

20071000/A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

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 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 田代真人

平成 20 年(2008)3 月

目 次

平成 19 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. 他動物由来物質を除いたおたふくかぜ生ワクチン製造法に関する研究 P. 7
分担研究者：加藤 篤 協力研究者：木所 稔、久保田 耐
2. 動物由来成分を排除した麻しんワクチン製造法の開発に関する研究 P. 13
分担研究者：沼崎 啓 協力研究者：堤 裕幸、市村 宏、齋藤義弘
3. 動物由来物質を除いた風しんワクチン開発に関する研究 P. 15
分担研究者：駒瀬勝啓
4. 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. 17
分担研究者：大槻紀之 協力研究者：伊藤 治
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
-無血清培地適応 Vero 細胞 (Vero-SFM 株) の樹立-
分担研究者：高崎智彦 協力研究者：田島 茂、小滝 徹
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. 22
水痘生ワクチンの遺伝子レベルでの品質管理
分担研究者：井上直樹
7. 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 P. 26
の検討
分担研究者：大隈邦夫 協力研究者：倉永雅彦、渡邊俊一郎
8. 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. 30
分担研究者：真鍋貞夫 協力研究者：斉藤裕之
9. 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 P. 33
の設定
分担研究者：李 富雄

10. 麻しんワクチン製造における迷入ウイルスリスク低減に関する研究 P. 35
分担研究者：末原章宏 協力研究者：尾山誠一郎
11. 組織培養インフルエンザワクチンの力価測定に必要な標準品に関する研究 P. 38
分担研究者：板村繁之 協力研究者：河野直子
12. 組織培養インフルエンザワクチンの試作及び免疫原性試験における鶏卵ワクチンとの比較検 討(2) P. 40
分担研究者：細井和男

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19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 ウイルスワクチンの製造過程で、予期せぬ感染性因子の混入を防ぐために、ウイルス培養においてウシ血清、ブタトリプシン等の動物由来物質を使用しない方法の開発またはそれらの代替品の使用の検討、および初代培養細胞の代わりに管理継代された株化細胞を用いることなどを検討した。また、近年ヒト社会での大流行が懸念されるインフルエンザウイルスのワクチンの製造において、安定な製造供給を確保する目的で、従来の発育鶏卵製造法に変えて組織培養細胞製造を検討した。その結果、おたふくかぜ、麻疹、風疹、水痘、日本脳炎、A型肝炎のワクチンについては、市販の無血清培地や組み換えトリプシンを使っても、従来の方法を改良することで、ほぼ同様にウイルスが増やせることが判った。しかし、一部のおたふくかぜワクチン株では、無血清培地で継代を繰り返すと高い頻度で変異体が観察された。水痘ワクチンについても、継代によって遺伝子変異の蓄積に多様性が認められた。麻疹ワクチンでは、7代後に温度感受性変異の復帰株の出現が認められた。これらの成績から、ワクチン製造ウイルス株のポピュレーション管理が大切であることがわかった。麻疹ワクチンについては、無血清培地で増殖させたワクチンについても、安定性は大きく低下しないことが示された。また、無血清培地で継代可能なウイルス製造細胞の開発を試み、日本脳炎ワクチン製造用のVero細胞において候補株が開発された。しかしそれ以外のワクチンについては、適当な細胞を確立するまでには至らなかった。牛血清中に牛ポリオマウイルスの遺伝子が検出されたが、感染性ウイルスは分離されなかった。一方、MDCK細胞を使って多くのインフルエンザウイルス株を増やせることが判かり、さらにMDCK細胞を使った方が、抗原的にヒト間で流行しているウイルスに近い利点があった。これらのスプリットワクチンをマウスに接種した場合には、中和活性等において、現行の発育鶏卵ワクチンと大きな差が認められなかった。

分担研究者

加藤 篤 国立感染症研究所ウイルス第3部
沼崎 啓 同上
大槻紀之 同上
高崎智彦 国立感染症研究所ウイルス第1部
井上直樹 国立感染症研究所ウイルス第1部
大隈邦夫 (財)化学及び血清療法研究所
真鍋貞夫 (財)阪大微生物病研究会
李 富雄 (社)北里研究所
末原章宏 武田薬品工業(株)
板村繁之 国立感染症研究所ウイルス第3部
細井和男 デンカ生研(株)

A. 研究目的

ウイルスはその性質上宿主細胞無くしては増える事ができない。そのためウイルス生ワクチンの製造においても細胞の使用が必須であり、その細胞の維持、増殖及びワクチンの製造行程に血清、トリプシン等の他動物由来物質が用いられてきた。ワクチンの製造には2005年の改正薬事法により医薬品GMPが適応され、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きびしく管理されるようになった。しかし、他動物由来物質にごく微

量に含まれる因子、あるいは未知の感染性因子の製剤への迷入を排除することは困難である。

一方、生物学的製剤には、BSE汚染地域となった米国産のウシ血清やウシ由来材料の使用が2005年4月から禁止された。しかし、BSE非汚染地域由来の動物材料でも、他の感染性因子の混入は否定しきれない。そこで、既知の感染性因子の高感度検出法の開発並びに未知の感染性因子が迷入する可能性を排除するために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。

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式から感染により大きな健康被害を受ける65歳以上の高齢者を主な接種対象者としたハイリスクグループ接種方式に変更された。それとともに一時低下していたインフルエンザワクチン需要が増え、それにともない製造量も年々増加している。

また、近年は新型トリインフルエンザウイルスが続発し、このウイルスがヒトにも感染するようになり、スペイン風邪様の大流行が起る事が警戒されている。現在、インフルエンザワクチンの製造は、発育鶏卵を用いて製造されている。

しかし、このままインフルエンザワクチンの需要が増えれば発育鶏卵の供給が不足し、インフルエンザワクチンの製造量が確保できなくなると予想される。また、新型インフルエンザウイルス出現に備えたワクチン製造についても、新型トリインフルエンザウイルスの流行がトリの間で同時期に起ると予想され、発育鶏卵の確保は極めて困難な状況になる。そこで、発育鶏卵から組織培養細胞を用いたワクチン製造に代替することにより、製造量の変化に比較的容易に対応が可能になる。これに加えて、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容易に行うことができ、安全性の向上にも貢献すると予測される。このような特長から組織培養ワクチンの開発、実用化は現在のワクチン政策上極めて重要な課題である。

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感染性因子を含む可能性のあるウシ血清、更にはトリプシン等の他動物由来物質の使用をワクチン製造から無くし、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行うことを目的としている。そのために、(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及びワクチンの安定剤に用いるゼラチン等の代替品を検討する。次に、(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、将来発見さ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。(3) この知見と技術をインフルエンザワクチンの製造方法に応用し、より安全性の高いワクチンを安定的に供給する体制を確立する。これが実用化されれば、新型インフルエンザウイルスの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役立つと期待される。

生物原料を用いて製造する生物学的製剤の性状は一般医薬品に比べ不安定である。医薬品GMPの実施により製造の再現性が確保されるようになったものの、製造に利用する動物由来物質に含まれる必須であるが、技術的に非常に困難である。特にウイルスワクチンの製造には、自ら増殖する力の無いウイルスを増やすために動物由来の適当な宿主細胞の使用が必須である。

また、その細胞を維持、増殖するためには、ウシ由来血清、ブタ由来トリプシン等の使用が伝統的に行われてきた。しかし、未知の感染性因子あるいはごく微量の既知の因子の製剤への混入を極力排除するためには、これらの動物由来の物質

を用いずに宿主細胞を培養し、さらにウイルスを増殖培養させることが必要である。

そこで、おたふくかぜ、麻疹、風疹、水痘、日本脳炎、A型肝炎、インフルエンザの各ワクチンについて、無血清培地やトリプシンの代替品を使って従来の方法と同様にウイルスを増殖させること、現在広くワクチン製造に使用されている初代培養細胞は発育鶏卵の代わりに管理継代された株化細胞を用いること、さらにこれらの方法においてウイルス増殖効率、ウイルスの生物学的性状や遺伝的な安定性などを解析し、より安全性の高いワクチンの製造方法の開発および実用化の可能性を検討した。

さらに近年ヒト社会での大流行が懸念されるインフルエンザウイルスのワクチンの製造について、従来の発育鶏卵製造法から鶏卵が不足しても製造できる方法を確立するために、MDCK細胞の特定細胞株を用いて増殖させ、得られたウイルスが従来の発育鶏卵増殖方法で得たウイルスと同一か否か、またワクチン製剤として実際に使えるか否かを検討した。

分担研究者の研究成果

加藤 篤

他動物由来物質を除いたおたふくかぜ生ワクチン製造法に関する研究

おたふくかぜ生ワクチンはウシ血清を含む培地で増殖維持された鶏胚由来初代繊維芽細胞(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る。製造工程中の動物由来物質の使用は、それらに由来する感染性因子が製剤に迷入する危険を伴う。無血清培地を使用することは、ウシ血清に由来する感染性因子が迷入する危険性を無くすには極めて有効な方法である。今までに我々は、市販の無血清培地はCEF並びにムンプスウイルスの増殖に適しているものの、ウイルスを8継代すると従来培地で増殖維持した場合には見られないブラックサイズの小さいウイルスが含まれるようになり株の同等性が確保できない危険性があること、5継代時点の変化を*R*、*HV*、*SH*遺伝子を含むウイルスゲノムの約1/4にあたる領域の塩基配列で確かめるとワクチン株により数も場所も異なった変化が起きたことを示した。今回、継代による変化をムンプスウイルスワクチン・ホシノ株、ミヤハラ株のゲノム全体に拡げ、ゲノム比較塩基配列決定(CGS)法を用いて無血清培地での継代に於ける安定性を評価する事を試みた。その結果、無血清培地での継代に特異的に現われる変異が15,384塩基のムンプスウイルスゲノム中ホシノ株では13箇所、ミヤハラ株では7箇所あり、そのうちそれぞれ9箇所と3箇所がアミノ酸変異を伴うものであった。継代によるゲノムの安定性が株によって異なることが

確認された。

駒瀬勝啓

動物由来物質を除いた風しんワクチン開発に関する研究

無血清培地に馴化した Vero 細胞をもちいる事で、風疹ウイルスワクチン株は血清を用いた細胞培養法とほぼ同等なウイルス力価を得ることができ、また、少なくとも5代までの継代ではウイルスの E1 構造蛋白遺伝子に変化を認めず、弱毒マーカーと考えられている温度感受性の性状を保持している事を報告してきた。今回は他の構造遺伝子について配列の変化を検討し、変化がないことを示した。一方、弱毒生ウイルスワクチンにおいては、製造用細胞を変更すればワクチン株の性状が変化する可能性が考えられる。よって新たに非臨床試験、臨床試験を行い、製造承認を得る必要がある。今回は製造承認に必要と考えられる経費についても考察した。

沼崎 啓

動物由来成分を排除した麻しんワクチン製造法の開発に関する研究

有効な麻疹抑制対策の実行のためには安全で効果の高いワクチン開発の開発・導入が不可欠である。現状の製造過程ではウシ血清以外にも多くの動物由来成分の含有が認められるが、将来的にはヒト由来細胞の組織培養系による麻しんワクチン製造も必要なものと考えられる。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てきた。麻疹ワクチン製造過程における動物由来成分の排除は可能であったが、十分なウイルス量の回収は困難であった。弱毒生麻疹ワクチンの力価の判定においては Vero/hSLAM 細胞の有用性が確認されたが、ヒト由来細胞を使用した麻疹の培養系の確立には至らなかった。

大槻紀之

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法に関する研究

これまでの研究により、細胞培養用牛血清の多くには牛ポリオーマウイルス (BPyV) の遺伝子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なっている。また牛血清に対するγ線照射は本遺伝子混入リスクの低減化に効果があることが示唆されている。しかしながら、感染性を有するウイルスを用いた研究は実施していない。本年度の研究では感染性を有するウイルスの分離を目的とし、各種細胞に BPyV 遺伝子陽性の牛血清を接種しウイルス分離を試みた。その結果いずれの細胞でもウイルス分離は成功しなかった。

井上直樹

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:水痘生ワクチンの遺伝子レベルでの品質管理

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、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42カ所の約半数について、Tm値解析法を用いて、定量的かつ迅速に製剤中のワクチン型と野生型配列の割合を同定できるようにしてきた。本年度は、この方法を用いて海外製剤と我国メーカーの製剤の比較を行った。非ライセンス製剤を中心に本来同じ株由来にも関わらずいくつかの部位で顕著な差を認めた。また、ワクチン間の差異を生物学的な方法で検出できないかと考え、前初期蛋白による初期遺伝子の活性化を検出するレポーター細胞株での反応性を比較したが、明確な差を認めなかった。このことは、逆にレポーター細胞を用いてワクチン力価を測定することが可能であることを示唆した。

高崎智彦

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 (Vero-SFM 株) の樹立—

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る。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た。順化した Vero 細胞を15継代後、毎回凍結保存し、再び解凍して無血清培地下に培養再開が可能であることを20継代まで確認した。また、日本脳炎ウイルスの増殖だけでなく日本脳炎ウイルスよりも増殖力が遅いデングウイルスを用いて、そのウイルス増殖能およびプラーク形成能を検討した。

大隈邦夫

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

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。

昨年度までの報告において、組換え型トリプシン様酵素が従来使用のトリプシンと比べ、細胞増殖性及びウイルス増殖性について同程度の効果を示す結果が得られた。また、GL37細胞の無血清培地への馴化の可能性を示す結果が得られた。

今回、組換え型トリプシン様酵素に関して細胞剥離条件の検討を実施した。その結果、組換え型トリプシン様酵素反応時間を延ばすことで従来使用のトリプシンと同程度の細胞剥離を行うことが出来た。無血清培地の検討では、新たな無血清培地と血清代替添加剤を使用し、細胞増殖性とHAV増殖性の検討を実施した。

真鍋貞夫

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

仔牛血清を使用しない生ワクチンの製造方法で培養した麻しんウイルス及び風しんウイルスを用いて乾燥弱毒生麻しん風しん混合ワクチン(以下MRワクチン)を作製し、25°C60%RHで保存したときの安定性について現行のMRワクチンとの比較・検討を実施した。その結果、風しんウイルスの力価は共に保存期間を通じてわずかな低下が認められ、麻しんウイルスの力価は共に経時的に同程度の低下が認められた。化学的性状としてpH及び含湿度について確認を行ったが、共に顕著な変動が認められなかった。

以上より、仔牛血清を使用せずに培養した麻しんウイルス及び風しんウイルスを用いて調製したワクチンは仔牛血清を用いて培養したウイルスで調製した現行のワクチンと同等の安定性を有することが示唆された。

李富雄

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

平成18年度には、牛血清を用いない麻疹ワクチンを製造レベルのモデルとして2層のCell Factoryを用いて無血清培地で培養を行い $10^{5.8}$ TCID₅₀/mlの感染価を得ることができた。従来のウシ血清を用いて製造したワクチン原液は $10^{6.2-6.5}$ TCID₅₀/mlの感染価と比較するとウイルス収量は若干低下した。本年度は、無血清培地で8代継代を続けAIK-Cの特徴である温度感受性(ts)の検討をおこなった。Vero細胞に接種し培養上清のウイルス感染価を検討するとtsの性状は保持されていたがB95a細胞に接種すると39°Cでも増殖が認められ33°Cの1/300とtsが崩れていた。継代6代まではtsの性状は保持されていた。

末原章宏

麻しんワクチン製造における迷入ウイルスリスク低減に関する研究

麻しんワクチン製造における迷入ウイルスリスク低減を行うために、麻しんワクチン製造への組換え型消化酵素及びγ線照射牛血清の適用検討(現行:ブタ由来トリプシン及びγ線未照射牛血清)を前年度に引き続き行った。組換え型消化酵素及びγ線照射牛血清使用により作製したニワトリ胚細胞の増殖性は、現行品と同等であることが確認され、麻しんワクチン小分製品の力価安定性も現行製品と同等であった。

板村繁之

組織培養インフルエンザワクチンの力価測定に必要な標準品に関する研究

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を目指し、組織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、昨年度に引き続きワクチンの力価測定に必要な標準品に関する基礎的な研究を実施した。組織培養ワクチンの力価は一元放射免疫拡散試験法(SRD法)によって測定するが、そのためには標準抗原が必要で測定値の精度にはその品質が重要である。本研究ではSRD試験に使用する標準抗原のHA含量の値付けについて検討した。値付けの変動を少なくするには一次標準抗原のHA含量の設定が重要であることがわかった。一次標準抗原のHA含量を決めるための試験、特にHA蛋白の割合を求めるSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)法の標準化が重要な課題である。

細井和男

組織培養インフルエンザワクチンの試作及び免疫原性試験における鶏卵ワクチンとの比較検討

- (1) 組織培養法によって産出したインフルエンザウイルス培養液から試作したサブユニットワクチンと、従来の鶏卵スプリットワクチンとの有効性比較を試みた。
- (2) A/New Caledonia/20/99(H1N1)株をモデルウイルスとして、組織培養法にて得たウイルス培養液から、不活化精製ウイルス粒子を調製し、これを界面活性剤処理等により、製法の異なる2種類の組織培養サブユニットワクチンを試作した。
- (3) 有効性評価のため本ワクチンを、対照となる鶏卵スプリットワクチンと共にマウス免疫原性試験に供し、得られたマウスの抗血清を用いて中和抗体価を測定した結果、両者で中和抗体価に大きな差異はなく、組織培養サブユニットワクチンは鶏卵スプリットワクチンと同程度の有効性を有すること

が示唆された。

B. 研究方法

自ら増殖する力の無いウイルスを増やすには宿主細胞が必須である。その細胞を維持、増殖するのに必要な、他動物質であるウシ由来血清、ブタ由来トリプシン等を用いずにウイルスを培養すること。初代培養細胞の代わりに管理継代された株化細胞を用いることなどを検討し、インフルエンザウイルスについては MDCK 細胞の特定細胞株を使って増殖させ、どちらも得られたウイルスが従来の方法で得たウイルスと変わらずに製剤として使えるか否かを検討した。

C. 結果

1) おたふくかぜ、麻疹、風疹、水痘、日本脳炎、A 型肝炎のワクチンについては、無血清培地や遺伝子組換えトリプシンやその代替品を使っても、従来の方法を改良すれば、ほぼ同様にワクチン株ウイルスが増やせることが判った。

2) しかし、一部のおたふくかぜワクチン株では、無血清培地で継代を繰り返すと高い頻度で変異体が観察された。この現象は異なるウイルス株間で違いが認められた。

水痘ワクチンについても、継代によって特定の遺伝子変異の蓄積に多様性が認められた。

一部の麻疹ワクチン株では、無血清培地において 7 代継代後に、温度感受性変異の復帰株の出現が認められた。

これらの成績から、無血清培地を用いた場合には、更に厳しいワクチン製造ウイルス株のポピュレーション管理が大切であることがわかった。

3) 麻疹ワクチンについては、無血清培地で増殖させたワクチンについても、保存安定性は大きく低下しないことが示された。

4) 無血清培地で継代可能なウイルス製造細胞の開発を試みた結果、日本脳炎ワクチン製造用の Vero 細胞において、無血清培地で継代可能なワクチン製造用細胞候補株が開発された。

しかし、それ以外のワクチンについては、適当な細胞を確立するまでには至らなかった。

5) 昨年度の研究において、輸入されたワクチン製造用の牛血清の一部のロット中に、牛ポリオーマウイルスの遺伝子が検出されたが、これらの牛血清からは感染性ウイルスならびに感染性因子は検出されなかった。γ線照射などの処理によって、感染性は失活されているものと考えられる。現時点においては、ワクチンとしての安全性に大きな問題は無いものと考えられる。

6) 特定の MDCK 細胞株を使って多くのインフルエンザウイルス株を増やせることが判かり、さらに MDCK 細胞を使った方が、抗原的にヒト間で流行しているウイルスに近い利点があった。こ

れらのスプリットワクチンをマウスに接種した場合には、中和活性等において、現行の発育鶏卵ワクチンと大きな差が認められなかった。

一部のおたふくかぜワクチン株では、無血清培地で継代を繰り返すと高い頻度で変異体が観察された。水痘ワクチンについても、継代によって遺伝子変異の蓄積に多様性が認められた。麻疹ワクチンでは、7 代後に温度感受性変異の復帰株の出現が認められた。これらの成績から、ワクチン製造ウイルス株のポピュレーション管理が大切であることがわかった。麻疹ワクチンについては、無血清培地で増殖させたワクチンについても、安定性は大きく低下しないことが示された。また、無血清培地で継代可能なウイルス製造細胞の開発を試み、日本脳炎ワクチン製造用の Vero 細胞において候補株が開発された。しかしそれ以外のワクチンについては、適当な細胞を確立するまでには至らなかった。牛血清中に牛ポリオーマウイルスの遺伝子が検出されたが、感染性ウイルスは分離されなかった。一方、MDCK 細胞を使って多くのインフルエンザウイルス株を増やせることが判かり、さらに MDCK 細胞を使った方が、抗原的にヒト間で流行しているウイルスに近い利点があった。これらのスプリットワクチンをマウスに接種した場合には、中和活性等において、現行の発育鶏卵ワクチンと大きな差が認められなかった。

D. 考察

多くの健康なヒトが予防のために用いるワクチンは安全性が高くなければならない。ワクチンの製造には予期せぬ感染性因子の混入を防ぐために他動物由来物質を用いない細胞培養システムを使うことが望ましい。本研究において、無血清培地の性能の進歩により従来法と変わらず細胞並びにウイルスを増やすことが可能になった。

しかし、この一方でワクチンウイルスが質的に以前と同等でなくなる例も認めれ、注意が必要であった。インフルエンザウイルスの場合は、培養細胞の使用により抗原的によりよいものが作れる可能性があった。

ウシ海綿状脳症(Bovine spongiform encephalitis; BSE)の原因物質とされる異常プリオンに汚染された牛肉を摂取することにより、ヒトでも類似の症状がでることが明らかになり、食品衛生上の管理が強化されるようになった。生物学的製剤も例外ではない。ウイルスの増殖には宿主細胞の使用が必須であり、そのため一部の組換えワクチンを除くほとんどのウイルスワクチンの製造には細胞が使われている。一般的に細胞の培養にはウシ血清を添加した培養液が用いられており、そのため仮に血清が感染性因子に汚染されていた場合には、ワクチン接種という医療行為

により病気を広めてしまう危険性をもつ。ウシ海綿状脳症にかかるウシのリスクは年齢依存的に増加し、また異常プリオンの体内汚染度は臓器ごとに異なる。

ワクチンに用いられる血清は、一般に若齢のウシ由来のものであり、また血清は異常プリオンによる汚染度の低い部位であるとされていることから、異常プリオンを含んだ血清により培養された細胞を使ってワクチンが製造された可能性は無いだろうと予想され、また仮にあったとしても製造工程で相当程度希釈されることから安全性において懸念はないと考えられている。動物由来物質のワクチン製造工程での使用は、その動物に由来する未知あるいは既知の感染性因子がワクチンに混入する危険性を持つ。従って、安全なワクチンの製造には、ウシ血清等の他動物由来物質を用いない代替物質の検討が必要である。

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、ウシ血清添加培地に比べて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医薬品 GMP 並びに生物学的製剤基準はワクチンの品質を均一に保つ事には寄与したが、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、無血清培地あるいは他動物由来物質の代替品の利用を検討し難くしていた。

しかし、近年細胞増殖因子の解明が進み無血清培地の性能が向上したと共に、他動物由来物質を組換え蛋白質として入手できる道が開かれた。それに加えて BSE 問題に始まる安全機運の高まりを鑑みて、本研究班では、これらの動物由来物質代替品を使用した細胞、あるいはウイルス増殖を現行法と能力的に比較すること、現行製造方法によるワクチンと同じウイルス学的性状を持つ事を確認し、そのうえで安全性と予防効果を確認しつつ、経済性を考慮して開発を行い、より安全性の高いワクチンの開発に結び付けたい。

一方、従来インフルエンザワクチンは発育鶏卵を用いて製造されてきた。鶏卵はインフルエンザウイルスを容易に増やせる利点があるものの、卵由来の感染性因子、並びにアレルギー物質等がワクチンに混入する等の安全性の観点、あるいは卵への接種、培養、採取などの製造過程の効率性の観点、またあるいは卵の供給量に依存しない安定的製造の観点から疑問点が投げかけられていた。そのため、国内外において組織培養によるインフルエンザワクチンに関する研究開発が数多く行われており、米国では3年後には組織培養由来のワクチンへの転換を目標として、政府が膨大な研究費を投入している。

しかしながら、わが国では、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。本研究の成果に

基づき、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。

E. 結論

おたふくかぜ、麻疹、風疹、水痘、日本脳炎、A型肝炎のワクチンについては、無血清培地やトリプシンの代替品を使っても従来の方と同様にウイルスが増やせることが判った。しかし、おたふくかぜワクチンでは、無血清培地で継代を繰り返すと高い頻度で変異体が観察され、ウイルスのポピュレーション管理が大切であることがわかった。一方、MDCK細胞を使って多くのインフルエンザウイルス株を増やせることが判かり、さらに MDCK細胞を使った方が、抗原的にヒト間で流行しているウイルスに近い利点があった。

F. 健康危害情報

特になし

G. 研究発表

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

他動物由来物質を除いたおたふくかぜ生ワクチン製造法に関する研究

分担研究者 加藤 篤 国立感染症研究所ウイルス第三部 室長
協力研究者 木所 稔 国立感染症研究所ウイルス第三部 主任研究官
協力研究者 久保田 耐 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ウシ血清を含む培地で増殖維持された鶏胚由来初代繊維芽細胞(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る。製造工程中の動物由来物質の使用は、それらに由来する感染性因子が製剤に迷入する危険を伴う。無血清培地を使用することは、ウシ血清に由来する感染性因子が迷入する危険性を無くすには極めて有効な方法である。今までに我々は、市販の無血清培地は CEF 並びにムンプスウイルスの増殖に適しているものの、ウイルスを 8 継代すると従来培地で増殖維持した場合には見られないブラックサイズの小さいウイルスが含まれるようになり株の同等性が確保できない危険性があること、5 継代時点の変化を *F*、*HN*、*SH* 遺伝子を含むウイルスゲノムの約 1/4 にあたる領域の塩基配列で確かめるとワクチン株により数も場所も異なった変化が起きたことを示した。今回、継代による変化をムンプスウイルスワクチン・ホシノ株、ミヤハラ株のゲノム全体に上げ、ゲノム比較塩基配列決定(CGS)法を用いて無血清培地での継代に於ける安定性を評価する事を試みた。その結果、無血清培地での継代に特異的に現われる変異が 15,384 塩基のムンプスウイルスゲノム中ホシノ株では 13 箇所、ミヤハラ株では 7 箇所あり、そのうちそれぞれ 9 箇所と 3 箇所がアミノ酸変異を伴うものであった。継代によるゲノムの安定性が株によって異なることが確認された。

A. 研究目的

製剤の特質として不活化操作を行わない生ワクチン製剤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由来物質から感染性因子が迷入する危険性が存在する。おたふくかぜ生ワクチンはトリ発育卵から採取した胚を初代繊維芽細胞(CEF)にした後、種ウイルス(ワクチン株プロダクションシード)を接種して増殖させて製造される。CEFを使う理由は、第一に本ワクチンが CEF でムンプスウイルスを弱毒化させた歴史的経緯を持つこと。第二に不死化した株化細胞を使うと細胞を不死化した因子が製剤中に入り込む可能性を危惧した事による。しかし、世界的にはヒト株化細胞 MRC-5 を使って製造されているおたふくかぜ生ワクチンも存在し、安全性が担保できるならばむしろ株化細胞を積極的に利用すべきとの考えも存在する。さて、CEF の培養増殖にはウシ血清を含む培地が用いられているため、ウシ血清に由来する感染性因子が迷入する危険性を含んでいる。特に近年は狂牛病の原因物質である異常プリオン蛋白質の迷入を発端として、未知の人畜共通感染性因子の迷入が心配されている。ワクチン被接種者が

健康な子供であること、対象者数が多い事などから、根本的な解決策が模索されている。

これまでに我々はウシ血清を含まない無血清培地(市販品：Opti SFM)が CEF の培養に使える事、その細胞を用いてムンプスウイルスワクチン株をウシ血清を含む従来法に比べても遜色無く増殖させられる事を示した。ところで均一な細胞株とは異なり、初代培養細胞は生体の組織を出発材料とするために作成・維持方法を変更することにより、変更前と変更後では異なった細胞集団を選択的に培養してしまう可能性がある。Opti SFM で増殖・維持された CEF は、血清添加 MEM で培養された CEF よりも細胞増殖の速度が早く代謝的にも活発な状態を維持しているばかりでなく、実際、顕微鏡的には血清入り従来培地で培養された CEF とは形態学的に異なった細胞が含まれている。これは、無血清培地中に含まれる物質により胚より分離された細胞が血清入り培地よりも効率よく増殖できるため、細胞の種類が血清入り培地を使った場合よりも豊富になるためと理解される。

一般的に弱毒生ワクチンは、ウイルスが変異しやすいという性質を利用してヒトと異なる宿主、異なる温度等で増えてくる特定のウ

ウイルスを選別し、ヒトで病気を起こしにくい株を選んできた経緯をもつ。国産ワクチン3株（トリイ、ホシノ、ミヤハラ）を生物学的製剤基準に従い5代の枠内で製剤が製造される様な低感染価で継代を行い、株に変化が生じるか否かの検証を全長15384塩基からなるムンプスウイルスゲノムのうちでM遺伝子(3228-4481)の後半からF遺伝子(4482-6210)、SH遺伝子(6218-6533)とHN遺伝子(6536-8428)を含むL遺伝子(8430-15360)の前半までの約4.5K塩基対(4178-8625)についてダイレクトシーケンス法によって塩基配列の決定を行った結果、ミヤハラ株では塩基置換が見られなかったもののホシノ株では5箇所、トリイ株では1箇所の置換が認められた。

株によって塩基置換の数が異なることが判明したが、塩基配列決定領域以外についても同様の事が言い得るのか否かについては結論できなかった。そこで、本年度は、塩基置換が0箇所のミヤハラ株と塩基置換が5箇所のホシノ株についてウイルスゲノム全体にわたる塩基配列決定を行い、無血清培地使用における株の安定性を評価することを試みた。

B. 方法

細胞の準備と感染

昨年度に準備した材料の一部を使って実験を行った。すなわち、10日齢の発育鶏卵から胚を取り出し、常法に従って鶏胚由来初代繊維芽細胞(CEF)を作製した。遠心により集めた細胞に従来の増殖培地(GM; MEM+10%TPB, 5%BS)と血清を含まない合成培地(Opti SFM; Opti-PRO SFM, Invitrogen Co.)を加え、 5×10^4 細胞/mlになるように調整した。3.5cmシャーレに 1×10^5 細胞/シャーレになる様に加え、37°Cの炭酸ガス培養器内で2-3日間培養した。細胞がほぼ均一になった時に、国内で使われているムンプスワクチン、ホシノ株(北里研究所、ロットK05)、ミヤハラ株(化学及び血清療法研究所、ロット3)を感染価0.01で1時間吸着させ、液を除いた後にPBSで細胞を一度洗い、3mlの添加物無しのMEM液(以下MEM(-)と記す)をそれぞれに加えて5日間、35.5°Cで培養した。

継代試験

5日後の培養上清3ml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。ウイルス液0.02mlをMEM(-)液0.08mlと混ぜ、再び血清添加MEM培地とOpti SFM培地で培養したCEF細胞に一時間

吸着させ、PBSで細胞を一度洗った後に3mlのMEM(-)培地を加え、35.5°Cで5日間培養を行った。この操作を合計4回繰り返し、継代歴5のウイルス液を得た。

塩基配列決定用RNA

継代歴5のウイルスを再び75cm²の培養フラスコにいっぱい広がったVero細胞に感染させ、CPEがほぼ全体の細胞に見られる時期(48時間目)に上清液をすて、細胞にTrizol(Invitrogen Co.)を加えて、常法に従いTotal RNAを抽出した。約40µgのTotal RNAにピオチン化されたOlig(dT)を50pmol加え、37°Cで5分間反応させた後、スレプトアビジンコート磁気ビーズを加えて室温で10分間反応させた。その後、マグネットスタンドにセットして、RNA溶液から磁気ビーズを除いた。このRNA溶液をさらにスレプトアビジンコートPCRチューブに移し、室温で5分間インキュベーションした。この操作を3回繰り返して得た非poly(A)RNA分画のRNAの濃度と泳動パターンをチェックし、ウイルスゲノムRNAを含む分画として塩基配列決定の材料に用いた。

ゲノム比較塩基配列決定法

ゲノム比較塩基配列決定(Comparative Genome Sequencing: CGS)法(NimbleGe, Madison, WI, 現ロッシュ・ダイアグノスティクス)は、微生物等のゲノムに起きた変異を迅速に見つけるために開発された方法である(図1)。この方法は、2段階から成っており、1段階目は、比較したい二つのゲノム領域それぞれを色素で標識し、それをあらかじめ用意したゲノム上の位置を少しづつずらしたDNAチップに対して競合的にハイブリダイスさせる。ゲノムの位置毎の競合比を数値化し、お互いが競合する場合には同じ塩基を、競合しないあるいは競合しにくい場合には異なる塩基を持つと判定する。特に後者の場合には、その部位を特定するために2段階目として、シーケンスングアレイに供し、変異部分の特定を行う。この方法を用いて無血清培地で5代継したときに現れる変異の中から血清入り培地で5代継したとき現れる共通変異を差し引いたものを無血清培地特異的変異として集計した。

C. 研究結果

細胞培養とウイルスの継代

ウシ血清を含む従来培地で培養したCEFを用いて8代継したおたふくかぜ生ワクチン株はブラックサイズが未継代のものと大差無い

のに比べて、無血清培地(Opti SFM)を使って培養した CEF を用いたものでは小さなブラックサイズの集団が増えること(初年度)、5 継代目の株についてムンプスウイルスゲノムの約 1/4 にあたる M 遺伝子後半から F、SH、HN 遺伝子を含む L 遺伝子前半までの -4500 塩基対 (4178-8625) についてダイレクトシーケンス法で塩基配列行くと、ミヤハラ株では 0 箇所であったものの、ホシノ株では 5 箇所の置換が、トリイ株では 1 箇所の置換が見つかったこと(二年度)を報告した。これらの結果は継代によりウイルスが変化すること、しかしその変化の度合いは株毎に異なる事を示すものである。

そこで今年度は全ゲノムの配列決定を新しくして簡便なゲノム比較塩基配列決定(CGS)法を用いて行うことにし、おたふくかぜワクチン株の継代によるゲノムの安定性評価に役立てることにした。従来同様に発育鶏卵から胚を取り出してトリプシンで消化後にウシ血清添加 MEM、あるいは無血清 Opti SFM 培地で培養した CEF 細胞におたふくかぜ生ワクチン株を細胞あたりの感染価 0.01 で接種し、35.5°C で 5 日間の培養を 5 継代まで繰り返した。5 代目のウイルスを Vero 細胞に感染させ、48 時間目の細胞から全 RNA を抽出し、Oligo(dT)非結合画分をウイルスゲノムを含む画分とし、CGS 法に用いた。

CGS 法によるゲノム変異場所の特定

CGS 法は、DNA 上にどのような変化が生じるのかを比較したい二つの DNA を競合的にチップ上の DNA とハイブリダイズさせ、その競合の度合いにより判定する方法である(図 1)。本研究では、ウシ血清添加 MEM あるいは無血清 Opti SFM 培地で培養した CEF に 5 代継したおたふくかぜ生ワクチン、ミヤハラ株とホシノ株それぞれのゲノムを用いて CGS 法で変異部位を決定し、継代による変化を比較した。

無血清培地で培養した CEF での 5 継代に特徴的な変異箇所は、ミヤハラ株では 15,384 塩基中 7 箇所あり、そのうち 3 箇所がアミノ酸変異を伴うものであった。一方、ホシノ株では 15,384 塩基中 13 箇所あり、そのうち 9 箇所はアミノ酸変異を伴うものであった(表 1)。継代されたミヤハラ株のアミノ酸変異箇所は、NP 蛋白質に 2 箇所、HN 蛋白質に 1 箇所であった。継代されたホシノ株のアミノ酸変異箇所は、ゲノム全体で比較してもミヤハラ株に比べて多く、アミノ酸変異部位は NP 蛋白質に 1

箇所、P/V 蛋白質共通部分に 2 箇所、M 蛋白質に 3 箇所及び L 蛋白質に 3 箇所であった(図 2)。両株で共通の変異はなかった。

D. 考察

他動物由来感染性因子のおたふくかぜ生ワクチンへの迷入を最小限にする試みとして、無血清培地 Opti SFM の可能性を検討してきた。Opti SFM は CEF の培養に使い、ムンプスウイルスワクチン株のウイルス収量を高くするのに効果がある。しかし、鶏胚から得られる CEF 細胞に形態の異なる様々な細胞が含まれる様になり、これらの細胞に馴化したウイルスが出現し、特定の性質を持ったウイルスがワクチン原株から選択される可能性がある。実際、ウシ血清入 MEM で培養した CEF に 8 継代したワクチンウイルス株は、原株と比較してブラックサイズに変化を認めなかったものの、無血清培地 Opti SFM で培養した CEF に 8 継代した場合にはブラックサイズが小さく変化したウイルスが含まれるようになる(初年度報告)。

ムンプスウイルスの M 遺伝子の後半から L 遺伝子の前半にいたるウイルスゲノム全体の約 1/4 にあたる -4500 塩基について未継代ウイルスと継代ウイルスを比較すると Opti SFM で培養した CEF を使った場合には、ミヤハラ株には変異が見られなかったもののホシノ株で 5 箇所、トリイ株で 1 箇所の変異が観察され、ワクチン株により変化のしやすさが異なることが示された(二年度報告)。

今年度は塩基配列決定部位をゲノム全体に拡大し、ミヤハラ株にも NP 蛋白質に 2 箇所、HN 蛋白質に 1 箇所のアミノ酸置換を伴う変化と F 蛋白質と L 蛋白質にそれぞれ 1 箇所と 3 箇所のアミノ酸変化を伴わない塩基置換の合計 7 箇所の置換が認められた。継代されたホシノ株が 13 箇所の置換があったことを考えると、ミヤハラ株のゲノムはホシノ株に比べて安定であると言える(図 2)。両継代株に共通のアミノ酸変化はなく、無血清培地への馴化を特定の塩基変化と結びつける事はできなかった。

昨年、ダイレクトシーケンス法により配列決定した部分を今年用いた CGS 法にて再評価してみると、若干の矛盾点がある。ダイレクトシーケンス法によるミヤハラ株の解析では塩基置換が無かったにもかかわらず、CGS 法では 5835 と 8278 の 2 箇所にアミノ酸変化を伴わない変異が示された。一方、ダイレクトシーケンス法によるホシノ株の解析

で見られた 4266、4374、4387 の塩基置換は CGS 法では同様に示されたものの、これに加えて CGS 法では 6548 と 8236 の 2 箇所にもアミノ酸変化を伴わない変異が示され、逆にダイレクトシーケンス法で見つかった 4402 と 8305 の塩基置換は CGS 法で検出されなかった。これらの矛盾箇所の存在は、今回 CGS 法で全ゲノムにわたって得られた変異箇所の信頼性に疑問を抱かせることになった。

ダイレクトシーケンスによる変異部位は、多かれ少なかれ二つのピークの混合になっており(図 3)、このことからすべてのウイルスの塩基が置換されたのではなく、塩基配列の異なる二種類のウイルスの混合物として存在していると理解される。二つのウイルスの混合比が CGS 法の塩基配列決定の原理になっている競合率の差として忠実に再現されればよいが、そうでなければ混合比の程度によりたとえ混合物であったとしても、どちらか一方の存在比の多い方に 1 本化されてしまうことになる。ダイレクトシーケンス法にあって CGS 法に無い変異部位は以上の様な理由ではないかと推察される。CGS 法にあってダイレクトシーケンス法に無いものについては、今のところ原因が不明で DNA チップ上に設定した配列を含め、今後の確認が必要である。

個々の変異点の信頼性に疑義があるものの、CGS 法の原理である同一条件で比較した二つのウイルスゲノムの比較という点において、信頼性が確保されているものと推察される。それ故、(1) 無血清培地で継代した株は、従来の血清入培地で培養した時には見られない変異が起る事、また、(2) その変異の起る数株によって異なる事の 2 点については、結論としてよいものと思われる。

E. 結語

血清に由来する感染性因子のワクチンへの迷入を排除するために、無血清培地の生ワク

チンの製造への使用が望ましい。しかしながら、おたふくかぜ生ワクチン株を無血清培地で培養した CEF で生物学的製剤基準で定められている最大にあたる 5 代の継代を行うと、変化の度合いはワクチン株により異なるものの、アミノ酸変化を伴う変異が出現する。それはすなわちワクチン株の同等性が確保されなくなることを示しており、もし使用するならば、株の管理をより厳しくするなどの株の安定性を確保する条件設定と、それを担保する手段が必須であると思われた。

F. 健康危害情報

無し

G. 研究発表

論文発表

(欧文)

1. Kato, A., K. Kiyotani, T. Kubota, T. Yoshida, M. Tashiro, and Y. Nagai. Importance of anti-interferon capacity of the Sendai virus C protein for pathogenicity in mice. *J. Virol.* 81:3264-3271 (2007)

(和文)

1. 加藤 篤、清谷克寛 センダイウイルス感染と宿主自然免疫 蛋白質核酸酵素 52:1194-1199 (2007)
2. 加藤 篤、清谷克寛 自然免疫とセンダイウイルスアクセサリー蛋白質 臨床とウイルス 35:12-20 (2007)

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

表1. CGS法により決定された塩基置換部位

ミヤハラ株								
塩基置換部位	PROBABILITY	置換前	置換後	アミノ酸	置換前	置換後	置換後	部位
276	0.905	A	C	NON	N	T	N	
1739	0.900	T	C	NON	F	L	N	
5835	0.970	T	C	SYN	Y	Y	F	
8278	0.910	T	C	NON	Y	W	HN	
10210	0.905	A	G	SYN	R	R	L	
12544	0.935	T	C	SYN	T	T	L	
14446	0.905	A	C	SYN	T	T	L	

ホシノ株								
塩基置換部位	PROBABILITY	置換前	置換後	アミノ酸	置換前	置換後	置換後	部位
52	0.920	C	A					leader
64	0.960	A	G					leader
212	0.970	G	C	NON	E	Q	N	
2238	0.965	G	A	NON	G	E	P/V	
2239	0.945	C	G	NON	G	E	P/V	
4266	1.000	T	C	NON	Y	H	M	
4374	0.905	T	C	NON	S	P	M	
4387	0.950	T	C	NON	L	P	M	
6458	0.915	G	A					noncoding
8236	0.940	T	C	SYN	T	T	HN	
9971	0.960	T	C	NON	F	L	L	
10312	0.910	C	G	NON	D	E	L	
12776	0.990	G	C	NON	A	P	L	

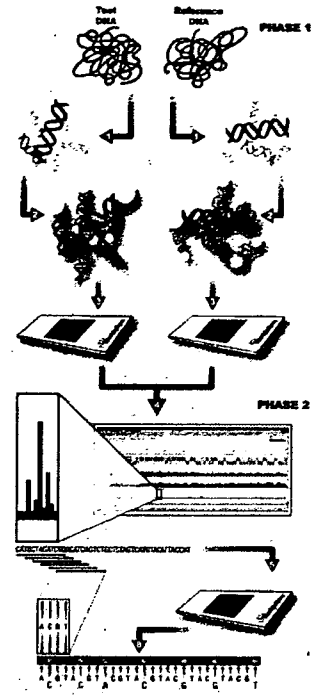
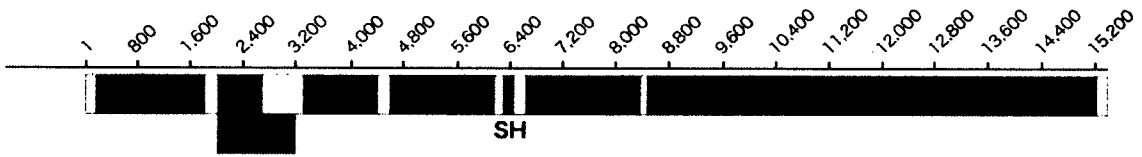


図1 CGS法の原理



昨年度ダイレクトシーケンス法で決定した部位

今年度CGS法で決定した全ゲノム:5代目無血清培地特異的変異箇所

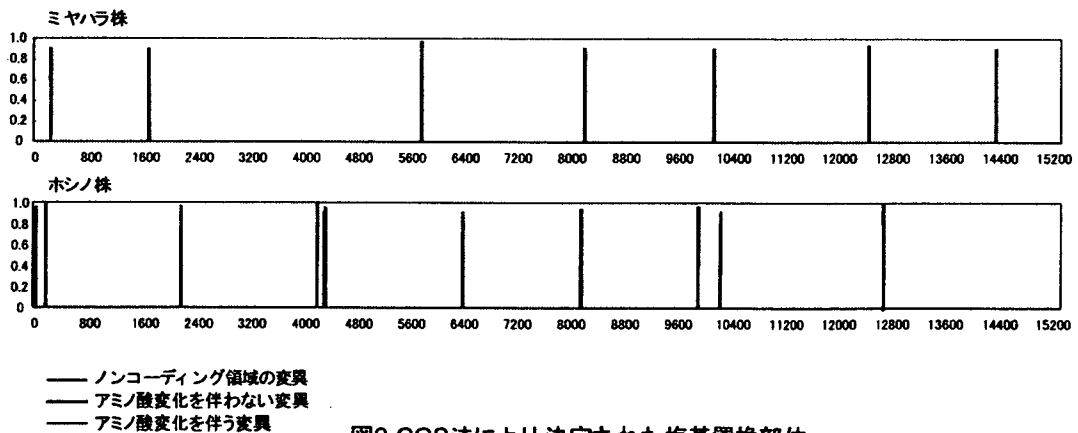


図2 CGS法により決定された塩基置換部位

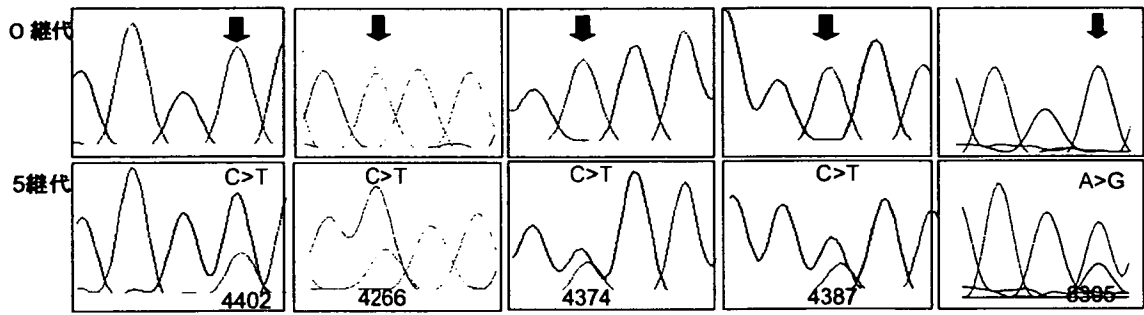


図3. ホシノ株のダイレクトシーケンス法による塩基置換部位の波形

動物由来成分を排除した麻疹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
研究協力者 堤 裕幸 札幌医科大学小児科 教授
研究協力者 市村 宏 金沢大学ウイルス学 教授
研究協力者 斉藤義弘 慈恵医科大学小児科 助手

研究要旨 有効な麻疹抑制対策の実行のためには安全で効果の高いワクチン開発の開発・導入が不可欠である。現状の製造過程ではウシ血清以外にも多くの動物由来成分の含有が認められるが、将来的にはヒト由来細胞の組織培養系による麻疹ワクチン製造も必要なものと考えられる。本研究では弱毒生麻疹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てきた。麻疹ワクチン製造過程における動物由来成分の排除は可能であったが、十分なウイルス量の回収は困難であった。弱毒生麻疹ワクチンの力価の判定においては Vero/hSLAM 細胞の有用性が確認されたが、ヒト由来細胞を使用した麻疹の培養系の確立には至らなかった。

A. 研究目的

有効な麻疹抑制対策の実行のためには安全で有効性の高いワクチン開発の開発・導入が不可欠である。またウイルス学および遺伝子学的特性に基づいたワクチンの評価および品質管理と安全性に関する科学的監視体制の確立も重要である。現在わが国で市販されている弱毒生麻疹ワクチンは 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。また製造過程においてはヒツジ腎細胞、サル腎細胞などでの継代が行われる場合もある。ウシ血清以外にもラクトアルブミン水酸化物、乳糖などのウシ乳由来成分やコレステロールなどのヒツジ毛由来成分を添加することもある。弱毒生麻疹ワクチンなどの製造過程において一般には細胞増殖の目的でウシ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。またヒト由来細胞の組織培養系の確立への応用の目的で Vero/hSLAM 細胞の有用性についても検討した。

B. 研究方法

本研究では弱毒生麻疹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。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。Dispase (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疹ワクチンを 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 (hSLAM) を受容体とするため、Vero/hSLAM でも力価を測定した。追跡可能であったものに関しては Vero/hSLAM 細胞で五代まで継代した後、H 遺伝子領域の変異の有無について検討した。

(倫理面への配慮)

人体由来の材料は使用せず、実験室的検討が主体であり、倫理面での配慮は特に必要としなかった。

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/hSLAM 細胞の有用性が確認された。また Vero/hSLAM 細胞は中和試験など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。麻疹ウイルス野生株の Vero/hSLAM 細胞での継代における変異はこれまで確認されていないが、ワクチン株に関しても継代過程における変異は確認されなかった。

麻疹ワクチン製造過程における動物由来成分の排除は可能であったが、十分なウイルス量の回収は困難であった。弱毒生麻疹ワクチンの力価の判定においては Vero/hSLAM 細胞の有用性が確認されたが、ヒト由来細胞を使用した麻疹の培養系の確立には至らなかった。

D. 考察

本研究の成果では直接的な学術的成果は得られなかったものの、研究過程に於いて Vero/hSLAM 細胞の有用性を確認し培養法の国際的な普及を実施した。ワクチンの製造過程においては、健康な動物に由来する原料を使用することが定められているが、将来的には動物由来成分の排除ならびにヒト由来細胞の組織培養系の確立が必要なものと考えられる。現行の弱毒生麻疹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、中和試験などへの応用が可能である。またウシ血清などの動物由来成分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麻疹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

ブタ胎由来の 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によってはウイルス収量の低下が推定された。

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。現状の製造過程ではウシ血清以外にも多くの動物由来成分の含有が認められるが、将来的にはヒト由来細胞の組織培養系による麻疹ワクチン製造も必要なものと考えられた。現行のワクチンと同等のウイルス量の獲得には現行のワクチン製造過程の見直しなども必要なものと判断された。

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

1). Numazaki K. Current problems of measles control in Japan and western pacific region. Vaccine 25; 3101-3104, 2007.

2. 学会発表

1). Numazaki K. Current strategies of measles elimination in western pacific region. 5th World Congress of the World Society for Pediatric Infectious Diseases, Bangkok, Thailand, November 15-18, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 用新案登録 なし
3. その他 なし

現在までのところ特記すべきこと無し

動物由来物質を除いた風しんワクチン開発に関する研究

分担研究者 駒瀬勝啓 国立感染症研究所 ウイルス第3部第2室長

研究要旨 無血清培地に馴化した Vero 細胞をもちいる事で、風疹ウイルスワクチン株は血清を用いた細胞培養法とほぼ同等なウイルス力価を得ることができ、また、少なくとも5代までの継代ではウイルスの E1 構造蛋白遺伝子に変化を認めず、弱毒マーカーと考えられている温度感受性の性状を保持している事を報告してきた。今回は他の構造遺伝子について配列の変化を検討し、変化がないことを示した。一方、弱毒生ウイルスワクチンにおいては、製造用細胞を変更すればワクチン株の性状が変化する可能性が考えられる。よって新たに非臨床試験、臨床試験を行い、製造承認を得る必要がある。今回は製造承認に必要なと考えられる経費についても考察した。

A. 研究目的

ワクチン等の生物製剤を製造するときには動物由来の成分を使用することがある。特に動物由来細胞をウイルス増殖の基質として用い、不活化行程を持たない生ウイルスワクチンでは、細胞由来あるいは、培養時にもちいる血清等動物由来成分からの何らかの外来性感染性因子が迷入する可能性を否定できない。健常な小児に広く接種するワクチンは、高い安全性が求められその製造プロセスから可能ならば動物由来の成分を除くことが望まれる。風しんワクチンはウズラ胚初代細胞、あるいはウサギ腎臓初代培養細胞にワクチン株を接種して製造する。これらの初代培養細胞の作製に用いる動物は SPF ではあるが、完全に感染性因子フリーとは言いがたい。又、その増殖にはウシ由来の血清をはじめ動物由来成分を用いている。動物由来の外来性感染性因子の危険性を最少にするには、安全性の確認された株化細胞を無血清培地で増殖させ、ワクチン製造に用いることが現実的に可能な方法として考えられる。本研究は、WHO、FDA でワクチンの製造に使用することが認可されている株化細胞 Vero 細胞を無血清培地に馴化させ、風しんワクチンの製造に用いる可能性をその開発経費も含めて検討したものである。

B. 研究方法

ワクチン株として T0-336 株を用いた。DM-201 培地で増殖させた Vero 細胞に接種し、5 代継代までのウイルスの E2 遺伝子、C 遺伝子を RT-PCR で増幅し塩基配列を決定した。また、WHO ガイドライン等から必要とされる臨床試験、非臨床試験等を考察し、ワクチンの製造承認に必要な経費を推定した。

C. 研究結果

- 無血清培地に馴化した Vero 細胞で5代継代したウイルスの E2, C 遺伝子の塩基配列には変化がな

かった。

- Vero 細胞の迷入ウイルス否定試験：細胞の迷入ウイルス否定試験として、MCB, WCB, CAL のウイルス否定試験を行うと約 3500 万円程度の委託試験費用がかかる。又、同様にワクチンシード株のウイルス否定試験には約 1500 万円程度の委託試験費が予想される。
- 非臨床試験：非臨床試験としては 2006 年より風疹ワクチンは麻疹・風疹混合ワクチンとして2回接種となった事から、反復投与試験が必要とされる可能性がある。単回投与試験（大動物、小動物）、反復投与試験、局所刺激試験、安全性薬理試験が必要と思われる。さらに妊娠時の接種は禁忌とされるが風疹ワクチンの場合、生殖発生毒性試験も必要かもしれない。想定される経費の概算は以下に示す。

試験	金額（千円）
単回投与試験（小動物）	1,000
単回投与試験（大動物）	4,000
反復投与試験	8,000
局所刺激試験	4,000
安全性薬理試験 （中枢神経系、心血管系、呼吸器系）	10,000
生殖発生毒性試験	8,000
合計	35,000

- 臨床試験：用量は現行のままと想定して、臨床試験としては少なくとも安全性の確認を目的として成人を対象とする第 I 相試験、並びに小児を対

象とする第Ⅲ相試験は必要であろう。臨床Ⅰ相試験を40名(20X2群)、Ⅲ相を400人程度で行うと7-8億程度が必要と思われる。

- 検定費の軽減: 迷入ウイルスの存在が否定された株化細胞を用いた場合、中間バルクで行われる迷入否定試験は不要になり、検定費は軽減される可能性がある。しかし、最初の5ロットは弱毒確認試験が必要であろう。

D. 考察

今までの結果から、無血清培地で培養した Vero 細胞を用いて動物由来物質を含まない風疹ワクチンを開発できる可能性はある。しかし、製造用細胞を変えるとワクチン株の性状の変化、あるいは異なる細胞由来物質の混入が予想され、例え同一のワクチンシードから製造したとしてもその安全性、有効性等を再度検証し、製造承認を得る必要がある。それらの経費を概算する事も本研究班の目的と考えている。示した様に、非臨床試験、臨床試験等に少なくとも10億円程度の開発経費がかかると推定される。さらにこの他に製造法の変更や市販後臨床試験等の費用も必要になってくる。また、現在は単味ワクチンの需要はほとんどなく、麻疹・風疹混合ワクチンとして市場にでている。開発の戦略にもよるが、混合ワクチンを開発するにはさらに開発経費が増大する可能性が考えられる。一方、国内の需要はMRワクチンで年間約200万ドーズ(2008年から5年間は約400万ドーズ)と限られており、これらの開発コストを考慮した価格の設定、あるいは開発コストのサポートなどの開発者へのインセンティブを与える様なシステムを模索する必要がある。

E. 健康危険情報: なし

F. 研究発表

1) 論文発表

- Haga T, Murayama N, Shimizu Y, Saito A, Sakamoto T, Morita T, Komase K, Nakayama T, Uchida K, Katayama T, Shinohara A, Koshimoto C, Sato H, Miyata H, Katahira K, Goto Y. Analysis of antibody response by temperature-sensitive measles vaccine strain in the cotton rat model. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2008 Feb 2.
- Momose, F., Kikuchi, Y., Komase, K., and Morikawa, Y., Visualization of micro-tubule-mediated transport of influenza viral progeny ribonucleoprotein. *Microbes Infect*. 2007 Oct;9(12-13): 1422-33.
- Fujino, M., Yoshida, N., Kimura, K., Zhou, J., Motegi, Y., Komase, K., Nakayama, T. Development of a new neutralization test for measles virus. *J Virol Methods*, 2007 142(1-2): 15-20.
- 駒瀬勝啓, 麻疹と麻疹ウイルス、診療研究、431: 10-16.

2) 学会発表:

- 海野幸子、大槻紀之、庵原俊昭、浅野喜造、岡田賢司、田代真人、駒瀬勝啓、風疹パネル血清候補の評価: 中和抗体価に関して、第48回日本臨床ウイルス学会、2007. 6. 2-3、富山
- 樋口彰、駒瀬勝啓、中山哲夫、SSPE(亜急性硬化性全脳炎)ウイルスの細胞融合能の解析、第55回日本ウイルス学会 2007. 10. 21-23、札幌
- 二宮健吾、中山哲夫、駒瀬勝啓、竹内薫、永田恭介、ムンプスウイルス星野株のリバースジェネティクス系構築、第55回日本ウイルス学会 2007. 10. 21-23、札幌
- 澤田成史、駒瀬勝啓、中山哲夫、RSウイルスの外殻蛋白を発現するキメラ麻疹ウイルスの作製、第55回日本ウイルス学会 2007. 10. 21-23、札幌
- 坂田真史、駒瀬勝啓、中山哲夫、弱毒風疹生ワクチンKRT株が示す温度感受性を担うゲノム領域の同定、第55回日本ウイルス学会 2007. 10. 21-23、札幌
- 百瀬文隆、菊池雄士、駒瀬勝啓、森川裕子、新規抗インフルエンザウイルス NP モノクローナル抗体によるウイルス RNP 複合体の可視化、第55回日本ウイルス学会 2007. 10. 21-23、札幌
- 大橋喬、菊池雄士、駒瀬勝啓、百瀬文隆、森川裕子、H5N1型高病原性鳥インフルエンザウイルス HA に結合する中和モノクローナル抗体のエピトープ解析、第55回日本ウイルス学会 2007. 10. 21-23、札幌
- 佐藤弘、多屋馨子、駒瀬勝啓、田代真人、岡部信彦、我が国における麻疹及び風疹に対する抗体保有状況(2006年度感染症流行予測調査より)、第11回日本ワクチン学会学術集会、2007. 12. 8-9、横浜
- 大槻紀之、田代真人、駒瀬勝啓、風しんワクチン株の全塩基配列の決定とワクチン品質管理への応用、第11回日本ワクチン学会学術集会、2007. 12. 8-9、横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定をふくむ)

- 1) 特許; 特になし
- 2) 実用新案登録; なし
- 3) その他; なし

「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19年度分担研究報告書

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 : 元 農林水産省動物医薬品検査所

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牛ポリオーマウイルス (BPyV) の遺伝子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なっている。また牛血清に対する γ 線照射は本遺伝子混入リスクの低減化に効果があることが示唆されている。しかしながら、感染性を有するウイルスを用いた研究は実施していない。本年度の研究では感染性を有するウイルスの分離を目的とし、各種細胞に BPyV 遺伝子陽性の牛血清を接種しウイルス分離を試みた。その結果いずれの細胞でもウイルス分離は成功しなかった。

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については、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。

しかしながら BPyV はヒトやウシに病原性を持たないことや、十分なウイルス培養系が確立されていない等のことからその不活化方法や検出方法については十分に調査されていない。しかしながら、ウイルスの除去・不活化の方法を検討する際には感染性を有するウイルスとその培養系が必要となる。そこで、本年度の研究では細胞培養用ウシ血清から BPyV の分離を目的とし各種細胞に試料を接種しウイルスの分離を試みた。

B. 研究方法

材料

(細胞) 4種の株化細胞 (齧歯類由来細胞 HmLu-1、ウシ由来細胞 MDBK、サル由来 Vero 細胞、ヒト由来 MRC-5 細胞) 及び生ワクチンの

製造に広く使用されているニワトリ胚初代線維芽細胞 (CEF) の計5種の細胞。なお、各細胞の継代時、調製には、BPyV 遺伝子が検出されないウシ血清を用い培養を行っている。

(ウシ血清) γ 線末照射かつ比較的長鎖の BPyV 遺伝子断片が PCR で検出された市販の細胞培養用ウシ血清2ロット及び国内で飼育されている健康牛のウシ血清2頭分を試料として用いた方法

25cm²培養フラスコに単層培養状態となった各細胞に試料を 0.5ml 接種し、37°C 1時間の処理後ウシ血清を含まない培地を加え7日間培養後、細胞ごと凍結融解を3度実施し遠心操作を加え細胞成分を除去した後、新たな単層培養状態の細胞に接種した。この操作を5代目まで実施し5代目の細胞並びに培養上清から DNA を抽出し PCR 法で長鎖の BPyV 遺伝子 (約 2Kbp) の検出を行った。さらに株化細胞では同様に血清を接種し、3週間培養を実施し培養期間終了後、細胞並びに培養上清から DNA を抽出し PCR 法で BPyV 遺伝子の検出を行った。なお、培養期間中は細胞の状態に応じ、仔ヒツジ血清を含む培地を使用し培地交換を実施した。

C. 研究結果

5代継代したサンプルからはいずれの細胞からも BPyV 遺伝子が検出されず、BPyV の分離はできなかったものと判断した。

また3週間連続培養を実施した細胞の内 MRC-5 及び HmLu-1 細胞では良好な細胞の状態が3週間維持できなかったため培養期間2週間でサンプリングを実施した。しかしながら3週間培養した MDBK、Vero 細胞、2週間培養の MRC-5、HimLu-1 細胞のいずれのサンプルからも5代継代サンプルと同様 BPyV 遺伝子が検出され