

た、患者発生に際して速やかに医療現場に抗毒素を届けることを可能にするために、国内数カ所に配備されている。なお、過去に患者発生があった都道府県においては、国有ワクチンを国から直接買い上げ、独自に県内に保管し供給体制を構築している場合もある。

この抗毒素製剤は海外でも製造・備蓄している国は少ないために、緊急時には国際機関を通じて供与依頼がある。2006年3月タイにおいて、保存していた水煮タケノコを原因食品として、仏教徒の年祭に集まった325人の村人のうち190人もの人が発症するという、近年まれにみる大規模なボツリヌス食中毒が起こった。このときWHOによるボツリヌス抗毒素の呼びかけにより、抗毒素の備蓄国であるUK, USA(CDC), カナダ(Sanofi-Pasteur)および日本から緊急供与した。日本はA, B, EおよびF型の多価抗毒素を23本提供し、

投与した8人中6人は12時間後に症状の改善が確認されている。さらに、9月には韓国へも緊急供与している⁸⁾。

IX おわりに

食中毒および経口感染症としてのボツリヌス中毒、ボツリヌス菌、ボツリヌス神経毒を解説した。食品への芽胞の汚染が避けられず、また、死を誘発してしまうのがボツリヌス食中毒・感染症で、事例数は少ないものの、注意を怠ってはならない食品衛生上の重要な疾病である。

ここで、わが国が世界に冠たるボツリヌス研究国であることを申し添えたい。基礎から応用研究まで、また、診断法の開発から毒素作用機構解明にわたり、非常に多くの優秀な研究がなされている。参考文献には、和文における総説数編と参考資料を追記しておく^{1,2,9~12)}。

参 考 文 献

- 1) 笹川千尋ら編：ボツリヌス菌，医科細菌学，南江堂(2008)
- 2) 山中英明ら編：ボツリヌス菌による食中毒，食品衛生学 第二版，恒星社厚生閣(2007)
- 3) 阪口玄二：ボツリヌス菌毒素の構造と機能，日本細菌学雑誌，**43**，951-960(1988)
- 4) IASR：岩手県で発生したボツリヌス食中毒事例について，**29**(2)，38(2008)
<http://idsc.nih.gov.jp/iasr/29/336/dj3362.html>
- 5) IASR：食餌性が疑われたA型ボツリヌス中毒の事例，**30**(7)，187(2009)
<http://idsc.nih.gov.jp/iasr/30/353/kj3531.html>
- 6) 厚生労働省：感染症法に基づく医師及び獣医師の届出について 32 ボツリヌス症
<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou11/01-04-32.html>
- 7) IASR：ボツリヌス症の実験室内検査，**29**，39-41(2008)
<http://idsc.nih.gov.jp/iasr/29/336/dj3364.html>
- 8) IASR：タイ，韓国における食餌性ボツリヌス症発生に対する日本の抗毒素供給支援，**29**，45-46(2008)
<http://idsc.nih.gov.jp/iasr/29/336/dj3368.html>
- 9) 小崎俊司：ボツリヌス神経毒素の構造と作用発現機構，日本細菌学雑誌，**51**，513-522(1996)
- 10) 小熊恵二：ボツリヌス毒素およびボツリヌス中毒について，日本食品微生物学雑誌，**21**，1-7(2004)
- 11) 大山 徹：ボツリヌス毒素の機能とそのサブユニット，蛋白質核酸酵素，**51**，2334-2340(2006)
- 12) 中村信一：ボツリヌス菌の疫学，日本食品微生物学雑誌，**23**，1-5(2006)

5

ボツリヌス毒素研究と将来展望

1) 品質管理とその定量法

国立感染症研究所細菌第二部 高橋元秀

ボツリヌス菌(*Clostridium botulinum*)が産生する神経毒素は、神経伝達物質の放出に対して運動ニューロンを妨げることによって麻痺を引き起こす強力な神経筋遮断剤として開発された。本製剤は筋肉の異常興奮または痙攣を含む数種の神経筋疾患の治療に広く各国で用いられている。

ボツリヌス毒素製剤の品質管理は臨床使用における安全性と有効性確認のために重要であり、物理化学的試験法で重量測定するだけでなく、生物学的製剤として毒素の効果判定を生物検定(バイオアッセイ)で試験することが求められる。

1

生物学的製剤としてのボツリヌス毒素の品質管理



Point

- 治療用ボツリヌス毒素はボツリヌス菌を培養した毒素を高度精製した生物学的製剤である。
- 生物学的製剤の製造と品質管理方法については WHO のガイドラインに則った規制・手法が国際的に導入されている。
- 品質管理試験は、感度、再現性および信頼性に優れ、ヒト接種後に起こりうる副反応を未然に防ぐ、高い安全性を保証する方法が必要である。
- 同様に、毒素の期待される特異的な効果を適切に反映する、よくバリデートされ、技術移転が容易な有効性試験が求められる。

WHO による生物学的製剤の定義は、1970 年には、「ヒトまたは動物の病気の予防、治療および診断に用いる製剤で、その力価および安全性を化学的または物理学的方法のみでは評価できないため、生物学的方法を用いて評価するもの」すなわち、動物、微生物、細胞などを用いた生物検定(バイオアッセイ)で評価される医薬品のことを示すとされた(WHO Tec. Rep. Ser. No.444, 1970)。ここで意味することは、製剤を“物”として具体的に示すのではなく、“試験法の特性”から規定された製剤であることを示していた。その後、1992 年に生物学的製剤 GMP(good manufacturing practice)指針が示され、微生物および真核細胞株の増殖、ヒトや動物および植物組織を含む生物や組織からの抽出物質、DNA 組み換え技術、細胞融合技術、胚細胞または動物における微生物の増殖産物等の生産物と定義された。具体的には、アレルゲン、抗原、ワクチン、ホルモン、サイトカイン、酵素、ヒト全血および血漿分画製剤、免疫血清、モノクローナル抗体、組み換え DNA 製品等が対象製剤であることを具体的に挙げている(WHO Tec. Rep. Ser. No.822, 1992)。

製剤の均質性の確保の検証として、製造承認審査・認可申請(安全試験、有効性試験)、製造工程における工程管理試験および国家検定(ロットリリース)時に規格値に適合しているかの確認試験が実施されている。これら試験は、物理化学試験(重量等)で測定・表現できない生物活性の評

価が求められ、実験動物を用いた有効性(力価)、安全性試験を実施する。試験法は感度、精度および再現性に優れた分析評価系の確立を目指す必要がある。したがって、ボツリヌス毒素の品質保証は科学的根拠に基づいた実証が求められている。

生物学的製剤の有効性と力価の関係は、必ずしも一致するものではない。すなわち、有効性が確認できるのは、ヒトに実用接種した場合に期待する効果が得られたときである。現在、ボツリヌス製剤の力価(単位)は、製造承認された製剤の工程管理において定めた規格値に適合していること、またロットごとの製造の連続性を確認する指標である。製剤の有効性を実験動物を用いた試験(*in vivo*法)で、生物活性を数値化して示すことにより、品質管理の性状確認試験の一つの指標となっているにすぎない。ヒトに接種した後の効果は狙った筋肉が毒素の麻痺により総合的に運動機能の復元が期待されるために、この毒素の麻痺作用を直接的に定量化することによって、より信頼性の高い製剤の品質管理に繋げることが議論となっている。具体的な問題提議は、米国で製造された Botox® と英国で製造された A 型ボツリヌス毒素製剤において、同じ単位表現であるにもかかわらず等価でないために、同様な臨床結果を得るには異なる単位(LD₅₀)を接種しなくてはならないことが報告された¹⁾。さらに、毒素製剤の単位をマウスの局所麻痺を指標とした値で評価すると、ヒト接種時に求める臨床効果と相関があることも示された²⁾。

2

ボツリヌス毒素の定量法と動物実験の必要性



Point

- マウス腹腔内注射法(マウス ipLD₅₀ 法)は古典的な方法ではあるが、ゴールドメソッドとして国際的に使われている。
- 海外で販売されている複数の製造所の製剤のラベルに記載されている単位(LD₅₀)の含量は一律ではない。
- ヒトにおける臨床反応を外装することのできる筋肉麻痺活性を実験動物での効果判定で評価される。
- 動物愛護の側面から、実験動物を用いない簡易な *in vitro* 法の導入が急務である。

ボツリヌス食中毒の実験室内診断法やボツリヌス菌の同定・解析に用いる細菌学試験法として開発され、マウス腹腔内投与後に観察される麻痺の延長上にある致死を指標とした方法である。本方法は、古典的ではあるが感度も優れているために(純品毒素の 10~20 pg を検出)、国際的にボツリヌス毒素定量の標準試験法として用いられている。現在もマウスの致死を指標として、試験結果を統計学的手法で解析して求めた 50% 致死量(LD₅₀)で示す方法がボツリヌス製剤の値付けに適用されている。

近年、動物愛護の観点から、現状のボツリヌス毒素の定量系である実験動物試験法の代替法(3Rs)の推進が世界的に提議されている(表 1)。米国では毒性試験法の開発、バリテーション方法について国際レベルでのハーモナイゼーションに関する問題を連邦政府内で調整する機関として NICEATM(The National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods)を開設している。また、その組織の下に国レベルの専門的な組織として ICCVAM(Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)を作り、活発な議論と活動を行っている。欧州連合(EC)でも同様に ECVAM(European Center for the Validation of Alternative Methods)を設立し対応している。

表1 実験動物の3Rs

1. 動物実験が他の方法で置き換えられるか
(試験管内法や低位の動物種へ代替手段の活用: replacement)
2. 動物数, 実験期間が適切か (使用数の減少: reduction)
3. 動物の苦痛軽減処置が考慮されているか
(苦痛の軽減, 安楽死措置, 飼育環境改善: refinement)

[4] Russell WMS, Burch RL: The principles of humane experimental technique. London; Methuen & Co Ltd, 1959 より引用]

上記3組織の共催で2006年11月には米国で、「ボツリヌス毒素試験のマウスLD₅₀法の代替法についてのワークショップ」が開催された。米国CDCとFDA, 各大学研究者および軍隊の研究機関, ボツリヌス関連製剤の製造所等広範囲の領域の国内外研究者により, ボツリヌス毒素の定量法について議論が行われた。このなかで, ボツリヌス毒素製剤や病気の診断等の毒素測定の目的に応じて 定量法に求められる感度, 精度および再現性は異なることが再認識された。毒素製剤の定量法については, 国際標準毒素の制定の必要性, マウスLD₅₀法の代替法の研究推進および統一法の検討ならびにガイドライン化等が議論され, 今後の各研究者の努力目標が示されている。特に英国National Institute for Biological Standards & Control (NIBSC)を中心に異なる3種類の毒素標品を使って試験法の標準化と標準品の作製について検討したが, 標品の安定性と試験法による活性の違い等の問題点の整理がついていない³⁾。しかし, EC内では標準毒素が使用されているようだが, 生物学的製剤の標準品を制定するWHOからは新しい国際的統一試験法と標準品の通知は今日までにない。

ボツリヌス毒素製造所や品質管理に用いる実験動物の取り扱い機関には, 「動物の愛護及び管理に関する法律(昭和48年制定, 平成17年改訂, 平成18年6月施行)」, 「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成18年4月28日環境省告示第88号)」, 「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針(文部科学省告示第71号)」, 「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」等への法的対応が求められる。したがって, 試験を実施する機関長は「動物実験委員会」を設置し, 実験者から提出される実験計画書の審査を行い, 委員会等の承認後でなければ試験を行うことを禁じることができる。実験計画書の審査における基本的考え方は, 動物実験の科学的正当性と動物倫理について実験者が理解して計画しているかが審査される。動物実験の目的・内容・方法等の把握, 使用予定の動物数の算定根拠, 使用動物の苦痛の程度と軽減処置が対象となる⁴⁾。

ボツリヌス毒素の定量法については, 用いる動物の妥当性, 適正な接種経路の選択, 試験の用量(希釈数), 用量間隔(希釈の間隔), 各用量に用いる動物数等を考慮した試験計画が求められる。英国NIBSCでは, 当初実施していたマウス腹腔内注射法からマウス皮下注射法に変更したことで多くのマウスを減じることに成功した(reductionへの対応)。また, 製造工程中の毒素原液の毒素活性の性状確認のためには, *ex vivo*法であるマウス横隔膜神経試験を実施し, 標準品の標準化試験にはマウス皮下注射法を実施しており, 目的に応じた試験を採用している。さらに2006年より*in vivo*法(マウス腹腔内や局所注射法)から*in vitro*法(エンドペプチダーゼ活性測定法)への変更も試行している(replacementへの対応)。試験法の改良や変更の際には, バリデートされた試験成績が根拠となり, さらに複数の国際的試験機関での検証が求められる。

ボツリヌス毒素製剤のロットリリースを実施するNIBSCでは, マウス腹腔内注射法を採用していた1994年には年間約10,000匹のマウスを使用していたが, マウス皮下注射法に変更した2003年には約200匹にまで使用動物数を減じることができた(図1)。しかし, 試験法を変えることのできないジフテリアトキソイドや破傷風トキソイドおよび百日咳ワクチン等の品質管理に用いる動物数には大きな変化はない。

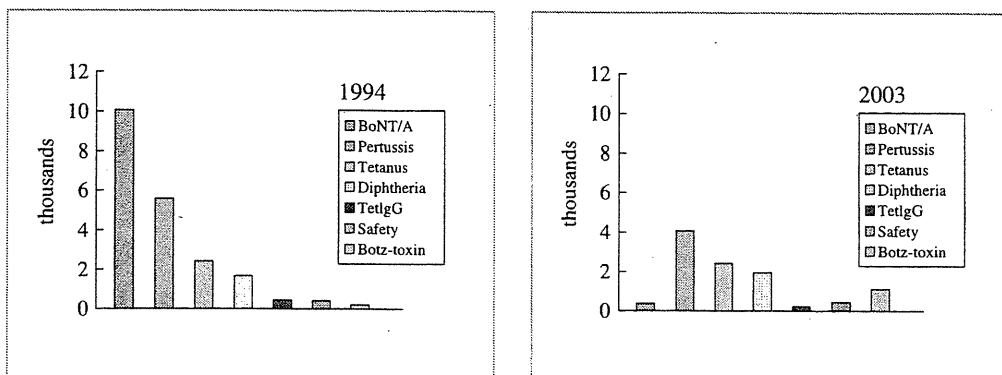


図1 細菌製剤製造での使用動物係計数

[NIBSC Dr.Sesardic 提供]

3 ボツリヌス毒素の管理に必要な規則



- ボツリヌス毒素を扱う場合には、バイオセーフティとバイオセキュリティの安全管理が求められる。
- バイオテロ対策として感染症法上では厚生労働大臣の許可が必要であるが、薬事法で承認を受けたボツリヌス毒素製剤は規定除外病原体等として許可を求めない。
- 生物学的製剤であるボツリヌス毒素は、バイオセキュリティとともに、保管管理者を指名して、立ち入りが制限された区域に施錠できる冷蔵庫等で出入管理して記録を残す必要がある。

バイオセーフティもバイオセキュリティも病原体等(ボツリヌス毒素)の安全管理に関する規則である。両者の概念の違いは、前者は病原体等の曝露を予防すること、後者は病原体等の紛失・盗難・濫用・悪用等の事故を防止する目的の規制である。

バイオセキュリティでは、バイオハザード(生物災害)の防止対策として、病原体等の取り扱い作業員自身が感染しないこと、周囲の人に感染させないこと、環境を汚染しないために病原体の取り扱い技術・管理(ソフト)と病原体の取り扱い安全設備・施設の整備(ハード)や毒素の意図しない曝露やこれらの拡散に対する封じ込めの原則、技術、実行を明確に規制している。一方、バイオセキュリティは、バイオテロ防止対策として毒素が意図的に使われ、周囲の人を死亡させることを防止し、毒素の紛失、盗難、誤使用、悪用、意図的な拡散を防止するために製造所や研究所や実験者の安全措置(職員等、管理区域の設定、立ち入り制限、病原体等の保管管理: 届け出、記帳、施錠、運搬管理、情報管理、教育・訓練、事故への対応措置など)を求めるものである。

- ① 一種病原体等(第56条の3～56条の5)は、原則として、何人も所持してはならない。
- ② 二種病原体等(第56条の6～56条の15)は、所持しようとする者は、厚生労働大臣の許可を受けなければならない。
- ③ 三種病原体等(第56条の16, 17)は、所持する者は、所持の開始の日から7日以内に、厚生労働大臣に届け出なければならない。

二種特定病原体であるボツリヌス毒素については、所持者等の義務(第56条の18～56条の29)として、感染症発生子防規程の作成等、病原体等取扱主任者の選任等、記帳の義務および施設の基準、保管等の基準等を備えることが求められた。また、組織内では監督(第56条の30～56条の38)として、報告聴取、立ち入り検査、改善命令および厚生労働大臣と警察庁長官等との関係等を明らかにすることが求められている。

人を発病させるおそれがほとんどないものとして、厚生労働大臣により以下のように規制除外病原体等(法6条指定)が定められている。この法律によって、ボツリヌス毒素製剤は、「A型ボツリヌス毒素製剤500単位以下、B型ボツリヌス毒素製剤10,000単位以下」および「0.1mg以下のもの」は、9条の20項の厚生労働大臣の指定する病原体等として許可を求める必要はない。

- ① 薬事法第14条第1項の規定による承認を受けた医薬品に含有される病原体等であって、人を発病させるおそれがほとんどないもの(製品、菌株等)について指定する。
- ② 薬事法の承認に向けて開発中の生ワクチン株(試験株)もしくはワクチン製剤で、非臨床試験を終え、臨床試験に用いるために、薬事法に基づく厚生労働大臣または農林水産大臣への治験計画が届け出されたものであって、人を発病させるおそれがほとんどないものについて指定する。
- ③ 病原体等の中で弱毒株と認められるもので、かつ、次の目的に用いられるものであって、人を発病させるおそれがほとんどないものについて指定する。なお、毒性に関係する因子を再導入させ、または、毒性を回復・増強させるような操作を加えた結果、弱毒株と認められなくなった場合は、指定を外すこととする。

ボツリヌス毒素は施設管理者の定めるバイオセーフティ上でBSL2管理区域内としてBSL2登

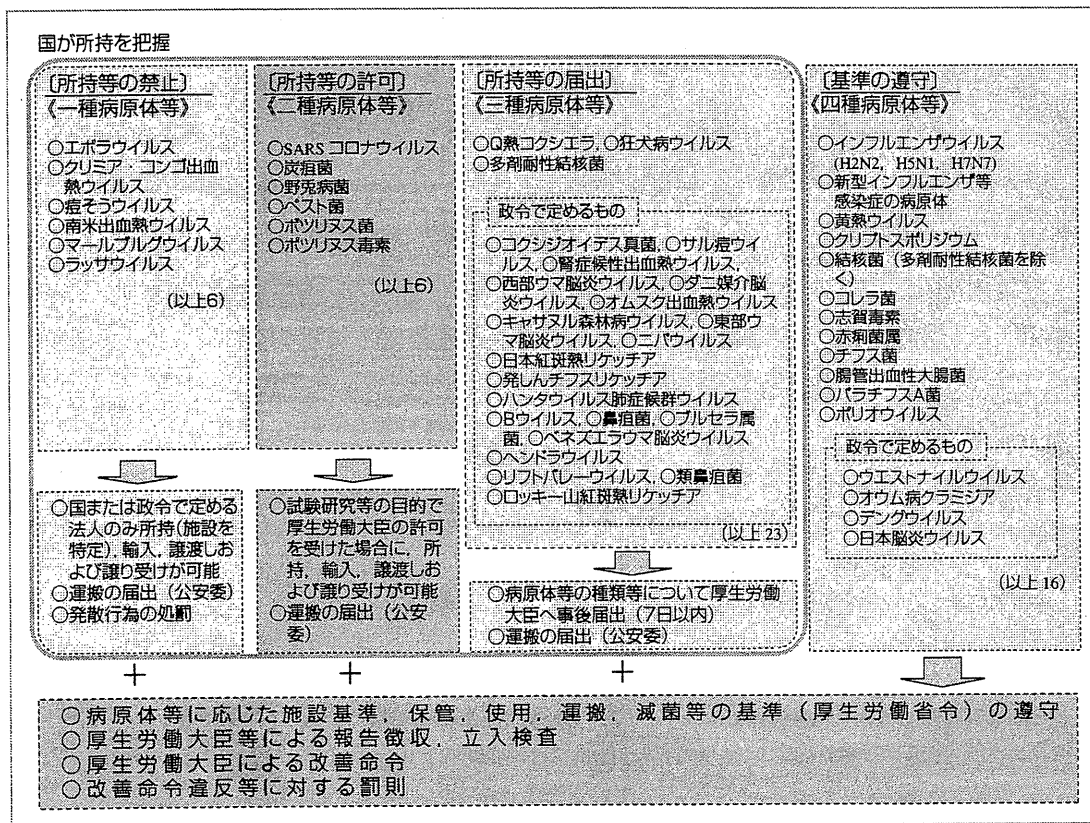


図2 病原体等の適正管理について

(厚生労働省 結核感染症法)

録・指定をする。また、ボツリヌス毒素にあつては、感染症法の特定病原体区分で2種病原体等となつており、施設管理者から厚生労働大臣への許可申請を行い許可された施設であることが求められる(図2)。

BSL2管理区域内への入退室においては、電子ロックシステムを導入し、研究者等を事前に登録して、研究を遂行するうえで限られたスタッフだけが入室することによるセキュリティーの強化を施す。また、病原体等の保管場所は施設可能な冷凍庫、冷蔵庫、保管庫を用意して、毎回の使用にあたっては記録を残す。

研究者等の使用に際して、バイオセーフティ講習会の定例参加、感染症法の特定病原体等の取り扱い、移動、管理等を熟読することが義務づけられている。登録者以外の研究者等が室内の機器類を使用する際にあつては、既登録者が必ず行動をとるにすることとして、入退室の時間、目的を記録する。

4

代表的なボツリヌス毒素の定量法



● *in vivo* 法

- ・マウスを用いた腹腔内投与、皮下投与、尾静脈内投与などがあり、致死、麻痺症状を指標として毒素活性を数値化する。
- ・ラットの腓腹筋に毒素注射後、複合筋活動電位(CMAP)を測定する方法による。

● *in vitro* 法

- ・毒素の軽鎖が担う亜鉛依存性酵素活性(エンドペプチダーゼ活性)を指標とする定量法が開発され、英国ではロットリリース試験で用いられている。
- ・機能をもった毒素の生物活性定量として、神経細胞を使った定量法の開発も進められている。

● *ex vivo* 法

- ・マウス横隔膜神経試験として生体から採取した神経および筋組織を特別な機器に装着して電気刺激による収縮の減弱を評価する。

1 *in vivo* 法

ボツリヌス毒素の定量法は、試料を階段希釈して1段階4匹以上のマウスに腹腔内注射して死亡を指標する、または、皮下に注射して局所の麻痺・症状をスコア化する、あるいは尾静脈内注射後のマウスの死亡時間から毒素量を換算する方法がある。

【毒素試験用試薬類】

- ・ゼラチン希釈液：リン酸一水素ナトリウム(4g)を精製水(1,000 mL)に溶解し、塩酸でpH 6.2に調整する。この溶液にゼラチン(2g)を加え、121℃で15分間滅菌する。必要に応じて、300 Uのペニシリンや0.5 mg/mLのストレプトマイシンを使用する。
- ・ピクリン酸溶液：適量をエタノールに溶解し、マウスのマーカ―に使用する。マウスの頭、頸、背中、尾、左右前足、左右後足等に標識して識別する。
- ・トリプシン溶液：検体中の毒素の活性化に使用する。トリプシン(活性1:250)は、2%にゼラ

チン希釈液に溶解し、結晶トリプシンの場合には0.02%に溶解して使用する。

A マウス腹腔内注射(mouse intra-peritoneal injection)による致死活性定量法 (マウス ipLD₅₀ 法)

1) 試験法の原理

ボツリヌス毒素をマウス腹腔内に注射すると、運動筋の弛緩性麻痺により呼吸困難を呈してマウスは死亡する。本方法は1980年代から毒素の検出法として用いられていたが、1900年になると試験したマウス数と死亡したマウス数を統計学的解析を施して数値化するようになった。LammannaらはBlissらの方法、Reed-Muench法を用いた50%致死量(LD₅₀)を求める方法を導入した⁵⁾。得られた成績は最小致死量(minimum lethal dose: MLD)で表すよりも、統計学的解析(プロビット[Probit]法、Reed-Muench法、Kaber法)を用いて50%致死量として、試験の連続性を評価できる。

致死量以上の毒素を腹腔内注射すると、毒素量に応じて特異的な全身筋の弛緩性麻痺が観察される(図3)。一番顕著に観察されるのは、腹部筋肉の麻痺による腹壁の陥凹であり、呼吸困難、歩行障害ののちに死に至る。

2) 試験法の手順

試験方法の実際は、任意に階段希釈した毒素液の0.5 mLをマウスの腹腔内に注射して3~4日後の生死を指標として判定する。この際に、注射に用いる希釈数(用量数)はすべてのマウスが死亡する、またはすべてのマウスが生存する用量の範囲内を選択する。

3) 試験法の感度、再現性

マウスの致死量は2~3LD₅₀である。試験に用いるマウスの系統、実験者および実験室の違いにより、得られる成績にバラツキが生じることがある。

4) 試験法の利点と欠点

(a) 利点

- ・ 国際的な標準法として広く用いられている。
- ・ 特別な機材や機器を使用しないため、どこの研究室でも試験が可能である。
- ・ 投与方法が容易なため、確実に技術移転が可能である。
- ・ 生死を指標とするため、判定が容易である。

(b) 欠点

- ・ 実験動物を用いる方法である。
- ・ 致死量の毒素を投与しなければ定量できない。



図3 ボツリヌス毒素腹腔内注射後に観察される全身性の筋肉麻痺

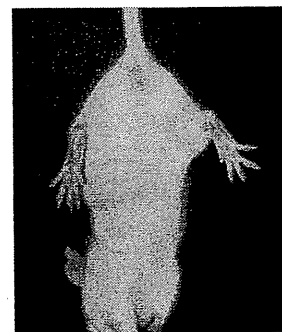


図4 ボツリヌス毒素皮下注射後に観察される筋肉麻痺による腹部の膨大

- ・毒素投与後の生死(離散量)により判定するため、精度と信頼性を欠く。
- ・判定に通常 72 時間かかる。
- ・腹腔内接種法で接種部位が見えないため、接種の確実性を欠く。

B マウス皮下注射(mouse subcutaneous[SC] injection)による局所麻痺活性定量法^{2) 6)}

1) 試験法の原理

マウスの下腹部内股(inguinocrural)局所に毒素を皮下注射したのちに観察される下腹部のたるみを指標として筋肉麻痺による毒素定量法である(図 4)。

2) 試験法の手順

希釈した毒素液の 0.1 または 0.2 mL を下腹部内股の皮下に接種する。接種後 24 ~ 48 時間に観察し、症状をスコアに変換する。マウス ipLD₅₀ 法で求めた毒素量 0.03 ~ 2 LD₅₀ の用量範囲で、症状と毒素量に直線性が成立するために定量可能となる(図 5)。

3) 試験法の感度、再現性

マウス ipLD₅₀ 法の 10 倍以上の感度である。

4) 試験法の利点と欠点

(a) 利点

- ・致死量の毒素を投与しないため、人道的、倫理的(humane endpoint)である。
- ・6 ~ 48 時間で判定可能である。
- ・筋肉麻痺を指標とするため、ヒト接種後に求める効果に近い麻痺評価系である。
- ・特別な機材や機器を使用しないため、経済的である。
- ・皮下接種法のため、接種に誤りが少ない。
- ・投与方法が容易なため、確実に技術移転が可能である。

(b) 欠点

- ・実験動物を用いる方法である。
- ・局所の麻痺を人が判定する反自動化手段である。
- ・毒素 Lc の活性だけの反応系であり、生物活性を完全に測定していない。
- ・レセプター結合など *in vitro* 反応系との関連づけが必要である。
- ・干渉が起こりやすく、その除去対応が必要である。

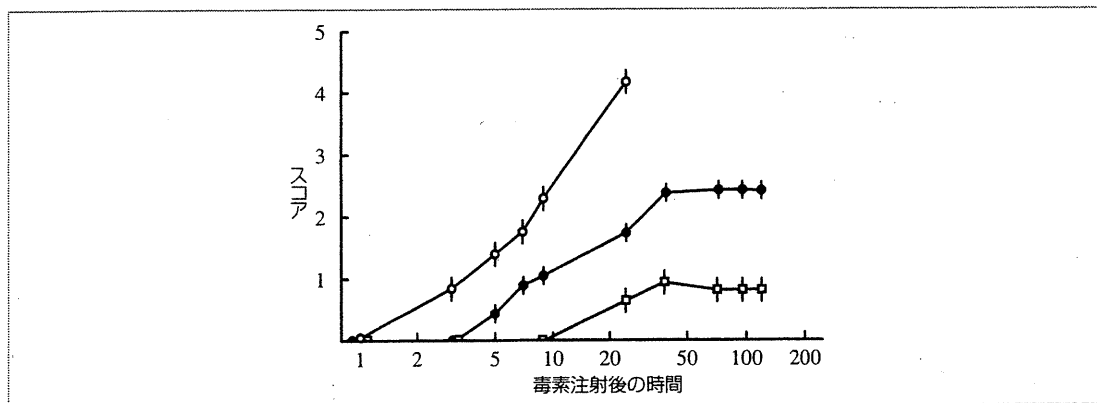


図 5 時間の経過とスコアの関係

○ : 38.4 LD₅₀, ● : 2.4 LD₅₀, □ : 0.15 LD₅₀

C マウス尾静脈内注射(mouse intra-venin injection) による致死活性定量法 (マウス ivLD₅₀ 法)⁷⁾

1) 試験法の原理

毒素をマウスの尾静脈より注射すると毒素濃度と死亡時間にある範囲で相関関係が成立する。毒素の型およびサイズ(M, L, LL)の違いにより、用量反応直線の得られる範囲や傾きが異なるために、それぞれの毒素性状に合わせた用量反応曲線を求める必要がある。

2) 試験法の手順

希釈した毒素液の0.1または0.2 mLをマウス尾静脈内に接種する。接種後に死亡するまでの時間を観察・確認する。一般的な毒素では15分から2時間程度の間には毒素濃度と死亡時間の用量反応に直線性が成立し、相関が得られる。しかし、濃度の低い毒素(数千 LD₅₀ 以下)は、直線区間からはずれるために、最終製剤のBotox[®]やDysport[®]などは毒素濃度が不足してこの系での測定は不可能である。

3) 試験法の感度、再現性

毒素の型と純度で異なるが、通常1,000～1,000,000 ipLD₅₀の用量範囲で死亡時間と毒素濃度に相関が得られる。マウス ipLD₅₀法やマウス皮下注射法での値に比べて、信頼区間の幅が狭い(試験の精度が高い)。

4) 試験法の利点と欠点

(a) 利点

- ・20分～2時間程度で判定可能である。
- ・特別な機材や機器を使用しないため、経済的である。
- ・尾静脈内接種法のため、接種に誤りが少ない。
- ・投与方法が容易なため、確実に技術移転が可能である。

(b) 欠点

- ・実験動物を用いる方法である。
- ・毒素濃度が濃い致死量の毒素を投与するため、試験者の危険度が高い。
- ・判定に際してマウスの死亡時間を確認するため、動物舎内に固定される。

D ラット複合筋活動電位(compound muscle action potential : CMAP) 定量法⁸⁾

1) 試験法の原理(図6)⁹⁾

ラットの皮膚表面から神経に電気刺激を行い、筋肉の筋線維の収縮活動から発生する複合筋活動電位(CMAP)、すなわち筋収縮時に発生する微小電流を増幅し記録したものである。ボツリヌス毒素を投与した筋肉に電気刺激を与えたとき、毒素的作用により神経終末からのアセチルコリンの放出を用量依存的に抑制するため、筋電位が発生しなくなり、筋電位の振幅の増減を数値化する。なお、本方法を用いて微量の抗毒素抗体を定量することも可能である。

2) 試験法の手順(図7)

毒素は0.5 w/v% ヒト血清アルブミンを含む生理食塩液で段階希釈し、0.1～300 LD₅₀/mLに調製する。ラット(雌性SD系、9週齢、5匹/群)は約40 mg/kgのペントバルビタールナトリウムを腹腔内に投与して麻酔する。眼瞼反射の消失後、ラットの後肢を剃毛し伏臥位におく。各濃度のボツリヌス毒素を30ゲージのインスリン用シリンジで左後肢の腓腹筋内に0.1 mL投与する。毒素投与部位の腓腹筋および毒素非投与側の腓腹筋のCMAP振幅を各々測定する。電極は、刺激電極を脊髄根上に、記録電極を左後肢腓腹筋筋腹に、リファレンス記録電極を左後肢腓腹筋腱に、アース電極を尾根部に各々設置する。刺激は25 mA、0.2 msecで行う。左右後肢のCMAPを経時的に測定することによって、神経筋接合部遮断作用を定量的に経過観察することが可能で

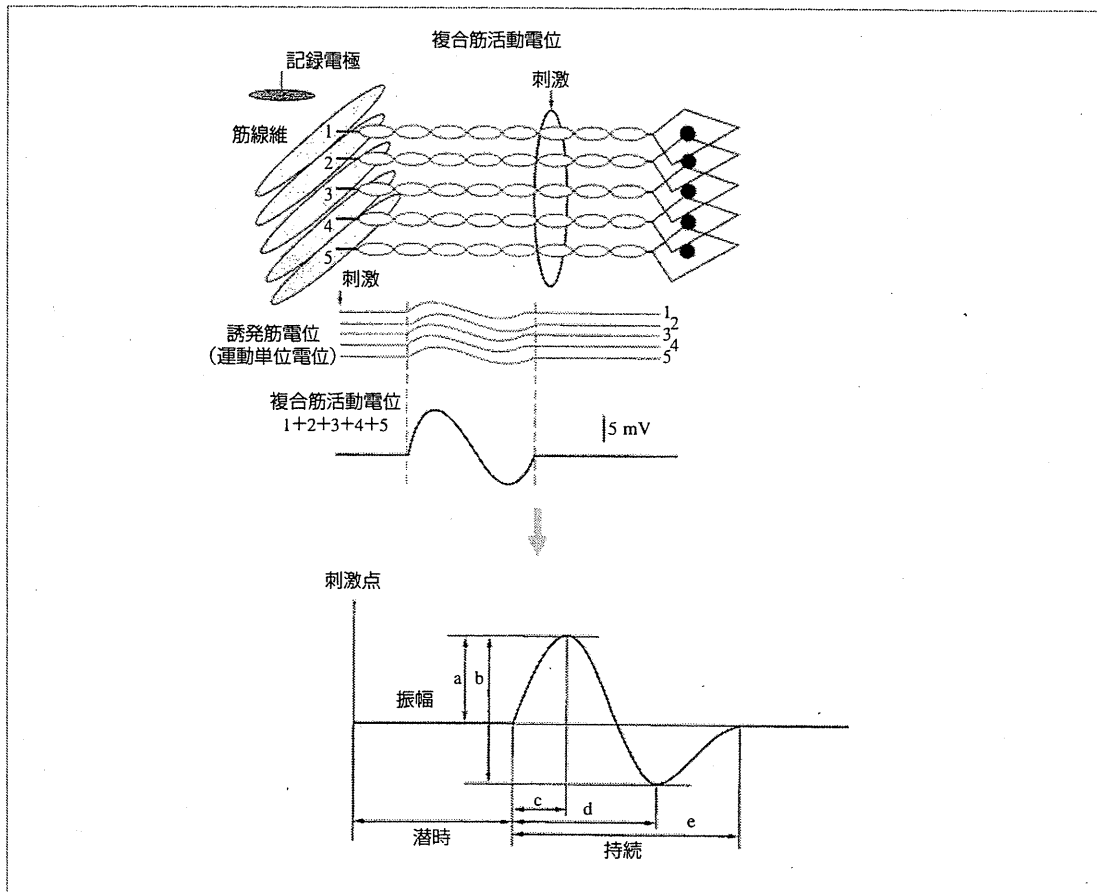


図6 CMAP定量法の原理

[9]木村 淳, 幸原伸夫: 神経伝導検査と筋電図を学ぶ人のために. 医学書院, 2003 より引用]

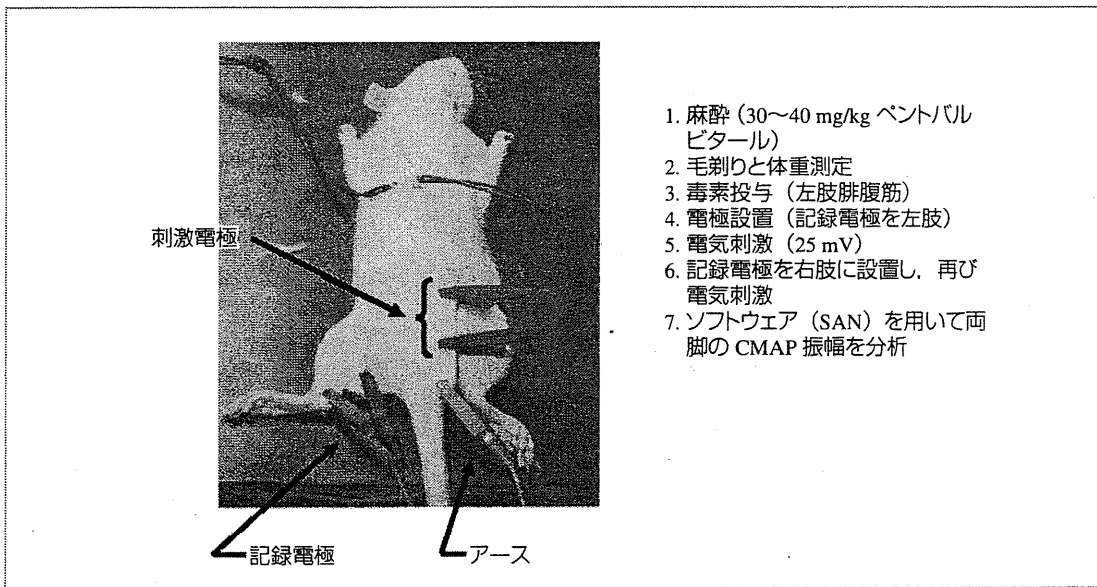


図7 ラット CMAP モデルのプロトコール

ある。

用量反応曲線は ipLD₅₀ 用量の対数値を横軸に、振幅値をロジット変換した値を縦軸にプロットすることで、0.01 ~ 30 U/head の範囲で直線性が得られる。

3) 試験法の感度, 再現性

投与後 1 日目では毒素接種量が 0.01 ~ 30 ipLD₅₀, 4 日目では 0.01 ~ 1 ipLD₅₀ の範囲で直線性が確認できる。

4) 試験法の利点と欠点

(a) 利点

- ・連続量として定量可能なため、測定精度と信頼性が高い。
- ・マウス ipLD₅₀ 法と比較し、使用動物数の削減と苦痛の軽減への対応が可能である。

(b) 欠点

- ・特別かつ高額な機器を必要とする。
- ・試験法の習得に専門的な技術を必要とする。

2 *in vitro* 法(enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA 法)

A エンドペプチダーゼ活性測定法¹⁰⁾

1) 試験法の原理

動物試験の *in vitro* 代替法の開発では、これまでに、抗原抗体反応に基づく ELISA 法等があるが、マウス試験に比較して感度が低く実用化には至らなかった(Shone, *et al*; 1985)。その後も様々な工夫により試験法の検出感度の向上が図られたが(Doellgast, *et al*; 1993, Kumar, *et al*; 1994), これら抗原抗体反応に基づく試験法ではボツリヌス毒素の生物学的な活性を測定することができないなど原理的な限界が指摘されている。

ボツリヌス毒素の軽鎖部分にはエンドペプチダーゼ活性=酵素活性(プロテアーゼ活性)があり、これが神経終末にある蛋白質群(SNARE 蛋白質)を分解する。標的とする蛋白質は毒素型特異的であり、A および E 型毒素は SNAP-25(synaptosomal-associated protein of 25 kDa), B, D, F および G 型毒素はシナプトブレビン(vesicle-associated membrane protein : VAMP), C 型毒素はシタキシシンと SNAP-25 の標的部位をそれぞれ切断する(表 2)。現在までにエンドペプチダーゼ活性に基づく試験法には、ELISA 法による数種の測定方法の報告がある(Hallis, *et al*; 1996, Ekong, *et al*; 1997, Witcome, *et al*; 1999)。また、ELISA 法以外によるエンドペプチダーゼ活性は、蛍光標識を用いた逆相高速液体クロマトグラフィー(Anne, *et al*; 2001)、キャピラリー電気泳動(Adler, *et al*; 2003)、質量分析(Boyer, *et al*; 2005, Barr, *et al*; 2005, Kalb, *et al*; 2006)、蛍光センサ(Schmidt, *et al*; 2003, Dong, *et al*; 2004, Parpura, *et al*; 2005)、Micromechanosensor(Liu, *et al*; 2003)、表面プラズモン共鳴(Ferracci, *et al*; 2005)等による数多くの方法が報告されている。

2) 試験法の手順

A および E 型毒素のエンドペプチダーゼ活性を ELISA 法により測定する試験法の一例を示す(図 8, Jones, *et al*; 2008)。A 型毒素は、SNAP-25 の 197 番目のグルタミンと 198 番目のアルギニンの配列部分を特異的に切断するため、A 型毒素のエンドペプチダーゼ活性の測定には合成 SNAP-25 ペプチド(137 ~ 206 のアミノ酸残基)を基質として用い、96 穴マイクロプレート(MaxiSorp, Nunc)にコートした SNAP-25 ペプチドを毒素と反応させる。A 型毒素により切断されたペプチドを認識する一次抗体には、SNAP-25 ペプチド(190 ~ 197 のアミノ酸残基)をウサギに免疫して得られた抗体を用いる。anti-SNAP-25₁₉₀₋₁₉₇ 抗体は、毒素により切断される前の SNAP-25 ペ

表2 ボツリヌス毒素の標的蛋白質と切断部位

型	標的蛋白質	切断部位
A	SNAP-25	Gln ₁₉₇ - Arg ₁₉₈
B	シナプトプレビン	Gln ₇₆ - Phe ₇₇
C	シンタキシン	Lys ₂₅₃ - Ala ₂₅₄
	SNAP-25	Arg ₁₉₈ - Ala ₁₉₉
D	シナプトプレビン	Lys ₅₉ - Leu ₆₀
E	SNAP-25	Arg ₁₈₀ - Ile ₁₈₁
F	シナプトプレビン	Gln ₅₈ - Lys ₅₉
G	シナプトプレビン	Ala ₈₁ - Ala ₈₂

プチドは認識せず、A型毒素により切断されたペプチドのみを認識する。二次抗体には市販の horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ IgG 抗体を用いて、ELISA 法により A 型毒素のエンドペプチダーゼ活性を測定する。一方、E 型毒素は、SNAP-25 の 180 番目のアルギニンと 181 番目のイソロイシンの配列部分を特異的に切断することから、A 型ボツリヌス毒素と同様に合成 SNAP-25 ペプチド(137～206 のアミノ酸残基)を基質に用いることができ、96 穴マイクロプレートにコートした SNAP-25 ペプチドを毒素と反応させる。E 型ボツリヌス毒素により切断されたペプチドを認識する一次抗体には、SNAP-25 ペプチド(173～180 のアミノ酸残基)をウサギに免疫して得られた抗体を用いる。anti-SNAP-25₁₇₃₋₁₈₀ 抗体は、毒素により切断される前の SNAP-25 ペプチドは認識せず、E 型毒素により切断されたペプチドのみを認識する。二次抗体には市販の HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体を用いて、ELISA 法により E 型毒素のエンドペプチダーゼ活性を測定する。本試験法は、簡便かつ特異性が高く A 型毒素と C 型毒素の切断部位には SNAP-25 のわずかに 1 アミノ酸の違いしかないが(表 2)、C 型毒素のエンドペプチダーゼ活性はほとんど検出されない(図 9)¹⁰⁾。

3) 試験法の感度、再現性

マウス ipLD₅₀ 法と同等または 1/10 以下の感度。

4) 試験法の利点と欠点

(a) 利点

- ・非動物系の試験であるため、動物愛護の対応(3Rs)がされている。

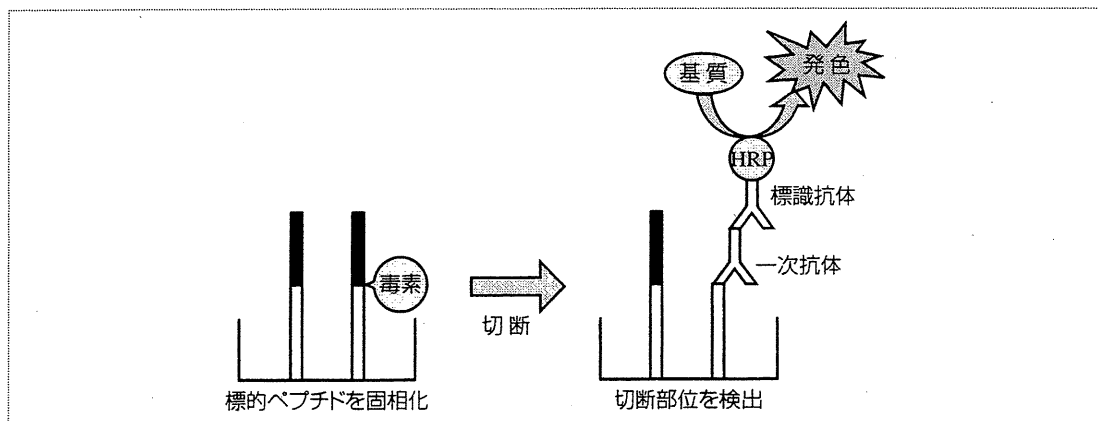


図8 ELISA 法によるボツリヌス毒素のエンドペプチダーゼ活性測定法

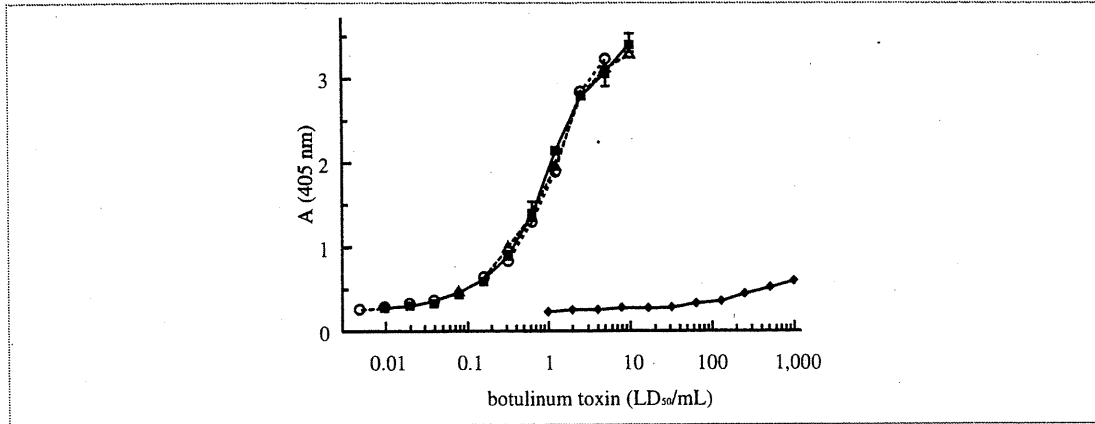


図9 A型ボツリヌス毒素のエンドペプチターゼ活性測定法の特異性

●, ○, ■, △: A型ボツリヌス毒素, ◆: C型ボツリヌス毒素

(10) Jones RG, Ochiai M, Liu Y, et al: Development of improved SNAP25 endopeptidase immuno-assays for botulinum type A and E toxins. *J Immunol Methods* 2008; 329: 92-101 より引用)

- ・強い毒素での動物実験でないため、試験者への危険回避ができています。
- ・判定は機械による自動化のため、客観性のある結果が得られる。
- ・筋肉麻痺を指標とするため、ヒト接種後に求める効果に近い麻痺評価系である。

(b) 欠点

- ・ELISA法が基本であるため、実験室内の器具、機械を必要とする。
- ・毒素 Lc の活性だけの反応系であり、生物活性を完全に測定していない。
- ・特異的な二次抗体が必要であり、陽性対象が必要である。
- ・レセプター結合など *in vitro* 反応系との関連づけが必要である。
- ・干渉が起こりやすく、その除去対応が必要である。

3 ex vivo 法

A マウス横隔膜神経試験(mouse phrenic nerve assay)¹¹⁾

1) 試験法の原理

横隔膜神経に対する電子刺激で誘発される横隔膜の収縮張力を経時的に記録し、標本に対してボツリヌス毒素を投与し、神経または筋組織上でボツリヌス毒素の影響を収縮張力で評価する。

2) 試験法の手順

電流を溶液中の組織に付加して、刺激する電気の強さにより生じる「痙攣」反応を測定する。横隔膜神経への電気刺激によって誘発される横隔膜の収縮緊張を経時的に減衰させることで評価する。

3) 試験法の感度、再現性

マウス ipLD₅₀ 法の値以下の感度。

4) 試験法の利点と欠点

(a) 利点

- ・実験動物を用いるが、マウス ipLD₅₀ 法と比較し少数の動物数でよい。
- ・強い毒素での動物実験でないため、試験者への危険回避ができています。
- ・判定は機械による自動化のため、客観性のある結果が得られる。

- ・筋肉麻痺を指標とするため、ヒト接種後に求める効果に近い麻痺評価系である。
- ・約2時間で判定可能である。

(b) 欠点

- ・実験動物を必要とする。
- ・特別かつ精密な機器を必要とし、さらに訓練された人員を必要とする。
- ・試験系のバリデーションがルーチン化しにくい。

5

ボツリヌス抗毒素抗体の定量法と治療用ウマ抗毒素製剤



- 毒素連続投与により誘導された抗体の確認は、毒素を中和する機能をもった中和抗体を用いた、マウスの致死活性を指標とした国際的統一試験法で行う。
- マウス中和試験法は、治療用ボツリヌスウマ抗毒素製剤の品質管理法を記載する生物学的製剤基準に示される、力価試験法で実施する。
- 治療用ボツリヌスウマ抗毒素製剤はボツリヌス症の治療に必須であり、国有品として備蓄・管理されている。
- ボツリヌス患者の治療を目的に、医師は抗毒素製剤の交付申請の手続きにより入手可能である。

抗毒素抗体の定量法は、マウスの致死活性を指標とした以下の方法が国際的統一法である¹¹⁾。

1 抗毒素製剤の試験法の実際

国際標準抗毒素(英国NIBSCから交付)に対して標準化した国内標準抗毒素を希釈して、0.25 mL中に0.05単位を中心に試験精度を考慮した適当な間隔濃度単位を含む5段階希釈(標準希釈)を作る。また、患者血清等の試験検体を希釈して、同様にした希釈(検体希釈)を作る。さらに、あらかじめ試験して0.05単位を中和する濃度を求めている試験毒素を希釈して、0.25 mL中に1試験毒素量を含む液(毒素希釈)を作る。標準希釈および検体希釈のそれぞれと各毒素希釈との等量ずつを正確に採り、よく混ぜて1時間室温に置く。試験動物は23～29日齢のマウス(SLC, ddY 雌)4匹以上を1群とする。各混合液に1群ずつを用い、1匹あたり混合液0.5 mLを腹腔内に注射して3日間観察する。各混合液注射群で死亡したマウス数を記録して得られた成績は、標準品に対する試験検体の相対力価を統計学的解析(プロビットによる平行線検定法)により試験検体の単位とする。

表3に試験の実際をモデルとして示す。この成績を統計学的に解析すると図10のような結果が導かれる。したがって、患者血清が検体とすると、血清1 mL中には0.361単位が検出されたことになる。

なお、局所注射法による麻痺を指標とする毒素の定量法を利用することにより、致死を指標とする試験法で求める抗毒素抗体価より約1/10以下の微量な抗毒素抗体を定量することも可能である¹²⁾。

表3 抗毒素抗体試験法の結果モデル

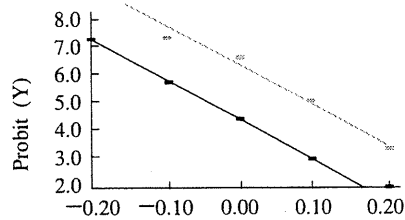
a. 国内標準品の希釈系と結果										b. 検体(患者血清)の希釈系と結果													
No.	標準品			検体期間(本数)					結果	No.	検体			検体期間(本数)					結果				
	100 IU/ml	PBS	100IU	0	1	2	3	4			1	PBS	100IU	0	1	2	3	4					
1	0.63	1.87	2.50	25.5	d															4/4			
				25.0	d																		
				25.8	d																		
				25.6	d																		
2	0.80	1.70	2.50	25.4	d															3/4			
				25.2	25.8	d																	
				25.3	d																		
				25.7	25.9	d																	
3	1.00	1.50	2.50	25.1	25.6	25.8														1/4			
				26.2	26.4	d																	
				26.1	26.7	27.1																	
				26.6	27.1	27.4	27.9	28.6															
4	1.25	1.25	2.50	26.1	26.9	27.3	27.8	28.1												0/4			
				26.8	27.5	28.3	28.5	28.8															
				27.2	27.8	28.3	28.4	29.1															
				25.1	26.2	26.9	27.3	27.6															
5	1.60	0.90	2.50	26.2	26.8	27.4	27.8	28.3												0/4			
				25.8	26.5	27.2	27.5	27.9															
				25.5	26.6	27.6	28.1	28.4															
				25.6	26.6	27.5	28.3	28.6															

【解析過程】

得られた成績を解析ソフトに入力

	1.00	4	1
STAND	1.25	4	0
	1.60	4	0
	0.63	4	4
TEST	0.80	4	4
	1.00	4	4
	1.25	4	2
	1.60	4	0

青線は標準品、黒線は検体の用量反応曲線



【解析結果】

下の解析結果は標準品を1単位として計算した検体の相対価：0.723 単位

Linearity x2=0.02 : Accept
 LD₅₀ 95% Confidence Interval
 STAND 0.89638 : 0.76485, 1.05052
 Linearity x2=0.35 : Accept
 LD₅₀ 95% Confidence Interval
 TEST 1.24039 : 1.06794, 1.44069
 Linearity x2=0.37 : Accept
 Parallel x2=0.00 : Accept
 Common Slope=-14.307
 Relative Potency 95% Confidence Interval
 0.723 IU/ml : 0.588, 0.866

下の解析結果は標準品を0.5単位として計算した検体の相対価：0.361 単位

Linearity x2=0.02 : Accept
 LD₅₀ 95% Confidence Interval
 STAND 0.89638 : 0.76485, 1.05052
 Linearity x2=0.35 : Accept
 LD₅₀ 95% Confidence Interval
 TEST 1.24039 : 1.06794, 1.44069
 Linearity x2=0.37 : Accept
 Parallel x2=0.00 : Accept
 Common Slope=-14.307
 Relative Potency 95% Confidence Interval
 0.361 IU/ml : 0.294, 0.433

図10 統計学的解析結果(プロビットによる平行線検定法)

2 治療用ボツリヌスウマ抗毒素製剤の入手方法

治療用のボツリヌス抗毒素は、緊急用医薬品として厚生労働省が需給調整し、国家備蓄品(国
有品)として化学及血清療法研究所に製造依頼した製剤を国内数箇所で保管している(表4)。国
内市場での一般的な流通はなく、緊急時の使用に際しては患者を診断治療する医療機関の所属す
る都道府県の衛生部または保健所を経由して交付申請する。凍結乾燥製剤としてA、B、Eおよ
びF型四種混合とE型単独の2種類がある。四種混合製剤は、1バイアル中にA、BおよびE型
の各抗毒素10,000単位とF型抗毒素4,000単位を含有する。免疫用抗原として各毒素をホルマ
リンで無毒化したトキシイドでウマを免疫し、ウマから採血後、分離した血漿を精製した免疫グ
ロブリン製剤である。

表4 国備品ボツリヌスウマ抗毒素の保管連絡先

(2009年4月1日現在)

保管場所	住所	電話番号	電話番号	電話番号
(株)ほくやく	〒063-0830 北海道札幌市西区発寒10条3-1-1 札幌西業務センター	011-665-0989	011-665-0989	011-671-0989
(株)バイタルネット	〒981-1298 宮城県名取市下余田字鹿島10	022-384-1119	022-384-1119 080-3192-5235 〈村上センター長〉 080-3146-9870 〈小松センター課長〉 090-2882-3054〈中目〉	022-384-3594
デンカ生研(株)	〒959-1834 新潟県五泉市木越字鎖田1359-1 物流センター	0250-42-0712	0250-43-4111〈警務室〉 0250-58-5574〈高岡〉 0250-42-6898〈加藤〉	0250-43-8811 0250-43-3789(夜間・休日) 03-3664-1023(営業部 FAX)
(学)北里研究所	〒364-0026 埼玉県北本市荒井6-111	048-593-3939	048-543-7808〈高瀬〉 048-728-8016〈加藤〉	048-593-3850
(財)阪大微生物病研究会 (大阪)	〒565-0871 大阪府吹田市山田丘3-1	06-6877-4804	06-6850-0715〈黒瀬〉 090-1957-9567〈黒瀬〉 06-6831-1860〈木下〉 090-8533-0182〈木下〉	06-6876-1984
(財)阪大微生物病研究会 (観音寺)	〒768-0061 香川県観音寺市八幡町2-9-41	0875-25-4171	0877-21-1257〈長尾〉 0875-23-2445〈山神〉 0875-27-7892〈磯野〉	0875-25-4830
武田薬品工業(株)	〒743-8502 山口県光市大字光井字武田4720	0833-71-5511	0833-71-5546〈警備本部〉	0833-71-5513 0833-71-5665(夜間・休日)
(財)化学及血清療法研究 所	〒860-8568 熊本県熊本市大窪1-6-1	096-345-6500	096-344-1211〈守衛室〉	096-344-9269
(株)琉薬	〒901-2686 沖縄県浦添市牧港5-6-5	098-878-3111 098-878-3314 〈直通〉	※夜間PM5:30～AM8:30 098-878-3358〈警備室〉 098-863-3730〈神谷〉 090-9780-0369〈神谷〉 090-8632-1931〈古富〉 090-9781-6060〈新里〉	098-878-1199 098-870-1749

厚生労働省連絡先 医薬食品局血液対策課 直通：03-3595-2395 FAX：03-3507-9064
厚生労働省 代表番号：03-5253-1111

文献

- 1) Borodic G, Johnson E, Goodnough M, *et al*: Botulinum toxin therapy, immunologic resistance, and problems with available materials. *Neurology* 1996; **46**: 26-29
- 2) Sesardic D, McLellan K, Ekong TA, *et al*: Refinement and validation of an alternative bioassay for potency testing of therapeutic type A toxin. *Pharmacol Toxicol* 1996; **78**: 283-288
- 3) Sesardic D, Leung T, Gaines Das R: Role for standards in assays of botulinum toxins: international collaborative study of three preparations of botulinum type A toxin. *Biologicals* 2003; **31**: 265-276
- 4) Russell WMS, Burch RL: The principles of humane experimental technique. London; Methuen & Co Ltd, 1959
- 5) Lamanna C, Glassman HN: The isolation of type B botulinum toxin. *J Bacteriol* 1947; **54**: 575-584
- 6) Takahashi M, Kameyama S, Sakaguchi G: Assay in mice for low levels of *Clostridium botulinum* toxin. *Int J Food Microbiol* 1990; **11**: 271-277
- 7) Kondo H, Takahashi M, Sakaguchi G: Titration of botulinum toxins for lethal toxicity by intravenous injection into mice. *Jpn J Med Sci Biol* 1984; **37**: 131-135
- 8) Torii Y, Goto Y, Takahashi M, *et al*: Quantitative determination of biological activity of botulinum toxins utilizing compound muscle action potentials (CMAP), and comparison of neuromuscular transmission blockage and muscle flaccidity among toxins. *Toxicon* 2009 Sep 22 [Epub ahead of print]
- 9) 木村 淳, 幸原伸夫: 神経伝導検査と筋電図を学ぶ人のために. 医学書院, 2003
- 10) Jones RG, Ochiai M, Liu Y, *et al*: Development of improved SNAP25 endopeptidase immuno-assays for botulinum type A and E toxins. *J Immunol Methods* 2008; **329**: 92-101
- 11) Dressler D, Lange M, Bigalke H: Mouse diaphragm assay for detection of antibodies against botulinum toxin type B. *Mov Disord* 2005; **20**: 1617-1619
- 12) Takahashi M, Komiya T, Kameyama S, *et al*: Titration of botulinum antitoxin of low levels by the score method. *Jpn J Med Sci Biol* 1990; **43**: 163-170

参考文献

- 13) 生物関連製剤ハンドブック2004. じほう, 2004

WHO Guidelines for the
Production Control
and Regulation of
**Snake Antivenom
Immunoglobulins**



World Health
Organization

[www.who.int / bloodproducts / snakeantivenoms](http://www.who.int/bloodproducts/snakeantivenoms)

These Guidelines were adopted by the WHO Expert Committee on Biological Standardization at its 59th meeting which took place in Geneva from 13 to 17 October 2008 and will be published in the WHO Technical Report Series.

© World Health Organization 2010

All rights reserved. Publications of the World Health Organization can be obtained from WHO Press, World Health Organization, 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland (tel.: +41 22 791 3264; fax: +41 22 791 4857; e-mail: bookorders@who.int). Requests for permission to reproduce or translate WHO publications – whether for sale or for noncommercial distribution – should be addressed to WHO Press, at the above address (fax: +41 22 791 4806; e-mail: permissions@who.int).

The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

The mention of specific companies or of certain manufacturers' products does not imply that they are endorsed or recommended by the World Health Organization in preference to others of a similar nature that are not mentioned. Errors and omissions excepted, the names of proprietary products are distinguished by initial capital letters.

All reasonable precautions have been taken by the World Health Organization to verify the information contained in this publication. However, the published material is being distributed without warranty of any kind, either expressed or implied. The responsibility for the interpretation and use of the material lies with the reader. In no event shall the World Health Organization be liable for damages arising from its use.