

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6455920号
(P6455920)

(45) 発行日 平成31年1月23日 (2019. 1. 23)

(24) 登録日 平成30年12月28日 (2018. 12. 28)

(51) Int.Cl.

F 1

C 1 2 N 15/117 (2010.01)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)
A 6 1 K 31/711 (2006.01)
A 6 1 P 37/04 (2006.01)

C 1 2 N 15/117 Z N A Z
A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 31/711
A 6 1 P 37/04

請求項の数 2 (全 43 頁)

(21) 出願番号 特願2014-223742 (P2014-223742)
(22) 出願日 平成26年10月31日 (2014. 10. 31)
(65) 公開番号 特開2016-86711 (P2016-86711A)
(43) 公開日 平成28年5月23日 (2016. 5. 23)
審査請求日 平成29年7月26日 (2017. 7. 26)

(73) 特許権者 311002447
キリン株式会社
東京都中野区中野四丁目 1 〇 番 2 号
(74) 代理人 100107984
弁理士 廣田 雅紀
(74) 代理人 100102255
弁理士 小澤 誠次
(74) 代理人 100096482
弁理士 東海 裕作
(74) 代理人 100131093
弁理士 堀内 真
(72) 発明者 堀江 暁
東京都中野区中野四丁目 1 〇 番 2 号 キ
リン株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物又はDNAの免疫賦活活性を予測する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 8 1、1 8 4、1 8 9 及び 1 9 4 からなる群から選択されるいずれかのヌクレオチド配列からなる DNA を 有効成分 とする免疫賦活剤。

【請求項 2】

配列番号 1 8 1、1 8 4、1 8 9 及び 1 9 4 からなる群から選択されるいずれかのヌクレオチド配列からなる DNA を 有効成分 とする免疫賦活のための組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、微生物又はDNAの免疫賦活活性を予測する方法、該方法を利用した免疫賦活活性を有すると予測される微生物又はDNAをスクリーニングする方法、及び、かかる微生物又はDNA等を有効成分として含む免疫賦活剤に関する。より詳しくは、微生物またはDNAの免疫賦活活性のうち、pDC細胞にインターフェロン（IFN-）産生を誘導する活性に代表される、TLR9受容体刺激を通じた免疫賦活活性について、DNA配列の特性にもとづいて、高活性の微生物およびDNAを効率的にスクリーニングする方法等に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒトや動物の体内に侵入したウイルスや細菌は免疫系の細胞によって認識・貪食される

。免疫系は自然免疫系と獲得免疫系にわけることができる。B細胞、T細胞などは獲得免疫系の免疫細胞であり、長期に渡る抗原特異的な反応にかかわっている。これに対し、マクロファージ・ナチュラルキラー（NK）細胞・樹状細胞などは自然免疫系の細胞とされており、短期かつ抗原非特異的な反応にかかわっている。自然免疫系は主として細菌やウイルス感染におけるプライマリーレスポンスを担い、中でも樹状細胞は強力かつ重要な構成細胞である。樹状細胞には極めて多くの亜種が存在するが、ミエロイド系樹状細胞（myeloid dendritic cell=mDC）とCD8⁺樹状細胞（CD8⁺dendritic cell=CD8⁺DC）及びプラズマサイトイド樹状細胞（plasmacytoid dendritic cell=pDC）に大別することができる。このうちpDCはウイルスに対して増殖阻害活性を示すIFN- γ の体内における主要な産生細胞であり、抗ウイルス生体防御において極めて重要な役割を持っている。

10

【0003】

pDCはエンドソーム内に局在するToll様受容体（Toll-like receptor=TLR）である、TLR7、TLR9を発現しており、これらの受容体がそのリガンドによって刺激されることにより活性化され、IFN- γ を産生する。IFN- γ はMxAなどのウイルス複製阻害因子、ウイルスを分解するRNA分解酵素の発現を誘導し、さらに他の免疫細胞であるマクロファージ、NK細胞、細胞傷害性T細胞、B細胞等の主要な免疫細胞を活性化し、強力なウイルス抵抗作用を誘導することが知られている（非特許文献1）。また、TLR7のリガンドとしてウイルス由来一本鎖RNAや抗ウイルス剤であるイミダゾキノリン、TLR9リガンドとして非メチル化CpGを含んだDNA配列が機能することが知られている。すなわち、ウイルス感染時には体内でpDCの活性化およびIFN- γ 産生がおこり、上述のような連鎖的なウイルス抵抗反応が誘導される。このため、B型及びC型肝炎などのウイルス病の治療にあたって、遺伝子組換え等の手法により生産されたIFN- γ タンパク質を筋肉内投与、皮下投与等の非経口投与する治療がおこなわれている。一方、ウイルスに対する免疫細胞の抵抗反応を、乳酸菌のような安全な食用微生物およびそれらの微生物による発酵食品を摂取して、経口的に誘導する例が数多く報告されている（非特許文献2）。しかし、このような報告の多くはマクロファージやmDC、NK細胞を活性化させているものであり、pDCを直接活性化してはいない。

20

【0004】

最近になって、Lactococcus lactis JCM 5805等のごく一部の乳酸菌がpDCを活性化し、IFN- γ 産生を誘導することや、そのIFN- γ 産生誘導活性がTLR9に依存的であることが報告されている（特許文献1及び非特許文献3）。これらの報告において、筆者らは無作為に選抜した多種多様の乳酸菌の中から、IFN- γ 産生誘導活性株をスクリーニングしている。しかし、高活性株はごく一部であり、100pg/mL以上のIFN- γ 産生誘導活性株が125株中3株（2.4%）でしか得られなかったとされている。また、上記特許文献1及び非特許文献3には、IFN- γ 産生誘導活性の高い乳酸菌をスクリーニングする技術として、マウス骨髓細胞中の樹状細胞（DC）と候補となる乳酸菌を共培養し、培養液中のIFN- γ をELISA法で測定する方法が開示されている。また、同様の実験はマウスの脾臓を用いても行うことができる。しかし、いずれの方法においても、各乳酸菌を1株ずつ数日間純粋培養後、集菌、洗浄、凍結乾燥する必要があること、適齢期のマウスよりpDC細胞を取得、培養する必要があること、IFN- γ 量をELISAで測定する必要があることから、膨大な時間とコストを必要とするという欠点があった。

30

40

【0005】

ところで、免疫賦活活性を有するオリゴヌクレオチド等のDNAをスクリーニングする方法において、TLR9リガンドとして知られる非メチル化CpGモチーフ含有ヌクレオチドに着目したスクリーニング方法が報告されている。例えば、非特許文献4には、プタTLR9を強制発現させた動物細胞（トランスフェクタント）に、乳酸菌由来の非メチル化CpGモチーフを含むオリゴヌクレオチドや、乳酸菌由来の非メチル化CpGモチーフを含まないオリゴヌクレオチド等を接触させ、該トランスフェクタントにおけるTLR9

50

への刺激の程度をNF- κ Bの活性化の程度を指標として、免疫賦活活性を有するオリゴヌクレオチドをスクリーニングする方法が、特許文献2（特開2005-027665号公報）には、ブタTLR9を強制発現させた動物細胞（トランスフェクタント）に、乳酸菌等の被験微生物由来の試料（細胞壁や、非メチル化CpGモチーフを有するDNA断片等）を接触させ、該トランスフェクタントにおけるTLR9の活性の上昇の程度を指標として、前記試料や被験微生物が腸管免疫系を活性化するか否かを評価する方法が、特許文献3（特表2002-517156号公報）には、非メチル化CpGモチーフを含むオリゴヌクレオチド等のオリゴヌクレオチドをマクロファージと共培養し、培養上清中のTh1サイトカイン産生量を指標として、ヒト免疫刺激活性を有するオリゴヌクレオチドをスクリーニングする方法が、開示されている。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】国際公開第2012/091081号

【特許文献2】特開2005-027665号公報

【特許文献3】特表2002-517156号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Immunol Rev (2010) 234 (1), 142-162

【非特許文献2】Br J Nutr (2011) 106 (4), 549-556

【非特許文献3】PLoS One. 2012; 7(4): e32588

【非特許文献4】Animal Science Journal (2004) 75(4), 377-382

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

上記の背景技術でも述べたように、IFN- γ 産生誘導活性の高い乳酸菌をスクリーニングする従来の方法では、膨大な時間とコストを必要とした。pDCを刺激する微生物を効率的にスクリーニングする簡単な手段があれば、さらにスクリーニングの範囲を広げることが可能となり、結果としてより増殖効率の良い菌、香味の優れた菌の選抜が短時間で行えと考えられる。さらに、より幅広い食品への応用や、より高いIFN- γ 産生誘導活性株を取得することも可能になると考えられる。これらのことから、IFN- γ 産生誘導活性の高い微生物の活性誘導物質の解明と、その特徴を利用した高活性微生物の効率的なスクリーニング法の開発が強く求められていた。また、上記の背景技術でも述べたように、食用微生物等を利用した従来の免疫賦活剤の多くは、マクロファージやmDC、NK細胞を活性化させているものであり、pDCを直接活性化してはいなかった。このため、pDCを直接刺激して、強力なウイルス耐性を誘導することができる微生物や、かかる微生物を利用した免疫賦活剤が求められていた。

30

【0009】

本発明の課題は、微生物又はDNAの免疫賦活活性（好ましくはIFN- γ 産生誘導活性）を効率的に予測する方法、免疫賦活活性（好ましくはIFN- γ 産生誘導活性）の高い微生物又はDNAを効率的にスクリーニングする方法、及び、かかる微生物又はDNA等を有効成分として含む免疫賦活剤（好ましくはIFN- γ 産生誘導剤）を提供することにある。また、本発明の課題は、IFN- γ 産生誘導活性以外の免疫賦活反応のうち、TLR9受容体刺激を通じた免疫賦活反応について、高活性であるところの微生物およびDNA断片を効率的にスクリーニングする方法を提供することや、pDCを直接刺激する微生物又はDNA等を有効成分として含む免疫賦活剤（好ましくはIFN- γ 産生誘導剤）を提供すること等にある。

40

【課題を解決するための手段】

【0010】

背景技術で述べたように、特許文献1および非特許文献3において、Lactococcus lact

50

is JCM 5805等のI F N - 産生誘導活性がT L R 9に依存的であることが報告されている。このことはこれらの乳酸菌の構成成分のうち、D N AがI F N - 産生誘導活性に必須であることを示している。本発明者らはこのことに着目し、I F N - が産生される乳酸菌はその染色体D N Aに特殊な構造を有しており、その構造を明らかにすれば、微生物のゲノム情報や遺伝子のD N A配列情報等の公開データベースを利用して、その構造含むD N Aや微生物を検索することが可能であり、I F N - 誘導活性の高いD N Aや微生物をより効率的にスクリーニングすることができると考え、研究を開始した。

【 0 0 1 1 】

前述のようにD N A断片のうち、非メチル化C p Gモチーフを含むものが、T L R 9刺激活性をもつことが知られている。また、特許文献1および非特許文献3においても非メチル化C p Gモチーフを含むオリゴD N Aがp D Cを活性化することが報告されている。本発明者は以上のことからI F N - 産生誘導活性の高いD N Aは非メチル化C p Gモチーフ数が多く含まれていること、I F N - 産生誘導活性の高い微生物は低い微生物に比べ、ゲノムD N A中により多くの非メチル化C p Gモチーフ数が含まれていると予想した。

【 0 0 1 2 】

本発明者らはこの仮説に基づいて、非メチル化C p Gモチーフ数の異なる同じヌクレオチド長のD N Aを合成し、非メチル化C p Gモチーフ数とI F N - 産生誘導活性との相関関係を調べた。その結果、非メチル化C p Gモチーフを全く持たないD N A断片や単位長さあたりの非メチル化C p Gモチーフ数が著しく低い断片は活性が認められなかった。一方、予想に反して、非メチル化C p Gモチーフ数が増加しても、I F N - 産生誘導活性は必ずしも増加せず、両者の間に明確な正の相関関係は認められなかった。

【 0 0 1 3 】

さらに本発明者らは、ゲノム情報を用いて、特許文献1および非特許文献3でI F N - 産生誘導活性の高いとされた微生物菌株についてゲノム中の全非メチル化C p Gモチーフ数を検索したところ、I F N - 産生誘導活性の低い株のゲノム中の全非メチル化C p Gモチーフ数よりも多いということとはなかった。これらの結果から本発明者は、I F N - 産生誘導活性の高いD N A断片であるためは、非メチル化C p Gモチーフ数とは異なる何らかのD N A構造が必要であると推察し、それを解明すべく鋭意研究を重ねた。その結果、I F N - 産生誘導活性の高いD N A断片は非メチル化C p Gモチーフ数を多く有していると同時に、D N A断片全体のG C含量が低く、多くても45%以下であること、G C含量が45%から35%の間において、G C含量とI F N - 産生誘導活性との間に負の相関関係があることを見出した。

【 0 0 1 4 】

さらに、非メチル化C p Gモチーフ数の割合が高いことと、G C含量が低いことが相反する事象であることから、本発明者らは、I F N - 産生誘導活性の高いD N A断片の非メチル化C p Gモチーフ数（又はその割合）およびG C含量をそれぞれ定義し、本発明を完成するに至った。さらに、本発明者は本定義にそって、各種微生物のゲノム構造を精査し、ゲノムD N Aの低G C含量領域における非メチル化C p Gモチーフ数又はその割合が高い微生物が、I F N - 産生誘導活性の高い微生物であることを証明し、本発明を完成させた。

【 0 0 1 5 】

すなわち、本発明は、

(1) 以下の工程 (A) ~ (F) を含むことを特徴とする、微生物の免疫賦活活性を予測する方法 :

(A) 前記微生物のゲノムD N Aの塩基配列データをデータベースから入手する工程 A :

(B) 前記微生物のゲノムD N Aの塩基配列データにおいて、互いに連続又は一部重複する50bp ~ 1000bpの範囲内の任意のD N A断片群の塩基配列データを得る工程 B :

(C) 前記D N A断片群の各D N A断片のG C含量を確認する工程 C :

(D) 前記D N A断片群のうち、G C含量が35%以下、40%以下又は45%以下であ

10

20

30

40

50

る低 G C 含量 D N A 断片を、前記ゲノム D N A の塩基配列上の対応する部分に配置し、該低 G C 含量 D N A 断片によってカバーされる前記微生物のゲノム D N A の領域を、前記微生物ゲノムにおける低 G C 含量領域とする工程 D :

(E) 前記低 G C 含量領域に含まれる非メチル化 C p G モチーフ数を合計し、低 G C 含量領域非メチル化 C p G モチーフ総数を算出する工程 E :

(F) 前記工程 (E) で算出された低 G C 含量領域非メチル化 C p G モチーフ総数が、微生物のゲノム D N A 1 万 b p 当たり 1 0 0 個以上である場合に、免疫賦活活性を有する微生物と予測する工程 F : や、

(2) 上記 (1) に記載の方法において免疫賦活活性を有する微生物と予測した微生物を、免疫賦活活性を有すると予測される微生物として選抜する工程 H を含むことを特徴とする、免疫賦活活性を有すると予測される微生物をスクリーニングする方法や、

(3) 工程 D における G C 含量が 4 0 % 以下であることを特徴とする上記 (1) 又は (2) に記載の方法や、

(4) 微生物が、乳酸菌であることを特徴とする上記 (1) ~ (3) のいずれかに記載の方法や、

(5) 乳酸菌が、球菌であることを特徴とする上記 (4) に記載の方法や、

(6) 免疫賦活活性が、プラズマサイトイド樹状細胞を介した I F N - 産生誘導活性であることを特徴とする上記 (1) ~ (5) のいずれかに記載の方法に関する。

【 0 0 1 6 】

また、本発明は、

(7) 以下の工程 (Q) ~ (S) を含むことを特徴とする、免疫賦活活性を有すると予測される D N A をスクリーニングする方法 :

(Q) 5 0 b p ~ 1 0 0 0 b p の範囲内の任意の D N A 断片群の塩基配列データを得る工程 Q :

(R) 前記 D N A 断片群の各 D N A 断片の G C 含量を確認し、G C 含量が 3 5 % 以下、4 0 % 以下又は 4 5 % 以下である D N A 断片を選抜する工程 R :

(S) 前記工程 R で選抜された D N A 断片に含まれる非メチル化 C p G モチーフ数を算出し、1 ヌクレオチドあたりの非メチル化 C p G モチーフ数が 0 . 0 1 7 個以上である D N A 断片を、免疫賦活活性を有する予測される D N A として選抜する工程 S : や、

(8) 工程 Q が、上記 (1) ~ (6) のいずれかに記載の方法により、免疫賦活活性を有すると予測した微生物のゲノム D N A の塩基配列データにおいて、5 0 b p ~ 1 0 0 0 b p の範囲内の任意の D N A 断片群の塩基配列データを得る工程であることを特徴とする上記 (7) に記載の方法に関する。

【 0 0 1 7 】

さらに、本発明は、

(9) G C 含量が 3 5 % 以下、4 0 % 以下又は 4 5 % 以下であり、1 ヌクレオチドあたりの非メチル化 C p G モチーフ数が 0 . 0 1 7 個以上であり、かつ、5 0 b p ~ 1 0 0 0 b p の範囲内である D N A を有効成分として含む免疫賦活剤や、

(1 0) D N A が、配列番号 1 7 3 ~ 1 7 7、1 7 9 ~ 1 8 1、1 8 3 ~ 1 8 5、1 8 7 ~ 1 9 0、1 9 4、2 1 3、2 1 4、2 1 6 ~ 2 2 0、2 2 5、2 2 9、2 3 1 及び 2 3 3 からなる群から選抜されるいずれかのヌクレオチド配列からなる D N A であることを特徴とする上記 (9) に記載の免疫賦活剤や、

(1 1) 上記 (1) ~ (6) のいずれかに記載の方法により、免疫賦活活性を有する微生物と予測される微生物又はその処理物を有効成分として含む免疫賦活剤や、

(1 2) 微生物が、I F N - 産生誘導活性を有する微生物であって、前記 I F N - 産生誘導活性が、前記微生物の乾燥物を骨髓由来樹状細胞の培養培地中に 1 0 μ g / m L となるように添加した後、3 7 $^{\circ}$ C、5 % C O ₂ 条件下で 2 日間、前記骨髓由来樹状細胞を培養した後の培養培地の上清中の I F N - 濃度が 1 0 0 p g / m L 以上となる I F N - 産生誘導活性であることを特徴とする上記 (1 1) に記載の免疫賦活剤や、

(1 3) ロイコノストック属又はペディオコッカス属に属する乳酸菌又はその処理物を有

10

20

30

40

50

効成分として含む上記(11)又は(12)に記載の免疫賦活剤に関する。

【発明の効果】

【0018】

本発明によると、微生物又はDNAの免疫賦活活性(好ましくはIFN- 産生誘導活性)を効率的に予測する方法、免疫賦活活性(好ましくはIFN- 産生誘導活性)の高い微生物又はDNAを効率的にスクリーニングする方法、及び、かかる微生物又はDNA等を有効成分として含む免疫賦活剤(好ましくはIFN- 産生誘導剤)を提供することができる。pDCを活性化し得る微生物又はDNAを含む免疫賦活剤は、pDCを直接刺激して、強力なウイルス耐性を誘導することができる。

【0019】

また、本発明の提供する微生物やDNAのスクリーニング方法はpDCのIFN- 産生誘導活性以外の免疫賦活反応のうち、TLR9受容体刺激によって誘導される免疫賦活反応のスクリーニングにも効果があると考えられる。これらの代表的な例をあげれば、IL-12産生誘導とそれに伴うTh1/2バランスの改善による喘息等アレルギーの抑制や、ワクチン投与時のアジュバント効果、B細胞の活性化などがあげられる。これらの免疫賦活反応にはいずれも非メチル化CpGモチーフを含むオリゴDNAや、特定の微生物が有効であるとされている(Nat Rev Immunol (2004) 4(4), 249-258、J Immunol (2013) 190 (4), 1591-1602)が、高活性配列や高活性株をスクリーニングする方法は明らかとなっていない。さらに、DNAにおいては非天然型のPS(ホスホロチオエート)結合を導入した骨格を有する等、合成コストや安全性の面でも課題が残されている。本発明によ

【0020】

後述の表14からも分かるように、ゲノム全体に含まれる低GC含量領域非メチル化CpGモチーフ数は、非メチル化CpGモチーフの総数と逆の傾向を示す。一方で、ゲノム全体における非メチル化CpGモチーフ数の出現頻度は、ゲノムDNAのGC含量と非常に強い相関を示すことが報告されている(J. Med. Microbiol. 63 (2), pp. 293-308)。すなわち、低GC含量非メチル化CpGモチーフ数は、ゲノムDNAのGC含量と一定程度、負の相関を示す。また、微生物の多くはゲノムDNAのGC含量が40%を超えており、非メチル化CpGモチーフの総数に対する低GC含量領域非メチル化CpGモチーフ総数の割合は通常それほど高くはなく、一定数以上(ゲノムの塩基数に対して一定割合以上)の低GC含量領域非メチル化CpGモチーフを有する微生物の割合はあまり高くない。そうすると、ゲノムの塩基数に対する低GC含量非メチル化CpGモチーフ総数が特定の割合以上であることを指標とした予測により、解析対象とする微生物を大きく絞り込むことが可能であり、本発明の微生物のスクリーニング方法は、スクリーニング方法としての有用性は極めて高いものと言える。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】本願実施例1の実験において、各DNA断片の非メチル化CpGモチーフ数とIFN- 産生誘導活性との相関関係を示す図である。

【図2】図1の実験結果のうち、DNA断片のGC含量が45%又は40%以下かどうかで、非メチル化CpGモチーフ数とIFN- 産生誘導活性との相関関係を分けて示した図である。図2A: GC含量が45%以下のDNA断片の結果を示す図である。図2B: GC含量が45%を超えるDNA断片の結果を示す図である。図2C: GC含量が40%以下のDNA断片の結果を示す図である。図2D: GC含量が40%を超えるDNA断片の結果を示す図である。

【図3】図1の実験結果を、DNA断片のGC含量の程度によって、6群(「~30」(30%以下)、「30~35」(30%より高く35%以下)、「35~40」(35%より高く40%以下)、「40~45」(40%より高く45%以下)、「45~50」(45%より高く50%以下)、「50~」(50%より高い))に分け、各群毎に求め

た「非メチル化CpGモチーフ1個当たりの活性」の平均値を示す図である。

【図4】本願実施例2の実験において、各DNA断片の非メチル化CpGモチーフ数とIFN- γ 産生誘導活性との相関関係を示す図である。

【図5】図4の実験結果のうち、DNA断片のGC含量が40%又は35%以下かどうかで、非メチル化CpGモチーフ数とIFN- γ 産生誘導活性との相関関係を分けて示した図である。図5A：GC含量が40%以下のDNA断片の結果を示す図である。図5B：GC含量が40%を超えるDNA断片の結果を示す図である。図5C：GC含量が35%以下のDNA断片の結果を示す図である。図5D：GC含量が35%を超えるDNA断片の結果を示す図である。

【図6】本願実施例3の実験の結果を、DNA断片のGC含量の程度によって、3群に分け、各群毎に求めた「非メチル化CpGモチーフ1個当たりの活性」の平均値を示す図である。図6A：「～45」（45%以下）、「45～55」（45%より高く55%以下）、「55～」(55%より高い)の3群に分けた図である。図6B：「40～」（40%以下）、「40～50」（40%より高く50%以下）、「50～」(50%より高い)の3群に分けた図である。

【発明を実施するための形態】

【0022】

本発明は、微生物の免疫賦活活性を予測する方法（以下、「本発明の微生物を予測する方法」とも表示する）、免疫賦活活性を有すると予測される微生物をスクリーニングする方法（以下、「本発明の微生物のスクリーニング方法」とも表示する）、DNAの免疫賦活活性を予測する方法（以下、「本発明のDNAを予測する方法」とも表示する）、免疫賦活活性を有すると予測されるDNAをスクリーニングする方法（以下、「本発明のDNAのスクリーニング方法」とも表示する）、及び、かかる微生物又はDNA等を有効成分として含む免疫賦活剤（以下、「本発明の免疫賦活剤」とも表示する）に関する。

【0023】

本明細書において非メチル化CpGモチーフとは、NNCGNN（但し、Nは、それぞれA、T、G、Cの任意のヌクレオチドを表す）で表記される6個のヌクレオチド配列（ヘキサマー）を意味する。また、本発明において、「DNA」や「ゲノムDNA」や「DNA断片」には、特に言及がない限りは、化合物としての実体を有するDNAやゲノムDNAやDNA断片のほか、ヌクレオチド配列（塩基配列）データであるDNAやゲノムDNAやDNA断片、すなわち、DNA配列やゲノムDNA配列やDNA断片配列も含まれる。本発明における「DNA」は、一本鎖であっても二本鎖であっても良く、また、該DNAが微生物に由来するDNAである場合は、センス鎖であってもアンチセンス鎖であってもよい。本明細書における「微生物由来のDNA」には、(x)その微生物から採取したDNA、及び、(y)その微生物から採取したDNAではないが、その微生物のゲノムDNAやその転写産物の全部又は一部のヌクレオチド配列と同一の又は相補的なヌクレオチド配列からなるDNAが含まれる。ゲノムDNA等のDNAが、細菌、ウイルス又は真菌等の微生物由来のDNAである場合は、哺乳動物由来のDNAである場合とは異なり、CpGモチーフのほとんどはメチル化されていないため、便宜上、CpGモチーフはすべて非メチル化CpGモチーフであるとみなす。また、本発明における免疫賦活活性としては、免疫賦活活性である限り特に制限されないが、プラズマサイトイド樹状細胞又はB細胞におけるTLR9の活性化を介した免疫賦活活性が好ましく、中でも、プラズマサイトイド樹状細胞におけるTLR9の活性化を介した免疫賦活活性がより好ましく、中でも、プラズマサイトイド樹状細胞におけるTLR9の活性化を介したI型インターフェロン（インターフェロン α 及び/又はインターフェロン β ）産生誘導活性がさらに好ましく、中でも、プラズマサイトイド樹状細胞におけるTLR9の活性化を介したインターフェロン γ 産生誘導活性が特に好ましい。

【0024】

< 1. 微生物の免疫賦活活性を予測する方法 >

本発明の提示する微生物の免疫賦活活性を予測する方法は、以下の工程(A)～(F)

を含むことを特徴とする。

(A) 前記微生物のゲノムDNAの塩基配列データをデータベースから入手する工程A:

(B) 前記微生物のゲノムDNAの塩基配列データにおいて、互いに連続又は一部重複する50bp~1000bpの範囲内の任意のDNA断片群の塩基配列データを得る工程B:

(C) 前記DNA断片群の各DNA断片のGC含量を確認する工程C:

(D) 前記DNA断片群のうち、GC含量が35%以下、40%以下又は45%以下である低GC含量DNA断片を、前記ゲノムDNAの塩基配列上の対応する部分に配置し、該低GC含量DNA断片によってカバーされる前記微生物のゲノムDNAの領域を、前記微生物ゲノムにおける低GC含量領域とする工程D:

(E) 前記低GC含量領域に含まれる非メチル化CpGモチーフ数を合計し、低GC含量領域非メチル化CpGモチーフ総数を算出する工程E:

(F) 前記工程(E)で算出された低GC含量領域非メチル化CpGモチーフ総数が、微生物のゲノムDNA 1万bp当たり100個以上である場合に、免疫賦活活性を有する微生物と予測する工程F:

【0025】

本発明の微生物を予測する方法のメリットである、微生物の免疫賦活活性を効率的に予測し得る点は、特に、多種(例えば10種以上、好ましくは20種以上)の微生物の免疫賦活活性を予測する場合により多く享受することができる。

【0026】

本発明における微生物としては、細菌、ウイルス及び真菌からなる群から選択される微生物が好ましく、中でも、細菌、ウイルスからなる群から選択される微生物がより好ましく、中でも、細菌がさらに好ましく、中でも、人体への安全性を確保しつつ、免疫賦活活性を得る観点から、乳酸菌、枯草菌がより好ましい。代表的な例として、ラクトコッカス属(Lactococcus)、ペディオコッカス属(Pediococcus)、ロイコノストック属(Leuconostoc)、ストレプトコッカス属(Streptococcus)、テトラジェノコッカス属(Tetragenococcus)、ラクトバチルス属(Lactobacillus)、エンテロコッカス属(Enterococcus)等の乳酸菌が挙げられる。中でも、菌体が小さいためpDCへより容易に取り込まれてより良い免疫賦活活性(好ましくはIFN- γ 産生誘導活性)が得られる可能性が高い点から、ラクトコッカス属、ペディオコッカス属、ロイコノストック属、ストレプトコッカス属、テトラジェノコッカス属、エンテロコッカス属等の乳酸球菌がさらに好ましい。これらの代表的なものとして、ラクトコッカス ラクティス、ロイコノストック メセンテロイデス、ペディオコッカス ペントサセウスが挙げられる。

【0027】

上記工程Aとしては、微生物のゲノムDNAの塩基配列(ヌクレオチド配列)データをデータベースから入手する工程である限り特に制限されず、用いるデータベースはNCBI等の公共のものデータベースであってもよいし、私用のものデータベースであってもよい。用いる塩基配列データは、免疫賦活活性を予測する対象である微生物と同属同種の微生物のゲノムDNAの塩基配列データである限り特に制限されず、予測する対象の微生物と同属同種の異株のゲノムDNAの塩基配列データであってもよいが、予測する対象の微生物と同属同種同株のゲノムDNAの塩基配列データが好ましい。また、本発明の微生物の予測方法を、後述の本発明の微生物のスクリーニング方法に用いる場合の「微生物のゲノムDNAの塩基配列データ」は、スクリーニングの対象を広げる観点から、スクリーニングの対象である微生物と同属同種異株のゲノムDNAの塩基配列データも、同属同種同株のゲノムDNAの塩基配列データと同程度に好ましい。本発明の微生物の予測方法や、微生物のスクリーニング方法において、同属同種異株のゲノムDNAの塩基配列データも用い得るのは、同属同種間ではゲノムDNAの配列の類似性がかなり高く、ゲノムDNAのGC含量や、低GC含量領域非メチル化CpGモチーフ数がかなり類似しているからである(例えば後述の表16参照)。同様に、本発明の微生物を予測する方法や、後述の本発明の微生物のスクリーニング方法の結果は、それに用いたゲノムDNAが由来する微生物

10

20

30

40

50

物と同属同種同株に適用することが好ましいが、該微生物と同属同種他株にも適用することができる。

【 0 0 2 8 】

本発明の微生物を予測する方法や、後述の本発明の微生物のスクリーニング方法に利用する「微生物のゲノムDNAの塩基配列データ」としては、必ずしも、その微生物の全ゲノムDNAの塩基配列データでなくてもよいが、免疫賦活活性の予測においてより高い精度を得る観点から、その微生物の全ゲノムDNAの塩基配列データの少なくとも50%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の割合のゲノムDNAの塩基配列データが挙げられ、最も好ましくは全ゲノムDNAの塩基配列データが挙げられる。

10

【 0 0 2 9 】

全ゲノムDNAの塩基配列が公知となっている乳酸菌の名称と、NCBI等の配列データベースにおける該ヌクレオチド配列のアクセッション番号を以下の表1～表3に例示する。

【 0 0 3 0 】

【表 1】

乳酸菌の名称	ゲノムDNAの アクセッション番号
Bifidobacterium adolescentis 22L	PRJNA240293
Bifidobacterium adolescentis ATCC 15703	PRJNA58559
Bifidobacterium animalis RH	PRJNA245929
Bifidobacterium animalis subsp. animalis ATCC 25527	PRJNA162513
Bifidobacterium animalis subsp. lactis AD011	PRJNA58911
Bifidobacterium animalis subsp. lactis ATCC 27673	PRJNA222803
Bifidobacterium animalis subsp. lactis B420	PRJNA163691
Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12	PRJNA158871
Bifidobacterium animalis subsp. lactis Bi-07	PRJNA163693
Bifidobacterium animalis subsp. lactis Bi-04	PRJNA59359
Bifidobacterium animalis subsp. lactis Bi12	PRJNA210081
Bifidobacterium animalis subsp. lactis BLC1	PRJNA158867
Bifidobacterium animalis subsp. lactis CNCM I-2494	PRJNA158869
Bifidobacterium animalis subsp. lactis DSM 10140	PRJNA59357
Bifidobacterium animalis subsp. lactis V9	PRJNA158865
Bifidobacterium asteroides PRL2011	PRJNA176921
Bifidobacterium bifidum BGN4	PRJNA167988
Bifidobacterium bifidum PRL2010	PRJNA59883
Bifidobacterium bifidum S17	PRJNA59545
Bifidobacterium breve 12L	PRJNA214949
Bifidobacterium breve 689b	PRJNA214955
Bifidobacterium breve ACS-071-V-Sch8b	PRJNA158863
Bifidobacterium breve JCM 7017	PRJNA214950
Bifidobacterium breve JCM 7019	PRJNA214951
Bifidobacterium breve NCFB 2258	PRJNA214954
Bifidobacterium breve S27	PRJNA214956
Bifidobacterium breve UCC2003	PRJNA193702
Bifidobacterium coryneforme LMG 18911	PRJNA239194
Bifidobacterium dentium Bd1	PRJNA43091
Bifidobacterium longum BXY01	PRJNA251950
Bifidobacterium longum subsp. infantis ATCC 15697 = JCM 1222 = DSM 20088	PRJNA58677
Bifidobacterium longum subsp. infantis ATCC 15697 = JCM 1222 = DSM 20088	PRJNA159865
Bifidobacterium longum subsp. longum BBMN68	PRJNA60163
Bifidobacterium longum subsp. longum JCM 1217	PRJNA62695
Bifidobacterium longum subsp. longum JDM301	PRJNA49131
Bifidobacterium thermophilum RBL67	PRJNA193770

【 0 0 3 1 】

10

20

30

40

【表 2】

乳酸菌の名称	ゲノムDNAの アクセッション番号
<i>Enterococcus faecalis</i> DENG1	PRJNA187445
<i>Enterococcus faecalis</i> OG1RF	PRJNA54927
<i>Enterococcus faecalis</i> str. Symbioflor 1	PRJNA183342
<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-14	PRJNA201479
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	PRJNA57685
<i>Lactobacillus casei</i> BL23	PRJNA59237
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 2038	PRJNA161929
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842	PRJNA58647
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC BAA-365	PRJNA57987
<i>Lactobacillus fermentum</i> CECT 5716	PRJNA162003
<i>Lactobacillus fermentum</i> F-6	PRJNA203391
<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	PRJNA58865
<i>Lactobacillus gasseri</i> ATCC 33323	PRJNA57687
<i>Lactobacillus helveticus</i> CNRZ32	PRJNA212302
<i>Lactobacillus helveticus</i> DPC 4571	PRJNA58761
<i>Lactobacillus helveticus</i> H9	PRJNA49151
<i>Lactobacillus helveticus</i> R0052	PRJNA174439
<i>Lactobacillus johnsonii</i> DPC 6026	PRJNA162057
<i>Lactobacillus johnsonii</i> N6.2	PRJNA229876
<i>Lactobacillus johnsonii</i> NCC 533	PRJNA58029
<i>Lactobacillus plantarum</i> JDM1	PRJNA59361
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 20016	PRJNA58471
<i>Lactobacillus reuteri</i> JCM 1112	PRJNA58875
<i>Lactobacillus reuteri</i> TD1	PRJNA213089
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 8530	PRJNA162169
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	PRJNA59313
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK900	PRJNA210957
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK908	PRJNA210958
<i>Lactobacillus ruminis</i> ATCC 27782	PRJNA73417
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 23K	PRJNA58281

【表 3】

乳酸菌の名称	ゲノムDNAの アクセッション番号
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> KW2	PRJNA219629
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363	PRJNA58837
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NZ9000	PRJNA167481
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> II1403	PRJNA57671
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IO-1	PRJNA192185
<i>Leuconostoc gasicomitatum</i> LMG 18811	PRJNA50385
<i>Leuconostoc gelidum</i> JB7	PRJNA175682
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KFRI-MG	PRJNA18679
<i>Leuconostoc</i> sp. C2	PRJNA68743
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745	PRJNA57981
<i>Pediococcus pentosaceus</i> SL4	PRJNA227215
<i>Streptococcus thermophilus</i> ASCC 1275	PRJNA222865
<i>Streptococcus thermophilus</i> CNRZ1066	PRJNA58221
<i>Streptococcus thermophilus</i> JIM 8232	PRJEA162157
<i>Streptococcus thermophilus</i> LMG 18311	PRJNA58219
<i>Streptococcus thermophilus</i> MN-ZLW-002	PRJNA166827
<i>Streptococcus thermophilus</i> ND03	PRJNA162015
<i>Tetragenococcus halophilus</i> NBRC 12172	PRJNA74441

10

20

30

【 0 0 3 3 】

上記工程 B としては、微生物のゲノム DNA の塩基配列データにおいて、互いに連続又は一部重複する 50 bp ~ 1000 bp の範囲内の任意の DNA 断片群の塩基配列データを得る工程である限り特に制限されない。上記の「互いに連続する 50 bp ~ 1000 bp の範囲内の任意の DNA 断片群の塩基配列データを得る」とは、50 bp ~ 1000 bp の範囲内の DNA 断片同士が互いに連続するような DNA 断片群の塩基配列データを得ることを意味し、互いに連続する 200 bp の DNA 断片群の塩基配列データを得る場合を例に説明すると、例えば、ゲノム DNA のヌクレオチド番号 1 ~ 200 のヌクレオチドからなる DNA 断片、ヌクレオチド番号 201 ~ 400 のヌクレオチドからなる DNA 断片、ヌクレオチド番号 401 ~ 600 のヌクレオチドからなる DNA 断片、といったように、互いに連続する DNA 断片群の塩基配列データを得ることが挙げられる。また、上記の「互いに一部重複する 50 bp ~ 1000 bp の範囲内の任意の DNA 断片群の塩基配列データを得る」とは、50 bp ~ 1000 bp の範囲内の DNA 断片同士が互いに一部重複するような DNA 断片群の塩基配列データを得ることを意味し、互いに一部重複する 200 bp の DNA 断片群の塩基配列データを、100 bp 毎にスライドさせて得る場合を例に説明すると、例えば、ゲノム DNA のヌクレオチド番号 1 ~ 200 のヌクレオチドからなる DNA 断片、ヌクレオチド番号 101 ~ 300 のヌクレオチドからなる DNA 断片、ヌクレオチド番号 201 ~ 400 のヌクレオチドからなる DNA 断片、というように、互いに一部重複する DNA 断片群の塩基配列データを得ることが挙げられる。

40

【 0 0 3 4 】

50

免疫賦活活性の評価や予測においてより高い精度を得る観点から、上記工程 B において、互いに連続する任意の DNA 断片群ではなく、互いに一部重複する任意の DNA 断片群の塩基配列データを得ることが好ましい。

【 0 0 3 5 】

上記工程 B における任意の DNA 断片群の長さは、50 bp ~ 1000 bp の範囲内である限り特に制限されないが、60 bp ~ 800 bp の範囲内が好ましく、80 bp ~ 600 bp の範囲内がより好ましく、100 bp ~ 500 bp の範囲内がさらに好ましく、150 bp ~ 400 bp の範囲内（好ましくは 180 bp ~ 355 bp の範囲内）がより好ましく、150 bp ~ 230 bp の範囲内又は 230 bp ~ 400 bp の範囲内がさらに好ましく、150 bp ~ 230 bp の範囲内がより好ましく、200 bp がさらに好ましい。また、工程 B における任意の DNA 断片群の長さは、50 bp ~ 1000 bp の範囲内である限り、すべて同じであってもよいし、異なるものを含んでいてもよいが、すべて同じ長さであることが好ましい。

【 0 0 3 6 】

「互いに一部重複する 50 bp ~ 1000 bp の範囲内の任意の DNA 断片群の塩基配列データを得る」ことの好適な態様として、50 bp ~ 1000 bp の範囲内のいずれかの長さの DNA 断片の開始ヌクレオチドを、微生物のゲノム DNA の塩基配列データ上で、1 ~ 20 bp の範囲内のいずれか毎（好ましくは 1 bp 毎）にスライドさせて、DNA 断片群の塩基配列データを得る態様が挙げられる。

【 0 0 3 7 】

上記工程 C としては、上記工程 B における DNA 断片群の各 DNA 断片の GC 含量（％）を確認する工程である限り特に制限されない。DNA 断片の GC 含量を確認する方法としては、上記工程 A で入手した、その微生物のゲノム DNA の塩基配列データから、各 DNA 断片の塩基配列データが既知であることを用いて、その塩基配列に基づいて GC 含量（％）を算出して確認する方法が挙げられる。代表的な方法としては、GENETYX や BioEdit のような塩基配列解析ソフトウェアを用いて、塩基配列に占めるグアニンおよびシトシンの塩基数をカウントし、その塩基数を、塩基配列全体の塩基数で除して、その割合（％）を求めることにより、GC 含量（％）を算出することができる。

【 0 0 3 8 】

上記工程 D としては、上記工程 C の DNA 断片群のうち、GC 含量が 35 % 以下、40 % 以下又は 45 % 以下である低 GC 含量 DNA 断片を、ゲノム DNA の塩基配列上の対応する部分に配置し、該低 GC 含量 DNA 断片によってカバーされる微生物のゲノム DNA の領域を、前記微生物ゲノムにおける低 GC 含量領域とする工程である限り特に制限されない。「低 GC 含量 DNA 断片を、ゲノム DNA の塩基配列上の対応する部分に配置し」における「ゲノム DNA の塩基配列上の対応する部分」とは、ゲノム DNA の塩基配列において、その低 GC 含量 DNA 断片の塩基配列と一致する部分を意味する。また、「低 GC 含量 DNA 断片を、ゲノム DNA の塩基配列上の対応する部分に配置」する際、低 GC 含量 DNA 断片同士の塩基配列がゲノム DNA 上で連続している場合は、ゲノム DNA の塩基配列上に低 GC 含量 DNA 断片を連続して配置することになり、他方、低 GC 含量 DNA 断片同士の塩基配列が一部重複している場合は、ゲノム DNA の塩基配列上に一部重複させて配置することになる。また、工程 D における「配置し」は配列データ上で配置すればよい。

【 0 0 3 9 】

なお、上記工程 D で用いる DNA 断片の GC 含量は 35 % 以下、40 % 以下又は 45 % 以下であればよいが、より優れた免疫賦活活性をより高い確率で有する微生物であると評価又は予測する観点から、GC 含量は 40 % 以下であることが好ましく、35 % 以下であることがより好ましい。ただし、工程 D で用いる DNA 断片の GC 含量が、35 % より高く 40 % 以下である場合や、GC 含量が 40 % より高く 45 % 以下である場合にも、優れた免疫賦活活性を有すると評価できる微生物が含まれているため、工程 D で用いる GC 含量の基準は状況に応じて適宜選ぶことができる。

【 0 0 4 0 】

上記工程 E としては、微生物ゲノム DNA において上記工程 D で特定した低 GC 含量領域に含まれる非メチル化 CpG モチーフ数を合計し、低 GC 含量領域非メチル化 CpG モチーフ総数を算出する工程である限り特に制限されない。代表的な方法としては、GENETYX や BioEdit のような塩基配列解析ソフトウェアを用いて、目的とする塩基配列に含まれる非メチル化 CpG モチーフ数をカウントすることができる。

【 0 0 4 1 】

本発明の微生物の予測方法等において、各 DNA 断片の非メチル化 CpG モチーフ数の計測自体は、工程 C 及び D を行った後に、工程 E において初めて行ってもよいし、工程 B と工程 C の間や、工程 C と工程 D の間に行ってもよく、いずれの態様も、工程 A ~ F を含む本発明の微生物の予測方法に含まれるが、各 DNA 断片間の非メチル化 CpG モチーフ数の重複を排除する必要がなく、より簡便である点で、工程 D において低 GC 含量領域を特定したのち、該領域に含まれる非メチル化 CpG モチーフ数を計測して合計する方法が好ましく挙げられる。

10

【 0 0 4 2 】

上記工程 F としては、上記工程 E で算出された低 GC 含量領域非メチル化 CpG モチーフ総数が、微生物のゲノム DNA 1 万 bp 当たり 100 個以上である場合に、前記微生物を、免疫賦活活性を有する微生物と予測する工程である限り特に制限されないが、より優れた免疫賦活活性をより高い確率で有する微生物であると予測する観点から、微生物のゲノム DNA 1 万 bp 当たりの前記低 GC 含量領域非メチル化 CpG モチーフ総数が 125 個以上であることが好ましく、150 個以上であることがより好ましい。微生物のゲノム DNA 1 万 bp 当たりの前記低 GC 含量領域非メチル化 CpG モチーフ総数の上限は、特に制限されないが、非メチル化 CpG モチーフ総数があまり増加すると、ゲノム DNA の GC 含量が上昇し、低 GC 含量領域非メチル化 CpG モチーフが減少するという関係があることから、自ずと上限があり、通常は、微生物のゲノム DNA 1 万 bp 当たりの前記低 GC 含量領域非メチル化 CpG モチーフ総数は通常、500 個以下である。

20

【 0 0 4 3 】

本発明の微生物を予測する方法は、上記工程 A ~ F に加えて、さらに以下の工程 G を有していてもよく、特に、免疫賦活活性を予測したい微生物と、用いるゲノム DNA が由来する微生物とが同属同種の異株の関係になる場合は、かかる工程 G を有していることが好ましい。なお、かかる工程 G における微生物は、実体を有する微生物に限られる。

30

(G) 前記工程 F で免疫賦活活性を有すると予測した微生物の免疫賦活活性を測定する工程 G :

【 0 0 4 4 】

上記工程 G をさらに有していると、微生物の免疫賦活活性（好ましくは IFN - 産生誘導活性）を確実に評価することができる。工程 G で用いる微生物は、工程 F で免疫賦活活性を有すると予測した微生物であり、きわめて高い蓋然性で免疫賦活活性（好ましくは IFN - 産生誘導活性）を有するため、すべての候補微生物について免疫賦活活性（好ましくは IFN - 産生誘導活性）を測定する場合と比較して、微生物の免疫賦活活性（好ましくは IFN - 産生誘導活性）を効率的に測定することができる。

40

【 0 0 4 5 】

本発明に用いる微生物は、例えば、理化学研究所 バイオリソースセンター（日本国 茨城県つくば市高野台 3 丁目 1 番地の 1）、独立行政法人製品評価技術基盤機構生物遺伝資源部門（<http://www.nbrc.nite.go.jp>）、American type culture collection（米国）、東京農業大学・菌株保存室（<http://nodaiweb.university.jp/nric/>；日本国 東京都世田谷区桜丘 1 丁目 1 番 1 号）、財団法人発酵研究所（日本国 大阪府大阪市淀川区十三本町 2 丁目 1 7 番 8 5 号）、DANISCO 社などから入手することができる。

【 0 0 4 6 】

上記工程 G において測定対象とする免疫賦活活性としては、免疫賦活活性である限り特に制限されないが、プラズマサイトイド樹状細胞（pDC）における TLR9 の活性化を

50

介した I 型インターフェロン (I F N - 及び / 又は I F N -) 産生誘導活性が好ましく、中でも、p D C における T L R 9 の活性化を介した I F N - 産生誘導活性がより好ましい。

【 0 0 4 7 】

上記工程 G における免疫賦活活性を測定する方法としては特に制限されず、公知の方法によって測定することができ、例えば、I F N - 産生誘導活性を測定する場合の公知の方法として、以下の方法を好ましく挙げることができる。

【 0 0 4 8 】

(p D C を利用した、微生物の I F N - 産生誘導活性の詳細な測定方法)

マウス等の哺乳動物 (好ましくはマウス) の大腿骨等から骨髓細胞を回収し、赤血球除去処理を行って、骨髓細胞を用意する。得られた骨髓細胞を、10 % F C S 、 2 μ M - メルカプトエタノールを含有する R P M I 培地 (S I G M A 社製) に、 5×10^5 個 / m L になるように懸濁する。得られた細胞培養液に、微生物の乾燥物 (好ましくは凍結乾燥物、より好ましくは凍結乾燥菌体) を 10 μ g / m L となるように添加する。37 、 5 % C O ₂ に維持したインキュベーター内で 2 日間培養した後に上清を回収し、該上清中の I F N - 濃度を測定する。かかる I F N - 濃度の測定には、E L I S A 法によるキット (P B L Assay Science 社製) を用いることができる。なお、微生物として生菌体を用いる場合は、培養した生菌体を一度凍結乾燥し、それを P B S に懸濁した液体を、骨髓由来樹状細胞の細胞培養液に添加することが好ましい。

【 0 0 4 9 】

本発明における哺乳動物としては、マウス、ラット、モルモット、ヒト、サル、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ等を挙げることができる。

【 0 0 5 0 】

本発明の微生物を予測する方法における、I F N - 産生誘導活性を有する微生物の好適な態様としては、上記の「微生物の I F N - 産生誘導活性の詳細な測定方法」による培養上清中の I F N - 濃度が、50 p g / m L 以上、好ましくは 75 p g / m L 以上、より好ましくは 100 p g / m L 以上、さらに好ましくは 150 p g / m L 以上、より好ましくは 200 p g / m L 以上である微生物を挙げることができる。

【 0 0 5 1 】

< 2 . 本発明の微生物のスクリーニング方法 >

本発明の免疫賦活活性を有すると予測される微生物をスクリーニングする方法は、本発明の微生物を予測する方法において免疫賦活活性を有すると予測した微生物を、免疫賦活活性を有すると予測される微生物として選抜する工程 H を含むことを特徴とする。選抜する対象である免疫賦活活性を有すると予測される微生物としては、低 G C 含量領域非メチル化 C p G モチーフ総数が、微生物のゲノム D N A 1 万 b p 当たり、100 個以上である限り特に制限されないが、より優れた免疫賦活活性を有する微生物をより高い確率で得る観点から、125 個以上であることが好ましく、150 個以上であることがより好ましい。選抜する対象である微生物の、ゲノム D N A 1 万 b p 当たりの前記低 G C 含量領域非メチル化 C p G モチーフ総数の上限は、特に制限されないが、通常、500 個以下である。

【 0 0 5 2 】

本発明の微生物のスクリーニング方法は、上記工程 H に加えて、さらに以下の工程 I 及び工程 J を有していてもよく、特に、選抜したい微生物と、用いるゲノム D N A が由来する微生物とが同属同種の異株の関係になる場合は、かかる工程 I 及び工程 J を有していることが好ましい。なお、かかる工程 I 及び工程 J に用いる微生物は、実体を有する微生物に限られる。

(I) 前記工程 H で選抜した免疫賦活活性を有すると予測される微生物の免疫賦活活性を測定する工程 I :

(J) 前記工程 I で免疫賦活活性が確認された微生物を、免疫賦活活性を有する微生物として選抜する工程 J :

【 0 0 5 3 】

上記工程 I において測定対象とする免疫賦活活性としては、免疫賦活活性である限り特に制限されないが、プラズマサイトイド樹状細胞 (p D C) における T L R 9 の活性化を介した I 型インターフェロン (I F N - 及び / 又は I F N -) 産生誘導活性が好ましく、中でも、p D C における T L R 9 の活性化を介した I F N - 産生誘導活性がより好ましい。

【 0 0 5 4 】

かかる工程 I 及び工程 J をさらに有していると、免疫賦活活性 (好ましくは I F N - 産生誘導活性) を確実に有する微生物を選抜することができる。工程 I で用いる微生物は、工程 H で免疫賦活活性 (好ましくは I F N - 産生誘導活性) を有すると予測される微生物として選抜した微生物であり、きわめて高い蓋然性で免疫賦活活性 (好ましくは I F N - 産生誘導活性) を有するため、すべての候補微生物について免疫賦活活性 (好ましくは I F N - 産生誘導活性) を測定して免疫賦活活性 (好ましくは I F N - 産生誘導活性) を有する微生物を選抜する場合と比較して、免疫賦活活性 (好ましくは I F N - 産生誘導活性) を有する微生物を効率的に選抜することができる。このように、本発明の微生物のスクリーニング方法は、免疫賦活活性を有する微生物の一次スクリーニングとして、好適に用いることもできる。

【 0 0 5 5 】

上記工程 I における微生物の免疫賦活活性 (好ましくは I F N - 産生誘導活性) を測定する方法は、上記の本発明の微生物を予測する方法において述べたとおりである。

【 0 0 5 6 】

上記工程 J は、先に述べたように、「工程 I で免疫賦活活性が確認された微生物を、免疫賦活活性を有する微生物として選抜する工程 J 」であるが、好ましくは、「工程 I で免疫賦活活性が確認された微生物のうち、免疫賦活活性 (好ましくは I F N - 産生誘導活性) の優れた微生物を選抜する工程 J ' 」である。かかる工程 J ' における「免疫賦活活性 (好ましくは I F N - 産生誘導活性) の優れた微生物を選抜する」ことには、上記の「微生物の I F N - 産生誘導活性の詳細な測定方法」による I F N - の濃度が、5 0 p g / m L 以上、好ましくは 7 5 p g / m L 以上、より好ましくは 1 0 0 p g / m L 以上、さらに好ましくは 1 5 0 p g / m L 以上、より好ましくは 2 0 0 p g / m L 以上の微生物を選抜することや、上記の「微生物の I F N - 産生誘導活性の詳細な測定方法」による I F N - の濃度が、ラクトコッカス ラクティス J C M 5 8 0 5 株のその I F N - の濃度に対して 1 2 . 5 % 以上、好ましくは 1 8 . 7 5 % 以上、より好ましくは 2 5 % 以上、さらに好ましくは 3 7 . 5 % 以上、より好ましくは 5 0 % 以上、さらに好ましくは 7 5 % 以上、より好ましくは 1 0 0 % 以上の微生物を選抜することが含まれる。なお、ラクトコッカス ラクティス J C M 5 8 0 5 株の I F N - 産生誘導活性はきわめて高いことが知られている (特許文献 1) 。

【 0 0 5 7 】

前述の本発明の微生物を予測する方法や、本発明の微生物のスクリーニング方法において、免疫賦活活性 (好ましくは I F N - 産生誘導活性) を有すると予測した微生物や、免疫賦活活性 (好ましくは I F N - 産生誘導活性) を有すると予測される微生物として選抜した微生物、中でも特に、免疫賦活活性 (好ましくは I F N - 産生誘導活性) を実際に測定し、免疫賦活活性 (好ましくは I F N - 産生誘導活性) を有する微生物と評価した微生物や、免疫賦活活性 (好ましくは I F N - 産生誘導活性) を有する微生物として選抜した微生物は、後述の免疫賦活剤 (好ましくは I F N - 産生誘導剤) などとして使用することができる。

【 0 0 5 8 】

< 3 . 本発明の D N A を予測する方法 >

本発明の D N A の免疫賦活活性を予測する方法は、以下の工程 K ~ N を含むことを特徴とする。

(K) D N A の塩基配列データを入手する工程 K :

(L) DNAのGC含量を確認する工程L:

(M) DNAに含まれる非メチル化CpGモチーフ数を確認する工程M:

(N) GC含量が35%以下、40%以下又は45%以下であり、かつ、1ヌクレオチド当たりの前記非メチル化CpGモチーフ数が0.017個以上であるDNAを、免疫賦活活性を有するDNAと予測する工程N:

【0059】

本発明のDNAを予測する方法のメリットである、DNAの免疫活性を効率的に予測し得る点は、特に、多種(例えば10種以上、好ましくは20種以上)のDNAの免疫賦活活性を評価等する場合により多く享受することができる。

【0060】

本発明のDNAを予測する方法や、後述の本発明のDNAのスクリーニング方法に用いるDNAは、細菌、ウイルス、真菌等の微生物に由来するDNAであってもよいし、いずれの微生物にも由来しない、任意に設計されたDNAであってもよく、また、好適な態様として、本発明の微生物を予測する方法や、本発明の微生物のスクリーニング方法により、免疫賦活活性を有すると予測された微生物のゲノムDNAの塩基配列データにおける50bp~1000bpの範囲内の任意のDNA断片を挙げることができる。

【0061】

本発明のDNAを予測する方法や、後述の本発明のDNAのスクリーニング方法に用いるDNAの長さは、50bp~1000bpの範囲内である限り特に制限されないが、60bp~800bpの範囲内が好ましく、80bp~600bpの範囲内がより好ましく、100bp~500bpの範囲内がさらに好ましく、150bp~400bpの範囲内(好ましくは180bp~355bpの範囲内)がより好ましく、150bp~230bpの範囲内又は230bp~400bpの範囲内がさらに好ましく、150bp~230bpの範囲内がより好ましく、180bp~214bpの範囲内がさらに好ましい。

【0062】

上記工程Kとしては、DNAの塩基配列データを入手する工程である限り特に制限されず、例えば、NCBI等の公共のデータベースや、私用のデータベースからDNAの塩基配列データを入手してもよい。また、DNAの塩基配列データは、微生物由来のDNAの塩基配列データであってもよいし、微生物由来のDNAではなく、塩基配列を任意に決定したDNAの塩基配列データであってもよい。

【0063】

上記工程Lとしては、DNAのGC含量を確認する工程である限り特に制限されず、DNAのGC含量を確認する方法としては、上記工程Kで入手した、該DNAの塩基配列データの塩基配列に基づいてGC含量(%)を算出して確認する方法が挙げられる。代表的な方法としては、GENETYXやBioEditのような塩基配列解析ソフトウェアを用いて、塩基配列に占めるグアニンおよびシトシンの塩基数をカウントし、その塩基数を、塩基配列全体の塩基数で除して、その割合(%)を求めることにより、GC含量(%)を算出することができる。

【0064】

上記工程Mとしては、DNAに含まれる非メチル化CpGモチーフ数を確認する工程である限り特に制限されず、代表的な方法としては、GENETYXやBioEditのような塩基配列解析ソフトウェアを用いて、目的とする塩基配列に含まれる非メチル化CpGモチーフ数をカウントすることができる。

【0065】

上記工程L及びMはどちらの工程を先に行ってもよい。また、工程Lを先に行う場合、GC含量が35%以下、40%以下又は45%以下であると確認されたDNAについてのみ、次の工程Mで非メチル化CpGモチーフ数を確認してもよいし、他方、工程Mを先に行う場合、DNA 1ヌクレオチド当たりの非メチル化CpGモチーフ数が0.017個以上であるDNAと確認されたDNAについてのみ、次の工程LでGC含量を確認してもよい。

【0066】

上記工程Nとしては、GC含量が35%以下、40%以下又は45%以下であり、かつ、1ヌクレオチド当たりの前記非メチル化CpGモチーフ数が0.017個以上であるDNAを、免疫賦活活性を有するDNAと予測する工程である限り特に制限されない。免疫賦活活性を有すると予測するDNAのGC含量は35%以下、40%以下又は45%以下であるが、より優れた免疫賦活活性をより高い確率で有するDNAであると評価又は予測する観点から、40%以下のDNAを選択することが好ましく、35%以下のDNAを選択することがより好ましい。ただし、GC含量が35%より高く40%以下のDNAや、GC含量が40%より高く45%以下のDNAの中にも、優れた免疫賦活活性を有するDNAも含まれているため、選択するDNAのGC含量の基準は状況に応じて適宜選ぶことができる。

10

【0067】

上記工程Nにおける、1ヌクレオチド当たりの非メチル化CpGモチーフ数としては、0.017個以上である限り特に制限されないが、より優れた免疫賦活活性（好ましくはIFN- 産生誘導活性）を有するDNAをより高い確率で得る観点から、0.025個以上であることが好ましく、0.0375個以上であることがより好ましく、0.05個以上であることがさらに好ましく、0.0625個以上であることがより好ましく、0.075個以上であることがさらに好ましい。予測するDNAにおける、1ヌクレオチド当たりの非メチル化CpGモチーフ数の上限は特に制限されないが、GC含量が45%以下であることから自ずと上限があり、通常は、0.125個以下である。

20

【0068】

本発明のDNAを予測する方法は、上記工程K～Nに加えて、さらに以下の工程Oを有していてもよい。なお、かかる工程Oに用いるDNAは、化合物としての実体を有するDNAに限られる。

（O）前記工程Nで免疫賦活活性を有すると予測したDNAの免疫賦活活性を測定する工程O：

【0069】

上記工程Oをさらに有していると、DNAの免疫賦活活性（好ましくはIFN- 産生誘導活性）を確実に評価することができる。工程Oで用いるDNAは、工程Nで免疫賦活活性を有すると予測したDNAであり、きわめて高い蓋然性で免疫賦活活性（好ましくはIFN- 産生誘導活性）を有するため、すべての候補DNAについて免疫賦活活性（好ましくはIFN- 産生誘導活性）を測定する場合と比較して、DNAの免疫賦活活性（好ましくはIFN- 産生誘導活性）を効率的に測定することができる。

30

【0070】

上記工程Oに用いるDNAを得る方法としては、既知の塩基配列情報に基づいてDNAを調製する方法が挙げられ、代表的な方法としては、PCRによって目的とするDNA断片を増幅することや、その増幅DNA断片を用いて該DNA断片を発現する組換えDNAを作製し、該組換えDNAを宿主微生物に導入し、その宿主微生物内で目的とするDNA断片を発現させることや、化学的手法によって目的とするオリゴヌクレオチドを合成することが挙げられる。

40

【0071】

上記工程Oにおいて測定対象とする免疫賦活活性としては、免疫賦活活性である限り特に制限されないが、プラズマサイトイド樹状細胞（pDC）におけるTLR9の活性化を介したI型インターフェロン（IFN- 及び/又はIFN- ）産生誘導活性が好ましく、中でも、pDCにおけるTLR9の活性化を介したIFN- 産生誘導活性がより好ましい。

【0072】

上記工程Oにおける免疫賦活活性を測定する方法としては特に制限されず、公知の方法によって測定することができ、例えば、IFN- 産生誘導活性を測定する場合の公知の方法として、以下の方法を好ましく挙げることができる。

50

【 0 0 7 3 】

(p D C を利用した、 D N A の I F N - 産生誘導活性の詳細な測定方法)

上記の微生物の I F N - 産生誘導活性の詳細な測定方法において述べた方法で骨髓由来樹状細胞を調製する。 I F N - 産生誘導活性を測定したい D N A を $2 \mu\text{g} / \text{mL}$ となるように該細胞の細胞培養液に添加し、 48 時間後に培養上清を回収する。培養上清に含まれる I F N - 濃度を測定する。かかる I F N - 濃度の測定には、 E L I S A 法によるキット (PBL Assay Science 社製) を用いることができる。

【 0 0 7 4 】

本発明の D N A を予測する方法における、 I F N - 産生誘導活性を有する D N A の好適な態様としては、上記の「 D N A の I F N - 産生誘導活性の詳細な測定方法」による培養上清中の I F N - 濃度が、 $50 \text{ pg} / \text{mL}$ 以上、好ましくは $75 \text{ pg} / \text{mL}$ 以上、より好ましくは $100 \text{ pg} / \text{mL}$ 以上、さらに好ましくは $150 \text{ pg} / \text{mL}$ 以上、より好ましくは $200 \text{ pg} / \text{mL}$ 以上、さらに好ましくは $300 \text{ pg} / \text{mL}$ 以上、より好ましくは $400 \text{ pg} / \text{mL}$ 以上である D N A を挙げることができる。

【 0 0 7 5 】

< 4 . 本発明の D N A のスクリーニング方法 >

本発明の免疫賦活活性を有すると予測される D N A をスクリーニングする方法は、本発明の D N A の免疫賦活活性を予測する方法において免疫賦活活性を有する D N A と予測した D N A を、免疫賦活活性を有すると予測される D N A として選抜する工程 P を含むことを特徴とする。また、本発明の D N A のスクリーニング方法のうち、好適な態様として、以下の工程 (Q) ~ (S) を含むスクリーニング方法が挙げられる。

(Q) $50 \text{ bp} \sim 1000 \text{ bp}$ の範囲内の任意の D N A 断片群を得る工程 Q :

(R) 前記 D N A 断片群の各 D N A 断片の G C 含量を確認し、 G C 含量が 30 %、 40 % 又は 45 % 以下である D N A 断片を選抜する工程 R :

(S) 前記工程 R で選抜された各 D N A 断片に含まれる非メチル化 C p G モチーフ数を算出し、 1 ヌクレオチドあたりの非メチル化 C p G モチーフ数が 0 . 017 個以上である D N A 断片を、 I F N - 産生誘導活性を有すると予測される D N A として選抜する工程 S :

【 0 0 7 6 】

工程 Q の好ましい態様として、本発明の微生物を予測する方法又は微生物をスクリーニングする方法により、免疫賦活活性 (好ましくは I F N - 産生誘導活性) を有する微生物と予測した微生物のゲノム D N A において、 $50 \text{ bp} \sim 1000 \text{ bp}$ の範囲内の任意の D N A 断片群の塩基配列データを得る工程が挙げられる。

【 0 0 7 7 】

本発明の D N A のスクリーニング方法において、選抜する対象である D N A としては、 G C 含量が 35 % 以下、 40 % 以下又は 45 % 以下であり、かつ、 1 ヌクレオチド当たりの前記非メチル化 C p G モチーフ数が 0 . 017 個以上である D N A である限り特に制限されないが、より優れた免疫賦活活性を有する D N A をより高い確率で得る観点から、 G C 含量については、 40 % 以下の D N A を選抜することが好ましく、 35 % 以下の D N A を選抜することがより好ましい。ただし、 G C 含量が 35 % より高く 40 % 以下の D N A や、 G C 含量が 40 % より高く 45 % 以下の D N A の中にも、優れた免疫賦活活性を有する D N A も含まれているため、選抜する D N A の G C 含量の基準は状況に応じて適宜選ぶことができる。また、選抜する D N A における、 1 ヌクレオチド当たりの非メチル化 C p G モチーフ数としては、 0 . 017 個以上である限り特に制限されないが、より優れた免疫賦活活性を有する D N A をより高い確率で得る観点から、 0 . 025 個以上であることが好ましく、 0 . 0375 個以上であることがより好ましく、 0 . 05 個以上であることがさらに好ましく、 0 . 0625 個以上であることがより好ましく、 0 . 075 個以上であることがさらに好ましい。選抜する D N A における、 1 ヌクレオチド当たりの非メチル化 C p G モチーフ数の上限は特に制限されないが、 G C 含量が 45 % 以下であることから自ずと上限があり、通常は、 0 . 125 個以下である。

【 0 0 7 8 】

本発明のDNAのスクリーニング方法は、上記工程P（又は上記工程Q～S）に加えて、さらに以下の工程T及び工程Uを有していてもよい。なお、かかる工程T及びUに用いるDNAは、化合物としての実体を有するDNAに限られる。

（T）前記工程P（又は上記工程Q～S）で選抜した免疫賦活活性を有すると予測されるDNAの免疫賦活活性を測定する工程T：

（U）前記工程Tで免疫賦活活性が確認されたDNAを、免疫賦活活性を有するDNAとして選抜する工程U：

【 0 0 7 9 】

かかる工程T及び工程Uをさらに有していると、免疫賦活活性（好ましくはIFN- γ 10
産生誘導活性）を確実に有するDNAを選抜することができる。工程Tで用いるDNAは、工程P（又は上記工程Q～S）で免疫賦活活性を有すると予測されるDNAとして選抜したDNAであり、きわめて高い蓋然性で免疫賦活活性（好ましくはIFN- γ 産生誘導活性）を有するため、すべての候補DNAについて免疫賦活活性（好ましくはIFN- γ 産生誘導活性）を測定して免疫賦活活性（好ましくはIFN- γ 産生誘導活性）を有するDNAを選抜する場合と比較して、免疫賦活活性（好ましくはIFN- γ 産生誘導活性）を有するDNAを効率的に選抜することができる。このように、本発明のDNAのスクリーニング方法は、免疫賦活活性（好ましくはIFN- γ 産生誘導活性）を有するDNAの一次スクリーニングとして、好適に用いることもできる。

【 0 0 8 0 】

上記工程TにおけるDNAの免疫賦活活性（好ましくはIFN- γ 産生誘導活性）を測定する方法は、上記の本発明のDNAを予測する方法において述べたとおりである。

【 0 0 8 1 】

上記工程Uは、先に述べたように、「工程Tで免疫賦活活性が確認されたDNAを、免疫賦活活性を有するDNAとして選抜する工程U」であるが、好ましくは、「工程Tで免疫賦活活性が確認されたDNAのうち、免疫賦活活性（好ましくはIFN- γ 産生誘導活性）の優れたDNAを選抜する工程U'」である。かかる工程U'における「免疫賦活活性（好ましくはIFN- γ 産生誘導活性）の優れたDNAを選抜する」ことには、上記の「DNAのIFN- γ 産生誘導活性の詳細な測定方法」によるIFN- γ の濃度が、50 pg/mL以上、好ましくは75 pg/mL以上、より好ましくは100 pg/mL以上、
さらに好ましくは150 pg/mL以上、より好ましくは200 pg/mL以上、さらに好ましくは300 pg/mL以上、より好ましくは400 pg/mL以上のDNAを選抜することや、上記の「DNAのIFN- γ 産生誘導活性の詳細な測定方法」によるIFN- γ の濃度が、murineTLR9リガンドであるCpGオリゴヌクレオチドODN 1585（InvivoGen社製）（配列番号242）を0.5 μ M（培地における終濃度）添加した場合（コントロール）のIFN- γ の濃度に対して50%以上、好ましくは75%以上、より好ましくは100%以上、さらに好ましくは125%以上、より好ましくは150%以上、さらに好ましくは175%以上の割合となるDNAを選抜することが含まれる。なお、上記ODN 1585の5'末端側の2個のgと、3'末端側の6個のgは、ホスホロチオエート結合したオリゴヌクレオチドである。
40

【 0 0 8 2 】

前述の本発明のDNAを予測する方法や、本発明のDNAのスクリーニング方法において、免疫賦活活性（好ましくはIFN- γ 産生誘導活性）を有すると予測されるDNAや、免疫賦活活性（好ましくはIFN- γ 産生誘導活性）を有するDNAとして選抜したDNAは、後述の免疫賦活活性（好ましくはIFN- γ 産生誘導剤）などとして使用することができる。

【 0 0 8 3 】

< 5 . 本発明の免疫賦活剤 >

本発明の免疫賦活剤は、特定の微生物若しくはその処理物、又は、特定のDNAを有効成分として含む。上記特定の微生物は、本発明の微生物を予測する方法又は本発明の微生物

10

20

30

40

50

物のスクリーニング方法により、免疫賦活活性を有すると予測される微生物であり、上記特定のDNAは、GC含量が35%以下、40%以下又は45%以下であり、1ヌクレオチド当たりの非メチル化CpGモチーフ数が0.017個以上であり、かつ、50bp～1000bpの範囲内であるDNAである。

【0084】

本発明の免疫賦活剤は、in vitro及びin vivoで免疫を賦活する。本発明の免疫賦活剤が発揮する免疫賦活活性としては、免疫賦活活性である限り特に制限されないが、プラズマサイトイド樹状細胞又はB細胞におけるTLR9の活性化を介した免疫賦活活性が好ましく、中でも、プラズマサイトイド樹状細胞におけるTLR9の活性化を介したI型インターフェロン（IFN- γ ）及び/又はIFN- α ）産生誘導活性がさらに好ましく、中でも、プラズマサイトイド樹状細胞におけるTLR9の活性化を介したIFN- γ 産生誘導活性が特に好ましい。したがって、本発明の免疫賦活剤としては、I型インターフェロン産生誘導剤が好ましく、IFN- γ 産生誘導剤がより好ましい。

【0085】

本発明の免疫賦活剤に用いる微生物やその好適な態様は上記【0026】で述べたとおりであるが、本発明の免疫賦活剤には、免疫賦活活性を有することが確認された微生物を用いる。本発明の免疫賦活剤に用いる好適な微生物として、上記【0048】に記載の「微生物のIFN- γ 産生誘導活性の詳細な測定方法」における培養後の培養培地の上清中のIFN- γ 濃度が70pg/mL以上、好ましくは100pg/mL以上、より好ましくは150pg/mL以上、さらに好ましくは200pg/mL以上、より好ましくは300pg/mL以上、さらに好ましくは350pg/mL以上となる微生物や、上記の「微生物のIFN- γ 産生誘導活性の詳細な測定方法」によるIFN- γ の濃度が、ラクトコッカス ラクティス JCM 5805株のそのIFN- γ の濃度に対して12.5%以上、好ましくは18.75%以上、より好ましくは25%以上、さらに好ましくは37.5%以上、より好ましくは50%以上、さらに好ましくは75%以上、より好ましくは100%以上の微生物が好ましく挙げられる。前述のIFN- γ 濃度が100pg/mL以上となる微生物として、ロイコノストック メセンテロイデスのNBRC 3832株及びNBRC 102481株や、ペディオコッカス ペントサセウスのNBRC 101982株、JCM 20109株、NBRC 101986株、NBRC 3892株が特に好ましく挙げられる。なお、これらの6株は、後述の表15に示されるように、アッセイにおける培養上清中のIFN- γ 濃度が100pg/mL以上と、きわめて優れたIFN- γ 産生誘導活性を示した株である。なお、本明細書において、特定の微生物株には、それと同等の微生物株も含まれる。ここで、同等の微生物株とは、その特定の微生物株から由来している微生物株、又は、その特定の微生物株が由来する微生物株若しくはその微生物株の子孫微生物株を意味する。

【0086】

微生物又はその処理物を有効成分として含む本発明の免疫賦活剤において、該微生物が細菌や真菌である場合、かかる微生物又はその処理物には、生菌体、死菌体、生菌体又は死菌体の破砕物、生菌体又は死菌体の凍結乾燥物、該凍結乾燥物の破砕物等が含まれ、また、生菌体又は死菌体の全部の処理物に限られず、一部の処理物も含まれる。また、前記微生物がウイルスである場合、かかる微生物又はその処理物には、ウイルス、ウイルスの破砕物、ウイルスの凍結乾燥物、該凍結乾燥物の破砕物等が含まれ、また、ウイルスの全部の処理物に限られず、一部の処理物も含まれる。ここで処理物には、酵素処理、熱処理等によって処理したもの、あるいは該処理したものをエタノール沈殿させ回収したものが含まれる。また、その微生物由来のDNAも処理物に含まれる。微生物由来のDNAを豊富に含んだ画分は、例えば酵素処理および熱処理によって（特開2001-46020号公報）、あるいはエタノールによる沈殿を回収することによって（特開2000-262247号公報）製造することができる。本発明における微生物由来のDNAを豊富に含んだ免疫賦活剤は、活性物質が濃縮されたより効果の高い免疫賦活剤として用いることができる。

【 0 0 8 7 】

上記微生物の生菌体やウイルス等は、微生物の種類に応じた公知の方法で該微生物を培養し、その培養物から得ることができる。例えば微生物が乳酸菌である場合、培地としては、MRS培地、GAM培地、LM17培地を用いることができ、適宜無機塩類、ビタミン、アミノ酸、抗生物質、血清等を添加して用いることができ、また、培養は、25～40℃で数時間～数日行うことができる。培養後の培養物を遠心分離やろ過するなどして、上記微生物の生菌体やウイルス等を得ることができる。死菌体は、生菌体をオートクレーブ等により熱処理することにより得ることができる。

【 0 0 8 8 】

前述したように、本発明の免疫賦活剤は、特定の微生物若しくはその処理物ではなく、特定のDNAを有効成分として含んでいてもよい。かかるDNAとしては、GC含量が35%以下、40%以下又は45%以下であり、1ヌクレオチド当たりの非メチル化CpGモチーフ数が0.017個以上（好ましくは0.025個以上、より好ましくは0.0375個以上、さらに好ましくは0.05個以上、より好ましくは0.0625個以上、さらに好ましくは0.075個以上）であり、かつ、50bp～1000bpの範囲内（好ましくは60bp～800bpの範囲内、より好ましくは80bp～600bpの範囲内、さらに好ましくは100bp～500bpの範囲内、より好ましくは150bp～400bpの範囲内（好ましくは180bp～355bpの範囲内）、さらに好ましくは150bp～230bpの範囲内又は230bp～400bpの範囲内、より好ましくは150bp～230bpの範囲内、さらに好ましくは180bp～214bpの範囲内）であるDNAが挙げられる。本発明の免疫賦活剤に用いるDNAとしては、その由来等に制限はないが、免疫賦活活性を有することが確認されたDNAを用いる。本発明の免疫賦活剤に用いる好適なDNAとしては、上記【0073】に記載の「DNAのIFN- γ 産生誘導活性の詳細な測定方法」における培養後の培養培地の上清中のIFN- γ 濃度が50pg/mL以上、好ましくは75pg/mL以上、より好ましくは100pg/mL以上、さらに好ましくは150pg/mL以上、より好ましくは200pg/mL以上、さらに好ましくは300pg/mL以上、より好ましくは400pg/mL以上であるDNAや、上記の「DNAのIFN- γ 産生誘導活性の詳細な測定方法」によるIFN- γ の濃度が、murineTLR9リガンドであるCpGオリゴヌクレオチドODN1585（InvivoGen社製）（配列番号242）を0.5 μ M（培地における終濃度）添加した場合（コントロール）のIFN- γ の濃度に対して50%以上、好ましくは75%以上、より好ましくは100%以上、さらに好ましくは125%以上、より好ましくは150%以上、さらに好ましくは175%以上の割合となるDNAを挙げることができる。

【 0 0 8 9 】

本発明の免疫賦活剤に用いる好適なDNAの具体例として、配列番号173～177、179～181、183～185、187～190、194、213、214、216～220、225、229、231及び233からなる群から選択されるいずれかのヌクレオチド配列からなるDNAを挙げることができる。より好ましくは、配列番号176、177、180、181、183～185、187～190、194、216、217、220及び229からなる群から選択されるいずれかのヌクレオチド配列からなるDNAを挙げることができる。さらに好ましくは、配列番号176、180、181、184、185、188、189、190、194及び229からなる群から選択されるいずれかのヌクレオチド配列からなるDNAを挙げることができる。

【 0 0 9 0 】

本発明の免疫賦活剤においては、上記特定の微生物及び/又はその処理物及び/又は特定のDNAを併用してもよいし、2種以上の特定の微生物又はその処理物を併用してもよいし、2種以上の特定のDNAを併用してもよい。

【 0 0 9 1 】

本発明の免疫賦活剤は、生体の免疫活性を高める医薬又は医薬組成物として用いることができる。該医薬は、既にI型インターフェロンの適応疾患と知られている、腎癌・多発

10

20

30

40

50

性骨髓腫・慢性骨髓性白血病・ヘアリー細胞白血病・膠芽腫・髄芽腫・星細胞腫・悪性黒色腫・菌状息肉症・成人T細胞性白血病などを含むガン、亜急性硬化性全脳炎・H T L V - 1 脊髄症・B 型肝炎・C 型肝炎などを含むウイルス感染症、クラミジア（性病）・マイコバクテリウム（結核）・リステリア（敗血症など）・スタフィロコッカス（食中毒）・ヘリコバクター（胃炎）等の細菌による感染症、多発性硬化症などを含む自己免疫疾患の予防あるいは治療薬として用いることができる。特に前記医薬はウイルス感染防御及びウイルス感染治療剤として有用である。また、I 型インターフェロンの活性として骨芽細胞から破骨細胞への分化抑制機能が知られていることから、骨そしょう症の予防あるいは治療薬としても用いることができる。

【 0 0 9 2 】

さらに、本発明の免疫賦活剤は、生体の免疫応答を増強し、ワクチンの効果を高めるアジュバントとして用いることもできる。本発明の免疫賦活剤をアジュバントとして用いる場合、アジュバントとして本発明の免疫賦活剤のみを用いてもよいし、他のアジュバントと併用してもよい。また、本発明の免疫賦活剤である微生物（好ましくは乳酸菌、より好ましくは乳酸球菌）中に、特定の疾患に対応する抗原を遺伝子工学的手法により発現させた微生物は、ワクチンとしても用いることができる。特に乳酸菌の細胞壁は胃酸から抗原を守る働きがあるため、このような異種抗原発現菌株は経口ワクチンのホストとして好適である。一般的にワクチンには生ワクチン、全粒子不活化ワクチン及びスプリットワクチンがあるが、生ワクチンにはウイルス強毒化の危険性があり、全粒子不活化ワクチンでは不純物による副作用懸念があり、最も安全性の高いスプリットワクチンでは有効性に問題がある。このような問題を克服するために目的の抗原のみを発現する組み換えワクチンの開発が進められているが、本発明の免疫賦活剤の活性のある微生物（好ましくは乳酸菌、より好ましくは乳酸球菌）中で目的抗原を発現させれば、アジュバント効果も合わせて得られることとなり、極めて有用性が高い。

【 0 0 9 3 】

本発明の免疫賦活剤の形態は特に限定されず、例えば、粉末、顆粒、錠剤、シロップ、注射剤、点滴剤、散剤、座剤、懸濁剤、軟膏剤などが挙げられる。本発明の免疫賦活剤は、経口で投与してもよく、また経静脈投与、筋肉内投与、皮下投与、直腸内投与、経皮投与、皮内投与、腹腔内投与等の非経口で投与してもよいが、経口投与が好ましい。前記免疫賦活剤は、賦形剤、崩壊剤、結合剤、滑沢剤、着色剤等を含んでも良い。賦形剤としてはブドウ糖、乳糖、コーンスターチ、ソルビット等が、崩壊剤としてはデンプン、アルギン酸ナトリウム、ゼラチン末、炭酸カルシウム、クエン酸カルシウム、デキストリン等が、結合剤としてはジメチルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、メチルセルロース、エチルセルロース、アラビアゴム、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン等が、滑沢剤としてはタルク、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール、硬化植物油等がそれぞれ挙げられる。投与量は、投与する患者の年齢、体重、性別、疾患の相違、症状の程度により適宜決定することができ、1 日 1 回又は数回に分けて投与すればよく、投与 1 回当たり菌数又はウイルス数にして $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{12}$ 細胞又は個に相当する量の微生物を投与することができる。あるいは、微生物の乾燥重量換算で投与 1 回当たり 1 ~ 1 0 0 0 m g を投与することができる。

【 0 0 9 4 】

さらに、本発明の免疫賦活剤は、飲食品に含ませて用いることもでき、飲食物に含ませることによってその飲食品を免疫賦活用飲食品、免疫増強用飲食品、ウイルス感染防御用飲食品等として用いることができる。対象となる飲食品の種類は、本発明の免疫賦活剤の免疫賦活活性が阻害されないものであれば特に限定されない。例えば、乳・乳製品；飲料；調味料；酒類；農産・林産加工食品；菓子・パン類；穀粉・麺類；水産加工品；畜産加工品；油脂・油脂加工品；調理冷凍食品；レトルト食品；インスタント食品；食品素材などが挙げられる。この中でも、ヨーグルト、チーズ等の発酵乳製品や乳酸菌飲料に好適に用いることができる。発酵飲食品として用いる場合、免疫賦活活性を有する乳酸菌を発酵飲食品に死菌として所要量添加するほか、乳酸菌スターターとして用いて発酵飲食品を製

10

20

30

40

50

造することもできる。

【 0 0 9 5 】

本発明における飲食品は、健康飲食品、特定保健用飲食品、栄養機能飲食品、健康補助飲食品等を含む。ここで、特定保健用飲食品とは、食生活において特定の保健の目的で摂取をし、その摂取により当該保健の目的が期待できる旨の表示をする飲食品をいう。これらの飲食品には、例えば、体の免疫機能を増強する、体の免疫機能を賦活する、風邪をひきにくくする、インフルエンザウイルス、ノロウイルスあるいはロタウイルス等のウイルスに感染しにくくする、発がん予防に効果を有する等の表示が付されていてもよい。

【 0 0 9 6 】

以下に、本発明を実施例によって詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例 1】

【 0 0 9 7 】

[Lactococcus lactis JCM 5805由来 2 0 0 b p D N A断片の I F N - 産生誘導活性評価]

Lc. lactis JCM 5805の I F N - 産生誘導活性が、該株のゲノム上の非メチル化 C p Gモチーフの総数に単純に依存しているかを評価するため、非メチル化 C p Gモチーフ数が様々に異なる D N A断片を P C Rにより調製した。具体的には、Lc. lactis JCM 5805のゲノム情報に基づいて、非メチル化 C p Gモチーフが 5 ~ 1 5 個含まれるような 2 0 0 b p領域を 3 4箇所選抜し、それらの各領域を増幅するのに必要な 3 4種類のオリゴヌクレオチドプライマーセットを作製した。これらのプライマーセットにおける各プライマーと、その配列番号との対応関係を以下の表 4 ~ 6 に示す。

【 0 0 9 8 】

10

20

【表 4】

プライマーセット		配列	配列番号
セットA 1	F w	CGACGGCCTTCGCGAATGG	1
	R v	AAAAGAACAAATCGTCGCCATGACAGG	2
セットA 2	F w	AATGACCCATTAGACCAC	3
	R v	AAATATGAATCGCTCAACC	4
セットA 3	F w	TTTAGCCGAAGTTTCTGG	5
	R v	CGTCAATTTTCAAGACGG	6
セットA 4	F w	TAAATCGACGCGGTAAAG	7
	R v	TAATACCAACGTTTAAACGG	8
セットA 5	F w	GAAGCGGTGGTGCTGATG	9
	R v	CAAATGCCCCAAAAGACTGAC	10
セットA 6	F w	TGCGTAAATTCGATGTTG	11
	R v	GAAATACGTTTCAAGTTAGTG	12
セットA 7	F w	CTCGGACGTACATCTTCAAC	13
	R v	CGTTGAAATCTTTAATTGCGATTTTATTAC	14
セットA 8	F w	GTATTGGCTCATTTGGACGCTG	15
	R v	AAGCTCGACCAGCCTTACC	16
セットA 9	F w	TCGCTAAAGGTGCGAAAG	17
	R v	TGTACCAGTTTTAGGGTTTGG	18
セットA 10	F w	GACCGCGGCATTTACGAAAC	19
	R v	GTAAATGATTCTCAGCGATTTTCATGCTC	20
セットA 11	F w	TGTCGGAACACATATGG	21
	R v	TGACGTTTGATCAATTGAG	22

10

20

30

【 0 0 9 9 】

【表 5】

プライマーセット		配列	配列番号
セットA12	F w	GACCTTAAATTCCCATTCTCATGGTTG	23
	R v	CCGTAAGCGTATGAGAGACCC	24
セットA13	F w	ATGGTTGCAAGAAGCACCAAAAG	25
	R v	CAGTCATTGGGTCAGAACCGTAAG	26
セットA14	F w	CGAATCTATCAACGCTGCGCAAC	27
	R v	TGGGAAGATACGTTCTACCAACAC	28
セットA15	F w	AACTCTTTAGCGATGATG	29
	R v	AACGTCCTTTGATAATCC	30
セットA16	F w	TTTAAATCATTCATAGGACCGTTCAAAG	31
	R v	AGATTTGGCTTTATTTTACTTCGGATAC	32
セットA17	F w	GCGGTGCTTGTAAGCAAGATG	33
	R v	AACCCTCGAAAGACCGCAAG	34
セットA18	F w	CTAGACCCGATTTTAGAAGCGACGTTTG	35
	R v	CGCATTGCCTGCTTTCATTCTCC	36
セットA19	F w	CTCAACTTCGTAAACAAC	37
	R v	TTCAAGATTTTCAGCATC	38
セットA20	F w	GCATCATGACAAAAGATAC	39
	R v	GTAACGCTCATTAAC TTC	40
セットA21	F w	CGAATTCCTGTTGGAAAG	41
	R v	CTTTGGCAAAAGATTAGATG	42
セットA22	F w	AGACCATTTTCATCTTTAATATTCTCCAC	43
	R v	GACGGACGTATCGCTCGTTTC	44

10

20

30

【0100】

【表 6】

プライマーセット		配列	配列番号
セットA 2 3	F w	CGTTAGGCATGACGCTCCTAC	4 5
	R v	AAC TTCACAAGATGTGAAGGCAAAG	4 6
セットA 2 4	F w	CATAACGCTTTCATTGAC	4 7
	R v	GTTTCCTCCTAATGAAAAC	4 8
セットA 2 5	F w	CGCTAAGGCCAGCTGTCTGACGAATCTC	4 9
	R v	TGTTTTAGAACGTTTCGTGAGCGCGTGAAAC	5 0
セットA 2 6	F w	GCTGATGACAATAATCAAG	5 1
	R v	ATAAATAGAGCGGAAGTAG	5 2
セットA 2 7	F w	ATAAACGTTTCGCCATTCC	5 3
	R v	GTTTCGTTTAGCCAATGAAC	5 4
セットA 2 8	F w	GCTTCATCTACAGCTTTGCTTACGCC	5 5
	R v	CAGGCAAACCTTGCACTTAGAGGGATTG	5 6
セットA 2 9	F w	GCTGACAAGTCCATCACTTCTTG	5 7
	R v	CAAGGGCTCCTTTTAATGCTTCC	5 8
セットA 3 0	F w	CGAGCTGGAACACCAGCAAC	5 9
	R v	ATTGGTGCTGGAGCTGTTTTGG	6 0
セットA 3 1	F w	ACAGCTTTGTTAGTAAAAGCTAATG	6 1
	R v	CCGTCGCTTCAAACGTTTC	6 2
セットA 3 2	F w	CGCTGGTCAAGAAGCTTCTC	6 3
	R v	GTGGGAACCATGAGTTTACAGG	6 4
セットA 3 3	F w	CATCTTCTTTACGTGTAAACTC	6 5
	R v	TTTTAAAAGTTTCGCGCTTG	6 6
セットA 3 4	F w	TTGGTCAAGGGGTTAAGACACCGCCTTTTC	6 7
	R v	GACCCGTAGGTCTCTTAAAAGCTGCGGATG	6 8

【 0 1 0 1 】

Lc. lactis JCM 5805の菌体から精製したゲノムDNAを鋳型とし、及び、前述の各プライマーセットを用いたPCRを行った。各PCRによって得られた各反応物から、増幅したDNA断片をそれぞれ精製し、得られた純粋なDNA断片をDNAライブラリーとした。上記PCRにはタカラバイオ社製のTaKaRa Ex Taq（登録商標）を用い、アニーリング温度を55℃、伸長時間を20秒として、35サイクルの反応を行った。また、増幅したDNA断片の精製は、QIAquick PCR Purification Kit（QIAGEN社製）を用いて、PCR反応物からプライマー等の夾雑物を除去することによって行った。

【 0 1 0 2 】

各DNA断片のIFN- γ 産生誘導活性はプラズマサイトイド樹状細胞（pDC）を利用する以下の方法で測定した。C57BL/6マウス骨髓細胞を大腿骨から常法に従って回収し、赤血球除去処理を行った。得られた骨髓細胞を、10% FCS、2 μ M β -メルカプトエタノールを含有するRPMI 1640培地（SIGMA社製）に、 5×10^5 個/mLになるよう

に懸濁した。得られた細胞懸濁液に、pDC誘導サイトカインとしてFlt-3L (R&D Systems社製)を終濃度100 ng/mLで添加した。CO₂インキュベーター内で37、5% CO₂にて7日間培養し、骨髓由来樹状細胞(BM-DC; bone marrow-derived dendritic cell)を得た。前述のPCRで得られたDNAライブラリーにおける各DNA断片を2 µg/mLとなるように添加し、48時間後に培養上清を回収した。培養上清に含まれるIFN- 量の測定には、ELISA法によるキット(PBL Assay Science社製)を用いた。

【0103】

各プライマーセットにより増幅されたDNA断片のヌクレオチド配列を示す配列番号、該DNA断片のGC含量及び該DNA断片を用いた上記アッセイにおける培養上清に含まれるIFN- 濃度(pg/mL)を以下の表7に記載する。

【0104】

【表7】

プライマ ー セット	DNA断 片の 配列番号	GC含量 (%)	IFN- α (pg/mL)	プライマ ー セット	DNA断 片の 配列番号	GC含量 (%)	IFN- α (pg/mL)
A1	173	24.9	217.3	A18	190	41.1	407.0
A2	174	25.0	283.1	A19	191	41.7	138.9
A3	175	27.8	265.8	A20	192	44.4	95.0
A4	176	30.1	401.4	A21	193	45.0	144.6
A5	177	31.4	388.2	A22	194	45.0	508.2
A6	178	32.5	173.8	A23	195	45.4	208.8
A7	179	33.8	271.5	A24	196	46.0	347.8
A8	180	34.3	406.3	A25	197	47.0	1.2
A9	181	34.8	524.1	A26	198	47.0	0.1
A10	182	35.1	8.4	A27	199	47.2	34.9
A11	183	35.4	317.2	A28	200	49.0	150.6
A12	184	35.6	510.2	A29	201	50.6	148.9
A13	185	37.4	493.7	A30	202	51.2	26.6
A14	186	40.2	2.5	A31	203	51.8	n.d.
A15	187	40.5	314.8	A32	204	52.2	197.9
A16	188	40.5	479.8	A33	205	54.2	19.9
A17	189	40.8	585.5	A34	206	55.0	95.9

【0105】

上記表7中の各DNA断片の非メチル化CpGモチーフ数とIFN- 産生誘導活性(IFN- 濃度(pg/mL))との相関関係を図1に示す。図1から分かるように、各DNA断片の非メチル化CpGモチーフ数とIFN- 産生誘導活性との間には明確な相関関係は認められなかった(決定係数 $R^2 = 0.2716$)。この結果から、Lc. lactis JCM 5

805の I F N - 産生誘導活性には、非メチル化 C p G モチーフ数以外の因子が影響していることが示唆された。そこで、本発明者らは、前述の D N A ライブラリーにおける各 D N A 断片についてさまざまな角度から検討を続け、試行錯誤を繰り返した結果、各 D N A 断片における G C 含量の違いが I F N - 産生誘導活性に影響を与えていることをようやく見出した。

【 0 1 0 6 】

図 1 の実験結果のうち、G C 含量が 4 5 % 以下の D N A 断片の実験結果を図 2 A に示し、G C 含量が 4 5 % を超える D N A 断片の実験結果を図 2 B に示す。図 2 A に示す通り、G C 含量が 4 5 % 以下となるような D N A 断片に限定した上で、非メチル化 C p G モチーフ数と I F N - 産生誘導活性との相関関係を示すと、両者の間に強い相関（決定係数 $R^2 = 0.508$ ）が認められた。一方、G C 含量が 4 5 % を超える D N A 断片では、図 2 B に示す通り、非メチル化 C p G モチーフ数と I F N - 産生誘導活性との間にはあまり明確な相関関係は認められなかった。図 2 B においては、非メチル化 C p G モチーフ数が比較的多いにもかかわらず、I F N - 産生誘導活性が低い例や、非メチル化 C p G モチーフ数が比較的少ないにもかかわらず、I F N - 産生誘導活性が低い例が比較的多く見られた。

10

【 0 1 0 7 】

図 1 の実験結果のうち、G C 含量が 4 0 % 以下の D N A 断片の実験結果を図 2 C に示し、G C 含量が 4 0 % を超える D N A 断片の実験結果を図 2 D に示す。図 2 C に示す通り、G C 含量が 4 0 % 以下となるような D N A 断片に限定した上で、非メチル化 C p G モチーフ数と I F N - 産生誘導活性との相関関係を示すと、両者の間に強い相関（決定係数 $R^2 = 0.4811$ ）が認められた。一方、G C 含量が 4 0 % を超える D N A 断片では、図 2 D に示す通り、非メチル化 C p G モチーフ数と I F N - 産生誘導活性との間にはあまり明確な相関関係は認められなかった。図 2 D においては、非メチル化 C p G モチーフ数が比較的多いにもかかわらず、I F N - 産生誘導活性が低い例や、非メチル化 C p G モチーフ数が比較的少ないにもかかわらず、I F N - 産生誘導活性が低い例が比較的多く見られた。

20

【 0 1 0 8 】

また、図 1 の実験結果において、各 D N A 断片の I F N - 産生誘導活性の値を、各 D N A 断片に含まれる非メチル化 C p G モチーフ数の値で除した値を、各 D N A 断片における非メチル化 C p G モチーフ 1 個当たりの活性とした。算出したこの活性を、各 D N A 断片の G C 含量の程度によって、6 群（「 ~ 30 」（30 % 以下）、「 $30 \sim 35$ 」（30 % より高く 35 % 以下）、「 $35 \sim 40$ 」（35 % より高く 40 % 以下）、「 $40 \sim 45$ 」（40 % より高く 45 % 以下）、「 $45 \sim 50$ 」（45 % より高く 50 % 以下）、「 $50 \sim$ 」（50 % より高い））に分け、各群毎に「非メチル化 C p G モチーフ 1 個当たりの活性」の平均値を求めた。その結果を図 3 に示す。図 3 の結果から、D N A 断片の G C 含量が低いほど、非メチル化 C p G モチーフ 1 個当たりの I F N - 産生誘導活性が高くなる傾向が明確に示された。特に、G C 含量が 4 5 % 以下の D N A 断片では、G C 含量が 4 5 % を超える D N A 断片と比較して、非メチル化 C p G モチーフ 1 個当たりの I F N - 産生誘導活性が顕著に高くなることが示された。

30

40

【 0 1 0 9 】

なお、上記表 7 の結果から、I F N - 濃度が 200 p g / m L 以上で、かつ、G C 含量が 4 5 % 以下である D N A 断片群として、配列番号 173 ~ 177、179 ~ 181、183 ~ 185、187 ~ 190 及び 194 からなる群から選択されるいずれかのヌクレオチド配列からなる D N A が挙げられ、I F N - 濃度が 300 p g / m L 以上で、かつ、G C 含量が 4 5 % 以下である D N A 断片群として、配列番号 176、177、180、181、183 ~ 185、187 ~ 190 及び 194 からなる群から選択されるいずれかのヌクレオチド配列からなる D N A が挙げられ、I F N - 濃度が 400 p g / m L 以上で、かつ、G C 含量が 4 5 % 以下である D N A 断片群として、配列番号 176、180、181、184、185、188、189、190 及び 194 からなる群から選択され

50

るいずれかのヌクレオチド配列からなるDNAが挙げられた。また、配列番号195又は196のヌクレオチド配列からなるDNAについては、GC含量が45%を超えるものの、IFN-濃度が200pg/mL以上のDNA断片として挙げられた。これらのDNA断片はIFN-産生誘導活性に優れているため、本発明の免疫賦活剤（好ましくはIFN-産生誘導剤）として好適に用いることができる。

【実施例2】

【0110】

[Lactococcus lactis JCM 5805由来300bp DNA断片のIFN-産生誘導活性評価]

実施例1で示された傾向や結果が、200bpの長さのDNA断片に特異的な現象でないことを確認するため、実施例1と同様の方法により、200bpではなく、300bpの35種類のDNA断片からなるライブラリーを作製した。このライブラリーを作製する際に用いた35種類のプライマーセットにおける各プライマーと、その配列番号との対応関係を以下の表8～10に示す。

【0111】

【表8】

プライマーセット		配列	配列番号
セットB1	Fw	TGAAGAGGATATTATGGAGCTCTTG	69
	Rv	AGACATCCCCGTTAGATAAAATCTC	70
セットB2	Fw	TAATATTCATCCTAAAGGAACAGG	71
	Rv	GACAGAATGTCAGTTCGAC	72
セットB3	Fw	ACATACAGACGTTTGCTTATTGTTT	73
	Rv	TCACACCATGCACGATATAAGG	74
セットB4	Fw	CAGAATTAATGCGAGACTATTG	75
	Rv	AACATTAATTTGTAATGGAGTGTTT	76
セットB5	Fw	GAGAAAGTTGAGGAAATTAGAATGG	77
	Rv	CGGAATAATTAACCATTTTGCATAC	78
セットB6	Fw	ATTTCTGAGAGTACAATTTATCAAG	79
	Rv	GTTTCAATTGTTGCAATATAGTC	80
セットB7	Fw	GTTGTCAATAAATGGGATACTCTTG	81
	Rv	TTGGTGGTTAATCGCTACTTG	82
セットB8	Fw	ACAAAAGTTAGCGACTGAGTG	83
	Rv	AGATTATGGTCGAACTTTCATAAG	84
セットB9	Fw	ACTTGAAAATATCTATACAACTTC	85
	Rv	TGATAGAATTATAATGTACCATTC	86
セットB10	Fw	CAGTTGGAGTCCACACAG	87
	Rv	CATCTAGCGTCATCCCAATC	88
セットB11	Fw	ACAACCATTTCCACTTATTGGG	89

【 0 1 1 2 】

【 表 9 】

プライマーセット		配列	配列番号
セット B 1 2	F w	GGGATTGGGACTTTAACGAC	9 1
	R v	AAAGCTCCAACCAATCCTAC	9 2
セット B 1 3	F w	AATGTCAGAAGGCTTGTGTC	9 3
	R v	CCTGATTCAGTTGCTTTACGG	9 4
セット B 1 4	F w	ATGCACCGTGGTTGATTG	9 5
	R v	TGGCTTGTTGGGTGTTTC	9 6
セット B 1 5	F w	AAGAGTAACGTCAAAGTGGAG	9 7
	R v	GCACTTTCGCCTGTCTTG	9 8
セット B 1 6	F w	AAGGTCTAGCGCCTCTTATG	9 9
	R v	GTGCCATTAGCCAAGTACC	1 0 0
セット B 1 7	F w	GCAGCACATCGAGTTAACC	1 0 1
	R v	AGCCAGACGACAGGATTG	1 0 2
セット B 1 8	F w	GCTCACTTACAAAGCTTGAAAC	1 0 3
	R v	TTTTCTGCCACTCCTCAAAG	1 0 4
セット B 1 9	F w	AATTGATGAGGCAGCTTTGAG	1 0 5
	R v	AATATCATAGACTCCAGGTC AAC	1 0 6
セット B 2 0	F w	AAAAGTTAACTACCAAGAG	1 0 7
	R v	TTTTCTTGATAGAAAATAAGAC	1 0 8
セット B 2 1	F w	GTAATTTGTCCACTTGCAC	1 0 9
	R v	TTATGATAGAAAGATACAATTGGAG	1 1 0
セット B 2 2	F w	CAGGAATTGTTGCTTCTTC	1 1 1
	R v	GACTTACAAGACTGCGTG	1 1 2

10

20

30

【 0 1 1 3 】

【表 10】

プライマーセット		配列	配列番号
セットB23	F w	GAAGACGTGGATTTTCCTG	113
	R v	AAATTTATCTTAGTGGTTCATGTC	114
セットB24	F w	AGTTGTAAATATGAAATTCCTTTG	115
	R v	GTTATTTATCCTGATTGCGAC	116
セットB25	F w	GCTGTATTGGTCGTCATAAAGG	117
	R v	GTTTATTATCCTTTGGCTCATATGG	118
セットB26	F w	GTTTAAGGGCAGACGTCATC	119
	R v	AATTAATTTCTAACACTGACACCC	120
セットB27	F w	ATGCTTCTTTCTCCATTTTC	121
	R v	TATCTGAAGCTGATAGATTAC	122
セットB28	F w	GCAAGCAGATTATCGTCAAC	123
	R v	AAAGTGTTATAATGGAGTCACTATG	124
セットB29	F w	TGGCGCTCCTAAATCAACC	125
	R v	TACTCACAACCCTAATCGCTG	126
セットB30	F w	TGTTTCCTGACCAAGACC	127
	R v	AAGTTTGGCACAGAATGTAG	128
セットB31	F w	TTGCTCTGCGAAAAGCTC	129
	R v	AGTCGACATCTTATCAGCTTTG	130
セットB32	F w	AAATTGCTGATTCTAGGAC	131
	R v	ACTCAATTTAGAGGTGTAATG	132
セットB33	F w	CTTGTTCAATTATTGCTAACGTC	133
	R v	ATATTAAATTGGGAATAATGAACGG	134
セットB34	F w	GGAAGGCTGGGGTTCTAC	135
	R v	TGGAGGATTACCCAAGTCC	136
セットB35	F w	ATTACGATAGTTTCTTCGTAGTC	137
	R v	GACTTTATGACTGTATCAAGTTATC	138

【0114】

上記ライブラリーにおける、300bpの35種類のDNA断片について、実施例1と同様の方法により、IFN- γ 産生誘導活性を測定した。各プライマーセットにより増幅されたDNA断片のヌクレオチド配列を示す配列番号、該DNA断片のGC含量及び該DNA断片を用いた上記アッセイにおける培養上清に含まれるIFN- γ 濃度を以下の表1及び表12に記載する。

【0115】

10

20

30

40

50

【表 1 1】

プライマー セット	DNA断片の 配列番号	GC含量 (%)	I F N- α (pg/mL)	I F N- α (相対活性 : %)
B 1	2 0 7	2 3 . 2	1 8 . 6	5 . 7
B 2	2 0 8	2 6 . 4	1 9 6 . 6	8 4 . 7
B 3	2 0 9	2 4 . 3	6 4 . 4	2 6 . 9
B 4	2 1 0	2 6 . 1	1 1 1 . 8	4 9 . 1
B 5	2 1 1	2 8 . 4	1 0 6 . 4	6 5 . 9
B 6	2 1 2	3 3 . 7	6 8 . 8	3 0 . 0
B 7	2 1 3	3 1 . 3	2 2 1 . 0	1 3 5 . 4
B 8	2 1 4	3 0 . 7	2 3 9 . 9	1 4 8 . 3
B 9	2 1 5	3 2 . 8	1 5 0 . 4	6 2 . 9
B 1 0	2 1 6	3 4 . 6	3 4 8 . 6	1 5 6 . 2
B 1 1	2 1 7	3 0 . 2	3 0 5 . 7	1 8 8 . 5
B 1 2	2 1 8	3 4 . 6	2 4 7 . 7	1 5 3 . 5
B 1 3	2 1 9	3 5 . 4	2 8 7 . 3	1 7 7 . 8
B 1 4	2 2 0	3 6 . 1	3 1 7 . 1	1 9 6 . 8
B 1 5	2 2 1	3 6 . 1	1 9 8 . 0	1 2 2 . 4
B 1 6	2 2 2	3 8 . 8	8 . 5	4 . 2
B 1 7	2 2 3	3 6 . 7	1 8 6 . 0	7 8 . 5
B 1 8	2 2 4	3 8 . 3	1 4 2 . 7	8 9 . 1

【 0 1 1 6 】

【表 1 2】

プライマー セット	DNA断片の 配列番号	GC含量 (%)	IFN- α (pg/mL)	IFN- α (相対活性：%)
B 1 9	2 2 5	3 9 . 0	2 8 9 . 0	1 7 8 . 0
B 2 0	2 2 6	4 0 . 2	8 5 . 2	3 8 . 2
B 2 1	2 2 7	4 0 . 3	9 1 . 8	4 0 . 5
B 2 2	2 2 8	4 3 . 8	1 0 1 . 0	4 3 . 0
B 2 3	2 2 9	3 8 . 9	4 0 1 . 1	2 4 8 . 1
B 2 4	2 3 0	4 0 . 3	2 9 . 1	1 8 . 0
B 2 5	2 3 1	3 6 . 9	2 3 6 . 8	1 0 1 . 2
B 2 6	2 3 2	4 1 . 5	9 0 . 0	5 5 . 6
B 2 7	2 3 3	3 9 . 7	2 6 5 . 1	1 6 3 . 2
B 2 8	2 3 4	4 5 . 3	2 3 3 . 4	1 4 4 . 4
B 2 9	2 3 5	5 6 . 2	0	0
B 3 0	2 3 6	4 4 . 7	3 4 . 8	1 3 . 6
B 3 1	2 3 7	4 5 . 1	1 7 0 . 6	7 4 . 6
B 3 2	2 3 8	4 7 . 7	2 4 4 . 3	1 5 0 . 8
B 3 3	2 3 9	5 1 . 9	1 7 1 . 8	1 0 5 . 9
B 3 4	2 4 0	4 8 . 3	3 6 8 . 4	1 5 8 . 7
B 3 5	2 4 1	5 1 . 1	1 . 5	0 . 5

【 0 1 1 7 】

この測定試験は2回に分けて行った。1回目はプライマーセットB 1、B 5、B 7、B 8、B 1 1～B 1 5、B 1 8、B 1 9、B 2 3、B 2 4、B 2 6～B 2 9、B 3 2、B 3 3、B 3 5によるDNA断片について行い、2回目はその他のDNA断片について行った。表 1 1や表 1 2の相対活性(%)は、コントロールにおけるIFN- α (pg/mL) (1回目は161.2 pg/mL、2回目は232.1 pg/mL)に対する相対値(%)として示した。かかるコントロールとしては、murineTLR9リガンドであるCpGオリゴヌクレオチド(ODN 1585: InvivoGen社製)(配列番号242)を0.5 μ M (培地における終濃度)添加したサンプルを用いた。各DNA断片に含まれる非メチル化CpGモチーフ数とIFN- α 産生誘導活性との相関関係を図4に示す。

【 0 1 1 8 】

図4の実験結果のうち、GC含量が40%以下のDNA断片の実験結果を図5Aに示し、GC含量が40%を超えるDNA断片の実験結果を図5Bに示す。GC含量が40%を超える場合(図5B)では、非メチル化CpGモチーフ数とIFN- α 産生誘導活性との間に相関は認められなかったのに対して(図4における決定係数 $R^2 = 0.0575$; 図5Bにおける決定係数 $R^2 = 0.149$)、GC含量が40%以下の場合(図5A)では非メチル化CpGモチーフ数とIFN- α 産生誘導活性との間に強い正の相関(決定係数 $R^2 = 0.5463$)が認められた。

【 0 1 1 9 】

また、図4の実験結果のうち、GC含量が35%以下のDNA断片の実験結果を図5Cに示し、GC含量が35%を超えるDNA断片の実験結果を図5Dに示す。200bpのDNA断片を用いた実施例1の場合と同様に、全ての断片を対象とした場合(図4)や、GC含量が35%を超える場合(図5D)では、非メチル化CpGモチーフ数とIFN- γ 産生誘導活性との間に相関は認められなかったのに対して(図4における決定係数 $R^2 = 0.0575$; 図5Dにおける決定係数 $R^2 = 0.0122$)、GC含量が35%以下の場合(図5C)では非メチル化CpGモチーフ数とIFN- γ 産生誘導活性との間に強い正の相関(決定係数 $R^2 = 0.642$)が認められた。

【0120】

なお、上記表11及び12の結果から、IFN- γ 濃度が200pg/mL以上で、かつ、GC含量が45%以下であるDNA断片群として、配列番号213、214、216~220、225、229、231及び233からなる群から選択されるいずれかのヌクレオチド配列からなるDNAが挙げられ、IFN- γ 濃度が300pg/mL以上で、かつ、GC含量が45%以下であるDNA断片群として、配列番号216、217、220及び229からなる群から選択されるいずれかのヌクレオチド配列からなるDNAが挙げられ、IFN- γ 濃度が400pg/mL以上で、かつ、GC含量が45%以下であるDNA断片群として、配列番号229のヌクレオチド配列からなるDNAが挙げられた。また、配列番号234、238及び240からなる群から選択されるいずれかのヌクレオチド配列からなるDNAについては、GC含量が45%を超えるものの、IFN- γ 濃度が200pg/mL以上のDNA断片として挙げられた。これらのDNA断片はIFN- γ 産生誘導活性に優れているため、本発明の免疫賦活剤(好ましくはIFN- γ 産生誘導剤)として好適に用いることができる。

【実施例3】

【0121】

[Lactobacillus rhamnosus ATCC 53103由来300bp DNA断片の活性評価]

実施例1及び実施例2で示された傾向や結果が、Lactococcus lactis JCM 5805以外の乳酸菌に由来するDNA断片でも成立することを確認するため、代表的な免疫賦活乳酸菌であるLactobacillus rhamnosus ATCC 53103(LGG)由来の300bpの17種類のDNA断片からなるライブラリーを実施例1と同様の方法により作製した。このライブラリーを作製する際に用いた17種類のプライマーセットにおける各プライマーと、その配列番号との対応関係を以下の表13に示す。なお、プライマーの設計は、上記LGG株のゲノム情報に基づいて行った。

【0122】

10

20

30

【表 1 3】

プライマーセット		配列	配列番号
セット C 1	F w	TCCGAGTAGCACAGATCGTAGG	1 3 9
	R v	TAGGGCTTACTACTTCTTTCGTTGG	1 4 0
セット C 2	F w	CTTGTTTACAAGTATCACC	1 4 1
	R v	TTGGAAAAGATTCTGAATG	1 4 2
セット C 3	F w	TTGTTTGTAAAGCGCTGTCC	1 4 3
	R v	AAGATTATCGCTGCCGTTC	1 4 4
セット C 4	F w	ACGGTCACACTCAACTGTCTTG	1 4 5
	R v	TTAAGAAATCGCAAGCAGTAGCTTC	1 4 6
セット C 5	F w	CGATATACATCAGGTACTGGCAGAGG	1 4 7
	R v	GGTCGTGGTTTGTTCAGTGG	1 4 8
セット C 6	F w	TCTGTCGGGTTTGTGGAATGG	1 4 9
	R v	TCAATCAGTTCAAGAGCAGATCGAG	1 5 0
セット C 7	F w	CGTGAAAAGGAAGCAACCACC	1 5 1
	R v	CTGCATTAACCCCTAAATTCGATTG	1 5 2
セット C 8	F w	CACCGTTTGGACATGGTGAAATG	1 5 3
	R v	ACCTGTACGCAATCAATGCCC	1 5 4
セット C 9	F w	TGCGCTGAGAAACGAGTTTG	1 5 5
	R v	ATGCTCGTGCCTTGTTGG	1 5 6
セット C 1 0	F w	CGGCTGCAAGTATTGTCGCCAAAG	1 5 7
	R v	CAAGCGCGGATTCTGATGGGTG	1 5 8
セット C 1 1	F w	AAAGAAGTTGGCAAGACC	1 5 9
	R v	TTTAGTTTCACGGTGAAAG	1 6 0
セット C 1 2	F w	GGAAGACGCTCAGGTTTGCAG	1 6 1
	R v	GCTTCCAGTGTTGCGGCATC	1 6 2
セット C 1 3	F w	CGATGGTATACTACCTGTC	1 6 3
	R v	CTGCGGGTATATACTCTC	1 6 4
セット C 1 4	F w	GCTGGCCCAGGCCAATAG	1 6 5
	R v	GGTTGGCGGTGCTCAAG	1 6 6
セット C 1 5	F w	AGACTTGGCAGCGTCATCAG	1 6 7
	R v	AAGTCAGGTGACGATTCACGG	1 6 8
セット C 1 6	F w	CGCTTCTTTGTGGGCCGTGATG	1 6 9
	R v	TGGCTTCCATGCCAATGACGAC	1 7 0
セット C 1 7	F w	CGTGGGATTGTAGCTAACCTG	1 7 1
	R v	GGGATTGACCTCAAAGGGAC	1 7 2

10

20

30

40

上記ライブラリーにおける、300bpの17種類のDNA断片について、実施例1と同様の方法により、IFN- γ 産生誘導活性を測定し、各DNA断片における非メチル化CpGモチーフ1個当たりの活性を算出した。算出したこの活性を、各DNA断片のGC含量の程度によって、3群（「 ~ 45 」（45%以下）、「45 ~ 55 」（45%より高く55%以下）、「55 \sim 」（55%より高い））に分け、各群毎に「非メチル化CpGモチーフ1個当たりの活性」の平均値を求めた。その結果を図6Aに示す。図6Aの結果から、DNA断片のGC含量が低いほど、非メチル化CpGモチーフ1個当たりのIFN- γ 産生誘導活性が高くなる傾向が明確に示された。特に、GC含量が45%以下のDNA断片では、GC含量が45%より高く55%以下のDNA断片や、GC含量が55%より高いDNA断片と比較して、非メチル化CpGモチーフ1個当たりのIFN- γ 産生誘導活性が顕著に高くなることが示された。このことから、ゲノムDNAの低GC領域に局在する非メチル化CpGモチーフが顕著なIFN- γ 産生誘導活性を有していることは、Lc. lactis JCM 5805の株に特異的なものではないことが示された。

10

【0124】

また、先ほどは、300bpの17種類のDNA断片の非メチル化CpGモチーフ1個当たりの活性を、各DNA断片のGC含量の程度によって「 ~ 45 」（45%以下）、「45 ~ 55 」（45%より高く55%以下）、「55 \sim 」（55%より高い）の3群に分けたが、今度は、「 ~ 40 」（40%以下）、「40 ~ 50 」（40%より高く50%以下）、「50 \sim 」（50%より高い）の3群に分け、各群毎に「非メチル化CpGモチーフ1個当たりの活性」の平均値を求めた。その結果を図6Bに示す。図6Bの結果から、DNA断片のGC含量が低いほど、非メチル化CpGモチーフ1個当たりのIFN- γ 産生誘導活性が高くなる傾向が明確に示された。特に、GC含量が40%以下のDNA断片では、GC含量が40%より高く50%以下のDNA断片や、GC含量が50%より高いDNA断片と比較して、非メチル化CpGモチーフ1個当たりのIFN- γ 産生誘導活性が顕著かつ有意（ $p < 0.05$ ）に高くなることが示された。このことから、ゲノムDNAの低GC領域に局在する非メチル化CpGモチーフが顕著なIFN- γ 産生誘導活性を有していることは、Lc. lactis JCM 5805の株に特異的なものではないことが示された。

20

【実施例4】

【0125】

〔低GC領域に局在する非メチル化CpGモチーフ数に基づくスクリーニング〕

30

実施例1～3の結果から、GC含量が低い領域に存在する非メチル化CpGモチーフがIFN- γ 産生誘導活性に重要であることが示された。このことを利用すれば、ゲノム情報に基づいて、IFN- γ 産生誘導活性が高い微生物が効率よくスクリーニングできると考えられた。これを検証すべく、各種乳酸菌の低GC領域に局在する非メチル化CpGモチーフ数を算出した。具体的には、以下のような方法で算出した。

【0126】

ゲノム配列が公開されている菌株（後述の表14参照）を対象として、互いに一部重複する200bpのDNA断片群を、それぞれの菌株の全ゲノム配列について得た。互いに一部重複する200bpのDNA断片群を得る際には、200bpの断片の開始ヌクレオチドを、菌株のゲノムDNA配列上で1bp毎にスライドさせて、それぞれのDNA断片を得た。すなわち、その菌株のゲノムDNAのヌクレオチド番号1～200のヌクレオチドからなるDNA断片、ヌクレオチド番号2～201のヌクレオチドからなるDNA断片、ヌクレオチド番号3～202のヌクレオチドからなるDNA断片、というように、互いに一部重複するDNA断片群を得た。これらDNA断片群の各DNA断片のGC含量を確認した。本実施例4では、DNA断片群のうち、GC含量が35%以下であるDNA断片を低GC含量DNA断片とした。かかる低GC含量DNA断片を、その菌株のゲノムDNAの塩基配列上の対応する部分に配置し、該低GC含量DNA断片によってカバーされる前記菌株のゲノムDNAの領域を、前記菌株ゲノムにおける低GC含量領域とした。かかる低GC含量領域に含まれる非メチル化CpGモチーフを、低GC含量領域非メチル化CpGモチーフとし、前記菌株のゲノムDNA配列上における低GC含量領域非メチル化C

40

50

p Gモチーフ数を計測した。これらの一連の解析は、Perl言語を用いて本発明者らが独自でソースコードを作成したシステムを使用して行った。同様のシステムは、コンピュータプログラミングの当業者であれば、容易に作成することができる。

【0127】

各種乳酸菌の公開情報に基づいて、上記低GC含量領域非メチル化CpGモチーフ数を解析した結果を表14に示す。

【0128】

【表14】

ゲノム公開乳酸菌株	ゲノム上の非メチル化CpGモチーフ総数	低GC含量領域 (GC含量35%以下) 非メチル化CpGモチーフ数	ゲノムDNA1 万bp当たりの 低GC領域非 メチル化CpG モチーフ数
<i>Lactococcus lactis</i> IL1403	57192	34127	144
<i>Tetragenococcus halophilus</i> NBRC 12172	80306	44690	174
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745	62485	28251	154
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ATCC 8293	66660	27842	137
<i>Streptococcus thermophiles</i> CNRZ1066	49226	13834	77
<i>Lactobacillus plantarum</i> WCSF	183276	15285	46
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334	165855	4450	15
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 53103	180144	3261	11
<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	143372	3695	18

【0129】

表14から分かるように、菌種によって、このような条件を満たす低GC含量領域非メチル化CpGモチーフの数は大きく異なることが明らかとなった。また、ゲノム全体に含まれる非メチル化CpGモチーフ総数と、低GC領域に分布する低GC含量領域非メチル化CpGモチーフ数との間には正の相関は認められず、むしろゲノム全体に含まれる非メチル化CpGモチーフ総数が多い菌種ほど、低GC含量領域非メチル化CpGモチーフ数は少ない傾向が見られた。これは、非メチル化CpGモチーフがNNCGNN（ただしNは、A、T、G、Cの中の任意のヌクレオチド）という最低でも33.3%のGC含量を示す配列であり、非メチル化CpGモチーフ数が多ければその領域は低GC領域ではなくなる傾向があることを考えれば、合理性のあることと考えられる。

【0130】

表14の結果から、低GC含量領域非メチル化CpGモチーフをゲノム上に多く含む種として*Lactococcus lactis*、*Leuconostoc mesenteroides*、*Pediococcus pentosaceus*を、逆に少ない種として*Lactobacillus plantarum*、*Lb. casei*、*Lb. rhamnosus*、*Lb. fermentum*を選抜した。これらの各々の種に属する様々な菌株のIFN- γ 産生誘導活性を評価することで、低GC含量領域非メチル化CpGモチーフ数を指標とする本発明のスクリーニング手法の有用性を検討した。菌株のIFN- γ 産生誘導活性の評価は以下のような方法で行った。

【0131】

10mLのMRS培地（OXOID社製）がそれぞれ分注された各コニカルチューブ（15mL容量）に、各菌株を接種した後、各チューブに密栓し、30℃ないし37℃で2日間静置培養した。培養後の培養液を高速遠心することで得られた菌体をPBSで2回洗浄

して上清を取り除き、 -80°C で2時間凍結した。この凍結菌体からエバポレーションによって水分を除去し、凍結乾燥菌体を得た。得られた各凍結乾燥菌体をPBSに懸濁し、 10 mg/mL の懸濁液を調製した後、実施例1に記載した方法で調製した骨髄由来樹状細胞(BM-DC)にそれぞれ $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ となるように添加した。 37°C 、 $5\%\text{ CO}_2$ に維持したインキュベーター内で2日間培養した後上清を回収し、ELISAキットを用いて該上清中のIFN- α 濃度を測定した。その結果を以下の表15に示す。

【0132】

【表15】

菌種	株	IFN- α (pg/mL)
<i>Lactococcus lactis</i>	JCM 5805	404.4
	JCM 20101	389.8
	ATCC 15577	12.2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NBRC 3349	3.2
	NBRC 3426	57.3
	NBRC 3832	353.5
	NBRC 12060	4.2
	NBRC 100495	5.7
	NBRC 100496	8.1
	NBRC 102479	36.0
	NBRC 102480	74.2
	NBRC 102481	167.0
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	NBRC 107766	4.4
	JCM 2026	84.0
	JCM 20109	353.3
	JCM 20459	5.5
	NBRC 3182	59.1
	NBRC 3891	15.8
	NBRC 3892	116.4
	NBRC 3893	32.2
	NBRC 3894	46.0
	NBRC 12229	18.7
	NBRC 12230	7.9
	NBRC 12232	14.8
	NBRC 12318	59.8
	NBRC 101982	404.4
	NBRC 101983	5.6
	NBRC 101984	5.9
	NBRC 101985	5.8
	NBRC 101986	172.3
<i>Lactobacillus plantarum</i>	NBRC 101987	34.3
	JCM 1551	16.7
	JCM 6651	55.2
	JCM 8341	4.0
	JCM 20110	9.8
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 393	5.6
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ATCC 53103	3.9
<i>Lactobacillus fermentum</i>	NBRC 3959	4.4
	NBRC 3961	5.2

【0133】

表15に示す通り、 100 pg/mL 以上という強力なIFN- α 産生誘導活性を示す

10

20

30

40

50

菌株が、*Lc. lactis*では3株中2株（67%の割合）、*Leuconostoc mesenteroides*では10株中2株（20%の割合）、*Pediococcus pentosaceus*では18株中4株（22%の割合）に認められた。無作為に乳酸菌をスクリーニングした過去の報告によると（非特許文献3）、100 pg/mL以上のIFN- γ 産生誘導活性株は125株中3株（2.4%の割合）でしか得られなかったことを考慮すると、低GC含量領域非メチル化CpGモチーフ数を指標とする本発明のスクリーニング手法が、強力なIFN- γ 産生誘導活性を示す微生物を効率良くスクリーニングする手法として極めて有用であることが示された。

【0134】

なお、同属同種であれば、異株であっても、ゲノムDNAのGC含量や、ゲノムDNA上の非メチル化CpGモチーフ総数や、低GC含量領域非メチル化CpGモチーフ数がどの程度類似しているかを、上記表15中のいくつかの同属同種の乳酸菌について、それぞれ3株ずつ確認した。その結果を以下の表16に示す。

【0135】

【表16】

菌株名	GC 含量(%)	ゲノム上の非メチル化 CpG モチーフ総数	低 GC 含量領域非メチル化 CpG モチーフ数
<i>Lactococcus lactis</i> IL1403	35.3	57192	34127
<i>Lactococcus lactis</i> iO-1	35.1	57261	35068
<i>Lactococcus lactis</i> KF147	34.9	60801	37448
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ATCC 8293	37.7	66660	27842
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> J18	37.7	62620	26231
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KFRI-MG	37.7	62249	26498
<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956	51.5	143372	3695
<i>Lactobacillus fermentum</i> CECT 5716	51.5	143171	4080
<i>Lactobacillus fermentum</i> F-6	51.7	141824	3274

【0136】

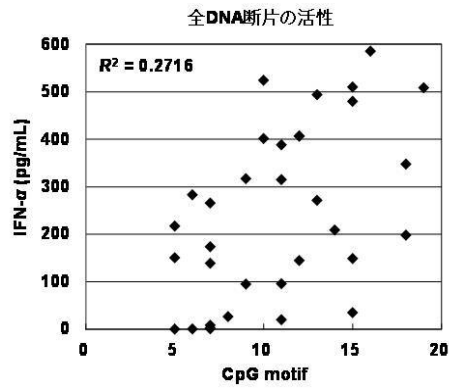
表16の結果から、同属同種間ではゲノムDNAのGC含量や、ゲノムDNA上の非メチル化CpGモチーフ総数や、低GC含量領域非メチル化CpGモチーフ数がかなり類似していることが示された。これは、同属同種間ではゲノムDNAの類似性がかなり高いことからして、当然の結果といえる。したがって、本発明の微生物を評価等する方法や、後述の本発明の微生物のスクリーニング方法における「ゲノムDNA」として、同属同種の異株のゲノムDNAを用いてもよい。また、本発明の微生物を評価等する方法や、後述の本発明の微生物のスクリーニング方法の結果は、それに用いたゲノムDNAが由来する微生物と同属同種の他株にも適用することができる。

【産業上の利用可能性】

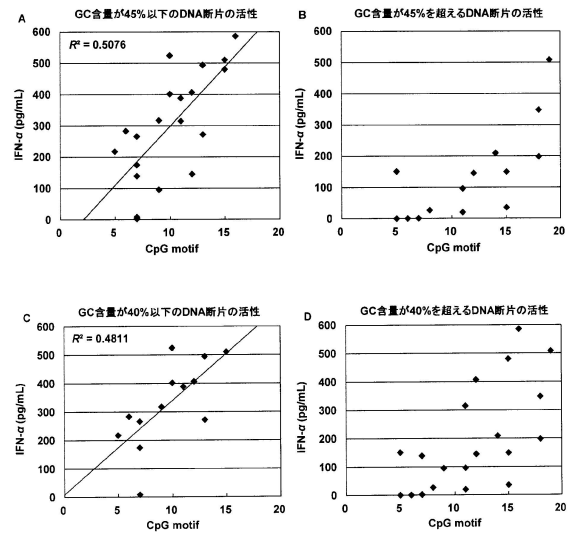
【0137】

本発明によると、微生物又はDNAの免疫賦活活性を効率的に予測する方法、免疫賦活活性の高い微生物又はDNAを効率的にスクリーニングする方法、及び、かかる微生物又はDNA等を有効成分として含む免疫賦活剤を提供することができる。

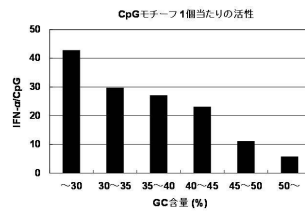
【図1】



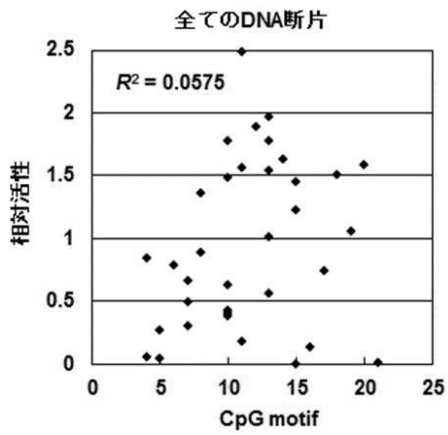
【図2】



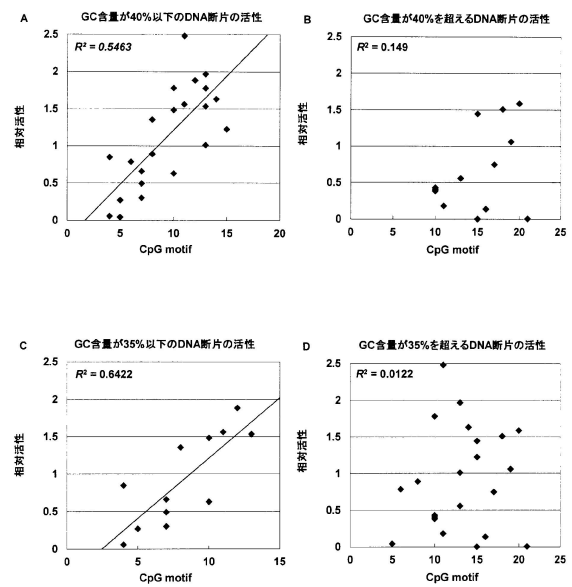
【図3】



【図4】

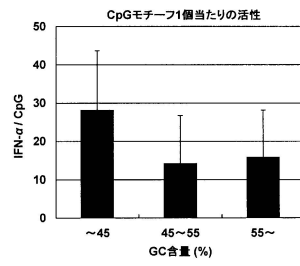


【図5】

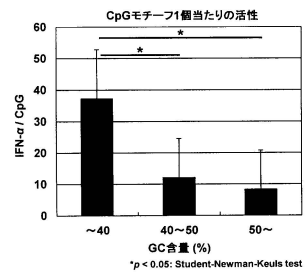


【図 6】

A



B



【配列表】

0006455920000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 藤井 敏雄
東京都中野区中野四丁目10番2号 キリン株式会社内
- (72)発明者 富田 康之
東京都中野区中野四丁目10番2号 キリン株式会社内

審査官 伊藤 良子

- (56)参考文献 国際公開第2012/091081(WO, A1)
 , Clinical Immunology , 2013年, Vol.149, No.3, pp.509-518
 , PLoS ONE , 2012年 4月, Vol.7, No.4, e32588, p.1-10
 キリン 研究開発成果レポート「免疫細胞pDCを直接活性化するプラズマ乳酸菌(JCM5805株)を
 発見」[online], インターネット, [平成30年4月25日検索], <URL: http://www.kirin.co.jp/company/rd/result/report/report_016.html>, 2013年12月 4日

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12N 1/00 - 7/08

A23L 33/10

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq