

は認められなかった。

#### D. 考察

Osaka05 株が産生する毒素の精製を試み、BoNT/Osaka05 の性状を調べた。BoNT は菌体内ではジスフィルド結合を少なくとも1カ所持つ1本鎖のポリペプチドとして産生される。BoNT/Okra や BoNT/111 はトリプシン処理により、BoNT 分子の特定部位に切れ目(nick)が入り毒素活性が 100 倍ほど上昇する(活性化)ことが知られているが、BoNT/Osaka05 は、電気泳動像および毒素活性から、すでに活性化していることが明らかになった。短期間の培養では、Osaka05 株は Okra 株や 111 株とは異なり、菌体から産生されるプロテアーゼが高いことが推測された。また BoNT/Osaka05 の毒素活性は BoNT/Okra と BoNT/111 の中間であったが、ウサギ抗 BoNT/Osaka05 IgG を用い ELISA による各 BoNT/B に対する反応性を調べたところ、BoNT/Osaka05 は BoNT/Okra とは異なるが、BoNT/111 と同様の抗原性を持っていた。しかし、Osaka05 株に対する Okra 株および 111 株のアミノ酸レベルの相同性は、受容体結合部位である重鎖 C 末端領域(H<sub>C</sub>)で 94.7%, 94.3%、BoNT 分子全体 96.2%, 98.5%と比べて低いことが分かっている。実際にリコンビナント H<sub>C</sub> を用いて、これら 3 株の抗原性は異なることが報告されている。これら H<sub>C</sub> のアミノ酸残基の相違は毒素活性の違いにも関与することが推測された。

#### E. 結論

BoNT/Osaka05 の毒素活性および抗原性は既報の BoNT/111、BoNT/Okra とは異なることが明らかになった。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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. 学会発表

1) 幸田知子、居原秀、向本雅郁、小崎俊司 Functional analysis of synaptotagmin II as a receptor for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin 第47回 IBRCC(2010)

#### 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

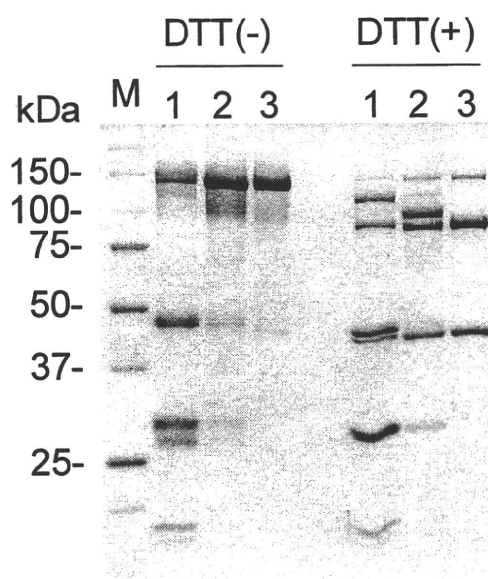
##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

表1. 神経毒素のマウス致死活性

菌株	致死活性 (ip LD <sub>50</sub> /mg protein)
Osaka05	3.5 x 10 <sup>7</sup>
Okra	1.2 x 10 <sup>8</sup>
111	1.7 x 10 <sup>7</sup>



M : Marker, 1 : L toxin, 2 : M toxin, 3 : Neurotoxin

図1. Osaka05 株の電気泳動像

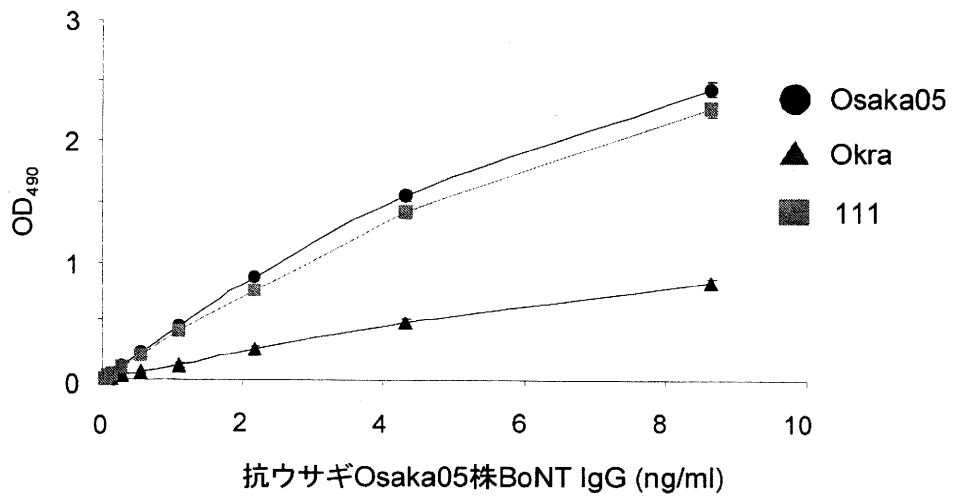


図2. 抗ウサギ Osaka05 株 BoNT 抗体の各抗原に対する反応性

厚生労働科学研究費補助金  
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・品質管理応用に関する研究

分担研究報告

まむし及びハブ抗毒素製剤のWHOガイドラインの検証

研究分担者

山本 明彦 国立感染症研究所・細菌第二部

研究要旨：平成22年度も、まむし及びハブ抗毒素製剤のWHOガイドライン（WGL）に照らして、蛇抗毒素の原料から、製剤製造そして市販後調査までそれぞれの担当部署における検証を行い、原材料供給から製造に至る各所での受け入れ可能なWGL対応が行われつつある。製造所で行われている品質管理試験について、現状とWGLでの規定とを比較した。日本においては抗致死活性に加えて、マムシ抗毒素製剤については抗出血活性をハブ抗毒素製剤についてはさらに抗出血I, II活性まで規定されているが、WGLでは、どの蛇抗毒素についても抗致死活性のみでの品質管理を規定している相違があった。

A. 研究目的

毒蛇による咬傷は、アフリカ、中東及び東南アジアで、毎年数十万件起こり、その約10%の数万人が死亡している。WHOは毒蛇咬傷に対する有効治療薬である蛇抗毒素製剤の安全性や有効性を一定に保ち、同種の蛇の生息する地域では同じ製剤を共用し、多くの種類の毒蛇に対処できる多価の抗毒素製剤の製造を目指して、製造と品質管理についての国際的なガイドライン

の作成を計画した。

そのWGLは、以下のような内容であった。

1) 蛇抗毒素製剤は、生産性が低く、発展途上国での製造と使用が多く、安価で安全性を担保しなければならないという特徴を持つが、これに他の生物学的製剤で導入が進んでいる品質保証制度の適用することの妥当性について述べている。2) GMP適合性の各製造所の対応状況として、まず、原薬を蛇、毒素、馬血漿及びその分画標品

のどれと規定するか、また、品質管理試験、組織、構造設備や文書管理などどこまで現状として適用できているか？また、適用させるべきか？3) 有効性のある製剤の製造法と同種の毒蛇の生息域内での特異性の確認法について述べている。4) 治療に用いた抗毒素製剤と蛇の種類の特特定法について述べている。5) 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ている。日本の蛇抗毒素製造について、このような特徴を持つWGLの検証を目的とする。

## B. 研究方法

日本の蛇抗毒素製剤の製造に関して、WGLの検証を行った。我が国における蛇抗毒素製剤の生産体制は、先ず、原料生産としての蛇毒の採取と提供は、ハブ毒は、沖縄衛生環境研究所が担当し、マムシ毒は、日本蛇族研究所が行っている。これらの原料を購入して馬に免疫し、その免疫血清を採取し、抗毒素製剤として製品化するのが、財団法人化学及血清療法研究所(化血研)という位置づけとなっている。このような日本の体制を、原材料供給、抗毒素製造、品質管理試験さらに市販後調査に分けてWGLに表現される個々の注意点を検証した。

## C. 研究結果及び考察

原材料供給について、ハブ毒を担当する沖縄衛生環境研究所では、第一年度ではハブ抗毒素の原料としてのハブの飼育管理について実際の方法とGMPの検証が行なわれ、ハブ飼育管理やハブ抗毒素原料と

しての取り扱う職員の意識改革を目指した。第二年度はハブの飼育施設の清掃、死体処理を予算化して依頼して飼育施設の整備が行なわれた。また、ハブ毒原材料のトレースアビリティを実施出来るように飼育施設の捕獲区分管理や健康状態の確認のためのマニュアルの作成の検討が行なわれた。さらに、昨年議論されて要望のあった粗毒素の冷蔵管理や生化学的な品質を一定にするための採毒時のプールサイズに関する検討がなされた。

一方、マムシ毒素を担当する日本蛇族研究所では、第一年度は、マムシの飼育管理について実際の方法とGMPの検証が行なわれ、第二年度は、主に2点の検証が行われた。第1点として、対馬に生息するツシママムシの毒の毒性と日本全国に生息するニホンマムシ抗毒素の効果について検証が行われた。化血研との共同研究で、ツシママムシ毒のマウスに対する致死活性はニホンマムシの半分程度、出血活性はウサギの場合で10分の1程度と、全体的にニホンマムシよりも毒性は低いという結果が明らかとなった。第2点として、検疫室の整備のための検疫室の管理マニュアルが作成された。さらにマムシの疾患として、寄生虫があげられるが、日大との共同研究で、健康なマムシの糞便検査を実施、線虫やその虫卵などをチェックが行われた。この研究を進める中で、日本産のヘビ類の吸虫リストが不備であることが明らかとなり、吸虫リストが新たに作成された。このように、蛇毒抗毒素の原材料供給部署でのWGL対応は適用可能な事項の整備な順調に進んでいると考察される。

次に、蛇毒抗毒素の製造所は化血研1か所が担当している。WGLの検証とその対応を目的として、第一年度は、抗毒素製造工程におけるウイルス汚染に関する調査を実施し、ウイルス汚染の評価用にウマ由来のウイルス3種類を選択がなされた。第二年度に当たる本年は、昨年の調査をもとに、蛇毒で免疫をしたウマ血清の最初の精製工程である蛇毒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の実験が実施された。あらかじめ製造スケールのウマ免疫血清との規模縮小による同等性を検証し終わった上で、少量の蛇毒ウマ免疫血清に昨年選択した3種類のウマ由来ウイルスを添加して、ペプシン消化してその生成物中のウイルス感染価の減少を調べた。この感染価の評価法についてもあらかじめその測定精度等を検証した上で結果を求めているが、その結果が参考文献での記述と同様のウイルスクリアランスが得られることが明らかとなった。この結果から、このペプシン消化によって、混入の可能性のあるウマ由来のウイルスが除去されることが証明され、WGLに規定される蛇毒抗毒素製造過程における製剤のウイルス安全性の確保が確保されたことになり、製造所におけるWGLに沿った体制整備が進みつつある。

続いて、毒蛇抗毒素の品質管理試験についてWGLに規定される試験は、蛇毒特異的な標準品を使用した毒素の中和試験、表示確認試験、タンパク含量試験、免疫グロブリン含有試験、発熱試験、無菌試験、含湿度試験等ほとんど現行の生物学的製剤基準(1)に記載された試験と同様ものを規

定されて、蛇毒抗毒素製剤の製造工程から最終製品に至るまでについて実際に品質管理試験として用いられている。しかし、毒素の中和試験については、WGLでは、どの蛇毒に関しても抗致死価試験のみを規定している。日本においては、マムシ抗毒素に関しては、抗出血価試験、ハブ抗毒素については、抗出血価IおよびIIの2種類の蛇毒の出血活性を中和する試験が課せられている。この試験は、ウサギの背部皮膚を用いて、対応する一定量の出血試験毒素と濃度を変えて抗毒素製剤とを一定時間反応させたのちに皮内注射して、24時間後の出血斑の大きさを測定することで、抗毒素製剤の日蛇毒に対する中和活性を測定するものである(1)。一方、WGL以外の諸外国における規制を、欧州薬局方(2)、米国薬局方(3)を参照すると、毒素の中和試験としては、マウスを用いた蛇毒の致死活性の中和試験が課せられているのみである。日本では、歴史的にマムシやハブの毒成分が分析されて、致死活性と出血活性として分けられている。実際、世界に生息する多くの毒蛇の毒素には、この出血毒成分が含まれていることが報告されている(4)。しかし、蛇毒は多くの毒素成分を含むもので、すべての毒成分についての中和活性を測定する方法が確立されているわけではない。このような状況において、日本以外の諸外国は、蛇毒の主活性として、致死活性を指標にその抗毒素の毒素中和試験を規定していることから、また、昨今の動物実験の3Rsから、不必要な動物試験は廃止してゆく方向があること。また、臨床において蛇毒の出血活性の重要性の

位置づけも変化しつつあることなどから、抗出血価試験の廃止を検討する必要も生まれてくると考えられる。この点は、来年度の詳しい調査を行う必要があると考える。

最後にWGLで規定されている市販後調査での蛇毒抗毒素の有効性の確認について現状を考察する。まず、ハブは、その主な生息地域である日本南西部の鹿児島県および沖縄県において、ハブ咬傷の発生数とハブ抗毒素の医療機関での配備状況やその使用数、ハブ咬傷を減少させるための対策等を含めた総合政策として実施されている(5)。このように、ハブ抗毒素に関しては必要十分な市販後調査が行われている。一方、マムシに関しては、その分布が日本全国にわたっているが、製造所でのマムシ抗毒素の販売数は把握されているが、その使用実態が明らかではない。そこで、昨年当研究班にて、全国219救急救命センターの協力を得て行ったマムシ抗毒素使用実態調査にて、少なくともこれらセンター全体では、毎年400例のマムシ咬傷症例が受け入れられ、その60%でマムシ抗毒素が使用されていることが明らかとなった。今後、使用されているマムシ抗毒素の有効性についてさらに解析する必要がある。

#### D. 結 論

平成22年度も、引き続きまむし及びハブ抗毒素製剤のWGLに照らして、蛇抗毒素の原料から、製剤製造そして市販後調査までそれぞれの担当部署における検証を行った。原料から製剤製造までの過程にお

いて、順調にWGL対応が進みつつある。また、製造所で行われている品質管理試験について、現状とWGLでの規定とを比較した。日本においては抗致死活性に加えて、マムシ抗毒素製剤については抗出血活性をハブ抗毒素製剤についてはさらに抗出血I, II活性まで規定されているが、WGLでは、どの蛇抗毒素についても抗致死活性のみでの品質管理を規定している相違があった。

#### 参考文献

1. 生物学的製剤基準、厚生労働省告示
2. 欧州薬局方
3. 米国薬局方
4. 武田壮一、蛇毒メタロプロテアーゼの立体構造とラッセルクサリヘビ毒素によるX因子活性化機構、日本血栓止血学会誌、Vol. 20 (No. 3)、pp307-314、2009.
5. ハブ対策事情の概要、鹿児島県保健福祉部編

#### F. 健康危険情報

特記すべきものなし

#### 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



## 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）

### 抗毒素製剤の効率的製造方法の開発に関する研究

#### 分担研究報告

#### 「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：

蛇毒抗毒素製剤の WHO ガイドライン案が 2008 年に提示され、近い将来、他の抗毒素のガイドラインも作成されてくると予想される。その準備として、蛇毒抗毒素ガイドラインを検証し、ボツリヌス抗毒素に置き換えて考えたときに問題となる部分を考えた。日本の感染症法で、ボツリヌス菌および毒素は特定二種病原体等に指定され、厳重な管理が求められている。特定病原体としての扱いと GMP の観点から、抗毒素製造用の菌と毒素をどのような管理すればよいか、今後検討する必要がある。また、これを扱う作業者の安全確保の問題も考える必要がある。製剤の品質管理の点では、力価試験に必要な標準品の国際的な調整が将来必要になると思われる。一方で、米国ではヒト型抗体によるボツリヌス抗毒素の研究開発も進んできており、こういった動向も把握しておく必要がある。

#### A. 研究の目的

現在、国内のボツリヌス抗毒素は ABEF 型の混合製剤と E 型単独の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。近年はボツリヌス症の国内発生ほとんどなくなっており、抗毒素が使用される機会も少なくなっている。しかし、ボツリヌス食中毒は致死率が高いので、発生に備えて抗毒素の国有備蓄は継続する必要がある。また、ボツリヌス毒素はバイオテロで使用される懸念が

あり、その脅威の対抗措置としての抗毒素の必要性がしばしば議論されている。米国ではこの問題意識が日本よりもかなり高く、新しいボツリヌス抗毒素やワクチンの開発が積極的に行われている。

2008 年に WHO の蛇毒抗毒素関連のガイドラインの改訂案が提示され、GMP の考え方がかなり細部まで取り入れられた。ボツリヌス抗毒素関連の WHO ガイドラインは、まだ提示されていないが、抗毒素としての基本的な製造法は同じであり、

今後、ガイドラインが作成されるのなら、蛇毒抗毒素のガイドラインに取り入れられた GMP の方針が横並びに導入されてくるものと思われる。

本研究では、蛇毒抗毒素の WHO ガイドラインを点検し、ボツリヌス抗毒素に当てはめて考えたときに問題となると思われる項目に検討を加えた。

## B. 研究方法

2008 年に提示された WHO 蛇毒抗毒素の製造、管理、規制に関するガイドライン案 (Proposed WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulines, 2008) を精査し、ボツリヌス抗毒素にあてはめた場合に問題となる点を抽出した。これらについて、特に品質管理上対応が必要なものについて対策を検討した。また米国における新しいボツリヌス抗毒素、ワクチンなどの開発状況を調査し、このような製剤が実用化されてきた場合に、どのような点が今回の蛇毒抗毒素ガイドラインと異なってくるかを考察した。

## C. 研究結果

蛇毒抗毒素 WHO ガイドライン案 (2008 年) は 19 セクションからなり、記載内容を分類すると表 1 のようになる。セクション 1-6 は、導入部と蛇毒抗毒素の概論で、蛇毒被害の疫学や、各地域で生産すべき抗毒素の種類、剤型などの記載がある。セクション 7-8 では免疫抗原である蛇毒の調製と管理方法、セクション 9-14 ではウマ抗毒素の製造工程、セクション 15-16 では抗毒素製剤の品質管理、セクシ

ョン 17-18 では臨床試験関連、最後のセクション 19 では NRA (National Regulatory authority) として国と行政の役割が記載されている。このうちセクション 1-6 の導入部と、セクション 7-8 の免疫抗原用蛇毒の調製は、蛇毒抗毒素に特化した内容である。それ以外の記述は抗毒素製剤製造に一般的に求められる内容になっている。もし、ボツリヌス抗毒素のガイドラインが作成されることになれば、当然のことながらセクション 1-8 はボツリヌス関連の内容に合わせて、大きく変わってくるが、セクション 9-19 は、比較的似た内容になってくると考えられる。

セクション 15 の抗毒素製剤の品質管理の部分に注目すると、ガイドラインでは表 2 に示すような試験項目が記載されている。この中で下線を入れたものは、日本の生物学的製剤基準では記載されていない試験である。これらは、製剤の内容量、浸透圧、分子サイズ分布、保存剤の含量、製造工程で使用された試薬類の残量確認などの試験である。日本の生物製剤基準では、すべての抗毒素製剤 (まむし、はぶ、ボツリヌス、ジフテリア、ガスエソ) の試験法は同項目がほぼ横並びに記載されている。日本のまむしやはぶ抗毒素製剤について、WHO 蛇毒抗毒素ガイドラインに基づいた新たな試験法の追加が検討されるとすれば、生物製剤学基準に記載されている、ボツリヌスやジフテリアなど他の抗毒素製剤についても、導入が検討されることになるとと思われる。

品質管理上、最も重要な試験の一つは力価試験である。抗毒素の力価試験につ

いては、昨年度、日本、米国、欧州で用いられているボツリヌス抗毒素力価試験法の比較調査を行い、報告書に記載した(表3)。調査した各法は、細かい点で試験のデザインは異なっているが、原理的には同じ方法を用いている(標準抗毒素と試験毒素を設定して力価を定める方法)。WHO 蛇毒抗毒素ガイドライン案に記載された力価試験法も同様な方法が記載されているが、蛇毒抗毒素は何種類も存在するため、試験に使用する標準抗毒素の規定や、製剤の力価含量などについて統一的なことは記載されていない。力価(ED<sub>50</sub>)の表記法についても、いろいろな表記法が考えられるとしながらも、単位(unit)表記することにはふれておらず、一定量の蛇毒を中和する抗毒素の液量(ml, μl)で表現する記載がなされている。また、「この試験法で求める力価は、方法の性質上、試験実施機関、製造所、国ごとに力価の設定に違いが出てくるので、行政と製造所は、力価の規格値を定め試験条件を公開せよ。」という記載がなされている。上述のように、蛇毒抗毒素は蛇毒ごとに多数の製剤があり、力価の規定について統一的な記載をすることが難しかったものと思われる。

一方、ボツリヌス抗毒素では国際標準品による国際単位(IU)が定められているので、国際標準品に基づいて適切に試験毒素を設定し、抗毒素製剤の力価を測定すれば、製造所間、製造国間を問わず力価をほぼ一定化して管理することが可能だと思われる。日本では、国際標準品に基づいた国内標準抗毒素が使用されているが、IUとの整合性が保てるようにな

っている。将来、この国内標準品が枯渇した場合は、国際標準品を用いて国内標準品の再設定が必要になる。ボツリヌス抗毒素の国際標準品は英国のNIBSC(<http://www.nibsc.ac.uk/>)が管理しているが、現時点の情報によると、正規のWHO標準品が残っているのは、B型とD型の抗毒素のみであり、A, C, E, F, G型はWHO暫定標準品あるいは参照品として交付可能ということである。昨年も報告書に記したが、この国際標準品の動向については、今後、国際的な調整作業や確認が必要であると考えられる。

また、日本ではボツリヌス、ジフテリア、ガスエその抗毒素は国有品として管理しているが、まむし、はぶの抗毒素は一般流通している。ガイドライン案、セクション16にある製剤の供給方法も、国の関与について解釈が少し異なってくる可能性がある。

ガイドライン案のセクション7-8は蛇毒の採取と精製(抗原の調製)が記載されている。この部分の記載は当然、生産する抗毒素によって抗原調製法が大きく変わってくるが、蛇毒の場合を見ると、蛇の飼育環境管理や、採毒、毒素の精製などに関して、かなり細かくGMP的な考えが導入されている。ボツリヌスに置き換えて考えた場合、ボツリヌス菌および毒素は、日本の感染症法で特定二種病原体等に指定されている。特定二種病原体等の取り扱いは厳重に規制されており、今後、ボツリヌス抗毒素関連のWHOガイドライン案が提示されてきた場合は、特定二種病原体等としての扱いとGMP管理による扱い方がどのように絡んでく

るか検討する必要がある。

また、ガイドラインで案は、蛇毒調製時に発生しうる咬傷事故の対応策などについても記載されている。ボツリヌス毒素も非常に強力で危険な物質であり、これを取り扱う作業者は何らかの安全対策が必要である。NIBSC などでは、研究所内でボツリヌス毒素の取り扱いをする作業者は、ボツリヌストキソイドの接種を受けることが求められている。日本でも、このような対応が必要になってくると考えられる。日本国内では承認薬としてのボツリヌストキソイドは存在しない。しかし、2008 年度に厚生労働科研費、抗毒素研究班の活動によって製造された ABEF 型の混合トキソイドが約 700 本存在する(国立感染症研究所(などに保管))。このトキソイドは、おもに研究者の利用を想定して生産されたもので、有効性、安全性の確認は国立感染症研究所で行っているが、医薬品としての承認は受けておらず、接種は自己責任となる。将来、ボツリヌス抗毒素関連の WHO ガイドライン案が提示され、ボツリヌス作業者の安全性確保が問題になった場合は、対応策としてトキソイドなどをどのように利用し、調達するかを考えていく必要がある。

米国では、ボツリヌス毒素によるバイオテロ脅威の意識が日本よりもかなり高い。また、ボツリヌス症の発生数も多いため(年間 100 例程度)、新しいボツリヌス抗毒素や、ワクチンを開発しようとする動きが積極的に見られる。近年新しく承認されたものに、ヒト抗ボツリヌス免疫グロブリン製剤がある(製剤名:

BabyBIG<sup>®</sup>)。ボツリヌストキソイドを接種したボランティアの血清を原料に、免疫グロブリン製剤にしたもので、A 型と B 型による乳児ボツリヌス症に適用される。乳児にウマ抗毒素を投与するのは好ましくないので、このようなヒト型の免疫グロブリン製剤が製造された。実際、米国で現在発生するボツリヌス症のうち 7~8 割が乳児ボツリヌス症なので、このような製剤の需要があった。ただし、十分な安全配慮は検証されたと思われるが、血液製剤を乳児に投与することには、未知のウイルス混入などの不安が残ると思われる。米国ではさらにヒト型モノクローナル抗体による、ボツリヌス抗毒素の開発が積極的に進められている。これは米 NIH の構成組織である、NIAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases) と XOMA 社 (<http://www.xoma.com/>) が契約を結び開発を進めている。これまで NIAID からは、1 億 US ドル近い開発費が出ている。現時点の情報では、すでに A、B、E 型のボツリヌス毒素の中和に有効なモノクローナル抗体が複数クローン得られているとのことである。モノクロー抗体 1 つでは毒素の完全中和は起こりにくいため、各毒素型に対して 3 つ程度のモノクロー抗体を混合して使用する方法がとられている。XOMA 社の XOMA 3AB と称する製剤候補品はモノクロー抗体 3 種が混合されていて、A 型のボツリヌス毒素を完全中和できるとしている。現在、前臨床段階にあるが、近いうちに臨床試験が行われるものと思われる。また、米国では、遺伝子組換え型のボツリヌストキソイドワクチンの開発も進められている。現在

最も開発が進んでいるのは、国防総省と DynPort Vaccine 社との契約進められているもので、rBV A/B という製品開発名で呼ばれている。もともとは米陸軍感染症医学研究所(U.S. Army Medical Research Institute for Infectious Diseases(USAMRIID))で基礎研究が行われたものだが、A と B 型のボツリヌス毒素の C 末端側を遺伝子組換えによって生産したものである。遺伝子組換えの宿主には酵母の一種 *Pichia pastoris* が使われている。米国では、ホルマリン不活化型のトキシド(米国に 1950 年代後半に生産された ABCDE 混合トキシドがある。未承認薬。)を、このような組換えワクチンに置き換えていく方針と思われる。開発中の rBV A/B は、現在フェーズ II の臨床試験が進められており、国防総省の計画では 2016 年に FDA の承認取得、2017 年には軍で兵士に使用することをめざしている。

#### D. 考察

WHO 蛇毒抗毒素ガイドライン案を検証し、ボツリヌス抗毒素に置き換えて考えたときに問題となる点を抽出し、その対応策などをまとめた。蛇毒抗毒素の WHO ガイドラインを踏まえて、もし日本の生物製剤基準のまむし、はぶ抗毒素の試験項目の記載に変更を検討するようなことがあれば、生物製剤基準では抗毒素製剤の試験法はほぼ横並びに同様の内容が記載されているので、ボツリヌス抗毒素も含めて、これらすべての医薬品各条に見直しの検討を入れる必要が考えられる。しかし、力価試験部分については、蛇毒

抗毒素よりもボツリヌス抗毒素の方が、製剤の種類が限られている上に、国際標準品も整備されているので(英国 NIBSC で管理)、国際的に調和性のある力価(国際単位 IU)で管理することができている。すでに今回の蛇毒のガイドラインの記載よりも適切に管理できていると考える。

米国では、新型の抗毒素の実用化や開発が進められている。例えば、乳児ボツリヌス用の BabyBIG<sup>®</sup>は、ウマ抗毒素ではなく血液製剤である。当然、今回のガイドライン案のような内容は当てはまらない。また、ヒト型モノクローナル抗体による抗毒素製剤が実用化されてきた場合も製造工程は全く別物になる。ヒト型モノクロー抗体による有効な抗毒素製剤が実際に開発されてくれば、ウマ血清より副作用の心配も少なく、乳児ボツリヌス症などにも適用できると考えられる。また、ウマを使用せず細胞培養によって大量生産を行い、コスト的にも有利な状況が実現されれば、ウマ抗毒素を凌駕していく可能性も考えられる。このような点は、今回の WHO 蛇毒抗毒素ガイドライン案検証の範囲をこえるが、将来的には、抗毒素製剤が向かう方向性と可能性を考えておく必要がある。

#### E. 結論

ボツリヌス抗毒素に関する WHO ガイドラインは、いまだに提示されていないため、その内容を正確に予測評価することは難しい。しかし、今回蛇毒抗毒素のガイドライン案を検証したことで、ボツリヌス抗毒素製剤の力価試験に使用する標準品の国際的な調整の問題や、ボツリヌ

ス毒素を扱う作業者の安全確保のための  
トキソイドワクチン調達など、いくつか  
の具体的な問題点が見つかった。

**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**

表 1. 蛇毒抗毒素 WHO ガイドライン案(2008 年) の内容概要

蛇毒抗毒素 WHO ガイドライン案 (2008 年) (Proposed WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulines, 2008)	
Section 1-6	蛇毒抗毒素の概要
Section 7-8	免疫用抗原の調製、保管、品質管理
Section 9-14	抗毒素製造工程 (ウマの管理、免疫、採血、精製、工程管理)
Section 15-16	抗毒素製剤の品質管理、保管、供給方法
Section 17-18	前臨床、臨床試験評価
Section 19	NRA の役割

表 2. セクション 15 に記載された、抗毒素製剤の品質管理試験法

15.1	ROUTINE ASSAYS
15.1.1	<i>Solubility (freeze-dried preparations)</i>
15.1.2	<u><i>Extractable volume</i></u>
15.1.3	<i>Venom-neutralising potency test</i>
15.1.4	<u><i>Osmolality</i></u>
15.1.5	<i>Identity test</i>
15.1.6	<i>Protein concentration</i>
15.1.7	<i>Purity</i>
15.1.8	<u><i>Molecular-size distribution</i></u>
15.1.9	<i>Pyrogen test</i>
15.1.10	<i>Abnormal toxicity test</i>
15.1.11	<i>Sterility test</i>
15.1.12	<i>Concentration of sodium chloride and other excipients</i>
15.1.13	<i>Determination of pH</i>
15.1.14	<u><i>Concentration of preservatives</i></u>
15.1.15	<u><i>Agents used in plasma fractionation (ammonium sulphate, caprylic acid, enzymes)</i></u>
15.1.16	<i>Visual inspection</i>
15.1.17	<i>Residual moisture (freeze-dried preparations)</i>

表 3. 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

抗毒素製剤の効率的製造方法の開発に関する研究

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：蛇毒抗毒素に関する WHO ガイドラインのドラフトがリリースされたのを受けて昨年度本研究班が発足した。WHO ガイドラインが正式に発効した場合に我が国の蛇毒抗毒素の安定供給にどのような影響が起ころうかを分析することが本研究班の主眼であるが、蛇毒抗毒素と生産工程上共通点の多い蛇毒以外の抗毒素についても早晩影響が及ぶことを見越して分析を試みることも本研究班の目的である。そこで、我が国で国有抗毒素として生産・備蓄されているジフテリア抗毒素について、WHO ガイドラインが及ぼしうる影響について分析した。また、前年度（21年度）に報告した欧米でのジフテリア抗毒素の供給状況の分析に加えて、本年度からはアジア地域を主とする発展途上国におけるジフテリア抗毒素の生産、供給状況の調査を開始した。

A. 研究の目的

2008年、蛇毒抗毒素に関する WHO ガイドラインのドラフトが公開された。内容は詳細にわたり、現行の国内での抗毒素製造工程と完全に一致したものではなかったため、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った。

蛇毒抗毒素に関するガイドラインが示されたことで、製造方法に類似点

の多いジフテリアウマ抗毒素の製造、品質管理、規制についても、同様のガイドラインが将来示される可能性が高いと考えられた。ジフテリア抗毒素はジフテリア治療において抗生物質と並んで有力な製剤である。我が国では国有抗毒素として国内生産され、備蓄されている。本研究では、蛇毒抗毒素のドラフトガイドラインの重要部分がジフテリア抗毒素にどの程度適用可能か、また適用に問題があるとする

ればどのような点かを検証した。また、昨年度は欧米におけるジフテリア抗毒素の生産・供給状況の調査結果を報告したが、本年度はアジアを主とする発展途上国での生産・供給体制についても知見を得るべく、調査を開始した。

## B. 研究方法

### (1) ガイドラインの検証

2008年に発表されたWHO蛇毒抗毒素ガイドラインのドラフトを精読し、ジフテリア抗毒素の製造、品質管理、規制方法と関連が深いと思われる部分について、ジフテリア抗毒素に適用された場合に考えうる問題点について考察した。

### (2) アジアを主とする発展途上国を対象とした調査

欧州を対象とした昨年度の調査に引き続き、アジアを主とする発展途上国を対象として同様の調査を行なった。調査は各種研修のために国立感染症研究所を訪れた各国のサーベイランス担当者、生物製剤品質管理担当者等を対象にして、アンケート形式で行なった。アンケートの項目を以下に記す（実際のアンケートは英文で行なわれたが、ここではその要旨を和文で示す）。

(1) アンケート対象国でのジフテリア抗毒素生産の有無、抗毒素の種類（人、ウマ）、メーカー名

(2) アンケート対象国でのジフテリア抗毒素輸入の有無、抗毒素の種類（人、ウマ）、メーカー名

(3) ジフテリア抗毒素の生産、輸入が

ある場合の品質管理について（品質管理を行なっているか、行なっているなら実際の試験か書類審査か）

(4) ジフテリア抗毒素の利用形態（国有抗毒素としての備蓄、生物製剤としての市販）。備蓄の主体（国、地方、等）

(5) ジフテリア抗毒素の年間使用量

(6) 対象国におけるジフテリアの年間発生数と死者数

### （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) ガイドラインの検証

WHO蛇毒抗毒素ドラフトガイドラインは全部で165ページに及ぶ大部で、原料の確保から生産と品質管理、そして全臨床試験および臨床試験までをカバーする19セクションからなる。本研究で検討の対象とするのは主に生産と品質管理の部分である。以下セクションごとに検討してゆく。

（セクション1から7は省略）

## 7 SNAKE VENOMS PREPARATION AND STORAGE

### 7.1 PREPARATION OF SNAKE VENOMS FOR IMMUNIZATION

#### 7.1.1 Quarantine of snakes

#### 7.1.2 Maintenance of captive snakes for venom production

#### 7.1.3 General maintenance of a snake farm

#### 7.1.4 Snake milking for venom

production

これらの項目は、抗毒素取得のためにウマを免疫する蛇毒の取得に関する部分で、これをジフテリア抗毒素に置き換えた場合には、菌の培養と毒素の精製とトキソイド化に相当する部分である。蛇毒においてはこれらの項目がGMP対応可能かどうか、議論があると思われるが、ジフテリアの場合はトキソイド生産に準じることであり、コントロールが蛇毒より容易と思われる。

## 7.2 STAFF RESPONSIBLE FOR HANDLING SNAKES

7.2.1 Safety and health considerations

7.2.2 Clothing and venom manipulation

7.2.3 Procedures to be followed if a bite occurs

## 7.3 MAIN RECOMMENDATIONS

これらは、蛇毒の取り扱いにおける安全などに関する記述である。ジフテリア抗毒素に置き換えて考えた場合には、トキソイド生産におけるバイオセーフティーの考え方を適用することになろうと思われる。

## 8 QUALITY CONTROL OF VENOMS

8.1 SNAKES ORIGIN, TRACEABILITY, POOL SIZE

8.2 NATIONAL REFERENCE MATERIALS

8.3 CHARACTERIZATION OF VENOM BATCHES

8.4 MAIN RECOMMENDATIONS

このセクションは抗原としての蛇毒の品質管理に関する部分である。詳しくみていくと、本文中に

The quality of snake venoms used as a reference standard by quality control laboratories and national regulatory authorities is very critical.

との表現がある。

ジフテリア抗毒素では、毒素とトキソイドを分けて考える必要がある。毒素は（主に力価試験などの試験毒素として用いられるが）免疫の最終段階でも用いられる可能性がある。しかし免疫のほとんどはトキソイドを用いて行なわれる。

蛇毒抗毒素の場合と考え方は近いが、蛇毒に標準トキソイドがおそらく存在しないと考えられるのに対し、ジフテリアには標準トキソイドが存在する。また日本では標準品に準ずる扱いの試験毒素が存在する（免疫原としての毒素標準品は存在しないが）。従ってジフテリアの場合には蛇毒で懸念されるほどは標準品の問題は大きくないと予想される。

（セクション9は省略）

10 SELECTION AND VETERINARY HEALTH CARE OF ANIMALS USED FOR ANTIVENOMS PRODUCTION

11 IMMUNIZATION REGIMENS AND USE OF ADJUVANT

12 COLLECTION AND CONTROL OF ANIMAL PLASMA FOR FRACTIONATION

13 PURIFICATION OF IMMUNOGLOBULINS AND IMMUNOGLOBULIN FRAGMENTS IN THE

## MANUFACTURE OF ANTIVENOMS

### 14 CONTROL OF INFECTIOUS RISKS

### 15 QUALITY CONTROL OF ANTIVENOMS

### 16 STABILITY, STORAGE AND DISTRIBUTION OF ANTIVENOMS

### 17 PRECLINICAL ASSESSMENT OF ANTIVENOMS

(セクション 18 は省略)

これらの項目については、動物免疫以降のステップであり、ジフテリア抗毒素の生産及び品質管理と共通する部分が多いので、ジフテリア抗毒素に適用された場合にも、おおむね準用が可能であろうと考えられる。

さらに、

### 19 ROLE OF NATIONAL REGULATORY AUTHORITIES

#### 19.1 CONTROL OF THE NEUTRALIZING EFFICACY OF VENOMS BY ANTIVENOMS PREPARATIONS

#### 19.2 ESTABLISHMENT LICENSE AND INSPECTIONS

これらの項目についても、そのまま適用可能 (NRA と NCL の役割分担は日本の実情に合わせて) と思われる。

#### 19.3 IMPACT OF GOOD MANUFACTURING PRACTICES

この項目には

An establishment licensing system for antivenom manufacturers by the competent national regulatory authorities should therefore exist. The main requirements to obtain an establishment license may include especially: Quality Assurance System and GMP applied to all steps

of production

という記述がある。GMP 関連については、蛇毒の調製関連でも問題になった部分である。ウマ飼育等関連に GMP をどう適用するかは、ジフテリアにおいても同様に問題となる可能性がある。

以上、WHO 蛇毒抗毒素ドラフトガイドラインをジフテリア抗毒素に適用する場合の問題点について検討した。

(2) アジアを主とする発展途上国を対象としたジフテリア抗毒素の生産、使用に関する調査

本年度は、

- ・カンボジア (National Maternal and Child Health Center, National Immunization Program)
- ・中国 (安徽省、Disease Control and Prevention Center of Anhui Province)
- ・インドネシア (National Quality Control Laboratory of Drug and Food, National Agency of Drug and Food Control)
- ・モンゴル (National Center for Communicable Diseases)
- ・ベトナム (DTP Department, Institute of Vaccines and Medical Biologicals)
- ・台湾 (台湾 FDA)

の担当者に対して、「研究方法」に記した内容のアンケートを行なった。

現在のところ、カンボジアから回答が寄せられている。回答によれば、同国ではジフテリア抗毒素の生産、輸入と