

ず、BPyV の分離はできなかつたものと判断した。

D. 考察

海外の報告では、感染性を有する BPyV の検出には MDBK 細胞を用い長期間の培養期間を必要とするとの報告がある(Narin C ら、Biologicals Dec;31(4):303-306)。今回の研究において BPyV が分離されなかつた理由として 1)血清に感染性を有するウイルスが存在しなかつた、2)培養期間が短くウイルスの分離が適わなかつた、3)感受性がない又は低い細胞を使用した、等が考えられるが陽性コントロールとなるウイルスがないため原因が特定できておらず、十分な検討が研究期間内に実施できなかつた。またウイルス分離が行えなかつたため、不活化方法についての検討も行えなかつた。

しかしながら、ワクチン製造の際に使用するウシ血清選択の際には、血清自体での PCR による長鎖 BPyV 遺伝子の否定だけではなく、製造に用いる細胞に使用予定血清を接種し、一定期間培養を実施しその上清や細胞から BPyV 遺伝子が検出されないことを一つの血清選択の際の指標として用いることが BPyV の混入リスクの低減化に繋がることは明らかであり、血清への γ 線の照射、血清からの BPyV 遺伝子の検出の否定などと組み合わせることによりよりリスクを低減化できると予想される。

E. 結論

5 種の細胞及び 4 種のウシ血清の組み合わせで BPyV の分離を試みたものの、BPyV は分離できなかつた。

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

なし

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－

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 田島茂、小滝徹 (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。

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。しかしこの場合、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、引き続き無血清培地に馴化した Vero 細胞の凍結保存および解凍による細胞経代が可能になるまで順化した。この細胞を Vero-SFM 株と命名し、日本脳炎ウイルスおよびデングウイルスに対する感受性を検討した。

B. 研究方法

1. 無血清培地に馴化した Vero 細胞系の樹立 Vero 細胞 (9013 株) に対し、上記無血清培地

VP-SFM (Invitrogen 社) を用いて継代 (15 継代) し、凍結保存したものを解凍し、継代ごとに凍結保存し再び解凍し、Vero-SFM 培地による増殖を確認した。

2. 上記 VP-SPF 適応 Vero 細胞 (Vero-SFM 株) のフラビウイルスに対する感受性をデングウイルス 2 型および日本脳炎ウイルス (JEV) を用いて検討した。18 継代目の Vero-SFM 細胞と親株細胞である Vero9013 細胞を用いた。

3. Vero-SFM 細胞のフラビウイルスに対する感受性の検討

i. デングウイルスに対する感受性

Vero-SFM 細胞および Vero9013 細胞を 6 穴プレートに用意し、デングウイルス 2 型 (NC 株) を MOI:0.1 で接種し、1 時間後に 1%メチルセルロース含有の培地を重層し、7 日目にホルマリン固定後、プラークを染色観察した。

また、Vero-SFM 細胞と Vero9013 細胞を 12 穴プレートに用意し、デングウイルス 2 型を MOI:0.1 で接種後、2 日目、4 日目、6 日目、7 日目に上清を回収し、ウイルス増殖の指標として NS1 抗原量を ELISA キット (Dengue Early ELISA; PanBio 社) により測定した。

ii. 日本脳炎ウイルスに対する感受性

Vero-SFM 細胞と Vero9013 細胞を 12 穴プレ

ートに用意し、デングウイルス 2 型を MOI:0.5 で接種後、2 日目、4 日目、6 日目、7 日目に上清を回収し、ウイルス増殖の指標として、ウイルス抗原検出 ELISA によりウイルス抗原量を検討した。抗原検出 ELISA は、抗日本脳炎ウイルス単クローン抗体 (JE503) をプレートに固着化し、ウイルス上清を 37°C・60 分間反応させ、緩衝液で 6 回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識した抗フラビウイルス単クローン抗体 (4G2) により検出した。

C. 研究結果

(1) 無血清培地による Vero 細胞の継代維持と凍結保存

無血清培地 (VP-SFM 培地) による場培養 Vero 細胞は、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 継代目辺りから細胞がしっかりとプラスチック底面に付着するようになり、トリプシン・EDTA 液を二度加えなければはがれないようになった。この細胞を Vero-SFM 細胞と命名し、15 継代後、凍結保存した。解冻後 VP-SFM および 10%MEM で培養したところ、同等の増殖力を示したため、以後 20 継代まで継代ごとに凍結保存し、1 週間後再び解冻し VP-SFM により培養した。解冻時、生細胞率はいずれも 80%~90%であった。いずれの解冻後も VP-SFM 培地により十分な増殖力を示した。

(2) Vero-SFM 細胞のフラビウイルスに対する感受性の検討

i. デングウイルスに対するプラーク形成能

デングウイルスは、通常 Vero 細胞や BHK 細胞に対して強い細胞変性を生じさせない。したがってプラークを形成させることは必ずしも容易でない場合がある。そこで、デングウイルスによるプラーク形成能を検討した結果、プラークの抜けかたはそれ程明瞭ではないが、Vero-SFM では、Vero9013 細胞に比べて、大きなプラークが接種後 7 日目に観察された (図 1)。

ii. デングウイルスおよび日本脳炎ウイルスの増殖能の検討

デングウイルスはどちらの Vero 細胞 (Vero-SFM、Vero9013) に対しても強い CPE は起こさなかったが、ウイルス増殖の指標とした NS1 蛋白抗原量はほぼ同等の増殖量を示した。一方、日本脳炎ウイルスはどちらの Vero 細胞にも強い細胞変性効果をきたした。上清中の日本脳炎ウイルス抗原量を、抗原検出 ELISA により測定したところ、図 3 の如く Vero-SFM 細胞では、接種後 2 日目をピークに徐々に抗原量は漸減した。接種後 2 日目の日本脳炎ウイルス抗原量は、Vero-SFM および Vero9013 とともに同等であった。そして Vero9013 ではその抗原量はほぼ接種後 7 日目まで維持された。両細

胞の細胞変性の違いは、Vero9013 に比べて Vero-SFM が接種後 4 日目頃より変性した細胞がシート状にはがれた始めたことであった。

D. 考察

平成 17 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とにより、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。また、新型インフルエンザワクチンの製造に関しても、鶏卵を用いない組織培養不活化ワクチンが緊急の増産には有用である。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 (FCS) 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。

我々は平成 18 年度までに無血清培地で 16 代以上継代し、無血清培地に適応した Vero 細胞を作製した。この細胞を 15 代および 16 代目で凍結保存した。以後 20 継代まで継代ごとに凍結保存し、1 週間後再び解冻し VP-SFM により培養した。同様の凍結・解冻を 20 継代目まで繰り返した結果、無血清培地 (VP-SFM 培地) で十分な増殖力が確認された。その結果、無血清培地に適応した Vero 細胞であると考え Vero-SFM 細胞と命名した。この Vero-SFM 細胞は、デングウイルスに対しては優れたプラーク形成能を示した。しかし、NS1 抗原量の測定結果からデングウイルス増殖力においては、両細胞にそれ程大きな差はないと考えられた。一方、日本脳炎ウイルスに関しては、2 日目まではウイルス抗原量は、Vero-SFM 細胞と Vero9013 細胞に大きな差はなかったが、その後減少した。これはおそらくつよい CPE のため細胞がシート状に壁面から剥がれたことに関連するものと考えられる。この解決策としてはウイルス接種量を減らす等の工夫が必要であると思われる。

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 16 継代したが、明らかな細胞増殖能の低下は認めなかった。また、15 継代以後、VP-SFM 培地で凍結解冻を繰り返したところ十分に培養継続が可能であることが確認され、Vero-SFM 細胞と命名した。この細胞のデングウイルスに対する増殖能に差はなく、プラーク形成能は親株に比べて高かった。一方、日本脳炎ウイルスに対しては強い細胞変性をきたし、シート状に剥がれる欠点を確認された。日本脳炎ウイルスに関しては、接種濃度を工夫する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

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、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。

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。最近、同じ岡株を用いた帯状疱疹ワクチンが米国で承認された。日本でも免疫力の上昇を目的とした成人への適用拡大が承認されている。

水痘ワクチンの弱毒化のメカニズムは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。ワクチン株(V-Oka)とその親株(P-Oka)の約15万塩基の全配列の比較から、1)両株間の差異は42箇所であること、2)いくつかの配列部位は、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。100%がワクチン株の配列部位もある一方で野生型が混じっている配列部位もあることから、水痘ワクチンは、いわゆるmixed populationであることが知ら

れている。従って、異なる製造工程を経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。我々はこれまでに蛍光エネルギー移動FRETを応用したVZV遺伝子の多様性解析法を導入し、ワクチン株に特徴的な塩基置換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を確立してきた。今回、この方法を用いて内外の水痘ワクチン製剤の比較を行った。

また、ワクチン株-親株間及び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。

B. 研究方法

1) 細胞培養、VZVの増殖

VZVレポーター細胞MV9G(Wang et al, 2006)及びヒト2倍体細胞HLF(human lung fibroblast)は、10%牛胎児血清(FBS)添加Dulbecco's MEM (DMEM)培地にて培養した。VZVの培養にはHLF細胞を用いた。

2) 免疫染色

フォルマリン固定した感染細胞を0.5% TritonXで処理後、抗VZV IE62モノクローナル抗体と反応させ、ペルオキシダーゼ標識抗体と反応後、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。ワクチン製剤は用法に従い水で溶解し、QIAamp DNAm mini kit (QIAGEN)を用いて精製した。

4) 非対称PCRとTm値解析

2つのプライマーの量を変えた非対称PCRを50 μ lのスケールにて、95 $^{\circ}$ C10分の初期ステップ、95 $^{\circ}$ C30秒、58 $^{\circ}$ C30秒、72 $^{\circ}$ C30秒の40-45サイクル、72 $^{\circ}$ C4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LightCycler(ロシュ)によるmelting curve analysisに用いた。LightCycler条件は95 $^{\circ}$ C1秒、0.95 $^{\circ}$ C/秒で40 $^{\circ}$ Cまで冷却後4秒保温、0.4 $^{\circ}$ C/秒で95 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C間のデータシートで得られる0.2 $^{\circ}$ Cごとの蛍光測定値を積算して求めた。PCRプライマー、LightCyclerプローブの配列は昨年度報告書参照。

5) VZVレポーター細胞アッセイ

96穴プレートにまきこんだVZVレポーター細胞MV9G(Wang et al, 2006)に細胞フリーのウイルスもしくはウイルス感染細胞を加え、2-3日後にDual-Glo Luciferase Assay System (Promega社)により化学発光反応させ、96穴プレート対応のルミノメーターにて相対的な発光値を測定した。

C. 研究結果

1) Tm値解析に基づくワクチンの評価

昨年度までの研究に基づき、至適化した非対称PCR及びMelting curve analysisの条件を用いて、本邦メーカー、本邦メーカーよりライセンス供与された海外メーカー3社(M社、S社、G社)、及びライセンス供与を受けずに由来不明のウイルスシードを用いている海外メーカー3社(C社、D社、K社)の各製剤について、そのVZVの15遺伝子部位のワクチン型及び野生型配列の割合を検討した。その結果、以下の事が明らかとなった。

a) Tm値解析に基づき推定したメルク社ワクチンの各部位におけるワクチン型と野生型の割合は、ORF62(107257)部位を除き、Quinlivanら(2007)が塩基配列解析に基づき推定した割

合とほぼ一致した。ORF62(107257)部位については、他のグループなどの報告と本研究の結果が一致していることから、Quinlivanらの論文図表の誤りと推測される(表1)。

b) どの製剤においてもORF62(106383)、ORF62(107257)、ORF62(107373)部位は、完全にワクチン型のみで構成されていた。

c) 本邦メーカー製剤とライセンス供与を受けているS社、G社の製剤は全般的に各部位で類似していたが、メルク社についてはORF6、ORF9Aなどいくつかの部位で異なっていた(表1)。

d) ライセンス供与を受けていないC社、D社、K社の製剤は、さまざまな部位で野生型もしくはワクチン型の一方に割合が多くなり、明らかに日本で樹立されたワクチン株から異なっていた(図1、表1)。

2) VZVレポーター細胞株での反応性の比較

VZV前初期蛋白IE62による初期蛋白プロモーターの活性化を利用してウイルス力価を定量的に測定できるVZVレポーター細胞株をすでに報告している。Gomiらによりワクチン株と野生株の前初期遺伝子IE62遺伝子の一過性発現系においてプロモーター活性化能に差があることが示されているので、ワクチン株-親株間及びワクチン間の差異を、レポーター細胞を用いて生物学的な方法で検出できないかと考え、レポーター細胞株での反応性を比較したが、ワクチンと野生株間(図2)及びワクチン製剤間で差は認めなかった。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。

D. 考察

ワクチン株に特徴的な42塩基置換の約1/3についてLightCyclerのTm値解析により内外7社の製剤を比較検討した。ライセンス供与を受けているメルク社の製剤が、本邦メーカー及びそのライセンス供与を受けた海外メーカー2社に比べ変化が大きかった。メルク社製剤のシェアが大きい米国においては、軽微ではあるものを含め水痘ワクチン接種に伴う副反応が一定の頻度で報告されており、ほとんど副反応報告のない本邦との間にこの点で差がある。メルク社のワクチンの1ドーズ当たりのウイルス力価は基準ぎりぎりであり、現在本邦にて用いられている製剤の力価まで上げると高頻度の副反応が発生する懸念がある。今回測定した塩基置換

の混在部位などを含め、副反応から分離される株についてさらに解析(一部報告あり、表1)を進める必要があると思われる。一方、非ライセンス製剤では、混在ではなくワクチン型もしくは野生型のどちらか一方に偏る傾向がある。シードが不明であることからみて、長期培養により選択的にどちらかの部位に変化したと考えられる。特定部位がワクチン型ないしは野生型の一方に偏ったpopulationになった場合、副作用もしくは効果が果たして保証されるかは臨床試験が行われない限り検証の方法がない。しかしながら、mixed populationの各構成要素から新たな製剤を作製し臨床試験を実施することが現実的でないことを考えると、現在のmixed populationの構成要素に変化がないことを品質管理の基準とすることが、低い副反応・高いワクチン効果を確保するうえで適切と考えられる。従って、遺伝子レベルでの検査法を水痘ワクチン製剤の品質管理基準として早期に導入

できるようにメーカーと協力しながらさらに検討していくことが重要と思われる。

E. 結論

Tm値解析を用いることにより、遺伝子レベルで本来のワクチン株配列からの逸脱がある製剤を指摘できる可能性を示した。

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 Tm値解析によるワクチン製剤の遺伝子レベルでの評価

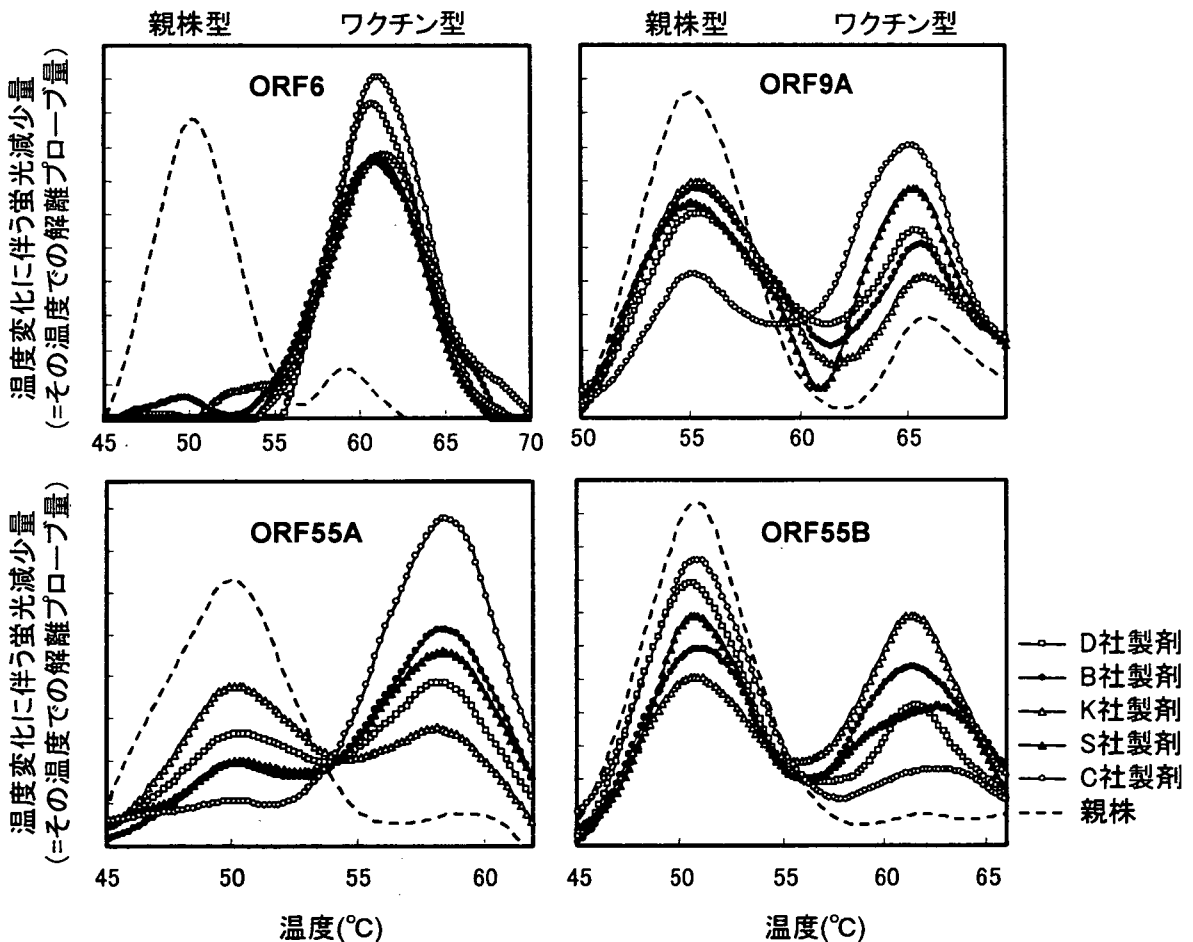


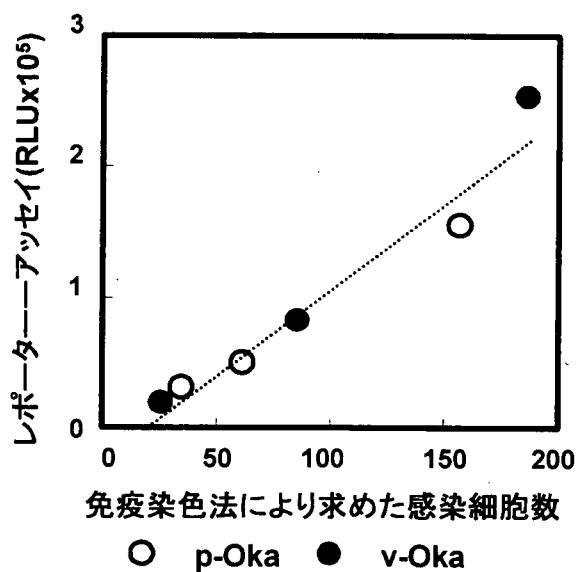
表1 ワクチン製剤の遺伝子レベルでの評価と副反応

部位	アミノ酸変異	接種後発疹分離株 野生型株の割合(%)		製剤中の野生型配列の割合			
		Loparev, 2007	Quinlivan, 2007	Merck*	Merck #	Biken #	C社 #
6	N	62	60			none	none
9A	Y	82	90			half	
10	Y	100	90			half	
21	Y	100	100	100		most	
31B	Y	74	50		two third	two third	
39	Y	41	50	44	half	half	
50	Y	92	70	70	two third	two third	
51	N	95	70			two third	
52	Y	87	100	92	two third	two third	
54	N	21	20		small	none	none
55A	Y	67	80			small	small
55B	Y	95	80		half	half	most
59	Y	41	70	71	two third	two third	most
62 (105431)	Y	44	70	78			
62 (105477)	Y	na	90			none	
62 (105665)	Y	(half?)	20	9		none	
62 (105826)	N	0	0	0			
62 (106383)	Y	0	0	0	none	none	none
62 (107257)	N	49	35		none	none	none
62 (107373)	Y	0	0	0	none	none	none
62 (108959)	Y	51	100	100		most	all
64	Y	59	100			half	

* 塩基配列解析による(Quinlivan 2007)

本研究Tm値解析による

図2 ワクチン株野生株間のレポーター細胞活性化の比較



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。

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。

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、Opti-Pro SFM : GIBCO 社、VP-SFM : GIBCO 社) を検討し、その可能性を探ることを目的とした。また、今回は血清代替添加剤 (SynQ : 日本ジェネティクス社) の検討も加えて行うこととした。研究対象として昨年に引き続き、A 型肝炎ワクチンの製造に用いる GL37 細胞 (アフリカミドリザル腎細胞由来) 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

昨年度までの結果より、今回は細胞剥離条件を改善する検討を行った。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、反応時間を変化させた際の GL37 細胞に与える影響について以下の確認をした。

- ・ 細胞剥離数
- ・ 細胞増殖性
- ・ 生存率

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, 25% TrypLE 10 分反応, 25% TrypLE 20 分反応, 25% TrypLE 30 分反応させたサンプルを比較した。尚、TrypLE の調製には、TrypLE 成分である 1mM EDTA を用いて希釈を行った。

(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、無血清培地による細胞増殖性と HAV 増殖性を検討した。今回は EX-Cell Vero、Opti-Pro SFM、VP-SFM の 3 つの無血清培地について検討し、さらに血清代替添加剤の SynQ

を用いて検討を行った。SynQ は RPMI1640(哺乳類細胞培養基本培地; GIBCO 社)に最適化された血清代替添加剤であることから、RPMI1640 も同時に検討を行うこととした。

馴化作業は対照培地と各種検討した培地の混合比率を継代時に変えることで行った。(【検討培地※ 0%】→【検討培地※ 25%】→【検討培地※ 50%】→【検討培地※ 75%】→【検討培地※ 100%】→【検討培地※ 100%】→【検討培地※ 100%】)

※表 1 参照

表 1

検討培地	
MEM+10%NBS (対照培地)	MEM+SynQ
EX-Cell Vero	EX-Cell Vero+SynQ
Opti-Pro SFM	Opti-Pro SFM+SynQ
VP-SFM	VP-SFM+SynQ
RPMI1640	RPMI1640+SynQ

HAV 増殖性の検討については、各検討培地に馴化された細胞に対し、m.o.i=0.1 でウイルス接種を行った。

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 の反応時間を変えることにより、細胞剥離効率を改善することが出来た。225cm² フラスコにおける細胞剥離数は、トリプシンに比べ少ないものの、TrypLE 反応時間を延ばすことで細胞剥離効率の悪さを改善していた(図 1)。850cm² ローラーボトルにおいても TrypLE 反応時間を延ばすことで細胞剥離効率を改善しており、トリプシンと同程度であった(図 2)。

(2) 無血清培地の検討

各種検討培地(表 1)において培養を行った結果、対照培地以外の検討培地では何らかの細胞形状に異常が見られた。RPMI1640 では馴化途中で細胞が死滅し、EX-Cell Vero 及び Opti-Pro

SFM、EX-Cell Vero+SynQ 以外の細胞では細胞増殖速度が遅くなった。継代可能な細胞に対し、HAV を接種したところ対照培地、EX-Cell Vero、Opti-Pro SFM 以外の細胞は全て増殖することが出来ず、死滅した。増殖した EX-Cell Vero、Opti-Pro SFM の細胞に関しても、HAV の増殖は認められなかった(表 2)。

表 2

検討培地	HAV 抗原含量 (μg/mL)
MEM+10%NBS (対照培地)	1.185
EX-Cell Vero	0.009
Opti-Pro SFM	0.006

D. 考察

GL37 細胞における TrypLE の細胞剥離効率を向上させる為に反応時間を延ばした結果、細胞剥離効率が改善された。さらにトリプシンを用いて剥離した細胞に比べ生存率、増殖率ともに同程度以上であった。昨年度までに、細胞増殖性及びウイルス増殖性に関してトリプシンと同程度の結果が得られていることから、今回の結果と合わせて製造導入に向けた可能性が得られた。225cm² フラスコにおいて TrypLE の細胞剥離効率が悪いが、850cm² ローラーボトルでは同じ様な傾向は見られない。850cm² ローラーボトルでは、TrypLE 反応時に回転させながら反応させるので、細胞剥離効率が良いと推測される。225cm² フラスコでは静置状態で反応させていることから、TrypLE 反応時に振とう等を行うことで細胞剥離効率向上が期待できる。

無血清培地の検討について、今回の培養では全ての無血清培地において細胞形状の異常が観察され、細胞増殖速度に影響が出るものも観察された。加えて、HAV が無血清培地で培養した細胞ではほぼ増殖できなかったことから、無血清培地馴化の過程で細胞の特性に変化が起きたと考えられる。また、今回検討した血清代替添加剤 SynQ はある程度細胞の生存を可能にしたが、細胞形状に異常が出る現象は同じであった。GL37 細胞に対する成長阻害因子や増殖阻害因子が存在している可能性が考えられる。

EX-Cell Vero 及び Opti-Pro SFM に関しては細胞増殖性が対照培地と同程度であったことから無血清培地への適応が期待されるが、HAV が増殖可能な細胞を確立することが今後の課題である。

E. 結論

組換え型トリプシン様酵素 (TrypLE) については、細胞剥離効率の向上を示す結果が得られたことから、トリプシンの代替品として十分な能力を持つことが示唆された。

無血清培地に関しては、細胞増殖が可能な培地の候補を数種確認したが、HAV の増殖可能な細胞を確立するまでには至らなかった。

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

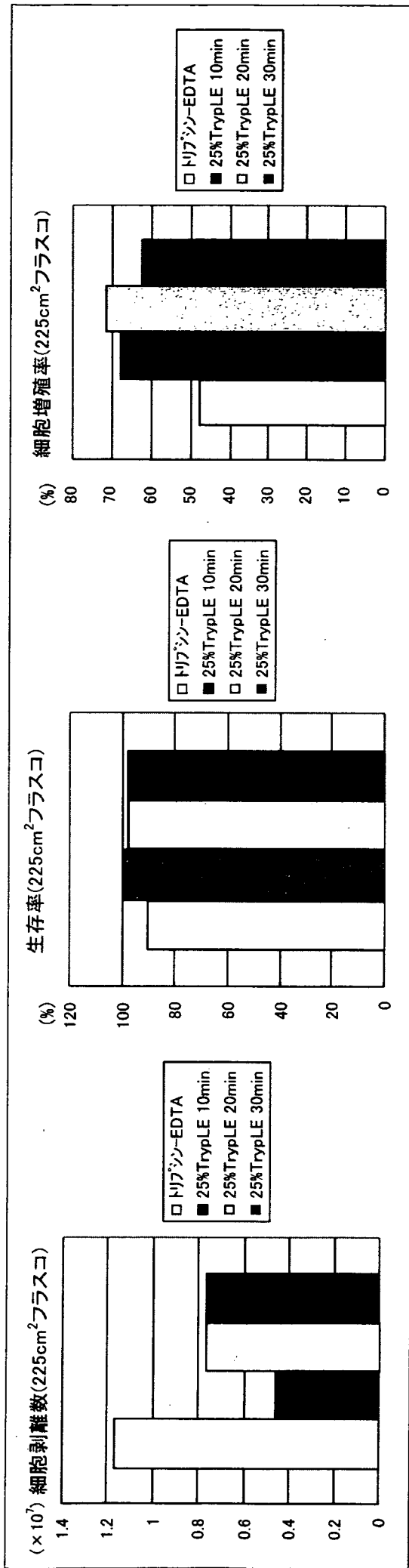


図 1 225cm² フラスコにおける TrypLE の影響

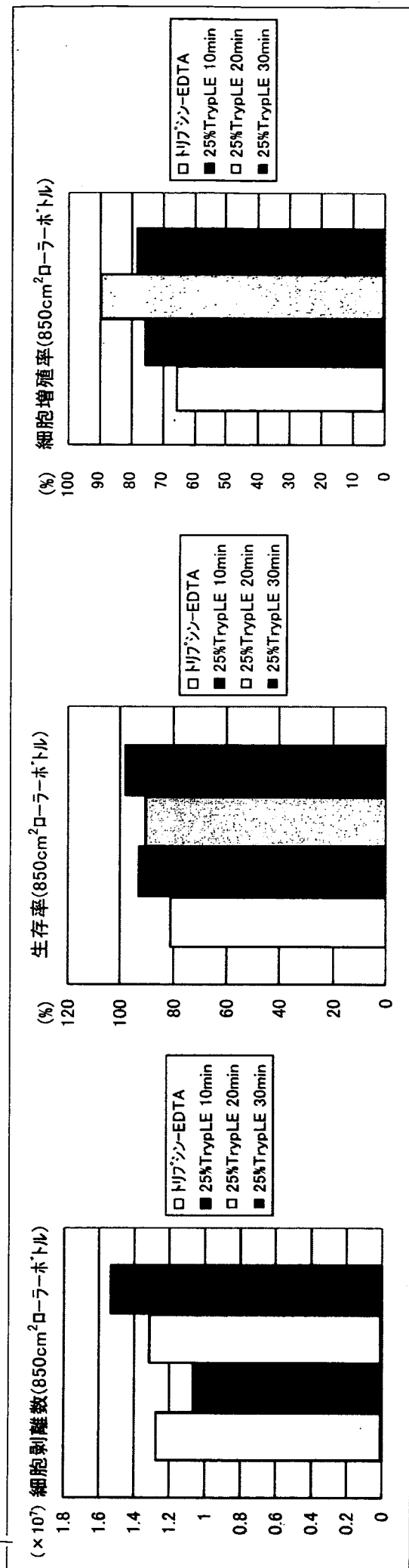


図 2 850cm² ローラーボトルにおける TrypLE の影響

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。

A. 研究目的

生ワクチンの製造において、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生ワクチンの製造方法の開発を目的として、細胞の処理に使用するトリプシンの濃度を下げることにより無血清培地の使用が可能であること、ウイルス培養液として使用する培地と無血清培地との混合が必要であること等の知見を得た。また、得られたウイルスについて、血清を用いて培養したウイルスと比較した結果、ウイルスの増殖性及びプラークサイズは同等の性状であることが確認された。本研究では、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、MR ワクチンを作製し、その安定性について現行の MR ワクチンとの比較することを目的とした。

B. 研究方法

1. MR ワクチンの作製

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、表 1 に示す MR ワクチンの成分及び分量になるように安定剤等を添加して凍結乾燥を実施し、MR ワクチンを作製した。この小分製品を以下、MR ワクチン(無血清)とした。尚、現行の MR ワクチンは、同時期に製造した市販用の小分製品(ミールビック Lot : MR006)を使用し、これを MR ワクチン(血清)とした。

表 1 MR ワクチンの成分及び分量

成分	分量
麻しんウイルス	5000PFU 以上
風しんウイルス	1000PFU 以上
リン酸水素ナトリウム	0.7mg
リン酸二水素ナトリウム	0.07mg
乳糖水和物	18mg
D-ソルビトール	5.4mg
L-グルタミン酸ナトリウム	1.8mg
TCM-199	残量

2. 安定性試験

安定性試験の保存条件は温度 25°C、相対湿度 60%RH とし、それぞれを 0、1、2、3 カ月間保存した。保存した検体は、力価試験(麻しん)、力価試験(風しん)、含湿度試験及び pH 試験を実施した。

C. 研究結果

1. 力価試験(麻しん)

麻しんウイルスの力価試験成績を表 2 及び図 1 に示した。MR ワクチン(無血清)と MR ワクチン(血清)の麻しんウイルスの力価はいずれのワクチンも保存 2 カ月まで経時的な低下が認められたが、保存 2 カ月から保存 3 カ月までは顕著な低下は認められず、同様な傾向を示した。

表2 麻疹ウイルスの力価試験成績
(log₁₀PFU/0.5mL)

検体	保存期間(月)			
	0	1	2	3
MR ワクチン (無血清)	5.76*	5.04	4.69	4.65
MR ワクチン (血清)	5.61	5.03	4.64	4.57

※：試験回数3回の平均値

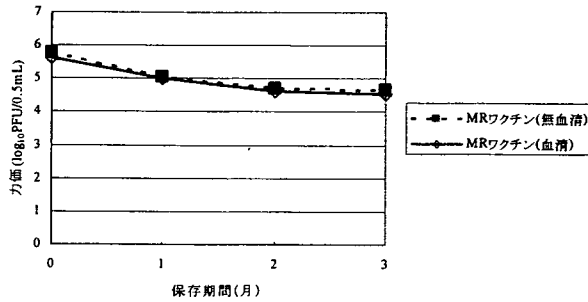


図1 麻疹ウイルスの力価試験成績

2. 力価試験(風しん)

風しんウイルスの力価試験成績を表3及び図2に示した。MR ワクチン(無血清)と MR ワクチン(血清)の風しんウイルスの力価はいずれのワクチンも保存3カ月まで経時的にわずかな低下が認められた。

表3 風しんウイルスの力価試験成績
(log₁₀PFU/0.5mL)

検体	保存期間(月)			
	0	1	2	3
MR ワクチン (無血清)	4.47*	4.33	4.15	4.11
MR ワクチン (血清)	4.52	4.34	4.31	4.25

※：試験回数3回の平均値

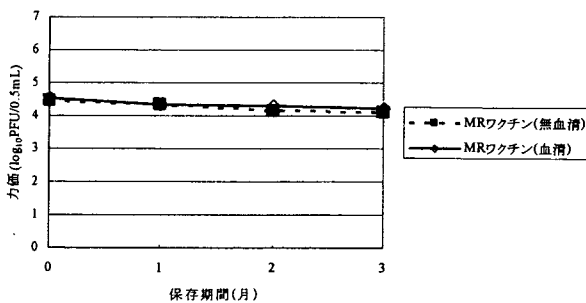


図2 風しんウイルスの力価試験成績

3. 含湿度試験

含湿度試験成績を表4及び図3に示した。MR

ワクチン(無血清)と MR ワクチン(血清)の含湿度は同様な低下の傾向を示し、3カ月の保存期間を通じて顕著な変動が認められなかった。

表4 含湿度試験成績(%)

検体	保存期間(月)			
	0	1	2	3
MR ワクチン (無血清)	1.1*	1.1	1.3	1.2
MR ワクチン (血清)	0.9	1.0	1.1	1.0

※：試験回数3回の平均値

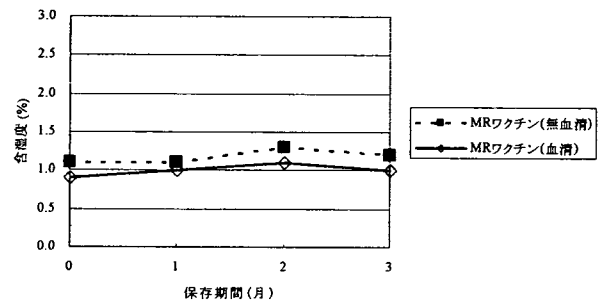


図3 含湿度試験成績

4. pH 試験

pH 試験成績を表5及び図4に示した。MR ワクチン(無血清)と MR ワクチン(血清)の pH は同様な低下の傾向を示し、3カ月の保存期間を通じて顕著な変動が認められなかった。

表5 pH 試験成績

検体	保存期間(月)			
	0	1	2	3
MR ワクチン (無血清)	8.0*	7.9	8.0	8.0
MR ワクチン (血清)	7.9	7.8	7.9	7.9

※：試験回数3回の平均値

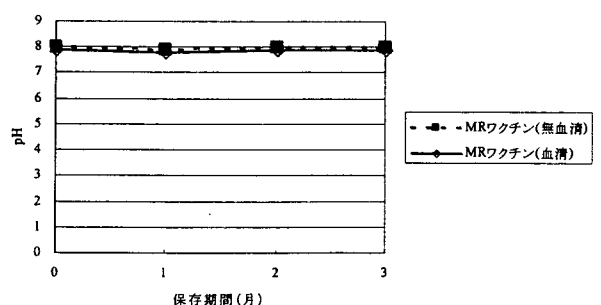


図4 pH 試験成績

D. 考察

仔牛血清を使用しない生ワクチンの製造方法により製造した麻しんウイルス及び風しんウイルスを用いてMRワクチンを作製し、そ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、MRワクチン(無血清)とMRワクチン(血清)の麻しんウイルスの力価は共に経時的に低下が認められ、また風しんウイルスの力価は共にわずかな低下が認められた。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、いずれも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で調製したMRワクチンは血清で培養したウイルスで調製したMRワクチンと同等の安定性を有することが確認できた。

E. 結論

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は仔牛血清で培養したウイルスとワクチンにしたときの性状が同等であることが示唆された。

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
なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

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：李 富雄（社）北里研究所 生物製剤研究所

【研究要旨】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℃でも増殖が認められ33℃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。

【研究目的】

AIK-C 株は Edmonston wild strain から我が国で独自に開発された株で、ヒツジ腎細胞で継代しニワトリ胎児胚細胞で 32.5℃の低温で small plaque cloning し樹立された。従って、39℃の高温では増殖できずに 33℃の増殖と比較すると 1/10,000 である温度感受性 (temperature sensitivity; ts) のマーカーを持っている。また、Vero 細胞に接種し small plaque を形成することが特徴である。ts の性状は P タンパク 439 位の Pro, small plaque は F タンパク 278 位の Leu がその性状に強く関連する遺伝子領域であることを報告した。AIK-C シードにおいて small plaque type の F278Leu と large plaque type の F278Phe が混在していることがわかっている。

AIK-C ワクチン株を製造する CE 細胞を VP-SFM 培地を無血清培地で培養を検討し無血清培地での安定性を検討するために8代継代しその性状を解析した。

【研究方法】

1) ウイルスの継代 VP-SFM 培地を用いて CE 細胞を培養しワクチン原液 M-17 を接種継代し (CEC-1 から CEC-8) のウイルス液を採取し検査まで-70℃以下に保存した。

2) ウイルス感染価の測定 ワクチン原液を継代したウイルス液を B95a 細胞、Vero 細胞に接種し 33℃、35℃、37℃、39℃の異なる培養温度で培養し感染1, 3, 5, 7日に培養上清を採取しウイルス感染価は 96 穴プレートに培養した B95a 細胞を用いて細胞変性効果を指標にウイルス感染価を測定した。

3) 塩基配列の決定 P タンパク領域に設定したプライマーを用いて遺伝子を増幅し dye terminator 法で塩基配列を検討した。

【結果】

1) ワクチンウイルスの安定性

無血清培地で8代継代することでのワクチンウイルスの安定性を検討した8代継代した CEC-8 を Vero 細胞に接種し 33℃、35℃、37℃、39℃で培養し7日後の上清中のウイルス感染価を測定し、また B95a 細胞に接種し同様に上清中の感染価を測定し結果を図1に示した。いずれも 33℃での増殖が良く培養温度が上昇すると産生するウイルス感染価は減少し 39℃の Vero 細胞培養では CPE は観察されたが上清中のウイルス感染価は検出されなかった。B95a 細胞に接種すると培養温度を上げると上清中のウイルス力価は減少し 39℃でも上清中に感染価が検出され 33℃培養の 1/300 と

なった。8代継代で ts の性状が喪失した。

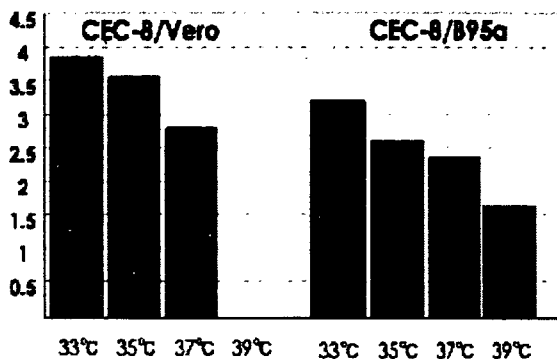


図1 CEC-8の温度感受性

無血清培地 CE 細胞で6代継代した CEC-6 の Vero 細胞、B95a 細胞での ts の性状を検討し図2に示した。いずれの細胞においても39°C培養ではCPEを認めず上清中の感染価も検出されず ts の性状は維持されていることが明らかとなった。

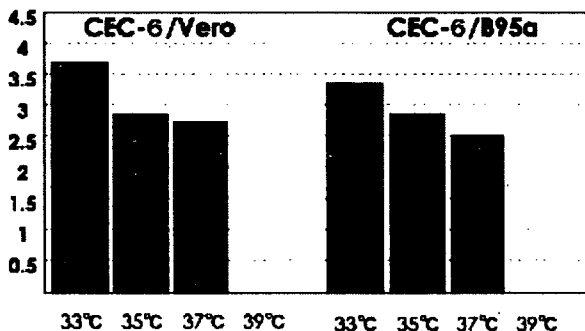


図2 CEC-6の温度感受性

4) Pタンパク遺伝子の変異

tsの温度感受性に強く関連するPタンパク439位のアミノ酸をCEC-8、CEC-6において検討した。CEC-6、CEC-8ともdirect sequenceの結果ではLeuに変異しておりtsの性状との関連性は更に検討が必要と考えられた。

【考察】

VP-SFM培地でCE細胞を培養しウイルス接種後もVP-SFMで維持し8代まで継代し麻疹ワクチンの弱毒に強く関連する生物学的なマーカーとしてtsの性状を検討した。無血清培地で6代継代までtsの性状は保持されているがPタンパク遺伝子の439位のアミノ酸はProからLeuに変異していた。生物学的性状は安定しているが遺伝子レベルではtsのポイントとなる遺伝子に変異しており他の領域を含めての解析が必要となる。

【研究発表】

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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

分担研究者 末原章宏 (武田薬品工業株式会社)
協力研究者 尾山誠一郎 (武田薬品工業株式会社)

研究要旨 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。

1. 研究目的

弱毒生麻しんワクチン（シュワルツ FF-8 株）の製造に用いる初代ニワトリ胚細胞は、ブタ由来トリプシンで消化し、牛血清を含む培地で増殖させている。使用されるトリプシン及び牛血清については、動物由来原料であることから、前年度より代替品の検討を継続している。

今年度は、組換え型消化酵素及び γ 線照射牛血清の製造への適用可否を確認するため、安全性及び有効性について現行品との比較を行った。

2. 研究方法

11 日発育鶏卵から得たニワトリ胚を組換え型消化酵素（インビトロジェン社）又はブタ由来トリプシンで消化し、初代ニワトリ胚細胞を得た。これに γ 線照射（26kGy）牛血清添加培地又は牛血清添加培地を加え、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ウイルス試料を作製した。

作製したウイルス試料を最終バルク濃度に調製し、安全性試験としてモルモット異常毒性試験を行った。また、小分製品として凍結乾燥剤を作製し、25℃加速安定性試験を行い、力価（ウイルス含量）安定性を比較検討した。

3. 研究結果及び考察

組換え型消化酵素又はブタ由来トリプシン、そして γ 線照射牛血清又は γ 線未照射牛血清を用い、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各々3ロットの試料を作成した。

ニワトリ胚細胞の顕微鏡観察の結果、接着性、増殖性についてはほぼ同等であった（図-1）。

最終バルク濃度に調製したウイルス試料のモルモット異常毒性試験結果は、接種後の体重変動及び剖検所見においても現行法と差異は認められなかった。

小分製品を 25℃で、1 週、2 週、3 週、1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月保存したサンプルについて、力価（ウイルス含量）を測定した結果、力価低下の回帰係数は現行法と有意差は認められず（ t 検定）、有効性についても同等であることが確認された（表-1、図-2）。

以上の検討結果より、弱毒生麻しんワクチン（シュワルツ FF-8 株）の製造における迷入ウイルスリスク低減として、組換え型消化酵素及び γ 線照射牛血清の適用の可能性が示唆された。

4. 結論

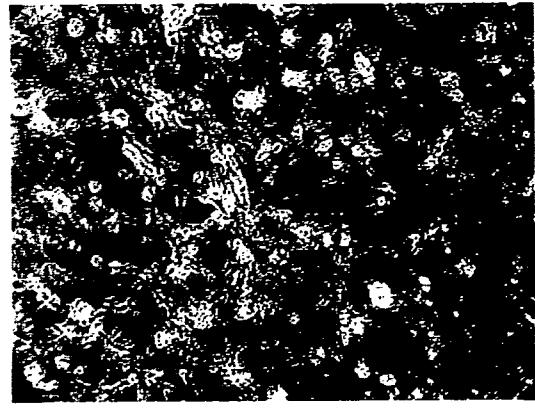
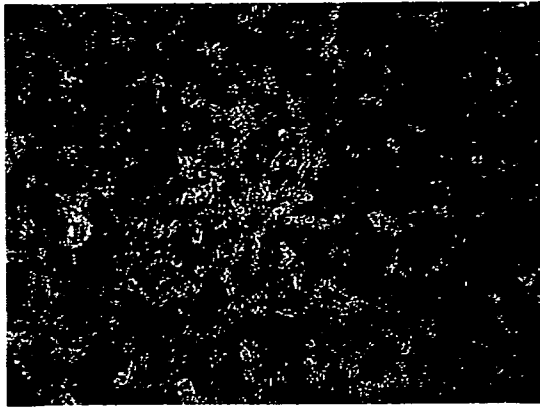
弱毒生麻しんワクチン（シュワルツ FF-8 株）の製造において、組換え型消化酵素及び γ 線照射牛血清を適用した場合とブタ由来トリプシン及び γ 線未照射牛血清を適用した場合の、ニワトリ胚細胞の増殖性、ウイルス試料のモルモット異常毒性試験結果及び小分製品の力価安定性結果に差は認められなかった。

5. 研究発表

- 1) 論文発表
なし。
- 2) 学会発表
なし。

6. 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。



ブタ由来トリプシン、未照射ウシ血清

組換え型消化酵素、γ線照射ウシ血清

図-1 ニワトリ胚細胞の顕微鏡観察

表-1 小分製品の力価安定性試験結果 (25°C加速試験)

消化酵素	牛血清	力価 (ウイルス含量) log CCID ₅₀ /0.5mL						
		開始時	1週	2週	3週	1ヵ月	2ヵ月	3ヵ月
ブタ由来トリプシン	未照射	5.4±0.4	5.1±0.0	4.6±0.2	4.7±0.1	4.6±0.3	4.5±0.1	4.3±0.2
	γ線照射	5.1±0.3	4.9±0.1	4.8±0.1	4.7±0.3	4.5±0.0	4.4±0.2	4.3±0.2
組換え型消化酵素	未照射	5.3±0.3	5.0±0.3	4.9±0.4	4.7±0.4	4.5±0.4	4.3±0.3	4.3±0.1
	γ線照射	5.2±0.4	4.7±0.4	4.8±0.4	4.8±0.4	4.6±0.5	4.5±0.5	4.3±0.2

値は、3試料の平均±標準偏差

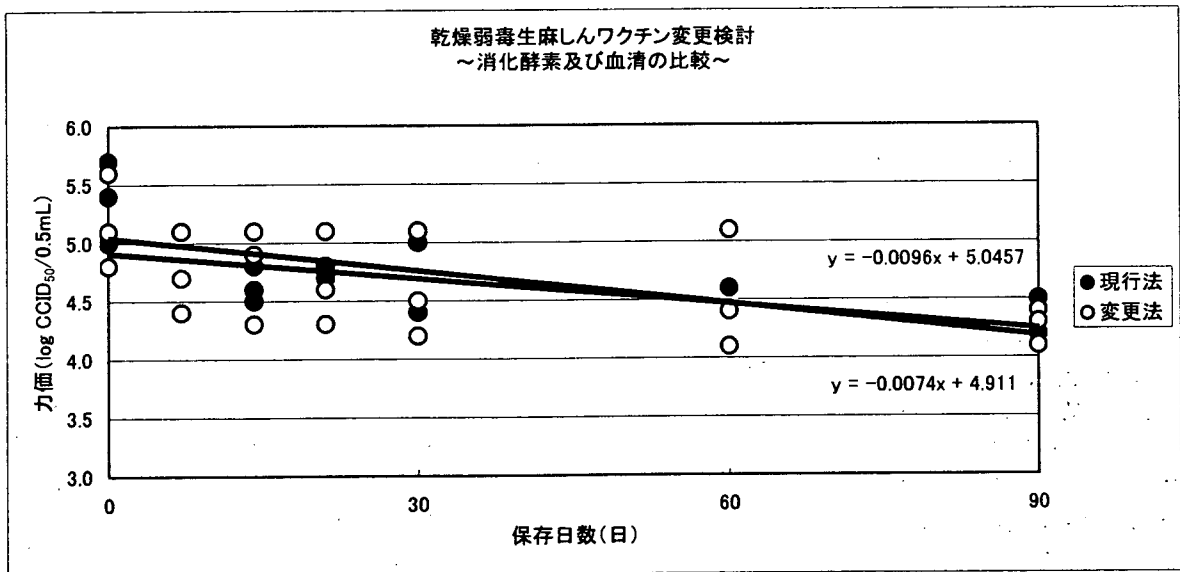


図-2 小分製品の力価安定性試験結果