

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-182751
(P2019-182751A)

(43) 公開日 令和1年10月24日(2019. 10. 24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/002 (2006. 01)	A 6 1 K 39/002	4 C O 8 5
A 6 1 P 33/02 (2006. 01)	A 6 1 P 33/02 1 7 1	4 H O 4 5
A 6 1 K 39/39 (2006. 01)	A 6 1 K 39/39	
C O 7 K 14/44 (2006. 01)	C O 7 K 14/44 Z N A	

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2018-71224 (P2018-71224)	(71) 出願人	504300088 国立大学法人帯広畜産大学 北海道帯広市稲田町西2線11番地
(22) 出願日	平成30年4月2日 (2018. 4. 2)	(71) 出願人	000125369 学校法人東海大学 東京都渋谷区富ヶ谷2丁目28番4号
		(74) 代理人	110002480 特許業務法人1Pアシスト特許事務所
		(72) 発明者	西川 義文 北海道帯広市稲田町西2線11番地 国立 大学法人帯広畜産大学内
		(72) 発明者	ラガブ マッハルーフ マハムッド フェ レイク 北海道帯広市稲田町西2線11番地 国立 大学法人帯広畜産大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ネオスポラ原虫感染症に対するワクチン製剤

(57) 【要約】

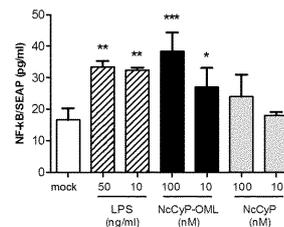
【課題】

本発明は、ウシ等の家畜の体内のTh1型反応とTh2型反応のバランスをTh1側にシフトさせることができる、安全なワクチン製剤を提供することを目的とする。さらに本発明は、ネオスポラ原虫感染に対して効果的な免疫応答、特に細胞性免疫を誘導し得る、安全なワクチン製剤を提供することを目的とする。

【解決手段】

本発明は、ネオスポラ原虫由来のシクロフィリン又はその免疫原性を保持した変異体若しくは誘導体が封入された、抗原提示細胞表面の糖鎖認識分子に結合し得るオリゴ糖を表面に有するリボソームを含む、ネオスポラ原虫感染症に対するワクチン製剤に関する。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ネオスポラ原虫由来のシクロフィリン又はその免疫原性を保持した変異体若しくは誘導体が封入された、抗原提示細胞表面の糖鎖認識分子に結合し得るオリゴ糖を表面に有するリポソームを含む、ネオスポラ原虫感染症に対するワクチン製剤。

【請求項 2】

変異体が、シクロフィリンを構成するアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含み、ネオスポラ原虫に対する免疫応答を誘導し得るタンパク質である、請求項 1 に記載のワクチン製剤。

【請求項 3】

誘導体が、シクロフィリン若しくはその変異体のアミノ酸残基の1若しくは数個が化学修飾されたタンパク質、シクロフィリン若しくはその変異体と他のポリペプチドとの融合タンパク質、及びシクロフィリン若しくはその変異体が血中滞留性を高める高分子で修飾されたタンパク質よりなる群から選択され、かつネオスポラ原虫に対する免疫応答を誘導し得るタンパク質である、請求項 1 に記載のワクチン製剤。

【請求項 4】

シクロフィリンが、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のワクチン製剤。

【請求項 5】

前記抗原提示細胞表面の糖鎖認識分子がマンノース・レセプターである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のワクチン製剤。

【請求項 6】

前記オリゴ糖が2~11の糖残基からなる、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のワクチン製剤。

【請求項 7】

前記オリゴ糖が3~5の糖残基からなる、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のワクチン製剤。

【請求項 8】

前記オリゴ糖が2以上のマンノース糖残基を含むものである、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のワクチン製剤。

【請求項 9】

さらに製薬上許容し得る担体を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のワクチン製剤。

【請求項 10】

皮下、皮内、経口又は経鼻投与されるものである、請求項 9 に記載のワクチン製剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ネオスポラ原虫感染症に対するワクチン製剤に関する。より詳しくは、抗原提示細胞表面の糖鎖認識分子に結合し得るオリゴ糖を表面に有するリポソームにネオスポラ原のタンパク質であるシクロフィリンを封入してなるワクチン製剤に関する。

【背景技術】

【0002】

ネオスポラ原虫 (*Neospora caninum*) はイヌ科動物を終宿主とし、ウシ、ヒツジ、ヤギ、シカ等を中間宿主とする細胞内寄生性原虫であり、宿主の上皮細胞、脳脊髄液中の単核細胞及び神経細胞の細胞内に寄生する。ネオスポラ原虫は、終宿主の糞便中に排出されるオーシストによる水平感染や中間宿主における垂直感染により伝播する。

【0003】

10

20

30

40

50

ネオスポラ原虫は、イヌに対しては多発性筋炎、上行性麻痺を引き起こし、またウシに対しては流産、死産あるいは子牛の神経症状を主徴とする異常産を高い頻度で引き起こす。特に、母体が免疫抑制状態になっている妊娠中期にネオスポラ原虫に感染すると、胎児に垂直感染して、先天的にネオスポラ原虫に感染している個体が生まれてくる。また、ネオスポラ原虫に感染した母牛は搾乳に供することができない場合が多い。このように、畜産業界において、特にウシのネオスポラ感染は大きな経済的損失を与える深刻な問題である。

【0004】

ネオスポラ原虫感染に対する治療として、サルファ剤、エリスロマイシン、ドキシサイクリン、クリンダマイシン等の投与が行われる。しかしながら、食用家畜に対する抗生物質の投与は望ましくないことから、ネオスポラ原虫の感染を予防する方法の確立が重要な課題となっている。

10

【0005】

ネオスポラ原虫の感染予防法として、不活化したネオスポラ原虫とアジュバントを含む不活化ワクチン（非特許文献1）や生ワクチンが検討された。また、ネオスポラ原虫そのものを使用する不活化ワクチン又は生ワクチンに加えて、ネオスポラ原虫の抗原タンパク質を含むワクチン等も開発されている。例えば、MIC1、MIC3、GRA2、GRA6、SAG1、SRS2等の組換えタンパク質を含むワクチンが提案されており、ネオスポラ原虫の感染抑制が確認されている（非特許文献2及び3）。しかしながら、これら組換えワクチンは、その生産に微生物やウイルスをベクターとして使用していることから、ベクターの病原性が問題となり得る。

20

【0006】

ネオスポラ原虫は細胞内寄生性の原虫であるため、ネオスポラ原虫感染症における液性免疫の誘導は、細胞外に存在する原虫の体内伝播阻止や原虫から放出される病原性因子の機能阻害には有効であるものの、細胞内の原虫への直接的な効果は期待できない。一方、細胞性免疫は原虫感染細胞を破壊することができるため、より直接的に細胞内原虫の駆除に寄与するものと考えられる。

【0007】

細胞性免疫を誘導し得る非生物的なワクチンキャリアとして、抗原提示細胞表面の糖鎖認識分子に結合する2~11個の糖残基から成るオリゴ糖、特にマンノースオリゴ糖を表面に有するリポソームに抗原を封入したワクチンが報告されている（特許文献1）。マンノースオリゴ糖を表面に有するリポソームは、マンノース受容体を介して抗原提示細胞に貪食され、MHCクラスI又はII分子を介して抗原を提示することにより、細胞性免疫を誘導することができる。

30

【0008】

本発明者らは、上記のマンノトリスを表面に有するリポソームにネオスポラ原虫由来のタンパク質であるDense granule protein 7 (GRA7) 又はApical membrane antigen 1 (AMA1) を封入した、ネオスポラ原虫に対するワクチン製剤を提唱している（特許文献2）。

【0009】

細胞性免疫はTh1細胞が産生するIFN γ 、IL2等のTh1サイトカインによりマクロファージや細胞傷害性T細胞が活性化されて誘導されるのに対し、液性免疫はTh2細胞が産生するIL4、IL10等のTh2サイトカインによりB細胞の形質細胞への分化や抗体産生が促進されて誘導される。生体内でTh1細胞による免疫応答（Th1型反応）とTh2細胞による免疫応答（Th2型反応）は相互に制御し合って平衡関係を維持しており、細胞性免疫の誘導が望まれる場合、平衡状態をTh1側にシフトさせることが重要であると考えられている。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】特開平7-126185号公報

50

【特許文献2】国際公開第2010/32408号パンフレット

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Dubey et al., *Clinical Microbiology Reviews*, 2007, 20:323 367

【非特許文献2】Ramamoorthy et al., *Int. J. Parasitol.*, 2007, 37:1531 1538

【非特許文献3】Nishikawa et al., *Vaccine*, 2001, 19:1710 1716

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明は、ウシ等の家畜の体内のTh1型反応とTh2型反応のバランスをTh1側にシフトさせることができる、安全なワクチン製剤を提供することを目的とする。さらに本発明は、ネオスポラ原虫感染に対して効果的な免疫応答、特に細胞性免疫を誘導し得る、安全なワクチン製剤を提供することを目的とする。

10

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明者らは、抗原提示細胞表面の糖鎖認識分子に結合するオリゴ糖を表面に有するリポソームにネオスポラ原虫由来のシクロフィリン (Neospora caninum cyclophilin, NcCypと略すことがある) を封入して生体に投与することで、Th1サイトカインがTh2サイトカインよりも優位に産生され、ネオスポラ原虫に対する細胞性免疫が優位に誘導されることを見だし、以下の各発明を完成した。

20

【0014】

(1) ネオスポラ原虫由来のシクロフィリン又はその免疫原性を保持した変異体若しくは誘導体が封入された、抗原提示細胞表面の糖鎖認識分子に結合し得るオリゴ糖を表面に有するリポソームを含む、ネオスポラ原虫感染症に対するワクチン製剤。

(2) 変異体が、シクロフィリンを構成するアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を含み、ネオスポラ原虫に対する免疫応答を誘導し得るタンパク質である、(1)に記載のワクチン製剤。

(3) 誘導体が、シクロフィリン若しくはその変異体のアミノ酸残基の1若しくは数個が化学修飾されたタンパク質、シクロフィリン若しくはその変異体と他のポリペプチドとの融合タンパク質、及びシクロフィリン若しくはその変異体が血中滞留性を高める高分子で修飾されたタンパク質よりなる群から選択され、かつネオスポラ原虫に対する免疫応答を誘導し得るタンパク質である、(1)に記載のワクチン製剤。

30

(4) シクロフィリンが、配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質である、(1)~(3)のいずれか一項に記載のワクチン製剤。

(5) 前記抗原提示細胞表面の糖鎖認識分子がマンノース・レセプターである、(1)~(4)のいずれか一項に記載のワクチン製剤。

(6) 前記オリゴ糖が2~11の糖残基からなる、(1)~(5)のいずれか一項に記載のワクチン製剤。

(7) 前記オリゴ糖が3~5の糖残基からなる、(1)~(6)のいずれか一項に記載のワクチン製剤。

40

(8) 前記オリゴ糖が2以上のマンノース糖残基を含むものである、(1)~(7)のいずれか一項に記載のワクチン製剤。

(9) さらに製薬上許容し得る担体を含む、(1)~(8)のいずれか一項に記載のワクチン製剤。

(10) 皮下、皮内、経口又は経鼻投与されるものである、(9)に記載のワクチン製剤。

【発明の効果】

【0015】

本発明で提供されるワクチン製剤は、Th1型反応とTh2型反応のバランスをTh1側にシフトさせ、ネオスポラ原虫感染に対して免疫応答、特に細胞性免疫を誘導することができる

50

ことから、ネオスポラ感染症に対して高い予防効果を有する。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】リポ多糖 (LPS)、シクロフィリン (NcCyp) 又はシクロフィリンを封入したリポソーム (NcCyp OML) を導入したRAW264.7細胞株 (NF κB/SEAP) が産生するアルカリフォスファターゼ量を示すグラフである。結果は平均値 ± 標準偏差で表される。図中、*は未処理群 (mock) に対して有意差 (*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$ 、***: $p < 0.001$) があることを示す。

【図2】LPS、NcCyp又はNcCyp OMLを導入したマウス腹腔由来マクロファージが産生するIL 12 p40量を示すグラフである。結果は平均値 ± 標準偏差で表される。図中、異なるアルファベットは群間に有意差があることを示す。

10

【図3】NcCyp又はNcCyp OMLを免疫したマウスにネオスポラ原虫を接種したときの、血清中NcCyp特異的IgG1抗体 (左図) 及びIgG2a抗体 (右図) 濃度を示すグラフである。結果は平均値 ± 標準偏差で表される。図中、*は同一群内で免疫前 (0日) との有意差 ($p < 0.05$) があることを示し、また異なるアルファベットは採材日が同一のサンプル間で有意差があることを示す。

【図4】NcCyp又はNcCyp OMLで免疫したマウスから採取した脾臓細胞にコンカナバリンA、ネオスポラ原虫ライセート (NLA) 又はNcCypを加えて培養したときの、脾臓細胞の増殖 (パネルA) 及び培養上清中のIFN 産生量 (パネルB) を示すグラフである。結果は平均値 ± 標準偏差で表される。図中、#は同一接種群内で陰性対照 (Medium) との有意差 ($p < 0.05$) があることを示し、また異なるアルファベットは同一の抗原刺激間で有意差があることを示す。

20

【図5】NcCyp又はNcCyp OMLで免疫したマウス (パネルA)、NcGRA7、M3 NcGRA7又はM3 GSTで免疫したマウス (パネルB)、NcAMA1、M3 NcAMA1又はM3 GSTで免疫したマウス (パネルC) から採取した脾臓細胞をそれぞれに対応する抗原刺激下で培養したときの、培養上清中のIFN 産生量とIL 4産生量の比を示すグラフである。

【図6】NcCyp又はNcCyp OMLで免疫したマウスにネオスポラ原虫を接種したときのマウスの生存曲線 (パネルA)、臨床スコア (パネルB)、脳組織中の原虫量 (パネルC) を示すグラフである。パネルBの結果は平均値 ± 標準誤差で表される。図中、*はPBS投与群に対して有意差 ($p < 0.05$) があることを示す。

30

【図7】NcCyp又はNcCyp OMLで免疫したマウスにネオスポラ原虫を接種したときのC57BL/6マウス (パネルA) 及びTLR2 KOマウス (パネルB) の生存曲線を示すグラフである。図中、*はPBS投与群に対して有意差 ($p < 0.05$) があることを示す。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明は、ネオスポラ原虫由来のシクロフィリン又はその免疫原性を保持した変異体若しくは誘導体が封入された、抗原提示細胞表面の糖鎖認識分子に結合し得るオリゴ糖を表面に有するリポソーム製剤を含む、ネオスポラ原虫感染症に対するワクチン製剤に関する。

【0018】

40

ネオスポラ原虫由来のシクロフィリン (Neospora caninum cyclophilin, NcCyp)

NcCypは、peptidyl prolyl cis trans isomerase (PPIase) 活性及び免疫抑制剤であるシクロスポリン (cyclosporine) への結合能を有するタンパク質であり、感染した宿主のIFN 産生を促す主要な成分であることが知られている (Tuo et al., Infect Immun., 2005, 73(8): 5093-5100.)。

【0019】

NcCypのアミノ酸配列や、これをコードする遺伝子のORF配列はすでに公知であり、それぞれ公共のデータベースであるGenBankにACCESSION No. XP_003880037.1

(アミノ酸配列)、ACCESSION No. XM_003879988 (塩基配列) として登録されている。シグナル配列を含まないNcCypのアミノ酸配列を配列番号1に、これをコードするDNAの塩基

50

配列を配列番号 2、シグナル配列を含む NcCyp のアミノ酸配列を配列番号 3 に、これをコードする DNA の塩基配列を配列番号 4 にそれぞれ示す。

【 0 0 2 0 】

本発明において、NcCyp の他に、NcCyp の免疫原性を保持した、すなわちネオスポラ原虫に対して免疫応答を誘導することができる NcCyp の変異体又は誘導體も、リポソームに封入されるタンパク質として利用することができる。

【 0 0 2 1 】

変異体の例としては、NcCyp のアミノ酸配列において 1 又は数個の、好ましくは 2 ~ 7 個、より好ましくは 2 ~ 5 個、最も好ましくは 2 ~ 3 個のアミノ酸残基が欠失、置換又は付加したアミノ酸配列からなり、かつ NcCyp の免疫原性を保持したタンパク質を挙げること

10

【 0 0 2 2 】

置換はいわゆる保存的置換が好ましく、そのような例としては、グリシン (Gly) とプロリン (Pro)、グリシンとアラニン (Ala) 又はバリン (Val)、ロイシン (Leu) とイソロイシン (Ile)、グルタミン酸 (Glu) とグルタミン (Gln)、アスパラギン酸 (Asp) とアスパラギン (Asn)、システイン (Cys) とスレオニン (Thr)、スレオニンとセリン (Ser) 又はアラニン、リジン (Lys) とアルギニン (Arg) 等のアミノ酸の間での置換を挙げることができる。

【 0 0 2 3 】

また、NcCyp のアミノ酸配列と、例えば BLAST の初期条件パラメーターを用いて同一性を計算したときに、少なくとも 70% 以上、好ましくは 80% 以上、より好ましくは 90% 以上、さらに好ましくは 95% 以上、特に好ましくは 97%、98% 若しくは 99% 以上の同一性を有しているアミノ酸配列からなるタンパク質であって、かつネオスポラ原虫に対して免疫応答を誘導することができるものも NcCyp の変異体に含まれ、リポソームに封入されるタンパク質として利用することができる。

20

【 0 0 2 4 】

また、NcCyp 若しくはその変異体のアミノ酸残基の 1 若しくは数個を化学修飾したタンパク質、NcCyp 若しくはその変異体と他のポリペプチドとの融合タンパク質、又は NcCyp 若しくはその変異体をポリエチレングリコール (PEG) 等の血中滞留性を高める高分子で修飾したタンパク質であって、かつネオスポラ原虫に対して免疫応答を誘導することができるものも、NcCyp の誘導體として、リポソームに封入されるタンパク質として利用することができる。

30

【 0 0 2 5 】

NcCyps の調製

NcCyp は、ネオスポラ原虫から公知の手段によって単離、精製したものを使用してもよいが、大腸菌その他の微生物、昆虫細胞又は動物細胞を宿主細胞とした組換えタンパク質の生産方法によって調製される組換え NcCyp を使用することが好ましい。組換え遺伝子の構築、宿主細胞への発現ベクターの導入、宿主細胞での目的タンパク質の発現その他の遺伝子工学的手法は、種々の遺伝子組換え操作を詳細に解説した実験操作マニュアル書の指示に基づいて行うことができる。

40

【 0 0 2 6 】

NcCyp、その変異体又は誘導體 (以下、纏めて NcCyps と表す) をコードする DNA は、NcCyps の組換え生産のため、適当な発現ベクターに組み込むことができる。NcCyps をコードする DNA を有する組換えベクターは、環状、直鎖状等いかなる形態のものであってもよい。また、かかる組換えベクターは、NcCyps をコードする塩基配列に加え、必要ならば他の塩基配列を有していてもよい。他の塩基配列の例は、エンハンサー配列、プロモーター配列、リポソーム結合配列、コピー数の増幅を目的として使用される塩基配列、シグナルペプチド等のペプチドや他のポリペプチドをコードする塩基配列、ポリ A 付加配列、スプライシング配列、選択マーカーとなる遺伝子の塩基配列等である。

【 0 0 2 7 】

50

遺伝子組換えに際しては、適当な合成DNAアダプターを用いて翻訳開始コドンや翻訳終止コドンをNcCypsをコードするDNAに付加したり、あるいは塩基配列内に適当な制限酵素切断配列を新たに発生又は消失させたりすることも可能である。これらは当業者が通常行う作業の範囲内であり、当業者はNcCypsをコードするDNAを任意かつ容易に加工することができる。

【 0 0 2 8 】

またNcCypsをコードするDNAを保持する発現ベクターとしては、使用する宿主に応じた適当なベクターを選択することができ、プラスミドの他にバクテリオファージ、バキュロウイルス、レトロウイルス、ワクシニアウイルス等の種々のウイルスを用いることも可能であるが、微生物、特にエシェリヒア属等の細菌を用いた宿主発現系に利用可能なベクターを用いることが好ましい。

10

【 0 0 2 9 】

NcCypsは、NcCyp遺伝子固有のプロモーター配列の制御下に発現させることができる。あるいは、NcCypsをコードする塩基配列の上流に別の適当な発現プロモーターを連結して使用することもできる。その様な発現プロモーターは、宿主に応じて適宜選択すればよく、例えば宿主がエシェリヒア属細菌、好ましくは大腸菌である場合にはT7プロモーター、lacプロモーター、trpプロモーター、PLプロモーター等を、宿主がバチルス属細菌、好ましくは*B. subtilis*である場合にはP43プロモーター、vegIプロモーター、xylose-inducibleプロモーター、tetracycline inducibleプロモーター等を挙げる事ができる。また、宿主が酵母である場合にはPH05プロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター等を、宿主が動物細胞である場合にはSV40由来プロモーター、レトロウイルスプロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)のIE(immediate early)遺伝子のプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SRプロモーター等を挙げる事ができる。

20

【 0 0 3 0 】

宿主細胞の例としては、エシェリヒア(*Escherichia*)属、バチルス(*Bacillus*)属、コリネバクテリウム(*Corynebacterium*)属、ブレヴィバクテリウム(*Brevibacterium*)属、セラチア(*Serratia*)属、シュードモナス(*Pseudomonas*)属、アースロバクター(*Arthrobacter*)属、エルウィニア(*Erwinia*)属、メチロバクテリウム(*Methylobacterium*)属及びロドバクター(*Rhodobacter*)属等の細菌、ストレプトミセス(*Streptomyces*)属、ザイモモナス(*Zymomonas*)属及びサッカロミセス(*Saccharomyces*)属等の真菌を挙げる事ができる。またカイコ等の昆虫細胞、HEK293細胞、MEF細胞、Vero細胞、Hela細胞、CHO細胞、WI38細胞、BHK細胞、COS 7細胞、MDCK細胞、C127細胞、HKG細胞及びヒト腎細胞株等の動物細胞も利用可能である。

30

【 0 0 3 1 】

発現ベクターを宿主細胞に導入する形質転換の方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、アルカリ金属法、リン酸カルシウム沈澱法、DEAEデキストラン法、マイクロインジェクション法等を挙げる事ができる。

【 0 0 3 2 】

NcCypsは、発現ベクターを導入した形質転換細胞を培養し、細胞内でタンパク質を発現させ、細胞又は培地から目的とするタンパク質を回収し、精製することによって得ることができる。形質転換細胞の培養は、炭素質化性や栄養要求性等の宿主細胞の性質、導入した組換え遺伝子に含まれる選択マーカー、プロモーター等に応じて常法に従って行えばよい。

40

【 0 0 3 3 】

NcCypsの精製は、タンパク質の精製に通常使用されている方法の中から適切な方法を適宜選択して行うことができる。すなわち、塩析法、限外濾過法、等電点沈澱法、ゲル濾過法、電気泳動法、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィーや抗体クロマトグラフィー等の各種アフィニティークロマトグラフィー、クロマトフォーカシング法、吸着クロマトグラフィー及び逆相クロマトグラフィー等の通常使用され得る方法の中か

50

ら適切な方法を適宜選択し、必要によりHPLCシステム等を使用して適当な順序で精製を行えばよい。

【0034】

また、NcCypsを他の機能性タンパク質又はペプチドとの融合タンパク質として発現させた場合には、その機能性タンパク質又はペプチドに特徴的な精製法を採用することが好ましい。かかる機能性タンパク質又はペプチドとそれに対応した精製法としては、6~10個程度の連続するヒスチジン残基からなるヒスチジントグとニッケル固定化アフィニティークロマトグラフィー、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)とグルタチオン固定化アフィニティークロマトグラフィー等が挙げられる。精製された融合タンパク質を適当なプロテアーゼ(トロンピン、トリプシン等)を用いて切断することで、NcCypsを回収することができる。

10

【0035】

さらに、組換えDNA分子を利用した無細胞系の合成方法も、遺伝子工学的な生産方法の1つである。

【0036】

NcCypsは、例えばFmoc法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)やtBoc法(tブチルオキシカルボニル法)等の有機化学的合成方法により、市販の適当なペプチド合成機を用いて生産することもできるが、遺伝子組換え技術によって、前記の核酸、特に発現ベクターに組み込まれたDNAを原核生物又は真核生物から選択される適当な宿主細胞を用いた好適な発現系に導入することによって生産することが好ましい。

20

【0037】

リポソーム及びその調製

本発明において使用されるリポソームは、抗原提示細胞表面の糖鎖認識分子に結合し得るオリゴ糖を表面に有するリポソームである。かかるリポソームは、特開平7 126185、US 5759572、WO2010/32408、US2011/0250265及びUS8821882に、その構成及び製造方法とともに記載されている。これらの文献は、その全体が参照により本願明細書に組み入れられる。

【0038】

「抗原提示細胞表面の糖鎖認識分子」とは、マクロファージ、樹状細胞等の抗原提示細胞の表面に存在するFcレセプター、補体レセプター、スカベンジャーレセプター、マンノース・レセプター、リポ多糖(LPS)レセプター、CD11b/CD18(CR3)、Toll様レセプター等の、糖鎖を介する細菌等の貪食、外来異物中の糖タンパク質の取り込み及び細胞表面への抗原提示に直接的又は間接的に関与している糖鎖結合性のレクチン様の性質を有する分子全般を意味する。その好適な例は、マンノース・レセプターである。

30

【0039】

リポソーム表面のオリゴ糖は、上述の抗原提示細胞表面の糖鎖認識分子と結合可能なものであれば特に限定されない。構成糖残基としては、Dマンノース(D Man)、Lフコース(L Fuc)、Dアセチルグルコサミン(D GlcNAc)、Dグルコース(D Glc)、Dガラクトース(D Gal)、Dアセチルガラクトサミン(D GalNAc)、Dラムノース(D Rha)等を挙げることができるが、D Manを含むオリゴ糖、例えばD Manのみからなるオリゴ糖又はD ManとD GlcNAcとからなるオリゴ糖が好ましく、特にD Manのみからなるオリゴ糖が好ましい。D Manのみからなるオリゴ糖としては、マンノピオース(Man2)、マンノトリオース(Man3)、マンノテトラオース(Man4)、マンノペンタオース(Man5)、マンノヘキサオース(Man6)、マンノヘプタオース(Man7)を挙げることができる。

40

【0040】

オリゴ糖を構成する各糖残基の結合様式は特に限定されず、1 2結合、1 3結合、1 4結合、1 6結合、1 4結合等を挙げることができ、また直鎖状に結合していても分岐状に結合していてもよい。

【0041】

オリゴ糖を構成する糖残基の数は2~11個が好ましく、特に3~11個、なかでも3

50

～ 5 個程度が好ましい。

【 0 0 4 2 】

本発明におけるリポソームを構成する脂質は、リポソームを構成することが知られている通常の脂質であればよく、例えば、飽和又は不飽和のアシル基を有する脂肪酸類、リン脂質類、ステロール類等を挙げることができる。また、卵黄レシチン、大豆レシチン等の天然物由来のリン脂質を含んでいてもよい。これらは単独で、又は二種以上を組み合わせて使用することができる。

【 0 0 4 3 】

脂肪酸及びリン脂質等における脂肪酸残基は任意に選択することができる。好ましい脂肪酸又は脂肪酸残基としては、炭素数 4 ～ 30 の飽和脂肪酸又は不飽和脂肪酸、より好ましくはラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸等の炭素数 12 ～ 24 の飽和脂肪酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキドン酸等の炭素数 14 ～ 22、不飽和結合 1 ～ 6 の不飽和脂肪酸を挙げることができる。これらは単独で、又は混合して利用ことができ、また二以上の脂肪酸残基を有する脂質においてはそれらの基は同一又は異なってもよい。

【 0 0 4 4 】

リン脂質の好適な例としては、ホスファチジルエタノールアミン (PA)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE)、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (DSPPE) 等のホスファチジルエタノールアミン類；ホスファチジルセリン (PS)、ジパルミトイルホスファチジルセリン (DPPS)、ジステアロイルホスファチジルセリン (DSPS) 等のホスファチジルセリン類；ホスファチジルコリン (PC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) 等のホスファチジルコリン類；ホスファチジン酸 (PA)、ジパルミトイルホスファチジン酸 (DPPA)、ジステアロイルホスファチジン酸 (DSPA) 等のホスファチジン酸類等が挙げられる。

【 0 0 4 5 】

ステロール類としては、コレステロール (Chol)、3 [N (ジメチルアミノエタン) カルバモイル] コレステロール (DC Chol)、N (トリメチルアンモニオエチル) カルバモイルコレステロール (TC Chol) 等を挙げることができる。

【 0 0 4 6 】

リポソーム表面へのオリゴ糖の導入は、上記オリゴ糖と脂質を結合して調製した人工糖脂質をリポソームの構成脂質として用いることを行うことができる。人工糖脂質は、オリゴ糖が有するアルデヒド基を、アミノ基を有するリン脂質と反応させてシッフ塩基を形成し、次にこのシッフ塩基を、常法に従い還元、好ましくは化学還元、例えば NaBH₄CN により還元することにより、オリゴ糖と脂質とを結合して調製することができる (例えば水落次男、糖質工学、224 232 頁、1992)。リポソーム表面におけるオリゴ糖は、抗原提示細胞表面に存在する糖鎖認識分子又はその一部を添加したときにリポソームの凝集反応が生じることで確認することができる。リポソーム表面に導入されるオリゴ糖の量は、リポソーム構成脂質 1mg に対して 0.5 μg ～ 500 μg であればよい。

【 0 0 4 7 】

リポソームに封入される NcCyps 量は特に限定されず、投与経路に応じて適宜調節可能であるが、一般的にリポソームに用いる脂質 1mg に対して 0.1 μg ～ 500 μg であることが望ましい。

【 0 0 4 8 】

リポソームへの NcCyps の封入は、脂質膜を水和する際に使用される水性溶媒に NcCyps を溶解することで行うことができる。例えば、前述のリポソームの脂質膜を構成する脂質及び人工糖脂質をクロロホルム等の有機溶媒で溶解後、有機溶媒を留去した乾燥物に、NcCyps を含む水性溶媒を添加した後、超音波処理又はボルテックス等による乳化を行うことで NcCyps が封入されたりポソームを調製することができる。この他にも、エタノール注入法、エーテル注入法、逆相蒸発法、界面活性剤法、凍結・融解法等によっても調製することができる。また、NcCyps に加えて、ネオスポラ原虫の感染予防又は治療等に有用な薬物、

核酸、ペプチド、タンパク質又はこれらの複合体等を併せて封入することができる。

【0049】

本発明におけるリポソームは、脂質二重層で構成される脂質膜を有する閉鎖小胞である限り、脂質膜の数は特に限定されず、多重膜リポソーム (multi lamella vesicle) であっても、また一枚膜リポソーム (uni lamella vesicle) であってもよい。また、リポソームの平均粒径に特に限定はなく、例えば所望の孔サイズのフィルターによる濾過を繰り返す等により平均粒径を調整することができる。

【0050】

ワクチン製剤

本発明のワクチン製剤は、上記のリポソームを生理食塩水、リン酸緩衝液、クエン緩衝液、酢酸緩衝液等の適当な水性溶媒に分散させた分散液の形態で使用することができる。分散液には、糖類、多価アルコール、水溶性高分子、非イオン界面活性剤、抗酸化剤、pH調節剤、水和促進剤、アルブミン又はカゼイン等のタンパク質、ウシ血清又は脱脂乳等のタンパク質含有物質等の、製薬上許容される担体や添加剤を適宜添加されていてもよい。本発明のワクチン製剤は、上記の分散液を凍結乾燥等した乾燥製剤の形態で利用することもできる。

10

【0051】

本発明のワクチン製剤は、所望によりアジュバント等を含み得る。アジュバントの例としては、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、サポニン、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、酸化アルミニウム、Nアセチルムラミル L トレオニル D イソグルタミン (thr MDP)、Nアセチルノルムラミル L アラニル D イソグルタミン (CGP11637、nor MDP)、Nアセチルムラミル L アラニル D イソグルタミン L アラニン 2 (1' 2' ジパルミトイル sn グリセロ 3 ヒドロキシホスホリルオキシ) エチルアミン (CGP19835A、MTP PE) 等を挙げることができるが、これらには限定されない。

20

【0052】

本発明のワクチン製剤の投与方法は特に制限はないが、皮下注射、静脈内注射又は筋肉内注射による投与が好ましい。

【0053】

投与量は、通常、1投与当たり抗原を0.01 µgから100,000 µgまでの範囲で、対象動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、シカ、イヌ等の哺乳動物の種類、その体調、年齢等、また投与経路を考慮して、適宜調節される。

30

【0054】

本発明のワクチン製剤は、単独投与スケジュールで、又は好ましくは複合投与スケジュールで与えられ得る。複合投与スケジュールでは、接種の開始時期に1~10の個別の投与を行い、続いて免疫応答を維持する及び又は強化するのに必要とされる時間間隔で、例えば2回目の投与として1~4ヵ月後に、別の投与を行い得る。必要であれば、数ヶ月後に引き続き投与を行い得る。投与のレジメもまた、少なくとも部分的には、個体の必要性により決定され、獣医師の判断に依存する。

【0055】

本発明のワクチン製剤は、ネオスポラ原虫感染の予防を目的に使用してもよいが、ネオスポラ原虫に感染した対象に投与してネオスポラ原虫を排除する治療的ワクチンとしても使用することができる。

40

【0056】

したがって、本発明はまた、その必要がある動物に有効量の上記ワクチン製剤を投与することを含む、ネオスポラ原虫感染症を治療及び/又は予防する方法を提供する。さらに本発明は、その必要がある動物に有効量の上記ワクチン製剤を投与することを含む、ネオスポラ原虫に対して特異的な免疫応答を当該動物において惹起させる方法をも提供する。

【0057】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定

50

されるものではない。

【実施例】

【0058】

実施例1 リポソームの調製

(1) ネオスポラ原虫 (*Neospora caninum*) のゲノムDNAを鋳型とし、シクロフィリン遺伝子 (GenBank ACCESSION No. XM 003879988) が増幅されるように設計したプライマーDNAを用いてPCRを行った。増副産物を発現ベクターpGEX 4T1のBamH I と EcoR Iサイトに組み込み、glutathione S transferase (GST) と配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるNcCypとの融合タンパク質を発現するベクターを構築した。このベクターで大腸菌DH5を形質転換し、菌体内で融合タンパク質を発現させた。菌体から融合タンパク質を回収し、Glutathione Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech) 及びDetoxi Gel™ Endotoxin Removing Gel (Pierce) を用いて精製及びエンドトキシン除去を行い、さらにGSTを切断除去して、組換えタンパク質としてNcCyp/リン酸緩衝液を得た。

10

【0059】

(2) Man 1 6(Man 1 3)Manという構造を有するマンノトリオース (Man3) 2.5~5mgを600 µlの蒸留水に溶解して、オリゴ糖溶液を調製した。クロロホルム/メタノール (1:1体積比) 混合液にジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE) を5mg/mlの濃度で溶解してDPPE溶液を調製した。また、メタノールにNaBH₃CNを10mg/mlの濃度に溶解して、NaBH₃CN溶液を調製した。前記オリゴ糖溶液600 µlに前記DPPE溶液9.4ml及び前記NaBH₃CN溶液1mlを加えて攪拌混合し、60 °Cにて16時間反応させた。反応混合液をシリカゲルカラム及びC18逆相カラムを通して、マンノトリオースジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (M3 DPPE) を調製した。

20

【0060】

(3) 10mL容フラスコ中のクロロホルム2mLに、Chol、DPPC及び(2)のM3 DPPEを10:10:1 (モル比) で混合溶解した後、クロロホルムを留去して脂質フィルムを作製した。この脂質フィルムに(1)で調製したNcCyp/リン酸緩衝液を1.4 ml (NcCyp含量2.0 mg) 加え、40 °Cの水槽でVortexしてリポソームを調製した。さらに0.2~1 MPaで加圧しながら1 µmのフィルターを5回通過させた後、PBS () で3回遠心洗浄して、NcCypが封入されたりポソーム (NcCyp OML、平均粒径1.0 µm) を得た。

30

【0061】

実施例2 NcCyp OMLの免疫誘導能の評価 (in vitro)

(1) RAW264.7細胞

NF-κBの活性化によって分泌型アルカリホスファターゼ (NF-κB/SEAP) を産生するマウスマクロファージ様RAW264.7細胞株を10%牛胎児血清含有ダルベッコ改変イーグル培地中に2 × 10⁶ cells/mlの濃度に懸濁し、0.1 ml/wellずつ96 well plateに分注した。次いで各ウェルにリポ多糖 (LPS) (終濃度50 µg/ml、100 µg/ml)、NcCyp (終濃度10 nM、100nM)、NcCyp OML (終濃度10nM、100nM) を加え、37 °C、5% CO₂下で24時間インキュベートした。インキュベート後の培養上清中の分泌型アルカリホスファターゼ量を、Secreted Alkaline Phosphatase Reporter Assay Kit (ノバス バイオロジカルズ) を用いて測定した。一元配置のANOVAとチューキー・クレーマーの多重比較検定により、測定値の統計解析を行った。

40

【0062】

結果を図1に示す。アルカリフォスファターゼ量は未処理群 (mock) と比較してNcCyp OML群で有意に多く、NcCyp OML添加によるNF-κBの活性化が確認された。

【0063】

(2) マウス腹腔由来マクロファージ

C57BL/6マウス (オス、8週齢) から常法に従って得たマウス腹腔由来マクロファージを10%牛胎児血清含有ダルベッコ改変イーグル培地中に3 × 10⁶ cells/mlの濃度に懸濁し、0.1 ml/wellずつ96 well plateに分注した。次いで各ウェルにリポ多糖 (LPS) (終濃度10 ng/ml)、NcCyp (終濃度10 nM、100nM)、NcCyp OML (終濃度10 nM、100nM) を加え、37 °C、5% CO₂下で24時間インキュベートした。インキュベート後の培養上清中の分泌型アルカリホスファターゼ量を、Secreted Alkaline Phosphatase Reporter Assay Kit (ノバス バイオロジカルズ) を用いて測定した。一元配置のANOVAとチューキー・クレーマーの多重比較検定により、測定値の統計解析を行った。

50

、5% CO₂下で20時間インキュベートした。インキュベート後の培養上清におけるIL 12 p40濃度を、IL 12 p40 Mouse ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。一元配置のANOVAとチューキー・クレーマーの多重比較検定により、統計解析を行った。

【0064】

結果を図2に示す。NcCyp OMLの添加により、マクロファージからのIL 12p40の産生が誘導された。

【0065】

以上から、NcCyp OMLがNcCypよりも強くNF- κ Bを活性化し、マクロファージからの炎症性サイトカインの産生を誘導することが確認された。

【0066】

実施例3 NcCyp OMLのNcCyp特異抗体産生誘導能の評価 (in vivo)

BALB/cマウス(メス、8週齢)に、NcCyp、NcCyp OML又はPBSを2週間隔で3回皮下免疫し(1回あたり25 pmolタンパク質)、さらに最終免疫から2週目にネオスポラ原虫(1×10^6)を腹腔内接種した。それぞれの免疫日の2日前に血清を採取し、NcCyp特異的IgG1及びIgG2a抗体をELISA法により検出した。ELISA法はNcCyp精製組換えタンパク質を抗原とし、一次抗体を100倍希釈マウス血清、2次抗体を4,000倍希釈HRP標識抗マウスIgGおよびIgG2a抗体、ABTSを基質として実施した。1回の実験で1試験区6匹のマウスを使用し、2回の実験で同様の結果を得た。二元配置のANOVAとチューキー・クレーマーの多重比較検定により、測定値の統計解析を行った。

【0067】

代表的な1回の実験結果を図3に示す。NcCyp OMLの免疫によりNcCyp特異的IgG1抗体の産生が確認された。また、ネオスポラ原虫感染後である初回免疫後49日目には、PBS投与群と比較して、NcCyp OML免疫群及びNcCyp免疫群においてNcCyp特異的IgG2a抗体の産生が確認され、NcCyp OML免疫の方がより多くの抗体産生が誘導された。

【0068】

以上から、NcCyp OMLの免疫により、NcCypに対する特異抗体であるTh2型のIgG1抗体とTh1型のIgG2a抗体の両方の産生が誘導されること、NcCypをOMLに封入することにより特異抗体の誘導効率が向上することが示された。

【0069】

実施例4 NcCyp OMLのNcCyp特異的サイトカイン産生誘導能の評価(マウス由来脾臓細胞)

(1) 脾臓細胞の増殖及びIFN- γ 産生

BALB/cマウス(メス、8週齢)に対し、NcCyp、NcCyp OML、PBSを2週間隔で3回皮下免疫した(1回あたり25 pmolタンパク質)。最終免疫から2週目に脾臓を摘出し、ホモジネートすることで脾臓細胞懸濁液を調製した(5×10^6 cells/ml RPMI1640培地)。脾臓細胞懸濁液にコンカナバリンA(ConA)(終濃度0.5 μ g/ml、5 μ g/ml)、ネオスポラ原虫ライセート(NLA)(終濃度10 μ g/ml、50 μ g/ml)、NcCyp(終濃度10 μ g/ml、50 μ g/ml)を加えて、又は陰性対照(Medium)として何も加えずに、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂下で48時間培養した。脾臓細胞の増殖をCell Counting Kit 8 reagent (CCK 8, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)を用いて、培養上清中のIFN- γ 濃度をIFN- γ Mouse ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて測定した。1試験区4匹のマウスを使用した。二元配置のANOVAとチューキー・クレーマーの多重比較検定により、測定値の統計解析を行った。

【0070】

結果を図4に示す。NcCyp OML免疫群由来脾臓細胞はNcCyp刺激下で増殖が亢進し(図4A)、またIFN- γ 産生量が増加した(図4B)。

【0071】

(2) 他のネオスポラ原虫由来抗原封入りポソームとの比較

実施例1と同様の方法で、NcCypに代えてGST融合組換えタンパク質であるネオスポラDefense granule protein 7(NcGRA7)を封入したリポソーム(M3 NcGRA7)、GST融合組換え

10

20

30

40

50

タンパク質であるネオスポラ Apical membrane antigen 1 (NcAMA1) を封入したりポソーム (M3 NcAMA1) を、又は GST を封入したりポソーム (M3 GST) を調製した。BALB/c マウス (メス、6 週齢) に対し、NcGRA7、M3 NcGRA7、NcAMA1、M3 NcAMA1、PBS を 2 週間隔で 3 回皮下免疫した (1 回あたり 25 pmol タンパク質)。最終免疫から 2 週目に脾臓を摘出し、ホモジネートすることで脾臓細胞懸濁液を調製した (5×10^6 cells/ml RPMI1640 培地)。脾臓細胞懸濁液にコンカナバリン A (ConA) (終濃度 $2 \mu\text{g/ml}$)、ネオスポラ原虫ライセート (NLA) (終濃度 $50 \mu\text{g/ml}$)、NcGRA7 (終濃度 $10 \mu\text{g/ml}$)、NcAMA1 (終濃度 $10 \mu\text{g/ml}$) を加えて、又は陰性対照 (Medium) として何も加えずに、 37°C 、5% CO_2 下で 48 時間培養した後、培養上清中の IFN γ 濃度を (1) と同様に測定した。培養上清中の IL 4 濃度は IL 4 Mouse ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

10

【0072】

免疫した抗原間の比較のため、上記の IFN γ 濃度及び IL 4 濃度の測定値、並びに (1) で測定した IFN γ 濃度及び IL 4 濃度の測定値を、CoA 刺激下での対応する測定値で除算して内部補正を行い、Th1 反応指向性を表す IFN γ /IL 4 の値を算出した。

【0073】

結果を図 5 に示す。M3 NcGRA7 (図 5 B) 又は M3 NcAMA1 (図 5 C) を免疫した場合と比較して、NcCyp OML を免疫したマウスの脾臓細胞は、NcCyp 及び NLA の抗原刺激に対して高い IFN γ /IL 4 値を示した (図 5 A)。

【0074】

以上から、NcCyp OML は、既存の OML ワクチンと比較して、Th1 型反応と Th2 型反応のバランスを Th1 側にシフトさせる能力が高いことが示された。

20

【0075】

実施例 5 感染マウスモデルにおける NcCyp OML の有効性の評価

BALB/c マウス (メス、8 週齢) に対し、NcCyp、NcCyp OML 又は PBS を 2 週間隔で 3 回皮下免疫し (1 回あたり 25 pmol タンパク質)、さらに最終免疫から 2 週目にネオスポラ原虫 (1×10^6) を腹腔内接種した。ネオスポラ原虫感染後 2 から 32 日まで、マウスの臨床スコアを評価した。臨床スコアは身体的症状、行動、神経症状、脱水・食欲減退、その他の 5 項目に関しての合計値を用いた (Reichel and Ellis, Int J Parasitol 2009, 39:1173-1187)。また、感染後 32 日目に生存マウスの脳組織を採材し、脳組織 DNA の 50ng あたりに含まれる原虫量を定量した (Abe et al., Parasit Vectors. 2015, 6:8:5)。1 回の実験で 1 試験区 6 匹のマウスを使用し、合計 2 回の実験結果を示した (1 試験区 12 匹のマウス)。感染後 32 日目のマウス生存率を Log rank (Mantel Cox) test により、臨床スコアを二元配置の ANOVA と Bonferroni の多重比較検定により、感染後 32 日目の生存マウス脳組織中の原虫量を一元配置の ANOVA と チューキー・クレーマー の多重比較検定により統計解析した。

30

【0076】

感染後 32 日目のマウスの生存曲線を図 6 A に示す。NcCyp 免疫群と NcCyp OML 免疫群では、PBS 投与群に対して有意に高い生存率が確認された。

【0077】

また、マウスの臨床スコアを図 6 B に示す。NcCyp 免疫群と NcCyp OML 免疫群では、PBS 投与群に対して臨床スコアが有意に低く、NcCyp 又は NcCyp OML 免疫による臨床症状の抑制効果が確認された。

40

【0078】

さらに、感染後 32 日目の生存マウス脳組織中の原虫量を図 6 C に示す。NcCyp OML 免疫群では、PBS 投与群に対して原虫量が有意に少なかった。

【0079】

以上から、NcCyp OML は、ネオスポラ原虫感染症に対して有効であることが示された。

【0080】

実施例 6 TLR2 KO マウスにおける NcCyp OML の有効性の評価

C57BL/6 マウス及び Toll like receptor 2 遺伝子を欠損した TLR2 KO マウス (オス、8 週齢) に対し、NcCyp、NcCyp OML 又は PBS を 2 週間隔で 3 回皮下免疫し (1 回あたり 25 pmol タ

50

ンパク質)、さらに最終免疫から2週目にネオスポラ原虫(1×10⁵)を腹腔内接種した。1回の実験で1試験区8匹のマウスを使用した。感染後70日目のマウス生存率をLog rank (Mantel Cox) testにより統計解析した。

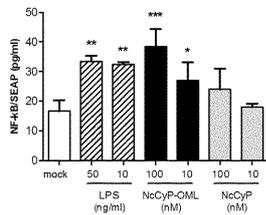
【0081】

感染後70日間のC57BL/6マウスの生存曲線を図7Aに、TLR2 KOマウスの生存曲線を図7Bに示す。C57BL/6マウスの場合、NcCyp OML免疫群でPBS投与群に対して有意に高い生存率が確認された。一方、TLR2 KOマウスの場合、NcCyp OML免疫群とPBS投与群との間に有意差は認められなかった。

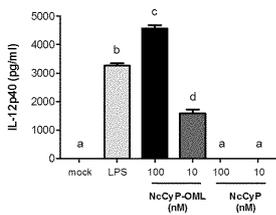
【0082】

以上から、NcCyp OMLによる防御免疫の誘導には、TLR2が必要であることが示された。

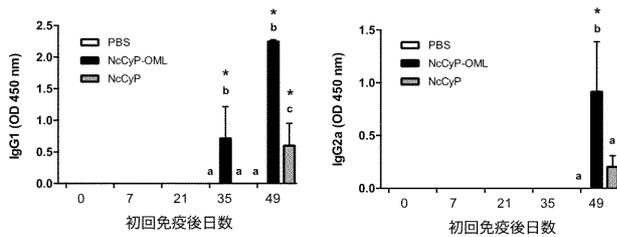
【図1】



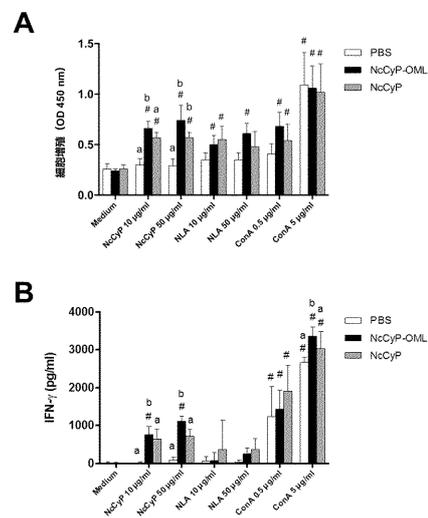
【図2】



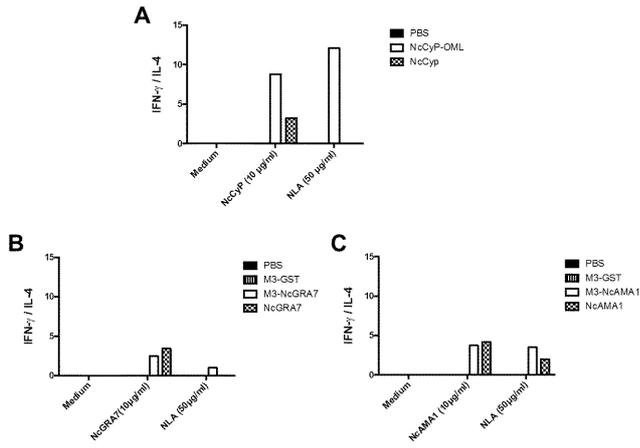
【図3】



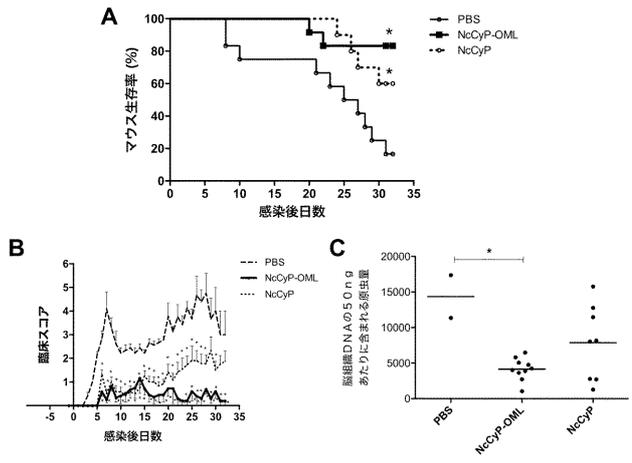
【図4】



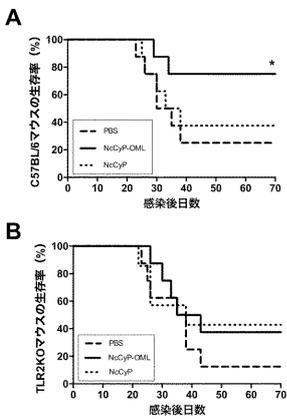
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【配列表】

2019182751000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 黒田 泰弘

神奈川県平塚市北金目四丁目1番1号 東海大学内

Fターム(参考) 4C085 AA03 BA02 BB11 EE06 FF14 GG04 GG05 GG08 GG10
4H045 AA30 CA20 DA86 EA31 FA74