

200401158A

**厚生労働科学研究費補助金  
食品の安全性高度化推進研究事業**

**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 16 年度 総括・分担研究報告書**

**主任研究者 田代真人**

**平成 17(2005)年 3 月**

## 目 次

平成 16 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. 他動物由来物質を除いたおたふくかぜ生ワクチン製造法に関する研究\_\_\_\_\_ P. 6  
加藤篤：協力研究者 木所稔 久保田耐
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. 11  
齋藤義弘：協力研究者 大槻紀之 沼崎啓
3. 無血清 Vero 細胞を用いた継代による風しんワクチンウイルスの塩基配列への影響に  
関する研究\_\_\_\_\_ P. 15  
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. 18  
高崎智彦
5. 水痘ワクチンのシード管理に関する研究\_\_\_\_\_ P. 23  
井上直樹：協力研究者 野沢直樹 原田志津子 倉根一郎
6. 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. 28  
武田直和：協力研究者 下池貴志
7. 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. 33  
伊藤治：協力研究者 大槻紀之 海野幸子
8. A 型肝炎ワクチン製造の無血清培養に関する検討\_\_\_\_\_ P. 36  
大隅邦夫：協力研究者 倉永雅彦 池野大介
9. 無血清培地を用いた MRC-5 細胞の培養条件の検討\_\_\_\_\_ P. 39  
真鍋貞夫：協力研究者 斉藤裕之
10. 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. 41  
駒瀬勝啓
11. 牛血清無添加による培養細胞で得たムンプスウイルスの遺伝子塩基配列に関する研究 P. 45  
末原章宏：協力研究者 岩本好司 山下利明

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

---

P. 47

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の迷入を排除する必要がある。そこで、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。その結果、現在実用化されている無血清培地を用いた場合に、ワクチンウイルスの増殖効率が悪く、また遺伝的安定性に問題がある可能性が指摘された。従って、現段階では、牛血清を完全に排除したワクチン製造は困難であり、更に技術的検討を続ける必要がある。2)人用の生ワクチン製剤およびそれに使用した牛血清材料について、動物ワクチンの領域で迷入汚染が危惧される牛血清由来の牛ポリオーマウイルスの遺伝子を検索した。感染性の保持に必要なとされる全長DNAに近い長鎖DNAの検出方法を開発して、これを用いてワクチン製剤について検討した結果、長鎖DNAは検出されず、感染性ウイルスの迷入は否定出来ると判断された。これを以て、牛ポリオーマウイルス迷入否定のための暫定基準を定めた。

**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 国立感染症研究所ウイルス第1部  
井上直樹 同上  
武田直和 国立感染症研究所ウイルス第2部  
伊藤 治 農林水産省動物医薬品検査所  
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  
末原章宏 武田薬品工業株式会社

沼崎 啓 同上  
下池貴志 国立感染症研究所ウイルス第2部  
野澤直樹 国立感染症研究所ウイルス第1部  
原田志津子 同上  
倉根一郎 同上  
斉藤裕之 阪大微生物研究会  
倉永雅彦 化学及び血清療法研究所  
池野大介 同上  
岩本好司 武田薬品工業株式会社  
山下利明 同上

**研究協力者**

大槻紀之 国立感染症研究所ウイルス第3部  
加藤宏幸 同上  
木所 稔 同上  
久保田耐 同上

**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過ごされる可能性がある。最近、食品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ト-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 因子の伝播リスクをゼロとし、また将来起こりうる既知および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、動物由来原料に迷入している既知のウイルスおよび異常プリオン物質等をより高感度に、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、牛血清からの迷入汚染が危惧される牛ポリオーマウイルスについて、ウイルス遺伝子 DNA の迷入を PCR を用いて検索した。

## C. 研究結果

1. 前年度までの研究に引き続き、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、ウイルス性状の安定性等を、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、現行ワクチン製造に使用されている株化細胞の継代および初代細胞の培養においては、無血清培地での長期間培養や継代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ものもあった。

しかし、細胞継代を重ねると、細胞の増殖およびウイルス収量が低下することが明らかとなった。また、無血清培地を用いた細胞培養では、一部のワクチン株では、ウイルスの継代歴に従って増殖効率が低下したり、プラックサイズが小さくなった。これらは、ウイルス遺伝子に突然変異が起これ、これらの変異ウイルスが選択されて元のワクチン株とは性状が変化してしまう可能性を示唆している。

これらのことから、いくつかのワクチンについては、ウイルスを増やすという目的には無血清培地が使用できる可能性がある一方で、現在使用されている無血清培地では、ウイルスの増殖性や遺伝的安定性の面から、ワクチンの安全性および有効性の確保には、問題があることが明らかにされた。

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。特に、無血清培地において増殖性の高い細胞においては、ウイルスの増殖はかえって低い傾向にあり、単純に無血清培地に馴化した細胞をワクチン製造に用いることは出来ないことが示された。また、細胞継代の際に用いる蛋白分解酵素トリプシンに対する代替品として、組み換え蛋白分解酵素について、細胞増殖性およびワクチンウイルス増殖への影響を検討した。組み換え酵素処理後には、酵素活性の中和のための血清を用いない場合には、細胞障害性が残り、細胞の生育が低

下した。この影響は、酵素処理後に細胞を洗浄して残存の酵素を除去することによって解消出来た。従って、動物由来の蛋白分解酵素を組み換え製品に変更することは可能であると判断された。

2. PCR 法によって、市販の牛血清中には牛ポリオーマウイルス遺伝子が高頻度（50%以上）に検出された。これらの血清を用いて製造された一部生ワクチンの特定のロットにもこれが検出された。

牛ポリオーマウイルスが人の健康に対して危険性をもつとの報告は無いが、この迷入ウイルスを排除もしくは感染性を否定しておく必要がある。

牛ポリオーマウイルスの感染性発現ための必要条件として、全長 DNA の存在があるが、この指標として、全長の遺伝子 DNA に近い長い遺伝子断片を検出する PCR 法を開発した。牛ポリオーマウイルス DNA 陽性と判断された血清およびワクチン製剤について、この長鎖 DNA の存在を検索した結果、いずれの製剤からも長鎖 DNA は検出されず、感染性ウイルスの存在は否定出来ると判断された。そこで、これをもって、牛ポリオーマウイルス迷入否定のための暫定基準とすることを提案した。

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造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。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、細菌類由来の物質、あるいは遺伝子組換え技法により細菌類等に作らせた動物由来物質、およびこれらを含む無血清培地を利用出来るか否かを検討した。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、また製造効率や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・検討した。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や既知の動物由来のウイルス等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および既知、未知のウイルス等の感染性因子に対する検出方法を検討し、品質管理の現場への導入を図る必要がある。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。

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。その結果、おたふくかぜ生ワクチンは、無血清培地で培養したニワトリ胎児細胞でも、増殖したが、細胞の継代を重ねると増殖性が低下した。これに対して、麻疹生ワクチンでは増殖量は約1/10であった。Vero細胞やウズラ細胞を用いた風しん生ワクチンの増殖は、無血清培地でも変化しなかったが、継代に伴ってブラックサイズが縮小化したことから、遺伝的に変化したものと判断された。日本脳炎ウイルスもVero細胞において、ほぼ同様の結果が得られた。一方、A型肝炎ウイルスの増殖に用いるサル腎由来GL37細胞の増殖は、無血清培地では効率が悪かった。

これらのことから、いくつかのワクチンウイルスを増やすという目的には無血清培地が使用できる可能性がある一方で、現在使用されている無血清培地では、ウイルスの増殖性や遺伝的安定性の面から、ワクチンの安全性および有効性の確保には、問題が

あることが明らかにされた。

一方、市販の牛血清中には牛ポリオーマウイルス遺伝子が高頻度に検出され、これらを用いて製造された一部生ワクチンの特定のロットにもこれが検出された。この迷入ウイルスの排除もしくは感染性を否定するために、ポリオーマウイルスの感染性の指標として全長の遺伝子 DNA に近い長い遺伝子断片を検出する PCR 法を開発した。これを用いて検索した結果、いずれの製剤からも長鎖 DNA は検出されず、感染性ウイルスの存在は否定出来ると判断された。牛血清には、従来の PCR で検出される DNA 断片は存在しても、感染性は欠如しているものと考えられ、現在のワクチン製剤の安全性には問題が無いと判断された。この方法による結果を牛ポリオーマウイルス迷入否定のための暫定基準とすることを提案した。

本研究結果から、いくつかのワクチンウイルスを増やすという目的には無血清培地が使用できる可能性がある一方で、現在使用されている無血清培地および組み換えタンパク分解酵素では、ウイルスの増殖性や遺伝的安定性の面から、ワクチンの安全性および有効性の確保には、問題があることが明らかにされた。

一方、平成17年4月から、BSEが発生している米国産の牛血清は、ワクチン製造用には使用禁止となり、ニュージーランドとオーストラリアのみが牛血清の供給地域となってしまった。しかし、この2地域においても今後BSEが発生する可能性は否定できず、もしも両地域が汚染地域になった際には、国内のウイルスワクチンの製造はほぼ完全に停止してしまい、我が国における感染症対策および公衆衛生上の危機となる。従って、このような状況にも対応できるワクチン製造体制を事前に確立することが不可欠である。このためには、本研究の成果に基づいて、更にスクリーニングの幅を上げた無血清培地および他の代替品の検索と、その安全性、有効性の検証が必要である。今後、これらの問題を解決して、動物由来の感染性因子が迷入していない安全なワクチンの開発・導入を図ることが国の政策上の重要かつ緊急課題である。

第2に、牛血清中に迷入している牛ポリオーマウイルスの感染性を否定する試験法として、長鎖 PCR 法を開発し、この結果を以て感染性牛ポリオーマウイルス迷入否定の暫定基準案とした。これを平成16

年10月に開催された薬事・食品衛生審議会、医薬品等安全対策部会に提案した。同部会で審議され、この条件を、牛ポリオーマウイルス迷入否定のための暫定基準とすることが了承された。

今後、この基準に基づいて、原料となる牛血清のスクリーニングを行う必要がある。一方、より直接的な感染性否定試験を開発し、牛血清に由来する感染性因子の排除を確実なものとする努力が必要である。

## 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、いくつかのワクチンウイルスを増やすという目的には無血清培地が使用できる可能性がある一方で、現在使用されている無血清培地および組み換えタンパク分解酵素では、ウイルスの増殖性が低下し、また遺伝的安定性の面から、ワクチンの安全性および有効性の確保には、問題があることが明らかにされた。特に、A型肝炎ワクチンについては、増殖効率が劣ることが示された。

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

現在我が国で市販されている牛血清の50%以上には、牛ポリオーマウイルスが迷入しているとされる。このウイルスが人の健康に対して危険であるとの証拠は無いが、ワクチン製造上からは、このウイルスの迷入を排除すること、または感染性が無いことを検証することが必要である。

牛血清中に迷入している牛ポリオーマウイルスの感染性を否定する試験法として、長鎖 PCR 法を開発し、この結果を以て感染性牛ポリオーマウイルス迷入否定の暫定基準案とした。これを平成 16 年 10 月に開催された薬事・食品衛生審議会、医薬品等安全対策部会に提案した。同部会で審議され、この条件を、牛ポリオーマウイルス迷入否定のための暫定基準とすることが了承された。

今後、この基準に基づいて、原料となる牛血清のスクリーニングを行う必要がある。一方、より直接的な感染性否定試験を開発し、牛血清に由来する感染性因子の排除を確実なものとする努力が必要である。

#### **G. 研究発表**

論文発表

なし

学会発表

#### **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



## 他動物由来物質を除いたおたふくかぜ生ワクチン製造法に関する研究

分担研究者 加藤 篤 国立感染症研究所ウイルス第三部室長  
協力研究者 木所 稔 国立感染症研究所ウイルス第三部主任研究管  
協力研究者 久保田耐 国立感染症研究所ウイルス第三部研究管

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)にムンプスウイルスワクチン株を接種することによって製造される。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が迷入する危険がつきまとう。過去 2 年に渡って市販の無血清培地が使用できるか否かを検討したところ、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く、増殖したウイルスを 2 代継代した範囲内ではブラックサイズ、SH 遺伝子の塩基配列供に明らかな差は認められないことが分かり、市販無血清培地を用いても現在と同等のムンプスウイルスを含んだワクチンを製造できる可能性が示唆された。そこで今年度は安全性の観点から継代を 8 代に増やし、それでも同等のムンプスウイルスと言えるかどうかを試験した。牛血清入り MEM 培地で増殖させた CEF を用いて 8 代継代したムンプスウイルスワクチン株のブラックサイズの平均値は、未継代のワクチンと変わらなかったが、無血清培地で増殖させた CEF を用いて 8 代継代したムンプスウイルスワクチン株のブラックサイズの平均は他より有意に小型化していた。

### 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發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、過去の試験において、牛血清を含まない市販の無血清培地(Opti SFM)が CEF の培養に使える事、その細胞を用いてムンプスウイルスワクチン株の増殖が遜色なく可能であることを示した。一方、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。実際、Opti SFM で増殖・維持された CEF は、顕微鏡的には血清入り培地の CEF とは形が異なっている。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。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可能性がある。昨年度は、3 つのワクチン株及び、1 つのワクチン候補株を 2 代継代した後に得られたウイルスのブラックサイズ並びに SH 遺伝子の塩基配列を比較したが、どちらにも優位な違いは見いだせなかった。今年度は、株を一株にしぼって 8 代まで継代した時に、この危険性がどの程度高いものなのかを確かめる事を目的に実験を行った。

### B. 方法

#### (細胞の準備と感染)

10 日令の發育鶏卵から胚と取り出し、常法に従って初代鶏胚培養細胞(CEF)を作製した。遠心により集めた細胞に従来の増殖培地(GM; MEM+10%TPB, 5%BS)と血清を含まない合成培地(Opti SFM; Opti-PRO SFM、Invitrogen Co.)を加え、 $5 \times 10^5$  細胞/ml になるようにした。10cm シャーレに  $5 \times 10^6$  細胞/シャ

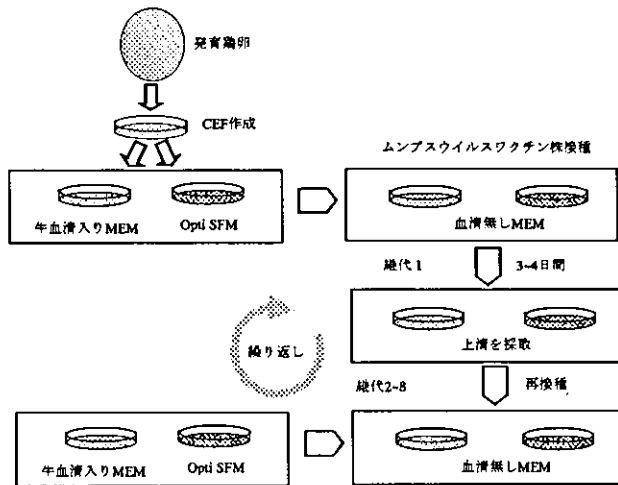


図1 CEFの培養と継代方法

一レになる様に加え、2~3日間培養した。

細胞がほぼ均一になった時に、国内で使われているワクチン株 A を感染価 0.002 で 1 時間吸着させ、液を除いたのちに PBS で一度細胞を洗った後、どちらも 5 ml の MEM 液(添加物無し)を加え 3~4 日間培養した(図 1)。

(継代試験)

3~4 日後の培養上清 5 ml を採取し、そのうち 1 ml を凍結保存し、0.2 ml をウイルス RNA 抽出材料とした残りを、再び、血清添加 MEM 培地と Opti SFM 培地で培養した CEF 細胞に一時間吸着させ、その後 PBS で細胞を一度洗って 5 ml の MEM 培地を加え、3~4 日間培養を行った。合計この操作を 7 回行い、継代歴 8 のウイルス液を得た(図 1)。

(RT-PCR)

継代歴 2 から 8 の培養上清から F プライマー: 5'-TCAAGTAGTGTCGATG-ATCTC-3' と R プライマー: 5'-AGGTG-GCATTGCTGACATTG-3' を使って RT-PCR を行う事によって、ムンプスウイルスの SH 遺伝子部分に対応する 549 塩基対の DNA 断片を増幅させた。RT-PCR 反応は、宝酒造のキットを用いて、説明書に従って行った。

(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、未継代のワクチン株 A、それを血清添加 MEM で培

養した CEF 及び Opti SFM 培養した CEF で 8 代継代したウイルス液を  $10^2$ 、 $10^{2.5}$ 、 $10^3$ 、 $10^{3.5}$  の間で適当に希釈して 0.1ml を接種し、0.8%アガロース培地を重層して 37°C で培養した。接種後 7 日後にニュートラルレッドを含むアガロース層を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、その各平均値間の統計学的有意差を Student の t 検定 ( $P < 0.05$  を有意差有り) によって判定した。8 代継代したものについては試験を 2 度行った。

C. 研究結果

昨年度の本課題では、継代 2 代の範囲内では増えてくるウイルスに質的な差は生じていないことを、ブラックサイズと SH 遺伝子の塩基配列により示した。しかし、この様な限られた、且つ、ぶれの範囲がある程度見込まれる条件下でブラックサイズに有意差が無く、顕著なウイルス形質上の差が見られなかったとするだけでは品質管理の観点からは不十分であるとの反省に基づき、今年度は、その継代を 8 代まで行い、培養方法の違いによりウイルスが異なる集団になり得るかどうかを検証することを試みた。

この試験の動機は、血清添加 MEM で培養された CEF と Opti SFM で培養された CEF は、生化学的に細胞増殖の速度が違うばかりでなく、形態学的にも細胞が異なっており、培地中に含まれる物質により細胞の生理状態

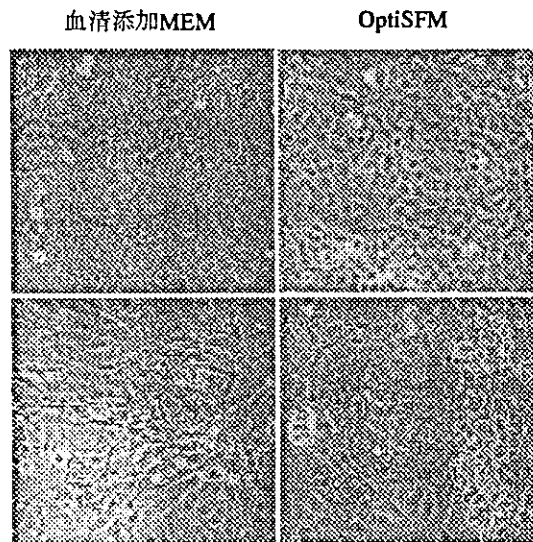


図2 培地による細胞形態の違い

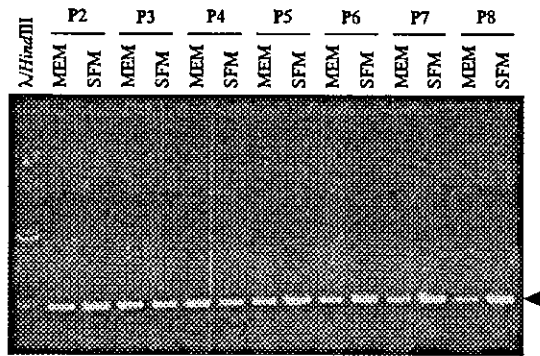


図3 継代とRT-PCRで増幅されたムンプスウイルスSH遺伝子

も、含まれている細胞の種類も異なる印象があることに由来する(図2上)。血清添加MEMでは主に細長い細胞が多いのに対して、Opti SFMでは敷石型の細胞の比率が高い。0~3代継代したムンプスウイルスワクチン株AをCEFに接種してしてもVero細胞で見られる様な顕著な細胞融合を伴う変性は見られない。形が縮んだり、球状になった細胞が多くなり、感染に伴ってそれらが培養器から離れて浮遊するのが見られる程度である(図2左下)。ところが、5代を経過するところから、Opti SFMのCEFに感染させると、比較的明瞭な細胞変性を示す様になった(図2右下)。

継代時に採取した培養上清の一部からRNAを抽出し、ムンプスウイルスのSH遺伝子部分を増幅することができる(図3)。継代数4までは、血清入りMEMとOpti SFMどちらを使って培養したCEFを用いてもほぼ同じ様な濃さのバンドが検出されていたが、継代数5から、Opti SFMで培養したCEFに感染させた方がより太いバンドが観察されるようになった。この様なバンドの太さの違いは、ウイルスの増殖の程度を反映していると思われ、実際、継代数8のウイルス量は、血清入りMEMで $10^{5.06}$ 、Opti SFMで $10^{6.79}$ であ

り、その間には50倍の開きが認められた。

継代数0(原株)及び8のウイルスそれぞれをVero細胞に接種し、ブラックを作らせた(図4)。どのブラックも周囲がはっきりしており、形態は明瞭であった。しかし、Opti SFMで培養したCEFで8継代したウイルスは、比較的形の小さなブラックが多く含まれている様に見られた。一方、血清入りMEMで培養したCEFで8継代したウイルスでは、中には大きなサイズのブラックも認められるが、大多数は継代前のサイズとほぼ等しいように見えた。ブラックのサイズを計測し、ヒストグラムを作製したところ、それが裏付けられた(図5)。継代数0のワクチン原株は、比較的均一なブラックサイズの一団と思われるが、それを血清添加MEM培養CEFに8代継代すると、小さなブラックサイズのものから、大きなブラックサイズのものまでが範囲が広がるようにも見える。ただし、平均値に有意差は認められなかった( $P=0.4892$ , 図6上)。一方、Opti SFM培養CEFに8代継代すると小さなブラックのものに集約されている様に見られ、実際にそれは、統計学的に有意な差を示した( $P=0.0028$ )。8代継代したものでどうして比較すると、やはり平均値の差には統計学的有意差が認められた( $P=0.0028$ )。このことを確かめる目的で、もう一度8代継代したものだけをVero細胞に再び接種し、ブラックサイズを比較したところ、血清添加MEM培養CEFとOpti SFM培養CEFとでは、平均値の差に再び統計学的有意差が認められた( $P=0.0000002$ , 図6下)。

#### D. 考察

動物由来感染性因子のムンプスワクチンへの迷入を最小限にする試みとして、完全合成培地Opti PRO SFMの可能性を検討してきた。今年度は昨年度の結果を踏まえ合成培地で培養したCEFにムンプスワクチン株Aを8代まで継代培養し、その生物学的性状の変化をブラックサイズを指標に評価することを試みた(図4)。血清添加MEMで培養したCEFに8代継代したウイルスでは、原株と比較して平均値としてブラックサイズに変化を認めなかったものの、無血清合成培地Opti SFMで培養したCEFに8代継代したウイルスのブラックサイズの平均値は有意に

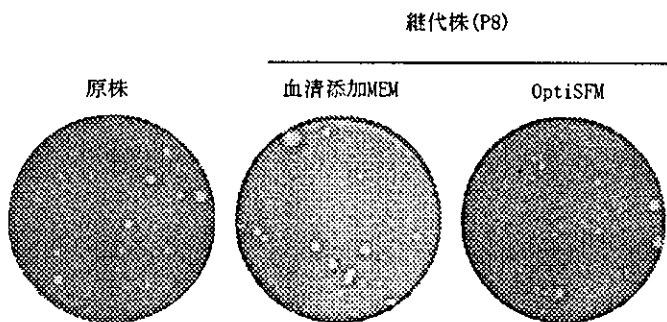


図4 継代方法とブラックの大きさ

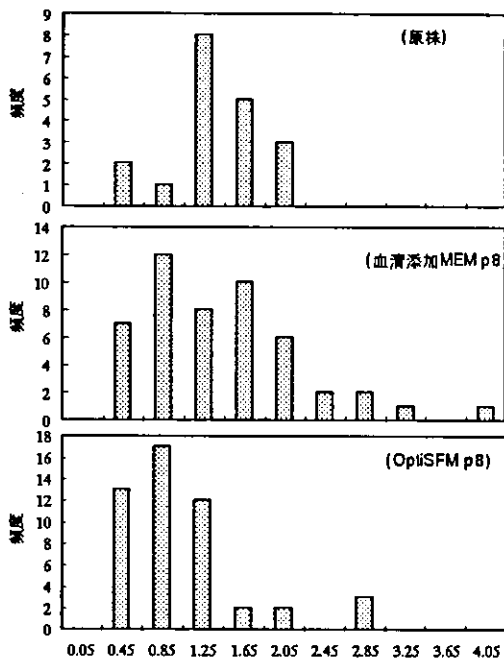


図4 継代方法とブラックの分布

低下していた(図6)。ヒストグラム(図5)は、血清添加 MEM で培養した CEF に8代継代したウイルスは、ワクチン原株に比べて大きなブラックサイズのウイルスと小さなブラックサイズのウイルス両方を含むことを示した。平均値が変わらなかったのは、ブラックサイズの大きなウイルスの個数が少ないことと、ブラックサイズの小さなウイルスの個数が上がった結果であると思われる(エラーバーの幅も広い)。一方、Opti SFM で培養した CEF に8代継代したウイルスのブラックサイズは、もっぱら小さなブラックを作るウイルスの集団からなっているように見えた。

この実験結果により、(1)継代により、ウイルスがより雑多な集団を構成するようになること、(2)CEF は用いる培養条件により構成される細胞の種類、あるいは細胞の生理条件の変化により異なったウイルスを増やしやす傾向があることが明らかになった。この二つの点は、ワクチンの品質管理上重要な点であると思われる。

繰り返しになるが、無血清培地 Opti SFM は、CEF の培養に使い、ムンプスウイルスワクチン株のウイルス収量を高くするのに効果がある。しかし、鶏胚から得られる CEF 細胞の形が異なること、それによりウイルス感染後の CPE 出現の仕方、ウイルス増殖速度が変わり、結果的にバイアス変異のかかったウイルスがワクチン原株から選択されてきたことを本実験は示したと思われる。すなわ

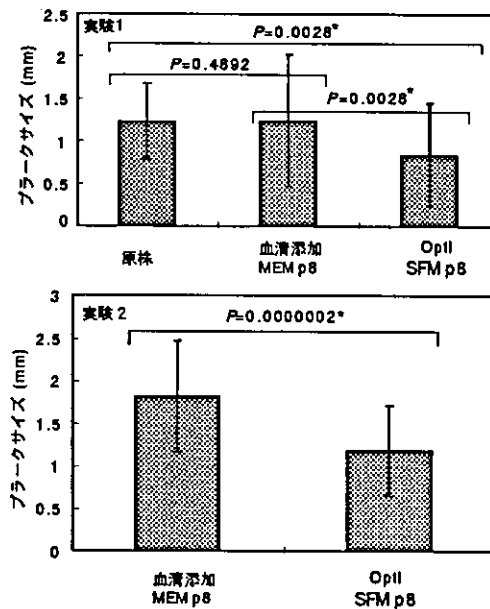


図5 継代条件によるブラックサイズの変化

ち、現行の製造では「ワクチン製造承認株から5代以内の継代」ならば、その間に株に大きな変化をしていないと見なして、製造に使えるが、この無血清培地 Opti SFM に関して言えば、2代の継代であるならば、ウイルスに有意な変化を認められないが、8代を経ると確実に違ったものに変化しており、RT-PCR によるバンドの太さの変化から継代5代目くらいに変化が現れたように推測される。ワクチン製造の現場のプロセスと、今回の実験のプロセスは異なり、製造現場でも5代で変化が現れるとは言い切れない。もっと、後かもしれないし、もっと前かもしれない。また、用いる株によってもその時期が変化する可能性がある。しかし、いずれにしても、ウイルスの同等性を保証しきれない状況では、ただちに無血清培地での培養を製造現場に当てはめるわけにはいけないと思われる。

## E. 研究発表

### (1) 論文発表

1. A. Kato, C. Cortese-Grogan, S. A. Moyer, F. Sugahara, T. Sakaguchi, T. Kubota, N. Otsuki, M. Kohase, M. Tashiro, and Y. Nagai. Characterization of the amino acid residues of Sendai virus C protein that are critically involved in its interferon antagonism and RNA synthesis down-regulation. *J Virol.* 76:7114-7124 (2004).

2. Y. Nagai, and A. Kato. Accessory genes of the Paramyxoviridae, a large family of nonsegmented negative strand RNA viruses, as a focus of active investigation by reverse genetics, in press. In Y. Kawaoka (ed.), *Biology of Negative Strand RNA Viruses: The Power of Reverse Genetics*, Springer-Verlag GmbH and Co. KG, *Curr. Topic Microbiol. Immunol* **283**:198-248 (2004)

(2) 学会発表  
(国際学会)

1. Kato, A., C. Cortese-Grogan, S. A. Moyer, F. Sugahara, T. Sakaguchi, M. Tashiro, and Y. Nagai. Characterization of the amino acid residues of Sendai virus C protein that are involved in its interferon antagonism. *Workshop on Replication and Cell Biology of Negative Strand RNA Viruses*. Evanston, IL, USA June 12-16, 2004

(国内学会)

1. 加藤 篤、久保田 耐、田代真人、永井美之：センダイウイルス C 蛋白質による抗インターフェロン効果 第 52 会日本ウイルス学会総会、神戸、2004 年 11 月
2. 久保田 耐、横沢紀子、横田伸一、藤井暢弘、田代真人、加藤 篤：ムンプスウイルスによる STAT1 分解とは異なる経路を介した宿主 IFN 情報伝達阻害 第 52 会日本ウイルス学会総会、神戸、2004 年 11 月
3. 村木優子、真鍋貞夫、福家 巧、石川豊加藤 篤、田代真人、山西弘一、高橋理明：ムンプスウイルスの神経病原性評価法としてのマーマセット接種試験の妥当性について 第 52 会日本ウイルス学会総会、神戸、2004 年 11 月
4. 坂口剛正、菅原文博、島津幸枝、加藤 篤、井上 誠、永井美之、吉田哲也：センダイウイルス C 蛋白質は宿主因子 AIP1 と相互作用してウイルス出芽を促進する。第 52 会日本ウイルス学会総会、神戸、2004 年 11 月
5. 立川(川名)愛、細谷紀彰、加藤 篤、塩田達雄、永井美之、岩本愛吉：エピトープ欠乏 b2 ミクログロブリンと TAP 阻害タンパク質を用いた HIV-1 特異的 CD8 陽性

T 細胞への効率的な抗原提示法の開発  
第 52 会日本ウイルス学会総会、神戸、2004 年 11 月

6. Identification and functional analysis of Calpain6 as a molecule down stream to endothelin-1 signaling in branchial arch formation. : 砺波一夫、栗原由紀子、佐藤崇裕、天野朋和、油谷浩幸、加藤 篤、栗原裕基：頭部/心臓神経堤細胞の発生分化における Endothelin-1 の役割 第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、2004 年 12 月

(3) 知的財産権の出願・登録状況  
無し

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）  
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  
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）  
協力研究者 沼崎 啓（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。現行の製造法と同等のウイルス量を得るには鶏胚組織から細胞を単離する方法の改良も必要である。

#### 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。前年度は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、ウイルス収量は減るものの増殖は可能であることを明らかにした。ウイルス収量が減る原因として、①牛血清中に含まれる細胞増殖因子の欠如、②Trypsin（ブタの豚由来）の代替品として使用した Dispase<sup>®</sup>の影響などが示唆された。そこで本年度は、胚組織から胚細胞を単離する際に使用する酵素のウイルス収量に及ぼす影響について検討した。

#### 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3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<sup>R</sup> (1 IU/ml in PBS, Invitrogen) 溶液で消化した細胞を PBS (-) でよく洗浄した後、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。3) Dispase<sup>R</sup> (1 IU/ml in PBS, Invitrogen) 溶液で消化した細胞を PBS (-) で 2) と同様に洗浄した後、市販の無血清培地 (Opti Pro<sup>TM</sup> SFM, Invitrogen) に再懸濁する。各細胞を 1 穴当り  $3 \times 10^6$  個になるように 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、32℃の 5% 炭酸ガス培養装置内で培養した。接種後 2 日、5 日、8 日に各培養上清を採取し、ウイルスの力価測定まで -80℃ で保存した。力価の測定には Vero 細胞を使用し、plaque 法 (1 希釈 2 穴、1 検体 10 倍階段希釈で 3 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

1) 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、2) Dispase<sup>R</sup> による消化後、従来の血清培地で培養した細胞、3) Dispase<sup>R</sup> による消化後、市販の無血清培地で培養した細胞を 1 穴当り  $3 \times 10^6$  個になるように 6 穴の培養プレート上にまき、それぞれ 8 日間 Eagle's MEM で培養した。8 日後の各細胞の 1 穴当りの細胞数は  $1.0 \times 10^6$ 、 $1.3 \times 10^6$ 、 $0.4 \times 10^6$  で、Dispase<sup>R</sup> で消化し、市販の無血清培地で培養した細胞の減少量は他の細胞に比べ著しかった。

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の場合には、接種後 8 日目まで上昇し続けた。一方 Dispase<sup>R</sup> による消化後、市販の無血清培地で培養した細胞の場合には、5 日目にはプラトーに達していた。Dispase<sup>R</sup> による消化後、従来の血清培地で培養した細胞の場合でも 5 日目にはプラトーに達していた。接種後 8 日目のウイルス力価の比較では、Dispase<sup>R</sup> 消化群の方が Trypsin 消化群より 1.0 log 程度低かった。今回、B 社のワクチン株では、A 社、C 社の株で見られたような増殖の差は認められなかった。

#### D. 考察

本年度は Trypsin の代わりに用いた Dispase<sup>R</sup>がその後の細胞の増殖やウイルスの増殖に影響を及ぼさないか検討した。Trypsin は血清を加えることによって酵素活性を不活化することができるが Dispase<sup>R</sup>には洗浄する以外に不活化する方法がない。細胞の増殖は牛血清を含む従来 of 培地で培養する方が良好で、胚組織から細胞を単離する酵素には依存していなかった。このことは Dispase<sup>R</sup>で消化後、十分に洗浄すれば、細胞の増殖には影響がないことを意味している。しかしウイルスの増殖に関しては、Dispase<sup>R</sup>で消化した群では、Trypsin で消化した群に比べて 1 log 程度低い傾向が認められ、残留した微量の Dispase<sup>R</sup>がウイルスの増殖に影響を及ぼしていることが考えられた。

#### 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で弱毒生麻しんワクチンを製造することは不可能ではない。しかし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、細胞を消化する際に用いる酵素の開発および不活化法の改良が必要である。

#### 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

麻疹ウイルスの分離および中和抗体価測定における Vero/hSLAM 細胞の有用性. 齋藤義弘、海野幸子、柳雄介、田代真人 第 52 回日本ウイルス学会. 東京 11 月 2004

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

無し

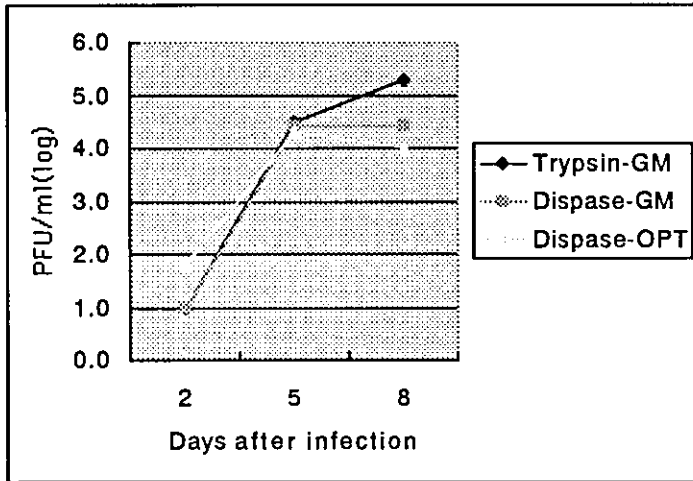
##### 2. 実用新案登録

無し

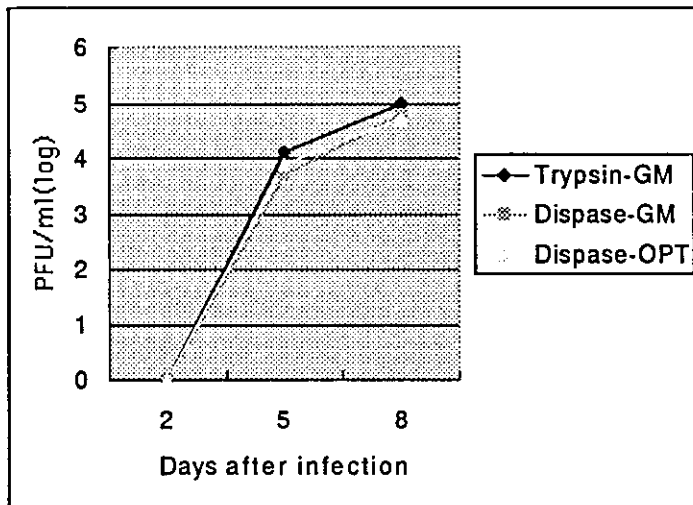
##### 3. その他

無し

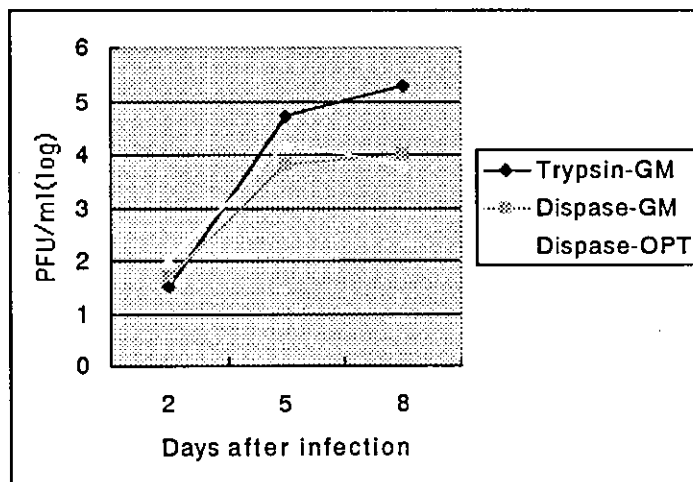




A 社弱毒生麻疹ワクチン



B 社弱毒生麻疹ワクチン



C 社弱毒生麻疹ワクチン

図 麻疹ウイルスカ価の比較

平成16年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）  
分担研究報告書

無血清 Vero 細胞を用いた継代による風しんワクチンウイルスの  
塩基配列への影響に関する研究

分担研究者 海野幸子（国立感染症研究所）

協力研究者 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 DM201 に馴化させた Vero 細胞で5代継代した風しん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。一方 DM201 培地にペプトン（大豆由来）を添加した培地に馴化した Vero 細胞で5代継代したウイルスでは E1 遺伝子上にアミノ酸の変異を伴う遺伝子の変異が 1 塩基で認められた。

#### 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代継代の範囲で、初代ウサギ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ワクチン製造時に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、我国では現在まで風しんワクチンの製造に用いられたことはない。前年度までの研究により DM201 培地に馴化した Vero 細胞においてワクチンウイルスがよく増殖するとともに本条件で増殖させたワクチンウイルスは、RK-13 細胞における温度感受性の変化および E1 タンパクをコードする遺伝子には変異が認められないことが、3代継代の範囲で確認されている。

本年度さらに 2 代継代し合計5代継代を行うことによりウイルスの遺伝学的変異の有無を調べることを目的とした。

#### B. 研究方法

DM201 培地単独、或はそれに 1%大豆由来ペプトンを添加した培地及び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（To-336 株）を m.o.i 0.4 で接種し 35℃ で5日間培養した。ウイルス感染後の培地は牛血清存在下で増殖させた細胞はペプトン未添加の DM201 培地を使用し、無血清培養の 2 種については細胞増殖用培地と同じものを使用した。各培養期間終了後3回の凍結融解を行い、回収したウイルス液を m.o.i 0.4 から 3.0 で新たな細胞に接種を行

い合計5代目まで継代を繰り返した。昨年度までの研究結果より 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い事が確認されているので、プラーク分離を経ずに得られたウイルス液から直接ウイルス RNA を抽出し E1 タンパクをコードする遺伝子領域を4つに分け RT-PCR を行った。得られた PCR 産物を用いダイレクトシーケンスを行い E1 領域 1443bp の塩基配列を決定し、元のワクチンウイルスのそれと比較した。

### C. 研究結果

各細胞で5代継代させたウイルスから得られた塩基配列及び元株である To-336 株の塩基配列を比較すると、血清を含む DME で培養した細胞及び DM-201 単独で培養した細胞で5代継代したウイルスでは元株である To-336 株と E1 領域 1443bp では変化が認められなかった。一方、1%ペプトンを添加した培地でウイルスを継代した細胞で継代したウイルスの E1 遺伝子の 271 番目の塩基の置換が認められた。この塩基の置換により 91 番目のアミノ酸がセリンからアラニンへと変化した。

### D. 考察

今回行った PCR 産物からの配列解析においては、無血清培地 DM201 培地及び牛血清を含む DME 培地を用い培養した Vero 細胞で各々増殖させ、5代継代させたウイルスでは元のウイルスと E1 遺伝子に変化は

認められなかったが、DM201 にペプトンを1%添加した培地で培養した Vero 細胞を用いた場合アミノ酸の変化を伴う塩基配列の置換が生じていた。風疹ウイルス E1 タンパク上には赤血球抗原や中和活性を担う抗原部位が存在しているため、感染防御抗原として重要だと考えられている。今回生じたアミノ酸の変異によりワクチンウイルスの生物活性や抗体誘導能が変化するか否かは不明であるが、本培養条件によりワクチンウイルスの塩基配列に変異を起こす事が示唆された。しかしながら本ワクチンウイルスは本来初代ウサギ腎細胞を用いワクチンを製造するため、本試験の様に Vero 細胞を用い培養した場合のウイルス遺伝子の安定性や生物活性の検討は今まで十分に行われていないこと、またワクチン株であっても単一の遺伝子を持つウイルス集団とは考えにくいことを考慮すると本遺伝子の変異がペプトンを1%添加した DM201 を用い培養された Vero 細胞で5代継代された場合でのみ出現するのか、継代時の接種 m.o.i によっては DM201 単独で培養した細胞であっても遺伝子の置換を引き起こすのか否かは十分な検討が必要と考えられる。一方、無血清培地で培養可能な Vero 細胞を用いワクチンを製造する事は混入する感染性因子の制御の観点から捉えると非常に有用であり、今回の試験では DM201 単独で培養した Vero 細胞でウイルスを継代した場合 E1 遺伝子には変異が認められない事を考慮すれば、今後風しんワクチンの製造法として無血清培地及び Vero 細胞を用

いることを検討することはワクチンの安全性の面から非常に重要だと考えられる。

#### **E. 結論**

無血清培地 DM201 で培養した 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**

無し

#### **G. 研究発表**

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

日本の風疹流行の現状 第 4 回国際  
ワクチン免疫学会、2004 年 9 月、茨  
城県つくば市

抗体検査から見た 2003 年の風疹 日  
本ウイルス学会第 52 回学術総会、2004  
年 11 月、横浜

麻疹ウイルスの分離及び中和抗体価  
測定における Vero/hSLAM 細胞の有用  
性 日本ウイルス学会第 52 回学術総  
会、2004 年 11 月、横浜

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況**

無し