



県神戸市灘区六甲台町 1 - 1 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 岡本明子 (OKAMOTO, Asako) [JP/JP]; 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1 - 1 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 浅田雅宣 (ASADA, Masanori) [JP/JP]; 〒5408566 大阪府大阪市中央区玉造 1 丁目 1 番 3 0 号森下仁丹株式会社内 Osaka (JP). 中辻雅章 (NAKATSUJI, Masaaki) [JP/JP]; 〒5408566 大阪府大阪市中央区玉造 1 丁目 1 番 3 0 号森下仁丹株式会社内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 南條博道 (NANJO, Hiromichi); 〒5300047 大阪府大阪市北区西天満 3 丁目 2 番 9 号翁ビル 5 階 Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM,

KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

リンを発現または菌体外分泌する形質転換微生物が包含されているカプセル製剤であることを特徴とする。微生物としては、ビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) 属、ラクトバチルス (Lactobacillus) 属、ラクトコッカス (Lactococcus) 属などの腸内細菌が用いられる。カプセル製剤の形態は、シームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤、硬カプセル製剤のいずれの形態でもよい。

明 細 書

経口ワクチン

5 技術分野

本発明は、細菌の感染症の予防および治療に有用な経口ワクチンおよびその製造方法に関する。

背景技術

10 腸チフスは、サルモネラ的一种であるチフス菌 (*Salmonella enterica* var. Typhi) によって引き起こされる感染症の一种であり、汚染された飲み水や食物などを摂取することにより、感染に至る。腸チフスは、全世界、特にアジア、中東、東欧、アフリカおよび中南米地域に多発している。年間1, 600万人が腸チフスに罹患し、60万人が命を落としており、犠牲者は主
15 に発展途上国の乳幼児である。現在、サルモネラ菌を起炎菌とする腸チフスに対するワクチンとして、弱毒化サルモネラ菌 (Ty21a) などの経口投与が行われているが、下痢や嘔吐などの副作用を伴うため5歳以下の乳幼児には投与できない。腸チフスは、一旦感染に至ると、体内で抗体が作成されるため、免疫が獲得されるが、この効果は長く持続しない。

20 コレラは、ビブリオ属 (*Vibrio cholerae* 01又は0139) によって引き起こされる感染症の一种である。コレラは、全世界、特にアジア、中東、およびアフリカに多発している。クラシカルコレラは、大流行を幾度となく繰返し、その病原性の強さ (死亡率20%) によって何百万もの人が犠牲となっている。現在、予防接種も行われているが、効果は比較的 low、50%程度である
25 とされている。

細菌性赤痢は、世界中に広く分布する細菌性の感染症であり、特に衛生状

態の悪い国で多く見られる。細菌性赤痢は、シゲラ (Shigella) 属に属する腸内細菌により引き起こされ、病原性が強い順に、Shigella dysenteriae、S. flexneri、S. boydii、およびS. sonneiの4群がある。

上記のように、細菌による種々の感染症があり、効果的な細菌性感染症に
5 対するワクチンが必要とされていることは明らかである。特に、ヒトからヒトに伝染する感染症を防御するためのワクチンが必要とされている。現在、例えば、種々のサルモネラ種に対するいくつかのワクチンが商業的に入手可能である。しかし、これらのワクチンは、時には有効であるが、重大な欠点を有する。これらのワクチンは、一般に、野生型細菌の感染の場合と同等の
10 抗体集団を誘導するため、被験者に過大な負荷を強いることになる。

この問題を解決するために、細菌の鞭毛に着目した研究もなされている。鞭毛は細胞表面から突き出た長い構造体であり、運動性および宿主細胞への侵入において重要な役割を果たす。鞭毛はフラジェリンと称されるタンパク質からなる。このフラジェリンタンパク質は高レベルの抗体を誘導することが知られている。サルモネラ (Salmonella typhimurium) の抗原性タンパク質フラジェリンは、McClelland M.ら、Nature, 413巻, 852頁 (2001) に記載されている。コレラ (Vibrio cholerae) の抗原性タンパク質フラジェリンは、Heiderbergら、Nature, 406巻, 477頁 (2000)に記載されている。また、赤痢菌 (Shigella dysenteriae) の抗原性タンパク質フラジェリンは、
15 Tominaga A.ら、Genes Genet. Syst., 76巻, 111頁 (2001) に記載されている。しかし、このような鞭毛に対する抗体を用いる有効なワクチンは、未だ提供されていない。
20

発明の開示

25 本発明は、感染症を起こす細菌に由来するフラジェリンタンパク質のみでは感染症を発症しないため、このフラジェリンタンパク質をワクチンとして

活用する手段の提供を目的とする。

本発明は、細菌感染性疾患に対する経口ワクチンを提供し、上記経口ワクチンは、カプセル製剤の形態であり、上記カプセル製剤は、カプセル皮膜と抗原タンパク質フラジェリンを発現する形質転換微生物とで構成され、上記
5 カプセル皮膜は耐酸性であり、上記形質転換微生物は上記カプセル皮膜によって包含されている。

本発明はまた、細菌感染性疾患に対する経口ワクチンの第一の製造方法を提供し、この方法は、抗原タンパク質フラジェリンを発現する形質転換微生物を調製する工程；および上記形質転換微生物を耐酸性のカプセル皮膜によ
10 って封入して、耐酸性カプセル製剤を生成する工程；を含む。

本発明はまた、細菌感染性疾患に対する経口ワクチンの第二の製造方法を提供し、この方法は、抗原タンパク質フラジェリンを発現する形質転換微生物を調製する工程；上記形質転換微生物をカプセル皮膜によって封入して、カプセル製剤を生成する工程；および上記生成したカプセル製剤のカプセル
15 皮膜を耐酸性にする工程；を含む。

一つの実施態様においては、上記抗原タンパク質フラジェリンは、上記微生物の菌体内に発現される。

別の実施態様においては、上記抗原タンパク質フラジェリンは、上記微生物の菌体外に分泌される。

一つの実施態様においては、上記微生物は、ビフィドバクテリウム (*Bifidobacterium*) 属、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属、ラクトコッカス (*Lactococcus*) 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、ロイコノストック (*Leuconostoc*) 属、テトラゲノコッカス (*Tetragenococcus*) 属、
20 エノコッカス (*Oenococcus*) 属、およびワイセラ (*Weissella*) 属からなる群に属する微生物から選択される少なくとも1種である。

一つの実施態様においては、上記経口ワクチンは、腸チフス、コレラ、または赤痢に対するワクチンである。

一つの実施態様においては、上記カプセル製剤は、シームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤、または硬カプセル製剤である。

- 5 本発明によれば、抗原性タンパク質であるフラジェリンを発現する形質転換微生物は、耐酸性カプセル製剤中に含有される。そのため、胃酸から形質転換微生物が保護され、生きた形質転換微生物を効果的に腸に送達することができる。この製剤は、腸内で溶解され、放出された形質転換微生物が抗原性を有するタンパク質であるフラジェリンを生産する。フラジェリン自体には感染性はないが、体内で抗体が生産される。特に、ビフィズス菌や乳酸菌などのいわゆる善玉菌といわれる腸内細菌を用いて形質転換微生物を調製したとき、腸内細菌が腸内で生育できる。従って、腸内でフラジェリンタンパク質が産生され、産生されたフラジェリンタンパク質を抗原として体内での抗体産生が誘導される。よって、感染症が抑制され得る。
- 10
- 15 従って、本発明によれば、抗体負荷の小さい細菌性感染症の予防および治療方法を提供することが可能となる。

図面の簡単な説明

図1は、プラスミド pBLE S100 の構造を示す模式図である。

- 20 図2は、フラジェリン発現ベクターとして調製された pBLE S-F1 i C の構造を示す模式図である。

図3は、三層構造でなる、フラジェリン発現形質転換微生物を含有するシームレスカプセル製剤の構成を示す模式断面図である。

- 25 発明を実施するための最良の形態

本発明の細菌感染性疾患に対する経口ワクチンは、カプセル製剤の形態に

ある。本明細書中では、内容物をその中に含むカプセルを「カプセル製剤」という。本発明におけるカプセル製剤は、カプセル皮膜と抗原タンパク質フラジェリンを発現する形質転換微生物とで構成され、このカプセル皮膜は耐酸性である。耐酸性であるカプセル皮膜と抗原タンパク質フラジェリンを発現する形質転換微生物とで構成されるカプセル製剤とは、耐酸性のカプセル皮膜を有し、そして抗原タンパク質フラジェリンを発現する形質転換微生物をカプセル内容物として含有する限り、任意の構成および形状をとり、当該カプセル製剤が、さらなる構成要素を含んでいることを除外しない。したがって、抗原タンパク質フラジェリンを発現する形質転換微生物が、耐酸性のカプセル皮膜によって包含されている、または封じ込められている（すなわち、耐酸性の皮膜によって形成されるカプセルの内部領域に含有されている）。本明細書中では、このカプセル製剤を「耐酸性カプセル製剤」ともいう。

以下、経口ワクチンの調製のためのフラジェリン遺伝子の取得、フラジェリン発現ベクターの調製、フラジェリンを発現する形質転換微生物の調製、形質転換微生物を含有する耐酸性カプセル製剤の製造、および細菌感染性疾患に対する経口ワクチンについて、順に説明する。

1. フラジェリン遺伝子の取得

フラジェリンをコードする遺伝子は、公知の遺伝子配列に基づいて、入手可能である。フラジェリンをコードする遺伝子は、例えば、感染症病原細菌（例えば、サルモネラ、コレラ菌、または赤痢菌）から調製したゲノムDNAあるいはcDNAを鋳型とし、該細菌のフラジェリンの構造遺伝子の配列情報に基づいて作製したプライマー対を用いてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）で増幅し、取得し得る。

腸チフスのフラジェリンをコードする遺伝子は、McClelland M. ら、Natur

e, 413巻, 852頁 (2001) に記載されたサルモネラ (*S. typhimurium*) のフラジェリンの構造遺伝子配列から入手可能である。例えば、*S. typhimurium* の染色体DNAあるいはcDNAを鋳型とし、配列表の配列番号1および2の配列をプライマーとするポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) で増幅し、入手
5 できる。

コレラのフラジェリンをコードする遺伝子は、Heiderbergら, *Nature*, 406巻, 477頁 (2000) に記載されたコレラ菌 (*Vibrio cholerae*) のフラジェリンの構造遺伝子から入手可能である。例えば、*V. cholerae*の染色体DNAあるいはcDNAを鋳型とし、配列表の配列番号3および4の配列をプライ
10 マーとするPCRで増幅し、入手できる。

赤痢のフラジェリンをコードする遺伝子は、Tominaga A. ら, *Genes Genet. Syst.*, 76巻, 111頁 (2001) に記載された赤痢菌 (*Shigella dysenteriae*) のフラジェリンの構造遺伝子から入手可能である。例えば、*S. dysenteriae* の染色体DNAあるいはcDNAを鋳型とし、配列表の配列番号5および6
15 の配列をプライマーとするPCRで増幅し、入手できる。

2. フラジェリン発現ベクターの調製

上記1. のように調製されたフラジェリン遺伝子をプラスミドに導入し、発現ベクターを調製する。発現ベクターの調製に用いられるプラスミドとしては、腸内細菌で発現可能なプラスミドであれば特に制限はない。ビフィド
20 バクテリウム (*Bifidobacterium*) 属の微生物に由来するプラスミド (例えば、pTB4、pTB6、pTB10、pBL67またはpBL78)、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属の微生物に由来するプラスミド (例えば、プラスミドpC194) などが用いられる。これらのプラスミドと大
25 腸菌のプラスミドとの複合プラスミドもまた用いられる (例えば、特開平5-130876号公報参照)。

発現の安定性および形質転換株の調製のためのDNAの調製の容易さという観点から、上記プラスミドの中でも、ビフィドバクテリウム・ロングム (*B. longum*) のプラスミドと大腸菌のプラスミドとから合成された複合プラスミドが好ましい。

- 5 発現ベクターは、形質転換株を選択する観点から、抗生物質耐性、アミノ酸要求性などの選択マーカーを有することが好ましい。

発現ベクターは、フラジェリンの発現のために、または発現に有利となるように、調節配列を付加したものが好ましい。調節配列としては、例えば、プロモーター配列、リーダー配列、プロペプチド配列、エンハンサー配列、
10 シグナル配列、ターミネーター配列などが挙げられる。これらの調節配列は、腸内細菌で発現するものであれば、その由来は特に制限はない。

- プロモーター配列としては、腸内細菌で発現するものであれば特に制限はない。発現効率の観点からは、ビフィドバクテリウム・ロングム (*B. longum*) のヒストン様タンパク (HU) のプロモーター配列 (以下、HUプロモーターということがある) が好ましく用いられる。例えば、*B. longum* の染色体DNAあるいはcDNAを鋳型とし、配列表の配列番号7および8の配列をプライマーとして、配列表の配列番号9および10のHU遺伝子の配列
15 (*Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66 (3), 598-603 (2002)) 中、塩基配列1~192位の配列を増幅し、回収することにより、HUプロモーター遺伝子が得られる。プライマー配列に適切な制限酵素部位 (配列番号7ではHind III、配列番号8ではNcoI) を付加することにより、容易に、プラスミドに
20 組み込むことができる。

- また、発現効率を高める観点からは、ターミネーター配列を有することが好ましい。ターミネーター配列としては、上記HU遺伝子のターミネーター配列が好ましく用いられ、配列表の配列番号9の475~600位の塩基配列である。
25

その他、必要に応じて、リーダー配列、プロペプチド配列、エンハンサー配列、シグナル配列などを配置することができる。例えば、分泌のためのリーダー配列およびシグナル配列を備え、微生物菌体外にフラジェリンを分泌できるようにすることが好ましい。

- 5 このように、上記のプラスミドに、必要に応じて、プロモーター配列、ターミネーター配列などの調節配列、および選択マーカー遺伝子を導入して、クローニングベクターが調製される。クローニングベクターのプロモーターの下流には、マルチクローニングサイトを有するリンカーなどを備えていることが好ましい。このようなリンカーを用いることにより、フラジェリンを
- 10 コードする遺伝子（DNA）がプロモーターの下流に、かつ、インフレームでフラジェリンを発現することができるように、組み込まれる。

- クローニングベクター用のプラスミドとしては、pBLES100、pBLEM100などが挙げられる。図1にpBLES100の構造模式図を示す。このプラスミドpBLES100は、大腸菌のベクターpBR322由来のPstI-EcoRI断片およびPstI-HindIII断片（合計4.4kbp：図1の直線部分）、*B. longum*のベクターpTB6由来のPstI-PstI断片（3.6kbp：図1の黒帯部分）、ならびにエンテロコッカス・フェカリス（*Enterococcus faecalis*）由来のスペクチノマイシンアデニルトランスフェラーゼ（spectinomycin adenyltransferase：SpR）をコードする領域（1.1kbp：図1の白抜き矢印）を含む。
- 15
- 20

- 例えば、プラスミドpBLES100は、以下のようにして調製される。*B. longum*由来のプラスミドであるpTB6をPstIで切断し、大腸菌のクローニングベクターpBR322（タカラバイオ社製）のPstI部位に導入する。さらに、エンテロコッカス・フェカリスのSpRをコードするHindIII-EcoRI断片領域をpBR322のEcoRI-HindIII部位に挿入する。
- 25

このプラスミドpBLES100に上記取得したHUプロモーター配列お

よびフラジェリン遺伝子（以下、F l i C遺伝子ということがある）断片をインフレームで組み込むことにより、フラジェリンを発現するベクターが得られる。具体的に例示すると、NcoI切断部位を有する配列番号1の配列とBamHI切断部位を有する配列番号2の配列とを一对のプライマーとし、*S. typhimurium*の染色体DNAを鋳型としてPCRで増幅し、増幅した断片をNcoIおよびBamHIで切断し、フラジェリン遺伝子断片を調製する。他方で、HindIII部位を有する配列番号7のプライマーとNcoI部位を有する配列番号8のプライマーとを一对のプライマーとし、*B. longum*の染色体DNAを鋳型としてPCRを行い、増幅した断片をHindIIIおよびNcoIで切断し、HUプロモーター断片を調製する。これらの断片を、HindIIIおよびBamHIで切断したpBLES100とライゲーションすることにより、HUプロモーター遺伝子（図2中「h u p P」）の下流にサルモネラのフラジェリン遺伝子（図2中「フラジェリン」）が組み込まれたフラジェリン発現ベクターpBLES-F l i Cが得られる。この発現ベクターpBLES-F l i Cを図2に示す。このような方法で得られるフラジェリン発現ベクターは、腸内細菌の形質転換に用いられる。

菌体外に分泌発現するためには、プラスミドpBLES100に分泌シグナルペプチド遺伝子断片およびフラジェリン遺伝子（F l i C遺伝子）断片をインフレームで組み込むことにより作製したベクターが用いられ得る。具体的に例示すると、NcoI切断部位を有する配列番号1の配列とBamHI切断部位を有する配列番号2の配列とを一对のプライマーとし、*S. typhimurium*の染色体DNAを鋳型としてPCRで増幅し、増幅した断片をNcoIおよびBamHIで切断し、フラジェリン遺伝子断片を調製する。他方で、HindIII部位を有する配列番号11のプライマーとNcoI部位を有する配列番号12のプライマーとを一对のプライマーとし、*B. bifidum*の染色体DNAを鋳型としてPCRを行い、増幅した断片をHindIIIおよびNcoIで切断し、分泌シグナルペプ

チド遺伝子断片を調製する。これらの断片を、BamHIおよびHindIIIで切断したpBLES100と混合することにより、分泌シグナルペプチド遺伝子断片の下流にサルモネラのフラジェリン遺伝子が組み込まれたフラジェリン分泌型発現ベクターpBLES-SP-Fl i Cが得られる。このような方法
5 で得られるフラジェリン発現ベクターは、腸内細菌の形質転換に用いられる。

3. フラジェリンを発現する形質転換微生物の調製

フラジェリンが発現される宿主の微生物としては、ヒトあるいは動物の大腸および小腸内で生育できる細菌（腸内細菌）であれば特に制限はない。宿主細菌が腸内で生育することにより、フラジェリンが発現される。発現され
10 たフラジェリンは、腸から血液中に吸収され、抗原性を発揮し、抗体が惹起される。ビフィズス菌や乳酸菌などのいわゆる善玉菌といわれる腸内で生育可能な細菌（すなわち、腸内細菌）を好都合に利用し得る。

好ましい微生物としては、例えば、ビフィドバクテリウム属、ラクトバチルス属、ラクトコッカス属、ペディオコッカス属、ストレプトコッカス属、
15 エンテロコッカス属、ロイコノストック属、テトラゲノコッカス属、エノコッカス属、およびワイセラ属に属する微生物が挙げられる（これらを総称して「乳酸菌」ともいう）。

ビフィドバクテリウム属に属する微生物（これらを総称して「ビフィズス菌」ともいう）としては、例えば、ビフィドバクテリウム・アドレスセンチ
20 イス (*Bifidobacterium adolescentis*)、ビフィドバクテリウム・アングラタム (*B. angulatum*)、ビフィドバクテリウム・アニマリス・サブスピーシス・アニマリス (*B. animalis* subsp. *animalis*)、ビフィドバクテリウム・アニマリス・サブスピーシス・ラクティス (*B. animalis* subsp. *lactis*)、
25 ビフィドバクテリウム・アステロイデス (*B. asteroides*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*B. bifidum*)、ビフィドバクテリウム・ボウム

(*B. boum*)、ビフィドバクテリウム・ブレベ (*B. breve*)、ビフィドバクテリウム・カテヌラタム (*B. catenulatum*)、ビフィドバクテリウム・ケリナム (*B. choerinum*)、ビフィドバクテリウム・コリネフォーム (*B. coryneforme*)、ビフィドバクテリウム・クニクリ (*B. cuniculi*)、ビフィドバクテリウム・デンティコレンス (*B. denticolens*)、ビフィドバクテリウム・デンティウム (*B. dentium*)、ビフィドバクテリウム・ガリクム (*B. gallicum*)、ビフィドバクテリウム・ガリナラム (*B. gallinarum*)、ビフィドバクテリウム・グロボサム (*B. globosum*)、ビフィドバクテリウム・インディカム (*B. indicum*)、ビフィドバクテリウム・インファンティス (*B. infantis*)、ビフィドバクテリウム・イノピナタム (*B. inopinatum*)、ビフィドバクテリウム・ラクティス (*B. lactis*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*B. longum*)、ビフィドバクテリウム・マグナム (*B. magnum*)、ビフィドバクテリウム・メリシカム (*B. merycicum*)、ビフィドバクテリウム・ミニナム (*B. minimum*)、ビフィドバクテリウム・パーブロラム (*B. parvulorum*)、ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラタム (*B. pseudocatenulatum*)、ビフィドバクテリウム・シュードロングム・サブスピーシス・グロボスム (*B. pseudolongum* subsp. *globosum*)、ビフィドバクテリウム・シュードロングム・サブスピーシス・シュードロングム (*B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum*)、ビフィドバクテリウム・プロルム (*B. pullorum*)、ビフィドバクテリウム・ルミナル (*B. ruminale*)、ビフィドバクテリウム・ルミナンティアム (*B. ruminantium*)、ビフィドバクテリウム・セクラル (*B. saeculare*)、ビフィドバクテリウム・スカードビ (*B. scardovii*)、ビフィドバクテリウム・ズブチル (*B. subtile*)、ビフィドバクテリウム・スイス (*B. suis*)、ビフィドバクテリウム・サームアシドフィルム (*B. thermacidophilum*)、およびビフィドバクテリウム・サームフィルム (*B. thermophilum*) が挙げられる。

この中でも、ビフィドバクテリウム・アドレスセンチス (*Bifidobacterium adolescentis*)、ビフィドバクテリウム・アニマリス・サブスピーシス・アニマリス (*B. animalis* subsp. *animalis*)、ビフィドバクテリウム・アニマリス・サブスピーシス・ラクティス (*B. animalis* subsp. *lactis*)、
5 ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*B. bifidum*)、ビフィドバクテリウム・ブレベ (*B. breve*)、ビフィドバクテリウム・ラクティス (*B. lactis*)、ビフィドバクテリウム・ロングム (*B. longum*)、およびビフィドバクテリウム・シュードロングム・サブスピーシス・シュードロングム (*B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum*) が好ましく用いられる。

10 ラクトバチルス属に属する微生物としては、例えば、ラクトバチルス・アシドフィルス (*Lactobacillus acidophilus*)、ラクトバチルス・アミロボラス (*L. amylovorus*)、ラクトバチルス・アニマリス (*L. animalis*)、ラクトバチルス・ブレビス (*L. brevis*)、ラクトバチルス・ブレビス・サブ
15 スピーシス・グラベセンシス (*L. brevis* subsp. *gravesensis*)、ラクトバチルス・ブフネリ (*L. buchneri*)、ラクトバチルス・ブルガリクス (*L. bulgaricus*)、ラクトバチルス・カゼイ (*L. casei*)、ラクトバチルス・カゼイ・サブスピーシス・カゼイ (*L. casei* subsp. *casei*)、ラクトバチルス・カゼイ・サブスピーシス・プランタラム (*L. casei* subsp. *plantarum*)、ラクトバチルス・カゼイ・サブスピーシス・トレランス (*L. casei* subsp. *tolerans*)、ラクトバチルス・セロビオサス (*L. cellobiosus*)、ラ
20 クトバチルス・カーバタス (*L. curvatus*)、ラクトバチルス・デルブルッキ (*L. delbrueckii*)、ラクトバチルス・デルブルッキ・サブスピーシス・ブルガリクス (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)、ラクトバチルス・デルブルッキ・サブスピーシス・デルブルッキ (*L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*)、ラクトバチルス・デルブルッキ・サブスピーシス・ラクティス
25 (*L. delbrueckii* subsp. *lactis*)、ラクトバチルス・ディバージェンス

(*L. divergens*)、ラクトバチルス・ファーメンタム (*L. fermentum*)、ラクトバチルス・フルクトサス (*L. fructosus*)、ラクトバチルス・ガセリ (*L. gasseri*)、ラクトバチルス・ヒルガルディ (*L. hilgardii*)、ラクトバチルス・ケフィール (*L. kefir*)、ラクトバチルス・ライヒマニイ (*L. 1 eichmannii*)、ラクトバチルス・パラカゼイ (*L. paracasei*)、ラクトバチルス・パラカゼイ・サブスピーシス・パラカゼイ (*L. paracasei subsp. pa racasei*)、ラクトバチルス・ペントーサス (*L. pentosus*)、ラクトバチルス・プランタラム (*L. plantarum*)、ラクトバチルス・ロイテリ (*L. reute ri*)、ラクトバチルス・ラムノーザス (*L. rhamnosus*)、ラクトバチルス・サケイ (*L. sakei*)、ラクトバチルス・サケイ・サブスピーシス・サケイ (*L. sakei subsp. sakei*)、ラクトバチルス・サンフランシスコ (*L. sanf rancisco*)、ラクトバチルス・バチノステルクス (*L. vaccinostrcus*)、およびラクトバチルス・スピーシス (*Lactobacillus sp.*) が挙げられる。

ラクトコッカス属に属する微生物としては、例えば、ラクトコッカス・ガルビエ (*Lactococcus garvieae*)、ラクトコッカス・ラクティス (*L. lacti s*)、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシス・ホードニエ (*L. lact is subsp. hordniae*)、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシス・ラクトティス (*L. lactis subsp. lactis*)、ラクトコッカス・プランタラム (*L. plantarum*)、およびラクトコッカス・ラフィノラクティス (*L. raffinola ctis*) が挙げられる。

ペディオコッカス属に属する微生物としては、例えば、ペディオコッカス・ペントサセウス (*Pediococcus pentosaceus*)、およびペディオコッカス・アシディラクティシ (*P. acidilactici*) が挙げられる。

ストレプトコッカス属に属する微生物としては、例えば、ストレプトコッカス・ボビス (*Streptococcus bovis*)、ストレプトコッカス・クレモリス (*S. cremoris*)、ストレプトコッカス・フェーカリス (*S. faecalis*)、ス

トレプトコッカス・ラクティス (*S. lactis*)、ストレプトコッカス・ピオジェネス (*S. pyogenes*)、およびストレプトコッカス・サーモフィラス (*S. thermophilus*) が挙げられる。

5 エンテロコッカス属に属する微生物としては、例えば、エンテロコッカス・カセリフラブス (*Enterococcus casseliflavus*)、およびエンテロコッカス・フェカーリス (*E. faecalis*) が挙げられる。

10 ロイコノストック属に属する微生物としては、例えば、ロイコノストック・シトリウム (*Leuconostoc citreum*)、ロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*)、ロイコノストック・メセンテロイデス・サブスピーシス・メセンテロイデス (*L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*)、およびロイコノストック・メセンテロイデス・サブスピーシス・デキストラニキウム (*L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*) が挙げられる。

15 テトラゲノコッカス属に属する微生物としては、例えば、テトラゲノコッカス・ハロフィラス (*Tetragenococcus halophilus*)、およびテトラゲノコッカス・ミュリアティクス (*T. muriaticus*) が挙げられる。

エノコッカス属に属する微生物としては、例えば、エノコッカス・エニ (*Oenococcus oeni*) が挙げられる。

20 ワイセラ属に属する微生物としては、例えば、ワイセラ・ビリデセンス (*Weissella vilidescens*) が挙げられる。

フラジェリン発現ベクターの腸内細菌への導入方法に特に制限はなく、当業者が通常用いる方法が用いられる。例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、カルシウムイオンを用いる方法、プロトプラスト法などを挙げることができる。エレクトロポレーション法が
25 好ましく用いられる。エレクトロポレーション法による場合、0.5~20 kV/cm、0.5 μ sec~10 msecの条件で行うことが可能である。

より好ましくは、 $2\sim 10\text{ kV/cm}$ 、 $50\ \mu\text{sec}\sim 5\text{ msec}$ で行うことが望ましい。

形質転換株は、フラジェリン発現ベクターが有する選択マーカーで選択される。形質転換株を培養する培地としては、宿主微生物それぞれに適した培地、例えば、ブドウ糖血液肝臓（BL）寒天培地、デ・マンローゴサーシャープ（MRS）寒天培地、岐阜大学嫌気性（GAM）寒天培地、改良GAM（TGAM）寒天培地、ブリッグス（Briggs）寒天培地、および酵母エキスブドウ糖ペプトン（YGP）寒天培地が挙げられる。これらの培地に選択マーカーに応じて抗生物質を添加し、あるいはアミノ酸を欠失または添加し、選択圧とする。

得られた形質転換微生物のフラジェリン発現の確認は、例えば、ウェスタンブロッティング法で行うことができる。まず、形質転換微生物を、例えば、非イオン性界面活性剤を用いて、溶菌する。非イオン性界面活性剤としては、ポリオキシエチレンソルビタンエステル（Tween（登録商標）20、40、60、65、80、85）、ソルビタンエステル（Span（登録商標）20、40、60、65、80、85）などが挙げられる。次いで、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（Tris）-塩酸緩衝液などを用いて希釈し、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル（SDS-PAGE）、トリス-グリシン-ポリアクリルアミドゲルなどを用いて電気泳動を行う。次いで、ニトロセルロース、ポリビニリデンフルオリド（PVF）膜などに転写し、フラジェリンに対する抗体（免疫グロブリンG（IgG））と反応させ、さらに蛍光標識を有する2次抗体で反応させることにより、フラジェリンの発現を確認できる。形質転換微生物のフラジェリン分泌発現は、形質転換株を選択した後に遠心分離して上清を得、この上清に対して上記と同様にしてウェスタンブロッティングを行うことにより確認し得る。

フラジェリンの発現が確認された形質転換微生物は、当業者が通常用いる方法により培養し、回収して、そのまま製剤の製造に用いてもよい。あるいは、乾燥して用いてもよい。乾燥は、凍結乾燥、低温乾燥などの低温処理を行い、腸内環境あるいは培地などの生育条件下に曝したときに生育可能となるような処理方法により行われる。

4. 形質転換微生物を含有する耐酸性カプセル製剤の製造

フラジェリンタンパク質を発現する形質転換微生物が経口ワクチンとして機能するためには、この形質転換微生物が胃を通過し、腸に到達し、そこで生育できるようにしなければならない。ところで、胃のpHは1~3であり、この著しく低いpHのため、経口摂取された乳酸菌などの腸内細菌は、その大部分が死滅する。増殖能を有したまま腸まで達する腸内細菌は、一般に、投与量の10000分の1以下とも言われている。従って、本発明で用いる形質転換微生物がヒトの腸内に生存したまま到達し、かつ、腸内で増殖してフラジェリンを発現するためには、形質転換微生物が胃酸による影響を極力受けないようにすることが必要である。

そのため、本発明においては、耐酸性のカプセル皮膜によって形質転換微生物が包含されまたは封じ込められている、すなわち、耐酸性の皮膜のカプセルの内側に形質転換微生物が含有されている、カプセル製剤とする。カプセル製剤の構成、形状などは、皮膜が胃酸に対して耐性を有する限り、特に制限がない。すなわち、胃酸がカプセル内に浸入し、形質転換微生物と接触しないように構成することが望ましい。カプセル皮膜は、pH4以下、好ましくはpH1~3で溶解しない皮膜であり得る。カプセル化法も特に制限はない。

(シームレスカプセル製剤)

胃酸に対して耐性を付与するためのカプセルの形状としては、好ましくは、シームレスカプセルが挙げられる。「シームレスカプセル」とは、軟カプセルの一種であり、継ぎ目のない皮膜で内容物を封入する形態のカプセルをいう。シームレスカプセルは、二層以上の多層構造が可能であり、三層またはそれ以上の多層構造を有することが好ましい。通常、最内層に内容物（本発明の場合は、形質転換微生物）を含み得、そして外層（または最外層）が皮膜となり得る。言い換えれば、形質転換微生物が皮膜によって包含された形態である。

以下に、三層構造のシームレスカプセル製剤の調製について説明する。図3は三層構造のシームレスカプセル製剤の模式断面図である。この三層構造は、最内層、この最内層を覆う内皮層、およびこの内皮層を覆う外層からなる。

最内層は、上記形質転換微生物、およびこの形質転換微生物を懸濁／混合するための非水性溶媒または固体成分（以下、この成分を最内層用物質という）からなる。最内層用物質には特に制限がない。例えば、各種油脂類、脂肪酸類、糖の脂肪酸エステル、脂肪族炭化水素、芳香族炭化水素、鎖状エーテル、高級脂肪酸エステル、高級アルコール、テルペン類が挙げられる。具体的には、大豆油、胡麻油、パーム油、パーム核油、コーン油、綿実油、椰子油、ナタネ油、カカオ脂、牛脂、豚脂、馬油、鯨油、融点が40℃以下である上記天然油脂の水添油脂、マーガリン、ショートニング、グリセリン脂肪酸エステル、蔗糖脂肪酸エステル、樟脳油、薄荷油、 α -ピネン、D-リモネンなどが挙げられるが、これらに限定されない。これらの最内層用物質は、単独でまたは2種以上を混合して用いることができる。

内皮層の材料としては、上記最内層用物質のうち、融点が20℃～50℃であり、かつ最内層と異なる物質が用いられる。より好ましくは、常温で固体の物質が用いられる。以下の実施例において、最内層用物質として融点が

3 4℃の水添パーム核油、および内皮層の材料として融点が4 3℃の水添パーム核油を用いたように、最内層用物質および内皮層の材料としてそれぞれ融点が異なるように水添処理された同種の油脂を用いることもできる。この内皮層は、水分および酸素の透過を抑制し、胃酸との接触を防ぐように働き得る。どのような物質を選択するかは、カプセルの保存期間などを考慮して決定することができる。

外層（三層構造以上の場合は最外層）の材料としては、タンパク質と水溶性多価アルコールとの混合物、タンパク質と水溶性多価アルコールと多糖類との混合物、多糖類と水溶性多価アルコールとの混合物などが挙げられる。タンパク質としては、例えば、ゼラチンおよびコラーゲンが挙げられる。水溶性多価アルコールとしては、例えば、ソルビトール、マンニトール、グリセリン、プロピレングリコールおよびポリエチレングリコールが挙げられる。多糖類としては、寒天、ゲランガム、キサントガム、ローカストビーンガム、ペクチン、アルギン酸塩、カラギナン、アラビアガム、デキストリン、変性デキストリン、デンプン、化工デンプン、プルラン、ペクチン、およびカルボキシメチルセルロース塩が挙げられる。ペクチン、アルギン酸塩、ゲランガム、もしくはカラギナンを使用する場合は、適宜アルカリ金属塩やアルカリ土類金属塩を添加してもよい。

上記の三層構造のシームレスカプセル剤の調製は、当業者に周知の技術、例えば、特許第1 3 9 8 8 3 6号明細書に記載されている三重ノズルを用いる滴下法で行われる。この滴下法では、同心三重ノズルの最内側ノズルから形質転換微生物（例えば、凍結乾燥菌体）と合わせた最内層用物質（好ましくは、20～50℃で非流動性である疎水性溶媒物質中への形質転換微生物（好ましくは、凍結乾燥菌体）の懸濁液）を、中間ノズルから内皮層を構成する物質（例えば、常温では固体である物質の融解液）を、そして、最外側ノズルから外層（皮膜）となる物質の溶液を同時に吐出し、冷却下で流動し

ているキャリア液（例えば、コーン油、ナタネ油など）中に滴下させることにより、最内層に形質転換微生物が含まれる三層構造の「シームレス」カプセルが形成される。したがって、形質転換微生物が、継ぎ目のない外層皮膜によって包含または封じ込められている。

- 5 上記のようにして形成されたカプセルは、次いで乾燥される。乾燥方法としては、例えば、常温通風乾燥を施す。乾燥は、例えば5℃～30℃の空気により乾燥させる方法が一般的である。乾燥時間は2～12時間が好適である。特開平07-069867号公報に記載される、上記のように通常の乾燥を施したカプセルに対し、さらに真空乾燥または真空凍結乾燥を施す方法
- 10 が好適に用いられ得る。真空度は0.5～0.02 torrに保ち、真空凍結乾燥では-20℃以下で凍結させ乾燥させる方法である。真空乾燥または真空凍結乾燥に要する時間は特に限定的ではないが、一般に5～60時間、好ましくは24～48時間である。5時間以下であると、乾燥が不十分であり、カプセル内に存在する水分が内容物質に悪影響を与え得る。

- 15 特開平07-069867号公報に記載の方法により得られるカプセルはそのカプセル内の水分が真空凍結乾燥により十分除去されており、Aw値は0.20以下で熱伝導率0.16 kcal/mh℃以下になり得る。真空乾燥または真空凍結乾燥によりもちろん水分が低下すると同時に、カプセルが十分乾燥し、多孔質になるため、熱伝導率も単に通常乾燥で得られたものよりも大きく低下することになる。
- 20

- Aw値とは試料中に存在する水分の絶対量ではなく、水分の存在状態によって決定される値、すなわち試料中における水の自由度を表したものであって、化学反応や微生物の生育に直接関与することができる水分を表す指標で、電気抵抗式水分活性測定法（例えば、AwメーターWA-360、(株)芝浦
- 25 電子製作所）で測定される。熱伝導率はフィッチ（F i t c h）法などで測定される。Aw値は好ましくは0.20以下であり、熱伝導率は好ましくは

0.02~0.08 kcal/mh°Cである。

シームレスカプセル製剤のカプセル皮膜に耐酸性を付与するには、耐酸性の外層を形成させるか、または形成されたシームレスカプセルの皮膜（最外層）を耐酸性となるように処理する。

- 5 耐酸性外層を形成させる方法としては、ゲル化能を有するゼラチン、寒天、カラギナンなどに対して、ペクチン、アルギン酸塩、アラビアゴムなどを0.01~20質量%、好ましくは0.1~10質量%となるように添加する方法が挙げられる。

- 10 形成されたシームレスカプセルの皮膜（最外層）に耐酸性を付与する方法としては、例えば、シームレスカプセルの外層（最外層）の架橋処理およびシームレスカプセルの表面のコーティング処理が挙げられる。これらの処理を単独でまたは組み合わせて行うことが好ましい。

- 15 タンパク質を含む外層を架橋処理する場合、まず、シームレスカプセルを調製した後、十分に水洗する。水洗したシームレスカプセルを、架橋剤を含む水溶液に加え、外層の表面を架橋させる。架橋剤としては、従来公知の架橋剤を使用することができる。架橋剤としては、例えば、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、プロピオンアルデヒド、グリオキサール、グルタルアルデヒド、シナムアルデヒド、バニルアルデヒド、アセトン、エチルメチルケトン、エチレンオキシド、プロピレンオキシド、カリミョウバン、およびアンモニウムミョウバンが挙げられる。一般には、シームレスカプセル1
20 質量部を、0.1~2w/v%、好ましくは0.5~2w/v%の架橋剤を含む水溶液50~100質量部に加え、10~300秒間攪拌することにより、外層の処理を行う。なお、架橋剤の使用量、作用させる時間は、架橋剤によって異なる。外皮膜の表面を架橋処理した後、十分に水洗することにより、架橋剤を含む水溶液を除去し、外層中に含まれる水分を乾燥させる。
25

また、上記のタンパク質を含む外層の架橋処理として、トランスグルタミ

ナーゼを用いる酵素処理による架橋を行ってもよい。この場合、生成したシームレスカプセル1質量部を、0.1~10w/v%、好ましくは0.5~2w/v%の酵素を含む水溶液50~100質量部に加え、1~300分間攪拌することにより、外層を処理し、上記と同様に水洗、乾燥させる。

- 5 コーティング処理を行う場合は、生成した湿シームレスカプセルを乾燥させた後、セラック、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン、セルロースTC-5、ビニルピロリドン-酢酸ビニル共重合体、ゼイン、エチレンワックスなどを基材とし、ヒマシ油、ナタネ油、ジブチルフタレート、ポリエチレングリコール、グリセリン、ステアリン酸、脂肪酸エステル、ソルビタンパルミテート、ポリオキシエチレンステアレート、アセチル化モノグリセリドなどを可塑剤として用いて、常法に従ってシームレスカプセルをコーティングする。
- 10

- さらに、カプセル皮膜に腸溶性を付与することにより、胃内の酸性溶液（例えば、胃酸）などからカプセルを保護しそして腸内で崩壊させることにより、カプセル内部の形質転換微生物を腸内で放出させ、腸内で抗原産生を十分行わせることが可能となる。腸溶性の付与は、当業者が通常腸溶性カプセルを製造する方法で行われる。また、シームレスカプセルの外層材料としてゼラチンおよびペクチンを含む混合物を用いることにより、腸溶化皮膜と
- 15
- 20
- できる。ゲル化能を有するゼラチン、寒天、カラギナンなどに対して、ペクチン、アルギン酸塩、アラビアゴムなどを0.01~20質量%、好ましくは0.1~10質量%となるように添加し、調製した耐酸性外層は、腸溶性もまた有する。

- シームレスカプセル製剤は、その製法に起因して、形状は球状であり得る。
- 25
- シームレスカプセルの平均粒径は、0.3~10mm、好ましくは、1.5~8.0mmである。

このようにして得られたシームレスカプセル製剤は、室温で形質転換微生物の活性を保持したまま6ヶ月以上保存することが可能であり、10℃以下で保存する場合は、1年以上の長期保存が可能である。

5 (軟カプセル製剤)

軟カプセル製剤は、シームレスカプセル製剤の場合と同様、非水性溶媒中への形質転換微生物の懸濁液を内容物とし、皮膜シートで包含したものである。皮膜シートの材料は、シームレスカプセルの外層の材料と同様である。

軟カプセル製剤は、公知の技術、例えば、特許第2999535号明細書
10 に記載されている方法で調製することができる。例えば、ロータリーダイを用いて、内容物を注入および充填しながら、皮膜シートを型を通して加熱することによって封入し、カプセル化し得る。腸において形質転換微生物を放出する機能を持たせるために、得られた軟カプセルから、離型剤である油を極性溶媒（例えば、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール）
15 で洗浄することによって除去する。その後、シームレスカプセルの場合と同様に、架橋処理およびコーティング処理を組み合わせで行うか、あるいはいずれか一方の処理を行い、耐酸性とし得る。

耐酸性皮膜シートを、ゲル化能を有するゼラチン、寒天、カラギナンなど
20 に対して、ペクチン、アルギン酸塩、アラビアゴムなどを0.01~20質量%、好ましくは0.1~10質量%となるように添加し、公知の方法に基づいて調製することもできる。あるいは、皮膜シートを架橋処理およびコーティング処理を組み合わせで行うか、あるいはいずれか一方の処理を行い、
25 耐酸性とし得る。このようにして得られた耐酸性皮膜シートを用いて、例えば、公知の技術によりカプセルの成形およびカプセル内への内容物の導入をし、次いでカプセルの継ぎ目を溶着することによって内容物を封入し、耐酸性皮膜によって形質転換微生物が包含された軟カプセル製剤を製造し得る。

軟カプセル製剤は、球状、楕円状、または矩形状の構造であり得る。軟カプセルは、長径が3～16mmおよび短径が2～10mmのものが好ましく、長径が5～7mmおよび短径が2～3mmのものがより好ましい。

5 このようにして得られた軟カプセル製剤は、室温で形質転換微生物の活性を保持したまま6ヶ月以上保存することが可能であり、10℃以下で保存する場合は、1年以上の長期保存が可能である。

(硬カプセル製剤)

10 硬カプセル製剤は、カプセル皮膜を予めボディとキャップとに成型し、内容物をカプセルボディに充填し、次いでカプセルキャップを組み合わせることにより、製造され得る。

15 硬カプセル製剤の皮膜材料としては、ゼラチン、セルロース、プルラン、カラギナン、ならびに、ヒドロキシプロピルメチルセルロースなどのセルロース誘導体が挙げられる。硬カプセルの成型は、当業者が通常用いる方法で行われ得る。成型カプセルは、市販のカプセルであってもよい。内容物を皮膜で包み込み、封入することもできる。

内容物は、形質転換微生物を賦型剤（例えば、無水ケイ酸、合成ケイ酸アルミニウム、乳糖、コーンスターチ、結晶セルロース）とよく混合させたもの、あるいは、形質転換微生物の乾燥菌末を含有する粉体であり得る。

20 内容物をカプセル内に入れた後、カプセル皮膜をコーティングしてもよい。このコーティングには、シームレスカプセルの外層で説明した材料および方法が適用され、それにより耐酸性および好ましくは腸における崩壊性（腸溶性）が付与される。このコーティングは、カプセル皮膜を封入して内容物を包含させる役割も有し得る。

25 耐酸性皮膜シートを、ゲル化能を有するゼラチン、寒天、カラギナンなどに対して、ペクチン、アルギン酸塩、アラビアゴムなどを0.01～20質

量%、好ましくは0.1～10質量%となるように添加し、公知の方法に基づいて調製することもできる。あるいは、皮膜シートを架橋処理およびコーティング処理を組み合わせて行うか、あるいはいずれか一方の処理を行い、耐酸性とし得る。このようにして得られた耐酸性皮膜シートを用いて、例えば、公知の技術で硬カプセルを成型し得、そしてこの成型した硬カプセル内部に内容物を入れて、カプセルの継ぎ目を溶着することによって内容物を封入し、耐酸性皮膜によって形質転換微生物が包含された硬カプセル製剤を製造し得る。

このようにして得られた硬カプセル製剤では、室温で形質転換菌の活性を保持したまま6ヶ月以上保存することが可能であり、10℃以下で保存する場合は、1年以上の長期保存が可能である。

5. 細菌感染性疾患に対する経口ワクチン

上記4. で調製された耐酸性カプセル製剤（シームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤、および硬カプセル製剤）は、経口投与され、pH1～3の胃内を通過して、腸に到達し、腸で溶解される。溶解により、製剤から放出された形質転換微生物は、腸内環境で生育し、フラジェリンを生産し、好ましくは菌体外に分泌する。フラジェリンは腸から吸収され、抗原と認識されて、抗体が生産される。従って、フラジェリンを有する微生物に対して有効な経口ワクチンとなる。

実施例

以下に実施例を挙げて本発明を説明するが、本発明は、これらの実施例により限定されるものではない。

25

(実施例1：腸チフス抗原を産生するビフィズス菌を含有する耐酸性カプ

セル製剤の調製)

A. PCRによる*S. typhimurium*由来のフラジェリン遺伝子の増幅

S. typhimurium ATCC 14028をLB培地（インビトロジェン株式会社製）で37℃にて12時間培養した。培養終了後、常法により*S. typhimurium*の
5 ゲノムDNAを抽出した。抽出したゲノムDNAを、PCR反応キット（ア
プライドバイオシステムズ社製）の取扱説明書に従って、0.5 units
のAmpli Taq DNAポリメラーゼを用いて増幅させた。プライマーとして、配
列表の配列番号1（forward）：5' -CATGCCATGGATGGCA
CAGTCATTAATACA-3'（5位から10位までのCCATGG
10 はNcoI切断部位である）、および配列番号2（reverse）：5' -CGCG
GATCCTTAACGCAGTAAAGAGAGGAC-3'（5位から
10位までのGATCCTはBamHI切断部位である）を用いた。PCRは、
鋳型DNAを125 ng、プライマーを各0.5 μmol、Pfu DNA
ポリメラーゼを2.5 units、Pfu DNAポリメラーゼ用×10緩
15 衝液を4 μL、dNTPを各200 μmol含む反応液40 μLを用い、9
4℃で1分、55℃で1分、72℃で1分の工程を30回繰り返した後、7
2℃で10分保温する条件で行った。PCRの終了後、NcoIおよびBamHIで
切断し、フラジェリン遺伝子断片を調製した。

20 B. PCRによるHUプロモーターの増幅

B. longum ATCC 15703株をMRS培地（日本ベクトン・ディッキンソン株
式会社製）で37℃にて12時間培養した。培養終了後、常法により*B. lon*
*gum*のゲノムDNAを抽出した。上記A.と同様の条件でPCRを行った。
用いたプライマーは配列番号7（forward）：5' -CGCCAAGCTT
25 TGGGCGCGGCGGCCATGAAG-3'（5位から10位までの
AAGCTTはHindIII切断部位である）、および配列番号8（reverse）：

5' -CGCGCCATGGAAAGCATCCTTCTTGGGTCA-
3' (5位から10位までのCCATGGはNcoI切断部位である)を用いた。PCRの終了後、HindIIIおよびNcoIで切断し、HUプロモーター遺伝子断片を調製した。

5

C. 発現ベクターの調製

プラスミドpBLES100をBamHIおよびHindIIIで切断し、上記A. で得られたサルモネラのフラジェリン遺伝子断片およびB. で得られたHUプロモーター遺伝子断片と混合してライゲーションすることにより、発現ベクターpBLES-FliCを得た。

10

D. 発現ベクターの*B. animalis*への導入

B. animalis ATCC 27536を、MRS培地に植菌し、37℃にて12時間、炭酸ガス10%を含む窒素ガス環境中で対数増殖期中期まで静置培養した。

15

得られた培養液を遠心分離して菌体を回収し、PBS (塩化ナトリウムを8g、塩化カリウムを0.2g、リン酸水素二ナトリウムを1.44g、リン酸二水素カリウム0.24gを1Lの蒸留水で希釈しpH7.4としたもの)で、3回洗浄した。次いで、 5×10^8 cells/mLとなるようにPBSを加えて、*B. animalis*の懸濁液を得た。この懸濁液50μL中に、上記B. で調製したpBLES-FliCを5μL (1μg DNA/5μL) 加え、これを0.2cm幅のエレクトロポレーション用キュベットに入れて、5μs、1000Vの条件にて形質転換を行った。

20

スペクチノマイシン (50μg/mL) 含有BL寒天培地 (日水製薬株式会社製) で、37℃にて炭酸ガス10%を含む窒素ガス環境中で培養することにより、形質転換された*B. animalis*を得た。

25

E. ウェスタンブロッティング

形質転換された*B. animalis*が、フラジェリンタンパク質が発現するか否かを、以下のように確認した。*B. animalis*を1 w/v % Tween (登録商標) 80を含むリン酸緩衝液 (pH 6.8)、および緩衝液A (トリス塩酸塩 126 mM、20 w/v %グリセリン、4 w/v %ドデシル硫酸ナトリウム、1.0 w/v % 2-メルカプトエタノール、0.05 w/v % ブロモフェノールブルー、pH 6.8) で希釈した。そのうちの5 μ g を電気泳動 (トリスグリシンポリアクリルアミドゲル) にかけて、分離したタンパク質をニトロセルロース膜にエレクトロブロットした。次いで、サルモネラ菌種に共通のフラジェリンに特有のIgG1 (ビロスタット社製) およびホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 標識した2次抗体 (1:500) を用いるELISAで、フラジェリンの発現を確認した。

F. 形質転換微生物の凍結乾燥菌末の調製

形質転換されたビフィズス菌 (*B. animalis*) の2白金耳を、50 μ Mのスペクチノマイシンを含むMRS培地 (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社製) 1 Lに植菌し、37°Cにて18時間、炭酸ガス10%を含む窒素ガスを吹き込みながら培養した。途中、pHの低下が見られるので、pH自動調整器を用いて10M水酸化ナトリウム水溶液でpHを5.5に調整を行いながら培養した。15時間培養後の菌数は、得られた菌液を適度に嫌気性希釈液で希釈し、50 μ Mのスペクチノマイシンを含むBL寒天培地に塗布し、コロニーの生育数により求めた。なお、嫌気性希釈液は、リン酸水素二ナトリウム6.0 g、リン酸二水素カリウム4.5 g、L-システイン塩酸塩0.5 g、Tween (登録商標) 80を0.5 g、および寒天1.0 gを1 Lの蒸留水に溶解させ、121°Cにて15分間蒸気滅菌したものである。

培養後、遠心分離 (15000 \times g、20分) し、菌体を回収した。得られた

菌体に蒸留水120g、クエン酸Naを12g、リンゴ酸Naを8g加えて菌体を懸濁させた。この懸濁液に、アビセルFD-101（旭化成株式会社）を8g添加し、良く攪拌した後、凍結させ、真空乾燥した。その後、得られた粉体に対して2倍量のデキストリンを加え、凍結乾燥菌末を得た。

5

G. 耐酸性シームレスカプセル製剤の調製

以下に説明するように、同心三重ノズルを備えたカプセル製造装置を用いて、形質転換菌体を含む耐酸性シームレスカプセル製剤を調製した。

硬化油（融点34℃の水添パーム核油）400gを融解し、これに上記F. で得られた凍結乾燥菌末100gを分散させた。この分散物を同心三重ノズルの内側ノズルから、その外側の中間ノズルから融解した硬化油（融点43℃の水添パーム核油）を、さらに最外側ノズルからゼラチン溶液（ゼラチン600g、グリセリン300g、およびペクチン100gを精製水4kgに溶解させたもの）を同時に吐出し、15℃冷却下で流動しているなたね油中に滴下させることにより、直径2.5mmの三層構造のシームレスカプセル内に形質転換菌体が包含された製剤を調製した。このカプセル製剤を20℃にて10時間、通気乾燥した後、更に常温にて真空乾燥を行うことにより、カプセル中の水分活性をAw値0.20以下および熱伝導率0.16kcal/mh℃以下にまで低下させた。

15
20

H. 耐酸性軟カプセル製剤の調製

上記F. で得られた凍結乾燥菌末50gをなたね油300gに懸濁させて、軟カプセルの内容液を調製した。ゼラチン400gおよびグリセリン100gを蒸留水200gに加えて、60℃で攪拌して溶解させ、これをシート状に成形することによりゼラチン膜を得、これを軟カプセルの皮膜として用いた。このゼラチン膜を、一對の回転円筒型金型の間を送り、これと連動する

25

ポンプで内容液をゼラチン膜間に噴出することにより、カプセル化した。

得られたカプセル化物400gを転動造粒器に入れ、セラック10gおよびヒマシ油1gをメタノール-酢酸エチル(1:1、v/v)混液400gに溶解させた溶液を、軟カプセルの全表面にコーティング膜厚0.3mmとなるように噴霧した。このようにして、長径4mmおよび短径3mmの大きさで、形質転換菌体を包含しかつ耐酸性のコーティングされた軟カプセル製剤を400g得た。

I. 耐酸性硬カプセル製剤の調製

10 上記F. で得られた凍結乾燥菌末を、硬カプセルの内容物とした。硬カプセル皮膜としては、市販の局方5号のカプセルを用いた。この内容物をカプセルのボディに充填し、これにキャップを合わせることで、カプセル化した。

15 得られたカプセル化物100gを転動造粒器に入れ、セラック10gおよびヒマシ油1gをメタノール-酢酸エチル(1:1、v/v)混液400gに溶解させた溶液を、硬カプセルの全表面にコーティング膜厚0.3mmとなるように噴霧し、形質転換菌体を包含しかつ耐酸性のコーティングされた硬カプセル製剤100gを得た。

20 (実施例2 コレラ抗原を産生する乳酸菌を含有する耐酸性カプセル製剤の調製)

コレラ抗原を産生する*V. cholerae* ATCC 11628をLB培地で、37℃にて12時間培養した。培養終了後、常法により*V. cholerae*のゲノムDNAを抽出した。配列番号3 (forward) および配列番号4 (reverse) の配列をプライマーとし、抽出したゲノムDNAを鋳型として、実施例1と同様にPCRを行った。得られた増幅断片を回収し、NcoIおよびBamHIで切断し、コレ

ラフラジェリン遺伝子断片を調製した。実施例1で調製した p B L E S - F l i C を NcoI および BamHI で消化し、大きい断片を回収した。この断片とコレラフラジェリン遺伝子断片とをライゲーションすることにより、コレラ抗原を発現する発現ベクター p B L E S - V c を得た。

- 5 得られたコレラフラジェリンの発現ベクター p B L E S - V c を用いて *Lb. plantarum* ATCC BAA-793 を形質転換し、コレラ抗原を産生する *Lb. plantarum* を得た。コレラ抗原の発現は、実施例1のE. に記載と同様に、抗原抗体反応を用いる E L I S A によって、確認した。

- 10 コレラのフラジェリタンパク質の発現が確認された *Lb. plantarum* を用いて、実施例1のF. と同様の方法で凍結乾燥菌末を調製し、そしてこの凍結乾燥菌末を含有するシームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤および硬カプセル製剤をそれぞれ実施例1のG.、H. およびI. と同様にして調製した。得られたシームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤および硬カプセル製剤の皮膜は、耐酸性である。

15

(実施例3 赤痢抗原を産生するビフィズス菌を含有する耐酸性カプセル製剤の調製)

- 20 赤痢抗原を産生する *S. dysenteriae* ATCC 29026 を LB 培地で 37℃ にて 12 時間培養した。培養終了後、常法により *S. dysenteriae* のゲノム DNA を抽出した。配列番号 5 (forward) および配列番号 6 (reverse) の配列をプライマーとし、抽出したゲノム DNA を鋳型として、実施例1と同様に P C R を行った。得られた増幅断片を回収し、NcoI および BamHI で切断し、赤痢フラジェリン遺伝子断片を調製した。実施例1で調製した p B L E S - F l i C を NcoI および BamHI で消化し、大きい断片を回収した。この断片と赤痢フラジェリン遺伝子断片をライゲーションすることにより赤痢抗原を発現する発現ベクター p B L E S - S d を得た。
- 25

得られた赤痢フラジェリン発現ベクター p B L E S - S d を用いて B. longum ATCC 15697 を形質転換し、赤痢抗原を産生する B. longum を得た。赤痢抗原の発現は、実施例 1 の E. に記載と同様に、抗原抗体反応を用いる E L I S A によって、確認した。

- 5 赤痢のフラジェリンタンパク質の発現が確認された B. longum を用いて、実施例 1 の F. と同様の方法で凍結乾燥菌末を調製し、そしてこの凍結乾燥菌末を含有するシームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤および硬カプセル製剤をそれぞれ実施例 1 の G.、H. および I. と同様にして調製した。得られたシームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤および硬カプセル製剤の皮
- 10 膜は、耐酸性である。

(比較例 1)

- 実施例 1 の G. において、皮膜となるゼラチン溶液の組成をゼラチン 6 0 0 g、グリセリン 3 0 0 g、およびソルビトール 1 0 0 g を精製水 4 k g に
- 15 溶解させたものに変更したこと以外は、実施例 1 と同様の操作を行うことにより、シームレスカプセル製剤を調製した。得られた製剤の皮膜は、耐酸性でない。

(比較例 2)

- 20 実施例 1 の H. 軟カプセルの調製においてコーティングを行わないこと以外は、実施例 1 と同様の操作を行い、軟カプセル製剤を調製した。得られた製剤の皮膜は、耐酸性でない。

(比較例 3)

- 25 実施例 1 の I. 硬カプセルの調製においてコーティングを行わないこと以外は、実施例 1 と同様の操作を行い、硬カプセル製剤を調製した。得られた

製剤の皮膜は、耐酸性でない。

(比較例 4～6)

5 微生物を実施例 2 で調製したコレラのフラジェリン発現形質転換微生物に代えたこと以外は、比較例 1～3 と同様にして、それぞれ、シームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤、および硬カプセル製剤を調製し、比較例 4～6 とした。得られたシームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤および硬カプセル製剤の皮膜は、耐酸性でない。

10 (比較例 7～9)

微生物を実施例 3 で調製した赤痢菌のフラジェリン発現形質転換微生物に代えたこと以外は、比較例 1～3 と同様にして、それぞれ、シームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤、および硬カプセル製剤を調製し、比較例 7～9 とした。得られたシームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤および硬カプセル製剤の皮膜は、耐酸性でない。

(実施例 4：腸チフスのフラジェリントタンパク質発現形質転換微生物 (組換え *B. animalis*) 投与による抗体惹起の確認)

8～12 週齢の BALB/c 雌マウス (日本チャールス・リバー株式会社) を購入し、標準飼料で 1 週間馴化した。マウスを 9 群 (一群 5～7 匹) に分け、3 群には、実施例 1 で調製した腸チフスのフラジェリンを発現する形質転換微生物を含有するシームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤および硬カプセル製剤をそれぞれ経口投与した。別の 3 群には、比較例 1～3 で調製した腸チフスのフラジェリンを発現する形質転換微生物を含有する、耐酸性のないシームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤および硬カプセル製剤を、
25 それぞれ経口投与した。さらに、残りの 3 群には、対照として、フラジェリ

ンを発現する形質転換微生物（組換え*B. animalis*）生菌、宿主の*B. animalis*生菌、およびリン酸緩衝液をそれぞれ投与した。これらのカプセル製剤、生菌などを、1日1回、3週間摂取させた。

3週間後、血清中および便中のIgA量を以下の方法により測定した。

- 5 96穴プレート（Nunc Immunoplate Maxisorb F96、ナルジェ ヌンク インターナショナル株式会社製）に、フラジェリン抗原を含むPBSを添加して、4℃にて16時間、プレート表面をコーティングした。その後、牛血清アルブミン1w/v%を含むPBSで、室温で2時間ブロッキングした。PBSで3回洗浄した後、血清あるいは便サンプルを加え、室温で3時間反応
- 10 させた。PBSで3回洗浄した後、二次抗体（ヤギ由来—抗マウスIgA、IgG、IgM（サンタクルズ社製））を加え、室温で3時間インキュベートした。PBSで3回洗浄した後、三次抗体（フルオレセインイソチオシアネート（FITC）標識—ウサギ由来—抗ヤギIgG（QEDバイオサイエンス株式会社製））を加え、室温で3時間インキュベートした。蛍光を、Fluoro
- 15 scanII（大日本製薬株式会社製）で測定した。得られた蛍光値を表1に示す。

表1

投与サンプル	BALB/c 数	1日投与量 10 ⁷ cfu/日	便中IgA量 (OD±標準誤差)	血清中IgA量 (OD±標準誤差)
実施例1:シームレスカプセル	7	2.5	0.16±0.012	0.40±0.145
実施例1:軟カプセル	7	3.2	0.15±0.013	0.38±0.151
実施例1:硬カプセル	7	3	0.14±0.014	0.37±0.120
比較例1:シームレスカプセル	5	2.5	0.05±0.011	0.12±0.038
比較例2:軟カプセル	5	3.2	0.06±0.010	0.14±0.041
比較例3:硬カプセル	5	3	0.06±0.010	0.13±0.028
形質転換微生物生菌	5	2.5	0.04±0.012	0.11±0.041
宿主微生物生菌	5	12	0.02±0.008	0.10±0.038
リン酸緩衝液	5	-	0.02±0.006	0.14±0.032

実施例1で得られた耐酸性のシームレスカプセル、軟カプセル、および硬カプセルの各製剤を摂取させた場合、いずれの形態の耐酸性カプセル製剤を用いても、耐酸性ではない比較例のカプセル製剤1~3、または生菌のみを
5 摂取させた例に比べて、便中、血中ともにIgA量が多く、抗体を惹起させる効果が高いことが分かった。

(実施例5：コレラのフラジェリン発現形質転換微生物投与による抗体惹起の確認)

10 実施例2で得たコレラのフラジェリン発現形質転換微生物(組換えLb. plantarum)を含むシームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤、および硬カプセル製剤、ならびに比較例4~6のカプセル製剤について、実施例4と同様にして、抗体惹起の確認を行った。

15 また、対照として、コレラのフラジェリンを発現する形質転換微生物生菌、宿主のLb. plantarum生菌、およびリン酸緩衝液をそれぞれ投与した。結果を表2に示す。

表2

投与サンプル	BALB/c 数	1日投与量 10 ⁷ cfu/日	便中IgA量 (OD±標準誤差)	血清中IgA量 (OD±標準誤差)
実施例2:シームレスカプセル	7	2.8	0.15±0.012	0.42±0.133
実施例2:軟カプセル	7	3.3	0.13±0.013	0.41±0.142
実施例2:硬カプセル	7	3.2	0.13±0.014	0.39±0.140
比較例4:シームレスカプセル	5	2.8	0.05±0.011	0.13±0.038
比較例5:軟カプセル	5	3.3	0.06±0.010	0.12±0.052
比較例6:硬カプセル	5	3.2	0.06±0.010	0.11±0.028
形質転換微生物生菌	5	2.8	0.03±0.012	0.12±0.032
宿主微生物生菌	5	8.3	0.02±0.008	0.10±0.022
リン酸緩衝液	5	-	0.02±0.006	0.15±0.033

実施例2で得られた耐酸性のシームレスカプセル、軟カプセル、および硬カプセルの各製剤を摂取させた場合、いずれの形態の耐酸性カプセル製剤を用いても、耐酸性ではない比較例4~6のカプセル製剤、生菌のみを摂取させた例に比べて、便中、血中ともにIgA量が多く、抗体を惹起させる効果が高いことが分かった。

(実施例6：赤痢のフラジェリン発現形質転換微生物投与による抗体惹起の確認)

10 赤痢菌のフラジェリン発現形質転換微生物（組換え*B. longum*）を含む実施例3で得たシームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤、および硬カプセル製剤、ならびに比較例7~9のカプセル製剤について、実施例4と同様にして、抗体惹起の確認を行った。

15 また、対照として、赤痢のフラジェリンを発現する形質転換微生物生菌、宿主の*B. longum*生菌、およびリン酸緩衝液をそれぞれ投与した。結果を表3に示す。

表 3

投与サンプル	BALB/c 数	1日投与量 10 ⁷ cfu/日	便中IgA量 (OD±標準誤差)	血清中IgA量 (OD±標準誤差)
実施例3:シームレスカプセル	7	3.2	0.13±0.012	0.38±0.142
実施例3:軟カプセル	7	3.9	0.12±0.013	0.37±0.153
実施例3:硬カプセル	7	4	0.13±0.014	0.39±0.131
比較例7:シームレスカプセル	5	3.2	0.06±0.011	0.11±0.038
比較例8:軟カプセル	5	3.9	0.05±0.010	0.12±0.051
比較例9:硬カプセル	5	4	0.06±0.010	0.11±0.028
形質転換微生物生菌	5	3.2	0.02±0.012	0.11±0.038
宿主微生物生菌	5	10.1	0.03±0.008	0.13±0.036
リン酸緩衝液	5	-	0.03±0.006	0.14±0.031

実施例3で得られた耐酸性のシームレスカプセル、軟カプセル、および硬カプセルの各製剤を摂取させた場合、いずれの形態の耐酸性カプセル製剤を用いても、耐酸性ではない比較例7~9のカプセル製剤、生菌のみを摂取させた例に比べて、便中、血中ともにIgA量が多く、抗体を惹起させる効果が高いことが分かった。

(実施例7：腸チフス抗原を菌体外に分泌するビフィズス菌を含有する耐酸性カプセル製剤の調製)

10 A. PCRによる*S. typhimurium*由来のフラジェリン遺伝子の増幅
実施例1のA.に記載の方法と同様にして*S. typhimurium*由来のフラジェリン遺伝子断片を調製した。

B. PCRによる分泌シグナルペプチドDNAの増幅

15 B. *bifidum* ATCC 29521をMRS培地(日本ベクトン・ディッキンソン株式会社製)で37℃にて12時間培養した。培養終了後、常法により*B. bifidum*のゲノムDNA (Access# AJ224435)を抽出した。実施例1のA.と同様にPCRを行った。本PCRでは、*B. bifidum*のゲノムDNAを鋳型として、配列表の配列番号11 (forward) : 5' -CGGCAAGCTTTA
20 TGGGGGATACAGGATTGGCGAT-3' (5位から10位までのAAGCTTはHindIII切断部位である) および配列番号12 (reverse) : 5' -GCGCCCATGGAAATCGGGTGGCGTCCTC
GACCG-3' (5位から10位までのCCATGGはNcoI切断部位である)のプライマー対を用いた。PCRの終了後、HindIIIおよびNcoIで切断
25 し、分泌シグナルペプチド遺伝子断片を調製した。

C. 分泌型発現ベクターの調製

プラスミド p B L E S 1 0 0 を BamHI および HindIII で切断し、上記 A. で得られたフラジェリン遺伝子断片および上記 B. で得られた分泌シグナルペプチド遺伝子断片と混合してライゲーションすることにより、分泌型発現ベクター p B L E S - S P - F l i c を得た。

D. 分泌型発現ベクターの B. breve への導入

発現ベクターとして上記 C. で得られた p B L E S - S P - F l i c、そして形質転換されるべき菌体として B. breve ATCC 15700 を用いたこと以外は、実施例 1 の D. と同様にして形質転換を行い、形質転換 B. breve を得た。

E. 分泌の確認

上記 D. で得られた形質転換 B. breve を、大理石含 M R S ブロス培地で 37℃ にて 12 時間培養した後、4℃ にて 12,000rpm で遠心分離し、上清を得た。遠心上清について、上記実施例 1 の E. の記載と同様にウェスタンブロットティングを行い、形質転換 B. breve によるフラジェリタンパク質の菌体外分泌を確認した。

F. 形質転換微生物の凍結乾燥菌末の調製

腸チフスフラジェリンの分泌が確認された B. breve を用いて、実施例 1 の F. と同様の方法で凍結乾燥菌末を調製した。

G. 耐酸性のシームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤および硬カプセル製剤の調製

上記 F. で得られた凍結乾燥菌末を用いて、シームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤および硬カプセル製剤をそれぞれ実施例 1 の G.、H. および

I. の方法にしたがって調製した。得られたシームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤および硬カプセル製剤の皮膜は、耐酸性である。

(比較例 10～12)

- 5 微生物を実施例 7 の腸チフスのフラジェリン分泌発現形質転換微生物に代えたこと以外は、比較例 1～3 と同様にして、それぞれ、シームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤、および硬カプセル製剤を調製し、比較例 10～12 とした。得られたシームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤および硬カプセル製剤の皮膜は、耐酸性でない。

10

(実施例 8)

実施例 7 で得た腸チフスのフラジェリン分泌発現形質転換微生物 (組換え B. breve) を含むシームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤、および硬カプセル製剤、ならびに比較例 10～12 のカプセル製剤について、実施例 4 と同様に、抗体惹起の確認を行った。

15

また、対照として、腸チフスのフラジェリン分泌発現形質転換微生物 (組換え B. breve) 生菌、宿主の B. breve 生菌、およびリン酸緩衝液をそれぞれ投与した。結果を表 4 に示す。

表 4

投与サンプル	BALB/c数	1日投与量 10 ⁷ cfu/日	便中IgA量 (OD±標準誤差)	血清中IgA量 (OD±標準誤差)
実施例7:シームレスカ プセル	7	3.5	0.18 ± 0.015	0.44 ± 0.155
実施例7:軟カプセル	7	4.1	0.16 ± 0.013	0.42 ± 0.148
実施例7:硬カプセル	7	3.6	0.20 ± 0.014	0.38 ± 0.140
比較例10:シームレス カプセル	5	3.5	0.05 ± 0.012	0.12 ± 0.033
比較例11:軟カプセル	5	4.1	0.04 ± 0.011	0.11 ± 0.046
比較例12:硬カプセル	5	3.6	0.06 ± 0.013	0.14 ± 0.034
形質転換微生物生菌	5	3.4	0.05 ± 0.011	0.13 ± 0.036
宿主微生物生菌	5	10.5	0.03 ± 0.009	0.12 ± 0.039
リン酸緩衝液	5	—	0.02 ± 0.007	0.13 ± 0.040

実施例7で得られた腸チフスのフラジェリン分泌発現形質転換微生物を含有する耐酸性のシームレスカプセル、軟カプセル、および硬カプセルの各製剤を摂取させた場合、いずれの形態の耐酸性カプセル製剤を用いても、耐酸性ではない比較例10～12のカプセル製剤、生菌のみを摂取させた例に比べて、便中、血中ともにIgA量が多く、抗体を惹起させる効果が高いことが分かった。

産業上の利用可能性

フラジェリンを発現する形質転換微生物を耐酸性カプセル内に入れた製剤とすることにより、抗フラジェリン抗体産生量が向上する。このように腸チフス、コレラ、赤痢などの細菌性感染症に対する経口ワクチンとして効果があることから、細菌性感染症の予防および治療方法が提供できる。近年の薬剤耐性感染症菌の蔓延を考慮すれば、流行地域住民やその地域へ仕事や旅行で出かける人への経口ワクチン投与は、理想的な予防および治療戦略となる。

請求の範囲

1. 細菌感染性疾患に対する経口ワクチンであって、該経口ワクチンがカプセル剤の形態であり、該カプセル剤が、カプセル皮膜と抗原タンパク質
5 フラジェリンを発現する形質転換微生物とで構成され、該カプセル皮膜が耐酸性であり、該形質転換微生物が該カプセル皮膜によって包含されている、経口ワクチン。
2. 前記抗原タンパク質フラジェリンが前記微生物の菌体内に発現される、
10 請求項1に記載の経口ワクチン。
3. 前記抗原タンパク質フラジェリンが前記微生物の菌体外に分泌される、請求項1に記載の経口ワクチン。
- 15 4. 前記微生物が、ビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) 属、ラクトバチルス (Lactobacillus) 属、ラクトコッカス (Lactococcus) 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、ロイコノストック (Leuconostoc) 属、テトラゲノコッカス (Tetragenococcus) 属、エノコッカス (Oenococcus)
20 s) 属、およびワイセラ (Weissella) 属からなる群に属する微生物から選択される少なくとも1種である、請求項1から3のいずれかに記載の経口ワクチン。
5. 前記経口ワクチンが、腸チフス、コレラ、または赤痢に対するワクチン
25 である、請求項1から4のいずれかに記載の経口ワクチン。

6. 前記カプセル製剤が、シームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤、または硬カプセル製剤である、請求項1から5のいずれかに記載の経口ワクチン。

7. 細菌感染性疾患に対する経口ワクチンの製造方法であって、
5 抗原タンパク質フラジェリンを発現する形質転換微生物を調製する工程；
および

該形質転換微生物を耐酸性のカプセル皮膜によって封入して、耐酸性カプセル製剤を生成する工程；
を含む、方法。

10

8. 前記形質転換微生物が、抗原タンパク質フラジェリンを菌体内に発現する、請求項7に記載の方法。

15

9. 前記形質転換微生物が、抗原タンパク質フラジェリンを菌体外に分泌する、請求項7に記載の方法。

20

10. 前記微生物が、ビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) 属、ラクトバチルス (Lactobacillus) 属、ラクトコッカス (Lactococcus) 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、ロイコノストック (Leuconostoc) 属、テトラゲノコッカス (Tetragenococcus) 属、エノコッカス (Oenococcus) 属、およびワイセラ (Weissella) 属からなる群に属する微生物から選択される少なくとも1種である、請求項7から9のいずれかに記載の方法。

25

11. 前記経口ワクチンが、腸チフス、コレラ、または赤痢に対するワクチンである、請求項7から10のいずれかに記載の方法。

1 2. 前記カプセル製剤が、シームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤、または硬カプセル製剤である、請求項 7 から 1 1 のいずれかに記載の方法。

- 5 1 3. 細菌感染性疾患に対する経口ワクチンの製造方法であって、
抗原タンパク質フラジェリンを発現する形質転換微生物を調製する工程；
該形質転換微生物をカプセル皮膜によって封入して、カプセル製剤を生成する工程；および
該生成したカプセル製剤のカプセル皮膜を耐酸性にする工程；
10 を含む、方法。

1 4. 前記形質転換微生物が、抗原タンパク質フラジェリンを菌体内に発現する、請求項 1 3 に記載の方法。

- 15 1 5. 前記形質転換微生物が、抗原タンパク質フラジェリンを菌体外に分泌する、請求項 1 3 に記載の方法。

- 1 6. 前記微生物が、ビフィドバクテリウム (Bifidobacterium) 属、ラクトバチルス (Lactobacillus) 属、ラクトコッカス (Lactococcus) 属、ペディオコッカス (Pediococcus) 属、ストレプトコッカス (Streptococcus) 属、
20 エンテロコッカス (Enterococcus) 属、ロイコノストック (Leuconostoc) 属、テトラゲノコッカス (Tetragenococcus) 属、エノコッカス (Oenococcus) 属、およびワイセラ (Weissella) 属からなる群に属する微生物から選択される少なくとも 1 種である、請求項 1 3 から 1 5 のいずれかに記載の方法。

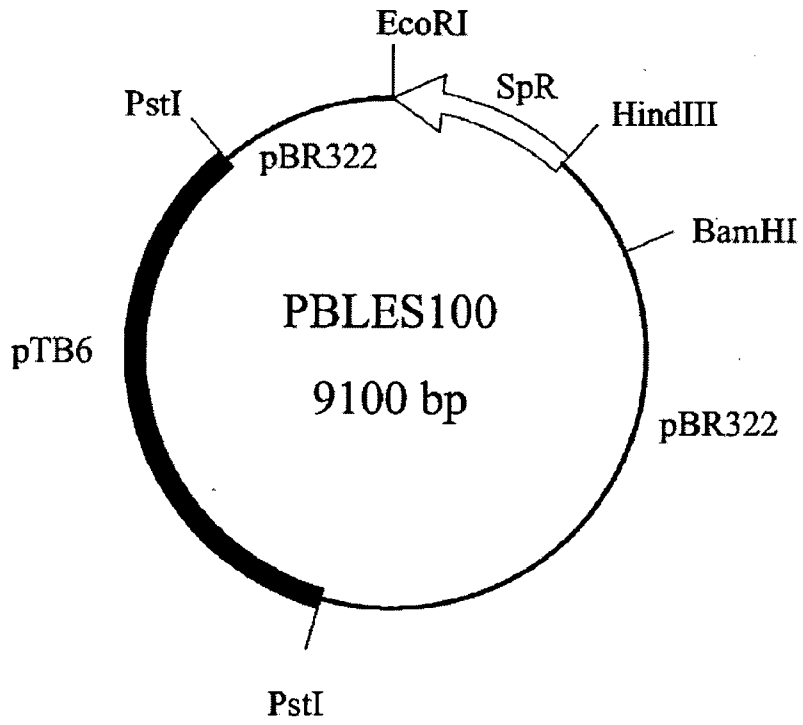
25

1 7. 前記経口ワクチンが、腸チフス、コレラ、または赤痢に対するワクチ

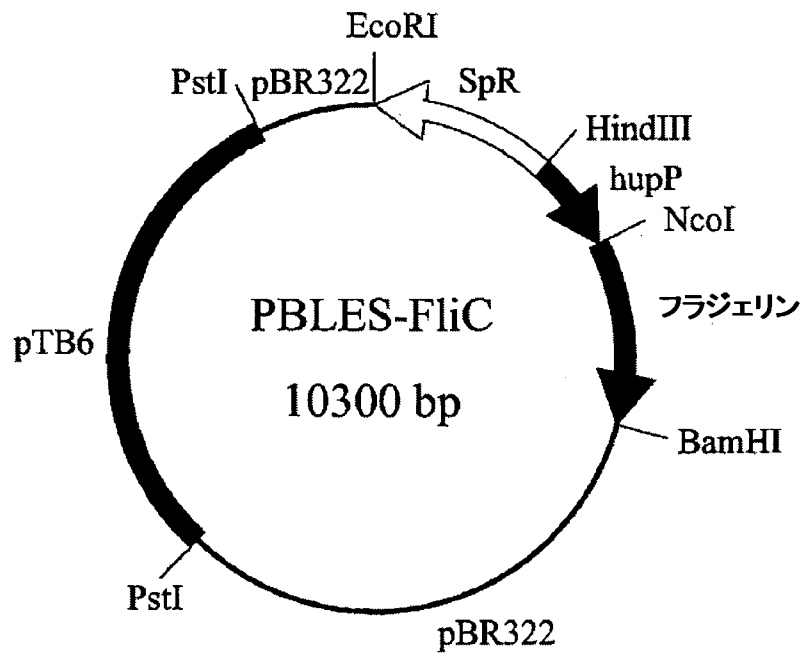
ンである、請求項 13 から 16 のいずれかに記載の方法。

18. 前記カプセル製剤が、シームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤、または硬カプセル製剤である、請求項 13 から 17 のいずれかに記載の方法。

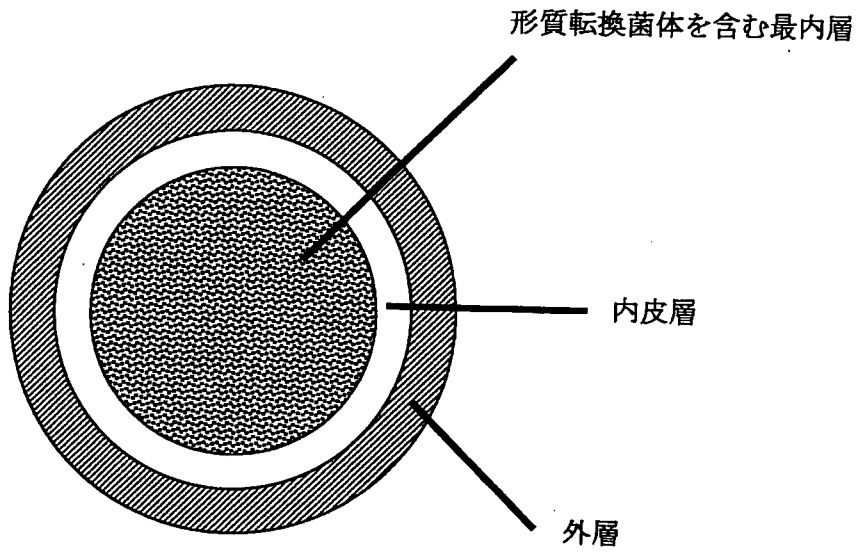
第1図



第2図



第3図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2008/055815

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 A61K39/02(2006.01)i, A61K9/48(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K39/106(2006.01)i, A61K39/112(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 A61K39/02, A61K9/48, A61K38/00, A61K39/106, A61K39/112, A61K48/00, A61P31/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
 Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2008
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2008 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2008

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN), JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TAKATA, T. et al, Genetically engineered Bifidobacterium animalis expressing the Salmonella flagellin gene for the mucosal immunization in a mouse model, J Gene Med, 2006, Vol.8, No.11, p.1341-6, full text, particularly, Abstract	1-18
Y	SIMANJUNTAK, CH et al, Oral immunisation against typhoid fever in Indonesia with Ty21a vaccine, LANCET, 1991, Vol.338, No.8774, p.1055-9, full text, particularly, Abstract	1-18
Y	LEVINE, M.M. et al, Duration of efficacy of Ty21a, attenuated Salmonella typhi live oral vaccine, Vaccine, 1999, Vol.17, Suppl 2, p.S22-7, full text, particularly, Abstract	1-18

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 12 May, 2008 (12.05.08)	Date of mailing of the international search report 27 May, 2008 (27.05.08)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/055815

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 61-151127 A (MORISHITA JINTAN KABUSHIKI KAISHA), 09 July, 1986 (09.07.86), Full text; particularly, Claims; examples & JP 93068446 B	1-18
Y	JP 07-069867 A (MORISHITA JINTAN KABUSHIKI KAISHA), 14 March, 1995 (14.03.95), Full text; particularly, Claims; examples & EP 634167 A1 & US 5478570 A & EP 634167 B1 & JP 3102990 B2	1-18

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K39/02(2006.01)i, A61K9/48(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K39/106(2006.01)i, A61K39/112(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K39/02, A61K9/48, A61K38/00, A61K39/106, A61K39/112, A61K48/00, A61P31/04			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2008年 日本国実用新案登録公報 1996-2008年 日本国登録実用新案公報 1994-2008年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS(STN), CAplus(STN), EMBASE(STN), MEDLINE(STN), JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
Y	TAKATA, T. et al, Genetically engineered Bifidobacterium animalis expressing the Salmonella flagellin gene for the mucosal immunization in a mouse model, J Gene Med, 2006, Vol.8, No.11, p.1341-6, 全文, 特に Abstract	1-18	
Y	SIMANJUNTAK, CH et al, Oral immunisation against typhoid fever in Indonesia with Ty21a vaccine, LANCET, 1991, Vol. 338, No. 8774, p.1055-9, 全文, 特に Abstract	1-18	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 12.05.2008		国際調査報告の発送日 27.05.2008	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 小堀 麻子	4C 2938
		電話番号 03-3581-1101 内線 3452	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	LEVINE, M.M. et al, Duration of efficacy of Ty21a, attenuated Salmonella typhi live oral vaccine, Vaccine, 1999, Vol.17, Suppl 2, p.S22-7, 全文, 特に Abstract	1-18
Y	JP 61-151127 A (MORISHITA JINTAN KK) 1986.07.09, 全文, 特に請求項, 実施例 & JP 93068446 B	1-18
Y	JP 07-069867 A (MORISHITA JINTAN KK) 1995.03.14, 全文, 特に請求項, 実施例 & EP 634167 A1 & US 5478570 A & EP 634167 B1 & JP 3102990 B2	1-18

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. c の続き)

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

- a. タイプ 配列表
 配列表に関連するテーブル
- b. フォーマット 紙形式
 電子形式
- c. 提出時期 出願時の国際出願に含まれていたもの
 この国際出願と共に電子形式により提出されたもの
 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの

2. さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：