

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016年1月21日(21.01.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/010081 A1

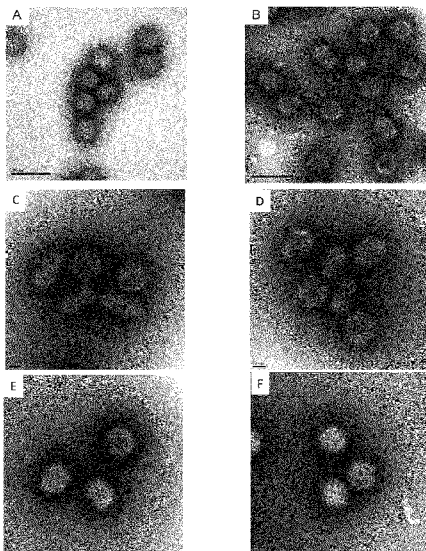
- (51) 国際特許分類:
A61K 39/12 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01)
A61K 39/29 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/070297
- (22) 国際出願日: 2015年7月15日(15.07.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2014-147845 2014年7月18日(18.07.2014) JP
- (71) 出願人: 一般財団法人化学及血清療法研究所
(THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH
INSTITUTE) [JP/JP]; 〒8608568 熊本県熊本市北区
大窪一丁目6番1号 Kumamoto (JP).
- (72) 発明者: 来海 和彦(KIMACHI Kazuhiko); 〒
8691298 熊本県菊池市旭志川辺1314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 Kumamoto (JP). 阿部 元治(ABE Motoharu); 〒
8691298 熊本県菊池市旭志川辺1314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 Kumamoto (JP). 池田 千将(IKEDA Kazuyuki);
〒8691298 熊本県菊池市旭志川辺1314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 Kumamoto (JP). 小沼 浩人(ONUMA
Hiroto); 〒8691298 熊本県菊池市旭志川辺131
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 Kumamoto (JP). 鶴留 ゆかり
(TSURUDOME Yukari); 〒8691298 熊本県菊池市旭
志川辺1314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 Kumamoto (JP). 池野
大介(IKENO Daisuke); 〒8691298 熊本県菊池市旭
志川辺1314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 Kumamoto (JP). 西山
清人(NISHIYAMA Kiyoto); 〒8608568 熊本県熊本
市北区大窪一丁目6番1号 一般財団法人化学
及血清療法研究所内 Kumamoto (JP). 恩智 達文
(ONCHI Tatsufumi); 〒8691298 熊本県菊池市旭志
川辺1314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 Kumamoto (JP). 大山
裕介(OOYAMA Yusuke); 〒8608568 熊本県熊本市
北区大窪一丁目6番1号 一般財団法人化学及
血清療法研究所内 Kumamoto (JP). 浅野 郁星
(ASANO Issay); 〒8608568 熊本県熊本市北区大窪
一丁目6番1号 一般財団法人化学及血清療法

[続葉有]

(54) Title: VACCINE CONTAINING VIRUS-LIKE PARTICLES

(54) 発明の名称: ウイルス様粒子を含むワクチン



A: 0.02%のホルマリンで4℃、6週間反応させた様体(B/WC株)
B: 0.05%のホルマリンで25℃、1週間反応後、エーテル処理した様体(B/WC株)
C: 0.08%のホルマリンで25℃、1週間反応後、エーテル処理した様体(A/C株)
D: 0.08%のホルマリンで25℃、1週間反応後、エーテル処理した様体(A/NY株)
E: 0.08%のホルマリンで25℃、1週間反応後、エーテル処理した様体(B/BR株)
F: 0.08%のホルマリンで25℃、1週間反応後、エーテル処理した様体(B/MA株)

A Sample (B/WC strain) reacted over six weeks at 4°C in 0.02% formalin
B Sample (B/WC strain) reacted over one week at 25°C in 0.05% formalin, then ether-treated
C Sample (A/C strain) reacted over one week at 25°C in 0.08% formalin, then ether-treated
D Sample (A/NY strain) reacted over one week at 25°C in 0.08% formalin, then ether-treated
E Sample (B/BR strain) reacted over one week at 25°C in 0.08% formalin, then ether-treated
F Sample (B/MA strain) reacted over one week at 25°C in 0.08% formalin, then ether-treated

(57) Abstract: The present invention provides a vaccine containing vir-
us-like particles derived from virus particles having an envelope, wherein
the lipid-component content of the virus-like particles is reduced relative to
the lipid-component content of the virus particles.

(57) 要約: 本発明は、エンベロープを有するウイルス粒子に由
来するウイルス様粒子を含有するワクチンであって、上記ウ
イルス様粒子の脂質成分の含有量が、上記ウイルス粒子の脂
質成分の含有量に対して低減している、ワクチンを提供す
る。



研究所内 Kumamoto (JP). 北野 涼一 (KITANO Ryoichi); 〒8608568 熊本県熊本市北区大窪一丁目6番1号 一般財団法人化学及血清療法研究所内 Kumamoto (JP).

(74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外 (HASEGAWA Yoshiki et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目1番1号丸の内 M Y P L A Z A (明治安田生命ビル) 9階 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG,

PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロアジア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称： ウイルス様粒子を含むワクチン

技術分野

[0001] 本発明は、ウイルス様粒子を含むワクチンに関する。本発明は、全粒子ウイルスに対して脂質成分の含有量が低減しているウイルス様粒子を含むワクチンに関する。

背景技術

[0002] インフルエンザウイルス及び日本脳炎ウイルス等のウイルスによる感染症は、ウイルスの種類、感染した対象によって、重症化する場合がある。このようなウイルスによる感染症に対する防御の方法として、ワクチンの接種等が知られている。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1： J. Infect. Dis. 2009 200 (6) 841－848

非特許文献2： Vaccine 2009 27 (5) 786－791

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] インフルエンザウイルス及び日本脳炎ウイルス等のウイルスに対するワクチンは不活化ワクチンと生ワクチンとの二種類が製造、市販されている。このうち、不活化ワクチンは、精製したウイルス粒子をホルマリン等の不活化剤で処理して調製する全粒子ワクチンと、精製したウイルス粒子を有機溶媒又は界面活性剤で破壊して調製するスプリットワクチンとに大別される。全粒子ワクチンは免疫原性が高く、感染予防の効果の面では優れている。しかし、全粒子ワクチンは局所反応及び発熱等の副反応が強く出る傾向がある。一方スプリットワクチンは、この副反応の問題を解決するため、ウイルスを有機溶媒又は界面活性剤で破壊（スプリット化）したものを含むワクチンで

ある。スプリットワクチンは、局所反応が低減され、発熱反応もほとんどないため安全性に優れている。しかし、基礎免疫が成立していない小児又は免疫反応が衰えた高齢者において、スプリットワクチンの免疫原性は低い傾向がある。したがって、スプリットワクチンより優れた有効性（免疫原性）、さらに好ましくは全粒子ワクチンに匹敵する有効性が示され、かつ安全性の高いワクチンの開発が望まれている。

[0005] 本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであり、免疫原性が高く、かつ副反応が抑えられたワクチンの提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究した結果、驚くべきことにウイルスの粒子構造を破壊（スプリット化）せずに、ウイルスエンベロープの脂質成分のみを低減し、それ以外は本来のウイルスと同等の成分及び構造を有するウイルス様粒子が、免疫原性試験及び発熱試験の成績において優れることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0007] すなわち、本発明は以下の〔１〕～〔１５〕を提供する。

〔１〕エンベロープを有するウイルス粒子に由来するウイルス様粒子を含有するワクチンであって、

上記ウイルス様粒子の脂質成分の含有量が、上記ウイルス粒子の脂質成分の含有量に対して低減している、ワクチン。

〔２〕上記ウイルス様粒子の脂質成分の含有量が、上記ウイルス粒子の脂質成分の含有量を基準として、５０質量％未満である、〔１〕に記載のワクチン。

〔３〕上記ウイルス様粒子の脂質成分の含有量が、上記ウイルス粒子の脂質成分の含有量を基準として、２０質量％未満である、〔１〕又は〔２〕に記載のワクチン。

〔４〕上記脂質成分がコレステロールである、〔１〕～〔３〕のいずれかに記載のワクチン。

〔５〕上記ウイルス様粒子が、

- 上記ウイルス粒子の表面抗原、
上記ウイルス粒子のマトリックス蛋白質又は膜蛋白質、及び、
上記ウイルス粒子の核蛋白質、
を含む、〔１〕～〔４〕のいずれかに記載のワクチン。
- 〔６〕上記ウイルス様粒子が、上記ウイルス粒子に由来するゲノム核酸を含む、〔１〕～〔５〕のいずれかに記載のワクチン。
- 〔７〕上記ウイルス粒子が、オルソミクソウイルス粒子、フラビウイルス粒子、又はＢ型肝炎ウイルス粒子である、〔１〕～〔６〕のいずれかに記載のワクチン。
- 〔８〕上記ウイルス粒子が、インフルエンザウイルス粒子、日本脳炎ウイルス粒子、又はＢ型肝炎ウイルス表面抗原（HBs）粒子である、〔７〕に記載のワクチン。
- 〔９〕上記ウイルス粒子が、インフルエンザウイルス粒子である、〔８〕に記載のワクチン。
- 〔１０〕上記インフルエンザウイルス粒子が、Ａ型インフルエンザウイルス粒子、又はＢ型インフルエンザウイルス粒子である、〔９〕に記載のワクチン。
- 〔１１〕上記インフルエンザウイルス粒子が、Ｈ１Ｎ１亜型株、Ｈ２Ｎ２亜型株、Ｈ３Ｎ２亜型株、Ｈ３Ｎ８亜型株、Ｈ５Ｎ１亜型株、Ｈ５Ｎ２亜型株、Ｈ５Ｎ６亜型株、Ｈ６Ｎ１亜型株、Ｈ７Ｎ３亜型株、Ｈ７Ｎ７亜型株、Ｈ７Ｎ９亜型株、Ｈ９Ｎ２亜型株、又はＨ１０Ｎ８亜型株に分類されるインフルエンザウイルス粒子である、〔９〕又は〔１０〕に記載のワクチン。
- 〔１２〕上記表面抗原が、ヘマグルチニン（HA）又はノイラミニダーゼ（NA）を含む、〔８〕～〔１１〕のいずれかに記載のワクチン。
- 〔１３〕上記マトリックス蛋白質又は膜蛋白質が、Ｍ１蛋白質又はＭ２蛋白質を含む、〔８〕～〔１２〕のいずれかに記載のワクチン。
- 〔１４〕上記ウイルス様粒子が、上記ウイルス粒子の粒子径の７０～１３０％の平均粒子径を有する、〔１〕～〔１３〕のいずれかに記載のワクチン。

[15] 上記ウイルス様粒子が、ショ糖密度勾配遠心で測定した場合に、ショ糖濃度35%以上にピークが検出されるウイルス様粒子である、[1]～[14]のいずれかに記載のワクチン。

[0008] さらに本発明は以下の[16]～[50]を提供する。

[16] ウイルス様粒子を含有するワクチンの製造方法であって、
エンベロープを有するウイルス粒子に対して粒子構造を固定化する工程と、

固定化された上記ウイルス粒子に対して脱脂処理を行う工程と、
を含む、製造方法。

[17] 上記固定化する工程が、上記ウイルス粒子を含む懸濁液Aに固定化剤を加える工程を含む、[16]に記載の製造方法。

[18] 上記固定化剤がアルデヒド類を含む、[17]に記載の製造方法。

[19] 上記固定化剤が1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドクロライド(EDC)を含む、[17]に記載の製造方法。

[20] 上記アルデヒド類が、ホルムアルデヒド、パラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、及びそれらの組合せからなる群から選択される、[18]に記載の製造方法。

[21] 上記アルデヒド類が、ホルムアルデヒドを含む、[20]に記載の製造方法。

[22] 上記ホルムアルデヒドの濃度が、上記懸濁液A及び上記固定化剤の全量を基準として、0.007～0.076w/v%である、[21]に記載の製造方法。

[23] 上記アルデヒド類が、グルタルアルデヒドを含む、[20]に記載の製造方法。

[24] 上記グルタルアルデヒドの濃度が、上記懸濁液A及び上記固定化剤の全量を基準として、0.002～0.05w/v%である、[23]に記載の製造方法。

〔25〕上記脱脂処理を行う工程が、固定化された上記ウイルス粒子を含む懸濁液Bに脱脂剤を加える工程を含む、〔16〕～〔24〕のいずれかに記載の製造方法。

〔26〕上記脱脂剤が、ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、酢酸メチル、酢酸エチル、及びそれらの組合せからなる群から選択される、〔25〕に記載の製造方法。

〔27〕上記脱脂剤が、ジエチルエーテルを含む、〔26〕に記載の製造方法。

〔28〕上記ジエチルエーテルの濃度が、上記懸濁液B及び上記脱脂剤の全量を基準として、10vol%以上である、〔27〕に記載の製造方法。

〔29〕上記脱脂剤が界面活性剤を更に含む、〔25〕～〔28〕のいずれかに記載の製造方法。

〔30〕上記ウイルス粒子が、培養細胞又は鶏卵に感染させて、回収されたウイルス粒子である、〔16〕～〔29〕のいずれかに記載の製造方法。

〔31〕上記培養細胞が、Vero細胞、又はMDCK細胞である、〔30〕に記載の製造方法。

〔32〕ウイルスによる感染症を予防する方法であって、
エンベロープを有するウイルス粒子に由来するウイルス様粒子を含有するワクチンを対象に投与する工程を含み、

上記ウイルス様粒子の脂質成分の含有量が、上記ウイルス粒子の脂質成分の含有量に対して低減している、方法。

〔33〕上記対象が哺乳動物である、〔32〕に記載の方法。

〔34〕上記対象がヒトである、〔32〕に記載の方法。

〔35〕上記ウイルス様粒子の脂質成分の含有量が、上記ウイルス粒子の脂質成分の含有量を基準として、50質量%未満である、〔32〕～〔34〕のいずれかに記載の方法。

〔36〕上記ウイルス様粒子の脂質成分の含有量が、上記ウイルス粒子の脂質成分の含有量を基準として、20質量%未満である、〔32〕～〔35〕

のいずれかに記載の方法。

[37] 上記脂質成分がコレステロールである、[32]～[36]のいずれかに記載の方法。

[38] 上記ウイルス様粒子が、

上記ウイルス粒子の表面抗原、

上記ウイルス粒子のマトリックス蛋白質又は膜蛋白質、及び、

上記ウイルス粒子の核蛋白質、

を含む、[32]～[37]のいずれかに記載の方法。

[39] 上記ウイルス様粒子が、上記ウイルス粒子に由来するゲノム核酸を含む、[32]～[38]のいずれかに記載の方法。

[40] 上記ウイルス粒子が、オルソミクソウイルス粒子、フラビウイルス粒子、又はB型肝炎ウイルス粒子である、[32]～[39]のいずれかに記載の方法。

[41] 上記ウイルス粒子が、インフルエンザウイルス粒子、日本脳炎ウイルス粒子、又はB型肝炎ウイルス表面抗原(HBs)粒子である、[40]に記載の方法。

[42] 上記ウイルス粒子が、インフルエンザウイルス粒子である、[41]に記載の方法。

[43] 上記インフルエンザウイルス粒子が、A型インフルエンザウイルス粒子、又はB型インフルエンザウイルス粒子である、[42]に記載の方法。

[44] 上記インフルエンザウイルス粒子が、H1N1亜型株、H2N2亜型株、H3N2亜型株、H3N8亜型株、H5N1亜型株、H5N2亜型株、H5N6亜型株、H6N1亜型株、H7N3亜型株、H7N7亜型株、H7N9亜型株、H9N2亜型株、又はH10N8亜型株に分類されるインフルエンザウイルス粒子である、[42]又は[43]に記載の方法。

[45] 上記表面抗原が、ヘマグルチニン(HA)又はノイラミニダーゼ(NA)を含む、[41]～[44]のいずれかに記載の方法。

〔４６〕上記マトリックス蛋白質又は膜蛋白質が、Ｍ１蛋白質又はＭ２蛋白質を含む、〔４１〕～〔４５〕のいずれかに記載の方法。

〔４７〕上記ウイルス様粒子が、上記ウイルス粒子の粒子径の７０～１３０％の平均粒子径を有する、〔３２〕～〔４６〕のいずれかに記載の方法。

〔４８〕上記ウイルス様粒子が、ショ糖密度勾配遠心で測定した場合に、ショ糖濃度３５％以上にピークが検出されるウイルス様粒子である、〔３２〕～〔４７〕のいずれかに記載の方法。

〔４９〕ウイルスに対するワクチンの製造における、エンベロープを有するウイルス粒子に由来するウイルス様粒子の使用であって、

上記ウイルス様粒子の脂質成分の含有量が、上記ウイルス粒子の脂質成分の含有量に対して低減している、使用。

〔５０〕ウイルスによる感染症を予防するための、エンベロープを有するウイルス粒子に由来するウイルス様粒子であって、

上記ウイルス様粒子の脂質成分の含有量が、上記ウイルス粒子の脂質成分の含有量に対して低減している、ウイルス様粒子。

発明の効果

〔０００９〕 本発明によれば、免疫原性が高く、かつ副反応が抑えられたワクチンの提供が可能になる。

図面の簡単な説明

〔００１０〕 〔図１〕インフルエンザウイルス粒子及びこれに由来するウイルス様粒子を電子顕微鏡で撮影した写真である（ホルマリン処理）。

〔図２〕インフルエンザウイルス粒子由来のウイルス様粒子における、マトリックス蛋白質（Ｍ１）と核蛋白質（ＮＰ）の有無を示すＳｌｏｔ－ｂｌｏｔ法の結果を示す写真である。

〔図３〕インフルエンザウイルス粒子由来のウイルス様粒子における、ヘマグルチニン（ＨＡ）、マトリックス蛋白質（Ｍ１）と核蛋白質（ＮＰ）の有無を示すＷｅｓｔｅｒｎ－ｂｌｏｔ法の結果を示す写真である。

〔図４〕インフルエンザウイルス粒子由来のウイルス様粒子におけるゲノムＲＮ

Aの有無を確認したアガロースゲル電気泳動の写真である。

[図5]インフルエンザウイルス粒子及びこれに由来するウイルス様粒子を電子顕微鏡で撮影した写真である（グルタルアルデヒド処理）。

[図6]インフルエンザウイルス粒子及びこれに由来するウイルス様粒子を電子顕微鏡で撮影した写真である（EDC処理）。

[図7]日本脳炎ウイルス粒子及びこれに由来するウイルス様粒子を電子顕微鏡で撮影した写真である（グルタルアルデヒド処理）。

[図8]組換え沈降B型肝炎ウイルス様粒子及びこれに由来するウイルス様粒子を電子顕微鏡で撮影した写真である（ホルマリン処理）。

発明を実施するための形態

[0011] 以下、本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。ただし、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。

[0012] （ウイルス様粒子を含有するワクチン）

本実施形態に係るワクチンは、エンベロープを有するウイルス粒子（以下、「エンベロープウイルス粒子」という場合がある。）に由来するウイルス様粒子を含有するワクチンであって、上記ウイルス様粒子の脂質成分の含有量が、上記ウイルス粒子の脂質成分の含有量に対して低減している。上記ワクチンの免疫原性は、スプリットワクチンの免疫原性以上であり、全粒子ワクチンの免疫原性と同等以上であってもよい。上記ワクチンは、局所反応及び発熱等の副反応がスプリットワクチンと同等以上に抑えられる。

[0013] 「エンベロープを有するウイルス粒子に由来するウイルス様粒子」（以下、単に「ウイルス様粒子」という場合がある。）とは、エンベロープを有するウイルス粒子を改変することで得られ、上記ウイルス粒子に類似の外部構造及び内部構造を有する構造体を意味する。本実施形態に係るウイルス様粒子は、その由来となっている元のウイルス粒子と同等の粒子性を維持するよう粒子構造が固定化されていてもよい。

[0014] エンベロープウイルス粒子に含まれる脂質成分としては、例えば、コレステロール、フォスファチジルコリン、フォスファチジルエタノールアミン、

フォスファチジルセリン、スフィンゴミエリン等が挙げられる。上記脂質成分はコレステロールであってもよい。

[0015] 上記脂質成分の含有量は、公知の方法によって測定が可能である。例えば、コレステロールオキシダーゼ・D A O S法、蛍光色素法、質量分析法等が挙げられる。

[0016] 例えば蛍光色素法で測定した場合、上記ウイルス様粒子の脂質成分の含有量は、上記ウイルス粒子の脂質成分の含有量を基準として、80質量%以下であってもよく、75質量%以下であってもよく、70質量%以下であってもよく、60質量%以下であってもよく、50質量%以下であってもよく、50質量%未満であってもよく、40質量%以下であってもよく、30質量%以下であってもよく、20質量%以下であってもよく、20質量%未満であってもよい。上記ウイルス様粒子の脂質成分の含有量が上記ウイルス粒子の脂質成分の含有量を基準として、上述した範囲内であると、ワクチンとしてウイルス様粒子を接種した場合、発熱反応等の副反応が更に抑制しやすい傾向がある。上記ウイルス様粒子の脂質成分の含有量の下限は特に制限はないが、例えば、上記ウイルス粒子の脂質成分の含有量を基準として、1質量%以上であってもよく、5質量%以上であってもよく、10質量%以上であってもよく、15質量%以上であってもよい。

[0017] エンベロープを有するウイルス粒子としては、例えば、ポックスウイルス粒子、ヘルペスウイルス粒子、オルソミクソウイルス粒子、パラミクソウイルス粒子、ラブドウイルス粒子、コロナウイルス粒子、アレナウイルス粒子、トガウイルス粒子、フラビウイルス粒子、ブニヤウイルス粒子、レトロウイルス粒子、ヘパドナウイルス粒子及びB型肝炎ウイルス粒子が挙げられる。上記ウイルス粒子は、粒子構造を固定化させる上で、表面抗原と、マトリックス蛋白質又は膜蛋白質と、を有するウイルス粒子であってもよい。このようなウイルス粒子としては、例えば、オルソミクソウイルス粒子、パラミクソウイルス粒子、ラブドウイルス粒子及びフラビウイルス粒子が挙げられる。上記オルソミクソウイルス粒子は、インフルエンザウイルス粒子であっ

てもよい。上記フラビウイルス粒子は、日本脳炎ウイルス粒子であってもよい。上記B型肝炎ウイルス粒子は、B型肝炎ウイルス表面抗原（HBs）粒子であってもよい。

[0018] インフルエンザウイルス粒子としては、例えば、A型インフルエンザウイルス粒子及びB型インフルエンザウイルス粒子が挙げられる。A型インフルエンザウイルス粒子の場合には、例えば、H1N1亜型株、H2N2亜型株、H3N2亜型株、H3N8亜型株、H5N1亜型株、H5N2亜型株、H5N6亜型株、H6N1亜型株、H7N3亜型株、H7N7亜型株、H7N9亜型株、H9N2亜型株、又はH10N8亜型株に分類されるインフルエンザ粒子が挙げられる。

[0019] ウイルス様粒子は、ウイルス粒子の表面抗原、ウイルス粒子のマトリックス蛋白質又は膜蛋白質、及び、ウイルス粒子の核蛋白質、を含んでいてもよい。このような構成を取ることによって、免疫原性が更に向上する傾向がある。

[0020] ウイルス粒子がインフルエンザウイルス粒子である場合、上記表面抗原としては、例えば、ヘマグルチニン（HA）、ノイラミニダーゼ（NA）が挙げられる。

[0021] ウイルス粒子がインフルエンザウイルス粒子である場合、上記マトリックス蛋白質としては、例えば、M1蛋白質が挙げられる。上記膜蛋白質としては、例えば、M2蛋白質が挙げられる。

[0022] ウイルス様粒子は、ウイルス粒子に由来するゲノム核酸を含んでいてもよい。上記ウイルス様粒子の上記ゲノム核酸の含有量は、上記ウイルス粒子（又は不活化全粒子ウイルス）の上記ゲノム核酸の含有量を基準として、50質量%以上であってもよく、80質量%以上であってもよく、85質量%以上であってもよく、90質量%以上であってもよく、95質量%以上であってもよく、100質量%であってもよい。上記ウイルス様粒子の上記ゲノム核酸の含有量の上限は、特に制限はないが、上記ウイルス粒子の上記ゲノム核酸の含有量を基準として、100質量%以下であってもよく、99質量%

以下であってもよく、95質量%以下であってもよい。

[0023] 上記ゲノム核酸の含有量は、公知の方法によって測定が可能である。例えば、蛍光法、吸光度法、PCR法等が挙げられる。

[0024] 従来、ウイルス粒子を構成する表面抗原、マトリックス蛋白質、又は膜蛋白質をコードする遺伝子を宿主内（例えば、酵母細胞、昆虫細胞等）へ導入して、それらの蛋白質を宿主内で発現させた後にウイルス粒子を形成させる、ウイルス様粒子（VLP）の作製方法が知られている。このような遺伝子組換え技術で得られたVLPには、ウイルス由来のゲノム核酸及び核蛋白質は含まれていない。一方、本実施形態に係るウイルス様粒子は、後述するように、ウイルス粒子自体を宿主へ感染、増殖させた後、得られたウイルス粒子に対して後述する固定化处理及び脱脂処理を施して作製する。そのため、本実施形態に係るウイルス様粒子は、遺伝子組換え技術で作製したVLPとは異なり、ウイルス粒子由来のゲノム核酸及び核蛋白質を含むことが可能である。

[0025] ウイルス粒子由来のゲノム核酸はアジュバントとして作用し得る。例えば、不活化ポリオウイルスワクチンにはウイルスゲノムRNAを含むD抗原と、ウイルスゲノムRNAを含まないC抗原がある。C抗原は免疫原性が弱くワクチン抗原としての効果を示さない。ワクチン抗原として効果を有する分子種はD抗原のみである。このことはワクチンに内包されたウイルスゲノムRNAがその効果の発現に重要であることを示唆している。そのため、本実施形態に係るウイルス様粒子は、ワクチンの免疫原性を更に向上させる観点からウイルス粒子由来のゲノム核酸を含有してもよい。核蛋白質は、ウイルスに対する細胞障害性T細胞等の細胞性免疫を誘導し、ウイルス排除に効果を示すことから、本実施形態に係るウイルス様粒子は核蛋白質を含んでもよい。

[0026] 本実施形態に係るウイルス様粒子は、Th1型応答を誘導し得る。スプリットインフルエンザワクチンがTh2型応答を誘導することとは対照的である。マウスにおいてTh1型応答によって誘導されるIgG2aサブクラス

の抗体は、T h 2 型応答によって誘導される I g G 1 サブクラスの抗体よりもインフルエンザウイルスに対する感染防御能が優れている。このことから、上記ウイルス様粒子による有効性のさらなる向上が期待できる。すなわち、上記ウイルス様粒子は、マウスにおいて抗原特異的 I g G 1 よりも抗原特異的 I g G 2 a を誘導してもよい。

[0027] ウイルス様粒子は、ショ糖密度勾配遠心、高速液体クロマトグラフィー、及び／又は動的光散乱法によって測定した場合、由来となる元のウイルス粒子と実質的に同一のパラメーター（例えば、分子量、平均粒子径、密度、ヘマグルチニン（H A）含量等）であってもよい。

[0028] 例えば、ウイルス様粒子が、由来となっている元のウイルス粒子の粒子径の 70～130%の平均粒子径を有するウイルス様粒子であってもよく、80～120%の平均粒子径を有するウイルス様粒子であってもよい。

[0029] ウイルス様粒子が、インフルエンザウイルス粒子に由来する場合、ウイルス様粒子の平均粒子径は、動的光散乱法で測定した場合に 120 nm 前後であってもよく、110 nm～130 nm であってもよく、120 nm～130 nm であってもよい。他の側面において、ウイルス様粒子が、インフルエンザウイルス粒子に由来する場合、ウイルス様粒子の平均粒子径は、動的光散乱法で測定した場合に 95 nm 以上であってもよく、100 nm 以上であってもよく、110 nm 以上であってもよく、120 nm 以上であってもよく、130 nm 以上であってもよい。上記平均粒子径は、145 nm 以下であってもよく、140 nm 以下であってもよく、130 nm 以下であってもよい。ウイルス様粒子が、日本脳炎ウイルス粒子に由来する場合、ウイルス様粒子の平均粒子径は、動的光散乱法で測定した場合に 95 nm 前後であってもよく、80 nm～120 nm であってもよい。ウイルス様粒子が、B 型肝炎ウイルス表面抗原（H B s）粒子に由来する場合、ウイルス様粒子の平均粒子径は、動的光散乱法で測定した場合に 100 nm 前後であってもよく、90 nm～160 nm であってもよい。

[0030] ウイルス様粒子は、ショ糖密度勾配遠心で測定した場合に、ショ糖濃度 3

５％以上にピークが検出されるウイルス様粒子であってもよく、シヨ糖濃度４５％以上５５％以下にピークが検出されるウイルス様粒子であってもよく、シヨ糖濃度４９％以上５２％以下にピークが検出されるウイルス様粒子であってもよい。上記シヨ糖濃度は、公知の方法によって求めることが可能である。例えば、ウイルス様粒子を含む検体を１５～６０％のシヨ糖密度勾配に重層し、４℃、１８０００rpmで１６時間、遠心分離を行うことで上記シヨ糖濃度を求めることができる。

[0031] ワクチンに含まれるウイルス様粒子の量は、ウイルスの種類又は投与対象に応じて適宜選択してもよい。例えば、ワクチンに含まれるウイルス様粒子の量（濃度）は、ヘマグルチニン濃度として、ウイルス株あたり１～４０μg／mlであってもよい。

[0032] ワクチンは、同じ種類のウイルス又は細菌に由来する抗原を含む、単味ワクチンであってもよい。ワクチンは、複数の種類のウイルス又は細菌に由来する抗原を含む、混合ワクチンであってもよい。ワクチンは、同じ属のウイルス又は細菌であって、複数の種類の型に由来する抗原を含む、多価ワクチンであってもよい。例えば、ワクチンがインフルエンザウイルスワクチンである場合、Ａ型インフルエンザウイルス様粒子又はＢ型インフルエンザウイルス様粒子のいずれかを含んでいてもよく、それらを両者とも含んでいてもよい。上記インフルエンザウイルスワクチン又は日本脳炎ウイルスワクチンは、他のウイルス又は細菌に由来する抗原を含んでいてもよい。例えば、ジフテリア・百日せき・破傷風・不活化ポリオウイルス混合ワクチン（ＤＰＴ－ＩＰＶワクチン）に混合されていてもよい。

[0033] ワクチンの剤形は、例えば、液状、粉末状（凍結乾燥粉末、乾燥粉末）、カプセル状、錠剤、凍結状態であってもよい。

[0034] ワクチンは、医薬として許容されうる担体を含んでいてもよい。上記担体としては、ワクチン製造に通常用いられる担体を制限なく使用することができる。具体的には、上記担体は、食塩水、緩衝食塩水、デキストロース、水、グリセロール、等張水性緩衝液及びそれらの組み合わせが挙げられる。ワ

クチンは、乳化剤、保存剤（例えば、チメロサル）、等張化剤、pH調整剤、不活化剤（例えば、ホルマリン）等が、更に適宜配合されてもよい。

[0035] ワクチンの投与経路は、例えば、経皮投与、舌下投与、点眼投与、皮内投与、筋肉内投与、経口投与、経腸投与、経鼻投与、静脈内投与、皮下投与、腹腔内投与、口から肺への吸入投与であってもよい。

[0036] ワクチンの投与方法は、例えば、シリンジ、経皮的パッチ、マイクロニードル、移植可能な徐放性デバイス、マイクロニードルを付けたシリンジ、無針装置、又はスプレーによって投与する方法であってもよい。

[0037] ワクチンの免疫原性をさらに高めるために、ワクチンがウイルス様粒子と共にアジュバントを含むことも可能である。アジュバントとしては、例えば、アルミニウムアジュバント又はスクアレンを含む水中油型乳濁アジュバント（AS03、MF59等）、CpG及び3-O-脱アシル化-4'-モノホスホリル Lipid A（MPL）等のToll様受容体のリガンド、サポニン系アジュバント、ポリγ-グルタミン酸等のポリマー系アジュバント、キトサン及びイヌリン等の多糖類が挙げられる。

[0038] 対象となる哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、サル、ヒト等が挙げられる。本実施形態に係るワクチンは、ヒトに対して用いられてもよく、5歳未満の小児、65歳以上の高齢者に対して用いられてもよい。

[0039] ワクチンは、投与の目的、投与方法、投与対象の状況（性別、年齢、体重、病状等）によって異なるが、ヒトに対して投与される場合、1回当たり、3.8 μg HA～30 μg HAの有効成分（ウイルス様粒子）が、投与されるように用いられてもよい。

[0040] （ワクチンの製造方法）

本実施形態に係るウイルス様粒子を含有するワクチンの製造方法は、エンベロープを有するウイルス粒子に対して粒子構造を固定化する工程と、固定化された上記ウイルス粒子に対して脱脂処理を行う工程を含む。

[0041] ワクチンの安全性を高める技術として、従来から、界面活性剤又は有機溶媒を使ってエンベロープを有するウイルス粒子を破壊（スプリット化）する方法が知られている。しかしながら、これらの方法では粒子の崩壊に伴いワクチンの有効性（免疫原性）が低下する傾向がある。上記製造法では、脱脂処理を行う前に、ウイルス粒子を固定化しているため、脱脂処理によってもウイルス粒子構造が維持され、結果的に、ワクチンの有効性を維持しつつ、安全性を高めることが可能になる。

[0042] 上記製造方法には、宿主を培養する工程、ウイルスを宿主へ感染させる工程、宿主内でウイルスを増殖させる工程、又は宿主からウイルス粒子を回収する工程を更に含んでいてもよい。

[0043] ウイルス粒子は、宿主にウイルス粒子を感染、増殖させた後に、宿主から回収されたウイルス粒子であってもよい。宿主はウイルス粒子の種類に応じて適宜選択してもよい。ウイルス粒子がインフルエンザウイルス粒子である場合には、宿主としては例えば、培養細胞、鶏卵が挙げられる。培養細胞としては、例えば、V e r o細胞及びMDCK細胞が挙げられる。

[0044] インフルエンザウイルスの感染、増殖方法としては、鶏卵又はV e r o細胞を宿主として用いる方法（V a c c i n e , 1 9 9 8 M a y - J u n ; 1 6 (9 - 1 0) : 9 6 0 - 8 . ）, V e r o細胞を宿主として用いる方法（V a c c i n e , 2 0 0 7 A u g u s t 1 0 ; 2 5 (3 2) : 6 0 2 8 - 6 0 3 6 . ）, MDCK細胞を宿主として用いる方法（J V i r o l . 2 0 1 2 N o v ; 8 6 (2 2) : 1 2 3 4 1 - 5 0 ）が、当業者にとって公知の方法である。

[0045] エンベロープを有するウイルス粒子に対して粒子構造を固定化する工程

本実施形態において「固定化」とは、表面抗原同士、表面抗原とマトリックス蛋白質（若しくは膜蛋白質）、又はマトリックス蛋白質同士（若しくは膜蛋白質同士）を化学的に結合させ、ウイルス粒子の粒子構造を保持することを意味する。ウイルス様粒子は、ウイルス本来の粒子構造を保持することによって、ウイルス様粒子の免疫原性がスプリットワクチンの免疫原性以上

であり、作製条件によっては不活化全粒子ウイルスの免疫原性と同等以上となると本発明者らは考えている。粒子構造の保持は、電子顕微鏡解析、ショ糖密度勾配遠心、又は動的光散乱法、HA、NP若しくはM1に対する抗体を用いた検出法（Slot blot、Western blot等）によって、確認することが可能である。

[0046] 上記固定化する工程は、ウイルス粒子を固定化剤で処理する方法が例示され、例えば、ウイルス粒子を含む懸濁液Aに固定化剤を加える工程が挙げられる。固定化剤の種類は、ウイルスの種類に応じて適宜変更できる。例えば、上記固定化剤は、有機溶媒、アルデヒド類、ジイミドエステル、ビス（3，5－ジブロモサリチル）フマレート（DBBF）、1－エチル－3－[3－ジメチルアミノプロピル]カルボジイミドクロライド（EDC）、及びそれらの組合せが挙げられる。有機溶媒としては、例えば、メタノール、エタノール、アセトン、及びそれらの組合せが挙げられる。アルデヒド類としては、例えば、ホルムアルデヒド（例えば、ホルマリン）、パラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、及びそれらの組合せが挙げられる。

[0047] 固定化剤の濃度は、ウイルスの種類、固定化剤の種類に応じて適宜変更してもよい。固定化剤が、ホルムアルデヒドを含む場合、ホルムアルデヒドの濃度は、懸濁液A及び固定化剤の全量を基準として、0.007～0.076 w/v%であってもよい。上記ホルムアルデヒドの濃度が0.007 w/v%未満である場合、固定化が弱くなり、粒子構造が保持されにくい傾向がある。上記ホルムアルデヒドの濃度が0.076 w/v%を超える場合、固定化が強く、架橋による化学修飾が進み過ぎる傾向がある。HA活性を更に向上させる観点から、ホルムアルデヒドの濃度は、懸濁液A及び固定化剤の全量を基準として、0.0175～0.076 w/v%であってもよく、0.028～0.076 w/v%であってもよい。ホルムアルデヒドを含む固定化剤を用いる方法は、ウイルス粒子がインフルエンザ粒子である場合に用いてもよい。

[0048] 固定化剤がホルマリン（35～38%ホルムアルデヒド水溶液）である場合

、ホルマリン濃度は、懸濁液A及び固定化剤の全量を基準として、0.02～0.2v/v%であってもよく、0.05～0.2v/v%であってもよく、0.08～0.2v/v%であってもよい。

[0049] 固定化剤が、グルタルアルデヒドを含む場合、グルタルアルデヒドの濃度が、懸濁液A及び固定化剤の全量を基準として、0.002～0.05w/v%であってもよく、0.005～0.01w/v%であってもよい。上記濃度が0.002w/v%未満である場合、ウイルス粒子として日本脳炎ウイルス粒子を用いたとき粒子が凝集する傾向がある。上記濃度が0.05w/v%を超える場合、ウイルス粒子として日本脳炎ウイルス粒子を用いたとき、主要構造タンパク質であるEタンパク質のエピトープが失活する傾向がある。固定化剤としてグルタルアルデヒドを用いる方法は、ウイルス粒子がインフルエンザ粒子、日本脳炎ウイルス粒子である場合に用いてもよい。

[0050] 固定化剤が、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドハイドロクロライド(EDC)を含む場合、EDCの濃度が、懸濁液Aの全量を基準として、0.005～0.5Mであってもよく、0.005～0.05Mであってもよい。EDCを含む固定化剤を用いる方法は、ウイルス粒子がインフルエンザ粒子である場合に用いてもよい。

[0051] 固定化剤で処理するときの温度は、ウイルスの種類、固定化剤の種類、固定化剤の濃度等に応じて適宜変更してもよい。上記温度は4℃から37℃であってもよく、25℃～37℃であってもよい。

[0052] 固定化剤で処理するときの期間(処理時間)は、ウイルスの種類、固定化剤の種類、固定剤の濃度、固定化処理の温度等に応じて適宜変更してもよい。上記期間は、1日から6週間であってもよく、1週間から4週間であってもよい。固定化剤としてEDCを用いる場合、上記期間は、0.5時間～4時間であってもよく、1.5時間～2.5時間であってもよい。

[0053] 固定化されたウイルス粒子に対して脱脂処理を行う工程

脱脂処理を行う工程は、固定化されたウイルス粒子を脱脂剤で処理する方法が例示され、例えば、固定化されたウイルス粒子を含む懸濁液Bに脱脂剤

を加える工程が挙げられる。脱脂剤の種類は、ウイルスの種類に応じて適宜変更してもよい。例えば、上記脱脂剤はジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、酢酸メチル、酢酸エチル、及びそれらの組合せが挙げられる。脱脂剤で処理する際の濃度は、ウイルスの種類又は脱脂剤の種類に応じて適宜変更してもよい。脱脂剤の濃度は、懸濁液B及び脱脂剤の全量を基準として、10vol%以上400vol%以下であってもよい。上記脱脂剤の濃度が10vol%未満である場合、脱脂が不完全となる傾向がある。上記脱脂剤の濃度が400vol%を超える場合、ウイルス粒子の構造が保持されなくなる傾向がある。脱脂剤がジエチルエーテルを含む場合、ジエチルエーテルの濃度は、懸濁液B及び脱脂剤の全量を基準として、10vol%以上であってもよく、12.5vol%~50vol%であってもよく、33vol%~50vol%であってもよい。

[0054] 脱脂剤は界面活性剤を含んでいてもよい。ウイルス様粒子同士の凝集が抑えられ、収率が向上する傾向がある。界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、ポリソルベート80、及びそれらの組合せが挙げられる。脱脂剤に含まれる界面活性剤の濃度は、0.002vol%~0.3vol%であってもよく、0.005vol%~0.1vol%であってもよい。

[0055] 脱脂剤で処理するときの温度は、ウイルスの種類、脱脂剤の種類、脱脂剤の濃度等に応じて適宜変更してもよい。上記温度は、4℃から常温（25℃）であってもよい。

[0056] 脱脂剤で処理するときの期間（処理時間）は、ウイルスの種類、脱脂剤の種類、脱脂剤の濃度、脱脂処理の温度等に応じて適宜変更してもよい。上記期間は1時間から2時間であってもよい。

[0057] 上記製造方法において、脱脂処理後に脱脂剤を除去する工程を更に含んでいてもよい。脱脂剤がジエチルエーテルである場合には、例えば、懸濁液B及び脱脂剤との混合液を、4℃、3000rpmにて、5分間遠心した後、水相を回収する方法が挙げられる。

[0058] 必要に応じて、回収したウイルス様粒子を精製する工程を更に含んでもよい。ウイルス様粒子を精製する方法としては、公知の方法によって適宜行うことが可能であるが、例えば、限外ろ過膜を用いてろ過する方法が挙げられる。

[0059] ワクチン接種では、実際の感染時と同様の免疫の質と量を対象に賦与できることが好ましく、実際の感染によって起こる免疫に対するワクチンによって誘導される免疫の模倣性がその効果を決定する。ワクチン中には感染防御のための抗原としてのウイルス蛋白質が全て含まれていてもよい。ウイルス蛋白質の免疫原性を高めるためのウイルス由来のゲノム核酸の存在、ウイルス粒子の大きさ、形等が、それぞれで免疫応答に働いていることを踏まえれば、最良のワクチンとは実際のウイルスにより近い成分及び構造を有するものであると本発明者らは考えている。本実施形態に係るウイルス様粒子は、ウイルスエンベロープの脂質成分のみを低減し、それ以外は本来のウイルス粒子と同等の成分及び構造を有するため、免疫原性が高く、かつ副反応が抑えられたワクチンの提供が可能になる。

実施例

[0060] 以下、実施例によって本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。

[0061] [実施例 1]

インフルエンザウイルス様粒子の調製

1. ホルマリン処理（ウイルス粒子に対して粒子構造を固定化する工程）

B型インフルエンザウイルス（B/Wisconsin/1/2011株、以下、「B/WC株」と記載することがある。）を11日齢の発育鶏卵の漿尿膜腔内に接種し、34℃で2日間培養した。得られた漿尿液を清澄化した後、遠心分離によってインフルエンザウイルス粒子を沈殿させた。上記インフルエンザウイルス粒子をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で再浮遊させ、ショ糖密度勾配遠心で、ショ糖濃度が33%～50%である画分を回収することによって精製した。精製したインフルエンザウイルス粒子の蛋白質の

濃度が終濃度 $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるように、得られた画分を希釈し、懸濁液 A を得た。その後、最終濃度が $0.02 \sim 0.2 \text{ vol} \%$ (ホルムアルデヒド換算で、 $0.007 \sim 0.076 \text{ w}/\text{v} \%$) となるようにホルマリン ($35 \sim 38 \text{ w}/\text{v} \%$ ホルムアルデヒド水溶液、固定化剤) を懸濁液 A に添加し、 4°C で 4 週間若しくは 6 週間、又は、 25°C で 1 週間反応させた。反応終了後、PBS で反応液を透析し、ホルマリンを除くことで、固定化されたインフルエンザウイルス粒子を含む懸濁液 B を得た。

[0062] 2. エーテル処理 (固定化されたウイルス粒子に対して脱脂処理を行う工程)

ホルマリン処理を行った上記インフルエンザウイルス粒子を含む懸濁液 B に、最終濃度が $0.1 \text{ vol} \%$ になるようにポリソルベート 80 を添加した。その後最終濃度が $50 \text{ vol} \%$ となるように、上記懸濁液 B と等容のジエチルエーテル (脱脂剤) を添加し、 4°C で 2 時間攪拌した。その後、得られた混合液を 4°C 、 3000 rpm で 5 分間遠心分離を行って、水相を回収することによってエーテル相を除いた。以上の工程によって、検体であるインフルエンザウイルス様粒子を調製した。

予備実験として、得られたインフルエンザウイルス様粒子の脂質成分の含有量をコレステロールオキシダーゼ・3, 5-ジメトキシ-N-エチル-N-(2-ハイドロキシ-3-スルホプロピル)-アニリンナトリウム (DAOS) 法で測定した。その結果、得られたインフルエンザウイルス様粒子の脂質成分の含有量は、インフルエンザウイルス粒子の脂質成分の含有量に対して多くても $80 \text{ 質量} \%$ 以下であることが示唆された。以下、蛍光色素法によって、インフルエンザウイルス様粒子の脂質成分の含有量を詳細に検討した。

インフルエンザウイルスのエンベロープは、コレステロールを多く含むことが報告されていることから、コレステロールを脂質成分の代表として定量した。

[0063] 3. 脂質成分の含有量

A型インフルエンザウイルスにおいても、H1N1亜型株（A／California／07／2009（X-179A）株、以下、「A／CA株」と記載することがある。）及びH3N2亜型株（A／New York／39／2012（X-233A）株、以下、「A／NY株」と記載することがある。）について、上記に準じた方法でウイルス様粒子を作製した。他のB型インフルエンザウイルスについてもB／Brisbane／60／2008株（以下、「B／BR株」と記載することがある。）及びB／Massachusetts／2／2012（BX-51B）株（以下、「B／MA株」と記載することがある。）について、上記に準じた方法でウイルス様粒子を作製した。代表として、0.08%のホルマリン濃度で25℃、1週間反応後、エーテル処理したインフルエンザウイルス様粒子の脂質成分の含有量を、Amplex Red Cholesterol Assay Kit（Invitrogen社製、商品名）を用いて測定した。まず、インフルエンザウイルス様粒子を含む検体を超遠心分離（24000rpm、2hrs、4℃）にかけて上清とペレット成分とに分離した。得られたペレット成分をPBSで再懸濁した。再懸濁したペレット成分に蛍光物質レゾルフィンを加えて反応させた。反応後の蛍光物質レゾルフィンの蛍光強度を測定することによって、インフルエンザウイルス様粒子の脂質成分の含有量を定量した。その結果、インフルエンザウイルス様粒子の脂質成分の含有量は、インフルエンザウイルス全粒子（以下、「全粒子抗原」と記載することがある。）の脂質成分の含有量に対して、多くても40質量%以下であることが示唆された（表1）。

[0064]

[表1]

全粒子抗原に対するウイルス様粒子のコレステロール含有量の割合（％）

由来となったウイルス 粒子の株名	ウイルス様粒子の コレステロール含有量 の割合（％）
A／C A株 （H 1 N 1 亜型株）	3 9
A／N Y株 （H 3 N 2 亜型株）	3 9
B／M A株 （B 型株）	2 9
B／B R株 （B 型株）	2 7

[0065] 4. 脂質成分の含有量（エーテル容量比検討）

H 1 N 1 亜型株（A／C A株）由来のウイルス様粒子を代表として、エーテル容量比を変化させることによる脱脂処理に対する影響について検討した。まず、蛋白質濃度が終濃度 $2500 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるように、PBSでウイルス様粒子を希釈し、0.08%のホルマリン濃度で 25°C 、1週間反応させた。反応終了後、PBSで反応液を透析し、ホルマリンを除くことで、固定化されたインフルエンザウイルス粒子を含む懸濁液Bを得た。その後、エーテルの容量を変えたこと以外は、上記「2. エーテル処理」と同様の方法によって、エーテル処理（脱脂処理）を行い、インフルエンザウイルス様粒子を得た。得られたインフルエンザウイルス様粒子を使用し、脂質成分の含有量をAmplex Red Cholesterol Assay Kit（Invitrogen社製、商品名）を用いて測定した。インフルエンザウイルス様粒子を含む検体を超遠心分離（ 24000rpm 、 2hrs 、 4°C ）にかけて上清とペレット成分とに分離した。得られたペレット成分をPBSで再懸濁した。再懸濁したペレット成分に蛍光物質レゾルフィンを加えて反応させた。反応後の蛍光物質レゾルフィンの蛍光強度を測定することによって、インフルエンザウイルス様粒子の脂質成分の含有量を定量した。比較対照は、ホルマリン濃度0.02%で 4°C 、6週間反応させた不活化全粒子ウイルス（以下、「全粒子抗原」と記載することがある。）を用いた

。その結果、エーテル：懸濁液B（v o l比）を1：1としてエーテル処理を行った場合、インフルエンザウイルス様粒子の脂質成分の含有量は、インフルエンザウイルス全粒子の脂質成分の含有量に対して、約70質量%であった。エーテル：懸濁液B（v o l比）を1：2又は1：6としてエーテル処理を行った場合、インフルエンザウイルス様粒子の脂質成分の含有量は、インフルエンザウイルス全粒子の脂質成分の含有量に対して、約30質量%であった。一方、エーテル：懸濁液B（v o l比）を1：12としてエーテル処理を行った場合、インフルエンザウイルス様粒子の脂質成分の含有量は、全粒子抗原と同様に脂質成分はほとんど除去されず、約100%残存していることが示唆された（表2）。上記結果から、脱脂の効果は、エーテルの量だけではなく、ポリソルベート80の濃度にも依存していると本発明者らは考えている。すなわち、「エーテル：懸濁液B」が、1：1から1：6に変化するにつれて、相対的にポリソルベート80の濃度が高くなるため、脱脂が進むと本発明者らは考えている。しかし、「エーテル：懸濁液B」が1：12になると、相対的にポリソルベート80の濃度が高かったとしても、エーテルの濃度が低すぎるものが影響し、脱脂の効果が減少すると本発明者らは考えている。

[0066] [表2]

A／C A株（H1N1亜型株）：

全粒子抗原に対するウイルス様粒子のコレステロール含有量の割合（％）

ウイルス様粒子	エーテル：懸濁液B (v o l比)	コレステロール含有量の 割合（％）
	1：1	73
	1：2	26
	1：6	27
	1：12	103
全粒子抗原		100

[0067] インフルエンザウイルス粒子に由来するスプリット抗原

比較対照とするスプリットインフルエンザウイルス（以下、「スプリット抗原」と記載することがある。）は、インフルエンザHAワクチン（化学及

血清療法研究所製、商品名「インフルエンザHAワクチン“化血研”」)を使用した。

[0068] [実施例2]

物性評価

上記実施例1で得られたウイルス様粒子(検体)の物性を以下の方法で評価した。なお、以下の実験において、特にことわりがない限り、比較対照として用いた全粒子抗原はホルマリン濃度0.02%で4℃、6週間反応させたものである。

1. ショ糖密度勾配遠心法による分析

実施例1によって調製したウイルス様粒子をショ糖密度勾配遠心法によって分析した。検体を15~60%のショ糖密度勾配に重層し、4℃、18000rpmで16時間、遠心分離を行った。遠心後、1フラクションあたり0.6mLずつ分画し、各フラクションのショ糖濃度、HA価及び蛋白質濃度を測定した。H1N1亜型株の結果を表3に示す。スプリット抗原では、蛋白質がショ糖濃度25~50%に幅広く分布し、ウイルス粒子が分解していることが示された。これに対し、ウイルス様粒子では高いショ糖濃度(49~51.4%)に単一ピークとして分画されていることから、不活化全粒子と同様の形状(粒子性)を有することが示された。HA活性についてはホルマリン処理時のホルマリン濃度が0.02%以上で2560倍であった。B型株(B/WC株)の結果を表4に示す。スプリット抗原では、蛋白質が同様にショ糖濃度25~50%に幅広く分布し、ウイルス粒子が分解していることが示された。これに対し、ウイルス様粒子では高いショ糖濃度(50.6~52.2%)に単一ピークとして分画されていることから、不活化全粒子と同様の形状(粒子性)を有することが示された。HA活性についてはホルマリン処理時のホルマリン濃度が高い程、HA価が高く、0.05%で2560倍、0.08%以上では5120倍であった。

[0069]

[表3]

A/C A株（H1N1亜型株）：エーテル処理後の検体（ウイルス様粒子）、及びスプリット抗原におけるシヨ糖密度勾配遠心分析及びHA活性

ホルマリン処理条件（ホルマリン濃度、反応温度及び反応時間）	0.02% 4℃ 6週間	0.02% 25℃ 1週間	0.05% 25℃ 1週間	0.08% 25℃ 1週間	0.2% 25℃ 1週間	スプリット 抗原
シヨ糖濃度（%）	51.3 単一 ピーク	51.3 単一 ピーク	49 単一 ピーク	51.4 単一 ピーク	50.2 単一 ピーク	25～50 幅広く分布
蛋白質含量（μg/mL）	66.6	62.0	70.8	70.2	80.2	－
HA活性（x）	2560	2560	5120	2560	2560	－

[0070] [表4]

B/WC株（B型株）：エーテル処理後の検体（ウイルス様粒子）、及びスプリット抗原におけるシヨ糖密度勾配遠心分析及びHA活性

ホルマリン処理条件（ホルマリン濃度、反応温度及び反応時間）	0.02% 4℃ 4週間	0.02% 25℃ 1週間	0.05% 25℃ 1週間	0.08% 25℃ 1週間	0.2% 25℃ 1週間	スプリット 抗原
シヨ糖濃度（%）	50.7 単一 ピーク	52 単一 ピーク	52.2 単一 ピーク	50.6 単一 ピーク	52 単一 ピーク	25～50 幅広く分布
蛋白質含量（μg/mL）	83.8	100.0	110.2	99.2	101.6	－
HA活性（x）	1280	1280	2560	5120	5120	－

[0071] 2. 電子顕微鏡による解析

ウイルス様粒子（B型株であるB/WC株由来）の形状をさらに詳細に調べるために、電子顕微鏡による観察を実施した。約500 μg/mLの上記検体を、グルタルアルデヒドを用いて室温で20分間固定した。その後、観察用のイオンコートしたシートメッシュ（日新EM社製）に、固定した検体を載せて約60秒間静置し、2%リンタングステン酸水溶液でネガティブ染色した。染色した検体を、透過型電子顕微鏡（FEIカンパニー社製テクナ

イ G 2 : 加速電圧 1 2 0 k V) を用いて観察、撮影した。

[0072] 代表として、0.05%のホルマリン濃度で25℃、1週間反応後、エーテル処理したウイルス様粒子の観察結果を示す(図1の(B))。比較対照として、0.02%のホルマリン濃度で4℃、6週間反応させた全粒子抗原の観察結果を示す(図1の(A))。さらに、H1N1亜型株(A/C A株)及びH3N2亜型株(A/N Y株)について上記に準じた方法でウイルス様粒子を作製した。他のB型インフルエンザウイルスであるB/B R株及びB/M A株について上記に準じた方法でウイルス様粒子を作製した。代表として0.08%のホルマリン濃度で25℃、1週間反応後、エーテル処理したウイルス様粒子の観察結果を示す(図1の(C)~(F))。ウイルス様粒子は全粒子抗原と同様に粒子構造が保たれていた。エンベロープがエーテル処理によって脱脂された観察像では、ウイルス様粒子同士が結合しあった凝集体は認められなかった。

[0073] 3. 動的光散乱

ウイルス様粒子(B型株であるB/WC株由来)の平均粒子径をParticle Sizing System: NICOMP 380 ZLS-Sを用いて解析した。動的光散乱法による液体中の平均粒子径を表5に示す。スプリット抗原は二峰性であり、110nm付近と400nm付近とにピークが認められた。一方、それ以外の全ての検体は平均粒子径が120nm前後で単峰性であった。このことから、エーテル処理後の平均粒径は、ウイルス粒子と同等の粒子サイズであることがわかった。すなわち、エーテル処理によって脱脂されてもウイルス様粒子の平均粒子径は単一で変わらないことがわかった。動的光散乱実験から、ウイルス様粒子の粒子構造は保たれており、凝集体のような不純物は認められなかった。

[0074]

[表5]

B/WC株（B型株）：動的光散乱法による液体中の平均粒子径

ホルマリン処理条件 （ホルマリン濃度、反 応温度及び反応時間）	0.02% 4℃ 6週間	0.02% 4℃ 4週間	0.02% 25℃ 1週間	0.05% 25℃ 1週間	0.08% 25℃ 1週間	0.2% 25℃ 1週間	スプリット抗原
エーテル処理	－	＋	＋	＋	＋	＋	
体積荷重平均粒子径（ 主ピーク）（nm）	129.3 単峰性	120.5 単峰性	120.5 単峰性	125.5 単峰性	123.3 単峰性	124.4 単峰性	111.1（主） 401.2（副） 二峰性

[0075] 4. 高速液体クロマトグラフィー（サイズ排除クロマトグラフィー（SEC））

代表として、H1N1亜型株（A/C株）に由来するウイルス様粒子、全粒子抗原及びスプリット抗原の分子量分布を測定した。上記測定は、TSK gel G6000PWL（TOSOH）を用いて行った。溶離液にPBSを用いた。溶出パターンを表6に示す。スプリット抗原は溶出時間19～29分付近に三峰性のピークが認められた。一方、ウイルス様粒子及び全粒子抗原は溶出時間17分付近に単峰性のピークが認められた。このことから、エーテル処理を行っているウイルス様粒子の分子量分布は、エーテル処理を行っていないウイルス粒子（全粒子抗原）と同等の分子量分布であることが分かった。この結果から、エーテル処理によって脱脂されても分子量分布は単一で変わらないことが示唆された。

[0076] [表6]

A/C株（H1N1亜型株）：SECの溶出パターン

	ウイルス様粒子	全粒子抗原 （ホルマリン固定）	スプリット抗原
溶出時間 （分）	16～17 単峰性	16～17 単峰性	19、26、30 三峰性

[0077] 5. ウイルス蛋白質の分析

ウイルス様粒子（B型株であるB/WC株由来）の構成蛋白質について調べるために、Slot-blot法によって抗体染色を行った。スプリット抗原、ホルマリン処理のみ行った検体、又はホルマリン処理後にエーテル処

理した検体について、それぞれの検体に対してSDS処理及び加熱処理を行っていない群（A群）、並びに、SDS処理及び加熱処理を行った群（B群）を用意した。検体の種類を表7に示す。

[0078] [表7]

B/WC株（B型株）：検体の種類

検体No. (レーンNo.)	1	2	3	4	5	6	7
ホルマリン処理条件 (ホルマリン濃度、反応温度及び反応時間)	スプリット 抗原	0.02% 4℃ 6週間	0.02% 4℃ 4週間	0.02% 25℃ 1週間	0.05% 25℃ 1週間	0.08% 25℃ 1週間	0.2% 25℃ 1週間
エーテル処理	+	—	+	+	+	+	+

[0079] (Slot-blot法)

上記の群のそれぞれの検体をPVD F膜（ポリフッ化ビニリデン膜）へアプライし、乾燥させた。染色、脱色後、PVD F膜をブロッキングし、一次抗体（マウスモノクローナル抗体：抗NP抗体又は抗M1抗体）、二次抗体（抗マウスIgG-HRPコンジュゲート）と反応させ、LAS-3000（富士フイルム株式会社製、商品名）で撮影した。図2にM1、NPのSlot-blotの結果を示す。SDS処理及び加熱処理を共に行っていない群（A群）では、粒子構造が壊れているスプリット抗原（第1レーン）、及びホルマリン固定が弱い検体（0.02%ホルマリン濃度反応後、エーテル処理した検体：第3、第4レーン）において、NP及びM1が検出された。これに対し、全粒子抗原（第2レーン）、及び0.02%より高いホルマリン濃度の検体（第5、第6、第7レーン）において、NP及びM1はほとんど検出されなかった。一方、SDS処理及び加熱処理を共に行った群（B群）では、ウイルス様粒子が破壊され、いずれの検体でもM1及びNPが検出された。このことから、M1及びNPはウイルス様粒子の内部に存在することが示された。

[0080] (Western blot法)

H1N1亜型株（A/C A株）について上記に準じた方法でウイルス様粒子を作製した。異なるホルマリン濃度（0.02%～0.14%）でウイル

ス粒子を固定化後、エーテル処理を行いウイルス様粒子を得た。得られたウイルス様粒子は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）を行った後、PVDF膜へ転写した。上記PVDF膜を、一次抗体（マウスモノクローナル抗体：抗HA抗体、抗NP抗体又は抗M1抗体）、及び二次抗体（抗マウスIgG-HRPコンジュゲート）と反応させ、LAS-3000（富士フイルム株式会社製、商品名）で撮影した。このとき、発色基質としてRPN2209 ECL Western Blotting Detection Reagents（GE Healthcare社製、商品名）を用いた。HA（図3のA）、M1（図3のB）、NP（図3のC）のWestern blotの結果を示す。ホルマリン未処理に対し、ホルマリン処理された各ウイルス構成タンパク質は高分子化し、高分子側に泳動されていることが示された。すなわちホルマリン未処理に対し、ホルマリン処理された各ウイルス構成タンパク質は、0.05%以上の濃度で250kDa以上の高分子重合体を生じ、ゲルトップに詰まっていることが示された。0.05%未満の弱い架橋ではエーテル処理時に粒子を保つことが出来ず、図2に示すようにNP及びM1が検出されている。

[0081] 6. ウイルス粒子に由来するゲノム核酸の分析（定性分析）

ウイルス様粒子（B型株であるB/WC株由来）におけるウイルス粒子に由来するゲノム核酸（「ウイルス由来ゲノム核酸」という場合がある。）について検討した。ホルマリン処理のみを行った検体、又はホルマリン処理後にエーテル処理した検体について、それぞれの検体に対して超遠心した群又は超遠心していない群を用意した。上記の群の上清からQIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN社製、商品名）を用いて、RNAを抽出した。抽出後、One Step RNA PCR Kit（AMV）（タカラバイオ株式会社製、商品名）、PCR System（GeneAmpR9700）を用いて、RT-PCRを行い、HAをコードするDNA領域を増幅した。アガロースゲル電気泳動を行い、DNA産物のバンドパターンを確認した。

[0082] 図4にRT-PCR後のDNA産物のバンドパターンの結果を示す。表8に図4の結果をまとめた。超遠心していない場合には、全ての条件でRT-PCRによってウイルス由来のRNAが検出された。一方、超遠心した場合には、スプリット抗原及びホルマリンによる固定化が最も弱い検体（0.02%のホルマリン濃度で4℃、4週間反応後、エーテル処理した検体）では、超遠心後の上清からもRNAが検出された。その条件以外の検体では、RNAが検出されなかった。このことから0.02%以上のホルマリン濃度で25℃、1週間ホルマリン処理し、エーテル処理された抗原では、RNAは粒子内に包含されていることが示された。

[0083] [表8]

B/WC株（B型株）：RT-PCRによる、ウイルス由来のゲノム核酸の分析結果

検体No. (レーンNo.)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
ホルマリン処理条件（ホルマリン濃度、反応温度及び反応時間）	0.02% 4℃ 6週間		0.02% 4℃ 4週間		0.02% 25℃ 1週間		0.05% 25℃ 1週間		0.08% 25℃ 1週間		0.2% 25℃ 1週間		ス プ リ ッ ト 抗 原	
エーテル処理	なし		あり		あり		あり		あり		あり			
超遠心	－	＋	－	＋	－	＋	－	＋	－	＋	－	＋	－	＋
RNA断片	＋	－	＋	＋	＋	－	＋	－	＋	－	＋	－	＋	＋

[0084] 7. ウイルス粒子に由来するゲノム核酸の分析（定量分析）

ウイルス様粒子における、ウイルス粒子に由来するゲノム核酸（「ウイルス由来ゲノム核酸」という場合がある。）の定量について検討した。ウイルス様粒子、全粒子抗原、スプリット抗原をPBSで希釈し、SDSとProteinase Kを加えて55℃、24時間で反応させた。その後、TRIzol LS ReagentとPureLink RNA Mini Kit、PureLink DNase（invitrogen社製、商品名）とを用いてRNAを抽出した。抽出したRNAの含有量は、Quant-iT RiboGreen RNA Reagent and Kit（invitrogen社製、商品名）で測定した。

[0085] 表9に全粒子抗原に対するウイルス様粒子とスプリット抗原のRNA含有量の割合を示す。ウイルス様粒子は全粒子抗原に対して、RNAが約90%

残存したが、スプリット抗原は10～40%であった。この結果から、ウイルス様粒子にはRNAがほぼ残存していることが示唆された。

[0086] [表9]

全粒子抗原に対するウイルス様粒子とスプリット抗原のRNA含有量の割合(%)

由来となったウイルス 粒子の株名	ウイルス様粒子	スプリット抗原
A/C A株 (H1N1亜型株)	90	30
A/N Y株 (H3N2亜型株)	94	12
B/M A株 (B型株)	87	22
B/B R株 (B型株)	93	38

[0087] 8. 免疫原性1

A型インフルエンザウイルスにおいて、H3N2亜型株(A/Texas/50/2012(X-223)株、以下、「A/TX株」と記載することがある。)についても実施例1に準じた方法でウイルス様粒子を作製した。ウイルス様粒子における免疫原性を、マウスを用いて評価した。ddYマウス(雌性、8週齢)に、スプリット抗原、全粒子抗原、又はウイルス様粒子を、蛋白質量として0.8μgの接種量で筋肉内接種した(一群当たり16匹)。免疫3週後にマウスを安楽死させ、全採血した。遠心分離によって血清を得て、HI抗体価を測定した。代表として0.08%のホルマリンで25℃、1週間反応後、エーテル処理した検体の免疫原性(HI抗体価(GMT))の結果を表10に示す。H1N1亜型株、H3N2亜型株の場合、ウイルス様粒子はスプリット抗原と比較して有意に高い免疫原性(H1N1亜型株:P<0.05、H3N3亜型株:P<0.01)であり、全粒子抗原と同等の免疫原性であった。B型株(B/M A株)の場合、ウイルス様粒子はスプリット抗原と比較して高い免疫原性であり、全粒子抗原と同等の免疫原性であった。

[0088]

[表10]

免疫原性（H I 抗体価（G M T））の結果

由来となったウイルス粒子の株名	スプリット抗原	全粒子抗原	ウイルス様粒子
A / C A 株 （H 1 N 1 亜型株）	1 2	4 4	3 5
A / T X 株 （H 3 N 2 亜型株）	7 3	9 9	1 5 3
B / M A 株 （B 型株）	3 1	4 6	4 0

[0089] 9. 免疫原性 2

H 1 N 1 亜型株（A / New C a l e d o n i a / 2 0 / 9 9、以下、「A / N C 株」と記載することがある。）、H 3 N 2 亜型株（A / W y o m i n g / 3 / 2 0 0 3、以下、「A / W Y 株」と記載することがある。）及び B 株（B / S h a n g h a i / 3 6 1 / 2 0 0 2、以下、「B / S G 株」と記載することがある。）について実施例 1 に準じた方法でウイルス様粒子を作製した。得られたインフルエンザウイルス様粒子における免疫原性を、マウスを用いて評価した。d d Y マウス（雌性、8 週齢）を用いて、スプリット抗原、又はウイルス様粒子を 1 群当たり 8 匹に 1 μ g H A の接種量で、3 週間の間隔で 2 回皮下接種した。1 次免疫を行って 3 週後に部分採血、2 次免疫を行って 2 週後に全採血した。遠心分離によって血清を得て、H I 抗体価を測定した。代表として 0. 2 % のホルマリンで 5 $^{\circ}$ C、3 日間反応後、エーテル処理した検体の免疫原性（H I 抗体価（G M T））の結果を表 1 1（1 次免疫後）、表 1 2（2 次免疫後）に示す。1 次免疫後の A / N C 株、A / W Y 株の場合、ウイルス様粒子はスプリット抗原と比較して有意に免疫原性が高かった。

[0090]

[表11]

免疫原性（H I 抗体価（G M T）（1 次免疫後））の結果

由来となったウイルス 粒子の株名	スプリット抗原	ウイルス様粒子
A / N C 株 （H 1 N 1 亜型株）	3 4	1 2 3 * ¹
A / W Y 株 （H 3 N 2 亜型株）	3 1	2 0 7 * ²
B / S G 株 （B 型株）	5 2	9 5

* ¹ : P < 0 . 0 5 、 * ² : P < 0 . 0 1

[0091] [表12]

免疫原性（H I 抗体価（G M T）（2 次免疫後））の結果

由来となったウイルス 粒子の株名	スプリット抗原	ウイルス様粒子
A / N C 株 （H 1 N 1 亜型株）	1 7 4	2 9 3
A / W Y 株 （H 3 N 2 亜型株）	2 0 7	3 4 9
B / S G 株 （B 型株）	1 3 1	2 3 8

[0092] 1 0 . 免疫原性 3

スプリット抗原、全粒子抗原、及びウイルス様粒子の免疫原性を、カニクイザル（雌性、21～29箇月齢）を用いて評価した。スプリット抗原、全粒子抗原、又はウイルス様粒子を1群当たり5匹に7.5 μ g HA相当（スプリット抗原のHA量に相当するタンパク質量）の接種量で、28日間の間隔で2回皮下接種した。2次免疫前、及び2次免疫後28日後に部分採血した。遠心分離によって血清を得て、H I 抗体価及び中和抗体価を測定した。代表として0.08%のホルマリンで25℃、7日間反応後、エーテル処理した検体（ウイルス様粒子）の免疫原性の結果を、表13（2次免疫後のH I 抗体価（G M T））、表14（2次免疫後の中和抗体価（G M T））に示す。H I 抗体価では、ウイルス様粒子はスプリット抗原と比較して高い免疫原性を有することが分かった。特に、H 1 N 1 亜型株では有意に免疫原性が高かった。中和抗体価においても、ウイルス様粒子はスプリット抗原と比較

して高い免疫原性を有することが分かった。特に、H 1 N 1 亜型株及びB型株では有意に免疫原性が高かった。

[0093] [表13]

2 次免疫後の H I 抗体価 (G M T)

由来となったウイルス粒子の株名	スプリット抗原	全粒子抗原	ウイルス様粒子
A / C A 株 (H 1 N 1 亜型株)	1 0	4 6 * ¹	3 5 * ¹
A / T X 株 (H 3 N 2 亜型株)	9	5 3 * ²	2 3
B / M A 株 (B 型株)	5	1 7 * ¹	7

* ¹ : P < 0 . 0 5 、 * ² : P < 0 . 0 1

[0094] [表14]

2 次免疫後の中和抗体価 (G M T)

由来となったウイルス粒子の株名	スプリット抗原	全粒子抗原	ウイルス様粒子
A / C A 株 (H 1 N 1 亜型株)	6 1	5 5 7	6 4 0 * ¹
A / T X 株 (H 3 N 2 亜型株)	5 3	3 6 8 * ¹	1 8 4
B / M A 株 (B 型株)	1 5	2 1 1 * ²	7 0 * ¹

* ¹ : P < 0 . 0 5 、 * ² : P < 0 . 0 1

[0095] 1 1 . 抗体サブクラス解析 1

抗体サブクラス解析として、上記「8. 免疫原性 1」で得られたマウスの血清中に含まれる、ウイルス抗原に特異的な I g G 1 及び I g G 2 a 抗体価を測定した。比較対照として、0. 0 2 % のホルマリンで 2 5 ° C 、 1 週間反応後、エーテル処理した検体を同様にマウスに免疫した。得られたマウスの血清中に含まれる、ウイルス抗原特異的な I g G 1 及び I g G 2 a の抗体価を測定した。その結果、スプリット抗原とは対照的に、ウイルス様粒子（ホルマリン濃度：0. 0 8 % ）は、全粒子抗原と同様に抗原特異的 I g G 1 よりも抗原特異的 I g G 2 a を誘導することが示された。一方、同じウイルス様粒子であっても、0. 0 2 % のホルマリンで固定化を行った検体は、スプリット抗原と同様に抗原特異的 I g G 2 a よりも抗原特異的 I g G 1 を誘導することが示された（[表 1 5] ～ [表 1 7]）。T h 1 型応答によって誘

導される I g G 2 a サブクラスの抗体は、T h 2 型応答によって誘導される I g G 1 サブクラスの抗体よりもインフルエンザウイルスに対する感染防御能が優れていることから、ウイルス様粒子（ホルマリン濃度：0.08%）による有効性のさらなる向上が期待できる。

[0096] [表15]

A / C A 株（H 1 N 1 亜型株）：サブクラス解析の結果（E U / m L）

I g G サブクラス	スプリット抗原	全粒子抗原	ウイルス様粒子	
			0.08%	0.02%
I g G 1	4815	451	2951	8977
I g G 2 a	1947	52209	19894	5376

スプリットワクチンを免疫したマウス血清を、それぞれ25600倍希釈した時の値を1 E U / m L とした。

[0097] [表16]

A / T X 株（H 3 N 2 亜型株）：サブクラス解析の結果（E U / m L）

I g G サブクラス	スプリット抗原	全粒子抗原	ウイルス様粒子	
			0.08%	0.02%
I g G 1	7550	407	10209	10679
I g G 2 a	3808	12326	15961	3707

スプリットワクチンを免疫したマウス血清を、それぞれ25600倍（I g G 1）、51200倍（I g G 2 a）希釈した時の値を1 E U / m L とした。

[0098] [表17]

B / M A 株（B 型株）：サブクラス解析の結果（E U / m L）

I g G サブクラス	スプリット抗原	全粒子抗原	ウイルス様粒子	
			0.08%	0.02%
I g G 1	15838	308	3859	9734
I g G 2 a	3020	26074	52923	10464

スプリットワクチンを免疫したマウス血清を、それぞれ25600倍希釈した時の値を1 E U / m L とした。

[0099] 12. 免疫原性4

ウイルス様粒子抗原の免疫原性機序を解析するために、T o l l l i k e r e c e p t o r 7 k n o c k - o u t (T L R 7 K O) マウス (B a c k b o r n e : B A L B / c) を用いて解析を行った。使用したマウスはオリエンタルバイオサービス社から購入した。雌性、5週齢のマウスを用いて、全粒子抗原、ウイルス様粒子抗原、スプリット抗原を1群当たり5～6匹に蛋白質量2 μ g / 各株の接種量で、3週間の間隔で2回筋肉内接種した。1次免疫を行って3週後に部分採血、2次免疫を行って2週後に全採

血した。遠心分離によって血清を得て、H I 抗体価を測定した。ワクチン株は、H 1 N 1 亜型株（A / C A 株）、H 3 N 2 亜型株（A / N Y 株）、B 型株（B / B R 株及びB / M A 株）を使用した。全粒子抗原、ウイルス様粒子抗原、及びスプリット抗原の調製方法に関しては、実施例 1 に準じた。1 次免疫を行って 3 週間後の血清中の H I 抗体価の幾何平均値（G M T）を表 1 8 に示す。野生型マウス（+ / +）では、ウイルス様粒子はスプリット抗原と比較して高い H I 抗体価を示した。一方、ノックアウトマウス（- / -）では、スプリット抗原と同等まで、ウイルス様粒子に対する H I 抗体価が低下していた。この結果は、ウイルス様粒子に内包されているウイルス一本鎖 R N A がウイルス様粒子の免疫原性に大きく寄与していることを示唆している。

[0100] [表18]

免疫原性（H I 抗体価（G M T））の結果

由来となった ウイルス粒子の株名	T L R 7	スプリット抗原	全粒子抗原	ウイルス様粒子
A / C A 株 (H 1 N 1 亜型株)	+ / +	1 7 . 4	3 0 . 3	2 5 . 2
	- / -	6 . 6	7 . 6	6 . 6

[0101] 1 3 . 抗体サブクラス解析 2

抗体サブクラス解析として、上記「1 2 . 免疫原性 4」で得られたマウスの血清中に含まれる、ウイルス抗原に特異的な I g G 1 及び I g G 2 a 抗体価を測定した。その結果を [表 1 9] ~ [表 2 1] に示す。T h 2 優位な免疫応答が誘導されやすい B A L B / c 野生型マウス（+ / +）においても、スプリット抗原とは対照的に、ウイルス様粒子は、抗原特異的 I g G 1 よりも抗原特異的 I g G 2 a を誘導することが示された。それに対してノックアウトマウス（- / -）では、I g G 2 a の抗体価が顕著に低下していた。この結果は、ウイルス一本鎖 R N A が T h 1 優位な免疫誘導に必須であることを示唆している。

[0102]

[表19]

A / C A 株 (H 1 N 1 亜型株) : サブクラス解析の結果 (E U / m L)

T L R 7	I g G サブクラス	スプリット抗原	全粒子抗原	ウイルス様粒子
+ / +	I g G 1	3 1 4 2	2 6 9	1 4 9 6
	I g G 2 a	2 1 4 7	1 1 5 8 5	1 0 9 8 0
- / -	I g G 1	1 4 2 5	2 7 1	1 2 3 7
	I g G 2 a	2 0 0	2 4 0 7	1 1 2 1

スプリットワクチンを免疫したマウス血清を、それぞれ 2 5 6 0 0 倍希釈した時の値を 1 E U / m L とした。

[0103] [表20]

A / N Y 株 (H 3 N 2 亜型株) : サブクラス解析の結果 (E U / m L)

T L R 7	I g G サブクラス	スプリット抗原	全粒子抗原	ウイルス様粒子
+ / +	I g G 1	9 7 0	2 0 0	3 5 8
	I g G 2 a	9 4 4	1 0 7 1 2	5 7 5 9
- / -	I g G 1	3 5 9	2 0 0	4 4 8
	I g G 2 a	2 0 0	1 3 3 6	6 0 8

スプリットワクチンを免疫したマウス血清を、それぞれ 2 5 6 0 0 倍希釈した時の値を 1 E U / m L とした。

[0104] [表21]

B / M A 株 (B 株) : サブクラス解析の結果 (E U / m L)

T L R 7	I g G サブクラス	スプリット抗原	全粒子抗原	ウイルス様粒子
+ / +	I g G 1	3 9 0	2 0 0	4 4 4
	I g G 2 a	5 4 4	8 6 2 1	2 6 2 5
- / -	I g G 1	2 0 0	3 9 2	9 1 3
	I g G 2 a	2 0 0	2 0 3 6	4 1 7

スプリットワクチンを免疫したマウス血清を、それぞれ 2 5 6 0 0 倍希釈した時の値を 1 E U / m L とした。

[0105] 1 4 . I F N - γ 産生細胞数解析

上記「1 2 . 免疫原性 4」で得られたマウスの脾臓中に含まれる、抗原特異的な I F N - γ 産生細胞数を計測するために E L I S P O T アッセイを行

った。解析にはMouse IFN gamma ELISPOT Ready-SET-Go! (eBioscience社製、商品名)を用い、添付概要書に記載されている方法に準じて行った。その結果を[表22]～[表25]に示す。樹状細胞、Th1細胞、及びNK細胞等の細胞性免疫に関わる細胞から産生されるIFN- γ は、スプリット抗原よりも全粒子抗原又はウイルス様粒子を接種されたマウスにおいて強く誘導されることが確認された。ノックアウトマウス(-/-)では、ウイルス様粒子抗原によって誘導されたIFN- γ 産生細胞数が顕著に低下していた。このことから、ウイルス一本鎖RNAによってIFN- γ 産生細胞が誘導され、Th1優位な免疫応答が惹起されることが示唆された。

[0106] [表22]

A/C A株 (H1N1亜型株) :
抗原特異的なIFN- γ 産生細胞数 (1×10^6 脾臓細胞中)

TLR7	スプリット抗原	全粒子抗原	ウイルス様粒子
+ / +	12	142	83
- / -	4	52	5

[0107] [表23]

A/N Y株 (H3N2亜型株) :
抗原特異的なIFN- γ 産生細胞数 (1×10^6 脾臓細胞中)

TLR7	スプリット抗原	全粒子抗原	ウイルス様粒子
+ / +	10	95	58
- / -	4	40	4

[0108]

[表24]

B/M A株（B型株）：

抗原特異的なIFN- γ 産生細胞数（ 1×10^6 脾臓細胞中）

TLR7	スプリット抗原	全粒子抗原	ウイルス様粒子
+ / +	10	57	52
- / -	6	49	5

[0109] [表25]

B/B R株（B型株）：

抗原特異的なIFN- γ 産生細胞数（ 1×10^6 脾臓細胞中）

TLR7	スプリット抗原	全粒子抗原	ウイルス様粒子
+ / +	4	43	47
- / -	8	38	3

[0110] 15. メモリーB細胞数解析

上記「12. 免疫原性4」で得られたマウスの脾臓中に含まれる、抗原特異的なメモリーB細胞数を計測するためにELISPOTアッセイを行った。ELISPOTを行う前に、メモリーB細胞から抗体産生細胞に分化させるために、マイトジェン（*Phytolacca americana*由来のレクチン、*S. aureus*由来のProtein A soluble、CpG ODN、及び*Escherichia coli*由来のLPS）による刺激を行った。その結果を[表26]～[表29]に示す。脾臓細胞中のメモリーB細胞は、スプリット抗原よりも全粒子抗原又はウイルス様粒子抗原を接種されたマウスにおいて強く誘導されることが確認された。ウイルス様粒子抗原を接種されたノックアウトマウス（-/-）では、脾臓中のメモリーB細胞数が低下していた。このことから、ウイルス様粒子抗原のメモリーB細胞誘導能にウイルス一本鎖RNAが大きく関与していることが示唆された。

[0111]

[表26]

A／C A株（H 1 N 1 亜型株）：

抗原特異的なメモリーB細胞数（ 1×10^6 脾臓細胞中）

T L R 7	スプリット抗原	全粒子抗原	ウイルス様粒子
+／+	4 8	1 2 6	1 1 7
-／-	4 8	9 8	5 5

[0112] [表27]

A／N Y株（H 3 N 2 亜型株）：

抗原特異的なメモリーB細胞数（ 1×10^6 脾臓細胞中）

T L R 7	スプリット抗原	全粒子抗原	ウイルス様粒子
+／+	4 5	1 2 3	1 1 5
-／-	5 0	8 5	4 8

[0113] [表28]

B／M A株（B型株）：

抗原特異的なメモリーB細胞数（ 1×10^6 脾臓細胞中）

T L R 7	スプリット抗原	全粒子抗原	ウイルス様粒子
+／+	3 0	4 5	6 2
-／-	1 8	3 3	3 0

[0114] [表29]

B／B R株（B型株）：

抗原特異的なメモリーB細胞数（ 1×10^6 脾臓細胞中）

T L R 7	スプリット抗原	全粒子抗原	ウイルス様粒子
+／+	4 8	6 5	8 5
-／-	1 8	6 3	1 8

[0115] 16. 発熱試験1

スプリット抗原、全粒子抗原又はウイルス様粒子をPBSで希釈し、1 mL中の蛋白質含量を $240\mu\text{g}$ としたものを試料とした。ウイルス様粒子は代表として0.08%のホルマリンで25℃、1週間反応後、エーテル処理した検体を用いた。上記試料を、体重1 kg当たりにつき1 mLをウサギに接種して、発熱の上昇を観察した。ウサギ3羽の発熱反応の和(℃)を表30に示す。

[0116] エーテル処理を行わなかった全粒子抗原のみ1.3℃以上の発熱和が認められた。エーテル処理を行ったスプリット抗原、ウイルス様粒子はいずれも1.3℃以上の発熱和は認められなかった。

[0117] [表30]

ウサギ3羽の発熱反応の和(℃)

由来となったウイルス粒子の株名	スプリット抗原	全粒子抗原	ウイルス様粒子
A/C A株 (H1N1亜型株)	0.53	3.72	0.63
A/T X株 (H3N2亜型株)	0.20	1.72	0.28
B/M A株 (B型株)	0.33	3.99	0.12

[0118] 17. 発熱試験2

H1N1亜型株(A/C A株)のウイルス粒子を、蛋白質濃度が終濃度 $2500\mu\text{g/mL}$ となるように希釈し、0.08%のホルマリン濃度で25℃、1週間反応させた。反応終了後、PBSで反応液を透析し、ホルマリンを除くことで、固定化されたインフルエンザウイルス粒子を含む懸濁液Bを得た。その後、エーテル容量及びポリソルベート80濃度を0.05 vol %に変えたこと以外は、上記「2. エーテル処理」と同様の方法によって、エーテル処理を行い、コレステロールの含有量がそれぞれ異なるインフルエンザウイルス様粒子を得た。得られたインフルエンザウイルス様粒子をPBSで希釈し、1 mL中の蛋白質含量を $240\mu\text{g}$ としたものを試料とした。体重1 kg当たりにつき1 mLの上記試料を、ウサギに接種して、発熱の上昇を観察した。ウサギ3羽の発熱反応の和(℃)を表31に示す。

[0119] コレステロールの含有量が全粒子抗原に対して約70%残存したウイルス様粒子（エーテル：懸濁液B（v o l比）が1：1の検体）を含め、すべての検体において、1.3℃以上の発熱和は認められなかった。

[0120] [表31]

A／C A株（H1N1亜型株）：
ウイルス様粒子に対するウサギ3羽の発熱反応の和（℃）

エーテル：懸濁液B (v o l比)	発熱反応の和
1：1	0.27
1：2	0.08
1：6	0.71

[0121] 18. サイトカイン定量1

発熱試験の代替法として、ヒトPBMCを用いた炎症性サイトカイン測定系によって、サイトカインの量を評価した。炎症性サイトカインとして代表的な、IL-1 β 、IL-6に関して測定を行った。ヒト末梢血単核球（PBMC）をFCS MEMに懸濁し、 4×10^6 cells/mLに希釈した。100 μ Lずつ96穴プレートに添加し、スプリット抗原、全粒子抗原又はウイルス様粒子を同量添加した（終濃度50 μ g/mL）。その後、37℃で24時間CO₂雰囲気下で培養し、上清中のIL-1 β とIL-6とをELISA法で定量した。代表として0.08%のホルマリンで25℃、1週間反応後、エーテル処理した検体のサイトカイン定量（IL-1 β ）の結果を表32に示し、サイトカイン定量（IL-6）の結果を表33に示す。ウイルス様粒子を用いた場合、全粒子抗原を用いた場合よりも、炎症性サイトカインの量が少ないことがわかった。このことから、ウイルス様粒子は、全粒子抗原に比べて、副反応を抑制しやすいことが示唆された。

[0122]

[表32]

サイトカイン定量 (IL-1 β) の結果 (pg/mL)

由来となったウイルス粒子の株名	スプリット抗原	全粒子抗原	ウイルス様粒子
A/C A株 (H1N1亜型株)	3.3	44.5	6.4
A/T X株 (H3N2亜型株)	5.1	13.0	5.5
B/M A株 (B型株)	7.3	7.8	7.3

[0123] [表33]

サイトカイン定量 (IL-6) の結果 (pg/mL)

由来となったウイルス粒子の株名	スプリット抗原	全粒子抗原	ウイルス様粒子
A/C A株 (H1N1亜型株)	18.4	205.1	52.3
A/T X株 (H3N2亜型株)	29.5	118.6	36.5
B/M A株 (B型株)	35.1	165.4	58.2

[0124] [実施例3]

インフルエンザウイルス様粒子の調製

1. グルタルアルデヒド (GA) 処理 (ホルマリンのようにメチレン架橋を形成せず、ウイルス粒子に対して不可逆的な架橋反応によって固定化する工程)

A型インフルエンザウイルス (H3N2亜型株 (A/NY株)) 及びB型インフルエンザウイルス (B/BR株) を実施例1と同様に精製した。精製したインフルエンザウイルス粒子を β -プロピオラクトン (BPL) 不活化後、蛋白質濃度が終濃度 $1000 \mu\text{g/mL}$ となるように希釈し、懸濁液A1 (A/NY株) 及び懸濁液A2 (B/BR株) を得た。次に、 $1\text{w/v}\%$ GA溶液を用いて、GA濃度が $0.016\text{w/v}\%$ 又は $0.008\text{w/v}\%$ となるように希釈した。

懸濁液A1又は懸濁液A2と、希釈したGA溶液 ($0.016\text{w/v}\%$ 又は $0.008\text{w/v}\%$) とを等量混合し、 4°C で3日間反応させた。反応終了

後、PBSで反応液を透析し、GAを除くことで、固定化されたインフルエンザウイルス粒子を含む懸濁液B1（A／NY株）及び懸濁液B2（B／BR株）を得た（全粒子抗原（GA固定））。

[0125] 2. エーテル処理（固定化されたウイルス粒子に対して脱脂処理を行う工程）

GA処理を行った上記インフルエンザウイルス粒子を含む懸濁液B1及び懸濁液B2に、最終濃度が0.05 vol %になるようにポリソルベート80を添加した。その後上記懸濁液B1又は懸濁液B2に、最終濃度が33 vol %となるようにジエチルエーテル（脱脂剤）を添加し、25℃で1時間攪拌した。その後、得られた混合液を4℃、3000 rpmで5分間遠心分離を行って、水相を回収することによってエーテル相を除いた。以上の工程によって、検体であるインフルエンザウイルス様粒子を調製した。

[0126] 得られたインフルエンザウイルス様粒子の脂質成分の含有量をAmplex Red Cholesterol Assay Kit（Invitrogen社製、商品名）を用いて測定した。インフルエンザウイルス様粒子を含む検体を超遠心分離（24000 rpm、2 hrs、4℃）にかけて上清とペレット成分とに分離した。得られたペレット成分をPBSで再懸濁した。再懸濁したペレット成分に蛍光物質レゾルフィンを加えて反応させた。反応後の蛍光物質レゾルフィンの蛍光強度を測定することによって、全粒子抗原（GA固定）に対するインフルエンザウイルス様粒子の脂質成分の含有量を定量した。その結果、インフルエンザウイルス様粒子の脂質成分の含有量は、インフルエンザウイルス粒子の脂質成分の含有量に対して多くても50質量%以下であることが示唆された（表34）。

[0127]

[表34]

全粒子抗原に対するウイルス様粒子のコレステロール含有量の割合 (%)

由来となったウイルス 粒子の株名	G A 濃度 (w / v %)	ウイルス様粒子のコレス テロール含有量の割合
A / N Y 株 (H 3 N 2 亜型株)	0 . 0 0 4	2 8
	0 . 0 0 8	5 0
B / B R 株 (B 型株)	0 . 0 0 4	1 2
	0 . 0 0 8	2 3

[0128] [実施例4]

物性評価

上記実施例3で得られたウイルス様粒子（検体）の物性を以下の方法で評価した。

1. 電子顕微鏡による解析

ウイルス様粒子（A / N Y 株由来）の形状をさらに詳細に調べるために、電子顕微鏡による観察を実施した。約 $500 \mu\text{g} / \text{mL}$ の上記検体を、グルタルアルデヒドを用いて室温で20分間固定した。その後、観察用のイオンコートしたシートメッシュ（日新EM社製）に、固定した検体を載せて約60秒間静置し、2%リンタングステン酸水溶液でネガティブ染色した。染色した検体を、透過型電子顕微鏡（FEIカンパニー社製テクナイG2：加速電圧120kV）を用いて観察、撮影した。

[0129] 代表として、0.008w/v%のGA濃度で4℃、3日間反応後、エーテル処理したウイルス様粒子の観察結果を示す（図5の（B））。比較対照として、0.008w/v%のGA濃度で4℃、3日間反応させた全粒子抗原の観察結果を示す（図5の（A））。ウイルス様粒子は全粒子抗原と同様に粒子構造が保たれていた。エンベロープがエーテル処理によって壊れ、染色液が侵入した観察像では、ウイルス様粒子同士が結合しあった凝集体は認められなかった。

[0130] 2. 動的光散乱

ウイルス様粒子の平均粒子径をウイルス様粒子の平均粒子径を Z e t a s i z e r N a n o Z S (M a l v e r n 社製) を用いて解析した。動的

光散乱法による液体中の平均粒子径を表35に示す。ウイルス様粒子は平均粒子径が130nm前後で単峰性であった。このことから、エーテル処理後の平均粒径は、ウイルス粒子と同等の粒子サイズであることがわかった。すなわち、エーテル処理により脱脂されてもウイルス様粒子の平均粒子径は単一で変わらないことがわかった。動的光散乱実験から、ウイルス様粒子の粒子構造は保たれており、凝集体のような不純物は認められなかった。

[0131] [表35]

動的光散乱法による液体中の平均粒子径（体積荷重平均粒子径（主ピーク）（nm））

由来となったウイルス 粒子の株名	GA濃度 (w/v%)	ウイルス様粒子	全粒子抗原 (ホルマリン固定)
A/NY株 (H3N2亜型株)	0.004	141.7	142.6
	0.008	144.6	
B/BR株 (B型株)	0.004	132.2	136.6
	0.008	133.0	

全粒子抗原（ホルマリン固定）はホルマリン濃度0.02%で4℃、6週間反応させたものである。

[0132] 3. ウイルス粒子に由来するゲノム核酸の分析（定量分析）

ウイルス様粒子におけるウイルス粒子に由来するゲノム核酸（「ウイルス由来ゲノム核酸」という場合がある。）の定量について検討した。ウイルス様粒子、全粒子抗原をPBSで希釈し、SDSとProteinase Kを加えて55℃、18～57時間で反応させた。その後、TRIzol LS ReagentとPureLink RNA Mini Kit、PureLink DNase（invitrogen社製、商品名）を用いてRNAを抽出した。抽出したRNAの含有量は、Quant-iT Ribogreen RNA Reagent and Kit（invitrogen社製、商品名）で測定した。

[0133] 表36に全粒子抗原に対するウイルス様粒子のRNA含有量の割合を示す。ウイルス様粒子は全粒子抗原に対してRNAが約80%残存していた。GA処理の場合においても、ホルマリン処理の場合と同様にウイルス様粒子にはRNAがほぼ残存していることが示唆された。

[0134] [表36]

全粒子抗原に対するウイルス様粒子のRNA含有量の割合 (%)		
由来となったウイルス 粒子の株名	GA濃度 (w/v %)	ウイルス様粒子のRNA 含有量の割合
A / NY株 (H3N2亜型株)	0.004	83
	0.008	100
B / BR株 (B型株)	0.004	100
	0.008	100

[0135] 4. 免疫原性1

ウイルス様粒子における免疫原性を、マウスを用いて評価した。ddYマウス（雌性、8週齢）に、スプリット抗原（ホルマリン不活化）、又はウイルス様粒子を蛋白質量として0.8 μ gの接種量で筋肉内接種した（一群当たり16匹）。免疫3週後にマウスを安楽死させ、全採血した。遠心分離によって血清を得て、中和抗体価を測定した。代表として0.004 w/v %のGAで4℃、3日間反応後、エーテル処理した検体の免疫原性（中和抗体価（GMT））の結果を表37に示す。B型株の場合、ウイルス様粒子はスプリット抗原と比較して高い免疫原性であった。

[0136] [表37]

免疫原性（中和抗体価（GMT））の結果		
由来となったウイルス 粒子の株名	スプリット抗原	ウイルス様粒子
B / BR株 (B型株)	27	48

[0137] 5. 免疫原性2

B型株であるB/WC株について実施例1に準じた方法でウイルス様粒子を作製した。得られたインフルエンザウイルス様粒子における免疫原性を、マウスを用いて評価した。ddYマウス（雌性、8週齢）に、スプリット抗原（ホルマリン不活化）、ウイルス様粒子を蛋白質量として0.8 μ gの接種量で筋肉内接種した（一群当たり16匹）。免疫3週後にマウスを安楽死させ、全採血した。遠心分離によって血清を得て、HI抗体価を測定した。代表として0.010 w/v %のGAで4℃、3日間反応後、エーテル処理

したウイルス様粒子の免疫原性（H I 抗体価（G M T））の結果を表 3 8 に示す。ウイルス様粒子はスプリット抗原と比較して高い免疫原性であった。

[0138] [表38]

免疫原性（H I 抗体価（G M T））の結果

由来となったウイルス 粒子の株名	スプリット抗原	ウイルス様粒子
B / W C 株 (B 型株)	1 7	2 5

[0139] 6. 発熱試験

ウイルス様粒子を P B S で希釈し、1 m L 中の蛋白質含量を 2 4 0 μ g としたものを試料とした。上記試料を、体重 1 k g 当たりにつき 1 m L をウサギに接種して、発熱の上昇を観察した。ウサギ 3 羽の発熱反応の和（ $^{\circ}$ C）を表 3 9 に示す。

[0140] エーテル処理を行ったウイルス様粒子はいずれも 1. 3 $^{\circ}$ C 以上の発熱和は認められなかった。

[0141] [表39]

ウイルス様粒子のウサギ 3 羽の発熱反応の和（ $^{\circ}$ C）

由来となったウイルス 粒子の株名	G A 濃度 (w / v %)	発熱反応の和（ $^{\circ}$ C）
A / N Y 株 (H 3 N 2 亜型株)	0. 0 0 4	0. 4 7
	0. 0 0 8	0. 3 9
B / B R (B 型株)	0. 0 0 4	0. 5 4
	0. 0 0 8	0

[0142] 7. サイトカイン定量

実施例 2 の「1 8. サイトカイン定量 1」に準じて、サイトカインを定量した。ウイルス様粒子 A / N Y 株のサイトカイン定量（I L - 1 β 及び I F N - α ）の結果を表 4 0 に、B / B R 株のサイトカイン定量の結果を表 4 1 に示す。ウイルス様粒子を用いた場合、全粒子抗原（ホルマリン固定）を用いた場合よりも、炎症性サイトカインの量が少ないことがわかった。このことから、ウイルス様粒子は、全粒子抗原に比べて、副反応を抑制しやすいことが示唆された。

[0143] [表40]

A／NY株（H3N2亜型株）：
サイトカイン定量の結果（pg/mL）

	GA濃度 (w/v%)	IL-1 β	IFN- α
ウイルス様粒子	0.004	13.1	2.7
	0.008	16.3	7.0
全粒子抗原		41.3	404.7

[0144] [表41]

B／BR株（B型株）：
サイトカイン定量の結果（pg/mL）

	GA濃度 (w/v%)	IL-1 β	IFN- α
ウイルス様粒子	0.004	16.4	26.8
	0.008	17.7	33.4
全粒子抗原		27.7	224.9

[0145] [実施例5]

インフルエンザウイルス様粒子の調製

1. 1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミド
ハイドロクロライド（EDC）処理（ウイルス粒子のカルボキシル基にアミ
ノ基を反応させてアミド結合を生成させ固定化する工程）

EDCを、濃度が4～0.1MとなるようにPBSで希釈した。A型イン
フルエンザウイルス（H3N2亜型株（A／NY株））及びB型インフル
エンザウイルス（B／BR株）を実施例1と同様に精製した。精製したインフ
ルエンザウイルス粒子をBPL不活化後、EDC濃度が0.5～0.005
Mとなるように希釈したEDC溶液を添加し、4℃で2時間反応させた。こ
のとき、反応液中の蛋白質濃度が2500 μ g/mLとなるようにした。反
応終了後、PBSで反応液を透析し、EDCを除くことで、固定化されたイ
ンフルエンザウイルス粒子を含む懸濁液B1（A／NY株）及び懸濁液B2
（B／BR株）を得た。

[0146] 2. エーテル処理（固定化されたウイルス粒子に対して脱脂処理を行う工
程）

E D C 処理を行った上記インフルエンザウイルス粒子を含む懸濁液 B 1 及び懸濁液 B 2 に、最終濃度が 0.05 v o l % になるようにポリソルベート 80 を添加した。その後上記懸濁液 B 1 又は懸濁液 B 2 に、最終濃度が 33 v o l % となるようにジエチルエーテル（脱脂剤）を添加し、25℃で1時間攪拌した。その後、得られた混合液を4℃、3000 r p m で5分間遠心分離を行って、水相を回収することによってエーテル相を除いた。以上の工程によって、検体であるインフルエンザウイルス様粒子を調製した。

[0147] 得られたインフルエンザウイルス様粒子の脂質成分の含有量を A m p l e x Red Cholesterol Assay Kit (Invitrogen 社製、商品名) を用いて測定した。インフルエンザウイルス様粒子を含む検体を、超遠心分離 (24000 r p m、2 h r s、4℃) にかけて上清とペレット成分とに分離した。得られたペレット成分を P B S で再懸濁した。再懸濁したペレット成分に蛍光物質レゾルフィンを加えて反応させた。反応後の蛍光物質レゾルフィンの蛍光強度を測定することによって、インフルエンザウイルス様粒子の脂質成分の含有量を定量した。その結果、インフルエンザウイルス様粒子の脂質成分の含有量は、インフルエンザウイルス粒子の脂質成分の含有量に対して多くても 50 質量% 以下であることが示唆された (表 42)。

[0148] [表42]

全粒子抗原に対するウイルス様粒子のコレステロール含有量の割合 (%)

由来となったウイルス 粒子の株名	E D C 濃度 (M)	ウイルス様粒子のコレステ ロール含有量の割合
A / N Y 株 (H 3 N 2 亜型株)	0.005	32
	0.05	30
	0.5	43
B / B R 株 (B 型株)	0.005	10
	0.05	10
	0.5	15

[0149] [実施例 6]

物性評価

上記実施例 5 で得られたウイルス様粒子（検体）の物性を以下の方法で評価した。

1. ショ糖密度勾配遠心法による分析

H3N2 亜型株（A/NY 株）由来のウイルス様粒子について、ショ糖密度勾配遠心法によって分析した。代表として、0.05 M の EDC 濃度で EDC 処理を行った検体（全粒子抗原及びウイルス様粒子）を 15～60% のショ糖密度勾配に重層し、4℃、18000 rpm で 16 時間、遠心分離を行った。遠心後、1 フラクションあたり 0.6 mL ずつ分画し、各フラクションのショ糖濃度、HA 価及び蛋白質濃度を測定した。結果を表 43 に示す。ウイルス様粒子では高いショ糖濃度（約 50%）に単一ピークとして分画されていることから、不活化全粒子と同様の形状（粒子性）を有することが示された。HA 活性については 1280 倍であった。

[0150] [表43]

A/NY 株（H3N2 亜型株）：ウイルス様粒子、及び全粒子抗原におけるショ糖密度勾配遠心分析と HA 活性

ウイルス様粒子又は全粒子抗原	ウイルス様粒子	全粒子抗原
ショ糖濃度 (%)	50.2 単一ピーク	47.2 単一ピーク
蛋白質含量 (μg/mL)	310.0	494.0
HA 活性 (x)	1280	10240

[0151] 2. 電子顕微鏡による解析

ウイルス様粒子（A/NY 株由来）の形状をさらに詳細に調べるために、電子顕微鏡による観察を実施した。約 500 μg/mL の上記検体を、グルタルアルデヒドを用いて室温で 20 分間固定した。その後、観察用のイオンコートしたシートメッシュ（日新 EM 社製）に、固定した検体を載せて約 60 秒間静置し、2% リンタングステン酸水溶液でネガティブ染色した。染色した検体を、透過型電子顕微鏡（FEI カンパニー社製テクナイ G2：加速

電圧 120 kV) を用いて観察、撮影した。

[0152] 代表として、0.5 M の EDC 濃度で 4℃、2 時間反応後、エーテル処理したウイルス様粒子の観察結果を示す (図 6 の (B))。比較対照として、0.5 M の EDC 濃度で 4℃、2 時間反応させた全粒子抗原の観察結果を示す (図 6 の (A))。ウイルス様粒子は全粒子抗原と同様に粒子構造が保たれていた。エンベロープがエーテル処理によって壊れ、染色液が侵入した観察像では、ウイルス様粒子同士が結合しあった凝集体は認められなかった。

[0153] 3. ウイルス粒子に由来するゲノム核酸の分析 (定量分析)

ウイルス様粒子におけるウイルス粒子に由来するゲノム核酸 (「ウイルス由来ゲノム核酸」という場合がある。) の定量について検討した。ウイルス様粒子、又は全粒子抗原を PBS で希釈し、SDS と Proteinase K を加えて 55℃、6 時間で反応させた。その後、TRIzol LS Reagent と PureLink RNA Mini Kit、PureLink DNase (invitrogen 社製、商品名) を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA の含有量は、Quant-iT RiboGreen RNA Reagent and Kit (invitrogen 社製、商品名) で測定した。

[0154] 表 44 に全粒子抗原に対するウイルス様粒子の RNA 含有量の割合を示す。ウイルス様粒子は全粒子抗原に対して RNA が約 90% 残存し、EDC 処理の場合においても、ホルマリン処理の場合と同様にウイルス様粒子には RNA がほぼ残存していることが示唆された。

[0155] [表44]

全粒子抗原に対するウイルス様粒子の RNA 含有量の割合 (%)

由来となったウイルス 粒子の株名	EDC 濃度 (M)	ウイルス様粒子の RNA 含有量の割合
A / NY 株 (H3N2 亜型株)	0.005	92
	0.05	93
	0.5	96

[0156] 4. 免疫原性 1

ウイルス様粒子における免疫原性を、マウスを用いて評価した。d d Y マウス（雌性、8 週齢）に、スプリット抗原（ホルマリン不活化）、又はウイルス様粒子を蛋白質量として 0.8 μ g の接種量で筋肉内接種した（一群当たり 16 匹）。免疫 3 週後にマウスを安楽死させ、全採血した。遠心分離によって血清を得て、中和抗体価を測定した。代表として 0.05 M の EDC で 4℃、2 時間反応後、エーテル処理したウイルス様粒子の免疫原性（中和抗体価（GMT））の結果を表 45 に示す。H3N2 亜型株の場合、ウイルス様粒子はスプリット抗原と比較して高い免疫原性であった。B 型株の場合、ウイルス様粒子はスプリット抗原と比較して有意に高い免疫原性（ $P < 0.05$ ）であった。

[0157] [表45]

免疫原性（中和抗体価（GMT））の結果

由来となったウイルス 粒子の株名	スプリット抗原	ウイルス様粒子
A / N Y 株 （H3N2 亜型株）	682	824
B / B R 株 （B 型株）	27	67

[0158] 5. 発熱試験

ウイルス様粒子を PBS で希釈し、1 mL 中の蛋白質含量を 240 μ g としたものを試料とした。上記試料を、体重 1 kg 当たりにつき 1 mL をウサギに接種して、発熱の上昇を観察した。ウサギ 3 羽の発熱反応の和（℃）を表 46 に示す。

[0159] エーテル処理を行ったウイルス様粒子はいずれも 1.3℃以上の発熱和は認められなかった。

[0160]

[表46]

ウイルス様粒子のウサギ3羽の発熱反応の和 (°C)

由来となったウイルス 粒子の株名	EDC濃度 (M)	発熱反応の和 (°C)
A／NY株 (H3N2亜型株)	0.005	0.64
	0.05	0.27
	0.5	0.41
B／BR株 (B型株)	0.05	0.77
	0.5	0.96

[0161] 6. サイトカイン定量

実施例2の「18. サイトカイン定量1」に準じて、サイトカインを定量した。ウイルス様粒子A／NY株のサイトカイン定量 (IL-1 β 及びIFN- α)の結果を表47に、B／BR株のサイトカイン定量の結果を表48に示す。ウイルス様粒子を用いた場合、全粒子抗原 (ホルマリン固定)を用いた場合よりも、炎症性サイトカインの量が少ないことがわかった。このことから、ウイルス様粒子は、全粒子抗原に比べて、副反応を抑制しやすいことが示唆された。

[0162] [表47]

A／NY株 (H3N2亜型株) :
サイトカイン定量の結果 (pg/mL)

	EDC濃度 (M)	IL-1 β	IFN- α
ウイルス様粒子	0.005	19.6	7.0
	0.05	19.2	8.3
全粒子抗原		41.3	404.7

[0163] [表48]

B／BR株 (B型株) :
サイトカイン定量の結果 (pg/mL)

	EDC濃度 (M)	IL-1 β	IFN- α
ウイルス様粒子	0.005	14.3	14.9
	0.05	10.9	28.7
全粒子抗原		27.7	224.9

[0164] [実施例7]

日本脳炎ウイルス様粒子の調製

1. グルタルアルデヒド処理（ウイルス粒子に対して粒子構造を固定化する工程）

V e r o細胞培養日本脳炎ワクチン原薬（化学及血清療法研究所製、商品名「エンセバック」（0.08%ホルマリンで不活化済）、懸濁液A）に対して、最終濃度が0.002~0.05 v o l %となるようにグルタルアルデヒドを添加し、4℃で3日間反応させた。反応終了後、賦活剤である乳糖（終濃度5 w / v %）を添加したP B Sで、得られた反応液を透析した。透析によって、グルタルアルデヒドを除くことで、固定化された日本脳炎ウイルス粒子を含む懸濁液Bを得た。

[0165] 2. エーテル処理（固定化されたウイルス粒子に対して脱脂処理を行う工程）

上記懸濁液Bに対して、等容のジエチルエーテル及び最終濃度が0.01 v o l %になるようにポリソルベート80を添加し、常温で1時間攪拌した。4℃、3000 r p mで5分間遠心した後、水相を回収し、エーテル相を除いた。以上の工程によって、検体である日本脳炎ウイルス様粒子を調製した。

[0166] [実施例8]

物性評価

上記実施例7で得られたウイルス様粒子（検体）の物性を以下の方法で評価した。

1. 電子顕微鏡による解析

ウイルス様粒子の形状を詳細に調べるために、電子顕微鏡による観察を実施した。観察用のイオンコートしたシートメッシュ（日新E M社製）に、約70 μ g / m Lの上記検体を載せて約60秒間静置し、2%リンタングステン酸水溶液でネガティブ染色した。染色した検体を、透過型電子顕微鏡（F E Iカンパニー社製テクナイG2：加速電圧120 k V）を用いて観察、撮影した。

[0167] 代表として、0.01 w/v %のグルタルアルデヒド濃度で4℃、3日間反応後、エーテル処理したウイルス様粒子の観察結果を示す（図7の（C））。比較対象として、グルタルアルデヒド未固定後、エーテル処理したウイルス様粒子（図7の（B））、V e r o細胞培養日本脳炎ワクチン原薬（図7の（A））の観察結果をそれぞれ示す。ウイルス様粒子はグルタルアルデヒドで固定することでV e r o細胞培養日本脳炎ワクチン原薬と同様に粒子構造が保たれていた。一方、グルタルアルデヒド未固定のウイルス様粒子は凝集している様子が観察された。

[0168] 2. 動的光散乱

ウイルス様粒子の平均粒子径をParticle Sizing System: N I C O M P 380 Z L S - Sを用いて解析した。動的光散乱法による液体中の平均粒子径を表49に示す。ウイルス様粒子は平均粒子径が約90 nmでほぼ単峰性であった。一方、V e r o細胞培養日本脳炎ワクチン原薬は約80 nmでほぼ単峰性であった。このことから、エーテル処理後の平均粒径は、エーテル処理を行っていないウイルス粒子よりわずかに大きく、エーテル処理によって脱脂されても平均粒子径はほぼ変わらないことがわかった。動的光散乱実験から、ウイルス様粒子の粒子構造は保たれており、凝集体のような不純物は認められなかった。

[0169] [表49]

動的光散乱法による液体中の平均粒子径（体積荷重平均粒子径（主ピーク（%）（nm）））

	ウイルス様粒子	V e r o細胞培養日本脳炎ワクチン原薬
体積荷重平均粒子径（主ピーク）（nm）	95.1（96.78%）	79.8（95.77%）

[0170] 3. 抗原の含有量

抗日本脳炎ウイルス抗体を用いたサンドイッチE L I S A法によって、抗原の含有量（抗原含量）を測定した。検体中に含まれるE抗原は、抗日本脳炎ウイルスウサギI g G（一次抗体；ポリクローナル抗体）が結合したマイ

クロプレートに捕捉される。その後、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ（H R P）を結合した抗日本脳炎ウイルスB蛋白質モノクローナル抗体（二次抗体；モノクローナル抗体）を反応させることで、プレートに結合した抗E抗原抗体／E抗原／二次抗体の複合体が形成される。反応せず残った試薬及び検体を洗浄によって除去し、酵素基質液（oーフェニレンジアミン溶液：O P D溶液）と反応させるとE抗原複合体上のH R Pが反応し、発色が起こる。O P Dの発色の強度は、複合体の量（E抗原量を反映）に比例することを利用し、E抗原含量を測定した。

[0171] 代表として0.01w／v％のグルタルアルデヒド濃度で4℃、3日間反応後、エーテル処理したウイルス様粒子（ポリソルベート80を0.005％添加してエーテル処理したものと、ポリソルベート80を添加しないでエーテル処理したもの）、グルタルアルデヒド未固定後エーテル処理したウイルス様粒子、及び、V e r o細胞培養日本脳炎ワクチン原薬それぞれの抗原含有量を表50に示す。ポリソルベート80を添加していない検体及びグルタルアルデヒド未固定の検体では抗原含有量が6.25μg／mL未満であったのに対し、ポリソルベート80を0.005％添加したウイルス様粒子はV e r o細胞培養日本脳炎ワクチン原薬と同等の抗原が含まれていた。

[0172] [表50]

抗原含有量の結果（μg／mL）				
	ウイルス様粒子 （ポリソルベ ート80添加）	ウイルス様粒子 （ポリソルベ ート80未添加）	ウイルス様粒子 （グルタルアル デヒド未固定）	V e r o細胞培 養日本脳炎ワク チン原薬
抗原含有量 （μg／mL）	74.0	6.25未満	6.25未満	80.0

[0173] 日本脳炎ウイルスの膜を構成する脂質として、コレステロールが最も多いことが示されている。そこで、ウイルス様粒子の脂質成分の含有量はコレステロールを代表として定量することとした。得られた日本脳炎ウイルス様粒子の脂質成分の含有量をA m p l e x R e d C h o l e s t e r o l A s s a y K i t（I n v i t r o g e n社製、商品名）を用いて測定した。日本脳炎ウイルス様粒子を含む検体を、超遠心分離（28000rpm

、6 h r s、4℃）にかけて上清とペレット成分とに分離した。得られたペレット成分をP B Sで再懸濁した。再懸濁したペレット成分に蛍光物質レゾルフィンを加えて反応させた。反応後の蛍光物質レゾルフィンの蛍光強度を測定することによって、日本脳炎ウイルス様粒子の脂質成分の含有量を定量した。その結果、日本脳炎ウイルス様粒子の脂質成分の含有量は、日本脳炎ウイルス粒子の脂質成分の含有量に対して多くても20質量%以下であることが示唆された（表51）。

[0174] [表51]

全粒子抗原に対するウイルス様粒子のコレステロール含有量の割合（％）

エーテル：懸濁液B (v o l 比)	ウイルス様粒子のコレステロール含有量の割合
1 : 1	24
1 : 2	5.2未満
1 : 4	5.2未満

[0175] 4. ウイルス粒子に由来するゲノム核酸の分析（定量分析）

ウイルス様粒子におけるウイルス粒子に由来するゲノム核酸（「ウイルス由来ゲノム核酸」という場合がある。）の定量について検討した。ウイルス様粒子、又は全粒子抗原をP B Sで希釈し、S D SとP r o t e i n a s e Kを加えて55℃、54時間で反応させた。その後、T R I z o l L S R e a g e n tとP u r e L i n k R N A M i n i K i t、P u r e L i n k D N a s e（i n v i t r o g e n社製、商品名）を用いてR N Aを抽出した。抽出したR N Aの含有量は、Q u a n t - i T R i b o G r e e n R N A R e a g e n t a n d K i t（i n v i t r o g e n社製、商品名）で測定した。

[0176] 表52に全粒子抗原に対するウイルス様粒子のR N A含有量の割合を示す。ウイルス様粒子は全粒子抗原に対してR N Aが約70%残存していることが示唆された（表52）。

[0177]

[表52]

全粒子抗原に対するウイルス様粒子のRNA含有量の割合 (%)

エーテル：懸濁液B (v o l 比)	ウイルス様粒子のRNA含有量 の割合
1 : 1	8 4
1 : 2	7 4
1 : 4	7 4

[0178] 5. サイトカイン定量

発熱試験の代替法として、ヒトPBMCを用いた炎症性サイトカイン測定系によって、サイトカインの量を評価した。炎症性サイトカインとして代表的な、IL-1 β 、IL-6に関して測定を行った。ヒト末梢血単核球(PBMC)をFCS MEMに懸濁し、 4×10^6 cells/mLに希釈した。100 μ Lずつ96穴プレートに添加し、ウイルス様粒子又はVer o細胞培養日本脳炎ワクチン原薬を同量添加した(終濃度25 μ g/mL)。その後、37℃で24時間CO₂雰囲気下で培養し、上清中のIL-1 β とIL-6とをELISA法で定量した。代表として0.01 w/v%のグルタルアルデヒド濃度で4℃、3日間反応後、エーテル処理した検体のサイトカイン定量(IL-1 β 及びIL-6)の結果を表53に示す。IL-1 β 、IL-6共にウイルス様粒子はVer o細胞培養日本脳炎ワクチン原薬よりも低かった。このことから、ウイルス様粒子は、Ver o細胞培養日本脳炎ワクチン原薬に比べて、副反応を抑制しやすいことが示唆された。

[0179] [表53]

サイトカイン定量の結果 (pg/mL)

	ウイルス様粒子 (ポリソルベート 80添加)	Ver o細胞培養 日本脳炎ワクチン 原薬
IL-1 β	3.3	324.2
IL-6	5.7	210.7

[0180] 6. 免疫原性(マウス)

ddYマウス(雌性、4週齢)に、代表として0.01 w/v%のグルタルアルデヒド濃度で4℃、3日間反応後、エーテル処理したウイルス様粒子

(ポリソルベート80を0.005%添加してエーテル処理したもの)又はVero細胞培養日本脳炎ワクチン原薬を4 μ g又は1 μ gの接種量で腹腔内接種した(一群当たり10匹)。免疫1週間後に再度免疫し、その1週間後にマウスを安楽死させ、全採血した。遠心分離によって血清を得て、群毎に等量ずつプールし、中和抗体価を測定した。50%プラック減少率から算出した結果を表54に示す。エーテル処理したウイルス様粒子はVero細胞培養日本脳炎ワクチン原薬と比較して同等又はそれ以上の中和抗体価であった。

[0181] [表54]

免疫原性(中和抗体価)の結果

接種量(μ g)	ウイルス様粒子	Vero細胞培養日本脳炎ワクチン原薬
4	10 ^{4.1}	10 ^{3.3}
1	10 ^{3.4}	10 ^{3.0}

[0182] 7. 免疫原性(カニクイザル)

カニクイザル(雌性、約8歳齢)に、代表として0.01w/v%のグルタルアルデヒド濃度で4℃、3日間反応後、エーテル処理したウイルス様粒子(ポリソルベート80を0.01%添加してエーテル処理したもの)又はVero細胞培養日本脳炎ワクチン原薬を4 μ gの接種量で腹腔内接種した(一群当たり3匹)。免疫3週間後に再度免疫し、その4週間後に部分採血した。遠心分離によって血清を得て、群毎に等量ずつプールし、中和抗体価を測定した。50%プラック減少率から算出した結果を表55に示す。エーテル処理したウイルス様粒子はVero細胞培養日本脳炎ワクチン原薬と比較し、同様に十分な中和抗体を誘導した。

[0183] [表55]

免疫原性(中和抗体価)の結果(カニクイザル)

免疫回数	ウイルス様粒子	Vero細胞培養日本脳炎ワクチン原薬
1次免疫後	10 ^{4.0}	10 ^{4.0} <
2次免疫後	10 ^{3.7}	10 ^{4.0} <

[0184] [実施例 9]

H B s ウイルス様粒子の調製

1. ホルムアルデヒド処理（ウイルス粒子に対して粒子構造を固定化する工程）

H B s 抗原液（懸濁液 A）を攪拌しながら、最終濃度が 0.018～0.162 w/v % となるようにホルムアルデヒドを添加し、反応させた。反応終了後、P B S で反応液を透析し、ホルムアルデヒドを除くことで、固定化された H B s 粒子を含む懸濁液 B を得た。

[0185] 2. エーテル処理（固定化されたウイルス粒子に対して脱脂処理を行う工程）

上記懸濁液 B に対して、最終濃度が 0.05 v o l % になるようにポリソルベート 80 を添加した。その後最終濃度が 50 v o l % となるように、上記懸濁液 B と等容のジエチルエーテル（脱脂剤）を添加し、25℃で1時間攪拌した。その後、得られた混合液を 4℃、3000 r p m で 5 分間遠心分離を行って、水相（懸濁液 C）を回収することによってエーテル相を除いた。

[0186] 3. アルミニウム塩の添加

上記懸濁液 C にアルミニウム塩を混合した。以上の工程によって、検体である H B s ウイルス様粒子を調製した。

[0187] [実施例 10]

物性評価

上記実施例 9 で得られたウイルス様粒子（検体）の物性を以下の方法で評価した。

1. 電子顕微鏡による解析

ウイルス様粒子の形状を詳細に調べるために、電子顕微鏡による観察を実施した。観察用のイオンコートしたシートメッシュ（日新 E M 社製）に、約 25 μ g/mL の上記検体を載せて約 60 秒間静置し、2% リンタングステン酸水溶液でネガティブ染色した。染色した検体を、透過型電子顕微鏡（F

E I カンパニー社製テクナイ G 2 : 加速電圧 1 2 0 k V) を用いて観察、撮影した。

[0188] 代表として、0. 0 5 w / v % のホルムアルデヒド濃度で 3 7 ° C 、 9 6 時間反応後、エーテル処理したウイルス様粒子の観察結果を示す (図 8 の (B)) 。比較対照として、ホルマリン固定後、エーテル未処理の全粒子 (図 8 の (A)) の観察結果を示す。ウイルス様粒子はホルマリンで固定することで H B s 全粒子と同様に粒子構造が保たれていた。

[0189] 2. 抗原の含有量

高親和性抗 H B s マウスモノクローナル抗体を用いた 1 ステップサンドイッチ E I A 法によって、抗原の含有量 (抗原含量) を測定した。上記測定は、全自動エンザイムイムノアッセイ装置 A I A (東ソー株式会社製、商品名) を用いて行った。測定に用いる試薬カップには、磁性ビーズに固定化された抗体とアルカリ性ホスファターゼ標識抗体とが、凍結乾燥体として封入されている。上記試薬カップに検体を添加することで抗原抗体反応を、一定時間、一定温度で行った。反応後、洗浄水で上記磁性ビーズを洗浄することによって遊離の酵素標識抗体及び検体成分を除去した。その後、磁性ビーズに結合したアルカリ性ホスファターゼ標識抗体の酵素活性を測定するため、酵素基質として 4 - メチルウンベリフェリリン酸を添加した。酵素反応の結果として得られる蛍光物質 (4 - メチルウンベリフェロン) の生成速度を測定することによって、検体中の H B s 抗原濃度を測定した。

[0190] 代表として、0. 0 5 w / v % のホルムアルデヒド濃度で 3 7 ° C 、 9 6 時間反応後、エーテル処理したウイルス様粒子、及び、比較対照として組換え沈降 B 型肝炎ワクチン (化学及血清療法研究所製、商品名「ビームゲン」) を使用した。それぞれの抗原含量 (n g / m L) を蛋白濃度 (n g / m L) で除した比活性の値を表 5 6 に示す。ポリソルベート 8 0 を 0. 0 0 5 % 添加したウイルス様粒子は組換え沈降 B 型肝炎ワクチンと同等の抗原が含まれていた。

[0191]

[表56]

抗原含量から蛋白濃度を除した比活性の結果

	ウイルス様粒子 (ポリソルベート80添加)	ウイルス様粒子 (ポリソルベート80未添加)	組換え沈降B型肝炎ワクチン
比活性	0.112	0.058	0.142

[0192] 3. 動的光散乱

ウイルス様粒子の平均粒子径をZetasizer Nano ZS (Malvern社製)を用いて解析した。代表として、0.05w/v%のホルムアルデヒド濃度で37℃、96時間反応後、エーテル処理したウイルス様粒子、及び、比較対照として組換え沈降B型肝炎ワクチンを測定した結果を表57に示す。どちらの検体も平均粒子径が100nm前後で単峰性であった。このことから、エーテル処理後のウイルス様粒子の平均粒径は、ウイルス粒子と同等の粒子サイズであり、単一で変わらないことがわかった。動的光散乱実験から、ウイルス様粒子の粒子構造は保たれており、凝集体のような不純物は認められなかった。

[0193] [表57]

動的光散乱による液体中の平均粒子径

	ウイルス様粒子 (ポリソルベート80添加)	組換え沈降B型肝炎ワクチン
体積荷重平均粒子径 (nm)	104 (単峰性)	90 (単峰性)

[0194] 4. ホスファチジルコリンの含有量試験

HBs抗原に含まれる脂質成分のうち、80%以上はホスファチジルコリンである。そこで、HBs抗原の脂質成分の含有量はホスファチジルコリンの含有量を代表として定量することとした。Phosphatidylcholine Assay Kit (CELL BIO LABS社製、商品名)を用いて測定した。西洋わさび由来ペルオキシダーゼ(HRP)の触媒下

で、反応過程で生じる過酸化水素を高感度蛍光プローブで検出し、その蛍光強度を測定することによってホスファチジルコリンの含有量を測定した。代表として、0.05 w/v %のホルムアルデヒド濃度で37℃、96時間反応後、エーテル処理したウイルス様粒子、及び、比較対照として組換え沈降B型肝炎ワクチンを測定した結果を表58に示す。ウイルス様粒子のホスファチジルコリンの含有量は、比較対照に対して、多くても59質量%以下であることが示唆された。

[0195] [表58]

組換え沈降B型肝炎ワクチンに対する、ウイルス様粒子のホスファチジルコリンの含有量の割合

	ウイルス様粒子 (ポリソルベート80添加)	組換え沈降B型 肝炎ワクチン
ホスファチジルコリン含有量(質量%)	59	100

[0196] 5. 免疫原性(マウス)

BALB/cマウス及びC57BL/6マウス(雌性、5週齢)に、0.05 w/v %のホルムアルデヒド濃度で37℃、96時間反応後、エーテル処理したウイルス様粒子(ポリソルベート80を0.005%添加してエーテル処理したもの)又は組換え沈降B型肝炎ワクチンを、2 µg又は0.5 µgの接種量で筋肉内接種した(一群当たり8匹)。免疫4週間後に再度免疫し、その4週間後にマウスを安楽死させ、全採血した。遠心分離によって血清を得て、全自動エンザイムイムノアッセイ装置AIA(東ソー株式会社製、商品名)を用いて、血清中の抗体価を測定した。固層及び酵素標識抗原にHBs抗原を用いた1ステップサンドイッチEIA法によって測定した。測定に用いる試薬カップには、磁性ビーズに固定化された抗原とアルカリ性ホスファターゼ標識抗原とが、凍結乾燥体として封入されている。上記試薬カップに検体を添加することで抗原抗体反応を一定時間、一定温度で行った。反応後、洗浄水で上記磁性ビーズを洗浄することによって未反応の酵素標識抗原を除去した。その後、磁性ビーズに結合したアルカリ性ホスファター

ゼ標識抗原の酵素活性を測定するため、酵素基質として4-メチルウンベリフェリリン酸を添加した。酵素反応の結果として得られる蛍光物質（4-メチルウンベリフェロン）の生成速度を測定することによって、検体中の抗HBs抗体濃度を測定した。結果を表59に示す。エーテル処理したウイルス様粒子は組換え沈降B型肝炎ワクチンと比較して同等又はそれ以上の免疫原性であった。

[0197] [表59]

免疫原性（抗体価GMT）の結果

接種量（ μ g）	BALB/c		C57BL/6	
	ウイルス様粒子	組換え沈降B型肝炎ワクチン	ウイルス様粒子	組換え沈降B型肝炎ワクチン
2	$10^{4.9}$	$10^{5.1}$	$10^{4.3}$	$10^{4.6}$
0.5	$10^{4.6}$	$10^{4.6}$	$10^{4.2}$	$10^{3.8}$

産業上の利用可能性

[0198] 本発明は医薬品の分野、特にワクチンの分野において有用である。

請求の範囲

- [請求項1] エンベロープを有するウイルス粒子に由来するウイルス様粒子を含有するワクチンであって、
前記ウイルス様粒子の脂質成分の含有量が、前記ウイルス粒子の脂質成分の含有量に対して低減している、ワクチン。
- [請求項2] 前記ウイルス様粒子の脂質成分の含有量が、前記ウイルス粒子の脂質成分の含有量を基準として、50質量%未満である、請求項1に記載のワクチン。
- [請求項3] 前記ウイルス様粒子の脂質成分の含有量が、前記ウイルス粒子の脂質成分の含有量を基準として、20質量%未満である、請求項1又は2に記載のワクチン。
- [請求項4] 前記脂質成分がコレステロールである、請求項1～3のいずれか一項に記載のワクチン。
- [請求項5] 前記ウイルス様粒子が、
前記ウイルス粒子の表面抗原、
前記ウイルス粒子のマトリックス蛋白質又は膜蛋白質、及び、
前記ウイルス粒子の核蛋白質、
を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載のワクチン。
- [請求項6] 前記ウイルス様粒子が、前記ウイルス粒子に由来するゲノム核酸を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載のワクチン。
- [請求項7] 前記ウイルス粒子が、オルソミクソウイルス粒子、フラビウイルス粒子、又はB型肝炎ウイルス粒子である、請求項1～6のいずれか一項に記載のワクチン。
- [請求項8] 前記ウイルス粒子が、インフルエンザウイルス粒子、日本脳炎ウイルス粒子、又はB型肝炎ウイルス表面抗原（HBs）粒子である、請求項7に記載のワクチン。
- [請求項9] 前記ウイルス粒子が、インフルエンザウイルス粒子である、請求項8に記載のワクチン。

- [請求項10] 前記インフルエンザウイルス粒子が、A型インフルエンザウイルス粒子、又はB型インフルエンザウイルス粒子である、請求項9に記載のワクチン。
- [請求項11] 前記インフルエンザウイルス粒子が、H1N1亜型株、H2N2亜型株、H3N2亜型株、H3N8亜型株、H5N1亜型株、H5N2亜型株、H5N6亜型株、H6N1亜型株、H7N3亜型株、H7N7亜型株、H7N9亜型株、H9N2亜型株、又はH10N8亜型株に分類されるインフルエンザウイルス粒子である、請求項9又は10に記載のワクチン。
- [請求項12] 前記表面抗原が、ヘマグルチニン（HA）又はノイラミニダーゼ（NA）を含む、請求項8～11のいずれか一項に記載のワクチン。
- [請求項13] 前記マトリックス蛋白質又は膜蛋白質が、M1蛋白質又はM2蛋白質を含む、請求項8～12のいずれか一項に記載のワクチン。
- [請求項14] 前記ウイルス様粒子が、前記ウイルス粒子の粒子径の70～130%の平均粒子径を有する、請求項1～13のいずれか一項に記載のワクチン。
- [請求項15] 前記ウイルス様粒子が、ショ糖密度勾配遠心で測定した場合に、ショ糖濃度35%以上にピークが検出されるウイルス様粒子である、請求項1～14のいずれか一項に記載のワクチン。
- [請求項16] ウイルス様粒子を含有するワクチンの製造方法であって、
エンベロープを有するウイルス粒子に対して粒子構造を固定化する工程と、
固定化された前記ウイルス粒子に対して脱脂処理を行う工程と、
を含む、製造方法。
- [請求項17] 前記固定化する工程が、前記ウイルス粒子を含む懸濁液Aに固定化剤を加える工程を含む、請求項16に記載の製造方法。
- [請求項18] 前記固定化剤がアルデヒド類を含む、請求項17に記載の製造方法。

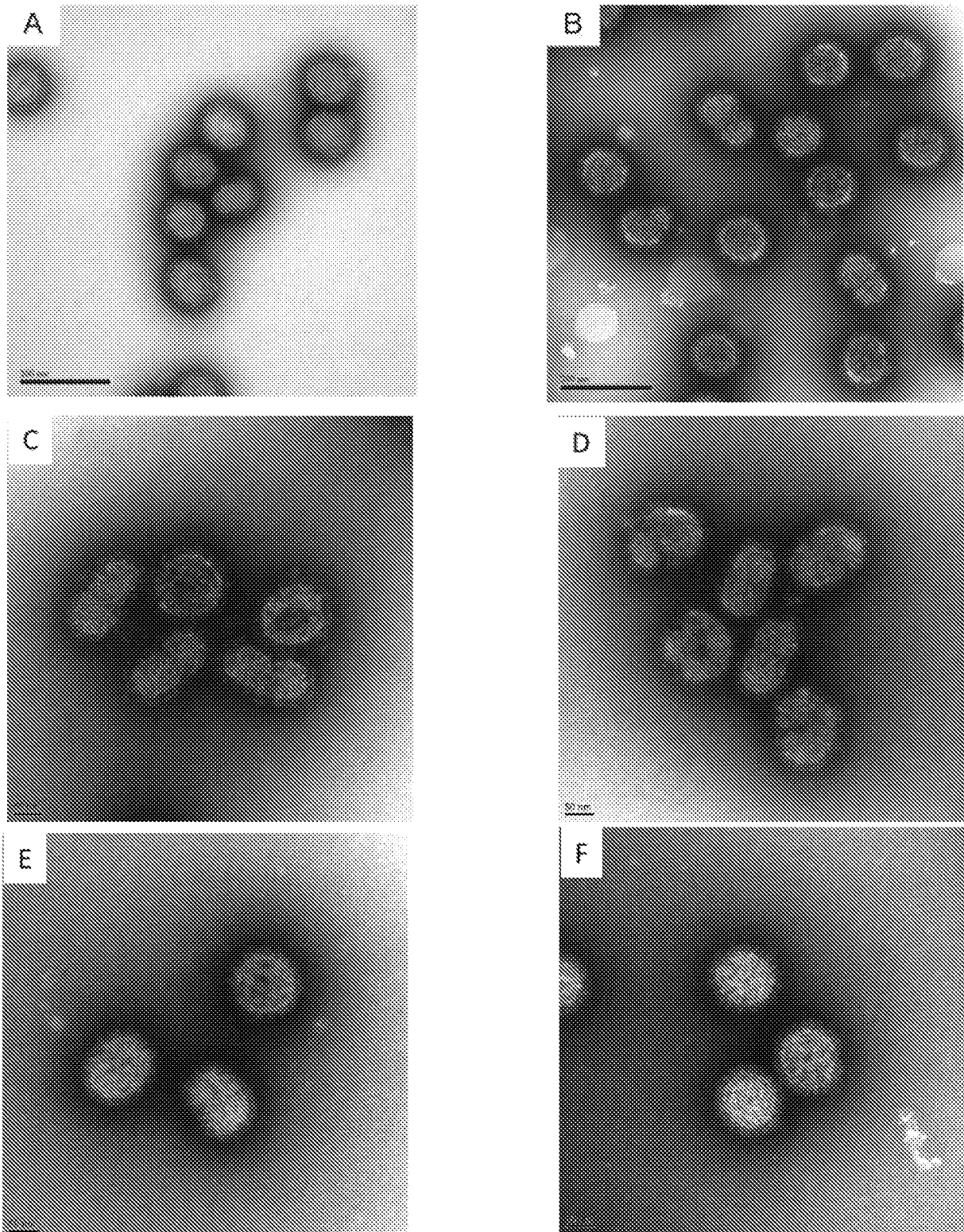
- [請求項19] 前記固定化剤が1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミドハイドロクロライド(EDC)を含む、請求項17に記載の方法。
- [請求項20] 前記アルデヒド類が、ホルムアルデヒド、パラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項18に記載の製造方法。
- [請求項21] 前記アルデヒド類が、ホルムアルデヒドを含む、請求項20に記載の製造方法。
- [請求項22] 前記ホルムアルデヒドの濃度が、前記懸濁液A及び前記固定化剤の全量を基準として、0.007~0.076w/v%である、請求項21に記載の製造方法。
- [請求項23] 前記アルデヒド類が、グルタルアルデヒドを含む、請求項20に記載の製造方法。
- [請求項24] 前記グルタルアルデヒドの濃度が、前記懸濁液A及び前記固定化剤の全量を基準として、0.002~0.05w/v%である、請求項23に記載の製造方法。
- [請求項25] 前記脱脂処理を行う工程が、固定化された前記ウイルス粒子を含む懸濁液Bに脱脂剤を加える工程を含む、請求項16~24のいずれか一項に記載の製造方法。
- [請求項26] 前記脱脂剤が、ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、酢酸メチル、酢酸エチル、及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項25に記載の製造方法。
- [請求項27] 前記脱脂剤が、ジエチルエーテルを含む、請求項26に記載の製造方法。
- [請求項28] 前記ジエチルエーテルの濃度が、前記懸濁液B及び前記脱脂剤の全量を基準として、10vol%以上である、請求項27に記載の製造方法。
- [請求項29] 前記脱脂剤が界面活性剤を更に含む、請求項25~28のいずれか

一項に記載の製造方法。

[請求項30] 前記ウイルス粒子が、培養細胞又は鶏卵に感染させて、回収されたウイルス粒子である、請求項16～29のいずれか一項に記載の製造方法。

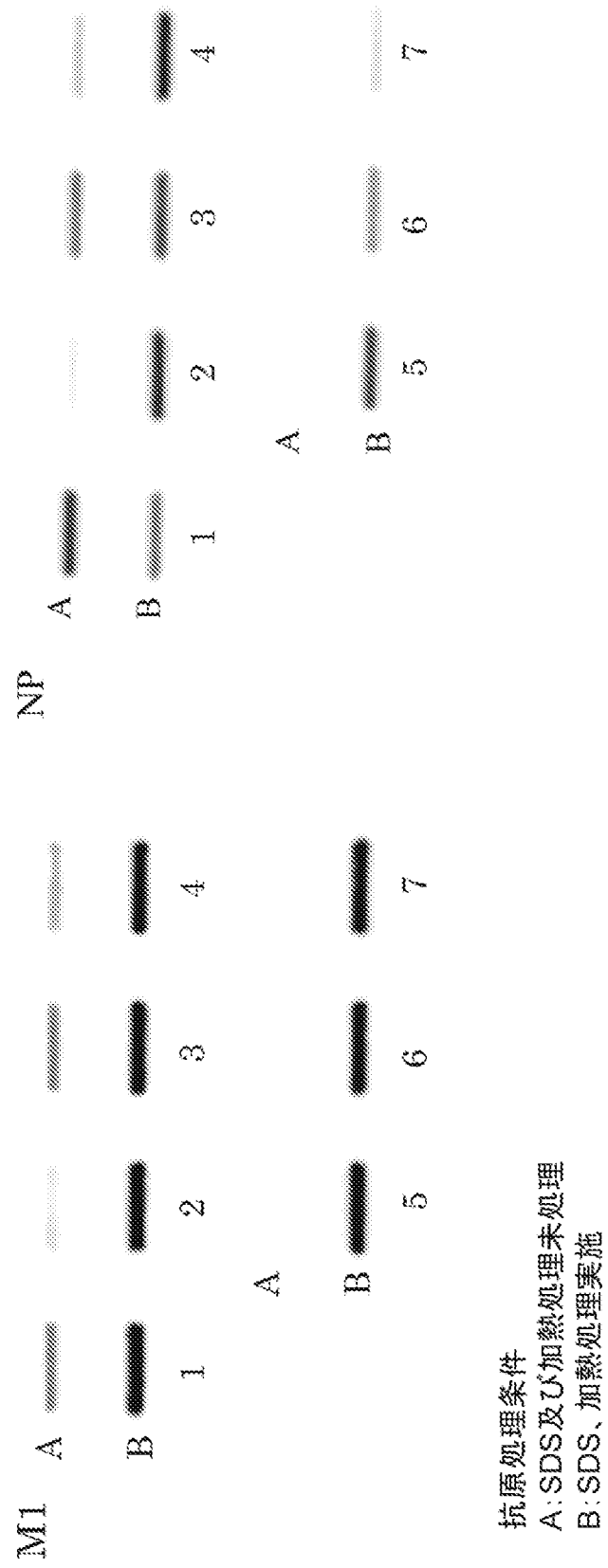
[請求項31] 前記培養細胞が、V e r o細胞、又はM D C K細胞である、請求項30に記載の製造方法。

[図1]

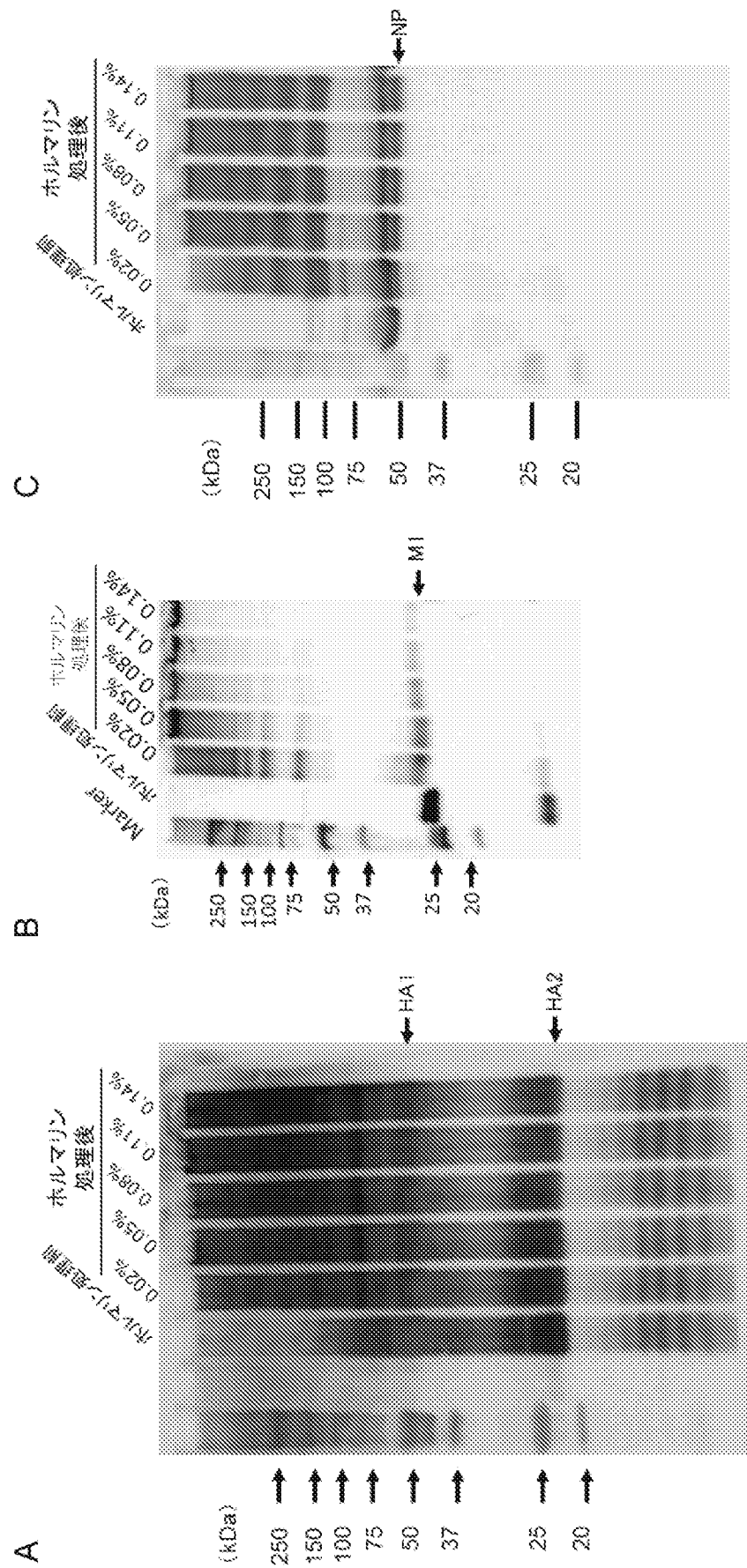


- A: 0.02%のホルマリンで4°C、6週間反応させた検体(B/WC株)
B: 0.05%のホルマリンで25°C、1週間反応後、エーテル処理した検体(B/WC株)
C: 0.08%のホルマリンで25°C、1週間反応後、エーテル処理した検体(A/CA株)
D: 0.08%のホルマリンで25°C、1週間反応後、エーテル処理した検体(A/NY株)
E: 0.08%のホルマリンで25°C、1週間反応後、エーテル処理した検体(B/BR株)
F: 0.08%のホルマリンで25°C、1週間反応後、エーテル処理した検体(B/MA株)

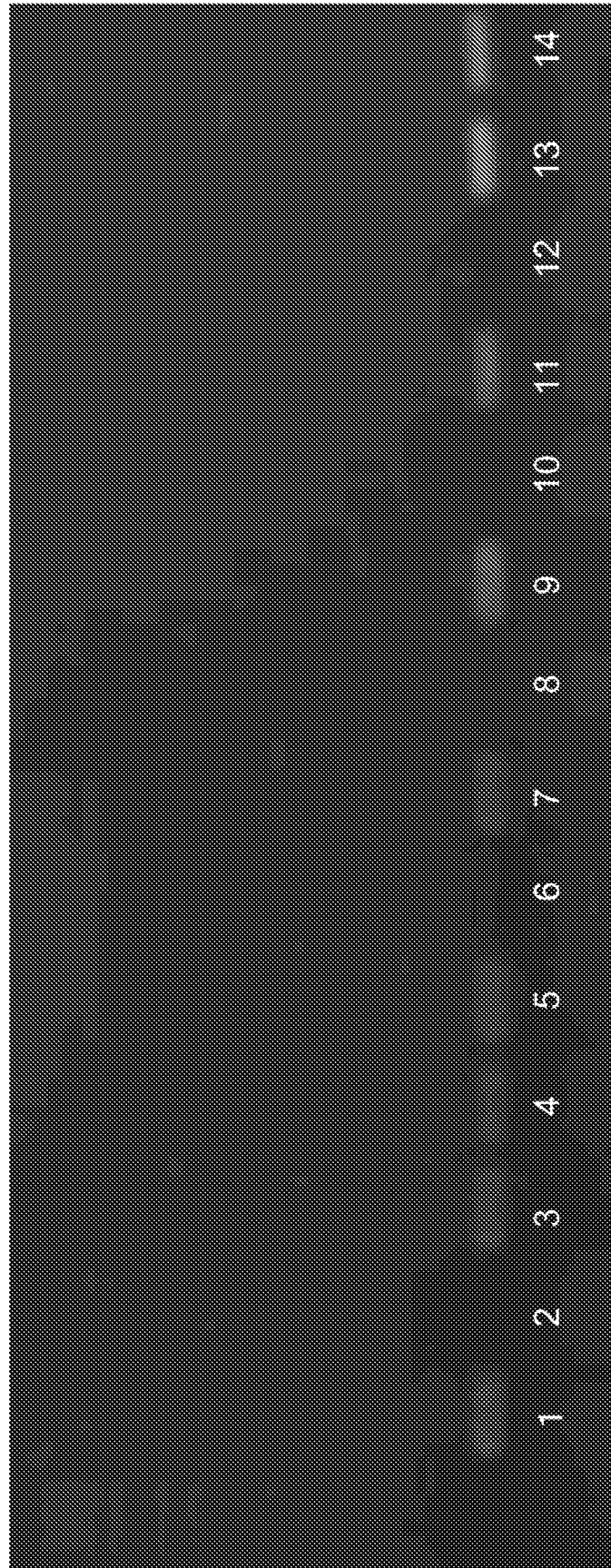
[図2]



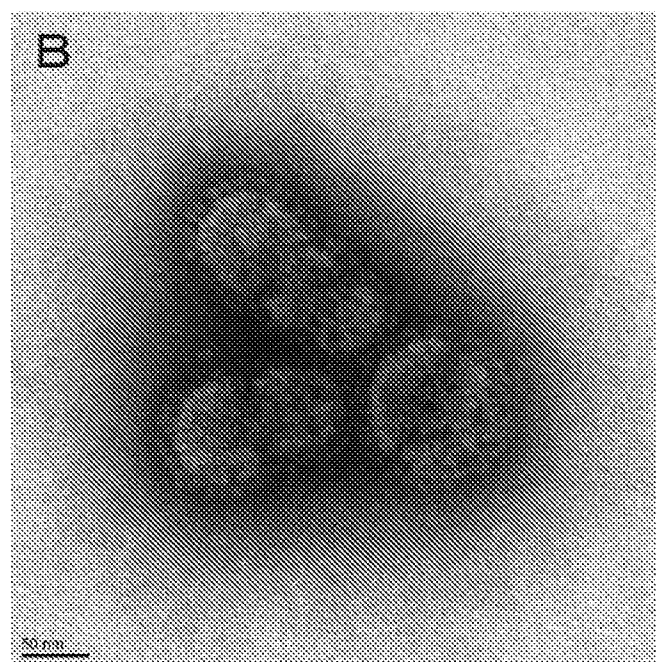
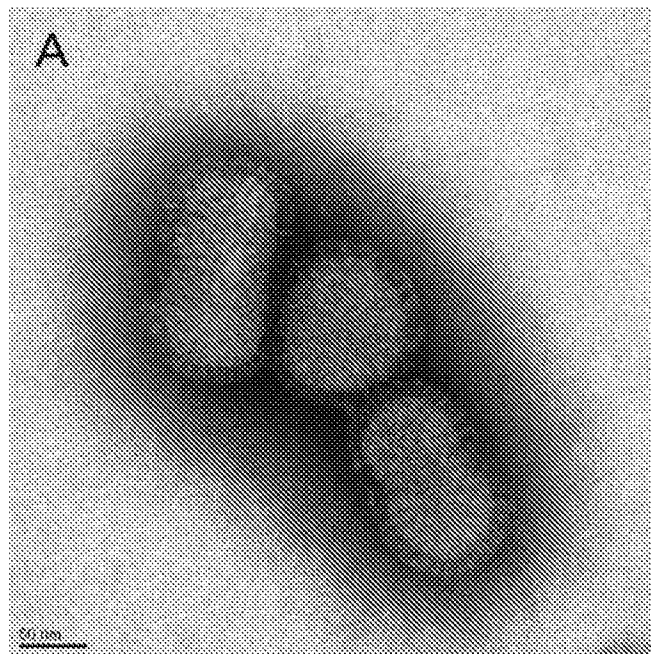
[図3]



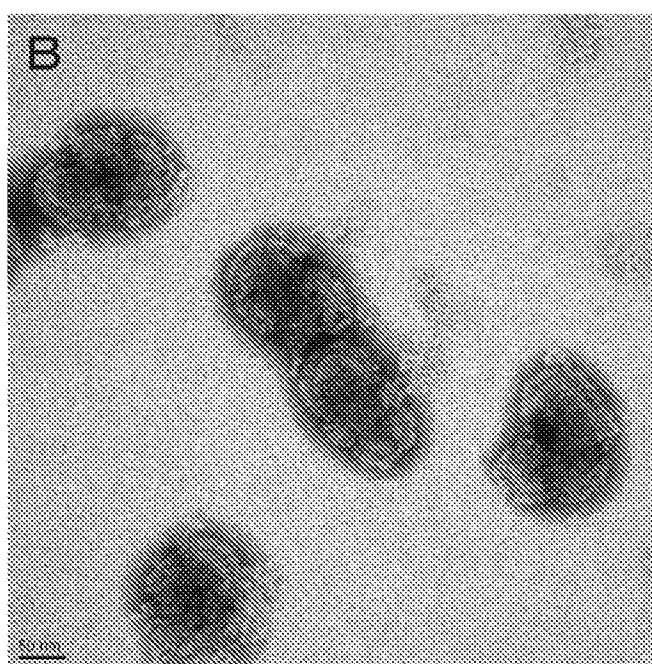
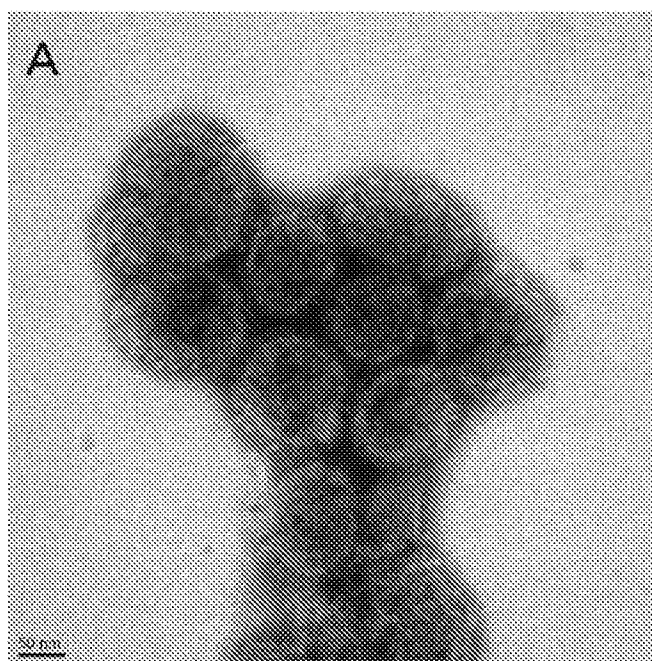
[図4]



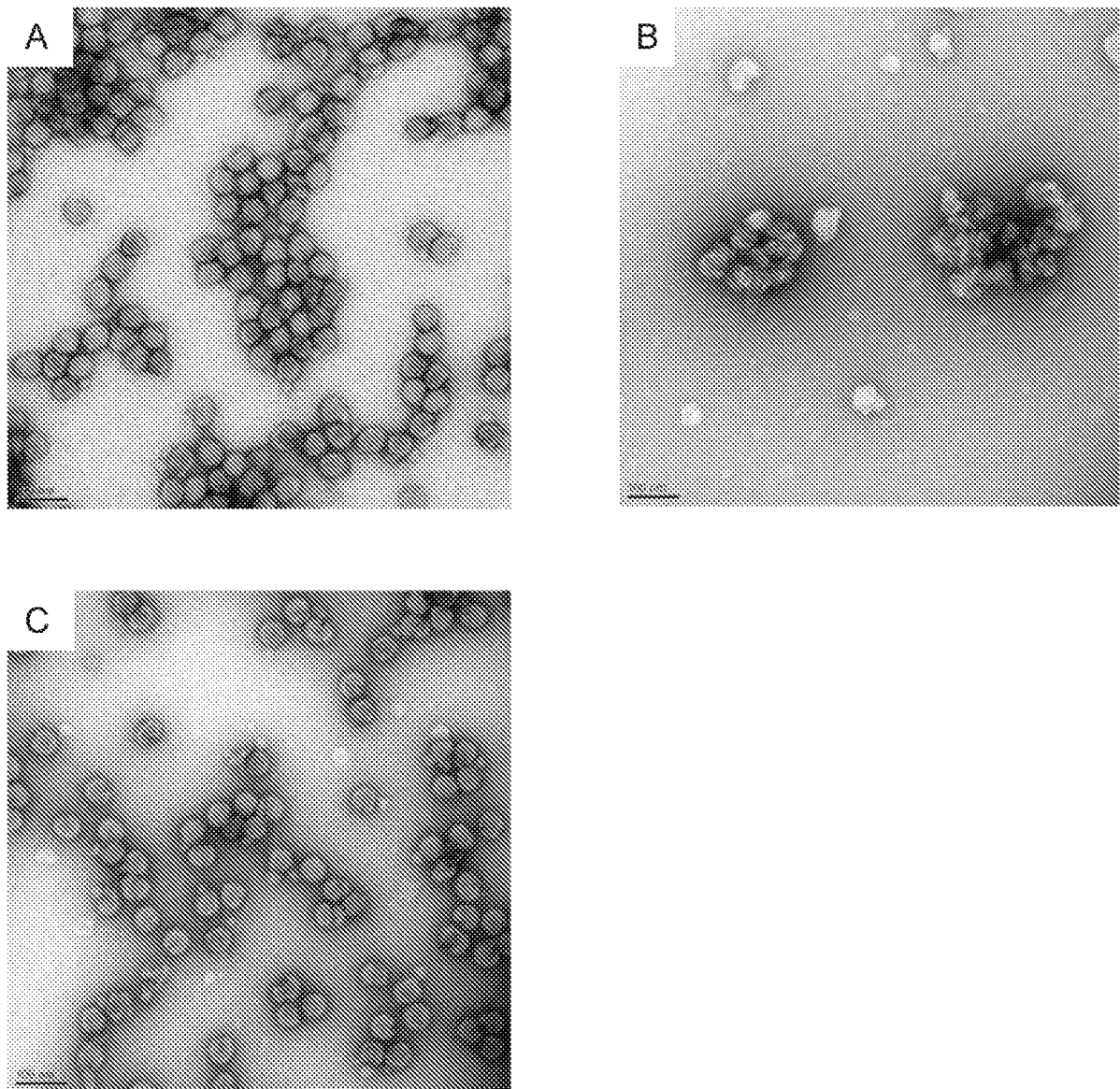
[図5]



[図6]



[図7]

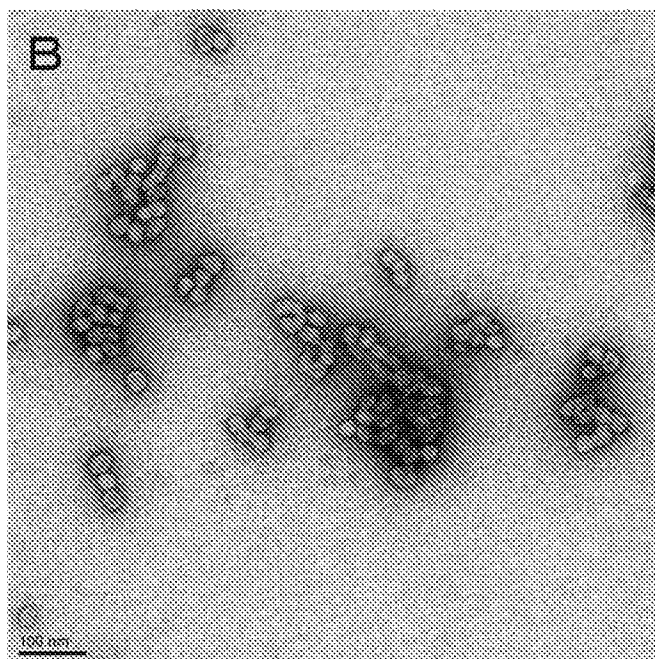
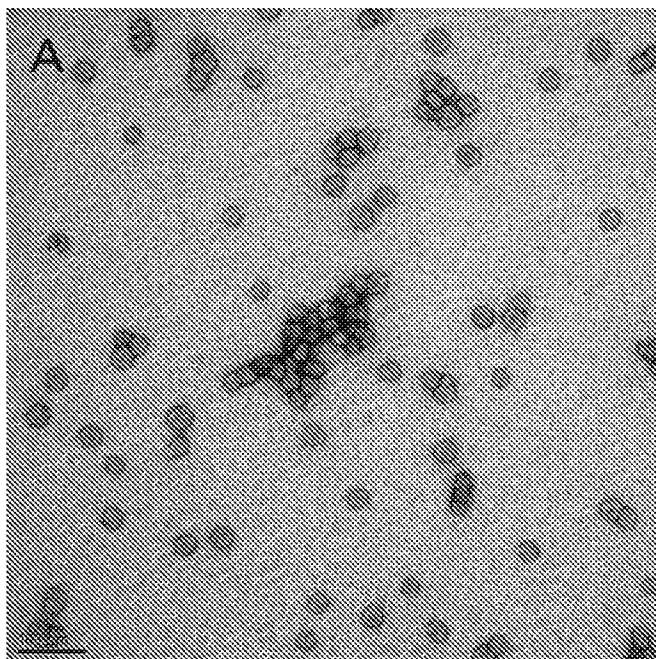


A: Vero細胞培養日本脳炎ワクチン原薬

B: グルタルアルデヒド未固定後、エーテル処理した検体

C: 0.01w/v%のグルタルアルデヒド濃度で、4℃、3日間反応後、エーテル処理した検体

[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/070297

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K39/12(2006.01)i, A61K39/145(2006.01)i, A61K39/29(2006.01)i, A61P31/12(2006.01)i, A61P31/16(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K39/12, A61K39/145, A61K39/29, A61P31/12, A61P31/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CApus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2007-524383 A (Lipid Sciences, Inc.), 30 August 2007 (30.08.2007), particularly, claims; paragraphs [0001], [0024], [0052] to [0053], [0064] to [0066], [0070] to [0084]; examples 1 to 12 & WO 2005/016246 A2 claims; page 1, lines 7 to 22; page 9, line 15 to page 10, line 12; page 17, lines 10 to 17; page 21, lines 3 to 26; page 22, line 10 to page 28, line 23; examples 1 to 12 & EP 1567188 A & CA 2529965 A & US 2005/0032222 A1	1-10, 14-18, 20, 23-30 11-13, 21, 22, 31

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 October 2015 (06.10.15)

Date of mailing of the international search report
13 October 2015 (13.10.15)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/070297

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SAWAI Toshihiro et al., Induction of cytotoxic T-lymphocyte and antibody responses against highly pathogenic avian influenza virus infection in mice by inoculation of apathogenic H5N1 influenza virus particles inactivated with formalin, Immunology, 2008, Vol.124, p.155-165, particularly, abstract, page 156, right column, "Influenza virus and vaccines"	11-13, 21, 22, 31
Y	SHE, Yi-Min et al., Surface modifications of influenza proteins upon virus inactivation by β -propiolactone, Proteomics, 2013, Vol.13, p.3537-3547, particularly, abstract, "1 Introduction"	11-13, 21, 22
Y	JP 2007-529997 A (Novavax, Inc.), 01 November 2007 (01.11.2007), particularly, paragraphs [0001] to [0002] & WO 2005/020889 A2 page 1, lines 4 to 27 & EP 1644037 A & US 2005/0009008 A1	11-13
A	DESOMBERE, Isabelle, Partial delipidation improves the T-cell antigenicity of hepatitis B virus surface antigen, Journal of Virology, 2006, Vol.80, No.7, p.3506-3514	1-31
A	CHAM, B. E., Delipidation of a hepadnavirus: Viral inactivation and vaccine development, Journal of Virological Methods, 2006, Vol.137, p.160-163	1-31
A	KITABWALLA, Moiz, Enhancement of cell mediated immune responses using lipid depleted lentivirus as immunogen: a novel approach for inducing recognition of new viral epitopes, Vaccine, 2005, Vol.23, p.4666-4677	1-31
A	KITABWALLA, Moiz, Delipidated retroviruses as potential autologous therapeutic vaccines-a pilot experiment, Experimental Biology and Medicine, 2008, Vol.233, No.6, p.732-740	1-31
A	JP 2010-514817 A (GlaxoSmithKline Biologicals S.A.), 06 May 2010 (06.05.2010), & US 2010/0143399 A1 & WO 2008/081014 A2 & EP 2099487 A	19

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K39/12(2006.01)i, A61K39/145(2006.01)i, A61K39/29(2006.01)i, A61P31/12(2006.01)i, A61P31/16(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K39/12, A61K39/145, A61K39/29, A61P31/12, A61P31/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 5 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 5 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 5 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2007-524383 A (リピッド サイエンシーズ, インコーポレイテッド) 2007.08.30, 特に、特許請求の範囲、【0001】、【0024】、【0052】～【0053】、【0064】～【0066】、【0070】～【0084】、実施例1～12	1-10, 14-18, 20, 23-30
Y	& WO 2005/016246 A2 (CLAIMS, 1頁7-22行、9頁15行-10頁12行、17頁10-17行、21頁3-26行、22頁10-28頁23行、EXAMPLE 1-12) & EP 1567188 A & CA 2529965 A & US 2005/0032222 A1	11-13, 21, 22, 31

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 6 . 1 0 . 2 0 1 5

国際調査報告の発送日

1 3 . 1 0 . 2 0 1 5

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 のぶよ

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 3 9

4 U

9 4 5 4

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	SAWAI Toshihiro et al., Induction of cytotoxic T-lymphocyte and antibody responses against highly pathogenic avian influenza virus infection in mice by inoculation of apathogenic H5N1 influenza virus particles inactivated with formalin, Immunology, 2008, Vol.124, p.155-165、特に、要約、156頁右欄 “Influenza virus and vaccines”	11-13, 21, 22, 31
Y	SHE, Yi-Min et al., Surface modifications of influenza proteins upon virus inactivation by β -propiolactone, Proteomics, 2013, Vol.13, p.3537-3547、特に、要約、“1 Introduction”	11-13, 21, 22
Y	JP 2007-529997 A (ノババックス インコーポレイテッド) 2007.11.01, 特に、【0001】～【0002】 & WO 2005/020889 A2 (1頁4-27行) & EP 1644037 A & US 2005/0009008 A1	11-13
A	DESOMBERE, Isabelle, Partial delipidation improves the T-cell antigenicity of hepatitis B virus surface antigen, Journal of Virology, 2006, Vol.80, No.7, p.3506-3514	1-31
A	CHAM, B. E., Delipidation of a hepadnavirus: Viral inactivation and vaccine development, Journal of Virological Methods, 2006, Vol.137, p.160-163	1-31
A	KITABWALLA, Moiz, Enhancement of cell mediated immune responses using lipid depleted lentivirus as immunogen: a novel approach for inducing recognition of new viral epitopes, Vaccine, 2005, Vol.23, p.4666-4677	1-31
A	KITABWALLA, Moiz, Delipidated retroviruses as potential autologous therapeutic vaccines-a pilot experiment, Experimental Biology and Medicine, 2008, Vol.233, No.6, p.732-740	1-31
A	JP 2010-514817 A (グラクソスミスクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム) 2010.05.06, & US 2010/0143399 A1 & WO 2008/081014 A2 & EP 2099487 A	19