

学 位 論 文 題 名

Studies on development of inactivated
Vero cell-derived Japanese encephalitis vaccine
using serum-free medium

（無血清培地を用い培養した Vero 細胞由来不活化日本脳炎ワクチンの
開発に関する研究）

学位論文内容の要旨

日本脳炎は、日本脳炎ウイルスが中枢神経系に侵入・増殖することによって起こる急性のウイルス性脳炎である。日本脳炎ウイルスは、エンベロープを有する直径 40-50nm の球形のウイルスで、ウエストナイルウイルスやデングウイルスと同じくフラビウイルス科フラビウイルス属に属する。ブタなど増幅動物の体内で増えたウイルスを、コダカアカイエカなどの蚊が媒介することによって感染環が成り立っている。最終宿主であるヒトも、蚊の吸血によって感染する。脳炎の発症率は、ウイルス感染者 100-3,000 人に 1 人と推測されており、多くは不顕性感染で終わる。しかし、世界ではアジア地区を中心に今でも年間 43,000 人ほどが発症し、このうち 11,000 人が死亡、9,000 人は回復するが重篤な後遺症が残る。現在、世界的には患者数が増加傾向をたどり、2003 年にベトナム・中国・香港、2005 年にベトナムで大流行が起きた。日本国内での患者数は 1966 年 2,017 人のピークを境に減少し、1991 年以降年間 10 例以下となっている。ワクチンの普及、ヒトが媒介蚊に刺される機会の減少などが理由とされている。しかし、近年の地球温暖化により、疾病媒介蚊の分布拡大、そしてそれにともなう感染地域の拡大も危惧されており、日本脳炎対策の推進は喫緊の課題である。

日本脳炎の征圧に最も効果的とされるのはワクチン接種である。現行の日本脳炎ワクチンはマウス脳を原材料とし、マウス脳内で増幅させたウイルスを回収・不活化・精製することによって製造されている。副作用として、ワクチン接種を誘因として自己免疫性の機序で発症するとされる急性散在性脳脊髄炎(Acute disseminated encephalomyelitis: ADEM) が報告されている。ADEM と日本脳炎ワクチンとの直接的な因果関係は不明であるが、マウス由来成分の関与が考えられ、厚生労働省は平成 17 年 6 月に積極的勧奨接種の中止を勧告した。また、製造には大量のマウスを用いるため、安定供給や動物愛護の面からも問題があり、新しいワクチン製造法の開発が望まれている。

そこで第一章では、培養細胞を用いた日本脳炎ワクチン製造法の開発を試みた。用いた培養細胞は、すでに狂犬病やポリオワクチンの製造に用いられ、安全性が高いとされる Vero 細胞である。牛海綿状脳症病原体感染の恐れを完全に除くため、ウシ胎児血清を用いない無

血清培地を使用し、さらに動物由来成分を極力除くため、ブタ由来トリプシンの代わりにリコンビナントプロテアーゼである TrypLE Select を細胞剥離に用い、細胞培養を試みた。また、作製したワクチンの品質の安定性、保存性を維持するための安定剤および保存温度について検討した。その結果、無血清培地とマイクロキャリアを用いた液量 50L のバイオリアクターによる Vero 細胞の培養が可能となり、我が国の生物学的製剤基準を満たす免疫原性の高いワクチンが製造出来ることが明らかになった。このように、細胞バンク作製の段階から動物由来成分を一切使わないワクチン製造が可能となり、より安全なワクチン製造への道が開けた。さらに、加える安定剤の種類により冷蔵 (4℃) 保存ばかりでなく、28℃ 保存でもワクチンの品質が維持されるという画期的な知見が得られた。このように、本ワクチンは、保存性においても、冷蔵が必要とされる現行液状ワクチンに比べはるかに優れており、国内、そして特に保存設備等の整っていない熱帯地域においては極めて有用である。

このように、Vero 細胞を利用することにより、より安全・安定なワクチン製造が可能であることが明らかになったが、細胞培養が煩雑で、かつ増殖の効率が十分に高くないことが課題として残っている。そこで、第二章では、BelloCell という、近年 CESCO 社によって開発された高密度培養が可能で、かつ操作の簡便な培養装置を用いて、無血清培地での Vero 細胞由来日本脳炎ワクチン製造の可能性を探った。その結果、培養規模は 500mL にすぎないものの、本装置の利用により、高密度で、ウイルスの回収量も現行のマイクロキャリア法を上回る培養が可能になった。また、回収したウイルスより作製したワクチンは、現行マウス脳由来ワクチンおよび上述の培養細胞由来ワクチンと比べ、品質において遜色がなかった。したがって、BelloCell を利用した本製造方法のスケールアップを検討する価値は十分にある。

日本脳炎ワクチン製造段階におけるもう一つの問題は、ワクチン力価の測定が煩雑で、しかも時間を要することである。現在、ワクチン力価は、免疫マウス血清における中和抗体価を指標として測定されているが、この中和抗体価測定に 1 ヶ月以上も要しているため、より迅速なワクチン力価の測定に、不活化精製ワクチンに含まれるウイルス量を指標として使うことが考えられる。しかし、現行のウイルス定量は、不活化前の生ウイルスを細胞によるプラーク法で行っており、結果が得られるまで 1 週間以上を要し、作業者によって結果に違いが生じる可能性もある。不活化ウイルスの定量方法としては、ELISA 法によりエンベロープ抗原の測定がされているが、その測定値と中和抗体価の相関が低いこと、測定に 1 日程度要することが問題である。そこで、第 3 章では、より迅速かつ簡便に日本脳炎ウイルスを定量することを目指し、ウイルスゲノム RNA の定量に基づく RT-LAMP (Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification) 法の応用を試みた。その結果、わずか 1 時間余りでの定量が可能となった。この RT-LAMP 法を用いたウイルス定量の信頼性を検討するために、現行のプラーク法と比較したところ、両者の結果に非常に高い相関が認められた。さらに、本法により、不活化ワクチンに含まれるウイルスの定量も可能であることが確認され、また本法により求められたウイルス量は中和抗体価と高い相関を示すことも確認された。簡便・迅速なこの RT-LAMP 法は従来のプラーク法および中和抗体価測定法に代わりうるものであり、ワクチン製造工程の管理、ワクチンの品質管理、さらには病原体の臨床診断にも大きく寄与するものと考えられる。

より安全な日本脳炎ワクチンの製造および開発に関する本研究の成果は、わが国のみならず東南アジア諸国、さらには世界における日本脳炎の予防と征圧に大きく貢献するものであり、持続的な人間社会の基盤構築に大きく寄与する。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 木 村 正 人
副 査 教 授 森 川 正 章
副 査 准教授 鈴 木 仁
副 査 名誉教授 高 木 信 夫

学 位 論 文 題 名

Studies on development of inactivated Vero cell-derived Japanese encephalitis vaccine using serum-free medium

(無血清培地を用い培養した Vero 細胞由来不活化日本脳炎ワクチンの
開発に関する研究)

日本脳炎は、日本脳炎ウイルスが中枢神経系に侵入・増殖することによって引き起こされる急性のウイルス性脳炎である。ブタなど増幅動物の体内で増えたウイルスを、コダカアカイエカなどの蚊が媒介することによって感染環が成り立っており、最終宿主であるヒトも、蚊の吸血によって感染する。世界ではアジア地区を中心に、現在においても年間 43,000 人ほどが発症し、このうち 11,000 人が死亡、9,000 人は回復するが重篤な後遺症が残る。現在、世界的には患者数が増加傾向を示しており、さらに温暖化による疾病媒介蚊の分布拡大、それにとまなう感染地域の拡大も危惧され、日本脳炎対策の推進は喫緊の課題となっている。

日本脳炎の予防に最も効果的とされるのはワクチン接種である。しかし、現行の日本脳炎ワクチンはマウス脳を原材料としているため、精製されているとはいえ、マウス由来成分による副作用の可能性がある。実際、ワクチン接種を誘因とする自己免疫性の機序により発症する急性散在性脳脊髄炎(Acute disseminated encephalomyelitis: ADEM) が報告されている。ADEM と日本脳炎ワクチンとの直接的な因果関係はまだ不明であるものの、厚生労働省は平成 17 年 6 月に積極的勧奨接種の中止を勧告した。しかし、勧奨接種中止以降、日本脳炎患者、特に小児における患者が発生したこともあり、より安全なワクチンの製造が望まれている。そこで申請者は、まず培養細胞を用いた日本脳炎ワクチン製造法の開発を行った。牛海綿状脳症病原体感染の恐れを完全に除くため、ウシ胎児血清を用いない無血清培地を使用し、さらに動物由来成分を極力除くため、ブタ由来トリプシンの代わりにリコンビナントプロテアーゼである TrypLE Select を細胞剥離に用い、細胞培養を試みた。そ

の結果、無血清培地とマイクロキャリアを用いた液量 50L のバイオリアクターによる Vero 細胞培養が可能となった。そして、この培養細胞を用いた免疫原性の高いワクチン製造に成功し、細胞バンク作製の段階から動物由来成分を一切使わない、より安全なワクチン製造への道を開いた。さらに、本ワクチンは、加える安定剤の種類により冷蔵（4℃）保存ばかりでなく、28℃保存でもその品質が維持される画期的なものであった。このように、本ワクチンは保存性においても、冷蔵が必要とされる現行液状ワクチンに比べ、はるかに優れており、国内、そして特に保存設備等が整っていない熱帯地域においては極めて有用である。

次に、申請者は、細胞培養の煩雑さの解消と、細胞やウイルス増殖の効率をさらに高めるため、BelloCell という高密度培養が可能でかつ操作の簡便な培養装置を用いて、無血清培地での Vero 細胞由来日本脳炎ワクチンの製造を試みた。その結果、本装置による高密度細胞培養が可能であり、ウイルスの回収量において現行のマイクロキャリア法を上回ることが示された。また、回収したウイルスより作製したワクチンは、現行マウス脳由来ワクチンおよび上述の培養細胞由来ワクチンと比べ、品質において遜色がなかった。このことから、ワクチン生産に向け、BelloCell を利用した本製造方法のスケールアップを検討する価値は十分にあると結論づけた。

日本脳炎ワクチン製造段階におけるもう一つの問題は、ワクチン力価の測定が煩雑で、しかも時間を要することである。そこで、申請者は、より迅速かつ簡便に日本脳炎ウイルスを定量するため、ウイルスゲノム RNA の定量に基づく RT-LAMP (Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification) 法の応用を行った。その結果、わずか 1 時間余りで定量が可能となった。次に、この RT-LAMP 法を用いたウイルス定量の信頼性と有用性を検討するため、不活化前の生ウイルスを利用して現行のプラーク法と比較した。その結果、両者の結果に非常に高い相関が認められ、本方法の定量性には問題ないことが示された。さらに、申請者は不活化ワクチンに含まれるウイルスの定量も可能であることを確認し、また本法により求められたウイルス量はワクチン力価を示す中和抗体価と高い相関を示すことも確認した。簡便かつ迅速なこの RT-LAMP 法は、従来のプラーク法および中和抗体価測定法に代わりうるものであり、ワクチン製造工程の管理、ワクチンの品質管理、さらには病原体の臨床診断にも大きく寄与するものである。

以上のとおり、より安全な日本脳炎ワクチンの製造および開発に関する本研究の成果は、わが国のみならず東南アジア諸国、さらには世界における日本脳炎の予防に大きく貢献し、持続的な人間社会の基盤構築に寄与するものである。

よって、申請者は博士（環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。