

私の歩んだ研究の道とそこからの教訓⑥—百日咳ワクチン—

日本で開発された精製百日咳ワクチン
(purified pertussis vaccine) の基礎研究,
開発過程および導入後の動き*

佐藤 勇 治**

はじめに

このたび平山宗宏先生から“日本小児感染症学会機関誌「小児感染免疫」で「私の歩んだ研究の道とそこからの教訓」というシリーズを掲載している。趣旨はわが国の小児感染症、そのワクチンの開発、開発のいきさつなどペーパーになっていない裏話的なことを含めて後輩のためにも書き残しておく必要がある。百日咳ワクチンについては佐藤が書くように”とのお話でした。私は後述するように1960～1991年まで国立予防衛生研究所で百日咳ワクチンの仕事をし、その間われわれが見出した百日咳感染防御抗原（ワクチンとしての有効成分）の研究をもとに、副作用の著しく軽減された精製百日咳ワクチンの開発に成功（日本国特許）、1981年秋からわが国の赤ちゃんに接種され始めました。この新ワクチンは世界の注目するところとなり、特にアメリカをはじめ既存の百日咳菌体ワクチンを使って困っている先進ヨーロッパ諸国が急遽WHOに参集、われわれの研究室をWHOの研究協力センターに指定、世界的な規模で行われた効果判定野外試験にも参加、1991年研究所を退官、その後も国内外を動き回り、本ワクチンの問題点、反省点など、いやというほどの教訓をいただきました。それ故、今回の平山宗宏先生の趣旨には大いに賛同するところがありまして書き残すことにしました。ここでは日本で開発さ

れた精製百日咳ワクチンがどのような流れでできあがってきたか、国際的にはどのような流れのなかにあったかなど、公表されていない仕事や裏話、ぼやきや苦労話などを含めて書きました。

I. 1960年以前の百日咳菌体ワクチンおよび百日咳防御抗原についての研究報告

ヒトの百日咳の起因菌である百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) は1906年パスツール研究所の細菌学者ボルテーとジャングーによって典型的な百日咳の症状（激しい咳の発作）を示している5カ月の乳児の痰から、血液加寒天培地上で分離されました。グラム陰性の小短桿菌（径約0.5 μ m）で4～5日培養で径1mmくらいのパール色のコロニーとなって観察されます。百日咳菌が百日咳の予防にワクチンとして試作され臨床試験がアメリカ、イギリスなどで行われ始めたのは1930年代に入ってからで、ワクチンの製造に特に重要だった発見は1936年米国の微生物学者レスリーとガードナーによる百日咳菌相変異の仕事でした。

百日咳菌は菌体表層抗原の違いでS型（I相→II相→III相）からR型（IV相）に分けられ、I相菌は病原性や毒性も強く菌体表面にK抗原、凝集原をもっており、このI相菌で作ったワクチンのみが有効であると実験動物で確認されました。この発見を下に製法、製造所の異なる23ロットの百日咳I相菌死菌体懸濁液（200億個/ml）が選ば

* Basic research and development of purified pertussis vaccine in Japan, and the vaccine thereafter

** (前) 国立予防衛生研究所細菌部

れ、イギリス医学研究会議 (Medical Research Council : MRC) のコントロール下、ロンドン郊外の約 20 万の乳幼児を対象にして 1946~1958 年の長期間を費やし典型的な二重盲検法による百日咳ワクチンの野外試験が行われました。その結果、この 23 ロットのワクチンのなか、適切な方法で製造された死菌体ワクチンは非常に有効 (家族内二次感染率 5%以下) であることが国際的にも確認されました。このようにこの 23 ロットのワクチンのヒトでの有効性 (力価) の順位がわかりましたが、実験室内 (動物実験) でも力価を知る必要があります。百日咳菌はヒト乳幼児にのみ感染、発病しますが動物は百日咳にかかりません。

約 30 年間にもわたり百日咳ワクチンの実験室内力価試験法が検討されましたが、1946 年米国の Dr. Kendrick がマウス脳内攻撃法という百日咳ワクチン力価試験法を考案しました。テストワクチンを腹腔に注射 (免疫) し、抗体が産生されたと思われる 2~3 週後、免疫されたマウスの脳間室内にごく微量 (500 個くらい) の百日咳強毒菌を接種する。2 週後のマウスの生死から力価を算出します。1 ロットのワクチンの力価測定に 200~250 匹のマウスと 40 日あまりの試験期間を必要とします。

さて、このマウス力価試験法で測定した上述の MRC のヒト野外試験に用いられた 23 ロットのワクチンは、マウス力価試験法とヒトでの有効性に高い相関性のあることが知られ、現在も百日咳ワクチンの力価試験法 (ケンドリックテスト) として採用されています。

また、この野外試験ではワクチン (23 ロット) 接種児に産生された抗体 (血中 IgG)、この時点では接種菌体を凝集させる凝集素の産生を測定していますが、凝集素産生能のよいワクチンはヒトでの有効性、マウスでの力価試験ともに高いことが知られました。このことは菌体表層の易熱性凝集素が防御抗原、ワクチンとなり得る可能性を強く示唆しています。ところが、1950 年アメリカの生化学者 Dr. Pillmer (彼は破傷風毒素蛋白を精製し結晶化した著名な人) が、凝集素は防御抗体ではないという結果を上記の MRC の野外試験で示しました。彼は百日咳 I 相菌を音波で破壊した音波抽出液中には百日咳感染防御抗原が抽出されるが、

この抽出液にヒトの O 型赤血球膜を入れると、血球膜に防御抗原が定量的に吸着することを前述のマウス力価試験法で知ったが、吸着した微量の蛋白質 (抽出液中の蛋白質の 1%程度) は何なのか、吸着物質を取り出し同定することができませんでした。Stroma-Adsorbed Protective Antigens (SAPA) と名づけられたこのワクチンは上述の MRC 野外試験に取り入れられていました。この SAPA は、最も有効な菌体ワクチンと同等のヒトでの有効性が認められましたが、接種児の血中には凝集素は全く産生されておらず、このことは SAPA は凝集原ではなく凝集原≠百日咳防御抗原ということを示唆しています。残念なことにこの SAPA は毒性、副作用が著しく強く、以降姿を消してしまいました。われわれはこの SAPA に大いに興味をもち、追試を行い、ストローマに吸着したのは後で詳しく述べますが百日咳毒素 (pertussis toxin : PT) であることを知りました。SAPA に強い毒性、副作用があるのは当然です。後述するようにわれわれは PT をホルマリンで無毒化し、トキシイドとして使用しました。

適切な方法で製造された百日咳菌死菌体ワクチンはよく効くことが国際的にも認められ、先進各国ではこぞって広汎に使用され始めました。が、しかしよく効く百日咳菌体ワクチンほど毒性、副作用が強いという好ましくない現象があり、特にスウェーデンなど北欧諸国からワクチン接種後の副作用、半数以上のワクチン接種児に一過性ではあるが接種局所 (皮下) のはれ、痛み、発熱、ごくまれにはあるが脳障害の誘発など重篤な副作用の起こることが報告され、社会問題となってきました。それ故、副作用の少ない有効な百日咳ワクチンの開発が急務となってきました。

II. 1960~1980 年、有効で副作用のない新しい百日咳ワクチンの研究：われわれの仕事を中心に

イギリス MRC の野外試験最終報告 (前述) 直後、私はボツリヌス毒素の精製、作用機作の仕事で Ph. D コースを終え、1960 年 3 月 30 日札幌を夜行列車で上野へ。4 月 1 日朝、当時目黒駅近くにあった国立予衛生研究所 (予研, National Insti-

tute of Health : NIH), 福見秀雄細菌部長の面接試験を受け, 百日咳の仕事をするよう命ぜられました。百日咳菌, ワクチンとのつき合いはここから始まり, 以降半世紀近く, 現在も継いでいます。1960年代は(東京オリンピック1964年)日本がようやく成長期, 政治(安保反対)経済(公害)で世界の仲間入りをしようとしていた頃でした。私は北海道大学から着のみ着のまま無一文で東京へ, 高校時代の親友(牧野一彌君)のところへもぐりこみ, しばらくは生活がやっとでした。予研は敗戦後, 日本の衛生状態の惨状からアメリカGHQの命で急遽作られたアメリカFDAのBureau of BiologicsとNational Institute of Infectious Diseasesの2つの機能をもたせた国家検定検査機関で, 東京大学伝染病研究所から関係者が予研に移籍して創設され(1947年)その後, 目黒駅前にあった旧海軍の建物(米軍が接收, 宿舎に使用)に移動, 業務を始めました。業務とはコレラ, ペスト, チフス, ジフテリア, 百日咳, 破傷風, 結核, ボツリヌスなどの菌, 日本脳炎, ポリオ, インフルエンザなどのウイルスの研究, 検査, ワクチンのあるものはその検査などです。3階建ての一応は鉄筋コンクリート作りではあるが, 昼でもうす暗く, 私のいた百日咳の部屋は米軍のシャワー室(便所)を取り壊した2階の端の部屋で45m²くらい, 退官までそこで仕事をしました。

スタートは百日咳ワクチンの検定業務(赤ちゃんに接種して大丈夫かどうか?)の習得からです。興味本位の研究とはわけが違います。ワクチン製造所が提出した検体, 菌体ワクチン(20mlバイアル瓶入り, 10本)につき, 外観ラベル, 異物などをみ, 安全性に関しては一般検定部へお願い, 私のところは実験動物による有効性の試験(前述のマウス脳内接種法)が中心でした。1回に450匹ほどの, 生後21日のマウスを購入, 体重差の著しいものは除き, 1ケージ10匹40~45のケージに入れ3~4日飼育後20匹のマウス腹腔内に一定量に3段階希釈された検体を計60匹に接種, 他に力価のわかっている標準ワクチンを同様の操作で希釈, 計60匹のマウス腹腔内に接種, 2週間(免疫期間)後, 百日咳菌の強毒株生菌を0.025ml, 各免疫マウスの脳間室内に接種, 14日間観察

後, 生残マウスの数から統計処理で力価を算出します。1ロットのワクチンの力価試験に少なくとも150匹のマウスを必要とし, 当時は年間40ロットの百日咳菌体ワクチンの検定があり約6,000~7,000匹のマウスを使用していました。

入所1カ月後頃の私の1週間の仕事を振り返ってみました(日記などから)。

百日咳ワクチンの検定には私を含め3名でした。

月曜日:朝9時出勤後, 白衣などに着替えて直ちに木造平屋の10畳間ほどのマウス小屋へ。前もって用意しておいた稲わらを床じぎにした木製のケージを45位用意する。業者から450匹のマウスが入荷, 1匹1匹の体重を量り平均から離れているものは除外, 1ケージ10匹ずつ用意したケージに入れる。

各ケージに給水びん, 給飼箱をつけ numberingする。3名とも汗だく, 体中が痒い。家ダニである。家ねずみもちよろちよろ, マスクはしているが鼻の穴真っ黒。着替えて研究室へ。昼食は研究室の人たちと一緒に, 私は近所の蕎麦屋の出前1ばい30円(安いので)。午後からまたマウス小屋へやり残した仕事をし, 研究室へ。

百日咳の仕事に与えられた1坪ほどの流し付き実験用机でボルデー・ジャングー培地を作り, ピペット, 試験管, 限られた本数の必要量を工面するのが大変, アツという間に夕方5時, 部屋の拭き掃除帰宅。

火曜日:9時出勤, 着替え動物舎へ。450匹45ケージのマウスの面倒をみる。記録などで午前中が過ぎる。午後, 部屋でワクチン製造所から来たワクチンを調べる(1週間に1検体の割合で来ます)。物理的性状試験など, ガラスなどの異物が入っていないか(入っていたら顕微鏡写真を撮る)。ラベルに間違いはないか, 今日冷蔵庫壊れる。大変, ワクチン検体その他の大事なsampleが入っている。修理の業者をよび, 修理。1日終了。

水曜日:9時出勤, 着替えマウス小屋へ。日が照っているので, 木製マウスケージの交換, 洗滌(かゆい, 悪臭)天日干し, 午後, ひきわらオートクレーブ, 新しいケージを作る, 部屋へ。検定台帳の整理等々。5時例によって拭き掃除, 研究所より出る(私の部屋のボスは5時以降仕事をするこ

とを認めなかった)。

木曜日：今日はワクチン免疫の日、検体ワクチン通常 (5 Lots) とわれわれの作った標準ワクチン無菌操作で希釈する。ドアに“無菌操作中入室禁止”を貼る。窓は一部目張り、バーナーを2本くらいつけ、綿栓をした20 ml 入り滅菌試験管に1本1本新聞紙でまいて間欠滅菌したガラス製ピペットを用いて各ワクチンを3段階希釈する。あらかじめ煮沸滅菌しておいた注射針、注射筒と一緒に1段階20匹、計約450匹のマウス腹腔に0.5 ml ずつ接種。昼食。午後またマウス小屋へ免疫マウスの数などチェック、給水給飼、洗い物など、部屋へ帰る。5時掃除、研究室から出る。14日後これら免疫されたマウスの脳室内に百日咳強毒菌を接種する Kendrick test があります。

金曜日：朝9時出勤、着替えマウス小屋へ。各マウスケージを調べ、免疫マウスの状態、数など正確にノートする。午後マウス室での洗い物、研究室で来週の仕事の打合せ、検定に必要な材料を購入伝票に記入など。5時掃除、帰宅。

土曜日：9時出勤、着替えマウス小屋へ。マウスのチェック。明日は来ないので入念に飼育状態のチェック。12時出所。ホッ。

その外に主な検定業務としては、①百日咳力価試験用標準ワクチンの製造、②ワクチン製造用菌株 (凍結乾燥)、③攻撃用菌株 (凍結乾燥)、④百日咳菌同定用血清 (アンプル分注)、⑤菌数測定用濁度管 (コールマンキューベット入り)、⑥凝集素価測定用抗原などがあり、外部からの分与、請求に対応する規定になっていました。特に大変だったのは①の製造でWHOより国際標準ワクチンを手し、例のマウス脳内接種法による力価試験を5~6回繰り返し、正確な防御単位を決めます。このワクチンの有効期限は1年半ですので、ほぼ毎年一定量 (10 ml × 400 本) のワクチン原液を作る必要がありました。この脳内接種法による力価試験は予研を退官する1991年まで続き、私の特技でした。この技術のお蔭で精製ワクチンが開発されたといっても過言ではありません。始めの1~2年は半年先輩の永瀬先生と2人で無我夢中で働きました。周囲の予研の若者は余裕があり、昼休みは中庭でテニス、バレーボール、夕方になると、

安保反対で霞ヶ関へ。またある日の夕方、われわれの研究室の階下の会議室や中庭には赤ちゃんのいるお母さんたちが来て“ポリオの生ワクチンを早く投与してください。輸入してください”と要望していたのを思い浮かべます。世は騒然としていました。

さて、独り立ちできるようになり、周囲の状況もみられるようになった入所2年後、福見部長の仲人で同じ細菌部でファージ型別室にいた北村博子と結婚、すぐに長女も授かり、お互いに仕事と生活が続けられるよう、博子の実家近くに居を移し、仕事に専念できるようになりました。博子は後に私の右腕となり共同研究者として精製ワクチン、PTの研究をしました。博子の仕事はCVI (WHO) も認め、2人でAwardをもらいました (後述)。当時日本では漸次力価の安定した菌体ワクチンが製造できるようになり、図1にみられるように百日咳にかかる小児も漸次減少傾向にありました。しかし、百日咳菌体ワクチンは有効ではあるが、半数以上の接種児に全身性発熱、接種局所 (皮下) の発赤腫脹、痛みが、さらには10万人に1人の割合で重篤な脳障害が起こるといわれ、さらにはジフテリアトキソイドや破傷風トキソイドと混和した2種、3種混合ワクチンが作られるようになり (図1)、どうしても副作用のない百日咳ワクチンを作ることが社会的な急務となってきました。当時、予研の周囲には細菌毒素研究の輝かしい伝統をもつ伝染病研究所、後の東京大学医学研究所の研究者がリーダーでおられ、細菌毒素の研究では世界の水準に追いつけ追い越せという雰囲気でも張り切っておられました。細菌毒素シンポジウムが毎夏、箱根で泊り込みで開かれ、発表、討論は非常に実り多いものでした。百日咳関係では易熱性壊死毒素、凝集原などの仕事が発表されていました。当時予研には血清部 (後に細菌第二部) という部があり、ジフテリア、破傷風、ヘビなどのトキソイドワクチンの研究・検定を行っており、このグループのやっていた抄読会に入れてもらい海外の一流の微生物学、免疫学、生化学雑誌 (海賊本も含め) を毎週夜遅くまで読みあったのが非常に勉強になりました。この会には石坂公成先生もおられ、2、3度、会で抄読されて

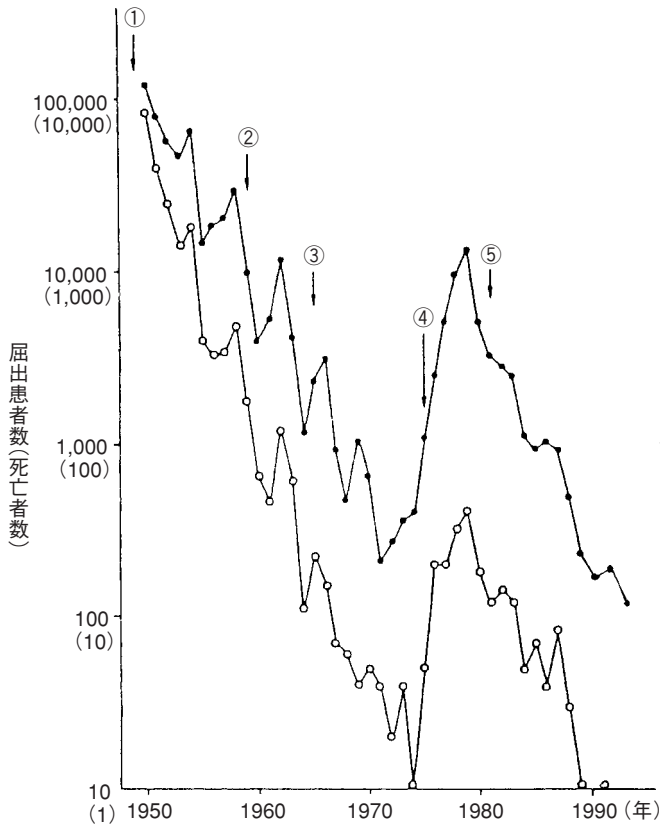


図 1 日本における年次別百日咳患者数 (●) および百日咳による死亡者数 (○)

- ① 百日咳全菌体ワクチン (P) の予防接種開始
- ② 百日咳全菌体ワクチンにジフテリアトキソイドを混和した 2 種混合ワクチン (DP) の接種開始
- ③ 2 種混合ワクチンに破傷風トキソイドワクチンを混和した 3 種混合ワクチン (DPT) の接種開始
- ④ DPT ワクチン接種による死亡事故
- ⑤ 新ワクチンの導入

(厚生省大臣官房統計情報部, 伝染病および食中毒統計概況)

いましたが、すぐに米国に行かれてしまいました。典型的な頭脳流出でした。われわれの部、室でも流出があり、私はようやく自由に研究といったことに手を出せるようになり、研究生、実習生も入ってきました。しかし、部屋に割り当てられる予算だけでは検定業務をこなすのがやっとで、各種の科学研究費を頼りに百日咳菌の産生する種々の抗原の分離精製を試み始めました。

1960年代後半になると、分析機器が急速な進歩をとげ超高速遠心分離機、電子顕微鏡、質量分析計など、分光機器が予研でも使用できるようになり、また、蛋白質の分離、精製にセルロースを支持体とする DEAE・CM クロマトグラフィ、ゲル濾過などの技術も使用できるようになってきました。そして、できるだけ機具機材を利用し、菌体音波抽出液や破壊液を出発材料とし、凝集原、易熱性毒素などの分離を試みましたが、良い成績が得られませんでした。当時、米国の Dr. Ribí は自

分の考案した cell-fractionator を使って、水に難溶性の細胞膜成分を取り、ワクチン化が可能だと報告、私もリボゾーム画分とか、細胞膜にある 22S 粒子であるとか、いろいろな報告をしました。後にも触れますが、内毒素が混在しワクチン化できるものではありませんでした。ところが 1967 年でした。私は菌体を高濃度塩溶液に懸濁、Ribí の cell-fractionator で壊し、超遠心して不溶物を除いた上清を蒸留水に透析、白色沈澱が得られ、乾燥、質量分析計にかけたところ丹羽充博士が前年毒素シンポジウムで報告した HSF の質量分析計のパターンと酷似していました。同じ 1967 年私は Dr. Pittman (アメリカ NIH の百日咳研究室長で百日咳の女王といわれた方) から非常に重要な information を得ました。それは日本の丹羽先生が百日咳菌体から抽出したヒスタミン増感因子 (histamine-sensitizing factor: HSF) がマウス脳内攻撃法による力価試験で強い感染防御能を示すことを

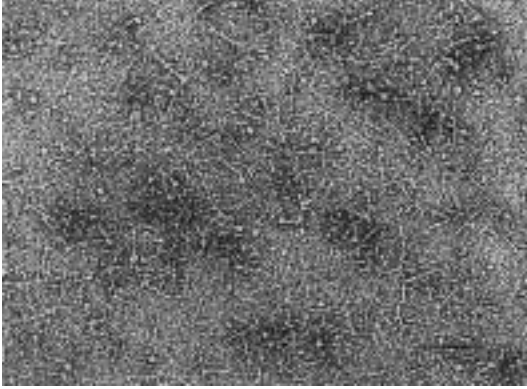


図 2 百日咳 I 菌培養上清より精製した LPF 分子の電子顕微鏡写真

ホスホタングステン酸によるネガティブ染色，バーの長さは 100 nm.

Pittman 自身の手で確認したというのです。われわれの研究の中心は当時白血球増多因子 (lymphocytosis-promoting factor : LPF) といわれる百日咳毒素蛋白に方向を絞っていましたが，これがすぐにこの HSF と同一物質であることがわかってきました。

1970～1974 年，われわれは百日咳菌を合成液体培地で培養，培養液中に産生された LPF が，百日咳菌の主要病原因子であると同時に百日咳感染防御抗原であることをマウス防御試験で見出し，米国の学術誌 *Infection and Immunity* (感染と免疫) に報告しました。

分子の重さの差で分離精製しようという技術を使い 5～20% のショ糖溶液 5 ml の上に粗原液 0.2 ml をのせ，105,000 g (約 40,000 rpm/min) という超高速遠心機 (水中ローター) で 15～20 時間回転すると LPF は中程まで沈降します。これを回収するというわけです。この仕事が日本の精製百日咳ワクチンの origin です。この方法で得た白血球増多因子は白血球増多 (LP) 活性のみならず，ヒスタミン増感 (HS) 活性，赤血球凝集 (hemagglutinin : HA) 活性，インスリン分泌促進 (islet-activating : IA) 活性，アジュバント活性などがあります。図 2 はその分子の電子顕微鏡写真でマッチ棒のような構造をした分子です。ところが，その頃佐藤博子 (一時東大医科研，加藤巖先生のと

ころでジフテリア毒素の研究をし，若い細菌毒素の研究者が受ける黒屋奨学賞を受賞，数年して再び予研へ，細菌第二部で細菌毒素の研究) から非常に重要な助言があり，このマッチ棒のような分子は 2 つの物質ではないかということです。早速マッチ棒状分子を蛋白分解酵素処理して調べた結果，酵素に安定な頭部の粒子状分子と酵素処理で HA 活性を失う棒状の部分からなる 2 種の HA からなることがわかり，クロマトグラフィなどでこの 2 種の HA を分離，その性状を報告しました。頭部が LPF-HA (PT) で分子量 10.5 万，5 種 6 個のサブユニット (S-1, S-2, S-3, 2S-4 と S-5) からなる複雑な分子構造をした蛋白毒素で，百日咳菌特有の病原因子であること，この蛋白毒素に対する抗体 (抗毒素) は百日咳の感染発病を防御することがわかってきました。棒の繊維状分子は F-HA (filamentous-hemagglutinin) と名付けられ，分子量 22 万， $2 \times 40 \text{ nm}$ の蛋白として分泌され，細胞膜などに吸着，赤血球凝集活性を示しますが毒性はありません。この 2 種類の HA が日本で新たに開発された精製百日咳ワクチンの抗原成分であります。

III. 1975 年以降：百日咳ワクチン改良研究班による精製ワクチンの製造

百日咳菌体ワクチン接種後の重篤な副反応は欧米では大きな社会問題となっていました，日本では幸いなことに重篤な反応例はまれでした。しかもワクチン接種で百日咳患者は減少し (図 1)，1970 年代初めには百日咳ワクチン不要論まで飛び出してきました。ところが，1971 年頃より，ワクチン接種後の強い副反応例が日本で目立ち始めました。

1974 年，夏の日差し強い予研の前庭での福見秀雄所長と私の立ち話 1 分間，「おーい佐藤君，君がやっている百日咳防御抗原の仕事はどうなんだ，ワクチン化できるのかね」「はい，できると思います。ただし大量生産の方法次第だと思います」「ではワクチン作りを始めよう。ワクチンメーカーを含め研究班を作ろう。後日相談しよう」

この立ち話をしてもまない 1974 年秋，すぐに翌 1975 年春に同じ T 社製 DPT3 種混合ワクチン接

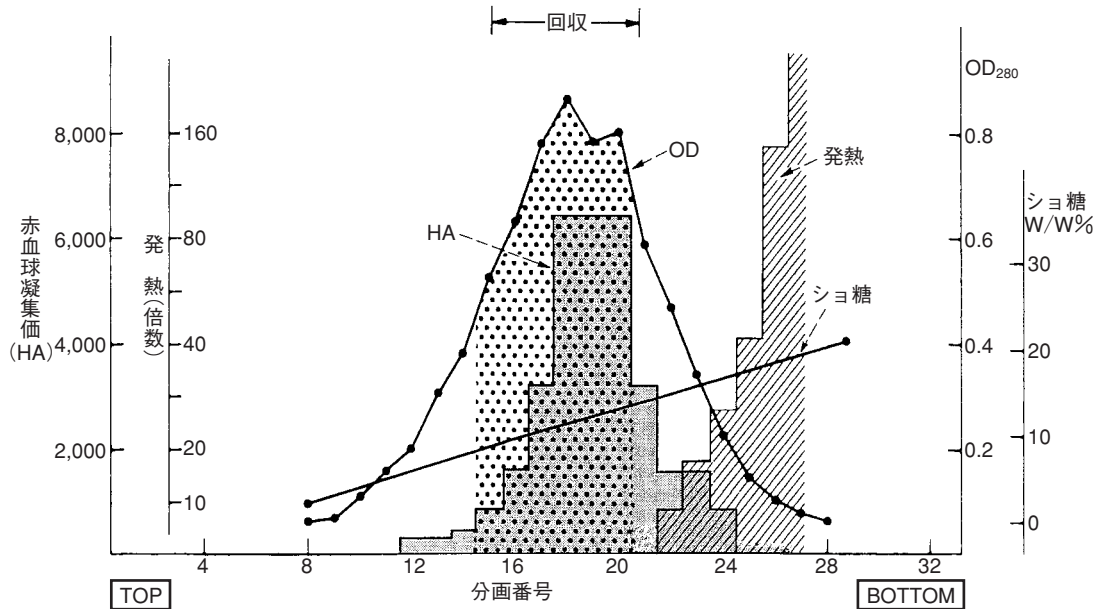


図3 粗抽出液のシヨ糖密度勾配遠心による分画

種後に2名の幼児が死亡するという大変な事故があり、厚生省は百日咳ワクチン（菌体）の入っているワクチン（P. DP. DPT）の接種を中止しました。福見所長はそのとき海外出張で留守でしたが、帰国後、直ちにA新聞に“ワクチンを止めると大変なことになりますよ、今止めると再び百日咳の流行が始まりますよ”といった論説を投稿したのを記憶しています。

2, 3カ月後、厚生省は接種年齢を上げて、ワクチン接種を再開しましたが同じ副作用のあるワクチンなので接種率は著しく低下、百日咳の流行が起こって来ました（図1）。百日咳ワクチン改良研究班に火がつけました。厚生省も漸く研究助成金を出し、ワクチン作りは私が、臨床試験は木村三生夫先生が中心となって動き始めました。

前述のようにわれわれが報告したワクチン調整法は菌体を使用せず、培養液中に“soluble form”で産生された感染防御抗原（LPF-HAとF-HA）をシヨ糖密度勾配遠心法を用いて精製する方法で従来までの簡単に大量を容易に製造できた菌体ワクチンとは設備、分離機器などで大いに異なります。研究班に参加した5つのワクチンメーカー、研究所に、始めはcell-wall vaccine, ribosomal vac-

cine, detergent-treated vaccineなども含め、それぞれのメーカーの希望する製造法で試作品を作ってみることにしました。

しかしこれらの、菌体からワクチンを調整する方法は毒性、特に内毒素が有効成分分画から除去できず、ワクチン化は無理でした。結局、本命のわれわれの方法、すなわちLPF-HAとF-HAからなるHAワクチンを作ることになりました。ここにわれわれが研究室で行った実験の1例を示します。

高分子蛋白を含まない合成液体培地で、百日咳菌を36時間振とう培養し、培養上清に硫酸を添加してHA活性蛋白を沈澱として濃縮、できるだけ少量の高濃度の食塩溶液で沈澱を溶かし、HA活性物質を十分に回収する。この回収した粗抽出液にはHA成分以外に不要な成分、特に内毒素が大量に含まれています。内毒素は微量で発熱作用があり、できるだけワクチン分画から取り除く必要があります。結局われわれは分子の重さを利用して分画することにしました。図3が粗抽出液のシヨ糖密度勾配遠心法による分離パターンです。1,000 ml容量の大型遠心管に5~30%のシヨ糖濃度勾配液を950 ml作り、その溶液上（最上部は

5%ショ糖溶液)に粗抽出液 50 ml を静かに上層する。水平ローターで 20,000 γ . p. m. 18 時間遠心する。遠心後ショ糖溶液を上層から 30 ml ずつ分取、約 32 の分画に(横軸の No) 分け、縦軸に示したように各分画の赤血球凝集価(HA)、ウサギを用いての発熱活性(内毒素活性)、OD₂₈₀による蛋白質の定量を行う。HA 活性は分画 12~24 位までに分布するが、内毒素は下層の重い部分に存在した。HA 活性の高い内毒素のない 15~20 の 6 分画、約 180 ml を集めワクチン材料とします。このワクチン材料中には図 2 の電子顕微鏡で示した LPF-HA (分子量約 20 万) と F-HA (分子量約 22 万) が存在します。LPF-HA は幾度も述べてきたように種々の生理活性をもつ毒素(致死量 15 μ g/kg) で強い副作用を示すので、このままワクチン中に防御抗原として、生体に接種できません。この毒素はジフテリアや破傷風の毒素と同じようにホルマリン処理で抗原性を保持したまま毒性を不活化できることをわれわれはすでに見出しており、その方法に従い先程 pool した HA 活性分画をセロファンチューブに入れ、0.05% にホルマリンを加えた 1 M NaCl P. B. に 37°C で数日間透析する。このホルマリン処理で LPF-HA (PT) のもつ生理活性、毒性は失われます。LPF-HA は強いアジュバント活性(IgG 抗体産生増強作用)があるが、ホルマリン処理で、毒性と同時にアジュバント活性も消失します。それ故、最後にアルミニウム(0.2 mg/ml) をアジュバントとして添加、LPF-HA と F-HA 抗原に対する抗体産生を増強させます。最終製品の抗原濃度は、マウスの力価試験で菌体ワクチンのときと同じ 8 国際防御単位/ml 以上の力価を保持するように調整します。

10 l の培養液から 1 l 程度の最終製品ができました。当時日本の赤ちゃんにいきわたる必要量はおおよそ 3,000 l (600 万 dose)。これだけの量のワクチンを佐藤の方法(ショ糖密度勾配遠心法を使用する)のできるのかが問題でした。一時はこの研究班での新ワクチン開発の望みも失いかけていましたが、T 製造所の S 君(私の後輩にあたる)が、私を信じてついて来てくれ、インフルエンザウイルス(ワクチン)の抗原分画に用いられていた連続ゾーン超遠心分離機を百日咳 HA ワクチン製造

に導入したことが成功に結びつきました。ついで B 研究所が成功、1979 年までに 33 ロットが試作され、そのうち 7 ロットが力価、毒性試験などの国家検定基準に合格、試作 3 種混合ワクチンの臨床試験、主に副反応試験が行われ、発熱、局所反応など極めて軽微であると報告された。なお、試作ワクチン接種前後の血清につき、これまで菌体ワクチンで行われていた凝集素産生能を参考までに調べたところ、T 社製では凝集素が菌体ワクチンの 1/10 程度、B 研究所製では産生されませんでした。その後の抗原分析で T 社のワクチンには凝集素が混在していることがわかりました。最も大事なワクチンの有効性ですが、研究班の磯村思元先生の報告で少数例ではありますが、試作ワクチン被接種児は百日咳感染にさらされても百日咳にならず(家族内二次感染)、有効性はほぼ 100% であるとの報告でした。

複数のワクチン製造所がこの HA ワクチンを製造できるようになった 1979 年、われわれはアメリカ政府(FDA・BOB)の職員として前述の Dr. Pittman の研究室へ出かけました。Pittman 先生は退官されてましたが、guest worker として研究室をもたれ、世界の百日咳ワクチンを指導していました。われわれは後任の Dr. M と共同研究という形でしたが、1 年も経たないうちに福見先生から“遊んでいないで帰って来い。こちらは大変だ”という電報を受け急遽帰国となりました。帰国後直ちに研究班が開かれ、これまでの成績をまとめ、厚生省へ新ワクチンとして申請することに決めました。私は研究班の報告をまとめ、厚生省薬務局生物製剤課へ提出、2~3 カ月後、霞ヶ関法曹会館で調査会が開かれ、たしか 10 名くらいの調査会委員の諸先生から 3 時間余にわたる質問を受けたと思いますが、事なく? 通過(1981 年春)、1981 年秋から、これまでの百日咳死菌体ワクチンから「沈降精製百日咳ワクチン」および「沈降精製百日咳・ジフテリア・破傷風混合ワクチン」という名で全面的に切り替わり、百日咳菌体ワクチンは日本から姿を消しました。図 1 にみられるようにこの新しいワクチンが導入された 1981 年以降、届出百日咳患者数は次第に減少、1990 年代半ばには患者数 130 名と、これまでの最低を記録しました。

表 1986～1994年にわたり行われた精製百日咳ワクチンの効果判定野外試験最終成績(1995年)

ワクチン製造所	試験国	ワクチン	百日咳抗原量 ($\mu\text{g Protein/dose}$)				接種回数	有効性 (95%CI)
			PT	FHA	PRN	Agg(s)		
Smith Kline Beecham	Sweden	DTaP(2) ¹⁾	25	25	0	0	3	59 (51～66)
Smith Kline Connaught	Sweden	DTaP(5)	10	10	3	5	3	85 (81～89)
Connaught	Sweden	DTwP	—	—	—	—	3	48 (37～58)
Amvax	Sweden	DTaP(1)	40	0	0	0	3	71 (63～78)
Japan-NIH-6 (Biken)	Sweden	aP(2)	23	23	0	0	2	92 (83～96)
Japan-NIH-7 (Biken)	Sweden	aP(1)	38	0	0	0	2	79 (66～87)
Lederle-Takeda	Germany	DTaP(4)	3.2	34.4	1.6	0.8	4	82 (75～)
Lederle	Germany	DTwP	—	—	—	—	4	91 (86～)
Smith Kline-Beecham	Germany	DTaP(3)	25	25	8	0	3	89 (77～95)
Smith Kline-Beecham	Germany	DTwP	—	—	—	—	3	97 (83～99)
Biken	Germany	DTaP(2)	23	23	0	0	3	82 (68～90)
Behringwerke	Germany	DTwP	—	—	—	0	3	96 (87～99)
Chiron-Biocine	Italy	DTaP(3)	5 ²⁾	2.5	2.5	0	3	84 (76～90)
Smith-Kline Beecham	Italy	DTaP(3)	25	25	8	0	3	84 (76～90)
Connought	Italy	DTwP	—	—	—	—	3	36 (14～52)
Pasteur-Merieux	Senegal	DTaP(2)	25	25	3	0	3	74 (52～86)
Pasteur-Merieux	Senegal	DTwP	—	—	—	—	3	91 (79～96)

¹⁾ DTaP(2) とは Diphtheria toxoid + Tetanus toxoid + 2 種類の Pertussis 抗原 (PT と FHA) を含むワクチンを意味する。WP: Whole cell Pertussis vaccine, P(1): PT toxoid のみ, P(2): P(1) + FHA, P(3): P(2) + Pertactin, P(4): P(3) + Agglutininogen 2, P(5): P(4) + Agglutininogen 3

²⁾ 無毒・百日咳毒素 CRM 蛋白質

IV. 新ワクチン導入後の世界の動き

1980年代前半の研究は新ワクチンに含まれる2つの感染防御抗原である百日咳毒素 (PT) と繊維状赤血球凝集素 (HA) の大量生産、精製方法に改良、ELISAによる抗原定量法の確立、両抗原の感染防御抗原としての役割などを追及、HAは感染初期の菌の宿主気道上皮細胞への吸着、定着に関与し、PTは百日咳症状の誘導にかかわっていることを、動物実験で示しました。またPTの各サブユニットに対するモノクローン抗体作製に成功し、毒素活性部位や抗原構造の解析を進めました。日本がこの精製ワクチンを使用し始めると、世界の注目を集め、WHOを中心にスウェーデン、アメリカ、イギリスなど15カ国が参加、日本の開発した新ワクチンの特に有効性の再評価を兼ねた国際共同研究が1984年から始まりました。当時百日咳で困っていた北欧、特にスウェーデンがまず自国への日本の新ワクチンの導入を希望、日本では実行できない二重盲検法による厳密な野外

効果判定試験を約1万人の乳幼児を対象にスウェーデンストックホルム郊外で行いたいと申し入れがありました。われわれはWHOから百日咳ワクチン国際協力センターに指定され、試験用ワクチンの提供、レファレンス抗原抗体の供給、ワクチン接種後の抗PT、抗F-HA抗体価の測定などで推進的役割を果たしました。提供したワクチンは(表)、PT-トキシドとF-HA(各23 $\mu\text{g/dose}$)の2つの抗原を含むJapan-NIH-6とPT-トキシド(38 $\mu\text{g/dose}$)単独抗原を含むJapan-NIH-7の2種類のワクチンで私が阪大微研に依頼して作っていただき検定試験に合格したものです。この野外試験の途中で2つの抗原を含むワクチン接種児に肺炎患者が出、F-HAに白羽の矢(免疫機能低下作用)が立てられたが、その後詳細な検討の結果、そのときのplacebo controlでも起こってきたこと、また同様のワクチンが日本で10万例以上に接種されているがそのようなadverse reactionは起きていないことから否定されました。

スウェーデンのこの野外試験の結果は1987～

1991年にかけて報告されていますが、最終報告はその後数カ国で別に行われた野外試験成績と一緒に1995年に報告されました。表に示すとおりJapan-NIH6および7の有効性は2回（通常は3回）の免疫で92および79%とほぼ完全な防御効果があることが再確認されました。

さらに表には、その後いくつかの国で行われた組成の異なる精製百日咳ワクチンの有効性に関する野外試験成績で、1995年の最終報告です。PT, F-HA 抗原以外に、細胞壁構成蛋白の pertactin (PRN), 易熱性凝集原 (Agg2 と Agg3) などを入れたワクチンのほうが有効性が高いのではないかという考えから〔動物実験の成績では PRN, Agg (s) は全く無効〕, PT, PT+FHA, PT+FAH+PRN, PT+FHA+PRN+Agg(s) の4種のワクチンを作りその効果を調べようとしたものです。しかしこの野外試験に用いられたワクチンは、抗原成分の違いのみならず、製造所、製造法、抗原の性質、含量なども異なっており、さらに野外試験の国も方法も異なっているため、算出された防御率の直接比較によって最適成分やその含量を論ずることは不可能となってしまいました。この表のなかには遺伝子工学的的手法で作出された無毒百日咳毒素 CRM 蛋白質も含まれていますが、十分な防御効果を示しています。

日本で開発された精製百日咳ワクチンは1992年アメリカFDAが承認し、レダリー社が日本のT社から精製した百日咳ワクチンの原液を購入し、自社で作ったジフテリア・破傷風トキソイドを混ぜ、沈降精製百日咳ジフテリア破傷風混合ワクチンとして米国の小児に接種しています。同様のことが日本のB研究所とアメリカのコンノート社との間で行われ、アメリカ、カナダなどで使用されています。WHOもJ-NIH-6やJ-NIH-7のような精製百日咳ワクチンの国際基準を作るべく、改めて動き始めました。

おわりに

1998年秋、Children's Vaccine Initiative (小児ワクチン計画: CVI) から連絡があり、11月10日ジュネーブのWHO本部に来るようにとのことです。

「Drs. Yuji SATO & Hiroko SATO は有効で副作用の少ない精製百日咳ワクチンを作り出し、そのワクチンを世界に広めるため、WHO 協力センターとして活動し世界の小児の百日咳の撲滅に貢献した」ということで表彰されました。講演会場にはWHOの援助で参加できた途上国のワクチン専門家もたくさんおられました。「受賞おめでとう。でも私たちは未だ精製ワクチンの恩恵を受けることはできません」われわれは申し訳ありませんと頭を下げるしかありませんでした。理由は簡単です。1981年、日本で製造した沈降精製百日咳・ジフテリア・破傷風混合ワクチンは2ドル/dose (今も3ドル/dose) 程度ですが、北米、カナダでは30ドル/dose、ヨーロッパでは40~50ドル/doseで接種されているそうです。それではお金のない国では接種できません。新ワクチンについて、わが国は日本国特許のみをとり、世界中どこでも使用できるようにと欧米の特許を申請しませんでした。そのため表にみられるように欧米の大ワクチンメーカーがビジネスチャンスとばかりに日本のワクチンを少し modify したワクチンを作り、莫大な経費をかけた野外試験の後、高いワクチンで売り始めました。われわれの思いが裏目に出てしまいました。特許や知的財産権に対する日本の対応、知識不足の時代でした。今でも大いに反省しています。

2008年5月、佐藤博子、勇治および共同研究者のDr. Keith (NIH, USA, 遺伝子工学的的手法で無毒百日咳毒素蛋白を作出した) の3名は中国政府の招待で武漢および蘭州生物製品研究所を訪れました。実は博子、勇治は新ワクチンに関する指導ですでに何度か中国を訪れていたのですが、1987年蘭州研究所を訪れた折、大学医学部を卒業したばかりのYang Xiao Mingを指導したことがありました。Dr. Yangはその後日本のC研究所でも精製百日咳ワクチンの製造法その他を学び米国へ。帰国後武漢研究所へ移動、現在は新進気鋭の新所長として、世界一の規模で精製百日咳ワクチン（中国では佐藤ワクチンと呼んでいます）の製造を指揮していました。驚きました。日本のわれわれが用いた超高速連続シヨ糖密度勾配遠心分離機を数十台ずらりと並べ、タンク培養(300l-1トン-5トン)した培養濾液を材料として、中国全土の乳幼

児を対象に年間 6,000 万 dose の製造を目指していたのです。来年には達成したいとっておりました。これが達成されると世界の 30% の小児が精製百日咳ワクチンの恩恵を受けられます。インドも続くと聞いています。しかも安価で作れるそうです。驚きと同時に反省が少し和らぎました。

最後になりましたが、「細菌と人類—終わりのなき攻防の歴史」〔ジャン・クレネ、ウイリー・ハンセン共著、渡辺格訳、中央公論新社、2004〕、というこの種の雑誌を読むものにとって一読に値する単行本に出会いました。ペスト、コレラ、チフスなど 16 種の細菌感染症を取り上げ、人類とこれらの恐ろしい感染症との長い戦いの歴史を説明しており、同時にこれら 16 種の感染症の研究に献身した人々について話しています。そのなかで日本人の研究者として、緒方正規（ペスト）、志賀潔（赤痢）、北里柴三郎（ジフテリア・破傷風）、野口英世（梅毒・黄熱）、佐藤勇治ら（百日咳）があげられていました。そして著者は「日本の若い研究者がこれら先人の努力に勇気づけられ、人類の将来の発展に貢献しようと燃やして下さることを大いに期待している」というメッセージを残しています。われわれが「精製百日咳ワクチン中の主要防御抗原は百日咳毒素である」といっても“そんなバカな”と信じてもらえなかったときもありました。科学はうそをいわない。われわれ夫婦の環境はあまり恵まれてはいませんでした。科学者になってよかったと思っています。

文 献

- 1) Sato Y, Arai H : Leukocytosis-promoting factor of *Bordetella pertussis*. I. Purification and characterization. *Infect Immun* 6 : 899-910, 1972
- 2) Sato Y, Arai H, Suzuki K : Leukocytosis-promoting factor of *Bordetella pertussis*. II. Biological properties. *Infect Immun* 7 : 992-999, 1973
- 3) Sato Y, Arai H, Suzuki K : Leukocytosis-promoting factor of *Bordetella pertussis*. III. Its identity with protective antigen. *Infect Immun* 9 : 801-810, 1974
- 4) Arai H, Sato Y : Separation and characterization of two distinct hemagglutinins contained in purified leukocytosis-promoting factor from *Bordetella pertussis*. *Biochem Biophys Acta* 444 : 765-782, 1976
- 5) Sato Y, Izumiya K, Sato H, et al : Aerosol infection of mice with *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 29 : 261-266, 1980
- 6) Sato Y, Izumiya K, Sato H, et al : Role of antibody to Leukocytosis-promoting factor hemagglutinin and to filamentous hemagglutinin in immunity to pertussis. *Infect Immun* 31 : 1223-1231, 1981
- 7) Sato Y, Cowell JL, Sato H, et al : Separation and purification of the hemagglutinins from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 41 : 313-320, 1983
- 8) Sato H, Sato Y, Ito I : Affinity of pertussis toxin produced by *Bordetella pertussis* for human haptoglobin : Application to the *in vitro* assay of the toxin. *J Microbiol Method* 1 : 99-109, 1983
- 9) Imaizumi A, Suzuki Y, Ono S, et al : Effect of heptakis (2,6-o-dimethyl) b-cyclodextrin on the production of pertussis toxin by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 41 : 1138-1143, 1983
- 10) Oda M, Izumiya K, Sato Y : Transplacental and transcolostral immunity to pertussis in a mouse model using acellular pertussis vaccine. *J Infect Disease* 148 : 138-145, 1983
- 11) Sato Y, Kimura M, Fukumi H : Development of a pertussis component vaccine in Japan. *Lancet* 1 : 122-126, 1984
- 12) Sato H, Sato Y : *Bordetella pertussis* infection in mice : Correlation of specific antibodies against two antigens, pertussis toxin, and filamentous hemagglutinin with mouse protectivity in an intracerebral or aerosol challenge system. *Infect Immun* 46 : 415-421, 1984
- 13) Sato H, Ito H, Chiba J, et al : Monoclonal antibody against pertussis toxin : Effect on toxin activity and pertussis infection. *Infect Immun* 46 : 422-428, 1984
- 14) Sato Y, Sato H : Anti pertussis toxin IgG and anti-filamentous hemagglutinin IgG production in children immunized with pertussis acellular vaccine and comparison of these titers with the sera of pertussis convalescent children. *Develop Biol Standard* 61 : 367-372, 1985
- 15) Sato H, Sato Y : Protective antigens of *Bordetella pertussis* : Mouse-protection test against intracerebral and aerosol challenge of *B. pertussis*. *Develop Biol Standard* 61 : 367-372, 1985

- Biol Standard 61 : 461-467, 1985
- 16) Isomura S, Suzuki S, Sato Y : Clinical efficacy of the Japanese acellular pertussis vaccine after intra-familial exposure to pertussis patients. *Develop Biol Standard* 61 : 531-537, 1985
 - 17) Sato H, Sato Y : Monoclonal antibody against pertussis toxin : Relationship between toxin neutralization and mouse protection activities. *Ann Sclovo n 1-2* : 259-267, 1986
 - 18) Sato Y : Use of the intracerebral challenge, mouse potency assay to standardize and license the Japanese acellular pertussis vaccine. Workshop on acellular pertussis vaccine. Department of Health and Human Service. Bethesda, Maryland, September, 1986
 - 19) Sato H, Sato Y, Ito I, et al : Effect of monoclonal antibody to pertussis toxin on toxin activity. *Infect Immun* 55 : 909-915, 1987
 - 20) Sato Y, Sato H, Ito I, et al : Isolation of mutant strains producing defective pertussis toxin, Japan. *J Med Sci Biol* 40 : 192-193, 1987
 - 21) Loch C, Cieplak W, Marchitto K, et al : Activities of complete and truncated forms of pertussis toxin subunits S1 and S2 expressed in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 55 : 2546-2553, 1987
 - 22) Placebo-controlled trial of two acellular pertussis vaccines in Sweden. Protective efficacy and adverse events. *Lancet* i : 955, 960, 1988
 - 23) Sato H, Sato Y : An attempt to introduce encephalopathy with pertussis toxin in mice. *Japan. J Med Sci Biol* 41 : 235-236, 1988
 - 24) Sato H, Chiba J, Sato Y : Monoclonal antibodies against alpha toxin of *Clostridium perfringens*. *FEMS Microbiol Letters* 59 : 173-176, 1989
 - 25) Yamakawa Y, Sato H, Sato Y : Isolation of pertussis toxin subunit proteins by reversephase high-performance liquid chromatography and reconstitution of the holotoxin molecule. *Analytical Biochem* 185 : 176-181, 1990
 - 26) Sato H, Sato Y : Protective activities in mice of monoclonal antibodies against pertussis toxin. *Infect Immun* 58 : 3369-3374, 1990
 - 27) Sato H, Sato Y : Relationship between mouse-protecting and toxin-neutralizing activities of anti-pertussis toxin monoclonal antibodies, Japan. *J Med Sci Biol* 43 : 271-272, 1990
 - 28) Sato H, Sato Y : Relationship between structure and biological and protective activities of pertussis toxin. *Dev Biol Stand* 73 : 121-132, 1991
 - 29) Sato Y, Sato H : Characterization of mutant strains producing pertussis toxin CRMs. *Dev Biol Stand* 73 : 93-107, 1991
 - 30) Brown DR, Keith JM, Sato H, et al : Construction and characterization of genetically inactivated pertussis toxin. *Dev Biol Stand* 73 : 63-73, 1991
 - 31) Matsuura Y, Sato H, Sato Y : Expression of the S1 subunit of pertussis toxin using a recombinant baculovirus. *Dev Biol Stand* 73 : 79-85, 1991
 - 32) Sato Y, Sato H : Comparison of toxicities of acellular pertussis vaccine with whole cell pertussis vaccine in experimental animals. *Dev Biol Stand* 73 : 251-262, 1991
 - 33) Sato Y, Sato H, Kodama H, et al : An improved ELISA system for the measurement of IgG antibodies against pertussis toxin (PT) and filamentous hemagglutinin (FHA) in human sera. *Dev Biol Stand* 73 : 167-174, 1991
 - 34) Sato H, Sato Y, Ohishi I : Comparison of pertussis toxin (PT)-neutralizing activities and mouse-protective activities of antiPT mouse monoclonal antibodies. *Infect Immun* 59 : 3832-3835, 1991
 - 35) Sato H, Sato Y : Relationship between mouse-protective and toxin-neutralising activities of anti-pertussis toxin monoclonal antibodies. *J Med Microbiol* 35 : 176-178, 1991
 - 36) Sato Y, Sato H : Acellular pertussis vaccine as a solution to the prevention of whooping cough. *Current Opinion in Infectious Diseases* 5 : 1992
 - 37) 佐藤勇治, 佐藤博子 : 百日ぜきワクチン. ワクチンハンドブック (国立予防衛生研究所学友会編). 丸善, 東京, 1994, 59-70
 - 38) 佐藤博子 : 百日咳. 毒素産生菌とその感染症. 竹田美文, 本田武司編, 医学ジャーナル社, 東京, 1998, 58-71