

200501087A

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

動物由来物質を排除したワクチン及び
組織培養インフルエンザワクチンの製造方法の開発研究

平成 17 年度
総括・分担研究報告書

主任研究者 田代真人
平成 18(2006)年 3 月

目 次

平成 17 年度

I. 総括研究報告書

動物由来物質を排除したワクチン及び組織培養インフルエンザワクチンの製造方法の 開発研究_____	P. 1
主任研究者：田代真人	

II. 分担研究報告書

1. 他動物由来物質を使わないおたふくかぜワクチン製造方法に関する研究_____	P. 5
分担研究者：加藤篤 協力研究者：木所稔	
2. ウシ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. 10
分担研究者：沼崎啓 協力研究者：堤裕幸、 齋藤義弘	
3. 動物由来物質を除いた風しんワクチン製造法の開発に関する研究_____	P. 12
分担研究者：海野幸子 協力研究者：大槻紀之	
4. 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. 16
分担研究者：大槻紀之 協力研究者：伊藤治、 海野幸子	
5. 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. 19
分担研究者：高崎智彦 協力研究者：原田文植	
6. 動物由来物質を除いた水痘生ワクチン製造法の開発に関する研究_____	P. 24
分担研究者：井上直樹	
7. 無血清培地を用いた A 型肝炎ワクチン製造法の開発に関する研究_____	P. 30
分担研究者：下池貴志 協力研究者：戸塚敦子	
8. 細胞培養、特に株化細胞を用いて製造するワクチンにおける牛由来成分を用いない 培養方法の検討_____	P. 34
分担研究者：大隈邦夫 協力研究者：倉永雅彦、 渡邊俊一郎	

9. 仔牛血清を使用しない弱毒生ウイルスワクチン製造法の開発_____ P. 38
分担研究者：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しんワクチン、
AIK-C 株の増殖条件の設定_____ P. 41
分担研究者：駒瀬勝啓
11. 牛血清を使用しない麻しんワクチン製造に関する研究_____ P. 44
分担研究者：末原章宏
協力研究者：岩本好司、山下利明
12. 組織培養インフルエンザワクチンに使用するシードウイルスの検討_____ P. 47
分担研究者：板村繁之
協力研究者：河野直子
13. 組織培養インフルエンザワクチンの試作・製造・規格試験の調査研究_____ P. 50
分担研究者：細井和男

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

動物由来物質を排除したワクチン及び組織培養インフルエンザワクチンの製造方法の開発研究
平成 17 年度総括研究報告書

主任研究者 田代真人 国立感染症研究所 ウイルス第 3 部 部長

研究要旨 ①感染症予防に使用されるウイルスワクチンの場合、ウイルスの性質としてその増殖が細胞に依存しているため、従来から製造材料として動物あるいは動物由来細胞を用い、また製造行程で多くの動物由来物質を用いざるを得なかった。そのためにワクチンの品質管理上、用いた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が重要となっている。なかでも弱毒生ウイルスワクチンは、その性質上不活化操作を伴わないため、ワクチンの製造工程の管理だけでは解決できない事項であり、動物由来物質の使用をワクチン製造過程から完全に排除することが求められる。そこで、製造から細胞を排除することが不可能な生ワクチンの改良として、厳密に管理された細胞を使用し、しかも細胞培養の段階でいっさいの動物由来物質を使用しない製造方法の開発を推進した。

②一方、インフルエンザワクチンは近年の接種者の増加と接種対象者が高齢者を中心としたハイリスク者になってきたことから、ますますその安全性の確保と安定供給が国民の健康を守るために重要な課題となってきている。インフルエンザワクチンは発育鶏卵を使用したワクチンが 1960 年代より製造されてきたが、いくつかの問題点が存在する。発育鶏卵の安定供給確保や外来性の病原体等の迷入を防ぐことが困難である。また、新型インフルエンザ出現に備えた迅速な製造体制の整備の観点からも組織培養ワクチンに期待される点が多い。わが国でもこのような観点から組織培養ワクチンの研究開発が進められてきたが、海外においては実用化直前の状況である。そこで、わが国での組織培養インフルエンザワクチンの実用化の促進と、効果・安全性のための品質確保を目的として以下の点についての研究を実施した。(1) 組織培養ワクチン製造に使用するシードウイルスとして現行のワクチン株である発育鶏卵から分離されたウイルス株を使用した場合のワクチンの製造量や特性についての検討。また、培養細胞から分離されたウイルス株のワクチン株としての可能性についての検討。(2) 組織培養ワクチンが発育鶏卵を使用した現行ワクチンと同様の規格試験によって安全性や効果についての品質確保ができるのかについての検討。

分担研究者

加藤 篤	国立感染症研究所ウイルス第 3 部	大隅邦夫	化学及び血清療法研究所
斎藤義弘	同上	真鍋貞夫	阪大微生物病研究会
海野幸子	同上	駒瀬勝啓	北里研究所
高崎智彦	国立感染症研究所ウイルス第 1 部	末原章宏	武田薬品工業株式会社
井上直樹	同上	板村繁之	国立感染症研究所ウイルス第 3 部
下池貴志	国立感染症研究所ウイルス第 2 部	細井和男	デンカ生研株式会社
伊藤 治	農林水産省動物医薬品検査所		

A. 研究目的

ワクチンの製造は厳選された材料と管理された製造方法により、その安全性と有効性が一定値以上になるように確保されているが、ごく微量に含まれる因子、あるいは未知の因子の迷入を排除することは不可能である。一方、生物製剤には、BSE 汚染地域となった米国産の牛血清や牛由来材料の使用が平成 17 年 4 月から禁止されている。

しかし、BSE 非感染地域由来の動物材料でも、他の微生物の混入は否定しきれない。そこで、これらの未知の微生物検出法の開発、動物由来物質に代わる安全な代替物質の開発が緊急に必要とされる。BSE 因子等の迷乳、伝播の危険性を無くし、将来起こりうる未知の因子による感染を防ぐためには、ワクチン製造過程から動物由来物質の使用を完全に排除することが求められる。

そこで、製造から細胞を排除することが不可能な生ワクチンの改良として、厳密に管理された細胞を使用し、しかも細胞培養の段階でいっさいの動物由来物質を使用しない製造方法の開発が早急に望まれており、本研究では、これらの開発を目的として、基礎研究を推進した。

一方、インフルエンザワクチンは 1994 年の予防接種法の改定に伴い従来の学童を中心とした集団防衛的な接種方針から実際に大きな健康被害を受ける、いわゆるハイリスク者である 65 歳以上の高齢者を主な接種対象者とした接種方針に大きく変更された。それとともに一時低下していたワクチン製造量が年々増加し 2004 年には約 2,074 万本に達している。このような需要の増加や新型インフルエンザ出現に備えたワクチン製造についても現在の発育鶏卵に依存した製造方法では急激な需要に対応することは困難である。

組織培養ワクチンでは製造量の変化に比較的容易に対応することが可能である。さらに組織培養の技術に基づいていることから、製造工程における無菌性の確保やワクチンへの混入物の管理が比較的容易に行うことができる。

このような特長から組織培養ワクチンの開発、実用化を目的とし、以下の 2 点を検討した。

(1) 組織培養ワクチン製造に使用するシードウイルスとして現行のワクチン株である発育鶏卵から分離されたウイルス株を使用した場合のワクチンの製造量や特性についての検討。

(2) 培養細胞から分離されたウイルス株のワクチン株としての可能性についての検討。

B. 研究方法

本研究では、特に狂牛病の原因物質とされる異常プリオンや動物固有のウイルスを含む可能性のあるウシ血清、更には他動物由来物質の使用をワクチン製造から完全に無くし、その代替方法を開発すること、及びこれを応用してより有効で安全な組織培養インフルエンザワクチンの開発を進めている。

(1) 近年進歩の著しい無血清培地をワクチン製造に利用すること。細胞培養に用いるトリプシン、ワクチン安定剤に用いるゼラチン等の代替品として、化学合成品、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。

(2) 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する。以上の検討により、将来現れるかもしれない未知の動物由来感染因子による汚染のリスクにも十分対応できる安全性の高い高品質ワクチンを世に出すことが期待できる。

その結果、より安全性の高いワクチンを安定的に供給する体制が確立されることが期待され、これが実用化されると新型インフルエンザ出現などの健康危機に際しても国民の健康保持に大きく貢献できる。

研究方法としては、

①ワクチン製造材料として使用されている動物由来物質について、動物固有のウイルスや他の未知の病原因子を検出し、そのヒトへの感染リスクの有無を検証する高感度検査法の開発を進めた。

②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、ゼラチン等）を使わずにすむように、微生物あるいは植物由来物質、または化学合成品などの代替品使用を検討した。

③代替品使用による細胞及びワクチン株の増殖曲線を現行原製造方法と比較検討を行いその有効性を検討した。また、代替品使用により作られるワクチンの抗原性及び免疫原性が現行製造品と同等であることを検証した。

④得られた知見を総括し、製造現場に適用できるか否かを検討した。

また、組織培養インフルエンザワクチンの規格制定と安全性向上、品質確保を目的とし、具体的には以下の3点について実施した。

①組織培養ワクチンに適したインフルエンザワクチン製造の為の、シードウイルスについて検討した。

②現行ワクチンの規格が組織培養ワクチンの規格に適用できるのか検討した。

③現行ワクチンの規格試験に使用している標準品などがそのまま利用可能であるのか検討した。

C. 研究結果

1. ムンプスワクチンウイルスを無血清培地で継代すると、ブラックサイズに大小が出現し、遺伝的に不安定であることがわかった。この結果、単純に無血清培地を使用することは、実用化には向いていないことがわかった。

2. それ以外の麻疹、風疹、水痘、日本脳炎、A型肝炎の各ワクチンについては、無血清培地で培養した細胞を用いた場合でも、遺伝的の塩基配列には大きな変化はなく、比較的安定であった。但し増殖効率には低いものもあり、製造には必ずしも向いていない場合もあった。これらについては、今後さらに検討する必要がある。

3. インフルエンザワクチン製造用の組織培養細胞開発

ヒト用のインフルエンザワクチン原材料であるワクチン株ウイルスの増殖に用いる、組織培養細胞の開発を進めた。候補細胞としては、MDC K細胞とVero細胞が考えられ、これらについて、ウイルス感受性、ウイルス増殖効率、最適培養条件、迷入ウイルス等の否定試験を行なった。その結果、MDC K細胞の特定の細胞株が、これらの基準に合致していることが明らかになった。

4. 培養細胞から分離されたウイルス株のワクチン株としての可能性についての検討。

組織培養ワクチン製造に使用するシードウイルスとして現行のワクチン株である発育鶏卵で分離されたウイルス株を使用した場合の、ワクチンの製造量や特性について検討した。MDC K細胞で分離されたウイルスは、ヒトの間で感染伝播しているウイルスの性状を保持しており、抗原性もヒトのウイルスと一致していた。

これに対して、発育鶏卵分離ウイルスまたはMDC K細胞分離ウイルスを1代でも発育鶏卵

で継代した場合には、突然変異によって鶏卵に馴化したウイルスとなった。抗原決定部位に影響する糖鎖が欠落したり、抗原性に影響する部位のアミノ酸変化が生じており、これは不可逆的であった。

従って、組織培養細胞で分離されたウイルス株を用いて、組織培養細胞で増殖させたウイルスを原材料としたワクチンが、抗原性の上からは、よりヒトの間で流行しているウイルスの近く、ワクチンとして相応しいと考えられる。

5. 組織培養ワクチンが発育鶏卵を使用した現行ワクチンと同様の規格試験によって安全性や効果について品質確保ができるのかについての検討。

D. 考察

安全なワクチンの製造には、牛血清を用いない細胞培養のシステムが不可欠である。血清を用いない無血清培地の研究はこれまでも行われてきたが、ウシ血清を加えたこれまでの培養システムに能力的にも経済的にも優るものはなかった。ワクチンの安全性と有効性を規程する生物学的製剤基準等は、製剤としてのワクチンを均一に保つには寄与したが、この一方で製造方法の変更、改良を容易ならざるものにし、ワクチン製造への無血清培地の使用と他動物由来因子代替物質の使用はこれまで行われてこなかった。

異常プリオン物質を含む可能性のあるウシ血清だけでなく、新たな感染性病原因子の迷入を断つためには、厳密に制御された原材料（細胞）以外の動物に由来する物質の使用を完全に取り止めることが必須であり、このような製造方法は避けて通れない。そこで、無血清培地と動物由来物質代替品の使用が、現行製造方法によるワクチンと同じ安全性と予防効果を持つことを確認しつつ、経済性を鑑みながら開発を行った。

インフルエンザワクチンは1994年の予防接種法の改定に伴い従来の学童を中心とした集団防衛的な接種方針から、実際に大きな健康被害を受けるハイリスク者である65歳以上の高齢者を主な接種対象者とした接種方針に大きく変更された。それとともに一時低下していたワクチン製造量が年々増加し2004年には約2,074万本に達している。このような需要の増加や新型インフルエンザ出現に備えたワクチン製造についても現在の発育鶏卵

に依存した製造方法では急激な需要に対応することは困難である。組織培養ワクチンでは製造量の変化に比較的容易に対応することが可能である。さらに組織培養の技術に基づいていることから、製造工程における無菌性の確保やワクチンへの混入物の管理が比較的容易に行うことができる。このような特長から組織培養ワクチンの開発、実用化が要請されている。

国内外において組織培養ワクチンのインフルエンザワクチンへの応用に関する研究開発は今までに多く行われてきた。実用化に向けたワクチンの規格策定や安全性や品質確保に関する検討があまり進んでいなかったが、海外においては、既に3社が組織培養ワクチンの実用化に成功している。

そこで、我が国における組織培養インフルエンザワクチンの実用化に向けて、具体的なワクチンの規格を制定し、ワクチンの安全性や品質確保に必要な試験方法の検討や必要に応じて新たな試験方法の開発を進める必要がある。本研究は、このようなワクチンの品質管理の視点から実用化への促進を図るものである。

本年度は、組織培養ワクチンの有用性と、候補となる細胞株の選定、絞込みが行なわれ、開発の可能性が強く示唆された。

E. 結論

(1) ムンプスワクチンを除いては、単純な無血清培地への移行では増殖性が劣るものの、いくつかの工夫によって実用化へ向かえることが分かった。来年度以降、更に最適な条件を検討して、実用化を目指すこととなる。(2) 我が国における組織培養インフルエンザワクチンの実用化に向けて、組織培養ワクチンの有用性を示すとともに、候補となる細胞株の選定、絞込みが行なわれた結果、開発の可能性が強く示唆された。

F. 健康危害情報

特記事項無し

G. 研究発表

論文発表

Kidokoro, M., Tashiro, M., Shida, H. : Genetically stable and fully effective smallpox vaccine strain constructed from highly attenuated vaccinia LC16m8. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102: 4152-4157, 2005
学会発表 なし

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

他動物由来物質を使わない おたふくかぜワクチン製造方法に関する研究

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・主任研究官

研究要旨：おたふくかぜ生ワクチンは鶏胚初代培養細胞(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ている。CEF は、あらかじめ牛血清等の動物由来物質を含む培地で増殖させた後に製造に使用される。そのため、原材料(発育鶏卵)及び工程中に使用する動物由来物質(牛血清、豚の臓器から調整されるトリプシン等)に感染性因子が混入しており、それに気づかずに使用してしまうと、不活化工程を含まない生ワクチンではそれがただちに健康被害につながる可能性を持つ。他動物由来物質の品質管理を徹底することは当然であるが、初代培養細胞を作る個体の管理も大切である。SPF 鶏に由来する卵を使ってはいけるものの、個体毎の完全な安全性管理は困難である。性状のはっきりした株化細胞を使う事が解決方法につながる。そこで、使用細胞の候補として Vero 細胞を使用した。牛血清入り培地で増殖させた Vero 細胞と無血清合成培地で増殖させた Vero 細胞を用いて、それぞれで 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を未継代のワクチン株と比較した。驚いた事に、どちらのブラックサイズも継代前よりは、直径が増していた。ブラックサイズのヒストグラム解析から、血清入り培地で増殖させた Vero 細胞を用いて 8 代継代したムンプスウイルスワクチン株は、大きなブラックを作るウイルスの均一集団であると思われたが、無血清培地で培養した Vero 細胞を用いて 8 代継代したムンプスウイルスワクチン株は、大きな一つのピークを持たないことから、雑多なウイルスの集団からなっていると想像された。容易にブラックサイズが変わってしまうことから、Vero 細胞は、血清入り培地で維持されたか、あるいは無血清培地で維持されたかにかかわらず、おたふくかぜ生ワクチンの製造には不向きであった。

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性物質に由来す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 SPF 鶏の発育卵から採取した胚を繊維芽細胞にし、種ウイルスを接種して増殖させて製造される。SPF 鶏に由来する卵を使ってはいけるものの個体毎の完全な安全性管理はおのずと限界があり、この課題の解決には、性状のはっきりした株化細胞を使う事を検討しなければならない。

そこで、本年度の研究課題として使用する株化細胞の候補として不活化ポリオウイルスワクチンの製造にも用いられようとしている Vero 細胞を入手し、更に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. 材料と方法

(Vero 細胞と細胞増殖試験)

田野良夫先生(日本ポリオ研究所)より、不活化ポリオウイルスの製造用に品質管理された Vero 細胞(MWCB93-1)の分与を受け実験に使用した。Vero 細胞を血清入り培地(MEM+10%FBS)と血清を含まない合成培地(Opti SFM、Invitrogen Co.)で培養し、96 穴プレートに 4×10^2 /well で調整した (1) 血清入り培地から血清入り培地に移した群(MEM+S > MEM+S)、(2) MEM(-)に移した群(MEM+S > MEM(-))、(3) 無血清合成培地から同じ無血清合成培地に移した群(SFM > SFM)、(4) MEM(-)に移した群(SFM > MEM(-))を作製した。5日間培養し、毎日細胞の増殖度を細胞内 ATP 量で測定した。測定には Promega Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay を使用した。

(細胞の準備と感染)

Vero 細胞 (MWCB93-1) を血清入り培地

(MEM+10%FBS)と血清を含まない合成培地(Opti SFM)で3代継代し、それぞれの培地に馴化したと思われる細胞をいくつかに分けて凍結保存した。細胞を使用する1日~2日前に解凍し、再びそれぞれ血清入培地(MEM+10%FBS)と無血清合成培地(Opti SFM)で培養した後、直径5cmのシャーレに 2×10^5 cells/pateの濃度で細胞をまいた。

翌日にはシャーレ上にほぼ均一に広がった細胞が得られるので、国内で使われているワクチン株Aを感染価0.05で1時間吸着させ、液を除いたのちにPBSで細胞を一度洗った後、どちらも5mlのMEM液(血清添加物無し)を加え2~3日間培養した。

(継代試験)

2~3日後の培養上清5mlを採取し、そのうち1mlを凍結保存し、0.2mlをウイルスRNA抽出材料とした。血清入培地(MEM+10%FBS)と無血清合成培地(Opti SFM)で準備したVero細胞のプレートに、1mlを一時間吸着させ、液を抜き取った後に、PBSで細胞を一度洗って5mlのMEM(-)培地を加え、2~3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)

継代歴1から8の培養上清からFプライマー: 5'-TCAAGTAGTGTGCGATGATCTC-3'とRプライマー: 5'-AGGTGGCATTGTCTGACATG-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、ブラックの直径をそれぞれ100個以上計測してヒストグラムと平均直径、偏差を求めた。

C. 研究結果

(なぜVero細胞か)

おたふくかぜ生ワクチンの製造には鶏胚初代培養細胞(CEF)が用いられている。今までの研究からCEFは、従来から使用している

血清入培地(MEM+5BS+10%TPB)よりむしろ合成無血清培地(SFM)でよく増殖することがわかっている。ところが、このようにして増やしたCEF細胞を使ってワクチンウイルスの継代を行うと、血清入培地で増やしたCEFと合成無血清培地を比較すると5代目くらいから徐々に無血清培地で増やした細胞を使った方が、ウイルスの増えがよくなった。8継代したウイルスのブラックの大きさを比較したところ、血清入培地で維持したCEFで継代したウイルスのブラックは無継代のウイルスのブラックと大きさに差がないのに対して、無血清合成培地で維持したCEFで継代したウイルスのブラックは明らかに直径が小さく変っていた。鶏胚は、個体として誕生する直前の状態であるので、当然、分化度の異なる性質の雑多な細胞集団である。従って、従来の培地とSFMで培養維持される細胞集団が異なり、SFMで増える細胞は、ある特定の性質を持つウイルス、この場合は小さなブラックを作るウイルスを増やし易い特性を持つのではないかと推察された。実際、SFMで培養されたCEFは、細胞増殖の速度が従来培地で培養されたCEFより早いばかりでなく、顕微鏡的な形態像が従来培地では主に細長い細胞が多いのに対して、SFMでは数石型の細胞の比率が高くなっている。

胚の様な多様な細胞を含むものを材料にするので、用いる培地により増殖維持される細胞集団が異なる可能性が生じるが、もともと均一な株化細胞を用いる事ができれば、この問題は回避できる。そこで、本研究課題では、不活化ポリオウイルスの製造用に準備され、品質の確認されたVero細胞を日本ポリオ研より分与を受け、おたふくかぜ生ワクチンの製造に適するか否かを検討した。

(細胞増殖性)

用いたVero細胞の各培地での増殖性を比較した(図1)。血清入培地(MEM+S)では5日

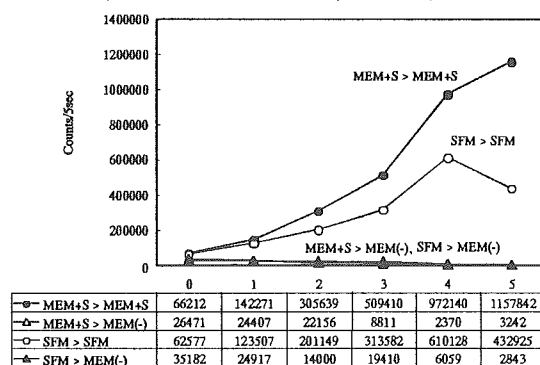


図1 Vero細胞の増殖性

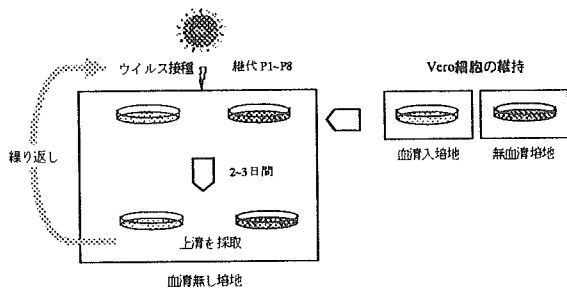


図2 Vero細胞の培養と継代方法

間の観察中もっともよく増殖した。無血清培地(SFM)は、細胞増殖するものの血清入培地ほど高い増殖性を認められなかった。また、4日以降細胞数が減少に転じた。一方、血清無し培地(MEM(-))を用いた場合、細胞増殖はまったく観察されなかった。このことから、用いた Vero 細胞の栄養要求性は、かなり高い事が判明した。

(株の継代試験)

Vero 細胞は、MEM(-)培地では増殖できない事が示されたが、3日間程細胞を維持することは可能であったので、市販ワクチン株 A を用いて株の継代試験を行うことにした。継代方法は、あらかじめ血清入培地(MEM+10%FBS)と無血清合成培地(SFM)で培養し、ある程度培地に慣せた同一継代歴の Vero 細胞を凍結保存し、継代ごとにそれを起こして使用した(図2)。

あらかじめ培養した培地組成による Vero 細胞の細胞形態的な違いは顕微鏡レベルで見あたらぬ(図3左)。ところが、どちらも血清無しの MEM で培養しているにも関わらずムンプスウイルスワクチン株を感染させて生じる細胞変性像は異なる。血清入培地で維持された Vero 細胞では、一般的な細胞融合像であるのに対して、無血清合成培地で維持された Vero 細胞では、細胞融合像よりも細胞の円形化と培養器からの脱落が主体であった

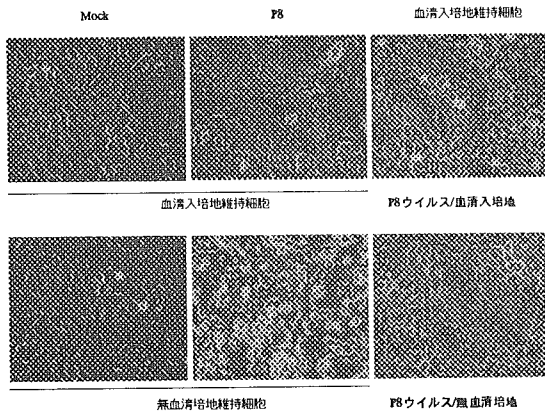


図3 血清入培地と無血清培地でのVero細胞CPE

(図3中央)。

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 遺伝子部分が增幅できることを利用して、ムンプスウイルスワクチン株が増えているか否かを確認した。血清入培地で維持した Vero 細胞に感染させた場合を(+)で、無血清合成培地で維持した Vero 細胞に感染させた場合を(-)で示した。継代数 1 から8まで、どちらもほぼ同じ様な濃さのバンドが検出され、それぞれの細胞でムンプスウイルスワクチン株が順調に継代されたことを示した(図4)。

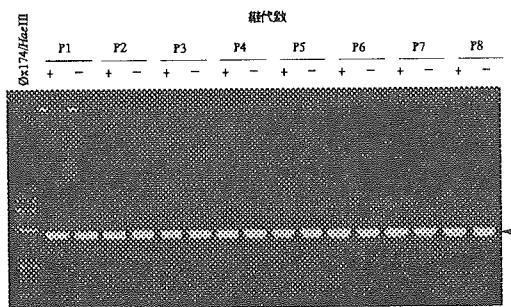


図4 Vero細胞でのムンプスウイルスワクチン株の継代

ムンプスウイルスワクチン株を無血清合成培地で維持された Vero 細胞に感染させると、円形化と脱落を起こす。この性質は、8代継代しても同じである。しかし同じウイルス液を、今度は血清入培地で維持された Vero 細胞に感染させると、巨細胞像を示すことから、細胞変性像の違いは、ウイルスの違いではなく、あらかじめ細胞が維持された培養条件の違いであった(図3右)。

(継代とブラックサイズ)

継代数 0(P0)及び 8(P8)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5)。P0 のブラックは、どれも小さなブラックを形成した。一方、8代継代ウイルスは、どちらも大きなブラックを形成した。ブラックは、周囲の境界がはっきりし、細胞の抜けも

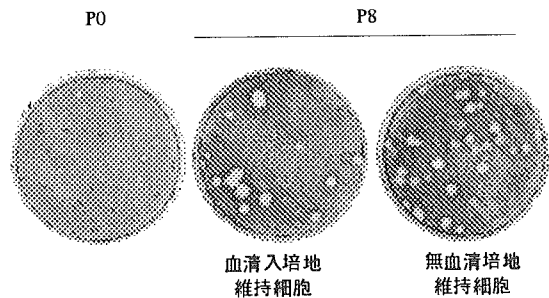


図5 継代ウイルスが作るブラック

よいコントラストのはっきりした像であった。それぞれのブラックの直径を顕微鏡的に計測し、ヒストグラムを作製した(図 6)。P0 のワクチン原株は、比較的均一な小さなブラックサイズの一群であるが、8 代継代するブラック像から明らかなようにどちらも直径が大きくなる。ところが、直径サイズの分布は、血清入培養で 8 代継代したものと、無血清培地で維持した Vero 細胞で継代したものでは異なっていた。無血清培地で維持した Vero 細胞で継代したものでは、ブラックサイズの小さなものから大きなものまでが広範囲に存在するのに対して、血清培地で継代したものでは、比較的均一な集団から構成されていた。平均値は、P0 で 1.18 mm、P8 の血清入培地で維持した Vero 細胞を使った物は、2.75mm、無血清培地で維持した Vero 細胞を使った物は、3.10 mm であった(図 7)。

ウイルス	平均	標準偏差
P0	1.18	0.42
P8/血清入培地	2.75	0.61
P8/無血清培地	3.10	0.83

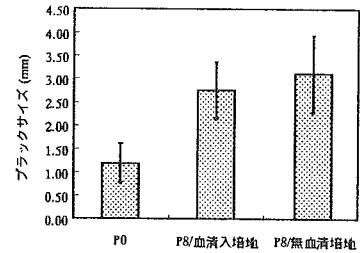


図7 継代培養によるブラックサイズの変化

ある。合成培地を CEF に用いると、むしろ従来用いている培地(MEM+5%BS+10%TPB)より細胞の増殖性が増していた。ところがそのようにして培養した細胞に接種したウイルスの生物学的性状をブラックサイズを指標に評価すると、血清入培地で維持した CEF で 8 代継代したウイルスでは原株(P0)と比較してブラックサイズに変化がなかったが、無血清合成培地で維持した CEF では有意に小さくなっていった。この原因として、鶏胚から得られる CEF の細胞集団が、血清入培地と無血清培地で異なり、そのため小さなブラックを作るウイルスが増え易い状況が生まれた事が考えられた。そこで、今回はもともと単一の細胞集団である株化細胞を使って培地を変えることにより異なる細胞集団になってしまう可能性を排除し、尚かつ動物個体由来する未知の感染性因子を排除することを検討した。

CEF で継代させると Vero 細胞で小さなブラックを作るウイルスが増えてくるのに対して、Vero 細胞に 8 代継代すると Vero 細胞に大きなブラックを形成するようウイルスが変化する。これは、ウイルスが増やした細胞に容易に馴化する性質があるためと思われる。サルの腎臓由来の Vero 細胞に馴化したウイルスはヒト細胞にも馴化しており、ヒトに対する病原性が増している可能性がある。このため血清入培地、無血清培地の使用にかかわらず、ムンプスウイルス生ワクチンの製造には不向きであると思われる。

以上に示した様に Vero 細胞は、製造に適さないと思われるが、とりあえず Vero 細胞における血清入培地と無血清培地を比較したので考察する。Vero 細胞は血清入培地の方が無血清合成培地より細胞の増殖性がよい。単一集団の株化細胞であるにもかかわらず、8 代継代した後のウイルスのブラックサイズの分布は異なっていた。これは、もともと単一の細胞集団である Vero 細胞なので、鶏胚を用いる CEF の時の様に使う培養液組成により細胞の構成集団が異なるということは考えら

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、ワクチン製造に用いる初代培養細胞、CEF、と合成培地、SFM、の相性について検討したことが

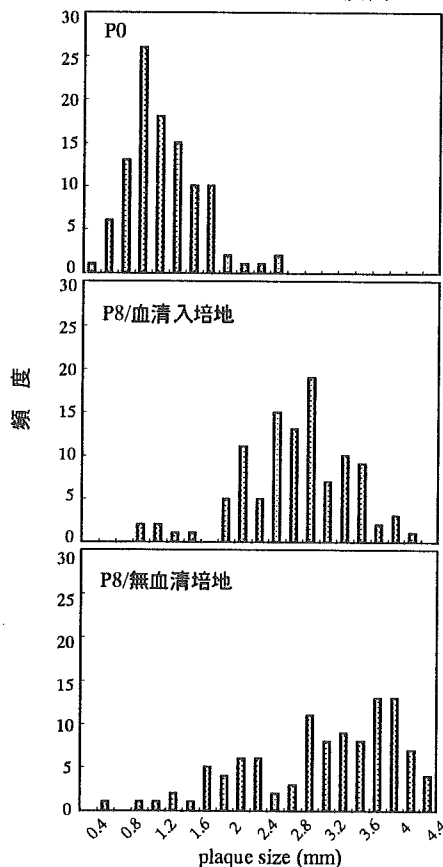


図6 継代ウイルスが作るブラックサイズのヒストグラム

れない。少なくとも顕微鏡的に細胞間の形態差はない。細胞の増殖性においては合成培地が劣っているため、用いた細胞の生理的環境が異なっていたことは十分に考えられる。すなわち、2~3日間の培養期間中に血清培地で維持された Vero 細胞では、ウイルスの増殖がよくてウイルスの複製回数が無血清培地で培養した Vero 細胞よりも進んでいる可能性がある。そのため、大きなブラックを形成するウイルス集団になりやすいが、ウイルスの複製回数のすくない無血清培地では大きなブラックをつくるウイルスの集団になりきれずに、依然小さなブラックをつくるウイルス、あるいはその移項段階の中間のサイズのブラックを作るウイルスが含まれて、サイズの広がりをもったウイルス集団になったのではないかと予想される。この一方で、培地組成がウイルスが必要とする細胞のマシナリーを変えて、そのため異なるウイルス集団が増えざるを得なかったと推測できることも可能である。

E. 結論

他動物由来因子の原材料からの混入をさけるため、株化 Vero 細胞と無血清培地がおたふくかぜ生ワクチン製造に使えるか否かを検討したが、培地組成に関係なく容易にブラックサイズが大きくなり、すくなくとも Vero 細胞の利用は不向きであることが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. **Kubota, T.**, N. Yokosawa, S. Yokota, N. Fujii, M. Tashiro, and **A. Kato**. Mumps virus V protein antagonizes interferon without the complete degradation of STAT1. *J. Virol.* **79**:4451-4459 (2005).
2. **Kidokoro, M.**, M. Tashiro, and H., Shida. Genetically stable and fully effective smallpox vaccine strain constructed from highly attenuated vaccinia LC16m8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 4152-4157 (2005)

2. 学会発表

(国際会議)

1. Kato, A., K. Kiyotani, M. Tashiro and Y. Nagai Sendai virus strategy to circumvent the self-limiting growth due to autocrine and paracrine interferons. IUMS, ICV, San Francisco, July 23-28, 2005
2. Kidokoro, M., M. Tashiro, and H. Shida: Novel genetically stable vaccine strain

constructed from highly attenuated vaccinia LC16m8. IUMS, ICV, San Francisco, July 23-28, 2005

(国内学会)

1. 加藤 篤、清谷克寛、久保田 耐、田代真人、永井美之 センダイウイルス抗インターフェロン能力の感染に及ぼす意味、第 16 回日本生体防御学会学術総会、東京、2005 年 8 月
2. 加藤 篤、清谷克寛、久保田 耐、田代真人、永井美之 センダイウイルス抗インターフェロン能力の感染に及ぼす意味、第 53 回日本ウイルス学会総会、横浜、2005 年 11 月
3. 安井文彦、北島正大、井上真吾、新井正明、森田公一、村井深、水野喬介、**木所稔**、志田壽利、松島綱治、小原道法：ワクシニアウイルスを母体とした SARS ワクチンの開発、日本予防医学リスクマネジメント学会第 3 回総会、東京、2005 年 9 月
4. 木所稔、田代真人：遺伝的安定性と免疫原性に優れた弱毒痘瘡ワクチン株の開発と B5R 遺伝子の機能、第 9 回日本ワクチン学会、大阪、2005 年 10 月
5. 木所 稔、齋加志津子、窪谷弘子、加藤篤、田代真人：ムンプスウイルスの中枢神経病原性に関わる遺伝子の同定と解析、第 53 回日本ウイルス学会総会、横浜、2005 年 11 月
6. 安井 文彦、北島 正大、横地祥司、井上 真吾、森田 公一、志田 壽利、**木所 稔**、村井 深、松島 綱治、小原 道法：SARS コロナウイルスの全構造蛋白質発現型組換えワクシニアウイルスによるワクチン効果の検討、第 53 回日本ウイルス学会総会、横浜、2005 年 11 月
7. 安井文彦、北島正大、横地祥司、井上真吾、森田公一、志田壽利、**木所稔**、村井深、松島綱治、小原道法：SARS コロナウイルスの全構造蛋白質発現型組換えワクシニアウイルスによるワクチン効果の検討、日本分子生物学会・第 28 回年会、福岡、2005 年 12 月

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

ウシ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 沼崎 啓 国立感染症研究所ウイルス第三部 室長

協力研究者 堤 裕幸 札幌医科大学小児科 教授

協力研究者 齋藤義弘 慈恵医科大学小児科 助手

研究要旨 麻疹排除対策の実行のためには安全で有効性の高いワクチン接種が不可欠である。またウイルス学的及び遺伝子学的特性に基づいたワクチン株の評価および品質管理と科学的監視体制の充実も必要とされる。現在わが国で市販されている弱毒生麻しんワクチンの最終製品はニワトリ胎児胚細胞で増殖したウイルスを含む培養上清を精製して作られている。本研究では弱毒生麻しんワクチンの作製に関してウシやその他の動物由来成分の排除の可能性について検討した。現行のワクチンと同等のウイルス量の獲得にはニワトリ胎児胚細胞の単離方法の改良も必要と判断された。

A. 研究目的

現在わが国で市販されているワクチンは Enders の分離した Edmonston 株由来の AIK-C 株、Schwarz-FF8 株、田辺株由来の CAM 株、TD97 株を起源としており、最終製品はニワトリ胎児胚細胞で増殖したウイルスを含む培養上清を精製して作られている。ワクチンの製造過程において一般には細胞増殖の目的でウシなどの血清成分の添加が現行のシステムでは必要である。一方、ワクチンの安全性の確保および品質管理に関しても多くの課題が指摘され早急な対応が求められている。本研究ではワクチン製造過程における動物由来成分の排除の目的でニワトリ胎児胚細胞の単離に非動物由来酵素の有用性について検討した。

B. 研究方法

10 日齢の鶏有精卵より胚を取り出し、PBS(-) で洗浄した後、ニワトリ胎児胚細胞を単離した。Dispace

(1 IU/ml in PBS, Invitrogen) 溶液で消化した細胞を PBS(-) で洗浄した後、無血清培地 (Opi Pro SFM, Invitrogen) に再懸濁させた。単層形成後の初代ニワトリ胎児胚細胞に市販の弱毒生麻しんワクチンを MOI 0.1 に調整後、接種した。室温で 1 時間吸着の後、洗浄し Eagle's MEM を加え培養した。培養後の 2, 5, 8 日目の培養上清を採取し、Vero 細胞で力価を測定した。ワクチン株の元となる Edmonston 株は野生株と同様に CD46 のみならず CD150(SLAM) を発現するため、Vero/hSLAM でも力価を測定した。

(倫理面への配慮)

実験室内診断に関する手技が主体であり、倫理面での配慮は必要としなかった。

C. 研究結果

弱毒生麻疹ワクチンの力価の判定においては Vero/SLAM 細胞の有用性が確認された。Vero/SLAM

細胞は中和抗体測定への応用も可能であった。
Dispase 処理後の無血清培地添加の条件下では通常のウシ胎児血清添加の条件下よりも著しい付着細胞数の減少を認めた。Dispase 処理後の無血清培地添加の条件下では8日目で 1.0 log の力価の低下が認められた。

D. 考察

ブタ臍由来の Trypsin を使用せずにニワトリ胎児胚細胞を Dispase で処理する単離は可能であった。しかし、血清培地添加の条件ではウイルス収量の低下が推定された。現行のワクチンの元株である Edmonston 株は CD46 のみならず CD150 もレセプターとする。このため Vero/hSLAM 細胞はワクチン株の力価験などへの応用が可能である。ウシ血清などを使用せずに十分なウイルス量を収集するためには新たなワクチン株の導入に関しても検討が必要なものと判断された。

E. 結論

本研究の成果により、麻疹ワクチン株におけるウイルス増殖機構の解明、ワクチンの安全性の確保などに寄与することが可能であった。

F. 健康危険情報

特に関連性は認められない。

G. 研究発表

1. 論文発表

沼崎 啓. 感染制御と教育、市民(親や子ども)の教育/啓蒙・コミュニケーション—麻疹根絶に向けての取り組みを中心に— . 小児科臨床 2005, 58: 2575-2583.

2. 学会発表

1) 沼崎 啓. わが国の麻疹対策の現状と展望—WHO

世界特別麻疹検査室および地域レファランス検査室の役割を中心に. 平成 17 年ウイルス検査技術連絡会講演, 2005 9. 16, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

現在までのところ特記すべきこと無し

平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書

動物由来物質を除いた風しんワクチン製造法の開発に関する研究

分担研究者 海野幸子 国立感染症研究所ウイルス第三部 室長
協力研究者 大槻紀之 国立感染症研究所ウイルス第三部 研究員

研究要旨 無血清培地 DM201 に馴化させた Vero 細胞に風しんワクチンを接種し、得られたウイルスを同じ条件下で 5 代継代した。1 代から 5 代まで 10^7 PFU/ml 以上の高いウイルス収量が維持された。5 代継代を繰り返したウイルスの 3 つの構成蛋白をコードする遺伝子の塩基配列は元のワクチンウイルスと同じだった。又、このウイルスの RK13 細胞での増殖性は元のワクチンウイルスと同様に 39℃で著しく抑制され、ワクチンのマーカーである増殖性における温度感受性も保持していた。無血清培地 DM201 に馴化させた Vero を用いた無血清培養によるワクチン製造の可能性が示された。

A. 研究目的

風しんワクチンの製造には、牛血清を用いたウサギ腎初代細胞あるいはウズラ胚初代細胞培養が用いられている。牛血清には BSE をはじめ Bovine viral diarrhoea virus や Bovine respiratory syncytial virus 等の牛由来ウイルスの混入が指摘されている。初代培養細胞への外来性感染性因子の混入は、調製する度毎の動物の品質に依存し、その外来性感染性因子の制御には動物コロニー

の注意深い管理を必要とする。混入した感染性因子は生ウイルスワクチンであるために不活化することができない。細胞や血清などの生物由来物質からの外来性感染性因子の混入を避けるためには生物由来物質を使用しないか代替品を用いる以外に方法がない。そこで、感染性因子の混入を制御しやすいために WHO がワクチン製造への使用を勧めている Vero 細胞を無血清の完全合成培地である DM-201 に馴化させ、風しんワ

クチンウイルスの増殖性を調べ、ワクチン製造への応用性を検討することを本研究の目的とする。

B. 研究方法

これまでの研究において DM-201 培地に馴化した Vero 細胞を用いた無血清培養系で風しんワクチン (To-336) 株はよく増殖し、5 代継代してもウイルスの感染防御抗原である E1 蛋白をコードする遺伝子に変異は認められないことが明らかになった。更に、構造蛋白である E2 及び C 蛋白をコードする遺伝子 (846bp と 900bp) をそれぞれ 2 領域に分けて RT-PCR を行い、PCR 産物のダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。また、5 代継代されたウイルスについてワクチンウイルスのマーカである温度感受性を元のワクチン及び血清添加培地で継代した Vero 細胞で 5 代継代したウイルスと比較した。m.o.i. 0.01~0.03 で RK13 細胞に感染させた後、両者についてそれぞれ 35, 37, 39℃における培養 3 日目と 4 日目の培養上清中の感染性ウイルス量をプラーク法で測定した。

C. 研究結果

1. M-201 に馴化した Vero 細胞と 5%牛胎児血清 (FBS) を添加したダルベッコ変法イーグル MEM(DME)に

馴化した Vero 細胞に風しんワクチン株を感染させたのち、DM-201 を加えて 35℃で培養し、同じ培養系で継代を 5 回繰り返した。ウイルスの増殖は無血清の方が $10^{7.3}$ PFU/ml とやや高く、継代による上昇傾向があった。一方 DME+5%FBS 培地系では継代数の増加に伴って僅かに増殖が低下した ($10^{6.5}$ PFU/ml) (図 1)。

2. 予めの実験で To-336 株の RK13 細胞での増殖性は $35 > 37 > 39$ ℃の順に高いことが分かっていたため、この 3 温度における増殖性について DM-201 で馴化した細胞で 1, 3, 5 代継代した各ウイルス (図 2-2) と元のワクチン株 (図 2-1) とを比較した。継代数の如何に拘わらず 39℃の増殖は 37 及び 35℃よりも約 $3\log_{10}$ 低下し、35℃の方が僅かに 37℃よりもウイルス量が高かった。無血清培養系で 5 回継代したウイルスの培養温度による増殖性の違いと各温度におけるウイルス収量は元のワクチンと同等で、DM-201 馴化細胞での継代はワクチン株の増殖における温度感受性に影響を与えなかった。培地の種類や血清の有無に拘わらず Vero 細胞に継代したウイルスの 37℃での 3 日目の増殖は元株よりも極僅か低い傾向があった。

3. 感染後 3 日目の 35℃と 37℃或いは 39℃との増殖比を求めて表 1 に

まとめた。元のワクチンに比べて DM-201 系も DME-5%FBS 系も 35/37 が僅かに高かった。4 日目になると 37°Cでの増殖量が僅かに上昇して 35/37 比は大きくなり、元のワクチン株と差がなくなった。

4. DM-201 系で 5 代継代したウイルスの E2 遺伝子 846 塩基および C 遺伝子 900 塩基の配列は元のワクチンのそれらと全く同じであった。

D. 考察

無血清培地 DM-201 に馴化した Vero 細胞に風しんワクチン株を接種し、無血清培養下で 5 回まで継代を繰り返しても、ウイルスの構造蛋白質をコードする遺伝子は全く変異せず、また、そのウイルスには、ワクチンのマーカーである増殖における温度感受性が保持されていた。これらの結果から DM-201 無血清培地に馴化した Vero 細胞で継代した風しんワクチン株の免疫原性はウサギ腎初代細胞で製造する元のワクチン株のそれと変わらないと考えられた。

米国での不活化ポリオワクチンの製造など Vero 細胞を用いたワクチン製造が認可されている。一方、Vero 細胞が樹立細胞であることから残存する細胞由来 DNA の腫瘍原性について考慮する必要があるが、例えば Vero 細胞で製造されるポリオワクチ

ンで許容可能なレベルはドーズ当たり 10 picograms とする意見があるものの、現在のところ危険とする DNA 量のレベルは世界的にまだ不確定である。

E. 結論

DM-201 無血清培地に馴化した Vero 細胞では風しんワクチン株がよく増殖し、少なくとも 5 代の継代の範囲ではその遺伝的性質や生物学的性状が変化しないことが確認され、牛血清を用いないワクチン製造への応用の可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(ア) 論文発表 なし

(イ) 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当する事項なし

図 1

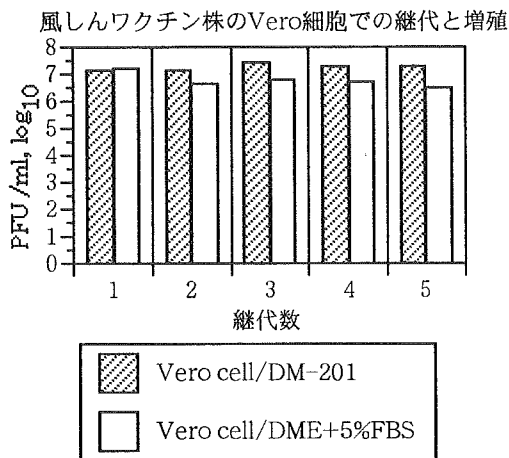


図 2-1

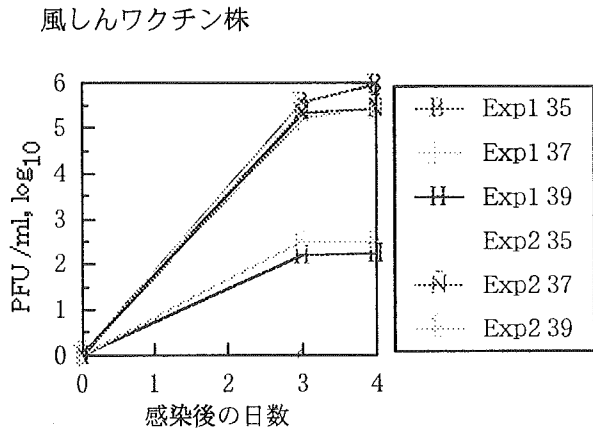


図 2-2

DM-201 馴化 Vero 細胞による
継代風しんワクチン株

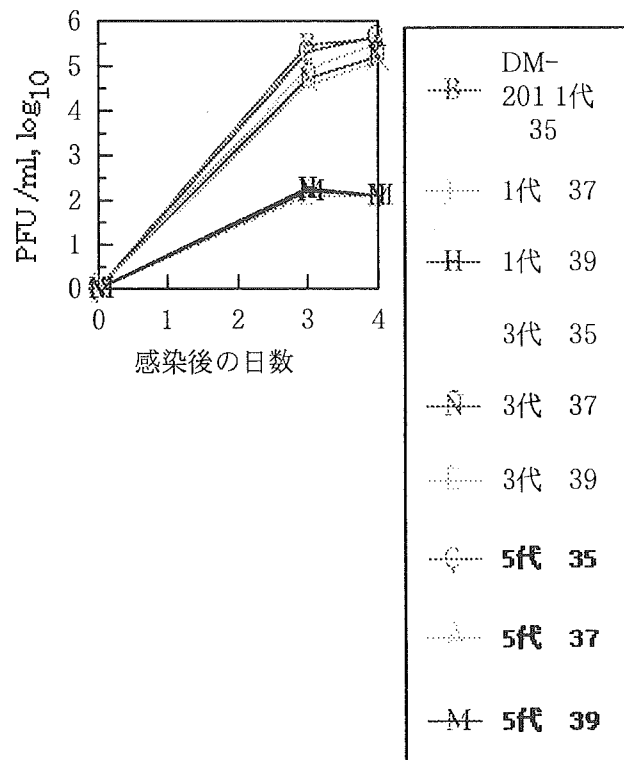


表 1

ウイルスの 由来	継代 数	培養温度における 増殖比 (log ₁₀)	
		35/37	35/39
DM-201 馴 化 Vero 細胞	1	0.5	3.2
	3	0.7	3.3
	5	0.7	3.1
5%FBS 添加 DME 継代 Vero 細胞	1	0.7	3.5
	3	0.7	3.5
	5	0.5	3.7
オリジナルワクチ ン		0.3	3.3
		0.2	3.0

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 大槻紀之 国立感染症研究所 ウイルス第3部
協力研究者 伊藤 治 農林水産省動物医薬品検査所
協力研究者 海野幸子 国立感染症研究所 ウイルス第3部

研究要旨 これまでの研究により、細胞培養用牛血清の多くにはウシポリオーマウイルス (BPyV) の遺伝子断片が混入していること、また一部のヒト用生ワクチンから本ウイルス遺伝子断片が検出されることが明らかとされている。本年度の研究では、完全長 BPyV 遺伝子の決定及び γ 線照射による BPyV 遺伝子の切断に関する影響を調査した。この結果 3 ロットの血清から得られた BPyV 遺伝子断片より完全長 BPyV 遺伝子を決定がなされた。また γ 線照射により BPyV 遺伝子が切断されることが示唆された。

A. 研究目的

多くのウイルス性生ワクチンでは、その製造に際しウシ血清が使用されている。通常ワクチン製造に使用されるウシ血清では多くの牛由来ウイルスの混入が否定されており血清中へのウイルスの混入ひいては、ワクチン製剤へのウイルスの混入の可能性は低いと考えられる。しかしながら、未知のウイルスや確実な検出系が存在しないウイルスの混入の危険性は常に存在している。2002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 (2003年10月より発効中)、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 (BPyV) を検出・排除すべき対象としている。

これまでの研究により、我が国において流通している細胞培養用ウシ血清の半数以上のもの

に BPyV 遺伝子が混入していること及び一部のヒト用生ワクチンから BPyV 遺伝子が検出される事が明らかとなっている。

このような状況にあるものの、BPyV はヒト及びウシに対し病原性がないと考えられているため十分な研究がなされておらず、ウイルスの遺伝子配列の情報も乏しい状況である。また、これまでの国内外での公表されている研究において BPyV の検出には PCR 法を利用した方法がほとんどである。しかしながら BPyV 遺伝子配列に関する情報は数少ないため PCR 法を利用した検出系であっても BPyV 遺伝子配列に多様性があった場合にはその感度に影響を与える可能性が存在する。そこで我々は市販のウシ血清から得られた BPyV 遺伝子断片を繋ぎ合わせ BPyV 完全長遺伝子配列の決定を試みた。また血清への γ 線照射が BPyV 遺伝子の断片化に有効か否かを調査した。

B. 研究方法

(BPyV 遺伝子配列の決定)

増幅領域をオーバーラップさせるように設計した BPyV 遺伝子検出プライマーセットを作製し、長鎖の BPyV 遺伝子断片が検出される細胞培養用ウシ血清 3 ロットから DNA を抽出し、これを鋳型とし各プライマーセットで PCR を行った後、PCR ダイレクトシーケンスにより各 PCR 産物の遺伝子配列を決定した後、得られた塩基配列を繋ぎ合わせるにより BPyV の全長の遺伝子配列を決定、推測した。

(γ 線照射による BPyV 遺伝子への影響の調査)

市販されている細胞培養用ウシ血清の内、同一ロットで γ 線照射されているものとされていないものを購入し、2 種の血清間において、約 300bp、1.5Kbp、3.1Kbp、3.8Kbp の BPyV 遺伝子断片を検出する PCR を実施し BPyV 遺伝子検出に差が生じるか否かを調査した。

C. 研究結果

(BPyV 遺伝子配列の決定)

3 ロットの血清から得られた 4679bp の BPyV 完全長遺伝子配列を既存の遺伝子データと比較したところ、血清から得られた遺伝子配列とデータベース上に登録されている遺伝子配列との間にはそれぞれ約 0.5%~1%の差が認められた。また 3 つの配列の間にも差が認められた。なお本遺伝子配列を決定する際に数塩基その遺伝子配列が特定できない部分が生じた。これが、実験の際の誤差で生じているのか、あるいは血清中に異なった塩基配列を有する BPyV 遺伝子が存在している事によるものなのかは判断が付かなかった。

(γ 線照射による BPyV 遺伝子への影響の調査)

3 ロット (いずれもウシ胎児血清) の血清を試験に使用したものの、内 2 ロットの血清では γ 線

照射の有無及び検出する遺伝子の長さに関わらず BPyV 遺伝子が検出されなかった。このためこれらの血清では、BPyV 遺伝子への γ 線照射による遺伝子断片化への影響を調査することはできなかった。

しかしながら 1 ロットの血清では γ 線未照射のもので 300bp、1.5Kbp、3.1Kbp の長さの BPyV 遺伝子断片が検出される一方、 γ 線照射が行われた血清ではいずれの長さの遺伝子断片も検出されなかった。

D. 考察

BPyV はヒトやウシに病原性がほとんどないこと等からこれまでほとんど研究されていない現状であり、その遺伝子配列等に関する情報は必ずしも十分ではない。これまで、ウシ血清中やヒト及び動物用生ワクチンへの BPyV 遺伝子の混入に関する報告が数例あるが、いずれの報告も PCR 法を利用したものがほとんどである。PCR 法を利用した検出はその感度や簡便性において優れていると考えられるが、対象となる遺伝子配列が多様性を持つ場合検出感度に影響する。そこで、BPyV 遺伝子の多様性を確認するためウシ血清から得られた BPyV 遺伝子断片から、完全長の BPyV 遺伝子配列の決定を行った。その結果、一定の多様性が認められたが、今回得られたいずれの配列も既存の遺伝子情報と比較して約 99%の遺伝子の相同性が確認された。このことから BPyV 遺伝子は一定の多様性は持つものの、ウイルス株間の差は少ないことが示唆された。得られた遺伝子配列情報を今後 PCR 系の改良等に利用できると考えられる。

市販されている細胞培養用ウシ血清において、血清中のウイルス等感染性物質の排除のために γ 線照射を行っているものも多く存在する。本研究では市販されている同一ロットの血清で γ