

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5245092号

(P5245092)

(45) 発行日 平成25年7月24日 (2013. 7. 24)

(24) 登録日 平成25年4月19日 (2013. 4. 19)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 1/21 (2006. 01)	C 1 2 N 1/21 Z N A
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 A
A 6 1 K 48/00 (2006. 01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 39/10 (2006. 01)	A 6 1 K 39/10
A 6 1 P 11/00 (2006. 01)	A 6 1 P 11/00

請求項の数 28 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-558682 (P2008-558682)	(73) 特許権者	591282973
(86) (22) 出願日	平成19年3月7日 (2007. 3. 7)		アンスティテュ パストゥール ドゥ リル
(65) 公表番号	特表2009-529338 (P2009-529338A)		INSTITUT PASTEUR DE LILLE
(43) 公表日	平成21年8月20日 (2009. 8. 20)		フランス国、59019 リル・セデクス
(86) 国際出願番号	PCT/EP2007/001942		、ボワト・ポスタル 245、リュ・デュ・プロフェッスール・カルメット 1
(87) 国際公開番号	W02007/104451	(73) 特許権者	596005872
(87) 国際公開日	平成19年9月20日 (2007. 9. 20)		アンスティテュ・ナショナル・デュ・ラ・サンテ・エ・デュ・ラ・ルシエルシュ・メディカル
審査請求日	平成21年12月15日 (2009. 12. 15)		フランス国、75654 パリ・セデクス 13、リュ・デ・トルビヤック 101
(31) 優先権主張番号	60/780, 827		
(32) 優先日	平成18年3月10日 (2006. 3. 10)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/817, 430		
(32) 優先日	平成18年6月30日 (2006. 6. 30)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
微生物の受託番号	CNCM CNCM I-3585		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 百日咳に対する単一用量ワクチンとしての生弱毒化ボルデテラ株

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 位置 9 のリジンがアルギニンに置換され、位置 1 2 9 のグルタミン酸がグリシンに置換された酵素的に不活性な毒素をコードする変異型ペルツシス毒素 (p t x) 遺伝子

(b) 欠失型皮膚壊死性毒素 (d n t) 遺伝子、および

(c) ボルデテラ a m p G 遺伝子に取って代わる E. コリ a m p G 遺伝子を少なくとも含む弱毒化された変異型ボルデテラ・ペルツシス株。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の変異型ボルデテラ・ペルツシス株であって、得られる株が 5 % 未満の残留気管細胞毒 (T C T) 活性を発現する変異型ボルデテラ・ペルツシス株。

【請求項 3】

3 重変異株である請求項 1 または 2 に記載の変異型ボルデテラ・ペルツシス株。

【請求項 4】

2 0 0 6 年 3 月 9 日に番号 I - 3 5 8 5 として国立培養微生物収集所 (C. N. C. M.) に寄託された B P Z E 1 株である、請求項 1 から 3 の何れか 1 項に記載の変異型ボルデテラ・ペルツシス株。

【請求項 5】

ボルデテラ種に起因する感染に対するワクチンとしての使用のための請求項 1 から 4 の何れか 1 項に記載の弱毒化ボルデテラ・ペルツシス株。

10

20

(b) 欠失型皮膚壊死性毒素 (d n t) 遺伝子、および
 (c) ボルデテラ a m p G 遺伝子に取って代わる E. コリ a m p G 遺伝子
 を少なくとも含む変異型ボルデテラ株の使用。

【請求項 2 3】

ボルデテラ感染に対する防御のレベルが 9 5 % を超える請求項 1 3 から 2 2 の何れか 1 項に記載の使用。

【請求項 2 4】

ボルデテラ感染に対する防御のレベルが 9 9 % を超える請求項 1 3 から 2 2 の何れか 1 項に記載の使用。

【請求項 2 5】

哺乳類におけるボルデテラ感染の治療のための粘膜応答および全身的応答を提供するためのワクチンの製造のための、請求項 4 に記載の弱毒化ボルデテラ・ペルツシス株の使用。

【請求項 2 6】

請求項 1 から 4 の何れか 1 項に記載の変異型ボルデテラ・ペルツシス株であって、更に、R N A またはタンパク質をコードする少なくとも 1 つの異種性核酸配列を含む変異型ボルデテラ・ペルツシス株。

【請求項 2 7】

前記少なくとも 1 つの異種性核酸配列が抗原である請求項 2 6 に記載の変異型ボルデテラ・ペルツシス株。

【請求項 2 8】

少なくとも 1 つの異種性抗原を発現するためのベクターとしての、請求項 1 から 4 の何れか 1 項に記載の変異型ボルデテラ・ペルツシス株。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、少なくとも、変異型 p t x 遺伝子、欠失型または変異型 d n t 遺伝子および異種性 a m p G 遺伝子を含む、変異型ボルデテラ (B o r d e t e l l a) 株に関する。弱毒化変異型ボルデテラ株は、ボルデテラ感染の治療または予防のための免疫原性組成物またはワクチンに使用することが可能である。ワクチンまたは免疫原性組成物の製造のための弱毒化ボルデテラ株の使用、ならびにボルデテラによる感染症から哺乳類を防御する方法もまた、本発明の一部を構成する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

百日咳は、未だなお世界中の死の主要な原因の 1 つであり、その発生率はワクチンの普及率が高い国々でさえ増加している。感染の可能性は全ての年齢層にあるが、乳児は若すぎるために現在使用可能なワクチンで防御できないため、乳児は最も深刻である。

【0 0 0 3】

百日咳 (w h o o p i n g c o u g h または p e r t u s s i s) は、2 0 世紀後半に有効なワクチンが導入される以前は高い死亡率をもたらす重篤な幼児期の疾病である。これらのワクチンの成功は、この疾病が本質的に制御可能であるという考えを生み出したが、まだなお年間に世界で 2 0 0 , 0 0 0 から 4 0 0 , 0 0 0 人が百日咳に関連して死亡しており、この疾病はまだ感染性の病原体による死亡の原因のなかで 6 番目に位置している [1] 。発展途上国において最も流行しているものの、この疾病はまた、アメリカを含む先進国において再び発生しており [2 , 3] 、アメリカでは、発生率は過去 2 年にわって 5 倍に増大している [4] 。予想外なことに、百日咳の疫学はワクチンの普及率が高い国々において変化しており、そのような国々では、青年および成人の百日咳の症例の頻度がますます増大している [5] 。これは、恐らく、青年期のワクチン仲介免疫の進行性の漸減が原因である。百日咳は、しばしば不規則でそれゆえに診断が困難であるため、一般に成人に

10

20

30

40

50

G 遺伝子に置き換えることを提案しており、このことは、生産される T C T の量を減少させる。

【0012】

従って、先行技術は、様々なタイプのワクチン接種組成物を開示しているものの、生後6ヶ月前の新生児に防御を提供しうるワクチンまたは免疫原性組成物を提供するという問題に取り組めていない。その上、先行技術は、ボルデテラ感染に対する迅速な防御免疫を提供する免疫原またはワクチンを開示していない。先行技術はまた、ボルデテラ感染に対する防御免疫であって、少なくともワクチン接種後の2ヶ月間にわたり増大する防御免疫を提供する免疫原性組成物またはワクチンを開示してない。

【0013】

それゆえ、本発明の目的は、先行技術の欠陥を克服することである。

【0014】

本発明の別の目的は、コロニー形成能および防御免疫誘導能を維持しつつも、病原性を減少させるために、B. ペルツシスまたはB. パラペルツシス (parapertussis) といったボルデテラ株の遺伝的弱毒化を通して、生弱毒化ワクチン候補または免疫原性組成物を製造することである。

【0015】

本発明の別の目的は、現在のaPVによって提供される防御よりも優れた防御を単一の鼻腔内投与後の新生児に誘導するワクチンまたは免疫原性組成物を提供することである。

【0016】

本発明のさらに別の目的は、ボルデテラ・パラペルツシス、ならびにaPVのワクチン接種後には見られないボルデテラ・ペルツシスの感染に対する防御を提供することである。

【0017】

本発明の別の目的は、新生児においてボルデテラ感染に対する強力な防御免疫を誘導することである。

【0018】

本発明のさらに別の目的は、粘膜的および全身的免疫を誘導するワクチンまたは免疫原性組成物を提供することである。

【0019】

本発明の別の目的は、生涯の早期において単一用量の経鼻ワクチンとして投与される生弱毒化ボルデテラ・ペルツシス、いわゆるBPZE1を製造することである。

【0020】

本発明の更に別の目的は、新生児のワクチン接種に使用できるだけでなく、百日咳の流行の場合にあらゆる世代の全ての哺乳類に使用することができるワクチンを提供することである。

【0021】

本発明の別の目的は、迅速な防御免疫および/または少なくともワクチン接種後2ヶ月間にわたり増大する防御免疫を誘導する、ボルデテラ感染に対するワクチンを提供することである。

【0022】

本発明の更に別の目的は、相対的に製造コストの低いボルデテラ感染に対する予防または治療を提供することである。

【0023】

これらのおよびその他の目的は、発明の概要、発明の詳細な説明および特許請求の範囲によって証明されるような本願発明によって達成される。

【発明の概要】

【0024】

本発明は、少なくとも変異型ペルツシス毒素 (ptx) 遺伝子、欠失型または変異型皮膚壊死性毒素 (dnt) 遺伝子、および異種性ampG遺伝子を含む変異型ボルデテラ株

10

20

30

40

50

ルツシス毒素を意味する。PTXは6つのポリペプチドS1からS5から成り、酵素活性成分はS1と呼ばれる。PTXは34アミノ酸のシグナル配列を有すが、成熟鎖は35から269番目のアミノ酸から成る。PTXは、B. ペルツシスから発現される主要な病原性因子(virulence factor)である。これらの毒素のA成分はADPリボシルトランスフェラーゼ活性を示し、B部分は、毒素を宿主受容体に結合させ、Aを作用部位に移行させることを仲介する(57)。

【0036】

本願で使用される「DNT」という略語は、皮内に注入された場合にマウスおよびその他の実験動物において局所的な病変を誘導する熱不安定性毒素であるペルツシス皮膚壊死性毒素を意味する。低用量で静脈内に注射された場合、マウスにとっては致死的である(58から61)。DNTは、ブタの萎縮性の鼻炎における鼻甲介の萎縮の発生における病原性因子と考えられている(62、63)。

10

【0037】

本願で使用される「TCCT」という略語は、ボルデテラによって合成される病原性因子である気管の細胞毒を意味する。TCCTはペプチドグリカン断片であり、インターロイキン-1生成および一酸化窒素合成を誘導する能力を有する。それは、繊毛の静止を引き起こす能力を有し、呼吸器の上皮細胞に対して致死の効力を有する。

【0038】

「哺乳類」という用語は、ヒトを含む、あらゆる哺乳綱の様々な温血脊椎動物であって、皮膚は毛で覆われ、メスは子供を育てるために乳を作り出す乳腺を有していることを特徴とする動物を包含する。

20

【0039】

「弱毒化」という用語は、免疫応答を刺激しおよび防御免疫を作り出すことができるが、何れの病気ももたらさない、弱められ、毒性の低下したボルデテラ株を意味する。

【0040】

「迅速な防御免疫」の用語は、ボルデテラに対する免疫が、本発明の変異型ボルデテラ株の投与後、短時間で与えられることを意味する。「短時間」とは、ワクチン接種され1週間後にチャレンジ(challenge)されることを意味する。より明確には、現存する病原体特異的末梢性リンパ球、CD8⁺細胞障害性エフェクター(CTLs)およびCD4⁺ヘルパー細胞の急速な増殖がある。CD4⁺ヘルパー細胞は、B細胞の成熟および抗体産生を誘導する。従って、記憶プールをもったリンパ球は、引き続く感染の時に急速に増殖する態勢が整う。

30

【0041】

「ボルデテラ株」という用語は、ボルデテラ・ペルツシス、ボルデテラ・パラペルツシスおよびボルデテラ・ブロンキセプティカ(bronchiseptica)由来の株を包含する。

【0042】

「ボルデテラ感染」という用語は、以下の3つの株のうち少なくとも1つによって引き起こされる感染症である：ボルデテラ・ペルツシス、ボルデテラ・パラペルツシスおよびボルデテラ・ブロンキセプティカ。

40

【0043】

「子供」とは、生後6ヶ月から12歳までの人または哺乳類を意味する。

【0044】

「新生児」とは、生後1日から24週間後までの人または哺乳類を意味する。

【0045】

本願で使用される「治療」という用語は、疾病の治癒およびその原因の除去に限定されず、対象となる疾病に関係する症状の治癒、緩和、除去もしくは軽減、または宿主の何れかの障害または機能不全にかかる可能性の防止もしくは減少する意味を特に包含する。

【0046】

「防御」および「予防」という用語は、本願では互換的に使用され、ボルデテラによる

50

その他の突然変異は、また、米国特許 6, 713, 072 (本願に援用される) に記述されるような方法、ならびに検出不可能なレベルに毒素活性を減少させることが可能な何れかの既知のまたはその他の突然変異を使用することが可能である。対立遺伝子の交換は、最初に p t x オペロンを削除するために使用され、次に変異型バージョンの挿入のために使用される。

【0057】

最後に、d n t 遺伝子は、その後、対立遺伝子の交換を使用して、ボルデテラ株から除去される。全体的な除去の他に、酵素活性は、点変異によって阻害することもできる。D N T は N 末端領域の受容体結合ドメインおよび C 末端部分の触媒ドメインから構成されるため、C y s - 1 3 0 5 を A l a - 1 3 0 5 に取り替える d n t 遺伝子の点変異は、D N T の酵素活性を抑制する (68)。D N T は、ボルデテラ・ブロンキセプティカの重要な毒素として同定され、わずかな量の注入で致死活性を示す (26)。

10

【0058】

変異型 p t x 遺伝子を挿入して d n t 遺伝子を阻害または除去する対立遺伝子の交換の他に、遺伝子の翻訳領域を、遺伝子配列またはプラスミドの挿入によって中断させることができる。この方法もまた本発明において意図される。

【0059】

本発明の 3 重変異型株は、B P Z E 1 株と呼ばれ、2006 年 3 月 9 日に番号 C N C M I - 3 5 8 5 としてフランス、パリの国立培養微生物収集所 (C o l l e c t i o n N a t i o n a l e d e C u l t u r e s d e M i c r o o r g a n i s m e s) (C N C M) に寄託された。B P Z E 1 に導入される突然変異は、急激な弱毒化をもたらすが、細菌のコロニー形成および残存を可能とする。従って、その他の実施態様において、本発明は、投与される場合に粘膜免疫および全身性免疫を誘導することができる B P Z E 1 を提供する。その他の側面において、B P Z E 1 は鼻腔内に投与される。

20

【0060】

本発明の変異型ボルデテラ株は、免疫原性組成物に使用できる。そのような免疫原性組成物は、哺乳類において抗体産生応答およびまたは好ましくは T 細胞反応の何れかの免疫応答を生じさせるのに有用である。好都合に、T 細胞反応は、ボルデテラ感染からまたはその結果から哺乳類を防御するようなものである。

【0061】

本発明の変異型ボルデテラ株は、ワクチンまたは免疫原性組成物において、生きた株として、または化学的に若しくは熱的に死滅させた株として使用することができる。一側面において、生きた株は経鼻投与に使用され、一方、化学的に若しくは熱的に死滅させた株は、全身的または粘膜的投与に使用することができる。

30

【0062】

免疫原性組成物はさらに、全身または局所投与に使用される場合、医薬的に適した賦形剤または担体および/または媒体を含んでよい。医薬的に許容可能な媒体は、リン酸緩衝生理食塩水、蒸留水、乳剤 (例えば油/水乳剤)、さまざまな種類の湿潤剤無菌液等を含むが、これらに限定されない。

【0063】

本発明の免疫原性組成物は、また、アジュバント、すなわち、T 細胞に仲介される反応、および、特に本発明の活性成分に対する C D 4 + に仲介されるまたは C D 8 + に仲介される免疫応答を促進または増加させることができる何れかの物質または化合物を含むことができる。ムラミルペプチド、例えば M D P、I L - 1 2、アルミニウムリン酸塩、水酸化アルミニウム、A l u m および/または M o n t a n i d e (登録商標) といったアジュバントが、本発明の免疫原性組成物に使用することができる。

40

【0064】

化学的にまたは熱的に処理した変異型ボルデテラ株をワクチンまたは免疫原性組成物に使用する場合、アジュバントおよび乳剤が免疫原性組成物に使用されることが、当業者に理解されるだろう。

50

株、組成物またはワクチンで、もしくは無細胞のワクチンで、または両者の組合せで、最初（初回ワクチン接種）、その後の少なくとも1回のリコール（recall）（続く投与）が為される。

【0075】

一側面において、ワクチンの鼻腔内投与または吸入であって、その投与のタイプは、コストが低くおよび下記の気道において本発明の弱毒化株によるコロニー形成が可能であるワクチンの鼻腔内投与または吸入が達成される：上気道（鼻部および鼻の通路、副鼻腔、およびのどまたは咽頭）および／または呼吸気道（喉頭（voice boxまたはlarynx）、気管、気管支および気管支梢）および／または肺（呼吸細気管支、腺胞管、肺胞嚢および肺胞）。

10

【0076】

液体溶液、懸濁液、乳剤、リポソーム、クリーム、ゲルまたはそのような多相性の組成物の類似物の形態で、免疫原性組成物またはワクチンの鼻腔内投与は達成される。溶液および懸濁液はドロップとして投与される。溶液は、また、点鼻薬瓶からまたは鼻吸入器からの微細な霧として投与することができる。ゲルは、1回の投与に必要な用量を含む小さなシリンジにて調合される。

【0077】

免疫原性組成物またはワクチンの吸入は、溶液、懸濁液および粉末の形態で達成することができ；これらの製剤は、エアロゾルまたは乾燥粉末吸入器によって投与される。配合粉末は、通気器またはパフアー（puffers）にて投与される。

20

【0078】

呼吸器疾患を治療するための多価ワクチンの製造のための、少なくとも変異型 p t x 遺伝子、欠失型または変異型 d n t 遺伝子および異種性 a m p G 遺伝子を含む変異型ボルデテラ株の使用は、本発明のまた別の側面である。この点に関して、上述の弱毒化変異型ボルデテラ株は、異種抗原を呼吸粘膜へ運ぶための異種性発現プラットフォームとして使用できる。従って、例えばナイセリア、ニューモフィラ（Pneumophila）、エルシニア、シュードモナス、マイコバクテリウム、インフルエンザ等の呼吸病原体は、担体として B P Z E 1 を使用して感染を予防できる。

【0079】

ボルデテラ感染の治療または予防のためのワクチンの製造のための、本願に記載される生弱毒化変異型ボルデテラ株の使用もまた、本発明に包含される。この点に関して、ワクチンは、B. ペルツシスおよびB. パラペルツシスによる感染症の同時的な治療または予防に使用することができる。

30

【0080】

ペルツシス伝染病の場合における迅速な防御免疫を提供するワクチンの使用もまた本発明に包含される。

【0081】

予防接種後少なくとも2ヶ月にわたり増加する、迅速な防御免疫を提供するワクチンの使用もまた本発明に包含される。

【0082】

ワクチンまたは免疫原性組成物はまた、キットにて提供される。キットは、ワクチンまたは免疫原性組成物、および免疫化のための説明書を提供する情報パンフレットを含む。

40

【0083】

本発明はまた、T細胞仲介免疫応答および特にCD4⁺仲介免疫応答またはCD8⁺仲介免疫応答を誘導する方法であって、ヒト以外の哺乳類またはヒト哺乳類において本発明の生弱毒化ボルデテラ株を投与することを含む方法に関する。

【0084】

ボルデテラによる感染によって起こされる疾病から哺乳類を防御する方法であって、少なくとも変異型 p t x 遺伝子、欠失型または変異型 d n t 遺伝子および異種性 a m p G 遺伝子を含む変異型ボルデテラ株をそのような治療を必要とする前記哺乳類に投与すること

50

【0090】

例2-B. ペルツシスBPZE1の構築

B. ペルツシスBPZE1を構築するために、B. ペルツシスampG遺伝子を、対立遺伝子の交換を使用して、E. コリアmpGと取り替えた。metと名付けられ、かつB. ペルツシスゲノムの位置49,149から49,990 (http://www.sanger.ac.uk/Projects/B_pertussis/) (B. ペルツシスampG遺伝子上流)に位置するPCR断片を、オリゴヌクレオチドA: 5'-TATAAATCGATATTCTGCTGGTTTCGTTCTC-3' (SEQ ID No: 5) およびB: 5'-TATAGCTAGCAAGTTGGGAAACGACACCAC-3' (SEQ ID No: 6)、ならびにテンプレートとしてのB. ペルツシスBP SM [13]ゲノムDNAを使用して増幅した。この634bpの断片を、Topo PCR II (Invitrogen Life Technology、フローニンゲン、オランダ)に挿入し、その後、ClaI-NheI断片として切り出し、ClaIおよびNheIで消化したpBP23 [50] (E. コリアmpG遺伝子を含み、その5'および3'末端にそれぞれ、618bp (B. ペルツシスゲノムの位置50,474から51,092)のおよび379bp (B. ペルツシスゲノムの位置52,581から52,960)のB. ペルツシスDNAが隣接した自殺ベクター)に挿入した。得られたプラスミドを、E. コリSM10 [51]に移し、その後BP SMを包含させ、記述されるように [52]、2つの連続した相同組換えを選択した。10個の独立したコロニーを、以下の通りにPCRによってスクリーニングした。コロニーを100μlのH₂Oに懸濁し、95℃で20分間加熱し、15,000xgで5分間遠心した。1μlの上清を、その後、PCRのテンプレートとして使用した。そのとき、E. コリアmpGの存在を検証するために、オリゴヌクレオチドAおよびC: 5'-TAAGAAGCAAAATAAGCCAGGCATT-3' (SEQ ID No: 7)を使用し、B. ペルツシスampGがないことを検証するために、オリゴヌクレオチドD: 5'-TATACCATGGCGCCGCTGCTGGTGCTGGGC-3' (SEQ ID No: 8)およびE: 5'-TATATCTAGACGCTGGCCGTAACCTTAGCA-3' (SEQ ID No: 9)を使用した。その後、E. コリアmpGを含み且つB. ペルツシスampGがなくなった菌株のうちの1つを選択し、完全なampGの遺伝子座について配列決定した。その後、この株を更なる設計に使用した。

【0091】

[21]に記述されるように、ptx遺伝子をこの菌株の染色体から除去し、その後、不活性PTXをコードする変異型ptxに置き換えた。pPT-RE [16]由来の変異型ptx遺伝子座を含むEcoRI断片を、pJQ200mp18rps1 [53]のEcroRIサイトに挿入した。得られたプラスミドを、E. コリSM10を介したコンジュゲーション (conjugation) 後、相同組換えによってptx遺伝子座においてB. ペルツシス染色体に組み込んだ。得られたB. ペルツシス株の染色体のptx遺伝子座について配列決定し、所望の変異の存在を確認した。PTXのサブユニットS1に特異的なIB7 [54]ならびにサブユニットS2およびS3に特異的な11E6 [55]のモノクローナル抗体の混合物を使用した免疫プロットにより、毒素生成を分析した。

【0092】

最後に、テンプレートとしてBP SMゲノムのDNA、ならびに、プライマーとして、dnt上流領域のためのオリゴヌクレオチドF: 5'-TATAGAATTTCGCTCGGTTTCGCTGGTCAAGG-3' (SEQ ID No: 10) およびG: 5'-TATATCTAGAGCAATGCCGATTCATCTTTA-3' (SEQ ID No: 11) ならびにdnt下流領域のためのH: 5'-TATATCTAGAGCGGCCTTTATTGCTTTTCC-3' (SEQ ID No: 12) およびI: 5'-TATAAAGCTTCTCATGCACGCCGGCTTCTC-3' (SEQ ID No: 13)を使用したPCRによりdnt隣接領域を増幅して、得られたB. ペルツシス株からdnt遺伝子を削除した。得られた799bpおよび712bp DNA

血清を回収し、抗体のタイターを、以前の記述[18]の通りに酵素結合免疫測定法 (E L I S A) で推定した。

【0098】

例8—サイトカインアッセイ

個々のマウス由来の脾臓細胞を、免疫化後、異なる時点において、熱死滅 B. ペルツシス B P S M (10^6 細胞 / ml)、 $5.0 \mu\text{g} / \text{ml}$ P T X (以前の記述 [20] の通りに B. ペルツシス B P G R 4 [19] から精製し、 80°C 20 分間の加熱により不活性化した)、 $5.0 \mu\text{g}$ 糸状赤血球凝集素 (F H A、以前の記述 [22] の通りに B. ペルツシス B P R A [21] から精製)、 $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ コンカナバリン A (Sigma Chemical Co., ミズーリ、セントルイス) またはコントロールとしての培地のみ 10
に
応答した *in vitro* でのサイトカイン生成について試験した。 37°C および 5% CO_2 での 72 時間のインキュベーションの後、上清を 3 重の培養からとり、I F N - γ および I L - 5 濃度をイムノアッセイ (B D O p t E I A s e t, P h a r m i n g e n) によって測定した。

【0099】

例9—鼻腔内感染およびワクチン接種：1、2、3 および 4 週時でのチャレンジ

小児 (3 週齢) マウスモデル [29] を、B P Z E 1 によるワクチン接種の効率と、無細胞百日咳ワクチン (a P v) によるワクチン接種の効率との比較のために使用した。メスの B a l b / C マウスに、 $20 \mu\text{l}$ P B S 中の約 1×10^6 の B P Z E 1 株を鼻腔内に感染させた。a P v (T e t r a v a c ; A v e n t i s - P a s t e u r, F r a n c e) によるワクチン接種のために、マウスに対しヒト用量の 20% で腹腔内に免疫した。B P Z E 1 または a P v によるワクチン接種の後の 1、2、3 または 4 週後、マウスに対し、病原性の B. ペルツシス B P S M / b c t A - 1 a c Z 株を鼻腔内にチャレンジした [53]。この株は、 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ のゲンタマイシンおよび $100 \mu\text{g} / \text{ml}$ のストレプトマイシン (B G g s) を含む B o r d e t - G e n g o u 寒天プレート上での B P Z E 1 (ゲンタマイシン感受性) の識別が可能な、B P S M - 誘導型ゲンタマイシン耐性株である。対照群は、B P S M / b c t A - 1 a c Z にチャレンジされた未処置マウスに相当する。チャレンジ感染から 1 週間後、以前の記述 [18] の通りに、肺を無菌的に摘出し、均質化しおよび C F U 決定のための B G g s にプレーティングした。 20

【0100】

マウスに、B P Z E 1 または a P v でワクチン接種し、摂取から 1、2、3 または 4 週後に病原性 B. ペルツシスにチャレンジさせた。肺 C F U カウントを、3 時間後または 7 日後に測定した。結果は、グループあたり 3 から 5 個体のマウスからの平均 (標準誤差) C F U として表す。防御のレベルは、それぞれのチャレンジ感染について、チャレンジ感染から 7 日後の、非免疫群の C F U の平均に対するそれぞれの群の C F U の平均パーセンテージとして算出する (表 2 ~ 5)。 30

【0101】

例10—統計分析

結果は、適宜、対応のない T 検定 (u n p a i r e d S t u d e n t ' s t t e s t) およびクラスカルーワース検定、その後のダンのポスト検定 (D u n n ' s p o s t - t e s t) (G r a p h P a d P r i s m p r o g r a m) を使用して分析した。差は、 $P \leq 0.05$ で有意であるとみなした。 40

【0102】

結果

B. ペルツシス B P Z E 1 の構築

3 つの病原性因子を一般に標的とした：気管細胞毒 (T C T)、ペルツシス毒素 (P T X) および皮膚壊死性毒素 (D N T)。

【0103】

T C T は、感染した宿主の気管における繊毛細胞の破壊の原因となり [24、25]、このため咳症候群に関係する可能性がある。T C T は、グラム陰性菌の細胞壁におけるペ 50

わりに P B S を受けたコントロールマウスのそれと類似していた。B P S M-感染は、少なくとも 2 ヶ月間持続する炎症を誘導した（データ示さず）。これらの結果は、B P Z E 1 に導入された突然変異は、急激な弱毒化をもたらすが、肺において細菌がコロニー形成し残存することを可能とすることを示す。

【0109】

B P Z E 1 による成体マウスの鼻腔内ワクチン接種後の B. ペルツシスチャレンジに対する防御

B P Z E 1 によって提供される防御を評価するために、8 週齢の B a 1 b / C マウスに対するこの株の単一の鼻腔内投与の、野生型チャレンジ株 B P S M による、続くコロニー形成における効果を、1 / 5 ヒト用量の a P V による 2 つの i. p. 免疫化のそれと比較した。この a P V 免疫化プロトコールは、ヒト臨床試験における百日咳ワクチンの有効性に関して最も優れたものとして記述されている [27、28]。チャレンジ感染から 7 日後における肺の細菌コロニー数の総クリアランスから示されるように、B P Z E 1 の単一の鼻腔内投与および a P V による 2 回の i. p. 免疫化は、同レベルの防御を提供した（図 9 a）。細菌の高い負荷は、ワクチンの代わりに 2 回の P B S 注射を受けたコントロールマウスにおいて見られた。

10

【0110】

B P Z E 1 による乳児マウスの鼻腔内ワクチン接種後の B. ペルツシスチャレンジに対する防御

新規の百日咳ワクチンの主要な標的は、現在利用できるワクチンで防御されない若い乳児であるため、小児（3 週齢）マウスモデル [29] を開発し、B P Z E 1 によるワクチン接種の効率と a P V によるワクチン接種による効率とを比較するために使用した。完全な細菌の除去がチャレンジから 1 週後の肺において認められたため、B P Z E 1 の単一の経鼻投与は、完全に小児マウスをチャレンジ感染から防御した（図 9 b）。対照的に細菌の実質的な数は、チャレンジ感染から 1 週間後において a P V 感染動物において維持された。B P Z E 1 ワクチン接種マウスと a P V ワクチン接種マウスとの間の細菌の負荷の差は統計的に有意であり、このことは、小児マウスモデルにおいて、B P Z E 1 による単一の鼻腔内投与が、2 回の a P V の全身的投与よりも良好な防御を与えることを意味する。

20

【0111】

加えて、a P V 免疫動物と比較して、マウスを B P Z E 1 で免疫した場合、投与から 3 時間後において、チャレンジ株の細菌負荷の強い減少が一貫して観察され（図 9 c）、このことは、B P Z E 1 によるワクチン接種は、チャレンジ株による感染に対する感受性を減少させることを示す。この効果は、8 週齢および若いマウスの両方で見られた。対照的に、a P V は、コントロールマウスと比較して、感染から 3 時間後において、細菌数に何の効果も示さなかった。

30

【0112】

B P Z E 1 による経鼻ワクチン接種後の B. パラペルツシスチャレンジに対する防御

小児、特に免疫化集団において、B. パラペルツシス感染についての関心が増加している [30、31]。B. パラペルツシスは、より穏やかな百日咳様症候群（その頻度はおそらく大部分は低く見積もられている）を引き起こす。さらに、B. パラペルツシス感染症の発病率は、最近数十年にわたって増加しており、それは恐らく、ペルツシスワクチンは、B. パラペルツシスに対する防御効果が非常にわずかであり、または防御効果がないことが知られるという事実を原因とする [32、33]。対照的に、B. ペルツシスによる感染は、近年、B. パラペルツシス感染から防御することが報告された [34]。B P Z E 1 もまた、小児マウスモデルを用いて、B. パラペルツシスに対する防御について評価された。以前報告されたように、a P V の 2 回の投与は、B. パラペルツシスに対して全く防御を提供しなかったにも関わらず、B P Z E 1 の単一の鼻腔内投与は、チャレンジから 1 週間後のワクチン接種マウスの肺における低い B. パラペルツシス数によって測定されるように、強力な防御を提供する（図 9 d）。

40

【0113】

50

【表 1】

表1:乳児マウスにおけるB. ペルツシスチャレンジに対するワクチン有効性の動力学

ワクチン接種と チャレンジとの間の時間	肺回収とチャレンジ との間の時間	Log10 cfu / マウスの肺		
		未処置	aPv ワクチン接種	BPZE1 ワクチン接種
1週間	3時間	5.71 ± 0.03	5.8 ± 0.07	5.74 ± 0.01
	7日	6.71 ± 0.06	5.97 ± 0.20	4.86 ± 0.35
2週間	3時間	5.77 ± 0.10	5.60 ± 0.02	5.49 ± 0.05
	7日	6.49 ± 0.08	5.31 ± 0.16	3.22 ± 0.33
3週間	3時間	6.03 ± 0.11	5.88 ± 0.04	5.33 ± 0.08
	7日	6.58 ± 0.09	5.62 ± 0.11	3.14 ± 0.38
4週間	3時間	6.31 ± 0.01	6.15 ± 0.02	5.83 ± 0.05
	7日	6.36 ± 0.04	5.21 ± 0.11	1.83 ± 0.46

10

20

【表3】

表3:2週間後における、非ワクチン接種マウスと比較した、aPvワクチン接種およびBPZE1ワクチン接種マウスの防御のレベル

非ワクチン接種マウス	肺の細菌数	細菌の平均数	残留する細菌のパーセンテージ ⁽¹⁾	残留する細菌の平均パーセンテージ	防御のレベル
非ワクチン接種1	5x10 ⁶	3.34x10 ⁶	aPv ワクチン接種マウス		
非ワクチン接種2	3.6x10 ⁶		2.84	8.11%	91.89%
非ワクチン接種3	1.7x10 ⁶		8.68		
非ワクチン接種4	2.4x10 ⁶		2.99		
非ワクチン接種5	4 x10 ⁶		20.36		
		1.9 x10 ⁵	5.69		
BPZE1 ワクチン接種マウス					
BPZE1-1	9.5 x10 ³	2.8 x10 ⁻³	1.03 x10 ⁻³ %		
BPZE1-2	450	1.35 x10 ⁻⁴			
BPZE1-3	3500	1.05 x10 ⁻³			
BPZE1-4	500	1.5 x10 ⁻⁴			

⁽¹⁾ 残留する細菌のパーセンテージ=それぞれの特定のマウスにおける細菌数/全ての非接種マウスの細菌の平均数

【表 5】

表5: 4週間後における、非ワクチン接種マウスと比較した、aPvワクチン接種およびBPZE1ワクチン接種マウスの防御のレベル

非ワクチン接種マウス		肺の細菌数		細菌の平均数	
非ワクチン接種 1		2.1 x 10 ⁶			
非ワクチン接種 2		2.2 x 10 ⁶			
非ワクチン接種 3		3.1 x 10 ⁶		2.36 x 10 ⁶	
非ワクチン接種 4		2.6 x 10 ⁶			
非ワクチン接種 5		1.8 x 10 ⁶			
		肺の細菌数	残留する細菌のパーセンテージ ⁽¹⁾	残留する細菌の平均パーセンテージ	防御のレベル
aPv ワクチン接種マウス					
aPv1		2.52 x 10 ⁵	10.68		
aPv2		3.28 x 10 ⁵	13.90		
aPv3		1.04 x 10 ⁵	4.41	7.76%	92.24%
aPv4		8.4 x 10 ⁵	3.56		
aPv5		1.48 x 10 ⁵	6.27		
BPZE1 ワクチン接種マウス					
BPZE1-1		190	8.05 x 10 ⁻⁵		
BPZE1-2		0	0		
BPZE1-3		110	4.66 x 10 ⁻⁵	7.13 x 10 ⁻⁵ %	99.999%
BPZE1-4		320	1.36 x 10 ⁻⁴		
BPZE1-5		220	9.32 x 10 ⁻⁵		

⁽¹⁾ 残留する細菌のパーセンテージ=それぞれの特定のマウスにおける細菌数/全ての非接種マウスの細菌の平均数

【 0 1 1 6 】

考察

百日咳は、その発生率が広くワクチンが普及した国で増加している、最初の感染症である。この逆説的な状況は、有効性の高いワクチンの広範囲な導入以来観察される、疫学的な変化に最も関連があるようである。プレワクチン接種 (pre-vaccinati

10

20

30

40

50

応答のTh2スキューニング (skewing) に関連する可能性があった。というのは、細胞全体のワクチンと比較して、aPV投与は、ワクチン接種された小児においてより多くのTh2型サイトカインを誘導し [10] およびTh1発達の遅れを起こすためである (Mascartら、準備中)。Th1機能の遅延性の成熟は、遺伝的素因のある個人において、アトピーのリスクと関係していた [33]。2つの機構は、互いに相容れないわけではない。aPVと比較して、BPZE1投与に対する免疫応答はTh2アームにさほど偏らず、および、BPZE1は粘膜投与されるため、膨化反応は起こり得ない。

【0120】

ワクチンとしての生弱毒化細菌の使用は、それらの生物学的安全性の問題を引き起こす。それ自体、それらは、環境に放出されやすい遺伝子改変生物のための指導およびガイドラインに管理される。これらのガイドラインおよび指導は、傷害性確認および環境リスクアセスメントを含む、満たさなければならない幾つかの目的を記述する [44]。潜在的な病原性は、特に免疫無防備状態の個人 (例えば、HIVに感染した個人) において、慎重に考えられる必要がある。B. ペルツシスの天然の生物学は、特にその事について興味深い。HIV感染者におけるペルツシスが時々記述されてきたものの、それはエイズ患者ではかなり珍しい [45]。その遺伝的に弱毒化された形態において、B. ペルツシスは、従って、特に現に多くのワクチンがそうであるように重篤なエイズが除外基準である場合、HIV感染した小児において大きな問題を起こすとは予想されない。B. ペルツシスのコロニー形成は、細菌が肺外に伝播することなく厳密に気道上皮に限られており、これは本来BPZE1ワクチン株の全身菌血症を除外する。にもかかわらず予知できない安全上の問題が起こる場合、ワクチン株は、マクロライド系抗生物質 (例えばエリスロマイシン) の使用によって容易に除去でき、本質的に全てのB. ペルツシス分離株はこれに対して非常に感受性が高い。

【0121】

例えば何かの生ワクチンについての更なる懸念は、環境へのワクチン株の潜在的放出およびそのような放出の結果である。B. ペルツシスは厳密にヒト病原体であり、動物ベクターまたは保有体は存在しない。そのうえ、B. ブロンキセプティカと異なり、環境中の野生型B. ペルツシスの生存は非常に限定されている [46]。ペルツシスは、咳をする個人によってのみ広がり、無症候性の保因は存在しないようである [47]。本研究で使用したマウスモデルでは、咳を評価することができない。しかしながら、BPZE1の遺伝子の変化の性質、特にTCTの強い減少およびPTXの遺伝子の不活性化により、この株は咳を誘導しないと期待される。活性PTXは、咳をするラットモデルにおける咳誘導のために必要であることが示されたが、その機構は未知である [48]。にもかかわらず、ワクチン株が非ワクチン接種個人に伝染された場合、これは、最悪の場合、ワクチン適用範囲の増大をもたらす。従って、これらの潜在障害の各々の結果は無視できるとして類別でき、容易におよび迅速に必要な応じて抗生物質の治療によって制御される。

【0122】

BPZE1の使用の利点は、比較的安い生産コスト (発展途上国にとって、それは特に魅力的である)、針が不要であり容易でおよび安全な投与の様式、ならびに全身性免疫に加えて粘膜免疫を誘導するその潜在性を含む。ペルツシスに対する粘膜免疫の役割は、意外にもそれほど言及されていないにもかかわらず、B. ペルツシスが厳密に粘膜の病原体であるという事実は、粘膜の免疫応答は有意に防御に関与するかもしれないことの可能性を高める。どの現在利用できるワクチンも、何かの有意な粘膜反応を誘導しない。

【0123】

ワクチン接種におけるBPZE1の使用のその他の利点は、以下の通りである：

- 免疫の誘導がワクチン接種から1週間後に検出できることによる、BPZE1の単一の鼻腔内の投与の後で得られる迅速な防御免疫応答、
- ワクチン接種後の少なくとも次の2ヵ月にわたる防御免疫の増加、および
- ワクチン接種から2週間後において、99.999%を超える防御のレベルが得られることによる、完全な防御免疫。

10

20

30

40

50

Infect Immun 57: 2223-2229.

16. Alonso S, Pethe K, Mielcarek N, Raze D, Loch C (2001) Role of ADP-ribosyl transferase activity of pertussis toxin in toxin-adhesin redundancy with filamentous hemagglutinin during *Bordetella pertussis* infection. *Infect Immun* 69: 6038-6043.

17. Collyn F, Lety MA, Nair S, Escuyer V, Ben Younes A, et al. (2002) *Yersinia pseudotuberculosis* harbors a type IV pilus gene cluster that contributes to pathogenicity. *Infect Immun* 70: 619-620.

18. Mielcarek N, Cornette J, Schacht AM, Pierce RJ, Loch C, et al. (1997) Intranasal priming with recombinant *Bordetella pertussis* for the induction of a systemic immune response against a heterologous antigen. *Infect Immun* 65: 544-550. 10

19. Loch C, Geoffroy MC, Renaud G (1992) Common accessory genes for the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin and fimbriae share sequence similarities with the *papC* and *papD* gene families. *EMBO J* 11: 3175-3183.

20. Sekura RD, Fish F, Manclark CR, Meade B, Zhang YL (1983) Pertussis toxin. Affinity purification of a new ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem* 258: 14647-14651.

21. Antoine R, Loch C (1990) Roles of the disulfide bond and the carboxy-terminal region of the S1 subunit in the assembly and biosynthesis of pertussis toxin. *Infect Immun* 58: 1518-1526. 20

22. Menozzi FD, Gantiez C, Loch C (1991) Interaction of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin with heparin. *FEMS Microbiol Lett* 62: 59-64.

23. Loch C, Antoine R, Jacob-Dubuisson F (2001) *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. *Curr Opin Microbiol* 4: 82-89.

24. Heiss LN, Flak TA, Lancaster JR, McDaniel ML, Goldman WE (1993) Nitric oxide mediates *Bordetella pertussis* tracheal cytotoxin damage to the respiratory epithelium. *Infect Agents Dis* 2: 173-177.

25. Goldman WE, Cookson BT (1988) Structure and functions of the *Bordetella* tracheal cytotoxin. *Tokai J Exp Clin Med* 13 Suppl: 187-191.

26. Loch C, Antoine R (1999) *Bordetella pertussis* protein toxins. In: Alouf J E, Freer JH, editors. *Comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*. Academic Press, pp. 130-146. 30

27. Guiso N, Capiou C, Carletti G, Poolman J, Hauser P (1999) Intranasal murine model of *Bordetella pertussis* infection. I. Prediction of protection in human infants by acellular vaccines. *Vaccine* 17: 2366-2376.

28. Mills KH, Ryan M, Ryan E, Mahon BP (1998) A murine model in which protection correlates with pertussis vaccine efficacy in children reveals complementary roles for humoral and cell-mediated immunity in protection against *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 66: 594-602.

29. Roduit C, Bozzotti P, Mielcarek N, Lambert PH, Del Giudice G, et al. (2002) Immunogenicity and protective efficacy of neonatal immunization against *Bordetella pertussis* in a murine model: Evidence for early control of Pertussis. *Infect Immun* 70: 3521-3528. 40

30. He Q, Viljanen MK, Arvilommi H, Aittanen B, Mertsola J (1998) Whooping cough caused by *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in an immunized population. *JAMA* 280: 635-637.

31. Watanabe M, Nagai M (2004) Whooping cough due to *Bordetella parapertussis*: an unresolved problem. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2: 447-454.

32. Mastrantonio P, Stefanelli P, Giuliano M, Herrera Rojas Y, Ciofi degli Atti M, et al. (1998) *Bordetella parapertussis* infection in children: epidemiology, 50

51. Simon R, Priefer U, Puhler A (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio/Technology* 1: 784-791.
52. Stibitz S (1994) Use of conditionally counterselectable suicide vectors for allelic exchange. *Methods Enzymol* 235: 458-465.
53. Antoine R, Huvent I, Chemlal K, Deray I, Raze D, et al. (2005) The periplasmic binding protein of tripartite tricarboxylate transporter is involved in signal transduction. *J Mol Biol* 351: 799-809.
54. Sato H, Ito A, Chiba J, Sato Y (1984) Monoclonal antibodies against pertussis toxin: effect on toxin activity and pertussis infections. *Infect Immun* 46: 422-428. 10
55. Sato H, Sato Y, Ito A, Ohishi I (1987) Effect of monoclonal antibody to pertussis toxin on toxin activity. *Infect Immun* 55: 909-915.
56. Tuomanen, E. And Weiss A. (1985) Characterization of two adhesions of *Bordetella pertussis* for human ciliated respiratory epithelial cells. *J. Infect. Dis.* 152:118-125.
57. Loch, C., Antoine, R., Veithen A. and Raze D. 2000. Pertussis Toxin: Structure-Function-Relationship. In Aktories K. Just I editors. *Handbook of Experimental Pharmacology, Bacterial Protein Toxins*, Springer, vol 145, pp. 167-185.
58. Horiguchi Y, Matsuda, H. Koyama H, Nakai T and Kume K. (1992) *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotizing toxin suppresses in vivo antibody responses in mice. *FEMS Microbiol. Lett.* 69:229-234. 20
59. Bordet et Genysa (1909) L' endotoxine coquelucheuse ; *Ann. Inst. Pasteur* 23 : 415-419.
60. Iida & Okonogi (1971) Lethal toxicity of *Bordetella pertussis* in mice ; *J. Med. Microbiol.* 4: 51-61.
61. R. Parton (1985) Effect of prednisone on the toxicity of *Bordetella pertussis* in mice, *J. Med. Microbiol.* 19: 391-400.
62. Magyar et al (1988) The pathogenesis of turbinate atrophy in pigs caused by *Bordetella bronchiseptica*, *Vet. Microbiol.* 3 : 1719-1728. 30
63. Roop et al (1987) Virulence factors of *Bordetella bronchiseptica* associated with the production of infectious atrophic rhinitis and pneumonia in experimentally infected neonatal swine, *Infect. Immun.* 55 : 217-222.
64. Weiss & Goodman (1989) Lethal infection by *Bordetella pertussis* mutants in the infant mouse model, *Infect. Immun.* 57 : 3757-3764.
65. Allan & Maskell (1996) The identification, cloning and mutagenesis of a genetic locus required for lipopolysaccharide biosynthesis in *Bordetella pertussis*, *Mol. Microbiol.* 19 : 37-52.
66. Alonso et al (2002) Eighty kilodalton N-terminal moiety of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin: adherence, immunogenicity, and protective role, *Infection & Immunity*, 70, 4142-4147. 40
67. Cummings, C.A., Bootsma, H.J., Relman D.A. and Miller J.F. (2006) Species- and Strain-specific Control of a Complex, Flexible Regulon by *Bordetella BvgAS*. *J. Bacteriol.* 188:1775-1785.
68. Kashimoto T., Katahira J, Cornejo WR, Masuda M, Fukuoh A, Matsuzawa T, Ohnishi T, Horiguchi Y. (1999) Identification of functional domains of *Bordetella dermonecrotizing* toxin. *Infect. Immun.* 67(8) 3727-32.

【図面の簡単な説明】

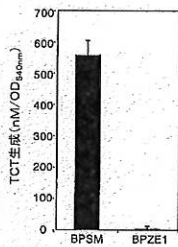
【0127】

【図1】 図1は、B P S MおよびB P Z E 1の培養上清に存在するT C Tを示す棒グラフ 50

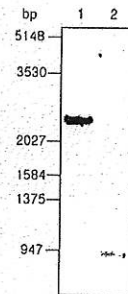
ID NO: 3) である。

【図14】 図14は、エシェリシア・コリ由来のAmp^rGのアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 4) である。

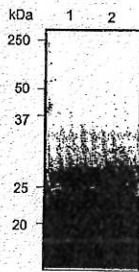
【図1】



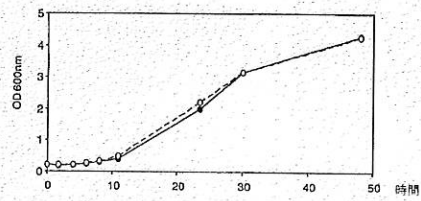
【図3】



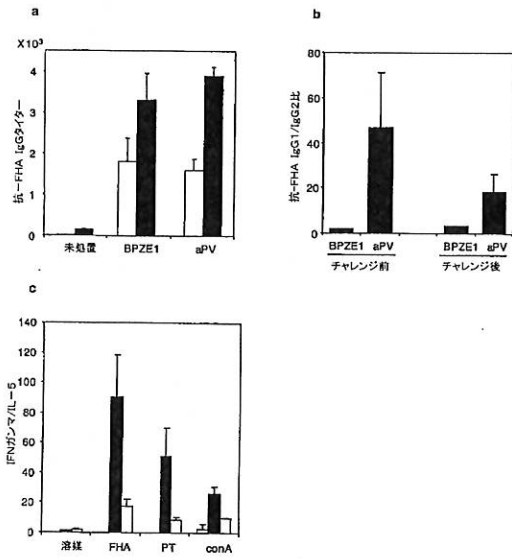
【図2】



【図4】



【図 10】



【図 11】

高活性タンパク質S1 (NP_882282)

```

MRCRAIRQTARTGWLTLALAVTAPVTSAPAWADDPATVYRYSRPPEDVF
QNGFTAWGNNDNVLDHLTGRSCQVGSNSAFVSTSSRRYTEVYLEHRMQEAV
EAERAGRGTGHFIGYIYEVRADNNFYGAASSYFVYVDTYGDNAGRILAGALAT
YQSEYLARRRIPPENIRRVTRVYHNGITGETTTTEYSNARYVSSQTRANPNPY
TSRRSVASIVGTLVRMAPVIGACMARQAESSEAMAASERAGEAMVLYVESI
AYSF

```

【図 12】

皮膚壊死性毒素 (NP_881965)

```

MKDKESALRQLVDMAVLGVYDGVVEELLALPSEESGDLAGGRKREKAEFALFS
EAPNGDEPIQDARTWFPKYPVAVSNLKKMQVAIRARLEPESLILQWLIA
LDVYLGVLAAALSRTVISDLVFEYVKARYEYIYLLNRVPHPLATAYKRRRQR
PVDRSGRSLGSVEFHPLWFADELAGTVLDLADIYEQALAESIERRMDGEPDDG
SLDTAEHDVWRLCRDGINRGEQAIQASGPGYGVVADAGYMRITVADLAYADALA
DCLHAQLRI RAQGSVDS PGDEMPKLD AWEIAKPHLAATQQA RVDLLEA APAL
DYAALRDVRYVYGDYRNALALRFIKREALRLLGARRGNASTMPVAAGEYDEIV
ASGAANDAAVYVMAAALAGVLCDESAQRTLPVVLARFRPLGVLARFRLEQ
ETAGMLLGDQEPFPRGFI SFTDFRDS DAFASV AEAQFN DYIDQYSILEAQR
LARILLALGSRMTVDQWCLPLQKVRHYKVLTSQPLIARGIENHNRGIEYCLGR
PPLTDLPLGLFTMFQLHDSSWLLVSNINGELWSDVLANAEVMQNPTLAALAEFQ
GRFRTGRRTGWFLGGPATEGPSLRDNYLLKLRQSNPGLDVKKCWYFGRYQY
RLPAGALGVPLFAVSVLRHSLDDLAHAKSALYKPSWQKPAFWIWPYFRIE
FPSTQDRSYRVDVGSIVFDSISLLASVFSIGGKLSFTRTQYGNLRFVVRQR
IAGLSQRLWRSVLKELPALIGASGLRSLRSLVDLYEIEFVPIRRLVAGFV
SATTVGGRNQAPLRFQAFSAASSAGRTGGQLASEWRMAGVDATGLVESTSGGR
FEGIYTRIGLPLSECTEHPFIVESGNAYRVIWDAYTHGWRVNVNRLPRLTYTV
PVRLNGQGHMETHLDVPGRCGAPEIFGRIRTRNLVALAAEQAAPMRRLLNQAR
RVALRHIDTCRSLALPRAESDMDAAIRIFPGEPDAGLRQIRGRLLQEVRAIY
GDLSPVNDVLYRAGYDLDDVATLNFNAVDRNTSLGRQARMELYLDAIVDLHARL
GVENARFVDMAPHLLSLGHAATASEVVEAVSPRLLGNVFDISNVAQLERGIG
NPASTGLFVMLGAYSESSPAIFQS FVNDIFPAWRQASGGGPLVWVWPGPAIISP
TRLDYANTD IGLNHGDISPLRARPLPGRRIDLPPGLDISFVRYDRPV RMS
APRALDASVFRFVVDGVPVHGVIQSWTGAIEYAYGAPAAARBVMVLTDNVRIISI
ENCGDEGAI GVRVRLDTPVATPPLITGGSLSGCCTMVGVKEGYLAFYHTGKST
ELGDWATAREGVQALYQAHLAMGYAPISIPAPMRNDDLVSIAATYDRAVIAYL
GKDVPGGSTRITRHDGAGSVVSFDYNAAVQASAVRPLGQVYVVISNDGQGA
RAVLLAEDLAWAGSGSALDVLNLERLVTLPAPV

```

【図 13】

AmpGタンパク質 (NP_878961. 1)

```

MAPLLVLGPASGLPLALSSGTLQAWATVENVSLOSIGPLTACTAYTLKFLWA
PLIDRYVPPFLGRRRCWMLLTQVLLAAAMVMGMLSPGSALLPLALVAVLVAF
LSASQDIAPDAYSTDLVRQEEERGAGAAAMRVMGYRLAMIVSGGLALIVADRNLG
WNTYVLMGGLMLACALGTLWAPEPERPANPPRDLGAAVVEPFREFFSRRAI
DMLLLVLYKLGDAFAGALSTTPLLRGAGFSATEVGTVNVKVLGLAATIVGALA
GGSIMTRWGLYRSLMAFGLLQAVSNLGYWLIASVSPKNLYLMLGAVGVENLCCG
LGTASFVALLMAMCRQQFSATQFALLSALAAGVTRTYLAGPLTPVLVWLDWPG
FFIIVTLIALPGLNLLRRLRRNVIDELDAQTR

```

【図 14】

AmpGタンパク質 (NP_752478. 1)

```

MSSQYLRIFQQPRSAIILLILGPASGLPLALSGTLQAWMTVENIDLKTI GFPS
LVQYAVFKFLWSPMLDRYTPPPFGRRRGWLLATQILLVVAIAAMGFLEPGTQ
LRWMAALAVVIFCSASQDI VFDWAKTDLVPAEERGAAGAAISVLGYRLGMLVS
GGLALWADKWLQWQGMWMLAALLIPCI IATLLAPEPTDTTIPVKTLEQAVV
APLRDFPGRNNAWLLILLIVLYKLGDAFAMSLTFTPLIRGVDFPAGEVGVVVK
TLGLLATIVGALYGGIIMQRLSLFRALLIFGILQASNAGYVLLSITDKHLYS
MGAAVFENLCCGMGTSAFVALLM TLCKNSFSATQFALLSALS AVGRVYVGPV
AGWFVEAHGWSYFVLSVAAA VPLILLVCRQTLBYTRVNDNFISRTYEPAG
YAFAMWTLAAGISLAVWLLLTMDALDLTHFSFLPALLEVGVLVALS SVVIG
GLLDYLALRKTMLM

```

フロントページの続き

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 P 31/04 (2006.01)

A 6 1 P 31/04

(74)代理人 100108855

弁理士 蔵田 昌俊

(74)代理人 100091351

弁理士 河野 哲

(74)代理人 100088683

弁理士 中村 誠

(74)代理人 100109830

弁理士 福原 淑弘

(74)代理人 100075672

弁理士 峰 隆司

(74)代理人 100095441

弁理士 白根 俊郎

(74)代理人 100084618

弁理士 村松 貞男

(74)代理人 100103034

弁理士 野河 信久

(74)代理人 100140176

弁理士 砂川 克

(74)代理人 100100952

弁理士 風間 鉄也

(72)発明者 ローシュ、カミール

ベルギー国、1180 ブリュッセル、アブニュ・ジャック・パストゥール 160

(72)発明者 ミエルカレ、ナタリー

フランス国、59830 ワンヌエーン、リュ・デュ・ベール・プレ 14

(72)発明者 デブリ、アンヌ・ソフィ

フランス国、59800 リール、リュ・ダミアン 37

(72)発明者 ラゼ、ドミニク

ベルギー国、7730 エステムブール、リュ・ドウ・ルナ 2

(72)発明者 ベルト、ジュリー

フランス国、59273 フレタン、リュ・カミール・ゲラン 43

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 国際公開第03/102170 (WO, A1)

MATTOO S, FRONTIERS IN BIOSCIENCE, 2001年11月 1日, V6, P168-186

MATTOO SEEMA, CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, 2005年 4月, V18 N2, P326-382

(58)調査した分野(Int. Cl., DB名)

C 1 2 N 1/00-1/38

C 1 2 N 15/00-15/90

PubMed