

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政策研究事業

ワクチン等の品質確保を目的とした新たな国家検定システムの構築のための研究

分担研究報告書

蛇毒抗毒素製剤の国家検定の見直しに関する研究

研究分担者 高橋 宜聖 国立感染症研究所 免疫部

研究協力者 松村 隆之 国立感染症研究所 免疫部

研究要旨：はぶウマ抗毒素、まむしウマ抗毒素の国家検定における SLP 審査の導入を検討するため、抗毒素製剤所（KM バイオロジクス株式会社）、細菌に関する抗毒素製剤担当室である感染研細菌第二部、および免疫部との間で協議を行なった。2019 年度に出検予定の乾燥まむしウマ抗毒素を先行させて SLP 審査の試行を開始し、その他の抗毒素製剤についても追従する形で進めることになった。また、はぶ毒素（出血Ⅱ）の出血活性がヒト血清中に含まれる α 2-マクログロブリンにより阻害されるとの学術論文による報告（Jpn J Infect Dis, 2018）を受け、はぶ咬傷歴のない健常ヒト血清の抗出血Ⅱ活性を、生物学的製剤基準の力価試験に準じて測定した。その結果、ヒト血清 1 リットルには乾燥はぶウマ抗毒素製剤 1 バイアルに含まれる下限値（6000 単位）の抗出血Ⅱ価が既に存在するとの結果が得られ、はぶ毒素（出血Ⅱ）ならびに本毒素を用いた力価試験を生物学的製剤基準より削除することについて検討を開始した。さらに、2008 年に日中韓で共同作製した標準まむし抗毒素が韓国で枯渇したことを受け、第 2 回 WPR-NCL ワークショップで、韓国から再度共同標準抗毒素の作製を提案されたが、日本、中国は在庫が十分にあるため、韓国が独自で国内標準品を作製し、その品質確認を日本、中国がサポートすることで合意した。平成 30 年度に、韓国国内標準品候補品が感染研に送付され、候補品の力価試験を免疫部で実施し、試験成績を期限内に韓国に提供した。

A. 研究目的

我が国で承認されている蛇毒抗毒素製剤には、乾燥はぶウマ抗毒素（はぶ抗毒素）と乾燥まむしウマ抗毒素（まむし抗毒素）がある。抗毒素製剤には、SLP 審査が未だ導入されておらず、課題となっていたため、SLP 導入を検討することを目的とした。

また、WHO ガイドラインが改定され、地域標準品や自家標準物質の導入の検討、動物倫理における 3R の遵守・推進が勧奨されている。国際的な動向に歩調を合わせ

る試みとして、2008 年に日本、中国、韓国が共同研究として製造し、分割して各国で保有している標準品が韓国で枯渇したため、韓国から再度共同で標準品を作製することが 2016 年 9 月の WPR-NCL 会議で提案された。韓国との標準品の使用方法の違いから、日本と中国においては、当該標準品の十分な在庫が残っている。そのため共通の標準品として作製することは困難であり、韓国での国内標準品の作製について情報共有し、日中でその品質確認をサポートすることで合意した。平成 30 年度

に韓国国内標準品候補品が感染研に送付され、候補品の力価試験を免疫部で実施し、国際協調に貢献することを目的とした。

加えて、3Rの推進・検定項目の削除検討のため、はぶ及びまむしの出血毒の評価にウサギが用いられているものについて、とくにはぶ毒素（出血Ⅱ）の生物学的製剤基準からの削除を検討した。

B. 研究方法

蛇毒抗毒素製剤へのSLP導入の検討

国内抗毒素製剤の製造所であるKMバイオロジクス株式会社と感染研の抗毒素製剤の製剤担当室である、免疫部第二室および細菌第二部第三室がSLP導入に関するワーキンググループを結成し、SLP導入方法ならびに時期について検討を行った。

はぶ毒素（出血Ⅱ）の生物基からの削除検討

まず、はぶ咬傷歴のない日本国内の健康成人の血清（3検体）中の $\alpha 2$ -マクログロブリン量をELISA法により測定した。

次に3検体（最終用量22、45、90、180 $\mu\text{L}/0.2\text{ mL}$ ）およびコントロールとして $\alpha 2$ -マクログロブリン（最終濃度0、22、45、90、180 $\mu\text{g}/0.2\text{ mL}$ ）と、はぶ試験毒素（出血Ⅱ）Lot.4（最終濃度1 MHD (minimum hemorrhagic dose)/0.2 mL）とを混合し、1時間反応液0.2 mLをウサギ（日本白色種♀）皮内へ投与した。24時間後、出血斑の大きさを測定し、ヒト血清および $\alpha 2$ -マクログロブリンによる阻害効果を調べた（日本白色種♀、n=2の試験を3回）。

また、生物学的製剤基準の力価試験〔乾燥はぶウマ抗毒素（乾燥はぶ抗毒素）3.2.7.3 抗出血Ⅱ価測定〕に準ずる試験を行った。3検体（最終用量64、80、100、126、160 $\mu\text{L}/0.2\text{ mL}$ ）およびコントロールとして標準はぶ抗毒素（最終濃度0.64、0.8、1、1.26、1.6 U/0.2 mL）と、はぶ試験毒素（出血Ⅱ）Lot.4（最終濃度1 TD (test dose)/0.2 mL）とを混合し、1時間反応液0.2 mLをウサギ（日本白色種♀）皮内へ投与した。24時間後、出血斑の大きさを測定し、平行線定量法にて抗出血Ⅱ価を求めた（日本白色種♀、n=2の試験を3回）。

韓国標準まむし抗毒素候補品の力価試験の実施

2018年5月29日に韓国NIFDSの関係者と協議を行い、力価試験プロトコールの擦り合わせを行なった。

抗致死価測定のため、標準まむし抗毒素（200 U/mL）あるいは候補品の0.32、0.4、0.5、0.63、0.8 mL/1 mLと毒素10 TD/1 mLとを混合し、1時間反応液を0.2 mLずつマウスに尾静脈投与した。48時間後に死亡率を測定し、プロビット法にて抗致死価を求めた（ICRマウス♀、各群n=5の試験を5回）。

抗出血価測定のため、標準まむし抗毒素（20 U/mL）あるいは候補品の0.32、0.4、0.5、0.63、0.8 mL/1 mLと毒素10 TD/1 mLとを混合し、1時間反応液を0.2 mLずつウサギ（ニュージーランドラビット♀）に皮内投与した。24時間後に出血斑を測定し、平行線定量法にて抗出血価を求めた（ニュージーランドラビット♀、n=2の試

験を 5 回)。

(倫理面への配慮)

ヒト検体・情報を用いる実験は、「ヘルシンキ宣言」の主旨に従い、国立感染症研究所のヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の審査・承認のもと行った。動物実験は、「動物の愛護および管理に関する法律」「実験動物の使用および保管等に関する基準」に基づき、国立感染症研究所の動物実験委員会の審査・承認のもと行った。

C. 研究結果

蛇毒抗毒素製剤への SLP 導入の検討

ワーキンググループにおいて SLP 様式案を整備し、2019 年度に出検予定の乾燥まむしウマ抗毒素を先行させて SLP 審査の試行を開始し、その他の抗毒素製剤についても追従する形で進めることにした。

はぶ毒素(出血Ⅱ)の生物基からの削除検討

ELISA の結果、はぶ咬傷歴のない日本国内の健常成人の血清 3 検体中の $\alpha 2$ -マクログロブリン値は 1.06、0.86、1.15 mg/mL であり、3 検体中の $\alpha 2$ -マクログロブリンの平均値は約 1 mg/mL となった。

はぶ毒素(出血Ⅱ)の出血活性(1 MHD)がヒト血清中に含まれる $\alpha 2$ -マクログロブリン(180 μ g)により完全中和されるとの報告については再現可能であることが確認され、ヒト血清 3 検体においても血清 180 μ L により 1 MHD のはぶ毒素(出血Ⅱ)を完全中和できることが示された。

生物基の力価試験に準じた標準はぶ抗毒素との比較試験の結果、ヒト血清 3 検

体の抗出血Ⅱ価は、それぞれ一回目 4.31708、3.99196、4.18850 U/mL、二回目 7.78727、7.41923、7.24915 U/mL、三回目 5.98519、6.29890、7.10663 U/mL となり、それぞれの平均は 6.029847、5.903363、6.181427 U/mL となった。3 検体の平均値は約 6 U/mL となり、ヒト血清 1 リットルには約 6000 単位の抗出血Ⅱ価が存在することが示された。

韓国標準まむし抗毒素候補品の力価試験の実施

抗致死価測定の結果、候補品の抗致死価は一回目 190.721、二回目 191.630、三回目 200.000、四回目 199.914、五回目 209.730 U/mL となり、平均 198.399 U/mL であった。したがって候補品は標準まむし抗毒素の抗致死価 200 U/mL と同等の力価を示すことが明らかとなった。

抗出血価測定の結果、候補品の抗出血価は一回目 24.91469、二回目 19.90947、三回目 19.13051、四回目 19.60737、五回目 19.52068 U/mL となり、平均 20.61654 U/mL であった。したがって候補品は標準まむし抗毒素の抗出血価 20 U/mL と同等の力価を示すことが明らかとなった。

D. 考察

抗毒素製剤への SLP 審査導入については、比較の出検頻度の高い乾燥まむしウマ抗毒素を先行させて SLP 審査の試行を開始し、出検頻度の低いその他の抗毒素製剤については追従する形が妥当であると考えられ、2019 年度出検予定の乾燥まむしウマ抗毒素から試行することにした。

はぶ咬傷の治療に使用される乾燥はぶ

ウマ抗毒素製剤 1 バイアルには、6000 単位以上の抗出血 II 価が含まれているが、はぶ咬傷歴のない日本国内の健常成人の血清 1 リットルにも約 6000 単位の抗出血 II 価が存在するとの結果が得られ、健常人については抗毒素製剤中のはぶ毒素(出血 II) に対する抗出血 II 価は必要ない可能性が示された。また、WHO ガイドラインでは抗毒素の抗致死価測定におけるマウスの使用は認められているものの、抗出血 II 価の測定に必要なウサギを用いた試験は推奨されていない。動物倫理における 3R の遵守・推進の観点からも、はぶ毒素(出血 II) ならびに本毒素を用いた抗出血 II 価の力価試験を生物学的製剤基準から削除することについて検討が必要である。

韓国標準まむし抗毒素候補品の力価試験実施の結果、現行の標準まむし抗毒素と同等の力価を示すことが明らかとなった。候補品は次期標準品として使用可能であると考えられる。

E. 結論

抗毒素製剤への SLP 審査導入につい

ては、2019 年度に出検予定の乾燥まむしウマ抗毒素を先行させて SLP 審査の試験を開始し、その他の抗毒素製剤についても追従する形で進めることになった。

また、乾燥はぶウマ抗毒素製剤 1 バイアルには、6000 単位以上の抗出血 II 価が含まれているが、ヒト血清 1 リットル中にも約 6000 単位の抗出血 II 価が存在することから、はぶ毒素(出血 II) ならびに本毒素を用いた力価試験を生物学的製剤基準より削除することについて検討が必要である。

韓国標準まむし抗毒素候補品の力価試験実施の結果、候補品は現行の標準まむし抗毒素と同等の力価を示したため、次期標準品として使用可能であると考えられた。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし