

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

分担研究者 桑原 靖 デンカ生研株式会社

協力研究者 甲斐 光 デンカ生研株式会社

研究要旨 株化細胞を使用した不活化ワクチン製造におけるウシ由来成分を使用しない培養法開発を目的として、細胞培養およびウイルス培養培地にウシ血清を始めとした動物由来成分を使用しない培養系を用いて、大量培養を前提としたマイクロキャリア培養法確立を目指した。株化細胞の培養、ウイルス培養共に動物由来成分を使用しない培地、培養法でも良好な成績が得られ、より安全性の高い不活化ワクチン製造法の可能性が高まった。

A. 研究目的

附着性細胞を使用したウイルスワクチンの製造では、培養培地中には細胞接着因子、成長因子が含有されるウシ胎児血清（FBS）が多用されてきた。しかしながら、昨今の BSE 等の問題から、製造工程中に FBS のみならず、動物由来成分を使用しないワクチン製造方法が求められている。今回我々は不活化ワクチン製造用に使用される例が多い Vero 細胞を用いて、動物由来成分を使用しない培養法を検討し、合わせて日本脳炎ウイルス（JEV）培養の基礎検討を行った。動物由来成分を用いない大量培養を前提として、使用する細胞培養培地およびウイルス培養培地をインビトロジェン社製無血清培地 VP-SFM、従来のトリプシンに代わる細胞分散剤としてインビトロジェン社製組換え型酵素 rProtease、組換え細胞接着因子（プロネクチン）をコートしたマイクロキャリア（MC）として三洋化成工業社が試作したプロネクチンコートビーズ（Pn ビーズ）を使用し、それら細胞培養基材としての有用性について検討した。

B. 研究方法

1. 材料

1) 細胞

Vero 細胞（ATCC CCL-81）

2) ウイルス

日本脳炎ウイルス北京株
（マウス由来ウイルス）

3) MC

cytodex1；アマシャム社製、表面積 4400cm²/g
cytodex3；アマシャム社製、表面積 2700cm²/g
Pn ビーズ；三洋化成工業試験品、表面積 310cm²/g

4) 細胞培養培地

DMEM（ニッスイ社製）+5%FBS
VP-SFM（インビトロジェン社製、無血清培地）

5) ウイルス培養培地

VP-SFM（インビトロジェン社製、無血清培地）

6) 細胞分散剤

rProtease（インビトロジェン社製、組換え型酵素）

7) 培養容器

スピナーフラスコ（テクネ社製、作動容量 100mL）

2. 細胞培養

DMEM+5%FBS にて継代中の Vero 細胞を 2x10⁵ cells/mL で、スピナーフラスコに播種した。実験系は A 系列として DMEM+5%FBS と cytodex1 の組み合わせ、B 系列として VP-SFM と cytodex1 の組み合わせ、C 系列として VP-SFM と cytodex3 の組み合わせ、D 系列として VP-SFM と Pn ビーズの組み合わせにて、24 日間培養を行った。細胞継代は 8 日毎に実施し、細胞播種 3 日目より毎日 50%の培地交換を行った。継代時に用いた細胞分散剤 rProtease を 5 倍希釈した希釈液にて 37°C条件下で細胞分散を行い、遠心操作によ

り上清を除去後、必要量を予め用意されたスピナーフラスコに播種して、継代操作とした。

3. ウイルス培養

培養開始 24 日目に A、B、C、D 各系列につき、培地除去後、PBS による洗浄を 2 回行い、JEV を M.O.I=0.01 にて接種した。ウイルス培養にグルコース (3.9g/L) 含有 VP-SFM を用いることで、培養途中に pH の低下が起きるため、ウイルス培養 2 日目にアルカリフィードを行い、pH のコントロールを行った。サンプリングはウイルス培養 2 日目～8 日目まで行い、細胞数についてはクエン酸処理後の核数を測定した。JEV 増殖の指標は①HA 価については定法により測定、②ELISA については、抗 JEV 抗血清 (ウサギ) をプロテイン A カラムによる抗体精製を実施し、ウェスタンブロッティング法により特異反応性を確認後、精製抗体のペルオキシダーゼ標識を行い、サンドイッチ ELISA を構築した。なお、ELISA 値は参照日本脳炎ワクチン北京株 Lot.197-P より自家値付し、不活化精製 JEV 液を標準抗原として使用した。

C. 研究結果

1. 細胞培養

MC から MC への細胞継代を培養開始 8 日目、16 日目にて行ったところ継代時の細胞密度は、VP-SFM で培養した cytodex1、cytodex3、Pn ビーズの B、C、D 系列共に 2×10^6 cells/mL を超える値であった。

ウイルス接種直前 (培養開始 24 日目) では、DMEM + 5%FBS で培養した cytodex1 の A 系列は約 1.6×10^6 cells/mL 程度に留まったが、VP-SFM で培養した cytodex1 と Pn ビーズの B、D 系列が同等の細胞密度 3×10^6 cells/mL であった【図 1】。この成績はガスコントロール等が制御された培養装置を用いて DMEM + 5%FBS と cytodex1 の組み合わせによる培養と同等であった。(未発表データ)

2. ウイルス培養

DMEM + 5%FBS と cytodex1 の組み合わせで細胞培養された A 系列は、ウイルス接種直前では約 1.6×10^6 cells/mL 程度であったが、ウイルス培養 3 日目には 2.7×10^6 cells/mL となり、VP-SFM で細胞培養されたその他の系列と同等の到達細胞数となった。HA 価、ELISA 値共に VP-SFM と Pn ビーズの組み合わせによる D 系列で得られた値 (HA 価 : 512 倍、ELISA 値 : 2367 U/mL) は、DMEM + 5%FBS と cytodex1 の組み合わせの A 系列で得られた値 (HA 価 : 256 倍、ELISA 値 : 1949 U/mL) より、高値であった。また、今回の検討におい

て、到達細胞数、ウイルス産生量共に Pn ビーズの D 系列が最も高値であった【表 1】。なお、各系列の ELISA 値をウイルス接種時の細胞数で割った単位細胞当たりのウイルス産生量を算出したところ、Pn ビーズの D 系列が、A 系列に続く良好な成績が得られた【表 2】。

【表 1】 各系列における測定値の最高値

	ウイルス接種時細胞数 ($\times 10^6$ cells/mL)	HA	ELISA (U/mL)
A 系列	1.6	256	1949
B 系列	3	128	1087
C 系列	2.4	64	626
D 系列	3	512	2367

【表 2】 単位細胞当たりの ELISA 値

	ELISA ($\times 10^6$ U/mL)
A 系列	1299
B 系列	362
C 系列	261
D 系列	789

D. 考察

1. Pn ビーズについて

cytodex1 は多くの MC 培養に用いられているが、無血清培地での培養や細胞接着性の低い細胞では、コラーゲンコートされた cytodex3 が有用とされている。本検討目的は、無血清で細胞培養を行うことから低付着性細胞用の cytodex3 を検討したが、この MC はブタ由来の接着因子である変性コラーゲンをコートしている点に留意すべきである。一方、組換え大腸菌によって産生される細胞接着因子であるプロネクチンをコートした Pn ビーズは動物由来成分を使用していないことから安全性に優れ、この MC の有用性につき評価したところ細胞培養、ウイルス培養共に良好な成績を示した。ただし、MC の均一性、細胞観察時の MC の光学的特性 (不透過性) において細胞培養上、cytodex と比較すると劣っていると言わざるを得なく、更に改良すべき点があると考えられる。しかしながら、安全性の高い Pn ビーズが動物由来成分を含まない細胞培養とウイルス培養系において、より優れた培養成績とコストメリットが得られれば、今後有用な細胞培養基材になると思われる。

2. VP-SFM について

動物由来成分を含有する A 系列における細胞培養では、ウイルス接種後に細胞増殖が認められ

るが、その他の VP-SFM を用いた細胞培養の系列ではウイルス接種時の細胞密度が最も高値であった。このことは、DMEM+5%FBS で細胞培養された Vero 細胞の増殖能力が VP-SFM ほど引出されていないと考えられた。今回の検討では VP-SFM の有用性が示唆された。

3. r Protease について

今回細胞分散剤として使用した rProtease は高純度醗酵生成物である組換え型酵素である。性能としては凍結融解、温度安定性に優れ、純度も高く、トリプシンと比較して細胞毒性を示さないとの報告（メーカー資料）があり、細胞培養を行う上で非常に有効であると考えられる。

以上のことから、Pn ビーズ、VP-SFM、rProtease を用いた細胞培養とウイルス培養法において、より高い安全性確保の観点から動物由来成分を含有しない培養法が可能であることが確認された。

E. 結論

組換え細胞接着因子を利用した MC を使用することで付着細胞培養系でも、ウシ由来成分のみならず、動物由来成分を必要としない細胞培養とウイルス培養が可能であることが確認され、ワクチン製造に必要とされる大量培養の可能性が示唆された。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む）

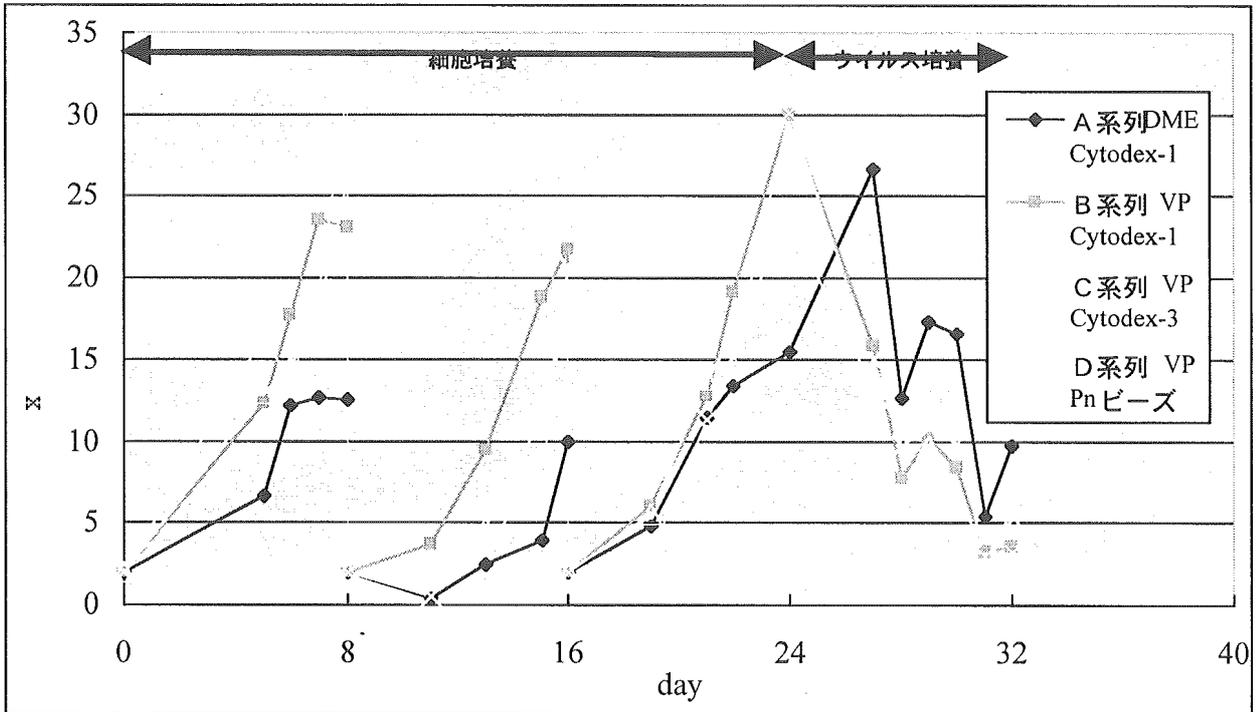
1.特許取得

あり

2.実用新案登録

なし

【図1】 各系列における細胞増殖曲線



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

分担研究者 末原章宏 武田薬品工業株式会社

研究要旨 牛血清添加培地で培養したニワトリ胚培養細胞から得られた麻しんウイルス（シュワルツ FF-8 株）と無血清培地で培養したニワトリ胚培養細胞から得られた麻しんウイルス（シュワルツ FF-8 株）の遺伝子塩基配列の比較を行った結果、N 領域は継代 0 代から 5 代まで、いずれの場合も変異は認められなかった。今後、H 領域並びに F 領域について解析予定であるが、細胞培養で添加する血清の有無により、麻しんウイルスの継代による遺伝子に変異を認めなかったことより、麻しんワクチン製造への無血清培地適用の可能性が示唆された。

A. 研究目的

弱毒生麻しんワクチンの製造に用いるニワトリ胚細胞培は、培養時に牛血清を添加しているが、昨年度、インビトロジェン社製の無血清培地（Opti-SFM）を使用することで、ニワトリ胚細胞培養及びウイルス培養が可能であることを報告した。今回、細胞培養で添加する牛血清の有無により、その培養細胞で得た麻しんウイルスの遺伝子塩基配列 N 領域に変異を起し得るかを調査した。

B. 研究方法

1. ウイルス試料の作製

牛血清を添加する現行法及び牛血清を添加しないインビトロジェン社製の無血清培地（Opti-SFM）を用いる方法でニワトリ胚細胞の培養を行い、麻しんウイルス（シュワルツ FF-8 株）を培養した。

ウイルス培養を 5 代まで継代し、継代開始時、継代 3 代及び継代 5 代のウイルスを RNA 採取用試料とした。

2. 遺伝子塩基配列解析用試料の作製

1. で作製したウイルスから常法に従い RNA を精製し、分光光度計を用いて純度ならびに精製量を測定した。TimeSaver cDNA Synthesis Kits™ を用い、N 領域 RNA の 3' 側に相補的なプライマーを使用した逆転写反応により cDNA を作製した。LA Taq ポリメラーゼを用い nested PCR 法により N 領域の DNA を増幅させ、遺伝子塩基配列解析用試料とした。

3. 遺伝子塩基配列の解析

プライマーウォーキング法を用いてシーケンシングを行い塩基配列の決定を行った。更に、DNASIS 解析ソフトを使用して得られた塩基配列の比較検討を実施した。

C. 研究結果

1. 牛血清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の解析

N 領域を含む 1775 塩基の決定を行った結果、継代開始時及び継代 5 代の塩基配列に相違は認められなかったが、継代 3 代において 3' 末端のポリ A 内に一塩基アデニンが挿入される変異が認められた。

2. 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の解析

N 領域を含む 1 7 7 5 塩基の決定を行った結果、継代開始時、継代 3 代及び継代 5 代の塩基配列に相違は認められなかった。

D. 考察

今回、牛血清添加培地で培養したニワトリ胚培養細胞から得られた麻しんウイルスと無血清培地で培養したニワトリ胚培養細胞から得られた麻しんウイルスの遺伝子塩基配列 N 領域の比較を行った結果、牛血清添加培養ウイルスの継代 3 代において 3' 末端のポリ A 内に一塩基アデニンが挿入される変異が認められたが、変異の位置が N 領域の末端であること及び継代 5 代の場合は、継代開始時と同じであったことから、この 3' 末端のポリ A 内に一塩基アデニンの挿入は解析中の解析エラーであると考えられ、牛血清添加培養の当該ウイルス株の N 領域は、継代開始時から継代 5 代まで変異は生じていないものと判断された。一方、無血清培地 (Opti-SFM) 培養ウイルスの継代開始時、継代 3 代及び継代 5 代に変異はなかったことから、ニワトリ胚細胞培養で添加する牛血清の有無は、麻しんウイルス (シュワルツ FF-8 株) の培養において、N 領域の遺伝子塩基配列には影響しないことが確認された。今後、H 領域及び F 領域の継代による遺伝子塩基配列の解析を行うとともに、製剤化した場合のウイルスの力価安定性等についても検討が必要と考える。

E. 結論

無血清培地で培養したニワトリ胚細胞から得られた麻しんウイルス(シュワルツ FF-8 株) の N 領域の遺伝子塩基配列は、ウイルスの継代による遺伝子の変異を認めず、牛血清を用いる現行法とも差を認めないことが確認されたことより、牛血清を使用しない麻しんワクチン製造方法として、無血清培地適用の可能

性が示唆された。

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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	頁	出版年
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
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 Dia ostic Laboratory mmunology	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 - 2345	2003
Tamura M, Natori K, Kobayashi M, Miyamura T, Takeda N	Inhibition of attachment of vorions of Norwalk virus to mammalian cells by soluble histone molecules.	Arch. Virol.	148	1659 - 1670	2003
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.	41	1548 - 1557	2003
Mgone, C.S., Mgone, J.M., Takasu, T., Miki, K., Kawanishi, R., Asuo, P.G., Kono, J., Komase, K.,	Clinical presentation of subacute sclerosing panencephalitis in Papua New Guinea.	Trop Med Int Health. Mar	8 (3)	219 - 227	2003

Alpers, M.P.					
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.	A continuing high incidence of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) in the Eastern Highlands of Papua New Guinea.	Epidemiology and Infection.	131	887 - 898	2003
Kumada,A., Komase,K., and Nakayama, T.	Recombinant measles AIK-C strain expressing current wild-type hemagglutinin protein.	Vaccine	22 (3-4)	309 - 316	2004