

と同程度の抗体産生能を有することを確認した。

本年3月より開始する非臨床試験に向けて、上記治験薬製法にて2バッチの原薬製造を行い、必要量の被験物質を確保した。

スケールアップ検討に関しては、600Lフアーメンターを用いたウイルス培養にて45Lスケールと同等のウイルス産生を達成し、現培養法はスケールアップに対応可能であることを確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

細胞培養系を用いた新型インフルエンザワクチンの開発研究

分担研究者 五反田亨（学）北里研究所生物製剤研究所

研究要旨：無血清培地とマイクロキャリアを用いた培養法で、MDCK 細胞に新型インフルエンザウイルス NIBRG-14 (A/VietNam/1194/2004) 株（以後 NIBRG-14 株とする）を感染させ、ウイルス培養条件及び精製条件を検討した。また、新規アジュバント候補のアジュバント効果について検討した。更に、200L での培養条件の検討を行った。その結果、MDCK 細胞で培養した新型インフルエンザウイルス NIBRG-14 株は、発育鶏卵培養よりも高い増殖性であることを確認した。また、新規不活化剤を用いることで、製造期間の短縮が図れることが確認できた。しかし、新規アジュバント候補は、マウスを用いた実験で季節性ワクチン抗原に対しては十分な免疫賦活効果を示したが、新型インフルエンザウイルス NIBRG-14 株では、アルミアジュバントと差が見られなかった。培養条件の検討においては、200L スケールにおいても小スケールと同様の培養が可能であることが確認できた。確立した製造方法及び剤形で非臨床試験用の試作ワクチンを作製した。

A. 研究目的

我々はこれまでの研究により、無血清培地とマイクロキャリアを用い MDCK 細胞を基質として、季節性インフルエンザウイルスを感染させてウイルス培養した場合、発育鶏卵を用いた場合とほぼ同等の高い感染価が得られることを確認している。

また、新規アジュバント候補として植物由来のアジュバントがマウスに十分な免疫効果を示すことを確認している。

本研究では MDCK 細胞の培養規模の増大、新型インフルエンザ候補ウイルスの培

養・精製検討及び新規アジュバントを用いた剤型を確立すると共に、MDCK 細胞培養を用いた新型インフルエンザワクチンの規格試験法を確立する。更に、試作新型インフルエンザワクチンを作製し、非臨床試験を実施する。

B. 研究方法

季節性インフルエンザウイルス培養条件と同様に、新型インフルエンザ候補ウイルスの一つである NIBRG-14 株を MDCK 細胞に感染・培養し、鶏卵培養のそれと比較

した。また、MDCK 細胞に新型インフルエンザウイルス NIBRG-14 株を感染・培養後、新規不活化剤を加えた後に精製し、これまでの不活化法と比較し、現行発育鶏卵培養インフルエンザワクチン原液の各規格試験項目を含むたん白質含量試験、無菌試験、異常毒性否定試験、マウス白血球数減少試験、力価試験、不活化試験、マウス体重減少試験、ウサギ発熱試験について測定し現行発育鶏卵培養のそれと比較した。

さらに、新規アジュバントの免疫効果をマウスで再検討した。MDCK 細胞で培養した季節性インフルエンザ HA 抗原、及び新型インフルエンザウイルス NIBRG-14 株の抗原を、それぞれ新規アジュバントの投与量及び抗原量を変えて BALB/c マウスに 3 週間間隔で 2 回投与し、最終投与から 2 週後に血清を採取し、抗原特異的な IgG 抗体産生量を ELISA 法で、HI 抗体価ならびに中和抗体価を測定し検討した。

次に、培養規模のスケールアップについては、培養パラメーターである、温度、酸素濃度、二酸化炭素濃度、pH、回転数と、攪拌翼の形状、及び培養時に最も重要なパラメーターの一つである K_{La} 値の諸条件について 50L 培養で得られた値を基に、200L 培養タンクでの検討を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験倫理規定を深く理解し、動物実験委員会の承認を得た後動物実験指針等を遵守して実施した。そのうえで「動物の愛護および管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号)、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」(昭和 55 年 3 月 27 日総理府告示第 6 号)の基本原則を適用した。

C. 研究結果

これまでの研究で、MDCK 細胞を用いた培養法として、パーフュージョン法を用いることで高い感染価が得られることを見出している。今回の新型インフルエンザウイルス候補株 NIBRG-14 株の培養においても本法を採用した。以前の研究と同様 NIBRG-14 株は、バッチ法よりパーフュージョン法で 4 倍以上のウイルスが回収できた。また、MDCK 細胞を用いた培養法で得られた精製ウイルスは、発育鶏卵培養法で得られたそれと比較して、約 1.3 倍量であった。

これまでの研究で、各種ウイルスに不活化作用のあることが既知である不活化剤を用いて、新型インフルエンザウイルスの NIBRG-14 株のウイルスの不活化を試みた。その結果、これまでのエーテル処理またはホルマリンによる不活化より、短時間での不活化が容易であることがわかった。即ち、検討不活化剤では、24 時間で新型インフルエンザウイルス NIBRG-14 株は不活化された。それに比べエーテル処理またはホルマリンによる不活化では、不活化までに 2 週間から 5 週を要した。しかし、検討不活化剤で不活化したウイルスの精製原液は、現行発育鶏卵培養インフルエンザワクチン原液の各規格試験項目のうち、異常毒性否定試験、及びウサギ発熱試験において、不適合となる場合が確認されたが、新規不活化剤での不活化に加えて短期間のホルマリン処理で適合することが確認された。

次に、新規アジュバントのマウスでの試験では、水酸化アルミニウムアジュバント 30 μ g、HA 抗原 3 μ g のインフルエンザ全粒

子ワクチン及びHAワクチンをコントロールとした。新規アジュバントは、季節性インフルエンザウイルスのスプリットHA抗原と共に免疫したときは、抗原量をコントロールの約10分の一から20分の一まで落としても、特異的なIgG抗体産生量、HI抗体価ならびに中和抗体価ともにコントロールとほぼ同等であった。しかし、新型インフルエンザウイルスNIBRG-14株の抗原では、季節性インフルエンザウイルスと異なり、アルミアジュバントと比較しても同等以上の結果は得られなかった。

培養条件については、培養パラメーターである、温度、酸素濃度、二酸化炭素濃度、pH、回転数と、攪拌翼の形状、及び培養時に最も重要なパラメーターの一つであるKla値の諸条件を検討した結果、200L培養規模においても50Lと同様のMDCK細胞の増殖を得ることが出来た。

D. 考察

これまでの研究結果と同様に、新型インフルエンザウイルスの培養には、MDCK細胞を基質としたパーフュージョン法での細胞培養法が応用できることが判明した。それは発育鶏卵培養法よりウイルスの増殖に優れていた。また、新規不活化剤を用いることで、短期間でのウイルス不活化が可能となったが、現行の鶏卵培養インフルエンザワクチンの規格試験の一部に不適合となることが確認され、新規不活化剤とホルマリン処理の両方が必要であったが、それでもなお、ワクチン製造の期間短縮が可能であった。これは新型インフルエンザワクチンを早期にリリースするために重要なことと考える。次に、新規アジュバントは、季

節性インフルエンザワクチンに極めて高い免疫賦活効果を示したが、新型インフルエンザウイルスNIBRG-14株ワクチンではアルミアジュバント以上の免疫賦活効果は得られなかった。新規アジュバントは、元々ある程度の免疫原性のある抗原には、きわめて有効であるが、免疫原性の弱い抗原にはあまり有効ではないことが考えられた。培養規模のスケールアップについては、検討条件の制御によって200L培養においてもMDCK細胞の増殖が小スケールと同程度に可能であった。今後、更なるスケールアップにおいても、同様の項目を検討することで可能であると考ええる。

E. 結論

MDCK細胞を基質とした細胞培養法として、パーフュージョン法が新型インフルエンザウイルス培養でも有効であった。また、50L規模では発育鶏卵法の1.3倍量のウイルス増殖を示した。新規不活化剤での新型インフルエンザウイルスの不活化は、製造期間の短縮に極めて有効であった。新規アジュバントは、新型インフルエンザウイルス抗原では水酸化アルミニウムアジュバントと同程度の免疫賦活効果しか得られなかった。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書に記入)

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

MDCK細胞を用いたワクチン開発

研究分担者 大塚 浩史 デンカ生研株式会社ワクチン研究部長

研究要旨

これまでに開発してきた浮遊系 MDCK 細胞の無血清培養でのインフルエンザウイルス培養工程が H5N1 株にも適用できることを確認した。ウイルスからサブユニット抗原を精製し、アルミアジュバントを用い調製したプロトタイプワクチンに免疫原性が認められた。アルミアジュバントへの抗原吸着機構を解析し、ウイルスたん白質のアルミアジュバントへの吸着率が高い製剤調製条件を設定した。培養工程、精製工程及び製剤化工程に関して、非臨床試験用製剤の調製に必要な一連の工程に関する検討を終了し、現在、マウスを用いて免疫原性を再度確認中である。浮遊系 MDCK 細胞のマスターセルバンク (MCB)、ワーキングセルバンク (WCB)、長期培養細胞 (CAL) について安全性試験を実施した。MCB, WCB の試験はほぼ完了し結果に問題はなかった (CAL は現在試験実施中である)。

A. 研究目的

本研究は、平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金の交付事業である医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス総合研究事業「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製造方法の開発研究」のうち、その分担研究として当社が実施した「組織培養インフルエンザワクチンの試作及び免疫原性試験における鶏卵ワクチンとの比較検討」で得られた成果を踏まえ、それを発展させて実施中である。

上記研究では浮遊系 MDCK 細胞の無血清培養で製造した季節性インフルエンザウイルスのスプリットワクチンを鶏卵のもの

と比較した。

今次研究では、この培養産生方法をインフルエンザウイルス (H5N1) に適用するとともに、スケールアップを行う。また、不活化後のウイルス抗原に、アジュバントを添加し、有効性が高いプロトタイプワクチンを製造する。

用いる細胞株を十分に試験、解析し、安全性が担保された恒常的なワクチン製造方法を確立し、非臨床試験用検体を製造する。

B. 研究方法

1. 培養工程の検討

1) MDCK 細胞の無血清培養

浮遊系 MDCK 細胞を無血清培地で培養し、50L 培養槽での増殖性を検討した。

2) ウイルス培養

インフルエンザウイルス Indo/05/2005 (H5N1)/PR8-IBCDC-RG2 株 (以下 Indo 株、リバースジェネティクス法による弱毒株) を浮遊系 MDCK 細胞に感染させ、50L 培養槽でのウイルス産生を検討した。

2. 精製工程の検討

ウイルスを含む培養上清から全粒子ウイルスを分画後、不活化及び DNA 分解処理を行い、不活化全粒子ウイルスを調製した。複数の精製法により含有抗原の異なる検体を調製しその品質等から不活化全粒子ウイルスを可溶化後、カラム等で精製するサブユニット抗原調製法を選択した。

3. 製剤化工程の検討

1) アルミアジュバント免疫原性の確認

サブユニット抗原にアルミアジュバントを加えたプロトタイプワクチンを調製し、マウスを用いた試験系で免疫原性を検討した。同時に不活化全粒子ウイルスにアルミアジュバントを加えた沈降全粒子ワクチンと比較した。

2) アルミアジュバントの吸着機構と製剤調製条件の検討

モデルたん白質及びウイルスたん白質を用いてアルミアジュバントの吸着機構について検討した。その結果を踏まえ

て、ウイルスたん白質のアルミアジュバントへの吸着率が高い製剤調製条件を設定した。

4. 細胞株の安全性確認

MCB, WCB, CAL のそれぞれにつき設定した項目で試験を行った。

5. 規格試験項目の検討

規格設定候補の試験項目につき、試験方法の基礎検討を実施した。

(倫理面への配慮)

問題なし

C. 研究結果

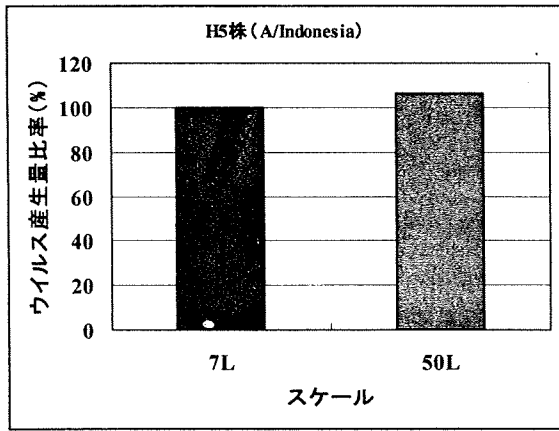
1. 培養工程の検討

1) MDCK 細胞の無血清培養

播種細胞濃度、培養温度、溶存酸素、培養時 pH、攪拌速度などのパラメーターを 7L 培養槽で検討し、そのデータに基づいて 50L 培養槽での培養を行った。50L 培養槽での浮遊系 MDCK 細胞の細胞増殖は、7L 培養槽と大きな違いは認められなかった。

2) ウイルス培養

インフルエンザウイルス Indo 株でのウイルス産生を検討した。接種時細胞濃度、トリプシン濃度、接種ウイルス量 (MOI)、培養温度、培養時 pH、培養時溶存酸素濃度 (DO)、攪拌回転数、培養日数などのパラメーターは季節性インフルエンザ株で検討したものを参考に設定した。50L 培養槽でのインフルエンザウイルス Indo 株のウイルス産生は、7L 培養槽のものとは大きな違いは見られなかった (図 1)。



*7L 実績値を 100 とした時の比率

図 1. ウイルス培養 7L と 50L の比較

2. 精製工程の検討

不活化全粒子ウイルス全粒子を可溶化後、カラム等で精製し、HA たん白質を主成分とするサブユニット抗原を精製した (図 2)。

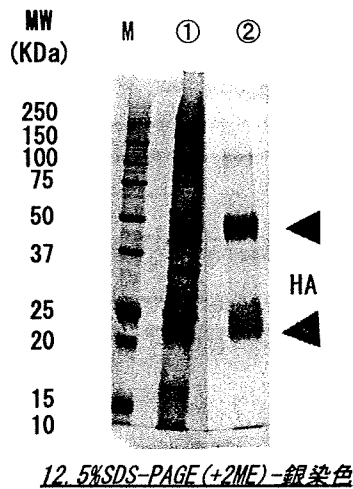


図 2. サブユニットサンプル調製

3. 製剤化工程

1) アルミアジュバント免疫原性の確認

アルミアジュバントを加えたプロトタイプワクチンを調製し、マウスで沈降全粒子ワクチンと免疫原性を比較検討した。

プロトタイプワクチン又は沈降全粒子ワクチンを BALB/c マウス (雌性)、10 匹/群に 0.1mL/Head、3 週間隔 2 回で筋肉内投与し、35 日 (2 回目投与から 2 週後) に採血、血清の中和抗体価を測定した (図 3)。

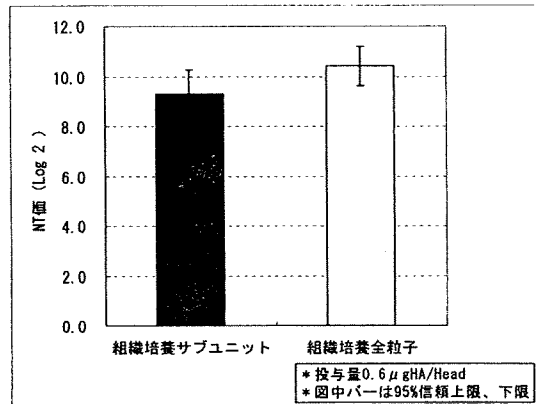


図 3. プロトタイプワクチンの免疫原性

プロトタイプワクチン、沈降全粒子ワクチンのいずれもマウスでの免疫原性が確認された。

2) アルミアジュバントの吸着機構と製剤調製条件の検討

アルミアジュバントへのたん白質の吸着には、静電引力の寄与が示唆された。一方、静電反発が起きる条件でも吸着が確認された。静電引力に加え、水素結合などの吸着因子が複合的に寄与していることが示唆された (図 4)。

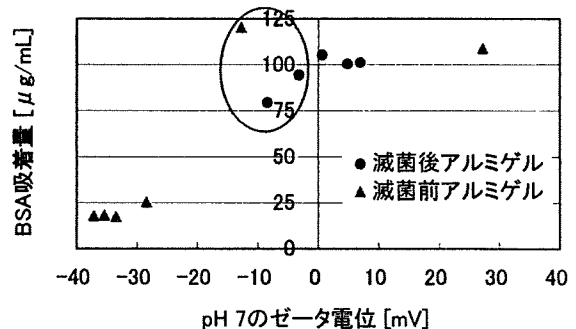


図 4 pH 7 のゼータ電位と BSA 吸着量

上記で例示した吸着機構に関する種々の検討結果に基づき、製剤組成などを改良することで吸着率が高い製剤を調製できる条件を確立した。

現在、本方法で調製した H5N1 株プロトタイプワクチンについてマウスにおける免疫原性を再度確認中である。

4. 細胞株の安全性確認

細胞 (MCB, WCB, CAL) の特性、ウイルス安全性試験、Tumorigenicity/Oncogenicity 試験の項目を設定した。CAL 細胞のウイルス安全性試験では動物への接種試験に加え、潜伏感染性 (latent infected) の DNA ウイルス (ヘルペスウイルス等)、RNA ウイルス (レトロウイルス等) を検出するインダクション試験も実施することとした。MCB、WCB で試験する 22 項目のうち 18 項目が終了、結果に問題は認められなかった (表 1)。CAL についても試験を開始した。

表 1. MCB, WCB 試験進捗状況まとめ

	試験		
	項目総数	終了項目	未了
MCB	19	16	3
WCB	3	2	1
合計	22	18	4

5. 原液及び製剤の規格試験基礎検討

原液及び製剤の規格試験として沈降新型インフルエンザワクチン (H5N1) 生物学的製剤基準の項目に加え、宿主由来不純物 (宿主たん白質、宿主 DNA)、工程由来不純物を予定しており、試験方法の基礎検討を順次実施している。

D. 考察

これまで開発を進めてきた浮遊系 MDCK 細胞を用いた無血清培地での季節性イ

ンフルエンザウイルスの培養産生方法は、インフルエンザウイルス (H5N1 株) への適用が可能であることを確認した。また、50L 培養槽での細胞及びウイルス増殖は、7L 培養槽と大きな違いは認められず、当該規模までのスケールアップに問題は認められなかった。

本邦において、現時点で十分な使用実績があり、安全性が充分確認されているアジュバントはアルミアジュバントのみである。

インフルエンザスプリットワクチン、サブユニットワクチンにおいてアルミアジュバントは効果が認められないとの報告もあるが、季節性ウイルス株を用いた自社試験では、アルミアジュバント添加の効果が認められたことから、アジュバントの調製及び製剤化の方法を改良することで使用が可能と考えている。精製したサブユニット抗原とアルミアジュバントで調製したプロトタイプワクチンに免疫原性が確認されたが、現在、抗原吸着率の高い条件で調製したワクチンで更に免疫原性を確認するとともに、ワクチンデザインの基礎データを拡充する動物試験を実施中である。

E. 結論

培養工程、精製工程、および製剤化工程について検討、非臨床試験用製剤の調製までに必要な一連の工程に関する基礎検討は終了し、これらの結果を踏まえ、現在非臨床試験の検体を製造中である。

次年度は非臨床試験を実施するとともに、500L 産生槽を用いたスケールアップ検討等を実施する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

精製法につき特許出願中（特願 2008
-253742（出願日 2008年9月30日））

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

細胞培養系を用いた新型インフルエンザワクチンの開発研究

研究分担者 二宮康行 株式会社 UMN ファーマ 取締役

【研究要旨】

本研究の目的は、パンデミック発生の早期より、短期間で大量のワクチン製造・供給を可能とするため、組換えインフルエンザヘマグルチニン抗原たん白（以下rHA）製造系を確立することである。本製造系は株化昆虫細胞（*expresSF+*細胞：以下SF+細胞）を宿主としたBaculovirus Expression Vector System（以下BEVS）を用いていることが特徴である。

平成21年度の第1四半期～第3四半期の研究成果として以下の成果を得たので報告する。

1. H5N1株2種（A/Vietnam/1203/2004株、A/Indonesia/05/2005株）及び新型H1N1株1種（A/California/04/2009株）の小スケールでのrHA発現培養に成功した。

A/Vietnam/1203/2004株のrHA発現培養を行い、100 Lまでの小スケールで、再現性あるrHA発現培養に成功した（第1章参照）。

また、異なるH5N1株であるA/Indonesia/05/2005株及びH5N1株以外のA/California/04/2009株についても、A/Vietnam/1203/2004株で確立した培養条件で、同様の発現パラメーター（生細胞数、生細胞率、平均細胞径）と細胞の形態変化を示し、目的のrHAが発現できることが確認された（第2章、第3章をそれぞれ参照）。

2. H5N1株2種（A/Vietnam/1203/2004株、A/Indonesia/05/2005株）及び新型H1N1株1種（A/California/04/2009株）のrHAの精製工程を確立した。rHAの種類によって、精製条件の最適化が必要である。

A/Vietnam/1203/2004株の100Lまでの小スケールで再現性あるrHA精製に成功した（第1章参照）。

A/Vietnam/1203/2004株以外のrHAにおいても、本精製工程により精製できることが確認された（第2章、第3章をそれぞれ参照）。得られたA/Indonesia/05/2005 rHAは精製工程中に開裂型HA0が増えてくることから、種々のrHAを安定にかつ高収量で得るためには、rHAの種類に応じた精製条件の最適化が必要である。BEVSの特長を活かすためには、精製条件の迅速な決定が不可欠である。

精製条件の最適化により、本法によるrHAワクチン原薬の製造は、宿主であるSF+細胞の増殖培養で3日間、ウイルス播種後の発現培養で3日間、さらにrHAの精製工程で4日間の合計10日間で完了させることができる。

3. rHA力価の測定のための一元放射免疫拡散試験法（Single Radial ImmunoDiffusion Assay, SRID法）を確立した。

リバースジェネティックス法で弱毒化したウイルス抗原（Ref#50）とrHAでは、それぞれで作製した抗血清との反応性が異なるため、rHAのSRID法には最適な抗血清が必要である。フェレット、ブタ、ヤギ、ウサギを精製rHAで免疫して得られた抗rHAポリクローナル抗体を用いて、抗体の希釈倍率、ゲル濃度、rHA前処理などの条件を最適化することにより、rHA力価測定のためのSRID法を確立した。また、アッセイ間のデータを比較するため、自社研究用のrHA標準抗原（R-0901）を設定した（第4章参照）。

4. パンデミック発生時に流行株rHAの早期生産を可能にするため、HA遺伝子を導入した組換えバキュロウイルスの構築を目指しており、HA遺伝子のcDNAを4種類入手した。また、HA遺伝子の遺伝子配列から、全合成によるcDNAの作製に着手した。

HA遺伝子のcDNAプラスミド（H5/Vietnam, H1/Solomon Islands, H3/Wisconsin, B/Malaysia）を入手し、組換えバキュロウイルスを作製中である（第5章参照）。また、インフルエンザウイルスからRT-PCR法を用いてcDNAの構築を試みている。公的機関から得られる遺伝子情報をもとに、全合成でHA遺伝子のcDNAを構築することを予定している。

*本報告の各章と、下表「平成21年度厚労科研費研究予定表（株）UMNファーマ」の各テーマの対応は以下のとおりである。

テーマ	本報告での章
1) rHA/H5/VN発現培養と精製	第1章 インフルエンザウイルスA/Vietnam/1203/2004株の組換えヘマグルチニンたん白の発現培養と精製
2) rHA/H5/IN発現培養と精製	第2章 A/Indonesia/05/2005株のrHAの発現培養と精製
3) SRID assay	第4章 一元放射免疫拡散試験法の確立
4) rBVの構築	第5章 組換えバキュロウイルスの構築
5) rHA/H1N1/ICAの発現培養と精製	第3章 新型H1N1 A/California/04/2009株のrHAの発現培養と精製

平成21年度 厚労科研費研究予定表（株）UMNファーマ

テーマ	検討項目内容	2009												2010			
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4		
1) rHA/H5/VN発現培養と精製	① 100Lタンク培養の成功	→															
	② 100Lタンク培養の再現性		→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
	③ 発現量、収量向上の検討 (10~20Lジャー高密度培養)				→			→			→						
	④ 100Lタンクスケールアップ											→					
2) rHA/H5/IN発現培養と精製	① rHA/H5/INの発現・培養の検討					→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
	② 各精製ステップの条件検討									→	→	→	→	→	→	→	→
	③ rHA/H5/IN精製条件の検討												→	→	→	→	→
3) SRID assay	① 標準抗血清、抗原の反応性				→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
	② rHA/VNIに対する社内標準抗血清作製					→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
	③ 社内標準抗血清を用いたSRID assayの検討									→	→	→	→	→	→	→	→
4) rBVの構築	① VN, IN株HAのcDNAを用いたrBVの構築手法の検討											→	→	→	→	→	→
	② 種々Flu-Virus株HAより作成したcDNAを用いたrBVの作製手法検討														→	→	→
5) rHA/H1/ICAの発現培養と精製	① rBV/H1/ICAを用いたrHA/H1/ICAの発現と精製				→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
	② 精製rHA/H1/ICAのin vitro及びin vivo生物活性の検討												→	→	→	→	→

→ : 実施済
⇨ : 未実施 / 実施中

第1章 インフルエンザウイルス

A/Vietnam/1203/2004 株の組換えヘマグルチニンたん白の発現培養と精製

A. 研究目的

Baculovirus Expression Vector System (以下 BEVS) を用いて、*expresSF+*細胞 (以下 SF+細胞) を宿主とした細胞培養法による組換えヘマグルチニン (以下 rHA) たん白の製造法を検討する。A/Vietnam/1203/2004 株由来の HA 遺伝子を導入した組換えバキュロウイルス (以下 rBV) を用いて、rHA の発現培養と精製の方法を確立する。また、A/Vietnam/1203/2004 株 rHA (以下 rHA/H5/VN) たん白の収量向上を目指し、実生産でのウイルス播種時の SF+細胞密度の許容範囲を検討する。

B. 研究方法

1. 宿主細胞

rHA 発現培養用宿主細胞の SF+細胞は、米国 Protein Sciences Corporation (以下 PSC) より入手した。SF+細胞は、ハスモンヨトウガ近似種 *Spodoptera frugiperda* 由来の Sf9 細胞から樹立され、無血清培地での培養及びたん白生産用に最適化された細胞である。

2. 組換えバキュロウイルス

A/Vietnam/1203/2004 株由来の HA 遺伝子を導入した rBV は PSC より入手した。rBV は次のように構築された。米国疾病予防管理センター (以下 CDC) から提供された H5N1 型インフルエンザウイルス A/Vietnam/1203/2004 株の vRNA から cDNA を合成し、バキュロウイルス組換えベクター (以下、pPSC12) に挿入した。pPSC12 と AcNPV E2 バキュロウイルスゲノム (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) を Sf9 細胞にコトランスフェクションしたのち、プラークアッセイ法により目的とする HA 遺伝子が完全な形で組み込まれた rBV を選定した。

3. 組換えバキュロウイルスの感染能の確認

rHA 製造に用いる rBV の感染能を確認するため、Sf9

細胞を用いてプラークを計測した。その方法は次のとおりである。10% FBS 含有 TNM-FH 培地で浮遊させた Sf9 細胞を 60 mm のシャーレに播種し、1 時間インキュベートして接着させた。培地を除去後、適宜希釈した rBV 溶液を播種し、さらに 1 時間インキュベートして感染させた。ウイルス溶液を除去後、1.36%寒天・10% FBS 含有 TNM-FH 培地を重層し、27°C で約 1 週間培養した。プラークは、実体顕微鏡を用いて検鏡しながら数を計測した。

4. 培養技術の確立

4.1 発現培養

発現培養は、20 L または 100 L の培養装置を使用した。27°C で、間欠的に酸素投入して溶存酸素量を一定に保ちながら SF+細胞を培養した。細胞濃度が 2×10^6 個/mL に達した時点で、rBV を播種し発現培養を開始した。rHA 発現細胞は遠心分離によって回収された。

発現培養開始後 24 時間、48 時間及び細胞回収時にそれぞれ生存細胞数、生細胞率、平均細胞径を計測した。同時に、細胞の形態を倒立顕微鏡で観察した。回収した細胞の一部を用いてウエスタンブロット法 (4.3.2 で述べる) により rHA の発現量を半定量的に計測した。

4.2 精製

4.2.1 rHA 抽出及び固液分離工程

回収した細胞を界面活性剤で処理することにより、発現した rHA を抽出した。rHA 抽出後、細胞残渣をろ過または遠心分離で除去し、液層画分を回収した。

4.2.2 クロマト I 工程

液層画分をカラム I に供して、非吸着の夾雑物を洗浄バッファーにより除去したのち、rHA 画分を溶出した。各フラクションを SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (以下 SDS-PAGE) で分析し、rHA 画分を確認した。

4.2.3 クロマト II 工程

クロマト I 工程より得た rHA 画分を、カラム II に供し、さらに精製した。各フラクションは SDS-PAGE にて分析し、rHA 画分を確認した。

4.2.4 DNA 除去工程

クロマト II 工程より得た rHA 画分を DNA 除去膜に供し、混在する DNA などを除去した。

4.2.5 緩衝液交換工程

DNA 除去工程後サンプルは、限外ろ過法で低分子の夾雑物を除去、最終原薬のバッファーに置換したのち、rHA の濃度調整を行った。

4.3 分析

4.3.1 SDS-PAGE 法による rHA の確認

定法に従って、SDS-PAGE 及びクーマシーブリリアントブルー（以下 CBB）染色により、精製工程及び最終精製 rHA を確認した。

4.3.2 ウェスタンブロット法による rHA の確認

定法に従って、ウェスタンブロット法（以下 WB）を実施し、rHA 発現細胞及び精製サンプルの rHA を確認した。抗血清は、精製 rHA をヒツジに免疫して得られた標準抗血清 S-7862L1 を Center for Biologics Evaluation and Research（以下 CBER）より入手し、アッセイに用いた。

5. ウイルス播種時における細胞密度の検討

5.1 発現培養

先に確立した培養条件より高い細胞密度で培養し、rBV を播種後、rHA の発現量と精製を検討し、rHA の収量を確認した。発現培養は、15 L または 20 L の培養装置を使用した。27°C で、間欠的に酸素投入して溶存酸素量を一定に保ちながら SF+細胞を培養した。目的の細胞密度（各 2, 2.5, 3.0, 4.0, 6.0×10^6 個/mL の 5 条件；以下×1, ×1.25, ×1.5, ×2, ×3 と表記）に達した時点で、rBV を播種し発現培養を開始した。発現培養開始後 24 時間、48 時間及び細胞回収時にそれぞれ生細胞数、生細胞率、

平均細胞径を計測して各細胞密度間の比較を行った。同時に、細胞の形態を倒立顕微鏡で観察した。

5.2 精製

4.2 精製と同様の方法で実施した。

5.3 分析

4.3 分析と同様の方法で実施した。

（倫理面の配慮）

該当せず。

C. 研究結果

1. 発現培養

1.1 発現培養時の細胞計測パラメーター

rHA 発現培養に用いた rBV 及び非組換え体バキュロウイルスの感染価を、上記ブランクアッセイにより確認したところ、それぞれ $1.7 \sim 2.6 \times 10^8$ pfu/mL 及び 0.22×10^8 pfu/mL であった。

生細胞数の変化は発現培養容量にかかわらず、培養開始時に比べて約 4 倍にまで増殖した。発現培養で、rBV 播種後から 48 時間までは生細胞数の変化はほとんどなく推移した。48 時間後から細胞回収時にかけて生細胞数は徐々に減少した(図 1-1)。

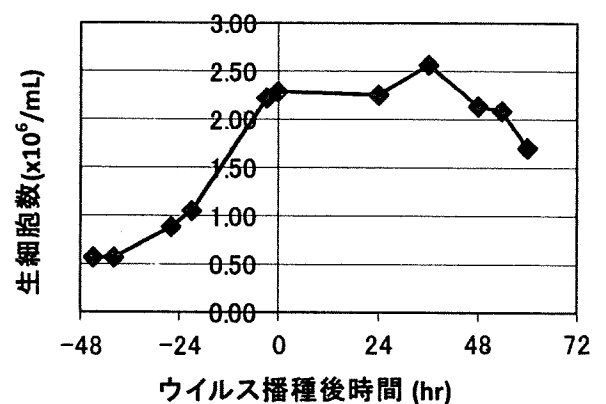


図 1-1 生細胞数の変化

（図は 100L 培養時の生細胞数を示す。）

生細胞率も発現培養容量にかかわらず、rBV 播種後 24～48 時間は徐々に低下し、48 時間以降は生細胞率の低下が大きかった(図 1-2)。

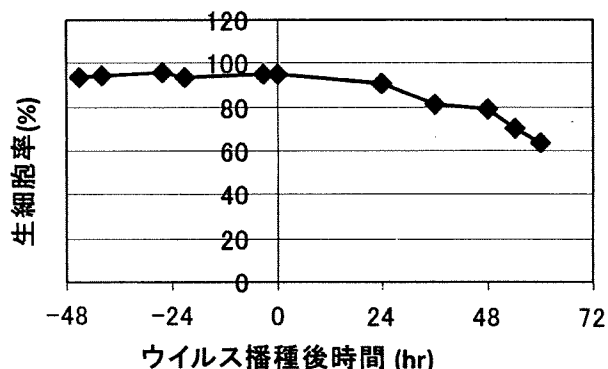


図 1-2 生細胞率の変化

(図は 100 L 培養時の生細胞率を示す。)

何れの細胞培養容量でも、rBV 播種前までは平均細胞径が約 19 μm 前後で推移し、rBV 播種後 24 時間の平均細胞径は約 22.5～24 μm にまで大きくなり、細胞回収時までその大きさを維持していた (図 1-3)。

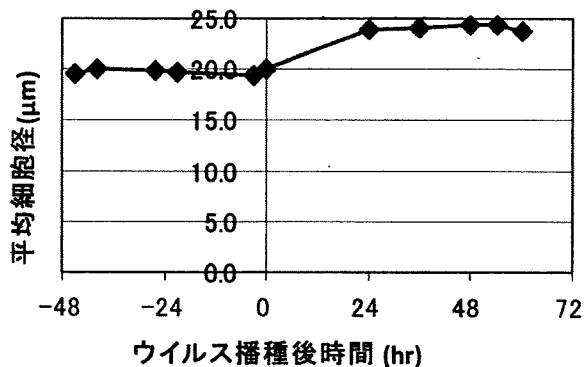


図 1-3 平均細胞径の変化

(図は 100L 培養時の平均細胞径を示す。)

rBV 播種後の経時的な細胞形態の変化を図 1-4 に示す。細胞培養容量にかかわらず、24 時間後の細胞のほとんどで膨化と細胞内ストローマ構造が観察された。さらに、48 時間後には細胞内蛇状構造が出現し、細胞回収時においてはほとんどの細胞で明瞭な蛇状構造が観察された。

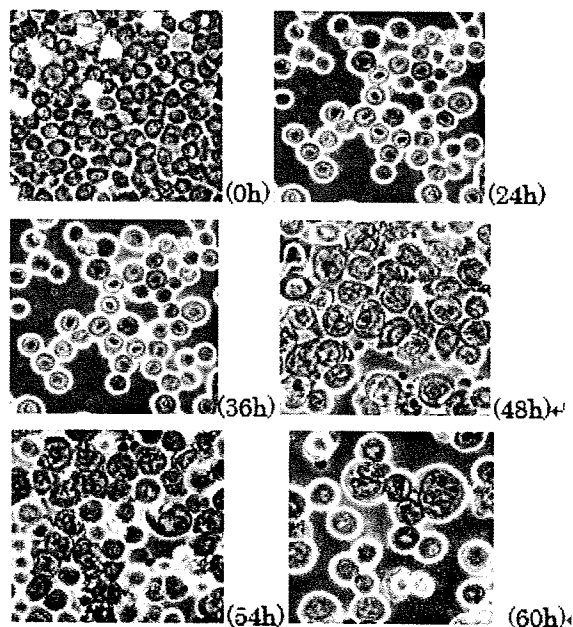
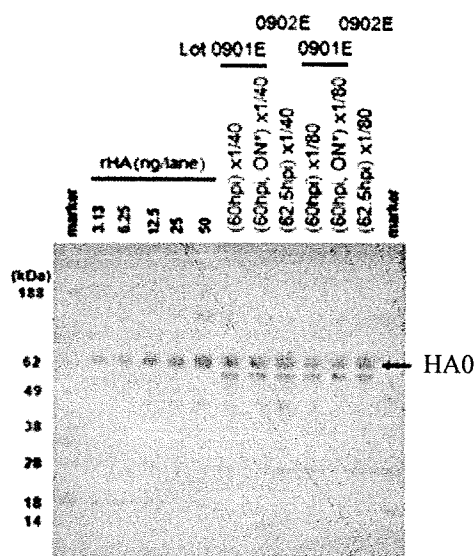


図 1-4 細胞形態の経時的变化

(写真は 100 L 培養時の形態変化を示す。)

1.2 rHA 発現の確認

rBV 播種後に経時的に採取した細胞で発現した rHA 量を WB 法により確認した。図 1-5 に示す様に、rBV 播種 24 時間後より、rHA の発現が認められ、その発現量は 48 時間まで時間の経過にしたがって増加し、48 時間後以降は、ほぼ定常状態に達した。



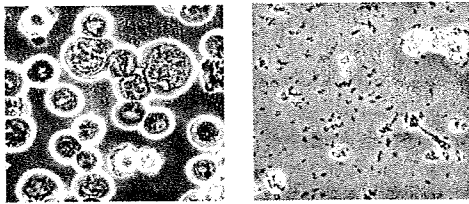
ON*: 細胞回収後、1 晩冷蔵保存した
hpi: hour post-infection (感染後時間)

図 1-5 100L 発現培養細胞の WB 像

2 rHA の精製

2.1 rHA 抽出及び固液分離工程

発現培養終了後に連続遠心機で細胞を回収し、界面活性剤を用いて rHA を抽出した。図 1-6 に示すように、これらの処理を経るとほとんどの細胞は破碎された。rHA 抽出後、細胞残渣をろ過または遠心分離で除去し、液層画分を回収した。



発現培養終了時

抽出処理後

図 1-6 培養終了後及び抽出後の細胞形態

2.2 クロマト I 工程

液層画分をカラム I に吸着させ、rHA の精製を行った結果、夾雑たん白が除かれ、目的の rHA は溶出バッファーで効率よく溶出された (図 1-7, 1-8)。

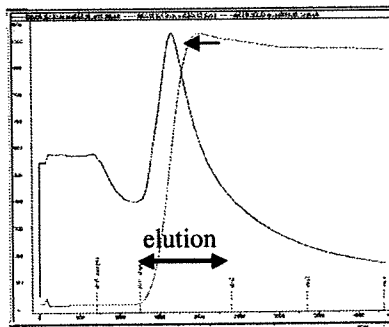


図 1-7 カラム I 溶出パターン

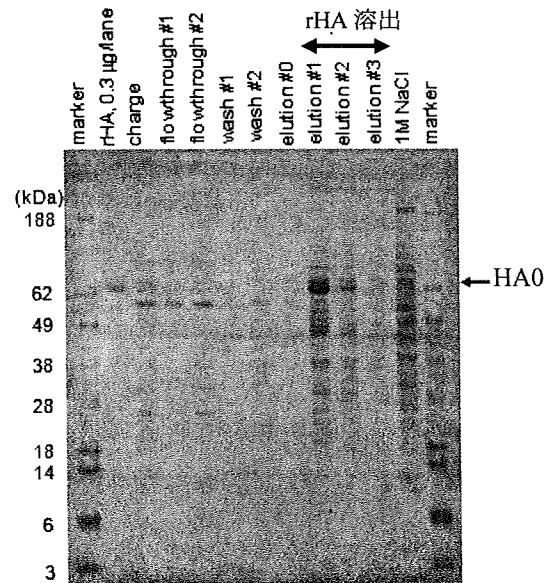


図 1-8 クロマト I 溶出サンプルの SDS-PAGE 像

2.3 クロマト II 工程

クロマト I 工程で溶出した rHA 画分をクロマト II 工程に供した。図 1-9 は、カラム II の溶出パターンを示す。SDS-PAGE により、rHA は矢印で示した画分に溶出されたことを確認した。クロマト I 及び II 工程により、rHA 以外のたん白はほとんど除去された (図 1-9, 10)。

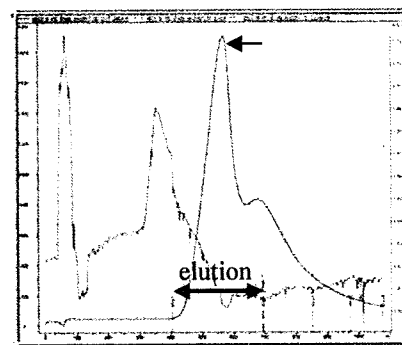


図 1-9 カラム II 溶出パターン

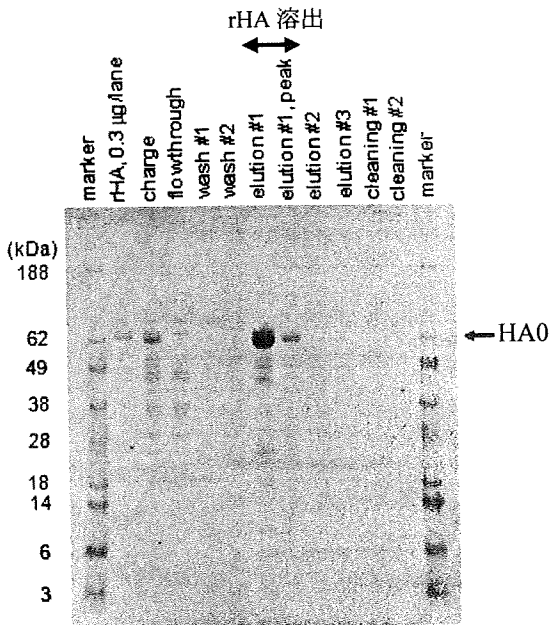


図 1-10 クロマト II 溶出サンプルの SDS-PAGE 像

2.4 DNA 除去工程

クロマト II 工程後、DNA 除去膜を用いてろ過した。

図 1-11 に SDS-PAGE 像を示す。

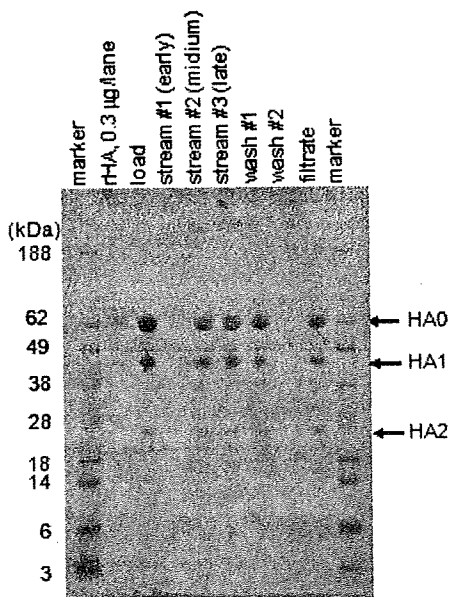


図 1-11 DNA 除去工程後の SDS-PAGE 像

2.5 緩衝液交換工程

限外ろ過膜を用いて、低分子の夾雑物を除去するとともに最終原葉の緩衝液に置換した。各精製工程のサ

ンプルを用いて一定のたん白量を泳動した SDS-PAGE 像を図 1-12 に示す。PSC にて GMP レベルで製造された原葉及び製剤と同程度の純度 (98%以上) を有する rHA が得られた(図 1-12)。rHA のタンパク量を BCA 法により決定し、収量及び収率を算出した(表 1-1, 1-2)。

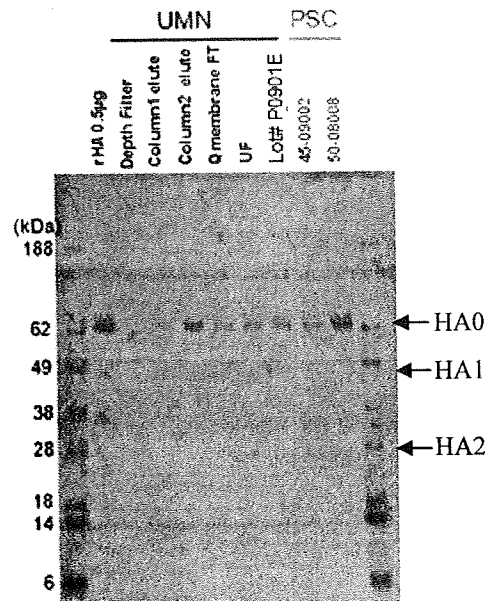


図 1-12 各精製工程サンプルの SDS-PAGE 像

表 1-1 各精製工程の総蛋白質量と収率

精製工程	100 L		20 L	
	タンパク量 (mg)	収率 (%)	タンパク量 (mg)	収率 (%)
クロマト I	3873	-	978	-
クロマト II	1013	26	202	21
DNA 除去	917	91	154	76
緩衝液交換	780	85	125	81

3. ウイルス播種時における細胞密度の検討

3.1 生細胞数の変化

SF+細胞の細胞密度を×1, ×1.25, ×1.5, ×2, ×3 で3日間前培養した。何れの細胞密度培養でも、×1 培養と同様の増殖速度で培養開始時に比べて約 4 倍にまで増殖した(図 1-13a、片対数目盛でプロットした図を 1-13b に示す)。rBV 播種後から 48 時間までは、×3 培養を除い

て生細胞数は同様に推移した (図 1-13a, b)。

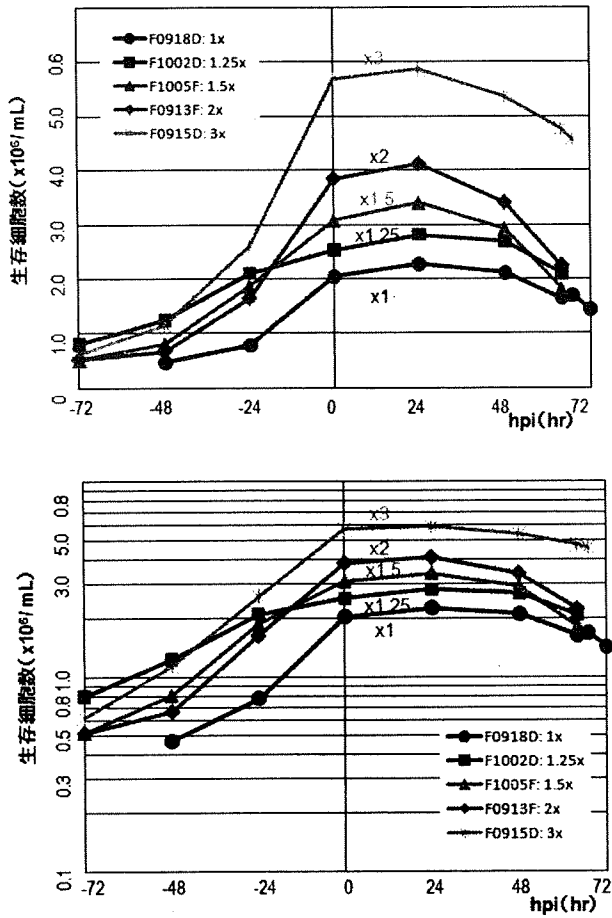


図 1-13 a (上), b (下) rHA 発現培養における生存細胞数の推移

3.2 生細胞率の変化

何れの細胞密度培養でも、rBV 播種後 68~72 時間までは生細胞率が低下し、中でも×1.5及び×2培養では、rBV 播種後 48 時間以降は×1培養と比較して、より急激な生細胞率の低下が認められた (図 1-14)。

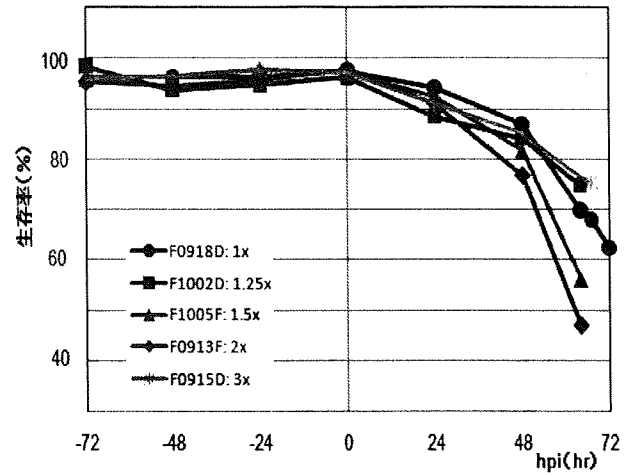


図 1-14 rHA 発現培養における生細胞率の推移

3.3 平均細胞径及び細胞の形態変化

何れの細胞密度培養でも、rBV 播種前までは平均細胞径が約 19 μm 前後で推移した。細胞密度×1.25培養では、×1培養と同様に、rBV 播種後 24 時間の平均細胞径は約 22.5 μm にまで増大して、48 時間後に最大となり、細胞回収時には 22.8 μm 前後の細胞径を維持していた (図 1-15)。×1.5及び×2培養では、rBV 播種後 24 時間までは×1培養と同様に推移するが、その後急速に縮小した。さらに、×3培養では、rBV 播種後 24 時間でも、細胞径は 20.6 μm 程度までしか増大せず、その後縮小した。

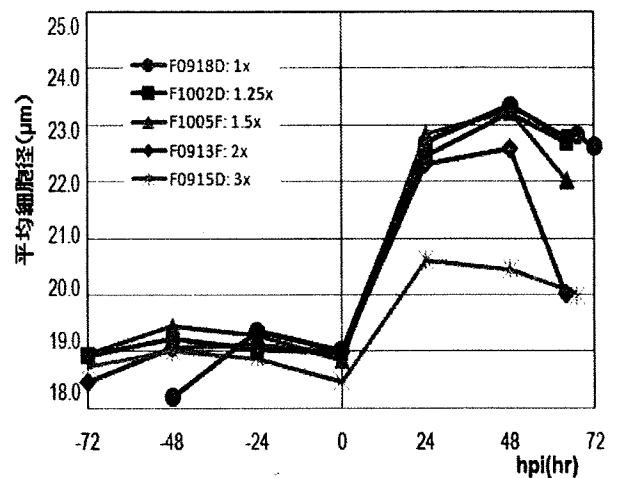


図 1-15 rHA 発現培養における平均細胞径の推移

rBV 播種後の経時的な細胞形態の変化を図 1-16 に示す。× 1.25 及び× 1.5 培養では、× 1 培養と同様に、24 時間後のほとんどの細胞で膨化と細胞内ストローマ構造が認められた。さらに、48 時間後には細胞内蛇状構造が出現し、細胞回収時においてはほとんどの細胞で明瞭な蛇状構造が観察された。

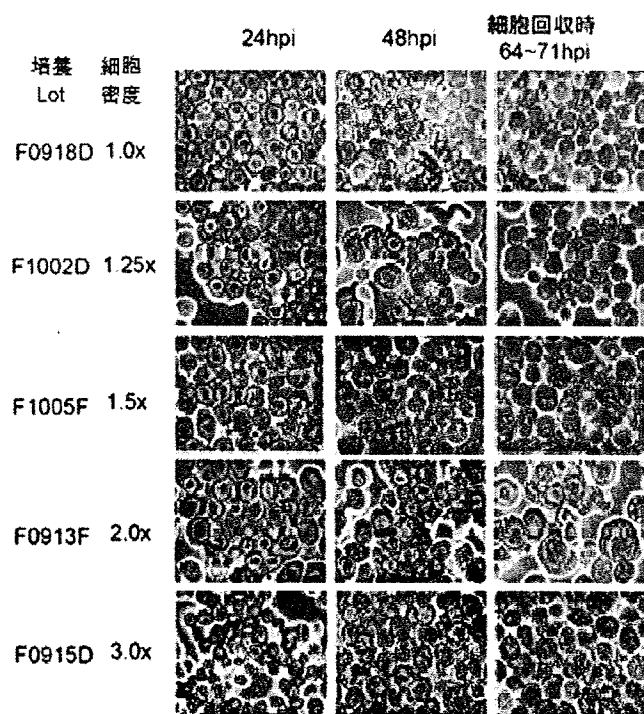


図 1-16 rHA 発現培養時の SF+細胞の経時的形態変化 (倍率 100 倍)

一方、× 2, × 3 培養では rBV 播種後のストローマ構造の出現が遅く、明瞭ではなかった。加えて、48 時間後の蛇状構造をもつ細胞の数が少なく、細胞回収時には多くの細胞に空胞が認められ、× 1 培養時にみられた形態変化を経ずに死に至る細胞が観察された。

3.4 発現培養液の WB による rHA 発現量の解析

図 1-17 に各発現培養条件における細胞抽出液の WB 像を示した。rBV 播種後 48 及び 64 時間のサンプルを SDS-PAGE 後、WB で rHA 発現量を解析した。既知濃度の rHA 標準溶液より半定量した (表 1-2)。

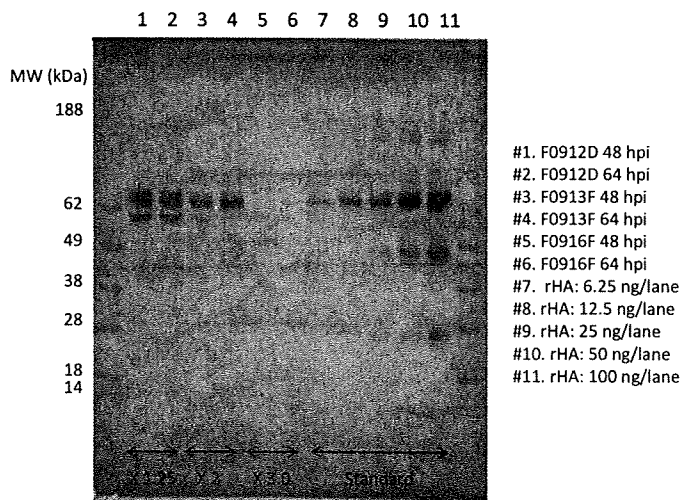


図 1-17 発現培養液の WB 像

lot# F0912D、F0913F、F0916F の発現培養における rHA の発現量は、各培養液 1L あたりそれぞれ 95.9 mg、60.8 mg、9.8 mg で、培養液量当りの細胞密度が高い程、rHA の発現量は少なかった。

表 1-2 64 hpi における発現培養液中の rHA 濃度

培養ロット	細胞密度 cells/mL	rHA mg 相当量 /L 培養液
F0912D	2.4×10^6	95.9
F0913F	4.0×10^6	60.8
F0916F	6.0×10^6	9.8

4 精製工程

表 1-3 に示す培養 7 ロットの精製を実施した。各発現培養の細胞密度により F0910D と F0911D (共に× 2 培養)は合わせて精製して P0911F とした。また、F0915D、F0916F 及び、F0917B (それぞれ× 3, × 3, × 2.25 培養)を合わせて精製し、P0917B とした。

表 1-3 各培養ロットの細胞密度と精製ロットの対比

培養ロット	細胞密度 cell/mL	表記	精製ロット
F0910D, F0911F	4.0×10^6	$\times 2$	P0911F
F0912D	2.4×10^6	$\times 1.25$	P0912D
F0913F	4.0×10^6	$\times 2$	P0913F
F0915D, F0916F, F0917B	5.6×10^6	$\times 2.8$	P0917B

図 1-18a には、P0912D のクロマト I 及び II 工程における rHA 溶出画分の SDS-PAGE 像 (還元条件下、CBB 染色) を示した。図 1-18b には、P0912D と P0917B のクロマト I 工程における rHA 溶出画分の SDS-PAGE (還元条件下、CBB 染色) の対比を示した。先の発現培養時の細胞液の WB から明らかなように、クロマト I 工程において P0912D では明瞭な HA0 のバンドが認められるが、P0917B では HA0 バンドがほとんど確認できなかった。

P0917B ($\times 3$ 培養) のクロマト II 工程を経ても発現培養での rHA 発現量が少なかったため、最終収量も低かった (data not shown)。

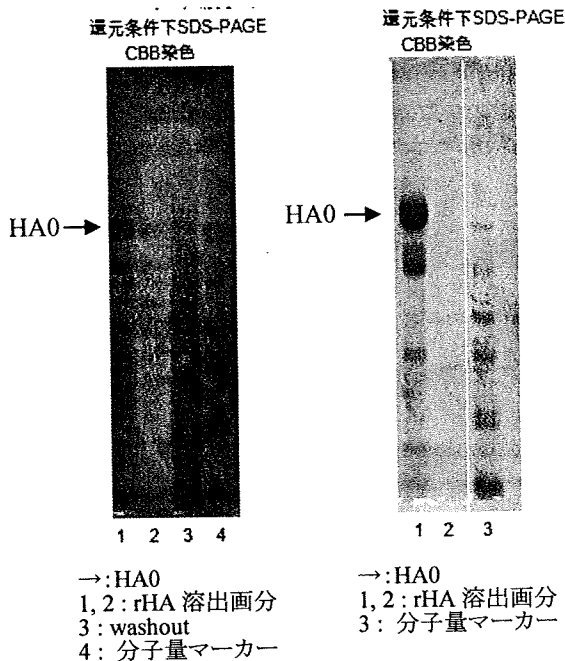
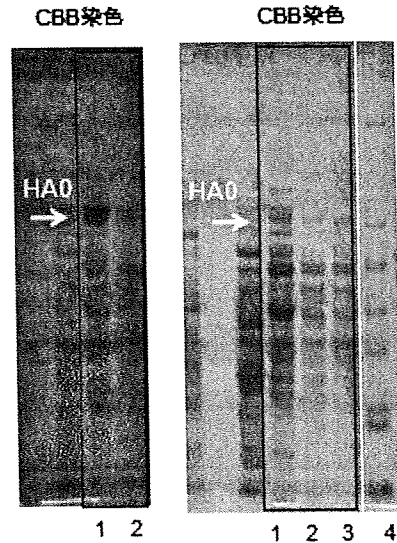


図 1-18a クロマト I (左) 及び II (右) による精製 (Lot# P0912D)



1, 2: rHA 溶出画分 1, 2, 3: rHA 溶出画分
図 1-18b クロマト I 精製工程の SDS-PAGE (CBB 染色、P0912D 及び P0917B)

5 発現培養時の細胞密度と rHA 収量の比較

発現培養及び精製の結果より、発現培養時の細胞密度と培養液量当りの rHA 収量の関係を図 1-19 に示した。 $\times 1$ 培養の参考値として、100 L 培養ロットである P0901E をプロットした。 $\times 1.25$ 培養では、 $\times 1$ 培養と同程度の収量で精製 rHA を得ることができた。一方、 $\times 2$ 及び $\times 3$ 培養のように細胞密度を高めると、単位培養液量あたりの rHA 収量は低下した。

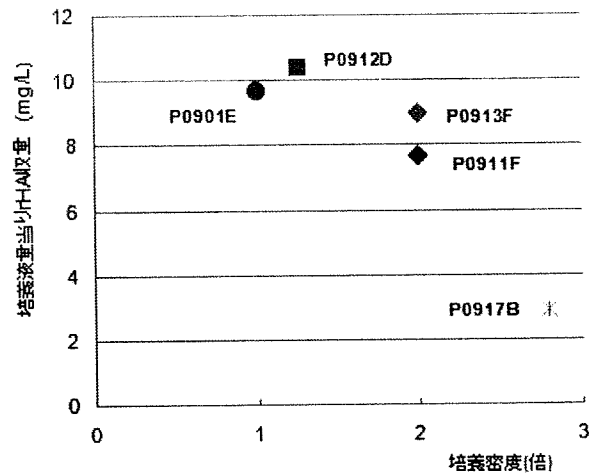


図 1-19 発現培養時の細胞密度と rHA 収量の関係