

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7667922号  
(P7667922)

(45)発行日 令和7年4月23日(2025.4.23)

(24)登録日 令和7年4月15日(2025.4.15)

(51)国際特許分類	F I	
A 6 1 K 35/744 (2015.01)	A 6 1 K 35/744	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 31/16 (2006.01)	A 6 1 P 31/16	
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14	
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20	E Z N A
請求項の数 24 (全38頁)		

(21)出願番号	特願2024-565887(P2024-565887)	(73)特許権者	591222245 国立感染症研究所長 東京都新宿区戸山一丁目23番1号
(86)(22)出願日	令和5年12月25日(2023.12.25)	(73)特許権者	000253503 キリンホールディングス株式会社 東京都中野区中野四丁目10番2号 中野セントラルパークサウス
(86)国際出願番号	PCT/JP2023/046405	(74)代理人	100088155 弁理士 長谷川 芳樹
(87)国際公開番号	WO2024/135856	(74)代理人	100128381 弁理士 清水 義憲
(87)国際公開日	令和6年6月27日(2024.6.27)	(74)代理人	100140888 弁理士 渡辺 欣乃
審査請求日	令和6年12月12日(2024.12.12)	(72)発明者	石井 洋 東京都新宿区戸山一丁目23番1号 国
(31)優先権主張番号	特願2022-206490(P2022-206490)		最終頁に続く
(32)優先日	令和4年12月23日(2022.12.23)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		
早期審査対象出願			

(54)【発明の名称】 局所投与用の医薬組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

乳酸菌を有効成分として含有する、局所投与用の医薬組成物であって、前記乳酸菌がラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス JCM5805 菌株であり、上気道および/または下気道においてプラズマサイトイド樹状細胞によるインターフェロン(IFN)の産生を誘導するための、医薬組成物。

【請求項2】

局所投与が経鼻投与、舌下投与または吸入投与である、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

局所投与が、上気道および/または下気道に対する投与である、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項4】

前記上気道が、鼻腔である、請求項3に記載の医薬組成物。

【請求項5】

前記医薬組成物の投与対象が感染症に罹患した後、該対象においてIFNの産生が誘導される、請求項1または2に記載の医薬組成物。

【請求項6】

感染症の予防または治療のための、または、投与対象の感染症への罹患リスク低減に用いるための、請求項1または2に記載の医薬組成物。

【請求項7】

感染症が、ウイルス感染症である、請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

ウイルス感染症の予防が、ウイルス感染症の発症予防またはウイルス感染症の重症化予防である、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

ウイルス感染症が C O V I D - 1 9 またはインフルエンザウイルス感染症である、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

ウイルス感染症が呼吸器系感染症の原因ウイルスが感染したものである、請求項 7 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 11】

呼吸器系ウイルス感染症の原因ウイルスが S A R S - C o V - 2 またはインフルエンザウイルスである、請求項 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

哺乳動物に投与される、請求項 1 または 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

哺乳動物がヒトである、請求項 12 に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

投与回数が 2 回以上である、請求項 1 または 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

投与間隔が 1 日以上である、請求項 1 または 2 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 16】

ウイルス感染症の予防の有効期間が、局所投与を行った最後の日から 5 6 日間である、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

乳酸菌の 1 日当たりの投与量（成体の体重 5 0 k g 基準）が、1 m g 以上 1 0 0 0 m g 以下である、請求項 1 または 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス J C M 5 8 0 5 菌株を有効成分として含有し、上気道および/または下気道に投与される、局所投与用組成物。

30

【請求項 19】

ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス J C M 5 8 0 5 菌株を有効成分として含有し、経鼻投与、舌下投与または吸入投与される、局所投与用組成物。

【請求項 20】

医薬組成物である、請求項 1 8 または 1 9 に記載の局所投与用組成物。

【請求項 21】

乳酸菌を有効成分として含有する、局所投与用の医薬組成物であって、前記医薬組成物が感染症の予防または治療のための、または、投与対象の感染症への罹患リスク低減に用いるための、医薬組成物であり、前記乳酸菌がラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス J C M 5 8 0 5 菌株であり、前記感染症が、ウイルス感染症であり、前記医薬組成物がウイルス感染部位である上気道および/または下気道に局所投与される、医薬組成物。

40

【請求項 22】

乳酸菌を有効成分として含有する、局所投与するための免疫賦活用組成物であって、前記乳酸菌がラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス J C M 5 8 0 5 菌株であり、前記局所投与が上気道および/または下気道に対する投与であり、次の 1 ) ~ 3 ) からなる群より選択される少なくとも一つのために用いられる免疫賦活用組成物。

1 ) 顎下リンパ節および/または脾臓における I F N 誘導性抗ウイルス遺伝子 ( I S G ) の発現を増強させるため

2 ) 脾臓中のリンパ球に対する p D C の比率を増加させるための、および/または、鼻

50

粘膜中のリンパ球に対する p D C の比率を増加させるため

3) 鼻粘膜中のリンパ球に対する C D 1 1 b + S i g l e c - H + 細胞の比率を増加させるため

【請求項 2 3】

乳酸菌を有効成分として含有する、局所投与するための免疫賦活用組成物であって、前記乳酸菌がラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス J C M 5 8 0 5 菌株であり、前記局所投与が経鼻投与、舌下投与または吸入投与であり、次の 1) ~ 3) からなる群より選択される少なくとも一つのために用いられる免疫賦活用組成物。

1) 顎下リンパ節および/または脾臓における I F N 誘導性抗ウイルス遺伝子 ( I S G ) の発現を増強させるため

2) 脾臓中のリンパ球に対する p D C の比率を増加させるための、および/または、鼻粘膜中のリンパ球に対する p D C の比率を増加させるため

3) 鼻粘膜中のリンパ球に対する C D 1 1 b + S i g l e c - H + 細胞の比率を増加させるため

【請求項 2 4】

I S G が、V i p e r i n、I s g 1 5 および M x 1 からなる群から選択される 1 種または 2 種以上である、請求項 2 2 または 2 3 に記載の免疫賦活用組成物。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の参照】

【0001】

本願は、先行する日本国出願である特願 2 0 2 2 - 2 0 6 4 9 0 ( 出願日：2 0 2 2 年 1 2 月 2 3 日 ) の優先権の利益を享受するものであり、その開示内容全体は引用することにより本明細書の一部とされる。

【技術分野】

【0002】

本発明は、局所投与用の医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0003】

新型コロナウイルス ( S A R S - C o V - 2 ) をはじめとするウイルスまたは細菌等による感染症の世界的な蔓延が社会問題となっている。S A R S - C o V - 2 による新型コロナウイルス感染症 ( C O V I D - 1 9 ) の治療薬としては、例えば、中和モノクローナル抗体を用いた抗体医薬品等の開発が進められてきた ( 非特許文献 1 ~ 3 ) 。一方で、医薬品として効果および効果が認められている新型コロナウイルス感染症予防薬はなく、その開発が求められている。特にウイルスは変異株が出現する可能性が高いため、さらに変異株に対してもその有効性が期待できる治療薬および予防薬の開発が求められている。

【0004】

乳酸菌はヨーグルト等の発酵乳等に多く含まれており、飲食品として古くから用いられている。また、乳酸菌は経口摂取により腸内等で様々な生理活性をもたらすことが知られているが、医薬用途での局所投与による効果は知られていない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【文献】Weinreich DM, et al., N Engl J Med., 2021; 384(3): 238-251.

【文献】Piccicacco N, et al., Open Forum Infect Dis., 2021; 8(7): ofab292.

【文献】Koehler J, et al., Infection, 2021; 49(6): 1313-1318.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、新規な局所投与用の医薬組成物の提供を目的とする。

【課題を解決するための手段】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 7 】

本発明者らは、乳酸菌を局所投与することにより感染症の予防効果を高められることを見出した。本発明者らはまた、乳酸菌を局所投与することにより免疫賦活効果が奏されることを見出した。本発明はこれらの知見に基づくものである。

## 【 0 0 0 8 】

本発明によれば以下の発明が提供される。

- [ 1 ] 乳酸菌を有効成分として含有する、局所投与用の医薬組成物。
- [ 2 ] 局所投与が経鼻投与、舌下投与または吸入投与である、上記 [ 1 ] に記載の医薬組成物。
- [ 3 ] 局所投与が、上気道および / または下気道に対する投与である、上記 [ 1 ] または [ 2 ] に記載の医薬組成物。 10
- [ 4 ] 前記上気道が、鼻腔である、上記 [ 3 ] に記載の医薬組成物。
- [ 5 ] 上気道および / または下気道においてプラズマサイトイド樹状細胞によるインターフェロンの産生を誘導するための、上記 [ 1 ] ~ [ 4 ] のいずれかに記載の医薬組成物。
- [ 6 ] 前記医薬組成物の投与対象が感染症に罹患した後、該対象において I F N の産生が誘導される、上記 [ 5 ] に記載の医薬組成物。
- [ 7 ] 感染症の予防または治療のための、または、投与対象の感染症への罹患リスク低減に用いるための、上記 [ 1 ] ~ [ 6 ] のいずれかに記載の医薬組成物。
- [ 8 ] 感染症が、ウイルス感染症である、上記 [ 7 ] に記載の医薬組成物。
- [ 9 ] ウイルス感染症の予防が、ウイルス感染症の発症予防またはウイルス感染症の重症化予防である、上記 [ 8 ] に記載の医薬組成物。 20
- [ 10 ] ウイルス感染症が C O V I D - 19 またはインフルエンザウイルス感染症である、上記 [ 8 ] または [ 9 ] に記載の医薬組成物。
- [ 11 ] ウイルス感染症が呼吸器系感染症の原因ウイルスが感染したものである、上記 [ 8 ] ~ [ 10 ] のいずれかに記載の医薬組成物。
- [ 12 ] 呼吸器系ウイルス感染症の原因ウイルスが S A R S - C o V - 2 またはインフルエンザウイルスである、上記 [ 11 ] に記載の医薬組成物。
- [ 13 ] 哺乳動物に投与される、上記 [ 1 ] ~ [ 12 ] のいずれかに記載の医薬組成物。
- [ 14 ] 哺乳動物がヒトである、上記 [ 13 ] に記載の医薬組成物。
- [ 15 ] 投与回数が 2 回以上である、上記 [ 1 ] ~ [ 14 ] のいずれかに記載の医薬組成物。 30
- [ 16 ] 投与間隔が 1 日以上である、上記 [ 1 ] ~ [ 15 ] のいずれかに記載の医薬組成物。
- [ 17 ] ウイルス感染症の予防の有効期間が、局所投与を行った最後の日から 5 6 日間である、上記 [ 8 ] ~ [ 16 ] のいずれかに記載の医薬組成物。
- [ 18 ] 乳酸菌の 1 日当たりの投与量 ( 成体の体重 5 0 k g 基準 ) が、 1 m g 以上 1 0 0 0 m g 以下である、上記 [ 1 ] ~ [ 17 ] のいずれかに記載の医薬組成物。
- [ 19 ] 乳酸菌がラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス J C M 5 8 0 5 菌株である、上記 [ 1 ] ~ [ 18 ] のいずれかに記載の医薬組成物。
- [ 20 ] ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティスを有効成分として含有する、局所投与用組成物。 40
- [ 21 ] 医薬組成物である、上記 [ 20 ] に記載の局所投与用組成物。
- [ 22 ] ウイルス感染部位に局所投与する、上記 [ 8 ] ~ [ 19 ] のいずれかに記載の医薬組成物。
- [ 23 ] 乳酸菌を有効成分として含有する、局所投与するための免疫賦活用組成物。
- [ 24 ] 顎下リンパ節および / または脾臓における I F N 誘導性抗ウイルス遺伝子 ( I S G ) の発現を増強させるための、上記 [ 22 ] または [ 23 ] に記載の免疫賦活用組成物。
- [ 25 ] I S G が、 V i p e r i n、 I s g 1 5 および M x 1 からなる群から選択される 1 種または 2 種以上である、上記 [ 24 ] に記載の免疫賦活用組成物。
- [ 26 ] 脾臓中のリンパ球に対する p D C の比率を増加させるための、および / または、 50

鼻粘膜中のリンパ球に対するpDCの比率を増加させるための、上記[22]～[25]のいずれかに記載の免疫賦活用組成物。

[27]鼻粘膜中のリンパ球に対するCD11b<sup>+</sup>Siglec-H<sup>+</sup>細胞の比率を増加させるための、上記[22]～[26]のいずれかに記載の免疫賦活用組成物。

[28]有効量の乳酸菌またはそれを含んでなる組成物を、それを必要としている対象に局所投与する工程を含む、感染症の予防方法もしくは治療方法、感染症の罹患リスク低減方法または免疫賦活方法。

[29]局所投与用の感染症の予防剤もしくは治療剤の製造のための、局所投与用の感染症の罹患リスク低減剤の製造のための、または局所投与用の免疫賦活剤の製造のための、あるいは、局所投与用の感染症の予防剤もしくは治療剤としての、局所投与用の感染症の罹患リスク低減剤としてのまたは局所投与用の免疫賦活剤としての、あるいは、局所投与による感染症の予防方法もしくは治療方法、局所投与による感染症の罹患リスク低減方法または局所投与による免疫賦活方法における、乳酸菌の使用。

[30]局所投与による感染症の予防もしくは治療に用いるための、局所投与による感染症の罹患リスク低減に用いるための、または局所投与による免疫賦活に用いるための、乳酸菌。

#### 【0009】

本発明によれば、局所投与（特に経鼻投与）することにより、有効成分である乳酸菌による感染症の予防効果および免疫賦活効果をより高めることができる点で有利である。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0010】

【図1】図1は、経鼻投与した場合の対照群および乳酸菌投与群（6群）の感染前の体重に対する感染3日後の体重の割合を示す。

【図2】図2Aは、経鼻投与した場合の対照群および乳酸菌投与群（6群）の感染3日後の肺におけるSARS-CoV-2のRNA量を示す。図2Bは、経鼻投与した場合の感染3日後の対照群および乳酸菌投与群（6群）のBALF中のSARS-CoV-2のRNA量を示す。

【図3】図3は、経鼻投与した場合の対照群および乳酸菌投与群（6群）の感染3日後のBALF中のSARS-CoV-2のウイルス力価（ウイルス量）を示す。

【図4】図4Aは、経鼻投与した場合の対照群および乳酸菌投与群（5群）の感染3日後の血漿中のIFN-濃度を示す。図4Bは、経鼻投与した場合の対照群および乳酸菌投与群（5群）の感染3日後のBALF中のIFN-濃度を示す。

【図5】図5Aは、経鼻投与した場合の対照群および乳酸菌投与群における各マウスの感染前の体重に対する感染後の体重の割合の経時変化を示す。図5Bは、経鼻投与した場合の対照群および乳酸菌投与群の感染前の体重に対する感染後の体重の割合の平均値の経時変化を示す。なお、図中の\*は $p < 0.05$ 、\*\*は $p < 0.01$ を示し（マン・ホイットニーのU検定）、エラーバーは標準偏差を示す。

【図6】図6は、経鼻投与した場合の対照群および乳酸菌投与群（5群）の感染2日後のNALT中のSARS-CoV-2のRNA量を示す。なお、図中の-は幾何平均値を示す。

【図7】図7は、経鼻投与した場合の対照群および乳酸菌投与群の感染2日後の鼻腔洗浄液中のA型インフルエンザウイルス（H1N1）のRNA量を示す。なお、図中の\*は $p < 0.05$ を示し（マン・ホイットニーのU検定）、-は幾何平均値を示す。

【図8】図8は、Low Volume（-）群、Low volume（+）群、High Volume（-）群およびHigh Volume（+）群における、Day（-3）の体重に対する、Day（-2）、Day（-1）およびDay（0）の体重の割合（相対的体重（Day（-3）基準）（%））を示す。なお、図中のエラーバーは標準偏差を示す。

【図9】図9は、Low Volume（-）群、Low volume（+）群、High Volume（-）群およびHigh Volume（+）群の顎下リンパ節における

10

20

30

40

50

、Viperin、Isg15、Mx1の相対的mRNA発現量を示す。なお、図中の\*は $p < 0.05$ 、\*\*は $p < 0.01$ を示し(スチューデントのt検定(Student's t-test)、エラーバーは標準偏差を示す。

【図10】図10は、Low Volume(-)群、Low volume(+)群、High Volume(-)群およびHigh Volume(+)群の脾臓における、Viperin、Isg15、Mx1の相対的mRNA発現量を示す。なお、図中の\*は $p < 0.05$ を示し(スチューデントのt検定(Student's t-test)、エラーバーは標準偏差を示す。

【図11】図11は、Low Volume(-)群、Low volume(+)群、High Volume(-)群およびHigh Volume(+)群の肺における、Viperin、Isg15、Mx1の相対的mRNA発現量を示す。なお、図中のエラーバーは標準偏差を示す)。 10

【図12】図12Aは、Low Volume(-)群およびLow volume(+)群の脾臓のリンパ球分画におけるCD11cおよびSiglec-Hに関するFACS解析像を示す。なお、 $CD11c^+Siglec-H^+$ 細胞集団をpDCとして解析した。図12Bは、Low Volume(-)群およびLow volume(+)群の脾臓中のリンパ球に対するpDCの比率(%)を示す。なお、図中の-は平均値を示す。

【図13】図13は、Low Volume(-)群およびLow volume(+)群における、脾臓中のpDCにおけるMHCクラスII(I-A/I-E)(A)およびCD86(B)の発現量(MFI:Median Fluorescence Intensity)を示す。なお、図中の-は平均値を示す。 20

【図14】図14Aは、Low Volume(-)群およびLow volume(+)群の顎下リンパ節のリンパ球分画におけるCD11cおよびSiglec-Hに関するFACS解析像を示す。なお、 $CD11c^+Siglec-H^+$ 細胞集団をpDCとして解析した。図14Bは、Low Volume(-)群およびLow volume(+)群の顎下リンパ節中のリンパ球に対するpDCの比率(%)を示す。図中の\*\*は $p < 0.01$ を示し(スチューデントのt検定(Student's t-test)、-は平均値を示す)。

【図15】図15は、Low Volume(-)群およびLow volume(+)群における、顎下リンパ節のpDCにおけるMHCクラスII(I-A/I-E)(A)およびCD86(B)の発現量(MFI)を示す。なお、図中の-は平均値を示す。 30

【図16】図16Aは、Low Volume(-)群およびLow volume(+)群の鼻粘膜のリンパ球分画におけるCD11bおよびSiglec-Hに関するFACS解析像を示す。 $CD11b^-Siglec-H^+$ 細胞集団をpDC、 $CD11b^+Siglec-H^+$ 細胞集団を $CD11b^+Siglec-H^+$ 細胞として解析した。図16Bは、Low Volume(-)群およびLow volume(+)群の鼻粘膜中のリンパ球に対するpDCおよび $CD11b^+Siglec-H^+$ 細胞の比率(%)を示す。なお、図中の\*は $p < 0.05$ 、\*\*は $p < 0.01$ を示し(スチューデントのt検定(Student's t-test)、-は平均値を示す。

【図17】図17Aは、Low Volume(-)群およびLow volume(+)群における、鼻粘膜中のpDCにおけるMHCクラスII(I-A/I-E)(A)およびCD86(B)の発現量(MFI)を示す。図17Bは、Low Volume(-)群およびLow volume(+)群における、鼻粘膜中の $CD11b^+Siglec-H^+$ 細胞におけるMHCクラスII(I-A/I-E)(A)およびCD86(B)の発現量(MFI)を示す。なお、図中の-は平均値を示す。 40

【図18】図18は、Low Volume(-)群およびLow volume(+)群から採取した鼻粘膜細胞を培養した時の、CpG-A添加なし(CpG-A 0 $\mu$ M)およびCpG-A添加あり(CpG-A 1 $\mu$ M)の培養上清中のIFN- $\gamma$ 産生量(pg/ml)を示す。なお、図中の\*\*は $p < 0.01$ を示し(スチューデントのt検定(Student's t-test)、-は平均値を示す。 50

【図19】図19は、Low Volume (-)群およびLow volume (+)群から採取した鼻粘膜細胞を培養した時の、不活化済HIN1添加なし(HIN1 0 μg/ml)および不活化済HIN1添加あり(HIN1 5 μg/ml)の培養上清中のIFN- $\gamma$  産生量(pg/ml)(A)、IFN- $\beta$  産生量(pg/ml)(B)およびIFN- $\alpha$  産生量(pg/ml)(C)を示す。なお、図中の-は平均値を示す。

【図20】図20Aは、経口投与した場合の対照群および乳酸菌投与群(6群)の感染2日後のNALTにおけるSARS-CoV-2のRNA量を示す(\*はp=0.0104を示す(マン・ホイットニー検定(Mann-Whitney test)))。図20Bは、経口投与した場合の対照群および乳酸菌投与群(6群)の感染3日後のNALTにおけるSARS-CoV-2のRNA量を示す。

10

【図21】図21は、経口投与した場合の対照群および乳酸菌投与群(6群)の感染3日後の肺におけるSARS-CoV-2のRNA量を示す(\*はp=0.0281を示す(マン・ホイットニー検定(Mann-Whitney test)))。

#### 【発明の具体的説明】

##### 【0011】

本発明は、乳酸菌を有効成分として含有する局所投与用の医薬組成物である。

##### 【0012】

本発明の有効成分である乳酸菌は、特に限定されないが、好ましくはインターフェロン(IFN: Interferon)産生を誘導する性質を有する乳酸菌であり、より好ましくはプラズマサイトイド樹状細胞(pDC: plasmacytoid dendritic cell)を活性化し、かつ、少なくともIFN産生を誘導する性質を有する乳酸菌である。例えば、10 μg/mlでヒト末梢血単核細胞由来のプラズマサイトイド樹状細胞(pDC)培養液に添加した場合に50 pg/mL以上、好ましくは100 pg/mL以上のIFN- $\gamma$  産生を誘導する性質を有する乳酸菌を使用することができる。

20

##### 【0013】

本発明の有効成分である乳酸菌はまた、本発明の医薬組成物の投与対象が感染症に罹患した後、該対象においてIFNの産生を誘導する性質を有する乳酸菌とすることができる。

##### 【0014】

本発明のIFN産生を誘導する性質を有する乳酸菌は、好ましくは、Type I IFN(I型インターフェロン)、Type II IFN(II型インターフェロン)、Type III IFN(III型インターフェロン)のいずれか1種以上のIFNの産生を誘導し得る。Type I IFNはウイルス感染に有効とされるサイトカインであり、IFN- $\alpha$  (1、2、4、5、6、7、8、10、13、14、16、17、21)およびIFN- $\beta$  等が含まれる。Type II IFNにはIFN- $\gamma$  が含まれ、Type III IFNにはIFN- $\delta$  が含まれる。本発明のIFN産生を誘導する性質を有する乳酸菌は、この中でも特にType I IFNの産生誘導活性を有するものが好ましい。本発明のIFN産生を誘導する性質を有する乳酸菌によりpDCが活性化されると、活性化pDCの特徴である細胞突起が出現し、Type I IFNおよびType III IFNの産生が誘導され、さらに、NK細胞またはTh1細胞からのIFN- $\gamma$  等のType II IFNの産生も誘導され得る。

30

40

##### 【0015】

本発明の有効成分であるIFN産生を誘導する性質を有する乳酸菌が産生を誘導し得るIFNは、特に限定されないが、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  およびIFN- $\gamma$  からなる群から選択される1種以上であることが好ましく、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  およびIFN- $\gamma$  からなる群から選択される2種以上であることがより好ましく、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  およびIFN- $\gamma$  からなる群から選択される2種以上であって、かつ、2種以上のIFNの内の少なくとも1種がIFN- $\alpha$  であることがさらに好ましく、2種以上のIFNの内の少なくとも2種がIFN- $\alpha$  およびIFN- $\beta$  であることがさらにまた好ましく、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  およびIFN- $\gamma$  の3種であることが特に好ましい。

##### 【0016】

50

本発明の有効成分であるIFN産生を誘導する性質を有する乳酸菌がpDCを活性化し、少なくともIFN産生を誘導し得るものであるかどうかは、例えば、候補乳酸菌をマウス等の哺乳類の骨髄細胞の共存下で培養した場合に、pDCが活性化され、IFNの産生が誘導されるかどうかを測定することにより確認することができる。例えば、IFN- $\gamma$ の産生は、培養液中のIFN- $\gamma$ 濃度をELISA等により測定することができ、具体的には、赤血球除去したマウス骨髄細胞を10%のウシ胎児血清(FCS)、2 $\mu$ Mの $\beta$ -メルカプトエタノールを含有するRPMI培地(SIGMA社)に、 $5 \times 10^5$ 個/mLになるように懸濁し、得られた細胞懸濁液に、pDC誘導サイトカインとしてFlt-3Lを終濃度100ng/mLで添加し、CO<sub>2</sub>インキュベータ内で37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>にて培養し、7日後に乳酸菌株を10 $\mu$ g/mLで添加し、48時間後に培養上清を回収して、培養上清中のIFN- $\gamma$ 濃度をIFN- $\gamma$ 測定キット(PBL社)を用いてELISA法にて測定することができる。

#### 【0017】

本発明の有効成分である乳酸菌は、特に限定されるものではないが、乳酸球菌が挙げられ、例えば、ラクトコッカス(*Lactococcus*)属、ロイコノストック(*Leuconostoc*)属、ペディオコッカス(*Pediococcus*)属、ストレプトコッカス(*Streptococcus*)属、エンテロコッカス(*Enterococcus*)属、ラクトバチラス(*Lactobacillus*)属およびオエノコッカス(*Oenococcus*)属、ビフィドバクテリウム(*Bifidobacterium*)属、ワイセラ(*Weissella*)属およびテトラジェノコッカス(*Tetragenococcus*)属に属する乳酸菌が挙げられる。本発明の有効成分である乳酸菌は、好ましくは、ラクトコッカス属またはペディオコッカス属に属する乳酸菌である。また、本発明の有効成分である乳酸菌は、1種の菌種または菌株を用いることができ、2種以上の菌種または菌株を組み合わせて用いることもできる。

#### 【0018】

ラクトコッカス属細菌としては、例えば、ラクトコッカス・ラクティス(*Lactococcus lactis*)ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)、ラクトコッカス・ガルビエアエ(*Lactococcus garvieae*)、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・クレモリス(*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*)、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ホールドニアエ(*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*)等が挙げられ、pDCを活性化し、かつ、少なくともIFN産生を誘導し得る観点からラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティスが好ましい。

#### 【0019】

ラクトコッカス属細菌の具体例としては、例えば、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティスJCM5805、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティスNBRC12007、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティスNRIC1150、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティスJCM20101、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティスJCM7638、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティスATCC11454、ラクトコッカス・ガルビエアエNBRC100934、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・クレモリスJCM16167、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・クレモリスNBRC100676、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ホールドニアエJCM1180、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ホールドニアエJCM11040およびラクトコッカス・プラントラムJCM11056等が挙げられ、pDCを活性化し、かつ、少なくともIFN産生を誘導し得る観点からラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティスJCM5805が好ましい。

#### 【0020】

ロイコノストック属細菌としては、例えば、ロイコノストック・ラクティス(*Leuconostoc lactis*)等が挙げられる。ロイコノストック属細菌の具体例としては、例えば、ロイコノストック・ラクティスNBRC12455等が挙げられる。

10

20

30

40

50

## 【0021】

ペディオコッカス属細菌としては、例えば、ペディオコッカス・アシディラクティシ (*Pediococcus acidilactici*)、ペディオコッカス・ペントサセウス (*Pediococcus pentosaceus*)、ペディオコッカス・セリコーラ (*Pediococcus cellicola*)、ペディオコッカス・クラウッセニー (*Pediococcus claussenii*)、ペディオコッカス・ダムノサス (*Pediococcus damnosus*)、ペディオコッカス・エタノーリデュランス (*Pediococcus ethanolidurans*)、ペディオコッカス・イノピナタス (*Pediococcus inopinatus*)、ペディオコッカス・パルヴルス (*Pediococcus parvulus*)、ペディオコッカス・スティレッシー (*Pediococcus stilesii*) 等が挙げられる。ペディオコッカス属細菌の具体例としては、例えば、ペディオコッカス・アシディラクティシ JCM8797、ペディオコッカス・アシディラクティシ K15 および ペディオコッカス・ダムノサス JCM5886 等が挙げられる。

10

## 【0022】

ストレプトコッカス属細菌としては、例えば、ストレプトコッカス・サーモフィラス等が挙げられる。ストレプトコッカス属細菌の具体例としては、例えば、ストレプトコッカス・サーモフィラス SBC8781 等が挙げられる。

## 【0023】

エンテロコッカス属細菌としては、例えば、エンテロコッカス・アルセディニス (*Enterococcus alcedinis*) 等が挙げられる。

## 【0024】

ラクトバチラス属細菌としては、例えば、ラクトバチラス・バラカゼイ (*Lactobacillus paracasei*)、ラクトバチラス・デルブルエッキ (*Lactobacillus delbrueckii*)、ラクトバチラス・アシドフィラス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチラス・カゼイ (*Lactobacillus casei*)、ラクトバチラス・フルクティヴォランス (*Lactobacillus fructivorans*)、ラクトバチラス・ヒルガルディー (*Lactobacillus hilgardii*)、ラクトバチラス・ラムノサス (*Lactobacillus rhamnosus*)、ラクトバチラス・プランタラム (*Lactobacillus plantarum*)、ラクトバチラス・ガセリ (*Lactobacillus gasseri*)、ラクトバチラス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチラス・ブルガリクス (*Lactobacillus bulgaricus*) が挙げられる。ラクトバチラス属細菌の具体例としては、例えば、ラクトバチラス・バラカゼイ KW3110、ラクトバチラス・バラカゼイ MCC1849、ラクトバチラス・バラカゼイ K71、ラクトバチラス・ラムノサス GG、ラクトバチラス・ラムノサス CRL1505、ラクトバチラス・ガセリ SBT2055、ラクトバチラス・パラケフィリ (新分類ではレンチラクトバチラス・パラケフィリ) JCM8573、ラクトバチラス・ペントーサス (新分類ではラクチプランチバチラス・ペントーサス) ONRICb0240、ラクトバチラス・プランタラム (新分類ではラクチプランチバチラス・プランタラム) L-137 および ラクトバチラス・アシドフィルス L-92 または ラクトバチラス・ブルガリクス OLL1073R-1 (菌体外多糖を有する当該株を含む) 等が挙げられる。本発明において、ラクトバチラス属細菌は、飲料中の水分散性に優れるという観点から、例えば、ラクトバチラス・バラカゼイ、ラクトバチラス・デルブルエッキ、ラクトバチラス・アシドフィラス、ラクトバチラス・カゼイ、ラクトバチラス・フルクティヴォランス、ラクトバチラス・ヒルガルディー および ラクトバチラス・ラムノサス からなる群から選択される 1 種または 2 種以上とすることができる。

20

30

40

## 【0025】

オエノコッカス属細菌としては、例えば、オエノコッカス・オエニ (*Oenococcus oeni*) 等が挙げられる。オエノコッカス属細菌の具体例としては、オエノコッカス・オエニ JCM6125 等が挙げられる。

## 【0026】

ビフィドバクテリウム属細菌としては、例えば、ビフィドバクテリウム・アニマリズ・サブスピーシズ・ラクティス (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) および ビフィドバクテリウム・ロンガム・サブスピーシズ・インファンティス (*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) 等が挙げられる。ビフィドバクテリウム属細菌の具体例として

50

は、*ビフィドバクテリウム・アニマリス・サブスピーシーズ・ラクティス* JCM10602 および *ビフィドバクテリウム・ロンガム・サブスピーシーズ・インファンティス* JCM1222 等が挙げられる。

【0027】

ワイセラ属細菌としては、例えば、*ワイセラ・パラメセンテロイデス* (*Weissella paramesenteroides*) 及び *ワイセラ・ビリデスセンス* (*Weissella viridescens*) 等が挙げられる。ワイセラ属細菌の具体例としては、*ワイセラ・パラメセンテロイデス* JCM9890 及び *ワイセラ・ビリデスセンス* JCM1174 等が挙げられる。

【0028】

テトラジェノコッカス属細菌としては、例えば、*テトラジェノコッカス・ハロフィルス* (*Tetragenococcus halophilus*) 等が挙げられる。テトラジェノコッカス属細菌の具体例としては、*テトラジェノコッカス・ハロフィルス* NRIC0098 等が挙げられる。

【0029】

本発明において、乳酸菌は公知の寄託機関等から入手することができ、例えば上記の乳酸球菌株のうち、JCM菌株は、理化学研究所・バイオリソースセンター・微生物材料開発室（茨城県つくば市高野台3丁目1番地の1）から、NBRC菌株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構生物遺伝資源部門（千葉県木更津市かずさ鎌足2丁目5番8号）から、NRIC菌株は、東京農業大学・菌株保存室（東京都世田谷区桜丘1丁目1番1号）から、ATCC菌株は、American type culture collection（米国）から、それぞれ入手することができる。

【0030】

本発明において有効成分として用いられる乳酸菌は、乳酸菌の培養物を含んでもよい。培養物とは、生菌体、死菌体、生菌体または死菌体の破碎物、生菌体または死菌体の凍結乾燥物、該凍結乾燥物の破碎物、生菌体または死菌体の酵素処理物、培養液、培養液抽出物等を含み、乳酸菌の一部や乳酸菌の処理物も含む。死菌体は、生菌体を処理することで得ることができ、例えば、加熱処理、抗生物質等の薬物による処理、ホルマリン等の化学物質による処理、紫外線による処理およびγ線等の放射線による処理のいずれか1または2以上の組合せにより得ることができる。処理物は、例えば、加熱菌体（死菌体）、その凍結乾燥物、これらを含む培養物を含み、さらに、超音波等による菌体の破碎液および菌体の酵素処理液を含む。また、処理物には、細胞壁を酵素または機械的手段により除去した処理物等も含む。さらに、菌体を界面活性剤等によって溶解した後、エタノール等によって沈殿させて得られる核酸含有画分も含まれる。さらに、本発明において有効成分として用いられる乳酸菌には死菌体を含むこともできる。さらに、上記乳酸菌の培養物には乳酸菌由来のDNAおよびRNAが含まれ、乳酸菌由来のDNAおよびRNAは、好ましくはpDCを活性化し、かつ、少なくともIFN産生を誘導し得るものである。

【0031】

乳酸菌の培養は、公知の培地を用いた公知の方法で行うことができる。培地としては、例えば、MRS培地、GAM培地およびLM17培地等を用いることができ、無機塩類、ビタミン、アミノ酸、抗生物質および血清等を適宜添加して用いることができる。培養は、25～40℃で数時間～数日行えばよい。

【0032】

培養後、乳酸菌菌体を遠心分離またはろ過により集菌することで乳酸菌の菌体を得ることができる。死菌体として用いる場合、オートクレーブ等により殺菌不活化して用いてもよい。

【0033】

本発明において局所投与は、有効成分である乳酸菌が直接作用する部位への局所的な投与を意味するが、例えば、経鼻投与、舌下投与、吸入投与、パッカル投与、経皮投与、経直腸投与、経膈投与、経肺投与、経気道投与（気管内投与）および点眼投与が挙げられる。局所投与としては、感染予防効果または感染抑制効果を高める点および投与負担軽減の点で、好ましくは経鼻投与、舌下投与および吸入投与である。局所投与では、有効成分で

10

20

30

40

50

ある乳酸菌が、例えば、鼻腔、舌下、咽頭、喉頭、気道、気管支、肺、膈、皮膚、眼および腸等の局所部位における粘膜を介して吸収されることが想定される。また、鼻腔から乳酸菌を投与する場合には、好ましくは、投与箇所はワルダイエル咽頭輪（例えば、咽頭扁桃、上咽頭（鼻咽頭）、口蓋扁桃、中咽頭または舌扁桃）である。局所投与は、内服剤等としての投与する経口投与と比べて、有効成分であるpDCを活性化し、かつ、少なくともIFN産生を誘導する性質を有する乳酸菌を当該局所周辺に存在するpDCや従来型樹状細胞（cDC）等に直接作用させることができるため、感染予防効果または感染抑制効果が高まる点で有利である。

#### 【0034】

本発明において局所投与に適した剤型（製剤）は当業者に周知であり、目的に応じて適宜選択することができる。剤型としては、例えば、点鼻剤（例えば、点鼻粉末剤、点鼻液剤）、吸入剤（例えば、吸入エアゾール剤、吸入粉末剤、吸入液剤）、舌下剤、パッカル投与剤、注射剤（皮内注射、皮下注射、筋肉内注射、静脈内注射を含む）、軟膏剤、クリーム剤、ゲル剤、坐剤、貼付剤および湿布剤が挙げられる。これらの剤型は、当分野で通常行われている手法（例えば、第十八改正日本薬局方 製剤総則等に記載の公知の方法）により、薬学上許容される担体（溶剤を含む）を用いて剤型化（製剤化）することができる。

10

#### 【0035】

本発明において、点鼻剤としては、特に限定されるものではないが、例えば、乳酸菌を、精製水もしくは生理食塩水等の液体または担体からなる粉体中等に分散させることにより調製できる。また、点鼻剤用の公知の噴霧器等に充填することにより点鼻剤として提供することができる。

20

#### 【0036】

本発明において、吸入剤としては、特に限定されるものではないが、例えば、乳酸菌を、精製水もしくは生理食塩水等の液体または担体からなる粉体中等に分散させることにより調製し、吸入剤用の公知の吸入器等に充填することにより吸入剤として提供できる。また、乳酸菌とともに水粒子または水蒸気を経口または経鼻等で吸入させる手段により提供することができる。具体的な手段としては、ネブライザー等の水粒子吸入が可能な吸入器により吸入させる方法、空気中の酸素との反応により発熱すると共に水蒸気を発生し、温められた水蒸気を対象に供給可能な蒸気発生具により吸入させる方法等が挙げられる。

#### 【0037】

ネブライザーは、超音波ネブライザー、メッシュ式ネブライザーまたはコンプレッサー式ネブライザーが好ましい。

30

#### 【0038】

吸入される水粒子の粒子径は、 $10\ \mu\text{m}$ 未満であることが好ましく、 $1\sim 8\ \mu\text{m}$ であることがより好ましい。ここで、水粒子の粒子径は、光散乱法によって測定することができる。

#### 【0039】

製剤化において薬学上許容される担体としては、限定されるものではないが、例えば、賦形剤、粘稠剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤、溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、乳化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤および安定化剤等が挙げられる。また、必要に応じて、保存剤（防腐剤）、pH調整剤、清涼化剤、抗酸化剤、湿潤化剤、粘着剤および矯臭剤等の添加物を含むことができる。

40

#### 【0040】

賦形剤としては、例えば、乳糖、白糖、D-マンニトール、澱粉、コーンスターチ、結晶セルロースおよび軽質無水ケイ酸等が挙げられる。

#### 【0041】

粘稠剤としては、例えば、グリセリン等の多価アルコール、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース等のセルロース類、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム等の親水性高分子、アルギン酸ナトリウム、コンドロイチン硫酸お

50

よびポリエチレングリコール等が挙げられる。

【0042】

滑沢剤としては、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルクおよびコロイドシリカ等が挙げられる。

【0043】

結合剤としては、例えば、結晶セルロース、白糖、デキストリン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、澱粉、ショ糖、ゼラチン、メチルセルロースおよびカルボキシメチルセルロースナトリウム等が挙げられる。

【0044】

崩壊剤としては、例えば、澱粉、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウムおよびL-ヒドロキシプロピルセルロース等が挙げられる。

【0045】

溶剤としては、例えば、水（精製水、純水等を含む）、エタノール、イソプロピルアルコールおよびプロピレングリコール等が挙げられる。

【0046】

溶解補助剤としては、例えば、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース等のセルロース類；ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、エタノール、トリスアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウムおよびポリビニルピロリドン等が挙げられる。

【0047】

懸濁化剤としては、例えば、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、モノステアリン酸グリセリン、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリソルベート等の界面活性剤、グリセリン等の多価アルコール、ソルビトール、マンニトール、ショ糖等の糖類、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース等のセルロース類、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー等の親水性高分子およびコンドロイチン硫酸等が挙げられる。

【0048】

等張化剤としては、例えば、ブドウ糖、D-ソルビトール、塩化ナトリウム、グリセリン、塩化カリウム、プロピレングリコールおよびショ糖等が挙げられる。

【0049】

緩衝剤としては、例えば、リン酸塩（リン酸水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム等）、ホウ酸、ホウ砂、酢酸塩（酢酸ナトリウム等）、炭酸塩（炭酸ナトリウム、炭酸カルシウム、炭酸カリウム等）、クエン酸およびL-グルタミン酸ナトリウム等が挙げられる。

【0050】

無痛化剤としては、例えば、ベンジルアルコール、クロロブタノール、プロピレングリコール、アミノ安息香酸エチルおよびリドカイン等が挙げられる。

【0051】

安定化剤としては、例えば、亜硫酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、メタ亜硫酸水素ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、ロンガリット、チオグリセロール、チオグリコール酸、チオ乳酸、システイン、グルタチオン、チオ酢酸、メチオニン、チオソルビトール、チオグルコース、チオ尿素等の硫黄化合物、ホウ酸、ホウ砂、リン酸、メタリン酸、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム等の無機酸およびその塩類、ギ酸、シュウ酸、酒石酸、クエン酸、エデト酸等の有機酸およびその塩類（エデト酸ナトリウム等）、アセトアミド、ジエチルアセトアミド、ニコチン酸アミド、尿素、バルピタール等の酸アミド、尿素誘導体、グリコール、プロピレングリコール、グリセリン、ポリエチレングリコール、ブドウ糖、アスコルビン酸等の多価アルコール、糖類、フェノール、キノン、クマロン、イソクマロン等のフェノール類、ジブチルヒドロキシルエン、グリシン、グルタミン酸、リ

10

20

30

40

50

ジン、フェニルアラニン、カゼイン、エデスチン等のアミノ酸およびタンパク質等が挙げられる。

【0052】

乳化剤としては、例えば、グリセリンエステル（モノオレイン酸グリセリン）、シヨ糖脂肪酸エステル、レシチン（植物レシチン、卵黄レシチン、大豆レシチン等）、各種界面活性剤（アルキルベンゼンスルホン酸塩型乳化剤、塩化ベンザルコニウム、セスキオレイン酸ソルピタン、ドデシルベンゼンスルホン酸等）およびトリエタノールアミン等が挙げられる。

【0053】

保存剤（防腐剤）としては、例えば、パラオキシ安息香酸プロピル、パラオキシ安息香酸ブチル等のパラオキシ安息香酸エステル類、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、ブチルパラベン等のパラベン類、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、グルコン酸クロルヘキシジン、塩化セチルピリジウム等の逆性石鹸類、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール等のアルコール誘導体、デヒドロ酢酸ナトリウム、ソルビン酸、ソルビン酸ナトリウム等の有機酸およびその塩類、パラクロルメトキシフェノールおよびパラクロルメタクレゾール等のフェノール類等が挙げられる。

10

【0054】

pH調整剤としては、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、リン酸三ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、塩酸、硝酸、クエン酸、ホウ酸および酢酸等が挙げられる。

【0055】

清涼化剤としては、例えば、1-メントール、カンファー、ハッカ水等が挙げられる。抗酸化剤としては、例えば、亜硫酸塩、アスコルビン酸、クエン酸およびエデト酸ナトリウム等が挙げられる。

20

【0056】

湿潤化剤としては、例えば、プロピレングリコール、ポリソルベート、ポリエチレングリコールおよびグリセリン等が挙げられる。

【0057】

粘着剤としては、例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシビニルポリマー、プロピレングリコールおよびポリソルベート80等が挙げられる。

30

【0058】

矯臭剤としては、トレハロース、リンゴ酸、マルトース、アニス精油、バニラ精油およびカルダモン精油等が挙げられる。

【0059】

本発明の医薬組成物は、感染症の予防または治療に用いることができる。

【0060】

本発明の医薬組成物は、投与対象の感染症の罹患リスク低減に、あるいは投与対象の病原体の感染リスク低減に用いることができる。投与対象は、本発明の医薬組成物を投与する対象であり、感染症の罹患リスクがある対象または病原体の感染リスクがある対象とすることができる。ここで、本発明において、「感染症の罹患リスク低減」は、感染症の罹患確率が低減されることを意味し、「病原体の感染リスク低減」は、病原体の感染確率が低減されることを意味する。

40

【0061】

また、本発明の一態様として、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティスを有効成分として含有する局所投与用組成物とすることができ、好ましくは当該組成物が医薬組成物である。

【0062】

本発明において、感染症は、特に限定されるものではないが、病原体が感染することで生じる疾患であり、例えば、ウイルス感染症、細菌感染症、リケッチア・クラミジア感染症、真菌感染症、寄生虫感染症およびプリオン感染症等が挙げられ、好ましくはウイルス

50

感染症および細菌感染症である。

【 0 0 6 3 】

本発明において、ウイルス感染症としては、例えば、C O V I D - 1 9、インフルエンザウイルス感染症、狂犬病、日本脳炎、ウエストナイル熱、デング熱、チクングニア熱、ジカウイルス感染症、ダニ媒介脳炎、E型肝炎、重症熱性血小板減少症候群（S F T S）、エボラ出血熱重症急性呼吸器症候群（S A R S）および中東呼吸器症候群（M E R S）等が挙げられる。

【 0 0 6 4 】

本発明において、細菌感染症としては、例えば、Q熱、ペスト、サルモネラ症、レプトスピラ症、猫ひっかき病、ブルセラ症、カプノサイトファーガ・カニモルサス感染症、コ

10

【 0 0 6 5 】

本発明において、リケッチア・クラミジア感染症としては、例えば、日本紅斑熱、つつが虫病およびオウム病等が挙げられる。

【 0 0 6 6 】

本発明において、真菌感染症としては、例えば、皮膚糸状菌症およびクリプトコッカス病等が挙げられる。

【 0 0 6 7 】

本発明において、寄生虫感染症としては、例えば、トキソプラズマ症、回虫症、エキノ

20

【 0 0 6 8 】

本発明において、プリオン感染症としては、例えば、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病（v C J D）等が挙げられる。

【 0 0 6 9 】

本発明においてウイルス感染症の予防は、ウイルス感染症の発症予防およびウイルス感染症の重症化予防を含む意味で用いられる。ここで、ウイルス感染症の発症の有無は、例えば、P C R検査、抗原検査および抗体検査等の公知の方法により判定することができる。ウイルス感染症の重症度の有無は、例えば、呼吸不全の有無、酸素飽和濃度および肺炎所見等を指標にして判定することができ、ウイルス感染症がC O V I D - 1 9の場合、米

30

【 0 0 7 0 】

本発明の医薬組成物により予防または治療されるウイルス感染症の原因ウイルスは、特に限定されるものではないが、例えば、S A R S - C o V - 2、重症急性呼吸器症候群（S A R S）コロナウイルス、中東呼吸器症候群コロナウイルス、通常型ヒトコロナウイルス（2 2 9 E、N L 6 3、O C 4 3 及びH K U 1）インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、アデノウイルス、R S ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ライノウイルス、デングウイルス、水痘・帯状疱疹ウイルス、単純ヘルペスウイルス、麻疹ウイルス、パラインフルエンザウイルス、エンテロウイルス、ライノウイルス、ヒトメタニュー

40

【 0 0 7 1 】

本発明において、S A R S - C o V - 2 は、最初に発見されたウイルス株のみならず、その変異株（例えば、B . 1 . 1 . 7 系統（アルファ株）、B . 1 . 3 5 1 系統（ベータ株）、P . 1 系統（ガンマ株）、B . 1 . 6 1 7 . 2 系統（デルタ株）およびB . 1 . 1

50

．529系統（オミクロン株）等）を含む。なお、SARS-CoV-2は、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2（severe acute respiratory syndrome coronavirus-2）と同義であり、SARS-CoV-2感染症（SARS-CoV-2の感染により引き起こされる疾患および症状）をCOVID-19（いわゆる新型コロナウイルス感染症）と呼ぶ。

【0072】

本発明の有効成分であるIFN産生を誘導する性質を有する乳酸菌は、生体内でIFN産生を誘導し得るものであって、IFNを生体に直接投与するものではない。IFNを生体に直接投与する場合には、経口投与および非経口投与があり得る。ここで、IFNを生体に直接経口投与する場合には、IFNは胃液や腸液に対する耐性が弱く、分解が引き起こされ、IFNのまま生体に吸収される可能性は低い。さらに、IFNを生体に直接非経口投与する場合には、例えば、皮下投与等があり得るが、摂取負担が高く、副作用（発熱、頭痛、うつ病等）の可能性も報告されている。したがって、本発明の有効成分であるIFN産生を誘導する性質を有する乳酸菌は、投与負担が軽減され得る点、副作用の可能性が軽減され得る点、ならびに、感染症の予防効果および治療効果の点で、IFNを生体に直接投与する場合より優れているといえる。

10

【0073】

ウイルス感染のメカニズムに関しては、例えば、SARS-CoV-2等の場合、細胞表面のACE2（angiotensin converting enzyme 2）受容体にウイルスが結合して吸着し、これを足掛かりとしてウイルスが細胞内に侵入することで感染に至ることが知られている。このため本発明の有効成分である乳酸菌をACE2受容体が高発現している組織へ局所投与することでより高い感染症の予防効果および治療効果をより発揮させることができる。ACE2受容体が高発現している組織としては、呼吸器（例えば、鼻腔、咽頭、喉頭、気管、気管支、肺）が挙げられ、好ましくは上気道（より好ましくは鼻腔）および下気道が挙げられる。

20

【0074】

後記実施例に示されるように、本発明の有効成分である乳酸菌は、局所投与されることにより免疫賦活作用を有し得るものである。したがって、本発明の別の面によれば、乳酸菌を有効成分として含有する局所投与するための免疫賦活用組成物が提供される。本発明の免疫賦活用組成物は、医薬組成物とすることができる。ここで、本発明において免疫賦活とは、免疫機能を維持もしくは増強、免疫力維持もしくは増強、免疫作用維持もしくは増強または免疫応答維持もしくは増強することを意味する。免疫賦活の効果は、後記実施例に示されるように、例えば、リンパ球に対するpDCの比率の増加等により確認することができる。

30

【0075】

後記実施例に示されるように、本発明の有効成分である乳酸菌は、顎下リンパ節および/または脾臓におけるIFN誘導性抗ウイルス遺伝子（ISG：IFN-stimulated gene）の発現を増強する性質を有し得るものである。すなわち、本発明の医薬組成物は、顎下リンパ節および/または脾臓におけるISGの発現増強に用いることができる。本発明の有効成分である乳酸菌が発現を増強し得るISGとしては、限定されるものではないが、例えば、Viperin（ビペリン）、Is g 15、Mx 1、Oas 12、IFITM、ISG 20およびRyDEN等が挙げられる。本発明の医薬組成物において、ISGは、Viperin、Is g 15およびMx 1からなる群から選択される1種または2種以上であり、好ましくは、Viperin、Is g 15およびMx 1からなる群から選択される1種または2種以上であり、より好ましくはViperinまたはISG 15である。ここで、ViperinによってコードされるViperinタンパク質は、多様な抗ウイルス活性を持つラジカルSAMドメイン含有分子であり、Is g 15によってコードされるISG 15は、抗ウイルス特性を有するユビキチン様の小分子であり、Mx 1によってコードされるMX 1は、ダイナミン様GTPaseであり、ウイルスのヌクレオカプシドを標的とし、複製が確立する前にウイルスを抑制することが知られて

40

50

いる (Schoggins JW., Curr Opin Virol., 2014: 40-46.)。

【0076】

後記実施例に示されるように、本発明の有効成分である乳酸菌は、脾臓中のリンパ球に対する pDC の比率を増加し得るものであり、鼻粘膜中のリンパ球に対する pDC の比率を増加し得るものである。すなわち、本発明の医薬組成物は、脾臓中のリンパ球に対する pDC の比率を増加させるために、および/または、鼻粘膜中のリンパ球に対する pDC の比率を増加させるために用いることができる。ここで、本発明において、脾臓中のリンパ球に対する pDC の比率とは、脾臓に含まれる全リンパ球に占める pDC の割合を意味し、鼻粘膜中のリンパ球に対する pDC の比率とは、鼻粘膜に含まれる全リンパ球に占める pDC の割合を意味する。脾臓中のリンパ球に対する pDC の比率および/または鼻粘膜中のリンパ球に対する pDC の比率は、限定されるものではないが、例えば、後記実施例に示されるように FACS (Fluorescence activated cell sorter) を用いた解析において、リンパ球分画における全リンパ球に対する pDC の比率(割合)として算出することができる。

10

【0077】

本発明において、「脾臓中のリンパ球に対する pDC の比率の増加」とは、乳酸菌を投与した場合の脾臓中のリンパ球に対する pDC の比率が、乳酸菌を投与しなかった場合の当該比率と比較して、増加することを意味する。具体的には、乳酸菌の投与後の対象の脾臓中のリンパ球に対する pDC の比率が、該対象の投与前の対象の当該比率と比較して、例えば、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2.0倍、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍、2.6倍、2.7倍、2.8倍、2.9倍または3.0倍以上である場合に、脾臓中のリンパ球に対する pDC の比率が増加したとすることができる。

20

【0078】

本発明において、「鼻粘膜中のリンパ球に対する pDC の比率の増加」とは、乳酸菌を投与した場合の鼻粘膜中のリンパ球に対する pDC の比率が、乳酸菌を投与しなかった場合の当該比率と比較して、増加することを意味する。具体的には、乳酸菌の投与後の対象の鼻粘膜中のリンパ球に対する pDC の比率が、該対象の投与前の対象の当該比率と比較して、例えば、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2.0倍、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍、2.6倍、2.7倍、2.8倍、2.9倍、3.0倍、3.1倍、3.2倍、3.3倍、3.4倍、3.5倍、3.6倍、3.7倍、3.8倍、3.9倍、4.0倍、4.1倍、4.2倍、4.3倍、4.4倍、4.5倍、4.6倍、4.7倍、4.8倍、4.9倍または5.0倍以上である場合に、鼻粘膜中のリンパ球に対する pDC の比率が増加したとすることができる。

30

【0079】

後記実施例に示されるように、本発明の有効成分である乳酸菌は、鼻粘膜中のリンパ球に対する CD11b<sup>+</sup> Siglec-H<sup>+</sup>細胞の比率を増加し得るものである。すなわち、本発明の免疫賦活用組成物は、鼻粘膜中のリンパ球に対する CD11b<sup>+</sup> Siglec-H<sup>+</sup>細胞の比率を増加させるために用いることができる。ここで、本発明において、鼻粘膜中のリンパ球に対する CD11b<sup>+</sup> Siglec-H<sup>+</sup>細胞の比率とは、鼻粘膜に含まれる全リンパ球に占める CD11b<sup>+</sup> Siglec-H<sup>+</sup>細胞の割合を意味する。鼻粘膜中のリンパ球に対する CD11b<sup>+</sup> Siglec-H<sup>+</sup>細胞の比率は、限定されるものではないが、例えば、後記実施例に示されるように FACS を用いた解析において、リンパ球分画における全リンパ球に対する CD11b<sup>+</sup> Siglec-H<sup>+</sup>細胞の比率(割合)として算出することができる。

40

【0080】

本発明において、「鼻粘膜中のリンパ球に対する CD11b<sup>+</sup> Siglec-H<sup>+</sup>細胞の比率の増加」とは、乳酸菌を投与した場合の鼻粘膜中のリンパ球に対する CD11b<sup>+</sup> Siglec-H<sup>+</sup>細胞の比率が、乳酸菌を投与しなかった場合の当該比率と比較して、

50

増加することを意味する。具体的には、乳酸菌の投与後の対象の鼻粘膜中のリンパ球に対するCD11b<sup>+</sup> Siglec-H<sup>+</sup>細胞の比率が、該対象の投与前の対象の当該比率と比較して、例えば、1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2.0倍、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍、2.6倍、2.7倍、2.8倍、2.9倍、3.0倍、3.1倍、3.2倍、3.3倍、3.4倍、3.5倍、3.6倍、3.7倍、3.8倍、3.9倍、4.0倍、4.1倍、4.2倍、4.3倍、4.4倍、4.5倍、4.6倍、4.7倍、4.8倍、4.9倍または5.0倍以上である場合に、鼻粘膜中のリンパ球に対するCD11b<sup>+</sup> Siglec-H<sup>+</sup>細胞の比率が増加したとすることができる。

【0081】

本発明の医薬組成物は、哺乳動物に投与することができる。哺乳動物としては特に限定はないが、例えば、霊長類、げっ歯類、食肉類等が挙げられ、好ましくは霊長類である。霊長類としては、例えば、ヒト、チンパンジー、アカゲザル、マーモセット、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタおよびヒツジ等が挙げられ、好ましくはヒトである。

【0082】

本発明の医薬組成物は、感染症の罹患前もしくは発症前（あるいは病原体の感染前）または感染症の罹患後もしくは発症後（あるいは病原体の感染後）のいずれにおいても投与することができる。感染症の予防に用いる場合は、感染前に投与することが望ましいといえるが、感染後であっても重症化を予防するため感染後初期（例えば、感染後5日以内）に投与してもよく、投与の時期は、ウイルス性感染症の流行状況や流行しやすい時期等を考慮して決定することもできる。

【0083】

本発明の医薬組成物の投与回数は、投与の目的、投与対象の体質、体調、症状等に応じて任意に設定することができるが、1回または複数回（例えば、2回以上、3回以上、4回以上、5回以上）とすることができる。複数回投与する場合の投与間隔は1～24時間または1～10日とすることができる。例えば、1日ごと、2日ごと、3日ごと、4日ごと、5日ごととすることができる。感染症の予防または治療に用いる場合は、予防効果または治療効果の持続および医療費節減の点から、1日ごとの投与間隔にて2回以上投与することが好ましい。

【0084】

本発明の医薬組成物は、ウイルス感染症の予防に用いる場合、有効成分が予防効果を奏する有効期間の始期は、効果即効性の観点から、投与を行った最後の日から0日目、1日目、2日目、3日目、4日目、5日目、6日目または7日目である。

【0085】

本発明の医薬組成物は、ウイルス感染症の予防に用いる場合、有効成分が予防効果を奏する有効期間の終期は、効果維持の観点から、投与を行った最後の日から7日目、14日目、28日目または56日目である。

【0086】

本発明の医薬組成物において、上記始期および上記終期は任意に組み合わせることができ、例えば、0日目から56日目まで、0日目から28日目まで、0日目から14日目まで、0日目から7日目まで、3日目から56日目まで、3日目から28日目まで、3日目から14日目まで、3日目から7日目まで、5日目から56日目まで、5日目から28日目まで、5日目から14日目まで、5日目から7日目まで、7日目から56日目まで、7日目から28日目まで、7日目から14日目までとすることができる。

【0087】

本発明の医薬組成物は、ウイルス感染症の予防に用いる場合、有効成分が予防効果を奏する有効期間は、投与を行った最後の日から56日間以内、28日間以内、14日間以内、7日間以内、6日間以内、5日間以内、4日間以内または3日間以内である。

【0088】

本発明の有効成分の1日当たりの投与量は、投与される対象の体重により適宜調整、決

10

20

30

40

50

定することができる。成体（例えば、ヒトの成人）の場合、体重50kgを基準として、例えば、乾燥菌体質量により特定することができ、感染予防効果または感染抑制効果の点から、その下限値（以上または超える）は、1mg、2mg、3mg、4mg、5mg、6mg、7mg、8mg、9mg、10mg、11mg、12mg、13mg、14mg、15mg、16mg、17mg、18mg、19mg、20mg、21mg、22mg、23mg、24mg、25mg、26mg、27mg、28mg、29mg、30mg、31mg、32mg、33mg、34mg、35mg、36mg、37mg、38mg、39mg、40mg、41mg、42mg、43mg、44mg、45mgまたは50mgとすることができ、その上限値（以下または未満）は1000mg、950mg、900mg、850mg、800mg、750mg、700mg、650mg、600mg、550mg、500mg、475mg、450mg、425mg、400mg、375mg、350mg、325mg、300mg、275mg、250mg、225mg、200mg、190mg、180mg、170mg、160mg、150mg、140mg、130mg、120mg、110mgまたは100mg、90mg、80mg、70mg、60mgまたは50mgとすることができる。これらの上限値および下限値はそれぞれ任意に組み合わせることができ、上記投与量の範囲は、例えば、1mg以上1000mg以下、10mg以上500mg以下、25mg以上450mg以下、30mg以上400mg以下、35mg以上375mg以下、40mg以上350mg以下、40mg以上325mg以下、45mg以上300mg以下、45mg以上250mg以下、45mg以上200mg以下、45mg以上150mg以下、45mg以上100mg以下、45mg以上90mg以下、45mg以上80mg以下、45mg以上70mg以下または45mg以上60mg以下とすることができる。

10

20

#### 【0089】

本発明の有効成分の1日当たりの投与量は、菌数により特定することもでき、成体（例えば、ヒトの成人）の場合、体重50kgを基準として、感染予防効果または感染抑制効果の点から、その下限値（以上または超える）は $1 \times 10^8$ 個、 $1 \times 10^9$ 個、 $1 \times 10^{10}$ 個または $1 \times 10^{11}$ 個とすることができ、その上限値（以下または未満）は $1 \times 10^{14}$ 個、 $1 \times 10^{13}$ 個、 $1 \times 10^{12}$ 個、 $5 \times 10^{11}$ 個または $1 \times 10^{11}$ 個とすることができる。これらの上限値および下限値はそれぞれ任意に組み合わせることができ、上記投与量の範囲は、例えば、 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{14}$ 個、 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{13}$ 個、 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{12}$ 個、 $5 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{11}$ 個または $1 \times 10^{11}$ 個とすることができる。乳酸菌の菌数は、例えば、蛍光染色法、フローサイトメトリー、培養法により測定することができ、正確性の点からフローサイトメトリーにより測定することが好ましい。

30

#### 【0090】

本発明の有効成分は、感染予防効果または感染抑制効果を期待する期間内は投与を継続することが好ましい。本発明の有効成分の投与期間は、感染予防効果または感染抑制効果をよりよく発揮させる観点から、例えば、上記1日量での投与を1週間以上、2週間以上、3週間以上、1カ月以上（4週間以上）とすることができる。本発明の有効成分の投与間隔は、上記1日量での投与を3日に1回、2日に1回または1日1回とすることができ、好ましくは1日1回である。

40

#### 【0091】

本発明の有効成分はまた、感染症の罹患可能性または発症可能性（病原体への感染可能性）が高まる等の感染予防が期待される出来事または時期よりも前に投与を開始してもよい。感染予防効果が期待される出来事の例としては、感染症の罹患可能性または発症可能性（病原体の感染可能性）が高まる行動（例えば、感染リスクが高い行事への参加、流行地域への渡航、家族等の同居人の感染）等が挙げられ、感染予防効果が期待される時期の例としては、感染症の流行期が挙げられる。感染予防効果が期待される出来事よりも前の投与時期（投与タイミング）としては、例えば、1日以上前、3日以上前、1週間以上前、2週間以上前、3週間以上前、1ヶ月以上前（4週間以上前）または2ヶ月以上前（8

50

週間以上前)が挙げられる。また、特に限定されるものではないが、投与を開始してから、感染予防効果が期待される出来事までは、場合によっては、投与間隔を置きながら継続して摂取することもできる。本発明において、感染予防効果が期待される出来事よりも前の好ましい投与タイミングとしては、例えば、1日前と3日前の計2回以上、4日前と6日前の計2回以上、7日前と9日前の計2回以上、10日前と12日前の計2回以上または14日前と16日前の計2回以上とすることができる。

#### 【0092】

本発明の有効成分はまた、感染予防効果が期待される出来事または時期よりも後に投与を開始してもよい。感染予防効果が期待される出来事よりも後の投与タイミングとしては、例えば、1日以上後、3日以上後、1週間以上後、2週間以上後が挙げられる。また、特に限定されるものではないが、感染予防効果が期待される出来事よりも後に投与するときには、場合によっては、投与間隔を置きながら継続して投与することもできる。本発明においては、特に好ましくは、感染予防効果が期待される出来事よりも前に本発明の有効成分の投与を開始し、当該出来事より後まで投与することもできる。

10

#### 【0093】

本発明の有効成分の投与は、公知の感染予防方法または感染抑制方法と組み合わせてもよい。公知の感染予防方法または感染抑制方法としては、例えば、免疫賦活剤(例えば、フコイダン、 $\alpha$ -グルカンなどの多糖類、ラクトフェリン、プロポリスおよびビフィズス菌等)の投与、抗ウイルス剤(例えば、M2イオン-チャンネル阻害剤(アマンタジンまたはリマンタジン)、ノイラミニダーゼ阻害剤(オセルタミビルまたはザナミビル)およびそれらの塩等)の投与、中和抗体薬(チキサゲビマブおよびシルガビマブ)の投与およびワクチン(例えば、生ワクチン、不活化ワクチン、組換えタンパクワクチン、mRNA(メッセンジャーRNA)ワクチン、DNAワクチンおよびウイルスベクターワクチン)の投与等が挙げられる。

20

#### 【0094】

本発明の別の面によれば、有効量の乳酸菌またはそれを含んでなる組成物を、それを必要としている対象に局所投与する工程を含む、ウイルス感染症の予防方法もしくは治療方法、感染症の罹患リスク低減方法もしくは病原体の感染リスク低減方法または免疫賦活方法が提供される。本発明の方法は、本発明の医薬組成物に関する記載に従って実施することができる。

30

#### 【0095】

本発明の別の面によればまた、局所投与用のウイルス感染症の予防剤もしくは治療剤の製造のための、局所投与用の感染症の罹患リスク低減剤もしくは病原体の感染リスク低減剤の製造のための、または局所投与用の免疫賦活剤の製造のための、乳酸菌の使用が提供される。本発明によればまた、局所投与用のウイルス感染症の予防剤もしくは治療剤としての、局所投与用の感染症の罹患リスク低減剤もしくは病原体の感染リスク低減剤としての、または局所投与用の免疫賦活剤としての、乳酸菌の使用が提供される。本発明によればまた、局所投与による感染症の予防方法もしくは治療方法、局所投与による感染症の罹患リスク低減方法もしくは病原体の感染リスク低減方法または局所投与による免疫賦活方法における、乳酸菌の使用が提供される。本発明の使用は、本発明の医薬組成物および本発明の方法に関する記載に従って実施することができる。

40

#### 【0096】

本発明の別の面によればまた、局所投与によるウイルス感染症の予防もしくは治療に用いるための、局所投与による感染症の罹患リスク低減もしくは病原体の感染リスク低減に用いるための、または局所投与による免疫賦活に用いるための、乳酸菌が提供される。本発明の乳酸菌は、本発明の医薬組成物および本発明の方法に関する記載に従って実施することができる。

#### 【実施例】

#### 【0097】

以下の実施例等に基づき本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの例に限定

50

されるものではない。

【0098】

実施例1：経鼻投与によるSARS-CoV-2感染予防効果の検討(1)

実施例1では、乳酸菌の経鼻投与によるSARS-CoV-2感染予防効果について検討した。

【0099】

(1)方法

ア 乳酸菌の投与、SARS-CoV-2の感染

BALB/cマウス(17週齢・雌・体重約20g、日本エスエルシー社)を対照群(乳酸菌未投与群)と5つの乳酸菌投与群の計6群に分け、表1に示す条件にて乳酸菌(ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス JCM5805菌株)の加熱死菌体を投与した(各群のn数は2または3)。各群のマウスは感染0日目に麻酔下において国立感染症研究所で樹立されたマウス馴化SARS-CoV-2 QHmusX株(Iwata-Yoshikawa Net al., Science Advances.(2022)8(1). eabh3827)を0.5xLD50(30μl)で感染させた。また、感染前と感染3日後で体重測定を行った。そして、感染3日後に解剖し、肺および肺胞洗浄液(BALF(Bronchoalveolar Lavage Fluid))を採取した。

10

【0100】

【表1】

20

表1:乳酸菌の投与条件

	投与時期*	投与量(1匹当たり)**
対照群(未投与群)	-	-
Day(-1/-3)群	感染1日前および感染3日前	1mg/日
Day(-2/-4)群	感染2日前および感染4日前	1mg/日
Day(-3/-5)群	感染3日前および感染5日前	1mg/日
Day(-1/-3)(low)群	感染1日前および感染3日前	0.2mg/日
Day(-2/-7)群	感染2日前および感染7日前	1mg/日
Day(-3/-8)群	感染3日前および感染8日前	1mg/日

\*投与時期はSARS-CoV-2感染前の各日にちをそれぞれ示す。

30

\*\*投与量の0.2mg/日または1mg/日は、PBS(GIBCO社)で4mg/mlまたは20mg/mlとなるようにそれぞれ調製した乳酸菌液(50μl)を麻酔下で経鼻投与した。

【0101】

イ RNAの抽出および調製

採取した肺をTRIzol(Thermo Fisher Scientific社)に浸漬し、gentleMACS M tube(Miltenyi Biotec社)に分散させた。遠心分離後、上清を回収しクロロホルム(ナカライテスク社)を添加し、遠心分離後、上部の水相を2-プロパノール(ナカライテスク社)を含むチューブへ回収した。遠心分離後、上清を除き75%エタノールでペレットを懸濁し遠心分離し、上清を完全に除き乾燥後、RNase-Free Water(GIBCO社)に懸濁した。また、採取したBALFからのRNAはQIAmp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN社)を用いて調製した。

40

【0102】

ウ RNAの定量

抽出したRNAはリアルタイムPCR法により定量した。リアルタイムPCRは、Quantitect Probe RT-PCR Kit(QIAGEN社)および遺伝子特異的SARS-CoV-2プライマー・プローブを用い、一般的な反応組成に従って、50で30分間、95で15分間、続いて95で15秒間、60で60秒間を45サイクル反応させることにより行った。プライマーは表2に示すものを用いた(Shir

50

ato K, et al., Jpn. J. Infect. Dis. 2020; 73(4): 304-307)。

【0103】

【表2】

表2:プライマー

プライマー名	配列(5' to 3')
NIID_2019-nCoV_N_F2	AAATTTTGGGGACCGGAAC
NIID_2019-nCoV_N_R2	TGGCAGCTGTGTAGGTCAAC
NIID_2019-nCoV_N_P2	FAM-ATGTCGCGCATTGGCATGGA-BHQ

10

【0104】

エ ウイルスの定量

BALFについて、感染性SARS-CoV-2ウイルスの定量を行った。具体的には、10質量%FCSを添加したDMEM(GIBCO社)で $10^{-1}$ から $10^{-6}$ まで10倍段階希釈系列を作成し、Vero細胞(アフリカミドリザル腎細胞株(JCRB1819 VeroE6/TMPRSS2、JCRB細胞バンク))をシートした96穴プレート(CORNING社)に各BALF希釈液100 $\mu$ lを4穴ずつ接種し、接種4日後における細胞変性の有無でウイルス感染を評価した。ウイルス力価の計算はReed-Muenchの式によってTCID<sub>50</sub>/mlとして算出した。

【0105】

20

(2) 結果

結果は、図1~3に示す通りであった。図1の示すSARS-CoV-2感染前の体重に対する感染3日目(感染約72時間後)の体重の割合から、乳酸菌投与群ではいずれも体重減少が認められなかったのに対し、対照群(乳酸菌非投与群)では感染前の90%程度の体重減少が認められた。Day(-2/-7)群およびDay(-3/-8)群においても体重減少の抑制効果が認められたことから、乳酸菌の経鼻投与による感染抑制効果が数日間(少なくとも3日間)は維持された。また、対照群では、乳酸菌投与群と比較して、毛並みが悪くなるとともに、活動量が低下し食餌摂取回数が減少する様子が観察された。

【0106】

30

図2では、SARS-CoV-2感染3日後(感染後約72時間後)の肺およびBALFにおけるSARS-CoV-2のRNA量(コピー数)が、対照群と比較して、Day(-1/-3)群、Day(-2/-4)群およびDay(-3/-5)群では顕著に減少しており、Day(-1/-3)(low)群、Day(-2/-7)群およびDay(-3/-8)群でも減少していることが確認された。Day(-2/-7)群およびDay(-3/-8)群においてもRNA量の減少が認められたことから、乳酸菌の経鼻投与による感染抑制効果が数日間(少なくとも3日間)は維持された。

【0107】

図3では、SARS-CoV-2感染3日後(感染後約72時間後)のBALFにおける感染性SARS-CoV-2のウイルス量が、対照群と比較して、Day(-1/-3)群、Day(-2/-4)群およびDay(-3/-5)群では顕著に減少しており、Day(-1/-3)(low)群、Day(-2/-7)群およびDay(-3/-8)群でも減少していることが確認された。Day(-2/-7)群およびDay(-3/-8)群においてもウイルス量の減少が認められたことから、乳酸菌の経鼻投与による感染抑制効果が数日間(少なくとも3日間)は維持された。

40

【0108】

これらの結果から、乳酸菌の投与により感染抑制だけでなく重症化を抑制する効果も奏されることが示された。

【0109】

実施例2:経鼻投与によるSARS-CoV-2感染予防効果の検討(2)

50

実施例 2 では、乳酸菌の経鼻投与による SARS - CoV - 2 感染後の血中および BALF 中の IFN - 産生に対する影響を検討した。

【 0 1 1 0 】

( 1 ) 方法

BALB / c マウス ( 1 7 週齢・雌・体重約 2 0 g、日本エスエルシー社 ) を対照群 ( 乳酸菌未投与群 ) と 5 つの乳酸菌投与群の計 6 群に分け、表 3 に示す条件にて乳酸菌 ( ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス JCM5805 菌株 ) の加熱死菌体を投与した ( 各群の n 数は 2 または 3 )。各群のマウスは感染 0 日目に麻酔下において国立感染症研究所で樹立されたマウス馴化 SARS - CoV - 2 QHmusX 株 ( Iwata - Yoshikawa N et al., Science Advances, 2022; 8 ( 1 ): eab h 3 8 2 7 ) を 0.5 x LD50 ( 3 0 μ l ) で感染させた。そして、感染 3 日後 ( 約 7 2 時間後 ) に解剖し、血中および肺胞洗浄液 ( BALF ) 中のインターフェロン - ( IFN - ) 濃度を interferon Al l S u b t y p e E L I S A K i t ( P B L B I O M E D I C A L L A B O R A T O R I E S 社 ) を用いて測定した。

10

【 0 1 1 1 】

【 表 3 】

表3:乳酸菌の投与条件

	投与時期*	投与量(1匹当たり)**
対照群(未投与群)	-	-
Day(-1)群	感染 1 日前	1mg/日
Day(-1/-2)群	感染 1 日前および感染 2 日前	1mg/日
Day(-1/-3)群	感染 1 日前および感染 3 日前	1mg/日
Day(-1/-2/-3/-4)群	感染 1 日前、感染 2 日前、 感染 3 日前、感染 4 日前	1mg/日

20

\*投与時期は SARS-CoV-2 感染前の各日にちをそれぞれ示す。

\*\*投与量の 0.2mg/日または 1mg/日は、PBS(GIBCO 社)で 4mg/ml または 20mg/ml となるようにそれぞれ調製した乳酸菌液(50 μ l)を麻酔下で経鼻投与した。

【 0 1 1 2 】

( 2 ) 結果

結果は、図 4 に示す通りであった。対照群では、SARS - CoV - 2 感染 3 日後 ( 感染後約 7 2 時間後 ) の血中の IFN - 濃度の平均値は 1 0 0 p g / m l を超え、BALF 中の IFN - 濃度の平均値は 3 0 0 p g / m l を超えていることが確認された。これに対し、乳酸菌投与群では、SARS - CoV - 2 感染 3 日後 ( 感染後約 7 2 時間後 ) の血中の IFN - 濃度の平均値は 5 0 p g / m l 以下であり、BALF 中の IFN - 濃度の平均値は 2 0 0 p g / m l 以下であることが確認された。

30

【 0 1 1 3 】

実施例 3 : 経鼻投与による SARS - CoV - 2 感染予防効果の検討 ( 3 )

実施例 3 では、乳酸菌の経鼻投与による SARS - CoV - 2 感染後の体重減少抑制について検討した。

40

【 0 1 1 4 】

( 1 ) 方法

BALB / c マウス ( 1 6 週齢・雌・体重約 2 0 g、日本エスエルシー社 ) を対照群 ( 乳酸菌未投与群 ) と乳酸菌投与群の 2 群に分け、表 4 に示す条件にて乳酸菌 ( ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス JCM5805 菌株 ) の加熱死菌体を投与した ( 各群の n 数は 6 )。各群のマウスは感染 0 日目に麻酔下において国立感染症研究所で樹立されたマウス馴化 SARS - CoV - 2 QHmusX 株 ( Iwata - Yoshikawa N et al., Science Advances, 2022; 8 ( 1 ): eab h 3 8 2 7 ) を 0.5 x LD50 ( 3 0 μ l ) で感染させた。そして、

50

感染 7 日後まで毎日体重測定し、感染前の体重に対する体重の割合を算出した。

【 0 1 1 5 】

【 表 4 】

表4:乳酸菌の投与条件

	投与時期*	投与量(1匹当たり)**
対照群(未投与群)	-	-
乳酸菌投与群	感染 1 日前および感染 3 日前	0.2mg/日

\*投与時期は SARS-CoV-2 感染前の各日にちを示す。

\*\*投与量の 0.2mg/日は、PBS(GIBCO 社)で 4mg/ml となるように調製した乳酸菌液(50 μl)を麻酔下で経鼻投与した。なお、対照群には、乳酸菌を含まない PBS(50 μl)を麻酔下で経鼻投与した。

10

【 0 1 1 6 】

( 2 ) 結果

結果は、図 5 に示す通りであった。対照群では感染後 3 日後から 4 日後をピークに顕著な体重減少が認められた。これに対し、乳酸菌投与群では、感染後に明らかな体重減少は認められず、対照群と比較して有意に体重減少が抑制された。

【 0 1 1 7 】

実施例 4 : 経鼻投与による SARS - CoV - 2 感染予防効果の検討 ( 4 )

20

実施例 4 では、乳酸菌の経鼻投与による SARS - CoV - 2 感染予防効果の持続性について検討した。

【 0 1 1 8 】

( 1 ) 方法

ア 乳酸菌の投与、SARS - CoV - 2 の感染

BALB/c マウス ( 1 5 週齢・雌・体重約 2 0 g、日本エスエルシー社 ) を対照群 ( 乳酸菌未投与群 ) と乳酸菌投与群 5 群の計 6 群に分け、表 5 に示す条件にて乳酸菌 ( ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス JCM 5 8 0 5 菌株 ) の加熱死菌体を投与した ( 各群の n 数は 4 または 5 ) 。各群のマウスは感染 0 日目に麻酔下において国立感染症研究所で樹立されたマウス馴化 SARS - CoV - 2 QHmus X 株 ( Iwata - Yoshikawa Net al . , Science Advance s . 2 0 2 2 ; 8 ( 1 ) : e a b h 3 8 2 7 ) を 5 x LD 5 0 ( 5 μ l ) で感染させた。そして、感染 2 日後に解剖し、鼻咽腔関連リンパ組織 ( NALT ( n a s a l - a s s o c i a t e d l y m p h o i d t i s s u e s ) ) を採取した。

30

【 0 1 1 9 】

【 表 5 】

表5:乳酸菌の投与条件

	投与時期*	投与量(1匹当たり)**
対照群(未投与群)	-	-
Day(-1/-3)群	感染 1 日前および感染 3 日前	1mg/日
Day(-4/-6)群	感染 4 日前および感染 6 日前	1mg/日
Day(-7/-9)群	感染 7 日前および感染 9 日前	1mg/日
Day(-10/-12)群	感染 10 日前および感染 12 日前	1mg/日
Day(-14/-16)群	感染 14 日前および感染 16 日前	1mg/日

\*投与時期は SARS-CoV-2 感染前の各日にちをそれぞれ示す。

\*\*投与量の 1mg/日は、PBS(GIBCO 社)で 100mg/ml となるように調製した乳酸菌液(10 μl)を麻酔下で経鼻投与した。なお、対照群には、乳酸菌を含まない PBS(10 μl)を麻酔下で経鼻投与した。

40

50

【 0 1 2 0 】

イ RNAの抽出および調製

例 1 ( 1 ) イの記載と同様にして、採取したNAL TからのRNAの抽出および調製を行った。

【 0 1 2 1 】

ウ RNAの定量

例 1 ( 1 ) ウの記載と同様にして、RNAの定量を行った。

【 0 1 2 2 】

( 2 ) 結果

結果は、図 6 に示す通りであった。Day ( - 1 / - 3 ) 群およびDay ( - 4 / - 6 ) 群では、対照群と比較して、SARS - CoV - 2 のウイルスRNA量およびサブゲノミックRNA量が顕著に低かった。また、Day ( - 7 / - 9 ) 群、Day ( - 1 0 / - 1 2 ) 群およびDay ( - 1 4 / - 1 6 ) 群においても、対照群と比較して、ウイルスRNA量およびサブゲノミックRNA量が10倍程度低い傾向にあった。

10

【 0 1 2 3 】

実施例 5 : 経鼻投与によるA型インフルエンザウイルス感染予防効果の検討

実施例 5 では、乳酸菌の経鼻投与によるA型インフルエンザウイルス ( H 1 N 1 ) 感染予防効果について検討した。

【 0 1 2 4 】

( 1 ) 方法

ア 乳酸菌の投与、A型インフルエンザウイルスの感染

BALB / cマウス ( 1 2 週齢・雌・体重約 2 0 g、日本エスエルシー社 ) を対照群 ( 乳酸菌未投与群 ) と乳酸菌投与群の 2 群に分け、表 6 および表 7 に示す条件にて乳酸菌 ( ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス JCM5805 菌株 ) の加熱死菌体を投与した ( 各群の n 数は 5 または 7 ) 。表 6 および表 7 の各群のマウスは感染 0 日目に麻酔下においてA型インフルエンザウイルスのA / PR8 / 34 ( PR8 ) ( 国立感染症研究所から入手、Ikeda K, Ainai A, et al., Vaccine. 2015; 33 ( 45 ) : 6066 - 9. ) またはA / Narita / 1 / 2009 ( Narita ) ( 国立感染症研究所から入手、Adachi Y, et al., J Exp Med. 2015; 212 ( 10 ) : 1709 - 23. ) を、40 x LD50 ( 5 μ l ) または 5 x LD50 ( 5 μ l ) でそれぞれ感染させた。そして、感染 2 日後に解剖し、鼻腔洗浄液を採取した。

20

30

【 0 1 2 5 】

【表 6】

表6: 乳酸菌の投与条件 (PR8感染)

	投与時期*	投与量 (1 匹当たり)**
対照群 (未投与群)	-	-
乳酸菌投与群	感染 1 日前および感染 3 日前	1mg/日

\* 投与時期は SARS-CoV-2 感染前の日にちを示す。

\*\* 投与量の 1mg/日は、PBS (GIBCO 社) で 100mg/ml となるように調製した乳酸菌液 (10 μ l) を麻酔下で経鼻投与した。なお、対照群には、乳酸菌を含まない PBS (10 μ l) を麻酔下で経鼻投与した。

40

【 0 1 2 6 】

50

## 【表 7】

表7:乳酸菌の投与条件(Narita 感染)

	投与時期*	投与量(1匹あたり)**
対照群(未投与群)	-	-
乳酸菌投与群	感染1日前および感染3日前	1mg/日

\*投与時期は SARS-CoV-2 感染前の日を指示す。

\*\*投与量の 1mg/日は、PBS(GIBCO 社)で 100mg/ml となるように調製した乳酸菌液(10 $\mu$ l)を麻酔下で経鼻投与した。なお、対照群には、乳酸菌を含まない PBS(10 $\mu$ l)を麻酔下で経鼻投与した。

10

## 【0127】

イ RNA の抽出および調製

採取した鼻腔洗浄液からの RNA は Q I A m p V i r a l R N A M i n i K i t ( Q I A G E N 社 ) を用いて調製した。

## 【0128】

ウ RNA の定量

抽出した RNA はリアルタイム PCR 法により定量した。リアルタイム PCR は、Q u a n t i T e c t P r o b e R T - P C R K i t ( Q I A G E N 社 ) および遺伝子特異的 A 型インフルエンザウイルスプライマー・プローブを用い、一般的な反応組成に従って、50 で 30 分間、95 で 15 分間、続いて 94 で 15 秒間、56 で 7.5 秒間を 40 サイクル反応させることにより行った。プライマーは表 8 に示すものを用いた ( N a k a u c h i M , e t a l . , J o u r n a l o f V i r o l o g i c a l M e t h o d s . 2 0 1 1 ; 7 1 7 1 ( 1 ) : 1 5 6 - 1 6 2 ) 。

20

## 【0129】

## 【表 8】

表8:プライマー

プライマー名	配列(5' to 3')
MP-39-67_forward	CCMAGGTCGAAACGTAYGTTCTCTCTATC
MP-183-153_reverse	TGACAGRATYGGTCTTGTCTTTAGCCAYTCCA
MP-96-75ProbeAs	ATYTCGGCTTTGAGGGGGCCTG

30

## 【0130】

## (2) 結果

結果は、図 7 に示す通りであった。乳酸菌投与群では、対照群と比較して、P R 8 感染と N a r i t a 感染のいずれにおいても鼻腔洗浄液中の A 型インフルエンザのウイルス RNA 量が有意に低かった。

## 【0131】

## 実施例 6 : 経鼻投与による免疫賦活効果の検討 ( 1 )

40

実施例 6 では、乳酸菌の経鼻投与による免疫賦活効果について検討した。

## 【0132】

## (1) 方法

ア 乳酸菌の投与

B A L B / c マウス ( 1 6 週齢・雌・体重約 2 0 g 、日本エスエルシー社 ) を表 9 に示す 4 群に分けて乳酸菌の経鼻投与試験を行った。対照群には P B S ( G I B C O 社 ) を投与し、投与群には表 9 に示す条件にて乳酸菌 ( ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス J C M 5 8 0 5 菌株 ) の加熱死菌体を投与した ( 各群の n 数は 3 ) 。なお、対照群には、投与群の投与用量と対応する P B S のみを投与した。そして、乳酸菌投与 3 日後に、麻酔下で心臓からの全採血により安楽死させ解剖した。

50

【 0 1 3 3 】

【表 9】

表9: 乳酸菌の経鼻投与条件

群* <sup>1</sup>	PBS または 乳酸菌液の投与日* <sup>2</sup>	1 匹当たりの PBS または 乳酸菌液の投与体積 (乳酸菌の投与量)
Low Volume 対照群 (Low Volume(-)群)	解剖 3 日前(Day(-3))および 解剖 1 日前(Day(-1))	10 μl (-)
Low Volume 投与群 (Low volume(+))群	解剖 3 日前(Day(-3))および 解剖 1 日前(Day(-1))	10 μl (1mg/日)
High Volume 対照群 (High Volume(-)群)	解剖 3 日前(Day(-3))および 解剖 1 日前(Day(-1))	50 μl (-)
High Volume 投与群 (High Volume(+))群	解剖 3 日前(Day(-3))および 解剖 1 日前(Day(-1))	50 μl (0.2mg/日)

\*<sup>1</sup> Low Volume(-)群および High Volume(-)群では、10 μl または 50 μl の PBS(乳酸菌なし)をそれぞれ経鼻投与した。Low Volume(-)群および High Volume(+))群では、乳酸菌を PBS で 100mg/ml または 4mg/ml となるようにそれぞれ調製した乳酸菌液 10 μl または 50 μl を麻酔下で経鼻投与した。なお、+および-は乳酸菌の投与の有無を示す。

\*<sup>2</sup> 投与日は解剖日(day 0)から起算した各日にちで示す。

10

20

【 0 1 3 4 】

イ RNA の抽出

各組織検体からの RNA 抽出は、次の下記 (i) ~ (vi) の手順で行った。

(i) 各組織検体を 1 ml TRIzol (Thermo Fisher Scientific 社) 入り Mチューブ (Miltenyi Biotec 社) に回収し、-80 で凍結保存した。

(ii) 凍結保存した組織検体を融解し、GentleMACS (Miltenyi Biotec 社) を用いて組織を破碎し、室温で 2 ~ 3 分静置した後、3,000 x g、5 分、4 で遠心した。上清をエッペンチューブに回収し、さらに 12,000 x g、10 分、4 で遠心した。

30

(iii) 上清をエッペンチューブに回収し、クロロホルム (富士フィルム和光純薬社) 180 μl を添加し、室温で 2 ~ 3 分静置した後、12,000 x g、15 分、4 で遠心した。

(iv) 上清上部の水層を 2 - プロパノール (富士フィルム和光純薬社) 450 μl 入りのエッペンチューブに回収し、室温で 10 分静置した後、12,000 x g、10 分、4 で遠心した。

(v) 上清を除去し、75%エタノール (富士フィルム和光純薬社) 1 ml を添加し、ボルテックスした後、7,500 x g、5 分、4 で遠心した。

(vi) 上清を除去し、15 分間ペレットを風乾させた。その後、RNase Free Water (QIAGEN 社) で懸濁し、56、10 分で熱処理を行った後、-80 で保存した。

40

【 0 1 3 5 】

ウ RNA の定量

抽出した RNA から IFN 誘導性抗ウイルス遺伝子 (ISG) である Viperin、Is g 15 および M x 1 の各 mRNA 発現量の定量を行った。具体的には、下記 (i) ~ (v) の手順で行った。

(i) 各サンプルの RNA 濃度をナノドロップにて測定した後、1000 ng / 15 μl となるよう iScript cDNA synthesis kit (BIORAD 社) の Nuclease Free Water で希釈した。

(ii) Master Mix (5 x iScript reaction mix 4 μl

50

/サンプル、iScript reverse transcript 1 $\mu$ l/サンプル)を調製し、各RNA溶液に5 $\mu$ lずつ添加した。

(iii)その後、サーマルサイクラーにてcDNA合成を行い、-20にて保存した。

(iv)各cDNAサンプルをMilliQ水で5倍希釈するとともに、全サンプルを混合したスタンダード溶液をx1、x2、x4、x8、x16、x32、x64およびx128の濃度で調整した。

(v)表10に示す反応液を96ウェルプレートにアプライし、リアルタイムPCRは、Light Cycler 480を用いて、95で10秒間、60で10秒間および72で10秒間のセットを45サイクル反応させることにより行った。プライマーは表11に示すものを用いた。

10

【0136】

【表10】

表10:反応液組成

TB Green Premix Ex TaqII (タカラバイオ社)	10 $\mu$ l
Forward プライマー	0.8 $\mu$ l
Reverse プライマー	0.8 $\mu$ l
MilliQ	6.4 $\mu$ l
cDNA	2.0 $\mu$ l
総量	20 $\mu$ l

20

【0137】

【表11】

表11:プライマー

プライマー名	配列(5' to 3')
Viperin_forward	CCCGTGAGTGTCAACTACCAC
Viperin_reverse	GCCCAAGTATTCACCCCTGTC
Isg15_forward	GGTGTCCGTGACTAACTCCAT
Isg15_reverse	CTGTACCCTAGCATCACTGTG
Mx1_forward	GACCATAGGGGTCTTGACCAA
Mx1_reverse	AGACTTGCTCTTTCTGAAAAGCC
Gapdh_forward(内部標準)	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
Gapdh_reverse(内部標準)	GGGGTCGTTGATGGCAACA

30

【0138】

(2)結果

結果は、図8~11に示す通りであった。図8では、Day(-3)(解剖3日前(乳酸菌の1回目の経鼻投与日))の体重に対する、Day(-2)(解剖2日前)、Day(-1)(解剖1日前(乳酸菌の2回目の経鼻投与日))およびDay(0)(解剖当日)の体重の割合から、Day(0)(解剖当日)においてLow volume(-)群とLow volume(+)で比較し、有意な差は認められなかった。また、Day(0)(解剖当日)においてHigh Volume(-)群とHigh Volume(+)群と比較し、有意な差は認められなかった。また、いずれの群においても、毛並みおよび活動量への影響は認められなかった。

40

【0139】

図9では、Low volume(+)群は、Low volume(-)群と比較して、顎下リンパ節におけるViperinおよびIsg15のmRNA発現量が有意に増加するとともに、Mx1のmRNA発現量も増加傾向にあった。これに対し、High Volume(+)群は、High Volume(-)群と比較して、有意な増加は認め

50

られなかった。Low volume (+) および High Volume (+) は、乳酸菌液の投与体積の量の違いから、それぞれ鼻腔および肺に作用させたものであった。この結果は、局所投与部位として鼻腔が好ましいことを示唆するものであった。

【0140】

図10では、Low volume (+) 群は、Low volume (-) 群と比較して、脾臓におけるViperinおよびIsg15の発現量が有意に増加するとともに、Mx1の発現量も増加傾向にあった。これに対し、High Volume (+) 群は、High Volume (-) 群と比較して、有意な増加は認められなかった。

【0141】

図11では、Low volume (+) 群は、Low volume (-) 群と比較して、肺におけるIsg15の発現量が増加傾向にあった。

10

【0142】

実施例7：経鼻投与による免疫賦活効果の検討(2)

実施例7では、実施例6で解剖により摘出した脾臓、顎下リンパ節および鼻粘膜を用いて、乳酸菌の経鼻投与によるpDCに与える影響について検討した。

【0143】

(1) 方法

実施例6で解剖により摘出した脾臓、顎下リンパ節および鼻粘膜の各組織におけるpDC数を次の手順で定量した。表12に示す蛍光標識抗体を用いて各組織を染色し、染色後の細胞をFACS bufferを用いて1回洗浄し、FACS bufferに再懸濁して、FACS解析に供した。そして、FACS Cant II (BD Biosciences社)を用いてデータを取得し、FlowJo software (Tree Star社)を用いて解析した。ここで、CD11cおよびSiglec-Hを発現する細胞(CD11c<sup>+</sup>Siglec-H<sup>+</sup>細胞)またはCD11bを発現せずSiglec-Hを発現する細胞(CD11b<sup>-</sup>Siglec-H<sup>+</sup>細胞)をpDCと定義し、FACS解析のリンパ球分画に含まれる全リンパ球に対するpDCの比率から各組織中のリンパ球に対するpDCの比率を定量するとともに、pDCの細胞表面活性化マーカーとしてMHCクラスII(I-A/I-E)およびCD86の発現レベルを測定した。また、FACS解析のリンパ球分画に含まれるCD11bおよびSiglec-Hを発現する細胞(CD11b<sup>+</sup>Siglec-H<sup>+</sup>細胞)の比率から各組織中のリンパ球に対するCD11b<sup>+</sup>Siglec-H<sup>+</sup>細胞の比率を定量した。

20

30

【0144】

【表12】

表12: 蛍光標識抗体

anti-mouse I-A/I-E Antibody-FITC (clone: M5 / 114.15.2, BioLegend 社)
anti-mouse CD86 Antibody-PE (clone: GL1, BioLegend 社)
anti-mouse Siglec-H Antibody-APC (clone: 551, BioLegend 社)
anti-mouse CD11c Antibody-PE-Cy7 (clone: N418, BioLegend 社)
anti-mouse CD11b Antibody-APC/Cy7(clone: M1/70, BioLegend 社)

40

【0145】

(2) 結果

結果は、図12~17に示す通りであった。図12では、Low volume 投与群(Low volume (+) 群)は、Low volume 対照群(Low volume (-) 群)と比較して、脾臓中のリンパ球に対するpDCの比率が増加傾向にあった。一方で、図13では、脾臓のpDCにおいて、MHCクラスII(I-A/I-E)(図13A)およびCD86(図13B)の発現量に有意な差は認められなかった。

【0146】

図14では、Low volume 投与群(Low volume (+) 群)は、Low

50

volume 対照群 (Low volume (-) 群) と比較して、顎下リンパ節中のリンパ球に対する pDC の比率は有意に減少した ( $p < 0.01$ )。一方で、図 15 では、顎下リンパ節の pDC において、MHC クラス II (I-A/I-E) (図 15 A) および CD86 (図 15 B) の発現量に有意な差は認められなかった。

【0147】

図 16 では、Low volume 投与群 (Low volume (+) 群) は、Low volume 対照群 (Low volume (-) 群) と比較して、鼻粘膜中のリンパ球に対する pDC の比率が有意に増加した ( $p < 0.05$ ) (図 16 A (実線囲み) および図 16 B (左))。一方で、図 17 A では、鼻粘膜の pDC において、MHC クラス II (I-A/I-E) および CD86 の発現量に有意な差は認められなかった。

10

【0148】

図 16 ではまた、Low volume 投与群 (Low volume (+) 群) は、Low volume 対照群 (Low volume (-) 群) と比較して、鼻粘膜中のリンパ球に対する CD11b<sup>+</sup> Siglec-H<sup>+</sup> 細胞の比率が有意に増加した ( $p < 0.01$ ) (図 16 A (点線囲み) および図 16 B (右))。一方で、図 17 B では、鼻粘膜の CD11b<sup>+</sup> Siglec-H<sup>+</sup> 細胞において、MHC クラス II (I-A/I-E) および CD86 の発現量に有意な差は認められなかった。

【0149】

#### 実施例 8：経鼻投与による免疫賦活効果の検討 (3)

実施例 8 では、実施例 6 で解剖により摘出した鼻粘膜から採取した鼻粘膜細胞を用いて、乳酸菌投与による免疫賦活効果についてさらに検討した。

20

【0150】

##### (1) 方法

実施例 6 で解剖により摘出した鼻粘膜を RPMI + 液中に一時保存した後、HBSS buffer 液中でピンセットを用いて鼻粘膜をしごき、液ごと 70  $\mu$ m セルストレーナーを通した後、遠心分離後 (1,500 rpm、4、5 分)、上清を除去し RPMI + を加えて細胞ペレットを懸濁した。次に、細胞数をカウントし、 $6 \times 10^5$  細胞/ml となるように調製し、500  $\mu$ l / ウェルで 48 ウェルプレートに播種した。そして、培地には、無添加のもの、CpG-A として ODN1585 (Invivogen 社) を 1  $\mu$ M となるように添加したもの、および不活化済インフルエンザウイルス H1N1 (HyTest 社) (H1N1) を 5  $\mu$ g/ml となるように添加したものを各ウェルに加え、CO<sub>2</sub> インキュベータで 24 時間培養した。培養終了後、細胞液を回収し遠心分離後 (5,000 rpm、4、2 分)、培養上清を回収した。培養上清中の IFN- $\gamma$  濃度は VeriKine Interferon ELISA Kit、Mouse (PBL Assay Science 社)、IFN- $\lambda$  濃度は VeriKine Interferon ELISA Kit (PBL Assay Science 社)、IFN- $\lambda$  濃度は Mouse IL-28B / IFN- $\lambda$  3 DuoSet ELISA (R&D systems 社) をそれぞれ用いて測定した。

30

【0151】

##### (2) 結果

結果は、図 18 および図 19 に示す通りであった。図 18 では、Low volume 投与群 (Low volume (+) 群) から採取した鼻粘膜細胞は、Low volume 対照群 (Low volume (-) 群) から採取した鼻粘膜細胞と比較して、CpG-A 添加あり (CpG-A 1  $\mu$ M) の場合は IFN- $\gamma$  産生量が有意に増加した ( $p < 0.01$ )。一方、CpG-A 添加なし (CpG-A 0  $\mu$ M) の場合は IFN- $\gamma$  産生量は検出されなかった。この結果から、乳酸菌の投与により細菌やウイルス等の病原体の感染後に IFN- $\gamma$  産生が誘導されて感染症の予防効果が奏されることが示された。

40

【0152】

図 19 では、Low volume 投与群 (Low volume (+) 群) から採取した鼻粘膜細胞は、Low volume 対照群 (Low volume (-) 群) から採取

50

した鼻粘膜細胞と比較して、不活化済H1N1添加あり(H1N1 5 µg/ml)の場合はIFN-、IFN- およびIFN- の産生量がいずれも増加傾向にあった。一方、不活化済H1N1添加なし(H1N1 0 µg/ml)の場合はIFN- 産生量は検出されなかった。この結果から、乳酸菌の投与によりインフルエンザウイルスの感染後にIFN-、IFN- およびINF- 産生が誘導されて感染症の予防効果が奏されることが示された。

### 【0153】

#### 参考例：経口投与によるSARS-CoV-2感染予防効果の検討

参考例では、公知の投与方法である乳酸菌の経口投与によるSARS-CoV-2感染予防効果について検討した。

### 【0154】

#### (1) 方法

##### ア ウイルス上気道接種試験群

BALB/cマウス(20週齢・雌・体重約20g)を対照群(標準餌摂取群)と試験餌摂取群の2群に分け(各群n=8)、SARS-CoV-2感染させる14日前から感染2日後または感染3日後まで標準餌または試験餌(乳酸菌としてラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス JCM5805菌株)の加熱死菌体を0.029質量%含む)を自由摂取させて飼育した。各群のマウスは感染0日目に麻酔下において国立感染症研究所で樹立されたマウス馴化SARS-CoV-2 QHmusX株(Iwata-Yoshikawa *et al.*, *Science Advances*. 2022; 8(1): eab h3827)を5×LD<sub>50</sub>(1.8×10<sup>4</sup>TCID<sub>50</sub>)(5 µl)で感染させた。そして、感染2日後または感染3日後に解剖し、鼻咽腔関連リンパ組織(NALT(nasal-associated lymphoid tissues))を採取した。

### 【0155】

##### イ ウイルス下気道接種試験群

BALB/cマウス(21週齢・雌・体重約20g)を対照群(標準餌摂取群)と試験餌摂取群の2群に分け(各群n=8)、SARS-CoV-2感染させる14日前から感染3日後まで標準餌または試験餌(乳酸菌としてラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシーズ・ラクティス JCM5805菌株)の加熱死菌体を0.05質量%含む)を自由摂取(経口投与)させて飼育した。各群のマウスは感染0日目に麻酔下において国立感染症研究所で樹立されたマウス馴化SARS-CoV-2 QHmusX株(Iwata-Yoshikawa *et al.*, *Science Advances*. 2022; 8(1): eab h3827)を10×LD<sub>50</sub>(3.5×10<sup>4</sup>TCID<sub>50</sub>)(30 µl)で感染させた。そして、感染3日後に解剖し、肺を採取した。

### 【0156】

##### ウ RNAの抽出および調製

例1(1)イの記載と同様にして、採取したNALTおよび肺からのRNAの抽出および調製を行った。

### 【0157】

##### エ RNAの定量

例1(1)ウの記載と同様にして、RNAの定量を行った。

### 【0158】

#### (2) 結果

ウイルス上気道接種試験群((1)方法 ア)に関する結果は図20に、ウイルス下気道接種試験群((1)方法 イ)に関する結果は図21にそれぞれ示す通りであった。ウイルス上気道接種試験群では、SARS-CoV-2感染させる14日前から感染2日後または感染3日後まで(合計16日間または17日間)標準餌または試験餌を自由摂取(経口投与)させた結果、マウス1匹1日当たり平均2.38g(試験餌として乳酸菌1.19mg)を摂取したことを確認した。一方、ウイルス下気道接種試験群では、SARS

10

20

30

40

50

- C o V - 2 感染させる 1 4 日前から感染 3 日後まで ( 合計 1 7 日間 ) 標準餌または試験餌を自由摂取 ( 経口投与 ) させた結果、マウス 1 匹 1 日当たり平均 2 . 2 g ( 試験餌として乳酸菌 0 . 6 4 m g ) を摂取したことを確認した。

【 0 1 5 9 】

図 2 0 では、S A R S - C o V - 2 感染 2 日後または 3 日後 ( 感染約 4 8 時間後または約 7 2 時間後 ) の N A L T における S A R S - C o V - 2 の R N A 量が、乳酸菌投与群では、対照群と比較して減少していることが確認された。

【 0 1 6 0 】

図 2 1 では、S A R S - C o V - 2 感染 3 日後 ( 感染約 7 2 時間後 ) の N A L T における S A R S - C o V - 2 の R N A 量が、乳酸菌投与群では、対照群と比較して減少していることが確認された。

10

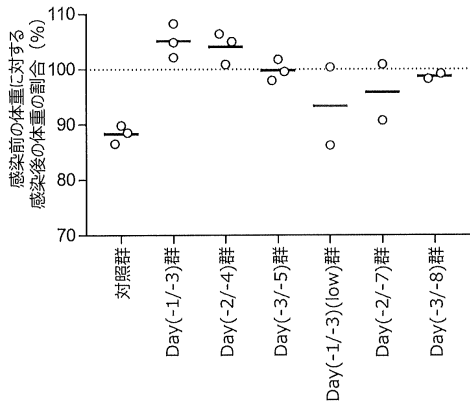
20

30

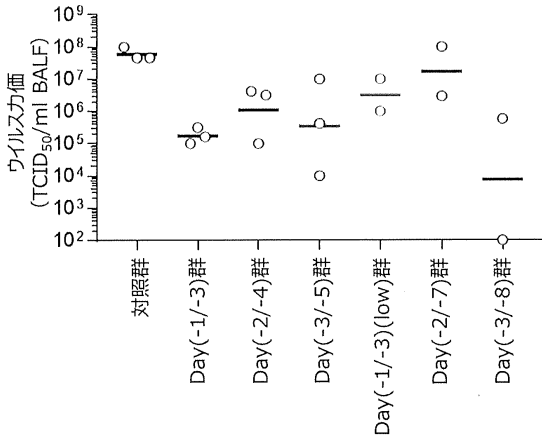
40

50

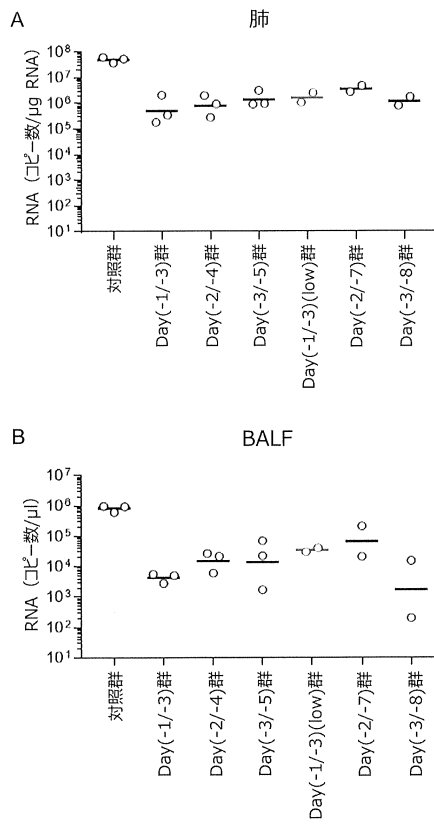
【図面】  
【図 1】



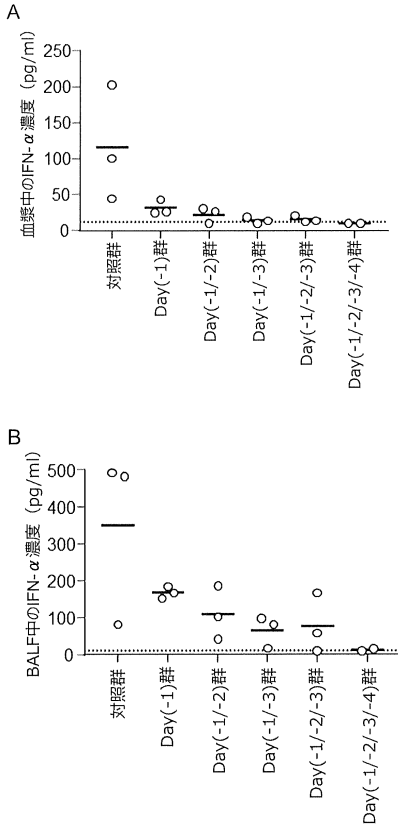
【図 3】



【図 2】



【図 4】



10

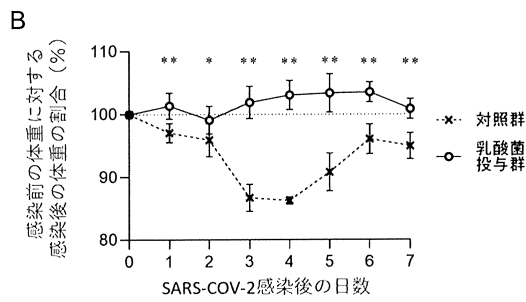
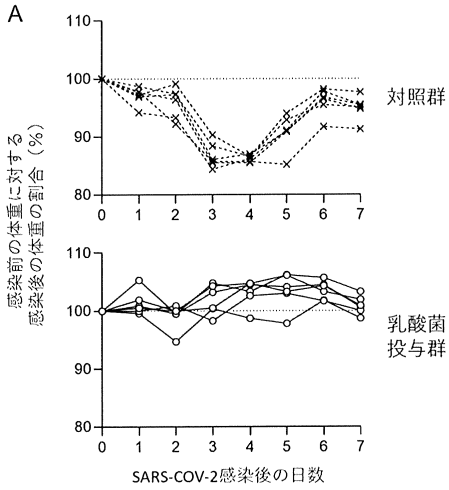
20

30

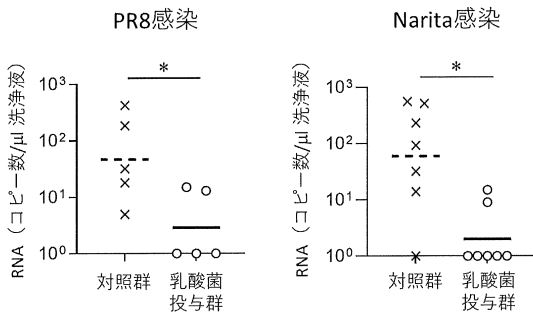
40

50

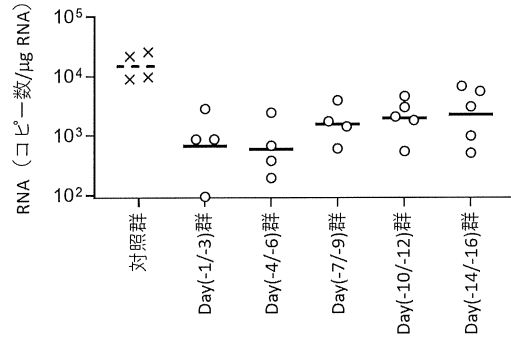
【 図 5 】



【 図 7 】



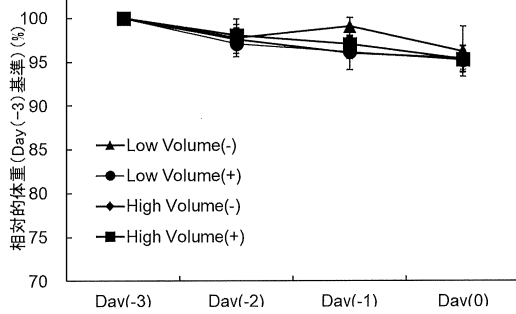
【 図 6 】



10

20

【 図 8 】

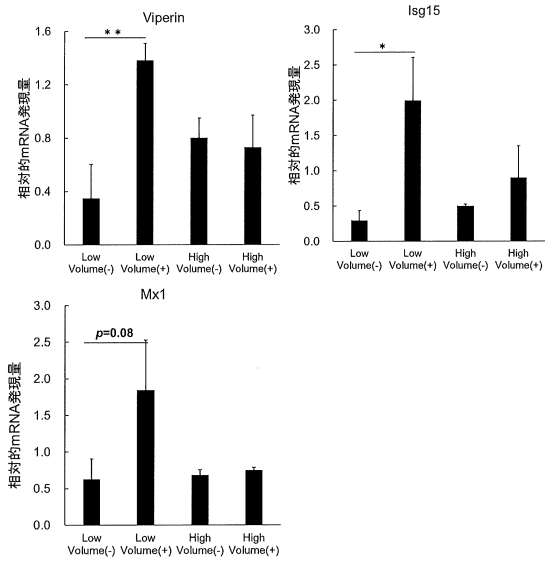


30

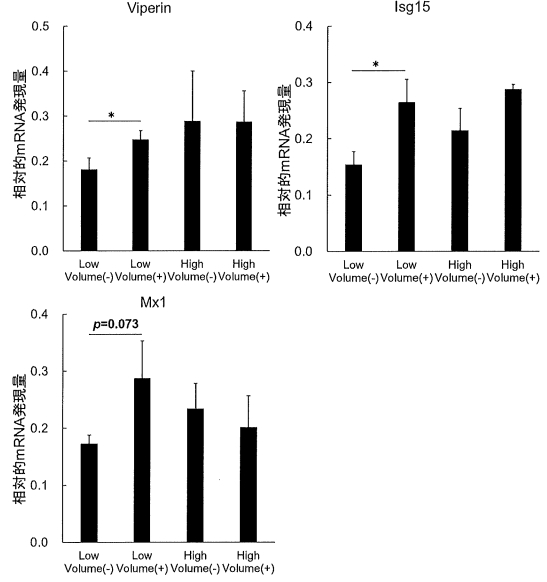
40

50

【 図 9 】



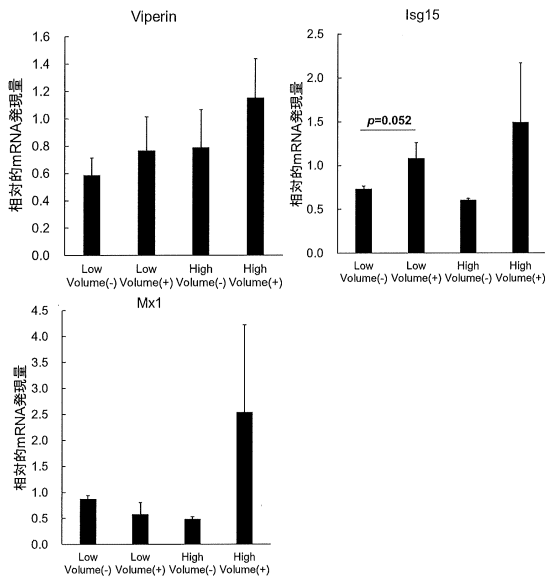
【 図 10 】



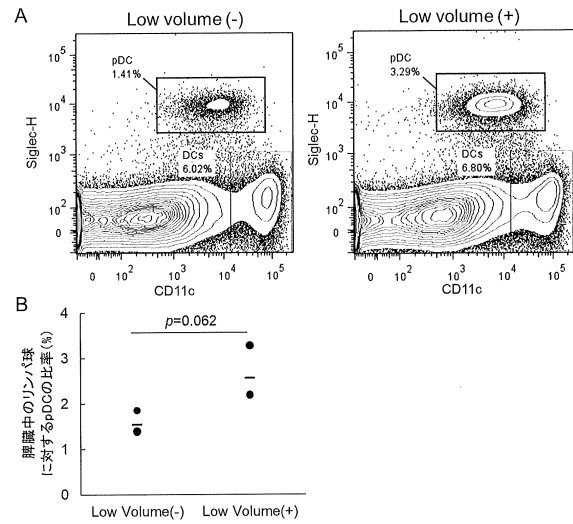
10

20

【 図 11 】



【 図 12 】

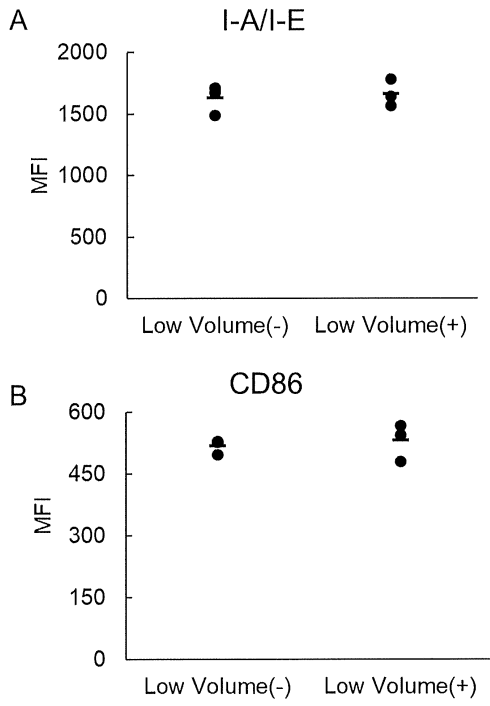


30

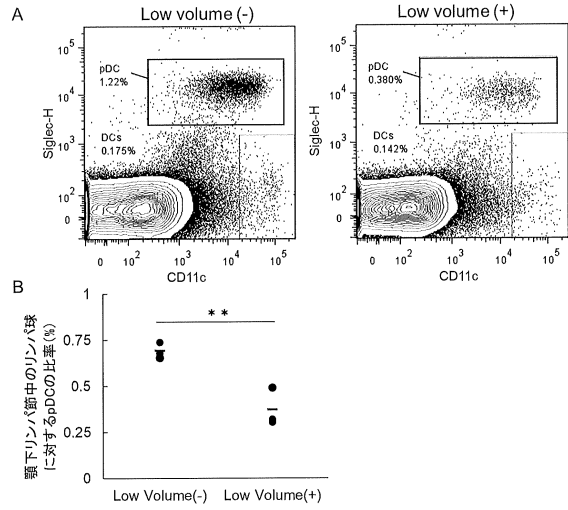
40

50

【 図 1 3 】



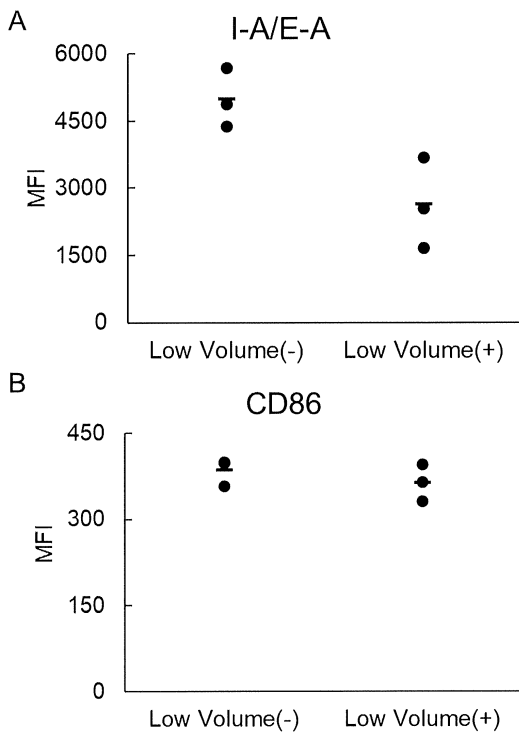
【 図 1 4 】



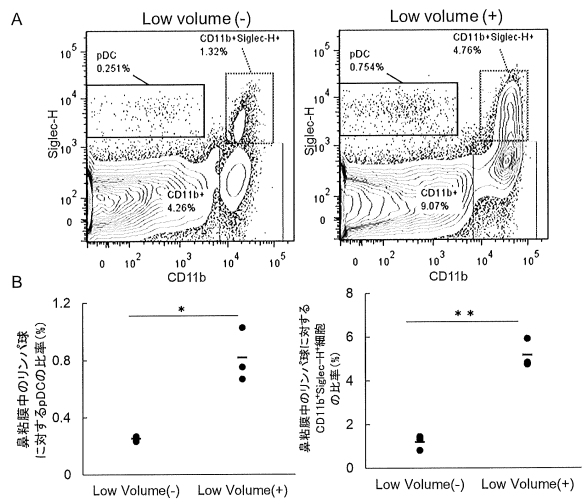
10

20

【 図 1 5 】



【 図 1 6 】

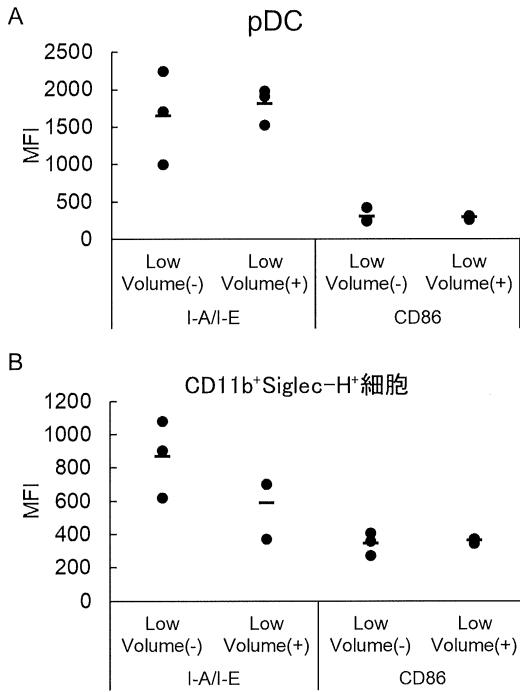


30

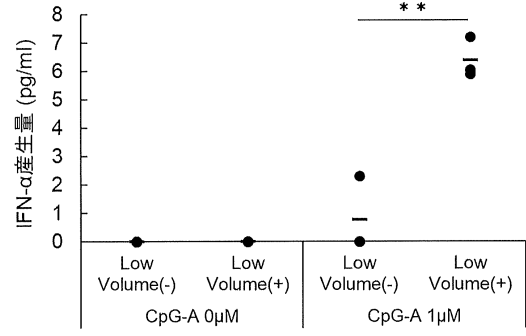
40

50

【 図 1 7 】



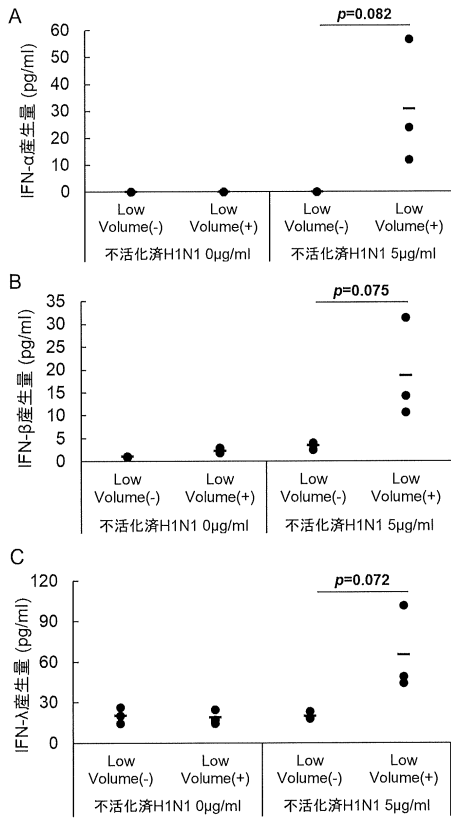
【 図 1 8 】



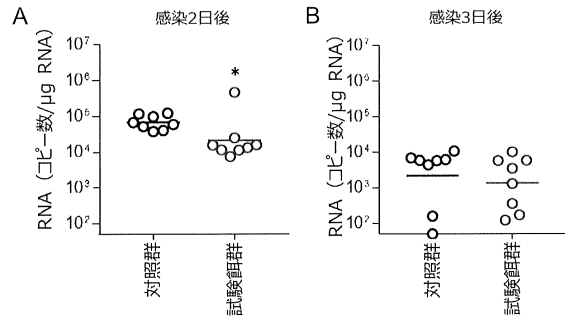
10

20

【 図 1 9 】



【 図 2 0 】

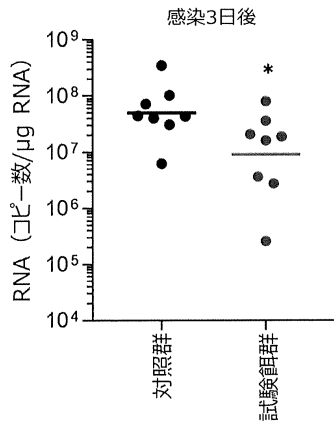


30

40

50

【 図 2 1 】



10

【 配列表 】

[0007667922000001.xml](#)

20

30

40

50

## フロントページの続き

- 立感染症研究所内
- (72)発明者 俣野 哲朗  
東京都新宿区戸山一丁目23番1号 国立感染症研究所内
- (72)発明者 城内 健太  
東京都中野区中野四丁目10番2号 キリンホールディングス株式会社内
- (72)発明者 辻 亮平  
東京都中野区中野四丁目10番2号 キリンホールディングス株式会社内
- 審査官 渡邊 潤也
- (56)参考文献 国際公開第2012/091081(WO, A1)  
国際公開第2023/074820(WO, A1)  
YAMAMOTO K. et al. , 552. Effect of Lactococcus lactis strain plasma (LC-Plasma) on immune response and symptoms in patients with mild COVID-19. Result of the multicenter, double-blinded, randomized controlled trial (PLATEAU study) , Open Forum Infectious Diseases , 2023年11月27日 , 10(Suppl. 2) , p. S330-S331 , Abstract citation ID: ofad500.621  
ZELAYA H. et al. , Nasal priming with immunobiotic Lactobacillus rhamnosus modulates inflammation-coagulation interactions and reduces influenza virus-associated pulmonary damage , Inflamm Res. , 2015年 , 64 , pp.589-602  
MFUNA ENDAM L. et al. , Intranasal application of Lactococcus lactis W136 bacteria early in SARS-Cov-2 infection may have a beneficial immunomodulatory effect: a proof-of-concept study , medRxiv preprint , 2021年04月20日 , pp. 1-18 , doi: 10.1101/2021.04.18.21255699  
杉村 哲, 他10名, L. lactis JCM5805株摂取によるプラズマサイトイド樹状細胞活性化を介したウイルス性呼吸器感染症抑制効果の検証, 第61回日本ウイルス学会学術集会プログラム・抄録集, 2013年10月29日, p.209, O2-2-05  
「乳酸菌L. ラクティス プラズマ(プラズマ乳酸菌)」による新型コロナウイルス増殖抑制メカニズムを試験管内試験で確認, キリンホールディングス株式会社, ニュースリリース[online], 2022年11月29日, [retrieved on 2024.03.06], retrieved from the Internet URL: [https://www.kirinholdings.com/jp/newsroom/release/2022/1129\\_01.html](https://www.kirinholdings.com/jp/newsroom/release/2022/1129_01.html)
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)  
A61K 35/744  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)