

R, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Matsuura Y, Koike K, Miyamura T. Hepatology. 2002 35 (4): 937-946.

下池貴志「知っていますか？食べ物でおこる A 型肝炎」食と健康（社団法人 日本食品衛生協会 11月号 8-17

国際会議：‘characteristic bases in HCV 5’UTR among genotypes identified by principal component and multidimensional scaling analyses’

T. Sasano, T. Shimoike, Y. Matsuura, T. Miyamura, and T. Suzuki 9th International Meeting on HCV and Related Viruses in San Diego 2001.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定をふくむ。）

なし

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

分担研究者 伊藤治 農林水産省動物医薬品検査所 検査第一部鶏病製剤第2検査室長

研究要旨：平成14年4月に欧州医薬品審査庁（EMA）は「ヒト用生物学的製剤の製造時に使用される牛血清に関するガイダンス」の中で、近年における動物由来ウイルスの混入の危険性を指摘している。特に特定試験として、確実な検出系が確立されていない及び情報量が必ずしも豊富でない牛ポリオーマウイルスが検出・排除すべき対象とされた。

本研究においては、1. 今日までの諸外国における本ウイルスに対する研究及び取組みを調査し、本邦への当該ウイルスの侵襲の危険度が著しく高い実態を確認した。2. EMAをはじめとする諸外国における規制の現状と動向について調べ、本ウイルスの製剤への混入防止に向けた対応、対策の必要性を明らかとした。3. 製造に利用される牛血清中からのウイルス断片の検出法を確立した。また、市販・流通している牛血清の汚染度調査の結果、市販血清の半数は産出国に関係なく、本ウイルスの遺伝子が検出され、製剤への混入の可能性を示唆した。

A. 研究目的

平成14年4月にヨーロッパにおける人体用医薬品の承認機関である欧州医薬品審査庁（EMA = The European Agency for the Evaluation of Medical Products）は「ヒト用生物学的製剤の製造時に使用される牛血清に関するガイダンス」の中で、近年における動物由来ウイルスの混入の危険性を指摘している。特に特定試験としてリストされた8種類の中には、確実な検出系が確立されていない及び情報量の多くないウイルスである牛ポリオーマウイルスが検出排除すべき対象とされている。そのため、本年度の研究においては、現状認識を確かにするとともに、スクリーニング検査法の検討に主眼をおいて次の事柄について検討した。1. 今日までの研究報告を解析し、本邦における侵襲の程度及びその危険度を評価する。2. 海外における対策の実態を調査する。3. 牛血清中におけるウイルス断片の検出法の確立と市販・流通の牛血清内汚染調査を行う。

B. 研究方法

牛血清中の牛ポリオーマウイルスの検出のために、既知の学術雑誌を検索し、試験方法に関する

比較検討を行った。更に、信頼度の高いと判断された1部の報告に関しては、著者と直接的な意見交換を行い情報を収集した。当該ウイルスの牛血清への混入に関する海外における規制的制度について、研究者からの聴き取り調査並びに公的文書の収集を行った。国内で市販されている牛胎子血清等のうち、保存血清又は提供血清をサンプルとして、入手された試験方法による遺伝子断片の検出を行った。同時に試験精度と測定感度の向上を目的として、既知の試験方法に各種の改良を検討した。

（倫理面への配慮）

倫理に関する特段の要件が試験の遂行上見付けられなかったため、手当てを行っていない。

C. 研究結果

1. 牛ポリオーマウイルスに関する研究と牛血清の危険度

1980年代から牛血清における牛ポリオーマ（様）ウイルスに対する抗体が調査され、多様な飼育環境における牛の40-60%が有意な抗体を保有していた。また、牛腎由来初代細胞の25%からウイルスが分離された。一方、人における研

究では、酪農に携わっている農夫、獣医師等 90 人のうち 70 人が抗体陽性であった。それら信頼度の高い 15 前後の報告からは、このウイルスは特異な地域性もなく、牛群間に広く分布していることが確認された。また、さまざまな経路から、人へ容易に感染する実態も警鐘として報告されている。

生物学的製剤の製造時に汎用される牛血清に関する決定的な問題提起は、1996 年のカナダ及び 1998 年にオランダの研究者の報告である。報告内容は類似で、市販されている牛血清中からの牛ポリオーマウイルス遺伝子断片の検出法の開発と混入頻度に関するものであった。その調査では試験対象とされた血清の 40-60%に牛ポリオーマウイルスに由来する明瞭な遺伝子断片が確認され、製剤への危険性が懸念されること及びそれらの排除の必要性が報告された。

2. 海外における牛ポリオーマウイルスの製剤への混入制御に関する規制制度の現状

本ウイルスの主要な研究者の 1 人であるカナダの Dr. A. Kappeler からの私信によると、既に 2000 年以前にカナダでは、動物用生物学製剤の製造に使用される牛血清等は、牛ポリオーマウイルスの迷入が否定されたもの又は明確に不活化されたことが保証されたもの以外の使用を禁止する通知がなされている。また、2000 年 4 月には、欧州医薬品審査庁の人用製剤の審査機関である医薬品委員会(CPMP = Committee for Proprietary Medicinal Products)は牛の胎盤を通過し、牛血清に混入することが知られている牛ポリオーマウイルス他 7 種類のウイルスについて、特定試験として検査することを義務付けた。更に、現在協議が進められている動物用医薬品の承認基準の国際調和会議(VICH)の生物学的製剤検査法作業部会のうち、迷入ウイルス否定試験検査法トピックでも牛ポリオーマウイルスが取上げられている。製造用に使用される牛血清を含む全ての材料又は中間、最終小分製品での迷入否定が義務化される傾向にある。

3. 牛ポリオーマウイルスの検査法の検討と市販牛血清中の汚染調査

検査法についての検討は、1996 年以降に発表された本ウイルスの検出に関する研究で採用され

ている遺伝子増幅法に改良を加えた。

改良点は①1st PCR に使用するプライマー塩基に関して Dr. A. Kappeler の協力を得て、既報のいくつかの塩基を変更した。②試料からの核酸抽出法は、試験の再現性と簡便性を考慮して、市販の抽出キットを使用した。③nested PCR 法に用いるサンプル量については、反応性の検討結果から報告の半量を用いることとした及び④全ての増幅産物に関する最終確認は酵素切断により行った。

試料は提供又は保管されていた 8 社によって販売された牛血清の 38 サンプルを用いた。新生牛由来の 2 血清を除き、全ては牛胎子血清で、アメリカ、カナダ、メキシコ、南米及びオーストラリアを原産国とする血清であった。

試料の半数に相当する 19 サンプルでは、nested PCR 法によって、明確に遺伝子増幅が確認された。また、それらの一部では 1st PCR においても既報に示されたと同様のサイズの増幅遺伝子が認められた。更に、nested 増幅産物について行った酵素切断において、期待される長さの遺伝子の分断が確認された。それらのことから本試験法によって、増幅が確認された牛血清中の遺伝子は牛ポリオーマウイルスに由来するものであると判断された。

D. 考察

牛ポリオーマウイルスの牛血清中への混入については 20 年ほど前から注目され、海外におけるいくつかの研究報告が存在している。その混入比率は、抗体調査又は遺伝子増幅検査でサンプル中 40%以上が陽性とされるものが多く、血清生産地域に広く浸潤し、牧場における感染の顕在化が想定される。

一方、牛ポリオーマウイルスに関する今日までの日本における研究は皆無に等しく、製造に使用する血清の多くを国外に求めている現状から、輸入される牛血清製剤の早急な調査並びに対策は必要となっている。特に製造機関の所在する EU 圏並びに関連地域における規制的方向があるため、今後、これらのウイルス及び遺伝子断片を含む血清が本邦に流入する可能性が危惧される。また国際的にもヒト及び動物用生物学的製剤中へのこれらの外来因子の混入及び牛ポリオーマウイルスを

含む製剤の国際間における流通は防止されなければならない。そのため日本においても今後、牛血清国内製造に関連する牧場の衛生調査並びに輸入牛血清等についての検査法の整備を行う必要性が考えられる。

試験した牛血清の半数から牛ポリオーマウイルス断片が検出され、1部にはその反応像から高濃度汚染の可能性も推測された。またサンプルとして最も多数について試験した血清販売社の例では、17例中8サンプルが陽性と判定された。それらの血清は1997年以降2002年までに製造されたもので、その生産国と陽性件数の内訳は、カナダが8サンプル中3、南米が6サンプル中3、米国が2サンプル中2及び豪州が1サンプル中1件から陽性反応が確認された。この事は、今やこの牛ポリオーマウイルスは地域による汚染の濃淡は比較的少なく、牛群間に広く分布している実態が明確にされた。

しかし、今回の試験の手法では、血清中に含まれる牛ポリオーマウイルス遺伝子断片を調査したものであり、生きたウイルスの存在を確認したものではないことから、別の角度からの調査の継続は必要とされる。これらの試験には、的確な判断を下すために、ヨーロッパの規制に基づいた不活化処理前の血清試料を対象とした試験により行うことが最も適当であるのかもしれない。また、一般的に販売される牛血清は、フィルターろ過あるいはγ線照射等による不活化又は除去操作が製造工程中に組込まれている。それらの操作を施すことにより、期待される効果が反映されているかについての保証は明確なものとなっていない。そのため、可能であるならば生きた牛ポリオーマウイルスを使用したスパイキング試験を実施して、不活化又は除去に関する効果判定を行うことは必要である。

E. 結論

腫瘍原性を有するウイルスと近似の牛ポリオーマウイルスは牛群間及び生物学的製剤の製造に使用する牛血清に広く、分布・混入していることが報告されている。製剤汚染を回避するためには的確な検査技術と不活化・排除方法の開発が必要とされる。

調査研究に早期から着手してきた地域では、製剤中への迷入による危険を低減化する目的で、使用する牛血清中の牛ポリオーマウイルス検査を義務付け、規制を強化している。また製剤の国際流通に連動した協議機関でも、このウイルスの検出を義務化する傾向にある。

今回の試験では8社によって販売された牛血清の38サンプルを用い、遺伝子増幅法による検出を行った。その結果、19サンプルにおいてnested PCR法によって、明確に遺伝子増幅が認められ、製剤への高い混入頻度が懸念される結果であった。それらの陽性が確認された血清の原産国は南北アメリカ及び豪州であり、既報告と同様に広く世界に分布している傾向が確認された。

今後は、更にサンプル件数を拡大し調査結果の補充を行うとともに、生きたウイルスの分離法の検討、血清に添加したウイルスの各種処理操作による不活化速度等の検討を行う予定である。

F. 健康危険情報

ウイルスのヒト及び動物に対する直接的な危険度に関する報告はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

農林水産省動物医薬品検査所年報、第40号、2003年に報告予定

2. 学会発表

2003年10月に開催予定の第136回日本獣医学会で発表予定

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

適用する事項はない。

A型肝炎ワクチン製造の無血清培養に関する検討

分担研究者 大隈邦夫 （財）化学及血清療法研究所

研究要旨 A型肝炎ワクチンの製造に用いるGMK細胞（アフリカミドリザル腎細胞：GL37）について、ワクチンの安全性を高める方策として牛胎児血清をできるだけ用いない培養方法を検討し、その可能性を探った。結果、GL37細胞の増殖時に添加する牛胎児血清の濃度を10%から5~3%程度に低減できると、ウイルス接種後のウイルス培養に用いる細胞の維持培地を無血清化することが可能であることがわかった。一方、今回の検討でGL37細胞の無血清培地への馴化の方法は見出せなかったが、成長因子等の添加剤を含めた検討が必要であると考えられた。

A. 研究目的

人体用ワクチンの製造方法の一つである組織培養法では、ウイルスの培養に用いる細胞基質の増殖に欠かすことのできない牛胎児血清が広く使用されているのは周知のとおりである。近年発生したBSE（ウシ海綿状脳症）問題等によって、医薬品への牛由来成分や牛以外の動物由来原料を用いて製造する医薬品については原料の安全性の確認を厳しく求められるようになった。そこで、ワクチンの安全性を高める方策として牛胎児血清をできるだけ用いない培養方法を検討し、その可能性を探ることを目的とした。研究対象としてA型肝炎ワクチンの製造に用いるGMK細胞（アフリカミドリザル腎細胞：GL37）について検討を行った。

B. 研究方法

(1) 牛胎児血清の濃度による細胞増殖の比較 GL37細胞に使用する継代用培地(MEM培地)を用いて牛胎児血清の添加濃度に対するGL37細胞の増殖性の検討を

行い牛血清濃度の低減と無血清化の可能性を探った。

1) 増殖培地の調製

通常使用しているMEM培地への牛胎児血清添加濃度(10%)に対して、7%, 5%, 3%, 0%になるように増殖培地を調製した。

2) GL37細胞の調製

予め拡張継代しておいたGL37細胞を等濃度(3×10^5 cells/ml)になるよう添加し、75 cm²の培養フラスコに調製した細胞浮遊液を30ml添加し、GL37細胞の増殖性を7日間観察した。同時に観察期間のpHの変動、7日間培養後の細胞数を比較した。

(2) 無血清培地への応用

A型肝炎ワクチン製造ではGMK細胞の継代上の上限が10代程度の継代しか設定されていないため、直接順応法により無血清培地(Gibco社：VP-SFM)に短い継代数でGL37細胞が順応できるかを検討した。

1) 使用培地

市販のGibco社の無血清培地(VP-SF

M) を用いた。

2) 細胞の調製

細胞は予め拡張継代しておいた GL-37 細胞を、トリプシンで消化後、ダイズトリプシンインヒビターを使用して酵素阻害を実施した。細胞濃度は 3×10^5 cells/ml になるように調製し、25 cm² の培養フラスコで 7 日間培養観察を行い、細胞数を計測した。また細胞の状況により継代を行った。

C. 研究結果

(1) 牛胎児血清の濃度による細胞増殖の比較

細胞接種濃度を 3×10^5 cells/ml に調製して培養を開始し、GL37 細胞の増殖培地 (MEM 培地に牛胎児血清を添加した培地) での牛血清濃度が細胞増殖に与える影響を比較した。

結果、添加牛血清濃度の差により、7 日後の細胞濃度は牛胎児血清 10% 添加 (図 1) が 3.7×10^6 cells/ml と最も多く、7% 添加が 3.3×10^6 cells/ml、5% 添加が 2.9×10^6 cells/ml、3% 添加が 2.6×10^6 cells/ml であった。添加牛血清の濃度間で細胞の収量に約 30% 程度の差が認められるものの、牛血清濃度 3% までは添加量を減らせることが推察された。尚、血清無添加では細胞の増殖は認められなかった。培養観察では、細胞シートは牛血清濃度 10~3% までの間では肉眼的には変わらなかった。全体の増殖の傾向として pH においても 0% 以外は pH が 6.8~7.2 の間でほぼ同様の値を示し、有意差は認められなかった。

(2) 無血清培地への応用

無血清培地への応用 GL37 細胞の順応化の

検討の結果、1 代の継代ではシートの形成を確認ができた (図 2)。しかし、細胞濃度は 3×10^5 cells/ml であり、殆ど増殖していないことがわかった。更にこれを継代してみたところ、細胞はさらに減少した。以上の結果より、無血清培地で細胞を維持することは可能であるが、直接法による無血清培地への順応は困難であった。

D. 考察

以上検討の結果、GL-37 細胞では牛胎児血清の濃度は 3% 以上あれば増殖するので、少なくとも牛血清の濃度を低減することができると考えられる。また、細胞継代の上限が定められていることから、GL-37 細胞では直説法での無血清培地への順応は困難であることが推察された。今回の培養では、成長因子や接着因子等の添加剤は用いなかった。これらの添加剤を使用すれば無血清培養は可能になるかもしれないが、製造工程での精製の再構築と、残存の否定を行わなければならないためかなりの時間を要すると考えられる。

E. 結論

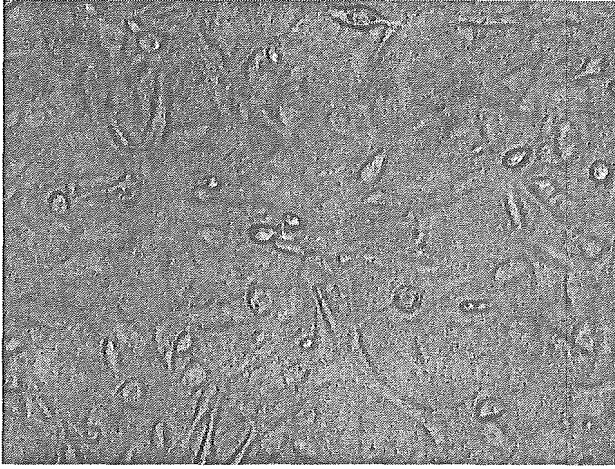
今回の検討から、現実的な対応として考えられるのは、GL-37 細胞の増殖時に添加する牛胎児血清の濃度を 10% から 5~3% 程度に低減することと、ウイルス接種後のウイルス培養期間中に用いる細胞の維持培地を無血清化することである。

F. 健康危機情報

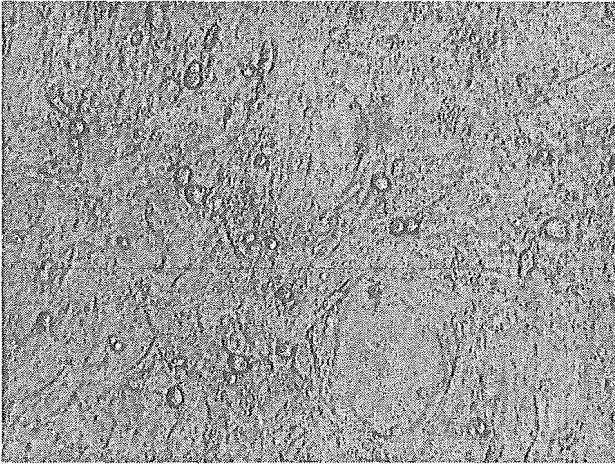
特になし

G. 研究発表等

特になし



(図 1 : GL-37 細胞、血清添加)



(図 2 : GL-37 細胞、無血清培養 1 代目)

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

分担研究者 真鍋貞夫 (財)阪大微生物病研究会

研究要旨 牛由来成分を使用しない新たなワクチン製造方法を開発するために、Vero 細胞及びウズラ胚細胞の無血清培地における細胞の増殖性を検討した結果、Opti-PRO 培地では増殖性が良く、牛血清を用いた培地と同等の成績が得られた。

A. 研究目的

現在、麻しんや風しんワクチンなどの生ウイルスワクチンの製造には、牛血清を使用している。現在、使用している牛血清は特定の原因国に由来しており安全であるが、未知のウイルスの存在も完全に否定できないことから、牛血清を使用しないワクチンの製造ができることが理想である。そこで予備試験として無血清培地での細胞の増殖性について検討した。

B. 研究方法

各社より販売されている無血清培地(Invitrogen 社製 Opti-PRO、VP 及び JRH 社製 EX-Cell™505 等)を用いて細胞の増殖性の検討を行った。最初に株化細胞である Vero 細胞の増殖性を検討した。方法として、Vero 細胞をアキターゼで処理し、MEM に浮遊させた細胞浮遊液を小分けして、遠心した。この沈査を各培地 (Opti-PRO、VP、EX-Cell™505、EX-Cell™505 (modified)、MEM+5%FBS) を用いて細胞数が 10 万 cells/mL になるように調製し、37°C で 4 日間培養した後、細胞数を測定した。更に採取した細胞を各培地で 3 倍希釈して継代培養し、4 代まで継代を行った。また、風しんウイルス培養に用いるウズラ胚細胞についても増殖性を検討した。ウズラ胎児を trypsin 液で消化し、消化液を遠心後、沈査を MEM に浮遊させた。この細胞浮遊液を、Opti-PRO、VP 及び MEM+5%CS で希釈し、37°C で、2 日間培養した後、細胞数を測定した。

当該研究では、バイオハザード対策しなければならない病原体等を使用していない為、倫理面への配慮は該当しない。

C. 研究結果

Vero 細胞の増殖性は、1 代目では Opti-PRO : 65.7、VP : 34.2、EX-Cell™505 : 55.2、EX-Cell™505 (modified) : 66.9 及び MEM+5%FBS : 91.2 であり、4 代目ではそれぞれ 109、62.4、85.2、85.8 及び 91.2 であった。(単位 ; 万 cells/mL)

風しんウイルス培養で用いるウズラ胚細胞の増殖性は Opti-Pro : 236、VP : 232、MEM+5%CS : 240 であった。(単位 ; 万 cells/mL)

D. 考察

Vero 細胞の増殖性の実験では、Opti-PRO は 4 代継代することで 100 万 cells/mL 以上に増殖し、対照である MEM+5%FBS と同等の増殖性を示した。VP は全体的に増殖性が悪く、EX-Cell™505 及び EX-Cell™505 (modified) でも良い増殖性を示した。また、ウズラ胚細胞を用いた試験では、用いた培地による増殖性の顕著な差は認められなかった。よって、Opti-PRO が無血清培地として有力な候補として考えられた。今後、ウイルスの増殖性についても検討する必要がある。

E. 結論

牛由来成分を用いないワクチンの製造方法を確立するための予備試験として、無血清培地における細胞の増殖性について検討した。数種類の無血清培地を比較した結果、Opti-PRO を用いた場合、Vero 細胞やウズラ胚細胞では細胞の増殖が可能であることが示唆された。

F. 健康危惧情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし。
2. 学会発表
なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. 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

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

分担研究者 駒瀬勝啓 （社）北里研究所部門長

研究要旨 ニワトリ血清、豚血清を用いて麻疹ウイルスワクチン株の製造に使用するニワトリ初代胚細胞の増殖能を検討した。またその細胞を用いて麻疹ウイルスワクチン AIK-C 株の増殖能を検討した。ニワトリ血清を用いた細胞培養では従来用いている牛血清（NCS; Newborn calf serum）とほぼ同等の細胞増殖能を示した。また AIK-C ウイルスの回収でも NCS を用いた結果とほぼ同様であった。一方、豚血清では細胞の伸張が弱く、ウイルス接種後は細胞が剥落しウイルスの回収はできなかった。ニワトリ血清は牛血清の代替えになる可能性がある。

A. 研究目的

麻疹ワクチン等の生ウイルスワクチンは現在、ニワトリ胚細胞、ウサギ腎臓細胞等の初代培養細胞を用いて製造されている。一般にこれらの細胞の培養では牛血清を含む培地を用いている。一方、1986年にBSE (Bovine spongiform encephalopathy) が英国で流行し社会問題となって以来、牛由来の製剤を医薬品等の分野では使用しない方向で検討がなされている。生ウイルスワクチンの製造工程で用いる牛血清も BSE 非流行国のものを用いる等の配慮がなされているが、可能ならば牛血清を用いない方法の確立が望ましい。本研究は牛血清を用いない麻疹ワクチンの製造法の可能性を検討するものである。

B. 研究方法

ニワトリ受精卵より胚を摘出して、トリプシン消化を行いニワトリ初代胚細胞を作成した。遠心後、非働化した NCS、ニワトリ血清 (Tissueculture biologicals, CA, USA)、豚血清 (日本バイオテスト研) を 3% 添加した LH 培地に懸濁し、細胞数を調整した。一部は各 40,000 cells/well になるように 96 穴プレートにまき、alamarBlue™ (Biosource, CA, USA) を加え 32 度で培養

し、経時的な細胞増殖を alamarblue の還元による蛍光発色で測定した。又、残りの 1.5×10^7 cells を T-75 ボトルにまき、細胞の形態を観察するとともに AIK-C ウイルスを M.O.I. 0.025 で接種し、ウイルスの増殖能を測定した。ウイルスの力価は Vero 細胞を用いた TCID₅₀ 法で測定した。

C. 研究結果

- 1) 細胞増殖能：alamarBlue™ を加えた各血清を含む培地における 1, 3, 5, 7 日目の蛍光強度を蛍光波長 590/544 で測定した。ニワトリ血清、豚血清を加えた培地では従来の NCS を含む培地とほぼ同様な数値を示した。
- 2) 細胞形態：ニワトリ血清を含む培地で増殖させた細胞は NCS 培地とともにモノレイヤーな状態でボトルに付着した。一方、豚血清をもちいた培地では細胞の伸張が弱く、ボトルから剥離する傾向にあった。
- 3) AIK-C ウイルス増殖能：AIK-C ウイルス接種後 6 日目のウイルス力価は NCS 培地; 3×10^3 TCID₅₀/ml, ニワトリ血清培地; 10^4 TCID₅₀/ml であったが豚血清を含んだ培地を用いた細胞は剥落が

激しく、ウイルスは検出されなかった。

会 学 術 集 会 ・ 総 会 、 千 葉 、
2002/11/30-12/1

D. 考察

近年、ワクチン等生物製剤の製造に使用する生物由来製品の規制が厳格になり、特にBSEの流行以来、牛由来製品を使用しない方向で製造工程の見直しがなされている。生ウイルスワクチンの製造には通常、牛血清を添加した培地で培養する初代培養細胞が用いられており、可能ならば牛血清を用いない製法の確立が望まれている。今回はニワトリ血清、豚血清を用いた培地でニワトリ胚細胞の細胞増殖能、ウイルス産生量を検討したところ、ニワトリ血清では従来の牛血清を用いた結果とほぼ同等の結果を得た。今回の結果ではウイルス産生量は通常の産生量よりともに低かったが、条件検討により産生量の増加は可能と思われる。鳥類であるニワトリは生物種として牛よりもヒトから遠く、交差する感染因子も少ない可能性がある。また、プリオンの報告はない。比較的安価でもあり、小型であるので屋内飼育等による品質の管理も容易であると想像される。将来、麻疹ワクチン等のニワトリ胚細胞を用いるワクチンの製造工程に牛血清の代用としてニワトリ血清を用いる事も可能と思われる。

E. 結論

ニワトリ血清を含む培地によるニワトリ胚初代培養細胞は麻疹ワクチンの製造に使用できる可能性がある。

F. 健康危険情報；北里研究所病原体等安全管理規定に従って行った。

G. 研究発表

1. 論文；なし
2. 学会発表；
 - 1) GFP 遺伝子挿入 AIK-C を用いた麻疹中和抗体測定法、藤野元子、中川正治、中山哲夫、新庄正宣、駒瀬勝啓、第50回日本ウイルス学会学術集会・総会、札幌、2002/10/16-18
 - 2) 麻疹ウイルスワクチン株、AIK-C を基盤にした多価ワクチンの可能性、駒瀬勝啓、飯嶋益巳、第6回日本ワクチン学

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得；なし
2. 実用新案登録；なし
3. その他；なし

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

分担研究者 桑原靖 デンカ生研株式会社

研究協力者 甲斐光 デンカ生研株式会社

研究要旨 人体用不活化ワクチンの製造用として使用される株化細胞（Vero、MDCK、GL37 等）の培養技術においてウシ胎児血清、仔ウシ血清及びウシ血清またはウシ血清由来物質を培地中に添加することが効率的で優れた技術であった。しかし、使用されるウシ血清等はその原産国に係らず将来に渡っても異常プリオン物質を含む可能性を完全に否定できない。そこで、本研究ではウシ血清やその由来物質等に代わり、未知の感染性・病原因子の迷入を排除できる代替物質の使用による株化細胞及びウイルス培養法を確立することを目的として、熱・化学安定性にも優れ、オートクレーブ可能な付着性細胞の増殖性に効果が期待される遺伝子組換えによる細胞接着性ペプチドである「プロネクチン」をコートしたマイクロキャリアビーズを使用して株化細胞（Vero 細胞）の無血清培養法について基礎検討を行った。

A. 研究目的

国内外において人体用不活化ワクチンの製造用としていくつかの株化細胞（Vero、MDCK、GL37 等）が利用されている。ワクチン製造のためにはそれら株化細胞の培養においてウシ胎児血清、仔ウシ血清及びウシ血清またはウシ血清由来物質を培地中に添加することが効率的で優れた技術であった。しかし、使用されるウシ血清等はその原産国に係らず将来に渡っても異常プリオン物質を含む可能性を完全に否定できないことから、より安全なワクチン製造法の開発を目的として、ウシ血清やその由来物質等に代わり、未知の感染性・病原因子の迷入を排除できる安全な代替物質の使用による株化細胞及びウイルス培養法の基礎検討を行った。上記の株化細胞はそのほとんどが付着性を有する細胞のため無血清培養法においても培地中にはウシ血清中に含まれるフィブロネクチン等の細胞接着

因子剤の添加が細胞の接着／増殖性などに効果的とされている。本研究では、新たに遺伝子組換えによる細胞接着性に優れた細胞接着性ペプチドであり、熱・化学安定性にも優れ、オートクレーブ可能な「プロネクチン」（三洋化成工業）をコートしたマイクロキャリアビーズを使用して株化細胞の無血清培養法について基礎検討を行った。

B. 研究方法

三洋化成工業株式会社より提供を受けたプロネクチンをコートしたポリスチレンマイクロキャリアビーズを用いて無血清培地での Vero 細胞での増殖性を検討した。対照とする細胞培養用基材は現在幅広く使用されている Cytodex 1（ファルマシア）を使用した。

以下に材料と方法を示す。

(材料)

(1)マイクロキャリアービーズ

- ・ 試験品：プロネクチン F コートポリスチレンビーズ (P n ビーズ 1001、LotR206001-B、三洋化成工業)
- ・ 対照品：Cytodex1 (ファルマシア)

(2)細胞

Vero 細胞 (ATCC より購入) 継代数 142 代、143 代

(3)培地

VP-SFM (インビトロジェン、無血清培地)

(4)培養容量

100mL (スピナーフラスコ、テクネ社)

(方法)

マイクロキャリアービーズの前処理については、プロネクチンコートビーズは PBS に浮遊し、オートクレーブ滅菌を行った後に培養に供した。また、Cytodex 1 は常法に従い膨潤操作を行った後にオートクレーブ滅菌を行い培養に供した。細胞培養は VP-SFM 培地に置換後、Vero 細胞を 2×10^5 cells/mL にて播種し、培養 3 日目以降顕鏡と細胞数を計測して細胞の増殖性を検討した。なお、マイクロキャリアービーズの濃度は Cytodex 1 を 4 g/L とし、プロネクチンコートビーズは Cytodex 1 と総培養表面積を合わせるために 24 g/L とした。

培養中のマイクロキャリアービーズの攪拌速度は共に 25rpm とし、培地交換は細胞播種 3 日目より毎日全量の 50% 交換法を採用した。

C. 研究結果

対照とする Cytodex 1 においては無血清培地 (VP-SFM) での Vero 細胞は培養 3 日目の顕鏡により全マイクロキャリアービーズへの細胞付着率は 50% 程度に留まり、培養 8 日目では細胞増殖が観察されたマイクロキャリアービーズは 5% 程度となった。細胞増殖性について総細胞数は播種時 2×10^7 cells に対して培養 3 日目では 0.6×10^7 cells、培養 8 日目では 1.6×10^7 cells と無

血清培地中での Cytodex 1 への細胞付着性が低いことに起因して Vero 細胞の増殖性が維持できなかった。

プロネクチンコートビーズによる培養では培養 3 日目での顕鏡により、大部分のプロネクチンコートビーズ上に Vero 細胞の付着が観察されず、プロネクチンコートビーズ上に細胞同士のクラスター形成が認められた。細胞増殖性については総細胞数は播種時 2×10^7 cells に対して培養 3 日目では 0.2×10^7 cells、培養 8 日目では 1.1×10^7 cells と培養初期のプロネクチンコートビーズ上への細胞付着性が低く、細胞増殖性は十分な効果が得られなかった。

D. 考察

無血清培地 (VP-SFM) を使用した場合の付着性細胞の増殖性検討を行うために、細胞性接着性に優れた遺伝子組換え合成蛋白質であるプロネクチンコートビーズを利用して Vero 細胞の増殖性を検討した。プロネクチンコートビーズを利用することで無血清培地でも Vero 細胞、MDCK 細胞等は血清添加培地での培養に匹敵する増殖性が維持できるとの報告があるが、今回の結果では Vero 細胞の増殖性に効果が得られなかった。その原因は主にプロネクチンコートビーズ上への Vero 細胞の付着性が低く、そのため細胞の十分な増殖が得られなかったと考えられる。プロネクチンコートビーズはポリスチレンビーズであるため Cytodex1 とはビーズ表面上の平滑性が異なるため、細胞播種時の培養条件 (攪拌速度等) の至適化と細胞の馴化を行う必要があり、ビーズ表面上への細胞付着性を向上させることで血清添加培地と同等な細胞増殖性が得られるものと期待される。

E. 結論

ウシ血清やその由来物質等に代わりに未知の感染性・病原因子の迷入を排除できる代替物質の使用による株化細胞及びウイルス培養法の確立を目的に、熱・化学安定性にも優れ、

オートクレーブ可能な、付着性細胞の増殖性に効果が期待される遺伝子組換え細胞接着性ペプチドである「プロネクチン」をコートしたマイクロキャリアビーズを用いて Vero 細胞の無血清培養法について基礎検討を行った。今回の検討結果ではプロネクチンコートビーズ上への Vero 細胞の付着性が低く、無血清培地（VP-SFM）での Vero 細胞の培養は十分な増殖性が得られなかったが、ビーズ表面上への Vero 細胞付着性を向上させるために細胞播種時の培養条件（攪拌速度等）の至適化を行う必要があり、加えて無血清培地への細胞の馴化を行うことで血清添加培地と同等な細胞増殖性が得られるものと期待される。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

無血清培地を用いた生ワクチン製造法の検討

分担研究者 末原章宏 武田薬品工業株式会社(光工場)

研究要旨 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に係り、“牛血清を使用しない製造方法”としてインビトロジェン社製の無血清培地〔VP-SFM、Opti-SFM、Opti-MEM〕を用い、ニワトリ胎児及びウサギ腎から採取した細胞の増殖性並びにウイルス増殖性について検討した。また、併せて“トリプシンを使用しない製造方法”についても検討を行った。

“牛血清を使用しない製造方法”としてトリプシン消化した細胞を無血清培地〔VP-SFM、Opti-SFM、Opti-MEM〕で培養した結果、ニワトリ胎児由来細胞は細胞増殖が確認されたが、ウサギ腎由来細胞では細胞増殖が確認されなかった。増殖性が確認されたニワトリ胎児由来細胞に麻しんワクチン株ウイルスを接種し培養した結果、麻しんウイルスによる細胞病変が認められ、ウシ血清を用いて培養したニワトリ胎児由来細胞と同等のウイルス増殖が確認された。

“トリプシンを使用しない製造方法”として、ニワトリ胎児をホモジナイザーで物理的に破砕して採取した細胞を、無血清培地で培養したときの細胞増殖性並びに麻しんワクチン株ウイルス接種したときのウイルス増殖を検討した結果、ホモジナイザーの回転数と破砕時間を調整することで細胞採取ができ、細胞増殖も認められることが判明した。しかし、増殖した細胞に麻しんウイルスを接種すると、麻しんウイルスの細胞病変が観察されなかった。

A. 研究目的

乾燥弱毒生麻しんワクチン、乾燥弱毒生風しんワクチン及び乾燥弱毒生おたふくかぜワクチンの製造工程には牛由来成分として牛血清が用いられていることより、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として“牛血清を使用しない細胞培養及びウイルス培養の可能性について”検討を行った。

また、牛由来成分ではないが、“トリプシンを使用しない細胞培養及びウイルス培養の可能性について”併せて検討を行った。

B. 研究方法

1. 牛血清を使用しない細胞培養及びウイルス培養の検討

牛血清を使用しないで、ワクチン製造が可能かを検討するため、現行製造方法と同様に、トリプシン消化して得た 11 日齢卵胎児細胞及びウサギ腎細胞を、インビトロジェン社製の市販無血清培地〔VP-SFM、Opti-SFM、Opti-MEM〕で浮遊し、37℃で培養して細胞状態を観察した。増殖が確認された細胞を用いワクチン株ウイルスを接種し、現行の製造方法と同様に

199 液に交換してウイルス培養を実施した。

2. トリプシンを使用しない細胞培養及びウイルス培養の検討

トリプシンを使用しないで、ワクチン製造が可能かを検討するため、細胞採取に適した 10 日齢卵と 11 日齢卵のニワトリ胎児を用い、ホモジナイザー破砕条件の検討として、回転数 10,000rpm × 破砕時間 60sec、120sec、180sec、11 日齢卵の胎児を用い、回転数 5,000rpm、10,000rpm、15,000rpm × 10sec でホモジナイザー破砕して得られた細胞を、VP-SFM、Opti-SFM、Opti-MEM で浮遊後、培養容器に入れ、37℃で培養して細胞状態を観察を行った。

処理条件として、回転数 5,000rpm × 10sec で破砕して得られた 11 日齢卵と 12 日齢卵の胎児細胞を、VP-SFM、Opti-SFM、Opti-MEM で浮遊後、培養容器に入れ、37℃で培養して細胞状態を観察し、増殖が確認された細胞に麻しんワクチン株ウイルスを接種し、199 液に交換してウイルス培養を行った。

C. 研究結果

1. 牛血清を使用しない細胞培養及びウイルス培養の検討

“接着”及び“増殖”は、細胞を培養する容器内側の細胞接着可能な面積（下面）に細胞が接着している面積を%で表している。

1) ニワトリ胎児における無血清培地（Opti-SFM培地）での細胞培養とウイルス培養

培養 2 日後に容器内の約 10%に細胞が接着し、培養 6 日後には約 50%~70%に増殖していた。細胞の状態は良好であった。また、培養 6 日後の細胞に麻しんワクチン株ウイルスを接種し、翌日、199 液に交換し、以後 7 日間ウイルス培養し、集液後、液中のウイルス含量を測定した。集液時の細胞状態も良好で、麻しんウイルス特有の細胞病変が観察され、測定したウイルス含量値は 4.2~5.9 log TCID₅₀/0.5mL であった。

2) ニワトリ胎児における各種無血清培地での細胞培養とウイルス培養

各種無血清培地によるニワトリ胎児細胞培養結果を表 1 に示した。VP-SFM培地は、培養 1 日後に容器内の約 75%に細胞が接着し、2 日後には約 100%に増殖していた。また、Opti-SFM培地も同様に、培養 1 日後に容器内の約 75%に細胞が接着し、2 日後には約 100%に増殖していた。細胞状態はいずれの培地も良好であった。一方、Opti-MEM培地は、培養 1 日後に容器内の約 75%に細胞が接着したが、2 日後でも約 75%程度の増殖であり、前者に比べ増殖が低い傾向であったが、細胞状態は良好であった。しかし、ウサギ腎由来細胞では細胞培養ができなかった（成績未記載）。

これら培地で培養した培養 1 日後の細胞に麻しんワクチン株ウイルス接種し、199 液に交換してウイルス培養を実施した結果、集液時の細胞状態はいずれの培地も良好で、麻しんウイルス特有の細胞病変が観察されたが、ウイルス含量試験は実施しなかった。

表 1 ニワトリ胎児細胞培養結果

	VP-SFM	Opti-SFM	Opti-MEM
培養 1 日	約 75%	約 75%	約 75%
培養 2 日	約 100%	約 100%	約 75%
状態	良好	良好	良好

2. トリプシンを使用しない細胞培養及びウイルス培養の検討

1) ホモジナイザー破砕処理条件の設定

ホモジナイザーによる細胞採取法として、ニワトリ胎児を用い、胎児日齢と破砕条件について検討した。

表 2 に示したように、回転数 10,000rpm において、使用した胎児の日齢を比較すると、いずれの破砕時間も、Opti-SFM培地による培養 2 日後の容器内の細胞接着量は 11 日齢卵群が良く、7 日間の培養で高い細胞増殖が確認されたことから、11 日齢卵胎児が適していると思われた。また、破砕時間はいずれの日齢も、60sec. で得た細胞の培養結果が良かったことから短時間が良いと思われた。

表 2 細胞増殖における胎児日齢と破砕条件

①10 日齢卵胎児

培養	処理時間(sec.)		
	60	120	180
2 日	約 5%	非接着	非接着
7 日	非接着	非接着	非接着

②11 日齢卵胎児

培養	処理時間(sec.)		
	60	120	180
2 日	約 20%	約 5%	非接着
7 日	約 80%	約 35%	非接着

上記の検討結果より、11 日齢卵胎児を用い、処理時間を更に短く 10 秒としたときの回転数の検討を行った結果、回転数も低いほうが細胞増殖性がよい傾向にあった。また、無血清培地の種類は VP-SFM 及び Opti-SFM で増殖性がよかった（表 3）。

表 3 細胞増殖における破砕時間と培地の影響

①5,000rpm×10sec.

培養	培地		
	VP-SFM	Opti-SFM	Opti-MEM
2 日	約 40%	約 60%	約 90%
3 日	約 95%	約 100%	約 80%

②10,000rpm×10sec.

培養	培地		
	VP-SFM	Opti-SFM	Opti-MEM
2 日	約 40%	約 30%	約 30%
3 日	約 50%	約 50%	約 60%

表3 続き
③15,000rpm×10sec.

培養	培地		
	VP-SFM	Opti-SFM	Opti-MEM
2日	約10%	約10%	約10%
3日	約45%	約30%	約30%

2) ホモジナイザー破碎で採取した細胞でのワクチン株ウイルス培養

1) の結果に基づき、5,000rpm×10sec.の破碎条件で、11日齢卵及び12日齢卵胎児から採取した細胞の細胞培養とワクチンウイルスの培養を実施した結果、11日齢卵と12日齢卵胎児の日齢差を比較は、細胞培養したときの接着及び増殖に差はみられなかったが、培養した細胞状態(汚さ)が異なり、12日齢卵胎児より11日齢卵胎児を使用するのが良いと思われた。また、培養液の違いによる接着及び増殖に差が見られないことから、いずれの培養液も使用は可能であると思われた。

次に、11日齢卵胎児2日培養細胞にそれぞれ、麻しんワクチン株ウイルス及びおたふくかぜワクチン株ウイルスを接種し、9日培養後の細胞の状態を観察した結果、いずれの培地においても培養日数が進むに従い、劣化が顕著であった。また、12日齢卵胎児2日培養細胞に、おたふくかぜワクチン株ウイルスを接種し、9日培養後の細胞の状態を観察した場合も同様に、いずれの培地においても培養日数が進むに従い、劣化が顕著であった。その結果を表4に示した。

表4 細胞増殖における胎児日齢とウイルス培養
①11日齢卵胎児

培地	細胞培養		ウイルス培養時の細胞状態
	1日	2日	
VP-SFM	約35%	約75%	劣化が激しい
Opti-SFM	約15%	約65%	劣化が激しい
Opti-MEM	約15%	約75%	劣化が激しい

②12日齢卵胎児

培地	細胞培養		ウイルス培養時の細胞状態
	1日	2日	
VP-SFM	約20%	約70%	劣化が激しい
Opti-SFM	約20%	約70%	劣化が激しい
Opti-MEM	約20%	約70%	劣化が激しい

D. 考察

牛血清を使用しない新たなワクチン製造方法として、市販されている無血清培地^{注)}を使用し牛血清を使用しない製造方法とトリプシンを使用しない製造方法を検討した。

今回の検討では播種する細胞数を調整しなかったため、実験によりバラツキがあったものの、ニワトリ胎児由来の細胞は無血清培地を使用することで、細胞培養とその後のウイルス培養が可能であり、現行の牛血清を用いた培養細胞と同等であったことより、麻しんワクチン製造の可能性が示唆された。

また、おたふくかぜワクチンも同じ細胞を同様の方法で使用する製造方法であることから、ワクチン製造は可能であるものと推測された。

しかしながら、ウサギ腎細胞を使用する風しんワクチンについては、細胞培養自体ができなかったことから、現状においてワクチン製造への適用は不可能と思われる。

トリプシンの代わりに、ニワトリ胎児をホモジナイザー処理し検討した結果、無血清培地での培養可能な細胞が得られることが確認された。しかし、得られた細胞を、培養して観察すると、細胞の状態が、トリプシン消化法で得た細胞と多少異なり、ウイルス培養期間中の細胞維持が不安定であり、ウイルス培養に必要な培養日数が得られずウイルス増殖が確認できなかった。これは、トリプシン消化では採取されない、例えば、骨細胞等の影響、あるいは、ホモジナイザー破碎による物理的な要因、さらには、培地に起因するものか今回の検討からは明らかにできなかった。

トリプシン使用しない生ワクチンの製造方法を確立するには、ホモジナイザーの破碎条件あるいは化学的処理方法を含めた細胞の採取方法の検討及び採取した細胞の培養条件、ウイルスの培養条件を検討することが必要であると考えられた。

注) 培地組成は、インビトロジェン社と秘密保持契約を行っていないため、未入手

E. 結論

1. 牛血清を使用しない製造方法として、麻しんワクチン及びおたふくかぜワクチンの製造の可能性が示唆された。
2. トリプシンを使用しない生ワクチン製造方法は今後更に検討が必要であると思われる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし。
2. 学会発表
なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
予定なし。
2. 実用新案登録
予定なし。
3. その他
特記なし。

刊行物研究成果の刊行に関する一覧表

T. <u>Takasaki</u> , M. Nawa, K.Yamada, A. Takeda, I. Kurane	Evaluation of dengue IgM detection tests using sera from patients with autoimmune diseases.	Journal of Virological Methods	102	61-66	2002
K. Yamada, T. <u>Takasaki</u> , M. Nawa, I. Kurane	Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection	Journal of Clinical Virology	24	203-209	2002
Y. Yamamoto, T. <u>Takasaki</u> , K. Yamada, M. Kimura, K.Washizaki, H.Yoshikawa, A. Hitani, T. Nakamura, A. 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, <u>Takasaki T</u> , 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
A. Yamamoto, M. Nakayama, Y. Kurosawa, K. Sugo, H. Karasawa, T. Ogawa, T. <u>Takasaki</u> , M. Tashiro, I. 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
Tsutsumi T, Suzuki T, <u>Shimoike T</u> , Suzuki R, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Matsuura Y, Koike K, Miyamura T.	Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor alpha modulates its transcriptional activity	Hepatology	35 (4)	937-946	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

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デング熱の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	医学書院	2003 版	143- 144	2002
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 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
下池貴志	「知っていますか？食べ物でおこるA型肝炎」	食と健康 (社 日本食品 衛生協会)	11 月号	8-17	2002