

Opti-SFM では、5 日目になると、急激にプラーク数が減少した。しかしながら、リアルタイム PCR (TaqMan PCR) 法では、必ずしもそのような急激な減少をきたしていない。フラビウイルスは、一般に細胞表面に吸着後、取り込まれた小包内で pH が酸性に傾き、フュージョンする。VP-SFM と Opti-SFM は、いずれも培養 3 日目以後、培養液が酸性になる。このことが、ウイルス表面の構造変化を生ぜしめ、ウイルスの感染力を低下させた可能性がある。pH を調整することで、もう少し増殖ウイルス量を増加させることが可能かも知れない。また継代回数を減らす等の工夫で解決する可能性は検討しなければならない。

E. 結論

牛胎児血清の混入を完全なくすためウイルス接種までに、無血清培地で Vero 細胞を 5 継代した場合、細胞増殖能に影響を及ぼし、日本脳炎ウイルス増殖が低下した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ken-Ichiro Yamada, Tomohiko Takasaki, Masaru Nawa, Sadao Yabe, Ichiro kurane. Antibody responses determined for Japanese dengue fever patients by neutralization and hemagglutination inhibition assays demonstrate cross-reactivity between dengue and Japanese encephalitis viruses. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 10(4) 725-728, 2003.

Tanabayashi K, Mukai R, Yamada A, Takasaki T, Kurane I, Yamaoka M, Terazawa A, Konishi E. Immunogenicity of a Japanese encephalitis DNA vaccine candidate in cynomolgus monkeys. Vaccine. 21(19-20):2338-45. 2003

2. 学会発表

根路銘令子、高崎智彦、野村秀和、倉根一郎. 日本脳炎ウイルスのサーベイランス：ブタ血清からのウイルス分離とその解析. 第 51 回日本ウイルス学会（京都）10/27-29/2003

新井 智、多屋馨子、高崎智彦、辻正義、石原智明、倉根一郎、岡部信彦. 日本脳炎ウイルス非構造タンパク質 NS1 の発現. 第 51 回日本ウイルス学会（京都）10/27-29/2003

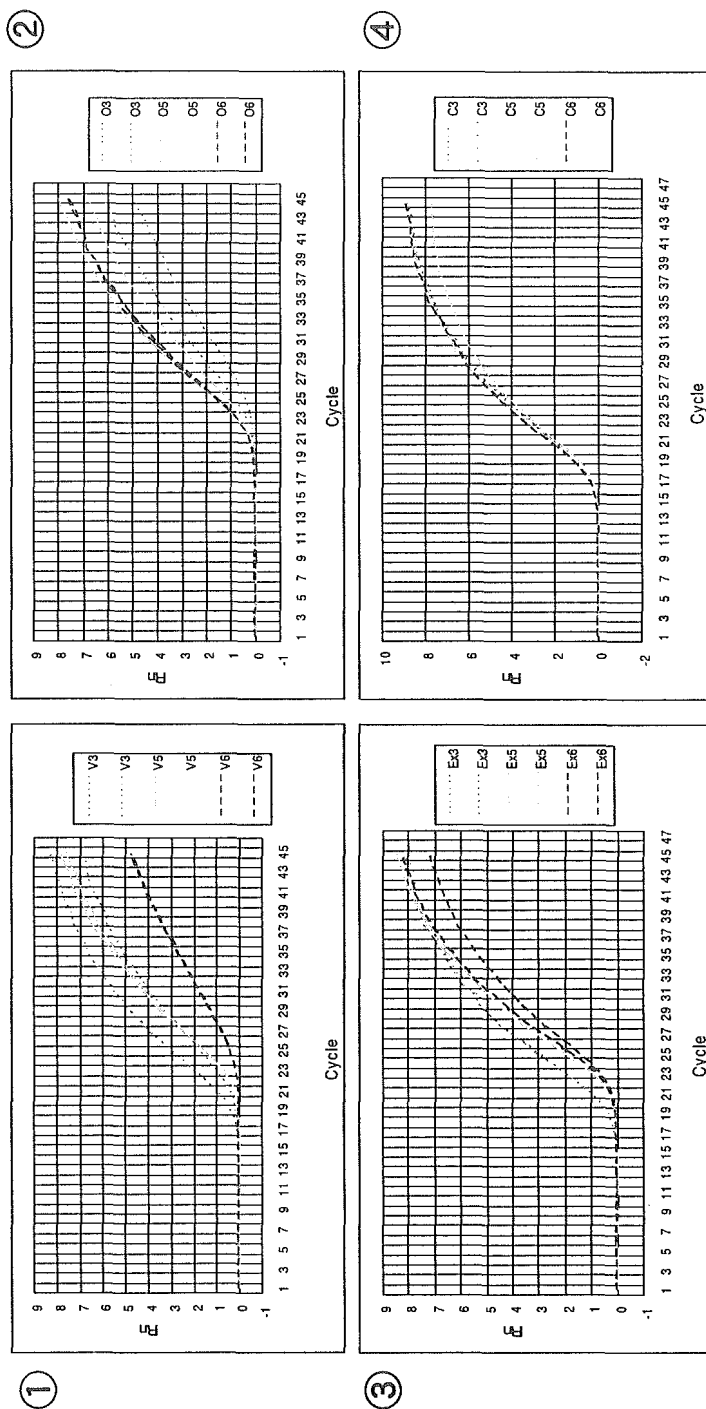
新井 智、多屋馨子、高崎智彦、早坂丘芳、倉根一郎、岡部信彦. 近年の日本脳炎患者発生状況および感染リスク. 第 3 回人と動物の共通感染症研究会学術集会（東京）11/1/2003

田島茂、高崎智彦、倉根一郎. 黄熱ワクチンへの ALV 混入に関する研究. 第 10 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会(京都) 10/26/2003

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

TaqMan RT-PCR法を用いた 培養上清中のウイルス定量



①Vp-SFM ②Opti-SFM ③Ex-520 ④2%FBS+MEM

点線：3日目上清、実線：5日目上清、破線：6日目上清

日本脳炎ウイルスプラーク数

接種後の日数	VP-SFM	Opti-SFM	Ex-520	2%FBS+ MEM
3日目	1.3	1.2	0.88	58
5日目	<10 ⁵	0.03	0.5	51
6日目	<10 ⁵	<10 ⁵	0.18	6.8

単位は10⁷ pfu/mL

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

分担研究者 武田直和(国立感染症研究所)

協力研究者 下池貴志(国立感染症研究所)

研究要旨 A 型肝炎ワクチンはサル腎細胞由来細胞株 GL37 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いる。ウイルス増殖を無血清培地で行うため、用いる細胞の培養条件を検討した。その結果、コラーゲン処理プレートを使うと未処理に比べて細胞数が増加するが、無血清培地を用いる限り細胞がコンフルエントになった後は増殖が停止することが明らかになった。また、コレステロール添加は細胞の浮遊化を促進する効果を示した。

A. 研究目的

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きた。これらの細胞の培養には、牛胎児血清 (FBS) が細胞増殖に必須の成分として培地に加えられてきた。大部分の FBS はウイルスの精製過程で除去されるためワクチンに混入する FBS は極めて微量であるが、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ことを目的とする。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の一つである。

これまでの研究結果より、GL37 細胞は無血清培地 VP-SFM で培養可能であることを明らかとした。更に VP-SFM で培養した GL37 細胞で馴化 HAV は増殖可能であることが明らかとなった。

しかしながら、VP-SFM での GL37 の培養と HAV の増殖は、これまで用いてきた 10% FBS 入り MEM (FBS-MEM) 培地の場合に比べて、それぞれ約 60%、及び 30-40%であった。このことは、VP-SFM 培地には何らかの細胞培養因子、さらに、ウイルス増殖に必要な因子が欠けていると考えられる。したがって、細胞の培養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。本年度の研究では、VP-SFM 培地で GL37 細胞の培養を改善する研究を行った。

B. 研究方法

FBS-MEM 培地で培養した GL37 細胞を PBS で洗い、トリプシン-EDTA によりプレートから剥離、分散した。遠心後、上清を捨て、再び PBS で GL37 細胞を洗浄した。PBS を加え、一部取り細胞数をカウントした。このものを 3 等分し、それぞれに無血清培地 VP-FSM、VP-FSM に 1/500 コレステロールを加えた培地 (VP-SFM+chol)、

および FBS-MEM を加えた。それぞれ 4.5×10^4 個の細胞を直径 2.4cm のコラーゲン未処理プレート、及びコラーゲン処理プレート（12 穴プレート）にそれぞれ継代した。添加したコレステロールには動物成分は含まれていない。これら、6 つの条件下（3 種類の培地 x 2 種類のプレート）で各細胞を 14 日間詳しく観察した。従来の条件（FBS-MEM 培地-コラーゲン未処理プレート）で培養した GL37 細胞を基準にして、各条件での細胞の増殖を比較した。

（倫理面への配慮） HAV は GL37 細胞で増殖可能なため、特に倫理面で問題になるようなことは無い。

C. 研究結果

FBS による細胞培養促進活性は、栄養物やホルモンの補給、老廃物の除去、緩衝作用、器壁への接着促進などによると考えられている。そこで、GL37 細胞を無血清培地 VP-SFM で培養するとき、細胞の器壁への接着を補助する目的で、コラーゲン（ラット尾コラーゲン I）コートしたプレートを用いた。また、栄養物の補給として、脂質である組換えコレステロールを用いて細胞培養条件を検討した（図）。その結果、以下のことが明らかになった。

1. 継代後 7 日までは、GL37 細胞はいずれの培地においてもコラーゲン処理プレートが未処理プレートよりも約 10% 良く増殖した。
2. 継代後 7 日以降は、コラーゲン処理、未処理にかかわらず、FBS-MEM 培地で増殖させた細胞以外は増殖がほぼ停止した。
3. 継代後 14 日目では、VP-SFM 培地での GL37 細胞はコラーゲン処理プレートが未処理プレートの場合より約 13% 増殖が良好であった。
4. コレステロール入り培地では、継代 10 日以降 GL37 は培地中に浮遊し始めた。14 日目でプレ-

トに付着する細胞は、基準プレートの約 30% になった。

5. 継代 10 日目以降、FBS-MEM 培地での GL37 細胞の増殖速度はコラーゲン未処理プレートの方が処理プレートでよりも良くなった。継代 14 日目でコラーゲン未処理プレートは処理プレートに比べて約 13% 増殖が良かった。

6. 細胞を顕微鏡で観察したところ、継代 10 日目以降、FBS-MEM 培地ではコラーゲン未処理プレートで細胞が互いに重なり合っていた。しかし、コラーゲン処理プレートではいずれの培地の場合でも GL37 は互いに重なることは無かった。

D. 考察

コラーゲン処理プレートを用いることで無血清培地 VP-SFM で GL37 細胞の増殖をこれまで用いたコラーゲン未処理プレートの場合より約 13% 良くすることが出来た。従来用いられている FBS-MEM 培地-コラーゲン未処理プレートで GL37 を培養して得られる細胞濃度までにするには、細胞同士が互いに重なり合うまでの密度にすればいいことが明らかとなった。今後、VP-SFM 培地に欠ける細胞増殖に必要な因子を探索することや、3 次元培養法を用いることで検討していきたい。今回の細胞培養条件で HAV を感染させ、得られるウイルス抗原量についても調べることも課題である。また、ウイルス増殖に必要な細胞側、及びウイルス側の因子について検討する必要がある。いずれにせよ、細胞増殖、及びウイルス増殖に起因する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。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. コラーゲン処理プレートを用いることで無血清培地 VP-SFM で GL37 細胞の増殖をこれまで用いたコラーゲン未処理プレートの場合より約 13%良くすることが出来た。
2. 従来用いられている FBS-MEM 培地、コラーゲン未処理プレートで GL37 を培養して得られる細胞濃度までにするには、細胞同士が互いに重なり合うまでの密度にすればいいことが明らかとなった。
3. コレステロール入り VP-SFM 培地では GL37 は培養 10 日以降、浮遊しだした。現在用いられている HA ワクチンの製造方法では接着した GL37 から HAV 抗原を回収するので、コレステロールを培地に加える方法はワクチン製造法には向かないことが明らかとなった。

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。

こうした中、2003 年、アメリカで A 型肝炎の大流行が起こった。原因はペンシルバニア州のレストランがメキシコから輸入した青ネギを未処理或いは、最小限の火を通しただけでメニューとして供したためと考えられ、2003 年 11 月 20 日現在、555 名の患者と 3 名の死者が出ている。

（国立感染症研究所感染情報センターのデータ

より）

G. 研究発表

論文発表

Tamura M, Natori K, Kobayashi M, Miyamura T, Takeda N: Inhibition of attachment of voriions of Norwalk virus to mammalian cells by soluble histone molecules. Arch. Virol. 2003;148: 1659-1670.

Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, Uchida K, Fukushi S, Hoshino FB, Takeda N, Katayama K: broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses by based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. J. Clin. Microbiol. 2003;41: 1548-1557.

学会発表

1)T. Shimoike. Specific translational repression of HCV by the viral core protein. The Structural Forum 2003 of VIRUS-CELL INTERACTION, August 2003, Stockholm/ Sweden.

2)Takeda N, Katayama K, Hansman G, Shirato H, Oka T, Ogawa S, Utagawa E, Natori K, Miyamura T: Genetic and Antigenic Diversity of Noroviruses. Workshop on Emerging Enteric Viral Diseases 2003 Nov 20.

3)Takeda N, Li T-C, Miyamura T: Imported hepatitis E in Japan. The 24th United States-Japan Hepatitis Panels (USJCMSP), Tokyo, Japan, 2003 Jan 11-13.

4)Yatsuhashi H, Tamada Y, Yano K, Koga M, Ishibashi H, Yano M, Takeda N, Li T-C, Miyamura T, Ahmad N, Khan M: Hepatitis E infection in non-ABC acute hepatitis in Japan : National hospital report. The 24th United States-Japan Hepatitis Panels (USJCMSP), Tokyo, Japan, 2003 Jan11-13.

5)Tomoyuki Tanaka, Tatsuya Miyoshi, Noritoshi Kitamoto, Yasuo Iwagami, Kiyoko Uchino, Katsuro

Natori, Kunio Kamata, Xi Jiang, Mary K.Estes,
Takeda N: Immunoreactive proteins in human feces
may cause nonspecific reactions in a Norwalk virus
antigen detection ELISA. 37th Joint Working
Conference on Viral Diseases, US-Japan Cooperative
Medical Science Program, Houston, USA, 2003 Aug
18-20., 2003 Aug 18-20.

6)Kazuhiko Katayama, Haruko Shirato-Horikoshi,
Tomoichiro Oka, Tatsuo Miyamura, Takeda. N:
Analysis of Norovirus replication using full-length
genome. 37th Joint Working Conference on Viral
Diseases, US-Japan Cooperative Medical Science
Program, Houston, USA, 2003 Aug 18-20., 2003 Aug
18-20.

7)李天成、落合晋、石古博昭、武田直和、宮村達

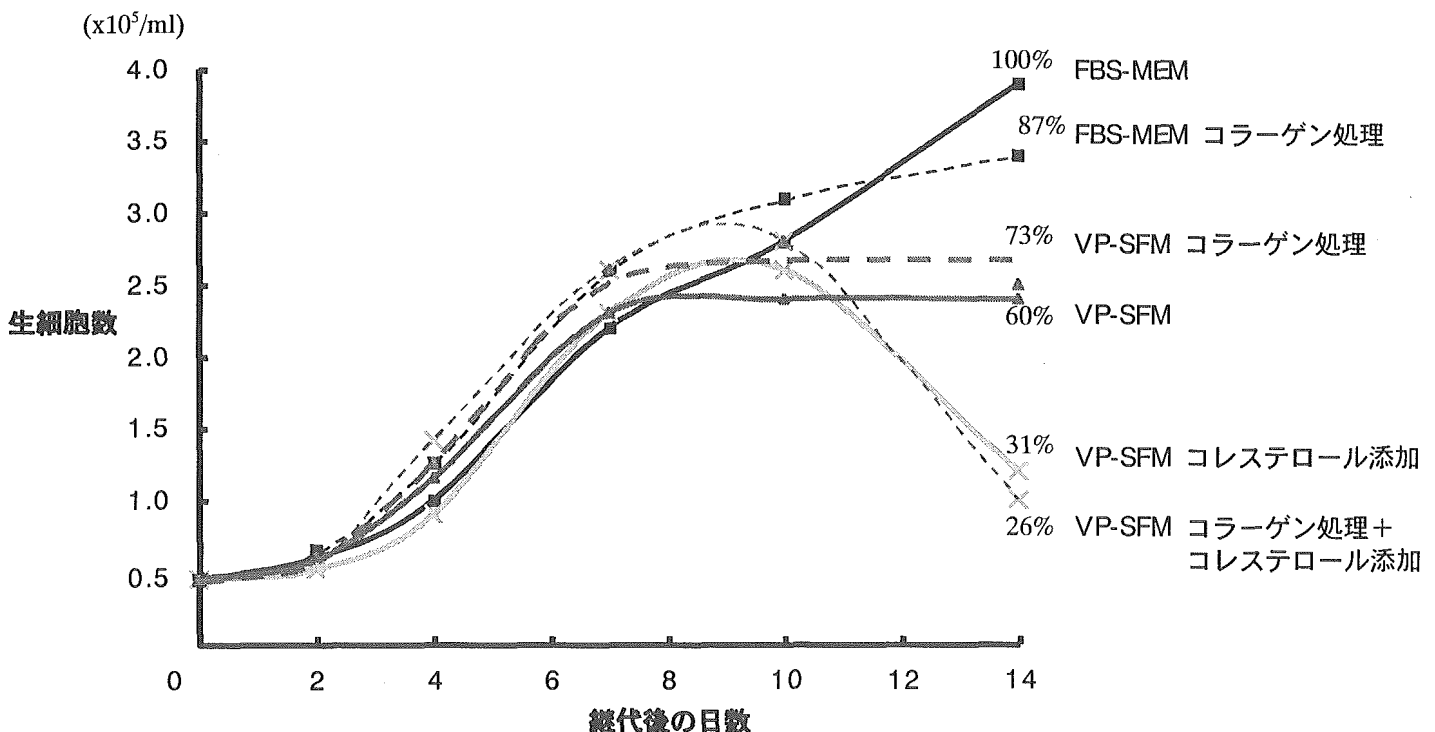
男。輸入感染症としての E 型肝炎。日本ウイル
ス学会、第 51 回学術集会 2003 年 10 月 京都
8)李天成、落合晋、永田典子、石古博昭、武田直
和、宮村達男。HEV Genotype IV の構造蛋白の発
現および抗原性の解析。日本ウイルス学会、第 51
回学術集会 2003 年 10 月 京都

9)下池貴志、戸塚敦子、米山徹夫、宮村達男。無
血清培地を用いた培養細胞による A 型肝炎ワク
チン製造の開発。日本ウイルス学会、第 51 回
学術集会 2003 年 10 月 京都

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

図 GL37細胞の増



注) 図中に示した割合 (%) は14日でのFBS-MEM-コラーゲン未処理プレートで増殖させたGL37の生細胞数に
対する他の条件で増殖させたGL37の生細胞数の割合である。

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
協力研究者 荒尾 恵 農林水産省動物医薬品検査所
田口邦史 農林水産省動物医薬品検査所
大槻紀之 農林水産省動物医薬品検査所/国立感染症研究所

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」を示し、特に特定試験として、確実な検出系が確立されおらず情報量が必ずしも豊富でない牛ポリオーマウイルス（BPV）が製造資材として用いられる牛血清からの確に排除されるべきであると提案した。

昨年度の研究においては、1. 本ウイルスの本邦への侵襲の危険度が著しく高い実態を調査した。2. 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。

本年度の研究では、1. 確立した試験法によって、130 を越える血清について遺伝子断片の混入の頻度を調査した。血清の生産国に関係なく概ね 55% のロットで断片が検出された。2. 遺伝子検出で陽性となった血清を用いて、適当とされた 3 株の継代細胞でウイルス分離を行った。3 代の連続継代によって、細胞性の変化と遺伝子検出法でウイルス増殖を指標とした。しかし、いずれの血清を試料とした培養細胞でウイルスの分離は出来なかった。3. EMA はコメントに基づく協議の結果、牛血清中の BPV 遺伝子断片の汚染頻度が高く、感染粒子を測定する試験系が定まっていないことから、細胞の培養に用いる牛血清には BPV を含めた多くの危険因子が内在している事実を知らせるとともに、新興牛ウイルスに注目することの必要性を関係者に通知するに止まった。

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（BPV）が検出、排除すべき対象として提案された。

そのため、昨年度の本研究においては、日本に

おける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検討した結果、次のことが明らかとされた。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. 製造に用いられる牛血清中からのウイルス断片の検出法を確立した。4. 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。

本年度は、昨年度に続き、試料とする牛血清のサンプル数を増加して BPyV の遺伝子の混入の頻度を調査するとともに、原産国別の解析を行いリスクの偏りがないかについて調べた。また、遺伝子断片の存在が確認された試料についてウイルスの分離について検討した。

B. 研究方法

昨年度の研究において確立された牛血清中の BPyV 遺伝子検出法を用いて、細胞培養用の血清を販売している会社及び動物用生物学的製剤を製造している各所社の協力を得て、製品として各種の除菌・滅菌処理のされた血清サンプルと販売社等が事前調査のために入手していた無処置の生血清サンプルを入手した。それらについて、遺伝子の検出を実施した。

血清からの遺伝子の抽出は市販のキット (Roche 社、High Pure Viral Nucleic Acid Kit) を用いて行った。遺伝子の検出の概要は、既報の nested PCR 法 (Kappeler ら 1996) に基づき、一部のプライマーに改良を加えると共に、PCR 反応の容量などに変更を加えた。すなわち第 1 反応ではプライマーセット f282 (5'-GAGGTCAGAATTTACCAAGG-3') 及び R279 (5'-GCCTGTAAACTGTGGGAAAA-3') を用い、第 2 反応ではプライマーセット f310 (5'-TAAAGTAGATGAGTAATAAGAG-3') 及び r257 (5'-TCCTCCCTTCAGACTGGAATTGG-3') を用いた。PCR 反応は AmpliTaq & 10X Buffer II (アプライドバイオシステムズ) を使用し、第 1 反応では 2.5mM の MgCl₂、プライマー濃度をそれぞれ 0.5 μ M、dNTP をそれぞれ 0.2mM、Taq ポリメラーゼを 0.25unit とし、鋳型 DNA を 10 μ l 加えトータル 50 μ l の容量で PCR 反応を行い、第 2 反応では MgCl₂濃度を 3.0mM とし、鋳型 DNA を第 1 反応の反応液 1 μ l とし PCR 反応を行った。PCR 反応は第 1 反応では、2分間の熱変性の後、94 $^{\circ}$ C60 秒、55 $^{\circ}$ C75 秒、72 $^{\circ}$ C75 秒の処理を 40 回繰り返した後、最後に 72 $^{\circ}$ C 5分間の処理を行った。第 2 反応では、2分間の熱変性の後、94 $^{\circ}$ C 45 秒、55 $^{\circ}$ C60 秒、72 $^{\circ}$ C60 秒の処理を 40 回繰り返した後最後に 72 $^{\circ}$ C 5分間の反応を行った。な

お、4種のプライマーのうち R279 のみ特異性を上昇させるために既報と異なる配列とした。

第 2 反応終了後、アガロースゲル電気泳動により増幅産物の有無を確認し、約 300bp の特異バンドが観察された試料を陽性と判定した。

昨年度の 4 倍程度の試験処理試料数の調査結果を基にして、血清の種類、原産国及び販売社別等の解析を行い、危険度の傾向について分析を行った。

PCR 法で陽性と判断された血清のうち (無処置の生血清を含む) 25 サンプルについて、Vero 細胞や MDBK 細胞に加え、げっ歯類由来の HmLu 細胞を用いて、一般的な培養法によるウイルス分離を行った。判定法として培養期間中の鏡顕及び継代時の培養液の PCR モニターによってウイルス分離及びウイルスの増殖動態を調査した。

25 cm² のフラスコ上単層培養状態となった各細胞に被検血清 0.1ml を接種し 37 $^{\circ}$ C 90 分間処理したのち、接種材料を取り除き BPyV 遺伝子陰性となった血清を含む培地で 5 日間培養を行う。その後、同培地で 5 日間隔で細胞の継代を 3 代目まで行った後、培養液を含む培養細胞ごと 3 度の凍結融解を行った。2,500rpm/10 分間の遠心処理によって得た上清について、ウイルス DNA を抽出し PCR サンプルとした。また、国際情報収集として、平成 14 年 4 月に欧州医薬品審査庁 (EMA) から発出されたガイダンスに関するコメントに対する EMA の対処方針等の追跡調査を行った。

(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認められなかったため、手当てを行っていない。

C. 研究結果

1. 牛血清の遺伝子検出調査

試験に供試した牛由来血清は牛胎子血清を中心に、現在までに日本国内で流通していたと考えられる 132 サンプルを用いた。これらの血清のうち原産国の明らかなものは 81 サンプルで、主な原産国はオーストラリア、カナダ及びニュージーランドであり、この 3 か国で 68 サンプルを占めた (表 1)。

この結果、132 サンプル中 73 サンプルで特異

バンドが出現し、その陽性率は 55%であった。この陽性率は報告されている陽性率の 60~70%とほぼ同率であった。血清の原産国別の陽性率はオーストラリア産 55%、カナダ産 45%、ニュージーランド産 71%、その他及び不明のもの合計で 55%となっており (表 2)、陽性率に若干の差があったものの、4 群に分けカイ 2 乗検定を行ったところ、どの群間においても有意差 (危険率 5%) は認められなかった。このことは、BPyV は地域による汚染状態の偏りはほとんどなく、世界各地に広く分布していることが改めて確認された。また、由来別で陽性率の比較を行ったところ、胎子由来血清では 56%、新生子牛血清及び子牛血清の合計では 66%、成牛血清では 0%となった。この成績では成牛の陽性率が低くなっているものの、成牛血清の検体数が 4 検体と少ないために結果に大きな差がでた可能性も否定できない。また、牛由来血清の販売会社別の陽性率に関して、大きな差は認められなかった (データ示さず)。

2. ウイルス分離

試験に用いた 25 サンプルのうち、無処置血清を含む 24 サンプルは 3 代継代培養する過程及び最終培養時の細胞観察並びに BPyV 遺伝子断片の検出試験結果から、当該ウイルスの増殖確認及び遺伝子の検出はできなかった。

残りの 1 サンプルについては Vero 細胞において接種 2 日目に、HmLu 培養細胞においては接種 2~3 日目に細胞観察の結果、細胞の顆粒状化や円形化の反応像が観察された。一方、同血清については、MDBK 細胞において培養の翌日に培養基面からの細胞の剥離像も確認された。しかし、これらの細胞由来サンプル及び培養液から BPyV 由来遺伝子の検出は出来なかった。

3. EUにおける BPyV に対する情報収集

EMEA/CPMP は 2002 年 4 月に発出した「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」の提案について、収集の後に、BPyV 等の危険因子対応をバイオテクノロジー作業部会で検討した。その結果、BPyV については牛血清の汚染頻度が高いこと、血清の製造者と利用者は感染性に関する試験法を確立し、血清ロツ

トからそれらのウイルスを削除又は不活化・除去する方法の検討を奨励した。

D. 考察

1. BPyV の市販牛血清中への遺伝子検出法を応用した汚染調査

検出法については、1996 年以降に海外で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、プライマー設計及び遺伝子抽出法に改良を加えた昨年度の本研究で提案された方法を用いた。本試験ではセカンド PCR 操作終了後アガロースゲル電気泳動を行い、本プライマーセットのターゲット配列の長さである約 300bp のバンドが検出されたものを BPyV 遺伝子断片陽性と判断した。

試料は昨年度用いた各種牛血清の 38 サンプルに新たに 94 サンプルを加えた計 132 サンプルについて、第 1 相試験として PCR 法を行った。その結果は、昨年度とほぼ同様に陽性率で 55%、オーストラリア、カナダ及びニュージーランドの原産国別の陽性頻度はそれぞれ 55,45 及び 71%で、あった。この事は、今やこの BPyV は地域による汚染の濃淡は比較的少なく、いずれの極、地域の牛群間に広く分布している実態が鮮明なものとされた。

一方、2003 年 9 月からドイツ、ランゲンのポールエーリッヒ研究所で開催されたフォーラムで、英国の Q-One Biotech の研究者は、PCR 法で約 70%陽性であった試料を彼らの開発した試験法で試験した場合、96%が陽性であったと報告した。

昨年 12 月末のアメリカにおける牛海綿状脳症の発生により、生物学的製剤の製造に用いられる血清等牛由来物質による危険を回避するために、未発生国であるオーストラリアやニュージーランドにそれらの製造資材を求める傾向にある。しかし、それらの国における家畜衛生に関する情報の中で BPyV に関するものを見つけることは困難であった。そのことは今後とも BPyV (遺伝子の) 汚染血清の日本への流入が加速する可能性を示唆している。

これら血清についてはフィルターろ過又は一部には γ 線照射等による除去が行われるのみで、

BPyV についてそれらの処置処方が適切、妥当な方法である科学的証明は明らかとされていないのが現状である。実証的手段の1つとされている迷入ウイルス否定試験では、in vitro 系で増殖の困難な BPyV について蛍光抗体法、酵素抗体法等を活用した特定試験によって検出される確率は必ずしも高くないことが想定される。また現実的にそのような検査制度を義務化した極・国は存在しないが、国際的検査バリデーションを行っている会社では、ターゲットウイルスの1つとして製造会社等からの問い合わせが好評であると伝えられている。

2. BPyV の分離

我々の改良した PCR 法の妥当性を評価する上で、生きた BPyV の入手は不可欠である。そのため、1つにはこのウイルスについて報告した研究者に問い合わせをするとともに、英国ウェブリッジ研究所、フランス AFSSA(Agence Francaise De Securite Sanitaire Des Aliments) 及び EDQM(European Directorate for the Quality of Medicines)、米国 USDA・NVAL(United States department of Agriculture/national Veterinary Service Laboratory)等に保存・保管に関する調査を依頼した。しかし、以前は使用したが既に廃棄した、又は不明、記録がないとの回答のみであった。そのため、一般的なウイルス分離方法である培養細胞による盲目継代による分離を試みた。PCR で陽性となった血清 23 サンプルを既知の報告で用いられた Vero 細胞及び MDBK 細胞と、げっ歯類由来の HmLu 細胞に接種し、ウイルス遺伝子の継代の可否と細胞性の変化を指標として、3代継代したがいずれのサンプルからもウイルスは分離されなかった。このことは、サンプル、供試細胞又は継代等を含めた培養条件に問題があったのか不明である。しかし、ポールエーリッヒ研究所のフォーラムで、ウイルスの分離には初代牛腎、MDBK 及び Vero 細胞が適しており、比較的長期間の培養インターバルで5週間以上3ヶ月程度培養する必要のあることを紹介している。

この報告と我々の試験で BPyV 分離が不成功であったことの差異を検証すると、分離のために培養した期間があまりにも短く、ウイルスが増殖

状態になる前に試験を終了したことに原因があるものと推察された。そのため、生きた BPyV を入手するために今後、この情報を参考に再試験を行う必要のあることも示唆された。

遺伝子断片検出法として開発された試験法の陽性検体として、仮に BPyV の混入した牛血清の不活性化又は排除するための方法を確立するためのスパイクング法の指示ウイルスとして、また動物及び人におけるリスク評価のために感染・増殖能を有する BPyV を確保することは重要である。

3. EU の対応方針

牛血清中の BPyV に由来する遺伝子断片の汚染頻度が極めて高く、感染粒子を的確に測定する試験系が定まっていないことから、EU としては現実的対応として、細胞の培養に用いる牛血清には BPyV を含めた多くの危険因子が内在している事実を知らせるとともに、新興牛ウイルスに注目することの必要性を EMEA/CPMP から関係者に通知した。

一方、9月のドイツ、ランゲンのフォーラムで、英国の Q-One Biotech の研究者は、BPyV に対する抗体の保有に関する調査をしたところ、牛、獣医師、酪農家、屠畜場関係者、獣医大学学生に限定されていたことから、このウイルスがズーノティックな感染形態を示す可能性のあることを明らかとしている。このことから、更に効率の良い、高精度の BPyV 及び抗体検出系の開発が行われるものと考えられる。

E. 結論

BPyV の遺伝子は調査対象を拡大した各種培養用血清中に検出された。BSE 未発生国であるオーストラリアやニュージーランドにおいても BPyV は牛群間に高頻度で分布していることが推定された。しかし、今回の試験では培養細胞を用いて牛血清から BPyV を単離することは出来なかった。

F. 健康危険情報

牛ポリオーマ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明確な報告はない。

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年印刷中

2. 学会発表

2003年10月開催の第136回日本獣医学会
会で発表済み

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。

表 1 供試血清

原産国	血 清			計
	胎子	新生	成牛	
豪州	28	1	2	31
カナダ	18	2	0	20
新西蘭	2	14	1	17
その他	13	0	0	13
不明	38	12	1	51
計	99	29	4	132

豪州：オーストラリア

新西蘭：ニュージーランド

その他：アメリカ、メキシコ、日本等

表 2 原産国別PCR結果

原 産 国	P C R 反 応		陽性率 (%)
	陽 性	陰 性	
豪州	17	14	55
カナダ	9	11	45
新西蘭	12	5	71
その他・不明	35	29	55
計	73	59	55

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。昨年報告で、GL37 細胞の増殖時に添加する牛胎児血清の濃度を現行の 10%から 3~5%程度に削減できることと、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できる可能性は見出せたが、GL 細胞の無血清培地への馴化の方法は見出せなかったため、この点について本年度も継続して検討を行った。今回の結果では無血清化は厳しい状況である。牛胎児血清を徐々に減らしていくような方法と、他の種類の増殖因子の組合せも含めて更なる検討が必要である。1 継代目までは牛胎児血清添加と同等の成績が得られたため、ウイルス接種後の無血清化が可能であることが示唆された。

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、生物由来原料基準が制定され、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）について昨年に引き続き検討を行った。

B. 研究方法

(1) 無血清培地への応用

GL37 細胞に使用する継代用培地（MEM 培地）に添加する牛胎児血清（10%）のかわりに、アルブマックス（※1）と ITS-A サプリメント（※2）を用いて 2 代継代を行い、GL37 細胞の増殖性、観察期間中の pH の変動を確認した。

※1：アルブマックス（GIBCO 社製）

ニュージーランド産のウシ血清からクロマトグラフィーにより分画精製された低エンドトキシンで血清中に存在する脂質区分を保持したウシ血清アルブミン。通常の精製アルブミンと比較して細胞成長促進効果が優れている。

※2: ITS-A サプリメント (GIBCO 社製)
Insulin-Transferrin-Selenium-A
Supplement の略称。広範囲の細胞の日常的な維持および低密度細胞培養時に、細胞の付着に必要なウシ胎児血清 (FBS) 濃度を減らすことができるサプリメント。

1) 増殖因子の調製

①アルブマックスの調製

PBS (-) で1%溶液を作製した。

②ITS-A の調製

市販品 (100×conc) をそのまま使用した。

2) 増殖培地の調製

通常使用している MEM 培地を調製し、牛胎児血清のかわりに、アルブマックスをそれぞれ終濃度 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5mg/mL になるように添加した。同様に MEM 培地に1%量の ITS-A を添加した。対照として、MEM 培地に牛胎児血清 10%を添加した溶液を作製した。

3) 細胞の調製

細胞はあらかじめ拡張しておいた GL37 細胞をトリプシンで消化後、細胞濃度を 3×10^6 cells/mL になるよう調製し、2) の増殖培地を用いて2代継代を行い、細胞の増殖性、pHの変動を観察した。

C. 研究結果

(1) 1 継代目の成績

観察期間中の培養液の pH、細胞の付着率は ITS-A 添加、アルブマックスの低濃度 (0.5、1.0、1.5 mg/mL) 添加とも状態が良くなく、観察7日目のシート状態は、いずれも約70%程度であった (図1参照)。

培養7日目のシート状態が最も良かった

のはアルブマックス 2.0 mg/mL 添加、2.5mg/mL 添加であり、培地 pHも問題なく、シート状態はほぼ通常どおりの約100%であった (図2、図3参照)。

(2) 2 継代目の成績

1 継代目で成績の良かった、アルブマックス 2.0 mg/mL 添加、2.5mg/mL 添加と、対照の牛胎児血清 10%添加のみ2代目に継代を行った。

アルブマックス 2.0 mg/mL 添加では、培地の pH も高く、培養7日目に細胞変性が見られ、不適となった。また、アルブマックス 2.5mg/mL 添加では、培地の pH も高く、培養7日目のシート状態は約30%で、モノシートの形成には至らず不適となった (図4、図5参照)。

(3) 追加検討1

上述した(1)、(2)で最も成績の良かったアルブマックス 2.5mg/mL 添加の再現実験と、アルブマックス 2.5mg/mL に ITS-A 1%量添加培地を作製し、追加検討を行った。細胞量の調製は従来どおり 3×10^6 cells/mL で行った。

この場合も、1 継代目においては、アルブマックス 2.5mg/mL 添加、アルブマックス 2.5mg/mL に ITS-A 1%量添加とも培地の pH も問題なく、ほぼ100%のシート形成が確認されたが、2 継代目においては、いずれも培地の pH も高く、約30%程度のシート状態でモノシート形成に至らず不適となった (図6参照)。

(4) 追加検討2

アルブマックス 2.5mg/mL に ITS-A 1%量添加培地を作製し、細胞量を従来2倍

である 6×10^6 cells/mL で行った。

この場合も、1 継代目においては、pH は良好で、ほぼ 100%のシート形成が確認されたが、2 継代目においては、pH も高く、約 60%程度のシート状態でモノシート形成に至らず不適となった (図 7 参照)。

D. 考察と結論

以上、検討の結果、現状の製造レベルでは GL37 細胞において、数代にわたる継代が必要、かつ、定められた上限内での継代が必要であり、今回の結果のみでは無血清化は厳しい状況である。牛胎児血清を徐々に減らしていくような方法と、他の種類の増殖因子の組合せも含めて更なる検討が必要である。ただ、1 継代目までは牛胎児血清添加と同等の成績が得られたため、ウイルス接種後の無血清化が可能であることが示唆された。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表等

特になし

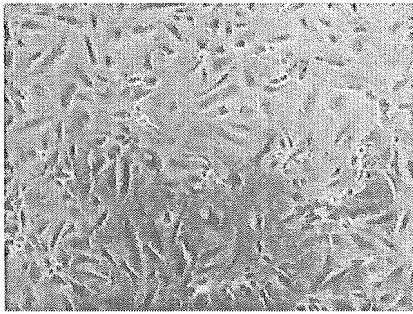


図 1 : ITS-A1%添加 1 継代、7 日目

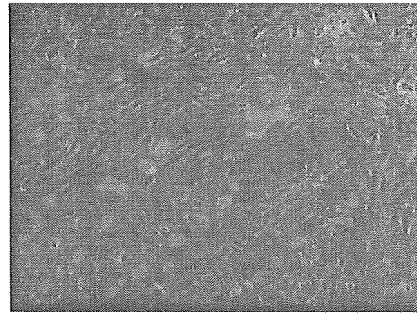


図 5 : 従来法 (牛胎児血清 10%添加) 2 継代、7 日目

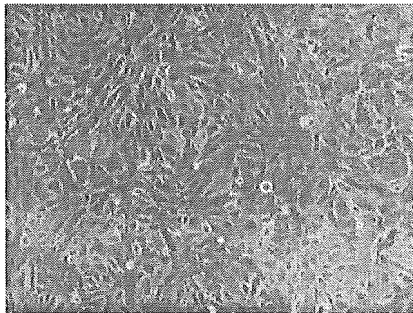


図 2 : アルブマックス 2.5mg/mL 添加 1 継代、7 日目

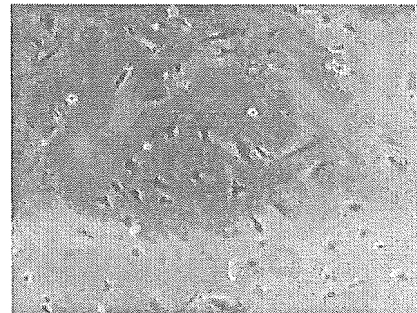


図 6 : アルブマックス 2.5mg/mL+ITS-A 添加 2 継代、7 日目

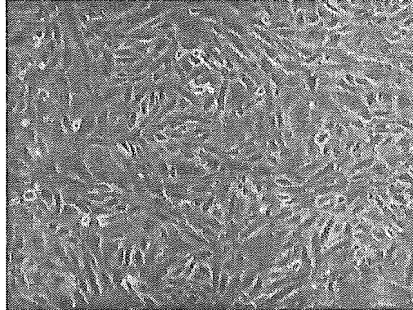


図 3 : 従来法 (牛胎児血清 10%添加) 1 継代、7 日目

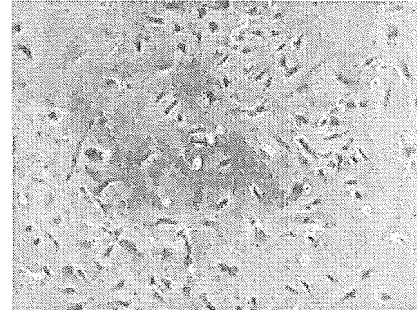


図 7 : アルブマックス 2.5mg/mL+ITS-A 添加 2 継代[細胞量 2 倍]、7 日目

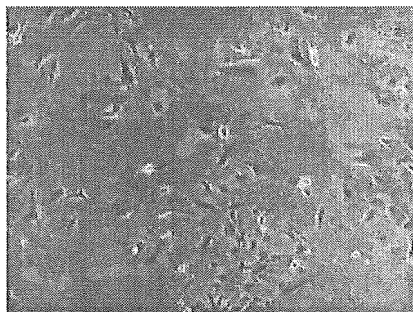


図 4 : アルブマックス 2.5mg/mL 添加 2 継代、7 日目

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

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

分担研究者 真鍋貞夫 (財)阪大微生物病研究会
研究協力者 斉藤裕之 (財)阪大微生物病研究会

研究要旨 牛血清を使用しない新たなワクチン製造法として、風しんウイルス（松浦株）の培養を試みた。昨年度報告したウズラ胚細胞の増殖性を更に検討した結果、ウズラ胚細胞の分散にはアキターゼより 0.01%トリプシン+0.02%EDTA を用いた方が細胞の増殖は良好であった。またその細胞を用いて風しんウイルス（松浦株）培養を行った結果、牛血清を用いた培養法と同程度のウイルス含量が得られた。このことから、牛血清を使用しないウズラ胚細胞及び風しんウイルス（松浦株）の培養は可能であることが示唆された。

A. 研究目的

風しんワクチン製造で使用する初代ウズラ胚細胞の培養は、牛血清を含む培地を使用している。その牛血清は特定の原因国のものを使用することで安全性を確保しているが、未知の感染性及び病原性をもつ因子の存在を完全に否定することは難しい。そこで牛血清を使用しない培養法を確立するために、無血清培地を用いて細胞の増殖性を調査した結果、インビトロジェン社製 Opti-PRO 液(以下 Opti)を用いることにより細胞培養が可能であることを昨年度報告した。本研究では Opti を用いた初代ウズラ胚細胞及び風しんウイルス（松浦株）の培養方法について検討した。

B. 研究方法

1. 初代ウズラ胚細胞の細胞分散液の検討

9 日齢卵ウズラ胚細胞をアキターゼ液、0.25%トリプシン液及び 0.01%トリプシン+0.02%EDTA 液で分散した。分散した細胞を遠心し、上清除去を行い、MEM で浮遊させ、再度遠心を行った。上清除去後 Opti に浮遊させ、細胞数が 300×10^4 cells/mL になるように調製した。それを培養容器に播種し、37°C で 2 日間培養し、細胞数を測定した。

2. 風しんウイルス（松浦株）の増殖性の検討

上記で培養を行った細胞に風しんウイルス（松浦株）を接種し、ウイルス培養液として M199 : Opti 液(1:0、1:1、2:1、3:1)に交換してウイルス増殖性を測定した。ウイルス含量は RK-13 細胞を用いたプラーク法で測定した。

C. 研究結果

1. 初代ウズラ胚細胞の細胞分散液の検討

各分散液による卵 1 個あたりの細胞数は、アキターゼ液処理時が 130×10^6 cells/egg と最も少なく、0.01%トリプシン+0.02%EDTA 液が 160×10^6 cells/egg、0.25%トリプシン液は 180×10^6 cells/egg と最も多く、アキターゼの約 1.4 倍量を得られた。また、分散した細胞の培養容器への接着状態を顕微鏡で観察したところ、アキターゼ液と 0.01%トリプシン+0.02% EDTA 液では、培養容器の全面に細胞が接着しており、両者に差は認められなかった。しかし、0.25%トリプシン液を使用したとき、培養容器の約 1/3 しか接着しなかった。

これらの細胞を 37°C で培養した細胞数は、アキターゼ液、0.01%トリプシン+0.02% EDTA 液共に 190×10^4 cells/mL であった。一方、0.25%トリプシン液で分散した細胞は細胞シートを形成せず、細胞数を確認することができなかった(表 1)。

表 1. 細胞分散液による細胞数と細胞培養

細胞分散液	卵 1 個あたりの分散細胞数 ($\times 10^6$ cells/egg)	培養開始 2 日目の細胞数 ($\times 10^4$ cells/mL)
アキターゼ	130	190
0.25%トリプシン	180	N.D. ¹⁾
0.01%トリプシン + 0.02%EDTA	160	190

1) 細胞シートを形成せず、確認できなかった。

2. 風しんウイルス (松浦株)の増殖性の検討

このウズラ胚細胞の分散液の検討より、風しんウイルスの増殖性の検討を行った。表2に示すように、ウイルス接種後の培養液として M199 だけではウイルス培養を行うことは困難であった。そこで M199 と Opti を混合して培養を試みた結果、M199 と Opti の混合比に関係なく、ウイルス含量として $10^{6.0}$ PFU /mL 以上が得られ、これは牛血清を用いた培養法と同程度であった。しかし、ウイルスの増殖性をみると、混合比が 1:1 のときウイルス増殖性は良く、2:1 及び 3:1 はやや悪かった。

表2. ウイルス培養液によるウイルスの増殖性

M199 :Opti の混合比	ウイルス含量(logPFU/mL)			
	9日目	10日目	11日目	12日目
1 : 0	N.D. ²⁾			
1 : 1	5.70	6.11	6.16	6.18
2 : 1	5.38	5.96	6.07	6.14
3 : 1	5.41	5.81	6.08	6.10

2) 細胞剥離のため培養を中止した

D. 考察

細胞分散液としてアキターゼを用いた系で、細胞培養は可能であるが、未分散の細胞が多く残り、細胞収率の観点からアキターゼは消化液として不十分である。また、0.25%トリプシンで処理では、細胞浮遊液中のトリプシンの残存量が多いため、細胞の培養容器への接着及び細胞増殖が悪かった。牛血清はトリプシンの分散作用を中和する効果があるに対し、無血清培地ではその作用を中和することが不十分であり、細胞に強い障害を与えたためと思われた。このため、無血清培地で培養するためにはトリプシンの作用をできるだけ抑制することが重要であると考え、用いるトリプシン濃度を低くした結果、細胞培養が可能となった。

またウイルス培養の結果より、M199 だけではウイルス培養が行えなかったが、M199 と Opti を混合することでウイルス培養が可能となった。これはウイルス接種後の細胞維持に Opti 中の何らかの成分が必要なためと考える。

E. 結論

無血清培地を用いたウズラ胚細胞の培養において、消化するトリプシン濃度を少なくすることにより、細胞培養が可能になった。またウイルス培養液には無血清培地と M199 を混合することで牛血清を用いた培養法と同程度のウイルス含量が得られた。

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。

平成 15 年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 無血清培地(VP-SFM; Invitrogen) 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。VP-SFM を用いた細胞培養では従来用いている牛血清 (NCS; Newborn calf serum)、あるいは先年報告したニワトリ血清を含んだ培地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 を含んだ培地を用いた結果とほぼ同様であった。回収されたウイルスは血清を含んだ培養液で増殖したウイルスと同様に、AIK-C 株の生物学的マーカーである温度感受性の性状を保持していた。

A. 研究目的

麻疹ワクチン、風しん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細胞を用いて製造されている。これらの初代胚細胞の培養では牛血清を含む培地を用いている。1986 年に BSE (Bovine spongiform encephalopathy) が英国で流行し、その後 BSE 牛を食したためと考えられる vCJD が発生するに至り、牛 (反芻動物) 由来の成分を医薬品等に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 未発生国のものを用いる等の配慮はされているが、可能ならば牛血清を用いない方法の確立が望ましいとされている。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、VP-SFM 培地、あるいは対照として非働化した NCS 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 穴プレートにまぎ、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 ボトルにまぎ、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。また回収したウイルスの温度感受性 (Ts) を調べる目的で、33℃、39℃でのウイルスの増殖性を比較した。また AIK-C 株の Ts 性をコントロールする P 遺伝子の解析をおこなった。

C. 研究結果

- 1) 細胞増殖能: alamarBlue™ を加えた培地における 1, 2, 5 日目の蛍光強度を蛍光波長 590/544 で測定した。VP-SFM を用いた培養は、従来の NCS を含む培地とほぼ同様な数値を示し、細胞の増殖能はほぼ同等と考えられた。
- 2) 細胞形態: VP-SFM で増殖させた細胞は、3%NCS を含む培地と同様に正常な形態でボトルに付着した。
- 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; $10^{5.3}$ TCID₅₀/0.1ml に対して VP-SFM ; $10^{5.50}$ TCID₅₀/0.1ml であり、ほぼ同等の結果が得られた。
- 4) 温度感受性、遺伝子解析: AIK-C 株の生物学的マーカーである Ts 性が無血清培地での培養でも保存されているかを検討した。33℃ではよく生育したが、39℃では約 1/10000 の増殖率であり Ts 性は保存されていた。また AIK-C 株の Ts 性は P 遺伝子上の変異によって制御されている事が知られている。無血清培地で生育したウイルスの P 遺伝子を解析したところ塩基配列の変異は観察されなかった。

D. 考察

BSE の流行以来、牛 (反芻動物) 由来の製品を極力使用しない方向で、生物製剤の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も牛血清を用いない製造方法が求められている。今回は市販の無血清培地 VP-SFM を用いてニワトリ胚細胞の細胞増殖能、ウイルス産生量を検討し、さらに回収されたウイルスの性状を調べた。無血清培地 VP-SFM を用いて培養した細胞やウイルスの増殖能は従来の牛血清を用いた結果とほぼ同等であり、小スケールながら製造可能なレベルであると考えら

れた。また AIK-C 株の生物学的マーカーである温度感受性の性状も保存され、塩基配列の変化もなかった。これらから無血清培地を用いて AIK-C ワクチンを製造できる可能性が考えられた。

3. その他；なし

E. 結論

無血清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；

- 1) Mgone, C.S., Mgone, J.M., Takasu, T., Miki, K., Kawanishi, R., Asuo, P.G., Kono, J., Komase, K., Alpers, M.P. 2003. Clinical presentation of subacute sclerosing panencephalitis in Papua New Guinea. *Trop Med Int Health*. Mar;8(3):219-27.
- 2) Takasu, T., Mgone, J.M., Mgone, C.S., Miki, K., Komase, K., Namae, H., Saito, H., Kokubun, Y., Nishimura, T., Kawanishi, R., Mizutani, T., Markus, T., Kono, J., Asuo, P. G., and Alpers, M. P. 2003. A continuing high incidence of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) in the Eastern Highlands of Papua New Guinea. *Epidemiology and Infection*. 131:887-898.
- 3) Kumada, A., Komase, K., and Nakayama, T., 2004. Recombinant measles AIK-C strain expressing current wild-type hemagglutinin protein. *Vaccine*, 22 (3-4) :309-316.

2. 学会発表

- 1) 麻疹ウイルスのN蛋白の解析、飯嶋益巳、駒瀬勝啓、第51回日本ウイルス学会、学術集会、総会、平成15年10月27日～29日 京都
- 2) コットンラット動物モデルにおけるP蛋白変異麻疹ウイルス株の解析、芳賀猛、村山丹穂、篠原明男、越本知大、駒瀬勝啓、第51回日本ウイルス学会、学術集会、総会、平成15年10月27日～29日 京都
- 3) 麻疹ウイルス野生株の温度感受性、藤野元子、吉田菜穂子、上島肇、駒瀬勝啓、中山哲夫、第51回日本ウイルス学会、学術集会、総会、平成15年10月27日～29日 京都
- 4) 組換え麻疹ウイルスのVero細胞への馴化、上島肇、吉田菜穂子、藤野元子、駒瀬勝啓、中山哲夫、第51回日本ウイルス学会、学術集会、総会、平成15年10月27日～29日、京都

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