

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 12 月 15 日(15.12.2016)



(10) 国際公開番号
WO 2016/199904 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 39/39 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/716 (2006.01) A61P 37/04 (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/067403
- (22) 国際出願日: 2016 年 6 月 10 日(10.06.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-117871 2015 年 6 月 10 日(10.06.2015) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人東京大学(THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 植松 智(UEMATSU, Satoshi); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 武村 直紀(TAKEMURA, Naoki); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 稲葉 良幸, 外(INABA, Yoshiyuki et al.); 〒1066123 東京都港区六本木 6-1-0-1 六

本木ヒルズ森タワー 23 階 TMI 総合法律事務所 Tokyo (JP).

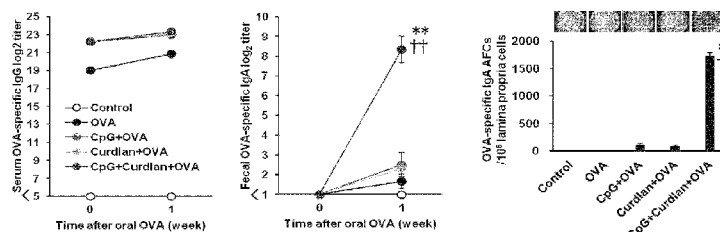
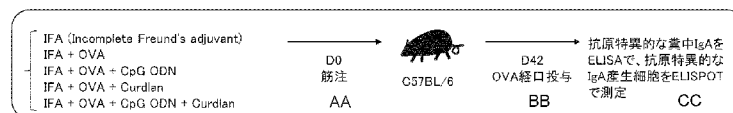
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ユーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: ADJUVANT FOR VACCINES, VACCINE, AND IMMUNITY INDUCTION METHOD

(54) 発明の名称: ワクチン用アジュバント、ワクチン、及び免疫誘導方法



**; P<0.01 (vs CpG+OVA), ††; P<0.01 (vs Curdian+OVA)

AA Intramuscular injection
BB Oral administration of OVA
CC Antigen-specific IgA in feces was measured by ELISA, and antigen-specific IgA production cell was measured by ELISPOT

(57) Abstract: The present invention provides: an adjuvant for vaccines, which comprises a Dectin-1 ligand and a TLR agonist; a vaccine comprising the adjuvant for vaccines and at least one antigen; and others.

(57) 要約: 本発明は、Dectin-1 リガンドと、TLR アゴニストを含むワクチン用アジュバント、及び、当該ワクチン用アジュバントと少なくとも 1 つの抗原とを備えるワクチン等を提供する。

WO 2016/199904 A1

明 細 書

発明の名称：

ワクチン用アジュバント、ワクチン、及び免疫誘導方法

技術分野

[0001] 本発明は、粘膜における抗原特異的IgA産生を効率よく誘導できるワクチン用アジュバント、及びこれを含むワクチン等に関する。

背景技術

[0002] 従来、ウイルスや細菌による感染症に対するワクチンが数多く開発されているが、そのほとんどは、Th1またはTh2応答の誘導を通じてIgG抗体を産生させる全身性免疫応答を誘導するものである。このようなワクチンは、感染後の重症化を防ぐことに大きく貢献しているものの、感染の成立自体を阻止することはできない。多くの病原体の侵入経路は、目、鼻腔、口腔、咽頭、気道、消化器、泌尿生殖器などの粘膜で覆われた組織や臓器であることから、感染の成立自体を防ぐためには、粘膜における免疫応答を強化し侵入を阻止する必要がある。そのため、IgA抗体を代表とする粘膜免疫応答と、IgG抗体を代表とする全身性免疫応答の双方を誘導できるワクチンが求められている。

[0003] 粘膜面を介して、粘膜免疫応答と全身性免疫応答の両方を効果的に誘導する方法の一つとして、免疫応答を増強するための様々なアジュバントの利用が検討されている。例えば、粘膜投与のワクチンとして、病原体の不活化抗原と、2本鎖RNA及びグルカン類を含むアジュバントを組み合わせることが提案されている（特許文献1）。また、経鼻投与する免疫アジュバントに、アウレオバシジウム属（*Aureobasidium* sp.）に属する微生物の培養物を利用することも提案されている（特許文献2）。この微生物の培養物には、 β -1,3-1,6-グルカンが含まれており、特許文献2では、当該培養物とPoly(I:C)を組み合わせることも提案されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2009-242367号公報

特許文献2：特許第5242855号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、鼻腔などの局所の粘膜に投与するワクチンは、抗原を浸透させる効率が低く、粘膜内に存在する樹状細胞に適切に抗原を到達させることが困難である。また、投与部位の周辺にしか効果が期待されず、全身性の免疫応答の誘導が弱いという問題もある。加えて、経鼻免疫応答では、消化管などの他の粘膜組織で粘膜免疫応答の誘導はできないという問題もある。

[0006] また、従来開発されてきたワクチンでは、とりわけ感染防御に有効なTh1応答の増強できるようなアジュバントが用いられてきたが、かかるアジュバントでは粘膜免疫応答を誘導する機能が得られない。

そこで、本発明者らは、粘膜免疫応答の誘導に必要な機能を樹状細胞に与えることを基準としてアジュバントを選択することにより、全身性免疫応答に加えて粘膜免疫応答をも効率よく誘導できる全く新しい免疫法が開発できるのではないかと考え、検討を行った。

[0007] すなわち、本発明は、全く新しい免疫法として、抗原特異的なIgA抗体とTh17応答の誘導、及び抗原特異的なIgG抗体とTh1応答の誘導を同時に行うことができるワクチン用アジュバント、及びかかるアジュバントを含むワクチンを提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0008] Uematsu, S. et al., Nat Immunol. 2008 Jul;9(7):769-76. (非特許文献1) には、腸管には、脾臓や骨髄に存在する樹状細胞とは異なり、抗原特異的なIgA抗体とTh17細胞を誘導できる特殊な樹状細胞が存在することが開示されている。そして、かかる特殊な腸管樹状細胞は、レチノイン酸合成酵素Raldh2を発現しており、レチノイン酸を合成することができ、このレチノイン酸

合成能がIgA抗体の誘導には必須であることも非特許文献1には開示されている。

また、Yokota A. et al. Int Immunol. 2009 Apr;21(4):361-377. (非特許文献2) には、腸管樹状細胞は、血中の単核球が腸管粘膜固有層に入り、腸内でGM-CSFとIL-4の影響を受けて分化することによって産生されることが開示されている。

[0009] そこで、本発明者らは、これら文献に開示された内容を踏まえ、まず脾臓に存在する樹状細胞をGM-CSFで処理したところ、樹状細胞がRaldh2を発現し、抗原特異的IgA抗体を誘導できるようになることを見出した。また、 β -1,3-グルカン等のグルカン類が樹状細胞におけるRaldh2の発現を誘導し、その結果、樹状細胞が抗原特異的IgA抗体誘導能を獲得することを見出した。

さらに、 β -1,3-グルカンと、TLR9アゴニストであるCpGオリゴデオキシヌクレオチドとを組み合わせたアジュバントを使用して抗原と共に投与すると、血中に抗原特異的なIgG抗体が誘導されるとともに、糞便中に抗原特異的なIgA抗体が誘導されることを見出した。この方法では、抗原特異的なIgG抗体産生の誘導は長期間持続したが、IgA抗体産生は一過性に上昇した後、消退した。しかしながら、抗原のみ粘膜面に投与することによって追加免疫を行ったところ、大量の抗原特異的IgA抗体が誘導され、IgA産生も3か月以上持続することを見出した。

[0010] また、本発明者らが用いた β -1,3-グルカンはDectin-1以外の自然免疫受容体を活性化することも報告されているが、 β -1,3-グルカンとCpGオリゴデオキシヌクレオチドとを組み合わせたアジュバントを抗原と共に投与したDectin-1 ノックアウト (KO) マウスでは抗原特異的IgA抗体産生の誘導が消失したことから、IgA抗体産生を誘導するにあたって β -1,3-グルカンが作用標的とする受容体はDectin-1であることを見出した。これは、Dectin-1を刺激する物質ならば、 β -1,3-グルカンに限らず同様の作用効果を奏することを示唆する。

[0011] このように、樹状細胞におけるDectin-1リガンドとTLRアゴニストとの組み

合わせをアジュバントとして用いれば、全身性のTh1応答及びIgG抗体産生並びに粘膜のTh17応答及びIgA抗体産生が誘導されると共に、追加免疫を行う際に投与ルートを選択することにより腸管や気道など所望の粘膜でTh17応答とIgA抗体産生が再誘導されることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0012] すなわち、本発明は

〔1〕 D e c t i n - 1 リガンドと、

T L R アゴニストと

を含むワクチン用アジュバント；

〔2〕

前記 D e c t i n - 1 リガンドが、 R a l d h 2 遺伝子の発現誘導剤である、〔1〕に記載のワクチン用アジュバント。

〔3〕

前記 R a l d h 2 遺伝子の発現誘導剤が、顆粒球単球コロニー刺激因子（G M - C S F）又はグルカン類である、〔2〕に記載のワクチン用アジュバント。

〔4〕

さらに、不完全フロイントアジュバントを含む、〔1〕から〔3〕のいずれかに記載のワクチン用アジュバント。

〔5〕

少なくとも1つの抗原と共に投与するための、〔1〕から〔4〕のいずれかに記載のワクチン用アジュバント。

〔6〕

少なくとも1つの抗原と、

〔1〕から〔5〕のいずれかに記載のワクチン用アジュバントとを備えるワクチン。

〔7〕

前記ワクチンは、前記抗原と、前記ワクチン用アジュバントとを含むワクチン組成物である、〔6〕に記載のワクチン。

〔 8 〕

前記少なくとも 1 つの抗原は、ウイルス、若しくはその一部、若しくはその成分を不活化若しくは弱毒化したもの、細菌、若しくはその一部、若しくはその成分を不活化又は弱毒化したもの、又はアレルゲンである、〔 6 〕又は〔 7 〕に記載のワクチン。

〔 9 〕

抗原特異的 I g A 産生を誘導する、〔 6 〕から〔 8 〕のいずれかに記載のワクチン。

〔 1 0 〕

抗原特異的 I g A 産生及び抗原特異的 I g G 産生を誘導する、〔 6 〕から〔 9 〕のいずれかに記載のワクチン。

〔 1 1 〕

粘膜免疫応答を誘導する、〔 6 〕から〔 1 0 〕のいずれかに記載のワクチン。

〔 1 2 〕

前記ワクチンの投与は、ワクチンを経皮投与、皮下投与、皮中投与、及び筋肉内投与からなる群より選択される方法で投与することによって行われる、〔 6 〕～〔 1 1 〕のいずれかに記載のワクチン。

〔 1 3 〕

前記ワクチンの投与後、一定期間経過後に、抗原を投与する追加免疫を少なくとも 1 回行う免疫誘導方法に用いられる、〔 6 〕から〔 1 2 〕のいずれかに記載のワクチン。

〔 1 4 〕

前記追加免疫は、経口投与、経鼻投与、経粘膜投与、経膣投与、経眼投与、及び直腸内投与からなる群より選択される方法で抗原を投与することによって行われる、〔 1 3 〕に記載のワクチン。

〔 1 5 〕

前記追加免疫は、アジュバントを使用せずに抗原を投与することによって

行われる、〔13〕又は〔14〕に記載のワクチン。

〔16〕

少なくとも1つの抗原と、

Dectin-1リガンドと、TLRアゴニストとを含むワクチン用アジュバントとを備えるワクチンを投与する工程を含む免疫誘導方法。

〔17〕

前記ワクチンを投与する工程は、ワクチンを経皮投与、皮下投与、皮中投与、及び筋肉内投与からなる群より選択される方法で投与することによって行われる、〔16〕に記載の免疫誘導方法。

〔18〕

前記ワクチンを投与する工程後、一定期間経過後に、抗原を投与して追加免疫を行う工程をさらに含む、〔16〕又は〔17〕に記載の免疫誘導方法。

〔19〕

前記追加免疫を行う工程は、経口投与、経鼻投与、経粘膜投与、経膣投与、経眼投与、及び直腸内投与からなる群より選択される方法で抗原を投与することによって行われる、〔18〕に記載の免疫誘導方法。

〔20〕

前記追加免疫を行う工程は、アジュバントを使用せずに抗原を投与することによって行われる、〔18〕又は〔19〕に記載の免疫誘導方法。

〔21〕

少なくとも1つのウイルス、細菌又はアレルゲンに由来する抗原と、

Dectin-1リガンドと、TLRアゴニストとを含むワクチン用アジュバントと、
を備えるワクチンを投与する工程
を含む、ウイルス感染症、細菌感染症又はアレルギの予防方法。

発明の効果

[0013] 本発明によれば、アジュバントとして、Dectin-1リガンドとTLRアゴニストの組み合わせを使用するという簡単な方法で、所望の抗原に対して、Th1応答及び抗原特異的IgG抗体産生に代表される全身性免疫応答と、Th17応答及び抗原特異的IgA抗体産生に代表される粘膜免疫応答の双方を効果的に誘導することができるので、病原体の侵入と、病状の悪化の抑制の双方を実現することができる。

また、上記アジュバントを使用して免疫応答の誘導を行うと全身性免疫応答の誘導は長期間持続する一方、粘膜免疫応答の誘導は比較的短期間で消失するが、さらに、抗原のみを粘膜面に投与して追加免疫を行うことにより、粘膜免疫応答の誘導も長期間持続させることができる。追加免疫の際、抗原の投与ルートに適宜選択することにより、腸管や気道など所望の部位に粘膜免疫応答を誘導することも可能である。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]図1は、抗原（OVA）、CpG ODN、及びGM-CSFで刺激した脾臓由来樹状細胞をマウスに腹腔内投与した後、抗原を経口投与し、抗原特異的な血清total IgGと糞便中IgAを測定した結果を示す。

[図2]図2は、脾臓由来樹状細胞をグルカン類（ザイモザン又はカードラン）又は各種TLRアゴニストで刺激し、Raldh2の発現を測定した結果を示す。

[図3]図3は、抗原（OVA）と、アジュバント（CpG ODN及び／又はカードラン）とを含むIFAエマルジョンをマウスに筋注投与し、経時的に抗原特異的な血清total IgGと糞便中IgAを測定した結果を示す。

[図4]図4は、抗原（コレラトキシン）と、アジュバント（CpG ODN及びカードラン）を含むIFAエマルジョンをマウスに筋注投与し、3週間後に抗原特異的な血清total IgGと糞便中IgAを測定した結果を示す。

[図5]図5は、図4の実験の後、マウスにコレラトキシンを経口投与し、下痢の症状を確認した結果を示す。

[図6]図6は、抗原（OVA）と、アジュバント（CpG ODN及び／又はカードラン）とを含むIFAエマルジョンをマウスに筋注投与し、42日後に抗原で追加免疫

し、その日及び1週間後の抗原特異的な血清total IgGと糞便中IgAを測定した結果を示す。

[図7]図7は、抗原（OVA）と、アジュバント（CpG ODN及び／又はカードラン）とを含むIFAエマルジョンをマウスに筋注投与し、42日後に抗原で追加免疫した後、経時的に抗原特異的な血清total IgGと糞便中IgAを測定した結果を示す。最初の追加免疫の後、13週目に2度目の追加免疫を行った。

[図8]図8は、抗原（OVA）と、アジュバント（CpG ODN及び／又はカードラン）とを含むIFAエマルジョンをマウスに筋注投与し、42日後に追加免疫し、その7日後にマウスから脾臓と腸管粘膜固有層の細胞を摘出して抗原存在下で培養し、4日後にIFN- γ 、IL-4及びIL-17の産生を測定した結果を示す。

[図9]図9は、抗原（OVA）と、アジュバント（CpG ODN及び／又はカードラン）とを含むIFAエマルジョンをマウスに筋注投与し、35日後に抗原を経鼻投与して追加免疫を行い、その7日後に抗原特異的な血清total IgGと気管支肺胞洗浄液中IgAを測定した結果を示す。

[図10]図10は、抗原（OVA）と、アジュバント（CpG ODN及び／又はカードラン）とを含むIFAエマルジョンをマウスに筋注投与し、35日後に抗原を経鼻投与して追加免疫を行い、その7日後に、マウスから肺粘膜固有層細胞を摘出して抗原存在下で培養し、4日後にIFN- γ 及びIL-17産生をELISAで測定した。

[図11]図11は、抗原（OVA）と、アジュバント（CpG ODN及び／又はカードラン）とを含むIFAエマルジョンをマウスに筋注投与し、35日後にMedroxyprogesteroneを投与し、42日後に抗原を腔内投与して追加免疫を行い、その7日後に、腔洗浄液中の抗原特異的IgAを測定した結果を示す。

[図12]図12は、CpG ODNで刺激を加えて、又は加えずに、 β -1, 3-グルカンの受容体であるdectin-1の脾臓由来樹状細胞における発現を測定した結果を示す。

[図13]図13は、抗原（OVA）とアジュバント（R-848単独、又はR-848とカードラン）を含むIFAエマルジョンをマウスに筋注投与し、28日目に抗原を経口投与して追加免疫を行った後、経時的に抗原特異的な血清total IgGと糞便中

IgAを測定した結果を示す。最初の追加免疫から4週間後に2度目の追加免疫を行った。

[図14]図14は、抗原（OVA）と、アジュバント（CpG ODN及び／又はレンチナン）とを含むIFAエマルジョンをマウスに筋注投与し、経時的に抗原特異的な血清total IgGと糞便中IgAを測定した結果を示す。

[図15]図15は、抗原（OVA）と、アジュバント（CpG ODN及び／又はレンチナン）とを含むIFAエマルジョンをマウスに筋注投与し、42日後に抗原で追加免疫し、その日及び1週間後の抗原特異的な血清total IgGと糞便中IgAを測定した結果を示す。

[図16]図16は、抗原（OVA）と、アジュバント（CpG ODN及び／又はレンチナン）とを含むIFAエマルジョンをマウスに筋注投与し、42日後に追加免疫し、その7日後にマウスから脾臓と腸管粘膜固有層の細胞を摘出して抗原存在下で培養し、4日後にIFN- γ 、及びIL-17の産生を測定した結果を示す。

[図17]図17は、抗原（OVA）と、アジュバント（CpG ODN及びカードラン）を含むIFAエマルジョンをDectin-1欠損マウスに筋注投与し、21日後に抗原特異的な血清total IgGと糞便中IgAを測定した結果を示す。

[図18]図18は、抗原（OVA）と、アジュバント（CpG ODN及びレンチナン）とを含むIFAエマルジョンをDectin-1欠損マウスに筋注投与し、42日後に抗原で追加免疫し、その日及び1週間後の抗原特異的な血清total IgGと糞便中IgAを測定した結果を示す。

[図19]図19は、抗原（OVA）と、アジュバント（CpG ODN及びカードラン）とを含むIFAエマルジョンをDectin-1欠損マウスに筋注投与し、42日後に追加免疫し、その7日後にマウスから脾臓と腸管粘膜固有層の細胞を摘出して抗原存在下で培養し、4日後にIFN- γ 、及びIL-17の産生を測定した結果を示す。

発明を実施するための形態

[0015]（ワクチン用アジュバント）

本発明に係るワクチン用アジュバントは、Dectin-1リガンドと、TLRアゴニストを含む。

本明細書において用語「ワクチン」は、感染症の予防を目的として用いられる医薬品であり、失活又は弱毒化した抗原を含む。ワクチンは、ヒトなどの動物に投与されると、免疫応答を誘導し、以後、そのワクチンに含まれる抗原による感染症（アレルギー反応を含む）の罹患や重症化を防ぐことができる。以下に、本発明に係るワクチン用アジュバントが、本発明に係る作用効果を奏する理由等を、主として従来技術のワクチン（又はワクチン用アジュバント）の作用効果や動物の生理作用を介して説明する。

[0016] まず、経鼻、経口などの粘膜に投与するワクチンは、粘膜免疫応答と全身性免疫応答が誘導されるのに対して、従来の筋注で投与するワクチンでは、粘膜免疫応答は誘導されず、全身性免疫応答のみが誘導される。ここで、樹状細胞はあまねく組織に存在しており、体内に侵入した抗原を認識すると、近傍のリンパ節に移動して抗体産生を含めた抗原特異的応答を誘導し、全身に波及させる。ただし、粘膜組織やそれに付属するリンパ節の樹状細胞は、非粘膜組織の樹状細胞とは違って、IgA抗体産生を誘導する機能をも備えている。誘導されたIgA抗体産生細胞は、このような樹状細胞の影響によって、付属する粘膜組織への移行を促進され、局所的に強い防御を発揮する。この樹状細胞の特性の違いが、粘膜にワクチンを投与した際と筋注によりワクチンを投与した際とのそれぞれ効果の差に大きく影響していると推察される。そのため、従来のワクチンでは、筋注で投与しても、そこにIgAが誘導できる樹状細胞が存在しないため、粘膜免疫応答が誘導することはできず、粘膜面を介して免疫をしないと粘膜免疫応答が誘導されない。なお、一般には、呼吸器でIgAを誘導したい場合は気道粘膜で、消化器でIgAを誘導したい場合は消化管粘膜で、生殖器でIgAを誘導したい場合は生殖器粘膜を介して免疫を付ける必要がある。一方、本発明に係るワクチンアジュバントを用いれば、抗原を粘膜組織ではない筋肉内に投与しても、粘膜組織での抗原特異的なIgA抗体の誘導ができ、加えて抗原特異的なIgG抗体の誘導をも同時に行うことができる。

[0017] 次に、粘膜に投与することで、全身性免疫応答を誘導することの困難性を

説明する。一般に粘膜にワクチンを投与する場合と非粘膜組織にワクチンを投与する場合とを比較して、粘膜組織では免疫応答の誘導効率が低い。この要因の一つとしては、抗原を効率よく粘膜を透過させて内部の樹状細胞に到達させることが困難なことにある。さらにこの要因としては、粘膜の表面では上皮層が物理的障壁となっていること（例えば、上皮細胞同士が固く結合して隙間の小さい層を形成していること）、流動性のある粘液によって抗原が拡散してしまうこと、消化酵素によって抗原が分解されてしまうことなどが挙げられる。従来のワクチンにおいて経鼻免疫がよく行われるのは、他の粘膜に比べて比較的鼻粘膜が薄いからであるが、それでも免疫誘導効率は十分ではない。これを打開する手段の一つとして、例えば上皮層を破壊する細菌毒素がアジュバントとして用いられることもできるが、経鼻の場合で言えば神経を傷害して嗅覚障害（嗅球が近いため）や顔面麻痺を招く場合がある。また他の要因の一つとしては、粘膜組織では抗原に対して免疫不応答（免疫寛容）になる機構が発達している点がある。鼻腔や腸管などの粘膜は、常日頃から多種多様の外来抗原に曝されており、通常はそれらに対して負の応答を維持する。特に、消化管は経口免疫寛容というシステムを有しており、食べ物に対して免疫を強力に抑制する機構を有している。このため、経口ワクチンは免疫を活性化するのではなく、逆に抑制してしまう。一方、病原体が侵入した際に防御応答が誘導されるのは、病原体の体成分が自然免疫受容体を活性化して炎症を誘導し、負の応答を解除するためである。そのため、免疫応答の誘導効率を上げるために、自然免疫受容体を活性化する従来のアジュバントの併用が試みられるが、上記透過率の問題もあり、体内に抗原を直接打ち込む筋注免疫に比べると効果が十分ではない。

[0018] また、本発明に係るワクチン用アジュバントを筋注投与する場合において、上述のような障害を克服するための工夫を述べる。従来においても樹状細胞を活性化して免疫応答の誘導効率を上げることが目的でアジュバントが併用されることがあるが、それは感染した病原体を駆除するために有効なTh1応答を増強することを主たる目的としている。上述のように、非粘膜組織の樹

状細胞はIgA誘導機能がないというのが通常であり、そのような樹状細胞にIgA誘導機能を付加する目的でアジュバントを併用するという着想は知られていない。この着想に加えて、本発明において注目すべきは、筋注免疫に加えて行う粘膜面への抗原投与である。樹状細胞を粘膜型に変換するDectin-1リガンドと、樹状細胞を活性化するTLRアゴニストとを併用することにより、強い抗原特異的Th1応答を含む全身免疫応答と、それに加えて抗原特異的IgA産生メモリー細胞、抗原特異的Th17細胞を誘導し、全身の粘膜に移行させることができる。また、より高い抗原特異的IgA抗体価を得るために、その後少なくとも抗原をIgA誘導を望む粘膜面に負荷することで、より大量の抗原特異的IgAを誘導することができる。従来において、何も免疫をしていない粘膜に抗原だけを負荷しても、免疫は付きにくく、逆に免疫寛容が誘導される。しかし、筋注免疫によってIgAのメモリー細胞が全身に所定量誘導されているので、その後の追加免疫により爆発的に増えてIgAを産生する。一方、従来のTLRアゴニスト単独使用など、全身免疫系を活性化するアジュバントを用いてもIgGやTh1応答は誘導されるが、本発明のようにDectin-1リガンドを併用しないとIgAのメモリー細胞は作られない。

[0019] このように本発明に係るワクチン用アジュバントや免疫誘導法は、粘膜に存在する樹状細胞の特性や、メモリーIgAが存在していると、抗原負荷によって速やかにIgA産生細胞が増殖し、大量のIgAを誘導するという粘膜免疫応答の詳細を熟知した上で練られた画期的なものであり、従来の筋注免疫や粘膜免疫の利点を全て獲得することができる。

[0020] 本明細書において用語「アジュバント」は、抗原と一緒に投与することにより、その抗原性を高めて免疫応答を誘導しやすくする物質を意味する。本発明においては、アジュバントとして、以下に詳述するDectin-1リガンド及びTLRアゴニストとを用いる。ワクチン用アジュバントとしては、Dectin-1リガンド及びTLRアゴニストを含む組成物であってもよいが、アジュバントの保存安定性の観点から、Dectin-1リガンドとTLRアゴニストとが別体であってもよい。

- [0021] 本明細書において用語「Dectin-1」は、樹状細胞における受容体であり、 β -1,3-グルカンに代表されるグルカン骨格を有する物質に特異的な受容体である。また、「Raldh2遺伝子」は、その翻訳産物が、レチナールからのレチノイン酸合成を触媒する酵素として知られる。本明細書において、「Raldh2遺伝子」はいずれの生物における遺伝子であってもよいが、ヒトにおいてはALDH1A2として知られている。ヒトRaldh2 mRNAはGenbankアクセッション番号：NM_001206897で示され、ヒトRaldh2タンパク質はGenbankアクセッション番号：NP_001193826で示され、マウスRaldh2 mRNAはGenbankアクセッション番号：NM_009022で示され、マウスRaldh2タンパク質はGenbankアクセッション番号：NP_033048で示される。
- [0022] 本明細書において用語「Dectin-1リガンド」は、Dectin-1に特異的に結合する物質を意味し、Dectin-1に結合するアゴニストも包含する。また、Dectin-1リガンドは、Raldh2の発現誘導を介して本発明の作用を奏していることが推察されるため、Raldh2の発現誘導剤であることが好ましい。
- [0023] 本明細書において用語「Raldh2の発現誘導剤」は、投与することによって少なくとも樹状細胞におけるRaldh2の発現を有意に上昇させる物質、又は当該物質を含む組成物を意味する。本明細書において用語「発現」は、特に断りがない限り、DNAの配列に基づいてmRNAが合成される転写と、mRNAの配列に基づいてタンパク質が合成される翻訳の双方の概念を含むものとして用いられる。
- [0024] Raldh2の発現誘導剤は、樹状細胞におけるRaldh2の発現（転写又は翻訳）を有意に上昇させる限り特に限定されないが、例えば、顆粒球単球コロニー刺激因子（GM-CSF）又はグルカン類とすることができる。
- [0025] 本明細書において用語「グルカン類」は、一般にグルカン類と呼ばれるグルカン骨格を有する物質であって、本発明の効果を得られる物質である限り特に限定されないが、例えば、 β -1,3-グルカンが挙げられる。 β -1,3-グルカンは、その主鎖がグルコースを β -1,3結合で連結した構造であればよく、側鎖にグルコースを β 1-6結合等で連結した構造を有していてもよい。具体的

に、 β -1,3-グルカンとしては、例えば、カードラン、カルボキシメチル化カードラン、シゾフィラン、ザイモザン、及びレンチナンが挙げられる。グルカン類の中でも、 β -1,3-グルカンが、Dectin-1リガンドとしてより確実に作用する観点から好ましい。

[0026] 本明細書において用語「TLRアゴニスト」は、TLRに結合すると、TLRに天然のリガンドが結合したときと同様の刺激を与える分子をいう。TLRアゴニストには、天然のリガンドも含まれる。本明細書において、TLRアゴニストは、いずれのTLRに対するアゴニストであってもよい。TLRアゴニストは、公知のものや市販のものを使用することができる。

TLRアゴニストとしては、例えば、TLR1~9アゴニストが挙げられる。これらのTLRアゴニストは、例えばヒトとマウスとで、TLR1~9が相同性を有していることから、共通した作用を示す。

[0027] TLR1アゴニストとしては、各種トリアシルリポペプチド、その機能的フラグメント又はアナログ、Pam3Cys-Ser-(Lys)4等が挙げられる。

TLR2アゴニストとしては、各種リポペプチド、ペプチドグリカン、熱ショックタンパク質、それらの機能的フラグメント又はアナログ、Pam3Cys-Ser-(Lys)4、MALP-2、FSL-1、Hib-OMPC等が挙げられる。

TLR3アゴニストとしては、二本鎖RNA、ポリイノシンポリシチジン酸 (Poly(I:C)) 等の二本鎖RNAアナログが挙げられる。

TLR4アゴニストとしては、各種リポ多糖、熱ショックタンパク質、フィブリノーゲン、ヘパリン硫酸、ヒアルロン酸、及びこれらの機能的フラグメント又はアナログ、アミノアルキルグルコサミニドホスフェート (AGP)、モノホスホリルリピドA (MPLA)、RC-529等が挙げられる。

TLR5は小腸粘膜固有層のCD11c陽性細胞に特異的に発現し、病原細菌のフラジェリンを認識して免疫応答を誘導することが知られている。TLR5アゴニストとしては、例えばリコンビナントフラジェリン、CBLB502等が挙げられる。

TLR6アゴニストとしては、各種ジアシルリポペプチド、その機能的フラグメント又はアナログ、FSL-1、Pam2Cys等が挙げられる。

TLR7は、ウイルス由来の一本鎖RNAを認識し、自然免疫系を活性化する。TLR7アゴニストとしては、例えば、Imiquimod、その誘導体であるR-848、Loxoribine、Bropiramine、Gardiquimodが挙げられる。Imiquimod、Loxoribine、Gardiquimod、及びR-848はヒトTLR8アゴニストとしても知られる。

TLR9は、生体内では、細菌やウイルス由来のCpGオリゴデオキシヌクレオチド (CpG ODN) を認識し、自然免疫系を活性化する。CpG ODNとは、CpGモチーフが含まれた短い合成オリゴデオキシヌクレオチドをいう。本発明に係るワクチン用アジュバントに用いられるTLR9アゴニストとしても、CpG ODNを用いることができるが、これに限定されない。TLR9アゴニストとなるCpG ODNは、当業者が適宜設計することができ、市販のものを用いることもできる。本発明に用いる場合、CpG ODNはその塩であってもよく、例えばナトリウム塩とすることができる。CpG ODNは、非メチル化CpG ODNとしてもよい。例えば、CpG-ODN 1668、2006、1826、2395等が挙げられる。

[0028] TLRアゴニストの中でも、本発明の作用効果を確実に奏する観点から、細胞内で類似した応答を示すことのできるTLR2アゴニスト、TLR4アゴニスト、TLR5アゴニスト、TLR7アゴニスト、及びTLR9アゴニストが好ましく、TLR7アゴニスト、及びTLR9アゴニストがより好ましい。TLR7アゴニストは、TLR8アゴニストであってもよい。

[0029] 本発明に係るワクチン用アジュバントの一態様は、Dectin-1リガンドとTLRアゴニストに加えて、不完全フロイントアジュバントを含む。「フロイントアジュバント」とは、油中水型エマルジョンを形成させるアジュバントであり、結核菌の加熱死菌を含む完全フロイントアジュバントに対して、結核菌の加熱死菌を含まないものを不完全フロイントアジュバントと呼ぶ。

[0030] 本発明に係るワクチン用アジュバントには、本発明の効果が得られる限り、Dectin-1リガンドとTLRアゴニスト以外の追加のアジュバント物質を含んでもよい。かかるアジュバント物質の非限定的な例として、水酸化アルミニウム、水酸化ナトリウム、リン酸アルミニウム、リン酸カルシウム、ミョウバン、カルボキシビニルポリマー等の沈降性アジュバント、フロイント

完全アジュバント、流動パラフィン、ラノリン、モンタナイドISA763AV、モンタナイドISA51等が挙げられる。

[0031] 本発明に係るワクチン用アジュバントは、少なくとも1つの抗原と共に投与するためのアジュバントであることが、本発明の作用をより確実に奏するために好ましい。ここで用いる抗原は、下記でワクチンに用いる抗原と同様である。

[0032] (ワクチン)

本発明に係るワクチンは、本発明に係るワクチン用アジュバントに加えて、少なくとも1つの抗原を備える。ワクチンは、上記ワクチン用アジュバントと、上記抗原とを含むワクチン組成物であってもよいが、ワクチンの保存安定性の観点から、上記ワクチン用アジュバントと上記抗原とが別体であってもよい。

[0033] 本明細書において用語「抗原」は、外部から生体内に侵入する異物又はその一部であって、生体内で免疫反応を引き起こす物質の総称をいう。抗原には、各種感染症を引き起こす細菌やウイルスなどの外来病原体のほか、花粉や食物などのうちアレルギー反応を生じさせるアレルゲンも含まれる。

[0034] ウイルス抗原の非限定的な例として、インフルエンザウイルス、ノロウイルス、ロタウイルス、ヒトパピローマウイルス、水痘ウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、ポリオウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ヒトコロナウイルス、風疹ウイルス、HIV、天然痘ウイルス、エボラウイルス、肝炎ウイルス、日本脳炎ウイルス、パルボウイルス、牛痘ウイルス、からなる群より選択される少なくとも1つのウイルス、又はその一部、又はその成分を、不活化若しくは弱毒化したものが挙げられる。

細菌抗原の非限定的な例として、インフルエンザ菌、肺炎球菌、百日咳菌、破傷風菌、ジフテリア菌、結核菌、腸管出血性大腸菌等の大腸菌、コレラ菌、サルモネラ菌、及びメチシリン耐性黄色ブドウ球菌からなる群より選択される少なくとも1つの細菌、又はその一部、又はその成分を、不活化若しくは弱毒化したものが挙げられる。

アレルゲンの非限定的な例として、花粉（スギ花粉、イネ科花粉、キク科花粉等）、真菌、昆虫、食物（大豆、卵、牛乳等）、及び薬剤（ペニシリン等）が挙げられる。

[0035] 本発明に係るワクチンは、抗原特異的IgG抗体産生及びTh1応答に代表される全身性免疫応答に加えて、抗原特異的IgA抗体産生及びTh17応答に代表される粘膜免疫応答を誘導する。粘膜免疫応答が誘導されたか否かは、公知のin vitro又はin vivoの方法によって確認することができる。例えば、in vivoの場合、血清中や糞便中の抗原特異的IgA抗体量をELISA法等で測定し、当該抗体量が増大していれば粘膜免疫応答が誘導されたと判断することができる。また、in vitroの場合、例えばパイエル板細胞等のIgA抗体産生細胞を培養し、培養上清に含まれる抗原特異的IgA抗体量をELISA法等で測定し、当該抗体量が増大していれば粘膜免疫応答が誘導されたと判断することができる。

[0036] 全身性免疫応答が誘導されたか否かも、公知のin vitro又はin vivoの方法によって確認することができる。例えば、in vivoの場合、血清中の抗原特異的IgG抗体量をELISA法等で測定し、当該抗体量が増大していれば全身性免疫応答が誘導されたと判断することができる。

[0037] 本発明に係るワクチンは、全身性免疫応答及び粘膜免疫応答を誘導できる限り、どのような方法で投与してもよく、例えば、経皮投与、皮下投与、皮中投与、及び筋肉内投与からなる群より選択される方法で投与することができる。ワクチンを経皮投与、皮下投与、皮中投与、及び筋肉内投与からなる群より選択される方法で投与することにより、全身性のTh1応答及びIgG抗体産生がより効率的に誘導される。中では、筋肉内投与にワクチンを投与することが好ましい。なお、本明細書において、筋肉内投与は、筋肉内注射、筋注、筋中投与、及び筋注免疫といった用語を包含する概念である。

[0038] 後述する実施例に示されるとおり、本発明に係るワクチンを投与すると、抗原特異的IgG抗体産生は長期間（少なくとも10週間）持続し、抗原特異的IgA抗体産生は投与後2～3週間でピークとなる程度に持続する。また、本発明者らは、ワクチン投与から一定期間経過後に抗原だけを粘膜面に投与する追加

免疫を行うことにより、非常に高力価の抗原特異的IgA抗体産生をさらに3ヶ月程度維持できること、また、各種粘膜面に少なくとも抗原を投与する追加免疫を繰り返すことにより、抗原特異的IgA抗体産生を繰り返し回復させ、維持できることを見出した。また、追加免疫における抗原の投与により粘膜面において強い抗原特異的Th17応答も誘導できることを見出した。

[0039] 本発明においては、樹状細胞におけるDectin-1リガンドとTLRアゴニストとの組み合わせをアジュバントとして用いることで、全身性のTh1応答及びIgG抗体産生並びに粘膜のTh17応答及びIgA抗体産生が誘導されると共に、追加免疫を行う際に投与ルートを選択することにより腸管や気道など所望の粘膜でTh17応答とIgA抗体産生が再誘導することができ、病原体の侵入と病状の悪化の双方を効果的に防ぐことができる。

[0040] 本明細書において「抗原を投与する追加免疫」は、IgA抗体産生を回復・維持できる限り、どのような方法で抗原を投与してもよく、例えば、経口投与、経鼻投与、経粘膜投与、経膣投与、経眼投与、又は直腸内投与等、粘膜に直接適用される投与方法が挙げられる。粘膜に直接適用される投与方法で投与することにより、腸管や気道など所望の粘膜でTh17応答とIgA抗体産生がより効率的に誘導され、また、経口投与で投与することにより、より簡易に対象に投与することができる。

抗原を投与する追加免疫では、アジュバントを使用せずに抗原を投与してもよく、抗原をアジュバントと共に投与してもよい。

[0041] 例えば、後述する実施例に示されるとおり、追加免疫を経鼻投与で行うことにより肺における抗原特異的IgA産生を誘導することができ、経口投与で行うことにより消化管における抗原特異的IgA産生を誘導することが確認されている。その他、子宮頸がんを引き起こすヒトパピローマウイルスに対するワクチンであれば、経膣投与を行って感染を防ぐことが考えられる。

[0042] ワクチン投与から、抗原のみを投与する追加免疫までの期間は特に限定されず、例えば、3週間、2〜3ヶ月、1年、又は数年等とすることができる。一度ワクチンを投与すれば、その後、粘膜免疫応答を誘導したいときに追加免

疫を行えばよい。

例えば、抗原としてインフルエンザウイルスを用いる場合、予め数種の抗原を含むワクチンを投与しておき、毎年インフルエンザが流行する季節に先立って、その年に流行すると予想される抗原で追加免疫を行えば、粘膜免疫によってインフルエンザウイルスの感染自体を抑制することが可能となる。

[0043] (免疫誘導方法)

本発明は、本発明に係るワクチンを投与する工程を含む免疫誘導方法も包含する。また、上記ワクチンを投与する工程後、一定期間経過後に、抗原を投与して追加免疫を少なくとも1回行う工程をさらに含む免疫誘導方法も包含する。

[0044] (予防方法)

本発明は、少なくとも1つのウイルス又は細菌に由来する抗原と、Dectin-1リガンドと、TLRアゴニストとを含むワクチン用アジュバントと、を備えるワクチンを投与する工程を含む、ウイルス感染症又は細菌感染症の予防方法も包含する。また、上記ワクチンを投与する工程後、一定期間経過後に、抗原を投与して追加免疫を行う工程をさらに含むウイルス又は細菌の感染症の予防方法も包含する。

「予防方法」とは、抗原により引き起こされる感染症又はアレルギー反応を、発現する前に予防する方法を意味する。

[0045] (治療方法)

本明細書において用語「ワクチン」は、感染症の予防を目的として用いられる医薬品であり、失活又は弱毒化した抗原を含む。ワクチンは、ヒトなどの動物に投与されると、免疫応答を誘導し、以後、そのワクチンに含まれる抗原による感染症の罹患や重症化を防ぐことができる。

[0046] 本発明は、ウイルス又は細菌の感染症に感染している対象に、Dectin-1リガンドと、TLRアゴニストとを含む免疫誘導薬を投与する工程を含む、ウイルス感染症又は細菌感染症の治療方法も包含する。また、上記免疫誘導薬を投与する工程後、一定期間経過後に、抗原を投与して追加免疫を

行う工程をさらに含むウイルス感染症又は細菌感染症の治療方法も包含する。

「治療方法」とは、抗原により引き起こされる感染症又はアレルギー反応を、発現した後に治療する方法を意味する。

[0047] 上述した免疫誘導方法、予防方法及び治療方法において、ワクチンを投与する工程は、全身性免疫応答及び粘膜免疫応答を誘導できる限り、どのような方法で投与してもよく、例えば、ワクチンを経皮投与、皮下投与、皮中投与、及び筋肉内投与からなる群より選択される方法で投与することができる。ワクチンを経皮投与、皮下投与、皮中投与、及び筋肉内投与からなる群より選択される方法で投与することにより、ワクチンを経皮投与、皮下投与、皮中投与、及び筋肉内投与からなる群より選択される方法で投与することにより、全身性のTh1応答及びIgG抗体産生がより効率的に誘導される。中では、筋肉内投与にワクチンを投与することが好ましい。

[0048] 上述した免疫誘導方法、予防方法及び治療方法において、「一定期間経過後」とは、最初のワクチンの投与によるIgA抗体産生誘導が消失した以降、どの時期であってもよい。例えば、ワクチンの投与後、3週間、2～3ヶ月、1年、又は数年等とすることができ、粘膜免疫応答を誘導したいときに追加免疫を行えばよい。

[0049] 上述した免疫誘導方法、予防方法及び治療方法において、抗原を投与して追加免疫を少なくとも1回行う工程は、IgA抗体産生を回復・維持できる限り、どのような方法で抗原を投与してもよく、例えば、経口投与、経鼻投与、経粘膜投与、経膣投与、経眼投与、又は直腸内投与等、粘膜に直接適用される投与方法が挙げられる。粘膜に直接適用される投与方法で投与することにより、腸管や気道など所望の粘膜でTh17応答とIgA抗体産生がより効率的に誘導され、また、経口投与で投与することにより、より簡易に対象に投与することができる。

抗原を投与して追加免疫を少なくとも1回行う工程では、抗原を投与してもよく、抗原をアジュバントと共に投与してもよい。

[0050] 本明細書において引用されるすべての特許文献及び非特許文献の開示は、全体として本明細書に参照により組み込まれる。

実施例

[0051] 以下、本発明を実施例に基づいて具体的に説明するが、本発明は何らこれに限定されるものではない。当業者は、本発明の意義を逸脱することなく様々な態様に本発明を変更することができ、かかる変更も本発明の範囲に含まれる。

[0052] 1. GM-CSFで刺激した脾臓由来古典的樹状細胞（「脾臓cDC」）によるIgA誘導

脾臓cDCを、抗原としてオボアルブミン（OVA; 100 $\mu\text{g/ml}$ ）と、アジュバントとしてCpG ODN 1668（1 $\mu\text{g/ml}$ ）単独、又はCpG ODNとGM-CSF（10 ng/ml ）の組み合わせとを用いて、24時間刺激した。

ここで、マウス小腸粘膜固有層細胞を、樹状細胞マーカーのCD11cとマクロファージマーカーのCD11bで分画すると、R1（樹状細胞）（CD11chighCD11blow）、R2（樹状細胞）（CD11chighCD11bhigh）、R3（マクロファージ）（CD11cintCD11bint）、R4（好酸球）（CD11cintCD11bhigh）の4群に分かれる。このR2樹状細胞が特異的にRaldh2を発現し、Th17応答及びIgA産生を誘導する（非特許文献1）。そこで、陽性コントロールとして、R2樹状細胞をOVA（100 $\mu\text{g/ml}$ ）及びCpG ODN 1668（1 $\mu\text{g/ml}$ ）で刺激した。脾臓cDCを、OVA（100 $\mu\text{g/ml}$ ）及びCpG ODN 1668（1 $\mu\text{g/ml}$ ）さらにGM-CSF（10 ng/ml ）ありなしで刺激した。

刺激後0日目と14日目に、抗原を取り込んだ樹状細胞（それぞれ 5×10^4 個）（またはPBS）を、CD57BL/6マウスの腹腔内に注射投与した。21日目から25日目に経口でOVAを1 mg/mouse で毎日投与し、32日目に抗原特異的な血清total IgGと、糞便中IgAをELISAで測定した。

[0053] 実験の概要と結果を図1に示す。脾臓cDC（図中SPDC）をOVAとCpG ODNのみで刺激してもIgA産生の誘導はわずかであったが、Raldh2の発現を誘導することが知られているGM-CSFを加えると（図中SPDC+GM-CSF）、R2樹状細胞（図中

LPDC) 以上にIgA産生が誘導された。

[0054] 2. グルカン類による脾臓cDCにおけるRaldh2の発現誘導

次に、グルカン類としてザイモザン (Zymosan : *Saccharomyces cerevisiae* 由来の酵母細胞壁由来の成分; 25 ng/ml) 及びカードラン (Curdlan : *Agrobacterium* spp., *Alcaligenes* spp. 由来の β -1,3-グルカン; 25 ng/ml) を用い、これらの物質で脾臓cDCを24時間刺激し、RNAを回収後、Raldh2のmRNAの発現をRT-PCRで測定した。

[0055] 実験の概要と結果を図2に示す。カードラン及びザイモザンは、GM-CSFと同様に、脾臓cDCにおけるRaldh2の発現を誘導した。

[0056] 3. CpG ODN+カードランの免疫(筋注)による消化管特異的なIgA誘導

不完全フロイントアジュバント (IFA) に、抗原としてOVA (500 μ g/ml)、アジュバントとしてCpG ODN 1668 (5 μ g/ml) 及び／又はカードラン (5 mg/ml) を加えたIFAエマルジョンを、200 μ l/mouseで筋注により投与した。その後、経時的 (一週間に一回) に血清と糞便を採取し、抗原(OVA)特異的な血清total IgGと糞便中IgAをELISAで測定した。

[0057] 実験の概要と結果を図3に示す。OVAを含まないコントロール以外、いずれのアジュバントを用いても抗原特異的IgGは誘導され、その状態が少なくとも7週間持続した。一方、IgAは、CpG ODNとカードランの双方を含む場合にのみ誘導された。

[0058] 4. CpG ODN+カードランの免疫(筋注)によるコレラトキシン (CT) 特異的なIgAの誘導

次に、3. と同様の実験を、抗原としてCT (1 μ g/mouse) を用いて行った。筋注による免疫後、3週間経過時に、抗原特異的な血清total IgGと糞便中IgAをELISAで測定した。

[0059] 実験の概要と結果を図4に示す。図中左に示されるとおり、IgGは、IFAとCTのみの場合と、CpG ODN及びカードランも加えた場合で、いずれでも同等に誘導された。一方、IgAは、IFAとCTのみの場合に比較して、CpG ODN及びカードランを加えた場合に、著しく高く誘導された。

[0060] 5. CpG ODN+カードランの免疫（筋注）によるCTに生じた下痢の改善

4. の実験の後、マウスに20 μ gのCTを経口投与し、下痢の症状を検討した。実験の概要と結果を図5に示す。正常な腸管では、固形の便が見られ、盲腸も小さい。一方、IFAのみ、又はIFAとCTのみ投与した場合には、便が水状となり、盲腸が肥大しているのが観察された。これに対し、IFA、CT、CpG ODN及びカードランを投与したマウスでは、固形の便が見られ、盲腸の肥大も見られなかった。

[0061] 6. CpG ODN+カードランの免疫（筋注）後の、抗原のみによる追加免疫の効果（1）

IFAにOVAと、CpG ODN及び／又はカードランを加えて、又はいずれも加えずに、筋注によりマウスを免疫した後、42日目にOVAを1 mg/mouseで単回経口投与して追加免疫を行い、経口投与した日、及びその1週間後に、抗原特異的な糞便中IgAをELISAで、抗原特異的なIgA産生細胞をELISpotで測定した。

[0062] 実験の概要と結果を図6に示す。いずれの場合もIgG産生が誘導され、その効果は追加免疫の前後にわたって維持された。一方、IgAは、OVAを経口投与した日にはほとんど検出されなかったが、追加免疫から1週間後には、アジュバントにCpG ODNとカードランの双方を含む場合、他のアジュバントを使用した場合に比較して抗原特異的IgA産生が著しく高く誘導された。抗原特異的IgA産生細胞も、CpG ODNとカードランの双方を含む場合に、他のアジュバントを使用した場合に比較して、著しく増加した。

[0063] 7. CpG ODN+カードランの免疫（筋注）後の、抗原のみによる追加免疫の効果（2）

6. と同様の実験を行った後、さらに長期間にわたって、抗原特異的な血清total IgGと糞便中IgAを経時的に測定した。実験の概要と結果を図7に示す。抗原特異的IgG量は追加免疫からその後13週間ほとんど低下せず、13週目に2度目の追加免疫を行うことによりわずかに上昇して当初の値まで回復した。一方、糞便中の抗原特異的IgA量は、徐々に低下して13週目にほとんどゼロとなったが、13週目にOVAを1 mg/mouseで単回経口投与して2度目の追加免疫

を行うことにより著しく回復した。

[0064] 8. CpG ODN+カードランの免疫（筋注）後の、抗原のみによる追加免疫の効果（3）

6. と同様の実験を行い、OVA経口投与による追加免疫後、7日目に、マウスから脾臓と腸管粘膜固有層の細胞を摘出して抗原存在下（OVA 100 $\mu\text{g/ml}$ ）で培養し、4日後にIFN- γ 、IL-4及びIL-17の産生をELISAで測定した。

[0065] 実験の概要と結果を図8に示す。図示される通り、腸管粘膜固有層細胞では、アジュバントにカードラン及びCpG ODNを含む場合に、IFN- γ 産生とIL-17産生が誘導され、OVAの経口投与による追加免疫で、消化管にTh1応答及びTh17応答が誘導されることが確認された。一方、IL-4は誘導されず、Th2応答は誘導されていないものと考えられた。

[0066] 9. CpG ODN+カードランの免疫（筋注）後の、抗原のみによる追加免疫の効果（4）

IFA、IFA+OVA+CpG ODN、IFA+OVA+カードラン、IFA+OVA+CpG ODN+カードランのそれぞれをマウスに筋注投与し、35日後にOVAを1 $\mu\text{g/mouse}$ で経鼻投与して追加免疫を行い、7日後に、抗原特異的な血清total IgGと気管支肺胞洗浄液中IgAをELISAで測定した。

[0067] 実験の概要と結果を図9に示す。アジュバントにCpGとカードランの双方を含む場合、OVAの経鼻投与による追加免疫で、肺における抗原特異的IgA産生を誘導できることが確認された。

[0068] 10. CpG ODN+カードランの免疫（筋注）後の、抗原のみによる追加免疫の効果（5）

9. の実験において、OVAの経鼻投与から7日後に、マウスから肺粘膜固有層細胞を摘出し、抗原存在下（OVA 100 $\mu\text{g/ml}$ ）で培養して、4日後にIFN- γ 、IL-4、及びIL-17産生をELISAで測定した。

[0069] 実験の概要と結果を図10に示す。CpG ODNとカードランの少なくとも一方をアジュバントに含めば、IFN- γ 産生が誘導され、肺においてTh1応答が誘導されることが確認された。一方、IL-17産生は、CpG ODNとカードランの双方

をアジュバントに含む場合に、著しく高く誘導され、このアジュバントを使用するとTh17応答が強く誘導されることが確認された。一方、IL-4は誘導されず、Th2応答は誘導されていないものと考えられた（図示せず）。

[0070] 1 1. CpG ODN+カードランの免疫（筋注）後の、抗原のみによる追加免疫の効果（6）

IFAに、OVAのみ、OVAとCpG ODN、OVAとカードラン、又は、OVAとCpG ODNとカードランを加え、それぞれマウスに筋注投与し（0日目）、35日目にMedroxyprogesteroneをマウス1匹あたり2 mg皮下投与し、42日目にOVAをマウス1匹あたり100 μ g膺内投与して、その1週間後に抗原特異的な膺洗浄液中IgAをELISAで測定した。

[0071] 実験の結果を図 1 1 に示す。アジュバントにCpGとカードランの双方を含む場合、OVAの膺内投与による追加免疫で、膺における抗原特異的IgA産生を誘導できることが確認された。

[0072] 1 2. CpG ODN刺激による脾臓cDCにおけるDectin-1の発現の増強

次に、 β -1, 3-グルカンを認識する受容体であるDectin-1の樹状細胞における発現を測定した。実験の概要と結果を図 1 2 に示す。図中左に示されるとおり、脾臓由来樹状細胞では、Dectin-1の発現は多くないが、CpG ODNで刺激することによりDectin-1の発現が3倍以上上昇することが確認された。Dectin-1はTh17応答を誘導することが知られる。これらのことは、CpG ODNと β -1, 3-グルカンの双方をアジュバントに加えることにより、樹状細胞が β -1, 3-グルカンによる刺激を受けやすくなり、Th17応答が誘導されるという本発明のメカニズムを示す。

[0073] 1 3. R-848+カードランによる免疫（筋注）と、抗原による追加免疫の効果

IFA、IFA+OVA+R-848（100 μ g/mouse）、又はIFA+OVA+R-848+カードランをマウスに筋注して免疫し、28日後にOVAを1 mg/mouseで単回経口投与して追加免疫し、経時的に、抗原特異的な血清total IgGと糞便中IgAをELISAで測定した。R-848は、TLR7/8アゴニストである。

[0074] 実験の概要と結果を図 1 3 に示す。いずれの場合も抗原特異的なIgG産生が

誘導され、その効果は5週間目まで持続した。一方、IgA産生は、筋注から3週間目にピークを迎えてその後低下したが、4週間目の追加免疫によって、最初のピークよりもかなり高くIgA産生が誘導された。

[0075] 1 4. CpG ODN+レンチナンの免疫（筋注）による消化管特異的なIgA誘導

IFAに、抗原としてOVA（500 μ g/ml）、アジュバントとしてCpG ODN 1668（5 μ g/ml）及び／又はレンチナン（5 mg /ml）を加えたIFAエマルジョンを、200 μ l/mouseで筋注により投与した。その後、経時的に血清と糞便を採取し、抗原特異的な血清total IgGと糞便中IgAをELISAで測定した。

[0076] 実験の概要と結果を図14に示す。OVAを含まないコントロール以外、いずれのアジュバントを用いても抗原特異的IgGは誘導され、その状態が少なくとも5週間持続した。一方、IgAは、CpG ODNとレンチナンの双方を含む場合しか誘導されず、また、この誘導は3週間目にピークを迎えた後、急激に消失した。

[0077] 1 5. CpG ODN+レンチナンの免疫（筋注）後の、抗原のみによる追加免疫の効果（1）

IFAにOVAと、CpG ODN及び／又はレンチナンを加えて、又はいずれも加えずに、筋注によりマウスを免疫した後、42日目にOVAを1 mg/mouseで単回経口投与して追加免疫を行い、経口投与した日、及びその1週間後に、抗原特異的な糞便中IgAをELISAで、抗原特異的なIgA産生細胞をELISpotで測定した。

[0078] 実験の概要と結果を図15に示す。いずれの場合もIgG産生が誘導され、その効果は追加免疫の前後にわたって維持された。一方、IgAは、OVAを経口投与した日にはほとんど検出されなかったが、追加免疫から1週間後には、アジュバントにCpG ODNとレンチナンの双方を含む場合、他のアジュバントを使用した場合に比較して抗原特異的IgA産生が著しく高く誘導された。抗原特異的IgA産生細胞も、CpG ODNとレンチナンの双方を含む場合に、他のアジュバントを使用した場合に比較して、著しく増加した。

[0079] 1 6. CpG ODN+レンチナンの免疫（筋注）後の、抗原のみによる追加免疫の効果（2）

15. と同様の実験を行い、OVA経口投与による追加免疫後、7日目に、マウスから脾臓と腸管粘膜固有層の細胞を摘出して抗原存在下 (OVA 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で培養し、4日後にIFN- γ 、IL-4及びIL-17の産生をELISAで測定した。

[0080] 実験の概要と結果を図16に示す。図示される通り、腸管粘膜固有層細胞では、アジュバントにレンチナン及びCpG ODNを含む場合にのみ、IFN- γ 産生とIL-17産生が誘導され、OVAの経口投与による追加免疫で、消化管にTh1応答及びTh17応答が誘導されることが確認された。いずれの組織においても、IL-4は誘導されず、Th2応答は誘導されていないものと考えられた。

[0081] 17. Dectin-1欠損マウスにおけるCpG ODN+カードランの免疫（筋注）による消化管特異的なIgA誘導

IFAに、抗原としてOVA (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、アジュバントとしてCpG ODN 1668 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 及びカードラン (5 mg/ml) を加えたIFAエマルジョンを、200 $\mu\text{l}/\text{mouse}$ でDectin-1ヘテロ欠損マウス (Clec7a $^{+/-}$) とDectin-1ホモ欠損マウス (Clec7a $^{-/-}$) に筋注により投与した。その3週後に血清と糞便を採取し、抗原特異的な血清total IgGと糞便中IgAをELISAで測定した。

[0082] 実験の概要と結果を図17に示す。Dectin-1ヘテロ欠損マウスとDectin-1ホモ欠損マウスのいずれにおいても抗原特異的IgGは誘導されていたが、一方でIgAはDectin-1ヘテロ欠損マウスでは検出されるものの、Dectin-1ホモ欠損マウスでは検出されなかった。

[0083] 18. Dectin-1欠損マウスにおけるCpG ODN+カードランの免疫（筋注）後の、抗原のみによる追加免疫の効果（1）

IFAにOVAと、CpG ODN及びカードランを加えて、筋注によりDectin-1ヘテロ欠損マウスとDectin-1ホモ欠損マウスを免疫した後、42日目にOVAを1 mg/mouse で単回経口投与して追加免疫を行い、経口投与した日、及びその1週間後に、抗原特異的な糞便中IgAをELISAで測定した。

[0084] 実験の概要と結果を図18に示す。いずれのマウスにおいてもIgG産生が誘導され、その効果は追加免疫の前後にわたって維持された。一方、IgAは、いずれのマウスにおいてもOVAを経口投与した日にはほとんど検出されなかった

が、追加免疫から1週間後には、Dectin-1ヘテロ欠損マウスにおいて抗原特異的IgA産生が著しく高く誘導されたのに対して、Dectin-1ホモ欠損マウスではIgA産生の誘導が著減していた。

[0085] 19. Dectin-1欠損マウスにおけるCpG ODN+カードランの免疫（筋注）後の、抗原のみによる追加免疫の効果（2）

18. と同様の実験を行い、OVA経口投与による追加免疫後、7日目に、マウスから脾臓と腸管粘膜固有層の細胞を摘出して抗原存在下（OVA 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）で培養し、4日後にIFN- γ 、IL-4及びIL-17の産生をELISAで測定した。

[0086] 実験の概要と結果を図19に示す。図示される通り、Dectin-1ヘテロ欠損マウスの腸管粘膜固有層細胞では、IFN- γ 産生とIL-17産生が誘導され、OVAの経口投与による追加免疫で、消化管にTh1応答及びTh17応答が誘導されることが確認された。ただし、Dectin-1ホモ欠損マウスではIFN- γ 産生とIL-17産生のいずれもが著減していた。いずれの組織においても、IL-4は誘導されず、Th2応答は誘導されていないものと考えられた。

産業上の利用可能性

[0087] 本発明に係るワクチン用アジュバントは、細菌やウイルスなどの外来病原体により引き起こされる各種感染症のほか、花粉や食物などをアレルゲンとして引き起こされるアレルギー反応に対して用いられるワクチン用アジュバントとして、産業上有用である。

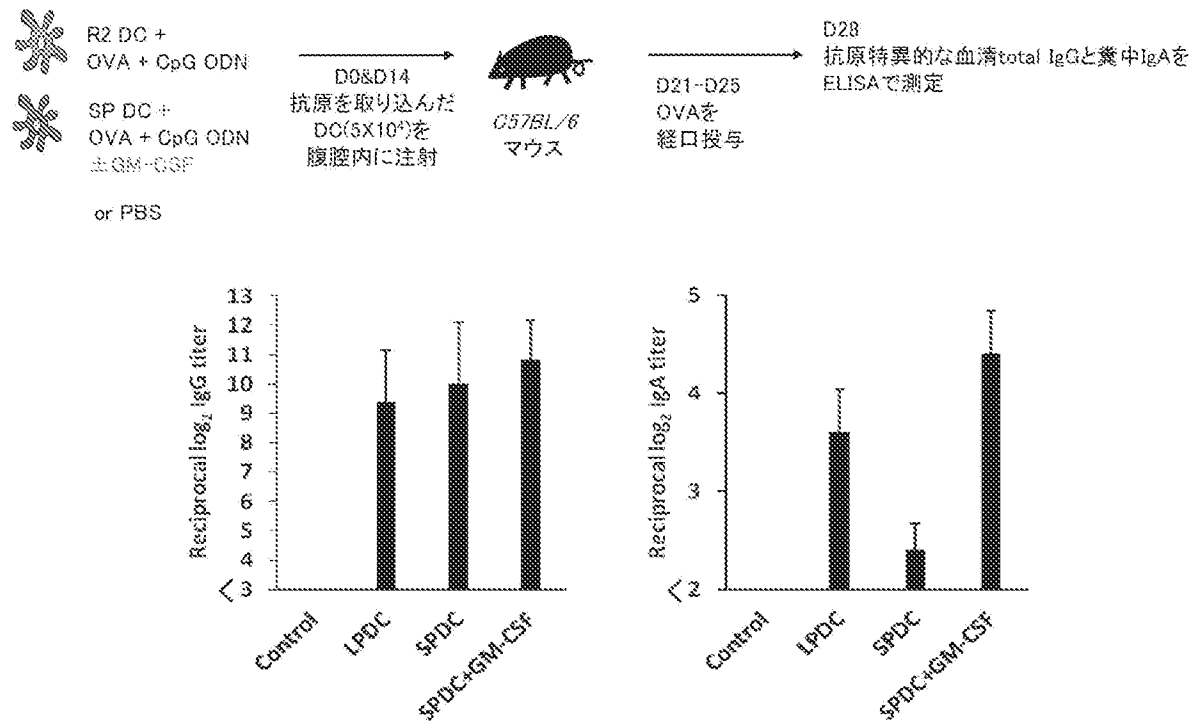
請求の範囲

- [請求項1] D e c t i n - 1 リガンドと、
 T L R アゴニストと
 を含むワクチン用アジュバント。
- [請求項2] 前記D e c t i n - 1 リガンドが、R a l d h 2 遺伝子の発現誘導
 剤である、請求項1 に記載のワクチン用アジュバント。
- [請求項3] 前記R a l d h 2 遺伝子の発現誘導剤が、顆粒球単球コロニー刺激
 因子（G M - C S F）又はグルカン類である、請求項2 に記載のワク
 チン用アジュバント。
- [請求項4] さらに、不完全フロイントアジュバントを含む、請求項1 から3 の
 いずれか1 項に記載のワクチン用アジュバント。
- [請求項5] 少なくとも1 つの抗原と共に投与するための、請求項1 から4 のい
 ずれか1 項に記載のワクチン用アジュバント。
- [請求項6] 少なくとも1 つの抗原と、
 請求項1 から5 のいずれか1 項に記載のワクチン用アジュバントと
 を備えるワクチン。
- [請求項7] 前記ワクチンは、前記抗原と、前記ワクチン用アジュバントとを含
 むワクチン組成物である、請求項6 に記載のワクチン。
- [請求項8] 前記少なくとも1 つの抗原は、ウイルス、若しくはその一部、若し
 くはその成分を不活化若しくは弱毒化したもの、細菌、若しくはその
 一部、若しくはその成分を不活化又は弱毒化したもの、又はアレルギー
 ンである、請求項6 又は7 に記載のワクチン。
- [請求項9] 抗原特異的 I g A 産生を誘導する、請求項6 から8 のいずれか1 項
 に記載のワクチン。
- [請求項10] 抗原特異的 I g A 産生及び抗原特異的 I g G 産生を誘導する、請求
 項6 から9 のいずれか1 項に記載のワクチン。
- [請求項11] 粘膜免疫応答を誘導する、請求項6 から1 0 のいずれか1 項に記載
 のワクチン。

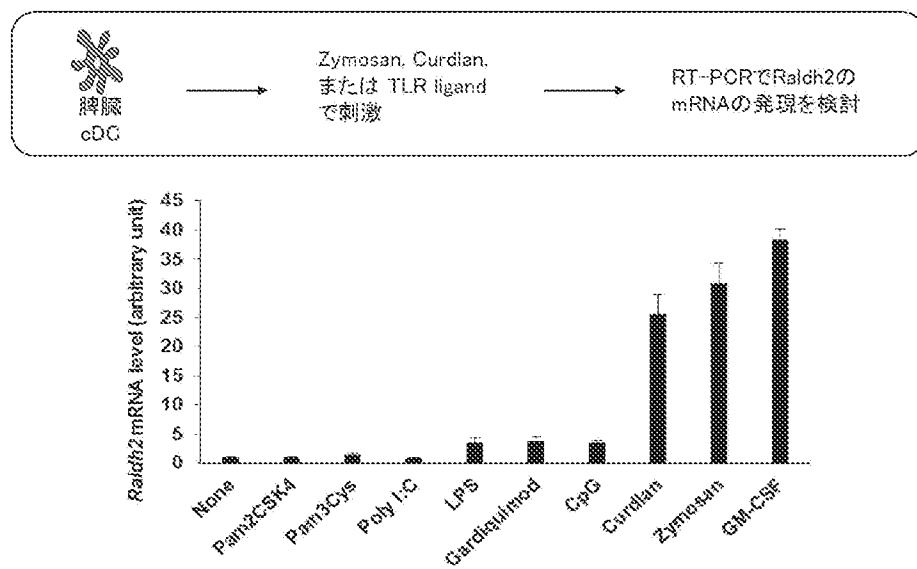
- [請求項12] 前記ワクチンの投与は、ワクチンを経皮投与、皮下投与、皮中投与、及び筋肉内投与からなる群より選択される方法で投与することによって行われる、請求項6～11のいずれか1項に記載のワクチン。
- [請求項13] 前記ワクチンの投与後、一定期間経過後に、抗原を投与する追加免疫を少なくとも1回行う免疫誘導方法に用いられる、請求項6から12のいずれか1項に記載のワクチン。
- [請求項14] 前記追加免疫は、経口投与、経鼻投与、経粘膜投与、経膣投与、経眼投与、及び直腸内投与からなる群より選択される方法で抗原を投与することによって行われる、請求項13に記載のワクチン。
- [請求項15] 前記追加免疫は、アジュバントを使用せずに抗原を投与することによって行われる、請求項13又は14に記載のワクチン。
- [請求項16] 少なくとも1つの抗原と、
Dectin-1リガンドと、TLRアゴニストとを含むワクチン用アジュバントとを備えるワクチンを投与する工程を含む免疫誘導方法。
- [請求項17] 前記ワクチンを投与する工程は、ワクチンを経皮投与、皮下投与、皮中投与、及び筋肉内投与からなる群より選択される方法で投与することによって行われる、請求項16に記載の免疫誘導方法。
- [請求項18] 前記ワクチンを投与する工程後、一定期間経過後に、抗原を投与して追加免疫を行う工程をさらに含む、請求項16又は17に記載の免疫誘導方法。
- [請求項19] 前記追加免疫を行う工程は、経口投与、経鼻投与、経粘膜投与、経膣投与、経眼投与、及び直腸内投与からなる群より選択される方法で抗原を投与することによって行われる、請求項18に記載の免疫誘導方法。
- [請求項20] 前記追加免疫を行う工程は、アジュバントを使用せずに抗原を投与することによって行われる、請求項18又は19に記載の免疫誘導方法。

[請求項21] 少なくとも1つのウイルス又は細菌に由来する抗原と、
 D e c t i n - 1 リガンドと、 T L R アゴニストとを含むワクチン
 用アジュバントと、
 を備えるワクチンを投与する工程
 を含む、ウイルス感染症又は細菌感染症の予防方法。

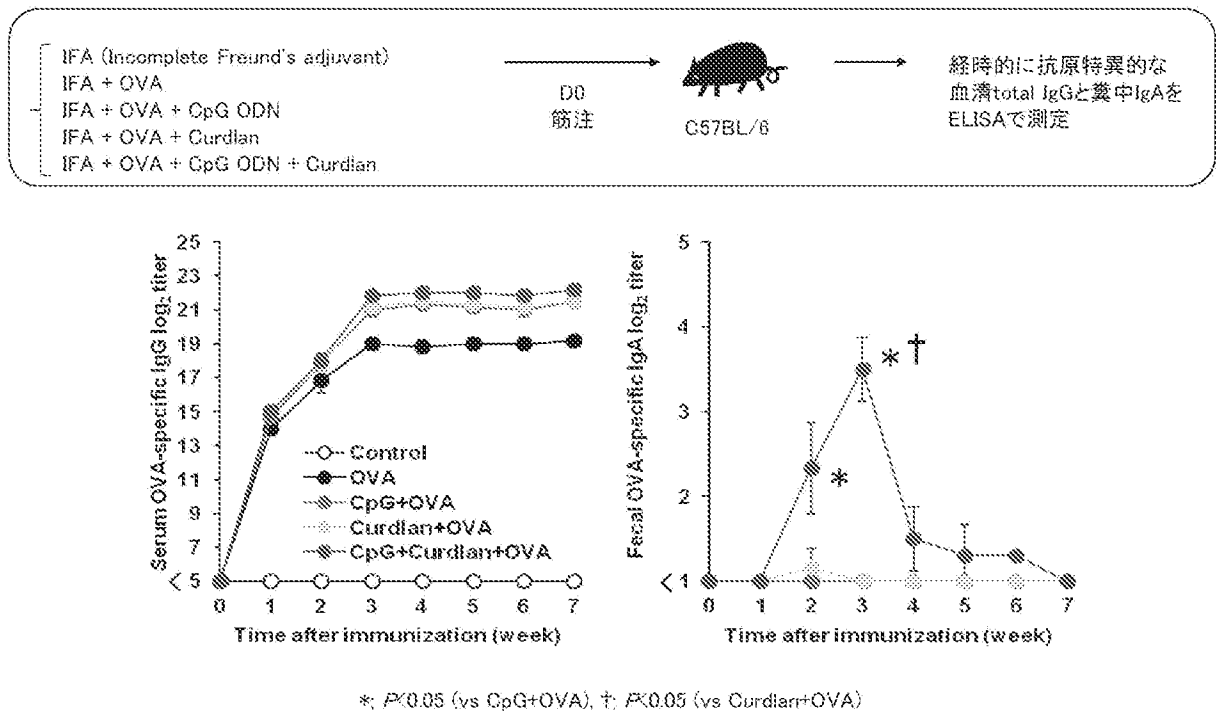
[図1]



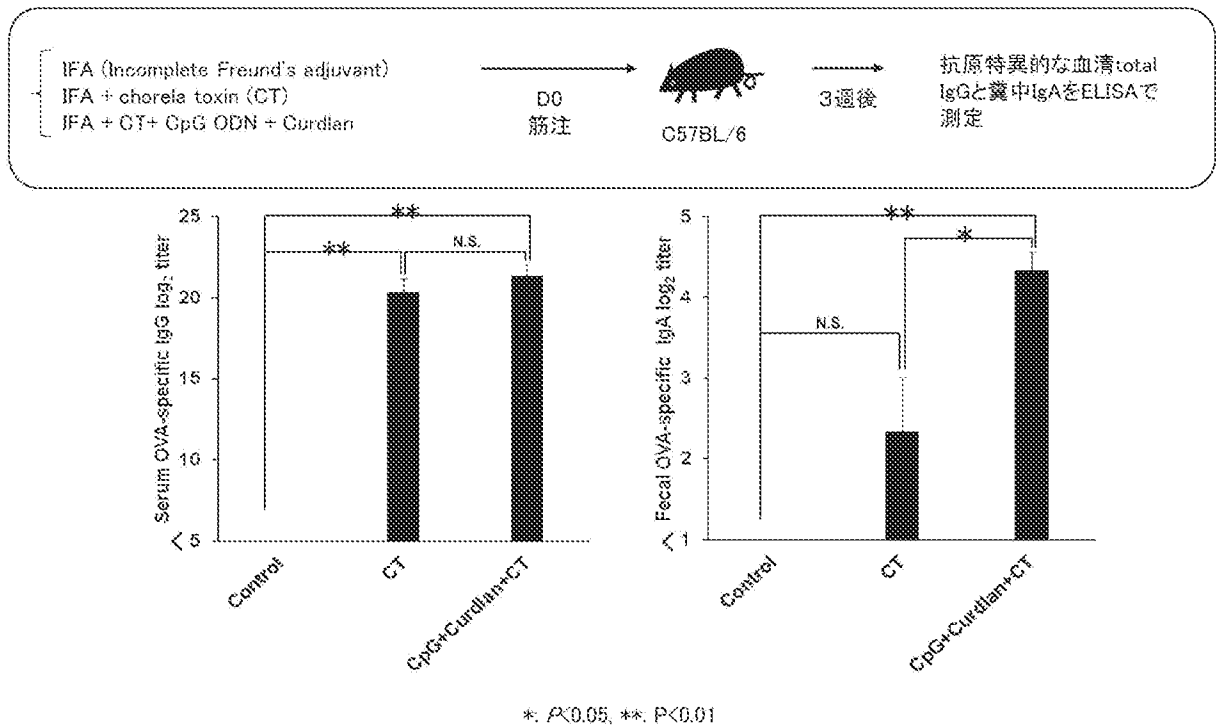
[図2]



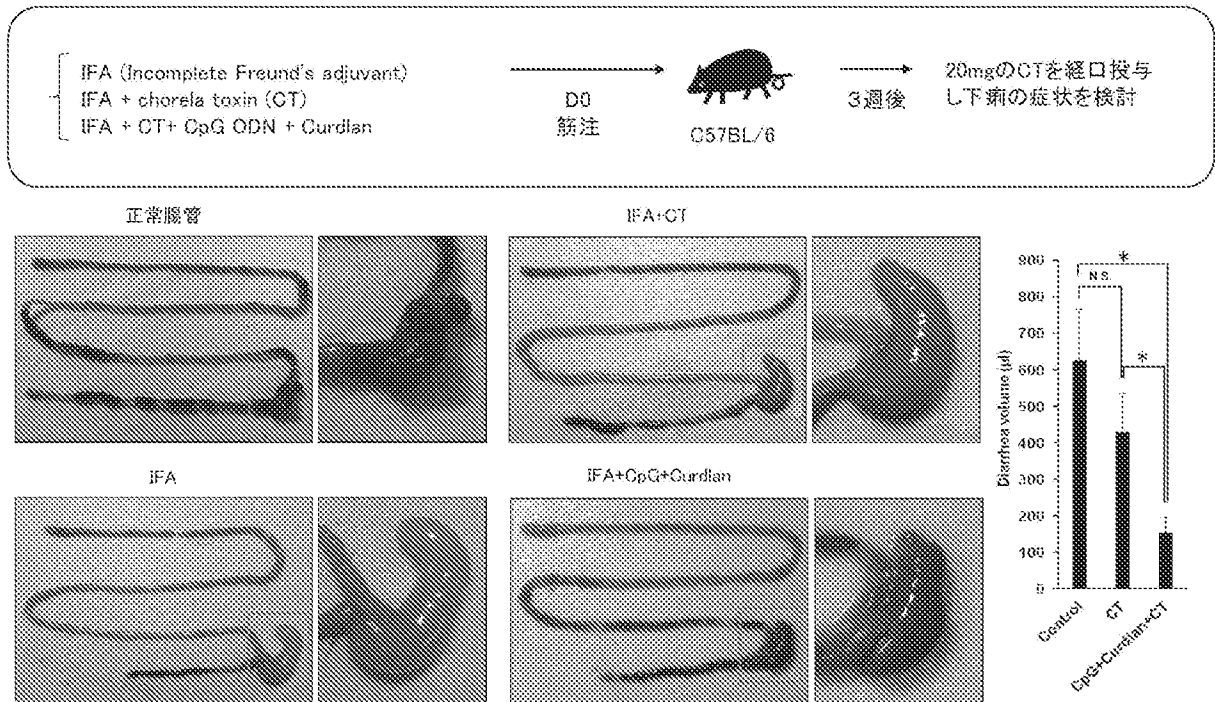
[図3]



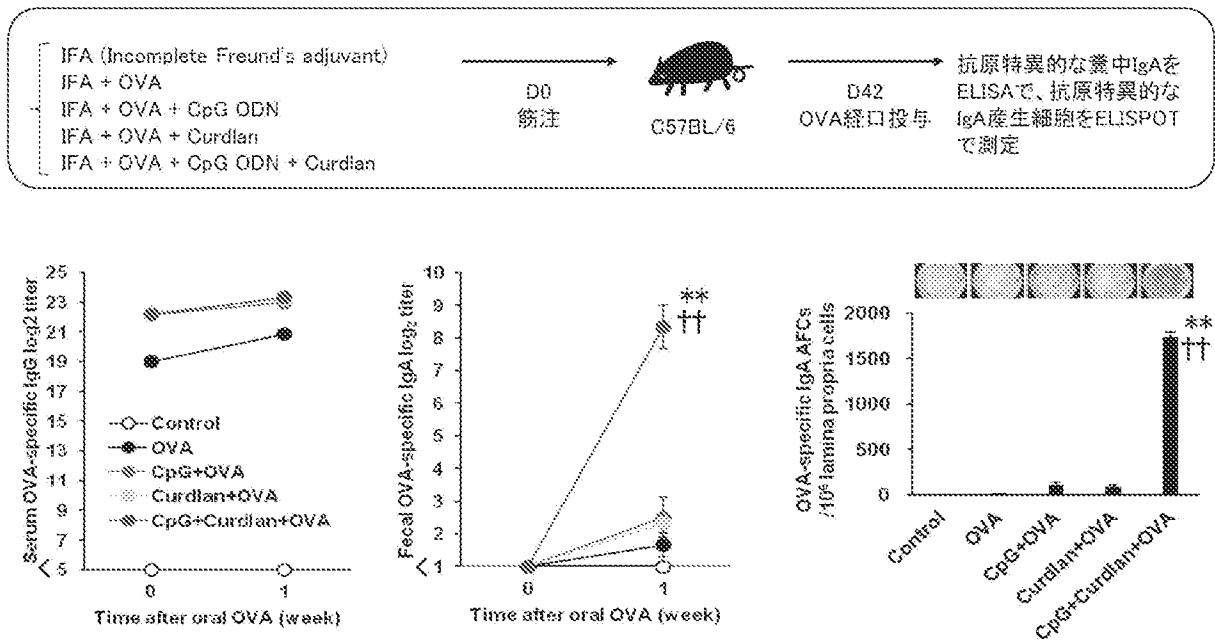
[図4]



[図5]

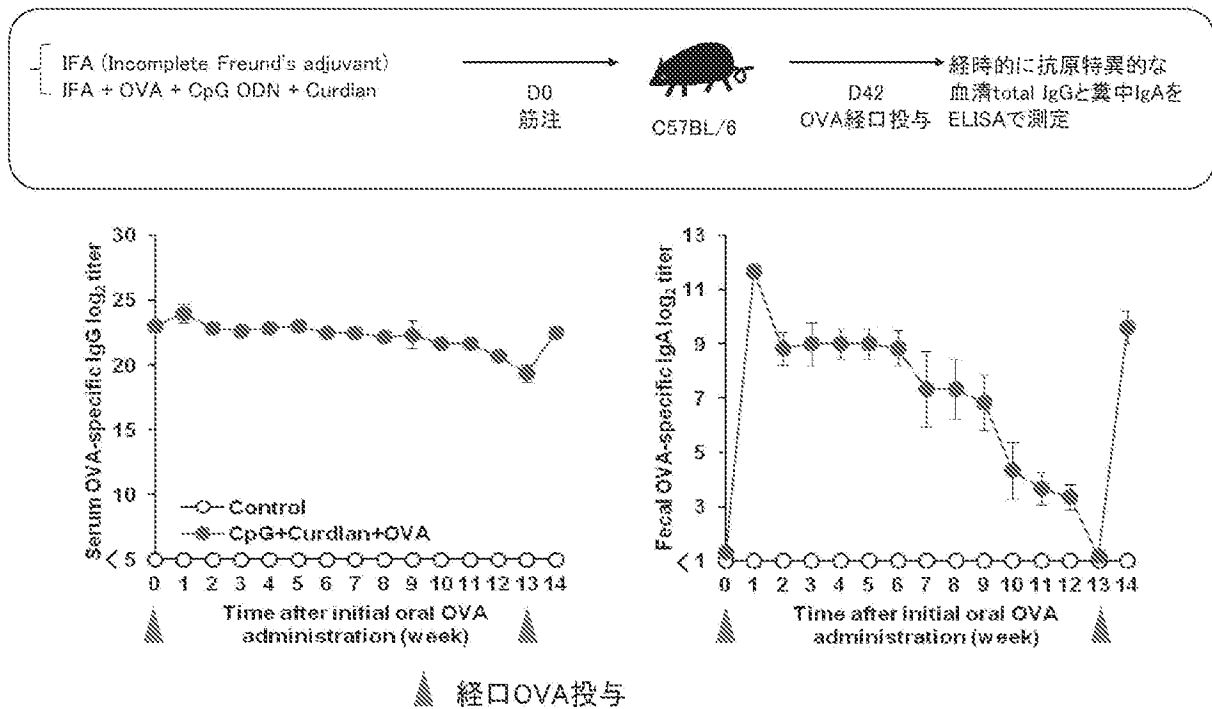


[図6]

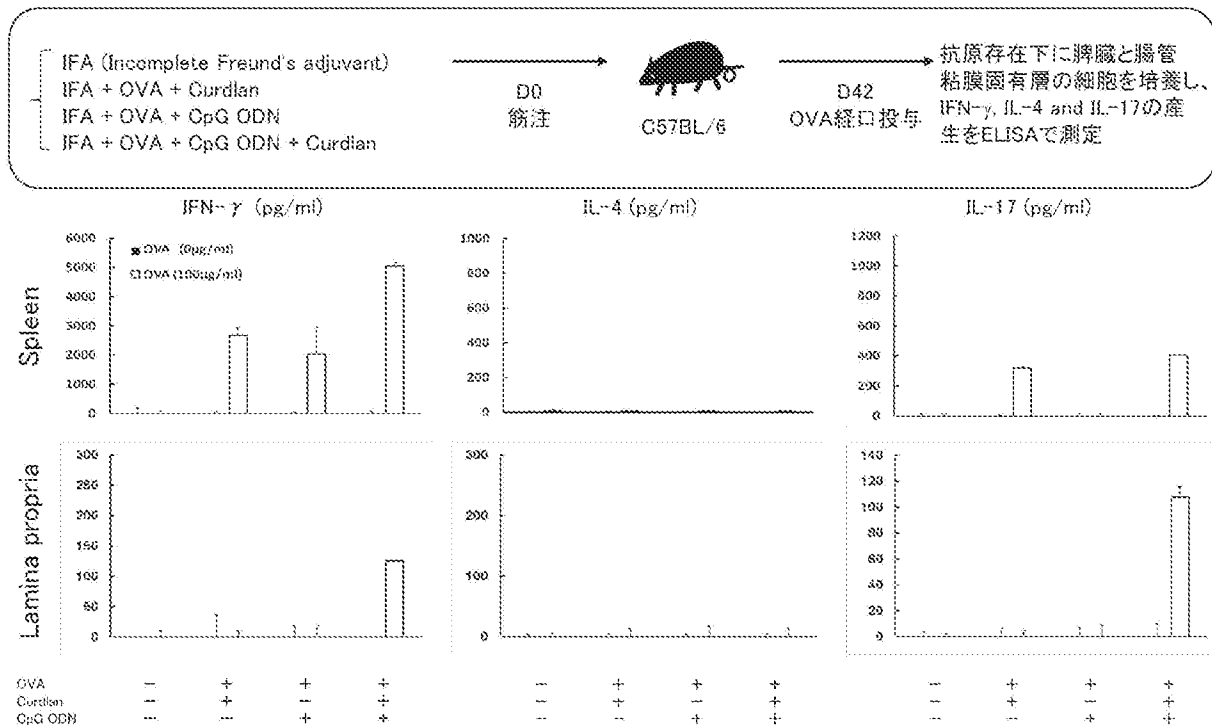


** $P < 0.01$ (vs CpG+OVA), †† $P < 0.01$ (vs Curdlan+OVA)

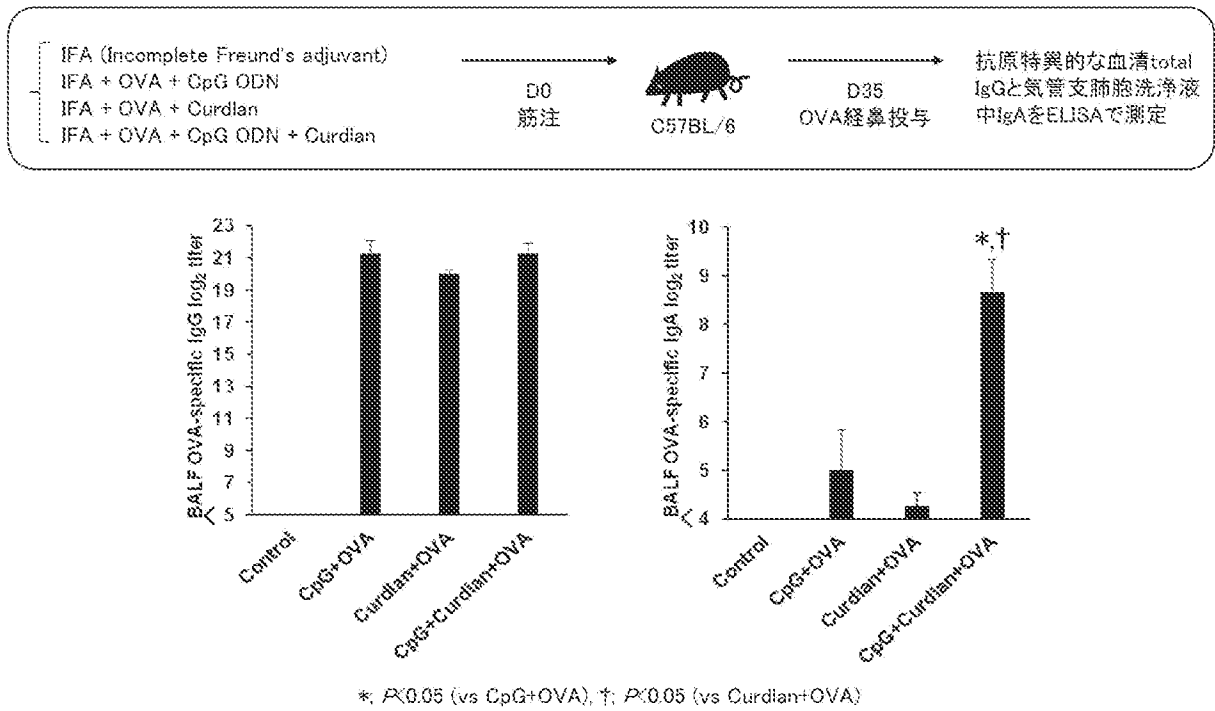
[図7]



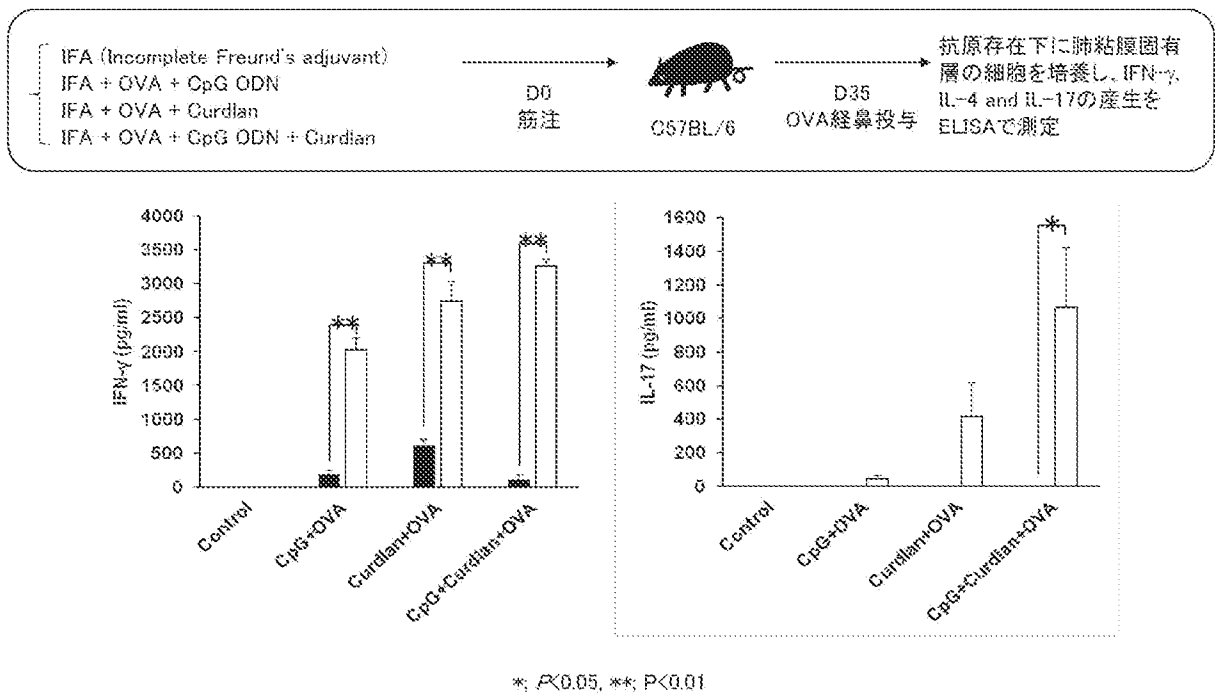
[図8]



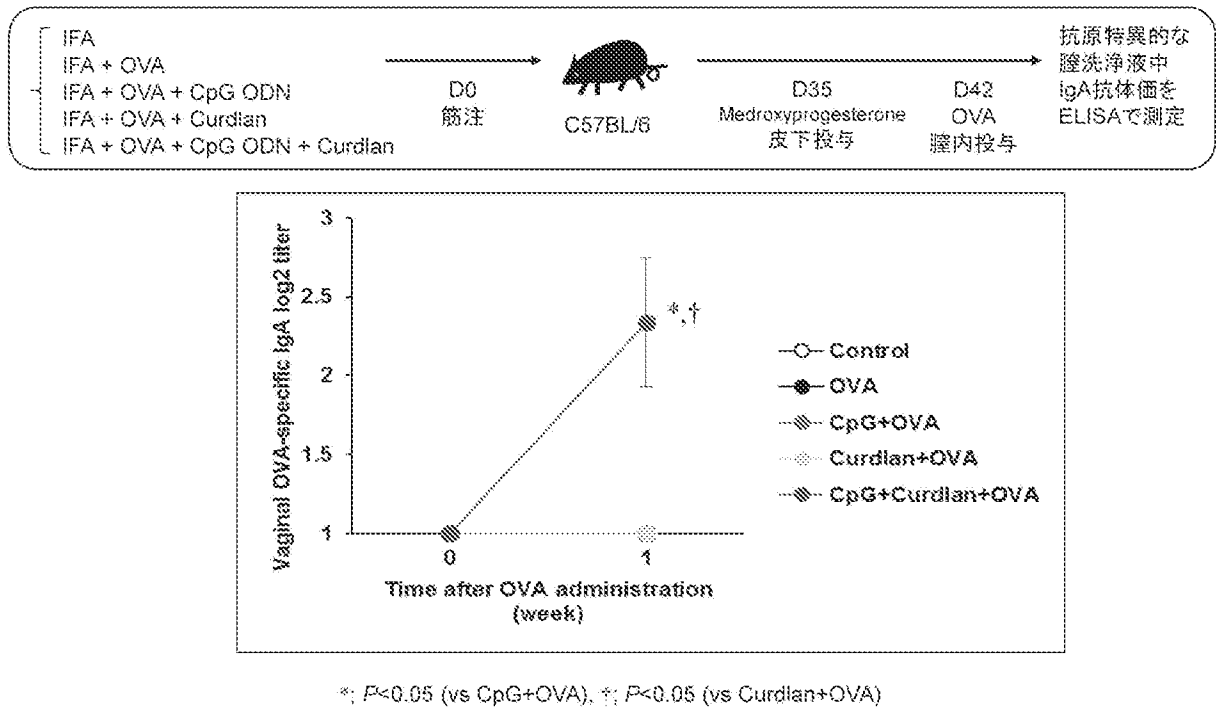
[図9]



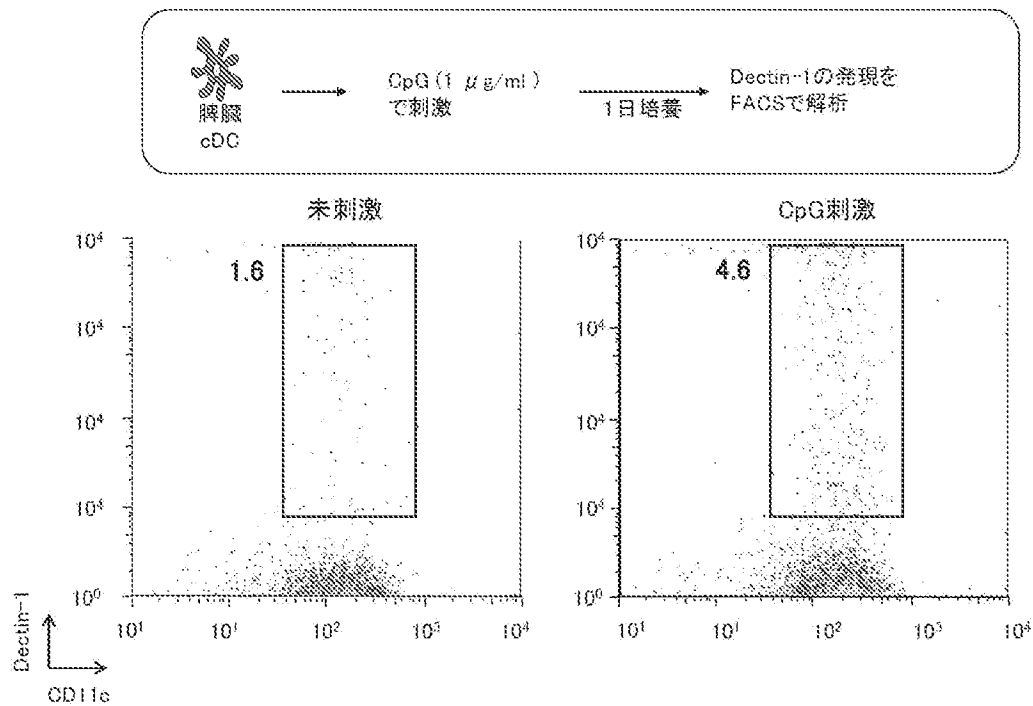
[図10]



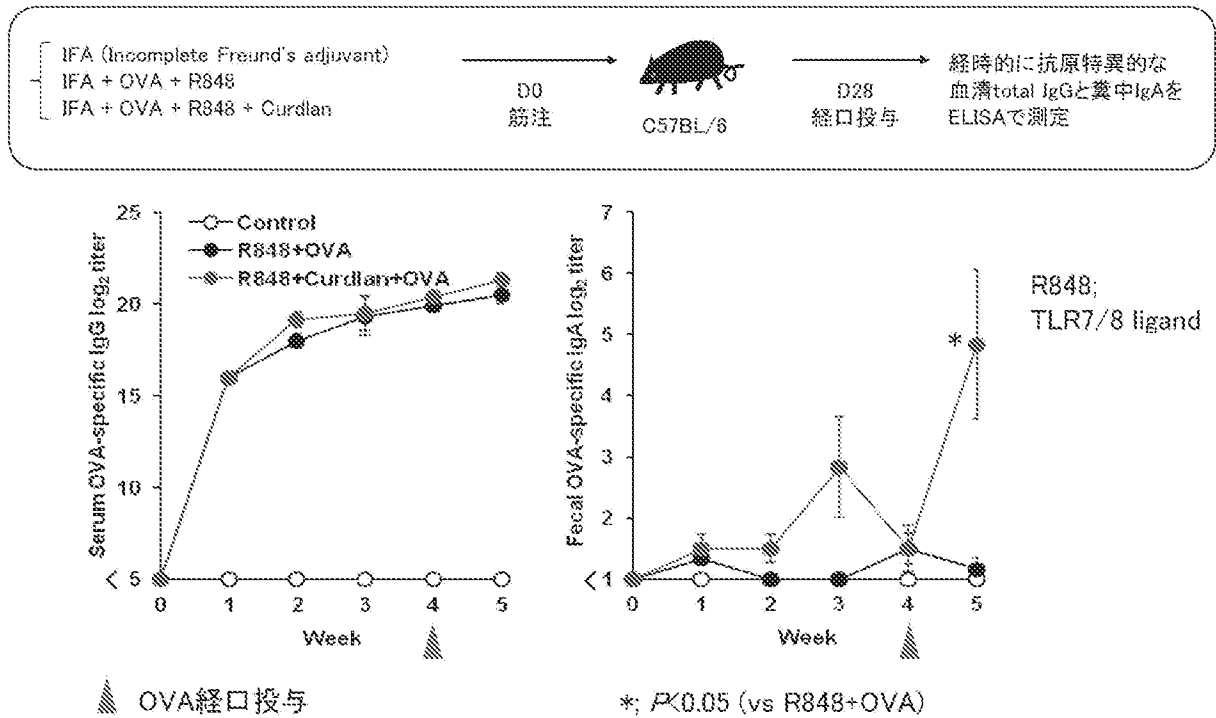
[図11]



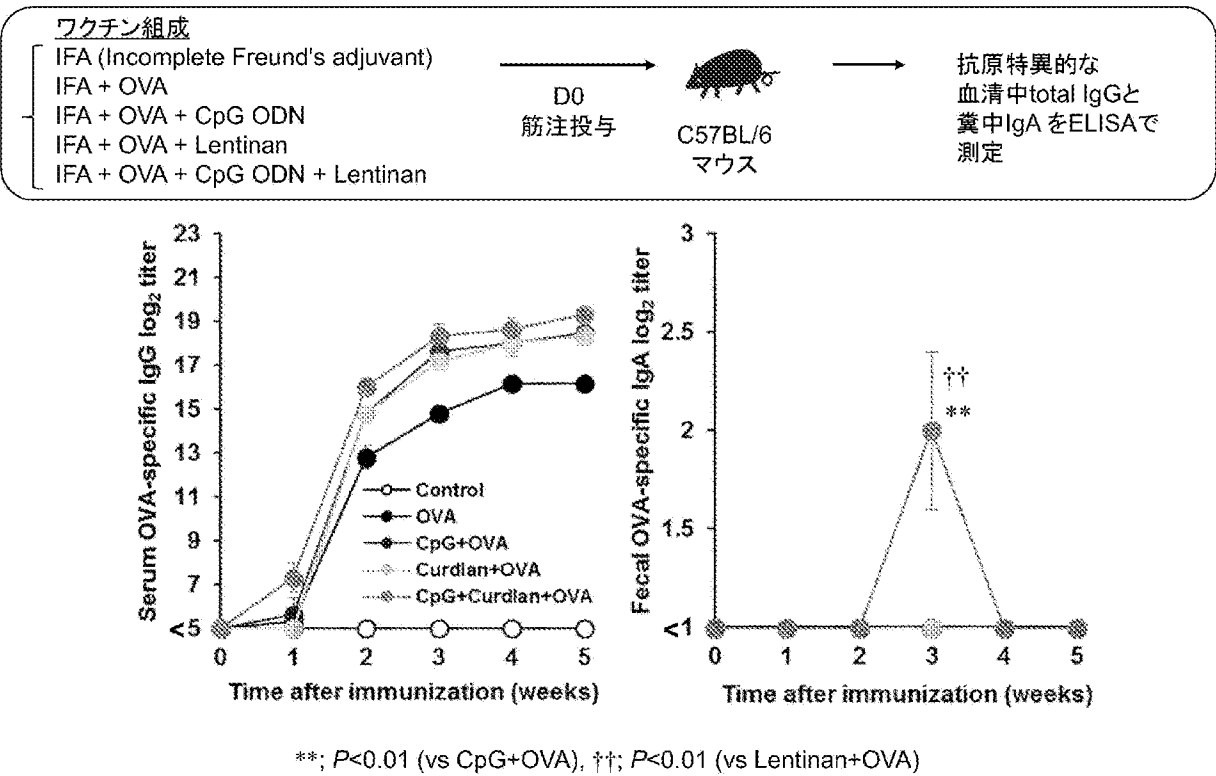
[図12]



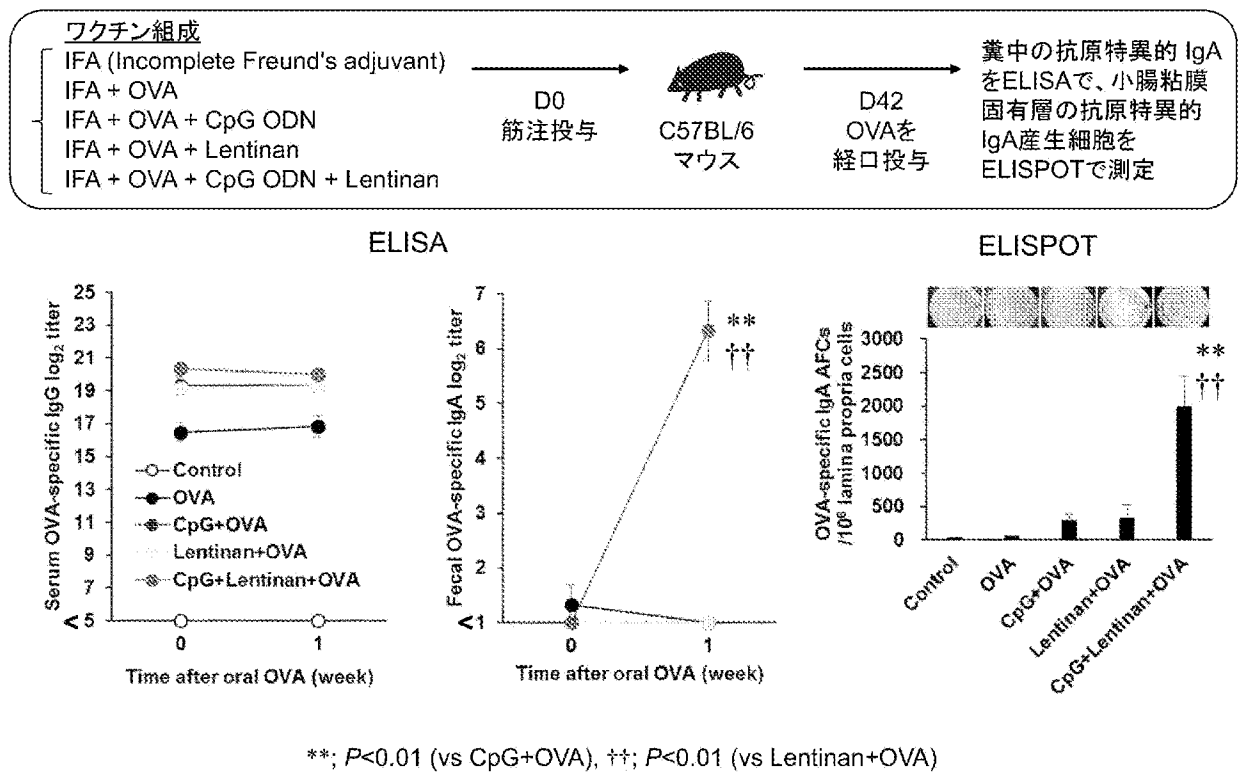
[図13]



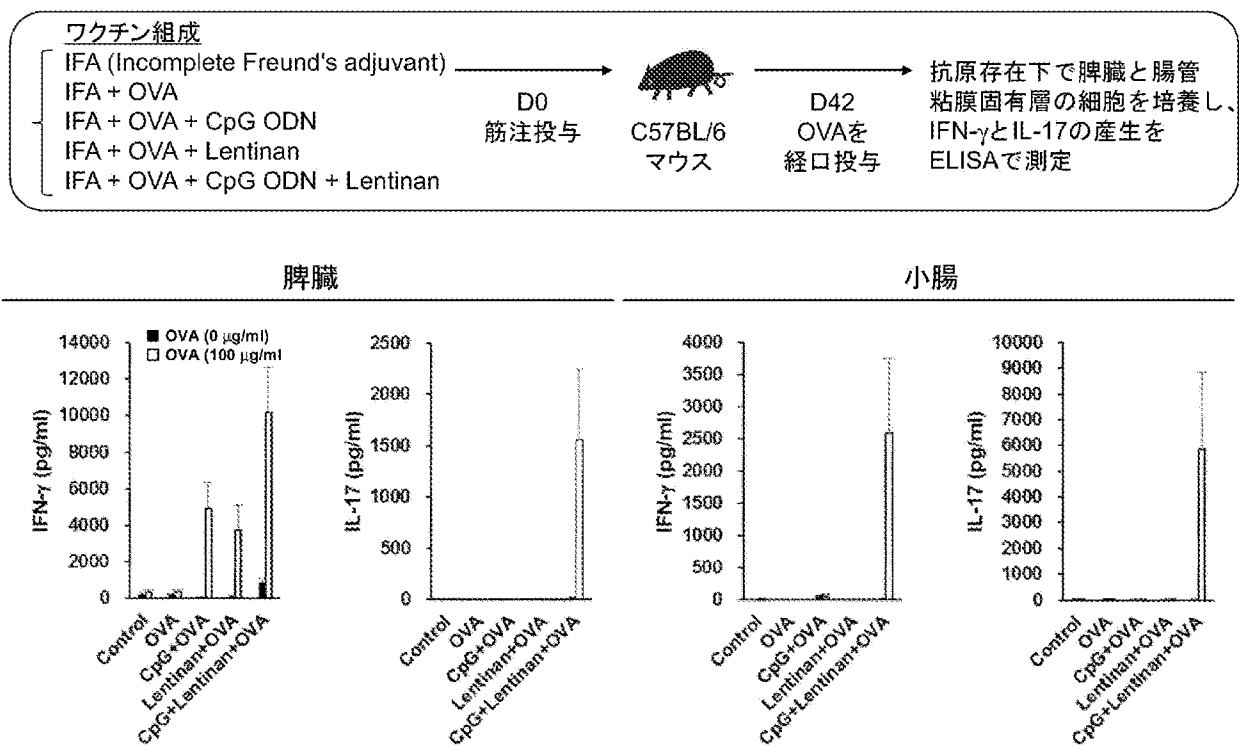
[図14]



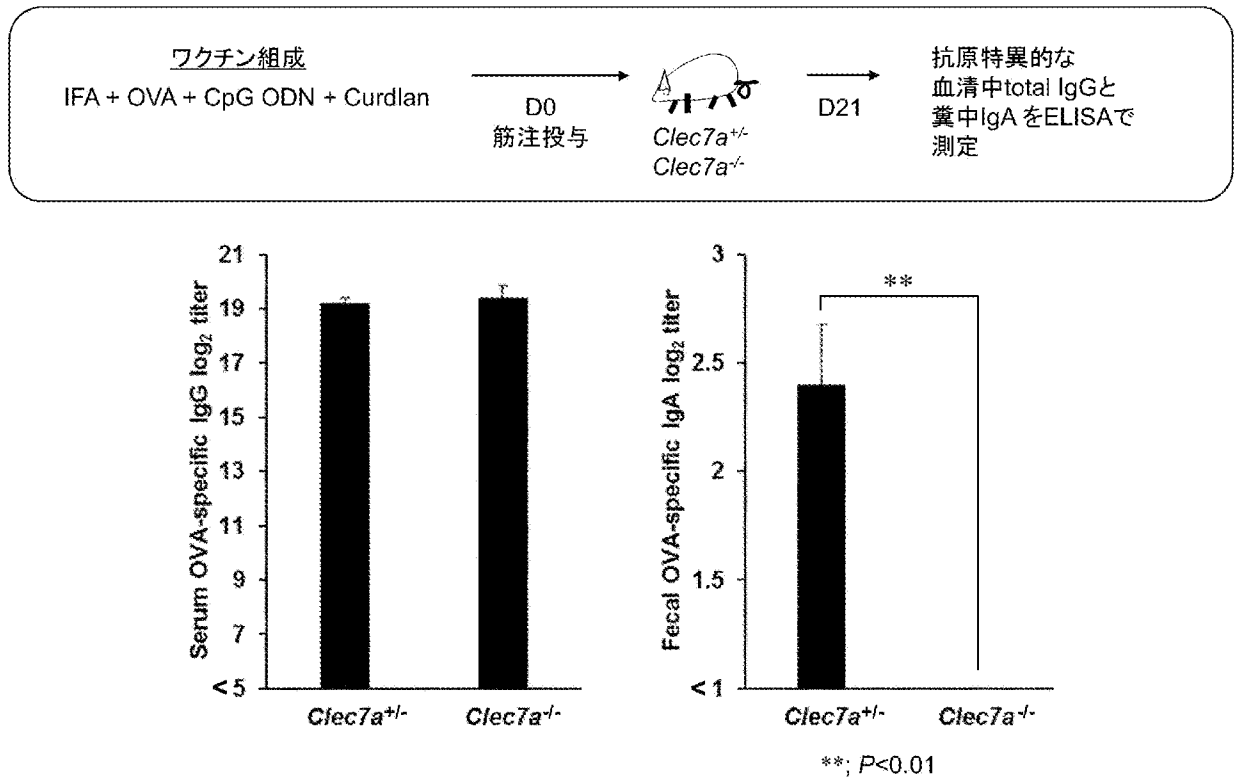
[図15]



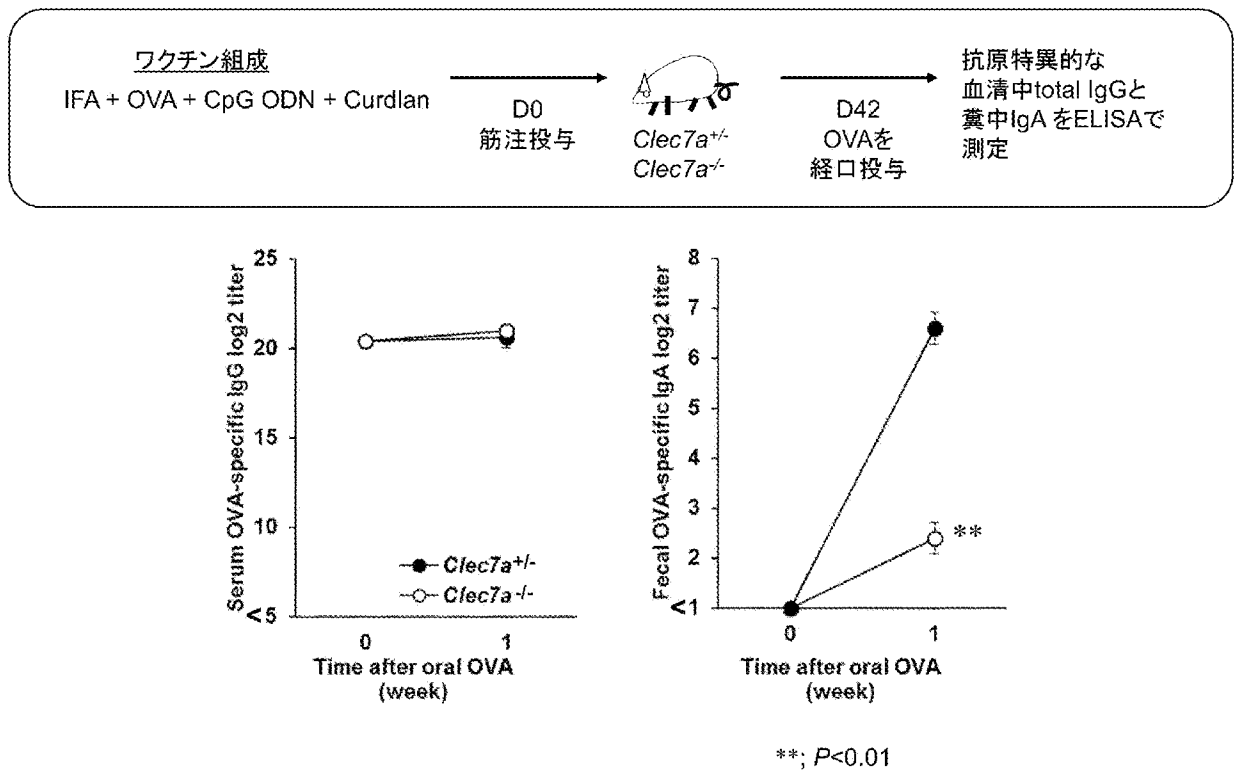
[図16]



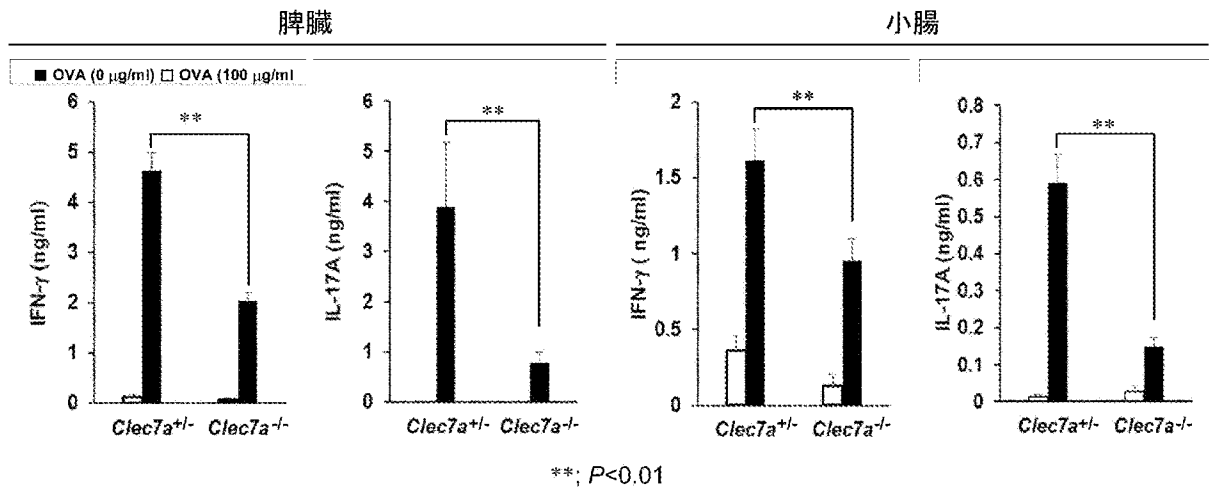
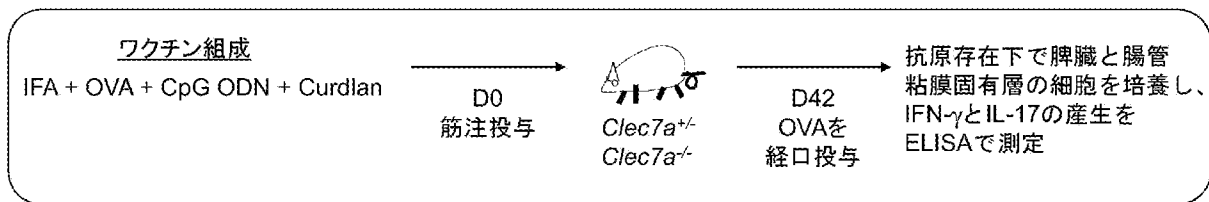
[図17]



[図18]



[図19]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/067403

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K39/39(2006.01)i, A61K31/716(2006.01)i, A61K38/22(2006.01)i, A61K45/06(2006.01)i, A61P37/04(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)

A61K39/39, A61K31/716, A61K38/22, A61K45/06, A61P37/04

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 1996-2016

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/041318 A1 (National Institute of Biomedical Innovation et al.), 26 March 2015 (26.03.2015), paragraphs [0001], [0018], [0050], [0063] to [0065] & CA 2923806 A paragraphs [0001], [0018], [0050], [0063] to [0065]	1-21
X	JP 2008-127277 A (Osaka Prefectural Hospital Organization et al.), 05 June 2008 (05.06.2008), claims 1 to 4; paragraphs [0023], [0025], [0026], [0034] (Family: none)	1-21



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

28 July 2016 (28.07.16)

Date of mailing of the international search report

09 August 2016 (09.08.16)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office

3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,

Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/067403

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2007-505827 A (Glaxo Group Ltd.), 15 March 2007 (15.03.2007), claim 1; paragraphs [0117], [0120] & US 2008/0145375 A1 claim 1; 0117, 0121, 0125, 0126 & GB 321615 D & WO 2005/025614 A2 & EP 1682175 A1 & CA 2538197 A & KR 10-2007-0029111 A & CN 1878567 A & SG 145767 A & ZA 200602156 A & AU 2004271726 A	1-21
X	US 2014/0314804 A1 (GORDEN et al.), 23 October 2014 (23.10.2014), claims 1, 5, 7 to 9 & WO 2013/036712 A1 & EP 2753337 A1	1-21
X	KOBIYAMA K. et al, A Dectin-1-assisted APC- targeting TLR9-agonist as an adjuvant., Proceedings of the Japanese Society for Immunology, 2012, 41, p.106,2-C-W26-7-O/P, the last paragraph	1-21
A	JP 2015-7044 A (Baylor Research Institute), 15 January 2015 (15.01.2015), & JP 2010-519316 A & JP 2016-40265 A & US 2008/0233140 A1 & US 2014/0322214 A1 & WO 2008/118587 A2 & EP 2129773 A1 & KR 10-2009-0114466 A & CN 101679949 A & AU 2008231242 A & MX 2009008926 A & ZA 200906619 A & CA 2717659 A & NZ 579262 A	1-21

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. A61K39/39(2006.01)i, A61K31/716(2006.01)i, A61K38/22(2006.01)i, A61K45/06(2006.01)i, A61P37/04(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（I P C））

Int.Cl. A61K39/39, A61K31/716, A61K38/22, A61K45/06, A61P37/04

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 6 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 6 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 6 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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2015/041318 A1（独立行政法人医薬基盤研究所ほか）2015.03.26, 段落 0001, 0018, 0050, 0063-0065 & CA 2923806 A, [0001], [0018], [0050], [0063]-[0065]	1-21
X	JP 2008-127277 A（地方独立行政法人 大阪府立病院機構ほか）2008.06.05, 特許請求の範囲請求項 1-4, 段落 0023, 0025, 0026, 0034（ファミリーなし）	1-21

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 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

2 8 . 0 7 . 2 0 1 6

国際調査報告の発送日

0 9 . 0 8 . 2 0 1 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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）

六笠 紀子

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 3 9

4 U

9 7 3 5

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2007-505827 A (グラクソ グループ リミテッド) 2007.03.15, 特許請求の範囲請求項 1, 段落 0117, 0120 & US 2008/0145375 A1, claim1, 0117, 0121, 0125, 0126 & GB 321615 D & WO 2005/025614 A2 & EP 1682175 A1 & CA 2538197 A & KR 10-2007-0029111 A & CN 1878567 A & SG 145767 A & ZA 200602156 A & AU 2004271726 A	1-21
X	US 2014/0314804 A1 (GORDEN et al.) 2014.10.23, claims1, 5, 7-9 & WO 2013/036712 A1 & EP 2753337 A1	1-21
X	KOBIYAMA K. et al, A Dectin-1-assisted APC-targeting TLR9-agonist as an adjuvant., 日本免疫学会総会・学術集会記録, 2012, 41, p. 106, 2-C-W26-7-0/P, 最終パラグラフ	1-21
A	JP 2015-7044 A (ベイラー リサーチ インスティテュート) 2015.01.15, & JP 2010-519316 A & JP 2016-40265 A & US 2008/0233140 A1 & US 2014/0322214 A1 & WO 2008/118587 A2 & EP 2129773 A1 & KR 10-2009-0114466 A & CN 101679949 A & AU 2008231242 A & MX 2009008926 A & ZA 200906619 A & CA 2717659 A & NZ 579262 A	1-21