

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

蛇毒抗毒素に関するWHOガイドライン改訂等に伴う、
抗毒素製剤等の効率的製造・品質管理
対応に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高橋元秀

平成22年 (2010)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

蛇毒抗毒素に関するWHOガイドライン改訂等に伴う、
抗毒素製剤等の効率的製造・品質管理
対応に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高橋元秀

平成22年(2010)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

蛇毒抗毒素に関するWHOガイドライン改訂等に伴う、 抗毒素製剤等の効率的製造・品質管理対応に関する研究班

平成 21 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
銀永 明弘	(財) 化学及血清療法研究所 第一製造部次長
玉那覇 康二	沖縄県衛生環境研究所 衛生科学班長
一二三 亨	独立行政法人国立病院機構災害医療センター救命救急科
小崎 俊司	大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科長
山本 明彦	国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官
見理 剛	国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官
岩城 正昭	国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官
鳥羽 通久	(財) 日本蛇族学術研究所長
櫻井 信豪	独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 品質管理部 調査役

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
諸熊 一則	(財) 化学及血清療法研究所 第一製造部主任部員
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
志垣 隆通	(財) 化学及血清療法研究所 病理部部长
徳永 英治	(財) 化学及血清療法研究所 品質管理部菊池品質管理室長
久米田幸介	(財) 化学及血清療法研究所 品質管理部品質管理課長
向本 雅郁	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
小宮 貴子	国立感染症研究所 細菌第二部 第三室
盛根 信也	沖縄県衛生環境研究所 衛生科学班主任研究員
寺田 考紀	沖縄県衛生環境研究所 衛生科学班研究員
小井 土雄一	独立行政法人国立病院機構 災害医療センター救命救急科

目 次

頁

I.	総括研究報告書	
	蛇毒抗毒素に関するWHOガイドライン改訂等に伴う、抗毒素製剤等の 効率的製造・品質管理対応に関する研究	
	研究代表者 高橋 元秀	1
II.	研究分担者報告書	
1.	抗毒素製剤の製造工程管理と品質管理の検証 大隈邦夫・銀永明弘	7
2.	ハブ及び毒素のGMP対応検証 玉那覇康二.....	15
3.	抗毒素製剤の臨床での使用実態調査 一二三 亨.....	23
4.	細菌毒素の抗毒素製剤の試験系 小崎俊司	29
5.	まむし及びハブ抗毒素製剤のWHOガイドライン検証 山本明彦	35
6.	ボツリヌス抗毒素製剤のWHOガイドライン検証 見理 剛	39
7.	ジフテリア抗毒素製剤のWHOガイドライン検証 岩城正昭	45
8.	まむし及び毒素のGMP対応検証 鳥羽通久	51
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	57
IV.	研究成果の刊行物・別刷り.....	59
V.	資料集.....	93

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療器等レギュラトリーサイエンス研究事業

蛇毒抗毒素に関するWHOガイドライン改訂等に伴う、抗毒素製剤等の
効率的製造・品質管理対応に関する研究

平成 21 年度
総括研究報告書

研究代表者 高橋元秀 国立感染症研究所

研究要旨

現行のウマ抗毒素製剤の製造効率化、安全性確保として、WHO が示している蛇抗毒素のガイドライン (WHO-GL) に照らした蛇毒抗毒素製剤の検証と、この GL をモデルに国内で製造するジフテリア抗毒素、ボツリヌス抗毒素製剤への適応を検証した。具体的には、蛇毒抗毒素製剤の製造工程管理と品質管理の検証、蛇毒抗毒素製造に用いる免疫用抗原であるハブ及びまむし毒素の GMP 対応への検証をおこなった。また、製造後に求めている品質保証システムでは、まむし抗毒素製剤の臨床での使用調査を実施し、需給実態と有効性および安全性を検証した。また、ジフテリア、ボツリヌスおよびガス壊疽疾患である細菌毒素の抗毒素製剤については、基礎研究の実績から得られる新しい評価系としての品質確認試験法の導入を検討する。

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	山本明彦	国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官
銀永明弘	(財) 化学及血清療法研究所 第一製造部次長	見理 剛	国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官
玉那覇康二	沖縄県衛生環境研究所 衛生科学班長	岩城正昭	国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官
一二三亭	(独) 国立病院機構災害医療 センター救命救急科	鳥羽通久	(財) 日本蛇族学術研究所 所長
小崎俊司	大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科長	櫻井信豪	(独) 医薬品医療機器総合機 構品質管理部 調査役

A. 研究目的

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、ハブやマムシの毒へび咬症の治療に対してウマ抗毒素製剤が利用されている。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。

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ソイドの十分な調達・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・高収量化)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。

WHO では昨年の医薬品に関する総括的な国際規制・ハーモナイズを討議する Expert Committee on Biological Standardization 会議 (ECBS) において、蛇毒ウマ抗毒素製剤の製造、品質管理及び規制方法に関する WHO ガイドライン (WHO-GL) が示された。これを踏まえて、国内製剤の製造、品質管理及び規制方法にかかる問題点を整理し、WHO-GL に準拠した方法を確立することを求められる。各国の規制当局や製造業者は、生産体制の GMP 適応範囲の見直しや迷入ウイルス

除去及びウイルスバリデーション等の新たな品質管理手法の導入を進めている。日本においても、規制当局が参考に資することができるよう、WHO-GL を踏まえた上述の規制を見直すための種々の検討を行う必要がある。

また、日本においては、生物学的製剤 GMP (Good Manufacturing Practices) の導入による施設改善等の必要性及びそれに伴う採算性の悪化により、過去に複数存在していたジフテリア抗毒素、マムシ抗毒素の国内製造所の多くは、当該製品の製造を中止している。その結果、現在国内では1社だけがウマ抗毒素製剤(ジフテリア、破傷風、ボツリヌス、ガスえそ、ハブ、マムシ)の製造を行い、安定供給の社会的な責務を担っている。WHO-GL を踏まえた広範囲にわたる新技術による製造方法や品質試験法の改良開発を当該企業だけで行うには限界があり、適切な国内製造体制の確保と国内製造品の国際標準への対応を図るためには、調査・研究を推進する必要がある。

さらに、肝膿瘍からガスえそ菌が感染した患者に対してはウマ抗毒素製剤を使用することにより治療効果が得られるケースがある。しかし、一般的な創傷性ガスえそ疾患と異なるために医療現場で抗毒素製剤の存在を知らない、または製剤の適用範囲にあるかを迷うケースがあった。国有品である貴重なガスえそ抗毒素製剤の使用について医療現場での問題点を整理し、今後の治療と効率的利用の対応を図る。

B. 研究方法

当研究班は、国内のウマ抗毒素製剤の製造所、蛇抗毒素製剤の抗原供給元施設、製剤の国家品質管理検定所および抗毒素製剤の使用頻度の高い救急救命センターの代表者で組織している。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している。国家品質管理と各国およびWHO-GLの全体に係わる検証を国立感染症研究所の研究者が担当し、製造技術の改良と実製造への検証と製造工程中の品質管理法に関しては化学及血清療法研究所が担当し、蛇抗毒素製剤のウマ免疫用抗原としての蛇毒のWHO-GL対応については日本蛇族学術研究所と沖縄県衛生研究所が担当し、ボツリヌス抗毒素を例としてWHO-GL対応は大阪府立大学を中心に化学及血清療法研究所、国立感染症研究所が担当する。臨床現場での抗毒素製剤の利用状況調査は国立病院機構災害医療センターを中心に実施し、製造におけるGMP適応の検証については医薬品医療機器総合機構を中心に検討する。

今年度は、直近の問題である蛇抗毒素製剤についての製造、品質管理及び規制するWHO-GLに関して、現実の状況とそぐ合わない点を洗い出し、特にBasic Productionの問題を集中的に可能な対応策を検討する。

C. 研究結果

1. 抗毒素製剤の製造工程管理と品質管理の検証として、(1)ウイルスバリデーションの導入方法については、過去に国内でウマから同定報告のあるウイルスのう

ち、文献や他のワクチン製剤のウイルスバリで広く使用されているものを候補とした。ウシウイルス性下痢ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよび脳心筋炎ウイルスの3株で、次年度製造工程での確認作業にはいる。(2)蛇毒の受入管理については、現状の把握と課題抽出ならびに対策案を検討した結果、運搬中の管理、出荷元の管理温度および毒素の品質確認試験の実施が異なることが確認され、次年度の対応課題とする。(3)ウマ抗毒素免疫原製造上の課題であったボツリヌス抗毒素のBSE対策として、米国产牛由来原料削除の可能性を生産規模で検証し、同原料削除によって免疫原の性状に変化はなく問題ないことを確認した。

2. まむし抗毒素製剤の使用調査を全国救命救急センター219施設にアンケート調査を実施した。まむし咬傷治療例は3年間で574症例であり、死亡は2例であった。抗毒素は44%に投与され、抗毒素使用症例の2.4%に副作用を認めたが、重篤な症状は認められてない。

3. 抗原用蛇毒素の供給体制の整備として、ハブの取り扱いに関しては、研究所内に動物実験委員会を設置するとともに動物実験実施規程を策定し、検疫室の設置、採毒後のハブの死体処理、飼育管理等を明確に規定した。また、ハブ毒の採毒方法は、採毒マニュアルの作成、記録簿、および原材料保管・管理のシステムを整備し、教育訓練を実施した。

4. ボツリヌス抗毒素製剤の有効性を検証する目的で、免疫方法により誘導される抗体の種類とその性質についてマウスを用いて検討した。トキシノイドで基礎免

疫した後、毒素で複数回追加免疫を行うことにより、トキソイドだけを抗原としたときには誘導されない毒素に対する新たな抗体を確認した。

D. 考 察

蛇ウマ抗毒素製剤のWHO-GLへの整合性をとるための具体的対応策として、ハブ毒素確保におけるソフトの対応を勧めている。これをモデルに今後まむし毒素確保に関する対応を図る。また、蛇抗毒素製剤と同様に、ボツリヌス、ガスエソ、ジフテリアウマ抗毒素製剤についても、蛇毒抗毒素製剤のモデルをもとに、事前に国内において品質の向上に関する検討が具体化される。なお、マムシおよびハブから採毒後の各毒素の品質確認試験としては、供給元での生物活性として致死毒性の定量(MLD)試験を実施するためのSOPの整備が必要であり、次年度の検討課題とする。

まむし抗毒素製剤の使用実態調査で、今回のアンケートを元に、今後は抗毒素の有効性だけについての評価が必要と思われる。そのために、投与群対非投与群での入院日数、副反応、転帰の比較、投与症例の重症度、投与までの時間の比較などの調査結果を反映し、製剤に求められる効果と、その重要な品質試験項目の再検討が可能となる。

毒素を高度免疫したマウスでは、A1毒素特異的な領域に中和に関わるエピトープが存在することが確認された。ボツリヌス毒素は、最近の研究で数種のする亜型が確認されており、これら毒素に対する特異的な中和能を有することが、治療

用抗毒素に必要とされるのか、今後の解析が期待される。

ジフテリア抗毒素について、諸外国の供給体制とその問題を調査した結果、欧州においては、近年複数の製造所がジフテリア抗毒素の製造を中止したために、供給体制の不備は切実な問題となっていた。当事国は需給体制の整備や輸入での対応等を検討しており、我が国の乾燥ジフテリアウマ抗毒素の輸出も現実的な要望対策として検討されていることを確認している。ジフテリア抗毒素に限らず、ボツリヌス抗毒素を製造していたドイツ、フランスでは製造を中止した。ウマ抗毒素製剤の製造方法は、100年以上前に製法が確立され、現在でもその古典的な製法から「Grand father products」と呼ばれている。近代的な製造法への改良とその製剤の一部変更承認には高額な費用と人材を必要とするために、稀少疾患への治療薬の開発はむろん、各企業はGMP対応を懸念して製造の撤退がおこなわれている。

E. 結 論

世界的に蛇毒抗毒素の供給不足が危惧され、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-GL制定に向けた動きがある。枯渇回避のみならず、ガイドライン案への準拠のための調査研究を図ることにより、高品質な抗毒素製剤を供給することが可能となる。

わが国で製造・品質管理するウマ抗毒素製剤は、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および高品質の抗毒素の安定供給が可能となる。

蛇毒抗毒素製剤に示されたWHO-GLの適応について、国内製剤に関するハードの充実・改善点を具体化し、不足の部分においてはソフトで対応することを検討中である。この蛇毒抗毒素製剤のWHO-GL対応の構築により、他の製剤への適応・対応策も可能となる。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Umeda, K., Seto, Y., Kohda, T., Mukamoto, M., Kozaki, S.: Genetic characterization of *Clostridium botulinum* associated with type B infant botulism in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 47; 2720-2728. 2009
- 2) 高橋元秀、鎌田洋一 食中毒における毒素産生細菌とその毒素6:ボツリヌス菌と神経毒素 食品衛生研究 60:7-14. 2010
- 3) 高橋元秀(梶龍児/総監修) ボツリヌス治療総論—ボツリヌス毒素製剤の基礎知識— ボツリヌス治療総論—ボツリヌス毒素製剤の基礎知識—第5章 ボツリヌス毒素研究と将来展望

1) 品質管理とその定量法 診断と治療社 2010

2. 学会発表

- 1) T. Komiya, A. Yamamoto, M. Iwaki, T. Kenri, Y. Noguchi, A. Tsunoda, Y. Arakawa and M. Takahashi. A human *C. ulcerans* case: isolation of the pathogen from the patient and from cats. Eleventh International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria (ELWGD) & Third Annual Meeting of Diphtheria Surveillance Network (DIPNET), October 2009, Riga (Latvia).
- (2) M. Iwaki, A. Ishiwa, T. Komiya, N. Nagata, Y. Arakawa and M. Takahashi. *Corynebacterium diphtheriae* C7(-) and PW8 strains: genome diversity and pathogenicity. Eleventh International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria (ELWGD) & Third Annual Meeting of Diphtheria Surveillance Network (DIPNET), October 2009, Riga (Latvia).

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許出願
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療器等レギュラトリーサイエンス研究事業

蛇毒抗毒素に関するWHOガイドライン改訂等に伴う、抗毒素製剤等の
効率的製造・品質管理対応に関する研究

分担研究報告書

抗毒素製剤の製造工程管理と品質管理の検証

研究分担者

銀永 明弘 財団法人 化学及血清療法研究所 第一製造部
大隈 邦夫 財団法人 化学及血清療法研究所 品質管理部

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

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
そ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。

本分担研究では、WHO ガイドラインの検証とその対応を目的として、「1. 抗毒素製
造工程におけるウィルスクリアランスに関する調査」と「2. 蛇毒受入管理における
現状把握と課題抽出」を実施した。さらに、抗毒素製剤の品質向上の観点より「3.
ボツリヌス抗毒素製造における BSE フリーの原料使用によるウマ免疫原製造方法の確
立」について検討した。

A. 研究目的

1. ウィルスクリアランスに関する調査

2008年、蛇毒抗毒素に関するWHOガイドライン
案の発表に伴い、迷入ウィルス除去やウィルスバ
リデーション（以下、ウィルスバリ）等の新たな
品質管理手法の導入が要求されることが予測され
る。本分担研究では、抗毒素精製工程におけるウ
ィルスバリ実施に向けて、使用するモデルウィル

スの選定を行った。

2. 蛇毒受入管理における現状把握と課題抽出

WHOガイドラインにおいて、製造所として使用
する蛇毒の品質管理が求められている。本年度は、
採毒した蛇毒及び受入れた蛇毒の管理について現
状把握し、課題を抽出した。

3. 米国産牛由来原料(培地)の除去検討

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。2004年、弊所は旧千葉県血清研究所（以下、千葉血清）よりボツリヌス抗毒素製剤を承継したが、千葉血清におけるボツリヌスA、B及びF型の菌培養用培地の原材料には、米国産牛肉が含まれていた（※E型菌培養には含まれていない）。本分担研究では、米国産牛由来成分（クックドミート、以下CM）を削除し、実生産レベルにおけるボツリヌス免疫用抗原製造方法の確立について検討した。

B. 研究方法

1. ウィルスクリアランスに関する調査

ウマ抗毒素製剤製造工程（図1）のペプシン消化及び硫酸分画工程において、ウィルスクリアランス（失活、分離）が可能であると考察しており、これらの工程を用いてウィルスバリを実施予定である。本分担研究では、馬に感染するウィルスに関する文献を参考に、使用するウィルスの選定を行った。尚、選定にあたっては、最低3種類の異なる構造（DNA/RNA、被膜有/無）であることや、検出系がバリデートされている点などに配慮した。

2. 蛇毒受入管理における現状把握と課題抽出

弊所では、「マムシ毒素」並びに「ハブ毒素（奄美大島産、沖縄産）」を（財）日本蛇族学術研究所（以下、蛇研）及び沖縄県衛生環境研究所ハブ研究部（以下、ハブ研）より受入れている。最近5年間の受入れ状況について現状調査を実施した。

3. 米国産牛由来原料（培地）の除去検討

(1) ボツリヌスA, B, F型菌の培養

ボツリヌス菌ワーキングシード（A型：98A株、B型：Okra株、F型：Langeland株）をPYG培地0.7Lに播種し、35℃で1～3日間前培養を行った。前培養液をPYG培地10Lに播種し、35℃で3～6日間培養し本培養を行った。

(2) ボツリヌスA, B, F型毒素の精製

培養液をろ過し（ポアサイズ0.2μm）、限外ろ過により濃縮した。濃縮液を陰イオン交換クロマトグラフィー又は核酸除去剤処理等の方法で核酸の除去を行った。この処理液を陽イオン交換クロマトカラムに展開し、カラムの吸着面分を溶出した。溶出液を限外ろ過により濃縮したものを各型の精製毒素とした。

(3) ボツリヌスA, B, F型毒素のトキシノイド化

精製毒素液を至適濃度に希釈後、ホルマリンを

終濃度が0.4 vol%になるように添加し、35℃で無毒化を行った。A型は21日間、B型及びF型は17日間加温した。

C. 研究結果 及び D. 考察

1. ウィルスクリアランスに関する調査

ウマから同定された報告のあるウィルスのリストを表1に示す。これを基にウィルスバリで使用する以下3種類のウィルスを選定した（表2）。これらウィルスは、文献や弊所のウィルスバリにおいて広く使用され、実績のあるものである。

①BVDV (Bovine virus Diarrhoea Virus、ウシウィルス性下痢ウィルス)：被膜有、RNA ウィルス、西部・東部・ベネズエラ馬脳炎ウィルスのモデル

②PRV (Pseudorabies virus、仮性狂犬病ウィルス)：被膜有、DNA ウィルス、馬ヘルペスウィルスのモデル

③EMCV (Encephalomyocarditis virus 脳心筋炎ウィルス)：核膜無、RNA ウィルス、馬ロタウィルスのモデル

尚、馬伝染性貧血ウィルス、馬インフルエンザウィルス及び馬日本脳炎ウィルスについては、選定したウィルスに含まれていないが、現行の馬健康管理方法[馬伝染性貧血陰性の確認、3種（馬インフル、日脳、破傷風）混合ワクチン接種]において、混入の可能性は低いものと考えられる。

2. 蛇毒受入管理における現状把握と課題抽出

蛇毒の受入状況の調査内容を表3に示す。この現状を踏まえて、以下に課題とその対策案を示す。

①運搬中の管理が未実施である。

→運搬中の管理を強化する（低温管理、輸送中の温度のバリデートを行う）。

②購入機関先により管理温度が異なる。

→粗毒の保管条件を統一する。

③受入蛇毒の均一性が未確認である。

→払出し側及び受入れ側の両方で毒力試験を実施する。管理幅の設定に向け、今後データを蓄積していく。

④受入試験において、マムシ/ハブ毒素であることが未確認である。

→SDS-PAGE, 蛋白含量, ゲル沈, 中和試験などの生物化学試験を検討する。

3. 米国産牛由来原料（培地）の除去検討

ボツリヌスA、B及びF型の菌培養用培地から米国産牛由来成分（CM）を削除し、実生産レベルで

ボツリヌス免疫用抗原製造方法を確立した。各型について、「菌増殖性と毒素産生」、「精製毒素の性状と抗原性」、並びに「トキシノイドの免疫原性」について評価・確認し、CM 削除により免疫原の性状の変化を認めないことを確認した。尚、CM 削除前の千葉血清作製の毒素は、現在、存在しておらず、両者の直接的な比較は不可能である。そこで同等性証明の為には、CM を使用して調製した精製毒素（試験毒素；国立感染症研究所より頒布）を使用した。

(1) 菌増殖性と毒素産生

米国産牛由来成分（CM）を削除した培地においても、各型とも安定した菌増殖性を示し、千葉血清規格（毒素産生性）と差のないことを確認した（表 4）。

(2) 精製毒素の性状と抗原性

CM を使用して調製した各型精製毒素（試験毒素）並びに CM を使用せずに調製した各型精製毒素の抗原性を、千葉血清作製の「ボツリヌス多価抗毒素製剤」（；CM 使用毒素を用いて作製された抗毒素）を用いてオクタロニー試験を行ない、評価した（図 2）。その結果、CM 使用あるいは非使用培地から調製した精製毒素は、毒素-抗毒素反応による明瞭な沈降線を形成し、スパーすることなく癒合することが確認された。よって、これら精製毒素の抗原性（本質）には相違の生じないことが示唆された。また、精製毒素の性状（SDS-PAGE、比活性）について検証し、問題ない成績であることが確認された（図 3、表 5）。

(3) トキシノイドの免疫原性

CM を使用せずに調製した免疫用抗原をマウスに免疫して得られた血清の力価（抗毒素含量）を測定した（表 6）。各型別の血清は、それぞれの毒素（感染研の試験毒素[標準品]使用）に対する中和試験において何れも十分な毒素中和能を保有していることが確認された。したがって、ウマ免疫に用いる免疫用トキシノイド抗原の品質は、調製の際に CM 未使用であっても、免疫原としての免疫原性（本質）に影響のないことが確認された。

E. まとめ

1. 本年度は、ウィルスバリで使用するモデルウィルスの選定を実施した。次年度は、「スケールダウンによる妥当性の評価（製造スケールとの同等性評価）」、「各プロセス液のウィルス測定系に及ぼす

影響確認（細胞毒性試験、インターフェランス試験）」並びに「ウィルスバリ本試験のデータ取得の開始」を実行する。また、ウィルス地域性に関する調査として、実際にウマ血液を用いて、含有ウィルスの測定試験も進める予定である。

2. 本年度は、蛇毒の品質管理という観点から、受入れた蛇毒の管理について現状把握し、課題を抽出した。次年度は、その課題と対策について、その妥当性も含めて、評価・検討を実施する。

3. ウマ抗毒素製剤の免疫原製造上の課題であったボツリヌス抗毒素の BSE 対策として、米国産牛由来原料削除の可能性を生産規模で検証し、米国産牛由来原料（CM）の削除による免疫原の性状に変化はなく、問題ないことを確認した。これにより全抗毒素製剤の切替が可能となる。今後、ボツリヌス抗毒素「多価」の製造承認書の一部変更申請にむけて準備を進めていく。

F. 研究発表

なし

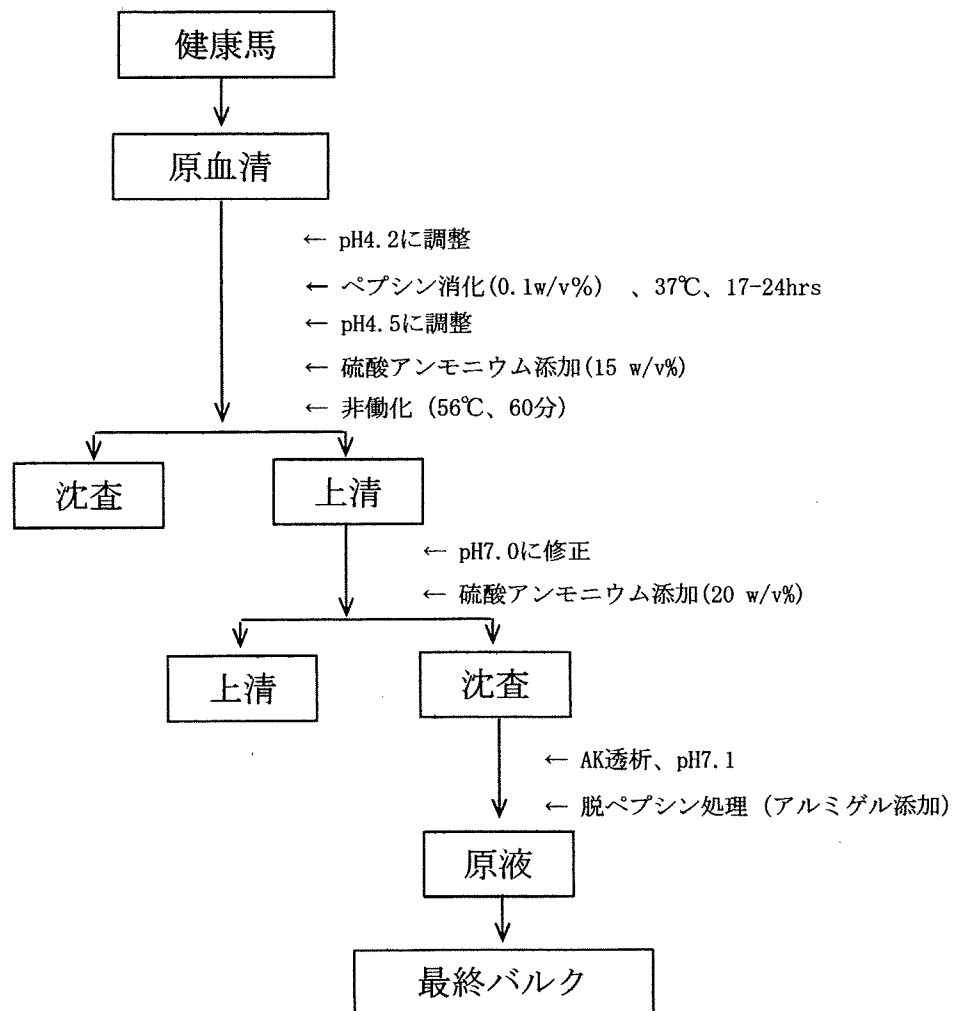


図1. 蛇毒ウマ抗毒素製剤の製造工程

表 1. ウマに感染するウイルス

[“Proposed WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins Antivenom” Draft 2 (WHO/BS/08.2008) より抜粋]

Virus	Family	Size (nm)	Genome	Presence in blood reported ¹	Classified as pathogenic to humans (CPMP, 2002)
Enveloped					
Equine Arteritis virus	Arteriviridae	50-60	ss-RNA		
Borna virus	Bornaviridae	70-130	ss-RNA	Yes	Yes
Equine Encephalitis virus, Eastern & Western	Togaviridae	40-70	ss-RNA		Yes
Equine coronavirus	Coronaviridae	75-160	ss-RNA		
Equine foamy virus	Retroviridae	80-100	ss-RNA	Yes	
Equine herpes virus 1-5	Herpesviridae	125-150	Ds-DNA		Yes
Equine infectious anaemia virus	Lentiviridae	80-100	ss-RNA	Yes	
Equine influenza virus	Orthomyxoviridae	80-120	ss-RNA		Yes
Equine morbilli virus (Hendra virus)	Paramyxoviridae	150	ss-RNA		Yes
Japanese encephalitis virus	Flaviviridae	40-70	ss-RNA		Yes
Nipah virus	Paramyxoviridae	150-300	ss-RNA		Yes
Rabies virus	Rhabdoviridae	75-180	ss-RNA		Yes
Salem virus	Paramyxoviridae	150-300	ss-RNA		
St-Louis encephalitis virus	Flaviviridae	40-70	ss-RNA		Yes
Venezuelan equine encephalitis virus	Togaviridae	40-70	ss-RNA	Yes	Yes
Vesicular stomatitis virus	Rhabdoviridae	50-80	ss-RNA	Yes	Yes
West Nile virus	Flaviviridae	40-70	ss-RNA	Yes	Yes
Non-enveloped					
Equine encephalosis	Reoviridae	80	Ds-RNA		
Equine rhinitis A and B viruses	Picornaviridae	22-30	ss-RNA		
Equine rotavirus	Reoviridae	60-80	Ds-RNA		

表 2. モデルウイルスの選定

使用ウイルス	Family	被膜	ゲノム	大きさ (nm)	モデルとなるウイルス
Bovine virus Diarrhoea virus (BVDV) ウシウイルス性下痢ウイルス	Togaviridae	+	ss-RNA	40-60	Eastern, Western and Venezuelan equine encephalitis virus*1 *2 ウマ脳症ウイルス
Pseudorabies virus (PRV) 仮性狂犬病ウイルス	Herpes	+	ds-DNA	100-200	Equine herpes virus*2 ウマヘルペスウイルス
Encephalomyocarditis virus (EMCV) 脳心筋炎ウイルス	Picornaviridae	-	ss-RNA	25-30	Equine rotavirus ウマロタウイルス

*1, ウマ血液中での報告例あり

*2, ヒトに対する病原性あり

表 3. 蛇毒の受入状況^{*1}

	マムシ毒素 (本州及び九州産)	ハブ毒素 (奄美大島産)	ハブ毒素 (沖縄産)
購入機関	(財)日本蛇族学術研究所		沖縄県衛生環境研究所 ハブ研究部
剤形 (購入機関先 保管温度) ^{*2}	バイアル入り凍乾品 (4-8℃保管)		プラスチック製容器入り凍乾品 (20-25℃保管)
輸送管理 ^{*3}	特に無し (クール便、品名:「試薬」)		特に無し (普通便、品名:「免疫抗原」)
購入頻度/量	1-3年間隔 2-5g/回	3-5年間隔、5-10g/回	

*1, 本表は、最近5年間(2005~2009年)の調査結果をもとに作成。

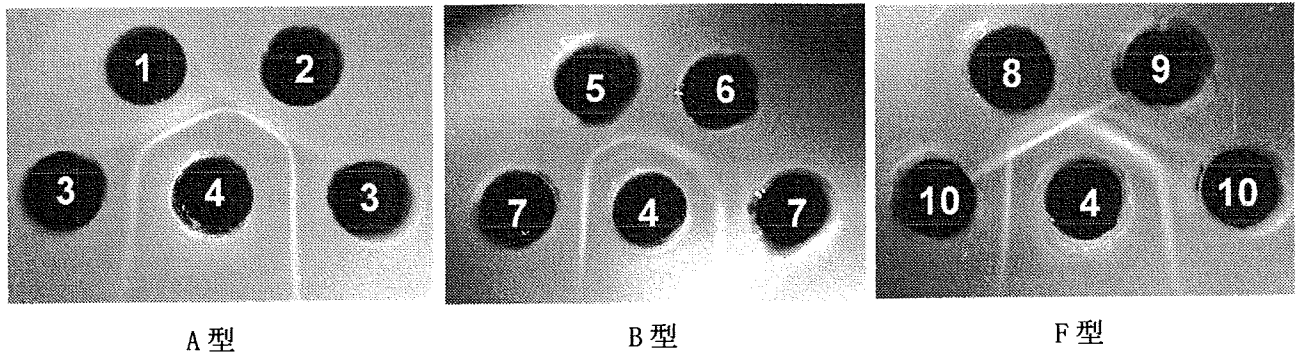
*2, 化血研受入後は、2-10℃で保管。

*3, 化血研受入後は、施錠管理し、ケミカルハザード的取り扱い。

表 4. ボツリヌス菌培養における菌増殖性と毒素産生性

	菌増殖		毒素産生	
	培養時間	OD ₆₆₀ ^{*1}	化血研実績	千葉血清 規格 [参考値]
			毒力 ^{*1} (ip LD ₅₀ /mL)	毒力 (ip LD ₅₀ /mL)
A型 (n = 3)	4日	0.155	3.07 × 10 ⁵	1.0 × 10 ⁵
B型 (n = 4)	4日	0.240	7.44 × 10 ⁶	1.0 × 10 ⁵
F型 (n = 12)	4日	0.099	8.03 × 10 ³	1.0 × 10 ⁴

*1, 平均値



- | | |
|------------------------------|-------------------------|
| 1. A型精製毒素 : クットミート (-) | 6. B型精製毒素 : クットミート (+) |
| 2. A型精製毒素 : クットミート (+) | 7. B型神経毒素 : クットミート (+) |
| 3. A型神経毒素 : クットミート (+) | 8. F型精製毒素 : クットミート (-) |
| 4. ボツリヌス抗毒素製剤「多価」(旧千葉血清研究所製) | 9. F型精製毒素 : クットミート (+) |
| 5. B型精製毒素 : クットミート (-) | 10. F型神経毒素 : クットミート (+) |

図 2. オクタロニー試験による精製毒素の抗原性

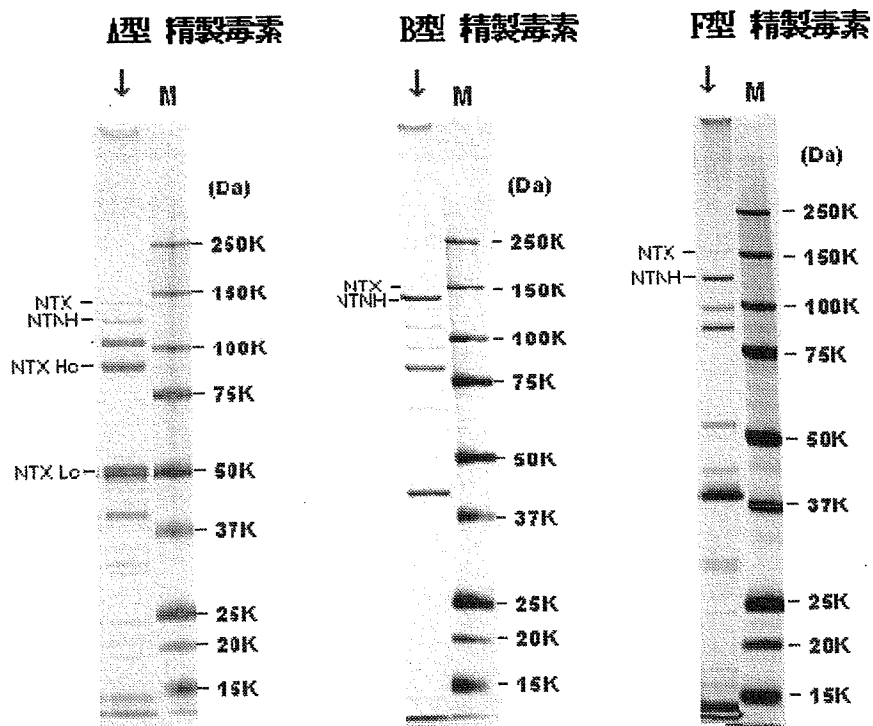


図 3. ボツリヌス精製毒素の SDS-PAGE 所見

表 5. ボツリヌス精製毒素の比活性

	A 型 (n = 5)	B 型 (n = 4)	F 型 (n = 4)
蛋白量当りの活性 *1 (ip LD ₅₀ /mg)	4.54×10 ⁷	4.71×10 ⁷	6.02×10 ⁵

*1, 平均値

表 6. ボツリヌス免疫用トキソイドの免疫原性

	A 型	B 型		F 型
		Okra	QC	
トキソイド力価 (IU/mL) *1 [免疫蛋白量]	36.40 [50 μg/mL]	5.990 [75 μg/mL]	3.410 [75 μg/mL]	6.948 [50 μg/mL]

*1, 各群 8 匹のマウスを用い、0.5mL/匹を 2 週間隔 2 回免疫。初回免疫より 4 週間後に全採血し、各群のプール血清のス抗毒素価を標準品を用いたマウス力価試験により測定。

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療器等レギュラトリーサイエンス研究事業

蛇毒抗毒素に関するWHOガイドライン改訂等に伴う、抗毒素製剤等の
効率的製造・品質管理対応に関する研究

分担研究報告書

ハブ及び毒素のGMP対応検証研究

研究分担者

玉那覇康二 沖縄県衛生環境研究所衛生科学班長

研究協力者

盛根信也 沖縄県衛生環境研究所衛生科学班主任研究員

寺田考紀 沖縄県衛生環境研究所衛生科学班研究員

研究要旨：WHOではウマ抗毒素製剤の製造、品質管理及び規制のガイドラインを2008年に初めて作成し国際的に生産体制のGMP適応範囲や迷入ウイルス除去及びウイルスバリデーション等の新たな品質管理手法の導入が進められている。沖縄県は、乾燥はぶウマ抗毒素の原材料としてハブ毒を製造所に提供している。このため、原材料としてのWHOのガイドライン（WHOGL）への対応の検証を行い、国内製造品の国際標準への対応を図るものである。

A. 研究の目的

乾燥はぶウマ抗毒素の製造には、ウマ免疫用抗原調整、数回の免疫、血清の精製および品質管理等に長期間を要し、大量の製剤の備蓄は困難である。

また、WHOGLに適応させるためにも、原材料としてハブ毒の品質管理を明確にすることにより、日本における生物医薬品管理体制の信頼性保証、安全性の確保を図ることを目的とする。

B. 研究方法

(1) ハブの咬傷患者の治療には、蛇抗毒素製剤（乾燥はぶウマ抗毒素）を使用している。乾燥はぶウマ抗毒素のウマ免疫には沖縄で捕獲されたハブの毒を用いているため、WHOGLを踏まえた規制を念頭に置いて沖縄県で採取したハブの取り扱いに関する検討を行う。

(2) ハブの飼育方法及びハブ毒の採毒方法について、WHOGLに基づいた、衛生的な取り扱い、管理に関する