

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年8月11日(11.08.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/168889 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 39/39 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01)
A61K 9/12 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01) A61K 39/145 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01) C07K 7/08 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01) C07K 14/00 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/004130

(22) 国際出願日: 2022年2月2日(02.02.2022)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2021-015938 2021年2月3日(03.02.2021) JP

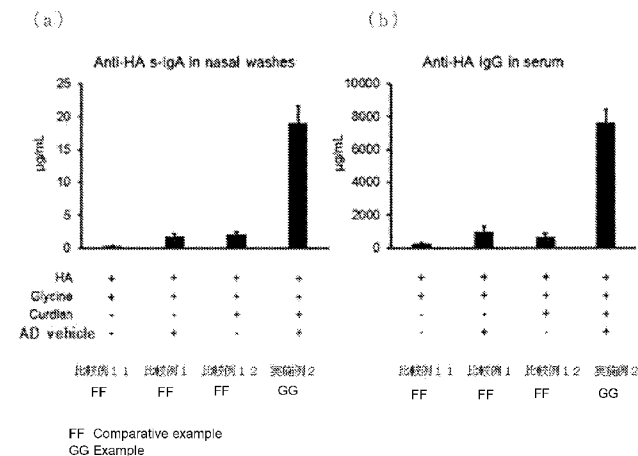
(71) 出願人: 応用酵素医学研究所株式会社(APPLIED MEDICAL ENZYME RESEARCH INSTITUTE CORPORATION) [JP/JP]; 〒7700873 徳島県徳島市東沖洲2丁目1-7 Tokushima (JP).

(72) 発明者: 木戸 博(KIDO, Hiroshi); 〒7700873 徳島県徳島市東沖洲2丁目1番7号 応用酵素医学研究所株式会社内 Tokushima (JP). 鈴木 宏一(SUZUKI, Koichi); 〒7700873 徳島県徳島市東沖洲2丁目1番7号 応用酵素医学研究所株式会社内 Tokushima (JP). 堺 聡子(SAKAI, Satoko); 〒7700873 徳島県徳島市東沖洲2丁目1番7号 応用酵素医学研究所株式会社内 Tokushima (JP). 木本 貴士(KIMOTO, Takashi); 〒7700873 徳島県徳島市東沖洲2丁目1番7号 応用酵素医学研究所株式会社内 Tokushima (JP).

(54) Title: FINE PARTICLE POWDER-TYPE MUCOSAL VACCINE

(54) 発明の名称: 微粒子粉末剤型粘膜ワクチン

[図1]



(57) Abstract: When this vaccine is administered to the nasal cavity, etc., a vaccine component stays in the nasal cavity or the pharynx, providing a means for heightening the effects of vaccine administration such as induction of immunity. It was confirmed that an antibody-production-inducing effect is greatly enhanced by a synergistic effect achieved by adding a synthetic peptide, a mixed lipid, β -1,3-glucan or inulin, and an amino acid to an antigen protein.

[続葉有]

(74) 代理人： 廣 田 雅 紀 (HIROTA, Masanori);
〒1070052 東京都港区赤坂二丁目 2 番 1 9
号アドレスビル6階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(57) 要約：ワクチンの鼻腔等への投与に際し、ワクチン成分が鼻腔や咽頭部にとどまり、ワクチン投与による免疫誘導等の効果を高めるための手段を提供するものである。抗原タンパク質に、合成ペプチド、混合脂質、 β -1, 3-グルカン又はイヌリン、及び、アミノ酸を添加することにより、相乗的な効果によって、抗体産生誘導効果が顕著に増強されることを確認した。

明 細 書

発明の名称：微粒子粉末剤型粘膜ワクチン

技術分野

[0001] 本発明は、微粒子粉末剤型粘膜ワクチンに関し、より詳細には、抗原タンパク質、及び、K n L mのアミノ酸配列からなる合成ペプチドと、混合脂質と、 β -1, 3-グルカン又はイヌリンと、アミノ酸とを含むアジュバントを包含する微粒子粉末剤型粘膜ワクチン、並びにその製造方法に関する。

背景技術

[0002] 現在、世界で広く使用されている皮下や筋肉内接種型ワクチンは、血液の抗病原体 I g G 抗体の誘導に優れ、感染重症化の防止に効果を示す。しかし、病原体の侵入する全身の粘膜で感染を防御する役割を担う抗病原体特異的分泌型 I g A (s - I g A) 抗体の誘導効果がほとんどないことから、感染予防効果は期待できないとされている（例えば、特許文献 1 及び 2 参照）。感染力が強いとされるインフルエンザウイルス、コロナウイルス等の場合、感染予防効果の充実が必要とされる。喫緊の課題である C O V I D - 1 9 については、飛沫感染と接触感染の侵入部位は鼻腔と口腔が主であり、いわゆる新型コロナウイルスの受容体である A C E 2 が唾液腺に豊富に存在し、鼻粘膜や口腔粘膜には、小唾液腺が多数存在しているとされるため、鼻腔や咽頭部へ効果的なワクチンを投与することも感染防止対策の一つとなる。

[0003] 発明者らは、これまで、界面活性剤として作用する肺や気管の粘膜表面を覆っている肺サーファクタントの組成を基本として、抗原提示細胞に抗原を運搬する機能を付与した人工合成肺サーファクタントを開発してきた。例えば、人工合成肺サーファクタントとして、K n L mのアミノ酸配列からなる合成ペプチドを用い、脂質とさらに増粘剤のカルボキシビニルポリマー（C V P）を加えることにより、安全で有効とされる経粘膜投与型インフルエンザワクチンを報告してきた（例えば、特許文献 3 及び 4 参照）。

[0004] かかる経粘膜投与型ワクチンは、血清中の抗原特異的 I g G 誘導作用、気

道粘膜（鼻腔洗浄液）抗原特異的分泌型 Ig A 誘導作用（例えば、特許文献 4 及び非特許文献 1 参照）、細胞性免疫誘導作用（例えば、非特許文献 2 参照）を示すことが確認されている。

[0005] しかし、例えば鼻粘膜には、繊毛が生えており、さらに粘液が充満する粘液層で覆われているため、従来の液状の経粘膜ワクチンが鼻粘膜に投与されると粘液に付着したとしても、鼻腔に入った空気中の小さなホコリや細菌とともに、強い排出作用により速やかに喉へと送り出されるので、実用化にはほとんど至っていない。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開WO 2005/097182号パンフレット

特許文献2：国際公開WO 2007/018152号パンフレット

特許文献3：国際公開WO 2009/123119号パンフレット

特許文献4：国際公開WO 2011/108521号パンフレット

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Vaccine 2019;37: 612-22.

非特許文献2：PLoS One 2018; 13:e0191133.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明の課題は、ワクチンの鼻腔等への投与に際し、ワクチン成分が鼻腔や咽頭部にとどまり、ワクチン投与による免疫誘導等の効果を高めるための手段を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、（経）粘膜ワクチンに使用してきた剤型について、改めて検証することとした。その結果、従来の液状の粘膜ワクチンに代えて、微粒子粉末型の粘膜ワクチンを作製することを思いついた。まず、抗原タンパク質と、K n L m のアミノ酸配列からなる合成ペプチドと混合脂質とCVPを

含む、従来の液状ワクチンを凍結乾燥して粉状のワクチンを作製しようとしたが、微粒子を形成することができず、塊や紐状の組成物が形成され、鼻腔への投入、分散が認められなかった。そこで、従来の液状ワクチンから粘性が高く、凍結乾燥で紐状になる原因と考えられるポリマーのCVPを除き、抗原タンパク質、及び、K n L mのアミノ酸配列からなる合成ペプチドと混合脂質とを含む組成物（ADビークル）を凍結乾燥して粉末化した乾燥粉末製剤についてマウスの鼻腔へ投与を試みたが、この組成だけでは鼻腔への気流に乗って飛散する効率が悪く鼻腔の粘膜にまで到達しなかった。

[0010] そこで、一般的に乾燥粉末製剤において飛散・分散作用を有する賦形剤として使用されていることが知られていたアミノ酸のうち、分子量が小さい中性アミノ酸であるグリシンを分散剤として、上記抗原タンパク質及びADビークル複合体に添加し、凍結乾燥して粉末化した組成物をマウスの鼻腔へ投与したところ、鼻腔の粘膜に到達し、鼻腔内に適切にいきわたらせることができた。投与されたマウスについて、鼻腔を洗浄した洗浄液中のs-IgAと血清中のIgGの濃度を測定すると予想されたよりも高く、グリシンの添加により抗体産生誘導効果が増強される可能性があると思われたので、さらに検討を進めることにした。

[0011] まず、上記抗原タンパク質及びADビークル複合体に、従来から乾燥粉末製剤において賦形剤や増量剤として使用されている種々の多糖類を、グリシンとともに添加した後、凍結乾燥して粉末化した組成物をマウスの鼻腔へ投与することとした。

[0012] β -1, 4グルカンに分類されるグルコース重合体であるセルロース、及び、ウロン酸重合体であるアルギン酸ナトリウムを、多糖類として選択した場合には、粘膜においても血清中においても抗体産生を誘導する効果が認められなかった。しかし、カードラン等の β -1, 3-グルカンを含むグルコース重合体、又はイヌリンを、上記抗原タンパク質及びADビークル複合体にグリシンとともに添加し、凍結乾燥して粉末化した組成物をマウスの鼻腔へ投与したところ、鼻腔の洗浄液中のs-IgAと血清中のIgGの値とが

、増加することを見出した。そこで、ADビークル、各種 $\beta-1$, 3-グルカン又はイヌリン、及び、各種アミノ酸の組合せについて、組合せを様々に変更してs-IgAとIgGの値について測定を続け、抗原タンパク質に、合成ペプチド、混合脂質、 $\beta-1$, 3-グルカン又はイヌリン、及び、アミノ酸を添加することにより、相乗的な効果によって、抗体産生誘導効果が顕著に増強されることを確認し、本発明を完成するに至った。

[0013] すなわち、本発明は以下の事項により特定されるものである。

[1] 抗原タンパク質と、以下の(A)～(D)を含むアジュバントとを包含する、微粒子粉末剤型粘膜ワクチン。

(A) $K_n L_m$ (但し、 n は4-8、 m は11-20の整数を表す) のアミノ酸配列からなる合成ペプチド；

(B) 混合脂質；

(C) $\beta-1$, 3-グルカン又はイヌリン；

(D) アミノ酸；

[2] $K_n L_m$ (但し、 n は4-8、 m は11-20の整数を表す) のアミノ酸配列からなる合成ペプチドが、配列番号1又は2に示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、上記[1]記載の微粒子粉末剤型粘膜ワクチン。

[3] 混合脂質が1又は2以上のリン脂質を含むことを特徴とする上記[1]又は[2]記載の微粒子粉末剤型粘膜ワクチン。

[4] 1又は2以上のリン脂質が、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジン酸から選ばれることを特徴とする、上記[3]記載の微粒子粉末剤型粘膜ワクチン。

[5] 混合脂質が、ラウリル酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、パルミトオレイン酸、オレイン酸、リノール酸、 γ -リノレン酸、アラキドン酸、 α -リノレン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸が

ら選ばれる1又は2以上を含むことを特徴とする、上記〔1〕～〔4〕のいずれか記載の微粒子粉末剤型粘膜ワクチン。

〔6〕抗原タンパク質が、病原体に由来するタンパク質、不活化抗原タンパク質、リコンビナント抗原タンパク質、又は無毒化毒素タンパク質であることを特徴とする、上記〔1〕～〔5〕のいずれか記載の微粒子粉末剤型粘膜ワクチン。

〔7〕 β -1、3-グルカンが、カードラン、ラミナラン、ザイモサン、イースト β グルカンから選ばれる1又は2種類以上であることを特徴とする、上記〔1〕～〔6〕のいずれか記載の微粒子粉末剤型粘膜ワクチン。

〔8〕 β -1、3-グルカンが、カードランであることを特徴とする、上記〔1〕～〔6〕のいずれか記載の微粒子粉末剤型粘膜ワクチン。

〔9〕アミノ酸が、グリシン、アラニン、セリン、トレオニン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、メチオニンから選ばれた1又は2種類以上のアミノ酸であることを特徴とする上記〔1〕～〔8〕のいずれか記載の微粒子粉末剤型粘膜ワクチン。

〔10〕粘膜において抗原特異的s-IgAの産生を増強し、又は、血中において抗原特異的IgGの産生を増強するために用いられることを特徴とする上記〔1〕～〔9〕のいずれか記載の微粒子粉末剤型粘膜ワクチン。

〔11〕鼻腔から咽頭部を経由する気道感染症に対して、感染防御効果を発揮する吸入型又は噴霧型の均一な微粒子粉末であることを特徴とする上記〔1〕～〔10〕のいずれか記載の微粒子粉末剤型粘膜ワクチン。

[0014] また、本発明は以下の事項により特定されるものである。

〔12〕（1）抗原タンパク質；

（2） K_nL_m （但し、 n は4-8、 m は11-20の整数を表す）のアミノ酸配列からなる合成ペプチド；

（3）混合脂質；

（4） β -1、3-グルカン又はイヌリン；

（5）アミノ酸；

を含む凍結乾燥された微粒子粉末剤型粘膜ワクチンの製造方法であって、以下の工程（a）～（e）を備えることを特徴とする前記製造方法。

（a）前記合成ペプチドと、混合脂質とを水に懸濁することにより、AD-ビークル懸濁液を調製する工程；

（b）AD-ビークル懸濁液に抗原タンパク質を添加し、加温と攪拌とを1回又は2回以上行い、抗原タンパク質-AD-ビークル複合体を形成する工程；

（c）抗原タンパク質-AD-ビークル複合体に、 β -1, 3-グルカン又はイヌリンを添加後攪拌することによる、グルカン添加抗原タンパク質-AD-ビークル複合体を調製する工程；

（d）グルカン添加抗原タンパク質-AD-ビークル複合体に、アミノ酸を添加後攪拌することによるワクチン液を調製する工程；

（e）ワクチン液を凍結乾燥して微粒子粉末剤型化する工程；

[13] 混合脂質が、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール及びパルミチン酸の3種脂質混合脂質であることを特徴とする上記[12]記載の微粒子粉末剤型粘膜ワクチンの製造方法。

[14] 抗原タンパク質-AD-ビークル複合体を形成する（b）工程において、加温の温度設定範囲が25～75℃であることを特徴とする上記[12]又は[13]記載の微粒子粉末剤型粘膜ワクチンの製造方法。

[15] 抗原タンパク質単独では、効果的な免疫誘導と感染防御効果を生じさせることのない量の抗原タンパク質を含み、合成ペプチドと、混合脂質と、 β -1, 3-グルカン又はイヌリンと、アミノ酸とを組み合わせることにより、効果的な免疫誘導と感染防御効果を生じさせるために用いられる、上記[12]～[14]のいずれか記載の微粒子粉末剤型粘膜ワクチンの製造方法。

[0015] 本発明のワクチンを例えば鼻腔に投与すると、鼻腔の粘膜をはじめとする全身の粘膜における抗原特異的s-IgA抗体と、血清中の抗原特異的IgG抗体の産生が顕著に増大し、感染症に対する優れた感染防御効果や抗体産

生誘導効果を得ることができる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]微粒子粉末剤型粘膜ワクチンに含まれるカードランを添加する場合の検討結果を示す図である。

[図2]微粒子粉末剤型粘膜ワクチンの走査電子顕微鏡による粒子径の測定結果を示すグラフである。

[図3]微粒子粉末剤型組成物を鼻口から投与した被検マウスの、投与から20分経過後の鼻腔、咽頭部、気管、気管支、肺部の画像である。

発明を実施するための形態

[0017] 本発明のワクチンとしては、抗原タンパク質；及び、(A) K_nL_m （但し、 n は4－8、 m は11－20）のアミノ酸配列からなる合成ペプチドと、(B) 混合脂質と、(C) β －1, 3－グルカンと、(D) アミノ酸とを含む、アジュバント；を包含する、微粒子粉末剤型粘膜ワクチンであれば特に制限されないが、本発明においてアジュバントとは、抗原タンパク質（ペプチド）と共に投与することにより、とりわけ、抗原タンパク質単独では、効果的に粘膜において抗原特異的 $s-IgA$ を産生し、血中において抗原特異的 IgG を産生することのない量の抗原タンパク質を含む場合に、上記抗原に対する抗体の産生を誘導し、各種抗体の産生量を増やすことができる成分及び／又は相乗的に抗体の産生量を増やすことができる成分の組合せをいう。

[0018] 上記 K_nL_m のアミノ酸配列からなる合成ペプチドとしては、N末側の n 個の K （リジン：Lys（K））残基とC末側の m 個の L （ロイシン：Leu（L））残基が連続して構成されるアミノ酸配列であって、上記 n は4－8、上記 m は11－20のアミノ酸配列からなる合成ペプチドであれば特に制限されないが、具体的には、以下のペプチドを例示することができる。なお、ここではアミノ酸残基は1文字記号で示している。

配列番号1：(K6L16)：KKKKKKLLLLLLLLLLLLLLLL
LL

配列番号2：(K6L11)：KKKKKKLLLLLLLLLLLL

- [0019] 上記合成ペプチドは、公知の化学合成法に従って調製することができる、純度95%以上のものを使用することが好ましい。
- [0020] 上記合成ペプチドは、合成ペプチド構造に影響を与えないメタノール、エタノール、トリフルオロ酢酸等の有機溶媒に溶解してK6L16ペプチド含有液としてワクチンに添加されることが好ましく、例えば、3mg~7mg/mLの濃度になるようにメタノールに溶解したK6L16ペプチド含有液として使用することができる。
- [0021] 上記混合脂質に含まれる脂質としては、2種類以上の脂質を含む脂質を挙げることができ、2種類以上の脂質としては、1又は2種類以上のリン脂質と1又は2以上のリン脂質以外の脂質との組合せや、2種類以上のリン脂質の組合せや、2種類以上のリン脂質以外の脂質の組合せを挙げることができるが、1又は2種類以上のリン脂質と1又は2種類以上のリン脂質以外の脂質との組合せが好ましく、2種類のリン脂質と1種類のリン脂質以外の脂質との組合せがより好ましい。
- [0022] 上記リン脂質としては、哺乳類由来天然肺サーファクタントが含有するリン脂質が好ましく、具体的には、ホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジリンイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジン酸、スフィンゴミエリン等を挙げることができ、かかるリン脂質は1種類を単独で、又は2種類以上の混合物として使用することができるが、2種類以上のリン脂質としては、ジパルミトイルホスファチジルコリンとホスファチジルグリセロールとの組合せを好ましく挙げることができる。
- [0023] 上記混合脂質に含まれるリン脂質がジパルミトイルホスファチジルコリンとホスファチジルグリセロールである場合の配合比率としては、ジパルミトイルホスファチジルコリン：ホスファチジルグリセロールが、10：1~1：10、5：1~1：5、4：1~1：1、3.5：1~2.5：1を例示することができる。
- [0024] 上記リン脂質以外の脂質としては、ラウリル酸、ミリスチン酸、パルミチ

ン酸、ステアリン酸、パルミトオレイン酸、オレイン酸、リノール酸、 γ -リノレン酸、アラキドン酸、 α -リノレン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸等を挙げることができるが、パルミチン酸が好ましい。

[0025] 上記混合脂質がリン脂質とリン脂質以外の脂質を含む場合の、リン脂質の含量とリン脂質以外の脂質の含量（質量）の比としては、リン脂質：リン脂質以外の脂質が100：1～30を挙げることができるが、100：5～15が好ましく、100：8～12がより好ましく、100：9～11がさらに好ましく、100：9.5～10.5が特に好ましい。

[0026] 本発明においては、上記混合脂質とK n L mのアミノ酸配列からなる合成ペプチドからなる組成物、又は、上記混合脂質とK n L mのアミノ酸配列からなる合成ペプチドを含む組成物を「ADビークル（ADvehicle）」と呼ぶことがある。ADビークルにおける混合脂質と合成ペプチドの質量の比率、すなわち、混合脂質：合成ペプチドとしては、100：0.1～50を挙げることができるが、100：0.5～10が好ましく、100：1～5がより好ましく、100：1.5～3がさらに好ましい。

[0027] 上記抗原タンパク質（類）としては、ワクチンの抗原として用いることができるタンパク質であれば特に制限されないが、抗原タンパク質に対する免疫（抗体）を体内に惹起することにより、上記抗原タンパク質が由来する病原体が引き起こす疾病の予防又は治癒が期待できるものを挙げることができるが、一般的な病原体に由来するタンパク質のほか、不活化抗原タンパク質、精製抗原タンパク質、部分精製抗原タンパク質、リコンビナント抗原タンパク質、無毒化毒素タンパク質、アレルゲン等を例示することができ、また、全（成熟）タンパク質のほか、プレタンパク質、プレプロタンパク質、これらの機能的又は免疫優性の抗原ペプチド等を含めた抗原タンパク質類とすることもできる。

[0028] 上記病原体としては、ウイルス、細菌、寄生虫等を例示することができる。

[0029] 上記ウイルスとしては、水痘ウイルス、麻疹ウイルス、ポリオウイルス、

ロタウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス、重症急性呼吸器感染症候群（SARS）ウイルス、新型コロナウイルス（Coronavirus：COVID-19）、エボラ出血熱ウイルス、ウエストナイルウイルス、ハンタウイルス、デングウイルス、日本脳炎ウイルス、黄熱ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス、HIVウイルス等を挙げることができる。

[0030] 上記細菌としては、百日咳菌、髄膜炎菌、インフルエンザb型菌、肺炎菌、コレラ菌等を挙げることができ、上記真菌としては、白癬菌、カンジダ、アスペルギルス等を挙げることができ、上記寄生虫としては、マラリア病原体、眠り病病原体等を挙げることができる。

[0031] 上記病原体がインフルエンザウイルスである場合の、抗原タンパク質の具体例としては、ヘマグルチニン（赤血球凝集素：HA）抗原タンパク質や、ノイラミニダーゼ抗原タンパク質、Mプロテイン等のウイルスの表面上に存在する抗原性糖タンパク質と、内部のヌクレオプロテイン等を例示することができる。

[0032] 本発明のワクチンにおける抗原タンパク質の含量（質量）は、上記ヘマグルチニンを抗原タンパク質として用いる場合を例にとると、ヘマグルチニン（HA）抗原タンパク質の含量として、Single radial immunodiffusion(SRD), Fahey, J. et al., J. Immunol., 94, 84-90(1965)の方法でHA量を定量測定したHA含量を表示する場合と、一度SRD法でHA含量を測定した後では、同じHA原液を用いる限り、表記はSRD定量より測定の容易な、ヘマグルチニン抗原タンパク質と、他の抗原タンパク質の総量を示すタンパク質量によって表記する場合を挙げることができる。すなわち後者の場合、インフルエンザウイルスのヘマグルチニン（HA）を使用したHA抗原タンパク質液におけるHA抗原タンパク質の質量としては、HA抗原タンパク質と、HA抗原タンパク質以外の抗原性タンパク質とを含む総タンパク質の質量を意味することもでき、その場合、本発明においてはHA抗原タンパク質の質量（HA抗原タンパク質量）や濃度と表現する。HA抗原タンパク質以外の抗原性タンパク質としては、Mタンパク質、ノイラミラーゼ、ヌクレオプロテ

イン等を挙げることができる。

[0033] 本発明のワクチンにおけるH A抗原タンパク質としては、本発明の効果を奏する限りにおいて特に制限されないが、抗体産生誘導を行う程度に免疫応答を増強させることができない量で済むという点で、H A抗原タンパク質量(A)の乾燥質量として、 $0.01\mu\text{g} \sim 3\mu\text{g} / 20\text{g}$ マウス体重を例示することができ、 $0.05\mu\text{g} \sim 2\mu\text{g} / 20\text{g}$ マウス体重が好ましく、 $1.2\mu\text{g} \sim 1.8\mu\text{g} / 20\text{g}$ マウス体重をより好ましく挙げることができる。なお通常の免疫応答試験には若年齢成熟マウスを使用することが多いため、7～8週齢で、マウス体重約20gを使用することから、ここでは20gマウス体重として表記している。

[0034] なお、上記H A抗原タンパク質におけるH A抗原分子それ自体の質量としては、5～90質量%を挙げることができ、10～80質量%が好ましく、20～70質量%が好ましく、30～60質量%が好ましい。

[0035] 上記抗原タンパク質(抗原ペプチド)の作製方法としては、公知の方法であれば特に制限されないが、ワクチン製造のために抗原タンパク質量を十分に確保できる作製方法が好ましく、遺伝子組換え技術により作製する方法や化学合成により作製する方法を挙げることができる。

[0036] 抗原タンパク質に対する上記混合脂質の質量比としては、本発明の効果を奏することができる限りにおいて特に制限されないが、混合脂質が抗原タンパク質の0.1～20倍を挙げることができ、1～18倍が好ましく、5～15倍がより好ましく、8～12倍がさらに好ましく、9～11倍がさらに好ましい。

[0037] 本発明における β -1,3-グルカン(β -1,3-Glucan)としては、 β -1,3-グリコシド結合にて連結されたグルコース重合体を含む、グルコースを主要な構成糖とする多糖であって、上記の本発明における役割を果たすことができる β -1,3-グルカンであれば特に制限されず、直鎖 β -1,3-グルカン構造を有する水不溶性の多糖類であるカードラン(Curdlan)、海藻やキノコに含まれる貯蔵多糖として知られ、 β -1

、3結合及び β -1, 6結合のグルコース主鎖からなる多糖であり、 β -1, 3結合と β -1, 6結合の比は約3:1であって、水に可溶であるグルコース重合体であるラミナラン (Laminaran)、イースト菌等の出芽酵母の細胞壁由来の多糖類の懸濁液であって、マンナンを含み、 β -1, 3-グルカンが主成分の多糖を活性成分とするザイモサン (Zymosan)、イースト β -グルカン (Yeast β -Glucan) を挙げることができる。

[0038] 上記イヌリンとは、1つのグルコースにフルクトースが2~60個程度連なった構造を有する食物繊維の一種である。

[0039] 本発明のワクチンにおける β -1, 3-グルカン、又はイヌリンの添加量としては、本発明において、アジュバント作用を有効に発揮できる量であれば特に制限されないが、抗原タンパク質-A D ビークル複合体の質量の5~50倍量、好ましくは10~30倍量や、抗原タンパク質の質量の10~1000倍量、好ましくは25~500倍量、より好ましくは50~200倍量、さらに好ましくは75~150倍量を例示することができる。

[0040] 本発明のワクチンにおけるアミノ酸としては、投与された本発明の微粒子粉末剤型粘膜ワクチンが気流に乗って鼻腔等の粘膜に到達し易くするために賦形剤として用いることができるとともに、感染防御抗体誘導効果の低下を起こさず、かつ、粘膜においてs-IgA産生量を増加させることができ、血清中のIgG産生量を顕著に増加させる等の抗体産生誘導効果を増強することができるアミノ酸であれば特に限定されないが、入手の容易性等から、生体のタンパク質の主要な構成単位となっている20種の α -アミノ酸が好ましく、グリシン (Gly)、アラニン (Ala)、イソロイシン (Ile)、ロイシン (Leu)、フェニルアラニン (Phe)、プロリン (Pro)、トリプトファン (Trp)、バリン (Val)、メチオニン (Met) 等の非極性側鎖を有する中性アミノ酸；アスパラギン (Asn)、グルタミン (Gln)、セリン (Ser)、トレオニン (Thr)、チロシン (Tyr) 等の極性の中性側鎖を有する中性アミノ酸；アスパラギン酸 (Asp)

、グルタミン酸（G l u）等の酸性側鎖を有する酸性アミノ酸；アルギニン（A r g）、リシン（L y s）、ヒスチジン（H i s）等の塩基性側鎖を有する塩基性アミノ酸などを例示することができるが、グリシン、アラニン、セリン、トレオニン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、メチオニンから選ばれる1又は2以上のアミノ酸が好ましく、グリシン、アラニン、セリン、トレオニン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニンから選ばれる1又は2以上のアミノ酸がより好ましく、グリシン、アラニン、ロイシン、フェニルアラニンから選ばれる1又は2以上のアミノ酸がより好ましく、グリシン又はフェニルアラニンがさらに好ましく、また、グリシン、セリン、ロイシン、フェニルアラニン、メチオニンから選ばれる1又は2以上のアミノ酸がより好ましく、グリシン、セリン、ロイシン、フェニルアラニンから選ばれる1又は2以上のアミノ酸がより好ましく、グリシン、アラニン、ロイシン、及び／又はフェニルアラニンが好ましく、グリシンやフェニルアラニンが最も好ましく、フェニルアラニンが特に好ましい。あるいは、システインを除くことが望ましく、メチオニンやシステイン等のS H基を側鎖に有するアミノ酸を除くことが望ましい場合もある。

[0041] 本発明のワクチンにおけるアミノ酸の添加量としては、上記本発明の効果を奏する限りにおいて特に制限されないが、抗原タンパク質－A D ビークル複合体の質量の15～35倍量、好ましくは25～30倍量、又は、抗原タンパク質の質量の10～3000倍量、好ましくは100～1500倍量、より好ましくは150～750倍量、さらに好ましくは200～400倍量を例示することができる。

[0042] 本発明のワクチンの投与回数としては、本発明のワクチンが効果を奏するものであれば特に制限されないが、1回（初回免疫のみ）又は2回以上の複数回を挙げることができ、2回（初回免疫と二次免疫）又は3回（初回免疫と二次免疫と三次免疫）を好ましく挙げることができ、1回目の投与から1週間～1月経過後、好ましくは10日～3週間経過後、より好ましくは2週間経過後に2回目の投与を行うことが好ましく、3回目の投与も2回目の投

与から1週間～1月経過後が好ましく、10日～3週間経過後がより好ましく、2週間経過後がさらに好ましい。

[0043] 本発明の微粒子粉末剤型粘膜ワクチンは、効果的な免疫誘導と感染防御効果を生じさせることのない量の抗原タンパク質を含み、合成ペプチドと、混合脂質と、 β -1, 3-グルカン又はイヌリンと、アミノ酸とを組み合わせることにより、粘膜において抗原特異的s-IgAの産生を増強し、又は、血中において抗原特異的IgGの産生を増強する効果的な免疫誘導と感染防御効果を生じさせるために用いられる、使用用途が限定された用途発明でもあるといえる。

[0044] 本発明において、顕著に抗体産生誘導効果が増加するとしては、例えば、抗原タンパク質とADビークルと、アミノ酸を投与した場合と比較してマウスの鼻腔洗浄液におけるs-IgAの産生が4倍以上、好ましくは5倍以上、より好ましくは10倍以上、さらに好ましくは15倍以上を挙げることができ、及び／又は、血清中のIgGの産生が1.5倍以上、好ましくは2.5倍以上、より好ましくは3倍以上、さらに好ましくは5倍以上、さらにより好ましくは10倍以上を挙げることができる。

[0045] 或いは、本発明のワクチンにおいて、効果的な免疫誘導を生じさせる量の抗体の誘導量とは、ウイルス感染阻止効果HIの値が、インフルエンザワクチンにおける国際的評価基準以上の数値（ $HI \geq 40$ ）であることを例示することができる。

[0046] 本発明の微粒子粉末剤型粘膜ワクチンの製造方法としては、

- (1) 抗原タンパク質；
- (2) $K_n L_m$ （但し、 n は4-8、 m は11-20）のアミノ酸配列からなる合成ペプチド；
- (3) 混合脂質；
- (4) アミノ酸；
- (5) β -1, 3-グルカン又はイヌリン；

を含む凍結乾燥されている微粒子粉末剤型粘膜ワクチンの製造方法であって

、

(a) 前記合成ペプチドと、混合脂質とを水に懸濁することにより、AD-ビークル懸濁液を調製する工程；

(b) AD-ビークル懸濁液に抗原タンパク質を添加し、加温と攪拌とを1回以上反復して抗原タンパク質-AD-ビークル複合体を形成する工程；

(c) 抗原タンパク質-AD-ビークル複合体に、 β -1, 3-グルカンを追加後攪拌して、均一なグルカン添加抗原タンパク質-AD-ビークル複合体を調製する工程；

(d) グルカン添加抗原タンパク質-AD-ビークル複合体に、アミノ酸を添加し、攪拌して均一なワクチン粗液を調製する工程；

(e) ワクチン粗液を凍結乾燥して微粒子粉末剤型化することにより微粒子粉末剤型粘膜ワクチンを調製する工程；を備える、微粒子粉末剤型粘膜ワクチンの製造方法を例示することができる。

[0047] さらに、上記(b)工程の後に、

(b') (b) 行程で調製された抗原タンパク質-AD-ビークル複合体を、凍結乾燥することにより、抗原タンパク質-AD-ビークル凍結乾燥体を調製する工程；

及び、上記(c)工程の前に、

(b'') (b') 工程で調製された抗原タンパク質-AD-ビークル凍結乾燥体を、水又は生理食塩水に懸濁して抗原タンパク質-AD-ビークル複合体(均一懸濁液)を調製する工程；を備えていてもよい。

[0048] 上記(a)工程において調製されるAD-ビークル懸濁液としては、 $K_n L_m$ (但し、 n は4-8、 m は11-20)のアミノ酸配列からなる合成ペプチドと、混合脂質とを水に懸濁することにより調製される液であれば特に制限されず、AD-ビークル懸濁液における、混合脂質と合成ペプチドの質量の比率、すなわち、混合脂質：合成ペプチドとしては、100:0.1~50を挙げることができ、100:0.5~10が好ましく、100:1~5がより好ましく、100:1.5~3がさらに好ましい。上記混合脂質と

合成ペプチドは、さらにクロロホルム、メタノール等の有機溶媒に溶解（混合脂質：有機溶媒＝１００：１～５０、好ましくは１００：２～２５、より好ましくは１００：５～１５、さらに好ましくは１００：８～１２）して、減圧乾固又は凍結乾燥により有機溶剤を除いた後で水に懸濁する際に便宜であり、この場合、K n L mのアミノ酸配列からなる合成ペプチドと脂質溶液とを含むＡＤ－ビークル懸濁液となる。

[0049] 上記（ｂ）工程において調製される抗原タンパク質－ＡＤビークル複合体としては、上記（ａ）工程において調製されたＡＤ－ビークル懸濁液について加温と攪拌とを１回又は２回以上行うことにより、疎水性相互作用等により形成される複合体を挙げることができる。上記攪拌としては、水浴中で抗原タンパク質を添加し、５～２０分間、好ましくは８～１２分間振盪攪拌混和することを挙げることができ、上記加温としては、一般的には２０～６０℃、好ましくは４０～５０℃の水浴中における加温を挙げることができるが、抗原タンパク質の熱安定性により加温する温度を考慮に入れて選択することが望ましく、インフルエンザワクチン抗原の場合は３５～４３℃が好ましく、４１～４２℃がより好ましい。

[0050] 上記（ｃ）工程において調製されるグルカン（又はイヌリン）添加抗原タンパク質－ＡＤビークル複合体としては、 β －１，３－グルカンを抗原タンパク質－ＡＤビークル複合体に添加後攪拌することにより得られる均一なグルカン添加抗原タンパク質－ＡＤビークル複合体を挙げることができ、抗原タンパク質－ＡＤビークル複合体が形成された後に β －１，３－グルカン又はイヌリンを添加することが好ましい。抗原タンパク質－ＡＤビークル複合体が形成される前に β －１，３－グルカン又はイヌリンを添加した場合には、ＡＤビークルのアジュバントとしての効果が消滅するおそれがある。均一なグルカン添加抗原タンパク質－ＡＤビークル複合体を調製するためには、ホモジナイザー、ミキサー、振盪器、攪拌器等を用いることが好ましい。

[0051] 上記（ｄ）工程において調製されるワクチン粗液としては、１又は２以上のアミノ酸をグルカン添加抗原タンパク質－ＡＤビークル複合体に添加後攪

拌することにより得られる、均一なワクチン粗液であれば特に制限されず、抗原タンパク質とADベークルとによる抗原タンパク質－ADベークル複合体が形成された後にアミノ酸を添加することが好ましい。抗原タンパク質－ADベークル複合体の形成前にアミノ酸を添加した場合には、ADベークルのアジュバント効果が消滅するおそれがある。均一なグルカン添加抗原タンパク質－ADベークル複合体を調製するためには、ホモジナイザー、ミキサー、振盪器、攪拌器等を用いることが好ましい。したがって、上記（b）工程の後に（d）工程を行い、（d）工程の後に上記（c）工程を行って、ワクチン粗液を調製することも可能である。

[0052] 上記（e）工程において調製される微粒子粉末剤型粘膜ワクチンとしては、ワクチン粗液を凍結乾燥して微粒子粉末剤型化することにより得られたワクチンであれば特に制限されず、凍結乾燥は、公知の凍結乾燥機を用いて行うことができ、上記ワクチン粗液を凍結乾燥して微粒子粉末剤型化できる方法によれば特に制限されないが、例えば、予備凍結プロセスで $-50\sim-80^{\circ}\text{C}$ にてワクチン粗液を5時間以上冷凍した後、凍結乾燥機に凍結試料を挿入し、真空度 $4.0\sim6.0\text{ Pa}$ 、トラップ温度 $-47\sim-50^{\circ}\text{C}$ 、周囲温度は室温の条件で、10時間以上凍結乾燥を実施することで、微粒子粉末剤型化することが好ましい。なお、上記の凍結乾燥は、上記条件において凍結乾燥をすることができる装置により行うことができる。

[0053] 上記（b'）工程において調製される抗原タンパク質－ADベークル凍結乾燥体としては、上記抗原タンパク質－ADベークル複合体を、凍結乾燥することにより得られる固体であれば特に制限されず、上記凍結乾燥の予備凍結プロセス温度としては、 $-80^{\circ}\text{C}\sim-50^{\circ}\text{C}$ を挙げることができ、かかる凍結乾燥体は $-20^{\circ}\text{C}\sim-30^{\circ}\text{C}$ で保存されることが好ましい。

[0054] また、上記（b''）工程において抗原タンパク質－ADベークル複合体均一懸濁液としては、（b'）工程において調製された抗原タンパク質－ADベークル凍結乾燥体を、水又は生理食塩水に懸濁してワクチンの処方に適した所定濃度に調整することにより調製された懸濁液を挙げることができる。

[0055] 上記抗原タンパク質－A D ビークル複合体が形成されているか否かの確認は、例えば、カロリメーターを用いて抗原タンパク質とA D ビークル分子間の疎水性相互作用シグナルを検出することにより確認することができる。カロリメーターは温度一定化において、抗原タンパクとA D ビークルが相互作用するときに生じる反応熱を測定することが可能であり、その反応熱を測定することで分子間の相互作用を確認することができる。さらに、抗原タンパク質－A D ビークル複合体形成量の定量測定は、遠心分離法により沈殿するA D ビークル分画に回収される抗原タンパク質量を、遠心前後の上清の抗原タンパク質量から計算することができる。本発明においては、抗原タンパク質の70%以上がA D ビークル分画に回収されることを確認して複合体が形成された標品と判定して用いることが好ましい。以下に上記抗原タンパク質－A D ビークル複合体形成が形成されている割合を計算するための、遠心分離法による結合率を算出するための方法（結合率算出方法）を例示する。

[0056] 上記結合率算出方法の例としては、H A（A液）と、[H A + A D ビークル]（B液）を作製し、それぞれを振盪攪拌混和し、各溶液を遠心し、遠心後の各上清標品を分取し、それぞれを遠心処理後の試料（C液）及び（D液）とする。各試料のタンパク質濃度を、B C A タンパク質アッセイキットを用いて測定し、遠心処理によって沈殿分画に回収される「A D ビークルと共沈する結合H A タンパク質量」を測定することにより、複合体を形成する、H A とA D ビークルとの結合率を算出することができる。結合率の計算式を以下に示す。

[0057] [数1]

$$\text{HA + ADビークルの結合率 (\%)} = \{[(B-D) / B] - [(A-C) / A]\} \times 100$$

[0058] 上記ワクチンの投与方法としては、公知の方法を用いることができるが、例えば、マウス等の試験動物の鼻腔に投与する場合には、工程（d）によって得られたワクチン粗液を、先端を閉じたエッペンドルフチューブに必要量

を充填して、工程（e）を実施して「ワクチン粗液微粒子粉末剤型を充填したエッペンドルフチューブ」を得ることができる。接種前にエッペンドルフチューブの先端を開放して、試験動物の鼻の入口に押し当てて、エッペンドルフチューブを手指で勢いよく押し、気流に乗せて噴霧投与することにより微粒子粉末を鼻腔に送り込む方法を例示することができる。ヒトに対する投与方法としては、経鼻噴霧用乾燥粉末製剤の鼻腔内投与に適切な公知の手段や単位投薬噴霧デバイス等を用いて投与する方法を挙げることができる。

[0059] また、上記鼻腔への投与により、経鼻吸入、気管又は気管支吸入、及び経肺吸入による投与を行うこともできるが、その場合、微粒子の好ましい粒径により目的とする到達場所を設定することができる。鼻腔を主な到達場所とする場合の微粒子粉末の粒径としては、 $5.0\mu\text{m}\sim 80\mu\text{m}$ が好ましく、 $6.5\mu\text{m}\sim 50\mu\text{m}$ がより好ましく、 $6.5\mu\text{m}\sim 40\mu\text{m}$ がさらに好ましい。気管又は気管支吸入を主な到達場所とする場合の微粒子粉末の粒径としては、 $3.0\mu\text{m}\sim 5.0\mu\text{m}$ が好ましく、肺胞を主な到達場所とする場合の微粒子粉末の粒径としては、 $0.5\mu\text{m}\sim 3\mu\text{m}$ が好ましい。 $0.5\mu\text{m}$ 以下は呼気により体外に放出されやすくなるおそれがある。

[0060] 本発明における粘膜としては、鼻腔を覆っている粘膜；気管粘膜；気管支粘膜；肺胞の粘膜のほか、膣粘膜、小腸の粘膜、大腸の粘膜等全身に位置する粘膜を例示することができ、粘膜において分泌された抗原特異的分泌型IgA（s-IgA）抗体の産生の有無や産生量の測定は、粘膜において分泌された分泌物中のs-IgA抗体量を測定することによって行うことができ、上記分泌物中の抗体量を測定する方法としては、鼻腔における鼻腔洗浄液、膣粘膜における膣洗浄液、小腸における小腸洗浄液、大腸における便、気管粘膜における気管洗浄液、気管支における気管支洗浄液、肺胞における肺胞洗浄液等においてそれぞれの抗体量を測定する方法を挙げることができる。

[0061] 本発明のワクチンの投与後に粘膜において産生誘導され、粘膜において分泌される分泌物中に多く見いだされる抗原特異的s-IgA（分泌型免疫グ

ロブリン A [secretary immunoglobulin A]) 抗体は、粘膜表面で病原体や毒素に結合し、それらの機能を無効化する感染防御的な作用を有する。また、本発明のワクチンの投与後に血中において見いだされる抗原特異的 I g G 抗体は、ワクチン接種部位の粘膜リンパ組織を介して抗原情報が脾臓のリンパ組織に伝達、記憶され、脾臓リンパ組織で産生され血液中に放出された抗体で、血液中に侵入した病原体に結合して無効化することにより、感染重症化を抑制する。この抗原情報は脾臓リンパ組織で減衰しながらも比較的長期間記憶と産生が維持され、再感染時には記憶抗原情報により迅速に抗体産生が立ち上がり、抗原を捕捉することができる。

[0062] 本発明のワクチンは、公知の手段によって製剤化されることができ、薬理学的に許容される基剤及び／又は添加物を適宜添加することもできる。

[0063] 上記薬理学的に許容される基剤及び／又は添加物としては、例えば滑沢剤、結合剤、溶剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤、安定化剤等を挙げることができる。また必要に応じて保存剤、pH調整剤、清涼化剤、抗酸化剤、湿潤化剤、矯臭剤等の添加物を含むことができる。

[0064] 本発明のワクチンは、一態様において鼻腔から咽頭部を経由する気道感染症に対して、感染防御効果を発揮する吸入型又は噴霧型の均一な微粒子粉末の剤型を有するワクチンである。

[0065] 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

実施例

[0066] [実施例 1]

[抗体誘導実験動物]

マウスを用いて、微粒子粉末剤型粘膜ワクチンにおける、鼻腔洗浄液中の抗インフルエンザウイルス特異的 s-IgA (Nasal wash s-IgA) と、血清中の抗インフルエンザウイルス特異的 IgG 抗体 (Serum IgG) の誘導作用を評価した。これ以降の動物実験はすべて徳島大学医学部実験動物センターの感染動物舎 (P2 レベル) で行われ、徳島大学医学

部動物実験委員会のガイドラインに従って行われた。

[0067] 上記マウスとしては、BALB/cマウス（7－8週齢、雌、平均体重20g）を日本チャールズリバー株式会社から購入して用いた。

[0068] [微粒子粉末剤型ワクチンの作製]

インフルエンザウイルスのヘマグルチニン（HA）を抗原タンパク質として、ワクチンとしての効果を検証するため、マウスの鼻腔に投与するための各種微粒子粉末剤型ワクチンを調製した。

[0069] （混合脂質の溶液の調製）

ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、ホスファチジルグリセロール（PG）からなるリン脂質が、10mg/mLの終濃度になるように、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、ホスファチジルグリセロール（PG）、パルミチン酸（PA）を75：25：10（w/w/w）の割合でクロロホルム：メタノール（2：1（v/v））混合液に懸濁し、混合脂質溶液を調製した。

[0070] （K6L16ペプチド含有液の調製）

純度95%以上の合成ペプチドK6L16（KKKKKKLLLLLLLLLLLLLLLLLLLL）（配列番号1）（GenScript社製）を、5.0mg/mLの濃度になるようにメタノールに溶解し、K6L16ペプチド含有液を調製した。

[0071] （AD-ビークルの調製）

上記混合脂質溶液とK6L16ペプチド含有液とを、混合脂質溶液：K6L16ペプチド含有液＝100：2の混合比（質量比）となるように混合し、かかる混合脂質－K6L16混合物4mgを、ロータリーエバポレーターを用いて約40℃で乾固した後、10%エタノール1mLに再懸濁し、約45℃の水浴中で15分間程度振盪混和し、脂質溶液－K6L16混合物の均一懸濁液（AD-ビークルの懸濁液）を調製した。かかるAD-ビークル懸濁液を凍結乾燥機により凍結乾燥したものを、凍結乾燥AD-ビークルとして－30℃にて保存した。

[0072] （抗原タンパク質の調製）

抗原タンパク質としては、インフルエンザウイルスのヘマグルチニン（HA）を使用した。国立感染症研究所供与ワクチン株より第一三共株式会社がワクチン抗原液を調製し、これを徳島大学に有償提供されたA/Singapore/GP1908/2015（H1N1）株からHA抗原タンパク質液を調製した。

[0073] （抗原タンパク質－ADビークル複合体の形成）

前記凍結乾燥ADビークルを室温に戻して超純水に懸濁して再度ADビークル懸濁液とし、かかるADビークル懸濁液に上記HA抗原タンパク質液を、HA抗原タンパク質量（A）に対する混合脂質中のリン脂質の質量（V）の比であるV/Aが10（すなわちHA抗原タンパク質量（A）：混合脂質中のリン脂質の質量（V）＝1：10）となるように添加し、ボルテックスミキサーで均一になるまで懸濁して懸濁液を調製後、かかる懸濁液を42℃の水浴中で10分間振盪混和して、抗原タンパク質とADビークルとを結合させ、抗原タンパク質－ADビークル複合体（HA＋ADビークル）を形成させた。かかる抗原タンパク質－ADビークル複合体を凍結乾燥し、抗原タンパク質－ADビークル凍結乾燥体として－30℃にて保存し、使用時には解凍して純水に懸濁し抗原タンパク質－ADビークル複合体の懸濁液として用いた。なお、これ以降インフルエンザワクチンのHA抗原タンパク質量（A）と混合脂質中のリン脂質の質量（V）とについて、V/A＝10に固定した。なお、抗原タンパク質中のHA抗原分子それ自体の量は、使用したロットでは、抗原タンパク質量の約36%であった。

[0074] （凍結乾燥）

凍結乾燥は、卓上型凍結乾燥機（ラブリコFZ-4.5型真空凍結乾燥機、朝日ライフサイエンス株式会社）を用いた。－80℃にてワクチン粗液を5時間以上予備凍結した後、凍結試料を凍結乾燥機に挿入し、真空度5.0Pa、トラップ温度－50～－47℃、周囲温度は室温の条件で、10時間以上凍結乾燥を実施した。

[0075] （マウスへの投与方法）

[微粒子粉末剤型粘膜ワクチンの投与方法]

微粒子粉末剤型粘膜ワクチンの投与は、ケタラル（62.6 mg/Kg マウス体重）及びセラクタール（12.4 mg/Kg マウス体重）で麻酔した各被検マウスの片鼻の入口に、微粒子粉末剤型粘膜ワクチンを充填したエッペンドルフチューブを当てて、指で押し出し、気流に乾燥粉末を乗せて投与を実施した。各群は4～6匹のマウスから成る。免疫は初回免疫後2週目に同様の組成からなる検体を、それぞれの群に2次免疫、3次免疫として同量経鼻投与した。最終免疫の後2週目に鼻腔洗浄液と血液検体を採取した。

[0076] [マウス鼻腔洗浄液サンプル及び血清サンプルの調製]

3次免疫後2週間目のマウスから、J Immunol. 2006; 176: 1122-1130に記載の方法に準じて、鼻腔洗浄液及び血清を調製し、抗原特異的なs-IgA、IgGの測定を行った。すなわち、ワクチンを投与した各マウスをペントバルビタール麻酔下で開腹開胸して気管を切開し、切開した気管から鼻腔方向へアトム静脈カテーテルを挿入し、1 mLの0.1%BSA（ウシ血清アルブミン）生理食塩水溶液を注入し、鼻から出てきた液を採取し、採取した液をマウス鼻洗浄液サンプルとして用いた。さらに、各マウスについて心臓より採血を行い、5000 rpmにて10分間の遠心分離により血清サンプルを調製した。

[0077] [抗原特異的抗体価の定量方法]

抗原（病原体）特異的抗体価（量）の測定は、鼻腔洗浄液サンプル及び血清サンプル中の抗インフルエンザs-IgA、IgG含有量を、上記J Immunol. 2006; 176: 1122-1130の記載に従い、ELISAアッセイにより定量することにより行った。ELISAアッセイは96ウェルのイムノプレート（Nalgene Nunc International社製、米国）の各ウェルにHA抗原タンパク質として0.1 µgを加え、さらに1 µg/mLのウシ血清アルブミン（BSA, SIGMA社製）と、100 µLのPBS溶液を加え、4℃にて一晩固層化反応を行った。その後洗浄液（50 mM Tris, 0.14 MのNaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0）でプレートを3回すすいだ。各ウェル

に0.15MのNaCl、200 μ Lの1%BSAを含む50mMのTris-HCl緩衝液(pH8.0)を加え、室温で1時間ブロッキング反応を行った。各ウェルを洗浄液で3回すすいだのち、サンプル結合緩衝液(50mMのTris, 0.15MのNaCl, 1%BSA, 0.05%Tween 20, pH8.0)にて適量に希釈した鼻洗浄液又は血清を100 μ L加え、室温で2時間反応させた。Goat anti-mouse IgA又はIgG-horse Radish peroxidase(HRP)(BETHYL LABORATORIES INC.)を二次抗体として用い、TMB Microwell Peroxidase Substrate System(Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. 社製、米国)を用いて発色反応を行った。各ウェルに100 μ L、2MのH₂SO₄(和光純薬株式会社)を添加することによって反応を停止し、450nmの吸光度をSPECTRAMAX PLUS 384で測定した。定量のためのスタンダードとして、上記J Immunol, 2006; 176: 1122-1130の記載に従いアフィニティー精製した抗インフルエンザIgA及びIgGそれぞれ10ngについて同様にして得られた吸光度の検量線を用いた。

[0078] [試験例]

(抗原タンパク質-A Dビークル複合体微粒子粉末剤)

抗原タンパク質-A Dビークル複合体を凍結乾燥して粉末化したものについてマウスの鼻腔へ投与を試みたところ、マウスの鼻腔に到達しなかった。分散剤の役割を果たす成分がないからであると推察した。

[0079] (アミノ酸の添加)

上記抗原タンパク質-A Dビークル複合体溶液に、アミノ酸の中でも一番小さい分子量を有するグリシンを、HA抗原タンパク質濃度([HA])の300倍量となるよう添加し、ホモジナイザーで攪拌することにより、ワクチン液を調製し、凍結乾燥を行うことにより、微粒子粉末剤型粘膜ワクチン(HA + ADvehicle + Gly)(比較例1)を作製した。

[0080] (糖類の添加)

公知の粉末型ワクチンにおいて、イヌリンが賦形剤として使用されている例があるため、糖類について、分散剤として適切なものがないかどうかを検

討した。グルコースが β -1, 4-グルコシド結合した多糖類であるセルロース（034-22221、富士フィルム和光純薬社製）、マンヌロン酸とグルロン酸という二種類のウロン酸が直鎖重合した構造を有するアルギン酸ナトリウム（Sodium alginate）（194-13321、富士フィルム和光純薬社製）、イヌリン（9005-80-5、富士フィルム和光純薬社製）、カードラン（030-09903、富士フィルム和光純薬社製）、ラミナラン（PS131、DEXTRA社製）、ザイモサン（NBP2-26233、NOVUS社製）、イースト β -グルカン（OG30829、Carbosynth社製）を、それぞれGlyを添加した抗原タンパク質-A Dビークル複合体溶液に加え、ホモジナイザーで攪拌後に凍結乾燥を行った。すなわち、グリシンを添加した抗原タンパク質-A Dビークル複合体（HA + ADvehicle + Gly）+セルロース（比較例2）、HA + ADvehicle + Gly + アルギン酸ナトリウム（比較例3）、HA + ADvehicle + Gly + イヌリン（実施例1）、HA + ADvehicle + Gly + カードラン（実施例2）、HA + ADvehicle + Gly + ラミナラン（実施例3）、HA + ADvehicle + Gly + ザイモサン（実施例4）、HA + ADvehicle + Gly + イースト β -グルカン（実施例5）からなる各微粒子粉末剤型粘膜ワクチンを調製して、各被検マウスに投与し、鼻腔洗浄液中のs-IgA、及び血清中のIgG量を測定した。なお、各多糖類の添加量は、HA抗原タンパク質濃度（[HA]）の100倍量とした。結果を表1に示す。

[0081]

[表1]

ワクチン（試料）	鼻腔洗浄液 (Nasal wash) s-IgA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	血清 (Serum) IgG ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
生理食塩水（比較例0）	0.007	0.06
HA + ADvehicle + Gly（比較例1）	1.862	602.47
HA + ADvehicle + Gly + セルロース（比較例2）	0.002	0.20
HA + ADvehicle + Gly + アルギン酸ナトリウム（比較例3）	0.100	144.42
HA + ADvehicle + Gly + イヌリン（実施例1）	7.935	1015.27
HA + ADvehicle + Gly + カードラン（実施例2）	18.426	7911.58
HA + ADvehicle + Gly + ラミナラン（実施例3）	6.793	7778.81
HA + ADvehicle + Gly + ザイモサン（実施例4）	6.095	1162.02
HA + ADvehicle + Gly + イースト β -グルカン（実施例5）	6.743	11436.91

[0082]（結果）

抗原タンパク質（HA）（ $1.5\mu\text{g}$ ）－ADビークル複合体（HA + ADvehicle）にグリシンを添加した、HA + ADvehicle + Gly（比較例1）は、HA + Gly（比較例11）と比較すると、鼻腔洗浄液中のs-IgA産生量は5倍近く、血清中のIgG産生量は約1.7倍程度となったが、鼻腔洗浄液中のs-IgA産生量、血清中のIgG産生量はともに十分高いとはいえなかった。HA + ADvehicle + Glyに、セルロースを添加したワクチンを投与した場合（比較例2）は、ネガティブコントロールの生理食塩水を投与した場合（比較例0）よりも鼻腔洗浄液中のs-IgA産生量が少なく、抗体産生誘導を抑制することが確認された。また、HA + ADvehicle + Glyに、アルギン酸ナトリウム（Sodium alginate）を添加した場合（比較例3）も、鼻腔洗浄液中のs-IgA産生量、血清中のIgG産生量ともに高いとはいえなかった。

[0083] なお、上記検討において、これ以降、添加した抗原タンパク質（HA）の

70%以上が、ADビークル抗原タンパク質（HA）と複合体を形成していたことについては、以下の方法によって確認した。

[0084] カロリーメーター(Malvern Panalytical社製)を用いて抗原タンパク質とADビークル分子間の疎水性相互作用シグナルを検出することにより確認した。結合率の算出では、0.4 mg HA（タンパク質量）／mL（超純水）（A液）と、[0.4 mg HA（タンパク質量）+ 4 mg ADビークル(リン脂質量)]／mL（超純水）（B液）の各1 mL溶液を作製し、それぞれを42℃にて10分間振盪攪拌混和した。それぞれの混和した溶液からタンパク質量測定用として各0.05 mLずつ分取し、分取したそれぞれを遠心処理前の（A液）及び（B液）試料とした。次に各溶液を遠心機（TOMY、MX-305）で4℃にて、20400×g、15分間遠心し、遠心後の各上清標品を0.05 mLずつ分取し、それぞれを遠心処理後の試料（C液）及び（D液）とした。各試料のタンパク質濃度をBCAタンパク質アッセイキット（Thermo Scientific、23227）を用いて測定した。

[0085] 遠心処理によって沈殿分画に回収されるADビークと共沈する結合HA蛋白質量を測定して結合率を算出した。結合率の計算式を以下に示す。

[0086] [数2]

$$\text{HA + ADビークルの結合率 (\%)} = \{[(B-D) / B] - [(A-C) / A]\} \times 100$$

[0087] HA + ADvehicle + Gly（比較例1）に、フルクトース重合体であるイヌリンを添加したワクチンを投与した場合（実施例1）は、HA + ADvehicle + Glyに比べて、鼻腔洗浄液中のs-IgA産生量は4.3倍、血清中のIgG産生量は1.7倍となり、顕著に抗体産生誘導効果が増強されたことが確認された。

[0088] 1) HA + ADvehicle + Glyに、カードランを添加したワクチンを投与した場合（実施例2）は、HA + ADvehicle + Gly（比較例1）に比べて、鼻腔洗浄液中のs-IgA産生量は約9.9倍、血清中のIgG産生量は約13

倍となり、顕著に抗体産生誘導効果が増強されたことが確認された。

2) HA + ADvehicle + Gly に、ラミナランを添加したワクチンを投与した場合（実施例3）は、HA + ADvehicle + Gly（比較例1）に比べて、鼻腔洗浄液中の s-IgA 産生量は約 3.6 倍、血清中の IgG 産生量は約 12.9 倍となり、顕著に抗体産生誘導効果が増強されたことが確認された。

3) HA + ADvehicle + Gly に、ザイモサンを添加したワクチンを投与した場合（実施例4）は、HA + ADvehicle + Gly（比較例1）に比べて、鼻腔洗浄液中の s-IgA 産生量は約 3.3 倍、血清中の IgG 産生量は約 1.9 倍となり、顕著に抗体産生誘導効果が増強されたことが確認された。

4) HA + ADvehicle + Gly に、イースト β -グルカンを添加したワクチンを投与した場合（実施例5）は、HA + ADvehicle + Gly（比較例1）に比べて、鼻腔洗浄液中の s-IgA 産生量は約 3.6 倍、血清中の IgG 産生量は約 18.9 倍となり、顕著に抗体産生誘導効果が増強されたことが確認された。

[0089] したがって、多糖類の中でも、イヌリンと、 β -1, 3-グリコシド結合にて連結されたグルコース重合体を含むグルコースを主要な構成糖とする多糖である、カードラン、ラミナラン、ザイモサン、イースト β -グルカン等の β -1, 3-グルカン（類）を添加した場合に、顕著に抗体産生誘導効果が増強されることが確認された。なお、 β -1, 4-グリコシド結合によりグルコースが重合しているセルロースは抗体産生誘導効果に寄与しないことが確認された。

[0090] [比較検討例]

上記で検討した多糖類について、抗原タンパク質であるヘマグルチニン（HA）にグリシンを添加するが、ADvehicleを添加せずに、凍結乾燥後にマウスの鼻腔に投与した場合（比較例11）との抗体産生誘導効果について確認した。マウス1匹当たりの投与質量は、HA 1.5 μ g、Gly 450 μ g、多糖類はそれぞれ150 μ gとした。結果を以下の表2に示す。

[0091]

[表2]

ワクチン（試料）	鼻腔洗浄液 (Nasal wash) s-IgA ($\mu\text{g/mL}$)	血清 (Serum) IgG ($\mu\text{g/mL}$)
生理食塩水（比較例0）	0.007	0.06
HA + ADvehicle + Gly（比較例1）	1.862	602.47
HA + Gly + セルロース（比較例4）	0.002	0.20
HA + Gly + アルギン酸ナトリウム （比較例5）	0.010	190.01
HA + Gly + イヌリン（比較例6）	0.213	203.14
HA + Gly + カードラン（比較例7）	1.910	801.82
HA + Gly + ラミナラン（比較例8）	2.951	2686.51
HA + Gly + ザイモサン（比較例9）	2.362	583.75
HA + Gly + イースト β -グルカン （比較例10）	5.523	2266.11
HA + Gly（比較例11）	0.380	345.98
HA + ADvehicle + Gly + カードラン （実施例2）	18.426	7911.58

[0092]（結果）

抗原タンパク質であるヘマグルチニン（HA）にADビークルを添加せずに、グリシンを添加し、セルロース（比較例4）やアルギン酸ナトリウム（比較例5）を添加した場合、抗体産生誘導効果の増強の程度は非常に小さかった。また、イヌリン（比較例6）、カードラン（比較例7）、ラミナラン（比較例8）、ザイモサン（比較例9）、イースト β -グルカン（比較例10）を添加した場合についても、それぞれの比較例6-10にADビークルを添加した（実施例1-5）の場合と比べると、抗体産生誘導効果の増強の程度は小さかった。

[0093] また、抗原タンパク質にアミノ酸だけを添加しても（比較例11）、また、さらにイヌリン（比較例6）や β -1,3-グルカンを添加しても（比較例7-10）、抗体産生誘導効果の増強は確認できなかった。また、前記で確認した通り、抗原タンパク質（HA）（ $1.5\mu\text{g}$ ）-ADビークル複合体（HA + AD vehicle）にグリシンを添加した場合（比較例1）も抗体産生誘導効果の顕著な増強は確認できなかった。しかし、さらにADビークルを添加した場合（実施例1-5）では、強い抗体産生誘導効果の増強が確認された。

。したがって、本発明において、ADビークルと、アミノ酸と、 β -1,3-グルカン又はイヌリンとは、抗体産生誘導効果を増強するアジュバントとして相乗効果をもたらす必須の組合せ成分であることが確認された。

[0094] (カードランの検討)

これまでの検討について、カードランに着目してデータをまとめた図1からも明らかなとおり、抗原タンパク質(HA)(1.5 μ g) - ADビークル複合体(HA + ADvehicle)に、グリシンを添加した比較例1と比べると、カードラン150 μ gを添加した、抗原タンパク質(1.5 μ g) - ADビークル複合体(HA + ADvehicle)に、グリシンを添加した実施例2において、抗体産生誘導効果の増強の程度が顕著に大きかった。抗原タンパク質(HA)とグリシン(比較例11)では、ほとんど抗体産生はみられなかった。抗原タンパク質(HA)(1.5 μ g)に、グリシン及びカードランを添加した場合(比較例7)も抗体産生はそれほど増加しなかった。したがって、ADビークル複合体とグリシンとカードランとは、その組合せによる相乗効果によって、鼻腔の粘膜をはじめとする全身の粘膜における抗原特異的s-IgA抗体と、血清中の抗原特異的IgG抗体の産生の増大させることが確認された。

[0095] 次に、カードランの最適な添加濃度を検討することとした。マウス一匹当たり、75、150、300、450 μ gのカードランを添加してワクチンを作製し、抗体誘導効果を検討した。結果を以下の表3に示す。

[0096]

[表3]

ワクチン（試料）	鼻腔洗浄液 (Nasal wash) s-IgA ($\mu\text{g/mL}$)	血清 (Serum) IgG ($\mu\text{g/mL}$)
生理食塩水（比較例0）	0.007	0.06
HA + ADvehicle + Gly + カードラン (75 μg)（実施例6）	3.313	1970.37
HA + ADvehicle + Gly + カードラン (150 μg)（実施例2）	18.426	7901.48
HA + ADvehicle + Gly + カードラン (300 μg)（実施例7）	28.801	8913.55
HA + ADvehicle + Gly + カードラン (450 μg)（実施例8）	33.842	7330.23
HA + Gly + カードラン (150 μg)（比較例12）	0.741	409.54

[0097]（結果）

表3から明らかなとおり、鼻腔洗浄液中のs-IgA濃度は、カードランの濃度に依存して増加傾向を示した。一方、血清中のIgGの濃度は、カードラン添加量150 μg （実施例2）でプラトーを示した。したがって、カードランの最適添加量は、HA抗原タンパク質濃度（[HA]）の100倍量である150 μg 程度であると判断した。なお、グリシンとカードランを添加し、ADビークルを添加しない場合（比較例12）は、顕著な抗体産生増強効果は認められなかった。

[0098]（アミノ酸の検討）

次にグリシン以外のアミノ酸について検討した。カードラン150 μg を添加した、抗原タンパク質（1.5 μg ）-ADビークル複合体（HA + AD vehicle）に、グリシン（実施例2）、アラニン（実施例9）、セリン（実施例10）、トレオニン（実施例11）、ロイシン（実施例12）、イソロイシン（実施例13）、フェニルアラニン（実施例14）、メチオニン（実施例15）、システイン（比較例13）をそれぞれ450 μg 添加してワクチンを作製し、抗体誘導効果を検討した。結果を以下の表4に示す。

[0099]

[表4]

ワクチン（試料）	鼻腔洗浄液 (Nasal wash) s-IgA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	血清 (Serum) IgG ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
HA + ADvehicle + カードラン + Gly (実施例 2)	17.889	8528.10
HA + ADvehicle + カードラン + Ala (実施例 9)	17.388	6819.90
HA + ADvehicle + カードラン + Ser (実施例 10)	10.332	12303.34
HA + ADvehicle + カードラン + Thr (実施例 11)	10.736	6783.88
HA + ADvehicle + カードラン + Leu (実施例 12)	20.008	8526.53
HA + ADvehicle + カードラン + Ile (実施例 13)	14.316	3248.11
HA + ADvehicle + カードラン + Phe (実施例 14)	22.508	11063.56
HA + ADvehicle + カードラン + Met (実施例 15)	8.596	8575.99
HA + ADvehicle + カードラン + Cys (比較例 13)	0.612	363.05

[0100] 表4から明らかなとおり、システインを除く各アミノ酸を添加した場合、グリシンと同様、鼻腔洗浄液中のs-IgAの値、及び血清中のIgGの値が、顕著に上昇したことが確認された。すなわち、フェニルアラニン、ロイシン、アラニン等のアミノ酸はHA特異的s-IgA誘導においてグリシンと同等以上の抗体誘導を、セリン、ロイシン、フェニルアラニン、メチオニン等のアミノ酸は血清中のHA特異的IgG誘導においてグリシンと同等以上の抗体誘導を示した。HA特異的s-IgA誘導及びIgG誘導において、システインを除くいずれのアミノ酸においても特に際立った大きな差異は見られず、システインを除くいずれのアミノ酸も、ADビークルと、 β -1,3-グルカン等の糖類と組み合わせることによりアジュバント成分として使用できると判定した。

[0101] [H1 価]

高分子のタンパク質抗原を含むワクチンは、凍結乾燥に伴う立体構造変化

により、感染防御能の指標となる抗体価の低下がみられることがあることが報告されている。そこで、作製されたワクチンについて感染防御能の指標となるヘマグルチニンインヒビション（HI）価を測定することとした。HI価の測定は、デンカ生研「クラスIII免疫検査用シリーズ インフルエンザウイルスキット・インフルエンザウイルスHI試薬「生研」」を使用し、血清中のインフルエンザウイルスHI抗体価を測定した。実施にあたっては、樹状細胞を刺激するアジュバントとして多くの研究で用いられているpoly（I：C）10 μ gを抗原タンパク質1.5 μ gに添加した試料をポジティブコントロールとして、生理食塩水をネガティブコントロールとして用い、HA+ADvehicle、HA+ADvehicle+カードラン+Gly（実施例2）について比較を行った。なお、HA+poly（I：C）、生理食塩水の検体は、凍結乾燥粉末として鼻腔への薬剤噴霧投与が困難であったことから、投与可能な液剤として経鼻投与した。マウスは各群6匹ずつ検討した。結果を表5に示す。

[0102] [表5]

ワクチン（試料）	HI 価
生理食塩水（比較例0）	0
HA + ADvehicle	40
HA + ADvehicle + カードラン + Gly（実施例2）	80
HA + poly(I:C)	40

[0103] （結果）

抗原タンパク質－ADビークル複合体にカードランとグリシンとを添加した実施例2のワクチンは、ポジティブコントロールとして用いたHA+poly（I：C）よりも、HI価が2倍高いことが確認された。したがって、本発明のワクチンは凍結乾燥を行うことによっても国際的評価基準として評価されるHI $\geq$ 40を満たすばかりか、高い抗体価を維持できることが確認された。かかるすぐれた効果が得られる理由の一つとしては、本発明におけるADビークルは、抗原タンパク質と弱い疎水性相互作用で複合体を形成で

きることから、凍結乾燥工程によるHA抗原のHI価の低下を回避できる保護作用をもたらすからであることが考えられる。

[0104] [全身粘膜組織のs-IgA抗体誘導効果]

本発明のワクチン投与後において、経鼻のみならず全身の各粘膜組織におけるs-IgA抗体の産生量を比較検討した。抗原タンパク質-A/Dビークル複合体にカードランとグリシンとを添加した実施例2のワクチンを2週間隔で合計3回経鼻投与を実施した。A/Dビークルを含まない比較例7を比較対象とした。最終免疫から、2週間後に鼻腔洗浄液(nasal fluids)、膣洗浄液(vaginal fluids)、小腸分泌液((small)intestinal fluids)、大腸の便(feces)を採取して、夫々の洗浄液の遠心上清に含まれる特異的抗インフルエンザA/California/7/2009(H1N1)pdm09の各洗浄液のs-IgA抗体価を測定した。上記データは、1匹当たりの各洗浄液の全体量で示されているが、採取検体全体量は、鼻腔洗浄液は1mL、膣洗浄液は1mL、肺洗浄液は2mL、小腸粘膜液は2mL、大腸は500μLであった。結果を表6に示す。

[0105] [表6]

	Amounts of anti-HA s-IgA (μ g/HEAD) (mean $\pm$ S.D.)			
	Nasal fluids	Vaginal fluids	Intestinal fluids	Feces (in 100mg feces)
HA + カードラン + Gly (比較例7)	4.22 $\pm$ 1.31	4.69 $\pm$ 5.05	1.09 $\pm$ 0.37	5.81 $\pm$ 4.17
HA + ADvehicle + カードラン + Gly (実施例2)	38.02 $\pm$ 11.63	39.91 $\pm$ 36.71	52.47 $\pm$ 20.02	126.99 $\pm$ 103.39

(n = 6)

[0106] (結果)

表6から明らかなとおり、実施例2のマウスが比較例7のマウスよりも1匹当たり高い抗体産生量を示した。また、実施例2の試料をマウスに投与し

た場合には、膣洗浄液において鼻腔洗浄液と同程度の抗体産生量を示し、さらに小腸粘膜液と大腸における便において $s - I g A$ の産生量が顕著に増加した。したがって、本発明の微粒子粉末剤型粘膜ワクチンは、局所的な投与によっても、全身の粘膜組織において、感染防御的な作用を有する $s - I g A$ を産生させることができることが確認された。

[0107] [微粒子粉末のサイズの確認]

実施例2の微粒子粉末剤型粘膜ワクチン $1.5 \mu g$ を、ビニール袋内に噴霧飛散させ、導電性両面テープを貼った測定用ステージ上に飛散粉末を写し取った。飛散粉末が写し取られたステージを金蒸着装置内に入れて金蒸着を実施した。金蒸着終了後測定用ステージを取り出して、走査電子顕微鏡装置（JCM5700、日本電子株式会社製）に挿入し、得られたSEM画像から微粒子粉末の粒径を附属の計測装置にて読み取ってグラフ化した。測定は、画像面積 $3.5 \times 10^{-6} m^2$ 当たりを確認された微粒子粉末244個について行い、長径を粒子径として測定し、粒子径の個数分布表を作成した。結果を図2に示す。

[0108] (結果)

図2から明らかなとおり、金蒸着法により固定化された実施例2の微粒子粉末の粒子径は、 $10 \sim 20 \mu m$ に該当する微粒子が一番多く、 $6.5 \sim 10 \mu m$ に該当する微粒子が次に多く、 $20 \sim 30 \mu m$ に該当する微粒子がその次に多く、 $5 \sim 6.5 \mu m$ に該当する微粒子がまたその次に多く、全体の約80%が $5 \sim 40 \mu m$ の範囲に該当した。

[0109] [ワクチン到達部位の確認]

マウスの鼻腔に投与した微粒子粉末剤型ワクチンの到達部位の確認を行った。抗原としてヘマグルチニンではなく、Alexa647蛍光色素でラベルしたオボアルブミン（OVA）を用いた他は、実施例2のワクチンと同一の組成を有する組成物（OVA抗原 $1.5 \mu g$ + ADビークル $15 \mu g$ + カードラン $150 \mu g$ + Gly（ $450 \mu g$ ））を充填したエッペンドルフチューブを被検マウスの鼻口に押し当てて、押し出す気流に乗せて噴霧投与す

ることにより経鼻投与した。経鼻投与から20分後に、インビボイメージングシステム（IVIS spectrum、パーキンエルマー社製）により、被検マウスの鼻腔、咽頭部、気管、気管支、肺の画像を撮影した。画像を図3に示す。

[0110] （結果）

図3から明らかなとおり、被検マウスの鼻腔、咽頭部において、投与した微粒子粉末が、被検マウスの鼻腔、咽頭部に分布していることが確認された。しかし、気管、気管支、及び肺には微粒子粉末は到達していなかった。この結果は、上記5 μ m以上の微粒子が到達する範囲と一致した。

産業上の利用可能性

[0111] 本発明のワクチンは、医療の分野において非常に有用である。なお、例えば、マウスに感染するよう馴化させたヒト由来のウイルス株等を用いるマウスの実験によって有効性が確認することができるため、当該技術分野においてはマウス等の試験動物の体表面積から、ヒトにおいて同等の作用が発現する用量を推定するHED換算方法や、最高血中濃度（C_{max}）や時間曲線下面積（AUC）のデータを参照する方法等の公知の方法により、ワクチンの投与量について、ヒトへの投与量を推定したうえで、実験データをさらに蓄積させてヒトへの投与量を決定することを行うことができる。

請求の範囲

- [請求項1] 抗原タンパク質と、以下の (A) ～ (D) を含むアジュバントとを包含する、微粒子粉末剤型粘膜ワクチン。
- (A) $K_n L_m$ (但し、 n は 4 – 8、 m は 11 – 20 の整数を表す) のアミノ酸配列からなる合成ペプチド；
- (B) 混合脂質；
- (C) β – 1, 3 – グルカン又はイヌリン；
- (D) アミノ酸；
- [請求項2] $K_n L_m$ (但し、 n は 4 – 8、 m は 11 – 20 の整数を表す) のアミノ酸配列からなる合成ペプチドが、配列番号 1 又は 2 に示されるアミノ酸配列からなることを特徴とする、請求項 1 記載の微粒子粉末剤型粘膜ワクチン。
- [請求項3] 混合脂質が 1 又は 2 以上のリン脂質を含むことを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の微粒子粉末剤型粘膜ワクチン。
- [請求項4] 1 又は 2 以上のリン脂質が、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジリンイノシトール、ホスファチジリエタノールアミン、ホスファチジン酸から選ばれることを特徴とする、請求項 3 記載の微粒子粉末剤型粘膜ワクチン。
- [請求項5] 混合脂質が、ラウリル酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、パルミトオレイン酸、オレイン酸、リノール酸、 γ – リノレン酸、アラキドン酸、 α – リノレン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸から選ばれる 1 又は 2 以上を含むことを特徴とする、請求項 1 ～ 4 のいずれか記載の微粒子粉末剤型粘膜ワクチン。
- [請求項6] 抗原タンパク質が、病原体に由来するタンパク質、不活化抗原タンパク質、リコンビナント抗原タンパク質、又は無毒化毒素タンパク質であることを特徴とする、請求項 1 ～ 5 のいずれか記載の微粒子粉末剤型粘膜ワクチン。

- [請求項7] β -1、3-グルカンが、カードラン、ラミナラン、ザイモサン、イースト β グルカンから選ばれる1又は2種類以上であることを特徴とする、請求項1～6のいずれか記載の微粒子粉末剤型粘膜ワクチン。
- [請求項8] β -1、3-グルカンが、カードランであることを特徴とする、請求項1～6のいずれか記載の微粒子粉末剤型粘膜ワクチン。
- [請求項9] アミノ酸が、グリシン、アラニン、セリン、トレオニン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、メチオニンから選ばれた1又は2種類以上のアミノ酸であることを特徴とする請求項1～8のいずれか記載の微粒子粉末剤型粘膜ワクチン。
- [請求項10] 粘膜において抗原特異的 s-IgA の産生を増強し、又は、血中において抗原特異的 IgG の産生を増強するために用いられることを特徴とする請求項1～9のいずれか記載の微粒子粉末剤型粘膜ワクチン。
- [請求項11] 鼻腔から咽頭部を経由する気道感染症に対して、感染防御効果を発揮する吸入型又は噴霧型の均一な微粒子粉末であることを特徴とする請求項1～10のいずれか記載の微粒子粉末剤型粘膜ワクチン。
- [請求項12] (1) 抗原タンパク質；
(2) K_nL_m (但し、 n は4～8、 m は11～20の整数を表す) のアミノ酸配列からなる合成ペプチド；
(3) 混合脂質；
(4) β -1、3-グルカン又はイヌリン；
(5) アミノ酸；
を含む凍結乾燥された微粒子粉末剤型粘膜ワクチンの製造方法であって、
以下の工程 (a) ～ (e) を備えることを特徴とする前記製造方法。
(a) 前記合成ペプチドと、混合脂質とを水に懸濁することにより、AD-ビークル懸濁液を調製する工程；
(b) AD-ビークル懸濁液に抗原タンパク質を添加し、加温と攪拌とを1回又は2回以上行い、抗原タンパク質-ADビークル複合体を

形成する工程；

(c) 抗原タンパク質－A D ビークル複合体に、 β －1，3－グルカン又はイヌリンを添加後攪拌することによる、グルカン添加抗原タンパク質－A D ビークル複合体を調製する工程；

(d) グルカン添加抗原タンパク質－A D ビークル複合体に、アミノ酸を添加後攪拌することによるワクチン液を調製する工程；

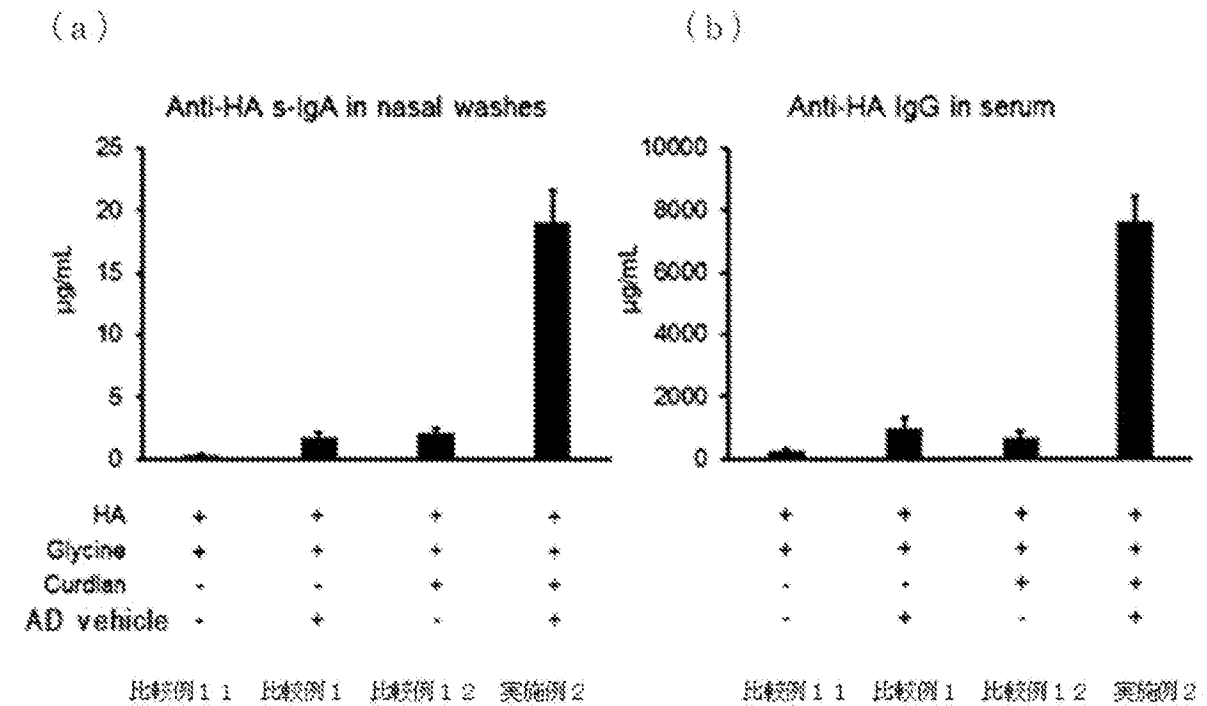
(e) ワクチン液を凍結乾燥して微粒子粉末剤型化する工程；

[請求項13] 混合脂質が、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロール及びパルミチン酸の3種脂質混合脂質であることを特徴とする請求項12記載の微粒子粉末剤型粘膜ワクチンの製造方法。

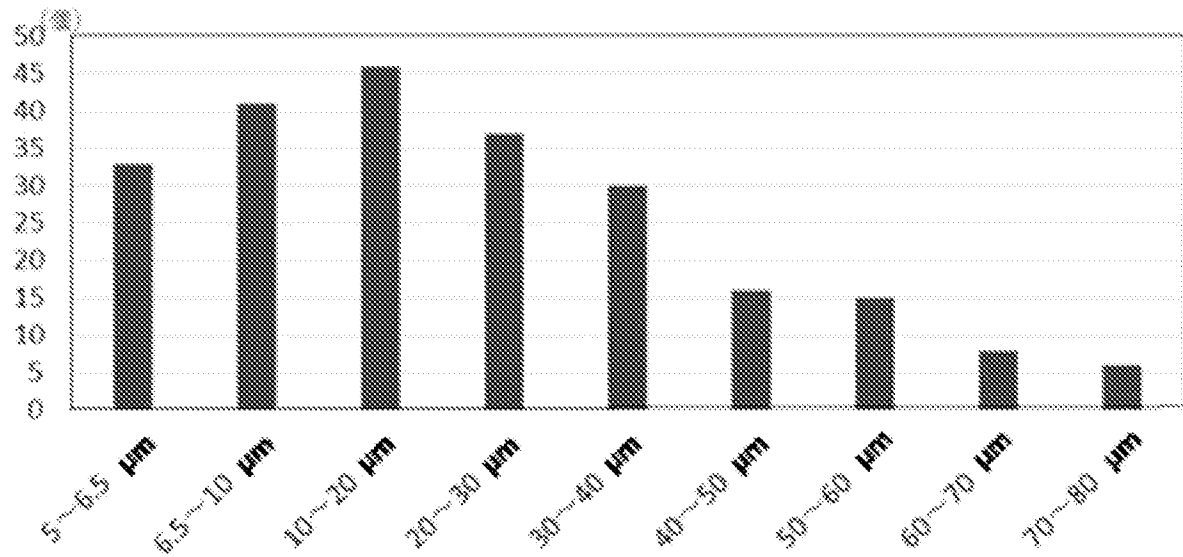
[請求項14] 抗原タンパク質－A D ビークル複合体を形成する(b)工程において、加温の温度設定範囲が25～75℃であることを特徴とする請求項12又は13記載の微粒子粉末剤型粘膜ワクチンの製造方法。

[請求項15] 抗原タンパク質単独では、効果的な免疫誘導と感染防御効果を生じさせることのない量の抗原タンパク質を含み、合成ペプチドと、混合脂質と、 β －1，3－グルカン又はイヌリンと、アミノ酸とを組み合わせることにより、効果的な免疫誘導と感染防御効果を生じさせるために用いられる、請求項12～14のいずれか記載の微粒子粉末剤型粘膜ワクチンの製造方法。

[図1]



[図2]

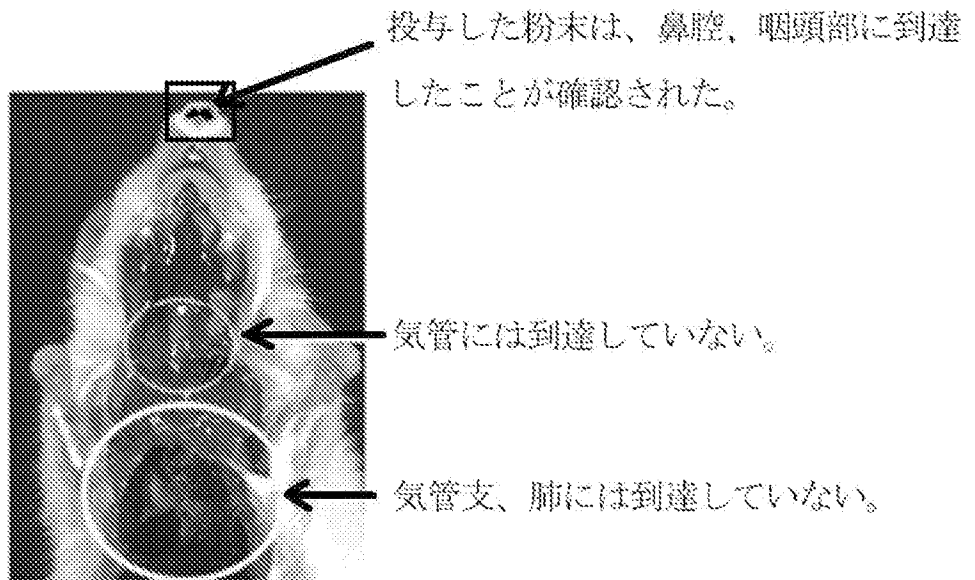


[図3]

濃度大



濃度少



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/004130

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 39/39(2006.01)i; **A61K 9/12**(2006.01)i; **A61K 9/14**(2006.01)i; **A61K 47/18**(2006.01)i; **A61K 47/36**(2006.01)i; **A61P 11/00**(2006.01)i; **A61P 31/16**(2006.01)i; **A61K 39/00**(2006.01)n; **A61K 39/145**(2006.01)n; **C07K 7/08**(2006.01)n; **C07K 14/00**(2006.01)n

FI: A61K39/39 ZNA; A61K9/12; A61K9/14; A61K47/18; A61K47/36; A61P11/00; A61P31/16; A61K39/00 H; A61K39/145; C07K7/08; C07K14/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K39/39; A61K9/12; A61K9/14; A61K47/18; A61K47/36; A61P11/00; A61P31/16; A61K39/00; A61K39/145; C07K7/08; C07K14/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022
Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2009/123119 A1 (TOKUSHIMA UNIVERSITY) 08 October 2009 (2009-10-08) claims, paragraphs [0018]-[0024], examples	1-15
Y	JP 2011-057605 A (MORIYAMA, Masami) 24 March 2011 (2011-03-24) claims, paragraphs [0012], [0031], [0034], [0035]	1-15
Y	WO 2017/047089 A1 (SHIN NIPPON BIOMEDICAL LABORATORIES, LTD.) 23 March 2017 (2017-03-23) claims	1-15
Y	CN 104208029 A (SHANGHAI INSTITUTE OF PHARMACEUTICAL INDUSTRY) 17 December 2014 (2014-12-17) claims, paragraphs [0008], [0037]	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 April 2022

Date of mailing of the international search report

19 April 2022

Name and mailing address of the ISA/JP

**Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan**

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/004130**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	浅桐公男. Inulin: イヌリン. 外科と代謝・栄養. 2020, vol. 54, no. 3, pp. 160, 161, (ASAGIRI, Kimio. Inulin. The Japanese Journal of Surgical Metabolism and Nutrition.) in particular, p. 160, II. Properties and Diverse Applications of Inulin	1-15
Y	JP 60-193925 A (THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE) 02 October 1985 (1985-10-02) claims	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/004130

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/004130

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2009/123119	A1	08 October 2009	US 2011/0110971 A1 claims, paragraphs [0026]-[0038], examples EP 2281574 A1	
JP	2011-057605	A	24 March 2011	(Family: none)	
WO	2017/047089	A1	23 March 2017	JP 2018-533547 A US 2018/0326039 A1	
CN	104208029	A	17 December 2014	(Family: none)	
JP	60-193925	A	02 October 1985	US 4710378 A claims EP 156242 A2	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61K 39/39(2006.01)i; A61K 9/12(2006.01)i; A61K 9/14(2006.01)i; A61K 47/18(2006.01)i; A61K 47/36(2006.01)i; A61P 11/00(2006.01)i; A61P 31/16(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)n; A61K 39/145(2006.01)n; C07K 7/08(2006.01)n; C07K 14/00(2006.01)n FI: A61K39/39 ZNA; A61K9/12; A61K9/14; A61K47/18; A61K47/36; A61P11/00; A61P31/16; A61K39/00 H; A61K39/145; C07K7/08; C07K14/00																				
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） A61K39/39; A61K9/12; A61K9/14; A61K47/18; A61K47/36; A61P11/00; A61P31/16; A61K39/00; A61K39/145; C07K7/08; C07K14/00 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2022年</td> </tr> </table> 国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2022年	日本国実用新案登録公報	1996-2022年	日本国登録実用新案公報	1994-2022年										
日本国実用新案公報	1922-1996年																			
日本国公開実用新案公報	1971-2022年																			
日本国実用新案登録公報	1996-2022年																			
日本国登録実用新案公報	1994-2022年																			
C. 関連すると認められる文献 <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2009/123119 A1 (国立大学法人徳島大学) 08.10.2009 (2009-10-08) 特許請求の範囲, 段落[0018]-[0024], 実施例</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2011-057605 A (森山 雅美) 24.03.2011 (2011-03-24) 特許請求の範囲, 段落[0012], [0031], [0034], [0035]</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2017/047089 A1 (SHIN NIPPON BIOMEDICAL LABORATORIES, LTD.) 23.03.2017 (2017-03-23) 特許請求の範囲</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 104208029 A (SHANGHAI INSTITUTE OF PHARMACEUTICAL INDUSTRY) 17.12.2014 (2014-12-17) 特許請求の範囲, 段落[0008], [0037]</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>浅桐公男, Inulin: イヌリン, 外科と代謝・栄養, 2020, vol.54, no.3, p.160,161 特にp.160;II イヌリンの性質と多様な用途</td> <td>1-15</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	Y	WO 2009/123119 A1 (国立大学法人徳島大学) 08.10.2009 (2009-10-08) 特許請求の範囲, 段落[0018]-[0024], 実施例	1-15	Y	JP 2011-057605 A (森山 雅美) 24.03.2011 (2011-03-24) 特許請求の範囲, 段落[0012], [0031], [0034], [0035]	1-15	Y	WO 2017/047089 A1 (SHIN NIPPON BIOMEDICAL LABORATORIES, LTD.) 23.03.2017 (2017-03-23) 特許請求の範囲	1-15	Y	CN 104208029 A (SHANGHAI INSTITUTE OF PHARMACEUTICAL INDUSTRY) 17.12.2014 (2014-12-17) 特許請求の範囲, 段落[0008], [0037]	1-15	Y	浅桐公男, Inulin: イヌリン, 外科と代謝・栄養, 2020, vol.54, no.3, p.160,161 特にp.160;II イヌリンの性質と多様な用途	1-15
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号																		
Y	WO 2009/123119 A1 (国立大学法人徳島大学) 08.10.2009 (2009-10-08) 特許請求の範囲, 段落[0018]-[0024], 実施例	1-15																		
Y	JP 2011-057605 A (森山 雅美) 24.03.2011 (2011-03-24) 特許請求の範囲, 段落[0012], [0031], [0034], [0035]	1-15																		
Y	WO 2017/047089 A1 (SHIN NIPPON BIOMEDICAL LABORATORIES, LTD.) 23.03.2017 (2017-03-23) 特許請求の範囲	1-15																		
Y	CN 104208029 A (SHANGHAI INSTITUTE OF PHARMACEUTICAL INDUSTRY) 17.12.2014 (2014-12-17) 特許請求の範囲, 段落[0008], [0037]	1-15																		
Y	浅桐公男, Inulin: イヌリン, 外科と代謝・栄養, 2020, vol.54, no.3, p.160,161 特にp.160;II イヌリンの性質と多様な用途	1-15																		
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。																				
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</td> <td>"&" 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</td> <td></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）	"&" 同一パテントファミリー文献	"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献							
* 引用文献のカテゴリー	"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの																			
"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの																			
"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの																			
"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）	"&" 同一パテントファミリー文献																			
"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献																				
"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献																				
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日																			
05.04.2022	19.04.2022																			
名称及びあて先	権限のある職員（特許庁審査官）																			
日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	池上 文緒 4U 3765 電話番号 03-3581-1101 内線 3439																			

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 60-193925 A (財団法人化学及血清療法研究所) 02.10.1985 (1985 - 10 - 02) 特許請求の範囲	1-15

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/004130

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2009/123119	A1	08.10.2009	US 2011/0110971 A1 特許請求の範囲，段落 [0026]-[0038]，実施例 EP 2281574 A1	
JP	2011-057605	A	24.03.2011	(ファミリーなし)	
WO	2017/047089	A1	23.03.2017	JP 2018-533547 A	
				US 2018/0326039 A1	
CN	104208029	A	17.12.2014	(ファミリーなし)	
JP	60-193925	A	02.10.1985	US 4710378 A 特許請求の範囲， EP 156242 A2	