(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第3733152号
(P3733152)

(45)発行日　平成18年1月11日(2006.1.11)　(24)登録日　平成17年10月21日(2005.10.21)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 1/38	(2006.01)	C12N	1/38	
C12N 1/20	(2006.01)	C12N	1/20	A
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	C
C12R 1/16	(2006.01)	C12N	1/38	
		C12R	1:16	

請求項の数 7　(全 8 頁)

(21)出願番号　特願平6-311751
(22)出願日　平成6年12月15日(1994.12.15)
(65)公開番号　特開平7-222585
(43)公開日　平成7年8月22日(1995.8.22)
審査請求日　平成13年11月8日(2001.11.8)
(31)優先権主張番号　特願平5-314722
(32)優先日　平成5年12月15日(1993.12.15)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(73)特許権者　000002934
武田薬品工業株式会社
大阪府大阪市中央区道修町四丁目１番１号
(74)代理人　100062144
弁理士　青山　葆
(74)代理人　100081422
弁理士　田中　光雄
(74)代理人　100115945
弁理士　宮川　直之
(74)代理人　100114041
弁理士　高橋　秀一
(74)代理人　100110456
弁理士　内山　務
(74)代理人　100073955
弁理士　朝日奈　忠夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】病原性非抗酸菌の培養方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

培地にプルロニック系界面活性剤を添加して、攪拌下培養することを特徴とする好気性の病原性非抗酸菌の培養方法。

【請求項２】

プルロニック系界面活性剤を０．００５～５．０％（ｗ／ｖ）の濃度で加える請求項１記載の方法。

【請求項３】

病原性非抗酸菌が百日咳菌である請求項１記載の方法。

【請求項４】

病原性非抗酸菌がジフテリア菌である請求項１記載の方法。

【請求項５】

培地にプルロニック系界面活性剤を添加して、百日咳菌を攪拌下培養し、得られる百日咳菌またはその培養液から百日咳繊維状赤血球凝集素（ＦＨＡ）、百日咳毒素（ＰＴ）、百日咳外膜蛋白（６９Ｋ－ＯＭＰ）および百日咳線毛（Ｆｉｍｂ）から成る群から選ばれる感染防禦成分を取り出すことを特徴とする当該感染防禦成分の製造法。

【請求項６】

当該感染防禦成分が百日咳繊維状赤血球凝集素（ＦＨＡ）、百日咳外膜蛋白（６９Ｋ－ＯＭＰ）または百日咳線毛（Ｆｉｍｂ）である請求項５記載の製造法。

【請求項７】

培地にプルロニック系界面活性剤を添加して、ジフテリア菌を攪拌下培養し、得られる培養上清からジフテリア毒素を精製することを特徴とするジフテリア毒素の製造法。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【産業上の利用分野】

本発明は病原性非抗酸菌の培養方法に関する。

【０００２】

【従来の技術】

伝染性の疾患の予防のためワクチンが広く用いられている。百日咳やジフテリアなどの病原性非抗酸菌に対するワクチンの製造においてはこれら病原性細菌を培養し、得られた全菌体を不活性化して利用（不活性化ワクチン）したり、さらに菌体成分中から有効成分を取り出してワクチン原料として用いられている。 百日咳においては、接種後の発熱防止のため百日咳菌体から百日咳繊維状赤血球凝集素（ＦＨＡ）、百日咳毒素（ＰＴ）、百日咳外膜蛋白（６９Ｋ－ＯＭＰ）、百日咳線毛（Ｆimb）などの感染防禦抗原を取り出し、内毒素（ＥＴ）を除去した精製百日咳コンポーネントワクチンも実用化されつつある。

ジフテリアにおいては、菌体から遊離したジフテリア毒素を精製してジフテリアトキソイドとしてジフテリア症の予防に用いられている。

【０００３】

好気性非抗酸菌である百日咳菌やジフテリア菌は、培養時に菌の集落が培地表面に層状に形成して成長する。また、菌体自体が物理的刺激に弱い上にワクチンとしての有効成分の産生量が生育条件に深く関係する。

従って、これまで百日咳菌やジフテリア菌のワクチン原料の取得を目的とする培養は、静置培養を行い、表層に生育するこれら病原菌の菌体を利用して来た。

百日咳菌の培養用の担体としては、通常ガラス製のルー瓶が用いられている。この培養法は、例えば１５００mlの容量のルー瓶に４５０mlの培地を充填し、３５℃で５日間静置して培養するものであり、百日咳毒素、百日咳繊維状赤血球凝集素、百日咳外膜蛋白および百日咳線毛を良く産生するが、ワクチンを生産する際は大量のルー瓶と大きな培養室が必要となり、生産効率上問題がある。

一方、大量に百日咳菌を培養するためにガラス瓶による振盪培養〔インフェクション　アンド　イミュニティー（Infection and Immunity、 第２５巻、７８４頁、１９７９年）〕や大型のタンクによる撹拌培養が行われている〔アプライト　ミクロバイオロジー　バイオテクノロジー（Applied Microbiology Biotechnology、第２８巻、３５６頁、１９８８年）〕が、これらの培養法では、百日咳毒素はある程度産生されるものの、百日咳繊維状赤血球凝集素の産生量はルー瓶による静置培養法に比べ極端に低い。

また、ジフテリア菌の培養用の担体としては、通常ガラス製のコルベンが用いられている。この培養方法は、例えば３０００mlの容量のコルベンに３００mlの培地を充填し、３３℃で５日間静置して培養するものであり、ジフテリア毒素を良く産生するが、ワクチンを生産する際は大量のコルベンと大きな培養室が必要となり、大量生産に適した培養方法とはいえない。

【０００４】

【発明が解決しようとする課題】

このように、上記した病原菌の性状および菌体中のワクチン成分の含有量の維持を計る必要があるため、これらの細菌を大量培養する際には強制通気や撹拌が必須となり、細菌の大量培養で一般に行われるようなタンク培養を行うことはできなかった。

【０００５】

【課題を解決するための手段】

本発明は、培地に非イオン性界面活性剤を添加して、撹拌下培養することを特徴とする好気性の病原性非抗酸菌の培養方法を提供するものである。

上記好気性の病原性非抗酸菌とは、ワクチンや改良ワクチンの製造のためのコンポーネントを分離、取得するために培養する細菌であり、百日咳菌やジフテリア菌などが挙げられ

る。
本発明の培地に添加する非イオン性界面活性剤は、複数の親水性基と親油性基を有し、水中でイオン化しないものであり、例えばポリプロピレングリコールを疎水基としてエチレンオキサイドを附化したポリマーの非イオン性界面活性剤であるプルロニック系界面活性剤やポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルであるソルビタン系界面活性剤（ツィーン２０、ツィーン８０など、いずれも和光純薬株式会社製など）などが挙げられる。
とりわけ毒性が低く、低起泡性であるプルロニック系界面活性剤が好ましく、平均分子量が１，０００～５，０００程度、平均エチレンオキサイド含量が３０重量％を超えるプルロニック系界面活性剤、好ましくは平均エチレンオキサイド含量が５０～８０重量％程度のもの、例えばプルロニックＦ－６１、同Ｆ－６８，同Ｆ－８８，同Ｆ－１０８（いずれも、旭電化工業株式会社製など）などが挙げられ、とりわけプルロニックＦ－６８またはＦ－８８がより好ましく用いられる。
非イオン性界面活性剤として、例えばプルロニック系界面活性剤の場合、最終濃度０．００５～５．０重量％（培地容量に対する添加する界面活性剤の重量％）、とりわけ０．０２～３．０重量％、さらに好ましくは０．０５～２．０重量％で培地に添加する。非イオン性界面活性剤は通常、培地に添加後高圧加熱などにより滅菌する。
培養は、細菌の生育に悪影響を与えない範囲内で撹拌して行われる。撹拌としては、例えば回転撹拌する場合は、培養槽内で回転体を５０～１５０回転／分程度で回転させて行われる。ここで言う回転体とは、通常、培養の撹拌に用いられているものであれば特に限定はなく、例えば回転翼、回転羽根および回転子などが挙げられる。撹拌培養は、培地を入れたコルベンをロータリー式の振盪機に設置し回転撹拌してもよい。例えば５００mlの容量のコルベンに５０～３００ml程度の培地を充填して培養する場合は、８０～１５０回転／分程度、好ましくは１２０～１４０回転／分程度でロータリー回転させて行われる。
本発明の培養方法においては、培養槽内に通気管を設置し、培養液中に空気，酵素ガス，酸素ガスと炭酸ガス（０～４５％）の混合気体など放出する通気条件下に行うことができる。これらの通気は内圧０～１kg／cm^2G程度で行う。
【０００６】
百日咳菌の培養に関し、百日咳菌〔ボルデテラ　パターシス（Bordetella pertussis）〕としては、例えば百日咳Ｉ相菌東浜株、百日咳Ｉ相菌山口株、百日咳Ｉ相菌１８－３２３株などの公知株が挙げられるが、なかでも百日咳Ｉ相菌東浜株〔インフェクション　アンド　イミュニティー（Infection and Immunity）、第６巻、８９９－９０４頁（１９７２年）〕が百日咳ワクチン製造株として好都合に用いられる。　培地としては公知の基本培地、例えばコーエンウイラー培地（Cohen-Wheeler Medium、アメリカン・ジャーナル・オブ・パブリック・ヘルス(American Journal of Public Health)、第36巻、371-376頁、(1946年)）、 ステナー　ショルト培地（Stainer-Scholte Medium、ジャーナル・オブ・ジェネラル・マイクロバイオロジー（Journal of General Microbiology、第63巻、211-220頁、(1971年)）等の液体培地を用いることができるが、なかでもステナーショルト培地が好ましい。ステナーショルト培地に対し、最終濃度が約１～５重量％になるようグルタミン酸ソーダを増量した改良培地を使用することもできる。
培養槽としては、ガラス製などの小型培養タンクのみならず、大型（３０～６００リットル程度）の培養タンクを用いることができ、３０～３７℃で２４～１２０時間培養する。
【０００７】
本発明の培養方法により製造される百日咳菌は、これまで用いられた培養方法により得られた菌体と同様に、培養上清あるいは菌体を精製し、不活性化すること（特開昭６４－９２８号公報参照）により百日咳不活性化ワクチンとして用いることができる。また、さらに本培養方法により得られる百日咳菌またはその培養液から百日咳繊維状赤血球凝集素（ＦＨＡ）、百日咳毒素（ＰＴ）、百日咳外膜蛋白（６９Ｋ－ＯＭＰ）、百日咳線毛（Ｆimb）などの感染防禦成分を取り出し、百日咳コンポーネントワクチンの製造にも用いることができる。
ジフテリア菌の培養に関して、ジフテリア菌〔コリネバクテリウム　ジフテリア（Coeyne

bacterium diphtheria）〕としては、例えばＰＷ－Ｎo.８、トロント株などがジフテリアトキソイド製造株として好都合に使用される。培養に用いられている公知の培地としては、例えばマーチン培地（Martin Medium）、ポープスミス培地（Pope-Smith Medium）、ポープの変法培地（Modified Pope Medium）、ミューラー培地（Mueller Medium）等の液体培地を用いることができるが、なかでもミューラー培地が好ましい。培養は３０～３７℃で、１日～１０日間行う。　ジフテリア菌培養中に産生されるジフテリア毒素は培養物を培養上清と菌体とに分離し、ついで培養上清を従来の公知の方法、例えば塩析による沈殿法、イオン交換ゲルや各種ゲル等への吸脱着法等、汎用されている常套手段を組み合わせて精製することにより得ることができる。

本発明の培養方法によると、好気性の病原性非抗酸菌の大量培養が可能である。さらに、本発明培養法では菌体量が増加するだけでなく有用な培養生成物の産生が促進され、特に百日咳菌の培養においては、従来促進方法が知られていなかった百日咳外膜蛋白および百日咳線毛が良く産生され、百日咳繊維状赤血球凝集素の生産量も増大する。

【０００８】

【作用および実施例】

以下に本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明の範囲がこれらに限定されるものでないことは言うまでもない。

百日咳菌の培養に用いたステナーショルト培地の調製は培地１０リットル当たり下記の組成を用いた。基礎組成の部分は高圧加熱滅菌し、補液部分は濾過滅菌した。使用時に両者を混合して最終濃度１０リットル当たり下記の組成になるよう蒸留水を加えて調製した。

基礎組成：		補液組成：	
塩化ナトリウム	25.0g	Ｌ－シスチン	0.4g
リン酸二水素カリウム	5.0g	硫酸鉄五水塩	0.1g
塩化カリウム	2.0g	ナイアシン	0.04g
塩化マグネシュウム六水塩	1.0g	アスコルビン酸	0.2g
塩化カルシュウム二水塩	0.26g	グルタチオン	1.0g
Ｌ－プロリン	2.4g		
グルタミン酸ソーダ	107.0g		
トリスバッファー	15.3g		

【０００９】

実施例１

回転撹拌器および通気管を有する培養タンク（２リットル容量）にステナーショルト培地１.３リットルおよびプルロニックＦ－６８（ポリプロピレングリコールの分子量，１７５０；エチレンオキシド８０％）を０.１重量％（w／v）を加えて高圧加熱滅菌した。

これに百日咳菌Ｉ相東浜株を最終濃度２０億個／mlになるように接種し、９０回転／分で撹拌しながら、約３５℃で、２４～１２０時間培養を行った（プルロニック添加法）。なお、培養中は通気量１リットル／分（酸素ガス１００％）で通気（バブリング）した。

対照としてそれぞれプルロニックを加えずに、１.５リットル容量のルー瓶を用いる静置培養、および培養槽に設置した通気管から酸素ガスを培養液中に放出する通気撹拌培養（バブリング法）を、上記と同様の培養条件下に行った。

各々の培養開始後、２４時間毎に培養液のサンプリングを行い、各検体の菌数、赤血球凝集活性（ＨＡ）、百日咳毒素（ＰＴ）、百日咳繊維状赤血球凝集素（ＦＨＡ）、百日咳外膜蛋白（６９Ｋ－ＯＭＰ）および百日咳線毛（Ｆimb）を下記の方法に従って測定した。その結果を〔表１〕に示す。

菌数の測定：比濁法により測定した。比色計（Coleman製）で、標準菌液から検体の菌数を算出した。単位は１０億個／ml。

赤血球凝集活性の測定：検体を０.０１Ｍリン酸緩衝液で２倍段階希釈後、０.６　v/v%のヒヨコ固定化血球を添加混合し、赤血球凝集反応を行った。凝集をおこした検体の最高希釈倍数を赤血球凝集素価（Haemagglutinin Titer：ＨＡ価）　とした。

百日咳毒素、百日咳繊維状赤血球凝集素、百日咳外膜蛋白および百日咳線毛の測定：ＥＬ

ＩＳＡ法により、精製した百日咳毒素、百日咳繊維状赤血球凝集素、百日咳外膜蛋白および百日咳線毛を標準として算出した。単位はμｇ蛋白／ｍl。

【００１０】

【表１】

	培養時間 (Hr)	菌量 (10億個/ml)	HA価 (HAU/ml)	FHA (μgP/ml)	PT (μgP/ml)	69K-OMP (μgP/ml)	Fimb (μgP/ml)
ルー瓶静置培養	72	24.6	106	12.9	1.2	0.5	0.7
	96	45.6	160	25.0	2.1	1.0	1.6
	120	50.6	240	30.6	2.1	1.5	2.0
バブリング法	24	17.3	8	0.5	0.7	0.6	0.2
	48	35.0	12	1.2	0.7	1.6	1.2
	72	28.0	< 4	0.5	0.3	0.3	1.8
	96	27.0	< 4	0.7	0.4	0.4	2.3
バブリング法 プルロニック添加 (0.1%)	24	41.3	352	8.1	1.7	2.6	2.9
	48	80.5	557	57.1	4.6	3.3	3.9
	72	66.8	557	56.1	3.1	5.4	5.2

この表から明らかなように、プルロニックを添加しなかった撹拌培養では産生されなかった百日咳繊維状赤血球凝集素が産生されている。

【００１１】

実施例２

実施例１と同様にステナーショルト培地にプルロニックＦ－６８を濃度を変えて添加した培養の結果を〔表２〕に示す。

【００１２】

【表２】

プルロニック濃度 (w/v%)	培養時間 (Hr)	菌量 (10億個/ml)	HA価 (HAU/ml)	FHA (μgP/ml)	PT (μgP/ml)	69K-OMP (μgP/ml)	Fimb (μgP/ml)
0.02%	24	31.8	132	4.1	1.6	2.0	2.2
	48	9.4	<40	1.2	0.9	1.2	0.5
	72	10.5	<40	0.3	0.4	1.2	0.5
0.05%	24	25.0	100	8.6	1.4	1.8	1.2
	48	72.3	480	52.0	5.0	2.0	3.4
	72	67.5	480	54.7	3.8	5.0	4.6
0.1%	24	41.3	352	8.1	1.7	2.6	2.9
	48	80.5	557	57.1	4.6	3.3	3.9
	72	66.8	557	56.1	3.1	5.4	5.2
0.5%	24	39.0	205	7.2	1.9	2.2	2.7
	48	48.5	704	37.7	4.6	3.9	3.5
	72	62.5	675	37.1	2.9	6.5	5.0
1.5%	24	18.3	90	6.7	1.1	1.6	0.8
	48	73.9	400	52.9	4.4	2.0	3.5
	72	64.5	320	45.4	3.4	5.1	4.1

【００１３】

実施例３

回転撹拌器および通気管を有する培養タンク（２リットル容量）に、ミューラー培地１．３リットルおよびプルロニックＦ－６８を０．３重量％（W/V ％）加え、高圧加熱滅菌した。これにジフテリア菌ＰＷ－No.８、トロント株を接種した。約３５℃で２４～１２０時間、９０回転／分で撹拌培養した。培養中は、通気量０．３リットル／分（酸素ガス１００％）で通気（バブリング）した。対照としてプルロニックＦ－６８を加えずに培養槽に設置した通気管から酸素ガスを培養液中に放出する通気撹拌培養（バブリング法）を行った。各々の培養開始後、２４時間毎に培養液のサンプリングを行い、各検体の菌数、ジフテリア毒素量としてＬｆ およびＥＬＩＳＡ抗原価を下記の方法に従って測定した。その結果を〔表３〕に示す。

菌数の測定：培養液を遠心（約１０００Ｇ，３０min）し再浮遊した菌数を比色計（Colemman 製）で比濁法（６５０nm）により測定した。単位はＯＤ（６５０nm）値で表した。
ジフテリア毒素の測定（Ｉ）：標準抗毒素を用いるフロキュレーション法により測定した。単位はＬｆ／ml。
ジフテリア毒素の測定（II）：ＥＬＩＳＡ法により測定し、精製ジフテリアトキソイドを標準として算出した。単位はＥｕ／ml。
【表３】

添　加　剤	培養日数（日）	菌　量 650nm	Lf Lf／ml	Eu Eu／ml
無　添　加	2	0.8	＜３０	４０
	3	2.1	５５	７４
	4	3.9	８５	１４３
	5	3.3	９５	１６６
0.1%プルロニック添加	2	2.7	６０	９６
	3	4.8	１１０	１６０
	4	4.3	１３５	１９７
	5	4.3	１４０	２０３

【００１４】
【発明の効果】
本発明の培養法により、病原性非抗酸菌のタンク大量培養が可能となり、ワクチンの効率的な生産ができる。

フロントページの続き

(72)発明者 高重 和人
山口県光市虹ケ丘５丁目１５番２９号
(72)発明者 石井 保
山口県光市光井８丁目５番１０号
(72)発明者 末原 章宏
山口県光市大字室積村２８３９番地の１

審査官 上條 肇

(56)参考文献 Appl.Microbiol.Biotechnol., １９８８年, Vol.28, No.4/5, p.356-360
J.Biotechnol., １９９２年, Vol.25, No.3, p.289-306

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N 1/20 - 1/38
C12N 5/02 - 5/08
C12P 21/02
JSTPlus(JOIS)