

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、よりウイルス抗原量を反映するために日本脳炎ウイルス抗原定量 ELISA 法を確立し、ウイルス抗原量を測定した。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、回収時期の検討なども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。今回は、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、ウイルス増殖（ウイルス抗原量）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、ウイルス抗原量を ELISA 法により検討した。

2. 日本脳炎ウイルス抗原定量 ELISA 法

1) IgG の固相化

抗日本脳炎ウイルス monoclonal antibody (Group-8, clone 503; 財)東京都神経科学総合研究所保井孝太郎博士より分与) を 10 μg/mL の濃度で 100 μl/well, 4℃下で一晩固相化した。

2)一次反応

0.1%BSAを加えた0.05% Tween-20のPBSを希釈液として用い、標準抗原、検体を上記の希釈液で一次希釈し、0.05%Tween-20,PBSを用いて固相化した Plate を6回洗浄後、希釈した抗原を100 μ l/well添加し、37 $^{\circ}$ C, 60min.反応させた。

3)二次反応

0.05%Tween20,PBS を用いて一次反応の終了した Plate を4回洗浄した。標識抗体は HRP-Anti Flavivirus monoclonal antibody (D1-4G2-4-15) IgG を500x (2.0 μ g/ml)濃度で用いた。37 $^{\circ}$ C,60min.反応させた。

4)発色

0.05%Tween-20,PBS で二次反応の終了した Plate を4回洗浄し、TMB 発色基質を加えた。室温で15分間反応(遮光下)させた。

5)反応停止

発色反応の終了した Plate に反応停止液(1N硫酸)を100 μ l/well添加した。

6)吸光度の測定

OD450を測定

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

VP-SFM は良好であった。とくに形態的变化は認められない。Opti-SFM は細胞が植え替え時にピペ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。Ex-520 は細胞接着が3継代目よりやや不良となった。Ex-MDCK は3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. ELISA 法による抗原量の定量

2%FBS 加 MEM 培地に比べて、VP-SFM、Ex-520 はウイルス接種後3日目では、それぞれ99.4%、91.7%とそれほど大きな差は無かったが、Opti-SFM は38.1%と少なかった。2%FBS 加 MEM 培地に比べて、VP-SFM、Opti-SFM、Ex-520 について共通する傾向は、接種後3日目をピークに急激に低下する傾向があった。(図2、表1)

D. 考察

日本脳炎ワクチンは、近年接種後に急性散在性脳脊髄炎(ADEM)を来した報告があり、因果関係は不明であるが、早期にマウス脳由来のワクチンから組織培養不活化ワクチンに移行することが望まれている。一方、日本脳炎ウイルスが髄膜炎を引き起こした症例も確認されている(Emerg. Infect. Dis. 11(3):471-473, 2005)。したがって、より安全なワクチンが待ち望まれている状況である。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。昨年度と同様、今年度も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、ウイルス抗原産生量を日本脳炎ウイルス抗原定量ELISAを用いて検討した。MDCK細胞用の無血清培地であるEx-MDCKでは、やはり3継代目より細胞接着が不良であったため、ウイルス接種を実施しなかった。2%FBS加MEM培地に比べて、VP-SFM、Ex-520はウイルス接種後3日目ではそれほど大きな差は無かったが、Opti-SFMは38.1%と少なかった。2%FBS加MEM培地に比べて、VP-SFM、Opti-SFM、Ex-520について共通する傾向は、接種後3日目をピークに急激に低下する傾向があった。昨年度の検討でプラーク数では、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。今回ワクチン生産に重要なウイルス抗原量を測定した結果、やはり 3 日目がピークでその後急激に減少することが確認された。

E. 結論

牛胎児血清の混入を完全に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することは昨年すでに確認していたが、欠陥粒子をも含むウイルス抗原としてもやはり、低下していることを確認した。しかし、接種後 3 日目に回収すれば、それなりのウイルス抗原量が回収できる可能性は示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Masaru Kuwayama, Mikako Ito, Shinichi Takao, Yukie Shimazu, Shinji Fukuda, Kazuo Miyazaki, Ichiro Kurane, Tomohiko Takasaki. Detection of Japanese encephalitis virus genome in cerebrospinal fluids from meningitis patients in Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 11(3):471-473, 2005

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1

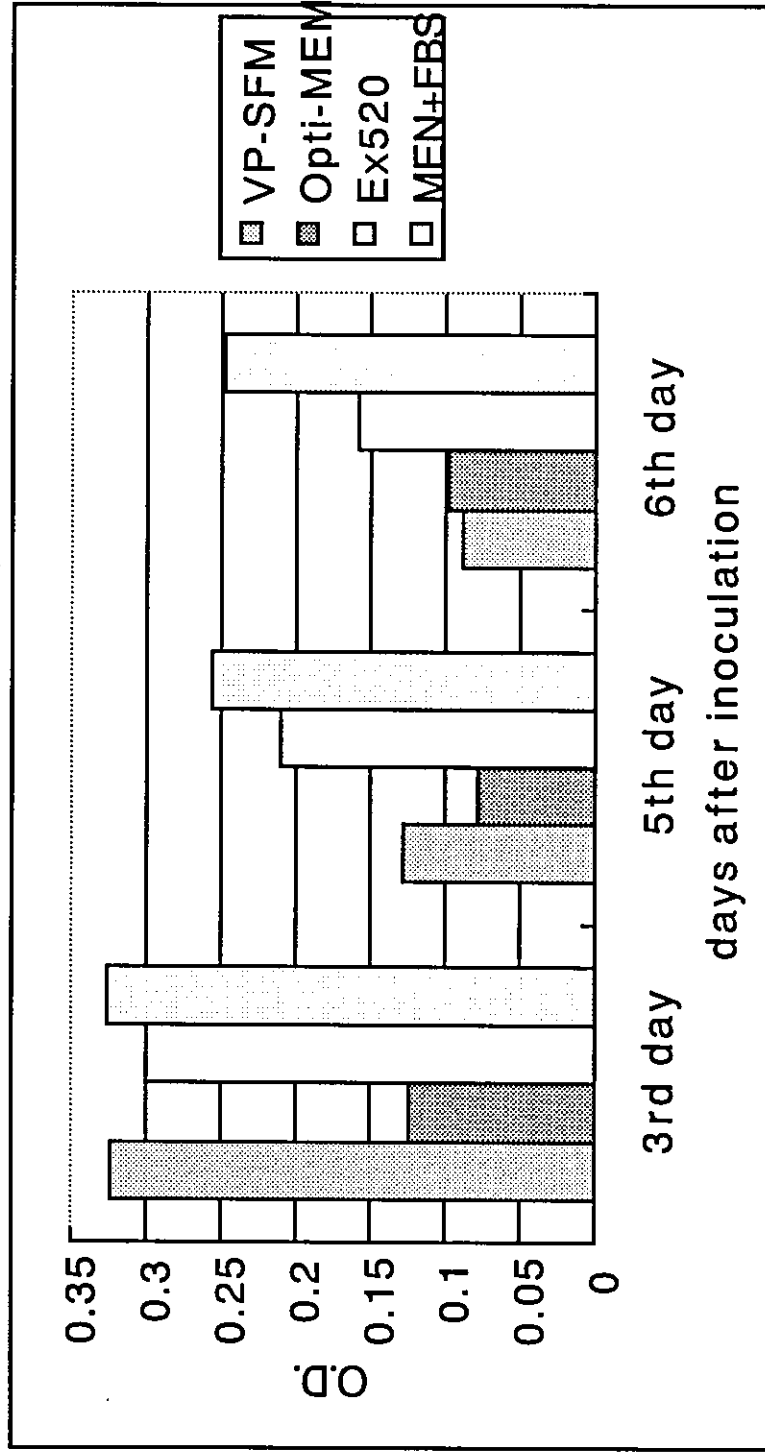
ウイルス接種後のウイルス抗原量比

	VP-SFM	Opti MEM	Ex520
3rd day	99.4	38.1	91.7
5th day	49.9	30.7	82.0
6th day	35.7	39.9	64.1

数字は、ウイルス接種後3日目、5日目、6日目の産生ウイルス抗原量を2% FCS加MEMによるウイルス抗原量を100%にした場合の抗原量比率（%）である。

図1

ウイルス接種後のウイルス抗原量



分担研究報告書

水痘ワクチンのシード管理に関する研究

分担研究者 井上 直樹（国立感染症研究所ウイルス1部）
協力研究者 野沢 直樹（国立感染症研究所ウイルス1部）
原田 志津子（国立感染症研究所ウイルス1部）
倉根 一郎（国立感染症研究所ウイルス1部）

研究要旨 弱毒生水痘ワクチン（岡株）は安全性・有効性に優れたワクチンである。しかし、弱毒化のメカニズムは明確にされておらず弱毒・強毒を容易に判定できる方法も確立されていない。このため、牛由来成分を含まない新たな培養条件等を検討した場合、ワクチンとしての有効性と安全性を生物学的に評価することは容易ではない。本研究では、ワクチン株に特徴的な塩基置換や2種の配列が混在する部位での各配列の割合がいかん保存されているかについて、遺伝子レベルで定量的かつ迅速に検討できるLightCyclerによるTm値解析法を検討し、シードロット管理への応用の可能性を示した。本法は今後、牛由来成分を含まない新たな培養法などの評価に応用できると考えられる。

A. 研究目的

岡株水痘ワクチンは、高橋らにより世界に先駆けて開発された弱毒生ワクチンで、その安全性・有効性はWHOの専門家委員会においても高く評価されている。世界中のメーカーがこの岡株を用いてワクチン製造を行なっている。また、我国においては生ワクチンとしてはじめてシードロット管理が導入されたワクチンでもある。我国での接種率は20-30%と推定されているが、米国をはじめとした多数の国においては学童期前の全小児への接種を目指した取り組みが実施されている。

水痘ワクチンについては、弱毒化のメカニズムが依然として明確でなく、SCID-huマウスなど特殊な系を用いる以外には容易に弱毒・強毒を判定しえる動物モデルなどのアッセイ系が存在しない。従って、牛由来成分を含まない新たな培養条件などを検討する場合、ワクチンとしての有効性と安全性を生物学的に評価することが容易ではない。このことから、新たな培養条件などで製造するワクチンの安全性・有効性を判断する第一ステップとして、現行ワクチンに特徴的な遺伝子配列が保存されていることを保証することが重要と考えられる。

水痘帯状疱疹ウイルスのゲノムは約15万塩基対より成る。Gomiらはワクチン株（V-Oka）とその親株（P-Oka）の全塩基配列を決定し、両者の比較から、1）両株間で差異は42箇所の配列のみに過ぎないこと、2）いくつかの配列部位では親株とワクチン株配列の”混じり“が存在することを報告した。”混じり“の存在は、外国社製品にも見られることから実用化段階からすでに存在していたものと思われる。42箇所の塩基変異の内20箇所がアミノ酸置換を伴い、その8置換は前初期蛋白IE62（ORF62遺伝子産物）に集中し、IE62のもつ転写活性化能の低下が弱毒化の一端を担っていると考察されている。

本研究では、ワクチン株に特徴的な塩基置換や配列の”混じり“の程度がいかん保存されているかを定量的かつ迅速に検討できる方法を開発し、シードロット管理の適正な運用の検証とワクチン株の新規培養法の評価を可能とする。

B. 研究方法

1) 方法の原理

米国疾病対策センター(CDC)において開発された蛍光エネルギー移動(FRET:

fluorescent resonance energy transfer)を応用したVZV遺伝子の多様性解析法(Loparev et al., 2000)を導入した。その原理は、図1に示すとおりである、プローブA及びBがテンプレートにハイブリダイズするとプローブAの3'末端に標識されたFITC色素が獲得したエネルギーが近傍のプローブBの5'末端に標識されたLC640やLC705色素に転移して測定可能な蛍光が生じるが、徐々に温度を上昇させプローブがテンプレートより解離すると蛍光が消失することでTm値が求められる (melting curve analysis)。この際、V-Okaで予想される変異部位をプローブB内に設定するとV-OkaとP-OkaのTm値の差異をもとに両者を判別することができる。

2) プライマー及びプローブ

ターゲットとする遺伝子、プライマー配列、FAM (もしくはFITC) で標識されたプローブA及びLC640で標識されたプローブBの配列は表1に示す。

3) 非対称PCRとTm値解析

2つのプライマーの量比を変えるとともに少ない方のプライマー濃度を通常より低い0.25 μ Mに設定することでmelting curve analysisでプローブがハイブリダイズするDNA鎖を過剰に産生した。PCRは、Applied 2700のサーマルサイクラーを用いて50 μ lのスケールにて、95_10分の初期ステップ、95_30秒、58_30秒、72_30秒の40-45サイクル、72_4分の最終ステップの条件で行った。PCR産物は、アガロース電気泳動により確認後、その10 μ lを0.2XSSC、2.5mM MgCl₂を含む反応液(全量20 μ l)をキャピラリーに充填しLight Cycler (ロシュ)によるmelting curve analysisに用いた。その際の条件は95_1分で完全に一本鎖DNAとし、0.95_/秒で40_まで冷却後40_4秒保温することによりアニリングさせ、0.40_/秒で95_まで加温する過程でTm値測定を行った。Tm値の測定は自動解析モード及び各ピークの相対的面積はTm値 \pm 2.0 $^{\circ}$ C間のデータシートで得ら

れる0.2_ごとの蛍光測定値を積算して求めた。

4) VZVの増殖とゲノムDNAの精製

V-Oka株 (J Cohen博士より分与)、P-Oka株(山西弘一博士より分与)、Webster株 (DS Schmid博士より分与) の培養にはヒト2倍体細胞HLF(CDC組織培養施設より分与)を用いた。Strausらの方法に従いゲノムDNAをnucleocapsid DNAとして精製した。即ち、感染細胞を集め、界面活性剤を含む緩衝液で溶解後、細胞由来の核酸を酵素分解し、ここからウイルスキャプシドを含む分画を超遠心により回収後、プロテアーゼ処理、フェノール抽出によりキャプシドにパッケージングされていたVZVゲノムDNAを精製した。

乾燥弱毒水痘生ワクチン製品バイアルを用法に従い0.7mlの注射用水で溶解し、その0.2ml分に5 μ gのsalmon sperm DNAをキャリアDNAとして加えたものからQIAamp DNA Mini kit (QIAGEN)を用いて100 μ lの水痘ワクチンDNA精製標品を得た。

PCR反応当り、感染細胞より精製したゲノムDNAは10ng、ワクチン製品由来標品では0.1-1 μ lを用いた。

5) ワクチンDNAの定量

すでに報告されているTaqMan PCR法 (Hawrami & Breuer, 1999) により、ワクチンDNA精製標品中のVZV DNAの定量を行った。コピー数決定のコントロールには濃度のわかっている精製したV-Oka株のnucleocapsid DNAを用いた。

6) ワクチンの力価測定

ヒト2倍体細胞にウイルスを接種し2時間培養後、接種液を除きメチルセルロースを含む培地で7-8日培養後、メチレンブルーで染色しプラーク数を測定した。

C. 研究結果

1) PCR条件及びTm測定条件の検討

ORF62A及びORF62B領域を増幅する非

対称PCRのプライマー量比を1:2-1:8の間で変化させ、また、少ない方のプライマー濃度を0.25 μ Mと0.5 μ Mとする条件で検討したところ量比1:4、0.25 μ Mが至適であった(図2)。

プローブとの反応の際にSSC濃度を変化させハイブリダイゼーションにおけるstringencyの影響を検討したところ、stringencyの高い条件(0.4xより低濃度のSSC)において1xSSC条件よりシャープなTm曲線の分布が得られた(図3)。

2) Tm値に基づくワクチン株と親株の判別

V-OkaにP-Okaを1:1(50%)から15:1(6.25%)の量比で加えてP-Okaの混入がどこまで判定できるかをTm値解析により検討した。ORF62A部位の場合V-OkaとP-OkaのTm値に約7 $^{\circ}$ Cの違いがあり、16分の1程度のP-Okaの混入でもV-Okaのシグナルにかぶることなく容易に検出できた(図4A)。ピーク面積の解析値から求めたP-Okaの混入割合は設定した割合と良く相関し(図4B)、この解析法に一定の定量性が期待できることが示された。

ORF62B及びORF62C領域については株間の判別はできるもののTm値の差がORF62A領域より小さく、少量のP-Oka株混入を検出するためにはプローブの改変が必要であると考えられた(図5)。

3) 異なる製造ワクチンロットのTm値解析

過去数年間に市販されたワクチンのいくつかのロット(阪大微研会より分与)についてウイルスを培養することなくワクチンバイアルそのものからDNAの抽出を行った。TaqManを用いてDNAの定量を行ったロットでは約 4×10^{10} コピー/mlのVZVゲノムが存在することが示された。このロットの感染力価は 9.8×10^4 /mlであった。

製造ワクチンより精製したDNAについてORF62Aに対するプローブを用いてTm値解析を行った。その際、V-Oka、P-Oka及びV-OkaにP-Okaが16分の1量混入しているものをコントロールとした。その結果、検討

したすべてのワクチンロットにおいて、ORF62A領域に対するプローブでV-OkaのTm値を示し、P-Okaへの復帰変異の混入は検出されなかった。

D. 考察

ワクチン株での塩基置換のうち、ORF62遺伝子内の3箇所についてLightCyclerのTm値解析がV-OkaとP-Okaの判別に有効であることを確認した。またORF62A領域については少量でも親株の混入は検出できた。少なくとも検討した範囲では製造ワクチン株に親株への復帰変異は検出されないことが示され遺伝子レベルからみてもシードロット管理が適切に運用されていることが示唆された。

今回プローブとしてP-Oka株由来の配列を用いたが、この場合、V-OkaからP-Okaと同一の塩基配列への復帰変異は検出できる。しかし、P-OkaでもV-Okaでもない他の2残基への変異はプローブと1残基のミスマッチがあるため、このプローブではV-Okaと区別できない。今後こうした変異も検出できるように、V-Okaの配列に対するプローブも作製して補完的データを得ていきたい。また、“混じり”のある部位を含めワクチン株に特異的な塩基置換のある様々な部位を検討できるようにプライマーとプローブの設計をさらに行いたい。

ワクチンバイアルからのDNA精製、PCR及びTm値解析は迅速簡便なものであり、今後、水痘ワクチンの品質保証や牛由来成分を含まない新たな培養法などの評価に本方法を応用できると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

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：なし

表1 PCRプライマーとLightCycler用プローブ

プライマー

ターゲット	プライマー1	プライマー2
ORF62A	5'-GGTTGCTGGTGGTGGACGCG	5'-TTCCCACCGCGGCACAAACA
ORF62B/C 注1)	5'-CGGGCCCCAAAACACTTTATCCTAC	5'-CTCGACTGGCTGGGACTTGCGCTTG

プローブ

ターゲット	プローブA	プローブB 注2)
ORF62A	5'-GTTGCTGGTGGTGGACGCGGTGGCCCT	5'-AGGTGGCCCAGGGATGGA
ORF62B	5'-ACACAGGCTCCCGACCCTCAGCCGT	5'-CCGCCGCACGCTCTCTTTCT
ORF62C	5'-GGACTGGAGCCCGTTGCCTCGGGGT	5'-TGCCATGCIIGGCAAAGGCTCTG

注1) 同一のPCR産物内の異なる部位に塩基置換がある

注2) 下線によりV-Okaにおいて塩基置換がある残基を示す

図1 FRET法による変異の検出

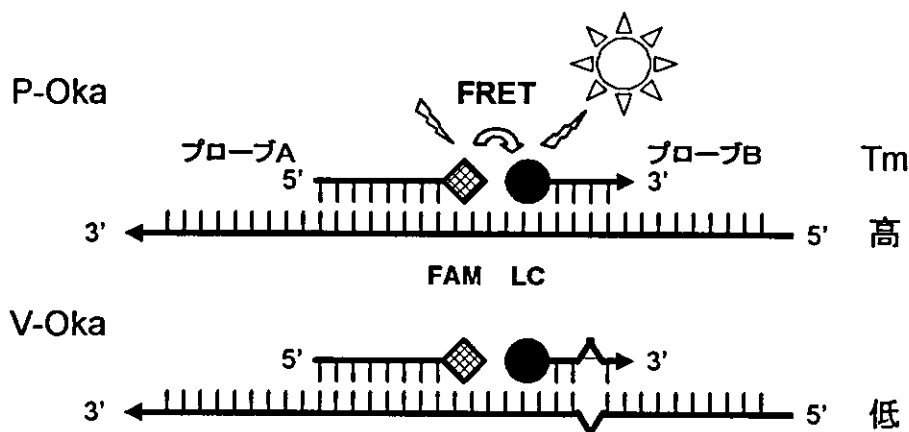


図2 非対称PCRの条件検討 (プローブ量比、少ない方のプライマー濃度)

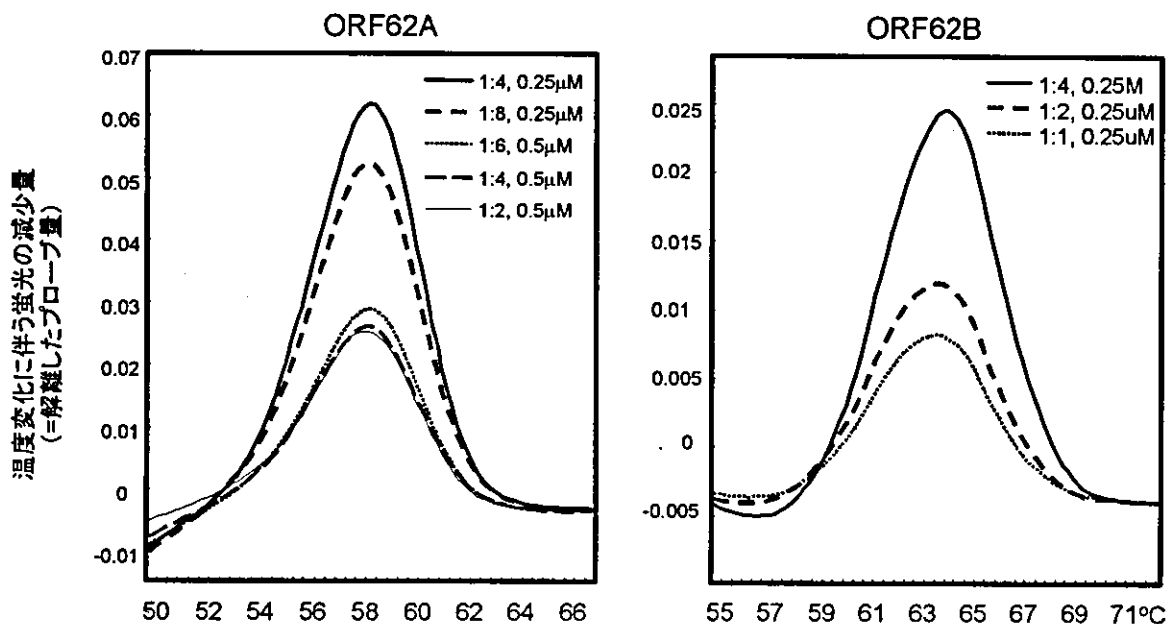


図3 ハイブリダイゼーションstringencyの影響

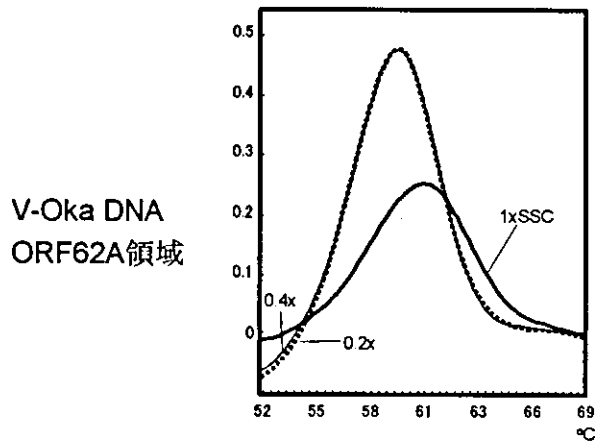


図4 Tm値比較に基づくワクチン株に人為的に混入させた親株の検出 (ORF62A領域)

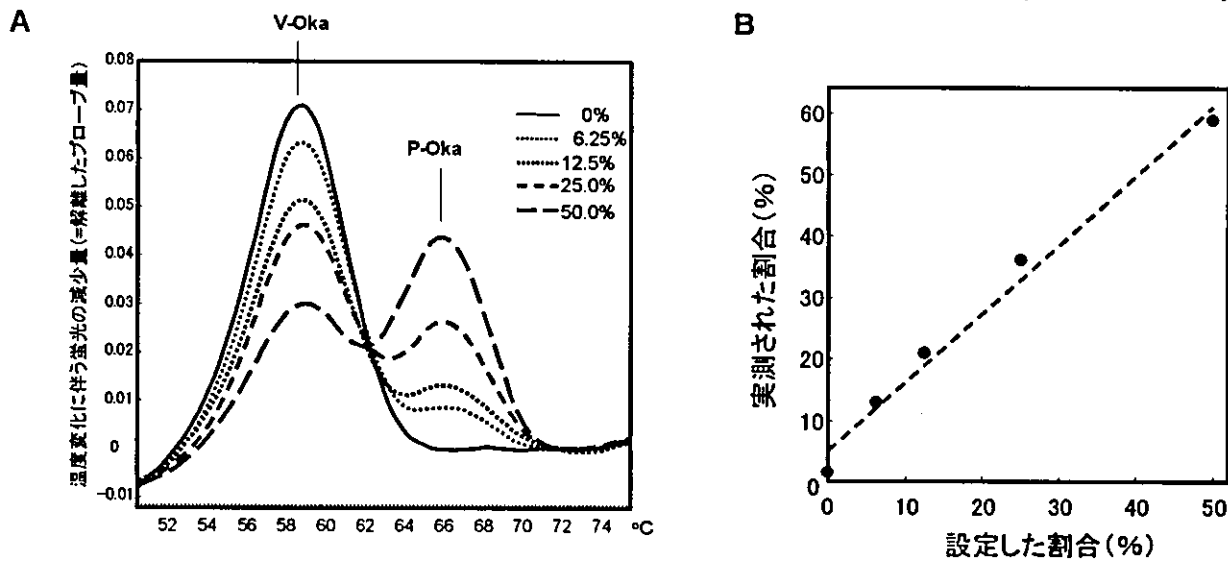
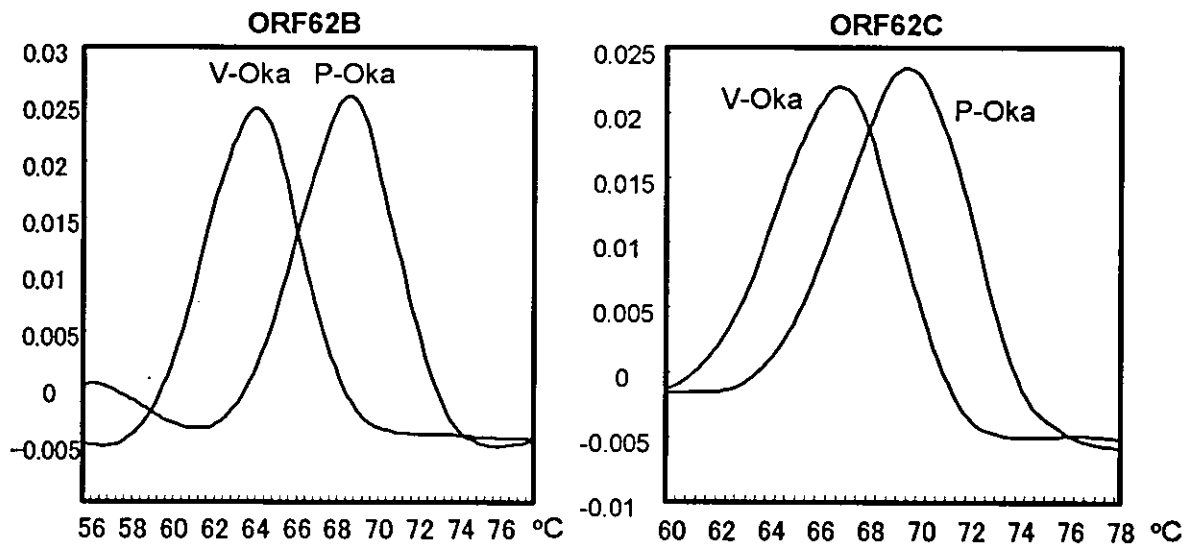


図5 Tm値比較に基づくワクチン株と親株の判別 (ORF62B, ORF62C領域)



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 年度分担研究報告書

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 型肝炎ウイルスの増殖を無血清培地で行うため、10 種類の異なる物質でコーティングしたプレートで GL37 細胞を継代し、その増殖を観察した。その結果、PDL、PLO/LM、LM、PDL/LM 処理プレートではこれまで用いてきた 10% FBS 入り MEM 培地 (FBS-MEM)-未処理プレートよりも細胞の増殖が良くなることが明らかとなった。また、collagen I プレートにアダプトさせた細胞 (collagen I アダプト細胞) は FBS-MEM-未処理プレートよりも細胞の増殖速度が速く、14 日で約 2.7 倍となった。しかしながら、HAV の増殖はどのプレートにおいても FBS-MEM-未処理プレートよりも悪く、一番 HAV の増殖の良い PDL/LM の場合でも FBS-MEM-未処理プレートの場合の約 1/3 の抗原量 (14 日目) であった。また、面白いことに、細胞の増殖が一番良かった collagen I アダプト細胞では、HAV が殆ど増殖しなかった。

A. 研究目的

A 型肝炎ワクチンはアフリカミドリザル腎臓細胞由来細胞株 GL37 に馴化した A 型肝炎ウイルス (HAV) を増殖、精製し、さらにホルマリンで不活化することにより作製されている。GL37 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 GL37 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、さらにこ

の細胞で馴化 HAV は増殖可能であることを明らかにした。しかしながら、VP-SFM での GL37 の培養、および HAV の増殖は、これまで用いてきた FBS-MEM 培地の場合に比べて、それぞれ約 60%と 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が、さらにこの細胞を用いたウイルス増殖にも何らかの因子が欠けていること示している。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、10 種類のプレートを用い、VP-SFM 培地で GL37 細胞の増殖を改善させる研究を行った。更にその条件での HAV の増殖を調べた。

B. 研究方法

細胞の継代 FBS-MEM 培地で培養した GL37 細胞を PBS で洗い、トリプシン-EDTA によりブ

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。これを等分し、それぞれに無血清培地 VP-FSM、或いは FBS-MEM を加えた。それぞれ 3.0×10^4 個の細胞を直径 3.5cm (6 穴) の 10 種類のプレートにそれぞれ継代した。プレートの種類は 1. 未処理、2. collagen I (ラット尾腱)、3. collagen IV (マウス腫瘍)、4. Poly L Lysine (PLL) (合成物質)、5. Poly D Lysine (PDL) (合成物質)、6. Laminin (LM) (マウス腫瘍)、7. Poly D Lysine/Laminin (PDL/LM)、8. Poly L Ornithine (合成物質) /Laminin (PLO/LM)、9. Matrigel (マウス腫瘍)、10. Fibronectin (ヒト血漿) である。更に今までの研究で確立した collagen I プレートにアダプトした GL37 細胞についても調べた。各細胞を 14 日間詳しく観察した。

HAV の増殖 上記の細胞に HAV を MOI=0.1 で感染させ、4 日、7 日、10 日及び 14 にサンプリングし、その増殖を antigen ELISA で調べた。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、及び HAV 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

1. PDL、PLO/LM、LM、PDL/LM 処理プレートでは FBS-MEM-未処理プレートよりも細胞の増殖が良くなる事が明らかとなった (図 1)。

2. collagen I プレートにアダプトさせた細胞は FBS-MEM-未処理プレートよりも細胞の増殖速度が速く、14 日で約 2.7 倍であった (図 1)。

3. HAV の増殖はどのプレートにおいても FBS-

MEM-未処理プレートよりも遅く、一番 HAV の増殖の良い PDL/LM の場合でも FBS-MEM-未処理プレートの場合の約 1/3 の量 (14 日目) であった (図 2)。

4. 細胞の増殖が一番良かった、collagen I アダプト細胞は、HAV が殆ど増殖しなかった (図 2)。

D. 考察

PDL、PLO/LM、LM、PDL/LM 処理プレートで GL37 細胞を無血清培地 VP-SFM で培養することによって FBS-MEM-未処理プレートよりもその増殖を良くすることが出来る事が明らかとなった。また、細胞を collagen I プレートでアダプトさせるとその増殖は FBS-MEM-未処理プレートの場合に比べて、約 2.7 倍増加させることが可能となった。

しかしながら、HAV の増殖は最も良いものでも依然 FBS-MEM-未処理プレートの場合に比べ約 1/3 の量である。更に、面白いことに collagen I にアダプトさせた細胞では HAV が殆ど増殖しなかった。

これらのことより、何らかの宿主因子が HAV の増殖と細胞の増殖に強く関係していると考えられる。

E. 結論

1. PDL、PLO/LM、LM、PDL/LM 処理プレートで GL37 細胞を無血清培地 VP-SFM で培養することで FBS-MEM-未処理プレートよりもその増殖を良くすることが出来る事が明らかとなった。

2. 細胞を collagen I プレートでアダプトさせるとその増殖は FBS-MEM-未処理プレートの場合に比べて、約 2.7 倍増加させることが可能となった。

3. しかしながら、HAV の増殖は最大でも FBS-MEM-未処理プレートの場合に比べ約 1/3 である。今後、HAV の増殖に必要な宿主因子を同定する

ことにより、無血清培地で HAV の増殖を良くさせることが可能と考えられる。

2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

F. 健康危険情報

2003 年 11 月 5 日から、感染症法の一部改訂により、HAV は単独疾患として四類感染症に分類され、診断後直ちに届出が必要となった。我が国では、近年 A 型肝炎は減少している 2002、2003、および 2004 年(2005 年 1 月 20 日現在)の患者数はそれぞれ、502、290、139 名である。2004 年、国内感染と推定されたのは 101 例で、40 代女性及び 50 代男性の比率が大きかった。また、国外での感染が推定される患者は 29 例で、推定感染国ではアジアが全体の 3/4 を占めた。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。

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

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

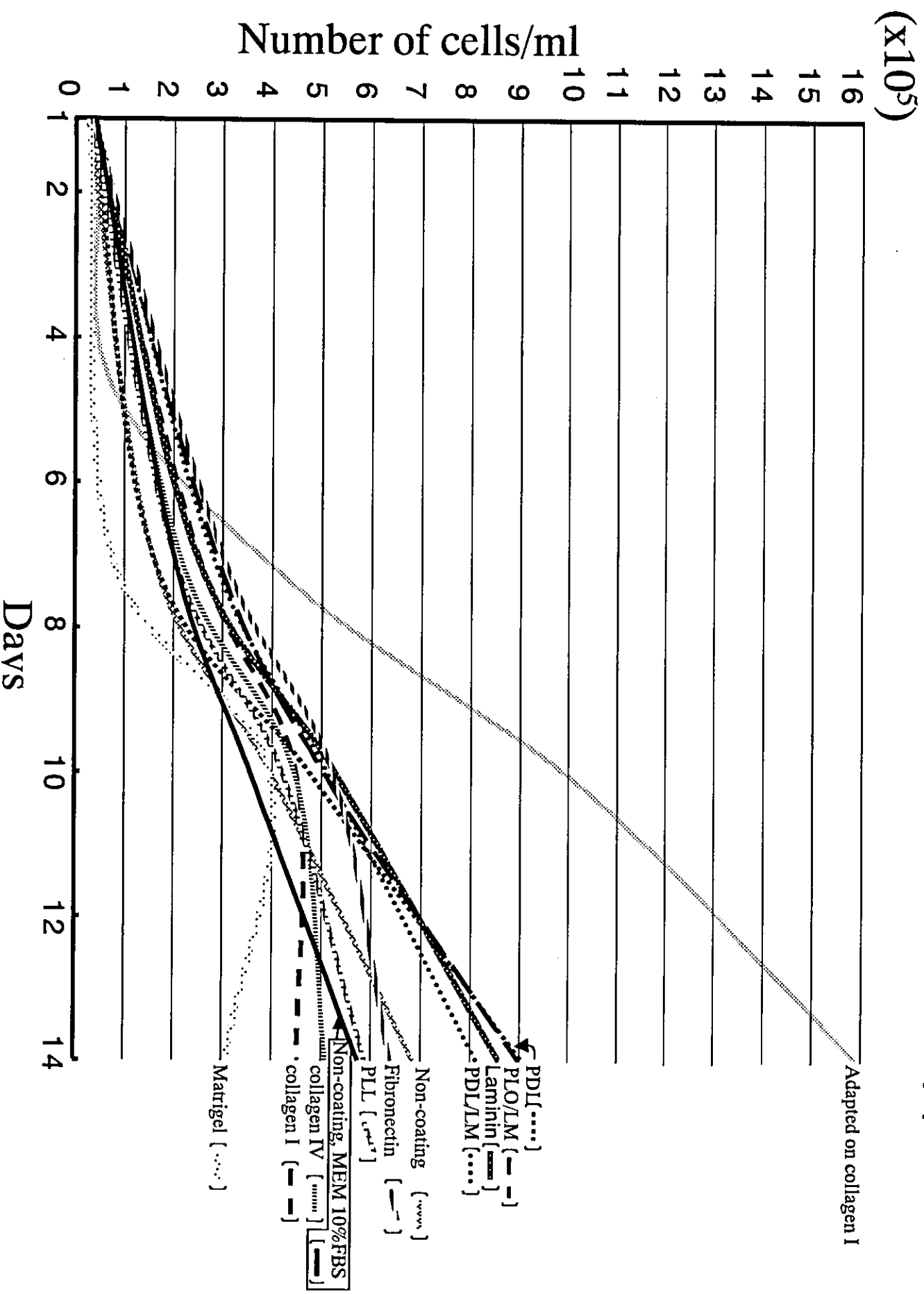
米山徹夫、下池貴志、清原知子、戸塚敦子、宮村達男 合成 siRNA による HAV の増殖抑制 日本ウイルス学会、第 52 回学術総会、2004 年 11 月 横浜

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請：なし

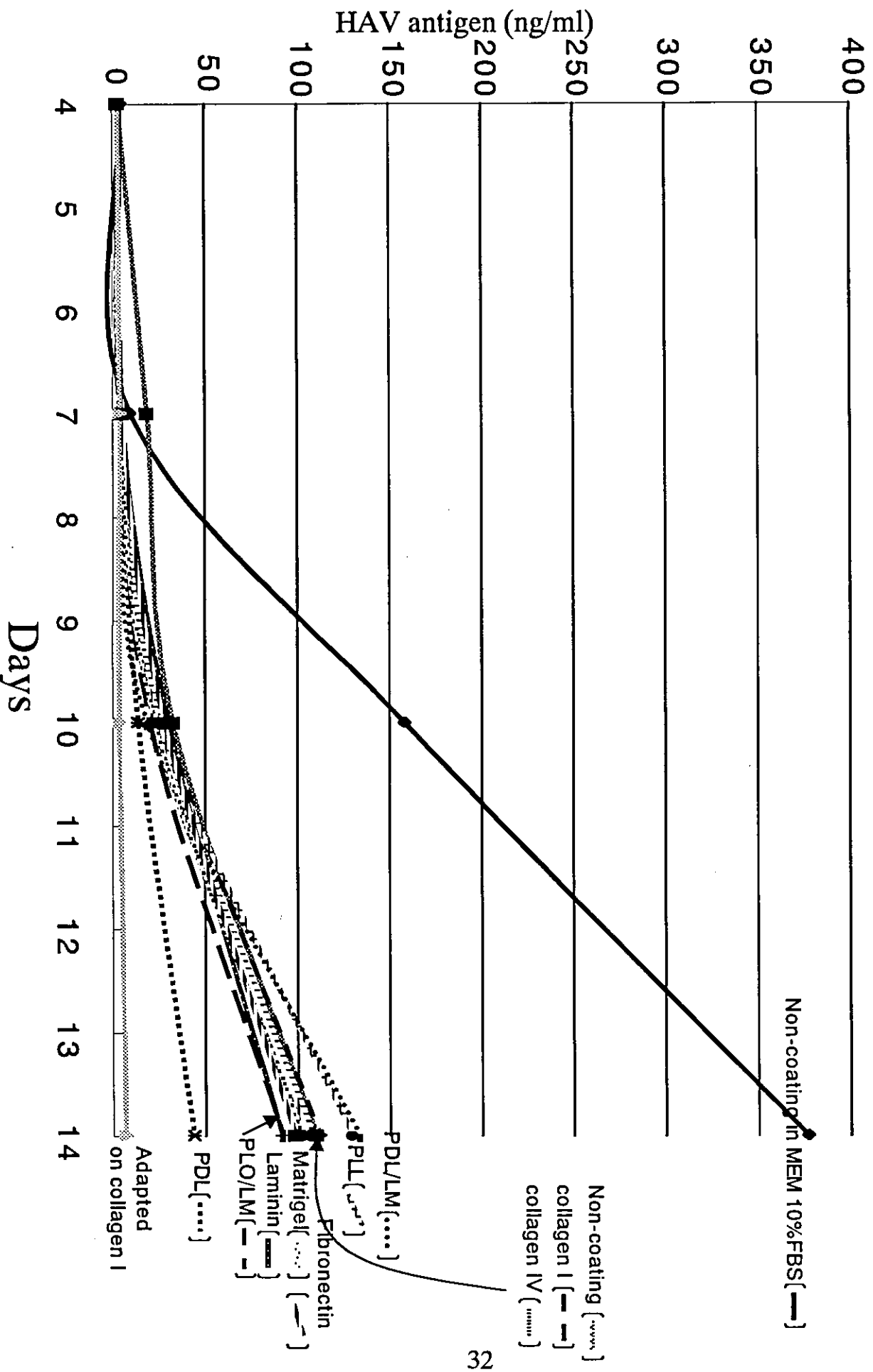
Cell-growth in different types of plates

Fig 1



HAV antigen in different types of plates

图 2



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

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 大槻紀之 海野幸子 （国立感染症研究所ウイルス 3 部）

研究要旨 昨年度までの本研究により日本国内で流通している培養用牛血清の 50%以上が牛ポリオーマウイルス（BPyV）遺伝子に汚染されている事が明らかとなっている。このため、ヒト用生ワクチンの製造時に使用される牛血清からヒト用生ワクチンへの混入の BPyV 遺伝子危険性が示唆された。そこで本年はヒト用生ワクチン（麻しん・風しん・おたふく風邪・ポリオ・水痘）への BPyV 遺伝子の混入を調査した。その結果水痘ワクチンから、BPyV 遺伝子が検出された。また培養用牛血清から検出される BPyV 遺伝子の塩基配列を解析したところ既知の配列と異なる部位が存在する事が明らかとなった。

A. 研究目的

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、特定試験として確実な検出系が確立されておらず情報量が必ずしも豊富ではない牛ポリオーマウイルス（BPyV）を検出・排除すべき対象として提案した。

そこで昨年度までの本研究では日本国内で流通していた概ね 130 ロットの牛血清について BPyV 遺伝子の有無を検査し、血清の原産国に関わらず概ね 55%の血清から本ウイルスの遺伝子が検出されることを明らかとした。また牛血清はワクチンを含む多くの生物学的製剤の製造時に使用する

ことよりこれらの製剤中へ BPyV 遺伝子が混入する可能性が示唆された。

そこで本年度は、ヒト用生ワクチンへの本ウイルスの混入の有無を従来の PCR 法を用い検査するとともに、個々の牛血清から検出される BPyV 遺伝子断片の長さ及び配列の解析を一部の牛血清について行った。

B. 研究方法

（試験 1）

昨年度までの本研究により確立した牛血清中の約 764bp（nested PCR の増幅は約 300bp）の BPyV 遺伝子検出 nested PCR 法を用いて、ヒト用生ワクチン 5 種合計 12 ロット（麻しん 4、風しん 4、おたふく風

邪 2、ポリオ 1、水痘 1) のワクチンから BPyV 遺伝子検出を実施し、ワクチン中への BPyV 遺伝子の混入の有無を確認した。

(試験 2)

数種類のプライマーを設計し、最長で約 3.8Kbp (BPyV 遺伝子全長は約 4.7Kbp) の BPyV 遺伝子を検出する PCR を牛血清中について実施し、その後 BPyV 遺伝子配列の特定を目的とし、PCR ダイレクトシーケンスを行い主にウイルス構造タンパクをコードする領域の遺伝子配列特定を試みた。

C. 研究結果

試験 1 に供試したワクチン 12 ロットのうち、水痘ワクチンを除く各ワクチンでは独立した試験を 2 回行った結果、全てのワクチンでは BPyV 遺伝子は検出されなかったが、水痘ワクチンでは 2 回の試験ともに BPyV 遺伝子由来と考えられる遺伝子増幅産物が検出された。このため、ロットの異なるワクチン及びワクチン製造の際使用した牛血清を製造所より供与を受け、それらについて同様に BPyV 遺伝子の有無を調査した。調査した 12 ロットのワクチンのうち合計 3 ロットから BPyV 遺伝子が検出された。また提供を受けた牛血清についても全ての血清から BPyV 遺伝子が検出された。さらに、試験 2 において昨年度までの本研究で確立した試験法と異なるプライマーペアでより長い遺伝子断片の検出を行ったところ、ワクチンサンプルからは 1Kbp 以上の長さの遺伝子は検出されなかったが、牛血清 (製造に使用したものも含む) では 7

サンプル中 3 サンプルで 3.8Kbp の遺伝子が検出された。これら得られた 3.8Kbp の遺伝子増幅産物からウイルス構造タンパクをコードする遺伝子約 2.1Kbp について可能な限りその塩基配列を明らかにし、既知の BPyV 塩基配列と比較した結果、数塩基配列の違いが認められた。また今回得られた塩基配列間においても数塩基の違いが確認された。

D. 考察

1. 生ワクチンからの BPyV 遺伝子検出

昨年度までの研究で明らかとなっている様に国内流通している培養用牛血清の多くは BPyV 遺伝子に汚染されておりワクチン中への BPyV 遺伝子の混入の可能性が否定できないため、ワクチンからの BPyV 遺伝子の検出を行った。その結果、水痘ワクチンからのみ遺伝子が検出された。しかしながら、BPyV 遺伝子陽性と判断したワクチンであっても同一ロット内でバイアルが異なると検出できない場合もあった。これが PCR の感度によるものなのか、バイアル間の違いによるものなのかは現在のところ不明である。また、水痘ワクチンでのみ BPyV 遺伝子が検出されたことの原因の一つとしては、水痘ワクチンはその製造工程上最終小分け製品を作製する際に他のワクチンと比べウイルス浮遊液の希釈倍率が低く、このため製造時に使用した牛血清の持ち込み量が他のワクチンに比べ多いことから結果として牛血清に含まれていた BPyV 遺伝子が検出された事が予想される。従って本結

果が必ずしも特定のワクチン中への BPyV の混入を意味するものではないと考えられた。

2. 牛血清から得られた BPyV 遺伝子塩基配列の解析

PCR 法を利用してその遺伝子の検出や定量を行う場合、対象となるウイルス遺伝子配列情報は非常に重要であるが、今までの報告から本ウイルスは牛及び人に病原性を有しないと考えられている事等から本ウイルスの遺伝子配列に関しても情報量が十分でない。今回解析した牛血清から得られた BPyV 構造タンパク領域遺伝子は既知の塩基配列と比較して数塩基の違いが認められるとともに、得られた塩基配列の中でも違いが存在する事が明らかとなった。この事から本ウイルスの遺伝子は多くのバリエーションがあり、PCR 法等を利用しウイルスの検出を行う際には注意が必要であることが示唆されるとともに、より多くの BPyV 遺伝子の解析を進め、株間により保存されている領域を特定して行く必要があると考えられた。

E. 結論

1. 一部の水痘ワクチンから BPyV 遺伝子が検出された
2. 牛血清から得られる BPyV 遺伝子は多様性を持つ事が示唆された。

F. 健康危険情報

シードロットシステムを採用している水痘生ワクチンでは、生物学的製剤基準で製造

に使用する牛血清は迷入ウイルスの存在が否定されたもの以外は使用できないこととなっている。このため、人に無害なウイルスであっても生きているウイルスであれば、製造資材として不適當である。このため製造に用いる牛血清には BPyV の遺伝子が認められないことが望ましいと考えられるが、現在国内外で流通している牛血清の多くは BPyV 遺伝子の混入が認められている。そこで、一つの判断基準として構造タンパクをコードする遺伝子を含む一定の長さ以上の遺伝子断片が認められなければ感染性を有する可能性は低いと考えられることから、暫定的に水痘ワクチンの製造に使用する牛血清は約 3.1Kbp をターゲットとした PCR で陰性となったもののみを使用するとする暫定基準を平成 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」に提案し了解された。

G. 研究発表

1. 論文発表
無し
2. 学会発表

2005 年 5 月 2005 PDA Viral & TSE Safety Conference に発表予定

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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
協力研究者 倉永 雅彦、池野 大介 同上

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用いない培養方法を検討し、その可能性を探った。結果、ラボスケールにおいて、細胞増殖用培地の無血清化を実現したが、ウイルス培養用培地の無血清化は達成されなかった。

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) GL37 細胞の増殖性

MEM + 10%NBS（対照培地）で培養した GL37 細胞を使用し、以下の培地で細胞継代作業を 3～7 回実施した（培養には静

置フラスコ（表面積 25cm²）を使用した）。

- ・ MEM + 10%NBS
- ・ VP-SFM
- ・ Opti-SFM
- ・ VP-SFM + 0.25%アルブマックス
- ・ Opti-SFM + 0.25%アルブマックス

また、細胞増殖が思わしくない群については、馴化工程を実施した（徐々に対照培地の割合を減らし(75%→50%→25%)、4 継代目以降から対照培地を含まない検討培地を使用)。

(2) A型肝炎ウイルスの増殖性

MEM + 10%NBS（対照培地）及び(1)の条件で培養した GL37 細胞を使用し、以下の培地で培養した A 型肝炎ウイルスの増殖性について ELISA 法で確認した（ウイルス培養には静置フラスコ（表面積 225cm²）を使用した）。

- ・ MEM + FBS（接種工程：8%、MC 工程：2%：対照ウイルス増殖培地）
- ・ VP-SFM
- ・ Opti-SFM
- ・ Opti-SFM + 0.25%アルブマックス

C. 研究結果

(1) GL37 細胞の増殖性 (図1)

① 馴化工程なし

アルブマックスを含んだ群では7継代にわたって安定的に細胞が増殖したが、アルブマックスを含まない群では細胞の増殖性が低かった。

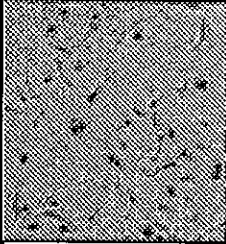
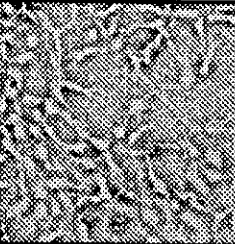
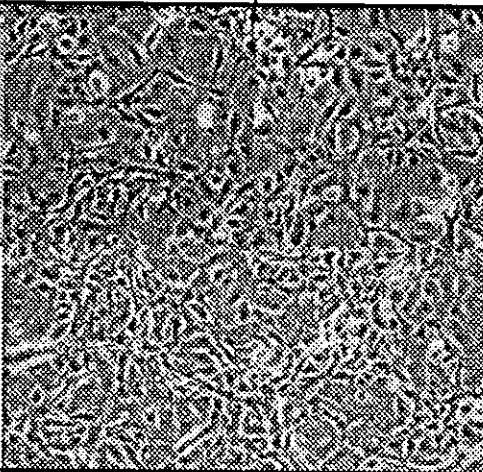
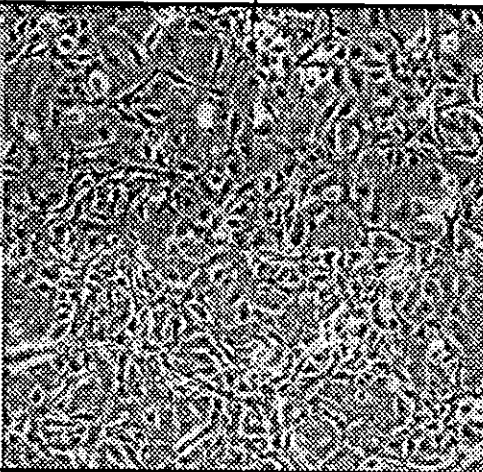
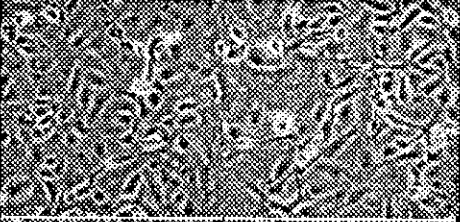
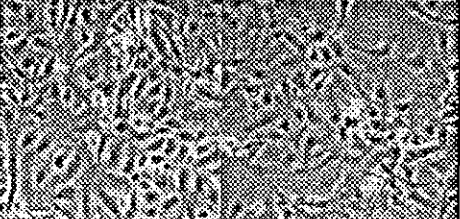
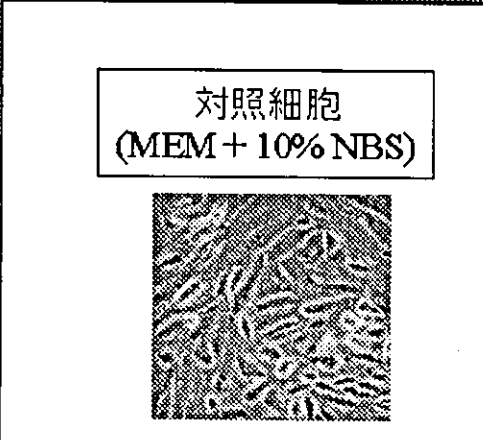
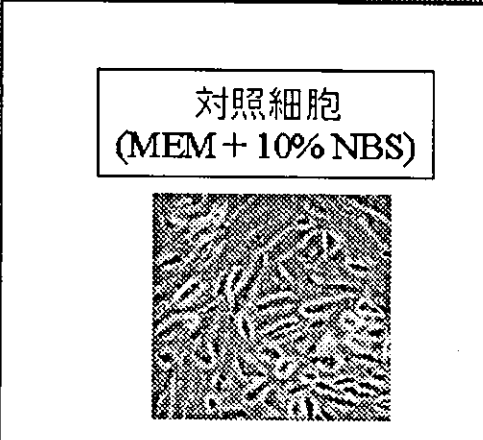
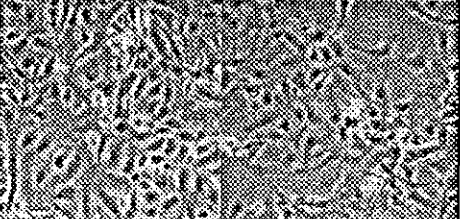

また、いずれの無血清培地においても、細胞の形状が対照細胞のものと異なっていた。

② 馴化工程あり

アルブマックスを含まない群において細胞の増殖性に問題が認められたので、これらの群については馴化作業を実施し、細胞の増殖性を確認した。

いずれも7回の継代作業が可能であったが、増殖性が対照細胞に比べて若干低い傾向が認められた。

図1：GL37 細胞の増殖性

		VP-SFM	Opti-SFM	VP-SFM +アルブマックス	Opti-SFM+ アルブマックス
① 馴化なし	3代目				
	7代目	N.D.	N.D.		
② 馴化あり	4代目				
	7代目				

対照細胞
(MEM + 10% NBS)

