

(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
2010年3月25日(25.03.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/032408 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 39/002 (2006.01) A61P 15/06 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01) A61P 33/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/004525
- (22) 国際出願日: 2009年9月11日(11.09.2009)
- (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 2008-237719 2008年9月17日(17.09.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人帯広畜産大学(OBIHIRO UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND VETERINARY MEDICINE) [JP/JP]; 〒0808555 北海道帯広市稲田町西2線11番地 Hokkaido (JP). 学校法人東海大学(Tokai University Educational System) [JP/JP]; 〒1510063 東京都渋谷区富ヶ谷2丁目28番4号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 西川義文 (NISHIKAWA, Yoshifumi) [JP/JP]; 〒0808555 北海

道帯広市稲田町西2線11番地 国立大学法人帯広畜産大学内 Hokkaido (JP). 横山直明 (YOKOYAMA, Naoki) [JP/JP]; 〒0808555 北海道帯広市稲田町西2線11番地 国立大学法人帯広畜産大学内 Hokkaido (JP). 小島直也 (KOJIMA, Naoya) [JP/JP]; 〒2591292 神奈川県平塚市北金目1117 東海大学内 Kanagawa (JP).

- (74) 代理人: 大野聖二, 外(OHNO, Seiji et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内一丁目6番5号丸の内北口ビル21階 大野総合法律事務所 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

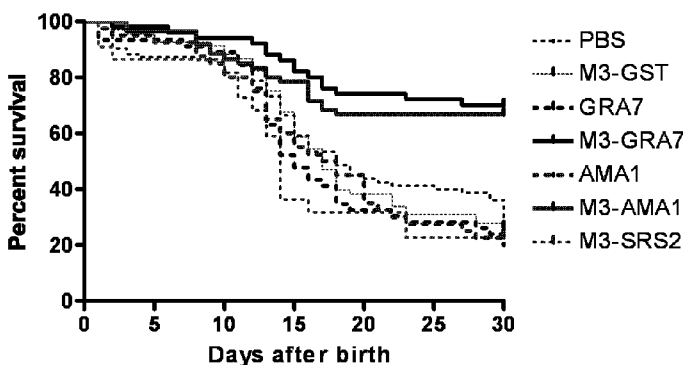
[続葉有]

(54) Title: VACCINE PREPARATION FOR NEOSPORA CANINUM INFECTION

(54) 発明の名称: ネオスポラ原虫感染症に対するワクチン製剤

[図2]

AA
新生マウスの生存曲線



AA SURVIVAL CURVE OF NEWBORN MICE

(57) Abstract: A vaccine preparation characterized by comprising: a liposome which has, on its surface, an oligosaccharide capable of binding to a sugar chain recognizing molecule located on the surface of an antigen presenting cell; and dense granule protein 7 or apical membrane antigen 1 each derived from *Neospora caninum* or an immunologically active mutant or derivative thereof, which is encapsulated in the liposome.

(57) 要約: 本発明は、ネオスポラ原虫由来の Dense granule protein 7 又は Apical membrane antigen 1 あるいはその免疫学的に活性な変異体又は誘導体を、抗原提示細胞表面の糖鎖認識分子に結合しうるオリゴ糖を表面に有するリボソームに封入してなることを特徴とする、ワクチン製剤に関する。

WO 2010/032408 A1

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
 - 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：ネオスポラ原虫感染症に対するワクチン製剤

技術分野

[0001] 本発明は、ネオスポラ原虫感染症に対するワクチン製剤に関する。より詳しくは、ネオスポラ原虫由来の可溶性タンパク質を抗原提示細胞表面の糖鎖認識分子に結合しうるオリゴ糖を表面に有するリポソームに封入してなるワクチン製剤に関する。

背景技術

[0002] ネオスポラ原虫 (*Neospora caninum*) は犬科動物を終宿主とし、牛・羊・山羊、鹿などを中間宿主とする細胞内寄生性原虫である。ネオスポラは、終宿主の糞便中に排出されるオーシストによる水平感染や中間宿主における垂直感染により伝搬され、特に牛では流産、死産或いは子牛の神経症状を主徴とする異常産を高率に引き起こす。欧米諸国の報告では、牛の流産の約40%の原因はネオスポラ原虫感染によるものとされている。ネオスポラ原虫の垂直感染は何世代にも渡って成立し、このことが本原虫の感染拡大の最大の原因として挙げられる。実際、ネオスポラ原虫の感染例は世界中で報告されており、日本においてもその発生は深刻である。ネオスポラ原虫が感染した母牛は搾乳に供することができない場合が多く、子牛と搾乳量の損耗などのため、畜産業会では、その発生による経済的損失は極めて大きい。ネオスポラ原虫感染による地球規模での被害額は年間約数十億USドルにのぼるとの試算もある。

[0003] ネオスポラ原虫感染を予防するワクチンについては、以下の点を考慮する必要がある。ネオスポラ原虫は細胞内寄生性の原虫であるため、その防御免疫には細胞性免疫が重要である。特に、インターフェロンガンマとCD4陽性T細胞の働きが重要である。ネオスポラ原虫に対する抗体の効果については議論の余地があるものの、細胞外に存在するネオスポラ原虫に反応して、その体内伝播を阻止することが推測されている。

- [0004] 妊娠時の感染は、母体特有の免疫応答により、流産や垂直感染を引き起こす。すなわち、妊娠初期にネオスポラ原虫が感染した場合、母体の免疫反応により流産が誘発される。また、母体が免疫抑制状態になっている妊娠中期にネオスポラ原虫が感染した場合、胎児への垂直感染が成立し、先天的にネオスポラ原虫に感染している個体が生まれてくる。
- [0005] これまでに、牛のネオスポラ症を対象に、不活化ワクチンや生ワクチンを用いたネオスポラ原虫に対するワクチン開発がいくつか試みられている。不活化したネオスポラ原虫とアジュバントとしてPOLYGENを用いた場合、胎児への感染を防ぐことはできなかった（非特許文献1）。不活化したネオスポラ原虫とアジュバントとしてHAVLOGENを用いた場合、ニュージーランドでは5.2%から54%の予防効果、コスタリカでは46%の予防効果が報告されている（非特許文献1）。また、生ワクチンの接種による死産の抑制効果も報告されている。しかしながら、自然感染牛に対するワクチンの効果は今だ実証されていない。
- [0006] 不活化ワクチンや生ワクチンに加え、ネオスポラ原虫由来のタンパク質を標的にした組換えワクチンの作製も試みられている。マウスモデルを使った実験では、ネオスポラ原虫由来タンパク質のMIC1, MIC3, GRA2, GRA6, SAG1, SRS2を用いた組換えワクチンにおいて、原虫の垂直感染を抑制する結果が得られている（非特許文献2、3）。
- [0007] しかしながら、上記組換えワクチンには微生物やウイルスがベクターとして使用されており、動物への接種の際にそのベクターの病原性が問題となる。従って、組換えワクチンを作製するには、安全性と細胞性免疫誘導能の高いベクターやアジュバントを開発することが課題としてあげられる。
- [0008] ワクチンや免疫療法などのアジュバントとして開発されたマンナンのような高分子多糖体にて被覆したリポソームには、強い細胞性免疫誘導能のあることが報告されている（特許文献1、非特許文献4）。しかし、マンナンは分子量が不均一なポリマンノースの混合物であり、また、生体に強い毒性を示すため（非特許文献5）、医薬品には適さない。

- [0009] 一方で、水落らは2～11個の糖残基から成り抗原提示細胞由来のレクチンに結合するオリゴ糖を表面に有するリポソームに抗原を封入することで、糖の毒性や抗原性を除き、ワクチンとしての効果が高まることを報告している（特許文献2）。また、この文献においては、オリゴ糖を表面に有するリポソームに封入された抗原に対する細胞性免疫が効率良く誘導できることも開示されている。オリゴ糖を表面に有するリポソームはマンノース受容体を介して抗原提示細胞に貪食され、MHCクラスI又はII分子を介して抗原を提示することにより、抗原特異的なT細胞の活性化やTh1由来サイトカインを誘導すると考えられている。
- [0010] 清水らは、オリゴ糖を表面に有するリポソームにリーシュマニア原虫（*Leishmania major*）由来の可溶性抗原を封入し、このリポソームでマウスを免疫すると、リーシュマニア原虫に対するTh1型免疫を有意に誘導し、原虫感染を制御することを報告している（非特許文献6）。

先行技術文献

特許文献

- [0011] 特許文献1：国際公開第92/04887号パンフレット
特許文献2：特許第2828391号公報

非特許文献

- [0012] 非特許文献1：Dubey et al., *Clinical Microbiology Reviews* 2007
20:323-367
非特許文献2：Ramamoorthy et al., *Int. J. Parasitol.* 2007, 37:1
531-1538
非特許文献3：Nishikawa et al., *Vaccine* 2001, 19:1710-1716
非特許文献4：Noguchi et al., *J. Immunol.* 1991, 146:3599-3603
非特許文献5：Mikami et al., 第15回糖質シンポジウム抄録, 1993,
43-44
非特許文献6：Shimizu et al., *Parasite Immunol* 2007, 29:229-239

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0013] 本発明の課題は、ネオスポラ原虫感染に対して、効果的な免疫応答を誘導しうる、安全なワクチン製剤を提供し、ネオスポラ原虫感染症の予防効果の向上を実現することにある。

課題を解決するための手段

[0014] 本発明者らは、上記の課題を解決すべく鋭意検討した結果、抗原提示細胞表面の糖鎖認識分子に結合するオリゴ糖を表面に有するリポソームにネオスポラ原虫由来の可溶性タンパク質を封入すると、ネオスポラ原虫に対するT_h1型反応とT_h2型反応のバランスが改善され、ワクチン効果が顕著に向上することを見いだした。

[0015] 本発明は、係る知見に基づくものであり、ネオスポラ原虫由来のDense granule protein 7又はApical membrane antigen 1あるいはその免疫学的に活性な変異体又は誘導体を、抗原提示細胞表面の糖鎖認識分子に結合しうるオリゴ糖を表面に有するリポソームに封入してなるリポソーム製剤に関する。

前記抗原提示細胞表面の糖鎖認識分子としては、例えばマンノース・レゼプターを挙げることができる。

[0016] 1つの態様において、Dense granule protein 7あるいはその免疫学的に活性な変異体又は誘導体は、例えば

- (a) 配列番号1に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質、あるいは
- (b) 配列番号1に示されるアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、ネオスポラ原虫に対する免疫応答を誘導しうるタンパク質である。

[0017] また、Apical membrane antigen 1あるいはその免疫学的に活性な変異体又は誘導体は、例えば

- (c) 配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質、あるいは
- (d) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠

失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、ネオスポラ原虫に対する免疫応答を誘導しうるタンパク質である。

[0018] 用いられるオリゴ糖は、2～11の糖残基であることが好ましく、3～7の糖残基からなることがより好ましく、3～5の糖残基からなることがもっとも好ましい。

好適なオリゴ糖としては、2以上のマンノースを含む糖鎖を挙げることができる。

[0019] 本発明のリポソーム製剤は、ネオスポラ感染症に対するワクチン製剤として利用することができる。前記ワクチン製剤は、製薬上許容しうる担体とともに製剤化され、例えば皮下、皮内、静脈内、経口又は経鼻投与されることが望ましい。

発明の効果

[0020] 本発明で提供されるワクチン製剤は、高い予防効果を有すると同時に副作用の危険性が低減されている。本発明にかかるワクチン製剤の使用により、ワクチン接種した個体だけでなく、胎児への原虫の垂直感染も予防することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0021] [図1]新生マウスの出生数と生後30日間の生存率を示した図である。

[図2]新生マウスの生後30日間の生存曲線を示した図である。

[図3]母親マウスのネオスポラ原虫感染率を示した図である。

[図4]被検物質処置を行ったマウスにおける血漿中封入抗原特異的IgG、IgG1、及びIgG2a抗体レベルを示した図である。

[図5]被検物質処置を行ったマウスにおける血漿中ネオスポラ原虫可溶性抗原特異的IgG、IgG1、及びIgG2a抗体レベルを示した図である。

[図6]被検物質処置を行ったマウスの脾細胞における、抗原刺激特異的なIFN- γ とIL-4の産生量を示した図である。

[0022] 本明細書は、本願の優先権の基礎である特願2008-237719号の明細書に記載された内容を包含する。

発明を実施するための形態

[0023] 本発明は、ネオスポラ原虫由来のDense granule protein 7又はApical membrane antigen 1あるいはその免疫学的に活性な変異体又は誘導体を、抗原提示細胞表面の糖鎖認識分子に結合しうるオリゴ糖を表面に有するリポソームに封入してなるリポソーム製剤と前記リポソーム製剤を含むネオスポラ感染症に対するワクチン製剤に関する。

以下、本発明について、詳細に説明する。

[0024] 1. ネオスポラ原虫

原虫（げんちゅう）とは真核単細胞微生物であって、運動能力や捕食能力を持つ動物的な単細胞生物である。単細胞の寄生虫と区別するため、寄生性で特に病原性のあるものを原虫と呼ぶことも多い。原虫には、ヒトにしか寄生できない宿主特異性の強い種類（マラリア原虫やイソスポーラなど）と、複数の動物種に寄生し、人畜共通の感染症を起す種類（赤痢アメーバやクリプトスポリジウムなど）がある。病原性は致死感染や重篤な症状を起すものから、無症状の非病原性のものまでさまざまである。消化管に寄生する原虫は、飲料水や食物を介して経口的に人体に侵入する。感染型は原虫の種類により異なるが、被囊したシストやオーシスト、孢子（spore）などがある。赤痢アメーバやランブル鞭毛虫などはシストを、コクシジウム類はオーシストを、微孢子虫類は孢子を形成する。血液や組織に寄生する原虫の多くは特定の吸血昆虫やマダニの腸管で増殖し、これらを媒介者として人体に感染する。

[0025] ネオスポラ原虫（*Neospora caninum*）は犬科動物を終宿主とし、牛・羊・山羊、鹿などを中間宿主とする細胞内寄生性原虫である。ネオスポラ原虫は、終宿主の糞便中に排出されるオーシストによる水平感染や中間宿主を介した垂直感染により伝搬される。ネオスポラ原虫は、宿主の上皮細胞、脳脊髄液中の単核細胞、神経細胞の細胞内に寄生し、特に牛では流産、死産或いは子牛の神経症状を主徴とする異常産を高率に引き起こす。イヌでは多発性筋炎、上行性麻痺を引き起こす。治療にはサルファ剤、エリロマイシン、ドキ

シサイクリン、クリンダマイシンが用いられるが、効果的な予防法は確立されていない。

[0026] ネオスポラ原虫感染に対して、ネオスポラ原虫自体やこれに由来する可溶性タンパク質MIC1, MIC3, GRA2, GRA6, SAG1, SRS2等を用いたワクチンの開発も進められているが、十分な効果が得られていない。

[0027] 2. Dense Granule Protein 7 (GRA7) 及びApical membrane antigen 1 (AMA1)

本発明においては、免疫応答を引き起こすオスポラ原虫由来の可溶性タンパク質として、Dense Granule Protein 7 (GRA7) とApical membrane antigen 1 (AMA1) を用いる。

[0028] GRA7は、ネオスポラ原虫の細胞小器官dense granuleに存在する抗原分子で、GRA7のほか、NcGRA7あるいはNcDG1と称されることもある。ネオスポラ原虫GRA7のアミノ酸配列や、これをコードする遺伝子配列はすでに公知であり、それぞれ公共のデータベースであるGenBankにU82229として登録されている。

[0029] AMA1もまた、ネオスポラ原虫の頂端部に存在する抗原分子で、AMA1あるいはNcAMA1と称される。ネオスポラ原虫AMA1のアミノ酸配列や、これをコードする遺伝子配列はすでに公知であり、それぞれ公共のデータベースであるGenBankにAB265823として登録されている。

[0030] 本発明で用いられるGRA7やAMA1は、構成されるアミノ酸配列中の疎水性領域を除いた領域やシグナル配列を除いた領域でもよく、開始コドンから終止コドン内のアミノ酸配列を使用すれば、アミノ酸の長さは限定されない。

[0031] 配列番号1にネオスポラ原虫GRA7のアミノ酸配列を、また配列番号2にネオスポラ原虫AMA1のアミノ酸配列を示す。しかしながら、配列番号1あるいは配列番号2に示されるアミノ酸配列に限定されることなく、それが所望の免疫原性を有する限り、配列番号1あるいは配列番号2に示されるアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換あるいは付加した配列であってもよい。なお、「数個」とは、好ましくは2～7個、より好ましくは2

～5個、最も好ましくは2～3個のアミノ酸を意味する。また、アミノ酸置換は、類似するアミノ酸残基間の保存的置換が好ましく、例えば、グリシン (Gly) とプロリン (Pro)、グリシンとアラニン (Ala) たはバリン (Val)、ロイシン (Leu) とイソロイシン (Ile)、グルタミン酸 (Glu) とグルタミン (Gln)、アスパラギン酸 (Asp) とアスパラギン (Asn)、システイン (Cys) とスレオニン (Thr)、スレオニンとセリン (Ser) 又はアラニン、リジン (Lys) とアルギニン (Arg) 等のアミノ酸の間での置換を挙げることができる。

[0032] あるいはまた、それが所望の免疫原性を有する限り、配列番号1あるいは配列番号2に表されるアミノ酸配列と、BLAST等を用いて計算したときに（例えば、BLASTのデフォルトすなわち初期条件のパラメーターを用いた場合に）、少なくとも70%以上、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、特に好ましくは97%、98%若しくは99%以上の相同性を有しているタンパク質であってもよい。

[0033] すなわち、本発明にかかる「免疫学的に活性な変異体又は誘導体」には、投与された生体内においてネオスポラ原虫に対する免疫応答活性を誘導しうる（例えば抗原性、受容体結合、MHCクラスI及びクラスII分子によるペプチドの結合による複合体の形成等）限りにおいて、わずかな改変や修飾を有するRNA7やAMA1タンパク質、RNA7やAMA1と他のペプチドとの融合タンパク質等が含まれる。

[0034] 3. GRA7及びAMA1の調製

3. 1 ネオスポラ原虫からの調製 本発明で用いられるGRA7やAMA1の調製は、ネオスポラ原虫由来可溶性タンパク質を含む天然物、例えばネオスポラ原虫から一般的なカラムワークで精製を行う方法によることができ、さらに得られたネオスポラ原虫由来可溶性タンパク質の糖鎖除去部分分解、修飾等の工程を適宜追加して行ってもよい。

[0035] 3. 2 組換え生産

大腸菌などの微生物や動物細胞、植物を使用し、ネオスポラ原虫のGRA7やA

MA1遺伝子全体あるいは一部を導入・発現して組換えタンパク質を調製してもよい。

- [0036] 組換えタンパク質作製のためのベクターは、公知のベクターにGRA7やAMA1をコードする遺伝子を連結（挿入）して得ることができる。前記ベクターは宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えば、プラスミドDNA、ファージDNA等が挙げられる。前記プラスミドDNAとしては、大腸菌由来のプラスミド（例えば、pBR322, pBR325, pUC18, pUC119, pTrcHis, pBlueBacHis等）、枯草菌由来のプラスミド（例えば、pUB110, pTP5等）、酵母由来のプラスミド（例えば、YEp13, YEp24, YCp50, pYE52等）、植物細胞宿主用プラスミド（pBI221, pBI121）等が挙げられ、ファージDNAとしてはλファージ等が挙げられる。さらに、レトロウイルス又はワクシニアウイルス等の動物ウイルス、バキュロウイルス等の昆虫ウイルスベクターを用いることもできる。
- [0037] ベクターに本発明の遺伝子を挿入するには、まず、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、適当なベクターDNAの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法等が採用される。本発明の遺伝子は、その遺伝子が機能しうる態様で、宿主に応じたプロモーターに連結して導入される必要がある。ここで「機能しうる態様」とは、プロモーター活性によって、その下流に配置された本発明の遺伝子が宿主中で適切に発現され、その機能を発揮することをいう。使用されるプロモーターの種類は、宿主細胞によって適宜決定されるが、その詳細は次項で説明する。
- [0038] 本発明のベクターは、プロモーター、本発明の遺伝子のほか、所望によりエンハンサー等のシスエレメント、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、形質転換マーカー遺伝子（例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ピアラフォス耐性遺伝子、カルボキシ耐性遺伝子、フレオマイシン耐性遺伝子等）、リボソーム結合配列（SD配列）等を含んでもよい。
- [0039] 組換えタンパク質を生産するための形質転換体は、前記ベクターを適当な

宿主に導入することにより得ることができる。宿主は、本発明のGRA7やAMA1遺伝子が発現できるものであれば特に限定されない。例えば、エッシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 等のエッシェリヒア属、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) 等のバチルス属、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) 等のシュードモナス属、リゾビウム・メリロティ (*Rhizobium meliloti*) 等のリゾビウム属に属する細菌、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) 等の酵母、麴菌 (*Aspergillus oryzae*)、COS細胞、CHO細胞等の動物細胞、あるいはSf9、Sf21等の昆虫細胞等が挙げられる。

[0040] 大腸菌等の細菌を宿主とする場合は、本発明のベクターが該細菌中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、リボゾーム結合配列、本発明の遺伝子、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。大腸菌としては、例えば、エッシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) HMS174 (DE3)、K12、DH1等が挙げられ、枯草菌としては、例えば、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) M114、207-21等が挙げられる。プロモーターとしては、大腸菌等の上記宿主中で発現できるものであれば特に限定されず、例えば、trpプロモーター、lacプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーター等の、大腸菌やファージに由来するプロモーターが挙げられる。また、tacプロモーター等のように、人為的に設計改変されたプロモーターを用いてもよい。細菌へのベクターの導入方法は、特に限定されず、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Cohen, S.N. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69:2110-2114 (1972)] や、エレクトロポレーション法等が挙げることができる。

[0041] 酵母を宿主とする場合は、例えば、サッカロミセス・セレビシエ、シゾサッカロミセス・ポンベ、ピヒア・パストリス等が用いられる。プロモーターとしては、酵母中で発現できるものであれば特に限定されず、例えば、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF α 1プロモーター、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター

一、ADHプロモーター、AOX1プロモーター等を挙げることができる。酵母へのベクターの導入方法は、特に限定されず、例えば、エレクトロポレーション法[Becker, D.M. et al. : Methods. Enzymol., 194 : 182-187 (1990)]、スフェロプラスト法[Hinnen, A. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 75 : 1929-1933 (1978)]、酢酸リチウム法[Itoh, H. : J. Bacteriol., 153 : 163-168 (1983)]等を挙げることができる。

[0042] 麹菌を宿主とする場合、プロモーターとしては、例えば、GlaA プロモーター (Hata et al. Curr. Genet., Vol 22, 85-91, 1992)、AmyB プロモーター (Tuchiya et al. Biosci. Biotechnol. Biochem., Vol 46, 1849-1853, 1992)、No. 8 プロモーター (Ozeki et al. Biosci. Biotech. Biochem., Vol 60, 383-389, 1996) が挙げられる。麹菌へのベクターの導入方法は、特に限定されず、例えば、エレクトロポレーション法、カルシウムイオン法等を用いることができる。

[0043] GRA7やAMA1タンパク質は、前述の形質転換体（宿主細胞）を適当な培地で培養し、その培養物から所望のタンパク質を採取することによって得ることができる。形質転換体の培養は、常法に従って行えばよい。例えば、大腸菌や酵母等の微生物を宿主とする形質転換体の場合は、微生物が資化する炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体を効率的に培養しうる天然培地、あるいは合成培地で培養すればよい。また、植物細胞を宿主として用いている場合には、チアミン、ピリドキシン等のビタミン類を添加した植物細胞用の培地で培養すればよい。

[0044] 炭素源としては、グルコース、フラクトース、スクロース、デンプン等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類が用いられる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩又はその他の含窒素化合物のほか、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー等が用いられる。無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグ

ネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が用いられる。

[0045] 培地中には必要に応じてアンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いたベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、Lacプロモーターを用いたベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド(IPTG)等を、trpプロモーターを用いたベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸(IAA)等を培地に添加してもよい。

[0046] 培養は、通常、振盪培養又は通気攪拌培養等の好氣的条件下、30~37°C位で6時間~3日間程度行う。培養期間中、pHは7.0~7.5程度に保持する。pHの調整は、無機又は有機酸、アルカリ溶液等を用いて行う。培養後、本発明のタンパク質が菌体内又は細胞内に生産される場合には、菌体又は細胞を破碎することにより該タンパク質を抽出する。また、本発明のタンパク質が菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去する。その後、タンパク質の単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えば、硫酸アンモニウム沈殿、SDS-PAGE、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独で又は適宜組み合わせるにより、前記培養物中から本発明のタンパク質を単離精製することができる。

[0047] 上記した方法のほか、GRA7やAMA1の部分配列や、T細胞エピトープを含むペプチド断片をタンパク質工学的に、或いはペプチド合成により作製してもよい。

[0048] 4. リポソーム

4. 1 リポソーム構成脂質

本発明で用いられるリポソームを構成する脂質は、リポソームを構成することが知られている通常の脂質であればよく、例えば、卵黄、大豆、又はそ

の他の動植物などの天然物由来の脂質やこれらを水素添加によって不飽和度を低下したもの、あるいは化学合成したものが挙げられ、これらを単独で又は複数組み合わせる使用することができる。

[0049] 後述するように、オリゴ糖導入では、リン脂質上のアミノ基とオリゴ糖の有するアルデヒド基を反応させるため、本発明で用いるリン脂質としてはアミノ基を有するものが好ましく、これらを単独で、又は二種以上組合せて使用できる。これらのリン脂質は1位、2位の2つの脂肪酸残基は任意に選択することができ、その脂肪酸残基は天然物由来又は合成物由来のいずれのものでもよく、混合脂肪酸、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、重合性脂肪酸などに由来する炭素数4～30の脂肪酸残基を利用できる。飽和脂肪酸としては炭素数12～24のものが好ましく、例えばラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸などがあげられる。また不飽和脂肪酸としては炭素数14～22、不飽和結合1～6のものが好ましく、例えばオレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキドン酸などがあげられる。このようなアミノ基を有するリン脂質の中では、天然物由来のものとしては卵黄又は大豆由来のリン脂質が好ましい。好適な例としては、例えばホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン又はホスファチジルスレオニン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルコリンなどがあげられる。

[0050] リポソームの膜構成成分（膜形成成分）としては、糖鎖の導入が可能な限り、アミノ基を有するリン脂質の他にもリポソームを形成しうる他の化合物も使用でき、例えば大豆レシチン、卵黄レシチン、ホスファチジルグリセロール、その他のリン脂質類、コレステロール、脂肪酸、脂肪酸塩など、従来からリポソームの膜構成成分として用いられているものが使用できる。

[0051] 具体的には、コレステロール（Chol）、 3β -[N-(ジメチルアミノエタン)カルバモイル]コレステロール（DC-Chol）、N-(トリメチルアンモニオエチル)カルバモイルコレステロール（TC-Chol）などのステロール類；ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（D

PPE)、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DSPE)などのホスファチジルエタノールアミン類;ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)などのホスファチジルコリン類;ジパルミトイルホスファチジルセリン(DPPS)、ジステアロイルホスファチジルセリン(DSPS)などのホスファチジルセリン類;ジパルミトイルホスファチジン酸(DPPA)、ジステアロイルホスファチジン酸(DSPA)などのホスファチジン酸類等が挙げられる。

[0052] リポソームは、多層タイプであっても、単層タイプであってもよい。本発明において用いられるリポソームの粒径は特に限定されないが、0.1~3 μm 、好ましくは0.2~2.5 μm である。リポソームの粒径が上記上限値を超えると、ゲル化してしまい、ワクチンとして使用できないからである。リポソームの粒径は、用いられる投与形態に応じて常法に従い、例えば所望の孔サイズのフィルターにより濾過することにより、調整することができる。

[0053] 4. 2 リポソーム表面のオリゴ糖

本発明で用いるリポソームは、その表面に抗原提示細胞表面の糖鎖認識分子に結合可能なオリゴ糖を有する。ここで、「抗原提示細胞」とは、マクロファージ、樹状細胞等を意味する。抗原提示細胞の表面には、Fcレセプターや補体レセプター、スカベンジャーレセプター、マンノース・レセプター、リポ多糖(LPS)レセプター、補体レセプターでもあるCD11b/CD18(CR3)、Toll様レセプターなどが存在し、糖鎖を介する細菌などの貪食や、外来異物中の糖蛋白質の取り込みと抗原提示に直接的あるいは間接的に重要な役割を果たしている。本発明にかかる「抗原提示細胞表面の糖鎖認識分子」とは、前述したような抗原提示細胞表面に存在する糖鎖結合性のレクチン様の性質を有する分子全般を意味しており、その好適な例としてマンノース・レセプターを挙げることができる。

[0054] リポソーム表面のオリゴ糖は、上述の抗原提示細胞表面の糖鎖認識分子と

結合可能なものであれば特に限定されず、構成する糖残基としては、D-マンノース (D-Man)、L-フコース (L-Fuc)、D-アセチルグルコサミン (D-GlcNAc)、D-グルコース (D-Glc)、D-ガラクトース (D-Gal)、D-アセチルガラクトサミン (D-GalNAc)、D-ラムノース (D-Rha) などが挙げられる。オリゴ糖は、D-マンノースを含む糖残基から成るハイマンノースタイプであることが好ましく、なかでもD-マンノースから成るものやD-マンノースとD-アセチルグルコサミンとからなるものが好ましく、特にD-マンノースのみから成るものが最も好ましい。D-マンノースから成るオリゴ糖としては、マンノビオース (Man₂)、マンノトリオース (Man₃)、マンノテトラオース (Man₄)、マンノペンタオース (Man₅)、マンノヘキサオース (Man₆)、マンノヘプタオース (Man₇) を挙げるができる。

[0055] オリゴ糖を構成する各糖残基の結合は特に限定されず、 α 1→2 結合、 α 1→3 結合、 α 1→4 結合、 α 1→6 結合、 β 1→4 結合等を挙げるができる。また、各糖残基は1つずつ直鎖状に結合していてもよいし、枝分かれ構造であってもよい。

[0056] オリゴ糖を構成する糖残基の数は2～11個が好ましく、特に3～11個、なかでも3～5個程度がもっとも好ましい。

[0057] リポソームの量に対するオリゴ糖の量はオリゴ糖の種類、封入しようとするネオスポラ原虫由来可溶性タンパク質の種類、リポソームの組合せ構造等により異なるが、一般に、リポソームを構成する脂質 1 mg に対して 0.5 μ g～500 μ g である。

[0058] リポソームへのオリゴ糖の導入は、上記オリゴ糖と脂質を結合して調製した人工糖脂質を用いて行うことができる。人工糖脂質は、オリゴ糖の有するアルデヒド基を、アミノ基を有するリン脂質と反応させてシッフ塩基を形成し、次にこのシッフ塩基を、常法に従い還元、好ましくは化学還元、例えば NaBH₃CN により還元することにより、オリゴ糖と脂質とを結合して調製できる (水落次男、糖質工学、224-232頁、1992)。次いで、こ

の人工糖脂質を利用して、リポソームにオリゴ糖を導入する。人工糖脂質が水溶性で有機溶剤に十分溶解しない場合（例えば、人工糖脂質として前記のRNとDPPEとの結合物（RN-DPPE）を用いるとき）には、これら（RN-DPPE）の水性溶液を調製し、これをポソームと混合して、例えば4℃ないし80℃（好ましくは内封物質が変性しない温度）、室温もしくは相転移温度において0.5～120時間、例えば約24時間インキュベーションする。人工糖脂質が有機溶剤に溶解する場合には、人工糖脂質をリポソーム構成用脂質と共に、リポソーム製造過程において有機溶剤に溶解し、常法に従いリポソームを形成すればよい。なお、リポソーム表面へのオリゴ糖の結合は、抗原提示細胞表面に存在する糖鎖認識分子あるいはその一部を添加してリポソームの凝集反応が生じるか否かで調べればよい。

[0059] 4. 3 リポソームの製剤化

本発明のリポソーム製剤は、上記リポソームに前述したGRA7あるいはAMA1タンパク質を内封して製造される。内封されるGRA7あるいはAMA1タンパク質の量は、特に限定されず、投与経路に応じて適宜調節可能であるが、一般的にリポソームに用いる脂質1mgに対して0.1μg～500μgであることが望ましい。

[0060] 5. ワクチン製剤

本発明のワクチン製剤は、本発明のリポソーム製剤に製薬上許容しうる担体を適宜加えて、溶液又は懸濁液のいずれかの形態で、投与可能に調製される。本発明のワクチン製剤には、薬学的に受容可能であって、活性成分に適合した賦形剤がしばしば混合される。適切な賦形剤には、例えば、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、及びそれらの混合物が挙げられる。さらに、所望に応じて、ワクチンは、少量の補助剤（例えば加湿剤又は乳化剤）、pH緩衝剤、及び/又はワクチンの効能を高めるアジュバントを含有し得る。有効であり得るアジュバントの例は、限定されないが、例えば以下を包含する。水酸化アルミニウム、N-アセチルムラミル-L-トレオニル-D-イソグルタミン（thr-MDP）、N-アセチル

ーノルムラミルーLーアラニルーDーイソグルタミン（CGP 11637、nor-MDPと称せられる）、NーアセチルムラミルーLーアラニルーDーイソグルタミニルーLーアラニンー2ー（1'ー2'ージパルミトイルーsnーグリセロー3ーヒドロキシホスホリルオキシ）ーエチルアミン（CGP 19835A、MTP-PEと称せられる）、及びRIBI。RIBIは、バクテリアから抽出した3成分、すなわちモノホスホリルリピドA、トレハロースジミコレート、及び細胞壁骨格（HPL+TDM+CWS）を2%スクアレン/Tween（登録商標）80エマルジョン中に含有している。アジュバントの効能は、GRA7やAMA1から構成されるワクチンを投与することにより生じる、抗体の量を測定することにより決定され得る。

[0061] 本発明のワクチン製剤は、通常皮下注射、静脈内注射又は筋肉注射のような、注射により投与される。他の投与態様に適切な別の処方としては、坐薬、及びある場合には経口、経鼻処方薬が挙げられる。

[0062] 所望により、アジュバント活性を有する1以上の化合物を加えることができる。アジュバントは、該免疫系の非特異的刺激因子である。それらは、ワクチンに対する宿主の免疫応答を増強する。当技術分野で公知のアジュバントの具体例としては、フロイント完全及び不完全アジュバント、ビタミンE、非イオンブロック重合体、ムラミルジペプチド、サポニン、鉱油、植物油及びCarbopolが挙げられる。粘膜適用に特に適したアジュバントとしては、例えば、大腸菌（E. coli）易熱性毒素（LT）又はコレラ（Cholera）毒素（CT）が挙げられる。他の適当なアジュバントとしては、例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム又は酸化アルミニウム、油性乳剤（例えば、Bayol（登録商標）又はMarcol 52（登録商標）のもの）、サポニン又はビタミンEソリュビリゼートが挙げられる。したがって、好ましい形態においては、本発明のワクチンはアジュバントを含む。

[0063] 例えば、皮下、皮内、筋肉内、静脈内に投与する注射剤において、本発明のワクチンと製薬上許容される担体又は希釈剤の他の具体例には、安定化剤、炭水化物（例えば、ソルビトール、マンニトール、デンプン、ショ糖、グ

ルコース、デキストラン)、アルブミン又はカゼインなどのタンパク質、ウシ血清又は脱脂乳などのタンパク質含有物質、及びバッファー(例えば、リン酸バッファー)などともに投与することができる。

[0064] 投与されるべき量は、通常投与当たり抗原を0.01 μ gから100,000 μ gまでの範囲であり、これは、処置される対象(例えば牛、羊、山羊、鹿、犬などの哺乳動物)、その対象の免疫系での抗体合成能、及び所望の防御の程度に依存し、経口、皮下、経鼻、皮内、筋肉内、静脈内投与経路などの投与経路にも依存する。

[0065] 本発明のワクチン製剤は、単独投与スケジュールで、又は好ましくは複合投与スケジュールで与えられ得る。複合投与スケジュールでは、接種の開始時期に1~10の個別の投与を行い、続いて免疫応答を維持する及び又は強化するのに必要とされる時間間隔で、例えば2回目の投与として1~4ヵ月後に、別の投与を行い得る。必要であれば、数ヶ月後に引続き投与を行い得る。投与のレジメもまた、少なくとも部分的には、個体の必要性により決定され、医師の判断に依存する。

[0066] さらに本発明のワクチンは、新たなネオスポラ原虫感染に対し、予防的に使用してもよい。さらにまた、ネオスポラ原虫に感染した対象に投与し、生体内にネオスポラ原虫に対する強い免疫反応を誘導することにより、ネオスポラ原虫を排除する治療的ワクチンとして使用してもよい。

[0067] 本発明のワクチンは、ネオスポラ原虫に感染した対象に投与され、GRA7あるいはAMA1タンパク質に対する免疫応答を誘導し、ネオスポラ原虫感染を予防する。

実施例

[0068] 以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

[0069] 実施例1: ネオスポラ原虫由来可溶性タンパク質の調製

GRA7、AMA1、SRS2遺伝子(それぞれ、GenBank ID U82229、AB265823、U93870)をネオスポラ原虫からクローニングし、その遺伝子を基に大腸菌にてg

lutathione S-transferase (GST)と融合した組換えタンパク質を発現させた。得られた組換えタンパク質は、Glutathione Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech社製)を用いて精製した。さらに、Detoxi-Gel™ Endotoxin Removing Gel (Pierce社製)を用いて、精製した組換えタンパク質からエンドトキシンを除去した。

[0070] 実施例2：人工糖脂質の調製

Man α 1 \rightarrow 6 (Man α 1 \rightarrow 3) Man という構造を有するマンノトリオース (Man 3) 2. 5 \sim 5 mg に 600 μ l の蒸留水を加えて攪拌溶解してオリゴ糖溶液を調製した。他方、クロロホルム/メタノール (1 : 1 体積比) 混合液に DPPE を 5 mg / ml の濃度で溶解して DPPE 溶液を調製した。また、メタノールに、NaBH₃CN を 10 mg / ml の濃度に溶解して NaBH₃CN 溶液を調製した。前記オリゴ糖溶液 600 μ l に前記 DPPE 溶液 9. 4 ml 及び前記 NaBH₃CN 溶液 1 ml を加えて攪拌混合した。この反応混合液を 60 $^{\circ}$ C にて 16 時間インキュベートし、人工糖脂質を生成せしめた。この反応混合液をシリカゲルカラム及び C18 逆相カラムにより精製することにより人工糖脂質 M3-DPPE を得た。

[0071] 実施例3：ネオスポラ原虫由来可溶性タンパク質封入リポソームの調製

コレステロール、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、実施例2で作製したマンノトリオースジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (M3-DPPE) をモル比で 10 : 10 : 1、あるいは、コレステロール、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) をモル比 1 : 1 で混合し、クロロホルム 2 ml に溶解し、10 ml のナシフラスコ内で脂質フィルムを作製した。次に脂質フィルムに 3. 75 mg / ml の実施例1で得られたネオスポラ原虫由来可溶性タンパク質 (含量 0. 5 mg / ml) を加え、40 $^{\circ}$ C の水槽で Vortex にて、リポソームを作製した。次にこのリポソームを整粒装置のエクストルーダーを用いて、1 μ m のフィルターに 0. 2 \sim 1 MPa の範囲で加圧しながら 5 回整粒を行った。次にリポソーム液を遠心法にて回収後、PBS (-) で 3 回懸濁、遠心、上清除去する

ことでリポソームに封入されなかった抗原を除去した。得られたリポソームの分析は、コレステロール量、ネオスポラ原虫由来可溶性タンパク質の測定をそれぞれ市販のキット、コレステロールEテストワコー（和光純薬、439-17501）、Modified Lowry Protein Assay Reagent Kit（Pierce、23240）を用いて行った。

[0072] 実施例4：ネオスポラ原虫由来可溶性タンパク質封入リポソームのワクチン効果の検証

以下の実施例で使用されているリポソーム封入体の略記について、「M3-GST」とは実施例1の様に作製したGSTタンパク質を封入したオリゴ糖（Man3）を表面に持つリポソームであることを示し、「M3-GRA7」とは実施例1の様に作製したGRA7タンパク質を封入したオリゴ糖（Man3）を表面に持つリポソームであることを示し、「M3-AMA1」とは実施例1の様に作製したAMA-1タンパク質を封入したオリゴ糖（Man3）を表面に持つリポソームであることを示し、「M3-SRS2」とは実施例1の様に作製したSRS2タンパク質を封入したオリゴ糖（Man3）を表面に持つリポソームであることを示す。また、「PBS」とはリン酸緩衝液であることを示し、「GRA7」とはリポソームに封入していない実施例1の様に作製したGRA7タンパク質であることを示し、「AMA1」とはリポソームに封入していない実施例1の様に作製したAMA1タンパク質であることを示す。

[0073] ネオスポラ原虫由来可溶性タンパク質封入リポソーム（タンパク量で40 nmol）、各種タンパク質（タンパク量で40 nmol）及びPBSをBALB/cマウス（6週齢、メス）に1週間間隔で3回皮下投与した。3回目の投与から1週後に、オスのBALB/cマウス（9週齢）と交配させた。妊娠10日目にネオスポラ原虫（tachyzoite）を100,000個、腹腔内接種した。新生マウスの出生数を計測し、生後30日間の新生マウスの生存率（図1）と生存曲線（図2）を計測した。さらに、生後30日目に母マウスから脳を回収し、PCR法によりネオスポラ原虫の感染の有無について解析した（図3）。上記の実験は3

回実施し、1回目の実験をtrial 1、2回目の実験をtrial 2、3回目の実験をtrial 3と示す。

[0074] 各実験群の一腹あたりの出生数と免疫及び感染をさせていない群の出生数(8.3±1.5匹)を比較したところ、有為な差は見られなかった(図1、Student's t-test、 $P<0.01$ で判定)。この結果は、リポソームあるいはタンパク質投与により、マウスの出生数には影響を与えなかったことを示している。

[0075] 各実験群の新生マウスの30日間生存率をPBS投与群の結果と比較したところ、M3-GRA7投与群とM3-AMA1投与群において、新生マウスの生存率の上昇が認められた(図1、chi-test、 $P<0.01$ で判定)。また、trial 1、trial 2、trial 3の実験結果を総合して各実験群の新生マウスの30日間生存曲線を作成したところ、M3-GRA7投与群とM3-AMA1投与群において生後12日目から17日目の間で新生マウスが死亡する傾向にあるのに対し、その他の投与群では生後10日目から22日目の間で新生マウスの死亡の傾向が認められた(図2)。この結果は、GRA7タンパク質あるいはAMA1タンパク質を封入したオリゴ糖リポソームの投与は、ネオスポラ原虫の垂直感染を防御できることを示している。

[0076] 各実験群の母親マウスにおけるネオスポラ原虫感染率をPBS投与群の結果と比較したところ、M3-GRA7投与群とM3-AMA1投与群において、感染率の低下が認められた(図3、chi-test、 $P<0.01$ で判定)。さらに、M3-GRA7投与が最も効果的にネオスポラ原虫の感染を抑制することが明らかとなった。

[0077] 図1、図2、及び図3で得られた結果より、M3-GSTあるいはM3-SRS2投与群においてワクチン効果がみられなかったことから、リポソームとネオスポラ由来のすべての抗原あるいは異種抗原との組み合わせでワクチン効果は誘導できないことが明らかとなった。このことは、リポソームと最適な抗原(例えばGRA7あるいはAMA1)の組み合わせがワクチン効果を誘導するのに重要であることを示している。

[0078] 実施例5：マウスにおけるオリゴ糖リポソーム処置によるネオスポラ原虫特

異的抗体産生

ネオスポラ原虫由来可溶性タンパク質封入リポソーム(タンパク量で40 nmol)、各種タンパク質(タンパク量で40 nmol)及びPBSをBALB/cマウス(6週齢、メス)に1週間間隔で3回皮下投与した。初回投与前、初回投与後7、14、21日目に採血し、血漿を得た。各実験群に用いた同一タンパク質を抗原(図4)あるいはネオスポラ原虫可溶性抗原を抗原(図5、Student's t-test、 $P < 0.01$ で判定)としたELISA法により、抗原特異的なIgG、IgG1、IgG2a抗体を測定した。図4におけるPBS投与群には、GSTを抗原として抗体産生を測定した。

[0079] GRA7投与群において、初回免疫後14日からGRA7特異的IgG、IgG1、IgG2a抗体の産生が認められた。M3-GRA7投与群においては、GRA7投与群と比較して、GRA7特異的IgG、IgG1、IgG2a抗体の産生に僅かな増加傾向が見られた。AMA1投与群において、初回免疫後21日からAMA1特異的IgG、IgG1、IgG2a抗体の産生が認められた。M3-AMA1投与群においては、初回免疫後14日からAMA1特異的IgG、IgG1、IgG2a抗体の産生が認められ、AMA1投与群と比較しても抗体産生が亢進していた。この結果は、ネオスポラ原虫可溶性タンパク質をリポソームに封入して免疫することで、封入抗原に対する特異抗体の産生を促進できることが明らかとなった。

[0080] 次にネオスポラ原虫可溶性抗原に対する抗体産生について解析した。GRA7投与群において、初回免疫後7日と14日でネオスポラ原虫可溶性抗原特異的IgGおよびIgG1抗体の産生が認められた。M3-GRA7投与群においては、初回免疫後21日でGRA7投与群と同じレベルのネオスポラ原虫可溶性抗原特異的IgG、IgG1抗体の産生が確認された。IgG2a抗体の産生は、GRA7投与群に比べM3-GRA7投与群で有意な産生が見られた。AMA1投与群において、ネオスポラ原虫可溶性抗原特異的抗体の有意な産生は認められなかった。M3-AMA1投与群においては、初回免疫後21日でネオスポラ原虫可溶性抗原特異的IgG、IgG1、IgG2a抗体の産生が認められた。この結果は、ネオスポラ原虫可溶性タンパク質をリポソームに封入して免疫することで、ネオスポラに存在する封入抗原

と同一のタンパク質に対する特異抗体の産生を促進でき、ネオスポラに対する液性免疫（IgG1抗体産生が指標）と細胞性免疫（IgG2a抗体産生が指標）を誘導できることが示された。抗原をリポソームに封入しない場合はIgG2a抗体の誘導効率が低いことから、リポソーム封入により効果的にIgG2a抗体の産生を促し、封入抗原特異的な細胞性免疫を誘導できることが示唆された。

[0081] 実施例6：マウスにおけるオリゴ糖リポソーム処置によるネオスポラ原虫特異的脾臓細胞の反応

ネオスポラ原虫由来可溶性タンパク質封入リポソーム（タンパク量で40 nmol）、各種タンパク質（タンパク量で40 nmol）及びPBSをBALB/cマウス（6週齢、メス）に1週間間隔で3回皮下投与した。最終投与後1週目に脾臓を摘出・ホモジネートし、脾細胞懸濁液を調製した（ 5×10^6 cells/ml、RPMI 1640 medium）。各個体の脾細胞懸濁液は、ネオスポラ原虫可溶性抗原（NLA、終濃度 $50 \mu\text{g/ml}$ ）、AMA1（終濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ ）、GRA7（終濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ ）存在下あるいは未刺激の条件（medium）にて、CO₂インキュベータ内にて48時間の培養を行い、培養上清を回収した。回収した培養上清中のインターフェロンガンマ（IFN- γ 、Th1反応指標）とインターロイキン（IL）-4（IL-4、Th2反応指標）をEIA法により測定した（図6、Student's t-test、 $P < 0.01$ で判定）。

[0082] 脾細胞のIFN- γ 産生量を測定した結果、M3-GRA7投与群の脾細胞はNLAとGRA7の刺激に反応しIFN- γ を産生した。この産生量は、GRA7投与群の脾細胞のIFN- γ 産生量と比較しても高いレベルであった。M3-AMA1投与群の脾細胞はNLAとAMA1の刺激に反応しIFN- γ を産生した。この産生量は、AMA1投与群の脾細胞のIFN- γ 産生量と比較しても高いレベルであった。M3-GRA7投与群の脾細胞とM3-AMA1投与群の脾細胞のIFN- γ 産生は、未刺激あるいは異種抗原の刺激では認められなかった。

[0083] 脾細胞のIL-4産生量を測定した結果、M3-GRA7投与群の脾細胞はNLAとGRA7の刺激に反応しIL-4を産生した。この産生量は、GRA7投与群の脾細胞のIL-4産生量と比較しても高いレベルであった。M3-AMA1投与群の脾細胞は、AMA1投

与群の脾細胞と比べてAMA1の刺激に反応し高いレベルのIL-4産生を示した。M3-GRA7投与群の脾細胞とM3-AMA1投与群の脾細胞のIL-4産生は、未刺激あるいは異種抗原の刺激では極めて低いレベルであった。しかしながら、本実験で測定されたIL-4の産生量は50 pg/ml以下であり、IL-4産生の誘導効率は低いと判定できる。

[0084] 各実験群の脾細胞における未刺激条件のIL-4産生量とIFN- γ 産生の結果を考慮すると、M3-GRA7投与群の脾細胞とM3-AMA1投与群の脾細胞はネオスポラ原虫の刺激に対しTh1反応を呈することが明らかとなった。

[0085] これらのことから、ネオスポラ原虫可溶性タンパク質であるGRA7あるいはAMA1を封入したオリゴ糖リポソームは、皮下投与によりネオスポラ原虫特異的な抗体産生とTh1反応を誘導し、当該原虫の脳への伝播及び垂直感染を防御できることが明らかとなった。したがって、本発明のネオスポラ原虫可溶性タンパク質を封入したオリゴ糖リポソームは、ネオスポラ原虫感染症に対する効果的なワクチンとして使用できることを確認した。また、本発明で提供されるワクチン製剤は、周産期における安全性も確認された。

[0086] 本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

産業上の利用可能性

[0087] 本発明によれば、安全で高い予防効果を有するネオスポラ原虫感染症に対するワクチン製剤が提供される。本発明にかかるワクチン製剤は、ワクチン接種した個体だけでなく、胎児への原虫の垂直感染も予防することができ、ネオスポラ原虫感染が深刻な畜産業界等において有用である。

請求の範囲

- [請求項1] ネオスポラ原虫由来のDense granule protein 7又はApical membrane antigen 1あるいはその免疫学的に活性な変異体又は誘導体を、抗原提示細胞表面の糖鎖認識分子に結合しうるオリゴ糖を表面に有するリポソームに封入してなるリポソーム製剤。
- [請求項2] Dense granule protein 7あるいはその免疫学的に活性な変異体又は誘導体が、
- (a) 配列番号1に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質、あるいは
 - (b) 配列番号1に示されるアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、ネオスポラ原虫に対する免疫応答を誘導しうるタンパク質である、請求項1に記載のリポソーム製剤。
- [請求項3] Apical membrane antigen 1あるいはその免疫学的に活性な変異体又は誘導体が、
- (c) 配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質、あるいは
 - (d) 配列番号2に示されるアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、ネオスポラ原虫に対する免疫応答を誘導しうるタンパク質である、請求項1に記載のリポソーム製剤。
- [請求項4] 前記抗原提示細胞表面の糖鎖認識分子がマンノース・レセプターである、請求項1～3のいずれか1項に記載のリポソーム製剤。
- [請求項5] 前記オリゴ糖が2～11の糖残基からなる、請求項1～4のいずれか1項に記載のリポソーム製剤。
- [請求項6] 前記オリゴ糖が3～5の糖残基からなる、請求項1～5のいずれか1項に記載のリポソーム製剤。
- [請求項7] 前記オリゴ糖が2以上のマンノース糖残基を含むものである、請求

項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載のリポソーム製剤。

[請求項8] 請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載のリポソーム製剤と製薬上許容しうる担体を含む、ネオスポラ原虫感染症に対するワクチン製剤。

[請求項9] 皮下、皮内、経口又は経鼻投与されるものである、請求項 8 に記載のワクチン製剤。

[図1]

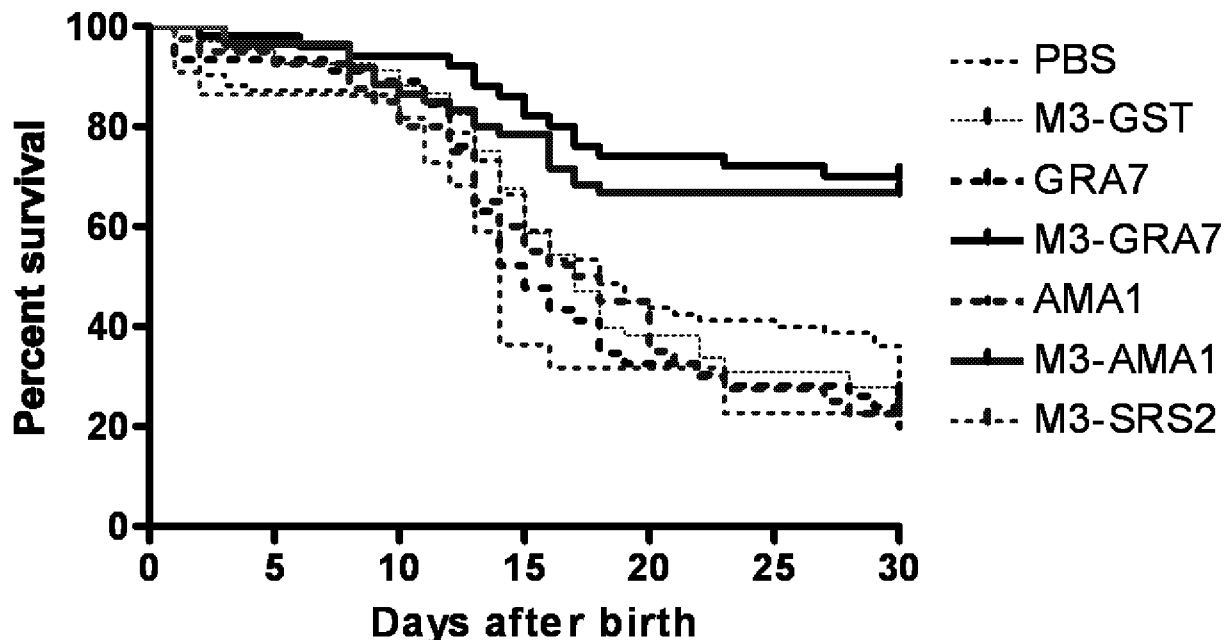
新生マウスの出生数と生後30日間の生存率

実験群	実験	妊娠 マウス数	一腹あたりの出生数 (標準偏差)	一腹あたりの 新生マウスの 30日間生存数	新生マウスの 30日間生存率
PBS	Trial 1	4	6.8 (2.6)	2/3, 2/7, 0/8, 2/9	6/27 (22.2%)
	Trial 2	5	7.2 (2.2)	1/5, 0/8, 0/10, 4/8, 0/5	5/36 (13.4%)
	Trial 3	4	7.8 (1.0)	2/7, 2/7, 4/9, 7/8	15/31 (48.4%)
	Total	13	7.2 (1.9)		26/94 (27.7%)
M3-GST	Trial 1	4	6.8 (1.7)	0/7, 3/6, 1/9, 3/5	7/27 (25.9%)
	Trial 2	5	6.4 (1.3)	0/7, 3/5, 0/7, 1/8, 0/5	4/32 (12.5%)
	Trial 3	2	4.5 (3.5)	2/2, 5/7	7/9 (77.7%)
	Total	11	6.2 (1.9)		18/98 (26.5%)
GRA7	Trial 2	4	6.3 (2.6)	2/8, 0/9, 1/4, 0/4	3/25 (12.0%)
	Trial 3	3	7.3 (2.1)	4/8, 3/5, 1/9	8/22 (36.4%)
	Total	7	6.7 (2.3)		11/47 (23.4%)
M3-GRA7	Trial 1	4	6.5 (1.3)	5/7, 8/8, 3/6, 3/5	19/26 (73.1%)
	Trial 2	5	5.0 (2.6)	2/4, 0/2, 5/6, 7/9, 2/4	16/25 (64.0%)
	Trial 3	4	7.0 (1.2)	2/8, 6/6, 8/8, 6/6	22/28 (78.6%)
	Total	13	6.1 (2.0)		57/79 (72.2%) **
AMA1	Trial 2	4	6.3 (2.5)	2/9, 0/7, 0/6, 0/3	2/25 (8.0%)
	Trial 3	2	7.5 (0.7)	3/7, 3/8	6/15 (40.0%)
	Total	6	6.7 (2.1)		8/40 (20.0%)
M3-AMA1	Trial 1	4	6.0 (2.2)	4/6, 6/8, 1/3, 4/7	15/24 (62.5%)
	Trial 2	5	5.2 (1.6)	2/7, 3/4, 1/3, 3/6, 6/6	15/26 (57.7%)
	Trial 3	2	5.0 (0)	5/5, 5/5	10/10 (100%)
	Total	9	5.1 (2.0)		40/60 (66.7%) **
M3-SRS2	Trial 1	4	5.5 (0.6)	1/5, 1/6, 0/5, 3/6	5/22 (22.7%)
	Total	4	5.5 (0.6)		5/22 (22.7%)

** $P < 0.01$

[図2]

新生マウスの生存曲線



[図3]

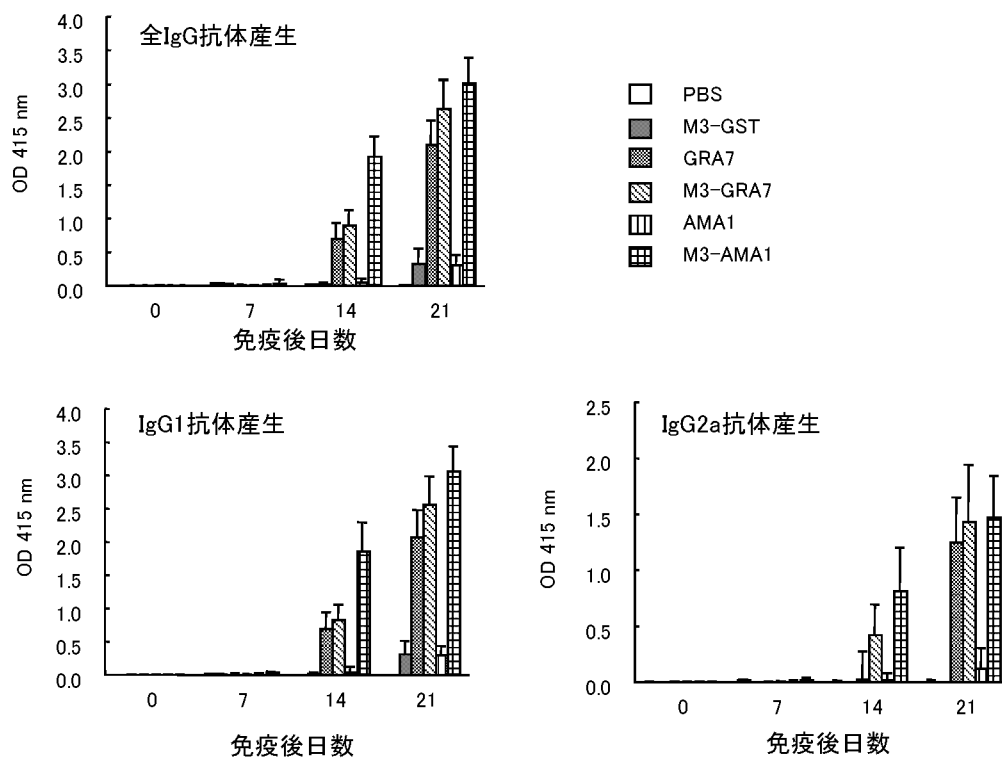
母親マウスのネオスポラ原虫感染率

実験群	実験	ネオスポラ原虫感染率
PBS	実験 1	4/4 (100%)
	実験 2	5/5 (100%)
	合計	9/9 (100%)
M3-GST	実験 1	4/4 (100%)
	実験 2	5/5 (100%)
	合計	9/9 (100%)
GRA7	実験 2	4/4 (100%)
M3-GRA7	実験 1	1/4 (25%)
	実験 2	2/5 (40%)
	合計	3/9 (33.3%) *
AMA1	実験 2	4/4 (100%)
M3-AMA1	実験 1	2/4 (50%)
	実験 2	2/5 (40%)
	合計	4/9 (44.4%) *
M3-SRS2	実験 1	4/4 (100%)

* $P < 0.01$

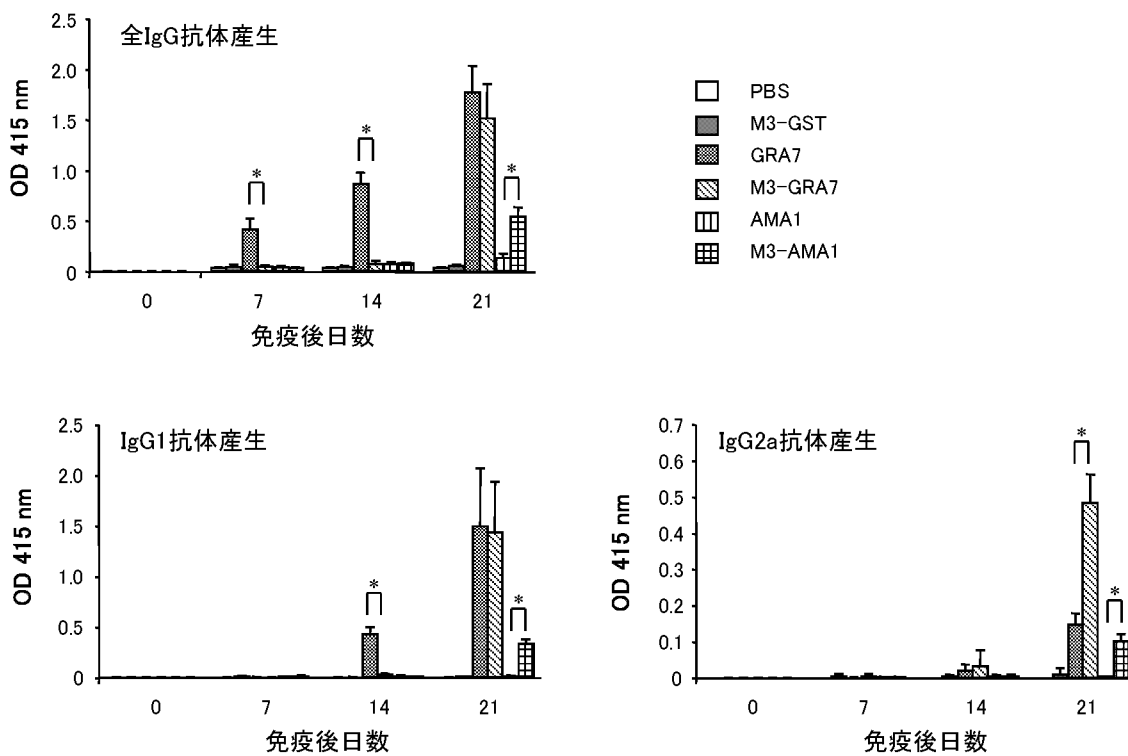
[図4]

免疫源に対する抗体産生



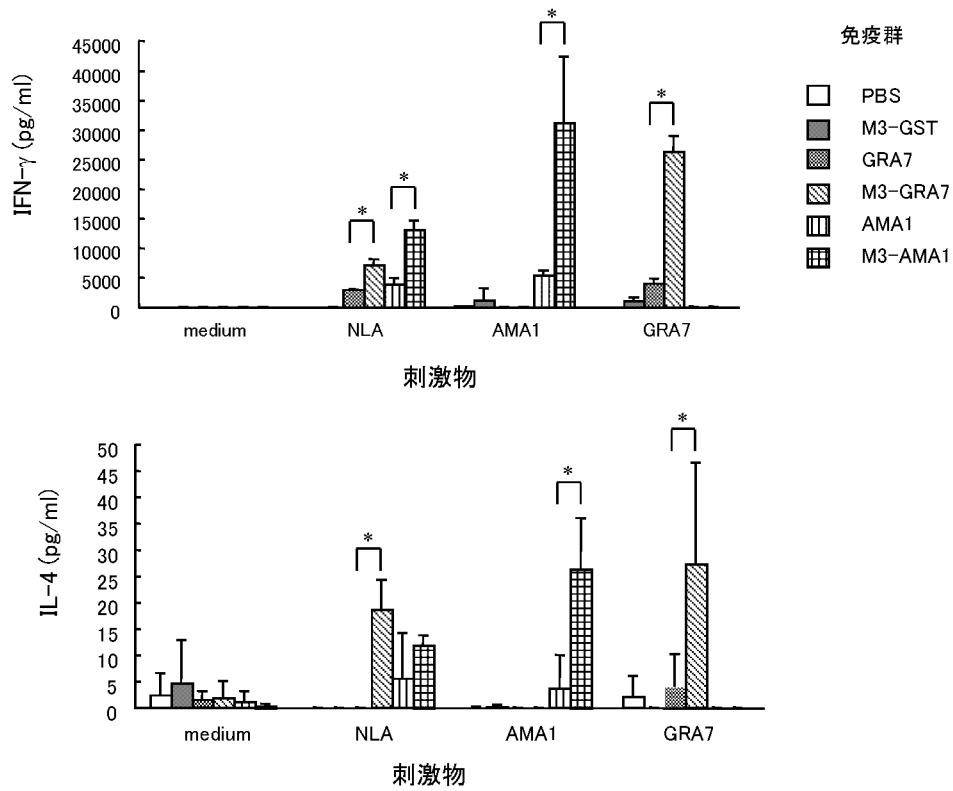
[図5]

ネオスポラに対する抗体産生



[図6]

サイトカイン産生



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/004525

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K39/002(2006.01)i, A61K9/127(2006.01)i, A61P15/06(2006.01)i, A61P33/00(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)

A61K39/002, A61K9/127, A61P15/06, A61P33/00

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	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

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

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Naoaki YOKOYAMA et al., "Genchu Kansensho ni Taisuru Oligomannose Tosa Hifuku Liposome Vaccine no Hyoka", The Japanese Society of Parasitology Taikai Program · Shorokushu, 2006, page 67, I-D-04	1-9
Y	Noritaka Kuboki et al., Preliminary evaluation of oligomannose-coated liposome vaccines against lethal protozoan infections in mice, J. Protozool. Res., 2007, Vol.17, p.9-15	1-9
Y	Kuboki N. et al., Adjuvant Effect of Oligomannose-Coated Liposome-Based Platform for Vaccine against African Trypanosomosis, J. Protozool. Res., 2008, Vol.18, p.1-10	1-9

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
06 November, 2009 (06.11.09)

Date of mailing of the international search report
17 November, 2009 (17.11.09)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/004525

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Y. SHIMIZU et al., Intraperitoneal immunization with oligomannose-coated liposome-entrapped soluble leishmanial antigen induces antigen-specific T-helper type immune response in BALB/c mice though uptake by peritoneal macrophages, <i>Parasite Immunology</i> , 2007, Vol.29, p.229-239	1-9
Y	Houshuang Zhang et al., Apical membrane antigen 1 is a cross-reactive antigen between <i>Neospora caninum</i> and <i>Toxoplasma gondii</i> , and the anti-NcAMA1 antibody inhibits host cell invasion by both parasites, <i>Molecular & Biochemical Parasitology</i> , 2007, Vol.151, p.205-212	1-9
Y	Ramesh Vemulapalli et al., Reduced cerebral infection of <i>Neospora caninum</i> in BALB/c mice vaccinated with recombinant <i>Brucella abortus</i> RB51 strains expressing <i>N.caninum</i> SRS2 and GRA7 proteins, <i>Veterinary Parasitology</i> , 2007, Vol.148, p.219-230	1-9
A	Yoshifumi NISHIKAWA et al., "Neospora Kansengyu ni Okeru Ryuzan Kanren Bunshi no Kenshutsu", <i>The Japanese Society of Veterinary Science Gakujutsu Shukai Koen Yoshishu</i> , 2008, page 186 CP4-3	1-9
P,X	Yoshifumi NISHIKAWA et al., "Oligosaccharide Liposome o Mochiita Neospora Suichoku Kansen ni Taisuru Vaccine Kaihatsu", <i>The Japanese Society of Veterinary Science Gakujutsu Shukai Koen Yoshishu</i> , 2009, page 228, CP2-1	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K39/002(2006.01)i, A61K9/127(2006.01)i, A61P15/06(2006.01)i, A61P33/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K39/002, A61K9/127, A61P15/06, A61P33/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2009年
日本国実用新案登録公報	1996-2009年
日本国登録実用新案公報	1994-2009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)

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	横山直明ら, 原虫感染症に対するオリゴマンノース糖鎖被覆リポソームワクチンの評価, 日本寄生虫学会大会プログラム・抄録集, 2006, 第67頁, I-D-04	1-9
Y	Noritaka Kuboki et al., Preliminary evaluation of oligomannose-coated liposome vaccines against lethal protozoan infections in mice, J. Protozool. Res., 2007, Vol.17, p.9-15	1-9

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、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.11.2009

国際調査報告の発送日

17.11.2009

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

松波 由美子

4C

9261

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	Kuboki N. et al., Adjuvant Effect of Oligomannose-Coated Liposome-Based Platform for Vaccine against African Trypanosomosis, J. Protozool. Res., 2008, Vol.18, p.1-10	1-9
Y	Y. SHIMIZU et al., Intraperitoneal immunization with oligomannose-coated liposome-entrapped soluble leishmanial antigen induces antigen-specific T-helper type immune response in BALB/c mice though uptake by peritoneal macrophages, Parasite Immunology, 2007, Vol.29, p.229-239	1-9
Y	Houshuang Zhang et al., Apical membrane antigen 1 is a cross-reactive antigen between Neospora caninum and Toxoplasma gondii, and the anti-NcAMA1 antibody inhibits host cell invasion by both parasites, Molecular & Biochemical Parasitology, 2007, Vol.151, p.205-212	1-9
Y	Ramesh Vemulapalli et al., Reduced cerebral infection of Neospora caninum in BALB/c mice vaccinated with recombinant Brucella abortus RB51 strains expressing N. caninum SRS2 and GRA7 proteins, Veterinary Parasitology, 2007, Vol.148, p.219-230	1-9
A	西川義文ら, ネオスポラ感染牛における流産関連分子の検出, 日本獣医学会学術集会講演要旨集, 2008, p. 186 CP4-3	1-9
P, X	西川義文ら, オリゴ糖リポソームを用いたネオスポラ垂直感染に対するワクチン開発, 日本獣医学会学術集会講演要旨集, 2009, p. 228, CP2-1	1-9