

[トピックス]

## 破傷風

高 橋 元 秀

Tetanus

Motohide TAKAHASHI

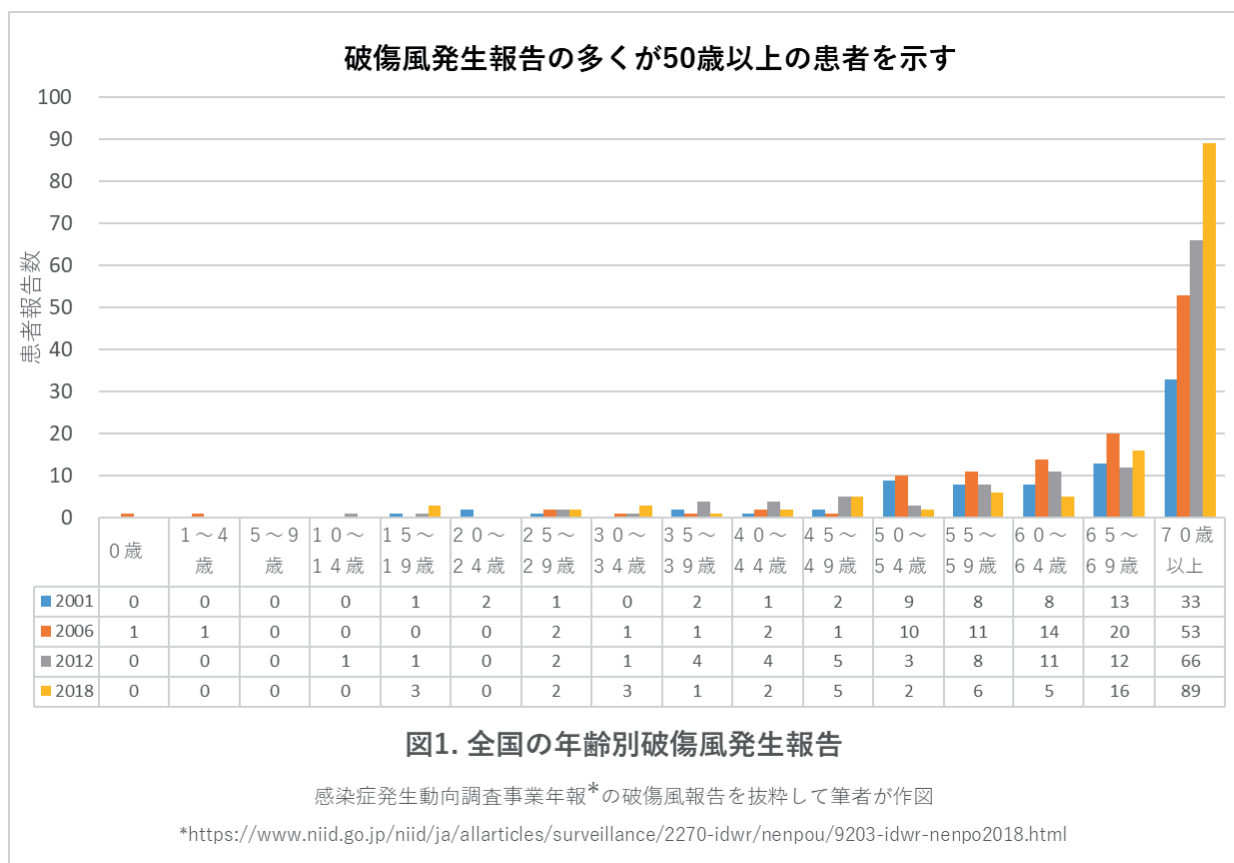
### 【要旨】

共同研究講座での研究調査活動内容の一つとして、破傷風の感染リスクの科学的根拠を示すために熊本県内の数か所の土壌を採取して破傷風菌の分布調査を実施している。講座の志多田大学院生の調査研究の内容について、必要性や今後の研究課題の方向と構想を含めて紹介する。

キーワード：破傷風，トキソイドワクチン，実験室診断，熊本県土壌，菌分布

共同研究講座は令和2年10月に設立1年となり、新規生物学的製剤・生物活性測定法構築、ヒト型の破傷風抗体製剤の開発研究を主題として進めている。熊本県小国町を故郷にもつ北里柴三郎が1889年に世界で初めて破傷風菌を分離した後に治療用のウマ抗毒素の開発、予防用の品質の高いトキソイドの開発により乳幼児への定期接種計画に用いられている。しかし、国内の破傷風の年間感染報告数は100名を超えている。そのうちの20-25%は感染部位が特定できていない。古来より創傷感染症として外傷部位から芽胞菌が侵入した場合に感染・発症するといわれている（解説1）。臨床診断で破傷風が疑われた場合には、専門性のある臨床医による感染部位を特定する努力にもかかわらず、4～5名に一人は感染部位が不明となっている。感染経路や感染部位が不明な原因・理由を調査することは、患者側の要因だけでなく、菌の生体内侵入・増殖の場所の再解析によって、衛生管理方法の見直し、感染リスクのある行動を特定することによる予防を可能とし、さらに早期の臨床診断や治療（解説2）にもつながる可能性がある。

ワクチンのヒト接種後の有効性や効果は2つの指標が期待される。一つ目は、季節性インフルエンザウイルスワクチンや新型コロナウイルスワクチンのように集団免疫と個人免疫がターゲットとなる。集団免疫は社会集団の大多数（約70%以上）にワクチン接種することにより人と人の伝播・流行を抑え、社会活動を停止させることを防ぐこと、さらに個人免疫は感染頻度を下げるとともに感染後の重篤化を防ぐことが目的である。この場合は、優先的にワクチンを接種する対象は医療従事者や重篤化のリスクが高い高齢者および高血圧、糖尿病の慢性疾患を有する人である。二つ目は本日の話題とする破傷風のように、人から人へ感染が拡大する疾病ではなく、個人が受傷時に適切な措置を怠ったために感染し発症することを防ぐものである。つまり、破傷風菌が産生した致死的な神経毒素を、ワクチン接種により体内に誘導した抗毒素抗体で中和して発症させないことである。破傷風は古来より国内外の感染患者報告は多数ある一方、ワクチンで予防可能な疾病（Vaccine preventable Diseases）の代表的な感染症である。破傷風菌が存在する地面・土壌が生活環境



の近くにある我々は全員感染リスクが高い。乳幼児を対象に破傷風トキソイドワクチン（T-td）は接種されているため、野外活動が活発で外傷・感染リスクの高い子供たちでも T-td の効果により感染・発症することは非常に稀である。今日でも日常生活における些細な傷からの感染報告もあり、破傷風の脅威は身近なものであり、毎年百人以上の患者と約 10% 程度の死亡者が報告されている。ワクチン接種が一般化されていなかった 1960 年代では毎年数百人が感染・発症し重篤な場合は死亡していた。過去 10 年間の報告患者の年齢は 50 歳以上が 90% 以上であり（図 1）、T-td による抗体が消失して発症リスクが高まる年齢と相関している（図 2）。11～12 歳時に人生最後のジフテリア破傷風トキソイド（DT）接種後、大人が定期的に接種される機会はない。緊急接種としては、自転車で転倒したとき、交通事故等で外傷を負ったときは予防的に接種される。また、海外渡航に際して訪問先の国の規則がある場合にも接種されるが、通常、抗毒素抗体が持続している 40 歳代までは発症報告は稀である。

言い換えれば、成人を対象に T-td を抗毒素抗体

が低減した中・高齢時に接種して抗体を維持しておけば、感染しても発症は免れるのである。乳幼児と学童への定期接種を完了し（解説 3）、さらに成人への T-td の追加接種により、破傷風の患者発生数を「0」に近づけることは可能と思われる。破傷風の脅威に対しては以下の課題が残されており、研究調査の必要性がある。

課題 1. 感染経路の見直しとして、破傷風患者の報告によれば、20～25% の患者には外傷が確認されていない。破傷風は創傷感染症と定義されているが、現状の診断方法、予防対策の見直しの必要はないか。➡侵入経路の特定による早期診断と治療の可能性

課題 2. 破傷風菌は芽胞として土壌に存在するが、菌の特性により感染・発症に影響する因子はないのか。➡病原体の再解析による疾患理解の構築および新規ワクチンの開発必要性

課題 3. 外傷時に予防的に用いられている人免疫グロブリン製剤の治療効果は十分か。また、発症後の複合的に用いる上記製剤の治療効果は十分得られているのか。➡新規製剤の開発

## 抗体が消失する年齢と発症リスクが高まる年齢は相関する

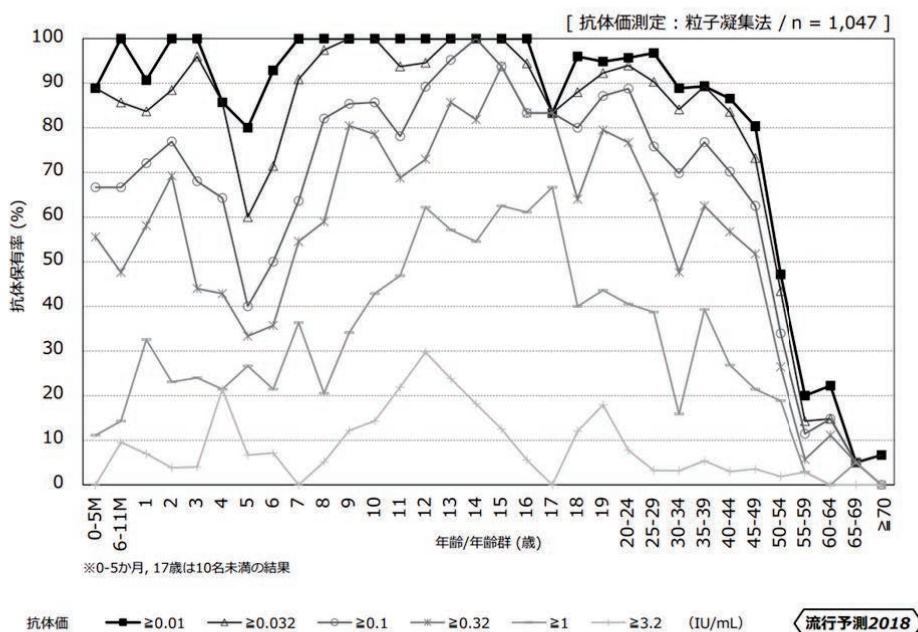


図2. 年齢/年齢群別の破傷風抗体保有状況 (2018年)

2018年度感染症流行予測調査\*より抜粋

\*<https://www.niid.go.jp/niid/images/epi/yosoku/2018/Seroprevalence/t2018serum-m.pdf>

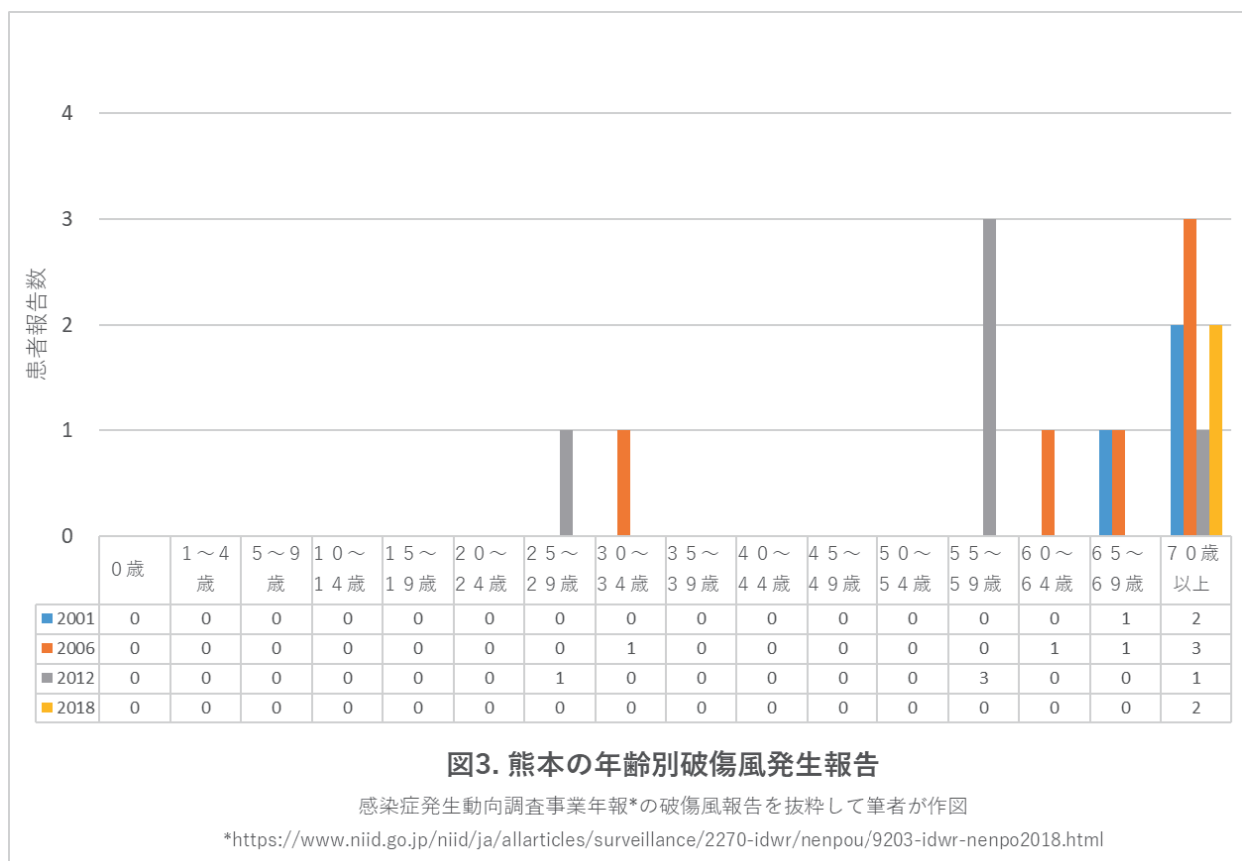
熊本県内の破傷風患者報告数を図3に示した。他県に比して民間・総合的な医療機関が多く治療体制の充実している熊本県が、より高い医療水準を目指して革新的な自治体行政を確立することには意義があると考ええる。品質の高いT-tdを含む混合ワクチンを製造している地元企業のKMバイオロジクス株式会社の品質情報を組み入れて、ワクチン接種の恩恵を十分発揮して医療費の削減、長寿国の安心安全を確保するため、感染症対策のモデル推進県となることを期待してシステム構築のために科学的な情報を発信する。

T-tdの効果を感じることなく、知らぬまま感染して発症から免れている事実を知り、近代社会の生活においても破傷風感染のリスクは変化していないことを実証するために、上記の2番目の課題に対して、当研究講座に所属する志多田大学院生の研究を紹介する。なお、当学では生物毒素の取り扱い区域はBSL2の病原体（破傷風菌）と同じ管理での作業が求められているが、バイオセーフティ上の必要性が明確でなく、一般区域での作業・実験の妥当性を進言している（解説4）。

破傷風菌は神経毒素であるテタノスパスミンと溶血毒素であるテタノリジンが主要な生物活性として知られている。そのほかに、寒天平板上での性状（遊走能、コロニーの形態等）、芽胞の性状（耐熱性、耐乾燥、耐UV等）の細菌学的な違いだけでなく、遺伝学的な違いによる毒素産生能、組織定着性、芽胞の発芽性等の分析も未解決の分野である。破傷風菌と感染・発症という分野を再分析するために、土壌から破傷風菌を分離して分析可能なパラメーターを用いた分離菌の解析により、感染経路が未特定の原因の調査と特定につながることを期待している。

## 【材料と方法】

土壌の採取方法：熊本県内の任意に選んだ地域、場所から土壌を採取している。古来、地名が「馬」に由来する名称の土壌からは破傷風菌の分離率は高いとも言われているために、「馬」に由来する数か所も意図的に採取場所としている。また、土壌に分布する有芽胞菌の過去の調査研究では、表面から10-20cmの深さから採取した報告もある。日常生活で受傷した場合には、地面表面の土壌との接触によ



る外傷部位への菌汚染により感染・発症すると考えられる。したがって、1採取場所では表面および10cmの深さから約10gずつ採取した。なお、使用機器類は無菌性が保証されているコニカルチューブ、滅菌薬匙を用いて、採取後は菌分離検査に用いるまで冷蔵保管した。

菌分離方法：芽胞の耐熱性は菌株により異なる可能性を利用して、土壌の夾雑菌の発育抑制と芽胞の発芽刺激（ヒートショック）として加熱処理（80℃ 10分、60℃ 10分）と非加熱の3条件を試みた。土壌の約1gをクックドミート培地（滅菌、脱気済み）に接種して37℃で3日間培養した。培養菌液は血液寒天平板培地（市販品BBL）に1エーゼ塗布して嫌気培養をおこない、約16時間後に培地表面を遊走した先端の菌はクックドミート培地と血液寒天平板培地に継代培養した。なお、移植した菌はグラム染色によりフィラメント状で複数の菌形が観察されないことを確認した。クックドミート培地は37℃で3日間培養した後、以下の試験に用いた。

- ① マウス試験：6000rpm 6分の遠心後、上清を0.22μmの濾過膜処理をして破傷風毒素の確認としてマウスに接種した。破傷風特有の症状

が観察された処理上清には破傷風抗毒素を混合して毒素が中和されることを確認した。

- ② PCR試験：破傷風菌毒素の遺伝学的報告に記載されているプライマーおよび検体の処理方法に準拠して、遺伝子の確認をおこなった。
- ③ 生化学的試験：市販されている簡易キット（Rapid 32 Api）を用いて試験し、データベースとの比較で適合性を確認した。

### 【結果と考察】

採取した場所は20ヶ所について採取場所の2か所の深さ違い、培養前の加熱処理の3条件で培養した場合の検体数は120検体となった。それぞれ培養後の菌液は上記3方法で菌と毒素の確認試験を実施した結果、毒素産生する破傷風菌が高率に分離されている。菌分離の目的は、日常生活の環境に存在する破傷風菌の感染・発症リスクを科学的に証明することであり、現時点では過去の分離報告以上に菌が分布していることを確認している。今回の分離方法では、複数の加熱処理後の培養条件で実施したことが分離率を高めたと予想される。今後、同じ採取場所



での深さの違い、および異なる加熱処理温度を条件として培養して得た破傷風菌の遺伝学的、分子生物学的、毒素学的な比較を検討する。さらに、過去に国内で分離された破傷風菌、患者から分離された菌株との比較検討も実施する。

講座内での研究課題として、破傷風毒素は3つの機能の異なる分子フラグメントで構成されており、それらを精製して生体内および培養細胞等での機能解析も検討中である。患者から分離された菌の違いが特定された場合は、上述した3つの破傷風に残された課題の解明が進むことを期待してやまない。

### 解説 1

感染と発症：病原体が皮膚や粘膜等の体表に付着し、生体内に侵入して局所または全身で増殖することで感染の成立となる。病原体の増殖に伴い器官や組織の変化や障害がおこることで発病または発症したことを確認する。破傷風の例では、芽胞菌を含む土壌が創傷等で皮下組織に侵入して空気と遮断した閉鎖的、嫌気的条件が整うことで菌は発育する。菌の侵入した場所や発育、増殖の時間や速度の違いで、産生される破傷風毒素が神経系の障害を起こして発症する。

### 解説 2

治療用の抗毒素：発展途上国では未だにこのウマ抗毒素製剤が使用されているが、日本をはじめとする先進工業国では人の免疫グロブリン製剤が開発されている。しかし、日本では米国から高単位の抗体を含む人血漿原料を100%輸入して製品化しており、重要な製剤の原料の供給体制システム確立ができず自給できていない。癌やリウマチ等の治療薬には科学技術の進歩に沿った人抗体が開発されているが、人血漿由来製剤に替わる安心安全な治療薬の開発は国家行政部門、製造所の責務ともいえる。科学的に安心な製剤であっても既存製剤を替えるには採算性が乏しく、一企業の開発は望めない。当講座で基礎・応用研究として既存製品に勝る高品質な人抗体の開発をおこない、そのシーズをもとに企業に展開することを検討する。

### 解説 3

破傷風トキソイド (T) は国内への薬事法的な導入

は1950年前半であり、ジフテリアトキソイド (D)、百日咳ワクチン (P) とほぼ同時代であった。しかし、1968年から予防接種法によるジフテリア・百日咳・破傷風混合ワクチン (DTwP) の定期予防接種が開始される以前は、T は定期接種に含まれていなかった。1994 年 (平成6年) 10月の予防接種法改正で沈降精製百日咳ジフテリア破傷風混合ワクチン (DTaP) 接種時期等が変更され、生後3カ月～90カ月未満に4回、11～12歳に二種混合ワクチン (DT) を1回接種となった。それ以前は自治体、医師会の方針や健康福祉に関心の強い自治体により、実際に接種されたワクチンの種類に多少の違いもある。また、1976年にDTwP接種後の副作用事故もあり、接種率の低下を経験して乳幼児の接種の有無に違いがある。したがって1960年代から1970年後半に誕生した人は母子手帳でワクチン接種歴を確認することを推奨する。なお、現在の破傷風トキソイド関連ワクチンは、前述のDTaPに不活化ポリオワクチン (IPV) とヘモフィルス・インフルエンザ菌 b 型 (Hib) ワクチンを混合したものが開発使用されている。

### 解説 4

毒素とバイオセフティ：微生物等の取り扱いや管理については、国際的指針としてはWHOのバイオセフティ、バイオセキュリティのガイダンスが一般的に利用されている。国内では細菌学会、ウイルス学会および国立感染症研究所から取り扱い基準等が示されている。それらの記載を見ると生物毒素のうち、ボツリヌス毒素と志賀毒素 (腸管出血性大腸菌 VERO 毒素を含む) はバイオテロに用いられる脅威としてBSL2施設での管理が求められる。感染症法の特定病原体では厳格な管理 (厚生労働大臣の許可) を求められるボツリヌス菌、ボツリヌス毒素、炭疽菌がある。生物毒素であるハブ毒素、マムシ毒素、破傷風毒素、ジフテリア毒素等はBSL2施設内での取り扱いは求められていない。医学教育のグローバル化が進む現在、過剰な規則設定による社会・医学検査機関との乖離や実験の場の制限等によって、学生の自由な教育の場が失われないことが望まれる。

(令和3年1月8日受理)