

厚生労働科学研究費補助金

食品安全確保研究事業

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 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 田代真人

平成 16(2004)年 3 月

## 目 次

平成 15 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\_\_\_\_\_ P. 1  
主任研究者：田代真人

### 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\_\_\_\_ P. 4  
加藤篤：協力研究者 久保田耐 木所稔 田代真人
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\_\_\_\_\_ P. 9  
齋藤義弘：協力研究者 大槻紀之
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\_\_\_\_\_ P. 13  
海野幸子：協力研究者 加藤宏幸 大槻紀之
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\_\_\_\_\_ P. 16  
高崎智彦
5. 無血清培地を用いた培養細胞による A 型肝炎ワクチン製造法の開発に関する研究\_\_\_\_\_ P. 21  
武田直和：協力研究者 下池貴志
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\_\_\_\_\_ P. 25  
伊藤治：協力研究者 荒尾恵 田口邦史 大槻紀之
7. A 型肝炎ワクチン製造の無血清培養に関する検討\_\_\_\_\_ P. 30  
大隅邦夫
8. 無血清培地を用いたウズラ胚細胞及び風しんウイルス（松浦株）の培養方法の検討\_\_\_\_ P. 34  
真鍋貞夫：協力研究者 斉藤裕之
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\_\_\_\_\_ P. 36  
駒瀬勝啓
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に関する研究\_\_\_\_\_ P. 38  
桑原靖：協力研究者 甲斐光
11. 牛血清無添加による培養細胞で得た麻しんウイルスの遺伝子塩基配列に関する研究\_\_\_\_ P. 42  
末原章宏

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

---

P. 44

Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷（別添）

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、本年度は昨年度に引き続き、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)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。

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  
海野幸子 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  
末原章宏 武田薬品工業株式会社

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過ごされる可能性がある。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きない。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

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

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。

## 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) 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。

## C. 研究結果

第1年目の研究に引き続き、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、現行使用の株化細胞の継代には、無血清培地での長期間培養は困難な場合が多い。しかし、維持培地として無血清培地を用いても、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、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、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。今回の成績から、現行の細胞を無血清培地で維持しても、ワクチンウイルスの増殖性には大きな影響を与えないことが示唆された。今後はこれらのウイルスの性状が変化していないことを示す必要がある。

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しう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。

#### F. 健康危害情報

特に情報はない。

#### 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

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金(食品安全確保研究事業)  
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

協力研究者 久保田 耐、木所 稔、田代真人

**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感染性因子迷入の危険がつきまとう。市販の無血清培地は、従来の血清入り培地と同等以上に CEF 細胞が培養でき、ワクチンウイルスの増殖度もよい。そこで、市販ワクチン等を用いて増えてくるウイルスに従来の血清培地と無血清培地との間で違いがあるかを検討したところ、試した継代方法の範囲内では明らかな差は認めなかった。

#### 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他動物由来物質によ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鶏発育卵から採取した胚を繊維芽細胞(CEF)にし、種ウイルスを接種して増殖させて製造される。この CEF の培養過程で、牛血清を含む培地が用いられているため、牛血清に由来する感染性因子迷入の危険性を伴っている。そこで、平成 14 年度の本課題では牛血清を含まない市販の無血清培地を用いて CEF の培養及びおたふくかぜ生ワクチンの増殖が遜色なく可能であることを示した。一般に RNA ウイルスはその複製過程で用いられるウイルス RNA ポリメラーゼの忠実度が低いために、たとえ単一ブラックから始まったクローン化ウイルスであったとしても継代の過程で変異が蓄積し、あるいは一定のウイルス集団を形成していると考えられている。そこで今年度は、無血清培地を使った CEF と従来の血清入り培地を使った CEF では、構成される細胞の集団が異なることに由来するある種の選択圧がかかって、増えてくるワクチンウイルス集団に違いが生じることが有るか否かを検討することを目的とした。

#### B. 研究方法

均一な細胞株とは異なり、初代培養細胞の作成、維持にあたっては、用いる培養方法を変更することにより、変更前の細胞集団とは異なった細胞集団を選択的に培養してしまう可能性がある。またこの一方で、弱毒生ワクチンは、ウイルスが変異しやすいという性質を利用して異なる宿主、異なる培養条件で増える特定のウイルスを選別して開発されてきた経緯をもつ。また、この選別されたウイルスもウイルス遺伝子の複製酵素である RNA ポリメラーゼの忠実度の低さから継代の過程でわずかな変異が蓄積し遺伝的にはヘテロな

ウイルス集団となっていると考えられている。したがって、培養方法の変更により変更前とは異なる細胞集団でワクチンウイルスを増殖させると、異なる細胞集団でより増えやすいウイルス変異体を誘発する選択圧をかける可能性があり、ワクチン株の性質を変えてしまうというワクチンの品質管理上の恐れがある。そこで、今年度は、この危険性がどの程度高いものなのかを確かめる目的で以下の検討を行った。

(試験 1)

10cm シャーレに  $8 \times 10^6$  細胞/plate にした鶏胚由来の初代培養細胞(CEF)を牛血清を含む従来の増殖培地(GM; 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、国内で使われている A、B、C のワクチン及び D ワクチン候補株を感染価 0.002 で接種して3日間培養した。A についてのみ培養上清中のウイルスのブラックサイズを任意に50個測定し、そのサイズの分布を測定した。

(試験 2)

A、B、C、D を感染させた試験 1 の試料からそれぞれの培地を除き、新しい培地に入れ換えて継続して再度3日間培養を行い、A についてそれぞれの培養上清中のウイルスのブラックサイズを任意に50個測定し、そのサイズの分布を測定した。

(試験 3)

A、B、C、D を感染させた試験 1 の感染細胞をトリプシンで消化し、 $4 \times 10^6$  細胞/plate になるように新しい10cm シャーレに移し、それぞれを新しい培養液と共に3日間培養した。A についてのみ培養上清中のウイルスのブラックサイズを任意に50個測定し、そのサイズの分布を測定した。

(試験 4)

A、B、C、D を試験 1 から 3 の条件で感染させて得た培養上清のウイルスにブラックを作らせた。その中から任意に5個の独立したブラックをピックアップし、ウイルス RNA を抽出するとともに、SH 遺伝子領域の

蛋白質読み枠(ORF)を含む527塩基の領域を RT-PCR 法により増幅しこの断片の塩基配列を決定して、それぞれの培養条件の違いにより塩基配列に違いが生じているかどうかを遺伝子のレベルで検討した。

(ブラック試験法)

組織培養用6穴プレートに Vero 細胞を均一な細胞シートとなるように静置培養し、培養3日後に、様々な培養条件で培養した A ムンプスワクチン株の培養上清を10倍段階希釈して、それぞれ0.1mlを接種し、0.8%アガロース培地を重層して37℃で培養した。接種後9日後にニュートラルレッドを含むアガロース層をさらに重層して細胞を染色した。その後、細胞をホルマリン固定し、ブラックサイズを計測してヒストグラムと共に平均サイズを求め、その平均値の有意差をF検定を用いて検討した。

A、B、C、Dを接種して単一ブラックからのウイルス RNA を抽出する場合には、ニュートラルレッド染色後、直ちにブラック部分を削り取って材料とした。

### C. 研究結果

昨年度の本課題で無血清培地と従来の血清を含む増殖培地で培養した CEF を比べると、無血清培地の方が細胞の増殖がよく、それぞれに A と B 二つのワクチンウイルスを感染させると A ワクチンは、5日後に、B ワクチンでは3日後にウイルス力価の最大値を示し、その値はどちらも無血清培地の方が0.1~0.8 log 程度高く、7日後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ものの、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ことを報告した。今年度は、増えてくるウイルスに質的な差が生じるのか否かの観点から試験を行った。

血清培地と無血清培地で培養している CEF に A ワクチンを感染させた3日後の感染細胞像は、どちらも特に大差ないが(図1;実験1)、それぞれを新しい培地に交換し、更に3日間培養すると明らかに無血清培地で培養した方の細胞に丸く盛り上がったような細胞変性像が見られた(図1;実験2)。培地を交換するだけではなく、細胞をプレートから剥がして数を揃えて新しいプレートで、且つ新しい培養液で更に3日間継代培養したものでは、血清培地で大きく広がった細胞が見えるのに対して、無血清培地ではより小さな密度の高い細胞になっていたが、細胞の間に間隙がみられるような像が多く見られた(図1;実験3)。これらの培養細胞像は、基本的に無血清培地の方が、血清培地に比べて細胞の増殖もウイルスの増殖もよいという昨年度の報告を裏付けるものであった。

ウイルスが培養方法により異なる集団になり得るかどうかを検証するために、血清入り培地と無血清培地で CEF を培養して得た実験1から3までの培養上清中のウイルスを Vero 細胞に接種し、ブラックを作らせそのサイズを比較した(図2)。血清入り培地と無血清培地で3日間培養したウイルスのブラックサイズの分布は、血清入り培地より無血清培地で培養したウイルスにより小さなサイズのブラックが多く含まれる様に見られ、集団として差があるように見えた(図2;実

験1)。ところが、新しい培地に交換して更に3日後の培養上清中のウイルスのブラックでは、その差が広がるどころかむしろ小さくなり、その中央値の差も小さいものとなっていた(図2;実験2)。また、細胞を継代して培養したもので同様にブラックのヒストグラム上の差は実験1より小さいものになっていた(図2;実験3)。実験3におけるブラックのそれぞれの平均値は1.35 mm(血清入り培地)と1.23 mm(無血清培地)で、有意差検定を行っても互いの間に有意さは認められなかった( $\alpha=0.05$ ) (図3)。実験1の結果と実験2、実験3の結果から、実験ごとの手技や培養条件の何らかの違いによりブラックサイズが異なるようになり、50個程度の測定では実験上のばらつきの方が多くてウイルスの集団としての違いを反映させるような試験として位置づけることはむずかしい事が分かった。

そこで、次に遺伝子による検討を行った。ムンプスウイルスは SH 遺伝子に変異が入りやすい事から、現在ではこの遺伝子を用いてウイルスの株型別が行われている。そこでこの SH 遺伝子に着目してそれぞれの培養条件で増やしたウイルスの塩基配列を比較することを試みた(図4)。

その結果、無血清培地1代3日間培養のウイルス(図4;実験1)と無血清培地で培地交換後3日間後のウイルス(図4;実験2)それぞれ1クローンで1塩基の置換が認められた。これらの塩基置換箇所は異なっており、いずれも SH 蛋白質読み枠内のアミノ酸置換を伴わない変異であった。しかし、これらの変異が異なる培養条件のために異なるウイルスが増えてきた事を示す理由と考えるには証拠に乏しいと思われた。

そこで、同じ実験を他のワクチン B、C 及びワクチン候補株 D についても追加して行った。B において血清入り培地、実験1の1代3日間培養のウイルス由来の1クローンで1塩基の置換が認められた(結果未表示)。この置換箇所も蛋白質読み枠の外側に位置し、アミノ酸置換を伴わない変異であった。しかし、実験2、実験3では変異体は認められなかった。また C 及び D の感染培養上中のウイルスには、塩基配列を決定した5例中に変異体はいずれも認められなかった(結果未表示)。

### D. 考察

市販の合成無血清培地 Opti-PRO は、CEF の維持増殖培地として従来の血清入り GM 培地と同等以上に利用できる。また、調べた A、B、C、D の4つのおたふくかぜワクチン及びその候補株は、いずれも無血清培地でよく増殖し、従来の培地に劣ることがなかった(一部結果未表示)。このように優れた性質を持つ無血清培地ではあるが、発育鶏卵の胚という本来雑多な細胞集団から始められる CEF は、従来の血清入り培地と無血清培地では異なる細胞集団から構成される可能性を持つ。また、この一方でワクチン株といっても、本来的に忠実度の低いウイルス複製酵素を用いて増殖するウイルスは、遺伝子的にはけっして均一ではなく、ある一定の集団を作っていると予想される。従って、無血清培地使用により異なる細胞集団から構成される可能性の



ある細胞でこれらのウイルス集団を増殖させた場合には、種ウイルス集団と増殖して増えてきたウイルス集団が異なる可能性を否定できない。もし、そのような事が起ればワクチンの性質を変える事になり、ワクチンの品質管理上大きな問題となる。そこで、このような差が生じる可能性がどの程度高いのかを調べる目的で、従来血清入り培地と無血清培地で CEF を作り、それに A、B、C、D の4つのムンプスウイルスを接種して、更に条件を変えて培養し評価する事を試みた。

それぞれの培養条件で得られた培養上清中のウイルスにブラックを作らせ、その大きさの分布に有意差が生じるかどうかを検討したが、50個という限られた範囲内では、実験毎のぶれの範囲の方が大きくそれぞれの培養条件でブラックサイズに有意差があるとは言い切れなかった。すなわち、1ないし2回という限られた継代歴、あるいは3ないし6日間という時間内では無血清培地を使ってもブラックサイズ上の顕著な差は生じるとは言い得ないことが示された。

また、次にそれぞれの培養条件で得られた培養上清中のウイルスにブラックを作らせ、そこから任意に5個を選んでウイルス RNA を抽出し、最も変異の起こりやすい SH 遺伝子部分の塩基配列を比較して、遺伝子の上から差を検出しようと試みたが、従来血清入り培地と無血清培地による違い、あるいは培養方法による顕著な違いは認められなかった。この点から、それぞれ5つのウイルスの塩基配列で、且つ SH 遺伝子で見るという制限内では、無血清培地を用いても血清培地を用いても得られるウイルスに有意差が生じるとは言え得ないことが示された。

今回の実験は、A、B、C、D の4つのムンプスウイルスを血清入り培地と無血清培地で作成した鶏初代培養 CEF に接種し増殖させても、得られる培養上清中のウイルスに(1)ブラックサイズ、(2)SH 遺伝子配列の二つの指標で見ると顕著な差は生じるとは言えないことを示し、従来血清入り GM 培地と同程度に無血清培地を使用してワクチンが生産できる可能性を示した。他動物由来物質をワクチンの生産工程から除き、そこから由来する可能性のある感染性因子を除くためには、無血清培地の使用を検討することは重要なことであり、今回の結果はそれをさらに進めるいい材料になるものと思われる。しかし、ワクチンの品質管理の観点から、今回の様な限られた条件下で顕著なウイルスの形質上の差が見られなかったとするだけでは不十分であり、今後さらに継代数を増やす、あるいは実験の再現性を含めて精度をあげる等のデザイン上の工夫が必要であると思われる。

#### 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製造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
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1 血清入り培地と無血清培地でのワクチン株接種像

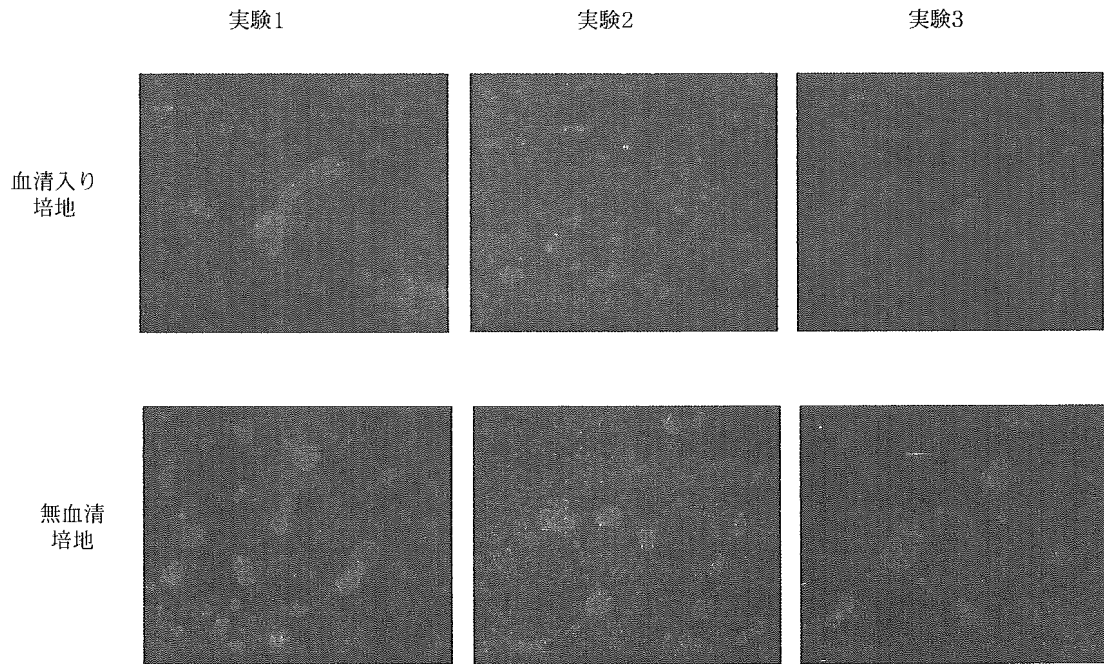


図2 血清入り培地と無血清培地でのプラーク直径のヒストグラム

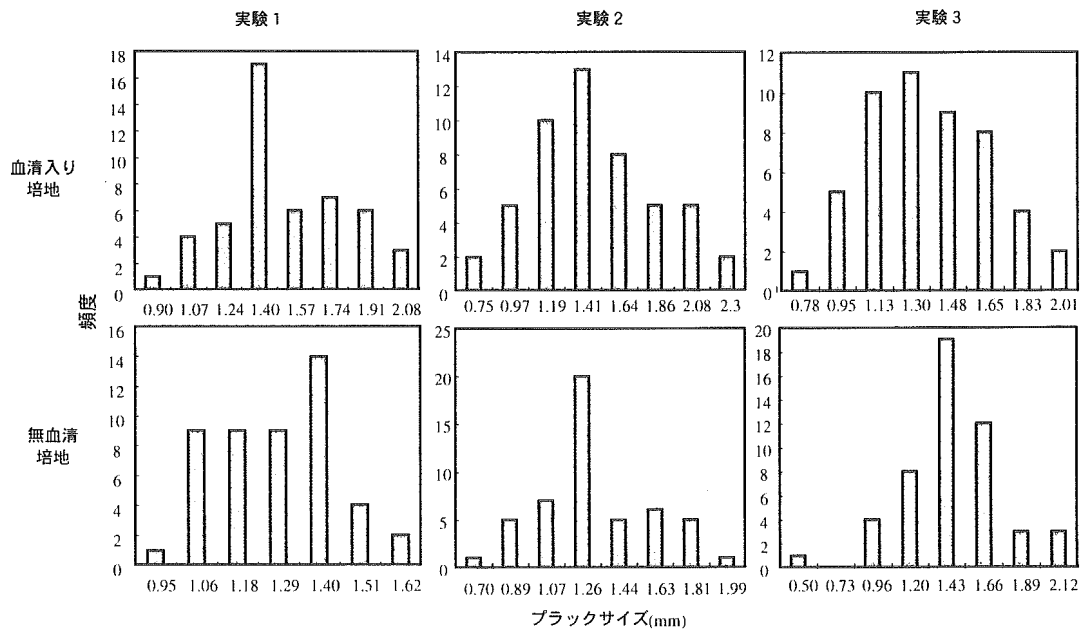


図3 プラークサイズの比較

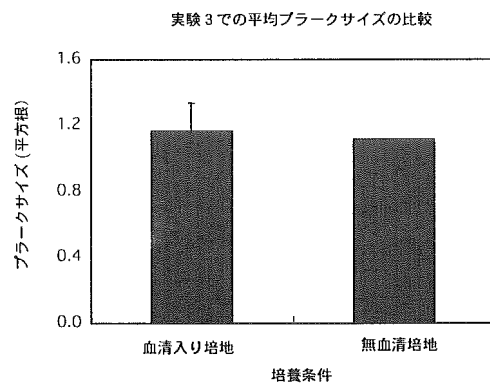


図4 血清入り培地と無血清培地で培養したウイルスのSH遺伝子の塩基配列

	SH	1	ATTCATCCTGCATTGAGAAAAGATTAGAAAAAACTAAATTAAGAATGAATATCCTGGGTCGTAACGCTCTCGTGACCTGCCGTTGCACTATGCCGGCGATCCAACCTCCCTTATACC	120
	1A#1	1	.....	120
	1A#2	1	.....	120
実験1	1A#3	1	.....	120
	1A#4	1	.....	120
	1A#5	1	.....	120
	1B#1	1	.....C.....	120
	1B#2	1	.....	120
実験2	1B#3	1	.....	120
	1B#4	1	.....	120
	1B#5	1	.....	120
	1B3+3#1	1	.....	120
	1B3+3#2	1	.....	120
実験3	1B3+3#3	1	.....	120
	1B3+3#4	1	.....	120
	1B3+3#5	1	.....	120
	*****			
		SH	121	CAACATTTCTATTGCTAATTCCTCTCTCTGATCATAAATTTGTATGTCTGGATTATATCAACCATCACTTACAAGACTGCGGTGCGACATGCAGCACTGCACCAGAGATCCCTCTCTCTC
	1A#1	121	.....	240
	1A#2	121	.....	240
実験1	1A#3	121	.....	240
	1A#4	121	.....	240
	1A#5	121	.....	240
	1B#1	121	.....	240
	1B#2	121	.....	240
実験2	1B#3	121	.....	240
	1B#4	121	.....	240
	1B#5	121	.....	240
	1B3+3#1	121	.....	240
	1B3+3#2	121	.....	240
実験3	1B3+3#3	121	.....	240
	1B3+3#4	121	.....	240
	1B3+3#5	121	.....	240
	*****			
		SH	241	GCTGGAGTCTCGATCACTCACTCTAGAAAGATCTCCAGTTGGGCAAGTCCCAATCCATCATTGAGAACAAAGCCGACTTTAAATGATGCCGTTCAATCATGAGACATAAAGAAAAATC
	1A#1	241	.....	360
	1A#2	241	.....	360
実験1	1A#3	241	.....	360
	1A#4	241	.....	360
	1A#5	241	.....	360
	1B#1	241	.....	360
	1B#2	241	.....	360
実験2	1B#3	241	.....	360
	1B#4	241	.....	360
	1B#5	241	.....	360
	1B3+3#1	241	.....T.....	360
	1B3+3#2	241	.....	360
実験3	1B3+3#3	241	.....	360
	1B3+3#4	241	.....	360
	1B3+3#5	241	.....	360
	*****			

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）  
分担研究報告書

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 3 部）  
協力研究者 大槻 紀之（国立感染症研究所ウイルス 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。初代鶏胚細胞の作製からウイルスの増殖まで動物由来成分を全く使用しないで麻しんワクチンウイルスの増殖が可能かどうかを検討した。動物由来成分を全く使用しなくても麻しんワクチンの製造は可能であると考えられるが、現行の製造法と同等のウイルス量を得るには、初代鶏胚細胞を作製する際使用される無血清培地に細胞増殖因子を添加するなどの考慮が必要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、その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。初代鶏胚細胞の作製からウイルスの増殖まで動物由来成分を全く使用しないで麻しんワクチンの増殖が可能かどうかを検討した。

**B. 研究方法**

10 日齢の鶏有精卵から胚を取り出し、PBS (-)で洗浄した後、以下の 2 法で、鶏胚細胞を単離した。  
1) 0.25% Trypsin 溶液で消化し、従来の牛血清を含む増殖培地（Eagle's MEM + 5% Calf serum + 10% Tryptose phosphate broth）に再懸濁する。  
2) Dispase (1 IU/ml in PBS, Invitrogen) 溶液で消化した細胞を PBS (-)で 2 回洗浄した後、

市販の無血清培地 (Opti Pro™ SFM, Invitrogen) に再懸濁する。1 穴当り  $3 \times 10^6$  個になるように各細胞を 6 穴の培養プレート上にまき、単層形成させた。得られ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°C の 5% 炭酸ガス培養装置内で培養した。接種後 2 日、5 日、7 日、10 日に各培養上清を採取し、ウイルスの力価測定まで -80°C 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した。培養上清中のウイルス力価は、Trypsin による消化後牛血清を含む従来の培地で培養した細胞を用いた場合には、接種後 10 日目まで上昇し続けた。一方 Dispase による消化后市販の無血清培地で培養した細胞を用いた場合には、7 日目前後をピークにウイルス力価の低下が認められた。接種後 7 日目のウイルス力価の比較では、Dispase と無血清培地群

の方が Trypsin と牛血清を含む培地群より 0.5~1 log 程度低いことが明かとなった。国内で市販されているワクチン株すべてについて同様の傾向が認められた。

#### D. 考察

前年度の報告書では、鶏胚細胞の細胞増殖性やワクチンウイルスの増殖効率、市販の無血清培地を使用した場合でも従来の血清入り培地と同等かそれ以上であることを報告した。しかしその時使用した細胞は鶏胚細胞を単離する際に、Trypsin と牛血清を含む培地が使用されており、完全に動物由来物質が排除されているわけではなかった。今回の実験が、初代鶏胚細胞の作製からウイルスの増殖まで動物由来成分を全く使用しないで行ったものと言える。鶏胚細胞の単離の際に牛血清と接触していれば増殖用培地を無血清培地に置き換えても、その後の細胞の増殖は維持でき、ウイルスの増殖にも全く支障はないと考えられる。しかしそうでない場合、現行の製造法に劣らないウイルス量を得るには、無血清培地に遺伝子組換え技法により菌類に作らせた細胞増殖因子を添加するなど考慮する必要があると考えられた。その他、dispase の洗浄が不十分であったために、その後の細胞の増殖やウイルスの増殖に悪影響を及ぼした可能性も否定はできない。

## E. 結論

ワクチンの原材料となる細胞以外動物由来成分を全く使用しない弱毒生麻しんワクチンの製造は不可能ではないが、現行の製造法と同等量のワクチンウイルスを得るためには、無血清培地に細胞増殖因子を添加するなどさらに検討する必要がある。

## 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

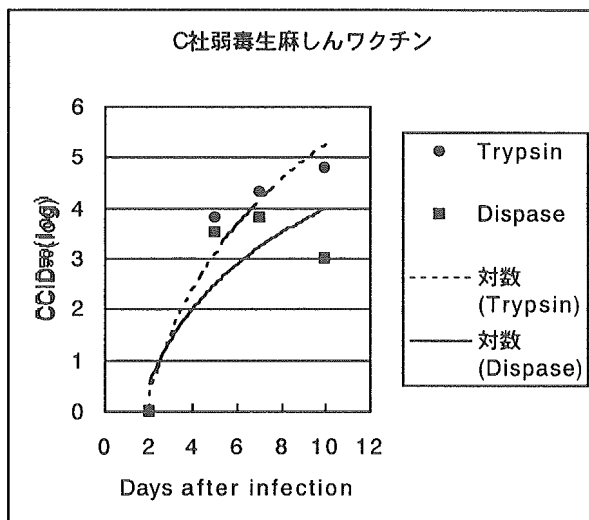
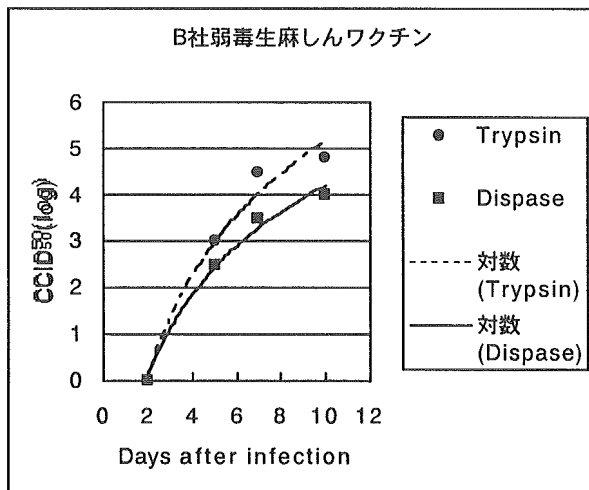
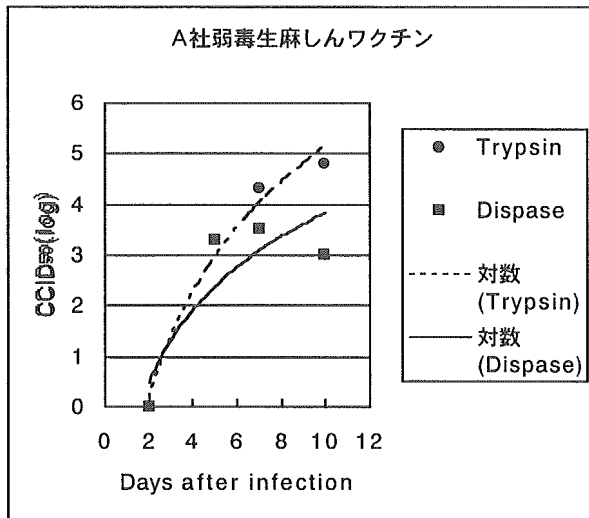


図 麻しんウイルスカ価の比較

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 海野幸子（国立感染症研究所）

協力研究員 加藤宏幸、大槻紀之（国立感染症研究所）

**研究要旨** 無血清培地 DM-201 単独、或いはそれに大豆由来ペプトンを添加した培地に馴化させた Vero 細胞でそれぞれ 3 代継代した風疹ワクチンウイルスの E1 遺伝子は、元のワクチンウイルス及び従来の牛血清を含む培地で培養された Vero 細胞で継代されたウイルスと同じ配列であった。また、これら継代を経たウイルスの RK13 細胞での増殖は元のワクチンウイルスと同様に高温で抑制された。DM-201 培地に馴化した Vero 細胞で無血清培地を用いて少なくとも 3 代継代を繰り返しても、ウイルスの性質は安定していると考えられた。

**A. 研究目的**

我国の風しんワクチンは製造許可株からワクチン製造まで 5 代の継代の範囲で、初代ウサギ腎細胞あるいは初代ウズラ胚細胞を用いて製造されている。一方、Vero 細胞は WHO により初代培養細胞に比べ混入する感染性因子の制御が容易であるという観点からワクチン製造に使用が認められているが、これまで風しんワクチンの製造に用いられたことはない。前年度までの研究で DM-201 培養に馴化した Vero 細胞において DM-201 培地のもとでワクチンウイルスが良く増殖し、無血清培養 Vero 細胞の有用性が示されたことから、本年度は風しんワクチンウイルスを DM-201 馴化 Vero 細胞で継代し、ウイルスの遺伝学的及び生物学的性状に与える継代の影響を調べることを目的とした。

**B. 研究方法**

DM-201 単独、或いはそれに 1% の大豆由来ペプトンを添加した無血清培地及び 5% の牛胎児血清を含む DME 培地で増殖させた 3 種類の Vero 細胞に風しんワクチンウイルス（武田 To-336 株）を m.o.i. 0.4 で接種し、35℃ で 5 日間培養した。感染後の培養液として、無血清系 2 者には細胞維持と同じ培地を、血清存在下培養された細胞には DM-201 を使用した。3 回凍結融解して得たウイルス液を新たな細胞に m.o.i. 0.4~2 で接種し、計 5 回の継代を繰り返した。得られた継代ウイルスの E1 蛋白をコードする領域を 4 つに分け、プライマーを用いて RT-PCR を行った。ABI 社のキット及びシーケンサーを用いて配列を決定し、元のワクチンウイルスのそれと比較した。また、RK13 細胞に m.o.i. 0.03 で感染させて、35、37、39℃での増殖性をワクチン株と比較した。



### C. 研究結果

1) 風しんワクチンウイルスを 2 種類の DM-201 培地馴化 Vero 細胞に感染させた時のウイルス増殖は、血清添加培養由来細胞と同等であり、昨年度の結果が再現された。更に 3 代まで継代を繰り返してもウイルスの増殖性は維持された (図)。血清添加培地由来の細胞では、2 代目から幾分ウイルスの収量が低下したが、これはこの継代時の m.o.i. が他より低かったためと推測された。

2) DM-201 培地馴化 Vero 細胞で無血清寒天 DM-201 培地のもとでは明瞭なプラークが得られなかったために、プラーク分離を経ずにウイルスの塩基配列の解析を行った。

3 種類の Vero 細胞で 3 継代されたウイルスから得られた配列はいずれも元のワクチンウイルスの E1 塩基配列と一致していた。一部バックグラウンドの高い試料が見受けられたが、センス鎖とアンチセンス鎖配列で一致していないことから変異配列の混在とは考えにくかった。

3) 39℃でのウイルス増殖が高かった感染後 3 日目の培養上清のウイルス量を比較に用いた。全てのウイルスの各温度での増殖量には、由来細胞及び継代数によらず、大差は認められなかった。また、それらの増殖性は 35>37>39℃の順に低下した。最も増殖量の高かった 35℃のウイルス量に対する 39℃の増殖量の比を算出すると、2 種類の DM-201 培地系で継代したウイルスの場合の比は継代数によらず元のワクチンのそれと同等で、39℃では増殖が顕著に抑制された (表)。血清存在下培養された細胞で増殖したウイルスの 35/39℃比及び継代を経た全てのウイルスの 35/37℃比が元のワクチンに比べ僅かに高かったが、実験の性質上有意な差と結論することはできなかった。

### D. 考察

今回行った PCR 産物の直接的な (クローニングを経ない) 配列解析は、主要配列を把握することには有利であるが、少量の混在配列を見逃す危険性を持つ。得られた配列のシグナルの強さが有る程度定量性を持つと仮定するならば、極めて明瞭な波形が得られた試料において混在配列の含有率は検出限界の 10~20%以下と思われる。従って少なくとも DM-201 培地馴化 Vero 細胞を用いて無血清培地において 3 代 (計 15 日) 培養したウイルスは、変異配列を PCR ダイレクトシーケンスの検出限界以下にしか持たないと結論できる。

風しんワクチンのマーカー試験の本態はワクチンウイルス株の 39℃での増殖が抑制されることに依ると考えられている。3 代継代してもウイルスの、特に高温で増殖性が高まるといふ変化は認められず、ウイルス増殖の温度感受性における安定性が確認された。

風しんウイルスの E1 蛋白上には、赤血球凝集、中和等ウイルスの生物活性を担う抗原部位が存在するため E1 は感染防御抗原として重要である。DM-201 培地に馴化した Vero 細胞で得られたウイルスは抗原性及びワクチンのマーカーに関わる性質において現在用いられているワクチンと同等であることが推測され、ワクチンとしての有効性が示された。

### E. 結論

無血清培地 DM-201 或いは 1%peptone 添加 DM-201 に馴化した Vero 細胞を用いた風しんワクチンの製造の可能性が示された。

### F. 健康危険情報

米国で BSE の発生が報告された。

## G. 研究発表

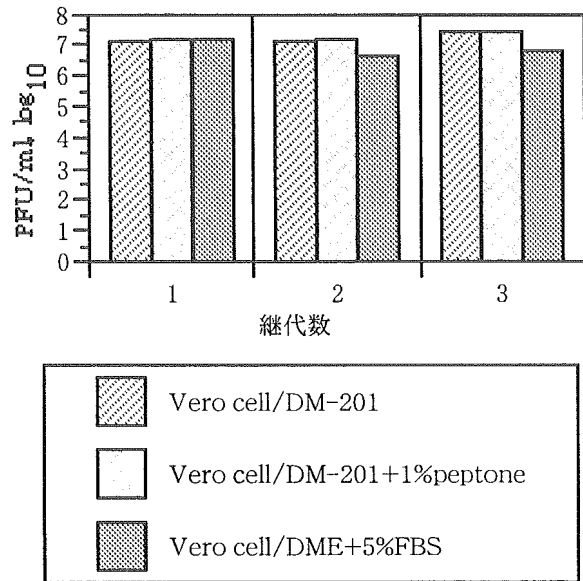
### 1. 論文発表

中島節子、海野幸子、加藤宏幸、田代真人、木添和博、濱野雅子、三春範夫 風疹のワクチン株と現在流行している野生株の遺伝子構造の比較 病原微生物検出情報 24: 9-10, 2003

### 2. 学会発表

海野幸子、加藤宏幸、田代真人、中島節子 風疹ワクチン株と現在流行している野生株の遺伝子配列及び抗原性の比較 日本ウイルス学会第51回学術集会

風しんワクチン株のVero細胞での継代



## 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

RK13細胞での増殖における温度感受性

ウイルスの由来	継代数	増殖比 (log <sub>10</sub> )	
		35/37	35/39
DM-201	1	0.5	3.2
	3	0.7	3.3
DM-201 +1%peptone	1	0.6	3.1
	3	0.6	3.2
DME +5%FBS	1	0.7	3.5
	3	0.7	3.5
風しんワクチン(To-336)		0.3	3.3

平成 15 年度厚生科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）  
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

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、ウイルス接種前の細胞維持継代段階から無血清培地を用いた場合のウイルス増殖をプラーク形成法、リアルタイム RT-PCR 法を用いて比較検討した。その結果、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が、培地の pH 調整など必要であることが確認された。

#### 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市場に出る予定がある。この場合、牛由来成分が混入する可能性がある。そこで、昨年に引き続き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。前回は、ウイルス接種後の増殖段階で無血清培地に替えてその増殖能を検討した。しかし、この方法では細胞継代維持に用いる牛胎児血清が、混入する可能性がある。今回は、細胞維持段階から無血清培地を用いることで、細胞およびウイルス増殖に及ぼす影響を検討した。

#### B. 研究方法

##### 1. 無血清培地を用いた日本脳炎ウイルス使用無血清培地

VP-SFM（Invitrogen 社）、Opti-SFM（Invitrogen 社）、Ex-CELL520（以後 Ex-520、JRH Bioscience 社）Ex-MDCK（JRH Bioscience 社）を用いた。

##### ワクチン株増殖能の検討

Vero 細胞（9013 株）を上記 4 種類の無血清培地を用いて継代（5 継代）し、Vero 細胞の増殖、形態変化等を観察した。5 継代目の Vero 細胞を用いてウイルス接種用にシート状になった Vero 細胞（9013 株）を作成し、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 4 種類の無血清培地により培養した。ウイルス接種後 3・5・6 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. リアルタイム RT-PCR（TaqMan RT-PCR 法）

設計し作製した。

JEen562s-585p/623cset:  
CTGGAYTGTGARCCAAGGA  
JEen623c-585p/562sset:  
GAHCCCACGGTCATGAC  
FAM-MGB -labeled probe  
JEen585p562s623c  
FAM-ACTRAACACTGAAGCGT-MGB

反応は 48°C で 30 分間逆転写反応後、95°C 10 分間熱変性反応させその後 95°C・15 秒→57°C・1 分のサイクルを 45 回繰り返した。産物は ABI Prism 7000 を用いて検出した。

## C. 研究結果

### 1. 無血清培地を用いた日本脳炎ウイルス

#### (1) 無血清培地による Vero 細胞の継代維持

- ①VP-SFM：良好とくに形態的变化は認められない。
- ②Opti-SFM：細胞が植え替え時にピペッティングしても固まったままのものが目立つようになった。
- ③Ex-520：細胞接着が 3 継代目よりやや不良となった。
- ④Ex-MDCK：2 継代目より細胞接着が不良で、維持が困難となった。

#### (1) ウイルス接種後の細胞変性効果 (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・Opti-SFM・Ex-520 による場合の CPE は MEM 培地と異なり、個々の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。

#### (2) プラーク法を用いた上清中のウイルス定量

それぞれの培地で増殖させた日本脳炎ウイルスのプラーク数を表 1 に示す。VP-SFM および Opti-SFM 培地では、接種後 3 日目が最も高く、5 日目、6 日目には急激に低下した。Ex-520 でも 3 日目が最も高かったが、3 つの無血清培

地の中で最も低かった。ただし、プラーク数は、5 日目・6 日目でも比較的維持されていた。2%FCS+MEM の場合が最も増殖がよく、ウイルスプラーク数も維持されていた。

#### (3) TaqMan RT-PCR による上清中のウイルス定量

図に示す如く、接種後 3 日目で、2% FCS 加 MEM が最も増殖がよく、続いて Ex520、VP-SFM が同等で Opti-SFM が最も低かった。その後培地ごとのウイルス量の動態を見ると、VP-SFM は 5 日目でウイルス量が維持されているが、6 日目には低下している。EX520 は 6 日までウイルス量は維持されている。一方 Opti-SFM は、5 日目にやや増加したが、他の培地よりも高くはなかった。しかし、その量が 6 日目でも維持されていた。コントロールとして用いた 2%FCS 加 MEM が、最も増殖がよくまた、ウイルス量も 6 日目まで維持されていた。

## 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。昨年度は、細胞増殖には 10%FCS 加 MEM 培地を用いて、ウイルス接種後に無血清培地を用いて日本脳炎ウイルス量を検討した。しかし、この方法では、やはり微量の牛血清成分が混入する可能性もある。このため今回は、接種前に無血清培地で 5 代継代し、その後ウイルスを接種し、ウイルス増殖能を検討した。MDCK 細胞用の無血清培地である Ex-MDCK では 2 継代目より細胞接着が不良で、維持が困難となったため、ウイルス接種を実施しなかった。VP-SFM、Opti-SFM、Ex-520 については、いずれも 2%FBS 加 MEM 培地に比べて、プラーク数では、50 分の 1 程度と十分なウイルス量を得られなかった。特に VP-SFM と