(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2010-502766
(P2010-502766A)
(43)公表日　平成22年1月28日(2010.1.28)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 39/39	(2006.01)	A61K 39/39	ZNA	4B024
A61K 39/00	(2006.01)	A61K 39/00		4C085
A61K 39/04	(2006.01)	A61K 39/04		
A61P 11/06	(2006.01)	A61P 11/06		
A61P 37/08	(2006.01)	A61P 37/08		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 31 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2009-530700 (P2009-530700)
(86)(22)出願日　平成19年6月15日 (2007.6.15)
(85)翻訳文提出日　平成21年2月16日 (2009.2.16)
(86)国際出願番号　PCT/US2007/071371
(87)国際公開番号　WO2008/054892
(87)国際公開日　平成20年5月8日 (2008.5.8)
(31)優先権主張番号　60/814,382
(32)優先日　平成18年6月16日 (2006.6.16)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　503048431
フロリダ　アトランティック　ユニヴァーシティ
米国，フロリダ州　３３４３１－０９９１，ボカ　レイトン，ピー．オー．ボックス　３０９１，グレイズ　ロード　７７７
(74)代理人　100080089
弁理士　牛木　護
(74)代理人　100137800
弁理士　吉田　正義
(74)代理人　100119312
弁理士　清水　栄松
(74)代理人　100125081
弁理士　小合　宗一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アジュバントとしてのキチン微粒子

(57)【要約】
キチン（天然のＮアセチル－Ｄ－グルコサミンの多量体）微粒子の調製、免疫アジュバントとしてのキチン微粒子の特徴付け、細胞内病原体及び疾患に対する防御免疫を増大し、アレルギー応答及び疾患を阻害するキチン微粒子の使用に関する組成物及び方法。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
直径約０．０１μｍないし２０μｍのキチン微粒子を少なくとも１個含むことを特徴とする、アジュバント組成物。
【請求項２】
前記キチン微粒子は直径約１μｍないし１０μｍであることを特徴とする、請求項１に記載のアジュバント組成物。
【請求項３】
前記キチン微粒子は直径約１μｍないし４μｍであることを特徴とする、請求項１に記載のアジュバント組成物。
【請求項４】
前記キチン微粒子は、２型ヘルパーＴ細胞の活性を低下させ、１型ヘルパーＴ細胞の活性を増大させるのに有効な量で医薬品組成物に懸濁されることを特徴とする、請求項１に記載のアジュバント組成物。
【請求項５】
前記キチン微粒子は、１ミリグラムあたり粒子約1×10^{3}個から5×10^{9}個までの濃度で存在することを特徴とする、請求項１に記載のアジュバント組成物。
【請求項６】
前記キチン微粒子は、１ミリグラムあたり粒子約1×10^{8}個から約6×10^{8}個までの濃度で存在することを特徴とする、請求項５に記載のアジュバント組成物。
【請求項７】
前記キチン微粒子の直径が約１μｍないし約１０μｍのとき、該キチン微粒子は１ミリグラムあたり粒子約1×10^{8}個から約3×10^{8}個までの濃度で存在することを特徴とする、請求項５に記載のアジュバント組成物。
【請求項８】
前記キチン微粒子の直径が約１μｍないし約４μｍのとき、該キチン微粒子は１ミリグラムあたり粒子約3×10^{8}個から約6×10^{8}個までの濃度で存在することを特徴とする、請求項５に記載のアジュバント組成物。
【請求項９】
前記組成物は、マイコバクテリウム属細菌の抗原と、ＭＤＰ－５９と、ブタクサのアレルゲンと、ピーナッツのアレルゲンと、木の実のアレルゲンと、花粉のアレルゲンと、家屋内のチリ・ダニのアレルゲンと、ゴキブリのアレルゲンと、卵白アルブミンと、マイコバクテリウム属細菌のヒート・ショックタンパク質６５と、抗原と、これらの精製タンパク質誘導体（ＰＰＤ）及び誘導体とをさらに含むことを特徴とする、請求項１に記載のアジュバント組成物。
【請求項１０】
前記抗原は、ワクチン、腫瘍抗原、ウイルス性抗原、細菌性抗原又はペプチドを含むことを特徴とする、請求項９に記載のアジュバント組成物。
【請求項１１】
エンドトキシン不含生理食塩水でキチンの原料を洗浄するステップと、
洗浄されたキチンを酸と混合するステップと、
酸可溶性のキチンの抽出及び単離するステップと、
可溶性のキチンを中和及び沈殿するステップと、
水に不溶性のキチンを洗浄するステップと、
水に不溶性のキチンを凍結乾燥するステップと、
水に不溶性のキチンをエンドトキシン不含生理食塩水に再懸濁するステップと、
キチンの粒子を微細孔を通して濾過するステップと、
１－１０μｍのキチン微粒子を調製するステップとを含むことを特徴とする、キチン微粒子を調製する方法。
【請求項１２】

前記キチン微粒子のサイズは約１μｍないし４μｍであることを特徴とする、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
生理食塩水中の前記キチン微粒子は少なくとも１年間４°Ｃで安定であることを特徴とする、請求項１１に記載の方法。
【請求項１４】
約１μｍないし４μｍの前記キチン微粒子の治療上の有効量を患者に投与するステップを含むことを特徴とする、炎症性疾患を治療及び／又は予防する方法。
【請求項１５】
前記キチン微粒子は、患者の体重１キログラムあたり約０．１－５００ｍｇを含む量で投与されることを特徴とする、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
前記キチン微粒子は、患者の体重１キログラムあたり約０．１－１０ｍｇを含む量で腹腔内又は皮下に投与されることを特徴とする、請求項１４に記載の方法。
【請求項１７】
前記キチン微粒子は、経口投与されるとき、患者の体重１キログラムあたり約０．１－１ｇを含む量で投与されることを特徴とする、請求項１４に記載の方法。
【請求項１８】
前記キチン微粒子は、２型ヘルパーＴ細胞の活性を低下させ、１型ヘルパーＴ細胞の活性を増大させるのに有効な量で医薬品組成物に懸濁されることを特徴とする、請求項１４に記載の方法。
【請求項１９】
投与経路は、経口投与、腹腔投与、静注及び／又は皮下投与であることを特徴とする、請求項１４に記載の方法。
【請求項２０】
前記キチン微粒子の投与はＴｈ２が介在する疾患を下向き調節するのに治療上有効であり、前記疾患は、アレルギー性喘息、食物アレルギー及びアレルギー性皮膚炎を含むことを特徴とする、請求項１４に記載の方法。
【請求項２１】
前記キチン微粒子の投与は、細胞内感染に対するＴｈ１宿主防御を上向き調節するのに治療上有効であることを特徴とする、請求項１４に記載の方法。
【請求項２２】
直径約１μｍないし４μｍの前記キチン微粒子の有効量を動物に投与するステップを含むことを特徴とする、免疫応答を変調する方法。
【請求項２３】
前記キチン微粒子は、２型ヘルパーＴ細胞の活性を低下させ、１型ヘルパーＴ細胞の活性を増大させるのに有効な量で医薬品組成物に懸濁されることを特徴とする、請求項２１に記載の方法。
【請求項２４】
投与経路は、経口投与、腹腔投与、静注及び／又は皮下投与であることを特徴とする、請求項２１に記載の方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、感染及び免疫疾患の予防及び治療のために動物及びヒトにおいてＴ細胞アジュバントを使用する方法の分野に関する。
【背景技術】
【０００２】
ある種の微生物は、全ての人、特に免疫機能低下状態（高齢者、病人、妊婦及び小児）

の人の健康を脅かす場合がある。微生物の取り込みは生命を脅かす感染病につながる。さらに、環境中のアレルゲンは、喘息を含むさまざまな即時型過敏性疾患の原因となる。宿主の防御機構を刺激しうる実用的な免疫変調剤、すなわちＴｈ１アジュバントは、多剤耐性菌を含む細胞内の病原体と、即時型過敏性疾患とに対する宿主の防御の促進への一般的なアプローチの典型となるであろう。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００３】

しかし本出願のために現在入手可能な臨床的に適切なＴｈ１アジュバントはない。

【０００４】

概要

本発明は、キチン（天然のＮアセチル－Ｄ－グルコサミンの多量体）微粒子の調製と、免疫アジュバントとしてのキチン微粒子の特徴付けと、キチン微粒子の使用とに関し、該キチン微粒子の使用は、感染しやすいモデル動物において食中毒及び胎児の流産の原因となるリステリア　モノサイトゲネスのような病原体に対する防御免疫を増強する。

【課題を解決するための手段】

【０００５】

好ましい実施態様では、アジュバントの組成物は、直径約０．０１μｍないし２０μｍのキチン微粒子を少なくとも１個含む。

【０００６】

別の好ましい実施態様では、前記キチン微粒子は直径約１μｍないし１０μｍである。

【０００７】

別の好ましい実施態様では、前記キチン微粒子は直径約１μｍないし４μｍである。

【０００８】

好ましい実施態様では、前記キチン微粒子は２型ヘルパーＴ細胞の活性の低下と、１型ヘルパーＴ細胞の活性の増大とに有効な量の医薬品組成物に懸濁される。前記キチン微粒子は、１ミリグラムあたり粒子約1×10^{3}個から5×10^{9}個までの濃度で存在することが好ましい。また、前記キチン微粒子は、１ミリグラムあたり粒子約1×10^{8}個から約6×10^{8}個までの濃度で存在することが好ましい。

【０００９】

別の好ましい実施態様では、前記キチン微粒子の直径が約１μｍないし約１０μｍであるとき、前記キチン微粒子は１ミリグラムあたり粒子約1×10^{8}個から約3×10^{8}個までの濃度で存在する。また、前記キチン微粒子の直径が約１μｍないし約４μｍであるとき、前記キチン微粒子は１ミリグラムあたり粒子約3×10^{8}個から約6×10^{8}個までの濃度で存在することが好ましい。

【００１０】

別の好ましい実施態様では、前記組成物は、マイコバクテリウム属細菌の抗原と、ＭＤＰ－５９と、ブタクサのアレルゲンと、ピーナッツのアレルゲンと、木の実のアレルゲンと、花粉のアレルゲンと、家屋内のチリ・ダニのアレルゲンと、ゴキブリのアレルゲンと、卵白アルブミンと、マイコバクテリウム属細菌のヒート・ショックタンパク質６５と、抗原と、これらの精製タンパク質誘導体（ＰＰＤ）及び誘導体とをさらに含む。

【００１１】

他の好ましい実施態様では、前記キチン微粒子は、ワクチン、腫瘍抗原、ウイルス抗原、微生物抗原又はペプチドを含む組成物として投与される。前記キチン微粒子は、ワクチンの投与前か、ワクチンとともにか、ワクチンの投与中及び投与後かに投与される。

【００１２】

他の好ましい実施態様では、キチン微粒子を調製する方法は、エンドトキシン不含生理食塩水でキチンの原料を洗浄するステップと、洗浄されたキチンを酸と混合するステップと、酸可溶性のキチンを抽出及び単離するステップと、可溶性のキチンを中和及び沈殿するステップと、水に不溶性のキチンを洗浄するステップと、水に不溶性のキチンを凍結乾

燥するステップと、水に不溶性のキチンをエンドトキシン不含生理食塩水に再懸濁するステップと、キチン粒子を微細孔を通して濾過するステップと、１－１０μｍのキチン微粒子を調製するステップとを含む。１つの局面では、前記キチン微粒子は約１ないし４μｍである。調製された前記キチン微粒子は生理食塩水中で長期間保存可能で、４°Ｃで少なくとも１年間安定である。

【００１３】

他の好ましい実施態様では、炎症性疾患を治療及び／又は予防する方法はキチン微粒子の治療上の有効量を患者に投与することを含み、前記キチン微粒子は約１μｍないし４μｍである。

【００１４】

別の好ましい実施態様では、前記キチン微粒子は前記患者の体重１キログラムあたり約０．１－５００ミリグラムを含む量で投与される。

【００１５】

別の好ましい実施態様では、前記キチン微粒子は前記患者の体重１キログラムあたり約０．１－１０ミリグラムを含む量で腹腔内又は皮下に投与される。

【００１６】

他の好ましい実施態様では、前記キチン微粒子は経口投与時に前記患者の体重１キログラムあたりに約０．１－１グラムを含む量で投与される。

【００１７】

別の好ましい実施態様では、前記キチンの微粒子は、２型ヘルパーＴ細胞の活性の低下と、１型ヘルパーＴ細胞の活性の増大とに有効な量の医薬品組成物中に懸濁される。投与経路は、経口投与、腹腔内投与、静注及び／又は皮下投与である。

【００１８】

別の実施態様では、キチン微粒子の投与は、アレルギー性喘息、食物アレルギー及びアレルギー性皮膚炎を含むＴｈ２が介在する疾患を下向き調節するのに治療上有効である。

【００１９】

別の好ましい実施態様では、キチン微粒子の投与は、細胞内感染に対するＴｈ１－宿主防御を上向き調節するのに治療上有効である。

【００２０】

別の好ましい実施態様では、免疫応答を変調する方法は直径約１μｍないし４μｍのキチン微粒子の有効量を動物に投与することを含む。

【００２１】

他の好ましい実施態様では前記キチン微粒子は、２型ヘルパーＴ細胞の活性の低下と、１型ヘルパーＴ細胞の活性の増大とに有効な量で医薬品組成物に懸濁される。

【００２２】

別の好ましい実施態様では、投与経路は、経口投与、腹腔内投与、静注及び／又は皮下投与である。

【００２３】

一部の実施態様では、キチン粒子の濃度は１－１０μｍのキチン粒子について１ミリグラムあたり粒子約1×10^{3}個ないし約5×10^{8}個であり、１－４μｍのキチン粒子について１ミリグラムあたり粒子約1×10^{4}個ないし約1×10^{9}個である。

【００２４】

他の局面は以下に説明される。

【００２５】

本発明は添付する請求の範囲に詳細に示される。本発明の上記及びさらなる利点は添付する図面とともに以下の説明を参照することによってさらに良く理解される場合がある。

【図面の簡単な説明】

【００２６】

【図１】キチン微粒子が宿主に投与されたときの宿主防御機構の作動機序を示す概念図。

【図２】哺乳類疾患の治療の使用時の機構を示す概念図。

【図３】キチン粒子が細菌のＣｐＧ及びＬＰＳによるＴＮＦα産生活性と比肩するＴＮＦα産生活性を誘導したことを示すグラフ。
【図４】キチン粒子の腹腔内（ＩＰ）投与は、腹腔マクロファージ（図４Ａ）及び脾臓マクロファージ（図４Ｂ）による活性窒素及び酸素中間体の放出を増大することを示すグラフ。結果は、前記マクロファージはスーパーオキサイドアニオン（ＲＯＳ）及び一酸化窒素（ＮＯ、ＲＯＳ）を放出したことをその結果は示す。Ｃ５７ＢＬ／６マウスは腹腔内投与でキチン微粒子を１ｍｇ投与された。示された間隔で、腹腔及び脾臓マクロファージは単離された。グリース（Ｇｒｉｅｓｓ）試薬によるＮＯの放出を測定するために、マクロファージはＬＰＳ（１μｇ／ｍＬ）で１時間刺激された。シトクロームｃの還元によるスーパーオキサイドアニオンの放出を測定するために、マクロファージはＰＭＡ（１μＭ）で１時間刺激された。平均値±標準偏差値、ｎ＝３。
【図５】キチン微粒子はＲＡＷ２６４．７マクロファージでＴＮＦαの産生を誘導するが（図５Ｂ）、ＩＬ－１０の産生を検出できない（図５Ａ）ことを示すグラフ。キチン微粒子（１００μｇ／ｍＬ）、ＣｐＧ－ＯＤＮ（５μｇ／ｍＬ）、ＧｐＣ－ＯＤＮ（５μｇ／ｍＬ）、熱殺菌されたマイコバクテリウム　ボビス菌ＢＣＧ株（ＨＫ－ＢＣＧ）（１００μｇ／ｍＬ）、ＬＰＳ（１μｇ／ｍＬ）、可溶性キチン少糖類（１ｍｇ／ｍＬ）、５０μｍより大きいキチン粒子（１ｍｇ／ｍＬ）、１－１０μｍのキトサン粒子（１ｍｇ／ｍＬ）又は１．１μｍのラテックスビーズ（１ｍｇ／ｍＬ）でＲＡＷ２６４．７細胞（細胞10^6個／ｍＬ）は刺激された。ＩＬ－１０及びＴＮＦαのレベルは特異的ＥＬＩＳＡ法で検出された。平均値±標準偏差値、ｎ＝４、＊はｐ＜０．０５、＃は同じ時間点で生理食塩水で処理された細胞と比較したときのｐ＜０．０１。
【図６】キチン微粒子は、マウス脾臓マクロファージでＴＮＦα産生を誘導するが（図６Ｂ）、ＩＬ－１０産生を検出できない（図６Ａ）ことを示すグラフ。マウスの脾臓マクロファージは正常なＣ５７ＢＬ／６マウスから単離された。１－１０μｍのキチン微粒子（１００μｇ／ｍＬ）、ＣｐＧ－ＯＤＮ（５μｇ／ｍＬ）、ＧｐＣ－ＯＤＮ（５μｇ／ｍＬ）、熱殺菌されたマイコバクテリウム　ボビス菌ＢＣＧ株（ＨＫ－ＢＣＧ）（１００μｇ／ｍＬ）、ＬＰＳ（１μｇ／ｍＬ）、可溶性キチン少糖類（１ｍｇ／ｍＬ）、５０μｍより大きいキチン粒子（１ｍｇ／ｍＬ）、１－１０μｍのキトサン粒子（１ｍｇ／ｍＬ）又は１．１μｍのラテックスビーズ（１ｍｇ／ｍＬ）で、ＴＮＦαの産生のために３時間及びＩＬ－１０の産生のために２４時間、３７°Ｃで脾臓細胞（細胞2×10^6個／ｍＬ）は刺激された。ＴＮＦα及びＩＬ－１０のレベルは特異的ＥＬＩＳＡ法で検出された。平均値±標準偏差値、ｎ＝４、＊はｐ＜０．０５、＃は同じ時間点で生理食塩水で処理された細胞と比較したときのｐ＜０．０１。
【図７】キチン微粒子、ＣｐＧ－ＯＤＮ、ＨＫ－ＢＣＧ及びＬＰＳは、ＲＡＷ　２６４．７細胞でｐ３８、ＥＲＫ１／２及びＪＮＫを活性化することを示すウエスタンブロットの画像図。キチン微粒子（１００μｇ／ｍＬ）、ＣｐＧ－ＯＤＮ（５μｇ／ｍＬ）、ＧｐＣ－ＯＤＮ（５μｇ／ｍＬ）、ＨＫ－ＢＣＧ（１００μｇ／ｍＬ）、ＬＰＳ（１μｇ／ｍＬ）、可溶性キチン少糖類（１ｍｇ／ｍＬ）、５０μｍより大きいキチン粒子（１ｍｇ／ｍＬ）、キトサン粒子（１ｍｇ／ｍＬ）又は１．１μｍのラテックスビーズ（１ｍｇ／ｍＬ）で０、１０、２０、３０及び４０分間、３７°Ｃで細胞（細胞10^6個／ｍＬ）は刺激された。単離されたマクロファージタンパク質は１１％のＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲルで分離され、ＰＶＤＦ膜にエレクトロブロットされた。リン酸化されたＭＡＰＫ（Ｐ－ｐ３８、Ｐ－Ｅｒｋ１／２及びＰ－ＪＮＫ）は特異抗体で検出された。
【図８】ブタクサで感作されたＢａｌｂ／ｃマウスにおける血清ＩｇＥレベルへのキチン処理の効果を示すグラフ。マウスの複数のグループ（７匹／グループ）が、ブタクサでの免疫前に経口にて３日間キチン（ｍｇ／マウス／日）を投与され、免疫化期間中継続してキチン投与された。免疫化されたマウスは、生理食塩水（０．５ｍＬ／マウス／日）を投与して免疫化されたマウスが対照として用いられた。血液サンプルは図示された日に尾静脈から回収された。前記血液サンプルでのＩｇＥレベルの全ては、ＥＬＩＳＡ法で測定された。平均値±標準偏差値、ｎ＝７、＊＊はｐ＜０．０１、＃は前記生理食塩水で処理さ

れたグループと比較したときのｐ＜０．０００５。
【図９】ＭＰＢ－５９及びキチン微粒子で同時免疫されたＣ５７ＢＬ／６（ＷＴ）及びＩＬ－１０ノックアウト（ＩＬ－１０－ＫＯ）マウスでＭＰＢ－５９で誘発されたフットパッドの遅延型過敏症の発症を示すグラフ。野生型（白色棒）及びＩＬ－１０（黒色棒）マウスは、図示されたようにＭＰＢ－５９、ＭＰＢ－５９／キチン、キチン及び生理食塩水で免疫された。最終免疫処理後７日目に、野生型及びＩＬ－１０ＫＯマウスは、右フットパッドに５０ｍｇのＭＰＢ－５９溶液を、左フットパッドに５０μＬの生理食塩水（対照）を供与された。４８時間後にマウスの各グループで右フットパッドの厚さと左フットパッドの厚さとの差が得られた。平均値±標準偏差値、ｎ＝６。
【図１０】PEG_2生合成能はキチン微粒子の投与によって下向き調節されることを示すグラフ。Ｃ５７ＢＬ／６マウスは腹腔内にキチン粒子（１ｍｇ）を投与された。腹腔マクロファージは刺激２４時間後に単離された。マクロファージの懸濁液（細胞10^6個／ｍＬ）はPEG_2放出を測定するために２時間、１μＭ　カルシウムイオノファア２３１８７（黒色棒）又は培養液（灰色棒）で刺激された。PEG_2はＥＬＩＳＡ法によってアッセイされた。平均値±標準偏差値、ｎ＝３。
【図１１】新規１－４μｍのキチン調製物で得られた結果を示すグラフ。１－１０μｍのキチン粒子は実施例の項で記載される通りに調製され、メッシュ及び差次的な遠心分離を通じて濾過された。細かい粒子（１－４μｍ）と、中間径の粒子（４－７μｍ）と、粗い粒子（７－１０μｍ）という３つの画分が得られた。粒径はサイトメーターで測定された。分画された前記粒子（２０μｇ／ｍＬ）が、上述したように脾臓細胞培養に含まれるマクロファージ及びＮＫ細胞に添加された。２４時間培養後、上清中のＩＬ－１２（黒色棒）及びＩＦＮγ（白色棒）レベルがＥＬＩＳＡ法によって測定された。平均値±標準偏差値、ｎ＝３ないし４。
【図１２】ＣｐＧ－ＯＤＮで誘導されたＩＬ－１０のｍＲＮＡレベルでのキチン微粒子の効果を示すブロット図。
【発明を実施するための形態】
【００２７】
詳細な説明
キチン微粒子を含む組成物。キチン（天然のＮアセチル－Ｄ－グルコサミンの多量体）微粒子の調製と、免疫アジュバントとしてのキチン微粒子の特徴付けと、病原体に対する防御免疫を増大するためのキチン微粒子の使用との方法。
【００２８】
定義
本明細書で用いられるところの「被験体」又は「患者」とは、本発明に従って実施される治療の受容者をいう。前記被験体はいずれかの脊椎動物であるが、哺乳類であることが好ましい。哺乳類の前記被験体はヒトであることが好ましいが、家畜、実験動物又はペット動物となる場合がある。
【００２９】
本明細書で用いられるところの「物質」とは免疫応答を誘導する場合があり、抗原及び病原体を含む、いずれかの物質をいう。
【００３０】
本明細書で用いられるところの、例えば、抗原のような物質に対する「曝露」とは、前記物質に対する自然曝露、環境曝露の両方と、被験体に対する前記物質の投与とを含む。
【００３１】
「ワクチン組成物」という用語は抗原を含むいずれかの医薬品組成物を示し、前記組成物は被験体の疾患又は状態を予防又は治療するために用いられる。ワクチン組成物は１種類又は２種類以上のアジュバントを含む場合がある。ワクチン組成物は病原体によって引き起こされる疾患の予防に用いられるのが典型であるが、本発明の前記ワクチン組成物は治療の前後で用いられることができる。
【００３２】

選択された成分、抗原又は興味のある組成物に対する「免疫応答」又は「免疫応答」は、前記成分又は興味のある組成物中に存在する分子（例えば、抗原）に対する個体の液性及び／又は細胞性免疫応答で発生する。本発明の目的のための「液性免疫応答」とは抗体分子によって仲介される免疫応答をいうが、「細胞性免疫応答」は、Ｔ－リンパ球、マクロファージ及び／又は他の白血球によって仲介される免疫応答をいう。哺乳類の免疫応答は免疫カスケードを含むと理解され、該カスケードは応答の広範なカテゴリーの２分の１を占め、カスケードを開始するヘルパーＴ細胞のクラスによって特徴付けられる。したがって、特異的抗原に対する免疫応答は１型ヘルパーＴ（Ｔｈ１）又は２型ヘルパーＴ（Ｔｈ２）の応答として特徴付けられる場合があり、該応答は抗原提示の後に抗原特異的Ｔリンパ球から放出されるサイトカインのタイプに依存する。抗原で刺激されたヘルパーＴ細胞に由来する、ＩＬ－２、インターフェロンガンマ（ＩＦＮ－γ）及び腫瘍壊死因子α（ＴＮＦ－α）のような炎症性サイトカインの放出によってＴｈ１の免疫応答は一般的に特徴付けられる。Ｔｈ１の応答は強い細胞性免疫（例えば、ＣＴＬｓ）及びＩｇＧ抗体のサブクラスの産生に関係があり、該ＩｇＧ抗体のサブクラスは一般的に用いられたモデルマウスにおけるＩｇＧ２ａのようにオプソニン活性及び補体結合活性を備えている。しかし、抗原特異的ヘルパーＴ細胞の刺激後におけるＩＬ－４及びＩＬ－１０のような非炎症性サイトカインの放出によってＴｈ２の免疫応答は特徴付けられる。前記Ｔｈ２の応答は一般的に最大ＣＴＬ活性を促進しないが、強い抗体応答に関係があり、該応答はオプソニン活性及び補体結合活性を喪失する抗体である前記マウスにおけるＩｇＧ１のようなＩｇＧサブクラスに代表される。一般的に、Ｔｈ２の応答に関係がある前記抗体レベルは、Ｔｈ１の応答に関係がある抗体レベルよりも非常に強い。

【００３３】

「アジュバント」という用語は、抗原特異的免疫応答を特異的又は非特異的に変化、増大、誘導、再誘導、増強又は開始する能力がある、いずれかの物質又は組成物を示す。したがって、（例えば、ワクチン組成物としての）アジュバント及び抗原の同時投与は、抗原の低投与又は少投与につながる場合があり、該低投与又は少投与は、前記抗原が投与された被験体における所望の免疫応答を達成するために必須となる。本発明のある実施態様では、抗原とアジュバントとの同時投与は前記抗原に対する免疫応答を再誘導するか、あるいは誘導されず、例えば、前記免疫応答はＴｈ２型からＴｈ１型までの免疫応答を再誘導する。アジュバントの有効性はワクチン組成物との該アジュバント投与するステップと、２つの使用する標準アッセイ法に対する抗体力価及び／又は細胞性免疫を比較するステップとによって測定可能であり、前記ワクチン組成物は動物を制御し、前記標準アッセイ法は、当業者に周知の放射性免疫検定法、ＥＬＩＳＡ法、ＣＴＬアッセイ法及び同様の方法である。典型的には、ワクチン組成物では前記アジュバントは抗原に由来する個別の原子団であるが、分子の単体は該アジュバント及び抗原の特徴の両方（例えば、コレラ毒）を有する。本発明の目的のために、特異的抗原に対する免疫応答を増大するか、あるいは、Ｔｈ２ないしＴｈ１応答の免疫応答状態を再誘導又は無効のいずれかにするためにアジュバントは用いられ、例えば、アジュバントがワクチン組成物との同時投与されるときに、前記アジュバントなしに投与された等量のワクチン組成物によって誘導された前記免疫応答よりも前記同時投与の結果生じる免疫応答はより大きくなる。さらに本発明の目的のために、アジュバントの「有効量」は、例えば、前記Ｔｈ１の応答のみを活性化するか、あるいはＴｈ２ないしＴｈ１応答の前記応答を再誘導するいずれかの免疫応答を増大する量となるか、あるいは単独の前記抗原に対する免疫応答と比較して、アジュバントの「有効量」は前記免疫応答の変化又は再誘導をもたらすのに十分な量となるであろう。

【００３４】

「アジュバント組成物」は、本発明のキチン微粒子を含む医薬品組成物を意味する。

【００３５】

本明細書で用いられるところの「自然免疫」の増大とは、マクロファージ、ＮＫ細胞、抗原提示細胞（ＡＰＣｓ）及びその他の要素の活性化の増大を含み、該活性の増大は多様な微生物の病原体への曝露後に対する即時型防御に含まれることが知られる。自然免疫の

増大はこれらの要素の活性化のための従来のアッセイ法を用いて測定可能であり、該アッセイ法は以下に列挙される実施例で説明されるアッセイ法を含むが、これらに限られない。

【００３６】

（１）抗原刺激された被験体、又は、抗原刺激及び感作された被験体と、対照とを比較して、抗原感作の前後に測定されたＩＬ－４又はＩＬ－５のレベルの低下か、あるいは処理された被験体におけるＩＬ－４の低レベルの検出（又は検出できない）、（２）抗原刺激された被験体、又は、抗原刺激及び感作された被験体と、対照とを比較して、抗原感作の前後のＩＬ－１２、ＩＬ－１８及び／又はＩＦＮ（α、β又はγ）のレベルの増大か、あるいは組成物を含むキチンで処理された被験体における、ＩＬ－１２、ＩＬ－１８及び／又はＩＦＮ（α、β又はγ）の高レベルの検出、（３）処理された被験体におけるＩｇＧ２ａ抗体又はそのヒト類似体の産生、（４）抗原刺激された被験体、又は、抗原刺激及び感作された被験体と、対照とを比較して、抗原感作の前後に測定されときの抗原特異的ＩｇＥレベルの低下か、あるいは組成物を含むキチンで処置された被験体における抗原特異的ＩｇＥの低レベルの検出（又は検出できない）、及び／又は、（５）処理された被験体における細胞傷害性Ｔリンパ球（「ＣＴＬ」）応答の誘導によって、本明細書で用いられるところの被験体における「Ｔｈ１の免疫応答の増大」又は「免疫応答の変調」は証明された。

【００３７】

キチン組成物

キチン微粒子が宿主（実験動物）に供与されたとき、該宿主防御機構は図１で示されたように促進される。感染性細菌をファゴサイトーシスするマクロファージに類似する機構でマクロファージ（ＭΦ）は、キチン微粒子をファゴサイトーシス（取り込み）する。３時間ないし２４時間以内にＩＬ－１２及び腫瘍壊死因子－α（ＴＮＦα）を誘導するＴｈ１サイトカインをマクロファージは産生する。前記Ｔｈ１サイトカインはナチュラルキラー（ＮＫ）細胞を活性化し、該細胞は１２時間ないし２４時間以内にインターフェロン－ガンマ（ＩＦＮγ）を産生するであろう。キチン微粒子投与後１日ないし３日以内にＩＦＮγはマクロファージを活性化し、該マクロファージは活性酸素及び窒素中間体（ＲＯＩ及びＲＮＩ）を生じるさせ、該ＲＯＩ及びＲＮＩはスーパーオキサイドアニオン及び一酸化窒素を含む。

【００３８】

図２で示されたように、ＩＬ－１２及びＴＮＦαを含むＴｈ１サイトカインは宿主の免疫応答を改変するため、キチン微粒子は、喘息、感染（リステリア症、結核（ＴＢ））及び癌に対する治療に用いられる。さらに、細菌の構成要素から調製される他のＴｈ１アジュバントと異なり、キチン微粒子はＩＬ－１０及びプロスタグランジン$Ｅ_2$（$ＰＧＥ_2$）を誘導しない。ＩＬ－１０及び$ＰＥＧ_2$の両方は、図１及び２で示されたＴｈ１アジュバント活性を阻害することが知られている。したがって、キチンは現在利用可能な最も有効なＴｈ１アジュバントであり、免疫機能低下状態の集団の生体防御の促進のための魅力的な候補であり、宿主防御は$ＰＥＧ_2$及びＩＬ－１０のレベルの増大によって下向き調節される。

【００３９】

好ましい実施態様では、本発明は物質に対する免疫応答を増大する方法を提供し、該物質は被験体に投与された抗原か、あるいは被験体が曝露される病原体である。前記方法は、規模と、持続時間と、抗原に曝露された後の免疫応答の状態とを変調するのに用いることができる。前記方法はキチン微粒子を含む組成物を投与するステップを含み、該キチン粒子は、単独か、あるいはワクチンその他の治療上有効な分子の投与の前、同時又は後のいずれかで被験体に投与される。抗原投与又は病原体曝露の前の本発明のキチン微粒子での前記被験体の「抗原刺激」はＴｈ１の免疫応答の増大を生じる。前記キチン組成物での抗原刺激は、Ｔｈ２型の応答からＴｈ１型の応答に前記免疫応答の状態を変化させる。

【００４０】

本発明の前記方法によって増大される免疫応答の例は、自然免疫の活性化（例えば、マクロファージ、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞）と、Ｔｈ１の応答と、細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）応答とを含むが、これらに限られない。前記方法は、予防的又は治療的に用いられる。

【００４１】

抗原刺激は自然免疫を活性化するため、本発明の前記方法は、ウイルス、細菌、寄生虫又は他の病原体のような病原体による感染後に対して保護するのに用いられる。物質は、感染病、アレルゲン又は癌に関連する病原体又は抗原であることが好ましい。感染病の例は、ウイルス性疾患、細菌性疾患、結核性疾患及び寄生性疾患を含むが、これらに限られない。

【００４２】

細胞性免疫として知られるＣＤ４陽性Ｔ細胞によって誘導される免疫攻撃によって、ある病原体及びある癌は効率的に抑制される。ポリオウイルスのような他の病原体は抗体を必要とし、該抗体は封じ込めのためにＢ細胞によって産生される。免疫攻撃のこれらの異なるクラス（Ｔ細胞又はＢ細胞）はＣＤ４陽性Ｔ細胞の異なる亜集団によって制御され、一般的に、１型ヘルパーＴ細胞及び２型ヘルパーＴ細胞として示される。

【００４３】

ヘルパーＴ（Ｔｈ）細胞の集団の２種類のタイプはモデルマウスでよく特徴付けられており、前記細胞集団が活性化されて放出するサイトカインによって定義される。前記Ｔｈ１集団は、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ及び腫瘍壊死因子を分泌し、マクロファージの活性化及び遅延型過敏性応答を仲介する。前記Ｔｈ２集団は、Ｂ細胞の活性化を促進する、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６及びＩＬ－１０を放出する。前記Ｔｈ１及び前記Ｔｈ２の集団は相互に抑制し合っている。例えば、ＩＬ－４はＴｈ１型応答を抑制し、ＩＦＮ－γはＴｈ２型応答を抑制する。同様に、Ｔｈ１及びＴｈ２の集団はヒトで理解されており、サイトカインの放出はモデルマウスで観察されたＴｈ１及びＴｈ２の集団と一致する。Ｔｈ２型の免疫応答の増大は、例えば、住血吸虫のような後生動物の寄生虫に対する保護の中核となる。さらにＴｈ２型応答は、同種免疫寛容の誘導及び維持と、順調な妊娠の維持とで重要である。反対に、Ｔｈ２型応答の抑制と、Ｔｈ１型免疫応答の増大とは疾患の治療で重要な鍵となり、前記疾患は、結核、類肉腫症、喘息、アレルギー性鼻炎及び肺癌のような癌及び呼吸器系の疾患を含む。

【００４４】

喘息は一般的な疾患であり、先進国で広く普及している。さまざまな刺激に対する気管支の応答性の増大と、気流制限を反転する初期の生理的障害と、気道を炎症させる病態の特徴とによって喘息は特徴付けられ、前記気流制限は自発的となるか、あるいは薬物と関係がある場合がある。喘息で気道の炎症を引き起こす前記免疫応答は、ＩＬ－４、ＩＬ－５及びＩＬ－１０を分泌するＴ細胞の前記Ｔｈ２クラスによってもたらされる。アトピー性喘息患者の肺に由来するリンパ球は、活性化されたとき、ＩＬ－４及びＩＬ－５を産生することが示されている。ＩＬ－４及びＩＬ－５の両方はＴｈ２クラスのサイトカインであり、喘息でＩｇＥの産生及び好酸球の関与に必要とされる。したがってＴｈ２応答の消失及びＴｈ１応答の増大は、喘息の治療で非常に有益である。

【００４５】

喘息に対する類似の免疫異常を有する他の疾患はアレルギー性鼻炎である。アレルギー性鼻炎は一般的な疾患であり、集団の少なくとも１０％に影響を与えていると推定される。アレルギー性鼻炎は季節性（花粉症）であり、花粉に対するアレルギーによって引き起こされる場合がある。非季節性（慢性）鼻炎は抗原に対するアレルギーによって引き起こされ、前記抗原は家屋内のチリ・ダニ又は動物のフケに由来するようなものである。アレルギー性鼻炎における前記免疫応答異常は、前記抗原に対する特異的ＩｇＥ抗体の過剰産生によって特徴付けられる。炎症性応答は、喘息のように前記気道に沿ってよりもむしろ鼻粘膜で起こる。喘息のように、影響を受けた組織における局所性好酸球増加症は、アレルギー性鼻炎の主要な特徴である。喘息とともに、Ｔｈ２免疫応答の消失及びＴｈ１応答

の増大は順調な治療の中核をなす。

【００４６】

多くの食物アレルギー性応答は、食物特異的ＩｇＥが介在する応答を含む。ＩｇＥ抗体及びアレルゲンは、高親和性ＩｇＥ受容体を通じてマスト細胞及び好塩基球を活性化する。この活性化はヒスタミン及び他のメディエーターの放出を引き起こし、全身性アナフィラキシー反応をもたらす。喘息でのように、Ｔｈ２に仲介されるＩｇＥ形成の消失は順調な治療に必須である。したがって好ましい実施態様では、食物アレルギーの危険を被っているか、あるいは悩む患者の治療は、食物アレルギーを治療するためのキチン微粒子の有効量を前記患者に投与するステップを含む。この治療は、アレルギーに関係するＴｈ２応答の消失及び以下の事象をもたらす。本明細書で説明されるいずれかの治療及び治療方法でのように、前記キチン微粒子は、食物サプリメント、錠剤、懸濁剤及び同様のもので経口投与される。例えば、ダイエット・サプリメントのように、アジュバントはおおよそ中性ないし低いｐＨ（２－７）で、等張性のいずれかの食物／飲料か、あるいは口内洗浄剤／練り歯磨きと混合される。前記アジュバントは比較的に熱に安定（オートクレーブ）であるために、該アジュバントは、料理された／過熱された料理（野菜、米、魚及び肉）、果物ジュース、ミルク、コーヒ及び紅茶のいずれかに添加される。

【００４７】

他の好ましい実施態様では、本発明は免疫応答を増大する方法を提供する。抗原が投与された後か、あるいは病原体のような物質に曝露された後の規模、持続時間及び／又は免疫応答の質を変調するのに前記方法は用いることができる。

【００４８】

好ましい実施態様では、前記方法は前記Ｔｈ１応答を増大する。前記キチン微粒子は免疫変更アジュバントとして作用する。「免疫変更アジュバント」は免疫応答の状態を効率的に変化又は誘導（再誘導）するアジュバントである。変化又は再誘導は免疫応答の状態に関係があり、該免疫応答は免疫変更アジュバントの非存在下で抗原に対して誘導される。したがって、Ｔｈ２型の応答の代わりにＴｈ１型の応答を促進するために選択された抗原に対して誘導される免疫応答の状態に変更するのに前記キチン微粒子は本明細書で用いられた。免疫変更アジュバントとして作用するためのアジュバントの能力は、例えば、ワクチン組成物の単独投与と、アジュバントとのワクチン組成物の投与とによって引き起こされる免疫応答の状態をアッセイによって測定される。この評価はサイトカインのタイプの特徴付け又は同定、及び／又は、優勢ＩｇＧサブクラスの特徴付け又は同定を含み、前記サイトカインは個体で抗原提示後に抗原特異的Ｔリンパ球から放出され、前記優勢ＩｇＧサブクラスは抗原単独と比較して抗原／アジュバントの組み合わせによって誘導される。特徴付け又は同定の全ては、本明細書によって示されたように完全に従来技術の範囲内である。特別な方法は以下の実施例部分で詳細に説明される。

【００４９】

他の好ましい実施態様では、前記方法は前記物質を認識する抗体の産生を増大又は変更する。被験体又は抗原投与前に組成物を含むキチンを供与されていない被験体の抗原レベルと比較して、被験体又はキチン組成物で抗原刺激された被験体の抗体レベルの増大を検出することによって抗体産生の変化は測定される。抗体の所望のクラスではない１つのクラスと比較して、抗体産生の増大は抗体のもう１つのクラスの産生の増大を含む。例えば、ＩｇＧ２ａ抗体の産生は増大させられ、ＩｇＥ抗体のレベルは低下される。

【００５０】

免疫応答はＴｈ２型からＴｈ１型の応答に応答を変更によって増大された。本明細書で用いられるところの「Ｔｈ１／Ｔｈ２応答」とは、１型及び２型のおのおののヘルパーＴリンパ球（Ｔｈ）に仲介される免疫応答をいう。Ｔｈ２応答はアレルギー関連ＩｇＥ抗体のクラスを含み、Ｔｈ２リンパ球によってＩＬ－４及びＩＬ－５サイトカインのレベルを上昇させた。Ｔｈ１細胞は、ＩＬ－２、インターフェロン－ガンマ（ＩＦＮγ）及び腫瘍壊死因子－β（ＴＮＦβ）を分泌する（後ろの２つは抗原刺激又は病原体での感染に対する応答におけるマクロファージの活性化及び遅延型過敏症を含む。）。

【００５１】
したがって、Ｔｈ２に関連する応答は抑制され、そのために持続型アレルギー性炎症及び抗原誘導性アナフィラキシーの危険性を低下する。細胞性免疫は活性化Ｔｈ１（ＩＦＮγ）細胞によって増大されるために、Ｔｈ１に関連する応答の増加は細胞内感染に対する応答で異常な数値となる。さらに、ポリヌクレオチドの投与はＣＴＬの産生を刺激するのを助け、さらに免疫応答を増大する。
【００５２】
本発明の方法は、予防及び治療の両方で免疫応答を変調又は増大するのに用いられる。したがって本発明は、被験体に免疫を付する方法と、免疫療法の方法とを提供する。
【００５３】
本発明の前記方法は、物質に曝露する前に被験体に対してキチンを含む組成物を投与するステップを含む。抗原投与又は物質に対する他の曝露の前に、この抗原刺激は少なくとも１時間実施されるのが典型である。抗原投与又は物質に対する他の曝露の前に、前記キチン微粒子は約６時間ないし約６週間の間で投与されることが好ましく、抗原投与の前に約１日間ないし約４週間の間がより好ましい。抗原投与の前に、前記キチン粒子は約１日間ないし約３日間の間で投与されることが最も好ましい。前記抗原又は他の物質は、従来の免疫技術又は自然曝露によって導入される。
【００５４】
前記物質は、アレルゲン又は癌となる抗原又は感染性疾患に関係がある病原体であることが好ましい。感染性疾患の例は、ウイルス性、細菌性、結核菌性、寄生性疾患を含むが、これらに限られない。アレルゲンの例は、植物花粉、ホコリ・ダニのタンパク質、動物のフケ、唾液及び真菌の胞子を含むが、これらに限られない。癌に関係がある抗原の例は、生存又は放射線照射した腫瘍細胞と、腫瘍細胞抽出物と、腫瘍抗原のタンパク質サブユニットとを含むが、これらに限られない。複数の実施態様では、前記抗原は環境中の抗原である。環境中の抗原は、呼吸器多核体ウイルス（「ＲＳＶ」）、インフルエンザウイルス及び感冒ウイルスを含むが、これらに限られない。
【００５５】
本発明は、アレルギー、癌又は感染のような疾患の治療及び予防に有用な組成物を提供する。ある実施態様では、前記組成物は医薬品組成物である。前記組成物は免疫治療用組成物であることが好ましい。前記組成物は、上述したような本発明のキチン微粒子の治療又は予防上の有効量を含む。前記組成物は薬学的に許容可能な担体のような担体を任意に含む。前記薬学的に許容可能な担体は、投与される特定の組成物と、前記組成物を投与するのに用いられる特定の方法とによってある程度測定される。したがって、本発明の医薬品組成物の広範な適切な製剤が存在する。
【００５６】
好ましい実施態様では、組成物のキチン微粒子の濃度は、１ミリグラムあたり粒子約1×10^{3}個ないし5×10^{9}個を含む。
【００５７】
別の好ましい実施態様では、前記キチン微粒子は、１ミリグラムあたり粒子約1×10^{8}個ないし約6×10^{8}個の濃度で存在する。
【００５８】
別の好ましい実施態様では、前記キチン粒子の直径が約１μｍないし約１０μｍであるとき、該キチン粒子は１ミリグラムあたり粒子約1×10^{8}個ないし約3×10^{8}個の濃度で存在する。
【００５９】
別の好ましい実施態様では、前記キチン粒子の直径が約１μｍないし約１０μｍであるとき、該キチン粒子は１ミリグラムあたり粒子約3×10^{8}個ないし約6×10^{8}個の濃度で存在する。
【００６０】
キチン粒子のアジュバントが免疫応答をＴｈ１型に変調するかどうか、該アジュバント

がワクチンなどの他の抗原との組み合わせで用いられるかどうかの依存性を前記濃度は変更する。例えば、前記組成物は、マイコバクテリウム属細菌の抗原、ＭＤＰ－５９又はブタクサ・アレルゲンをさらに含む。他の抗原は、ピーナッツのアレルゲンと、木の実のアレルゲンと、花粉のアレルゲンと、家屋内のチリ・ダニのアレルゲンと、ゴキブリのアレルゲンと、卵白アルブミンと、マイコバクテリウム属細菌のヒート・ショックタンパク質６５と、精製タンパク質誘導体（ＰＰＤ）の組成物のいずれかとを含む。

【００６１】

他の好ましい実施態様では、前記キチン粒子は免疫が抑制された個体の治療に用いられる。前記キチン粒子組成物の投与は、例えば、ＨＩＶ患者のようなかかる患者に投与するステップを含み、前記患者の免疫系を増大するための前記キチンの治療計画及び利益の全てはより強固な免疫系に関係がある。

【００６２】

抗原

前記好ましい実施態様では、前記キチン微粒子はＴｈ１応答に対するアジュバント及び免疫転換剤として用いられ、抗原の異なるタイプは前記組成物に含まれる。免疫応答が生じるとき、該免疫応答はワクチン接種された個体に対する複数のレベルの治療効果を提供するために前記抗原は選択され、該治療効果は、例えば、病原体に対する複数のレベルの有効な保護である。前記実施態様では、Ｔｈ１の特性の前記免疫応答を増大するために改変されたＤＮＡワクチンに由来する前記免疫応答を示し、ワクチンにおいて前記ＤＮＡによってエンコードされる前記抗原は所望のこの効果とともに選択されるであろう。

【００６３】

他の好ましい実施態様では、ワクチン又は他の免疫製剤に対する低応答者である患者の治療に前記キチン粒子は用いられる。例えば、複数の患者はＢ型肝炎ワクチンに対する低応答者である。前記ワクチン及びキチン微粒子の投与は、より強烈は免疫応答を提供するのに用いられる。

【００６４】

キチン微粒子と同時投与される抗原の例は無限である。特別な例は腫瘍特異的抗原を含む。腫瘍特異的抗原は、さまざまなＭＡＧＥｓ（メラノーマに関連する抗原Ｅ）のいずれかと、さまざまなチロシナーゼ（ＨＬＡ－Ａ２ペプチド）のいずれかと、ｒａｓ突然変異体と、ｐ５３突然変異体と、ｐ９７メラノーマ抗原とを含むが、これらに限られず、前記ＭＡＧＥｓはＭＡＧＥ１、ＭＡＧＥ２、ＭＡＧＥ３（ＨＬＡ－Ａ１ペプチド）、ＭＡＧＥ４など含む。他の腫瘍特異的抗原は、癌の進行と関係があるＲａｓペプチド及びｐ５３ペプチドと、子宮頸癌と関係があるＨＰＶ１６／１８及びＥ６／Ｅ７抗原と、乳癌と関係があるＭＵＣ１－ＫＬＨ抗原と、大腸癌と関係があるＣＥＡ（癌胎児性抗原）と、メラノーマと関係があるｇｐ１００又はＭＡＲＴＩと、前立腺癌と関係があるＰＳＡ抗原とを含む。前記ｐ５３の遺伝子配列は知られており（Ｈａｒｒｉｓら、Ｍｏｌ．　Ｃｅｌｌ．　Ｂｉｏｌ．　６：４６５０　４６５６（１９８６）．を参照せよ。）、登録番号Ｍ１４６９４でＧｅｎＢａｎｋに登録されている。

【００６５】

適切なウイルス性抗原は、肝炎ウイルスのファミリーから得られたか、あるいは由来する抗原を含むが、これらに限られず、該ファミリーは、Ａ型肝炎ウイルス（ＨＡＶ）、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）、Ｄ型肝炎ウイルス（ＨＤＶ）、Ｅ型肝炎ウイルス（ＨＥＶ）及びＧ型肝炎ウイルス（ＨＧＶ）を含む。

【００６６】

ヘルペスウイルス・ファミリーに由来する抗原は本発明で用いられ、該抗原は、１型及び２型の単純ヘルペスウイルスに由来するか、あるいは得られた抗原と、水痘・帯状疱疹ウイルス（ＶＺＶ）、エプスタイン－バーウイルス（ＥＢＶ）及びサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）に由来する抗原と、他のヒトヘルペスウイルスに由来する抗原とを含み、前記単純ヘルペスウイルスの抗原はＨＳＶ－１及びＨＳＶ－２の糖タンパク質のｇＢ、ｇＤ及びｇＨのようなものであり、前記サイトメガロウイルス抗原はＣＭＶ　ｇＢ及びｇＨを含

み、前記他のヒトヘルペスウイルス抗原はＨＨＶ６及びＨＨＶ７のようなものである。（例えば、米国特許第５，１７１，５６８号公報明細書、Ｃｈｅｅら、Ｃｙｔｏｍｅｇａｌｏｖｉｒｕｓｅｓ、Ｊ．　Ｋ．　ＭｃＤｏｕｇａｌｌ編、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ、１２５－１６９頁（１９９０）．、ＭｃＧｅｏｃｈら、Ｊ．　Ｇｅｎ．　Ｖｉｒｏｌ．　６９：１５３１－１５７４（１９８８）．、Ｂａｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ　３１０：２０７－２１１（１９８４）．、Ｄａｖｉｓｏｎら、Ｊ．　Ｇｅｎ．　Ｖｉｒｏｌ．　６７：１７５９－１８１６（１９８６）．を参照せよ。）

【００６７】

多数のＨＩＶ－１及びＨＩＶ－２単離体のｇｐ１２０配列のようなＨＩＶ抗原は知られ、報告され、該単離体はＨＩＶのさまざまな遺伝的サブタイプのメンバーを含み、該単離体のいずれかに由来する抗原は本明細書の方法で使用されると理解されるであろう（例えば、Ｍｙｅｒｓら、ロスアラモスデータベース、ロスロスアラモス国立研究所、ニューメキシコ州ロスアラモス（１９９２）と、Ｍｏｄｒｏｗら、Ｊ．　Ｖｉｒｏｌ．　６１：５７０－５７８（１９８７）とを参照せよ。）。さらに、本発明はさまざまなＨＩＶ単離体のいずれかに由来する他の免疫性原子団に同等に適用可能であり、該免疫性原子団はさまざまなエンベロープタンパク質のいずれかを含み、該エンベロープタンパク質は、ｇｐ１６０及びｇｐ４１と、ｐ２４ｇａｇ及びｐ５５ｇａｇのようなｇａｇ抗原と、ｐｏｌ、ｅｎｖ、ｔａｔ、ｖｉｆ　ｒｅｖ、ｎｅｆ　ｖｐｒ、ｖｐｕ及びＨＩＶのＬＴＲ領域に由来するタンパク質とのようなタンパク質である。

【００６８】

他のウイルスに由来する他の抗原は、ピコルナウイルス科（例えば、ポリオウイルスなど）、カリシウイルス科、トガウイルス科（例えば、風疹ウイルス、デングウイルスなど）、フラビウイルス科、コロナウイルス科、レオウイルス科、ビルナウイルス科、ラブドウイルス科（例えば、狂犬病ウイルスなど）、フィロウイルス科、パラミクソウイルス科（例えば、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器多核体ウイルスなど）、ブニヤウイルス科、アレナウイルス科、レトロウイルス科（例えば、（ＨＴＬＶ－ＩＩＩ、ＬＡＶ、ＡＲＶ、ｈＴＬＲなどとして知られる）ＨＴＬＶ－Ｉ、ＨＴＬＶ－ＩＩ、ＨＩＶ－１）のメンバーを含み、該レトロウイルス科は、ＨＩＶＩＩＢ、ＨＩＶＳＦ２、ＨＩＶＬＡＶ、ＨＩＶＬＡＩ、ＨＩＶＭＮ、ＨＩＶ－１ＣＭ２３５、ＨＩＶ－１ＵＳ４、ＨＩＶ－２、その他のウイルスの単離体に由来する抗原を含むが、これらに限られない。前記及び他のウイルスの説明のために、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ、第３版、Ｗ．　Ｋ．　Ｊｏｋｌｉｋ編（１９８８）及びＦｕｎｄａｍｅｎｔａｌ　Ｖｉｒｏｌｏｇｙ、第２版、Ｂ．　Ｎ．　Ｆｉｅｌｄｓ及びＤ．　Ｍ．　Ｋｎｉｐｅ編（１９９１）を参照せよ。

【００６９】

細菌性及び寄生性抗原の例は、疾患の原因となる既知の原因成分から得られたか、あるいは由来するこれらを含み、該疾患は、破傷風、百日咳、破傷風、結核、細菌性又は真菌性肺炎、コレラ、腸チフス、伝染病、細菌性赤痢又はサルモネラ症、レジオネラ症、ライム病、ハンセン病、マラリア、十二指腸虫症、回旋糸状虫症、住血吸虫症、トリパノソーマ症、レーシュマニア症、ジアルジア症、アメーバ症、糸状虫症、ライム病及び旋毛虫症のような疾患である。さらに抗原は非定型ウイルス又はウイルス様成分、又は、タンパク質性感染性粒子から得られたか、あるいは由来し、該ウイルス及び成分は、クル病、クロイツフェルト－ヤコブ病（ＣＪＤ）、震顫病、伝達性ミンク脳症及び慢性消耗病の原因成分のようなものであり、前記タンパク質性感染性粒子は狂牛病に関係があるプリオンのようなものである。

【００７０】

本発明で使用される場合があるアレルゲンの例は、花粉と、動物のフケと、イネ科植物と、糸状菌と、ホコリと、抗生物質と、刺咬昆虫の毒素と、さまざまな環境中の薬物及び食物アレルゲンとに由来するアレルゲンを含むが、これらに限られない。一般的な樹木のアレルゲンは、ヒロハハコヤナギ、ポプラ（ｐｏｐｕｌａｒ）、セイヨウトネリコ、カバ、カエデ、オーク、ニレ、ヒッコリー及びペカンの木に由来する花粉を含み、一般的な植

物のアレルゲンは、ライムギ、ブタクサ、イギリスオオバコ、スイバ及びアカザに由来するアレルゲンを含み、植物関連アレルゲンは、毒性オーク、毒性ツタ及びイラクサに由来するアレルゲンを含み、一般的なイネ科植物のアレルゲンは、オオアワガエリ、セイバンモロコシ、ギョウギシバ、
1234751951203_0
ノケグサ及び
1234751951203_1
1234751951203_2
ギのアレルゲンを含み、一般的なアレルゲンは、アルテルナリア属、フザリウム属、ホルモデンドラム属、アスペルギルス属、ミクロポリスポラ属、ケカビ属及び好熱性放線菌類のような糸状菌又は真菌から得られ、ペニシリン及びテトラサイクリンは一般的な抗生物質性アレルゲンであり、上皮性のアレルゲンは、ウマ又は有機的なホコリ（真菌に由来するのが典型的である。）か、家ダニのような昆虫（ヤケヒョウヒダニ）か、あるいは羽毛と、ネコ及びイヌのフケとのような動物性資源から得られ、一般的な食物アレルゲンは、ミルク及びチーズ（習慣）、卵、小麦、木の実（例えば、ピーナッツ）、海産物（例えば、甲殻類）、エンドウ豆、豆及びグルテンのアレルゲンを含み、一般的な薬物アレルゲンは局所麻酔薬及びサリチル酸塩のアレルゲンを含み、抗生物質性アレルゲンはペニシリン及びスルホンアミドのアレルゲンを含み、一般的な昆虫のアレルゲンは、ミツバチ、スズメバチ及び蟻の毒素と、ゴキブリの杯とのアレルゲンを含む。特によく特徴付けられたアレルゲンは、Ｄｅｒ ｐ Ｉアレルゲンの主要及び潜在性エピトープ（Ｈｏｙｎｅら、Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、８３１９０－１９５（１９９５））と、ミツバチの毒素のホスホリパーゼＡ２（ＰＬＡ）（Ａｋｄｉｓら、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９８：１６７６－１６８３（１９９６））と、カバの花粉アレルゲンＢｅｔ ｖ １（Ｂａｕｅｒら、Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１０７：５３６－５４１（１９９７））と、組み換えイネ科植物の多数エピトープのアレルゲンｒＫＢＧ８．３（Ｃａｏら、Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ９０：４６－５１（１９９７））とを含むが、これらに限られない。前記又は他の適切なアレルゲンは商業的に入手可能及び／又は以下の周知技術で容易に調製される。

【００７１】

他の好ましい実施態様では、前記キチン微粒子は１種類又は２種類以上の他のアジュバントを含む組成物で投与される。例えば、適切なアジュバントは、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムなどのようなアルミニウム塩（ミョウバン）から製造されたアジュバントと、フロイント完全アジュバント（ＣＦＡ）及びフロイント不完全アジュバント（ＩＦＡ）のような水中油型及び油中水型の乳濁剤と、硬質寒天と、ブロック共重合体と、アブリジン（商標）脂質－アミンと、ＳＥＡＭ６２と、リポ多糖を含むアジュバント（例えば、脂質Ａ又はモノホスホリピッドＡ（ＭＰＬ）（Ｉｍｏｔｏら、Ｔｅｔ．Ｌｅｔｔ．２６：１５４５－１５４８（１９８５））、トレハロースジミコレート（ＴＭＤ）及び細胞壁骨格（ＣＷＳ））のような細菌の細胞壁構成要素から製造されたアジュバントと、ヒート・ショックタンパク質又はこれらの誘導体と、ＡＤＰ－リボシル化細菌毒素及びＡＤＰ－リボシル化細菌毒素突然変異体と（例えば、Ｂｉｘｌｅｒら、Ａｄｖ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．Ｂｉｏｌ．２５１：１７５（１９８９）、Ｃｏｎｓｔａｎｔｉｎｏら、Ｖａｃｃｉｎｅ（１９９２））を参照せよ。）、ＱｕｉｌＡ（米国特許第５，０５７，５４０号公報明細書）のようなサポニンアジュバント又はＩＳＣＯＭｓ（免疫刺激複合体）のようなサポニンから生産される粒子と、ケモカイン及びサイトカインと、ムラミルペプチドと、ＣｐＧファミリーの分子、ＣｐＧジヌクレオチド及びＣｐＧモチーフを含む合成オリゴヌクレオチド（Ｋｒｉｅｇら、Ｎａｔｕｒｅ ３７４：５４６（１９９５）、Ｍｅｄｚｈｉｔｏｖら、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．９：４－９（１９９７）、Ｄａｖｉｓら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６０：８７０－８７６（１９９８））に由来するアジュバントと、ＡＴＣ Ｃ．リモスム細胞外酵素と、ＰＣＰＰ（ポリジ（カルボキシルアトフェノキシ）ホスファゼン）（Ｐａｙｎｅら、Ｖａｃｃｉｎ

ｅｓ　１６：９２－９８（１９９８））のような合成アジュバントとを含むが、これらに限られず、前記ＡＤＰ－リボシル化細菌毒素は、ジフテリア毒素（ＤＴ）、百日咳毒素（ＰＴ）、コレラ毒素（ＣＴ）、大腸菌加熱不安定型毒素（ＬＴ１及びＬＴ２）、シュードモナス・エンドトキシンＡ、シュードモナス・エキソトキシンＳ、Ｂ．セレウス細胞外酵素、Ｂ．スファエリカス毒素、Ｃ．ボツリヌスのＣ２及びＣ３毒素、Ｃ．リモスム細胞外酵素と、ウェルシュ菌、Ｃ．スピリフォーマ及びＣ．ディフィシル、黄色ブドウ球菌ＥＤＩＮに由来する毒素とを含み、前記ＡＤＰ－リボシル化細菌毒素突然変異体は、ＣＲＭ１９７、非毒性ジフテリア毒素突然変異体のようなものであり、前記ケモカイン及びサイトカインは、インターロイキン（例えば、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－１２など）、インターフェロン（例えば、γ－インターフェロン）、マクロファージコロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）、ディフェンシン１又は２、ＲＡＮＴＥＳ、ＭＩＰ１－α及びＭＩＰ－２などのようなものであり、前記ムラミルペプチドは、Ｎ－アセチル－ムラミル－Ｌ－スレオニル－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（ｎｏｒ－ＭＤＰ）、Ｎ－アセチルムラミル－Ｌ－アラニル－Ｄ－イソグルタミニル－Ｌ－アラニン－２－（１'－２'－ジパルミトイル－ｓ－ｎ－グリセロ－３ヒドロキシホスホリルオキシ）－エチルアミン（ＭＴＰ－ＰＥ）などのようなものである。前記アジュバントは、Ａｃｃｕｒａｔｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ、Ｒｉｂｉ　Ｉｍｍｕｎｅ　ｃｈｅｍｉｃａｌｓ　モンタナ州ハミルトン、ＧＩＢＣＯ、Ｓｉｇｍａ　ミズーリ州セントルイスのような多くの販売者から商業的に入手可能である。

【００７２】

現在の組成物として使用するための好ましいアジュバントは、少なくともエタノール中に部分的に溶解可能なアジュバントである。本明細書で使用するための特に好ましいアジュバントのクラスは「サポニン」として分類されるアジュバントであり、つまり、該アジュバントは、キラヤ属、サポナリア属又はジプソフィラ属の植物で生産されるサポニンに由来する。サポニンはグリコシドの天然植物生産物であり、１種類又は２種類以上の糖鎖に結合される環状構造（アグリコン）からなる。前記アグリコンは、アステロイド、トリテルペノイド又はステロイドアルカロイドであり、グリコシド結合に連結される多くの糖が大いに変更可能である。医薬品アジュバントとして用いられる最も一般的なサポニンは南アフリカの樹木のＱ．サポナリアから抽出されたトリテルペングリコシドであり、Ｑｕｉｌ　Ａ（例えば、米国特許第５，６８８，７７２号公報明細書、米国特許第５，０５７，５４０号公報明細書、米国特許第４，４３２，９６９号公報明細書、国際公開第ＷＯ８８／０９３３６号公報明細書を参照せよ。）、ＱＳ－２１と呼ばれるサポニンの活性構成要素として言及される。他の好ましいアジュバントは、「ＧＭＴＰ－Ｎ－ＤＰＧ」（Ｎ－アセチルグルコサミニル－Ｎ－アセチルムラミル－Ｌ－アナニル－Ｄ－イソグルタミル－Ｌ－アナニル－ディップ－パルミトイルプロピルアミド）と呼ばれるムラミルジペプチド類似体である。Ｆａｓｔら、Ｖａｃｃｉｎｅ　１５：１７４８－１７５２（１９９７）を参照せよ。

【００７３】

前記アジュバントは個別に即時型組成物としてか、あるいは２種類又は３種類以上のアジュバントの組み合わせとして提供される場合がある。これに関して、組み合わされるアジュバントは、免疫応答の促進又は転換において相加又は相乗効果を有する場合がある。２種類又は３種類以上のアジュバントを組み合わせることによって達成される結果の効果は、個別に投与されたとき、各アジュバントで達成される結果に稀に加えられることによって期待される効果よりも相乗効果はおおきな効果である。

【００７４】

投与及び投与量

方法の好ましい実施態様では、肝臓、骨髄、のような特異的組織に直接的にか、あるいは癌治療の場合における腫瘍にキチン微粒子組成物は全身性又は粘膜性経路を介して投与される。全身性経路の例は、皮内注、筋注、皮下注及び静注を含むが、これらに限られな

い。粘膜性経路の例は、経鼻、経膣、腎臓内、気管内及び眼内投与を含むが、これらに限られない。粘膜経路、特に経鼻、気管内及び眼内投与は環境中の病原体か、あるいはアレルゲンへの自然曝露に対する保護のために実施され、該病原体は、ＲＳＶ、インフルエンザウイルス及び感冒ウイルスのようなものであり、該アレルゲンは、イネ科植物及びブタクサの花粉と、家屋内のチリ・ダニとのようなものである。キチン微粒子による自然免疫の局所的活性化は、抗原、アレルゲン、病原体のような物質に遭遇後に対する保護効果を増大させるであろう。

【００７５】

治療は、予防及び治療を含む。予防又は治療は、１回の時間点又は複数回の時間点における個別の直接投与によって達成される。投与は、１箇所又は複数箇所に送達される。

【００７６】

被験体は脊椎動物のいずれかとなるが、哺乳類となることが好ましいであろう。哺乳類は、ヒト、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、ブタ及びヒツジを含む。哺乳類の前記被験体はヒトとなることが好ましいが、家畜、実験動物又はペット動物となる場合がある。

【００７７】

本発明の組成物は生理学的に許容可能な担体を含むことが好ましい。当業者に知られた適切な担体のいずれかは発明の組成物で供される場合があるとき、担体のタイプは投与様式の依存性を変更するであろう。皮下注のような非経口投与のために、前記担体は、水、生理食塩水、アルコール、脂肪、ワックス又は緩衝剤を含むことが好ましい。経口投与のために、以上の担体又は固形担体のいずれかは供される場合があり、前記担体は、マンニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、ブドウ糖、ショ糖及び炭酸マグネシウムのようなものである。生分解性微粒子は（例えば、ポリ乳酸ガラクチド）は、本発明の組成物のために担体として供される。適切な生分解性微粒子は、例えば、米国特許第４，８９７，２６８号公報明細書、米国特許第５，０７５，１０９号公報明細書で開示される。本発明の前記組成物は、急速な異化反応から抗原を保護するために設計された物質を含む場合があり、該物質は水酸化アルミニウム又はミネラルオイルのようなものである。

【００７８】

一般的に、本発明の組成物は、注射（例えば、皮内注、筋注、静注又は皮下注）、経鼻（例えば、呼吸による）又は経口によって投与される場合がある。ある実施態様では、肺に導くか、肺内の気道粘膜性表面への送達に本発明の前記組成物は都合のよい剤形である。例えば、噴霧剤形又は噴霧器によって患者に送達するための液体製剤に前記組成物は懸濁される場合があり、前記噴霧器は喘息の治療で現在供される噴霧器に類似する。

【００７９】

好ましい投与回数及び有効投与量は個体間で異なり、既知の抗原は免疫応答をもたらし、既知の抗原を用いる免疫で現在用いられる回数及び投与量に匹敵する場合がある。一般的に、ポリペプチド免疫増強剤の投与量は宿主の体重１ｋｇあたり約１ｐｇないし約１００ｍｇの投与量（又はｉｎ　ｓｉｔｕでポリヌクレオチドによって生産される投与量）の範囲で提供され、約１０ｐｇないし約１ｍｇであることが典型的であり、約１００ｐｇないし約１μｇであることが好ましい。適切な投与サイズは患者のサイズで異なるが、約０．１ｍＬないし約２ｍＬの範囲であることが典型的であろう。

【００８０】

複数の好ましい実施態様では、前記キチン微粒子は宿主の体重１ｋｇあたり約０．１－５００ｍｇで投与される。これらの投与量は異なり、例えば、おおよその投与量は、腹腔内又は皮下投与のためには１ｋｇあたり約１－４ｍｇであり、、経口投与のためには１ｋｇあたり約１－５００ｍｇである。

【００８１】

本明細書で用いられるところの「約」という用語は、投与における活性構成要素の投与量をいい、規定投与量から５％の上昇までの変化を意図する。

【００８２】

上述の実施態様の１種類又は２種類以上の特徴のいずれかは、本発明の他の実施態様のいずれかの１種類又は２種類以上の特徴といずれかの方法で組み合わされる。さらに、本発明の多くの変更は明細書の概説で当業者に明らかとなるであろう。本発明の範囲は上述を参照しないで決定されるべきであり、完全な範囲の均等とともに現特許請求の範囲を参照することで決定されるべきである。

【００８３】

文献又は特許文献のそれぞれが個別的に示されたのと同程度に、本明細書に引用された文献及び特許の全ては全ての目的のために適切な部分で引用により本明細書に取り込まれた。

【００８４】

実施例

キチン微粒子の精製

発明者はキチン微粒子を調製するための方法を確立し、該微粒子はマクロファージの活性化を誘導し、殺菌効果及びＴｈ１アジュバント効果を仲介する。

【００８５】

簡単な手順

１．未精製のキチン調製物（Ｃ９２１３）はＳｉｇｍａ社から購入された。２．エンドトキシン不含生理食塩水で洗浄した。３．酸可溶性キチンは、３０分間冷たい１２Ｎ　塩酸（ＨＣｌ）でキチン混合物から抽出された。４．酸可溶性キチンは、４°Ｃで１，５００ｘｇ、１５分間の遠心分離によって単離された。５．酸可溶性キチンは、冷たい１０Ｎ水酸化ナトリウム（ＮａＯＨ）でｐＨ７に中和された。６．キチンは不溶性となり、沈殿した。７．不可溶性キチンは、４°Ｃで１，５００ｘｇ、各１５分間の遠心分離によって生理食塩水で５回洗浄された。８．ｐＨ７．０に調製した後に、不溶性キチンは遠心分離によって収集された。９．ペレットは凍結乾燥され、乾燥機に保管された。

【００８６】

使用直前

１０．凍結乾燥されたキチン粉末は、約５０ｍｇ／ｍＬで生理食塩水に懸濁された。１１．前記懸濁は氷上で音波破壊された。１２．１－１０μｍのキチン粒子は１０μｍの孔を有するナイロンメッシュを通じて濾過された。粒子の　　は４－５μｍであった。１－４μｍのキチン粒子は、４μｍの孔を有するナイロンメッシュを通じてさらに濾過された。１３．濾過された粒子は、４°Ｃで１，５００ｘｇ、各１５分間の遠心分離によって生理食塩水で４回収集され、洗浄された。１４．前記遠心分離収集物は、使用前に１０ｍｇ／ｍＬ又は１６ｍｇ／ｍＬに調製された。

【実施例１】

【００８７】

アジュバントとしてのキチン微粒子

生物活性分子はマクロファージ培養で測定され、以上で調製された生物活性分子のキチン微粒子の測定するために、マウスマクロファージＲＡＷ２６４．７細胞は２０又は１００μｇ／ｍＬのキチン粒子で３、６及び２４時間刺激された。上清中のＴｈ１サイトカインである腫瘍壊死因子－α（ＴＮＦα）のレベルは、商業的に入手可能なＥＬＩＳＡキット（ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ、カリフォルニア州サンディエゴ）によって測定された。陽性対照として、５μｇ／ｍＬの細菌のＤＮＡ（ＣｐＧ－ＯＤＮ）及び０．１μｇ／ｍＬの細菌のエンドトキシン（ＬＰＳ）は比較検討のために用いられた。陰性対照として、培養液単独（無刺激対照）、１００μｇ／ｍＬのキトサン微粒子（脱アセチル化キチン粒子）及び５μｇ／ｍＬのＧｐＣ－ＯＤＮは用いられた。図３に示されたように、発明者の新たに調製されたキチン粒子は、細菌のＣｐＧ及びＬＰＳによるレベルに匹敵するレベルで活性分子を産生するＴＮＦαを誘導した。

【００８８】

キトサン（脱アセチル化キチン）微粒子はＴＮＦα産生を誘導せず、Ｔｈ１アジュバント活性を全く示さない。上述の発明者の精製方法はキチン微粒子だけでなく、キトサン微

粒子を生産するのに重要である。

【００８９】

経口キチンはＬ．モノサイトゲネスの致死性感染から保護され、発明者のキチン微粒子がＬ．モノサイトゲネスの致死性投与量から保護するかどうかを決定するために、キチン微粒子８ｍｇは、選択されたマウスに単独経口投与された。

正常なＢａｌｂ／ｃ及びＣ５７ＢＬ／６は、感染に対して感受性かつ耐性のおのおのとなることが知られており、ＩＬ－１０ノックアウトＣ５７ＢＬ／６（ＩＬ－１０$^{-/-}$）マウスはＣ５７ＢＬ／６（野生型、ＷＴ）マウスより耐性であり、アテローム性動脈硬化のモデルとして用いられる高コレステロール血症系統のアポリポプロテインＥノックアウトＣ５７ＢＬ／６（ａｐｏＥ$^{-/-}$）マウスは、Ｃ５７ＢＬ／６（野生型）マウスよりもＬ．モノサイトゲネスの感染に対してより感受性であった。

【００９０】

表１に示されたように、キチン微粒子での処理は、１０ｘＬＤ$_{50}$にするＬ．モノサイトゲネス感染の検討に供されたマウス全てを保護した（表１）。Ｌ．モノサイトゲネスがこの検討のために選択されたのは、このグラム陽性細胞内生物が細胞内免疫応答の検討で広範囲に用いられるためである。免疫応答性のヒトでは、中度の食中毒と関係があるのが典型的である（Ｇａｒｉｆｕｌｉｎ，　Ｏ．、Ｂｏｙａｒｔｃｈｕｋ，　Ｖ．、Ｂｒｉｅｆ　Ｆｕｎｃｔ　Ｇｅｎｏｍｉｃ　Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃ　４，　２５８－６９（２００５））。この生物は生物兵器用剤としても利用可能である。

【００９１】

【表１】

	10^5 CFU		10^6 CFU		10^7 CFU	
	生理食塩水	キチン	生理食塩水	キチン	生理食塩水	キチン
Balb/c	5/5	5/5	0/5	5/5*	0/5	0/5
WT (C57Bl/6)	5/5	5/5	2/5	5/5*	0/5	2/5
ApoE$^{-/-}$	3/5	5/5	0/5	5/5*	0/5	0/5
IL-10$^{-/-}$	5/5	5/5	4/5	5/5	0/5	4/5*

【００９２】

経口キチンはＬ．モノサイトゲネスの致死性及び亜致死性感染から免疫機能低下状態及び対照マウスを保護するということを表１の結果は示す。１０－２０週齢の５匹の雌マウスのグループは、８ｍｇのキチン粒子を経口投与された。２時間後に、１０^{5}ＣＦＵ、１０^{6}ＣＦＵ又は１０^{7}ＣＦＵのＬ．モノサイトゲネス（１０４０３Ｓ　血清型　１／２ａ）は腹腔内投与された。死亡数は１２日間にわたって記録された。グループの全てで生存するマウスの全ては、Ｌ．モノサイトゲネスでの感染後の１２日間にわたり脾臓、肺及び肝臓で検出不可能なＣＦＵレベル（＜１０　ＣＦＵ）を示した（データは示さず）。結果は、各マウスの系統又は遺伝型と、各処理グループとについて５匹のマウスに関する。示された結果は、２回の別個の実験で得られた。数は１２日間の各グループにおける全動物数のうちの生存数である。＊キチン処理グループないし生理食塩水対照グループ間の生存数データの差異は、統計的に重要であった（ｐ＜０．０１；対数順位検定）。

【００９３】

キチン粒子の腹腔内投与による局所的なマクロファージ抗原刺激について、Ｌ．モノサ

イトゲネスのような細胞内細菌を殺傷するために、ＲＯＩ及びＲＮＩ（活性酸素及び窒素中間体）はマクロファージ（ＭΦ）で産生される（Ｓｈｉｂａｔａ，　Ｙ．ら、Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　１６１，　４２８３－８（１９９８）、Ｍｙｅｒｓ，　Ｊ．Ｔ．，　Ｔら、Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　１７１，　５４４７－５３（２００３））（図１を参照せよ）。ホルボールミリステートアセテート（ＰＭＡ）で誘導されたとき、実験動物に対するキチンを含む貪食可能な粒子の前記投与は、ｉｎ　ｖｉｖｏの実験動物の酸化的バーストを１００倍増大する産生のために１－３日間以内に非特異的に一部のマクロファージを刺激することをＭｙｒｖｉｋら及びＳｈｉｂａｔａら（Ｍｙｒｖｉｋ，　Ｑ．Ｎ．ら、Ｊ　Ｌｅｕｋｏｃ　Ｂｉｏｌ　５４，　４３９－４３（１９９３）、Ｓｈｉｂａｔａ，　Ｙ．ら、Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　１６１，　４２８３－８（１９９８）、Ｓｈｉｂａｔａ，　Ｙ．ら、Ｉｎｆｅｃｔ　Ｉｍｍｕｎ　６５，　１７３４－４１（１９９７）、Ｓｈｉｂａｔａ，Ｙ．ら、Ｉｎｆｅｃｔ　Ｉｍｍｕｎ　６９，　６１２３－３０（２００１））は発見した。

【００９４】

発明者のキチン微粒子の腹腔内投与は腹腔のマクロファージ及び脾臓のマクロファージを刺激するかどうかを発明者は調べた。前記マクロファージは、スーパーオキサイドアニオン（ＲＯＳ）及び一酸化窒素（ＲＮＳ）を放出することを図４は示す。Ｃ５７ＢＬ／６マウスは腹腔内投与によって１ｍｇのキチン微粒子を供与された。示された間隔で、腹腔及び脾臓のマクロファージは単離された。グリース試薬による一酸化窒素の放出を測定するために、マクロファージはＬＰＳ（１μ／ｍＬ）で２４時間刺激された。シトクロームｃの還元によるスーパーオキサイドアニオンの放出を測定するために、マクロファージはＰＭＡ（１μＭ）で１時間刺激された。平均値±標準偏差値、ｎ＝３。

【００９５】

キチンはＩＬ－１０を誘導せず、図２に示されたように、ＩＬ－１０はＴｈ１アジュバント活性分子を阻害する。理想的なＴｈ１アジュバントはＩＬ－１０産生を誘導しない。キチン微粒子はＴｈ１サイトカイン産生物のＴＮＦαを誘導するが、検出可能なＩＬ－１０産生を誘導しないということを発明者は発見した。この発見は図５及び６に示された実験に基づいている。ＴＮＦα産生に加えて、以前に示したようにキチン微粒子はＩＬ－１２及びＩＬ－１８を誘導することを発明者は測定した（Ｓｈｉｂａｔａ，　Ｙ．ら、Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　１６１，　４２８３－８　（１９９８））。

【００９６】

ＭＡＰキナーゼはマクロファージによってリン酸化され、該マクロファージはキチン粒子だけでなく、キトサン又はラテックス粒子を貪食し、図２で示されたように、３－２４時間以内のＴｈ１サイトカインの産生後にマクロファージは（ＭΦ）はキチン微粒子を貪食する。しかしながら、マクロファージが不活性な粒子（ラテックスビーズ、キトサン微粒子）を貪食するとき、マクロファージはＴｈ１サイトカインを産生しない。免疫変調剤によるマクロファージの活性化は、１０－４０分間以内にＭＡＰＫ（ｐ３８、Ｅｒｋ１／２及びＪＮＫ）のリン酸化をもらたすことが知られている。ＲＡＷ２６４．７マクロファージにおいて１０－４０分間でｐ３８、Ｅｒｋ１／２及びＪＮＫ（Ｐ－ｐ３８、Ｐ－Ｅｒｋ１／２及びＰ－ＪＮＫ）のリン酸化をキチン粒子が誘導したことを図７は示す。キチンに誘導されるリン酸化の動態は、細菌のＴｈ１アジュバント（ＣｐＧ－ＯＤＮ及びＨＫ－ＢＣＧ）又はエンドトキシン（ＬＰＳ）に関して観察されるキチンに誘導されるリン酸化の動態と比較された。しかしながら、可溶性キチン、＞５０μｍのキチン粒子、１－１０μｍのキトサン又は１．１μｍのラテックスビーズはＭＡＰＫファミリーを活性化した。

【００９７】

経口キチンはアレルギー応答を阻害し、アレルギー性気道疾患のマウスモデルでは、日々の経口投与量の８ｍｇのキチンはＴｈ１応答を増大し、血清のＩｇＥレベル及び肺の好酸球の数を６０％まで低下される。経口でキチン提供されるマウスは全く苦痛を示さないが、僅かに体重の増加が示されたことに注目されるべきである。アレルギー性喘息のマウスモデルにおいて血液中のＩｇＥレベルを抑制するキチンの微粒子の経口投与の典型的な

結果を図８は示す。

【００９８】

キチン微粒子は抗原特異的遅延型過敏症（ＤＴＨ）を誘発するＴｈ１アジュバントであり、キチン微粒子とともに混合される可溶性の細菌性タンパク質（抗原）で１マウスの免疫化は、抗原特異的Ｔｈ１免疫を確立することを発明者は測定した。Ｃ５７ＢＬ／６（ＷＴ）マウス及びＩＬ－１０ノックアウト（ＩＬ－１０－ＫＯ）マウスはキチン微粒子と混合される３０－ｋＤａの微生物の感染防御抗原であるＭＰＢ－５９で免疫され、前記キチン微粒子は遅延型過敏症（ＤＴＨ）である抗原特異的Ｔｈ１応答（細胞性免疫）を効率的に増大することを発明者の検討は示す。ＭＢＰ－５９及びキチン微粒子で同時免疫されたＣ５７ＢＬ／６（ＷＴ）マウス及びＩＬ－１０ノックアウト（ＩＬ－１０－ＫＯ）マウスでＭＰＢ－５９に誘発されるフットパッドの遅延型過敏症の発症を図９は示す。最後の免疫後から７日目に、野生型及びＩＬ－１０－ＫＯマウスは右フットパッドに５０μｇのＭＢＰ－５９溶液と、左フットパッドに５０μＬの生理食塩水（対照）とを供与された。４８時間後に、マウスの各グループにおいて右フットパッドの厚さから左フットパッドの厚さを引いた値が得られた。

【００９９】

キチン微粒子の腹腔内投与は腹腔マクロファージによるPEG_2の放出を阻害し、図２で示されたように、PEG_2はＴｈ１アジュバント活性分子を阻害する。理想的なＴｈ１アジュバントはPEG_2の産生を最小限にする。マクロファージでＣＯＸ－２（シクロオキシゲナーゼ－２）の活性化による感染及び炎症の間にPEG_2は合成されることが知られている。キチン微粒子の投与は局所的なマクロファージにおけるＣＯＸ－２の改変をもたらすことを発明者は測定した。改変されたＣＯＸ－２はPEG_2の合成に関する触媒活性を消失する。Ｃ５７ＢＬ／６マウスが１ｍｇのキチン微粒子を腹腔内投与されたとき、腹腔マクロファージによるｅｘ　ｖｉｖｏでのPEG_2の生合成能は非常に低下されるとこを図１０は示す。腹腔マクロファージは刺激後２４時間で単離された。マクロファージの懸濁液（10^6／ｍＬ）は、PEG_2の放出を測定するために２時間１μＭのカルシウム・イオノフォア２３１８７（黒色棒）又は培養液（灰色棒）で刺激された。PEG_2はＥＬＩＳＡ法によってアッセイされた。

【０１００】

新規１－４μｍのキチン粒子（１－４μｍのキチン）の調製について、図１及び２で示されたように、キチン微粒子はＩＬ－１２を含むＴｈ１サイトカインを誘導し、前記ＩＬ－１２は２４時間以内にＩＦＮγを生産するためにＮＫ細胞を活性化する。ＩＬ－１２の前記誘導及びＩＦＮγの産生は、Ｔｈ１アジュバント活性分子の鍵となる。よりＴｈ１アジュバント活性分子を発現するキチン微粒子を調節するために、１－１０μｍのキチン粒子は、ナイロンメッシュを通じて１－４μｍ、４－７μｍ及び７－１０μｍのサイズでさらに分画される。前記生物活性分子は、脾臓細胞培養に各画分を２０μｇ／ｍＬで添加することによって測定された。図１１で示されたように、前記１－４μｍの分画はＩＬ－１２及びＩＦＮγ産生に関して最も高い活性を有し、未処理の１－１０μｍのキチン調製物と比較して少なくとも５倍より大きくなる。等量において、１－１０μｍのキチンの約２倍の多くのキチン粒子を含むために、キチンの効果は吸収されたサイズ及び数量の両方によって決定される場合があることをこれらの結果は示唆している。

【０１０１】

発明者は１－１０μｍのサイズでのキチン微粒子の調製を確立し、前記調製は商業的レベルの生産物を製造するための規模を拡大させることが可能である。発明者の生産物の経口投与は、Ｌ．モノサイトゲネスの感染の致死量から免疫応答性及び免疫機能低下状態のヒト個体のモデルであるマウスの多くの系統（Ｂａｌｂ／ｃ、Ｃ５７ＢＬ／６、ＩＬ－１０－ＫＯ、ａｐｏＥ－ＫＯ）を妨げる（表１）。キチン微粒子の経口投与は、アレルギーモデルのマウスにおいて血液中のＩｇＥレベルを含むアレルギー反応を阻害する（図８）。キチン微粒子の腹腔内投与は、モデルマウスにおいて同時注射された可溶性タンパク質抗原に対するＴｈ１応答を増大する（図９）。キチン微粒子は以下の免疫防御応答を生産

する。（ａ）キチン微粒子はＴｈ１サイトカイン（ＴＮＦα、ＩＬ－１２及びＩＬ－１８）を誘導するが、Ｔｈ２サイトカインのＩＬ－１０を誘導しない。ＩＬ－１０は細菌の構成要素によって誘導され、殺菌活性及びＴｈ１アジュバント活性分子を阻害することが知られている（図３，５及び１１）。（ｂ）細胞内細菌を直接攻撃する活性酸素及び窒素中間体を生産するためのマクロファージをキチン微粒子は誘導する（図４）。（ｃ）キチン微粒子は分裂促進剤－活性化タンパク質キナーゼ（ＭＡＰＫ）を活性化する一方で、キトサン微粒子又はラテックスビーズはＭＡＰＫをを活性化しない（図７）。ＭＡＰＫの活性化は、マクロファージの殺菌作用及びＴｈ１アジュバント活性分子を仲介に必須である。（ｄ）キチン微粒子はPEG_2の生合成を阻害する（図１０）。PEG_2はＴｈ１サイトカインの産生を阻害するが、Ｔｈ２サイトカインの産生を増大する。

【０１０２】

１－１０μｍのキチン微粒子は、前記Ｔｈ１アジュバント活性に関して以上で調べられた。さらに、１－４μｍのサイズのキチン微粒子はよりよいＴｈ１アジュバント活性を提供することを発明者は発見した。発明者が確立した前記キチン微粒子はさまざまな炎症性疾患に対する防御免疫を誘導するのに用いられ、前記疾患は免疫機能低下状態の集団におけるリステリア症及び喘息を含む。

【実施例２】

【０１０３】

キチン粒子はＣｐＧ－ＯＤＮに誘導されるＩＬ－１０の産生を阻害するが、ＩＬ－１０ｍＲＮＡの合成を阻害しない。

ＣｐＧ－ＯＤＮで刺激されたとき、無処理のＲＡＷ２６４．７マクロファージは１，１０６　ｐｇ／ｍＬのＩＬ－１０を産生した（表２）。ＣｐＧ－ＯＤＮで刺激されたマクロファージは、ＣｐＧ－ＯＤＮ刺激の前後の選択された時点においてキチン粒子で処理された。キチン微粒子は、ＣｐＧ－ＯＤＮ刺激の９時間後までにＩＬ－１０産生を著しく阻害したことをその結果（表２）は示した。

【０１０４】

【表２】

キチン粒子はＲＡＷ　２６４．７マクロファージによるＣｐＧ－ＯＤＮ誘発性ＩＬ－１０産生を阻害する。

キチン添加時点(a)	刺激(37° C、24時間)	
	CpG-ODN	生理食塩水
	IL-10 pg/mL(産生の百分率)(ｂ)	
粒子なし	1,106±31 (100)	29±14
-1時間	181±9# (16)	18±17
0時間	187±19# (17)	18±8
1時間	245±44# (22)	17±4
3時間	314±5# (28)	38±14
6時間	459±5# (42)	<15(ｃ)
9時間	883±5# (80)	32±15
12時間	991±5 (90)	16±5

(a)　ＣｐＧ－ＯＤＮを培養に添加した時点が０時間とみなされる。キチン微粒子は表示の時点で培養に添加された。マクロファージの刺激は２４時間で終了した。
（ｂ）　平均値±標準偏差値、ｎ＝３、かっこないの数字はＣｐＧ－ＯＤＮ単独で刺激された細胞と比較された生産の百分率。＃は、ＣｐＧ－ＯＤＮ単独で刺激された細胞と比較したときのｐ＜０．０１。示されたデータは３回の別個の実験の典型を示す。
（ｃ）　ＩＬ－１０は１５ｐｇ／ｍＬは検出最低限界である。

【０１０５】
図１２はＣｐＧ－ＯＤＮに誘導されるＩＬ－１０ｍＲＮＡのレベルにおけるキチン粒子の効果を示すブロットである。ＲＡＷ２６４．７　ＭΦ（細胞５×１０^{5}個／ｍＬ）は、ＣｐＧ－ＯＤＮ単独か、あるいはキチン粒子又はキトサン粒子との組み合わせで３７°Ｃで６時間及び２４時間刺激された。全てのＲＮＡは、製造者の指図に従ってＴｒｉｚｏｌ試薬（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カリフォルニア州カールスバッド）を用いて細胞から抽出された。ＩＬ－１０　ｍＲＮＡの発現は、ＲＴ－ＰＣＲによって調べられた。ｍＲＮＡの逆転写は、製造者の指図に従ってオリゴ－（ｄＴ）プライマーを用いたＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ^{TM}　ＲＴ－ＰＣＲ一本鎖合成システム（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）によって達成された。用いられたＰＣＲプライマーは、ＩＬ－１０（フォアード、５’－ＧＧＴＴＧＣＣＡＡＧＣＣＴＴＡＴＣＧＧＡ－３’（配列番号１）、リバース、５’－ＡＣＣＴＧＣＴＣＣＡＣＴＧＣＣＴＴＧＣＴ－３’（配列番号２））及びＧＡＰＤＨ（フォアード、５’－ＴＴＣＡＣＣＡＣＣＡＴＧＧＡＧＡＡＧＧＣ－３’（配列番号３）、リバース、５’－ＧＧＣＡＴＧＧＡＣＴＧＴＧＧＴＣＡＴＧＡ－３’（配列番号４））である。１５μＬのＰＣＲ産物は、２％アガロースゲル上で電気泳動された。臭化エチジウム染色後、ＰＣＲ産物はＵＶ照射によって可視化された。

【０１０６】
図１２で示されたように、キチン微粒子は検出可能なＩＬ－１０ｍＲＮＡを誘導しないが、ＣｐＧ－ＯＤＮは刺激後６時間及び２４時間でＩＬ－１０ｍＲＮＡを誘導する。しかしながら、キチン微粒子及びＯＤＮ－ＣｐＧの混合物での前記刺激後６時間及び２４時間でキチン微粒子は、ＣｐＧ－ＯＤＮに誘導されるＩＬ－１０ｍＲＮＡレベルを変化させない。キチン粒子は転写後のレベルでＩＬ－１０の産生を阻害することをこれらの結果は示

す。

【０１０７】

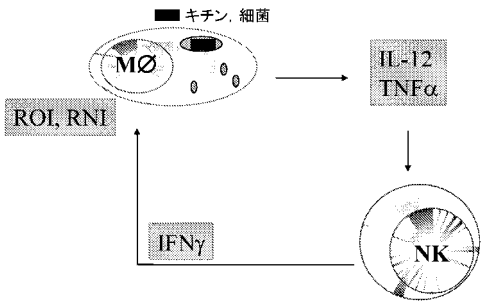
他の実施態様

本発明はこれらの詳細の説明を説明すると理解されるであろうが、前述の説明は例示することを意図し、本発明の射程を限定することを意図するものではない。他の局面、利益及び改変は以下の特許請求の範囲で定められる範囲内である。

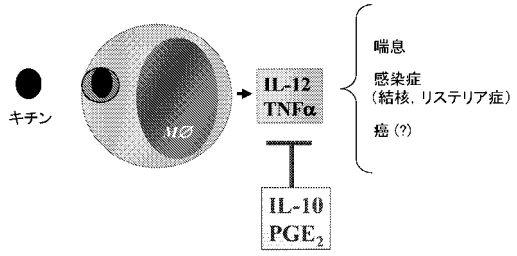
【０１０８】

本明細書で引用された文献全ては引用により本明細書に取り込まれる。

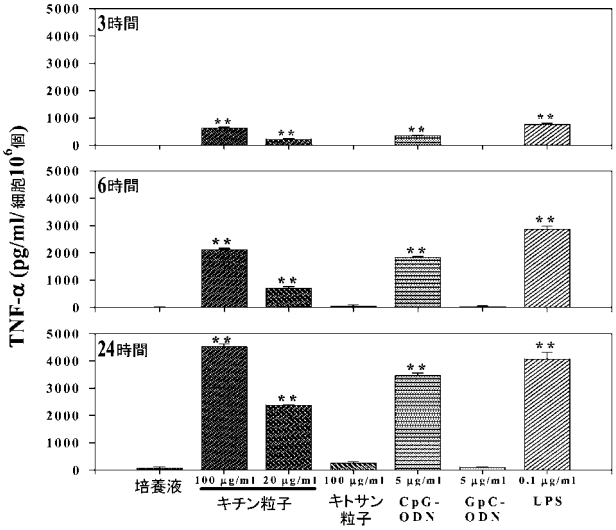
【図１】



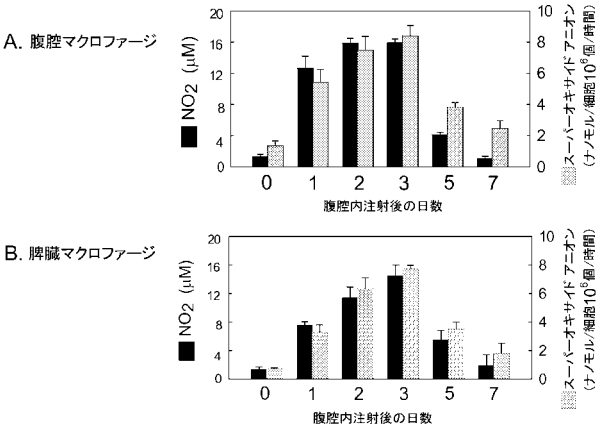
【図２】



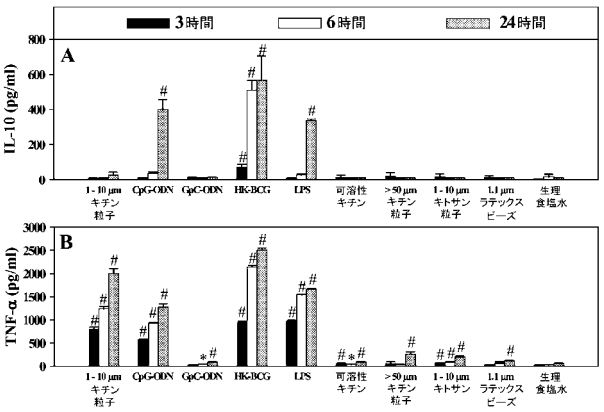
【図３】



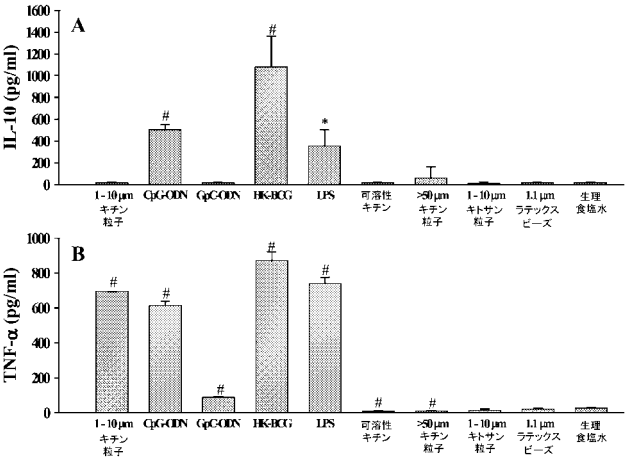
【図４】


A. 腹腔マクロファージ
B. 脾臓マクロファージ
NO2 (μM)
スーパーオキサイド アニオン (ナノモル/細胞10^6個/時間)
腹腔内注射後の日数

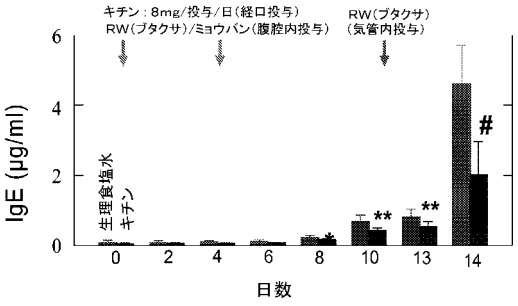
【図５】


3時間
6時間
24時間
A
B
IL-10 (pg/ml)
TNF-α (pg/ml)
1-10μm キチン粒子
CpG-ODN
GpG-ODN
HK-BCG
LPS
可溶性キチン
>50μm キチン粒子
1-10μm キトサン粒子
1.1μm ラテックスビーズ
生理食塩水

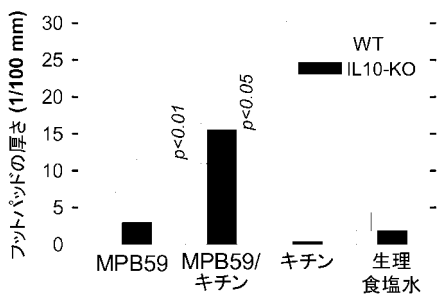
【図６】


A
B
IL-10 (pg/ml)
TNF-α (pg/ml)
1-10μm キチン粒子
CpG-ODN
GpG-ODN
HK-BCG
LPS
可溶性キチン
>50μm キチン粒子
1-10μm キトサン粒子
1.1μm ラテックスビーズ
生理食塩水

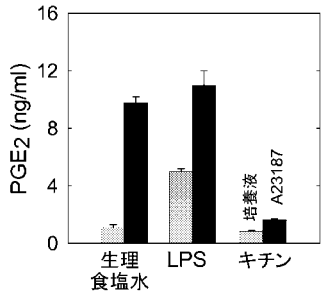
【図８】


キチン：8mg/投与/日（経口投与）
RW（ブタクサ）/ミョウバン（腹腔内投与）
RW（ブタクサ）（気管内投与）
生理食塩水
キチン
IgE (μg/ml)
日数

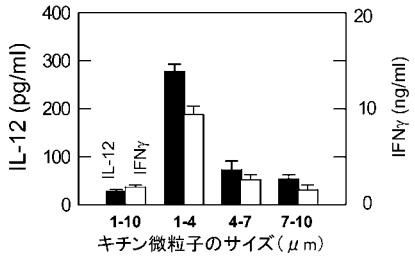
【図９】


フットパッドの厚さ (1/100 mm)
WT
IL10-KO
p<0.01
p<0.05
MPB59
MPB59/キチン
キチン
生理食塩水

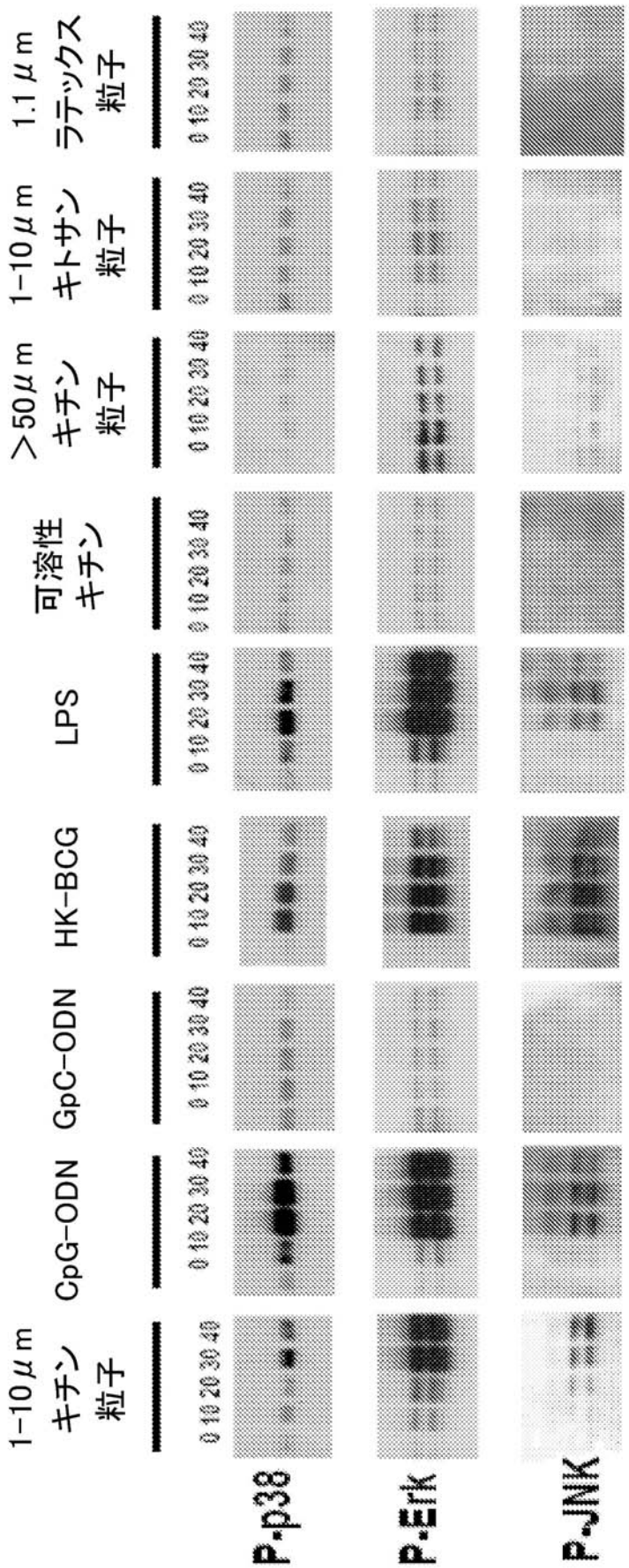
【図１０】


16
12
8
4
0
PGE2 (ng/ml)
培養液
A23187
生理
食塩水
LPS
キチン

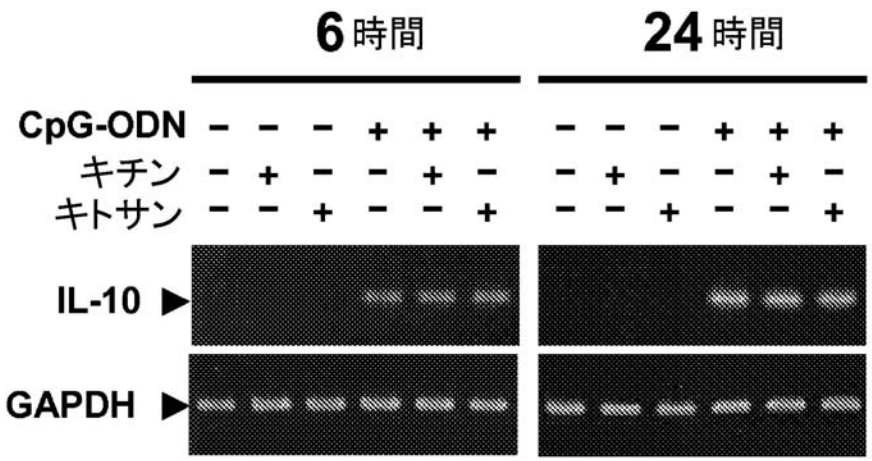
【図１１】


400
300
200
100
0
IL-12 (pg/ml)
IL-12
IFNγ
20
10
0
IFNγ (ng/ml)
1-10
1-4
4-7
7-10
キチン微粒子のサイズ（μm）

【図７】


1−10μm キチン 粒子
CpG−ODN
GpC−ODN
HK−BCG
LPS
可溶性 キチン
>50μm キチン 粒子
1−10μm キトサン 粒子
1.1μm ラテックス 粒子
0 10 20 30 40
P-p38
P-Erk
P-JNK

【図１２】



【配列表】
2010502766000001.app

【国際調査報告】

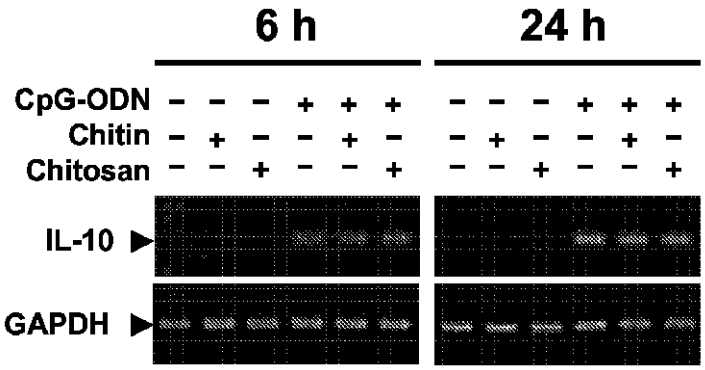


FIGURE 12

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*17/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/02		
Ａ６１Ｐ	*37/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/00		
Ｃ１２Ｎ	*15/09*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/00	Ａ	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,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,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 柴田 芳実
アメリカ合衆国，フロリダ州 ３３４９８，ボカ レイトン，シー パインズ ウェイ １９５９９
(72)発明者 マービック，クエンティン，エヌ．
アメリカ合衆国，ノースカロライナ州 ２８４６５，キャズウェル ビーチ，パルメット ドライヴ ４０４

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA02 CA11 HA14
4C085 AA03 AA38 BA01 BA09 EE06 FF14 FF18 GG02 GG04 GG06
GG08