

## 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  
研究協力者 大槻紀之 国立感染症研究所 ウイルス第3部 研究官  
研究協力者 海野幸子 国立感染症研究所 ウイルス第3部 客員研究者

**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、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。

**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。健全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使用できる可能性を検討し、さらにその開発経費を考察したものである。

**B. 研究方法**

ウイルス株、細胞：風しんワクチン株として T0-336 株（武田薬品工業）を用いた。Vero 細胞は無血清培地、DM-201（日本製薬）に馴化させ使用した。細胞継代時の消化には植物由来のパパインを用いた。T0-336 株を DM-201 培地で増殖させた Vero 細胞に接種し、5 代継代後の性状を観察した。5 代継代後のウイルスの E1 遺伝子、E2 遺伝子、C 遺伝子を RT-PCR で増幅し、塩基配列を決定し、元株との変化を調べた。また Vero 細胞 5 代継代ウイルスとワクチン株

元株を RK-13 細胞に moi0.01～0.03 で接種し、35℃、37℃、39℃での増殖性を培養 3 日目、4 日目のウイルス量で測定し、比較した。ウイルスの力価はウサギ由来の株化細胞である RK-13 細胞を用いたブランク法で測定した。さらに、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、ワクチンを市場に提供するために必要な経費を推定した。

**C. 研究結果**

- DM-201 培地で増殖させた Vero 細胞に接種した T0-336 株は 35℃でよく増殖し、5 代継代後では  $10^{7.3}$  PFU/mL の力価のウイルスを得るに至った。これは現行のワクチンの製造に用いているウサギ初代腎細胞での増殖で得られるウイルス力価よりも高かった。（平均 約  $10^6$  PFU/mL）
- 5 代継代後のウイルスの E1、E2、C 遺伝子は、RT-PCR 法で増幅し、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定した限りにおいては、元株のワクチン株との変化は見られなかった。
- Vero 細胞の 5 代継代後のウイルスの温度感受性を調べた。39℃におけるウイルスの増殖性は 35℃の増殖性と比較して約 1/1000 に低下していた。これはワクチン株でのそれぞれの温度における増殖性の差とほぼ同様であった。
- 無血清培地を用いた風疹ワクチン開発に係わるコストの検討
  - Vero 細胞の迷入ウイルス否定試験：試験機関に委託し、MCB、WCB、CAL 細胞の迷入ウイルス否定試験を実施するとおよそ 3500 万円程度の委託試験費がかかる。又、同様にワクチンシード株の迷入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。

また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。総額、約 3500 万円程度かかると推定される。

- 3) 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、Ⅲ相を 400 人程度で行うと 7-8 億程度が必要と思われる。
- 4) 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、検定費はかなり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

風しんウイルスワクチン株 T0-336 株は無血清培地 DM-201 で培養した Vero 細胞でもよく増殖した。また、その大部分のウイルスが持つ構造蛋白遺伝子はウサギ初代腎細胞で製造されたワクチン株と変化がないことが示された。さらに、ワクチン株の特性である温度感受性の性状も、Vero 細胞で 5 代継代後のウイルスはワクチン株と同様に保持していた。これらの事から、無血清培地で培養した Vero 細胞で増殖させた風しんワクチン株 T0-336 は、現行のワクチン株と同様の性状を保持している可能性が高いと考えられた。よって無血清培地で培養した Vero 細胞を風しんワクチン製造用の細胞として用いる事の可能性が示された。一方、製造用細胞を変えると、たと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と非臨床試験、臨床試験等だけでも約 10 億円程度が必要と推定される。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る。また、現在は単味の風疹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経費が増大する。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

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

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  
海野幸子 国立感染症研究所ウイルス3部客員研究員

**研究要旨** 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ーマウイルス (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。

### 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ひいては、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のに 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。ウイルスの培養方法等が十分に確立されていないことなどから、ウシ血清等からの BPyV の検出には PCR 法を利用し遺伝子断片の検出を行っているのが現状である。しかしながら BPyV の遺伝子配列に関しても十分な情報が無く PCR に利用するプライマーの選択の適否を判断するためにウイルス遺伝子の全長を明らかにし、その多様性を確認すると共に、ウシ血清中に存在する BPyV を排除するために  $\gamma$  線照射が有効であるか確認することを目的とする。またウイルスの不活化・除去の評価に必要となる感染性を有するウイルスの分離も目的とした。

### B. 研究方法

#### 1. BPyV ウイルス遺伝子の特定

比較的長鎖の BPyV 遺伝子が PCR により検出された市販の細胞培養用ウシ血清 3 ロットより DNA を抽出し、これを鋳型とし増幅領域をオーバーラップさせるように設計したプライマーセットで PCR を実施した後 PCR ダイレクトシーケンスによりその遺伝子配列を決定し、それをつなぎ合わせるにより BPyV 遺伝子配列を決定、推測した

#### 2. $\gamma$ 線照射による血清中 BPyV 遺伝子への影響の調査

(財) 北里環境科学センター、嶋崎典子先生ならびに梶岡実雄先生の御協力を受け、血清を液状状態 (1ml/5ml ガラスバイアル) で、5、10、25、50 kGy の 4 種の照射強度を用い  $\gamma$  線の照射を実施した。

(BPyV 遺伝子の検出)

検出には以下の 3 種の PCR 系を使用した。

- ・ Kappeler らが発表した (1996) nested PCR
- ・ BPyV 遺伝子の構造タンパクの一つである VP2 領域全体を挟むように設計したプライマーペア (増幅産物サイズ; 約 1.2Kbp) をもちいた PCR
- ・ BPyV 遺伝子全長約 4.8Kbp の約 65% の長さにあたる 3.1Kbp の長さをターゲットとした PCR

いずれの PCR 系を用い  $\gamma$  線照射をした血清及び未照射の血清サンプルからウイルス DNA を抽出し同条件で PCR を実施した。

#### 3. BPyV の分離

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 種の細胞に  $\gamma$  線非照射かつ比較的長鎖の BPyV 遺伝子断片が PCR で検出されたウシ血清及び国内で飼育されてい

る健康牛のウシ血清 2 頭分血清を接種培養し PCR での検出を指標としてウイルス分離を試みた。

### C. 研究結果

#### (BPyV 遺伝子配列の決定)

3 ロットの血清から得られた 4679bp の BPyV 完全長遺伝子配列を既存の遺伝子データと比較したところ、血清から得られた遺伝子配列とデータベース上に登録されている遺伝子配列との間にはそれぞれ約 0.5%～1% の差が認められた。このことから BPyV 遺伝子は一定の多様性は持つものの、ウイルス株間の差は少ないことが示唆された。得られた遺伝子配列情報を今後 PCR 系の改良等に利用できると考えられ、今後遺伝子バンクへの登録を予定している。

( $\gamma$  線照射による血清中 BPyV 遺伝子への影響の調査)

$\gamma$  線の照射の強度と PCR の結果を表 1 に示す。

いずれの血清も 5kGy 又は 10kGy の  $\gamma$  線の照射では nested PCR 及び VP 2 検出 PCR では陽性の結果となっている。また血清 A では 3.1Kbp の PCR においても陽性となっている。しかしながら 25kGy 以上の  $\gamma$  線照射によりいずれの PCR 系によっても BPyV に由来すると考えられる遺伝子増幅産物は検出されなかった。

照射量 (KGy)	PCRターゲット			
	Nested PCR	3.1Kbp	VP2	
血清A	未照射	+	+	+
	5	+	±	+
	10	+	+	+
	25	-	-	-
	50	-	-	-
血清B	未照射	+	±	+
	5	+	-	+
	10	+	-	+
	25	-	-	-
	50	-	-	-

± : 2回のPCRで結果が分かれたもの

表 1 : PCR の結果

このことより BPyV 遺伝子は 25kGy 以上の  $\gamma$  線照射により PCR 法による検出限界以下までウイルス遺伝子の断片化が進んだことが示唆された。ウイルス遺伝子の断片化が生じれば結果的にウイルスの感染性が損なわれることが考えられることより、 $\gamma$  線照射済みのウシ血清を製造に用いることにより、ワクチンへの BPyV の混入リスクの低減化に一定の効果があると考えられた。

#### (ウイルス分離)

今回の研究手法では感染性を有するウイルスの分離はできなかった。

### D. 考察

本研究では本来は感染性を持つウイルスを入手し、その検出法・不活化方法を検討することが最も重要であると考えられるが、海外の獣医系研究機関等に問い合わせをしたものの、BPyV に関する研究を行っているところは皆無でありウイルスの分与を受け

ることができなかった。また国内の獣医系大学等から健康牛の血清などの材料の分与を受け BPyV の分離を試みたものの、ウイルスの分離は適わなかった。このためウイルス自体を用いた研究が実施できなかった。

しかしながら、ウイルス遺伝子の全長を決定したことにより PCR プライマーの設計のための基礎データの収集できたこと、またウシ血清に対する  $\gamma$  線照射が BPyV の生物学的製剤への混入のリスク低減化に有効であることが示唆されたことは、生物学的製剤の安全性の確保に十分に寄与できたと考えられる。

また本研究内容を国内のウイルス性生ワクチン製造各所に連絡することにより血清の選択時に  $\gamma$  線照射のものを積極的に採用する製造所社もあり、現状で生物学的製剤の安全性の確保に十分に寄与できていると考える。

### E. 結論

BPyV 遺伝子は 1% 程度の多様性を持つものの株間の差は少ないことが示された。

培養用ウシ血清に混入している BPyV 遺伝子は 25kGy 以上の  $\gamma$  線照射により PCR 法の検出限界以下まで低下することが示された。

### F. 健康被害情報

特になし

### G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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

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

- ・ 大槻紀之、海野幸子、田代真人：細胞培養用ウシ血清からのウシポリオマウイルス遺伝子の検出及び  $\gamma$  線照射による影響 第 10 回日本ワクチン学会学術集会、2006 年 10 月 大阪

### H. 知的財産権の出願・登録状況

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。

#### 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) 製造用マウスの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。この 3 年間に渡り、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-SFM 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 (14 継代目) の植え替え後 3 日目の培養上清および対照として、10%FCS 加 MEM 培地により培養した Vero9013 細胞の植え替え後 3 日目の培養上清より、DNA Extraction Kit (和光純薬) を用いて DNA を回収した。また陽性コントロールには、Vero 細胞より Wizard Genomic DNA Purification Kit (プロメガ) を用いて回収した DNA を、陰性コントロールには市販のラムダファージ DNA (東洋紡) をそれぞれ希釈して使用した。各 DNA をアルカリ変成させ中和後、プロットティング装置 (Bio-Dot SF; パイオラッド) を用いてナイロン膜上に転写、固定した。Vero 細胞由来 DNA 検出用のプローブは、Gene Images Random Prime Labeling Kit (GE) を用いて調製した。ハイブリダイゼーション

は上記ラベリングキットに従い調製した溶液を使用し、60°Cで一晩行った。ハイブリダイゼーション後、膜を 1xSSC, 0.1% SDS で 60°C 15 分、0.5%SSC, 0.1% SDS で 60°C 15 分洗浄し、Gene Images CDP-Star Detection Kit を用いて Vero DNA を検出した。各ドットのシグナル強度は Bio Rad 社の ChemiDoc システムを用いて定量した。

#### 4. 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 法は、下記の方法で実施した。抗日本脳炎ウイルス単クローン (Group-8, clone 503; 財)東京都神経科学総合研究所保井孝太郎博士より分与) を 10  $\mu$ g/mL の濃度で 100  $\mu$ l/well, 4°C 下で一晩固相化した。

##### 2)一次反応

0.1%BSA を加えた 0.05% Tween-20 の PBS を希釈液として用い、標準抗原、検体を上記の希釈液で一次希釈し、0.05%Tween-20,PBS を用いて固相化した Plate を 6 回洗浄後、希釈した抗原を 100  $\mu$ l/well 添加し、37°C, 60min.反応させた。

##### 3)二次反応

0.05%Tween20,PBS を用いて一次反応の終了した Plate を 4 回洗浄した。標識抗体は HRP-Anti Flavivirus monoclonal antibody (D1-4G2-4-15) IgG を 500x (2.0  $\mu$ g/ml) 濃度で用いた。37°C,60min.反応させた。

##### 4)発色

0.05%Tween-20,PBS で二次反応の終了した Plate を 4 回洗浄し、TMB 発色基質を加えた。室温で 15 分間反応 (遮光下) させた。

##### 5)反応停止

発色反応の終了した Plate に反応停止液 (1 N 硫酸) を 100  $\mu$ l/well 添加した。

#### 6)吸光度の測定

OD450 を測定

### 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。解凍後 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 週間後再び解凍し VP-SFM により培養した。解凍時、生細胞率はいずれも 80%~90%であった。いずれの解凍後も VP-SFM 培地により十分な増殖力を示した。

#### (2) Vero-SFM 培養上清中の Vero 細胞由来 DNA 量の定量

VP-SFM 適応 Vero 細胞 (14 継代目) の植え替え後 3 日目の培養上清および対照として、10%FCS 加 MEM 培地により培養した Vero 細胞の植え替え後 3 日目の培養上清中の DNA 量をドットハイブリダイゼーション方により、検討した。本方法では 1.5625pg/dot でもわずかではあるがシグナルは検出されることから、その検出限界は数 pg/dot (100  $\mu$ l) と考えられる。

その結果から、どちらの上清も X 線フィルムにてどちらも強いシグナルを認めた (図 1A)。そこでこれを定量できる程度に希釈し (図 1B)、イメージアナライザーにて比較定量した (図 2)。その結果、相対的 Vero 細胞 DNA 量は、無血清培地 (VP-SFM) 上清が 19.98、血清添加培地 (10% FCS) 上清が 30.03 であった。

#### (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もたらした。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勧奨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) を用いること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。我々は本研究事業において無血清培地で 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 週間後再び解凍し VP-SFM により培養した。同様の凍結・解凍を 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。一方、ワクチン製造用基材としての Vero-SFM 細胞の評価のため測定した Vero 細胞上清中の細胞由来 DNA 量は、無血清培地にて発育させた Vero 細胞上清中の細胞由来 DNA 量の増加は認められず、むしろ血清添加培地 (10%FCS) の上清中のほうが多い傾向をしめした。このことは、無血清培地

順化 Vero 細胞が、無血清培地に十分順化し、良好な増殖力を有し、ワクチンの製造用基材として使用できると考えられる。Vero-SFM 細胞は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

#### 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 培地で凍結解凍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。Vero 細胞由来 DNA は Vero-SFM 細胞の方が、Vero9013 細胞と比べて少なく、WHO によって規定されているワクチン製剤中の細胞由来 DNA の基準量以下のワクチン製剤を作るのに十分である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文

なし

##### 2. 学会発表

高崎智彦、倉根一郎. 無血清培地を用いた日本脳炎ワクチンの製造法に関する研究. 第 9 回日本ワクチン学会 (大阪) 2005 年 10 月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

分担研究者 井上 直樹 (国立感染症研究所ウイルス1部)

**研究要旨** 弱毒生水痘ワクチン(岡株)は安全性・有効性に優れたワクチンである。しかしながら、高力価の細胞フリーウイルスが得にくい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ブラン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ヵ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。

#### 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。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、同じ岡株を用いて带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。

水痘ワクチン株を含め水痘带状疱疹ウイルス(VZV)は、ヒト2倍体細胞など限られた細胞でしか増殖しないこと、増殖が遅く高力価とならないこと、また、細胞フリーウイルスとして培養液中にほとんど放出されないことが知られる。そのため、感染細胞を超音波処理により破碎し、その遠心上清をウイルス液として用いることとなる。従って、他のワクチンに比べてより多くの培地中の夾雑物を濃縮した製品

がワクチン液として製造される可能性を有している。そこで、本研究では、牛由来成分を含まないないしは低減した新たな培養条件などを検討することを第1の研究目的とした。

水痘ワクチンは、弱毒化のメカニズムが依然として明確でなく、SCID-huマウスなど特殊な系を用いる以外には容易に弱毒・強毒を判定しえる動物モデルなどのアッセイ系が存在しない。従って、新たな培養条件下で製造したワクチンの有効性と安全性を遺伝子レベルで評価できる方法の確立が必要と考えられる。水痘带状疱疹ウイルスのゲノムは約15万塩基対より成り、ワクチン株(V-Oka)とその親株(P-Oka)の全塩基配列の比較から、1)両株間での差異は42箇所の配列のみに過ぎないこと、2)いくつかの配列部位では親株とワクチン株配列の“混じり”が存在することが報告されている。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てきた。本研究では、ワクチン株に特徴的な塩基置換部位の多く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、ワクチン製剤の遺伝子レベルでの評価を可能にするとともに、内外の製剤を比較し、水痘ワクチンの品質管理に資することを第2の目的とした。

さらに、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も比較した。

## B. 研究方法

### 1) 細胞培養、VZVの増殖

VZVレポーター細胞MV9G及びヒト2倍体細胞HLFは、10% FBS添加DMEM培地にて培養した。テロメラーゼ遺伝子により不死化されたヒト繊維芽細胞hTERT-BJ1は、10%FBS添加DMEM:199(4:1)培地にて培養した。VZVの培養にはHLF細胞を用いた。

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

### 2) 免疫染色

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 (Chemicon) 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

ワクチン親株P-OkaゲノムDNAは、Strausらの方法に従いnucleocapsid DNAとして精製した。即ち、感染細胞を集め、界面活性剤を含む緩衝液で溶解後、細胞由来の核酸を酵素分解し、ここからウイルスキャプシドを含む分画を超遠心により回収後、プロテアーゼ処理、フェノール抽出によりキャプシドにパッケージングされていたゲノムDNAを精製した。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

プライマーの量比を1:4とし少ない方のプラ

イマー濃度を0.25 $\mu$ Mに設定する非対称PCRを50 $\mu$ lスケール、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 $\mu$ lを0.2XSSC、2.5mM MgCl<sub>2</sub>を含む反応液(全量20 $\mu$ 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求めた。

### 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に細胞フリーウイルスもしくはウイルス感染細胞を加えて、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発光値を測定した。

## C. 研究結果

### 1) 培養条件の検討

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

1% FBS添加のOptiPro-SFMやFBM培地でHLF細胞を培養し、ほぼコンフルエントな状態から0%、0.2%、もしくは1%FBS添加培地で水痘ワクチン株を接種し、プラーク形成を検討した。その結果、プラーク数の減少はあるものの0.2%血清添加条件下でも通常サイズのプラークが形成された(図1)。これらのプラークは、VZVの前初期蛋白IE62に対する抗体で免疫染色できることを確認した。HLF細胞に加えて、テロメラーゼで不死化されたhTERT-BJ1株に

についても検討したが、不死化している利点はあるものの、VZVの増殖が悪く実用的に利用できないと判断した。

### 2) Tm値に基づくワクチン株と親株の判別

方法の原理は図2に示した。非対称PCR産物にプローブA及びBを加え、LightCycler用キャピラリー内で、ハイブリダイゼーションするとプローブAの3'末端に標識されたFITC色素が獲得したエネルギーが近傍のプローブBの5'末端に標識されたLC640色素に転移して測定可能な蛍光が生じる。徐々に温度を上昇させプローブがテンプレートより解離すると蛍光が消失することでTm値が求められる (melting curve analysis)。この際、V-Okaで予想される変異部位をプローブB内に設定するとV-OkaとP-OkaのTm値の差異をもとに両者を判別することができる。プローブAを同一のものにして、プローブBの長さや領域を変えることにより、各塩基置換を判別できる条件を検索した。18部位についてプライマー・プローブセットを検討し、15部位について、期待される産物を得てP-Okaとワクチン株との分別を可能とした。

### 3) Tm値解析に基づくワクチン製剤の評価

本邦メーカーの製剤は、検討した数種のロット間で各部位におけるワクチン型配列と野生型配列の混在の程度は、ほぼ同程度であり、シードロットシステムが適正に運用されていることが確認できた

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、15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Merck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、Merck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3、表1)。

### 4) 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及びワクチン製剤間で差は認めなかった。

## D. 考察

通常の1/10に相当する1%FBSを添加すれば検討した5種類の培地のうち2種類ではヒト2倍体細胞の増殖及びウイルス感染を起こすことができることを明らかにした。しかしながら、今回の培養条件の検討は小スケールで行ったので、今後実用的スケールでの検討を行う必要がある。また、VZVの前初期蛋白IE62をプラーク中には検出したが、VZVは細胞フリー粒子を培地中にほとんど放出しないため、プラーク形成しても感染性粒子が産生されたのかを検討する必要がある。ワクチン株と野生株間でVZVレポーター細胞への反応性に差が見られなかったことから、この細胞株の共培養により感染粒子産生を定量することが可能と考えられる。

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え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

- 1) 低血清条件で継代した細胞にワクチンを感染し、0.2%血清存在下でそのプラーク形成が可能であった。
- 2) ワクチン特異的変異42部位中15部位について野生型配列の混入を迅速かつ定量的に検出する方法を確立した。
- 3) 遺伝子レベルで本来のワクチン株配列から逸脱してい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

井上直樹、野澤直樹、山本由美子、稲見有希、Vladimir Loparev、倉根一郎「LightCyclerによるTm値解析を応用した水痘ワクチンの品質管理」 第21回ヘルペスウイルス研究会、岐阜、2006年6月

## 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 低血清培養条件におけるウイルスの増殖

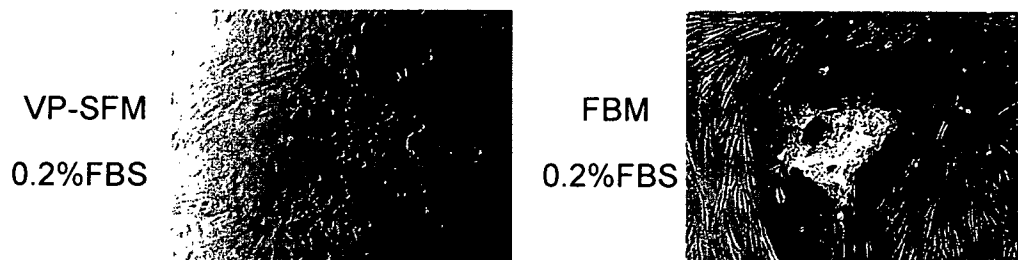


図2 Tm値解析による野生株配列の検出原理

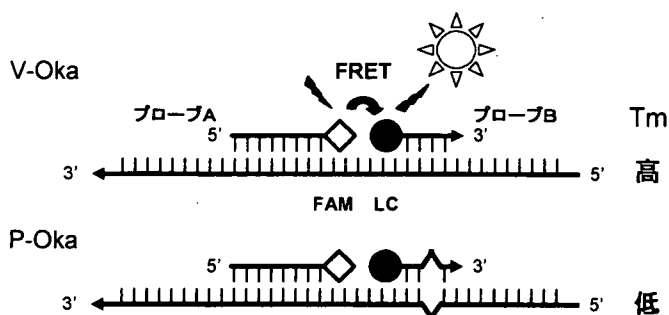


図3 Tm値解析によるワクチン製剤の遺伝子レベルでの評価

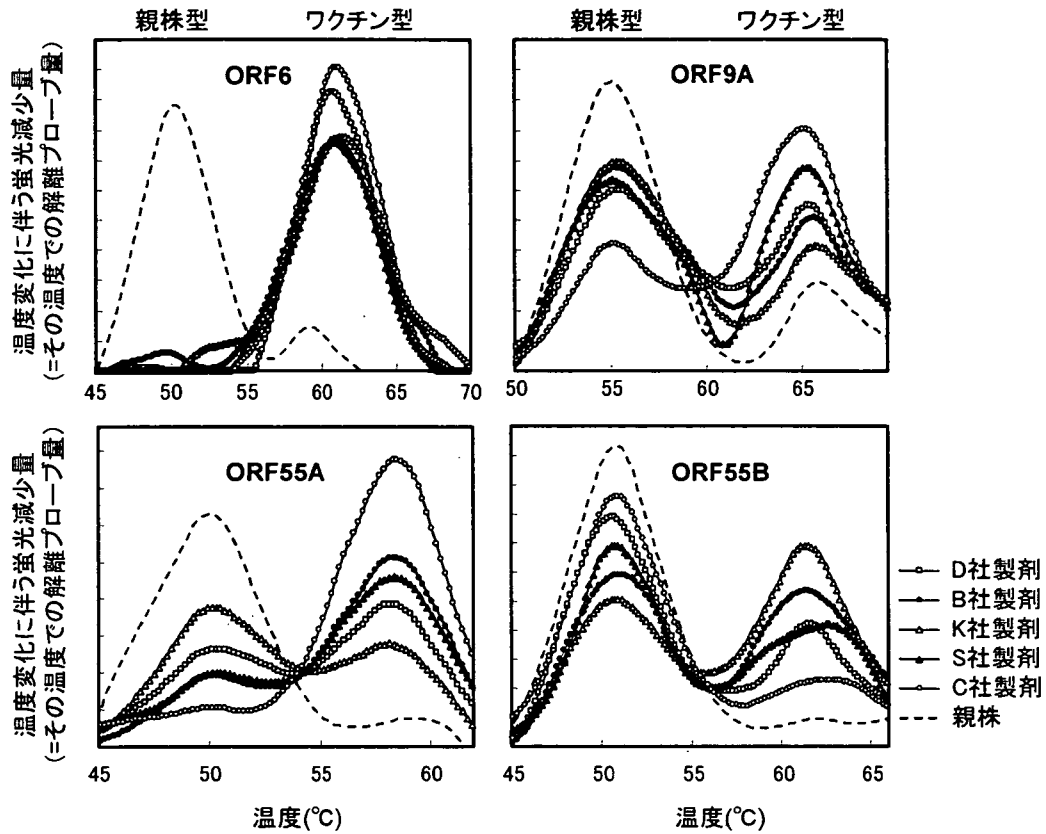


表1 ワクチン製剤の遺伝子レベルでの評価と副反応

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	65	two third	none	none
9A	Y	82	90	100	all	half	small
10	Y	100	90	100	all	half	
21	Y	100	100	100		most	small
31B	Y	74	50	45	two third	two third	all
39	Y	41	50	44	half	half	
50	Y	92	70	70	two third	two third	
51	N	95	70	100		two third	
52	Y	87	100	92	two third	two third	
54	N	21	20	30	small	none	none
55A	Y	67	80	61	half	small	small
55B	Y	95	80	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	90		none	small
62 (105665)	Y	(half?)	20	9		none	small
62 (105826)	N	0	0	0			
62 (106383)	Y	0	0	0	none	none	none
62 (107257)	N	49	35	50		none	none
62 (107373)	Y	0	0	0	none	none	none
62 (108959)	Y	51	100	100		most	all
64	Y	59	100	60		half	

\* 塩基配列解析による(Quinlivan 2007)

# 本研究Tm値解析による

分担研究者 大隈 邦夫 (財)化学及血清療法研究所 品質管理部長

## 1. 研究目的

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。

## 2. 研究方法

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

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

- ・細胞剥離活性
- ・細胞増殖性
- ・ウイルス増殖性

細胞剥離活性と細胞増殖性の確認での細胞培養は 225cm<sup>2</sup> フラスコと 850cm<sup>2</sup> ローラーボトルで行い、0.05%トリプシン-EDTA, 100% TrypLE, 25% TrypLE, 10% TrypLE を使用し比較した。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。ウイルス増殖性には 0.05%トリプシン-EDTA と 25%TrypLE を使用して細胞を剥離した後、MOI=0.1 で A 型肝炎ウイルス (HAV) を接種して ELISA 法により確認した。最終年度は細胞剥離活性向上に向けて TrypLE 処理時間を検討し、確認を行った。

### (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、無血清培地の検討を行った。初年度の検討では、EX-Cell Vero (JRH 社) の検討を行い、馴化の必要性を確認した。次年度は EX-Cell Vero、Opti-Pro SFM(GIBCO 社)、混合無血清培地 (EX-Cell Vero : Opti-Pro SFM = 1 : 1) の 3 つの無血清培地について検討を行った。最終年度は VP-SFM(GIBCO 社) の検討も加え、さらに血清代替添加剤の検討し、その効果を確認した。無血清培地に馴化したものについては HAV を接種し、増殖性を確認した。

(倫理面への配慮)  
特になし。

## 3. 研究結果及び考察

### 1) 研究結果

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

TrypLE の細胞剥離活性はトリプシンに比べ低い傾向を示したが、細胞増殖性に関してはトリプシンに比べ同程度以上の効果を示した。

また、ウイルス増殖性に関してもトリプシン処理の細胞に比べ、TrypLE 処理の細胞が同程度の効果を示した。

TrypLE の細胞剥離活性の低さは反応処理時間を 20 分以上に延ばすことで改善することが出来た。

#### (2) 無血清培地の検討

EX-Cell Vero と Opti-Pro SFM において培養を行った結果、細胞形状に若干の異常が見られたものの、増殖率は対照細胞と同程度以上であった。しかしながら HAV 増殖性は対照培地に比べ非常に低かった。その他に検討した培地に関しては、細胞が増殖するものの増殖速度が遅く、HAV を接種すると全て死滅した。

## 2) 考察

GL37 細胞における TrypLE の効果を従来のトリプシンと比較したところ、今回は細胞増殖性とウイルス増殖性に関してはトリプシンの効果と同程度の結果が得られており、トリプシンの変更品として要求される効果を満たしていた。また、細胞剥離活性においてはトリプシンよりも TrypLE 使用群は低かったが、濃度による細胞剥離数の違いは見られなかった。細胞剥離活性の低さは TrypLE 反応時間を延ばすことで改善することができ、トリプシンと同程度の効果を得ることが期待される。

無血清培地の検討について、昨年度まで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若干観察されたが、細胞の増殖率が対照培地と同程度以上であったことから、GL37 細胞の無血清培地への適応が期待される。最終年度においても無血清培地への馴化は再現されたが、HAV 増殖性を持った細胞を得ることは出来なかった。今後の課題は以下の通りである。

- ① 無血清培地馴化細胞におけるウイルスの増殖性確認 (HAV 増殖可能細胞確立)
- ② 無血清培地馴化細胞の細胞特性を解析
- ③ 無血清培地馴化細胞により培養したウイルスの遺伝子解析

## 4. 評価

### 1) 達成度について

A 型肝炎ワクチンにおいての、生体由来成分の排除に向けての手がかりを得ることができた。ほぼ計画通りと考える。

### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

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。特に当該の A 型肝炎ワクチンにおいては、本邦での生産は弊所のみであり、その意味からも成果の意義は大きいと考える。

### 3) 今後の展望について

本研究を継続・発展させ、目的とする生体由来成分の排除を達成する。

## 5. 結論

TrypLE に関しては、細胞増殖性・ウイルス増殖性が従来使用のトリプシンと同程度以上の効果を示す結果を得ることができた。細胞剥離活性の低さに関しては、TrypLE 反応時間を延ばすことで補うことが出来た。

無血清培地に関しては、細胞増殖性は対照培地と同程度以上であり、変更の可能性を確認したが、A 型肝炎ウイルスの増殖性並びに無血清培地馴化細胞の特性を解析することが必要である。

## 6. 研究発表

国内及び海外 特になし。

口頭発表 0 件

原著論文による発表 0 件

それ以外 (レビュー等) の発表 0 件

その主なもの

論文発表 特になし。

学会発表 特になし。

## 7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

特になし。

## 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。

### A. 研究目的

麻しんワクチンや風しん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、感染性及び病原性をもつ未知の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麻しんワクチン及び風しんワクチンの製造方法を確立するために無血清培地を用いた培養法について検討した。風しんウイルスの製造方法において、細胞の処理に使用するトリプシン液の濃度を下げることにより無血清培地でウズラ胚細胞の培養が可能であること、また、ウイルス培養液では TCM-199 と無血清培地との混合がウイルス培養に必要であることが明らかになった。本研究では上記の方法を麻しんワクチンの製造にも応用し、無血清培地を用いて培養した麻しんウイルス及び風しんウイルスの性状を解析するために、種々の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ウイルスと比較・検討した。また、得られた麻しんウイルス及び風しんウイルスをワクチンに調製したときの安定性について、現行のワクチンと比較を実施した。

### B. 研究方法

#### 2.1. CEF 細胞での麻しんウイルスの培養の検討

ニワトリ胚をトリプシン処理して遠心後、上清を除去し、仔牛血清を含む MEM 又は無血清培地 VP-SFM を含む MEM に浮遊させ、37℃で培養 1 日目及び 2 日目の細胞数を測定した。

また、これらの培地で 2 日間培養を行った細胞に弱毒生麻しんウイルス田辺株を M.O.I=0.02 で接種し、上記と同じ培地をそれぞれのウイルス培養液として添加した。29℃で 5 日間培養を行った後、TCM-199 に培養液を交換して 29℃で更に 3 日間培養し、各ウイルス液を採取した。ウイルス含量は Vero 細胞を用いたプラーク法により測定した。

#### 2.2. 無血清培地を使用したときのウイルスの性状解析

##### 2.2.1. ウイルスの増殖性

##### 2.2.1.1. CEF 細胞及び Vero 細胞における麻しんウイルスの増殖性の検討

ニワトリ胚をトリプシン処理して遠心後、上清の除去を行い、仔牛血清を含む MEM に浮遊させ、37℃で 2 日間培養した。この細胞に無血清培地で培養した麻しんウイルス又は仔牛血清を添加した培地で培養した麻しんウイルスを M.O.I=0.02 で接種後、TCM-199 を添加して 29℃で培養し、各ウイルス液を経時的に採取した。

また、Vero 細胞をトリプシン処理し、牛胎児血清を含む MEM に浮遊させ、37°C で 2 日間培養した。この細胞に、同様に無血清培養の麻しんウイルス又は血清添加培養の麻しんウイルスを M.O.I=0.1 で接種し、牛胎児血清を含む TCM-199 を添加して 32、37 及び 39°C で培養し、各ウイルス液を経時的に採取した。

採取した検体のウイルス含量により、ウイルスの増殖性を評価した。

### 2.2.1.2. QEF 細胞及び RK-13 細胞における風しんウイルスの増殖性の検討

ウズラ胚をトリプシン処理して遠心後、上清の除去を行い、仔牛血清を含む MEM に浮遊させ、37°C で 2 日培養した。この細胞に無血清培養の風しんウイルス又は仔牛血清添加培養の風しんウイルスを接種後、TCM-199 を添加してウイルスを 30°C で培養し、各ウイルス液を経時的に採取した。

また、RK-13 細胞をトリプシン処理して牛胎児血清を含む MEM に浮遊させ、37°C で培養した。この細胞に、同様に無血清培養の風しんウイルス又は血清添加培養の風しんウイルスを M.O.I=0.01 で接種し、牛胎児血清を含む TCM-199 を添加して 32、37、39°C で培養し、各ウイルス液を経時的に採取した。

採取した検体のウイルス含量により、ウイルスの増殖性を評価した。

### 2.2.2. プラークサイズの測定

Vero 細胞を 6well プレートに播種し、37°C、5%CO<sub>2</sub> 下で 2 日間培養後に無血清培地で培養した麻しんウイルス及び仔牛血清を含む培地で培養した麻しんウイルスをそれぞれプラーク数が 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、アガロース培地を重層し、37°C で 7 日間培養した。更にニュートラルレッドを含むアガロース培地を重層後、形成したプラークの直径を測定し、統計学的に解析した。風しんウイルスについても RK-13 細胞を用い、培養温度 32°C で同様の解析を実施した。

### 2.3. ワクチン調製時の安定性

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を用いて、安定剤等を添加して凍結乾燥を実施し、MR ワクチン（以下 MR ワクチン（無血清））を作製した。尚、対照となる現行の MR ワクチンは、同時期に製造された市販用の小分製品（ミールビック Lot : MR006、以下 MR ワクチン（血清））を使用した。安定性試

験における保存条件は温度 25°C、相対湿度 60%RH とし、MR ワクチン（無血清）及び MR ワクチン（血清）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）を実施した。

## C. 研究結果

### 3.1. CEF 細胞での麻しんウイルスの培養

仔牛血清を添加した培地又は無血清培地での CEF 細胞の増殖性及び麻しんウイルスの増殖性の結果を表 1 に示した。CEF 細胞の増殖性には差が認められず、またウイルスの増殖性もほぼ同等であった。

表 1 CEF 細胞の増殖性及び麻しんウイルスの増殖性

培養方法	細胞数 ( $\times 10^6$ 細胞数/mL)		ウイルス含量 (log <sub>10</sub> PFU/mL)
	1 日*	2 日	
血清	1.07	1.20	7.67
無血清	0.98	1.18	8.09

※：細胞培養開始日よりの培養期間

### 3.2. ウイルスの性状解析

#### 3.2.1. ウイルスの増殖性

##### 3.2.1.1. CEF 細胞及び Vero 細胞における麻しんウイルスの増殖性

CEF 細胞における麻しんウイルスの増殖性調査では、無血清培地で培養したウイルス及び仔牛血清添加培地で培養したウイルスは共にウイルス培養開始 9 日目でウイルス含量が最大となり、それらの増殖曲線に差は認められなかった（表 2 及び図 1）。

また、Vero 細胞での増殖性調査では、37°C と 39°C 培養のそれぞれ 4 日目と 3 日目に細胞が CPE によって剥離したが、観察可能な日数においては、それぞれの培養温度での無血清培養と血清添加培養の麻しんウイルスの増殖曲線の間に差は認められなかった（表 3 及び図 2）。

表 2 CEF 細胞における麻しんウイルスの増殖性

培養ウイルス	ウイルス含量(log <sub>10</sub> PFU/mL)				
	6 日	7 日	8 日	9 日	10 日
CS	7.11	7.24	7.43	7.55	7.52
SFM	7.11	7.32	7.46	7.51	7.50



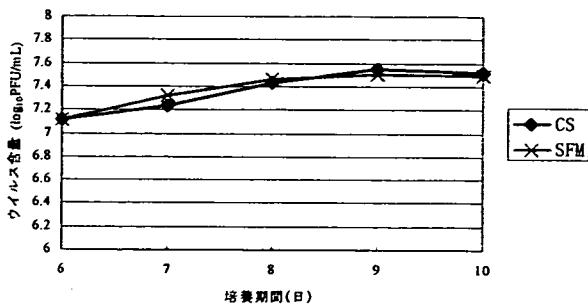


図1 CEF細胞における麻疹ウイルスの増殖性の比較

表3 Vero細胞における麻疹ウイルスの増殖性

培養ウイルス	培養温度	ウイルス含量(log <sub>10</sub> PFU/mL)					
		0日	1日	2日	3日	4日	5日
CS	32℃	1.18	<1.00	4.30	5.56	6.20	6.56
			0				
SFM	32℃	1.00	<1.00	4.04	5.41	5.98	6.42
			0				
CS	37℃	1.00	2.24	4.99	5.15	NT	NT
SFM	37℃	<1.00	2.20	5.01	4.95	NT	NT
		0					
CS	39℃	1.30	1.40	4.24	NT	NT	NT
SFM	39℃	<1.00	1.00	4.76	NT	NT	NT
		0					

NT: CPEによる細胞剥離のため、試験中止した

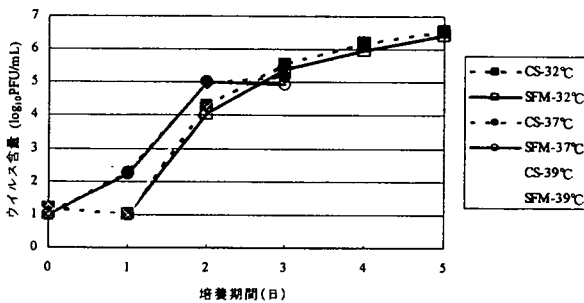


図2 Vero細胞における麻疹ウイルスの増殖性の比較

### 3.2.1.2. QEF細胞及びRK-13細胞における風しんウイルスの増殖性

QEF細胞における風しんウイルスの増殖性調査では、無血清培養のウイルス及び血清添加培養のウイルスは共にウイルス培養開始11~12日目までウイルス含量が最大を示し、またそれらの増殖曲線はほぼ完全に一致した(表4及び

図3)。

また、RK-13細胞における風しんウイルスの増殖性調査では、無血清培養のウイルス及び血清添加培養のウイルスの含量は、全ての培養温度においてウイルス培養開始から4日目に最大となり、また、各培養温度におけるこれらのウイルスの増殖曲線はほぼ一致していた(表5及び図4)。

表4 QEF細胞における風しんウイルスの増殖性

培養ウイルス	ウイルス含量(log <sub>10</sub> PFU/mL)						
	8日	9日	10日	11日	12日	13日	14日
CS	4.9	5.4	5.5	5.8	5.8	5.6	5.5
	5	4	5	8	6	4	2
SFM	4.8	5.3	5.5	5.8	5.9	5.6	5.6
	7	5	7	8	1	8	1

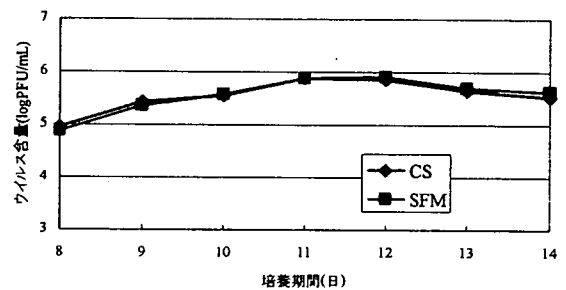


図3 QEF細胞における風しんウイルスの増殖性の比較

表5 RK-13細胞における風しんウイルスの増殖性

培養ウイルス	培養温度	ウイルス含量(log <sub>10</sub> PFU/mL)					
		0日	1日	2日	3日	4日	6日
CS	32℃	0.00	3.74	6.18	7.07	7.12	6.85
SFM	32℃	0.00	3.74	6.19	7.20	7.22	6.95
CS	37℃	0.00	3.56	5.06	5.82	5.86	5.65
SFM	37℃	0.00	3.65	4.89	5.82	5.90	5.61
CS	39℃	0.00	1.40	2.22	2.65	2.69	2.66
SFM	39℃	0.00	1.48	2.50	2.59	2.64	2.69

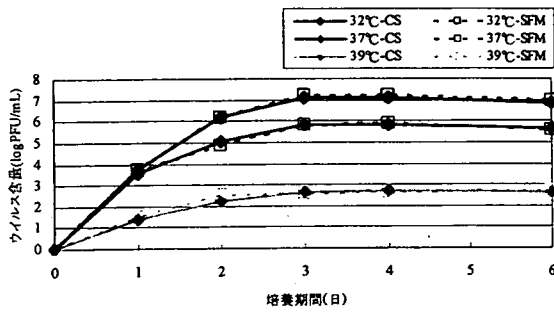


図4 RK-13細胞における風しんウイルスの増殖性の比較

### 3.2.2. プラークサイズ

プラークサイズの測定結果を表6に示した。麻しんウイルスにおいて、無血清培地で培養したウイルスと仔牛血清入り培地で培養したウイルスとの間にプラークサイズの分布の偏りは認められず ( $\chi^2$ 検定:  $P=0.95$ )、またプラークサイズの平均値に有意な差は認められなかった ( $t$ 検定:  $P=0.33$ )。また、風しんウイルスにおいても同様に、プラークサイズの分布の偏りは認められず ( $\chi^2$ 検定:  $P=0.97$ )、プラークサイズの平均値にも有意な差は認められなかった ( $t$ 検定:  $P=0.16$ )。

表6 プラークサイズの測定結果

ウイルス	培養方法	平均 (mm)	$\chi^2$ 検定	$t$ 検定
麻しん	CS	1.20	$P>0.05$	$P>0.05$
	SFM	1.17	( $P=0.95$ )	( $P=0.33$ )
風しん	CS	1.95	$P>0.05$	$P>0.05$
	SFM	1.89	( $P=0.97$ )	( $P=0.16$ )

### 3.3. ワクチン調製時の安定性

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試験成績を表7及び図5に示した。麻しんウイルスの力価は保存2カ月まで経時的な低下が認められたが、3カ月時の力価は2カ月時とほぼ同じであった。風しんウイルスの力価は保存3カ月まで経時的にわずかな低下が認められた。麻しんウイルス及び風しんウイルスの各力価において、MR ワクチン(無血清)と MR ワクチン(血清)は同様な低下の傾向を示した。

表7 麻しんウイルスの力価試験成績

( $\log_{10}$ PFU/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

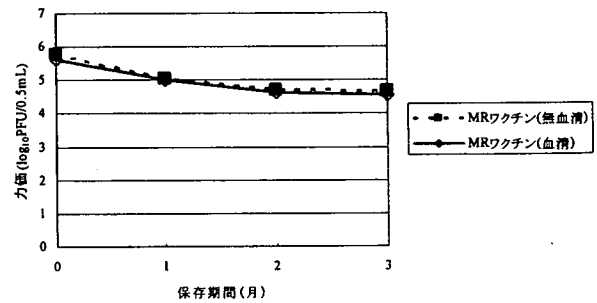


図5 麻しんウイルスの力価試験成績

表8 風しんウイルスの力価試験成績

( $\log_{10}$ PFU/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

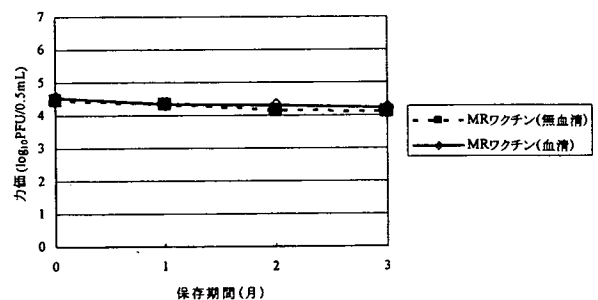


図6 風しんウイルスの力価試験成績

### D. 考察

細胞培養とウイルス培養の双方において無血清培地を使用した麻しんウイルス及び風しんウイルスの増殖性は仔牛血清を使用して培養したウイルスの増殖性と遜色がないため、無血清培地を使用しても実生産に耐えるウイルス量が得られることが示唆された。

また、無血清培地を使用してウイルス培養を

行った際にウイルスの性状が変化してしまうのではないかという懸念については、

(1) 感受性細胞を用いたブランクアッセイにおいてブランクサイズの平均及び分散に有意差が認められなかったことから、ウイルスの細胞間伝播に変化がないと考えられる。

(2) 保存後の力価試験の結果より、力価の減衰の程度が同等であるとみられるため、ウイルス構成成分の安定性に変化がないと考えられる。

これらの結果より、少なくとも培養細胞での増殖においては際立った性状変化は起こっていないことが示唆された。

従って、無血清培地を用いて麻しん及び風しんワクチンを作製することは可能であると考えられた。

## E. 結論

仔牛血清を使用しない麻しんウイルスの培養は無血清培地を用いることで可能であり、得られたウイルスは仔牛血清入り培地で培養したウイルスと同じ性状であることが示唆された。また、無血清培地で培養した風しんウイルスも同様に仔牛血清入り培地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. 研究発表

1. 論文発表  
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  
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\* \*：現 国立感染症研究所 ウイルス第三部  
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】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℃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。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の継代による変化をみるためにReverse geneticsによりlarge plaque typeとsmall plaque typeのcDNA cloneから感染性ウイルスを作製しVero細胞で継代するとsmall plaque typeのウイルスは3代継代以内にlarge plaqueに変化し、tsも消失し塩基配列はEdmonston wild typeに戻る傾向が認められた。継代の過程で性状の変化を生じることからAIK-C麻疹ワクチンの製造細胞には不適であることが解った。

麻疹ワクチンは初代ニワトリ胚細胞(CE細胞)を用いて製造されており、CE細胞はウシ血清を添加した培地で増殖、維持されてきた。

1986年に英国でBovine Spongiform Encephalitis; BSE)の流行が社会問題となった。更に、BSEに汚染された食品からヒトへの感染

でvCJDを発症する危険性が報告されている。こうした潜在的な危険性を回避するために生物由来の原材料を医薬品等の製剤には使用しない方向で検討されている。生ワクチン製造の工程で用いられてきたウシ血清はBSE非流行国の製品を用いる等の配慮が執られている。しかしながら、ウシ血清を製造工程に使用しない製造システムを確立する必要がある。

AIK-Cワクチン株を製造するCE細胞をVP-SFM培地を用いてCE細胞の増殖性を検討し、製造モデルとして2層のCell Factoryを用いて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) ウイルスの作製 CE細胞の培養にウシ血清を用いてはいるもののウイルス培養液を採取する最終段階ではウシ血清をのぞいて製造して保管してあったワクチン原液M13- M18を用いた。
- 2) CE細胞 ニワトリ受精卵より胚を摘出しトリプシン消化し、ニワトリ初代胚細胞を作製した。VP-SFM培地に浮遊し細胞数を調整した。
- 3) AIK-Cウイルスの接種と培養 ワクチン原液製造とほぼ同様の工程をとった。2層のCell Factoryを用いて33℃、5%CO<sub>2</sub>内で培養した。
  1. CE細胞は200,000/mlに調整しCell Factory 1層あたり270mlを撒き(Day 0) 32℃で2日間培養した。
  2. m. o. i.=0.025でAIK-Cウイルスを接種し、32℃で3日間培養した。
  3. 培養液交換(VP-SFM) (Day 5) 32℃で3日