

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2009年7月2日 (02.07.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/082002 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 39/12 (2006.01) A61K 39/39 (2006.01)
A61K 39/295 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/073732
- (22) 国際出願日: 2008年12月26日 (26.12.2008)
- (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 2007-334909
2007年12月26日 (26.12.2007) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人北里研究所 (THE KITASATO INSTITUTE) [JP/JP]; 〒1088641 東京都港区白金5丁目9番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小宮 智義 (KOMIYA, Tomoyoshi) [JP/JP]; 〒3640026 埼玉県北本市荒井六丁目111番地 学校法人北里研究所内 Saitama (JP). 鳥庭 弘子 (TORINIWA, Hiroko) [JP/JP]; 〒3640026 埼玉県北本市荒井六丁目111番地 学校法人北里研究所内 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒3000847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 規則4.17に規定する申立て:
— 出願し及び特許を与えられる出願人の資格に関する申立て (規則4.17(ii))
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書

(54) Title: METHOD OF PRODUCING JAPANESE ENCEPHALITIS VACCINE STABLY STORABLE OVER LONG TIME AND USE OF THE VACCINE

(54) 発明の名称: 安定に長期間保存できる日本脳炎ワクチンの製法方法及び該ワクチンの用途

(57) Abstract: Attempts have been made to improve a method of inactivating a Japanese encephalitis vaccine and examine the safety of a vaccine produced by mixing a plural number of vaccines. As a result, a Japanese encephalitis vaccine, which can be stably stored over a long period of time compared with the existing Japanese encephalitis vaccines and has a high safety because of being produced by cell culture, can be successfully produced. Moreover, a similar production method is expected to have a potential to improve the storage stability of other virus vaccines.

(57) 要約: 本発明者らは日本脳炎ウイルスワクチンの不活化処理方法の改良や、複数のワクチンを混合し、製造されたワクチンの安全性の検討を行った。その結果、従来の日本脳炎ワクチンよりも安定に長期間保存でき、細胞培養により製造した安全性の高い日本脳炎ワクチンを製造することに成功した。また、他のウイルスワクチンにおいても、同様の製造方法により、保存安定性の良好なワクチンが製造できると期待される。

WO 2009/082002 A1

明 細 書

安定に長期間保存できる日本脳炎ワクチンの製法方法及び該ワクチンの用途

技術分野

[0001] 本発明は長期間の保存においても力価が実質的に保持される特徴を有する日本脳炎ワクチンの製造方法に関する。また、当該製造方法により製造された日本脳炎ワクチン、並びに日本脳炎ワクチンおよび他の種類の抗原ワクチンからなる混合ワクチンに関する。さらに、当該ワクチンを対象者に投与する工程を含む、対象者において細菌および／またはウイルスに起因する疾患を予防する方法に関する。

背景技術

[0002] 日本脳炎は、コガタアカイエカなどの蚊が媒介する日本脳炎ウイルスの感染によって引き起こされる感染症であり、生後の早期から罹患しうる。ウイルス感染により引き起こされる脳症で死亡率は高く、後遺症は重い。予防の為には乳児期の早期からワクチンによる免疫が有効である。日本脳炎ウイルスはフラビウイルスに属する。日本脳炎の予防に使用されるワクチンは既に製造販売されており、日本では定期接種に組み入れられている。日本脳炎ワクチンを製法から分類すれば、マウス脳法により製造されるワクチンと細胞培養法により製造されるワクチンがある。また不活化日本脳炎ワクチンと弱毒生日本脳炎ワクチンがある。また剤型により、液状ワクチンと凍結乾燥ワクチンが製造販売されている。以下にマウス脳法により製造される不活化日本脳炎ワクチンについて従来 of 学説を簡単に説明する。

[0003] 最初の日本脳炎ワクチン、すなわちマウス脳由来ワクチンは1954年に実用化されたが、その精製度は低く、アレルギー性の中枢神経障害を誘発する危険性が指摘されていた。その後改良が重ねられ、1965年にウイルス精製が進んで品質が向上した改良日本脳炎ワクチンが実用化され、現在までその製造技術が踏襲されてきた。

マウス脳法により製造される不活化日本脳炎ワクチンは、前述のごとく精製度も高く、有効性の高いワクチンである。しかし、この不活化日本脳炎ワクチンは、安全性と保存安定性に問題があると指摘されてきた。

安全性に関しては、十分に管理されていない環境で飼育されたマウスを使用するので、今日要求される安全性水準からみた場合に、迷入因子がワクチン製品に混入する可能性を排除できないことが問題視される。この点は細胞培養法による製造法の採用で基本的に解決される。最近、細胞培養法により製造されるワクチンが世界的に注目を集め、先進国、発展途上国を問わず世界的に要望が高まっている。保存安定性に関しては、安定剤としてゼラチンがワクチンに添加された。しかし、ゼラチンはアレルギー反応を誘発する危険性が指摘されて、安定剤として使用されなくなっている。保存安定性を確保する別の方法として、凍結乾燥製品を製造することにより、冷室保存で長期保存が可能になる。しかし、凍結乾燥製品は製造コストが高価であり、冷所保存や冷凍保存には、保存の為の施設、冷蔵庫などの機器が必要であり、保存の費用がかかる欠点がある。

すなわち、不活化日本脳炎ワクチンの有効性、安全性、保存安定性に関して以下の通りまとめられる。まず、有効性は比較的満足な状況にある。安全性の問題は細胞培養製造法の開発により改良される可能性が高い。しかし、保存安定性の問題は凍結乾燥法による解決法はあるものの、製造コストが高価になる欠点があり、液状製品の保存安定性は確保されていない。すなわち、安定に長期間保存できる新しい日本脳炎ワクチンが求められている。

[0004] また、別の理由から、液状製品の保存安定性の向上が求められている。液状製品は通常注射法で接種される。しかし、十分な医療施設や医療専門家が不足する地域において経鼻接種もしくは経皮接種に使用するために安定な液状日本脳炎ワクチン製品の供給が要望されている。

日本脳炎ワクチンと同様に、他のウイルスワクチンにおいても、安価な製造費用を維持しつつ、保存安定性に優れたワクチンの開発が求められている。

[0005] 尚、本出願の発明に関連する先行技術文献情報を以下に示す。

特許文献1: CA 2,390,995

特許文献2: US 6,841,374

特許文献3: EP 841,942

特許文献4: US 5,891,705

非特許文献1:TF Tsai et al (1999): In, Vaccines (3 rd Ed.) (ed. by S A Plotkin and WA Orenstein, 1999), pp 672-710 : Japanese Encephalitis vaccine.

非特許文献2:K Sugawara et al (2002): Biologicals ,30, 303-314: Development of Vero cell-derived Inactivated Japanese Encephalitis vaccine.

非特許文献3:SC Wu, G Y-L Huang (2002): Biotechnol. Prog. 18, 124-128: Stationary and microcarrier cell culture processes for propagating Japanese Encephalitis virus.

非特許文献4:AK Srivastava et al (2001): Vaccine 19, 4557-75: A purified inactivated Japanese Encephalitis vaccine made in vero cells.

非特許文献5:A Lyons et al.(2007): Vaccine 25, 3445-53: A phase 2 study of a purified inactivated virus vaccine to prevent Japanese Encephalitis.

非特許文献6:SJ Barteling , R. Woortmeyer (1984): Arch Virol.80(2-3),103-17: Formaldehyde inactivation of foot-and-mouth disease virus: Conditions for the preparation of safe vaccine.

非特許文献7:B Metz et al. (2004): J. Biol. Chem., 279 (8), 6235-6243: Identification of Formaldehyde-induced Modifications in Proteins: reactions with model peptides .

非特許文献8:C Marquie et al. (1998) :Nahrung /Food (3/4), 42, 264-265: How to monitor the protein cross-linking by formaldehyde, glutaraldehyde or glyoxal in cotton-seed protein protein-based films? (short communication)

非特許文献9:WM McClurg et al. (1996): J Heart Valve Dis. 5(3), 343-7: Formaldehyde replaces glutaraldehyde in porcine bioprosthetic heart valves.

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、マウス脳法で製造される不活化日本脳炎ワクチンの問題点を解決する事を目的とする。より詳しくは、細胞培養法で得られた日本脳炎ウイルスに対し、複数の不活化処理を組み合わせる工程を含む、室温付近においても長期間安定に保存でき、有効かつ安全な液状不活

化日本脳炎ワクチンの製造方法を提供することにある。また、当該製造方法によって製造された日本脳炎ワクチン、若しくは当該安定な日本脳炎ワクチンと他の種類の抗原ワクチンを混合した混合ワクチンを提供することも目的とする。また、それらの使用方法を提供することも目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 上記課題を解決するために、本発明者らは細胞培養法で得られる日本脳炎ウイルスの不活化処理方法を検討した。また、複数のワクチンを混合し、製造された混合ワクチンの保存安定性の検討を行った。

まず、日本脳炎ウイルスの不活化処理条件を検討した。その結果、アミノ酸などの存在下で不活化処理を行うことにより、室温付近で安定に長期間（例えば2年（24ヶ月）以上）保存できる液状不活化日本脳炎ワクチンを製造出来ることを見いだした。次にアミノ酸などの存在下で物理化学的処理による追加の不活化処理を行う工程、又は加温しつつホルマリン不活化を行う工程等を組み合わせることによっても、室温付近で安定に長期間保存できる液状不活化日本脳炎ワクチンを製造出来ることを見いだした。次に、上記の方法で得た保存安定性の改善された液状不活化日本脳炎ワクチンと他のワクチンと混合し、混合ワクチンの評価を行った。その結果、混合ワクチンにおいても日本脳炎ワクチンは、安定に長期間保存できることを見いだした。さらに、不活化時にアミノ酸を添加することに加え、精製後にアミノ酸等の安定剤を添加することにより、日本脳炎ワクチンの安定性が保持されることを明らかにした。

即ち、本発明者らは、従来のマウス脳法により製造された不活化日本脳炎ワクチンに比べ、安全性と保存安定性の両方が改善された日本脳炎ワクチンを、複数の不活化処理工程を組み合わせることで安価に製造することに成功し、これにより本発明を完成するに至った。

[0008] 本発明は、より具体的には以下の〔1〕～〔20〕を提供するものである。

〔1〕日本脳炎ウイルスに対し、以下の(a)および／または(b)に記載の不活化処理を行う工程を含む、不活化全粒子日本脳炎ワクチンの製造方法。

(a)アミノ酸、アミン類、アミド類、および／または有機酸の存在下において化学的手法による不活化処理を行う工程

(b)物理化学的手法による不活化処理を行う工程

[2][1](a)に記載のアミノ酸が、アスパラギン酸、 γ -アミノ酪酸、アラニン、 β -アラニン、アルギニン、グリシン、グルタミン酸、イソロイシン、ロイシン、リジン、セリン、スレオニン、およびバリンから選択される少なくとも一つのアミノ酸である、[1]に記載の日本脳炎ワクチンの製造方法。

[3][1](a)に記載のアミン類がエチルアミン、エタノールアミン、およびプロパノールアミンから選択される少なくとも一つのアミン類であり、または(a)に記載のアミド類が尿素、グリシンアミド、および β -アラニルアミドから選択される少なくとも一つのアミド類であり、または(a)に記載の有機酸がコハク酸、酒石酸、グルコン酸、オレイン酸、ラクツビオン酸から選択される少なくとも一つの有機酸である、[1]または[2]に記載の日本脳炎ワクチンの製造方法。

[4][1](b)に記載の不活化処理が加温、 γ 線照射、電子線照射、およびレーザー光照射から選定される少なくとも一つの処理方法である、[1]から[3]のいずれかに記載の日本脳炎ワクチンの製造方法。

[5]加温による不活化処理が24℃以上で行われることを特徴とする[4]に記載の日本脳炎ワクチンの製造方法。

[6]日本脳炎ウイルスが臨床分離株(野外株)、人工変異株、遺伝子組換え株、または逆遺伝学による回収株、のいずれかである[1]から[5]のいずれかに記載の日本脳炎ワクチンの製造方法。

[7]細胞培養法で製造された日本脳炎ウイルスを用いることを特徴とする、[1]から[6]のいずれかに記載の日本脳炎ワクチンの製造方法。

[8]無血清培養法で製造された日本脳炎ウイルスを用いることを特徴とする、[1]から[6]のいずれかに記載の日本脳炎ワクチンの製造方法。

[9]無血清培養法で製造されたマスター細胞バンクを細胞培養の播種において用いることを特徴とする、[7]または[8]に記載の日本脳炎ワクチンの製造方法。

[10][1]～[9]のいずれかに記載の製造方法により製造される、力価が保持されたまま長期間保存できる特徴を有する不活化全粒子日本脳炎ワクチン。

[11]15℃以上40℃以下の保存温度において、力価が保持されたまま長期間保存

できる特徴を有する、〔10〕に記載の日本脳炎ワクチン。

〔12〕アミノ酸、アミン類、および／またはアミド類を安定剤として含む、〔10〕に記載の日本脳炎ワクチン。

〔13〕1年以上、4年未満の保存期間において安定している特徴を有する〔10〕に記載の日本脳炎ワクチン。

〔14〕アジュバントをさらに含む〔10〕に記載の日本脳炎ワクチン。

〔15〕アジュバント添加ワクチンの1ドーズの抗原量がアジュバント無添加ワクチンの場合より少ないことを特徴とする〔14〕に記載のワクチン。

〔16〕剤型が液状であることを特徴とする〔10〕から〔15〕のいずれかに記載のワクチン。

〔17〕〔10〕から〔16〕のいずれかに記載された日本脳炎ワクチンおよび他の種類の抗原からなる混合ワクチン。

〔18〕他の種類の抗原が、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、百日せきワクチン、インフルエンザ菌ワクチン、髄膜炎菌ワクチン、経口ポリオワクチン、不活化ポリオワクチン、または肝炎ワクチンから選択される少なくとも一つの抗原である〔17〕の混合ワクチン。

〔19〕〔10〕に記載の日本脳炎ワクチンまたは〔17〕に記載の混合ワクチンを対象者に投与する工程を含む、対象者において細菌および／またはウイルスに起因する疾患を予防する方法。

〔20〕疾患が、日本脳炎ウイルスに起因する疾患であることを特徴とする〔19〕に記載の方法。

以下に、細胞培養法で製造する液状不活化日本脳炎ワクチンについて説明する。

[0009] 〔発明の実施の形態〕

本発明は、細胞培養法で得られた日本脳炎ウイルスに対し、複数の不活化処理を組み合わせる工程を含む、室温付近においても長期間安定に保存でき、有効かつ安全な液状不活化日本脳炎ワクチンの製造方法を提供することにある。また、当該製造方法によって製造された日本脳炎ワクチン、若しくは当該安定な日本脳炎ワクチンと他の種類の抗原ワクチンを混合した混合ワクチンを提供することも目的とする。

。また、それらの使用方法を提供することも目的とする。

[0010] 以下の記述において「保存安定性」とは、日本脳炎ワクチンを室温付近で保存した場合の残存力価が保持されることを意味する。特に断らない限り、本発明の製造方法によって製造されたワクチンは液状製品を意味する。室温付近とは、15℃以上40℃以下の温度を意味する。本発明において、保存期間として、好ましくは1年以上の期間であり、より好ましくは2年以上4年未満の期間である。当然であるが、本発明のワクチンを凍結乾燥品として製造した場合、従来通り、冷所で長期間、安定に保存できる。

[0011] 本発明の日本脳炎ワクチンの製造に使用するウイルス株は抗原性があれば、臨床分離株、野生株、人工変異株、弱毒生ワクチン株、遺伝子組換え株の何れでも使用できる。遺伝子組換え株の中には逆遺伝学の手法で回収されるウイルス株を含む。また、ウイルス取得法としてはマウス脳法と、細胞培養法のいずれでも良いが、細胞培養法が好ましい。

ウイルス株の細胞培養に使用する細胞は日本脳炎ウイルスに感受性の有る細胞ならいずれでも良い。例えば、Vero 細胞、MDCK 細胞(浮遊細胞)、Per.C6 などの細胞が挙げられる。

[0012] ワクチン製造のための日本脳炎ウイルスの細胞培養は血清添加培地で実施するのが通例である。しかし、ワクチンの安全性の観点からは無血清培養で得たウイルスを使用するのがより好適である。細胞培養に播種するためのマスター細胞バンク(master cell bank)、作業用細胞バンク(working cell bank)は、特に断らない限り血清添加培養で作成するのが通例である。しかし、無血清培養法で作成して得たマスター細胞バンク(master cell bank)、作業用細胞バンク(working cell bank)を使用するのがより好適である。これにより、製造されたワクチンの安全性を高めることが出来る。

[0013] 本発明で発明者らが使用した細胞培養法による液状不活化日本脳炎ワクチンの製造方法の概略は以下の通りである。

Vero 細胞(ATCC CCL-81)をATCC より購入後、無血清培地にて馴化し、マスター細胞バンクおよび作業用細胞バンクを作製した。ウイルスは、マウス脳由来日本脳炎ワクチン製造用株北京-1 株をVero 細胞にて数代継代しマスターウイルスバンク

並びにワーキングウイルスバンクを作製した。

Vero 細胞をマイクロキャリア (Cytodex-1 または 3、GEヘルスケア社製) 上で、無血清培地で5〜7日間培養し、細胞数が 1×10^6 cells/ml の濃度に達した際に、日本脳炎ウイルスを接種し、約3日間培養し、その後、培養上清を回収し、ウイルス浮遊液を得た。

ホルマリンで不活化後、蔗糖密度勾配遠心によりウイルス浮遊液を精製し、ワクチンとした。その際に、すなわち精製後に安定剤を加えることも出来る。安定剤としては、アミノ酸またはアミン類、アミド類、有機酸等を挙げることができる。

本発明の液状不活化日本脳炎ワクチンは室温付近で長期間保存する場合の安定性が顕著に改善される。本発明の改良不活化日本脳炎ワクチンの製造方法は、従来の不活化処理方法の改良法である。本発明で行った改良は下記2種の処理のいずれか一つ、またはその組合せを不活化の際に行うものである。

[0014] 本発明における不活化処理方法における第1の改良点としては、不活化処理の際にアミノ酸等を存在させることが挙げられる。本発明では日本脳炎ウイルスの不活化処理に際して、緩衝液中に不活化剤(例えばホルマリン)と共にアミノ酸またはアミン類、アミド類、有機酸を存在させる。これにより室温付近で長期間保存しても力価が実質的に保持される不活化日本脳炎ワクチンを製造することができる。

[0015] 細菌や全粒子ウイルス、もしくはタンパク質トキシンの不活化に際してアミノ酸やアンモニア、アミン類などを存在させて、不活化の進行度を制御する方法は公知である(非特許文献6参照)。一例としてリジンはホルマリンと反応して過剰なホルマリンを捕捉し、ホルマリンの作用を中和し、不活化が過度に進行するのを制御し、ないしは不活化を事実上停止させる効果があることが広く受け入れられてきた。また、ホルマリンとリジンの末端アミノ基との反応でシッフ塩の形成されることが証明されている(非特許文献7〜9参照)。

[0016] 従来、不活化日本脳炎ワクチン製造においては、不活化処理は出来るだけ完全に進行すること、すなわちウイルスを完全に不活化させることが望ましいと考えられた。そのため、これまで日本脳炎ウイルスのホルマリンによる不活化処理の際には、ウイルスの不活化を妨げる効果があると考えられていたアミノ酸は添加されていなかった

。本発明者らは、不活化ワクチンの製造において、ホルマリン濃度や処理時間を変化させ、不活化の程度との相関を調べた。その中で、不活化を制御する一つの方法としてアミノ酸を添加したところ、予想外の新規の効果として保存安定性が改善されることを見だし、室温付近で長期間保存しても安定な不活化日本脳炎ワクチンの開発に成功した。

[0017] 日本脳炎ワクチンの不活化に際してアミノ酸またはアミン類、アミド類、有機酸を共存させることが保存安定性を改善させる効果をもたらすことは本発明者らが見いだした新規で有用な知見である。

[0018] 本発明の不活化処理の際に使用するアミノ酸の種類は入手可能なアミノ酸なら何れでも良く、中でもタンパク質構成アミノ酸が好ましい。また、塩基性アミノ酸がより好ましい。しばしば、水溶性アミノ酸が好ましいが、バリンなど非水溶性アミノ酸が効果的な場合もある。天然型(L-型)、非天然型(D-型)何れも使用可能である。より好ましいアミノ酸としては、アスパラギン酸、 γ -アミノ酪酸、アラニン、 β -アラニン、アルギニン、グリシン、グルタミン酸、イソロイシン、ロイシン、リジン、セリン、スレオニン、バリン、これらを含むペプチド、およびアミノ酸オリゴマー、等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0019] 好適なアミン類、アミド類としては、エチルアミン、エタノールアミン、プロパノールアミンなどのアルキルアミン類、尿素、グリシンアミド、 β -アラニルアミドなどのアミド類、アンモニア、および上記物質の無機塩類、等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0020] 酸性アミノ酸や塩基性アミノ酸、アミン類は塩としても使用可能であり、また、アミノ酸のメチルエステル、およびエチルエステルなど、簡単なエステルも使用可能である。

好適な有機酸としてはコハク酸、酒石酸、グルコン酸、オレイン酸、ラクチオン酸、およびこれらの無機塩などを含むがこれらに限定されない。また、その他、医薬上許容される酸とその塩が使用可能である。例えば、マレイン酸、リンゴ酸、ステアリン酸、リノール酸、グルコヘプトン酸、カルボキシビニルポリマー等、およびその無機塩が含まれるがこれらに限定されない。

[0021] 本発明で使用するアミノ酸またはアミン類、アミド類、有機酸の濃度は、0.005 M~0

.5 M の範囲が実用的に使用可能であり、好ましくは0.02 M～0.2 M の範囲である。ただし、最適の濃度は日本脳炎ウイルスの濃度、緩衝液のpH、不活化反応液の温度などにより異なる。ワクチン従事者には最適濃度を決定する方法は公知である。

本処理におけるアミノ酸またはアミン類、アミド類、有機酸の添加方法は、最初から一度に添加しても良いし、あるいは一週間に1－2回程度の間隔で分割添加しても良い。

本発明の日本脳炎ワクチンを製造するのに適した日本脳炎ウイルス株はとくに限定されない。すなわち、ワクチン製造に使用した場合に抗原性を示す能力があれば、臨床分離株(すなわち野生株)、人工変異株、弱毒株、遺伝子組換え株(逆遺伝学による回収株を含む)の何れでも使用可能である。

[0022] 本発明により製造された日本脳炎ウイルスワクチン製品の保存安定性は、保存中の残存力価を測定して判定することができる。日本脳炎ワクチンの力価測定方法としては、中和抗体価法、HI法、ELISA法などの免疫学的測定法などが挙げられる。この中で中和抗体価法が簡便かつ信頼性が高いとして日本生物製剤基準に採用されているので、好適である。中和抗体価測定法は、別名、50%ブラック減少法とも呼ばれる。免疫抗血清を希釈した試料と既知量の日本脳炎ウイルス液を混合し、Vero細胞と接触して生じるブラック数で残存ウイルス量を測定し、ブラック数が50%減少する希釈度を中和抗体価とする方法である。この方法はワクチンを取り扱う専門家にとって公知である。

[0023] 本発明の処理方法において、不活化時にアミノ酸またはアミン類、アミド類や有機酸を共存させることにより安定化効果がもたらされるメカニズムを考察すると以下の通りである。グリシンやリジンなど末端にアミノ基を持つアミノ酸を例に説明する。簡潔に要約すれば、アミノ酸存在下の不活化ではウイルス表層の多糖その他の構造物の立体構造が変化して、より安定な構造をとる一方で、ホルマリン不活化がより完全に進むからと推測される。すなわち、日本脳炎ウイルス表層にはエンベロープ蛋白と共に大きな多糖構造物やその他の高分子量の酸性分子が入り組んで存在する。このため、ウイルス表層上のホルマリンと反応可能な部位の一部は覆い隠されていると考えられる。従って、ホルマリン分子はウイルス表層蛋白質分子の遊離アミノ基の一部に到

達しにくい。

すなわち、従来法のアミノ酸非存在下における不活化において、ホルマリンはウイルス表面に露出した部分の蛋白を不活化するものの、隠れた部分の蛋白を不活化することができず、一部ウイルス蛋白は活性を保持したまま隠れて残存するものと考えられる。これは半不活化製品である。

[0024] ここで本発明のとおり、グリシンやリジンなど末端にアミノ基のあるアミノ酸を共存させた場合、アミノ酸が酸性物質と塩を形成する性質があり、ウイルスの大きな構造物のどこかと結合しうる。アミノ酸が新たにどこかに結合するとウイルス表層上の入り組んだ多糖分子の高次構造に変化がおこり、これまで隠れていた部分のアミノ基が露出する。この時、近傍に存在する遊離ホルマリンが結合する。このような過程を経て、ウイルス表層蛋白質へのホルマリンの結合がより完全にすすみ、その過程で不活化ウイルス粒子表層の蛋白質がより安定な高次構造に変化すると想像される。もしくは、ホルマリンによる不活化がより完全になる結果、ワクチン製品中に微量に混在する蛋白分解酵素の攻撃に対する抵抗性が増す可能性がある。このように考えると、アミノ酸などの存在下でホルマリン処理することにより、安定に長期間保存できる日本脳炎ウイルスワクチンを製造できる事を説明できる。

[0025] 本発明における不活化処理方法における第2の改良点としては、ウイルスに物理化学的手法による第二の不活化処理を施すことが挙げられる。第2次不活化は化学的不活化剤の存在下、非存在下いずれでも良い。

従来、全粒子ウイルスや蛋白質の不活化処理においては化学処理法と物理化学的処理法の両方が使用されてきた。しかし、ホルマリンやグルタルアルデヒドによる化学的不活化処理、またはγ線処理や紫外線処理などの物理化学的手段による不活化処理においても、ただ1種類の処理のみ実施し、複数の方法を組み合わせて不活化が行われることはなかった。これまでは、全粒子ウイルスの不活化処理の場合はウイルスの不活化が確認できれば、また、遊離タンパク質の不活化においては機能活性の消失を確認できれば、不活化が完了すると理解されてきた。従って、複数の不活化処理を組み合わせて実施するのは無駄であると考えられ、あえて試みられることはなかった。本発明者らは化学的手段を用いた不活化で製造した日本脳炎ウイルス

ワクチンが、保存中に品質の劣化を起こす原因の一つは不完全な不活化にあると考え、日本脳炎ウイルスの不活化方法を検討した。その結果化学的不活化処理に加えて物理化学的手段による第2次不活化を追加実施することがワクチンの保存安定化に有効であることを見いだした。

第2次不活化は種々の物理化学的処理の方法で実施できる。以下に例を示すが、これらに限定されるものではない。また、使用可能な条件の一例を合わせて示すが、これらに限定されるものではない。

[0026] <物理化学的処理法およびその条件>

加温処理(温度:15~40 °C;加温時間:10~120 分)、 γ 線照射(線源:コバルト60;5~50 kGy (キログレー)),レーザー光照射(光源:各種レーザー照射装置;波長500~700 nm;光量:0.01-1 J(ジュール)/cm²)、電子線照射(電子レンジ)、超音波照射。

[0027] また、全粒子ウイルスをマイクロカプセル化することにより品質劣化を防止することも可能である。これらの1種または複数の方法を組み合わせて用いることができる。同じ方法を複数回繰り返し実施してもよい。処理条件は固定的ではなく、浮遊ウイルス量、温度、緩衝液のpH、処理時間、などを変化させて、好適な条件を設定することができる。上記物理化学的処理は、無菌条件下で操作する。

[0028] 第1次と第2次不活化において、処理条件によっては、処理の結果、抗原タンパク質が過度に変性して抗原性を失う場合がある。そのため、処理後に免疫原性、その他の性質を調べ、最適の手段と最適の処理条件を総合的に考慮して選択する。

本発明の第2次不活化は、物理化学的不活化処理の少なくとも一つの処理を行うものである。複数の処理を組み合わせる不活化を行う場合は、化学的不活化処理の後、物理化学的不活化処理を行ってもよいし、物理化学的不活化処理の後、化学的不活化処理を行ってもよい。

[0029] 本発明の第2次不活化効果のメカニズムについて、加温下の不活化を例に考察すると以下の通りである。アミノ酸存在下でのホルマリンによる不活化の場合と同様のメカニズムを仮定することができる。すなわち簡潔に要約すれば、穏和な物理化学的処理、例えば、穏和な加温処理を施しながらホルマリンで不活化する場合、ウイルス表層の多糖その他の構造物の立体構造が変化して、ホルマリンのウイルス表面への

結合がより完全に進む結果、安定性が増すと推測される。アミノ酸存在下の化学的不活化処理と物理化学的手段による第二不活化処理の組合せとして、例えば、アミノ酸存在下、緩やかに加温しながらホルマリンで不活化する事が含まれる。

[0030] 上記のメカニズムを支持する事実としては、処理効果の認められた加温処理、 γ 線処理、超音波処理などは、穏和な条件下ではいずれも、多糖や複合蛋白質など高分子構造物の立体構造を変化させる効果がある点で共通している。

上記の安定な日本脳炎ワクチンの製造方法は、他のフラビウイルスに属するウイルスの全粒子ワクチンの製造にも適用できる。他のフラビウイルスにはデングウイルス、黄熱病ウイルス、ダニ媒介脳炎ウイルス(TBE)、ウエストナイルウイルス、セントルイスウイルス、などが含まれる。その他、全粒子インフルエンザワクチンの製造にも用いられる。

[0031] 本発明の安定な日本脳炎ワクチンは、別種類の抗原ワクチンと混合した混合ワクチンの製造に使用できる。例えば、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、百日せきワクチンの三種類を混合したDTP三種混合ワクチンと本発明の日本脳炎ワクチンを混合した4種混合ワクチンとして使用することが可能である。他の細菌ワクチン抗原としてインフルエンザ菌ワクチンB型 (*Haemophilus influenza* type B)、髄膜炎菌(*Neisseria meningitidis*)、チフス菌(*Salmonella typhi*)、毒素産生大腸菌(*enterotoxigenic Escherichia coli*)、コレラ菌(*Vibrio cholera*)、黄色ブドウ状球菌(*Staphylococcus aureus*)、または肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)を挙げることができる。ウイルス抗原として、経口ポリオワクチン、不活化ポリオワクチン、肝炎ワクチン、およびインフルエンザワクチンをあげられるが、これらに限定されない。

[0032] ワクチンに有効なアジュバントを添加してワクチンの効果を増強させることは公知である。従って本発明のワクチン(混合ワクチンを含む)にも適切なアジュバントを添加する。本発明のワクチンに用いられるアジュバントとしては、水酸化アルミニウムとその無機塩類、スクワレンやオイルなどの炭化水素類、コレラトキシンなど、細菌毒素、イヌリンなどの多糖類、及びこれらの組合せがあげられるが、これらに限定されない。一般にあるワクチン抗原の免疫作用を増強させるのに有効なアジュバントの種類に規則性は見いだせない。また、有効なアジュバントの種類は投与方法によっても異なる

。しかし、当業者にとって公知の試行錯誤法により、ワクチンに有効なアジュバントの種類と濃度を決定できる。

ワクチンの通例として、本発明のワクチン製品は抗原の他に、安定剤(例えばゲラチン)、保存剤(例えばチメロサル、フェノキシエタノール)、着色剤(例えばフェノールレッド)などを含有させる事が出来る。

[0033] さらに、本発明は、本発明のワクチンを対象者に投与する工程を含む、対象者において細菌および／またはウイルスに起因する疾患を予防する方法に関する。本発明において疾患としては、日本脳炎ウイルスに起因する疾患を挙げることができる。

本発明において、「投与する」とは、経口的、あるいは非経口的に投与することが含まれる。経口的な投与としては、経口剤という形での投与を挙げることができ、経口剤としては、錠剤、カプセル剤、溶剤、あるいは懸濁剤等の剤型を選択することができる。さらに適切な剤型を選べば、経鼻接種、経皮接種も可能である。

非経口的な投与としては、注射剤という形での投与を挙げることができる。

投与量、投与方法は、対象者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

[0034] 以下に実施例をあげて説明するが、これは本発明を限定するものではない。

なお本明細書において引用されたすべての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

[0035] [実施例1] 不活化時のアミノ酸添加がワクチンの保存安定性に与える効果

アミノ酸の存在下でホルマリンによりウイルスを不活化処理して得られた改良日本脳炎ウイルスワクチンを保存し、保存安定性を調べた。実施方法は以下の通りである。

日本脳炎ウイルス株は、北京-1株を使用した。培養培地は、細胞培養用無血清培地VP-SFM (Invitrogen 社製)を使用した。培養は80L容フアーメンターに50L培地を入れて細胞培養を実施した。

Vero 細胞(ATCC CCL-81)をATCC より購入後、無血清培地にて馴化し、マスターセルバンクおよびワーキングセルバンクを作製した。ウイルスは、マウス脳由来日本脳炎ワクチン製造用株北京-1 株をVero細胞にて数代継代しマスターウイルスバン

ク並びにワーキングウイルスバンクを作製した。

無血清培地でVero 細胞をマイクロキャリア (Cytodex-1 または3) 上で5～7日間培養し、細胞数が 1×10^6 cells/ml の濃度に達した時点で日本脳炎ウイルスを接種し、約3日間培養後、培養上清からウイルスを回収し、北里研究所の日本脳炎ウイルスワクチン製造方法に従い精製した後、リン酸緩衝食塩水 (PBS) に懸濁して、ウイルス浮遊液とした。

[0036] その後、0.05 % (v/v) ホルマリン存在下、4℃、3 ヶ月間 放置することにより不活化した。この際、ウイルス浮遊液に0.5%アミノ酸または他の試験物質を、各々一種類または数種類添加した(表1)。

不活化処理後に、蔗糖密度勾配遠心法により不純物ならびにホルマリンと添加物質を除去し、PBS 中でウイルス濃度を調整した。その後、0.7 mL ずつバイアルに分注して日本脳炎ワクチンを作成した。

各バイアルを4℃の冷所に保存した。保存開始から9ヶ月後まで3ヶ月ごとにバイアルを開封し、同一条件で作成した試料のバイアル5 本分を合わせて1検体とした。5 検体を使用し、日本生物製剤基準に従い力価測定法により、各保存期間後の残存力価を測定した。表1において、各保存期間の残存力価を中和抗体価で示す。

[0037] [表1]

試験 番号	不活化時に添加したアミノ酸と 糖アルコール		保存 温度	保存ワクチンの中和抗体価 10E(n)			
				0ヶ月	3ヶ月	6ヵ月	9ヵ月
1	0.5%グリシン		4℃	2.264	2.550	2.501	2.101
2	0.5%グリシン	1.8%ソルビトール	4℃	2.661	2.536	2.469	2.060
3	0.4%L グルタミン	1.8%ソルビトール +5%ラクトース	4℃	2.653	2.401	2.116	1.563
4	0.5%グリシン+ 0.4%L グルタミン	1.8%ソルビトール +5%ラクトース	4℃	1.890	2.506	2.227	1.476
5	無添加(対照)		4℃	2.639	1.759	0.907	0.299

表1の保存6ヶ月後と9ヶ月後の結果において、ホルマリンによる日本脳炎ウイルスの不活化処理の際に、グリシン、グルタミンなどのアミノ酸を添加した場合(試験番号1-4)、およびアミノ酸と共に糖アルコールを添加して(試験番号2-4) 作成した場合の日本脳炎ワクチン製品が、無添加条件下で不活化した従来法の製品(試験番号5)と比較して残存力価が高いことが明らかとなった。すなわち、長期間保存した場

合でも、上記添加物を添加した上で不活化処理を行った場合には、無添加の場合と比較して保存安定性が増すことが明らかとなった。アミノ酸および糖アルコールの両方とも無添加で不活化処理した従来法の製品(対照)では力価の低下が著しかった。

[0038] [実施例2] 液体日本脳炎ワクチン製品の長期保存におけるアミノ酸類の添加効果
実施例1と同様の方法でウイルス浮遊液を得た。これを用いて0.5%グリシン添加条件下、または無添加条件下において、ホルマリンで日本脳炎ウイルスを不活化した。その後、蔗糖密度勾配遠心にて精製し不純物を除去した。その後、ウイルスタンパク量 $10 \mu\text{g/ml}$ にてPBSで再浮遊してワクチンとし、バイアルに0.7mLずつ分注した。この際、バイアル中のワクチンに安定剤としてアミノ酸と糖アルコールを添加した。その後、4°Cおよび28°Cで保存して、保存安定性を調べた。具体的には、3ヶ月おきに生物学的製剤基準に規定される方法でバイアル中の残存力価を測定した。以上の結果を表2に示す。力価は中和抗体価で示す。

[0039] 表2に示した結果から、以下のことが明らかである。

1. 試験番号1と3との比較、ならびに試験番号2と4との比較から、アミノ酸を添加した条件でウイルスを不活化して製造した日本脳炎ワクチンの液体製品は、15ヶ月間保存後に、無添加条件下で不活化した製品より高い力価を保持していた。すなわち、不活化処理におけるアミノ酸添加は、安定な日本脳炎ワクチンを製造するために有効な方法である。
2. 試験番号3と4の比較において、ワクチン中に安定剤としてアミノ酸と糖アルコールを添加した場合、保存開始から15ヶ月後に、無添加より高い力価を保持していた。しかし、試験番号1と2の比較において、アミノ酸存在下にホルマリンで不活化した本発明の日本脳炎ワクチンでは、十分に安定性を獲得しており、12ヶ月間保存後において、アミノ酸と糖アルコールの追加的安定化効果は明白ではなかった。15ヶ月間保存後において、試験番号1の方が、残存力価が高い傾向があった。
3. 試験番号1において、4°Cでの保存と28°Cでの保存でいずれの場合も、無添加対照(試験番号3)より高い力価が保持されていたが、28°Cの保存においてより明白であった。試験番号2においても同様の傾向が認められた。

4. 24ヶ月目では、28℃保存において試験番号1が 無添加対象(試験番号3)より、高い力価が保持されていることが明らかになった。すなわち、不活化処理におけるアミノ酸添加は、安定な日本脳炎ワクチンを製造するために有効な方法であることが明らかとなった。

[0040] [表2]

	安定剤		保存温度	保存ワクチンの中和抗体価 10E(n)					
	不活化中	精製後		0ヶ月	3ヶ月	6ヶ月	12ヶ月	15ヶ月	24ヶ月
1	0.5%グリシン	無添加	4℃	2.017	2.475	2.347	2.714	2.324	2.533
			28℃	2.017	2.906	1.767	2.537	3.127	2.630
2	0.5%グリシン	0.5%グリシン 1%ソルビトール	4℃	2.373	2.132	2.186	2.874	2.042	2.630
			28℃	2.373	2.579	2.616	2.695	2.345	1.523
3	無添加	無添加	4℃	2.298	1.350	1.350	1.542	1.859	1.271
			28℃	2.298	1.498	1.498	2.023	1.694	1.465
4	無添加	0.5%グリシン 1%ソルビトール	4℃	1.755	2.557	1.788	1.767	2.024	2.436
			28℃	1.755	1.942	1.530	2.274	2.580	1.659

[0041] [実施例3] ワクチンの保存2年後の感染防御効果

実施例1と同様に無血清培地で細胞培養を実施しウイルス浮遊液を得た。実施例2と同様に、0.5%グリシン添加条件下でホルマリン不活化処理を4℃で3ヶ月間行い、蔗糖密度勾配で精製して不純物を除去した後、バイアルに0.7 mL ずつ分注してワクチンとした。ワクチンを4℃または28℃で25ヶ月保存した。保存ワクチンの有効性を確認するために、保存ワクチンで免疫したマウスをウイルスで攻撃し、感染防御能を調べた。ddY マウス(4週齢)に3日間隔で保存ワクチンを4回免疫した。その2週間後に日本脳炎ウイルス0.03ml(50LD₅₀)を脳内に接種し、2週間マウスの生存を観察した。生存マウスの数と生存率を表3に示す。対照として、不活化処理時にもワクチン中の安定剤としても何も加えないで製造した細胞培養由来ワクチンを使用した。また、力価測定用標準ワクチン(参照ワクチン)として、国家検定に使用するマウス脳由来ワクチン(感染症研究所より購入、凍結乾燥品)を測定のたびに規定された方法でPBSに溶解して使用した。

[0042] 表3の試験番号1において、0.5%グリシン存在下で不活化し、精製後とワクチン製品中にはアミノ酸は無添加の製品を28℃で25ヶ月間保存した場合、ウイルス攻撃後のマウスの生存率が83%であった(試験番号1、28℃保存)。一方、参照ワクチンを使用

して同様に処理した場合、生存率は80%であった(試験番号4)。以上の結果により、本発明のワクチンは、液状で、28℃で2年以上安定に保存できることが確認された。

4℃の保存では、生存率は67%であった(試験番号1、4℃保存)。

アミノ酸存在下で不活化処理し、ワクチン保存中に保存剤としてアミノ酸と糖アルコールを添加した場合は、試験番号1に比較してワクチンの残存有効性が低かった(試験番号2)が、無添加対照(試験番号3)より高いことが示された。従来製品は力価低下が著しいので、安定に保存できなかった。

[0043] [表3]

試験 番号	添加物質		保存 温度	ウイルス攻撃後のマウス生存率(%)				
	不活化中	ワクチン中		マウス 数	6 日	8 日	10 日	14 日
1	0.5%グリシン	無添加	4℃	6	100	67	67	67
			28℃	6	100	83	83	83
2	0.5%グリシン	1% ソルビトール 0.5%グリシン	4℃	10	100	50	40	40
			28℃	10	100	50	30	30
3	無添加(対照)	無添加(対照)	4℃	10	100	20	10	10
			28℃	10	100	40	20	20
4	参照ワクチン(凍結乾燥品)			10	100	90	80	80

[0044] [実施例4] 精製後のアミノ酸添加がワクチンの保存安定性に与える効果

実施例1と同様の方法でウイルス浮遊液を得た。これを用いて0.5%グリシンと1%ソルビトール添加条件下、ホルマリンに日本脳炎ウイルスを不活化した。その後、蔗糖密度勾配遠心にて精製し、不純物を除去した。その後、ウイルスタンパク質10 μ g/mlにてPBSで再浮遊してワクチンとし、ここに安定剤として1%ソルビトールとともに各種アミノ酸を添加して保存し、実施例2と同様に3ヶ月おき6ヶ月まで残存力価を測定した。以上の結果を表4に示す。

[0045] [表4]

	安定剤		保存温度	保存ワクチンの中和抗体価 10E(n)		
	不活化中	精製後		0ヶ月	3ヶ月	6ヶ月
1		0.5%グリシン	4℃	2.175	3.303	2.128
		1%ソルビトール	28℃	2.175	2.736	2.651
0.5%リジン		4℃	2.175	2.433	2.646	
1%ソルビトール		28℃	2.175	3.082	2.305	
0.5%アラニン		4℃	2.175	2.235	2.032	
1%ソルビトール		28℃	2.175	3.198	3.058	
0.5%アルギニン		4℃	2.175	2.724	2.289	
1%ソルビトール		28℃	2.175	2.977	3.058	
0.5%バリン		4℃	2.175	2.118	2.730	
1%ソルビトール		28℃	2.175	2.017	2.468	
6		1%ソルビトール	4℃	2.175	2.445	2.718
			28℃	2.175	1.913	1.734
7		無添加	4℃	2.175	2.468	2.629
			28℃	2.175	2.631	2.333

[0046] 表4に示した結果から、以下のことが明らかである。

試験番号7の無添加(28°C保存)と比較した場合、試験番号1のグリシン、試験番号2のアラニンおよび試験番号4のアルギニン添加により、高い力価が得られた。不活化時にアミノ酸を添加することに加え、さらに精製後にアミノ酸を添加することにより、28°C保存における日本脳炎ワクチンの安定性が保持されることが明らかになった。

[0047] [実施例5] DTP 三種混合ワクチンと改良日本脳炎ワクチンの混合ワクチン

実施例2の場合と同様に不活化処理を行い、ウイルス浮遊液を得た。ホルマリンで不活化処理する際に、グリシン0.5%を存在させ、24°Cで10日間放置することにより不活化処理し、日本脳炎ワクチンとした。一方、北里研究所製DTP三種混合ワクチンおよび本発明の安定な日本脳炎ワクチンを等量ずつ混合して混合ワクチンを作成した。

それぞれの成分抗原の力価を日本生物製剤基準の方法で測定した。結果を表5に示す。試験した力価試験において何れの項目も日本生物製剤基準に適合した。

[0048] [表5]

試験項目		日本生物製剤 基準	実測値	判定
毒性試験	異常毒性否定試験	異常を示さず	異常を示さず	適合
	マウスヒスタミン増感試験	0.4 単位以下	0.08 単位	適合
	ジフテリア毒素不活化試験	異常を示さず	異常を示さず	適合
	破傷風毒素不活化試験	異常を示さず	異常を示さず	適合
力価試験	日本脳炎ワクチン	8 単位以上	42 単位	適合
	ジフテリアトキソイド	47 単位以上	100 単位	適合
	破傷風トキソイド	27 単位以上	32 単位	適合

産業上の利用可能性

[0049] 本発明の製造方法により製造された日本脳炎ワクチンは、従来製造されてきたマウス脳法による液状不活化日本脳炎ワクチンと同等もしくはそれ以上の有効性を持ち、かつ当該従来ワクチン製品より、安全性と保存安定性が改良されているものである。

安全性については、不活化処理の前段階で、無血清培養法で作成したマスター細胞バンクを細胞培養の播種において使用し、かつ無血清細胞培養法でウイルスを培養製造するので、例えばBSE(狂牛病)や肝炎ウイルスなど血清由来の迷入因子がワクチンに混入する危険性が低い。したがって、本願の製造方法により製造された日本脳炎ワクチンは、従来のワクチン製品、または血清添加培養により製造した細胞培養法日本脳炎ワクチンより、安全である。

[0050] 長期間の保存においてワクチンの力価が安定に維持されることは重要かつ有利なことである。特に液体製品が室温付近での保存でも長期に保存できることは製造管理上、流通上、また医療現場での保存上、非常に便利である。亜熱帯から熱帯地方で長期にわたって猛威を奮う日本脳炎ウイルスの場合、感染防止をワクチンで対処するためには、様々な種類のワクチンを簡便な温度管理条件で長期保存する必要がある。本発明のワクチンは、そのような長期保存の必要性がある場合に有効である。

請求の範囲

- [1] 日本脳炎ウイルスに対し、以下の(a)および／または(b)に記載の不活化処理を行う工程を含む、不活化全粒子日本脳炎ワクチンの製造方法。
- (a)アミノ酸、アミン類、アミド類、および／または有機酸の存在下において化学的手法による不活化処理を行う工程
- (b)物理化学的手法による不活化処理を行う工程
- [2] 請求項1(a)に記載のアミノ酸が、アスパラギン酸、 γ -アミノ酪酸、アラニン、 β -アラニン、アルギニン、グリシン、グルタミン酸、イソロイシン、ロイシン、リジン、セリン、スレオニン、およびバリンから選択される少なくとも一つのアミノ酸である、請求項1に記載の日本脳炎ワクチンの製造方法。
- [3] 請求項1(a)に記載のアミン類がエチルアミン、エタノールアミン、およびプロパノールアミンから選択される少なくとも一つのアミン類であり、または(a)に記載のアミド類が尿素、グリシンアミド、および β -アラニルアミドから選択される少なくとも一つのアミド類であり、または(a)に記載の有機酸がコハク酸、酒石酸、グルコン酸、オレイン酸、ラクチオン酸から選択される少なくとも一つの有機酸である、請求項1または2に記載の日本脳炎ワクチンの製造方法。
- [4] 請求項1(b)に記載の不活化処理が加温、 γ 線照射、電子線照射、およびレーザー光照射から選定される少なくとも一つの処理方法である、請求項1から3のいずれかに記載の日本脳炎ワクチンの製造方法。
- [5] 加温による不活化処理が24℃以上で行われることを特徴とする請求項4に記載の日本脳炎ワクチンの製造方法。
- [6] 日本脳炎ウイルスが臨床分離株(野外株)、人工変異株、遺伝子組換え株、または逆遺伝学による回収株、のいずれかである請求項1から5のいずれかに記載の日本脳炎ワクチンの製造方法。
- [7] 細胞培養法で製造された日本脳炎ウイルスを用いることを特徴とする、請求項1から6のいずれかに記載の日本脳炎ワクチンの製造方法。
- [8] 無血清培養法で製造された日本脳炎ウイルスを用いることを特徴とする、請求項1から6のいずれかに記載の日本脳炎ワクチンの製造方法。

- [9] 無血清培養法で製造されたマスター細胞バンクを細胞培養の播種において用いることを特徴とする、請求項7または8に記載の日本脳炎ワクチンの製造方法。
- [10] 請求項1～9のいずれかに記載の製造方法により製造される、力価が保持されたまま長期間保存できる特徴を有する不活化全粒子日本脳炎ワクチン。
- [11] 15℃以上40℃以下の保存温度において、力価が保持されたまま長期間保存できる特徴を有する、請求項10に記載の日本脳炎ワクチン。
- [12] アミノ酸、アミン類、および／またはアミド類を安定剤として含む、請求項10に記載の日本脳炎ワクチン。
- [13] 1年以上、4年未満の保存期間において安定している特徴を有する請求項10に記載の日本脳炎ワクチン。
- [14] アジュバントをさらに含む請求項10に記載の日本脳炎ワクチン。
- [15] アジュバント添加ワクチンの1ドーズの抗原量がアジュバント無添加ワクチンの場合より少ないことを特徴とする請求項14に記載のワクチン。
- [16] 剤型が液状であることを特徴とする請求項10から15のいずれかに記載のワクチン。
- [17] 請求項10から16のいずれかに記載された日本脳炎ワクチンおよび他の種類の抗原からなる混合ワクチン。
- [18] 他の種類の抗原が、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、百日せきワクチン、インフルエンザ菌ワクチン、髄膜炎菌ワクチン、経口ポリオワクチン、不活化ポリオワクチン、または肝炎ワクチンから選択される少なくとも一つの抗原である請求項17の混合ワクチン。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/073732

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K39/12(2006.01) i, A61K39/295(2006.01) i, A61K39/39(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, A61K39/295, A61K39/39

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	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

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

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Tomoyoshi KOMIYA et al., "Soshiki Baiyo Yurai Fukatsuka Nihonnoen Vaccine no Anteisei ni Tsuite", The Japanese Society of Virology Gakujutsu Shukai Program Shoroku-shu, 2006, Vol.54th, page 252	1-18
X	WO 99/011762 A1 (CHEIL JEDANG CORP.), 11 March, 1999 (11.03.99), Page 4, lines 25 to 26; page 11, lines 29 to 31; page 12, lines 6 to 7 & AU 9890047 A & KR 99023955 A & EP 1025209 A1 & CN 1272879 A & NZ 503522 A & JP 2001-514844 A & US 6309650 B1 & AU 748730 B & KR 314404 B & EP 1604685 A2 & EP 1025209 B1	1-11, 13-18

☐ 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
20 January, 2009 (20.01.09)

Date of mailing of the international search report
03 February, 2009 (03.02.09)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

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, A61K39/295(2006.01)i, A61K39/39(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, A61K39/295, A61K39/39

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 0 9 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 9 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 9 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)

CAplus/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDream2)

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	小宮智義 他, 組織培養由来不活化日本脳炎ワクチンの安定性について, 日本ウイルス学会学術集会プログラム・抄録集, 2006, Vol. 54th, p. 252	1-18

☒ 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

2 0 . 0 1 . 2 0 0 9

国際調査報告の発送日

0 3 . 0 2 . 2 0 0 9

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)

安川 聡

4 C

3 0 3 9

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

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
X	WO 99/011762 A1 (CHEIL JEDANG CORPORATION) 1999.03.11, 第4頁第25－26行、第11頁第29－31行、第12頁第6－ 7行参照 & AU 9890047 A & KR 99023955 A & EP 1025209 A1 & CN 1272879 A & NZ 503522 A & JP 2001-514844 A & US 6309650 B1 & AU 748730 B & KR 314404 B & EP 1604685 A2 & EP 1025209 B1	1-11, 13-18