

201034025A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高橋元秀

平成23年(2011)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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高橋元秀

平成23年(2011)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 22 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 信頼性保証部門担当理事付  
銀永 明弘 (財) 化学及血清療法研究所 第一製造部次長  
鳥羽 通久 (財) 日本蛇族学術研究所長  
小崎 俊司 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科長  
玉那覇 康二 沖縄県衛生環境研究所 衛生科学班長  
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  
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  
櫻井 信豪 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 品質管理部長

##### 研究協力者

諸熊 一則 (財) 化学及血清療法研究所 第一製造部主任部員  
鳥居 恭司 (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 病理部部長  
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  
堺 淳 (財) 日本蛇族学術研究所  
渡辺 晋 (財) 日本蛇族学術研究所  
向本 雅郁 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科  
幸田 知子 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科  
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  
小宮 貴子 国立感染症研究所 細菌第二部 第三室  
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  
佐々木次雄 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 品質管理部  
全国 219 病院の救急救命センター

## 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	9
2.	ハブ及び毒素のGMP対応検証 玉那覇康二	23
3.	抗毒素製剤の臨床での使用実態調査 一二三 亨	29
4.	細菌毒素の抗毒素製剤の試験系 小崎俊司	37
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	43
6.	ボツリヌス抗毒素製剤のWHOガイドライン検証 見理 剛	49
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	57
8.	まむし及び毒素のGMP対応検証 鳥羽通久	63
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	79
IV.	研究成果の刊行物・別刷り	81
V.	資料集	

# 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 22 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および安全性確保として、WHO が示している蛇毒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。本年度は、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 対応への検証として以下の検討を実施した。

1. ウマ抗毒素製剤の製造工程におけるウイルスクリアランスとしてペプシン消化工程において、昨年選定したウイルスを用いてバリデーションを実施した。
2. ボツリヌス抗毒素の製造に用いる毒素はサブタイプ A1 毒素であるが、国内分離株にはサブタイプ A2 毒素が確認されている。両毒素の抗毒素に対する反応性を比較し、現行の製剤の有効性評価の検証をおこなった。
3. マムシとハブの飼育及び採毒に関する管理マニュアルを作成し、乾燥粗毒の安定性試験をおこなった。
4. 蛇毒の抗毒素製剤以外について、蛇毒抗毒素の WHO-GL に示された内容についての検証をおこなった。

研究分担者

大隈邦夫	(財) 化学及血清療法研究所 信頼性保証部門理事付	玉那覇康二	沖縄県衛生環境研究所 衛生科学班長
銀永明弘	(財) 化学及血清療法研究所 第一製造部次長	一二三亭	(独) 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	岩城正昭	国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官
山本明彦	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 所長
見理 剛	国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官	櫻井信豪	(独) 医薬品医療機器総合機 構 品質管理部長

## 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、ハブやマムシの毒ヘビ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)、抗毒素血清の精製の技術力向上(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) が示し、検討することが示された。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。WGO-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。

ジフテリア抗毒素の力価試験に用いる試験毒素は約 40 年前に培養・精製したものを保存して自然状態で安定化した標品が用いられている。ジフテリア毒素の安定性について、新規にトキソイド製造用に培養した毒素を入手して活性を継時的に定量して、今後の試験毒素の確保に必要な条件を検討する。

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エソ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、

1. ハブウマ抗毒素の製造工程（ペプシン消化工程）において、昨年度の調査結果で得られた「日本薬局方参考情報」、  
「WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake

Antivenom Immunoglobulins」及び「血漿分画製剤のウイルスに対する安全性確保に関するガイドライン」の情報を元に、選択したモデルウイルスを用いてウイルス不活化の確認を試験する。

2. ボツリヌス毒素はA-G型の7型の毒素が知られており、各型には複数のサブタイプが存在することが近年明らかとなっている。現在製造されているA型ボツリヌス抗毒素はA1毒素を用いて製造されている。サブタイプの異なる各種毒素に対する抗毒素の反応性はモノクローナル抗体では報告されており、A1毒素を用いて作製されたモノクローナル抗体のA2毒素に対する反応性は、A1毒素に対するより数倍～数百倍低いと報告されている。現在、抗毒素検定で用いられている標準A型抗毒素のA1毒素あるいはA2毒素に対する反応性を比較した。また、A2毒素をウマに免疫し、その抗毒素血清を精製して自家標準A2抗毒素を製造し、A1毒素あるいはA2毒素に対する反応性について比較した。
3. WHO-GLの毒蛇の管理および毒素の管理方法の検証とともに、マムシおよびハブの飼育及び採毒に関する管理マニュアルの作成し、乾燥ハブ粗毒の安定性試験を実施した。また、
4. WHO-GLでは抗毒素の市販後の有効性及び安全性についての追跡調査を継続して実施することが推奨されている。マムシ抗毒素は全国的に発生がありながら抗毒素の使用実態把握がなかったため、昨年度、全国219施設の救命救急センターに協力のもと実施した。本年度は、その結果を基に治療に関する詳細調査として、抗毒素とセフェランチンおよび、その他の治療法の有効性について2回目のアンケート調査を実施した。

5. ジフテリア試験毒素の作製として、精製ジフテリア試験毒素は阪大微生物病研究会から液状毒素の 2 リットルを入手した。毒素の性状は、タンパク窒素  $523 \mu\text{g/ml}$ 、ジフテリア毒素含有量  $1400 \text{ Lf/ml}$ 、純度  $2677 \text{ Lf/mgPN}$  である。毒素活性の測定は、ジフテリアトキシノイド製造する 4 所社の協力をえて、Vero 細胞を用いた培養細胞法（細胞死指標）で直接活性を測定した。
6. 蛇毒抗毒素と生産工程上に共通点の多い蛇毒以外のジフテリア、ボツリヌス等の抗毒素製剤についても今後蛇抗毒素 WHO-GL の影響が及ぶことを見越して分析を試みる。

### C. 研究結果

1. ハブウマ抗毒素において、ペプシン消化工程が有するウイルス不活化能力をモデル試験により評価した結果、使用した 3 種類のモデルウイルスにおいてウイルスクリアランスが認められた。これは昨年文献による調査結果と同様な成績を示した。従って、ペプシン消化工程が、本製剤のウイルス除去工程としても重要であることを確認した。
2. サブタイプの異なる毒素と各型毒素に対する抗毒素の交差試験では以下の結果が得られた。現在の標準 A 型抗毒素は A1 毒素との間で得られる用量反応曲線と A2 毒素との反応曲線は異なることを確認した。また、A2 毒素由来の抗毒素と A1 毒素も同様に異なる反応曲線であった。このことは、抗毒素 1 単位がホモの毒素を中和する毒素活性 ( $\text{LD}_{50}$ ) とヘテロの毒素では約 13 倍の違いが確認された。

3. WHO-GL をモデルにハブの採毒マニュアルを作成した。沖縄ハブおよそ 200-300 個体からなる乾燥ハブ粗毒バッチの生物化学的性状の検査を実施し SDS-PAGE の泳動パターンは還元、非還元状態でバッチ間の差はみられなかった。また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」の効果を確認するために、ツシママムシの毒の致死活性と出血活性を測定し、現製造の抗毒素に対する有効性を評価した。ツシママムシ毒の致死活性はニホンマムシ毒の約  $1/2$ 、出血活性は約  $1/100$  であった。現製造の抗毒素は、これらの活性を中和することを確認できたために、対馬におけるマムシ咬症対策は、特別な措置は必要ないことを確認した。
4. 救急センター 219 施設のアナケート調査では、114 施設 (52.1%) の回答により、234 症例の治療における実態を得た。来院時に症状が悪化している場合には有意に白血球数が高いことが確認された。治療においては、抗毒素だけでなく、セファランチンの混合または単独使用も確認された。治療方法の違いによる症状の回復度を入院日数を指標とすると有意差は認めなかった。また、セファランチンの使用目的に抗毒素と同様の治療効果を求めている場合も確認された。
5. 培養細胞法による直接活性値（各所平均）を 6 施設で 3 回繰り返した結果の平均値は、 $1.0 \times 10^{10}$  であった。施設間での成績は、最大で 4 倍の差を認めた。現在までに累積した培養細胞法の測定における誤差範囲から著明に逸脱

した値は認められなかった。毒素の安定性確保のために、阪大微研に依頼して毒素はバイアルに小分け分注して凍結乾燥標品とした。

6. 蛇毒抗毒素以外の製剤においては、ウマ免疫用の抗原の調製・確保（培地作製、菌株の選定、毒素精製、ワクチン化等）は、実験室での工程管理が可能である。このことは GMP 上の管理が容易であり、生体由来原料としての問題を回避できる。一方、高度免疫血清が得られた後の作業工程は、蛇毒抗毒素製剤と同様な問題点と対応が必要であることを確認した。

#### D. 考察

毒素サブタイプと該当する抗毒素の中和能の違いが確認されたことにより、ボツリヌス患者発生時には分離される菌株と産生する毒素サブタイプの解析は治療用抗毒素の有効性評価として重要な情報となる。現在、国内の食中毒患者発生は数年に1度、乳児ボツリヌス症は年間数例の報告となっている。患者発生時には地方衛生研究所を中心に病原体診断として毒素と菌の検出を患者および環境物で実施している。調査の結果、A型については、毒素サブタイプとして A1 および A2 を産生する2種類の菌が分離されている。食餌性ボツリヌス患者においては治療用の抗毒素が使用される場合が多いために、製造されている A1 毒素に対する A1 抗毒素の有効性の評価は、今後 慎重に見極めていく必要がある。

ハブの採取場所の区分や採毒記録簿を作成することにより、ハブ毒のトレーサ

ビリティが可能となった。採毒方法として1個体からの毒素量は少なく、品質試験は実際的でないために、200-300 個体の採毒でもバッチ毎の差は小さく、毒成分の個体差または地域差は平均化されると考えられる。

マムシ抗毒素およびセファランチンの使用実態および有効性判断をアンケート調査した結果、いずれの治療方法でも入院期間を指標にした場合差がないことが示された。抗毒素療法の有効性評価は、咬傷時の毒素の摂取量、咬傷部位、患者の年齢（抵抗性、基礎疾患）、咬傷後の治療までの時間等が期待される効果の要因となる。セファランチンの使用とその効果についても医師側の誤解もあり、マムシ咬傷の適切な治療マニュアル作成と啓蒙が必要である。

ジフテリア抗毒素製剤の力価試験用に用いるジフテリア毒素を大量に入手して、その直接活性を6施設で定量した結果、試験毒素として十分な性状であることを確認した。安定性を高めるために液状品を凍結乾燥した剤形とした。今後、凍結乾燥後の直接活性および標準抗毒素との中和活性（間接活性）を継時的に測定する。また、ジフテリア毒素の有する異なる生物活性を比較するために、培養細胞法（細胞毒性）、ウサギ皮内試験法（発赤反応）およびモルモット法（致死活性）による試験結果を解析する。

#### E. 結論

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 ガイドラインに示された毒蛇の管理および採取毒素の

品質管理方法について、国内の供給施設で検証した。毒蛇については、海外の供給施設が実施しているような蛇農場 (Snake Farm) としてハードを整えることは、現状では供給組織の設立目的や運営・業務体系から実施することは多くの問題を解決する必要がある。また、採取した蛇毒の個体の健康管理と採毒記録等のソフトについては、マニュアル等の作成を含めて対応策が具体化された。

製造工程におけるウイルスクリアランスでは、実製造で実施しているペプシン消化工程でのウイルス不活化が機能していることを確認した。

ボツリヌスについては、患者治療に用いている抗毒素の製造に使用している免疫用毒素 (トキシイド) はサブタイプ A1 であるが、サブタイプ A2 毒素との中和能が異なるため、今後 国内患者発生の際に分離される菌株と毒素型、および抗毒素療法を実施した場合の効果について注視することが必要である。

蛇毒抗毒素以外の抗毒素製剤についての WHO-GL 検証では、ウマ免疫用抗原の確保は製造所内での調達 (菌培養と毒素精製) が可能となることから、他の生物学的製剤に適応した GMP 対応の経験が生かされるため、蛇毒抗毒素の WHO-GL 対応よりも比較的ソフト対応は容易なことが予想される。

#### 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.: A novel multiplex PCR method for *Clostridium botulinum* neurotoxin type A cluster typing. Microbiol Immunol. 54; 308-312. 2010
- 2) 高橋元秀: クロストリジウム属菌感染症と抗毒素療法、日本集中治療医学会誌 17. 253-255. 2010
- 3) 一二三亨、高橋元秀、諸熊一則 他 6 名: *Clostridium perfringens* 感染患者に対する治療用ウマ抗毒素製剤の存在を知っていますか? 日本集中治療医学会誌 17. 287-289. 2010

##### 2. 学会発表

- 1) まむしウマ抗毒素製剤の救命救急センターでの使用実態調査 一二三亨, 山本明彦, 井上潤一, 加藤宏, 小井土雄一, 高橋元秀 日本救急医学会 2010, 10, 9 東京

#### 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・医薬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

分担研究報告書

蛇毒（まむし・はぶ）ウマ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データの取得

研究分担者

銀永 明弘 一般財団法人 化学及血清療法研究所 第一製造部  
大隈 邦夫 一般財団法人 化学及血清療法研究所 信頼性保証部門担当理事付

研究協力者

諸熊 一則 一般財団法人 化学及血清療法研究所 第一製造部  
八木 翼 一般財団法人 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減少している。一方、世界的には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 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重要である。

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、昨年度は「抗毒  
素製造工程におけるウイルスクリアランスに関する調査」を実施した。本年度は、そ  
の調査をもとに、「蛇毒（まむし・はぶ）ウマ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データの取得」を実施した。

A. 研究目的

2008年の蛇毒抗毒素に関するWHOガイドライン  
案の発表に伴い、迷入ウイルス除去やウイルスバ  
リデーション等の新たな品質管理手法の導入が要  
求されることが予測される。昨年度は蛇毒（まむ  
し・はぶ）ウマ抗毒素製剤のウイルスバリデーシ  
ョン実施準備として文献調査及びモデルウイルス  
の選定を行い、本年度はペプシン消化工程におい

てウイルスバリデーションを実施した。

本バリデーションの実施にあたっては、「日本薬  
局方参考情報」（平成14年厚生労働省告示第395  
号）、「WHO Guidelines for the Production,  
Control and Regulation of Snake Antivenom  
Immunoglobulins」（蛇毒抗毒素に関するWHOガイ  
ドライン）及び「血漿分画製剤のウイルスに対す  
る安全性確保に関するガイドライン」（医薬発第

1047号)を参考とした。また、まむし抗毒素とはぶ抗毒素は、精製方法・条件及び製造スケールは同一であることから、両製剤を代表してはぶ抗毒素を用いた。

### 1. スケールダウン系の構築

ペプシン消化工程(図1)をスケールダウンし、ウイルスクリアランス試験における工程の各要素が、実生産規模での製造工程を反映し、妥当であるか評価した。

### 2. 感染価測定系のプレスタディー

感染価測定系のプレスタディーとして細胞毒性試験及びインターフェランス試験を実施し、感染価測定系の妥当性を検討した。

### 3. ウイルスクリアランス試験

「1. スケールダウン系の構築」、「2. 感染価測定系のプレスタディー」の事前検討データをもとに「ウイルスクリアランス試験」を実施した。

昨年度選定した3種類のモデルウイルス(PRV, BVDV, EMCV)(表1)を用いて、ペプシン消化工程において「ウイルススパイク試験」及び「ウイルス感染価測定」を実施し、対数減少率(Reduction Factor)を算出した。

## B. 研究方法

### 1. スケールダウン系の構築

実生産に準じてペプシン消化工程をスケールダウンし、実製造(30L)とスケールダウンした系(100mL)で同一原料を用いてペプシン消化を行った。試験条件は表2に示す。品質の同等性評価として、工程前後の抗致死価回収率、比活性及びSDS-PAGEについて比較した。

### 2. 感染価測定系のプレスタディー

細胞毒性試験では、試験検体中の成分が感染価測定時の細胞の成長に影響するか確認した。インターフェランス試験では、試験検体中の成分がウイルスの細胞への感染成立に影響するか確認した。影響が確認される場合は、感染価測定時にそれを回避するために必要な希釈倍率を設定した。

### 3. ウイルスクリアランス試験

#### 1) スパイク試験条件

- ①試験回数：モデルウイルス毎に2回実施。
- ②試験系：ラボスケール(100mL)で実施。
- ③ウイルススパイク量：出発原料(ペプシン消化前)に対して10 v/v%。

④採取検体：PRV「ペプシン消化前、消化開始4時間、18時間、ホールド」、BVDV・EMCV「ペプシン消化前、消化開始4時間、8時間、18時間、ホールド」試験フローを図2に示す。

⑤工程条件：その他試験条件及びその設定根拠を表3に示す。

### 2) 感染価測定

- ①使用細胞：Vero細胞(PRV)、BT細胞(BVDV)、Vero C1008細胞(EMCV)
- ②測定法：50%感染終末点法(Cell Culture Infectious Dose 50 : CCID<sub>50</sub>)により測定し、Spearman-Kärber法に基づいてウイルス感染価(単位はLogCCID<sub>50</sub>/mL)を算出した。
- ③測定回数：1検体につき3回測定し、その相加平均値を検体のウイルス感染価とした。
- ④Reduction Factorの算出：ウイルス感染価を基に対数減少率(Reduction Factor)を算出した。

## C. 研究結果 及び D. 考察

### 1. スケールダウン系の構築

表4より、ペプシン処理後の抗致死価回収率について、実生産スケールでは100%超、ラボスケールでは102.8±12.8% [mean ±2SD]であった。また、ペプシン処理後の蛋白量あたりの比活性について、実生産スケールでは11.3 U/mg、ラボスケールでは10.9±1.72 U/mg [mean ±2SD]であった。よって、両スケールにおいて抗致死価回収率及び蛋白量あたりの比活性は同程度であると判断した。さらに、図3より、ペプシン処理後の製造スケールとラボスケールのバンドパターンは共通しており、両者のSDS-PAGE泳動像には差がないと判断した。以上のことから、両者間で相違が無いことを確認し、実生産規模が適切にスケールダウンされていると判断した。

### 2. 感染価測定系のプレスタディー

検討の結果、一部の検体とウイルスの組み合わせについて、細胞毒性及びインターフェランスが確認された(表5, 表6)。よって、これらの組み合わせについては、ウイルス感染価測定試験において測定前に必要倍数の希釈を行い、細胞毒性及びインターフェランスを回避することとした(表7)。

### 3. ウイルスクリアランス試験

「消化前」を工程処理前、「消化18時間後」を工程処理後としてReduction Factorを算出した。

2 回のスパイク試験より、本工程は表 8 に示すウイルス除去能を有することを確認した。また、総ウイルス感染価平均値の経時変化を図 4 に示す。

#### E. まとめ

弊所の蛇毒ウマ抗毒素において、ペプシン消化工程が有するウイルス不活化能力をモデル試験により評価した。結果、3 種類のモデルウイルスについて表 8 に示すウイルスクリアランスを有し、これは調査した参考文献（表 9）と同程度であった。よって、弊所のペプシン消化工程が、本製剤のウイルス安全性を確保する上で、重要な工程であることが確認された。今後、蛇毒以外のウマ抗毒素製剤についてもウイルスクリアランスデータの取得を目指す。

#### F. 研究発表

なし



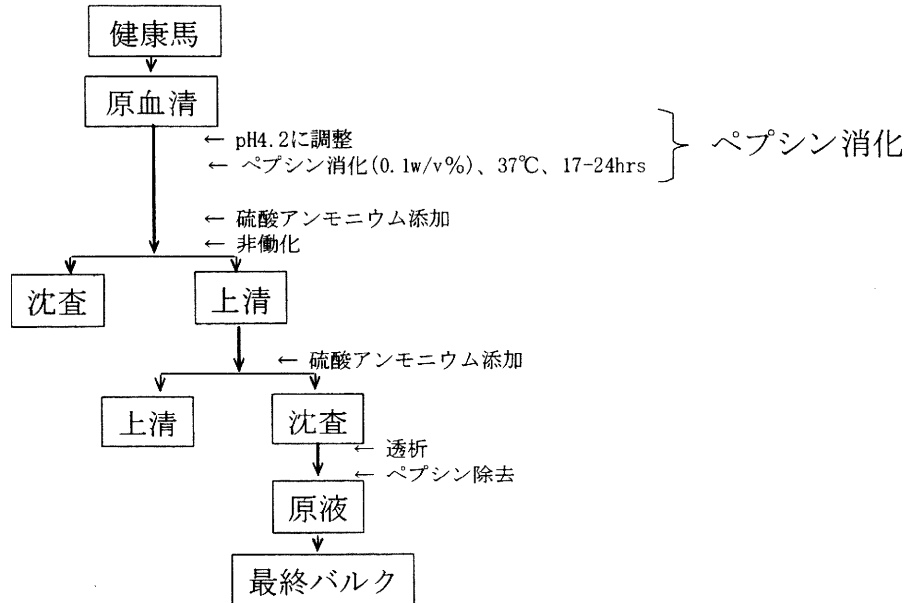


図 1. 蛇毒ウマ抗毒素製剤の製造工程

表 1. モデルウイルス

選択したウイルス	科	エンベロープ	ゲノム	大きさ (nm)	物理化学的処理に対する耐性	モデルとなるウイルス
Pseudorabies virus (PRV) 仮性狂犬病ウイルス	ヘルペスウイルス	+	ds-DNA	100-200	中	Equine herpes virus ウマヘルペスウイルス
Bovine virus Diarrhoea virus (BVDV) ウシウイルス性下痢ウイルス	トガウイルス	+	ss-RNA	40-60	低	Eastern, Western and Venezuelan equine encephalitis virus ウマ脳症ウイルス
Encephalomyocarditis virus (EMCV) 脳心筋炎ウイルス	ピコルナウイルス	-	ss-RNA	25-30	中	Equine rotavirus ウマロタウイルス

表 2. 「スケールダウン系の構築」の試験条件

条件	実生産スケール	ラボスケール (n=3)
反応スケール	30L	100mL
使用材料	はぶ原血清	
消化温度	37.0 ± 1.0°C	
消化時間	22 時間	
ペプシン濃度	0.1w/v%	
消化開始時 pH	4.15 - 4.24	

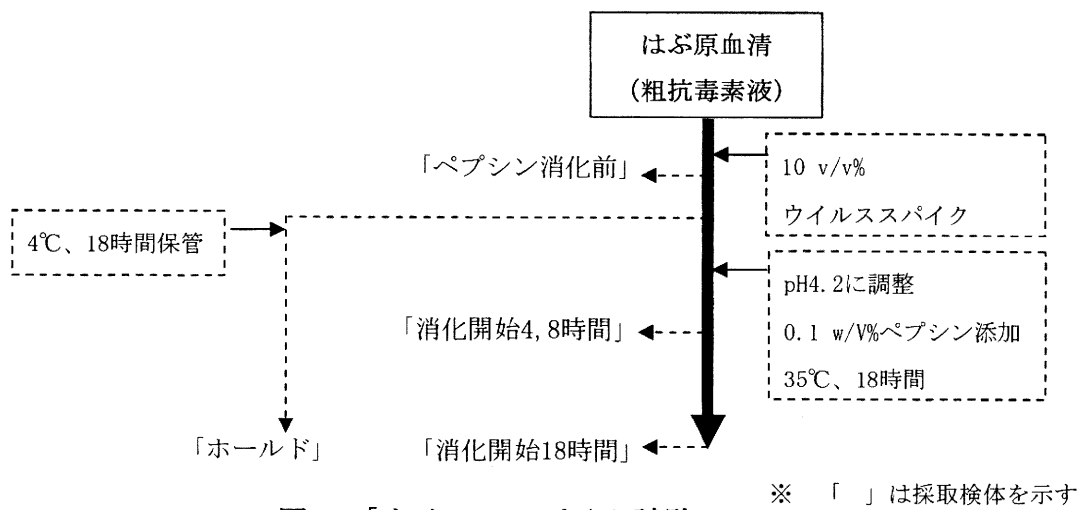


図 2. 「ウイルススパイク試験」フロー

表 3. 「ウイルススパイク試験」の試験条件と設定根拠

設定項目	実生産条件	スパイク試験条件	スパイク試験条件設定根拠等
処理量	約 30L	100mL	実生産の約 1/300 スケール
試験温度	37.0±1.0℃	35.0±1.0℃	ワーストケースとして実製造下限値を超えない範囲で設定
消化時間	18-24 時間	18 時間	ワーストケースとして実製造下限値を設定
ペプシン濃度	0.1w/v%	0.1w/v%	実生産と同様
消化開始時 pH	4.15 - 4.24	4.15 - 4.24	実生産と同様

表 4. 「スケールダウン系の構築」の試験結果

	工程	容量 (mL)	抗致死価		たん白質含量		比活性 (U/mg)
			(U/mL)	回収率 (%)	(mg/mL)	回収率 (%)	
実生産 スケール	ペプシン消化前	30100	156.5	100	28.2	100	5.5
	ペプシン消化後	31300	180.0	>100	15.9	58.6	11.3
ラボ スケール (n=3)	ペプシン消化前	100	189.5	100	29.8	100	6.4
	ペプシン消化後	103	189.8	102.8±12.8	17.5	60.2±3.2	10.9±1.72

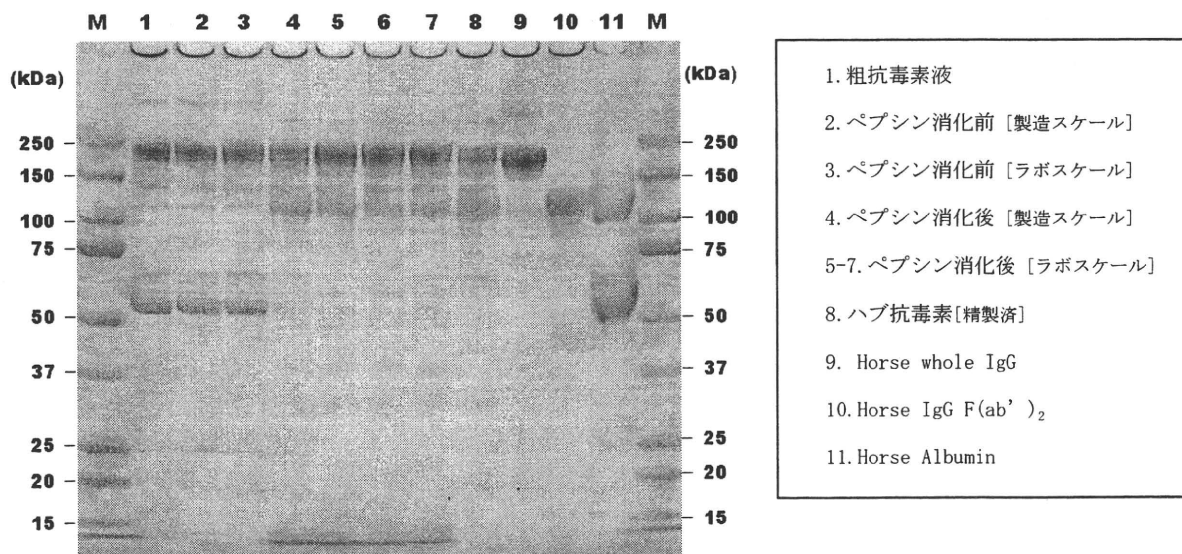


図 3. 「スケールダウン系の構築」の SDS-PAGE 所見 (非還元、CBB 染色)

表 5. 細胞毒性ありと判定された試験検体の最大希釈率

	ペプシン処理前液	ペプシン処理後液
PRV	なし	1 倍
BVDV	なし	1 倍
EMCV	なし	なし

※ 試験検体を、1 倍、2 倍、4 倍、8 倍、16 倍、32 倍、64 倍、128 倍で希釈調製

表 6. インターフェランスありと判定された試験検体の最大希釈率

	ペプシン処理前液	ペプシン処理後液
PRV	なし	1 倍
BVDV	なし	1 倍
EMCV	2 倍	なし

※ 試験検体を、1 倍、2 倍、5 倍、11 倍、25 倍、125 倍で希釈調製

表 7. 感染価測定試験において必要な希釈率

	ペプシン処理前液	ペプシン処理後液
PRV	なし	2 倍
BVDV	なし	2 倍
EMCV	5 倍	なし

表 8. 「ウイルススパイク試験」の総ウイルス感染価(Log CCID<sub>50</sub>)と対数減少率

	総ウイルス感染価(Log CCID <sub>50</sub> )					対数減少率 (Reduction Factor)
	ペプシン 消化前	消化 4 時間後	消化 8 時間後	消化 18 時間後	ホールド	
PRV	8.14	≤3.36	—	≤3.36	7.82	≥4.8
BVDV	8.68	7.81	7.27	6.12	8.49	2.6
EMCV	8.24	5.82	5.79	5.63	7.84	2.6

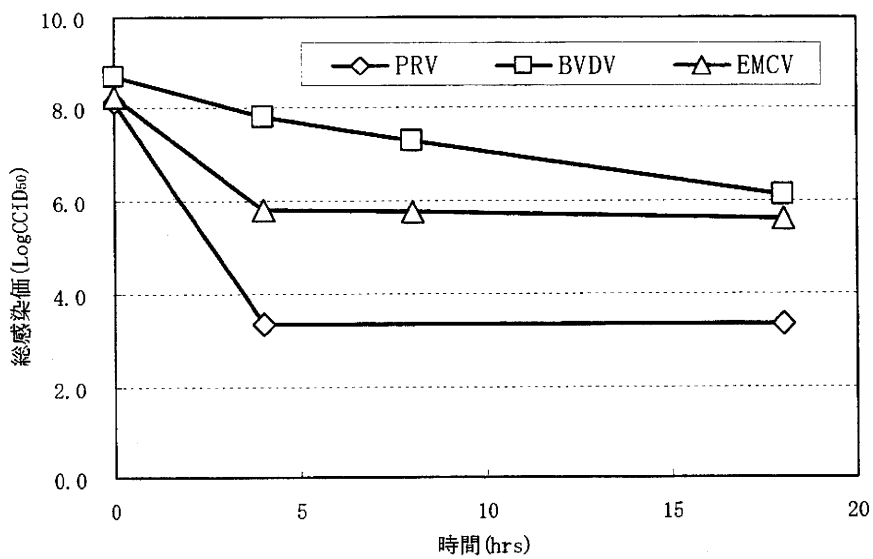


図 4. 「ウイルススパイク試験」の総ウイルス感染価の経時変化

表 9. ウマ抗毒素のペプシン消化工程におけるウイルスクリアランスの比較

	対数減少率 (Reduction Factor)	
	幣所条件 [pH4.2, 18時間]	参考文献 *1 [pH3.3, 60分]
PRV	≥4.8	>5.1
BVDV	2.6	1.7
EMCV	2.6	2.5~5.7

\*1: Burnouf et al., 2007 からの引用。