

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

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 仔牛血清を使用しない風しんワクチンの製造方法として無血清培地を用いることで培養可能であることを平成 15 年度に報告した。今回、この培養方法を用いて培養したウイルス(以下 SFM 培養ウイルス)の性状を確認するために、ウズラ胚初代培養細胞(以下 QEF 細胞)又はウサギ腎臓細胞(以下 RK-13 細胞)でのウイルスの増殖性及びプラークサイズの分布を仔牛血清で培養した風しんウイルス(以下 CS 培養ウイルス)と比較した。ウイルスの増殖性において、QEF 細胞を用いたところ SFM 培養ウイルスと CS 培養ウイルスとの増殖曲線に差が認められなかった。RK-13 細胞における各培養温度(32、37、39°C)でも SFM 培養ウイルスと CS 培養ウイルスの増殖曲線に差が認められなかった。また、RK-13 細胞で形成したプラークの直径を測定して統計学的に解析したが、SFM 培養ウイルスと CS 培養ウイルス間に有意な差は認められなかった。以上より、SFM 培養ウイルスは CS 培養ウイルスと同様な性状を持つことが示唆された。

A. 研究目的 挨拶

風しんワクチン製造において、個体別細胞培養工程及び個体別ウイルス培養工程で仔牛血清を含む培地を使用している。その仔牛血清は「生物由来原料基準」を遵守することで安全性を確保しているが、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。そこで仔牛血清を使用しない風しんワクチン製造方法として、細胞の処理に使用するトリプシン液の濃度を下げるにより無血清培地の使用が可能であること、ウイルス培養液の TCM-199 と無血清培地との混合が必要であることを平成 15 年度に報告した。本研究では無血清培地を用いて培養した風しんウイルスの性状を解析するために、QEF 細胞又は RK-13 細胞におけるウイルスの増殖性及びプラークサイズの分布について仔牛血清を用いて培養した風しんウイルスと比較・検討した。

B. 研究方法

1. ウイルスの増殖性

1.1 QEF 細胞におけるウイルスの増殖性の検討

10 日齢ウズラ胚をトリプシン処理して細胞を遠心後、上清除去を行い、細胞数が 2.5×10^6 cells/mL になるように仔牛血清を含む MEM で調製した。それを培養容器に播種し、37°C で 2 日培養した。その細胞に SFM 培養ウイルス及び CS 培養ウイルスを接種・吸着後、TCM-199 を添加し、14 日間培養した。各ウ

イルス液のサンプリングはウイルス培養開始 8～14 日目に実施し、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。

1.2 RK-13 細胞におけるウイルスの増殖性の検討

RK-13 細胞をトリプシン処理し、仔牛血清含有 MEM に浮遊させ、細胞数が 1.5×10^5 cells/mL になるように調製した。培養 2 日後に SFM 培養ウイルス及び CS 培養ウイルスを接種・吸着させ、仔牛血清含有 TCM-199 を添加し、32、37、39°C で培養した。各ウイルス液のサンプリングは培養開始 0、1、2、3、4、6 日で行い、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. プラークサイズの測定

RK-13 細胞を 6well プレートに播種し、37°C、5%CO₂ 下で 2 日間培養後に SFM 培養ウイルス及び CS 培養ウイルスをプラーク数が 20 個/well になるように希釈して接種した。ウイルスを吸着後、0.5%アガロース培地を重層し、32°C で 7 日間培養した。更にニュートラルレッドを含む 0.5%アガロース培地で重層後、形成したプラークの直径を測定し、統計学的に解析した。

C. 研究結果

1.1 QEF 細胞におけるウイルスの増殖性の検討

QEF 細胞における SFM 培養ウイルス及び CS 培養ウイルスの増殖性を調査した。表 1 及び図

1 に示すように、SFM 培養ウイルス及び CS 培養ウイルス共にウイルス培養開始 11~12 日目にウイルス含量が最大を示し、またその増殖曲線に差は認められなかった。

表 1 QEF 細胞におけるウイルスの増殖性

培養ウイルス	ウイルス含量(logPFU/mL)						
	8日	9日	10日	11日	12日	13日	14日
CS	4.95	5.44	5.55	5.88	5.86	5.64	5.52
SFM	4.87	5.35	5.57	5.88	5.91	5.68	5.61

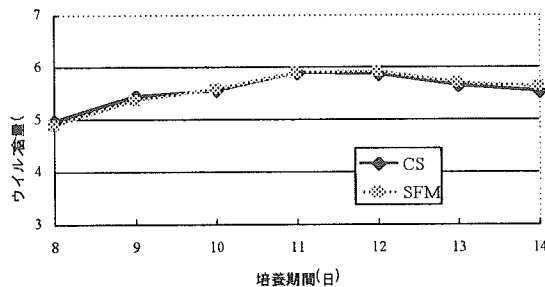


図 1 QEF 細胞におけるウイルスの増殖性の比較

1.2 RK-13 細胞におけるウイルスの増殖性の検討

RK-13 細胞における SFM 培養ウイルス及び CS 培養ウイルスの増殖性を調査した。表 2 及び図 2 に示すように、SFM 培養ウイルス及び CS 培養ウイルスのウイルス含量の最大は各培養温度共にウイルス培養開始 4 日目であり、また SFM 培養ウイルス及び CS 培養ウイルスの各培養温度における増殖曲線に差は認められなかった。

表 2 RK-13 細胞におけるウイルスの増殖性

培養ウイルス	培養温度	ウイルス含量(logPFU/mL)					
		0日	1日	2日	3日	4日	6日
CS	32°C	0.00	3.74	6.18	7.07	7.12	6.85
SFM		0.00	3.74	6.19	7.20	7.22	6.95
CS	37°C	0.00	3.56	5.06	5.82	5.86	5.65
SFM		0.00	3.65	4.89	5.82	5.90	5.61
CS	39°C	0.00	1.40	2.22	2.65	2.69	2.66
SFM		0.00	1.48	2.50	2.59	2.64	2.69

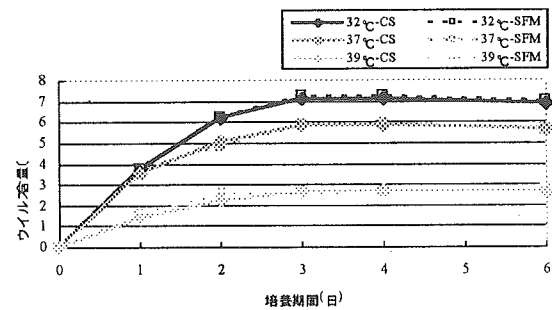


図 2 RK-13 細胞におけるウイルスの増殖性の比較

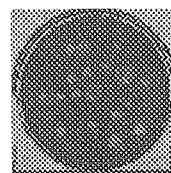
2. プラークサイズ測定

RK-13 細胞に SFM 培養ウイルス及び CS 培養ウイルスを接種して形成したプラークのサイズを比較した(図 3)。形成したプラークのサイズの分布は図 4 及び χ^2 検定($P=0.97$)より、SFM 培養ウイルス及び CS 培養ウイルス間に分布の偏りが見られなかった。また t 検定($P=0.16$)においてもプラークサイズの平均値に有意な差が認められなかった。

表 3 プラークサイズの測定結果

培養ウイルス	平均(mm)	分散	χ^2 検定	t 検定
CS	1.95	0.32	$P>0.05$	$P>0.05$
SFM	1.89	0.32	($P=0.97$)	($P=0.16$)

CS 培養ウイルス



SFM 培養ウイルス

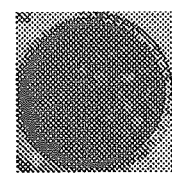


図 3 CS 培養ウイルス及び SFM 培養ウイルスのプラーク像

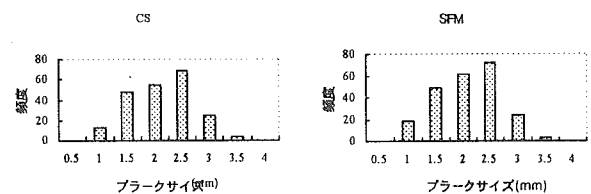


図 4 CS 培養ウイルス及び SFM 培養ウイルスのプラークの直径の分布

D. 考察

無血清培地を用いた培養方法によるウイルスの性状への影響を調査するために、QEF 細胞又は RK-13 細胞におけるウイルスの増殖性及びプラークサイズの分布を比較した。

ウイルスの増殖性の変化について QEF 細胞を用いて調査したところ、SFM 培養ウイルスと CS 培養ウイルスは同様の増殖曲線を示し、培養方法の違いによるウイルスの増殖性に差が認められなかった。また、RK-13 細胞においても同様に増殖性を確認したところ、SFM 培養ウイルス及び CS 培養ウイルスの各培養温度での増殖曲線に差は認められず、ウイルス増殖に与える培養温度の差異は認められなかった。これらのことから、無血清培地がウイルスの増殖性に与える影響は確認できなかった。

また、SFM 培養ウイルス及び CS 培養ウイルスを接種して形成したプラークのサイズの比較を実施した。SFM 培養ウイルス及び CS 培養ウイルスとのプラークサイズの平均値及び分散に差がなく、プラークの分布及び平均値に有意な差が認められなかった。

また、SFM 培養ウイルスのモルモットを用いたマーカー試験を実施したところ、モルモットの抗体産生は認められず、CS 培養ウイルスと同様な結果が得られた(試験成績は示さず)。

以上より、SFM 培養ウイルスは CS 培養ウイルスと同等の性状を有すると判断する。

E. 結論

無血清培地で培養した風しんウイルスは仔牛血清で培養したウイルスと同じ性状のものが得られることが示唆された。

F. 健康危惧情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし。
2. 学会発表
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。

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 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や無血清培地を用いて初代ニワトリ胚細胞(CE細胞)を培養し、無血清培地を用いても細胞やウイルスの増殖性がほぼ血清を用いた時と同様に確保できることを報告してきた。一方、ワクチン製造時の製法(培地、添加物等)を変更するためにはワクチン株の増殖性の問題だけでなく、その性状、特に弱毒に関する性状が保持されているかを検証する必要がある。そこで AIK-C 株の弱毒に関与すると考えられている温度感受性を支配する蛋白の同定を試み、P遺伝子上の439位のプロリンがもっとも重要な変異であることを見いだした。また、CE細胞で継代を行うと Working Seed 株から5代目からは非温度感受性株が低い頻度ながらも観察され、ワクチン製造には細胞、継代数などが適切に管理される必要があることが確認された。

A. 研究目的

麻疹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培養細胞を用いて製造されており、これらの細胞の培養では牛血清を含む培地を用いている。一方、1986年に BSE (Bovine spongiform encephalopathy) が英国で流行し社会問題となって以来、生物由来の原料を医薬品等の分野では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 非流行国のものを用いる等の配慮がなされているが、可能ならば牛血清を用いない方法の確立が望ましい。これまでにニワトリ初代胚細胞は無血清培地でも増殖が確認され、麻しんウイルス AIK-C 株の増殖が可能であることを示してきた。しかし、無血清培地で継代したウイルスの性状に関しては今まで十分な検討がなされていない。そこで本研究は、AIK-C 株の弱毒のマーカーであると考えられている温度感受性の性状に着目し、この性状を支配するウイルスゲノム上の変異を同定するとともに、この性状の安定性を検討し、無血清培地を用いた製造方法を検討する時のウイルスの弱毒性を確認するための方法を検討することを目的としている。

B. 研究方法

温度感受性に関する遺伝子の同定

1) ミニゲノムシステムによる温度感受性に関わる蛋白の同定

Edmonston 株由来、並びに AIK-C 株由来の N、P、L 遺伝子を T7 プロモーターの下流にクローニングした。Renilla luciferase 遺伝子を持つ麻しんウイルスミニゲノム RNA とこれらの N、P、L 遺伝子発現プラスミドを T7 RNA polymerase

発現ワクチニアウイルス、VTF7-3 を感染させた HeLa 細胞に co-transfection し、33℃、ならびに 37℃で培養し、luciferase の発現により、それぞれの温度における ミニゲノム RNA の転写、複製能を観察した。

2) infectious clone 系による温度感受性の確認
麻しんウイルス AIK-C 株の RNA ゲノムから cDNA を合成し、ゲノムに相当する全長 CDNA ゲノムを作製し、T7 プロモーターの下流にクローニングした (rMVAIK-C)。作製したゲノムの P 蛋白遺伝子のみを Edmonston 由来の P 蛋白遺伝子と交換したゲノムを作製した (rMVED)。rMVAIK-C の P 蛋白の 439 位をプロリンからロイシンに変えたゲノムを作製した (rMDAIKP439-leu)。rMVED の P 蛋白の 439 位をロイシンからプロリンに変えたゲノムを作製した (rMVED439-Pro)。これらを N、P、L 遺伝子発現プラスミドを T7 RNA polymerase 発現ワクチニアウイルス、VTF7-3 を感染させた HeLa 細胞に transfection し、4 種の P 遺伝子をもつ感染性の麻しんウイルスを回収した。これらのウイルスを 33℃、39℃で増殖させ温度感受性を確認した。

3) 温度感受性の性状の安定性

温度感受性マーカーの安定性を確認する目的で生ワクチン製造用基質細胞として国際的に使用されている SPF ニワトリに由来した胚(CE)細胞に AIK-C 株を感染させ、33℃、40℃の増殖性を調べ、温度感受性の性状の安定性を調べた。AIK-C ワクチンの Working Seed Lot を出発材料とし、これを 8 代迄継代 (Master Seed から 10 代) 調整した継代株について検討した。

C. 結果

1) AIK-C の温度感受性の関与する蛋白の同定

a) Edmonston 株由来の N、P、L 蛋白を発現させた HeLa 細胞では 33 °C、37 °C の温度で共に luciferase の発現が観察されたが AIK-C 株由来の N、P、L 蛋白を発現させた細胞では 33 °C のみで luciferase の発現が観察され、37 °C では観察されなかった。このことは AIK-C 株の N、P、L 蛋白のいずれかが、ミニゲノム RNA の 37 °C での転写、複製を制限した可能性を示した。

b) Edmonston 株、AIK-C 株由来の N、P、L 蛋白を組合わせて luciferase の発現を指標にミニゲノム RNA の転写、複製能を調べた。AIK-C 株の P 蛋白を含むすべての組み合わせで、37 °C では luciferase の発現がみられず、AIK-C 株 P 蛋白が温度感受性に関わっている事が考えられた。

c) P 蛋白質上に存在する AIK-C 株、Edmonston 株間のアミノ酸の変異部位を置換したキメラプラスミドを作製し、ミニゲノム系を用いて温度感受性に関与するアミノ酸の変異を検索した。その結果、AIK-C 株、P 蛋白上の 439 位のプロリンが 37 °C におけるミニゲノムの転写、複製能を制御していることが示された

d) 麻疹ウイルス infectious clone 系を用いて rMVAIK-C、rMVED、rMVAIK439-Leu、rMVED439-Pro の 4 種類のウイルスを作出し、温度感受性を調べた。rMVED、rMVAIK439-Leu は 32 °C、39 °C ではウイルスが増殖したが、rMVAIK-C、rMVED439-Pro は 32 °C でのみ増殖が観察されたが、39 °C ではみられなかった。以上のことから AIK-C 株の温度感受性は P 蛋白の 439 位のプロリンによると考えられた。

2) ニワトリ初代胚細胞における温度感受性の安定性

AIK-C 株の至適培養温度である 33 °C 及び非容認温度である 40 °C における各継代株の CE 細胞での増殖能を観察した。33 °C に於ける増殖性は 8 代継代迄継代数による有意な変動はみられず、培養 3 日目に最高の増殖値に達した。しかし 40 °C での増殖性は moi:0.05 で 3 代継代株まで認められなかったが、5 代株及び試料 8 代株は培養 3 ~ 4 日目の時点で温度感受性をウイルスの一過性増殖が低感染価 (2 log₁₀ 以下) ながら確認された。

C. 考察

生ウイルスワクチン株の体内での動態はほとんどが不明であり、その弱毒のメカニズムを検証することは難しい点が多い。弱毒に関連するウイルス側の性状として、温度感受性が知られている。この性状は宿主の体温でウイルスの増殖が抑制されることから、弱毒に関連すると考えられており、

RSV、HPIV、インフルエンザ等では動物実験その関連が示されている。AIK-C 株も温度感受性の性状を保持しており、おそらく弱毒に関連していると推測される。この性状をつかさどるゲノム上の特徴を把握することは無血清培地等を用いる等の製造法を検討する時に、ワクチン株の品質管理を行う上での重要な情報になりうると考えている。Reverse genetics 法を用いた一連の実験の結果、AIK-C 株に温度感受性は P 蛋白上の 1 アミノ酸の変異によることが判明した。この変異を確認することで、AIK-C 株の同定ができるとともに、弱毒性の確認がある程度可能になると思われる。AIK-C 株の温度感受性の安定性を検討したところ、現行の製法に則した方法で継代しても、working seed 株から 5 代目からは非温度感受性株が低い頻度で出現することが確認され、製造条件の変更は増殖能等の検討だけでなく、性状の変異に留意する必要があることが示された。

E 健康危険情報；北里研究所病原体等安全管理規定に従って行った。

F. 研究発表

1. 論文；

- 1) Komase K., Nakayama T., Iijima M., Miki K., Kawanishi R., Uejima H., The phosphoprotein of attenuated measles AIK-C vaccine strain contributes to its temperature-sensitive phenotype, *Vaccine* 2006, 24(6): 826-34
- 2) Uejima H., Nakayama T., Komase K., Passage in Vero cells alters the characteristics of measles AIK-C vaccine strain. *Vaccine* 2006, 24(7):931-6.

2. 学会発表；

- 1) インフルエンザパンデミックワクチンの開発に係わる試作モックアップワクチンの調整及びその性状、板村繁之、小田切孝人、田代真人、駒瀬勝啓、多田善一、後藤修郎、池田富夫、第 9 回日本ワクチン学会、大阪、2005 年 10 月 15 日 ~ 16 日
- 2) 外来蛋白を発現する麻疹ウイルス AIK-C ワクチン株の樹立、中山哲夫、吉田菜穂子、藤野元子、駒瀬勝啓、第 9 回日本ワクチン学会、大阪、2005 年 10 月 15 日 ~ 16 日
- 3) 麻疹ウイルスワクチン温度感受性 AIK-C 株の動物モデルとしてのコットンラット、芳賀猛、村山丹穂、清水佑也、齋藤暁、篠原明男、越本知大、佐藤浩、駒瀬勝啓、中山哲夫、宮田博規、第 53 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2005 年 11 月 20 日 ~ 22

日

- 4) SSPE ウイルスにおける遺伝子の機能解析
東郷将希、長尾竜兵、吉田菜穂子、藤野元子、駒瀬勝啓、中山哲夫、水谷智彦、第53回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2005年11月20日～22日
- 5) 麻疹ウイルスの N-P interaction に関する領域、藤野元子、吉田菜穂子、駒瀬勝啓、中山哲夫、第53回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2005年11月20日～22日
- 6) 麻疹ウイルス野生株とワクチン株の抗原性の差、中山哲夫、吉田菜穂子、藤野元子、駒瀬勝啓、第53回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2005年11月20日～22日
- 7) CD8-Positive (CD8⁺) Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) Responses Are Induced By The Nontoxic Double Mutant CT (E112K/KDGL) Adjuvant.
Yukari HAGIWARA, Ayako HINO³, Katuhiro KOMASE, Yujiro SUZUKI, Hiroshi KIYONO, Jerry R. McGHEE and Kohtaro FUJIHASHI,
12th International Congress. of Mucosal Immunology. Boston, USA, June 25-30, 2005
- 8) Molecular Analysis of Measles Virus Genome Derived From SSPE and Acute Measles Patients in Papua New Guinea, Kenji Miki, Katsuhiko Komase, Ryuta Kawanishi, Toshiaki Takasu, Tomohiko Mizutani, XVIIIth World Congress of Neurology, Sydney Australia, 5-11 November, 2005

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

牛血清を使用しない麻しんワクチン製造に関する研究

分担研究者 末原章宏（武田薬品工業株式会社）
協力研究者 岩本好司 山下利明（武田薬品工業株式会社）

研究要旨 牛血清非添加培地で培養した初代ニワトリ胚培養細胞から得た麻しんウイルス（シュワルツ FF-8 株）を製剤化し、25℃加速試験による力価安定性を調査した。25℃・21 日間の保存後の麻しんウイルス力価低下速度は、牛血清添加培地由来ウイルスと差異は認められなかった。また、継代数による違いについても、牛血清非添加、添加由来ウイルスで力価低下速度に差異を認めなかったことより、麻しんウイルスシュワルツ FF-8 株は、牛血清非添加培地を用いて培養した初代ニワトリ胚培養細胞を用いても、ワクチン力価安定性には影響しないことが示唆された。

A. 研究目的

これまでの研究成果として、弱毒生麻しんワクチンの製造に用いる初代ニワトリ胚細胞は、牛血清非添加培地で培養が可能であり、この培養細胞を用い麻しんワクチンウイルス株（シュワルツ FF-8 株）を培養したとき、牛血清添加培地とウイルス増殖性に差異は認められず、また、牛血清非添加培地で培養したニワトリ胚細胞から得た麻しんワクチンウイルス株は、継代 5 代まで、塩基配列（N 領域を含む 1775 塩基）に変異は認められず、牛血清添加培地で得たウイルス株と相違のないことを報告した。

今年度は、牛血清非添加培地で得たウイルス株の安定性を確認することを目的に、製剤化を行い、25℃加速試験による力価安定性の調査を行うこととした。

B. 研究方法

1. ウイルス試料の作製

牛血清添加培地及び牛血清非添加培地で培養した初代ニワトリ胚培養細胞を用いて、それぞれ、麻しんワクチン原液製造方法に準じたウイルス培養方法で 5 代まで継代培養を行い、

3 代及び 5 代継代後の麻しんウイルス（シュワルツ FF-8 株）液を採取した。

2. 小分製品の作製

3 代及び 5 代継代後の麻しんウイルス液について、凍結乾燥後の麻しんウイルス力価が生物学的製剤基準で規定されている力価以上となるよう希釈剤液で希釈して最終バルクを調製し、凍結乾燥を行い小分製品を作製した。

3. 麻しんウイルス力価評価方法

牛血清非添加及び添加培地で培養した初代ニワトリ胚培養細胞由来の 3 代及び 5 代継代の麻しんウイルス（シュワルツ FF-8 株）液で製造した小分製品の力価安定性を比較するため、25℃加温による相対比較試験を実施した。

保存期間は、開始時、保存 7 日、14 日及び 21 日とし、検体中の麻しんウイルス力価は、Vero 細胞を用いたプラーク法により測定した。

C. 研究結果

表 1 及び図 1 に示したとおり、牛血清非添加培地に由来し、3 代継代培養した麻しんウイルスの小分製品の試験開始時における平均力価は、4.50 log PFU/0.5mL から 25℃・21 日間の保

存により 0.27 log PFU/0.5mL 程度低下し、牛血清添加培地に由来する 3 代継代培養した麻しんウイルスの力価低下は 0.47 log PFU/0.5mL 程度であった。また、5 代継代培養した牛血清非添加培地由来及び牛血清添加培地に由来する麻しんウイルスの 25°C・21 日間保存後の力価低下程度は、それぞれ、0.53 log PFU/0.5mL、0.57 log PFU/0.5mL と差異を認めなかった。

D. 考察

今回、牛血清非添加培地で培養したニワトリ胚培養細胞から得られた麻しんウイルスの性状として、力価安定性を調査した。

現行製造法と同様の処方・製法で調製した小分製品について 25°C で 21 日間まで保存した試料の麻しんウイルス力価を測定した結果、力価低下速度は、牛血清添加培地に由来する麻しんウイルスと差は認められず、継代数による力価低下の違いについても、牛血清非添加、添加のいずれの場合も差異を認めなかった。

以上のことより、麻しんウイルスシュワルツ FF-8 株は、牛血清非添加培地を用いて培養した初代ニワトリ胚培養細胞を用いても、ワクチン力価安定性には影響しないことが示唆された。

これまで牛血清非添加培地に由来する麻しんウイルスシュワルツ FF-8 株の特性として、継代による塩基配列に変異のないことを確認しているものの、牛血清非添加培地を製造に適用するためには、温度感受性やプラークサイズ等の継代による変化、免疫原性なども調査する必要があると思われる。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
予定なし。
2. 実用新案登録
予定なし。
3. その他
特記なし。

表1 小分製品の25°C保存による麻しんウイルス力価試験成績 (単位: log PFU/0.5mL)

継代数	ウイルス由来	保存期間 (日)											
		保存開始時			7日			14日			21日		
3代	牛血清非添加培地	4.8	4.3	4.4	4.5	4.3	4.5	4.4	4.1	4.3	4.4	4.1	4.2
		4.50±0.26			4.43±0.12			4.27±0.15			4.23±0.15		
	牛血清添加培地	4.9	5.2	4.9	4.9	4.8	4.7	4.5	4.7	4.5	4.7	4.5	4.4
		5.00±0.17			4.80±0.10			4.57±0.12			4.53±0.15		
5代	牛血清非添加培地	5.1	4.9	4.8	5.0	4.8	4.7	4.6	4.5	4.1	4.4	4.4	4.4
		4.93±0.15			4.83±0.15			4.40±0.26			4.40±0.00		
	牛血清添加培地	4.9	4.8	4.7	4.7	4.5	4.5	4.5	4.4	4.0	4.1	4.3	4.3
		4.80±0.10			4.57±0.12			4.30±0.26			4.23±0.12		

下段: 3 バイアルの平均±標準偏差

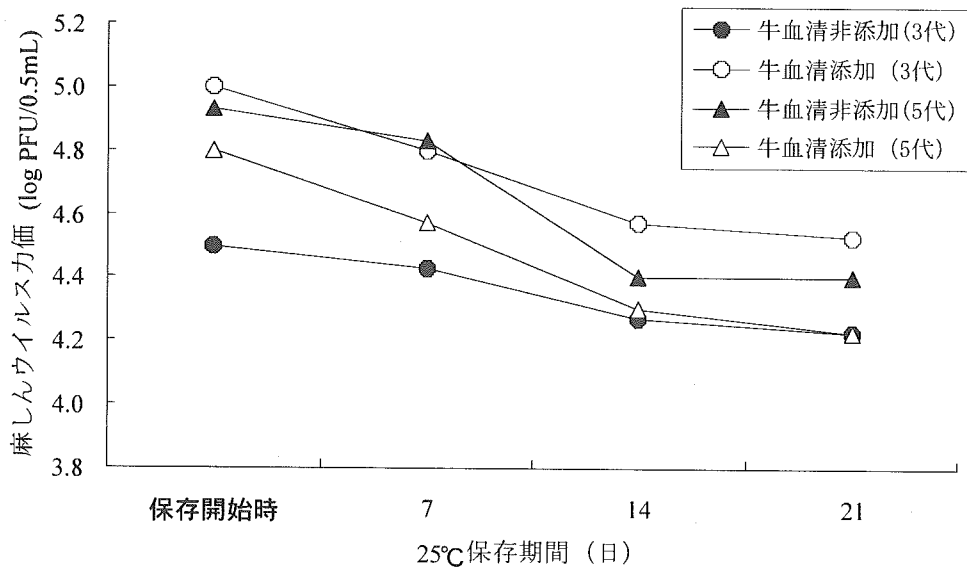


図1 小分製品の25°C保存による麻しんウイルス力価低下

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

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

分担研究者 板村 繁之 国立感染症研究所 主任研究官
協力研究者 河野 直子 国立感染症研究所

研究要旨 わが国での細胞培養インフルエンザワクチンの実用化を促進するために、細胞培養ワクチンの効果・安全性のための品質確保を目的として本年度は、細胞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と現在の流行株の分離に主に使用されている MDCK 細胞などから分離されたウイルス株を使用した場合について、抗原性や増殖性の特徴について比較し検討した。同一の臨床材料から分離したウイルス株であっても分離基材が異なる発育鶏卵、MDCK 細胞を使用して分離した 2 種類のウイルス株の抗原性に差が見られることがわかった。この抗原性の違いについて、現在使用されている力価試験法である SRD 試験においてどのような影響があるのか解析するのが今後の重要な課題のひとつである。また、それぞれの基材におけるウイルス株の増殖性には大きな差は認められなかったが、製造レベルでの増殖性について検討する必要がある。

A. 研究目的

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。そのため、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た。

インフルエンザワクチンは発育鶏卵を使用

して全粒子ワクチンが 1960 年代より製造が開始され、その後 1972 年に現在の HA ワクチンと呼ばれているスプリットワクチンへの改良はあったものの、依然として発育鶏卵を使用して製造されるワクチンである。しかしながら、発育鶏卵を使用したワクチン製造にはいくつかの問題点が存在する。発育鶏卵の安定供給の確保のためには一定の施設や設備を必要とするため製造量の増減に対応するのが容易ではない。一方、細胞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。新型インフルエンザ出現のような緊急事態に備えた迅速な製造体制の整備の観

点からも細胞培養ワクチンに期待される点が多い。また、培養細胞などと比較して外来性の病原体等の迷入の可能性も高くなる。このような特長から細胞培養ワクチンの開発、実用化はワクチンの安全性の確保、安定供給の観点から現在のインフルエンザワクチンに関して極めて重要な課題である。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。一方、海外においては培養細胞を使用したインフルエンザワクチンの開発は実用化直前の状況である。

そこで本研究ではわが国での細胞培養インフルエンザワクチンの実用化を促進するために、細胞培養ワクチンの効果・安全性のための品質確保を目的として研究を実施する。本年度は、細胞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と現在の流行株の分離に主に使用されている MDCK 細胞などから分離されたウイルス株を使用した場合について、抗原性や増殖性の特徴について比較し検討した。

B. 研究方法

試験するウイルス株として同じ臨床材料から異なる分離基材である発育鶏卵、MDCK 細胞を使用して分離した 2 種類の A/Japan/434/2003(H3N2) について、抗原性と増殖性を比較した。抗原性の解析は、七面鳥の赤血球を使用した HI 試験とそれぞれのウイルス株をチャレンジウイルスとして使用した中和試験によって実施した。被検血清は、RDE を用いて非特異的凝集抑制物質を除去して使用した。ウイルスの増殖性は、発育鶏卵・MDCK 細胞で増殖させ HA 力価を測定して比較した。

C. 研究結果

発育鶏卵、MDCK 細胞を使用して分離した 2 種類の A/Japan/434/2003(H3N2) ウイルス株はともに HA 価が 512 で増殖性は同程度であった。表に示すように、抗原性については両ウイルス株でほぼ同様の HI 抗体価や中和抗体価を示すものが多かったが、一部の血清では大きく異なるものがあった。従って両ウイルスで抗原性の差があることがわかった。

D. 考察

同一の臨床材料から分離したウイルス株であっても分離基材が異なると宿主への適応過程で HA 蛋白に変異が起こり抗原性に変化が起こることが以前より報告されているが、今回使用したウイルス株についても同様のことが観察された。この抗原性の違いが、従来使用されている発育鶏卵で増殖させたウイルスを用いて調製された標準抗原でワクチンの有効成分である HA 蛋白含量を測定した場合に実際と異なる測定値が得られるのか調査することは今後の重要な課題である。

両ウイルス株の増殖性についてはほぼ同程度であり、製造に関しての効率については大きな差異はないと考えられるが、実際にこれらのウイルス株を使用して製造レベルでの増殖性について検討する必要がある。

E. 結論

細胞培養ワクチンで使用するシードウイルスについて抗原性と増殖性について検討した。同一の臨床材料から分離したウイルス株であっても分離基材が異なる発育鶏卵、MDCK 細胞を使用して分離した 2 種類のウイルス株の抗原性に差が見られた。この抗原性の違いについて、現在使用されている力価試験法である

SRD 試験においてどのような影響があるのか調査するのが重要な課題のひとつである。また、それぞれの基材におけるウイルス株の増殖性には大きな差は認められなかったが、製造レベルでの増殖性について検討する必要がある。

F. 研究発表

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 特記事項なし

中和抗体試験、HI試験を使用した発育鶏卵、培養細胞分離の違いによるシードウイルスの抗原性の解析

	A/Japan/434/2003				A/Panama/2007/99(NIB-41)	
	Egg-grown		MDCK cell-grown		Egg-grown	
	NT	HI	NT	HI	NT	HI
Sheep antiserum						
A/Panama/2007/99(NIB-41) (H3N2)	25	-	91	-	63	-
A/New Caledonia/20/99 (IVR-116) (H1N1)	<10	-	<10	-	<10	-
Human serum						
I	5	<10	5	<10	6	<10
J	5	<10	8	<10	10	<10
K	6	<10	14	<10	16	<10
M	6	<10	8	<10	20	<10
L	8	<10	8	<10	25	<10
G	8	<10	10	<10	32	<10
N	13	<10	24	<10	25	<10
A	20	10	28	<10	80	10
B	25	10	24	<10	63	10
C	25	20	40	10	101	20
D	25	10	34	10	80	20
O	25	<10	24	<10	25	<10
P	32	20	57	10	127	40
Q	50	20	135	10	254	40
T	50	-	135	-	>1280	-
H	63	40	113	10	160	40
S	80	160	320	80	20	40
R	127	40	381	<10	160	40
F	254	160	453	10	640	80

H17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
「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」
分担研究報告書

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

分担研究者 細井 和男 デンカ生研株式会社ワクチン研究部長

研究要旨

- (1) 組織培養法で産生・精製したインフルエンザウイルスと従来の卵培養法で産生・精製調製したインフルエンザウイルス (A/New Caledonia/20/99 (H1N1)) について、インフルエンザワクチンの力価測定法として代表的な CCA 価測定、一元放射免疫拡散試験 (SRD 法) を比較測定し、両者が同じ試験方法で比較評価できるかの検討を行った。
- (2) たん白質量あたりの CCA 価は 15%ほどの差が見られたが、SRD 法での HA 含量測定値はほぼ一致した。
- (3) SRD 法では同じ比活性が得られたものの、リング形状に濃度パターンに若干差が見られた。
- (4) 両者について、実験動物を用いた免疫原性 (抗体産生能) 試験などを通じてさらに、品質と有効性の同等性に関する検討を続ける必要がある

A. 研究目的

発育鶏卵を用いたインフルエンザワクチンの製造に対して、インフルエンザワクチンの安定供給や、近年懸念されている H5N1 高病原性トリインフルエンザウイルスの現状から、動物細胞を用いた組織培養インフルエンザワクチン製造法が期待されている。現在製造・販売されている鶏卵法によるインフルエンザ HA ワクチンは、一元放射免疫拡散試験法 (Single-Radial Diffusion ; SRD 法) によりウイルス表面たんぱく質である HA (ヘムアグルチニン) たん白質の含量を測定している。

この SRD 法は抗原・抗体反応を利用して HA 含量を求めるものだが、現在開発が進められている組織培養法においてもその主要な有効成分は HA たん白質になるものと考えられるため、SRD 法が適用可能か否かを検討することは重要である。

しかしながら、組織培養法により作製されたウイルスたん白質が鶏卵法で作製されたものと同様の抗原・抗体反応を示すかどうかは現在のところ明らかではない。

また、鶏卵法と組織培養法では、ウイルス

培養のための基材、出発材料が異なることから抗原の純度も同様であるとは限らない。

そこで本検討では、鶏卵法と組織培養法の間で SRD 法による測定結果に差を生ずるか、また、ウイルス抗原の品質が異なる可能性があるのか、を検討することを目的とする。

B. 研究方法

1) A/New Caledonia/20/99(H1N)株を用い、発育鶏卵及び MDCK 細胞で増殖させ、限外ろ過濃縮一次精製後、ショ糖密度勾配遠心でウイルス粒子を精製した。

精製ウイルス サンプル名

卵培養法	ANT-T-1
組織培養法	J3-40 ゴーナル

2) 力価測定法として次の測定を行った。

- ・ HA 試験 (ニワトリ赤血球凝集反応)
- ・ TCA-BCA たん白質含量測定

以下の試験は、生物学的製剤ハンドブック 2004 「インフルエンザワクチン」に記載の方法に

従った。

・ CCA 価測定 (ミラー・スタンレー変法)

・ 一元放射免疫拡散試験 (SRD 試験)

SRD 標準抗原 ; A/New Caledonia/20/99 (IRV-116) (H1N1) Lot. 2004AH1A (59_gHA/mL)

C. 研究結果

測定結果の比較を表 1 に示した。

サンプル名	ANT-T-1 (卵培養法)	J3-40 ゾーナル (組織培養 法)
HA 価	±204800	±204800
P 濃度 (μg/mL)	1482	1240
CCA 価 (CCA/mL)	12410	12240
比活性 (CCA/ _g P)	8.37	9.87
SRD (μgHA/mL)	465	409
HA 含量 (μg _{HA} / _g P)	0.31	0.33

おおよそのたん白質量をそろえて HA 試験を行ったところ、同じ HA 価となった。

たん白質量当たりの CCA 価は組織培養法の値が 1.6 ポイント (約 15%) 高かった (CCA 比活性)。

たん白質量当たりの HA 含量 (SRD による HA 含量比活性) はほぼ一致した。

SDR 試験におけるリングの拡散状態 (大きさ) には組織培養材料と鶏卵材料とで差が見られなかったが、色素による染色の度合い・濃度に若干の差が見られた (図に示さず)。

D. 考察

組織培養法で産生・精製したインフルエンザウイルスと従来の卵培養法で産生・精製調製したインフルエンザウイルス (A/New Caledonia/20/99 (H1N1)) について、インフルエンザワクチンの力価測定法として代表的な CCA 価測定、一元放射免疫拡散試験 (SRD 法) を比較測定し、両者が同じ試験方法で比較評価できるかの検討を行った。

たん白質量当たりの CCA 価は 15%ほどの差が見られたが、SRD 法での HA 含量測定値はほぼ一致した。

CCA 価測定は赤血球を用いる測定方法であり、赤血球の状態等により影響を受ける場合

があるため、今後更にデータを蓄積して評価する必要があると考える。

SRD 法では同じ比活性が得られたものの、リングの濃度パターンに若干差が見られた。

このリングの濃度パターンの差が生じたことについては明らかではない。

また、両者について、実験動物を用いた免疫原性 (抗体産生能) 試験などを通じてさらに、品質と有効性の同等性に関する検討を続ける必要がある。

E. 結論

A/New Caledonia/20/99 (H1N1) をモデルウイルスとして、組織培養法で産生・精製した精製ウイルス試料と従来の卵培養法で産生・精製調製した精製ウイルス試料について、CCA 価測定、一元放射免疫拡散試験 (SRD 法) を測定し、比較検討を行った。

CCA 価による比活性では 15%の差を生じたが、今後更なるデータを蓄積して評価する必要があると考える。

SRD 試験による HA 含量の比活性は両者間でほぼ同等であり、試験の実施は原理的には可能であると考えられるが、リングの濃度パターンに若干差が見られたため、更に検討を進める必要がある。

さらには、今後、両者について、実験動物を用いた安全性試験、免疫原性 (抗体産生能) 試験などを通じてさらに、品質と有効性の同等性に関する検討を続ける必要がある。

F. 研究発表

1. 研究発表 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 特記事項なし