

線照射のものと γ 線未照射のもので検出できる BPyV 遺伝子の長さを比較した。この結果、 γ 線未照射の血清では 3.1Kbp のウイルス遺伝子が検出されたものの照射血清では 300bp の遺伝子すら検出されなかった。このことは BPyV 遺伝子が γ 線の照射により切断されていることを示唆する結果と考えられる。更なる検証は必要であると考え、血清に対する γ 線照射は BPyV の排除に対して一定の効果があると考えられる結果となった。

E. 結論

1. 培養用ウシ血清から得られた BPyV 遺伝子断片より、3 種の完全長 BPyV 遺伝子配列を特定した。またこれらの配列は一定の多様性を持つものの株間の差は少ないことが示された。
2. 血清に対する γ 線の照射は BPyV 遺伝子の切断に一定の効果があることが示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

N. Otsuki, O. Itoh, Y.Umino, M. Tashiro: Detection of bovine polyomavirus DNA in bovine serum used for cell culture and live viral vaccines available in Japan. Viral & TSE Safety Conference. Washington,D.C.,USA May 16-18, 2005

大槻紀之：細胞培養用ウシ血清中のウシポリオマウイルス 第 5 回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム、東京、2005 年 12 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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
—無血清培地適応 Vero 細胞の樹立—

分担研究者 高崎智彦 (国立感染症研究所ウイルス第一部)

協力研究者 原田文植 (国立感染症研究所ウイルス第一部)

研究要旨 マウス脳由来の不活化精製ワクチンは、日本をはじめ広くアジアで使用されてきた。しかし、以前より 1) マウス脳由来の物質の混入の可能性、2) 急性散在性脳脊髄炎との因果関係が完全に否定できないこと、3) 精製に時間と費用がかかり過ぎること、4) マウス確保が将来的に不安定になる可能性、5) マウス焼却に伴う環境破壊および動物愛護の観点などから Vero 細胞を用いた組織培養不活化ワクチンの製造が急がれていた。しかしこの場合、細胞培養に使用する牛胎児血清を通じて、牛由来成分が混入する可能性がある。我々は市販されている無血清培地を用いて、Vero 細胞を維持培養できるように順化し、その細胞を用いて日本脳炎ウイルスの増殖力を検討した。その結果、無血清培地に順化した Vero 細胞により、日本脳炎ウイルスを増殖させた場合は、上清回収日をやや遅らせる必要があるが明らかとなった。

A. 研究目的

マウス脳由来の不活化精製ワクチンは、日本をはじめ広くアジアで使用されてきた。しかし、以前より 1) マウス脳由来の物質の混入の可能性、2) 急性散在性脳脊髄炎との因果関係が完全に否定できないこと、3) 精製に時間と費用がかかり過ぎること、4) マウス確保が将来的に不安定になる可能性、5) マウス焼却に伴う環境破壊および動物愛護の観点などから Vero 細胞を用いた組織培養不活化ワクチンの製造が急がれていた。この場合、牛由来成分が混入する可能性がある。そこで、一昨年、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検討した。前回は、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）に及ぼす影響について ELISA 法を用いて検討した。今回、維持段階におけるさらなるフォローアップ及び、他の手法を用いて無血清培地がウイルス増殖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)
ワクチン株増殖能の検討

Vero 細胞 (9013 株) に対し、上記無血清培地を用いて継代 (10 継代) し、Vero 細胞の増殖、形態変化等を観察した。10 継代目の Vero 細胞に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 VP-SFM 培地により培養した。ウイルス接種後 3・5・7 日目の細胞の形態観察を行った。

2. ウイルス接種後 3・5・7 日目に、その上清を回収し、RT-PCR と、LightCycler を用いたリアルタイム PCR (TaqMan PCR) によってウイルス RNA の定量を行った。

1. RT-PCR

プライマー

JEER (forward)および JE8Ks (reverse)を使用した。

2. 日本脳炎ウイルスの TaqMan RT-PCR プライマーとプローブ

JEen562s-585pset (forward) :

5'CYGGAYTGYGARCCAAGGA3'

JEen585p5625623 (probe)

JEen623s-585pset (reverse) :

5'GAHCCCACGGTCATGA3'

TaqMan 解析用 Amplification Curve にて増幅産物の出現を確認し、比較検討した。

C. 研究結果

1. 無血清培地を用いた日本脳炎ウイルス

(1) 無血清培地による Vero 細胞の継代維持

3 継代目から培養液の色の変化が著しくなった (培養液が黄褐色に変色しやすくなった)。9 継代目ころから細胞増殖能に関しては、血清培地に比して遅れる傾向があった。

5 継代目辺りから大きな細胞が出現するようになり、(図 1)。血清を用いた培地で発育させた細胞 (図 2) と顕著な形態変化を認めるようになった。

9 継代目以降発育速度の低下を認めた。

(2) ウイルス接種後の細胞変性効果 (CPE) の出現時期 (図 3)

3 日目から CPE を認めるようになった。

2. RT-PCR によるバンドの確認 (図 4)

血清培地では 5 日目の上清で既に陽性コントロールと変わらないほどの濃いバンドを認めたが、無血清培地では 7 日目のもので血清培地 3 日目同等もしくはかやや薄いバンドを認めた。

3. TaqMan RT-PCR によるウイルス増殖能の定量的評価 (図 5)

血清培地の 7 日目、5 日目、3 日目、無血清培地の 7 日目、5 日目、3 日目の順に、それぞれ 10cycle、15cycle、16cycle、17cycle、20cycle、22cycle、25cycle で増幅産物が確認された。

D. 考察

昨年 5 月に、日本脳炎ワクチン接種後急性散在性能脳脊髄炎 (ADEM) の増悪例を認めたころにより、厚生労働省による積極接種推進がなくなったこともあり、早期にマウス脳由来のワクチンからより安全性の高い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。しかし、一方で BSE 問題が今後も続き汚染国が拡大するようなら、牛胎児血清を用いるのが好ましくない状況になる可能性もあり、無血清培地の使用も考慮されなければならない。

我々は無血清培地で 10 代以上継代し、無血清培地に適応した Vero 細胞を作製した。その細胞の形態的特徴を観察し、その後ウイルスを接種し、ウイルス抗原産生量をリアルタイム PCR を用いて検討した。5 継代目から顕著な形態変化を認めるよう

になった。しかし発育能力は血清培地を用いたものと比較して遜色なかった。9継代目より細胞増殖能が明らかに血清培地を使用したものと比較して低下した。

血清培地および無血清培地にて発育させた VERO 細胞にウイルスを接種し、各々の3日目、5日目、7日目における細胞変性効果 (CPE) 出現の有無を観察した。無血清培地に接種したにも3日目には CPE の出現を認めた。

RT-PCR を行ったところ血清培地では3日目のものでもバンドを認めたが、無血清培地の7日目で同程度の濃さのバンドが認められた。

またリアルタイム PCR (TaqMan 法) Amplification Curve を用いた解析から、血清培地7日目、5日目、3日目、無血清培地7日目、5日目、3日目の順に増幅産物が確認された。しかし、血清培地3日目と無血清培地7日目で産生量にはあまり差がなく、無血清培地を用いても、ウイルスの回収次期を長くすることで、十分なウイルス増殖を期待できると考えた。

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、市販の無血清培地 (VP-SFM) で Vero 細胞を5継代したが、明らかな細胞増殖能の低下は認めなかった。但し、10継代目を超えると細胞を維持するのが困難となる印象があった。今回の研究では、無血清培地にて10継代目の順化細胞を用いても、接種後7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が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文

なし

2. 学会発表

高崎智彦、倉根一郎. 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. 第9回日本ワクチン学会 (大阪) 2005年10月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1

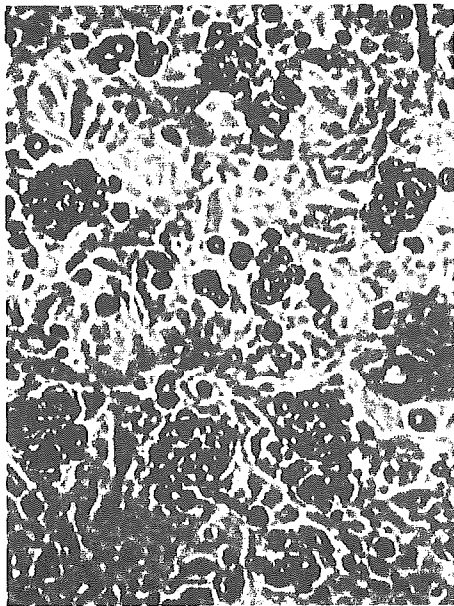


図3

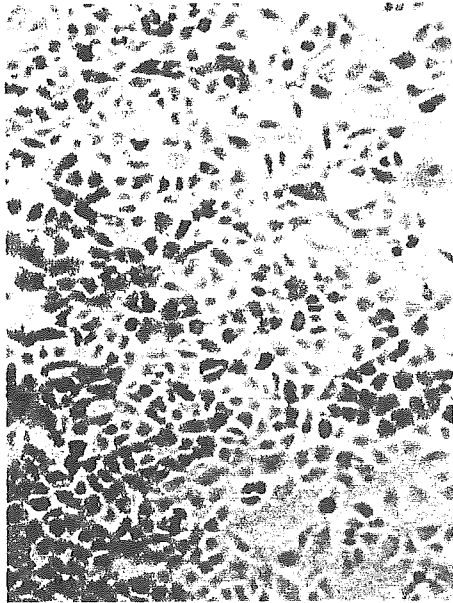


図2

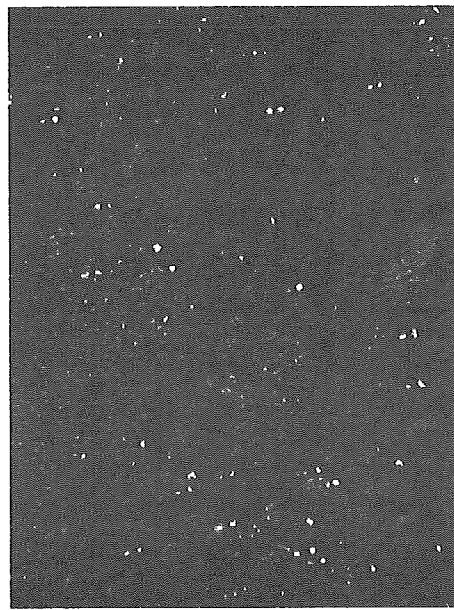
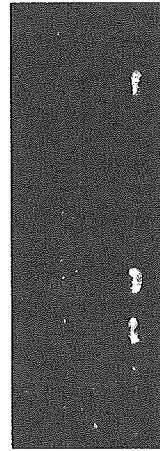


図4



1 2 3 4 5 6 7 8

Lane 1: マーカ-

Lane 2: 血清培地3日目

Lane 3: 血清培地5日目

Lane 4: 血清培地7日目

Lane 5: 無血清培地3日目

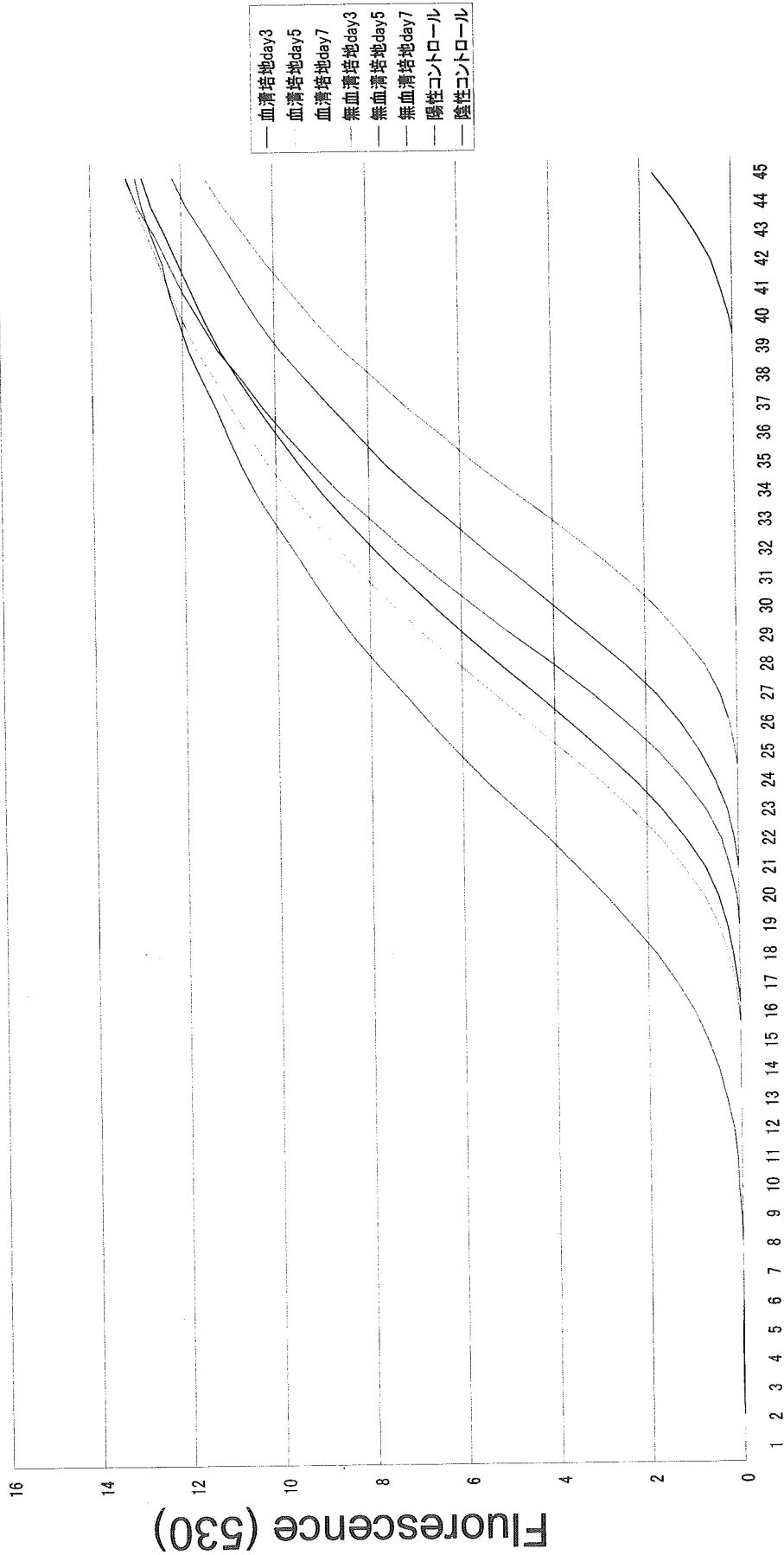
Lane 6: 無血清培地5日目

Lane 7: 無血清培地7日目

Lane 8: 陽性コントロール

Lane 9: 陰性コントロール

5



Cycle

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

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。しかしながら、高力価の細胞フリーウイルスが得にくいため感染細胞を超音波処理することによりウイルス粒子を調製するため、他のワクチンに比べより多くの培地中の夾雑物を濃縮した製品が製造される可能性を有している。そこで、ウイルス増殖が可能なヒト2倍体細胞を無血清、低血清、ないしは牛血清代替品を含む培地で培養し、細胞及びウイルスの増殖が可能か検討した。その結果、無血清にはできないが1%まで血清濃度を下げても細胞の継代は可能であった。1%血清条件で継代した細胞にワクチンを感染し、0.2%血清存在下で培養してもウイルスのプラーク形成が可能であった。牛血清代替品として市販されているものはこの用途には適さなかった。また、弱毒化のメカニズムが明確にされていないため、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。ワクチン株と親株で塩基置換ないしは2種の塩基配列に混在がある部位が42箇所報告されている。そこで、そのうちの9箇所について、LightCyclerによるTm値解析法を用いて、ワクチン株と親株間の塩基配列の違いを遺伝子レベルで定量的かつ迅速に同定できるようにした。新たな培養法などの評価時に利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。

水痘ワクチン株を含め水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）は、ヒト2倍体細胞など限られた細胞でしか増殖しないこと、増殖が遅く高力価とならないこと、また、細胞フリーウイルスとして培養液中にほとんど放出されない。そのため、感染細胞を集め超音波処理しその遠心上清中のウイルス粒子をウイルス液として用いることとなる。従って、他のワクチンに比べてより多くの培地中の夾雑物を濃縮した製品がワクチン液として製造される可能性を有している。そこで、本研究では、牛由来成分を含まないないしは低減した新たな培養条

件などを検討することを第1の目的とした。

水痘ワクチンは、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、新たな培養条件下で製造したワクチンの有効性と安全性を遺伝子レベルで評価できる方法の確立が必要と考えられる。水痘帯状疱疹ウイルスのゲノムは約15万塩基対より成り、ワクチン株（V-Oka）とその親株（P-Oka）の全塩基配列の比較から、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“が存在することが報告されている。我々はこれまでに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、ワクチン株に特徴的なORF62配列内の塩基置換3部位について定量的かつ迅速に塩基置換を検討できる方法確立した。本研究では、同定可能な塩基置換部位を増やすとともに、”混じり“を伴う部位も対象にしてワクチン株の安定性について検討することを第2の目的とした。

B. 研究方法

1) 細胞培養、VZVの増殖

ヒト2倍体細胞HLF((human lung fibro blast : CDC組織培養施設より分与)は、10%牛胎児血清 (FBS) 添加Dulbecco's MEM (DMEM) 培地にて培養した。テロメラゼ遺伝子により不死化されたヒト繊維芽細胞hTERT-BJ1 (Invitrogen) は、10%牛胎児血清 (FBS) 添加Dulbecco's MEM : 199(4:1)培地にて培養した。VZVの培養にはHLF細胞を用いた。

無血清用培地H4281(Sigma)、VP-SFM、OptiPro-SFM(Gibco)、FBM(Cambrex社)、牛血清代替品PANEXIN(Biotech GmbH)を検討した。

2) 免疫染色

感染細胞をPBSにて洗浄後3.7%フォルマリンにて5分間処理し、PBSにて3回洗浄後0.5%TritonXを含むPBSで10分間処理した。PBSにて3回洗浄後、300倍希釈した抗VZV IE62モノクローナル抗体 (Chemicon) を1時間反応させ、PBS洗浄後さらにペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体と反応させ、DAB基質を用いて発色反応させた。

3) 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。

4) 非対称PCRとTm値解析

非対称PCR用のプライマーとmelting curve analysisに最終的な結果を得ることに用いたプローブは表1に示した。

2つのプライマーの量比を1:4とし少ない方のプライマー濃度を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_1秒で40_まで冷却後40_4秒保温することによりアニーリングさせ、0.4_1秒で95_まで加温する過程でTm値測定を行った。Tm値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_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。

C. 研究結果

1) 培養条件の検討

無血清、無血清培地に通常より低濃度となる0.2%、1%、もしくは5%FBSを添加した培地、無血清培地に牛血清代替品を添加した培地におけるHLF細胞の増殖性を検討した。継代に際してはFBS濃度を段階的に低下させる馴化も試みた。典型的な細胞像を図1にまとめた。無血清培地のいずれにおいても、細胞の形態変化が観察され、継代には耐えず死滅した。また、馴化過程を経ても無血清条件では増殖しなかった。OptiPro-SFM、H4281及びDMEM培地では1%FBSを添加しても細胞増殖は大きく改善しなかった。しかしながら、VP-SFMやFBM培地では形態が通常の培養条件と大差なく、多少遅くなるものの細胞増殖に支障はなかった。HLF細胞については牛血清代替品として市販されるPANEXINは、その機能を果たさなかった

次に、1%FBS添加のOptiPro-SFMやFBM培地でHLF細胞を培養し、ほぼコンフルエントな状態から0%、0.2%、もしくは1%FBS添加培地で水痘ワクチン株を接種し、プラーク形成を検討した。その結果、プラーク数の減少はあるものの0.2%血清

添加条件下でも通常サイズのプラークが形成された(図2)。これらのプラークは、VZVの前初期蛋白IE62に対する抗体で免疫染色できることを確認した。

HLF細胞に加えて、テロメラーゼで不死化されたhTERT-BJ1株についても検討したが、不死化している利点はあるものの、VZVの増殖が悪く実用的に利用できないと判断した。

2) Tm値に基づくワクチン株と親株の判別

方法の原理は図3に示した。非対称PCR産物にプローブA及びBを加え、LightCycler用キャピラリー内で、ハイブリダイゼーションするとプローブ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色素に転移して測定可能な蛍光が生じる。徐々に温度を上昇させプローブが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。

プローブAを同一のものにして、プローブBの長さや領域を変えることにより、各塩基置換を判別できる条件を検索した。標的にしたV-Oka株とP-Oka株での塩基置換部位、最終的に用いたプローブ配列などは表1に要約した。2社(ここではC社及びD社と呼ぶ)のワクチン即ちV-Oka株及び親株P-Oka株より調製したゲノムDNAを用いたTm値解析の結果の一部を図4に示した。ORF54、ORF62A、ORF62Cの各部位では、2社のV-Oka株のTmが完全に一致し、P-Oka株の配列との混じりも見られない。ORF6部位ではC社のV-Oka株は、P-Oka株配列の混じりがない一方で、D社のものには一定量の混じりがあることがわかる。一方、ORF31、ORF59部位では、C社のみ混じりが見られる。ORF55及びORF62B部位はC社のものにわずかな混じりがみられた。ORF39部位では、2社ともに混じりが見られる。なお、論文報告されている塩基配列解析の結果から、ORF31、ORF39、ORF55部位の各部位で混じりがあるとされている。

D. 考察

通常の10分の1に相当する1%FBSを添加すれば検討した5種類の培地のうち2種類ではヒト2倍体細胞の増殖が可能であること、また、ウイルス感染を起こすことができることを明らかにした。しかしながら、今回の培養条件の検討は、6穴プレートという小スケールで行ったので、条件が絞れたのもう少し大きなスケールでの検討を行う必要がある。また、VZVの前初期蛋白IE62をプラーク中には検出したが、VZVは細胞フリー粒子を培地中にほとんど放出しないため、プラーク形成しても感染性粒子が産生されたのかは共培養などの方法を用いてさらに検討の必要がある。この際、我々が最近樹立したVZVレポーター細胞(投稿中)が有用と考えられる。

VZVの増殖に適している細胞をテロメラーゼ遺伝子などで不死化させ、長期培養により無血清培地条件に馴化できるかなど検討すべき課題がある。

今回ワクチン株での42塩基置換のうち、9箇所についてLightCyclerのTm値解析によりV-OkaとP-Okaを判別できる条件を明らかにした。比較した2社のワクチン間で、塩基置換の混在の程度が異なっていた部位があることは、製造認可以降にプラーク精製が行われることはないという前提に基づけば、培養・製造条件によっては混在する塩基置換の割合が変化しえる可能性を示唆するものである。今後、低血清培地などで増殖したワクチン株の塩基置換を検討し、各部位の安定性などについて明らかにしていきたい。また、塩基配置が混在する部位間に何らかの相関があるのかについて検討することにより、ワクチンに弱毒化されてきた過程を理解するうえで参考になると思われる。

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

図1 各種培養条件における細胞の増殖と形態

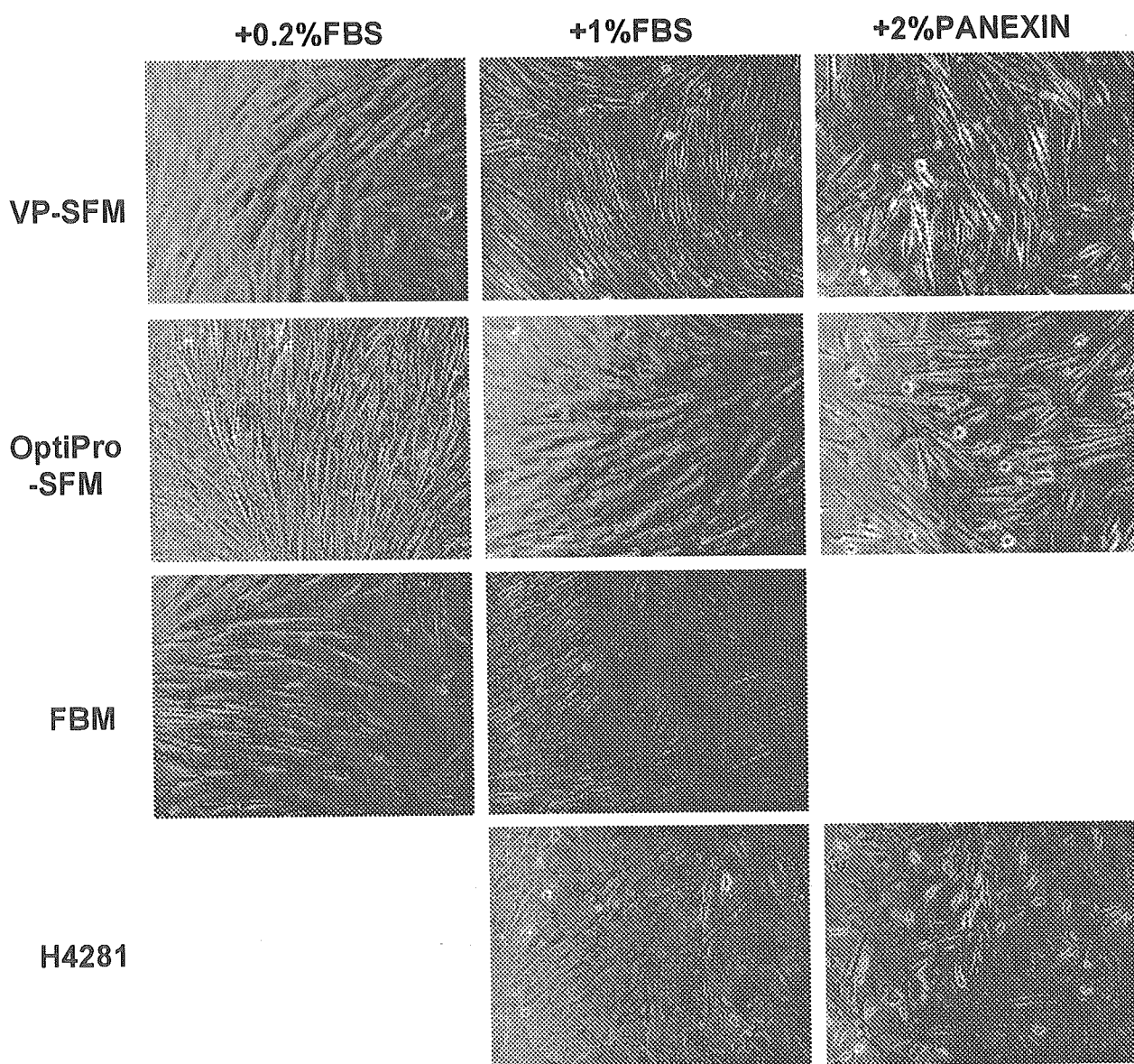


図2 低血清培養条件におけるウイルスの増殖

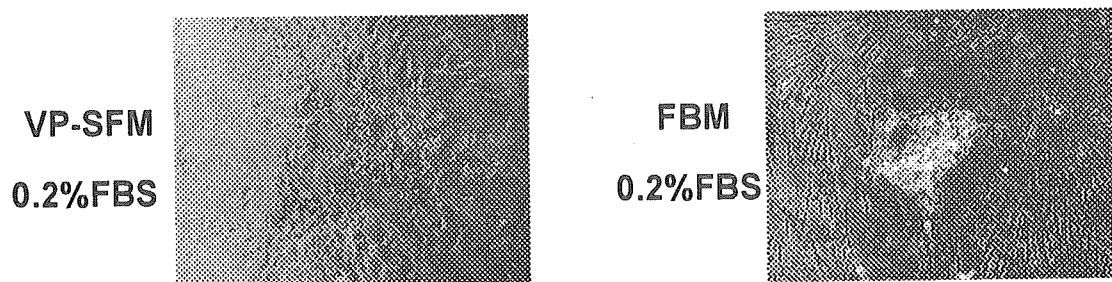
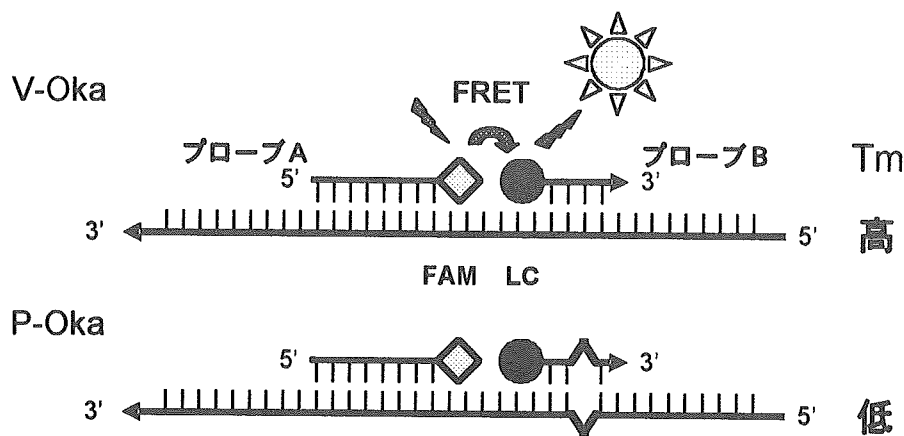


表 1 ワクチン特異的変異同定に用いたプライマーとプローブ

部位名	置換部位	プライマー1 プライマー2	上段：プローブ A (3'-FITC 修飾) 下段：プローブ B (5'-LC640 修飾、3'磷酸化)
ORF6	5745	5'-GTCGAATGTTCCAGTGCAA 5'-ATGCGTCCAGACAAGTTAC	5'-TGAACGTAAGGTTGCGCGTAATAAAC 5'-TATTTAGCC <u>CCCC</u> CGCAA
ORF31	58595	5'-TCTGTTCCAAGCTGGCCC 5'-GCTCGTATTCTCGGCGAC	5'-GTACTACCAGATACCCTCATAGAGTT 5'-AAGTATAAC <u>CG</u> CGTGTATCT
ORF39	71253	5'-TTACGGCGTATTATACTCTT 5'-ACTAAAACGAAATAGATGT	5'-GTGTCGTGGGGTCCAAGTCCAGCCG 5'-ACTGGTAA <u>C</u> GGCGGCA
ORF54	94168	5'-AGGACTCTGTTCTCGCCT 5'-CTTCACCGGGTAAACAAT	5'-CTGACCTATGTACCTCGCTTTGAGTTTGCC 5'-AAGAATCC <u>CA</u> ATCGGGTG
ORF55	97749	5'-TACATCCCGATAAGGTATCGT 5'-AGAAGTAGCTGCACCATG	5'-TGCCTTAACCCTGGAGTTATTGTCTG 5'-CAAACAAA <u>A</u> CCCCCTTAC
ORF59	101090	5'-CCAGTTGCGAAGAGACGG 5'-CGCGTATGCCAATGAAATG	5'-CTTGAAGGTTGGGGGGTCTAGCTTA 5'-CCAAAGGC <u>G</u> CCCCG
ORF62A	106383	5'-GGTTGCTGGTGTGGACGCG 5'-TTCCACCGCGGCACAAACA	5'-GTTGCTGGTGTGGACGCGGTGGCCCT 5'-AGGTGGCC <u>C</u> AGGGATGGA
ORF62B	107257	5'-CGGGCCCAAAAACACTTTATCCTAC 5'-CTCGACTGGCTGGGACTTGCCTTG	5'-ACACAGGCTCCCGACCCTCAGCCGT 5'-CCGCCG <u>C</u> AGCTCTCTTT
ORF62C	107373	5'-CGGGCCCAAAAACACTTTATCCTAC 5'-CTCGACTGGCTGGGACTTGCCTTG	5'-GGACTGGAGCCCGTTGCCTCGGGGT 5'-TGCCATGC <u>T</u> GGCAAAGGC

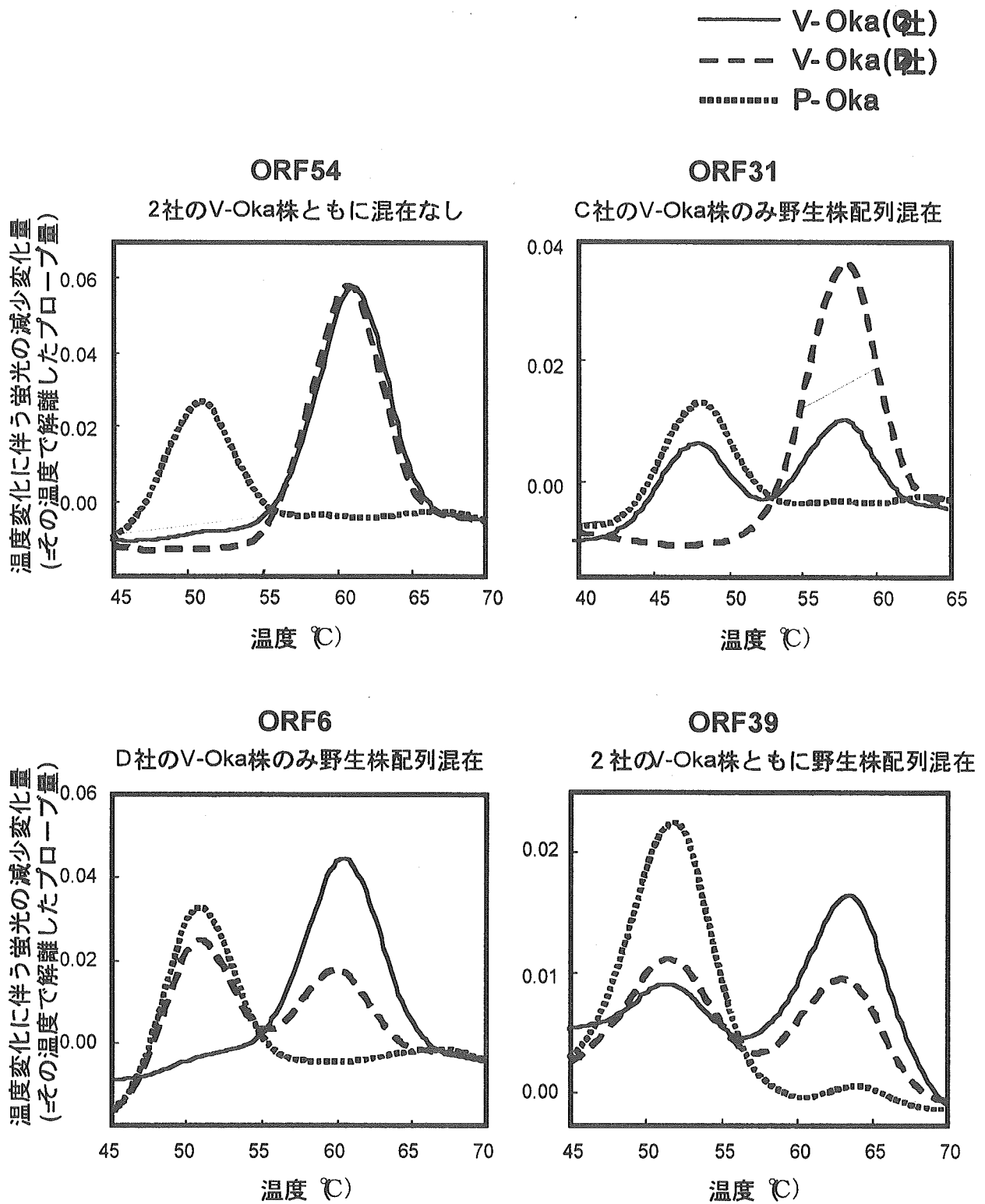
塩基置換部位はOka株の塩基配列番号に基づく。プライマーB内に設定したP-OkaとV-Oka間の塩基置換部位を下線で示した。変異部位ORF6からORF59に対するプローブBはV-Oka株の塩基配列、ORF62A, B, CはP-Oka株の塩基配列に基づく。

図 3 FRET法による変異の検出



プローブBにV-Oka株の配列を設定した場合を例に図示した。

図4 Tm値比較に基づくワクチン株と親株の判別



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

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

分担研究者 下池貴志 (国立感染症研究所)

協力研究者 戸塚敦子 (国立感染症研究所)

研究要旨 GL37 細胞で A 型肝炎ウイルスの増殖が既存の無血清培地で十分可能かどうかを検討した。Opti-Pro-SFM 培地は VP-SFM より優れたウイルス増殖性を示したが、現行の 2% FBS 添加 MEM 培地には及ばなかった。これらの無血清培地では少量のウイルスからの増殖時や感染初期において、ウイルスの増殖は血清無添加の MEM よりも悪い傾向を示した。細胞の増殖に伴う培地の pH 低下を抑制するため重曹を添加したが、無血清培地でのウイルス増殖には効果はなかった。無血清培地を MEM で希釈して使用した場合も、ウイルスの増殖は MEM を超えなかった。今後、無血清培地に加える添加物の検討、無血清培地で HAV の増殖の良い細胞の樹立、無血清培地馴化細胞でよく増殖する HAV の分離などが課題である。

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) 添加培地を使用されている。ワクチン製造の精製過程で不純物は除去されるが、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、無血清培地での GL37 細胞の培養と、ウイルス増殖能を検討した。いままでの当研究室および化血研での研究から GL37 細胞は無血清培地に増殖・馴化可能であるが、無血清培地では HAV 増殖が FBS 添加培地に比べ悪いことが判った。今年度は無血清培地での HAV 増殖性を比較検討し、増殖能を改善する方法を探った。

B. 研究方法

HAV は KRM003Gp72 株を用い、GL37 細胞は 20～25 継代を使用した。10%FBS 添加 MEM 培地または無血清培地 (VP-SFM、Opti-Pro-SFM (インビトロゲン社)) で細胞を培養し、5 日目に MEM で洗浄して HAV を接種した。接種後の維持培地は 2%FBS-MEM を標準とした。

1) 96 well culture 感染実験：ウイルス接種濃度を広く変えて、各種培地によるウイルス増殖能の違いを調べた。MEM で 10 倍階段希釈した HAV (細胞あたり MOI 10 から、0.001=ウェルあたり約 10 CCID₅₀まで) を 0.025 ml 接種した。対照として MEM を加えた。各種培地をウェルあたり 0.2 ml 添加した。同じ条件の実験を 2 ウィルずつ行った。9 日後に 80%メタノール固定して洗浄、乾燥した。抗 HAV ウサギ血清、HRPO 標識抗ウサギ IgG を順次反応後、基質 OPD による発色を

492nm で測定する EIA 法で HAV 抗原量を比較した。

2) イムノフォーカス法 : 6 ウェル細胞培養に 30 から 300 FFU の HAV をふくむ 0.1 ml の MEM を接種吸着後、アガロース添加各種培地を重層した。8~9 日後に培地を除き固定し、EIA 法で DAB 基質を用い Ni および Co 塩で増強して HAV 感染フォーカスを比較した。

3) 12 well culture 感染実験 : 細胞培養を MEM で洗浄後、HAV を MOI=0.1 で接種し各種培地を 2 ml 加えて培養した。7 日目にハーベストしたウェル以外は液換えした。7、10、14 日後に培養液と細胞を別々にハーベストし、ELISA 法によりそれぞれの HAV 抗原量を定量した。また感染時と 14 日目の細胞数を調べた。

C. 研究結果

1) 96 well culture 感染実験

HAV 増殖に対する MEM 中の FBS 濃度、2%FBS MEM の重曹濃度の影響をこの方法で確認したところ、FBS は 0.5%、1%、2%と濃度の増加により増殖増強作用を示した。5%、10% FBS は 2% とほぼ同等であった。重曹の濃度の影響はより顕著で、0.075%、0.11%、0.15%、0.22%と増殖増強を示し、0.22%、0.3%、0.35%は同等であった。

VP-SFM、Opti-Pro-SFM の無血清培地では特に 0.01、0.001 の低い MOI 感染での HAV 増殖が悪かった。50%、20%、10%と MEM で無血清培地を希釈するにつれて HAV 増殖が良くなったが、MEM 以上にはならなかった。また重曹を添加してみたが HAV 増殖増強は起きなかった。

2) イムノフォーカス法による感染フォーカスの大きさの培地による影響

無血清培地 50%では 2%FBS-MEM と比べごく小さなフォーカスを示した。無血清培地 10%で少し大きくなった。VP-SFM 培養細胞に接種した場

合は 2%FBS-MEM でもフォーカスは小さく、50%VP-SFM ではほとんど確認できなかった。

3) 12 well culture 感染実験 (表 1)

ウイルス接種前の細胞数は、10%FBS-MEM と VP-SFM で培養 cm^2 あたり 5.5×10^4 と 5.3×10^4 とほぼ同じだった。HAV 接種 7 日後では培地による抗原量の差異がとくに際立っていた。10%FBS-MEM 培養細胞に感染後 2%FBS-MEM で維持したサンプル(1)にくらべ、VP-SFM 増殖細胞、VP-SFM 維持サンプル(11)は(1)に比べ 7 日目に 7%の抗原量にすぎず、14 日目には(1)は 17 倍に増加しているものの、(11)は(1)に比べ 19%と増殖抗原量は少なかった。しかしながら(1)と(11)の細胞数はほぼ同じだった。また 10%FBS-MEM 増殖細胞、VP-SFM 維持サンプル(5)は 14 日目の細胞数は(1)の 1.4 倍なのに、抗原量は(1)の 46%であった。Opti-Pro-SFM のほうが VP-SFM より抗原産生に優れていたが、Opti-Pro-SFM 維持サンプル(15)の 14 日目の抗原量は(1)の 40%にすぎなかった。各無血清培地培養細胞とも、感染後 2%FBS-MEM で維持すれば(1)と同等のウイルス抗原を産生した。

D. 考察

VP-SFM 培地では FBS 無添加の MEM よりも HAV の増殖性が低かった。これはウイルス増殖に必要な成分が VP-SFM で不足していると言うよりむしろ、ウイルス増殖を阻害する成分が入っている可能性も考えられる。VP-SFM よりは Opti-Pro-SFM を使用したほうが HAV 増殖に良い結果となったが、FBS 添加 MEM と比較すると悪い。さらに今回は炭酸ガス培養器を使用しているが、製造レベルでは密栓状態での培養となるため、この差異はさらに大きくなる可能性がある。したがってこの無血清培地をそのまま HAV ワクチンの製造には使用できないだろう。今後

以下の解決策が考えられるが、3)と4)が現実的であろう。

- 1) 他の市販の無血清培地を調べる。
- 2) MEM、DME、199培地等に接着因子、growth factorなどを添加して合成培地を自作する。
- 3) Opti-Pro-SFM 馴化継代細胞からコロニー純化法で HAV 増殖の良い細胞を確立する。
- 4) 無血清培地馴化細胞に HAV を継代して増殖の優れたウイルスを得る。P1 領域アミノ酸（特に中和抗原構造関連アミノ酸部位）に変異のないことを確かめて種ウイルスとする。A 型肝炎ワクチンは不活化ワクチンなので抗原性に問題なければ他の変異は許容されよう。

E. 結論

GL37 細胞での HAV 増殖には、無血清培地 Opti-Pro-SFM が VP-SFM より適しているが、FBS 添加 MEM と比べると劣る。したがってワクチン製造のためには、無血清培地に馴化しながらも十分なウイルス感受性を維持した細胞とか、ウイルス株の選択などが必要となろう。

F. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

清原知子、戸塚敦子、下池貴志、米山徹夫、宮村達男、日本における A 型肝炎の血清疫学調査-2004 年度- 日本ウイルス学会第 53 回学術集会、2005 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

表1 A型肝炎ウイルスの増殖性

細胞増殖培地	接種後維持培地	接種後7日			接種後10日			接種後14日		
		細胞内 ng/cm ² (% to 1)	細胞内 ng/cm ² (% to 1)	細胞内 ng/cm ² (% to 1)	細胞内 ng/cm ² (% to 1)	細胞内 ng/cm ² (% to 1)	細胞内 ng/cm ² (% to 1)	細胞上清 ng/cm ²	細胞数 x10 ⁴ /cm ² (% to 1)	
(1) 10%FBS in MEM	2% FBS in MEM (0.15%Bica)	24.8 (100)	62.7 (100)	147.4 (100)	0.24	18.8 (100)				
(2) 10%FBS in MEM	MEM (0.15%Bica)	14.3 (58)	45.2 (72)	95.0 (64)	1.01	12.5 (66)				
(3) 10%FBS in MEM	2% FBS in MEM (0.22%Bica)	32.5 (131)	99.3 (158)	167.3 (114)	0.28	ND				
(4) 10%FBS in MEM	MEM (0.22%Bica)	13.6 (54)	49.6 (79)	98.6 (67)	0.48	ND				
(5) 10%FBS in MEM	VP-SFM	2.6 (11)	21.0 (34)	67.2 (46)	4.54	26.0 (138)				
(6) 10%FBS in MEM	10% VP-SFM in MEM (0.15%Bica)	8.2 (33)	41.8 (67)	96.3 (65)	0.68	15.0 (80)				
(7) 10%FBS in MEM	Opti SFM	4.5 (18)	39.8 (64)	113.0 (77)	3.43	ND				
(8) 10%FBS in MEM	10% Opti SFM in MEM (0.15%Bica)	10.0 (40)	50.6 (81)	116.2 (79)	1.86	ND				
(9) VP-SFM	2% FBS in MEM (0.15%Bica)	14.7 (59)	59.9 (96)	149.9 (102)	0.37	17.3 (92)				
(10) VP-SFM	MEM (0.15%Bica)	3.6 (15)	15.2 (24)	42.6 (29)	0.37	8.6 (46)				
(11) VP-SFM	VP-SFM	1.7 (7)	9.0 (14)	28.3 (19)	0.77	19.4 (103)				
(12) VP-SFM	10% VP-SFM in MEM (0.15%Bica)	3.2 (13)	22.5 (36)	46.5 (32)	0.31	9.6 ((51)				
(13) Opti SFM	2% FBS in MEM (0.15%Bica)	26.4 (106)	80.1 (128)	154.4 (105)	0.11	ND				
(14) Opti SFM	MEM (0.15%Bica)	5.3 (22)	16.8 (27)	50.5 (34)	0.35	ND				
(15) Opti SFM	Opti SFM	4.5 (18)	20.7 (33)	59.2 (40)	0.58	ND				
(16) Opti SFM	10% Opti SFM in MEM (0.15%Bica)	7.3 (29)	30.0 (48)	47.9 (33)	0.37	ND				

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
平成17年度分担研究報告書

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

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、渡邊俊一郎 同上

研究要旨 A型肝炎ワクチンの製造工程には動物成分由来のものが用いられており、ワクチンの安全性確保の観点から、動物由来の感染性因子迷入の可能性を排除することが必要である。そこで、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、組換え型トリプシン様酵素の使用と無血清培地による培養方法を検討し、その可能性を探った。結果として、組換え型トリプシン様酵素への変更については可能性が示唆されたが、無血清培地については更なる検討の必要性が確認された。

A. 研究目的

現行のA型肝炎ワクチンの製造は組織培養法を用いて行われているが、その工程にはトリプシンやFBSなどの動物由来の成分を使用している。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トリプシンの代替品として組換え型トリプシン様酵素（Trypsin Like Enzyme；TrypLE：GIBCO社）、牛胎児血清の代替品として無血清培地（EX-Cell Vero：JRH社）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）について検討を行った。

B. 研究方法

(1) 動物由来成分不含の組換え型トリプシン様酵素（TrypLE）の検討

動物由来成分不含の組換え型トリプシン様酵素（以下、TrypLE）を用いた際のGL37細胞に与える影響について以下の検討を行った。

- ・ 細胞剥離活性
- ・ 細胞増殖性
- ・ ウイルス増殖性

細胞剥離活性と細胞増殖性の確認での細胞培養は225cm²フラスコと850cm²ローラーボトルで行い、0.05%トリプシン-EDTA、100% TrypLE、25% TrypLE、10% TrypLEを使用し比較した。ウイルス増殖性には0.05%トリプシン-EDTAと25%TrypLEを使用して細胞を剥離した後、MOI=0.1でA型肝炎ウイルスを接種してELISA法により確認した。

(2) 無血清培地の検討

MEM+10%NBS(対照培地)で培養した GL37 細胞を用い、EX-Cell Vero の検討を行った。今回は MEM+10%NBS、EX-Cell Vero (馴化無)、EX-Cell Vero (馴化有) の 3 つについて検討し、馴化作業は対照培地と EX-Cell Vero 培地の混合比率を継代時に変えることで行った (【対照培地 100%+EX-Cell Vero 0%】→【対照培地 75%+EX-Cell Vero 25%】→【対照培地 50%+EX-Cell Vero 50%】→【対照培地 25%+EX-Cell Vero 75%】→【対照培地 0%+EX-Cell Vero 100%】)。

C. 研究結果

(1) 動物由来成分不含の組換え型トリプシン様酵素 (TrypLE) の検討

TrypLE の細胞剥離活性は細胞培養容器によって異なった。225cm² フラスコにおいては細胞剥離数は TrypLE の濃度に依存して少なくなり、850cm² ローラーボトルにおいては濃度に依存しなかったが、トリプシンの細胞剥離数よりも少なかった (図 1)。

細胞増殖性とウイルス増殖性については、従来使用のトリプシンに比べ、同程度以上の効果が得られた (図 2)。

(2) 無血清培地の検討

馴化無の EX-Cell Vero 培地において培養を行った結果、継代 2 の時点で細胞形状の異常、増殖率の低下が見られ、継代 3 では 100%シートを形成しなかった。馴化有の EX-Cell Vero 培地での培養結果は、細胞形状の若干の異常が見られたものの増殖率は対照細胞と同じかそれ以上であった (図表 1)。

D. 考察

GL37 細胞における TrypLE の効果を従来のトリプシンと比較したところ、細胞増殖性とウイルス増殖性に関してはトリプシンの効果を上回

る結果が得られており、トリプシンの変更品として要求される効果を満たしていた。しかし、細胞剥離活性においてはトリプシンよりも低く、十分な数の細胞を剥離することが出来なかったため、今後トリプシンと同程度の活性を得るための検討が必要である。

無血清培地の検討について、馴化無での細胞培養においては細胞形状の異常や細胞増殖率の低下が見られ、現時点で製造に適さない可能性が示唆された。馴化有の細胞培養においては細胞形状の異常が若干観察されたが、細胞の増殖率も対照培地と同程度以上であったことから、無血清培地への適応が期待される。しかしながら、製造における継代数には限りがあり、馴化作業を長期間できないことから、馴化無の細胞でも無血清培地に適応できるような添加剤等を今後検討する必要がある。

E. 結論

組換え型トリプシン様酵素 (TrypLE) については、細胞に対し細胞増殖性とウイルス増殖性に関しては悪影響を及ぼさなかった。EX-Cell Vero (馴化無) では現時点で製造に適さないことが確認された。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

特に無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

特に無し

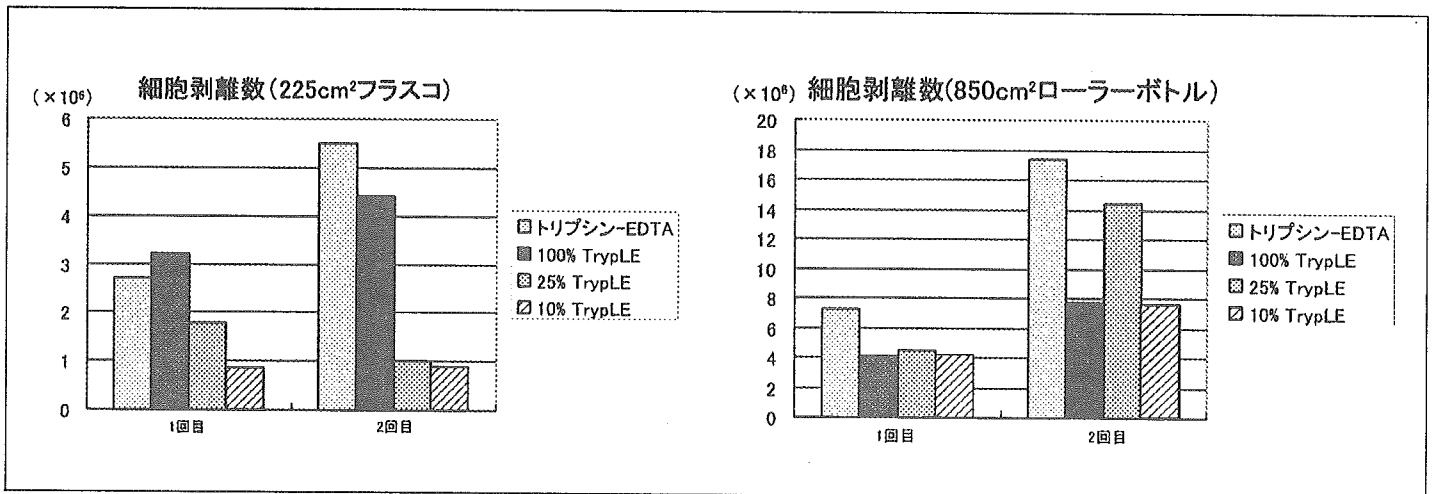


図1 TrypLEによる細胞剥離活性の検討

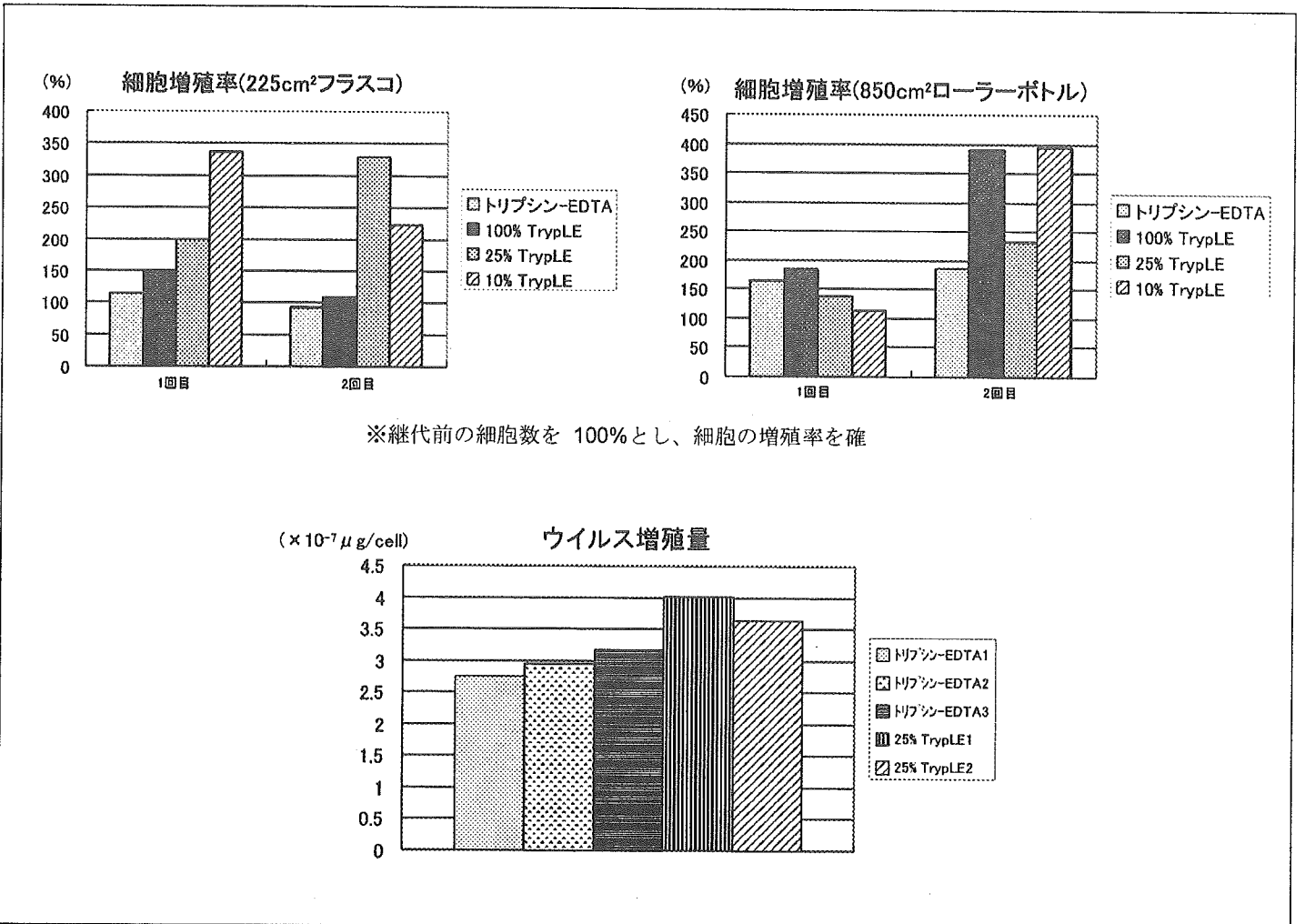
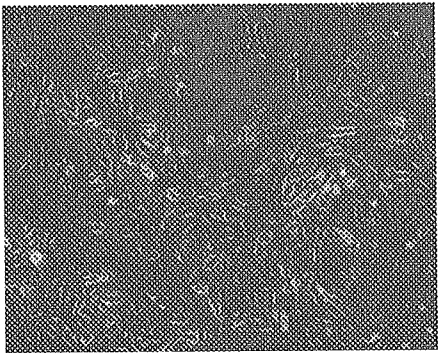
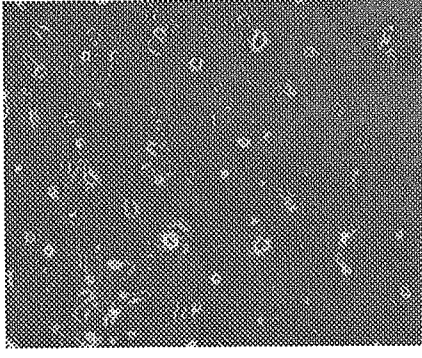
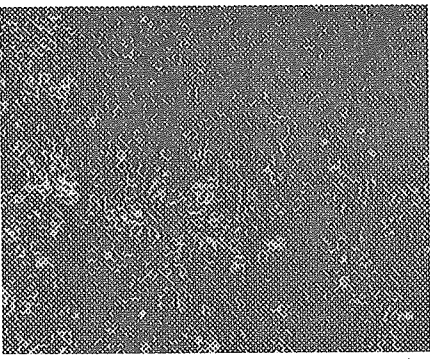
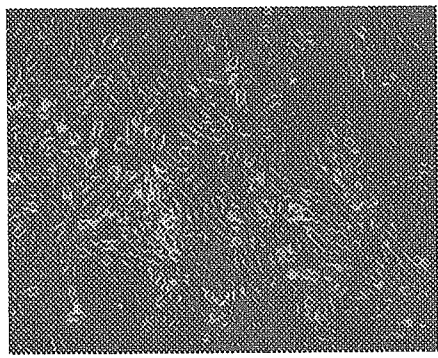
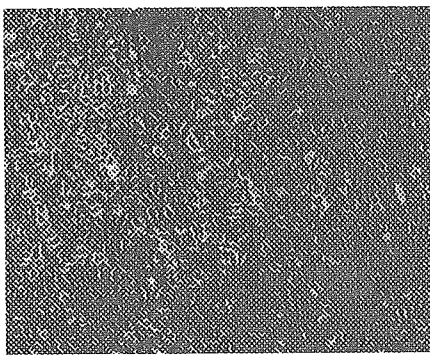
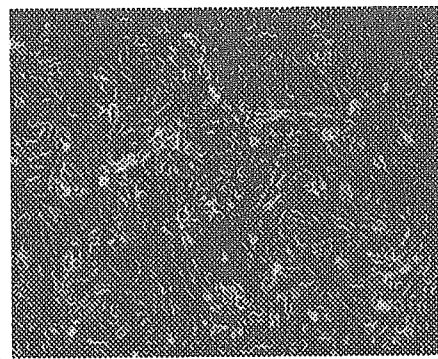
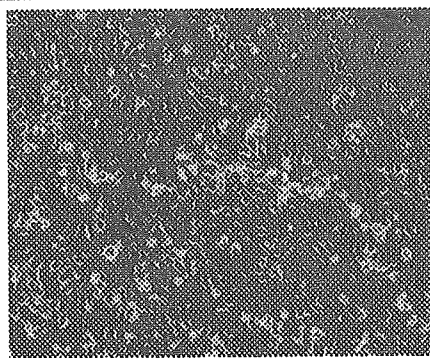


図2 TrypLEの細胞増殖とウイルス増殖に与える影響の検討

	MEM	EX-Cell Vero(馴化無)	EX-Cell Vero(馴化有)
継代 36 日目			 ※MEM 50% + EX-Cell Vero 50%
継代 47 日目			 ※MEM 25% + EX-Cell Vero 75%
継代 57 日目			 ※MEM 0% + EX-Cell Vero 100%

図表 1 無血清培地の検討