世界知的所有権機関
国際事務局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 **C12N 7/00, A61K 39/15, G01N 33/569**	**A1**	(11) 国際公開番号 **WO98/17785** (43) 国際公開日 1998年4月30日(30.04.98)

(21) 国際出願番号 PCT/JP97/03777

(22) 国際出願日 1997年10月20日(20.10.97)

(30) 優先権データ
特願平8/312547 1996年10月18日(18.10.96) JP

(71) 出願人（米国を除くすべての指定国について）
財団法人 阪大微生物病研究会
(THE RESEARCH FOUNDATION FOR MICROBIAL DISEASES OF OSAKA UNIVERSITY)[JP/JP]
〒565 大阪府吹田市山田丘3番1号 大阪大学内 Osaka, (JP)
(72) 発明者；および
(75) 発明者／出願人（米国についてのみ）
中込 治(NAKAGOMI, Osamu)[JP/JP]
中込とよ子(NAKAGOMI, Toyoko)[JP/JP]
〒010 秋田県秋田市柳田字境田19番地8 Akita, (JP)
村上茂樹(MURAKAMI, Shigeki)[JP/JP]
今川 忠(IMAKAWA, Tadashi)[JP/JP]
〒768 香川県観音寺市八幡町2丁目9番41号
財団法人 阪大微生物病研究会 観音寺研究所内 Kagawa, (JP)

(74) 代理人
弁理士 西澤利夫(NISHIZAWA, Toshio)
〒150 東京都渋谷区宇田川町37-10
麻仁ビル6階 Tokyo, (JP)

(81) 指定国 CA, CN, ID, JP, KR, MX, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類
国際調査報告書

(54)Title: **ROTAVIRUS ANTIGENS, VACCINES AND DIAGNOSTIC DRUGS FOR INFECTION WITH ROTAVIRUS, AND PROCESSES FOR PRODUCING THE SAME**

(54)発明の名称 ロタウイルス抗原、ロタウイルス感染症ワクチン及び診断剤、並びにこれらの製造方法

(57) Abstract

A process for producing rotavirus antigens characterized by cloning, from cultured cells, those allowing an ample growth of rotavirus which can be hardly cultured on a large scale, subculturing and conditioning the rotavirus in the cell clone strain thus obtained to thereby give a cell clone-conditioned rotavirus strain, culturing as a seed virus this strain or a reassortant constructed by using the same as the parent strain, and then isolating and purifying a rotavirus antigen from the culture; and vaccines and diagnostic drugs for infection with rotavirus produced by using these antigens. These antigens, vaccines and diagnostic drugs largely contribute to fundamental studies and clinical application relating to infection with rotavirus.

（５７）要約

この発明は、量産培養が困難なロタウイルスの増殖を高度に許容する細胞を培養細胞からクローニングし、得られた細胞クローン株にロタウイルスを継代し馴化させることにより細胞クローン馴化ロタウイルス株を作成し、この馴化ロタウイルス株又はこれを親株に用いて作成したリアソータントをシードウイルスとして培養し、その培養物よりロタウイルス抗原を単離・精製することを特徴とするロタウイルス抗原の製造方法と、この方法により得られたロタウイルス抗原、この抗原を用いて製造されたロタウイルス感染症ワクチン及び診断剤を提供する。これらの抗原、ワクチン及び診断剤は、ロタウイルス感染症に関する基礎研究及び臨床応用の各分野に大きく寄与する。

ＰＣＴに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたＰＣＴ加盟国を同定するために使用されるコード（参考情報）

AL アルバニア
AM アルメニア
AT オーストリア
AU オーストラリア
AZ アゼルバイジャン
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ
BB バルバドス
BE ベルギー
BF ブルキナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
BY ベラルーシ
CA カナダ
CF 中央アフリカ
CG コンゴー共和国
CH スイス
CI コートジボアール
CM カメルーン
CN 中国
CU キューバ
CY キプロス
CZ チェッコ
DE ドイツ
DK デンマーク
EE エストニア
ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB 英国
GE グルジア
GH ガーナ
GN ギニア
GR ギリシャ
HU ハンガリー
ID インドネシア
IE アイルランド
IL イスラエル
IN インド
IS アイスランド
IT イタリア
JP 日本
KE ケニア
KG キルギス
KP 北朝鮮
KR 韓国
KZ カザフスタン
LC セントルシア
LI リヒテンシュタイン
LK スリランカ
LR リベリア
LS レソト
LT リトアニア
LU ルクセンブルグ
LV ラトヴィア
MC モナコ
MD モルドヴァ
MG マダガスカル
MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国
ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
MX メキシコ
NE ニジェール
NL オランダ
NO ノールウェー
NZ ニュージーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア
RU ロシア
SD スーダン
SE スウェーデン
SG シンガポール
SI スロヴェニア
SK スロヴァキア
SL シエラ・レオーネ
SN セネガル
SZ スワジランド
TD チャード
TG トーゴー
TJ タジキスタン
TM トルクメニスタン
TR トルコ
TT トリニダッド・トバゴ
UA ウクライナ
UG ウガンダ
US 米国
UZ ウズベキスタン
VN ヴィェトナム
YU ユーゴースラヴィア
ZW ジンバブエ

明細書

ロタウイルス抗原、ロタウイルス感染症ワクチン及び診断剤、並びにこれらの製造方法

技術分野

この発明は、細胞培養による量産が困難なロタウイルス抗原、ロタウイルス感染症ワクチン及び診断剤、並びにこれらの製造方法に関するものである。さらに詳しくは、この発明は、ロタウイルス感染症の予防と診断に有用なワクチン及び診断剤と、これらの有効成分であるロタウイルス抗原に関するものである。とりわけ、この発明は、ヒト・ロタウイルス感染症の予防と診断に寄与するものである。

背景技術

ロタウイルスは、ヒト、サル、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウサギ、ネズミ、ニワトリ、シチメンチョウ等の下痢症の病原体であり、全世界に広く分布している。特にヒトでのロタウイルス感染症は乳児嘔吐下痢症、冬季乳児下痢症、白色便下痢症、小児仮性コレラ等として注目されており、その予防及び診断が今や世界的規模で待望されている。

このロタウイルスについては、以下が明らかになっている。

形態とゲノム構造:

国際ウイルス分類委員会の第6回報告によれば、このウイルスは、レオウイルス科に属し、エンベロープを有さず、内外二重(その中間層を含め合計3層)のキャプシド構造からなる直径約 70 nm の正20面体であり、内側キャプシドの中心部に直径約 50 nm のコアを有する。このコア内部にゲノムが存在

し、そのゲノムは 11 分節の線状2本鎖RNAからなり、これ等のゲノム分節の大きさは 0.6-3.3 kbp の範囲にある("Virus Taxonomy: Sixth Report of the International Committee of Taxonomy of Viruses", Archives of Virology, Supplement 10, pp.219-222, 1995)。

遺伝子型と血清型:

上記の11ゲノム分節のうち、特に、第4ゲノム分節、及び第9ゲノム分節(株により第7又は第8ゲノム分節のことがある)がワクチン及び診断剤の開発では注目されている。また、世界各地で分離されるロタウイルス株はAからFまでの6群(serogroupes)に、各群は種々の血清型(serotypes)に分類され、また、遺伝子型(genotypes)による大別も便宜的に試みられいる。これ等の分離株の抗原性及び遺伝子型は共に多様である("Fields Virology", 3rd ed., vol.2, pp.1625-1629, B.N.Fields ら編, Lippincott-Raven Publishers 1996,USA)。以下、この点につて説明する。

第4ゲノム分節はウイルス粒子の表面にスパイク状に露出している構造タンパクVP4をコードし、このVP4の機能は、血球凝集素、中和抗原、プロテアーゼが促進する感染性、病原性、膜融合、細胞への付着等にあることが報告ないしは推定されている。ロタウイルス株は、このVP4のアミノ酸配列とその遺伝子RNAあるいはcDNAの相同性に基づき、現在、20の遺伝子型(以下、「P遺伝子型」という)に、また、中和試験に基づき10又は14の血清型(以下、「P血清子型」という)にそれぞれ分類されている。

第9ゲノム分節(株によっては第7又は第8ゲノム分節)は、ウイルス粒子の外側キャプシドVP7をコードし、このVP7の機能は、中和抗原エピトープ、2つの疎水性領域等の保有にあることが報告ないしは推定されている。ロタウイルス株は、このVP7の中和試験に基づき14の血清型(以下、「G血清子型」という)に分類されている。

ウイルス株の分類:

既報の多数の多様な分離株(前記"Fields Virology", 3rd ed., vol.2, p.1627)のうち、前記のA群に属するヒト・ロタウイルス代表株と、本発明者らが分離し報告した次の3株:AU-1(Journal of Clinical Microbiology, 25, 1159-1164, 1987);AU32(Microbiology and Immunology, 34, 77-82, 1990);AU64(Archives of Virology, 19, 67-81, 1991)の分類の概要は表1に例示したとおりである。

表1

株名	G血清型P血清型[遺伝子型]
Wa	G1P1A[8]
DS-1	G2P1B[4]
P	G3P1A[8]
AU-1	G3P3 [9]
Hochi	G4P1A[8]
ST3	G4P2A[6]
AU32	G9P1A[8]
AU64	G1P1B[4]

血清型の検出頻度:

世界各地のロタウイルスのG血清型の検出頻度に関する約20の研究報告によれば、日本、欧米諸国、オーストラリア、中央アフリカ等ではG1型が約60-85%と主流を占め、残りは主にG2型とG3型である。一方、インド、タイ、バングラディッシュ、メキシコ等ではG1、G2、G3及びG4型が散発して検出され、これらの合計率が約 20-80%にわたると共に、これ等以外の他の型の散在が顕著に見られる。

ウイルスの培養:

サルや家畜等から分離されたロタウイルスは通常、培養細胞で比較的容易

に増殖するので、その培養ないし継代培養は必ずしも困難ではない。ところが、ヒト・ロタウイルスの細胞培養による培養では、ウイルス抗原が生産されても感染性ウイルス粒子は連続して継代され得ないという、いわゆる不発感染(abortive infection)により、その継代培養は極めて困難である。そのため、低増殖能ヒト・ロタウイルスとサルやウシ等の高増殖能ロタウイルスとの間でリアソータント(reassortant)を作成し、ヒト・ロタウイルスの増殖能の向上を図る工夫や、また、トリプシンで前処理したヒト・ロタウイルスをサル由来の細胞株 MA104(ECACC No.85102918)や AGMK(African Green Monkey Kidney)細胞に接種した後、トリプシンを添加混合した維持培地を用いて回転培養する等の工夫が図られている。現在では後者の回転培養により、ほとんどのA群に属するヒト・ロタウイルスの実験室内での直接培養や分離が可能になっている。しかし、この回転培養であっても、ワクチンや診断剤の製造に必要な量のウイルス抗原を得ることはできない。また、上記のA群以外のロタウイルスの培養あるいは継代培養は、現在もなお困難な状態にある。

ウイルス培養の宿主:

ロタウイルスの増殖を許容する(permissive)感受性細胞培養としては、前記の MA104 や GMK 細胞以外に、FBK(Fetal Bovine Kidney)、CMK(Cercopithecus Monkey Kidney)、MK(Crab-eating Macaque Kidney)等の各細胞、また、サル由来の CV-1、FRh L2、BSC-1、Vero、イヌ由来の MDCK、ヒト小腸上皮由来の CaCO-2 等の各細胞株が知られている(WO 92/01784、特開平 06-328107、前記"Fields Virology", 3rd ed., vol.2, pp.1647-1648, pp.1661-1662)。さらに、ワクチンの製造を目的とするロタウイルス抗原の量産においては、他のウイルスワクチンの製造に用いられている Vero、DBS-FLC-1、DBS-FLC-2、DBS-FRh L2、ESK-4、HEL、IMR-90、MRC-5、MRC-9、WI-38、WRL68 等の細胞株が利用できる

("ATCC Microbes & Cells at Work", 2nd ed., p.144, American Type Culture Collection 1991, USA)。

ワクチン:

ヒト・ロタウイルス感染症ワクチンは、1985 年頃から種々の開発が試みられている。その主流は、天然痘ワクチンと同様に、抗原性が類似の非ヒト由来の弱毒ウイルスをワクチンとして代用する、いわゆるジェンナー方式(Jennerian Approach)による生ワクチンの開発である。例えば、ウシ又はサル由来の弱毒ウイルス、ヒト・ウシ両者又はヒト・サル両者由来のウイルス2株間での弱毒リアソータント等を用いる生ワクチンの臨床試験が知られている(WO 92/01784; EPO 130906; 特開平 06-328107; "Modern Vaccinology", pp.213-229, E.Kurstak 編, Plenum Medical Book Company 1994, USA; "Vaccines", 2nd ed., pp.809-822, S.A.Plotokin and E.A.Mortimer 編, W.B.Saunders Company 1994, USA; "The Jordan Report-Accelarated Development of Vaccines 1996", p.46 and p.68, National Institute of Health 発行, USA)。しかしながら、これ等の生ワクチンあるいはその経口投与に関する臨床試験データが蓄積するにつれ、予防効果が不十分であるという判断が強まり、現在では上記ジェンナー方式とは別の着想に基づくワクチン製造が模索されている。

診断剤:

ポリクローナルあるいはモノクローナル抗体を用いる抗原検出が主流になっており、例えば、EIA(Enzyme Immunoassay)ないし ELISA(Enzyme-linked Immunosorent Assay)、ラテックス凝集法、受身赤血球凝集反応等のキットが市販されている。また、PAGE-SS(polyacrylamide gel electrophoresis with silver stain)や PCR(polymerase chain reaction)

等による遺伝子レベルでの診断が開発されている(“Priciples and Practice of Infectious Disease”, 4th ed.,vol.2, pp.1450-1451, G.L.Mandell ら編, Churchill Livingstone 1995, USA)。しかし、ウイルス抗原を用いて抗体検出する診断剤は流布していないので、患者における各種抗体の消長に関するデータは、ロタウイルス感染症の解明並びに予防と治療の対策に極めて有用であるにも拘らず不足ぎみである。

この発明は、以上のとおりのヒト・ロタウイルスに関する事情に鑑みてなされたものであって、細胞培養によるロタウイル抗原の量産が困難な現状を克服し、ロタウイルス感染症ワクチン及び診断剤の製造に必要なロタウイルス抗原の多量製造法を提供することを目的としている。

またこの発明は、上記方法により得られた抗原、この抗原を用いて製造したロタウイルス感染症ワクチン及び診断剤を提供することを目的としている。

発明の開示

この出願は、前記の課題を解決するものとして、以下の発明を提供する。

すなわち、第1の発明は、ロタウイルスの増殖を高度に許容する細胞を培養細胞からクローニングし、得られた細胞クローン株にロタウイルスを継代し馴化させることにより細胞クローン馴化ロタウイルス株を作成し、この馴化ロタウイルス株又はこれを親株に用いて作成したリアソータントをシードウイルスとして培養し、このシードウイルスの培養培地よりロタウイルス抗原を単離・精製することを特徴とするロタウイルス抗原の製造方法である。

この第1発明は、培養細胞が Vero 細胞(ATCC CCL 81)であることを好ましい態様としている。

また、この第1発明は、細胞クローン株が Vero CL-9(FERM BP-6028)であることを別の好ましい態様としている。

さらにまた、この第1発明は、ロタウイルスがヒト・ロタウイルス株 AU32n 及

び／又はAU64nであることをさらに別の好ましい態様としている。

第2の発明は、上記の方法により得られたロタウイルス抗原である。

第3の発明は、上記第2発明のロタウイルス抗原をさらに不活化剤で不活化することにより調製された不活化抗原である。

第4の発明は、上記第2発明のロタウイルス抗原、又は第3発明の不活化抗原を、免疫を奏する量含有するロタウイルス感染症ワクチンである。

第5の発明は、上記第2発明のロタウイルス抗原、又は第3発明の不活化抗原であって、血清型又は遺伝子型が互いに異なる2種以上の抗原をそれぞれ、免疫を奏する量含有する混合多価ロタウイルス感染症ワクチンである。

第6の発明は、上記第2発明のロタウイルス抗原、又は第3発明の不活化抗原を、抗原抗体反応を呈する量含有する診断剤である。

第7の発明は、細胞クローン株Vero CL-9(FERM BP-6028)である。

第8の発明は、細胞クローン馴化ヒト・ロタウイルス株AU32nである。

第9の発明は、細胞クローン馴化ヒト・ロタウイルス株AU64nである。

なお、この出願において、「細胞クローン株」とは、単一細胞の子孫のみからなるクローンの培養細胞を意味する。

「馴化」とは、ウイルス培養に用いる細胞の種類や温度等が一定の条件下でウイルスの量産が可能になるよう、ウイルス増殖能の変異又は選択を図り、その増殖能を合目的化することを意味する。例えば、或る細胞に馴化させたウイルスはその細胞で、また、低温馴化ウイルスはその低温でそれぞれ良好に増殖する。

「感受性」とは、ウイルスの増殖を許容する細胞の性質“permissive”を意味する。例えば、「ロタウイルス感受性細胞」とは、その細胞においてロタウイルスの増殖あるいは培養が可能なことを意味する。

「細胞クローン馴化ウイルス株」とは、細胞クローン株に継代培養し、馴化させたウイルスを意味する。

その他の用語については、以下の発明の最良形態の説明において明らかにする。

発明を実施するための最良の形態

この出願の各発明は、以下の第１～第４工程を順次行うことにより実施される。

第１工程：細胞培養からロタウイルスの増殖を高度に許容する細胞、すなわち、高度感受性細胞をクローニングする。

第２工程：前工程で得られた細胞クローン株にロタウイルスを継代培養し、馴化させることにより細胞クローン馴化ロタウイルス株、すなわち、細胞クローン株おいて極めて旺盛あるいは高度に増殖する馴化ロタウイルス株を作成する。必要に応じて、この馴化ロタウイルス株を親株に用いてリアソータントを作成する。なお、第１行程で使用するロタウイルスは、この第２行程で培養するロタウイルスと同一のものである必要なない。

第３工程：前工程で得られた馴化株又はリアソータントをシードウイルスとし、このシードウイルスを大量培養することにより、ロタウイルス抗原、すなわち、ロタウイルスの完全粒子、不完全粒子、抗原性タンパク、ゲノム、遺伝子等を量産する。

第４工程：前工程で得られた完全粒子、不完全粒子、抗原性タンパク、ゲノム、遺伝子等を精製、加工ないしは修飾することによりワクチン、診断剤、試薬等を調製・製造する。

上記の工程順に以下、順を追って説明する。

第１工程で用いる培養細胞：

ロタウイルスの増殖を高度に許容する細胞をクローニングするための対象となる培養細胞としては、先に、背景技術の“*ウイルス培養の宿主*”の欄に記載

した種々の細胞あるいは細胞株を用いることができる。なお、使用に際しては、これ等のうち、為害性迷入因子や癌遺伝子の存在が否定された培養細胞、例えば、Vero 細胞(ATCC CCL 81)の使用が望ましい。

第2工程で用いるロタウイルス:

前工程で得た細胞クローン株に継代し、馴化させるロタウイルスとしては、前記文献(“Fields Virology”, 3rd ed., vol.2, p.1627, Archives of Virology, 19, 67-81, 1991 等)に記載の分離株、あるいは任意のロタウイルス株が使用できる。特に、細胞培養での継代が困難な株、あるいは抗原生産量の増収が期待されるウイルス株への適用が好ましい。例えば、AU-1、AU32、AU64 等の公知株、並びにこの発明が提供する、ワクチン製造用ウイルス株としての継代歴が的確な新規ヒト・ロタウイルス株 AU32n 及び AU64n 等である。

細胞培養培地とウイルス増殖培地:

公知や市販の培地、例えば、199 培地、MEM(Eagle's Minimum Essential Medium)培地、BME(Eagle's Basal Medium)培地、Hanks 液、 Dulbecco のリン酸緩衝液(PBS)等を使用できる。これ等の組成と調製法は、ウイルス実験、細胞培養、組織培養等に関する常用テキスト(例えば、“Cells & Tissue Culture; Laboratory Procedures”, 全2巻, A.Doyle et al.編, John Wiley & Sons 1993, USA)や市販製品カタログ等に詳述されている。また、このような培地や塩類溶液は、補助剤ないしは添加剤を添加混合して修飾することもできる。添加剤としては、常用の物質、例えば、市販のヒト血清、ウシ胎児血清 FCS(Fetal Calf Serum)、抗生物質、炭酸水素ナトリウム溶液、塩化ナトリウム、非必須アミノ酸等から適宜選択し、適量使用できる。例えば、培地1リットル当たりに添加混合する添加剤の最終濃度は、血清

類は約 3-25%(V/V)、炭酸水素ナトリウムは約 1-6 g、塩化ナトリウムは約 0.1-0.25 モル、また非必須アミノ酸は製品カタログに記載の標準量が望ましい。特に、ロタウイルス増殖培地にはプロテアーゼあるいはトリプシンを添加混合するのが好ましいことが知られている。なお、ロタウイルス増殖培地中のトリプシンの最終濃度は約 0.1-10 μ g/ml である。

細胞培養と細胞クローニング:

細胞株の植え継ぎないしは継代は、通常、細胞培養培地で約 10^5-4×10^5 細胞／ml の細胞浮遊液を調製し、この浮遊液を培養容器の容積の約 1/10－1/5容、例えば100ml容器なら約10-20 ml植え込み、約37℃で培養する。また、容器内の底面上でモノシートを形成した細胞を培養容器面から剥離し、細胞を分散させるには、通常、Ca 及び Mg 両イオンを除いた PBS で調製した最終濃度約 0.25%(W/V)トリプシン液により行う。

細胞のクローニングは、常法(前記"Cells & Tissue Culture; Laboratory Procedures", vol.1, pp.4B:3)により行うことができる。例えば、培養細胞モノシートをトリプシン液で剥離した後、細胞培養培地に分散させ、遊離単一細胞の浮遊液(約 1-5 細胞/ml)を調製の後、これを培養容器、例えば、シャーレやマイクロテストプレート等に植え込み、培養することにより、単一細胞の子孫のみからなるクローンを作成する方法(コロニー形成法)により行うことができる。得られたコロニーごとに個別に培養して細胞数を増やせば、クローン化細胞ないしは細胞クローン株が得られる。

ウイルスの培養と継代馴化:

細胞培養を宿主とするウイルス培養の温度は通常、約 20-37℃であり、培養日数は約2－16日である。静置培養や回転培養を採用できる。培養後の培養液上清はウイルス浮遊液としてウイルス継代に供する。ウイルス継代は、

ウイルス浮遊液を、順次、新たに培養した細胞に接種しウイルスを増殖させることにより行う。このウイルス継代を特定細胞において約２－５０回、好ましくは約３－２０回繰り返し行うことにより、その細胞で優れて高度に増殖する特定細胞馴化ウイルス株を得ることができる。また、この馴化ウイルス株を親株に用い、他のウイルス株との間でリアソータントを作成することにより、馴化ウイルス株の高度増殖能を別のウイルス株に移入できる。例えば、紫外線（UV波長 280nm）を照射して感染性を失活させたロタウイル株と、上記馴化ウイルス株（親株）とを混合培養し、両株ウイルスのゲノム分節の reassortment を誘導した後、抗親株中和抗体で親株ウイルスを失活させ除去することにより、生き残りの感染性ウイルスがリアソータントとして得られる。

ロタウイルスに対する高度感受性細胞クローン株の選別:

細胞クローンごとにロタウイルスを接種して培養し、ウイルスの増殖により生産される感染ウイルス数、ウイルス粒子数、又はウイルス抗原量を測定する。この場合、MOI（multiplicity of infection）の違いによる増殖の程度、いわゆる、ウイルス接種量の違いによるウイルス生産量の高低を後述の方法で測定することも大切である。このような測定値を指標としてウイルスが高度に増殖する細胞クローンをスクリーニングすることにより、高度感受性細胞クローン株を得ることができる。上記の測定は、例えば、プラック形成法（PFU: plaue forming unit の計数）、フォーカス形成法（FFU: focus forming unit の計数）、ELISA、IME（immune elctron microscopy）等により行うことができる。なお、FFUの計数はウイルスの感染・増殖により形成される感染細胞領域を蛍光色素FITC（fluorescein isothiocyanate）で標識した抗体で染色する蛍光抗体法、EIA（enzyme immunoassay）等により行うことができる。

ウイルスとその抗原の量産・調製:

高度感受性細胞クローン株の細胞培養を宿主に用い、この細胞株への馴化ウイルス株を培養することにより、ウイルス及びその抗原を量産する。具体的には、培養終了後、例えば、ウイルス培養液を低速遠心した上清(例えば、ドライアイスと有機溶媒で凍結融解したウイルス感染細胞の浮遊液を低速遠心した上清等)を採取することにより、完全ウイルス粒子とその抗原を調製できる。なお、このような調製物は、ウイルス浮遊液をそのまま使用することもできる。この浮遊液は、膜濾過法により除菌可能であり、抗生物質を添加することもできる。また、これ等の浮遊液液中のウイルス抗原は、膜濃縮法、密度勾配超遠心法、蔗糖クッションを用いる超遠心法等により濃縮かつ精製できる。例えば、蔗糖溶液層をクッションとして、その上にウイルス浮遊液を重層し、超遠心にかけ、ウイルス抗原を遠心管底に沈降させた後、その沈降物を再浮遊液して精製ウイルス抗原を調製できる。

ワクチン原液の調製:

上記ウイルス浮遊液又は精製ウイルス抗原を用いてワクチン原液を調製できる。なお、ワクチン用抗原として、ウイルス浮遊液中の完全ウイルス粒子、不完全ウイルス粒子、ビリオン構造タンパク、例えば VP4、VP7、中和反応エピトープ領域、構造タンパクの翻訳後修飾体等、またビリオン非構造タンパクとその翻訳後修飾体、感染防御抗原等を使用できる。かかるワクチン用抗原は常用の不活化剤で固定化することにより立体構造を安定化できる。不活化剤としては、例えば、ホルマリン、フェノール、グルタルジアルデヒド、β－プロピオラクトン等をワクチン原液の調製の前又は後に添加して用いることができる。ホルマリンを使用する場合、その添加量は約 0.005-0.5%(V/V)、不活化温度は約 2-38℃、不活化時間は、約 5-180 日である。ただし、不活化により抗原性が損なわれる場合には、不活化条件を緩和するための創意工夫を要

する。例えば、不活化剤の減量、中性アミノ酸や塩基性アミノ酸等の添加、不活化温度の低下等である。また、不活化工程で残存する遊離ホルムアルデヒドは、必要なら、等量の亜硫酸水素ナトリウムを添加してこれを中和するか、透析により除去できる。以上により得られた調製物をワクチン原液として次の工程に供する。

ワクチンの調製:

前記のワクチン原液を、例えば培地 BME で希釈し、ワクチン中の抗原量が抗体産生に必要な量になるよう調整する。

その際、ワクチンの耐熱性を増強する安定化剤や、免疫原性を高める補助剤としてのアジュバントを添加混合できる。例えば、安定化剤として糖類やアミノ酸類、また、アジュバントとして鉱物油、植物油、ミョウバン、リン酸アルミニウム、ベントナイト、シリカ、ムラミルジペプチド誘導体、サイモシン、インターロイキン等を利用できる。

また、粘膜免疫あるいは局所免疫の誘導を目的として、ワクチン原液中のウイルス抗原を加工あるいは修飾できる。これには、例えばリポソーム、エマルジョン、マイクロカプセル、マイクロスフェアー、ポリ乳酸、ポリグコール酸等を用いるDDS(drug delivery system)に関係した技術を適用できる。

次いで、上記のワクチン溶液を適当な容積、例えば約 1-20 ml 容のバイアルに分注し、密栓・密封した後、ワクチンとして使用に供する。このワクチンは、液状のみならず、分注後に凍結乾燥を行うことにより、乾燥製剤として使用に供することができる。また、経口投与を目的として、ワクチン原液を、例えばシロップ状や飴玉状等に加工することも可能である。

なお、調製したワクチン製剤は、使用に供する前、すなわち、その製造工程下及び小分品の段階でその品質を保証するため、安全性と有効性に関する検定を行い、ワクチンとしての適格性を確認する必要がある。このような検定

は、この発明のロタウイルスワクチンと類似の製剤に関する基準、例えば、薬事法（昭和３５年法律第１４５号）並びに昭和３５年・厚生省告示第３１５号及び昭和３６年・厚生省告示第３３７号改正に基づく「生物学的製剤基準」に定める「不活化急性灰白髄炎ワクチン基準」の規程、上記薬事法並びに平成５年・厚生省告示第２１７号に基づく「生物学的製剤基準」に定める「日本脳炎ワクチン」及び「乾燥日本脳炎ワクチン」の両規程、あるいは上記薬事法並びに平成 ６年・厚生省告示第３３２号に基づく「生物学的製剤基準」に定める「乾燥組織培養不活化Ａ型肝炎ワクチン」の規程等に準拠して行うことができる。

ワクチンの用法:

ワクチン接種は、例えば、1ドーズ約 0.25-0.5 ml を皮下接種する; 1ドーズ約 1.0 ml を飲用する; 約 0.05 ml を口腔内に注入する等により行うことができる。なお、これらの接種は約２－４週間隔で１－３回程度行うのが好ましい。ただし、ワクチンの用法は上記の例にのみ限定される分けではない。

診断剤の調製:

前記と同様にして、ウイルス浮遊液、精製抗原等を調製し、これ等を診断用抗原（例えば、沈降反応、凝集反応、中和反応、蛍光抗体法、酵素免疫測定法、ラジオイムノアッセイ等の抗原）として提供できる。また、診断用抗原やワクチン原液を動物（例えば、ウサギ、モルモット、マウス等）の腹腔内、皮下、筋肉内等に接種し、この動物の血清から抗体を作成できる。この抗体は、例えば、上記の各種診断法での抗原検出用として提供できる。なお、この発明に係る診断用の抗原や抗体は、これ等の診断剤中の含量が、抗原抗体反応を生じるに必要な量となるよう希釈調整し使用に供する。さらに、この発明に係るロタウイルスのゲノム及び遺伝子断片は、例えば、遺伝子診断における

プローブ試薬や同定試薬として提供できる。

以下、実施例を示してこの発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明は以下の例に限定されるものではない。

実施例1

(1) 細胞のクローニング:

細胞培養培地として最終濃度 9%(V/V)の FCS(Gibco 社製・米国)を添加混合したMEMを用い、培養面積 25 cm^2の容器内で Vero 細胞(ATCC CCL 81)を 37℃で培養し、モノシートを形成させた。そのモノシートを 0.25% (W/V)トリプシン(トリプシン 1:250; Difco 社製・米国)液で培養容器面から剥離し、細胞を分散させて遊離単一細胞にした後、低速遠心(1,500rpm, 5分)により細胞を集め、上記の培養培地にて細胞数2細胞/mlの遊離単一細胞の浮遊液を調製した。この浮遊液を、組織培養用96ウェルのマイクロテストプレート(Falcon Microtest Ⅲ Plate; Becton Dickinson 社製・米国)の各ウェルに 0.2 ml ずつ植え込み、炭酸ガス培養器内で 37℃、14 日間培養し、各ウェル面に単一細胞の子孫のみからなるコロニーを形成させた。これ等の各コロニーの細胞を順次、より大きな培養容器を用いて3回植え継ぎ、細胞数を増やすことにより、合計40の各 Vero 細胞クローンの細胞浮遊液を得た。

(2) ロタウイスル感受性細胞クローン株のスクリーニング:

上記(1)で得た合計40の各細胞クローンごとにロタウイルスを培養・増殖させ、各培養上清の中のロタウイルス抗原量をELISAで測定し、クローニング前の Vero 細胞に比べ、著しく抗原価の高い細胞クローン株の検索を、以下の a)-c)のとおりに行った。

a) 各細胞クローンにおけるウイルスの培養:

上記の各細胞クローンごとに前記マイクロテストプレート(96 ウェル: 横 8 × 縦 12 ウェル)の横列8ウェルを割り当て、合計40の各クローンの細胞浮遊液

をそれぞれ 0.2ml/ウェル植え込み、37℃で培養し、各クローンのモノシートを形成させた後、各ウェルの培養液を血清無添加の新鮮 MEM と交換し、さらに一夜培養した。次に、これ等の各ウェル内の細胞に、後述するウイルス増殖培地(ただし、トリプシン最終濃度 20 μ g/ml)で 37℃、20分間のトリプシン処理により活性化したロタウイルス AU64 株を 0.05 ml/ウエル接種し、37℃で30分間、静置して細胞にウイルスを吸着させた後、ウイルス増殖培地として最終濃度 0.5 μ g/ml のトリプシン(トリプシン type IX; Sigma 社製・米国)を加えた MEM を 0.2 ml/ウェル添加し、37℃で7日間、ウイルスを培養し増殖させた。培養終了後の各ウェル内の培養液はウイルス浮遊液(検体)として下述のウイルス抗原量の測定に供した。なお、比較対照として、クローニング前の前記 Vero 細胞を用いた。

b) ウイルス抗原量の測定(一次スクリーニング):

pH9.6 の 50 mM 炭酸緩衝液にてA群ロタウイルスに対する抗体(モルモット過免疫血清から精製したIgG)を希釈し、濃度1.0 μ g/mlの抗体液を調製した。この抗体液をELISA用96ウェルのテストプレート(ELISA-PLATE; Greiner社製・ドイツ)に0.1 ml/ウェル添加し、4℃で一夜静置し、抗体をウェル表面に吸着させた。吸着後、洗浄液[最終濃度 0.05%(W/V)の tween 20 含有 PBS]で各ウェルを洗浄した。一方、前述の各ウイルス浮遊液を抗原希釈液[ブロックエース(雪印乳業社製)を脱イオン水で 10 倍希釈]で5倍希釈し調製した各検体を上記の各ウェルに 0.1ml 添加し、25℃で 90 分間、1次反応させた。次いで、上記洗浄液でウェルを洗浄の後、前記の抗原希釈液で 2,000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗 rotavirus ヤギ抗体(Viro Stat 社製・米国)を 0.1ml/ウェル加え、再度 25℃で 90 分間、2次反応させた。次いで、各ウェルは前記の洗浄液で洗浄の後、基質溶液[最終濃度 0.4 mg/ml の o-フェニレンジアミン(和光純薬社製)及び 35%(V/V)の過酸化水素液(和光純薬社製)含有 0.5M クエン酸ーリン酸緩衝液(pH5.0)]を 0.1ml/ウェ

ル添加し、室温で10分間、ペルオキシダーゼによる発色反応を行い、4規定の硫酸を 0.05ml/ウェル追加して反応を停止させた。反応停止後、波長490nm の単色光で各ウェルの吸光度(OD)を計測した。以上の一次スクリーニングの結果、比較対照の OD に比べ、5倍以上の OD を示す6検体を、細胞クローン株の候補として選定し、下述する二次スクリーニングに供した。

c) ウイルス抗原量の測定(二次スクリーニング):

前述(1)と同様にして上記候補6株の各細胞クローンをマイクロテストプレートで培養すると共に、各ウェル内の細胞で AU64 株ウイルスを培養し増殖させた。ただし、ウイルス浮遊液は MOI の違いによる増殖の程度を見るため、4倍階段希釈し、希釈1段階につき縦1列・横列2ウェルを割り当てた。また、ウイルス抗原量の測定は一次スクリーニングと同様にELISAで行った。その結果、ロタウイルスの増殖を高度に許容する高度感受性の細胞クローン3株を得、これ等の株をそれぞれ Vero CL-9(FERM BP-6028)、Vero CL-16、及び Vero Cl-81-7 と命名した。

実施例2

ロタウイルスの馴化:

実施例1で得た Vero CL-9、Vero CL-16、及び Vero Cl-81-7 の各細胞クローン株、並びに比較対照としてのクローニング前の Vero 細胞をそれぞれ、細胞培養培地として MEM[最終濃度 9%(V/V)のFCS(Gibco 社製・米国)含有]を用い、37℃で培養し、各細胞のモノシートを形成させた。なお、培養容器として組織培養用試験管を各細胞株につき2本用いた。モノシート形成後、各容器の培地を血清無添加の新鮮な MEM と交換し、さらに一夜培養した。次に、各容器内の細胞に AU64 株ウイルス浮遊液 0.2 ml を接種し、37℃で60分間、静置して細胞にウイルスを吸着させた後、接種液を除き、ウイルス増殖培地として MEM[最終濃度 0.5 μg/ml のトリプシン type IX(Sigma 社製・

米国）含有]を1 ml/容器に添加し、 37℃で7日間、ウイルスを回転培養した。培養終了後、培養液を採取し、ウイルス浮遊液として－80℃で保存した。これ等の各ウイルス浮遊液を用いて同様のウイルス培養を繰り返し行うことにより、ウイルスを7代継代した。各継代のウイルス浮遊液につき、下述の蛍光抗体法（FA）及び酵素抗体法（EIA）により感染価FFUを測定した。

チェンバースライド（Nunc 社製・米国）内で上記と同様の方法により培養した各細胞クローン株及び比較対照細胞に10倍階段希釈した各継代のウイルス浮遊液を接種し、37℃で2日間培養の後、各細胞を固定し、次いで、間接FA及びEIAにより、FFUを計数した。細胞の固定は、PBS及び脱イオン水で順次、細胞を静かに洗浄の後、最終濃度 10%(V/V)メタノール添加アセトン中に室温で5分間、浸漬し行った。

なお、上記FAは、一次反応に抗ヒト rotavirus モルモット過免疫血清を、二次反応にはFITC標識モルモット IgG ヤギ IgG（Cappel 社製・米国）をそれぞれ用いて行った。

一方、EIAは、一次反応にA群 rotavirus に対するモルモット過免疫血清を、二次反応にはペルオキシダーゼ標識抗モルモット IgG ヤギ血清（Cappel 社製・米国）を、そして、発色反応には基質溶液[最終濃度 1mg/ml の 4-クロロ-1-ナフトール（Bio-Rad 社製・米国）、20%(V/V)メタノール、及び1/1,000 容の 35%(V/V)過酸化水素水加トリス塩酸緩衝液]をそれぞれ用いて行った。

以上に基づくFFUカウントの結果を表2に示す。実施例1で得た高度感受性の各細胞クローン株におけるロタウイルスの馴化は順調に進み、感染ウイルス量 log(FFU/ml)が、6.5 以上の継代ウイルスをクローン化 Vero 細胞馴化ウイルス株として－80℃に保存した。

表2

ウイルス	細胞クローン株			比較対照
継代数	Vero CL-9	Vero CL-16	Vero CL81-7	Vero CCL 81
1	5.3	4.8	5.1	2.7
2	5.8	5.3	5.5	2.7
3	6.0	5.4	5.7	2.8
4	6.7	6.0	6.2	—
5	6.9	6.1	6.4	—
6	7.2	6.2	6.6	—
7	7.3	6.5	6.8	—

数値：log (FFU/ml)
—：実施せず
Vero CCL 81：クローニング前の Vero 細胞(ATCC CCL 81)

実施例3

(1) 新規ヒト・ロタウイルス株 AU64n の分離：

AGMK(African Green Monkey Kidney)細胞を培養用試験管内で実施例1と同様にして培養し、モノシートを形成させた後、後述するウイルス分離材料を接種する前日に新鮮な無血清 MEM と培地交換した。

一方、ウイルス分離材料を次の通り調製した。ロタウイルス感染幼児の下痢便 0.1 g を MEM0.9 ml に浮遊し、この浮遊液に前述のトリプシン type IX を最終濃度が10 μg/ml になるよう添加混合の後、37℃で20分間保温した。次に、これを微量高速遠心機で遠心(10,000rpm, 30 秒)し、その上清を採取し、MEM で 10 倍希釈の後、経口 0.22 μm のフィルターで除菌濾過した。この濾液をウイルス増殖用培地(最終濃度 0.5 μg/ml のトリプシン type IX を添加混合した MEM)で10倍階段希釈し、ウイルス分離材料とした。

次に前記の AGMK 細胞の培地を捨て、各試験管内の細胞に上記ウイルス分離材料を 1 ml ずつ接種した。これを 37℃で1時間保温し、分離材料中のウイルスを細胞に吸着させた後、接種液を捨て、ウイルス増殖用培地(1 ml/試

験管)で細胞を1回洗浄した。次いで洗浄液を捨て、各細胞に新鮮なウイルス増殖用培地(1 ml/試験管)を添加し、回転培養した。この培養下でCPEが観察された細胞をその培養液と共に凍結融解することにより検体を調製し、各検体についてELISA(実施例1)により、ロタウイルス抗原の検出を行い、この抗原が陽性の検体を得、その検体の低速遠心上清を初代ウイルスとして下記の継代に供した。

(2) 新規ヒト・ロタウイルス株の継代:

上記の初代ウイルスに、最終濃度が10 μg/mlになるようトリプシン type IXを添加混合し、37℃で 90 分間、保温処理(以下「ウイルスの活性化」という)を行った後、これをMEMで10倍希釈し、前記(1)と同様にして、新鮮な下記の細胞に接種して培養し、ウイルスを連続継代した。その結果、AGMK 細胞5代、次にVero細胞(ATCC CCL81)5代、さらにVero CI-9細胞(FERM BP-6028)2代(以下、継代歴を"AGMK/5, Vero CCL81/5, Vero CL-9/2"の要領で表記する)からなるヒト・ロタウイルス株を得た。

なお、この新たに分離したヒト・ロタウイルス株の血清型及び遺伝子型は、発明者らによる既報(Microbiology and Immunology, 38(4), p.317-320, 1994)に記載された血清型及びウイルスゲノムRNAの電気泳動パターンを用いる方法により解析した結果、G1P1B[4]であることが確認された。この血清型及び遺伝子型は、表1に示した分類に従えば、AU64 株と同一であるため、この新規ヒト・ロタウイルス株をAU64nと命名した。

(3)AU64n株ウイルス"AGMK/5, Vero CCL81/5, Vero CL-9/2"の馴化:

プラーククローニングにより次の通り行った。炭酸ガス培養器中で、Vero CL-9細胞を6ウェル Falcon プレート(Becton Dickinson社製・米国)上でモノシートになるまで培養の後、培地を無血清MEMに置換し、さらに一昼夜培養した。次に、前述の通りトリプシンで活性化したAU64n株ウイルスをウイルス増殖用培地で10倍希釈の後、これを上記の細胞に1ml/ウェルずつ接種

した。37℃で1時間保温して細胞にウイルスを吸着させた後、接種液を捨て、アガー培地[最終濃度 0.7(W/V)%アガロース ME(FMCBIO PRODUCTS 社製・米国)及び 0.5 μ g/ml トリプシン type IXを添加混合の199培地]を2ml/ウェルずつ重層し、アガーが固化した後、プレートを反転し培養を続けた。ウイルス接種の後、4 日目及び7日目にそれぞれ上記のアガー培地を繰り返し重層して培養を続け、さらに 11 日目に色素[最終濃度 0.003(W/V)ニュートラルレッド(和光純薬社社製)を添加混合したアガー培地]を重層して培養し、細胞染色によりプラークを形成させ、12 日目に直径が大きく分離独立したプラークを採取(クローニング)した。次に、このプラークをMEMに浮遊し、前述(2)のウイルス継代と同様の方法により、Vero CL-9 細胞で一度ウイルスを増幅の後、再度、プラーククローニングを行った。このクローニングとウイルス増幅の操作を合計3回繰り返し行った後、さらに Vero CL-9 細胞で2代継代し、次いで4回目のプラーククローニングと増幅をそれぞれ行い、得られた AU64n 株ウイルスをさらに Vero CL-9 細胞に 1 代継代し、ヒト・ロタウイルス AU64n 株のオリジナルシード(継代歴は"AGMK/5, Vero CCL81/5, Vero CL-9/12)を作成した。各継代レベルでの感染価は、実施例2の記載と同様にして log(FFU/ml)を測定した結果、継代順に次の通りであった:

2.5, 3.7, 4.6, 5.4, 5.8(AGMK に5代継代);

2.8, 3.5, 3.6, 4.0, 4.4(Vero CCL81 に5代継代);

5.9, 6.4, 6.8, 7.0, 7.1, 7.1, 7.1, 7.2, 7.2, 7.2, 7.2, 7.2

(Vero CL-9 に 12 代継代)。

実施例4

(1) AU64n 株ウイルスの大量培養:

培養1回につきローラーボトル10本を用いてウイルスを大量培養し、これを合計8回繰り返し行った。すなわち、Falcon ローラーボトル(Becton

Dickinson 社製・米国、製品番号 3027)で回転培養した Vero CL-9 細胞の培地を無血清MEMと置換し、さらに一夜培養した後、培地を捨て、各ボトルの細胞に実施例3で得たAU64n株オリジナルシードを20ml/ボトル接種した。なお、このオリジナルシードはトリプシン type IXで事前に活性化した。次に、37℃で 1 時間、回転下で保温して細胞にウイルスを吸着させた後、接種液を捨て、新鮮なウイルス増殖用培地を80ml/ボトル添加し、37℃で2日間、回転培養した。培養終了後、各ボトルの培養物を凍結融解してウイルス浮遊液を調製し、これ等をプールした。次に、このウイルス浮遊液を低速遠心(3,000rpm, 10 分)の後、その上清(培養1回につき 800ml)を採取し、粗精製ウイルス浮遊液とした。合計8回培養により得られた各粗精製ウイルス浮遊液につき、実施例3の(3)記載と同様にしてウイルス感染価($\times 10^{6}$ FFU/ml)を測定した。その結果、得られたlog(FFU/ml)はそれぞれ、4.9, 5.5, 10.0, 7.0, 7.5, 8.0, 4.2, 及び 4.0 であった。

(2) AU64n 株ウイルスの精製:

上記の粗精製ウイルス浮遊液を用い、1.2 リットルを1ロットとする合計4ロットを編成し、各ロットのウイルスを次の通り精製した。各ロットの粗精製ウイルス浮遊液を遠心(10.000rpm, 10 分)した後、その上清を採取し、さらに超遠心(19,000rpm、6時間)を行い、その沈降物を 15mM PBS(pH7.5)に浮遊して 40ml とし、30 倍濃縮液とした。この濃縮液を遠心(10,000rpm、10 分)した後、その上清を採取し、これを 30(W/V)%蔗糖クッションに重層して超遠心(38,000rpm、3 時間)し、この超遠心後の沈降画分を 15mM PBS(pH7.5)に再浮遊し、精製 AU64n 株ウイルスを得た。再浮遊(6ml/ロット)した合計4ロットにつき、ウイルス感染価を測定すると共に、フェノール試薬法で蛋白量を定量した。その結果、各ロット(#1～#4)のウイルス感染価($\times 10^{8}$ PFU/ml)と[蛋白量(mg/ml)]はそれぞれ、#1:3.8[1.36]、 #2:4.8 [1.10]、 #3:3.3[0.94]、#4:1.3[1.57]であった。

（３） AU64n 株ウイルスの不活化：

上記の各ロット(#1～#4)から再浮遊液(精製 AU64n 株ウイルス)を 3ml ずつ採取し、プールした合計 12ml の再浮遊液当の蛋白量が 100 μ g/ml になるよう 15mM PBS(pH7.5)で希釈調整の後、最終濃度が 0.1(V/V) %になるようホルマリンを添加混合し、4℃で２週間静置した。次に、15mM PBS(pH7.5)に対し 5℃で 30 時間透析を行った。透析完了後の不活化ウイルス含有液につき、不活化ロタワクチン原液としての適格性を確認するため、各種試験を行った。すなわち、前述の生物学的製剤基準に定める「日本脳炎ワクチン」の規程に準拠し、たん白質含量試験、染色試験、無菌試験、不活化試験、及び異常毒性否定試験を行った。ただし、不活化試験は Vero CL-9 細胞を用いて行った。その結果、上記の不活化ウイルス含有液は、ワクチン原液として適格であることが確認された。

（４） ロタウイルス感染症ワクチンの調製：

上記のワクチン原液を 15mM PBS(pH7.5)で希釈し、蛋白量を 50 μ g/ml に調整することにより、不活化 AU64n ワクチンを調製した。一方、不活化しない前記４ロットから各々0.5ml ずつ採取し、プールした再浮遊(精製 AU64n 株ウイルス)の蛋白量を上記と同様にして 50 μ g/ml に調整し、生 AU64n 含有液とした。

（５） 不活化 AU64n ワクチンの免疫原性の測定：

不活化 AU64n ワクチンを、蛋白量 10 μ g/ドーズにて２週間隔で２回、4-5 週齢の ddY マウス(７匹)に接種し、その２週間目に全採血を行った。比較対照として、上記の生ＡＵ６４ｎ含有液及び 15mMPBS(pH7.5)の両者を用い、不活化 AU64n ワクチンと同様、前者は１９匹の、後者は１０匹のマウスにそれぞれ接種の後、全採血した。得られた各血清の AU64n 株に対する中和抗体価を 60%プラック減少法により測定した。結果は表３に示したとおりであり、このワクチンの優れた免疫原性が確認された。

表３

免疫に用いた抗原	中和抗体価±信頼限度
不活化 AU64n ワクチン	2.20±0.23
生 AU64n 含有液	2.30±0.12
15mM PBS(pH7.5)	≦1.60

中和抗体価：個々のマウスの抗体価（常用対数）の幾何平均値
信頼限界：危険率 5%

（６） 不活化 AU64n ワクチンの免疫特性：

不活化 AU64n ワクチンによる上記のマウス免疫血清（7 匹分）の、血清型又は遺伝子型が異なるロタウイルスに対する中和能を 60%フォーカス減少法により測定した。その結果を表４に示す。AU64n 株を有効成分として用いるワクチンは、AU64n 株だけではなく、P血清型と遺伝子型とが異なるWa株、及びG血清型が異なるDS-1 株の両者の感染防御に有効であるとことが示唆された。

表４

攻撃ウイルス	G・P血清型[遺伝子型]	中和抗体±信頼限度
ＡＵ６４ｎ	Ｇ１Ｐ１Ｂ[4]	2.19±0.52
Ｗａ	Ｇ１Ｐ１Ａ[8]	2.43±0.43
ＤＳ－１	Ｇ２Ｐ１Ｂ[4]	1.90±0.25

中和抗体価：個々のマウスの抗体価（常用対数）の幾何平均値
信頼限界：危険率 5%

実施例５

新規ヒト・ロタウイルス株 AU32n の取得：

実施例３の記載と同様の方法により、新規ヒト・ロタウイルス株を分離かつ継代し、感染価を測定すると共に、血清型及び遺伝子型を解析した。すなわ

ち、ロタウイルス感染幼児の下利便から、AGMK 細胞を用いてヒト・ロタウイルス株を分離し、さらに同細胞で2代継代の後、Vero CL-9 細胞に合計8代継代［第1～3代(プラーククローニング)、第4代(静置培養)、第5代(プラーククローニング)、第6代(静置培養)、第7～8代(回転培養)］することにより、細胞クローン馴化ヒト・ロタウイルス株(継代歴は、AGMK/3、Vero CL-9/8)を得た。このヒト・ロタウイルス株の感染価log(FFU/ml)は6.0であった。また、血清型[遺伝子型]は G9P1A[8]であり、AU32 株と同一であるため(表1参照)、この新規ヒト・ロタウイルス株を AU32n と命名した。

実施例6

Vero CL-9 細胞によるロタウイルスの分離:

実施例3(1)の記載と同様の方法によりロタウイルスの分離を行う。ただし、AGMK 細胞の代わりに Vero CL-9 細胞を用いて行う。

産業上の利用可能性

この発明は、ロタウイルス感染症に係るワクチン、診断剤、試薬及びこれらの製造方法を提供するものであり、人類の保健、世界の医療行政、環境衛生、畜産、及びロタウイルス感染症に関する基礎・臨床・応用の各研究に寄与するものである。特に、この発明は、小児嘔吐下痢症、白色便下痢症、小児仮性コレラ等の病名で恐れられている感染症に対する強力な予防手段としてのワクチンの提供により、世界の一般家庭のみならず、世界保健機構(WHO)を始めとする全世界の医療・保健従事者に待望の福音をもたらす。

請求の範囲

1. ロタウイルスの増殖を高度に許容する細胞を培養細胞からクローニングし、得られた細胞クローン株にロタウイルスを継代し馴化させることにより細胞クローン馴化ロタウイルス株を作成し、この馴化ロタウイルス株又はこれを親株に用いて作成したリアソータントをシードウイルスとして培養し、このシードウイルスの培養培地よりロタウイルス抗原を単離・精製することを特徴とするロタウイルス抗原の製造方法。

2. 培養細胞がVero細胞(ATCC CCL 81)である請求項1のロタウイルス抗原の製造方法。

3. 細胞クローン株がVero CL-9(FERM BP-6028)である請求項1又は2のロタウイルス抗原の製造方法。

4. ロタウイルスがヒト・ロタウイルス株AU32n及び／又はAU64nである請求項1、2又は3のロタウイルス抗原の製造方法。

5. 請求項1から4のいずれかの方法により得られたロタウイルス抗原。

6. 請求項5のロタウイルス抗原をさらに不活化剤で不活化することにより調製された不活化抗原。

7. 請求項5のロタウイルス抗原、又は請求項6の不活化抗原を、免疫を奏する量含有するロタウイルス感染症ワクチン。

8. 請求項5のロタウイルス抗原、又は請求項6の不活化抗原であって、血清型又は遺伝子型が互いに異なる2種以上の抗原をそれぞれ、免疫を奏する量含有する混合多価ロタウイルス感染症ワクチン。

9. 請求項5のロタウイルス抗原、又は請求項6の不活化抗原を、抗原抗体反応を呈する量含有する診断剤。

10. 細胞クローン株Vero CL-9(FERM BP-6028)。

11. 細胞クローン馴化ヒト・ロタウイルス株AU32n。

12. 細胞クローン馴化ヒト・ロタウイルス株AU64n。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP97/03777

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl^6 C12N7/00, A61K39/15, G01N33/569

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)

Int. Cl^6 C12N7/00, A61K39/15, G01N33/569

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

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

WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), JICST File(JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP, 5-509225, A (Ambico Inc.), December 22, 1993 (22. 12. 93), & WO, 9119786, A1 & US, 5147639, A & US, 5283172, A & EP, 651790, A1	5 - 9 1
X	JP, 60-248624, A (Royal Children's Hospital Research Foundation), December 9, 1985 (09. 12. 85) & EP, 152295, A1 & US, 4624850, A	5 - 8
X	JP, 6-505964, A (James N. Gamble Institute of Medical Research), July 7, 1994 (07. 07. 94) & WO, 9208786, A1 & EP, 557427, A1 & US, 5474773, A	5 - 8
Y	JP, 2-138970, A (The Wistar Institute of Anatomy and Biology), May 28, 1990 (28. 05. 90) & EP, 323708, A1	1

[X] 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 document 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	Date of mailing of the international search report
January 8, 1998 (08. 01. 98)	January 20, 1998 (20. 01. 98)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP97/03777

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 5-508325, A1 (The Wistar Institute of Anatomy and Biology), November 25, 1993 (25. 11. 93) & WO, 9219725, A1 & EP, 516287, A1 & US, 5610049, A	1

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ９７／０３７７７

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int. Cl⁶　Ｃ１２Ｎ　７／００，　Ａ６１Ｋ　３９／１５，　Ｇ０１Ｎ　３３／５６９

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（ＩＰＣ））

Int. Cl⁶　Ｃ１２Ｎ　７／００，　Ａ６１Ｋ　３９／１５，　Ｇ０１Ｎ　３３／５６９

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

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）
ＷＰＩ（ＤＩＡＬＯＧ），　ＢＩＯＳＩＳ（ＤＩＡＬＯＧ），　ＪＩＣＳＴファイル（ＪＯＩＳ）

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	関連する請求の範囲の番号
X Y	JP,5-509225,A (ｱﾝﾋﾞｺ, ｲﾝｺｰﾎﾟﾚｰﾃｯﾄﾞ) 22.12月.1993(22.12.93) & WO,9119786,A1 & US,5147639,A & US,5283172,A & EP,651790,A1	5－9 1
X	JP,60-248624,A (ﾛｲﾔﾙ ﾁﾙﾄﾞﾚﾝｽﾞ ﾎｽﾋﾟﾀﾙ ﾘｻｰﾁ ﾌｧｳﾝﾃﾞｨｼｮﾝ) 9.12月.1985(09.12.85) & EP,152295,A1 & US,4624850,A	5－8
X	JP,6-505964,A (ｼﾞｪｰﾑｽﾞ ｴﾇ.ｷﾞｬﾝﾌﾞﾙ ｲﾝｽﾁﾁｭｰﾄ ｵﾌﾞ ﾒﾃﾞｨｶﾙ ﾘｻｰﾁ) 7.7月.1994(07.07.94) & WO,9208786,A1 & EP,557427,A1 & US,5474773,A	5－8
Y	JP,2-138970,A (ｻﾞ･ｳｨｽﾀｰ･ｲﾝｽﾃｨﾁｭｰﾄ･ｵﾌﾞ･ｱﾅﾄﾐｰ･ｱﾝﾄﾞ･ﾊﾞｲｵﾛｼﾞｰ) 28.5月.1990(28.05.90) & EP,323708,A1	1

☒ 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」先行文献ではあるが、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 ０８．０１．９８	国際調査報告の発送日 20.01.98
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００ 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） 竹内　亜希　印　４Ｂ　９２８２ 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４９

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０（第２ページ）（１９９２年７月）

国際調査報告	国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ９７／０３７７７

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	関連する請求の範囲の番号
Y	JP,5-508325,A1（ｻﾞ・ｳｨｽﾀｰ・ｲﾝｽﾃｨﾁｭｰﾄ・ｵﾌﾞ・ｱﾅﾄﾐｰ・ｱﾝﾄﾞ・ﾊﾞｲｵﾛｼﾞｰ）25.11月.1993(25.11.93)　& WO,9219725,A1 & EP,516287,A1 & US,5610049,A	1