

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4447054号  
(P4447054)

(45) 発行日 平成22年4月7日(2010.4.7)

(24) 登録日 平成22年1月29日(2010.1.29)

(51) Int. Cl.	F I	
<b>C 1 2 N 7/02 (2006.01)</b>	C 1 2 N 7/02	
<b>A 6 1 K 39/145 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/145	
<b>G O 1 N 33/569 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/569	
A 6 1 K 38/48 (2006.01)	A 6 1 K 37/547	
C 1 2 N 5/07 (2010.01)	C 1 2 N 5/00	E

請求項の数 3 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願平9-535090	(73) 特許権者	597125955
(86) (22) 出願日	平成9年4月1日(1997.4.1)		カイロン ベーリング ゲーエムペーハー アンド カンパニー
(65) 公表番号	特表2000-507825 (P2000-507825A)		ドイツ国 マールブルグ 35006, ポ ストファッハ 1630, エミル フォ ン ベーリング シュトラーセ 71
(43) 公表日	平成12年6月27日(2000.6.27)	(74) 代理人	100078282
(86) 国際出願番号	PCT/IB1997/000404		弁理士 山本 秀策
(87) 国際公開番号	W01997/037001	(74) 代理人	100062409
(87) 国際公開日	平成9年10月9日(1997.10.9)		弁理士 安村 高明
審査請求日	平成14年2月18日(2002.2.18)	(74) 代理人	100113413
審査番号	不服2006-11963 (P2006-11963/J1)		弁理士 森下 夏樹
審査請求日	平成18年6月9日(2006.6.9)	(72) 発明者	グレナー, アルブレヒト
(31) 優先権主張番号	19612967.2		ドイツ国 ゼーハイム デー—64342 、ファザネンヴェク 6
(32) 優先日	平成8年4月1日(1996.4.1)		最終頁に続く
(33) 優先権主張国	ドイツ(DE)		
微生物の受託番号	DSM ACC2219		

(54) 【発明の名称】細胞培養におけるインフルエンザウイルスの複製の方法、および本方法によって入手可能なインフルエンザウイルス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ワクチンの処方における使用のための細胞培養におけるインフルエンザウイルスの複製のための方法であって、インフルエンザウイルスに感染していないが感染し得る細胞を、細胞培養において培養し、該細胞が、インフルエンザウイルスを接種され、そして感染後、ウイルス複製のために33の温度で培養され、複製されたインフルエンザウイルスを回収および単離し、そしてワクチンを得るために該インフルエンザウイルスが処方され、ここでプロテアーゼを含む細胞培養またはプロテアーゼが、インフルエンザウイルスの接種と同時に培養細胞に添加される方法であって、ここで該細胞は、M D C K 3 3 0 1 6 ( D S M A C C 2 2 1 9 )であり、該プロテアーゼはトリプシンであり、そしてここで該複製が無血清培地中で行われることを特徴とする、方法。

【請求項 2】

前記細胞または細胞の残渣が培養培地から分離される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ワクチン中に生の弱毒化ウイルスとしてウイルスが存在する、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

本発明は、低減した温度での細胞培養におけるインフルエンザウイルスの複製のための方法、ならびに記載されるプロセスによって入手可能なインフルエンザウイルス、およびこの型のウイルスまたはその構成物を含むワクチンに関する。

40年代から今日まで用いられている全てのインフルエンザワクチンは、ヒトおよび動物の処置のための許容ワクチンとして、胚を有する（embryonate）雌鶏卵において複製される1つ以上のウイルス株からなる。これらのウイルスは、感染した雌鶏卵の尿膜液から単離され、これらの抗原は、インタクトなウイルス粒子または界面活性剤および/もしくは溶媒によって分解されたウイルス粒子のいずれかのようなワクチン（いわゆる切断されたワクチン）、あるいは単離され、限定されたワクチン（いわゆるサブユニットワクチン）として使用される。全ての許容ワクチンにおいて、ウイルスは、当業者に公知の方法によって不活化される。生弱毒化ウイルス（実験的なワクチンにおいて試験される）の一般的な複製が、胚を有する雌鶏卵において実施される。

ワクチン産生のための胚を有する雌鶏卵の使用は、時間、労働、および費用を要する。卵（獣医によってモニターされる雌鶏の健全群由来）は、感染前に、通常12日間インキュベートされなければならない。感染前に、卵は生存する胚に関して選択されなければならない。なぜなら、これらの卵のみがウイルス複製に適切であるからである。感染後、卵は通常2～3日間再びインキュベートされる。この時までなお生存している胚は、冷却によって屠殺され、そして次いで、尿膜液が、個々の卵から吸引によって得られる。面倒な精製プロセスの手段により、ワクチンの所望でない副作用を導く雌鶏卵からの物質が、ウイルスから分離され、そしてウイルスは濃縮される。卵は滅菌（病原体を含有しない）されていないので、さらに、発熱物質および存在し得る全ての病原体を除去および/または不活化する必要がある。ウイルスの収率を増加させるために、雌鶏卵におけるインフルエンザウイルスの複製は、概して、低減した温度（約34℃）で実施される。呼吸性疾患を引き起こすようなウイルスは、細胞培養において複製され得る。ここで、減少された温度が使用される（約33℃）いくつかの場合においては、ワクチンの質に対して影響を及ぼさず、好ましく複製されるのみである。

例えば、狂犬病ウイルス、おたふく風邪、麻疹、および風疹ウイルス、ポリオウイルス、ならびにFSMEウイルスのような他のワクチンのウイルスは、細胞培養において複製され得る。試験された細胞バンクから始まる細胞培養は、病原体を含有せず、そして雌鶏卵に比べて、（理論的には）ほとんど制限されない量が入手可及な限定されたウイルス複製系であるため、これらは、インフルエンザウイルスの場合でさえ、特定の環境下で経済的なウイルス複製が可能である。経済的なワクチン産生はまた、限定された、滅菌された細胞培養培地からのウイルスの単離および精製は、多数のタンパク質を含む尿膜液からの単離および精製よりも簡単なようであることがおそらく達成され得る。

卵中のインフルエンザウイルスの単離および精製は、臨床的な単離とは大きく異なる特定の表現型の選択を導く。臨床的単離とは異なり、細胞培養におけるウイルスの単離および複製においては、継代依存性選択は生じない（Oxford, J.S. ら、J.Gen.Virology 72（1991）,185-189；Robertson, J.S. ら、J.Gen.Virology 74（1993）,2047-2051）。従って、有効なワクチンのために、細胞培養におけるウイルス複製はまた、この局面より卵におけるものに対して好ましい。インフルエンザウイルスが細胞培養において複製され得ることは公知である。雌鶏胚細胞およびハムスター細胞（BHK21-FおよびHKCC）に加えて、MDBK細胞および特にMDCK細胞が、インフルエンザウイルスのインビトロでの複製のための適切な細胞として記載されている（Kilbourne, E.D., : Influenza, 89～110頁、Plenum Medical Book Company-New York and London, 1987）。首尾よい感染のための必須条件は、感染培地へのプロテアーゼ（好ましくは、トリプシンまたは類似のセリンプロテアーゼ）の添加である。なぜなら、これらのプロテアーゼは、赤血球凝集素[HA<sub>0</sub>]の前駆体タンパク質を、活性な赤血球凝集素[HA<sub>1</sub>およびHA<sub>2</sub>]に、細胞外的に切断するからである。切断された赤血球凝集素のみが、続く細胞へのウイルス同化を伴う細胞上のインフルエンザウイルスの吸着を導く（Tobita, K. ら、Med.Microbiol.Immunol., 162（1975）, 9-14；Lazarowitz, S.G. およびChoppin, P.W., Virology, 68（1975）440-454；Klenk, H.-D. ら、Virology 68（1975）426-439）、そしてそれゆえ、細胞培養におけるウイルスのさらなる複製サイクルを導く。

米国特許第4 500 513号は、接着性増殖細胞の細胞培養におけるインフルエンザウイルス

10

20

30

40

50

の複製を記載した。細胞増殖後、栄養培地は除去され、そして新鮮な栄養培地が、インフルエンザウイルスでの細胞の感染と同時にまたはその少し後に細胞に添加される。感染から所定の時間の後、プロテアーゼ（例えばトリプシン）が至適ウイルス複製を得るために添加される。ウイルスは回収され、精製され、そして不活化または弱毒化ワクチンを生じさせるために加工される。しかし、ワクチン産生のための必須条件としての経済的なインフルエンザウイルス複製は、培地の変換、続く感染、ならびにトリプシンの添加のような、後に個々の細胞培養容器を数回開ける必要性をもたらし、それゆえ大変労力を要するこの特許に記載の方法論を用いては達成され得ない。さらに、培養容器の各操作での所望でない微生物やウイルスによる細胞培養の汚染の危険が増大する。より安価な選択は、当業者に公知の発酵槽系における細胞増殖であり、細胞はマイクロキャリア上の接着性増殖する。しかし、マイクロキャリア上の細胞の増殖に必要な血清（通常、ウシ胚血清）は、トリプシンインヒビターを含み、その結果、この産生方法においてさえ、トリプシンによるインフルエンザ赤血球凝集素の切断を達成し、それゆえ適切な高度なウイルス複製のために、培地の無血清培地への変換が必要である。従って、この方法論はまた、培養容器を数回開けることを必要とし、それゆえ汚染の危険を増大させる。

従って、本発明は、細胞培養における簡単かつ経済的なインフルエンザウイルスの複製を可能にし、そして高度に有効なワクチンを導く方法を提供する目的に基づく。

この目的は、特許の請求の範囲に示された実施態様の提供によって達成される。

従って、本発明は、細胞培養物におけるインフルエンザウイルスの複製のためのプロセスに関する。インフルエンザウイルスによって感染され得る細胞は細胞培養で培養され、この細胞はインフルエンザウイルスで感染され、そして感染の後にウイルス複製のために30~36の範囲の温度で培養される。

本発明のプロセスの好ましい実施態様において、ウイルス複製のための感染細胞の培養は、32~34、そして特に好ましくは33で実施される。

驚くべきことに、減少した温度での感染細胞におけるインフルエンザウイルスの複製によって、37での複製によって得られるウイルスよりも、ワクチンとして相当高い効率を有するウイルスが得られることが見出されている。37での複製（細胞培養においてインフルエンザ複製のために通常使用される温度）は、短時間で比較的高いウイルス収率に導くことが認められている。しかし、このように産生されたウイルスは、本発明のプロセスによって調製されたウイルスと比較すれば、ワクチンとして低い効率を有する。

インフルエンザウイルスの複製に関する本発明のプロセスにおいて使用される細胞は、原則的に、細胞培養で培養され得、そしてインフルエンザウイルスによって感染され得る所望の任意の型であり得る。これらは、接着性増殖細胞または懸濁物中で増殖する細胞のいずれでもあり得る。

好ましい実施態様において、細胞は脊椎動物細胞であり、詳細にはトリ細胞、そしてこの状況においては好ましくは雌鳥細胞（例えば、雌鳥胚細胞（CEF細胞））である。

なお好ましい実施態様において、細胞は哺乳動物細胞（例えば、ハムスター、ウシ、サル、またはイヌ細胞）である。好ましくは、腎臓細胞またはこれに由来する細胞株が使用される。適切なハムスター細胞の例は、BHK21-FまたはHKCCの名前を有する細胞株である。

可能なサル細胞は、例えば、VERO細胞であり、そして可能なウシ細胞はMDBK細胞株である。適切な腎臓細胞株の例は、イヌ腎臓由来のMDCK細胞株（ATCC CCL34 MDCK（NBL-2））である。

本発明の状況において、上記の腎臓細胞株MDCKからさらなる細胞株を樹立した。このさらなる細胞株は、無血清培地における懸濁物における増殖に適用され、それによって特に単純かつ効率的な培養およびウイルス複製を可能にする。この細胞株MDCK 33016は、本発明のプロセスにおいて特に好ましく使用される。これは、特許手続のための微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約の規定に基づき、国際寄託部署として承認されているブルンスウィック（ドイツ連邦共和国）のGerman Collection of Microorganisms（DSM）に、受託番号DSM ACC 2219で1995年6月7日に寄託された。

本発明のプロセスにおける細胞の培養のために、当業者に公知の通常の方法（特に、細胞

10

20

30

40

50

培養におけるインフルエンザウイルス複製のためにすでに公知な方法)が細胞培養に使用され得る。懸濁物中で増殖する細胞(特に無血清培地中で培養され得る細胞)を用いる本発明のプロセスの実施は、特に単純かつ効率的なウイルス複製を可能にする。懸濁物中での細胞の培養は、この場合、バッチプロセスおよび灌流系(例えば、当業者に公知の細胞貯留系(例えば、遠心分離、濾過、スピンフィルターなど)を用いる攪拌容器発酵槽において)の両方において行われ得る。

細胞の培養は、原則として、好ましくはpH6.6~pH7.8の範囲、詳細にはpH6.8~pH7.3の範囲の調節されたpHで実施される。

さらに、 $pO_2$ 値は、有利に調節され得、原則的に25%と95%との間、詳細には35%と60%(空気飽和に基づく)との間である。

懸濁物中で培養された細胞の感染は、好ましくは、バッチプロセスにおける細胞が約 $8 \sim 25 \times 10^5$ 細胞/ml、または灌流系において約 $5 \sim 20 \times 10^6$ 細胞/mlの細胞密度に達したときに行われる。接着性増殖細胞が用いられる場合、感染のために最適な細胞密度は特定の細胞株に依存する。

インフルエンザウイルスでの細胞の感染は、好ましくは約0.0001~10、好ましくは0.002~0.5のm.o.i.(多重感染度)で行われる。

赤血球凝集素の前駆体タンパク質[HA<sub>0</sub>]の切断、従って細胞へのウイルスの吸着をもたらすプロテアーゼの添加は、本発明に従い、インフルエンザウイルスでの細胞の感染の少し前、同時、または少し後に行われ得る。添加が感染と同時に進行される場合、プロテアーゼは感染されるべき細胞培養に直接または例えば、ウイルス接種と一緒に濃縮物として添加され得る。血清含有培地培地が培養に使用される場合、これはプロテアーゼ添加の前に除去されるべきである。プロテアーゼは好ましくはセリンプロテアーゼ、そして特に好ましくはトリプシンである。

トリプシンが使用される場合、培養培地に添加される最終濃度は有利には $1 \sim 200 \mu\text{g/ml}$ であり、好ましくは $5 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ 、そして特に好ましくは $5 \sim 30 \mu\text{g/ml}$ である。

感染の後に、感染細胞培養物はウイルスを複製させるために、詳細には最大細胞障害効果、または最大量のウイルス抗原が検出され得るまで、さらに培養される。

このプロセスの好ましい実施態様において、複製されたインフルエンザウイルスの採取および単離は、感染から2~10日後、好ましくは3~7日後に行われる。これを行うために、例えば、細胞または細胞残基は、当業者に公知の方法の手段(例えば、分離器またはフィルターにより)により、培養培地から分離される。これに続いて、培養培地中に存在するインフルエンザウイルスの濃縮が、当業者に公知の方法(例えば、勾配遠心分離、濾過、沈殿などのような)により行われる。

本発明は、本発明のプロセスにより入手可能なインフルエンザウイルスにさらに関する。これは、ヒトまたは動物への投与のためのワクチンとして、公知の方法により処方され得る。上記ですでに説明したように、この型のインフルエンザウイルスは、細胞培養中で37°Cでの複製によって得られたインフルエンザウイルスよりも、ワクチンとして高い効率を有する。

ワクチンとして得られたインフルエンザウイルスの免疫原性または効率は、当業者に公知の方法(例えば、曝露実験における保護分与の手段により、またはウイルス中和抗体の抗体力価として)により決定され得る。

産生されたウイルスまたは抗原の量の決定は、例えば、当業者に公知の方法による赤血球凝集素の量の決定により行われ得る。例えば、切断赤血球凝集素は種々の種の赤血球(例えば、雌鳥赤血球)に結合することが知られている。これは、産生されたウイルスまたは形成された抗原の、適切な検出方法による単純かつ迅速な定量を可能にする。

動物モデルにおける比較実験によって、本発明のインフルエンザウイルスは、37°Cで複製されたウイルスよりも有意に高い力価の中和抗体を産生し、これにより、インフルエンザウイルス感染に対する有意に良好な保護を付与することが実証された。動物モデルとしてマウスを用いる実験において、中和抗体の力価は、例えば、少なくともワクチン接種後42週間での1つの因子だけ37°Cで複製されたインフルエンザウイルスでの接種後の中和抗体

10

20

30

40

50

の力価よりも高かった。接種後4週間で、中和抗体の力価は、少なくとも17の因子だけより高く、そしていくつかの場合では27倍高かった。ワクチン再接種を行う場合、本発明のインフルエンザウイルスを使用すれば、37で複製されたインフルエンザウイルスと比較して、中和抗体の力価は60を越える因子だけ高くあり得る。従って、曝露実験における100LD<sub>50</sub>（致死用量50%）の投与量を使用する動物の生存率は、1/10から少なくとも8/10まで、好ましくは9/10まで、そして特に好ましくは10/10（100%）まで増大され得る。

本発明はさらに、本発明のプロセスから入手可能なインフルエンザウイルスを含むワクチンに関する。この型のワクチンは、必要に応じて、ワクチンにたいして通常の添加剤、詳細には、免疫応答を増大する物質（すなわち、いわゆるアジュバント）（例えば、種々の金属の水酸化物、細菌細胞壁の成分、油またはサポニン）、およびさらに通常の薬学的に許容可能な賦形剤を含み得る。

10

ウイルスは、ワクチン中にインタクトなウイルス粒子として、詳細には弱毒化生ウイルスとして存在し得る。この目的のために、ウイルス濃度は所望の力価に調節され、そして凍結乾燥されるか、または液体形態において安定化される。

さらに好ましい実施態様において、本発明のワクチンは崩壊（すなわち、不活性化）された、またはインタクトだが不活性化されたウイルスを含み得る。この目的のために、ウイルスの感染性が、化学および/または物理的方法（例えば、界面活性剤またはホルムアルデヒドにより）によって破壊される。次いで、ワクチンは、抗原の所望の量まで調整され、そして可能なアジュバントの混合の後、または可能なワクチン処方の後、例えば、リボソーム、ミクロスフェアまたは「徐放」処方物として分配される。

20

さらに好ましい実施態様において、本発明のワクチンは最後にサブユニットワクチンとして存在し得、すなわち、それは、定義された、単離ウイルス構成物、好ましくはインフルエンザウイルスの単離されたタンパク質を含有し得る。これらの成分は、当業者に公知の方法により、インフルエンザウイルスから単離され得る。

より低い温度で調製された本発明のインフルエンザウイルスが、より高い温度で従来の方法に従って調製されたウイルスよりも高い抗原性を有するという差異は、診断目的のために使用され得る。従って、本発明はまた、適切である場合には、この分野で通常の添加剤および適切な検出剤と組み合わせて、本発明のインフルエンザウイルスまたはこのようなウイルスの成分を含む診断組成物に関する。

実施例は、本発明を例示する。

30

#### 実施例 1

##### 33 でのMDCK細胞におけるインフルエンザウイルスの複製

MDCK細胞（ATCC CCL 34）を、細胞培養ボトル（2%FCSを用いるEagle's MEM [EMEM]、37で4日間のインキュベーション）において複製した。得られた濃厚な細胞ローンを、トリプシン溶液を用いて容器の壁から剥離し、細胞を単離し、そして細胞濃縮物を血清含有培地中に再懸濁した。細胞を、ローラーボトル（200ml/ボトル）において $5 \times 10^5$ 細胞/mlの細胞密度で接種し、そして37で4rpmでインキュベートした。2日後、細胞にインフルエンザウイルスを感染させた。これを行うために、濃厚な細胞ローンの上の培地を除去し、そして無血清EMEMにより置換した。0.1のm.o.i.（感染多重度）を有するインフルエンザウイルスA/PR/8/34および25 $\mu$ g/mlの最終濃度のトリプシンを培地に添加した。

40

いずれの場合も2つのローラーボトルを37または33でインキュベートした。ウイルス複製を、抗原の量（赤血球凝集素単位として測定）として決定し、そして感染性（CCID<sub>50</sub>試験において測定）として決定した。そして、これを表1に示す。

表1

抗原含量 (HA単位および感染性) (CCID<sub>50</sub>)として測定した場合の37℃および33℃でのインキュベーション後のローラーボトル (MDCK細胞株) におけるインフルエンザA/PR/8/34の複製

	HA含量			CCID <sub>50</sub> /ml
	2 dpi	3 dpi	4 dpi	[log <sub>10</sub> ]
37℃	1 : 128	1 : 512	1 : 1024	6.4
33℃	1 : 64	1 : 256	1 : 1024	5.7

10

## dpi = 感染後の日数

示した比は、1 : X 希釈のウイルス収集物が依然として血球凝集特性を有することを意味する。血球凝集特性は、例えば、Mayerら, *Virologische Arbeitsmethoden*, [ *Virological Working Methods* ], 第1巻 (1974), 260~261頁またはGrist, *Diagnostic Methods in Clinical Virology*, 72~75頁に記載のように決定し得る。

20

CCID<sub>50</sub> 値の決定は、例えば、Paul, *Zell- und Gewebekultur* [ *Cell and tissue culture* ] (1980), 395頁に記載される方法に従って実施し得る。

## 実施例 2

懸濁物中での増殖に適応しており、そしてインフルエンザウイルスにより感染され得る細胞株の調製

懸濁培養における増殖に適切であり、そしてインフルエンザウイルスにより感染され得る細胞株を、MDCK細胞 (ATCC CCL34 MDCK (NBL-2)) から開始して選択した。この細胞は、研究室において少数回の継代のみにより、または数ヶ月かけて増殖させておいた。この選択を、16rpm (付着性増殖細胞を有するローラーボトルについての習慣的な約3rpmの代わりに) で回転したローラーボトルにおける細胞の増殖により実施した。培地中に懸濁して存在する細胞の数回の継代後、懸濁物中で増殖している細胞株を得た。これらの細胞株にインフルエンザウイルスを感染させ、そしてこの株をどの株が最大のウイルス収量を生じるかについて選択した。16rpmでの最初の継代の間の懸濁物中での細胞の増殖速度の増加は、当業者に公知の選択系 (例えば、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン、またはアラノシンおよびアデニンを個々にまたは組み合わせで) の添加により1~3回の継代にわたって達成される。懸濁物中で増殖している細胞の選択はまた、当業者に公知の他の攪拌細胞培養系 (例えば、攪拌フラスコ) において可能である。懸濁物中での増殖に適応しており、そしてインフルエンザウイルスにより感染され得る細胞の例は、細胞株MDCK 33016 (DSM ACC2219) である。

30

40

## 明澄

## 実施例 3

33 でのMDCK 33016細胞におけるインフルエンザウイルスの複製

懸濁物中で増殖している細胞株MDCK 33016 (DSM ACC2219) を、16rpmで回転するローラーボトルにおいて週に2回、1 : 8 ~ 1 : 12の分割割合で、Iscove培地中で37℃で複製させた。移してから4日後、約 $7.0 \times 10^5$ 細胞/mlの細胞数を達成した。この4日齢の細胞培養物のインフルエンザ株A/PR/8/34 (m.o.i. = 0.1) での感染と同時に、細胞培養物をトリプシン (25 µg/mlの最終濃度) で処理し、37℃ または33℃ でさらにインキュベートし、そしてウイルス複製を3日間にわたって決定した (表II)。

50

表II

37℃または33℃のインキュベーション温度での培地交換なしの細胞培養物の感染後に、ローラーボトル (MDCK細胞株MDCK 33016) における抗原含量 (HA単位) として測定したインフルエンザA/PR/8/34の複製

## 感染後の日数 (dpi) によるHA含量

	1 dpi	2 dpi	3 dpi	
37℃	1 : 64	1 : 512	1 : 1024	10
33℃	1 : 16	1 : 128	1 : 1024	

## 実施例 4

33 でのMDCK 33016細胞 (DSM ACC 2219) における種々のインフルエンザ株の複製細胞株MDCK 33016 (DSM ACC 2219) を、16rpmで回転するローラーボトルにおいて週に2回、1 : 8 ~ 1 : 12の分割割合で、Iscove培地中で37 で増殖させた。移してから4日後、約 $7.0 \times 10^5 \sim 10 \times 10^5$ 細胞/mlの細胞数を達成した。この4日齢の細胞培養物の種々のインフルエンザ株 (m.o.i. 約0.1) での感染と同時に、細胞培養物をトリプシン (25  $\mu$ g/mlの最終濃度) で処理し、33 でさらにインキュベートし、そしてウイルス複製を感染5日後に決定した (表III)。

20

表III

抗原含量 (HA単位) として測定した、培地交換なしの細胞培養物の感染後のローラーボトル (細胞株MDCK 33016) におけるインフルエンザ株の複製

## 感染5日後のHA含量

インフルエンザ株	HA含量	
A/Singapore	1 : 1024	30
A/Sichuan	1 : 256	
A/Shanghai	1 : 256	
A/Guizhou	1 : 128	
A/Beijing	1 : 512	
B/Beijing	1 : 256	
B/Yamagata	1 : 512	
A/PR/8/34	1 : 1024	40
A/Equi 1/Prague	1 : 512	
A/Equi 2/Miami	1 : 256	
A/Equi 2 Fontainebleau	1 : 128	
A/Swine/Ghent	1 : 512	
A/Swine/Iowa	1 : 1024	
A/Swine/Arnsberg	1 : 512	

## 実施例 5

実験用インフルエンザワクチンの調製

50

マウスにおける接種の後、ヒト病原性インフルエンザウイルスは、通常病理学的プロセスを伴う感染に至らず、その結果、マウスを用いる保護実験は、構築することが実験的に非常に困難である。しかし、インフルエンザウイルスA/PR/8/34株は、マウスに適応され、そして鼻腔内投与の後に、マウスにおいて用量依存性死亡を引き起こす。

実験用ワクチンを、実施例3に由来するインフルエンザウイルスA/PR/8/34 (37 または33 で複製させたA/PR/8) から調製した。細胞培養培地中のインフルエンザウイルスを、低速遠心分離 (2000g、20分、4 ) によって細胞および細胞フラグメントから分離し、そしてショ糖勾配遠心分離 (10~50% (wt/wt) の直線状ショ糖勾配、30,000g、2時間、4 ) によって精製した。インフルエンザウイルス含有バンドを入手し、PBS (pH7.2) で1:10に希釈し、そして20,000rpmで沈殿させ、そして沈殿物をPBS (容量: 最初の細胞培養培地の50%) 中に取り出した。インフルエンザウイルスを、ホルムアルデヒドで不活化した (24時間の間隔で35%強度ホルムアルデヒド溶液の0.025%の2回の添加、攪拌しながら20 でのインキュベーション)。

10匹のNMRIマウスの各々 (18~20gの重量) に、皮下注射により0日目および28日目に各々0.3mlのこれらの不活化実験用ワクチンとともにインキュベートした。接種の2および4週間後、ならびにさらにワクチン再接種の1および2週間後に、血液を動物から採取して、A/PR/8/34に対する中和抗体の力価を測定した。保護割合を決定するために、マウスを、ワクチン再接種 (実験の開始後6週間) 後に1000LD<sub>50</sub> (致死量の50%) の鼻腔内投与によって2週間曝露した。実験の結果を表IVに編集した。

#### 表IV

**実験用ワクチンの効力: ワクチンAに関しては、インフルエンザウイルスA/PR/8/34を37°Cで複製させ、そしてワクチンBに関しては33°Cであった。A/PR/8に対する中和抗体の力価およびさらにマウスの曝露後の保護割合を調査した。**

	中和抗体の力価		/ml*		保護割合 数 生存/総数
	2 w pvacc	4 w pvacc	1 w prevacc	2 w prevacc <sup>二</sup>	
37°C	<28	56	676	1 620	1/10
33°C	112	1 549	44 670	112 200	9/10

\* ワクチン後の週 (W pvacc) およびワクチン再接種後の週 (W prevacc) 。

これらの実験は、細胞培養において37 で複製した、高い抗原収量 (HA力価) を伴うインフルエンザウイルスが、マウスにおいて低い中和抗体力価のみを誘導し、そしてかろうじて保護を提供し、一方、細胞培養において33 で複製した、同様に高い抗原収量 (HA力価) を伴うインフルエンザウイルスは、マウスにおいて非常に高い中和抗体力価を誘導し、そして非常に良好な保護に至ったことを確認する。

#### 実施例6

33 でのMDCK細胞におけるインフルエンザウイルスの複製および得られるワクチンの効力細胞株MDCK (ATCC CL34) を、週に2回の1:8~1:12の分割割合で、細胞培養ボトル中で2%FCSを有するEagleのMEM (EMEM) において37 で複製させた。形質転換の4日後、高密度な細胞ローンが生じた。この培地から血清非含有EMEMへの変更の後、細胞培養物を、インフルエンザB/Beijing (m.o.i. = 0.1) で感染させ、トリプシンを25 μg/mlの最終濃度で培地に添加し、そして感染細胞培養ボトルを、37 または33 のいずれかでインキュベートした。感染の4日後、実験用バッチ中のHA含量は両方とも256HA単位であった。細胞/細胞残渣を除去するための低速遠心分離の後、上清中のウイルスを、ホルムアルデヒド (24

時間の間隔の35%強度ホルムアルデヒド溶液の0.025%の2回の添加、攪拌しながら20でのインキュベーション)で不活化した。各実験セクションにおいて、添加したアジュバントは水酸化アルミニウムであった(2%強度Al(OH)<sub>3</sub>溶液の10%最終濃度)。これらの実験用ワクチンを用いて、各ケースにおいて、実験セクション当たり3匹のモルモット(400~500g)に0.2mlでの足底内ワクチン接種を与え、そしてその後に同じワクチンで4週間ワクチン再接種を与えた。ワクチンの効力を調査するために、血液サンプルを接種後の2、4および6週間採取し、そして赤血球凝集阻害試験および血清中和試験において試験した(表Vを参照のこと)。

### 表V

細胞培養における37℃および33℃でのウイルスの複製の後のインフルエンザB/Beijing由来の実験用ワクチンの効率：血清学的パラメーター赤血球凝集阻害および中和抗体を調査した(3匹のモルモットの平均値)

	血液凝集化阻害 力価			中和抗体 力価		
	2 w pvacc*	4 w pvacc*	6 w pvacc	2 w pvacc	4 w pvacc	6 w pvacc
37°C	85	341	1024	851	1290	6760
33°C	85	341	853	3890	22400	117490

\*W pvacc=接種後の週(6 W pvacc=ワクチン再接種後の2週)

10

20

---

フロントページの続き

合議体

審判長 鵜飼 健

審判官 鈴木 恵理子

審判官 引地 進

(56)参考文献 特開昭55-135723(JP,A)

Rev.Farm.Biochim.Univ.S.Paulo,vol.29, no.2,  
p.89-95, jul./dez., (1993)

Biologicals vol.19 p.287-292 (1991)

Bulletin of the World Health Organization,  
56(6), p.991-993 (1978)

Acta.path.microbiol.scand. Sect B 89, p.179  
-183 (1981)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N7/02

C12N5/00

BIOSIS

MEDLINE

WPIDS