

抗毒素製造に使用する動物の選択、健康管理と免疫

1. 動物の選択と獣医による健康管理

抗毒素製造のための動物を選ぶ目安は、1) 抗毒素製造の規模で大量の抗毒素の製造にはウマなどの大型の動物が適している。2) 入手しやすさ。3) 抗体のタイプ、動物によっては特殊なイムノグロブリンを持っている。4) その地方ではやっている病気への耐性。5) 飼育管理に関するコスト。現状では、多くの場合ウマが使われ、少数ながらヒツジが使われている。

動物を選んだら、まず数ヶ月の検疫期間をおき、その間に、個体識別用の処置、破傷風などの予防接種、寄生虫の駆除などを行って、免疫のための準備をする。動物は、最上の状態で飼育管理されなければならない。

免疫を開始したら、動物の健康状態を常にチェックし、病変の兆候が見えたら、免疫を中止して適切な治療を行う。特に毒を注射した局所の傷害には注意を払うべきである。動物の毒に対する免疫応答については、免疫の期間を通して監視を続ける。

動物が何らかの抗生物質や生ワクチンを投与された時は、4週間はいったん免疫計画からはずすべきである。

2. 免疫計画とアジュバント

免疫原であるヘビ毒と免疫計画は、動物の健康状態に深刻な影響を及ぼすものであってはならない。免疫原の調製と免疫プロトコールは、技術的に単純で、経済的であり、毒の使用量も最小にすべきである。

ヘビの毒は95%以上はタンパク質で、コブラ科の毒の主成分(後シナプス型神経毒を指す)は分子量10kD以下で、免疫原性は低い。これに対しクサリヘビ科の毒の主成分にはタンパク質の加水分解酵素が多く含まれ、分子量は10kD以上、免疫原性は高い。

動物の表皮内には、抗原提示細胞として働く樹上細胞が存在しており、その数は1平方ミリあたり数百で、微生物の生産物で活性化される。皮下に入った免疫原はこの樹上細胞と共にリンパ節に送られ、リンパ節が免疫応答の場となる。ガイドラインの免疫戦略は、この原理を基礎に置いている。

そこで免疫原の作成は、まず毒溶液の調製、毒の無毒化、アジュバントと一緒にして免疫原の調製、という順序になる。毒を扱う上で注意すべきは、凍結乾燥した毒は非常に軽く、空気中に飛散しやすく、アレルギー原性があるので、吸い込まないようにする。また吸湿性が高いので、乾燥した部屋で取り扱うのが望ましい。吸湿した毒は固まったり、秤量で誤差を生じるし、毒液中のタンパク質分解酵素によって変性したりする。

毒液の調製に当たっては、複数の毒液を扱う場合、一緒に混ぜるのではなく、個々の毒液を別個に調製する。このとき泡立てるのは、タンパク質が変性するので好ましくない。無毒化にはアルデヒドなどを使用するが、しばしば毒性ばかりでなく抗原性もそこなうことになり、その場合抗体ができて元毒を中和することはできなくなるので、注意すべきである。少量の毒を十分なアジュバントと共に投与する場合には生毒を使うのがよい。

アジュバントの選定は、有効性、副作用、扱いやすさ、コストなどを考慮して行う。1例としてFCAを使うとすると、毒をPBSに溶かして、等量のFCAと混合し、よく混ぜることで安定的な乳剤を得る。

3. ウマの免疫

毒液の投与に当たっては、リンパ節に近い首筋や腰の皮下に、1-2mgの毒を、2週間隔で投与するが、FCAを使う場合には、肉芽腫ができやすいので、少量ずつ10個所以上に分けて注射する。免疫期間中は詳細な記録をとり、生体内およびELISAなど生体外での検定を行って、抗体産生の状況を監視する。

有効な抗毒素を得るためには、生毒を上記の方法で投与し、2週間隔で、3回目からは毒を増量することができ、オイルアジュバントも必要なくなる。抗体価が十分上がったら採血するが、7-10日で3回から4回の採血ができる。その後は2-5週間の休止期間において、ふたたび免疫のスケジュールがスタートするが、オイルアジュバントは必要ではない。

個々の動物、あらゆる段階の免疫、プラズマの採取について、生産された抗毒素の品質管理のために、トレーサビリティが確保されなければならない。

セッションIV

分画のために用いる血漿の採取と管理

1. 血漿は抗毒素製剤の製造に国際的に広く使用している。血漿を用いる利点は血球成分を動物に戻すことができ、IgGの回収率が高いこと、ヘモグロブリンの混入が少なく、速やかに血液凝固阻止血液からの血漿が分離できることである。採血場所は専用施設とし、清潔に保ち、採血時は動物に不要なストレスを与えず、手際よく採血を終了させる。採血瓶（パック）には動物の管理内容、抗毒素名、採血月日等を記載する（バーコードで管理も考慮する）。馬の全血採血方法としては、1Kgあたり20mLとして通常1頭当たり5-8リッターで、適当な週間隔で実施する。全血採取後の血漿分離に関しては、戦勝施設を用意し、無菌条件化で、滅菌した容器に血漿を移し、清浄区域内の冷蔵室（2-8℃）で保存する。自動成分採血機（自動血漿採取機）の利点は、採血に関する作業中の事故を少なく（適正量）する。個々の血漿とプール後血漿は追跡を可能にし、品質保証を得られる手段を講じるよう。
2. 血漿の精製については、IgG、F(ab')₂およびFabの精製方法が用いられている。精製工程では、高度に安全で有効な製品化が求められる。そのためには、中和活性に悪影響を与えない方法で、蛋白の凝集を最小限にし、微生物管理によるエンドトキソンの混入には細心の注意が必要である。そのためにはGMP準拠と高い回収率およびSOPに記述された精製工程と工程管理が本質である。

精製工程で硫酸アンモニウム塩析は、IgGの回収率が悪く、蛋白の凝集が起りやすく、アルブミン等の混入があるために、カプリリク酸（オ

クタン酸)を推奨する。ペプシン処理による F(ab')₂ フラグメントは Fc フラグメントを除き蛋白の少ない製剤として用いられる。羊血液製剤では Fab が用いられて、局所拡散性に優れる反面、半減期が短く、安定性を欠く。人への咬傷後の蛇毒の作用と機能を考慮した抗体の型選択が必要である。製剤の凍結乾燥においては抗体蛋白の変性と凝集をしない保証が求められる。

品質管理試験では、溶解度(凍結乾燥品)、Extractable volume、Osmolality、Identity test、Protein concentration、Purity、Molecular-size distribution、Pyrogen test (rabbit and limulus test)、Sterility test、Concentration of sodium chloride and other excipients、Determination of pH、Concentration of preservatives、Determination of agents used in plasma fractionation、Visual inspection、Residual moisture 等が必要である。

セッション V

感染性リスク管理

人の治療にこの数年使用されてきた他の生物学的製剤から何を学んだかを元に製剤への適応を図る。これら要因は、生物学的製剤のウイルス安全性に寄与する。出発原料中の潜在的なウイルスリスクは最小に制御するために、動物の地域、個体および原材料の品質管理は重要である。十分なレベルのウイルス安全性を確保を可能とする 2 ステップのウイルスの除去を組み入れたウイルス不活化または除去方法を製造工程に補足的手段を入れる。製造の全工程で GMP として、処理の一貫性、モニターおよび重要安全性パラメーター記録が必要である。ポストマーケティング監視から発生する新しい出来事/情報に適切な対応も求められる。ウイルス不活性化および削除方法は人血漿製剤のウイルス安全性を保証するガイドラインを参考とする。

<http://www.who.int/bloodproducts>

セッション V

GMP

各国の現状

インド：3 製造所は GMP にパスしている。

タイ：FDA 査察は終了してパスしている。

中国：毒素の取り扱いは GMP 外であるが、今後含めることは可能である。

インドネシア：FDA の意見として対応可能。

ベトナム：小さな製造所は対応が難しく、小規模製造所が製造する製剤が止まるのは困る。

基本的に蛇毒生産者は抗毒素製造所が責任をもって Audit する。毒素の品質管理から GMP 対応とする案が体勢となる。ただし、インド、オーストラリアは対

応可能な意見である。

ウマの使用方法については、ある種の毒素を注射して期待する又は過去にない応答により、以降の免疫が困難とされたウマについては、他の抗原での免疫を可能とするか。

品質管理の力価試験方法

- ・毒素と抗毒素の力価の指標は、LD50 または ED50 で良いか？・・・マウスの症状・死と人の症状のメカニズムが異なるのでないか
- ・力価試験で確認するのは何か・・・抗毒素は人の発症のメカニズムに則した活性を見ることが望まれる・・・関係のない活性や現場での治療に間に合わない活性を指標にしても意味がない（ネクローズ）
- ・抗毒素の力価確認法は、in vitro で毒素と抗毒素を混合して注射するのではなく、抗毒素をあらかじめ注射しておき、その後直接動物に毒素を注射する方法が直接評価を可能とするのではないか（ライセンス申請時に成績を添付させる）。

臨床試験

F1 は不要で、F2/3 は必要。臨床治験のデザインはメーカーにとって困難なことが多い、またガイドラインに組み入れるのは統一法は無理である。たとえば、毒素の違い、患者の条件（咬傷部位、毒素量、年齢および経過時間）、投与量、臨床所見の項目等が問題である。

Post-marketing ができていない国がほとんどである。

Poison center の国家システムに蛇咬傷数等があがってくる国は、インドネシア、フィリピンで、センター病院は大半が政府系病院であり、個人病院がセンターとなっているインドでは情報収集が困難である。

WHO Bi-Regional Workshop on Production, Control
and Regulation of Antivenoms
Jakarta, Indonesia, 26 - 30 May 2008



Western Pacific Region

Australia, Brunei, New Zealand, Cambodia, China, Papua New Guinea, Philippines, Guam, Japan, Singapore, Korea, Malaysia, Viet Nam, Mongolia

South-East Asian Region

Bangladesh, Myanmar, Bhutan, Nepal, DPR Korea, Sri Lanka, India, Thailand, Indonesia

蛇毒抗毒素の歴史

- 毒素性細菌（ジフテリア、ボツリヌス、ガス壊疽等）と毒蛇咬傷患者の治療にはウマ抗毒素製剤が有効である
- 抗毒素製剤は歴史が古い製剤で、製法等の一部変更は近代GMPの手続きが面倒で各国とも変更・改良が遅れている
- 特に発展途上国では近代医療設備と技術の導入が遅れていることもあり、抗毒素治療は必須である

会議の目的

- 蛇毒抗毒素の製造と品質管理について国際的なガイドラインを作成する
- 今回のWPROとSEAROの2地域での協議後、AFROとEURO地域の協議を行う
- 2008年10月までに完成させ本年度のWHOのECBS会議に提議する

ECBS : Expert Committee on Biological Standardization

REPORT OF A WHO WORKSHOP ON THE STANDARDIZATION AND CONTROL OF ANTIVENOMS
(7 - 9 February 2001, National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, UK)

主な議論点

- 蛇毒抗毒素製剤を他の生物学的製剤で導入が進んでいる品質保証制度を適応することの必要性と妥当性(生産性が低い、発展途上国での製造と使用が多い、安価、安全性)
- GMP適合性の各製造所の対応状況として、原薬(蛇、毒素、血漿、分画標品)、品質管試験、組織、構造設備、文書管理
- 有用な製剤の製造法と同種生息地域内での特異性確認
- 治療に用いた抗毒素製剤と蛇の種類の特定
- 市販後の有効性と安全性調査

具体的な対応課題

- マムシ咬傷の患者数、臨床症状および抗毒素製剤の有効性と安全性評価調査 -

- ハブ咬傷については沖縄県と鹿児島県(奄美)でハブ対策事業年報でまとめられている。
- マムシ咬傷については患者数、症状解析、抗毒素製剤の使用量と効果について疫学調査が全く行われていない
- マムシ咬傷の実態調査方法は困難・・・救急救命センター等の医療組織、学会
- 抗毒素の市販後調査の問題点と対応策・・・アンケート調査

具体的な対応課題

- GMP適応範囲の確認 -

- 蛇-毒素-ウマ(牧場)-血漿のいずれからをGMP対象とするか
- 国内(化血研)では毒素(免疫用抗原)からGMP対象
- 参加国で多くの発言のあったインド、オーストラリアでも毒素からはGMP対象
- 中国では対応可能な方向(私信)・・・多くの蛇管理場があるが、食用目的を除けば指導可能
- 蛇族学術研究所、沖縄および鹿児島の実態との乖離
- 規制当局の最終判断・・・蛇抗毒素製剤と国内需給の特性

具体的な対応課題

— 有効期間10年の確認試験 —

- 凍結乾燥品の有効期限の設定
- 日本は10年、他国は5年程度
- 試験法・・・実温保存での安定性確認
- 加速変性試験法の安定性試験としての導入と認知度・・・WHO WGのガイドライン作成進捗との整合性
- 保存品について安定性試験の実施

具体的な対応課題

- 有効期間10年の確認試験 -

- 凍結乾燥品の有効期限の設定
- 日本は10年、他国は5年程度

Products	Units/Vial	Term of Validity
Freeze dried <i>Mamushi (Glycybus Blomhoffii)</i> antivenom		
anti-lethal titer	6,000	10 year
anti-haemorrhagic titer	6,000	10 year
Freeze dried <i>Habu (Rhabdophis tigrinus)</i> antivenom		
anti-lethal titer	6,000	10 year
anti-haemorrhagic titer	6,000	10 year
Freeze dried <i>diphtheria</i> antitoxin (Liquid type)	1,500	10 year
	1,500	3 year
Freeze dried <i>botulism</i> antitoxin		
Type A,B,E & F	A 10,000	10 year
	B 10,000	
	E 10,000	
	F 6,000	
Type E	10,000	10 year
Freeze dried <i>Gas gangrene</i> antitoxin		
<i>C.perfringens</i> type A antitoxin	5,000	10 year
<i>C.septicum</i> antitoxin	5,000	10 year
<i>C.oedematiens</i> antitoxin	5,000	10 year

具体的な対応課題

- 採血方法 -

- 免疫ウマからの採血
 - 動物愛護の側面・・・殺さない- -公園、動物園での引き取り、血球成分環流、成分採血
 - 力価の維持・・・血球成分環流、成分採血
 - 無菌性の確保・・・エンドトキシン混入防止
 - 人献血方法の導入・・・血漿成分自動還流
- 免疫・・・アジュバント種類、

具体的な対応課題

- 安全性の高い製造方法 -

- 病原体の混入の危険性制御・・・製造国でのウマ感染症との関連
- ウイルス除去または不活化方法・・・ウイルスバリデーション
- 各製造工程のウイルス混入安全確保とプロセスバリデーション
- 血漿の保存方法・・・添加物種類と温度
- 免疫グロブリンの精製技術・・・硫酸アンモニウム塩、カブリック酸処理
- 製剤のグロブリン型・・・IgG, F(ab')₂, Fab

具体的な対応課題
— 国際共同研究 —

- 各国の製品を他国の毒素で中和能があるか、各製造所の責任で試験する
- 製剤の互換使用を地域間で確認し、製造の効率化を図る
- WHOが提案して近々に関係国に試験依頼の実施予定・・・特にスリランカへの支援
- 近い将来、必ずすべてのウマ抗毒素製剤が本ガイドラインの対象となるでしょう(ガス、ボツリヌス、ジフテリア・・・)

AGENDA

SESSION I: ESTIMATES OF ENVENOMING AND MORTALITY DUE TO SNAKEBITE & MAJOR VENOMS TO BE CONSIDERED FOR PREPARATION OF ANTIVENOMS IN ASIAN AND PACIFIC REGIONS.

- 推定蛇咬傷数と死亡率
- 対象2地域(SEAROとWPRO)で抗毒素の準備を考慮すべき蛇(サソリ)と毒素の種類、臨床的に関連するヘビ毒

AGENDA

SESSION II: DESIGN AND PREPARATION OF VENOM MIXTURES

- ウマ免疫用に混合する毒素のデザインと準備、単一毒素または複数毒素の特異性の選択、毒素の調整と保存法およびその品質管理、凍結乾燥と免疫時の組成およびその方法

SESSION III : SELECTION, HEALTH CONTROL AND IMMUNIZATION OF ANIMALS (HORSES) USED IN ANTIVENOMS PRODUCTION

- 抗毒素製造に用いる免疫動物と健康管理方法、検査方法、予防接種、ウマの感染症、獣医師の監視と免疫スケジュール、アジュバント、血漿中の迷入ウイルス

AGENDA

SESSION IV: FRACTIONATION TECHNOLOGY

- 血漿採取方法、採血量と間隔、血漿の分画・精製方法、血漿の保存方法、免疫グロブリンの精製技術、IgG, F(ab')₂, Fab

SESSION V: CONTROL OF INFECTIOUS RISKS

- 感染症の危険性制御、ウイルス除去または不活化方法、各製造工程のウイルス混入安全確保とプロセスバリデーション

AGENDA

SESSION VI: GOOD MANUFACTURING PRACTICES FOR THE PRODUCTION OF ANTIVENOMS

- 抗毒素製造におけるGMP、製造者におけるGMP問題点、水の供給、凍結乾燥品の含湿度、トレーサビリティ、書類審査、プラント設計、製品/動作確認/無駄/材料の流れ

SESSION VII: PRECLINICAL ASSESSMENT OF ANTIVENOMS

- 臨床前評価、実験動物を用いた安全性と力価試験、品質管理試験法、LD₅₀、発熱試験、LAL導入、バリデーションテスト

SESSION VIII: CLINICAL ASSESSMENT OF ANTIVENOMS

- 臨床評価、臨床試験と市販後調査、有効性確認、副反応調査

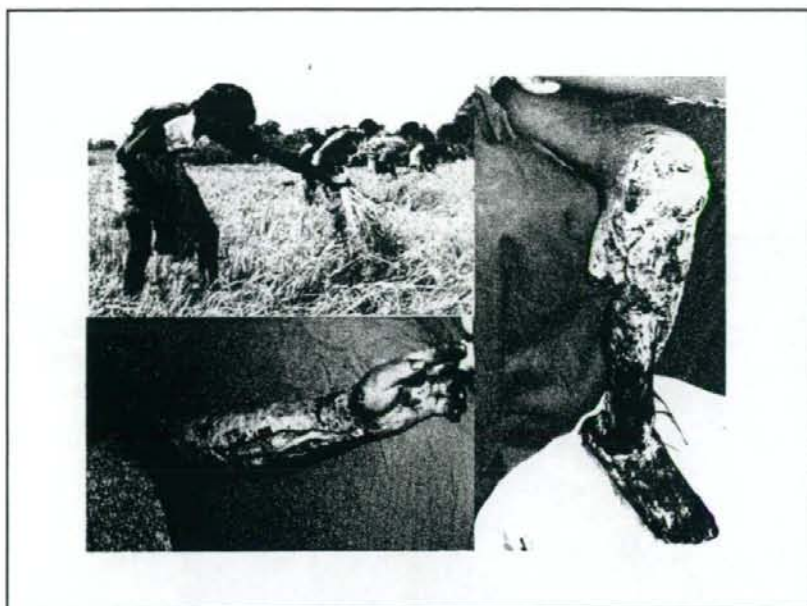
AGENDA

ANTIVENOMS PRODUCTION CAPACITY IN ASIAN AND PACIFIC REGIONS.

- 2地域における生産能力、製造所ごとの対応毒素ごとの抗毒素生産量

ENVENOMINGS AND MORTALITY DUE TO SNAKE BITE:

- サソリ、毒蛇等の毒素注入動物による死亡率、毒素学者や疫学者による信頼性のある情報整理



The ward with krait snakebite PTs
≈ 3 week mechanical ventilation



Prolonged
& dilated
pupils after
1 year

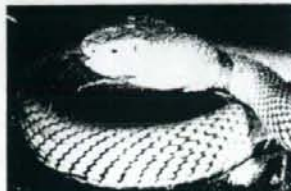


Mistakes are common and easy to make



With a great large diversity of "green" pit viper species, identification errors are commonplace.

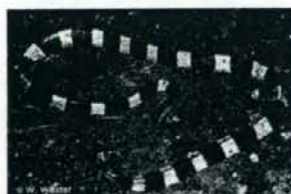
Cryptelytrops albolabris (for which specific antivenom exists) is often confused with other green-coloured vipers.



High-quality studies on the cross-species efficacy of *C. albolabris* antivenom have not been carried out, and the efficacy of antivenom for other species is unknown.

Which snake is *Cryptelytrops albolabris*

Confusing colours



Two specimens of *Bungarus candidus*?

*Bungarus fasciatus*は大多数は黄色および黒の縞模様ですが、黒いバンドおよび白いバンドと *Bungarus candidus*と混同する。

さらに、黒白の模様の *B. multicinctus*, *B. candidus* and *B. wanghaotingi*などの種とは混乱をおこします。

Common misidentification



Would the real Indonesian spitting cobra please stand up?

多くの蛇収集者がインドシナのドクハキコブラ(*Naja siamensis*)をインドネシアのドクハキコブラ(*Naja sputatrix*)と誤ります。これらの2匹のヘビの毒が異なるので、商用販売所から毒を購入する生産者および研究者は問題となる。

Regional variation in venoms



Buphaneshwar, Orissa, India



Bangkok, Thailand



Nikaweratiya, Sri Lanka

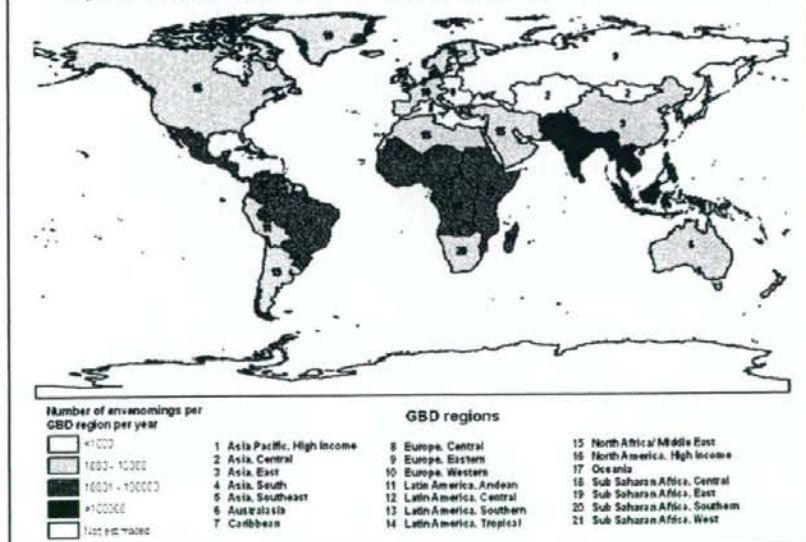
"Russell's vipers" (*Daboia russellii*, *Daboia siamensis*)から採取した毒は地域性だけでなく、国内の蛇でも異なります。

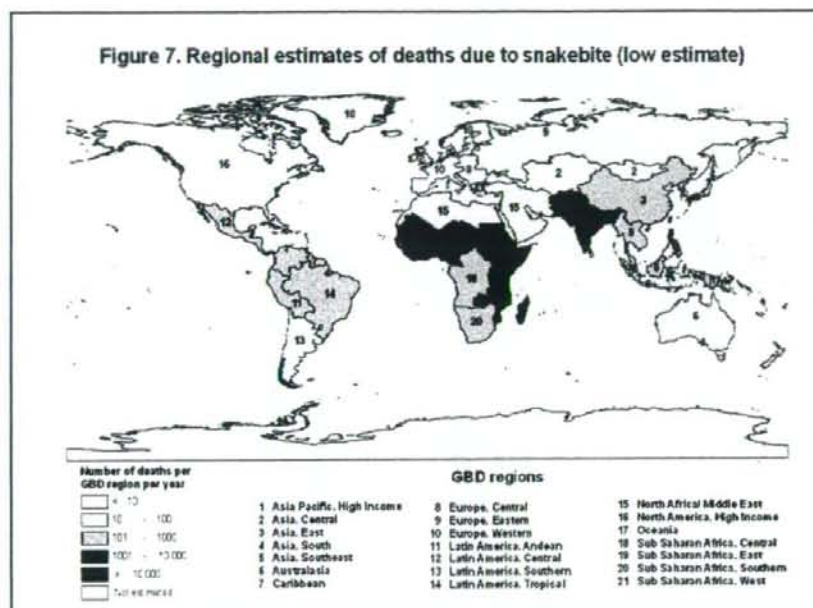
このように、異なる毒素で免疫した抗毒素製剤でないと効果は望めない。

WPRO and SEARO Member Nations

- Australo-Papuan
 - Australia, PNG and Indonesian West Papua
- South-Eastern Asian
 - Brunei Darussalam, Malaysia and Singapore
 - Cambodia, Laos, Thailand, Myanmar and Vietnam
 - Indonesia and East Timor
 - Philippines
- Eastern Asia
 - China, Japan, North & South Korea, Taiwan
- Southern Asia
 - India, Sri Lanka, Maldives, Nepal, Bangladesh and Bhutan

Figure 5. Regional estimates of envenomings due to snakebite (low estimate)





Comparison between current and previous estimates

Region	Current estimate of envenom.	Chippaux envenom. 1998	Current estimate of deaths	Swaroop & Grab deaths 1954	Chippaux deaths 1998
Global	421 000 – 1 841 000	2 682 500	20 000 – 94 000	30 000 – 40 000	125 345
Asia	237 000 – 1 185 000	2 000 000	15 000 – 58 000	25 000 – 35 000	100 000
Australasia	1 500 – 6 000	3 000	250 – 520	10	200
Oceania					

Estimates of snakebite envenomings by region in 2007

Region	Number of snakebite envenomings per year		
	Low estimate	High estimate	Range for wider region
Asia Pacific, high income	703	3 156	237 151-1 183 337
Asia, East	4 582	218 673	
Asia, South	121 333	463 350	
Asia, Southeast	110 533	498 158	
Australasia	1 099	1 260	1 099-1 260
Oceania	361	4 635	361-4 635
Total	238 611	1 189 232	238 611 - 1 189 232

Estimates of deaths due to snakebites by region in 2007

Global burden Region	Number of deaths per year		
	Low estimate	High estimate	Range for wider region
Asia Pacific, high income	12	18	15 376 - 57 636
Asia, East	462	4 829	
Asia, South	14 112	33 666	
Asia, Southeast	790	19 094	
Australasia	2	4	2 - 4
Oceania	227	516	227 - 516
Total	15 605	58 156	15 605 - 58 156



Thailand: Plasmapheresis: clean room

Thailand : Purification under laminar air flow

