

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3689337号
(P3689337)

(45) 発行日 平成17年8月31日(2005.8.31)

(24) 登録日 平成17年6月17日(2005.6.17)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 N 1/10
A 6 1 K 35/68
A 6 1 P 31/00
C 1 2 N 3/00
/(C 1 2 N 3/00C 1 2 N 1/10
A 6 1 K 35/68
A 6 1 P 31/00
C 1 2 N 3/00
C 1 2 N 3/00

請求項の数 25 (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-600682 (P2000-600682)
 (86) (22) 出願日 平成12年2月25日(2000.2.25)
 (65) 公表番号 特表2002-538784 (P2002-538784A)
 (43) 公表日 平成14年11月19日(2002.11.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2000/004733
 (87) 国際公開番号 W02000/050072
 (87) 国際公開日 平成12年8月31日(2000.8.31)
 審査請求日 平成13年8月27日(2001.8.27)
 (31) 優先権主張番号 60/122,160
 (32) 優先日 平成11年2月26日(1999.2.26)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 593141953
 ファイザー・インク
 アメリカ合衆国・ニューヨーク州・ニュー
 ヨーク・イースト・42nd・ストリート
 ・235
 (74) 代理人 100089705
 弁理士 社本 一夫
 (74) 代理人 100071124
 弁理士 今井 庄亮
 (74) 代理人 100076691
 弁理士 増井 忠次
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100096013
 弁理士 富田 博行

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 シスト及びオーシストの精製、回収及び胞子形成方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

オーシストの胞子形成方法であって、水と、好ましくない微生物の増殖を排除するために十分な量で存在する過酸化水素とを含むオーシストの水性懸濁液を形成する工程と；オーシストに胞子形成させる工程とを含む前記方法。

【請求項2】

該水性懸濁液に通気する工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】

該水性懸濁液を約72時間までの時間培養する、請求項1記載の方法。

【請求項4】

該水性懸濁液を約40～72時間培養する、請求項1記載の方法。

【請求項5】

培養中の該水性懸濁液が約22～約32の温度において飽和レベルの約80%より大きい溶解酸素レベルを有するように、該水性懸濁液に約40時間より長い時間にわたって、総ての固体を適当に懸濁させるために十分な攪拌レベルで培養する、請求項1記載の方法。

【請求項6】

該水性懸濁液が約 10^4 ～約 10^6 オーシスト/mlの濃度と、約1,000～約20,000 mg/lの初期過酸化水素濃度とを含む、請求項1記載の方法。

【請求項7】

10

20

オーシストがエイメリアオーシストである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

エイメリアオーシストがエイメリア・マキシマ (*Eimeria maxima*)、エイメリア・ミティス (*Eimeria mitis*)、エイメリア・テネラ (*Eimeria tenella*)、エイメリア・アセルブリナ (*Eimeria acervulina*)、エイメリア・ブルネッチ (*Eimeria brunetti*)、エイメリア・ネカトリックス (*Eimeria necatrix*)、エイメリア・プレコックス (*Eimeria praecox*) 及びこれらの組み合わせ由来のオーシストからなる群から選択される、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

オーシストの精製、回収及び孢子形成方法であって、オーシストを含む第 1 懸濁液からオーシストを分離する工程と、分離したオーシストに請求項 1 記載の方法によって孢子形成させる工程とを含む前記方法。

【請求項 10】

オーシストがエイメリアオーシストである、請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

エイメリアオーシストがエイメリア・マキシマ (*Eimeria maxima*)、エイメリア・ミティス (*Eimeria mitis*)、エイメリア・テネラ (*Eimeria tenella*)、エイメリア・アセルブリナ (*Eimeria acervulina*)、エイメリア・ブルネッチ (*Eimeria brunetti*)、エイメリア・ネカトリックス (*Eimeria necatrix*)、エイメリア・プレコックス (*Eimeria praecox*) 及びこれらの組み合わせ由来のオーシストからなる群から選択される、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

オーシストの分離が、塩フロテーション・プロセスによって達成される、請求項 9 記載の方法。

【請求項 13】

該塩が硫酸ナトリウム、硫酸カリウム、硫酸マグネシウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、リン酸マグネシウム、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、酢酸マグネシウム又はこれらの混合物を含む、請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】

該塩が硫酸ナトリウムを含む、請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

該塩が硫酸マグネシウムを含む、請求項 13 記載の方法。

【請求項 16】

該塩フロテーション・プロセスが、オーシストと塩を含む混合物を調製する工程と；該スラリーを遠心分離して、それから上澄み液を回収する工程と；上澄み液の希釈物を形成し、該希釈物を遠心分離する工程と；該遠心分離済み希釈物から濃縮物を回収する工程とを含む、請求項 12 記載の方法。

【請求項 17】

オーシストの分離が、第 1 懸濁液中の気泡と被のう原生動物との間の接着に影響を及ぼすために十分な pH に該第 1 懸濁液を調節する工程と；懸濁液中の粒子を選択的に被覆するために充分な量の界面活性剤化合物と、安定なフロスを生じるために充分な量の異極性化合物とを加えることによって該 pH 調節済み懸濁液をコンディショニングする工程と；該コンディショニング済み懸濁液を少なくとも 1 個のガスフロテーション・セルに通過させる工程と；該ガスフロテーション・セルから被のう原生動物を回収する工程とを含むガスフロテーション・プロセスによって達成される、請求項 9 記載の方法。

【請求項 18】

残留微生物を不活化し、残留有機物質を除去するために充分な量でブリーチング剤を孢子形成したオーシスト又は孢子形成するオーシストに加える工程と；該孢子形成したオー

10

20

30

40

50

シスト又は孢子形成するオーシストをブリーチングする工程とをさらに含む、請求項 9 記載の方法。

【請求項 19】

ブリーチング剤が過酸化水素である、請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】

ブリーチングが孢子形成と同時にされる、請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

過酸化水素が最初に約 2,000 ~ 約 20,000 mg / リットルの量で存在する、請求項 19 記載の方法。

【請求項 22】

該ブリーチング剤が約 5,000 ~ 約 10,000 ppm の量で存在する次亜塩素酸ナトリウム、フリーアベイラブル塩素、空気中に約 3 % までの量で存在するオゾン、又はこれらの組み合わせである、請求項 18 記載の方法。

【請求項 23】

クロス - フロー膜濾過によって該ブリーチング済みオーシストを洗浄して、該残留ブリーチング剤濃度を許容レベルまでに減ずる工程とをさらに含む、請求項 18 記載の方法。

【請求項 24】

ブリーチングされ、洗浄されたオーシスト懸濁液が約 1×10^6 ~ 約 2.5×10^6 オーシスト / ml の濃度、約 200 ミクロン未満の最大固体サイズ及び約 0.9 % 未満の塩含量を有する、請求項 23 記載の方法。

【請求項 25】

ブリーチングされ、洗浄されたオーシストを濃縮して、無菌濃縮物を得る工程と；1 種類以上の種のオーシストの無菌濃縮物を一緒にして、複合濃縮物を得る工程と；複合濃縮物を無菌条件下でパッケージングする工程とをさらに含む、請求項 23 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の背景)

本発明は一般に、ワクチンの製造に用いるための被のう原生動物(encysted protozoa)の精製、回収及び孢子形成方法に関する。原生動物は、ホストの胃腸管を襲うことが知られている病原菌である。ホストが例えば非常に若いホスト、非常に年取ったホスト及び免疫無防備状態ホストのように、弱い又は抑制された免疫系を有する状況では、感染が致命的でありうる。このような損失は経済的損失にもなりうる。原生動物は環境中に比較的安定なシスト(cyst)形態で存在し、この形態は、原生動物が孢子虫類である場合にはオーシスト(oocyst)とも呼ばれる。ホスト中に摂取されると、被のう原生動物は胃腸管の状態に応じて、ホストを感染させる。

【0002】

これらの疾患の問題を予防又は軽減するために、ノン - イン - オボ ワクチン(non-in-ovo vaccines)が開発されている。これらのワクチンは典型的に、疾患を発症させずにホスト中に免疫を発生させるために、ホストを低レベルの原生動物に暴露させる。このようなワクチンは、多くの種のコクシジウムのうちのいずれか 1 種から生じるトリコクシジウム症に対するワクチン(米国特許第 5,055,292 号)、トキソプラズマに対するネコのためのワクチン(米国特許第 5,045,313 号)、及びブタと他の反芻動物のためのワクチン(米国特許第 4,808,404 号)を包含する。これらのワクチンは胃管栄養によって与えるか又は動物の飲料水若しくは食物に加えなければならないので、これらのワクチンは部分的にのみ有効である。胃管栄養は手によるワクチン導入を必要とするので、胃管栄養は効果的ではない。さらに、多くのひな鳥(chicks)は取り扱いのために死ぬ。ワクチンを食物又は飲料水に加えることも、若いひな鳥は孵化直後には殆ど食べず、そのため疾患制御が遅延するので、効果的ではない。その結果、体重増加はあまり迅速ではなく、市場に出せる体重(market weight)に達するには長時間かかる。

【0003】

10

20

30

40

50

ワクチンを製造するためには、十分に精製された被のう原生動物が得られなければならない。現在の分離及び回収方法は、腐食性で、危険な有害物質を用いる。これらの物質を相殺するためには、例えば、低い生成物収率を生じる、これらの物質を除去するための広範囲な洗浄操作のような手段を行わなければならない。被のう原生動物を得るための典型的な方法は、例えば、感染した動物の腸又は糞便のような、被のう原生動物ソースを得ることを包含する。被のう原生動物から腸物質又は糞便物質を分離する必要がある、フロテーション方法が用いられる。重液 (heavy media) が塩化ナトリウム (米国特許第 4, 863, 731 号) 又はスクロース (米国特許第 5, 068, 104 号) である場合には、重液フロテーション (heavy media flotation) 又は沈降プロセスが用いられている。重液は水性混合物として用いられる。残念ながら、重液の水性混合物の使用は不利な効果を有する。例えば、塩化ナトリウムの水性混合物はひどい装置腐食をもたらす可能性がある。

10

【0004】

被のう原生動物が伝染性になりうる前に、分離したオーシストを軽度な酸化によって孢子形成させなければならない。軽度な酸化は懸濁液を振とう台 (shaking table) 上に置くか又はオーシストの懸濁液に通して空気をバブリング (bubbling) させるかのいずれかによって達成される。孢子形成中の好ましくない微生物増殖を抑制するために、重クロム酸カリウムが通常用いられる。しかし、重クロム酸カリウムは危険な物質である。その使用は取り扱い及び廃棄問題を生じる。その除去は結果として収量減少と費用増加を生じる。

【0005】

残留有機物質と望ましくない微生物とを除去するために、次亜塩素酸ナトリウムを用いる最終ブリーチング工程が用いられる。ブリーチングされた被のう原生動物は残留ブリーチング剤濃度を許容レベルまで減じるために洗浄されなければならない。一連の希釈とオーシスト回収操作によって洗浄が達成されて、ブリーチング剤レベルが減じられ、オーシスト濃縮物が得られる。最終的な被のう原生動物濃縮物は無菌条件下でワクチンに加工される。各ワクチンはできるだけ最大の保護度を与えるために多重種の原生動物を包含しうる。

20

【0006】

より効果的なワクチン接種方法 (vaccination method) の必要性が存在する。このようなワクチン接種方法は、免疫応答を発生させて、免疫を樹立する (build immunity) ために十分な、但し急性症状を惹起するほどではない低いレベルで投与される生ワクチンを用いる。例えば、トリコクシジウム症に対してのイン・オボ ワクチン (in-ovo vaccine) は処置時間を短縮することができ、より均一な投与を可能にする。この方法はクリプトスポリジウム (Cryptosporidium) 及びギアルディア・ラムブリア (Giardia lamblia) を含めた原生動物に対する保護のためのヒトワクチンを集めて、生産するためにも用いることができる。この方法は非腐食性濃厚媒質フロテーション・プロセス又は、塩の必要性を完全に除去するガスフロテーション・プロセスを用いる。この改良方法は例えば重クロム酸カリウムのような危険な殺生物剤を用いない。このような代替殺生物剤又はオキシダントはブリーチング剤としての役割りも果たすことができ、プロセスにおけるもう 1 つの工程ともう 1 つの危険な化合物とを排除する。

30

【0007】

(発明の概要)

本発明は、被のう原生動物の精製及び回収方法であって、被のう原生動物を含む懸濁液から、塩が例えば硫酸ナトリウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、塩化カルシウム若しくはこれらの混合物である塩フロテーション・プロセス、又はガスフロテーション・プロセスによって被のう原生動物を分離することを含む前記方法に関する。

40

【0008】

1 実施態様では、被のう原生動物の分離方法が塩フロテーションによって達成され、塩が硫酸ナトリウムである。この実施態様では、方法は被のう原生動物とを硫酸ナトリウムとを含む混合物を調製する工程と；該スラリーを遠心分離し、それから上澄み液を回収する工程と；該上澄み液の希釈物を形成し、該希釈物を遠心分離する工程と；遠心分離した希

50

積物から濃縮物を回収する工程とを包含する。この実施態様は、該混合物を非常に強度な均質化によってホモジナイズする工程をさらに包含することもできる。該混合物中に、硫酸ナトリウムは約 3 ~ 約 30 重量 % の量で存在する。さらに、希釈物の比重は被のう原生動物の比重よりも小さくなりうる。該濃縮物は約 $1 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^6$ 被のう原生動物 / ml を含む。

【0009】

他の実施態様では、被のう原生動物の分離がガスフロテーション・プロセスによって達成される。このガスフロテーション・プロセスは、該懸濁液中の気泡と被のう原生動物との間の接着に影響を及ぼすために十分な pH に該懸濁液を調節する工程と；懸濁液中の粒子を選択的に被覆するために十分な量の界面活性剤化合物と、安定なフロス (froth) を生じ 10
るために十分な量の異極性化合物とを加えることによって該 pH 調節済み懸濁液をコンディショニングする工程と；該コンディショニング済み懸濁液を少なくとも 1 個のガスフロテーション・セルに通過させる工程と；該ガスフロテーション・セルから被のう原生動物を回収する工程とを包含する。適当なガスは空気を包含する。ガスが空気であるときに、pH を約 2.5 ~ 約 3.5 に調節することができる。該界面活性剤化合物は長鎖アルキル水素スルフェートのナトリウム塩、第 4 級アンモニウム化合物、脂肪アンモニウムアセテートと 2 - エチルヘキサノールとのブレンド、エステル / アミド化合物、アルキルオキシポリエチレンオキシエタノール、又はこれらの混合物を包含する。該異極性化合物はアミルアルコール、ブチルアルコール、テルピノール、クレゾール、又はこれらの混合物を包含する。ガスフロテーション・セルの適当なガス流量は、ガス約 0.25 ~ 約 1.1 量 / 20
懸濁液量 / 分の範囲である。好ましい実施態様では、ガスフロテーション・セルは少なくとも 2 個の連続ガスフロテーション・ユニットを含み、これらのユニットは異なるガス流量を有しうる。

【0010】

本発明はまた、オーシストの孢子形成方法であって、水と、好ましくない微生物の増殖を排除するために十分な量で存在する過酸化水素とを含むオーシストの水性懸濁液を形成する工程と；該水性懸濁液に通気して、オーシストに孢子形成させる工程とを含む前記方法にも関する。エアレーション (aeration) 中の該水性懸濁液が約 22 ~ 約 32 の温度において飽和レベルの約 80 % より大きい溶解酸素レベルを有し、総ての固体を適当に懸濁させるために十分な攪拌レベルを有しうるような条件下で、該水性懸濁液に約 40 時間より長い時間にわたって通気することができる。この実施態様では、水性懸濁液は約 $10^4 \sim 10^6$ オーシスト / ml のオーシスト濃度と、約 1,000 ~ 約 20,000 mg / リットルの過酸化水素濃度とを包含することができる。 30

【0011】

他の実施態様では、本発明は、オーシストの精製、回収及び孢子形成方法であって、オーシストを含む第 1 懸濁液からオーシストを分離する工程と、分離したオーシストに本発明の方法によって孢子形成させる工程とを含む前記方法を包含する。適当なオーシストは、エイメリア・マキシマ (Eimeria maxima)、エイメリア・ミティス (Eimeria mitis)、エイメリア・テネラ (Eimeria tenella)、エイメリア・アセルブリナ (Eimeria acervulina)、エイメリア・ブルネッチ (Eimeria brunetti)、エイメリア・ネカトリックス (Eimeria necatrix)、エイメリア・プレコックス (Eimeria praecox) 及びこれらの組み合わせである。1 実施態様では、オーシストの分離が、オーシストと硫酸ナトリウムとを含む混合物を調製する工程と；該スラリーを遠心分離して、それから上澄み液を回収する工程と；上澄み液の希釈物を形成し、該希釈物を遠心分離する工程と；該遠心分離済み希釈物から濃縮物を回収する工程とを含む硫酸ナトリウム・フロテーションによって達成される。 40

【0012】

他の実施態様では、オーシストの分離が、第 1 懸濁液中の気泡と被のう原生動物との間の接着に影響を及ぼすために十分な pH に該第 1 懸濁液を調節する工程と；懸濁液中の粒子 50

を選択的に被覆するために十分な量の界面活性剤化合物と、安定なフロスを生じるために十分な量の異極性化合物とを加えることによって該pH調節済み懸濁液をコンディショニングする工程と；該コンディショニング済み懸濁液を少なくとも1個のガスフロテーション・セルに通過させる工程と；該ガスフロテーション・セルから被のう原生動物を回収する工程とを包含するガスフロテーション・プロセスによって達成される。この実施態様はさらに、残留微生物を不活化し、残留有機物質を除去するために十分な量でブリーチング剤を孢子形成したオーシストに加える工程と；該孢子形成したオーシストをブリーチングする工程とをさらに包含しうる。他の実施態様では、ブリーチングが孢子形成と同時にわれ、ブリーチング剤が過酸化水素である。さらに他の実施態様では、該ブリーチング剤は約5,000～約10,000ppmの量で存在する次亜塩素酸ナトリウム、フリーアベイラブル塩素(free available chlorine)、空気中に約3%までの量で存在するオゾン、又はこれらの組み合わせである。

10

【0013】

この方法はさらに、クロス・フロー膜濾過(cross-flow membrane filtration)によって該ブリーチング済みオーシストを洗浄して、残留ブリーチング剤濃度を許容レベルまでに減ずる工程をさらに包含しうる。さらに他の実施態様では、ブリーチング剤は、残留微生物の増殖を抑制するために十分な濃度で洗浄後に存在する次亜塩素酸ナトリウムであり、ブリーチングされ、洗浄されたオーシスト懸濁液が約 1×10^6 ～約 2.5×10^6 オーシスト/mlの濃度、約200ミクロン未満の最大固体サイズ及び、シスト又はオーシストの生存能力と伝染性(infectivity)とに影響を及ぼさないほど十分に低く、好ましくは約3%未満、より好ましくは約0.9%未満の量で存在する硫酸ナトリウムを有する。この方法はさらに、ブリーチングされ、洗浄されたオーシストを濃縮して、無菌濃縮物を得る工程と；1種類以上の種のオーシストの無菌濃縮物を一緒にして、複合濃縮物を得る工程と；複合濃縮物を無菌条件下でパッケージングする工程とをさらに包含しうる。

20

【0014】

(発明の詳細な説明)

本発明は、ワクチンに用いられる、シスト又は孢子形成したオーシストの濃縮物の製造に関する。詳しくは、この方法は、コクシジウム症に対するイン・オボ ワクチンの生産に用いられる、孢子形成したトリコクシジウム・オーシストの濃縮物の製造に関する。適当な、許容されるワクチンの生産は、複数の単位プロセスから成る多重工程処理プロセスを必要とする。図1Aと図1Bに示すように、ワクチン生産プロセスは、被のう原生動物の懸濁液を用意する工程と、該懸濁液をホモジナイズする工程と、塩フロテーション若しくはガスフロテーションのいずれかによって該懸濁液から被のう原生動物を分離する工程と、必要な場合に被のう原生動物に孢子形成させる工程と、孢子形成した被のう原生動物をブリーチングする工程と、ブリーチングした生成物を洗浄する工程と、被のう原生動物を濃縮する工程と、多重被のう原生動物からの濃縮物を一緒にする工程と、無菌充填して、ワクチンを生産する工程を包含しうる。これらの工程は以下でさらに詳細に説明する。

30

【0015】

シスト及びオーシストを包含する被のう原生動物は、精製懸濁液、腸裏層(intestinal linings)及び糞便懸濁液を含めた、種々なソースから得ることができる。被のう原生動物が糞便から得られる場合には特に、懸濁液又はスラリーはかなりの量の好ましくない懸濁固体を包含しうる。例えば、懸濁液は約1重量%から約20重量%までの固体又は糞便を包含しうる。好ましくは、懸濁液は、塩フロテーションを用いる場合は約5～約20重量%の固体を包含し、ガスフロテーションを用いる場合は約1重量%の固体を包含する。懸濁液中の会合有機物質(associated organics)からシストを遊離させるために、懸濁液を均質化工程にさらすことができる。均質化の強度に依存して、懸濁液を約0分間より長く約5分間までの時間、好ましくは1分間にわたってホモジナイズすることができる。均質化はシスト及びオーシストを遊離させるために十分に強度で、但しそれらの分解を防止するほど穏やかであるべきである。

40

【0016】

50

被のう原生動物はこの第1懸濁液から、好ましくは少なくとも約70%の被のう原生動物回収率と少なくとも約80%固体排除(rejection)を達成するほどに、分離する必要がある。典型的に、これは約 1×10^4 ~ 約 1.5×10^6 被のう原生動物/mlの被のう原生動物濃度を生じる。分離は塩フロテーション・プロセス又はガスフロテーション・プロセスのいずれかによって達成することができる。

【0017】

塩フロテーション・プロセスを用いる場合には、未精製被のう原生動物と塩との混合物が調製される。適当な塩溶液は、アンモニウム、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム及び亜鉛の塩化物、硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩及び酢酸塩を含めた水溶性塩の濃厚溶液を包含する。適当な高水素結合有機物(highly hydrogen-bonded organics)は尿素と、グアニジエン(guanidiane)の塩を包含する。好ましくは、塩は硫酸ナトリウム、塩化ナトリウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、塩化カルシウム、及びこれらの混合物を包含する。より好ましくは、塩は硫酸ナトリウムである。これらの塩はプロセス装置に対して有意に低腐食性であるという利益を生じる。塩は、被のう原生動物の比重と混合物の比重との間に差を生じるために十分な量で加えられる。好ましくは、被のう原生動物の比重は混合物の比重よりも小さい。塩は約3 ~ 約30重量%、好ましくは約14 ~ 約20重量%、より好ましくは約20重量%の量で存在する。

【0018】

次に、混合物を遠心分離し、上澄み液と濃縮物とを回収する。混合物の状態に依存して、被のう原生動物を上澄み液又は濃縮物のいずれかに含めることができる。混合物を約3000 ~ 約15,000g、好ましくは12,000gにおいて、被のう原生動物を十分に分離するために必要な時間にわたって、典型的には約10分間まで遠心分離する。20%硫酸ナトリウム溶液では、被のう原生動物は上澄み液中に含まれるので；上澄み液を回収して、濃縮物又はペレットを廃棄物に向ける。図2に示すように、20%の硫酸ナトリウム濃度は上澄み液(生成物)中に高濃度の被のう原生動物(この場合には、オーシスト)を与え、ペレット(廃棄物)中にごく少量の被のう原生動物を与える。回収した上澄み液に水を添加して、希釈物を形成する。被のう原生動物の比重が希釈物の比重よりも大きいように、上澄み液を十分に希釈する。それ故、被のう原生動物は希釈物中で沈降する傾向がある。20%の硫酸ナトリウム濃度に関して、希釈物重量の、上澄み液重量に対する比率は約4 ~ 約8である。

【0019】

次に、残留塩濃度が約10重量%未満、好ましくは約1重量%未満であり、生じるシスト濃度が約 10^4 ~ 10^6 シスト/mlであって、約80 ~ 約95%の回収率を表すように、希釈物を第1遠心分離におけると同様な遠心分離条件下で再度遠心分離する。固体デブリ(debris)排除率は好ましくは約90 ~ 約99%である。この実施態様では、被のう原生動物は濃縮物から回収され、上澄み液は廃棄物に向けられる。

【0020】

他の実施態様では、被のう原生動物の分離がガスフロテーション・プロセスによって達成される。好ましくは、ガスは空気であるが、酸素及び窒素を包含する任意のガスを用いることができる。ガスフロテーションを用いる場合には、懸濁液のpHを、被のう原生動物の表面化学の変更によって懸濁液中の気泡と被のう原生動物との接着に影響を及ぼすために十分なpHに調節する。このpHは典型的に約2 ~ 約9、好ましくは約2.5 ~ 3.5、より好ましくは約3のpHに調節される。

【0021】

pH調節済み懸濁液をさらに、時にはコレクター化合物(collector compound)と呼ばれる界面活性剤化合物と、時にはフロサー化合物(frother compound)と呼ばれる異極性化合物とを添加することによってコンディショニングする。選択的洗剤、湿潤剤又は乳化剤とも呼ばれる界面活性剤化合物を、フロートさせるべき粒子上に薄い被膜を形成し、これらの粒子を疎水性にするが、他の粒子は被覆しないことによって、選択された固体と気泡との間の接触を促進するために十分な量で加える。それ故、界面活性剤化合物の選択によって

10

20

30

40

50

、フロートさせるべき粒子を決定することができる。それ故、被のう原生動物を、被のう原生動物がフロートされるガスフロテーション・プロセスにおいて又は除去されるべき固体がフロートされる逆フロテーション・プロセスにおいて回収することができる。適当な界面活性剤は長鎖アルキル水素スルフェートのナトリウム塩、第4級アンモニウム化合物、脂肪アンモニウムアセテートと2-エチルヘキサノールとのブレンド、エステル/アミド化合物、アルキルオキシポリエチレンオキシエタノール、又はこれらの混合物を包含する。好ましくは、界面活性剤化合物はラウリル硫酸ナトリウムである。界面活性剤は、フロートされる粒子を被覆するために十分な量で存在すべきである。界面活性剤はコンディショニング済み懸濁液中に約0.5~2 lb/トン固体、好ましくは0.5 lb/トン固体の量で存在する。或いは、界面活性剤化合物は、中性pHが得られるまで塩酸によって酸性化されている約0.5 lbドデシルアミン/トン固体、又は約0.5 lbオレイン酸カリウム塩/トン固体でありうる。

10

【0022】

異極性化合物は、それらが水の表面張力を変化させ、安定なフロスを生じることができるために、選択される。典型的に、これらの異極性化合物は1つの極性基に結合した1つ以上の炭化水素基を含有し、該炭化水素ラジカルは5又は6個以上の炭素原子を有する。適当な異極性化合物はアミルアルコール、ブチルアルコール、テルピノール、クレゾール及びこれらの混合物を包含する。好ましくは、異極性化合物はメチルイソブチルカルビノール(MIBC)であり、これはメチルアミルアルコールとも呼ばれ、最も正確には4-メチルペンタノール-2と呼ばれる。異極性化合物は安定なフロスを生じるために十分な量で存在する。好ましくは、異極性化合物は約2.0 lb/トン固体までの量、より好ましくは約0.5~2.0 lb/トン固体、最も好ましくは約0.5 lb/トン固体の量で存在する。

20

【0023】

コンディショニング済み懸濁液をガスフロテーション・セルに通過させ、被のう原生動物を回収する。選択したpH、界面活性剤化合物及び異極性化合物に依存して、被のう原生動物はフロートされうるか又は懸濁液中に保持されうる。好ましくは、被のう原生動物はフロートされる。ガスフロテーション・プロセスは、約20~100%、好ましくは約85%の被のう原生動物を回収し、約20~90%、典型的に70%の固体デブリを排除するために十分な時間にわたって、十分な空気流量で行われる。ガスフロテーション・プロセスは約3分間から約10分間を超えるまでの時間、好ましくは約10分間にわたって行われる。空気フロテーション・セル中のガス流量はガス約0.25~約1.1量/溶液量/分("vvm")、好ましくは約0.25~約0.83vvm、より好ましくは約0.25~約0.75vvmである。ガスフロテーション・セルは複数個の連続フロテーション・ユニットを含有しうる。好ましくは、ガスフロテーション・セルは少なくとも2個の連続フロテーション・ユニットを包含する。好ましくは、フロテーション・ユニットはガスフロテーション・カラムである。連続フロテーション・ユニットにおけるガス流量は同一であることも、異なることも可能である。好ましくは、ガス流は異なり、例えば32インチ高さ、2インチ直径カラムでは約0.47vvmであり、60インチ高さ、2インチ直径カラムでは約0.27vvmである。

30

40

【0024】

被のう原生動物がオーシスト又は被のう胞子虫類(encysted sporozoa)であるときに、オーシストは胞子形成している。図3に示すように、胞子形成はオーシストの回収後できる限り早く起こるべきであり、好ましくは、オーシストは回収後3日間以内に胞子形成すべきである。オーシストとオキシダント又は殺生物剤との水性懸濁液を調製し、オーシストに胞子形成させるために十分な時間にわたって、該水性懸濁液に通気する。オーシストを分離するために塩フロテーション・プロセスを用いた場合には、胞子形成中の塩濃度は約10重量%未満、好ましくは約2重量%未満、より好ましくは約1重量%未満であるべきである。好ましくは、胞子形成中のシスト濃度は約 10^4 ~約 10^6 オーシスト/ml、より好ましくは、約 10^5 オーシスト/mlである。オーシストは、精製シスト濃縮物の

50

回収後約1～24時間以内に、孢子形成するべきである。水性懸濁液のpHは約5.0～7.0、好ましくは約5.2～6.8であるべきである。1実施態様における水性懸濁液の温度は約20～約33、好ましくは約22～約32、より好ましくは約25～約29、最も好ましくは約25である。1実施態様における通気速度は約0.1～約10vvm、好ましくは約0.1～約2.0vvmである。全体として、攪拌レベルは、孢子形成中に総ての固体を完全に懸濁させるために充分であるが、オーシストを破壊するほどではないレベルであるべきである。これはエアレーション、振とう、攪拌及びこれらの組み合わせによって発生しうる。例えば、攪拌を用いる場合には、攪拌は懸濁液の固体を懸濁状態に維持するために充分であるが、シスト又はオーシストを破壊するほどではない攪拌であるべきである。6インチ直径容器中の適当な攪拌は約121～204rpm、好ましくは約197～200rpm、より好ましくは約200rpmにおいて生じうる。溶解酸素含量は、オーシストに孢子形成させるために充分なレベル、好ましくは一定温度における飽和濃度の約80%に維持されるべきである。孢子形成のための時間は約72時間まで、好ましくは約40～約72時間、より好ましくは約48～約50時間でありうる。

【0025】

オキシダントは、水性懸濁液中の好ましくない微生物増殖を不活化するために充分な量で加えられる。適当なオキシダント、又は殺生物剤は過酸化水素、オゾン、重クロム酸カリウム、塩素及びこれらの組み合わせを包含する。1実施態様では、オキシダントは重クロム酸カリウムであり、約2.5v/w%の量で存在する。好ましい実施態様では、オキシダントは、約1,000～約20,000mg/リットル、好ましくは約5,000mg/リットルの量で存在する過酸化水素である。過酸化水素は容易で、費用のかからない取り扱いという利益を与え、このプロセスからの危険な廃棄副生成物の発生は緩和される。

【0026】

エアレーションは、シェーカー台(shaker table)上での振とう又は孢子形成タンク(例えば、発酵タンク)中での空気スパーキング(air sparging)によって達成することができる。好ましくは、エアレーションは空気スパーキングタンク中で達成される、この理由は、空気の質量移動が大きく、そのために孢子形成のための時間及び装置の必要なサイズを減少させるからである。

【0027】

孢子形成後に、必要な場合には、オーシストを洗浄して、残留オキシダント濃度を許容レベルにまで減ずることができる。過酸化水素はこの工程の必要性を排除するという利益を与える。洗浄は連続的洗浄によって達成されることができ、好ましくは、洗浄は膜濾過によって、より好ましくは透析濾過(diafiltration)によって達成される。膜濾過の場合には、膜の孔度は、膜を通しての溶質の通過を可能にするが、膜の片側から他方の側へのオーシストの通過を制限するように選択される。1実施態様では、洗浄は水によって、約30psiまで、好ましくは約20～約25psiの膜内外圧力差(transmembrane pressure)、約10m/s、好ましくは約2m/sのクロスフロー速度(crossflow velocity)、及び約10リットル/分/m²まで、好ましくは約3リットル/分/m²の膜を通してのフラックス(flux)において行われる。

【0028】

残留微生物を不活化し、残留有機物質を排除するために、オーシストをブリーチングすることができる。最初に、充分な量のブリーチング剤を加えてから、オーシストを、充分な時間、ブリーチング剤によってブリーチングするか又はブリーチング剤と接触させる。オーシストを1.5時間までの期間にわたってブリーチングすることができる。適当なブリーチング剤は次亜塩素酸ナトリウム、過酸化水素、オゾン及びこれらの混合物を包含する。ブリーチング剤は最初に約2,000～約20,000mg/リットル、好ましくは約8,000～約10,000mg/リットル、より好ましくは8000mg/リットルの量で存在することができる。ブリーチング剤はプロセス装置において腐蝕を惹起するほどの量で存在すべきではない。過酸化水素を孢子形成のために用いる場合には、ブリーチングと孢子形成とを同時に行うことができる。ブリーチング後に、必要な場合には、ブリー

10

20

30

40

50

チング済み懸濁液を洗浄して、残留オキシダント濃度を許容レベルまで減ずることができる。次亜塩素酸ナトリウムがブリーチング剤である場合には、許容レベルは約 1 mg / リットル未満である。洗浄は連続洗浄又は透析洗浄のいずれかによって達成されうる。

【0029】

ブリーチング済み懸濁液を濃縮して、効果的で、有効な取り扱いのために十分に高い濃度を有する無菌濃縮物を得ることができる。例えば、最終的濃縮被のう原生動物懸濁液は約 200 ミクロン未満、好ましくは約 25 ミクロン未満の最大固体サイズと、約 0.9 % 未満の塩含量と、約 1 mg / リットル未満であるが残留微生物増殖の抑制を維持するために十分な遊離残留塩素濃度と、約 $1 \times 10^6 \sim 2.5 \times 10^6$ シスト / ml のシスト濃度とを包含することができる。

10

【0030】

非常に多くの被のう原生動物又は 1 つの属の異なる種の被のう原生動物を単一ワクチンの生産に用いる予定である場合には、該異なる種からの無菌濃縮物を一緒にして、単一無菌濃縮物を得る。例えば、被のう原生動物は、それぞれの多重菌株 (multiple strains) を包含する、エイメリア・マキシマ (*Eimeria maxima*)、エイメリア・ミティス (*Eimeria mitis*)、エイメリア・テネラ (*Eimeria tenella*)、エイメリア・アセルブリナ (*Eimeria acervulina*)、エイメリア・ブルネッチ (*Eimeria brunetti*)、エイメリア・ネカトリックス (*Eimeria necatrix*)、エイメリア・プレコックス (*Eimeria praecox*) 及びこれらの組み合わせを包含するトリコクシジウムオーシストでありうる。最後に、一緒にした濃縮物に対して無菌条件下で充填及びパッケージングを行って、ワクチンが生産される。

20

【0031】

本発明の好ましい実施態様を説明したが、本発明が非常に多くの種類の動物及びヒトのための他のワクチンを生産するために使用可能であることは理解される。この方法は実際に、例えばクリプトスポリジウム (*Cryptosporidium*) 及びギアルディア・ラムブリア (*Giardia lamblia*) のような、典型的な水生原生動物 (water borne protozoa) に対してヒトを免疫化するために用いることができる。さらに、全体的な回収プロセスを説明したとしても、その単位プロセスを、本発明の範囲又は要旨から逸脱することなく、独立的に用いるか又は他の回収、モニタリング又は処置スキーム中に挿入することができる。

30

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 A は、本発明の第 1 部方法の実施態様を説明するフローチャートである；図 1 B は、本発明の第 2 部方法の実施態様を説明するフローチャートである。

【図 2】 図 2 は、硫酸ナトリウム濃度に対するオーシスト濃度を示すプロットである。

【図 3】 図 3 は、シスト回収後の時間に対する孢子形成 % を示すプロットである。

【図 1】

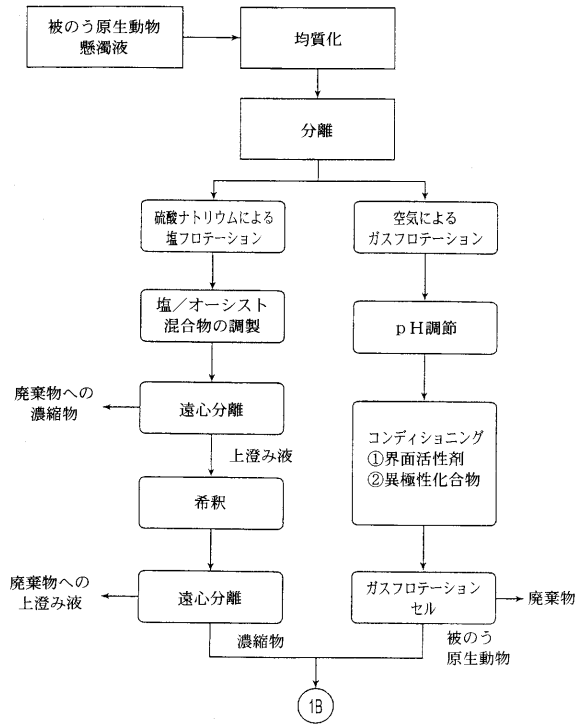


Fig. 1A

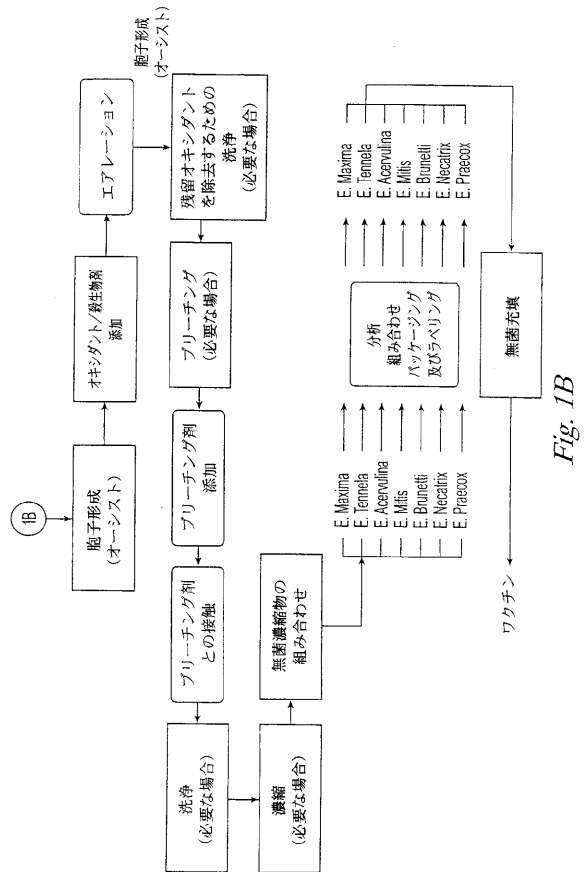
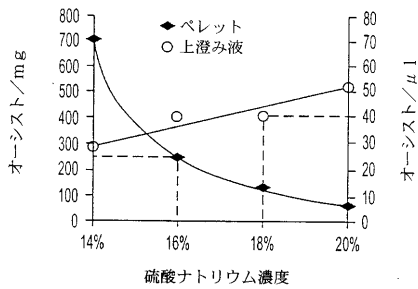
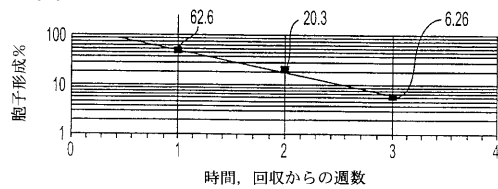


Fig. 1B

【図 2】



【図 3】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷ F I
C 1 2 R 1:90) C 1 2 R 1:90

(74)代理人 100091638

弁理士 江尻 ひろ子

(72)発明者 コンクル, ハロルド・エヌ

アメリカ合衆国オハイオ州4 3 2 2 0, コロンバス, カーニング・コート 8 7 5

(72)発明者 プロニゲン, スコット・ジェイ

アメリカ合衆国オハイオ州4 3 0 2 6, ヒリヤード, ブリックスシャー・ドライブ 4 6 5 1

(72)発明者 ワーナー, ティモシー・エム

アメリカ合衆国オハイオ州4 3 2 1 2, コロンバス, ブロードビュー・アベニュー 1 3 2 7

(72)発明者 シュルツ, ジョセフ・イー

アメリカ合衆国カリフォルニア州9 3 0 1 2, カマリロ, バランカ・ロード 1 1 6 7 5

(72)発明者 キラノウスキ, デーヴィッド・アール

アメリカ合衆国オハイオ州4 3 0 1 7, ダブリン, ラッシュウッド・ドライブ 5 7 8 3

(72)発明者 テュークスバリー, テッド・エル

アメリカ合衆国オハイオ州4 3 2 2 8, コロンバス, ディーアリック・ドライブ 1 3 0 9

(72)発明者 モンズイク, ブルース

アメリカ合衆国オハイオ州4 3 0 1 5, デラウェア, ブレイシー・ロード 7 4 6 0

(72)発明者 クックシー, チャド・エム

アメリカ合衆国オハイオ州4 3 2 2 0, コロンバス, パーリントン・クラブ・ドライブ 4 6 7 7

(72)発明者 ウェーバー, フレッド・エイチ

アメリカ合衆国インディアナ州4 7 8 0 3, テラ・ホート, フェニックス・コート 1 5 9

(72)発明者 マッカーサー, ハミッシュ・エイ・アイ

アメリカ合衆国コネチカット州0 6 3 3 5, ゲールズ・フェリー, フェザント・ラン・ドライブ
1 9

審査官 田村 明照

(56)参考文献 英国特許出願公開第0 2 0 0 8 4 0 4 (GB, A)

米国特許第0 5 0 6 8 1 0 4 (US, A)

特開平0 2 - 0 3 5 0 8 5 (JP, A)

米国特許第0 5 0 5 5 2 9 2 (US, A)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

C12N 1/10

BIOSIS/WPI (DIALOG)