に関しては生物学的製剤基準（1993年）一般試験法に準じて、現在、国立感染症研究所で国家検定として行っている方法を用いた。調査研究として

は台北市の行政院衛生署疾病管制局と同薬物食品検驗局を訪問した。

C. 研究結果と考察

中国上海生物制品研究所製造の精製まむし抗毒素血清、台湾行政院衛生署予防医学研究所（現衛生署疾病管制局）製造の台湾はぶ抗毒素血清及び日本国内全域に生息し、かつては無毒蛇とされていたが、咬傷において、消耗性凝固傷害や播種性血管内凝固症候群（DIC）また急性腎不全をも引き起こすことより、国内用備蓄のために試験製造されたやまかがし抗毒素血清（厚生科学研究特別事業：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）について、安全性試験として規定されている発熱試験と異常毒性否定試験を実施した。発熱試験はウサギの耳静脈内に定められた被検体の規定量を接種し、ウサギ

の直腸内体温を経時的に測定し、その結果に基づいて、発熱物質が規定量以上に含まれているか否かを見る試験である。発熱の大部分の原因は内毒素と考えられるが、ウサギや人に発熱性があってもリムルス試験で陽性にならない物質がある故に本試験は欠かせない。異常毒性否定試験は体重約 350g のモルモットを用い、モルモットの腹腔内に被検体を 5 ml 接種し、その後の異常の有無また接種後 1, 2, 3 そして 7 日目の体重が同種製剤接種動物母集団と比較して、 $P=0.01$ のレベルにおいて、統計学的に有意の体重減少を示す製剤か否かを検定する。異常を認めた場合体重測定の他に最終判定には病理組織学的検索をも加味する。本試験ではその製剤に固有でない毒性物質の関与又その製剤に固有な物質であっても、それがこの試験法で検出できる異常反応を示すか否かを調べる。本試験は諸外国での方法より、より厳密である。

その結果、三種の抗毒素検体共に、両試験法で異常を認めず、日本の生物学的製剤基準に適合した(別紙成績を参考)。上記製剤の安全性は、これらの試験でみた限りでは国内の同種製剤に匹敵すると考えられる。尚、試験は国家検定として国立感染症研究所で実施されている方法に従った。

更に、我が国のものと同種製剤を製造そして品質管理している国外の施設を訪問し、製造法、GMP 査察状態、品質管理等に関する実情を調査する必要がある。まずその初めとして、1 月 11 日～13 日に台北市南港区にある台湾の行政院衛生署疾病管制局(Center for Disease Control), 同薬物食品検驗局(National Laboratories of Foods and Drugs)及び台中縣にある国光生物科技股份有限公司(Kuo Kwang

Biotech Corp.)を調査訪問した。

疾病管制局(CDC)は、衛生署の国立検疫所、国立予防医学研究所そして伝染病管制部を統合して 1999 年 7 月 1 日に設立された。CDC は 9 部、7 支局そしてワクチンセンターより成る。局長、他 3 人の副局長が各機能を統括担当している。

今回の訪問目的である抗毒素血清に関しては、CDC では 5 種の毒ヘビ〔タイワンハブ(*Trimeresurus mucrosquamatus*)、アオハブ(*Trimeresurus gramineus*)、タイワンアマガサ(*Bungarus multicinctus multicinctus*)、タイワンコブラ(*Naja naja atra*)、百歩蛇(*Agkistrodon acutus*)〕の内、現在、咬症の 80%を占める 3 種のヘビのウマ抗毒素(神経毒をもつアマガサ、出血毒をもつアオハブと百歩蛇)を主に製造している。製剤は各地の病院や医療センター等に備蓄されている。有効期限は 5 年である。毒蛇咬症の治療費は 4 年前から国家負担となっており、患者の経済的負担はない。

又、破傷風抗毒素(4000IU, 1500IU), そしてジフテリア抗毒素(5000IU)も製造している。破傷風抗毒素に関しては、現在、年間僅かに数例の破傷風の発症とのことである。ジフテリア抗毒素は 1989 年以來ジフテリアの発症例がなく、緊急用の備蓄としての製造である。抗毒素血清を得るための馬への免疫は台中縣にある台中騎馬倶楽部中部馬術訓練センターで行われる。抗毒素血清製造用の馬の飼育管理は全て当センターに移管している。馬及び飼料はアメリカからの輸入である。免疫スケジュールに基づき貧血、感染症を認めない健康馬を使用して免疫する。ポツリヌス抗毒素は、現在は 10 例以下のポツリヌスの発症とのことで、製造はされていない。

実験動物は全て自家繁殖で、マウスは ICR,

BALB そして DDY (現在繁殖中止)、モルモットは Hartley そしてウサギは日本白色種を繁殖している。時間の関係でそれらの施設は見られなかった。

GMP(Good Manufacturing Practice)は 1982 年から開始しているが、なぜか Validation 開始は 1996 年からである。尚、衛生署での GMP 査察官は専任 8 名、非常勤約 20 名である。

衛生署薬物食品検査局(NLFD)は CDC に隣接しており、1978 年 9 月 20 日に創立された。局長 1 名、副局長 1 名で、その監督下に 5 組、3 センター、3 事務所そして 3 地区試験所が存在する。NLFD は食品と医薬品(含、薬品と医療品)の国家検査、医薬品と食品添加物の分析、標準品の供給、各地域の食品、薬品、家庭用品や化粧品関係の査察員の訓練等も行っている。我々の仕事と関係の深い第二組は 3 科に分かれ、生物学的製剤、抗生物質、診断薬等の試験を行っていた。尚、医薬品の申請・承認に関するシステムは日本と同様であった。又、GLP(Good Laboratory Practice)の推進も実施している。

現在、台湾では国(CDC)と台湾唯一の民間メーカーの国光生物科技股份有限公司(KKBC)とで生物学的製剤の製造を行っている。KKBC で製造するようになったのは 1999 年からで、現在は日本脳炎ワクチンを主に製造している。民間への移管に関する法改正に 2 年間を費やし、未だ行政上の手続き等で CDC から KKBC への移管は速やかには進んでおらず、早くてもあと 2~3 年は必要と思う。KKBC は新しい製造、検査施設の建設を準備しているが、台北市から遠距離にあり、技術導入、人材確保は多難であろう。

D. 結論

今年度は蛇抗毒素製剤(毒蛇名:中国マムシ、台湾ハブそして日本ヤマカガシ)について、発熱試験及び異常毒性否定試験を行い、両試験成績に関しては、我が国の現行乾燥まむし抗毒素、乾燥はぶ抗毒素と遜色がないことを確認した。また、台湾衛生署の二局及び今後、製造の中心となる予定の民間生物学的製剤製造所を訪問し、台湾での現状を知ることができた。

E. 研究発表

なし

註: 蛇抗毒素名は生物学的製剤基準に従い蛇名をひらがなで表記した。また、試験報告書の試験品名称は製剤に添付されているラベルに従った。

発熱試験報告書

- ・ 試験品名称：精製抗蝮蛇毒血清
- ・ 製造所：上海生物制品研究所、中国
- ・ 製造番号：981201
- ・ 注射量：3 ml / kg 静注
- ・ ウサギ：日本白色種（北山ラベス）
- ・ 試験日：平成12年10月13日
- ・ 試験実施者：安全性研究部、内藤誠之郎
- ・ 判定：適

試験日 1: 平成12年10月13日 2: 3: 4:

試験 回数	ウサギ		注射量 ml	注射前の 体温	注射後の体温			体温 上昇	体温上昇 合計	備考
	No.	体重			1時間	2時間	3時間			
1	200000001	2517	7.5	39.39	39.35	39.31	39.37	0.00	0.00	
1	200000002	2458	7.4	39.13	38.99	38.92	38.84	0.00		

試験日 1: 平成12年10月12日 2: 3:

試験 回数	ウサギ		予備試験体温			
	No.	体重	1	2	3	4
1	200000001	2513	39.02	38.91	38.84	39.06
1	200000002	2437	38.92	39.08	38.81	38.76

発熱試験報告書

- ・試験品名称：抗台湾はぶ毒血清
- ・製造所：行政院衛生署予防医学研究所、台湾
- ・製造番号：FH008701
- ・注射量：添付の溶解液 10 ml で溶解して 3 ml / kg 静注
- ・ウサギ：日本白色種（北山ラベス）
- ・試験日：平成 12 年 10 月 13 日
- ・試験実施者：安全性研究部、内藤誠之郎
- ・判定：適

試験日 1: 平成12年10月13日 2: 3: 4:

試験回数	ウサギ		注射量 ml	注射前の体温	注射後の体温			体温上昇	体温上昇合計	備考
	No.	体重			1時間	2時間	3時間			
1	200000004	2517	7.5	39.17	39.15	39.22	39.19	0.05	0.11	
1	200000005	2560	7.7	39.58	39.64	39.45	39.54	0.06		

試験日 1: 平成12年10月12日 2: 3:

試験回数	ウサギ		予備試験体温			
	No.	体重	1	2	3	4
1	200000004	2423	39.13	39.21	39.28	39.68
1	200000005	2555	39.63	39.67	39.54	39.48

発熱試験報告書

- ・試験品名称：乾燥やまかがしウマ抗毒素
- ・製造所：国立感染症研究所
- ・製造番号：0001
- ・注射量：大塚蒸留水 10 ml で溶解して 3 ml / kg 静注
- ・ウサギ：日本白色種（北山ラベス）
- ・試験日：平成12年10月13日
- ・試験実施者：安全性研究部、内藤誠之郎
- ・判定：適

試験日 1: 平成12年10月13日 2: 3: 4:

試験回数	ウサギ		注射量 ml	注射前の 体温	注射後の体温			体温 上昇	体温上昇 合計	備考
	No.	体重			1時間	2時間	3時間			
1	200000006	2519	7.6	39.29	39.30	39.18	39.67	0.38	0.39	
1	200000007	2622	7.9	39.18	39.19	39.09	39.16	0.01		

試験日 1: 平成12年10月12日 2: 3:

試験回数	ウサギ		予備試験体温			
	No.	体重	1	2	3	4
1	200000006	2407	39.13	39.16	39.09	39.61
1	200000007	2529	39.16	39.13	39.12	39.40

異常毒性否定試験報告書

- ・試験品名称：精製抗蝮蛇毒血清
- ・製造所：上海生物制品研究所、中国
- ・製造番号：981201
- ・注射量：5ml/匹、腹腔内投与
- ・モルモット：Hartley 種 (SLC)
- ・試験日：平成12年10月16日開始、23日終了
- ・試験実施者：安全性研究部、加藤博史
- ・判定：適

接種年月日 平成12年10月16日

モルモット 番号	接種時 体重	接種後実体重				接種後差体重				所見
		1	2	3	7	1	2	3	7	
200001263	331	341	349	374	396	10	18	43	65	異常なし
200001353	359	365	375	384	431	6	16	25	72	異常なし

異常毒性否定試験報告書

- ・試験品名称：抗台湾はぶ毒血清
- ・製造所：行政院衛生署予防医学研究所、台湾
- ・製造番号：FH008701
- ・注射量：5ml/匹、添付溶解水 10ml に溶解後腹腔内投与
- ・モルモット：Hartley 種 (SLC)
- ・試験日：平成 12 年 10 月 16 日開始、23 日終了
- ・試験実施者：安全性研究部、加藤博史
- ・判定：適

接種年月日 平成12年10月16日

モルモット 番号	接種時 体重	接種後実体重				接種後差体重				所見
		1	2	3	7	1	2	3	7	
200001314	360	362	379	391	433	2	19	31	73	異常なし
200001328	348	349	364	366	401	1	16	18	53	異常なし

異常毒性否定試験報告書

- ・試験品名称：乾燥やまかがしウマ抗毒素
- ・製造所：国立感染症研究所
- ・製造番号：0001
- ・注射量：5ml/匹、大塚蒸留水 10ml に溶解後腹腔内投与
- ・モルモット：Hartley 種 (SLC)
- ・試験日：平成 12 年 10 月 16 日開始、23 日終了
- ・試験実施者：安全性研究部、加藤博史
- ・判定：適

接種年月日 平成12年10月16日

モルモット 番号	接種時 体重	接種後実体重				接種後差体重				所見
		1	2	3	7	1	2	3	7	
200001306	344	351	360	369	407	7	16	25	63	異常なし
200001350	362	370	371	386	421	8	9	24	59	異常なし

HISTORY

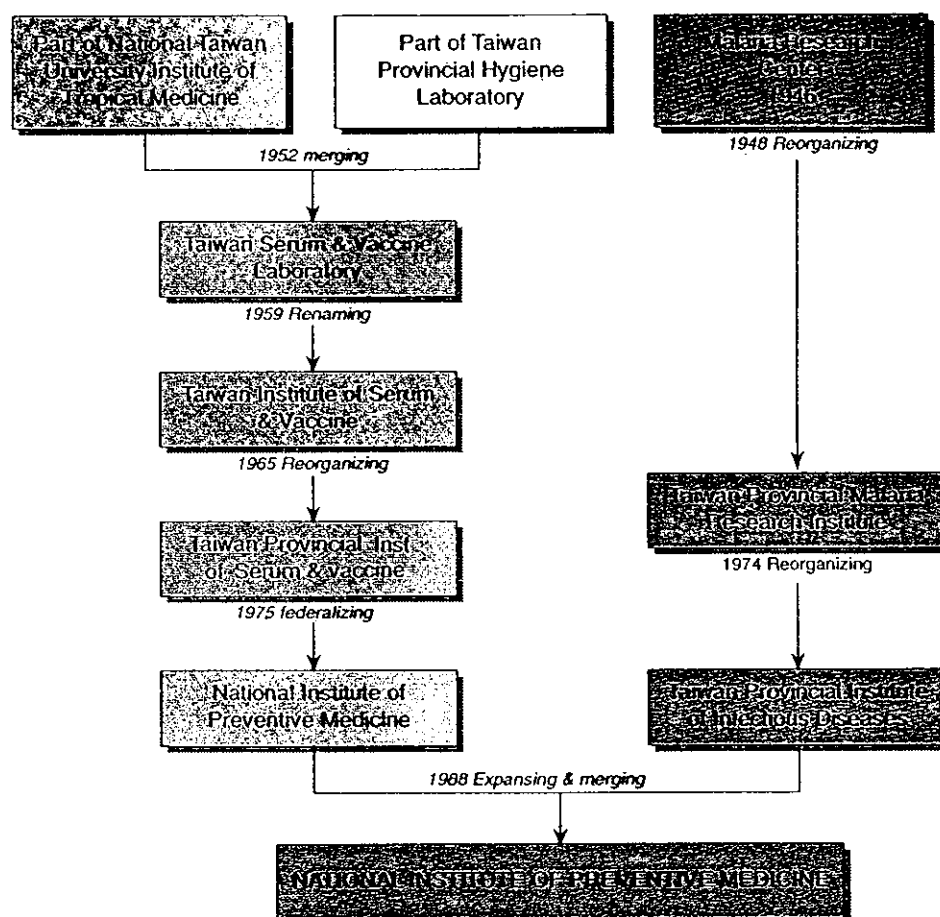
Its year-round sultry weather makes Taiwan, an island located right on the Tropic of Cancer, a hotbed for infectious diseases to spread after outbreaks.

Not long after the Japanese occupation of the island coming to an end in 1945, it was the Tropical Disease Institute of the National Taiwan University and the Provincial Hygiene Laboratory took the lead into producing and dispensing the urgently needed vaccines and serums to the people. Due to lacking in funds and planning, and coupled with the fast increase in population in those days, it hardly took any length of time for the demand, both in quantity and quality, started going beyond what the two outfits could possibly provide, and the implementation of immunization programs being thus significantly hampered. To remedy this situation, the provincial government and NTU signed a three-year lease in 1952 to have the two crews combined together to form the Taiwan Serum and Vaccine Laboratory in Shihlin, Taipei to improve efficiency. The temporary arrangement was kept on with another nine-year agreement after the first term expired in 1955, except the combined facilities were renamed the Taiwan Institute of Serum & Vaccin in 1958 to insinuate the addition of research to their capacity. By the time the second term expired in 1964, it had become quite obvious that such setup was no longer sufficient to meet the challenge. Both parties involved then reached another agreement in 1965. This time they made the institute a permanent installment under the sole authority and the total financial support of the provincial government. Accordingly, its name was changed again to the Taiwan Provincial Institute of Serum & Vaccine. One year later, the Provincial Health Department, with an eye to consolidating its Taipei operations, had a new compound, the Health Building, built in Nankang District, and moved its three subsidiary branches into it. This is how we got the present address.

Another threatening public health problem in the early days was the prevalence of malaria on the island. It is estimated that there were one million two hundred thousand people among a population of mere five to six million at the moment being infected with the disease. The Rockefeller Foundation of the US rendered our government a hand in setting up a Malaria Research Center at Chaochou in South Taiwan. Two years later, the Center was put under the control of the provincial government and renamed the Taiwan Provincial Malaria Research Institute (TAMRI). With the help of WHO, the Joint Commission on Rural Reconstruction (JCRR) and health and civic organizations at all levels, the Institute finally attained its goal: WHO announced in 1965 that Taiwan was certified free of malaria. Having set this



milestone, the Institute, rather than phased out, remained intact for the task of keeping malaria from resetting foot on the island. They also started to shift their energy into other two fields, control of human parasites and study of vector entomology. They became one of the other occupants of the Health Building in Nankang in 1966. It was reorganized eight years after the move and became the Taiwan Provincial Institute of Infectious Diseases.



HISTORICAL DERIVATION OF NIPM

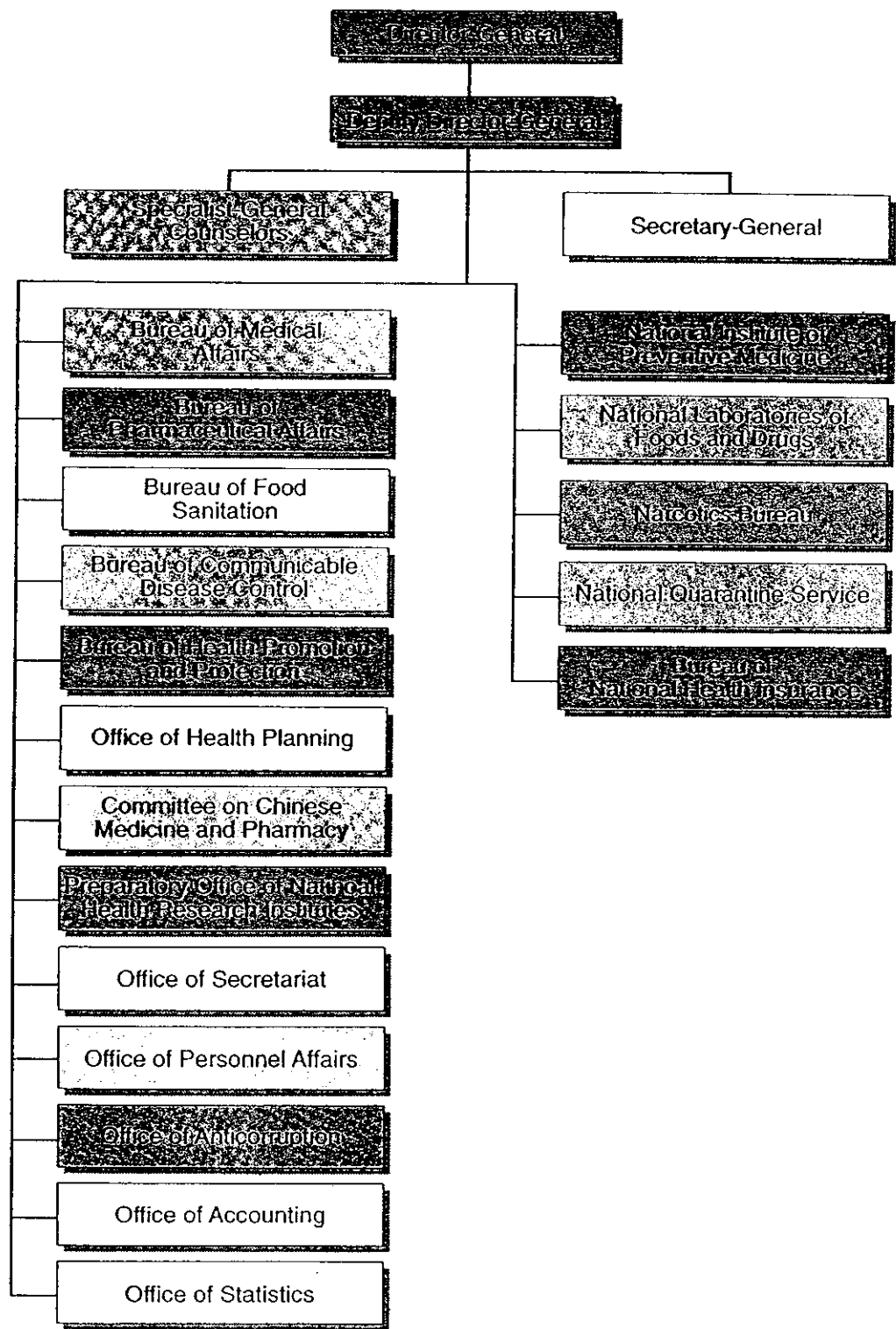
It was undoubtedly a big event when a national Department of Health (DOH) was created in 1971. After the inception of DOH, many former provincial health organizations were one after another changed their affiliation to the new ministry, with the Taiwan Provincial Institute of Serum & Vaccine being no exception. It turned into national in 1975 with the new title the National Institute of Preventive Medicine (NIPM), and reporting directly to DOH. At that time the Institute comprised only six operational units other than its administrative staff. It was not until 1988 that the Executive Yuan ordered a NIPM expansion to merge with its co-tenant of years, the Taiwan Provincial Institute of Infectious Diseases, and thus add three new operational units and a Field Epidemiology Training Program to its wing.



ORGANIZATION

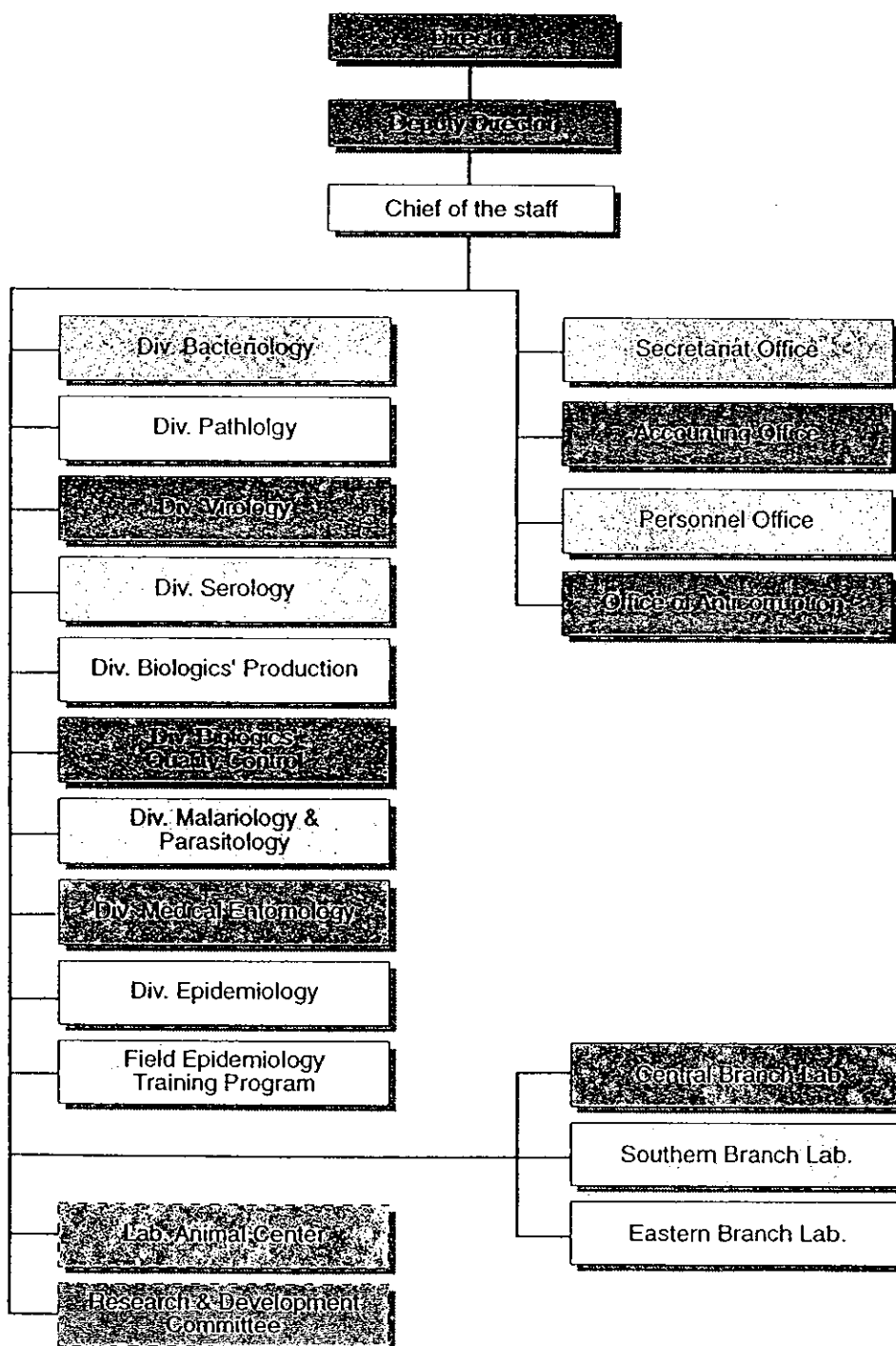
The National Institute of Preventive Medicine (NIPM) is one of the five subordinate agencies of the Department of Health, the Executive Yuan. (figure 1).

FIGURE 1
ORGANIZATION
CHART OF
DEPARTMENT OF
HEALTH





The Institute has twelve technical divisions and four administrative offices as Figure 2 shows. Among these twelve technical divisions, the Laboratory Animal Center and the Research & Development Committee are two task force units. The former is in charge of raising and supplying animals for experiment and the latter, for integrating and supporting research and development work. In addition, there are three laboratories located in the central, southern, and eastern parts of Taiwan and to functioning branches of the Institute.



**FIGURE 2
ORGANIZATION
CHART OF
NATIONAL
INSTITUTE OF
PREVENTIVE
MEDICINE**