

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業

牛由来成分を使用しない新たなワクチン製造の
開発に関する研究

平成 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 田代真人

平成 15(2003)年 3 月

目 次

平成 14 年度

I. 総括研究報告書

牛由来成分を使用しない新たなワクチン製造の開発に関する研究

主任研究者：田代真人_____ P.1

II. 分担研究報告書

1. おたふくかぜ生ワクチンウイルスの牛由来成分を使用しない培養方法に関する研究

加藤篤：協力研究者 久保田耐 木所稔 田代真人_____ P.4

2. 牛血清を使用しない麻しんワクチン製造法の開発に関する研究

齋藤義弘：協力研究者 木所稔 加藤篤_____ P.7

3. 無血清 Vero 細胞を用いた風疹ウイルス増殖系の確立と増殖ウイルスの生物学的性状の解析

中島節子：協力研究者 海野幸子 加藤宏幸_____ P.10

4. 無血清培地を用いた日本脳炎ワクチンの製造法に関する研究及び、異常プリオン検出に関する研究

高崎智彦_____ P.12

5. 無血清培地を用いた培養細胞によるウイルスワクチン製造法の開発に関する研究

武田直和：協力研究者 下池貴志_____ P.16

6. 牛血清等ワクチン製造資材における未知の迷入因子検査法と排除に関する研究

伊藤治_____ P.19

7. 牛由来成分を使用しない新たなワクチン製造の開発に関する研究

大隅邦夫_____ P.22

8. 牛由来成分を使用しない新たなワクチン製造の開発に関する研究

真鍋貞夫_____ P.25

9. 牛血清を用いない初代ニワトリ胚細胞の培養条件の検討と麻疹ワクチン、AIK-C 株の増殖条件の設定

駒瀬勝啓 _____ P.27

10. 不活化ワクチン製造用に用いられる株化細胞におけるウシ由来成分を使用しない培養法の研究

桑原靖 _____ P.29

11. 無血清培地を用いた生ワクチン製造法の検討

末原章宏 _____ P.32

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 _____ P.36

IV. 研究成果の刊行物・別刷（別添）

平成14年度厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業

牛由来成分を使用しない新たなワクチン製造の開発に関する研究
総括研究報告書

主任研究者 田代真人 (国立感染症研究所ウイルス第3部長)

研究要旨 現行ワクチン製剤の製造に用いる原材料には動物由来の成分が用いられているものが多いが、ワクチン製剤の安全性を確保するためには動物由来の感染性因子迷入を排除する必要がある。そこで、初年度の研究では、1) 動物由来成分を使用しないワクチン製造方法の開発を目的として、現行の麻疹、風疹、おたふくかぜの各生ワクチンおよび日本脳炎ワクチン、A型肝炎ワクチンの不活化ワクチンの製造に使用されている各種細胞について、動物に由来する成分を含まない無血清培地を用いて培養した場合の細胞増殖性およびワクチン製造用種ウイルスの増殖効率を、動物血清を添加した現行の製造方法と比較検討した。2) 牛胎児血清の代替物としてウサギ血清を検討した。3) 動物ワクチンの領域で迷入汚染が危惧される牛ポリオーマウイルスについて検索した。4) 不活化日本脳炎ワクチンについて、ELISA法を用いてBSE異常プリオンを検索した。

分担研究者

加藤篤 国立感染症研究所ウイルス第3部
斎藤義弘 同上
中島節子 同上
高崎智彦 同ウイルス第1部
武田直和 同ウイルス第2部
伊藤治 農林水産省動物医薬品検査所
検査第1部
大隅邦夫 化学及び血清療法研究所
真鍋貞夫 阪大微生物病研究会
駒瀬勝啓 北里研究所
桑原靖 デンカ生研株式会社
未原章宏 武田薬品工業株式会社

がある。最近、食物中への紛れ込みが警戒されている異常プリオンの例は、本来ヒツジの集団内で起こっていた海綿状脳症(スクレイピー病)が、ウシの集団内に移り(BSE)、更にヒト社会にも飛び火したものである(変型クロイツフェルド-ヤコブ病)。ヒト社会への感染ルートは、食品以外にも医療行為による直接的な体内接種があげられる。これには異種動物片移植、臓器片を含む同種移植の他にも、ワクチン接種が心配される。なかでも予防接種法に基づくワクチン接種は、その対象人口の規模と主に弱齢層に接種されることを考えると、その危険度は無視でない。BSE因子の伝搬リスクをゼロとし、また将来起こりうる未知の因子による感染を防ぐためには、厳密に制御された原材料(たとえば細胞)以外の動物由来物質を、ワクチン製造の全ての過程から完全に排除することである。また、現実的に現行ワクチンの接種を継続する上では、異常プリオン物質をより高感度に、より短時間に検出する方法の開発を検討し、現行ワクチンの安全度を高める手立てを検討する必要がある。

本研究においては、これらの2点について、それぞれの専門家が分担して研究を行い、ウイルスワクチンの安全性確保を図ることを目的とした。

A. 研究目的

動物あるいは動物由来物質を原料または製造試薬等に用いて製造されるウイルスワクチンについては、その動物に由来する感染性因子あるいは病原性因子の迷入を否定することは品質管理の基本原則である。既に同定された既知の因子の場合には、検出感度並びに検出方法の改善によって、迷入否定が比較的容易に行われるが、未知の因子の場合には、その検出と排除が見逃される可能性

B. 研究方法

各分担研究者がそれぞれの担当項目を分担し、情報交換を行いながら平行して研究を進めた。詳細に関しては、各分担研究を参照されたい。

(1) 現行の麻疹、風疹、おたふくかぜの各生ワクチンおよび日本脳炎ワクチン、A型肝炎ワクチンの不活化ワクチンの製造に使用されている各種細胞について、動物に由来する成分を含まない無血清培地を用いて培養した場合の細胞増殖性およびワクチン製造用種ウイルスの増殖効率を、動物血清を添加した現行の製造方法と比較検討した。(2) 牛胎児血清の代替物としてウサギ血清を検討した。(3) 動物ワクチンの領域で迷入汚染が危惧される牛ポリオーマウイルスについて検索した。(4) 不活化日本脳炎ワクチンについて、ELISA法を用いてBSE異常プリオンを検索した。

C. 研究結果

第1年目の研究においては、現行の麻疹、風疹、おたふくかぜの各生ワクチンおよび日本脳炎ワクチン、A型肝炎ワクチンの不活化ワクチンの製造に使用されている各種細胞について、動物に由来する成分を含まない無血清培地を用いて培養した場合の細胞増殖性およびワクチン製造用種ウイルスの増殖効率を、動物血清を添加した現行の製造方法と比較検討した。

その結果、麻疹、風疹、おたふくかぜ、日本脳炎の各ウイルスについては、無血清培地においても現行法に劣らない増殖効率が示され、ワクチン製造方法としての可能性が示唆された。一方、A型肝炎ワクチンの種ウイルスについては、無血清培地での増殖性は現行法に劣ることが示され、更に検討の余地を残している。また牛胎児血清の代替物として、ウサギ血清を用いた場合には、麻疹ワクチンウイルスの増殖は良好であることが示された。更に、BSEの異常プリオン蛋白の検出方法として実用化されているELISA法を用いて、現在市販されている不活化日本脳炎ワクチンについて検索した結果、異常プリオンは検出されなかった。また、動物ワクチンの領域で迷入汚染が危惧される牛ポリオーマウイルスについて検索したところ、多くのワクチン製剤に同ウイルスの迷入は示された。

今後は、更に検討の幅を広げるとともに、細胞の継代の際に使用するトリプシン等の動物由来の試薬についても、合成代替品の検討が必要である。

各研究の詳細については、分担研究報告書を参

照されたい。

D. 考察

本研究の目的は、第一に異常プリオン物質を含む可能性をもつウシ血清およびウシ由来の物質すべてを、ウイルスワクチンの製剤過程から完全に排除する事を前提として、その代替方法を開発することである。更に、今後、起こりうる新たな感染性・病原性因子の迷入の可能性を完全に絶つために、厳密に制御された原材料(たとえば細胞)以外の動物由来物質のすべてについてもワクチン製造への利用を取り止め、その代替方法を検討することを目的としている。そのためには、細胞培養に用いる牛血清やトリプシン、ワクチン安定剤であるゼラチン等の代替品として、植物や、菌類由来の物質、あるいは遺伝子組換え技法により菌類等に作らせた動物由来物質を利用することを提言する。次に、この代替方法によって、試験製造されたワクチンが、従来の製品と同等以上の安全性と免疫原性を保持し、また製造経費の点からもどの程度の経済性を有しているかを含めて調査検証する。しかし、これらの検討中においても、現行ワクチンの製造・市場供給を中止することはできないので、少なくとも現行ワクチンが異常プリオンに汚染されていないことを検証する必要がある。そのためにこれらを評価する迅速で、高感度の異常プリオン検出方法を検討し、品質管理の現場への導入を図る。また、得られた知見を動物用ワクチン製剤にも適用し、食肉用の家畜動物が動物用ワクチンにより汚染されることを防ぎ、ひいては食肉等の動物製品を介してヒト集団に侵入する事を防ぐことに研究成果を利用できる。以上の検討により、より安全性の高い、未知の動物由来感染因子による汚染のリスクにも十分対応できる高品質ワクチンを世に出すことができる、更には、これらの因子のヒトへの伝搬を絶つことに寄与するものと考えられる。

E. 結論

① 麻疹、風疹、おたふくかぜ、ポリオ生ワクチン及び、日本脳炎、肝炎等不活化ワクチンに用いられている他動物由来物質(牛血清、トリプシン、ゼラチン、乳糖等)のすべてについて、その代替品を検討した。

② 代替品(無血清培地、非牛血清培地等)の使用による各種細胞の増殖性及びこれを用いたワクチン製造株の増殖曲線、抗原性及び免疫原性につい

て、現行原製造法と

の比較検討を行った。その結果、A型肝炎ワクチン以外のワクチンでは、増殖効率は大きく損なわれていないことが示された。しかし、A型肝炎ワクチンについては、増殖効率が若干劣ることが示唆された。

③ 動物用ワクチン製剤について、牛ポリオーマウイルスの迷入・汚染の可能性について検討した。その結果、細胞培養に牛血清を用いている現行ワクチンの多くには牛ポリオーマウイルスの迷入が認められた。この迷入ウイルスが非接種動物に与える影響、およびそれを食品としてヒトが摂取した場合の危険性について、早急に検討する必要がある。

④ 現行ワクチンの安全性を評価するために、現在BSEの異常プリオンの検出に実用化されているELISA法を用いて、異常プリオンの迷入を検討した。その結果、現行の不活化日本脳炎ワクチンに関しては、異常プリオンは検出されなかった。

F. 健康危害情報

特に情報は無い。

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし

厚生労働科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)
分担研究報告書

おたふくかぜ生ワクチンウイルスの牛由来成分を使用しない
培養方法に関する研究

分担研究者 加藤篤 (国立感染症研究所)

協力研究者 久保田耐、木所稔、田代真人 (国立感染症研究所)

研究要旨 おたふくかぜ生ワクチンは牛血清等の動物由来物質を含む培地で増殖維持された鶏胚初代培養細胞(CEF)を用いて製造される。工程中の動物由来物質の使用は、製剤中にそれらに由来する既知あるいは未知の感染性因子迷入の危険がつきまとう。製剤の安全性確保の観点から、動物由来物質の不使用あるいは代替品の検討が重要である。そこで、市販の無血清培地を CEF に用いて検討したところ、従来 of 血清入り培地と同等以上の細胞増殖力が示された。更に、ワクチンウイルスを接種し、ウイルス増殖度を比較したところ、無血清培地の方が優れていた。

A. 研究目的

初代培養細胞を用いて製造され、特に不活化操作を伴わない生ワクチン製剤には如何に製品の製造ラインを無菌化しても常に細胞を採取した動物、あるいは培養に用いた動物性物質に由来する感染性因子迷入の危険がつきまとう。おたふくかぜ生ワクチンは発育卵から採取したニワトリ胚を繊維芽細胞にし、種ウイルスを接種して増殖させて製造される。この過程で、トリプシン、牛血清が用いられ、またワクチンの安定剤としてさらに乳糖あるいはゼラチン、ヒト血清アルブミンが添加されている。このうち小規模な製造方法の変更で済ませられる添加剤の見直しはすでに行われつつあるものの、大規模な変更を伴う培養方法の見直しは遅れている。そこで本研究では、特に牛血清に注目し、牛血清を用いないおたふくかぜ生ワクチンの製造が可能かどうかを検討することを目的とした。

B. 研究方法

一般に初代培養細胞は、株化細胞に比べて培養維持が困難である。従って使用培地の変更は、細胞の生命力維持を損なわないような注意が必要である。そこで、(1)鶏胚由来の初代培養細胞(CEF)を、牛血清を含んだ従来の培地(MEM+10%TPB, 5%BS)と血清を含まない

合成培地(Opti-PRO SFM; Invitrogen Co.)で培養し、細胞の増殖力を比較すること。そこで細胞増殖力に有意な差が認められなかった場合には(2)国内で市販されているおたふくかぜワクチンウイルス(弱毒ムンプスウイルス)のうち A 社と B 社の 2 株を CEF に接種し、細胞の状態、ウイルスの産生速度と最終到達ウイルス産生量の比較を行うことを計画した。

C. 研究結果

CEF の増殖力を従来の培地 (TPB+BS/MEM) と市販の無血清合成培地 (Opti-PRO) とで比較した。細胞形態を顕微鏡的に 1 週間観察したところ、CEF はどちらの培地でも細長く広がり、互いの中で差は認められなかった。また疎の状態から培養を開始した細胞は、明らかに TPB+BS/MEM より Opti-PRO の方が密になるのが早かった。そこで、細胞内 ATP 量を測定する方法で、細胞の増殖速度を測定して確認したところ、Opti-PRO の方が TPB+BS/MEM に比べて倍近い早さで増殖していることが判明した。また、この際凍結保存した CEF の回復度についても比較したところ、明らかに Opti-PRO の方が TPB+BS/MEM に比べて多くの細胞が培養器底に定着していた。次にそれら Opti-PRO あるいは TPB+BS/MEM で培養した CEF では、

ウイルスの産生量も増加しているのかどうかを調べるために A と B の二つワクチンウイルス株をそれぞれ moi 0.1 以下で接種して、多段階増殖における増殖速度を感染 7 日後まで比較した。ウイルス感染による細胞障害効果 (CPE) は感染後 5 日目から両培地で顕著になったが、その程度は Opti-PRO の方が強かった。培養上清を 0, 3, 5, 7 日で採取して溶液中のウイルス力価を測定したところ、A ワクチンは、5 日目に B ワクチンでは 3 日目にウイルス力価の最大値を示し、その値はどちらも Opti-PRO の方が 0.1~0.8 log 程度高かった。7 日目ではどちらの培地でも培養上清中のウイルス量が減少したが、その減少量の間には有意な培地間の差は認められなかった。

D. 考察

市販合成培地 Opti-PRO は、CEF の維持増殖培地として従来の血清入り培地と同等以上に利用できる。調べた A と B の二つのおたふくかぜワクチン株は、どちらも Opti-PRO でよく増殖し、従来の培地に劣ることもなく、ウイルスの安定性にも大差は認められなかった。このことから合成培地は、CEF の培養とワクチンウイルスの増殖に利用できると考えられた。

E. 結論

動物由来物質を含まないおたふくかぜ生ワクチンの開発が可能であることを示した。

F. 健康危害情報

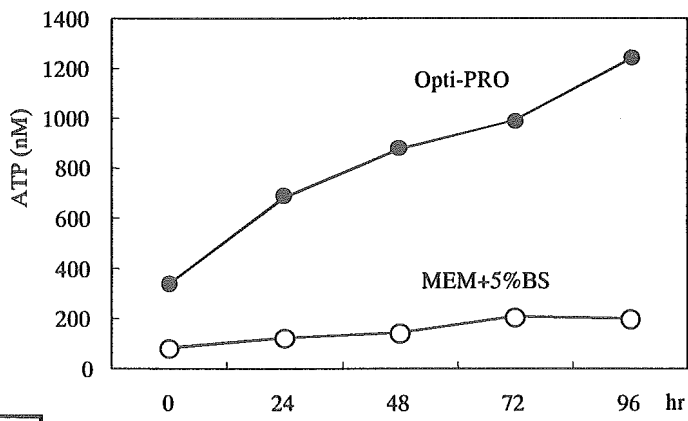
いまのところ情報は無い。

G. 研究発表

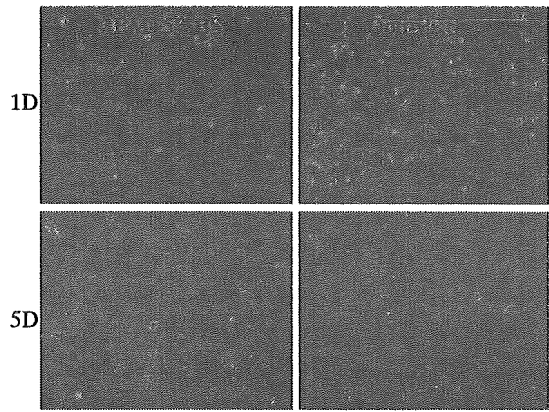
1. 論文発表

無し

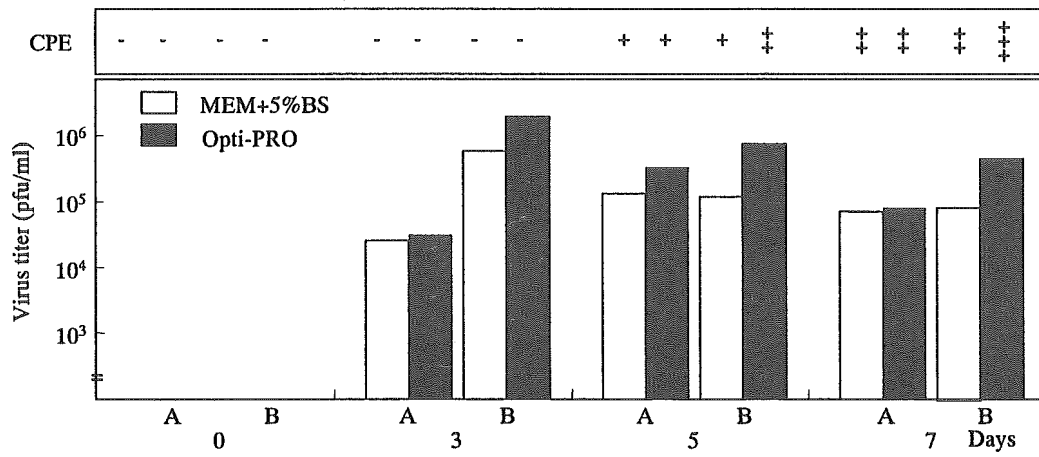
A CEF growth



B CE F recovery



C Mumps virus growth in CEF



牛血清を使用しない麻しんワクチン製造法の開発に関する研究

分担研究者 齋藤義弘 (国立感染症研究所ウイルス第3部)

協力研究者 木所稔、加藤篤 (国立感染症研究所ウイルス第3部)

研究要旨 弱毒生麻しんワクチンの製造には、鶏胚細胞が利用され、その製造過程で牛やその他の動物由来成分が使用される。牛由来血清を含まない培地で鶏胚細胞を培養し、麻しんワクチンウイルスの増殖実験を試みた。市販の無血清培地でも牛由来血清を含む従来の培地と同等もしくはそれ以上のウイルス増殖が認められ、牛由来成分を使用しない弱毒生麻しんワクチンの製造は可能であると考えられた。

A. 研究目的

現行の弱毒生麻しんワクチンの製造には、初代鶏胚細胞が使用され、細胞増殖用培地には牛由来血清が必須の成分として添加されている。一方、ウイルスを増殖させる段階では、培養細胞はよく洗浄され、牛血清を含まない培地が用いられるため、最終製品中には牛由来成分の大部分が除去されることになる。しかし牛由来血清を使用する以上、異常プリオンの混入の危険性は残る。異常プリオンをはじめ未知の動物由来の感染性因子の迷入を防ぐためには、鶏胚細胞以外の動物由来物質をワクチン製造過程から完全に排除することが望ましい。そこで本年度は、細胞培養に用いる培地を無血清培地に変更しても、弱毒生麻しんワクチンの製造が可能か否かを検討した。

B. 研究方法

凍結保存されていた初代鶏胚細胞を従来の牛血清を含む培地 (Eagle's MEM + 5% Calf serum + 10% Tryptose phosphate broth ; RIF) と市販の無血清培地 (Opti

Pro™ SFM, Invitrogen ; OPT) を用いて培養し、6 穴の培養プレート上で単層形成させた。初代鶏胚細胞に現在国内で市販されている 3 社 (A 社、B 社、C 社) の弱毒生麻しんワクチンウイルスを MOI 0.1 になるように接種した。室温で 1 時間ウイルスを細胞に吸着させた後、細胞を Eagle's MEM でよく洗浄し、Eagle's MEM 培地を加え、30℃の 5%炭酸ガス培養装置内で培養した。感染後 3 日、5 日、7 日、10 日に各培養上清を採取し、増殖したウイルスの力価測定まで -80℃に保存した。力価の測定には、Vero 細胞を使用し、CPE 法 (1 希釈 4 穴、1 検体 6 希釈) にて行った。培養条件は、市販の各ワクチンの力価測定の際の条件に従った。

C. 研究結果

麻しんワクチン株の増殖曲線を図に示す。感染後 10 日目までウイルスは増殖を続け、無血清培地 (OPT) を用いたほうが従来の培地 (RIF) よりウイルス力価は高く、最終的なウイルス産生量も良好で

あった。また国内で市販されているワクチン株すべてについて同様な傾向が認められた。

D. 考察

ヒトおよび動物由来成分を含まない市販の無血清培地を用いても、従来の牛由来血清を含む培地と同等もしくはそれ以上のワクチンウイルスの増殖が期待できる。今回の実験では、初代鶏胚細胞を作成する際、トリプシン（ブタの膵臓由来）が使用され、動物由来物質を完全に排除されているわけではない。次年度は、初代鶏胚細胞の作製からウイルスの増殖までを動物由来成分を全く使用しない系で行う予定である。

E. 結論

牛由来成分を含まない弱毒生麻しんワクチンの製造は可能であると考えられた。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表 無し
2. 学会発表 無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

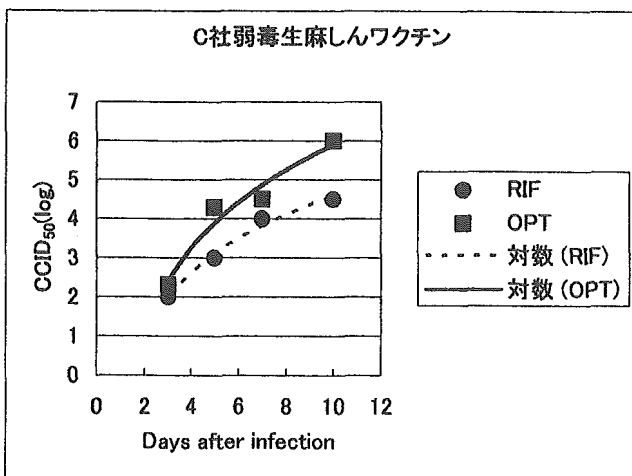
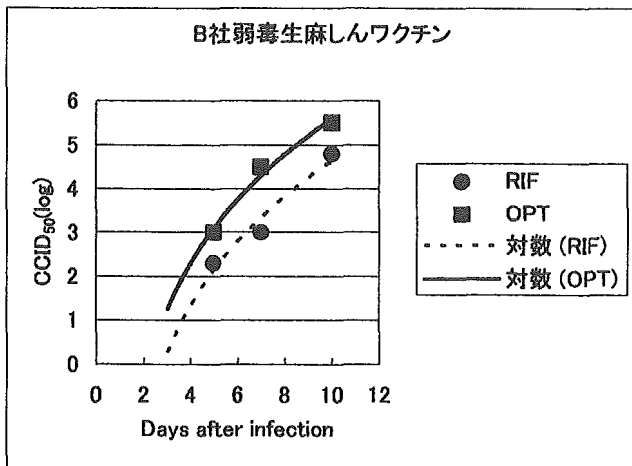
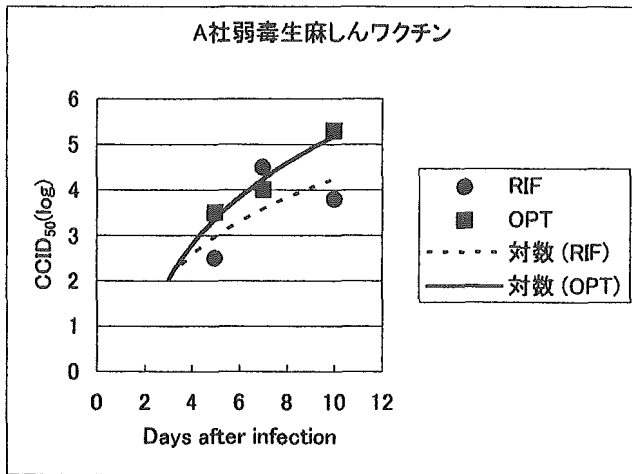


図 麻しんウイルス力価の比較

無血清 Vero 細胞を用いた風疹ウイルス増殖系の確立と
増殖ウイルスの生物学的性状の解析

分担研究者 中島節子（国立感染症研究所）

協力研究者 海野幸子、加藤宏幸（国立感染症研究所）

研究要旨 Vero 細胞を DM-201 培地に馴化させ、無血清培養系を確立した。その際、培地中に大豆由来のペプトンを添加すると効率よく無血清培養系が確立できた。細胞の分散にはトリプシンに代わり植物由来のパパインが使用できることがわかった。風疹ワクチンウイルスを無血清 Vero 細胞に接種し、ウイルス増殖性を血清を含む培養系と比較したところ、同等の増殖性が得られた。

A. 研究目的

弱毒生風疹ワクチンは牛血清等を含む培地で増殖維持されたウサギ腎初代培養細胞あるいはウズラ胚初代培養細胞を用いて製造されている。ウイルス製剤から異常プリオン物質を含む可能性のある牛血清および牛由来物質を排除し、さらに動物由来物質中に含まれる既知あるいは未知の感染性因子迷入の危険性をなくするために動物由来物質の不含有あるいは代替品を検討することが重要である。市販の無血清培地の殆どは培地中に動物由来あるいは遺伝子組換え体の増殖因子を含んでいる。それに対して、DM-201 培地は完全合成培地で、これまでに多数の株化細胞の無血清培養系の確立に用いられてきた。本研究では、動物由来成分を全く含まない完全合成培地および植物由来の代替品を用いて WHO によりワクチン使用が認められている株化 Vero 細胞を増殖させ、風疹ワクチンウイルスを接種して増殖性を調べ、ワクチン製造が可能かどうかを検討することを目的とした。

B. 研究方法

Vero 細胞(ATCCNo.CCL-81)は通常 10%牛胎児血清を含むダルベッコ MEM (DMEM-10)培地で継代した。Vero 細胞を無血清の DM-201(DM-201-0)培地（日本製薬）に数代馴化させた後、更に大豆ペプトン（インビトロジェン）1%を培地に加え(DM-201-0-Peptide-1)馴化させた。植物由来のパパインで消化し、6 穴のプレートに蒔き、単層が形成された後、風疹ワクチンウイルス（武田 To-336 株）を接種し、経時的に培養液を細胞と一緒に回収した。ウイルス増殖曲線を書くために、ウイルス液を 3 回凍結融解し、ウサギ腎由来の株化細胞 RK-13 の単層培養細胞に接種した後アガロースの入った培地を重層し、7 日目にニュートラル レッドの入ったアガロース培地で染色し、9 日目までプラークを計測した。コントロールに DMEM-10 で増殖させた Vero 細胞でのウイルスの増殖曲線を用いた。

C. 研究成果

Vero 細胞は DMEM-0 では継代を継続させることはできなかった。DM-201-0 では継代 1 代ではよく増殖したが、その後増殖速度はだんだん遅

くなった。DM-201-0に大豆由来のペプトンを1%に加えると、細胞の状態は改善され細胞も大きくなった。増殖速度もDM-201-0におけるより速かった。しかし、細胞は単層を形成するまで増殖した後、細胞密度が増加する様子はみられず、プレート当たりの細胞数はDMEM-10のその約半数であった。

ウイルス増殖曲線はDM-201-0-Peptone-1でウイルスを増殖させた方がDMEM-10で増殖させたウイルスより立ち上がりは速かったが、その後のウイルス増殖には両者で殆ど差がみられず、 $10^{6.9}$ PFU/mlに達した。7日目ではDM-201-0-Peptone-1でのウイルス増殖は減少に向かった。細胞当たりのウイルス産生量を比較すると、明らかにDM-201-0-Peptone-1でのウイルス増殖の方が大きかった。

パパイン0.125%、EDTA 0.05%で分散したVero-DMEM-10でのプラーク形成効率率はトリプシン0.1%、EDTA 0.1%のものとはほぼ同じであった。しかしながら、DM-201-0に馴化した細胞を同じパパインの条件下で分散して増殖させると、細胞はプレートに付着しなかった。

D. 考察

完全合成培地DM-201に1%大豆ペプトンを加えた培地を用いると短期間で無血清培地に馴化したVero細胞が得られた。パパインで細胞を分散させてもDM-201-0-Peptone-1中で細胞が増殖できるのは、パパインによる過度の消化が培地中に存在するペプトンにより緩衝されるためと考えられた。DM-201-0-Peptone-1で増殖した細胞では細胞当たりのウイルス産生量が高いので、増殖細胞の密度が改善されれば風しんワクチン産生系として用いることが出来ると考えられた。

E. 結論

動物由来物質を含まない風しん生ワクチンの開発が可能であることが示された。

F. 健康危害情報

特に情報は無い。

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし

分担研究報告書

無血清培地を用いた日本脳炎ワクチンの製造法に関する研究及び、
異常プリオン検出に関する研究

分担研究者 高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部）

研究要旨 日本脳炎不活化ワクチンは、現在マウス脳由来の不活化精製ワクチンであるが、一部は Vero 細胞を用いた組織培養ワクチンに移行する予定がある。従って牛由来成分が混入する可能性は、むしろ増大する可能性がある。そこで、我々は市販されている無血清培地を用いて日本脳炎ウイルスの増殖について比較検討した結果、無血清培地においてもある程度のウイルス増殖が得られることが確認された。また、現在 BSE の診断に使われている ELISA キットを用いて、現行日本脳炎不活化ワクチンが、擬陽性を示す可能性の有無を検討した結果、用いた 13 ロットに関して全く問題がないことを確認した。

A. 研究目的

マウス脳由来の不活化精製ワクチンである日本脳炎不活化ワクチンは、日本だけでなく、韓国・台湾や東南アジアで広く使用されているが、マウス脳を使うため精製に時間と費用がかかることから、近い将来 Vero 細胞を用いた組織培養不活化ワクチンが発売される予定がある。この場合、牛由来成分が混入する可能性がある。そこで、我々は市販されている無血清培地を用いて日本脳炎ウイルスの増殖について比較検討した。また、現在 BSE の診断に使われている酵素抗体反応キットで現行日本脳炎不活化ワクチンが、擬陽性を示す可能性を検討した。

B. 研究方法

1. 無血清培地を用いた日本脳炎ウイルスワクチン株増殖能の検討

シート状になった Vero 細胞（9013 株）に、日本脳炎ウイルス北京 1 株（ワクチン製造株）を接種（MOI:0.5）し、2%牛胎児血清（FBS）含有 MEM 培地および市販されている VP-SFM（Invitrogen 社）、AIM 培地（Invitrogen 社）の 2 種が類の無血清培地により培養した。細胞変性効果（CPE）が出現を観察し、細胞変性がしたウイルス接種後 4 日目に、その上清を回収し、下記の方法によりプラーク数を計測した。

プラーク計測法

組織培養用 6 穴プレートに Vero 均一な細胞シートになるように静置培養し、培養 1 日後の細胞に、回収した各培養上清（ウイルス液）を 10 倍階段希釈し、それぞれ 0.1mL を接種し、90 分間 37℃90 分間インキュベートし、1%メチルセルロース添加 MEM 培地を加え、6 日後にプラーク数を計測した。

2. BSE 用 ELISA 法

牛海綿状脳症診断用酵素抗体反応キット（ブラテリア BSE キット [BioRad 社]）を用いて日本脳炎不活化ワクチンの反応性を検討した。

C. 研究結果

1. 無血清培地を用いた日本脳炎ウイルスワクチン株増殖能の検討 RT-PCR 法の確立

(1)細胞変性効果（CPE）の出現時期とその特徴

いずれの培地を用いた場合でも、培養 3 日目に円形化した細胞が出現し、4 日目にはかなり（CPE）が出現した。CPE の強さとしては MEM 培地が最も強く、VP-SFM による場合の CPE は MEM 培地や AIM 培地と異なり、細胞が浮き上がることが少なく、シート状のまま剥がれ落ちる傾向があった。

（図 1 参照）

(2) プラーク法を用いたウイルス定量

表 1 に示す如く、2%牛胎児血清 (FBS) 含有 MEM 培地と AIM 培地 (Invitrogen 社) におけるウイルス増殖は、ほぼ同等であった。一方、ウイルス増殖用培地である VP-SFM では、約 6 分の 1 程度のウイルス量であった。

3. BSE 用 ELISA 法

現在 BSE の診断に使われている ELISA キットを用いて、日本脳炎ワクチンの反応性を検討した結果は、表 2 に示す如く全く反応せず陰性であった。

D. 考察

現在市販されている無血清培地には、牛胎児血清に代用としてどのような成分が添加されているか公表されていないものも多い。しかしながら、牛成分を排除した日本脳炎ウイルス組織培養ワクチンを製造するためには、少なくとも現在市販されている無血清培地で、牛胎児血清を用いた場合と同等量のウイルスが得られる必要がある。今回の実験結果から、無血清培地により、培養した場合でも牛胎児血清を用いた場合に比べて、同等のウイルス量が得られることが明らかとなった。VP-SFM に関しては CPE の形態が、他の培地に比べてやや異なったため、ウイルスの回収率を検討する余地はあると考えられる。

一方、マウス脳由来日本脳炎不活化ワクチンが、現在 BSE の一時検査として、広く使われている酵素抗体反応キットにおいて、擬陽性を示す可能性が低いことが確認された。従って今後組織培養不活化ワクチンが使用される状況になり、本キットで陽性の結果が得られた場合は、なんらかの牛由来成分が使用され、そのなかに BSE に汚染された材料があったことが疑われなければならない。

E. 研究発表

1. 論文発表

Tomohiko Takasaki, Masaru Nawa, Ken-Ichiro Yamada, Akira Takeda, Ichiro Kurane. Evaluation of dengue IgM detection tests using sera from patients with autoimmune diseases. *Journal of Virological Methods* 102, 61-66. 2002

Ken-Ichiro Yamada, Tomohiko Takasaki, Masaru Nawa, Ichiro Kurane. Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. *Journal of Clinical Virology* 24:203-209, 2002

高崎智彦. 黄熱, その他のアルボウイルス感染症. *小児科診療* 65:2077-2081 (2002)

Yuuji Yamamoto, Tomohiko Takasaki, Ken-

Ichiro Yamada, Mikio Kimura, Kazushige Washizaki, Hiroki Yoshikawa, Akihiro Hitani, Tetsuya Nakamura, Aikichi Iwamoto. A Case of acute disseminated encephalomyelitis following dengue fever. *Journal of Infection and chemotherapy* 8:175-177, 2002

Arai YT, Kimura M, Sakaue Y, Hamada A, Yamada K, Nakayama M, Takasaki T, Kurane I. Antibody responses induced by immunization with a Japanese rabies vaccine determined by neutralization test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Vaccine*. 20(19-20):2448-2453, 2002

Akira Yamamoto, Mikio Nakayama, Yae Kurosawa, Ken Sugo, Hideharu Karasawa, Tetsuro Ogawa, Tomohiko Takasaki, Masato Tashiro, Ichiro Kurane. Development of a particle agglutination assay system for detecting Japanese encephalitis virus-specific human IgM, using hydroxyapatite-coated nylon beads. *J Virol Methods*. 104:195-201, 2002

多賀賢一郎, 井村俊郎, 林 昭宏, 鎌倉和政, 橋本 智, 高崎智彦, 倉根一郎, 内田幸憲. 日本人における黄熱ワクチン接種後の抗体獲得に関する検討. *感染症学雑誌* 76(9):738-746, 2002

徳田敦子, 多部田弘士, 杉戸一寿, 高崎智彦, 山田堅一郎, 倉根一郎: フィリピンへの団体旅行で感染した Dengue 熱の 3 症例. *感染症学雑誌* 76(11):953-957, 2002

高崎智彦. ウエストナイル熱/脳炎. *東獣ジャーナル* 441(12):14-16 (2002)

高崎智彦. 日本脳炎, その他の脳炎ウイルス. 今日の治療指針 2003 年版. 医学書院 143-144. 2003

高崎智彦. 新世紀の感染症学「ウエストナイル熱/脳炎」*日本臨床* 61(増刊号 2):288-291. 2003

高崎智彦. ウエストナイル熱/脳炎. *Modern Media* 49(2) 1-6. 2003

2. 学会発表

K.I. Yamada, T. Takasaki, M. Nawa, I. Kurane: The future of dengue fever cases during 1998-2001 at National Institute of Infectious Diseases, Japan. XIIth International Congress of Virology (Paris) July. 2002

根路銘令子、高崎智彦、山田堅一郎、伊藤美佳子、倉根一郎。フラビウイルス科、フラビウイルス属、日本脳炎ウイルス種の命名法に関する提案。第37回日本脳炎ウイルス生態学研究会。（大分）7月。2002年

中山幹男、松野重雄、吉田靖子、山西重機、高崎智彦、倉根一郎。日本脳炎ウイルス分離株の遺伝学的変異と、その抗原性解析。第50回日本ウイルス学会。（札幌）10月。2002年

高崎智彦、倉根一郎。シンポジウム：新興・再興節足動物媒介ウイルス感染症の現状。第43回日本熱帯医学会大会（高知）11月。2002年

中山幹男、松野重夫、高崎智彦、倉根一郎。組織培養不活化日本脳炎ワクチンに関する研究－Vero細胞で増殖させたウイルスの遺伝学的検討－。第6回日本ワクチン学会（千葉）11月。2002年
新井 智、高崎智彦、多屋馨子、松永康子、倉根一郎、岡部信彦。2000年度感染症流行予測調査事業の結果を用いた、小児における予防接種歴別日本脳炎ウイルス中和抗体保有状況。第6回日本ワクチン学会（千葉）11月。2002年

図 1. 三種類の培地による日本脳炎ウイルスによる細胞変性効果 (Vero 細胞)

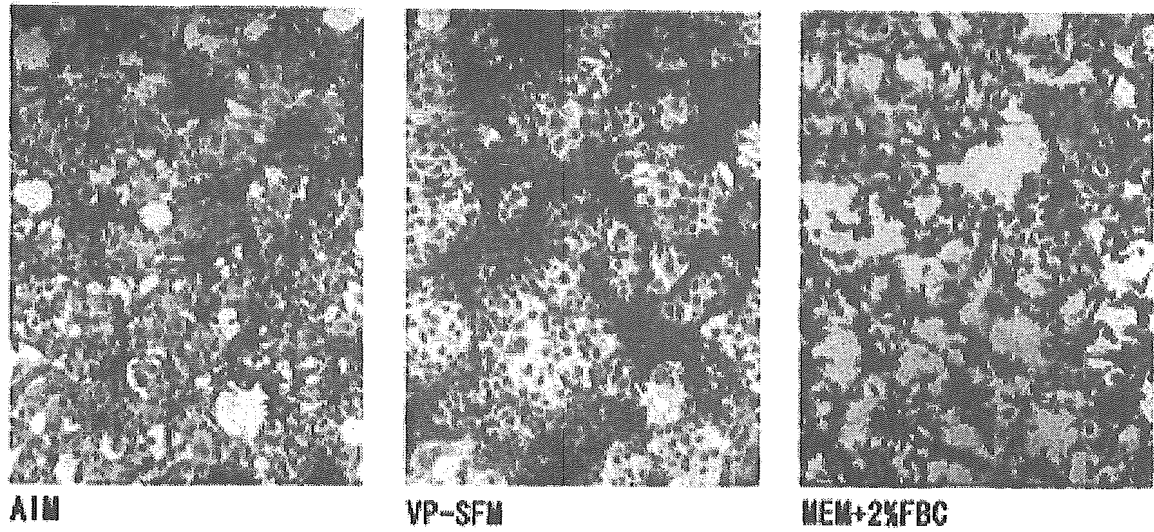


表 1. 三種類の培地による日本脳炎ウイルス増殖能

| | 培 地 | | |
|-------------------------|--------|-------|-----------|
| | VP-SFM | AIM-V | 2%FCS+MEM |
| x10 ⁷ PFU/ml | 3.2 | 18.7 | 21.5 |

表 2. 日本脳炎不活化ワクチンのプラテリア BSE での非特異反応の検討

| | | | |
|----------|-------|------|-------|
| 陰性コントロール | # 2 | # 6 | # 1 0 |
| 陰性コントロール | # 2 | # 6 | # 1 0 |
| 陰性コントロール | # 3 | # 7 | # 1 1 |
| 陰性コントロール | # 3 | # 7 | # 1 1 |
| 陽性コントロール | # 4 | # 8 | # 1 2 |
| 陽性コントロール | # 4 | # 8 | # 1 2 |
| # 1 | # 5 | # 9 | # 1 3 |
| # 1 | # 5 | # 9 | # 1 3 |
| 0.12 | 0.10 | 0.11 | 0.11 |
| 0.11 | 0.10 | 0.10 | 0.11 |
| 0.10 | 0.10 | 0.09 | 0.10 |
| 0.11 | 0.10 | 0.11 | 0.13 |
| 5.13 | 0.09 | 0.11 | 0.13 |
| 5.49 | 0.10 | 0.11 | 0.13 |
| 0.13 | 0.09 | 0.09 | 0.11 |
| 0.13 | 0.10 | 0.09 | 0.10 |
| Cut off | 0.235 | | |

厚生労働科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)
分担研究報告書

無血清培地を用いた培養細胞によるウイルスワクチン製造法の開発に関する研究

分担研究者 武田 直和 国立感染症研究所 ウイルス第二部

協力研究者 下池 貴志 国立感染症研究所 ウイルス第二部

研究要旨 A 型肝炎ワクチンはサル腎細胞由来細胞株 GL37 を用い、この細胞に馴化した A 型肝炎ウイルス (HAV) を増殖させ、精製ウイルスを不活化することにより作製されている。これらの細胞の培養に用いる FBS からプリオンが混入する可能性を取り除くため、本研究ではウイルス増殖に用いる細胞を無血清で培養する手法を確立し、ウイルス増殖に及ぼす影響について検討した。

のひとつである。

A. 研究目的

これまで A 型肝炎ワクチンはサル腎細胞由来細胞株を用い、この細胞に馴化した A 型肝炎ウイルスを増殖させ、精製ウイルスを不活化することにより作製されてきた。これらの細胞の培養には、ウシ胎仔血清 (FBS; 10%含む) が細胞増殖に必須の成分として培地に加えられてきた。その後のウイルス増殖は FBS を 2%に減少させた培地で行われ、細胞内のウイルスを回収するために細胞は洗浄されるので、大部分の FBS は除去されるため混入する FBS は極めて微量である。さらに、精製工程を経た場合には FBS は事実上検出限界以下の量になる。しかしながら、FBS を使う以上、プリオンが混入する危険性は排除できない。本研究ではこの危険性を完全に除くため、ウイルス増殖に用いる細胞を無血清で培養する手法を確立する。また、ウイルス増殖に及ぼす影響についても検討する。FBS に含まれる細胞増殖に必須の成分を同定することも目的

B. 研究方法

1. 細胞増殖試験

GL37 と同じサル腎臓細胞由来細胞株である COS-7 が増殖可能である培地 VP-SFM、CD293、293 SFM II 3 種類を用いて、これら各培地で GL37 の増殖を調べた。コントロールとして、これまで用いてきた 10% FBS 入り MEM (FBS-MEM) 培地での増殖を調べた。

2. ウイルス増殖試験

GL37 を各培地でそれぞれ更に数代継代した。その後 6 ウェルプレートに撒き、GL37 に馴化した HAV を感染させ、細胞の増殖、及び ELISA による抗原アッセイによりウイルスの増殖を調べた。

(倫理面への配慮) HAV は培養細胞 GL37 で増殖可能なため、特に倫理面で問題になるようなことは無いと考えられる。

C. 研究結果

1. 細胞増殖試験

FBS-MEM 培地で増殖させた GL37 を PBS で洗い、trypsin-EDTA によりプレートからはがした後 4 等分した。それぞれに各培地 (VP-FSM、CD293、293 SFM II、FBS-MEM) を加え、 1×10^6 個の GL37 細胞を 10cm プレートにそれぞれまき、各細胞の増殖を観察した。その結果、3 培地の中で VP-SFM 培地でのみ GL37 は増殖可能であることが明らかとなった。その増殖速度は最初の 7 日間は FBS-MEM 培地の場合に比べ約 2/3 であったが、その後ほぼ同じとなった。

2. ウイルス増殖試験

細胞増殖試験の結果、GL37 は無血清培地 VP-SFM で増殖可能であることが確認された。そこで、VP-SFM、及び FBS-MEM 培地で更に GL37 を 3 代継代し、馴化 HAV の増殖を HAV 抗原量により調べた。その結果、VP-SFM 培地で増殖させた GL37 で馴化 HAV は増殖可能であることが明らかとなった。しかし、HAV 接種後 7 日目、及び 14 日目の細胞あたりの抗原量は MEM 培地で増殖させた GL37 を用いた場合に比べそれぞれ約 43%、及び 31%であった。

D. 考察

1. この研究で GL37 細胞は無血清培地 VP-SFM で増殖可能であることが明らかとなった。その増殖速度は増殖開始後 7 日目までは FBS-MEM 培地に比べて約 2/3 であるが、それ以降はほぼ同じになり問題は無いように思われる。

2. VP-SFM 培地で増殖させた GL37 での HAV 増殖を HAV 抗原産生で見たとき、MEM で増殖させた場合に比べ約 30~40%であった。このことは、VP-SFM 培地には何らかの細胞増殖、また、ウイルス増殖に必要な因子が欠けていると考え

られる。今後、細胞の増殖に必要な因子の探索、及び、ウイルス増殖に必要なウイルス側と細胞側の因子の探索を進める必要がある。特に、このウイルス抗原の産生の低さはワクチン製造において収率の低下につながるため、これは克服しなければならない重要な課題である。

E. 結論

1. A 型肝炎ワクチン作製用細胞 GL37 は無血清培地 VP-SFM で増殖可能であることが明らかとなった。
2. 馴化 HAV は VP-SFM 培地で増殖させた GL37 で増殖可能であることが明らかとなった。しかしながら、その産生された HAV 抗原は FBS-MEM 培地での場合に比べ約 40~30%であった。

F. 健康危険情報

我が国では、近年 A 型肝炎は減少しているが、依然、国内感染例が多い (2002 年 10 月 9 日現在 391 名)。また、国外での感染が推定される患者は 2001 (56 名)、2002 年 (2002 年 10 月 9 日現在 59 名) と増加しており、その主な感染推定地はアジアで、2002 年は特に中国が多くなっている (2002 年 10 月 9 日現在 35 名)。年齢別では 20 歳代から 50 歳代が多く発症している。特に、海外での感染が推定される場合、多くは 30 代から 50 代前半の男性となっている。年齢が増すほど劇症肝炎発症率が大きくなるので、今後の劇症肝炎増加が懸念される。(国立感染症研究所感染情報センターのデータから)

G. 研究発表

論文発表

Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor alpha modulates its transcriptional activity. Tsutsumi T, Suzuki T, Shimoike T, Suzuki