

明 細 書

発明の名称：

フィブロイン含有ナノ粒子を含む経口投与型ワクチン用組成物

技術分野

[0001] 本発明は、フィブロイン含有ナノ粒子を含む経口投与型ワクチン用組成物に関し、より詳しくは、抗原及びフィブロインを含むナノ粒子を、含む経口投与型ワクチン用組成物、又は、抗原、フィブロイン及びセリシンを、含むナノ粒子を含む経口投与型ワクチン用組成物に関する。

背景技術

[0002] 近年、家畜の多頭羽飼育環境で見られる慢性複合感染症による損害の防止やその軽減対策として、多くの抗生物質が使用されている。抗生物質の乱用により、薬剤耐性菌の出現あるいは食品中への残留による食の安全が懸念されている。これら抗生物質に代わるものとして安全で有用な動物用ワクチンの開発が進んでいる。さらに、かかるワクチン開発においては、注射剤ワクチンよりも、動物への負担と作業者の危険性を軽減できる経口ワクチンが望まれている。

[0003] また、注射によるワクチン接種では全身系における防御免疫や感作を誘導できるが、病原体の入り口である呼吸器・消化器粘膜組織を通じた防御はできず、特に感染症の場合には、感染阻止という予防の効果は低いと言われている。

[0004] さらに、注射用ワクチンを経口ワクチンに転用することは非常に困難である。なぜならば、口から投与する場合には必ず胃を通過するため、胃内における強酸下の環境やペプシン等の消化酵素により分解を受けて、抗原特異的免疫反応を的確かつ有効に誘導することはできないことが多いからである。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開2005-97229号公報

非特許文献

- [0006] 非特許文献1: Andreas S Lammellら、Biomaterials、2010年6月、31巻、16号、4583～4591ページ
非特許文献2: Zheng Zhaoら、Int J Mol Sci.、2015年3月4日、16巻、3号、4880～4903ページ
非特許文献3: Fatemeh Rezaeiら、Biomater Sci.、2021年4月7日、9巻、7号、2679～2695ページ

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 本発明は、前記従来技術の有する課題に鑑みてなされたものであり、動物に経口投与して抗原特異的な抗体産生の誘導を可能とする、ワクチン用組成物を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0008] 本発明者らは、前記課題を解決するために、絹タンパク質を経口投与型ワクチンの担体として利用することを構想した。
- [0009] なお、絹は、精練処理して外側のセリシン層を除去し、得られたフィブロイン繊維を溶かして水溶液にすることにより、パウダー、フィルム、スポンジ等に加工作ることが出来る。さらに、塩析や脱溶媒和等によって、フィブロイン水溶液からフィブロインナノ粒子を作製することも可能である。そして、かかるナノ粒子については、薬物等の送達システムの担体としての利用が試みられている（非特許文献1～3）。
- [0010] また、抗原タンパク質を発現させた遺伝子組換えカイコ産生繭を、精練せずに物理的に破碎し、その絹粉末を、フロイントの完全アジュバントと共に、マウスの皮下に注射した結果、その血中抗体価が上昇したことも報告されている（特許文献1）。
- [0011] しかしながら、本発明者らが、特許文献1に記載の方法に沿って、絹粉末を調製し、マウスに経口投与した結果、絹成分に対する抗体産生が優位に誘

導され、目的抗原に対する抗体産生を効率よく誘導することは困難であることが示唆された。

[0012] そこで、本発明者らが更に鋭意研究を重ね、精練糸を溶解したシルク溶液（フィブロインを含む溶液）又は未精練繭糸を溶解したシルク溶液（セリシン及びフィブロインを含む溶液）と、抗原タンパク質との混合液を塩析し、抗原タンパク質含有シルクナノ粒子を作製した。そして、このナノ粒子を、経口投与することで、前記抗原タンパク質に特異的な抗体産生を誘導できることを見出した。特に、前記抗体産生においては、粘膜免疫の賦活化を示す I g A と、全身免疫の賦活化を示す I g G の双方の抗原特異的な産生誘導が認められた。すなわち、前記ナノ粒子は、胃内部での胃酸や消化酵素による分解を回避し、腸管（小腸、大腸）に抗原を送達させることにより、粘膜免疫を作動させ、全身免疫も誘導できる、優れた経口ワクチンの担体であることを明らかにし、本発明を完成するに至った。

[0013] すなわち、本発明は以下の態様を提供する。

[0014] [1] 抗原及びフィブロインを含むナノ粒子を、含む経口投与型ワクチン用組成物。

[0015] [2] 前記ナノ粒子はセリシンを更に含む、[1]に記載の経口投与型ワクチン用組成物。

[0016] [3] 前記ナノ粒子は、精練された絹の溶解液と前記抗原との混合溶液から塩析されたものである、[1]に記載の経口投与型ワクチン用組成物。

[0017] [4] 前記ナノ粒子は、精練されていない絹糸の溶解液と前記抗原との混合溶液から塩析されたものである、[2]に記載の経口投与型ワクチン用組成物。

発明の効果

[0018] 本発明によれば、動物に経口投与することによって、抗原特異的な抗体産生を誘導することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]遺伝子組換えカイコ産生繭における、フィブロインL鎖（F i b L）と

卵白アルブミン（O V A）との融合タンパク質（F i b L－O V A）の発現、又は、セリシン層における遊離型のO V A（S e r－O V A）の発現を、抗O V A抗体を用いたウェスタンブロットによって、検出した結果を示す、写真である。

[図2] F i b L－O V A発現繭又はS e r－O V A発現繭の破砕物を、生理食塩水に懸濁し、経口投与したマウス血清中の抗体価を評価した結果を示す、グラフである。図中、横軸の「未精練繭糸」、「精練糸」、「セリシンホープ」及び「O V A」は、E L I S Aにおいて、未精練の繭糸の水溶液、精練した繭糸の溶解液、セリシンホープ繭（フィブロインを含まずセリシンのみを含む）の水溶液及びO V A溶液を各々コーティングしたアッセイプレートを用いた結果を示す。図中、「生食」は、コントロールとして生理食塩水のみを経口投与した試験区の結果を示す。

[図3A]未精練の繭糸の溶解液又は精練した繭糸の溶解液に、抗原タンパク質（O V A）を混合し、シルクナノ粒子を調製する工程を示す、図である。

[図3B]前記O V A含有シルクナノ粒子を走査電子顕微鏡（S E M）にて観察した結果を示す、写真である。図中、「繭糸」は未精練の繭糸の溶解液のみから調製したシルクナノ粒子の観察結果を示し、「繭糸＋10％O V A」は、当該溶解液にO V Aを混合して調製したシルクナノ粒子の観察結果を示し、「精練糸」は精練した繭糸の溶解液のみから調製したシルクナノ粒子の観察結果を示し、「精練糸＋10％O V A」は、当該溶解液にO V Aを混合して調製したシルクナノ粒子の観察結果を示す。

[図4]前記シルクナノ粒子に取り込まれたO V Aを、抗O V A抗体を用いたウェスタンブロットによって検出した結果を示す、写真である。

[図5A]前記O V A含有シルクナノ粒子を経口投与したマウス血清中のI g G量を、E L I S Aによって分析した結果を示す、グラフである。図中、横軸の「未精練繭糸」、「精練糸」、「セリシンホープ」及び「O V A」は、E L I S Aにおいて、未精練の繭糸の水溶液、精練した繭糸の溶解液、セリシンホープ繭（フィブロインを含まずセリシンのみを含む）の水溶液及びO V

A溶液を各々コーティングしたアッセイプレートを用いた結果を示す。凡例の「生食」は生理食塩水を経口投与した試験区の結果を示し、「繭」は、未精練の繭糸の溶解液のみから調製したシルクナノ粒子を経口投与した試験区の結果を示し、「繭+OVA」は、未精練の繭糸の溶解液にOVAを混合して調製したシルクナノ粒子を経口投与した試験区の結果を示し、「精練糸」は、精練した繭糸の溶解液のみから調製したシルクナノ粒子を経口投与した試験区の結果を示し、「精練糸+OVA」は、精練した繭糸の溶解液にOVAを混合して調製したシルクナノ粒子を経口投与した試験区の結果を示す。

[図5B]前記OVA含有シルクナノ粒子を経口投与したマウス血清中のIgA量を、ELISAによって分析した結果を示す、グラフである。図中の表記については、図5Aのそれらと同様である。

[図6]各種無機塩又は有機塩を溶解した水溶液を塩析に用いて調製したシルクナノ粒子を、SEMにて観察した結果を示す、写真である。図中、「精練糸」は、精練した繭糸から調製したものであることを示し、「繭」は、繭糸から精練せずに調製したものであることを示し、「-OVA」又は「+OVA」は、抗原タンパク質（OVA）を含めずに又は含めて調製したものであることを示す。左側には、塩析に用いた無機塩又は有機塩の種類を示す。各写真の下には、平均粒子径（直径、 μm ）を示し、また括弧内の数値は標準偏差（SD）を示す。なお、ここでの平均粒子径は、SEM観察1視野に存在する各粒子の最大直径（各粒子を包含する最小円の直径）から算出される平均値である。検出した粒子数は、下記2種のパターンを除き、50個以上である。（パターン1）SEM観察1視野において、計測下限未満の粒子しかない場合（図中、粒子径が $<0.34\mu\text{m}$ となっている例）、5～20個検出した。（パターン2）一視野に計測可能な粒子が50個以下しかない場合（酢酸ナトリウム：精練糸-OVA、酢酸カリウム：精練糸+OVA等）、可能な限り全ての粒子を検出した。

[図7]各種無機塩又は有機塩を溶解した水溶液を用いて調製したシルクナノ粒子に取り込まれたOVAを、抗OVA抗体を用いたウェスタンブロットによ

って検出した結果を示す、写真である。図中、「精練糸＋OVA」は、精練した繭糸の溶解液に抗原タンパク質（OVA）を含めて調製したシルクナノ粒子であることを示し、「繭＋OVA」は、繭糸から精練せず、OVAを含めて調製したシルクナノ粒子であることを示す。各レーンにおいて示す、塩析に用いた無機塩又は有機塩の種類は、以下のとおりである。また、「OVA」のレーンは、陽性対照のレーンとなる。レーンNo. 1：クエン酸三ナトリウム、レーンNo. 2：硫酸ナトリウム、レーンNo. 3：硫酸マグネシウム、レーンNo. 4：酢酸マグネシウム、レーンNo. 5：酢酸ナトリウム、レーンNo. 6：硫酸アンモニウム、レーンNo. 7：酢酸カリウム、レーンNo. 8：酒石酸ナトリウム、レーンNo. 9：クエン酸三アンモニウム。

発明を実施するための形態

[0020] 後述の実施例に示すとおり、本発明者らは、絹の溶解液（セリシン及びフィブロインを含む溶液）と抗原との混合液から作製した、抗原含有ナノ粒子を、経口投与することで、当該抗原に特異的な抗体産生を誘導できることを明らかにした。

[0021] 本発明者らはさらに、精練した絹の溶解液（フィブロインを含む溶液）と抗原との混合液から作製した、抗原含有ナノ粒子を、経口投与することで、当該抗原に特異的な抗体産生を誘導できることをも明らかにした。

[0022] よって、本発明は、抗原及びフィブロインを含むナノ粒子を、含む経口投与型ワクチン用組成物に関し、また本発明は、セリシンを更に含む前記ナノ粒子を、含む経口投与型ワクチン用組成物に関する。

[0023] <本発明にかかるナノ粒子について>

本発明において、ナノ粒子に含まれる「フィブロイン」は、フィブロインL鎖、フィブロインH鎖及びフィブロヘキサメリン（P25）からなる群から選択される少なくとも1のタンパク質又は当該タンパク質の部分ペプチドを意味する。また、本発明にかかる「フィブロイン」には、前記タンパク質の複合体も含まれる。複合体としては、例えば、天然に存在する状態（例え

ば、フィブロインL鎖及びフィブロインH鎖がジスルフィド結合したヘテロ2量体、又は、当該2量体が6分子とフィブロヘキサメリン1分子とが非共有結合で集合してなる複合体）が挙げられる。

[0024] 本発明において、「セリシン」は、セリシン1、セリシン2、セリシン3及びセリシン4からなる群から選択される少なくとも1のタンパク質又は当該タンパク質の部分ペプチドを意味する。また、本発明にかかる「セリシン」には、前記タンパク質の複合体も含まれる。複合体としては、例えば、天然に存在する状態（例えば、セリシン1、セリシン2及びセリシン3を含むセリシン層又はその断片）が挙げられる。

[0025] 本発明にかかるナノ粒子において、上記フィブロインとセリシンとは、複合体を形成して含まれていてもよい。また、フィブロイン及びセリシンは、絹に由来する天然のタンパク質であってもよく、組み換えタンパク質であってもよい。「天然のタンパク質」としては、例えば、鱗翅目昆虫（家蚕（*Bombyx*属、*mori*種）、野蚕（*Antheraea*属、*pernyi*、*yamamai*、*militta*、*assama*種等、*Philosamia*属、*cynthia ricini*種、ミノガ等）、クモ（*Araneae*目）、ハチ目又はハエ目に属する節足動物が産生するタンパク質が挙げられる。「組み換えタンパク質」は、遺伝子工学的手法により調製されるタンパク質を意味し、例えば、上述のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等の宿主細胞内で、あるいは大腸菌抽出液、ウサギ網状赤血球抽出液、小麦胚芽抽出液等の無細胞発現系で発現させることによって調製することが出来る。

[0026] 本発明において、「絹」は、上記フィブロインからなるフィブロイン繊維と、当該繊維とを包むセリシン層とからなる繊維を意味する。また、天然由来の場合には、上記節足動物が産生する繭等から調製される繊維を意味し、例えば、繭層、繭糸、生糸、絹糸が、本発明にかかる絹には含まれる。「精練」とは、絹からセリシンを除去する処理を意味し、当該除去が出来る限り、とくに制限はないが、例えば、アルカリ精練、酸精練、セッケン精練、酵

素精練、又はこれらの組み合わせ（例えば、セッケン・アルカリ精練）が挙げられるが、コストの観点及び工業的により実績のある方法として、アルカリ精練が好ましい。アルカリ精練とは、絹をアルカリ存在下煮沸する処理を意味し、当該処理において用いられるアルカリとしては、通常弱アルカリであり、例えば、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、ケイ酸ナトリウムが挙げられる。これらの中で、コスト及び試薬の溶解度の観点から、炭酸ナトリウムを用いたアルカリ精練がより好ましい。

- [0027] 本発明においては、ナノ粒子を調製するために、先ず、フィブロイン、更にはセリシン、精練された絹、又は、精練されていない絹を溶解する。
- [0028] かかる溶解において用いられる溶媒としては、特に限定されず、水及び／又は有機溶媒等を用いることができる。有機溶媒としては、例えば、低級アルコール（エタノール、メタノール、イソプロパノール等）、グリコール（プロピレングリコール、ジエチレングリコール等）を用いることができ、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、N-メチルモルホリン-N-オキシド等の非プロトン性溶媒であってもよいが、安全性及び環境負荷の観点から、好ましくは、水と低級アルコールとの混合溶媒であり、より好ましくは、水とエタノールとの混合溶媒である。
- [0029] 溶媒には、無機塩が添加されていることが好ましい。無機塩としては、特に限定されず、例えば、アルカリ金属やアルカリ土類金属の塩を用いることができる。具体的には、臭化リチウム、臭化カリウム、臭化カルシウム、塩化リチウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、チオシアン酸リチウム、チオシアン酸カリウム等が挙げられるが、フィブロイン、セリシン及び抗原タンパク質の分解を抑えながら、これらを効率よく溶解し易いという観点から、好ましくは、臭化リチウム、チオシアン酸リチウム、塩化カルシウムであり、より好ましくは臭化リチウムである。
- [0030] 本発明において、溶媒に添加される無機塩の濃度（終濃度）としては、特に限定されないが、例えば、3 M以上、4 M以上、5 M以上、6 M以上、7 M以上、8 M以上、9 M以上、10 M以上と適宜設定することができる。溶

媒のpHとしては、特に限定されないが、好ましくは、pH7以上（例えば、pH8、pH9）である。

[0031] 溶解する際の温度としては、特に限定されないが、好ましくは100℃以下であり、より好ましくは55℃以下（37℃、室温（例えば25℃）等）である。また、このようにして調製される溶解液は、前記無機塩を除去（脱塩）するために、例えば透析処理に供してよい。かかる処理に用いられる透析液としては、特に制限はないが、脱イオン水、RO水、若しくはそれらに緩衝剤を加えたもの（1mMTri s-HCl（pH9）、PBS等）、又は、上記溶媒が挙げられる。

[0032] 本発明においては、このようにして調製された溶解液に、後述の抗原を混合し、粒子化する。かかる粒子化方法としては、上記ナノサイズの粒子を調製できれば特に制限はないが、例えば、塩析（salting-out法、Lammel, A. S. ら、Biomaterials 2010, 31, 4583-4591等 参照）、エタノール沈殿等の脱溶媒和法（コアセルベーション法、Kundu, J. ら、Int. J. Pharm. 2010, 388, 242-250、Zhang, Y. Q. ら、J. Nanopart. Res. 2007, 9, 885-900、Cao, Z. ら、Soft Matter 2007, 3, 910-915、Shi, P. J. ら、Int. J. Pharm. 2011, 410, 282-289等 参照）、超臨界流体技術（Zhao, Z. ら、Ind. Eng. Chem. Res. 2013, 52, 3752-3761等 参照）、エレクトロスプレー法（Gholami, A. ら、J. Nanopart. Res. 2011, 13, 2089-2098、Qu, J. ら、Mater. Sci. Eng. C: Mater. Biol. Appl. 2014, 44, 166-174等 参照）、機械的粉碎（Rajkhowa, R. ら、Powder Technol. 2008, 185, 87-95、Rajkhowa, R. ら、Powder Technol. 2009, 191, 155-163、Kazemimostaghimi, M. ら、Powder Technol. 2013, 2

41, 230-235、Kazemimostaghimi, M. ら、Powder Technol. 2013, 249, 253-257等 参照)、マイクロエマルション法(Myung, S. J. ら、Macromol. Res. 2008, 16, 604-608等 参照)、電氣的制御法(Huang, Y. L. ら、Chin. Sci. Bull. 2011, 56, 1013-1018等 参照)、キャピラリーマイクロドット技術(Gupta, V. ら、Int. J. Nanomed. 2009, 4, 115-122等 参照)、PVA混合フィルム法(Wang, X. ら、Biomaterials 2010, 31, 1025-1035等 参照)が、挙げられる。

[0033] これら粒子化方法の中で、得られるナノ粒子のサイズ、コスト及び収率の観点、抗原タンパク質の変性や分解を低減し易いという観点、またナノ粒子中への他成分の混入を避け易いという観点から、好ましくは、塩析、脱溶媒和法であり、より好ましくは塩析である。かかる塩析においては、上記溶解液に添加することにより、抗原及びフィブロイン等を析出できれば、特に制限はなく、無機塩であってもよく、有機塩であってもよい。無機塩としては、例えば、アルカリ金属やアルカリ土類金属の塩、アンモニウム塩を用いることができ、具体的には、リン酸二カリウム、リン酸一カリウム、リン酸一ナトリウム、リン酸二ナトリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム、硫酸ナトリウム、硫酸アンモニウム等が挙げられ、有機塩としては、クエン酸三ナトリウム、クエン酸三アンモニウム、酢酸マグネシウム、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、酒石酸ナトリウムが挙げられる。これらの塩において、接種動物に対して有害な成分となり難いことや、希釈を避け、効率よくナノ粒子を回収し易いという観点から、好ましくはリン酸二カリウム、リン酸二ナトリウム、リン酸一カリウム、リン酸一ナトリウムであり、より好ましくはリン酸二カリウムである。

[0034] 本発明において、抗原と上記溶解液との混合液に添加される塩の濃度(終濃度)としては、抗原及びフィブロイン等が塩析できる限り、特に限定され

ないが、例えば、0.8 M以上、好ましくは1 M以上、より好ましくは1.2 M以上が挙げられる。また、かかる塩析は、抗原及び上記溶解液に、塩の飽和水溶液を加えて混合することによって行うことができる。塩析する際の温度としては、特に限定されないが、通常室温以下（例えば、25℃、4℃）で行われる。

[0035] 本発明においては、このようにして得られる析出物を、例えば、水で洗浄した後、破碎することによって、ナノ粒子に調製することができる。かかる調製方法としては、特に制限はないが、例えば、超音波処理、攪拌が挙げられる。

[0036] 本発明にかかる「ナノ粒子」は、かかる絹タンパク質を担体として含む微粒子であり、その形態は問うものではない。また、その粒径はナノサイズ又はマイクロサイズである。「ナノサイズ又はマイクロサイズ」とは、平均粒子径で5 μm 未満、好ましくは4 μm 未満、より好ましくは3 μm 未満、さらに好ましくは2 μm 未満、より好ましくは1 μm 未満、さらに好ましくは900 nm以下、より好ましくは800 nm以下、さらに好ましくは700 nm以下、より好ましくは600 nm以下、さらに好ましくは500 nm以下（例えば、400 nm以下、350 nm以下、300 nm以下、250 nm以下、200 nm以下、150 nm以下、100 nm以下）が挙げられる。また、「平均粒子径」は、例えば、走査型電子顕微鏡（SEM）観察により測長される粒子径の平均値が挙げられ、より具体的には、SEM観察1視野に存在する各粒子の最大直径（各粒子を包含する最小円の直径）から算出される平均値が挙げられる。検出する粒子数としては、例えば5～100個（例えば、5～10個、5～20個、5～30個、5～40個、5～50個、50個以上）が挙げられる。また、1視野に存在する全てであってもよい。

[0037] 本発明にかかるナノ粒子における各タンパク質の含有量に関し、ナノ粒子が、抗原及びフィブリンを含むもの（例えば、精練した絹から製造したナノ粒子）である場合には、抗原のナノ粒子における含有量は、フィブリン

のナノ粒子における含有量に対して、好ましくは0.05～30質量%であり、より好ましくは0.1～20質量%であり、さらに好ましくは0.1～10質量%である。また、絹におけるフィブロインとセリシンの質量比は約3:1(7:3～8:2)である。さらに、精練においては、その方法及び条件等に依って、絹から完全にセリシンが除去されないこともある。よって、かかる場合、本発明にかかるナノ粒子において、フィブロインのナノ粒子における含有量に対して0.1～20質量%のセリシンを、不純物として含み得る。

[0038] また、本発明にかかるナノ粒子が、抗原、フィブロイン及びセリシンを含むもの（例えば、精練していない絹から製造したナノ粒子）である場合には、抗原のナノ粒子における含有量は、フィブロイン及びセリシンのナノ粒子における含有量に対して、好ましくは0.05～30質量%であり、より好ましくは0.1～20質量%であり、さらに好ましくは0.1～10質量%である質量%である。また、フィブロインとセリシンの質量比（ナノ粒子におけるフィブロインの質量：ナノ粒子におけるセリシンの質量）は、好ましくは60～90:10～40であり、より好ましくは65～85:15～35である。

[0039] 本発明のナノ粒子に含まれる「抗原」としては、動物において免疫応答を惹起するものであれば特に限定されず、例えば、ウイルス、細菌、寄生虫、真菌、リケッチア、クラミジア、プリオン、がん細胞、又はこれらに由来する分子（例えば、タンパク質、核酸、糖、脂質）が挙げられる。

[0040] ウイルス、細菌、寄生虫、真菌、リケッチア、クラミジア等は、これらを弱毒化したものを抗原としてもよく（生ワクチン）、不活化したものを抗原としてもよい（不活化ワクチン）。また、これらに由来するトキシイドやキャプシド、表面に存在するタンパク質等を抗原としてもよい。

[0041] ウイルスとしては、動物に感染し疾患を引き起こすものであれば特に限定はされず、例えば、アデノウイルス、インフルエンザウイルス、エボラウイルス、ニパウイルス、パピロマウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、肝炎ウイ

ルス（A型、B型、C型、D型、E型、F型、G型等）、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ポリオウイルス、ロタウイルス、ノロウイルス、サポウイルス、エンテロウイルス、狂犬病ウイルス、黄熱ウイルス、水痘带状疱疹ウイルス、ムンプスウイルス、サイトメガロウイルス、コロナウイルス、ポリオーマウイルス、ヘルペスウイルス、日本脳炎ウイルス、デングウイルス、マールブルグウイルス、パルボウイルス、ラッサウイルス、ハンタウイルス、トゴトウイルス、ドーリウイルス、ニューキャッスルウイルス、トガウイルス、パラミクソウイルス、オルソミクソウイルス、ポックスウイルス、レオウイルス、口蹄疫ウイルスが挙げられる。

[0042] 細菌としては、動物に感染し疾患を引き起こすものであれば特に限定はされず、例えば、破傷風菌、レンサ球菌、黄色ブドウ球菌、腸球菌、リステリア菌、病原性大腸菌、百日咳菌、ジフテリア菌、肺炎桿菌、プロテウス菌、髄膜炎球菌、緑膿菌、セラチア菌、淋菌、エンテロバクター菌、シトロバクター菌、マイコプラズマ、クロストリジウム、結核菌、コレラ菌、ペスト菌、赤痢菌、炭疽菌、梅毒トレポネーマ、レジオネラ菌、レプトスピラ菌、ピロリ菌、ボレリア菌、インフルエンザ菌が挙げられる。

[0043] 寄生虫としては、動物に寄生して疾患を引き起こすものであれば特に限定はされず、例えば、マラリア原虫、トキソプラズマ、リーシュマニア、トリパノソーマ、クリプトスポリジウム、エキノコックス、住血吸虫、フィラリア、回虫が挙げられる。

[0044] 真菌としては、動物に感染し疾患を引き起こすものであれば特に限定はされず、例えば、カンジダ真菌、アスペルギルス真菌、クリプトコッカス真菌、ヒストプラズマ真菌、白癬真菌、ニューモシスチス真菌、コクシジオイデス真菌が挙げられる。

[0045] <本発明のワクチン組成物等>

本発明の組成物は、上述のシルク粒子を含む経口投与型ワクチン用組成物である。かかる組成物においては、当該シルク粒子の他、薬理学上許容される添加剤を含んでいてもよい。かかる「薬理学上許容される添加剤」として

は、例えば、本発明の組成物が固形製剤の態様をとる場合には、賦形剤、結合剤、滑沢剤、フィルムコーティング剤等が挙げられる。本発明の組成物が液状製剤の態様をとる場合には、等張化剤、溶解補助剤、保存剤、安定剤、懸濁化剤、乳化剤等が挙げられる。また、本発明の組成物は、更にアジュバントを含んでいてもよい。アジュバントとしては、例えば、不完全フロイントアジュバント、完全フロイントアジュバント、アルミニウムゲルアジュバント等の無機物質、微生物又は微生物由来物質（BCG、ムラミルジペプチド、百日咳菌、百日咳トキシン、コレラトキシン等）、界面活性作用物質（サポニン、デオキシコール酸等）、油性物質（鉱油、植物油、動物油等）のエマルジョン、ミョウバンが挙げられる。

[0046] 本発明においてはまた、後述の実施例に示すとおり、本発明にかかるナノ粒子又は本発明の経口投与型ワクチン用組成物を、動物に経口投与し、当該動物において上記抗原に対して特異的な抗体の産生を誘導する方法をも提供する。また、当該方法は、前記抗原が関連する疾患（感染症等）を予防する又はその症状を軽減する方法とも言い換えられる。

[0047] 本発明において経口投与の対象となる「動物」としては、特に制限はないが、ヒトであってもよく、非ヒト動物であってもよい。「非ヒト動物」としては、特に制限はなく、種々の家畜、家禽、ペット、実験用動物等が挙げられる。具体的には、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、カモ、ダチョウ、アヒル、イヌ、ネコ、ウサギ、ハムスター、マウス、ラット、サル等が挙げられるが、これらに制限されない。

[0048] また、本発明にかかるナノ粒子又は本発明の経口投与型ワクチン用組成物の投与量は、当業者であれば、抗原の種類、又は、投与対象の種類、週齢、体重若しくは健康状態等により適宜決定することができる。また、投与回数は、単回であってもよく、また複数回であってもよく、この回数も、当業者であれば、前記抗原の種類等に応じて適宜決定することができる。

実施例

[0049] 以下、実施例及び比較例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本

発明は以下の実施例に限定されるものではない。また、本実施例は、下記材料及び方法を用いて行った。

[0050] (実験の材料と方法)

1. 組換えカイコ産生繭を免疫原としたマウス経口投与試験

特許文献1（特開2005-97229号公報）に記載の方法に沿って、抗原タンパク質を発現させた遺伝子組換えカイコの繭糸を破碎し、得られた破碎物を経口投与して、抗原特異的な抗体産生が誘導されるかにつき評価した。具体的には、以下に示すとおりである。

[0051] 1-1. フィブロインL鎖融合OVAタンパク質（FibL-OVA）を発現する組換えカイコ産生繭、又は、セリシン層に遊離型のOVA（Ser-OVA）を発現する組換えカイコ産生繭の、破碎処理

FibL-OVA及びSer-OVA発現繭を0.5cm角に裁断した後、マルチビーズショッカーMB3200（S）（安井器械株式会社）により、液体窒素条件下で凍結粉碎（3秒粉碎→3分液体窒素で凍結のサイクルを15回繰り返す）し、さらにその後、水（溶媒）を添加して湿式冷却粉碎（30秒粉碎→60秒冷却（0℃）のサイクルを40回繰り返す）により粒径が数十～数百μmのシルク破碎物を調製した。

[0052] 1-2. FibL-OVA発現シルク破碎物又はSer-OVA発現シルク破碎物のマウスへの経口投与試験

シルク破碎物の濃度を、繭重量から計算して50mg/mlとなるように生理食塩水に懸濁し、1回あたり10ml/kg（マウス体重）となるように経口ゾンデを用いて経口投与した。コントロールとして等量の生理食塩水を経口投与した。連続3日間経口投与した後、初回投与から1週間おきに3回経口投与し、最終投与翌日にイソフルラン吸入麻酔下で全採血を行った。マウスはICRマウス、6週齢のメスを各試験対照区で3匹ずつ使用した。

[0053] 1-3. FibL-OVA発現シルク破碎物又はSer-OVA発現シルク破碎物を経口投与したマウス血清を用いたELISA

96ウェルアッセイプレートに、非組換えカイコw1-pndの未精練繭

溶解液若しくは精練糸溶解液、セリシンホープ（セリシンのみからなる）の溶解液（それぞれ0.25 mg/ml）又はOVA溶液（0.625 mg/ml）を、各ウェルに100 µlずつ分注し、4℃で一晩コーティングした。Assay Diluent（Biolegend）で各ウェルをブロッキングした（室温で60分静置）。PBS-T（0.05% Tween 20含有PBS）で洗浄後、Assay Diluentで1/200希釈したマウス血清を反応させた（室温で90分）。洗浄後、HRP標識抗マウスイムノグロブリン抗体（Dako）と反応させた（室温で60分）。洗浄後、ELISA POD基質TMB溶液（ナカライテスク）を添加した。発色させた後、2N H₂SO₄を添加して反応を止めて、吸光度（450 nm）を測定した（Bio-Rad, iMark Microplate Reader）。

[0054] 2. salting-out法（塩析法）による抗原タンパク質含有シルクナノ粒子の作製

2-1. 繭、精練糸の調製

繭はw1-pndの繭を使用した。精練糸としてぐんま200の生糸を炭酸精練（0.02M 炭酸ナトリウム水溶液で、98℃、30分処理）したものを使用した。

[0055] 2-2. 繭・精練糸水溶液の調製

繭又は精練糸を、70%エタノール、次いで0.1%SDS水溶液で洗浄した後、RO水で十分にリンスした。精練糸2gについて、2mlの70%エタノール及び18mlの10M LiBr, 100mM Tris-HCl（pH9.0）を加えて、37℃において激しく混合し、水溶液を調製した。繭1gにつき、4mlの70%エタノール及び36mlの10M LiBr, 100mM Tris-HCl（pH9.0）を加えて、37℃において激しく混合し、水溶液を調製した。得られたシルク水溶液は、透析膜（エーディア UC24-32-100）に封入し、RO水に対して透析を行った。透析後4時間以降における透析外液の電気伝導率が0.3 µS以下と

なるまでRO水を交換しながら透析を続けた。透析後のシルク水溶液を遠心チューブに回収し、12,000rpm、25℃、10分遠心（TOMY MX-307）して固形物を除去した後、RO水で希釈して10mg/mlの水溶液とした。

[0056] 2-3. シルクナノ粒子の調製（1）

10mg/mlのシルク水溶液（繭又は精練糸）50mlに対して、1mg/ml（w/w）のOVA（富士フィルム和光 012-09885）あるいはRO水を、50ml添加して混和した後、室温で20分静置してナノ粒子用原液を調製した。

なお、調製した4種類のナノ粒子用原液の組成は以下のとおりである。

（1）繭溶解液（5mg/ml）

（2）繭+OVA繭溶解液（繭溶解液 5mg/ml + OVA溶液 0.5mg/ml）

（3）精練糸溶解液（5mg/ml）

（4）精練糸+OVA溶解液（精練糸溶解液 5mg/ml + OVA溶液 0.5mg/ml）。

[0057] 500mlの遠心ボトルに1.25M K_2HPO_4 を360ml入れ、これに上記のナノ粒子用原液90mlを加えて、30分静置した。その後ゆっくりと転倒混和することで混合し、4℃で二晩静置してナノ粒子化を行った。静置後、遠心（Himac RC-20, 4,000rpm, 30分、25℃）して上清を除いた後、沈殿物に500mlのRO水を加えて遠心して洗浄する操作を2回繰り返した。得られた沈殿物を少量のRO水に懸濁して50mlチューブに回収し、RO水で50mlにメスアップした後、遠心（TOMY MX-307; 5,000rpm, 室温、10分）して上清を除いた後、再度RO水で洗浄する操作を2回繰り返し、沈殿物に10mlのRO水を加えて懸濁し、超音波破碎（BRANSON SONIFIRE）してシルクナノ粒子溶液とした。さらにシルクナノ粒子溶液の一部をとって、9倍量の10M LiBr, 100mM Tris-HCl (pH9.0)

を加えて溶解して280nmの吸光度を測定し、フィブロインタンパク質から求めた検量線をもとにタンパク質濃度を測定した。

[0058] 2-4. 走査電子顕微鏡 (SEM) によるシルクナノ粒子の観察 (1)
(2-3) にて得られたシルクナノ粒子をRO水で10倍希釈した後、シリコンウエハ上に1 μ l滴下して観察用資料とした。観察は卓上顕微鏡 (HITACHI TM2000Plus) を用いて、5kV, 2500倍の条件で行った。

[0059] 2-5. シルクナノ粒子に抗原タンパク質が取り込まれていることの確認 (1)

(2-3) にて作製した「OVA含有繭糸ナノ粒子」又は「OVA含有精練糸ナノ粒子」に、10M LiBr, 100mM Tris-HCl (pH9.0) を加えて溶解し、それぞれ2mg/ml (in 2M LiBr, 20mM Tris-HCl (pH9.0)) シルク水溶液に濃度調製した。さらにSDSサンプルバッファーで段階希釈し、各ウェルに5、2.5、1、0.5、0.25 μ gとなるようにサンプルをのせた。またナノ粒子懸濁液を4℃で1週間程度保管していたものの上清を一部回収し、SDSサンプルバッファーで1/20希釈したものを5 μ lと一緒に電気泳動した。SDS-PAGEした後、PVDFメンブレンに転写し、抗OVA抗体 (Abcam) と反応後 (室温、60分)、アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ抗体 (Dako) と反応させた (室温、60分)。BCIP-NBT溶液 (ナカライテスク) を添加して呈色反応させた。

[0060] 2-6. シルクナノ粒子の調製 (2)

また、上記1.25M K_2HPO_4 の代わりに、1.25Mに濃度調製した各種塩析用溶媒を用い、より小スケールでのシルクナノ粒子の調製を試みた。具体的には、2mlのチューブにあらかじめ1.25Mに濃度調製した各種塩析用溶媒 (クエン酸三ナトリウム、硫酸ナトリウム、硫酸マグネシウム、酢酸マグネシウム、酢酸ナトリウム、硫酸アンモニウム、酢酸カリウム、酒石酸ナトリウム又はクエン酸三アンモニウム) を1.5mlずつ入れて

おき、これに上記ナノ粒子用原液0.3 mlを重層し、30分静置した。その後ゆっくりと転倒混和することで混合し、4℃で一晩静置してナノ粒子化を行った。静置後、遠心(TOMY MX-307, 5,000 rpm, 15℃, 20分)して上清を除いた後、沈殿物に1.5 mlのRO水を加えて転倒混和し、遠心(TOMY MX-307, 15,000 rpm, 15℃, 20分)して上清を除いた後、沈殿物に250 µlのRO水を加えて、超音波破碎(BRANSON SONIFIRE)してシルクナノ粒子溶液とした。

[0061] 2-7. SEMによるシルクナノ粒子の観察(2)

(2-6)にて得られたシルクナノ粒子をシリコンウエハ上に1 µl滴下して乾燥し、観察用試料とした。観察は卓上顕微鏡(HITACHI TM4000Plus)を用いて、5 kV, 2500倍の条件で行った。

[0062] 2-8. シルクナノ粒子に抗原タンパク質が取り込まれていることの確認(2)

(2-6)にて作製したシルクナノ粒子溶液の150 µlをとって、遠心(15,000 rpm, 15℃, 10分)して、上清140 µlを捨て(10 µl残す)、10M LiBr, 100mM Tris-HCl (pH9.0) 40 µlを加え、完全に溶解した。A280を測定してタンパク質濃度を算出し、1.5 mg/ml in 2M LiBr, 20mM Tris-HCl (pH9.0)に調製した。

[0063] 等量の2XSDSサンプルバッファーを加えてボイルし、各ウェルに3 µgとなるようにサンプルをのせた。SDS-PAGEした後、PVDFメンブレンに転写し、抗OVA抗体(Abcam)と反応後(室温、60分)、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)標識抗ウサギ抗体(Dako)と反応させた(室温、60分)。化学発光分析試薬 Chemi-Lumi One L (ナカライテスク)を添加して化学発光させ、Hyperfilm ECL (Cytiva)を用いて現像した。

[0064] 3. マウスへのOVA含有シルクナノ粒子経口投与試験

3-1. 上記(2-3)で作製した4種類のシルクナノ粒子(約35 mg/ml)を1回あたり10 ml/kg(マウス体重)となるように、経口ゾンデを用いて経口投与した。コントロールとして等量の生理食塩水を経口投与した。連続3日間経口投与した後、初回投与から1週間おきに3回経口投与し、最終投与翌日にイソフルラン吸入麻酔下で全採血を行った。マウスはICRマウス、6週齢のメスを各試験対照区で3匹ずつ使用した。

[0065] 3-2. OVA含有シルクナノ粒子を経口投与したマウス血清を用いたELISA

96ウェルアッセイプレートに、未精練繭糸、精練糸、セリシンホープ溶解液(それぞれ0.25 mg/ml)又はOVA溶液(0.625 mg/ml)を各ウェルに100 µlずつ分注し、4℃で一晩コーティングした。Assay Diluent(Biolegend)で各ウェルをブロッキングした(室温で60分静置)。PBST(0.05% Tween20含有PBS)で洗浄後、Assay Diluentで1/100希釈したマウス血清を反応させた(室温で90分)。洗浄後、HRP標識抗マウスIgG抗体(Dako)あるいはHRP標識抗マウスIgA抗体(Abcam)と反応させた(室温60分)。洗浄後、ELISA POD基質TMB溶液(ナカライテスク)を添加した。発色させた後、2N H₂SO₄を添加して反応を止めて、吸光度(450 nm)を測定した(Bio-Rad, iMark Microplate Reader)。

[0066] 以上の材料及び方法にて得られた結果を、以下に示す。

[0067] (結果)

(比較例1) 遺伝子組換えカイコ産生繭を免疫原とした経口投与試験
フィブロインL鎖融合OVAタンパク質(FibL-OVA)を発現する組換えカイコ産生繭、又は、セリシン層に遊離型のOVA(Ser-OVA)を発現する組換えカイコ産生繭を、9M 臭化リチウムで完全に溶解した。その繭糸溶解液を、SDS-PAGE、次いで、抗OVA抗体(Abcam)を用いたウェスタンブロットに供した(1次抗体:抗OVA抗体、2次

抗体：アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギポリクローナル抗体）。その結果、組換えカイコが産生した繭糸において、F i b L－O V A融合タンパク質及びセリシン層遊離型O V A（S e r－O V A）それぞれの発現を確認することができた（図1）。

[0068] そして、F i b－O V A又はS e r－O V A発現繭を破碎したシルク微粒子を、マウスに経口投与した。その結果、これらのマウスの血清中では、O V Aに対する抗体産生が有意に誘導されていることは確認できなかった。一方、シルク成分、特にセリシンに対しては、強力に抗体産生が誘導されていた（図2）。

[0069] 以上のことから、特開2005-97229号公報に記載のように調製した、抗原タンパク質を発現させた遺伝子組換えカイコ産生繭破碎物を、経口投与した結果、シルク成分に対する抗体産生が優位に誘導され、目的抗原に対する抗体産生を効率よく誘導することは困難であることが示唆された。

[0070] （実施例1） O V A含有シルクナノ粒子を免疫原としたマウス経口投与試験

繭溶解液又は精練糸溶解液に、シルクタンパク質量の10%量となるO V Aを加えた混合液を1.25M K_2HPO_4 に混合してシルクナノ粒子を作製した（図3A）。得られたシルクナノ粒子を走査電子顕微鏡（SEM）で観察した。その結果、精練糸を用いたものは直径が0.5～4 μm と最も大きく、全体として直径2 μm 程度の大きさの粒子が多かった。一方、O V Aを10%加えたナノ粒子では、粒子径分布はほぼ同様だが、やや小さい直径0.5～1.0 μm の粒子が多く認められた。繭溶解液又は10% O V A含有繭溶解液を原料とした場合、粒子はさらに小さくなり、直径0.2～0.3 μm の粒子が大半を占めていた（図3B）。

[0071] また、作製したシルクナノ粒子にO V Aが取り込まれていることを確認するために、作製したシルクナノ粒子を再度臭化リチウムで溶解し、その溶解液をSDS-PAGEした後、抗O V A抗体を用いてウェスタンブロットを行い、O V Aがシルクナノ粒子中に確実に取り込まれていることを確認した。

(図4)。

[0072] さらに、10% OVA含有繭溶解液、10% OVA含有精練糸溶解液を原料として作製したシルクナノ粒子の懸濁液を、1週間程度4℃保存していた上清中に、OVAが存在していることを確認した。このことから一度シルクナノ粒子中に取り込まれたOVAがナノ粒子を懸濁している溶液中に徐放されることを確認した(図4)。

[0073] そして、繭溶解液、繭+OVA繭溶解液、精練糸溶解液、又は、精練糸+OVA溶解液を原料として作製したシルクナノ粒子を、経口投与したマウスの血清を用いて、シルク成分やOVAに対する抗体産生が誘導されるかどうかを評価した。

[0074] その結果、繭のみからなるナノ粒子を経口投与したマウス血清中には、シルク成分であるセリシンに特異的な抗体(IgG及びIgA)の産生が認められた。また、若干ではあるがセリシンを除去した精練糸溶解液にも反応していることから、フィブロインに対する抗体産生も誘導されていた(図5A及び5B)。

[0075] 一方、繭+OVA繭溶解液から作製されたナノ粒子を経口投与したマウスにおいては、セリシンに対する抗体(IgG及びIgA)の産生も誘導されるが、さらにOVAに特異的な抗体(IgG及びIgA)の産生が誘導されることが明らかになった(図5A及び5B)。

[0076] また、精練糸のみからなるナノ粒子、又は、精練糸+OVA溶解液から作製したナノ粒子を経口投与したマウスでは、除去したセリシンのみならず、フィブロインに対する抗体産生の誘導は認められなかった(図5A及び5B)。

[0077] さらに、精練糸+OVA溶解液から作製したナノ粒子を経口投与したマウスでは、OVAに特異的な抗体(IgG及びIgA)の産生が顕著に誘導されていた(図5A及び5B)。

[0078] (実施例2) 各種塩析用溶媒を用いたOVA含有シルクナノ粒子形成
上記(2-6)に示すとおり、繭溶解液又は精練糸溶解液にシルクタンパ

ク質量の10%量となるOVAを加えた混合液を、1.25Mに調製した各種塩析用溶媒に混合し、シルクナノ粒子を作製した。得られたシルクナノ粒子をSEMで観察したところ、精練糸溶解液のみ（精練糸-OVA）を用いたものは直径の平均がおおよそ1~4 μm 程度の粒子を形成していることが確認できた。一方、精練糸溶解液に10%OVAを加えたもの（精練糸+OVA）では、それぞれの条件でやや小さい直径0.8~3 μm の粒子形成が確認された。繭溶解液のみ（繭-OVA）又は繭溶解液に10%OVAを加えたもの（繭+OVA）を原料とした場合、粒子はさらに小さくなり、直径の平均が0.3 μm 以下から0.5 μm 程度の粒子形成が確認された（図6）。

[0079] また、このようにして作製したシルクナノ粒子にOVAが取り込まれていることを確認するために、作製したシルクナノ粒子を再度臭化リチウムで溶解し、その溶解液をSDS-PAGEした後、抗OVA抗体を用いてウェスタンブロットを行った。その結果、異なる塩析用溶媒を用いて作製したそれぞれのシルクナノ粒子中にOVAが確実に取り込まれていることを確認した（図7）。

[0080] 以上のことから、精練糸を溶解したシルク溶液（フィブロインを含む溶液）又は未精練繭糸を溶解したシルク溶液（セリシン及びフィブロインを含む溶液）と、抗原タンパク質との混合液から作製した、抗原含有シルクナノ粒子を、経口投与することで、抗原に特異的な抗体産生を誘導できることが明らかになった。

産業上の利用可能性

[0081] 以上説明したように、本発明によれば、抗原及びフィブロインを含むナノ粒子を、経口投与することによって、抗原特異的な抗体産生を誘導することが可能となる。特に、前記抗体産生においては、粘膜免疫の賦活化を示すIgAと、全身免疫の賦活化を示すIgGの双方の抗原特異的な産生誘導が認められた。すなわち、前記ナノ粒子は、胃内部での胃酸や消化酵素による分解を回避し、腸管（小腸、大腸）に抗原を送達させることにより、粘膜免疫

を作動させ、全身免疫も誘導できる。したがって、本発明は、経口投与型ワクチン用組成物として有用である。

請求の範囲

- [請求項1] 抗原及びフィブロインを含むナノ粒子を、含む経口投与型ワクチン用組成物。
- [請求項2] 前記ナノ粒子はセリシンを更に含む、請求項1に記載の経口投与型ワクチン用組成物
- [請求項3] 前記ナノ粒子は、精練された絹の溶解液と前記抗原との混合溶液から塩析されたものである、請求項1に記載の経口投与型ワクチン用組成物。
- [請求項4] 前記ナノ粒子は、精練されていない絹糸の溶解液と前記抗原との混合溶液から塩析されたものである、請求項2に記載の経口投与型ワクチン用組成物。