

201132010A・B

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 21-23 年度 総合研究報告書

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山本 明彦

平成 24 年 (2012) 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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山本明彦

平成24年 (2012)3月

## 医薬品・医療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 23 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 第三室室長  
山本明彦 国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官

##### 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  
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) 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  
鳥羽通久 (財) 日本蛇族学術研究所 所長  
堺 淳 (財) 日本蛇族学術研究所 研究員  
櫻井信豪 (独) 医薬品医療機器総合機構 品質管理部長  
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  
山本明彦 国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官

##### 研究協力者

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  
堀川義兼 (財) 化学及血清療法研究所 品質管理部  
久米田幸介 (財) 化学及血清療法研究所 品質管理部  
諸熊一則 (財) 化学及血清療法研究所 品質管理部  
渡辺 晋 (財) 日本蛇族学術研究所  
幸田知子 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科  
向本雅郁 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  
寺田考紀 沖縄県衛生環境研究所 衛生科学班  
松田聖子 沖縄県衛生環境研究所 衛生科学班  
小宮貴子 国立感染症研究所 細菌第二部  
小井土雄一 (独) 国立病院機構 災害医療センター救命救急科 部長  
佐々木次雄 (独) 医薬品医療機器総合機構 品質管理部  
高橋元秀 (独) 医薬品医療機器総合機構 品質管理部

## 目 次

	頁
I. 総括研究報告書	
抗毒素製剤の効率的製造方法の開発に関する研究	
研究代表者 山本 明彦 .....	1
研究協力者 高橋 元秀	
II. 分担研究報告書	
1. 1) 抗毒素製剤（ボツリヌス・ガスエソ・ジフテリア）における ウイルスクリアランスデータの取得	
2) カプリル酸沈殿法による抗毒素精製に関する調査	
大隈 邦夫、銀永 明弘 .....	13
2. ハブ及び毒素のGMP対応検証	
玉那覇 康二 .....	21
3. マムシ抗毒素製剤使用アンケート解析 II	
一二三 亨 .....	31
4. 現行ボツリヌス抗毒素製剤の有効性に関して	
小崎 俊司 .....	39
5. WHOガイドラインの検証及びマムシ抗毒素製剤使用アンケート解析	
山本 明彦 .....	45
6. ボツリヌス抗毒素製剤のWHOガイドラインの検証	
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 .....	55
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	61
IV. 研究成果の刊行物・別刷り .....	65

# 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 23 年度  
総括研究報告書

研究代表者 山本明彦 国立感染症研究所  
研究協力者 高橋元秀 国立感染症研究所

研究要旨：WHO が示した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、及びこの GL をモデルに国内で製造するウマ抗毒素製剤 (ジフテリア、ボツリヌス等) の適応を検証した結果、以下の概要のとおりである。

1. 蛇毒抗毒素製剤の製造工程管理の検証では、(1)毒素供給元である蛇研および沖縄衛研における採毒する蛇の個別管理、採毒後の毒素管理等について製剤の品質に影響を与える各工程の手順を設けて記録を残すシステムを構築した。(2)抗毒素製造工程において製品品質に影響があり GL とのギャップの大きい項目である毒素受け入れ、ウイルスクリアランス、及び精製方法について検証し、対応策を具体化した。
2. 品質管理試験については、現在の品質管理試験は過去に実施した蛇毒の臨床作用と実験動物での基礎研究のもとに確立された試験方法である。しかし、現在実施している致死活性価と出血活性価の複数の力価試験を製品の品質試験法として必須項目とするか、WHO-GL の推奨する 1 試験対応への検討を行なった結果、研究班としてハブおよびマムシ抗毒素の力価試験には、致死活性価だけで実施する提言をすることとした。
3. 国内に生息する毒蛇に対応する抗毒素が供給されているかの検証では、マムシとハブ以外にヤマカガシの咬傷による死亡例が報告されている。これを受けて、過去に試験製造されたヤマカガシウマ抗毒素が、現状の在庫調査を実施した結果、相当本数が 3 ケ所で保存されているが、10 年以上を経過しているために、安定性確認を含めて今後の対応を当局と検討することとした。
4. 蛇毒素以外のウマ抗毒素製剤についての WHO-GL 適応の可能性を検証したが、製剤の元原料が異なり、化血研法は血清であり、千葉血清承継法は血漿である。したがって、採血、精製工程に関わる管理方法が異なるために、通常では薬事法の製造承認内容の一部変更を伴う対応が求められる。このため、国家備蓄品であ

る当該製品の変更の必要性は当局と協議して対応することとした。

## A. 研究目的

ガス壊疽、ジフテリア、及び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行われていない。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、基礎研究及び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シノイドの十分な調達・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)及び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 から 2004 年に「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。これを踏まえれば、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が求められる。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。

## 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（蛇研）と沖縄県衛生研究所（沖縄衛研）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。

#### CとD. 研究結果と考察

WHO-GLが示す多くの推奨内容のうち、3年間に研究班員で調査・研究した結果、対応の具体化または方向性を見出した項目を要約する。

1.「蛇毒抗毒素製剤の出発材料であるウマ免疫用抗原である蛇毒採取、毒素管理」への検証と対応の考察。

マムシ毒素の供給元である蛇研は、集めた生体を飼育・管理し、定期的に毒素を採取している。WHO-GLが求めるマムシを含むセンター内で管理するヘビ類の受け入れに当たり、検疫室の整備と記録を整理した。管理マニュアルを作成すると共に、寄生虫を検索する準備を進め、日本のヘビに寄生する吸虫のリストを作成した。また、ニホンマムシの毒でウマを免疫しているが、現行の抗毒素の適合性を見るために、国内に生息するツシママムシに対する抗毒素の有効性を中和試験で確認した結果、特別な対応・措置は必要ないことと考察した。また、マムシとハブ毒素の管理において、蛇研および沖縄衛研における採毒する蛇の個別管

理、採毒後の毒素管理、等については、品質に影響を与える各工程の手順を設けて記録を残すシステムを構築した。

#### 2. WHO-GLの示す「抗毒素の製造工程・管理」への検証と対応の考察

毒素受け入れについては、WHO-GLでは一定の品質の毒素を供給するために必要な人員の確保を組織責任として整えることが求められる。供給する毒素の品質確保を教育・研修により習得し、毒素採取後の品質試験結果の判定・出荷システムを明確化して文書化して記録も求められる。現在の供給元の機関・組織は、マムシ毒は民間の研究所である蛇研、ハブ毒は地方衛生研究所及び地方自治体が所轄する保健所であり、薬事法の医薬品等の取り扱い施設に求められる構造設備、管理体制ではない。今後、抗毒素の製造に関わる原料である蛇毒を扱う業者、毒素の採取技術と適当な施設管理、毒素の保管、及び品質試験等が継続的に可能なシステムを構築することが、現状の問題点の解決であることを確認した。

ウイルスクリアランスについては、現状の製造工程で、原材料である血清、または血漿中に混入する未知のウイルス、または馬に感染する可能性のある人獣共通感染ウイルスを不活化または除去することは、本製剤の安全性確認として求められている。実生産の製造量規模ではなく、スケールダウンした規模で、馬の管理環境下で感染等が想定される特定の病原性ウイルスをモデルに、血清等に混入した場合のウイルスクリアランスを検証した。その結果、製造工程中の硫酸濃縮、

精製工程（ペプシン消化）は、ウイルス不活化に影響するが、RNA、DNA ウィルス、およびエンベロープの有・無に対応するすべてのウィルスを不活化・除去できる条件ではないことを確認した。今後の課題として、ウイルス除去フィルターを工程に加える必要性は検討課題である。

精製方法については、現状の製造工程中で精製に用いる硫酸法は、目的とする免疫グロブリンが凝集しやすく、血漿蛋白を混入させ易いため、WHO-GL ではカプリ酸法を推奨している。カプリ酸法は基礎研究分野では採用している研究室も多く、収率と純度が優れている方法である。製造工程における精製は品質に重要な影響を与えるために、今後の検討課題である。

3. 蛇毒素以外のウマ抗毒素製剤についての WHO-GL 適応の可能性を検証した。蛇毒関係の「マムシ抗毒素」と「ハブ抗毒素」であるが、前者は化血研製法、後者は千葉血清製法（承継品）と製法工程に複数の相違がある。「ジフテリア抗毒素」「ボツリヌス抗毒素」「ガス壊疽抗毒素」は、すべて国有品として千葉血清製法が承継されている。蛇毒抗毒素と同様に、製剤の原料は、化血研法は血清であり、千葉血清承継法は血漿である。採血、精製工程に関わる管理方法が異なり、これらの変更に伴っては、個々に製造承認内容の一部変更が必要である。国有品である製剤は希少疾患として一企業が製造する経済的な負担が大きいため、国内備蓄の必要性に対応する国の需給制度である。従って、蛇毒抗毒素に対する

WHO-GL が他の抗毒素製剤へ波及する場合は、薬事法への対応について製造所と当局の協議が不可欠である。なお、免疫により高い抗体価を確認されたウマの採血方法については、一定期間内に血漿成分だけを複数回で得る方法を推奨しているが、この項目についても製造方法の変更となるか、当局との協議が必要である。

4. 品質管理試験については、現在実施している蛇毒素の品質管理試験は、過去に実施・検証した咬傷後の毒素の臨床観察と実験動物での基礎研究のもとに確立されている。しかし、製品の品質試験法として、現在実施している致死活性価と出血活性価の複数の力価試験を必須項目とするか、WHO-GL が推奨する 1 試験での品質保証対応への検討を議論した。その結果、ハブ咬傷の沖縄中央病院の臨床の現場では、咬傷患者への多角的な医療導入（補液、対症療法、筋膜切除等）を実施することで、出血への抗毒素効果の期待は重要ではなくなったこと、一般的に本土のマムシ咬傷では出血への治療は重要な指標でないこと、が医療の現場の情報を得た。さらに、同種のマムシ抗毒素を製造する中国の生物学的製剤基準では、抗致死活性だけを試験することを求めている。WHO は実験動物の使用にあたり、Reduction、Refinement 及び Replacement の 3Rs を強く求めている。特に欧州では生物学的製剤の品質管理試験における実験動物の使用にも積極的に動物試験を制限する方向にある。このような現状に配慮し、現状の生物学的製剤

生物学的製剤基準では、ハブおよびマムシ抗毒素の力価試験には、抗致死活性と抗出血活性の力価を求めているが、本研究班としては抗致死活性だけを残すことを提言することとした。

5. 国内で製造する蛇抗毒素の適正について WHO・GL は、「各国の担当部局は、その国の毒蛇と咬症実態を調査して、適切な抗毒素を製造するか、輸入する場合にはその国にあった抗毒素を選定して行う必要がある、重要な種の毒素の標本を備えて抗毒素の力価テストやその他の比較研究に供するようにすべきである」としている。国内では医学的に重要な種として、マムシとハブ毒に対する抗毒素製剤の開発・製造が優先されてきたが、ヤマカガシの咬傷による死亡例が報告されていた。ヤマカガシ毒素はマムシ、ハブ毒素と作用が全く異なる血液凝固系の破綻がおこす急性播種性血管内凝固 (DIC) により重篤な場合は死亡例もある。厚生科学研究費補助金の研究班で「ヤマカガシウマ抗毒素」が 2001 年に製造された。この製品の使用と在庫調査を実施した結果を表 1 に示した。製造後、10 年以上を経過しているが、2011 年に 3 例の患者に使用し、効果が確認できている。しかし、承認製剤であっても有効期間は 10 年間である。従って本製品は、今後も継続的な品質試験・管理が必要である。さらに、将来の備蓄については、医療現場におけるヤマカガシ咬症事例と重篤性を継続的に調査して、必要に応じて、毒素の確保 (免疫用、品質管理用)、製剤化、および品質保証システムの構築を検討する。

## 6. 市販後の使用実態調査についての検証と対応の考察

ハブ咬傷事例数や抗毒素製剤の効果については、沖縄県及び鹿児島県の年次報告で明らかとなっている。平成 23 年度 3 月沖縄県衛生環境研究所の抗毒素研究報告では、咬傷事例 48 件 (人口 1000 人当たりの受傷率 0.037)、最近 10 年間では 2004 年の 43 件 (受傷率:0.035) につぎ、少なくなっていることを確認している。また、抗毒素の使用実績と解析の詳細はないが、過去に比べて患者への抗毒素使用は減少傾向にあるようである。一方、鹿児島県のハブ対策事業概要報告によれば、平成 22 年度の咬傷事例は 77 件のうち 59 本の抗毒素を治療に使用し、うち 12 例について詳細な症状と抗毒素投与の有無および症状の経過等、さらに抗毒素の効果および購入方法の詳細も紹介・報告されている。したがって、ハブ咬傷と抗毒素の使用については、両県の年次報告で大まかな実態は把握出来ている。

一方、マムシウマ抗毒素は製造販売元の化血研から販売業者を通じて医療機関、保健所等に販売された後は、製品が使用されているか、また副反応と有効性についての実態が不明であった。抗毒素が最も多く使用される医療現場は、救命救急センターが考えられるため、全国 219 施設において、過去 3 年間におけるマムシ咬傷の症例数とマムシ抗毒素製剤の使用状況及び副反応を調査した。回答のあった 114 施設において 234 症例の事例を確認し、患者の詳細な症状を分類して、抗毒素の治療効果を分析した結果を論文と

してまとめた。今後、継続的な調査が求められる。

#### E. 結論

アジア、アフリカ諸国では多くの毒蛇による咬傷は公衆衛生上大きな問題であり、治療効果が望める品質の良い抗毒素の製造方法と品質管理は WHO-GL が示すとおり、共通の課題である。一方、国内の蛇咬傷患者数およびその重篤性は、海外に比べて差がある。蛇毒の採取できる施設、人員も限られる一方、海外で見られる蛇の生態、毒素採取を目的とする蛇管理センターは必要としていない。したがって、今回検証した国内の蛇毒の供給機関における WHO-GL の検証による管理項目の設定は、抗毒素の品質と安定供給を考慮する場合に妥当な水準と判断した。

わが国で製造・品質管理するウマ抗毒素製剤は、ハブ抗毒素、マムシ抗毒素、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。WHO-GL の示した製造工程の複数の項目を検証した結果、これらを実際の製造で達成するためには、薬事法における製造認可承認の一部変更の手続きを必要とする。厚生労働省（国）が数種の抗毒素製品を発注し、管理保管する国有品についても、どのように対応するか、具体化するために製造所、行政当局、および専門家による協議が必要である。

過去にボツリヌス抗毒素を製造していたドイツ、フランスでは WHO-GL 対応だけではないが、採算と技術承継が困難なために製造を中止している。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臨床試験を含む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である抗毒素製剤については、国内では最低限の対応として、現状の製造と品質管理システムの継続が必要である。

#### F. 健康危害情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Hifumi, T., Yamamoto, A., Morokuma, K., Ogasawara, T., Kiri, N., Hasegawa, E., Inoue, J., Kato, H., Koido, J., and Takahashi, M.: Surveillance of the Clinical Use of Mamushi (*Gloydius blomhoffii*) Antivenom in Tertiary Care Centers in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 64, 373-376, 2011

2) Morokuma, K., Kobori, N., Fukuda, T., Uchida, T., Sakai, A., Toriba, M., Ohkuma, K., Nakai, K., Kurata, T., and Takahashi, T.: Experimental Manufacture of Equine Antivenom against Yamakagashi (*Rhabdophis tigrinus*). *Jpn. J. Infect. Dis.*, 64, 397-402, 2011

##### 2. 学会発表

1) Torii, Y., Shinmura, M., Takahashi, M., Kohda, T., Kozaki, S., Nakahira, S., and

Ginnaga, A. : Immunological difference between botulinum toxin subtype A1 and A2 using polyclonal antibody. 7th International conference on Basic and Therapeutic Aspects of Botulinum and Tetanus Toxins (TOXINS2011).

含む)

1. 特許出願  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を

表 1. ヤマカガシウマ抗毒素の使用と保管状況

	保管状況			投与患者情報		
	在庫数	出庫数	冷蔵庫の記録	抗毒素使用日	効果情報	雑誌等への報告
蛇研(主保管)	396	4	冷蔵室(4~5℃)	2001年7月(1本) 埼玉県 病院	あり	・皮膚臨床に報告(45[2], 2003)
				2011年8月(2本) 愛知県 病院	あり	・日本小児科学会(2012年4月) に報告予定(抄録あり)
				2000年に検定のため使用(1本)		
感染研 (分散保管施設A)	440	0	集中管理システム (必要に応じ印刷可) 5℃保管	0	なし	該当無し
化血研 (分散保管施設B)	373	8	施設管理課による 中央管理(長期保 管が前提の記録は ない)  保管温度:4℃	2005年8月(5本) 佐賀県 病院 13歳 男	投与後短時間で回 復傾向、4日後に 退院。副反応なし (予防のために抗ヒ スタミンとステロイド を前投与)。	捕獲して遊んでいる時に咬 まれ、出血傾向と著名な凝 固異常(DIC)。受傷24時間 後抗毒素を投与(1本)。
				2011年7月(1本) 福岡市 病院 40歳 男	受傷4日後正常 化。副反応なし(予 防のために抗ヒス タミンとステロイドを 前投与)。	草刈り中に咬まれ、血尿と 顕著な血液凝固異常。受傷 約24時間後に抗毒素を投 与(1本)。
				2011年10月(2本) 長崎県 病院 38歳 男	翌日には回復傾 向。副反応なし(予 防のために抗ヒス タミンとステロイドを 前投与)。	捕獲ヘビを持帰り、遊んでい る時に咬まれ、激しい頭痛、 短時間で血液凝固不全、出 血傾向、褐色尿。受傷7時 間後に抗毒素を投与(2 本)。
杏林大学 (分散保管施設C)	108	0	医局の多目的冷 蔵庫:4-10℃	該当無し		

## 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

- I. 抗毒素製剤（ボツリヌス・ガスエソ・ジフテリア）における  
ウイルスクリアランスデータの取得
- II. カプリル酸沈殿法による抗毒素精製に関する調査

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 品質管理部  
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、ガスエソ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。しかしながら、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、蛇毒抗毒素に関する WHO ガイドラインが制定された。枯渇回避のみならず、この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。

本年度の分担研究では、WHO ガイドラインの検証とその対応を目的として、以下2項目について実施した。I. 昨年度は蛇毒抗毒素製剤について実施したが、本年度はボツリヌス、ガスエソ、及びジフテリア抗毒素製剤についてペプシン消化工程におけるウイルスクリアランス試験を3種類のモデルウイルスを用いて実施した。II. WHO ガイドライン推奨の抗毒素精製法であるカプリル酸沈殿法について、情報収集及び調査を行った。

## I. 抗毒素製剤（ボツリヌス・ガスエそ・ジフテリア）におけるウイルスクリアランスデータの取得

### A. 研究目的

蛇毒抗毒素に関するWHOガイドラインの制定に伴い、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ている。昨年度は蛇毒抗毒素製剤（まむし・はぶ）について、ペプシン消化工程におけるウイルスクリアランス試験を実施した。本年度は、蛇毒抗毒素以外の抗毒素製剤（ボツリヌス、ガスエそ、及びジフテリア）についても同様にウイルスクリアランス試験を実施した。

本試験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、ボツリヌス、ガスエそ及びジフテリア抗毒素製剤のペプシン消化条件は、消化時間以外は同一で、使用設備も共通である（表1）。よって、本試験ではこれらを代表してガスエそ原血漿を用い、消化時間をウイルス不活化にとってワーストの条件に設定することで、全製剤に適応できるデータを取得した。

#### 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いて工程の各要素が、実生産規模での製造工程を反映し、妥当であるかどうかを評価した。

#### 2. 感染価測定系のプレスタディ

感染価測定系のプレスタディとして細胞毒性試験及びインターフェラランス試験を実施し、感染価測定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」及び「2. 感染価測定系のプレスタディ」のデータをもとに「ウイルスクリアランス試験」を実施した。

昨年度の蛇毒抗毒素で使用したのと同様の3種類のモデルウイルス（PRV, BVDV, EMCV）（表2）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（LRV: Log Reduction Value）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、実製造スケール（25 L）とスケールダウンした系（100 mL）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3に示す。品質の同等性評価として、工程前後の抗毒素価の回収率、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

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どうかを確認した。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どうかを確認した。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：以下5検体。ペプシン消化前、消化30分後、消化50分後、ホールド1(※4℃、50分、ペプシン添加なし)、ホールド2(※35.5℃、50分、ペプシン添加なし)。試験フローと検体採取ポイントを図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1に示す。

#### 2) 感染価測定

- ①使用細胞：Vero細胞(PRV)、BT細胞(BVDV)、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、その平均値を検体のウイルス感染価とした。

④対数減少率(LRV)の算出：ウイルス感染価を基にLRV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に示したように、ペプシン処理後の抗毒素価の回収率は、実生産スケールでは73.3%、ラボスケールでは75.8±12.4%[平均±2SD]であった。また、ペプシン処理後のたん白量あたりの比活性については、実生産スケールでは20.3 U/mg、ラボスケールでは19.1±4.5 U/mg [平均±2SD]であった。よって、両スケールにおいて抗毒素価の回収率及びたん白量あたりの比活性は同等であると考えられた。

図3に示したように、SDS-PAGEにおいて、200 kDa付近にwhole IgGを認め、ペプシン処理によりFc部分が切断され、ペプシン処理後には、110 kDa付近にF(ab')<sub>2</sub>を認められた。なお、レーン5及び7のラボスケールでは、わずかに200 kDa付近に切れていないHorse whole IgGのバンドが認められ、実生産スケールと差が見られた。原因は、昇温時間(温度負荷)の違いによるものと推測している。しかし、レーン6のラボスケールでは差が認められなかったこと、及び昇温時間の違いはラボスケールがウイルス不活化に関してワースト条件となっていることから、ウイルススクリアランス試験のモ

デル系としては問題ないものと考えられた。

以上のことから、それぞれの品質を比較して、ウイルスクリアランス試験を実施するにあたって、ラボスケールの試験系は妥当な系であることを確認した。

## 2. 感染価測定系のプレスタディ

検討の結果、一部の検体とウイルスの組み合わせにおいて、細胞毒性及びインターフェランスを確認した(表5, 表6)。よって、これらの組み合わせにおいては、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50分後」を工程処理後としてLRV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。

なお、EMCVについては、「ホールド2(※ペプシン添加なし)」の総ウイルス感染価が「消化50分後」より低い結果となった(表8)。文献よりEMCVは、低pH(3.3)で効果的に不活化される。したがって、ペプシン消化が進みpHが上昇した「消化50分後」と比較して、pHが上昇せずに低pHで推移した「ホールド2」の方が、より高い不活化効果が得られたものと推察した。

## E. まとめ

ボツリヌス、ガスエソ、及びジフテリア抗毒素製剤において、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ウイルスを用いて評価した。その結果、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、これは昨年実施した蛇毒抗毒素及び既報の文献と同レベルであった(表9)。また、現在、硫安分画工程においてもウイルスクリアランスデータを取得中であり、今後、抗毒素製剤の更なるウイルス安全性レベルの向上にむけ、データ取得を進めていく予定である。

## II. カプリル酸沈殿法による抗毒素精製に関する調査

### A. 研究目的

「蛇毒抗毒素に関するWHOガイドライン、セクション13 抗毒素製剤の精製」において、カプリル酸沈殿による精製方法が推奨されているため、本製法について調査及び検討を開始した。

### B. 研究方法

WHOガイドライン推奨の抗毒素精製法と弊所の製法について比較を行い(表10)、さらに、カプリル酸沈殿に関する情報(特徴、長所、特許情報等)を収集した。

## C. 研究結果 及び D. 考察

### (1) カプリル酸沈殿法の特徴

#### ①原理

カプリル酸沈殿法は、古くから抗体精製に用いられている手法であり、酸性条件下でカプリル酸を血漿蛋白に作用させることで、アルブミンなどのIgGやF(ab')<sub>2</sub>以外の血漿タンパクを沈殿させ、その上清を精製液として回収することが出来る。

#### ②長所

- ・高収率、高純度の精製が可能である。
- ・たん白の凝集を防ぐことができる。
- ・細菌、ウイルス（特にエンベロープ有）に対して不活化能を持つ。
- ・液状で扱いやすく、工程が単純であり、短時間での作業が可能である。

- ・安定剤として他の薬剤にも使用されており、安全性が高い。

#### (2) 特許情報の調査

国内外において、カプリル酸沈殿により精製したウマ抗毒素の製造・販売で障壁となるような特許は現時点(2011.11月)では存在しなかった。

#### E. まとめ

カプリル酸沈殿法による精製法が文献レベルで有用な製法であることが確認できた。現在、ジフテリア原血漿を用いて、WHOガイドライン及び文献の条件を参考に基礎データを取得中であり、ガイドライン推奨方法について評価を進めていく予定である。

#### F. 研究発表

なし