特別シンポジウム わが国のボツリヌス研究の温故知新～阪口先生のご研究に焦点を当てて～

● History of the Basic and Applied Research in Botulism in Japan: Featuring Research Achievement by Dr. Sakaguchi

日本のボツリヌストキソイドワクチンの開発

History of Production and Quality Control Utilizing Human Botulinum Toxoid in Japan

高橋元秀[†]

((独)医薬品医療機器総合機構品質管理部)

Motohide TAKAHASHI

(Pharmaceutical and Medical Devices Agency, 3-3-2 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0013)

ボツリヌストキソイドの開発経緯と必要性

国内では1950年以降、主に東北・北海道でボツリヌスE型菌・毒素による食中毒患者が多数報告されていた。毒素性細菌感染症の治療には、不活化毒素をウマに接種して血清・血漿を原料としたウマ抗毒素製剤が国際的に広く用いられていた。1959年、北海道衛研（飯田ら）によりカナダ コンノート社製のE型ウマ抗毒素の治療で効果が確認された。これを機に国立予防衛生研究所（予研：現在の感染症研究所）の阪口玄二、村田良介、近藤 久らの研究者が中心となり抗毒素の製造、品質管理による国内治療用ウマ抗毒素製剤が完成した（1961年12月）。その後、1969年に宮崎県で推定原因食品がキャビアによるB型食中毒患者が確認された。また、A型毒素による食中毒事例は海外で多く報告され、汚染食品の国内輸入による患者の発生が心配された。さらに1960年にはデンマークでF型菌（Langeland株）が分離され、ソ連の土壌調査（1966, 1973）でも多くのF型菌が分離・同定された。国内の食中毒患者の治療体制としてE型抗毒素だけでは不十分であり、薬事審議会で四型多価抗毒素の製造が勧告された。予研および千葉県血清研究所（千葉血清）により、A, B, E, F型菌を個々に培養し、得られた毒素を精製し、ホルマリン処理によるトキソイド化、ウマ免疫、血漿からのグロブリン精製までの工程管理検討が行われた。作製した各精製血漿の原液は、希釈・混合後、凍結乾燥してABEF型混合ボツリヌス多価ウマ抗毒素製剤が製造され、同時に品質試験法も確立した（1972年製造承認）。この抗毒素製剤の開発の道のりの脇ではボツリヌストキソイドワクチン（ボツトキ）の開発が進められた。

ボツリヌス症の発生に際して、患者由来の検体や食品の検査を実施する国立感染症研究所（感染研）、地方衛生研究所、および大学等で菌・毒素を取扱う研究者、ならびに治療用の抗毒素製造所の担当者などは、バイオ

セーフティ・バイオセキュリティの管理体制を踏まえて十分な教育と防御措置の環境下で研究・検査活動を行っていた。ボツリヌス菌・毒素の取扱従事者は極めて毒性の強いボツリヌス毒素に暴露されるリスクがあるため、欧米では当該作業の従事者にはボツトキ接種を義務化している機関が多い。本シンポジウムの主題である故阪口玄二先生の基礎および応用研究を基に1969年に試作ボツトキが調製され、研究者らの自己防衛を目的として投与されてきた¹⁾。1960年代から予研、千葉血清および大阪府立大学によって合計5ロットが試作製造され、接種希望者に対しては自己防衛目的で自己責任により接種されてきた²⁾。2006年には、厚生労働科学研究班が組織され感染研、大阪府立大学、化学及血清療法研究所（化血研）により、『ボツリヌスABEF多価トキソイドワクチン（Lot 4）』が試作製造され、薬事法で承認製造認可されている破傷風トキソイドに準じた品質管理試験項目の試験を実施し、客観的かつ科学的に安全性の向上を図った（Fig. 1）。さらに、2011年からヒューマンサイエンス事業団の公的研究の位置づけで、医師法による接種と大阪大学の倫理委員会の許可の下に、国内研究者らのワクチン接種希望者約50名に接種して、その有効性と安全性の確認が行われた。

Fig. 1

[†]連絡先

品質管理部 GMPエキスパート

*1 100-0013 東京都千代田区霞が関3-3-2 新霞ヶ関ビル12F

国内で製造した5ロットの試験成績

現在までにE型単味トキソイド (E単味ボットキ) は1ロット, ABEF型四価混合多価トキソイド (多価ボットキ) は4ロットが製造された。製造開始から品質試験終了までには1~2年を要することもあり, 大まかな製造時期, および協力した機関名等を示した (Fig. 2)。

本稿では1960年代に試作されたE型単味ボットキ, および多価ボットキについて, 実験動物およびヒト接種後の安全性と有効性についての概要を解説する。

1. E型ボットキの結果:

E型毒素単独の成分で製造され, マウス, モルモット, およびウサギに接種後の抗毒素誘導の比較とともに, 研究者に接種した後の血中抗毒素価の成績が示された¹⁾ (Fig. 3)。この報告の結果により, その後の多価ボットキの基本的な製造方法, 品質試験方法が構築されたと考えられる。

ホルマリンで不活化処理する毒素(12S)は, トリプシンで活性化した毒素(act.toxin)と活性化しない毒素(protoxin)を実験動物 (マウス, モルモット) による力価試験 (免疫原性) で比較した。その結果, 活性化しない毒素が高い免疫能を示した。この結果により, 国内のボットキ製造には毒素は活性化なしでホルマリン不活化処理する方法が採用されることとなった。

活性化されていない精製毒素を不活化しアルミニウムゲルと混合して製造したE単味ボットキ0.5 mlを4-2-2-10週の間隔で18名のボランティア (研究者) に皮下注射し, 血清中の抗毒素価をマウス中和法で定量した (Table 1)。血中抗毒素は2回注射後よりボランティア1/4で検出可能となり, 3回接種後には2名を除くすべてで0.03 IU/mlを検出した。その後, 接種回数と抗毒素価はほぼ相関関係にあり, 高い免疫誘導を確認した。ボツリ

^{*1} 予: 国立予防衛生研究所 (現 国立感染症研究所)
 千: 千葉血清研究所
 大: 大阪府立大学
 化: 化学及血清療法研究所

Fig. 2

ヌス毒素に暴露された場合に必要とするヒトの血中抗毒素量は不明であるが, サルを用いた実験結果から2 IUで1,000サルMLD (80万マウスLD₅₀) を防御した結果を得ていた。ヒトは基礎と追加接種により多くが0.1 IU/ml以上の血中抗毒素価を示したため, 毒素の暴露に対して防御効果が期待できると推定している。なお, 接種後の副反応調査では, 全身性の発熱, 関節痛, 発赤, 発疹などはなく, 接種局所の軽度な疼痛と硬結が観察されている。

2. ABEF型四価混合ボットキ (多価ボットキ) の結果

過去に作製した多価ボットキに用いた毒素は分子サイズが統一されていなかったため, Lot 4では, 技術的に可能な努力によって不要な成分を除き副反応が少ない製品を目指した。すなわち, 作製当時に阪口先生によって確立されていた毒素精製法によって, 凝集素成分を削除した神経毒素 (重鎖と軽鎖) と Non-toxic = Non-HA成分で構成される安定なM毒素(12S)を精製し, これをトキソイド化するという製造戦略を立てた²⁾ (Fig. 4)。

実験動物での安全性と有効性

市販されている破傷風トキソイドの生物学的製剤基準に準拠した安全性と有効性の品質試験をボランティアに接種前に実施した。物理化学的および実験動物を用いた試験は, すべて適合であった³⁾ (Fig. 5)。

ヒトでの安全性と有効性

接種計画: 大学および都道府県衛生研究所等に所属す

Fig. 3. Immune response of rabbits to multiple doses of Proto-Td. (Lot 4-a) and Act-Td. (lot 4-b).

Table 1. Immune response of human volunteers to four injections of Proto-Td. (Lot 4-a)*

Subject	I	II	III	IV	V	VI
1. H. K.	0**	0	0.01-0.03	0.03	0.01-0.03	1
2. S. K.	0	0	0	0.01	0.03	3-10
3. R. M.	0	0	0.01-0.03		0.01-0.03	1-3
4. T. S.	0	0	0	0.01	0	0.1-0.3
5. A. O.	0	0	0	0.01-0.03	0.01-0.03	0.3-1
6. S. S.	0	0	0.01	0.03	0.01-0.03	0.3-1
7. S. Y.	0	0	0	0.03-0.1	0.03-0.1	0.3-1
8. K. H.	0	0	0	0.03-0.1	0.03-0.1	1-3
9. S. K.	0	0	0			
10. S. T.	0	0	0	0.01		
11. A. I.	0	0	0.01-0.03	0.03-0.1	0.03	3-10
12. S. Y.	0	0	0.1	0.3		
13. S. K.	0	0	0	0.1	0.01-0.03	1
14. S. S.	0	0	0	0.03-0.1	0	0.3-1
15. T. N.	0	0	0.01-0.03	0.03-0.1	0.1	3
16. G. S.	0	0	0	0	0.01	0.1-0.3
17. K. A.	0	0	0	0	0.01-0.03	0.1-0.3
18. T. T.	0	0	0	0.03-0.1	0.1	1-3
<0.01IU/ml	18/18	18/18	12/18	2/16	2/15	0/15
0.01IU/ml	0/18	0/18	1/18	3/16	1/15	0/15
>0.01IU/ml		5/18	11/16	12/15	15/15	

* Bleeding (I) → 1st injection → (4 weeks) → bleeding (II) → 2nd injection → (2 weeks) → bleeding (III) → 3rd injection → (2 weeks) → bleeding (IV) → (10 weeks) → bleeding (V) → 4th injection → (3 weeks) → bleeding (VI).

** 0 means lower than 0.01 IU/ml.

Fig. 4

Fig. 6

品質管理試験の結果		
Table1 多価トキシノイドワクチンの品質試験		
試験	品質試験項目	結果
一般試験	タンパク量 (μg/mL)	117.8
	pH	6.52
	アルミニウム (mg/mL)	0.20
	ホルムアルデヒド (%)	0.0005
	チメロサール (ppm)	8.8
安全性試験	無菌試験 (直接法)	Passed
	異常毒性否定試験	Passed
	無毒化試験 (5°C, 37°C)	Passed
有効性試験	力価試験 (血中抗毒素価定量法)	Passed
	力価試験 (モルモット 10 ⁴ LD ₅₀ 毒素攻撃)	Passed
	力価試験 (マウス 100LD ₅₀ 毒素攻撃)	Passed

トキシノイド製造時に行った品質管理試験の一部として、無菌試験、無毒化試験及びA型毒素に対する力価試験を生物学的製剤基準に準拠した方法で行ったところ、製造時と有意差のない結果を得た。

Fig. 5

るボツリヌス研究者や患者検体の検査担当者でボツトキ未接種者および既接種者を対象にした。一般のボランティアは対象外であり、研究対象の目標人数を50名とした。接種方法は、1回に多価ボツトキ0.5 mlを基礎免疫として4週間隔で3回、および追加免疫として初回接種から1年後に1回、それぞれ皮下注射した。血清中の抗ボツリヌス毒素抗体価はELISA法およびマウス中和法で測定した。検体血清は採血後暗号化し、抗体測定者を含む第3者には個人の特定が不可能にした。得られた抗体価については、当該被験者に報告した (Fig. 6)。

安全性については、4施設45人規模のボランティアに延べ138回の接種を行った結果、積極的な治療を要する有害事象は認められなかった。医師の診察を要する中等

度の有害事象が1例，その他は接種部位の発赤など，また，接種と直接関係のない軽症の上気道炎など軽症の有害事象があった。この臨床研究により，その高い抗毒素抗体の誘導と安全性の確認成績が収集された。

有効性については，血清中の各毒素型に対する抗毒素価をELISAで測定した結果，1回接種後では，BとF型はAとE型に比べて高い傾向にあった。各型ともに接種回数を増すことにより抗毒素価は上昇したが，1回接種後と同様にBとF型は高い傾向である（Fig. 7）。

血清中の各毒素に対する抗毒素価を中和試験法で測定した。測定は3回接種後1カ月，および3回接種した翌年に1回追加接種した1カ月後に採血した血清である。血清は機関ごとに免疫したボランティアのプール血清を用い，1 mL中に0.2 IUをカットオフとして示した。各型とも接種回数が増えるごとに陽性者数は増加し，追加接種後にはすべて0.2 IU/mL以上になった（Fig. 8）。なお，本研究内容の詳細（ヒトの安全性と有効性）については投稿準備中である。

Fig. 7

Fig. 8

考 察

米国のボツトキの製造状況については、軍隊およびボツリヌス研究者用としてABCDE型トキシイドワクチンがCDCから供給されていた。しかし、現在のロットは30年前に製造したトキシイド原液を用いて製剤化したものであり、副反応発生率が高くなったため2012年から接種を取りやめ、新たな製造をしていない⁴⁾。また、その他の国でボツリヌストキシイドワクチンを開発・製造しているという報告はない。このため、海外からの当ワクチンの国内輸入は困難であるという状況下にある。

上述の5ロットはいずれも薬事法下で求める一般医薬品等の製造品質管理基準であるGood Manufacturing Practice (GMP)には準拠した製造方法ではなく、また、ヒトへの投与もGood Clinical Practice (GCP)治験を実施するためのルールには沿っているものではなかったが、各製造ロットのヒトでの安全性と有効性を示すデータが得られてきた。現在、約10年前に製造した多価ボツトキLot4の在庫はほとんどなくなっている。日本国内における当該菌および毒素の検査、研究およびワクチン製造等の作業者に接種する多価ボツトキは、製薬会社が営利を目的とする製品開発や試作製造とは異なるため、薬事法で求める規制の合法化を考慮した取り組みが求められる。

おわりに

ボツリヌス菌・毒素の公衆衛生上およびバイオセキュリティ上の重要性については今後も変わりはなく、取扱従事者は安全・安心して取扱うためにはバイオセーフティの順守とともにワクチンが必要であることは疑い余地はない⁵⁾。ボツトキの社会的な需要は、患者ならびに予防的投与必須対象者が国内に毎年数十名程度と少ないため、メーカーによる当該ワクチンの新規開発（治験含む）は極めて困難である。したがって、この状況を打開するには、ボツリヌス菌・毒素の研究・検査の従事者を確保することを目的とした、言うなれば国家の危機管理体制を構築するためのワクチン接種による個人の防御の確立が必要である。

海外のボツリヌスウマ抗毒素製剤を製造可能な国・製造所は、ウマの管理に必要な牧場維持、人材確保などが障害となり、企業経済性や技術継承が困難になり、多くの国でこの製剤の製造を中止している。一方、国内では、国内備蓄による患者対応を国が責任を持ち、抗毒素製剤を買い上げる仕組みによってかろうじて製造所と感

染研で製造と品質管理技術は継承されている。ボツトキは国内で5ロットの製品をほぼ10年間隔で継続的に製造して研究者らの実験室事故を防いできたが、今後の製造の見通しは具体化されていない。抗毒素製剤とトキシイド作製の基盤技術は、阪口玄二先生の基礎研究・応用研究の功績を布石として、今後も食品衛生、感染症、および公衆衛生分野で関連する研究者などが承継し発展させることが大事である。

本発表は多くの研究者の研究推進と功績、ご協力の下に成し得たものであり、筆者が代表して阪口玄二先生の足跡として整理したものである。以下、敬省略す。

阪口玄二、小崎俊司、向本雅郁、幸田知子、阪口澄子（大阪府立大学 大学院生命環境科学研究科）

近藤 久、徳丸洋一、泉 七江、川口清二郎、鳥居恭司（千葉県血清研究所）

杉本 央、鳥居恭司（大阪大学医学部）

銀永明弘、鳥居恭司、堀田 晶、緒方洋一、千北一興（一般財団法人 化学及血清療法研究所）

村田良介、近藤 久、阪口玄二（国立予防衛生研究所）

山本明彦、見理 剛、岩城正昭（国立感染症研究所 細菌第二部）

また、講演と執筆に際して資料提供と校正に協力いただいた銀永明弘、鳥居恭司の両博士に深謝いたします。

文 献

- 1) Kondo, H., Kondo, S., Murata, R. and Sakaguchi, G.: Antigenicity of *Clostridium botulinum* type-E formol toxoid. Jpn. J. Med. Sci. Biol., **22**, 75-85 (1969).
- 2) Torii, Y., Tokumaru, Y., Kawaguchi, S., Izumi, N., Maruyama, S., et al.: Production and immunogenic efficacy of botulinum tetravalent (A, B, E, F) toxoid. Vaccine, **20**, 2556-2561 (2002).
- 3) Torii, Y., Kohda, T., Sugimoto, N., Takahashi, M., Ginnga, A., et al.: Clinical study of a tetravalent (types A, B, E, and F) botulinum toxoid vaccine in Japan. 50th International Botulism Research Coordinating Committee 2013, Maryland, U.S.A., Oct. (2013).
- 4) Centers for Diseases Control and Prevention: Notice of CDC's discontinuation of investigational pentavalent (ABCDE) botulinum toxoid vaccine for workers at risk for occupational exposure to botulinum toxins. Morb. Mortal. Wkly. Rep., **60**, 1454-1455 (2011).
- 5) Rusnak, J. M. and Smith, L. A.: Botulinum neurotoxin vaccines: Past history and recent developments. Hum. Vaccin., **5**, 794-805 (2009).