

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6085886号
(P6085886)

(45) 発行日 平成29年3月1日(2017.3.1)

(24) 登録日 平成29年2月10日(2017.2.10)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 K 39/39	(2006.01)	A 6 1 K 39/39	Z N A
A 6 1 K 39/155	(2006.01)	A 6 1 K 39/155	
A 6 1 K 39/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/00	G
A 6 1 K 47/32	(2006.01)	A 6 1 K 47/32	
A 6 1 K 47/14	(2006.01)	A 6 1 K 47/14	

請求項の数 9 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-531356 (P2013-531356)
 (86) (22) 出願日 平成24年8月29日(2012.8.29)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2012/071831
 (87) 国際公開番号 W02013/031827
 (87) 国際公開日 平成25年3月7日(2013.3.7)
 審査請求日 平成27年7月21日(2015.7.21)
 (31) 優先権主張番号 特願2011-185873 (P2011-185873)
 (32) 優先日 平成23年8月29日(2011.8.29)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 304020292
 国立大学法人徳島大学
 徳島県徳島市新蔵町2丁目24番地
 (74) 代理人 100093230
 弁理士 西澤 利夫
 (72) 発明者 木戸 博
 徳島県徳島市蔵本町3丁目18番地の15
 国立大学法人徳島大学 疾患酵素学研究
 センター内
 (72) 発明者 水野 大
 徳島県徳島市蔵本町3丁目18番地の15
 国立大学法人徳島大学 疾患酵素学研究
 センター内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 RSV粘膜ワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の組成：

(a) KnLm (ただしnは4-8、mは11-20) のアミノ酸配列からなる合成ペプチドと脂質とからなるADピークル；

(b) カルボキシビニルポリマー；および

(c) RSV抗原

を含む組成物。

【請求項2】

医薬組成物である請求項1記載の組成物。

【請求項3】

粘膜ワクチンである請求項2記載の組成物。

【請求項4】

経鼻用の粘膜ワクチンである請求項3記載の組成物。

【請求項5】

合成ペプチドが、配列番号1または配列番号2のアミノ酸配列からなる請求項1から4のうちのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項6】

脂質が、ホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルエ

10

20

タノールアミン、ホスファチジン酸、ラウリル酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸およびオレイン酸の少なくとも1種である請求項1から5のうちのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項7】

脂質が、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロールおよびパルミチン酸の3種脂質混合物である請求項6記載の組成物。

【請求項8】

RSV抗原が、RSV-Fタンパクである請求項1から7のうちのいずれか一項に記載の組成物。

【請求項9】

請求項8記載の組成物を製造する方法であって、RSV-FタンパクとADピークルとの混合物を凍結乾燥または超音波処理したのち、カルボキシビニルポリマーと混合することを特徴とする方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この発明は、RSVに対して粘膜免疫IgAと血中免疫IgGを効果的に誘導する医薬組成物、具体的にはRSV粘膜ワクチンであり、好ましくは経鼻用のRSV粘膜ワクチンに関するものである。

【背景技術】

【0002】

20

特許文献1および2には、従来の不活化ワクチンやトキシイド等における欠点、粘膜ワクチンおよび免疫アジュバントの開発に関する現状等が詳細に記載されている。

【0003】

これら特許文献1、2に記載のとおり、皮下や筋肉内等へ接種する従来ワクチンから、ウイルスの自然感染ルートである粘膜においてIgA抗体の産生を誘導する粘膜ワクチンへの切り替えの必要性は、広くかつ深く認識されている。特に、21世紀における次世代ワクチンとしては、IgA抗体の産生、局所免疫あるいは粘膜免疫を誘導する、いわゆる粘膜ワクチンの開発と実用化が全世界で待望されているが、未だ達成されていない。

【0004】

本願発明者らはこのような課題に対して、(1)肺サーファクタントプロテインBおよび/または肺サーファクタントプロテインCと脂質との複合体である抗原薬物(AD)ピークル、並びに(2)このADピークルと抗原とからなる粘膜ワクチンを発明し、特許出願している(特許文献1)。さらに本願発明者らは、ADピークル量(V)と抗原量(A)との重量比V/Aの調節によって、IgA抗体の選択的産生とIgA及びIgG両抗体産生とが変換可能であることを見出し、これを作用機序とする粘膜ワクチンを特許出願している(特許文献2)。またこれらの特許文献1、2は、肺サーファクタントプロテインBおよびCの断片(ペプチド)の有効性についても開示している。

30

【0005】

さらに本願発明者らは、肺サーファクタントプロテイン断片の様々な変異体について抗体産生増強作用を検討した結果、特許文献1、2に開示された部分ペプチドよりもサイズの小さいペプチドであるにもかかわらず、抗体産生の強い誘導あるいは増強作用、特に、分泌型IgA抗体の単独産生、また、分泌型IgAと血中IgGの両抗体産生の優れて効果的な誘導作用を有する合成ペプチドKnLm(ただしnは4-8、mは11-20)と脂質を成分とするADピークル(以下、「ADピークル(a)」と略す)と、このADピークル(a)と抗原とからなる粘膜ワクチンを発明し、特許出願している(特許文献3)。

40

上記特許文献1~3に記載の発明は、汎用性を有する粘膜ワクチンに関するものであるが、実施例に記載されているようにインフルエンザウイルスを用いて検証されたものである。

【0006】

一方、粘膜ワクチンはインフルエンザウイルス以外の他の呼吸器疾患原因ウイルスでも

50

検討されてきた。中でもRSVはかぜ症候群の主要な原因ウイルスの一つであり、生涯に何度も感染することから免疫獲得の難しいウイルスの1つである。

RSV感染は乳幼児、高齢者、免疫不全患者に細気管支炎、肺炎を引き起こし、特に乳幼児の初感染においては30%程度が下気道炎に至る。そのうち1～3%が重症化して入院治療を要することからワクチンの登場が切望されている。

RSVはパラミクソウイルス科に属するRNAウイルスで、大きくサブタイプAとサブタイプBに分けられる。ウイルス表面には宿主細胞との融合に重要なFタンパク（非特許文献1）、宿主細胞への接着に関与するGタンパク（非特許文献1）、SHタンパクが存在することが知られている。したがって、ウイルスの全粒子やこれらの蛋白質を抗原とした多くのRSVワクチンが研究されてきた。

10

【0007】

通常、ウイルスワクチンにおいて最初に試みられるのはホルマリン不活化ワクチンである。インフルエンザウイルスではこの方法で十分なワクチン効果が得られたため、ホルマリン不活化ワクチンは長く利用されてきた。

RSVにおいても1960年代にホルマリン不活化ワクチンが試みられたが、インフルエンザウイルスの場合とは異なり、RSVにおいてはワクチン効果が得られないばかりか、乳幼児で逆に重篤な副作用を引き起こした。（非特許文献2）

それ以降、RSVワクチンにおいてはウイルス構成成分の一部とアジュバントを混合したスプリットワクチンの研究が行われるようになった（特許文献4、特許文献5）。現在に至るまでRSVワクチン開発の試みは、感染防御能のある抗原を特定する試みと、有効なアジュバントの開発、ワクチン接種法についての開発が実施されてきた。これまでに、新規不活性化法による感染防御抗体誘導の報告（非特許文献3）、RSVの膜融合Fタンパクが抗原として有効であるとの報告（非特許文献4）、RSVのGタンパクが抗原として有効であるとの報告（非特許文献5）があり、ワクチンとしての抗原投与方法の違い、添加するアジュバントと抗原の組み合わせの違いにより、種々の結果が出ている現状である。しかしながら依然としてワクチン効果が不十分、もしくは副作用によって現在までに承認及び販売されたRSVワクチンは存在しない。

20

【特許文献1】国際公開WO 2005/097182号公報

【特許文献2】国際公開WO 2007/018152号公報

【特許文献3】国際公開WO 2009/123119号公報

30

【特許文献4】国際公開WO2004/083251 公報

【特許文献5】国際公開WO1995/027787公報

【非特許文献1】Biochem. Biophys. Res. Commun. 366 (2), 308-313 (2008)

【非特許文献2】Am J Epidemiol. 1969 Apr;89 (4):422-34.

【非特許文献3】PLoS one. 6(7), e21823, 1-14 (2011)

【非特許文献4】Future Microbiol. 5, 585-602 (2010)

【非特許文献5】J. Virol. Doi:10.1128/JVI.01162-12 (2012)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

40

過去および現在臨床開発が行われているほとんどのRSVワクチンは経皮注射ワクチンであるため、血液中にIgGを誘導することはできるものの、粘膜上でウイルスの感染防御に重要な役割を果たすIgA抗体を誘導することができない。

一方、特許文献5はアジュバントとして弱毒化コレラ毒素を用いた経鼻RSVワクチンであり、鼻腔粘膜中にIgAを誘導することができる。しかし細菌毒素を用いた経鼻ワクチンは顔面麻痺の副作用が懸念される（The New England Journal of Medicine 2004; 350:896-903）。したがって安全な経鼻ワクチンには代替アジュバントが必須である。

また一般的に従来の粘膜型ワクチンは経皮注射ワクチンよりも多量の抗原を必要とし、生産効率が悪いという問題もある。

本願発明は、RSVにおいて従来経皮注射ワクチンと同等のIgG誘導効果に加え、RSV感

50

染防止効果が期待されるIgAを鼻腔中に誘導し、かつ顔面麻痺のような副作用の懸念がない、安全でRSV感染防御に優れた効果を発揮するワクチンの提供を課題とする。

【0009】

本願発明は、特許文献3に記載されたADピークル(a)をRSV抗原に適用した場合の粘膜ワクチンよりもさらに強い抗体産生能を有し、その結果として経皮注射ワクチンに匹敵するような少量の抗原の経鼻投与で血液と粘膜に優れた感染抑制効果を発揮することのできる改良型RSV粘膜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】

【0010】

本願発明者らは、特許文献3に記載されたADピークル(a)をRSV抗原に適用した場合の粘膜ワクチンの抗体誘導をさらに増強する手段として、インフルエンザウイルス抗原を用いた点鼻薬や粘膜適用型ワクチンに使用されているゲル化剤であるカルボキシビニルポリマー（以下、CVPと略す）が、ADピークルに働いて抗原提示細胞に運ばれる抗原量を増加させ、粘膜免疫IgAおよび血中免疫IgGを誘導する効果を有することを確認し、本願発明を完成させた。

10

【0011】

すなわち、本願発明は、以下の組成：

(a) KnLm（ただしnは4-8、mは11-20）のアミノ酸配列からなる合成ペプチドと脂質とからなるADピークル（以下、ADピークル（a）と略す）；

(b) カルボキシビニルポリマー；および

20

(c) RSV抗原

を含む組成物である。具体的には、(a)～(c)を含む医薬組成物であり、好ましくはRSV粘膜ワクチンであり、より好ましくは経鼻用のRSV粘膜ワクチンである。

【0012】

本願発明の組成物においてRSV抗原(c)は、さらに、ADピークル(a)との組合せ、またはカルボキシビニルポリマー(b)との組合せによっても効果的な感染防御効果を生じさせる量の抗原特異的粘膜免疫IgAおよび血中免疫IgGを産生させることのない量である。

【0013】

この組成物における一つの態様において、前記の合成ペプチドは配列番号1又は配列番号2のアミノ酸配列からなるペプチドであり、好ましくは配列番号1のアミノ酸配列からなるペプチドである。

30

【0014】

またこの組成物における別の態様において、脂質は、ホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジレイノシトール、ホスファチジエタノールアミン、ホスファチジン酸、ラウリル酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸およびオレイン酸の少なくとも1種である。さらに具体的には、脂質は、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ホスファチジルグリセロールおよびパルミチン酸の3種脂質混合物である。

【0015】

この組成物におけるRSV抗原は、RSVの全粒子、弱毒株全粒子、全粒子をスプリット化したもの、Fタンパク、Gタンパク、SHタンパク、Nタンパク、Pタンパク、M2-1タンパク、M2-2タンパク、Lタンパク、Mタンパク、NS1タンパク、若しくはNS2タンパク、又は、それらの組み合わせやそれらを含む混合物のRSV全粒子であり、特に好ましくはRSV-Fタンパクである。

40

【0016】

さらには、各タンパクについて変異の導入、欠失、部分配列の挿入、置換など遺伝子工学的に改変したもの、さらには各タンパクの部分配列、異なるタンパクとのキメラを含む。好ましくは、Fタンパクを遺伝子工学的に改変したもの、またはFタンパクの少なくとも一部を含むキメラである。

また、RSV-Fタンパクを抗原とする場合の組成物の製造法としては、RSV-FタンパクとAD

50

ピークルとの混合物を凍結乾燥または超音波処理したのち、カルボキシビニルポリマーと混合する方法が好ましい。

【0017】

本願発明において、「効果的な免疫誘導を生じさせる量の粘膜免疫IgAおよび血中免疫IgG」とは、例えば、RSV細胞感染系において、ウイルス増殖を抑制する量のIgAおよびIgGである。

【0018】

なお、以下の説明において、前記本願発明の組成(a)で示す合成ペプチドと脂質とからなる組成物を「ADピークル(a)」と記載し、このADピークル(a)と前記RSV抗原とからなる粘膜ワクチンを「RSV+ADピークル」と記載し、RSV抗原とCVPからなる粘膜ワクチンを「RSV+CVP」と記載することがある。また、ADピークル(a)とCVPとRSV抗原とからなる本願発明の組成物を「RSV+ADピークル+CVP」と記載することがある。さらに、本願発明の組成物は「RSV粘膜ワクチン」またはRSV粘膜ワクチン「RSV+ADピークル+CVP」と記載することがある。

10

【発明の効果】

【0019】

本願発明のRSV粘膜ワクチン「RSV+ADピークル+CVP」は、RSV抗原特異的IgAおよびIgG抗体の極めて強い誘導効果と、誘導された抗体のRSV細胞感染系におけるウイルス増殖抑制効果を有している。これらの効果は、特許文献3の粘膜ワクチンをRSV抗原に適用したRSV+ADピークルの効果や、米国特許US 5,158,761公報のCVPをRSV抗原に適用したRSV+CVP

20

の効果からは予期しえないほどの極めて顕著である。

【0020】

例えば、試験例1に示したように、「RSV+ADピークル」は十分な抗体産生誘導を示さないが、本願発明のRSV粘膜ワクチン「RSV+ADピークル+CVP」は、「RSV+ADピークル」に比較して、IgA産生量で24.3倍、IgG産生量で12.1倍の抗体価を示す。また、本願発明のRSV+ADピークル+CVPIは、RSV+CVPと比較して、IgA生産量で21.1倍、IgG生産量で4.6倍の抗体価を示す。

このような強い抗体誘導能から、従来の粘膜ワクチンでは得ることのできない感染防御効果が達成される。

【0021】

30

なお、本願発明の粘膜ワクチン「RSV+ADピークル+CVP」に含まれるADピークル(a)とCVP自身には、抗原認識細胞刺激効果は無いことが確認されている。そのため、本願発明の粘膜ワクチン「RSV+ADピークル+CVP」を投与した場合、RSV抗原以外の抗原による予期しない副作用、例えば自己免疫疾患、ワクチン接種後のアレルギーの増悪等の起きる可能性は極めて低いと考えられる。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】試験1の結果であり、エーテルスプリットRSV抗原とFタンパクを抗原としてマウスに経鼻投与した場合の、鼻洗浄液IgA量と血清IgG量を示す。図中のL、Hは、表1に記載してある抗原タンパク量の少量(L)と大量(H)を示し、L+SF-10、H+SF-10は、それぞれの抗原量(L、H)にADピークルを加えた後に凍結乾燥し、最後に上記のCVPを添加したものを、それぞれ示している。血清の抗RSV IgG抗体のタイターを左に、鼻洗浄液の抗RSV IgA抗体のタイターを右に示す。それぞれ10匹の結果である。

40

【図2】試験1の結果であり、RSV-Gタンパクと、RSV-GタンパクエピトープペプチドのHAコンジュゲートを抗原にしてマウスに経鼻投与した場合の、各群10匹における鼻洗浄液IgA量と血清IgG量を示す。図中のL、Hは、表1に記載してある抗原タンパク量の少量(L)と大量(H)を示し、L+SF-10、H+SF-10は、それぞれの抗原量(L、H)にADピークルを加えた後に凍結乾燥し、最後に上記のCVPを添加したものを、それぞれ示している。血清の抗RSV IgG抗体のタイターを左に、鼻洗浄液の抗RSV IgA抗体のタイターを右に示す。上段(3)には、RSV-Gタンパクの抗原エピトープアミノ酸のHAコンジュゲートの例

50

を、下段(4)にはRSV-Gタンパクを抗原にした場合を示す。抗原量(L、H)にADピークルを加えた実験系をL(H)+ADvと記載し、L(H)+CVP、L(H)+ADv+CVPをL(H)+SF-10としてそれぞれ表記した。

【図3】試験2の結果であり、各検体をマウスに経鼻投与した場合の、鼻洗浄液IgA量(下)と血清IgG量(上)を示す。

【発明を実施するための形態】

【0023】

本願発明のRSV粘膜ワクチン「RSV + ADピークル + CVP」は以下の組成からなる。

合成ペプチド

KnLm(ただしnは4-8、mは11-20)のアミノ酸配列からなる合成ペプチドである。このKnLmはN末側のn個のK(Lys)残基とC末側のm個のL残基が連続している。このような合成ペプチドは、例えば以下のいずれかのペプチドである。なお、括弧内はペプチドの略号である。またアミノ酸残基は1文字記号で示している。

配列番号1(K6L16):KKKKKKLLLLLLLLLLLLLLLLLLLL

配列番号2(K6L11):KKKKKKLLLLLLLLLLLL

配列番号1(K6L16)は、N末側の6個のK(Lys)残基とC末側の16個のL残基(Leu)とからなり、配列番号2(K6L11)は、N末側の6個のK(Lys)残基とC末側の11個のL(Leu)残基とからなる。これらの合成ペプチドは、公知の化学合成法に従って調製された、純度95%以上のものを使用することが好ましい。

脂質

リン脂質としては、肺サーファクタントが含有するリン脂質、例えばホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール等の使用が望ましい。その他、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジン酸、スフィンゴミエリン等を用いることができる。また、脂肪酸としては、ラウリル酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、パルミトオレイン酸、オレイン酸等を用いることができる。更に、肺の膨張が活発なクジラ、イルカ等の水棲動物に由来の脂質を用いることができる。

カルボキシビニルポリマー(CVP)

CVPはアクリル酸を主成分として重合して得られる親水性ポリマーであり、ハイビスワコー103、ハイビスワコー104、ハイビスワコー105、Sigma社製のpAA130(Sigma, St. Louis, MO, Cat No. 181293)、pAA450(Sigma, Cat No.181285)、pAA1250(Sigma, Cat No.306215)などの市販品を用いることができる。中でも化粧品や医薬品用ゲルの作製に汎用されているハイビスワコー104、Sigma社製のpAA130、pAA1250が好ましい。CVPを純水あるいは生理食塩水で超音波処理下に0.2-2.0重量%溶解液を作製した後、NaOH中和液でpH5.0-10.5の作製が可能であるが、RSV抗原の安定性に影響しないpHを選択することが好ましい。例えば、RSV抗原の場合では、pH6.8-8.0、好ましくはpH7.0-7.2に調整する。

【0024】

抗原

RSV抗原としては、全粒子、弱毒株全粒子(国際公開 W02010/053883 公報(ワイス、弱毒株))、全粒子をスプリット化したもの、Fタンパク(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81(24), 7683-7687(1984)(A2株 Fタンパク))、Gタンパク(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82(12), 4075-4079(1985)(A2株 Gタンパク))、SHタンパク(Virology 141(2), 283-291(1985)(A2株 SHタンパク))、Nタンパク(Virology 146(1), 69-77(1985)(A2株 Nタンパク))、Pタンパク(J. Virol. 52(3), 991-994(1984)(A2株 Pタンパク))、M2-1タンパク、M2-2タンパク(J. Virol. 55(1), 101-110(1985)(A2株 M2-1、M2-2タンパク))、Lタンパク(Virology 183(1), 273-287(1991)(A2株 Lタンパク))、Mタンパク(J. Virol. 50(1), 92-99(1984)(A2株 Mタンパク))、NS1タンパク、若しくはNS2タンパク(Virology 143(2), 442-451(1985)(A2株 NS1タンパク、NS2タンパク))、又は、それらの組み合わせやそれらを含む混合物のRSV全粒子が挙げられる。特に好ましくは、RSV-Fタンパクである。

また、各タンパクについて、変異の導入、欠失、部分配列の挿入、置換など遺伝子工学的に改変したもの（国際公開 WO2010/077717 公報（Novavax 683 を含む出願）、国際公開 WO2009/079796 公報（ID Bio Medical、Pre Form 固定化改変F）、国際公開 WO2010/075491 公報（Rochester 大学、F抗原自己フォールディング中和抗体エピトープ）、国際公開 WO2010/149745 公報（GSK、三量体促進化改変Fタンパク）、国際公開 WO2010/039224 公報（マサチューセッツ医科大学、RSV改変タンパクとVLP）、国際公開 WO2010/059689 公報（LYGOCYTE、FタンパクVLP）、国際公開 WO2009/000433公報（PEVION virosome）、米国 US2010111989 公報（PEVION 改変 Fタンパク）、米国 US20080003236 公報（米国保健福祉省、GENVEC ベクタ + RSV）、国際公開 WO2010/057650 公報（Bavarian Nordic、Vaccinia ベクタ + RSV-F）、国際公開 WO2008110627 公報（ピエールファブレメディカモン、RSV マイクロカプセル）、Vaccine 28 (34), 5543-5550 (2010) (Groningen 大学、Virosome)、Vaccine 20 (29-30), 3436-3442 (2002) (Siena大学、Virosome)、Vaccine 27 (46), 6415-6419 (2009) (EPFL、Virosome)、Vaccine 25, 7132-7144 (2007) (Alphavax、RSV-Fタンパク + replicon)) が挙げられる。

さらには、各タンパクの部分配列（前記特許文献9、米国 US2010/0172925 公報（NHRI、CTLエピトープ）、国際公開WO2011/017442 公報（米国保健福祉省、Gタンパクペプチド抗原）、国際公開 WO2011/050168 公報（米国保健福祉省、中和抗体エピトープ断片）、及び異なるタンパクとのキメラ（特許第3290662号（コノートラポラトリー、PIV & RSV キメラ）、特表2010-522540公報（ID Bio Medical、FGFキメラ）、国際公開 WO2011/046925 公報（TECHNO VAX、F & M1 & M2タンパクVLP）、国際公開 WO2010149743 公報（GSK、RSV + PIV3 + MPV キメラ））などが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、Fタンパクと異なるタンパクのキメラである。

また、これらの抗原はRSVサブタイプA以外の、例えば RSVサブタイプB（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94 (25), 13961-13966 (1997)（B1株全タンパク、cs mutant、ゲノム配列AF013254）、（B9320株全タンパク、ゲノム配列 AY353550））に由来するものであっても良い。さらに別の態様においては抗原はニューモウイルス亜科に属するウイルスに由来するものであっても良い（国際公開 WO2010149743 公報（GSK、RSV + PIV3 + MPV キメラ））。

【0025】

これらの抗原は、量的に特に制限されないが、それ単独、特にADピークル(a)との組合せまたはカルボキシビニルポリマー（CVP）との組合せによっても効果的な免疫誘導を生じさせる量の抗原特異的粘膜免疫IgAおよび血中免疫IgGを産生させることのない量を調製して使用することができる。

【0026】

次に、これらの材料からADピークル(a)および本願発明のRSV粘膜ワクチン（RSV + ADピークル + CVP）を調製する方法を説明する。

ADピークル(a)の調製

前記の脂質のうちの幾つかを任意の割合で混合し、脂質量として、例えば10mg/mLの濃度となるようにクロロホルム：メタノール（2：1（v/v））混合液に懸濁し、脂質成分とする。また、合成ペプチドは、例えば5.0mg/mL濃度となるようにエタノールに溶解する。次いで、この脂質成分と合成ペプチドとを混合する。混合比は、合成ペプチドが約0.2～約12.0乾燥重量%、脂質が約88～約99.8乾燥重量%である。この混合物をロータリーエバポレーターを用いて約40 で乾固し、任意の濃度で10%エタノールに再懸濁し、約45 の水浴中で15分間程度振盪混和し、均一分散液を調製し、凍結乾燥する。この乾燥物は約4～30 で保存し、使用時にその都度、純水または生理食塩水を加えて懸濁したのち、超音波、ホモジナイザー、ミキサー、振盪器等を用いて均一分散液とする。

RSV粘膜ワクチン「RSV + ADピークル + CVP」の調製

前記のADピークル(a)、CVPおよびRSV抗原を任意の割合で混合する。すなわち、RSVワクチンの場合、ワクチン中の抗原量（A）に対するADピークル(a)量（V）の乾燥重量比V/Aが所望の値になるよう、ワクチン原液にADピークル(a)液を添加混合し調製する。マウス

1匹当たりには投与する抗原の乾燥重量(A)は約0.01~約100 μg/kg体重、好ましくは約0.03~約50.0 μg/kg体重である。

【0027】

このような抗原量において、IgA抗体産生を優先的かつ選択的に誘導するためのV/Aは、約0.1~約1.0が望ましい。また、IgA及びIgG両抗体産生を誘導するためのV/Aは、約1.0~約100、好ましくは約5~約20の範囲を採用できる。以上のとおりのV/Aにおいて、抗原の約60%以上がADピークルに結合し、それによって得られたRSV粘膜ワクチン(RSV+ADピークル+CVP)はIgA抗体産生及び/またはIgG抗体産生を効率的に誘導することができる。

【0028】

またCVPを加えた最終経鼻投与ワクチン液中のCVP濃度は約0.1%~1.0%、好ましくは0.3%~0.8%の割合である。ADピークル(a)、抗原、CVPを均一に混合するには、ホモジナイザー、ミキサー、振盪器、攪拌器等を用いることができる。

【0029】

なお、RSV粘膜ワクチンが有効な抗体誘導を引き起こすためには、用いる抗原の種類によって適した製造方法が異なる可能性があるが、RSV抗原として特に好ましいFタンパク(試験1)を用いる場合には、以下の超音波処理工程を含む製造法と凍結乾燥工程を含む製造法が推奨される。

【0030】

すなわち、超音波処理を含む方法では、下記実施例1に示したように、RSV-F抗原とADピークル(a)を混合した後、3分間超音波処理を行い、1%CVP生理食塩水溶液を等量加えて本願発明のRSV粘膜ワクチン(RSV+ADピークル+CVP)を製造することができる。この方法は、HAの代わりにRSV抗原を用いていること、CVPを添加することを除き、特許文献3に記載された方法と同一である。

【0031】

一方、凍結乾燥工程を含む方法は、実施例2に示したような以下の工程からなる製造方法である。

(1) ADピークル(a)と抗原とを水(純水)に懸濁

(2) 加温と攪拌とを1回以上反復

(3) 凍結乾燥

(4) 凍結乾燥体を生理食塩水に懸濁して所定濃度に調製

(5) 生理食塩水に溶解したCVP溶液の添加

この方法は後記試験1に示したように、超音波処理を用いて製造した場合と同様に高い抗原特異的なIgAおよびIgGの産生を可能とする、優れた方法である。

【0032】

調製したRSV粘膜ワクチン「RSV+ADピークル+CVP」は、1回の投与で使用することもできるが、2回投与(初回免疫と2次免疫)または3回投与(初回免疫、2次免疫、3次免疫)として使用することが好ましい。このような複数回の免疫処置により、IgAおよびIgGの抗体価を著しく増加させることができる。なお、2回または3回のワクチン投与は、1週間から3週間、好ましくは約2週間の間隔で行うようにする。さらに、本願発明のRSV粘膜ワクチン「RSV+ADピークル+CVP」の投与経路は、鼻腔のほか、口腔内や腔腔への投与も可能である(例えば、Lubrizol Pharmaceutical Bulletin, Polymers for Pharmaceutical Applications, Lubrizol Advanced Materials, Inc. 2008)。

【0033】

以下、実施例を示して本願発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、本願発明は以下の例に限定されるものではない。

【実施例1】

【0034】

[超音波処理工程を含むRSV粘膜ワクチンの製造例]

まず、以下のとおりにADピークル(a)を調製した。

ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ホスファチジルグリセロール(PG)、バル

10

20

30

40

50

ミチン酸(PA)を75:25:10 (w/w/w) の割合で混合し、リン脂質量として10 mg/mLの濃度になるようにクロロホルム:メタノール (2:1 (v/v))混合液に懸濁し、脂質成分とした。また純度95%以上の合成ペプチドK6L16 (KKKKKKLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLL: 配列番号1) (GenScript社製)を5.0 mg/mLになるようにメタノールに溶解した。脂質成分 (DPPC:PG:PA = 75:25:10, w/w/w) 溶液とK6L16ペプチド溶液を重量比として、リン脂質成分:K6L16= 100:2となるように混合し、ロータリーエバポレーターを用いて40 ℃で乾固した。これをリン脂質量として4 mg/mLとなるように、10%エタノールに再懸濁し、45 ℃の水浴中で15分間振盪混和し、均一分散液を調製した。これを凍結乾燥して、ADピークル(a)として4 ℃ ~ -30 ℃で保存した。

【0035】

次に、前記のADピークル(a)を用いてRSV粘膜ワクチン「RSV + ADピークル + CVP」を以下のとおりに調製した。

【0036】

凍結乾燥したADピークル(a)は用時に生理食塩水に懸濁して用いた。以下の方法にて調製したRSV-Fタンパクを抗原として用いた。配列番号3の塩基配列からなるDNAをカイコ幼虫-バキュロウイルス発現系にて発現させ(旧 片倉工業株式会社、現 シスメックス株式会社)、抗FLAG抗体アフィニティゲル(Sigma-Aldrich Co. LLC.)にて精製して配列番号4のアミノ酸配列からなるRSV-Fタンパクを得た。DCプロテインアッセイ(バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社)にて測定した抗原溶液のタンパク濃度は2.03mg/mLであった。

RSV-F抗原とADピークルの混合量は、抗原溶液のタンパク量(A)に対するADピークル(a)溶液のリン脂質量(V)の量比V/A = 8となるように混合し、超音波処理を30秒間隔でオンとオフを3回繰り返して、合計90秒のオンと90秒のオフの合計3分間の超音波処理(Handy sonic model UR-20P、TOMY SEIKO Co., LTD)を行い、生理食塩水に溶解し、中性に調整した1% CVP(ハイビスワコー104)を最終濃度で0.5%になるように加えた。すなわち、マウス一匹当たり、片鼻2 μLを両鼻に投与する合計4 μLに含まれる組成は、RSV抗原タンパク量/ADピークル(a)溶液のリン脂質量/CVP重量 = 1.0 μg/8.0 μg/20 μgとなる。

【0037】

以下、この超音波処理工程を含む方法で製造したRSV粘膜ワクチン「RSV + ADピークル + CVP」を「RSV + SF-10」と記載する。なお、SF-10量は、前記のとおりADピークル(a)(8.0 μg) + CVP(20 μg) = 28 μgであるが、下記の説明ではアジュバントのピークル作用の基本骨格となるADピークル(a)のリン脂質量で表記して、SF-10(8.0 μg)と標記する。他の実施例におけるSF-10量もCVP量を除いた値で記載する。

【実施例2】

【0038】

[凍結乾燥工程を含むによるRSV粘膜ワクチンの製造例]

実施例1と同様のRSV-Fタンパク液に、凍結乾燥したADピークル(a)粉末を純水に溶解して混合調製した。この懸濁液を、ウォーターバスを用いて10分間42 ℃に加温処理し、加温処理中3分、7分時にミキサーで10秒間攪拌して液を均一化した。加温処理後、懸濁液を-20 ℃ ~ -75 ℃で一晩凍結させ、凍結乾燥を行って乾燥粉末体を作製した。凍結乾燥粉末は4 ℃ ~ -30 ℃で保存した。用時に凍結乾燥粉末を、あらかじめ生理食塩水に溶解した0.5% CVP液で泡立たないように軽く攪拌、溶解してRSV粘膜ワクチン「RSV + ADピークル + CVP」とした。マウス1匹当たり片鼻2 μLを両鼻に投与する合計4 μLに含まれるRSV抗原タンパク量は1.0 μg、ADピークル(a)のリン脂質量は8.0 μgである。以下、この凍結乾燥工程を含む方法で製造したRSV粘膜ワクチン「RSV + ADピークル + CVP」をRSV + SF-10Fと記載する。

[比較例1]

【0039】

粘膜ワクチン(RSV + ADピークル(a))を調製した。RSV-FタンパクおよびADピークル(a)は実施例1と同一のものを使用し、ワクチンの調製は実施例1に準じ、最後に1% CVP(ハ

10

20

30

40

50

イビスワコー104)を最終濃度で0.5%になるように加える代わりに、等容量の生理食塩水を加えた。RSVF抗原タンパク量は1.0 µg、ADビークル(a)量は8.0. µgである。

[比較例 2]

【0040】

粘膜ワクチン(RSV+CVP)を調製した。RSV-Fタンパクを純水で希釈し、等量の1% CVP(ハイビスワコー104)を加えた。RSV-Fタンパク量は1.0 µg、ADビークル(a)量は8.0. µgで、CVPは最終濃度0.5%である。

[比較例 3]

RSV-Fタンパクを生理食塩水で希釈して、ワクチンとして使用した。1匹当たりのRSV-Fタンパク投与量は1.0 µgである。

[比較例 4]

8.0. µgのADビークル(a)に1% CVP(ハイビスワコー104)を最終濃度で0.5%になるように加え、SF-10を調整した。

[試験 1]

【0041】

マウスを用いて、各種RSV抗原を用いたADビークルによる経鼻粘膜ワクチンの抗体産生増強作用を試験した。

1. 粘膜ワクチン

表1に示す4種のウイルス抗原：RSVエーテルスプリット、RSV-Fタンパク(分泌型)、RSV-Gタンパク(分泌型)、RSV-Gタンパクのエピトープ部分配列(GenBank/CAA51765の第156-175アミノ酸配列)のそれぞれにオブアルブミン(OVA)、牛血清アルブミン(BSA)、インフルエンザハマグルチニン(HA)をコンジュゲートした抗原を、マウス1匹当たりの経鼻接種抗原量を少量(L)、大量(H)として、表1に示すADビークルとの混合比で混合して、実施例2に記載の凍結乾燥方法にてRSV粘膜ワクチンを調整後、比較例1の方法で最終調整を行い、マウスに経鼻接種した。

【表1】

	抗原の種類	Vaccine/ADv	投与量(マウス1匹当たり) (Low:L, High:H)
1	RSVエーテルスプリット	8.2	0.24, 0.97
2	F蛋白(一膜貫通領域)分泌型 バキュロウイルスーカイコ発現系	2.0	1.01, 4.06
3	G蛋白質エピトープペプチド(G-pep)	30.8	0.06, 0.26
	G-pep-OVA	4.3	0.47, 1.88
	G-pep-BSA	4.0	0.50, 1.98
	G-pep-HA	4.7	0.43, 1.72
4	G蛋白(一膜貫通領域)分泌型 バキュロウイルスーカイコ発現系	2.2	0.90, 3.60

2. 動物

6-8週齢、BALB/c雌マウスを日本チャールズリバーから購入して用いた。全ての動物実験はアステラス製薬筑波研究センターの動物実験施設で行われ、アステラス製薬動物実験委員会のガイドラインに従って行われた。

3. 免疫法

ワクチンの経鼻投与においては、上記1の4種の粘膜ワクチンを、片鼻に2 μ Lづつを両側に投与して、合計4 μ Lをソムノペンチル（共立製薬株式会社）(81.0 mg/kg)で麻酔したマウスの両側鼻腔に点鼻投与した。検定には抗原量を少量(L)、大量(H)の2種類で実施した。各群は10匹のマウスから成る。なお、抗原量(L、H)は表1に示したとおりである。

【0042】

免疫は初回免疫後2週目に同様の組成からなる検体を、それぞれの群に2次免疫として同量経鼻投与した。2次免疫後2週目に同様な方法で3次免疫を行い、その後2週目に検体を採取した。なお、ワクチンの投与は合計3回おこなっているが、2次免疫で終了してもほぼ同様の結果が得られるものと考えられる。

4. マウス鼻腔洗浄液および血清の調製

3次免疫後2週間目のマウスの、鼻腔洗浄液および血清を調製して、RSV抗原特異的なIgA、IgGの測定を行った。文献(Mizuno D, Ide-Kurihara M, Ichinomiya T, Kubo I, Kido H. Modified pulmonary surfactant is a potent adjuvant that stimulates the mucosa I IgA production in response to the influenza virus antigen. J Immunol. 2006;176:1122-30)記載の方法に準じて、以下のとおりに行った。

【0043】

ワクチン投与マウスをソムノペンチル麻酔下で開腹開胸し、気管を切開しアトム静脈カテーテル節付3 Fr (アトムメディカル株式会社 日本・東京) 鼻腔方向へ挿入し、1 mLの0.1% BSAを含む生理食塩水を注入し、鼻から出てきた液を採取した。この液を鼻洗浄液として用いた。さらに、眼窩もしくは腹部大静脈、あるいは心臓より採血を行い、遠心分離により血清を調製した。

5. 抗RSV抗体価の測定

鼻洗浄液の抗RSV抗原IgA抗体含有量および血清中の抗RSV抗原IgG抗体含有量は、ELISA assayにより定量した。

【0044】

ELISA assayは、以下の方法で行った。96ウェルNuncイムノプレート(Nalgen Nunc International アメリカ・ニューヨーク)各ウェルに、免疫に用いた抗原と同じものを抗原タンパク5ng個層化した。次いで0.05M Carbonate-Bicarbonate(pH 9.6) 50 μ Lを加え、4で一晩固層化反応を行った。その後洗浄液(25 mM Tris, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20)で3回すすぎ抗原液を除去した。各ウェルに0.15 M NaCl、1% BSAを含む50 mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.6) 200 μ Lを加え、室温で1時間ブロッキング反応を行った。各ウェルを洗浄液で3回すすいだのち、サンプル結合緩衝液(50 mM Tris, 0.15 M NaCl, 1% BSA, 0.05% Tween 20, pH 7.6)にて適量に希釈した鼻洗浄液あるいは血清を50 μ L加え、室温で1時間反応させた。Anti-mouse IgA PeroxidaseまたはAnti-mouse IgG Peroxidase (Sigma.)を二次抗体として使い、TMB Microwell Peroxidase Substrate System (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. アメリカ・メリーランド)を用いて発色反応を行った。各ウェルに50 μ L、2 N H₂SO₄ (ナカライテスク株式会社)を添加することによって反応を停止し、450 nmの吸光度をEnVisionで測定した。

6. 結果

図1には、RSVエーテルスプリット抗原、RSV-Fタンパク抗原を抗原とするRSV粘膜ワクチンを経鼻摂取した時の、血清の抗RSV IgG抗体量および鼻洗浄液の抗RSV IgA抗体量を、Log₂タイターで示している。図2には、RSV-Gタンパク抗原と、G-タンパク抗原エプトープペプチドをHAにコンジュゲートした抗原を経鼻摂取した時の、血清の抗RSV IgG抗体量、および鼻洗浄液の抗RSV IgA量を、Log₂タイターで示している。なお、マウス1匹当たり投与した抗原量の少量(L)、大量(H)は表1に記載のとおりである。

図1および2に示すように、抗原量がLからHに変化することで、いずれの抗原でも抗体価は上昇傾向を示すが、RSV-Fタンパクにおいて最も優れた鼻洗浄液の抗RSV IgA抗体産生と血液の抗RSV IgG抗体産生が観察された。RSVエーテルスプリット抗原、RSV-Gタ

10

20

30

40

50

ンパク抗原の場合、血液のIgG抗体の誘導は起きるが、鼻洗浄液の抗RSV IgA抗体産生が起きにくかった。これらの結果から、SF-10アジュバントに適したRSV抗原はFタンパクであることが確認された。

[試験2]

【0045】

以下の検体について、抗体産生増強効果を試験した。なお、RSV抗原としてはRSV-Fタンパクを用いた。

- ・生理食塩水
- ・RSV単独（比較例3）
- ・RSV + CVP（比較例2）
- ・RSV + SF-10F（実施例2）
- ・RSV + ADピークル(a)（比較例1）
- ・RSV + SF-10（実施例1）

1. 動物

試験1と同様のマウスを使用した。

2. 免疫法

ワクチンの経鼻投与においては、上記5種の検体を、片鼻に2 μ Lづつを両側に投与して、合計4 μ Lをソムノペンチル（共立製薬株式会社）（81.0 mg/kg）で麻酔したマウスの両側鼻腔に点鼻投与した。各群は10匹のマウスから成る。

【0046】

免疫は初回免疫後2週目に同様の組成からなる検体を、それぞれの群に2次免疫として同量経鼻投与した。2次免疫後2週目に同様な方法で3次免疫を行い、その後2週目に検体を採取した。なお、ワクチンの投与は合計3回おこなっているが、2次免疫で終了してもほぼ同様の結果が得られるものと考えられる。

3. マウス鼻腔洗浄液および血清の調製

試験1の方法と同様な条件で実施した。

【0047】

4. 抗RSV-F抗体価の測定

鼻洗浄液の抗RSV-F IgA含有量および血清中の抗RSV-F IgG含有量は、ELISA assayにより定量した。

【0048】

ELISA assayは、以下の方法で行った。96ウェルNuncイムノプレート（Nalgen Nunc International アメリカ・ニューヨーク）各ウェルにRSV Fタンパク 5 ngを固層化して、試験1に記載している方法で測定した。

7. 結果

7-1. 抗体産生増強作用

抗RSV抗体の誘導結果を、図3の下段（鼻洗浄液中の抗RSV IgA抗体）、および図3の上段（血液中の抗RSV IgG抗体）に示す。結果の要約は以下のとおりである。

- (1) RSV + SF-10（実施例1）投与群における抗体価は、RSV + ADピークル(a)（比較例1）よりもIgAで24.3倍、IgGで12.1倍高かった。
- (2) RSV + SF-10（実施例1）投与群における抗体価は、RSV + CVP（比較例2）よりもIgAで21.1倍、IgGで4.6倍高かった。
- (3) RSV + SF-10F（実施例2）投与群における抗体価は、RSV + ADピークル(a)（比較例1）よりもIgAで12.1倍、IgGで18.4倍高かった。
- (4) RSV + SF-10F（実施例2）投与群における抗体価は、RSV + CVP（比較例2）よりもIgAで10.6倍、IgGで7.0倍高かった。
- (5) RSV抗原単独（比較例3）の抗体価は、非常に低いものであった。

RSV + SF-10やRSV + SF-10Fにおけるこのような顕著に優れた抗体誘導効果は、RSV抗原単

10

20

30

40

50

独を用いた場合には認められず、特許文献3において公知のADピークル(a)と、米国特許US5,158,761において公知のCVPとの単純な組み合わせをRSV抗原に適用することから予測される範囲を遙かに超えるものであった。またSF-10とRSV Fタンパクとの組み合わせからなる組成物の製造には凍結乾燥と超音波処理が共に使用できることが判明した。

[試験3]

以下の検体について、鼻腔洗浄液中の抗RSV IgA抗体のウイルス中和活性を試験した。なお、RSV抗原としてはRSV-Fタンパクを用いた。また、使用した動物、免疫法および鼻腔洗浄液の調製は試験2と同様に行った。

- ・生理食塩水
- ・RSV + SF-10 (実施例1)

10

1. 中和活性の測定

鼻腔洗浄液の抗RSV-F IgA抗体のウイルス中和活性は、中和されたウイルス力価の変動を50%細胞変性終末点 (TCID₅₀ 法、Reed LJ & Muench H. Am J Hygiene 27: 493-497, 1938) 法にて測定した。RSVに適合したTCID₅₀の迅速な簡易測定法としてKaul TN等の方法 (Laul TN, Welliver RC, Ogra PL. J Clin Microbiol 13(5): 957-962, 1981) と naphthol blue-black を用いたイメージング測定法 (Perricone MA, Saldate V, Hyde DM. Microsc Res Tech 31(3): 257-264, 1995) を組み合わせて、以下のとおりに測定した。96 ウェルNuncイムノプレートにHEp-2細胞を2 × 10⁵ 細胞加え、一晚培養した。鼻腔洗浄液から予めKAPTIV-AETM IgA-affinity column (Tecnogen S.p.A., Piacenza, Italy) でIgA分画 (全IgA) を部分精製して50 mg/50 mLに調整した検体に、RSV A臨床分離ウイルス株 (仙台ウイルスセンターより供与) の段階希釈系列液 (20, 60, 180, 540, 1620, 4820, 14580 倍希釈) 50 mL を加えて100 mLとして、室温で30分間反応した後でこれを細胞に加えた。細胞を37 °C の条件下で72時間培養した後、10%フォルマリンで細胞を10分間固定し、naphthol blue-blackにて細胞を30分間染色した。2回の流水洗浄で変性した細胞を除去して、プレートに残存する細胞を.1 N NaOH 100 mL(micro L)で溶解して630 nmの吸光度を測定して細胞変性終末点を測定した。

20

2. 結果

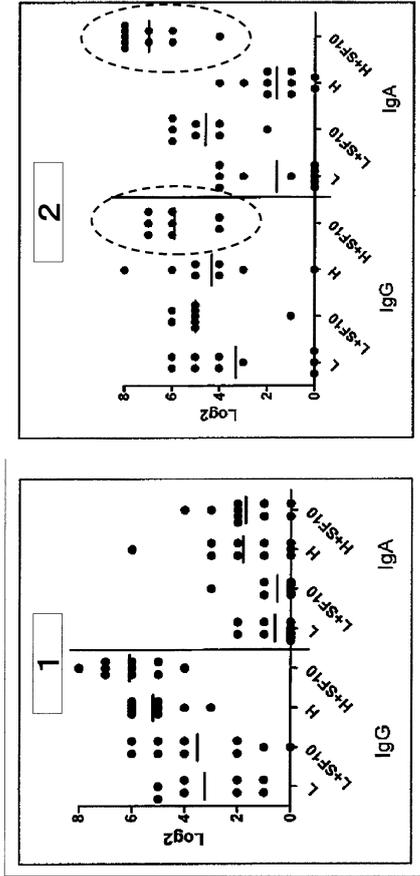
生理食塩水を経鼻投与したマウスから採取したIgA分画を細胞培養系に加えた条件で示すウイルスのTCID₅₀ 価、1 × 10^{3.7}が、RSV + SF-10 (実施例1) 由来のIgA分画ではTCID₅₀ 価、1 × 10^{2.7}となり、ウイルス価は1/10に減少した。データには示していないが、実施例2のRSV + SF-10F由来の検体でもほぼ同様な値が得られた。以上の結果から、本願発明の組成物 (粘膜ワクチンRSV + SF-10およびRSV + SF-10F) が誘導する鼻腔洗浄液にはRSV中和活性が認められ、感染防御効果を発揮することが確認された。

30

【 図 1 】

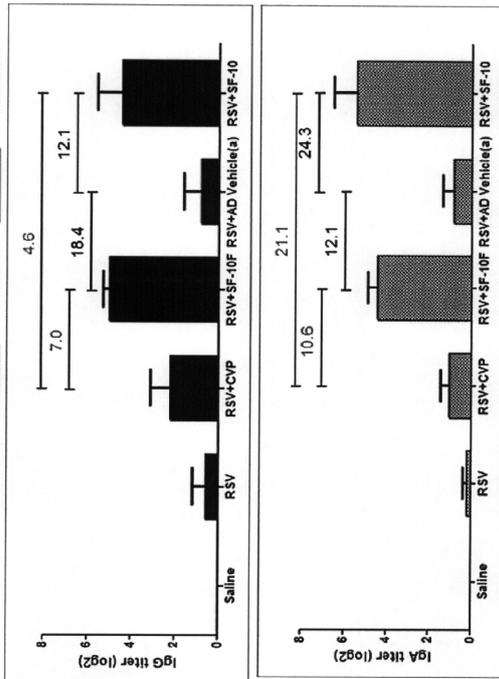
F 蛋白質

RSV エーテルスプリット

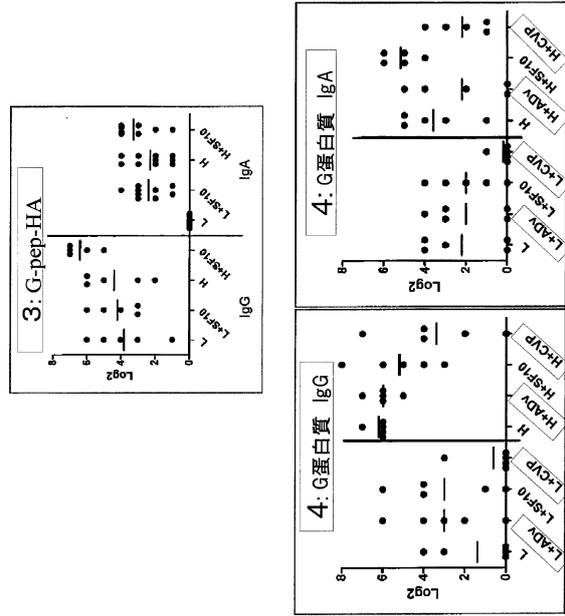


【 図 3 】

比較例3 比較例2 実施例2 比較例1 実施例1



【 図 2 】



【配列表】

0006085886000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 47/12	(2006.01)	A 6 1 K 47/12
A 6 1 P 31/14	(2006.01)	A 6 1 P 31/14
C 0 7 K 7/08	(2006.01)	C 0 7 K 7/08
C 0 7 K 14/00	(2006.01)	C 0 7 K 14/00
C 0 7 K 14/08	(2006.01)	C 0 7 K 14/08

(72)発明者 上田 博嗣
東京都中央区日本橋本町二丁目3番11号 アステラス製薬株式会社内

(72)発明者 吉川 浩司
東京都中央区日本橋本町二丁目3番11号 アステラス製薬株式会社内

(72)発明者 大隅 恵介
東京都中央区日本橋本町二丁目3番11号 アステラス製薬株式会社内

(72)発明者 山本 信行
東京都中央区日本橋本町二丁目3番11号 アステラス製薬株式会社内

(72)発明者 周藤 健治
東京都中央区日本橋本町二丁目3番11号 アステラス製薬株式会社内

審査官 菊池 美香

(56)参考文献 特開平03-038529(JP,A)
国際公開第2001/017556(WO,A1)
国際公開第2009/123119(WO,A1)
Vaccine, 2000年, Vol.18, p.2723-2734

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K	3 9 / 3 9
A 6 1 K	3 9 / 0 0
A 6 1 K	3 9 / 1 5 5
A 6 1 K	4 7 / 1 2
A 6 1 K	4 7 / 1 4
A 6 1 K	4 7 / 3 2
A 6 1 P	3 1 / 1 4
C 0 7 K	7 / 0 8
C 0 7 K	1 4 / 0 0
C 0 7 K	1 4 / 0 8

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)