

厚生労働科学研究 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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高橋元秀

平成15（2003）年3月

厚生労働科学研究 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14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
杉本 央 大阪大学大学院 医学系研究科 教授
大隈 邦夫 (財)化学及血清療法研究所 第一製造部長
桑原 靖 (株)デンカ生研 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
松岡 誠治 (財)化学及血清療法研究所
諸熊 一則 (財)化学及血清療法研究所
本川 賢司 (財)北里研究所
市森 有三 武田薬品工業株式会社
糸川 敬三 (財)阪大微研会観音寺研究所
佐藤 保 タイ国赤十字研究所
Lei Dianliang National Institute for the Control of Pharmaceutical & Biological Products, Beijing, China
Seunghwa Hong Division of Blood Products, KFDA, Seoul, Korea
Feng Dou-Jia Lanzhou Institute of Biological Products MPH, China
Chen Pingyu Lanzhou Institute of Biological Products MPH, China

目 次

| | 頁 |
|----------------------------------|-----|
| I. 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 | |
| 班長 高橋 元秀 | 1 |
| 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 | 9 |
| 2. 抗毒素の安全性に関する研究 ー異常毒性否定試験・発熱試験ー | |
| 後藤 紀久 | 19 |
| 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 | 37 |
| 4. 緊急用ボツリヌスウマ抗毒素の試作製造に関する研究 | |
| 大隈 邦夫 | 58 |
| 5. ガスエソ抗毒素の適正使用と効果に関する研究 | |
| 杉本 央 | 84 |
| 6. 海外抗毒素のデータベース構築に関する研究 | |
| 桑原 靖 | 109 |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 113 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 | 115 |

I. 総括研究報告書

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、米国のバイオテロ事件を契機にボツリヌス毒素に対する唯一の治療薬として国内需給体制の再構築が必要となった。海外から緊急的に輸入することが可能か調査した結果、現状では最終製剤の入手は困難であった。中国で本製剤を製造している蘭州研究所から高度免疫血清を輸入して、ABEF 型の多価抗毒素として国内の製造所で約 250 本製剤化した。生物学的製剤基準の試験項目について検査した結果、品質には問題のないことが確認された。
2. まむしウマ抗毒素製剤を製造・使用している中国、韓国との共同で、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った。本年度までに、アジア地区標準まむし抗毒素として約 4,000 本の製造を完了した。
3. 国有品であるガスエソ抗毒素は毎年約 200 本が医療現場からの要請により出庫されているが、本製剤の使用状況と効果判定については不明な点が多い。平成 12 年度に出庫した製剤について、使用した医師へアンケートを実施した結果、非クロストリジウムによるガスエソ疾患に対しても本製剤が使用されていることが明らかとなった。
4. 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。製造元の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、輸入できた製剤について品質試験を行った。

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 |
| 杉本 央 | 大阪大学大学院 医学系研究科 教授 |
| 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、製剤を輸入して用いる際の障壁となる。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蘭州生物製品研究所製の製剤を輸入し、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ことで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を効果的に入手できるかについて、適切な品質管理試験法を用いて調査、検討して製造を行う。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した。

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実施した。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"の候補標準品は昨年度出来上がり、候補標準品の抗出血価と抗致死価を決定した。力価決定に際して、3ヶ国の国家品質管理機関の担当者と協議して、同じ試験方法（注射経路、解析方法等）で実施し、標準化終了後は3ヶ国に配布して、品質試験で得られた結果の共有化が可能となった。

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。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・試験方法についての情報を得ながら、実施している試験の妥当性を輸入製剤について品質試験した。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)を行った。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立し、試験成績は統計学的解析を十分にを行い判断した。

4. 生物学的製剤基準に準じたエンドトキシン試験を実施し、標準エンドトキシンとして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) で溶解して用いた。測定は、カイネティック比色法 (エンドスペシー, 生化学工業) またカイネティック比濁法で測定した。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。

5. ガスエソウマ抗毒素製剤の使用実態調査: ガス壊疽抗毒素の使用実体について、使用目的、使用対象および評価について、明かにすることを目的に医療機関に対してアンケート調査を行なった。

調査対象は、平成12年4月から平成13年9月までにガス壊疽抗毒素の払いだし記録に基づいた (血液対策課資料)。実際に抗毒素を患者に投与した医療機関は合計25機関で、アンケート用紙の送付に先だって、電話でガス壊疽抗毒素使用の有無を確認するとともにアンケート調査への協力を依頼した。抗毒素使用に至らなかったとの回答があった医療機関が4機関、担当医師の転勤等のため協力できないと回答した3機関を除いた18医療機関にアンケート用紙を送付し、13機関から23症例についての回答を得て分析した。

6. 海外の抗毒素製剤に関する情報の

データベース化: WHO より入手した「International List on Availability of Vaccine and Sera」(1999) に基づいた海外抗毒素製剤情報及び国内で製造されている抗毒素製剤情報について、特に製造する海外企業名、連絡先等を再調査し、可能だけ新しいデータベースに修正し、緊急対応的な入手に役立つ情報の提供・入手が行えるように作製した。

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: 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。緊急対策用として高度に免疫した馬血清を部分精製標品後に濃縮して国内に輸入した。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製造を2年間で完了し、国内の唯一の抗毒素製造所 (化血研) で約250本の ABEF 型多価ウマ抗毒素を最終製剤として完成させた。製剤の品質管理試験は、現行のボツリヌスウマ抗毒素の検定基準項目について試験し、各試験成績は問題のないことが確認されている。

2. アジア地区標準まむし抗毒素の製造: 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担当者と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。抗毒素の力価測定は、現状では3ヶ国の力価試験法の基準が異なるために暫定的な標準試験法を協議・設定した。また、得られた成績を統計学的に処理して、力価を求める方法も共通の手法を用いるために、開発した解析ソフトを配布し、各国で試験した成績を統計学的に解析して力価を付

与した。従って、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、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が終了した。

3. 海外から入手した抗毒素製剤の品質試験：海外から入手した抗毒素製剤について、日本国内の基準に照らし合わせた品質試験を実施した。異常毒性否定試験に関してはタイのコブラ抗毒素、インドネシアの狂犬病抗毒素、ブルガリアのガス壊疽抗毒素およびインドネシアのジフテリア抗毒素の4種である。発熱試験に関しては前4種に加えて、インドネシアのクサリヘビ抗毒素、インドネシアの破傷風抗毒素の合計6種である。その結果、一部の製剤が、日本の生物学的製剤基準への適合性に疑問が持たれ、ジフテリア抗毒素は脾臓に著明な腫大を示し、病理組織所見では脾臓に赤脾髄の顕著な拡張が見られた。

なお、本数に限りがあり、国内の基準通りに試験はできなかったが、試験したすべての製剤に置いて無菌試験が不適合な製剤は見られなかった。

4. 抗毒素の安全性を確認する新しい試験法：ウサギ発熱試験より感度・精度および再現性にすぐれたエンドトキシン試験を用いて、試験製造品を含め3検体の国内製抗毒素製剤と20検体の海外から輸入した各種抗毒素製剤の安全性（発熱性）を確認するため、製剤中のエンドトキシン量を評価した。試験した抗毒素製剤には、一部の抗毒素製剤にエンドトキシンの混入が認められた。また、これら抗毒素製剤へのエンドトキシン試験の適用の可能性についても検討した結果、多くの製剤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が、一部の製剤において

エンドトキシン試験への強い阻害作用が認められた。これらの製剤においても、製剤を希釈して試験を実施することで試験への阻害作用を減弱しエンドトキシン試験の測定が可能であることが確認された

5. ガスえそウマ抗毒素製剤の使用実態調査：ガス壊疽抗毒素の医療現場での使用が適正に使用されていないことが判明した。本製剤の約半分が適応疾患の誤認により使われているため、国家備蓄品である本製剤の出庫要請時の内容確認、製剤の使用書への追加説明、医療現場への本疾患の治療方法の啓蒙等について具体化が求められる。今後、本製剤の適正備蓄とも関連するために、今後の対応について関係機関と協議を予定している。

6. 海外の抗毒素製剤に関する情報のデータベース化：国内外で製造されている抗毒素製剤の情報を整理して使い易いデータベース化をおこなった。緊急時の対応として、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とした。なお、関係機関からの問い合わせにすべての情報はCDに焼き付けて、配布するとともに分与願いあった場合は分与するように体制を整えた。

D. 考 察

1. 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。今回、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部分精製して濃縮した高度免疫血清の入手方法（事務手続き、輸送経路等）を具体化し、日本国内の製造所（化血研）で最終製剤化した。製剤化に当たり、各型毒素に対する単独の抗毒素（例えば、A 型毒素に対する A 型単味の抗毒素）が考えられたが、緊急時の使用に当たって型の特定以前に治療が求められるため、4 種混合の抗毒素を作製することとした。

これにより、今後国内で緊急的にボツリヌスウマ抗毒素の製造が求められたときには、国際的な対応が可能となることが明らかとなった。また、今回試験製造したボツリヌス ABEF 型多価ウマ抗毒素は、GMP 上の製造認可承認を得ていない製法で製造しているが、バイオテロなどに際して患者が発生し国内備蓄品が無くなった折には緊急避難的に使用することが可能と考える。

2. アジア地区標準まむし抗毒素の製造は、予定していた力価を含むような候補標準品が約 4000 本ができあがった。また、日本、中国および韓国の国家品質（管理）試験室の試験担当者が標準試験法（致死、出血活性）による標準化を実施した。3ヶ国の国家あるいは地域標準品として、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、少なくともの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。さらに生物学的製剤基準に記載されている試験方法（致死、出血活性）が3ヶ国で多少異なるために、各国の基準変更を含めて適正な試験方法への統一を検討する。

3. 海外の抗毒素製剤について安全性試験としてウサギ発熱試験を実施した結果、製剤によっては発熱物質の混入が認められた。

また、モルモットの異常毒性否定試験においても国内の製剤では見られない脾臓の著明な腫大が観察された。今後、国内で枯渇した抗毒素製剤を海外より緊急輸入する場合は、特に安全性の確認試験が重要で、今回安全性に疑いがでた試験法での確認が必要と思われる。なお、安全性を確認する新しい試験法として、ワクチン等の生物学的製剤の試験で実施されているリムルス試験を用いて、国内外の抗毒素製剤を対象に基準への導入の可否を検討した。その結果、今回の成績だけでは十分とは言えないが、一部の製剤ではリムルス試験に強い阻害作用が認められたため、本試験だけでの安全性の評価（発熱試験の代用）には検討の余地がある。

4. ガスエソウマ抗毒素製剤の使用実態調査：現行の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。本研究班の提言により、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。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・現状を調査した結果を基に、適正な使用方法および使用量に基づく製造計画が策定されることで国有品である本製剤の安定供給の具体的方策につながった。

5. 国内外で製造されるワクチン・抗毒素製剤のデータベース作成を目的に、WHO より入手した「International List on Availability of Vaccine and Sera」（1999）を利用し、さらに国内で製造される抗毒素製剤の情報及び海外企業名、連絡

先等を再調査して最新の情報へ追加・修正を行うことで、国内外の抗毒素製剤情報の収集・品質調査に貢献することが予想される。

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を緊急製造した。海外から輸入した免疫血清を用いて、国内で製造・市販されている A,B,E,F 多価抗毒素を 25 本製造した。また、製剤を国内の生物学的製剤基準に照らした品質試験を実施した結果、過去に製造された製剤と同様の品質であることが確認された。

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、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し、力価を付与して 3ヶ国に配布した。

3. 海外から輸入した抗毒素製剤の国内基準にあわせた試験結果：安全性試験として実施したウサギ発熱試験とモルモット異常毒性否定試験では、数種の製剤において国内基準に適合しない製剤があった。なお、限られた本数を用いて実施した無菌試験では、問題のある製剤は見られなかった。

4. 抗毒素の安全性を確認する新しい試験法：ウサギ発熱試験より感度・精度および再現性にすぐれたエンドトキシン試験で試験した結果、大半の抗毒素製剤には、顕著なエンドトキシン汚染は認められなかったが、一部の抗毒素製剤にエンドトキシンの混入が認められた。また、一部の製剤においてエンドトキシン試験への強い阻害作用が認められた。

5. ガス壊疽抗毒素の医療現場での使用が適正に使用されていないことが判明した。

本製剤の約半分が適応疾患の誤認により使われているため、国家備蓄品である本製剤の出庫要請時の内容確認、製剤の使用書への追加説明、医療現場への本疾患の治療方法の啓蒙等について具体化が求められる。今後、本製剤の適正備蓄とも関連するために、今後の対応について関係機関と協議を予定している。

6. 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・再確認し、最終的にまとめた情報を入力した CD を作製し、必要に応じて交付が可能となった。

F. 健康危険情報

国内では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。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。

また、現行のガス壊疽抗毒素はクロストリジウム属菌の産生する毒素に対する抗毒素抗体である。本研究班で実施した本製剤の使用実態調査で、医療現場での使用が適正に使用されていないことが判明した。本製剤の約半分が非クロストリジウム性のガスえそ疾患に用いられており、科学的には効果が期待できないと予想される。国家備蓄品である本製剤の需給制度および適正使用についての対応が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sasaki T. Sterile product manufacturing in Japan. PDA J. GMP and Validation. 2002, 4: 80-84.

- 2) Sasaki T. Parametric release for moist heated pharmaceutical products in Japan. PDA J. GMP and Validation. 2002, 4: 7-10.
- 3) M. Ochiai et al. A Limulus amoebocyte lysate activating activity (LAL activity) that lacks biological activities of endotoxin found in biological products, Microbiol. Immunol. 2002; 46(8): 527-33
- 4) TAKAHASHI, M. OMORI-SATOH, T. : What is the rabbit skin test method by Kondo et al. (1960) for determining hemorrhagic activities of snake venom? Toxicon 40, 2002
- 5) 高橋元秀、岩城正昭、荒川宜親 ポツリヌス症 感染症の診断・医療ガイドライン (生涯教育シリーズ 51) 日本医師会雑誌 第 128 巻、第 1 号 2002.7.1
- 6) Yasushi Torii, Yoichi Tokumaru, Seijirou Kawaguchia, Nanae Izumia, Seika Maruyama, Masafumi Mukamoto, Shunji Kozaki, and Motohide Takahashi : Production and immunogenic efficacy of botulinum tetravalent (A, B, E, F) toxoid. Vaccine 20, 2556-2561, 2002,

2. 学会発表

- 1) 組換えコレラ毒素 B サブユニットを添加した試作調整 DPT ワクチンの経鼻投与におけるジフテリアと破傷風の毒素中和抗体誘導について：井坂雅徳、安田陽子、谷口 暢、小宮貴子、前山順一、諸熊一則、大隈邦夫、高橋元秀、後藤紀久、枋久保邦夫 第 6 回ワクチン学会 平成 14 年 11 月 30-12 月 1 日 千葉市
- 2) モンゴル国内における健康人の血中のジフテリア、破傷風抗体調査結果：高橋元秀、小宮貴子、岩城正昭、福田 靖 第 6 回ワクチン学会 平成 14 年 11 月 30-12 月 1 日 千葉市
- 3) ジフテリア毒素産生性 *Corynebacterium ulcerans* の実験室内診断法の確立ー試験法確認のための予備調査報告ー 小宮貴子、岩城正昭、福田 靖、荒川宜親、

- 高橋元秀 第 6 回ワクチン学会 平成 14 年 11 月 30-12 月 1 日 千葉市
- 4) ワクチン国際化の潮流に関する一考察 堀内善信、高橋元秀、荒川宜親、倉田 毅 第 6 回ワクチン学会 平成 14 年 11 月 30-12 月 1 日 千葉市
- 5) ジフテリア菌新規抗原遺伝子：5 塩基単位の繰り返し構造による多形性：岩城正昭、三枝智美、小宮貴子、高橋元秀 細菌学会関東支部総会 平成 14 年
- 6) ジフテリア菌から見いだされた新規抗原の解析：岩城正昭、小宮貴子、福田 靖、高橋元秀 第 75 回日本細菌学会 平成 14 年 4 月 4 日ー6 日、横浜
- 7) ヒト抗体ライブラリーからのジフテリア毒素中和抗体の単離：柿田麻衣、鈴木和宏、高橋剛、森野和彦、黒澤良和、小宮貴子、高橋元秀 第 25 回日本分子生物学会 2002 年 12 月 11 日-14 日 パシフィコ横浜
- 8) ヒト抗体ライブラリーからクローニングされた抗ジフテリア毒素中和抗体の検定：高橋 剛、柿田麻衣、鈴木和宏、森野和彦、辻 孝雄、黒澤良和、小宮貴子、高橋元秀 第 25 回日本分子生物学会 2002 年 12 月 11 日-14 日 パシフィコ横浜

H. 知的所有権の取得状況

なし

Ⅱ. 分担研究報告書

分担研究報告書

抗毒素の安全性に関する研究 —発熱物質試験—
（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 | 細菌第二部 |
| 研究協力者 | 落合雅樹 | 国立感染症研究所 | 細菌第二部 |
| | 山本明彦 | 国立感染症研究所 | 細菌第二部 |
| | 蒲地一成 | 国立感染症研究所 | 細菌第二部 |
| | 片岡紀代 | 国立感染症研究所 | 細菌第二部 |
| | 豊泉裕美 | 国立感染症研究所 | 細菌第二部 |

研究要旨

インドネシアおよびブルガリアで製造された各種抗毒素製剤の安全性（発熱性）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。インドネシアで製造された抗毒素製剤は概してリムルス試験に強い阻害作用を認めた。しかし、大部分の製剤で検体の希釈によりエンドトキシン試験の適用が可能であると考えられた。ブルガリアで製造された抗毒素製剤には、強いリムルス活性を示す製剤が認められた。しかしながら、このリムルス活性はリムルス試験擬陽性物質による活性であると考えられた。今回試験した抗毒素製剤には、顕著なエンドトキシン汚染は認められなかったものの、一部の抗毒素製剤にエンドトキシンの混入が認められた。

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證する試験の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。そこで海外で製造された各種抗毒素製剤の安全性を確認するため、エンドトキシン試験適用の

可能性検討および製剤中のエンドトキシン含量の評価をした。

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として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）で溶解して使用した。

カイネティック比色法（エンドスペシー，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（ES-III，和光純薬）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 units, 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を変更して試験を実施した。

C. 研究結果

1. インドネシア製各種抗毒素の評価

インドネシアで製造された各種抗毒素製剤を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試験したところ，これらの抗毒素製剤中には強いリムルス活性を示す製剤は認められなかったが，カイネティック比色法・カイネティック比濁法ともに添加エンドトキシンのリムルス活性に対する強い抑制が認められた（表1，2）。

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，この範囲内に反応阻害を抑えるために必要な抗毒素製剤の希釈倍率を調べた。抗毒素製剤を各々注射用蒸留水で希釈し4倍，16倍，64倍，256倍，1024倍および4096倍の希釈系列を作製し測定に用いた。また各希釈検体に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た検体についても測定した。表3に示すように，カイネティック比色法では蛇毒抗毒素で256倍以上，破傷風抗毒素で16倍以上，ジフテリア抗毒素で64倍以上，狂犬病抗毒素で1024倍以上の希釈により，添加エンドトキシンのリムルス活性の回収率が50%以上となった。表4に示すように，カイネティック比濁法では蛇毒抗毒素で64倍以上，破傷風抗毒素で16倍以上，ジフテリア抗毒素で16倍以上，狂犬病抗毒素で256倍以上の希釈により，添加エンドトキシンのリムルス活性の回収率が50%以上となった。

2. ブルガリア製各種抗毒素の評価

ブルガリアで製造された各種抗毒素製剤を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試験した。ボツリヌス抗毒素（A，B，E型）および蛇毒抗毒素では，エンドトキシン試験への阻害作用を取り除くためにカイネティック比濁法で16倍以上の希釈が必要であったが，カイネティック比色法では4倍希釈から測定が可能であった（表5）。これらの抗毒素製剤中のエンドトキシン量は，添加回収率を用いて補正した場合，カイネティック比色法では0.066 - 0.694 EU/mL，カイネティック比濁法で0.262 - 0.884 EU/mLであった。

一方，ガス壊疽抗毒素は，カイネティック比色法では2.701 EU/mL（添加回収率72.0%），カイネティック比濁法では94.5 EU/mL（添加回収率3265%）と2つの方

法で得られた試験結果が大きく異なり、カイネティック比濁法での添加回収率が異常に高い値を示した。これらのことから、ガス壊疽抗毒素中に検出されたリムルス活性には、通常のエンドトキシンとは性状の異なるリムルス試験擬陽性物質（文献1）が混入していることが疑われた。そこで、エンドトキシン活性を阻害するポリミキシンB（文献1, 2）を用いて、本製剤中に検出されたリムルス活性のポリミキシンBに対する感受性をカイネティック比色法により評価した。ポリミキシンBに感受性のあるエンドトキシンは、ポリミキシンB処理によりリムルス活性が0.7%に減少した。一方、ガス壊疽抗毒素では72.2%のリムルス活性が同処理に耐性を示し、エンドトキシン活性を表すと考えられるポリミキシンB感受性のあるリムルス活性は0.882 EU/mLであった（表6）。そこで、ガス壊疽抗毒素中のエンドトキシンの生物活性を、ウサギ末梢血を用いた *in vitro* 試験法（文献3）を用いて標準エンドトキシンの活性との相対比較により評価したところ、ガス壊疽抗毒素中のエンドトキシン活性は1.156 EU/mLであった。

D. 考察

本研究で試験したインドネシア製の各種抗毒素製剤には強いリムルス活性を示す製剤は認められなかったが、エンドトキシン試験への強い阻害作用が認められた。これらの抗毒素製剤の阻害作用は希釈により減弱された。しかしながら、狂犬病抗毒素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（50 - 200 %）の添加回収を得るには、カイネティック比色法で1024倍以上、カイネティック比濁法で256倍以上の希釈が必要であった。リムルス試薬の検出感度とそ

れぞれの希釈倍率における添加エンドトキシンの回収率を考慮に入れて検出限界推定値を算出した場合、それぞれ5.791 EU/mL、10.717 EU/mLと推定され、エンドトキシン試験の検出感度がウサギ発熱試験と同等あるいは劣ることになる場合もありうるということがわかった。

ブルガリア製のポツリヌス抗毒素（A, B, E型）および蛇毒抗毒素では、エンドトキシン試験への阻害作用を取り除くためには、カイネティック比濁法で16倍以上の希釈が必要であったが、カイネティック比色法では4倍希釈から測定が可能であり、試験への強い阻害作用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、添加回収率を用いて補正して評価した場合、カイネティック比色法では0.066 - 0.694 EU/mL、カイネティック比濁法で0.262 - 0.884 EU/mLであり、2種類の方法で測定された試験結果で、ほぼ同等の結果が得られた。

一方、ブルガリアで製造されたガス壊疽抗毒素は、カイネティック比色法とカイネティック比濁法の2つの方法で得られた試験結果が大きく異なり、カイネティック比濁法で添加回収率が異常に高い値（3265%）を示した。これらのことから、ガス壊疽抗毒素中に検出されたリムルス活性には、通常のエンドトキシンとは性状の異なるリムルス試験擬陽性物質（文献1）が混入していることが疑われた。そこで、エンドトキシン活性を阻害するポリミキシンB（文献1, 2）を用いて、本製剤中に検出されたリムルス活性のポリミキシンBに対する感受性をカイネティック比色法により評価したところ、ガス壊疽抗毒素中の72.2%のリムルス活性が同処理に耐性を示し、エンドトキシンの活性を表すと考えられるポリミキシンB感受性リムルス活性は0.882 EU/mLであった。そこで、ガス壊疽抗毒

素中のエンドトキシンの生物活性を、ウサギ末梢血を用いた *in vitro* 試験法（文献3）を用いて測定したところ、ガス壊疽抗毒素中のエンドトキシン活性は 1.156 EU/mL と評価され、ポリミキシンB感受性リムルス活性とほぼ一致した。このことから、ガス壊疽抗毒素中に認められたリムルス活性には、リムルス擬陽性物質が含まれていたことが強く示唆された。従って、ガス壊疽抗毒素中のエンドトキシン量を評価するには、製剤中に認められるリムルス活性のポリミキシンBに対する感受性を確認すること、そして製剤中のエンドトキシンの生物活性を適当な試験法により確認することが重要と考えられた。

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、今回試験した各種抗毒素製剤には著しくエンドトキシン含量が高い製剤は認められなかった。しかしながら、ブルガリア製のボツリヌス A 型抗毒素、蛇毒抗毒素そしてガス壊疽抗毒素製剤でエンドトキシンの混入が認められた。抗毒素製剤には治療で大量に投与される場合があり、エンドトキシン試験を適用する場合には臨床で使用される投与量を考慮に入れた基準値の設定が必要と考えられる。また製剤中のエンドトキシン量を評価するには、可能な限り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実施することが望ましい。

E. 結論

1. 本研究で試験した海外製の各種抗毒素製剤には、エンドトキシン試験に対して強い阻害作用を示す製剤が認められたが、製剤を希釈することでエンドトキシン試験への阻害作用は減少した。ただし阻害の除去に高度の希釈を必要とする製剤では、エンドトキシン試験の検出限界がウサギ発熱

試験と同等あるいは劣る場合もありうるということがわかった。ブルガリア製のガス壊疽抗毒素中にはエンドトキシンとは性状を異にするリムルス試験擬陽性物質の混入が疑われ、エンドトキシン量を正しく評価するには製剤中のリムルス活性の性状等を確認する必要があると考えられた。

2. 今回、試験した各種抗毒素製剤には、著しいエンドトキシン汚染が認められた製剤はなかった。しかし一部の製剤でエンドトキシンの混入が認められた。

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. M. Ochiai et al. A Limulus amoebocyte lysate activating activity (LAL activity) that lacks biological activities of endotoxin found in biological products, *Microbiol. Immunol.* 2002; 46(8): 527-33
2. A. Rustici et al. Molecular and detoxification of lipid A binding site by synthetic peptides, *Science* 1993; 259: 361-5
3. M. Ochiai et al. A quantitative in vitro assay for detecting biological activity of endotoxin using rabbit peripheral blood, *Jpn. J. Infect. Dis.* 2001; 54: 131-6

表1 インドネシアで製造された各種抗毒素製剤のエンドトキシン試験結果(カインテック比色法)

| 抗毒素 | 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 | | | |
|--------|----------------------|-------|-------|---------------------|-------|---------|---------|--------|---------------------|-------|
| | 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 (%) | エンドトキシンの含量 (EU/mL)† | |
| 抗蛇毒 | 0.094 | 0.041 | 0.027 | — | 0.389 | 0.218 | 0.100 | — | — | |
| 抗破傷風 | | 0.028 | | 0.028 | 0.579 | 0.578 | 0.440 * | 0.579 | 55.1 | 0.050 |
| 抗ジフテリア | 0.081 | | | 0.081 | 0.565 | 0.395 * | 0.124 * | 0.565 | 48.5 | 0.167 |
| 抗狂犬病 | 0.074 | 0.028 | 0.015 | — | 0.225 | 0.112 | 0.063 | — | — | — |

†: 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

*: 試験に強い阻害を示したため計算から除去した値

表2 インドネシアで製造された各種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)

| 抗毒素 | 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 | | エンドトキシンの含量(EU/mL)† | |
|--------|---------------------|-------|-------|--------------------|-------|-------|---------|-------|--------------------|-------|
| | 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 | | (%) |
| 抗蛇毒 | 0.313 | 0.313 | 0.313 | 0.313 | 1.051 | 0.713 | 0.339 * | 0.837 | 52.4 | 0.598 |
| 抗破傷風 | 0.229 | 0.229 | 0.229 | 0.229 | 0.937 | 0.937 | 0.620 * | 0.937 | 70.8 | 0.323 |
| 抗ジフテリア | 0.229 | 0.229 | 0.229 | 0.229 | 0.984 | 0.984 | 0.480 * | 0.984 | 75.5 | 0.303 |
| 抗狂犬病 | 0.916 | 0.229 | 0.057 | — | 0.282 | 0.118 | — | — | — | — |

†: 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の推定含量

*: 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インドネシア製抗毒素製剤の添加回収

| 希釈倍率 | 抗蛇毒 | | 検出限界推定値 | | 抗破傷風 | | 検出限界推定値 | |
|------|-------------|--------------|-------------|--------------|-----------|----------|-----------|----------|
| | 添加回収率(%)* | (EU/mL)† | 添加回収率(%)* | (EU/mL)† | 添加回収率(%)* | (EU/mL)† | 添加回収率(%)* | (EU/mL)† |
| 4096 | 74.8 | 16.428 | 87.4 | 14.066 | | | | |
| 1024 | 70.2 | 4.376 | 84.6 | 3.632 | | | | |
| 256 | <u>59.8</u> | <u>1.284</u> | 85.4 | 0.899 | | | | |
| 64 | 47.1 | 0.408 | 88.2 | 0.218 | | | | |
| 16 | 14.9 | 0.323 | <u>88.2</u> | <u>0.054</u> | | | | |
| 4 | — | — | 41.4 | 0.029 | | | | |

| 希釈倍率 | 抗ジフテリア | | 検出限界推定値 | | 抗狂犬病 | | 検出限界推定値 | |
|------|-------------|--------------|-------------|--------------|-----------|----------|-----------|----------|
| | 添加回収率(%)* | (EU/mL)† | 添加回収率(%)* | (EU/mL)† | 添加回収率(%)* | (EU/mL)† | 添加回収率(%)* | (EU/mL)† |
| 4096 | 88.4 | 13.900 | 60.1 | 20.448 | | | | |
| 1024 | 85.8 | 3.580 | <u>53.0</u> | <u>5.791</u> | | | | |
| 256 | 87.8 | 0.875 | 41.0 | 1.874 | | | | |
| 64 | <u>90.6</u> | <u>0.212</u> | 20.3 | 0.948 | | | | |
| 16 | 59.7 | 0.080 | — | — | | | | |
| 4 | 4.7 | 0.255 | — | — | | | | |

*: 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

表4 エンドトキシン試験に強い阻害作用を示したインドネシア製抗毒素製剤の添加回収

| 希釈倍率 | 抗蛇毒 | | 抗破傷風 | |
|------|-------------|------------------|-------------|------------------|
| | 添加回収率(%)* | 検出限界推定値 (EU/mL)† | 添加回収率(%)* | 検出限界推定値 (EU/mL)† |
| 4096 | 113.5 | 108.254 | 121.3 | 101.305 |
| 1024 | 106.2 | 28.931 | 117.3 | 26.193 |
| 256 | 101.8 | 7.544 | 109.6 | 7.005 |
| 64 | <u>80.4</u> | <u>2.389</u> | 115.9 | 1.656 |
| 16 | 30.4 | 1.578 | <u>94.3</u> | <u>0.509</u> |
| 4 | — | — | 33.9 | 0.354 |

| 希釈倍率 | 抗ジフテリア | | 抗狂犬病 | |
|------|-------------|------------------|-------------|------------------|
| | 添加回収率(%)* | 検出限界推定値 (EU/mL)† | 添加回収率(%)* | 検出限界推定値 (EU/mL)† |
| 4096 | 121.3 | 101.305 | 91.0 | 135.004 |
| 1024 | 103.1 | 29.783 | 73.4 | 41.855 |
| 256 | 113.2 | 6.782 | <u>71.7</u> | <u>10.717</u> |
| 64 | 115.9 | 1.656 | 28.0 | 6.865 |
| 16 | <u>94.3</u> | <u>0.509</u> | — | — |
| 4 | 21.7 | 0.554 | — | — |

*: 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

†: カイネティック比濁法で使用されたのLAL試薬の検出限界を0.03EU/mLとして評価し、添加回収率を乗じた値