

厚生科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）  
総合研究報告書

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が実用化にむけて開発中である。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。また、現在 BSE の診断に使われている ELISA キットを用いて、現行日本脳炎不活化ワクチンが、擬陽性を示す可能性の有無を検討した結果、用いた 13 ロットに関して全く問題がないことを確認した。

## 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、理論的に牛由来成分が混入する可能性がある。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比較検討した。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、また、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ため、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。また、現在 BSE の診断に使われている酵素抗体反応キットで現行日本脳炎不活化ワクチンが、擬陽性を示す可能性を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 無血清培地を用いた日本脳炎ウイルスワクチン株増殖能の検討

#### 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。 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. プラーク計測法

組織培養用 6 穴プレートに Vero 細胞を均一な細胞シートになるように静置培養し、培養 1 日後の細胞に、回収した各培養上清 (ウイルス液) を 10 倍階段希釈し、それぞれ 0.1mL を接種し、90 分間 37℃90 分間インキュベートし、1%メチルセルロース添加 MEM 培地を加え、6 日後にプラーク数を計測した。

### 3. リアルタイム RT-PCR (TaqMan RT-PCR 法)

日本脳炎ウイルス検出のための TaqMan RT-PCR 用に下記のプライマーおよびプローブを設計し作製した。

JEen562s-585p/623cset:  
CTGGAYTGTGARCCAAGGA  
JEen623c-585p/562sset:  
GAHCCCACGGTCATGAC  
FAM-MGB -labeled probe

JEen585p562s623c  
FAM-ACTRAACTGAAGCGT-MGB

反応は 48°C で 30 分間逆転写反応後、95°C 10 分間熱変性反応させその後 95°C・15 秒→57°C・1 分のサイクルを 45 回繰り返した。産物は ABI Prism 7000 を用いて検出した。

#### 4. 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; 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°C 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 μl/well 添加し、37°C, 60min 反応させた。

##### 3) 二次反応

0.05% Tween-20, 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 μg/ml) 濃度で用いた。37°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 (1 N 硫酸) を 100 μl/well 添加した。

##### 6) 吸光度の測定

OD450 を測定

#### 2. BSE 用 ELISA

牛海綿状脳症診断用酵素抗体反応キット (プラテリア BSE キット [BioRad 社]) を用いてマウス脳由来日本脳炎不活化ワクチンの反応性を検討した。

### C. 研究結果

#### 1. 無血清培地を用いた日本脳炎ウイルス増殖に関する研究

##### (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、継代維持

が困難となった。

##### (2) 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、ウイルス接種後 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。

##### (3) プラーク法を用いたウイルス定量

それぞれの培地で増殖させた日本脳炎ウイルスのプラーク数は低いもので 50 分の 1 程度に低下した。VP-SFM および Opti-SFM 培地では、接種後 3 日目が最も高く、5 日目、6 日目には急激に低下した。Ex-520 でも 3 日目が最も高かったが、3 つの無血清培地の中で最も低かった。ただし、プラーク数は、5 日目・6 日目でも比較的維持されていた。2% FCS+MEM の場合が最も増殖がよく、ウイルスプラーク数も維持されていた。

##### (4) 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。

##### (5) TaqMan RT-PCR による上清中のウイルス定量

図に示す如く、接種後 3 日目で、2% FCS 加 MEM が最も増殖がよく、続いて Ex520、VP-SFM が同等で Opti-SFM が最も低かった。その後培地ごとのウイルス遺伝子量の動態を見ると、VP-SFM は 5 日目でウイルス遺伝子量が維持されているが、6 日目には低下している。EX520 は 6 日までウイルス遺伝子量は維持されている。一方 Opti-SFM は、5 日目にやや増加したが、他の培地よりも高くはなかった。しかし、その量が 6 日目でも維持されていた。コントロールとして用いた 2% FCS 加 MEM が、最も増殖がよくまた、ウイルス遺伝子量も 6 日目まで維持されていた。

#### 2. BSE 用 ELISA キットの検討

現在 BSE の診断に使われている ELISA キットを用いて、日本脳炎ワクチンの反応性を検討した結果は、全く反応せず陰性であった。

#### D. 考察

日本脳炎ワクチンは、接種後に急性散在性脳脊髄炎 (ADEM) を来たした報告があり、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. Infec. 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。BSE 混入の可能性を限りなく低くするため、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 により検討した。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. Infec. 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

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

**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保証するために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を定量的に測定できる方法を検討した。

**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水痘ワクチンで、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前段階として、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検証できる方法を確立することが重要と考えられる。平成16年度に本研究事業の分担研究者に加わり、この点を検討し、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ことを目指した。

**B. 研究方法**

1) 方法の原理

PCR産物である鋳型DNAにハイブリダイズする2つのプローブ間のエネルギー移動(FRET:fluorescent resonance energy transfer)により生ずる蛍光が、徐々に温度を上昇させプローブが鋳型DNAから解離し蛍光が消失することでTm値が求められる (melting curve analysis)。ワクチン株と野生型株間で異なる塩基配列部位をプローブ内に含ませることにより、解離温度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 $\mu$ 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産物は、アガロース電気泳動により確認後、LightCycler（ロシュ）によるmelting curve analysisに用いた。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 $\pm 2.0^{\circ}\text{C}$ 間のデータシートで得られる0.2 $\mu$ 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

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注射用水で溶解後、QIA amp DNA Mini kit (QIAGEN)を用いてDNA精製標品を得た。

#### 5) ワクチンDNAの定量

報告されているTaqMan PCR法 (Harami & 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。

#### 6) ワクチンの力価測定

ヒト2倍体細胞にウイルス接種2時間後、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、プライマー濃度を検討したところ、量比1:4、0.25 $\mu$ Mが至適であった。

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)においてシャープなTm曲線の分布が得られた。

#### 2) ワクチン株と親株の判別

V-OkaにP-Okaを加えてP-Okaの混入がどこまで判定できるかを検討した。ORF62A部位の場合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。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、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(図1)。

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。

#### 3) 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についてDNA抽出を行い、ORF62Aに対するプローブを用いてTm値解析を行った。その結果、検討したすべてのロットにおいて、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る方法を確認した。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。今後他の部位における差異も定量的に検出できるようにプライマーとプローブの設計を行いたい。

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'-GGTTGCTGGTGTGGACGCG	5'-TTCCCACCGCGGCACAAACA
ORF62B/C <sup>注1)</sup>	5'-CGGGCCCAAAAACACTTTATCCTAC	5'-CTCGACTGGCTGGGACTTGCCTTG

プローブ

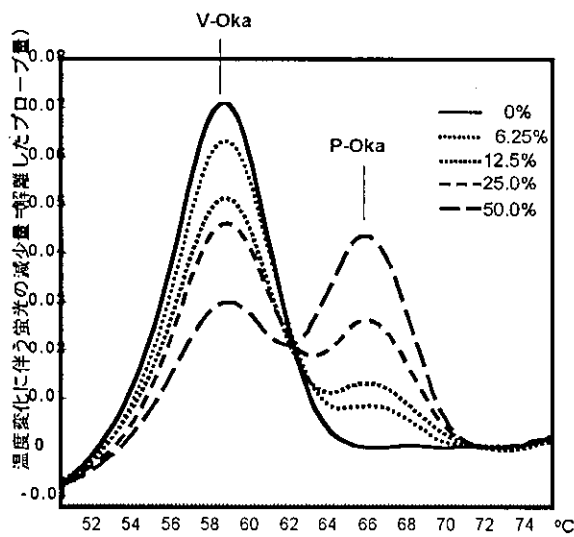
ターゲット	プローブA	プローブB <sup>注2)</sup>
ORF62A	5'-GTTGCTGGTGTGGACGCGGTGGCCCT	5'-AGGTGGCC <u>C</u> AGGGATGGA
ORF62B	5'-ACACAGGCTCCC <u>G</u> ACCCTCAGCCGT	5'-CCGCCGC <u>A</u> CGCTCTCTTTCT
ORF62C	5'-GGACTGGAGCCCGTTGCCTCGGGT	5'-TGCCATGC <u>I</u> GGCAAAGGCTCTG

注1) 同一のPCR産物内の異なる部位に塩基置換がある

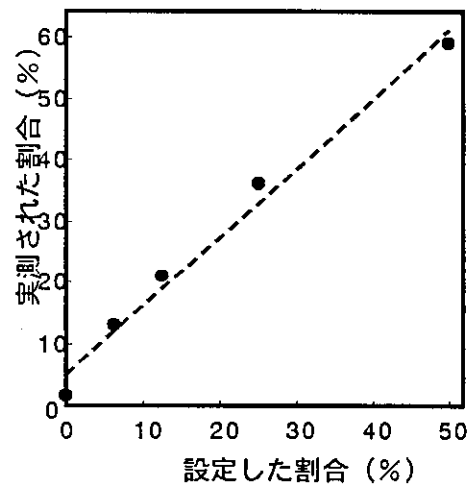
注2) 下線によりV-Okaにおいて塩基置換がある残基を示す

図1 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)

A



B



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

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 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いる。この細胞の培養に用いる FBS からプリオンが混入する可能性を取り除くため、本研究では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し、ウイルス増殖に及ぼす影響について検討した。その結果、GL37 は無血清培地 VP-SFM で増殖可能であり、更にこの培地で増殖した GL37 で HAV は増殖可能であることを確認した。しかしながら、VP-SFM で GL37 を増殖させた場合、GL37、及び HAV の増殖 (HAV の抗原量で測定) は、10% の FBS を含む現在用いられているワクチン製造用培地 (FBS-MEM) で GL37 を増殖させた場合に比べ、それぞれ約 66%、及び 31% であった。無血清培地 VP-SFM の GL37 及び HAV の増殖を改善するため、10 種類の異なる物質でコーティングしたプレートで増殖を調べた。その結果、PDL、PLO/LM、LM、PDL/LM 処理プレートで GL37 細胞の増殖が FBS-MEM-未処理プレートの場合より良くなることが明らかとなった。しかし、どの処理プレートでも HAV の増殖は FBS-MEM-未処理プレートの場合より悪かった。これ以外に collagen I 処理プレートにアダプトさせた GL37 は FBS-MEM-未処理プレートの場合より GL37 の増殖が約 2.7 倍で、調べた条件の中で細胞の増殖が一番良かった。しかし、面白いことに collagen I アダプト GL37 では HAV は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、ウイルスに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。

#### B. 研究方法

**細胞の準備** 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。これを等分し、各培地 (無血清培地、FBS-MEM) を加えた。それぞれ  $1.0 \times 10^6$ 、或いは  $3.0 \times 10^4$  個の細胞を直径 10cm、或いは 3.5cm (6 穴) の各種プレート (それぞれ 10 種類の物質でコーティング処理したもの、未処理のもの) にそれぞれ

れ継代した。

**GL37 細胞の増殖** 各条件（各培地、各種コーティングプレート）の GL37 細胞を 37°C で培養し、細胞をプレートから剥がし、培養開始 0, 1, 4, 7, 10, 14 日の細胞を注意深く観察、細胞数をカウントした。

**HAV の増殖** 各条件（各培地、各種コーティングプレート）の GL37 細胞を 37°C で培養し、培養開始 4, 7, 10, 14 日の細胞を剥がし、細胞内の HAV 抗原量を ELISA にて測定した。

（倫理面への配慮）HAV は人とは無関係な培養細胞 GL37 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ない。

## C. 研究結果

### I. GL37 細胞が増殖可能な無血清培地の選択

#### i) 細胞増殖試験

GL37 と同じサル腎臓細胞由来細胞株である COS-7 が増殖可能である培地 VP-SFM、CD293、293 SFM II 3 種類を用いて、これら各培地で GL37 の増殖を調べた。コントロールとして、これまで用いてきた 10% FBS 入り MEM (FBS-MEM) 培地での増殖を調べた。

その結果、3 種の培地の中で VP-SFM 培地でのみ GL37 は増殖可能であることが明らかとなった。その増殖速度は最初の 7 日間は FBS-MEM 培地の場合に比べ約 2/3 であったが、その後ほぼ同じとなった。

#### ii) ウイルス増殖試験

細胞増殖試験の結果、GL37 は無血清培地 VP-SFM で増殖可能であることが確認された。そこで、VP-SFM、及び FBS-MEM 培地で更に GL37 を 3 代継代し、馴化 HAV の増殖を HAV 抗原量により調べた。その結果、VP-SFM 培地で増殖させた GL37 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、HAV 接種後 7 日目、及び 14 日目の細胞あたりの抗原量は MEM 培地で増殖させた GL37 を用いた場合に比べそれぞれ約 43、及

び 31% であった。

## II. 無血清培地 VP-SFM 培地で GL37 細胞、HAV の増殖の改善

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、i) 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、10 種類の物質をコーティングしたプレートでの GL37、及び HAV の増殖を調べた。また、ii) 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。

### i) 各 10 種類のコーティングプレートでの GL37、HAV の増殖試験

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。

その結果、ア). 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（約 1.5 倍）なることが明らかとなった（図 1）。

イ). 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）。

ウ). 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 の量（14 日目）であった（図 2）。

エ). 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）。

### ii) 組換えコレステロールを用いた細胞培養条件の



## 検討

コレステロール入り培地では、培養 10 日までは FBS-MEM-未処理プレートで増殖させた細胞とほぼ同じ速度で増殖したが、培養 10 日以降細胞は培地中に浮遊し始めた。14 日目でプレートに付着する細胞は、FBS-MEM-未処理プレートの約 30%になった。

## D. 考察

1. この研究で GL37 細胞は無血清培地 VP-SFM で増殖可能であることが明らかとなった。
2. 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（約 1.5 倍）することが出来る事が明らかとなった。
3. 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。
4. 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。
5. 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。
6. 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。
7. 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。これは今後克服しなければならぬ重要な課題である。

## E. 結論

1. A 型肝炎ワクチン作製用細胞 GL37 は無血清培地 VP-SFM で増殖可能であることが明らかとなった。
2. 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。

3.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。

4. 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。

5. コレステロール入り VP-SFM 培地では GL37 は培養 10 日以降、浮遊し出した。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. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

i) 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

ii) 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

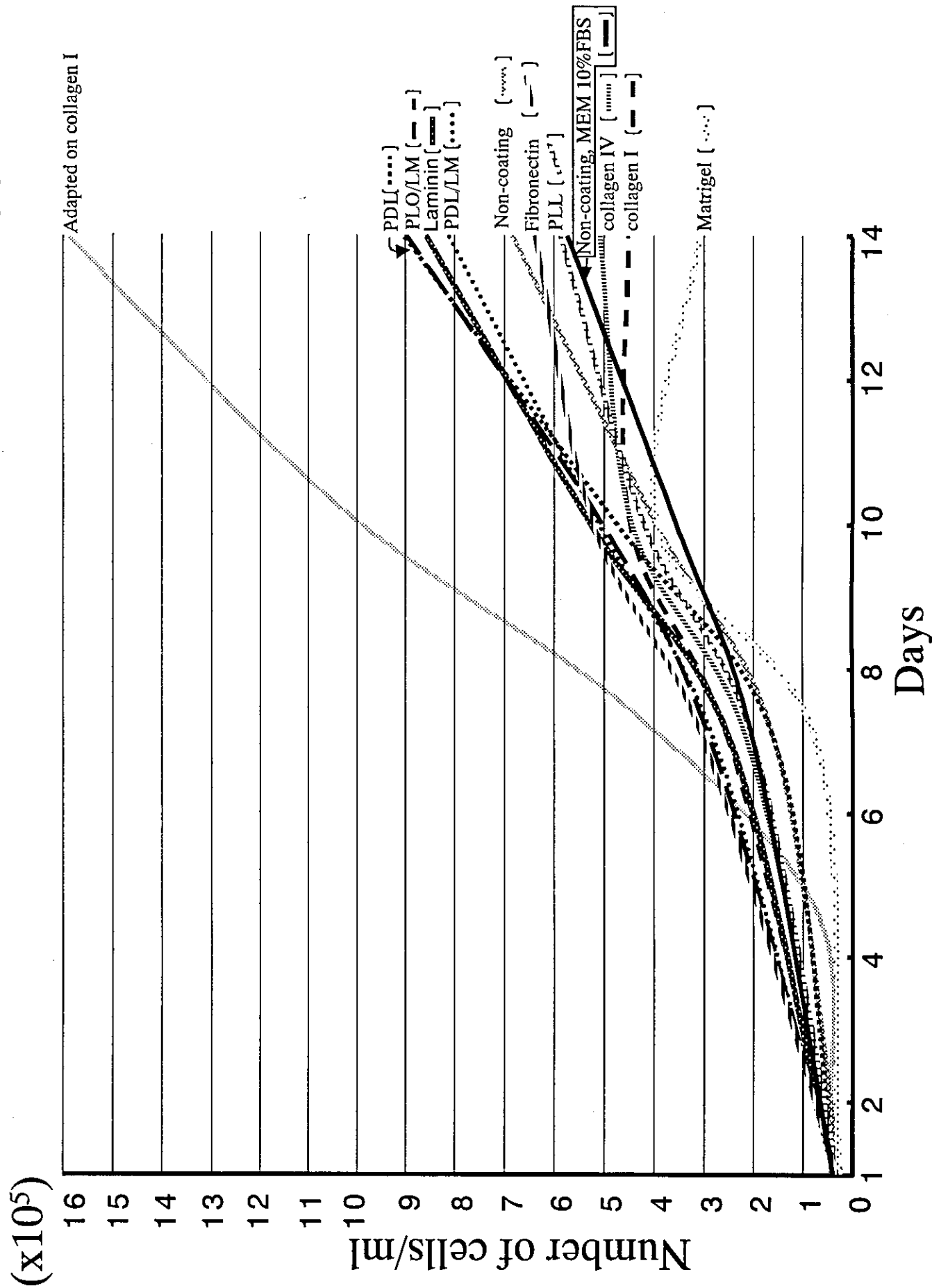
## G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請：なし

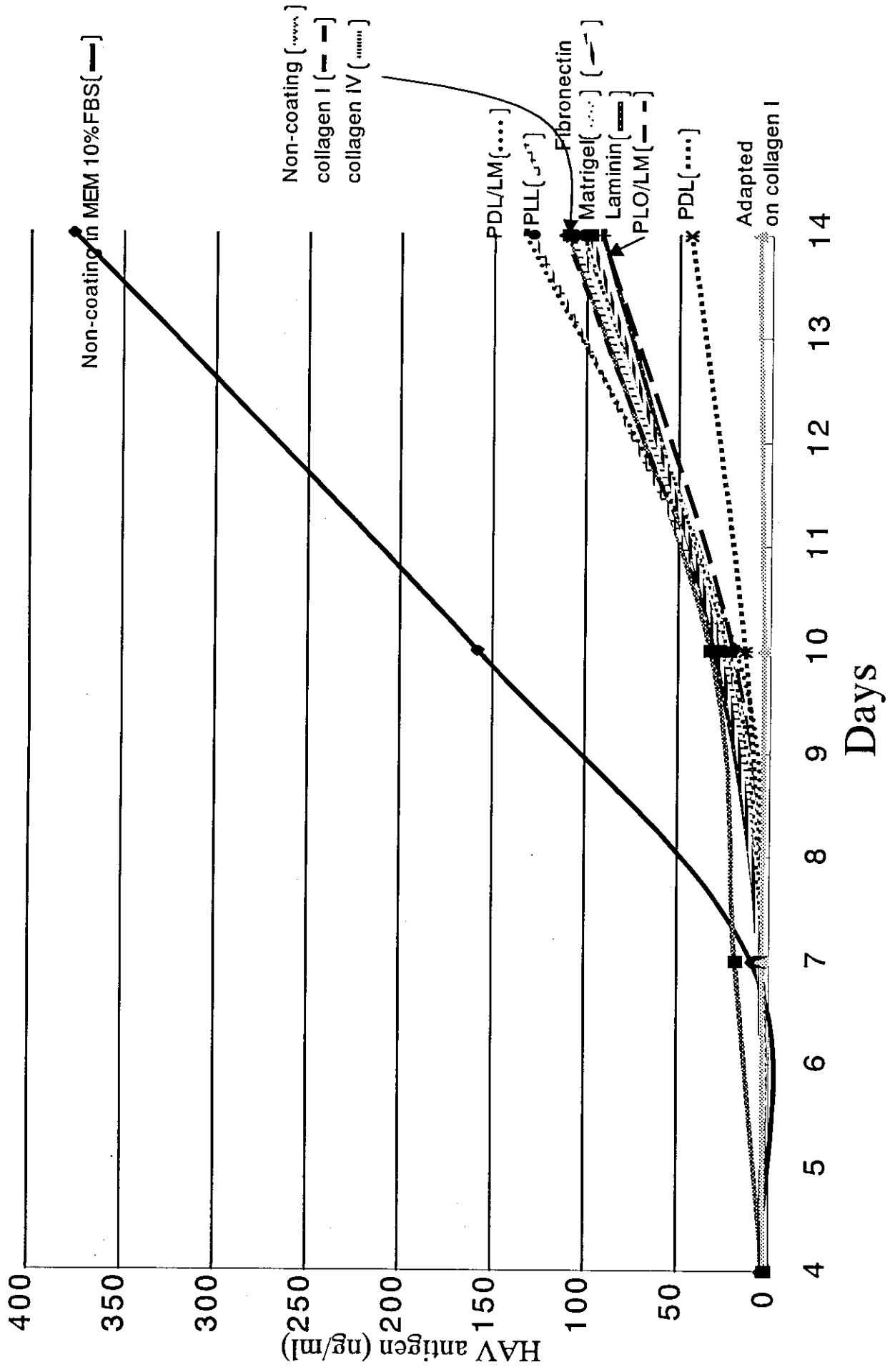
2. 実用新案登録：なし

3. その他：なし

# Cell-growth in different types of plates ☒ 1



# HAV antigen in different types of plates 2



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	農林水産省動物医薬品検査所/国立感染症研究所
	海野幸子	国立感染症研究所
	田口邦史	農林水産省動物医薬品検査所
	千田 恵	農林水産省動物医薬品検査所

**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ドンス」の中で、特に特定試験として確実な検出系が確立しておらず、情報量が豊富でない牛ポリオーマウイルス（BPV）を、製造資材として使用される牛血清から検出・排除すべき対象とした。そこで本研究では、1. 日本国内で流通している100サンプルを越す細胞培養用牛血清における BPV 遺伝子断片の混入の頻度を調査し、55%の血清が BPV 遺伝子に汚染されていることを明らかとし、これら BPV 陽性血清は原産国に係わらず高頻度である事を確認した。2. ヒト用生ワクチン（麻疹・風しん・おたふくかぜ・ポリオ・水痘）における BPV 遺伝子の混入を調査した結果、水痘ワクチンから BPV 遺伝子が検出された。

#### 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ドンス」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ない牛ポリオーマウイルス（BPV）を検出・排除すべき対象として提案した。

生物学的製剤の製造時に使用される牛血清に関する問題提起は、1996年のカナダ及び1998年オランダの研究者の報告によるものである。これら2つの報告では、市販されている牛血清から BPV 由来遺伝子の検出を行った結果60～70%から BPV 遺伝子が確認され、ワクチンを含む生物学的製剤への混入の危険性が懸念されること及びそれらの排除の必要なことが明らかとされた。一方、我が国においては本ウイルスの牛血清への混入に関する知見が乏しいため、日本国内で流通している牛血清における BPV 遺伝子の混入の頻度の調査及びヒト用ウイルス性生ワクチンから BPV 遺伝子が検出されるか否かを調査した。

#### B. 研究方法

（牛血清からの BPV 遺伝子の検出）

細胞培養用血清の販売会社及び動物用生物学的製剤協会（現：日本動物用医薬品協会）の協力を得て、国内で市販された細胞培養用牛血清132サンプルを試料として BPV 遺伝子検出を目的とする PCR を行った。PCR は1996年に Kappeler らが報告した nested PCR を基本とし、血清からの遺伝子の抽出方法等に変更を加えて実施した。また、PCR の結果から、血清の種類・原産国・販売会社別に解析を行った。更に nested PCR 用プライマーの他に、数種類のプライマーを設計し、最長で3.8Kbp（BPV 遺伝子の全長は約4.7Kbp）の BPV 遺伝子を検出する PCR を数種の牛血清について実施した。その後 BPV 遺伝子配列の特定のために、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の特定を試みた。

（生ワクチンからの BPV 遺伝子の検出）

5種類のヒト用生ワクチン合計12ロット（麻疹4、風しん4、おたふくかぜ2、ポリオ1、水痘1）

から遺伝子を抽出して、BPyV 遺伝子の検出を目的とした nested PCR を行い、BPyV 遺伝子の有無を確認した。

### C. 研究結果

#### 1. 牛血清からの遺伝子検出調査

牛血清 132 サンプルにおける nested PCR の結果、73 サンプルで BPyV 遺伝子由来と考えられる遺伝子増幅産物が確認され、その陽性率は約 55%であった。この陽性率は文献上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%、その他及び不明合計 55%となっており(表 1)、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。また血清の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、子牛血清の合計で 66%、成牛血清では 0%となっている。この成績では成牛血清の陽性率が低くなっているものの、検体数が 4 検体と少ないために結果に大きな差が出たことも否定できない。また、牛血清の販売会社別の陽性率に関しても大きな差は認められなかった。

また、7種の牛血清について 3.8Kbp の遺伝子を増幅する PCR を行ったところ 3 サンプルにおいて陽性となった。得られた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配列を明らかにし、既知の BPyV 塩基配列と比較したところ数塩基の違いが認められた。また本試験で得られた塩基配列間においても数塩基の違いのあることが確認されている。

#### 2. 生ワクチンからの BPyV 遺伝子の検出

試験に供試したワクチン 12 ロットの内、水痘ワクチンを除くワクチンでは BPyV 遺伝子は検出されなかったが、水痘ワクチンにおいては 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、製造所よりロットの異なるワクチンの分与を受け、同様に試験を行ったところ 12 ロット(当初の試験に用いた 1 ロットを含む)の水痘ワクチンの内 3 ロットから BPyV 遺伝子が検出された。

### D. 考察

本研究により、日本国内で流通している牛血清の約 55%に BPyV 遺伝子断片が混入している事が明らかとなった。この陽性率は既報の陽性率である 60~70%とほぼ同率であり、我が国においても海外と同様に高率に BPyV 遺伝子が牛血清中に混入している事が明らかとなった。また、原産国別の陽性頻度も差は認められず、BPyV は地域による汚染の濃度差は比較的少なく、牛群間に広く分布している実態が鮮明なものとされた。

更に、一部の血清から得られた BPyV 遺伝子の塩基配列の解析結果より、BPyV の遺伝子配列には多くのバリエーションが存在する可能性が示唆された。このため PCR 法を利用したウイルス遺伝子の検出や定量を行う際には注意が必要である事が示唆されるとともに、より多くの BPyV 由来遺伝子の解析をすすめ、株間により保存されている領域を特定していく必要があると考えられた。

国内流通の培養用牛血清の多くが 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確認されていない。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、水痘ワクチンは他のワクチンと比べ製造工程上最終小分け製品を作製する際にウイルス浮遊液の希釈倍率が低く、そのため原液等の製造時に使用した牛血清の持ち込み量が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想定される。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。

しかしながら、これらの研究で明らかとした事は、牛血清及び生ワクチンから BPyV の遺伝子を検出したに過ぎず、この事が感染性を有する BPyV の存在を確認したものではない。このため、今後感染性を有する BPyV を感度良く検出できる系の確立の必要

性があると考えられる。一方で PCR 法はその簡便性の観点からスクリーニングのための試験としては有用性があると考えられる。また牛血清中の BPyV の不活化条件や除去方法の開発・検討も必要であると考えられる。

#### E. 結論

1. 日本国内で流通する牛血清の約 55% が BPyV 遺伝子に汚染されている事が示された
2. 水痘ワクチンから BPyV 遺伝子が検出された
3. 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半数以上に 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 で陰性と判断され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

大槻紀之、田口邦史、千田恵、伊藤治. 組織培養用牛血清からの牛ポリオーマウイルス遺伝子断片の検出 動物医薬品検査所年報 40: 21-23, 2003

##### 2. 学会発表

大槻紀之、田口邦史、千田恵、伊藤治. 組織培養用

牛血清からの牛ポリオーマウイルス遺伝子断片の検出 第 136 回日本獣医学会学術集会 2003 年 10 月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 原産国別BPyV遺伝子検出結果

country	PCR		positive percentage
	Positive <sup>1)</sup>	Negative	
Australia	17	14	55%
Canada	9	11	45%
New Zealand	12	5	71%
Other Countries <sup>2)</sup> & Unknown	35	29	55%
total	73	59	55%

1)The 300bp PCR product was generated after second PCR.

2)Chile,Costarica,Japan,Mexico and Panama

A型肝炎ワクチン製造における無血清培養に関する研究

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、牛血清フリーの培養方法を検討したところ、細胞増殖用培地の無血清化は達成したが、ウイルス培養用培地においては達成されなかった。ウイルス培養方法の確立が今後の課題である。

**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、牛胎児血清が広く使用されている。しかし、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、原料の安全性の確認を厳しく求められるようになった。そこで本検討では、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 A 型肝炎ワクチン製造方法を確立することを目的とした。

**B. 研究方法**

- ① 血清量を削減した培地及び無血清培地を用いて、細胞増殖性を確認した。
  - ・ 血清量削減・無血清培地使用（H14 年度）
  - ・ 添加剤使用（H15 年度）
  - ・ 馴化法(※)の導入（H16 年度）
- ② 無血清培地を用いて、A 型肝炎ウイルスの増殖性を確認した（H16 年度）。  
(※ 馴化法：血清量を徐々に減少させ、最終的に無血清培地に置換する方法を指す。)

(倫理面への配慮)

A 型肝炎ウイルスは継代細胞で増殖可能

な為、特に問題はないと思われる。

**C. 研究結果**

- ① 細胞増殖性は、無血清培地に添加剤を加えたもの、無血清培地で馴化法を行ったもので良好な成績が得られた（但し、添加剤は動物由来成分を含む）。
- ② ウイルスの増殖性は、無血清培地でも従来法の 30%程度であった。

**D. 考察**

添加剤は動物由来成分を含むため、細胞増殖方法は馴化法を用いる方が望ましい。ウイルス増殖については、増殖因子の特定などを急ぐ必要がある。

**E. 結論**

細胞継代工程については無血清化の実現を示唆するデータが得られたが、ウイルス増殖工程は現時点では厳しい状況にある。

**F. 研究発表**

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

**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



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

無血清培地を用いた各種細胞の培養条件及び風しんウイルス（松浦株）の増殖性に関する研究

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の開発に関する研究として、市販されている無血清培地を用いて、初代細胞であるウズラ胚細胞(以下 QEF 細胞)、株化細胞であるアフリカミドリザル腎細胞(以下 Vero 細胞)及びヒト胎児肺正常二倍体細胞(以下 MRC-5 細胞)の増殖性について検討した。その結果、Opti-PRO を用いた場合に QEF 細胞及び Vero 細胞で牛血清を用いた場合と同程度の増殖性が認められ、培養が可能であることが示唆された。QEF 細胞では、胎児を消化する細胞分散液として 0.01%トリプシン+0.02%EDTA を使用したとき細胞収率及び細胞増殖の観点から優れていることが確認できた。また、その細胞を用いて風しんウイルス(松浦株)の増殖性を検討した結果、TCM199 と Opti-PRO を混合することで高い感染価のウイルスが得られた。しかしながら、MRC-5 細胞は、市販されている無血清培地では細胞の増殖が観察されなかった。

### A. 研究目的

現在、麻しん、風しん及び水痘ワクチンなどの生ウイルスワクチンの製造には牛血清を使用しており、牛血清は原産国や使用部位等について生物由来原料基準で厳しく規制されている。しかしながら、そのような牛血清でも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、無血清培地を用いた QEF 細胞、Vero 細胞及び MRC-5 細胞の培養法について検討した。また、無血清培地で培養した QEF 細胞については風しんウイルス(松浦株)の増殖性も併せて調査した。

### B. 研究方法

#### 1. QEF 細胞の細胞分散液と風しんウイルス(松浦株)の増殖性の検討

ウズラ胎児をトリプシン消化し、遠心後、沈渣の細胞を MEM で浮遊させた。この細胞浮遊液を Opti-PRO(Invitrogen 社)、VP-SFM(Invitrogen 社)及び 5%子牛血清(以下 NBS)含有 MEM で希釈し、37°C で 2 日間培養後の細胞数を測定した。

また、ウズラ胎児をアキターゼ、0.25%トリプシン及び 0.01%トリプシン+0.02%EDTA の各細胞分散液で消化し、遠心後、沈渣の細胞を MEM で浮遊させ、再度遠心した。沈渣の細胞を Opti-PRO に浮遊させ、細胞数が  $3.0 \times 10^6$  cells/mL になるように調製して、培養容器に分注し、37°C で 2 日間培養後の細胞数を測定した。

更に、この QEF 細胞に風しんウイルス(松浦株)を接種し、培養液として TCM199 と Opti-PRO 混合培地の混合比を変量してウイルスの増殖性を調査した。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。

#### 2. Vero 細胞の増殖性の検討

Vero 細胞を細胞分散液(アキターゼ)で処理し、遠心後、沈渣の細胞を Opti-PRO、VP-SFM、EX-Cell505(JRH 社)及び 5%牛胎児血清(以下 FBS)含有 MEM に浮遊させ、細胞数を  $1.0 \times 10^5$  cells/mL に調製して培養容器に分注し、37°C で 4 日間培養後の細胞数を測定した。更に採取した細胞を各培地で 3 倍に希釈して 4 代まで継代培養を行い、その細胞数を測定した。

#### 3. MRC-5 細胞の培養液の検討

MRC-5 細胞をトリプシン処理し、遠心後、沈渣の細胞を VP-SFM、Opti-PRO、HyQMega (HyClone 社)、PC-1(Cambrex 社)、EX-Cell505 及び 8%FBS 含有 MEM で浮遊させた。浮遊液の細胞数を  $8.0 \times 10^4$  cells/mL に調製して培養容器に分注し、37°C で 6 日間培養後の細胞数を測定した。また、上記と同様な処理をした沈渣の細胞を GIT(注 1) (日本製薬社)で浮遊させて、同条件で培養して細胞数を測定した。

注 1：牛血清中の細胞増殖因子 GFS(Growth Factor in Serum)を分取し、その GFS と基礎培地との組み合わせにより得られた汎用性に富む細胞培養培地。

### C. 研究結果

#### 1. QEF 細胞の細胞分散液と風しんウイルス(松浦株)の増殖性の検討

無血清培地を用いた QEF 細胞の増殖性を検討した結果、Opti-PRO で  $2.4 \times 10^6$  cells/mL、VP-

SFM で  $2.3 \times 10^6$  cells/mL 及び NBS 含有 MEM で  $2.4 \times 10^6$  cells/mL と、無血清培地においても牛血清を用いた場合と同等の増殖性を示した。

また、ウズラ胎児を消化するときの各細胞分散液と胎児 1 個あたりの細胞数の収量は、0.25% トリプシンを用いたときに  $1.8 \times 10^8$  cells/embryo と最も多く、次に 0.01% トリプシン+0.02% EDTA、アキターゼの順に低下した。各細胞を Opti-Pro で 37°C 2 日間培養したときの細胞数は、0.01% トリプシン+0.02% EDTA 及びアキターゼで消化した細胞は  $1.9 \times 10^6$  cells/mL であるが、0.25% トリプシンでは細胞シートを形成しなかった(表 1)。

表 1 各細胞分散液による細胞数

細胞分散液	胎児 1 個あたりの分散細胞数 ( $\times 10^8$ cells/embryo)	培養 2 日後の細胞数 ( $\times 10^6$ cells/mL)
0.25% トリプシン	1.8	N.D.* <sup>1</sup>
0.01% トリプシン + 0.02% EDTA	1.6	1.9
アキターゼ	1.3	1.9

\*<sup>1</sup> 細胞シートを形成せず、確認できなかった。

この QEF 細胞を用いて風しんウイルスの増殖性の検討を行った結果、ウイルス接種後の培養液として TCM199 で培養を試みたが、細胞剥離が起こり、ウイルス培養を行うことは困難であった。そこで、TCM199 と Opti-PRO を混合して培養を行った結果、混合比にかかわらず、 $6.0(\log_{10}$ PFU/mL)以上のウイルス含量が得られた(表 2)。

表 2 風しんウイルスの増殖性

混合比 (TCM199 : Opti-PRO)	ウイルス含量( $\log_{10}$ PFU/mL)			
	9 日* <sup>1</sup>	10 日	11 日	12 日
1:0	N.D.* <sup>2</sup>			
1:1	5.7	6.1	6.2	6.2
2:1	5.4	6.0	6.1	6.1
3:1	5.4	5.8	6.1	6.1

\*<sup>1</sup> ウイルス接種日からの培養期間

\*<sup>2</sup> 細胞剥離のため、培養を中止した。

## 2. Vero 細胞の増殖性の検討

各培地での Vero 細胞の増殖性は、継代 1 代では FBS 含有 MEM を用いたときの増殖性が  $9.1 \times 10^5$  cells/mL と最も良かった。更に 3 代継代を重ねた結果、Opti-PRO が  $11.0 \times 10^5$  cells/mL と

細胞数が多く、FBS 含有 MEM と同等の増殖性を示した(表 3)。

表 3 各培地における Vero 細胞の増殖性

培養液	細胞数( $\times 10^5$ cells/mL)	
	1 代	4 代
Opti-PRO	6.6	11.0
VP-SFM	3.4	6.2
EX-Cell505	5.5	8.5
FBS 含有 MEM	9.1	9.1

## 3. MRC-5 細胞の培養液の検討

MRC-5 細胞の培養 6 日目の細胞状態を顕微鏡観察したとき、FBS 含有 MEM では単層(図 1)を形成したのに対し、VP-SFM(図 2)、Opti-PRO と PC-1 では一部の細胞が培養容器に接着しているものの、その細胞に膨潤が観察された。HyQMega と EX-Cell505 では細胞が培養容器に接着していなかった。また、VP-SFM、Opti-PRO 及び PC-1 の細胞数は FBS 含有 MEM と比べ少なかった(表 4)。しかし、GIT を用いたときの細胞数は、 $18.0 \times 10^4$  cells/mL であり、FBS 含有 MEM の約 60%であった。

表 4 各培地における培養 6 日後の細胞数

培地	細胞数( $\times 10^4$ cells/mL)
VP-SFM	5.4
Opti-PRO	8.0
PC-1	2.4
HyQMega	-. <sup>1</sup>
EX-Cell505	-. <sup>1</sup>
FBS 含有 MEM	30.0
GIT	18.0

\*<sup>1</sup> 細胞が培養容器に接着しなかった。

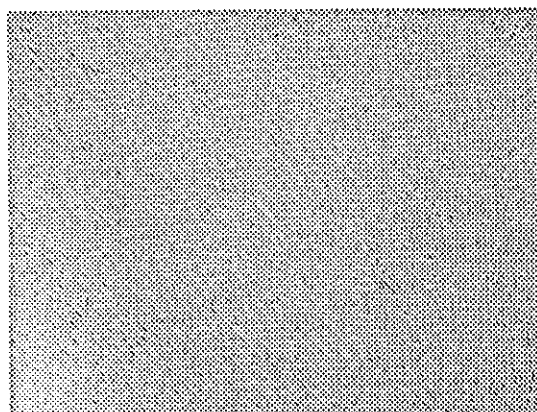


図 1 FBS 含有 MEM を用いた MRC-5 細胞培養

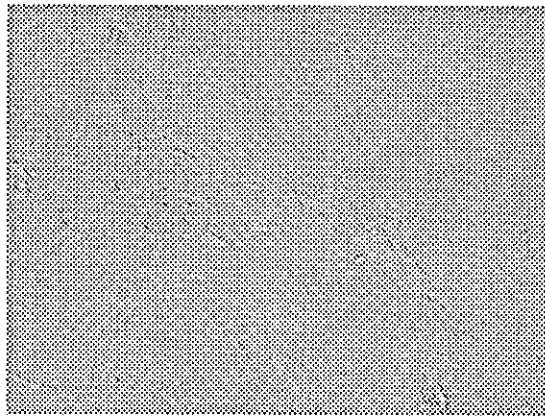


図2 VP-SFMを用いたMRC-5細胞培養

#### D. 考察

風しんワクチンの製造に使用されている QEF 細胞について、無血清培地を用いた培養を検討した結果、NBS 含有 MEM と同等の増殖性が認められた。更に、ウズラ胎児消化時の細胞分散液を検討した結果、アキターゼでは未分散細胞が多く残り、細胞収量に問題があるものの、消化された細胞の培養は可能であった。アキターゼは動物由来原料を使用していない酵素であり、動物由来原料の排除という観点に適した試薬であるが、細胞収量が低いことにより実用化には更なる改良が必要であると考えられる。また、0.25%トリプシンを用いたときは、細胞収量が多いものの、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酵素活性を中和する効果があるのに対し、無血清培地ではその活性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酵素活性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、無血清培地での細胞培養が可能となった。

また、風しんウイルスの増殖性を検討した結果、培養液として TCM199 を用いたとき細胞剥離が起り、培養を行うことができなかった。しかし、TCM199 と Opti-Pro を混合することでウイルスの培養が可能となった。

無血清培地を用いた Vero 細胞の増殖性は、Opti-PRO を用いて 4 代継代することで向上し、FBS 含有 MEM と同等の増殖性を示した。よって、無血清培地を用いた Vero 細胞の培養は可能であると考えられた。

水痘ワクチンの製造に使用する MRC-5 細胞についても無血清培地での培養を試みたが、良

好な細胞の増殖が認められなかった。しかしながら、牛血清中の細胞増殖因子を含む GIT を用いることで、MRC-5 細胞の増殖性が改善されたことから、無血清培地と適切な細胞増殖因子を組み合わせることで MRC-5 細胞の増殖が可能であることが示唆された。

#### E. 結論

牛由来成分を使用しないワクチン製造方法を確立するため、無血清培地を用いた細胞の増殖性及びウイルスの増殖性を検討した。市販されている無血清培地を用いて検討した結果、Opti-PRO を用いたとき QEF 細胞培養で増殖可能であることが示唆された。その培養において、ウズラ胎児を消化する細胞分散液として用いるトリプシンの濃度を低くすることにより、細胞培養が効率よく行えるようになった。また、その QEF 細胞を用いて風しんウイルスの増殖性を検討した結果、TCM199 と Opti-PRO を混合することで高い感染価のウイルスが得られた。また、Vero 細胞でも無血清培地を用いた培養が可能であった。しかし、MRC-5 細胞の培養においては、市販されている無血清培地で細胞の増殖が観察されなかった。無血清培地を用いた MRC-5 細胞の培養は更なる条件の検討が必要であると考えられる。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし。
2. 学会発表  
なし。

#### G. 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。

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

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、生物製剤研究所、副所長

**研究要旨** 麻しんワクチン等生ウイルスワクチンの製造に用いる初代培養細胞の培養には牛血清が用いられている。BSE 感染の可能性を最小にするためには、牛由来材料を用いない製造方法を検討する必要がある。本研究では、牛血清を使用しないで麻しんワクチンを製造する方法を探索するために、ウシ等反芻動物以外の血清（ニワトリ由来、ぶた由来）、あるいは無血清培地(VP-SFM; Invitrogen)を用いて初代ニワトリ胚細胞を培養し、ワクチン製造が可能かを検討した。また無血清培地 VP-SFM で培養が可能である事が知られている Vero 細胞を用いた麻しんワクチンの製造の可能性も検討した。ニワトリ血清、または無血清培地を用いた時、初代ニワトリ胚細胞は newborn calf serum (NCS)を用いた培養系とほぼ同様な増殖を示し、麻しんワクチン株 AIK-C の回収もほぼ同様であった。また、ワクチン株の性状も安定していた。一方、豚血清では細胞の伸張が弱く、ウイルス接種後は細胞が剥落しウイルスの回収はできなかった。よってニワトリ血清や無血清培地(VP-SFM; Invitrogen)はウシ血清の代替になる可能性がある事が示された。一方、無血清培地(VP-SFM; Invitrogen)で培養した Vero 細胞で AIK-C 株を増殖すると、わずかな継代の間に遺伝子の変異が観察され、性状が変化していく事が観察された。よって Vero 細胞を用いての麻しんワクチンの製造は適切でないと考えられた。

#### A. 研究目的

麻しんワクチン、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感染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しん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

1) ニワトリ血清、ブタ血清、又は無血清培地を用いて培養したニワトリ初代胚細胞(CEF細胞)での麻しんワクチン株の増殖：ニワトリ受精卵より胚を摘出し、トリプシン消化を行いCEF細胞を作成した。遠心後、非働化したNCS、ニワトリ血清(Tissueculture biologicals, CA, USA)、豚

血清(日本バイオテスト研)を3%添加したLH培地、あるいはVP-SFM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穴プレートにまき、alarBlue™(Biosource, CA, USA)を加え32度で培養し、経時的な細胞増殖をalarblueの還元による蛍光発色で測定した。又、残りの $1.5 \times 10^7$  cellsをT-75ボトルにまき、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TCID<sub>50</sub>法で測定した。又、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

2) 無血清培地で継代したVero細胞で増殖させた麻しんワクチン株の性状の検討：麻疹ワクチンAIK-C株のシードウイルスから全長cDNAゲノムを作製した。AIK-C株はsmall plaque type(F蛋白278番目のアミノ酸がLeu)とlarge plaque type(F蛋白278番目のアミノ酸がphe)が混在していることが知られており、それぞれのcDNAをpIC-MVAIK-F278Leu(small type)とpIC-MVAIK-F278Phe(large type)とした。これらのcDNAからB95a細胞を用いて