

200710001 B

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 17~19 年度 総合研究報告書

主任研究者 田代真人  
平成 20 年 (2008) 3 月

## 目次

平成 17～19 年度

### I 総合研究報告書

- 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 分担研究総合報告書

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. 8  
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. 15  
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. 19  
分担研究者: 駒瀬勝啓 協力研究者: 大槻紀之、海野幸子
4. 牛血清等ワクチン製造資材における未知の迷入因子検査法と排除に関する研究 P. 21  
分担研究者: 大槻紀之 協力研究者: 伊藤治、海野幸子
5. 無血清培地を用いた日本脳炎ワクチンの製造法に関する研究 P. 23  
-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. 26  
水痘生ワクチンの品質管理  
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の検 P. 31  
討  
分担研究者: 大隈邦夫
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. 33  
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 株の増殖条件の設 P. 38  
定  
分担研究者: 駒瀬勝啓、李富雄
10. 麻しんワクチン製造における動物由来物質のリスク低減に関する研究 P. 41  
分担研究者: 末原章宏 協力研究者: 岩本好司、山本彰嗣、尾山誠一郎
11. 組織培養インフルエンザワクチン製造における品質管理に関する研究 P. 46  
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規格試験と免疫原性試験における鶏卵ワクチンとの比 P. 48  
較検討  
分担研究者: 細井和男

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 17~19 年度総合研究報告書

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。

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續発し、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

生ワクチンの製造に他動物由来物質を使用することは、それらに由来する感染性因子が製剤に迷入し、ワクチン被接種者に害を及ぼす危険性を含んでいる。おたふくかぜ生ワクチンもこの例外ではなく、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して製造されている。製造工程から他動物由来物質の使用を控える工夫が必要であり、そのために CEF の培養に無血清培地の使用を検討した。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た。しかし、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 にあたる領域をダイレクトシーケンシング法により確かめるとワクチン株により場所も数も異なるもののウイルス遺伝子に変化が起きていることが示された。無血清培地での継代に特異的な変化をゲノム比較塩基配列決定 (CGS) 法を用いてムンプ

スウイルスゲノム全体で評価したところ、15,384塩基の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。無血清培地を用いて生ワクチンを製造する場合には株の同等性を確保するための特別の注意が必要であることが判明した。

#### 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、少なくとも5代までの継代ではウイルスのE1、E2、Cの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た。一方、弱毒生ウイルスワクチンでは、継代する細胞を変更すれば、ウイルスの性状が変化する可能性が考えられる。よってワクチンとして使用されるためには、非臨床試験、臨床試験を行い、新たに製造承認を得る必要がある。そのための開発研究経費は少なくとも10億円程度は必要と考えられ、日本国内での需要は限られていることから、安全性をめざしたこのようなワクチンの開発をサポートするシステムを考える必要がある。

#### 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に関する研究

本研究では生ワクチンの製造資材となる細胞培養用牛血清中への遺伝子レベルでの高率な混入が指摘されているウシポリオマウイルス(BPyV)の検出・排除方法に資するため、BPyV遺伝子全長(約4.7kbp)の塩基配列を決定比較し、株間によりおよそ1%程度の差しか無いことを確認した。またウシ血清に対して約25kGyの $\gamma$ 線を照射することによりウイルス遺伝子の断片化がすすみ結果として血清中へのBPyVの混入リスクの低減へ効果があることが示唆されるデータを得た。一方で不活化・排除法を検討する際に必要となる感染性を有するウイルスの分離はできなかった。

#### 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しんワクチンは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タ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。弱毒生麻しん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。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。

#### 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、高力価の細胞フリーウイルスが得にくい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、培地中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。そこで、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、LightCyclerによるTm値解析法を用いて野生株型塩基配列の混在を遺伝子レベルで定量的かつ迅速に同定することを可能にした。この方法を用いて内外の製剤の比較を行った。正式なライセンスを取得することなく製造されている海外製剤を中心に本来の岡ワクチン遺伝子配列から逸脱していることが見出された。

#### 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馴化した。馴化した Vero 細胞 (Vero-SFM 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。Vero-SFM 細胞上清中の細胞由来 DNA 量を測定し、ワクチン製造用細胞に関する WHO の基準を満たすことを確認した。

#### 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弱毒生ワクチンの製造方法を確立することを目的として、まず風しんウイルスの培養方法を確立し、次いで麻しんウイルスの培養方法を検討した。その結果、無血清培養で得られた麻しんウイルスは仔牛血清を用いた培養方法と比較して、同等以上のウイルス含量を有しており、またニワトリ胚初代培養細胞 (以下 CEF 細胞) 又はアフリカミドリザル腎由来細胞 (以下 Vero 細胞) における双方のウイルスの増殖性に差は認められず、プラークサイズについても統計学的に有意な差は認められなかった。同様に風しんウイルスについても、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について仔牛血清入り培地で培養したウイルスと比較した結果、QEF 細胞及び RK-13 細胞での双方のウイルスの増殖性は同等であり、かつプラークサイズに有意差が認められなかった。更に、無血清培地で培養した麻しんウイルス及び風しんウイルスより乾燥弱毒生麻しん風しん混合ワクチン (以下 MR ワクチン) を調製して、その安定性について市販の MR ワクチン (ミールビック) と比較した結果、同等の安定性が認められた。以上より、麻しんウイルス及び風しんウイルスは無血清培地を用いることで培養は可能であり、仔牛血清入り培地で培養したウイルスと同様な性状であることが示唆された。

#### 大隈邦夫

組織培養、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

現行の A 型肝炎ワクチンの製造は組織培養法、特に株化細胞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 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。

#### 駒瀬勝啓、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

牛血清を用いない麻疹ワクチンを製造するために、ウシ等の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、無血清培地でもウシ血清を用いた時と同レベルのウイルス感染価をもつウイルス液を得ることができた。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  $10^{5.8}$  TCID<sub>50</sub>/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 M13 から M18 ワクチン原液は  $10^{6.2-6.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml の感染価で無血清培地ではウイルス収量は若干低下した。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動物由来物質の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、①牛血清非添加培地、②組換え型消化酵素及び  $\gamma$  線照射牛血清の検討及び③牛血清中のウシポリオーマウイルス遺伝子検出試験の導入検討を行った。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°C加速試験による力価安定性を調査した結果、25°C・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ず、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。

また、組換え型消化酵素及び $\gamma$ 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ることを確認した。牛血清中のウシポリオーマウイルス検出法については、陽性遺伝子を鋳型として得られた PCR 産物の添加実験により試験系の妥当性について確認することができた。

#### 細井和男

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

- (1) 組織培養インフルエンザワクチンを試作し、現行の鶏卵ワクチンとの特性及び有効性比較を試みた。
- (2) 組織培養法で産出・精製したインフルエンザウイルスと、従来の鶏卵法でのウイルスについて、SRD 法による HA 含有率を比較したところ、両者に大きな差異は認められなかった。
- (3) 組織培養法で産出したウイルス培養液を精製・不活化して得られた不活化精製ウイルス粒子を出発材料として、スプリットワクチン及びサブユニットワクチンを調製した。
- (4) 両試作ワクチンを、鶏卵スプリットワクチンを対照としてマウス免疫原性試験に供した。得られたマウス抗血清を用いて HI 抗体価または中和抗体価を測定した結果、両試作ワクチンは鶏卵スプリットワクチンと同様に免疫原性を有することが確認された。

#### 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。 $\gamma$ 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る必要がある。

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てる必要がある。

今後の研究方針への提言としては、①試作ワクチンの保存試験を開始する。②試作ワクチンが、現行ワクチンの製造方法の軽微な変更として法的に対処できる事なのか、あるいは新規ワクチンとして再審査すべき事なのかを判断するために必要な科学的証拠が何であるかを整理し、その事実に従ってワクチン製品ごとに検討する。③事項変更ですむと判断されたワクチン製品から順に、その変更手続きを開始し、本製造の順次を行う。



④新製品として最審査が必要と判断されたワクチン製品については、それが経済的に採算のとれると判断されたものについて、前臨床試験および臨床試験の準備を行い、審査に必要な整備を行う。

具体的には、1) シードウイルスとして同一臨床検体に由来する MDCK 細胞等の哺乳動物由来の培養細胞で分離されたウイルス株と従来の発育鶏卵で分離されたウイルス株を用いて組織培養ワクチンの製造効率やワクチンの特性について効果や安全性の面から調べる。2) 現行ワクチンが規定されている規格値について組織培養ワクチンにおいても適応できるのか調べる。その際の規格試験の製造所と検定機関である国立感染症研究所との間での測定誤差などの検討を行い、判定基準についても検討する。3) 現行ワクチンの規格試験に使用している標準品や参照品が、組織培養ワクチンに適応した際に生じる問題点を明らかにし、必要に応じて適切な標準品や参照品の制定を検討する。

## 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法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：**生ワクチンの製造に他動物由来物質を使用することは、それらに由来する感染性因子が製剤に迷入し、ワクチン被接種者に害を及ぼす危険性を含んでいる。おたふくかぜ生ワクチンもこの例外ではなく、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して製造されている。製造工程から他動物由来物質の使用を控える工夫が必要であり、そのために CEF の培養に無血清培地の使用を検討した。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た。しかし、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 にあたる領域をダイレクトシーケンシング法により確かめるとワクチン株により場所も数も異なるもののウイルス遺伝子に変化が起きていることが示された。無血清培地での継代に特異的な変化をゲノム比較塩基配列決定(CGS)法を用いてムンプスウイルスゲノム全体で評価したところ、15,384 塩基の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。無血清培地を用いて生ワクチンを製造する場合には株の同等性を確保するための特別の注意が必要であることが判明した。

### A. 研究目的

製剤の特質上不活化操作を行わない生ワクチン製剤には如何に製品の製造ラインを無菌化しても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製剤に迷入する危険性が常に存在する。おたふくかぜ生ワクチンもその例外ではなく、鶏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では細胞を不死化した因子が製剤中に入り込むのを危惧しなければならない事による。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した方がよいとの考えも存在する。さて、培養細胞の増殖には通常、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製剤に迷入する危険性を伴っている。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食品中への迷入を発端として、既知及び未知の人畜共通感染性因子の迷入の危険性を可能な限り減らすべきであると考えられている。

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、異なる培養条件で増える特定のウイルスを選別して、ヒトで病気を起こしにくい株を選んできた経緯をもつ。血清を含まない培地を使った CEF と従来の血清入り培地を使った CEF では、構成される細胞の集団が異なり、その結果、その細胞で増えやすいウイルス集団を継代により選択してしまうことになり、その様なウイルスはワクチンとしての有効性や安全性が変化し、もはやワクチンとして使えない危険性を持つ。そこで、無血清培地での継代を行い、国産おたふくかぜ生ワクチン 3 株に変化が生じるか、生じるとすればどの程度なのかを主に塩基配列の違いを指標に検証を行った。

### B. 研究方法

#### 細胞の準備と感染

10 日齢の発育鶏卵から胚を取り出し、常法

に従って 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、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、トリイ株(武田薬品工業、ロット 008)、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 で感染後、添加物無し の MEM 液(以下 MEM(-))を加えて 5 日間、35.5°C で培養した。

#### ウイルスの継代

5 日後の培養上清を採取し、そのうちの一部分からウイルス RNA を抽出した。同様に一部を再び血清入り MEM 培地と無血清 Opti SFM 培地で培養した CEF 細胞に感染させ、その後、MEM(-)で培養を行う操作を合計 7 回行い、継代歴 8 までのウイルス液を得た。

#### ウイルスブラックサイズの変化

組織培養用 6 穴プレートに Vero 細胞を均一な細胞シートとなるように静置培養し、培養 3 日後に、未継代のワクチン株および、それを血清入り MEM 培地で培養した CEF 及び無血清 Opti SFM 培地で培養した CEF で 8 継代したウイルス液を  $10^2$ 、 $10^{2.5}$ 、 $10^3$ 、 $10^{3.5}$  の間で適当に希釈して 0.1ml を接種し、0.8%アガロース培地を重層して 37°C で培養した。7 日後にニュートラルレッドを含むアガロース層を重層して細胞を染色した。その後、細胞をホルマリン固定し、ブラックサイズを計測した。

#### 主要抗原蛋白質コード領域の変化

継代歴 0 の接種ウイルス及び継代歴 5 の培養上清から抽出した RNA を用いて全長 15,384 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)後半から *F* 遺伝子(4482-6210)と *SH* 遺伝子(6218-6533)を含む *HN* 遺伝子(6536-8428)前半までの約 2.5 K 塩基対(4178-6656)と *SH* 遺伝子前半から *HN* 遺伝子を含む *L* 遺伝子(8430-15360)の前半までの約 2.4 K 塩基対(6238-8625)を RT-PCR 反応により増幅し、DNA シークエンサー(ABI 3130xl Genetic Analyzer)を使った DNA ダイレクトシークエンス法によって塩基配列を決定した。得られた ~4500 塩基対(4178-8625)の塩基配列データは Seq-Ed と GENETYX-MAC を用いて解析した。塩基に複数の候補が含まれる場合には、その部分がウイルスにより異なるかと判断して主要構成成分だけでなく少数成分につ

いても記録した。

#### ゲノム全体の変化

継代歴 5 のウイルスを 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)の細胞に Trizol (Invitrogen Co.)を加えて Total RNA を抽出した後、Olig(dT)磁気ビーズを用いて非 poly(A)RNA 分画を得、これをウイルスゲノム RNA を含む分画とした。この分画を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ゲノム比較塩基配列決定(Comparative Genome Sequencing: CGS)法(NimbleGen, Madison, WI, 現ロッシュ・ダイアグノスティクス)により解析し、無血清培地で 5 継代したときに現れる変異の中から血清入り MEM 培地で 5 継代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。

#### (倫理面への配慮)

個人情報を含むと思われる臨床検体を研究材料に用いなかったため、特別な配慮は行わなかった。

### C. 研究結果

#### 継代とブラックサイズの変化

継代歴 0 及び従来の血清入り培地、あるいは、無血清 Opti SFM 培地で培養した CEF で 8 継代したウイルスを Vero 細胞に接種し、継代によりブラックサイズに変化が生じるか否かを検討した。接種されたウイルスは明瞭で縁辺のはっきりしたブラックを作った(図 1)。ブラックの直径を計測し、ヒストグラムを作製したところ、従来の血清入り MEM 培地で 8 継代したウイルスでは、大きなサイズのブラックも散見されるが、大多数は継代前のサイズとほぼ等しかった。その一方で、無血清 Opti SFM 培地で培養した CEF で 8 継代したウイルスは、それに比べ形の小さなブラックが多く含まれていた(図 2)。

#### 継代と主要抗原蛋白質コード領域の変化

生物学的製剤基準に記された継代の上限である 5 継代をしたときにウイルスの遺伝子にどのような変化が生じるかを、特にワクチンの有効性に影響する細胞融合に関与する *F* と細胞接着に関与する *HN* 遺伝子領域に着目し、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クエンス法で塩基配列の決定を行った。

ウシ血清入り MEM 培地で培養した CEF を使って 5 継代した場合には、トリイ、ホシノ、ミヤハラ各株ではこの領域に塩基置換は無く、現状の生物製剤基準にある 5 継代という枠は、妥当であると判断された。一方、無血清 Opti SFM 培地の場合、ミヤハラ株では変異部分は 0 箇所であったものの、ホシノ株とトリイ株には塩基置換が認められた（図 3）。ホシノ株では M 遺伝子 3' 末端側の M 蛋白質コード領域に 3 箇所、ノンコード領域に 1 箇所、HN 遺伝子の HN 蛋白質コード領域内に 1 箇所の合計 5 箇所に置換が認められた。一方、トリイ株では M 遺伝子の 3' 末端側の M 蛋白質コード領域に 1 箇所の置換が認められた（表 1）。ホシノ株に見られた変異のうち M 遺伝子の蛋白質コード領域内の 3 箇所は、アミノ酸置換を伴う変異であり、トリイ株の 1 箇所の変異もアミノ酸置換を伴う変異であった。変化の見られたホシノ株とトリイ株の置換場所は M 遺伝子に集中しているものの同一箇所ではなく無血清 Opti SFM 培地に特異的な変化は認められなかった。

ダイレクトシーケンスの波形を見ると、いずれの変異部位においても変異型のシグナルだけではなく、未変異のシグナルが少しではあるが共存している状況であった（図 4）。すなわち、完全に変異型塩基を持つ株に置き換わったのではなく、株が混在した状態になっており、5 継代の段階では変異株が優位な状態を示していると理解された。

#### 継代とゲノム全体の変化

ゲノム比較塩基配列決定 (CGS) 法を用いて継代の影響をゲノム全体に広げて評価することを試みた。CGS 法は DNA 上にどのような変化が生じる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。ウシ血清入り MEM 培地あるいは無血清 Opti SFM 培地で培養した CEF に 5 継代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を Vero 細胞に感染させ、48 時間目の細胞から Total 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て CGS 法に供して、継代による変異部位を決定した。

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 2）。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 5）。ゲノム全体で比較しても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 Opti SFM 培地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継代により増幅される可能性がある。実際、ウシ血清入り MEM 培地で培養した CEF に 8 継代したワクチン株は、無継代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 Opti SFM 培地で培養した 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った（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 5 継代したウイルスとを比較すると無血清 Opti SFM 培地で培養した 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（2 年度報告）。

塩基配列決定部位をムンプスウイルスゲノム全体に拡大すると、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 箇所のアミノ酸置換を伴わない塩基置換の合計 7 箇所の変異が認められた。継代されたホシノ株が 13 箇所の変異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った。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（3 年度報告）。

2年度に行ったダイレクトシーケンス法により配列決定した部分と3年度にCGS法により再評価した部分には、若干の矛盾点が存在する。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、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4)、すべてのウイルスの塩基が変異したのではなく、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の程度によっては、たとえ混合物であったとしても、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あり、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と思われる。

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は、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)その変異の起る数は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は無血清培地等、他動物由来物質を使わない生ワクチンの製造が望ましい。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際の最大にあた

る5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る。

## F. 健康危害情報

無し

## G. 論文発表

### 1) 国内

口頭発表	0件
原著論文による発表	0件
それ以外の発表	5件

その主なもの

1. 加藤 篤 おたふくかぜワクチン、臨床とウイルス 34(4):261-270 (2006)
2. 加藤 篤、木所 稔 第十五改正日本薬局方解説書 乾燥弱毒生おたふくかぜワクチン 廣川書店 G:44-46 2006年6月20日発行
3. 加藤 篤 シンプル微生物学 改訂第4版 パラミクソウイルス 東匡伸、小熊恵二 編集 pp269-272 南江堂 2006年5月1日発行
4. 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)
5. 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)

### 2) 海外

口頭発表	0件
原著論文による発表	4件
それ以外の発表	0件

その主なもの

1. Saika S., M. Kidokoro, H. Kubonoya, K. Ito, T. Ohkawa, A. Aoki, N. Nagata, and K. Suzuki., Development and biological properties of a new live attenuated mumps vaccine. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 29:89-99, 2006.
2. Nakatsu Y., M. Takeda, M. Kidokoro, M. Kohara, and Y. Yanagi. Rescue system for measles virus from cloned cDNA driven by vaccinia virus Lister vaccine strain. *J Virol Methods.* 137:152-155, 2006.

3. Kitabatake M., S. Inoue, F. Yasui, S. Yokochi, M. Arai, K. Morita, H. Shida, M. Kidokoro, F. Murai, M.Q. Le, K. Mizuno, K. Matsushima, and M. Kohara. SARS-CoV spike protein-expressing recombinant vaccinia virus efficiently induces neutralizing antibodies in rabbits pre-immunized with vaccinia virus. *Vaccine*. 25:630-637, 2007. pathogenicity in mice J. Virol. 81:3264-3271, 2007
4. 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

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 継代により生じた塩基の変異場所

株	CEF 培地	Genes				
		M	F	SH	HN	L
トリイ	MEM	無し	無し	無し	無し	無し
	SFM	4366 G=A (S=N)	無し	無し	無し	無し
ホシノ	MEM	無し	無し	無し	無し	無し
	SFM	4266 T<C (Y<H)	無し	無し	8305 T<C (silent)	無し
		4374 T<C (S<P)				
		4387 T<C (L<P)				
	4402 T<C					
ミヤハラ	MEM	無し	無し	無し	無し	無し
	SFM	無し	無し	無し	無し	無し

表2 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	アミノ酸変位	置換前	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	G	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	アミノ酸変位	置換前	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

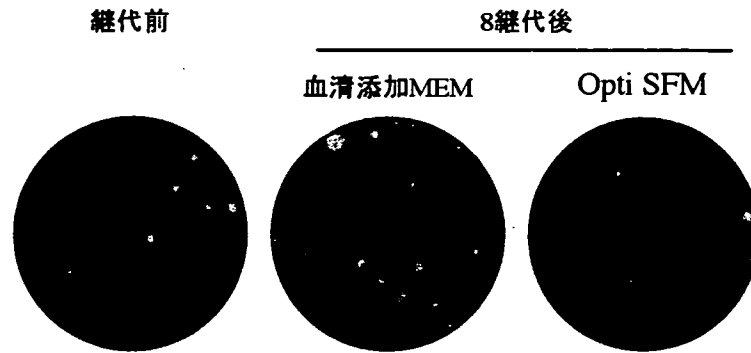


図1 継代されたムンプスウイルスのブラック

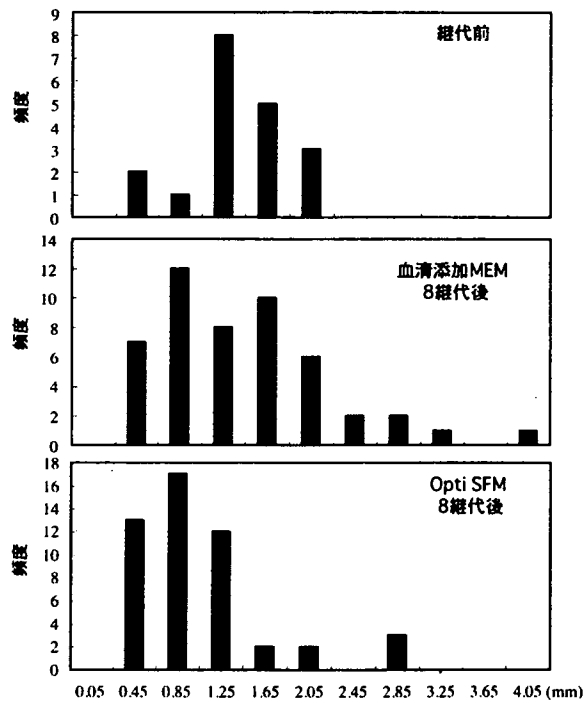
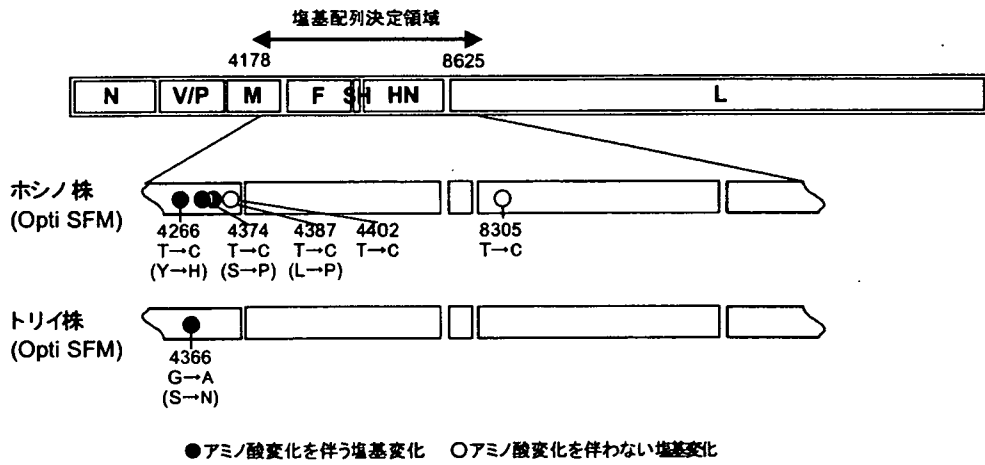


図2 継代とブラックサイズの分布



● アミノ酸変化を伴う塩基変化 ○ アミノ酸変化を伴わない塩基変化  
 図3 継代により変化した塩基部分のムンプスウイルスゲノム上の位置

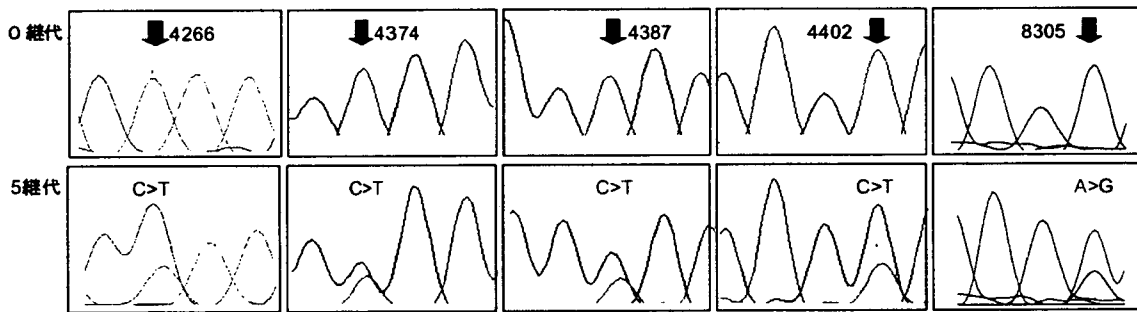


図4 ホシノ株のダイレクトシーケンス法による塩基置換部位の波形

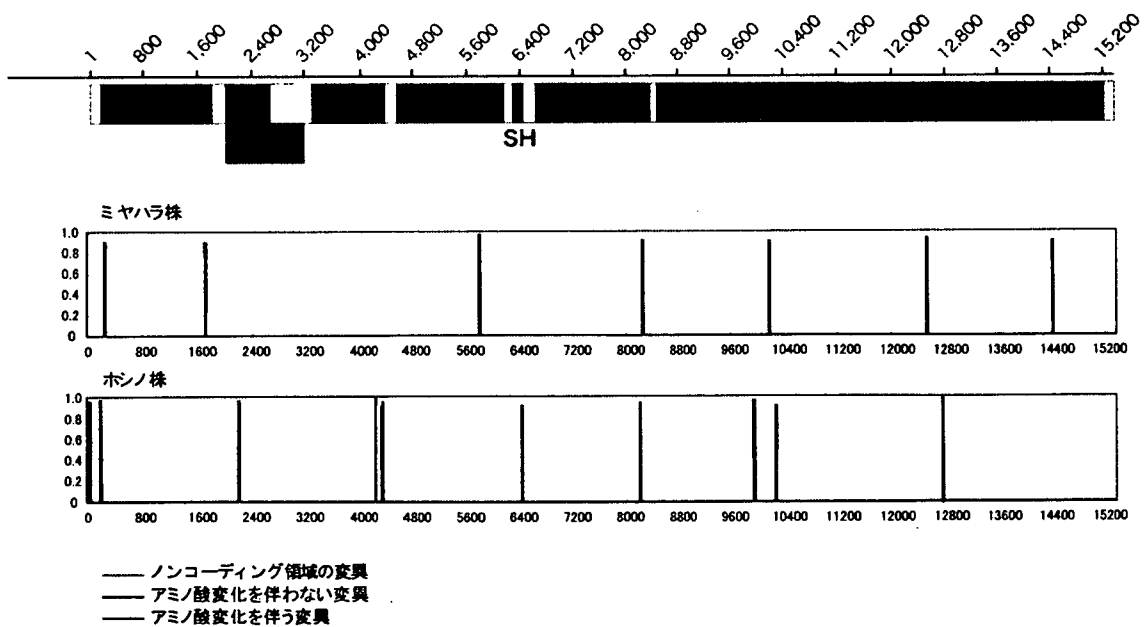


図5 CGS法により決定された塩基置換部位



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

## 1. 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。またウイルス学の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。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。

## 2. 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の後、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。

## 3. 研究結果

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

## 4. 考察

本研究の成果で直接的な学術的成果は得られなかったが、Vero/SLAM 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。

## 5. 結論

ブタ臍由来の Trypson 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。

## 6. 健康危険情報

特に関連性は認められない

## 7. 研究発表

### (1) 論文発表

1. Tanaka K, Numazaki K, Tsutsumi H.: Human cytomegalovirus genetic variability in strains isolated from Japanese children during 1983-2003. *J Med Virol* 2005, 76: 356-360.
2. Numazaki K. Human cytomegalovirus infections in premature infants by breastfeeding. *Afr J Biotechnol* 2005, 4: 867-872.
3. Numazaki K, Asanuma H, Niida Y. Respiratory tract infections due to Chlamydia trachomatis in early neonatal period. In: Kishimoto, T., Yamazaki, T., Kuo, C-C., eds. Symposium on Chlamydial Infections, Proceedings of The Third Joint Auspices of Japan Society for Chlamydia Research and Department of Pathobiology, University of Washington, pp. 16-21, Life Science Co. Ltd., Tokyo, 2005.
4. Tanaka K, Yamada H, Minami M, Kataoka S, Numazaki K, Minakami H, Tsutsumi H. Screening for vaginal shedding of cytomegalovirus in healthy pregnant women using real-time

PCR: Correlation of CMV in the vagina and adverse outcome of pregnancy. *J Med Virol* 2006, 78: 757-759.

5. Koizumi Y, Ndembi N, Miyashita M, Lwembe R, Kageyama S, Mbanya D, Kapture L, Numazaki K, Fujiyama Y, Ichimura H. Emergence of ART resistance-associated primary mutations among drug-naïve HIV-1-individuals in rural western Cameroon. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006, 43: 15-22.
6. Numazaki K. Current concepts of management for congenital cytomegalovirus infection. *Trends in Developmental Biology* 2007, 3:(in press). Numazaki K. Current problems of measles control in Japan and western pacific region. *Vaccine* 2007, 25: 3101-3104.
7. Homma K, Numazaki K. The steam humidifier hand burn in infants. *Int Med J* 2007, 6: (1).
8. Numazaki K. Current concepts of management for congenital cytomegalovirus infection. *Trends in Developmental Biology* 2007, 2:1-11.
9. Goto T, Kimura H, Numazaki K, Akiyama M, Kato M, Noda M, Nozaki Y, Tanaka-Taya K, Taniguchi K, Yamagata T, Nishio O, Oogane T, Momoi MY, Okabe N. A case of meningoencephalitis associated with human G1P [8] rotavirus infection in a Japanese child. *Scand J Infect Dis J* 2007, 39: 1067-1081.
10. 沼崎 啓. 小児に多い感染症とその対策ー当院での対応ー8. マイコプラズマ肺炎. *小児看護* 2005, 28: 618-624.
11. 沼崎 啓. 感染制御と教育、市民(親や子ども)の教育/啓蒙・コミュニケーションー麻疹根絶に向けての取り組みを中心ー. *小児科臨床* 2005, 58: 2575-2583
12. 田中香織、堤 裕幸、沼崎 啓. サイトメガロウイルス感染症. *小児科診療* 2005, 68: 2116-2121
13. 沼崎 啓. 冬の院内ウイルス感染対策. *感染と抗菌薬* 2005, 8: 413-415

14. 沼崎 啓. サイトメガロウイルス感染症. 小児科診療 2006, 69: 増刊号 小児の治療指針 209-212.
15. 沼崎 啓. 診断・治療のポイント マイコプラズマ感染症. Infectious Diseases Report 2006, No. 37.
16. 福村 忍, 黒岩由紀, 木下和子, 沼崎 啓, 中田修二, 堤 裕幸, 遠藤高夫, 秦史壮. 小腸血管腫より出血を来たした Blue Rubber Bleb Nevus syndrome の 1 例. 臨床小児医学 2006, 54: 45-47.
17. 沼崎 啓. 先天性感染と HCMV. 日本臨床増刊号 ヘルペスウイルス学—基礎・臨床研究の進歩—, 2006, 496-499.
18. 沼崎 啓. 突発性発疹. 小児内科小児外科編集委員会共編. 小児内科 2006, 38: 増刊号 小児疾患の診断治療基準. 東京, 東京医学社, 2006, 318-319.
19. 狩山雅代, 野口秀樹, 吉田永祥, 内野清子, 三好龍也, 松尾光子, 田中智之, 藤井史敏, 阪本瑠子, 武内一, 片桐真二, 西垣正憲, 沼崎 啓. 麻疹家族内感染事例とその対応—堺市. 病原微生物検出情報 2007, 28: 147-149.
20. 沼崎 啓. 麻疹ウイルス株の遺伝子解析. 病原微生物検出情報 2007, 28: 244-245.
21. 沼崎 啓. RSウイルス感染症. 感染と抗菌薬 2007, 10: 365-369.
22. 沼崎 啓. 医薬品各条 乾燥弱毒生麻疹ワクチン. 渡辺治雄編. 生物学的製剤基準解説 2007 年版. 東京, (株) じほう, 2007, 140-148.
23. 沼崎 啓. 医薬品各条 弱毒生麻疹おたふくかぜ風疹混合ワクチン. 渡辺治雄編. 生物学的製剤基準解説 2007 年版. 東京, (株) じほう, 2007, 149-151.
24. 沼崎 啓. サイトメガロウイルス. 岡部信彦編. 小児感染症学. 東京, 診断と治療社, 2007, 373-378.

## (2) 学会発表

1. 沼崎 啓. 小児におけるマイコプラズマおよびクラミジアの病原性. 東北小児感染症懇話会 2005 特別講演, 2005 1. 15, 仙台.
2. 沼崎 啓. 小児科でよくみられる呼吸器感染症の新しい話題. 平成 17 年京都市学校医会、小児科医会学術講演会 特別講演, 2005 3. 5, 京都.
3. 沼崎 啓. 小児科領域のクラミジア感染症と感染制御戦略. 第 19 回北海道クラミジア・感染・免疫研究会 特別講演, 2005 5. 27. 札幌
4. 沼崎 啓. わが国の麻疹対策の現状と展望—WHO 世界特別麻疹検査室および地域レファランス検査室の役割を中心に—. 平成 17 年ウイルス検査技術連絡会講演, 2005 9. 16, 東京.
5. 沼崎 啓. 世界から麻疹が消える日を目指して—WHO の麻疹根絶計画—. ワクチンセミナー「麻疹根絶をめざして」 特別講演, 2005 10. 7, 苫小牧.
6. 沼崎 啓. 小児呼吸器感染症の最近の動向と治療戦略—マイコプラズマおよびクラミジアを中心に—. 第 7 回浜松呼吸器感染症セミナー特別講演, 2005 10. 15, 浜松.
7. Numazaki K. Current problems of measles control in Japan and western pacific region. 4th Global Measles & Rubella Laboratory Network meeting, WHO HQ, Geneva, Switzerland, August 28-30, 2006.
8. 沼崎 啓. 小児呼吸器感染症の新しい概念と治療戦略. 平成 18 年相模原市医師会小児科医会総会特別講演, 2006 3. 15, 相模原.
9. 沼崎 啓. マイコプラズマ・クラミジア小児呼吸器感染症の新しい概念. 平成 18 年江戸川区小児科医会学術講演会特別講演, 2006 7. 29, 東京.
10. 沼崎 啓, 岡野素彦 (司会). シンポジウム「ウイルスの分子疫学」. 衛生微生物技術協議会第 27 回研究会, 2006 6. 29-30, 札幌.
11. Numazaki K. Current problems of measles control in Japan and western pacific region. Symposium 1, Progress in Infectious Pathogens Vaccines and Immunization, Fifth World Congress on Vaccines, Immunization & Immunotherapy. Montreal, Quebec, November 6-9, 2006.
12. Numazaki K. Vero/SLAM cell line. WHO/WPRO Hands-on Training/Workshop on the Laboratory Diagnosis of Measles Virus Infection. 2006,

March 13-18, Hong Kong.

13. 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.
14. 沼崎 啓. わが国と西太平洋地区における麻疹根絶計画の現状と展望. 平成19年度 札幌医科大学医学部同窓会総会 特別講演, 2007 7. 14, 札幌.
15. 沼崎 啓. わが国と西太平洋地域における麻疹対策の現状と展望. シスメックス感染症セミナー, 2007 6. 8, 神戸.
16. 沼崎 啓. ウイルスによる院内感染と対策. 苫小牧市立病院感染対策実践部会主催 院内感染対策講演会. 2007 6. 15, 苫小牧.
17. 沼崎 啓. 麻疹ウイルスの分子疫学的解析. 国立感染症研究所学友会コロキウムワークショップ, 麻疹 Elimination に向けてー現状と国立感染症研究所の役割ー, 2007 9. 10, 東京.
18. Numazaki K. Current problems of measles circulation in Japan and Western Pacific Region. The Fifth WHO Global Measles and Rubella Laboratory Network Meeting. Expanded Programme on Immunization. Geneva, Switzerland, September 26-28, 2007.

#### 8. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

- (1)特許取得 無し。
  - (2)実用新案登録 無し。
  - (3)その他 無し。
- 特記すべき事無し。