

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5511660号  
(P5511660)

(45) 発行日 平成26年6月4日(2014.6.4)

(24) 登録日 平成26年4月4日(2014.4.4)

(51) Int.Cl.		F 1
<b>A 6 1 K 39/39</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 39/39
<b>A 6 1 P 31/14</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 31/14
<b>A 6 1 P 31/16</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 31/16
<b>A 6 1 P 31/20</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 31/20
<b>A 6 1 P 1/16</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 1/16

請求項の数 8 (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-515839 (P2010-515839)	(73) 特許権者	000173555
(86) (22) 出願日	平成21年5月27日 (2009.5.27)		一般財団法人化学及血清療法研究所
(86) 国際出願番号	PCT/JP2009/059671		熊本県熊本市北区大窪一丁目6番1号
(87) 国際公開番号	W02009/147980	(74) 代理人	100068526
(87) 国際公開日	平成21年12月10日 (2009.12.10)		弁理士 田村 恭生
審査請求日	平成24年3月28日 (2012.3.28)	(74) 代理人	100100158
(31) 優先権主張番号	特願2008-147328 (P2008-147328)		弁理士 鮫島 睦
(32) 優先日	平成20年6月4日 (2008.6.4)	(74) 代理人	100126778
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 品川 永敏
		(74) 代理人	100150500
			弁理士 森本 靖
		(74) 代理人	100156111
			弁理士 山中 伸一郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 不活化日本脳炎ウイルス粒子をアジュバントとして使用する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Vero細胞培養により得られた不活化日本脳炎ウイルスをアジュバントとして含有させる工程を含むことを特徴とする、ワクチンの製造方法。

【請求項 2】

不活化日本脳炎ウイルスが粒子状構造であることを特徴とする、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記工程が、ワクチンに不活化日本脳炎ウイルスを添加する工程であることを特徴とする、請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 4】

ワクチンが二つ以上の異なるワクチンを混合した混合ワクチンであることを特徴とする、請求項 1 ないし 3 の何れか一項記載の方法。

【請求項 5】

前記ワクチンが、ジフテリアワクチン、百日咳ワクチン、破傷風ワクチン、ポリオワクチン、A型肝炎ワクチン、B型肝炎ワクチン、狂犬病ワクチン、麻疹ワクチン、風疹ワクチン、インフルエンザワクチン、おたふくかぜワクチン、水痘ワクチン、ロタワクチン、痘そうワクチン、黄熱病ワクチン、ダニ媒介性脳炎ワクチン、Hibワクチン、腸チフスワクチン、コレラワクチン、BCGワクチン、肺炎球菌ワクチン及び髄膜炎菌性髄膜炎ワクチンからなる群より選択されたものであることを特徴とする、請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

10

20

不活化日本脳炎ウイルス粒子が250ng ~ 34 µg/mLであることを特徴とする、請求項1ないし5の何れか一項記載の方法。

【請求項7】

請求項1ないし6のいずれか一項記載の方法により製造されたワクチン。

【請求項8】

アルミニウムアジュバントを含有することを特徴とする、請求項7記載のワクチン。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、不活化日本脳炎ウイルス（以下、「JEV」と称することもある）粒子を種々の混合ワクチンや多価ワクチンのアジュバントとして使用する方法に関する。 10

【背景技術】

【0002】

感染症に対するワクチンの接種は、幼児期に終了しておくことが望ましい。そのためには一定期間内に多種類のワクチンを接種する必要がある。種々の感染症に対して効率よくワクチン接種を行うための工夫として幾つかのワクチンを混合した混合ワクチンの開発が行なわれている。混合ワクチンは、(i)複数の病原体に対する防御能を同時に付与することができる、(ii)複数のワクチンを接種する場合の接種スケジュールの煩雑性を解消することができる、(iii)被接種者の投与費用や時間の負荷を軽減するので接種率の増加が期待される、(iv)医療従事者の負荷を軽減することができる、(v)接種回数が減ることにより廃棄物削減による環境への負荷を軽減することができる等、多くのメリットを有する。 20

したがって、混合ワクチンは、そのワクチン抗原の種類が多ければ多いほど好ましい。

【0003】

しかしながら、混合ワクチンの製造において混合できるワクチン抗原の数量には限界がある。すなわち、多くのワクチン抗原を混合すれば、それだけ投与できる個々のワクチン抗原量は少なくなる。また、混合する抗原の種類によっては、互いに干渉し合い、抗体誘導能を低下させる場合がある。これは結果としてワクチンの抗体価の低下に繋がり、効果的な感染防御ができなくなることを意味する。

【0004】

現在既に公開されている具体的な混合ワクチンとしては、ジフテリア、百日咳、破傷風(DPT)ベースの混合ワクチン製剤『VACCINE COMPOSITION』（例えば、特許文献1参照）、パピローマウイルス(HPV)抗原を含む混合ワクチン『新規組成物』（例えば、特許文献2参照）、多価DPTポリオワクチン『MULTIVALENT DTP-POLIO VACCINES』（例えば、特許文献3参照）、生ワクチンの細胞性免疫活性を不活化ワクチンにも起こさせる方法、及びこれより得られる混合ワクチン（例えば、特許文献4参照）等、上記以外にも実に多くの組み合わせの混合ワクチンがすでに公開されている。日本脳炎ワクチンに関しては、DPTワクチン、B型肝炎ワクチン(HepB)、A型肝炎ワクチン(HepA)等との混合ワクチンの研究報告（例えば、非特許文献1参照）がある。更に混合化を進めたワクチンの開発が望まれるところであるが、上述したワクチン効果の減少に係る問題がある。これを克服するために、できる限り少ない抗原量で高い抗体価を取得できるアジュバントの開発が求められる。 40

【0005】

一般に、アジュバントは、これをワクチン抗原に添加したときにワクチン抗原の免疫効果を高めることが知られている。このようなアジュバントとしては、アルミニウムゲル粒子（アルミニウム塩）、鉱物油を主成分として含有するオイルアジュバント、白扁豆から精製されるサポニンのような界面活性剤様のアジュバント、細菌内毒素(LPS等)由来のTH1誘導型のアジュバントが知られている。動物用ワクチンのアジュバントとしては、アルミニウムゲルよりも局所反応性が強いオイルアジュバントが使用されることが多いが、人体用ワクチンのアジュバントについては、有効性に加え、特に安全性が求められる。

【0006】

従来、人体用ワクチンには実績のあるアルミニウムゲルが主に使用されてきたが、新たに開発されたMPLや2本鎖RNAなどのアジュバントが人体用ワクチンのアジュバントとして選択されるようになってきている。すでに知られているアジュバント組成物としては、免疫刺激剤（MPL）と金属塩からなる『ワクチン』（例えば、特許文献5参照）、3D-MPL、スクアレン、アルファトコフェノール、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレートなどの油からなる水中油エマルジョン『アジュバント組成物』（例えば、特許文献6参照）、合成化合物アジュバント『免疫アジュバント化合物』（例えば、特許文献7参照）、コレラ毒素をアジュバントとして用いた『ワクチン製剤』（例えば、特許文献8参照）、肝炎表面抗原の粒子形成ポリペプチドから形成されるウイルス様粒子（VLP）を用いた『アジュバントとしてのウイルス用粒子の使用』（例えば、特許文献9参照）等多数のものが挙げられる。

10

## 【0007】

日本脳炎ワクチンに関して言えば、現行では、日本脳炎ウイルス（JEV）をマウス脳内に接種し、脳炎症状を呈した脳からウイルスを精製し、ホルマリンで不活化した不活化ワクチンが使用されているが、マウス脳の代わりにアフリカミドリザル腎株化細胞（Vero）を用いた不活化JEVワクチンの開発が進められている（例えば、特許文献10、11及び12参照）。しかしながら、これらのJEV粒子がアジュバント活性を有することは知られていなかった。

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

20

## 【0008】

【特許文献1】W02002/080965

【特許文献2】特開2004-67696

【特許文献3】W098/00167

【特許文献4】特開2001-253833

【特許文献5】特開2007-262097

【特許文献6】特開2007-231029

【特許文献7】特表2002-535411

【特許文献8】W000/23107

【特許文献9】W098/08146

30

【特許文献10】W000/20565

【特許文献11】特開2000-83657

【特許文献12】特開2004-65118

【非特許文献1】RESEARCH DISCLOSURE no. 329, September 1991, HAVANT GB 'POLYVALENT ANTIGEN VACCINE FOR HUMAN USE' 32975

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0009】

上述したように、より多くの感染症を一気に免疫できる混合ワクチンの開発が期待される場所であるが、混合化するワクチン抗原の数が多くなればなるほどその混合ワクチンに含有させる抗原量の減少を余儀なくされる。そこで、これを補うため、低抗原量でも高い抗体価を誘導できるアジュバントの開発が必要とされていた。

40

## 【課題を解決するための手段】

## 【0010】

上記状況に鑑み、鋭意研究を重ねた結果、本発明者らは、ジフテリア、百日咳、破傷風、ポリオ、B型肝炎及びA型肝炎の各感染症防御抗原の一部または全てを含むワクチン液に不活化したJEV粒子を添加することにより、該JEV粒子を含有しないワクチン液に比較してより高く、より早く免疫が誘導されること、すなわち、不活化JEVにアジュバントとしての活性が存在することを見出し、本発明を完成するに至った。これまで、混合ワクチンにおけるワクチン抗原である不活化日本脳炎ウイルス粒子そのものが有するアジュバント

50

活性を利用するという発想はなく、本発明者らが初めて見出したものである。本発明の目的は、不活化JEV粒子を種々の混合ワクチンのアジュバントとして使用方法及びJEV含有混合ワクチンを提供することにある。

【0011】

すなわち、本発明は以下のとおりである。

〔1〕不活化日本脳炎ウイルスをワクチンのアジュバントとして利用する方法。

〔2〕不活化日本脳炎ウイルスが、細胞培養により得られた日本脳炎ウイルスを不活化したものであることを特徴とする、〔1〕記載の方法。

〔3〕不活化日本脳炎ウイルスが粒子状構造であることを特徴とする、〔1〕又は〔2〕記載の方法。

〔4〕ワクチンが混合ワクチンであることを特徴とする、〔1〕ないし〔3〕の何れかに記載の方法。

〔5〕不活化日本脳炎ウイルスをアジュバントとして含有させる工程を含むことを特徴とする、ワクチンの製造方法。

〔6〕不活化日本脳炎ウイルスが、細胞培養により得られた日本脳炎ウイルスを不活化したものであることを特徴とする、〔5〕記載の方法。

〔7〕不活化日本脳炎ウイルスが粒子状構造であることを特徴とする、〔5〕又は〔6〕記載の方法。

〔8〕前記工程が、ワクチンに不活化日本脳炎ウイルスを添加する工程であることを特徴とする、〔5〕ないし〔7〕の何れか一項記載の方法。

〔9〕ワクチンが二つ以上の異なるワクチンを混合した混合ワクチンであることを特徴とする、〔5〕ないし〔8〕の何れかに記載の方法。

〔10〕前記ワクチンが、ジフテリアワクチン、百日咳ワクチン、破傷風ワクチン、ポリオワクチン、A型肝炎ワクチン、B型肝炎ワクチン、狂犬病ワクチン、麻疹ワクチン、風疹ワクチン、インフルエンザワクチン、おたふくかぜワクチン、水痘ワクチン、ロタワクチン、痘そうワクチン、黄熱病ワクチン、ダニ媒介性脳炎ワクチン、Hibワクチン、腸チフスワクチン、コレラワクチン、BCGワクチン、肺炎球菌ワクチン及び髄膜炎菌性髄膜炎ワクチンからなる群より選択されたものであることを特徴とする、〔9〕記載の方法。

〔11〕不活化日本脳炎ウイルス粒子が250ng～34µg/mLであることを特徴とする、〔5〕ないし〔10〕の何れかに記載の方法。

〔12〕〔5〕ないし〔11〕のいずれかに記載の方法により製造されたワクチン。

〔13〕アルミニウムアジュバントを含有することを特徴とする、〔12〕記載のワクチン。

【発明の効果】

【0012】

本発明に従えば、不活化JEV粒子をアジュバントとして含有するワクチンの製造方法及び当該製造方法により得られたワクチンが提供される。例えば、不活化JEV粒子をアジュバントとして混合ワクチンに添加することにより、これを添加しない場合に比較して、より高く、より早く免疫応答を誘導することができる。すなわち、少ない抗原量で感染防御を達成できる一定の抗体価を取得することができるので、混合ワクチン中の個々の抗原量を減らすことができ、結果として、より多くの種類の抗原を混合することが可能となる。

【0013】

また、本発明の方法に従えば、混合ワクチンの免疫を付与すると同時に、日本脳炎ウイルスの感染を阻止するための抗体価を上昇させることができるので、日本脳炎のワクチンとしての効用をも有する。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1は、DPTワクチンとJEV粒子との混合液で免疫したマウスの血清についてELISAを行なった結果を示す図面である。a：抗TT抗体価、b：抗PT抗体価、c：抗DT抗体価、d：抗JEV抗体価

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 5 】

【図2】図2は、DPTワクチンと各濃度のJEV粒子との混合液で免疫したマウスの血清についてELISAを行なった結果を示す図面である。a：抗TT抗体価、b：抗PT抗体価、c：抗D T抗体価

## 【 0 0 1 6 】

【図3】図3は、DPTワクチンと各濃度のJEV粒子との混合液で免疫したマウスの血清についてELISAを行なった結果を示す図面である。a：抗TT抗体価、b：抗PT抗体価、c：抗D T抗体価

## 【 0 0 1 7 】

【図4】図4は、IPVワクチンとJEV粒子との混合液で免疫したラットの血清についてELISAを行なった結果を示す図面である。a：抗PV-1抗体価、b：抗PV-2抗体価、c：抗PV-3抗体価

10

## 【 0 0 1 8 】

【図5】図5は、HBワクチンとJEV粒子との混合液で免疫したマウスの血清についてELISAを行なった結果（抗HBs抗体価）を示す図面である。

【図6】図6は、HepAワクチンとJEV粒子との混合液で免疫したマウスの血清についてELISAを行なった結果（抗HVA抗体価）を示す図面である。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【 0 0 1 9 】

本発明は、不活化したJEVをアジュバントとして含有させる工程を含むワクチンの製造方法によって特徴付けられる。

20

## 【 0 0 2 0 】

本発明に使用されるJEVの株には特に制限はない。本発明では、北京-1株を用いた。JEVは以下の2つの方法により取得できる。一つは、JEVをマウスの脳内に接種し、脳内でウイルスを増殖させた後、該ウイルス感染脳から精製する方法であり、他方は、JEVを培養細胞に接種し、ウイルス感染細胞を培養することによって増殖したJEV感染細胞及びその培養液から精製する方法である。動物愛護の観点から、好ましくは、培養細胞により増殖させる方法が取られる。JEVの増殖に用いる宿主細胞としては、JEVの増殖性が良く、且つ免疫原性の高い抗原を産生するVero細胞が用いられる。細胞の拡張培養に用いる培地としては、M199培地、イーグルMEM培地等、一般に組織培養に使用されているものから適宜選択できるが、好ましくはダルベッコMEM培地とこれにアミノ酸、塩類、抗カビ・抗菌剤及び動物血清等を添加したものが使用される。JEV粒子を大量に得るためにマイクロキャリアを使用した高密度培養を行なうことがある。この目的のためのマイクロキャリアは、数多く知られているが、Vero細胞を増殖させるにふさわしいものとして濃度5g/L以下のサイトデックス（Cytodex 1, アマシャムファルマシアバイオテク社）が挙げられる。

30

## 【 0 0 2 1 】

培養温度及び培養期間は、細胞の種類、ウイルス接種量及び培養スケール・方法等の組み合わせにより調節される。例えば、Vero細胞を用いて静置培養又はローラボトル培養法によりJEVを増殖させる場合には、該細胞を、非必須アミノ酸及び牛血清を添加したダルベッコMEM培地からなる増殖培地中で、培養温度32 ~ 38 で、培養期間2~7日間培養する。JEVを増殖させる際には、増殖が安定期に達した後、培地を吸引除去し、リン酸緩衝食塩水等で数回洗浄した後、JEVを感染効率（M.O.I）0.01~0.0001で接種する。ウイルス接種後の維持培地として、無血清、低蛋白濃度の培地を使用することが望ましい。例えば、VP-SFM（GIBCO社）にL-グルタミン酸を添加した培地が使用される。上記培養温度で4~7日間培養する。培養終了後、培養物、すなわち、細胞の破碎液又は培養上清を回収し、これにホルマリンを添加し、4 前後で1~3ヶ月間以上静置することによりウイルスの不活化が行なわれる。

40

## 【 0 0 2 2 】

得られたJEV含有液からJEV粒子を精製するときは、一般に、蛋白質化学において使用される精製方法、例えば、遠心法、塩析法、通常ろ過法、限外ろ過法、等電点沈殿法、電気

50

泳動法、イオン交換クロマト法、ゲルろ過クロマト法、アフィニティークロマト法、疎水クロマト法、ハイドロキシアパタイトクロマト法などの方法が使用される。これらの中から、JEV粒子を精製するのに適した方法を選択し、組み合わせて用いる。本実施例では、J EV含有液をショ糖密度勾配遠心にかけて後、JEV粒子画分を分画・プールし、更にセルロース硫酸エステルゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィーを行なうことにより精製した。精製した不活化JEV含有液は、例えば、リン酸緩衝液、生理食塩水等でアジュバントとして使用するのに適したウイルス量となるように希釈される。こうして得られた不活化JEV粒子含有液は、アジュバントとして種々のワクチンに添加される。

#### 【0023】

本発明の方法は、ウイルス感染症に対するワクチン及び細菌感染症に対するワクチンの何れにも使用できる。ウイルス感染症に対するワクチンとして、例えば、A型肝炎、B型肝炎、狂犬病、ポリオ、麻疹、風疹、インフルエンザ、黄熱病、ダニ媒介性脳炎、おたふくかぜ、水痘、ロタ、痘そうなどが挙げられる。また、細菌感染症に対するワクチンとして、例えば、百日咳、ジフテリア、破傷風、腸チフス、コレラ、髄膜炎菌性髄膜炎、Hib(インフルエンザ桿菌b型)、BCG、肺炎球菌などが挙げられる。これらのワクチンからなる群より選択されるワクチンは、単独であっても良いし、2つ以上を混合した混合ワクチンであっても良いが、不活化JEV粒子をアジュバントとして使用するときにはワクチンの抗原量を低減することができるので、抗原量が制限される混合ワクチンに用いるのが好ましい。

10

#### 【0024】

剤形としては、液状 液状をバルク工程にてすでに混ぜた液状製品、液状 液状、液状-凍乾品を使用時にワンタッチで混合する容器に入ったシステム製品、もしくは手作業にて混合する用時調製製品で、注射剤、シリンジ剤、経皮剤、スプレー剤等の形状を取ることができる。投与径路として、筋肉注射、皮下注射、経皮投与などが挙げられ、目的に応じて適宜選択される。また、投与方法として同接種部位のみでなく、異なる接種部位にて利用することも可能である。

20

#### 【0025】

上記のワクチンには、免疫原性を高めるために抗原液に適当なアジュバントが添加される。その添加量は、抗原の種類、数、量などによって適当に設定される。アジュバントの種類としては、水酸化アルミニウムゲル、リン酸アルミニウムゲル、硫酸アルミニウムゲル、ミネラルオイル及びノンミネラルオイル等が挙げられるが、多くの人用ワクチンに使用され、安全性について十分な実績のあるアルミニウムゲルを使用する人が多い。アルミニウムゲルの使用における安全性は認められているものの、その使用量を間違えるとアルミニウム脳症、アルミニウム骨症などの副作用が見られる場合がある。それ故、添加されるアルミニウムゲル量は、できる限り少ない方が好ましい。本発明の不活化JEV粒子は、アルミニウム含有ワクチンにおいてアルミニウムゲルの量を減らすことができるので、アルミニウムゲルと併用するのが効果的である。

30

#### 【0026】

不活化JEV粒子は、アジュバント活性を示す250ng~34 $\mu$ g/mLの範囲で使用されるが、好ましくは、1~16 $\mu$ g/mLである。更に好ましくは、2~8 $\mu$ g/mLである。不活化JEV粒子をワクチンに添加するタイミングとしては、該ワクチンを調製するときには不活化JEV粒子を含有させても良いし、ワクチンを調製後に不活化JEV粒子を添加しても良い。例えば、弱毒生ウイルスワクチン原液や不活化ワクチン原液あるいはこれらの混合液に相当量の不活化JEV粒子を添加した後、リン酸緩衝液又は生理食塩水等で適当に希釈する方法が取られる。不活化JEV粒子を添加する前に、必要に応じてアルミニウムゲルを使用しても良い。ワクチン及びアルミニウムゲルは、それぞれ50ng~80 $\mu$ g/mL及び100~400 $\mu$ g/mLの範囲で使用される。

40

#### 【0027】

不活化JEV粒子のアジュバントとしての評価は、不活化JEV粒子を含有するワクチン又は混合ワクチンを動物の皮下、筋肉内又は皮内に注射し、誘導される免疫応答を、不活化JE

50

V粒子を含有しない同ワクチンで誘導された免疫応答と比較することにより行なわれる。斯かる評価には、ラット、マウス、モルモット、ウサギなどの小動物が用いられる。例えば、不活化JEV粒子含有ワクチンで免疫した動物から採血後血清分離し、得られた血清の抗体(価)を測定し、これを、不活化JEV粒子を含有しないワクチンで免疫した動物の血清抗体(価)と比較することにより不活化JEV粒子のアジュバント活性が評価される。抗体(価)の測定方法としては、ELISA、EIA、毒素と細胞株を用いた中和試験などの方法が挙げられるが、何れの方法を用いても良い。

#### 【0028】

以下、参考例および実施例に従い、本発明を更に詳細に説明するが、下記の実施例に何ら限定されるものではない。

##### 〔参考例1〕

日本脳炎ウイルス粒子は、特開2000-83657の方法に従って調製した。簡単には、ダルベッコMEM培地を用いた浮遊培養法により増殖させたVero細胞に、M.O.I.値=0.01で日本脳炎ウイルス(北京-1株)を接種し、37℃、90分間吸着後、同培地を添加して同温度で3~5日間培養した。培養液をショ糖密度勾配遠心にかけてウイルス画分を回収し、セルロース硫酸エステルゲルを用いてウイルス粒子を精製した。ウイルス粒子の不活化は、0.08vol%のホルマリン濃度条件下、冷房内にておよそ半年放置し、ウイルスを不活化した。こうして得られた不活化日本脳炎ウイルス粒子を実施例において使用した。不活化日本脳炎ウイルス粒子のタンパク質量は、ローリー法により測定した。

#### 【0029】

##### 〔参考例2〕

##### (1) 抗体価測定に用いたELISA法

固相抗原として、百日咳トキソイド(PT)2.5 µg/mL、ジフテリアトキソイド(DT)5 µg/mL、破傷風トキソイド(TT)5 µg/mL、B型肝炎ウイルス表面抗原(HBs)5 µg/mL、ポリオウイルス1型1.9Du/mL、ポリオウイルス2型0.975Du/mL、ポリオウイルス3型1.5Du/mL、不活化JEV粒子5 µg/mLを用いた。HBsと不活化JEV粒子のタンパク質量はローリー法で測定し、DPTの各抗原量はケルダール法によりタンパク室素量を測定し、その値をタンパク質量に換算した。ポリオウイルスはD抗原量を測定した。100 µL/wellの固相抗原を96well plate(Nunc社、Maxisorp)に加え、4℃で一晩静置して固相化した。翌日、各wellを350 µLの0.05% Tween20含有PBS(PBST)で3回洗浄し、PBSで4倍希釈したBlock Ace(大日本住友製薬社、以後BAと略す)を350 µL/well添加して室温で2時間静置した。2時間後、4倍希釈BAを十分に除き、350 µL/wellのPBSTにて3回洗浄後、0.05% Tween20含有PBSにて10倍希釈したBAで検体を希釈して、希釈検体を100 µL/well添加した。37℃、2時間反応後、350 µL/wellのPBSTにて3回洗浄し、十分に洗浄液を除いた後、検体希釈液を用いて2000倍希釈したHRP標識抗マウスIgGヤギ抗体(American Qualax社、A131PS)又はHRP標識抗マウスIgGラット抗体(Zymed斜、04-6020)、HRP標識抗ラットIgG(H+L)ヤギ抗体(Zymed斜、81-9520)を100 µL/wellにて添加し、37℃、1時間反応した。1時間後液を十分に捨て、350 µL/wellのPBSTで4回、同量の蒸留水で2回洗浄し、発色基質液TMB+(Dako社)を100 µL/well添加して遮光下室温で30分間反応した。その後、1N硫酸を100 µL/well添加して発色を停止し、450nmの吸光度を測定した。

#### 【0030】

##### (2) 標準血清の調製と抗体価算出

抗体の対象となる感染症防御用抗原を免疫動物に免疫し、2週~4週間後、下記抗体価測定系にて十分抗体価が上がっていることを確認した血清を標準抗体として使用した。具体例としてDPT各抗原に対する標準血清は、DPT現行製剤を5倍希釈したものを0.5mL腹腔免疫し2週間後採血したものを使用した。各抗原に対する抗体価は、免疫していないマウス血清26~30匹を検体希釈液にて50倍希釈又は200倍希釈し、各希釈検体をduplicateにて上記ELISAで測定を行いそのOD450nm値を測定した。測定したOD450nm値の平均値にその標準偏差値の2倍を加えた価をカットオフ値と設定した。標準血清を段階希釈してOD450nm値を測定し、カットオフ値を超える希釈倍率(PT:12,800倍、DT:96,000倍、TT:320,000倍

10

20

30

40

50

、JEV:1,024,000倍)を標準血清の抗体価とした。すなわちその希釈倍率の血清を各抗体価の1EUとして、検体の測定を行なった。抗ポリオ抗体のELISAについては、100倍希釈した検体を測定し、OD値の測定を行なった。

【0031】

(3) 抗HBs抗体価測定、陽転率判定

抗HBs抗体価についてはELISAのみでなくIMxオーサブアッセイシステム(abbott社製、2262-83)も使用して抗体価測定を行ない、陽転率判定を行なった。

【実施例1】

【0032】

《DPTワクチン抗原に対するJEV粒子のアジュバント活性》

参考例1で得た不活化日本脳炎ウイルス(JEV)粒子とDPT各抗原を表1に示した組成となるように混合し、得られた混合液0.5mLを1群4匹の10週齢SPFマウス(C57BL/6)(オス)の腹腔内に接種し、接種前、初回接種後2, 3, 4週目に採血し、4週目の採血後に同混合液で追加接種を行なった。2回目接種後1週目及び2週目に採血し、各血清の抗体価を参考例2-(1)の抗体価測定方法に従って測定した。その結果、JEVを加えたことによる抗原同士の負の干渉作用はみられず、JEVを加えた群のDPT各抗原(PT,DT,TT)に対する抗体価は、DPT単味の群より高かった(図1 a, b, c)。また、初回接種後2週目からJEV粒子のアジュバントとしての効果が見られた。

【0033】

【表1】

	DPTワクチン	JEV粒子
1群	PT:0.24 $\mu$ g/head, DT:0.41Lf/head,	—
2群	TT:0.043Lf/head, Alum:0.006mg/mL	1 $\mu$ g/head

【実施例2】

【0034】

《JEV粒子濃度のアジュバント活性に与える影響》

(1) 参考例1で得たJEV粒子とDPT各抗原を表2に示した組成となるように混合し、得られた混合液0.5mLを1群5匹の9週齢SPFマウス(C57BL/6)(オス)の腹腔内に接種し、接種前、初回接種後4週目に採血した。各血清の抗体価を参考例2-(1)の抗体価測定方法に従って測定した。抗体価測定結果(ELISA Units)を幾何平均値にて示した。その結果、2群から7群のDPT各抗原(PT,DT,TT)に対する抗体価は、JEV粒子を加えていない1群より高かった(図2)。

【0035】

【表2】

	DPTワクチン	JEV粒子
1群	PT:0.24 $\mu$ g/head, DT:0.41Lf /head,	—
2群	TT:0.043Lf/head, Alum:0.006g/mL	0.25 $\mu$ g/head
3群		0.5 $\mu$ g/head
4群		1 $\mu$ g/head
5群		2 $\mu$ g/head
6群		4 $\mu$ g/head
7群		8 $\mu$ g/head

【0036】

(2) 参考例1で得たJEV粒子とDPT各抗原を表3に示した組成となるように混合し、得られた混合液0.5mLを1群4匹の9週齢BDF-1マウス(メス)の腹腔内に接種し、接種前、初回接種後4週目に採血した。各血清の抗体価を参考例2-(1)抗体価測定方法に従って測定

10

20

30

40

50



した。JEV粒子を添加した群は、何れもJEV粒子を添加しなかった群に比べて高い抗体価を示した(図3)。

【0037】

【表3】

	DPTワクチン	JEV粒子
1群	PT:3.6 $\mu$ g/head, DT:6.25Lf/head, TT:0.65Lf/head, Alum:0.1mg/mL	—
2群		1 $\mu$ g/head
3群		8 $\mu$ g/head

10

【実施例3】

【0038】

《IPVワクチンに対するJEV粒子のアジュバント活性》

参考例1で得たJEV粒子と2倍及び4倍に希釈した市販のIPVワクチン(IMOVAX POLIO Sanofi Pasteur)を表4に示した組成となるように混合し、得られた混合液0.5mLを1群3匹の8週齢SPFラットWister(メス)の後肢大腿部に筋注し、接種前、初回接種後4、8週目に採血した。各血清の抗体価を参考例2-(1)抗体価測定方法に従って測定した。JEV粒子を添加した群は、何れもJEV粒子を添加しなかった群に比べて高い抗体価を示した(図4)。

【0039】

【表4】

	IPVワクチン	JEV粒子
1群	2倍希釈 (I:20UD, II:4UD, III:16UD)	—
2群		1 $\mu$ g/head
3群	4倍希釈 (I:10UD, II:2UD, III:8UD)	—
4群		1 $\mu$ g/head

20

【実施例4】

【0040】

《HBワクチンに対するJEV粒子のアジュバント活性》

参考例1で得たJEV粒子とHBワクチンのHBs抗原を表5に示した組成となるように混合し、得られた混合液1mLを1群5匹の5週齢BALB/c(オス)の腹腔内に接種し、接種前、初回接種後3、5、6週目に採血した。各血清の抗体価を参考例2-(1)の抗体価測定方法に従って測定した。JEV粒子を添加した群は、何れもJEV粒子を添加しなかった群に比べて高い抗体価を示した(図5)。0.25  $\mu$ g/headのHBワクチンにJEVを添加すると0.5  $\mu$ g/headのHBワクチンの抗体価と同等又はそれ以上に回復した。また各血清の抗体価を参考例2-(3)の方法に従い測定した。JEV粒子を添加した4群は、JEV粒子を添加しなかった3群に比べて高い陽転率を示した(表6)。

【0041】

【表5】

	HBワクチン	JEV粒子
1群	HBs:0.5 $\mu$ g/head, Alum:0.01mg/mL	—
2群		1 $\mu$ g/head
3群	HBs:0.25 $\mu$ g/head, Alum:0.006mg/mL	—
4群		1 $\mu$ g/head

30

40

【0042】

【表 6】

群	平均抗体価 (mIU/mL)	陽転率
1	80	100% (5/5)
2	118	100% (5/5)
3	26	60% (3/5)
4	19	80% (4/5)

## 【実施例 5】

## 【0043】

10

## 《HepAワクチンに対するJEV粒子のアジュバント活性》

参考例 1 で得たJEV粒子とHepAワクチンのHAV抗原を表 7 に示した組成となるように混合し、得られた混合液1mLを1群5匹の5週齢BALB/c(オス)の腹腔内に接種し、初回接種後 2, 7 週目に採血した。各血清の抗体価はELISAにて測定した。1次固相には抗HAVウサギ免疫血清を使用し、PBSTで3回洗浄後次にHAV抗原を1.25ng/50  $\mu$ L/wellを固相化、サンプルをアプライして1晩4 で反応させ、PBSTで3回洗浄後、HRPコンジュゲートの2次抗体を反応、PBSTで4回洗浄後基質を反応させ吸光度を測定した。また、免疫していない血清30検体を測定し、カットオフ値(3SD)を算出し、陽転率を求めた(2wカットオフ値:0.061、7wカットオフ値:0.065)。

## 【0044】

20

JEV粒子を添加した群は、何れもJEV粒子を添加しなかった群に比べて高い抗体価を示した(図 6)。また1、2群では、2週後の血清で陽転率に差が見られ、3、4群では、2週後、7週後に陽転率に差が見られた(表 8)。

## 【0045】

## 【表 7】

	HepAワクチン	JEV粒子
1群	HAV抗原:0.05 $\mu$ g/head	—
2群		1 $\mu$ g/head
3群	HAV抗原:0.025 $\mu$ g/head	—
4群		1 $\mu$ g/head

30

## 【0046】

## 【表 8】

群	陽転率	
	2w	7w
1	60% (3/5)	80% (4/5)
2	80% (4/5)	80% (4/5)
3	20% (1/5)	20% (1/5)
4	40% (2/5)	60% (3/5)

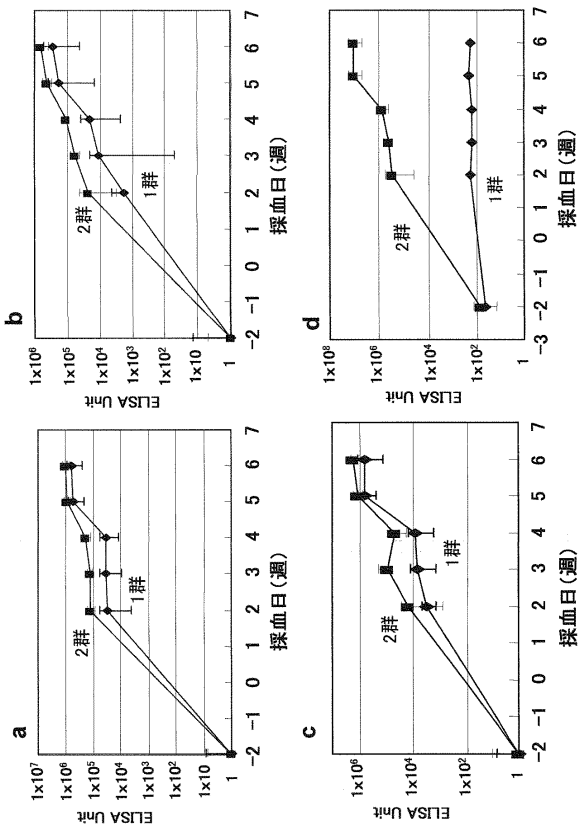
40

## 【産業上の利用可能性】

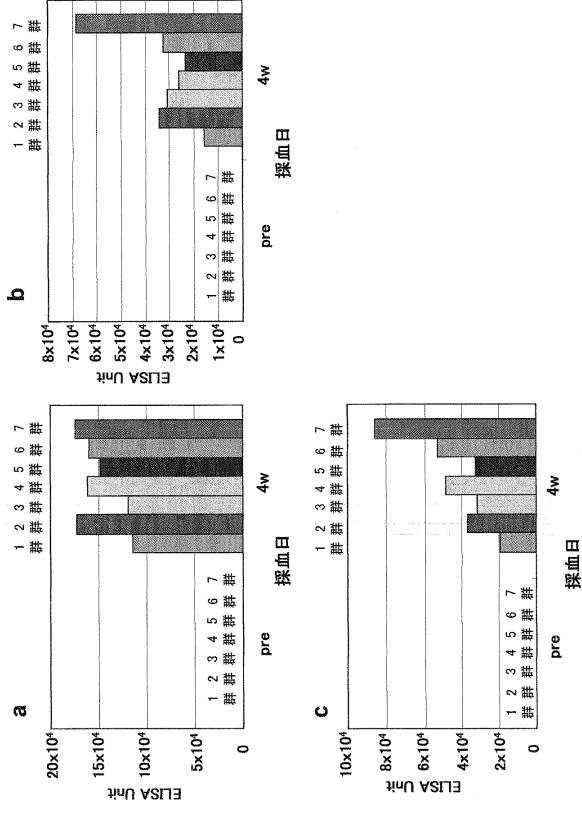
## 【0047】

本発明の不活化JEV粒子は、種々のワクチン(特に混合ワクチン)の免疫応答を高めるアジュバントとして有用である。

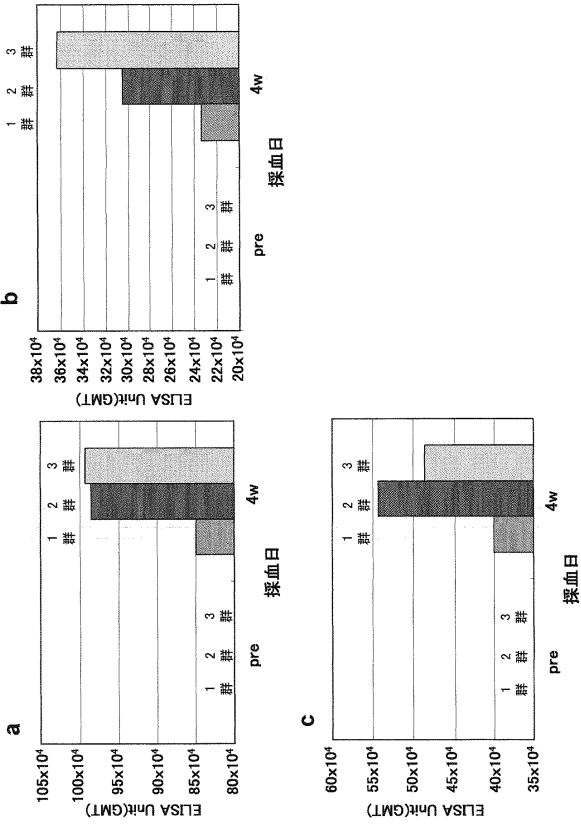
【図 1】



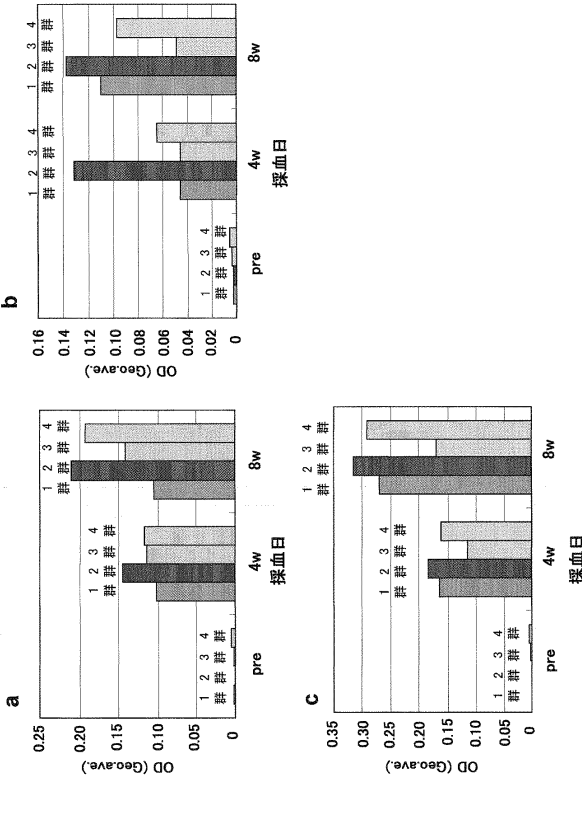
【図 2】



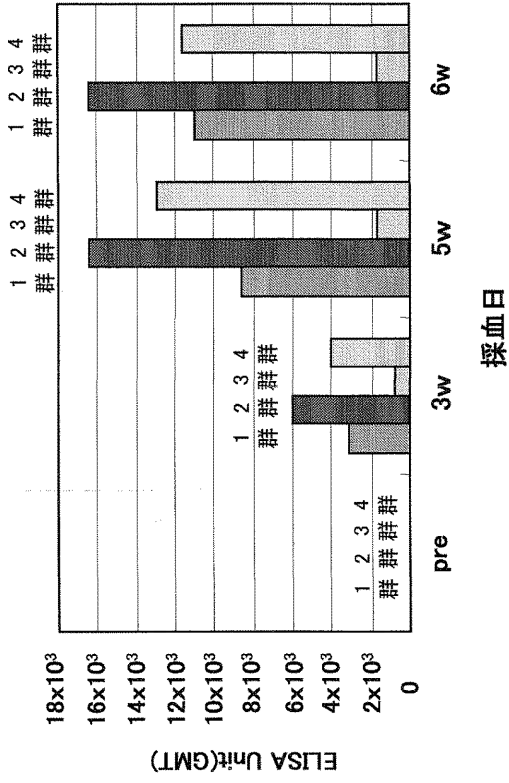
【図 3】



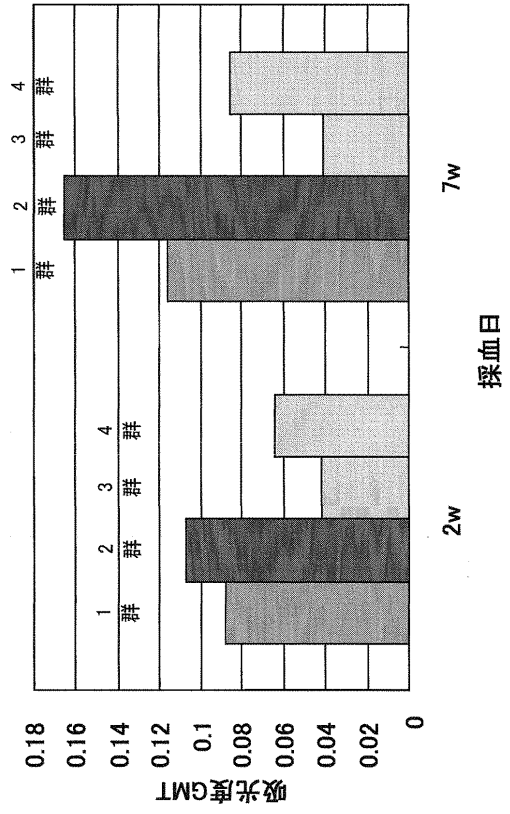
【図 4】



【 図 5 】



【 図 6 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
 A 6 1 P 31/12 (2006.01) A 6 1 P 31/12  
 A 6 1 K 39/00 (2006.01) A 6 1 K 39/00 G  
 A 6 1 P 31/12 1 7 1

- (71)発明者 森山 真  
 熊本県菊池市旭志川辺 1 3 1 4 番地 1 一般財団法人化学及血清療法研究所菊池研究所内
- (72)発明者 上仲 一義  
 熊本県菊池市旭志川辺 1 3 1 4 番地 1 一般財団法人化学及血清療法研究所菊池研究所内
- (72)発明者 松田 純一  
 熊本県菊池市旭志川辺 1 3 1 4 番地 1 一般財団法人化学及血清療法研究所菊池研究所内
- (72)発明者 野崎 周英  
 熊本県菊池市旭志川辺 1 3 1 4 番地 1 一般財団法人化学及血清療法研究所菊池研究所内

審査官 光本 美奈子

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 0 6 / 0 8 5 9 8 3 ( W O , A 1 )  
 特表平 1 1 - 5 0 7 5 4 5 ( J P , A )  
 特開 2 0 0 0 - 0 8 3 6 5 7 ( J P , A )  
 特開平 0 8 - 2 3 1 4 2 2 ( J P , A )

- (58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)  
 A 6 1 K 3 9 / 0 0 ~ 3 9 / 3 9  
 C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )