

めている。

抗毒素の製造所である化血研は、血液製剤の製造経験もあり、その製造工程にGMPの適用はすでに行われている。しかし、WHOガイドラインが求めている免疫動物（ウマ）の健康管理などにGMP概念の適用や、製剤製造工程におけるウイルス汚染の評価方法については、今まで行われていない。本年度は、改善の手始めとして、混入ウイルスを評価するための基準ウイルスの選定が検討された。

II. マムシ抗毒素製剤使用アンケートの解析

WHOガイドラインの最後に、抗毒素製剤市販後の有効性と安全性の調査の必要性について述べられている。わが国では、ハブ咬傷については、その発生数と治療に用いられた抗毒素についての統計が毎年まとめられているが¹⁾、マムシ咬傷については、患者数の調査もほとんど行われていない。そこで、マムシ抗毒素使用に関するアンケートを、全国救命救急センターを対象として行った。

アンケートの結果の詳細は、災害医療センター救命救急科の一二三 亨博士の報告に記されている。本稿ではアンケート結果に関して、気づいた2,3の点を指摘する。アンケートは、平成18年度から20年度までの3年間のマムシ咬傷とその治療法の実態調査を、全国救命救急センター219施設に

依頼し、108施設からの回答が寄せられた。症例経験のある施設のうち、6,7割の施設でマムシ抗毒素を使用していることが判明した。また、抗毒素の投与による副反応は重篤なものは発生していない。

特筆すべき点として、マムシ咬傷の治療に抗毒素の代わりにセファランチンの使用を第一選択肢として使うとの解答が目立っていた。セファランチンは、抗アレルギー作用、血液幹細胞増加作用があり、造血機能の回復を促進するほか、末梢血管を拡張・末梢循環障害を改善する薬効を持った薬剤である²⁾。このようにセファランチンはマムシ毒素の中和作用は有しない非特異的な薬剤である。

セファランチンの治療への使用に関しては、最近の文献でもマムシ抗毒素が副作用に比してその薬効が現れにくいものであるなどの批判が散見される^{3, 4)}。しかし、この議論はすでに15年ほど前になされていることが文献上確認できる^{5, 6)}。マムシ毒素は、重篤な場合はヒトを死亡させる毒素である。その特異的な中和作用を有するのは抗毒素以外にはない。また、抗毒素を使用せずに患者を死亡させた場合、裁判で主治医が敗訴する事例も報告されている⁵⁾。マムシに限らず蛇咬傷は、どれだけ毒が体内に入ったかを確認することが困難である。わが国でも毎年、20名前後の死亡例が推察されていることから、抗毒素を用いない安易な対応は重篤な転機を招く恐れのあることを考慮すべきである。

巷間心配されるウマ由来の抗毒素製剤による副反応は⁷⁾、今回のアンケート結果からもほとんど起きていない事実を認識すべきである。

一方、セファランチンは前述の如く、抗アレルギー作用がある薬剤なので、その使用法は、蜂などを含めたアレルギー全般に適用できる。マムシ咬傷治療と言う一点に絞ってこの薬剤と抗毒素の使用の是非の議論が、如何に的を射ていないことであるかを冷静に受けてとめていただきたいと切に望むものである。

参考文献

- 1) 鹿児島県保健福祉部薬務0課編。ハブ対策事業の概要, 平成20年度
- 2) 杉山勝三 他。ラット肥満細胞からのヒスタミン遊離の Cephalexin による抑制作用, アレルギー 1976 ; 25 (9) : 685-690.
- 3) 重田匡利 他。日農医誌 2007 ; 56 : 61-67.
- 4) 植松正久 他。マムシ咬傷 29 例の検討—とくに抗マムシ血清の有効性について—。日臨外会誌 1994 ; 55 : 54-60.
- 5) 海老沢 功 他。マムシ咬傷に対

するセファランチン療法の問題点。日本医事新報 1994 ; 3677 : 46-49.

6) 沢井芳男。マムシ咬傷における結成の必要性。日本医事新報 1994 ; 3667 : 124-125.

7) 真栄城優夫 他。蛇毒咬傷。救急医学 1979 ; 3 : 1378-1383.

F. 健康危機情報

特になし

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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

資料 1 : ヘビ抗毒素に関するWHOガイドライン及び資料 2 : 2008 年 10 月開催された ECBS での検討事項を資料集に添付した。

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

「ボツリヌス抗毒素製剤のWHOガイドラインの検証」

分担研究者 見理 剛 国立感染症研究所 細菌第二部

要旨：ボツリヌス抗毒素の力価測定法について、日本の生物学的製剤基準に記載されている方法と、欧州薬局方または米国で採用されている方法の比較検証を行った。どの方法も同じ原理に基づくマウスを使用した中和試験法が採用されていたが、試験に用いられる抗毒素と毒素の量はかなり異なっていた。また、この試験を最初に実施するためにはWHOの国際標準抗毒素が必要である。しかし現在、WHOの標準品リストの中には、すべての型の標準品抗毒素がそろっていない。日本では、WHOの標準品に準ずる国内標準品があるので、現時点で大きな問題はないが、将来はWHOの標準品について国際的な調整が必要だと思われる。

A. 研究の目的

ボツリヌス症の治療に用いられるボツリヌスウマ抗毒素は、国内では抗ABEFの多価製剤と抗E型の単価製剤が生産されており、すべて国有品として備蓄されている。近年、国内でのボツリヌス症の発生はまれとなっており、抗ボツリヌス抗毒素が使用される機会も少なくなってきた。しかし、国内備蓄のない韓国やタイでボツリヌス症が発生した際には、国際協力と

して日本のボツリヌス抗毒素が分与されたこともあった。抗毒素を投与したときのボツリヌス症患者の症状緩和、回復効果は良好であり、国内発生は減ってはいても、万一の患者発生に備えて抗毒素を備蓄しておく意義は大きいと考えられる。さらに、ボツリヌス毒素は非常に強力な致死性の高い毒素であり、比較的容易に量産できることから、バイオテロリズムに使用される物質として常に注意が払わ

れている。こうしたバイオテロリズム対策の観点からも、ボツリヌス抗毒素をある程度の量、国有備蓄し、必要に応じて追加供給するための手段を明確しておくことも必要だと考える。ボツリヌス抗毒素を安定的に備蓄していく上では、力価などについて品質管理を適切に行えるようにしておくことが重要である。ボツリヌス抗毒素の力価の設定は、WHOの国際標準品を基準にして各製剤の力価を合わせるようになるが、そのためには標準品に基づいた、試験毒素を設定し、この試験毒素で、抗毒素製品の力価を測定していく方法がとられる。この力価試験法は生物製剤基準に記載されているが、記述は簡略であり、原理の詳細がやや理解しにくい。また、海外のボツリヌス抗毒素生産国で採用されている力価測定法と日本の方法にどの程度共通性があるのかも不明である。このため、本研究では米国と欧州で使用されているボツリヌス力価試験法の情報を収集し、日本で行われている方法との比較検討を行った。

B. 研究方法

欧州のボツリヌス抗毒素力価試験は欧州薬局方 (EP: *European Pharmacopoeia*) に概要が記載されており、この内容を検証した。米国の場合は、米国薬局方 (USP: *US Pharmacopoeia*) にボツリヌス抗毒素の項目があるものの、試験法については記載されていない。米国で用いられている試験法について米国人のボツリ

ヌス研究者に問い合わせたところ、**Battelle Institute**

(<http://www.battelle.org/>) という非営利の研究団体が作成した試験法が、ボツリヌス抗毒素の力価試験法として、唯一FDAの承認を受けた方法になっているとのことであった。この方法が解説されている書籍を取り寄せ、その内容について検証を行った。

Immunogenicity of the neurotoxins of C. botulinum, by Charles Hatheway and Carol Dang, pp. 93-107 in *Therapy with Botulinum Toxin*, Joseph Jankovic and Mark Hallet, eds., Marcel Dekker, NY/Basel/Hong Kong, 1994. (この本の第8章に上記の米国の試験法の詳しい記載がある)。

C. 研究結果

表1に示すように、ボツリヌス抗毒素の力価試験は、いずれの場合もマウスを用いた中和試験法が採用されていた。もともと、ボツリヌス抗毒素のWHO国際標準品力価(IU)とは、マウスに対して、10,000 LD₅₀ (A、B、C、D型の場合)、または1000 LD₅₀ (E型の場合)の活性をもつ毒素を中和する抗毒素量を1IUとして定義したものである(直接力価)。しかし、毒素は調製時の条件によって比活性が異なるため、異なる毒素を用いて抗毒素の直接力価を測定すると、誤差が非常に大きくなる。このため、あらかじめ抗毒素標準品(IU値を設定した標準品)もとにして試験毒素(TD: Test toxin)を設定し、この試験毒素によって抗毒素製剤

と抗毒素標準品の力価を相対的に合わせる方法がとられる（間接力価）。表1の日本、欧州、米国の各試験法は、原理的にはこの間接力価測定法を用いている。しかし、これらの試験が行われる L+レベルは各法でかなり違いがあった。日本の生物製剤基準では毒素型にかかわらず L+/20 レベルで試験が行われる。一方 EP では L+/10 となっている。また、米国の方法では L+ という用語は用いられていないが、試験でマウスに投与される抗毒素の量は毒素型 (A-F の 6 種) ごとに異なっていて、その量を L+レベルに換算すると、L+/62.5 から L+/4000 とかなり少ない量に設定されている。EP と米国の方法ではマウス 1 dose あたりの試験毒素の LD₅₀ の値も定められており、EP では 1000 LD₅₀ 以上、米国では 10 LD₅₀ 以上となっている。日本の方法では、マウス 1 dose あたりの試験毒素の LD₅₀ 値は規定されていないが、現在、実際に使用されている試験毒素の場合は A、B_{okra}、B_{qc} E、F 型で、それぞれ 53、884、229、306、168 LD₅₀ の毒素が 1 dose 中に含まれている。日本の L+/20 レベルの試験では、マウス 1 dose あたり抗毒素量は 0.05IU であり、これに試験毒素 1 dose (1TD) が混合された場合に投与マウスの生死が 50% (ED₅₀) になるように試験が設計されている。試験毒素は必ずしも高純度なものを使用する必要はないが、現行の日本の試験毒素はかなり純度よく精製したものである。粗製の毒素ではない。この点から逆に考えると欧州

と米国の方法での試験毒素は、高純度で非活性がかなり高いものである必要がある。欧州の場合は L+/10 レベルでの試験のため 1 dose あたり 1000 LD₅₀ 以上の毒素を使用することは可能だと思われる。しかし、米国の方法では非常に低い L+レベルに試験が設定されているため、1 dose あたり 10 LD₅₀ 以上の試験毒素で試験を行うには、極度に非活性の高い毒素でなければならぬと思われる。日本で使用している試験毒素で、この L+レベルの試験を行うのは不可能である。この点、今回入手した米国の資料の記載に問題があるのか、または実際の試験では何らかの工夫がなされているのか確認を行う必要がある。

試験に使用するマウスについて、生物製剤基準では 23-29 日齢のもの、EP では使用するマウスの一番重い個体と軽い個体の体重差が 5g 以内におさまることとの記載がある。また、米国の方法では、18-25 g の ICR strain のマウスを使用することとの記載がある。マウスの使用数はどの方法も 1 群あたり 4 匹で、検体接種液量は、日本、EP、米国でそれぞれ 0.5、1、2ml とされている。検体接種後のマウスの観察期間は日本では 3 日間、EP では 96 時間、米国では 4 日間と記載されている。

いずれの方法でも最初に試験毒素を設定する際には、WHO の国際標準品が必要になる。現在、日本では、WHO 国際標準品の IU に基づいて設定した国内標準抗毒素を作製している。当面は国内標準品を指標として品質管理

を行って問題ないが、国内標準品が枯渇すれば再校正も必要になる。ボツリヌス抗毒素の WHO 標準品の策定、管理は英国の NIBSC の主導で行われている。現在 NIBSC の標準品カタログに、WHO 標準品として記載されているのは B 型と D 型の抗毒素のみであり、他の型の抗毒素は、更新されていない可能性がある。今後、WHO 国際標準品について NIBSC との情報交換や打ち合わせが必要である。

D. 考察

力価試験は、製剤の有効性、均一性を保証する上で重要な試験であり、適切に行われなければ、製剤の品質が保証できない。筆者の所属する研究室では、ボツリヌス抗毒素の品質管理の習得のため海外からの研修生を受け入れたことがあった。この研修生は自国で試験生産したボツリヌス抗毒素製剤を持参していた。製剤には自国で測定した力価も表示されていたので、研修の一環として日本の力価試験法でこの製剤の試験を行ってみた。その結果、研修生が持参した製剤の表示力価は、日本の標準抗血清の力価とかなりずれていることがわかった。この原因を知るため研修生とディスカッションをおこなったところ、自国で測定した力価は、直接力価を測定する方法で求めたものとのことだった。WHO の国際標準抗毒素は取り寄せていたが、これを用いて試験毒素を設定するのではなく、精製毒素の LD₅₀ 値を指標にして抗毒素の力価を測定したとのこと

であった。このため日本の標準品とは値が大きく異なったものと思われる。

精製毒素の中には、精製の過程で構造が変化して、活性が失われた毒素タンパク質も生じている。このような毒素タンパク質でも、普通は抗原性を有しており抗毒素とは反応する。不活化毒素がどの程度精製毒素に含まれてくるかは、精製ごとに微妙に異なるので、異なる精製毒素を用いて抗毒素の力価を測定した場合、力価に違いが生じてくる。この問題を回避するために、間接力価測定による力価試験が行われるが、直接力価に比べて間接力価の概念は、抗毒素製剤の品質管理について経験が少ない場合には、理解しにくく、混同しやすいと思われる。

今回、日本、EP、米国の力価試験法を検証したが、これらはすべて間接力価測定の原理に基づいて試験法が記載されている。間接力価に基づく方法で試験する限りは、測定誤差は比較的少なく抑えられるはずである。しかし、3つの方法を比べると試験の L+レベルがかなり異なっており、このような条件間で力価測定に大きな誤差が生じないかは不明である。今後はこの点を検討する余地がある。

E. 結論

ボツリヌス抗毒素の力価試験法について、日本、欧州、米国で採用されている方法について比較調査を行った。各法とも同じ原理の試験法が記載されているが、試験の L+レベルのデザインは各法で異なっている。この違い

によってどの程度、力価試験に誤差が生じるかは検討の余地がある。将来的には、WHO 国際標準品を用いた標準品、試験毒素の再校正は必要になるので、その動向については注意を払う必要がある。

F. 健康危機情報

特になし

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）なし

表 1. 日本、欧州、米国のボツリヌス抗毒素力価試験法の比較

	生物製剤基準	EP	USA
試験レベル	L+/20	L+/10	A: L+/500 B: L+/2000 C: L+/500 D: L+/62.5 E: L+/80 F: L+/4000
標準抗毒素量/ 1 dose	0.05 IU	0.1 IU	A: 0.002 IU B: 0.0005 IU C: 0.002 IU D: 0.016 IU E: 0.0125 IU F: 0.00025 IU
LD50 /1 dose (1TD)	A: 53 B okra: 884 B QC: 229 E: 306 F: 168	1000 以上	10 以上
マウス	23~29 日齢	使用マウスの体重 差 5g 以内	17~25g の ICR strain マウス
マウス使用数(1 群)	4 匹	4 匹	4 匹
接種容量	0.5 ml	1 ml	0.2 ml
観察日数	3 日	96 時間	4 日

厚生労働科学研究費補助金
医薬品等医療技術リスク評価研究事業

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

ジフテリア抗毒素製剤のWHOガイドライン検証

研究分担者

岩城正昭 国立感染症研究所細菌第二部

要旨：蛇毒抗毒素についてWHOのガイドラインが示されたが、蛇毒以外の抗毒素製剤についてもWHOガイドラインに対応する準備を進めておく必要がある。我が国で国有抗毒素として製造・使用されているジフテリア抗毒素もそのひとつである。本研究では、将来予想されるジフテリア抗毒素製剤のWHOガイドライン制定に備えて、海外でのジフテリア抗毒素の供給体制とレギュレーションをめぐる動きを調査する。初年度である本年度は、まず海外におけるジフテリア抗毒素の供給体制を把握し、供給に伴う問題を諸外国特に欧州各国がどのように解決しようとしているのかを探った。ジフテリア抗毒素の国内供給体制が整っている国は非常に少なく、日本で生産される乾燥ジフテリア抗毒素に対する期待が高いことが明らかになった。

A. 研究の目的

ジフテリアウマ抗毒素の作製と抗毒素療法への利用は、北里柴三郎とベーリングによって、1990年に報告された。この業績によりベーリングは1901年のノーベル賞を受賞した。

ジフテリア抗毒素は、今でも抗生物質と並んでジフテリア治療の柱の1つとなっており、我が国では国内生産された製剤が国有抗毒素として常に備蓄されている。

海外においてもジフテリア治療におけるジフテリア抗毒素の重要性は大きく、多くの国々がジフテリア抗毒素を必要としている。米国および英国における治療のガイドラインを資料1と資料2、3としてそれぞれ添付する。

WHOは2008年のECBSにおいて、蛇毒抗毒素の製造、品質管理及び規制方法に関するガイドラインを示した。これを受けて蛇毒抗毒素については製

造側、品質管理/規制当局側の双方が対応を要することになる。

ジフテリア抗毒素は、蛇毒抗毒素と同じウマ抗毒素であり、製造・品質管理の面で蛇毒抗毒素と共通する部分が多い。今回のWHOガイドラインは蛇毒抗毒素に関するものであるが、ジフテリア抗毒素に関しても、将来WHOから製造、品質管理及び規制方法に関するガイドラインが示されることが予想される。

本研究では、予想されるガイドライン制定に備えて、海外でのジフテリア抗毒素の供給体制とレギュレーションを調査する。初年度は海外におけるジフテリア抗毒素の供給体制を調査した。

B. 研究方法

(1) 海外での調査

ジフテリアに関する国際的なネットワークであるDIPNETを活用した。DIPNETは、1990年代の旧ソ連地域でのジフテリアの大流行（患者数11万人、死者4000人以上といわれる）を受けWHOの要請により1993年に発足したEuropean Laboratory Working Group for Diphtheria (ELWGD)が原形である。欧州以外にも規模を拡大し2004年DIPNETと併称してECDCの援助を受けて隔年集会を開催するネットワークとなった。ECDC (EU)の支援が切れた今年、最後のミーティングが行なわれたが、最終的にEUおよびその周辺から25ヶ国、他の地域（旧ソ連地域を含む）から14ヶ国のジフテ

リア対策担当者が集まる組織となっている。日本からは報告者が毎回出席している。

今回は、2009年10月にラトビア共和国リガ市で行なわれたDIPNET final meetingに出席し、ジフテリア抗毒素に関する海外の動向を調査し情報を収集した。

(2) 国内での調査

DIPNETで得られた情報をもとに、インターネットを利用して海外における抗毒素製造所の供給状況を調査した。

(倫理面への配慮)

特に倫理面に配慮すべき活動は今回行なっていない。

C. 研究結果と考察

(1) 海外での調査

今回のDIPNETミーティングには34ヶ国から89人のジフテリア担当者の参加があった。

3日間の会期中4つのセッションがあり、そのうちの1つ“Serological immunity studies and diagnostics”においてジフテリア抗毒素の供給の問題が議論された。

DIPNETは世界的なジフテリア抗毒素の供給不足を認識しており、2008年には57ヶ国を対象としたジフテリア抗毒素の需要および供給に関するアンケート調査を行なっている(44ヶ国から回答あり)。日本も報告者の部署が、血液対策課の了承を得てこのアンケートに回答する形で協力した。調査の結果は2010年になって論文として刊行されたが(1)、それに先行して

DIPNET では詳細な報告があった。

我が国においてはジフテリア抗毒素は国有抗毒素として（廃業した千葉血清から化血研に速やかに承継され）安定的に供給されているが、世界的にみるとジフテリア抗毒素は供給不足に陥っている。以下個別の項目について紹介する。

(a) ジフテリア抗毒素製剤の種類

我が国では化血研により乾燥ジフテリアウマ抗毒素が製造され用いられている。海外においてはすべて液状のウマ抗毒素である。現在4製造所（ロシア Mikrogen 社、クロアチア Institute of Immunology 社、ブラジル国立 Butantan 研究所、インド Serum Institute 社）が海外への供給を行なっている。またクロアチアの Institute of Immunology 社は、カナダの Intervax 社を通じての海外供給も行なっている。一方、日本（化血研）、トルコ、ブルガリアは国内供給のための製造を行なっている。オーストラリア、フランス、スイス、ポーランドは国内、国外への供給を行なっていたが近年これらの国々の製造所はジフテリア抗毒素の製造を中止した。

(b) 製剤の有効期限

日本の乾燥ジフテリアウマ抗毒素は有効期限 10 年である。海外の製剤は 2-3 年と報告された。

(c) 抗毒素はどのような組織によって備蓄されているか

我が国では国有抗毒素として全国9ヶ所に備蓄されている。海外でも多くの国では保健担当の中央官庁が備蓄を

管轄し、いくつかの国では地方レベルでの備蓄がある。しかしすべての国で備蓄がなされているわけではないと報告された。

(d) 供給の安定について

欧州においては、外国の製造所の製品（上記4製造所）に供給を依存しているのが実情である。また米国も国内供給ができなためブラジルからの供給に頼っている。

このようにして海外からの供給による備蓄を行なっているのは、米国の他に欧州では英国、アイルランド、スイス、フィンランド、ドイツ、オーストリアなどで、また備蓄を行なっていない国はフランス、イタリア、スウェーデン、ノルウェー、スペインなど多数である。

抗毒素の備蓄がない国では、患者への対応に困難をきたした経験を持つ国もあった（ノルウェー）と報告された。

(2) 日本製の乾燥ジフテリアウマ抗毒素に対する国外からの興味

上記のような欧州の事情を背景に、DIPNET 会議場において英国の担当者より日本のジフテリア抗毒素の供給体制についてさらに詳しく知りたいとの申し出があった。

会議が終わり帰国後、WHO Euro と ECDC に cc した電子メールで、同じ英国の担当者から、日本で製造されている乾燥ジフテリアウマ抗毒素の海外供給の可能性について知りたいと記したメールが報告者に届いた。

報告者の職務権限の範囲では回答できないことであり、製造所である化血

研の事情も報告者には不明なことから、血液対策課に照会するようにと回答した。乾燥ジフテリアウマ抗毒素は有効期限が長く、備蓄に適していることが、英国担当者が興味を示す理由の一つと思われた。

D. 結論

本年度はまず海外におけるジフテリア抗毒素の供給体制を把握し、供給に伴う問題を諸外国特に欧州各国がどのように解決しようとしているのかを探った。

その結果、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ことから、ジフテリア抗毒素の供給体制の不備は予想以上に深刻になっていることが判明した。いまだに解決策は見出されていないが、当事国は真剣に対応を検討しており、我が国の乾燥ジフテリアウマ抗毒素に関心が持たれていることが明らかになった。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

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).

G. 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

F. 参考文献

- (1) Wagner, K. et al. A review of the international issues surrounding the availability and demand for diphtheria antitoxin for therapeutic use. Vaccine 28, 14-20, 2010.

資料 1 . CDC Pink Book.
<http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/>

pinkbook/default.htm からダウンロード可。

資料 2 . Green Book.
http://www.dh.gov.uk/en/PublicHealth/Healthprotection/Immunisation/Greenbook/DH_4097254 からダウンロード可。

ード可。

資料 3. Bonnet, J. M. and Begg, N. T. Control of diphtheria: guidance for consultants in communicable disease control. *Commun. Dis. Public Health* 2, 242-249. 1999.

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

日本蛇族学術研究所におけるWHOのガイドラインへの対応に関する研究

研究分担者

鳥羽通久 財団法人日本蛇族学術研究所

要旨：(財)日本蛇族学術研究所では、蛇毒抗毒素の原料としてニホンマムシおよび奄美群島産ハブの粗毒を生産して、(財)化学及血清療法研究所に供給しているが、WHOガイドラインの制定に伴い、生産工程において、基準に合致させるための検討を行った。採毒作業や咬まれたときの対応については、特に問題はなかったが、施設・設備で見直しが必要になった。特に、検疫室を新たに設けることで、新しく入ってくるヘビによる病害虫の侵入を防ぐことになった。また対馬のツシママムシの毒に対する現行の「乾燥まむしウマ抗毒素」の効果を検討することにしたが、毒量がまだ足りないために、研究を来年度に継続することにした。北九州産のニホンマムシの毒の特異性についても同様に来年度に継続する。

A. 研究の目的

財団法人日本蛇族学術研究所においては、ヘビ類の分類・生態、蛇毒及び毒蛇咬症の疫学等の研究を行っているが、その一環として、ニホンマムシおよび奄美群島産ハブの粗毒の生産を行い、抗毒素の原料として(財)化学及血清療法研究所に供給している。そうした中、WHOが蛇毒抗毒素製造のための新たなガイドラインの

策定を行い、その中で抗毒素の原料である蛇毒の生産にもGMP対応が求められるようになった。そこで、現状を見ると、ガイドラインに合致しない点が多く、今年度はそれらをガイドラインに対応させるために、作業内容や施設・設備等の検討を行った。

また、ガイドラインでは、蛇毒の生産者、抗毒素の製造者共に、爬虫類学者との連携を密にし、分類の見直しに

よる毒蛇の分類の変更に対しては、適切な対応が求められている。これに該当するケースがマムシで、1970年代くらいまでは、日本とアジア大陸東部のマムシはただ1種で、和名もマムシで済んでいた。しかし、その後の分類の見直しで、アジア東部には数種のマムシが分布し、日本には北海道、本州、四国、九州の主要4島と多くの離島に固有のニホンマムシ *Gloydius blomhoffii* と、対馬に固有のツシママムシ *Gloydius tsushimaensis* の2種が分布することが分かってきた。現在作られている「乾燥まむしウマ抗毒素」は、ニホンマムシの毒で免役したものであるが、これまでの予備的研究で、ニホンマムシとツシママムシの毒には大きな違いがあることが分かっており、「乾燥まむしウマ抗毒素」がどの程度ツシママムシの毒を抑えるのかが、不明である。この点を明らかにするために、化学及血清療法研究所と共同で検討を行うこととし、今年度はまずツシママムシの採集を行い、毒を集めて研究に供することにした。

一方、ニホンマムシには1つ問題があり、これまでの症例で、福岡と熊本で1例ずつ、強い神経毒症状を伴う重症例が見られた。これがこの地域特有の現象なのか、とりあえず毒の比較を行うこととし、九州北部のニホンマムシを採集して毒を集めることにした。

B. 研究方法

(1) 日本蛇族学術研究所における採毒の作業内容や施設・設備等の検討

日本蛇族学術研究所においては、マムシやハブ以外にも、さまざまな毒ヘビの採毒を行っている。今回これらの採毒の見直しを行い、その手順や関連設備について、ガイドラインとの突き合わせを行って、改善方法とその実現可能性の検討を行った。

(2) ツシママムシと北九州産のニホンマムシ毒

どちらの場合も業者を通しての入手は難しく、地理的な利便性を考慮に入れて、北九州市在住の橋元浩一氏に採集を依頼した。採集されたツシママムシとニホンマムシは、研究所において飼育しながら採毒を行い、ツシママムシについては化学及血清療法研究所と実験方法の検討を行い、まず毒のLD₅₀を見いだして、次いでニホンマムシ毒を使った検定方法に準拠して、ニホンマムシとの比較を行うこととした。検定のための実験は、化学及血清療法研究所において行う。北九州産のニホンマムシについては、崇城大学の上田直子教授との共同研究の一環として、二次元電気泳動による比較を行うと共に、マウスを使って直接神経毒性の試験を行う。その際他の地域のニホンマムシの他に神経毒性の強い中国産のタンビマムシ *Gloydius brevicaudus* との比較も行う。

C. 研究結果

(1) 日本蛇族学術研究所における採毒の作業内容や施設・設備等の検討

まず採毒作業について、当研究所では対象とする毒ヘビの種と大きさが

多岐にわたるために、ガイドラインと比べても、はるかにきめ細かい作業を行っている。マムシとハブの保定の仕方にしても、当研究所の方法の方がガイドラインによるものよりも優れているが、半面熟練を要するものでもあり、一般的な記述にはなじまない。したがって、特段の見直しは必要ないと考えられたが、毒のトレーサビリティの確保のために、記録を確実にとることの重要性を確認した。

施設や設備については、次の点が問題点としてあげられた。

① ニホンマムシの入手ルートの確保

ハブについては、鹿児島県では保健所が買い上げを行っているために、何の問題もない。しかし、マムシについては、業者から購入しているのが実情で、現在飼育している北海道天売島、新潟県、群馬県、岐阜県、鹿児島県産のマムシの内、安定して供給されているのは新潟県産のみである。全国的にマムシを捕る人が減っており、新潟県の業者も高齢で、将来継続する見通しは立っていない。ガイドラインでは、できるだけ広い地域の個体から採毒することを推奨しており、今後採毒用の個体をどう確保するかは大きな問題である。マムシは特に小さい個体が多いために、1回の採毒で採集できる毒量が少なく、個体数の確保は重要である。

解決策は、当面新たな業者を見つけることと、繁殖させて数を増やすことが上げられた。マムシは薬用としても

広く使われているために、養殖の研究が行われてきているが、生産コストを下げるのが難しく、実用化には至っていない。しかし、採毒用であれば死なせる必要はなく、ある期間飼育して採毒できればよいので、生産コストの問題はかなり小さくなる。したがって、将来的には、繁殖個体の割合を増やすことと、新たな地域を含めて職員や関係者の採集によって数や多様性を確保することで、この問題は解決できると考えられた。

② 検疫室の整備

ガイドラインでは、検疫室を設けて、新たに入手した採毒用のヘビを一定期間収容し、病気や寄生虫の感染を防がなければならないとしている。

日本蛇族学術研究所では、飼育室に余裕がなく、これまで検疫室を設けてこなかったが、新しいヘビが入ってくるのは、ほぼ暖かい季節に限られることから、暖房の付いていない部屋でも使用可能と考え、毒蛇咬症研修センターの動物室を改装して、検疫室とすることにした。同センターについては、平成22年度に修繕を計画しており、その一環として検疫室の整備を行うことになった。検疫室は常勤の獣医が管理し、新しく入ったヘビは2ヶ月間ここで寄生虫等のチェックを行う。

③ 種ごとの部屋の分離と洗浄室

ガイドラインは種ごとに飼育室を分けることを推奨しているが、日本蛇族学術研究所では飼育室に余裕がなく、また国内における海外産毒ヘビのほとんどを一括管理しているという

ことから、飼育室を分けるのは困難である。飼育室を分ける理由は、採毒作業における種の取り違えを防ぐことであるので、現在飼育と採毒を行っているのが熟練した研究者であって、ニホンマムシやハブを取り違える可能性がないこと、ラベルをきちんと付けておけば問題ないことを考えると、あえて飼育室を分離する必要はないと考えられた。

また、ガイドラインには洗浄室等を設けることがあるが、採毒室が飼育室から離れていること、空いていることが多いことから、採毒室を洗浄室と兼用としても何ら問題がないと考えられた。

④ 毒成分のチェック

抗毒素の品質を安定させるためには、元になる蛇毒の品質の安定化が欠かせない。そのためにガイドラインでも生産者が品質のチェックを行うことを定めている。これまで日本蛇族学術研究所においては、ニホンマムシの収集から、採毒、凍結乾燥、保存に関して特に問題はなく、それ以上のチェックはほとんど行わないで、化学及血清療法研究所に送ってきたが、今後はどこまでを生産者側が行うか、受入側の化学及血清療法研究所とも協議を行いながら、毒の品質チェックを行っていくこととした。

⑤ その他

採毒方法が多岐にわたるためと、熟練者による採毒を想定しているために、採毒マニュアルは整備されていない。しかし、事故で毒へびに咬まれた

ときの対応についてはマニュアル化され、ガイドラインには詳しく載っていないが、目に毒が入ったときの対応も、血清を使用することで、ガイドラインよりも効果的な対応が可能になっている。

(2) ツシママムシと北九州産ニホンマムシの毒について

ツシママムシは10個体を採集して採毒に供したが、ニホンマムシに比べて飼育が難しく、多くが採毒後死亡した。これは採毒のストレスよりも、飼育下で餌を食べないことが大きい。したがって必要量の毒を確保できず、来年度補充の個体を採集することにした。一方、子へびが生まれたので飼育しているが、子へびはニホンマムシに比べやはり神経質であるとはいえ、野生で採集された個体よりはよく餌を食べ、ある程度まで成長させれば、採毒用としては野生の個体よりも有用であると思われた。

北九州産のマムシについては、現地をよく知る人に依頼したにもかかわらず、2個体しか採集できず、やはり必要な毒量が確保できなかった。環境の変化(悪化?)により、従来マムシが多く見られた場所で、見つけることができなかったという。来年度は、もっと広い地域での採集を行うべく、採集場所の検討を行ってもらっている。

D. 考察

日本蛇族学術研究所における採毒施設は、老朽化が進んでおり、近い将

来に全面的な改修あるいは改築が必要になってきているが、財政難のため見通しは立っていない。したがって、今回のWHOのガイドラインへの対応も、小規模の改修で対応する他はないと思われる。

一方で、スタッフは熟練しており、採毒技術もガイドラインのはるか上をいっており、また毒ヘビの同定も国内ではトップレベルにあり、条件が整えば理想的な蛇毒の生産施設となる。蛇毒の品質管理を含め、今後は化学及血清療法研究所との連携を深め、良質の抗毒素の供給を支えていくこととしたい。

ツシママムシの飼育が難しいことは、以前より注目されていた。その理由としては2つ考えられる。1つは、性質が神経質できわめて攻撃的であること。もう1つは食性がニホンマムシと少し違うことである。対馬には3種のヘビしか生息せず、特に本土でカエルをもっぱら食べているヤマカガシとシマヘビがいないことで、食性がカエルに片寄っている可能性がある。このことは毒性の違いにも反映されている可能性があるが、詳細は今後の研究に待たなければならない。

食べない個体には仕方なく強制給餌を行っているが、その後で死亡する個体が多く、飼育方法にも工夫が必要となっている。その点で、子ヘビの飼育の成功は多くの示唆を与えるものである。

北九州のニホンマムシの毒につい

ては、ある程度の毒が集まらないと実験を始めることができないので、来年度補充の個体を採集してからのことになるだろう。

E. 結論

日本蛇族学術研究所においては、WHOのガイドラインに対応するためには、採毒作業や咬まれたときの対応については、特に問題はなかったが、施設・設備で見直しが必要になった。特に、検疫室を新たに設けることで、新しく入ってくるヘビによる病虫害の侵入を防ぐことになった。

ツシママムシの毒に対する「乾燥まむしウマ抗毒素」の効果については、ツシママムシ毒がまだ不足しているために来年度への継続課題となった。北九州産のニホンマムシの毒性についても、マムシ毒の不足のために、同じく来年度に継続することになった。

F. 健康危機情報

特になし

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）

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

英文雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Umeda, K., Seto, Y., Kohda, T., Mukamoto, M., Kozaki, S.	Genetic characterization of <i>Clostridium botulinum</i> associated with type B infant botulism in Japan.	J. Clin. Microbiol	47	2720-2728	2009

邦文雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
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

書籍

著者氏名	タイトル名	出版書籍名	出版社	ページ	出版年
高橋元秀(梶龍児/総監修)	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	ボツリヌス治療総論—ボツリヌス毒素製剤の基礎知識—	診断と治療社	58-74	2010