

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4668499号
(P4668499)

(45) 発行日 平成23年4月13日 (2011. 4. 13)

(24) 登録日 平成23年1月21日 (2011. 1. 21)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 16/18 (2006. 01)

A 2 3 L 1/30 (2006. 01)

A 6 1 K 39/106 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 (2006. 01)

A 6 1 P 15/14 (2006. 01)

C O 7 K 16/18

A 2 3 L 1/30

A 6 1 K 39/106

A 6 1 K 39/395

A 6 1 K 39/395

A

V

Y

請求項の数 18 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-535411 (P2001-535411)
 (86) (22) 出願日 平成12年10月31日 (2000. 10. 31)
 (65) 公表番号 特表2003-513106 (P2003-513106A)
 (43) 公表日 平成15年4月8日 (2003. 4. 8)
 (86) 国際出願番号 PCT/NL2000/000783
 (87) 国際公開番号 W02001/032713
 (87) 国際公開日 平成13年5月10日 (2001. 5. 10)
 審査請求日 平成19年10月1日 (2007. 10. 1)
 (31) 優先権主張番号 60/162, 752
 (32) 優先日 平成11年11月1日 (1999. 11. 1)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 00202709. 2
 (32) 優先日 平成12年7月27日 (2000. 7. 27)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 303061845
 ムコパックス・ホールディング・ビー・ブ
 イ
 オランダ国、2 3 3 3 シーエー・ライデ
 ン、ニエルス・ボーアベーク 1 1 - 1 3
 (74) 代理人 100084618
 弁理士 村松 貞男
 (74) 代理人 100092196
 弁理士 橋本 良郎
 (74) 代理人 100095441
 弁理士 白根 俊郎
 (72) 発明者 リー、サン・ヘー
 オランダ国、エヌエルー 2 3 3 1 エイチ
 エヌ・ライデン、フィアン・デ・ラ・マー
 ストラート 2 6

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 家畜における乳腺分泌抗体の生産

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ある抗原に特異的な抗体を含有する乳腺分泌産物を製造する方法において：

(a) 家畜を前記抗原で超免疫する工程であって、該超免疫は、前記抗原を前記家畜の
 気道、膈内、直腸内、および鼻内投与からなる群から選択される粘膜内経路を介して投与
 することを含む工程と；

(b) 前記抗原を、前記家畜の乳腺および／または乳腺上リンパ節に投与する工程と；

(c) 前記家畜から前記乳腺分泌産物を採集する工程

を含む方法。

【請求項 2】

前記乳腺分泌産物が乳である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記抗体が I g A 抗体である請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記家畜における前記抗原に対する免疫応答をブーストすることをさらに含む請求項 1
 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記ブーストする工程が、前記抗原を前記家畜の気道、乳腺、および／または乳腺上リ
 ンパ節に投与にすることを含む請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

10

20

前記抗原が、該抗原をコードする核酸を投与することにより投与される請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記家畜がウシまたはヒツジである請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記超免疫する工程が、前記家畜にアジュバントを投与することを更に含む請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記アジュバントが、クロストリジウムジフィセル (*Clostridium difficile*) の B 毒素である、請求項 8 に記載の方法。

10

【請求項 10】

第二の超免疫工程が、前記抗原を前記家畜の乳腺および/または乳腺上リンパ節に投与した後に行われる請求項 1 ないし 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記抗原が、クロストリジウムジフィセル (*Clostridium difficile*) の培養物に由来する、請求項 1 ないし 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記抗原が、クロストリジウムジフィセル (*Clostridium difficile*) の孢子である、請求項 11 に記載の方法。

20

【請求項 13】

前記抗原が、クロストリジウムジフィセル (*Clostridium difficile*) の A 毒素、B 毒素またはそれらの組合せである請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

ある抗原に特異的な抗体を含有する抗体組成物を製造する方法であって：

(a) 請求項 1 ないし 13 のいずれか 1 項に記載の方法によって、ある抗原に特異的な抗体を含有する乳腺分泌産物を製造する工程と；

(b) 前記乳腺分泌産物から前記抗体組成物を誘導する工程を含む方法。

【請求項 15】

ある抗原に特異的な抗体を製造する方法であって：

30

(a) 請求項 1 ないし 13 のいずれか 1 項に記載の方法によって、ある抗原に特異的な抗体を含有する乳腺分泌産物を製造する工程と；

(b) 前記乳腺分泌産物から前記抗原に特異的な抗体を精製する工程を含む方法。

【請求項 16】

ある抗原で超免疫された家畜から得られた熟成乳であって、前記超免疫は、既に前記抗原が乳腺および/または乳腺上リンパ節に投与されている家畜に対して、該家畜の気道、膈内、直腸内、および鼻内投与からなる群から選択される粘膜内経路を介して前記抗原を投与することを含んでなり、前記乳は、前記抗原に特異的な Ig A 抗体を、前記抗原に対して免疫感作されている非選別的な別々の家畜の初乳から得られる前記抗原に特異的な Ig A 抗体の平均的量の少なくとも 200 % の量で含んでいることを特徴とする熟成乳。

40

【請求項 17】

ある抗原で超免疫された家畜から得られた熟成乳であって、前記超免疫は、既に前記抗原が乳腺および/または乳腺上リンパ節に投与されている前記家畜に対して、該家畜の気道、膈内、直腸内、および鼻内投与からなる群から選択される粘膜内経路を介して前記抗原を投与することを含んでなり、前記乳は、前記抗原に特異的なポリクローナル抗体を少なくとも 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含んでいることを特徴とする熟成乳。

【請求項 18】

前記抗原に特異的な抗体が Ig A からなる、請求項 17 に記載の熟成乳。

【発明の詳細な説明】

50

【 0 0 0 1 】

本発明は、免疫学の分野に関する。より詳細には、本発明は抗体製造の手段および方法に関する。

【 0 0 0 2 】

科学および医学において、抗体は多くの用途が見出されている。それらは、非常に特異的な標的に結合するという驚くべき能力を有する。さらに、ある標的に対する新しい抗体を産生することはかなり簡単なことである。抗体は種々の方法で製造できる。大抵の用途のために、抗体は、抗体産生B細胞と不死化した細胞株を融合させて得られるハイブリドーマと呼ばれる細胞株によって生産される。そのようなハイブリドーマ細胞は容易に培養でき、抗体を培養液上清から採集することができる。抗体を生産する別の方法は、免疫した動物の血清からの採集、または細菌による抗体断片の生産である。勿論、他にも多くの生産方法が存在する。

10

【 0 0 0 3 】

抗体生産のためのたくさんの異なる方法が存在するにもかかわらず、それらは全て、多かれ少なかれ同じ問題を抱えている。生産コストが比較的高いことである。ハイブリドーマ系の培養系のためには、大きな培養系を確立し、認証し、維持しなければならない。血清が供給源の場合、血液を収集し、処理する必要がある。さらに、系においては、産物の微生物/ウイルスによる汚染を適切に点検する必要がある。抗体のコストが重要な所では、生産コストが高いと、多くの用途の実行が阻害される。例えば、多くの疾病の診断キットは、発展途上国にとっては一般に利用できないものである。

20

【 0 0 0 4 】

抗体生産のコストを減少させるための一つの方法は、家畜を用いることである。家畜の繁殖技術は広く知られており、また家畜小屋 (farm - animal housing) は比較的安価である。家畜の乳中で抗体を生産するという幾つかの試みがなされている。例えば、乳腺上のリンパ節による免疫が、ギドリー (Guidry) ら著、J . Dairy Sci . 77 (10) : 2965 - 2974 (1994)、およびトミタ (Tomita) ら著、J . Dairy Sci . 81 (8) : 2159 - 2164 (1998) に記載されている。鼻腔内または乳房内経路による免疫は、ウッド (Wood) J . 著、Am . Vet . Med . Assoc . 173 (5 Pt 2) : 643 - 647 (1978)、およびボール (Bohl) ら著、Infect . Immun . 11 (1) : 23 - 32 (1975) に記載されている。レイントナー (Leintner) らのWO99/33954に記載されるように、乳腺上のリンパ節によって、またピーターセン (Petersen) らの米国特許第3,376,198号、およびハスチン (Hastings) の米国特許第5,017,372号に記載されるように、乳腺組織への直接注入による免疫によって、市販規模で実行することが試みられている。しかしながら従来は、家畜の乳腺分泌産物中には、免疫原特異的な抗体に限られた量しか得られなかった。最良の結果は初乳、すなわち、出産後の雌によって生産される最初の乳汁 (lacteal fluid) 中に得られる。初乳段階 (colostrum stage) の後の段階にある雌によって生産される乳を、ここでは熟成乳 (mature milk) と呼ぶ。初乳は、乳腺の特徴的な生理的かつ機能的な状態から生じる、極めて独特な産物である。反芻動物においては、初乳と熟成乳の組成上の主な差異は、非常に高含有量の初乳免疫グロブリンであり、そのうちIgGクラスは80~90%以上である。

30

40

【 0 0 0 5 】

【 表 1 】

免疫グロブリン(mg/mL)	初乳	乳
総IgG	32-212	0.72
IgG ₁	20-200	0.6
IgG ₂	12.0	0.12
IgA	3.5	0.13
IgM	8.7	0.04

McFadden, T.B. et al. (1997) in Milk Composition, Production and Biotechnology, Welch, R.A.S., Burns, S.R., Popay, A.I. and Prosser, C.G., Eds. pp133-152, CAB International, New York.

10

初乳中の抗体レベルが熟成（通常の）乳よりも高いにもかかわらず、初乳は出産後最長でも2, 3日しか持続しないので、初乳の採集には、出産の正確な時期が必要となる。さらに、初乳は2, 3日しか得られないので、動物当たり採集できる抗体の絶対的な量が限られている。より多くの、市販規模の抗体を生産するためには、大量の家畜を維持しなければならない。大量の家畜が必要ということは、より多くの免疫等が必要となり、従って、物流上の問題および生産コストが増加する。さらに、初乳の濃度/粘度のために（脂肪とタンパク質の濃度が非常に濃い）、初乳の下流での加工が問題となる。

20

【0006】

何十年もの間、家畜の乳腺による免疫原特異的な抗体の分泌を上昇させるために、種々の（免疫の）試みが行われてきた。そのような試みは、乳による大量の免疫原特異的な抗体の産生と同様に、部分的に、乳腺における感染、すなわち乳腺炎を抑制すること（ギドリー（Guidry）ら著、J. Dairy Sci. 77(10): 2965-2974 (1994)；ピエッティ（Pighetti）ら著、J. Dairy Sci. 78(3): 528-537 (1995)）を目的としていた。しかしながら、熟成乳中の抗体レベルは、初乳中に得られる抗体レベルと比較すると未だ低い（約1オーダー分）ままである（ホドキンソン（Hodgkinson）ら、WO98/54226、ハスティングス（Hastings）、米国特許第5017372号）。従って、多くの臨床および前臨床試験において使用される抗原特異的な抗体は、初乳由来であり、大部分はIgGクラスに属する（トレマー（Tollemar）ら著、Bone Marrow Transpl. 23: 283-290 (1999)；ボストウィック（Bostwick）ら、米国特許第5,773,000号；コードル（Cordle）ら、米国特許第5,260,057号）。

30

【0007】

本発明は、ある抗原に特異的な抗体を含有する、採集された乳腺分泌産物を提供し、乳腺分泌産物は、

- 家畜を抗原で超免疫（hyperimmunizing）し、
- 前記抗原を動物の乳腺および/または乳腺上リンパ節に投与し、かつ
- 乳腺分泌産物を家畜から採集する

40

ことにより得られる。乳腺分泌産物は驚くべきことに、従来技術における通常の方法により得られる分泌産物よりも高レベルの、抗原に特異的な抗体（ここでは抗原原特異的な抗体と呼ぶ）を含有する。さらに、本発明の方法を使用すると、授乳中の動物の熟成乳中に、実質的な量の抗原特異的な抗体を得ることが可能であることが観察された。実際には、そのような抗原特異的な抗体のレベルは初乳中に産生され得る範囲であった。超免疫によるということは、動物は超通常レベルの抗原特異的な抗体を、血液中または粘膜分泌において生産し、乳分泌において生産するのではないことを意味する。超通常レベルとは、動物の体内の抗体量が、その抗原を投与しない場合、または一回投与後よりも高いことを意味する。好ましくは、超免疫は、動物の気道への抗原の投与を含む。気道投与をすると、動物に抗

50

体の追加免疫投与をする必要なく、動物の乳中における実質的な量の抗体の長期生産を得ることが可能である。しかしながら、いくらかの時間後に抗原特異的抗体のレベルが低下したことが分かった場合には、動物に対する抗原の追加免疫投与を行ってもよい。好ましくは、気道投与は、抗原の鼻腔内投与を含む。鼻腔内投与は、実施が比較的容易であり、また気道投与はより高レベルの抗原特異的抗体を乳腺分泌産物中に誘導し、またさらに、動物の乳中における抗体の生産を長時間 (over time) 維持することが観察されている。好ましくは、乳腺分泌産物は乳である。乳は収集が容易であり、乳中における抗原特異的抗体生産が長時間維持されるので、乳中に最適なレベルの抗原特異的抗体を有する動物の群を選択することが可能であり、従って、生産の全体的な性能および物流 (logistics) が向上する。

10

【0008】

従って、本発明は、長期的な方法における独特な乳汁の生産の可能性を証明する。そのような乳汁の特徴は、a) 該乳汁は、抗原特異的抗体レベルに関する限りでは初乳の特徴を有し、b) さらに、該乳汁の全体的な組成上の特徴は乳のそれに匹敵することである。ここで意味する抗原特異的抗体レベルに関する限りの初乳の特徴によれば、抗原特異的抗体の量および/または種類は、乳よりも初乳に匹敵する。例えば、乳汁中の抗原特異的抗体の量は、通常乳中に得られる抗原特異的抗体の量よりも多くなければならない。そのような場合、その乳汁中の抗原特異的抗体の量は、いずれの量も通常乳中に得られる抗原特異的抗体の量よりも多いので、少なくとも幾分かは、初乳中の抗原特異的抗体の量に匹敵する。

20

【0009】

抗原で超免疫された動物において起こるいかなる免疫スケジュールも、結果を得るためには、乳腺および/または乳腺上リンパ節への抗原の投与と併用できることは明らかである。抗原の乳腺および/または乳腺上リンパ節への投与が行われる前に、動物が超免疫されたかどうかを評価する必要性は実際には無い。人は、動物の乳腺分泌産物中の抗体レベルを容易に測定できる。分泌産物中の抗体が低レベルであれば、動物が超免疫されておらず、また、超免疫を達成させるにはさらなる抗原の投与が必要であることを表す。

【0010】

抗原特異的抗体が産生される抗原は、免疫応答を誘発し得るいかなる化合物または化合物集団であっても良い。抗原は一般的に、タンパク質またはそれらの機能的部位、派生物および/または類似化合物を含む。動物に投与された抗原は、一般的に、その動物への投与と異ならない。しかしながら、これは必ずしも真実でなくてもよい。異なる提示が免疫学的に同じ部分を少なくとも1部分含む限り、異なる抗原、例えば異なるタンパク質の提示を使用することも可能である。免疫学的に言えば、同じということは、その抗体が、抗原の異なる提示を認識する能力があることを意味する。抗原または機能的にそれに相当するものをコードする核酸を投与することによっても、抗原を投与することができる。投与された核酸は、核酸が導入された動物の細胞によって発現される。動物の細胞内における抗原または機能的に等価なものの発現は、免疫応答の上昇 (mounting) を導く。この技術は当該技術において、核酸ワクチンとも呼ばれる。

30

【0011】

理論によって束縛されるものではないが、抗原特異的抗体産生細胞の実質的な貯蔵、循環または蓄積を提供するためには、高度の一般的な免疫応答が必要とされると考えられる。抗原特異的抗体の乳腺排出産物への分泌が可能となるように、細胞を、貯蔵、循環、または蓄積から乳腺組織に誘引するためには、乳腺および/または乳腺上リンパ節の免疫が必要である。この方法によれば、貯蔵、循環、または蓄積の少なくとも一部は乳腺に対して初回抗原刺激され得るので、貯蔵、循環、または蓄積の発生が高度な粘膜免疫応答をもたらす免疫スケジュールと共に起こることが好ましい。従って、乳腺および/または乳腺上リンパ節の免疫における抗原特異的抗体の、より早期で、より明白な分泌が亢進する。しかしながら、貯蔵、循環、または蓄積は、粘膜のおよび/または全身性の高度な免疫応答をもたらす免疫スケジュールによって生じることが好ましい。

40

50

【0012】

免疫スケジュールは、家畜への1またはそれ以上の抗原投与を含む。粘膜のおよび/または全身性の高度な免疫応答という結果を引き起こす免疫スケジュールは、好ましくは少なくともある程度は、動物による抗原の吸入によって達成される。吸入用の組成物は勿論、好ましくは組成物中の抗原が、動物の気道の主要部分に渡って分布するように投与される。気道投与は、好ましくはエアゾルの形態で達成される。好ましくは、気道投与は、鼻腔内投与によって行われる。好ましくは、粘膜および/または全身性の高度な免疫応答という結果を引き起こす免疫は、抗原を含む組成物の少なくとも2回の気道投与を含む。更に好ましくは、抗原を含む組成物の少なくとも4回の気道投与を含む。

【0013】

本発明の手段および方法によれば、乳腺免疫、および抗原含有組成物の乳腺上投与の両方とも、家畜の乳中に、大量の抗原特異的抗体の分泌を可能にする効果を有する。好ましくは、乳腺上リンパ節に少なくとも1回の投与が行われる。好ましくは、乳腺上リンパ節に少なくとも2回の投与が行われる。乳腺上リンパ節投与により、より高度でより早期に、乳中の抗原特異的抗体が急増する(surge)。

【0014】

本発明の手段および方法は、高度で長期的な、いかなる授乳中の哺乳動物の乳中における抗原特異的抗体産生を達成するのに好適である。好ましくは、動物は家畜である。家畜とは、乳、肉、または抗体を生産するために、人によって商業ベースの目的で利用される動物である。既に市販規模の乳の生産に利用されている家畜は、これらの動物には乳の生産に最適化された特別な系統および/または品種が存在するので、本発明にとって好ましい。好ましくは、家畜は乳牛である。代わりとしては、家畜はヤギである。

【0015】

本発明の方法を用いると、例えば初乳または乳のような、いかなる乳腺分泌産物中にも、高レベルの抗原特異的抗体を得ることが可能である。

【0016】

乳中の抗原特異的抗体は、いかなる免疫クラスでもよい。しかしながら、好ましくは抗体はIgGおよび/またはIgAクラスである。より好ましくは、抗体はIgAクラスである。

【0017】

抗原特異的抗体を含有する乳は、好ましくは動物を搾乳することにより収集する。従って収集された乳は直接使用することもでき、または乳は、例えば純粋な抗原特異的抗体へとさらに加工されてもよい。乳からの(抗原特異的)抗体の(部分的な)精製方法は当該技術分野に存在し、ここに記載する必要はない。

【0018】

本発明の抗原特異的抗体は、ほとんどのいかなる目的にも使用できる。好ましくは、抗体は、当該技術において使用されるポリクローナル抗体の目的に使用される。しかしながら、当該技術における精製方法を使用すると、例えば本質的に1つだけの抗原部位を含む抗原による免疫処理によって、本質的にモノクローナル抗体を得ることも可能である。本来、モノクローナル抗体は、例えば、抗体に対して本質的に1つだけの結合領域を含むペプチドを用いた免疫精製のような他の方法によっても生産できる。(乳から精製された、または精製されていない)抗原特異的抗体は、好ましくは薬物の調製に使用される。そのような抗体は、例えば皮膚の創傷の治療用の薬物を調製するのに、例えば皮膚細菌に特異的な抗体と共に使用できる。そのような抗体は、消化管内の病原体によって引き起こされる疾病の治療に特に好適でもある。一般的に、家畜の乳からの抗原特異的抗体は、人体のいかなる(少なくともある程度は)免疫保護された領域においても使用できる。そのような領域は、例えば消化管、気道、尿生殖路、眼、口、および皮膚である。しかしながら、そのような抗体は、例えば、患者への抗体の全身性投与のように、血流によって患者に到達され得る抗原に結合するためにも使用できる。治療される個体が通常は人であり、かつ抗体は家畜に由来するものであることを考慮すると、特に全身的に投与された場合、個体の

10

20

30

40

50

免疫系は投与された抗体に应答することが予想される。しかしながら、そのような抗体の全身性投与の多くの用途が可能である。例えば、個体がまだ抗体に対する免疫応答が起きていない場合（例えば前記個体において初めて使用する場合）、または免疫応答が消えてしまっている場合（オーバータイム（overtime））である。

【0019】

抗原特異的抗体（乳から精製されたまたはされていないもの）は、例えば食品の調製にも使用できる。細菌性だけでなくウィルス性の多くの微生物は、消化管内に存在し得る。それらの微生物のいくつかは、潜在的に存在し得る。本発明の方法によれば、微生物のうち1またはそれ以上に対して特異的な抗体が産生され得る。そのような抗体は、食品または他の製品の調製にも使用できる。その製品を食べることにより、1またはそれ以上の微生物に対する抗体が消化管内に放出され、少なくともある程度は微生物が増殖するのを防止する。

10

【0020】

家畜内で抗体が産生されることを考慮すると、その抗体は一般的にその動物内に通常存在しない抗原（異物）に特異的であろう。従って、一般的に抗体はその動物に対して外来性のいかなる抗原に対しても産生され得る。一般的に、そのような抗体は、細菌、ウィルス、およびそれらの毒に対する特異性を有する。しかしながら、投与した抗原と家畜内のその抗原の相同体との間に十分な相違がある場合は、哺乳動物の抗原に対する抗体も産生され得る。あまり容易ではないが、少なくともいくつかの自己抗原に反応する抗体を産生することも可能である。その結果を得るいくつかの方法が、当該技術に存在する。

20

【0021】

1またはそれ以上の免疫スケジュールは、家畜の免疫応答の刺激および/または調節ができる1またはそれ以上の他の化合物の投与をさらに含んでも良い。好適なアジュバントは当該技術において知られており、数ある中でも、フロイント不完全アジュバント、水酸化アルミニウム、サポニン/コレステロール系免疫刺激複合物ISCOMS、およびグリセリド-ポリソルベート系アジュバント「Rhino Vax」（ヤコブセン（Jakobsen）ら著、Infect. Immun. 67: 4128-4133（1999））を含むことができる。好ましくは、そのアジュバントは粘膜の免疫応答を促進するように免疫応答を調節できる。そのような化合物の非限定的な例は、 $I\alpha, 25(OH)_2D_3$ 、コレラホ毒素、クロストリジウムジフィセル（Clostridium difficile）のA毒素およびB毒素、IL-5、IL-6、IL-12またはTGF- β のようなサイトカイン、リン酸ジエステルを主鎖とする非メチル化C_pG（細菌のDNA）配列である。フロイント完全アジュバントに代わる商業的に入手可能なものは、Ribiadjuvant system（RAS）、Titer Max、Syntex Adjuvant Formulation（SAF）、Elvax 40W、Montanide、AdjuPrime、GerbuAdjuvant、およびSuper Carrierである。ゆっくりと放出させるために、抗原をL-チロシンと共沈殿させるか、またはニトロセルロースに吸着させることが出来る。勿論、アジュバントを組み合わせたものも使用できる。

30

【0022】

本発明の方法は、家畜において、抗原に対する免疫応答を誘発するのに使用できる。しかしながら、勿論本発明の方法を、その家畜内に既に存在する抗原に対する免疫を増幅するために用いることも可能である。

40

【0023】

家畜は、1つの抗原に対して免疫することができるが、ポリクローナル免疫応答が発生していることを考慮すると、乳中の抗原特異的抗体は一般的に、その抗原の2またはそれ以上の異なる部位に対する特異性を有する。異なる化合物の複合混合物を含む抗原を用いる場合、その抗原の異なる部位に対する特異性を含むたくさんの抗体が産生され、その動物の乳中に存在することになるであろう。異なる抗原に対して本発明の方法を1または複数回繰り返す、1または複数の抗原または複数の架橋された抗原に対する抗体の組（set

50

）を含む乳腺分泌産物を産生することは勿論容易である。

【 0 0 2 4 】

与えられた抗原に対する家畜の免疫応答性は、その動物に対する遺伝子操作によってさらに増強させることができる。例えば、B細胞の活性化から粘膜表面における抗体分泌までの工程に含まれる不可欠な多数の生化学的段階のそれぞれは、遺伝子操作によって最適化することができる。非限定的な例は、十分な抗原提示のための特異的なMHC抗原分子の発現の増加、IgA二量体形成を増加させるためのJ鎖の発現の増加、および/または活性化リンパ球の乳腺組織への移動の増加のためのホーミング受容体の発現の増加、である。工程に含まれる多数のサイトカインおよびリンホカインの発現は、抗体分泌が最大となるように最適なレベルに操作することもできる。さらに、所定の抗原に対して高度な応答者であることが証明された動物をクローン化することができ、クローン化された動物の免疫においては、抗原特異的抗体が高収率で得られることが保証される。

10

【 0 0 2 5 】

一つの実施形態においては、抗原はクロストリジウムジフィセルの培養液から採集される化合物の収集物を含む。この化合物の収集物は、ホルムアルデヒド不活化C・ジフィセル(VPI10463)細胞、この微生物のホルムアルデヒド不活化孢子、およびこの微生物のホルムアルデヒド不活化トキソイド(A毒素およびB毒素)の中の幾つかのタンパク質を含有する。この収集物に対して産生される抗体は、一般的に、C・ジフィセルの1以上のタンパク質に対する特異性を有する。好ましくは、この抗体はC・ジフィセルの孢子に特異的な抗体を含む。そのような抗体の調製は、C・ジフィセル感染に関連する疾病の治療用の薬物の調製に利用できる。ある個体への投与は、好ましくは抗体が腸に搬送されるように行われる。当該技術においてそのような搬送を可能にするための方法はいくつか存在し、例えば抗体を、中身を腸に放出するための丸薬に包含させることができる。本発明の好ましい実施形態において、本発明の抗体はC・ジフィセルの孢子に対する特異性を有する。そのような抗体は、少なくともある程度は、C・ジフィセルに関連する疾病の再発を防ぐのに特に有用である。一般的に、C・ジフィセル関連疾病は、C・ジフィセルの細菌を直接的に除去する薬物療法によって治療する。そのような薬物療法は、例えば1またはそれ以上のC・ジフィセルの細菌成分に対する抗生物質および/または抗体の投与から成る。この治療は一般的に、患者を症状から治癒させるのに有効であるにもかかわらず、しばしば(20%の場合)、患者における疾病の再発を防止するのには十分でない。C・ジフィセルの孢子に対する特異性を持つ抗体を患者の腸に搬送することにより、少なくともある程度は、再発を防ぐことができる。腸内のC・ジフィセル孢子の少なくとも一部分に対する抗体の結合は、少なくともある程度は、孢子が孵化する傾向を減少させる。従って、患者におけるC・ジフィセル関連疾病の再発を、少なくともある程度は防止する。従って本発明は、C・ジフィセルの孢子に結合可能な抗体を含有する組成物も提供する。さらに、薬物の調製のための、C・ジフィセル孢子特異的抗体の使用を提供する。好ましくは、抗体はC・ジフィセル関連疾病の治療用の薬物の調製に使用される。

20

30

【 0 0 2 6 】

家畜を搾乳すると、乳腺内に、細菌性および/またはウィルス性の感染が起こり得る。そのような感染は少なくともある程度は、乳腺の分泌区画(compartment)への抗原特異的抗体分泌を可能にすることによって治療できる。そのような疾病のうちの1つは、乳腺炎である。従って本発明はさらに、高度な免疫応答を得るための抗原の動物への投与、および動物の乳腺および/または乳腺上リンパ節への抗体の投与を含み、抗原は少なくともその微生物の一部分、またはその機能的な派生物、および/または類似化合物を含む、動物の乳腺における細菌感染の治療方法を提供する。免疫応答は、全身性の免疫応答でも良い。好ましくは、免疫応答は通常の(全身性および粘膜性のいずれも)免疫応答である。動物は乳腺炎を患っているまたは乳腺炎を患っている危険性があることが好ましい。

40

【 0 0 2 7 】

本発明はさらに、乳腺の細菌感染の治療用の薬物の調製における抗原の使用であって、薬

50

物が、抗原の気道投与用の組成物、および抗原の乳腺および/または乳腺上リンパ節投与用の組成物を含む使用を提供する。好ましくは、細菌感染は乳腺炎を引き起こす。薬物は人の治療に好適であっても良い。

【0028】

乳腺炎は、一過性の、および時には永久的な乳生産の減少を引き起こす。乳生産の減少は、その疾病自体によって、または乳生産に影響を及ぼす抗体の使用、またはその両方によって誘導され得る。乳腺炎を患った動物は重病になり、時には死亡する。乳腺炎は、農業家にとって、仕事量および生産コストにかなり影響する。

【0029】

他の態様において、本発明は、家畜を搾乳することにより得られる、少なくとも $0.5 \mu\text{g/mL}$ の抗原特異的抗体を含む乳を提供する。好ましくは、乳は少なくとも $15 \mu\text{g/mL}$ の抗原特異的抗体を含む。より好ましくは、乳は少なくとも $50 \mu\text{g/mL}$ の、本発明の方法によって動物を免疫した抗原に対する抗体を含む。

10

【0030】

動物への抗原の投与は、当該技術において知られる手段によって行われる。一般的に抗原は、約 10 kDa のタンパク質で $5 \sim 500 \mu\text{g}$ の範囲で投与される。細胞全体（不活化させたもの）および/または孢子に基づく抗原は、一般的に、 $10^8 \sim 10^{11}$ 個の範囲に相当する細胞および/または孢子が動物に提供されるように投与される。動物のサイズ、抗原の免疫原性、および/またはアジュバントおよび他の当該技術において知られる可変性のものに依存して、別の濃度および/または量が同様に使用できる。

20

【0031】

文献には、乳牛の初乳および乳から得られる病原体特異的抗体は、種々の病原体によって引き起こされる胃腸管系の感染の予防や治療に効果的であるという、多くの証拠が存在する。しかしながら、有望な効果があるにもかかわらず、主として十分な量の病原体特異的抗体が入手不可能であるために、製品開発は未だ広く実現されていない。

【0032】

通常の方法による免疫後に、乳牛の初乳から高レベルの抗原特異的抗体を得ることは比較的容易である。しかしながら、初乳の分泌は、各出産後2、3日しか続かず、熟成した授乳期に入るとすぐに、その抗体レベルは0付近まで低下する。本発明において、我々は、授乳中の家畜の初乳中だけでなく熟成乳中にも、高レベルの抗原特異的抗体の分泌を

30

【0033】

従って、本発明の1つの態様によれば、その哺乳動物の初乳（ここで、この初乳は抗原で哺乳動物を免疫した後に得られるものである）から得られる抗原特異的抗体の少なくとも50%の量の抗原特異的抗体を含む、哺乳動物から得られる熟成乳が提供される。IgAは複合体を非常によく形成できる二量体を形成するので、抗原特異的抗体はIgAから成ることが好ましい。

【0034】

ここでは、初乳中に得られる抗原特異的抗体の平均含量とは、その抗原で免疫した非選択的な別々の動物の初乳から得られる抗原特異的抗体の収量の平均を意味する。

40

【0035】

先行技術においては、熟成乳中の抗原特異的抗体の収率は、初乳から得られる収率と比較して10分の1が可能なだけであったので、少なくとも50%の収率というのは重大な改良点である。しかしながら、本実施例において示すように、本発明は、熟成乳中に、当該技術における通常の方法を用いた初乳中において得られるよりも高い収率のIgAを提供する。従って、本発明の好ましい態様においては、その割合が少なくとも100%、より好ましくは少なくとも200%である、本発明に従った熟成乳が提供される。

【0036】

50

実施例

材料および方法

人への使用が認可された経口コレラワクチンであるDUKORAL（登録商標）を、ストックホルム所在のSBL Vaccin ABより購入した。各アンプルは、pH 7.4のリン酸緩衝食塩水（PBS）3 mL中にそれぞれ、細胞数 10^{11} のホルマリン不活化されたコレラ菌およびコレラ毒素サブユニットB（CTB）、および1 mgのタンパク質が含まれて成る。

【0037】

クロストリジウムジフィセルホールセル。C.ジフィセルホールセルを以前に記載されているように調製し、不活化させた。すなわち、C.ジフィセルVIP10463をBHI培地中で、37℃の嫌気性雰囲気下で36時間培養した。培養物を遠心分離し、細胞をPBSで3回洗浄した。得られた沈殿物を、1%（vol/vol）ホルムアルデヒドを含有するPBS中に再懸濁し、使用するまで4℃に放置した。各免疫前にPBSで2回洗浄することにより過剰のホルムアルデヒドを除去した。 10^9 CFUに相当するC.ジフィセル（光路1 cmで550 nmにおける吸光度が1.0である細胞懸濁液）をBHI培地に接種し、嫌気製雰囲気中で37℃、36時間後、増殖は見られなかった。

10

【0038】

C.ジフィセルトキシイド。C.ジフィセル培養物の濾液を以前に記載されているように調製し、不活化させた。すなわち、C.ジフィセルVIP10463を、プロテオースペプトン-イースト抽出物培地中で37℃、48時間培養し、ホルムアルデヒドを1%（vol/vol）の濃度になるように添加し、37℃で1時間インキュベートすることにより不活化した。上清をフィルター滅菌し、限外濾過（Amicon、30 kDa）によりPBSで3回洗浄し、500 mLの細胞濃縮機（cell concentrator）中で10倍に濃縮し、使用するまで-20℃で保存した。

20

【0039】

動物。妊娠中のホルスタイン種（Holstein-Friesian）およびMRY乳牛（dairy cows）を、オランダにおいて一般的に受け入れられている酪農管理方法に従って管理した。本明細書において記載した実験においては、ほとんどホルスタイン種の牛を使用した。さらに、妊娠中のヤギを選択し、別の飼育場で、一般的に受け入れられている管理方法に従って管理した。

30

【0040】

免疫の経路および方法。乳牛：筋肉内（IM）、乳腺内（IUDR）、または乳腺上リンパ節内（LMF）免疫のために、2 mL PBS中のワクチン製剤を、それぞれの組織内への直接注射によって投与した。鼻腔内（IN）免疫のためには、顔を上に向けさせている間に、牛の鼻孔の一方に、注射器に取り付けたノズルを通して、2 mLのワクチン製剤を噴霧した。コレラワクチンでの免疫のためには、DUKORAL（登録商標）を、2 mL当たり 6.5×10^9 のV.コレラと66 µgのCTBを含むようにPBSで希釈した。C.ジフィセル（CD）ワクチンの場合には、トキシイドとホールセル製剤を混合し、培養液上清2 mL中に 5×10^{10} の不活化したC.ジフィセルと、5.5 mgのタンパク質を含むようにPBSで希釈した。

40

【0041】

ヤギ：乳牛用に調製したワクチンを、等量のPBSでさらに（50%となるように）希釈した。LMF以外の各免疫には2 mL使用し、LMFには1 mLだけ使用した。

【0042】

試料の収集および、血清および乳性の調製。通常は、各乳房区から5 mLずつの乳試料を毎週収集した。必要な時に、5 mLの血液試料も尾静脈から収集した。乳清を乳試料から以前に記載されているように調製した。すなわち、4℃において、MSE Mistral Centrifuge 6000で4,300 × g、15分の遠心により、脂肪を除去した。酢酸ナトリウムと酢酸を添加することによりpH 4.6で酸沈殿（acid precipitation）させた後、室温で3,500 × g、15分の遠心により、カゼ

50

インを除去した。血液を凝固させるために4 で一晩放置し、遠心により血清を得た。

【0043】

アッセイ。乳清および血清試料中の免疫原特異的IgGおよびIgAレベルを測定するために、間接ELISAを行った。初めに(DUKORALで免疫した乳牛からの試料のために)、ELISAを手作業で行ったが、後で(CDワクチンで免疫した乳牛からの試料と、DUKORALおよびCDワクチンで免疫したヤギからの試料のために)、ELISA robot BioTek OMNIを行った。両方の場合において、マイクロタイタープレート(Greiner 655902, Greiner)をCTBまたはC.ジフィセルホールセルのいずれかで、それぞれ1ウェルあたり0.3μgCTBまたは 2×10^7 セルの濃度でコートした。コーティングは、CTBで37、2時間、またはC.ジフィセルホールセルで70、2時間のインキュベーションにより行った。各インキュベーション工程後に、プレートを0.05%のTween 20を含むPBSで洗浄した。ウェルをPBS中の2%ゼラチンで、室温で1時間ブロッキング処理した。試料をPBSで2倍に希釈し、37で1時間インキュベートした。収集した試料中の抗原特異的ウシ抗体を測定するために、ジゴキシゲニン標識したモノクローナル抗ウシIgG、または抗ウシIgAを研究室内で製造し、2次抗体として使用した。収集した試料中の抗原特異的ヤギ抗体を測定するために、2次抗体として、抗ウシ抗体の代わりにモノクローナル抗ヤギ抗体を使用した。検出には、西洋わさびペルオキシダーゼ標識した、ヤギ抗ジゴキシゲニン-POD, Fabフラグメント(Boehringer Mannheim)を使用した。西洋わさびペルオキシダーゼの基質として、ABTS, 2, 2'-アジノジエチルベンゾチアゾリンスルホン酸(2, 2'-Azino diethyl benzothiazoline sulfonic acid)(Sigma)を使用した。37で30分インキュベート後、415nmにおける吸光度を、Bio-Tek Elx800 readerで測定した。

【0044】

力価。試料中の免疫原特異的Igのレベルは、1000ユニット/mLの標準物質に対するユニットで表した。標準物質は、DUKORALまたはCDワクチンのいずれかで免疫した乳牛の初乳から調製した乳清である。

【0045】

乳中の総Igの測定。免疫した乳または免疫していない乳から調製した各乳清試料中の総Ig含量を、高圧ゲルろ過液体クロマトグラフィーを用いて測定した。

【0046】

結果

抗原特異的抗体アッセイのための標準物質の産生。妊娠後期の乳牛を、出産前に、免疫の間隔を3週間開けて4回免疫した。各免疫には、鼻腔内(IN)および皮下(SC)経路を組み合わせて使用した。等容量の両ワクチン(DUKORALおよびCDワクチン)から成る免疫原を、IN経路ではコレラ毒素(50μg/ウシ/免疫)で、SC経路ではフロイント不完全アジュバント(免疫源と等容量)で補充した。それぞれの乳牛から初回搾乳の初乳を収集し、乳清を調製した。必要なだけPBSで希釈(抗CTB IgA 320倍、抗CTB IgG 8000倍、抗CD IgA 130倍、および抗CD IgG 8000倍)後、ELISAを行った。415nmにおける吸光度測定の結果を図1(抗CTB抗体)および図2(抗CD抗体)に示した。乳清製剤を貯蔵し、標準物質として使用した。

【0047】

コレラワクチン、Dukoralで免疫後の乳牛の乳中の抗CTB Igレベル。哺乳動物の乳中に高レベルの免疫源特異的Igを長期間得るという目的で、種々の免疫経路を用いて、授乳中の乳牛において、抗原として種々の服用量のDukoralを試した。例えば、皮下(CS)、乳腺内(IUDR)、乳腺上リンパ節(LMF)、膈内(IVG)、および腹腔内(IP)経路の組み合わせを、DUKORALの濃度範囲が50倍希釈から無希釈までで探索した。大抵の場合、乳中の抗CTB IgAおよびIgGの力価は、1

000 ユニット / mL の標準物質と比較すると、非常に低かった (図 3 および図 4)。少数の場合において、レベルが数百ユニットに達したが、それらは 1 週間以上持続できなかった。さらに、そのような散発性のピークの出現時期は、免疫の時期と関連して予測できなかった。

【0048】

経鼻噴霧、続いて乳腺内免疫後の、乳牛の乳中および血中の抗 C T B I g レベル。成熟授乳 (m a t u r e l a c t a t i o n) 中の 6 頭の乳牛のグループを、1 週間に 1 回、5 週連続してコレラワクチン、D u k o r a l で鼻腔内 (I N) 経路で免疫した。この 5 週間の期間中、乳の乳清および血液中の C T B 特異的 I g A および I g G のレベルをモニターした。乳中においては低レベル (0 から約 50 の範囲) であり、以前の実験で得られた結果と有意な差は無かった (図 5 および図 6)。しかしながら、血液中の抗 C T B I g G レベルは、繰り返す I N 処理に伴って増加し続け (約 10 から始まり、第 5 免疫セッションの最後には約 1000 ユニットまで)、一方、血中の C T B 特異的 I g A は実験期間を通して検出可能なレベル以下であった。しかしながら、1 回のブースト処置は、多数の態様におけるこれらの結果に興味深い変化をもたらした (図 5 および図 6)。最後の I N 免疫後 6 週間で与えたブースト処置は、それぞれ 2 mL ずつ、I M を 1 回、後部右側 (r e a r r i g h t) 乳房区への I U D R を 1 回、およびこれも後部右側乳房区への L M F を 1 回で行った。5 ヶ月に渡る抗 C T B I g A および抗 C T B I g G の力価の測定結果を、図 5 および図 6 に示した。乳腺内ブースト免疫により得られたわずかな著しい変化は、次のようである。i) 抗 C T B I g A および抗 C T B I g G の両方の応答が、全ての動物 (6 / 6) において観察された。i i) 標準物質 (1000 ユニット / mL) における力価と比較して、I g A 応答が非常に強く、数頭の乳牛において標準レベルの約 300 ~ 500 % に達した。I g G 応答は I g A の応答よりは低かったが、依然として非常に高かった (高い応答者においては標準の 30 % に達した)。i i i) I g A 応答は I g G 応答よりも明らかに長く続いた。i v) 免疫応答において動物間で大きな違いがあるにもかかわらず、ここで用いた免疫方法は、動物間で同調的な応答をもたらすことができた。v) I g A 応答は、多かれ少なかれ免疫した乳房区に限定されたが、I g G 応答は一般的に 4 つの全ての乳房区に拡散した。

【0049】

経鼻噴霧、続いて乳腺内免疫後の乳中の、抗 C . ジフィセル (ホールセル) I g レベル。以前の試験において成された興味深い観察により、発明者らは異なる免疫源を用いて試験を広げることにした。従って、上記で用いた手順に多少の修正をして、C D ワクチンを用いて試験を行った。新しい手順において使用した変更点は、I N 免疫と乳腺内免疫の間隔の重要性と同様に、乳腺内注入前の I N 免疫回数の重要性の評価を意図したものである。授乳期間の中頃にある 10 頭のグループの各乳牛に、2 mL の I N 免疫を 1 回と、2 mL の I M 免疫を 1 回行った。初回免疫刺激後、ブースト前に収集した試料中の抗 C D (ホールセル) I g A および I g G レベルの測定は予想通りの結果を示し、わずかに検出可能であった (図 7)。初回免疫刺激から 3 週間後、各乳牛に、2 mL の I N を 1 回、2 mL の I U D R を後部右側乳房区に 1 回、および 2 mL の L M F を、これも後部右側乳房区に 1 回からなるブースト処置を行った。乳試料を毎週収集し続け、抗 C D (ホールセル) レベルの測定を、E L I S A を用いて行った。乳牛によって 130 ~ 430 ユニット / mL (1000 ユニット / mL の抗 C D 標準物質と対照して) の範囲での免疫源特異的 I g G の同調的な急増 (s u r g e) が、ブースト処置後の初めの 1 週間で観察された (図 7)。コレラワクチンを用いた場合において観察されたように、抗 C D I g G 分泌は 4 つの乳房区に均等に分布し、また高レベルの分泌は比較的短期間であり、2 週間以内に約 50 % のレベルまで減少した。即時型であるブースト後の I g G 応答とは異なり、抗 C D I g A 応答は遅く現れ、1 ヶ月以上後に検出でき (図 8)、その時には (10 頭中) 7 頭の乳牛を選択して再免疫した。再免疫は、2 回の I N 免疫を 1 週間置いて行うことから始めた。その 2 週間後、各乳牛に、1 回の I N 免疫と 2 回の L M F 免疫 (各後部乳房区に 1 回ずつ) を行った。I g G 応答の場合と異なり、驚いたことに、抗 C D I g A 応答は、免疫

した乳牛の間で、同調しなかった。(抗CD IgA 応答の同調性は、後で、ブーストとしてLMFとIMA経路を組み合わせに行った時に回復した(図11の実験を参照))。本実験における他の予想外の結果は、抗CTB IgA 応答の場合に観察されたがここでは観察されなかった、強い乳房区特異性であり、即ち、免疫した乳房区(後部右側)が必ずしも最高レベルの抗CD IgAを分泌するわけではないということである。

【0050】

免疫経路の相対的な重要性。乳中への抗体分泌の最終的な結果に対する各免疫経路の相対的な寄与を評価するために、8頭の乳牛をCDワクチンで免疫した。予想されたように、2週間の間隔を開けて2回連続して行ったIN経路による免疫後の乳中には、抗CD抗体は検出されなかった(図9および図10)。2回目のINから1週間後、全ての乳牛に、前部(front)乳房区のみへのIMA免疫に加えて3回目のINを行った(5/22/2000に)。それから1週間後(5/28/2000)、抗CD IgGが4つ全ての乳房区から検出されたが、非常に少なかった(図9)。しかしながら抗CD IgAは、4つ全ての乳房区から検出されなかった(図10)。次に、8頭の乳牛を2つのグループに分けた。そのうちの4頭(グループ1)にLMF経路でCDワクチンを接種し、別の4頭(グループ2)には生理食塩水を接種した(5/29/2000)。それから1週間後、グループ1のみにおいて、抗IgG分泌において注目すべき上昇が起こり、IMA経路はIgGクラスの分泌には比較的重要でないことを意味した(図9)。予想されたように、この分泌には乳房区特異性は無かった。しかしながら、IgAクラスは、両方のグループにおいて、生理食塩水で処置したグループでさえも(時間の経過と共にすぐに減少したものの)、有意なレベルの抗CD抗体の分泌が観察された(図10)。このデータは、LMF経路はIgA分泌にとって主要な役割を果たし、IMA経路はより低い程度の役割を果たすことを意味する。さらに(以前の実験に加えて)、乳房区特異性の明らかな減少があった。この観察結果は免疫の経路とは独立して現れ、従って使用したワクチン、即ち、CDの弱毒化したA毒素、CDの弱毒化したB毒素、および/または不活化したCD細胞によるものに違いない。この観察結果は、乳牛の後部乳房区のみから乳を収集しなくてはならないという、望ましくない物流上の問題を解決させてくれるので、潜在的に重要である。(LMF経路を用いた乳牛の前部乳房区の免疫は、手術なしでは出来ない)。本実験におけるIgAおよびIgG両方の全体的な抗CD抗体のレベル(図9および図10)は、以前観察されたものよりも少なくとも1オーダー分だけ低かった。この結果は明らかに、IMA、膈内、直腸内、および/または好ましくは鼻腔内経路のような、他の粘膜性の経路に伴って、LMF経路によりブーストすることは、非常に望ましいということを示唆する。IN経路による初回免疫後に、LMFおよびIMA経路によって乳牛を免疫した例の一つを、図11(抗CD IgA)、および図12(抗CD IgG)に示す。

【0051】

免疫した乳牛の乳中の総Ig濃度のレベル。本明細書中に記載される方法を用いると、抗原特異的抗体レベルは、免疫した乳牛の初乳中に通常見られる範囲に達する(近づく)ことができた。免疫していない乳牛の初乳中の総Ig濃度は熟成乳中のものよりも約2オーダー分だけ高いので、明白な論点は、免疫した乳牛中の乳中の総Ig濃度がどうなるかである。高圧液体クロマトグラフィーを用いて行った測定により、免疫した乳中の総Ig量は、免疫していない乳中のそれとは明らかな違いは無いことが示され、その平均は0.3mg/mLであった。免疫した乳および免疫していない乳中の相対的な総Ig量を、図13に示す(各乳牛の免疫応答性は図8を参照されたい)。対照グループの値は、貯蔵されたもの(9検体から)の値である。

【0052】

乳牛以外の他の動物の免疫応答性。同様な結果を得るための、他の哺乳動物に対する同じ免疫方法の適用性を調べるために、ヤギを選択した。ヤギは大量に入手可能であり、それぞれは2,000リットルに達する乳を生産できる。自動搾乳装置も入手可能であり、また、その病気状態や取り扱いについての情報と同様に、その乳からのチーズの作製方法、従って乳清の作製方法も広く知られている。10頭のヤギをIN経路によって、各免疫の

間隔を3週間開けて3回免疫した。3回目のINから2週間後、各ヤギに3種の免疫を、IN、IMA、LMF経路によってそれぞれ1回ずつ行った。乳清試料中の抗CTB IgG、抗CTB IgA、抗CD IgGおよび抗CD IgAのレベルの測定結果は、免疫した乳中の乳中に観察された免疫応答の一般的なパターンと同様であった。

【図面の簡単な説明】

【図1】 標準物質として使用した、免疫した乳牛の初乳中の抗CTB IgAおよびIgGの相対レベルを示す図。

【図2】 標準物質として使用した、免疫した乳牛の初乳中の抗CD IgAおよびIgGの相対レベルを示す図。

【図3】 当該技術において知られる種々の免疫方法の適用後の乳牛の乳中における、抗CTB IgA応答（標準の1,000ユニット/mLに対する）を示す図。 10

【図4】 当該技術において知られる種々の免疫方法の適用後の乳牛の乳中における、抗CTB IgG応答（標準の1,000ユニット/mLに対する）を示す図。

【図5】 本発明の免疫方法の適用後の乳牛の乳中における、抗CTB IgA応答（標準の1,000ユニット/mLに対する）を示す図。

【図6】 本発明の免疫方法の適用後の乳牛の乳中における、抗CTB IgG応答（標準の1,000ユニット/mLに対する）を示す図。

【図7】 本発明の免疫方法の適用後の乳牛の乳中における、抗CD IgG応答（標準の1,000ユニット/mLに対する）を示す図。

【図8】 本発明の免疫方法の適用後の乳牛の乳中における、抗CTB IgA応答（標準の1,000ユニット/mLに対する）を示す図。 20

【図9】 種々の経路による免疫後の乳中における、相対的な抗CD IgG応答性を示す図。

【図10】 種々の経路による免疫後の乳中における、相対的な抗CD IgA応答性を示す図。

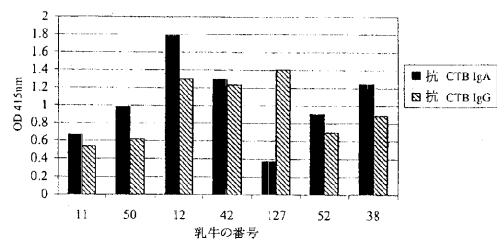
【図11】 LMF経路とIMA経路によってブーストした結果としての、乳牛の乳中における抗CD IgA応答（標準の1,000ユニット/mLに対する）を示す図。

【図12】 LMF経路とIMA経路によってブーストした結果としての、乳牛の乳中における抗CD IgG応答（標準の1,000ユニット/mLに対する）を示す図。

【図13】 免疫していない乳牛に対する免疫した乳牛の、乳中の総Igの相対的なレベル。 30

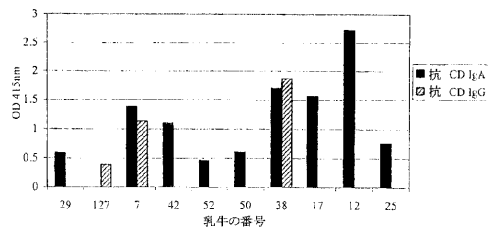
【図 1】

図1: 初乳中の抗 CTB 抗体の相対レベル

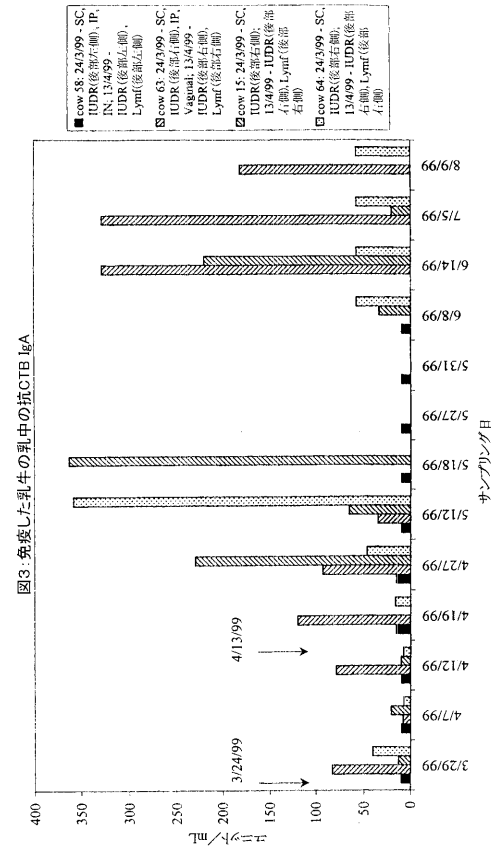


【図 2】

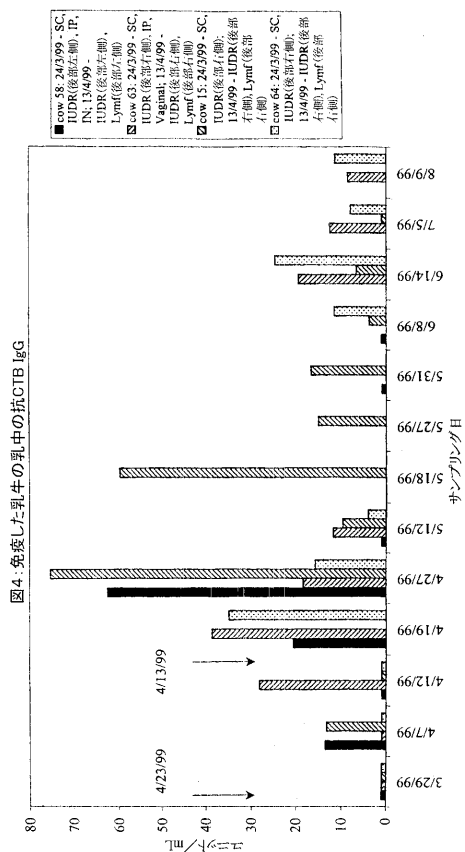
図2: 初乳中の抗 CD 抗体の相対レベル



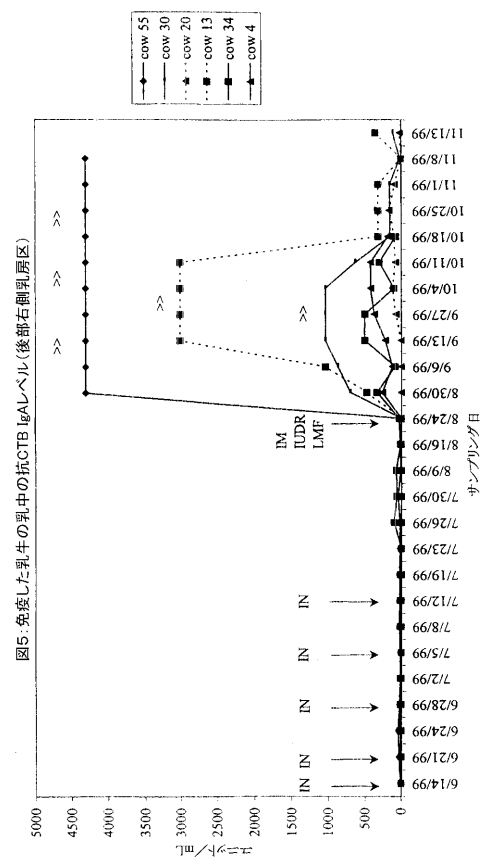
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【図 6】

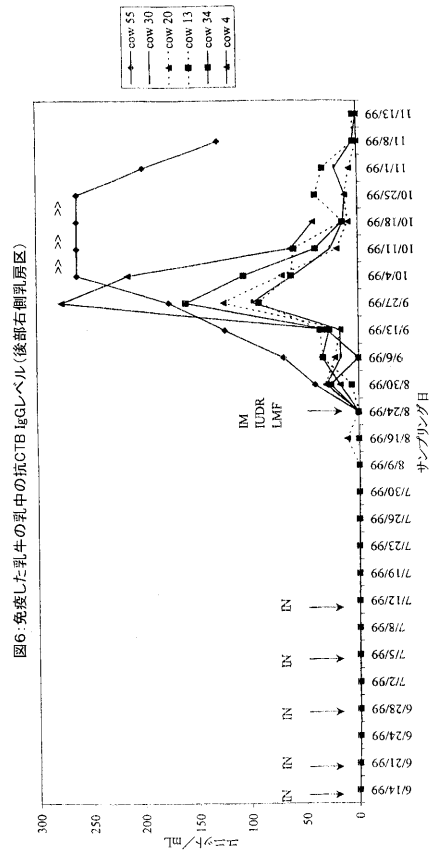


図6:免疫した乳牛の乳中の抗CD IgG(後部右側乳房区)

【図 7】

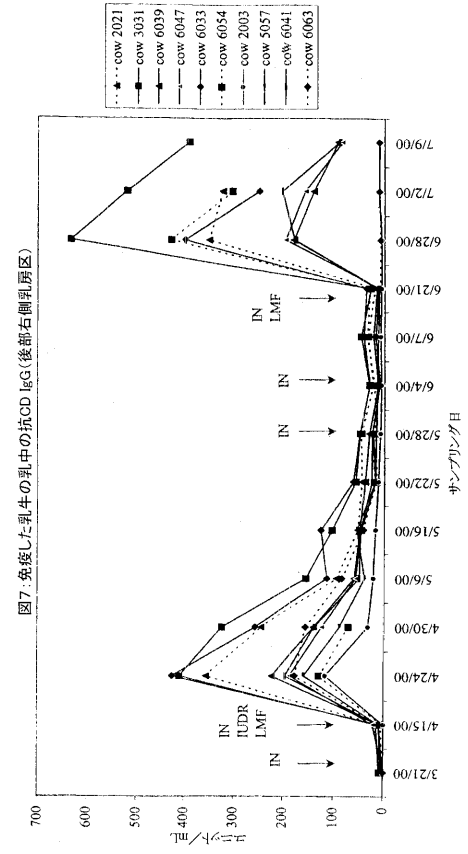


図7:免疫した乳牛の乳中の抗CD IgG(後部右側乳房区)

【図 8】

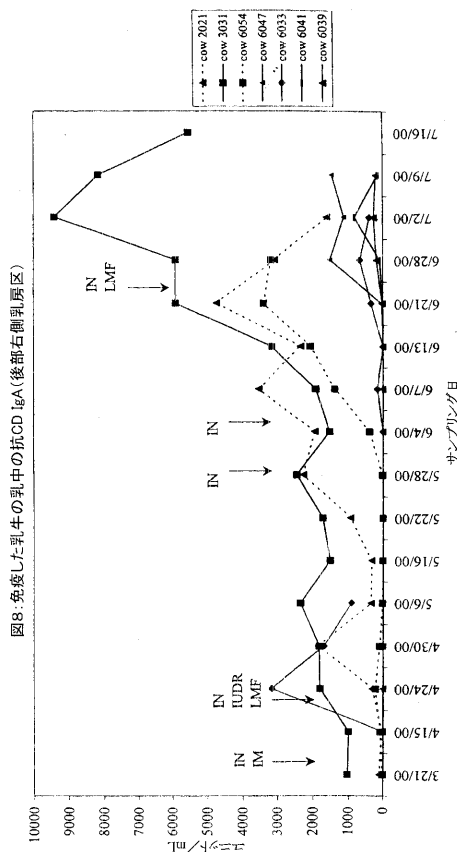
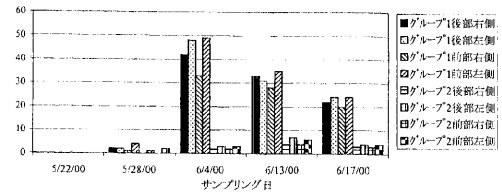


図8:免疫した乳牛の乳中の抗CD IgA(後部右側乳房区)

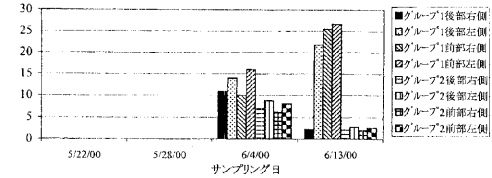
【図 9】

図9:乳中の相対的な抗 CD IgG 応答



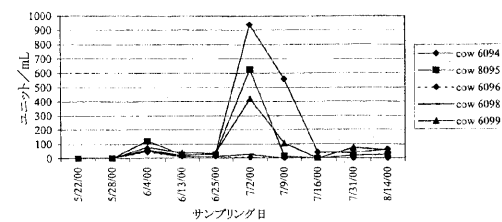
【図 10】

図10:乳中の相対的な抗 CD IgA 応答



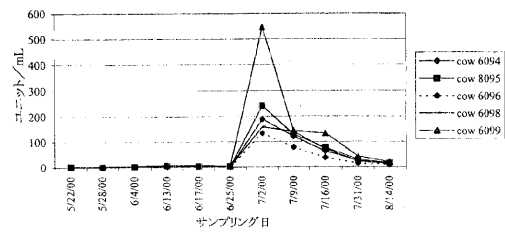
【図 11】

図11:免疫した乳牛の乳中の抗 CD IgA(後部右側乳房区)



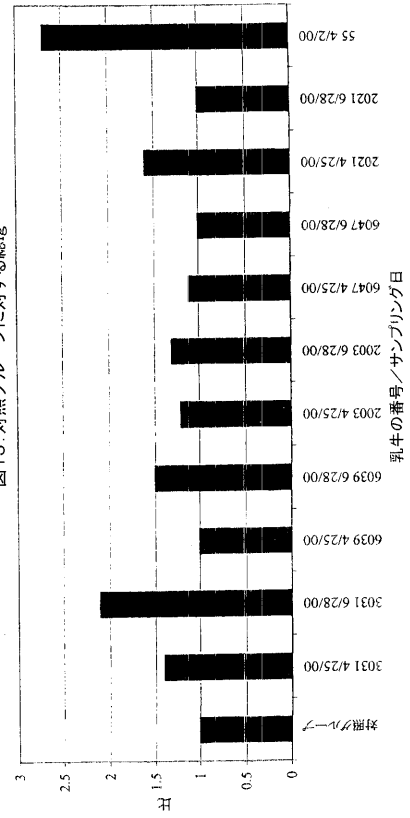
【図 12】

図12:免疫した乳牛の乳中の抗 CD IgG(後部右側乳房区)



【図 13】

図13:対照グループに対する総Ig



 フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
A 6 1 P 31/04	(2006.01)	A 6 1 P	15/14	1 7 1
		A 6 1 P	31/04	1 7 1

審査官 小暮 道明

(56)参考文献 米国特許第 0 4 9 4 4 9 4 2 (U S , A)
 特表平 1 1 - 5 1 0 7 9 3 (J P , A)
 特開平 0 8 - 0 9 2 1 0 8 (J P , A)
 特開昭 5 8 - 0 6 5 2 2 3 (J P , A)
 Am. J. Vet. Res., 45[1](1984) p.49-58
 IJAZ M K , ANTIVIRAL RESEARCH , 1 9 8 7 年 , V8 N5-6 , P283-287
 GARDNER D L , BOVINE PRACTITIONER , 1 9 7 7 年 , V11 , P76-77
 Infect. Immun., 16[3](1977) p.961-966
 アレルギー , 38[4](1989) p.342-351

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
 C12N15/
 C07K
 CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)