(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3920320号
(P3920320)
(45)発行日　平成19年5月30日(2007.5.30)　(24)登録日　平成19年2月23日(2007.2.23)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 39/02	(2006.01)	A61K	39/02	
A61P 31/04	(2006.01)	A61P	31/04	
C07K 14/195	(2006.01)	C07K	14/195	
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A

請求項の数 9　(全 34 頁)

(21)出願番号　特願平5-515007
(86)(22)出願日　平成5年2月24日(1993.2.24)
(65)公表番号　特表平7-507444
(43)公表日　平成7年8月24日(1995.8.24)
(86)国際出願番号　PCT/US1993/001558
(87)国際公開番号　WO1993/016723
(87)国際公開日　平成5年9月2日(1993.9.2)
審査請求日　平成12年2月17日(2000.2.17)
審判番号　不服2003-12253(P2003-12253/J1)
審判請求日　平成15年6月30日(2003.6.30)
(31)優先権主張番号　841,644
(32)優先日　平成4年2月26日(1992.2.26)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　503236795
ヴァンダービルト　ユニバーシティ
アメリカ合衆国　テネシー　３７２４０，ナッシュビル，　カークランド　ホール　４０５
(74)代理人　100107489
弁理士　大塩　竹志
(72)発明者　カバー，ティモシー　エル.
アメリカ合衆国　テネシー　３７２０９，ナッシュビル，ブランチ　クリーク　ロード　７４４
(72)発明者　ブレイザー，マーティン　ジェイ.
アメリカ合衆国　テネシー　３７２０５，ナッシュビル，ダーデン　プレイス　７３３

最終頁に続く

(54)【発明の名称】精製されたＨｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ　ｐｙｌｏｒｉ由来の空胞形成毒素およびその使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

真核細胞の空胞形成を特異的に誘導し、かつウシ胎児血清タンパク質を含まないＨ．ｐｙｌｏｒｉ由来の精製抗原であって、ここで、該抗原は、９７２，０００より大きい分子量（未変性条件下でのゲル濾過クロマトグラフィーによって測定される）および変性したときに約８７，０００の分子量（還元条件下でのドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミド電気泳動で決定される）および約６．１の等電点で特徴づけられる、精製抗原。

【請求項２】

前記抗原が、配列番号２に示されるアミノ末端配列を含有する、請求項１に記載の精製抗原。

【請求項３】

真核細胞の空胞形成を特異的に誘導するＨ．ｐｙｌｏｒｉ由来の精製抗原であって、該抗原が、ブロス培養上清中より５０００倍を越える高純度であり、ここで、該抗原は、９７２，０００より大きい分子量（未変性条件下でのゲル濾過クロマトグラフィーによって測定される）および変性したときに約８７，０００の分子量（還元条件下でのドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミド電気泳動で決定される）および約６．１の等電点で特徴づけられる、精製抗原。

【請求項４】

Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ感染に対するワクチンであって、該ワクチンが、薬学的に容認される担体を有し、Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ感染に対する防御抗体の産生を誘導するのに効果的な量の請

求項１に記載の精製抗原を含む、ワクチン。
【請求項５】
前記抗原が、９７２，０００より大きい分子量（未変性条件下でのゲル濾過クロマトグラフィーによって測定される）および変性したときに約８７，０００の分子量（還元条件下でのドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミド電気泳動で決定される）および約６．１の等電点で特徴づけられる、請求項４に記載のワクチン。
【請求項６】
Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ感染を検出するための診断用検査キットであって、
該検査キットが以下を含む、キット：
（ａ）固定した請求項１に記載の精製抗原
（ｂ）該固定化抗原に、試験されるヒトまたは動物から採取した体液を通過させるための手段；および
（ｃ）該固定化抗原に結合した該体液からの免疫グロブリンを検出するための手段。
【請求項７】
ヒトまたは動物から採取した体液サンプル中の抗毒素抗体を検出する方法であって、以下の工程を包含する、方法：
（ａ）固相に結合した請求項１に記載の精製抗原と該サンプルとを接触させる工程；
（ｂ）工程（Ａ）の該接触物をインキュベートし、該抗体を該結合した精製抗原に結合させる工程；および
（ｃ）該結合抗毒素抗体を検出する工程。
【請求項８】
毒素産生Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ株によって患者において引き起こされる感染を検出する方法であって、以下の工程を包含する、方法：
（ａ）固相に結合した請求項１に記載の精製抗原を該患者由来の体液サンプルと接触させる工程；
（ｂ）工程（Ａ）の該接触物をインキュベートし、該抗体を該結合抗原に結合させる工程；
（ｃ）該結合抗毒素抗体を検出する工程；
（ｄ）検出された抗毒素抗体量を標準と比較し、毒素産生Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ株によって引き起こされる感染を検出する工程。
【請求項９】
ヒトを含む動物中でのＨ．ｐｙｌｏｒｉに対する防御抗体の産生を誘導するために、Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ感染に対する防御免疫が望ましい動物に投与されるのに適した、請求項４に記載のワクチン。
【発明の詳細な説明】
発明の背景
本件は1992年２月26日に出願した米国出願第841,644号の一部継続出願である。
発明の分野
本発明はHelicobacter pyloriの空胞形成毒素と、消化性潰瘍および胃の悪性疾患への素因に関する診断用試験において毒素を使用する方法と、H. pylori感染に対する免疫学的防御を提供するワクチンとして毒素を使用する方法とに関する。
背景技術の簡単な説明
Helicobacter pyloriはヒトの胃の中に通常存在している湾曲したグラム陰性細菌であり、この生物は１度獲得すると数年間または数十年間存続する（Blaser, M.J.（1990）J. Infect. Dis. 161:626-633）。多くの列挙される証拠より、H. pyloriに感染するとほとんど全般的に慢性胃炎になることが示されている（Dixon, M.F.（1990）J. Gastroenterol. and Hepatol. 6:125-130）。H. pyloriに誘導される胃炎にかかっているほとんどの人は無症状のままであるが、この状態は消化性潰瘍および胃腺癌の両方を発病させる重要な危険因子である（Peterson, W.L.（1991）N. Engl. J. Med. 324:1043-1048、ならびにNomura, A., Stemmermann, G.N., Chyou, P.-H., Kato, I., Perez-Perez, G.I,およびBlaser

, M.J., N. Eng. J. Med. 1991; 325:1132-6）。
H. pylori感染の発生病理はまだよく分かっていない。生物による高レベルのウレアーゼ産生（Dunn, B.E., Campbell, G.P., Perez-Perez, G.I.,およびBlaser, M.J.（1990）J. Biol. Chem. 265:9464-9469）は、胃感染の開始および維持に関して必須であると考えられる（Eaton, K.A., Morgan, D.R., Krakowka, S.（1989）Infect. Immun. 57:1119-1125）。他の潜在毒性の決定要因は、真核細胞の空胞形成を誘導する毒素である（Cover, T.L., Halter, S.A., Blaser, M.J.（1992）Human Pathol. 23:1004-1010）。機能的に活性な毒素を、インビトロでH. pylori単離物の50～60％が産生する（Leunk, R.D., Johnson, P.T., David, B.C., Kraft, W.G.,およびMorgan, D.R.（1988）J. Med. Microbiol. 26:93-99ならびにCover, T.L., Dooley, C.P.,およびBlaser, M.J. Infect. Immun.; 58:603-610（1990））。毒素活性を中和する抗体はH. pylori感染者由来の血清中に存在し、そのことより空胞形成毒素活性はインビボで関連があることが示唆される（Leunk, R.D., Ferguson, M.A., Morgan, D.R., Low, D.E.,およびSimor, A.E.（1990）J. Clin. Microbiol. 28:1181-1184ならびにCover, T.L., Cao., P.,およびBlaser, M.J.（1991）Gastroenterology 100:A570）。２つの研究で、毒素産生H. pylori感染の普及は、消化性潰瘍のH. pylori感染患者の間のほうが胃炎のみの感染患者の間より高いことが示唆された（Figura, N., Guglielmetti, P., Rossolini, A., Barberi, A., Cusi, G., Musmanno, R., Russi, M.,およびQuaranta, S.（1989）J. Clin. Microbiol. 27:225-226; Goosens, H., Vlaes, L., Lambert, J.P., Glupczynski, Y., Burette, A.,およびButzler, J.P.（1991）Microb. Ecol. Health Dis. 4:130）。
以前の研究で、本発明者らは空胞形成毒素活性のあるブロス培養上清中には存在するが、毒素活性の欠落した上清中には存在しないかまたは濃度が低い、いくつかのH. pyloriタンパク質の同定を行った（Cover, T.L., Dooley, C.P.,およびBlaser, M.J.（1990）Infect. Immun. 58:603-610）。さらに、本発明者らは空胞形成毒素がH. pyloriウレアーゼとは異なることを示した（Cover, T.L., Puryar, W., Perez-Perez, G.I.,およびBlaser, M.J.（1991）Infect. Immun. 59:1264-1270）。本出願で本発明者らはH. pylori由来の空胞形成毒素の精製および特徴付けについて述べている。

発明の要旨

空胞形成毒素活性を有する実質的に純粋な抗原組成物を提供することが、本発明の目的である。本抗原組成物は天然物または組換え産物のいずれかから精製され得る。
組換え空胞形成毒素またはそのフラグメントを提供するために発現され得る遺伝子を提供することが、本発明のさらなる目的である。上記遺伝子の部分的なＤＮＡ配列を配列番号１に提示する。
毒素に対する抗体に特異的に結合する精製抗原組成物を提供することが、本発明の目的である。
毒素産生H. pylori感染の存在についての臨床診断用試験を提供し、それによって消化性潰瘍疾患または胃の悪性疾患の危険のある患者を特定することが本発明の目的である。
H. pylori毒素に対する高レベルの特異抗体を誘導し、そしてヒトにおいてH. pylori自然感染に対して保護するタンパク質ワクチンを提供することが本発明の目的である。
H. pylori毒素に特異的なポリクローナルまたはモノクローナル抗体、および毒素の検出におけるそれらの使用または治療目的での方法を提供することが本発明の他の目的である。
本明細書中で開示した抗原組成物、ワクチン、方法、抗血清または抗体、およびキットを提供することにより、これらおよび他の実施態様が達成される。
本発明の１つの実施態様では、空胞形成毒素活性を有する精製抗原組成物（これ以降ＣＢ抗原とする）は、H. pyloriのブロス培養上清から抽出され、972,000ダルトンより大きい分子量（非変性条件下でゲル濾過クロマトグラフィーによって決定した）、および変性したときに87,000±300ダルトンの明確な分子量（還元条件下でのドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PSGE）で決定した）を有した。抗原は配列番号２に示されるアミノ末端配列、配列番号15～17に示される中間アミノ酸配列を含有し得、そ

して加えて配列番号１に提示した核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を含有し得る。ＣＢ抗原という用語は機能的に活性のある未変性の空胞形成毒素として定義される；それに対して、Mr＝87,000タンパク質はＣＢ抗原の機能的に不活性なサブユニットであり、変性条件下でのみ検出される。ＣＢ抗原という用語は、H. pyloriから得られるか、あるいは合成または組換えによる生産で得られる完全体毒素（holotoxin）の抗原性のあるフラグメントを含有する。ＣＢ抗原またはそのフラグメントと実質的に相同性を有する抗原タンパク質もまた、本発明に従って使用され得る。さらに、ＣＢ抗原アナログもまた期待される。

ＣＢ抗原に対して産生された抗血清またはモノクローナル抗体は、毒素の存在に関する試験に使用され得る。試験サンプルをそのような抗血清に接触させ、次いで試験サンプルの成分に結合する抗体を検出する。そのような結合が予め決定しておいた陽性閾レベルを越えたところで、サンプルは毒素に対して陽性とする。

ＣＢ抗原は、無毒的な方法でヒトに投与したときに、H. pylori感染に対する感染防御免疫を誘導し得る。それ故に、抗原は将来的なH. pylori感染に対するワクチンとして、適切なアジュバントと組み合わせて使用され得る。

本発明の１つの局面では、ＣＢ抗原は抗毒素抗体の検出のための方法に使用される。精製した毒素を、抗毒素抗体を含むと疑われる体液のサンプルと接触させる。そのような接触に次いで、公知の方法が、抗原－抗体複合体形成量を決定するために使用される。複合体の形成が予め決定した陽性閾値を越えるときは、試験は抗毒素抗体の存在に対して陽性とする。

抗原－抗体複合体の形成を検出するために好ましい技術は酵素免疫アッセイ（ELISA）、間接免疫蛍光アッセイ、ラテックス凝集、およびリポソーム－ベースアッセイを含むが、それらに限定されない。あるいは、ウエスタンブロット技術を用い得て、その場合バンドが目視判定で検出され、そして濃いバンドの実質的な出現が陽性の指標として得られ得る。陽性シグナル（すなわち、試験サンプルが毒素特異抗体を含むことを示す）と考えられる抗原／抗体複合体の量は、選んだ検出方法によるが、一般的に他の全てのパラメーター（サンプルの希釈、インキュベート時間、など）を一定にしておいて、陰性コントロール群由来のサンプルで観察された結果から、平均値プラス標準偏差の１区間より高い値として定義され得る。より高い特異性が望まれるいくつかの実施態様においては、平均値プラス２標準偏差または平均値プラス３標準偏差が利用され得る。陰性コントロール群は、H. pylori感染がないと知られている個体からなる。

本発明の１つの局面では、本発明の範囲内の抗原組成物を含み、そしてさらに上記組成物中の抗原に結合し得る試験サンプル中に、何らかのイムノグロブリンが存在することを検出する手段を含むキットが提供される。

さらに、H. pylori感染に関する診断用試験は、被検者の核酸サンプルの増幅を導くプライマーに基づいて開発され得る。さらに詳細には、配列番号１に提示した核酸から選択した合成オリゴヌクレオチドは、H. pyloriの毒素を検出可能レベルにまで増幅するためのポリメラーゼチェイン反応で使用され得る。

【図面の簡単な説明】

図１はH. pylori空胞形成毒素のカラムクロマトグラフィーを示す。カラムの溶出物は280ナノメーターの吸光度（実線）に対してモニターした。そして塩濃度は点線で示す。画分の空胞形成毒素活性はニュートラルレッドアッセイを用いてアッセイし、純光学濃度（net optical density）（黒丸）として表わす。Ａ）硫酸アンモニウム沈澱させた上清中のタンパク質のPHENYLSUPEROSE（Pharmacia）クロマトグラフィー。初期の画分（１ml～15ml容量）の緩衝液中の硫酸アンモニウム（0.5M）の存在が、これらの画分によって誘導されるニュートラルレッドの取り込みに貢献した（Cover, T.L., Puryear, W., Perez-Perez, G.I., Blaser, M.J.（1991）Infect. Immun. 59:1264-70）。Ｂ）Ａからの溶出ピークをSUPEROSE 12（Pharmacia）カラムに添加し、そして毒素活性をボイド容量で検出した。Ｃ）SUPEROSE 12（Pharmacia）カラムから溶出した毒素活性を有する画分をMONO Q（Pharmacia）カラムに添加し、そして毒素活性をNaClの直線濃度勾配をかけて溶出した。

図２はH. pylori毒素（ＣＢ抗原）の変性、還元条件下でのドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（12%アクリルアミド）を示す。レーンは：ａ、H. pylori 60190のブロス培養上清から、硫酸アンモニウムの50%飽和溶液で沈澱させたタンパク質；ｂ、疎水性相互作用クロマトグラフィーで部分的に精製した毒素；ｃ、ゲル濾過クロマトグラフィーで部分的に精製した毒素；ｄ、陰イオン交換クロマトグラフィーをかけた後、変性、還元条件下でMr＝87,000のバンドとして視覚化された精製ＣＢ抗原。クロマトグラフィー条件はテキストに記載されている通りであった。既知の分子量（キロダルトン）のマーカータンパク質の移動度は左に示す。

図３は免疫ウサギ血清によるMr＝87,000のタンパク質バンドのウエスタンブロットの認識を示している。硫酸アンモニウム50%飽和溶液により、H. pylori 60190のブロス培養物から沈澱させたタンパク質を10%アクリルアミドゲルで電気泳動し、ニトロセルロース紙に移し、ウサギ血清の1:10,000希釈液とインキュベートし、抗原を分析した。レーンａ、免疫前血清。レーンｂ、精製したMr＝87,000の変性H. pyloriタンパク質サブユニットに対して作製した抗血清。この抗血清ではMr＝87,000のバンドのみ認識した。

図４は精製したMr＝87,000の変性タンパク質サブユニットに対して産生された抗血清によるH. pyloriの空胞形成毒素活性の中和を示す。免疫前血清、および精製したMr＝87,000のH. pyloriタンパク質サブユニットに対して産生された抗血清を毒素中和活性について試験した。H. pylori 60190由来の粗濃縮ブロス培養上清によって誘導されたニュートラルレッドの取り込みを、点線で示す。1:64希釈で、抗血清は完全に毒素活性を中和したが、免疫前血清は毒素活性を中和しなかった。

図５はH. pylori上清中の空胞形成毒素の検出を示す。８つのtox^+ H. pylori株および８つのtox^-株由来の濃縮培養上清を炭酸緩衝液で1:100に希釈し、Mr＝87,000の変性タンパク質サブユニットに対する抗血清（1:10,000希釈）との反応性についてELISAで試験した。tox^+上清はtox^-上清よりかなり高い光学濃度値を示した（0.614±0.11に対し0.046±0.01、P<0.0001）。

図６はヒト血清による精製H. pylori毒素（ＣＢ抗原）の血清学的な認識を示す。２０人のH. pylori感染者および２０人の未感染者由来の血清を1:100に希釈し、精製ＣＢ抗原（15ng／マイクロタイターウエル）とのＩｇＧ反応性についてELISAで試験した。H. pylori感染患者由来の血清は未感染者由来の血清より有意に高く精製毒素を認識した（平均光学濃度はそれぞれ0.424±0.06および0.182±0.02、p=0.0009）。

発明の詳細な説明および最良の形態

本発明は、H. pyloriの空胞形成毒素の等質性への最初の精製を示している。本毒素は硫酸アンモニウム沈澱、次いで疎水性相互作用クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、および陰イオン交換クロマトグラフィーによってブロス培養上清より単離された。実質的に純粋という用語は、ＣＢ抗原が他のH. pylori産物に対して、H. pyloriブロス培養上清中より高い濃度で抗原組成物中に存在することを意味する。

これらの手順により、非変性条件下で972,000ダルトンを越える分子量を有する、精製された、機能的に活性な毒素（ＣＢ抗原）が回収された。本タンパク質の精製により毒素の比活性は5000倍より大きく増加した。変性、還元条件下でのSDS-PAGEによる精製毒素（ＣＢ抗原）の分析により、87,000ダルトンに移動する１本のバンドの存在が示された。ELISAで、Mr＝87,000の変性タンパク質サブユニットに対する抗血清は、tox^- H. pylori上清よりもtox^+ H. pylori上清と有意に高い割合で反応した。さらに、Mr＝87,000の変性タンパク質サブユニットに対する抗血清は、H. pylori 60190の空胞形成毒素活性を、他のH. pylori株によって産生される毒素と同様に中和した。要するに、本データは空胞形成毒素活性におけるＣＢ抗原の役割を支持し、そして種々のH. pylori株により産生される毒素は抗原的に関連があることを示す。

ウエスタンブロット分析は、Mr=87,000の変性タンパク質サブユニットがtox^+ H. pylori培養上清の本発明者らの以前の分析において同定したバンド（原文でMr＝82,000と報告）に関連があると考えられることを明らかにした（Cover, T.L., Dooley, C.P.,およびBlaser, M.J.（1990）Infect. Immun. 58:603-610）。本発明者らのtox^+ H. pylori上清に関

する以前の研究で、Mr＝128,000のタンパク質もまた同定された。そのタンパク質は潰瘍疾患を伴わないH. pylori感染者より、消化性潰瘍の患者由来の血清により多く認められた（Cover, T.L., Dooley, C.P.,およびBlaser, M.J.（1990）Infect. Immun. 58:603-610;Crabtree, J.E., Taylor, J.D., Wyatt, J.I., Heatley, R.V., Shallcross, T.M., Tompkins, D.S.,およびRathbone, B.J.（1991）Lancet 338:332-335）。最近の研究で、Mr＝128,000のタンパク質は空胞形成毒素活性の発現に要求されず、Mr＝87,000のタンパク質サブユニットと免疫学的に交差反応しないことが示されている。

抗体含有の疑いのあるいずれものサンプルが、本明細書中に記載の方法に従って試験され得る。試験するサンプルは、好ましくは、血液、血清、尿、涙液、唾液などのような体液である。ヒトのサンプルに加えて、サンプルは、ヒトではない霊長類、馬、豚などのような哺乳類から採取され得る。記載の試験の感度によって、試験の前にサンプルを希釈し得る。希釈は、サンプル、試験する抗体、および抗原組成物の各々に適合した溶液を加えることによって行い得る。血清は、サンプルとして使用するとき、例えば、リン酸緩衝生理食塩水（pH7.0～7.4）（これ以後「ＰＢＳ」）、Ｔｗｅｅｎ ２０を含むＰＢＳ（これ以後「ＰＢＳ Ｔ」）、チメロサールを含むＰＢＳ Ｔ（これ以後「ＰＢＳ ＴＴ」）、ゼラチンを含むＰＢＳ ＴＴ（これ以後「ＰＢＳ ＴＴＧ」）、およびウシγグロブリンを含むＰＢＳ ＴＴＧ（これ以後「ＰＢＳ ＴＴＧＧ」）からなる群より選択される１つ以上の溶液で希釈され得る。希釈は、ＩｇＧ抗体について試験するとき、約1:100から約1:1000の比率程度であり得る。サンプルはＩｇＡおよびＩｇＭについても試験され得るが、ＩｇＧ試験が好ましい。

好ましい希釈剤および希釈率は、試験されるサンプルに従って異なり得る。例えば、尿は既にかなり希釈されていて、さらなる希釈は必要とされ得ない。しかし、他のアッセイでしばしば必要であるように尿を濃縮する必要がないことがある。試験の前に、好ましくは、尿のpHを、抗体機能にとって好ましいpHである約7.0と7.4との間に調整する。

サンプルの希釈が要求されない一方、H. pylori特異抗体の非存在下で有意な抗原／抗体複合体が形成される可能性は、希釈することで減少すると考えられる。希釈範囲は、陽性シグナルと考えられる抗原／抗体複合体のレベル閾に合わせることを考慮にいれるべきである。

本開示により、寄託されたH. pylori株由来の精製毒素（ＣＢ抗原）を得るための簡易な方法が提供される一方、この抗原は多くのH. pylori株に共通であることが強調される。寄託された株および本明細書の記載により、本抗原の簡易な単離方法が提供される一方、本発明は抗原が得られる原料または方法（例えば組換え生産による）に関わらず、抗原の利用を広く包含することが強調される。

試験サンプルを本発明に従って抗原化合物に接触させる前に、この抗原組成物を従来の技術を用いて固定するのが好ましい（しかし必要ではない）。１つの選択的な実施態様では、以下にさらに詳しく記載したようなリポソームーベースアッセイが使用され得る。従来の固定については、例えばポリスチレンプレートを、本発明に従って作製した抗原懸濁液とインキュベートし得る。あるいは、例えば電気泳動ゲル上にタンパク質バンドとして単離された抗原を、既知の方法でニトロセルロースシートに移し得る。Towbinら, Proc. Natl. Acad. Sci., 76:4350-54（1979）; Burnetteら, Biochem., 112:95-203（1981）参照。当該分野において、抗原を実質的に不活性な基質に結合させる多数の他の技術が知られている。

本発明に従って結合させた抗原を、好ましくは、H. pyloriに対する抗体の存在について試験するサンプルを含む希釈液と接触させる。本抗原およびサンプルを、好ましくは、少なくとも５分間から１５分間インキュベートする。インキュベーションはヒトの体温またはその付近（約３７℃）で行うと、少ない時間で済む。他の温度でのインキュベーション（例えば４℃）もまた適切だが、一般的に追加のインキュベーション時間が必要である。３７℃での好ましいインキュベーション時間は、約５分間から約９０分間である。迅速アッセイもまた室温で行われ得る。次いで、結合抗原をすすぎ、いずれもの非結合抗体（つまり抗原に対して特異的ではない抗体）をも除く。好ましくは、すすぎはＰＢＳ Ｔ、Ｐ

ＢＳ ＴＴ、またはトリス／Ｔｗｅｅｎ／塩化ナトリウム／アザイドのような緩衝液で行う。多数回のすすぎが好ましい。
インキュベーションの間、H. pylori特異抗体は固相抗原に結合し、抗原／抗体複合体を作る。全ての非結合抗体は、実質的にすすぎ手順の間に除かれる。本発明の抗原は高特異性のため、H. pyloriに特異的でない抗体は実質的にすすぎで除かれる。もちろん、もし試験サンプルがH. pylori特異抗体を含まなかったら、固相抗原は実質的にヒト抗体を結合せず、そして抗原／抗体複合体に対する次の試験では、そのような複合体の実質的な存在は示されない。他方で、もし試験サンプルにH. pylori特異抗体が豊富にあったら、これらの抗体は固相抗原に結合し、次で検出される多量の抗原／抗体複合体を形成する。
抗原／抗体複合体の検出は、幅広い種類の既知の方法によって行われ得る。好ましい方法には、酵素免疫アッセイ、ラテックス凝集、ウエスタンブロット技術、または間接免疫蛍光アッセイが含まれるが、それらに限定されない。
一般的に、固相抗原に複合したH. pylori特異抗体は、標識、または他の方法で検出可能な、試験される免疫グロブリンに特異的である第２抗体と接触させることによって検出される。例えば、もし試験サンプルがヒト血清ならば、検出可能な第２抗体は、ヒト免疫グロブリンに特異的である。標識した第２抗体はどのヒト抗体（好ましくはＩｇＧまたはＩｇＡ型、最も好ましくはＩｇＧ）に対しても特異的であり得る。急性セロコンバージョンが疑われるとき、ＩｇＭに特異的な標識第２抗体を使用するＩｇＭ試験が適当であり得る。第２抗体は、好ましくは固相抗原と約２０℃から約３７℃の温度において、約５分間から約２時間、好ましくは３０分間から６０分間、インキュベートする。それから、全ての非結合標識抗体を除くために、抗原を緩衝液で洗浄する（好ましくは多くの回数）。洗浄により、抗原上に存在する免疫グロブリンに結合した抗体以外の、実質的に全ての標識抗体が除かれる。もちろん、実質的には、この時点で存在するヒト免疫グロブリンのみがH. pyloriに特異的な抗体である。このため、H. pylori特異抗体の存在は、標識第２抗体の存在または非存在を決定することによって、間接的に測定され得る。
標識を検出するためには、多くの既知の技術があり、これは使用した標識の型で異なる。例えば、フルオレセイン標識抗体は、フルオレセインの特定波長で発光された光を走査することにより、検出され得る。あるいは、酵素標識は、適切な基質とのインキュベーションおよび酵素活性、好ましくは色調変化になる活性、の検出によって検出される。そのような活性は、目視判定により決定され得るか、または適切な波長にセットした分光光度計によって機械的に読みとられ得る。
あるいは、酵素標識が、西洋ワサビペルオキシダーゼであり得、そして基質が、H_2O_2と、酵素の存在下で生成され、414nmにセットした分光光度計で検出可能な化合物である2,2'-アジノビス（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸）とであり得る。
ウエスタンブロッティングにおいて、陽性シグナルは、酵素が第２抗体とコンジュゲートするときに検出され得る。適切な基質とインキュベートすると、本プロセスによって分析される抗原バンド前後に酵素により色素産物が生成される。反応するバンドの存在は、目視判定で検出され得る。間接免疫蛍光アッセイ法において、フルオレセイン標識第２抗体はフルオレセイン励起検出器または目視判定で検出され得る。
リポソーム－ベースアッセイは表面にH. pylori抗原が発現されるリポソーム内にフルオレセイン、酵素、または基質の存在を含み得る。これらのリポソームを、試験する希釈体液サンプルとインキュベートし、そして充分に洗浄する。表面に抗原／抗体複合体を形成する免疫グロブリンを有するいかなるリポソームもが、リポソームを含むポリスチレンチューブの内壁上に、第２抗体（試験する免疫グロブリンに特異的である）を付着させることによって認識され得る。表面に抗体を結合させたリポソームは、チューブ壁に固定され、そして非固定リポソームは洗浄除去される。リポソームは、例えば界面活性剤または補体で細胞溶解され得、そして内部に存在していた酵素または基質が遊離し、チューブ内で溶液中の相補的な基質（または酵素）と反応する。酵素活性（好ましくは色調変化反応）は、目視判定または分光光度計の色調測定により検出され得た。予め決定した陽性閾を越える酵素活性により、H. pylori特異抗体の存在が示される。

本発明に従った抗体検出の感度および特異性は、限定した集団のヒトから得られる血清を使用して決定した。ELISAにより、精製毒素（ＣＢ抗原）に対するＩｇＧ抗体が、H. pylori感染者由来の血清中で同定された。およそ50％のH. pylori感染者由来の血清によって提示されたELISAの光学濃度値は、非感染者由来の血清によって提示された範囲を越えていた。このことは、およそ50％のH. pylori感染者が毒素を産生するH. pylori株に感染していることを示唆する。同様に、およそ50％のH. pylori株がインビトロで毒素を産生する（Leunk, R.D., Johnson, P.T., David, B.C., Kraft, W.G.,およびMorgan, D.R.（1988）J. Med. Microbiol. 26:93-99;Cover, T.L., Dooley, C.P.,およびBlaser, M.J.（1990）Infect. Immun. 58:603-610）。

この出願では、結果を平均±ＳＥＭで表す。光学濃度値は独立変数に関するステューデントの両側ｔ検定を用いて比較した。

さらに、体液または組織を含有する試料中の核酸の検出は、核酸の存在量が少量であるため、あるいは試料中に異なった原料由来のＤＮＡまたはＲＮＡを含有する他の干渉物質が存在するために困難であり得る。これらの限界は、ポリメラーゼチェイン反応（ＰＣＲ）技術と呼ばれる分析方法を採用することにより、克服され得る。この技術によって、特異ＤＮＡ配列の選択的富化が、標的配列の指数関数的増幅により達成され得る。Mullisら,Met. Enzymol., 155, 335（1987）。H. pylori毒素を検出するための方法は、H. pylori毒素を産生する核酸のサンプルを検出可能なレベルにまで増幅するために、配列番号１に提示されるＤＮＡ配列から選択されるオリゴヌクレオチドの増幅を導くプライマーの使用により提供される。

ＰＣＲ増幅を促進するために、ペアのオリゴヌクレオチドプライマーが、米国特許第4,683,202号（本明細書中で参考として援用されている）に記載のように採用され得る。このプライマーは標的ＤＮＡに隣接する配列にハイブリダイズするように設計する。インビトロ増幅に続いて、増幅した標的配列を、ハイブリダイズプローブを用いて検出する。例えば、この分析手順は、Ouら、Science, 238, 295-97（1988）に記載されるように、ＨＩＶ－１の直接検出のために使用されてきた。増幅サイクルは、Saikiら、Science, 239, 487-91（1988）によって記載されるように、95℃までのインキュベーションで熱安定であるポリメラーゼを使用することによって促進される。

本発明のある実施態様では、合成オリゴヌクレオチド配列をプライマーとして使用した。これらの配列は、周知の化学的方法で調製され得、そして市販のＤＮＡ合成機もまた使用され得る。例えば、必要とされる配列は、Beaucageら、Tetrahedron letters, 22:1859-62（1981）に記載の合成方法で調製され得る。固相支持体上でのオリゴヌクレオチドの合成のための他の方法は、米国特許第4,458,066号に記載されている。自動ＤＮＡ合成装置はApplied Biosystems社が発売しているＤＮＡ合成機のようなものが用いられ得る。

さらに詳細には、プローブ配列のオリゴヌクレオチド配列は、ヌクレオチドが以下に示される標準略語文字で表される：Ａはアデノシン、Ｔはチミジン、Ｇはグアノシン、Ｃはシトシン、およびＮは不明。これらの鎖は、標準の５’プライムから３’プライム方向に表記されている。変性プライマー中に用いられる略語は表３に示す。

実施例１

毒素の精製

以前に記載した毒素産生株のH. pylori 60190（ATCC 49503）を、毒素精製のための原料として用いた。H. pylori 60190を、５％CO_2を含む包囲環境中で、0.5％活性炭（未処理、粒径８～２０メッシュ、Sigma）を含むBrucellaブロス中で37℃で48時間培養した（Cover, T.L., Puryear, W., Perez-Perez, G.I.,およびBlaser, M.J.（1991）Infect. Immun. 59:1264-1270）。培養物を10,000gで20分間遠心分離し、そして上清に存在するタンパク質を硫酸アンモニウムの50％飽和溶液で沈澱させた。10,000gで15分間遠心分離した後、ペレットを60mM Tris-HCl（pH7.7）に再懸濁した。

疎水性相互作用クロマトグラフィーを、60mM Tris-HClおよび0.5M硫酸アンモニウム（pH7.7）を含む緩衝液を用いて、PHENYLSUPEROSE HR 5/5カラム（Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, NJ）で行い、そしてタンパク質を60mM Tris HCl（pH7.7）で溶出

した。サイズ排除クロマトグラフィーを、60mM Tris-HClおよび0.1M NaCl（pH7.7）を含む緩衝液を用いて、0.12ml/分の流速でSUPEROSE 12 HR 16/50カラム（Pharmacia）で行った。陰イオン交換クロマトグラフィーを20mM Tris（pH7.7）中で、MONO-Q HR 5/5カラム（Pharmacia）で行った。タンパク質は20mM Tris中で10mlにわたって0.3Mから0.6MのNaClの直線濃度勾配をかけて溶出した。カラム溶出物を、280nmのＵＶ吸光度に対してモニターした。

HeLa細胞を、以前に記載したように、96-ウエルプレート中で、10%のウシ胎児血清を含むEagleの修正最小必須培地（MEM-FBS）で培養した（Cover, T.L., Dooley, C.P.,およびBlaser, M.J.（1990）Infect. Immun. 58:603-610）。毒素調製物をMEM-FBSで系列希釈し、そして96-ウエルプレート中で、10μl分注量を接着細胞および培養液90μlと37℃で18時間インキュベートした。その後、以前に記載したように、細胞の空胞形成をニュートラルレッド取り込みアッセイを用いて分光光度計で定量した（Cover, T.L., Puryear, W., Perez-Perez, G.I.,およびBlaser, M.J.（1991）Infect. Immun. 59:1264-1270）。サンプル中の毒素活性の力価は、培養液のみで提示される光学濃度の３ＳＤ以上の光学濃度が提示されるサンプルの最大希釈率として定義した。サンプルの特異活性は、毒素の逆数力価のタンパク質濃度（mg/ml）に対する比率で定義した。比活性を決定するために、MEM-FBSに塩化アンモニウム（10mM）を加えた。これは毒素活性を増強することを以前に示した濃度（Cover, T.L., Puryear, W., Perez-Perez, G.I.,およびBlaser, M.J.（1991）Infect. Immun. 59:1264-1270）であり、H. pylori感染したヒトの胃液中のアンモニウムイオンの濃度に近い（Marshall, B.J.およびLangton, S.R.（1986）Lancet i:965-966）。

タンパク質濃度は、サンプルの濃度によって、QUANTIGOLD試薬（Diversified Biotech, Newton Centre, MA）またはBCAタンパク質アッセイ試薬キット（Pierce, Rockford, Illinois）のいずれかを使用して測定し、標準としてアルブミンを使用した。SDS-PAGEはAmesによって記載された（Ames, G.F.-L（1974）J. Biol. Chem. 249:634-644）ような、修正Laemmliゲル系で行い、そしてタンパク質をOakleyらの銀染色を用いてゲルで分析した（Oakley, B.R., Kirch, D.R.,およびMorris, N.R.（1980）Anal. Biochem. 105:361-363）。分子量標準は、ウサギ筋肉ホスホリラーゼｂ（97,400）、ウシ血清アルブミン（66,200）、ニワトリ卵白オボアルブミン（45,000）、ウシ炭酸脱水酵素（31,000）、および大豆トリプシンインヒビター（21,500）（Biorad, Richmond, CA）。

H. pyloriの空胞形成毒素の精製は、ブロス培養上清中に存在するタンパク質の硫酸アンモニウム沈澱を含み、続いて上記のように、疎水性相互作用、ゲル濾過、陰イオン交換の一連のクロマトグラフィーを行った。変性条件下でのSDS-PAGEおよび銀染色で、Mr＝87,000±300のタンパク質サブユニットの等質性までの精製が示された（図２）。表１にまとめたように、精製プロセスの各段階の比活性の分析で、毒素（ＣＢ抗原）は未濃縮ブロス培養上清から5000倍および硫酸アンモニウム沈澱物から25倍を越える精製度であった。このように、他のH. pylori産物に比較して、H. pyloriブロス培養上清中より高濃度で存在する実質的に純粋な調製物が得られた。精製毒素の回収率は、培養上清１リットルあたり８μgで、これは原未濃縮上清中で存在する毒素活性の５%より少ない量に相当する。

上記精製方法に加えて、実質的に純粋な毒素は、SUPEROSE 12（Pharmacia）カラムの代わりにSUPEROSE 6（Pharmacia）カラムを用いることによって生成され得る。同様に、精製方法におけるその他の修正も、当業者により採用され得る。例えば、PMSF、DTT、EDTA、および10%グリセロールのようなタンパク質変性を阻害するための添加物が包含され得る。

表１ H. pylori株60190由来の空胞形成細胞毒素活性の精製

精製段階	比活性	精製度（-倍）
ブロス培養上清	4.5±1.5	1
硫酸アンモニウム沈澱	950±530	211
フェニルスーパーロース クロマトグラフィー	2000±310	444
SUPEROSE 12 クロマトグラフィー	16,000±5900	3556
MONO Q クロマトグラフィー	24,000±5600	5333

[1] 3回の精製結果を示す（平均±SEM）。クロマトグラフィー条件はテキストの説明通りであった。比活性は、タンパク質濃度（mg/ml）に対する毒素活性の逆数力価比率で定義した。

実施例２

ＣＢタンパク質の特徴付け

疎水性相互作用クロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーにより部分的に精製した後、毒素調製物を変性条件下の７％アクリルアミドゲル上で電気泳動した。Mr＝87,000バンドを切り出し、ゲルから溶出し、そして0.7M炭酸水素アンモニウムを加えた。次いで溶液をPHENYLSUPEROSE HR 5/5カラム（Pharmacia）に流し、蒸留水で溶出した。アミノ末端アミノ酸配列決定を既に記載されているようにして行い（Pei, Z., Ellison, R. T., III, Lewis, R.V.,およびBlaser, M.J.（1988）J. Biol. Chem. 263:6416-6420）、そしてNational Biomedical Research Foundation and Swiss-Protデータベースで既知のタンパク質との潜在的な相同について検索した。アミノ酸組成分析を、Jones（Jones, B. N.（1981）J. Liq. Chromatogr. 4:565:586）の記載のようにして行った。

精製したMr＝87,000の変性タンパク質サブユニットのアミノ酸組成は以下のようであった（モル％で示す）：Asx 14.8, Glx 9.6, Ser 9.3, His 1.5, Gly 13.0, Thr 6.7, Arg 3.5, Ala 8.1, Tyr 3.8, Met 2.3, Val 6.7, Phe 4.6, Ile 6.7, Leu 9.3（Lys, Trp, Pro, およびCysは未決定）。２回の測定に基づき23個のＮ末端アミノ酸の配列は、表２に示すようである（配列番号２）。Ｎ末端配列は疎水性アミノ酸に富み、非荷電性であり、そして推定される等電点が5.83である。Garnier-Robson構造予測は、この部分の配列が100％伸長構造（extended conformation）に関連していることを示す。

Mr＝87,000タンパク質サブユニットおよび他の既知のタンパク質のＮ末端配列間の比較では、強い相同性はないことが示された。しかし、Mr＝87,000タンパク質サブユニットのＮ末端配列と多数の他の既知のタンパク質の中間配列との間には、部分的な相同性があった

。これらの既知のタンパク質の多くは、輸送過程に関わっていた（表２）（Salkoff, L., Butler, A., Scavarda, N.,およびWei, A.（1987）Nucleic Acids Res. 15:8569-72; Rogart, R.B., Cribbs, L.L., Muglia, L.K., Kephart, D.D., およびKaiser, M.W.（1989）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8170-74; Takeyasu, K., Tamkun, M.M., Renaud, KJ., およびFambrough, D.M.（1988）J. Biol. Chem. 263:4347-54; Hesse, J.E., Wieczorek, L., Altendorf, K., Reicin, A.S., Dorus, E., およびEpstein, W.（1984）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:4746-50; Mandel, M., Moriyama, Y., Hulmes, J.D., Pan, Y-C. E. Nelson, H., およびNelson, N.（1988）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5521-24; Hiles, I.D., Gallagher, M.P., Jamieson, D.J., およびHiggins, C.F.（1987）J. Mol. Biol. 195:125-42; およびSzkutnicka, K., Tschopp, J.F., Andrews, L., およびCrillo, V.P.（1989）J. Bacteriol 171:4486-93; Hawkins, A.R., Lamb, H.K., Smith, M., Keyte, J.W., およびRoberts, C.F.（1988）Mol. Gen. Genet. 214:224-231; Goldrick, D., Yu, G.-Q., Jiang, S.Q., およびHong, J.-S.（1988）J. Bacteriol 170:3421-3426）。水治療法プロット分析（hydropathy plot analyses）に基づくと、H. pylori Mr＝87,000タンパク質サブユニットに相同な配列は、しばしば疎水性の膜に広がっているセグメントであった。表２に挙げたタンパク質に加えて、ブタ由来のカルシウムチャンネル放出タンパク質（Harbitz, I., Chowdhary, B., Thomsen, P.D., Davies, W., Kaufmann, W., Kran, S., Gustavsson, I., Christensen, K., およびHauge, J.G.（1990）Genomics 8:243-248）、ラット由来のカイニン酸ゲートイオンチャンネル前駆体（Hollmann, M., O'Shea-Greenfield, A, Rogers, S.W., およびHeinemann, S.（1989）Nature 342:643-8）、Saccharomyces cerevisiae由来の一般アミノ酸（amino aid）パーミアーゼ（Jaunizux, J.-C., およびGrenson, M.（1990）Eur. J. Biochem. 190:39-44）、S. cerevisiae由来のアルギニンパーミアーゼ（Hoffmann, W.（1985）J. Biol. Chem. 260:11831-7）、E. coli由来のラクトースパーミアーゼ（D.E., Groneborn, B., およびMuller-Hill, B.（1980）Nature 283:541-545）、およびE. coli由来のマンノースパーミアーゼEII-P MANセグメント（Erni, B., Zanolari, B., およびKocher, H.p.（1987）J. Biol. Chem. 262:5238-47）と部分的な相同性があった。Mr＝87,000タンパク質サブユニットのＮ末端と、複数のファミリーのイオンチャンネルおよび輸送タンパク質の異なる領域との間の部分相同性は、この関係が注目に値することを示唆している。

表２．　H. pylori空胞形成毒素とイオンチャンネルタンパク質または輸送タンパク質との間の配列相同性

開始	配列	終了
H. pylori Mr=87,000 タンパク質サブユニット	（配列番号２）	
1	A F F T T - V I - I P A I V G G I A T G T A V G T	23
ナトリウムチャンネル：Drosophila	（配列番号３）	
1355	A F F T T-V F G L E A I V K I V G L R Y H Y F T	1378
ナトリウムチャンネルタンパク質ｉ心臓(i cardiac)：ラット	（配列番号４）	
1752	L F F T T Y I I - I S F L I V V N M Y I A I I L E	1775
Na+-K+-輸送ATPアーゼα：ニワトリ	（配列番号５）	
241	A F F S T - N C - V E G T A V G I V I S T G D R T	263
H+-K+-輸送ATPアーゼｂ鎖：E. coli	（配列番号６）	
256	V A L L V - C L - I P T T I G G L L S A S A V A G	278
H+-輸送ATPアーゼプロテオリピド鎖：ウシ	（配列番号７）	
50	E M I M K - S I - I P V V M A G I I A I Y G L V V	72
オリゴペプチドパーミアーゼ：Salmonella typhimurium	（配列番号８）	
104	A F L L A - V I - I G V S A G V I A A L K Q N T R	126
ガラクトースパーミアーゼ：Saccharomyces cerevisiae	（配列番号９）	
486	A F F T P - F I - T S A I N F Y Y G Y V F M G C L	508
キナ酸パーミアーゼ：Aspergillus nidulans	（配列番号１０）	
458	F F F A S - L M - I L S I V F V F F L I P E T K G	480
ホスホグリセリン酸輸送体：S. typhimurium	（配列番号１１）	
366	Q F L A S - V Q - T M E I V P S F A V G S A V G L	388
胃H+K+-ATPアーゼαサブユニット：ヒト	（配列番号１２）	
254	A F F S T - M C - L E G T A Q G L V V N T G D R T	276
Ca++-ATPアーゼ（筋小胞体由来）：ウサギ	（配列番号１３）	
208	L F S G T - N I - A A G K A L G I V A T T G V S T	230
クロム親和性顆粒H+-ATPアーゼ 16kDaプロテオリピドサブユニット：ウシ		
（配列番号１４）		
50	E M I M K - S I - I P V V M A G I I A I Y G L V V	72

＊は、H. pylori Mr=87,000タンパク質サブユニットと同一であることを示す
：は、同類置換を示す

非変性毒素（ＣＢ抗原）の分子量の測定を、60mM Tris-HClおよび0.1M NaCl（pH7.7）を含有する緩衝液を用いて、SUPEROSE 6 HR 10/30カラム（Pharmacia）で行った。標準物質（Sigma, St. Louis, MO）は、サケ精子ＤＮＡ（ボイド容量）、ブルーデキストラン（2,000,000）、ウシチログロブリン（669,000）、ウマ脾臓アポフェリチン（443,000）、サツマイモ由来β－アミラーゼ（200,000）、ウシ血清アルブミン（66,000）、およびウシ赤血球由来カルボニックアンヒドラーゼ（29,000）を含む。この分析に用いられた毒素調製物は、疎水性相互作用クロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーにより部分精製を行い、次いでSUPEROSE（Pharmacia）6 HR 10/30カラムにかけた。空胞形成毒素活性（細胞培養で検出されるような）およびSDS-PAGEにより検出されたMr＝87,000バンドはいくつかの画分に存在し、972,000よりも大きなMrを有する各画分は凝集によるものと

考えられる。凝集が精製に用いられる処理から生じるかどうかを決定するために、H. pylori 60190由来の濃縮していないブロス培養上清を同じカラムを通して継代培養し、Mr＝87,000タンパク質サブユニットに対する抗血清との反応性について、画分をELISAで分析した。100,000よりも大きい推定分子量のタンパク質を含む複数の画分が抗血清により認識され、Mr＝87,000タンパク質サブユニットの凝集が未処理の上清においても生じていることが示された。

精製毒素のpIを等電点電気泳動により測定した。等電点電気泳動は、５M尿素および2.5％アンフォライト（pH範囲3.5～9.5）を含む５％アクリルアミドゲル（LKB, Bromma, Sweden）用いるResolve Alpha水平電気泳動ユニット（Isolab, Inc., Akron, OH）で行った。標準物質（Sigma）は、トリプシンインヒビター（4.6）、β－ラクトグロブリンＡ（5.13）、ウシ炭酸脱水酵素II（B）（5.9）、およびヒト炭酸脱水酵素Ｂ（6.6）であった。精製されたH. pyloriのMr＝87,000の変性タンパク質サブユニットおよび等電点電気泳動標準物質を、１時間エレクトロブロッティングすることによりニトロセルロース紙上に移した。標準物質は、クマシーブルーでの染色により分析し、そしてH. pyloriタンパク質は、以下に記載の方法を用い、特異抗血清でのイムノブロッティングにより分析した。非変性毒素は１％アガロースゲル（Isolab, Akron, Ohio）で移動しなかった。おそらくそのサイズが大きいことによる。従って、Mr＝87,000タンパク質サブユニットを、SDS-PAGEゲルフラグメントから溶出し、５M尿素を含む５％アクリルアミドゲルで等電点電気泳動し、pIは約6.1を示した。

実施例３

毒素をコードするＤＮＡ配列のＰＣＲ増幅
および毒素遺伝子のクローニング

中間アミノ酸配列を決定するために、H. pylori 60190由来ＣＢ抗原を、Coverら、「Helicobacter pylori由来空胞形成毒素の精製および特徴付け」、J. Biol. Chem. 267:10570-575（1992）の記載のようにカラムクロマトグラフィーにより精製した。クロマトグラフィーについては実施例１を参照のこと。

精製した87kDaバンドをPVDF紙に固定化し、切り出した。アミドブラック染色し切り出したタンパク質バンドをMilli-Q水で１回洗浄し、0.5mlの200μM NaOH／20%アセトニトリルで１分間脱色し、次いでMilli-Q水で１回洗浄した。残っている非特異的タンパク質結合部位を0.5mlの0.2%PVP-40／メタノール（ｗ／ｖ）で室温で30分間、次いで0.5mlのMilli-Q水を加えてブロックした。サンプルを１mlのMilli-Q水で６～10回洗浄して過剰のPVP-40を除去し、約１×１-mm平方に裁断し、同じEppendorfチューブに戻した。50マイクロリットルの１%RTX-100／10%アセトニトリル／100mM Tris-HCL（pH8.0）をストリップに加え、次いで５μｌのArg-Cプロテアーゼを加えた。最良の結果は、５０μｌ未満の体積の消化緩衝液で得られた。消化は、37℃で24時間行った。消化緩衝液中に0.001%より多いSDSを使用する実験では、ヘプタン／イソアミルアルコール（４：１、ｖ／ｖ）での抽出をHPLC分析の前に行った。Frank, R.W., およびBosserhoff, A.（1988）Methods in Protein Sequence Analysis（Wittmann-Liebold, B.,編）, pp. 273-279, Springer Verlag, Berlin Heidelberg。消化後、サンプルを５分間超音波処理にかけ、次いで1700rpmで５分間遠心分離し、そして上清をHPLC注入バイァル（Hewlett-Packard）に移した。引続き50μｌの消化緩衝液（１Ｘ）および50μｌの1.1%TFA（２Ｘ）での洗浄を、超音波処理および遠心分離にかけて上記のようにして行った。すべての上清を全部で200μｌになるようプールした。サンプルをすぐにHPLCで分析しない場合は、２μｌの１%DFP／エタノール（ｖ／ｖ）をプールした上清に加えて消化を停止させ、バイァルを－２０℃で保存した。

ペプチドの単離は、二溶媒デリバリーシステム、ダイオード線検出器、容量可変インジェクター、およびオートサンプラーを備えた1090M HPLC（Hewlett-Packard, Avondale, PA）で行った。フローセルからの放出を、死容量（dead volume）が９μｌであるキャピラリーによりフラクションコレクターに直接連結した。データは、Hewlett-Packard 79995A Chem-Stationソフトウェアを用いて集めた。ペプチドを注入（200μｌ）し、Vydac C_{18}

カラム（2.1×250mm）で、流速150μｌ／分で、室温で分離した。クロマトグラフィー条件は、Stoneらの記載のようにした。Stone, K.L., LoPresti, M.B., Williams, N.D., Crawford, J.W., DeAngelis, R., およびWilliams, K.R.（1989）Techniques in Protein Chemistry（Hugli, T.E., 編）, 377-390頁, Academic Press, New York。簡単に述べると、濃度勾配は、1.6～29.6％Ｂ（０～63分）、29.6～60％Ｂ（63～95分）、60～80％Ｂ（95～105分）であり、そして用いた緩衝液は、Ａ＝0.1%TFA／Milli-Q水およびＢ緩衝液＝0.08%TFA／アセトニトリルであった。次いでカラムを、80％Ｂで12分間、150μｌ／分で洗浄し、1.6％Ｂで50分間、300μｌ／分で再び平衡化した。ペプチド溶出を220ナノメーターでモニターした。画分を0.5分ごとに集め（75μｌ／画分）、配列分析を行うまで－20℃で保存した。次いで、中間ペプチドのミクロ配列決定をFernandez（Anal. Biochem. 1992:201:255-264）に記載のようにして行った。

３つのペプチドのミクロ配列決定により、以下のアミノ酸配列が得られた（括弧は不明瞭な残基を示す）；

(L) G Q F N G N (S) F T (S) Y K D X A D

配列番号１５

(N) I K N V E I T R

配列番号１６

(T)R V/I D F N A K N I L I D N F L E I N N R

配列番号１７

この情報を用いて、配列番号２のアミノ酸残基番号２から８、および配列番号１７に既に示されている中間ペプチドのアミノ酸残基番号１３から２０に相当する、変性オリゴヌクレオチドプライマーを合成した。

5′ T T Y T T Y A C N A C N G T N A T H A T 3′

配列番号１８

5′ G A Y A A Y T T Y Y T N G A R A T H A A Y A A 3′
（センス）

配列番号１９

3′ C T R T T R A A R R A N C T Y T A D T T R T T 5′
（アンチセンス）

配列番号２０

表３

R=A,G	H=A,T,Cであって、Gではない
Y=C,C	B=G,T,Cであって、Aではない
M=A,C	V=G,A,Cであって、Tではない
K=G,T	D=G,A,TであってCではない
S=G,C	N=G,A,T,C

変性プライマー中に用いられている記号を表３に示す。
変性オリゴヌクレオチドプライマーは、ＤＮＡシンセサイザーで標準ホスホルアミダイト（phosphoramididite）化学を用いて合成した。これらの変性オリゴヌクレオチド（配列番号１８および２０）をポリメラーゼ連鎖反応におけるプライマーとして用いた。このプライマーは、毒素遺伝子の介在配列を増幅するように設計した。H. pylori 60190細胞を蒸留水中に血液寒天プレートから採取し、100℃で５サイクルボイルし、遠心分離にかけてデブリを除去した。この上清を、ＰＣＲのＤＮＡテンプレートとして用いた。
ＰＣＲは、Perkin Elmer ＤＮＡ熱サイクラーを用いて、製造者の指示に従って行った。ＰＣＲは、温度94℃で1.5分間、37℃で２分間、および72℃で２分間のサイクルで５サイクル、次いで、温度94℃で1.5分間、41℃で２分間、および72℃で２分間のサイクルで45サイクル行った。増幅したＤＮＡをアガロースゲル電気泳動により分析し、有力なバンドが0.5kbに移動したことが分かった。
0.5kbの増幅されたＤＮＡフラグメントをアガロースゲルから切り出し、精製し、そしてpT7blue T-ベクターキット（Novagen）を用いてNOVABLUE（Novagen）細胞にクローニングした。プラスミドＤＮＡを形質転換体から精製し、そしてPstIおよびBamHIで消化することにより、0.5kb挿入断片の存在を確認した。λZAPベクタープライマーを用いる挿入断片のジデオキシヌクレオチド配列決定は、標準法により行った。Sangerら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 71:1342-46（1977）、およびManiatis, ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor, NY, 1989。増幅産物の核酸配列を配列番号１に示す（５’から３’方向、24から495塩基）。この配列の部分は、配列番号２、15、および17のアミノ酸配列を正確にコードしていたので、毒素遺伝子の一部が首尾よくクローニングされたことが分かる。詳細には、配列番号15は、配列番号１の400から450塩基によりコードされていた。
完全な毒素遺伝子をクローニングするために、H. pylori 60190由来の染色体ＤＮＡを超音波処理により剪断し、得られたフラグメントを0.7%アガロースゲル上で電気泳動した。２～10kbの大きさの範囲のフラグメントを切り出し、Ｔ４ ＤＮＡポリメラーゼで処理し平滑末端を得、ホスホリル化EcoRIオクタマーリンカー（New England Biolabs）に連結した。ＤＮＡをEcoRI切断し、λZAPベクター（Stratagene）のEcoRIアームに連結した。連結混合物をGigapack IIパッケージングミックス（Stratagene）に加え、XL1-blue細胞で滴定した。上記の毒素遺伝子のクローン化0.5kbフラグメントをランダムヘキサマーを用いるプライマー伸長により放射標識し、ゲノムライブラリーをスクリーニングするのに用いた。８つの反応性クローンから組換えファージミド（phagemid）を切り出し、XL1-blue細胞に形質転換した。これらのクローンに由来するプラスミドＤＮＡは、1.2kb、1.1kb、または2.2kbのＤＮＡ挿入断片であることを示した。このような大きさの挿入断片を含む３つの代表的なクローンを、それぞれさらなる研究に用いた（p1A1、p3A1、およびp3C）。これらの組換えプラスミドの制限エンドヌクレアーゼ処理により、p1A1とp3A1との間には重複がないことが示された。
p1A1およびp3A1の部分配列を、順方向および逆方向ベクタープライマーの両方を用いて決定した。毒素のＮ末端アミノ酸配列に相当するＤＮＡ配列はp3A1中で同定され、配列番号15および17に示される中間アミノ酸配列に相当する配列はp1A1中で同定された。p3A1の1.

1kb挿入断片は、配列番号１の１から177塩基に相当する配列、および約0.9kbの上流配列を含んでいた。p1A1の1.2kb挿入断片は、配列番号１に示された配列の178から1412塩基に相当する配列を含んでいた。

E. Coliで組換え毒素の発現

クローン3A1は、毒素遺伝子の177塩基（Ｎ末端アミノ配列を含む）、リーダー配列、有望なプロモーター、および約0.8kbの上流配列を含んでいた。クローン1A1は、1.2kbの中間毒素遺伝子（配列177－1412）を含んでおり、そして3A1の下流末端にあるEcoR1部位に隣接している。毒素を組換え発現させる１つのアプローチは、プライマーとして配列番号１の１から20塩基および1392から1412塩基を用いて、毒素遺伝子の1412塩基対フラグメントをＰＣＲ増幅することである。次いで、この配列をE. coli XL1BlueのpBluescriptにサブクローニングし得、組換え毒素を発現させ得る。あるいは、3A1および1A1のＤＮＡ挿入断片をpBluescriptプラスミドから切り出し得、ゲル精製し得る。挿入3A1を中間制限部位でカットし、3A1のフラグメントをゲル精製する。毒素遺伝子の所望の部位（プロモーター、リーダー配列、および１から177塩基）を含む3A1のフラグメントを挿入断片1A1に連結し、pBluescriptにサブクローニングし得る。両場合ともに、pBluescriptによる組換え毒素の生産は、IPTGにより誘導され得る。組換え毒素がpBluescriptで発現されない場合は、融合タンパク質の生産を含む改変発現ベクター（例えば、pGEX2T）が用いられ得る。

本実施例で議論されるように、約55％の毒素遺伝子がクローニングされ、配列決定された；しかし、毒素遺伝子の残りの部分の配列をクローニングおよび配列決定するために、既知の配列の下流部分をプローブとして用い、λZAP IIライブラリーを再スクリーニングし得る。次いで、完全な遺伝子をコードする配列の構築を上記の方法と類似の方法を用いて行い、そして完全組換え毒素をE. coliで発現させ得る。

実施例４

ポリメラーゼチェイン反応またはプローブ

ハイブリダイゼーションによるH. pylori毒素遺伝子の検出

H. pylori感染の診断用試験はサンプルの増幅に関するプライマーに基づいて開発され得る。より詳細には、配列番号１に示したヌクレオチドから選択される合成オリゴヌクレオチドを、ポリメラーゼチェイン反応において用い、検出可能なレベルにまでH. pylori毒素を増幅し得る。この検査では、非変性プライマー配列をＰＣＲに用いる。これらの非変性プライマー配列は、配列番号１に示される核酸から選択される。より詳細には、それらは以下を含み得る：

5'TTTTTTACAACCGTGATCAT 3'　配列番号２１

3'CTATTAAAAAATCTTTAGTTATT 5'　配列番号２２

これらのプライマーを用いることにより、実施例３に示したようにして、0.5kbの増幅産物を生成する。あるいは、臨床サンプルを、放射標識した配列番号１またはその一部分とハイブリダイズすることにより、毒素遺伝子を検出し得る。

実施例５

ＣＢ抗原の検出および中和における

毒素に対する特異抗血清の使用

Mr＝87,000タンパク質サブユニットに対する抗血清は、雌シロニュージーランドウサギにおいて産生させた。これは、既に記載されたレジメに従って行った（Cover, T.L., Dooley, C.P., およびBlaser, M.J.（1990）Infect. Immun. 58:603-610）。まず、ウサギを、Mr＝87,000の変性タンパク質サブユニットを含むクマシーブルー染色アクリルアミドゲルフラグメントで免疫した。続けて、そのウサギを、非染色SDS-PAGEゲルから蒸留水で溶出し、上記のように疎水性相互作用クロマトグラフィーにより濃縮したMr＝87,000の変性タンパク質サブユニットで免疫した。

免疫前血清および免疫血清をウエスタンブロット分析により評価した。SDS-PAGEにより分

離した後、H. pylori培養上清中のタンパク質を、１アンペアで１時間のエレクトロブロッティングによりニトロセルロース紙上に移した。ニトロセルロース紙ストリップを血清とインキュベートし、洗浄し、アルカリホスファターゼ結合抗ヒトIgG（Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN）または抗ウサギIgG（Tago, Burlingame, CA）とインキュベートし、そしてBlakeら（Blake、M.S., Johnston, K.H., Russel-Jones, G.I., およびGotschlich, E.C.（1984）Anal. Biochem. 136:175-179）の記載のようにして呈色（develop）した。精製されたMr＝87,000タンパク質サブユニットに対して産生された抗血清は、Mr＝87,000タンパク質バンドを認識し、他のH. pylori成分は認識しなかった（図３）。

免疫前ウサギ血清および免疫ウサギ血清はまた、ELISAにより評価した。ELISAは、マイクロタイターウエル当り15ngの精製ＣＢ抗原で行い、方法は既に記載されている通りであった（Perez-Perez, G.I., Dworkin, B.M., Chodos, J.E., およびBlaser, M.J.（1988）Ann. Intern. Med. 109:465-471本明細書中に参考として援用されている）。ペルオキシダーゼ結合抗ヒトIgG（Tago）または抗ウサギIgG（Boehringer Mannheim）をコンジュゲートとして用いた。ウサギ血清の力価を、0.2より大きい光学濃度を生じる最高希釈の逆数として定義した。この方法を用いると、抗血清の力価は1:512,000であり、一方免疫前血清の力価は1:200未満であった。

空胞形成毒素活性の中和。　中和アッセイに用いる毒素調製物を、既に記載のようにして、H. pylori 60190を48時間、５％ウシ胎児血清を含むBrucellaブロスにおいて培養し、培養物を遠心し、そして限外濾過により上清を濃縮することにより調製した（Cover, T.L., Puryear, W., Perez-Perez, G.I., およびBlaser, M.J.（1991）Infect. Immun. 59:1264-1270）。血清を56℃で30分間加熱し、組織培養液中で希釈し、そして等量の濃縮H. pylori上清と１時間インキュベートした。これは既に記載されているようにして行った（Cover, T.L., Cao, P., Murthy U.K., Sipple, M.S., およびBlaser, M.J.（1992）J. Clin. Invest. 90:913-918）。空胞形成毒素活性における血清の中和効果は、ニュートラルレッド取り込みアッセイ（neutral red uptake assay）を用いて定量した（Cover, T.L., Puryear, W., Perez-Perez, G.I., およびBlaser, M.J.（1991）Infect. Immun. 59:1264-1270）。用いたアッセイ条件下では、抗血清は、1:64希釈でH. pylori 60190由来の上清の空胞形成毒素活性を完全に中和したが、一方免疫前血清は中和活性を有していなかった（図４）。抗血清はまた、２つの他の毒素産生H. pylori株に由来の培養上清に存在する毒素活性をも完全に中和し、種々のH. pylori単離株により産生される空胞形成毒素は抗原的に関連があることが示された。

表４　本研究で用いたヒト由来H. pylori単離株

株	起源	毒素産生	逆数毒素力価[a]
60190	ATCC 49503	+	320
85-456	NTCC 11638	+	40
87-29	Colorado	+	160
87-199	Colorado	+	80
87-81	Colorado	+	40
87-90	Colorado	+	40
86-86	New York	+	80
88-43	Thailand	+	20
Tx30a	Texas	-	<10
87-141	Colorado	-	<10
87-75	Colorado	-	<10
86-385	Colorado	-	<10
86-313	Colorado	-	<10
87-6	Colorado	-	<10
87-225	Colorado	-	<10
87-203	Colorado	-	<10

[a]逆数の毒素力価は、記載に従って、培養液のみで誘導される取り込みより、３SDより大きいHeLa細胞ニュートラルレッド取り込みが誘導される最大希釈として定義した（Cover, T.L., Puryear, W., Perez-Perez, G.I., およびBlaser, M.J. (1991) Infect. Immun. 59:1264-1270）。

H. pylori培養上清における空胞形成毒素の検出。

次の実験は、空胞形成毒素活性とH. pylori培養上清中のＣＢ抗原の存在との間に関係があるかどうかを決定することを目的とした。濃縮H. pylori培養上清の採取物から、８つのtox$^+$株および８つのtox$^-$株の上清を選択した（Cover, T.L., Dooley, C.P., およびBlaser, M.J.（1990）Infect. Immun. 58:603-610）。

これらのH. pylori株（表４）を５％ウシ胎児血清を含むBrucellaブロスにおいて培養し、培養上清を、既に記載のようにして、限外濾過により濃縮した（Cover, T.L., Dooley, C.P., およびBlaser, M.J.（1990）Infect. Immun. 58:603-610）。

空胞形成毒素活性を定量するために、これらの上清の各希釈物を、ニュートラルレッドアッセイを用いて検査した（Cover, T.L., Puryear, W., Perez-Perez, G.I., およびBlaser, M.J.（1991）Infect. Immun. 59:1264-1270）。1:20よりも希釈した場合に、各tox$^+$上清は、培養液のみより２倍より大きい、細胞による純ニュートラルレッド取り込みを誘導

したが、一方各tox⁻上清は、1:10に希釈したときに有意なニュートラルレッド取り込みを誘導しなかった。ＣＢ抗原を検出するために、16種の上清を、Mr＝87,000タンパク質サブユニットに対する抗血清の1:10,000希釈を用いてELISAにより検査した（図５）。tox⁺株由来の上清は、tox⁻株由来の上清よりも有意の高い光学濃度値を生じた（0.614±0.105に対し0.046±0.009、p<0.0001）。ウエスタンブロット研究により、各tox⁺上清中のMr＝87,000バンドの存在を確認し、これが変性条件下でのＣＢ抗原の形態であることが示された。これらの２つのグループの上清の間で重複がないことは、ＣＢ抗原が、H. pylori清中での空胞形成毒素活性を媒介する主要な置換体であることを示している。

実施例６

H. pylori感染ヒト由来の体液中の抗毒素抗体の検出

今までの研究により、全てのH. pylori感染者に由来するわけではないが、いく人かのH. pylori感染者に由来する血清は、毒素中和抗体を含んでいることが実証されている（Leunk, R.D., Ferguson, M.A., Morgan, D.R., Low, D.E., およびSimor, A.E.（1990）J. Clin. Microbiol. 28:1181-1184; Cover, T.L., Cao, P., Murthy U.K., Sipple, M.S., およびBlaser, M.J.（1992）J. Clin. Invest. 90:913-918）。そこで、本発明者らは、H. pylori感染者および非感染者由来の血清中にある、精製ＣＢ抗原タンパク質に対する抗体の普及率を測定することを試みた。

ヒト血清を、以前にthe University Hospital and the Veterans Administration Medical Center, Syracuse, NYで胃十二指腸内視鏡検査をうけた、症状のある患者から選択された40人の患者から得た。これらの患者の胃生検標本の分析および血清学的評価に基づくと、20人はH. pyloriに感染しており、20人は非感染であった。これらの患者の特徴およびこれらの血清の毒素中和活性は既に記載されている（Cover, T.L., Cao, P., Murthy U.K., Sipple, M.S., およびBlaser, M.J.（1992）J. Clin. Invest. 90:913-918）。これらの40の血清を、ELISAにおいて精製ＣＢ抗原とのIgG反応性について試験した（図６）。ELISAは、マイクロタイターウエル当り15ngの精製ＣＢ抗原で行い、方法は、既に記載の通りであった（Perez-Perez, G.I., Dworkin, B.M., Chodos, J.E., およびBlaser, M.J.（1988）Ann. Intern. Med. 109:465-471本明細書中に参考として援用されている）。ペルオキシダーゼ結合抗ヒトIgG（Tago）または抗ウサギIgG（Boehringer Mannheim）をコンジュゲートとして用いた。H. pylori感染者由来の血清によるＣＢ抗原の平均の認識度は、非感染者由来の血清によるよりも顕著に強かった（p＝0.0009）。およそ半分のH. pylori感染者に由来の血清は、非感染者と重複した光学濃度値を生じたが、一方他のH. pylori感染者に由来の血清は、重複しない光学濃度値を生じた。このことは、２つの集団が存在し得ることを示唆し、H. pylori株の50%～60%がインビトロで毒素産生性であるという観察結果と一致する。本発明者らは、次いで、ELISAによるＣＢ抗原の認識と、細胞培養アッセイ（Cover, T.L., Cao, P., Murthy U.K., Sipple, M.S., およびBlaser, M.J.（1992）J. Clin. Invest. 90:913-918）において既に測定された毒素中和活性との間に関係があるかどうかを決定した。H. pylori感染者由来の血清について、ＣＢ抗原のELISA認識は、毒素中和活性と有意に関連していた（p＝0.019、r＝0.518、直線回帰分析による）。対して、非感染者由来の血清については、これらの変数は有意に関連していなかった（p＝0.973、r＝0.008）。

実施例７

ヒトを含む哺乳類への投与のための経口ワクチンの調製

本発明者らは、H. pylori感染に対するワクチンの開発におけるＣＢタンパク質の使用の可能な適用を考慮した。ワクチン調製物における胃酸およびタンパク質分解酵素の効果を制限するには、全体のＣＢタンパク質またはそれらの一部分が腸被覆ゼラチンカプセル中にパッケージされ得るか、または炭酸水素ナトリウムと共に投与され得る（Blackら、「炭酸水素ナトリウムと共にまたは腸被覆カプセル中で投与されたTy21a弱毒化Salmonella typhiの免疫原性」、Dev. Biol. Stand. 53:0, 1983）。このワクチンにおいて用いられる抗原が組付換えにより生産され得ることは注目すべきことである。成人の投与量は、好ましくは、本発明の抗原の5.0～50.0mgである。

ＣＢタンパク質の胃腸の免疫系への送達を高めるために、タンパク質［またはタンパク質のフラグメント］を化学結合させずに、230μｍの大きさの５～10個の経口摂取される生分解性ミクロスフェアに取り込み得る（Eldridgeら、「生分解性ミクロスフェア：経口免疫のためのワクチン送達システム）」Curr. Top. Microbiol. Immunol. 146:59, 1989）。ミクロスフェアは、グリコール酸および乳酸のコポリマーで構成される。これらは加水分解により元の成分に分解される。コポリマー内でのグリコール酸と乳酸との比を調整することにより、加水分解速度は数時間から数カ月まで変動する。従って、速効性および遅効性のミクロスフェアの両方が作製され得る。速効性および遅効性のミクロスフェアの混合物の使用は、１回の経口免疫で、一次および二次免疫応答の両方を誘導させるために用いられる。

実施例８

ヒトを含む哺乳類への投与のための非経口ワクチンの調製

胃腸の病原体に対しては経口投与ワクチンが好ましいと思われるが、他のいくつかの感染因子に対しては非経口ワクチンが効果を示す。細菌Salmonella typhiの成分（腸チフスの原因である）は精製され、非経口投与ワクチンとして使用されている。この成分、Vi莢膜多糖、はかなり有効である（Kl-ugman KP, ら、「腸チフスに対するVi莢膜多糖ワクチンの防御活性」Lancet 1987;2:165-69）。ポリオのソークワクチンを非経口的に投与すると、ポリオウイルスへの感染にはほとんどまたは全く効果がないが、ポリオの疾患を予防する。非経口ワクチンはまた、限定的ではあるが、コレラの予防にも有効である。

H. pyloriに対して、非経口ワクチンはＣＢタンパク質またはそれらのフラグメントを含み得た。トキソイド調製物もまたジフテリアまたは破傷風トキソイドの用途に類似して調製され得た。タンパク質またはそのフラグメントは、アジュバントと共に、または適切な緩衝液中で単独で投与され得た。アジュバントは、限定はされないが、ムラミルジペプチド、コンカナバリンA、DEAEデキストラン、脂質多価陽イオン、または炭水化物（例えばヘキサデカン）を包含する。

H. pyloriワクチンは、ヒトに対し、１mlのリン酸緩衝生理食塩水（pH7.4）中1.0mg（0.5～5.0mg範囲）の抗原（ＣＢタンパク質）として供与され得る。適切な抗原であれば、１回のみの投与が必要とされ得るが、アジュバントを加えたまたは加えない複数投与は考慮され得る。

実施例９

H. pylori毒素に対する抗体の検出および

H. pylori毒素の検出のための検査キット

いくつかの異なる検出法を用いて抗体を検出するために、特定の検査キットが構成される。抗体検出のための１つの検査キットは、複数のウエル、ＣＢタンパク質またはその抗原性フラグメントで使用する前にコーティングされたプレート、ならびにペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgGおよび0.005％過酸化水素を含むマッキルベン緩衝液中のABTSからなる変色指示薬からなる酵素検出のためのELISA材料を含む区画された容器（compartmented enclosure）で構成される。アッセイにおいて用いられる抗原は組換えにより生産され得ることは注目すべきことである。もちろん、他の酵素および呈色剤もまた用いられ得る。例えば、アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗ヒトIgGは、ジエタノールアミンおよび塩化マグネシウム緩衝液中でp-ニトロフェニルホスフェートと組み合わせて用いられ得る。

ウエスタンブロット法を用いる抗体検出のための第２の検査キットは、容器、カバー、ニトロセルロースシート、および、ドデシル硫酸ナトリウムが存在しているポリアクリルアミドスラブゲル、界面活性剤、pH調整剤、乾燥脱脂乳、および過酸化水素を加えたTris中のDABからなる変色指示薬を含む酵素検出のための材料で構成される。このウエスタンブロット分析キットはまた、ペルオキシダーゼ標識ヤギまたはウサギ抗ヒト免疫グロブリン、およびＣＢタンパク質またはその抗原性フラグメントの原料を含む。

間接免疫蛍光アッセイを用いる抗体検出のための別のH. pylori特異検査キットは、抗原としてＣＢタンパク質またはその抗原性フラグメントを加えた区画された容器、ヒト試験血清、リン酸緩衝生理食塩水、およびフルオレセイン結合ヤギ抗ヒトIgGを含み得る。

最後に、抗体検出のための別のH. pylori特異検査キットは、リポソームを用い、容器、ヒト試験血清、蛍光マーカー（または酵素または基質）充填リポソーム（表面に抗原を有する）、および界面活性剤を含む。このアッセイでは、この容器は、ヤギ抗ヒトIgGを有する予めコーティングされたチューブまたはウエルであり得る。

H. pylori特異検査キットは、いくつかの異なる検出法を用いてH. pylori毒素を検出するために構成される。H. pylori毒素検出のための１つのキットは、複数のウエル、試験されるサンプルでコーティングされたプレート、ＣＢタンパク質またはその抗原性フラグメントに対する過免疫抗血清（またはモノクローナル抗体）、抗ウサギ免疫グロブリン、および本実施例で上述されているような適切なELISA材料を含む区画された容器を含む。

ウエスタンブロット法を用いるH. pylori毒素検出のための第２の検査キットは、容器、カバー、ニトロセルロースシート、および、ドデシル硫酸ナトリウムが存在しているポリアクリルアミドスラブゲル、界面活性剤、pH調整剤、乾燥脱脂乳、および過酸化水素を加えたTris中のDABからなる変色指示薬を含む酵素検出のための材料で構成される。このウエスタンブロット分析キットはまた、ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン、およびＣＢタンパク質またはその抗原性フラグメントに対する過免疫抗血清の原料を含む。

ラテックス凝集アッセイを用いるH. pylori毒素検出のための別の特異検査キットは、区画された容器、ラテックスビーズにコンジュゲートしたＣＢタンパク質またはその抗原性フラグメントに対する過免疫血清、およびリン酸緩衝生理食塩水または水を含み得る。

実施例10

bafilomycin A1によるH. pylori空胞形成毒素活性の阻害

H. pylori空胞形成毒素に応答して形成する細胞空胞は酸性のpHである（Cover TL, Halter SA, MJ Blaser. 1992. 「H. pyloriブロス培養上清により誘導されたHeLa細胞空胞の特徴付け」Human Pathology 23:1004-1010）。真核細胞の区分（compartment）内のpH濃度勾配の維持は、典型的には空胞型プロトン輸送ATPアーゼの活性に依存している（Mellman I, Fuchs R, およびA Helenius. 1986. 「エンドサイトーシスおよびエキソサイトーシス経路の酸性化」Annu. Rev. Biochem. 55:663-700）。本発明者らは、真核細胞の空胞ATPアーゼがH. pylori毒素に誘導された空胞の形成および維持に重要であり得るという仮説をたてた。そこで、H. pylori毒素誘導細胞空胞形成における空胞ATPアーゼインヒビターの効果を試験した。

イオン輸送ATPアーゼの９つの種々のインヒビター（bafilomycin A1、N-エチルマレイミド（NEM）、7-クロロ-4-ニトロベンズ2-オキサ-1,3-ジアゾール（NBDクロライド）、N,N'ジシクロヘキシルカルボジイミドペンタクロロフェノール複合体（DCCD）、硝酸ナトリウム、ウワバイン、ジゴキシン、オルトバナジン酸ナトリウム、オメプラゾール、およびオリゴマイシン（oligomycin））の存在下で、HeLa細胞をH. pylori毒素とインキュベートした。

より詳細には、H. pylori 60190（空胞形成毒素を産生する非常に特徴付けられた株である）を、５％ウシ胎児血清を加えたBrucellaブロス中で、５％CO_2環境で37℃で48時間培養した。培養物を遠心分離にかけた後、上清を超遠心分離により30倍に濃縮し、0.2ミクロンのフィルターに通した。上清は組織培養アッセイで試験する前に-70.0℃で保存した。精製毒素は、ゲル濾過クロマトグラフィーをSUPEROSE 12HR 10/50カラム（Pharmacia）の代わりにSUPEROSE 6 HR 10/50カラム（Pharmacia）で行ったこと以外は、既に記載のようにして、H. pylori 60190から調製した。

HeLa細胞を、10％ウシ胎児血清および25mM HEPES緩衝液（pH7.2）を含むアール（Earle's）塩を加えたイーグル修正最小必須培地で、５％CO_2環境下で培養した。精製H. pylori毒素を包含する実験において、培地を10mM塩化アンモニウムで補足し、活性を強めた。細胞をATPアーゼインヒビターと予め１時間インキュベートさせた後、濃縮した培養上清または精製したH. pylori 60190由来毒素を加え、細胞を37℃でさらに18時間インキュベートした。空胞形成は、倒立光学顕微鏡（200×倍率）により視覚的に評価し、またはニュートラルレッド取り込みアッセイを用いて定量した。（Coverら、Infect. Immun, 59:1264-1270（1991））。顕微鏡アッセイでは、H. pylori空胞形成毒素活性の阻害を、細胞の10

％未満に空胞が認められるストリンジェント基準により定義した。
おもに空胞型ATPアーゼのインヒビターは、H. pylori毒素に反応して空胞の形成を阻害し、そして毒素により誘導される空胞形成をくつがえした。試験した空胞ATPアーゼインヒビターのうちbafilomycin A1が毒素で誘導される空胞形成の最も有効なインヒビターであった（最小阻害濃度＝25nM）。他の空胞ATPアーゼインヒビター（N-エチルマレイミド、7-クロロ-4-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアゾール、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド、および硝酸ナトリウムを含む）は、より高い濃度で空胞形成毒素活性を阻害した。それに対して、F_1F_0型またはＰ型ATPアーゼインヒビターは毒素活性を阻害しなかった。（表５を参照のこと）。

表５．ATPアーゼインヒビターによるH. pylori毒素で誘導される空胞形成の阻害

インヒビター	H. pylori毒素に対する最小阻害濃度（MIC）[a]	阻害されるATPアーゼの主要クラス	真核生物空胞ATPアーゼの IC_{50}[b]
Bafilomycin	25 nM	V-型	2-10 nM
N-エチルマレイミド（NEM）	25 uM	V-型	1-13 uM
NBD-Cl[c]	50 uM	V-型	2.5 uM
DCCD[d]	25 uM	V-型	5-20 uM
硝酸ナトリウム	100 mM	V-型	30-100 mM
ウアバイン	>100 uM	P-型	>2000 uM
バナジン酸塩	>100 uM	P-型	>100 uM
オメプラゾール	200 uM	胃 F_1F_0	≧100 uM
オリゴマイシン	> 50 uM	F_1F_0	50 uM

a H. pylori 60190株由来の濃縮上清の1:10希釈とインキュベートしたHeLa細胞のうち90%より多くの細胞において空胞形成を阻害するのに必要とされる最小濃度；結果は３回の実験の平均値を示す。

b 無細胞系での空胞のプロトン輸送の最大阻害の１／２に必要とされる薬剤濃度。

c 7-クロロ-4-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアゾール

d N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

要約すると、空胞型ATPアーゼのインヒビター（bafilomycin A1で例示される）は、H.pylori空胞形成毒素により誘導される細胞傷害のインヒビターであり、H.pylori関連胃十二指腸疾患の治療において有用な治療薬であり得る。

本発明は特定のおよび好ましい実施態様に関連しておもに記載されているが、本発明の範囲から逸脱しない改変を行い得ることが理解される。以下の請求の範囲は、一般には本発明の原則に従い、そして本発明の属する分野において既知のまたは慣例の実施内にあるような、または当業者に明らかであるような本発明の開示からの変更を包含する、本発明の

すべての変形、使用、または適用をカバーすることが意図されている。
配列表
（1）一般的情報：
（i）出願人：カバー，ティモシー エル.
ブレイザー，マーティン ジェイ.
（ii）発明の名称：精製されたHelicobacter Pylori由来の空胞形成毒素およびその使用方法
（iii）配列数：22
（iv）連絡住所：
（A）住所人：ティルトン，ファロン，ラングマン アンド チェスナット
（B）番地：サウス ワッカー ドライブ １００，スイート ９６０
（C）市：シカゴ
（D）州：イリノイ
（E）国：アメリカ合衆国
（F）郵便番号：60606-4002
（v）コンピューター読み出し形態：
（A）媒体型：フロッピーディスク
（B）コンピューター：IBM PC互換
（C）ＯＳ：PC-DOS/MS-DOS
（D）ソフトウェア：パテントインリリース #1.0、バージョン #1.25
（vi）現在の出願データ：
（A）出願番号：ＵＳ
（B）出願日：
（C）分類：
（viii）代理人／事務所情報：
（A）氏名：フェントレス，スーザン ビー.
（B）登録番号：31,327
（C）照会／記録番号：92104 CIP
（iX）電話回線情報：
（A）電話：（312）-456-8000
（B）テレファックス：（312）-456-7776
（2）配列番号：１の情報：
（i）配列の特色：
（A）長さ：1412塩基対
（B）型：核酸
（C）鎖の数：不明
（D）トポロジー：不明
（ii）配列の種類：genomic ＤＮＡ
（xi）配列：配列番号：１：

GCCTTTTTTA CAACCGTGAT CATTCCAGCC ATTGTTGGGG GCATCGCTAC
AGGCACCGCT 60

GTAGGAACGG TCTCAGGGCT TCTTGGCTGG GGGCTCAAAC AAGCCGAAGA
AGCCAATAAA 120

ACCCCAGATA AACCCGATAA AGTTTGGCGC ATTCAAGCAG GAAAAGGCTT
TAATGAATTC 180

CCTAACAAGG AATACGACTT ATACAAATCC CTTTTATCCA GTAAGATTGA
TGGAGGTTGG 240

GATTGGGGGA ATGCCGCTAC GCATTATTGG ATCAAAGGCG GGCAATGGAA
TAAGCTTGAA 300

GTGGATATGA AAGACGCTGT AGGGACTTAT AAACTCTCAG GGCTAAGGAA
CTTTACTGGT 360

GGGGATTTAG ATGTCAATAT GCAAAAAGCC ACCTTGCGCT TGGGCCAATT
CAATGGCAAT 420

TCTTTCACAA GCTATAAGGA TAGTGCTGAT CGCACCACAA GAGTGGATTT
CAACGCTAAA 480

AATATCTTAA TTGATAATTT TTTAGAAATC AATAATCGTG TGGGTTCTGG
AGCCGGGAGG 540

AAAGCCAGCT CTACGGTTTT GACTTTGCAA GCTTCAGAAG GGATTACTAG
CAGTAAAAAT 600

GCTGAAATTT CTCTTTATGA TGGCGCTACG CTCAATTTGG CTTCAAACAG
CGTTAAATTA 660

AATGGCAATG TGTGGATGGG CCGTTTGCAA TACGTGGGAG CGTATTTGGC
CCCTTCATAC 720

AGCACGATAA ACACTTCAAA AGTGACAGGG GAAGTGAATT TTAACCATCT
CACTGTGGGC 780

GATCACAACG CCGCTCAAGC AGGCATTATC GCTAGTAACA AGACTCATAT
TGGCACACTG 840

GATTTGTGGC AAAGCGCGGG GTTAAATATC ATTGCCCCTC CCGAAGGTGG
CTACAAGGAT 900

AAACCTAATA ATACCCCTTC TCAAAGTGGT GCTAAAAACG ACAAACAAGA
GAGCAGTCAA 960

AATAATAGTA ACACTCAGGT CATTAACCCA CCCAATAGCA CGCAAAAAAC
AGAAGTTCAA 1020

CCCACGCAAG TCATTGATGG GCCTTTTGCG GGTGGCAAAG ACACGGTTGT
CAATATTGAT 1080

CGCATCAACA CTAAAGCCGA TGGCACGATT AAAGTGGGAG GGTTTAAAGC
TTCTCTTACC 1140

ACCAACGCGG CTCATTTGAA TATCGGCAAA GGCGGTGTCA ATCTGTCCAA
TCAAGCGAGC 1200

GGGCGCACCC TTTTAGTGGA AAATCTAACC GGGAATATCA CCGTTGATGG
GCCTTTAAGA 1260

GTGAATAATC AAGTGGGTGG CTATGCTTTG GCAGGATCAA GCGCGAATTT
TGAATTTAAG 1320

GCTGGTGTGG ATACTAAAAA CGGCACAGCC ACTTTCAATA ACGATATTAG
TCTGGGAAGA 1380

TTTGTGAATT TAAAGGTGGA TGCTCATACA GG
1412

(2) 配列番号：２の情報：
(i) 配列の特色：
(A) 長さ：23アミノ酸
(B) 型：アミノ酸
(C) 鎖の数：不明
(D) トポロジー：不明
(ii) 配列の種類：タンパク質
(xi) 配列：配列番号：２：

Ala Phe Phe Thr Thr Val Ile Ile Pro Ala Ile Val
1 5 10

Gly Gly Ile Ala Thr Gly Thr Ala Val Gly Thr
15 20

(2) 配列番号：３の情報：
(i) 配列の特色：
(A) 長さ：24アミノ酸
(B) 型：アミノ酸
(C) 鎖の数：不明
(D) トポロジー：不明
(ii) 配列の種類：タンパク質
(xi) 配列：配列番号：３：

Ala Phe Phe Thr Thr Val Phe Gly Leu Glu Ala Ile
1 5 10

Val Lys Ile Val Gly Leu Arg Tyr His Tyr Phe Thr
15 20

(2) 配列番号：４の情報：

(i) 配列の特色：
(A) 長さ：24アミノ酸
(B) 型：アミノ酸
(C) 鎖の数：不明
(D) トポロジー：不明
(ii) 配列の種類：タンパク質
(xi) 配列：配列番号：４：

```
Leu Phe Phe Thr Thr Tyr Ile Ile Ile Ser Phe Leu
1               5                  10

Ile Val Val Asn Met Tyr Ile Ala Ile Ile Leu Glu
        15                  20
```

(2) 配列番号：５の情報：
(i) 配列の特色：
(A) 長さ：23アミノ酸
(B) 型：アミノ酸
(C) 鎖の数：不明
(D) トポロジー：不明
(ii) 配列の種類：タンパク質
(xi) 配列：配列番号：５：

```
Ala Phe Phe Ser Thr Asn Cys Val Glu Gly Thr Ala
1               5                  10

Val Gly Ile Val Ile Ser Thr Gly Asp Arg Thr
        15                  20
```

(2) 配列番号：６の情報：
(i) 配列の特色：
(A) 長さ：23アミノ酸
(B) 型：アミノ酸
(C) 鎖の数：不明
(D) トポロジー：不明
(ii) 配列の種類：タンパク質
(xi) 配列：配列番号：６：

```
Val Ala Leu Leu Val Cys Leu Ile Pro Thr Thr Ile
1               5                  10

Gly Gly Leu Leu Ser Ala Ser Ala Val Ala Gly
        15                  20
```

(2) 配列番号：７の情報：
(i) 配列の特色：
(A) 長さ：23アミノ酸
(B) 型：アミノ酸
(C) 鎖の数：不明
(D) トポロジー：不明
(ii) 配列の種類：タンパク質
(xi) 配列：配列番号：７：

Glu Met Ile Met Lys Ser Ile Ile Pro Val Val Met
1 5 10

Ala Gly Ile Ile Ala Ile Tyr Gly Leu Val Val
15 20

(2) 配列番号：８の情報：
(i) 配列の特色：
(A) 長さ：23アミノ酸
(B) 型：アミノ酸
(C) 鎖の数：不明
(D) トポロジー：不明
(ii) 配列の種類：タンパク質
(xi) 配列：配列番号：８：
Ala Phe Leu Leu Ala Val Ile Ile Gly Val Ser Ala
1 5 10

Gly Val Ile Ala Ala Leu Lys Gln Asn Thr Arg
15 20

(2) 配列番号：９の情報：
(i) 配列の特色：
(A) 長さ：23アミノ酸
(B) 型：アミノ酸
(C) 鎖の数：不明
(D) トポロジー：不明
(ii) 配列の種類：タンパク質
(xi) 配列：配列番号：９：
Ala Phe Phe Thr Pro Phe Ile Thr Ser Ala Ile Asn
1 5 10

Phe Tyr Tyr Gly Tyr Val Phe Met Gly Cys Leu
15 20

配列番号：10の情報：
(i) 配列の特色：
(A) 長さ：23アミノ酸
(B) 型：アミノ酸
(C) 鎖の数：不明
(D) トポロジー：不明
(ii) 配列の種類：タンパク質
(xi) 配列：配列番号：10：
Phe Phe Phe Ala Ser Leu Met Ile Leu Ser Ile Val
1 5 10

Phe Val Phe Phe Leu Ile Pro Glu Thr Lys Gly
15 20

(2) 配列番号：11の情報：
(i) 配列の特色：
(A) 長さ：23アミノ酸
(B) 型：アミノ酸
(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：不明
(ii) 配列の種類：タンパク質
(xi) 配列：配列番号：11：

```
Gln Phe Leu Ala Ser Val Gln Thr Met Glu Ile Val
1               5                  10

Pro Ser Phe Ala Val Gly Ser Ala Val Gly Leu
            15                  20
```

(2) 配列番号：12の情報：
(i) 配列の特色：
(A) 長さ：23アミノ酸
(B) 型：アミノ酸
(C) 鎖の数：不明
(D) トポロジー：不明
(ii) 配列の種類：タンパク質
(xi) 配列：配列番号：12：

```
Ala Phe Phe Ser Thr Met Cys Leu Glu Gly Thr Ala
1               5                  10

Gln Gly Leu Val Val Asn Thr Gly Asp Arg Thr
            15                  20
```

(2) 配列番号：13の情報：
(i) 配列の特色：
(A) 長さ：23アミノ酸
(B) 型：アミノ酸
(C) 鎖の数：不明
(D) トポロジー：不明
(ii) 配列の種類：タンパク質
(xi) 配列：配列番号：13：

```
Leu Phe Ser Gly Thr Asn Ile Ala Ala Gly Lys Ala
1               5                  10

Leu Gly Ile Val Ala Thr Thr Gly Val Ser Thr
            15                  20
```

(2) 配列番号：14の情報：
(i) 配列の特色：
(A) 長さ：23アミノ酸
(B) 型：アミノ酸
(C) 鎖の数：不明
(D) トポロジー：不明
(ii) 配列の種類：タンパク質
(xi) 配列：配列番号：14：

```
Glu Met Ile Met Lys Ser Ile Ile Pro Val Val Met
1               5                  10

Ala Gly Ile Ile Ala Ile Tyr Gly Leu Val Val
            15                  20
```

(2) 配列番号：15の情報：
(i) 配列の特色：
(A) 長さ：17アミノ酸

(B) 型：アミノ酸
(C) 鎖の数：不明
(D) トポロジー：不明
(ii) 配列の種類：タンパク質
(xi) 配列：配列番号：15：

```
Leu Gly Gln Phe Asn Gly Asn Ser Phe Thr Ser Tyr
1               5                   10

Lys Asp Xaa Ala Asp
        15
```

(2) 配列番号：16の情報：
(i) 配列の特色：
(A) 長さ：９アミノ酸
(B) 型：アミノ酸
(C) 鎖の数：不明
(D) トポロジー：不明
(ii) 配列の種類：タンパク質
(xi) 配列：配列番号：16：

```
Asn Ile Lys Asn Val Glu Ile Thr Arg
1               5
```

(2) 配列番号：17の情報：
(i) 配列の特色：
(A) 長さ：21アミノ酸
(B) 型：アミノ酸
(C) 鎖の数：不明
(D) トポロジー：不明
(ii) 配列の種類：タンパク質
(ix) 配列の特徴：
(A) NAME/KEY：改変部位
(B) 位置：３
(D) 他の情報：／注記＝「バリンまたはイソロイシンのいずれかがここで用いられ得る」
(xi) 配列：配列番号：17：

```
Thr Arg Val Asp Phe Asn Ala Lys Asn Ile Leu Ile
1               5                   10

Asp Asn Phe Leu Glu Ile Asn Asn Arg
        15                  20
```

(2) 配列番号：18の情報：
(i) 配列の特色：
(A) 長さ：20塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：不明
(D) トポロジー：不明
(ii) 配列の種類：genomic ＤＮＡ
(xi) 配列：配列番号：18：

```
TTYTTYACNA CNGTNATHAT
          20
```

(2) 配列番号：19の情報：
(i) 配列の特色：

(A) 長さ：23塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：不明
(D) トポロジー：不明
(ii) 配列の種類：genomic ＤＮＡ
(xi) 配列：配列番号：19：
GAYAAYTTYY TNGARATHAA YAA
23

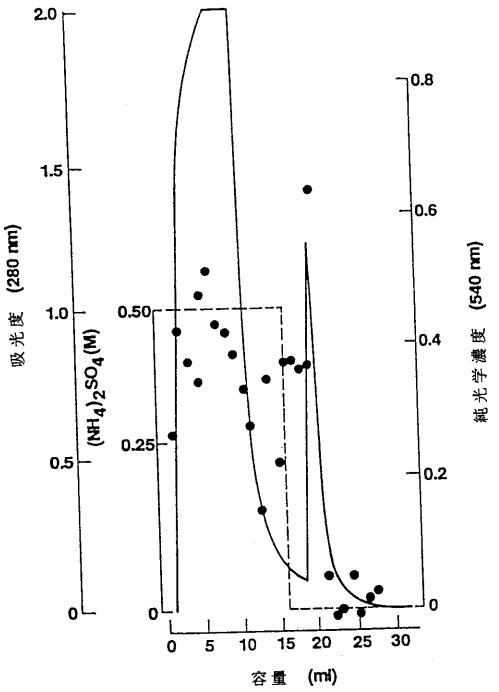
(2) 配列番号：20の情報：
(i) 配列の特色：
(A) 長さ：23塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：不明
(D) トポロジー：不明
(ii) 配列の種類：genomic ＤＮＡ
(xi) 配列：配列番号：20：
CTRTTRAARR ANCTYTADTT RTT
23

(2) 配列番号：21の情報：
(i) 配列の特色：
(A) 長さ：20塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：不明
(D) トポロジー：不明
(ii) 配列の種類：genomic ＤＮＡ
(xi) 配列：配列番号：21：
TTTTTTACAA CCGTGATCAT
20

(2) 配列番号：22の情報：
(i) 配列の特色：
(A) 長さ：23塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：不明
(D) トポロジー：不明
(ii) 配列の種類：genomic ＤＮＡ
(xi) 配列：配列番号：22：
TTATTGATTT CTAAAAAATT ATC
23

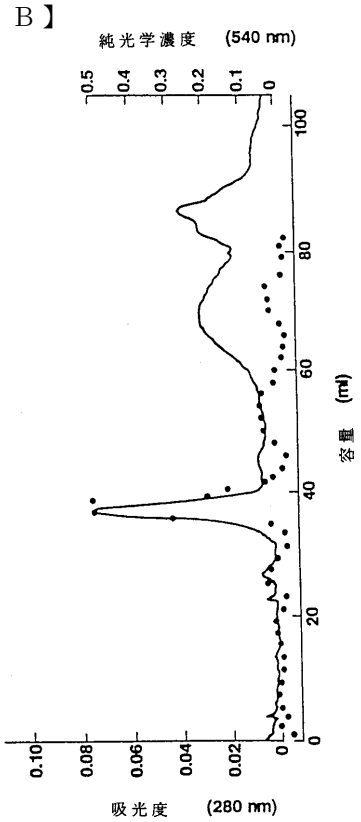
【図１Ａ】

Fig. 1A



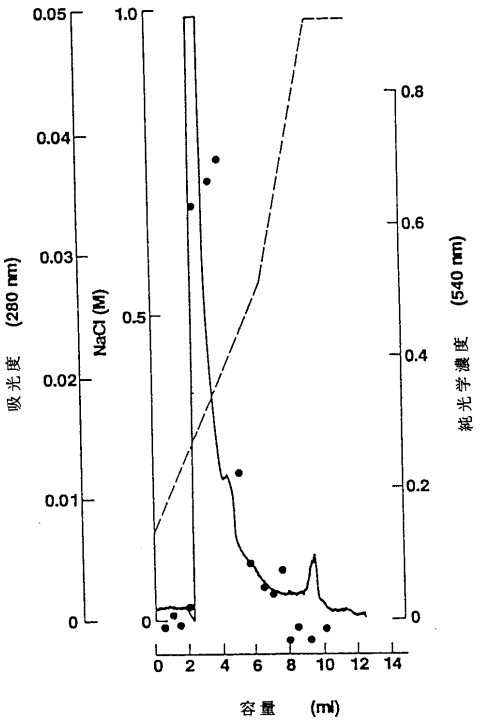
【図１Ｂ】

Fig. 1B



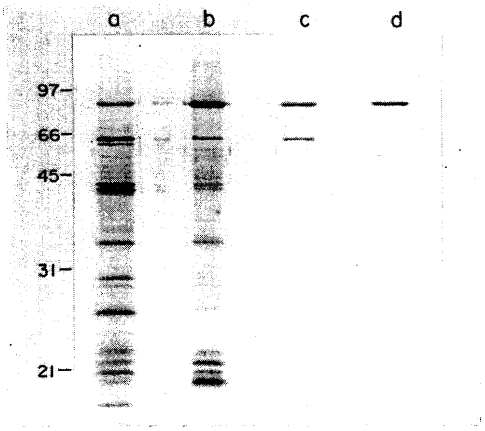
【図１Ｃ】

Fig. 1C

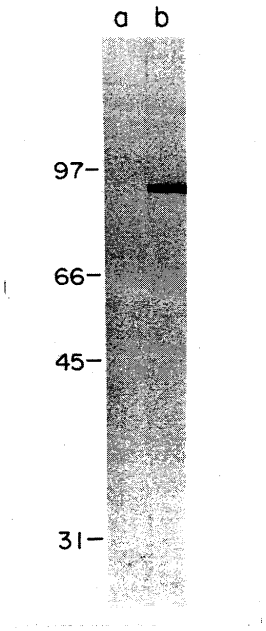


【図２】

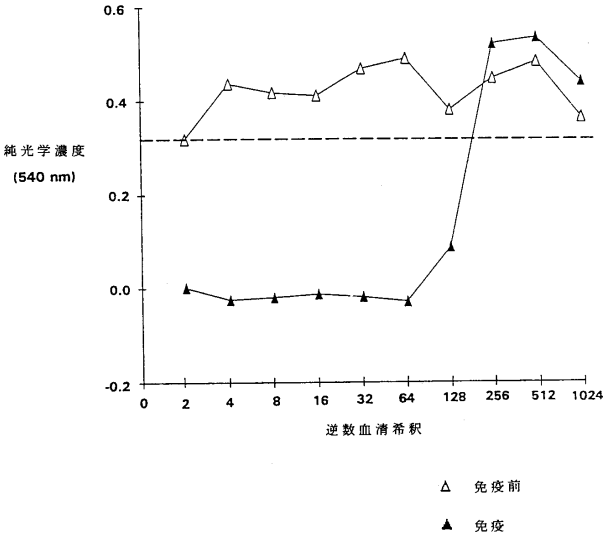
FIG. 2



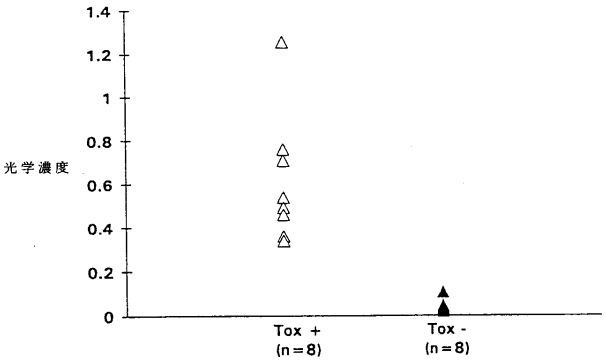
【図３】
FIG. 3



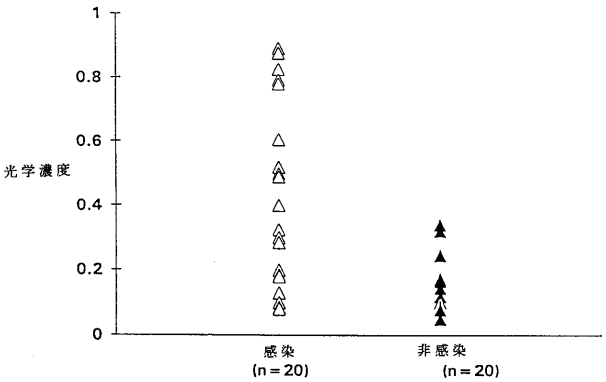
【図４】
Fig. 4



【図５】
Fig. 5



【図６】
Fig. 6



フロントページの続き

合議体
審判長　種村　慈樹
審判官　冨永　みどり
審判官　鈴木　恵理子

(56)参考文献　特表平7－504565（JP, A）
特表平8－502725（JP, A）
J. Biol. Chem., Vol. 265, 1990, p. 21940－21945
Gastroenterology, Vol. 100, No. 5, Pt. 2, 1991, p. A570
Rev. Infect. Dis., Vol. 13, Suppl. 8, 1991, p. S686－689
Infect. Immun., Vol. 58, No. 3, 1990, p. 603－610
J. Biol. Chem., Vol. 267, 1992, May, p. 10570－10575
Mol. Microbiol., Vol. 7, 1993, Jan., p. 323－327

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
BIOSIS／WPI（DIALOG）
GenBank／EMBL／DDBJ／GeneSeq
SwissProt／PIR／GeneSeq