

200401158B

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 14~16 年度
総合研究報告書

主任研究者 田代真人
平成 17(2005)年 3 月

目 次

平成 14～16 年度

I. 総合研究報告書

- 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. 分担研究者総合研究報告書

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. 12
齋藤義弘：協力研究者 大槻紀之 沼崎啓
3. 無血清培養 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. 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. 21
井上直樹
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. 24
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. 29
伊藤治：協力研究者 大槻紀之 海野幸子 田口邦史 千田 恵
8. A 型肝炎ワクチン製造における無血清培養に関する検討_____ P. 33
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. 34
真鍋貞夫：協力研究者 齊藤裕之
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. 37
駒瀬勝啓
11. 牛血清を使用しない麻しんワクチン及びおたふくかぜワクチン製造に関する研究_____ P. 41
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.45

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
総合研究報告書

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	沼崎 啓	同上
斎藤義弘	同上	下池貴志	国立感染症研究所ウイルス第2部
海野幸子	同上	野澤直樹	国立感染症研究所ウイルス第1部
高崎智彦	国立感染症研究所ウイルス第1部	原田志津子	同上
井上直樹	同上	倉根一郎	同上
武田直和	国立感染症研究所ウイルス第2部	斉藤裕之	阪大微生物研究会
伊藤 治	農林水産省動物医薬品検査所	倉永雅彦	化学及び血清療法研究所
大隅邦夫	化学及び血清療法研究所	池野大介	同上
真鍋貞夫	阪大微生物病研究会	岩本好司	武田薬品工業株式会社
駒瀬勝啓	北里研究所	山下利明	同上
末原草宏	武田薬品工業株式会社		

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 および長鎖 PCR で、感染性ウイルスの

存否を組織培養細胞を用いたウイルス分離によって検索した。

C. 研究結果

1. 3年間にわたって、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かった。しかし第1年度および第2年度においては、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た。

一方、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DNA遺伝子の迷入が示された。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、同ウイルスの迷入およびその危険性の評価、更には合成代替品の検討が必要であることが明らかになった。

第3年度においては、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かった。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、これらにおいても、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、ブ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、医薬品等安全性部会において承認された。

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。

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広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

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）
総合研究報告書

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)を用いて製造される。工程中の動物由来物質の使用は、それらに由来する既知あるいは未知の感染性因子が製剤中に迷入する危険が伴う。そこで、製剤の安全性確保の観点から市販の無血清培地を代替品として使用できるか否かを検討した。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かった。ところが、従来の培地で培養した CEF に 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いにも関わらず、無血清合成培地で増殖させた CEF に 8 代継代した株のブラックサイズの平均値は有意に小型化していた。即ち、無血清培地で増殖させた CEF を用いたワクチン中には、従来とは性質が異なるウイルスが含まれる可能性があり、初代培養細胞に用いる培地の代替には注意が必要であることが判明した。

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動物性物質に由来する感染性因子迷入の危険が付きまとう。おたふくかぜ生ワクチンは発育卵から採取したニワトリ胚を繊維芽細胞(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、トリプシンが用いられ、またワクチンの安定剤としてさらに乳糖あるいはゼラチン、ヒト血清アルブミンが添加されている。このうち小規模な製造方法の変更で済ませられる添加剤の見直しはすでに行われつつあるものの、大規模な変更を伴う培養方法の見直しは遅れている。そこで本研究では、特に牛血清に注目し、牛血清を用いないおたふくかぜ生ワクチンの製造が可能かどうかを検討することを目的とした。

B. 研究方法

細胞の準備

10 日令の発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、 5×10^5 細胞/ml になるようにした。10cm シャーレに 5×10^6 細胞/シャーレになる様に加え、2~3 日間培養した。

培養液の違いによる細胞の活力の比較

鶏胚由来の初代培養細胞(CEF)を、牛血清を含んだ従来の培地と血清を含まない合成培地で培養し、細胞の活力を細胞内の ATP 量によって測定する方法(Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega Co.)により比較した。

ウイルス増殖試験

10cm シャーレに 8×10^6 細胞/plate にした CEF を牛血清を含む従来の増殖培地と血清を含まない合成培地で培養し、国内で市販されているおたふくかぜワクチンウイルス A と B の 2 株をそれぞれ moi 0.1 以下で接種し、培養上清を 0, 3, 5, 7 日で採取して溶液中のウイルスカ価を測定した。

培養方法の違いによるウイルスの比較

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。この結果、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、ワクチン株の性質

を変えてしまうという品質管理上の恐れを評価した。

継代試験：10cm シャーレに 8×10^6 細胞/plate にした CEF を牛血清を含む従来の増殖培地と血清を含まない合成培地で培養し、国内で使われているワクチン株 A と B の 2 株を感染価 0.002 で接種して 3 日間培養した(継代歴 1)。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。B に関しては SH の塩基配列を行った。

A と B 株を感染させた継代歴 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 日間培養を行った(継代歴 2-1：ウイルス)。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。B に関しては SH の塩基配列を行った。

A と B 株を感染させた継代歴 1 の感染細胞をトリプシンで消化し、 4×10^6 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(継代歴 2-2：細胞)。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。B に関しては SH の塩基配列を行った。

8 連続継代試験：継代による効果をさらに検討した。常法に従って CEF を作製し、従来の増殖培地と血清を含まない合成培地を 10cm シャーレに 5×10^6 細胞/シャーレになる様に加え、2~3 日間培養した。細胞がほぼ均一になった時に、ワクチン株 A を感染価 0.002 で 1 時間吸着させ、液を除いて 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。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 培地と合成培地で培養した CEF 細胞に 1 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。

RT-PCR

F プライマー：5'-TCAAGTAGTGTCGATGATCTC-3' と **R プライマー：**5'-AGGTGGCATTGTCTGAC-ATTG-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、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°C 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 Student の *t* 検定 ($P < 0.05$ を有意差有り)によって判定した。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。

倫理面での配慮

患者等のヒトから得た材料を用いた実験、動物実験等を計画しておらず、プライバシー、人権上の問題が生じる恐れが無いので倫理面での配慮は払っていない。

C. 研究結果

CEF の増殖力を従来の培地(TPB+BS/MEM)と市販の無血清合成培地(Opti-PRO)とで比較した。細胞の形態を顕微鏡的に 1 週間観察したところ、CEF はどちらの培地でも主に細長く広がり、その細胞の形態的差は認められなかった。しかし、合成培地には、たとえば敷石型のような大きさも形も異なる細胞が少数含まれていた。細胞内 ATP 量を測定する方法で、細胞の活力を測定したところ、合成培地で培養した細胞の方が従来の培地で培養した細胞に比べて倍近い活力を示すことが判明した(図 1A)。

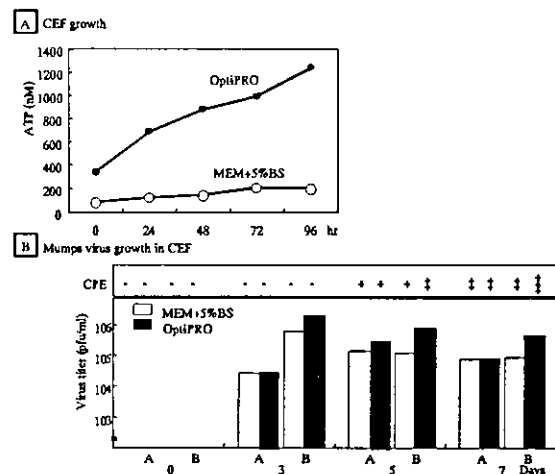


図1 培地による細胞活性、ウイルス増殖の違い

次に合成培地で培養した CEF にムンプスウイルスを増やす能力があり、ワクチン製造に使えるか否かを確かめる目的で、A と B の二つワクチン

ウイルス株を接種してウイルス産生能を従来培地で培養した CEF と比較した。ウイルス感染による細胞障害効果(CPE)は感染後 5 日目から両培地で顕著になったが、その程度は合成培地の方が強かった。接種後 0, 3, 5, 7 日に採取した培養上清液中のウイルス力価を測定したところ、A ワクチ

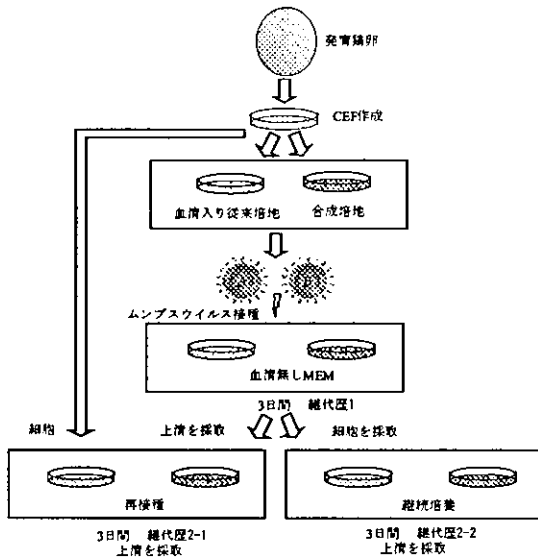
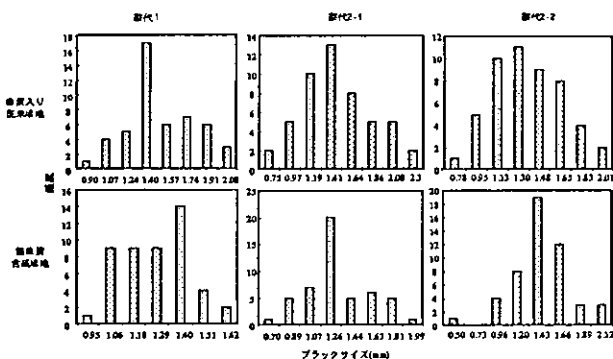


図2 継代による接種株の変化

ンは 5 日目に、B ワクチンは 3 日目にウイルス力価の最大値を示し、その値はどちらも合成培地の方が 0.1~0.8 log 程度高かった(図 1B)。7 日目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が、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。この事から合成培地が、CEF の培養並びにムンプスウイルスの増殖に使えることが判明した。

次に、合成培地で培養した CEF に含まれる生理状態や形態が異なる細胞集団にウイルスが接種されることにより、ウイルスが異なる集団になってしまわないかどうかを検証を試みた(図 2)。血清入り培地と無血清培地で培養した CEF に国内ムンプスウイルスワクチン株 A と B の 2 株を接種し、培養上清中のウイルスを Vero 細胞でプラックを作らせて、そのサイズを比較した。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プラックサイズ(図 3; 継代歴 1)、新しい培地に交換して更に 3 日間培養したウイルスのプラックサイズ(図 3; 継代歴 2-1)、細胞を継代して更に 3 日間培養したウイルスのプラックサイズ(図 3;



継代歴 2-2)について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 ($\alpha=0.05$)。

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、継代歴 1 のウイルスと継代歴 2-1 のウイルスそれぞれ 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 において継代歴 1 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、継代歴 2-1、2-2 のウイルスでは変異体は認められなかった。

継代数が足りないために変化を捉えられない可能性があるため継代数を 8 代まで増やして、再び培養方法の違いによりウイルスが異なる集団にな

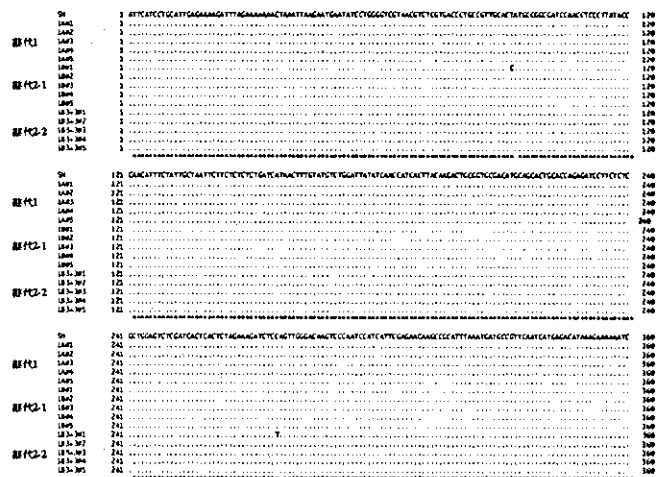


図4 SH遺伝子配列の継代による比較

り得るかどうかを検証することを試みた(図 5)。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 6 左下)。ところが、5 代を経過するころから、合成培地で培養した 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 6 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 7)。継代数 4 までは、従

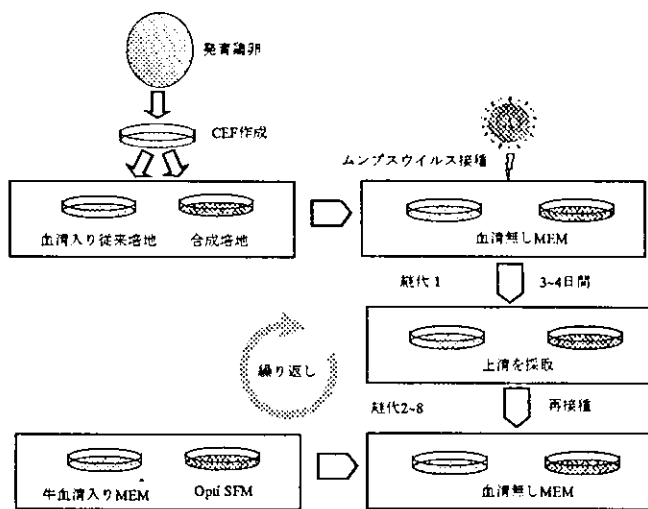


図5 CEFの培養と継代方法

来の培地と合成培地の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、合成培地で培養した 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る、実際、継代数 8 のウイルス量は、血清入り MEM で $10^{5.06}$ 、合成培地で $10^{6.79}$ であり、その間には 50 倍の開きが認められた。

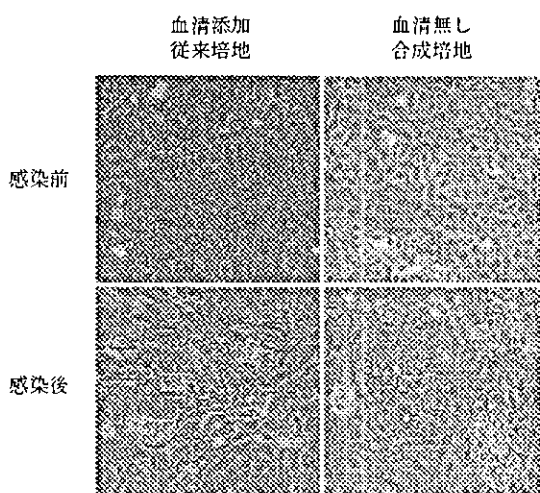


図6 培地による細胞形態の違い

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 8)。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、合成培地で培養した 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 9)。

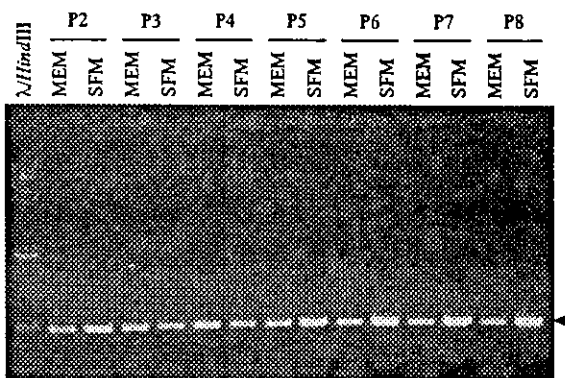


図7 継代とRT-PCRで増幅されたムンプスウイルスS/H遺伝子
継代数 0 のワクチン原株は、比較的均一なブラックサイズの一団と思われるが、それを血清添加 MEM 培養 CEF に 8 代継代すると、小さなブラックサイズのものから、大きなブラックサイズのものまでが範囲が広がるようにも見える。ただし、平均値に有意差は認められなかった($P=0.4892$, 図 10 上)。一方、合成培地培養 CEF に 8 代継代すると小さなブラックのものに集約されている様に見られ、実際にそれは、統計学的に有意な差を示した ($P=0.0028$)。8 代継代したものと士で比較すると、やはり平均値の差には統計学的有意差が認められた($P= 0.0028$)。確認の目的で、もう一度 8 代継代したものをだけ Vero 細胞に接種し、ブラックサイズを比較したところ、血清添加 MEM 培養 CEF と合成培地培養 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 10 下)。

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培地と同等以上に利用できる。また、調べた A と B の 2 つのおたふくかぜワクチン株は、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細胞集団の構成が異なる可能性を持つ。異なる細胞集団にワクチンウイルス株を接種した場合には、ある細胞で増え易い

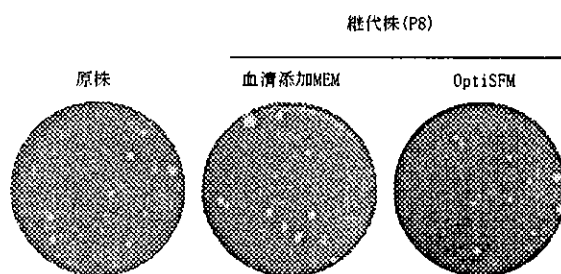


図8 継代方法とブラックの大きさ

変異ウイルスが選択されるというバイアス圧がかかる可能性を否定できない。もし、そのような事が起き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。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、従来の血清入り培地と無血清培地で CEF を作り、ムンプスウイルスワクチン株 A と B を接種して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。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えなかった。また、最も変異の起こりやすいムンプスウイルスの SH 遺伝子部分の塩基配列から差を検出しようと試みたが、従来の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。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で培養した CEF を使っても、従来の血清入り培地で培養した CEF を使っても、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。

ところが、合成培地で培養した CEF に 8 代継代したムンプスウイルスワクチン株 A の平均ブラックサイズ値は、有意に低下していた。おそらく、鶏胚から得られる CEF 細胞の集団が異なり、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。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、製造に使えることになっている。従来培地と合成培地で培養した CEF の差は RT-

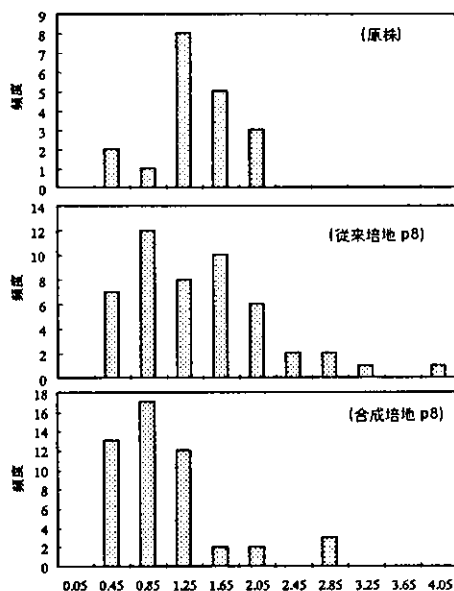


図9 継代方法とブラックの分布

PCR によるバンドの太さの変化から継代 5 代目く

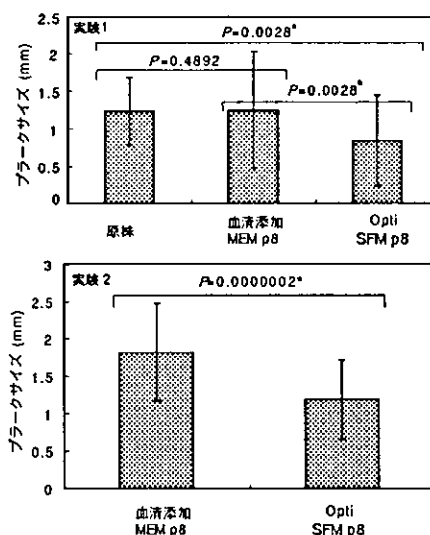


図10 継代条件によるブラックサイズの変化

らいに変化が現れたように推測される。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、品質管理上同等のウイルスとは言いがなくなっている。

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。用いる株によってもその時期が変化する可能性がある。ウイルスの同等性を保証できる状況でのみ、無血清培地を製造現場に当てはめる事が可能であると思われる。

E. 結論

牛血清を含まない合成培地によるおたふくかぜ生ワクチン製造が可能であるが、CEF が異なる細胞集団構成になること等に由来する変異ウイルス生成のバイアス圧が発生し、継代に伴い変異ウイルスが蓄積する可能性がある。継代を制限し、ワクチンに含まれる株の管理を厳密におこない、株の同等性を確保することが重要である。

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

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)

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

(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回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回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、石川豊数、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モセット接種試験の妥当性について 第52回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回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回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

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
総合研究報告書

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。その結果、初代鶏胚細胞を作製する際に Trypsin（ブタの膵臓由来）と牛血清を使用せずに、現行の製造法と同等のウイルス量を得るには、①使用する無血清培地に細胞増殖因子を添加する必要があること、②鶏胚組織から細胞を単離するため、Dispase[®]に替わる新しい酵素の開発が必要であること、の2点が明らかになった。

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。そこで、①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（H14年度、H15年度）、②ウイルス収量に

影響を及ぼす因子は何か（H15年度、H16年度）、の2点について検討した。

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[®]（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[®]（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[™] SFM, Invitrogen）に再懸濁する。各細胞を1穴当り3×

10⁶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、新しい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。

(倫理面への配慮)

鶏有精卵から胚細胞を単離し、ウイルス培養に用いる実験であり、特に倫理面の問題はないと判断した。

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再懸濁した細胞、2) Dispase^Rによる消化後、従来の血清培地で再懸濁した細胞、3) Dispase^Rによる消化後、市販の無血清培地で再懸濁した細胞を1穴当り3×10⁶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1.0×10⁶、1.3×10⁶、0.4×10⁶で、Dispase^Rで消化し、市販の無血清培地で再懸濁した細胞の減少量は他の細胞に比べ著しかった。またTrypsinによる消化後、牛血清を含む従来の増殖培地で消化を止めた後、上清を無血清培地におきかえて再懸濁した細胞は、従来の培地での増殖と大きな変わりは

なかった。

培養上清中の麻しんワクチンウイルス力価は、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^R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^R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^R消化群の方がTrypsin消化群より1.0log程度低かった。

D. 考察

細胞の増殖は、牛血清を含む従来の培地で培養したほうが、無血清培地で培養するよりも良好であった。ただしTrypsinの消化を止めるためだけに牛血清を使用し、その後無血清培地で培養しても細胞増殖は良好なことから、牛血清中の細胞増殖因子に短時間でも接触させることが最も重要であることが示唆された。またDispase^Rで消化後、十分洗浄すれば、その後の細胞の増殖には影響がないことから、ブタの膵臓由来のTrypsinを使用せずとも、胚組織から細胞を単離することができることも明らかになった(Trypsinを使用する場合には、その消化を止めるため動物の血清が不可欠である)。しかしウイルスの増殖に関しては、Dispase^Rで消化した群では、Trypsinで消化した群にくらべ1log程度低い傾向が認められ、残留した微量のDispase^R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疹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、①初代鶏胚細胞を作製する際使用する無血清培地に細胞増殖因を添加する必要があること、②鶏胚組織から細胞を単離するため、Dispase^Rに替わる新しい酵素の開発が必要であること、の2点が明らかになった。

F. 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

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

無血清培養 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）

協力研究者 加藤宏幸、大槻紀之（国立感染症研究所）

研究要旨 Vero 細胞を完全合成培地 DM-201 に馴化させ、無血清培養系を確立した。大豆由来ペプトンを添加すると細胞増殖性が改善された。パパインで消化した無血清 Vero 細胞での風しんワクチンウイルスの細胞当たりの産生量は血清添加培養よりも高かった。更に、DM-201 単独、あるいは DM-201 に 1% の大豆ペプトンを添加した無血清培養と 5% ウシ胎児血清を含む培養で増殖させた 3 系列の Vero 細胞で風しんワクチンウイルスを 3 代継代しても、無血清培養系のウイルスの増殖性は高く維持され、得られたウイルスは元のワクチン株と同様に温度感受性を示した。ウイルスの E1 遺伝子は元のワクチンウイルス及び血清添加培養系のウイルスと同じ塩基配列だった。更に 5 代まで継代を延長しても DM-201 単独培養のウイルスの E1 に変異は検出されなかった。しかし、大豆ペプトン添加培養系のウイルスの E1 にアミノ酸の変異を伴う遺伝子の変異が 1 塩基認められた。ワクチンウイルスの特性である温度感受性に変化が認められず遺伝的にも安定していたことから、DM-201 を用いた無血清培養 Vero 細胞の牛血清を用いないワクチン製造への応用性が示された。

A. 研究目的

弱毒生風しんワクチンは牛血清を含む培地で増殖維持されたウサギ腎初代培養細胞あるいはウズラ胚初代培養細胞を用いて製造されている。ウイルス製剤から異常プリオン物質を含む可能性のある牛血清及び牛由来物質を排除し、さらに動物由来物質中に含まれる既知あるいは未知の感染性因子迷入の危険性をなくすために動物由来物質の不使用あるいは代替品を検討することが重要である。市販の無血清培地には動物由来あるいは遺伝子組換え体の増殖因子を含んでいることがある。それに対して、DM-201 培地は完全合成培地で、

これまで多数の株化細胞の無血清培養系の確立に用いられてきた。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。そこで本研究では、動物由来成分を全く含まない完全合成培地及び植物由来の代替品を用いて株化 Vero 細胞の無血清培養系を確立し、その細胞での風しんワクチンウイルスの増殖性、更に増殖ウイルスの生物学的及び遺伝的性状の安定性を調べて、ワクチン製造への応用の可能性を検討した。

B. 研究方法

通常 10%牛胎児血清を含むダルベッコ MEM(DME-10)培地で継代している Vero 細胞 (ATCC No. CCL-81) を DM-201(DM-201-0) (日本製薬) に数代馴化させた後、更に大豆ペプトン (インピトロジェン) 1%を培地に加え (DM-201-0-Peptone-1) 馴化させた。植物由来のパパインで細胞を消化し単層が形成された後、風しんワクチンウイルス (武田 To-336株) を接種して、その増殖を DME-10 培養と比較した。

確立した無血清培養の 2 系列 (DM-201-0 と DM-201-0-Peptone-1) と血清添加培養 (DME-5) の 3 系列の Vero 細胞に同ウイルスを m.o.i. 0.4 で接種し、35℃で 5 日間培養した。感染後の培養液には、無血清 2 系列にはそれぞれの細胞維持培地を、血清添加培養細胞には DM-201 を用いた。感染細胞を 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 3 代目のウイルスの E1 蛋白をコードする遺伝子領域を 4 つに分け RT-PCR を行った。PCR 産物のダイレクトシーケンシングを行い 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。更に継代を 5 代まで延長して同様に E1 遺伝子の塩基配列を調べた。また、1 代及び 3 代継代したウイルスを RK13 細胞に m.o.i. 0.03 で感染させて、35、37、39℃での増殖性を元のワクチン株と比較した。

C. 研究結果

1) Vero 細胞は DM-201-0 を用いた継代 1 代では良く増殖したが、その後その増殖速度は次第に低下した。大豆由来ペプトンを 1%添加すると、細胞の状態は改善されたが、単層

が形成するまで増殖した後、細胞密度は増加する様子が見られず、細胞数は DME-10 の約半数にとどまった。しかし、継代可能な無血清培地に馴化した Vero 細胞が得られた。

2) DM-201-0-Peptone-1 Vero 細胞での風しんワクチンウイルスの増殖曲線は DME-10 Vero 細胞と同等で、感染 4 日後には横ばいになり $10^{6.6}$ PFU/ml に達した。細胞あたりのウイルス産生量は DME-10 Vero よりも明らかに高かった。DM-201-0 単独ではパパインによる消化後細胞が増殖しなかった。

3) 2 つの無血清培養系で 5 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、3 代目でどちらも $10^{7.4}$ PFU/ml となり、DME-5 の $10^{6.9}$ PFU/ml を僅かに上回った。

4) 3 系列の細胞で 3 代継代されたウイルスから得られた E1 遺伝子の配列はいずれも元のワクチンウイルスと一致していた。5 代に継代を増やしても DM-201-0 及び DME-5 Vero 細胞由来のウイルスの E1 遺伝子に変化は認められなかった。しかし、DM-201-0-Peptone-1 Vero 細胞由来ウイルスでは E1 遺伝子 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変化した。

5) 39℃でのウイルス増殖が高かった感染後 3 日目の培養上清を各温度におけるウイルス増殖量の比較に用いた。各温度での増殖量に、由来細胞及び継代数による違いは認められず、ウイルスの増殖は $35 > 37 > 39$ ℃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どちらの無血清培養系でも $10^{3.1-3.3}$ 、DME-5 で $10^{3.5}$ となり元のワクチンの $10^{3.3}$ と大差がなかった。

D. 考察

完全合成培地 DM-201 に 1%大豆ペプトンを加えた培地を用いると短期間で無血清培地に馴化した Vero 細胞が得られた。パパインがトリプシンの代替品として使用できる可能性が示されたが、DM-201 単独では細胞増殖を阻害するため、パパインの作用を緩和するためには 1%大豆ペプトンの添加の必要があった。ワクチンウイルスを無血清培養系で継代を 3 代繰り返しても、特に高温で増殖性が高まるという変化は認められず、ワクチンウイルスの特性である温度感受性が安定していたことが確認された。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、感染防御抗原として重要である。DM-201-0 Vero 細胞で 5 代継代しても E1 遺伝子に変化が認められなかったことから、E1 の抗原性が保持されていると考えられた。一方、DM-201 に大豆ペプトンを 1%加えた培養系で 5 代継代したウイルスに検出された変異がワクチンウイルスの生物活性や抗原性に影響を与えるかどうかは不明である。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、この変異が大豆ペプトン添加 DM-201 を用いて培養された Vero 細胞で 5 代継代された場合のみで出現するのか、尚検討が必要と考えられた。

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ことは混入する感染性因子の制御の観点から捉えると有用性が高い。今回の検討で、少なくとも DM-201 単独で培養した Vero 細胞で得られる風しんワクチンウイルスはその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、無血清培

養によるワクチン製造の可能性のある 1 つの方法が得られた。

E. 結論

無血清培地 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. 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、2003 年 10 月、京都
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

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし