場合、E型抗毒素で発熱試験と同程度の感度、F型抗毒素では発熱試験より感度が劣ることが明らかになった。

しかしながら、これらの検体は、広い希釈範囲でエンドトキシンの LAL 活性に対し、ほぼ一定の阻害作用を示すことから、図1(a)に示されるように標準エンドトキシンの検量線との間に平行性が認められ、平行線定量法を用いて高精度の解析が可能であった。したがってこれら検体をカイネティック比色法で試験する場合は、表1に示したように添加回収率を用いて製剤中のエンドトキシン含量を補正し評価することで、希釈倍率を抑え、高感度かつ高精度なエンドトキシン試験の測定が可能となると考えられた。また、この評価法により得られた抗毒素製剤中のエンドトキシン含量は、カイネティック比色法およびカイネティック比濁法の測定法の違いによる有意な差は認められず同等の結果が得られた。

2．抗毒素中のエンドトキシン量の評価

エンドトキシン試験により測定されたボツリヌス抗毒素製剤中のエンドトキシン量は、表1および表2のエンドトキシン無添加検体の結果に示した。しかしこれらの抗毒素製剤には、エンドトキシン試験に強い阻害作用を示すものが存在するため、試験で測定されたエンドトキシン量を添加回収率を用いて補正した値を製剤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、試験したボツリヌス抗毒素製剤中のエンドトキシン含量は、カイネティック比色法で 0.019 − 1.024 EU/mL、カイネティック比濁法で 0.018 − 0.807 EU/mL であり各測定法の間に有意な差は認められなかった。

中国製のA型およびB型のボツリヌス抗毒素製剤には、エンドトキシンの混入が認められなかった。これに対しE型の抗毒素製剤では、アンプル間でエンドトキシン含量の差が認められた。また、F型の抗毒素は、今回試験した製剤中でもっとも高いエンドトキシン含量（約1 EU/mL）であった。

国内で製造されたボツリヌス抗毒素製剤では、A，B，EおよびF型の多価抗毒素製剤中にはエンドトキシンの混入は認められず、E型の抗毒素中に約 0.2 EU/mL のエンドトキシンが検出された。

## D．考察

本研究で試験した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は、中国製のE型およびF型抗毒素製剤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、カイネティック比濁法では16倍希釈および64倍希釈の検体で十分に阻害作用が減弱され、エンドトキシン試験の適用は可能であると考えられた。一方、カイネティック比色法では、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を得るには、E型抗毒素では320倍以上、F型抗毒素では5120倍以上の希釈が必要であり、この希釈倍率で検出しうるエンドトキシン限界値はそれぞれ 1.805 EU/mL、23.03 EU/mL と評価された。この場合、エンドトキシン試験で検出できる感度は、E型抗毒素では発熱試験と同程度、F型抗毒素ではむしろ発熱試験よりエンドトキシン検出感度が劣る結果となった。しかしながら、これらの抗毒素製剤は、広い希釈範囲でエンドトキシン試験に対して一様な阻害作用を示すため、標準エンドトキシンの検量線との間に平行性が認められ、平行線定量法を用いて高精度の解析が可能であった。したがって中国製のE型およびF型抗毒素のように、希釈によってエンドトキシン試験

に対する阻害作用を取り除くことが難しい検体では、添加回収率を用いて製剤中のエンドトキシン含量を補正し評価することで、希釈倍率を抑え高感度かつ高精度なエンドトキシン試験の適用が可能となると考えられた。また、このようにして求められた各抗毒素製剤中のエンドトキシン含量は、測定法の違いによる有意な差も認められず同等の結果を得ることができた。

今回、試験をする事のできた抗毒素製剤は各々1ロットと限りがあるものの、今回試験した中国製および国内製造品のボツリヌス抗毒素製剤には著しくエンドトキシン含量が高く品質の劣る抗毒素は認められなかった。しかしながら、中国製のF型抗毒素製剤でやや高いエンドトキシンの混入が認められた。また、中国製のE型抗毒素製剤のアンプル間でエンドトキシン含量の差が認められた。

昨年の報告でも考察したように、抗毒素製剤が臨床で用いられる場合、大量に患者に投与されることがある。この場合、著しいエンドトキシンの混入が認められなかった製剤でも、発熱を十分に起こしうるエンドトキシン量が投与されてしまう場合がありうる。したがって、製剤中のエンドトキシン量を評価する品質管理試験には可能な限り感度に優れた試験法を用ることが望ましい。

## E．結論

1．本研究で試験した中国製および国内製造のボツリヌス抗毒素製剤には、エンドトキシン試験に対して強う阻害作用を示す製剤が認められた。しかし検体の希釈倍率を高くする、あるいはエンドトキシンの添加回収率を考慮に入れて製剤中のエンドトキシン量を評価することで、これらの製剤へのエンドトキシン試験による測定は可能であると考えられた。

2．カイネティック比色法およびカイネティック比濁法を用いて抗毒素製剤を試験した場合、今回試験したボツリヌス抗毒素製剤では、測定法の違いによる有意な差は認められなかった。また、これらの抗毒素製剤中のエンドトキシン量は約 0.02 － 1 EU/mL と評価され、中国製の抗毒素製剤でやや高い値を示した製剤が認められたが、著しくエンドトキシン汚染した製剤は存在しなかった。しかし抗毒素製剤は治療で大量に投与される場合があるため、製剤中のエンドトキシン量を評価するには、エンドトキシン試験のように感度のよい試験法を用いて行われることが望ましい。

## 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

表1　ボツリヌス抗毒素製剤のエンドトキシン試験結果（カイネティック比色法）

| 型 | エンドトキシン無添加検体（EU/mL） | | | | エンドトキシン添加検体（EU/mL） | | | | 添加回収率 | エンドトキシン |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 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 | （%） | 含量（EU/mL）† |
| 中国製 | | | | | | | | | | |
| A型 | | | 0.016 | 0.016 | 0.782 | 0.844 | 0.961 | 0.853 | 83.7 | 0.019 |
| B型 | | | 0.016 | 0.016 | 0.752 | 0.804 | 0.844 | 0.796 | 78.0 | 0.021 |
| E型 ‡ | | | 0.030 | 0.030 | 0.496 | 0.456 | 0.477 | 0.475 | 44.5 | 0.067 |
| | 0.199 | 0.126 | 0.147 | 0.148 | 0.553 | 0.595 | 0.602 | 0.583 | 43.5 | 0.340 |
| F型 ‡ | 0.287 | 0.232 | 0.272 | 0.261 | 0.513 | 0.490 | 0.545 | 0.516 | 25.5 | 1.024 |
| | 0.326 | 0.263 | 0.346 | 0.311 | 0.581 | 0.607 | 0.691 | 0.624 | 31.3 | 0.994 |
| 国内製 | | | | | | | | | | |
| A,B,E,F混合型 | | | 0.009 | 0.009 | 1.021 | 0.864 | 0.775 | 0.891 | 88.2 | 0.010 |
| E型 | 0.214 | 0.125 | 0.190 | 0.165 | 0.920 | 1.170 | 1.249 | 1.083 | 91.8 | 0.180 |

†：エンドトキシン未添加検体の結果を添加回収率により補正したエンドトキシン推定含量

‡：E型およびF型抗毒素は2アンプルについて試験した

表2　ボツリヌス抗毒素製剤のエンドトキシン試験結果（カイネティック比濁法）

| 型 | エンドトキシン無添加検体（EU/mL） | | | | エンドトキシン添加検体（EU/mL） | | | | 添加回収率 | エンドトキシン |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 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 | （%） | 含量（EU/mL）† |
| 中国製 | | | | | | | | | | |
| A型 | | | 0.018 | 0.018 | 0.734 | 1.111 | 1.227 | 1.050 | 103.2 | ＜0.018 |
| B型 | | | 0.018 | 0.018 | 0.722 | 0.976 | 0.914 | 0.885 | 86.7 | ＜0.021 |
| E型‡ | | | 0.040 | 0.040 | 0.633 | 0.799 | 0.694 | 0.713 | 67.3 | 0.059 |
| | | 0.201 | 0.163 | 0.171 | 0.851 | 0.928 | 0.704 | 0.805 | 63.4 | 0.270 |
| F型‡ | 0.351 | 0.328 | | 0.365 | 1.084 | 1.055 | 0.795 * | 1.067 | 70.2 | 0.520 |
| | | 0.480 | | 0.480 | 1.125 | 1.040 | 0.843 * | 1.075 | 59.5 | 0.807 |
| 国内製 | | | | | | | | | | |
| A,B,E,F混合型 | | | 0.042 | 0.042 | 0.903 | 1.173 | 0.870 | 0.969 | 92.7 | ＜0.045 |
| E型 | | 0.235 | 0.208 | 0.219 | 1.151 | 1.248 | 0.990 | 1.109 | 89.0 | 0.246 |

†:エンドトキシン未添加検体の結果を添加回収率により補正（添加回収率が100%未満の検体のみ）したエンドトキシン推定含量

‡:E型およびF型抗毒素は2アンプルについて試験した

*:試験に強い阻害を示したため計算から除去した値

表3　エンドトキシン試験に強い阻害作用を示した中国製ボツリヌス抗毒素製剤の添加回収

| 希釈倍率 | E型 | 検出限界推定値 | F型 | 検出限界推定値 |
|---|---|---|---|---|
| | 添加回収率(%)＊ | (EU/mL)† | 添加回収率(%)＊ | (EU/mL)† |
| 5 | — | — | 28.0 | 0.054 |
| 20 | 47.8 | 0.126 | 31.0 | 0.194 |
| 80 | 48.8 | 0.492 | 32.3 | 0.743 |
| 320 | 53.2 | 1.805 | 33.0 | 2.909 |
| 1280 | 68.5 | 5.606 | 42.3 | 9.078 |
| 5120 | 75.2 | 20.426 | 66.7 | 23.028 |

＊:製剤の各希釈液で換算した場合に各々0.25EU/mL となるように、標準エンドトキシンを添加

†:カイネティック比色法で使用されたのLAL試薬の検出限界を 0.003EU/mL として評価し、添加回収率を乗じた値

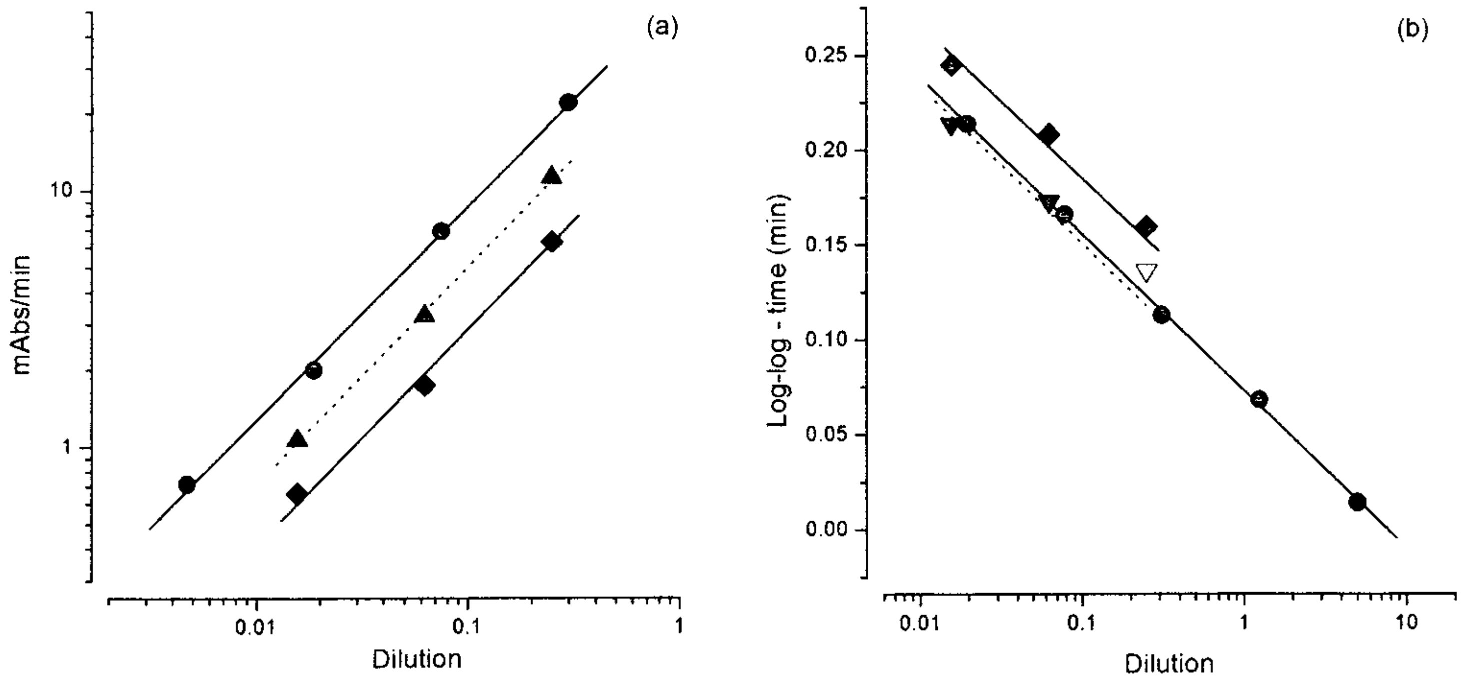


図1. エンドトキシン試験に強い阻害作用を示した中国製F型ボツリヌス抗毒素製剤　(a) カイネティック比色法　(b) カイネティック比濁法

—●—：エンドトキシン標準品　—◆—：ボツリヌス抗毒素（エンドトキシン無添加）　---▼---：ボツリヌス抗毒素（エンドトキシン添加）

▽　：ボツリヌス抗毒素（エンドトキシン添加、4倍希釈検体）計算から除去した値

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ベトナムにおける生物学的製剤 GMP 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、本年度は中国蘭州生物製品研究所製造の精製乾燥ボツリヌスウマ抗毒素（A, B, E, F 各型）に関して、日本の生物学的製剤基準一般試験法に定められた発熱試験と異常毒性否定試験への適合性を評価した。また、国外の品質管理施設及び抗毒素製剤製造所として、ベトナム・ハノイの National Center for Quality Control of Medicobiological Products (CENCOBI)とニャーチャンにある National Institute of Vaccines and Biological Substances (IVAC)の二ヶ所を訪問し、ベトナムの GMP (Good Manufacturing Practice) の現状を調査研究した。

## A. 研究目的

諸外国で製造されている抗毒素製剤を緊急対応時に輸入することがある場合を想定して、それらの製剤の安全性及び有効性を日本の品質管理基準により評価しておくことは重要である。また、その製剤を製造している施設が日本の GMP またはこれと同等以上の GMP に適合していることを確認しておく必要がある。アジアでは未だ GMP が施行されていない国も多い。今回は訪問国であるベトナムの GMP の現状についても調査研究した。

## B. 研究方法

中国蘭州生物製品研究所製造精製乾燥ボツリヌスウマ抗毒素（A, B, E, F）の日本の基準への適合を検討した。

発熱試験及び異常毒性否定試験（1. モルモット試験法）に関しては生物学的製剤基準（1993 年）一般試験法に準じて行った。発熱試験は規定量の被検体を体重 2~3kg のウサギの耳静脈内に投与し、経時的に直腸内体温を温度センサーを用いて測定し、その値を逐次検定法を用いて判定する。

異常毒性否定試験は体重 320~380g のモルモットの腹腔内に被検体を 5ml 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。今回は数種の関連国内品母集団との比較も試みた。さらに、打ち切り時（投与後 7 日目）に剖検を行い、主要臓器の病変の有無を詳細に調べた。調査研究としてはベトナム・ハノイの CENCOBI とニャーチャンにある IVAC

を訪問した。

### C．研究結果と考察

**発熱試験及び異常毒性否定試験**

中国蘭州生物製品研究所製造の精製乾燥ボツリヌスウマ抗毒素(A, B, E, F)について、一般試験法として規定されている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。製剤による発熱反応の原因の大部分は製剤中に混入した内毒素によるものと考えられるが、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ため本試験は欠かせない。

異常毒性否定試験ではその製剤に固有でない毒性物質の関与、また、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。我が国の試験法は諸外国での方法に比べて極めて厳密である。その結果、A, B, E そして F 型の検体共に、両試験法で異常が認められず、日本の生物製剤基準に適合した（別紙成績を参照)。特に、異常毒性否定試験では四種の国内品母集団 [A：乾燥ボツリヌスウマ抗毒素(n=6), B：乾燥はぶウマ抗毒素(n=10), 乾燥まむしウマ抗毒素(n=6), D：乾燥抗破傷風人免疫グロブリン(n=44)] との比較を行うことにより、適否判定が実施された。更に、剖検によっても、いずれの動物の主要内臓器に、異常と思われる病理変化は認められなかった。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。

9 月 17 日～20 日にベトナムの CENCOBI と IVAC を訪問し、ベトナムでの抗毒素製剤の製造と品質管理そして GMP の現状等を調査研究した。私の報告は担当した GMP の現状に留める。

## Vietnam における GMP(Good Manufacturing Practice)の現状

ベトナムに於いては、本年までワクチン製造所の GMP 査察が実施されていなかった。1998 年から GMP に適合した製造を目標に準備が行なわれてきた。それに先立ち、WHO の Chris Rolls と Norm Ackland の両氏が 1995 年と 1996 年に、あらかじめ、数回 IVAC (National Institute of Vaccines and Biological Substances) の施設の状態を見るために訪問している。

IVCA ではインドネシアの BioFarma とオランダの RIVM (National Institute of Public Health and Environmental Protection) の協力を得て、GMP 対応に向けての準備を行い、IVAC から上記二施設に GMP 研修スタッフを派遣した。また、RIVM に事前査察をやってもらっている。

一方、査察する側の CENCOBI (National Center for Quality Control of Medicobiological Products) では GMP 査察チームを結成した。チームのメンバーと他の CENCOBI スタッフは GMP 原則に関しての一週間トレーニングコースに本番の間際に参加した。Dr. Hong は 1993 年に BioFarma で 3 週間の GMP トレーニングを受けてはいたが、チームの誰もが実際の GMP 査察を経験していなかった。2001 年 5 月に実施された、初めての GMP 査察に向けての準備として、ガイドラインとチェックリスト

の作成は行われていた。

GMP 規則は未だ施行されていないので、査察には、特に許可を受け、WHO 生物学的製剤査察ガイドラインに基づいて作成されたチェックリストが使用された。このチェックリストは GMP システムの全ての主要要素を広範囲に、また確実に網羅している。チェックリストは調査する為の非常に有用な道具である。ガイドライン及びチェックリストに作成の日付が記載されていないため、正確にいつ作成されたものかは不明である。最初の CENCOBI による GMP 査察は 5 月 28～31 日の 4 日間に亘り、IVAC が GMP 実施に努力したところの破傷風トキソイドに対して行われた。

CENCOBI チーム(4 名、うち 1 名は 1 日のみの参加)に、指導の為に派遣された WHO エキスパート 2 名が加わった。チームの中には品質管理試験に於ける特殊技術を持つ専門家が含まれていた。

二人の WHO エキスパートの一般的感想として、IVAC は WHO GMP に従おうと考えていなかったようだが、全ての主要システムは適切で、文書管理も雑ではなく、そしてスタッフの健康状態の記録と訓練記録に関しても非常に良かった。より一層の実施と改善が要求された事は、特に、キャリブレーション、バリデーションそしてより頻回で広範囲の環境モニタリングの実施であった。設備の改善は広範囲にわたり、現在、GMP の要求に適合した設計の新しい充填包装設備を建設中である。また、近代的な動物舎の建設も計画されていた。

今回の IVAC の査察に於ける問題点は、今後、CENCOBI がベトナムの GMP ルールに従って解決するであろう。国際的に受け入れられる方向へ向上させる為に IVAC への問題点のフィードバックが要求された。

WHO 基準への以下のような不適合が見出されている。

1. HEPA フィルターの評価に DOP を用いていなかった。
2. 最近（1 ヶ月以内）の無菌試験のバリデーションに、承認されたスタンダード (2 種類の培地、2 種類の温度、3 種類の菌株) があるが、培地性能試験用菌株を 1 種類しか使用していなかった。
3. キャリブレーションプログラムは全ての設備、計器に及ぶ必要がある。有効日を含み、一貫したキャリブレーション表示を全般にわたり行う必要がある。
4. 停電のように重要な問題に関しての取り決めの SOP が特に、充填操作工程の重要な部分に対して整っていない。
5. 環境モニタリングはもっと何度も実施するように要求された（現在の月 1 回のプログラムより、むしろ各作業の間中に)。また、より一層のモニタリング機器が要求された（特に、パーティクルカウンターと RODAC)。
6. 動物舎は表面を清掃可能にする事と環境コントロールをしてグレートアップするように考慮する。
7. 水の生産システムを WFI の設計に合致させる事。ネジ切りされた部品を使用しないという要求に沿っていない。全てのラインは排水のために傾斜していた。

以上であった。

ベトナムの GMP の推進は CENTOBI の

Division for Quality Management of Medicobiologicals に所属する GMP 査察、治験、認可後監視のセクションで行われている。

査察報告書は CENCOBI からベトナム保健省 (MOH) へ送られ、そのコピーが WHO の Chris Rolls へ配付された。ベトナムの GMP は今年 (2001 年) の 5 月から開始されたが、事前に十分な準備の基に実施されたと思う。IVAC の査察における不適合項目は GMP の初歩的な部類によるものが多いと考えられる。定期的な通常査察実施に向けて、CENCOBI チームでは次の査察対象生物学的製剤製造所として Poliomyelitis Vaccine Research and Production Center（ポリオセービンワクチンを製造）と National Institute of Hygiene and Epidemiology (B 型肝炎ワクチン、日本脳炎ワクチン等を製造) を考えているそうである。

## D. 結論

今年度は中国蘭州生物製品研究所製造の精製乾燥ボツリヌス抗毒素製剤（A, B, E, F 型）について、発熱試験及び異常毒性否定試験を行い、両試験の成績から、四種の検体共に我国の基準に適合することが分かった。また、開発途上国から抗毒素製剤を輸入しなければならない時には、GMP の施行の現状が重要な判断条件となる。ベトナムの品質管理研究所と抗毒素製剤製造所を現地調査し、GMP の現状を知ることができた。

## E. 研究発表

なし

## F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得　なし
2. 実用新案登録　なし
3. その他　なし

2001年9月7日
安全性研究部　一般毒性室

# 発熱試験報告書

・試験品名称：精制肉毒Ａ型抗毒素（精製乾燥ボツリヌスＡ型ウマ抗毒素）
・製造所：中国蘭州生物制品研究所
・製造番号：８７０４１
・ウサギ：日本白色種（北山ラベス）
・注射量：３ml／kg、局方注射用水１０mlに溶解後静脈内投与
・試験実施者：安全性研究部　内藤誠之郎、前山順一
・判定：適

試験日　1:　平成13年9月7日　　2:　　3:　　4:

| 試験回数 | ウサギ No. | ウサギ 体重 | 注射量 ml | 注射前の体温 | 注射後の体温 1時間 | 注射後の体温 2時間 | 注射後の体温 3時間 | 体温上昇 | 体温上昇合計 | 備考 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 200100389 | 2344 | 7 | 39.14 | 38.95 | 38.98 | 39.06 | 0.00 | 0.19 | |
| 1 | 200100391 | 2604 | 7.8 | 39.25 | 39.44 | 39.27 | 39.24 | 0.19 | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |

試験日　1:　平成13年9月6日　　2:　　3:　　4:

| 試験回数 | ウサギ No. | ウサギ 体重 | 予備試験体温 1 | 予備試験体温 2 | 予備試験体温 3 | 予備試験体温 4 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 200000025 | 2410 | 39.00 | 38.89 | 39.06 | 39.19 |
| 1 | 200000027 | 2583 | 39.20 | 39.02 | 39.02 | 39.23 |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |

２００１年９月７日
安全性研究部　一般毒性室

# 発熱試験報告書

・試験品名称：精制肉毒Ｂ型抗毒素（精製乾燥ボツリヌスＢ型ウマ抗毒素）
・製造所：中国蘭州生物制品研究所
・製造番号：７９００１
・ウサギ：日本白色種（北山ラベス）
・注射量：３ml／kg、局方注射用水１０ml に溶解後静脈内投与
・試験実施者：安全性研究部　内藤誠之郎、前山順一
・判定：適

試験日　1:　平成13年9月7日　2:　3:　4:

| 試験回数 | ウサギ No. | ウサギ 体重 | 注射量 ml | 注射前の体温 | 注射後の体温 1時間 | 注射後の体温 2時間 | 注射後の体温 3時間 | 体温上昇 | 体温上昇合計 | 備考 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 200100393 | 2575 | 7.7 | 39.46 | 39.52 | 39.52 | 39.46 | 0.06 | 0.08 | |
| 1 | 200100394 | 2464 | 7.4 | 39.39 | 39.26 | 39.41 | 39.32 | 0.02 | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |

試験日　1:　平成13年9月6日　2:　3:　4:

| 試験回数 | ウサギ No. | ウサギ 体重 | 予備試験体温 1 | 予備試験体温 2 | 予備試験体温 3 | 予備試験体温 4 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 200000029 | 2602 | 39.58 | 39.50 | 39.53 | 39.59 |
| 1 | 200000030 | 2476 | 39.59 | 39.27 | 39.19 | 39.43 |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |

２００１年９月７日
安全性研究部　一般毒性室

# 発熱試験報告書

・試験品名称：精制肉毒Ｅ型抗毒素（精製乾燥ボツリヌスＥ型ウマ抗毒素）
・製造所：中国蘭州生物制品研究所
・製造番号：７８００２－３
・ウサギ：日本白色種（北山ラベス）
・注射量：３ml／kg、局方注射用水１０ml に溶解後静脈内投与
・試験実施者：安全性研究部　内藤誠之郎、前山順一
・判定：適

試験日　1:　平成13年9月7日　2:　3:　4:

| 試験回数 | ウサギ No. | ウサギ 体重 | 注射量 ml | 注射前の体温 | 注射後の体温 1時間 | 注射後の体温 2時間 | 注射後の体温 3時間 | 体温上昇 | 体温上昇合計 | 備考 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 200100395 | 2442 | 7.3 | 39.36 | 39.25 | 39.27 | 39.10 | 0.00 | 0.00 | |
| 1 | 200100396 | 2364 | 7.1 | 39.53 | 39.40 | 39.35 | 39.38 | 0.00 | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |

試験日　1:　平成13年9月6日　2:　3:　4:

| 試験回数 | ウサギ No. | ウサギ 体重 | 予備試験体温 1 | 予備試験体温 2 | 予備試験体温 3 | 予備試験体温 4 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 200000031 | 2577 | 39.37 | 39.08 | 38.87 | 39.04 |
| 1 | 200000032 | 2401 | 39.10 | 38.94 | 39.11 | 39.31 |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |

2001年9月7日
安全性研究部　一般毒性室

# 発熱試験報告書

・試験品名称：精制肉毒Ｆ型抗毒素（精製乾燥ボツリヌスＦ型ウマ抗毒素）
・製造所：中国蘭州生物制品研究所
・製造番号：８３００１－２
・ウサギ：日本白色種（北山ラベス）
・注射量：３ml／kg、局方注射用水１０ml に溶解後静脈内投与
・試験実施者：安全性研究部　内藤誠之郎、前山順一
・判定：適

試験日　1:　平成13年9月7日　2:　3:　4:

| 試験回数 | ウサギ No. | ウサギ 体重 | 注射量 ml | 注射前の体温 | 注射後の体温 1時間 | 注射後の体温 2時間 | 注射後の体温 3時間 | 体温上昇 | 体温上昇合計 | 備考 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 200100398 | 2487 | 7.5 | 39.20 | 39.34 | 39.46 | 39.30 | 0.26 | | |
| 1 | 200100399 | 2531 | 7.6 | 39.25 | 39.34 | 39.54 | 39.41 | 0.29 | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | 0.55 | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |

試験日　1:　平成13年9月6日　2:　3:　4:

| 試験回数 | ウサギ No. | ウサギ 体重 | 予備試験体温 1 | 予備試験体温 2 | 予備試験体温 3 | 予備試験体温 4 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 200000034 | 2431 | 39.55 | 39.20 | 39.14 | 39.22 |
| 1 | 200000035 | 2527 | 38.95 | 38.85 | 39.18 | 39.41 |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |

# 異常毒性否定試験報告書

- 試験品名称：精制肉毒A型抗毒素
  (精製乾燥ボツリヌスA型ウマ抗毒素)
- 製造所：中国蘭州生物制品研究所
- 製造番号：87041
- 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13年7月16日開始、23日終了
- 試験実施者：安全性研究部　加藤博史、後藤紀久
- 判定：適

| 動物番号 | 実体重(g) | | | | | 差体重(g) | | | | 病理所見 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0d | 1d | 2d | 3d | 7d | 1d | 2d | 3d | 7d | |
| 200100859 | 352 | 356 | 364 | 376 | 403 | 4 | 12 | 24 | 51 | 異常なし |
| 200100861 | 363 | 358 | 372 | 377 | 427 | -5 | 9 | 14 | 64 | 異常なし |
| 200100879 | 341 | 347 | 349 | 363 | 402 | 6 | 8 | 22 | 61 | 異常なし |

| | p値 | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 1d | 2d | 3d | 7d |
| A: | 0.78455 | 0.68479 | 0.91906 | 0.96254 |
| B: | 0.86584 | 0.70893 | 0.85796 | 0.96441 |
| C: | 0.95050 | 0.99967 | 0.99709 | 0.97489 |
| D: | 0.82412 | 0.94319 | 0.96079 | 0.99377 |

A:乾燥ボツリヌスウマ抗毒素(国内品、n=6)を母集団として判定
B:乾燥はぶウマ抗毒素(国内品、n=10)を母集団として判定
C:乾燥まむしウマ抗毒素(国内品、n=6)を母集団として判定
D:乾燥抗破傷風ヒト免疫グロブリン(国内品、n=44)を母集団として判定

# 異常毒性否定試験報告書

・試験品名称：精制肉毒B型抗毒素
　　　　　　（精製乾燥ボツリヌスB型ウマ抗毒素）
・製造所：中国蘭州生物制品研究所
・製造番号：79001
・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13年7月16日開始、23日終了
・試験実施者：安全性研究部　加藤博史、後藤紀久
・判定：適

| 動物番号 | 実体重(g) | | | | | 差体重(g) | | | | 病理所見 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0d | 1d | 2d | 3d | 7d | 1d | 2d | 3d | 7d | |
| 200100814 | 365 | 376 | 389 | 402 | 435 | 11 | 24 | 37 | 70 | 異常なし |
| 200100870 | 355 | 353 | 367 | 375 | 412 | -2 | 12 | 20 | 57 | 異常なし |
| 200100908 | 346 | 362 | 374 | 379 | 433 | 16 | 28 | 33 | 87 | 異常なし |

| | p値 | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 1d | 2d | 3d | 7d |
| A: | 0.99934 | 0.99994 | 0.99990 | 0.99889 |
| B: | 0.99826 | 0.99185 | 0.99275 | 0.99829 |
| C: | 0.99958 | 1.00000 | 1.00000 | 0.99898 |
| D: | 0.98732 | 0.99997 | 0.99972 | 0.99997 |

A:乾燥ボツリヌスウマ抗毒素(国内品、n=6)を母集団として判定
B:乾燥はぶウマ抗毒素(国内品、n=10)を母集団として判定
C:乾燥まむしウマ抗毒素(国内品、n=6)を母集団として判定
D:乾燥抗破傷風ヒト免疫グロブリン(国内品、n=44)を母集団として判定

# 異常毒性否定試験報告書

・試験品名称：精制肉毒E型抗毒素
　　　　　　（精製乾燥ボツリヌスE型ウマ抗毒素）
・製造所：中国蘭州生物制品研究所
・製造番号：78002-3
・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13年7月16日開始、23日終了
・試験実施者：安全性研究部　加藤博史、後藤紀久
・判定：適

| 動物番号 | 実体重(g) | | | | | 差体重(g) | | | | 病理所見 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0d | 1d | 2d | 3d | 7d | 1d | 2d | 3d | 7d | |
| 200100790 | 339 | 339 | 352 | 356 | 369 | 0 | 13 | 17 | 30 | 異常なし |
| 200100821 | 363 | 365 | 371 | 388 | 415 | 2 | 8 | 25 | 52 | 異常なし |
| 200100865 | 361 | 363 | 377 | 383 | 409 | 2 | 16 | 22 | 48 | 異常なし |

| | p値 | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 1d | 2d | 3d | 7d |
| A: | 0.74745 | 0.89452 | 0.95633 | 0.59298 |
| B: | 0.84524 | 0.83486 | 0.89513 | 0.67217 |
| C: | 0.94122 | 0.99999 | 0.99897 | 0.72353 |
| D: | 0.80673 | 0.98378 | 0.97645 | 0.73379 |

A:乾燥ボツリヌスウマ抗毒素(国内品、n=6)を母集団として判定
B:乾燥はぶウマ抗毒素(国内品、n=10)を母集団として判定
C:乾燥まむしウマ抗毒素(国内品、n=6)を母集団として判定
D:乾燥抗破傷風ヒト免疫グロブリン(国内品、n=44)を母集団として判定

# 異常毒性否定試験報告書

・試験品名称：精制肉毒F型抗毒素
（乾燥精製ボツリヌスF型ウマ抗毒素）
・製造所：中国蘭州生物制品研究所
・製造番号：83001-2
・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13年7月16日開始、23日終了
・試験実施者：安全性研究部　加藤博史、後藤紀久
・判定：適

| 動物番号 | 実体重(g) | | | | | 差体重(g) | | | | 病理所見 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0d | 1d | 2d | 3d | 7d | 1d | 2d | 3d | 7d | |
| 200100773 | 366 | 368 | 378 | 375 | 411 | 2 | 12 | 9 | 45 | 異常なし |
| 200100778 | 356 | 349 | 366 | 370 | 399 | -7 | 10 | 14 | 43 | 異常なし |
| 200100823 | 348 | 343 | 360 | 366 | 391 | -5 | 12 | 18 | 43 | 異常なし |

| | p値 | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 1d | 2d | 3d | 7d |
| A: | 0.15150 | 0.83204 | 0.46903 | 0.60597 |
| B: | 0.39973 | 0.79241 | 0.57981 | 0.68277 |
| C: | 0.64827 | 0.99996 | 0.88812 | 0.73337 |
| D: | 0.48109 | 0.97321 | 0.75462 | 0.74700 |

A:乾燥ボツリヌスウマ抗毒素(国内品、n=6)を母集団として判定
B:乾燥はぶウマ抗毒素(国内品、n=10)を母集団として判定
C:乾燥まむしウマ抗毒素(国内品、n=6)を母集団として判定
D:乾燥抗破傷風ヒト免疫グロブリン(国内品、n=44)を母集団として判定

別紙2

厚生科学研究費補助金（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

## 抗毒素製剤の無菌性と安定供給に関する考察

分担研究者　佐々木次雄（国立感染所研究所室長）

**研究要旨**：戦後半世紀、わが国で製造された生物学的製剤の品質の推移、並びに抗毒素製剤の製造量及び国家検定不合格数の推移について解析を試み、抗毒素製剤の安定供給について考察した。

**協力研究員**：新谷三春、佐々木裕子、見理剛、堀野敦子（国立感染所研究所安全性研究部無菌性制御室）

### A．研究目的

現在、日本では6種類の抗毒素製剤（ジフテリア、破傷風、ハブ蛇毒、マムシ蛇毒、ガス壊疽、ボツリヌス抗毒素）が製造されている。何れもウマで免疫したもので製造量は少なく、緊急時使用の国家買上げ製剤である。これらの製剤を将来ともに国内に安定供給するための方策を探るとともに、国内外で製造された抗毒素製剤の無菌性について考察する。

### B．研究方法

中国蘭州生物製品研究所で製造された乾燥ボツリヌスウマ抗毒素製剤（A, B, E, Fの4ロット）に対して無菌試験を実施した。また戦後半世紀、わが国で製造された生物学的製剤の品質の推移、並びに抗毒素製剤の製造量及び国家検定不合格数の推移について解析を試み、抗毒素製剤の安定供給について考察する。

（倫理面への配慮）

特になし。

### C．研究経過

1．国内外で製造された抗毒素製剤に対する無菌試験

中国産のボツリヌス製剤4検体並びに国産のボツリヌス製剤 1 検体（20mL x 300 本/Lot、千葉県血清研究所製）全てが、無菌試験に適合した。

2．生物学的製剤（添付資料1）及び抗毒素製剤（添付資料2）の品質推移について解析を行った。

### D．考　察

無菌試験による汚染菌の検出感度は低く、現在の製法では例え汚染があっても無菌試験では確認できない。抗毒素製剤のように最終滅菌のできない医薬品の場合には、ろ過工程、充てん工程、凍結乾燥工程、閉塞工程等、一連の無菌製造工程の無菌性バリデーションが重要であり、医薬品 GMP ではその徹底を求めている。しかし、抗毒素製剤の場合、製造量も少なく、通常の医薬品のようにバリデートされた充てん機を用いず、手動充てんが行われることが多い。そのため無菌性保証水準も低くなると推定される。

生物学的製剤の無菌性は、1970 年代に HEPA フイルターが普及し始めてから一段

と向上し、不合格率及び再試験率が激減した（資料１）。国家検定「無菌試験」では、再試験検体のうち約１割しか不合格にはできず、かなりの汚染製剤が使用されていたことが容易に想像できる。再試験検体数は、1991-1995 年に 11 検体、1996-2000 年に 4 検体と少なく、国が国家検定制度の中で無菌試験を実施する意義は薄れたと言える。今後は、GMP 査察を通しての品質保証システムの評価制度に変える必要がある。

抗毒素製剤の製造量は、1960 年代にピークを向かえ、1970 年代から減少に転じた（資料２）。製造技術の進歩に伴い、1965 年から抗破傷風抗体価の高い健常者血漿を用いた破傷風ヒト免疫グロブリン製剤の使用、更に 1972 年からはガス壊疽製剤を除いては凍結乾燥製剤に代わり、安全性は一段と向上した。ワクチン接種率の向上に伴う破傷風とジフテリアの減少、マムシやハブ咬傷の減少等により、抗毒素製剤の製造量は激減した。今後、抗毒素製剤の全てを日本で製造する必要性は必ずしも無いと考える。

## Ｅ．結論

抗毒素製剤のロットサイズは極端に小さいため、充填工程を含めヒトの介在が多い。そのため、無菌性保証水準は必ずしも高いとは言えないが、ガス壊疽製剤を除いては乾燥製剤のため、微生物学的には安全な医薬品と言える。このことは、添付資料１の国家検定「無菌試験」結果からも分かる。緊急避難用に国内製造されている抗毒素製剤を今後とも全て国内で製造する必要はなく、医薬品 GMP が施行されている近隣諸国の製造所でウマに免疫し、得られた抗毒素原料を輸入し国内で最終製品にするか、最終製品を輸入する方向も検討に値すると考えられる。

## Ｆ．研究発表

１．論文発表　なし

２．学会発表　なし

## Ｇ．知的所有権の取得状況

１．特許取得

なし

２．実用新案登録

なし

３．その他

なし