

厚生労働科学研究 研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス
総合研究事業

抗毒素製剤の効率的製造方法の開発に関する研究

平成18-20年度 総合研究報告書
平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高橋元秀

平成21年(2009)3月

厚生労働科学研究 研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス
総合研究事業

抗毒素製剤の効率的製造方法の開発に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高橋元秀

平成21年 (2009)3月

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

抗毒素製剤の効率的製造方法の開発に関する研究班

平成 20 年度 研究組織

研究代表者

高橋 元秀 国立感染症研究所 細菌第二部 第三室長

研究分担者

大隈 邦夫 (財) 化学及血清療法研究所 品質管理部長
黒澤 良和 藤田保健衛生大学総合医科学研究所 所長、教授
向本 雅郁 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科准教授
千葉 丈 東京理科大学基礎工学部 教授
山本明彦 国立感染症研究所 細菌第二部 第三室

研究協力者

千北一興 (財) 化学及血清療法研究所 第一製造部部长
銀永明弘 (財) 化学及血清療法研究所 第一製造部次長
諸熊一則 (財) 化学及血清療法研究所 第一製造部
中西喜彦 (財) 化学及血清療法研究所 第一製造部
八木 翼 (財) 化学及血清療法研究所 第一製造部
東 成見 藤田保健衛生大学 総合医科学研究所
小崎俊司 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科教授
幸田知子 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科
相内 章 国立感染症研究所 感染病理部 協力研究員
前田仁孝 東京理科大学 基礎工学部大学院 基礎工学研究科
川瀬琢央 東京理科大学 基礎工学部大学院 基礎工学研究科
井田明里 東京理科大学 基礎工学部大学院 基礎工学研究科
石田 功 (株) キリン医薬カンパニー
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
見理 剛 国立感染症研究所 細菌第二部 第三室

目 次

頁

I.	総括研究報告書	
	抗毒素製剤の効率的製造方法の開発に関する研究	
	研究代表者 高橋 元秀	3
II.	分担研究報告書	
1.	ウマ抗毒素製剤の改良と人型抗体に関する開発研究	
	大隈邦夫	13
2.	ウマ抗毒素血清からヒトモノクローン抗体への開発移行に おける障害の解決・研究	
	—抗ボツリヌス毒素中和抗体単離を例とした免疫ヒト リンパ球から完全ヒト中和抗体作製の開発研究—	
	黒澤良和	23
3.	ボツリヌス抗毒素製剤の評価法に関する研究	
	向本雅郁	27
4.	抗破傷風毒素ヒト組換えポリクローナル抗体製剤の開発	
	千葉 丈	35
5.	抗毒素の力価定量法の検討	
	— 抗毒素の力価定量法の検討とWHOへビ抗毒素ガイド ラインの検証—	
	山本明彦	41
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	55
IV.	研究成果の刊行物・別刷り	59

I. 総括研究報告書

総括研究報告書

抗毒素製剤の効率的製造方法の開発に関する研究

研究責任者 高橋元秀 国立感染症研究所

研究要旨

ウマ抗毒素製剤の製造法の改良として、ウマ免疫用抗原の製造時に用いる培地等の BSE 対策、製造工程におけるウイルス除去方法の検討、および使用実態が不明なまむし抗毒素の調査方法を検討した。また、ウマ抗毒素血清からヒトモノクローン抗体への開発移行における障害の検証をおこない、ファージディスプレイ関連特許のライセンス、ボツリヌスなど超希少疾患の治療薬開発には国策として企業-国家の関係構築を具体化すること、オリゴクローン抗体の承認体制の整備が必要なこと、および製造認可承認における臨床治験の場の欠如等が障害となるために対応策が必要であることを確認した。また、作製したボツリヌス A 型と E 型毒素に対するマウス-ヒトキメラ抗体は低い毒素レベルでは完全中和が確認された。また、破傷風毒素に対するヒト組み替えポリクローナル抗体の検討では、KM マウスを用いて破傷風毒素を中和するヒト IgG1 抗体は、過去に作製した EBV ハイブリドーマ法で得た抗体とは異なるエピトープを認識し、複数混合することで中和能が増強されることを確認した。また、抗毒素の力価定量法の検討として、抗破傷風人免疫グロブリンの力価定量法を検討した結果、現行生物学的製剤基準の試験期間は短縮の可能性がある、今後の製造所の試験成績を含めて解析し、基準変更を目指すこととなった。また、ヘビ抗毒素製剤の WHO ガイドラインへの適合性を日本及び台湾の状況調査の結果、両国ともガイドラインを満たす十分な製造、品質管理体制ではないことがあきらかとなった。

研究分担者

大隈邦夫	(財)化学及血清療法研究所 品質管理部長
黒沢良和	藤田保健衛生大学 総合医科学研究所長 教授
向本雅郁	大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科准教授
千葉 丈	東京理科大学 基礎工学部 教授

A. 研究目的

ウイルス感染もしくは毒素性細菌が体内に侵入・増殖し産生した毒素を吸収すると、それを中和する能力を持つ抗体が産生される。この抗体が病気治癒に役立っており、ガス壊疽、ジフテリア、ボツリヌス等の毒素性細菌感染症の治療や、ハブヤママシの毒ヘビ咬症の治療に対してウマ抗毒素製剤が利用されてきた。海外においてもウマ抗毒素製剤は多方面の治療に用いられているが、製造方法の改良は、投入する費用回収の採算性が乏しく、製造所による積極的な検討は事実上おこなわれていない。国有抗毒素製剤は市場性、経済性に乏しく、民間企業だけでは改良、開発が望めない製剤であるため、基礎研究、具体的な製剤化に関して、国の経済的、政策的な支援が必要である。当該研究組織は、国内のウマ抗毒素製剤の製造所、ヒト型抗体の研究開発の問題点を理解し、それらに対応可能な知識、技術基盤を有する産官学の研究者で構成する。

ウマ抗毒素製剤の安定供給には、免疫原である毒素およびトキシノイドの十分な調達・確保(量・品質面)、ウマ免疫の効率化(有効率・高力価収量・低労力)、抗毒素精製の技術力向上(高品質・高収量その他)等、さまざまな課題がある。これらの問題点を少しずつでも解決していくことは、将来的には抗毒素製剤の効率的製造方法への改善へと繋がり、延いては国への大きな社会的貢献が期待出来る。また、ウマ抗毒素製剤は異種由来の蛋白ため血清病等の問題があり、これをヒトモノクローン抗体に変換したいという強い社会

的ニーズが存在するため、現行ウマ抗毒素製造の具体的な改良点と対応策およびウマ血液由来製剤以外のヒト抗体の基礎研究が望まれている。また、組換えモノクローナル抗体を作製する技術の多くは、海外の企業などの特許が成立していることから、治療の対象として企業の採算に合うものでなければ開発が難しい状況にある。本研究の一部では、そのような技術は用いないで、過去に独自に開発をしたEBV-ハイブリドーマ法を用いてモノクローナル抗体を作製する点に特色と獨創性がある。

B. 研究方法

1. ウマ抗毒素製剤の改良：ウマ抗毒素製剤には化血研独自で製造法を開発した製剤(はぶ抗毒素・まむし抗毒素)と千葉県血清研究所から承継した製剤(ボツリヌス・ジフテリア抗毒素・ガスエソ抗毒素)がある。両者の製造法は製造許可申請時の方法で、製造工程が微妙に異なる。最終製剤の γ グロブリンの構成比を SDS-PAGE および HPLC で比較した。また、菌培養における培地は BSE 発生対象国の薬品等を使用しない方向である。ガスエソ抗毒素の培地に用いられている米国産牛由来原料の代替品を非発生国の試薬で検討した。
2. ウマ抗毒素血清からヒトモノクローン抗体への開発移行における障害の解決・研究：関連した文献およびガイドライン等を整理して、総括した。さらに A 型および B 型抗体の完全中和の組み合わせを検討した。
3. ボツリヌス毒素に対する再現性に優れた効率的な評価法の確立：前研究班で作出した抗 A 型および E 型神経毒素キメ

ラ抗体産生細胞のクローニングを行い抗体産生量の高いクローンを選別した。無血清培地で培養し、培養上清より Protein G 結合からカラムを用いてキメラ IgG を精製した。精製キメラ IgG を用いて中和活性をマウス中和法で、結合活性を ELISA 法により評価した。

4. 抗破傷風毒素ヒト組換えポリクローナル抗体製剤の開発：ヒトの抗体遺伝子を含む人工染色体を有し、マウス自身の抗体遺伝子の発現は完全に抑制されている KM マウス（協和発酵キリン）を免疫に用いた。KM マウスに破傷風トキソイドあるいは破傷風毒素を繰り返し投与して免疫した。免疫後、血清の破傷風毒素に対する抗体価を ELISA でモニターし、中和抗体活性は ddY マウスを用いた *in vivo* 中和試験で定量した。血清の中和抗体活性の高いマウスの脾細胞を用いて、SP2/0 とのハイブリドーマを作製し、抗破傷風毒素抗体産生ハイブリドーマを ELISA で選択し、その中から、さらに中和抗体産生ハイブリドーマを *in vivo* 中和試験で選択し、破傷風毒素を中和するヒト抗体パネルを作製した。これらの中和抗体が破傷風毒素上のどの部分を認識しているかを調べるために、大腸菌内で発現させた破傷風毒素の L および Hc フラグメントへの結合性を解析した。また、BIACORE を用いた競合解析で、これらの中和抗体は互いに異なるエピトープを認識するかを調べた。さらに、中和抗体パネルを用いて、それらのいくつかを組み合わせることで、中和活性の増大が起こるかどうかを、ddY マウスを用いた中和試験で定量し検討した。

5. 抗破傷風人免疫グロブリンの力価測定のための、マウスの観察期間の短縮の可能性を確認する具体的な方法として、抗破傷風人免疫グロブリン 50 検体分の力価試験結果を検証した。観察期間を 4 日、3 日および 2 日と短縮した時の、標準品および検体それぞれのマウスの生死数から、プロビット法による統計処理を行って力価を算出し、通常行っている 5 日間の観察から算出された力価と比較した。算出された力価の比較には、対応する 2 つの力価を二元配置し、その相関曲線及び相関係数とその危険率を算出した。

C. 研究結果

1. ウマ抗毒素製剤の改良：(1) 米国産牛由来原料(培地)の除去検討では、プロテオスバプトンの原産国を豪州産牛のものに変更し菌培養を試み、生産規模での菌培養における菌発育性、毒素産生性並びに産生毒素の性状等も評価し確認した。ガスエソ Welchii 抗原は、PB6K 株を本培養用培地 10 L へ植菌後、約 12 時間で至適継代菌数 (OD_{660nm}:1.0~2.0) に到達し、3.2~4.5 Lv/mL の毒素産生を達成した。また、ガスエソ VS 抗原は #44 株を本培養用培地 10 L へ植菌後、約 21 時間で至適継代菌数 (OD_{660nm}:0.6~0.7) に到達し、結果として 400~476 LD₅₀/mL の毒素産生を達成した。(2) ウマ抗毒素製剤のウイルス除去対策への取組みでは、ウマ抗毒素製剤の一般的な製造工程においてペプシン消化条件の相違によるウイルス不活化状況を文献的に調査した結果、一般的な消化条件 (pH 3.1~3.3, 0.6~24 時間) で殆どのウイルスは不活化可能な報告があり、今後条件設定して検討する。

(3) まむし抗毒素の使用実態調査への取り組みは、まむし咬傷数と診断根拠の調査、抗毒素使用の症例数と抗毒素入手に係る課題、症例当りの使用本数の実態、まむし咬傷例の転帰と抗毒素使用の有無、血清病の発生頻度と重篤性又は転帰、抗毒素以外の使用代用薬、担当医の判断についての調査案の作製を完了した。

2. ウマ抗毒素血清からヒトモノクローン抗体への開発移行における障害の解決・研究：本研究班で開発した抗体の実用化には解決しなくてはならない課題が山積している。

- ・本件で該当するのはファージディスプレイ関連特許であるが、本件に代表される関連特許の丸抱えによる莫大な特許費用・マイルストーンの要求、或いは特許のライセンスアウトを拒む企業政策が、医薬品開発での高い壁となっている点。
- ・ボツリヌス症など超希少疾患の治療薬開発・より安全な医薬品代替化に、国策として企業—国家の関係構築が必要ではないか（医薬品開発には莫大な開発コストが必要となることから、企業は売上が見込めない疾患の医薬品開発が殆ど行われないのが現状である。生命を守る安全な医薬品を国民に提供するには国策による医薬品開発から販売までの間の補助が不可欠と言える）。また上記特許問題との兼ね合いをどうつけるか。
- ・今回見出したボツリヌス毒素中和抗体の様な複数のモノクローン抗体を組み合わせ使用しなくては効果を発揮しない（オリゴクローン抗体）抗体医薬品の承認体制が整備されていない。
- ・安全性を考慮したウマ抗毒素製剤からの

切り替えを目標に開発を実施しても、超希少且つ緊急性を要する重篤な疾患のため、安全性・効果を確認する臨床試験の実施が困難である。

我々は問題を提起するとともに、国の関与も含めた解決策を模索していく必要がある。

3. 抗A型神経毒素キメラ抗体では、2種類の異なるマウスハイブリドーマクローン由来のH鎖およびL鎖を用いて作製したキメラ抗体において1 μ g/mlの濃度で40 LD₅₀/mlの神経毒素を中和できるクローンが得られた。抗E型神経毒素キメラ抗体ではマウスモノクローナル抗体で完全中和したクローンから作製したキメラ抗体で同様の高い中和活性と結合活性をもつクローンを得ることができた。

4. 抗破傷風毒素ヒト組換えポリクローナル抗体製剤の開発：作製したハイブリドーマの中で破傷風毒素へ結合するヒト抗体を産生しているハイブリドーマを選択するためにELISA法を行った結果、75クローンを得た。このクローン中で毒素中和能を有する抗体の選択は培養上清の毒素中和試験を行った。その結果、毒素中和能を有する7クローンを確認した。また、これら抗体を複数混合することで、単独時よりも中和能が増強されることを確認した。さらに中和抗体が破傷風毒素上のどの部分を認識するか解析として、大腸菌内で発現させた破傷風毒素のLおよびHcフラグメントへの結合性を解析した。その結果、3種類の中和抗体はHcと結合することが示された。またBIACOREを用いた競合解析で、これらの中和抗体は互いに異なるエピトープを認識することが示唆

された。

5. 今回解析に用いた 50 検体分の力価試験値は、ヒト及びウマ由来の 2 種類の標準品を用いた試験値が含まれている。また、抗破傷風人免疫グロブリン製剤は、その剤形が乾燥、液状及びポリエチレングリコール処理と 3 種類存在し、5つの製造所により生産されている。このような分割できる群ごとに、観察期間を短縮して計算される力価を比較した。その結果、観察日数は 5 日から 4 日であれば力価に及ぼす影響が無いことが確認された。また、蛇毒抗毒素の製造と品質管理方法等の WHO ガイドラインへの適応調査を日本及び台湾に関して調査した結果、両国ともに GMP に即した管理は原材料の蛇にまで及んでいない。台湾では 3 種類の蛇抗毒素を CDC が製造しているが、その効果を測定するための試験方法は、マウス致死活性の中和試験を行っている。しかし、試験に際しては、標準抗毒素、標準毒素を用いていないために、安定した製剤が製造を目指す場合は、WHO ガイドラインが示す国家検定期間の標準品作製が必要である。

D. 考察

1. 米国産牛由来原料(培地)の除去検討として、2種の抗原作製における BSE 対策が抗原の生物活性を指標として評価する系で確認された。今後は実生産で毒素をトキシソイド化して接種した免疫馬の抗体誘導が安定して得られる確認作業が求められる。抗毒素製剤のウイルス除去対策への取り組みとして、ウイルス・クリアランス・データ取得に向け、ペプシン消化におけるウイルス不活化

の報告例を調査した結果、当所製剤のペプシン消化時の蛋白濃度は低く、従来品(まむし・はぶ)で pH は高めであるが処理時間は長いため、当所の条件でウイルス・クリアランスは十分なレベルと推察された。ウイルス不活化のデータ取得に当っては、最低 3 種類の異なる構造を持つウイルスを選定し(DNA/RNA、被膜有/無)、人畜共通感染症の観点からウマに保菌の可能性の高いウイルス群を選択することが望ましく、当該検出系の確立や取扱の簡便さ等も重要な要素となる。これらの要求を考慮すれば、ウマインフルエンザウイルスや日本脳炎ウイルスが妥当と考える。

まむし抗毒素の使用実態調査への取り組みでは、実施上の課題が明確になった。

2. 本研究を実施するに当たり抗体のソースとなったドナーの血清中には、中和抗体価としては充分とは言えないまでも、ボツリヌス毒素に対して中和活性を示す。その体内に存在する抗体産生細胞を取り出してライブラリー化し、単離した A 型ボツリヌス毒素を中和するモノクローン抗体は、元来血清中に含まれる A 型ボツリヌス毒素中和抗体全体の何%をカバーしているかは不明である。しかし、特定の中和抗体同士を組み合わせることで完全なる中和活性を再現することに成功し、治療用途に耐え得る活性を示す組み合わせまで到達することができた事は大きな意味を持つ。それは我々の「目的の性質を示す抗体を保有する 1 名のドナーから成分採血による抗体産生細胞の獲得→抗体ライブラリー作製→スクリーニング→単離抗体の活性評価・抗体の組合せ決定」という一連のストラテジーが目論見通りワークしたことを表現している。

3. A 型神経毒素に対するモノクローナル

抗体ではこれまで1クローン単独で毒素を完全中和する抗体がなかなか得られなかった。今回、遺伝子組み換えを利用することで異なるクローン由来のH鎖とL鎖の組み合わせで非常に高い中和活性を有する抗体を作製することができた。今後、さらに多くのクローンからの抗体遺伝子の組み合わせを用いることでより有効な抗体が得られることが期待される。E型に対する抗体は1クローンから得られた抗体で十分利用できることが明らかとなった。マウス-ヒトキメラ抗体は今後ウマ抗毒素に代わる安全で有効な抗毒素製剤となりうる事が示された。

4. 7種類の破傷風中和ヒト抗体のうち5種類は破傷風毒素上のHcフラグメントを認識して、破傷風毒素が神経細胞へ結合する作用に関与する。従ってHcフラグメントに反応性の中和抗体は、毒素が細胞へ結合することを直接阻害することで、中和能を発揮していると推測される。本実験で得られたこれらの中和抗体は今まで得られていた抗体とは異なる部分を認識して中和を誘導できることより、新たな抗体としての有用性が示された。今後、抗毒素製剤に匹敵する中和能をもったオリゴクローナル製剤の実現が期待される。

5. 台湾のヘビ抗毒素製剤の製造と品質管理の調査では、市販後の有効性と安全性の調査体制は充実しており、我が国においても国家主導の台湾のような体制を確立することが必要であると思われた。

E. 結論

1. ウマ抗毒素製剤の免疫原製造上の課題であるガスエソ抗毒素のBSE対策として、

米国産牛由来原料の切替えはWelchii抗原とVS抗原につて、米国産牛由来ブクテオス[®]を豪州産で可能となった。ウイルス除去対策では文献上ではペプシン消化で可能なことが明らかとなり、チャレンジャー[®]ウイルスを選定し、具体的実証をおこなう。また、国内のまむし抗毒素の使用実態解明からのアンケート調査案の作成を終了した。

2. ウマ抗毒素血清からヒトモノクローン抗体への開発移行における障害の検証では、ファージディスプレイ関連特許によりライセンスアウトを拒む企業政策が開発費への課題であり、ボツリヌス症など超希少疾患の治療薬開発においては、国策として企業-国家の関係構築を具体化することが必要である。また、本研究結果である複数のモノクローン抗体を組み合わせることで効果が期待されるオリゴクローン抗体の承認体制が整備されていない。さらに現行の製造認可承認制度で求められる臨床治験の場を探すことは極めて困難である。

3. 3種類のA型ボツリヌス毒素中和マウス-ヒトキメラ抗体のH鎖、L鎖遺伝子をシャッフルして得たキメラ抗体は、1 μ g/mlの抗体濃度でA型神経毒素を完全中和した。また、E型毒素中和キメラ抗体を産生する1クローンは、抗体濃度5 μ g/mlで完全中和した。以上の結果から、A型とE型毒素を中和するマウス-ヒトキメラ抗体を作出した。

4. 破傷風毒素を中和するヒトIgG1抗体の新たな7クローンを、KMマウスを用いて作製した。これらの抗体は、EBVハイブリドーマ法で得た中和抗体とは異なる破傷風毒素Hc断片上に存在するエピトープを認識した。また、これらの中和抗体を

組み合わせた場合は、中和能が増強された。抗毒素製剤に匹敵する中和能をもったオリゴクローナル製剤の開発に期待される。

5. WHO ヘビ抗毒素製剤の製造・品質管理等に対するガイドラインの検証を国内および台湾でおこなったが、示されているGMPの実施には多くの経済的負担と担当者への教育が必要であることが確認された。

F. 健康危害情報

わが国のウマ抗毒素製剤には、はぶ抗毒素、まむし抗毒素、ガスエソ抗毒素、ジフテリア抗毒素及びボツリヌス抗毒素の計5種類がある。当該研究班活動による事業を積極的に展開することにより、将来的にはこれらのウマ抗毒素製剤の効率的製造方法への改善が期待され、国の危機管理を含めた高品質な抗毒素の安定供給が成就され、大きな社会貢献となり得る。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許出願

「A型ボツリヌス毒素中和組成物及びヒト抗A型ボツリヌス毒素抗体」を国際出願した。

国際出願番号 PCT/JP2009/000250

出願日 2009.1.23

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

II. 分担研究報告書

分担研究報告書

抗毒素製剤の効率的製造方法確立への取組み
— ウマ抗毒素製剤の改良研究 —

研究分担者：大隈 邦夫
財団法人 化学及血清療法研究所

研究要旨

わが国のウマ抗毒素製剤には、はぶ抗毒素、まむし抗毒素、ボツリヌス抗毒素、ガスエソ抗毒素及びジフテリア抗毒素の計5種類があり、全て同じ製造所で製造されている。衛生環境の向上、ワクチンの普及及び毒素性疾患に対する対症療法の進歩に伴い、国内における抗毒素製剤の需要は低くなっている。ただ、世界的には蛇毒抗毒素の供給不足も危惧され、抗毒素の国際的な補い合いによる解決への足掛りとして、WHOガイドライン制定に向けた動きがある。枯渇回避のみならず、ガイドライン準拠のための調査研究を図り、高品質な抗毒素製剤を供給することは我々の重要な責務である。

本研究では、抗毒素製剤の品質向上の一貫から、昨年に引き続き、ウマ免疫用抗原製造時に使用の「米国産牛由来原料の切替え」及び「免疫グロブリンのウィルス除去対策」について検討した。また、その他の取組みとして「まむしウマ抗毒素の使用実態アンケート調査」についても検討した。

A. 研究目的

1. 米国産牛由来原料(培地)の除去検討：
ガスエソ抗毒素の免疫用抗原製造に用いている培地には、原材料に米国産牛肉が含まれている。2003年12月末、米国でBSE感染牛が報告されて以来、米国産牛由来原料を含む医薬品に関しては法規制により、早急な原料の切替えが要求されている。昨年度はWelchii菌について、現行培地(原材料に米国産牛由来成分を含む)と

同等の菌発育性・毒素産生性を有する代替培地候補品として、現行培地の原産国-豪州産牛への切替えによるものが最有力であることを報告した。本分担研究ではWelchii菌及び残された課題のVS菌についても、代替培地を用い生産規模での検討を行った。

2. ウマ抗毒素製剤のウィルス除去対策への取組み：2008年、蛇毒抗毒素製剤の製造・品質及び規制に関するWHOガイドラインが検討

されている。これに伴い、生産体制の GMP 適応範囲の見直しや迷入ウイルス除去・ウイルスパクリーション等の新たな品質管理手法の導入が要求されている。本分担研究では抗毒素製剤のペプシン消化工程におけるウイルスクリアランスに関するデータ取得に向けた調査を実施した。

3. まむし抗毒素の使用実態調査への取り組み： まむし咬傷は、保健所・厚労省への届出システムがなく、咬傷患者の実数は不明である。抗毒素の販売量から 2,000～3,000 件/年の発生が考えられ、まむし咬傷による死亡数は 20～100 件/年と推測されている。重症例には、緊急的な抗毒素療法が最も有効であるが、その使用実態は不明である。本分担研究では、国内のまむし咬傷とその治療実態の解明を目的に、抗毒素使用に関するアンケート調査を計画し検討した。

B. 研究方法および C. 研究結果

1. 米国産牛由来原料(培地)の除去検討： ガスエソ Welchii 菌の培養には米国産牛を由来とするクックトミートとプロテオスバクトンを使用している。また、ガスエソ VS 菌の培養にも米国産牛由来のプロテオスバクトンを使用している。これまで、当研究班活動を通じ、Welchii 抗原については代替培地の選定まで終えている。今年度は Welchii 抗原対応の最終確認の位置付けとして実生産規模での菌培養を試みた。また、VS 抗原への対応は本年度から新規に代替培地の検討を開始した。Welchii 抗原検討の実績を参考に、プロテオスバクトンの原産国を豪州産牛のものに変更し菌培養を試み、最終的には Welchii 抗原同様、生産規模で

の菌培養における菌発育性、毒素産生性並びに産生毒素の性状等も評価し確認した。尚、培地の調製は現行法に従い実施した。

(1) ガスエソ Welchii 抗原の検討

Clostridium perfringens PB6K 株を、生産規模の本培養用培地 10 L へ植菌後、約 12 時間で至適継代菌数 (OD660nm: 1.0～2.0) に到達し、結果として 3.2～4.5 Lv/mL の毒素産生を達成した。代替培地による菌の発育と毒素産生は現行培地とほぼ同等であった(表 1)。ゲル内沈降反応では代替培地由来と現行培地由来の両毒素間で抗原性の差は認められなかった(図 1-A)。SDS-PAGE では代替培地由来の培養上清には 15KDa 付近に不純蛋白を多く含んでいたが、精製後の除去を確認し、純度は同等以上であることが示された(図 1-B)。

(2) ガスエソ VS 抗原の検討

Clostridium septicum #44 株を、生産規模の本培養用培地 10 L へ植菌後、約 21 時間で至適継代菌数 (OD660nm: 0.6～0.7) に到達し、結果として 400～476 LD50/mL の毒素産生を達成した。代替培地の菌発育性と毒素産生性は現行培地と比較し同等以上の成績であった(表 2)。ゲル内沈降反応では代替培地由来と現行培地由来の両毒素(培養上清・精製毒素)間で抗原性に差を認めなかった(図 2-A)。SDS-PAGE でも培養上清中及び精製毒素中のそれぞれの蛋白成分に大差はなく、同等の性状を確認した(図 2-B)。

2. ウマ抗毒素製剤のウイルス除去対策への取り組み： 国内の法規制及び蛇毒抗毒素-WHO ガイドライン案において、当該製剤でのウイルス

不活化/除去率の取得が求められている。ウマ抗毒素製剤の、一般的な製造工程(図3)において、ペプシン消化、硫酸分画工程等でウイルス除去はある程度可能と推察されている。本分担研究ではペプシン消化工程に焦点を当て、①ペプシン消化条件の相違によるウイルス不活化状況を文献的に調査し、②今後の当該率取得への取組みからのウイルス選定の一助とする。ウマ抗毒素製剤のペプシン消化におけるウイルス不活化の報告例を表3-1に纏めた。一般的な消化条件(pH 3.1~3.3、0.6~24時間)で殆どのウイルスは不活化可能なことが確認されている。一方で、被膜なしのウイルスは不活化されにくいという報告もある。

3. まむし抗毒素の使用実態調査への取組み：国内でのまむし抗毒素の使用実態を明らかにする目的で、以下に示す内容のアンケートを起案した(別紙1)。

- ①まむし咬傷数と診断根拠の調査。
- ②抗毒素使用の症例数と抗毒素入手に係る課題。
- ③症例当りの使用本数の実態。
- ④まむし咬傷例の転帰と抗毒素使用の有無(受傷から抗毒素投与までの時間)。
- ⑤血清病の発生頻度と重篤性又は転帰。
- ⑥抗毒素以外の使用代用薬(セファンチン等)。
- ⑦担当医の判断(抗毒素は有効か/必要か)。

本分担研究では、結果として当該医療機関へのアンケート調査の実施には至らなかったが(別紙2)、今後に向けて課題が明確となった。

D. 考察

1. 米国産牛由来原料(培地)の除去検討がスエーデンWelchii菌及びVS菌について、代替培地を用い生産規模で検討し、菌発育

性、毒素産生性並びに産生毒素の性状を比較/分析した。評価すべき項目の全てで同等性を確認し、代替培地への切替の可能性を見極めた。以下に補足の説明を加える。

Welchii毒素の毒力測定は卵黄法(Lv試験)及びマウス-LD50法で行った。両測定値の相似性確認において、代替培地検討と現行培地共に「1Lv≒40LD50」であった。この結果から、両培地間で産生されるα毒素(=Welchii毒素)以外のθ毒素やκ毒素は、その産生量に大差のないことが示された。

Welchii毒素のゲル内沈降反応において(図1-A)、現行培地では2本の沈降線が生じたのに対し、代替培地では1本のみであった。リコンビナントWelchii毒素との沈降線の融合より、現行培地の他1本の沈降線は培養上清中のWelchii毒素以外の不純物との反応であることが推察された。

1. ウマ抗毒素製剤のウイルス除去対策への取組み

抗毒素製剤のウイルス・クリアランス率取得に向け、ペプシン消化におけるウイルス不活化の報告例を調査し検証した。当該報告例のデータを分析し、当所製剤のペプシン消化条件との比較を行った(表3-2)。当所製剤のペプシン消化時の蛋白濃度は低く、従来品(まむし・はぶ)でpHは高めであるが処理時間は長い為、当所の条件でウイルス・クリアランスは充分ないかと推察された。

ウイルス不活化の率取得に当っては、最低3種類の異なる構造を持つウイルスを選定し(DNA/RNA、被膜有/無)、人畜共通感染症の観点からウマに保菌の可能性の高いウイルス群を選択することが望ましい。加えて、当

該検出系の確立や取扱の簡便さ等も重要な要素となる。これらの要求を考慮すれば、ウマインフルエンザウイルスや日本脳炎ウイルスが妥当と考える。

3. まむし抗毒素の使用実態調査への取組み

当該アンケート調査は、結局、実施出来なかったが、実施上の課題が明確になった。①製剤への付属による調査は販売網への直接的負荷に繋がり困難である。②公的機関(例えば研究班)からのランダムなアンケート調査は高回収率が期待出来ない(販社へのクレームも懸念)。③アンケート調査会社への全面委託は金銭的に難しい。④個人情報保護法面の課題も懸念される。

E. 結論

1. ウマ抗毒素製剤の免疫原製造上の課題として、ガスエソ抗毒素のBSE対策から、米国産牛由来原料の切替えの可能性を生産規模で検証し、代替培地への変更は問題ないことを確認した。すなわち、①Welchii抗原については米国産牛由来プロテオスベプトンを豪州産に変更し、米国産牛由来クックミートは未使用とする。②VS抗原でも米国産牛由来プロテオスベプトンを豪州産に変更する。今後、薬事法上の所定の手続を経て、生産実施へと移行していく予定である。

2. ウマ免疫グロブリンのウイルス除去対策への取組みとして、文献等の報告事例を調査し、ペプシン消化は我々の条件と対比し、ウイルス不活化への寄与が確認された。今後、チャレンジウイルスを選定し、具体的な検討計画を立案し、抗毒素製造工程におけるウイルスクリアランスを調査していく必要がある。

3. 国内のまむし抗毒素の使用実態解明からのアンケート調査の実施には至らなかったものの課題が明らかとなり、調査すべき内容を整理できたことは、今後に向けて大きな成果となった。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

論文発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

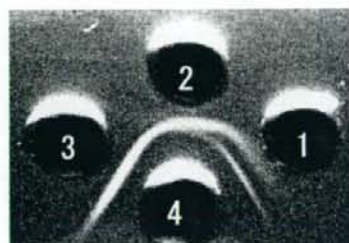
なし

表1. ガスえそWelchii:代替培地での毒素産生性の確認

No.	培地の種類	菌発育		毒素産生			
		培養時間 ^{#1} (時間)	OD ₆₆₀	毒力		蛋白量 (μ g/mL)	純度 (Lv/mg)
				卵黄法 (Lv/mL)	マウス法 (LD ₅₀ /mL)		
1	代替培地	10.9	1.590	3.2	133	216	15
2	代替培地	11.9	1.341	4.5	190	166	27
3	代替培地	11.9	1.572	4.5	190	193	23
製造実績 (n=19) 現行培地		12.4 ^{#2}	1.381 ^{#2}	3.36 \pm 0.71 ^{#2}	—	234 \pm 24.5 ^{#2}	15 \pm 4.1 ^{#2}

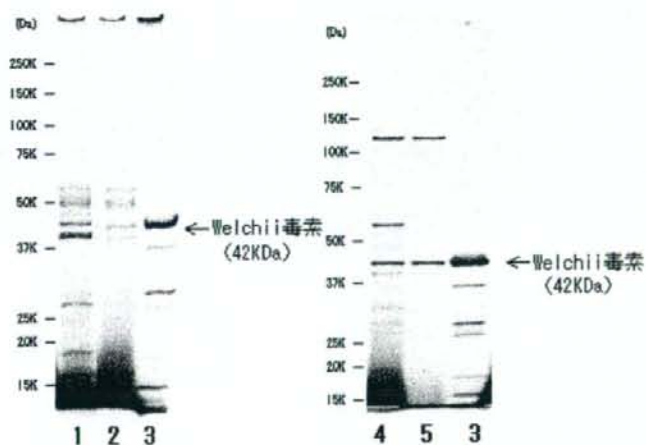
#1, 菌植付～継代までの培養時間。

#2, 「平均値」又は「平均値 \pm SD」を示す。



(ゲル沈による抗毒素との反応性)

- 1: 培養上清(現行培地)
- 2: 培養上清(代替培地)
- 3: リコンビナントWelchii毒素
- 4: Welchiiウマ抗毒素



培養 (SDS-PAGEによる性状比較)

- 1: 現行培地による
- 2: 代替培地による
- 3: リコンビナントWelchii毒素
- 4: 精製前(代替培地)
- 5: 精製毒素(代替培地)

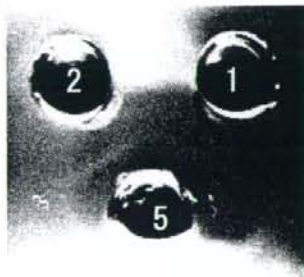
図1. ガスえそWelchii:代替培地での毒素性状と免疫原性の確認

表 2. ガスエそ VS:代替培地での毒素産生性の確認

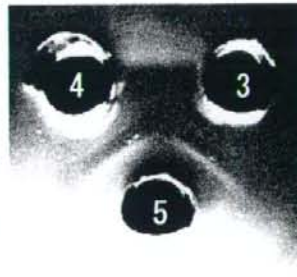
No.	培地の種類	菌発育		毒素産生			
		培養時間 ^{#1} (時間)	OD ₆₀₀	毒力 (LD ₅₀ /mL)	蛋白量 (μ g/mL)	純度 ($\times 10^3$ LD ₅₀ /mg)	
1	代替培地	21.1	0.637	476	151	3.2	
2	代替培地	21.8	0.608	400	151	2.7	
3	代替培地	20.0	0.762	476	160	3.0	
製造実績 (n=10)		現行培地	21 ^{#2}	0.65 ^{#2}	352 \pm 173 ^{#2}	186 \pm 50.1 ^{#2}	2.1 \pm 1.1 ^{#2}

#1, 菌植付～継代までの培養時間。

#2, 「平均値」又は「平均値 \pm SD」を示す。



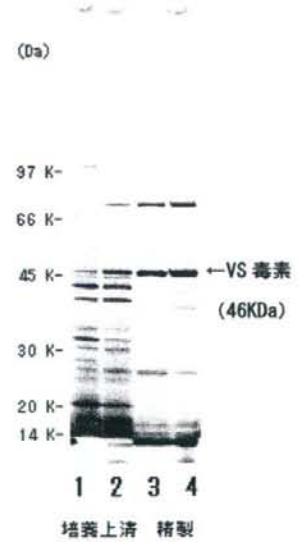
培養上清



精製

(ゲル沈による抗毒素との反応性)

- 1と3: 代替培地による
- 2と4: 現行培地による
- 5: VS γ 抗毒素



(SDS-PAGEによる性状比較)

- 1と3: 代替培地による
- 2と4: 現行培地による

図 2. ガスエそ VS:代替培地での毒素性状と免疫原性の確認

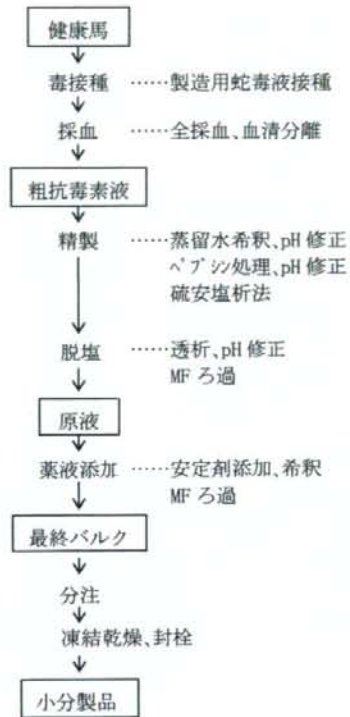


図 3. 蛇毒マ抗毒素製剤の製造工程