

間培養した。

4. M-199 無血清培地に液交換 (Day 8) 32°Cで4日間培養した。
5. 培養ボトルを4°Cに移し一晩静置した (Day 12)。
6. 培養液を採取した (Day 13)。
- 4) 同様に VP-SFM 培地を用いて CE 細胞を培養しワクチン原液 M-17 を継代し (CEC-1 から CEC-8) のウイルス液を保存した。
- 5) ウイルス感染価の測定 ワクチン原液、継代した培養液を B95a 細胞、Vero 細胞に接種し 33°C、35°C、37°C、39°C の異なる培養温度で感染 1, 3, 5, 7 日後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。
- 6) 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) M13-18 ワクチン原液の感染価

現在の製造方法は CE 細胞浮遊液を調整し 2 日間培養し、AIK-C ウイルスを接種し液交換し Day 8 に M-199 無血清培地に変更するまでは胎児ウシ血清を含有している。Day 8 以降ではウシ血清は含まれていない。この工程で製造されてきた M13-18 のワクチン原液は  $10^{6.2-6.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml であった。

2) ワクチン製造工程を同じスケジュールで液交換を行い Day 8 まで VP-SFM で培養を続けた。Day 5, 8, 10, 12, 13 で培養液を採取し感染価を測定し結果を図 1 に示した。各工程で種ウイルス接種後経時的に培養液中の感染価は増加し最終工程後には  $10^{5.8}$  TCID<sub>50</sub>/ml まで増加した。

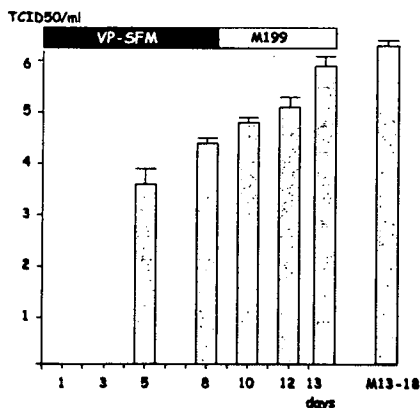


図 1. 培養期間中の感染価

#### 3) 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。無血清培地をもちいて 8 代継代した CEC-8 を Vero 細胞に接種し

33°C、35°C、37°C、39°C 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 2 に示した。いずれも 33°C での増殖が良く培養温度をあげると産生するウイルス感染価は減少し 39°C 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 細胞に接種し、培養温度を上げると上清中のウイルス力価は減少し 39°C でも上清中に感染価が検出され 33°C 培養の 1/300 となった。無血清培地で 8 代継代により ts の性状が喪失した。

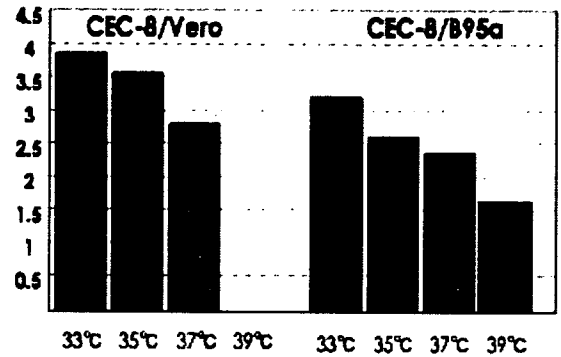


図 2 CEC-8 の温度感受性

無血清培地 CE 細胞で 6 代継代した CEC-6 の Vero 細胞、B95a 細胞培養における ts の性状を検討し図 3 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。

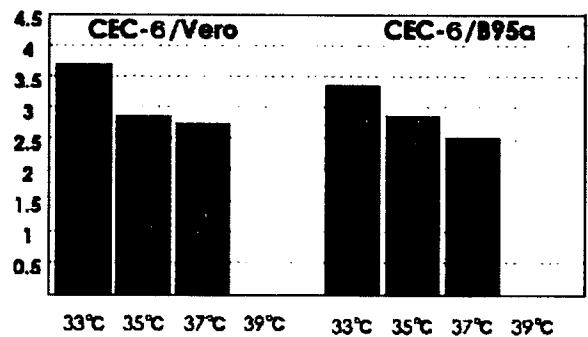


図 3 CEC-6 の温度感受性

#### 4) 遺伝子の検索

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 Pro が 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 で維持し最終段階で M199 無血清培地でウイルス液を採取することで Cell Factory

システムで若干感染価は低下するが  $10^{5.8}$  TCID<sub>50</sub>/ml のウイルス液を採取できることが明らかとなった。ウイルス接種量、培養日数等の条件を検討することほぼ同程度のワクチンウイルス原液を製造できると考えられる。生物学的なマーカーとして ts の性状は 6 代継代まで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。

### 【評価】

#### 1) 達成度

牛血清をもちいないで VP-SFM で麻疹ワクチン AIK-C 株を増殖させ従来の製造工程で得られるウイルス量と比較すると若干低いものの small scale production のレベルでは十分なウイルス量を得ることができた。6 代継代までは生物学的な安定性は確認できたが遺伝子レベルでの解析が更に必要である。

#### 2) 今後の展望と意義

牛血清を使用しないワクチンの small scale での製造が確認できたが更に製造レベルでの検討が必要となる。牛血清のもつ潜在的危険性を回避できることは乳幼児のワクチンとして将来的な不安をとり除き、より安全なワクチンの製造が可能となる。

### 【結論】

small scale での牛血清を使用しない麻疹ワクチン AIK-C の製造が可能と考えられる。本格的な製造には、scale up が必要でその際には更に詳細に検討を行う必要がある。

### 【研究発表】

#### 1. 論文発表

- 1) Kumada A, Komase K, Nakayama T. Recombinant measles AIK-C strain expressing current wild-type hemagglutinin protein. Vaccine 2004; 22: 309-316.
- 2) Komase K, Nakayama T, Iijima M, Miki K, Kawanishi R, Uejima H. The phosphoprotein of attenuated measles AIK-C vaccine strain contributes to its temperature-sensitive phenotype. Vaccine 24: 826-34, 2006.
- 3) Uejima H, Nakayama T, Komase K. Passage in Vero cells alters the characteristics of measles AIK-C vaccine strain. Vaccine 24: 931-6, 2006.

#### 2. 学会発表

- 1) 麻疹ウイルス野生株の高温での増殖能 藤野元子、吉田菜穂子、飯嶋益巳、駒瀬勝啓、中山哲夫 第 52 回日本ウイルス学会 横浜 2004 11/21-23.
- 2) ムンプスウイルス野生株の遺伝子型による細胞融合能の差 吉田菜穂子、藤野元子、駒瀬勝啓、中山哲夫 第 52 回日本ウイルス学会 横浜 2004 11/21-23.
- 3) 麻疹ウイルスワクチン温度感受性 AIK-C 株の動物モデルとしてのコトンラット 芳賀 猛、村山丹穂、清水佑也、齋藤 暁、篠原明男、塚本知大、佐藤 浩、駒瀬勝啓、中山哲夫、宮田博規 第 53 回日本ウイルス学会 横浜 2005 11/20-22.
- 4) SSPE ウイルスにおける遺伝子の機能解析 東郷将希、長尾竜平、吉田菜穂子、藤野元子、中山哲夫、駒瀬勝啓、水谷智彦 第 53 回日本ウイルス学会 横浜 2005 11/20-22.
- 5) 麻疹ウイルス野生株とワクチン株の抗原性の差 中山哲夫、吉田菜穂子、藤野元子、駒瀬勝啓 第 53 回日本ウイルス学会 横浜 2005 11/20-22.
- 6) 外来蛋白を発現する麻疹ウイルス AIK-C ワクチン株の樹立 中山哲夫、藤野元子、茂木淑江、吉田菜穂子、駒瀬勝啓 第 9 回日本ワクチン学会 大阪 2005 10/15-16.
- 7) ムンプスウイルスワクチン星野株ゲノムの全塩基配列の決定 竹内 薫、中山哲夫、駒瀬勝啓 第 47 回日本臨床ウイルス学会 東京 2006.6.3-4
- 8) 弱毒風疹生ワクチン高橋株を用いた reverse genetics 法の確立 坂田真史、駒瀬勝啓、中山哲夫 第 54 回日本ウイルス学会 名古屋 2006. 11.19-21
- 9) 弱毒風疹生ワクチン(高橋株)の reverse genetics 法の確立 坂田真史、駒瀬勝啓、中山哲夫 第 10 回日本ワクチン学会 大阪 2006. 10.21-22.

### 【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

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)  
平成 17～19 年度分担研究総合報告書

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

分担研究者 末原章宏 (武田薬品工業株式会社)  
協力研究者 岩本好司、山本彰嗣、尾山誠一郎 (同上)

**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、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℃加速試験による力価安定性を調査した結果、25℃・21 日間の保存後の麻しんウイルス力価低下速度は牛血清添加培地由来ウイルスと差異は認められず、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。

## 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作製し、牛血清を含む培地で増殖させている。使用されるブタ由来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、牛血清非添加培地、組換え型消化酵素及び $\gamma$ 線照射牛血清の検討、ウシポリオーマウイルス遺伝子検出試験の導入検討などを行い、動物由来物質を排除したワクチン又は迷入ウイルスリスク低減を図ることを目的とした検討を行った。

## 2. 研究方法

### 1) 牛血清非添加培養の検討

牛血清添加培地及び牛血清非添加培地で培養した初代ニワトリ胚培養細胞を用いて、それぞれ麻しんワクチン原液製造方法に準じて麻しんウイルスを 5 代まで継代培養した。3 代及び 5 代継代後の麻しんウイルス液を調製後、凍結乾燥を行い、25℃加温による力価安定性試験を実施した。

### 2) 組換え型消化酵素及び $\gamma$ 線照射牛血清の適用検討-1

11 日齢の鶏卵から得られたニワトリ胚を組換え型消化酵素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 $\gamma$ 線照射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、それぞれの力価(ウイルス含量)を測定・比較した。

### 3) 組換え型消化酵素及び $\gamma$ 線照射牛血清の適用検討-2

11 日齢の鶏卵から得られたニワトリ胚を組換え型消化酵素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 $\gamma$ 線照射牛血清添加培地又は牛血清添加培地を加え、麻しんワクチン原液製造方法に準じて作製したそれぞれのウイルス液を調製後、凍結乾燥を行い、25℃加温による力価安定性試験を実施した。

### 4) 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

「牛血清からのウシポリオーマウイルス遺伝子の検出法(国立感染症研究所・大槻先生)」に準じ、High Pure Viral Nucleic Acid Kit(ロッッシュ社)を使用して試料から DNA を精製し、TaKaRa Ex Taq、f09 プライマー(aaaaaaggattaaaaggacagc)そして Tr01 アンチセンスプライマー(atggaattaacatgagggaatg)を用いて PCR(94℃・

1分→94℃・30秒、55℃・30秒、72℃・3分、40サイクル→72℃・5分)を行った。その後反応液を1.0w/v%アガロースゲル電気泳動で処理し、約3.1kbpのバンドが検出された場合をウシポリオーマウイルス(BPyV)遺伝子陽性と判断した。陽性コントロールには、国立感染症研究所より分与された陽性遺伝子を鋳型として作製したPCR産物を使用した。

試験系の確認には、PCR産物を含む牛血清を遺伝子抽出系に擬似的に添加し、続いてPCR及びアガロースゲル電気泳動を行い、約3.1kbpの遺伝子を確認することにより評価した。

### 3. 研究結果及び考察

#### 1) 牛血清非添加培養の検討

牛血清非添加培地で培養したニワトリ胚培養細胞から得られた麻しんウイルス凍結乾燥小分製品について、25℃、21日間保存した力価結果は、牛血清添加培地(現行法)と比較して差異を認めなかった(表1及び図1)。

牛血清非添加培地を製造に適用するためには、更に温度感受性やプラークサイズ等の継代変化や免疫原性などの調査の必要性が考えられた。

#### 2) 組換え型消化酵素及びγ線照射牛血清の適用検討-1

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2)。

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得られた各麻しんウイルスを最終バルク濃度に調製し、モルモット異常毒性試験を実施した結果、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。

また、麻しんウイルスの力価(ウイルス含量)は同等であり、危険率5%で有意差(*F*検定、*t*検定)があるとはいえなかった(表2)。

#### 3) 組換え型消化酵素及びγ線照射牛血清の適用検討-2

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得られた麻しんウイルスの凍結乾燥小分製品について、25℃で、1週、2週、3週、1ヵ月、2ヵ月、3ヵ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3、図3)。

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) 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

感染研から分与されたウシポリオーマウイルス陽性遺伝子を鋳型として、PCR産物を作成した。これを陽性コントロールとして、遺伝子抽出系に添加し、PCR及び電気泳動を行い、牛血清に含まれる約3.1kbpの遺伝子の検出が可能であることを確認した。

更に、牛血清3ロット、麻しんワクチン原液3ロットを試料としてウシポリオーマウイルス遺伝子検出試験を行った結果、図1に示すとおりいずれも陽性を示す約3.1kbpのバンドは検出されなかった(図4)。

### 4. 結論

弱毒生麻しんワクチン(シュワルツ FF-8 株)の製造において牛血清非添加培地の使用、組換え型消化酵素又はγ線照射牛血清の導入は、ワクチン内の迷入ウイルス低減の目的からも有用であり、力価安定性試験結果からも現行品と比較して同等であることが確認出来た。

### 5. 健康危険情報

なし

### 6. 研究発表

- 1) 論文発表  
なし。
- 2) 学会発表  
なし。

### 7. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

- 1) 特許取得  
なし。
- 2) 実用新案登録  
なし。
- 3) その他  
なし。

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

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

下段: 3 バイアルの平均±標準偏差

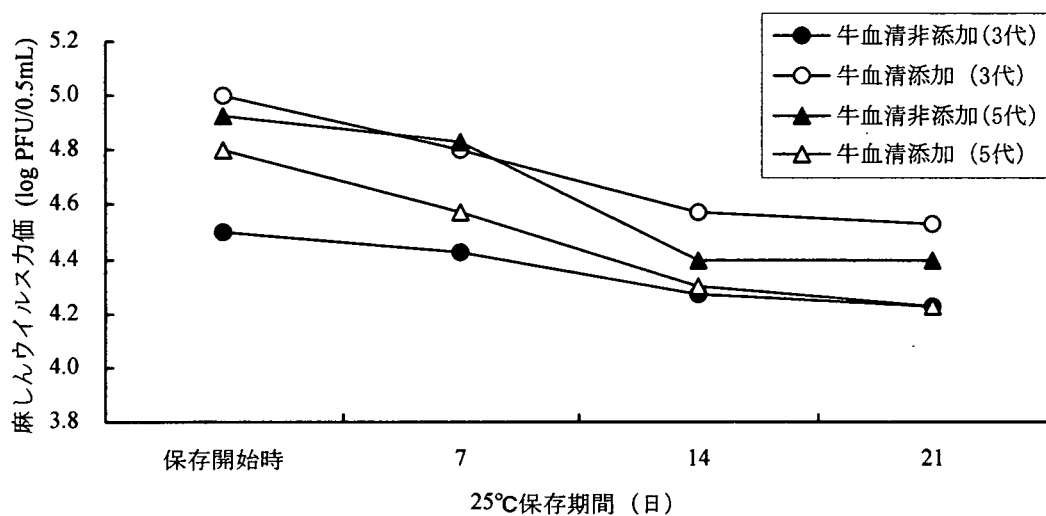
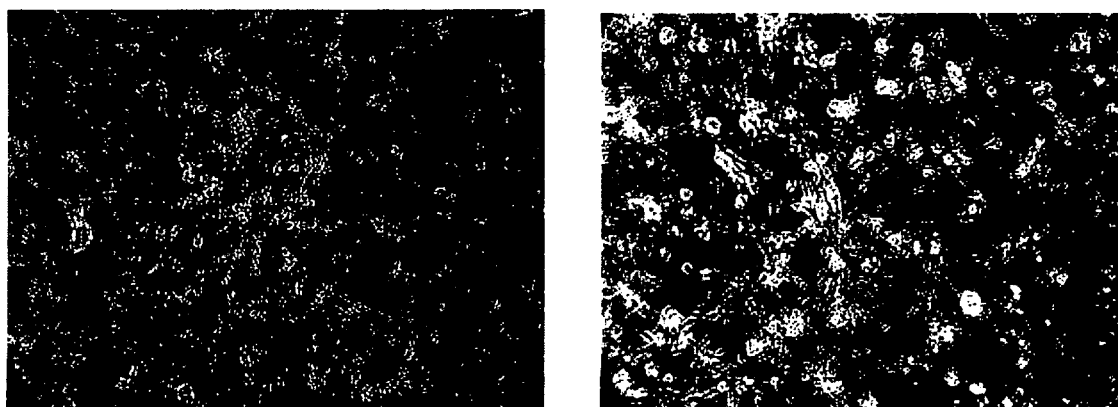


図1 小分製品の25°C保存による麻しんウイルス力価安定性



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2 ニワトリ胚細胞の顕微鏡観察

表2 組換え型消化酵素及びγ線照射牛血清のウイルス含量試験成績

消化酵素	牛血清	ウイルス含量(logPFU/0.5mL)
ブタ由来トリプシン	未照射	6.4、6.4、6.0
	γ線照射	6.5、6.3、5.9
組換え型消化酵素	未照射	6.3、6.1、5.9
	γ線照射	6.3、6.3、6.0

表3 小分製品の力価安定性試験結果 (25℃加速試験)

消化酵素	牛血清	力価 (ウイルス含量) log CCID <sub>50</sub> /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

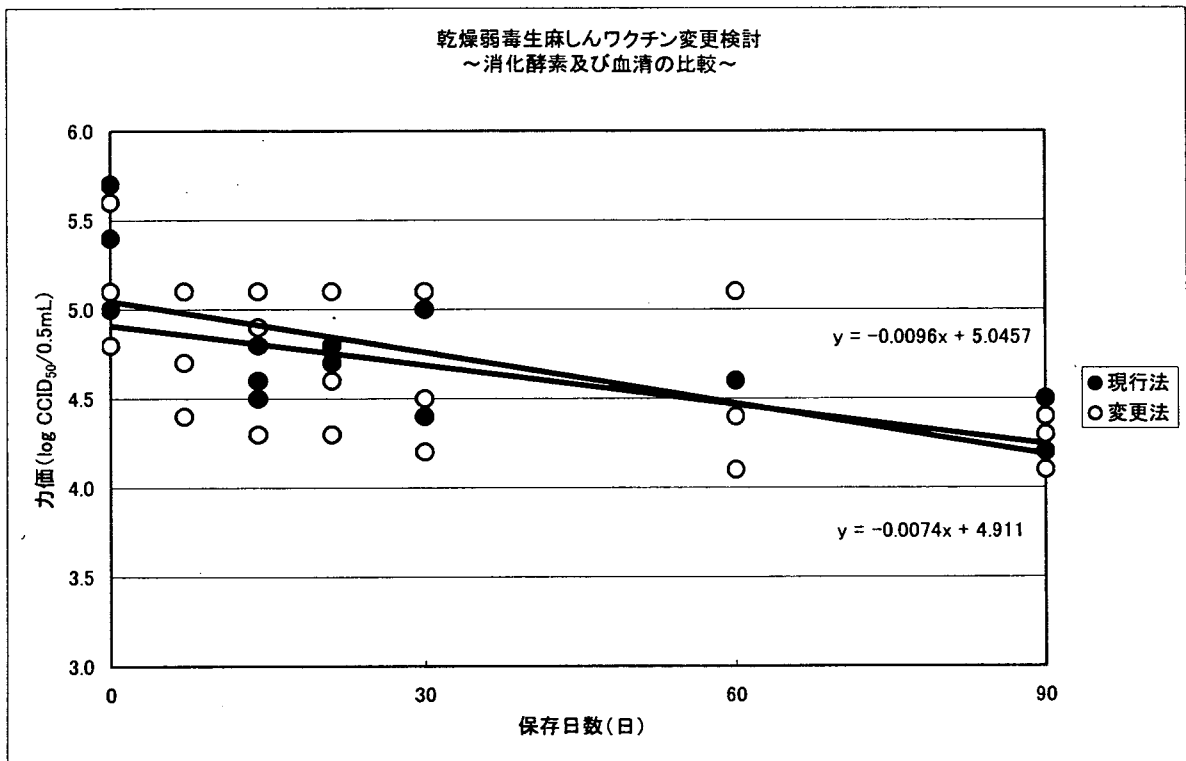


図3 小分製品の力価安定性試験結果

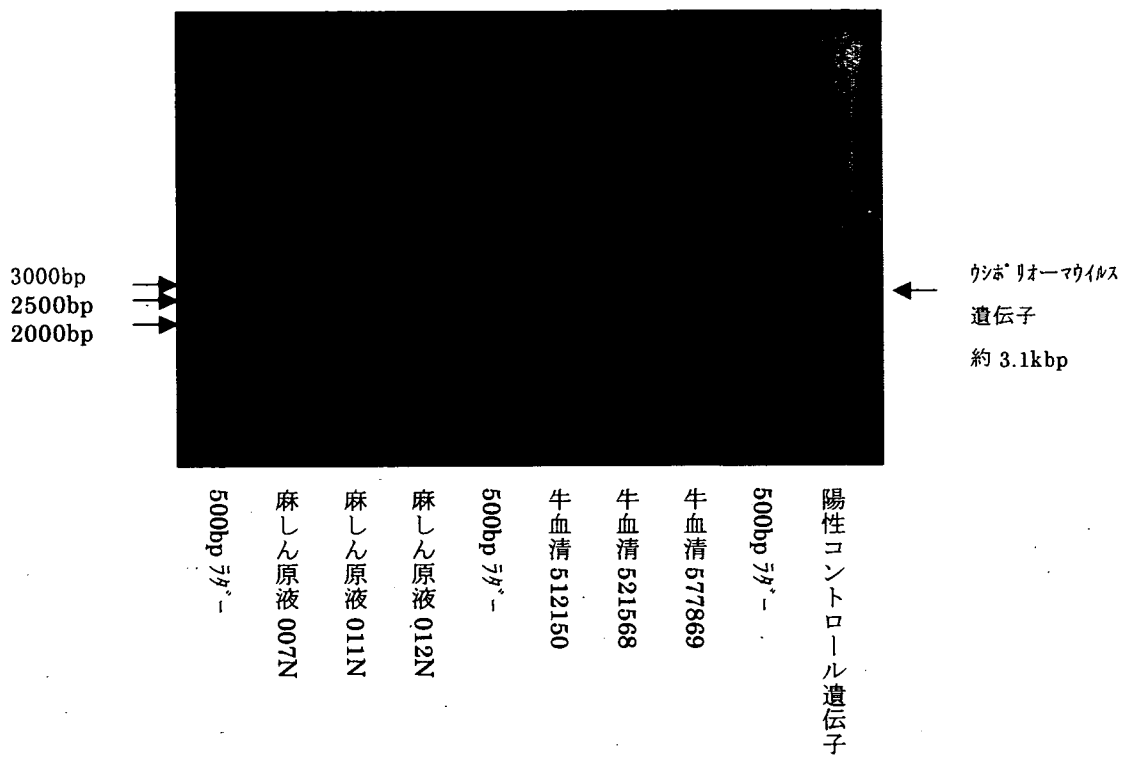


図 4 電気泳動パターン

組織培養インフルエンザワクチン製造における品質確保に関する研究

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

**研究要旨** 本研究ではわが国での組織培養インフルエンザワクチンの実用化を促進するために、組織培養ワクチンの品質確保を目的として、製造に使用するシードウイルス、ワクチンの力価測定に必要な標準品に関する基礎的な研究を実施した。細胞培養ワクチンで使用するシードウイルスは、同一の臨床材料から分離したウイルス株であっても分離基材が異なると抗原性の違うウイルスが分離されることから、ウイルス株としての特性を考慮する必要があることを明らかにした。組織培養ワクチンの力価は一元放射免疫拡散試験法（SRD 法）によって測定するが、そのためには標準抗原が必要で測定値の精度にはその品質が重要である。培養細胞で分離されたウイルスは発育鶏卵で分離されたウイルスと抗原性が異なる場合があるために、従来の発育鶏卵で製造された標準抗原が組織培養ワクチンの力価測定に適しているか検討することは重要な課題である。標準抗原の安定性について検討したところ、一定の手順に従って製造した標準抗原であっても、力価の安定性において相当の違いがあることがわかった。より安定性の高い標準抗原を作製するための研究が必要である。また、標準抗原の力価の値付けの変動を少なくするには一次標準抗原の HA 含量の設定が重要であることがわかった。一次標準抗原の HA 含量を決めるための試験、特に HA 蛋白の割合を求める SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）法の標準化が重要な課題である。

### A. 研究目的

インフルエンザワクチンは 1990 年代後半にはほとんど接種されなかった時期があったが、ワクチンの接種対象者を学童中心から実際に健康被害を受ける、いわゆるハイリスク者である 65 歳以上の高齢者へとワクチンの接種方針を変更したことや、さらに新型インフルエンザの出現が危惧されるような状況が影響して、ワクチン接種への意欲が高まり、現在では国民全体で 15 から 30% 程度の接種率と考えられ欧米並みに高い接種率を維持している。そのため、インフルエンザワクチンの安全性の確保と安定供給は重要な課題である。

現行のインフルエンザワクチンは発育鶏卵を使用して製造される不活化ワクチンである。長期間にわたって製造され実績のあるワクチンではあるが、発育鶏卵を使用したワクチン製造にはいくつかの問題点が存在する。発育鶏卵の安定供給の確保のためには一定の鶏や施設・設備を必要とするため緊急に製造量の増減に対応するのは容易ではない。一方、細胞培養ワクチンでは製造量の変化に比較的容易に対応することが可能と考えられる。新型インフルエンザ出現のような緊急事態に備えた迅速な製造体制の整備の観点からも細胞培養ワクチンに期待される点が多い。また、

発育鶏卵では培養細胞などと比較すると外来性の病原体等の迷入の可能性も高く、その頻度についても予測できない。このような点からも組織培養ワクチンの開発、実用化はワクチンの安全性の確保、安定供給や新型インフルエンザ対策の観点から極めて重要な課題である。

わが国でもこのような観点から組織培養ワクチンの研究開発が進められてきたが、実用化のために残された課題も多い。一方、海外においては培養細胞を使用したインフルエンザワクチンの開発は実用化直前の状況である。

本研究ではわが国での組織培養インフルエンザワクチンの実用化を促進するために、組織培養ワクチンの品質確保を目的とした研究を実施することとし、製造に使用するシードウイルス、ワクチンの力価測定に必要な標準品に関する基礎的な研究を実施した。

### B. 研究方法

シードウイルス株として同じ臨床材料から異なる分離基材である発育鶏卵、MDCK 細胞を使用して分離したウイルスについて、抗原性と増殖性を比較し、製造株としての適性を検討した。また、ワクチンの力価を測定するのに必要な一元放射免疫拡散試験法（SRD 法）に使用する標準抗原の製



造・保管・力価の値付けに関する検討を実施した。

### C. 研究結果・考察

同一の臨床材料から分離したウイルス株であっても分離基材が異なる発育鶏卵、MDCK 細胞を使用して分離した2種類のウイルス株の抗原性に差が見られた。従って細胞培養ワクチンで使用するシードウイルスは、その分離由来に基づく特性を明らかにして製造に使用する必要がある。現在使用されている力価試験法である SRD 試験は抗原抗体反応に基づく試験であるために従来の発育鶏卵で製造された標準抗原が、組織培養ワクチンの力価を測定するのに適しているのか検討することは重要な課題のひとつである。

ワクチンの力価を測定するのに必要な SRD 試験に使用する標準抗原の安定性について検討したところ、一定の手順に従って製造した標準抗原であっても力価の安定性において相当の違いがあることがわかった。一定品質のワクチンを製造するためには、今後より安定性の高い標準抗原を作製するための検討が必要である。また、標準抗原の値付けにおいて一次標準抗原の HA 含量の設定が重要であることが検討の結果わかった。一次標準抗原の HA 含量を決めるための試験、特に HA 蛋白の割合を求める SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) 法の標準化が重要な課題である。

### D. 結論

本研究ではわが国での組織培養インフルエンザワクチンの実用化を促進するために、組織培養ワクチンの品質確保を目的とした研究を実施することとし、製造に使用するシードウイルス、ワクチンの力価測定に必要な標準品に関する基礎的な研究を実施した。その結果、同一の臨床材料から分離したウイルス株であっても分離基材が異なると抗原性の違うウイルスが分離されることから、細胞培養ワクチンで使用するシードウイルスは、ウイルス株としての特性を考慮する必要があること、また、現在使用されている力価試験法である SRD 試験は抗原抗体反応に基づく試験であるために従来の発育鶏卵で製造された標準抗原が、組織培養ワクチンの力価を測定するのに適しているのか検討することは重要な課題のひとつであることを明らかにした。さらに、ワクチンの力価を測定するのに必要な SRD 試験に使用する標準抗原の安定性について検討したところ、一定の手順に従って製造した標準抗原であっても力価の安定性において相当の違いがあることがわかった。一定品質のワクチンを製造するためには、今後より安定性の高い標準抗原を作製するための検討が必要である。また、標準抗原の力価の値付けの変動を少なくするには一次標準抗原の HA

含量の設定が重要であることがわかった。一次標準抗原の HA 含量を決めるための試験、特に HA 蛋白の割合を求める PAGE 法の標準化が重要な課題である。

### E. 研究発表

なし

### F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得           なし
2. 実用新案登録   なし
3. その他             特記事項なし

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

分担研究者 細井和男 デンカ生研株式会社ワクチン研究部部长

## 研究要旨

- (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。  
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。

## A. 研究目的

発育鶏卵を用いたインフルエンザワクチンの製造に対し、製造量の変化への対応、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を比較的容易に行うことができる組織培養ワクチンの開発、実用化はワクチンの安全性の確保、安定供給の観点から現在のワクチン政策上極めて重要な課題である。また、新型インフルエンザ出現に備えた迅速な製造体制の整備の観点からも組織培養ワクチンに期待される点が多い。

本研究は、組織培養インフルエンザワクチンの実用化の促進や、それらの効果・安全性のための品質確保を目的として、以下の点について研究を実施する。

- (1) 組織培養ワクチン製造に使用するシードウイルスとして現行のワクチン株である発育鶏卵から分離されたウイルス株を使用した場合のワクチンの製造量や特性について検討する。
- (2) 組織培養ワクチンが発育鶏卵を使用した現行ワクチンと同様の規格試験によって安全性や効果について品質確保ができるのかについて検討する。

## B. 研究方法

### H17 年度

組織培養法で産出・精製したインフルエンザウイルス試料と従来の鶏卵法でのウイルス試料について、SRD 試験による HA 含有率の比較を試みた。

A/New Caledonia/20/99(H1N)株(以下、A/NC 株)シードウイルスを、発育鶏卵及び MDCK 細胞で増殖させ、限外ろ過濃縮、しょ糖密度勾配遠心等で精製したウイルス粒子を試料とした。両試料

について、以下の試験を実施した。

- ・たん白質含量測定(TCA-BCA 法)
  - ・HA 試験(ニワトリ赤血球凝集反応)
  - ・CCA 価測定\*(ミラー・スタンレー変法)
  - ・一元放射免疫拡散試験\*(以下、SRD 試験)
- (\* 生物学的製剤基準「インフルエンザワクチン」に記載の方法に従い、現行鶏卵法 HA ワクチンの試験用標準抗原及び抗血清を用いて測定した。)

### H18 年度

組織培養法によって産出したウイルス培養液を精製・不活化後、エーテル処理で解裂させたスプリットワクチンを作製し、本ワクチンの有効性評価を鶏卵スプリットワクチンを対照として試みた。

- 1) A/NC 株を MDCK 細胞で培養し、その培養上清を限外ろ過濃縮、しょ糖密度勾配遠心等により精製・不活化し、不活化精製ウイルス粒子を作製した。
- 2) 不活化精製ウイルス粒子を現行鶏卵法と同様にエーテル処理により解裂させ、組織培養スプリットワクチンを試作した。
- 3) 組織培養スプリットワクチンは鶏卵スプリットワクチンと共に、下記条件でマウス免疫原性試験に供した。  
動物: ddY マウス 雌 4 週齢  
投与量: 1, 0.2, 0.04  $\mu$ g HA/匹(一群 10 匹)  
免疫期間: 初回免疫から 3 週目に追加免疫、5 週目に全採血を実施
- 4) 得られた抗血清について、ニワトリ赤血球を用いた HI 抗体価と MDCK 細胞を用いた中和抗体価を測定した(攻撃ウイルスとして鶏卵にて産生したウイルスを使用した)。
- 5) 各スプリットワクチンの投与量と HI 抗体価及

び中和抗体価の関係をグラフ化し、ドーズレスポンスの比較を行った。

### H19 年度

組織培養法によって産出したウイルス培養液から作製した不活化精製ウイルス粒子を材料として、ウイルス表面抗原を主成分とするサブユニットワクチンを試作し、その有効性評価を鶏卵スプリットワクチンを対照として試みた。

- 1) A/NC 株を MDCK 細胞で培養し、その培養上清から不活化精製ウイルス粒子を調製した。
- 2) 不活化精製ウイルス粒子を用い、界面活性剤処理等により、製法の異なる 2 種類のサブユニットワクチンを試作した。
- 3) 組織培養サブユニットワクチンは、鶏卵スプリットワクチンと共に、投与量以外は H18 年度と同条件にてマウス免疫原性試験に供した。  
投与量: 0.04, 0.008, 0.0016  $\mu\text{g}$  HA/匹(一群 10 匹)
- 4) 得られた抗血清について、MDCK 細胞を用いた中和抗体価を測定した(攻撃ウイルスとして鶏卵にて産生したウイルスを使用した)。
- 5) 各サブユニットワクチンの投与量と中和抗体価の関係をグラフ化し、ドーズレスポンスの比較を行った。

## C. 研究結果と考察

### H17 年度

測定結果の比較を表 1 に示した。

表 1 測定結果比較

サンプル名	卵培養法 精製ウイルス	組織培養法 精製ウイルス
たん白質濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	1482	1240
HA 価	204800	204800
CCA 価(CCA/mL)	12410	12240
比活性(CCA/ $\mu\text{g}$ P)	8.37	9.87
SRD 法 HA 含量 ( $\mu\text{g}$ HA/mL)	465	409
HA 含有率 ( $\mu\text{g}$ HA/ $\mu\text{g}$ P)	0.31	0.33

- ・たん白質量をそろえて HA 試験を行ったところ、同じ HA 価となった。
- ・たん白質量当たりの CCA 価(比活性)は組織培養法のほうが約 15% 高かった。
- ・たん白質量当たりの HA 含量(SRD 試験による HA 含有率)はほぼ一致した。
- ・SRD 試験におけるリングの拡散状態(大きさ)は組織培養材料と鶏卵材料とで差が見られな

かったが、色素による染色の度合い・濃度に若干の差が見られた。

今後更なるデータの蓄積が必要ではあるが、組織培養法で調製したインフルエンザウイルスでも現行鶏卵法 HA ワクチンの SRD 標準抗原及び抗血清を用いて力価測定が原理的には可能であることが示唆された。

### H18 年度

マウス免疫原性試験における投与量と抗体価の関係をグラフ化したところ、両ワクチン共にドーズレスポンスは良好でなかった。この原因として、今回の投与量の設定が高すぎた可能性が考えられた。

そこで、最も濃度が高い  $1 \mu\text{g}$  HA/匹の群を除外し、残りの 0.2, 0.04  $\mu\text{g}$  HA/匹での組織培養スプリットワクチン(以下、TCIV-SP)及び鶏卵スプリットワクチン(以下、EGG-SP)での抗体価の結果(対数平均値:  $\log_2(\text{抗体価}/5)$ と 95%信頼限界)を HI 抗体価について図 1 に、中和抗体価について図 2 に示した。

両ワクチンの有意差検定を実施したところ、それぞれの投与量で 5%の危険率で有意差は認められず、TCIV-SP は EGG-SP と同程度の有効性を有することが示唆された。

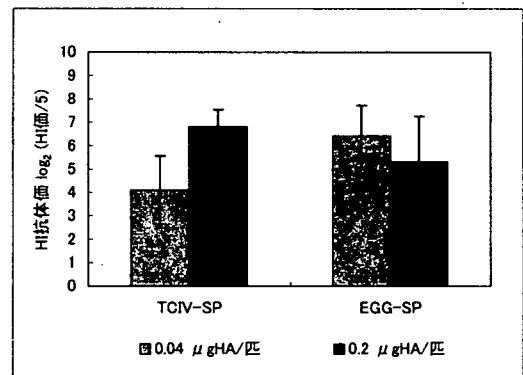


図1 HI抗体価の比較

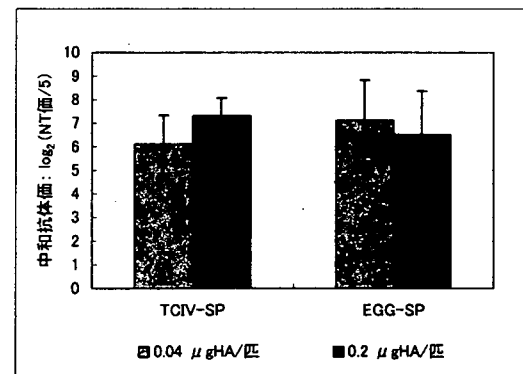


図2 中和抗体価の比較

## H19 年度

試作した 2 種類の組織培養サブユニットワクチン(以下、TCIV-SU1、-SU2)と鶏卵スプリットワクチン(以下、EGG-SP)について、たん白質濃度及び SRD 法による HA 含量の分析結果を以下に示す。

表 2 測定結果比較

サンプル名	EGG-SP	TCIV-SU1	TCIV-SU2
たん白質濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	1031	618	268
SRD 法 HA 含量 ( $\mu\text{g HA/mL}$ )	392	592	271
HA 含有率 ( $\mu\text{g HA}/\mu\text{g P}$ )	0.38	0.96	1.01

TCIV-SU1 及び TCIV-SU2 の SRD 試験による HA 含量はたん白質濃度とほぼ同じ値を示し、両 TCIV-SU は EGG-SP と異なり HA が大部分を占めるサブユニットワクチンであることが確認された。

これら試作ワクチンをマウス免疫原性試験に供し、投与量と抗体価の関係をグラフ化したところ、全体的にドーズレスポンスは良好であった。0.04 及び 0.008  $\mu\text{g HA/匹}$  における TCIV-SU1、-SU2 及び EGG-SP での中和抗体価(対数平均値:  $\log_2(\text{抗体価}/5)$ と 95%信頼限界)を図 3 に示した。

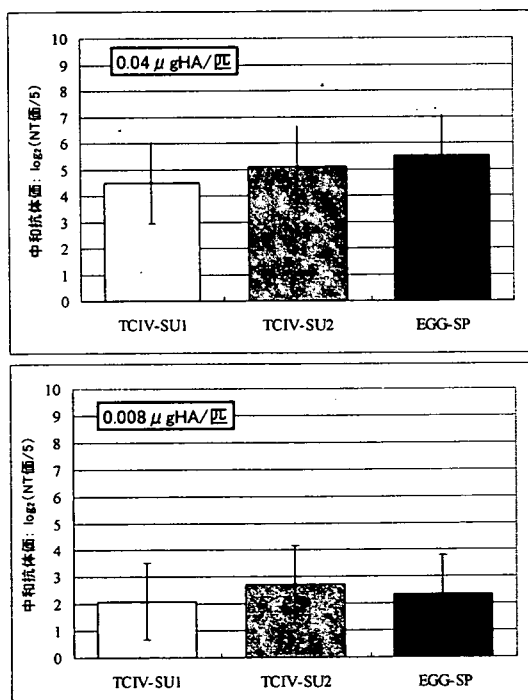


図 3 中和抗体価の比較

今回試作した TCIV-SU1 及び -SU2 は免疫原性を有し、EGG-SP と同程度の有効性を有することが

確認された。また、サブユニット化の方法によって有効性に影響がある可能性もあるため、精製方法を含めて今後更なる検討が必要である。

## D. 結論

組織培養インフルエンザワクチンの開発及びその効果・安全性について検討するため、A/NC 株をモデルウイルスとした組織培養ワクチンを作製し、現行の鶏卵ワクチンとの特性及び有効性比較を行った。

最初に、組織培養法で産出・精製したインフルエンザウイルス試料を現行鶏卵法の標準抗原及び抗血清を用いた SRD 試験に供し、鶏卵ワクチンと同様に測定可能かを調べた。その結果、組織培養ウイルス試料は測定可能で、鶏卵ウイルス試料とほぼ同等の HA 含有率を示したことから、現行の SRD 試験適応の可能性が示唆された。

次に、組織培養ワクチンの効果に関する検討として、不活化精製ウイルス粒子からスプリットワクチン、及びサブユニットワクチンを試作した。これら試作ワクチンを、対照となる鶏卵スプリットワクチンと共にマウス免疫原性試験に供し、得られたマウス抗血清を用いて 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示唆された。

今後は組織培養ワクチンの実用化に向けて、有効性や安全性はもとより、生産性に関する検討も行っていきたい。

## E. 研究発表

1. 研究発表 なし
2. 学会発表 なし

## F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他特記事項 なし