

厚生科学研究 研究費補助金

医薬安全総合 研究事業

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

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高橋元秀

平成14 (2002) 年3月

厚生科学研究 研究費補助金 医薬安全総合 研究事業

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班

平成13年度 研究組織

主任研究者 (班長)

高橋 元秀 国立感染症研究所 細菌第二部 第三室長

分担研究者

堀内 善信 国立感染症研究所 細菌第二部 第五室長  
後藤 紀久 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 第四室長  
佐々木 次雄 国立感染症研究所 細菌第二部 第二室長  
大隈 邦夫 (財)化学及血清療法研究所 第一製造部長  
丸山 成和 千葉県血清研究所 製造部長  
桑原 靖 デンカ生研株式会社 生産本部 開発研究部長

研究協力者

岩城 正昭 国立感染症研究所 細菌第二部 第三室  
小宮 貴子 国立感染症研究所 細菌第二部 第三室  
福田 靖 国立感染症研究所 細菌第二部 第三室  
落合 雅樹 国立感染症研究所 細菌第二部 第五室  
山本 明彦 国立感染症研究所 細菌第二部 第五室  
内藤 誠之郎 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 第四室  
加藤 博史 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 第四室  
前山 順一 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 第四室  
新谷 三春 国立感染症研究所 細菌第二部 第二室  
岩城 裕子 国立感染症研究所 細菌第二部 第二室  
堀野 敦子 国立感染症研究所 細菌第二部 第二室  
見理 剛 国立感染症研究所 細菌第二部 第二室  
石田 説而 元国立感染症研究所 安全性研究部  
その他 細菌製剤協会の抗毒素製造担当者

## 目 次

I. 総括研究報告書	頁
班長 高橋 元秀 .....	1
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	
II. 分担研究報告書	
1. 抗毒素の安全性に関する研究 ー発熱物質試験ー	
堀内 善信 .....	1 6
2. 抗毒素の安全性に関する研究 ー異常毒性試験ー	
後藤 紀久 .....	2 4
3. 抗毒素の安全性に関する研究 ー無菌試験ー	
佐々木 次雄 .....	3 6
4. 製造所における品質管理法の比較に関する研究	
大隈 邦夫 .....	5 7
5. 製造所における品質管理法の比較に関する研究	
丸山 成和 .....	6 2
6. 海外抗毒素のデータベース構築に関する研究	
桑原 靖 .....	6 7
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	7 1
IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....	7 2

# 厚生科学研究 研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

## 総括研究報告書

### 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

主任研究者 高橋 元秀 国立感染症研究所

#### 研究要旨

1. ボツリヌス抗毒素は、昨年おこった米国のバイオテロ事件および国内唯一の製造所の廃業という問題が生じたため、国内需給体制の再構築が必要となった。本研究班の調査研究により、中国製のボツリヌス抗毒素は、国内製剤と比較して品質に問題がないことが確認された。しかし、ボツリヌス抗毒素の製剤化までには1年以上の期間を要する。緊急に大量の抗毒素を必要とする場合には海外からの輸入も困難である。製剤化の工程で血清原液、部分精製または最終製剤のどの段階で輸入することが、より高い品質のものが入手可能かについて調査、検討し、時化的に輸入し、試験的に製造し品質管理試験を行う。
2. アジア地区標準まむし抗毒素の製造と評価および標準試験法の確立を目指して、当該製剤を製造・使用している中国、韓国との共同で、アジア地域標準まむし抗毒素を作製し、共通の"ものさし"で品質が確認できるシステム構築のために技術的な共同研究を行う。
3. 国内で緊急対応または枯渇が予想される製剤は、ボツリヌス抗毒素以外に、まむし抗毒素、ガスエソ抗毒素等がある。現在、これら抗毒素の入手先は中国、ロシア、フランス等が候補としてある。相手国の国家検定機関および製造所より、品質管理・試験方法について情報を得ながら、試験の妥当性について輸入できた製剤について品質試験を行う。

#### 分担研究者名

堀内 善信	国立感染症研究所 細菌第二部 第五室室長
後藤 紀久	国立感染症研究所 血液・安全性研 究部 第四室室長
佐々木 次雄	国立感染症研究所 細菌第二部 第二室室長
大隈 邦夫	(財)化学及血清療法研究所 第1製造部長
丸山 成和	千葉県血清研究所 製造部長
桑原 靖	(株)デンカ生研 生産本部 開発研究部長

#### A. 研究目的

毒素性細菌の感染症、海洋生物の刺傷や蛇咬傷の治療には、各毒素に対する特異的抗毒素療法が行われている。海外においても様々な抗毒素製剤が開発製造されており、自国のNational authorityによってその品質は規定されている。抗毒素製剤は治療用医薬品として、一般医薬品と異なり、求められる品質管理手法が異なることも予想される。国内の生物学的基準には採用されていない試験項目、確認試験等が導入されている場合には、それら技術と情報を調査研究することにより国内の品質管理手法の向上を目指すことは国家検定実施機関では必要である。

また、国内では製造していない抗毒素製剤を輸入し治療に用いる場合には、輸入する相手国の品質管理方法や技術を基とした製剤の品質についての情報は不可欠である。しかし、試験法、製剤の品質についての詳細な情報、調査は行われておらず、製剤を用いようとする際の障壁となる。近年、製剤の品質管理試験法の精度管理、適正な試験法等について国際的な協調も進む一方、ある種の製剤については地域特異性を生かして、限定した関連国間での共同研究の推進が求められている。これら製剤に対する地域標準品の制定の手始めとして、本研究班では、まむし抗毒素については日本、中国及び韓国で、統一した試験法で標準化した標品を作製することの必要性について、試験担当者で協議しつつ相互間の認識を取りながら早急に対応し、今後予想されるこれらシステム構築における先駆的な規範としたい。

## B. 研究方法

1. ボツリヌス抗毒素の原液の確保と品質管理試験：ボツリヌス抗毒素は中国製の製剤を輸入し、国内品質管理法に準拠した項目を試験し、さらに中国国家検定機関との情報交換により、国内製剤と比較して品質に問題がないことが確認された。中国の最終製剤の剤型はアンプルであり、国内のバイアルとは異なるために医療現場では取り扱いに問題が予想される。また、ボツリヌス抗毒素の製剤化までには約1ヶ年を要するため、緊急に大量の抗毒素を必要とする場合には、海外からの輸入も困難である。したがって、製剤化の工程で血清原液、部分精製または最終製剤のどの段階で輸入することが、より高い品質のものが入手できるかを適切な品質管理試験法を用いて調査、検

討し、時化的に輸入し、製造を行う。なお、製造工程におけるバリデーション等は、本研究がバイオテロを想定した緊急避難的なものであるが、実際に人に投与する場合も考えられるため、十分GMPに対応したものとして検討することとする。

2. アジア地区標準まむし抗毒素の製造と評価および標準試験法の確立：当該製剤を製造して患者の治療に使用している中国、韓国との共同でアジア地域標準品を作製し、共通の"ものさし"で品質が確認できるシステム構築のために技術的な共同研究を着手した。中国上海生物製剤研究所に製造を委託した"アジア地域まむし抗毒素"は本年度出来上がるために、最終年度に向けて本候補標準品の抗出血価と抗致死価を決定する。力価決定後は、3ヶ国の国家品質管理機関の担当者と協議・配布して品質管理試験に用いることを提唱する。

なお、当該国同士の共通利用を目的として、試験した抗毒素の需要・供給量について、継続的な関係を維持する体制についても協議する。

3. 緊急輸入が予想される抗毒素の品質管理試験：国内で緊急対応または枯渇が予想される製剤は、ボツリヌス抗毒素以外に、まむし抗毒素、ガスエソ抗毒素等がある。現在、これら抗毒素の入手先は中国、ロシア、フランス等が候補としてある。昨年度までと同様に、相手国の国家検定機関および製造所より、品質管理・試験方法について情報を得ながら、試験の妥当性について輸入できた製剤について品質試験する。安全性については、製剤の工程管理上最も初歩的且つ重要である細菌混入の確認ができる発熱物質試験（リム

ルス試験)を行う。また、有効性試験は、各毒素を特異的に精度が良く、且つ感度が高い方法を確認し、試験成績は統計学的解析を十分に行い判断する。

### C. 結果

1. ボツリヌス抗毒素の原液の確保と品質管理試験：本研究班2年間の活動により海外の抗毒素製剤の品質の評価ができたものの中にボツリヌス抗毒素がある。この製剤に関連して、昨年、米国でおこったバイオテロ事件および国内唯一の製造所の廃業という問題が生じたため、国内需給体制の再構築が必要となった。海外の抗毒素製剤の品質管理、需給体制を調査して得た実績を基に、本研究班で得られた成績では中国製のボツリヌス抗毒素の品質は国内製剤に劣らないことが確認できた(別紙1)。緊急対策用として高度に免疫した馬血清または部分精製標品または最終製剤を輸入し、国内の抗毒素を永続的に確保することを目的とし検討した。抗毒素の製造には、さまざまな工程・品質管理試験を実施するために長期間を要する。ボツリヌス毒素によるバイオテロ対策用には可及的速やかに準備する必要があり、製造を依頼する相手側との交渉にも早急な対応が求められるために、本計画の製造にかかわる部分的予算を本年度に追加申請することとした。

具体的には、中国蘭州研究所への委託製造としてボツリヌス抗毒素の製造用の原血清を2年間で完了し、一部は国内で最終製剤として完成させる予定である(別紙2)。今年度はボツリヌスA,B,EおよびF型のおのおのの菌を培養し、毒素を精製後、トキシノイド化と、それらウマ免疫用抗原の品質管理をほぼ終了した。最終製剤は平成14年度内の完成を予定しており、完成後はバイオテロ対応用として備蓄する。

2. アジア地区標準まむし抗毒素の製

造：本研究の推進事業として、今年度「外国の研究機関等への研究委託事業」に、「アジア地区標準まむし抗毒素の製造と品質管理」を申請し、認められたため実施した。日本、韓国および中国のまむし抗毒素製剤の国家品質管理試験を実施している担当者と中国でまむし抗毒素を製造している上海生物制品研究所責任者と協議して、候補品の力価含有量とその試験法を確認した。現在、予定していた力価を含む候補標準品が約4000本製造終了した(別紙3)。最終年度までに3ヶ国の品質試験担当者と確認した標準試験法による標準化試験を実施する。抗毒素の力価測定は、中国国内では抗致死活性しか測定していないが、日本国内の試験と同様に抗出血活性も試験することを確認している。また、得られた成績を統計学的に処理して、力価を求める方法についても共通の手法を用いるために、解析ソフトを完成し提供する予定である。

3. 海外から入手した抗毒素製剤の品質試験：本年度はボツリヌス抗毒素を2ヶ国から入手し、主に力価試験で表示単位を確認したときに双方の試験方法に問題のないことを確認した。中国蘭州生物制品研究所から分与を受けたボツリヌス抗毒素はType A, B, EおよびF型ボツリヌス抗毒素をそれぞれ15本ずつであった。剤型は各アンプル凍結乾燥品として10,000, 5,000, 5,000および5,000IU/アンプルである。中国国内でも最近では製造されておらず、分与された時点で有効期限切れであった。中国国内での試験は、同定試験(力価試験として)、力価試験、無菌試験、異常毒性否定試験、タンパク含量試験、発熱試験、等が合格済みであった。国立感染症研究所で日本国内の生物学的製剤基準に準拠し

た数種の品質試験では、すべて基準を満たした（別紙1）。また、当初予定していたフランス、米国で製造した製剤が入手できなかったが、ブルガリア製（National Center of Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD)）のボツリヌス抗毒素の分与を受けた。本数が限られていたため日本国内では力価試験を実施した結果、製剤の表示単位の力価が確認された。

また、ブルガリアからは同時にガスエソウマ抗毒素（*Clostridium perfringens*, *Clostridium oedematiens* および *Clostridium septicum* antitoxin）と破傷風ウマ抗毒素の分与を受けた。分与本数が限られていたため（各3本）、これら製剤の品質試験は、力価試験についてだけ、来年度実施することを計画している。

海外から入手した抗毒素と国内製造の製剤を較べると、ガラスアンプルの凍結乾燥品または液状品等、国内の生物学的製剤基準に合わない剤型のものも認められた。特に、液状品には防腐剤として0.25%前後のフェノールを含む製剤も見られた。

3. 抗毒素の安全性を確認する新しい試験法として、ウサギ発熱試験にエンドトキシン試験が変わり得るかを実施した。国内外の製剤を試験して得られた成績は、現行法のウサギ発熱試験で得られた結果とほぼ相関し、さらに感度、精度および再現性でも優れていることが確認できた。しかし、ある種の抗毒素製剤を用いて、エンドトキシンの添加・回収試験を実施した結果、リムルス試験に阻害作用を示す物質が含まれていることが伺われた。さらに、複数の抗毒素製剤を試験すると共に条件検討をかさね、さらには物質を特定する事も必要であろう。

5. 国内で製造されているガスエソ抗毒素は、液状品の剤型で国家買上品として用いられている。製造認可承認では液状品ばかりでなく、凍結乾燥品も許可され、生物学的製剤基準にも掲載されている。ウマ抗毒素の製造に関しては、抗原の調整、免疫、血清の精製等、時間と労力を要する。液状品から凍結乾燥品に変わるにより、有効年数が3年から10年に延長するばかりでなく、国家買上品としての事業予算を削減が可能であり、経済的効果も期待できる。

また、まむし抗毒素、ガスエソ抗毒素製剤の使用実績は未確認のものが多いため、使用実績に見合った製造が必要である。本年度、作成したアンケート案をもとに調査を具体化・実施し、抗毒素の適正な製造量および有効な利用方法を確立する。

6. WHO から入手した海外のワクチン、抗毒素製剤に関する情報と国内製剤の情報を整理して使い易いデータベースを進めているが、さらに海外からの緊急対応的な入手に備えて WHO から入手した情報については海外メーカー名等を再調査して、可能な限り新しいデータベースを作成するための作業を進め、来年度までに完成させ、関係機関に配付する予定である。

#### D. 考 察

海外からボツリヌス抗毒素を輸入することは、昨年の米国で発生したバイオテロ事件以来、非常に困難である。特に、最近まで製造していたフランス、米国の製造所では、昨今求められている GMP 対応として適合施設への投資が必要となるなどの問題により、製造中止となっている。

中国蘭州生物制品研究所に依頼したボツリヌス A,B,E および F 型抗毒素製剤

の原料となる高度免疫血清が入手されることにより、その一部は日本国内の製造所で最終製剤化を計り、残りの原液は緊急対策用に備蓄することが可能となる。

アジア地区標準まむし抗毒素の製造は、今年度内に予定していた適正力価を含むような候補標準品を約 4,000 本製造を終了した。最終年度内には、日本、中国および韓国の国家品質（管理）試験室で本年度までに確認している標準試験法（致死、出血活性）による標準化を実施する。標準化終了後は、3ヶ国の国家あるいは地域標準品として、さらに試験方法が統一されることにより、各国で使用するまむし抗毒素製剤の品質が共通の"ものさし"で力価の判定が可能となる。これにより、少なくとも3ヶ国内では、緊急時には品質管理された製剤が輸出入の対応が可能となり、また日本国内の長期的な需給対応にも新しい展開が期待される。

初年度から実施している抗毒素の安全性を確認する新しい試験法としてエンドトキシン試験の生物学的製剤基準への適応を実施している。国内外の抗毒素製剤を試験して得られた成績は、現行法のウサギ発熱試験成績とほぼ相関し、さらに感度、精度および再現性も優れていることが確認できた。しかし、ある種の抗毒素製剤にはリムルス試験に阻害作用を認める因子が含まれるようであり、この点について条件検討をかさねることで、動物試験から試験管内試験への移行が期待される。

現行、ガスエソウマ抗毒素製剤は液状品が製造されているが、生物学的製剤基準および製造認可承認では凍結乾燥品の製造が認められている。ガスエソウマ抗毒素製剤のみならず、ウマ抗毒素製剤の製造には、(1)ウマ免疫用抗原の調整、(2)高い力価のウマ血清を得

ることとそれに要する期間、(3)ウマ血清の精製および品質試験等、最終製剤は経済的にも労力的にも貴重なものである。今回、液状品から乾燥製剤への製造上の問題点と解決策が具体化したことにより、国家買上事業の予算の軽減および製剤の有効利用が可能となる。さらに、これまで全く集計されていなかった抗毒素製剤の使用の実態・現状を調査することにより、適正な使用量に基づく製造計画が策定されることで安定供給が確実なものとなる。

## E. 結 論

1. 国内でバイオテロなどにより大量に必要となり、将来、枯渇が予想されるボツリヌスウマ抗毒素製剤の緊急対応用の原液の製造を開始した（別紙2）。
2. アジア地区の標準まむし抗毒素の候補品として約 4,000 本の製造が終了し、今後、日本、中国および韓国の国家検定機関で標準化試験を実施する（別紙3）。
3. 海外から入手したボツリヌスウマ抗毒素製剤と日本国内で製造した製品は、力価には大きな差は認められなかった。一方、海外の抗毒素製剤は製造工程が異なるものがあり、特に国内製剤には使われないフェノール等を含有し、国内基準に適合しないものも見られた。海外からの輸入に際しては、製剤の品質管理には留意することが示された。
4. エンドトキシン試験は、抗毒素に含まれる恐れのある発熱物質を定量的に測定する方法として、国内生物学的製剤基準への適応の可能性が見いだされた（堀内分担研究者）。
5. 中国蘭州生物制品研究所のボツリヌスウマ抗毒素は、ウサギ発熱試験および異常毒性否定試験の結果、国内基準を満たしていることが確認された。また、ベトナムの製造施設では GMP の導入・適応は、ほぼ終了している状況であった。国家検定機関



については、研究所が移転中であり、その全貌については不明な点が多かった（後藤分担研究者）。

6. 中国蘭州生物制品研究所のボツリヌスウマ抗毒素は、国内基準に準拠した試験の無菌試験成績で適合となった。また、抗毒素の無菌性保証水準は、他の製剤に較べると低いと考えられる。今後、抗毒素製剤の国内備蓄用の政策については、医薬品GMPが施行されている海外の製造所からの輸入も検討することを推奨する（佐々木分担研究者）。

7. ガスエソウマ抗毒素は現在液状品として製造市販されていたが、凍結乾燥品への製剤変更の可能性を見だし、実作業への洗い直しを行った。また、同製剤の使用状況をアンケート調査として情報を収集する作業を開始した（丸山分担研究者）。

8. 蛇毒抗毒素の医療現場での使用実態は明らかでないため、アンケート調査により情報を収集することを企画し、来年度調査を具体化する（大隈分担研究者）。

9. 海外で製造している抗毒素製剤、製造所等をデータベース化するために、WHOに掲載されている情報を整理・再確認作業を実施した（桑原分担研究者）。

## F. 健康危険情報

我が国におけるボツリヌス食中毒発生事例は、例年、数例が報告され、原因食は多数販売の食品あるいは複数が喫食するレストラン等で発生している。また、過去にオウム事件の経験もあり、緊急時に対応可能な抗毒素の備蓄が求められる。なお、ボツリヌス毒素のバイオテロ対策として、警察、自衛隊および研究者等の初動捜査・対応する担当者には、少なくとも人に感受性の高い毒素に対する免疫の付与が必要で、A, B, EおよびF型の多価ボツリヌストキソイドによる予防対策が必要と思われる。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 佐々木次雄：日本薬局方における微生物管理試験法の動向、医薬品研究、32 (6): 453-462, 2001.
- 2) 佐々木次雄、棚元憲一：「ろ過滅菌法」の日局導入に関する研究、医薬品研究、32 (12): 814-819, 2001.
- 3) 佐々木次雄：無菌性保証と第14改正日本薬局方、JAAME News 25 (September): 29-36, 2001.
- 4) 佐々木次雄：無菌試験法、(財)日本公定書協会編 JPTI 2001, p.224-228, 2001.
- 5) 佐々木次雄：最終滅菌医薬品の無菌性保証、(財)日本公定書協会編 JPTI 2001, p.270-271, 2001.
- 6) 佐々木次雄：滅菌法及び無菌操作法、(財)日本公定書協会編 JPTI 2001, p.263, 2001.
- 7) 佐々木次雄：最終滅菌法及び滅菌指標体、第十四改正日本薬局方解説書、廣川書店、p. F37-F60, 2001.
- 8) Masaki Ochiai \*, Akihiko Yamamoto, Michiyo Kataoka, Hiromi Toyoizumi and Yoshinobu Horiuchi Interfering effect of diphtheria-tetanus- acellular pertussis (DTaP) vaccines on the bacterial endotoxin test Biologicals, 29, 55-58, 2001
- 9) Yoshinobu Horiuchi\*, Motohide Takahashi, Toshifumi Konda, Masaki Ochiai, Akihiko Yamamoto, Michiyo Kataoka, Hiromi Toyoizumi and Yoshichika Arakawa Quality control of diphtheria tetanus acellular pertussis combined (DTaP) vaccines in Japan. Jpn J Infect Dis, 54, 167-180, 2001.
- 10) 高橋元秀、他：〈特集〉破傷風 2001年現在、病原微生物検出情報、国立感染症研究所情報センター、23,1, (263) p1-9, 2002.
- 11) 畑中章生、岡本誠、中村朗、大江健二、小宮貴子、岩城正昭、荒川宜親、

高橋元秀：〈情報〉本邦で始めて確認されたコロナウイルスによるジフテリアの症例、病原微生物検出情報、国立感染症研究所情報センター、23,3,(265) p61, 2002.

12) 高橋元秀、荒川宜親：「ジフテリア予防対策マニュアル」について、*Medical Technology*, 29, 6, p630-633, 2001.

13) 高橋元秀：ボツリヌス症、SRL 宝函、25, 4, p323-330, 2001.

## 2. 学会発表

1) 諸熊一則、小堀徳廣、大隈邦夫、福田靖、高橋元秀、内田哲也、村田厚夫、島崎修次、倉田毅：やまかがしウマ抗毒素の試験製造、第5回ワクチン学会、熊本市、2001.10.

2) 高橋元秀、永田典代、須崎百合子、網康至、小宮貴子、福田靖、岩城正昭、内藤誠之郎、荒川宜親、内田哲也：サルにおける VT2 の発症機序と試作ワクチンの発症防止効果、第74回日本細菌学会総会、p321, 2001.4.

## H. 知的所有権の取得状況

なし

## 中国 蘭州生物制品研究所製造 ポツリヌスウマ抗毒素の試験結果(国内基準に準拠した場合)

結果	力価試験 (IU/Amp.)	無菌試験	異常毒性 否定試験	発熱性物質 試験		物理化学的試験		
				ウサギ	(EU/ml) エンドキシン	タンパク含量 濃度(mg/ml)	pH	含湿度 濃度(%)
A型ポツリヌス抗毒素	≥10000	適合	適合	適合	0.017	11.0	6.28	0.7
B型ポツリヌス抗毒素	5000	適合	適合	適合	0.016	8.7	6.36	0.5
E型ポツリヌス抗毒素	≥5000	適合	適合	適合	0.03	16.4	6.72	0.3
F型ポツリヌス抗毒素	≥5000	適合	適合	適合	0.263	17.2	6.69	0.1

**AGREEMENT OF COMMISSION MANUFACTURE  
OF ANTI-BOTULINUM PLASMA (EQUINE)**

By and Between

Lanzhou Institute of Biological Products, Director: Dr. Fen Duoqia, Address:  
178 Yanchang Road, Lanzhou, Gansu, 730046, China (hereafter referred to as  
“LIBP”) and

Department of Bacterial & Blood Products, National Institute of Infectious  
Disease, Chief of Bacterial product III: Motohide Takahashi, PH.D, Address:  
4-7-1, Gakuen, Musashimurayama-shi, Tokyo, Japan (hereafter referred to as  
“DBBP”)

WHEREAS LIBP posses the technology of manufacturing anti-botulinum  
plasma (equine).

WHEREAS DBBP authorized LIBP and LIBP agreed to manufacture  
anti-botulinum plasma (equine) for DBBP.

The parties hereto agree as follows:

1 Definition

1.1 Type of anti-botulinum plasma (equine)

- anti-botulinum plasma, type A;
- anti-botulinum plasma, type B;
- anti-botulinum plasma type E;
- anti-botulinum plasma, type F.

1.2 Production Quantity

Two horses prepared for producing each type of botulinum immunoplasma.  
Full amount plasma donation shall be made after the titer of plasma  
antibody reaches the requirement. At least 20,000ml plasma shall be  
collected from 2 horses for each type.

### 1.3 Animal Quarantine

All the horses for manufacturing anti-Botulinum plasma are horses newly purchased by LIBP and quarantined by Animal Quarantine Station of Gansu Province. The Certification for qualified horses will be issued by Gansu Animal Quarantine Stations and only qualified horses will be used for vaccination.

1.4 The preparation of type A、B、E anti-Botulinum plasma shall follow the China National Requirements for Biological Production. The preparation of type F anti-Botulinum plasma shall follow the way and standard agreed by parties.

### 1.5 Preparation Schedule

#### 1.5.1 Antigen Preparation

Seed culture – Batch cultivation—Clarification—detoxification—Quality control, 3 month; each type need two batch, four types antigen preparation will take 5 month.

#### 1.5.2 Immune horse

3 month will take for immune horse including Preliminary immune and boost immune, four types will take 5 month.

#### 1.5.3 Plasma purification

Each type of plasma will take 1 week for purification from crude plasma to ammonium sulfate four types will take 4 weeks.

Totally, it will cost 9 month for preparation four types of initial purified Botulinum antitoxin. If something happen during preparation unexpected, the schedule will be postponed.



Shanghai Institute of Biological Products

1262 Yan An Road(w), Shanghai 200052, PRC  
Tel: (8621) 6280-5234 Fax: (8621) 6280-1807

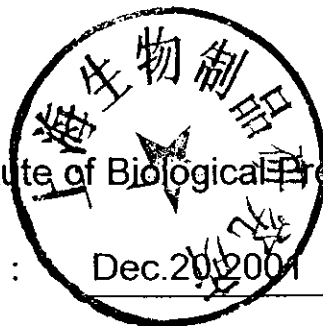
## Independent Test Reports

Manufacturer		Shanghai Institute of Biological Products, China	
Address		1262, Yan An Road (W), Shanghai, China	
Name of Product		Standard Agkistrodon halys Antivenom	
Batch No.		Lot 011201	
No.	Test Items	Results	
1	pH	6.9	
3	Sterility Test	PASS	
4	Safety Test	PASS	
5	Pyrogen Test	PASS	
6	Anti-Lethal Activity Test *	2900 U /Vial	
7	Anti-hemorrhagic Activity Test *	3100 U /Vial	

Store at  $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 

Shanghai Institute of Biological Products

Date of Report : Dec. 20, 2001



## Standardization of Chinese Agkistrodon Halys Antivenom

**Purpose:** Use Japanese Standard to standardize the anti-lethal & anti-hemorrhagic titer of Chinese Agkistrodon Halys Antivenom

**Material:**

1. Japanese Standard (JS): provided by National Institute of Infectious Diseases

Including: Standard lethal venom: 530 TD / Amp. Lot No.: Lot-3-2  
Standard hemorrhagic venom: 1200 TD / Amp. Lot No.: Lot-3-2  
Standard antivenom: Batch No.: (Lot C-48)  
Anti-lethal titer– 2100 U/vial.  
Anti-hemorrhagic titer– 3300 U/vial.

2. Test sample: Purified Agkistrodon halys antivenom (Lot No. 011201), prepared by SIBP.
3. Diluent: 0.017M phosphate buffer solution containing 0.2% gelatin (pH7.0)
4. Experiment animals

- Mice: Healthy, albino mice, Kunming strain, weighing 15~16g
- Rabbit: Select healthy rabbit, weighing around 2500g, whose fur can be clipped closely and whose skin is free from mechanical irritation or trauma.

All animals are supplied by Animal Center of SIBP, which has the qualification as national animal center, and with the certificate issued by national authority.

## I Anti-lethal titer test

### 1.1 Anti-lethal titer tested by Japanese Standard

#### 1.1.1 Test method

- Dissolve JS antivenom (Anti-lethal titer 2100 U / Amp) with diluent to make 200 U/ml, then make a serial dilution, each ml containing 63U, 80U, 100U, 125U and 160U, respectively (hereafter referred to as "standard dilution"), as shown Table 1.
- Similarly, series of five dilutions shall be made with the test sample (hereafter referred to as "test dilution").
- Dissolve JS-lethal venom ( Lethal venom 530 TD / Amp) with diluent to 10 Test Dose per ml (10TD/ml)(hereafter referred to as "venom dilution").
- A volume (1.0ml) shall be taken accurately from each of standard and test dilutions, added with an equal volume of venom dilution and mixed well. Each mixture shall be kept standing at 37°C for 1 hour.
- Inject 0.2ml (i.m.) of mixture into 4 mice. The animals shall be observed for 48 hours (2 days) after the injection.

Table 1. Preparation of "standard dilution" and "test dilution"

Group	Dilution of antivenom (ml)		Diluted JS lethal-Venom (10TD/ml)	Mice in group	Dose per mice (ml)
	JS antivenom (200 U/ml) Or pre-diluted test sample( ml )	Diluent (ml)			
1	0.32	0.68	1.0	4	0.2
2	0.40	0.60	1.0	4	0.2
3	0.50	0.50	1.0	4	0.2
4	0.63	0.37	1.0	4	0.2
5	0.80	0.20	1.0	4	0.2

- Test the anti-lethal titer of the sample for three groups, each group test 10 times, totally test 30 times.
- Test the anti-hemorrhagic titer of the sample for three groups, each group test 10 times, totally test 30 times.

#### 1.1.2 Test results of anti-lethal titer

Table 2. Test of Japanese Standard—Anti-lethal test result of Standard

Group	Anti-lethal titer per ml Zi	Lg Zi Xi	Mice tested	Actual No.		Accumulated No.		Alive ratio P
				Live Ri	Dead (N-Ri)	Live Si	Dead Si*	
1	64 U	1.8	4	0	4	0	11	0/11=0.00
2	80 U	1.9	4	1	3	1	7	1/8 =0.125
3	100 U	2.0	4	1	3	2	4	2/6 =0.333
4	125 U	2.1	4	3	1	5	1	5/6 =0.833
5	160 U	2.2	4	4	0	9	0	9/9 =1.00



## II Anti-hemorrhagic titer test

### 2.1 Test method

- The JS-antivenom shall be diluted to 20U/ml, then diluted to five levels that 1ml of each dilution contains 6.3, 8.0, 10.0, 12.5 or 16.0 units (hereafter referred to as "standard dilution").
- Similarly, series of five dilutions shall be made with the test sample (hereafter referred to as "test dilution"), as shown in Table 1.
- JS-Hemorrhagic venom shall be diluted as to contain 10 test dose per ml (hereafter referred to as "venom dilution")
- A volume of 1ml shall be taken accurately from each of standard and test dilutions, added with an equal volume of venom dilution and mixed well. Each mixture shall be kept at 37°C standing for 1 hour.
- Each mixture shall be injected intracutaneously at a dose of 0.2ml into 2 rabbits weighing about 2500g. At least two injections at different sites shall be made with each mixture. Animals shall be killed by protracted narcosis 24 hours after injection and striped off the skin. The cross-diameters of hemorrhagic spots shall be measured from the inner side of the skin.

### 2.2 Test results of test group(1)

Table 35. Anti-hemo titer of test sample (1) tested by Japanese Standard

Group	Antivenom dilution (ml)			JS venom dilution (10TD/ml)	Hemorrhagic spots (mm)		ED <sub>10mm</sub>
		Antivenom	Diluent		Rabbit 1	Rabbit 2	
1	JS Antivenom (20U/ml)	0.32	0.68	1.0	10x11	10x11	0.4
2		0.40	0.60	1.0	10x10	10x10	
3		0.50	0.50	1.0	10 x 9	10 x 9	
4		0.63	0.37	1.0	8 x 8	8 x 9	
5		0.80	0.20	1.0	5 x 6	5 x 6	
1	Test Sample(1) (150 X dilution)	0.32	0.68	1.0	10x11	10x10	0.4
2		0.40	0.60	1.0	10x10	10x10	
3		0.50	0.50	1.0	7x10	9x10	
4		0.63	0.37	1.0	5 x 6	5x6	
5		0.80	0.20	1.0	—	—	

### III. Data statistics

Table 50. Test results statistics of the test sample

Test times	Anti-lethal titer (U / ml)			Anti-hemorrhagic titer (U / ml)		
	Sample(1)	Sample(2)	Sample(3)	Sample(1)	Sample(2)	Sample(3)
1	3000	2868	2868	3000	3000	3000
2	2868	3007	2736	3000	3000	3000
3	3144	2868	2496	3000	3000	3000
4	2868	2736	3144	3000	3000	3000
5	3144	3007	3144	3000	3000	3000
6	3000	2736	3144	3000	3000	3000
7	2868	3007	3144	3000	3750	3000
8	2868	3007	2862	3000	3750	3000
9	2868	3007	2862	3000	3000	3750
10	3144	2736	3144	3000	3000	3750
$\bar{X}$	$\bar{X}_1=2977\pm120$	$\bar{X}_2=2898\pm118$	$\bar{X}_3=2956\pm214$	$\bar{X}_1=3000\pm000$	$\bar{X}_2=3150\pm300$	$\bar{X}_3=3150\pm300$
CV	CV <sub>1</sub> =4.0%	CV <sub>2</sub> =4.0%	CV <sub>3</sub> =7.2%	CV <sub>1</sub> =0.0%	CV <sub>2</sub> =9.5%	CV <sub>3</sub> =9.5%

### Test result:

Table 51. Test result

	Anti-lethal titer	Anti-hemorrhagic titer
$\bar{X}$	$\bar{X}=2945\pm165$ U/ml	$\bar{X}=3100\pm255$ U/ml
CV	CV=5.6%	CV=8.2%

## 厚生科学研究費補助金（厚生科学特別 研究事業）

### 分担研究報告書

#### 抗毒素の安全性に関する研究 ―発熱試験―

（リムルス試験、安全性評価系の確立）

分担研究者 堀内善信 国立感染症研究所 安全性研究部

研究協力者 落合雅樹 国立感染症研究所 安全性研究部

山本明彦 国立感染症研究所 安全性研究部

片岡紀代 国立感染症研究所 安全性研究部

豊泉裕美 国立感染症研究所 安全性研究部

#### 研究要旨

国外で製造された輸入ボツリヌス抗毒素製剤および国内で製造されたボツリヌス抗毒素製剤の安全性（発熱）を保証するために、感度、精度および再現性にすぐれたエンドトキシン試験による測定が可能であるか検討した。一部の抗毒素製剤においてリムルス試験に強い阻害作用を認めたが、大部分の製剤において問題なくエンドトキシン試験の適用が可能であると考えられた。リムルス試験に強い阻害を示した製剤においても、一定の条件下でエンドトキシン試験の適用が可能であると考えられた。またこれらの製剤中には、顕著なエンドトキシン汚染は認められなかったものの、一部の輸入製剤に、国内製剤にくらべ高いエンドトキシン含量を示すものが認められた。また抗毒素製剤は製剤の性格上、治療の場において大量に投与されるケースがあり、製剤中のエンドトキシン量を評価するには、臨床で使用される用量を考慮に入れることが重要である。

#### A. 研究目的

国内で製造されている抗毒素は、生物学的製剤基準により製剤の安全性を保証する試験の1つとして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あるいは精度及び再現性などの点で多くの問題を含んでいる。そこで昨年引き続き、国外で製造された輸入ボツ

リヌス抗毒素製剤の安全性を確認するため、ボツリヌス抗毒素製剤へのエンドトキシン試験適用の可能性検討および国内外で製造されたボツリヌス抗毒素製剤のエンドトキシン含量の比較を試みた。

#### B. 研究方法

生物学的製剤基準に準じてエンドトキシ

ン試験を実施した。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) で溶解し用いた。カイネティック比色法 (エンドスペシー, (株) 生化学工業) では 0.3, 0.075, 0.01875 および 0.0046875 EU/mL となるように、またカイネティック比濁法では 5, 1.25, 0.3125, 0.078125 および 0.01953125 EU/mL の 4 倍希釈系列となるように標準エンドトキシンを希釈し測定に用いた。抗毒素検体は各々注射用蒸留水で 4 倍, 16 倍および 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。エンドトキシン量は、カイネティック比色法では用量および測定値 (mAbs/min) の対数変換値を用いて、カイネティック比濁法においては用量の対数変換値と測定値 (min) の二重対数変換値を用いて、それぞれ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 として表した。必要に応じて、抗毒素検体の希釈倍数および添加エンドトキシン量は変更し試験を行った。

## C. 研究結果

### 1. エンドトキシン試験適用の検討

昨年と同様にカイネティック比色法を用いて各ボツリヌス抗毒素製剤を試験したところ、大部分のボツリヌス抗毒素製剤はエンドトキシン試験への反応干渉作用は認められなかったが、中国製の E 型抗毒素で添加エンドトキシン回収率が約 45-50%、F

型の抗毒素で約 25-30% とエンドトキシン試験を強く阻害した (表 1)。またこれらの検体は図 1 (a) で示されるように、4 倍から 64 倍の希釈倍率の間では、希釈による阻害作用の抑制は認められなかった。そこでカイネティック比濁法を用いて試験を行ったところ、表 2 に示されるようにカイネティック比色法と同様、中国製の E 型と F 型の抗毒素がエンドトキシンに強い阻害作用を示した。しかしながらカイネティック比濁法では、表 1 および図 1 (b) で示されるように希釈倍率を 16 倍以上にあげることで、これらの製剤によるエンドトキシン試験への阻害作用を十分に取り除くことが可能であった。

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% であるため、カイネティック比色法でこの範囲内に反応阻害を抑えられる抗毒素製剤の希釈倍率を調べるために、中国製の E 型および F 型抗毒素検体を各々注射用蒸留水で 5 倍, 20 倍, 80 倍, 320 倍, 1280 倍および 5120 倍の希釈系列を作製し測定に用いた。また各希釈検体にはエンドトキシン濃度が、各希釈液で換算した場合に 0.25 EU/mL となるように標準エンドトキシンを添加し試験した。表 3 に示すように、E 型抗毒素では 320 倍以上、F 型抗毒素では 5120 倍以上の希釈により、添加したエンドトキシンの LAL 活性の回収率が 50% 以上となった。しかしカイネティック比色法で用いた LAL 試薬の検出感度限界を 0.003 EU/mL と仮定すると、320 倍および 5120 倍希釈検体の検出限界値はそれぞれ 0.96 EU/mL、15.36 EU/mL と評価された。これに、それぞれの希釈倍率で得られた抗毒素製剤中のエンドトキシン添加回収率を考慮に入れて真の検出限界値を補正した場合、E 型抗毒素では 1.805 EU/mL、F 型抗毒素では 23.03 EU/mL と推定された。この