

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4324379号  
(P4324379)

(45) 発行日 平成21年9月2日(2009.9.2)

(24) 登録日 平成21年6月12日(2009.6.12)

(51) Int.Cl.

F 1

<b>C 12 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 12 N	15/00	Z N A A
<b>C 07 K</b>	<b>14/115</b>	<b>(2006.01)</b>	C 07 K	14/115	
<b>C 07 K</b>	<b>16/10</b>	<b>(2006.01)</b>	C 07 K	16/10	
<b>C 07 K</b>	<b>19/00</b>	<b>(2006.01)</b>	C 07 K	19/00	
<b>C 12 N</b>	<b>5/10</b>	<b>(2006.01)</b>	C 12 N	5/00	A

請求項の数 91 (全 113 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-576654 (P2002-576654)  
 (86) (22) 出願日 平成14年2月7日 (2002.2.7)  
 (65) 公表番号 特表2005-503766 (P2005-503766A)  
 (43) 公表日 平成17年2月10日 (2005.2.10)  
 (86) 國際出願番号 PCT/US2002/004117  
 (87) 國際公開番号 WO2002/077211  
 (87) 國際公開日 平成14年10月3日 (2002.10.3)  
 審査請求日 平成17年2月7日 (2005.2.7)  
 (31) 優先権主張番号 60/267,253  
 (32) 優先日 平成13年2月7日 (2001.2.7)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 503285531  
 クリプティック アフリクションズ リミテッド ライアビリティ カンパニー  
 アメリカ合衆国 カンザス州 66006  
 ボルドウイン シティー テンス ストリート 1315  
 (74) 代理人 100059959  
 弁理士 中村 梶  
 (74) 代理人 100067013  
 弁理士 大塚 文昭  
 (74) 代理人 100082005  
 弁理士 熊倉 褒男  
 (74) 代理人 100065189  
 弁理士 宍戸 嘉一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ルプラウイルス (RUBULAVIRUS) 属に属するニューロビルレントウイルス (NEUROVIRULENT) (クリプトウイルス (CRYPTOVIRUS)) とその使用

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

(A) (配列番号1) の塩基番号 1 ~ 1 5 2 4 6 のヌクレオチド、  
 (B) (A) に相補なヌクレオチド配列、又は  
 (C) 少なくとも 1 5 ヌクレオチド長であり、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で前記 (A) 又は (B) と結合するが、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で配列番号2に示される塩基配列又はその相補物とは結合しない、(A) 又は (B) に特異的なフラグメント、  
 を含む单離核酸。

## 【請求項2】

前記フラグメント (C) が、  
 (i) (配列番号1) の塩基番号 1 5 2 ~ 1 6 7 8 のヌクレオチド、その相補配列、又はその縮重コード配列、  
 (ii) (配列番号1) の塩基番号 1 8 5 0 ~ 2 5 1 5 のヌクレオチド、その相補配列、又はその縮重コード配列、  
 (iii) (配列番号1) の塩基番号 1 8 5 0 ~ 3 0 2 3 のヌクレオチド、その相補配列、又はその縮重コード配列、  
 (iv) (配列番号1) のヌクレオチド位置 2 3 3 9 と (配列番号1) のヌクレオチド位置 2 3 4 0 の間にさらに挿入された2つのグアニン残基を結合した (配列番号1) の塩基番号 1 8 5 0 ~ 3 0 2 3 のヌクレオチド、その相補配列、又はその縮重コード配列、

10

20

(v) (配列番号1) の塩基番号 3141 ~ 4271 のヌクレオチド、その相補配列、又はその縮重コード配列、

(vi) (配列番号1) の塩基番号 4530 ~ 6182 のヌクレオチド、その相補配列、又はその縮重コード配列、

(vii) (配列番号1) の塩基番号 4587 ~ 6182 のヌクレオチド、その相補配列、又はその縮重コード配列、

(viii) (配列番号1) の塩基番号 4587 ~ 4835 のヌクレオチド、その相補配列、又はその縮重コード配列、

(ix) (配列番号1) の塩基番号 4836 ~ 6182 のヌクレオチド、その相補配列、又はその縮重コード配列、

(x) (配列番号1) の塩基番号 4272 ~ 6515 のヌクレオチド、その相補配列、又はその縮重コード配列、

(xi) (配列番号1) の塩基番号 6303 ~ 6434 のヌクレオチド、その相補配列、又はその縮重コード配列、

(xii) (配列番号1) の塩基番号 6584 ~ 8278 のヌクレオチド、その相補配列、又はその縮重コード配列、並びに

(xiii) (配列番号1) の塩基番号 8414 ~ 15178 のヌクレオチド、その相補配列、又はその縮重コード配列、

から成る群から選択される核酸セグメントを含む、請求項1に記載の核酸。

#### 【請求項3】

前記フラグメント(C)を含み、前記フラグメントが15ヌクレオチドから500ヌクレオチド長であり、かつ、配列番号2に示される塩基配列又はその相補物とは結合しない、請求項1に記載の核酸。

#### 【請求項4】

前記フラグメントが15ヌクレオチドから50ヌクレオチド長であり、かつ、配列番号2に示される塩基配列又はその相補物とは結合しない、請求項3に記載の核酸。

#### 【請求項5】

前記フラグメントが15ヌクレオチドから35ヌクレオチド長である、請求項4に記載の核酸。

#### 【請求項6】

前記核酸がRNAである、請求項1に記載の核酸。

#### 【請求項7】

前記核酸がcDNAである、請求項1に記載の核酸。

#### 【請求項8】

請求項1に記載の核酸、及び生理学的に認容性のあるキャリアを含む、組成物。

#### 【請求項9】

請求項1に記載の核酸を含む、核酸構築物。

#### 【請求項10】

ワクチン製造における請求項1に記載の核酸の使用。

#### 【請求項11】

ワクチン製造における請求項9に記載の核酸構築物の使用。

#### 【請求項12】

請求項9に記載の核酸構築物を含む発現ベクター。

#### 【請求項13】

請求項9に記載の核酸構築物を含むクローニングベクター。

#### 【請求項14】

請求項12に記載の発現ベクター又は請求項13に記載のクローニングベクターを含む、宿主細胞。

#### 【請求項15】

前記細胞が哺乳類細胞である、請求項14に記載の宿主細胞。

10

20

30

40

50

**【請求項 16】**

( A ) ( 配列番号 1 ) の塩基番号 1 5 2 ~ 1 6 7 8 のヌクレオチド、又はその縮重コード配列、

( B ) ( 配列番号 1 ) の塩基番号 1 8 5 0 ~ 2 5 1 5 のヌクレオチド、又はその縮重コード配列、

( C ) ( 配列番号 1 ) のヌクレオチド位置 2 3 3 9 と ( 配列番号 1 ) のヌクレオチド位置 2 3 4 0 の間にさらに挿入された 2 つのグアニン残基を結合した ( 配列番号 1 ) の塩基番号 1 8 5 0 ~ 3 0 2 3 のヌクレオチド、又はその縮重コード配列、

( D ) ( 配列番号 1 ) の塩基番号 3 1 4 1 ~ 4 2 7 1 のヌクレオチド、又はその縮重コード配列、

( E ) ( 配列番号 1 ) の塩基番号 4 5 3 0 ~ 6 1 8 2 のヌクレオチド、又はその縮重コード配列、

( F ) ( 配列番号 1 ) の塩基番号 4 5 8 7 ~ 6 1 8 2 のヌクレオチド、又はその縮重コード配列、

( G ) ( 配列番号 1 ) の塩基番号 4 5 8 7 ~ 4 8 3 5 のヌクレオチド、又はその縮重コード配列、

( H ) ( 配列番号 1 ) の塩基番号 4 8 3 6 ~ 6 1 8 2 のヌクレオチド、又はその縮重コード配列、

( I ) ( 配列番号 1 ) の塩基番号 6 3 0 3 ~ 6 4 3 4 のヌクレオチド、又はその縮重コード配列、

( J ) ( 配列番号 1 ) の塩基番号 6 5 8 4 ~ 8 2 7 8 のヌクレオチド、又はその縮重コード配列、あるいは

( K ) ( 配列番号 1 ) の塩基番号 8 4 1 4 ~ 1 5 1 7 8 のヌクレオチド、又はその縮重コード配列、

を含む核酸セグメントによってコードされる単離クリプトウイルスタンパク質、ここでクリプトウイルスは ( 配列番号 1 ) に示される塩基配列に相補である一本鎖 R N A をゲノムとするウイルスである。

**【請求項 17】**

前記タンパク質が ( E ) 、 ( F ) 、 ( G ) 、 ( H ) 、 ( I ) 、 又は ( J ) を含む核酸セグメントによってコードされるクリプトウイルスエンベロープタンパク質である、請求項 16 に記載のタンパク質。

**【請求項 18】**

請求項 16 に記載のタンパク質、及び生理学的に認容性のあるキャリアを含む、組成物。

**【請求項 19】**

( A ) ( 配列番号 1 ) の塩基番号 1 5 2 ~ 1 6 7 8 のヌクレオチド、又は縮重コード配列、

( B ) ( 配列番号 1 ) の塩基番号 1 8 5 0 ~ 2 5 1 5 のヌクレオチド、又は縮重コード配列、

( C ) ( 配列番号 1 ) のヌクレオチド位置 2 3 3 9 と ( 配列番号 1 ) のヌクレオチド位置 2 3 4 0 の間のヌクレオチド配列中にさらに挿入された 2 つのグアニン残基を結合した ( 配列番号 1 ) の塩基番号 1 8 5 0 ~ 3 0 2 3 のヌクレオチド、又は縮重コード配列、

( D ) ( 配列番号 1 ) の塩基番号 3 1 4 1 ~ 4 2 7 1 のヌクレオチド、又は縮重コード配列、

( E ) ( 配列番号 1 ) の塩基番号 4 5 3 0 ~ 6 1 8 2 のヌクレオチド、又は縮重コード配列、

( F ) ( 配列番号 1 ) の塩基番号 4 5 8 7 ~ 6 1 8 2 のヌクレオチド、又は縮重コード配列、

( G ) ( 配列番号 1 ) の塩基番号 4 5 8 7 ~ 4 8 3 5 のヌクレオチド、又は縮重コード配列、

10

20

30

40

50

( H ) ( 配列番号 1 ) の塩基番号 4 8 3 6 ~ 6 1 8 2 のヌクレオチド、又は縮重コード配列、

( I ) ( 配列番号 1 ) の塩基番号 6 3 0 3 ~ 6 4 3 4 のヌクレオチド、又は縮重コード配列、

( J ) ( 配列番号 1 ) の塩基番号 6 5 8 4 ~ 8 2 7 8 のヌクレオチド、又は縮重コード配列、あるいは

( K ) ( 配列番号 1 ) の塩基番号 8 4 1 4 ~ 1 5 1 7 8 のヌクレオチド、又は縮重コード配列、

を含む核酸セグメントによってコードされるクリプトウイルスタンパク質を含むキメラタンパク質、ここでクリプトウイルスは(配列番号1)に示される塩基配列に相補である一本鎖RNAをゲノムとするウイルスである。 10

【請求項20】

前記クリプトウイルスタンパク質が( E )、( F )、( G )、( H )、( I )、又は( J )を含む核酸セグメントによってコードされるクリプトウイルスエンベローブタンパク質である、請求項19に記載のキメラタンパク質。

【請求項21】

クリプトウイルス特異抗体産生における請求項16又は請求項19に記載のタンパク質の使用、ここでクリプトウイルスは(配列番号1)に示される塩基配列に相補である一本鎖RNAをゲノムとするウイルスである。 20

【請求項22】

ワクチン製造における請求項16又は請求項19に記載のタンパク質の使用。

【請求項23】

請求項16に記載のタンパク質に特異的に結合する単離抗体。

【請求項24】

請求項23に記載の抗体、及び生理学的に認容性のあるキャリアを含む、組成物。

【請求項25】

( A ) ( 配列番号 1 ) の塩基番号 4 5 3 0 ~ 6 1 8 2 のヌクレオチド、又は縮重コード配列、

( B ) ( 配列番号 1 ) の塩基番号 4 5 8 7 ~ 6 1 8 2 のヌクレオチド、又は縮重コード配列、 30

( C ) ( 配列番号 1 ) の塩基番号 4 5 8 7 ~ 4 8 3 5 のヌクレオチド、又は縮重コード配列、

( D ) ( 配列番号 1 ) の塩基番号 4 8 3 6 ~ 6 1 8 2 のヌクレオチド、又は縮重コード配列、

( E ) ( 配列番号 1 ) の塩基番号 6 3 0 3 ~ 6 4 3 4 のヌクレオチド、又は縮重コード配列、あるいは

( F ) ( 配列番号 1 ) の塩基番号 6 5 8 4 ~ 8 2 7 8 のヌクレオチド、又は縮重コード配列、

によってコードされるクリプトウイルスエンベローブタンパク質を特異的に結合する、請求項23に記載の抗体、ここでクリプトウイルスは(配列番号1)に示される塩基配列に相補である一本鎖RNAをゲノムとするウイルスである。 40

【請求項26】

前記抗体がポリクローナル性である、請求項23に記載の抗体。

【請求項27】

前記抗体がモノクローナル性である、請求項23に記載の抗体。

【請求項28】

前記抗体がキメラである、請求項23に記載の抗体。

【請求項29】

クリプトウイルス感染症治療用薬剤の製造における、請求項23に記載の抗体の使用、ここでクリプトウイルスは(配列番号1)に示される塩基配列に相補である一本鎖RNA 50

をゲノムとするウイルスである。

【請求項 3 0】

請求項 1 に記載の核酸を含む、単離ウイルス粒子。

【請求項 3 1】

請求項 3 0 に記載のビリオン、及び生理学的に認容性のあるキャリアを含む、組成物。

【請求項 3 2】

請求項 1 7 に記載のタンパク質を含む、単離ウイルス粒子。

【請求項 3 3】

(配列番号 1 ) に示される塩基配列に相補である一本鎖 R N A をゲノムとする、単離クリプトウイルス粒子。 10

【請求項 3 4】

ワクチン製造における請求項 3 2 に記載のウイルス粒子の使用。

【請求項 3 5】

ワクチン製造における請求項 3 3 に記載のクリプトウイルス粒子の使用。

【請求項 3 6】

前記ウイルス粒子が弱毒ビリオンである、請求項 3 4 又は 3 5 に記載の使用。

【請求項 3 7】

前記ウイルス粒子が、死菌ビリオンである、請求項 3 4 又は 3 5 に記載の使用。

【請求項 3 8】

前記クリプトウイルスが B B R 株である、単離クリプトウイルス粒子、ここでクリプトウイルスは(配列番号 1 ) に示される塩基配列に相補である一本鎖 R N A をゲノムとするウイルスである。 20

【請求項 3 9】

請求項 3 に記載の核酸を含む、プローブ。

【請求項 4 0】

請求項 5 に記載の核酸を含む、プライマー。

【請求項 4 1】

生物材料サンプル中におけるクリプトウイルスタンパク質の存在の有無を検出する方法であって、前記方法が、

生物材料サンプルを、請求項 2 3 に記載の抗体に接触する工程、及び 30

前記サンプルの構成要素に対する前記抗体の特異的結合を検出する工程であって、特異的結合の存在が、前記サンプル中における前記クリプトウイルスタンパク質の存在を示す工程、

を含む方法、ここでクリプトウイルスは(配列番号 1 ) に示される塩基配列に相補である一本鎖 R N A をゲノムとするウイルスである。

【請求項 4 2】

生物材料サンプル中におけるクリプトウイルス特異的 R N A の存在の有無を検出する方法であって、前記方法が、

哺乳類から採取された、 R N A を含む生物材料サンプルを提供する工程、

少なくとも中程度にストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で前記サンプルを請求項 3 9 に記載のプローブに接触させる工程であって、検出可能なハイブリダイゼーション産物の形成が、前記サンプル中に前記クリプトウイルス特異的 R N A が存在することを示す工程、 40

を含む方法、ここでクリプトウイルスは(配列番号 1 ) に示される塩基配列に相補である一本鎖 R N A をゲノムとするウイルスである。

【請求項 4 3】

生物材料サンプル中におけるクリプトウイルス特異的 R N A の存在の有無を検出する方法であって、前記方法が、

哺乳類から採取された、 R N A を含む生物材料サンプルを提供する工程、

増幅反応混合物中で、請求項 4 0 に記載のプライマーを少なくとも一つ使用して、前記 50

サンプル中のクリプトウイルス特異的 R N A を増幅する工程、

次に、前記増幅反応混合物中におけるクリプトウイルス特異的核酸増幅産物の存在の有無を検出する工程であって、前記反応混合物中の前記増幅産物の存在が、前記サンプル中における前記クリプトウイルス R N A の存在を示す工程、

を含む方法、ここでクリプトウイルスは（配列番号 1）に示される塩基配列に相補である一本鎖 R N A をゲノムとするウイルスである。

【請求項 4 4】

前記生物材料が細胞材料である、請求項 4 1、4 2、又は 4 3 のいずれかに記載の方法。  
。

【請求項 4 5】

前記生物材料が血液又は血清である、請求項 4 1、4 2、又は 4 3 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 4 6】

前記生物材料が脳脊髄液である、請求項 4 1、4 2、又は 4 3 のいずれかに記載の方法。  
。

【請求項 4 7】

前記生物材料がリンパ組織である、請求項 4 1、4 2、又は 4 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 8】

前記生物材料が神経組織である、請求項 4 1、4 2、又は 4 3 のいずれかに記載の方法。  
。

20

【請求項 4 9】

前記神経組織が脳組織である、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

生物材料サンプル中におけるクリプトウイルス特異抗体の存在の有無を検出する方法であって、前記方法が、

前記サンプルを請求項 1 6 に記載のタンパク質に接触する工程、

特異的タンパク質 - 抗体複合体の形成させる工程、

前記特異的タンパク質 抗体複合体の存在を検出する工程であって、該特異的タンパク質 抗体複合体の存在が、前記サンプル中における前記クリプトウイルス特異抗体の存在を示す工程、  
。

30

を含む方法、ここでクリプトウイルスは（配列番号 1）に示される塩基配列に相補である一本鎖 R N A をゲノムとするウイルスである。

【請求項 5 1】

生物材料サンプル中におけるクリプトウイルス特異抗体の存在の有無を検出する方法であって、前記方法が、

前記サンプルを請求項 1 9 に記載のタンパク質に接触する工程、

特異的タンパク質 - 抗体複合体の形成させる工程、及び

前記特異的タンパク質 抗体複合体の存在を検出する工程であって、該特異的タンパク質 抗体複合体の存在が、前記サンプル中における前記クリプトウイルス特異抗体の存在を示す工程、  
。

40

を含む方法、ここでクリプトウイルスは（配列番号 1）に示される塩基配列に相補である一本鎖 R N A をゲノムとするウイルスである。

【請求項 5 2】

ヒト由来の抗体を含有する生物材料サンプル中におけるクリプトウイルスを選択的に結合する抗体の存在の有無を検出するためのアッセイ法であって、前記アッセイ法が、

クリプトウイルス感染症を罹患していると疑われる個体に由来するサンプルである、前記サンプルを、クリプトウイルスを選択的に結合する抗体が存在しているならば、抗体が結合したエンベロープタンパク質複合体を形成するように、請求項 1 7 のエンベロープタンパク質に接触させる工程、  
。

50

形成された任意の抗体結合エンベロープタンパク質複合体を、抗ヒト抗体を結合する抗体に接触して、前記抗体と前記抗体結合エンベロープタンパク質複合体との複合体を形成させる工程、及び

形成された任意の抗体結合エンベロープタンパク質複合体の存在の有無を検出する工程であって、前記複合体の存在が、クリプトウイルスを選択的に結合する抗体がサンプル中に存在することを示す工程、

を含むアッセイ法、ここでクリプトウイルスは（配列番号1）に示される塩基配列に相補である一本鎖RNAをゲノムとするウイルスである。

#### 【請求項53】

ヒト由来の抗体を含有する生物材料サンプル中においてクリプトウイルス抗原を選択的に結合する抗体の存在の有無を検出するためのアッセイ法であって、前記アッセイ法が、

クリプトウイルス感染症を罹患していると疑われる個体に由来するサンプルである、前記サンプルを、クリプトウイルス抗原を選択的に結合する抗体が存在しているならば、抗体が結合したウイルス複合体を形成するように、請求項32に記載のウイルス粒子に接触させる工程、

かくして形成された任意の抗体結合ウイルス複合体を、抗ヒト抗体を結合する抗体に接触して、前記抗ヒト抗体結合抗体と前記抗体結合ウイルス複合体との複合体を形成させる工程、及び

形成された任意の複合体の存在の有無を検出する工程であって、前記複合体の存在が、クリプトウイルス抗原を選択的に結合する抗体がサンプル中に存在することを示す工程、を含むアッセイ法、ここでクリプトウイルスは（配列番号1）に示される塩基配列に相補である一本鎖RNAをゲノムとするウイルスである。

#### 【請求項54】

哺乳類におけるクリプトウイルス感染の検出法であって、前記方法が、

前記哺乳類から採取された生物材料サンプルを提供する工程、及び

前記サンプルを用いて請求項41、42、43、50、51、52、又は53のいずれかの方法を行い、これにより、前記哺乳類におけるクリプトウイルス感染を示す前記サンプル中にあるクリプトウイルスタンパク質、クリプトウイルス特異的RNA、及び／又はクリプトウイルス特異抗体の存在を検出する工程

を含む方法、ここでクリプトウイルスは（配列番号1）に示される塩基配列に相補である一本鎖RNAをゲノムとするウイルスである。

#### 【請求項55】

前記哺乳類がヒトである、請求項54に記載の方法。

#### 【請求項56】

前記ヒトが神経学的、神経変性、及び／又は神経精神医学的疾患有する、請求項54に記載の方法。

#### 【請求項57】

前記ヒトが、原発性気道及び／又はリンパ節腫脹関連疾患有する、請求項54に記載の方法。

#### 【請求項58】

培養哺乳類羊膜細胞であって、前記細胞が、クリプトウイルスに非増殖的に感染しており、細胞株AV<sub>3</sub>/SSPEの特徴を有する細胞、ここでクリプトウイルスは（配列番号1）に示される塩基配列に相補である一本鎖RNAをゲノムとするウイルスである。

#### 【請求項59】

クリプトウイルスピリオン単離方法であって、前記方法が、

(a) クリプトウイルス感染を有するヒトから得られた複数の末梢血単核細胞を、細胞グアニリルシクラーゼ活性を増加する薬剤を含む人工水性培地で培養する工程、

(b) 複数の末梢血単核細胞を複数の哺乳類羊膜細胞と共に、細胞グアニリルシクラーゼ活性を増加する薬剤を含む新鮮人工水性培地で共培養する工程、

(c) 前記末梢血単核細胞を前記哺乳類羊膜細胞と共に共培養基で継代培養する工程

10

20

30

40

50

、  
 ( d ) 複数の哺乳類上皮細胞を前記末梢血単核細胞及び前記哺乳類羊膜細胞と共に、細胞グアニリルシクラーゼ活性を増加する薬剤を含む新鮮人工水性培地中で共培養する工程、並びに

( e ) 上清中にあるクリプトウイルスピリオンを得るために、前記水性培地の前記上清を、前記細胞から分離する工程、

を含む方法、ここでクリプトウイルスは(配列番号1)に示される塩基配列に相補である一本鎖RNAをゲノムとするウイルスである。

**【請求項60】**

クリプトウイルスの増殖方法であって、前記方法が、

10

( a ) 複数の哺乳類上皮細胞を、請求項59に記載の方法によって単離された複数の無細胞クリプトウイルスピリオンに曝露する工程、及び

( b ) ピリオンに曝露された、前記哺乳類上皮細胞を、細胞グアニリルシクラーゼ活性を増加する薬剤を含む人工水性培地中でさらに培養する工程、

を含む方法、ここでクリプトウイルスは(配列番号1)に示される塩基配列に相補である一本鎖RNAをゲノムとするウイルスである。

**【請求項61】**

クリプトウイルスで非増殖型感染された哺乳類細胞株の產生方法であって、前記方法が

、  
 ( a ) 前記哺乳類羊膜細胞がクリプトウイルスによって非増殖型感染されるように、クリプトウイルスに感染しているヒトから得られた末梢血単核細胞を、哺乳類羊膜細胞と共に、細胞グアニリルシクラーゼ活性を増加する薬剤を含む人工水性培地中で共培養する工程、

20

( b ) 前記非増殖型感染哺乳類羊膜細胞を、前記末梢血単核細胞と共に継代培養して、前記共培養物が非増殖型感染された哺乳類羊膜細胞の単培養とする工程、  
 を含む方法、ここでクリプトウイルスは(配列番号1)に示される塩基配列に相補である一本鎖RNAをゲノムとするウイルスである。

**【請求項62】**

前記哺乳類羊膜細胞がヒト羊膜細胞である、請求項59又は請求項61に記載の方法。

**【請求項63】**

30

前記ヒト羊膜細胞がAV<sub>3</sub>細胞である、請求項62に記載の方法。

**【請求項64】**

前記哺乳類上皮細胞が、Vero又はCV-1細胞から成る群から選択されるシミアン上皮細胞である、請求項59又は請求項60に記載の方法。

**【請求項65】**

前記CV-1細胞がCV-1細胞亜株である、請求項64に記載の方法。

**【請求項66】**

細胞グアニリルシクラーゼ活性を増加する前記薬剤が、サイクリックGMP、インスリン、亜鉛ジカチオン、又はこれらのいずれかの組み合わせである、請求項59、60、又は61に記載の方法。

40

**【請求項67】**

前記人工水性培地中で前記サイクリックGMP濃度が0.05~5mMである、請求項66に記載の方法。

**【請求項68】**

細胞グアニリルシクラーゼ活性を増加する薬剤が、一酸化窒素又は、有機硝酸塩化合物、ニトロシル鉄化合物、S-ニトロソチオール化合物、シドノンイミン化合物、及びNO-NOエート化合物から成る群から選択される一酸化窒素ドナーである、請求項59、60、又は61に記載の方法。

**【請求項69】**

前記水性培地がさらにグルタミンを含む、請求項59、60、又は61に記載の方法。

50

**【請求項 7 0】**

請求項 6 0 に記載の方法を含む、クリプトウイルスで急性感染された哺乳類上皮細胞株を產生する方法、ここでクリプトウイルスは（配列番号 1）に示される塩基配列に相補である一本鎖 RNA をゲノムとするウイルスである。

**【請求項 7 1】**

クリプトウイルスで急性感染された哺乳類上皮細胞であって、前記細胞が請求項 6 0 の方法によって產生される、哺乳類上皮細胞、ここでクリプトウイルスは（配列番号 1）に示される塩基配列に相補である一本鎖 RNA をゲノムとするウイルスである。

**【請求項 7 2】**

クリプトウイルスで非増殖型感染された細胞であって、前記細胞が請求項 6 1 に記載の方法に従って產生される、細胞、ここでクリプトウイルスは（配列番号 1）に示される塩基配列に相補である一本鎖 RNA をゲノムとするウイルスである。 10

**【請求項 7 3】**

抗ウイルス治療薬候補のインビトロスクリーニング方法であって、前記方法が、

（a）請求項 7 1 に記載の細胞を培養する工程、

（b）前記細胞を前記抗ウイルス治療薬候補に曝露する工程、並びに

（c）クリプトウイルス複製及び／又はクリプトウイルスビリオンのアセンブリに対する前記薬剤の有効性を測定する工程であって、コントロールに比較してクリプトウイルス複製及び／又はクリプトウイルスビリオンのアセンブリが阻害されることが、前記治療薬候補の抗ウイルス活性を示す工程、 20

を含む方法、ここでクリプトウイルスは（配列番号 1）に示される塩基配列に相補である一本鎖 RNA をゲノムとするウイルスである。

**【請求項 7 4】**

抗ウイルス治療薬候補のインビトロスクリーニング方法であって、前記方法が、

（a）請求項 5 8 又は 7 2 に記載の細胞を培養する工程、

（b）前記細胞を前記抗ウイルス治療薬候補に曝露する工程、並びに

（c）クリプトウイルス複製、クリプトウイルスゲノム複製、及び／又はクリプトウイルス特異的転写に対する前記薬剤の有効性を測定する工程であって、コントロールに比較してクリプトウイルス複製、クリプトウイルスゲノム複製、及び／又はクリプトウイルス特異的転写が阻害されることが、前記治療薬候補の抗ウイルス活性を示す工程、 30

を含む方法、ここでクリプトウイルスは（配列番号 1）に示される塩基配列に相補である一本鎖 RNA をゲノムとするウイルスである。

**【請求項 7 5】**

ヒト疾患研究のための動物モデルであって、前記モデルが、非ヒト哺乳類を含み、前記非ヒト哺乳類が、（配列番号 1）に示される塩基配列に相補である一本鎖 RNA をゲノムとする感染性無細胞クリプトウイルスを人工的に接種されるか、あるいは前記クリプトウイルスで非増殖型感染された細胞を接種されており、これによって前記非ヒト哺乳類が、接種された後、以前に前記非ヒト哺乳類によって呈示されていなかった症状である、ヒト疾患に特徴的な症状を少なくとも一つ呈示する動物モデル。

**【請求項 7 6】**

前記非ヒト哺乳類が齧歯類又はウサギ類である、請求項 7 5 に記載の動物モデル。 40

**【請求項 7 7】**

前記非ヒト哺乳類が非ヒト靈長類である、請求項 7 5 に記載の動物モデル。

**【請求項 7 8】**

前記ヒト疾患が、神経学的、神経変性、及び／又は神經精神医学的疾患である、請求項 7 5 に記載の動物モデル。

**【請求項 7 9】**

治療薬候補のインビオスクリーニング方法であって、前記方法が、

（a）請求項 7 5 に記載の動物モデルに前記スクリーンされる治療薬候補を投与する工程であって、前記非ヒト哺乳類が、前記治療薬候補の投与前に、ヒト疾患に特徴的な症状 50

を少なくとも一つ呈示している工程、及び

( b ) 前記治療薬候補の有益な抗ウイルス効果の有無を検出する工程であって、有益な抗ウイルス効果の存在が前記治療薬候補の活性を示す工程、  
を含む方法。

【請求項 8 0】

予防薬候補のインビオスクリーニング方法であって、前記方法が、

( a ) 前記スクリーニングされる予防薬候補を、以前にヒト疾患症状を有していない非ヒト哺乳類に投与する工程、

( b ) (配列番号 1) に示される塩基配列に相補である一本鎖 RNA をゲノムとする感染性無細胞クリプトウイルス、あるいは前記クリプトウイルスで非増殖型感染された哺乳類細胞で、前記非ヒト哺乳類を接種する工程、並びに

( c ) 前記非ヒト哺乳類において、その後の有益な抗ウイルス効果の有無を検出する工程であって、前記接種された非ヒト哺乳類における有益な抗ウイルス効果の存在が前記予防薬候補の活性を示す工程、

を含む方法。

【請求項 8 1】

前記予防薬候補が免疫予防薬である、請求項 8 0 記載の方法。

【請求項 8 2】

前記非ヒト哺乳類が齧歯類又はウサギ類である、請求項 7 9 請求項 8 0 に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記非ヒト哺乳類が非ヒト靈長類である、請求項 7 9 又は請求項 8 0 に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記ヒト疾患が神経学的、神経変性、及び / 又は神經精神医学的疾患である、請求項 7 9 又は請求項 8 0 に記載の方法。

【請求項 8 5】

抗クリプトウイルス抗体検出キットであって、前記キットが、

請求項 3 3 に記載のクリプトウイルス粒子、及び

標識抗ヒト抗体結合抗体、

を含むキット、ここでクリプトウイルスは(配列番号 1) に示される塩基配列に相補である一本鎖 RNA をゲノムとするウイルスである。

【請求項 8 6】

前記クリプトウイルス粒子を支持するための固体マトリックスをさらに含む、請求項 8 5 に記載の抗クリプトウイルス抗体検出キット。

【請求項 8 7】

抗クリプトウイルス抗体検出キットであって、前記キットが、

請求項 1 6 又は請求項 1 9 に記載のタンパク質、及び

標識抗ヒト抗体結合抗体、

を含むキット、ここでクリプトウイルスは(配列番号 1) に示される塩基配列に相補である一本鎖 RNA をゲノムとするウイルスである。

【請求項 8 8】

前記タンパク質を支持するための固体マトリックスをさらに含む、請求項 8 7 に記載の抗クリプトウイルス抗体検出キット。

【請求項 8 9】

前記フラグメント (C) が、(配列番号 3 4)、(配列番号 3 5)、(配列番号 3 6)、  
(配列番号 3 8)、(配列番号 3 9)、(配列番号 4 0)、(配列番号 4 1)、(配列番号 4 2)、(配列番号 4 3)、(配列番号 4 4)、(配列番号 4 5)、(配列番号 4 6)、(配列番号 4 7)、又は(配列番号 4 8) を含むか、あるいはこれらのいずれかの相補ヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の核酸。

【請求項 9 0】

前記フラグメント (C) を含み、前記フラグメントが少なくとも 17 ヌクレオチド長で

10

20

30

40

50

あり、かつ、配列番号 2 に示される塩基配列又はその相補物とは結合しない、請求項 1 に記載の核酸。

**【請求項 9 1】**

前記フラグメントが 17 ヌクレオチドから 500 ヌクレオチド長であり、かつ、配列番号 2 に示される塩基配列又はその相補物とは結合しない、請求項 9 0 に記載の核酸。

**【発明の詳細な説明】**

**【発明の詳細な説明】**

**【0001】**

本出願を通じて、種々の出版物をカッコ内に参照する。本発明が関連する最先端技術をより十分に説明するために、これらの出版物の全文を本出願に参考文献として引用する。 10

**1. 発明の分野**

本発明は医療技術、また特にウイルス学分野、そして、さらに詳しくは、「クリプトウイルス」と命名された新ヒトルプラウイルスに関する。

**2. 背景技術**

パラミクソウイルス科のルプラウイルス属（図 1 を参照）は、一本マイナス鎖 R N A ゲノムによって特徴づけられるエンベロープウイルスである。いくつかのルプラウイルスは家畜動物を感染して、神経疾患を起因し得るという実質上の証拠がある。これらの神経性ルプラウイルスは、イヌパラインフルエンザウイルスタイプ 2、ブタルプラウイルス（別名、La Piedad-Michoacan-Mexico ウィルス）、並びにメナングルウィルス（Menangle Virus）を含む。これらウイルス間の強い配列同一性は、これらウイルスのそれぞれが、共通先祖であるルプラウイルス種の別々の宿主適応種を代表していることを含意する。 20

イヌパラインフルエンザウイルスタイプ 2 ( C P I V としても公知である) は、イヌの感染性気管気管支炎に関連する。これは、(通常は) 気道の非致死的疾患である (Appel と Binn、イヌ感染性気管気管支炎。Virus Infections of Carnivores (食肉類のウイルス感染症)。Elsevier Science Publishing Co., New York, N.Y., pp 201~211, 1987)。しかしながら、このウイルスはまたイヌの後肢麻痺 (Evermannら、"J.A.V.M.A." 177: 1132~1134, 1980)、神経機能不全 (Baumgartnerら、"Infect. Immun." 31: 1177~1183, 1981)、脳炎 (Evermannら、"Arch. Virol." 68: 165~172, 1981)、並びに水頭症 (Baumgartnerら、"Vet. Pathol." 19: 79~92, 1982) に関連することが発見されている。 30

ブタルプラウイルス（別名、La Piedad-Michoacan-Mexico ウィルスまたは LPMV）は、ブタの青眼疾患 (BED) に関連する。この疾患の症状は、幼若なブタにおける角膜混濁、極度な「神経質」、並びに雌ブタと雄ブタの不妊症を含む (Ramirez-Mendozaら、"J. Comp. Pathol." 117: 237~252, 1997)。BED から回復後もこのウイルスはブタの中核神経系に残存する (Wimanら 1998; Hjertnerら 1998)。このウイルスは、そのヌクレオチド配列の 95% 以上をクリプトウイルスと共有する。 40

メナングルウィルスは、1997 年にオーストラリアで初めて同定された出現ルプラウイルスである (Philbeyら、"Emerging Infectious Diseases" 4: 269~271, 1998)。このウイルスは、死産コブタの脳及び脊髄の重篤な退行変性に関連する (Philbey ら 1998)。これらの動物のニューロンは、メナングルウィルス封入体 (ヌクレオカプシド) を含んでいた。血清検査によってさらに、ブタ、フルーツコウモリ、並びに少なくとも 2 人の豚飼育所作業員中にこのウイルスに対する中和抗体が発見された。

多数のヒトルプラウイルスは、ヒトにおける疾病の原因であることが公知である。これらは、(1) ムンプスウイルス (ヒト流行性耳下腺炎を起因)、(2) ヒトパラインフル 50

エンザウイルスタイプ2(別名、HPIV-2、比較的軽症な上気道、インフルエンザ様疾患と関連する)、(3)ヒトパラインフルエンザウイルスタイプ4Aと4B(別名、HPIV-4A、HPIV-4B、これもまた比較的軽症な上気道、インフルエンザ様疾患と関連する)を含む。流行性耳下腺炎を罹患すると、実際のところ生命に危険は及ぼさないが、かなりの数の患者において神経系に関与するという証拠もある。

対照的に、もう一方のルプラウイルスである、シミアンウイルス5(Simian Virus 5)(SV5)は、ヒトまたは実験的感染動物のいずれにおいても疾患を起因することを明確に実証する公表された研究はなく、重度の免疫不全症を併発するマウスにおいてさえ、実験的感染マウスに疾患を起こさないことを立証する研究発表が少なくとも一つある(Didcockら,"J. Virol." 73: 3125~3133, 1999)。

#### 【0002】

1978年に、一つの研究論文が、多発性硬化症(MS)患者の骨髄から「病原菌」が単離されたことを記述した。(Mitchell, DNら, Isolation of an infectious agent from bone marrow of patients with multiple sclerosis(多発性硬化症患者の骨髄からの病原菌の単離), "Lancet" ii: 387~391 [1978])。後続の論文が別々のMS患者に由来する、5つの別々の「ヒトSV5分離株」について記載した。(Goswami, KKAら, Does simian virus 5 infect humans?(シミアンウイルス5はヒトを感染するか? "Journal of General Virology" 65: 1295~1303 [1984]、Goswami, KKAら, Evidence for the persistence of paramyxoviruses in human bone marrows(ヒト骨髄におけるパラミクソウイルスの残存の証拠), "Journal of General Virology" 65: 1881~1888 [1985]、Randall, REら, Isolation and characterization of monoclonal antibodies to simian virus 5 and their use in revealing antigenic differences between human, canine and simian isolates(シミアンウイルス5に対するモノクローナル性抗体の単離とキャラクタリゼーション並びにヒト、イヌ、及びシミアン分離物間の抗原的相違の解明におけるその用途), "Journal of General Virology" 68: 2769~2780 [1987])。しかしながら、SV5とMSの因果関係は推測に留まった。

1987年に、Goswamiらが、何人かのMS患者の脳脊髄液(CSF)がSV5に対する抗体を含んでいることを報告した。(Goswami KKAら, Antibodies against the paramyxovirus SV5 in the cerebrospinal fluids of some multiple sclerosis patients(何人かの多発性硬化症患者の脳脊髄液におけるパラミクソウイルスSV5に対する抗体), Nature 327: 244~247 [1987])。しかし、この報告は、他の高名なパラミクソウイルス学者によるその結果の再現が失敗に終わったために、議論的となった。(Vandvik, B. とNorby, E., Paramyxovirus SV5 and multiple sclerosis(パラミクソウイルスSV5と多発性硬化症), Nature 338: 769~771 [1989]、しかしRussell, WCとRandall, RE, Multiple sclerosis and paramyxovirus(多発性硬化症とパラミクソウイルス), Nature 340: 104 [1989]を参照)。したがって、SV5とMSの明確な因果関係は当該分野では確立されなかった。

多発性硬化症は、最も一般的には若年及び初期中年成人(18才から40才)を冒す、慢性の退行変性中枢神経系疾患である。青年で診断されることは稀であり、小児ではさらに稀である。35万人のアメリカ人を冒すMSは、外傷性障害を除いては神経性廃疾の最

10

20

30

40

50

多原因の一つである。 ("Harrison's Principles of Internal Medicine (Harrison、内科学の原理)" , 第13版. , K. J. Isselbacherら (編集) , McGraw-Hill , pp. 2287-95 [1994]に掲載されている、 S. L. Hauser , Multiple Sclerosis and other demyelinating diseases (多発性硬化症とその他の脱髓性疾患) )。本疾患の発症、進行並びに結果は、疾患のいくつかのパターンの一つの症状を発現する患者によって高度に変化する。例えば、理由は明瞭ではないが、 MS は男性の2倍もの女性を冒す。 MS の診断、臨床的描写を包括する個々のコンポーネントはずっと以前から詳しく描写されているにも係わらず、その症状のシーケンスと重症度は、症例によって極めてばらつきが大きい。 (Hallpike J. F. , Adams C. W. M. , 及び Tourtelotte W. W. , 編集 , 1983 , "Multiple Sclerosis: Pathology, Diagnosis and Management (多発性硬化症:病理、診断と管理)" , Chapman & Hall , London , McAlpine E. ら , 1972 , "Multiple Sclerosis: A Reappraisal (多発性硬化症:再評価)" , Churchill Livingstone , Edinburgh , Rose A. S. . , 1972 , "Multiple Sclerosis: Immunology, Virology and Ultrastructure (多発性硬化症:免疫学、ウイルス学、超微細構造)" Wolfgram F. , Ellison G. W. , Stevens J. G. , と Andrews J. M. , 編集 , Academic Press , New York に掲載されている Multiple Sclerosis: A Clinical Interpretation (多発性硬化症:臨床的解釈) )。 MS を罹患するどの2人の患者をとっても同様ではないと言ってよく、その結果、何が定型的な臨床的病歴を構成するのかについての論議がある。

#### 【0003】

最も一般的には、 MS は最初に一連の神経系発作を示し、続いて症状が軽減するが一定の安定期後に回帰する完全または部分的緩解を示す(再発-緩解MS)。その他の患者では、この疾患は、明瞭な緩解を伴わず、しばしば短いプラトーあるいは症状の僅かな軽減を伴う漸進的な衰退によって特徴づけられる(原発-進行性MS)。さらに他の患者では、初期段階では疾患の再発と緩解の経過をたどり、その後進行性に衰退する可能性がある(二次的-進行性MS)。

一般的に、慢性進行性及び慢性再発性MSの第一の症状発現にはさほど変化がない。潜行性疾患(無気力、抑鬱症、疲労、体重減少、筋肉痛)が存在したことは、最初の神経学的症状発現前の患者のカルテからしばしば明らかにできる。全ての確実なMS症例の約50%における第一の兆候は、肢の衰弱感、1つ以上の肢、四肢、または軀幹周囲の痺れ感、または刺痛(paresthesia)である。兆候と症状にはしばしば不一致が見られる。 AdamsとVictor ("Principles of Neurology (神経学の原理)" Adams R. D. と Victor M. , 編集 , McGraw Hill , New York に掲載されている、 1997 , Multiple sclerosis and allied demyelinating diseases (多発性硬化症と類似脱髓性疾患) は、「MS患者が片側の脚に症状があり、両側に兆候(両側性バビンスキーメンタル)を有することは一般的な警句である」を言及している。もう一つのよく見られる初期兆候は、一方または両側の眼を冒す球後視神経炎の短期エピソードである。多数のMS患者は、視神経炎(視神経ヘッドの膨満)を呈し、これは神経ヘッドに対する脱髓斑の近位性に依存する。症例の有意なパーセントを占める視神経炎が他の疾患を構成しているのか、それともMSのサブクラスを構成するのかについてはかなりの議論があるが、症例の約50%において、この疾患はMSに進行する(Arnasonら, "J. Neurol. Sci." 22: 419, 1974)。

診断が確実になるときには、臨床的症候群のさらに定型的な群が、進行的あるいは緩解様式に発症している。大多数の患者は、視神経、脳幹、小脳、及び脊髄に関連する混合ま

10

20

30

40

50

たは全身型疾患を呈示する。約三分の一が、脊髄型を呈し、約5%が小脳または橋小脳型、並びに同様な割合で黒内障型を呈する。AdamsとVictor(前出)は、彼ら自身の臨床材料が少なくとも80%の脳脊髄及び脊髄型の疾患を含んでいたと推定している。

心理障害が頻繁に観察され、AdamsとVictor(前出)がおそらく前頭葉にある広範な白質病変に拠るであろうとする、不相応な多幸性として呈示され得る。高比率のMS患者において、抑鬱症並びに過敏性が観察される。

比較的最近まで、MSとテンカンは、別々の実体であると考えられていた。これらの障害間の「オーバーラップ」を実証する多数の最近の研究についての出版物がこの考え方を訂正している。過去10年に実施された疫学ならびに人口統計学的研究は、かなりの割合のMS患者における併発テンカン様症状の重要な証拠を提供してきた。テンカン様症状の併発は、早発性MS(即ち、小児及び青年)において顕著に高く、MS患者におけるテンカンの総罹患率は、一般集団よりも何倍も高い。10

ヒトテンカンは、不可解な医学的状態で、事実、特定の疾患あるいは一つの症候ではないが、しかし、むしろそれ自体が種々の病態プロセスに対して二次的であり得る、いくつかの障害を受けた脳機能から生じる広いカテゴリーの複合症状である。今日、多数の臨床的現象がテンカン発作として認識されており、そのいくつか(例えば、ミオクローヌス性及びアトニー性テンカン発作)は現在よく理解されておらず、事実、伝統的に「テンカン性」と考慮されていた病態生理学的プロセスとは若干異なる神経メカニズムを反映している可能性がある。おそらく、これらの疾患の不可解かつ複雑な本質の最大の反映は、この疾患の病因が、圧倒的大多数の症例において(70%以上)、「原因不明」(即ち、不明瞭、不確かな起源による)あるいは「特発性」(即ち、未知の原因による)なことである。20

#### 【0004】

テンカンはテンカン発作にとどまらない。テンカン患者は典型的には、テンカン発作活動がほとんどあるいは全くないものから、軽い活動(「小発作性」または「無」テンカン発作)、反復かつ難治性「大発作性」テンカン発作に至るまでの応答スペクトルを呈する(これらの出来事は、門外漢の一般大衆によって、テンカンの全ての形態を定義する症状であるとしばしば誤解される、"Epilepsy: A Comprehensive Textbook(テンカン:総合テキストブック)"、Engel, Jr. J. and Pedley, T.A., 編集 Lippincott-Raven, 1997を参照)。その状態実体は、各個人によって異なり、廃疾とクオリティ・オブ・ライフの損失の原因となる、多数の局面から成る。症状の理学的スペクトルは、極度に微妙な「小発作性」または「無」テンカン発作から、障害が著しい「大発作性」テンカン発作の範囲に渡るが、多数の患者が同じく障害と成り得るその他の共通な病的プロセス(例えば、記憶喪失、錯乱状態、嗜眠、睡眠障害、並びに臨床的な抑鬱状態)を経験する。テンカン発作のみに焦点を置く治療は、障害を軽減するためには往々にしてほとんど役に立たない。これはおそらく、テンカン発作性脳組織の外科的切除に成功した患者が、テンカン発作は消失しても社会的に孤立し失職したままであり、生活が改善された証拠がほとんどないことによって好適に説明されるであろう。治療上の介入は、テンカンを構成する複数及び相互作用性の医学的、心理学的、並びに環境的因素が対処される場合にのみ、至適となり得る。30

もう一つのテンカン様疾患は、稀かつ致死的小児と青年の退行変性中枢神経系疾患である、亜急性硬化性全脳炎(SSPE)である。(SeverとZeman, 編集, Measles Virus and Subacute Sclerosing Panencephalitis(麻疹ウイルスと亜急性硬化性全脳炎)。"Neurology (Supplement 1)" 18: 1~192, 1968、PayneとBaublis, "Perspectives in Virology" 7: 179~195, 1971、JohannesとSever, "Ann. Rev. Med." 26: 589~601, 1975、Meulenら, "Comp. Virol." 18: 105~159, 1983、Dyken, "Neurol. Clin." 3: 179~196,40

1985）。初期においては、本疾患は普通は情動性あるいは行動障害を呈し、数ヶ月の間に著明なテンカン様の神経疾患に進行する。その後期は、難治性テンカン発作、除脳硬直、昏睡及び死亡によって特徴づけられる。時として、ほとんど全てのSSPE患者がテンカンと「誤診」される。

SSPEの症例は、世界中を通して先進国及び開発途上国のいずれにおいても記述されている(CanalとTorck, "J. Neurol. Sci.", 1:380~389, 1964、Pettayら, "J. Infect. Dis." 124:439~444, 1971、Haddadら, "Lancet" 2:1025, 1974、Sofferら, "Israeli J. Med. Sci." 11:1~4, 1975、Naruszewicz-Lesiukら, "Przeg Epidemiologiczna" 23:1~8, 1979、Moodieら, "South African Med. J." 58:964~967, 1980)。この疾患の発現頻度は大きくばらつき、英国(Dick, "Brit. Med. J." 3:359~360, 1973)と米国(Jabourら, "J. A. M. A." 220:959~962, 1972)では一年あたり100万人の人口(cpmpy)につき0.06~0.10症例、イスラエル(Sofferら, "Israeli J. Med. Sci." 11:1~4, 1975)とニュージーランド(BaguleyとGlasgow, "Lancet" 2:763~765, 1973)では3.40~7.70cpmpyに及ぶ。本疾患の究極の発生機序の原因である因子(複数でもよい)は明らかではない。

#### 【0005】

多くの研究が、SSPE患者の中核神経系組織が麻疹ウイルスによって持続的に感染されていることを示している。本疾患が幼年期に獲得された持続性麻疹ウイルスの感染の再発に関連することを示す相当な根拠がある。この仮説を支持するSSPE患者における特定の所見は、(1)小児麻疹の病歴、(2)血清中の麻疹ウイルス特異抗体の力価の著明な上昇、(3)脳脊髄液中における麻疹ウイルス特異抗体の存在、(4)特異的免疫蛍光法によって実証されるCNS組織中における麻疹ウイルス抗原の存在、(5)オリゴデンドログリア及び神経細胞におけるパラミクソウイルスヌクレオカプシドの細胞内封入、並びに(6)感受性細胞と共に培養する場合、脳及びリンパ組織からの感染性麻疹ウイルスの単離、を含む(Bouteilleら, "Revue Neurologie" 113:454~458, 1965、Connollyら, "Lancet" 1:542~544, 1967、Legg, "Brit. Med. J." 3:350~354, 1967、Payneら, "New Eng. J. Med." 281:585~589, 1969、Horta-Barbosaら, "Nature" 221:974, 1969)。最後に、そしておそらく最も説得力のある疫学的根拠は、麻疹ワクチンの接種が、本疾患の発症リスクを実質的に低下させることを示唆する(Modlinら, "Pediatrics" 59:505~512, 1977、Halseyら, "Am. J. Epidemiol." 111:415~424, 1980、Dykenら, "Morb. Mortal. Weekly Report" 31:585~588, 1982)。

これらの所見にも係わらず、麻疹ウイルスのみがこの疾患の唯一の病因であることに一貫しないいくつかの変則がある。それらは以下を含む。

第一に、神経毒性。麻疹患者由来の麻疹ウイルスの臨床分離株は、実験的に感染させた動物にSSPE様疾患を起因することが示されていない。細胞性SSPE由来株は、しかしながら、ケナガイタチ、マモセット、並びにサルにおいて係る疾患を起因することが示されている(Katzら, "J. Infect. Dis." 121:188~195, 1970、Thormarら, "J. Infect. Dis." 127:678~685, 1973、Uedaら, "Biken Journal" 18:179~181, 1975、Yamanouchiら, "Japan. J. Med. Sci. Biol." 29:177~186, 1976、Thormarら, "J. Infect. Dis." 136:229~238, 1977、Albrechtら, "Science" 195:64~66, 1977、Thormarら, "J. Exp. Med." 14

10

20

30

40

50

8 : 6 7 4 ~ 6 9 1 , 1 9 7 8、Ohuchiら, "Microbiol. Immunol." 25: 8 8 7 ~ 8 9 3 [1981])。

第二は、ウイルス封入体の分布と形態。感染細胞中の麻疹ウイルス抗原は、蛍光抗体法で検査すると大型の癒着する細胞質内封入体を形成している。SSPE患者血清で標識されると、ウイルス抗原は、細胞性SSPE由来ウイルス株中及び実験的に感染させた動物CNS組織中では明瞭に異なるパターンを実証する。係る物質では、細胞内封入体は、「こしょう様」粒子及び/または「飛散様」分布を示す(Doiら, "Japan. J. Med. Sci. Biol." 25: 3 2 1 ~ 3 3 3, 1 9 7 2、KimotoとBaba, "Biken Journal" 18: 1 2 3 ~ 1 3 3, 1 9 7 5、de Felicciら, "Annales Microbiologie" 126: 5 2 3 ~ 5 3 8, 1 9 7 5、Ohuchiら, "Microbiol. Immunol." 23: 8 7 7 ~ 8 8 8, 1 9 7 9)。

#### 【0006】

第三は、ウイルスヌクレオカプシドの超微細構造形態である。麻疹ウイルス感染細胞では、細胞質ヌクレオカプシドが主として「ファジー」または「顆粒状」形態となる(Tawara, "Virus (Osaka)" 14: 8 5 ~ 8 8, 1 9 6 5、Matsumoto, Bull. "Yamaguchi Med. School" 13: 1 6 7 ~ 1 8 9, 1 9 6 6、Nakaiら, "Virology" 38: 5 0 ~ 6 7, 1 9 6 9、NakaiとImagawa, "J. Virol." 3: 1 8 7 ~ 1 9 7, 1 9 6 9)。SSPE由来CNS組織では、ファジー及び平滑ヌクレオカプシドのいずれも一貫して観察されている(Oyanagiら, "J. Virol." 7: 1 7 6 ~ 1 8 2, 1 9 7 1、Dubois-Dalcqら, "Arch. Neurol." 31: 3 5 5 ~ 3 6 4, 1 9 7 4)。平滑な細胞質ヌクレオカプシドはまたほとんどの細胞性SSPE由来細胞株において観察されており(Doiら, Japan. "J. Med. Sci. Biol." 25: 3 2 1 ~ 3 3 3, 1 9 7 2、Makinoら, "Microbiol. Immunol." 21: 1 9 3 ~ 2 0 5, 1 9 7 7; Uedaら, "Biken Journal" 18: 1 1 3 ~ 1 2 2, 1 9 7 5、Burnsteinら, "Infect. Immun." 10: 1 3 7 8 ~ 1 3 8 2, 1 9 7 4、Mirchamsyら, "Intervirology" 9: 1 0 6 ~ 1 1 8, 1 9 7 8、Schottら, "Revue Neurologie" 135: 6 5 3 ~ 6 6 4, 1 9 7 9)、そのいくつかは係る構造のみを含む(Doiら, Japan. "J. Med. Sci. Biol." 25: 3 2 1 ~ 3 3 3, 1 9 7 2、Thormarら, "J. Exp. Med." 148: 6 7 4 ~ 6 9 1, 1 9 7 8)。

第四は、ウイルスヌクレオカプシドの免疫反応性である。ファジーなヌクレオカプシドは動物で実験的に產生されたHRP-結合麻疹ウイルス特異抗体で標識されるが、平滑なウイルスヌクレオカプシドは標識されない(Dubois-Dalcqら, "Lab. Invest." 30: 2 4 1 ~ 2 5 0, 1 9 7 4、Brownら, "Acta Neuropathologica" 50: 1 8 1 ~ 1 8 6, 1 9 8 0)。さらに興味深いことは、どちらもSSPE血清によって容易に標識され得る(Brownら, "Acta Neuropathologica" 50: 1 8 1 ~ 1 8 6, 1 9 8 0)。

そして第五は、疫学。SSPE発生機序の麻疹ウイルス理論の最も理解できない特色は、本疾患が極めて出現頻度が低いことである。社会経済学的、人口統計上、並びに遺伝因子の役割について多数の研究が行われているにも係わらず(CanalとTorck, "J. Neurol. Sci." 1: 3 8 0 ~ 3 8 9, 1 9 6 4、Pettayら, "J. Infect. Dis." 124: 4 3 9 ~ 4 4 4, 1 9 7 1、Haddadら, "Lancet" 2: 1 0 2 5, 1 9 7 4、Sofferら, "Israeli J. Med. Sci." 11: 1 ~ 4, 1 9 7 5、Naruszewicz-Lesiukら, "Przeg Epidemiologiczna" 23: 1 ~ 8, 1 9 7 9、Modieら, "South African Med. J." 58: 9 6 4 ~ 9 6 7, 1 9 8 0、Dick, "Brit. Med. J." 3: 3 5 9 ~ 3 6 0, 1 9 7 3、J

10

20

30

40

50

abbourら, "J. A. M. A." 220: 959~962, 1972, BaguleyとGlasgow, "Lancet" 2: 763~765, 1973, Modlinら, "Pediatrics" 59: 505~512, 1977, Halseyら, "Am. J. Epidemiol." 111: 415~424, 1980, Dykenら, "Morb. Mortal. Weekly Report" 31: 585~588, 1982)、麻疹ウイルスが実際に世界中の何百万人もの小児を感染しているのに、SSPEが何故これほど稀であるのかは、現在に至るまで全くもって明らかにされていない。

#### 【0007】

50万人のアメリカ人を冒す、さらに一般的な特発性神経学的及び／または神経精神医学的疾患は、慢性疲労症候群(CFS)であり、テンカン様の症状の併発を頻繁に伴う。(P. H. Levine, What we know about chronic fatigue syndrome and its relevance to the practicing physician(慢性疲労症候群について我々が知っていることと臨床医師との関連性), "Am. J. Med." 105(3A): 100S~03S [1998])。慢性疲労症候群は、少なくとも6ヶ月継続する、その他の医学または精神病状態に起因しない、持続性、衰弱性疲労およびエネルギー喪失が突然発症することによって特徴づけられ、その症状は、頭痛、認識及び行動機能障害(例えば、短期記憶喪失)、咽頭炎、リンパ節及び関節の疼痛、並びに微熱を含む。(M. Termanら, Chronic Fatigue Syndrome and Seasonal; Affectionate Disorder: Comorbidity, Diagnostic Overlap, and Implications for Treatment(慢性疲労症候群と季節；情動障害：同時罹患率、診断上の重複と治療の意義), "Am. J. Med." 105(3A): 115S~24S [1998])。抑鬱症と関連症状がまたよく見られ、睡眠障害、不安症、及び月経前症状またはその他の婦人科合併症の悪化を含む。(A. L. KomaroffとD. Buchwald, Symptoms and signs of chronic fatigue syndrome(慢性疲労症候群の症状と兆候), "Rev. Infect. Dis." 13: S8~S11 [1991]、B. L. Harlowら, Reproductive correlates of chronic fatigue syndrome(慢性疲労症候群の生殖的関連性), "Am. J. Med." 105(3A): 94S~99S [1998])。神経性低血圧症、副腎皮質機能低下、及び免疫調節不全を含むその他の生理学的異常もまた、CFSに関連する。(P. H. Levine [1998])。CFS患者の亜群は、気分状態の悪化、働く気力の低下、並びに季節性情動障害を暗示する冬の月間での起床の困難を訴える。(M. Termanら [1998])。

CFSの病因は不明であり、CFS症状の不均一性は特定の診断用臨床検査の利用を妨げてきた。(P. H. Levine [1998])。CFSとウイルスまたは細菌感染症、毒物曝露、起立性低血圧及びストレスに起因するその他の疾患状態の間に並行する症候があることが示唆されてきたが、これらのいずれもCFSの原因的役割を有することが示されていない。(例えば、I. R. Bellら, Illness from low levels of environmental chemicals: relevance to chronic fatigue syndrome and fibromyalgia(環境化学物質の低レベルに起因する疾患：慢性疲労症候群と線維筋痛に対する関連性), "Am. J. Med." 105(3A): 74S~82S [1998]、R. L. Brunoら, Parallels between post-polio fatigue and chronic fatigue syndrome: a common pathophysiology?(後ポリオ疲労と慢性疲労症候群との類似性：共通病態生理学？), "Am. J. Med." 105(3A): 66S~73S [1998]、R. GlaserとJ. K. Kiecolt-Glaser, Stress-associated immune modulation relevance to vir

10

20

30

30

40

50

al infections and chronic fatigue syndrome (ストレス関連免疫変調とウイルス感染及び慢性疲労症候群との関連性) , "Am. J. Med." 105 (3A) : 35S~42S [1998]、P. C. RoweとH. Calkins, Neural lly mediated hypotension and chronic fatigue syndrome (神経性低血圧と慢性疲労症候群) , "Am. J. Med." 105 (3A) : 15S~21S [1998]、L. A. Jasonら, Estimating the prevalence of chronic fatigue syndrome among nurses (看護士における慢性疲労症候群の罹病率の推定) , "Am. J. Med." 105 (3A) : 91S~93S [1998])。したがって、CFSの診断及び/または治療を方向づけるための既知の原因は未だ存在しない。その結果、CFSの診断と治療は、根底にある治療可能な原因というよりはむしろ症状に目が向けられ続けている。例えば、リラキシンの用途は、不随意筋を弛緩して、その結果CFSに付随する疼痛を軽減することであると説明されている。(S. K. Yue, Method of treating myofascial pain syndrome with relaxin (筋筋膜疼痛症候群のリラキシンによる治療法, 米国特許番号第5,863,552号) )

多数の特発性の神経学的、神経変性、神経心理学的、並びに神経精神医学的障害及び原発性気道内及び/またはリンパ節腫脹性疾患の原因となる因子について、新しい抗ウイルス薬候補のスクリーニングを含む、診断検査、研究及び開発、そして治療法を確立する需要がある。本発明によるこの点及び他の利点を本願に説明する。

#### 【0008】

##### 発明の概要

本発明は、パラミクソウイルス科 (Paramyxoviridae) のルプラウイルス (Rubulavirus) 属に属する、クリプトウイルス (Cryptovirus) と命名された新ヒトウイルスの発見と単離に基づく。本発明の単離クリプトウイルスのゲノムは、(配列番号1) に完全相補なヌクレオチド配列を有するマイナス鎖RNAである。

本発明は、クリプトウイルス特異的である単離された核酸に関する。本発明のクリプトウイルス特異的核酸は以下を包含する：(A) (配列番号1) の隣接ヌクレオチド位置1~15246のヌクレオチド配列、即ち、限定はされないが、プラス鎖RNA (例: mRNA) 及びcDNA、あるいは(B) (配列番号1) の隣接ヌクレオチド位置1~15246に相補なヌクレオチド配列、即ち、限定はされないが、マイナス鎖RNA (例: ゲノムまたはクローン化RNA) 及びcDNA、あるいは(C) (A) または(B) のクリプトウイルス特異的フラグメントで、少なくとも約5ヌクレオチド長であるフラグメント。本発明は、RNA及びDNAのどちらも包含し、したがって、本発明が、核酸、即ち、(配列番号1)においてウラシル残基 ('U') がチミン残基 ('T') を置換しているRNAを包含することは当業者には理解されよう。本発明の核酸は、有用なクリプトウイルス特異的プローブ及びプライマーを含む。

本発明の核酸を含む、クローニングベクター及び発現ベクターを含む本発明の核酸構築物が提供される。係る本発明の組換えベクターは、本発明の宿主細胞中に含まれる。

本発明はまた、クリプトウイルス特異的核酸セグメントによってコードされる単離クリプトウイルスタンパク質に関する。本発明のクリプトウイルスタンパク質は、単離クリプトウイルスヌクレオカプシド及びエンベロープタンパク質、並びにクリプトウイルスタンパク質成分を含むキメラタンパク質を含む。

本発明は、ウイルス発現ベクターのような本発明のクリプトウイルス核酸、または本発明のシードタイプビリオン、または本発明の単離クリプトウイルスピリオンまたはその他のクリプトウイルス粒子のような本発明のクリプトウイルスタンパク質を含む単離ビリオンまたはその他のウイルス粒子に関する。

本発明のクリプトウイルス核酸、クリプトウイルスタンパク質、または単離ビリオン及びその他のウイルス粒子を、キャリアと共に含む本発明の組成物はまた本発明に含まれる

10

20

30

40

50

。

さらに、本発明は、クリプトウイルスピリオンの単離法を提供する。本発明の方法は、クリプトウイルス感染を有するヒトから得られた複数の末梢血单核細胞（PBMNC）を培養することに関する。PBMNCは、限定はされないが、サイクリックGMPのような細胞のグアニリルシクラーゼ活性を増加する薬剤を含む人工水性培地中で培養される。PBMNCは次に、この薬剤を含む新鮮水性培地中で複数の哺乳類羊膜細胞と共に培養されて、この共培養物は1回以上継代培養される。継代培養に引き続いて、複数の哺乳類上皮細胞をPBMNCと哺乳類羊膜細胞と共にこの薬剤を含む新鮮水性培地中で共培養する。この共培養の結果、水性培地中にクリプトウイルスピリオンが放出される。上清中に見いだされるクリプトウイルスピリオンを得るために、水性培地の上清を培養中の細胞から分離する。本発明の方法は、細胞材料からクリプトウイルスピリオンを多数単離することに役立つ。このようにして単離されたビリオンは、本発明が提供するクリプトウイルス増殖についての本発明の方法によって、さらに増殖することができる。10

本発明によるクリプトウイルス増殖の方法は、複数の哺乳類上皮細胞を、かくして単離された、複数の無細胞クリプトウイルスピリオンに曝露し、細胞グアニリルシクラーゼ活性を増加する薬剤を含む人工水性培地中で、クリプトウイルスピリオンに曝露された哺乳類上皮細胞をさらに培養することを含む。したがって、クリプトウイルスによって急性感染された哺乳類上皮細胞が供給され、この発明による細胞は本方法によって產生される。

本発明はまた、クリプトウイルスによって非増殖型感染された哺乳類細胞株を產生する方法にも関連する。この方法は、クリプトウイルスに感染しているヒトから得られたPBMNCを、哺乳類羊膜細胞（例えば、齶歯類または靈長類の羊膜細胞）と共に、細胞グアニリルシクラーゼを増加する薬剤を含む人工水性培地中で共培養して、これによって哺乳類羊膜細胞がクリプトウイルスによって非増殖型感染するようになることを含む。この非増殖型感染哺乳類羊膜細胞を、末梢血单核細胞と共に継代培養後、この共培養物は、非増殖型感染された哺乳類羊膜細胞の単培養となる。本発明はまた、クリプトウイルスによって非増殖型感染された細胞に関連し、この細胞は本方法に従って產生される。20

#### 【0009】

クリプトウイルスは、原因不明かつ特発型のヒト疾患、例えばテンカン、に関連する。クリプトウイルスはまた、神経機能障害及び神経病態が明らかであり、かつテンカン様症状が常に併発（例えば、亜急性硬化性全脳炎、SSPE）または頻繁に併発する（例えば、多発性硬化症[MS]及び慢性疲労症候群[CFS]）、その他のヒト神経学的、神経変性、及び／または神経精神医学的疾患に関連する。したがって、本発明の細胞株、ウイルス粒子及びビリオンは、クリプトウイルスに感染した、ヒトを含む、哺乳類の治療に有用であり得る薬剤を発見するために、抗ウイルス薬候補のスクリーニングに特に有用である。30

特に、抗ウイルス治療薬候補をスクリーニングするために有用なインビトロ法が提供される。このインビトロスクリーニング法に基づいて、本発明のクリプトウイルス感染細胞は培養されて、次に抗ウイルス治療薬候補に曝露される。急性感染された哺乳類上皮細胞が使用されるならば、次にクリプトウイルス複製及び／またはクリプトウイルスピリオンアセンブリに対する抗ウイルス治療薬候補の効果が測定される（例えば、クリプトウイルスゲノム複製、クリプトウイルス転写、及び／または翻訳に対する効果、即ち、クリプトウイルスマRNAからのタンパク質合成、產生されるクリプトウイルスピリオンの数またはクリプトウイルス粒子の完全性）。この薬剤を投与されないコントロールと比較する、クリプトウイルス複製及び／またはクリプトウイルスピリオンのアセンブリの阻害は、治療薬候補の抗ウイルス活性を示す。一方、非増殖型感染細胞が使用される場合、抗ウイルス治療薬候補のクリプトウイルス複製、クリプトウイルスゲノム複製、及び／またはクリプトウイルス特異的転写に対する効果の測定が行われる。この薬剤を投与されないコントロールと比較する、クリプトウイルス複製、クリプトウイルスゲノム複製、及び／またはクリプトウイルス特異的転写の阻害は、治療薬候補の抗ウイルス活性を示す。これらの本発明の方法は、有望な新しい抗ウイルス薬の同定、スクリーニング、または単離に有用で40

ある。いったん、本発明の方法によって化合物の潜在能力が同定されると、次にその臨床的効用を確認するためにさらなる研究が行われ得る。したがって、化学療法薬候補をスクリーニングするための本発明の方法は、クリプトウイルス関連状態及びモノネガウイルス目に属するその他のウイルスに関連するその他の状態の治療を目的とする抗ウイルス医薬品の発見と開発にメリットがある。

本発明はまた、例えば、神経学的、神経変性、及び／または神経精神医学的疾患（例えば、テンカン、S S P E、M S、並びにC F Sのような特発性テンカン様疾患）のようなヒト疾患研究用の動物モデルを提供する。この動物モデルは、（配列番号1）に相補である一本鎖RNAを含むゲノムを有する感染性無細胞クリプトウイルスを接種された、あるいはクリプトウイルスで非増殖型感染された細胞を接種された非ヒト哺乳類を含む。接種を受けた非ヒト哺乳類の動物モデルは、接種前にはこの非ヒトの乳類によって呈示されていなかった、ヒト疾患に特徴的な症状を少なくとも一つ接種後に呈示する。10

動物モデルは、抗ウイルス治療薬候補のインビボスクリーニング法に有用である。この方法は、スクリーニングを受ける治療薬候補を、本発明の動物モデルに投与することを含む。治療薬候補の投与前に、この非ヒト哺乳類は、ヒト疾患に特徴的な症状を少なくとも一つ呈示する。治療薬候補の投与後、有益な抗ウイルス効果の有無が検出され、この薬剤を投与されなかったコントロール動物と比較して、有益な抗ウイルス効果があることは、治療薬候補の活性を指示する。

本発明の動物モデルのもう一つの実施形態を利用して、抗ウイルス予防薬のインビボスクリーニング法が提供される。この方法は、スクリーニングを受ける予防薬候補を、例えば、神経学的、神経変性、及び／または神経精神医学的疾患である、ヒト疾患の症状を有さない非ヒト哺乳類に投与することを含む。この動物モデルは、前述のように、（配列番号1）に相補である一本鎖RNAを含むゲノムを有する感染性無細胞クリプトウイルス、あるいはクリプトウイルスで非増殖型感染された細胞の接種を受ける。その後、この予防薬候補の投与を受けなかったコントロールと比較して、非ヒト哺乳類における有益な抗ウイルス効果の有無が検出される。接種を受けた非ヒト哺乳類における有益な抗ウイルス効果が後に存在することは、予防薬候補の活性を指示する。20

#### 【0010】

本発明の核酸構築物、クリプトウイルスタンパク質、及び粒子とビリオンはまた、クリプトウイルス特異抗体の産生、並びにワクチンの産生と製造に特に有用であり、その抗体とワクチンは、クリプトウイルスのヌクレオカプシドまたはエンベロープのようなクリプトウイルスタンパク質に対して特異的に産生される。これらのワクチンは、弱毒ウイルス、死菌ウイルス、組換えキメラウイルス、ウイルスのタンパク質またはその他の部分、あるいは1つ以上の単離または組換え発現されたクリプトウイルスタンパク質を含む。30

本発明はまた、クリプトウイルスタンパク質を特異的に結合する単離抗体、並びにクリプトウイルス感染治療のための薬剤製造における本発明の抗体の使用に関連する。抗体とキャリアを含む組成物がまた提供される。

その他の態様では、本発明は通常、例えば、生物材料がクリプトウイルス汚染されているか否か、あるいはヒトを含む哺乳類がクリプトウイルスに感染しているか否かを決定するための方法とアッセイを導出する。40

特に、本発明は、血清のような生物材料サンプル中におけるクリプトウイルスタンパク質、クリプトウイルス特異的RNA、またはクリプトウイルス特異抗体の存在の有無を検出するための方法を提供する。

クリプトウイルスタンパク質検出方法では、生物材料サンプルを、クリプトウイルスタンパク質を特異的に結合する本発明の抗体と接触させ、サンプルの構成成分に抗体が特異的結合する場合は、サンプル中にクリプトウイルスタンパク質が存在することを指摘する。

同様にして、RNAを含む生物材料サンプル中のクリプトウイルス特異的RNAの検出方法では、少なくとも中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件において、サンプルを本発明のクリプトウイルス特異プローブと接触させ、検出可能なハイブリ50

ダイゼーション産物の形成は、サンプル中にクリプトウイルスRNAが存在することを指摘する。

一方、RNAを含むサンプルは、少なくとも1つの本発明のクリプトウイルス特異プライマーを増幅反応混合物中で使用して、サンプル中でクリプトウイルス特異的RNAの増幅を受ける。増幅反応混合物中でクリプトウイルス特異的核酸増幅産物の存在の有無を検出することによって、サンプル中におけるクリプトウイルス特異的RNA存在の有無を決定することができ、反応混合物中にクリプトウイルス特異的増幅産物が存在することは、サンプル中にクリプトウイルス特異的RNAが存在することを指摘する。

本発明はまた、血清のような抗体含有生物材料サンプル中において、クリプトウイルス特異抗体の存在の有無を検出する方法を提供する。この方法は、生物材料サンプルを、クリプトウイルスエンベロープタンパク質、あるいは本発明のビリオンまたはウイルス粒子のような本発明のタンパク質と、それぞれ特異的タンパク質-抗体複合体、または抗体を結合したウイルス複合体を形成させるような条件下で接触することを含む。係る特異的タンパク質-抗体複合体、または抗体を結合したウイルス複合体の存在が検出されることは、サンプル中にクリプトウイルス特異抗体が存在することを指摘する。本方法の実施に便利な、本発明の抗クリプトウイルス抗体検出キットがまた提供される。10

したがって、ヒトを含む哺乳類由来の生物材料サンプルについて、クリプトウイルスタンパク質、クリプトウイルス特異的RNA、またはクリプトウイルス特異抗体の存在の有無を検出する前述した本発明による方法のいずれかを実施することによって、サンプル中にクリプトウイルスタンパク質、クリプトウイルス特異的RNA、またはクリプトウイルス特異抗体の存在が指摘されるため、哺乳類におけるクリプトウイルス感染を検出または診断する本発明の方法が提供される。治療ストラテジーとは関わりなく、「一次」感染時（即ち、ウイルスに対する初めての曝露）あるいは出来る限りその直後（即ち、一次感染の進展中）に治療を開始することが好都合であるために、これらの診断方法は有益である。20

本発明のその他の特色、目的、及び利点は、付隨の図面と以下の好ましい実施形態の詳細な説明から明らかであろう。

#### 【0011】

##### 図面の簡単な説明

図1は、本発明のヒトクリプトウイルスの、パラミクソウイルス科のルプラウイルス属に対する分類学的割り当てを示すチャートである。30

図2は、Collinらのバージョン(Virology(ウイルス学), 第三版, Fields, Knipe, 及びHowley編集, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996, 第41章, 1206ページ, Parainfluenza Viruses(パラインフルエンザウイルス))から修正した系統樹である。修正系統樹は、原型であるルプラウイルスシミアンウイルス5から区別するために、3つのルプラウイルス種(ブタルプラウイルス、イヌパラインフルエンザウイルスタイプ2、及び本発明のヒトクリプトウイルス)のクラスタリングを強調する。

図3は、パラミクソウイルス科ファミリの各属の典型的メンバーの遺伝子地図の表示である。遺伝子サイズは目盛り付きで描かれている。垂直線は、遺伝子の境界を定めている。ニューモウイルスL遺伝子転写は、22K(M2)遺伝子と重複しているため、したがって互い違いなフォーマットで表示される。このオーバーラップ立体構造は、ヒト及び動物ウイルスで見られるが、その他のニューモウイルス属では見られない(Virology(ウイルス学), 前出に掲載の、LambとKolakofsky, 第40章, 1181ページ, The Viruses and Their Replication(ウイルスとその複製))。

図4は、改訂版のルプラウイルス遺伝子地図であり、これは向神経性を示し、それらの融合タンパク質のカルボキシ末端にある付加22アミノ酸「テール」をコードする関連ウイルスのクラスタ(即ち、ヒトクリプトウイルス、イヌパラインフルエンザタイプ2、ブ

1020304050

タルプラウイルスの「向神経性種」)からシミアンウイルス5を区別するものである。各向神経性ウイルス種の融合(F)タンパク質は、シミアンウイルス5と融合タンパク質に對してよりも、互いにさらに密接に關連している(図10を参照)。

図5は、還元条件下で10%アクリルアミドLaemmliスラブゲルによるSDS-PAGE後の勾配・精製ヒトクリプトウイルス(BBR株)及びシミアンウイルス5(NIH 21005-2WR株)の[<sup>35</sup>S]-メチオニン標識タンパク質の図示による比較オートラジオグラムを示す。

図6は、ローダミン・イソチオシアナート標識ヤギ抗麻疹ウイルス血清(パネルA、C、E、G、及びI)とウサギ抗クリプトウイルス血清、その後でフルオレセイン・イソチオシアナート標識したヤギ抗ウサギIgG(パネルB、D、F、H、及びJ)で直接二重標識後に撮影した種々のSSPE由来の非増殖型感染細胞培養物の蛍光顕微鏡写真の対応セットの組み合わせである。パネルAとBは、クリプトウイルスで持続感染され、これらの免疫蛍光試験のためにカバーグラス上に継代培養される前に、麻疹ウイルスエドモンストン株で感染されたAV<sub>3</sub>/SSPE/MV細胞を示す。パネルCとDは、「キタケン」(Uedaら, "Biken Journal" 18: 179~181, 1975)と命名された非増殖型SSPE由来細胞株を示す。パネルEとFは、「ニイガタ」(Doiら, "Japan. J. Med. Sci. Biol." 25: 321~333, 1972)と命名された非増殖型SSPE由来細胞株を示す。パネルGとH及びIとJは、それぞれ「ビケン」(Yamanouchiら, "Japan. J. Med. Sci. Biol." 29: 177~186, 1976, Ohuchiら, "Microbiol. Immunol." 25: 887~983, 1981)と命名された非増殖型SSPE由来細胞株を示す。

図7は、同腹仔として生まれ、新生児(生後2日目)時にブラーク精製クリプトウイルス(BBR株、図7A)またはシミアンウイルス5のNIH 21005-2WR株(SV5、図7B)で脳内接種された2ヶ月後の2匹のオス有色マウスの写真を示す。

図8は、同腹仔として生まれ、新生児(生後2日目)時にブラーク精製クリプトウイルス(BBR株、図8A)で脳内接種された3ヶ月後、及び新生児(生後2日目)時にブラーク精製クリプトウイルスで脳内接種された6ヶ月後(図8B)の2匹のメス有色マウスの写真を示す。

#### 【0012】

図9は、ヒトクリプトウイルスBBR株(配列番号1)とシミアンウイルス5W3A株(配列番号2)のFASTAフォーマット配列(即ち、mRNAセンス5'から3')の比較である。(配列番号2)の各ラインにおける(配列番号1)からの変異数は、右側マージンに記録されている。SV5配列と一致しないクリプトウイルス特異的ヌクレオチド位置は、太文字下線で示しており、その不一致がコード領域であるならば、コードされた該当するアミノ酸をクリプトウイルスヌクレオチド配列のコドン上に記載し、もしその不一致のクリプトウイルスヌクレオチドが、相似位置にあるSV5コドンと異なるアミノ酸をコードするコドンを生じる場合、SV5アミノ酸から類似クリプトウイルスタンパク質の異なるアミノ酸に向かう矢印を示している。枠に囲まれたヌクレオチドは、既知SV5及び類似クリプトウイルスの開始または停止部位を、記載のように示す。

図10は、ルプラウイルスFタンパク質ヌクレオチド(図10A、FASTAフォーマット、即ち、mRNAセンス5'から3'配列)とコードされたアミノ酸(図10B)配列の比較である。一番目のライン(最上)は、本発明のクリプトウイルスFタンパク質('CV'[BBR株])の配列の実施形態を示し、二番目のラインは、イヌパライフルエンザウイルスタイプ2('CPV'[T1株]、Itōら, "J. Gen. Virol." 81: 719~727, 2000を参照)を示し、三番目のラインは、ブルーブラウイルス('PR'、KlenkとKlenk, EMBL/GenBankデータベースに直接登録, 2000年9月、GenBank受託番号AJ278916)を示し、四番目のラインは、シミアンウイルス5('W3A'[W3A株]、Patersonら, "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 81: 6706~6710,

10

20

30

40

50

1984)を示し、並びに五番目(最下)のラインは、シミアンウイルス5(「WR」[WR株]、Itōら, "J. Virol." 71: 9855~9858, 1997)を示す。太字下線体のアミノ酸は、クリプトウイルスFタンパク質の類似配列にあるアミノ酸と不一致であるアミノ酸を指し、そして右側マージンの記録は、各配列ブロックについての不一致数である。

図11は、クリプトウイルスタンパク質の発現を示す。図11は、還元条件下でSDS-PAGE後に急性感染されたVero細胞において産生された勾配・精製<sup>[35]S</sup>-メチオニン標識クリプトウイルスピリオンのオートラジオグラムの写真である。図12の右側に表示されているタンパク質の見かけ分子量は、分子量が既知であるマーカータンパク質(Sigma Chemicals)に対するその移動を比較することによって計算された。  
L = 最大ヌクレオカプシド関連タンパク質、ビリオン関連RNA依存性RNAポリメラーゼの主要成分、HN = ヘマグルチニンタンパク質、エンベロープ関連タンパク質の一つ、F<sub>0</sub> = 非切断型融合タンパク質、第二のエンベロープ関連糖タンパク質、NP = ヌクレオカプシドタンパク質、ヌクレオカプシド関連主要構造タンパク質、F<sub>1</sub> = 切断型融合タンパク質の大型フラグメント、P = ヌクレオカプシド関連リンタンパク質、M = ビリオン関連マトリックスまたは膜タンパク質、V = ウィルスポリメラーゼの成分であると考えられる微量RNA結合タンパク質、F<sub>2</sub> = 切断型融合タンパク質の小型フラグメント。注: 小型エンベロープ関連タンパク質であるSHタンパク質(約5kD)は、ゲルを流出してしまったために図示されていない。

図12は、亜急性硬化性全脳炎と診断された患者の脳脊髄液(CSF)(図12A)及び微生物学的スクリーニングのために採取されたCSFを有する6人のランダムに選択された神経科/神経外科患者のCSF(図12B)を用いて、<sup>[35]S</sup>-メチオニン標識ウイルス特異的タンパク質の沈降とSDS-PAGE分離によって得られた典型的な放射線免疫検定プロファイル(RIP)のオートラジオグラム写真を示す。図12Aは、年齢11才男児であるSSPE患者のCSFによる、麻疹ウイルスエドモンストン株で急性感染された<sup>[35]S</sup>-メチオニン標識CV-1c細胞(レーンMV)、クリプトウイルスBBR株(レーンCV)または両方の混合物(レーンB)で急性感染された同一標識CV-1c細胞の沈降結果のRIPを示す。レーンVは、<sup>[35]S</sup>-メチオニン標識勾配・精製クリプトウイルスピリオンのSDS-PAGEプロファイルを示す(図11をまた参照)。図12Bは、6人の神経科/神経外科患者のCSFによる、クリプトウイルスBBR株で急性感染された<sup>[35]S</sup>-メチオニン標識CV-1c細胞由来タンパク質の沈降結果のRIPを示す。レーン2にRIPプロファイルが見られる患者は、運動失調症、錯乱及び記憶喪失を呈したが、特定の診断が下されなかつた成人男性であった。レーン4にRIPプロファイルが見られる患者は、水頭症及び難治性テンカン発作を呈し、後にテンカン重積症で死亡した乳児(女性)であった。図12Bの患者由来のCSFはいずれも、麻疹ウイルスのどのエンベロープタンパク質も沈降しなかつた(データ表示なし)。図12Aは、図23(以下に説明する)と同一であるが、比較のために図12Bと同ースケールに縮小されている。

### 【0013】

図13は、2つのCSF検体によって、クリプトウイルスBBR株で急性感染された<sup>[35]S</sup>-メチオニン標識CV-1c細胞から沈降されたクリプトウイルス特異的タンパク質の放射性免疫検定プロファイル(RIP)の高解像オートラジオグラム(図13A)、並びに、クリプトウイルスのBBR株(図13B レーンCV)及びSV5のNIH 21005-2WR株(図13B レーンSV5)の勾配・精製ビリオンの主要な対応構造タンパク質の移動を図によって示している。図13AのRIPは、クリプトウイルス陰性であると評価された患者(レーン「-」、即ち、クリプトウイルス特異抗体を含まない)及びクリプトウイルス陽性(レーン「+」、即ち、クリプトウイルス特異抗体を含む)であると評価された患者からのCSF沈降物を示す。図13Bは、クリプトウイルスのF<sub>0</sub>及びHNタンパク質の近接する同時移動及び、シミアンウイルス5におけるその別々の移動の図示である(図5のSDS-PAGEプロファイルをまた参照)。

図14は、勾配・精製クリプトウイルスピリオンを標的として用いた、対応する血清と

10

20

30

40

50

4人の血清陽性の神経科／神経外科患者からのCSF検体のELISAを示す。コントロール血清は、偽感染されたCV-1<sub>c</sub>細胞に対して産生されたウサギ抗血清（コラム1、「-」）及び、勾配・精製クリプトウイルスビリオンに対して産生された過免疫ウサギ抗血清（コラム2、「+」）であった。FN=水頭症及び難治性テンカン発作と診断された女乳児、SG=特発性頭蓋内圧亢進と診断された成人女性、WK=急性ウイルス性髄膜炎と診断された男児、JK=診断がつかなかった成人男性。血清希釈は1：20（最上列）から開始し、2倍の段階希釈で下方に続行した。CSF希釈は、最上列で1：2から開始し、同様にして続行した。血清検体は、左から右に分配し、CSF標本は右から左に分配した。全患者がその血清中にクリプトウイルス特異抗体を有したが、テンカン発作障害を有する患者（FN）のみがCSF中に抗体を有したことを注記する。

10

図15は、アルツハイマー病と診断された患者からの3セットの対応する血清（S）とCSF（C）を用いたRIPアッセイの写真である。

図16は、慢性疲労症候群（CFS）と診断された患者からの4つのCSF検体を用いたRIP分析後のオートラジオグラム写真である。レーン1～3は、「クリプトウイルス陽性」と評価され、レーン4は「クリプトウイルス陰性」と評価された。

図17は、「コレクション1」（以下参照）として得られたCSFサンプルを用いたRIP分析後のオートラジオグラム写真である。レーン2の陽性CSF沈降物は、後に運動失調症、記憶喪失、一時的意識喪失、テンカン発作、複視、及び頭痛を呈示する55才成人男性から得られたものであることが発見された。

図18は、「コレクション2」（以下参照）として得られたCSFサンプルを用いたRIP分析後のオートラジオグラム写真である。

20

図19は、（38サンプル中から選ばれた）5人のMS患者から得られた血清サンプルについてRIPアッセイを実施後のオートラジオグラム写真である。

図20は、（38サンプル中から選ばれた）25人のさらなるMS患者から得られた血清サンプルについてRIPアッセイを実施後のオートラジオグラム写真である。

図21は、16人のMS患者から得られた16のCSF検体についてRIPアッセイ実施後のオートラジオグラム写真である。

図22は、6人のオーストラリア人SSPE患者の血清（レーン1～6）及び6人のコントロール血清（レーン7～12、クリプトウイルス主要エンベロープタンパク質（F<sub>0</sub>、及びHN）に対する抗体を有さない小児患者の血清）によって[<sup>35</sup>S]-メチオニン標識細胞から沈降されたクリプトウイルスNPタンパク質（p63）のRIPプロファイルの作出後に得られたオートラジオグラムの写真である。

30

図23は、SSPEと診断された年齢11才の男児からのCSFによって、[<sup>35</sup>S]-メチオニン標識麻疹ウイルス感染CV-1<sub>c</sub>細胞（レーンMV）、クリプトウイルス感染CV-1<sub>c</sub>細胞（レーンCV）、または両方の混合物（レーンB）から沈降された麻疹ウイルス特異的及びクリプトウイルス特異的タンパク質のRIPプロファイルのオートラジオグラム写真である。レーンV=[<sup>35</sup>S]-メチオニン標識クリプトウイルス感染CV-1<sub>c</sub>細胞からの勾配・精製クリプトウイルスビリオン。L=最大ヌクレオカプシド関連タンパク質、ビリオン関連RNA依存性RNAポリメラーゼの主要成分、HN=ヘマグルチニンタンパク質、エンベロープ関連タンパク質の一つ、F<sub>0</sub>=非切斷型融合タンパク質、第二のエンベロープ性糖タンパク質、NP=ヌクレオカプシドタンパク質、ヌクレオカプシド性主要構造タンパク質、F<sub>1</sub>=切斷型融合タンパク質の大型フラグメント、P=ヌクレオカプシド関連リンタンパク質、M=ビリオン関連マトリックスまたは膜タンパク質、V=ウイルスポリメラーゼの成分であると考えられる微量RNA結合タンパク質、F<sub>2</sub>=切斷型融合タンパク質の小型フラグメント。注：小型エンベロープ関連タンパク質であるSHタンパク質（約5kD）は、ゲルを流出してしまったために図示されていない。

40

図24は、クリプトウイルス感染ニューロンの顕微鏡写真を示す。図24Aは、2日齢時にクリプトウイルスBBR株を接種された有色マウス（接種2ヶ月後にテンカン発作を呈示後屠殺された）の脳の単ニューロンにおけるクリプトウイルス特異的免疫蛍光を示す。図24Bは、SSPE由来細胞性ウイルスのニイガタ-1株を接種後亜急性脳症を呈示

50

したモルモット脳からの単ニューロンにおける細胞質免疫蛍光を示す。

図25は、持続性感染A V<sub>3</sub> / S S P E / M V細胞におけるクリプトウイルスと麻疹ウイルスの細胞内ヌクレオカブシドの分別immuno gold標識の写真を示す。図25Aは、クリプトウイルスの約15nm～約17nmの「平滑」で幅の狭いヌクレオカブシドの10nm金ビーズによる標識を示す。使用された食刻法のために平滑なヌクレオカブシドの微細構造の解像損失した結果、見えにくい杉綾模様を呈した。図25Bは、麻疹ウイルスの25nmの「ファジー」で幅の広いヌクレオカブシドの15nm金ビーズによる標識を示す。倍率は約500,000倍である。

#### 【0014】

#### 好みしい実施形態の詳細な説明

10

本願に記述される新ウイルスは、培養ヒト細胞中のその不顕性あるいは「潜在性」細胞病理学及び実験的に感染された動物における緩徐で「暗号化された」病原性に基づいて、クリプトウイルス(CV)と命名された。ウイルス中に存在するヌクレオチド配列、及びその構造的、生物学的、並びに病原的な特徴からして、クリプトウイルスはパラミクソウイルス科のルプラウイルス属に属することが最も適合する(図1)。さらに詳細には、このウイルスは、イヌパラインフルエンザウイルスタイプ2(イヌパラインフルエンザウイルス、CPⅠ並びにCPⅣとしても知られる)及びブルターブラウイルス(La-Piedra-Michoacan-Mexicoウイルス及びLPMVとしても知られる)として公知のウイルスによく似ている。(図2を参照)。クリプトウイルスとこれら2つのウイルスの関連性は、その配列とその構造、生物学的、並びに病原的特徴の関連性に見ることができる(図3を参照)。CPⅣは、そのヌクレオチド配列の95%以上をクリプトウイルスと共有する。クリプトウイルスに対するメナングルウイルスのヌクレオチド配列ホモロジーの度合いは、メナングルウイルスゲノムの配列が未だ公表されていないために現在は知られていない。

20

クリプトウイルスと(1)シミアンパラインフルエンザウイルスタイプ5(シミアンウイルス5及びSV5として公知である。図4、図5、図9及び図10を参照。ここで、配列とウイルスの構造並びに免疫学的特性間に関連性があるが、生物学的または病原的類似性はほとんどあるいは全くない)、(2)ヒトムンプスウイルス(ここでは、ある程度の構造、生物学的、並びに病原的関連性がある)、さらに(3)ヒト麻疹ウイルス(ここではさらにまた、ある程度の構造、生物学的、並びに病原的関連性がある)の間にはまた明らかな関連性がある。これらの関連性は、クリプトウイルスの分類並びにその新規性の確立に役立つ。

30

テンカンまたはテンカン様疾患、即ち、テンカン様症状を有する疾病、障害、あるいは状態(例えば、CFS、MS、SSPE)の特発性並びに原因不明な形態における役割を有する他に、クリプトウイルスはまた、強迫性または反復性身体的、行動的、または心理学的症状を呈する中枢神経系(CNS)の特発性障害スペクトルに係わりを有する。クリプトウイルス感染の結果としてこれらの障害の症状の兆候は、完全に亜急性であるか、または本質的に緩徐進行性であり発症するのに数週間、数ヶ月または何年もかかる。クリプトウイルスに感染したヒト患者によって呈示された身体的症状スペクトルは、発熱性応答、眼科疾患(光過敏症、かすみ目、眼振、失明)、刺痛、麻痺、振戦、筋クローヌス、及び大発作性並びに小発作性(無)テンカン発作を含む。患者によって呈示された行動的または心理学的症状スペクトルは、反復運動と強迫性行動(強迫神経症の特徴)、睡眠障害、記憶喪失、並びに不快、拒食症、自閉症、精神遅滞、情動障害、情緒異常(臨床的抑鬱症)、精神分裂病、及び双極性障害を含む。

40

本発明の必須特性ではないが、クリプトウイルス感染の侵入経路は、咽頭の口腔粘膜(即ち、気道内上皮)であり、ウイルスのインキュベーション期間は、亜急性の持続期間(即ち、何日、何週間にも及ぶ)であり得る。新規に感染した個体は、感染性単核症のようではない、長期間の発熱性咽頭炎及びリンパ節腫脹を発症する。一方、ウイルスの侵入経路はまた、経胎盤性であり、したがってウイルスの保菌者である母親が子宮内で胎児に伝播することがあり、その結果子供が神経学的、神経変性、及び/または神経精神医学的疾

50

患あるいはその他の発育障害（例えば、自閉症、脳性麻痺、水頭症、生まれつきの障害、半身麻痺）を発症することがある。係る子供は、しばしば「知恵遅れ」と診断かつレッテルを貼られることになる。事実、テンカン及びテンカン発作の出現度は、重症な「精神遅滞者」において顕著に高い（一般集団よりも50倍近くも高い）。

ヒトクリプトウイルスゲノムのヌクレオチド配列（15, 246 隣接ヌクレオチド）を、FASTAフォーマット（即ち、mRNAセンス、5'から3'）で図9に示す（配列番号1）。このウイルスの実際のゲノムは、マイナス鎖（mRNAに対するアンチセンス）であり、（配列番号1）と完全相補なヌクレオチド配列を有する。

#### 【0015】

したがって、本発明は、FASTAフォーマット（即ち、実際のゲノムに対してプラス鎖、mRNAセンス、並びに相補配列）で、配列番号1を有する、単離ヒトマイナス鎖RNAウイルスを包含する。図9では、シミアンウイルス5のW3A株のヌクレオチドから変異したヌクレオチドが取り上げられており、各株での変異数は、右マージンに記録されている。ヒトクリプトウイルスBBR株のFASTAフォーマット配列をシミアンウイルス5W3A株（配列番号2、図9を参照）と比較した。種々のルプラウイルスタンパク質アミノ酸配列間の比較もまた行われた（図10）。

クリプトウイルス「粒子」は、完全クリプトウイルスピリオンであり、ビリオン形成の中間体（例えば、ヌクレオカプシド）、またはその他の場合は一部である粒子をも包含する。クリプトウイルス粒子は、一般的には、それらに含まれるクリプトウイルス特異的核酸に関連する1つ以上のクリプトウイルスタンパク質を有する。好みのクリプトウイルス粒子またはビリオンは、クリプトウイルスBBR株であり、ATCC受託番号（）として寄託されている。

本発明はまた、本発明のクリプトウイルス粒子とキャリアを含む組成物に関する。

本願で使用する場合、「キャリア」は、有機または無機キャリアあるいは賦形剤であつてよく、水または水溶液、または油／水あるいは水／油エマルジョンのようなエマルジョン、及び様々な種類の湿潤剤であり得る。本発明のウイルス粒子、核酸構築物、タンパク質、または抗体のような活性成分は、オプションとして、例えば、注入、錠剤、ペレット、カプセル、溶液、エマルジョン、懸濁液用に非毒性、生理学的に認容性のあるキャリアと製剤化された組成物、またはインピトロまたはインピボ使用に適する任意の他の製剤と複合されてもよい。係るキャリアはまた、グルコース、ラクトース、アカシアゴム、ゼラチン、マンニトール、スターチのり、三ケイ酸マグネシウム、タルク、コーンスターチ、ケラチン、コロイドシリカ、ポテトスターチ、尿素、中鎖長トリグリセリド、デキストラン、正常生理食塩水、リン酸緩衝食塩水、並びに固体、半流動性、液体形態の調製物の製造用途に適する他のキャリアを含む。さらに、補助剤、安定剤、濃厚化剤、及び発色剤並びに芳香剤を適宜に使用してもよい。適切なキャリアの他の例は、以下に記述されるが、当該分野に公知の適切なキャリアを意味する。

クリプトウイルスピリオンの本発明による単離方法は、前述のように、クリプトウイルスに感染しているヒトから得られたPBMCを、重要なことには、細胞グアニリルシクラーゼ活性を増加する薬剤を含む人工水性培地で培養する。

本発明の目的では、人工水性培地は、細胞グアニリルシクラーゼ活性を増加する薬剤を、IMEMZO、MEM、HYQPF Vero (Hyclone) または RPMIのような既知の最少細胞培養用培地に添加して、pH 6.8 ~ 7.8、最も好ましくはpH 6.8 ~ 7.2に（例えば、HEPESで）緩衝して調製する。この薬剤は、本発明に従って、クリプトウイルスの単離及び／または増殖を可能かつ促進するために作用する。

オプションとして、ウシ胎児血清（約2%（容量／容量）～約10%（容量／容量））を培地に加えてよい。従来量のペニシリンまたは streptotimicin のような抗生物質をまた培地に加えてよい。

細胞グアニリルシクラーゼ活性を実際に測定することは、本発明にとって重要ではない。さらに、本発明は、この薬剤が細胞グアニリルシクラーゼ活性の増加（あるいは増加しない）に作用するメカニズム、あるいはいかなるメカニズムによって薬剤が、本発明に従

10

20

30

40

50

ってクリプトウイルスの単離及び／または増殖を可能及び／または促進に作用するかには関係がない。

細胞グアニリルシクラーゼ活性を増加する薬剤の有用な例は、最もこのましくは、グアノシン3'，5' - 環状一リン酸（「サイクリックGMP」）（遊離酸、または好ましくは、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、またはアンモニア塩などのような、それらの薬剤認容性塩）、インスリン（好ましくは、ヒトイインスリン）、亜鉛ジカチオン（好ましくは、塩化物、硫酸塩、炭酸塩、炭酸水素塩、硝酸塩、酢酸塩またはその他の薬剤認容性塩）、あるいはこれらの任意または全ての組み合わせを含む。

サイクリックGMPが人工水性培地に使用される濃度は、約0.05～約5mMであることが好ましい。さらに好ましくは、培地中のサイクリックGMP濃度は、約0.5～約2.5mMであり、最も好ましくは、約0.75～約1.25mMである。濃度が約5mM以上のサイクリックGMPは、クリプトウイルスの培養、増殖、または単離には至適ではない。

#### 【0016】

人工水性培地中のインスリンの好ましい濃度範囲は、約1～約10mg/L、さらに好ましくは約2～約6mg/L、そして最も好ましくは約3～約5mg/Lである。

人工水性培地中の亜鉛ジカチオンの好ましい濃度範囲は、約0.05～約0.25mg/L  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ に当量であり、さらに好ましくは、約0.10～約0.20mg/L  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ に当量であり、または最も好ましくは、約0.13～約0.15mg/L  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ に当量である。

他方、ある実施形態では、細胞グアニリルシクラーゼ活性を増加する薬剤は、一酸化窒素または一酸化窒素ドナーである。一酸化窒素ガスは、生物膜を介して完全に浸透性である。吸入可能な一酸化窒素ガスは、例えば、当該分野で公知の制御ガス混合物のマスクによって哺乳類に投与することができる（例えば、Kieler Jensen, N.ら, *Inhaled nitric oxide in the evaluation of heart transplant candidates with elevated pulmonary vascular resistance*（肺血管抵抗性が増大した心臓移植候補患者の評価における吸入一酸化窒素）, "J Heart Lung Transplant." 13(3) : 366～75 [1994]、Rajek, A.ら, *Inhaled nitric oxide reduces pulmonary vascular resistance more than prostaglandin E(1) during heart transplantation*（一酸化窒素の吸入は、心臓移植中にプロスタグランジンE(1)よりも肺血管抵抗性を低下させる）, "Anesth Analg." 90(3) : 523～30 [2000]、Solina, A.ら, *A comparison of inhaled nitric oxide and milrinone for the treatment of pulmonary hypertension in adult cardiac surgery patients*（成人心臓手術患者における肺高血圧症治療向けの一酸化窒素吸入とミルリノンの比較）, "J Cardiothorac Vasc. Anesth." 14(1) : 12～17 [2000]、Fullerton, D.A.ら, *Effective control of pulmonary vascular resistance with inhaled nitric oxide after cardiac operation*（心臓手術後の一酸化窒素吸入による肺血管抵抗性の有効なコントロール）, "J Thorac Cardiovasc Surg" 111(4) : 753～62, ディスカッション 762～3 [1996]）。一酸化窒素(NO)ガス混合物濃度は、好ましくは約1～100ppm NO、さらに好ましくは約4～80ppm NO、そして最も好ましくは約20～40ppm NOである。ガス混合物はまた、酸素、及び窒素、及び／または、二酸化炭素、ヘリウム、またはアルゴンのようなその他の不活性ガスを適當な濃度で含む。

一酸化窒素ドナーは、生物系に適用されるとNO関連生理学的活性を産する化合物であ

10

20

30

40

50

る。したがって、NOドナーは、内因性NO関連応答を模倣したり、または内因性NO欠乏症を代償することができる。当業者は、生物系においては、種々のNOドナー(NO<sup>+</sup>、NO<sup>0</sup>またはNO)によって遊離され得る少なくとも3つのレドックス状態があり、その全てが、本発明の目的には、用語「一酸化窒素」または「NO」によって包含されることを認識しよう。NOのレドックス状態は、その他の生物分子、副産物のプロファイル、並びに生物応答に対するNOドナー反応性に対して有意な相違を生じる(Feelisch, M., The use of nitric oxide donors in pharmacological studies(薬理学的研究における一酸化窒素ドナーの用途), "Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol." 358: 113~22 [1998])。NOドナーのあるクラスは酵素の触媒作用を必要とし、その他は非酵素的にNOを产生し、あるNOドナーは、NOを遊離するためには、例えは、チオールによる還元を、あるものは酸化を必要とする。

一酸化窒素ドナーの好ましい例は、単価及び多価アルコールの硝酸エステルである、有機硝酸塩化合物を含む。典型的には、これらは水溶解性が低く、原液はエタノールまたはジメチルスルホキシド(DMSO)中で調製される。三硝酸グリセリル(GTN)またはニトログリセリン(NTG)、四硝酸ペンタエリトリチル(PETN)、二硝酸イソソルビド(ISDN)、及び5-一硝酸イソソルビド(IS-5-N)がその例である。有機硝酸塩の投与は、静脈内、腹腔内、筋肉内、経皮、またはPETN、ISDN、NTG、並びにIS5Nの場合は経口で行うことができる。

#### 【0017】

一酸化窒素ドナーのその他の好ましい例は、S-ニトロソ-N-アセチル-D,L-ペニシルアミン(SNAP)、S-ニトロソグルタチオン(SNOG)、S-ニトロソアルブミン、S-ニトロソシステインを含む、S-ニトロソチオール化合物である。S-ニトロソチオール化合物は特に光過敏性であり、氷上で暗所に保存した原液は数時間安定性であり、安定性を増強するために、EDTAのようなキレート剤を原液に加えてもよい。投与は、静脈内または動脈内ルートによることが好ましい。

一酸化窒素ドナーのその他の好ましい例は、モルシドミン(N-エトキシカルボニル-3-モルホリノ-シドノンイミン)、リンシドミン(SIN-1、3-モルホリノ-シドノンイミンまたは3-モルホリニルシドノネイミン、または5-アミノ-3モルホリニル-1,2,3-オキザジアゾリウム、例えは塩化物塩)、そしてピルシドミン(CAS 936)のようなシドノンイミン化合物を含む。原液は典型的にはDMSOまたはDMFで調製し、遮光状態では、4~室温で安定性がある。リンシドミンは、水溶解性が高く、約pH 5に調整された脱酸素化蒸留水で作製された酸性溶液中で一日中安定である。生理学的pHでは、SIN-1は迅速に非酵素的に加水分解されて、暗所、pH 7.4で安定性のある、より好ましい一酸化窒素ドナーである開環型SIN-1Aになる。投与は、静脈内または動脈内ルートによることが好ましい。

また、ニドロブルシドナトリウム(SNP、ペンタシアノニトロシル鉄(II)酸ナトリウム)のようなニトロシル鉄化合物は一酸化窒素ドナーとしても有用である。水性原液は、使用前に脱酸素水で新鮮に作製して暗所に保存することが好ましく、原液の安定性は、pH 3~5で増大する。グルタチオンのような生理学的許容性のあるチオールを送達緩衝液に含むと、NOの遊離を増大し得る。SNPは静脈内注入によって投与され、熟達した医師は、NOが遊離されると1モルのSNPあたり5当量の有毒CNが遊離されるために、長期使用は禁止されていることを理解しよう。

最も好ましい一酸化窒素ドナーは、所謂NONOエート(NONOate)化合物から選択される。NONOエートは、アミンまたは亜硫酸塩基のような求核性残基(X)とNOの付加物であり、NO二量体は、窒素原子を介して求核性残基に結合して、X[N(O)NO]構造体の官能基を形成する。NONOエートは典型的には、生物学的反応物質にほとんど影響されることなく予測可能な速度でNOを遊離し、そしてNO遊離は、酸触媒による解離によると考えられ、XとNOの再生を伴う。

NONOエートは、最も好ましくは、ジエチルアミン-NONOエート(DEA/NO

10

20

30

40

50

、N - エチルエタンアミン : 1 , 1 - ジエチル - 2 - ヒドロキシ - 2 - ニトロソヒドラジン (1 : 1) 、または 1 - [ N , N - ジエチルアミノ ] ジアゼン - 1 - イウム - 1 , 2 - ジオラート ) を含む。その他の好ましいNONOエートは、ジエチレントリアミンNONOエート (DETA / NO、2 , 2' - ヒドロキシニトロソヒドラジノ) ビス - エタンアミン ) 、スペルミン - NONOエート (SPER / NO、N - (4 - [ - 1 - (3 - アミノプロピル) - 2 - ヒドロキシ - 2 - ニトロソヒドラジノ] プチル) - 1 , 3 - プロパンジアミン ) 、プロピルアミノ - プロピルアミン - NONOエート (PAPA / NO、3 - (2 - ヒドロキシ - 2 - ニトロソ - 1 - プロピルヒドラジノ) - 1 - プロパンアミンまたは (Z) - 1 - [ N - (3 - アミノプロピル) - N - (n - プロピル) アミノ ] ジアゼン - 1 - イウム - 1 , 2 - ジオラート ) 、MAHMA - NONOエート (MAMHMA / NO、6 - (2 - ヒドロキシ - 1 - メチル - 2 - ニトロソヒドラジノ) - N - メチル - 1 - ヘキサンアミン ) 、ジプロピレントリアミン - NONOエート (DPTA / NO、3 , 3' - (ヒドロキシニトロソヒドラジノ) ビス - 1 - プロパンアミン ) 、PIPERAZI / NO 10 、プロリ - NONOエート (PROLI / NO、1 ( [ 2 - カルボキシラト ] ピロロリジン - 1 - y 1 ) ジアゼン - 1 - イウム - 1 , 2 - ジオラート - メタノール、例えば二ナトリウム塩 ) 、SULFO - NONOエート (SULFO / NO、ヒドロキシジアゼンスルホン酸 1 - オキシド、例えば、ニアンモニウム塩 ) 、亜硫酸NONOエート (SULFI / NO) 、及びアンゲルス塩 (Angelis salt) を含む。

## 【0018】

ほとんど全てのNONOエート化合物は、水溶解性が高く、原液は使用直前に冷脱酸素化 1 ~ 10 mM NaOH (好ましくは約 pH 12) で調製される。アルカリ原液は、冷暗所、氷上で保存する場合は数時間は安定である。NONOエートのUV吸光度特性は、NONOエート水溶液の分光光度法による数量化に使用することができる。NONOエートは、静脈または動脈内投与することが好ましい。

一酸化窒素ドナーは、異なる力価を有する (Ferraro, ら, Comparative effects of several nitric oxide donors on intracellular cyclic GMP levels in bovine chromaffin cells correlation with nitric oxide production (ウシクロム親和性細胞の一酸化窒素産生における細胞内サイクリックGMPレベルに対するいくつかの一酸化窒素ドナーの比較的影響), "Br. J. Pharmacol." 127 (3) : 779 ~ 87 [1999])。例えば、DEA / NOは、その半減期が約 2 ~ 4 分である、最も力価が高い一酸化窒素ドナーに含まれ、PAPA / NO ( $t_{1/2}$  が約 15 分) と SPER / NO (早く  $t_{1/2}$  が 34 ~ 40 分) はそれよりは力価が低く、DETA / NO ( $t_{1/2}$  は約 20 時間) と SNAP ( $t_{1/2}$  は約 33 ~ 41 時間、グルタチオンのような生理学的還元剤が存在する場合はこの時間は短縮される) はさらに力価が低い。SNP はまた力価が高いNOドナーである。(Ferreroら[1999]、Salom, J. B. ら, Relaxant effects of sodium nitroprusside and NONOates in rabbit basilar artery (ニトロブルシドナトリウムとNONOエートのウサギ基底動脈における弛緩薬効果), "Pharmacol" 57 (2) : 79 ~ 87 [1998]、Salom, J. B. ら, Comparative relaxant effects of the NO donors sodium nitroprusside, DEA / NO and SPER / NO in rabbit carotid arteries, (ウサギ頸動脈における、NOドナー、ニトロブルシドナトリウム、DEA / NO及びSPR / NOの比較的弛緩薬効果)、"Gen. Pharmacol." 32 (1) : 75 ~ 79 [1999]、Salom, J. B. ら, Relaxant effects of sodium nitroprusside and NONOates in goat middle cerebral artery delayed impairment by global ischemia reperfusion (ヤギ中大脳動脈におけるニトロブルシドナトリウム及びNONOエートの弛緩薬効果は 20 30 40 50

、全虚血性再灌流による機能障害を遅延した），"Nitric Oxide" 3(1) : 85~93 [1999]、Kimura, M.らResponses of human basilar and other isolated arteries to novel nitric oxide donors(ヒト基底及びその他の単離動脈の新規一酸化窒素ドナーに対する応答)，"J. Cardiovac. Pharmacol." 32(5) : 695~701 [1998]。結局、NONOエートまたは他のNOドナーの有効濃度または投与量は可変であるが、日常的スクリーニング法によって決定できる。

有機硝酸塩はバイアルが適切に密封されている限り、数ヶ月から数年保存することができるが、NOドナーの原液は、使用前に新鮮に作製し（それぞれ特定のNOドナーについて適切なpH）、氷上で冷却し、（例えば、アルミニウムフォイルで包んだ暗色ガラスバイアルを使用することによって）遮光することが好ましい。好ましくは、被験体に投与する直前に、最終希釈液を製剤認容性の緩衝液で調製し、強酸性（例えば、塩酸塩）またはアルカリ性（例えばNONOエート）原液を使用する場合は特に、NOドナー含有緩衝液の最終pHが生理学的適合性のあることがチェックされる。10

NO曝露時間及びNO濃度の結果は、外から供給されたNOに対する生物応答の質と度合いを多くの場合決定する。DEA/NOのような短命NOドナーは、NOの短期的バーストのみの送達を避けるために、ボーラスというよりはむしろ連続注入によって投与することが最も好ましい。

#### 【0019】

本発明に従って、人工水性培地は、必須ではないが、さらに約0.5~約5mMの好ましい濃度のグルタミンを含むことが好ましい。培地中のさらに好ましいグルタミン濃度は、約1~約3mMである。20

本発明によるクリプトウイルスピリオンの単離とクリプトウイルスで非増殖型感染された哺乳類細胞株の產生の方法において、PBMNCは、前述のように人工水性培地中で哺乳類羊膜細胞と共に培養される。

有用な哺乳類細胞の例は、限定はされないが、齧歯類、ウサギ、靈長類、ヒツジ、ウシ、イヌ、ネコまたはブタ細胞を含む。

本発明に従って、一つの好ましい実施形態は、靈長類細胞、即ち、靈長類を源とする細胞である。靈長類は、哺乳類目のメンバーで、キツネザル、メガネザル、サル（例えば、アフリカミドリザル、コロブスモンキー、及びバブーン）、類人猿（例えば、チンパンジー、ゴリラ、オランウータン、及びギボン）、並びにヒトを含む。30

羊膜細胞は、羊膜または羊膜腔を起源とする培養細胞である。

好ましい靈長類羊膜細胞は、ヒト羊膜細胞、例えばAV<sub>3</sub>である。

本方法によって非増殖型感染された本発明の細胞の例は、ATCC受託番号（）として寄託されている、AV<sub>3</sub>/SSPEである。

これらの発明の方法では、PBMNCと哺乳類羊膜細胞共培養物の継代培養は1回以上行われる。培養細胞の新鮮培地（前述の培地）への継代培養は、典型的には一週間あたり2回行われる。本発明に従って、少なくとも約2~約12継代培養を行うことが好ましい。典型的には共培養を8~12継代すると、実質的に全ての哺乳類羊膜細胞がクリプトウイルスによって非増殖型感染される。一般的には、約2~約3継代のうちに、PBMNCは培養基から消失して、哺乳類羊膜細胞のみが残る。40

本発明に従って、哺乳類上皮細胞は、哺乳類上皮組織に起源を発する培養細胞である。一つの好ましい実施形態では、哺乳類上皮細胞は、仔ハムスター腎臓（BHK）細胞のような、齧歯類上皮細胞である。他の好ましい実施形態では、哺乳類上皮細胞は、例えば、VeroまたはCV-1細胞のようなサル上皮細胞である。最も好ましくは、CV-1細胞は、亜株CV-1c細胞である。

本発明のクリプトウイルス粒子を同定するために本願に提供された配列情報に加えて、本発明のクリプトウイルスとそのウイルスサブコンポーネントは、以下に例示するものを含む、数々のウイルス学的、生化学的、及び分子技術によって特徴づけすることが可能であり、これが実行されてきた。50

プラーク滴定アッセイ：单層の哺乳類上皮細胞（例えば、BHK、Vero、またはCV-1<sub>c</sub>）上に肉眼で可視なプラーク形成を使って、感染性クリプトウイルスの調製物を定量することができる（Robbinsら，“J. Infect. Disease” 143: 396~403, 1981）。

中和滴定アッセイ：プラーク形成は、臨床血清検体及びウサギで產生したクリプトウイルス特異的抗血清の段階希釈で阻害され得る（例えば、Robbinsら，“J. Infect. Disease” 143: 396~403, 1981）。中和滴定アッセイは、所定の患者がある特定のウイルスに対する中和抗体を有することを実証するために医学ウイルス学研究において日常的に使用される。中和アッセイは、クリプトウイルスに対する中和抗体の有無についての診断に使用することができる。中和アッセイの典型例では、検査対象の血清またはCSFサンプルのような生物材料の段階希釈は、一般的には、最終プレーティング濃度が最終希釈液（希釈血清またはCSFを含む）0.2mLあたり約100~200プラーク形成単位のウイルスとなるように、十分に感染性のあるウイルスを加えて4で約1時間インキュベートする。インキュベーション後、約0.2mLの希釈ウイルス-血清（またはCSF）混合物を、典型的には单層の感受性細胞（例えば、VeroまたはCV-1）に播種して、細胞を部分的CO<sub>2</sub>大気（例えば5%（容積/容積））中37でインキュベートする（典型的には15分ごとに接種物を攪拌する）。インキュベーション期間の終わりに、接種された单層は、典型的には、十分量の2%（重量/容量）カルボキシメチルセルローズ溶液を含有する人工水性細胞培養基（例えば、一般的にはウシ胎児血清及び約200ユニットペニシリノン/mL及び/または100μgストレプトマイシン/mLのような適量の抗生物質を含み、pH約6.8~約7.4に緩衝された、IMEMZO培地）で、10~12日間存続するようにオーバーレイされる（即ち、单層が乾燥しないために十分な量）。至適には、インキュベーション期間中はプレートを移動してはならない。10~12日後、オーバーレイを吸引除去して、細胞をホルマリン固定液で固定して、タンパク質染色（例えば、ギムザ）を行う。各プレート上に形成されたプラーク数を次に列挙して、PRD<sub>50</sub>を計算する（PRD<sub>50</sub>=プラーク減少希釈度、コントロール[ウイルスと生理食塩水のみを含む試験管]上に形成されたプラーク数を50%減少する血清またはCSFの希釈）。

#### 【0020】

密度勾配精製法：増殖型（例えば、Vero及びCV-1<sub>c</sub>）並びに非増殖型感染（例えば、AV<sub>3</sub>/SSPE）細胞由来のビリオン及び細胞ヌクレオカプシドをショ糖-酒石酸カリウム勾配（ビリオン）及びCsCl勾配（ヌクレオカプシド）上で精製することができる（Robbinsら，“J. Infect. Disease” 143: 396~403, 1981、RappとRobbins, “Intervirology” 16: 160~167, 1981、RobbinsとRapp, “Arch. Virol.” 71: 85~91, 1982、及びRobbinsとAbbott-Smith, “J. Virol. Meth.” 11: 253~257, 1985を参照）。

電子顕微鏡：トランスマッショントラック型電子顕微鏡の検査に有用である。電子顕微鏡で検査すると、クリプトウイルスは、パラミクソウイルス科のその他のメンバーに一貫する形態と超微細構造を有することが示された（即ち、直径約100nm~約120nm、らせん状ヌクレオカプシドを含む、エンベロープ型多形性ビリオン）。増殖型（例えば、Vero及びCV-1<sub>c</sub>）並びに非増殖型感染（例えば、AV<sub>3</sub>/SSPE）細胞の薄切片中にあるウイルスの細胞内封入体は、パラミクソウイルス科のその他のメンバーのヌクレオカプシドに類似する寸法を有する糸状構造から成る凝集体から成ることが示されている（Robbinsら，“J. Infect. Disease” 143: 396~403, 1981及びRobbinsとRapp, “Arch. Virol.” 71: 85~91, 1982を参照）。

放射免疫沈降(RIP)アッセイ：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-PAGE、以下参照)による、[<sup>35</sup>S]-メチオニン標識した未感染、非

10

20

30

40

50

増殖型並びに増殖型感染、哺乳類細胞のクリプトウイルス特異的免疫沈降物の比較分析によって広範なデータが生成されている。

S D S - P A G E：精製ビリオンとウイルスの細胞質ヌクレオカプシドは、還元及び非還元条件下（図11と図12を参照）でS D S - P A G Eによって分析され、これは還元条件下でS D S - P A G E後に急性感染されたV e r o細胞において產生された、勾配・精製[<sup>35</sup>S]—メチオニン標識クリプトウイルスピリオンのオートラジオグラムである。図11の右側に表示されているタンパク質の見かけ分子量は、分子量が既知であるマーカータンパク質（Sigma Chemical Co., St. Louis, MO）に対するその移動を比較することによって計算された。MWが約5kDである小型エンベロープ関連タンパク質である、SHタンパク質は、ゲルを流出してしまったために、図11には示されていない。10

免疫 - 超微細構造分析（Immunogold分析）：非増殖型及び増殖型感染哺乳類細胞の細胞内ヌクレオカプシドは、典型的には、クリプトウイルス特異的またはクリプトウイルスピリオン特異抗体、例えば過免疫ウサギ抗体、並びに間接的Immunogold標識技術（以下に説明）を用いて、電子顕微鏡下でその場所を突きとめられる。20

先述は、本発明の単離クリプトウイルスピリオンを特徴づけるために典型的に有用な公知技術の、徹底的な一覧ではなく、単に例示である。その他の従来の技術、または未だ発見されていないウイルス学による技術はまた、本発明のクリプトウイルスピリオンをさらに特徴づけるために利用し得る。20

クリプトウイルスのさらなる特徴は以下を含む：

潜伏性と持続性 クリプトウイルスは、ヒト末梢血单核細胞（PBMNC）を潜伏かつ持続感染する。パラミクソウイルス科のその他のメンバーはいずれもこれを示さない。感染の証拠は、（1）インビトロ培養及びマイトジェン及び/またはサイクリックGMPによる誘導後のPBMNC中での間接的免疫蛍光抗体法によるクリプトウイルス特異的タンパク質の検出、（2）哺乳類細胞で連続共培養することによるPBMNCからのウイルスの回収（Robbinsら、"J. Infect. Dis." 143: 396~403, 1981を参照）、並びに（3）18ヶ月の期間に渡り、SSPE患者から採取されたPBMNCから反復してウイルスを回収できること、を含む。30

#### 【0021】

融合活性の欠陥 パラミクソウイルス科の特徴である細胞融合が、クリプトウイルスの実験的インビトロ感染では欠陥性があるか、または極めて制限されている（即ちヒト羊膜細胞（AV<sub>3</sub>）の劣性非増殖型感染及びサル腎細胞の増殖型感染）（例えば、Vero及びCV-1c、Robbinsら、"J. Infect. Dis." 143: 396~403, 1981, 及びRobbinsとRapp, "Arch. Virol." 71: 85~91, 1982を参照）。

潜伏感染細胞における限定発現 クリプトウイルス特異的タンパク質発現は、哺乳類羊膜細胞（例えば、ヒトAV<sub>3</sub>細胞）の実験的非増殖型潜伏発現では劣性である。この限定は、ウイルスによってコードされるエンベロープタンパク質（F, HN及びSH）の極度な発現低下、あるいは非発現に関連する（RobbinsとRapp, "Arch. Virol." 71: 85~91, 1982を参照）。40

B細胞リンパ向性 クリプトウイルスは、B細胞向性を示し、したがって係る細胞の生体内原位置に潜伏し得る。これは、ヒトドナー由来のEBV形質転換B細胞株をこのウイルスで感染させることによって（即ち、クリプトウイルス特異的免疫蛍光法によって、実験的感染されたEBV形質転換B細胞株の細胞質中にクリプトウイルス特異的封入体の形成が進行することを検出することによって）、実証されている。対照的に、クリプトウイルス特異的タンパク質は、実験的に感染されたヒトT細胞株であるCCR5-CEMにおいては検出されなかった。したがって、クリプトウイルスは、感染個体中ではB細胞に存在し得る。

向神経性 クリプトウイルスはまた、新生児動物の脳内接種後、（クリプトウイル50

ス特異的免疫蛍光法によって検出されるように）、マウスにおいてニューロンに明らかな向性を実証する。その他の神経系組織が感染されるか否かについては不明である。パラミクソウイルス科のその他のヒトメンバー（例えば、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス）と比較、対照する場合、向神経性それ自体はクリプトウイルスに独特ではないが、CNS組織（ニューロンを含む）のクリプトウイルス感染の神経病理学的結果のいくつかは独特であると思われる（以下参照）。

後肢萎縮症と麻痺 後肢麻痺と萎縮症は、新生児時にクリプトウイルスを脳内接種されたQuackenbushマウスの約33%において観察された。さらに、新生児時にクリプトウイルスを接種されたが、顕性症状を発症しなかった成熟メスQuackenbushマウスの子孫のあるものにおいて、後肢萎縮症と麻痺が観察された。後者の場合の症状出現頻度は、係る特徴を持って生まれて、後に発症するような新生児動物を母親が共食いする傾向があるために、評価が困難であった。  
10

亜急性／緩徐進行性脳症及びテンカン原性の潜在性 感染性クリプトウイルス調製物を接種された新生児有色マウスの約30%が亜急性／緩徐進行性脳症及び／またはテンカン様疾患を発症した（係る動物によって呈示される特定の症状は以下に説明する）。実際に脳症及び／またはテンカン様疾患を発症した動物の数は、30%を超えると思われる、その理由は、過去に無症状であった動物の何匹かがケージの中でクローヌス体位（難治性テンカン発作後あるいは発作中の死亡に関連する症状）で死亡していたのが発見されたからである。少なくとも2つのケースでは、前日に反復性テンカン発作を発症した動物に生じた。係る疾患を発症した動物は優先的にオスであった（約2：1、オス：メス）。  
20

緩徐進行性精神病の潜在性 新生児時の感染性クリプトウイルス調製物の脳内接種を生存して、青年期または若年成体動物時にテンカン様疾患を発症しなかった有色マウスのうち、約30%が成体時に著明な身体及び行動異常を発症した。これらの動物が呈示した異常性を以下に説明する。これらの動物群では突然死は観察されなかった。係る疾患を発症した動物は優先的にメスであった（約3：1、メス：オス）。

前述は、本発明のクリプトウイルスの観察可能な特性のいくつかの単なる例示であり、徹底的な一覧ではない。

#### 【0022】

本発明はまた、「クリプトウイルス特異的」、即ち、クリプトウイルスに独特、である单離核酸及び单離タンパク質に関する。  
30

クリプトウイルス特異的核酸セグメントまたはタンパク質は、塩基またはアミノ酸の既知配列、例えば、その他のルプラウイルス核酸またはタンパク質配列、との配列類似性またはホモロジー（相同性）によって決定される。塩基及びアミノ酸配列ホモロジーは、PowerBLAST、QBLAST、PSI-BLAST、PHI-BLAST、gappedまたはungapped BLAST、またはBaylor College of Medicine server（バイエル医科大学サーバ）（www.hgsc.bcm.tmc.edu/seq\_data）を使用する「オンライン」プログラムのようなコンピュータ化アルゴリズムを使用して、National Center for Biotechnology Information（国立バイオテクノロジーアイノベーションセンター）のGenBankデータベース（NCBI；www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/）のようなゲノム科学／プロテオミックスデータベースの配列類似性検索を行うことによって決定される。（例えば、Altchul, S. F.,ら、Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs（Gapped BLASTとPSI-BLAST：新世代のタンパク質データベース検索プログラム），"Nucleic Acids Res." 25(17):3389~402 [1997]、Zhang, J., & Madden, T. L., PowerBLAST: a new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation（PowerBLAST：インターラクティブまたは自動配  
40

列分析と注釈用の新ネットワークBLASTアプリケーション) , "Genome Res." 7(6) : 649~56 [1997]、Madden, T. L., ら, Applications of network BLAST server(ネットワークBLASTサーバのアプリケーション) , "Methods Enzymol." 266:131~41 [1996]、Altschul, S. F., ら, Basic local alignment search tool(基本ローカルアライメント検索ツール) , "J. Mol. Biol." 215(3) : 403~10 [1990])。

本発明の目的では、「単離」という用語は「精製」を包含する。したがって、高度に均質までさらに精製される、単離核酸、タンパク質、ウイルス粒子、または抗体は、また「単離」される。  
10

本発明の目的では、「核酸」という用語は、任意の長さの、重合リボヌクレオチド(RNA)または、cDNAのような重合デオキシリボヌクレオチド(DNA)である、ポリヌクレオチドを含む。

「単離核酸」という用語は、クリプトウイルスゲノムが天然に会合するポリペプチドを実質的には含まず、即ち、約50%以下、好ましくは約70%以下、そしてそれよりもさらに好ましくは約90%以下含むクリプトウイルスゲノムRNAを意味する。他方、本発明の「単離」核酸は、クリプトウイルス特異的「組換えポリヌクレオチド」であり、これは本願で使用する場合は、ゲノムRNA、センスRNA(即ち、mRNAセンス)、cDNA、半合成、または合成起源を意味し、その起源または操作によって：(1)天然で会合するポリヌクレオチドの全てまたは一部と会合しない、(2)天然で結合するポリヌクレオチド以外のポリヌクレオチドと結合する、あるいは(3)天然では発生しない。本発明の核酸は、センスまたはアンチセンス方向であり得る。  
20

本願で使用する際は、核酸の「センス鎖」は、その配列のmRNAと配列ホモジジーを有する配列を含む。「アンチセンス鎖」は、「センス鎖」配列に相補な配列を含む。本発明の核酸はまた、二本鎖及び一本鎖DNAとRNAを含む。

ウイルス粒子からウイルスポリヌクレオチドを精製する技術は当該分野で公知であり、例えば、カオトロピック試薬による粒子の破壊、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、及び密度勾配沈降法による、ポリヌクレオチド(複数でもよい)及びポリペプチドの分別抽出と分離を含む。

### 【0023】

本発明の核酸はまた、例えば、標識、メチル化、「キャップ」のような公知のタイプの修飾、1つ以上の天然ヌクレオチドのヌクレオチド類似体による置換、例えば、無電荷結合(例えば、メチルホスホナート、ホスホトリエステル、ホスホアミダート、カルバミン酸塩等)及び電荷結合(例えば、ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート等)を有するポリヌクレオチドのようなインターヌクレオチド修飾、例えば、タンパク質(例えば、ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジン等)のようなペンドント成分を含むもの、インターラーザー(挿入剤)(例えば、アクリジン、ソラレン等)を有するもの、キレート剤(例えば、金属、放射性金属、ホウ素、酸化型金属等)を含むもの、アルキル化剤を含むもの、修飾結合を有するもの(例えば、アノマー核酸など)、並びにポリヌクレオチドの未修飾形態を包含する。  
40

「核酸セグメント」は、大型核酸のポリヌクレオチドサブポーションである。

本発明のクリプトウイルス特異的ヌクレオチド配列に相補なヌクレオチド配列は、本願で使用する際は、クリプトウイルス特異的ヌクレオチド塩基配列と特異的に結合またはハイブリダイズする配列である。「特異的に結合する」あるいは「ハイブリダイズする」という表現は、ポリヌクレオチド配列が、相補塩基配列を認識して、相補塩基対間に水素結合を形成することによって二重らせんセグメントを形成する能力を包含する。したがって、相補配列は、例えば、センス配列またはコード配列に対するアンチセンス配列を含む。当業者には公知であるように、ハイブリッドの安定性は、そのハイブリッドの融点( $T_m$ )に反映される。一般的には、ハイブリッドの安定性は、ナトリウムイオン濃度と温度の関数である。典型的に、ハイブリダイゼーション反応は、比較的低いストリングエンシー  
50

条件下で行われるがその後、異なる、しかしそれ高い、ストリンジエンシーで洗浄が行われる。ハイブリダイゼーションの厳密性（ストリンジエンシー）の基準は、そのような洗浄条件に関連する。

本願で使用する際は、「中程度にストリンジエントなハイブリダイゼーション」という表現は、標的RNAまたはDNAが、その標的RNAセグメントまたはDNAセグメントに対して少なくとも約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、あるいは約100%同一性を有する相補核酸と結合することを可能にする条件を意味する。好ましくは、中程度ストリンジエントな条件は、50%ホルムアミド、5×デンハート液、5×SSPE、0.2%SDS中、42でハイブリダイゼーションを行い、0.2×SSPE、0.2%SDS中、65で洗浄を行う場合のストリンジエンシーにほぼ等価な条件である。10

「高ストリンジエンシーハイブリダイゼーション」という表現は、0.018MNaCl中、65で安定なハイブリッドを形成する核酸配列のみのハイブリダイゼーションを可能とする条件を意味する（即ち、ハイブリッドが0.018MNaCl中、65で安定でなければ、それは本願で意図するような高ストリンジエンシーケンス条件下で安定ではない）。高ストリンジエンシーケンス条件は、例えば、50%ホルムアミド、5×デンハート液、5×SSPE、0.2%SDS中、42でハイブリダイゼーションを行い、0.1×SSPE、0.1%SDS中、65で洗浄を行うことによって提供され得る。20

「低ストリンジエンシーハイブリダイゼーション」という表現は、典型的には、10%ホルムアミド、5×デンハート液、6×SSPE、0.2%SDS中、42でハイブリダイゼーションを行い、1×SSPE、0.2%SDS中、50で洗浄を行う場合に等価な条件である。デンハート液及びSSPE（例えば、*Sambrookら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual*（分子クローニング、実験マニュアル），Cold Spring Harbor Laboratory Press [1989]）は、その他の適切なハイブリダイゼーション用緩衝液と同様に、当業者には公知である。30

本発明の核酸は、配列番号1または相補配列の、少なくとも5隣接ヌクレオチド、そして15245隣接ヌクレオチドまでの長さのクリプトウイルス特異的核酸フラグメントを含む。30

#### 【0024】

したがって、有用なフラグメントは、クリプトウイルスゲノムまたは相補配列の翻訳領域から成る核酸セグメントを含む。「翻訳領域」（ORF）は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の領域であり、この領域は、コード配列の一部または全コード配列に相当し得る。

「コード配列」は、適切な調節配列のコントロール下に置かれると、mRNAに転写及び/またはポリペプチドに翻訳されるポリヌクレオチド配列である。コード配列の境界は、5'末端にある翻訳開始コドンと3'末端にある翻訳終止コドンによって決定される。コード配列は、限定はされないが、mRNA、cDNA、及び組換えポリヌクレオチド配列を含み得る。40

フラグメントの有用な例は、クリプトウイルスタンパク質をコードする以下のような核酸セグメントを含む：(i)（配列番号1）の隣接ヌクレオチド位置152～1678（[配列番号3]とも指定される）、(ii)（配列番号1）の隣接ヌクレオチド位置1850～2515（[配列番号5]とも指定される）、(iii)（配列番号1）の隣接ヌクレオチド位置1850～3023（[配列番号33]とも指定される）、(iv)（配列番号1）のヌクレオチド位置2339と（配列番号1）のヌクレオチド位置2340の間にさらに2つのグアニン残基の挿入を結合している（配列番号1）の隣接ヌクレオチド位置1850～3023（[GG]挿入を含む結合配列は[配列番号7]と指定される）、(v)（配列番号1）の隣接ヌクレオチド位置3141～4271（[配列番号9]とも指定される）、(vi)（配列番号1）の隣接ヌクレオチド位置4530～6182（[配列番号11]とも指50

定される)、(vii) (配列番号1)の隣接ヌクレオチド位置4587～6182 ([配列番号13]とも指定される)、(viii) (配列番号1)の隣接ヌクレオチド位置4587～4835 ([配列番号15]とも指定される)、(ix) (配列番号1)の隣接ヌクレオチド位置4836～6182 ([配列番号17]とも指定される)、(x) (配列番号1)の隣接ヌクレオチド位置4272～6515 ([配列番号34]とも指定される)、(xi) (配列番号1)の隣接ヌクレオチド位置6303～6434 ([配列番号19]とも指定される)、(xii) (配列番号1)の隣接ヌクレオチド位置6584～8278 ([配列番号21]とも指定される)、あるいは(xiii) (配列番号1)の隣接ヌクレオチド位置8414～15178 ([配列番号23]とも指定される)。(配列番号3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、または23のいずれかと少なくとも一つのヌクレオチド位置が異なる少なくとも一つのコドンを有するが、参照核酸と同一アミノ酸をコードする、タンパク質コード核酸配列を意味する。例えば、「UCU」、「UCC」、「UCA」、及び「UCG」の三塩基組によって特定されるコドンは、これらのコドン4つの全てがアミノ酸セリンをコードするために、お互いについて縮重である。

本願で使用する際は、「縮重コード配列」、あるいは互換性を持って使用される「縮重配列」という用語は、任意の参照核酸、例えば、配列番号3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、または23のいずれかと少なくとも一つのヌクレオチド位置が異なる少なくとも一つのコドンを有するが、参照核酸と同一アミノ酸をコードする、タンパク質コード核酸配列を意味する。例えば、「UCU」、「UCC」、「UCA」、及び「UCG」の三塩基組によって特定されるコドンは、これらのコドン4つの全てがアミノ酸セリンをコードするために、お互いについて縮重である。

ある実施形態では、クリプトウイルス特異的フラグメントは、最大約500ヌクレオチド長である。その他の実施形態では、フラグメントは約50ヌクレオチド長である。本発明の核酸フラグメントの他の実施形態は、約15ヌクレオチド～約35ヌクレオチド長であり、例えば、これは、核酸增幅反応用のクリプトウイルス特異的オリゴヌクレオチドである、本発明のクリプトウイルス特異的プライマーの好ましい長さである。最も好ましくは、本発明のクリプトウイルス特異的プライマーは、約17～約22ヌクレオチド長であるが、7隣接ヌクレオチドのような短いプライマーが、いくつかの遺伝子特異的配列には有用であり得る。(例えば、Vincent, J., et al., Oligonucleonucleotides as short as 7-mers can be used for PCR amplification (7マーのように短いオリゴヌクレオチドをPCR增幅に使用することができる), "DNA Cell Biol." 13 (1) : 75～82 [1994]).

#### 【0025】

本発明のプローブは、好ましくは約7～約500ヌクレオチド長であり、最も好ましくは約15～約150ヌクレオチド長であり、さらに、少なくともその長さの一部として、適切にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、このプローブがクリプトウイルス特異的一本鎖核酸とハイブリダイズするような、少なくとも7～15ヌクレオチド長であるクリプトウイルス特異的ヌクレオチド配列を含む。例えば、本願に説明される本発明のオリゴヌクレオチドプライマー配列を含むプローブは、核酸増幅産物を含む、クリプトウイルス特異的核酸を検出または分析するためのプローブとして使用するために標識され得る。

プライマーまたはプローブとして有用なクリプトウイルス特異的フラグメントの非限定例は、以下を含む核酸を含む：配列番号1の隣接ヌクレオチド位置1684～1701 (配列番号35と指定)、配列番号1の隣接ヌクレオチド位置1700～1717 (配列番号36と指定)、配列番号1の隣接ヌクレオチド位置4299～4316 (配列番号38と指定)、配列番号1の隣接ヌクレオチド位置4285～4302 (配列番号39と指定)、配列番号1の隣接ヌクレオチド位置4300～4317 (配列番号40と指定)、配列番号1の隣接ヌクレオチド位置4518～4535 (配列番号41と指定)、配列番号1の隣接ヌクレオチド位置4533～4550 (配列番号42と指定)、配列番号1の隣接ヌクレオチド位置6116～6133 (配列番号44と指定)、配列番号1の隣接ヌクレオチド位置6192～6209 (配列番号45と指定)、配列番号1の隣接ヌクレオチ

10

20

30

40

50

ド位置 6191 ~ 6208 (配列番号 43 と指定)、配列番号 1 の隣接ヌクレオチド位置 7501 ~ 7518 (配列番号 46 と指定)、配列番号 1 の隣接ヌクレオチド位置 7517 ~ 7534 (配列番号 47 と指定)、あるいは、前述の配列番号 35 ~ 47 のいずれかに相補なヌクレオチド配列。特にヒト由来の生物材料サンプルまたはそれに由来する増幅産物中の核酸を探索するためにプローブとして特に有用なポリヌクレオチドは、配列番号 1 の隣接ヌクレオチド位置 4292 ~ 4549 を含む核酸 (配列番号 48 と指定) または相補配列である。ヒトからの生物材料サンプル由来の核酸を探索するには、例えば、配列番号 1 の隣接ヌクレオチド位置 4272 ~ 6515 (配列番号 34 と指定) を含む核酸または相補配列のような、配列番号 1 のさらに大型核酸セグメントを使用することができる。

10

プライマーは、適切な条件下に置かれると、ポリヌクレオチド鎖の合成の開始点として作用することができる。プライマーは、コピーされるべきポリヌクレオチド鎖の領域と完全にあるいは実質的に相補である。したがって、ハイブリダイゼーションを導出する条件下では、プライマーは、アナライト鎖の相補領域にアニールする。適切な反応物 (例えば、ポリメラーゼ、ヌクレオチド三リン酸等) を添加すると、プライマーは、重合剤によって伸長して、アナライト鎖のコピーを形成する。プライマーは、一本鎖、または、もう一方の選択肢として、部分的あるいは完全に二本鎖であり得る。

「アナライトポリヌクレオチド」及び「アナライト鎖」という用語は、クリプトウイルス特異的標的配列を含むと推察される、及び生物材料サンプル中に存在し得る、一本鎖または二本鎖核酸分子を意味する。

20

本発明のプローブは、プローブ中にある少なくとも一つのヌクレオチド配列が標的領域にある配列と相補であるために、クリプトウイルス特異的標的配列とハイブリッド構造を形成するポリヌクレオチドから成る構造体である。プローブのポリヌクレオチド領域は、DNA、及び / または RNA、及び / または合成ヌクレオチド類似体によって構成され得る。「標的領域」とは、増幅及び / または検出されるべき核酸の領域を意味する。「標的配列」という用語は、プローブまたはプライマーが望ましい条件下で安定なハイブリッドを形成する、クリプトウイルス特異的配列を意味する。

「捕獲プローブ」及び「標識プローブ」はプローブに含まれる。好ましくは、プローブは、核酸増幅反応を起動するために使用される配列 (複数でもよい) の相補配列を含まない。

30

#### 【 0026 】

「捕獲プローブ」という用語は、本願で使用する際は、結合パートナーと共に役する一本鎖ポリヌクレオチドから成るポリヌクレオチドを意味する。一本鎖ポリヌクレオチドは、アナライトポリヌクレオチドにおいて検出されるべき標的領域にある標的配列と相補である、ターゲティングポリヌクレオチド配列から成る。相補領域は、アナライトポリヌクレオチドを固体表面に (結合パートナーを介して) 不動化するために十分に安定な二本鎖を提供するために十分な長さと標的配列に対する相補性を有する。結合パートナーは、第二結合パートナーについて特異的であり、第二結合パートナーは、固体支持体表面に結合することができるか、あるいはその他の構造体または結合パートナーを介して間接的に固体支持体に結合され得る。

40

「結合パートナー」という用語は、本願で使用する際は、リガンド分子を高特異性に結合可能である分子、即ち例えば、その分子に特異的な抗原及び抗体、を意味する。一般的には、特異的結合パートナーは、単離条件下で、アナライトコピー / 相補の二本鎖 (捕獲プローブの場合) を不動化するために、十分な親和性で結合しなければならない。特異的結合パートナーは当該分野では公知であり、例えば、ビオチン及びアビジンまたはストレプトアビジン、IgG 及びタンパク質 A、多数の公知の受容体リガンド結合、並びに相補ポリヌクレオチド鎖を含む。相補ポリヌクレオチド結合パートナーの場合は、パートナーは一般的には少なくとも約 15 塩基長であり、また少なくとも 40 塩基長であることがあり、さらに G と C 含量が少なくとも約 25 %、最大約 75 % を有する。ポリヌクレオチドは、DNA、RNA、または合成ヌクレオチド類似体から構成され得る。

50

「共役」とは、本願で使用する際は、共有結合あるいは、強い非共有相互作用（例えば、疎水性相互作用、水素結合等）によって連結することを意味する。共有結合は、例えば、エステル、エーテル、ホスホエステル、アミド、ペプチド、イミド、炭素-イオウ結合、炭素-リン結合等である。

「支持体」とは、望ましい結合パートナーが固定され得る固体または半流動体表面を意味する。適切な支持体は、ガラス、プラスチック、金属、ポリマーゲルなどを含み、ビーズ、ウェル、ディップスティック、膜などの形態をとる。

本願で使用する際は、「標識プローブ」という用語は、アナライトポリヌクレオチド中に検出されるべき標的配列に相補である、ターゲティング（標的指向化）ポリヌクレオチドから成るオリゴヌクレオチドを意味する。相補領域は、「標識プローブ」及び「標的配列」から成る二本鎖が標識によって検出されることを可能にするために十分な長さと標的配列に対する相補性を有する。オリゴヌクレオチドは、互いに高特異性を有する1セットのリガンド分子を介して、直接的または間接的に標識と共に役する。10

「標識」は、検出可能（好ましくは定量可能）なシグナルを供給するために使用することができ、例えば、抗体のような、従来の手段によってポリヌクレオチドまたはポリペプチドに連結することのできる任意の原子または成分を含む。標識は、単独あるいは付加試薬と組み合わせて使用し得る。係る標識は当該分野で公知である。標識は、適切な放射線検出手段によって検出される、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、<sup>3</sup>H、または<sup>15</sup>Oのようなラジオアイソotopeであり得る。一方、標識は、有用な免疫蛍光トレーサーである蛍光色素（色素）を形成するために変性することなしに、抗体または抗原と化学的に結合する蛍光標識物質であり得る。免疫蛍光分析技術の説明は、Antibody As a Tool（ツールとしての抗体），Marchalonisら，編集、John Wiley & Sons，Ltd.，pp. 189～231（1982）に掲載されている、De Luca、"Immuno fluorescence Analysis（免疫蛍光分析）"に見られる。その上、任意の多様な蛍光色素をオプションとして使用して、プローブまたはプライマー、あるいは増幅産物を標識して、検出及び／または分析を容易にことができる。有用な蛍光色素は、限定はされないが、ローダミン、フルオレセイン、SYBRグリーンI、Y10-PRO-1、チアゾールオレンジ、Hex（即ち、6-カルボキシ-2'，4'，7'，4，7-ヘキサクロロフルオレセイン）、ピコグリーン、エダンス、フルオレセイン、FAM（即ち、6-カルボキシフルオレセイン）、またはTET（即ち、4'，7'，2'，7' テトラクロロ-6-カルボキシフルオレセイン）を含む。（例えば、J. SkeidsvollとP.M. Ueland, Analysis of double-stranded DNA by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection using the monomeric dye SYBR green I（単量体色素SYBRグリーンIを用いるレーザー誘導蛍光検出を伴うキャピラリ電気泳動による二本鎖DNAの分析），"Anal. Biochem." 231(20): 359～65 [1995]、H. Iwahanaら, Multiple fluorescence-based PCR-SSCP analysis using internal fluorescent labeling of PCR products（PCR産物の内部蛍光標識を用いる複数の蛍光ベースPCR-SSCP分析），"Biotechniques" 21(30): 510～14, 516～19 [1996]）。203040

### 【0027】

本発明の核酸構築物は、本発明の核酸を含む組換えクローニング及び発現ベクター（プラスミド及びレトロウイルスまたはアデノウイルスペクターのようなウイルス発現ベクターを含む）を含む。「ベクター」は、連結されたセグメントの複製及び／または発現を引き起こすために、他のポリヌクレオチドセグメントが連結されたレプリコンである。「レプリコン」とは、細胞内においてポリヌクレオチド複製の自律ユニットとして振る舞い、即ち、レプリコン自体のコントロール下で複製が可能である、例えば、プラスミド、染色体、ウイルス、コスミド等のような任意の遺伝的因子である。本発明の組換え型発現ベク50

ターは、1つ以上の本発明の核酸セグメントを含み、並びに転写ユニット中にある本発明の核酸セグメントに作動可能に連結された少なくとも一つのプロモーター領域を含む。本発明の核酸構築物の好ましい例は、クリプトウイルスタンパク質をコードする1つ以上の核酸セグメントを含む構築物であり、クリプトウイルスコード配列（複数でもよい）が、構築物内の1つ以上の転写ユニット内に適切に配置され且つ適切な調節配列に作動可能に連結されている。

「制御」または「調節」配列、エレメントまたは領域とは、それが結合したコード配列の発現を影響するために必要なポリヌクレオチド配列を意味する。係る制御配列の本質は、宿主生物によって異なるが、原核生物では、係る制御配列は一般的には、プロモーター、リボソーム結合部位、及びターミネーターを含み、真核生物では、一般的に、係る制御配列は、プロモーター、ターミネーター、及びある場合はエンハンサーを含む。「制御配列」という用語は、少なくとも、その存在が発現のために必須である全ての構成要素を含み、また、例えば、リーダー配列のように、その存在が好都合であるその他の構成要素を含むことがある。

本願で使用する際は、「発現」とは、遺伝子がmRNAに転写されて、次にペプチド、ポリペプチド、タンパク質に翻訳されるプロセスを意味する。組換え型発現ベクターに関しては、プロモーター領域は、ベクターが作動可能に連結されているコード配列の転写を制御する核酸セグメントを意味する。プロモーター領域は、RNAポリメラーゼ認識、結合、転写開始に十分な特異的配列を含む。さらに、プロモーター領域は、RNAポリメラーゼのこの認識、結合、並びに転写開始活性をモジュレートする配列を含む。これらの配列は、シス作用性であるか、あるいはトランス作用因子に応答性があり得る。制御の本質に拠っては、プロモーターは、構成的であるか、あるいは発生的または誘導的に制御され得る。本発明の実施において使用された代表的なプロモーターは、SV40初期プロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、マウス乳房腫瘍ウイルス(MMTV)ステロイド誘導性プロモーター、モロニーマウス白血病ウイルス(MMLV)プロモーター等を含む。

哺乳類細胞における外来性遺伝子（例えば、本発明のクリプトウイルス遺伝子）の至適発現のためには、発現ベクターはまたターミネーター配列並びにポリA付加配列を必要とすることがあり、発現を増加するエンハンサー配列、及び遺伝子の增幅を起因する配列もまた望ましい。係る配列は当該分野に公知である。

本願で使用する際は、「作動可能に連結された」という用語は、核酸と、プロモーター、エンハンサー、転写及び翻訳終止部位、並びにその他のシグナル配列のような調節（制御またはエフェクター）ヌクレオチド配列との機能的関係を意味する。例えば、プロモーターに対してDNAまたはRNAが作動可能な連結することとは、そのDNAとRNAをそれぞれ特異的に認識、結合、及び転写するRNAポリメラーゼによって、そのDNAまたはRNAの転写がプロモーターから開始されるような、DNAまたはRNAとプロモーターの間の物理的並びに機能的関係を意味する。コード配列に「作動可能に連結される」調節配列は、調節配列と適合性のある条件下で、コード配列の発現が達成されるように連結される。したがって、例えば、転写ユニット内で、プロモーター配列は、コード配列から上流（即ち、それに関して5'）に位置し、コード配列はプロモーターに対して3'にあるか、または言い換えればプロモーターに対して3'の遺伝子配列または翻訳フレーム内にあり、そして発現がそれによって協調的に制御されている。プロモーター及びコード配列のどちらも5'から3'向きに方向づけられており、したがって、転写は、全ての必須酵素、転写因子、コファクター、アクチベーター、及び反応体が存在すると、望ましい物理的条件下、例えば、適切なpHと温度、インビトロで起こり得る。これは、特定の細胞において、条件が転写を有利にすることを意味するわけではない。例えば、組織特異性プロモーターからの転写は、一般的には異なる組織に由来する異種細胞型ではうまくいかない。

【0028】

クリプトウイルス特異的核酸を含む、本発明の発現ベクターは、細胞を形質転換するた

10

20

30

40

50

めに用いられる。「形質転換」とは、本願で使用する際は、外来性ポリヌクレオチドの宿主細胞内への挿入を意味し、例えば、直接取り込み、トランスフェクション、形質導入、f - 接合、マイクロ粒子ボンバードメント、または電気穿孔法、のような挿入に使用される方法には関係ない。外来性ポリヌクレオチドは、例えば、プラズミドのような非組み込み型ベクターとして、あるいは反対に宿主ゲノムに組み込まれて維持され得る。「形質転換された」宿主細胞とは、形質転換を受けた細胞、並びに当初の外来性ポリヌクレオチドを維持するその子孫を意味する。

適切な発現ベクターは、当業者には公知であり、真核細胞及び／または原核細胞内で複製可能であり、エピソーム性のまま存続するか、あるいは宿主細胞ゲノム中に組み込まれるものと含む。  
10

形質転換された哺乳類細胞における目的タンパク質の少なくともいくつかの発現についての重要な保証を提供する、クローン化ウシパピローマウイルスゲノム、マウスレトロウイルスのクローン化ゲノム、及び pSV-2 gpt 系 (Mulligan and Berg, 1979, "Nature" Vol. 277: 108~114 に記述)、Okayama-Berg クローニング系 ("Mol. Cell Biol." Vol. 2: 161~170, 1982)、pGAL4、pCI (例えば、pCI-neo) のような真核性カセット、及び Genetics Institute (遺伝研究所) ("Science" Vol. 228: 810~815, 1985) によって記述されている発現ベクターを含む、代表的な真核性発現ベクターが利用可能である。

哺乳類細胞のトランスフェクションまたは形質導入のために、本発明の核酸に結合できる調節エレメントを含むベクターが好ましい。pCDNA1 (インビトロジェン (In Vitrogen), San Diego, CA) のようなサイトメガロウイルス (CMV) プロモーターベースのベクター、pMAMNeo (クローニング (Clontech), Palo Alto, CA) 及び pMSG (ファルマシア (Pharmacia), Piscataway, NJ) のようなMMTV プロモーターベースのベクター、並びに pSV (Clontech, Palo Alto, CA) のようなSV40 プロモーターベースのベクターがその例である。本発明の一つの実施形態では、哺乳類細胞を異種クリプトウイルス特異的核酸で形質導入するために、アデノウイルストラ nsフェリン / ポリリジン - DNA (Tf Adp1DNA) ベクター複合体 (Wagnerら, 1992, "PNAS", USA, 89: 6099~6103, Curie1ら, 1992, "Hum. Gene Therapy", 3: 147~154; Gaoら, 1993, "Hum. Gene Ther.", 4: 14~24) が使用される。本願に記述する任意のプラズミド発現ベクターを Tf Adp1DNA 複合体において使用してもよい。  
20

さらに、発現ベクターは、例えば、ヒト免疫不全症ウイルスのようなレトロウイルス、レンチウイルス、ムンプスウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルスのようないくつかのウイルスピリオンによってベクターがパッケージされることを可能にして、その結果「ウイルスペクター」を形成するような適切なパッケージング・シグナルを含み得る。(例えば、Anderson, W. F., Gene therapy scores against cancer (遺伝子療法がガンに勝つ), "Nat. Med." 6(8) : 862~63 [2000] を参照)。これらのウイルスペクターは、例えば、単純ヘルペスウイルスペクター (例えば、Gellerら, 1988, "Science", 241: 1667~1669)、ワクシニアウイルスペクター (例えば、Piccinini ら, 1987, "Meth. in Enzymology", 153: 545~563)、サイトメガロウイルスペクター (Mocarski ら、Viral Vectors (ウイルスペクター), Y. Gluzman and S.H. Hughes, 編集, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988, pp. 78~84)、モロニーマウス白血病ウイルスペクター (Danos ら, 1980, "PNAS, USA", 85: 6469)、アデノウイルスペクター (例えば、Logan ら, 1984, "PNAS, USA" 50

", 81:3655~3659; Jonesら, 1979, "Cell", 17:683~689; Berkner, 1988, "Biotechniques", 6:616~626; Cottonら, 1992, "PNAS, USA", 89:6094~6098; Grahamら, 1991, "Meth. Mol. Biol.", 7:109~127)、アデノ関連ウイルスベクター、レトロウイルスベクター(米国特許第5,252,479号, WIPO(世界知的所有権機関)公報 国際公開番号WO 92/07573、WO 90/06997、WO 89/05345、WO 92/05266、及びWO 92/14829、米国特許番号第4,405,712号と4,650,764号、Shackelfordら, 1988, "PNAS, USA", 85:9655~9659を参照)等を含む。 10

## 【0029】

好みしいウイルスベクターは、モロニーマウス白血病ウイルス及び水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質(VSV-G)-モロニーマウス白血病ウイルスと呼ばれるモロニーウィルス由来のシードタイプレトロウイルスベクターである。最も好みしいウイルスベクターは、HIVウイルス由来のシードタイプ(VSV-G)レンチウイルスベクターであり、これは哺乳類細胞の形質導入に使用される。(Naldini, L., et al., *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector*(レンチウイルスベクターによるインビオ遺伝子デリバリーと非分裂細胞の安定な形質導入), "Science" 272: 263~267 [1996])。この遺伝子デリバリー系は、3プラズミド発現系によって產生されたレトロウイルス粒子を利用する。この系では、パッケージング構築物は、全てのウイルスタンパク質の発現を誘導する、ヒトサイトメガロウイルス(hCMV)最初期プロモーターを含む。この構築物のデザインは、ウイルスのパッケージング、逆転写並びにこれらの転写物の組み込みに重要なシス作用配列を排除する。第二プラズミドは、異種エンベロープタンパク質(env)、即ち、水疱性口内炎ウイルス(VSV-G)のG糖タンパク質、をコードする。第三のプラズミドは、形質導入ベクター(pHR')であり、パッケージング、逆転写、及び組み込みに必要なヒト免疫不全症ウイルス(HIV)のシス作用配列と異種性相補DNA(cDNA)をクローニングするための固有な制限部位を含む。例えば、緑色蛍光タンパク質(GFP)、増強緑色蛍光タンパク質(ECFP)、青色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、蛍光フィヨビリンタンパク質、-ガラクトシダーゼ、及び/または他の予め選択された産物をコードする遺伝子のような遺伝的選択マーカーが、HR'ベクターのhCMVプロモーターの下流にクローン化され、そして転写ユニットを形成するように作動可能に連結される。VSV-Gシードタイプレトロウイルスベクター系は、異なる種由来の広範な細胞を感染して、ゲノム中に組み込むことが可能である。いくつかのレトロウイルス、即ちHIVのようなレンチウイルス、は非分裂細胞を感染する能力を有する。レンチウイルスは、異種DNA配列について限定された能力を有し、このベクターのサイズ制限は7~7.5キロベースである(Verma, I.M.とSomia, N., *Gene Therapy promises, problems and prospects*(遺伝子療法-将来性、問題並びに展望), "Nature" 389:239~242 [1997])。レンチウイルスを用いるインビオ実験は、他のレトロウイルスベクターのように発現が遮断されず、脳、筋肉、肝臓、膵島細胞におけるインビオ発現は、少なくとも6ヶ月以上持続され、これは現在までに試験された最長記録である(VermaとSomia [1997]、Anderson, WF., *Human Gene Therapy*(ヒト遺伝子療法), "Nature" (Suppl). 392:25~30 [1998])。

前記のウイルスの全てが、非病原性または低抗原性にするために修飾を必要な可能性がある。しかしながら、その他の公知ウイルスベクター系は、また本発明の範囲内で有用である。

外来性cDNAの発現に有用で、ワクチン調製に使用され得る、特に有用な発現ベクターは、ワクシニアウイルスである。この場合は、異種cDNAはワクシニアゲノム中に挿

10

20

30

40

50

入される。ワクシニアウイルスゲノム中への外来性cDNAの挿入技術は、当該分野で公知であり、例えば、相同組換えを利用する。異種cDNAの挿入は一般的には、天然では必須ではない、例えば、チミジンキナーゼ遺伝子(tk)中に行われ、これはまた選択性マークターを供給する。組換え型ウイルスの構築を著しく促進するプラズミドベクターが説明されている(例えば、Mackettら(1984)"DNA Cloning(DNAクローニング)"Vol II IRL Press, p. 191, Chakrabartiら(1985), "Mol. Cell Biol."5:3403, Moss(1987)"Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(哺乳類細胞用の遺伝子転移ベクター)"(Miller and Calos, 編集, p. 10)、を参照)。免疫反応性領域を含む所望のポリペプチドの発現が次に細胞、及び、生存組換え型ワクシニアウイルスで感染及び/または免疫された哺乳類内で生じる。  
10

### 【0030】

本発明の「核酸構築物」はまた、ベクターに含まれていない構築物、例えば、ホスホチオアートオリゴデオキシヌクレオチドのような合成アンチセンスオリゴヌクレオチドも包含する。mRNAを認識して選択的に結合するようにデザインされた合成アンチセンスオリゴヌクレオチド、またはその他のアンチセンス化学構造体は、クリプトウイルスコード鎖の一部、例えば、配列番号3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、または23に示すコード配列、に相補であるように構築される。哺乳類細胞に取り込まれると、このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、クリプトウイルスコード領域の少なくとも一部の翻訳発現を防止して、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、クリプトウイルスタンパク質の発現防止に有用である。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的mRNA配列に結合して、例えばRNA分解酵素I消化によって、mRNAの変性を誘導するか、あるいは翻訳調節因子またはリボソームの結合を妨害するかあるいは、リボザイム配列または標的mRNAを変性または化学的に修飾する反応化学基のようなその他の化学構造体の封入によって、mRNA標的配列の翻訳を阻害することによって、標的mRNAの配列を不活性化する。アンチセンスオリゴヌクレオチドを利用する遺伝子に基づく療法ストラテジーは当該分野で公知である。(例えば、Rait, A.ら, 3'-End conjugates of minimally phosphorothioate-protected oligonucleotides with 1-O-hexadecylglycerol: synthesis and anti-ras activity in radiation-resistant cells(最少ホスホチオアート保護オリゴヌクレオチドと1-O-ヘキサデシルグリセロールとの3'末端複合体:照射抵抗性細胞における合成と抗ras活性),"Bioconjug Chem.", 11(2):153~60 [2000], Stenton, G. R.ら, Aerosolized syk antisense suppresses syk expression, mediator release from macrophages, and pulmonary inflammation(エアロゾル化sykアンチセンスはsyk発現、マクロファージから遊離されるメディテーター、ならびに肺炎症を抑制する),"J. Immunol.", 164(7):3790~7 [2000], Suzuki, J.ら, Antisense Bcl-x oligonucleotide induces apoptosis and prevents arterial neointimal formation in murine cardiac allografts(アンチセンスBcl-xオリゴヌクレオチドは、マウス心臓同種移植片において、アボトーシスを誘導し、そして動脈性、新生動脈内膜形成を防止する)"Cardiovas Res.", 45(3):783~7 [2000], Kim, J. W.ら, Antisense oligodeoxy nucleotide of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human cervical carcinoma cell line(グリセル

20

30

40

50

アルデヒドー 3 - リン酸脱水素酵素遺伝子は、ヒト子宮頸ガン細胞株において細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導する) , "Antisense Nucleic Acid Drug Dev." , 9(6) : 507~13 [1999]、Han, D. C. ら, Therapy with antisense TGF-beta1 oligodeoxynucleotides reduces kidney weight and matrix mRNAs in diabetic mice (アンチセンスTGF- $\beta$ 1オリゴヌクレオチドによる療法は、糖尿病マウスにおいて腎臓重量とマトリックスmRNAを低下させる) , "Am. J. Physiol. Renal Physiol." , 278(4) : F628~F634 [2000]、Scalza, S. ら, Adenovirus-mediated suppression of HMG1(Y) protein synthesis as potential therapy of human malignant neoplasias (ヒト悪性新生物の治療法候補としてのHMG1(Y)タンパク質合成のアデノウイルス媒介による抑制) , "Proc. Natl. Acad. Sci. USA." , 97(8) : 4256~4261 [2000]、Arteaga, C. L. ら, Tissue-targeted antisense c-fos retroviral vector inhibits established breast cancer xenografts in nude mice (組織標的アンチセンスc-fosレトロウイルスベクターは、ヌードマウスにおける樹立乳ガン異種移植を阻害する) , "Cancer Res." , 56(5) : 1098~1103 [1996]、Muller, M. ら, Antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide down-regulation of the insulin-like growth factor I receptor in ovarian cancer cells (卵巣ガン細胞におけるインスリン様成長因子I受容体のアンチセンスホスホチオアートオリゴデオキシヌクレオチドによるダウンレギュレーション) , "Int. J. Cancer" , 77(4) : 567~71 [1998]、Engelhard, H. H. , Antisense Oligodeoxynucleotide Technology: Potential Use for the Treatment of Malignant Brain Tumors (アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドテクノロジー: 悪性脳腫瘍治療用途の展望) , "Cancer Control" , 5(2) : 163~170 [1998]、Alvarez-Salas, L. M. ら, Growth inhibition of cervical tumor cells by antisense oligodeoxynucleotides directed to the human papilloma virus type 16 E6 gene (ヒトパピローマウイルスタイプ16 E6遺伝子に指示されたアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドによる子宮頸部腫瘍細胞の成長抑制) , "Antisense Nucleic Acid Drug Dev." , 9(5) : 441~50 [1999]、Im, S. A. ら, Antiangiogenesis treatment for gliomas: transfer of antisense-vascular endothelial growth factor inhibits tumor growth in vivo (神経膠腫の抗血管形成療法: アンチセンス-血管内皮成長因子の転送はインビオ腫瘍成長を抑制する) , "Cancer Res." , 59(4) : 895~900 [1999]、Maeshima, Y. ら, Antisense oligonucleotides to proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 inhibit human mesangial cell proliferation (増殖細胞核抗原及びKi-67に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトメサンギウム細胞増殖を抑制する) , "J. Am. Soc. Nephrol." , 7(10) : 2219~29 [1996]; Chen, D. S. ら, Retroviral Vector-mediated transfer of an antisense cyclin G1 construct inhibits osteosarcoma tumor growth [50]

h in nude mice (アンチセンスサイクリンG1構築物のレトロウイルスベクター媒介伝達は、ヌードマウスにおける骨肉腫の成長を抑制する) , "Hum. Gene Ther.", 8(14):1667~74 [1997]、Hirao, T.ら, Antisense epidermal growth factor receptor delivered by adenoviral vector blocks tumor growth in human gastric cancer (アデノウイルスベクターによって送達されたアンチセンス上皮成長因子受容体は、ヒト胃ガンにおいて腫瘍成長をブロックする) , "Cancer Gene Ther." 6(5):423~7 [1999]、Wang, X. Y.ら, Antisense inhibition of protein kinase C $\alpha$  reverses the transformed phenotype in human lung carcinoma cells (タンパク質キナーゼカルファのアンチセンス抑制は、ヒト肺ガン細胞における表現型を逆転する) , "Exp Cell Res.", 250(1):253~63 [1999]、Sacco, M. G.ら, In vitro and in vivo antisense-mediated growth inhibition of a mammary adenocarcinoma from MMTV-neu transgenic mice (MMTV-neuトランスジェニックマウス由来の乳房腺ガンのインビトロ及びインビトロアンチセンス媒介による成長抑制) , "Gene Ther.", 5(3):388~93 [1998]、Leonetti, C.ら, Antitumor effect of c-myc antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides on human melanoma cells in vitro and in mice (インビトロヒト悪性黒色種細胞及びマウスにおけるc-mycアンチセンスホスホチオアートオリゴデオキシヌクレオチドの抗腫瘍効果) , "J. Natl. Cancer Inst.", 88(7):419~29 [1996]、Laird, A. D.ら, Inhibition of tumor growth in liver epithelial cells transfected with a transforming growth factor alpha antisense gene (トランスフォーミング成長因子アンチセンス遺伝子でトランスフェクトされた肝臓上皮細胞における腫瘍成長の抑制) , "Cancer Res." 54(15):4224~32 (Aug 1, 1994)、Yazaki, T.ら, Treatment of glioblastoma U-87 by systemic administration of an antisense protein kinase C- $\alpha$  phosphorothioate oligodeoxynucleotide (アンチセンスタンパク質キナーゼC-ホスホチオアートオリゴデオキシヌクレオチドの全身投与によるグリア芽細胞種の治療法) , "Mol Pharmacol.", 50(2):236~42 [1996]、Ho, P. T.ら, Antisense oligonucleotides as therapeutics for malignant diseases (悪性疾患のための治療としてのアンチセンスオリゴヌクレオチド) , "Semin. Oncol.", 24(2):187~202 [1997]、Muller, M.ら, Antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide down-regulation of the insulin-like growth factor I receptor in ovarian cancer cells (卵巣ガン細胞におけるアンチセンスホスホチオアートオリゴデオキシヌクレオチドによるインスリン様成長因子I受容体のダウンリギュレーション) , "Int. J. Cancer", 77(4):567~71 [1998]、Elez, R.ら, Polo-like kinase 1, a new target for antisense tumor therapy (ポロ様キナーゼ1、アンチセンス腫瘍治療の新ターゲット) , "Biochem. Biophys. Res. Commun.", 269(2):352~6 [2000]、Monia, B. P.ら, Antitumor

more activity of a phosphorothioate antisense oligodeoxy nucleotide targeted against C-raf kinase (C-raf キナーゼを標的化するホスホロチオアートアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドの抗腫瘍活性) , "Nat. Med.", 2(6): 668~75 [1996] )。

## 【0031】

本発明は、単離クリプトウイルスタンパク質に関する。「タンパク質」という用語は、任意の長さのアミノ酸の重合体、即ち、ポリペプチド、を意味し、特定の長さの産物を意味するわけではなく、したがって、「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「オリゴペプチド」は、「タンパク質」の定義に含まれ、係る用語は本願では「タンパク質」と互換性を持って使用される。「タンパク質」という用語はまた、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化等のような、ポリペプチドの発現後修飾を含む。「タンパク質」の定義には、例えば、1つ以上のアミノ酸類似体（例えば、不飽和アミノ酸等を含む）を含むポリペプチド、置換結合、並びに当該分野で公知の、天然及び非天然のその他の修飾を有するポリペプチドが含まれる。ペプチド配列中にアミノ酸類似体を挿入する方法は、当該分野で公知である。10

「単離クリプトウイルスタンパク質」という表現は、インビオ環境で通常在来タンパク質に関連する細胞成分及び／または混入物を実質的に含まない、即ち、約50%以下、好ましくは約70%以下、そしてさらに好ましくは約90%以下含む、クリプトウイルスタンパク質を意味する。本発明の単離クリプトウイルスタンパク質はまた、1つ以上のクリプトウイルス粒子のその他の成分、例えば、その他のクリプトウイルスタンパク質種、ウイルスエンベロープのリン脂質成分、またはウイルスゲノム、であり得る。いくつかの有用な実施形態では、本発明の単離クリプトウイルスタンパク質は、既知のウイルス学的及び生化学的方法によって均一になるまで精製される。20

本発明のタンパク質は、クリプトウイルス特異的核酸セグメントによってコードされ、その核酸セグメントは、以下を含む：

(i) (配列番号1) の隣接ヌクレオチド位置 152 ~ 1678 (配列番号3とも指定される)、またはクリプトウイルスヌクレオカプシド (NP) タンパク質をコードする縮重コード配列、30

(ii) (配列番号1) の隣接ヌクレオチド位置 1850 ~ 2515 (配列番号5とも指定される)、またはウイルスRNA依存性RNAポリメラーゼと考えられるクリプトウイルスRNA結合 (V) タンパク質をコードする、縮重コード配列、30

(iii) (配列番号1) のヌクレオチド位置 2339 と (配列番号1) のヌクレオチド位置 2340 の間にさらに2つのグアニン残基の挿入を連合している、(配列番号1) の隣接ヌクレオチド位置 1850 ~ 3023 (配列番号3とも指定される) ([GG]挿入を含む連合コード配列は [配列番号7] と指定される)、またはその縮重コード配列、クリプトウイルス核カプシド関連リンタンパク質 (Pタンパク質) をコードするmRNA中へのこのフレームシフトを生起する挿入は、mRNAのプロセシング中に起こり、クリプトウイルスマイナス鎖RNAゲノム配列によって鋳型されたわけではない。40

(iv) (配列番号1) の隣接ヌクレオチド位置 3141 ~ 4271 (配列番号9とも指定される)、またはクリプトウイルスピリオン関連マトリックスまたは膜 (M) タンパク質をコードする、縮重コード配列、40

(v) (配列番号1) の隣接ヌクレオチド位置 4530 ~ 6182 (配列番号11とも指定される) または、主要エンベロープ関連糖タンパク質のプロペプチド形であり、そのアミノ末端に19アミノ酸シグナル領域を含む、クリプトウイルス(非切断型)融合 (F) タンパク質をコードする縮重コード配列、50

(vi) (配列番号1) の隣接ヌクレオチド位置 4587 ~ 6182 (配列番号13とも指定される) または、主要エンベロープ関連糖タンパク質のプロペプチド形であり、そのアミノ末端に19アミノ酸シグナル領域を欠いている、クリプトウイルス(非切断型)融合 ( $F_0$ ) タンパク質をコードする縮重コード配列、50

(vii) (配列番号1)の隣接ヌクレオチド位置4587～4835(配列番号15とも指定される)、または切断型F<sub>2</sub>タンパク質をコードする、縮重コード配列、

(viii) (配列番号1)の隣接ヌクレオチド位置4836～6182(配列番号17とも指定される)、または、クリプトウイルス感染性に重要であると考えられる22アミノ酸カルボキシ末端ペプチドセグメントを含む、切断型F<sub>1</sub>タンパク質をコードする、縮重コード配列、

(ix) (配列番号1)の隣接ヌクレオチド位置6303～6434(配列番号19とも指定される)、または、小型エンベロープ関連タンパク質である、クリプトウイルスSHタンパク質をコードする、縮重コード配列、

(x) (配列番号1)の隣接ヌクレオチド位置6584～8278(配列番号21とも指定される)、または、もう一方の主要エンベロープタンパク質である、クリプトウイルスヘマグルチニン(HN)タンパク質をコードする、縮重コード配列、あるいは

(xi) (配列番号1)の隣接ヌクレオチド位置8414～15178(配列番号23とも指定される)、またはクリプトウイルスの最大ヌクレオカブシド関連タンパク質(Lタンパク質)をコードする、縮重コード配列。

### 【0032】

これらは、先述の本発明のタンパク質に対応するアミノ酸配列を同一順序で示す。

(i) NPは以下のアミノ酸配列(配列番号4)を有し、

#### 配列

Met	Ser	Ser	Val	Leu	Lys	Ala	Tyr	Glu	Arg	Phe	Thr	Leu	Thr	Gln	Glu	20
1				5					10				15			
Leu	Gln	Asp	Gln	Ser	Glu	Glu	Gly	Thr	Ile	Pro	Pro	Thr	Thr	Leu	Lys	25
									20				30			
Pro	Val	Ile	Arg	Val	Phe	Val	Leu	Thr	Ser	Asn	Asn	Pro	Glu	Leu	Arg	35
									40				45			
Ser	Arg	Leu	Leu	Leu	Phe	Cys	Leu	Arg	Ile	Val	Leu	Ser	Asn	Gly	Ala	50
									55				60			
Arg	Asp	Ser	His	Arg	Phe	Gly	Ala	Leu	Leu	Thr	Met	Phe	Ser	Leu	Pro	65
									70				75			80
Ser	Ala	Thr	Met	Leu	Asn	His	Val	Lys	Leu	Ala	Asp	Gln	Ser	Pro	Glu	85
									90				95			90
Ala	Asp	Ile	Glu	Arg	Val	Glu	Ile	Asp	Gly	Phe	Glu	Gly	Ser	Phe	100	
									105				110			105
Arg	Leu	Ile	Pro	Asn	Ala	Arg	Ser	Gly	Met	Ser	Arg	Gly	Glu	Ile	Asn	115
									120				125			120
Ala	Tyr	Ala	Ala	Leu	Ala	Glu	Asp	Leu	Pro	Asp	Thr	Leu	Asn	His	Ala	130
									135				140			135
Thr	Pro	Phe	Val	Asp	Ser	Glu	Val	Glu	Gly	Thr	Ala	Trp	Asp	Glu	Ile	145
									150				155			150
Glu	Thr	Phe	Leu	Asp	Met	Cys	Tyr	Ser	Val	Leu	Met	Gln	Ala	Trp	Ile	165
									170				175			170
Val	Thr	Cys	Lys	Cys	Met	Thr	Ala	Pro	Asp	Gln	Pro	Ala	Ala	Ser	Ile	180
									185				190			185
Glu	Lys	Arg	Leu	Gln	Lys	Tyr	Arg	Gln	Gln	Gly	Arg	Ile	Asn	Pro	Arg	195
									200				205			200
Tyr	Leu	Leu	Gln	Pro	Glu	Ala	Arg	Arg	Ile	Ile	Gln	Asn	Val	Ile	Arg	210
									215				220			215
Lys	Gly	Met	Val	Val	Arg	His	Phe	Leu	Thr	Phe	Glu	Leu	Gln	Leu	Ala	225
									230				235			230
Arg	Ala	Gln	Ser	Leu	Val	Ser	Asn	Arg	Tyr	Tyr	Ala	Met	Val	Gly	Asp	240

10

30

40

50

245	250	255	
Val Gly Lys Tyr Ile Glu Asn Cys Gly Met Gly Gly Phe Phe Leu Thr			
260	265	270	
Leu Lys Tyr Ala Leu Gly Thr Arg Trp Pro Thr Leu Ala Leu Ala Ala			
275	280	285	
Phe Ser Gly Glu Leu Thr Lys Leu Lys Ser Leu Met Ala Leu Tyr Gln			
290	295	300	
Thr Leu Gly Glu Gln Ala Arg Tyr Leu Ala Leu Leu Glu Ser Pro His			
305	310	315	320
Leu Met Asp Phe Ala Ala Ala Asn Tyr Pro Leu Leu Tyr Ser Tyr Ala			
325	330	335	
Met Gly Ile Gly Tyr Val Leu Asp Val Asn Met Arg Asn Tyr Ala Phe			
340	345	350	
Ser Arg Ser Tyr Met Asn Lys Thr Tyr Phe Gln Leu Gly Met Glu Thr			
355	360	365	
Ala Arg Lys Gln Gln Gly Ala Val Asp Met Arg Met Ala Glu Asp Leu			
370	375	380	
Gly Leu Thr Gln Ala Glu Arg Thr Glu Met Ala Asn Thr Leu Ala Lys			
385	390	395	400
Leu Thr Thr Ala Asn Arg Gly Ala Asp Thr Arg Gly Gly Val Asn Pro			
405	410	415	
Phe Ser Ser Val Thr Gly Thr Thr Gln Met Pro Ala Ala Ala Thr Gly			
420	425	430	
Asp Thr Phe Glu Ser Tyr Met Ala Ala Asp Arg Leu Arg Gln Arg Tyr			
435	440	445	
Ala Asp Ala Gly Thr His Asp Asp Glu Met Pro Pro Leu Glu Glu Glu			
450	455	460	
Glu Glu Asp Asp Thr Ser Ala Gly Pro Arg Thr Glu Pro Thr Pro Glu			
465	470	475	480
Gln Val Ala Leu Asp Ile Gln Ser Ala Ala Val Gly Ala Pro Ile His			
485	490	495	
Thr Asp Asp Leu Asn Ala Ala Leu Gly Asp Leu Asp Ile			
500	505	/ / (配列番号4)、	

## 【0033】

(ii) Vは以下のアミノ酸配列(配列番号6)を有し、  
配列

Met Asp Pro Thr Asp Leu Ser Phe Ser Pro Asp Glu Ile Asn Lys Leu			
1	5	10	15
Ile Glu Thr Gly Leu Asn Thr Val Glu Tyr Phe Thr Ser Gln Gln Val			
20	25	30	
Thr Gly Thr Ser Ser Leu Gly Lys Asn Thr Ile Pro Pro Gly Val Thr			
35	40	45	
Gly Leu Leu Thr Asn Ala Ala Glu Ala Lys Ile Gln Glu Ser Ile Asn			
50	55	60	
His Gln Lys Gly Ser Val Gly Gly Thr Asn Pro Lys Lys Pro Arg			
65	70	75	80
Ser Lys Ile Ala Ile Val Pro Ala Asp Asp Lys Thr Val Pro Glu Lys			
85	90	95	
Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Pro Ser Thr Gln			
100	105	110	

Thr Val Leu Asp Leu Ser Gly Lys Thr Leu Pro Ser Gly Ser Tyr Lys  
           115                     120                     125  
 Gly Val Lys Leu Ala Lys Phe Gly Lys Glu Asn Leu Met Thr Arg Phe  
           130                     135                     140  
 Ile Glu Glu Pro Arg Glu Asn Pro Ile Ala Thr Ser Ser Pro Ile Asp  
           145                     150                     155                     160  
 Phe Lys Arg Gly Arg Asp Thr Gly Gly Phe His Arg Arg Glu Tyr Ser  
           165                     170                     175  
 Ile Gly Trp Val Gly Asp Glu Val Lys Val Thr Glu Trp Cys Asn Pro  
           180                     185                     190                     10  
 Ser Cys Ser Pro Ile Thr Ala Ala Ala Arg Arg Phe Lys Cys Thr Cys  
           195                     200                     205  
 His Gln Cys Pro Val Thr Cys Ser Glu Cys Glu Arg Asp Thr  
           210                     215                     220                     / / (配列番号6)、

## 【0034】

(iii) Pは以下のアミノ酸配列(配列番号8)を有し、  
配列

Met Asp Pro Thr Asp Leu Ser Phe Ser Pro Asp Glu Ile Asn Lys Leu  
   1                     5                     10                     15  
 Ile Glu Thr Gly Leu Asn Thr Val Glu Tyr Phe Thr Ser Gln Gln Val  
   20                     25                     30                     20  
 Thr Gly Thr Ser Ser Leu Gly Lys Asn Thr Ile Pro Pro Gly Val Thr  
   35                     40                     45  
 Gly Leu Leu Thr Asn Ala Ala Glu Ala Lys Ile Gln Glu Ser Ile Asn  
   50                     55                     60  
 His Gln Lys Gly Ser Val Gly Gly Thr Asn Pro Lys Lys Pro Arg  
   65                     70                     75                     80  
 Ser Lys Ile Ala Ile Val Pro Ala Asp Asp Lys Thr Val Pro Glu Lys  
   85                     90                     95  
 Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Pro Ser Thr Gln  
   100                    105                     110                     30  
 Thr Val Leu Asp Leu Ser Gly Lys Thr Leu Pro Ser Gly Ser Tyr Lys  
   115                    120                     125  
 Gly Val Lys Leu Ala Lys Phe Gly Lys Glu Asn Leu Met Thr Arg Phe  
   130                    135                     140  
 Ile Glu Glu Pro Arg Glu Asn Pro Ile Ala Thr Ser Ser Pro Ile Asp  
   145                    150                     155                     160  
 Phe Lys Arg Gly Ala Glu Ile Pro Val Gly Ser Ile Glu Gly Ser Thr  
   165                    170                     175  
 Gln Ser Asp Gly Trp Glu Met Lys Ser Arg Ser Leu Ser Gly Ala Ile  
   180                    185                     190                     40  
 His Pro Val Leu Gln Ser Pro Leu Gln Gln Gly Asp Leu Asn Ala Leu  
   195                    200                     205  
 Val Thr Asn Val Gln Ser Leu Ala Leu Asn Val Asn Glu Ile Leu Asn  
   210                    215                     220  
 Thr Val Arg Asn Leu Asp Ser Arg Met Asn Gln Leu Glu Thr Lys Val  
   225                    230                     235                     240  
 Asp Arg Ile Leu Ser Ser Gln Ser Leu Ile Gln Thr Ile Lys Asn Asp  
   245                    250                     255  
 Ile Ile Gly Leu Lys Ala Gly Met Ala Thr Leu Glu Gly Met Ile Thr         50

260	265	270	
Thr Val Lys Ile Met Asp Pro Gly Val Pro Ser Asn Val Thr Val Glu			
275	280	285	
Asp Val Arg Lys Lys Leu Ser Asn His Ala Val Val Val Pro Glu Ser			
290	295	300	
Phe Asn Asp Ser Phe Leu Thr Gln Ser Glu Asp Val Ile Ser Leu Asp			
305	310	315	320
Glu Leu Ala Arg Pro Thr Ala Thr Ser Val Lys Lys Ile Val Arg Lys			
325	330	335	
Val Pro Pro Gln Lys Asp Leu Thr Gly Leu Lys Ile Thr Leu Glu Gln			10
340	345	350	
Leu Ala Lys Asp Cys Ile Ser Lys Pro Lys Met Arg Glu Asp Tyr Leu			
355	360	365	
Leu Lys Ile Asn Gln Ala Ser Ser Glu Ala Gln Leu Ile Asp Leu Lys			
370	375	380	
Lys Ala Ile Ile Arg Ser Ala Ile			
385	390	/ / (配列番号 8 )、	

## 【 0 0 3 5 】

( iv ) Mは以下のアミノ酸配列(配列番号 10 )を有し、  
配列

Met Pro Ser Ile Ser Ile Pro Ala Asp Pro Thr Asn Pro Arg Gln Ser			
1	5	10	15
Ile Lys Ala Phe Pro Ile Val Ile Asn Ser Asp Gly Gly Glu Lys Gly			
20	25	30	
Arg Leu Val Lys Gln Leu Arg Thr Thr Tyr Leu Asn Asp Leu Asp Thr			
35	40	45	
His Glu Pro Leu Val Thr Phe Val Asn Thr Tyr Gly Phe Ile Tyr Glu			
50	55	60	
Gln Asn Arg Gly Asn Ala Ile Val Gly Glu Asp Gln Leu Gly Lys Lys			
65	70	75	80
Arg Glu Ala Val Thr Ala Ala Met Val Thr Leu Gly Cys Gly Pro Asn			
85	90	95	
Leu Pro Ser Leu Gly Asn Val Leu Arg Gln Leu Ser Glu Phe Gln Val			
100	105	110	
Ile Val Arg Lys Thr Ser Ser Lys Ala Glu Glu Met Val Phe Glu Ile			
115	120	125	
Val Lys Tyr Pro Arg Ile Phe Arg Gly His Thr Leu Ile Gln Lys Gly			
130	135	140	
Leu Val Cys Val Ser Ala Glu Lys Phe Val Lys Ser Pro Gly Lys Val			
145	150	155	160
Gln Ser Gly Met Asp Tyr Leu Phe Ile Pro Thr Phe Leu Ser Val Thr			
165	170	175	
Tyr Cys Pro Ala Ala Ile Lys Phe Gln Val Pro Gly Pro Met Leu Lys			
180	185	190	
Met Arg Ser Arg Tyr Thr Gln Ser Leu Gln Leu Glu Leu Met Ile Arg			
195	200	205	
Ile Leu Cys Lys Pro Asp Ser Pro Leu Met Lys Val His Ile Pro Asp			
210	215	220	
Lys Glu Gly Arg Gly Cys Leu Val Ser Val Trp Leu His Val Cys Asn			
225	230	235	240

Ile Phe Lys Ser Gly Asn Lys Asn Gly Ser Glu Trp Gln Glu Tyr Trp  
                  245                 250                 255  
 Met Arg Lys Cys Ala Asn Met Gln Leu Glu Val Ser Ile Ala Asp Met  
                  260                 265                 270  
 Trp Gly Pro Thr Ile Ile His Ala Arg Gly His Ile Pro Lys Ser  
                  275                 280                 285  
 Ala Lys Leu Phe Phe Gly Lys Gly Gly Trp Ser Cys His Pro Leu His  
                  290                 295                 300  
 Glu Ile Val Pro Ser Val Thr Lys Thr Leu Trp Ser Val Gly Cys Glu  
                  305                 310                 315                 320                 10  
 Ile Thr Lys Ala Lys Ala Ile Ile Gln Glu Ser Ser Ile Ser Leu Leu  
                  325                 330                 335  
 Val Glu Thr Thr Asp Ile Ile Ser Pro Lys Val Lys Ile Ser Ser Lys  
                  340                 345                 350  
 His Arg Arg Phe Gly Lys Ser Asn Trp Gly Leu Phe Lys Lys Thr Lys  
                  355                 360                 365  
 Ser Leu Pro Asn Leu Thr Glu Leu Glu  
                  370                 375                 // (配列番号10)、

## 【0036】

(v) Fは以下のアミノ酸配列(配列番号12)を有し、  
 配列  
 Met Ser Thr Ile Ile Gln Ser Leu Val Val Ser Cys Leu Leu Ala Gly  
   1             5                 10                 15  
 Ala Gly Ser Leu Asp Pro Ala Ala Leu Met Gln Ile Gly Val Ile Pro  
   20                 25                 30  
 Thr Asn Val Arg Gln Leu Met Tyr Tyr Thr Glu Ala Ser Ser Ala Phe  
   35                 40                 45  
 Ile Val Val Lys Leu Met Pro Thr Ile Asp Ser Pro Ile Ser Gly Cys  
   50                 55                 60  
 Asn Ile Thr Ser Ile Ser Ser Tyr Asn Ala Thr Val Thr Lys Leu Leu  
   65                 70                 75                 80                 30  
 Gln Pro Ile Gly Glu Asn Leu Glu Thr Ile Arg Asn Gln Leu Ile Pro  
   85                 90                 95  
 Thr Arg Arg Arg Arg Phe Ala Gly Val Val Ile Gly Leu Ala Ala  
   100                105                 110  
 Leu Gly Val Ala Thr Ala Ala Gln Val Thr Ala Ala Val Ala Leu Val  
   115                120                 125  
 Lys Ala Asn Glu Asn Thr Ala Ala Ile Leu Asn Leu Lys Asn Ala Ile  
   130                135                 140  
 Gln Lys Thr Asn Ala Ala Val Ala Asp Val Val Gln Ala Thr Gln Ser  
   145                150                 155                 160                 40  
 Leu Gly Thr Ala Val Gln Ala Val Gln Asp His Ile Asn Ser Val Ile  
   165                170                 175  
 Ser Pro Ala Ile Thr Ala Ala Asn Cys Lys Ala Gln Asp Ala Ile Ile  
   180                185                 190  
 Gly Ser Ile Leu Asn Leu Tyr Leu Thr Glu Leu Thr Thr Ile Phe His  
   195                200                 205  
 Asn Gln Ile Thr Asn Pro Ala Leu Ser Pro Ile Thr Ile Gln Ala Leu  
   210                215                 220  
 Arg Ile Leu Leu Gly Ser Thr Leu Pro Thr Val Val Glu Lys Ser Phe  
                  225                 230                 235                 50

225	230	235	240
Asn Thr Gln Ile Ser Ala Ala Glu Leu Leu Ser Ser Gly Leu Leu Thr			
245	250	255	
Gly Gln Ile Val Gly Leu Asp Leu Thr Tyr Met Gln Met Val Ile Lys			
260	265	270	
Ile Glu Leu Pro Thr Leu Thr Val Gln Pro Ala Thr Gln Ile Ile Asp			
275	280	285	
Leu Ala Thr Ile Ser Ala Phe Ile Asn Asn Gln Glu Val Met Ala Gln			
290	295	300	
Leu Pro Thr Arg Val Ile Val Thr Gly Ser Leu Ile Gln Ala Tyr Pro			10
305	310	315	320
Ala Ser Gln Cys Thr Ile Thr Pro Asn Thr Val Tyr Cys Arg Tyr Asn			
325	330	335	
Asp Ala Gln Val Leu Ser Asp Asp Thr Met Ala Cys Leu Gln Gly Asn			
340	345	350	
Leu Thr Arg Cys Thr Phe Ser Pro Val Val Gly Ser Phe Leu Thr Arg			
355	360	365	
Phe Val Leu Phe Asp Gly Ile Val Tyr Ala Asn Cys Arg Ser Met Leu			
370	375	380	
Cys Lys Cys Met Gln Pro Ala Ala Val Ile Leu Gln Pro Ser Ser Ser			20
385	390	395	400
Pro Val Thr Val Ile Asp Met His Lys Cys Val Ser Leu Gln Leu Asp			
405	410	415	
Asp Leu Arg Phe Thr Ile Thr Gln Leu Ala Asn Val Thr Tyr Asn Ser			
420	425	430	
Thr Ile Lys Leu Glu Thr Ser Gln Ile Leu Pro Ile Asp Pro Leu Asp			
435	440	445	
Ile Ser Gln Asn Leu Ala Ala Val Asn Lys Ser Leu Ser Asp Ala Leu			
450	455	460	
Gln His Leu Ala Gln Ser Asp Thr Tyr Leu Ser Ala Ile Thr Ser Ala			30
465	470	475	480
Thr Thr Thr Ser Val Leu Ser Ile Ile Ala Ile Cys Leu Gly Ser Leu			
485	490	495	
Gly Leu Ile Leu Ile Ile Leu Ser Val Val Val Trp Lys Leu Leu			
500	505	510	
Thr Ile Val Ala Ala Asn Arg Asn Arg Met Glu Asn Phe Val Tyr His			
515	520	525	
Asn Ser Ala Phe His His Pro Arg Ser Asp Leu Ser Glu Lys Asn Gln			
530	535	540	
Pro Ala Thr Leu Gly Thr Arg			40
545	550	/ / (配列番号12)、	
【0037】			
(vi) F0は以下のアミノ酸配列(配列番号14)を有し、			
配列			
Leu Asp Pro Ala Ala Leu Met Gln Ile Gly Val Ile Pro Thr Asn Val			
1	5	10	15
Arg Gln Leu Met Tyr Tyr Thr Glu Ala Ser Ser Ala Phe Ile Val Val			
20	25	30	
Lys Leu Met Pro Thr Ile Asp Ser Pro Ile Ser Gly Cys Asn Ile Thr			
35	40	45	50

Ser Ile Ser Ser Tyr Asn Ala Thr Val Thr Lys Leu Leu Gln Pro Ile  
       50                    55                    60  
 Gly Glu Asn Leu Glu Thr Ile Arg Asn Gln Leu Ile Pro Thr Arg Arg  
       65                    70                    75                    80  
 Arg Arg Arg Phe Ala Gly Val Val Ile Gly Leu Ala Ala Leu Gly Val  
       85                    90                    95  
 Ala Thr Ala Ala Gln Val Thr Ala Ala Val Ala Leu Val Lys Ala Asn  
       100                   105                   110  
 Glu Asn Thr Ala Ala Ile Leu Asn Leu Lys Asn Ala Ile Gln Lys Thr  
       115                   120                   125                    10  
 Asn Ala Ala Val Ala Asp Val Val Gln Ala Thr Gln Ser Leu Gly Thr  
       130                   135                   140  
 Ala Val Gln Ala Val Gln Asp His Ile Asn Ser Val Ile Ser Pro Ala  
       145                   150                   155                   160  
 Ile Thr Ala Ala Asn Cys Lys Ala Gln Asp Ala Ile Ile Gly Ser Ile  
       165                   170                   175  
 Leu Asn Leu Tyr Leu Thr Glu Leu Thr Thr Ile Phe His Asn Gln Ile  
       180                   185                   190  
 Thr Asn Pro Ala Leu Ser Pro Ile Thr Ile Gln Ala Leu Arg Ile Leu  
       195                   200                   205                    20  
 Leu Gly Ser Thr Leu Pro Thr Val Val Glu Lys Ser Phe Asn Thr Gln  
       210                   215                   220  
 Ile Ser Ala Ala Glu Leu Leu Ser Ser Gly Leu Leu Thr Gly Gln Ile  
       225                   230                   235                   240  
 Val Gly Leu Asp Leu Thr Tyr Met Gln Met Val Ile Lys Ile Glu Leu  
       245                   250                   255  
 Pro Thr Leu Thr Val Gln Pro Ala Thr Gln Ile Ile Asp Leu Ala Thr  
       260                   265                   270  
 Ile Ser Ala Phe Ile Asn Asn Gln Glu Val Met Ala Gln Leu Pro Thr  
       275                   280                   285                    30  
 Arg Val Ile Val Thr Gly Ser Leu Ile Gln Ala Tyr Pro Ala Ser Gln  
       290                   295                   300  
 Cys Thr Ile Thr Pro Asn Thr Val Tyr Cys Arg Tyr Asn Asp Ala Gln  
       305                   310                   315                   320  
 Val Leu Ser Asp Asp Thr Met Ala Cys Leu Gln Gly Asn Leu Thr Arg  
       325                   330                   335  
 Cys Thr Phe Ser Pro Val Val Gly Ser Phe Leu Thr Arg Phe Val Leu  
       340                   345                   350  
 Phe Asp Gly Ile Val Tyr Ala Asn Cys Arg Ser Met Leu Cys Lys Cys  
       355                   360                   365                    40  
 Met Gln Pro Ala Ala Val Ile Leu Gln Pro Ser Ser Ser Pro Val Thr  
       370                   375                   380  
 Val Ile Asp Met His Lys Cys Val Ser Leu Gln Leu Asp Asp Leu Arg  
       385                   390                   395                   400  
 Phe Thr Ile Thr Gln Leu Ala Asn Val Thr Tyr Asn Ser Thr Ile Lys  
       405                   410                   415  
 Leu Glu Thr Ser Gln Ile Leu Pro Ile Asp Pro Leu Asp Ile Ser Gln  
       420                   425                   430  
 Asn Leu Ala Ala Val Asn Lys Ser Leu Ser Asp Ala Leu Gln His Leu  
       435                   440                   445                    50

[ 0 0 3 8 ]

(vii) F2は以下のアミノ酸配列(配列番号16)を有し、配列

```

Leu Asp Pro Ala Ala Leu Met Gln Ile Gly Val Ile Pro Thr Asn Val
   1           5           10           15
Arg Gln Leu Met Tyr Tyr Thr Glu Ala Ser Ser Ala Phe Ile Val Val
   20          25          30
Lys Leu Met Pro Thr Ile Asp Ser Pro Ile Ser Gly Cys Asn Ile Thr
   35          40          45
Ser Ile Ser Ser Tyr Asn Ala Thr Val Thr Lys Leu Leu Gln Pro Ile
   50          55          60
Gly Glu Asn Leu Glu Thr Ile Arg Asn Gln Leu Ile Pro Thr Arg Arg
   65          70          75          80
Arg Arg Arg
// (配列番号 1-6)、

```

【 0 0 3 9 】

(viii) F1は以下のアミノ酸配列(配列番号18)を有し、配列

Phe Ala Gly Val Val Ile Gly Leu Ala Ala Leu Gly Val Ala Thr Ala  
 1 5 10 15  
 Ala Gln Val Thr Ala Ala Val Ala Leu Val Lys Ala Asn Glu Asn Thr  
 20 25 30  
 Ala Ala Ile Leu Asn Leu Lys Asn Ala Ile Gln Lys Thr Asn Ala Ala  
 35 40 45  
 Val Ala Asp Val Val Gln Ala Thr Gln Ser Leu Gly Thr Ala Val Gln  
 50 55 60  
 Ala Val Gln Asp His Ile Asn Ser Val Ile Ser Pro Ala Ile Thr Ala  
 65 70 75 80 40  
 Ala Asn Cys Lys Ala Gln Asp Ala Ile Ile Gly Ser Ile Leu Asn Leu  
 85 90 95  
 Tyr Leu Thr Glu Leu Thr Thr Ile Phe His Asn Gln Ile Thr Asn Pro  
 100 105 110  
 Ala Leu Ser Pro Ile Thr Ile Gln Ala Leu Arg Ile Leu Leu Gly Ser  
 115 120 125  
 Thr Leu Pro Thr Val Val Glu Lys Ser Phe Asn Thr Gln Ile Ser Ala  
 130 135 140  
 Ala Glu Leu Leu Ser Ser Gly Leu Leu Thr Gly Gln Ile Val Gly Leu  
 145 150 155 160 50

Asp Leu Thr Tyr Met Gln Met Val Ile Lys Ile Glu Leu Pro Thr Leu  
                      165                     170                     175  
 Thr Val Gln Pro Ala Thr Gln Ile Ile Asp Leu Ala Thr Ile Ser Ala  
                      180                     185                     190  
 Phe Ile Asn Asn Gln Glu Val Met Ala Gln Leu Pro Thr Arg Val Ile  
                      195                     200                     205  
 Val Thr Gly Ser Leu Ile Gln Ala Tyr Pro Ala Ser Gln Cys Thr Ile  
                      210                     215                     220  
 Thr Pro Asn Thr Val Tyr Cys Arg Tyr Asn Asp Ala Gln Val Leu Ser  
                      225                     230                     235                     240                     10  
 Asp Asp Thr Met Ala Cys Leu Gln Gly Asn Leu Thr Arg Cys Thr Phe  
                      245                     250                     255  
 Ser Pro Val Val Gly Ser Phe Leu Thr Arg Phe Val Leu Phe Asp Gly  
                      260                     265                     270  
 Ile Val Tyr Ala Asn Cys Arg Ser Met Leu Cys Lys Cys Met Gln Pro  
                      275                     280                     285  
 Ala Ala Val Ile Leu Gln Pro Ser Ser Ser Pro Val Thr Val Ile Asp  
                      290                     295                     300  
 Met His Lys Cys Val Ser Leu Gln Leu Asp Asp Leu Arg Phe Thr Ile  
                      305                     310                     315                     320                     20  
 Thr Gln Leu Ala Asn Val Thr Tyr Asn Ser Thr Ile Lys Leu Glu Thr  
                      325                     330                     335  
 Ser Gln Ile Leu Pro Ile Asp Pro Leu Asp Ile Ser Gln Asn Leu Ala  
                      340                     345                     350  
 Ala Val Asn Lys Ser Leu Ser Asp Ala Leu Gln His Leu Ala Gln Ser  
                      355                     360                     365  
 Asp Thr Tyr Leu Ser Ala Ile Thr Ser Ala Thr Thr Thr Ser Val Leu  
                      370                     375                     380  
 Ser Ile Ile Ala Ile Cys Leu Gly Ser Leu Gly Leu Ile Leu Ile Ile  
                      385                     390                     395                     400                     30  
 Leu Leu Ser Val Val Trp Lys Leu Leu Thr Ile Val Ala Ala Asn  
                      405                     410                     415  
 Arg Asn Arg Met Glu Asn Phe Val Tyr His Asn Ser Ala Phe His His  
                      420                     425                     430  
 Pro Arg Ser Asp Leu Ser Glu Lys Asn Gln Pro Ala Thr Leu Gly Thr  
                      435                     440                     445  
 Arg  
     // (配列番号18)、  
**【0040】**  
 (ix) SHは以下のアミノ酸配列(配列番号20)を有し、  
 配列  
 Met Leu Pro Asp Pro Glu Asp Pro Glu Ser Lys Lys Ala Thr Arg Arg  
   1             5                     10                     15  
 Thr Gly Asn Leu Ile Ile Cys Phe Leu Phe Ile Phe Phe Leu Phe Val  
   20             25                     30  
 Thr Leu Ile Val Pro Thr Leu Arg His Leu Leu Ser  
   35             40                     // (配列番号20)、  
**【0041】**  
 (x) HNは以下のアミノ酸配列(配列番号22)を有し、  
 配列                     50

Met Ile Ala Glu Asp Ala Pro Val Lys Gly Thr Cys Arg Val Leu Phe			
1	5	10	15
Arg Thr Thr Thr Leu Ile Phe Leu Cys Thr Leu Leu Ala Leu Ser Ile			
20	25	30	
Ser Ile Leu Tyr Glu Ser Leu Ile Thr Gln Lys Gln Ile Met Ser Gln			
35	40	45	
Ala Gly Ser Thr Gly Ser Asn Ser Gly Leu Gly Gly Ile Thr Asp Leu			
50	55	60	
Leu Asn Asn Ile Leu Ser Val Ala Asn Gln Ile Ile Tyr Asn Ser Ala			
65	70	75	80
Val Ala Leu Pro Leu Gln Leu Asp Thr Leu Glu Ser Thr Leu Leu Thr			
85	90	95	
Ala Ile Lys Ser Leu Gln Thr Ser Asp Lys Leu Glu Gln Asn Cys Ser			
100	105	110	
Trp Gly Ala Ala Leu Ile Asn Asp Asn Arg Tyr Ile Asn Gly Ile Asn			
115	120	125	
Gln Phe Tyr Phe Ser Ile Ala Glu Gly Arg Asn Leu Thr Leu Gly Pro			
130	135	140	
Leu Leu Asn Ile Pro Ser Phe Ile Pro Thr Ala Thr Thr Pro Glu Gly			
145	150	155	160
Cys Thr Arg Ile Pro Ser Phe Ser Leu Thr Lys Thr His Trp Cys Tyr			
165	170	175	
Thr His Asn Val Ile Leu Asn Gly Cys Gln Asp His Val Ser Ser Asn			
180	185	190	
Gln Phe Val Ser Met Gly Ile Ile Glu Pro Thr Ser Ala Gly Phe Pro			
195	200	205	
Ser Phe Arg Thr Leu Lys Thr Leu Tyr Leu Ser Asp Gly Val Asn Arg			
210	215	220	
Lys Ser Cys Ser Ile Ser Thr Val Pro Gly Gly Cys Met Met Tyr Cys			
225	230	235	240
Phe Val Ser Thr Gln Pro Glu Arg Asp Asp Tyr Phe Ser Thr Ala Pro			
245	250	255	
Pro Glu Gln Arg Ile Ile Met Tyr Tyr Asn Asp Thr Ile Val Glu			
260	265	270	
Arg Ile Ile Asn Pro Pro Gly Val Leu Asp Val Trp Ala Thr Leu Asn			
275	280	285	
Pro Gly Thr Gly Ser Gly Val Tyr Tyr Leu Gly Trp Val Leu Phe Pro			
290	295	300	
Ile Tyr Gly Gly Val Ile Lys Asn Thr Ser Leu Trp Asn Asn Gln Ala			
305	310	315	320
Asn Lys Tyr Phe Ile Pro Gln Met Val Ala Ala Leu Cys Ser Gln Asn			
325	330	335	
Gln Ala Thr Gln Val Gln Asn Ala Lys Ser Ser Tyr Tyr Ser Ser Trp			
340	345	350	
Phe Gly Asn Arg Met Ile Gln Ser Gly Ile Leu Ala Cys Pro Leu Gln			
355	360	365	
Gln Asp Leu Thr Asn Glu Cys Leu Val Leu Pro Phe Ser Asn Asp Gln			
370	375	380	
Val Leu Met Gly Ala Glu Gly Arg Leu Tyr Met Tyr Gly Asp Ser Val			
385	390	395	400

Tyr Tyr Tyr Gln Arg Ser Asn Ser Trp Trp Pro Met Thr Met Leu Tyr  
                  405                        410                        415  
 Lys Val Thr Ile Thr Phe Thr Asn Gly Gln Pro Ser Ala Ile Ser Ala  
                  420                        425                        430  
 Gln Asn Val Pro Thr Gln Gln Val Pro Arg Pro Gly Thr Gly Asp Cys  
                  435                        440                        445  
 Phe Ala Thr Asn Arg Cys Pro Gly Phe Cys Leu Thr Gly Val Tyr Ala  
                  450                        455                        460  
 Asp Ala Trp Leu Leu Thr Asn Pro Ser Ser Thr Ser Thr Phe Gly Ser  
                  465                        470                        475                        480  
 Glu Ala Thr Phe Thr Gly Ser Tyr Leu Asn Ala Ala Thr Gln Arg Ile  
                  485                        490                        495  
 Asn Pro Thr Met Tyr Ile Ala Asn Asn Thr Gln Ile Ile Ser Ser Gln  
                  500                        505                        510  
 Gln Phe Gly Ser Ser Gly Gln Glu Ala Ala Tyr Gly His Thr Thr Cys  
                  515                        520                        525  
 Phe Arg Asp Thr Gly Ser Val Met Val Tyr Cys Ile Tyr Ile Ile Glu  
                  530                        535                        540  
 Leu Ser Ser Ser Leu Leu Gly Gln Phe Gln Ile Val Pro Phe Ile Arg  
                  545                        550                        555                        560  
 Gln Val Thr Leu Ser  
                  565 // (配列番号22)

また

【 0 0 4 2 】

(xi) L は以下のアミノ酸配列（配列番号 24）を有する、配列

Arg Gln Thr Asp His Asn Asp Pro Asp Leu Ile Thr Tyr Ile Glu Asn			
195	200	205	
Arg Glu Gly Ile Ile Ile Ile Thr Pro Glu Leu Val Ala Leu Phe Asn			
210	215	220	
Thr Glu Asn His Thr Leu Thr Tyr Met Thr Phe Glu Ile Val Leu Met			
225	230	235	240
Val Ser Asp Met Tyr Glu Gly Arg His Asn Ile Leu Ser Leu Cys Thr			
245	250	255	
Val Ser Thr Tyr Leu Asn Pro Leu Lys Lys Arg Ile Thr Tyr Leu Leu			
260	265	270	10
Ser Leu Val Asp Asn Leu Ala Phe Gln Ile Gly Asp Ala Val Tyr Asn			
275	280	285	
Ile Ile Ala Leu Leu Glu Ser Phe Val Tyr Ala Gln Leu Gln Met Ser			
290	295	300	
Asp Pro Ile Pro Glu Leu Arg Gly Gln Phe His Ala Phe Val Cys Ser			
305	310	315	320
Glu Ile Leu Asp Ala Leu Arg Gly Thr Asn Ser Phe Thr Gln Asp Glu			
325	330	335	
Leu Arg Thr Val Thr Thr Asn Leu Ile Ser Pro Phe Gln Asp Leu Thr			
340	345	350	20
Pro Asp Leu Thr Ala Glu Leu Leu Cys Ile Met Arg Leu Trp Gly His			
355	360	365	
Pro Met Leu Thr Ala Ser Gln Ala Ala Gly Lys Val Arg Glu Ser Met			
370	375	380	
Cys Ala Gly Lys Val Leu Asp Phe Pro Thr Ile Met Lys Thr Leu Ala			
385	390	395	400
Phe Phe His Thr Ile Leu Ile Asn Gly Tyr Arg Arg Lys His His Gly			
405	410	415	
Val Trp Pro Pro Leu Asn Leu Pro Gly Asn Ala Ser Lys Gly Leu Thr			
420	425	430	30
Glu Leu Met Asn Asp Asn Thr Glu Ile Ser Tyr Glu Phe Thr Leu Lys			
435	440	445	
His Trp Lys Glu Ile Ser Leu Ile Lys Phe Lys Lys Cys Phe Asp Ala			
450	455	460	
Asp Ala Gly Glu Glu Leu Ser Ile Phe Met Lys Asp Lys Ala Ile Ser			
465	470	475	480
Ala Pro Lys Gln Asp Trp Met Ser Val Phe Arg Arg Ser Leu Ile Lys			
485	490	495	
Gln Arg His Gln His His Gln Val Pro Leu Pro Asn Pro Phe Asn Arg			
500	505	510	40
Arg Leu Leu Leu Asn Phe Leu Gly Asp Asp Lys Phe Asp Pro Asn Val			
515	520	525	
Glu Leu Gln Tyr Val Thr Ser Gly Glu Tyr Leu His Asp Asp Thr Phe			
530	535	540	
Cys Ala Ser Tyr Ser Leu Lys Glu Lys Glu Ile Lys Pro Asp Gly Arg			
545	550	555	560
Ile Phe Ala Lys Leu Thr Lys Arg Met Arg Ser Cys Gln Val Ile Ala			
565	570	575	
Glu Ser Leu Leu Ala Asn His Ala Gly Lys Leu Met Lys Glu Asn Gly			
580	585	590	50

Val Val Met Asn Gln Leu Ser Leu Thr Lys Ser Leu Leu Thr Met Ser			
595	600	605	
Gln Ile Gly Ile Ile Ser Glu Arg Ala Arg Lys Ser Thr Arg Asp Asn			
610	615	620	
Ile Asn Arg Pro Gly Phe Gln Asn Ile Gln Arg Asn Lys Ser His His			
625	630	635	640
Ser Lys Gln Val Asn Gln Arg Asp Pro Ser Asp Asp Phe Glu Leu Ala			
645	650	655	
Ala Ser Phe Leu Thr Thr Asp Leu Lys Lys Tyr Cys Leu Gln Trp Arg			
660	665	670	10
Tyr Gln Thr Ile Ile Pro Phe Ala Gln Ser Leu Asn Arg Met Tyr Gly			
675	680	685	
Tyr Pro His Leu Phe Glu Trp Ile His Leu Arg Leu Met Arg Ser Thr			
690	695	700	
Leu Tyr Val Gly Asp Pro Phe Asn Pro Pro Ala Asp Thr Ser Gln Phe			
705	710	715	720
Asp Leu Asp Lys Val Ile Asn Gly Asp Ile Phe Ile Val Ser Pro Arg			
725	730	735	
Gly Gly Ile Glu Gly Leu Cys Gln Lys Ala Trp Thr Met Ile Ser Ile			
740	745	750	20
Ser Val Ile Ile Leu Ser Ala Thr Glu Ser Gly Thr Arg Val Met Ser			
755	760	765	
Met Val Gln Gly Asp Asn Gln Ala Ile Ala Val Thr Thr Arg Val Pro			
770	775	780	
Arg Ser Leu Pro Thr Leu Glu Lys Thr Ile Ala Phe Arg Ser Cys			
785	790	795	800
Asn Leu Phe Phe Glu Arg Leu Lys Cys Asn Asn Phe Gly Leu Gly His			
805	810	815	
His Leu Lys Glu Gln Glu Thr Ile Ile Ser Ser His Phe Phe Val Tyr			
820	825	830	30
Ser Lys Arg Ile Phe Tyr Gln Gly Arg Ile Leu Thr Gln Ala Leu Lys			
835	840	845	
Asn Ala Ser Lys Leu Cys Leu Thr Ala Asp Val Leu Gly Glu Cys Thr			
850	855	860	
Gln Ser Ser Cys Ser Asn Leu Ala Thr Thr Val Met Arg Leu Thr Glu			
865	870	875	880
Asn Gly Val Glu Lys Asp Ile Cys Phe Tyr Leu Asn Ile Tyr Met Thr			
885	890	895	
Ile Lys Gln Leu Ser Tyr Asp Ile Ile Phe Pro Gln Val Ser Ile Pro			
900	905	910	40
Gly Asp Gln Ile Thr Leu Glu Tyr Ile Asn Asn Pro His Leu Val Ser			
915	920	925	
Arg Leu Ala Leu Leu Pro Ser Gln Leu Gly Gly Leu Asn Tyr Leu Ser			
930	935	940	
Cys Ser Arg Leu Phe Asn Arg Asn Ile Gly Asp Pro Val Val Ser Ala			
945	950	955	960
Val Ala Asp Leu Lys Arg Leu Ile Lys Ser Gly Cys Met Asp Tyr Trp			
965	970	975	
Ile Leu Tyr Asn Leu Leu Gly Arg Lys Pro Gly Asn Gly Ser Trp Ala			
980	985	990	50

Thr Leu Ala Ala Asp Pro Tyr Ser Ile Asn Ile Glu Tyr Gln Tyr Pro  
                  995                     1000                 1005  
 Pro Thr Thr Ala Leu Lys Arg His Thr Gln Gln Val Leu Met Glu Leu  
                  1010                 1015                 1020  
 Ser Thr Asn Pro Met Leu Arg Gly Ile Phe Ser Asp Asn Ala Gln Ala  
                  1025                 1030                 1035                 1040  
 Glu Glu Asn Asn Leu Ala Arg Phe Leu Leu Asp Arg Glu Val Ile Phe  
                  1045                 1050                 1055  
 Pro Arg Val Ala His Ile Ile Ile Glu Gln Thr Ser Val Gly Arg Arg  
                  1060                 1065                 1070                 10  
 Lys Gln Ile Gln Gly Tyr Leu Asp Ser Thr Arg Ser Ile Met Arg Lys  
                  1075                 1080                 1085  
 Ser Leu Glu Ile Lys Pro Leu Ser Asn Arg Lys Leu Asn Glu Ile Leu  
                  1090                 1095                 1100  
 Asp Tyr Asn Ile Asn Tyr Leu Ala Tyr Asn Leu Ala Leu Leu Lys Asn  
                  1105                 1110                 1115                 1120  
 Ala Ile Glu Pro Pro Thr Tyr Leu Lys Ala Met Thr Leu Glu Thr Cys  
                  1125                 1130                 1135  
 Ser Ile Asp Ile Ala Arg Ser Leu Arg Lys Leu Ser Trp Ala Pro Leu  
                  1140                 1145                 1150                 20  
 Leu Gly Gly Arg Asn Leu Glu Gly Leu Glu Thr Pro Asp Pro Ile Glu  
                  1155                 1160                 1165  
 Ile Thr Ala Gly Ala Leu Ile Val Gly Ser Gly Tyr Cys Glu Gln Cys  
                  1170                 1175                 1180  
 Ala Ala Gly Asp Asn Arg Phe Thr Trp Phe Phe Leu Pro Ser Gly Ile  
                  1185                 1190                 1195                 1200  
 Glu Ile Gly Gly Asp Pro Arg Asp Asn Pro Pro Ile Arg Val Pro Tyr  
                  1205                 1210                 1215  
 Ile Gly Ser Arg Thr Asp Glu Arg Arg Val Ala Ser Met Ala Tyr Ile  
                  1220                 1225                 1230                 30  
 Arg Gly Ala Ser Ser Ser Leu Lys Ala Val Leu Arg Leu Ala Gly Val  
                  1235                 1240                 1245  
 Tyr Ile Trp Ala Phe Gly Asp Thr Leu Glu Asn Trp Ile Asp Ala Leu  
                  1250                 1255                 1260  
 Asp Leu Ser His Thr Arg Val Asn Ile Thr Leu Glu Gln Leu Gln Ser  
                  1265                 1270                 1275                 1280  
 Leu Thr Pro Leu Pro Thr Ser Ala Asn Leu Thr His Arg Leu Asp Asp  
                  1285                 1290                 1295  
 Gly Thr Thr Thr Leu Lys Phe Thr Pro Ala Ser Ser Tyr Thr Phe Ser  
                  1300                 1305                 1310                 40  
 Ser Phe Thr His Ile Ser Asn Asp Glu Gln Tyr Leu Thr Ile Asn Asp  
                  1315                 1320                 1325  
 Lys Thr Ala Asp Ser Asn Ile Ile Tyr Gln Gln Leu Met Ile Thr Gly  
                  1330                 1335                 1340  
 Leu Gly Ile Leu Glu Thr Trp Asn Asn Pro Pro Ile Asn Arg Thr Phe  
                  1345                 1350                 1355                 1360  
 Glu Glu Ser Thr Leu His Leu His Thr Gly Ala Ser Cys Cys Val Arg  
                  1365                 1370                 1375  
 Pro Val Asp Ser Cys Ile Ile Ser Glu Ala Leu Thr Val Lys Pro His  
                  1380                 1385                 1390                 50

Ile Thr Val Pro Tyr Ser Asn Lys Phe Val Phe Asp Glu Asp Pro Leu			
1395	1400	1405	
Ser Glu Tyr Glu Thr Ala Lys Leu Glu Ser Leu Ser Phe Gln Ala Gln			
1410	1415	1420	
Leu Gly Asn Ile Asp Ala Val Asp Met Thr Gly Lys Leu Thr Leu Leu			
1425	1430	1435	1440
Ser Gln Phe Thr Ala Arg Gln Ile Ile Asn Ala Ile Thr Gly Leu Asp			
1445	1450	1455	
Glu Ser Val Ser Leu Thr Asn Asp Ala Ile Val Ala Ser Asp Tyr Val			
1460	1465	1470	10
Ser Asn Trp Ile Ser Glu Cys Met Tyr Thr Lys Leu Asp Glu Leu Phe			
1475	1480	1485	
Met Tyr Cys Gly Trp Glu Leu Leu Leu Glu Leu Ser Tyr Gln Met Tyr			
1490	1495	1500	
Tyr Leu Arg Val Val Gly Trp Ser Asn Ile Val Asp Tyr Ser Tyr Met			
1505	1510	1515	1520
Ile Leu Arg Arg Ile Pro Gly Ala Ala Leu Asn Asn Leu Ala Ser Thr			
1525	1530	1535	
Leu Ser His Pro Lys Leu Phe Arg Arg Ala Ile Asn Leu Asp Ile Val			
1540	1545	1550	20
Ala Pro Leu Asn Ala Pro His Phe Ala Ser Leu Asp Tyr Ile Lys Met			
1555	1560	1565	
Ser Met Asp Ala Ile Leu Trp Gly Cys Lys Arg Val Ile Asn Val Leu			
1570	1575	1580	
Ser Asn Gly Gly Asp Leu Glu Leu Val Val Thr Ser Glu Asp Ser Leu			
1585	1590	1595	1600
Ile Leu Ser Asp Arg Ser Met Asn Leu Ile Ala Arg Lys Leu Thr Leu			
1605	1610	1615	
Leu Ser Leu Ile His His Asn Gly Leu Glu Leu Pro Lys Ile Lys Gly			
1620	1625	1630	30
Phe Ser Pro Asp Glu Lys Cys Phe Ala Leu Thr Glu Phe Leu Arg Lys			
1635	1640	1645	
Val Val Asn Ser Gly Leu Ser Ser Ile Glu Asn Leu Ser Asn Phe Met			
1650	1655	1660	
Tyr Asn Val Glu Asn Pro Arg Leu Ala Ala Phe Ala Ser Asn Asn Tyr			
1665	1670	1675	1680
Tyr Leu Thr Arg Lys Leu Leu Asn Ser Ile Arg Asp Thr Glu Ser Gly			
1685	1690	1695	
Gln Val Ala Val Thr Ser Tyr Tyr Glu Ser Leu Glu Tyr Ile Asp Ser			
1700	1705	1710	40
Leu Lys Leu Thr Pro His Val Pro Gly Thr Ser Cys Ile Glu Asp Asp			
1715	1720	1725	
Ser Leu Cys Thr Asn Asp Tyr Ile Ile Trp Ile Ile Glu Ser Asn Ala			
1730	1735	1740	
Asn Leu Glu Lys Tyr Pro Ile Pro Asn Ser Pro Glu Asp Asp Ser Asn			
1745	1750	1755	1760
Phe His Asn Phe Lys Leu Asn Ala Pro Ser His His Thr Leu Arg Pro			
1765	1770	1775	
Leu Gly Leu Ser Ser Thr Ala Trp Tyr Lys Gly Ile Ser Cys Cys Arg			
1780	1785	1790	50

Tyr Leu Glu Arg Leu Lys Leu Pro Gln Gly Asp His Leu Tyr Ile Ala  
                  1795                 1800                 1805  
 Glu Gly Ser Gly Ala Ser Met Thr Ile Ile Glu Tyr Leu Phe Pro Gly  
                  1810                 1815                 1820  
 Arg Lys Ile Tyr Tyr Asn Ser Leu Phe Ser Ser Gly Asp Asn Pro Pro  
                  1825                 1830                 1835                 1840  
 Gln Arg Asn Tyr Ala Pro Met Pro Thr Gln Phe Ile Glu Ser Val Pro  
                  1845                 1850                 1855  
 Tyr Lys Leu Trp Gln Ala His Thr Asp Gln Tyr Pro Glu Ile Phe Glu  
                  1860                 1865                 1870                 10  
 Asp Phe Ile Pro Leu Trp Asn Gly Asn Ala Ala Met Thr Asp Ile Gly  
                  1875                 1880                 1885  
 Met Thr Ala Cys Val Glu Phe Ile Ile Asn Arg Val Gly Pro Arg Thr  
                  1890                 1895                 1900  
 Cys Ser Leu Val His Val Asp Leu Glu Ser Ser Ala Ser Leu Asn Gln  
                  1905                 1910                 1915                 1920  
 Gln Cys Leu Ser Lys Pro Ile Ile Asn Ala Ile Ile Thr Ala Thr Thr  
                  1925                 1930                 1935  
 Val Leu Cys Pro His Gly Val Leu Ile Leu Lys Tyr Ser Trp Leu Pro  
                  1940                 1945                 1950                 20  
 Phe Thr Arg Phe Ser Thr Leu Ile Thr Phe Leu Trp Cys Tyr Phe Glu  
                  1955                 1960                 1965  
 Arg Ile Thr Val Leu Arg Ser Thr Tyr Ser Asp Pro Ala Asn His Glu  
                  1970                 1975                 1980  
 Val Tyr Leu Ile Cys Ile Leu Ala Asn Asn Phe Ala Phe Gln Thr Val  
                  1985                 1990                 1995                 2000  
 Ser Gln Ala Thr Gly Met Ala Met Thr Leu Thr Asp Gln Gly Phe Thr  
                  2005                 2010                 2015  
 Leu Ile Ser Pro Glu Arg Ile Asn Gln Tyr Trp Asp Gly His Leu Lys  
                  2020                 2025                 2030                 30  
 Gln Glu Arg Ile Val Ala Glu Ala Ile Asp Lys Val Val Leu Gly Glu  
                  2035                 2040                 2045  
 Asn Ala Leu Phe Asn Ser Ser Asp Asn Glu Leu Ile Leu Lys Cys Gly  
                  2050                 2055                 2060  
 Gly Thr Pro Asn Ala Arg Asn Leu Ile Asp Ile Glu Pro Val Ala Thr  
                  2065                 2070                 2075                 2080  
 Phe Ile Glu Phe Glu Gln Leu Ile Cys Thr Met Leu Thr Thr His Leu  
                  2085                 2090                 2095  
 Lys Glu Ile Ile Asp Ile Thr Arg Ser Gly Thr Gln Asp Tyr Glu Ser  
                  2100                 2105                 2110                 40  
 Leu Leu Leu Thr Pro Tyr Asn Leu Gly Leu Leu Gly Lys Ile Ser Thr  
                  2115                 2120                 2125  
 Ile Val Arg Leu Leu Thr Glu Arg Ile Leu Asn His Thr Ile Arg Asn  
                  2130                 2135                 2140  
 Trp Leu Ile Leu Pro Pro Ser Leu Gln Met Ile Val Lys Gln Asp Leu  
                  2145                 2150                 2155                 2160  
 Glu Phe Gly Ile Phe Arg Ile Thr Ser Ile Leu Asn Ser Asp Arg Phe  
                  2165                 2170                 2175  
 Leu Lys Leu Ser Pro Asn Arg Lys Tyr Leu Ile Thr Gln Leu Thr Ala  
                  2180                 2185                 2190                 50

Gly Tyr Ile Arg Lys Leu Ile Glu Gly Asp Cys Asn Ile Asp Leu Thr  
 2195 2200 2205  
 Arg Pro Ile Gln Lys Gln Ile Trp Lys Ala Leu Gly Cys Val Val Tyr  
 2210 2215 2220  
 Cys His Asp Pro Met Asp Gln Arg Glu Ser Thr Glu Phe Ile Asp Ile  
 2225 2230 2235 2240  
 Asn Ile Asn Glu Glu Ile Asp Arg Gly Ile Asp Gly Glu Glu Ile  
 2245 2250 2255  
 // (配列番号 24)。

## 【0043】

10

本発明のタンパク質はまた、(配列番号4)、(配列番号6)、(配列番号8)、(配列番号10)、(配列番号12)、(配列番号14)、(配列番号16)、(配列番号18)、(配列番号20)、(配列番号22)、または(配列番号24)と実質的に同一なアミノ酸配列を有するポリペプチドを包含する。本願で使用する際は、「実質的に同一アミノ酸配列」という用語は、参照アミノ酸配列に関して、少なくとも約80%、さらに好ましくは約90%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列を意味し、約95%以上の配列同一性が特に好ましい。しかしながら、スプライス変異体として生じる、記述レベルより低い配列同一性を含むポリペプチドまたは保存アミノ酸置換によって修飾されるポリペプチドはまた、本発明の範囲内に包含されることが認識される。配列ホモロジーの度合いは、PowerBLAST、QBLAST、PSI-BLAST、PHI-BLAST、gappedまたはungapped BLAST、またはBaylor College of Medicine server(バイエル医科大学サーバ)(www.hgsc.bcm.tmc.edu/seq\_data)を使用する「オンライン」プログラムのようなコンピュータ化アルゴリズムを使用して、National Center for Biotechnology Information(国立バイオテクノロジーインフォーメーションセンター)のGenBankデータベース(NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)のデータベースのようなタンパク質データベースのアミノ酸配列類似性検索を行うことによって決定される。(例えば、Altschul, S. F., ら, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs(Gapped BLASTとPSI-BLAST:新世代のタンパク質データベース検索プログラム), "Nucleic Acids Res." 25(17): 3389~402 [1997]、Zhang, J., & Madden, T. L., PowerBLAST: a new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation(PowerBLAST:相互作用または自動配列分析と注釈用の新ネットワークBLASTアプリケーション), "Genome Res." 7(6): 649~56 [1997]、Madden, T. L., ら, Applications of network BLAST server(ネットワークBLASTサーバのアプリケーション), "Methods Enzymol." 266: 131~41 [1996]、Altschul, S. F., ら, Basic local alignment search tool(基本ローカルアライメント検索ツール), "J. Mol. Biol." 215(3): 403~10 [1990])。

20

生物学上機能的または活性ペプチド類似体もまた、クリプトウイルスタンパク質という用語に包含される。ペプチド「類似体」という用語は、1つ以上の残基が機能的に類似な残基で保存的に置換されて、天然クリプトウイルスタンパク質の生物活性を模倣する能力を呈示する、本願に特に示された配列と実質的に同一なアミノ酸残基配列を有する任意のポリペプチドを含む。

保存的置換の例は、イソロイシン、バリン、ロイシン、またはメチオニンのような一つの無極性(疎水性)残基の別の残基への置換、アルギニンとリジン間、グルタミンとアス

30

40

40

50

パラギンの間、グリシンとセリンの間のような一つの極性（親水性）残基の別の残基への置換、リジン、アルギニン、またはヒスチジンのような1つの塩基性残基の別の残基への置換、あるいは、アスパラギン酸またはグルタミン酸のような一つの酸性残基の別の残基への置換を含む。

「保存的置換」という表現はまた、係るポリペプチドが必要な生物活性を呈示するならば、非誘導体化残基の代わりに化学的に誘導体化した残基の使用を含む。

#### 【0044】

「化学的誘導体」とは、側鎖官能基の反応によって化学的に誘導体化されている1つ以上の残基を有する対象ポリペプチドを意味する。係る誘導体化分子は、例えば、遊離アミノ基が誘導体化されて、アミン塩酸塩、p-トルエンスルホニル基、カルボベンゾオキシ基、t-ブチルオキシカルボニル基、クロロアセチル基またはホルミル基を形成するような分子を含む。遊離カルボキシル基は、誘導体化されて、塩、メチル及びエチルエステル、またはその他の種類のエステル類またはヒドロジド類を形成し得る。遊離ヒドロキシ基は、誘導体化されてO-アシルまたはO-アルキル誘導体を形成し得る。ヒスチジンのイミダゾール窒素は、誘導体化されてN-im-ベンジルヒスチジンを形成する。20の標準アミノ酸の天然アミノ酸誘導体を一つ以上含むペプチドも化学的誘導体に含まれる。例えば、4-ヒドロキシプロリンは、プロリンに置換され、5-ヒドロキシリジンは、リジンに置換され、3-メチルヒスチジンは、ヒスチジンに置換され、ホモセリンは、セリンに置換され、そしてオルニチンは、リジンに置換され得る。本発明のポリペプチドはまた、本願にその配列を表示する本発明のポリペプチド配列を基準にして、必要な生物活性が維持される限りは、1つ以上の残基の付加及び/または欠失を有する任意のポリペプチドを含む。

本発明はまた、(配列番号4)、(配列番号6)、(配列番号8)、(配列番号10)、(配列番号12)、(配列番号14)、(配列番号16)、(配列番号18)、(配列番号20)、(配列番号22)、または(配列番号24)によって指定されるクリプトウイルスタンパク質の変異体も包含する。「変異体」とは、指定のクリプトウイルスタンパク質のアミノ酸配列が、配列中にある1つ以上のアミノ酸の欠失、置換、付加、または転位によって修飾されているポリペプチドを意味する。変異体が生じる(例えば、組換えによる)または作成される(例えば、部位特異的突然変異誘発による)方法は、当該分野で公知である。

クリプトウイルスタンパク質はまた、当業者に公知である、1つ以上の標識を含むことができる。

本発明のタンパク質は、例えば、本願に記述の組換え発現系、沈降法、ゲルfiltration、イオン交換、逆相及びアフィニティクロマトグラフィー、電気泳動等を含む、種々の公知の生化学的手段によって単離または精製される。その他によく知られた方法は、Deutscherら、Guide to Protein Purification Methods in Enzymology Vol. 182(酵素学におけるタンパク質精製方法ガイド 第182巻)，(Academic Press, [1990])に記述されている。

本発明の単離クリプトウイルスタンパク質はまた、化学的に合成することができる。例えば、合成ポリペプチドは、Applied Biosystems, Inc. (アプライドバイオシステム社) モデル430Aまたは431A自動ペプチドシンセサイザー(Foster City, CA)を、製造元提供の化学と本願に提供されているアミノ酸配列を用いて產生することができる。一方、クリプトウイルスタンパク質は、天然細胞ソースから単離または精製され得る。他方、クリプトウイルスタンパク質は、適切なプロテアーゼを使用することによって、本発明のキメラタンパク質から単離することができる。

他方、クリプトウイルスタンパク質は、本願に記述するように本発明の方法に従って、クリプトウイルスタンパク質をコードするポリヌクレオチドを発現するように遺伝的に修飾された真核または原核細胞によって產生され、組換えによって得ることができる。組換

10

20

30

40

50

え法は公知であり、例えば、Sambrookら、前述、1989)に記述されている。本発明のクリプトウイルスタンパク質を調製する手段の例は、目的のクリプトウイルスタンパク質をコードする核酸を、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、両生類細胞(即ち、卵母細胞)、または哺乳類細胞のような、本発明の発現ベクターを含む適切な宿主細胞中で、当該分野に公知の方法を用いて発現し、公知な方法を再度用いて、発現されたポリペプチドを回収することである。

#### 【0045】

「組換え宿主細胞」、「宿主細胞」、「細胞」、「細胞株」及び単細胞または単層実体として培養される原核または真核細胞株を指すその他の用語は、組換体発現ベクターまたはDNAまたはRNAのようなその他の外来核酸のレシピエントとして使用し得るか、あるいは使用された細胞を意味し、またトランスフェクトされた起源細胞の子孫を含む。天然、偶発性、作為突然変異のために、一つの親細胞は、その形態、ゲノムまたは全DNA成分が元の親と完全に同一であるとは限らないことが理解されている。10

本発明は、キメラタンパク質を含む。「キメラタンパク質」という用語は、天然では連鎖しない2つ以上の別々のタンパク質から抜き出されたアミノ酸配列を含むポリペプチドを意味する。本発明では、「キメラタンパク質」は、非クリプトウイルスタンパク質またはポリペプチド部分に融合された、クリプトウイルスタンパク質、または修飾アミノ酸配列を有するその分岐型またはポリペプチド変異株を含むポリペプチドを示すために用いられる。キメラタンパク質は、大変便利なことには、一つのポリペプチド部分を5'末端そして別のポリペプチドを3'末端にコードし、この別々な部分が適切な宿主細胞中で発現され得る一つの翻訳領域内で結合される、融合遺伝子の発現によって產生される。ある実施形態では、クリプトウイルスタンパク質は、キメラタンパク質のカルボキシ末端に位置する。他の実施形態では、クリプトウイルスタンパク質は、キメラタンパク質のアミノ末端に位置する。20

本発明のキメラタンパク質の、非クリプトウイルスタンパク質部分、あるいは「キメラパートナー」は、機能的酵素フラグメントであり得る。適切な機能的酵素フラグメントは、クリプトウイルスタンパク質に融合発現されると、定量可能な活性を呈示するポリペプチドである。代表的な酵素は、限定はされないが、-ガラクトシダーゼ(-gal)、-ラクタマーゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)、グルコースオキシダーゼ(GO)、ヒトスーパーオキシドジスムターゼ(hSOD)、ウレアーゼ等を含む。これらの酵素は、簡単な比色分析の手段によって產生されたキメラタンパク質量を定量化することができるため便利である。他方、例えば、ヒトスーパーオキシドジスムターゼ(hSOD)のような抗原タンパク質またはフラグメントを利用して、非クリプトウイルスタンパク質キメラパートナーに特異的な抗体を用いてキメラタンパク質を簡単に検出及び定量することが可能である。キメラタンパク質において、有用なキメラパートナーは、組換え宿主からの分泌を供給し、クリプトウイルスタンパク質のエピトープ(複数でもよい)の免疫反応性を増強し、あるいはクリプトウイルスピリペプチドの支持体またはワクチンキャリアへの共役を促進するアミノ酸配列を含む。(例えば、ヨーロッパ特許公報第116,201号、米国特許第4,722,840号、ヨーロッパ特許公報第259,149号、米国特許第4,629,783号を参照)。30

本発明のクリプトウイルスタンパク質の実施形態は、免疫反応性ポリペプチドとして有用であり、クリプトウイルス特異抗体の產生のための使用を含む。「免疫反応性」とは、抗体または受容体がポリペプチド中に含まれる特異的なエピトープを認識するために、抗体及び/またはリンパ球抗原受容体と免疫学的に結合するポリペプチドの能力、あるいはペプチドが免疫原性であるための abilities を意味する。「免疫原性」タンパク質は、アジュvantの有無に係わらず単独でまたはキャリアに結合して、細胞及び/または液性免疫応答を惹起するポリペプチドである。目的とする種々の単離クリプトウイルスタンパク質、またはクリプトウイルスタンパク質フラグメントの免疫原性は、一般的なスクリーニング法によって決定される。免疫反応性は、抗体結合、さらに詳しくは、抗体結合の動態、及び/または抗体が誘導されるエピトープを含む競合(複数でもよい)既知ポリペプチド(複数)40

数でもよい)を用いる結合の競合によって決定し得る。ポリペプチドが抗体と免疫反応性を有するか否かの決定方法は当該分野で公知である。免疫原性クリプトウイルスタンパク質の特に有用な例は、エンベロープタンパク質、即ち、F、F<sub>0</sub>、F<sub>2</sub>、F<sub>1</sub>、HN、並びにSHタンパク質である。

本願に使用する際は、「エピトープ」とは、ポリペプチドの抗原決定基を言及する。エピトープは、エピトープに特有の空間配座にある3個のアミノ酸を含むことができる。エピトープは典型的には、少なくとも約5個のアミノ酸、さらに普通は少なくとも約8個のアミノ酸から約10個、あるいはそれ以上のアミノ酸を含むようにマップされる。アミノ酸の空間配座を決定する方法は当該分野に公知であり、例えば、X線結晶学並びに二次元核磁気共鳴法を含む。

10

## 【0046】

免疫原性クリプトウイルスタンパク質は、ワクチンの生産または製造に有用である。前述のように、クリプトウイルスはウイルスのパラミクソウイルス科ファミリーに属する。多数のワクチンが、このウイルスファミリーのウイルスに対してヒト及び家畜動物向けに開発されてきた。例えば、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、イヌジステンパーウイルス、イヌパラインフルエンザウイルスタイプ2、及びニューカッスル病(家禽)に対する有効なワクチンがある。これらのウイルスは、種向性が狭く(即ち、そのウイルスは一種のみあるいは数種のみを感染する)、唯一または一つの優先的な血清型として存在し(そのウイルスに対して普遍的保護性を有するワクチンを作製する)、宿主において有意な罹患率の原因となる(即ち、そのウイルスがヒト疾患の明らかな原因である)、並びにそれらのウイルスは汎発性である(即ち、世界的な懸念である)ために、有効なワクチン開発の対象となった。

20

クリプトウイルスは、他のファミリーメンバーと同様な理由でワクチン開発に適する。このウイルスの別々のソースに対して作製された過免疫ウサギ抗血清の交差中和能力が実証されており、このウイルスゲノムの極めて類似するヌクレオチド配列がウイルスの2つのソースから得られている(BBR株及びニイガタ細胞関連株)。

本発明に従って、多価または単価ワクチンが、1つ以上のクリプトウイルスタンパク質に対して調製され得る。特に、限定はされないが、エンベロープタンパク質F、F<sub>0</sub>、F<sub>2</sub>、F<sub>1</sub>、HN、並びにSHタンパク質のような1つ以上のクリプトウイルスタンパク質を含むワクチンが考案されている。免疫原性ポリペプチドを活性成分として含有するワクチンの製造方法は、当業者には公知である。典型的には、係るワクチンは、クリプトウイルスタンパク質(複数でもよい)を液状溶液または懸濁液のいずれかとして含む注射可能な組成物として調製され、注射前に液体で溶液とするかあるいは懸濁液とするために適する固形形態で調製されてもよい。調製物はまたエマルジョン、あるいはリポソーム中にカプセル化したタンパク質でもよい。活性免疫原性成分は典型的には、薬剤として認容性があり、活性成分と適合性がある賦形剤と混合される。適切な賦形剤またはキャリアは、例えば、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール等及びそれらの組み合わせである。さらに、所望するならば、ワクチンは湿潤剤または乳化剤のような補助物質、pH緩衝剤、及び/またはワクチンの有効性を増強するアジュバントを少量含んでもよい。

30

有効であり得るアジュバントの例は、限定はされないが、以下を含む:水酸化アルミニウム、N-アセチル-ムラミル-L-テロニル-D-イソグルタミン(thr-MDP)、N-アセチル-ノル-ムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン(CGP 11637、nor-MDPと呼ぶ)、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミニル-L-アラニン-2-(1-2-ジパルミトイール-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミン(CGP 19835A、MTP-PEと呼ぶ)、並びに細菌から抽出された3つの成分である、モノホスホリルリピドA、トレハローズジミコラート、及び細胞壁骨格(MPL+TDM+CWS)を含むRIBI含有2%スクアレン/Tween 80エマルジョン。特定のアジュバントの有効性は、免疫原性クリプトウイルスタンパク質をアジュバントと共に含むワクチンを投与する結果として、本タンパク

40

50

質に対して誘導される抗体量を測定することによって決定され得る。

タンパク質は、中性または塩の形状でワクチン中に製剤化され得る。薬剤認容性塩は、酸付加塩（ペプチドの遊離アミノ基で形成される）、及び、例えば、塩酸またはリン酸のような無機酸、あるいは、酢酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸等のような有機酸によって形成されるものを含む。遊離カルボキシル基で形成される塩はまた、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウムまたは水酸化第二鉄のような無機塩基、及び、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどのような有機塩基に由来し得る。

#### 【0047】

ワクチンは従来は非経口的に注射、例えば、皮下または筋肉内によって投与されるが、鼻内、腸内、あるいは任意のその他の送達ルートによっても送達されてもよい。投与にアジュバント使用の有無は問わない。その他の非注射投与モードに適するワクチン組成物の他の製剤は、坐薬及びある場合は経口製剤を含む。坐薬用の、従来の結合剤及びキャリアは、例えば、ポリアルキレングリコールまたはトリグリセリドを含んでもよく、係る坐薬は、活性成分を0.5%～10%、好ましくは1%～2%の範囲で含有する混合物から形成され得る。経口製剤は、例えば、製薬グレードのマンニトール、ラクトース、スターチ、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどのような通常利用される賦形剤を含む。これらの組成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、丸薬、カプセル、カプレット、徐放性製剤または粉末の形態をとってよく、典型的には活性成分を10%～95%、好ましくは25%～70%含有する。

上記の他に、弱毒化微生物、例えば、突然変異型クリプトウイルス粒子を含む弱毒化または非病原性ウイルス粒子、及び1つ以上のクリプトウイルスタンパク質をコードする本発明の組換え核酸を含むその他の弱毒化ウイルス粒子、または本願に記述するような、本発明の発現ベクターによってコードされた組換え型クリプトウイルスタンパク質を発現する宿主細胞から成る生ワクチンを製造することが可能である。適切な弱毒化微生物は当該分野で公知であり、例えば、ウイルス（例えば、ワクチニアウイルス）並びに細菌を含む。

他方、死菌クリプトウイルス粒子またはビリオン、またはクリプトウイルスエンベロープタンパク質を担う死菌シュードタイプウイルス粒子またはビリオンは、ワクチンの製造に有用である。ビリオンは、公知方法によって、ワクチン目的に死菌される。

ワクチンは、投与量処方に適合し、予防及び/治療的に有効であるような量が投与される。投与量は、一般的には一用量あたり約5μg～約250μgの範囲であるが、ワクチン接種される対象、抗体を合成するための対象の免疫力、及び所望する保護の度合いに基づく。投与されるべき活性成分の正確な量は医者の判断に拠り、ワクチンを受ける各動物またはヒトに特有であり得る。齧歯類、ウサギ類、ヤギ、ブタ、ウシ、ヒツジ、及び靈長類を含む、特に哺乳類種のメンバーである、任意の適切な脊椎動物はワクチン接種され得る。

ワクチンは、単一投与スケジュール、あるいは好ましくは複数回投与スケジュールで接種され得る。複数回投与スケジュールは、ワクチン接種の主要な経過が、1～10の別々の用量によるものであり、免疫応答を維持及び/または強化するために必要とされる時間間隔で、例えば、第二投与は1～4ヶ月目、必要であれば、数ヶ月後に後続投与（複数でもよい）を行うものである。用法はまた、少なくとも部分的には、ワクチン接種を受ける個々の動物またはヒトの免疫学的特徴並びにニーズによって決定されるのもあり、医師の判断に拠らなければならない。

さらに、前述のクリプトウイルスタンパク質を含有するワクチンは、例えば、免疫グロブリンのような、その他の免疫調節剤と併用して投与してもよい。

本発明の組成物は、その後多数の適応に使用することのできる、ポリクローナル抗体（従来の方法を用いて血清から精製または単離される）を生成するために、個々の動物またはヒトに投与し得る。例えば、ポリクローナル抗体は、動物またはヒトを受動免疫するため、または以下に説明するように、免疫化学用試薬として使用することができる。

10

20

30

40

50

本発明はまた、クリプトウイルスN P、V、P、M、F、 $F_0$ 、 $F_2$ 、 $F_1$ 、S H、H N、またはLタンパク質のような、クリプトウイルスタンパク質を特異的に結合する単離抗体に関連する。「抗体」という用語は、少なくとも一つの抗体結合ドメインから成るポリペプチドまたはポリペプチド群を意味する。「結合ドメイン」は、抗体分子の可変ドメインの折り畳みによって形成され、抗原のエピトープの特徴に相補性のある内部表面形態と電荷分布を有する三次元結合空間を形成し、これが抗原との免疫反応を可能にする。抗体結合ドメインは、抗原結合の原因となる超可変ループを形成する、H鎖及び/またはL鎖ドメイン（それぞれ $V_H$ と $V_L$ ）から形成され得る。典型的な脊椎動物の抗体はテトラマーであるか、その凝集体であり、典型的にY型立体配置に凝集され、鎖間に共有結合を有していることもあるれば、有していないこともある、L鎖とH鎖を含む。脊椎動物の抗体では、ある特定の抗体の全鎖のアミノ酸配列は、インビボまたはインビトロでその抗体を產生するリンパ球（例えば、ハイブリドーマ）によって產生された一つの抗体中に発見される鎖と相同である。

## 【0048】

「单離された」抗体は、例えば、ポリクローナル抗体であり、それを產生する動物またはヒトの身体から取り出された抗体である。本発明のポリクローナル抗体は、例えば、血液、リンパ、または乳のような細胞材料からさらに精製することができる。好ましい実施形態は、1つ以上のクリプトウイルスタンパク質に対して誘導された抗血清の形態である。他方、本発明の「单離」抗体は、その產生が、例えば、モノクローナル抗体またはキメラ抗体のように、操作またはヒトの介入を伴う抗体を含む。

本発明の「抗体」は、IgG、IgM、IgA、IgD、またはIgE、あるいは特定のクリプトウイルスエピトープを結合する抗体フラグメントを含む、任意の免疫グロブリンを含む。係る抗体はまた、当該分野に公知のハイブリドーマ、化学合成、または組換え法によって產生され得る。（例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual（第二版）（分子クローニング：実験マニュアル）（第二版），Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA [1989]）、HarlowとLane, Antibodies: A Laboratory Manual（抗体：実験マニュアル）（Cold Spring Harbor Laboratory [1988]）。抗クリプトウイルスタンパク質及び抗キメラタンパク質抗体のどちらも本発明の範囲において有用であり得る。（Bahouthら, "Trends Pharmacol. Sci." 12:338 [1991]、AusubeらCurrent Protocols in Molecular Biology（分子生物学における現代のプロトコル）（John Wiley and Sons, NY [1989]）。キメラ抗体の例は、米国特許番号4,816,397号及び第4,816,567号に説明されている。蛍光標識抗体、酵素結合抗体、あるいは、当該分野で公知であるように、別の方法で検出機能が標識されている抗体が、「抗体」にまた含まれる。

「抗体」はまた「キメラ抗体」も含む。キメラ抗体は、H鎖及び/またはL鎖がキメラタンパク質である抗体である。典型的には、この鎖の定常ドメインは一つの特定の種及び/またはクラスに由来し、そして可変ドメインは別の種及び/またはクラスに由来する。H鎖またはL鎖のいずれかまたは両方が、そのソースが異なるクラス、あるいは起源の異なる種であろうが、融合点が可変/定常境界である如何に関わらず、異なるソースの抗体配列を模倣する配列の組み合わせによって構成される。したがって、定常及び可変領域のいずれも既知抗体配列を模倣しない抗体を產生する可能性がある。そこで、例えば、その可変領域がある特定の抗原に高特異的親和性を有するか、あるいはその定常領域が、補体固定の増強を誘導できる抗体を構築すること、または特定の定常領域が所有する特性のその他の改善を行うことが可能になる。

抗体のFab及び $F(ab')フラグメントもまた「抗体」の定義に含まれる。「Fab」領域は、H及びL鎖の枝分かれ部分を含む配列に対して、おおよそ等価、または類$

10

20

30

40

50

似である、そして特定の抗原に対する免疫結合を呈示しているが、エフェクターF<sub>c</sub>部分を欠如する、H及びL鎖の部分を意味する。「F a b」フラグメントは、一本のH鎖と一本のL鎖の凝集体である。同様にエフェクターF<sub>c</sub>部分を欠如するF(a b')<sub>2</sub>フラグメントは、指定された抗原または抗原ファミリーと選択的に反応することができる、二本のH鎖と二本のL鎖を含むテトラマー（四量体）である。抗体の「F a b」及びF(a b')<sub>2</sub>フラグメントを产生する方法は、当該分野で公知であり、例えば、タンパク質分解、及び組換え法による合成を含む。したがって、本発明の抗クリプトウイルス抗体はまた、F a bまたはF(a b')<sub>2</sub>フラグメントでもあり得る。

V<sub>H</sub>ドメインから構成される抗体であり、クリプトウイルス抗原と免疫反応する「単ドメイン抗体(d A b)」もまた有用である。d A Bは、V<sub>L</sub>ドメインを含まないが、例えば、カッパ及びラムダドメインのような抗体に存在することが公知のその他の抗原結合ドメインを含み得る。d A Bの調製方法は、当該分野で公知である（例えば、Wardら、「Nature」341：544 [1989]を参照）。

#### 【0049】

その他の好ましい実施形態は、ヒト化、CDRグラフトまたは二機能性、即ち、二価抗体、のような修飾抗体を含み、その総てをまた当該分野に公知の方法によって产生することができる。「修飾抗体」とは、脊椎動物における天然アミノ酸配列が変異されている抗体を意味する。組換えDNA技術を利用して、望ましい特性を獲得するために抗体を再設計することができる。可能な変異は多数あり、そして1つ以上のアミノ酸の変更から、例えば定常領域のような領域の完全な再設計まで及ぶ。定常領域における変化は、一般的には、所望の細胞プロセス特性、例えば、補体固定、膜との相互作用、並びにその他のエフェクター機能の変更、を得るために行われる。可変領域における変化は、抗原結合特性を修飾するために行われることがある。抗体はまた、特定の細胞または組織部位への分子または物質の特異的送達を補助するために設計され得る。望ましい修飾は、分子生物学、例えば、組換え法、部位特異的突然変異誘発等、における公知技術によって作製し得る。

本発明の抗体の好ましい実施形態は、前述のクリプトウイルスエンベロープタンパク質を特異的に結合する。本発明の抗体の他の好ましい実施形態は、クリプトウイルヌクレオカプシドタンパク質を特異的に結合するが、他のどのクリプトウイルスタンパク質を特異的に結合する抗体もまた有用であり好ましい。

本発明の抗体は、なかでもとりわけ、診断またはアッセイ方法及び生物材料サンプル中に存在するクリプトウイルスタンパク質を検出するために使用できる。係るポリペプチドの検出に関して、抗体は、インビトロ診断またはアッセイ方法、あるいはインビボイメージング法に使用できる。係る抗体はまた、本発明のクリプトウイルスタンパク質の免疫アフィニティーまたはアフィニティークロマトグラフィー精製にも使用できる。

本発明は、生物材料サンプル中におけるクリプトウイルスタンパク質の存在の有無のインビトロ検出法を含む。この方法は、特に、しかし独占的というわけではなく、診断または病理学的目的の、臨床または実験用生物材料の検査に有用である。

サンプルは、本願に記述する本発明の抗体と接触され、サンプルの構成要素に対する抗体の特異的結合を検出するために、公知の免疫学的方法が用いられる。特異的結合の存在は、サンプル中にクリプトウイルスタンパク質が存在することを指示する。

サンプル中の標的クリプトウイルスタンパク質のインビトロ検出に有用な免疫学的方法は、検出可能な形態にある本発明のクリプトウイルスタンパク質特異抗体を利用する免疫アッセイ系を含む。

係る免疫アッセイ法及び系の既知プロトコルは、例えば、競合、または直接反応、またはサンドイッチタイプアッセイに基づく。係る免疫アッセイ法及び系は、例えば、当該分野に公知である、ELISA、免疫プロット、免疫蛍光アッセイ（IFA）、パンデックスマイクロ蛍光定量アッセイ、凝集アッセイ、フローサイトメトリ、血清診断アッセイ及び免疫組織化学染色法を含む。

抗体は、当該分野に公知の種々の手段によって検出可能に作製することができる。一次抗体・抗原複合体からのシグナルを增幅するアッセイ系もまた知られており、その例は、

10

20

30

40

50

ビオチンとアビジン、並びに E L I S A アッセイのような、酵素標識と介在型免疫アッセイを利用するアッセイである。検出マーカーは、このアッセイプロトコルでは、一次または二次抗体に直接または間接的に連結することができる。有用なマーカーは、例えば、放射性核種、酵素、フルオロゲン（蛍光原）、色素原、及び化学ルミネッセント標識を含む。実施形態は、固体支持体マトリックスを利用したり、または免疫沈降法を含む。

これらの同一免疫アッセイ法と系は、抗体を含有する生物材料中におけるクリプトウイルス特異性抗体の有無を検出する本発明の方法に利用することができる。抗体を含有する生物材料は、限定はされないが、全血及び血液成分、血漿、血清、髄液、リンパ液、呼吸器、腸、及び尿生殖路の外部切片、涙、唾液、乳、白血球、及び骨髄腫を含む。プロセスされた抗体含有画分またはこれらのいずれかの希釈液はまた、抗体を含有する生物材料と見なされる。10

#### 【 0 0 5 0 】

クリプトウイルス特異抗体の存在の有無を検出する方法の一つの好ましい実施形態は、クリプトウイルスに感染していると疑われる個体由来のサンプルを、本願に説明するように、ウイルスピリオンまたは1つ以上のクリプトウイルスエンベロープタンパク質を含むウイルス粒子に接触させて、クリプトウイルス抗原を選択的に結合する抗体が存在する場合は、抗体結合複合体が形成することを含む。次に、かくして形成された任意の抗体が結合したクリプトウイルス抗原複合体は、抗ヒト抗体を結合する免疫グロブリンまたは、例えば、F a b 及び / または F ( a b ' )<sub>2</sub> フラグメントのような、抗ヒト抗体を結合するフラグメントに接触され、そして免疫グロブリンまたはそのフラグメントと抗体が結合したクリプトウイルス複合体との複合体形成が可能となる。複合体が形成されたか否かは、本願に記述のような公知の免疫検出手段のいずれかを用いて検出される。係る複合体の存在は、サンプル中にクリプトウイルス抗原を選択的に結合する抗体が存在することを示す。20

他のさらに好ましい実施形態は、クリプトウイルスに感染していると疑われる個体由来のサンプルを、本発明のクリプトウイルスエンベロープタンパク質に接触させ、クリプトウイルスを選択的に結合する抗体が存在する場合には、抗体が結合したエンベロープタンパク質複合体が形成される。かくして形成された任意の抗体が結合されたエンベロープタンパク質複合体は、次に抗ヒト抗体を結合する免疫グロブリンまたは F a b と F ( a b ' )<sub>2</sub> フラグメントのような抗ヒト抗体を結合するフラグメントと接触される。免疫グロブリンまたはその F a b 及び F ( a b ' )<sub>2</sub> フラグメントと抗体が結合したエンベロープタンパク質複合体との複合体の形成が可能となり、かくして形成された抗体結合エンベロープタンパク質複合体の存在の有無が検出される。係る複合体の存在は、クリプトウイルスを選択的に結合する抗体がサンプル中に存在することを示す。30

クリプトウイルスタンパク質またはクリプトウイルス抗原に対する抗体の「選択的」または「特異的」な結合という用語は、S V 5 のような密接に関連するルプラウイルスとの非対称性交差反応性結合を含むが、非関連性抗原または表面に対する非特異的結合は含まれない。当業者は、非特異抗体結合を決定するための免疫アッセイ系に含まれることが好ましい重要なコントロールについて認識している。典型的には、例えば E L I S A においては、非特異的結合のバックグラウンドレベルが決定され、基線として用いられる。40

「複合体形成」とは、抗体のようなタンパク質が、複合体 - 即ちその他の構成要素間の化学的結合 ( binding ) または結合 ( bonding ) の結果生じる混合物または付加物 - の構成要素またはメンバーであることを意味する。化学的結合 ( binding ) または結合 ( bonding ) は、共有結合、イオン結合、水素結合、疎水結合である性質、または、種々なタイプからなる成分を一つまたは多数を有する可能性のある、複合体の構成要素を任意の部分または成分で結合するこれらの結合タイプの任意の組み合わせを有することができる。抗体 - 抗原結合は典型的には非共有結合である。複合体の全ての構成要素が全てのその他の構成要素と結合する必要はないが、各構成要素は少なくとも複合体の一つの構成要素と少なくとも一つの化学的結合を有する。例えば、アッセイ系における二次抗体は、クリプトウイルス抗原、またはウイルス粒子またはビリオンに直接的に50

結合しないこともあるが、それと複合体を形成している。

ヒト患者におけるクリプトウイルス感染を検出するための臨床診断用実施形態のさらなる非限定例として、患者からの血清検体を、クリプトウイルス特異抗体について、ELISA、放射性免疫沈降法、免役プロット法、または任意のその他の免疫学的方法（例えば、直接または関節蛍光抗体法、免役ビーズ等）によって、ウイルスの主要エンベロープタンパク質（F<sub>0</sub>とHN）に対してスクリーンする。オプションとして、他の血液サンプルを任意の血清陽性の個体から得る。ウイルスは、細胞を適切な勾配培地上で単離し、サイクリックGMPの存在下で細胞を培養し、次に（1）クリプトウイルス特異的蛍光抗体を伴う細胞内クリプトウイルス特異的封入体について細胞をスクリーニングすること、または（2）クリプトウイルス特異的ヌクレオチドプライマーを用いて誘導されたPBMCのPCR增幅を行うこと、のいずれかによって、係るサンプルのPBMC中に検出することができる。10

#### 【0051】

クリプトウイルス特異抗体は、血清陽性個体の血清中に発見され、現在あるいは過去のクリプトウイルス感染を指摘するが、これらの抗体は必ずしもテンカン様または脳疾患の兆候ではない。クリプトウイルスは、必ずしも脳疾患を起因することなく、かなりの割合の個体のPBMC中に感染または存在していると思われる。これらの個体は、明白に無症候性であると考えられる。ウイルスの神経病理学的（例えば、テンカン様、脳性、及びその他の神経学的、神経変性、及び／または神経精神医学的疾患）潜在能力は、ウイルスが神経系組織を感染した個体においてのみ顕在化するように思われる。結局、脳脊髄液（CSF）中に発見されたクリプトウイルス特異抗体のみ（即ち、ウイルスの主要エンベロープタンパク質、FとHNに対して誘導されたもの）が、神経学的、神経変性、及び／または神経精神医学的疾患の完全な兆候であり、したがって、それらは実質的に常に兆候である。さらなる例として、顕著な短期記憶喪失を伴う慢性疲労症候群であることが過去に診断され、CSFサンプルを得ることのできた10人のヒト患者は、その全員がCSF中にクリプトウイルス特異抗体、並びに欠神テンカン（即ち小発作性テンカン）の診断と一貫する脳波プロファイルを有することが見いだされている。20

本発明はまた、特に抗体を含有する生物材料において、生物サンプルの検査またはアッセイに有用である、抗クリプトウイルス抗体検出キットに関する。したがって、本発明のキットは、ヒト血液、血清、血小板、血漿、組織及び臓器である臨床用サプライを、輸血または移植目的でその安全性を判定するためのスクリーニングに有益である。本発明のキットの診断への適用もまた有用である。30

本発明のキットは、クリプトウイルス及びその抗原を選択的に結合する抗体を検出するための本発明のアッセイ法及びクリプトウイルス特異抗体の存在の有無についての本発明による検出方法を実施するために特に有用である。いくつかの好ましい実施形態では、このキットは、（配列番号1）と完全相補なヌクレオチド配列を有するゲノムを含む、単離クリプトウイルス粒子を含む。キットは、標識抗ヒト抗体を結合する抗体、好ましくは抗ヒト免疫グロブリン、または、F<sub>a</sub>b及び／またはF(a b')<sub>2</sub>のような、標識抗ヒト抗体を結合する抗体フラグメントを含む。キットの好ましい実施形態は、さらにクリプトウイルス粒子（複数でもよい）を支持するための固体マトリックスを含む。好ましい実施形態では、抗クリプトウイルス抗体検出キットにおけるクリプトウイルス粒子は、クリプトウイルスピリオンであり、好ましい実施形態では、クリプトウイルスピリオンは、急性感染仔ハムスター腎臓（BHK）細胞由来細胞株、Vero由来細胞株、またはCV-1-由来細胞株（例えば、CV-1<sub>c</sub>由来細胞株、以下に説明）のような急性クリプトウイルス感染細胞株から產生される。40

一方、クリプトウイルス粒子を含まない本発明の抗クリプトウイルス抗体検出キットの最も好ましい実施形態では、キットは、前述のように、複数の一つ以上の種類の単離クリプトウイルスタンパク質及び／またはクリプトウイルスタンパク質成分を含むキメラタンパク質を含む。いくつかの好ましい実施形態では、クリプトウイルスタンパク質またはタンパク質成分は、本願に説明するように、エンベロープタンパク質である。係る実施形態50

はまた、抗ヒト免疫グロブリンのような、標識抗ヒト抗体を結合する抗体または、F<sub>a</sub>b及び／またはF(a b')<sub>2</sub>フラグメントのような、標識抗ヒト抗体を結合する抗体フラグメントを含む。係るキットの好ましい実施形態は、さらにクリプトウイルスタンパク質を支持するための固体マトリックスを含む。

固体マトリックス、または支持体、並びに固体マトリックスにウイルス粒子及びタンパク質を付着または吸収する方法は当該分野で公知である。本発明のキットに従って、「固体マトリックス」という用語は、ウイルス粒子またはタンパク質が固定または接着することができる任意の固体または半流動体支持体または表面を含む。適切な支持体は、ガラス、プラスチック、金属、ポリマーゲルなどを含み、ビーズ、ウェル（単一、複数ウェル血清プレート）スライド、ディップスティック、膜などの形態をとる。

#### 【0052】

例えば、ELISA、RIA、またはサンドイッチタイプアッセイのようなキットを使用する当業者には公知であるように、至適に可溶化または懸濁の上、至適に希釈した生物サンプルは、典型的には固体マトリックス（例えば、血清プレートのウェル）表面に支持されたウイルス粒子またはタンパク質と接触され、そして適切な洗浄とインキュベーションの後、さらに標識抗ヒト抗体と結合する免疫グロブリンまたは標識抗ヒト抗体と結合するフラグメントに接触される。さらなる洗浄後、クリプトウイルス粒子またはタンパク質と結合したヒト抗体に結合された抗ヒト抗体複合体の形成を検出するために、市販のプレートリーダー及び／またはその他の付属検出機器を、典型的には本発明のキットと併用する。

使用説明書はキットに含まれる。「使用説明書」は、典型的には、本願に説明するような特定の本発明のアッセイ方法における、試薬濃度または、混合されるべき試薬とサンプルの相対量、試薬／サンプル混合物の維持期間、温度、バッファー条件、インキュベーション、洗浄などのような少なくとも一つのアッセイ方法パラメーター、典型的には用途を説明する具体的な表現を含む。

オプションとして、キットはまた、希釈剤、緩衝液、またはその他の認容性のあるキャリア、検体容器、シリング、ピペットまたは計量ツール、濃縮、沈降、または分画サンプル用装置、またはコントロールに使用するための本発明の抗体のような他の有用な成分を含む。

キットにアセンブルされた材料と成分は、操作性と有用性を保つ便利で適切な方法で格納されて、医師に提供され得る。例えば、成分は、溶解、脱水、または凍結乾燥形態で、室温、冷蔵、または冷凍温度で提供され得る。

成分は典型的には、適切な包装材（複数でもよい）中に含まれる。本願で使用する際は、「包装材」という表現は、キットの内容物を収納するために使用される1つ以上の物理的構造物を意味する。包装材は公知の方法によって構築され、好ましくは滅菌、不純物を含まない環境を提供する。

キットで使用される包装材は、ウイルス及びペプチド系で通常利用されるものである。本願で使用する際は、「包装」という用語は、ガラス、プラスチック、紙、フォイル等のような、個々のキット成分を保持することが可能である、適切な固体マトリックスまたは材料を意味する。したがって、例えば、包装はウイルスまたはペプチド成分を含む本発明の組成物の適量を収容するために用いられるガラス製バイアルであり得る。包装材は一般的には内容物、容量、及び／またはキットの目的及び／またはその成分を表示する外部ラベルを有する。

したがって、本発明は、研究、臨床診断、及び輸血または移植を目的とする血液、血液成分または製品、並びに組織と臓器のスクリーニングに有用な免疫アッセイ法とキットを提供する。これらの使用は、末梢血单核細胞（PBMC）がクリプトウイルスを潜伏し、係る汚染血液、血液製品、組織、または細胞を投与された患者において感染して疾患を起こす可能性があるために、極めて価値と有用性がある。

本願に先述する、生物材料サンプル中におけるクリプトウイルス特異的RNAの存在の有無を検出するための本発明の方法はまた、これら並びにその他の目的に特に有用である

10

20

30

40

50

。本方法の最も好ましい実施形態に従って、クリプトウイルスRNAは、核酸セグメントを増幅する数多くの既知方法のいずれかによってRNAまたはcDNAの形態に増幅される。増幅前に、必須ではないが、サンプル中のDNAからRNAを抽出または分離し、そしてDNAから分離されたサンプルのその分画に残存する核酸を増幅することが好ましい。増幅産物は、もあるとすれば、次にクリプトウイルス特異的増幅産物が存在することを検出するために分析される。クリプトウイルス特異的増幅産物が存在する場合、その所見はサンプル中にクリプトウイルスRNAが存在することの表れである。陰性(即ち、クリプトウイルス特異的増幅産物が検出されない)の解釈を信頼度を高めるため、細胞ハウスキーピング遺伝子、例えば、アクチン、ホスホフルクトキナーゼ(PFK)、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ、またはホスホグリセリン酸キナーゼをコードする遺伝子、に特異的なmRNAのコントロール増幅後にオプションとして分析が行われる。  
10

### 【0053】

サンプル中のRNAは、適切な増幅法によって増幅される。例えば、好ましい実施形態では、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)が、クリプトウイルス特異的核酸の増幅に利用される。簡単に言えば、増幅プロセスには、cDNAを増幅してクリプトウイルス特異的増幅産物を產生するために、サンプル中のクリプトウイルス特異的RNA鑄型からクリプトウイルス特異的cDNAを転写するための逆転写酵素、耐熱性DNAポリメラーゼ(例えば、Taqポリメラーゼ)の2つの酵素、並びにクリプトウイルス特異的プライマーが使用される。制限サイクルPCRの使用は、半定量的な結果を生じる。(例えば、Gelfandら, Reverse transcription with thermostable DNA polymerase-high temperature reverse transcription(耐熱性DNAポリメラーゼによる逆転写-高温逆転写), 米国特許番号第5,310,652号、5,322,770号、Gelfandら, Unconventional nucleotide substitution in temperature selective RT-PCR(温度選択性RT-PCRにおける従来とは異なるヌクレオチド置換), 米国特許番号第5,618,703号)。  
20

本発明の方法の他の好ましい実施形態では、単一酵素RT-PCRがクリプトウイルス特異的核酸の増幅に利用される。単一反応で逆転写とポリメラーゼ機能のどちらも実行する一つの酵素が今では存在する。例えば、パーキンエルマー組換え型高度好熱菌(*The thermus thermophilus*)(rTth)酵素(ロシュ分子(Roche Molecular))、あるいはその他の同様な酵素が市販されており入手可能である。パーキンエルマーABIプリズム7700(Perkin Elmer ABI Prism 7700)、いわゆるライトサイクラー(Roche Molecular)のようなサイクリング機器及び/またはその他の同様な機器がRT-PCRの実行に有用である。オプションとして、例えば、rTth酵素を利用する単一酵素RT-PCRテクノロジーをPCR系において使用することができる。

例えば、RT-PCR検査はウイルス検出に極めて感受性がある。例えば、RT-PCRプライミング法は、(培養、サイクリックGMP誘導、及び継代培養することなく)非増殖的にウイルスを潜伏しているPBMCにおける検出可能なクリプトウイルス運搬率を $1:10^5$  PBMCの次数で確認するために使用される。さらに、クリプトウイルスゲノムの数多くのフラグメントが、クリプトウイルス特異的プライマーとRT-PCR増幅法を用いてAV<sub>3</sub>/SSPEからクローン化されている。  
40

好ましくは、増幅と分析は、サンプルからRNAを自動的に抽出し、次にPCRを実施し、そしてTaqManまたは分子標識プローブのようなプローブを用いて増幅産物の蛍光検出が後続する、自動化様式で実行される。典型的には、この計測手段は、さらなる増幅または分析ステップなしに、PCR中、または直後に定量的分析結果を提供するソフトウェアを含む。

他の好ましい実施形態では、クリプトウイルス特異的核酸を増幅するためにtrans  
50

cription-mediated amplification (TMA) 法(転写増幅法)が利用される。(例えば、K. Kamisangoら, Quantitative detection of hepatitis B virus by transcription-mediated amplification and hybridization protection assay (転写増幅及びハイブリダイゼーション保護アッセイによるB型肝炎ウイルスの定量的検出), "J. Clin. Microbiol." 37(2): 310~14 [1999]、M. Hiroseら, New method to measure telomerase activity by transcription-mediated amplification and hybridization protection assay (転写増幅及びハイブリダイゼーション保護アッセイによるテロメラーゼ活性測定の新方法), "Clin. Chem." 44(12): 2446~52 [1998])。cDNAの増幅にRT-PCRを使用するよりはむしろ、TMAはクリプトウイルス特異的(標的配列)RNAを認識するプローブを使用し、後続するステップにおいては、プローブ中にビルトインされたプロモーター配列から、RNAポリメラーゼは反復してcDNA中間体を転写し、実質的にオリジナルRNA転写物を増幅して、RT-PCRの感受性に近いレベルで新コピーが作出される。この反応は、PCRのように異なる温度を通じてサイクリングするよりはむしろ、等温(一つの温度)で行われる。

#### 【0054】

その他の有用な増幅法は、RT-PCRと同様な有用性を持つ、逆転写酵素介在性リガーゼ連鎖反応(RT-LCR)を含む。RT-LCRは、逆転写酵素がmRNAからcDNAを生成し、次にDNAリガーゼが、標的cDNAに結合後に隣接する合成オリゴヌクレオチドを結合する。

最も好ましくは、サンプル中にあるクリプトウイルス特異的核酸セグメントの増幅は、本願に説明するように、本発明のクリプトウイルス特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いて達成し得る。

オプションとして、ハイスループット分析は、例えば、さらなる診断情報を得るために、クリプトウイルス特異的核酸のみならず、ハウスキーピング遺伝子(コントロール)またはその他の診断マーカー候補の発現産物を増幅するように誘導されたプライマーのような複数のプライマーセットを用いて、当該分野に公知のマルチプレキシング技術によって達成し得る。(例えば、Z. Linら, Multiplex genotype determination at a large number of gene loci (多数遺伝子座におけるマルチプレックス遺伝子型決定), "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 93(6): 2582~87 [1996]、Demetriouら, Method and probe for detection of gene associated with liver neoplastic disease (肝臓新生物疾患に関連する遺伝子検出のための方法並びにプローブ), 米国特許番号第5,866,329号)。

ハイブリダイゼーション分析は、クリプトウイルス特異的核酸増幅産物の存在の有無を検出するための増幅産物分析の好ましい方法であり、相補ヌクレオチド配列を含む一本鎖クリプトウイルス特異的核酸増幅産物と、適切なストリンジエンシー条件下でハイブリダイズする、1つ以上のクリプトウイルス特異的プローブ(複数でもよい)を用いる。増幅産物は典型的には、セルロースまたはニトロセルロース膜のような基質上に沈着され、次にオプションとして電気泳動後に、標識クリプトウイルス特異的プローブ(複数でもよい)でハイブリダイズされる。従来のドットプロット、サザン、ノーザン、または蛍光インサイト(FISH)ハイブリダイゼーションプロトコル、インリキッド・ハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション保護アッセイ、またはその他の半定量あるいは定量ハイブリダイゼーション分析法は通常は、本発明のクリプトウイルス特異的プローブと併用される。当業者には容易に理解されるように、係る分析用ハイブリダイゼーション法及びその他(例えば、ノーザンプロッティング)は、増幅ステップ(複数でもよい)を含まな

い、生物材料サンプル中におけるクリプトウイルス特異的RNAの存在の有無の検出するための本発明による方法のその他の実施形態に応じて有用である。これらの実施形態では、本発明のクリプトウイルス特異的プローブは、ハイブリダイゼーション分析を行うために、サンプル中でRNAに直接に接触される。

#### 【0055】

他方、増幅産物の分析または検出用の電気泳動は、従来のスラブまたはキャピラリ電気泳動から成る様々な方法のいずれかを用いて、迅速かつ高感度で実行され、医者はオプションとして、限定はされないが、放射性核種、UV吸光度、レーザー誘導蛍光を含む核酸フラグメント検出の任意の補助手段を使用することを選択することができる。(K. Keparnikら, *Fast detection of a (CA) 18 microsatellite repeat in the IgE receptor gene by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection* (レーザー誘導蛍光検出法を併用するキャピラリ電気泳動によるIgE受容体遺伝子における(CA)18マイクロサテライト反復の迅速な検出), "Electrophoresis" 19(2); 249~55 [1998]; H. Inoueら, *Enhanced separation of DNA sequencing products by capillary electrophoresis using a stepwise gradient of electric field strength* (電場強度のステップワイズ勾配を用いるキャピラリ電気泳動によるDNA配列産物分離の増強), "J. Chromatogr. A." 802(1): 179~84 [1998]; N. J. Dovichi, *DNA sequencing by capillary electrophoresis* (キャピラリ電気泳動によるDNA配列決定), "Electrophoresis" 18(12-13): 2393~99 [1997]; H. Arakawaら, *Analysis of single-strand conformation polymorphisms by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection* (レーザー誘導蛍光検出法を併用するキャピラリ電気泳動による単鎖構造多形性の分析), "J. Pharm. Biomed. Anal." 15(9~10): 1537~44 [1997]; Y. Baba, *Analysis of disease-causing genes and DNA-based drugs by capillary electrophoresis. Towards DNA diagnosis and gene therapy for human diseases* (キャピラリ電気泳動による疾患起因遺伝子及びDNAベース薬剤の分析。ヒト疾患のためのDNA診断及び遺伝子療法に向けて), "J. Chromatogr. B. Biomed. Appl." 687(2): 271~302 [1996]; K. C. Chanら, *High-speed electrophoretic separation of DNA fragments using a short capillary* (短キャピラリを用いるDNAフラグメントのハイスピード電気泳動分離法), "J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl." 695(1): 13~15 [1997]).

生物材料サンプル中においてクリプトウイルス特異的タンパク質またはクリプトウイルス特異的RNAの存在の有無を検出するための本発明の方法を実施する目的にはいかなる生物材料を採取してもよい。採取のための好ましい生物材料は、血液、血清、リンパ組織、脳組織を含む神経組織を含む。しかしながら、生物材料は、脳脊髄液(CFS)、リンパ、血漿、糞便、精液、前立腺液、涙、唾液、乳、胃液、粘液、滑液、胸水、腹膜浸出液、心嚢貯留液、皮膚、血管上皮、口腔上皮、瞼上皮、子宮頸管上皮、子宮上皮、腸管上皮、気管支上皮、食道上皮、または中皮、または任意組織由來の細胞物質の生検サンプルであってもよい。細胞材料は、組織サンプル、発現組織液、組織洗浄液または組織リンス液、血液細胞(例えば、末梢血单核細胞)、腫瘍、臓器、及びインビトロ細胞培養成分(限定はされないが、細胞培養基中の細胞生長に起因する条件培地、推定ウイルス感染細胞、

組換え細胞、及び細胞成分を含む)を含む、哺乳類細胞を含む任意のサンプルを含む。

採取され得る組織サンプルは、限定はされないが、脳、血液、脾臓、リンパ節、血管系、腎臓、下垂体、輸尿管、膀胱、尿道、甲状腺、耳下腺、顎下腺、舌下腺、骨、軟骨、肺、縦隔、乳房、子宮、卵巣、精巣、前立腺、子宮頸部、子宮内膜、脾臓、肝臓、副腎、食道、胃、及び/または腸を含むことができる。

#### 【0056】

サンプルは一方培養哺乳類細胞、無細胞抽出物、あるいは哺乳類被験体の身体に間接的に由来する検体、並びに被験体の身体から直接採取された物質に由来する。検出法(例えば、核酸増幅法及び/または分析、または免疫化学検出法)を適用する前に、急速冷凍、または例えばジメチルスルホキシド(DMSO)、グリセロール、またはプロパンジオール-ショ糖のような凍結保護物質が存在する条件下での制御冷凍法のような、核酸またはタンパク質を検出可能及び/分析可能な状態に保存する公知の保存手段によって、サンプルを保存することができる。分析と検出のためにサンプル中のクリプトウイルス特異的核酸を増幅する目的、またはクリプトウイルスタンパク質検出目的で、保存の前後にサンプルをプールしてもよい。

サンプルは、オプションとして、一晩冷蔵または冷凍保存、希釈、フェノール・クロロホルム抽出、あるいはその他の手段によって、使用する種々の増幅反応を阻害する可能性のある因子、例えば、ヘム含有色素または尿因子、を除去するために、前処理してもよい。(例えば、J. Mahonyら, Urine specimens from pregnant and non-pregnant women inhibitory to amplification of Chlamydia trachomatis nucleic acid by PCR, ligase chain reaction, and transcription-mediated amplification: identification of urinary substances associated with inhibition and removal of inhibitory activity(PCR、リガーゼ連鎖反応、及び転写増幅法によりトラコーマ病原体(*Chlamydia trachomatis*)核酸の増幅に阻害性のある妊娠及び非妊娠女性から採取した尿標本:阻害と阻害活性の除去に関する尿物質の同定), "J. Clin. Microbiol." 36(11): 3122~26 [1998] )。

本発明はまた、ヒト疾患、好ましくは、限定はされないが、神経学的、神経変性、及び/または神経精神医学的疾患研究のための動物モデルに関する。「神経学的疾患」という用語は、神経系の疾患を意味するものであり、中枢神経系及び/または末梢神経系に症状が現れる神経障害を含む。これらは、テンカン様疾患及び非テンカン様CNS疾患(例えば、パーキンソン症)及び末梢神経系疾患(複数でもよい)(例えば、筋萎縮性側索硬化症、または「ルー・ゲリッグ疾患(Lou Gehrig's Disease)を含む。「神経変性」疾患は、典型的に振戻、脱力、及び萎縮症を呈示する、例えば、ルー・ゲリッグ疾患またはアルツハイマー病のような、消耗性または麻痺性神経学的疾患を含む。

「神経精神医学的」及び「神経心理学的」という用語は、本願では互換性を持って使用される。「神経精神医学的疾患」は、根底にある神経生理学的プロセスから派生する行動上の症状をまた含む神経学的疾患である。動物モデルは、限定はされないが、齧歯類、ウサギ類、または非ヒト靈長類のような非ヒト哺乳類である。

齧歯類は、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、リス、マーモット、ビーバー、ゴーファー、ハタネズミ、ヤマアラシ、及びアグーチのような齧歯目である任意の比較的小型の齧歯哺乳類である。ウサギ類は、ウサギ目に属する種々の草食性哺乳類であり、ウサギ、野ウサギ、ナキウサギを含む。

動物は、本発明の感染性無細胞クリプトウイルスピリオンを接種されるか、または既に接種されている。他方、動物は、AV<sub>3</sub>/SSPEのようなクリプトウイルスで非増殖型感染されている細胞を人工的に接種されるか、または接種されている。

接種は、末梢性または脳内投与ルートのいずれであってもよい。神経学的、神経変性、

10

20

30

40

50

及び／または神経精神医学的疾患の研究には、脳内接種が好ましいが、末梢神経系の関与を呈示する疾患については、末梢接種もまた有用であり得る。

脳内接種は任意の適切な手段によるが、脳内、好ましくは神経組織内に直接注射することが好ましく、そして当該分野に公知の定位的注射手段によるものが最も好ましい。他方、クリプトウイルスまたは非増殖型感染細胞による脳内接種は、動脈内（例えば、頸動脈内）または静脈内注射または注入により、物理的または化学的手段による血液脳関門の少なくとも一時的分断と組み合わせて、クリプトウイルスまたは非増殖型感染細胞が同時に送達される。

#### 【0057】

「同時」とは、血液脳関門を分断するための物理的または化学的手段が、クリプトウイルスびビリオンまたは非増殖型感染細胞と同時発生的または同時に投与されることを意味する。「同時に」はまた、分断手段がクリプトウイルスまたは非増殖型感染細胞の最終投与後約1時間以内、好ましくは、約30分以内、そして最も好ましくは、クリプトウイルスまたは非増殖型感染細胞と同時に投与されることを包含する。他方、「同時に」は、薬剤が、クリプトウイルスまたは非増殖型感染細胞が最初に投与される約30分前以内、そして好ましくは約15分前以内に投与されることを意味する。

血液脳関門の物理的分断は、「機械的」損傷またはその他の物理的外傷の手段によって、脳の血管系の少なくとも一つの位置において血液脳関門が破壊されることを含む。化学的分断は、血液脳関門を一時的に透過促進にして、脳の微小血管系を通してクリプトウイルスが血流から脳に侵入することを可能にする薬剤を含む。係る透過促進剤は公知であり、例えは、ブラジキニン及びブラジキニン類似体、及びカルシウム依存性またはATP依存性カリウムチャネルの活性化物質である。（例えは、B. Malfroy Camine, Method for increasing bloodbrain barrier permeability by administering a bradykinin agonist of bloodbrain barrier permeability（血液脳関門透過性のブラジキニンアゴニストの投与により血液脳関門透過性を増加する方法），米国特許番号第5,112,596号、J.W. Kozarichら，Increasing blood brain barrier permeability with permeabilizer peptides（透過促進ペプチドによる血液脳関門透過性の増加），米国特許番号第5,268,164号、Inamuraga, Tら，Bradykinin selectively opens blood tumor barrier in experimental brain tumors（ブラジキニンは、実験的脳腫瘍における血液脳関門を選択的に開放する），"J. Cereb Blood Flow Metab." 14(5) : 862~70 [1994]、K.L. Black, Method for selective opening of abnormal brain tissue capillaries（異常脳組織毛細管の選択的開口方法），米国特許番号第5,527,778号と5,434,137号、N.G. Rainov, Selective uptake of viral and monocystalline particles delivered intravascularly to experimental brain neoplasms（実験的脳新生物に動脈内送達されたウイルス及び単結晶粒子の選択的取り込み），"Hum. Gene Ther." 6(12) : 1543~52 [1995]、N.G. Rainovら，Long term survival in a rodent brain tumor model by bradykinin enhanced intraarterial delivery of a therapeutic herpes simplex virus vector（治療用単純ヘルペスウイルスベクターのブラジキニン増強動脈内投与による齧歯類脳腫瘍モデルにおける長期生存），"Cancer Gene Ther." 5(3) : 158~62 [1998]、F.H. Barnettら，Selective delivery of herpes virus vectors to experimental brain tumors using RMP7（50

RMP-7を使用する実験的脳腫瘍へのヘルペスウイルスペクターの選択的投与) , "Cancer Gene Ther." 6(1) : 14~20 [1999]、国際特許公開番号WO 01/54771 A2及びWO 01/54680 A2)。

接種された非ヒト哺乳類は、かくして接種された後に、接種前にはこの非ヒトの乳類によって呈示されていなかった、ヒト神経学的、神経変性、及び/または神經精神医学的疾患に特徴的な症状を少なくとも一つ呈示する。係る症状は、亜急性症状並びにさらに緩徐進行性症状を含む。

#### 【0058】

一般的には、係る実験的感染に付随する亜急性症状(接種後、約3週間から約2ヶ月して発症する)は、以下を含む：(1)悪液質/食欲不振(即ち、体重と身体サイズの消耗または減少)、(2)退行性神経消耗または麻痺、(3)肢(複数でもよい)萎縮症、(4)後肢麻痺、(5)光過敏症または反復性まばたき、(6)活動高進または知覚過敏(例えば、神経質、激越(不安興奮)、競走、せん妄、触感と音に対する過敏症)、(7)運動失調症(即ち、平衡喪失、歩調不安定)、(8)知覚減退、(9)他の動物からの離脱と孤絶、目を閉じる、「背をかがめる」姿勢、(10)昏迷(即ち、硬直、準昏睡、夢遊歩行様無動作)、(11)痙攣またはテンカン発作(即ち、四肢をつっぱる、意識喪失、くるくる回る、転げ回る、及び/または旋回する)、(12)筋痙攣または筋クローヌス(例えば、振戦、筋痙攣、筋肉の反復反射)、(13)角膜混濁(角膜の曇り)、並びに(14)突然死。個々の動物は、一つ以上の先述の亜急性症状を呈示し得るが、一般的には2つ以上の複合症状が観察される。亜急性症状はメス動物と比べて、オス動物により頻繁に観察される。10

さらに緩徐進行性症状(即ち、接種後約2ヶ月そしてある場合は、約6ヶ月あるいはそれ以上も発症しない)は以下を含む：(1)肥満、(2)知覚減退(即ち、感覚性刺激に対する感受性の減少)、(3)極度の嗜眠及び持続睡眠、(4)活動高進または知覚過敏20

(即ち、感覚性刺激に対する感受性の増加)、(5)攻撃性(例えば、飛び上りまたは噛みつき行動)、(6)妄想強迫性行動(例えば、過剰かつ遷延な顔洗い行動、または頻繁なひっかき行動)、(7)自傷行為(皮膚が傷つくほどまでの極端な妄想強迫性洗浄またはひっかき行動)、(8)実験的感染メスに生まれた新生児動物における死亡胎児及び奇形(一般的には麻痺または肢萎縮症)、並びに(9)子殺し(多数の新生児または全同腹仔の共食い)。個々の動物は、一つ以上の先述の緩徐進行性症状を呈示し得るが、一般的には2つ以上の複合症状が観察される。緩徐進行性症状はオス動物と比べて、メス動物により頻繁に観察される。30

本発明の動物モデルは、典型的に振戦、脱力、及び萎縮症を呈示する、神経変性、消耗または麻痺性神経学的疾患の研究の極めて優れたモデル系である。

本発明の動物モデルはまた、感染動物が、実質的にヒトのテンカン様疾患に付随する全ての症状スペクトルを呈示するために、特発性テンカン様疾患研究のための極めて優れたモデル系である。現在では、ほとんどの既存のテンカンの動物モデル(例えば、グルタミン酸受容体アゴニストであるカイナイトの接種、あるいは軽度の窒息によるテンカン発作の誘導)は、テンカン発作と、ヒト疾患の実際の症状スペクトルの病因とは無関係なテンカン発作に付随する粗雑な解剖学的病変を生じるように設計されている。これらのモデルは、テンカン発作活動に対する治療薬の開発に有用であるが、ヒトのテンカン様疾患の究極の発生機序または生じる実際の症状スペクトルに適用性があるかについてはほとんどまたは全く証拠がない。40

対照的に、本発明の動物モデルは、真に相同的な動物モデルであり、即ち、ヒト疾患に関連する実際の因子/症状が現存し、そして治療並びに予防ストラテジーのどちらからも特定して標的化できる動物モデルである。したがって、本願に開示された本発明の動物モデルは、抗テンカン及び抗向精神薬を含む抗ウイルス薬または薬物をスクリーンし、並びにワクチンやその他の予防薬を試験し、そして任意の、及び全治療ストラテジーを如何にして最適に連係させて至適化するかを決定するために使用することができる。

クリプトウイルスは、細胞培養では軽度に細胞変性性であるが、実験的に感染させた動50

物では著明な神経病理学的疾患を起因する。このウイルスの細胞変性及び神経変性のいずれの形質も、抗ウイルス治療薬及び／または予防薬候補を同定並びに試験するためにデザインされるスクリーンにおいてマーカーとして使用することができる。

したがって、本発明は、免疫予防薬を含む、抗ウイルス治療薬及び／または抗ウイルス予防薬をスクリーニングするためのインビトロ及びインビボ法を特徴として備え持つ。抗ウイルス治療または予防薬「候補」は、クリプトウイルスに対して有効な抗ウイルス特性を有することが臨床的に未だ確認（即ち、フェーズIII 臨床治験）されていない薬剤である。クリプトウイルス感染に対して臨床的に試験されていない、あるいはフェーズI及びフェーズIIに関してのみクリプトウイルス感染に対して臨床治験が行われた薬剤はまた、本発明の目的の抗ウイルス治療及び／または予防薬「候補」に包含される。

10

#### 【0059】

治療または予防薬候補の本発明によるインビトロスクリーニング法に従って、急性または増殖型感染哺乳類細胞培養物（例えば、BHK、Vero、またはCV-1。）または非増殖型感染保菌細胞培養物（例えば、AV<sub>3</sub> / SSP E 細胞）を使って抗ウイルス薬候補を評価することができる。急性感染（増殖型）細胞系は、クリプトウイルスエンベロープ糖タンパク質のプロセシングとアセンブリを標的する（例えば、F<sub>0</sub>切断活性化のプロテアーゼ阻害）薬剤のスクリーニングに優先的に有用であるが、転写またはその他のポリメラーゼ阻害因子による長期治療の有効性についてのスクリーニングには、非増殖型感染細胞系（例えば、AV<sub>3</sub> / SSP E）が好ましい。

本発明の動物モデルは、通常は抗ウイルス治療薬候補のインビボスクリーニング法に利用される。本方法は、スクリーンの対象となる治療薬候補を、本発明の動物モデルに従って、クリプトウイルスを接種後の本発明の動物モデルに投与することを含む。

20

本発明の動物モデルの他の実施形態は、抗ウイルス予防薬候補のインビボスクリーニング法に利用される。この方法は、スクリーニングの対象となる予防薬候補を、限定はされないが、神経学的、神経変性、及び／または神経精神医学的疾患のようなヒト疾患（例えば、テンカン様疾患）の症状を有さない非ヒト哺乳類に投与することを含む。次に、本願に説明するように、感染性無細胞クリプトウイルスまたはクリプトウイルスで非増殖型感染された哺乳類細胞をこの動物に接種する。この方法は、特に、係る目的のみに限定はされないが、抗テンカンまたは抗向精神性抗ウイルス予防薬候補を同定するために有用である。

30

予防薬または治療薬候補の投与は、任意の適切な投与ルート、腸内（例えば、経口または坐薬による）または非経口（例えば、注射、輸液、経膜、経皮、または吸入投与ルート）による。

本発明に従って、評価され得る薬剤の例は、クリプトウイルス以外のウイルスに対して既知の抗ウイルス特性を有する化合物または物質、即ち、先述するような、潜在的抗ウイルス活性を有する細胞、植物または動物抽出物、及びワクチンのような、新化合物または化合物の混合物、またはこれらの任意な組み合わせを含む。

本発明のインビボスクリーニング法を用いる場合、免疫予防薬候補（即ち、ウイルス複製、アセンブリまたはウイルス増殖と蔓延に関連する任意のその他のプロセスを攻撃または阻害するために応答するように免疫系を刺激するワクチン）は、非ヒト動物に（前述のように）推定予防薬またはワクチンを接種して、次に感染性クリプトウイルスでチャレンジして、クリプトウイルス関連性疾患の発症を予防するその有効性を評価することができるために、試験に適している。本発明に従って発見された係る薬剤の使用は、麻疹及びムンプス（或多福風邪）ワクチンが多くの国家においてこれらの疾患を制御するために使用されてきたように、ヒト集団においてヒトクリプトウイルス関連疾患を制御かつ根絶するためには究極的に必要であろう。

40

上記に記載したものの他に、当業者は、本願に提供されるインビトロ（細胞培養）またはインビボ方法を用いて分析または評価し得る多数の抗ウイルス化学的及び分子的治療薬候補を認識しよう。これらの抗ウイルス治療及び／または予防薬は、クリプトウイルス以外のウイルスを影響することが公知である既存の抗ウイルス薬（例えば、ビラゾール（商

50

標)としても公知であるリバビリオン(商標)及び新しい抗ウイルス薬候補を含み得る。例えば、分子治療薬(例えば、アンチセンスヌクレオチド及びリボザイム)またはプロテアーゼ阻害薬はまた、本発明のインビトロ及び/またはインビボスクリーニング法を用いて試験することができる。ウイルス融合タンパク質( $F_0$ )の切断を阻害する薬剤が探し求められており、そしてこれらは、融合タンパク質の切断及びウイルス赤血球凝集素/ノイラミニダーゼ(HN)とのその会合はその他のバラミクソウイルス科による感染の病原性を決定するに際して重要なイベントであることが証明されているために、特に有用であり得る(Yaoら, "J. Virol." 71 650~656, 1997)。さらに、これらの抗ウイルス薬候補は、例えば、クリプトウイルス複製またはアセンブリ、あるいは、限定はされないが、Lタンパク質及びそのコンパニオンP及びVタンパク質を含むクリプトウイルスコードRNA依存性RNAポリメラーゼのような、クリプトウイルス遺伝子及びタンパク質の発現または活性に対して誘導され得る。本発明のスクリーニング法はまた、クリプトウイルス以外のウイルスに有効な広域抗ウイルス薬の開発に利用することができる。

#### 【0060】

感染細胞またはウイルス粒子を攻撃するために免疫系を攻撃または刺激する(例えば、受動的抗体投与またはクリプトウイルス特異的モノクローナル抗体の導入による)免疫治療薬はまた、ビリオンのアセンブリ、遊離、または細胞間伝達を遮断または阻害できるために、試験に適している。しかし、ウイルスは、そのエンベロープタンパク質の産生を遮断して、免疫系によって検出不能であるように見える「潜在性」または不顕性状態になることによって、インサイツで生存すると考えられるために、これらの薬剤の投与は持続的且つ慢性クリプトウイルス感染を「治癒」するには限られた価値しかないであろう。

予防または治療薬候補の適量は変化し、常套的なスクリーニングによって決定される。

治療薬または予防薬候補をスクリーニングするための本発明によるインビボ法に従って、薬剤は、本発明の動物モデルにおいて有益な抗ウイルス効果を誘導、作出、招来、あるいはその原因となる能力について評価される。「有益な抗ウイルス効果」とは、コントロール動物の組織と比較して、アッセイを受ける動物において、クリプトウイルスによる感染の予防、またはクリプトウイルス感染に付随する少なくとも一つの症状の持続期間または重症度の軽減を含む。「有益な抗ウイルス効果」はまた、このスクリーニング法によってアッセイされる動物由来の組織サンプルにおける細胞変性効果(CPE)の予防または低減を含む。また、「有益な抗ウイルス効果」によって包含されるものには、クリプトウイルス複製及び/またはクリプトウイルスピリオンアセンブリに対する阻害効果(例えば、クリプトウイルスゲノム複製、クリプトウイルス転写、及び/または翻訳に対する阻害効果、即ち、適切なコントロールと比較する、クリプトウイルスマRNA由来のタンパク質合成、または產生されるクリプトウイルスピリオン数の減少、またはクリプトウイルス粒子の完全性の相対的欠如)があり、その効果は、アッセイされた動物から採取された細胞または組織において公知手段によって測定される。

スクリーニング法に使用される適切なコントロールは、当業者には自明であろう。係るコントロールは、以下を含む:(1)同じ予防または治療薬候補を投与され、そして滅菌人工水性培地のみまたはSV5株を含む培地でチャレンジされた動物、(2)生理食塩水(または予防または治療薬候補投与に使用したものと同一のキャリア)で偽処理されて、クリプトウイルスでチャレンジされた動物、(3)生理食塩水(または予防薬または治療薬候補の送達に使用したものと同じキャリア)で偽処理されて、滅菌人工水性培地のみまたはSV5株を含む培地でチャレンジされた動物。

本発明の実施は、特記しない限りは、当業者の技術範囲である、生化学、分子生物学、微生物学、ウイルス学、組換え核酸技術、及び免疫学に属する従来またはその他の公知テクニックを利用する。係るテクニックは、文献資料に詳細に説明されている。(例えば、Maniatisら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual(分子クローニング: 実験マニュアル), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N

10

20

30

40

50

ew York, USA (1982)、DNA Cloning (DNAクローニング), 第一巻と二巻 (D. N Glover編集 1985)、Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (分子クローニング: 実験マニュアル(第二版)), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA (1989)、Davisら, Basic Methods in Molecular Biology (分子生物学の基礎方法), Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (1986)、または Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques (酵素学方法: 分子クローニング技術ガイド) 15 10 2巻, S. L. BergerとA. R. Kimmerl編集, Academic Press Inc., San Diego, USA (1987)、Oligonucleotide Synthesis (オリゴヌクレオチド合成) (M. J. Gait 編集, 1984)、Nucleic Acid Hybridization (核酸ハイブリダイゼーション) (B. D. HamesとS. J. Higgins編集 1984)、Transcription And Translation (転写と翻訳) (B. D. HamesとS. J. Higgins 編集 1984)、Animal Cell Culture (動物細胞培養) (R. I. Freshney 編集 1986)、Immobilized Cells And Enzymes (不動化細胞と酵素) (IRL Press, 1986)、B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (分子クローニングの実用ガイド) (1984)、the series, Methods In Enzymology (酵素学方法) (Academic Press, Inc.)、Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (哺乳類細胞用遺伝子伝達ベクター) (J. H. MillerとM. P. Calos 編集 1987, Cold Spring Harbor Laboratory), Methods in Enzymology (酵素学方法) 第154巻と155巻 (それぞれ、Wu and GrossmanとWu編集), MayerとWalker編集 (1987), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (細胞における免疫化学的方法と分子生物学) (Academic Press, London), Scopes, (1987), Protein Purification Principles And Practice (タンパク質精製の原理と実際), 第二版 (Springer-Verlag, N.Y.), 並びにHandbook Of Experimental Immunology (実験免疫学ハンドブック), Volumes I-IV (D. M. WeirとC. C. Blackwell 編集 1986)。

本発明は、以下の非限定例を参照して、さらに詳細に説明されよう。

#### 【0061】

##### 実施例

##### 実施例1 感染細胞におけるクリプトウイルスの検出並びにクリプトウイルスウイルス粒子の単離と精製

本発明に従って、SSPEを罹患する患者の末梢血から得た被膜形成細胞(末梢血单核細胞: PBMC)から、無細胞クリプトウイルス粒子を回収した。使用方法は、Robbinsら("J. Infect. Dis." 143: 396~403, 1981)の修正方法を用いた。修正は、本発明に従って、水性培地にサイクリックGMP(最終濃度が1mMになるように)を添加し、この培地はPBMC初期培養及びヒト羊膜細胞(AV<sub>3</sub>)との一次共培養中に添加された。結果は、PBMCと羊膜細胞との共培養ステップにおいて哺乳類上皮細胞株として、CV-1細胞のクローン化亜株(CV-1<sub>c</sub>)を用いることによってさらに至適化された。

ウイルスの単離に成功するためには、生存可能なPBMCを必要とする。係るPBMC

N C は、フィコール - ハイパック ( F i c o l l - H y p a q u e ) ( 商標 ) 勾配培地を使用する標準法によってその他の血液成分から分離された。遠心分離後、被膜形成細胞は培地界面にバンドを形成し、滅菌ピペットを用いて取り出した。次にこれを 1 ~ 2 % のウシ胎児血清を含む R P M I 細胞培養培地の 50 容量希釈で丁寧に洗浄してから、卓上冷却遠心分離器で遠心した ( 1 0 0 0 r p m × 5 分 )。ペレット化した P B M N C を次に  $2 \times 10^5$  細胞 / mL まで 10 % ウシ胎児血清と 1 mM サイクリック G M P ( ナトリウム塩 ) を含む R P M I 培地で希釈して、37 度で 12 ~ 18 時間動かさないようにして静置インキュベートした。インキュベーション後、培養物をリヒター修正最少必須培地 ( I M E M Z O ) ( インスリン、亜鉛、H E H E S 緩衝液 2 mM L - グルタミン、200 U ペニシリン / mL、100 pg ストレプトマイシン / mL、5 ~ 10 % ( 容量 / 容量 ) ウシ胎児血清、pH 6.8 ~ 7.0 を補充 ) 中に十分な A V<sub>3</sub> 細胞と共に、最終細胞濃度が  $2 \times 10^5$  細胞 / mL ( 培養中の全細胞 ) になるように播種し、37 度で再インキュベートした。いったん培養がコンフルーエントに達したら ( 2 ~ 3 日 ) 、単層を、0.02 % ( 重量 / 容量 ) E D T A C M F - P B S ( カルシウムとマグネシウムを含まないリン酸緩衝生理食塩水 ) 溶液でキレート化して、細胞を分散して、前述のように I M E M Z O 中で  $2 \times 10^5$  細胞 / mL で継代培養した。

この培養を、次に 3 ~ 4 日ごとに一回 ( およそ一週間に二回 ) コンフルーエントになつたときに、同じ方法で盲目的に、2 ~ 3 週間にわたって継代培養した。2 週間後、クリプトウイルス特異的間接蛍光抗体法 ( 過免疫ウサギ抗クリプトウイルス抗血清に曝露後、フルオレセイン抱合ヤギ抗ウサギ IgG で標識する ) を用いて、細胞質中のクリプトウイルス特異的封入体の存在の有無について細胞を検査するためにスライド培養を調製した。

細胞の 5 ~ 10 % がクリプトウイルス特異的封入体に陽性であった場合、培養物は、前述の許容的 C V - 1<sub>c</sub> 細胞と共に培養する用意ができたことになる。これは、継代培養した一次 P B M N C / A V<sub>3</sub> 培養物を最終濃度が  $2 \times 10^5$  細胞 / mL になるようにリヒター修正最少必須培地で希釈した C V - 1<sub>c</sub> 細胞と 1 : 1 共培養することを含む。これらの培養物を次に、微妙な細胞変性効果の発生 ( C P E : 細胞の星形化と円形化、または 3 個以上の核を含む多核細胞 ) について、その後 4 ~ 5 日にわたってモニタした。培養がコンフルーエントになる前に C P E が発生しないときは、継代培養を行って再びモニタした。3 回の係る継代培養後に C P E が発生しなかった場合は、培養物は廃棄した。

いったん C P E が観察されたら、全培養物を -70 度で冷凍、解凍して、細胞を分散させて 1.0 mL のアリコートに分配した。これらのアリコートは、推定一次単離ウイルスを意味する。ウイルスを次に、リヒター修正最少必須培地で作製した 2 % ウシ胎児血清を含む 1 % ( 重量 / 容量 ) カルボキシメチルセルロースナトリウム ( N a C M C ) の半流動性溶液で重層した单層の C V - 1<sub>c</sub> 細胞上に滴定することによりブラーク精製した。この培養物を部分的 C O<sub>2</sub> 大気 ( 5 % 容量 / 容量 ) 中 37 度でインキュベートした。ブラークは 8 ~ 12 日で形成され、次に前述のように選択かつ再ブラーク形成させた。いったんブラークの三重精製を行ったら、ウイルスのアリコートを 25 ~ 75 cm<sup>2</sup> 細胞培養フラスコ中の C V - 1<sub>c</sub> 单層 ( 5 % ウシ胎児血清と前述のサプリメントを含む I M E M Z O 培地中の ) 上で培養した。いったん、培養細胞の半数以上を含む十分な C P E が発生したら、全培養物を冷凍、解凍して、溶解物を分散、再びアリコートに分割して、-70 度で再冷凍した。ウイルスストックのサンプルを次に将来の用途のために R o b b i n s らの方法によって滴定した。 ( R o b b i n s ら, " J . I n f e c t . D i s e a s e " 14 : 396 ~ 403, 1981 ) 。

密度勾配精製法 : 増殖型 ( V e r o 及び C V 1<sub>c</sub> ) 並びに非増殖型 ( A V<sub>3</sub> / S S P E ) 感染細胞から単離されたビリオンと細胞内ヌクレオカプシドを、ショ糖 - 酒石酸カリウム勾配 ( ビリオン ) 及び C s C l 勾配 ( ヌクレオカプシド ) 上で、R o b b i n s らの方法によってさらに精製した ( R o b b i n s ら, " J . I n f e c t . D i s e a s e " 14 : 396 ~ 403, 1981, Rapp と R o b b i n s , " I n t e r v i r o l o g y " 16 : 160 ~ 167, 1981, R o b b i n s と Rapp , " A r c

h. Virol." 71: 85~91, 1982、並びに Robbins と Abbott-Smith, "J. Virol. Meth." 11: 253~257, 1985)。  
。

### 【0062】

#### 実施例2 クリプトウイルス増殖及びビリオンの単離と精製

いったん単離されると、無細胞ウイルスストックはを、サル上皮細胞株（例えば、VeroまたはCV-1細胞）で増殖した。本願に説明した研究で使用したクリプトウイルス単離物は、三重精製ブラークであり、CV-1<sub>c</sub>と命名されたCV-1細胞のクローニング株中で増殖させた。感染ウイルスの至適産生は、インスリン、亜鉛、HEHES緩衝液、2 mM L-グルタミン、200 U ペニシリン / mL、100 µg ストレプトマイシン / mL、5~10%（容量 / 容量）ウシ胎児血清、pH 6.8~7.0を補充したIMEMZOを用いる場合に生じる。  
10

組織培養培地中におけるインスリン、並びにオプションとしての亜鉛ジカチオンの存在は、感染性ウイルスの生存可能な力値を得るために有用である。標準培地（例えば、MEM）を用いてCV-1細胞でウイルスを増殖するための別の試みはほとんどなく増殖しなかった。対照的に、靈長類細胞培養中のクリプトウイルスタンパク質の発現とクリプトウイルス感染の生殖力は、サイクリックGMP（1 mM、ナトリウム塩）を標準培地（特にMEM）に添加することによって劇的に増強された（50~100倍）。獲得された増強は、先に発表された麻疹ウイルス複製の増強に極めて類似していた（Robbins,  
"Intervirology" 32: 204~208, 1991）。  
20

ビリオンの単離と精製。 ビリオンを単離して、感染72時間後に、急性感染されたCV-1細胞の組織培養培地上清からさらに精製した。使用した方法は、分画遠心分離によるウイルス粒子の分離を含む。

感染培養物の上清培地を滅菌プラスチック50-mLファルコン遠心分離試験管中にデカントして、2000 rpmで10分間遠心して清澄化した。上清を次に、耐衝撃性ガラス遠心管（Sorvall）に移して、さらに10,000 rpmで10分間遠心して清澄化した。全ての遠心分離は、RC2B Sorvall遠心分離器中、4°で行った。第二清澄化ステップで得られた上清液を、60%（重量 / 容量）ショ糖クッショング（10 mMトリス、5 mM EDTA、pH 7.2）上に重層して、Beckman SW-28ローターに入れて、約130,000 × G、4°で90分、Beckman L70超遠心機で遠心分離した。組織培養培地 - ショ糖界面から物質を回収してプールし、組織培養培地で希釈してから、前述のように新たな60%ショ糖クッショング上で再遠心分離した。界面にある物質を再び取り出して、組織培養培地で希釈して、前述のトリスEDTA緩衝液で調製した60%（重量 / 容量）上に30%（重量 / 容量）を重ねた不連続（即ち層状）ショ糖勾配を通して35,000 rpm（280,000 × G）で60分間遠心分離した。ビリオンは、30% : 60%ショ糖界面から回収され、冷却トリスEDTA緩衝液で希釈して、Beckman SW41ローターで、41,000 rpm、4°で60分間ペレット化された。ペレット化ビリオンは、可変量の冷却トリスEDTA緩衝液に再懸濁して、使用するまで-70°で冷凍した。各ビリオン調製物の総タンパク質は、Lowryら（1951）の方法によって決定した。  
30

### 【0063】

#### 実施例3 抗血清の調製

抗血清は、クリプトウイルスのショ糖 - 酒石酸カリウム勾配・精製ビリオン、CsCl勾配・精製ヌクレオカプシド（感染CV-1<sub>c</sub>細胞の細胞質に由来）、及びSDS-PAGE後ポリアクリルアミドゲルから抽出された主要ウイルスヌクレオカプシドタンパク質であるNPに対して、成体ニュージーランド白ウサギで作製した。ウサギ抗血清はまた、SV5のNIH21005-2WR株及び麻疹ウイルスのEdmonston（エドモンストン）株に対しても作製した。

動物は、滅菌27ゲージ針と1.0 mLシリングで、各動物に3シリーズの3つの別々な接種（背部に皮内接種 1回、腹腔内接種 1回、並びに後足蹠接種 1回）を含むビ  
50

ンクッション法によって接種された。接種の第一シリーズは、フロインド完全アジュバンドと 1 : 1 に混合した勾配・精製・透析ビリオン (100 μg ビリオンを含有する 0.3 mL の 10 mM トリス - 5 mM EDTA 溶液) を用いて行い、各接種は、約 200 μL のビリオン : アジュバンド混合物を含んだ。接種の第二シリーズは、二週間後に、各動物の反対側の同位置に行われ、フロインド不完全アジュバンドで混合された同量のビリオンから構成された。接種の第三シリーズは、二週間後に第一接種と同位置に、ビリオンのみを用いて行われた (前述のように 0.6 mL のトリス - EDTA 溶液で希釈)。接種の最終シリーズの二週間後に、動物の心臓内全採血によって血液を収集した。収集された血液は、遠心分離 (2000 rpm で 10 分) して、氷上で凝血させた。上部血清成分を収集して、生理食塩水洗浄した凍結乾燥アセトン : メタノール抽出サル腎臓組織のペレット化成分 (2000 rpm で 10 分) に吸収させた (15 分ごとに攪拌を加えながら 4 で 1 時間)。吸収された血清を遠心分離 (2,000 で 10 分) 収集して、1.0 mL のアリコートにして、-20 で保存した。

抗クリプトウイルス抗血清の全ては、(1) 免疫沈降法、(2) 免疫蛍光法、(3) 免疫プロット法、(4) 超微細構造免疫標識法 (免疫ゴールド)、及び (5) 勾配・精製ウイルス粒子に対して産生された抗血清の場合は、中和滴定アッセイ、によって分析された場合、対応するクリプトウイルス特異的物質に強い反応性を有する。ウサギで産生された全ての過免疫ウイルス特異的抗血清は、1280 以上、そして通常は 2560 以上の同種中和力値を有した (PRD<sub>50</sub> の逆希釈)。

全ての実験的に産生された抗血清は、生理食塩水洗浄、凍結乾燥された、サル腎臓細胞のアセトン : メタノール抽出物、または AV<sub>3</sub> 細胞及び / または CV-1 細胞の同様な抽出物に対して吸収された。

臨床血清は同様に吸収されたが、CSF 検体は、通常少量しか入手できず、二重試験及び並行試験のためのアリコートを保存する必要性があるために前吸収は行わなかった。

精製ヌクレオカプシド及び精製ウイルスに対して作製された実験血清の沈降「力値」は、特に決定されなかつたが、通常では、5 ~ 10 μL が陽性コントロール免疫沈降反応に使用され、25 μL の陽性コントロール抗血清 (1 : 10 または 1 : 20 に希釈) が、ELISA アッセイの陽性コントロールとして使用された。

クリプトウイルス特異的抗血清はまた、勾配・精製された感染性クリプトウイルスピリオンで実験的接種されたマウスにおいて産生された。これらの抗血清は、免疫沈降法によって分析され、全てのクリプトウイルスエンベローブタンパク質を強く沈降することが発見された。

クリプトウイルスピリオンに対して作製された抗血清と、SV5 の NIH 2 WR-21005 株のビリオンに対して精製された抗血清の間には著明な非対称的交差反応性があつた。この点において観察された非対称性は、常に、異種反応 (即ち、クリプトウイルス特異的抗血清対 SV5 物質、及び SVS 特異的抗血清対クリプトウイルス物質) は、同種反応 (即ち、クリプトウイルス特異的抗血清対クリプトウイルス物質、及び SVS 特異的抗血清対 SV5 物質) よりも 2 から 4 倍弱いことであった。SV5 の NIH 21005-2 WR 株に対して個別に作製され、また Pur nell Choppin 博士のご厚意で提供された他の抗血清は、前述の SV5 に対する抗血清と同様に非対称的な様式で行動した。

係る交差反応性は驚くには至らない。その他のパラミクソウイルス系を検査する場合、同様な非対称的な交差反応性が明らかに生じている (例えば、麻疹ウイルス抗体を、密接に関連するイヌジステンバー及び牛痘ウイルスと反応させたり、その逆反応を行う際、麻疹ウイルス抗体間に 2 ~ 4 倍の非対称的な交差反応性がある)。クリプトウイルス特異的抗体とその他のパラミクソウイルス (例えば、麻疹ウイルス) 間には限られた (即ち、ずっと弱い) 交差反応性があつた。

#### 【0064】

##### 実施例 4 単離クリプトウイルスのキャラクタリゼーション

クリプトウイルスの神経毒性及び向神経性。 図 24 A に示すように、クリプトウイ

10

20

30

40

50

ルスは、ニューロンに対して向性を示した。感染性クリプトウイルスまたは非増殖型ウイルス保菌細胞（AV<sub>3</sub>/SSPE）でマウスを脳内接種すると、その結果として、テンカン様、神経学的及び／または神経心理学的因素を有する、亜急性／緩徐進行性の神経病理学的症状スペクトルを生じる。これらの応答は、ニイガタ、キタケン、及びビケンのような「細胞性麻疹様」ウイルスの接種後の動物において、先に報告された「実験的SSPE」と類似であった（図24B、Doiら、"Japan. J. Med. Sci. Biol." 25: 321~333, 1972、Uedaら、"Biken Journal" 18: 179~181, 1975、Yamanouchiら、"Japan. J. Med. Sci. Biol." 29: 177~186, 1976、Ohuchiら、"Microbiol. Immunol." 25: 887~983, 1981）。 10

神経毒性SSPE由来ウイルス保菌細胞株におけるクリプトウイルスの存在。 SSPE患者由来の4つのウイルス保菌細胞株を、麻疹ウイルス及び／またはクリプトウイルス特異抗原の存在の有無について免疫蛍光法で試験した。これらは、AV<sub>3</sub>/SSPE/MV（エドモンストン株麻疹ウイルスで実験的に感染されたAV<sub>3</sub>細胞と共に培養されたSSPE患者のPBMCに由来するSSPE由来細胞株、Robbins、未発表データ）、「キタケン」と命名された非増殖型SSPE由来細胞株（Uedaら、"Biken Journal" 18: 179~181, 1975）、「ニイガタ」と命名された非増殖型SSPE由来細胞株（Doiら、"Japan. J. Med. Sci. Biol." 25: 321~333, 1972）、「ビケン」と命名された非増殖型SSPE由来細胞株（Yamanouchiら、"Japan. J. Med. Sci. Biol." 29: 177~186, 1976、Ohuchiら、"Microbiol. Immunol." 25: 887~983, 1981）であった。ニイガタ細胞株が例外である可能性はあるが、ウイルス特異的免疫蛍光法によって試験すると（図6に示す）、これらウイルス保菌細胞株の全てが麻疹ウイルス特異的抗原とクリプトウイルス特異的抗原の両方を発現した。麻疹ウイルスの無細胞臨床単離物は未だかつて実験的感染動物においてSSPE様疾患を起因することが示されていないことを考慮すると、これらの培養物中におけるクリプトウイルスの存在は、これらの動物に見られる亜急性／緩徐進行性神経障害は、培養物中の麻疹ウイルスではなく、クリプトウイルスの存在に拠ることを強く示唆する。 20

クリプトウイルス封入体（即ち、細胞質ヌクレオカプシド）は、急性感染細胞（CV-1c）及び非増殖型並びに持続感染細胞（AV<sub>3</sub>/SSPE）のいずれにおいても、CNS生検及びSSPE患者からの剖検材料及びSSPE由来非増殖型生ウイルス保菌細胞株において以前に説明されたものと同様な「こしょう様」及び／または「飛散様」分布を呈示した（例えば、de Felicciら、"Annales Microbiologie" 126: 523~538 [1975]、Makinoら、"Microbiology and Immunology" 21: 193~205 [1977]、Brownら、"Acta Neuropathologica" 50: 181~186 [1980]）。これは、図6のパネル、B、D、F、H、及びJにおいて最も明瞭に示されている。これらの特徴は、細胞内麻疹ウイルス封入体の離散様及び「癒着状」分布と形態と鮮明なコントラストを示す（図6のパネルA、C、E、及びGを参照）。 30

中和滴定アッセイ。 単層の哺乳類細胞（例えば、BHK、Vero、またはCV-1c）上での肉眼で可視なブラーク形成を使って、感染性クリプトウイルスの調製物を定量することができる。ブラーク形成は、臨床血清検体及びウサギで產生したクリプトウイルス特異的抗血清の段階希釈で阻害され得る（例えば、Robbinsら、"J. Infect. Disease" 143: 396~403, 1981）。単離クリプトウイルスのPRD<sub>50</sub>を決定するためにブラーク滴定アッセイを行った。 40

#### 【0065】

簡単に言えば、検査の対象である血清またはCSF検体の10倍段階希釈に、最終希釈液（希釈血清またはCSFを含む）0.2mLあたり100~200ブラーク形成単位の最終プレーティング濃度を生じるために十分な量の感染性ウイルスを加えて4で1時間

インキュベートした。インキュベーション後、0.2 mL の希釈ウイルス - 血清（またはウイルス - CSF）混合物を、次に単層の感受性細胞（例えば、Vero または CV-1<sup>c</sup>）に播種して、細胞を部分的 CO<sub>2</sub> 大気（例えば 5%（容積 / 容積））中 37<sup>o</sup>でインキュベートした（15 分ごとに接種物をかき混ぜた）。インキュベーション期間の終わりに、接種された単層は、十分量の 2%（重量 / 容量）カルボキシメチルセルローズ溶液で、10 ~ 12 日間存続するように重層した（2% ウシ胎児血清、インスリン、亜鉛、HEPES 緩衝液、2 mM L - グルタミン、200 U ペニシリン / mL 及び / または 100 μg ストレプトマイシン / mL、pH 約 6.8 ~ 約 7.0 を含む、IMEMZ 培地で調製）（即ち、単層が乾燥しないために十分な量）。プレートはインキュベーション期間中は動かないように静置した。10 ~ 12 日後、上層（オーバーレイ）を吸引除去して、細胞をホルマリン固定液で固定して、タンパク質染色（例えば、ギムザ）を行った。各プレートに形成されたブラーク数を次に数え上げて、PRD<sub>50</sub> を計算した。

特に、各ウイルスのブラーク形成単位（PFU）の 50% を中和する抗血清の力価の決定を含む交差中和アッセイを、各種ウイルスについて行った。クリプトウイルスの BBR 株及び SV5 の NIH 21005-2 WR 株のウイルスストックを無血清最少必須培地（2 mM L - グルタミン、200 U ペニシリン / mL、100 μg ストレプトマイシン / mL を含むイーグル MEM を NaHCO<sub>3</sub> で pH 6.8 ~ 7.0 に調整したもの）で 1 mLあたり 1,000 PFU の力価になるように希釈した（希釈及びブレーティング後に 100 PFU / ウェル）。ニュージーランド白ウサギで作製された抗血清を同じ無血清 MEM で 10 倍の増分で段階希釈した。希釈ウイルスストックのアリコート（0.5 mL）を次に抗血清の各希釈アリコート 0.5 mL に混合して、緩やかにボーテックスで混合してから、氷上で緩やかな混合を 15 分ごとに加えながら 1 時間インキュベートした。インキュベーション期間後、培地を 6 ウェルクラスタプレート（NUNC）中の CV-1 細胞単層から吸引除去して、単層を温かい生理食塩水で洗浄し、生理食塩水を吸引除去してから、0.2 mL の各希釈抗血清 - ウイルスインキュベート物を 2 つの単層上に播種した。接種したクラスタプレートを次に CO<sub>2</sub> インキュベーター（5% CO<sub>2</sub> 容量 / 容量）内で 37<sup>o</sup> で 1 時間、15 分ごとに接種物を手動でかき混ぜながらインキュベートした。この吸収期の後、各ウェルに半流動重層培地（1% 重量 / 容量 カルボキシメチルセルロースナトリウム含有、2 mM L - グルタミン、200 U ペニシリン / mL、100 μg ストレプトマイシン / mL を含むイーグル MEM （NaHCO<sub>3</sub> で pH 6.8 ~ 7.0 に調整））を 10.0 mL 重層して、動かさないようにして、CO<sub>2</sub> インキュベーター（5% CO<sub>2</sub> 容量 / 容量）内で 37<sup>o</sup> で 10 ~ 12 日インキュベートした。このインキュベーション期間後、上層（オーバーレイ）を吸引除去して、単層を穏やかに温かい生理食塩水で洗浄してから、ホルマリン固定液（重量比 3.7% ホルムアルデヒドガス含有生理食塩水）で一時間以上固定した。固定後、固定液を吸引除去して、固定された単層を穏やかに蒸留水で洗浄してから、ウェルあたり 1 ~ 2 mL のギムザ染色液（42 mL 温 [55] グリセリン、42 mL 無水メタノールに 0.5 g のギムザ粉末を溶解して、濾過後、使用の直前にホルマリン固定液で 1 : 5 に希釈して調製）で、室温で 1 時間染色した。染色液を次にデカントして、単層を水道水で洗浄して、室温で乾燥させた。単層上のブラークは、ライトボックス上で光を当て、ウイルスと抗血清シリーズの各希釈液について、拡大鏡を使って数を数えて記録した。各抗血清ウイルスシリーズの中和力価は、ブラーク形成数を 50% 減少させる抗血清希釈の逆数として計算された。

各交差中和セット（即ち、抗クリプトウイルス抗血清対クリプトウイルス及び抗クリプトウイルス抗血清対 SV5、抗 SV5 抗血清対クリプトウイルス及び抗 SV5 抗血清対 SV5）の計算による中和力価は、異種混合物（即ち、抗クリプトウイルス抗血清対 SV5 及び抗 SV5 抗血清対クリプトウイルス）が、同種混合物（抗クリプトウイルス抗血清対クリプトウイルス及び抗 SV5 抗血清対 SV5）よりも一貫して 2 ~ 4 倍低かった。同種対と比較して、いずれの異種混合物もその差異が 2 倍以下であることはなかった。

#### 【0066】

クリプトウイルス超微細構造と免疫微細構造上のキャラクタリゼーション。 AV<sub>3</sub>/

10

20

30

40

50

S S P E / M V 細胞（麻疹ウイルスエドモンストン株で持続的且つ非増殖型感染された A V<sub>3</sub> / S S P E 細胞）、A V<sub>3</sub> / S S P E 細胞、並びにクリプトウイルス B B R 株で急性感染された C V - 1<sub>c</sub> 細胞は、2% ホルムアルデヒド及ピクリン酸並びに3% グルタルアルデヒド含有0.1M カコジル酸緩衝液溶液、pH 7.2 で15分、室温で（カバーガラス上で）インサイト固定された。抗体処理を受ける検体（即ち、免疫超微細構造研究用に調製されたもの）については、四酸化オスミウム後固定は省いた。固定細胞を有するカバーガラスをカコジル酸緩衝液を3回交換して洗浄し、70% エタノールで脱水してから、LR白レジンに包埋した。レジンを50°で24時間重合した。超薄切片を作製して、非コートニッケルグリッド上にマウントした。

クリプトウイルス B B R 株及び A V<sub>3</sub> / S S P E 細胞で急性感染された C V - 1<sub>c</sub> 細胞の染色薄切片を電子顕微鏡で検査した。感染 C V - 1<sub>c</sub> 細胞では、直径100~120 nm の多形性ビリオン粒子が急性感染細胞の表面から発芽するのが見られ、また多数の糸状構造（ラセン状ヌクレオカプシド、直径15~17 nm）の蓄積が細胞の細胞質中に観察された（データ表示なし）。ビリオンとヌクレオカプシドのどちらも、パラミクソウイルス科の他のメンバーについて説明するものと同様であった。A V<sub>3</sub> / S S P E 細胞表面からビリオンが発芽するのは観察されなかったが、細胞内ヌクレオカプシドの封入体は多数観察され、これらは、急性感染細胞に見られるものと同一であった。

非増殖型及び増殖型感染哺乳類細胞の細胞内ヌクレオカプシドは、クリプトウイルス特異的またはクリプトウイルスヌクレオカプシド特異的過免疫ウサギ抗体及び間接的免疫ゴールド標識法を用いて、電子顕微鏡下でその場所を容易に突きとめることができる。

A V<sub>3</sub> / S S P E / M V 細胞切片の免疫標識は、ニッケルグリッドにマウントした切片（四酸化オスミウム後固定しないで説明のようにプロセスされたもの）を、密閉加湿チャンバー内で溶液の雲に浮遊することによって行った。切片は、Ingramら ("Parasitology Research" 74: 208~215, 1988) の方法に従って食刻（エッチング）した。5% ウシ血清アルブミン含有修正トリス緩衝液（20 mM トリス、0.5 M NaCl, 20 mM アジ化ナトリウム 並びに 0.05% Tween 20、pH 8.2）を加えて、免疫標識前に切片を37°で30分インキュベートすることによって、非特異的標識を低減させた。全ての希釈と洗浄には修正トリス緩衝液を使用した。

単一標識実験では、切片に修正トリス緩衝液で1:20に希釈したウサギ抗血清（抗エドモンストン麻疹ウイルスまたは抗クリプトウイルス B B R 株）を加えて、37°で2時間インキュベートし、緩衝液を3回交換して洗浄してから、ヤギ抗ウサギ IgG コロイド金（10~15 nm 粒子サイズ、1:20 希釈、37°、1時間）を加えてインキュベートした。緩衝液を2回、次に蒸留水を2回交換して洗浄し、切片を2% 酢酸ウラニルと1 ed（発光素子）クエン酸塩で薄く対比染色してから、JEOL 1200 EX 透過型電子顕微鏡で検査した。

二重標識実験では、単一標識法で説明したように、ウサギ抗エドモンストン麻疹ウイルスと15 nm コロイド金粒子を用いて切片の一面を免疫標識して、切片の反対側が標識液で汚染されていないことを確認した。切片の反対面を標識する際に、抗体の交差反応が生じる可能性を減少するために、標識面を次にセロイジンの薄膜でコートした。切片の反対面の免疫標識は、第二抗血清（ウサギ抗クリプトウイルス B B R 株）と10 nm のコロイド金粒子を用いて、前述のように行った。これらの二重標識切片の検査によって、2つの抗血清の標識パターンの同時比較が可能になった。

これらの試験の結果は、疑いの余地がなく、図25に示している。第一標識シーケンス（15 nm 金ビーズ）は、幅の広い「ファジー」な麻疹ウイルスヌクレオカプシド（図25Bに表示）のみを標識したが、第二標識シーケンス（10 nm 金ビーズ）は、幅が狭い平滑なクリプトウイルスヌクレオカプシド（図25Aに表示）のみを標識した。

#### 【0067】

実施例5 単離クリプトウイルスタンパク質のキャラクタリゼーション  
放射免疫沈降（R I P）アッセイ：ドデシル硫酸ナトリウムゲルポリアクリラミド電

10

20

30

40

50

気泳動 ( S D S - P A G E 、以下参照) により、[<sup>35</sup>S] - メチオニン標識した未感染、非増殖型、並びに増殖型感染ヒト及び靈長類細胞のクリプトウイルス特異的免疫沈降物の比較分析によって広範なデータが生成されている。

C V - 1<sub>c</sub> または V e r o 細胞単層を、他で説明されている ( R o b b i n s と R a p p , " V i r o l o g y " 1 0 6 : 3 1 7 ~ 3 2 6 , 1 9 8 1 ) 方法を用いて、1 ~ 2 P F U / 細胞の多重感染度で、クリプトウイルスの B B R 株、S V 5 の N I H 2 1 0 0 5 - 2 W R 株または麻疹ウイルスエドモンストン株で感染した。

標識は、以下の方法によって感染 24 時間後に達成された。組織培養培地を感染細胞単層から除去して、細胞を血清とメチオニンを含まないイーグル基礎 M E M ( 飢餓培地 ) で洗浄した。次に感染培養物に飢餓培地を補充して 37 度 60 ~ 90 分インキュベートした。飢餓期間後、培養物を、1 0 0 m C i / m L [<sup>35</sup>S] - メチオニン ( A m e r s h a m ( アマシャム社 ) ) を含有する飢餓培地で標識した。標識は、37 度、5 % C O<sub>2</sub> 大気条件で 5 ~ 6 時間行った。免疫沈降法は、L a m b l a , " V i r o l o g y " 9 1 : 6 0 ~ 7 8 , 1 9 7 8 の方法に従って行われた。

S D S - P A G E : ビリオンと免疫沈降物は、10% ( または極めて小さいペチド種 [ 例えば、S H タンパク質 ] の存在の検出には 20% ) ポリアクリルアミドスラブゲルで、変性及び還元条件で分析した ( L a e m m l i , 1 9 7 0 ) 。電気泳動後、ゲルを蛍光溶液 ( A m e r s h a m ) で処理し、乾燥してから、X線フィルムに曝露した。

ウイルスの精製ビリオンは、還元及び非還元条件下で S D S - P A G E によって分析した ( 図 1 1 、還元条件下で S D S - P A G E 後に急性感染された V e r o 細胞において產生された、勾配・精製 [<sup>35</sup>S] - メチオニン標識クリプトウイルスビリオンのオートラジオグラム、を参照 ) 。図の右側に表示されているタンパク質の見かけ分子量は、分子量が既知であるマーカータンパク質 ( S i g m a C h e m i c a l C o . , S t . L o u i s , M O ) に対するその移動を比較することによって計算された。注釈は、図面の簡単な説明で定義されている。M W が約 5 k D である小型エンベロープ関連タンパク質である、S H タンパク質は、ゲルを流出してしまったために、図 1 1 には示されていない ( 以下参照 ) 。

S H タンパク質 。 明らかに S H タンパク質が小型であることと、相対的にメチオニン含量が低い理由で、S H タンパク質は、クリプトウイルスの B B R 株及び S V 5 の N I H 2 1 0 0 5 - 2 W R 株のどちらの放射標識ビリオンにおいても検出が困難であった。両ウイルスの非標識精製ビリオン調製物を、変性及び還元条件下で、低分子量マーカータンパク質 ( B i o R a d ) の傍らで 20% ポリアクリルアミドスラブゲル上を泳動して、銀染色法 ( B i o R a d ) で染色した際に、S H タンパク質として同定された、約 5 k D の M<sub>r</sub> を有する小型タンパク質がクリプトウイルス及び S V 5 ビリオン調製物中に発見された。クリプトウイルスの B B R 株、S V 5 の N I H 2 1 0 0 5 - 2 W R 株の S H タンパク質の移動に検出可能な差異はなかった。

F<sub>0</sub> 及び H N の異常な同時移動 。 多数のルプラウイルス ( 例えば、S V 5 ) の主要エンベロープタンパク質 ( F<sub>0</sub> 及び H N ) は、S D S - P A G E ゲル上の異なるバンドとして容易に識別可能であったが、大型のクリプトウイルス F<sub>0</sub> タンパク質 ( 即ち、+ 2 2 アミノ酸 ) は、本タンパク質 ( M<sub>r</sub> = 6 9 k D ) にしては有意に低い移動度を起因した。図 1 3 A 、 B に示すように、係るゲルの詳細な検査は、多少困難ではあるが、両タンパク質に識別を可能にした。図 1 3 A と 1 3 B は、主要クリプトウイルスエンベロープタンパク質 F<sub>0</sub> 及び H N の移動パターンの写真を示す。図 1 3 A は、主要クリプトウイルスエンベロープタンパク質 F<sub>0</sub> 及び H N の観察されたほぼ同時移動を示す。図 1 3 A の C S F 陽性患者 ( 右レーン ) からの R I P の拡大は、クリプトウイルス F<sub>0</sub> 及び H N タンパク質のほぼ同時移動の結果生じる「弓型」または「稜型」構造を示す。クリプトウイルス F<sub>0</sub> 及び H N タンパク質のほぼ同時移動と、シミアンウイルス 5 類似タンパク質の離散型移動の図による解釈を図 1 3 B に示す。

【 0 0 6 8 】

実施例 6 マウスの実験的感染：動物モデルの作製

10

20

30

40

50

感染性クリプトウイルスストック ( C V - 1<sub>c</sub> 細胞で調製 ) 及び生存非増殖型感染 A V<sub>3</sub> / S S P E 細胞を使って、実験用マウス 2 系 ( Quackenbush 及び有色、 C 5 7 ブラックの非近交種 ) に脳内接種した。

簡単に言えば、新生児マウス ( 1 ~ 2 日齢 ) に、  $5 \times 10^4$  PFU 無細胞クリプトウイルスまたは  $5 \times 10^3$  非増殖型感染ヒト羊膜細胞 ( A V<sub>3</sub> / S S P E ) のいずれかを含む 0.025 mL ( リン酸緩衝生理食塩水、 pH 7.4 ) を注射によって接種した。接種後、新生児マウスは、自由に食餌と水を供給されているその母親の元に戻した。毎日接種マウスの観察を行った。21日後に罹患動物において初めて疾患の症状が出現し、他の動物では、60日以上後まで症状は現れなかった。観察された症状は、悪液質、筋痙攣、振戻、強迫性行動 ( 例えば、長時間のひっかき、擦りつけ行動、またはくるくる回る行動 ) 、活動高進 / 知覚過敏、テンカン発作及び痙攣、並びに昏迷を含んだ。これらの結果は、クリプトウイルスの脳内接種が亜急性中枢神経系 ( C N S ) 疾患を起因することを実証した。マウスにおける神経学的、神経変性、及び / または神経精神医学的疾患の呈示は、ヒトにおける呈示と実質的に識別不能である。  
10

全ての接種動物がウイルスのヌクレオカプシドタンパク質 ( N P ) に対する抗体を発生したが、その全てがエンベロープタンパク質 ( F 、 H N 、及び S H ) に対する抗体を発生したわけではない。クリプトウイルスピリオンを接種されたマウスの 90 % 以上が、エンベロープタンパク質に対する抗体を発生したが、 A V<sub>3</sub> / S S P E 細胞を接種されたマウスでは 33 % のみが抗体を発生した。

同時に、感染性クリプトウイルスストックで接種された動物の多くは、著明な神経病理学的疾患を発症したが、非増殖型感染 A V<sub>3</sub> / S S P E 細胞を接種された動物はほとんど係る疾患を発症せず、そしてウイルスのエンベロープタンパク質に対する抗体の発生と C N S 症状の発症には強い関連性があった。これは、 C N S 疾患の発症は、ウイルスによる急性または亜急性 C N S 感染及びある細胞または組織におけるウイルス構造タンパク質全ての発現に依存することを示唆する。  
20

以下にさらに詳細な例を示す：

Quackenbush マウス。  $5 \times 10^4$  PFU のクリプトウイルス ( B B R 株 ) ( 10 個体 ) または麻疹ウイルス ( エドモンストン株 ) ( 8 個体 ) を脳内接種した二腹の 1 ~ 2 日齢の Quackenbush マウスを、母親の元に戻して、 3 ヶ月間にわたって観察した。2匹の動物 ( 1 匹はクリプトウイルス、他方は麻疹ウイルスを接種 ) が死亡しているのが発見され、翌朝には部分的に食べられていた。これらの死亡は、「針による外傷」及び / または母親の共食いに拠った。麻疹ウイルスを接種されたどのマウスも、試験期間を通じて神経学的、神経変性、生理学的または神経精神医学的症状を発症しなかったが、クリプトウイルスを接種された 2 匹のオスマウスが、接種 3 ~ 4 週間後に萎縮症及び対側後肢麻痺 ( 左後肢 ) を発症した。3番目 ( メス ) マウスは、接種の約 4 週間後に後肢を引きずっている ( 非萎縮性 ) いるのが観察されたが、翌日殺されて半ば共食いされているのが発見された。クリプトウイルスを接種された 9 匹中 3 匹が後肢麻痺を発症 ( 33 % ) したが、どの動物も、試験期間にわたってテンカン発作、消耗または神経精神医学的な顕著な症状は示さなかった。新生児時にクリプトウイルスを接種されたが、顕性な症状を発症しなかった成熟メス Quackenbush マウスのかなりの数の子孫に、後肢萎縮症と麻痺が観察された。この現象の出現頻度は、係る特徴を持って生まれて、後に発症するような新生児動物を母親が共食いする傾向があるために、評価することが困難であった。  
30

#### 【 0069 】

有色マウス。 1 ~ 2 日齢の有色マウスの 3 群の同腹仔 ( 26 個体から成る ) に  $5 \times 10^4$  PFU のクリプトウイルス ( B B R 株 ) 、シミアンウイルス 5 ( N I H 21005 - 2 W R 株 ) 、または麻疹ウイルス ( エドモンストン株 ) 、または偽感染細胞を脳内接種後、毎日観察した。各同腹仔の半分にクリプトウイルスを接種し ( 13 匹 ) 、他の半分を 3 群に分けて、シミアンウイルス 5 ( 6 匹 ) 、麻疹ウイルス ( 4 匹 ) 、または偽感染 C V - 1<sub>c</sub> 溶解物 ( 3 匹 ) で感染した。各群は区別目的で、 1 つの肢の上部皮膚にフェノ  
40

ールレッド染色でマークした（即ち、右前肢、左前肢、右後肢、左後肢）。クリプトウイルスを接種した1匹は接種後24～48時間で死亡したが、これは母親の元に戻したときに摂食を中止（あるいは拒否された）理由による、「針外傷／飢餓」に起因した。3～4週間後に、1匹オスと1匹メスが強直間代性姿勢でケージ内で死亡しているのが発見された - どちらの動物もクリプトウイルスを接種されていた。その同腹仔と比較するとどちらも体重が低めであったことが注記された。クリプトウイルス接種2ヶ月後、3匹目のマウス（オス）が悪液質、摂食障害性消耗、振戦、及びテンカン発作を有することが観察された（図7A）。次の1ヶ月にわたり（接種後約11週）、4匹目の動物（オス）が、消耗は観察されなかつたが、振戦とテンカン発作を発症した（データの表示なし）。SV5のNIH 21005-2WR株を接種された図7Aに示したクリプトウイルス感染マウスのオス同腹仔を図7Bに示す。マウスを麻疹ウイルスエドモンストン株、偽感染CV-1c細胞、またはホモジナイズドAV<sub>3</sub>/SSPE細胞のいずれかで接種した場合、同一の結果が観察された（即ち、全て健康のままであって、神経学的、神経変性、または神経精神医学的症状を発症したものは全くなかった。データ表示なし）。

その後の6ヶ月にわたり、（接種後9ヶ月まで観察した）、クリプトウイルスを接種された残りの動物（残り8匹のうち4匹）の有意な数が生理学的、神経学的、及び／または神経精神医学的症状を発症した。係る遅発性動物は、亜急性発症動物（即ち、接種後最初の3ヶ月に症状を発症したもの）において観察された顕性のテンカン発作とは著しく対照的である症状を呈した。これらの症状は、顕性神経学的症状というよりはむしろ生理学的、神経精神医学的並びに行動障害が優位を占めており、以下を含んだ：顕著な体重増、刺激に対する極度の攻撃的／受動的応答、強迫性行動、運動失調及び振戦。疾患動物において、攻撃性は、取り扱い時の身体的激昂または噛みつき素因によって最も頻繁に特徴づけられた。受動的動物は、過食、体重増、そして睡眠の傾向があった。反復行動がまた突然的に観察され、主として、極端なために頭部と頸部の抜け毛並びに摩擦性創傷の発症を起因するような、際限ない歩行及び／または顔洗いから成った。1匹の動物（図8Aに示すメス）は、異常な頭蓋構造（小頭症）を有し、6ヶ月目には、肥満、チック症及び筋肉単収縮（背部と左側）並びに強迫性顔洗いとひっかき行動を含む広域な生理学的及び行動上の症状を表した。係る強迫性行動のエピソードは、1時間以上継続することが観察された。接種後初めの5ヶ月間は明らかに正常と見えた2匹目のメス動物は（図8Bに示す）、5ヶ月～6ヶ月の間に顕著な運動失調、振戦及び攻撃性の呈示を開始した。この動物は正常な体重と外觀を維持したが、静止時にバランスを維持するために脚を外に開き、歩行時にはつまずき、そして取り扱いまたは邪魔をすると噛みつき及びヒス音をたてたり／うなつたりする傾向があった。図8に示した動物のいずれも、図7Aに示した動物と比較すると、顕著な（大発作性）テンカン発作は発症しなかつた。2匹の他の動物（1匹のオスと1匹のメス）がまた、緩徐進行性の混合症状を発症した（データ表示なし）。遅発性動物のいずれにおいても顕性テンカン発作活動は観察されず、SV5、麻疹ウイルス、または偽感染細胞を接種された動物のいずれも同様な症状は発症しなかつた。

クリプトウイルスを接種された13匹の新生児動物中、1匹は針外傷で死亡（性別不明）、2匹は、消耗症の兆候を有し強直間代姿勢で死亡（テンカン重積症による突然死の兆候）（1匹オス、1匹メス）、2匹は消耗して、大発作型テンカン発作を発症（どちらもオス）、4匹は広域遅発性神経学的／神経心理学的症状を発症（3匹メス、1匹オス）、1匹は繁殖後子殺しを犯し（メス）、そして3匹はいずれの症状も発症しなかつた（2匹メス、1匹オス）。この式から針外傷死を除くと、12匹の動物中9匹が、神経学的、神経変性、及び／または神経精神医学的症状を発症した（75%）。2匹の間代性姿勢の死亡を除くと、10匹の動物中7匹が症状を発症した（70%）。これはコントロール接種マウスの併合結果と比べて極めて有意であり（クリプトウイルス接種した7/10のマウスが神経学的症状を呈示したがコントロール群では0/13であった、p = 0.0005、両側フィッシャー正確検定）、そしてまたSV5接種マウスとのみ比較しても（7/10に対して0/6、P = 0.01、両側フィッシャー正確検定）、並びに麻疹接種マウスとのみ比較した場合さえ（7/10に対して0/4、P = 0.035、片側フィッシャー

10

20

30

40

50

正確検定)有意であった。この群ではマウスが少数であったために、非感染細胞溶解物で接種されたマウスと比較すると、統計学的有意さは達成されなかった(7/10対0/3、 $p = 0.069$ 、片側フィッシュ正規検定)。しかしながら、2匹の間代性姿勢の死亡が含まれた場合でも、この少数コントロール群でさえ、有意な差があった(9/12対0/3、 $p = 0.044$ 、両側フィッシュ正規検定)。したがって、クリプトウイルス感染に起因する疾患(複数でもよい)及び症状は明らかに有意であった。

子殺し。 新生児期にクリプトウイルスを接種されたにもかかわらず、試験の最初の9ヶ月にわたって亜急性または遅発性症状を発症しなかった4匹の有色マウスのうち、3匹はメスで、月齢9ヶ月時に未感染のオスと交配された。その結果生じた3群の同腹仔のうち2群の子孫の全ては正常に発育したが、1群の同腹仔の全て(10匹)が殺されて、全部または部分的に母親によって共食いされた。係る子殺しは、SV5、麻疹または偽感染細胞を接種されたメスの同腹仔には起こらなかった。別の試験では(以下参照)、生存AV<sub>3</sub>/SSPE細胞を接種されたが、顕性な症状を発症しなかったメスの1匹は、遅発性生理学的及び行動上の症状を発症して、未感染オスと交配後同腹仔を全部子殺しした。

非増殖型感染AV<sub>3</sub>/SSPE細胞の接種を利用する動物モデル。 別の試験では、2群の同腹新生マウス(18匹)を生存またはホモジナイズドAV<sub>3</sub>/SSPE細胞(各6匹)または生存またはホモジナイズドAV<sub>3</sub>細胞(各3匹)で(生後1~2日目に)接種した。針外傷による死亡はなかった。ホモジナイズドAV<sub>3</sub>/SSPE細胞、生存AV<sub>3</sub>細胞、またはホモジナイズドAV<sub>3</sub>細胞(12匹)を接種された動物のいずれも亜急性または遅発性症状を一切発生しなかったが、生存AV<sub>3</sub>/SSPE細胞を接種された6匹のうちの1匹が亜急性退行変性及び神経学的症状(1匹、オス)を発症し、1匹が遅発性症状を発症した(1匹、メス)。亜急性症状を発症した動物は、脳内接種24日後に症状を呈示した。5日間にわたって、呈示症状は悪液質、消耗症、背を丸める姿勢、チューチューチー鳴いたり、クリック音を反復し、知覚過敏、尿失禁、振戦、筋痙攣、及び昏睡を含んだ。顕著なテンカン発作は観察されなかった。動物は昏睡発症時に屠殺された。遅発性症状を発症した動物(1匹メス)は、(接種後)5~6ヶ月時に、反復性歩行、攻撃性及び進行性肥満を呈示した。6ヶ月時にこの動物を未感染オスと交配した。8匹の仔を産んだ7日後に、このマウスは全同腹仔を殺して、各仔を部分的に食べた。テンカン発作または顕性な神経学的症状の兆候は観察されなかった。ホモジナイズドAV<sub>3</sub>/SSPE細胞、AV<sub>3</sub>細胞、またはホモジナイズドAV<sub>3</sub>細胞を接種され、交配された(計6匹)その他のメスのいずれも子殺しはしなかった。

#### 【0070】

実施例7 神経学的、神経変性、及び/または神経精神医学的疾患と診断されたヒト患者の血清と脳脊髄液中にクリプトウイルス特異抗体が存在する。

患者の血清とCSF中におけるウイルスの主要エンベロープタンパク質(F<sub>0</sub>とHN)に対するクリプトウイルス特異抗体の存在の証拠が、急性感染CV-1<sub>c</sub>細胞において產生された[<sup>35</sup>S]-メチオニン標識クリプトウイルス特異的タンパク質の免疫沈降法によつて判別された。図12Aと12Bは、SDS-PAGE(還元)後の臨床CSF検体によつて[<sup>35</sup>S]-メチオニン標識急性感染CV-1<sub>c</sub>細胞から沈降された麻疹ウイルス、またはクリプトウイルス特異的タンパク質のRIPプロファイル例となるオートラジオグラム写真である。図12Aでは、レーン「V」は、急性感染された[<sup>35</sup>S]メチオニン標識CV-1<sub>c</sub>細胞(BBR株)からの勾配・精製クリプトウイルスピリオンを含む。レーン「MV」は、麻疹ウイルス(エドモンストン株)で急性感染された放射標識CV-1<sub>c</sub>細胞から11才の男児SSPE患者のCSFによって沈降されたタンパク質を含む。レーン「B」は、麻疹ウイルスまたはクリプトウイルスで急性感染された放射標識CV-1<sub>c</sub>細胞の1:1混合物から同一のCSF検体によって沈降されたタンパク質を含む。レーン「CV」は、クリプトウイルスで急性感染された放射標識CV-1<sub>c</sub>細胞から同一CSF検体によって沈降されたタンパク質を含む。図12Bは、診断用スクリーニングのためにCSFを採取された神経科/神経外科患者からランダムに選択された6人のCSFによって沈降されたクリプトウイルス特異的タンパク質のRIPプロファイルを示す。レーン2のサンプル

10

20

30

40

50

が採取された患者は、運動失調症、錯乱及び記憶喪失を呈した成人男性であった（小脳性運動失調症と仮診断されていた）。レーン4のサンプルを採取された患者は、水頭症及び難治性テンカン発作を呈し、後にテンカン重積症で死亡した乳児（女性）であった。

#### 【0071】

実施例8 クリプトウイルスは、特発性ヒト神経学的、神経変性、及び／または神経精神医学的疾患であると診断された患者における疾患の発生機序に関する

クリプトウイルスは、拒食症、多発性硬化症（M S）、テンカン、亜急性硬化性全脳炎（S S P E）、自閉症、精神遅滞、情動障害、情緒異常（臨床的鬱病）、精神病、強迫性神経症、躁鬱病（双極性障害）、慢性疲労症候群（C F S）、水頭症、小脳性運動失調症及び非定型ウイルス性髄膜炎を含む、特発性神経学的、神経変性、及び／または神経精神医学的疾患であると診断された患者の疾患発生機序に関連する。そのC S F 中にクリプトウイルス特異抗体を有するほとんどの患者は複数の疾患を有していた。したがって、神経科または神経外科患者のC S F 中におけるクリプトウイルスの主要エンベロープタンパク質（F<sub>0</sub>とH N）に対する特異抗体の存在と顕著な「反復性」または強迫性要素を伴う状態の事前診断には関連性がある。10

クリプトウイルス血清陽性は、必ずしもC S F 陽性（即ち、C S F 中のクリプトウイルスF<sub>0</sub>及びH Nタンパク質に対する抗体の存在）あるいは任意の神経病理学的状態の診断に関連しないが、C S F 陽性は、中枢神経系の顕著な障害の事前診断と強く関連した。これらの関連性は、ある種の診断（例えば、S S P E、M S、C F S、及び特発性テンカンのある形態）を受けた患者には一貫して発見され、またその他の診断（例えば、アルツハイマー病）を受けた患者からの検体にも偶然発見された。20

免疫プロット法によって分析された2つのC S F 検体（データ表示なし）、または酵素結合免疫吸着アッセイ法（E L I S A、図14を参照）によって分析された血清とC S F 検体で、同一サンプルで利用可能な容量が限られているためにC S F 検体のほんの一部を使ってこれらのアッセイが行われたにも係わらず、同様な結果が得られた。

ある患者は、前述症状のいくつかを呈したが、C S F 検体中にウイルスに対する抗体を有さなかつたが、多数の症状を呈示せず、明らかな神経病理学的または神経心理学的障害と診断されなかつた患者のC S F 中にクリプトウイルス特異抗体が発見された事例はなかつた。

さらに、血清陽性個体（即ち、その血清中にクリプトウイルス特異抗体を有する個体）は、そのP B M N C 中に非増殖型、不顯性、しかし誘導可能な状態にあるウイルスを潜伏している。30

個々の患者のP B M N C 中におけるウイルスの存在は、神経病理学的障害の発症と対称的に関連はしなかつたが、これらの所見は、ウイルスが微小血管イベント（即ち、クリプトウイルスを担うP B M N C のC N S 中への漏入）を介して、またはその他のC N S 刺激に対する免疫系応答によって（即ち、その他の感染に対する炎症性応答の一部として、クリプトウイルスを担うリンパ球のC N Sへの漏出、トロイの馬現象）によってC N S 中への侵入を得ることができる。対称的な関連性の欠如についての参考は、P B M N C 検査を受け、そのC S F 中にクリプトウイルス特異抗体を有する個人の全てがそれらの細胞中にウイルスを有しているが、そのP B M N C 中にウイルスを有することが発見された全ての個人が、その時点で、神経学的、神経変性、及び／または神経精神医学的障害を罹患しているわけではないことを意味する。40

以下の例がさらなる詳細を明らかにする。

(a) アルツハイマー病。 図15に示すように、血清とC S F の3つの対応したセット（National Neurological Research Specimen Bank（国立神経学リサーチ標本バンク）（N N R S B）、ロサンゼルス、CA 提供）について、放射標識した急性感染C V - 1<sub>c</sub> 細胞からのクリプトウイルスF<sub>0</sub>とH Nタンパク質を沈降する能力についてR I P 分析によって検査した。3つの検体全てが血清中にクリプトウイルス特異抗体を有したが、患者3のみがこれらの抗体をそのC S F 中に含んだ。このことは、アルツハイマー病と診断された患者3が罹患する疾患は、C N S 組織の50

クリプトウイルス同時感染を合併していた。あるいは、患者3は誤診されていて、実はクリプトウイルス関連神経障害を罹患していた場合もある。

サンプルのサイズは小さいにも係わらず、アルツハイマー病患者3人の全てがクリプトウイルスに曝露されていて、多分それをリンパ球に担っていたということは興味深いことである。しかしながら、患者1と2はそのCNS組織中にウイルスを有するようには思われないために、クリプトウイルスがアルツハイマー病の発症に役割を果たすとは考えにくい。

#### 【0072】

(b) 小脳性運動失調症、非定型ウイルス性髄膜炎、水頭症、特発性不規則性機能高進症及びテンカン重積症。オーストラリア、クイーンズランド、ブリスベンにあるロイヤル・ブリスベン＆ロイヤル小児病院の臨床微生物学部によって診断スクリーンのためにCSF検体が採取された神経科または神経外科患者に由来する66のCSF検体について盲検を行った(即ち、検体に関する診断または病歴のどちらも検体スクリーニング前には提供されない)。これらのCSF検体のうち、10検体がクリプトウイルス陽性であった(図17参照)。10のクリプトウイルス陽性CSF検体のうちの1検体は、小脳性運動失調症と診断された成人男性患者のものであることが同定された。(図12B参照)。10のクリプトウイルス陽性CSF検体のうちの他の1検体は、非定型ウイルス性髄膜炎と診断された成人女性患者のものであることが同定された。3番目の陽性CSF検体は、運動失調症、記憶喪失、一時的意識喪失、テンカン発作、複視と頭痛を呈して、水頭症、慢性疲労症候群、及びテンカンの可能性があると診断された55才男性のものであり、4番目の陽性CSF検体は、特発性不規則性機能高進症と診断された成人男性に由来し、5番目の陽性CSF検体は、慢性の手の運動及び難治性テンカン発作を呈して、水頭症及びテンカン重積症と診断された乳児(女性)であった(以下のc及びdを参照)。残りの5つのクリプトウイルス陽性CSF検体の診断と症状は入手できなかった。

(c) 慢性疲労症候群(CFS)。CFSの症状を呈する多数の青年及び成人患者がその血清中に高力値の抗クリプトウイルス抗体を有することが発見され、これはこのウイルスの一次感染が、慢性倦怠感及びリンパ節腫脹を付随する慢性発熱性気道内疾患として症状発現し得ることを示した。これは感染性単核症の症状(即ち咽頭炎と持続性「腺性発熱」)ではない。係る患者またはその血清またはCSF中にクリプトウイルス特異抗体を有することが発見されたその他の患者において、急性脳性(または脳症)疾患を示す証拠はなかった。「急性」とは本願では、7日以内に迅速な発症と症状の呈示することを意味する。

CFSと診断された患者からの56の血清検体が地域の医師(ブリスベンと南西クイーンズランド)からクリプトウイルススクリーニングのために提供された。11の対応するCSF検体が次に得られた。RIP分析によって、血清サンプルの54/56(96.4%)及びCSF検体の10/11(90.9%)がクリプトウイルス特異抗体を含むことが明らかになった(図16)。

水頭症、テンカン、及びCFSと同時診断された患者を含むと(図17及び以下のテンカンのデータを参照)、CFS患者からの全12のCSF検体がRIP分析されて、11/12(91.7%)がその中にクリプトウイルス特異抗体を有した。

CFSと診断された患者はほとんど常に2つ以上の併発診断を受けていた。これらは：拒食症、MS、テンカン発作、情緒異常(臨床的鬱病)、精神分裂病、及び躁鬱病(双極性障害)、を含んだ。例えば、拒食症と慢性疲労症候群(CFS)を同時診断された一人の青年女性は、CSF中にクリプトウイルス特異抗体を有していた。実質的に全てのこれら障害の病因が特発性であることは注記に値する。

CFS患者が呈する症状は、広域スペクトルに及ぶが、このスペクトルは、実はかなりばらばらで本疾患を代表する。これは多分以下に呈示する5人の患者の病歴を調べることによって最もよく説明されよう。

患者PRは、成人男性、年齢55才で、主として精神錯乱、嗜眠、記憶喪失、かすみ目、情緒異常、及び小発作性テンカン発作を罹患していた。EEG結果は異常であり、これ

10

20

30

40

50

はテンカン様疾患を指示する。患者 P R は、進行性に悪化する C N S 症状を有するが歩行可能であった。

患者 D F は、成人男性、年齢 52 才で、主として精神錯乱、嗜眠、記憶喪失、情緒異常、及び小発作性テンカン発作を罹患していた。EEG 結果は異常で、前側半球の皮質及び皮質下機能にテンカン様応答を示した。患者 D F は、進行性に悪化する C N S 症状を有するが歩行可能であった。

患者 N B は、成人女性、年齢 36 才であり、主として精神錯乱、嗜眠、及び極度の疲労、記憶喪失、情緒異常、運動失調症、かすみ目、及び刺痛を罹患し、腺性発熱、長引く反復性咽頭炎、振戦、及び小発作性テンカンの病歴を有した。N B の姉妹は拒食症と筋クローヌスと診断された。患者 N B は、進行性に悪化する C N S 症状を有し、寝たきりで一部歩行可能であった。  
10

#### 【 0 0 7 3 】

患者 K T は、成人女性、年齢 27 才であり、主として精神錯乱、集中力喪失、記憶喪失、拒食症、嗜眠及び極度の疲労、及び振戦を罹患し、反復発熱性リンパ節腫脹の病歴を有した。患者 K T は安定していたが寝たきりで、歩行は僅かに可能であるのみであった。

患者 S S は、成人女性、年齢 23 才で、主として集中力喪失、記憶喪失、及び嗜眠を罹患し、年齢 14 才の時から情緒異常が始まり、EBV 陰性腺性発熱の病歴を有した。直系家族メンバー（母親、父親、2姉妹、及び1兄弟）は全て血清陽性であった。さらに S S の母親は9年の情緒異常病歴を有し、クリプトウイルス抗原がその培養 P B M N C 中に検出された。サンプル採取の2年後、患者 S S は安定かつ歩行可能となつた。  
20

(d) テンカンと水頭症。R I P 分析を使って、C S F 検体の2つの臨床コレクションにおいてクリプトウイルス特異抗体の存在を測定した。最初のコレクションは、クイーンズランド、ブリスベンにあるロイヤル・ブリスベン病院の臨床微生物学部に、神経科及び神経外科部門の医師によって提出された検体からランダムに選択された 66 検体を含んだ（前記 b を参照）。検体に関する診断または病歴のどちらも検体スクリーニング前には提供されなかった。図 17 は、このコレクションからの C S F で行われた R I P アッセイの結果を示す。レーン 2 の陽性 C S F 沈降物は、後に運動失調症、記憶喪失、一時的意識喪失、テンカン発作、複視、及び頭痛を呈示する 55 才成人男性（R W）から得られたものであることが発見された。この患者は、水頭症状態であることが決定され、この状態を軽減するために脳室シャントを挿入する手術を受けた。この患者は、水頭症、テンカン、及び慢性疲労症候群（CFS）と診断されていた。  
30

コレクション 1 の 66 の C S F 検体中の 10 検体が、クリプトウイルス特異抗体を含むことが発見された（15%）。これらの患者の 5 人については診断が下されており、次を含んだ：(1) 女乳児 - 水頭症及び難治性テンカン発作、後に死亡（図 12B を参照）、(2) 成人男性 - 小脳性運動失調症（図 12B を参照）、(3) 女児 - 非定型ウイルス性髄膜炎、(4) 成人男性 - 刺痛、及び(5) 図 17 に関連して説明した患者 - 水頭症、テンカン及び CFS。

56 のクリプトウイルス陰性 C S F 検体中の 2 検体についてのみ診断が下された。一人の患者（W K、男性）は、急性ウイルス性髄膜炎と診断され、もう一人（S G、女性）は、特発性頭蓋内圧亢進と診断された。  
40

第二コレクション（コレクション 2）は、オーストラリア、ニューサウスウェールズ州、シドニーにあるキャンベルダウン小児病院において神経科医によって収集された小児（12 才以下）から得られた 20 の C S F 検体を含んだ。再び、検体に関する診断または病歴のどちらも検体スクリーニング前には提供されなかった。しかし、このコレクションでは、テンカン様疾患を呈した、または特発性テンカンのある形態と診断された小児からの未公開数の C S F 検体を含むように要請された。

図 18 は、コレクション 2 からの C S F で行われた R I P アッセイの結果を示す。レーン 1 で分析された C S F 沈降物は、難治性テンカン発作を発症して、テンカン重積症で死亡した新生児に由来し（患者 C T、以下）、レーン 2 で分析された沈降物は、レノックス - ガストー / 汎発性テンカンの診断を受けた小児に由來した。バンドを見るために長期間  
50

の曝露（30日）を必要とした結果、このオートラジオグラムのバックグラウンドノイズは高かった。

コレクション2（バイアス化）で提供された20CSF検体のうち6検体が、クリプトウイルス特異抗体を有することが発見され、後にこのスクリーニングは、テンカンまたはその他のテンカン様疾患と診断されて、このコレクションに含まれた患者由来の7検体のうち6検体を同定したことが判明した。6つのクリプトウイルス陽性CSF検体は以下の患者から得られた：（1）CT、難治性痙攣及びテンカン発作を有し、テンカン重積症で死亡、（2）LB、レノックス・ガトーテンカン及び汎発性テンカンと診断された、（3）BM、重度精神遅滞及びテンカンと診断された、（4）FZ、難治性テンカン発作を有し、テンカン重積症で死亡した2ヶ月の小児、（5）CN、水頭症、脳性麻痺、及びテンカン様発作を有した、並びに（6）LD、原発性乳児性痙攣を有した。テンカンまたはその他のテンカン様疾患と診断された8人の患者中3人において、水頭症も同時に診断された。  
10

#### 【0074】

14のクリプトウイルス陰性CSF検体の一つは、テンカンと診断された患者から得られたものであるが、残りの検体については診断は提供されなかった。それらの検体は、単に無症候性患者（即ち、テンカン様症状を呈示しなかったあるいはテンカン様疾患と診断されなかった患者）由来の小児神経科または神経外科検体として特徴づけられた。

（e）多発性硬化症（MS）。MS患者由来の臨床検体は、スクリーンされた物質では最も大型グループの一つを成す（38血清サンプル及び30CSFサンプル、このうち各30の対応セットを含む）。血清サンプルのうち8検体は、衰弱性疾患を有し、オーストラリアの国立多発性硬化症協会によって運営されている養護施設に住んでいた、クイーンズランド、ブリスベンのMS患者に由來した。これらの患者からCSF検体は得られなかった。30の血清及びCSFの対応セットは、National Neurological Research Specimen Bank（国立神経学リサーチ標本バンク）（NNRSB）、ロサンゼルスから提供された。  
20

図19は、NNRSB提供の5/30MS患者の血清サンプルについて実施したRIPアッセイの結果を例示する。NNRSB提供の他の25血清検体から得られた結果は図20に示し、NNRSB提供のMS患者からのCSF検体の16/30から得られたRIP結果は図21に示す。残りの8検体を用いて行われたRIPの結果は同様なプロファイルを示した（データ表示なし）。図19～21に示すように、これらの分析の結果は、全患者が、血清中に高レベルのクリプトウイルス特異抗体（100%）を有し、29/30の患者がそのCSF中にクリプトウイルス特異抗体を有した（96.7%）。

（f）亜急性硬化性脳炎（SSPE）。麻疹ウイルスのみがSSPEの単独病因であることでは説明のつかない変態（従来の技術のディスカッションを参照）が観察されたことは、SSPEの発生機序が、麻疹及びクリプトウイルス（SSPE患者から単離された）によるCNSの二重感染を含むことの証拠によって説明され得る。

SSPE患者の血清は、非増殖型感染AV<sub>3</sub>/SSPE細胞からのウイルスの主要ヌクレオカプシドタンパク質（NP、63kD）を沈降することが発見された（図22参照）。図22は、6人のオーストラリア人SSPE患者の血清（レーン1～6）及び6人のコントロール血清（レーン7～12、クリプトウイルス主要エンベロープタンパク質（F<sub>0</sub>、HN）に対する抗体を有さない小児患者の血清）によって[<sup>35</sup>S]-メチオニン標識細胞から沈降されたクリプトウイルスNPタンパク質（p63）のRIPプロファイルの作出後に得られたオートラジオグラム写真である。  
40

図23は、SSPEと診断された年齢11才の男児からのCSFサンプルによって、[<sup>35</sup>S]-メチオニン標識麻疹ウイルス感染CV-1細胞（レーンMV）、クリプトウイルス感染CV-1細胞（レーンCV）、または両方の混合物（レーンB）から沈降された麻疹ウイルス特異的及びクリプトウイルス特異的タンパク質のRIPプロファイルのオートラジオグラム写真である。レーンV=[<sup>35</sup>S]-メチオニン標識クリプトウイルス感染CV-1細胞から勾配・精製されたクリプトウイルスピリオン。図23は、SSPE患者から  
50

の C S F がクリプトウイルスと麻疹ウイルスタンパク質のどちらをも沈降することを示す。このアッセイの結果は、S S P E C S F は、麻疹ウイルス特異抗体及びクリプトウイルス特異抗体（即ち、麻疹ウイルスの H N タンパク質（レーン M V ）及びクリプトウイルスの H N 及び F<sub>0</sub> タンパク質（レーン C V ）のどちらも有し、両方がほぼ等量含まれていることを示す。クリプトウイルスタンパク質を沈降したその他の C S F サンプル（例えば、M S 、C F S 、またはテンカン患者由来）のいずれも、麻疹ウイルス H N タンパク質を沈降しなかったために、これはユニークであった。

この C S F 検体によって沈降されたクリプトウイルス特異的タンパク質の R I P プロファイルは、現在までに試験された M S 患者、C F S 患者及び特発性テンカン患者の「クリプトウイルス陽性」 C S F によって産生されるプロファイルに象徴的であった（図 12 A 10 と 17 を比較）。F<sub>0</sub> 及び H N タンパク質に対する抗体応答の強度にはかなりの変動があったが、一つのタンパク質またはその他に対する抗体の存在についてはほとんど変動は見られなかった。しかしながら、F<sub>1</sub> と F<sub>2</sub> タンパク質に対する応答には可変性があった（即ち、多くの患者において、係る応答は存在しないと見られる）。このパラドックスは、インサイツにおけるタンパク質のタンパク質分解性切断と対応する免疫応答に関する可能性があり（即ち、F<sub>0</sub> タンパク質は、ある患者では効率的に切断されて、F<sub>1</sub> と F<sub>2</sub> フラグメントを生成し、究極的にはこれらを免疫系に曝露する）、他の患者ではこのタンパク質切断の効率が悪く（あるいは全く切断されず）、したがって、これらの患者はこれらのフラグメントに対して抗体応答をほとんど発生しないことがある）。

#### 【0075】

10

#### 実施例 9 罹患ヒト患者と実験的感染動物間の相関性

本願の例のいくつかは、その脳脊髄液（C S F ）中にクリプトウイルス特異抗体を有する患者の多数によって、あるいはこのウイルスで実験的に感染されたマウスによって、呈示されるテンカン様症状に注目している。この関連性は強いが、クリプトウイルス特異抗体をその C S F 中に有する患者の全てが顕性のテンカン発作または痙攣を呈示するわけではない。テンカン患者は典型的には、テンカン発作活動がほとんどあるいは全くないものから、軽い活動（「小発作性」または「無」テンカン発作）、反復かつ難治性「大発作性」テンカン発作に至るまでの応答スペクトルを呈する（これらの出来事は、門外漢の一般大衆によって、テンカンの全ての形態を定義する症状であるとしばしば誤解される、"Epilepsy: A Comprehensive Textbook"（テンカン：総合テキストブック），Engel, Jr., J. and Pedley, T. A., 編集 Lippincott-Raven, 1997 を参照）。

20

ヒトクリプトウイルス感染の症状及び兆候の発症に関して、空間的（「どこで」）、時間的（「いつ」）、並びに量子的（「他に何が」）に関与する因子を認識することが必須である：（1）どの細胞、組織、神経路、及び C N S 構造がウイルスによって感染されるのか、（2）感染時点でのそれらのシステムの発生状態、及び（3）感染の発生と進行における環境及び宿主因子それぞれの役割。

30

例えば、ここに呈示されたデータは、テンカン様症状とこのウイルスによる初期 C N S 感染（即ち、乳児期、小児初期、または青年期、及び実験的感染された新生児マウス）の間に強い相関性があることを確立し、この相関性は、成人（及びテンカン様症状を発症しない成体マウス）ではあまり強くなく、観察された C N S 兆候スペクトルははるかに広域に渡る。

40

一般的には、ヒトまたは実験的にこのウイルスで感染された動物によって最も頻繁に、そして一貫して呈示される特徴は、「反復性」または「強迫性」神経障害及び行動の発症である。これはおそらく、C N S 発生の異なる時点または異なるステージにおける中枢神経系（C N S ）の異なる部分のニューロン（例えば、介在ニューロン）またはニューロン路の選択的欠損（またはこれに対する免疫病理学的損傷）に起因すると思われる。

C S F 中にクリプトウイルス特異抗体を有する患者の病歴を検討すると、患者の全てが 1 つ以上の重度な神経障害を有すると診断されている。これらは、限定はされないが、以下を含む：

50

- (1) 亜急性硬化性脳炎 (SSPE) : 検査された 4 つの C SF のうち 4 検体 (100%)、全て青年患者)、  
 (2) 特発性 / 原因不明テンカン : 検査された 7 つの C SF のうち 6 検体 (85.7%) が、テンカン発作を呈し、特発性テンカンまたはテンカンの原因不明な形態と診断された、乳児及び小児、  
 (3) 多発性硬化症 (MS) : 試験された 30 の C SF のうち 29 検体 (96.7%)、全て成人、並びに  
 (4) 慢性疲労症候群 (CFS) / 臨床型躁鬱病 : 検査された 12 の C SF のうち 11 検体 (91.7%)、全て成人。

これらの結果は、C SF 中のクリプトウイルス特異抗体と CNS 疾患の狭域スペクトルの間の明らかな相関性を実証する。上記に一覧した疾患は別々の疾病特徴的実体の代表として定義されるが、現実にはこれらの患者によって呈示される症状とその診断の間にはかなりの重複がある。例えば、最終的に SSPE と診断された患者の全てが実質的には、当初はテンカンと診断されている。同様にして、初期ステージ MS は、CFS の提示と極めて類似しており、臨床型躁鬱病はその両方の共通的特徴である。CFS の別名が「非定型多発性硬化症」であることは驚くには当たらない。(Bell, The Disease of a Thousand Names (千の名前を持つ疾患), Pollard Publications, Lyndonville, NY [1991])。

#### 【0076】

(1) 重症テンカン様疾患を患う患者の年齢 (SSPE とテンカン、その大多数が乳児、小児、または青年) 並びに (2) さらに瀰漫性または複雑な神経学的機能障害を煩う患者の年齢 (例えば、MS 及び CFS 患者は全て成人) の間には強い相関性がある。さらに、特発性及び原因不明テンカンのある種の形態である、SSPE 及び MS は、多数の共通な神経病理学的特徴を有する。これらは、離散型、限局性、または播種性硬化症領域 (CNS 組織における瘢痕形成)、形成異常病巣 (免疫病理学的プロセスまたはニューロン路欠失のいずれかの結果として)、及び免疫細胞の血管周囲性免疫細胞集積 (病巣周辺における炎症プロセスの証拠) を含む。したがって、これらの疾患のそれぞれが、クリプトウイルス感染 CNS 組織を有する空間的、時間的、量子的因子の別々の病理学的「複合体」を共有特徴として提示している可能性がある。SSPE に関しては、本疾患には麻疹ウイルスがまた関与していることを過去のデータが確立 (及び本願のデータが確認) した。SSPE は、両ウイルスによる広域 CNS 感染に起因 (脳白質間に炎症性及び播種性硬化症を生起する) するが、特発性テンカンのある形態は、クリプトウイルスのみによる CNS の初期感染を表す (感受性介在ニューロン及びニューロン路の欠失並びに離散性形成異常病巣の発生)。ほとんど専ら成人に発症する MS は、CNS の遅延性及び限局性クリプトウイルス感染の病理学的結果を代表し - 完全に分化した CNS 組織におけるクリプトウイルス複製の制限と成熟グリアアーキテクチャによる脳の有効な分節に拠る。

要約すると、ウイルス、あるいはウイルスで非増殖型感染された細胞によるマウスの脳内接種は、大部分の動物において亜急性神経病理学的疾患の発生を起因する。これらの疾患は、その脳脊髄液中にクリプトウイルス特異抗体を有する患者に見られるヒト神経障害の症状スペクトルと密接に類似している。

さらに、クリプトウイルス陽性 C SF を有する患者は、様々な疾患を診断されており、明らかに以下の 2 群 (1) しばしば致命的である亜急性テンカン様身体症状に優先される疾患有する乳児、小児、及び青年、並びに (2) 通常は致命的ではなく、はっきりした身体的症状は少ないが、明らかな神経心理学的要素を呈する緩徐進行性の慢性疾患有する若年成人と成人、に分けられる。

これらの所見は、その究極的兆候が、(1) 一次感染した個体の年齢、(2) ウィルスが CNS 組織への侵入を獲得するメカニズム、(3) その時点での感染の度合い、(4) 感染されたときの CNS の発生段階、(5) 感染を受けた CNS の場所、(6) 遺伝的因素 (例えば、免疫系欠損、神経機能不全、CNS 組織上におけるウイルス受容体存在の有無等)、並びに (7) その他の環境因子 (例えば、頭部外傷の存在、任意の種類の神経外

科手術、その他の因子によるCNS組織の前または同時感染、薬物または毒性化学物質への曝露等)に依存する、神経学的な障害の原因であるという結論を支持する。

本発明の多数の実施形態が説明された。それにも係わらず、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく様々な変形を作製できることが理解されよう。したがって、その他の実施形態は、以下の特許請求の範囲内である。

【図面の簡単な説明】

【0077】

【図1】図1は、本発明のヒトクリプトウイルスの、パラミクソウイルス科のルプラウイルス属に対する分類学的割り当てを示すチャートである。

【図2】図2は、Collinらのバージョン(Virology(ウイルス学), 第三版, Fields, Knipe, 及びHowley編集, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996, 第41章, 1206ページ, Parainfluenza Viruses(パラインフルエンザウイルス))から修正した系統樹である。 10

【図3】図3は、パラミクソウイルス科ファミリの各属の典型的メンバーの遺伝子地図の表示である。

【図4】図4は、改訂版のルプラウイルス遺伝子地図である。

【図5】図5は、還元条件下で10%アクリルアミドLaemmliスラブゲルによるSDS-PAGE後の勾配・精製ヒトクリプトウイルス(BBR株)及びシミアンウイルス5(NIH 21005-2WR株)の[<sup>35</sup>S]-メチオニン標識タンパク質の図示による比較オートラジオグラムを示す。 20

【図6】図6は、ローダミン・イソチオシアナート標識ヤギ抗麻疹ウイルス血清(パネルA、C、E、G、及びI)とウサギ抗クリプトウイルス血清、その後でフルオレセイン・イソチオシアナート標識したヤギ抗ウサギIgG(パネルB、D、F、H、及びJ)で直接二重標識後に撮影した種々のSSPE由来の非増殖型感染細胞培養物の蛍光顕微鏡写真の対応セットの組み合わせである。

【図7】図7は、同腹仔として生まれ、新生児(生後2日目)時にプレーク精製クリプトウイルス(BBR株、図7A)またはシミアンウイルス5のNIH 21005-2WR株(SV5、図7B)で脳内接種された2ヶ月後の2匹のオス有色マウスの写真を示す。

【図8】図8は、同腹仔として生まれ、新生児(生後2日目)時にプレーク精製クリプトウイルス(BBR株、図8A)で脳内接種された3ヶ月後、及び新生児(生後2日目)時にプレーク精製クリプトウイルスで脳内接種された6ヶ月後(図8B)の2匹のメス有色マウスの写真を示す。 30

【図9】図9は、ヒトクリプトウイルスBBR株(配列番号1)とシミアンウイルス5W3A株(配列番号2)のFASTAフォーマット配列(即ち、mRNAセンス5'から3')の比較である。

【図10】図10は、ルプラウイルスFタンパク質ヌクレオチド(図10A、FASTAフォーマット、即ち、mRNAセンス5'から3'配列)とコードされたアミノ酸(図10B)配列の比較である。

【図11】図11は、クリプトウイルスタンパク質の発現を示す。 40

【図12】図12は、亜急性硬化性全脳炎と診断された患者の脳脊髄液(CSF)(図12A)及び微生物学的スクリーニングのために採取されたCSFを有する6人のランダムに選択された神経科/神経外科患者のCSF(図12B)を用いて、[<sup>35</sup>S]-メチオニン標識ウイルス特異的タンパク質の沈降とSDS-PAGE分離によって得られた典型的な放射線免疫検定プロファイル(RIP)のオートラジオグラム写真を示す。

【図13】図13は、2つのCSF検体によって、クリプトウイルスBBR株で急性感染された[<sup>35</sup>S]-メチオニン標識CV-1c細胞から沈降されたクリプトウイルス特異的タンパク質の放射性免疫検定プロファイル(RIP)の高解像オートラジオグラム(図13A)、並びに、クリプトウイルスのBBR株(図13B レーンCV)及びSV5のNIH 21005-2WR株(図13B レーンSV5)の勾配・精製ビリオンの主要な対応構 50

造タンパク質の移動を図によって示している。

【図14】図14は、勾配・精製クリプトウイルスビリオンを標的として用いた、対応する血清と4人の血清陽性の神経科／神経外科患者からのCSF検体のELISAを示す。

【図15】図15は、アルツハイマー病と診断された患者からの3セットの対応する血清(S)とCSF(C)を用いたRIPアッセイの写真である。

【図16】図16は、慢性疲労症候群(CFS)と診断された患者からの4つのCSF検体を用いたRIP分析後のオートラジオグラム写真である。

【図17】図17は、「コレクション1」(以下参照)として得られたCSFサンプルを用いたRIP分析後のオートラジオグラム写真である。

【図18】図18は、「コレクション2」(以下参照)として得られたCSFサンプルを用いたRIP分析後のオートラジオグラム写真である。 10

【図19】図19は、(38サンプル中から選ばれた)5人のMS患者から得られた血清サンプルについてRIPアッセイを実施後のオートラジオグラム写真である。

【図20】図20は、(38サンプル中から選ばれた)25人のさらなるMS患者から得られた血清サンプルについてRIPアッセイを実施後のオートラジオグラム写真である。

【図21】図21は、16人のMS患者から得られた16のCSF検体についてRIPアッセイ実施後のオートラジオグラム写真である。

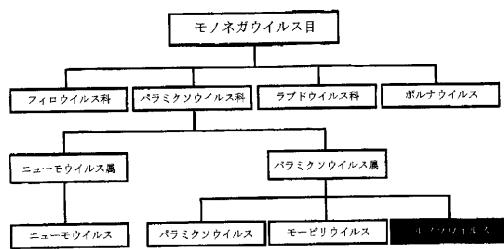
【図22】図22は、6人のオーストラリア人SSPE患者の血清(レーン1~6)及び6人のコントロール血清(レーン7~12、クリプトウイルス主要エンベロープタンパク質(F<sub>0</sub>、及びHN)に対する抗体を有さない小児患者の血清)によって[<sup>35</sup>S]-メチオニン標識細胞から沈降されたクリプトウイルスNPタンパク質(p63)のRIPプロファイルの作出後に得られたオートラジオグラムの写真である。 20

【図23】図23は、SSPEと診断された年齢11才の男児からのCSFによって、[<sup>35</sup>S]-メチオニン標識麻疹ウイルス感染CV-1<sub>c</sub>細胞(レーンMV)、クリプトウイルス感染CV-1<sub>c</sub>細胞(レーンCV)、または両方の混合物(レーンB)から沈降された麻疹ウイルス特異的及びクリプトウイルス特異的タンパク質のRIPプロファイルのオートラジオグラム写真である。

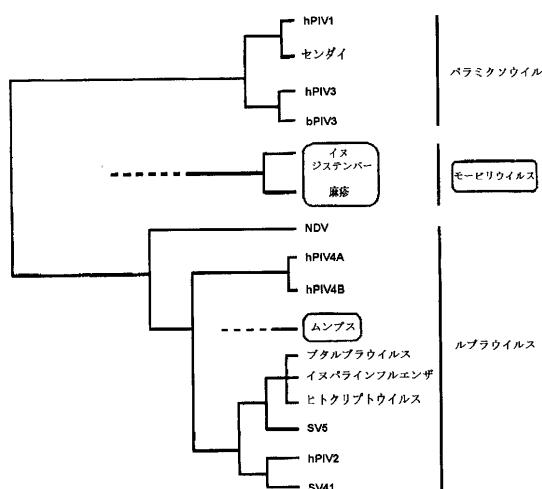
【図24】図24は、クリプトウイルス感染ニューロンの顕微鏡写真を示す。

【図25】図25は、持続性感染AV<sub>3</sub>/SSPE/MV細胞におけるクリプトウイルスと麻疹ウイルスの細胞内ヌクレオカプシドの分別immunogold標識の写真を示す。 30

【 図 1 】



【圖 2】



( 4 )

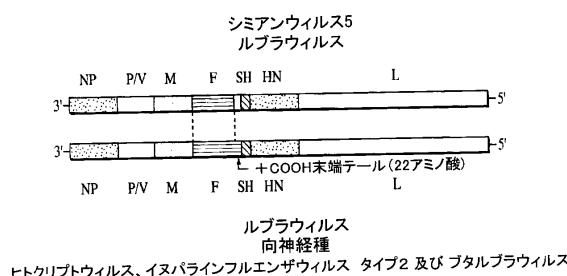
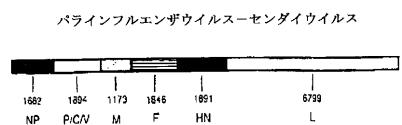
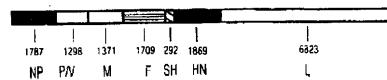


FIG. 4

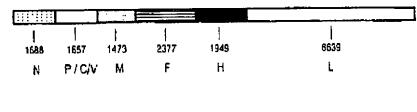
〔 図 3 〕



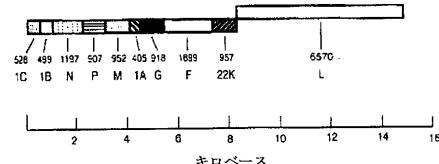
ルプラウイルス-SV5



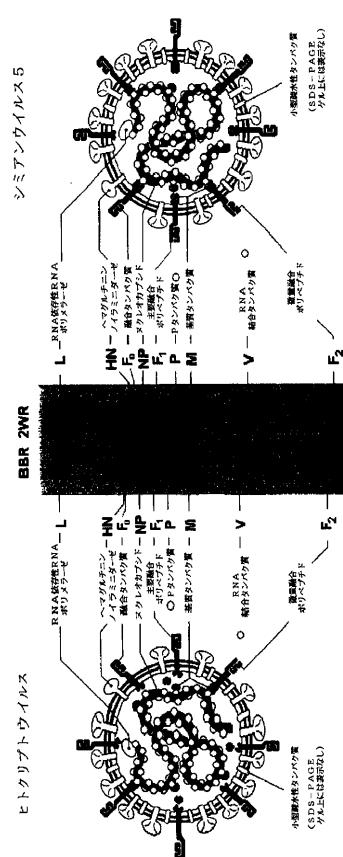
## モービリウイルス—麻疹



## ニューモウイルス—呼吸器合胞体ウイルス



( 5 )



【図6】

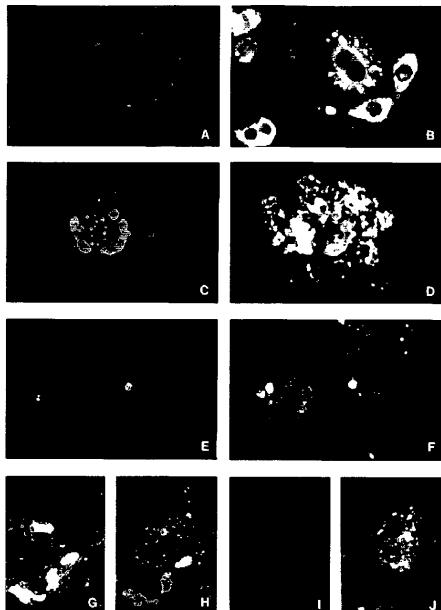


Fig. 6

【図7】

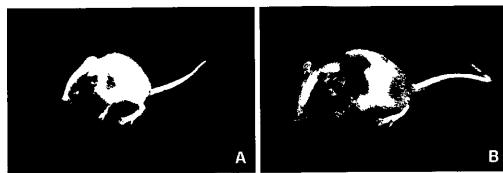


Fig. 7

【図8】

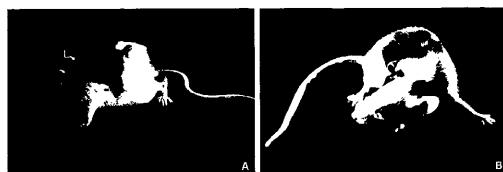


Fig. 8

【図9.1】

00001 ACCAAGGGGA AAATGAGTG GTGACTCAA TCATCGAAGA CCCTCGAGAT TACAT<sup>Arg</sup>GGTC  
00001 ACCAAGGGGA AAATGAGTG GTGACTCAA TCATCGAAGA CCCTCGAGAT TACAT<sup>Arg</sup>GGTC  
NP mRNA開始 ↑

00061 CGGAACCTAT GGCTTCCG ACCGACCTGG AGTCAGAGTA GTTCATAAGA GACCTATCAA  
00061 CGGAACCTAT GGCTTCCG ACCGACCTGG AGTCAGAGTA GTTCATAAGA GACCTATCAA

Arg 2  
00121 GTTTGGCAAA TTTTCGCCC CCGACACAAA ATGTCATCC GTGCTTAAAG CATATGAGAC  
00121 GTTTGGCAAA TTTTCGCCC CCGACACAAA ATGTCATCC GTGCTTAAAG CATATGAGC  
→ Nランバク質開始

Thr 3  
00181 ATTACACACTC ACTCAAGAAC TGCAAGATCA GAGTGAAAGA GGCRATCC CACCTAACAC  
00181 ATTACACCTC ACTCAAGAAC TGCAAGATCA GAGTGAGGA GGATCACCTC CACCTAACAC

Val 4  
00241 ACTAAAACCG GTTATCAGGG TATTGTACT AACCTCTAAT AACCCAGAGC TAAGATCCG  
00241 ACTAAAACCG GTTATCAGGG TATTGTACT AACCTCTAAT AACCCAGAGC TAAGATCCG

Leu 5  
00361 TGAGGCAATTA CTACATGT TTTCGCTACC ATCAGCCTACA ATGCTCATC ATGTCATC ATGTCATC  
00361 TGAGGCAATTA CTACATGT TTTCGCTACC ATCAGCCTACA ATGCTCATC ATGTCATC ATGTCATC

ページ1/25

【図9.2】

Leu 2  
00301 GCTTCTTCTA TTCTGCTAC GGATTCCTCT CAGTAATGGT GCAAGGGATT CCCATCGCTT  
00301 GCTTCTTCTA TTCTGCTAC GGATTCCTCT CAGTAATGGT GCAAGGGATT CCCATCGCTT

Ala 2  
00361 TGAGGCAATTA CTACATGT TTTCGCTACC ATCAGCCTACA ATGCTCATC ATGTCATC ATGTCATC  
00361 TGAGGCAATTA CTACATGT TTTCGCTACC ATCAGCCTACA ATGCTCATC ATGTCATC ATGTCATC

Arg 3  
00421 AGCTGACCG AGTCAAGAGG CTGATATCGA AAGGGTAGAG ATCCATGGCT TTGAGGGAGG  
00421 AGCTGACCG AGTCAAGAGG CTGATATCGA AAGGGTAGAG ATCCATGGCT TTGAGGGAGG

Ile 3  
00481 ATCATTCGGC TTATTCGCC ATGCAGCTTC AGGTATGAGC CCTGGGRGAGA TCAATGCCCTA  
00481 ATCATTCGGC TTATTCGCC ATGCAGCTTC AGGTATGAGC CCTGGAGAGA TCAATGCCCTA

Gly 3  
00541 TGCTGCACTT GCAGAAGATC TACCTGACAC ACTAAACCAT GCACACCTT TGTTGATGTC  
00541 TGCTGCACTT GCAGAAGATC TACCTGACAC ACTAAACCAT GCACACCTT TGTTGATGTC

Asp 1  
00601 CGAAGTCGAG GGAACTGCTAT GGAGTGTGAT TGAGACTTTC TTAGATATGT TTACAGTGT  
00601 CGAAGTCGAG GGAACTGCTAT GGAGTGTGAT TGAGACTTTC TTAGATATGT TTACAGTGT

Pro 1  
00661 CCTTAATGCG GCATGGATAG TGCTTGCAG GTGCATGACT GCGCCAGACC AACCTGCTGC  
00661 CCTTAATGCG GCATGGATAG TGCTTGCAG GTGCATGACT GCGCCAGACC AACCTGCTGC

Pro 1  
00721 TTCTTATTGAG AAACGCCCTGC AAAAATATCG TCAGCAAGGC AGGATCAACC CAAGATATCT  
00721 TTCTTATTGAG AAACGCCCTGC AAAAATATCG TCAGCAAGGC AGGATCAACC CGAGATATCT

Arg 1  
00781 CCTGCAACCG GGGGCTGCRC GAATAATCCA GAATGTATTC CGGAAAGGGAA TGGTGGTCAG  
00781 CCTGCAACCG GGGGCTGCRC GAATAATCCA GAATGTATTC CGGAAAGGGAA TGGTGGTCAG

Arg 1  
00841 ACATTTCTC ACCTTTGAC TGCACTTGC CGGAGCACAAGC AGCCTTGTAT CAAATAGGTA  
00841 ACATTTCTC ACCTTTGAC TGCACTTGC CGGAGCACAAGC AGCCTTGTAT CAAATAGGTA

Arg 1  
00901 TTATGCTATG GTAGGGGTG TTGGAAGTA TATAGAGAAT TGIGGAATGG GAGGCTTCTT  
00901 TTATGCTATG GTAGGGGTG TTGGAAGTA TATAGAGAAT TGIGGAATGG GAGGCTTCTT

ページ2/25

【図9.3】

Thr

00961 TTTGACACTA AAATATGCAT TAGGAGCCAG ATGGCCACA CTGCTTGT CGCATTTC 1  
00961 TTTGACACTA AAATATGCAT TAGGAGCTAG ATGGCCACA CTGCTTGT CGCATTTC

Lys

01021 AGGAGACCA ACAAAGCTAA AGTCACCACCA GGGATCTAG CAGACCCCTG GTGACAGGC 1  
01021 AGGAGACCA ACAAAGCTAA AGTCACCACCA GGGATCTAG CAGACCCCTG GTGACAGGC

His

01081 CGCATTTTG GCCTATTGG AGTCACCACCA CTGATGGAT TTGCTGCGAG CAACATGCC 2  
01081 CGCATTTTG GCCTATTGG AGTCACCACCA CTGATGGAT TTGCTGCGAG CAACATGCC

Leu

01141 ATGGTATAT AGCTATGCTA TGGAATAGG CTATGTTA GATGTCACAA TGAGAACATA 1  
01141 ATGGTATAT AGCTATGCTA TGGAATAGG CTATGTTA GATGTCACAA TGAGAACATA

Asn

01201 CGCTTCTCC AGATCATACA TGATAAGAC ATATTCACCA TTGGGATGG AACATGCAAG 1  
01201 CGCTTCTCC AGATCATACA TGATAAGAC ATATTCACCA TTGGGATGG AACATGCAAG

01261 AAAACACAG GGTCAGTTG ACAITGGAGAT GGCAAGAGAT CTGGCTCAA CTCAAGCGA  
01261 AAAACACAG GGTCAGTTG ACAITGGAGAT GGCAAGAGAT CTGGCTCAA CTCAAGCGA

01321 ACCGACGAG ATGGCAATA CACTGCCAA ATGGACACCA GCAATCTGAG GGGCAGRCAC  
01321 ACCGACGAG ATGGCAATA CACTGCCAA ATGGACACCA GCAATCTGAG GGGCAGRCAC

Val>Met

01381 CAGGGAGGA CTCACTGGCT TCATCATCTG CACTGGGACA ACTTCAGTCG CGCGTGCAGC 1  
01381 CAGGGAGGA CTCACTGGCT TCATCATCTG CACTGGGACA ACTTCAGTCG CGCGTGCAGC

Leu

01441 AACAGGTGAC ACATTCAGA GTTACATGCC AGCCGGATCGA CTGAGGCAGG GATATGCTGA 1  
01441 AACAGGTGAC ACATTCAGA GTTACATGCC AGCCGGATCGA CTGAGGCAGG GATATGCTGA

01501 TCCAGGCC ACCATGATGAG AGATGCCACC ATTGAAGAG GAGGAAGAGG RCGCACAC 1  
01501 TCCAGGCC ACCATGATGAG AGATGCCACC ATTGAAGAG GAGGAAGAGG RCGCACAC

Gly>Glu

01561 TGCAGGTCCA CGCACTGGAC CAACTCTGA ACAAGGGCC TTGGACATCC AGACGGCAGC 3  
01561 TGCAGGTCCA CGCACTGGAC CAACTCTGA ACAAGGGCC TTGGACATCC AGACGGCAGC

ページ3 / 25

【図9.4】

Asp

01621 AGTGTGAGCT CCATCCATA CAGAGACCT GAATGCCGA CTAGGTGTC TTGACATCTG 2  
01621 AGTGTGAGCT CCATCCATA CAGAGACCT GAATGCCGA CTAGGTGTC TTGACATCTG  
N Pタンパク質停止 ←|

01681 GACAAATCGA ATCCCAATCGA TAATTTGATA TACCTTAATTG ATTAGTTAGA TGGAACTACA 3  
01681 GACAAATCGA ATCCCAATCGA TAATTTGATA TACCTTAATTG ATTAGTTAGA TGGAACTACA

01741 GTGGATTCGA TAAGGTCTC GCCTTACCATC GCCTTAAAG AAAAATGG GCGGGACGG 1  
01741 GTGGATTCGA TAAGGTCTC GCCTTACCATC GCCTTAAAG AAAAATGG GCGGGACGG  
NP mRNA終止 ←| P/V mRNA開始

01801 GTAGACACA AGCGACTGCC GATGCCAACA GCACATCCA CAATCTACA TGGATCCAC 1  
01801 GTAGACACA AGCGACTGCC GATGCCAACA GCACATCCA CAATCTACA TGGATCCAC  
|→ P/Vタンパク質開始

Ile

01861 TGATCTGAGC TCTCTCCCGG ATGAGATCAA TAAGCTGATA CAGACAGGGC TGAATACTG 1  
01861 TGATCTGAGC TCTCTCCCGG ATGAGATCAA TAAGCTGATA CAGACAGGGC TGAATACTG

01921 AGAGATTTT ACTTCACACG AAATGCAAGG AACATCCCTT CTGAAAGGA ATACAATACC 1  
01921 AGAGATTTT ACTTCACACG AAATGCAAGG AACATCCCTT CTGAAAGGA ATACAATACC

Thr>Ile

01981 ACCAGGGTC ACAGGACTAC TACCAATGC TGAGAGGA AAAGTCAGG AGTCATCTGA 2  
01981 ACCAGGGTC ACAGGACTAC TACCAATGC TGAGAGGA AAAGTCAGG AGTCATCTGA

Gly>Ala

02041 CCTACAGAG CGCTCAGTCG GTGGGGGTAC AACATCAGG AAACCGGCGP CARAAATTCG 4  
02041 CCTACAGAG CGCTCAGTCG GTGGGGGTAC AACATCAGG AAACCGGCGC CARAAATTCG

Gly>Glu

02101 CATTTGCGCA GCAGATGACA AAACAGTGC CGAAAAGCCG ATCCCAACC CTCTACTAGG 2  
02101 CATTTGCGCA GCAGATGACA AAACAGTGC CGAAAAGCCG ATCCCAACC CTCTACTAGG

Leu

02161 TCTGGACTCC ACCCCGAGCA CCAAAACGT GTTGTGATCA ACTGGAAA CATTACATC 1  
02161 TCTGGACTCC ACCCCGAGCA CCAAAACGT GTTGTGATCA ACTGGAAA CATTACATC

ページ4 / 25

【図9.5】

Gly

02221 AGGATCTAT AAGGGGTTTA AGCTTGCCTA ATTTGGGAAA GAAATCTGA TGACACGGTT 1  
02221 AGGATCTAT AAGGGGTTTA AGCTTGCCTA ATTTGGGAAA GAAATCTGA TGACACGGTT

02281 CATCGAGGA CCCAGAGGA ATCCCTATCGC ACCAGTCC CCCATCGATT TTAGAGGGG  
02281 CATCGAGGA CCCAGAGGA ATCCCTATCGC ACCAGTCC CCCATCGATT TTAGAGGGG

Gly>Ala

02341 CAGGAGTACG GGTGGGTTTC ATTTAGGGGA GTTACTCAGTCG CGATGGGGGG GAGATGAAGT 2  
02341 CAGGAGTACG GGTGGGTTTC ATTTAGGGGA GTTACTCAGTCG CGATGGGGGG GAGATGAAGT

02401 CAAGGTCACT GAGTGGTGCCTA ATCCATCTG TTCTCCAAAC ACCGGTGCCTA CAAGGGGATT  
02401 CAAGGTCACT GAGTGGTGCCTA ATCCATCTG TTCTCCAAAC ACCGGTGCCTA CAAGGGGATT

Leu

02461 TAAATGCACT TGTCACCAAT GTTCAGTCAC TTGCTCTCGA TGCGAACAGG ATACATCTA 2  
02461 TAAATGCACT TGTCACCAAT GTTCAGTCAC TTGCTCTCGA TGCGAACAGG ATACATCTA  
Vタンパク質停止 →|

02521 CAGTGAGAAA TTGGACTCT CGGTGAATC PACTGGGAGC AAAAGTAGAT CGCAATTCTCT  
02521 CAGTGAGAAA TTGGACTCT CGGTGAATC PACTGGGAGC AAAAGTAGAT CGCAATTCTCT

Val>Ile

02581 CATCTCAGTC TCTAATCCAG ACCATCAAGA ATGACATATA TTGGCTTAAAC CGAGGGATGG 1  
02581 CATCTCAGTC TCTAATCCAG ACCATCAAGA ATGACATATA TTGGCTTAAAC CGAGGGATGG

02641 CTACTTGA AGGAATGATT ACAACTGTGA AAATCATGGA CCCGGGAGTT CCCGTAATG  
02641 CTACTTGA AGGAATGATT ACAACTGTGA AAATCATGGA CCCGGGAGTT CCCGTAATG

Thr>Lys

02701 TTACTGTGGA AGATGTCAGC AGAAACTAA GTAACATGCC TTGTGTTGCG CGACATCAT 1  
02701 TTACTGTGGA AGATGTCAGC AGAAACTAA GTAACATGCC TTGTGTTGCG CGACATCAT

02761 TCAATGATAG TTCTTGACT CAATCTGAG ATGCTATTC ACTTGATGAG TTGGCTGAC  
02761 TCAATGATAG TTCTTGACT CAATCTGAG ATGCTATTC ACTTGATGAG TTGGCTGAC

02821 CAACTGCAAC AAGTGTGAG AGATGTCAGC TCTCTAGAG GATCTGACTG  
02821 CAACTGCAAC AAGTGTGAG AGATGTCAGC TCTCTAGAG GATCTGACTG

ページ5 / 25

【図9.6】

Ile

02881 GATGTGAGCT CTCCTAGAG CAATGGCAA AGGATGCAAT CAGCAACCGG AGAGATGAGGG 1  
02881 GATGTGAGCT CTCCTAGAG CAATGGCAA AGGATGCAAT CAGCAACCGG AGAGATGAGGG

Glu>Asp

02941 AACATATCTC CCTCTAGTC ACCCAGGCTT CTAGTGAGC TCAGCTAATT GACCTCAAGA 3  
02941 AACATATCTC CCTCTAGTC ACCCAGGCTT CTAGTGAGC TCAGCTAATT GACCTCAAGA

Lys

03001 AACGAACTAT CGGGAGTCA ATTGGATCAA GAAACACCCA ATTACACTAC ACTGGTATGA  
Pタンパク質停止 ←|

03061 CACTGTACTA ACCCTGAGGG TTITAGAAA ACGGATTAAC GATAAATAG CGGAAACACT  
03061 CACTGTACTA ACCCTGAGGG TTITAGAAA ACGGATTAAC GATAAATAG CGGAAACACT  
P mRNA終止 ←| M mRNA開始

03121 ACATCTTACCC TGAGGGAGCC ATGCGATCTCA TCAGCATCTTC CGCAGACCCC ACCAATCCAC 1  
03121 ACATCTTACCC TGAGGGAGCC ATGCGATCTCA TCAGCATCTTC CGCAGACCCC ACCAATCCAC  
|→ Mタンパク質開始

Ile

03181 GTCAATCAAT AAAAGGTTTC CCAATGIGA TCAACAGTG TGAGGGTGGAG ARAGGCCCT 1  
03181 GTCAATCAAT AAAAGGTTTC CCAATGIGA TCAACAGTG TGAGGGTGGAG ARAGGCCCT

Arg

03241 TGCTTAAACAA ACTCGGAGA ACCCTACTGA TTCACTCTAG ACGAGATTCG GGGGAAATGCC ATTTGCGGAG 1  
03241 TGCTTAAACAA ACTCGGAGA ACCCTACTGA TTCACTCTAG ACGAGATTCG GGGGAAATGCC ATTTGCGGAG

Ile>Val

03301 CTTCTCAAT TACCTTATGGA TTCACTCTAG ACGAGATTCG GGGGAAATGCC ATTTGCGGAG 3  
03301 CTTCTCAAT TACCTTATGGA TTCACTCTAG ACGAGATTCG GGGGAAATGCC ATTTGCGGAG

Asp>Asp

03361 AGGATCACT ZGGGGAGAAA AGAGGGGCTG ATGGTTTACCC TTGGGTGTC 1  
03361 AGGATCACT ZGGGGAGAAA AGAGGGGCTG ATGGTTTACCC TTGGGTGTC

Thr>Ala

03421 GGCCTATCT ACCATCAATA GGGAAATGTCG TGAGCAACT GAGTGAATTC CGACTCATTC 3  
03421 GGCCTATCT ACCATCAATA GGGAAATGTCG TGAGCAACT GAGTGAATTC CGACTCATTC

Gly>Arg

03421 GGCCTATCT ACCATCAATA GGGAAATGTCG TGAGCAACT GAGTGAATTC CGACTCATTC  
03421 GGCCTATCT ACCATCAATA GGGAAATGTCG TGAGCAACT GAGTGAATTC CGACTCATTC

ページ6 / 25

## 【図9.7】

03481 TTAGGAGAC ATCCAGCAA GGGAGAGA TGGCTTTGA AATTGTAAG TATCCGAGAA  
03481 TTAGGAGAC ATCCAGCAA GGGAGAGA TGGCTTTGA AATTGTAAG TATCCGAGAA

03541 TATTCGGG TCATACATTA ATCCAGAAC GACTACTCG TCTCTCGCA GAAAATTTCG  
03541 TATTCGGG TCATACATTA ATCCAGAAC GACTACTCG TCTCTCGCA GAAAATTTCG

IIe>Val  
03601 TTAAGTCACC AGCGAAGTCA CAACTGGAA TGGGCTATCT CTTCATCCG ACATTTCTGT 1  
03601 TTAAGTCACC AGCGAAGTCA CAACTGGAA TGGGCTATCT CTTCATCCG ACATTTCTGT

Tyr  
03661 CAGTGACTA CGTGTCCAGGT GCAATCAAAT TTCAAGTACCC TGGGCCCATG TTGAAATGAA 1  
03661 CAGTGACTA CGTGTCCAGGT GCAATCAAAT TTCAAGTACCC TGGGCCCATG TTGAAATGAA

Arg  
03721 GGTCAAGATA CACTCAGAGC TTACACTTG AACTAATGAT AAGAACTCTG TTGAAAGCCG 1  
03721 GATCAGAGATA CACTCAGAGC TTACACTTG AACTAATGAT AAGAACTCTG TTGAAAGCCG

Thr>Ile  
03781 ATTCGGCACT TATGAAGGTC CATAAACCTG ACAAGGGGG AAGGGATGT CTGTATCAC 1  
03781 ATTCGGCACT TATGAAGGTC CATAAACCTG ACAAGGGGG AAGGGATGT CTGTATCAC

03841 TATGGCTGCA TGTATGCAAC ATCTTCAAT CAGGAAACAA GAATGGCAGT GAGTGGCAGG  
03841 TATGGCTGCA TGTATGCAAC ATCTTCAAT CAGGAAACAA GAATGGCAGT GAGTGGCAGG

03901 AATACTGGAT GAGAAAGTGT GCTAACATGC AACTTGAAGT GTGCAATTGCA GATATGGGG  
03901 AATACTGGAT GAGAAAGTGT GCTAACATGC AACTTGAAGT GTGCAATTGCA GATATGGGG

03961 GACCAACTAT CATAATTCTAT GCAGAGGTC ACATTTCCA AAGTGTAAAG TTGTTTTTG  
03961 GACCAACTAT CATAATTCTAT GCAGAGGTC ACATTTCCA AAGTGTAAAG TTGTTTTTG

Val>Ile  
04021 GAAAGGGTGC ATGGAGCTGC CATCACTTC ACAGAAATGT TCCAGTGTCA ACTAAACAC 1  
04021 GAAAGGGTGC ATGGAGCTGC CATCACTTC ACAGAAATGT TCCAGTGTCA ACTAAACAC

Val Glu  
04081 TATGGCTCGT AGGTTCTGAA ATTACAAAGG CGAAGGCAAT AATCAAGAG AGTAGCATCT 2  
04081 TATGGCTCGT GGCGCTGAG ATTACAAAGG CGAAGGCAAT AATCAAGAG AGTAGCATCT

ページ7/25

## 【図9.8】

04141 CTCTTCTCGT GGAGACTACT GACATCAAAT GTCCTAAAGT TAAATTCGA TCTAAACATC 1  
04141 CTCTTCTCGT GGAGACTACT GACATCAAAT GTCCTAAAGT TAAATTCGA TCTAAACATC

Val Leu  
04201 GCGGCTTGTG GAAATCAAAT TGGGGCTGT TCAAGAARAC TAAATCACTA CCTAAACCTAA 2  
04201 GCGGCTTGTG GAAATCAAAT TGGGGCTGT TCAAGAARAC TAAATCACTG CCTAAACCTAA

04261 CGGAGCTGGA ATGACTGACC TCTAATCGAG ATGACCAAA CTCACAACTAT AGGIGGGTAG 5  
04261 CGGAGCTGGA ATGACTGACC TCTAATCGAG ACTACACCGG CGCAACAACTAT AGGIGGGTAG  
Mタクソ質停止 ←

04321 TACCCAGTG ATTAATCTTG CAAAGTACGTA TCGTGGCTA CAACACAGCA ATATTATCCA 4  
04321 TACCCAGTG ATTAATCTTG CAAAGTACGTA TCGTGGCTA CAACACAGCA ATATTATCCA

04381 GATTTAGAGG CTTAAATACG TCTGTATTAAT TAAATACACT ATATTCCAA TAATCTGGAAAT 1  
04381 GATTTAGAGG CTTAAATACG TCTGTATTAAT TAAATACACT ATATTCCAA TAATCTGGAAAT

04441 TACCCAGTG ATTAATCTTG AAAATGATTC AAAGAAAGCA GATCAATTAA AGACTACCT 3  
04441 CACCACTG ATTAATCTTG AAAATGATTC AAAGAAAGCA GATCAATTAA AGACTACCT  
M mRNA終止 ←

Cys>Ser Phe>Ser  
04501 AACACCGAAC CCATATCGTC CTTCAAATCA TGACCACTAT ATTCAATCT CTGGGGCTCT 3  
04501 AACACCGAAC CCATATCGTC CTTCAAATCA TGACCACTAT ATTCAATCT CTGGGGCTCT  
→ F mRNA開始 → F シンハイ質開始

04561 CCTGTCTATT GGCAGGAGCA GGCAGCCTTG ATCCAGCAGC CCTCAATGCAA ATCGGTGTC  
04561 CCTGTCTATT GGCAGGAGCA GGCAGCCTTG ATCCAGCAGC CCTCAATGCAA ATCGGTGTC

04621 TTCCAAACAA TTGTCGGCAA CTTCAGTATT AATCTGGCC CTCATCAGCA TTCAATGTTG  
04621 TTCCAAACAA TTGTCGGCAA CTTCAGTATT AATCTGGCC CTCATCAGCA TTCAATGTTG

04681 TGAAGTTRAT GCTCAATTGACTCGGTTAGTGGATG TAAATATAACA TCAATTTCAA  
04681 TGAAGTTRAT GCTCAATTGACTCGGTTAGTGGATG TAAATATAACA TCAATTTCAA

04741 GCTATAATGC AACAGTGACA AAACCTCTAC AGCCGATCG TGAGAATITG GAGACGATTA  
04741 GCTATAATGC AACAGTGACA AAACCTCTAC AGCCGATCG TGAGAATITG GAGACGATTA

ページ8/25

## 【図9.9】

04801 GGAACCAAGTT GATTCGAACG CGGGAGAGC GCGGGTTTGC AGGGGTGGT ATTGGATTAG  
04801 GGAACCAAGTT GATTCGAACG CGGGAGAGC GCGGGTTTGC AGGGGTGGT ATTGGATTAG

Gln Val Val  
04861 CTGCATTAGG AGTAGCTACT CCCAACAG TCATCTGGC AGTAGCACTA GTTAAAGGCA 3  
04861 CTGCATTAGG AGTAGCTACT CCCAACAG TCATCTGGC AGTAGCACTA GTTAAAGGCA

Ala>Thr  
04921 ATGAAATAC TCGGGCTATA CTCAATCTCA AATATGCAAT CCAAAAAACA ATATCAGCAG 1  
04921 ATGAAATAC TCGGGCTATA CTCAATCTCA AATATGCAAT CCAAAAAACA ATATCAGCAG

04981 TTGCAGATGT GTTCCAGGCC ACACAAATCAC TAGGACCGG AGTTCAGGCA TTGTCAGAGTC  
04981 TTGCAGATGT GTTCCAGGCC ACACAAATCAC TAGGACCGG AGTTCAGGCA TTGTCAGAGTC

Val>Ile  
05041 ACATAACAG TTGGTAACT CCAGCAATTA CAGCAGCCAA TTGTAAGGCC CAAAGATGCA 1  
05041 ACATAACAG TTGGTAACT CCAGCAATTA CAGCAGCCAA TTGTAAGGCC CAAAGATGCA

Thr  
05101 TCATTGGCTC AATCTCAAT CTCTTATTGCA CGGAGTTGAC AACTATCTTC CAAATCAA 1  
05101 TCATTGGCTC AATCTCAAT CTCTTATTGCA CGGAGTTGAC AACTATCTTC CAAATCAA

Pro  
05161 TTACAAACCC TGCATTGAGT CCTTATTACAA TTCAAGCTTT AGGAGTCTCA CTGGGGAGTA 1  
05161 TTACAAACCC TGCATTGAGT CCTTATTACAA TTCAAGCTTT AGGAGTCTCA CTGGGGAGTA

05221 CCTTGGCGAC TGTGGTCGAA AAATCTTCATACCCAGAT PAGTGCAGCT GAGCTTCTCT  
05221 CCTTGGCGAC TGTGGTCGAA AAATCTTCATACCCAGAT PAGTGCAGCT GAGCTTCTCT

Leu  
05281 CATCAGGGTT GTTGCAGGCC CAGATTGCG GATTAGATTT GACCTATATG CAGATGGTCA 1  
05281 CATCAGGGTT GTTGCAGGCC CAGATTGCG GATTAGATTT GACCTATATG CAGATGGTCA

05341 TAAAAATTGA GCTGCCAACT TTAACTGTAC AACCTSCAAC CGACATCAAAT GATCTGGCA  
05341 TAAAAATTGA GCTGCCAACT TTAACTGTAC AACCTSCAAC CGACATCAAAT GATCTGGCA

Met>Ile  
05401 CCATTCTGC ATTCATTACG AATCAGAGG TCACTGCCAA ATTACCAAACA CGGTGTTATC 1  
05401 CCATTCTGC ATTCATTACG AATCAGAGG TCACTGCCAA ATTACCAAACA CGGTGTTATC

ページ9/25

## 【図9.10】

05461 TGACTGGCAG CTTGATCCAA GCCTATCCG CTCAGCAATG CAACTATCAA CCCAACACTG 1  
05461 TGACTGGCAG CTTGATCCAA GCCTATCCG CTCAGCAATG CAACTATCAA CCCAACACTG

Thr  
05521 TGACTGTAG CTAAATGAT GCCCAGTAC TCTCAGATGA TACGAGGCT TGCTTCAAAG 1  
05521 TGACTGTAG CTAAATGAT GCCCAGTAC TCTCAGATGA TACGAGGCT TGCTTCAAAG

05581 GTCAGTGTAC AGATGCACTC TTCTCTCCAG TGGTTGGAG CTTTCICACT CGATCTGTC  
05581 GTCAGTGTAC AGATGCACTC TTCTCTCCAG TGGTTGGAG CTTTCICACT CGATCTGTC

Leu  
05641 TGTTCGATGG AATAGTTTAT GCAAAATGCA GGTGCGATGT GTGCAAGTGC ATGCAACCTG 1  
05641 TGTTCGATGG AATAGTTTAT GCAAAATGCA GGTGCGATGT GTGCAAGTGC ATGCAACCTG

Ala Tyr>His  
05701 CTGCGCTGAT CCTACAGCCG AGTTCATCCC CTGTAACCTG CATTGACATG CACAAATCTG 2  
05701 CTGCGCTGAT CCTACAGCCG AGTTCATCCC CTGTAACCTG CATTGACATG TACAATCTG

Asn>Asp  
05761 TGAGCTCTGCA CCTGAGCACAT CTCAAGATCA CCAATCACTA ATTGGCCAT GTAACCTCA 1  
05761 TGAGCTCTGCA CCTGAGCACAT CTCAAGATCA CCAATCACTA ATTGGCCAT GTAACCTCA

Ser>Thr Ser>Pro  
05821 ATAGCACCAC CAAGCTTGAA ACATCCAGA TCTTCGCTTAT TGATCCGTTG GATATATCCC 2  
05821 ATAGCACCAC CAAGCTTGAA ACATCCAGA TCTTCGCTTAT TGATCCGTTG GATATATCCC

Gln Lys  
05881 AGAAATTCAGC TGGCGTGAAT AGAGCTCTA CTGATGCTCT ACACACCTTA GCACAAAGTG 2  
05881 AGAAATTCAGC TGGCGTGAAT AGAGCTCTA CTGATGCTCT ACACACCTTA GCACAAAGTG

Tyr  
05941 ACACATCACT TTCTGCATTC ACATCAGCTA CGCTACAGAG TGTATATTCG ATAATAGCAA 1  
05941 ACACATCACT TTCTGCATTC ACATCAGCTA CGCTACAGAG TGTATATTCG ATAATAGCAA

06001 TCTGTCTGG ATCGTTAGGT TAAATATTAAT TAACTCTGGCT CAGTGTAGTT GTGTGGAAGT  
06001 TCTGTCTGG ATCGTTAGGT TAAATATTAAT TAACTCTGGCT CAGTGTAGTT GTGTGGAAGT

ページ10/25

【図9.11】

	Val→Ala	Lys→Asu Stop→Ser
06061	TATTGACCAT TGTGGCTGCT ATATGAAATA GAAATGGAGA TTTTGTGTTAT CATAATTCAG	3
06061	TATIGACCAT TGTGGCTGCT ATATGAAATA GAAATGGAGA TTTTGTGTTAT CATAATTCAG	3
	シミアンウイルス 5'W 3'A 構造	
06121	Ser→Pro	
06121	CATTCCACCA CTGAGGACT GATCTCGAGT AGAAAATCA ACCTGCAACT CTTGGACAA	1
06121	CATTCCACCA CTGAGGACT GATCTCGAGT AGAAAATCA ACCTGCAACT CTTGGACAA	
	ヒトクリプトウイルス BBR 構造	
	F タンパク質停止	
06181	GATTAAGACG TCATCCATTA GTATCTCAA AGAAAAAARC GATTTGGACCC AAACTAGTAT	4
06181	GATTAAGACG TCATCCATTA GTATCTCAA AGAAAAAARC GATTTGGACCC AAACTAGTAT	
	F mRNA の終止	SH mRNA 開始
06241	TGAAAAGACT GTCTCGGTCA ATTGGATTA TGAGGCTGTG ACCGCTCTGG AAAGCTCAA	2
06241	TGAAAAGACC GTCTCGGTCA ATCTGGATTA TGAGGCTGTG ACCGCTCTGG AAAGCTCAA	
	Lys	Ala→Thr
06301	TCTTGCTGCC TGATCCGGAA GATCCGGAA GCAAAAAGGC TACAAGGAGA CGAGGAACC	2
06301	TCTTGCTGCC TGATCCGGAA GATCCGGAA GCAAAAAGGC TACAAGGAGA CGAGGAACC	
	SH タンパク質開始	
	Lys	Leu→Pro
06361	TAATTATTCG CTTCCTATTG ATCTCTCTTC TGTTTGTAAAC CTTCATCTGT CCAACTCTAA	1
06361	TAATTATTCG CTTCCTATTG ATCTCTCTTC TGTTTGTAAAC CTTCATCTGT CCAACTCTAA	
	SH タンパク質停止	
	Leu Ser	
06421	GACACTTGTG ATCTCTTACAC CTGGCATAGG CTATCCACTG CATCATCTCT TCTGGCATAC	4
06421	GACACTTGTG ATCTCTTACAC CTGGCATAGG CTATCCACTG CATCATCTCT TCTGGCATAC	
	SH タンパク質停止	
06481	TTCTACTCTA CATCATATCT ATTAAAAGA AAAATTCGGC CGGAACACTA ATCCGGCCGG	
06481	TTCTACTCTA CATCATATCT ATTAAAAGA AAAATTCGGC CGGAACACTA ATCCGGCCGG	
	SH mRNA の終止	HN mRNA の開始
	Val→Ile	
06541	CAGTGCACAT GCACACACAA CACTCACACT ACATCACACT ATATGATGTC CAGAAGATGC	1
06541	CAGTGCACAT GCACACACAA CACTCACACT ACATCACACT ATATGATGTC CAGAAGATGC	
	Arg→Lys	Ala→Gly
06601	CCCTGTAAAG GGCACTTGGC GAGTTTATTG TCCGAACACA ACTTTTATCT TCTCTATGGAC	4
06601	CCCTGTAAAG GGCACTTGGC GAGTTTATTG TCCGAACACA ACTTTTATCT TCTCTATGGAC	
	Arg	Ile

ページ 11 / 25

【図9.12】

06661	ACTACTAGCA TTAAAGCACT CTATCCTTTA TGAGAGGTAA ATAACCCAAA AGCAAACTAT	
06661	ACTACTAGCA TTAAAGCACT CTATCCTTTA TGAGAGGTAA ATAACCCAAA AGCAAACTAT	
	<b>Ser</b>	<b>Ser → Gly</b>
06721	GAGGCCAACGA GGCTCAACTG GATCAATTCT TGGATTAGGA GGTATTAAGT ATCTCTTAA	3
06721	GAGGCCAACGA GGCTCAACTG GATCAATTCT TGGATTAGGA GGTATTAAGT ATCTCTTAA	
	<b>Leu</b>	
06781	TAATATTCTCT TCTGTGCGAA ATCAGATTAT ATATAACTCT GCAGTCGCCT ACCTCTACA	1
06781	TAATATTCTCT TCTGTGCGAA ATCAGATTAT ATATAACTCT GCAGTCGCCT ACCTCTACA	
06841	ATTGGGACACT CTGGAATCAA CACTCTCTTAC AGCCATTAAAG TCTCTTCAA CGAGTGACAA	
06841	ATTGGGACACT CTGGAATCAA CACTCTCTTAC AGCCATTAAAG TCTCTTCAA CGAGTGACAA	
	<b>Ser → Gly</b>	
06901	GCTGAGACAG RACIGCTGCT GGGTGGCTGAC ACTGATTAAT GATAATAGAT ACATTAATGG	1
06901	GCTGAGACAG RACIGCTGCT GGGTGGCTGAC ACTGATTAAT GATAATAGAT ACATTAATGG	
	<b>Phe</b>	
06961	CATCAATCAG TTCTCAATTCT CAATTGCTGA GGGTGCAAT CTGACACTTG GCGCAACTCT	1
06961	CATCAATCAG TTCTCAATTCT CAATTGCTGA GGGTGCAAT CTGACACTTG GCGCAACTCT	
	<b>Met → Ile</b>	
07021	TAATATGCC ACCGTTCAATTC CAACTGGCCAC GACACAGAG GGCTGACCAA GGATCCCATC	1
07021	TAATATGCC ACCGTTCAATTC CAACTGGCCAC GACACAGAG GGCTGACCAA GGATCCCATC	
	<b>Thr</b>	
07081	ATTCTCGCTC ACTAAGACAC ACTGGTGTAA TACGCAACAT GTTATCCTGA ATGGATGCCA	1
07081	ATTCTCGCTC ACTAAGACAC ACTGGTGTAA TACGCAACAT GTTATCCTGA ATGGATGCCA	
07141	GGATCATGTA TCCTCAATC AATTGTTTC CATGGGAACT ATTGAACCCA CCTTCGGGG	
07141	GGATCATGTA TCCTCAATC AATTGTTTC CATGGGAACT ATTGAACCCA CCTTCGGGG	
	<b>Phe → Ser</b>	
07201	GTTTCCATTC TTTCGAACCT TAAAGACTCT ATATCTCAGC GATGGGGCTA ATCTCTAAGAG	1
07201	GTTTCCATTC TTTCGAACCT TAAAGACTCT ATATCTCAGC GATGGGGCTA ATCTCTAAGAG	
	<b>Val</b>	
07261	CTGCTCTTATC AGTCACTGTTT CGGGGGGTTG TAGTGATCTA TGTGTTGTTGCTAATCTCAAC	1
07261	CTGCTCTTATC AGTCACTGTTT CGGGGGGTTG TAGTGATCTA TGTGTTGTTGCTAATCTCAAC	

ページ 12 / 25

( 図 9 . 1 3 )

		Ala → Thr		
07321	AGAGAGGGAT GACTACTTTT CTACCGCTCC TCCAGAACAA CGAAATTATTA TAATGTACTA			
07321	AGAGAGGGAT GACTACTTTT CTGCCGCTCC TCCAGAACAA CGAAATTATTA TAATGTACTA			
		Asp		
07381	TRATGATACA ATCGTGGGAGC GCTATTAATA TCCACCCGGG GTACTAGAGC TATGGCAAC			1
07381	TRATGATACA ATCGTGGGAGC GCTATTAATA TCCACCCGGG GTACTAGAGC TATGGCAAC			
		Gly → Asn		
07441	ATTGAACCCC GGAAACAGGAA SCGGGGTATA TTATTTAGGT TGGGTGCCTT TTCCAAATA			
07441	ATTGAACCCC GGAAACAGGAA SCGGGGTATA TTATTTAGGT TGGGTGCCTT TTCCAAATA			
		Phe Ile		
07501	TGGCGGGCTG ATTAAAATAA CGAGTTTATG GAAATATCAA GCAAAATAAT ACTTCTATCC			4
07501	TGGCGGGCTG ATTAAAAGGTA CGAGTTTATG GAAATATCAA GCAAAATAAT ACTTCTATCC			
		Cys		
07561	CCAGATGGTT GCTGCCCTCT GCTCRAAAA CCNGGGCACT CAAGTCRCAA ATGCTAAGTC			
07561	CCAGATGGTT GCTGCCCTCT GCTCRAAAA CCNGGGCACT CAAGTCRCAA ATGCTAAGTC			
		Asp → Glu		
07681	TCTTCGACAG GATCTAACCA ATGAGTGTGTT AGTTCTGCCCTT TTCTCTAATG ATCAGGTGCT			1
07681	TCTTCGACAG GATCTAACCA ATGAGTGTGTT AGTTCTGCCCTT TTCTCTAATG ATCAGGTGCT			
		Iyr		
07741	TATGGGTGCT GAAGGGAGAT TATACATGTA TGTTGACTCG GTGTATTACT ACCAAAGAG			1
07741	TATGGGTGCT GAAGGGAGAT TATACATGTA TGTTGACTCG GTGTATTACT ACCAAAGAG			
		Ser		
07861	CAATAGTGG TGCCCTATGA CCATGCTGTA TAAGGTAAAC ATAACATTC A CTAATGGCA			
07861	CAATAGTGG TGCCCTATGA CCATGCTGTA TAAGGTAAAC ATAACATTC A CTAATGGCA			
		Ala		
07921	AGRCTGCTT GCACCAATA GATGTCGGG TTTTGTCTG ACAGGAGTGT ATGCGATGC			1
07921	AGRCTGCTT GCACCAATA GATGTCGGG TTTTGTCTG ACAGGAGTGT ATGCGATGC			

ページ 13 / 25

(図 9.14)

		Ser
07981	TTGGTATTCTG ACCAACCTCT CGTCTACAG TACATTGGG TCAGAACCAA CCTTCACTGG	
07981	CTGGTATTCTG ACCAACCTCT CGTCTACAG TACATTGGG TCAGAACCAA CCTTCACTGG	
	<b>Thr→Ala</b>	
08041	TTCTTATCTC AACGCCACCA CTCAGCGTAT CAATCCGCG ATGTTATATCG CGAACACAC	1
08041	TTCTTATCTC AACACGCAAA CTAGCGGTAT CAATCGCG ATGTTATATCG CGAACACAC	
	<b>Thr</b>	
08101	ACAGATCATCA AGCTCACAGC ATTGGATC AAGCGTCAA GAAGCAGCAT ATGGCCACAC	
08101	ACAGATCATCA AGCTCACAGC ATTGGATC AAGCGTCAA GAAGCAGCAT ATGGCCACAC	
	<b>Thr</b>	
08161	AACCTGTTTT AGGGCACACG GCTCTGTTAT GTTATATCTG ATCTATATTA TTGAATTGTC	1
08161	AACCTGTTTT AGGGCACACG GCTCTGTTAT GTTATATCTG ATCTATATTA TTGAATTGTC	
	<b>His</b>	
08221	CCTATCTCT TTAGGACATC TTCAAGATTG CCCATTATTC CGTCAGGGAA CACTATCC	
08221	CCTATCTCT TTAGGACATC TTCAAGATTG CCCATTATTC CGTCAGGGAA CACTATCC	
	HNタンパク質停止 ←	
08281	AGGCAGAAG CCTTCAGAGTC TGACCTAGCC AATCAAAGCA TTATACCGAA CCATGGAAATG	3
08281	AGGCAGAAG CCTTCAGAGTC TGACCTAGCC AATCAAAGCA TTATACCGAA CCATGGAAATG	
	<b>mRNAの終止</b>	
08341	CATACAAAC ATTATTGACA CTAATGACAC ACAAAATGG TTTTAAGAAA   ACCAAGAGA	
08341	CATACAAAC ATTATTGACA CTAATGACAC ACAAAATGG TTTTAAGAAA   ACCAAGAGA	
	HN mRNAの終止 ←	
08401	ACAATA <del>TGC</del> AGATACTGCTG GGTCCTGGGA GATATTACTC CCTGAAGTCG ATCTCAATTTC	1
08401	ACAATA <del>TGC</del> AGATACTGCTG GGTCCTGGGA GATATTACTC CCTGAAGTCG ATCTCAATTTC	
	→ L mRNA開始	
	→ Lタンパク質開始	
	<b>Leu→Ile</b>	
08461	ACCRATTGTA AAGCATAAGC TATACATTA CATTCTACTT GGAAACCTCC CAAATGAGAT	
08461	ACCAATTGTA AAGCATAAGC TATACATTA CATTCTACTT GGAAACCTCC CAAATGAGAT	
	<b>Gln</b>	
08521	CGGACATTGAC GATTAGGTC CATTACATTA TCAAAATIGG AATCAATAG CACATGAAGA	2
08521	CGAACCTTGCAC GATTAGGTC CATTACATTA TCAAAATIGG AATCAGATAG CACATGAAGA	
	<b>Leu→Ile</b>	
08581	GTCTAACTTA GCTCAACGCT TGGTAAATGT AAGAAATTTC CTAACTACCC ACATCCCTGA	
08581	GTCTAACTTA GCTCAACGCT TGGTAAATGT AAGAAATTTC CTAACTACCC ACATCCCTGA	

## 【図9.15】

Val

08641 TCTTGAAGG GGCATGGC AAGGATGATG AAATGATAAA CTGTGGCCGC GAATCTTCC 1  
08641 TCTTGAAGG GGCATGGC AAGGATGATG CAATGATAAA CTGTGGCCGC GAATCTTCC

08701 CTTGATCCC GATTTAAAAA TCATGACCA ATTGCCCTCG CTCAAATTGG GGGACAAGTT  
08701 CTTGATCCC GATTTAAAAA TCATGACCA ATTGCCCTCG CTCAAATTGG GGGACAAGTT

Ala

08761 AGTTAAAGA TCATGTCAG TAATCAATGC GGGTACTTC CAGTGCATTC AGAACATCAG 1  
08761 AGTTAAAGA TCATGTCAG TAATCAATGC AGGTACTTC CAGTGCATTC AGAACATCAG

08821 CTATGGACTG ACAGGTGCGG GGAACTCTT TACACGATCA CGTGAACTCT CGTGTGACCG  
08821 CTATGGACTG ACAGGTGCGG GGAACTCTT TACACGATCA CGTGAACTCT CGTGTGACCG

Thr

08881 CAGGGATATT GATCTTAAAGA CGGTTGCGC AGCATGGCAT GACTCAGACT GGAAAAGAAT 1  
08881 CAGGGATATT GATCTTAAAGA CAGTGTGCGC AGCATGGCAT GACTCAGACT GGAAAAGAAT

08941 AACGTGATTT TGAGATTATGA TCAAAATCCA GATGAGACAA TTAAATTGTTA GGCAACACAGA  
08941 AACGTGATTT TGAGATTATGA TCAAAATCCA GATGAGACAA TTAAATTGTTA GGCAACACAGA

Ser→Pro

09001 TCATAATGAT CTCGATTTAA TCACGTATAT CGAAAATAGA GGAGGCATAA TCATCATAAC 1  
09001 TCATAATGAT CTCGATTTAA TCACGTATAT CGAAAATAGA GGAGGCATAA TCATCATAAC

Asn

09061 CCCTGAACTG GTAGCATTAT TAAATGTCGA GAATCATAAC CTAACACATA TGACCTTTGA 1  
09061 CCCTGAACTG GTAGCATTAT TAAATGTCGA GAATCATAAC CTAACACATA TGACCTTTGA

09121 AACGTGACTG ATGGTTTCAG ATATGTACGA AGGTGCTAC AACATTTTAT CACTATGAC  
09121 AACGTGACTG ATGGTTTCAG ATATGTACGA AGGTGCTAC AACATTTTAT CACTATGAC

09181 AGTTAGCACT TACCTGAATC CTCTGAAGAA ARGAATAACA TATTATGCA GCCTGTAGA  
09181 AGTTAGCACT TACCTGAATC CTCTGAAGAA ARGAATAACA TATTATGCA GCCTGTAGA

ページ15/25

## 【図9.16】

09241 TAACTTAGCT TTTCAGATAG GTGATGCTGT ATATAACATA ATTGCTTGC TAGAATCCTT  
09241 TAACTTAGCT TTTCAGATAG GTGATGCTGT ATATAACATA ATTGCTTGC TAGAATCCTT

09301 TGTATATGCA CAGTTGCAAATG TGTCAGATCC CATCCAGAA CTCAAGGAGC AATTCCATGC  
09301 TGTATATGCA CAGTTGCAAATG TGTCAGATCC CATCCAGAA CTCAAGGAGC AATTCCATGC

Arg

09361 ATTCTGATGAT TCTGAGATTC TTGATGCACT AAGGGAACT AATAGTTCA CCCAGGATGA 1  
09361 ATTCTGATGAT TCTGAGATTC TTGATGCACT AAGGGAACT AATAGTTCA CCCAGGATGA

09421 ATTAAGAACT GTGACAACATA ATTTGATATC CCCATTCAA GATCTGACCC CAGATCTAC  
09421 ATTAAGAACT GTGACAACATA ATTTGATATC CCCATTCAA GATCTGACCC CAGATCTAC

09481 GGCTGAATT CTCTGTATAA TGAGGCTTGG GGGACACCCCC ATGCTCACTG CCAGTCAGC  
09481 GGCTGAATT CTCTGTATAA TGAGGCTTGG GGGACACCCCC ATGCTCACTG CCAGTCAGC

Ala

09541 TCGCGGAAAG GTACCCGAGT CTATGTCGC TGCGAAAGTA CTCGACTTTC CCACATTAT 5  
09541 TCGCGGAAAG GTACCCGAGT CTATGTCGC TGCGAAAGTA CTCGACTTTC CCACATTAT

09601 GAAACACTA GCCTTTTCC ATACTATTC GATCANTGGA TACAGGAGGA AGCAATCATGG  
09601 GAAACACTA GCCTTTTCC ATACTATTC GATCANTGGA TACAGGAGGA AGCAATCATGG

Pro

09661 AGTATGGCA CCCCTAAACT TACCGGTAA TGCTTCAGAG GGTCTCACAG AACTTATGAA 2  
09661 AGTATGGCA CCCCTAAACT TACCGGTAA TGCTTCAGAG GGTCTCACAG AACTTATGAA

Thr

09721 TGACAAACTG GAAATGACT ATGAATTAC ACCTTAAGCAT TGGAAAGGAA TCTCTCTTAT 3  
09721 TGACAAACTG GAAATGACT ATGAATTAC ACCTTAAGCAT TGGAAAGGAA TCTCTCTTAT

Asn

09781 AAAATTCAAG AAATGTTTG ATGCAGACCC AGGTGAGGAA CTCAAGTATAT TTAGAAGAA  
09781 AAAATTCAAG AAATGTTTG ATGCAGACCC AGGTGAGGAA CTCAAGTATAT TTAGAAGAA

Glu

09841 TAAAGCAATT AGTGCACCAAA ACAAGACTG GATGAGCTG TTTAGAGAA GCCTAACTCA 1  
09841 TAAAGCAATT AGTGCACCAAA ACAAGACTG GATGAGCTG TTTAGAGAA GCCTAACTCA

Val→Ile

09841 TAAAGCAATT AGTGCACCAAA ACAAGACTG GATGAGCTG TTTAGAGAA GCCTAACTCA

ページ16/25

## 【図9.17】

Leu

09901 ACAGGCCAT CAGCATCATC AGGTCCTCT ACCAAATCCA TTCAATGGC GGCTATTGCT 1  
09901 ACAGGCCAT CAGCATCATC AGGTCCTCT ACCAAATCCA TTCAATGGC GGCTATTGCT

09961 AAACTTCTC GGAGATGACA AATTCGACCC GAATGTTGG CTACAGTATG TAACATCAGG  
09961 AAACTTCTC GGAGATGACA AATTCGACCC GAATGTTGG CTACAGTATG TAACATCAGG

10021 TGAGTATCTA CATGATGACA CGTTTCTGC ATCATATTCA CTAAAGAGA AGGAATTAA  
10021 TGAGTATCTA CATGATGACA CGTTTCTGC ATCATATTCA CTAAAGAGA AGGAATTAA

10081 ACCTGATGGT CGAATTTCAG CAAAGTTGAC TAAGAGATAG AGATCATGTC AGGTATAGC  
10081 ACCTGATGGT CGAATTTCAG CAAAGTTGAC TAAGAGATAG AGATCATGTC AGGTATAGC

ページ17/25

## 【図9.18】

Leu

10501 TCACTTCGGG CTAATGGTA GTACACTTAA CGTGGGGGAC CCCTTCACCC CACCCAGCAGA 2  
10501 TCACTTCGGG CTAATGGTA GTACACTTAA CGTGGGGGAT CCCTTCACCC CACCCAGCAG

10561 TACCACTGCA TTGATGCTAG ATAAAGTAAT TAATGGAGAT ATCTTCATG TATCACCAG  
10561 TACCACTGCA TTGATGCTAG ATAAAGTAAT TAATGGAGAT ATCTTCATG TATCACCAG

Asp

10621 AGGTGGAATT GAAGGGTGT GTCAAAAGC TTGGACAATG ATATCTATC CTGTGATAAT 2  
10621 AGGTGGAATT GAAGGGTGT GTCAAAAGC TTGGACAATG ATATCTATC CTGTGATAAT

Lys

10681 TCTATCTGCC ACAGAGCTG GCACACGGT AATGAGCTG GTGCAGGGAG ATAATCAAGC 1  
10681 TCTATCTGCC ACAGAGCTG GCACACGGT AATGAGCTG GTGCAGGGAG ATAATCAAGC

10741 AATTGCTGTC ACCACACGG TACCAAGGG CCTGCCACT CTTGAGAAA AGACTATTGC  
10741 AATTGCTGTC ACCACACGG TACCAAGGG CCTGCCACT CTTGAGAAA AGACTATTGC

Leu

10801 TTTTAGATCT TGTAAATGTT TCTTTGAGAG GTTAAATGTT AATAATTTG GATTAGGTC 1  
10801 TTTTAGATCT TGTAAATGTT TCTTTGAGAG GTTAAATGTT AATAATTTG GATTAGGTC

10861 CCATTGAA GACAGAGAGA CTATCAATTG TTCTTCACCTT TTGTTTATA GCAAGAGAT  
10861 CCATTGAA GACAGAGAGA CTATCAATTG TTCTTCACCTT TTGTTTATA GCAAGAGAT

Ala→Ser

10861 TCTATCTGCC ACAGAGCTG GCACACGGT AATGAGCTG GTGCAGGGAG ATAATCAAGC 2  
10861 TCTATCTGCC ACAGAGCTG GCACACGGT AATGAGCTG GTGCAGGGAG ATAATCAAGC

Ser

10921 ATCTTATGAG GGGAGGGATTC TAACCGCAGG CCTTTAAATG CTGAGTAAGC TCTGCTTCAC  
10921 ATCTTATGAG GGGAGGGATTC TAACCGCAGG CCTTTAAATG CTGAGTAAGC TCTGCTTCAC

10981 AGCTGTGTC CTAGGAGAT GCACCCGATC ATCACTTGTG ATCTTGTGAA CTACTGTGAT  
10981 AGCTGTGTC CTAGGAGAT GCACCCGATC ATCACTTGTG ATCTTGTGAA CTACTGTGAT

Leu

11041 GAGCTTAACT GAGATGTTG TTGAAAGAGA TATCTGTTTC TACTTGAGTA TCTATATGAC  
11041 GAGCTTAACT GAGATGTTG TTGAAAGAGA TATCTGTTTC TACTTGAGTA TCTATATGAC

Phe

11101 GATCAACAG CTTCCTCTAG ATATCATCTT CCCTCAAGTG TCGATTCCCTG GAGATCAGAT 1  
11101 GATCAACAG CTTCCTCTAG ATATCATCTT CCCTCAAGTG TCAATTCCTG GAGATCAGAT

ページ18/25

## 【図9.19】

Leu 11161 CACATTAGAA TACATAAATA ATCCACACCT GGTATCAGGA TTGGCTCTTC TACCATCCC 1  
11161 CACATTAGAA TACATAAATA ATCCACACCT GGTATCAGGA TTGGCTCTTC TACCATCCC

Gly 11221 GTTGGGAGGT CTAAACTACG TGTCATCGAG TAGGCTGTC AATCGAAAC 2  
11221 GTTGGGAGGT CTAAACTACG TGTCATCGAG TAGGCTGTC AATCGAAAC

11281 GGTTGTTTC GCAGTTGCAG ATCTTAAGAG ATTAATTAAA TCAGGATGTA TGAGTACTG  
11281 GGTTGTTTC GCAGTTGCAG ATCTTAAGAG ATTAATTAAA TCAGGATGTA TGAGTACTG

11341 GATCCTTAT AACCTTATAG GGAGAAACC GGGAAACGCC TCATGGCTA CTITAGCAGC  
11341 GATCCTTAT AACCTTATAG GGAGAAACC GGGAAACGCC TCATGGCTA CTITAGCAGC

Pro 11401 TGACCCGTAC TCAATCAATA TAGAGTATCA ATACCCCCCA ACTACAGCTC TTAGAGGGCA 1  
11401 TGACCCGTAC TCAATCAATA TAGAGTATCA ATACCCCCCA ACTACAGCTC TTAGAGGGCA

Ala→Val 11461 CACCCACACAA GCTCTGATGG AACTCASTAC GAATCCATG TTACGGGCA TATTCTCTGA 1  
11461 CACCCACACAA GCTCTGATGG AACTCASTAC GAATCCATG TTACGGGCA TATTCTCTGA

Asn 11521 CAATGCACAG CGAGAAGAA ATAACCTTC TAGGTTCTC CTGGATAGGG AGGTGNTT 1  
11521 CAATGCACAG CGAGAAGAA ATAACCTTC TAGGTTCTC CTGGATAGGG AGGTGNTT

Lys 11581 TCCGGCTGTA GCTCACATCA TCATTGAGCA ACCAGCTGC GGGAGGAGAA ACAGATTC 1  
11581 TCCGGCTGTA GCTCACATCA TCATTGAGCA ACCAGCTGC GGGAGGAGAA ACAGATTC

Val Ile→Val 11641 AGGATATTG GATTCACATA GATGATTAAT GAGGAATCA CTGAGATTA ACCCCCTTC 2  
11641 AGGATATTG GATTCACATA GATGATTAAT GAGGAATCA CTGAGATTA ACCCCCTTC

Leu 11701 CAATAGGAG CTTAATGAA TACTGGATTA CAACATCAAT TACCTAGCTT ACAATTGGC 1  
11701 CAATAGGAG CTTAATGAA TACTGGATTA CAACATCAAT TACCTAGCTT ACAATTGGC

ページ19/25

## 【図9.20】

Thr 11761 ATTACTCAAG ATGCTATTTG AACCTCCGAC TTATTTGAG GCAATGACCC TTGAAACATG 1  
11761 ATTACTCAAG ATGCTATTTG AACCTCCGAC TTATTTGAG GCAATGACCC TTGAAACATG

Asn→Ser 11821 TAGCATCGAC ATTGCAAGGA GCTCTCGGA GCTCTCTGG GCCCCACTCT TGGGGGGAG 1  
11821 TAGCATCGAC ATTGCAAGGA GCTCTCGGA GCTCTCTGG GCCCCACTCT TGGGGGGAG

Leu Ile 11881 AAATCTTGA GGACTAGAGA CGCCAGATTC CATTGAAATC ACTGCAGGAG CATTAAATTG 2  
11881 AAATCTTGA GGACTAGAGA CGCCAGATTC CATTGAAATC ACTGCAGGAG CATTAAATTG

11941 TGGATCGGC TACTTGAAAC AGTGTGCTC AGGAGACAT CGATTACAT GGTTTTCTT  
11941 TGGATCGGC TACTTGAAAC AGTGTGCTC AGGAGACAT CGATTACAT GGTTTTCTT

12001 GCCATCTGGT ATCGRGATAG GAGGGGATCC CCGTGATAT CCTCTTATCC GTSTACCGTA  
12001 GCCATCTGGT ATCGRGATAG GAGGGGATCC CCGTGATAT CCTCTTATCC GTSTACCGTA

12061 CATTGGCTCC AGGACTGATG AGAGGGGGT AGCCTCAATG GCATACATCA GGGGTGCTC  
12061 CATTGGCTCC AGGACTGATG AGAGGGGGT AGCCTCAATG GCATACATCA GGGGTGCTC

Ser Leu 12121 AGTAGCTTA AAGCAGATTC TTAGACTGGC GGGAGTGTAC ATCTGGCAT TOGGAGATAC 2  
12121 GAGTAGCTTA AAGCAGATTC TTAGACTGGC GGGAGTGTAC ATCTGGCAT TOGGAGATAC

12181 TCTGGAGAT TGGATGATG CACTGGATT GTCTCACACT AGAGTTAAC TCAACTTGA  
12181 TCTGGAGAT TGGATGATG CACTGGATT GTCTCACACT AGAGTTAAC TCAACTTGA

Leu 12241 ACAGTACAA TCCCTCACCC CACTTCCAC CTCCTGCCAT CTAAACCCAT GGTGGATGA 2  
12241 ACACCTGCAA TCCCTCACCC CACTTCCAC CTCCTGCCAT CTAAACCCAT GGTGGATGA

Ala 12301 TGCCACAAT ACCCTAAAGT TTACTCTGC AGGCTCTTAC ACCTTTCAA GTTCACTCA 1  
12301 TGCCACAAT ACCCTAAAGT TTACTCTGC AGGCTCTTAC ACCTTTCAA GTTCACTCA

Tyr 12361 TATATCAAT GATGAGCAAT ATCTGACAAT TAATGACAAA ACTGCAGATT CAAATATAAT 1  
12361 TATATCAAT GATGAGCAAT ATCTGACAAT TAATGACAAA ACTGCAGATT CAAATATAAT

ページ20/25

## 【図9.21】

Gly 12421 CTACCAACAG TTATGATCA CTGGACTCGG GATCTTAGAA ACATGGAATA ATCCCCCAAT 1  
12421 CTACCAACAG TTATGATCA CTGGACTCGG AATCTTAGAA ACATGGAATA ATCCCCCAAT

12481 CAATGAAAC TTGAGAAT CTACCCCTACA TTGTCACACT GGTGATCAT TTGTTGTCG  
12481 CAATGAAAC TTGAGAAT CTACCCCTACA TTGTCACACT GGTGATCAT TTGTTGTCG

Leu→Ile 12541 ACCTGTGGAC TCTCGATTA TCTCAGAACG ATTAACAGTC AAGCCACATA TTACAGTACC 1  
12541 ACCTGTGGAC TCTCGATTA TCTCAGAACG ATTAACAGTC AAGCCACATA TTACAGTACC

Glu Glu 12601 GTACAGCAAT AAATTTGTAT TTGATGAGGA CCCGCTATCT GAATATGAGA CTGCRRAAC 2  
12601 GTACAGCAAT AAATTTGTAT TTGATGAGGA CCCGCTATCT GAATATGAGA CTGCRRAAC

12661 GGAATCGTTA TCATTCAGG CCCAATTAGG CAACATTGAT GCTCTAGATA TGACAGGTTA  
12661 GGAATCGTTA TCATTCAGG CCCAATTAGG CAACATTGAT GCTCTAGATA TGACAGGTTA

12721 ATTAACATTA TTGTCCTAAC TCACTGCAAG GCAGAATTAC AATGCAATCA CTGGACTCGA  
12721 ATTAACATTA TTGTCCTAAC TCACTGCAAG GCAGAATTAC AATGCAATCA CTGGACTCGA

Val 12781 TGAGTCGTG TCTCTTACTA ATGATGCCAT TTGTCATCA GACTATGCT CCAATTGGAT 1  
12781 TGAGTCGTG TCTCTTACTA ATGATGCCAT TTGTCATCA GACTATGCT CCAATTGGAT

12841 TAGTGGACTG ATGTATACCA ATATGATGA ATTATTTAG TATGTTGGT GGGACTACT  
12841 TAGTGGACTG ATGTATACCA ATATGATGA ATTATTTAG TATGTTGGT GGGACTACT

12901 ATGGGACTA TCTCTTACCA TGATGATCT GGGGGTAGT GGGGGAGTA ATATGTTGG  
12901 ATGGGACTA TCTCTTACCA TGATGATCT GGGGGTAGT GGGGGAGTA ATATGTTGG

12961 TTATTCCTAC ATGATCTTGA GAAGNATCCC GGGTGCAGCA TAAACATTC TGGCATCTAC  
12961 TTATTCCTAC ATGATCTTGA GAAGNATCCC GGGTGCAGCA TAAACATTC TGGCATCTAC

13021 ATTAAGTCAT CCAAAACTTT TCCGACGAGC TATCACCTA GATATGTT CCCCTTAA  
13021 ATTAAGTCAT CCAAAACTTT TCCGACGAGC TATCACCTA GATATGTT CCCCTTAA

ページ21/25

Val→Met 13081 TGCTCTCAT TTGATGATCA TGGACTACAT CAAGATGAGT ATGGATGCAA TACTCTGGG 1  
13081 TGCTCTCAT TTGATGATCA TGGACTACAT CAAGATGAGT ATGGATGCAA TACTCTGGG

13141 CTGTAAGAGA GTCATCAATG TGCTCTCAA TGAGGGGAC TTAGAATTAG TTGIGACATC  
13141 CTGTAAGAGA GTCATCAATG TGCTCTCAA TGAGGGGAC TTAGAATTAG TTGIGACATC

13201 TGAAGATAGC TTATTCCTCA TGACGGATC CATGAACTTC ATTCCAGGA ATTAACATT  
13201 TGAAGATAGC TTATTCCTCA TGACGGATC CATGAACTTC ATTCCAGGA ATTAACATT

13261 ATTATCACTG ATTACCCATA ATGGTTGG ACTACCAAG ATTAAGGGGT TCTCTCTGA  
13261 ATTATCACTG ATTACCCATA ATGGTTGG ACTACCAAG ATTAAGGGGT TCTCTCTGA

13321 TGAGAAGTGT TTGCTTTGA CAGAATTGGT GAGGAAGTG GTGACCTCAG GGTGGATTC  
13321 TGAGAAGTGT TTGCTTTGA CAGAATTGGT GAGGAAGTG GTGACCTCAG GGTGGATTC

13381 AAATGAGGAC CTATCAATT TTATGATCAA TGAGGGAGAC CCACGGCTTG CAGCATCTGC  
13381 AAATGAGGAC CTATCAATT TTATGATCAA TGAGGGAGAC CCACGGCTTG CAGCATCTGC

Ser 13441 CAGCAACAT TACTACCTGA CGAGAAATT ATGAAATTCA ATRCGAGATA CTGAGTCAGG 1  
13441 CAGCAACAT TACTACCTGA CGAGAAATT ATGAAATTCA ATRCGAGATA CTGAGTCAGG

13501 TCAAGTAGCA GTCACCTCAT ATTATGAACT ATTAGNATAT ATGAGTATGCTTAAAGTAC  
13501 TCAAGTAGCA GTCACCTCAT ATTATGAACT ATTAGNATAT ATGAGTATGCTTAAAGTAC

13561 CCCACATGTG CCTGGACACTT CATGCAATGA GGATGATGATG CTATGATCAA ATGATTACAT  
13561 CCCACATGTG CCTGGACACTT CATGCAATGA GGATGATGATG CTATGATCAA ATGATTACAT

13621 ATATGATGATC ATGAGTATCA ATGCAACCTT GGAGAAGTAT CCATTCCTCA ATAGCCCGA  
13621 ATATGATGATC ATGAGTATCA ATGCAACCTT GGAGAAGTAT CCATTCCTCA ATAGCCCGA

13681 GGATGATGCC AATTCACATA ACTTTAAGTT GAATGCTCA CGGACGATA CCTTACCGCC  
13681 GGATGATGCC AATTCACATA ACTTTAAGTT GAATGCTCA CGGACGATA CCTTACCGCC

ページ22/25

## 【図9.23】

Ser

13741 ATTAGGGTTG TCATCGACTG CTGGTATAA GGTATAAACG TGCTGCAGGT ACCTTGAGCG 1  
13741 ATTAGGGTTG TCATCGACTG CTGGTATAA GGTATAAACG TGCTGCAGGT ACCTTGAGCG

13801 ATTAAGCTA CCACAGGTG ATCATTATA TATTGAGAA GTAGTGGT CGAGTATGAC 1  
13801 ATTAAGCTA CCACAGGTG ATCATTATA TATTGAGAA GTAGTGGT CGAGTATGAC

13861 AACATAGAA TACCTATTC CAGGAAGAA GATATATTAC AATTCTTAT TTAGTAGTGG 1  
13861 AACATAGAA TACCTATTC CAGGAAGAA GATATATTAC AATTCTTAT TTAGTAGTGG

13921 TGACAATCC CCACAAAGAA ATTATGCCAC ATATGCCACT CAGTTCATG AGAGTGC 1  
13921 TGACAATCC CCACAAAGAA ATTATGCCAC ATATGCCACT CAGTTCATG AGAGTGC

13981 ATACAAGCTC TGGCAAGCRC ACACAGATCA ATATCCGAG ATTTTGAGG ACTTCGC 1  
13981 ATACAAGCTC TGGCAAGCRC ACACAGATCA ATATCCGAG ATTTTGAGG ACTTCGC

14041 TCTATGGACG GGAAACCGCG CCATGACTGA CATAGGATG AGACGTTGAG TAGAGTC 1  
14041 TCTATGGACG GGAAACCGCG CCATGACTGA CATAGGATG AGACGTTGAG TAGAGTC

Val

14101 CATCAATCGA GTGGCCCAA GGACTTCAG TTTAGTACAT GTAGATTGG AATCAAGTGC 1  
14101 CATCAATCGA GTGGCCCAA GGACTTCAG TTTAGTACAT GTAGATTGG AATCAAGTGC

14161 AAGCTTAAAT CAACATGCC TGTCAARGCC GATAATTAT GTATCATCA CTGCTACAC 1  
14161 AAGCTTAAAT CAACATGCC TGTCAARGCC GATAATTAT GTATCATCA CTGCTACAC

14221 TGTGTTGTC CCTCATGGGG TGTTTATTC GAAATATAGT TGTGTTGCA TTTAGTACAT 1  
14221 TGTGTTGTC CCTCATGGGG TGTTTATTC GAAATATAGT TGTGTTGCA TTTAGTACAT

14281 TAGTACTTTC ATCACCTCT TATGGTGCTA CTTGGAGAGA ATCACGTTC TTAGGAGCAC 1  
14281 TAGTACTTTC ATCACCTCT TATGGTGCTA CTTGGAGAGA ATCACGTTC TTAGGAGCAC

ページ23/25

## 【図9.24】

14341 ATATTCTGAT CCAGCTAATC ATGAGGTTTA TTAAATTGT ATCCTGCCA ACAACTTGC 1  
14341 ATATTCTGAT CCAGCTAATC ATGAGGTTTA TTAAATTGT ATCCTGCCA ACAACTTGC

14401 ATTCCAGACT GTCTCGCAGG CAACAGGAAT GCGCATGACT TAAACGATC AAGGGTTAC 1  
14401 ATTCCAGACT GTCTCGCAGG CAACAGGAAT GCGCATGACT TAAACGATC AAGGGTTAC

Lys

14461 TTGATATCA CCTGAGAAA TAATCATGA TTGGATGGT CACTTGAAGC AAGACGAT 2  
14461 TTGATATCA CCTGAGAAA TAATCATGA TTGGATGGT CACTTGAAGC AAGACGAT

Thr

14521 CGTAGCAGNA GCAATTGATA AGGTGGTTCT AGGAGAAART GCTCTATTAA ATTCAAGTGA 1  
14521 CGTAGCAGNA GCAATTGATA AGGTGGTTCT AGGAGAAART GCTCTATTAA ATTCAAGTGA

14581 TATGAAATTA ATTTCATCAAT GTGGAGGGAC ACCAAATGCA CGGAACTCA TCGATATGCA 1  
14581 TATGAAATTA ATTTCATCAAT GTGGAGGGAC ACCAAATGCA CGGAACTCA TCGATATGCA

Ile

14641 GCGAGTGGCA ACTTTTATAG ATTGTGACA ACTATGTCG ACATGCTTC GAACTTCACT 2  
14641 GCGAGTGGCA ACTTTTATAG ATTGTGACA ACTATGTCG ACATGCTTC GAACTTCACT

14701 GAAGAAATA ATTGATATAA CAAAGTCTGG AACCCAGGT TATGAAAGT TATTACTCAC 1  
14701 GAAGAAATA ATTGATATAA CAAAGTCTGG AACCCAGGT TATGAAAGT TATTACTCAC

14761 TCTTCTACAT TTAGTCTTC TTGGTAAAT CAGTACGATA GTGAGATTAT TAACAGAAG 1  
14761 TCTTCTACAT TTAGTCTTC TTGGTAAAT CAGTACGATA GTGAGATTAT TAACAGAAG

14821 GATTCTAAAT CATACTATCA GGAATGGTT GATCCTCCCA CCTTCGCTCC AGATGATCGT 1  
14821 GATTCTAAAT CATACTATCA GGAATGGTT GATCCTCCCA CCTTCGCTCC GGATGATCGT

14881 GAAGCAGGAC TTGGGATTTC GCATATTCAG GATTACTTCC ATCCCAATT CTGATCGTT 1  
14881 GAAGCAGGAC TTGGGATTTC GCATATTCAG GATTACTTCC ATCCCAATT CTGATCGTT

Lys → Thr

14941 CCTGAAACTT TCTCCAATAA GGAATACCTT GATTACACAA TTACTGCA GCTACATTAG 2  
14941 CCTGAAACTT TCTCCAATAA GGAATACCTT GATTACACAA TTACTGCA GCTACATTAG

ページ24/25

## 【図9.25】

Cys

15001 GAAATTGATT GAGGGGGATT GTAAATATCGA TCTAACAGA CCTATCCAA AGCAGAACTG 1  
15001 GAAATTGATT GAGGGGGATT GTAAATATCGA TCTAACAGA CCTATCCAA AGCAGAACTG

Tyr

15061 GAAAGCATTA GTTTGTGAG TCATCTGCA CGATCCAATG GATCAAAGGG AGTCACACAGA 1  
15061 GAAAGCATTA GTTTGTGAG TCATCTGCA CGATCCAATG GATCAAAGGG AGTCACACAGA

15121 GTTTATTGAT ATAATATATA ATGAGAAAT AGACCGGGG ATTCATGGCG AGGAAATCT 1  
15121 GTTTATTGAT ATAATATATA ATGAGAAAT AGACCGGGG ATTCATGGCG AGGAAATCT  
Lタシブク質停止 ←

15181 ATATATCAA GAATCAGAAT TAATTTAAGA AAAAGGAGC GGATTAATCT TGTTTTCCC 3  
15181 ATATATCAA GAATCAGAAT TAATTTAAGA AAAAGGAGC GGATTAATCT TGTTTTCCC  
L mRNA終止 ←

15, 246ヌクレオチド

237

CVのゲノムを含む15, 246ヌクレオチド中、その配列とSV5\_W3八株の配列間にには237ヌクレオチドの不一致がある(1. 5%不一致、9.8. 4.5%ホモジニー)

ページ25/25

## 【図10A.1】

CV-0001 ATAGGCACTA TAATTCATCA TCTGGTGGIC TCCCTGCTAT TGCCAGGAGC AGGCAGCCTT 1  
CPV-0001 ATGGGTACTA GAAATCAATC TCTGGTGGIC TCCCTGCTAT TGCCAGGAGC AGGCAGCCTT 5  
PR-0001 ATGGGTACTA TAATTCATCA TCTGGTGGIC TCCCTGCTAT TGCCAGGAGC AGGCAGCCTT 3  
W3A-0001 ATGGGTACTA TAATTCATCA TCTGGTGGIC TCCCTGCTAT TGCCAGGAGC AGGCAGCCTT 3  
WR-0001 ATGGGTACTA TAATTCATCA TCTGGTGGIC TCCCTGCTAT TGCCAGGAGC AGGCAGCCTT 4

CV-0061 GATCCAGACG CCCTCATGCA ATTCATGTC ATCCACAAA ATGGCCGGCA ACTTATGTTAT 1  
CPV-0061 GATCCAGACG CCCTCATGCA ATTCATGTC ATCCACAAA ATGGCCGGCA ACTTATGTTAT 1  
PR-0061 GATCCAGACG CCCTCATGCA ATTCATGTC ATCCACAAA ATGGCCGGCA ACTTATGTTAT 1  
W3A-0061 GATCCAGACG CCCTCATGCA ATTCATGTC ATCCACAAA ATGGCCGGCA ACTTATGTTAT 1  
WR-0061 GATCCAGACG CCCTCATGCA ATTCATGTC ATCCACAAA ATGGCCGGCA ACTTATGTTAT 1

CV-0121 TATACCTGAGG CCTCATCAGC ATTCATGTT GTGAGGTTA TGCCATCAT TGACTCGCC 1  
CPV-0121 TATACCTGAGG CCTCATCAGC ATTCATGTT GTGAGGTTA TGCCATCAT TGACTCGCC 1  
PR-0121 TATACCTGAGG CCTCATCAGC ATTCATGTT GTGAGGTTA TGCCATCAT TGACTCGCC 1  
W3A-0121 TATACCTGAGG CCTCATCAGC ATTCATGTT GTGAGGTTA TGCCATCAT TGACTCGCC 1  
WR-0121 TATACCTGAGG CCTCATCAGC ATTCATGTT GTGAGGTTA TGCCATCAT TGACTCGCC 1

CV-0181 ATTAGTGGAT GTAAATAAAC ATCAATTCAG AGCTTATAAG CRACAGTGAC AAATCTCTTA 1  
CPV-0181 ATTAGTGGAT GTAAATAAAC ATCAATTCAG AGCTTATAAG CRACAGTGAC AAATCTCTTA 4  
PR-0181 ATTAGTGGAT GTAAATAAAC ATCAATTCAG AGCTTATAAG CRACAGTGAC AAATCTCTTA 4  
W3A-0181 ATTAGTGGAT GTAAATAAAC ATCAATTCAG AGCTTATAAG CRACAGTGAC AAATCTCTTA 4  
WR-0181 ATTAGTGGAT GTAAATAAAC ATCAATTCAG AGCTTATAAG CRACAGTGAC AAAACTCTTA

ページ1/6

## 【図10A.2】

CV-0241 CAGCCGATCG GTGAGAATTG GGAGACGATT AGGAACAGT TGATTCAC TCGGAGGAGA  
CPV-0241 CAGCCGATCG GTGAGAATTG AGAGACGATT AGGTAACAGT TGATTCAC TCGGAGGAGA 2  
PR-0241 CAGCCGATCG GTGAGAATTG GGAGACGATT AGGAACAGT TGATTCAC TCGGAGGAGA 1  
W3A-0241 CAGCCGATCG GTGAGAATTG GGAGACGATT AGGAACAGT TGATTCAC TCGGAGGAGA  
WR-0241 CAGCCGATCG GTGAGAATTG GGAGACGATT AGGAACAGT TGATTCAC TCGGAGGAGA 1  
  
CV-0301 CGCCGGTTG CAGGGGTGGT GATTGGATTA GCTGCATTAG GAGTAGCTAC TGCGGCACAA  
CPV-0301 CGCCGGTTG CAGGGGTGGT GATTGGATTA GCTGCATTAG GAGTAGCTAC TGCGGCACAG 3  
PR-0301 CGCCGGTTG CAGGGGTGGT GATTGGATTA GCTGCATTAG GAGTAGCTAC TGCGGCACAG 1  
W3A-0301 CGCCGGTTG CAGGGGTGGT GATTGGATTA GCTGCATTAG GAGTAGCTAC TGCGGCACAG 1  
WR-0301 CGCCGGTTG CAGGGGTGGT GATTGGATTA GCTGCATTAG GAGTAGCTAC TGCGGCACAG 1  
  
CV-0361 GTCACTCGG CAGTAGCACT AGTAAGGGCA AATGAAATAA CTGGGGCATAT ACTCAATCTC  
CPV-0361 GTCACTCGG CAGTAGCACT AGTAAGGGCA AATGAAATAA CTGGGGCATAT ACTCAATCTC 5  
PR-0361 GTCACTCGG CAGTAGCACT AGTAAGGGCA AATGAAATAA CTGGGGCATAT ACTCAATCTC 3  
W3A-0361 GTCACTCGG CAGTAGCACT AGTAAGGGCA AATGAAATAA CTGGGGCATAT ACTCAATCTC 3  
WR-0361 GTCACTCGG CAGTAGCACT AGTAAGGGCA AATGAAATAA CTGGGGCATAT ACTCAATCTC 2  
  
CV-0421 AAAAATCCCA TCCAAAAAAC AATTCAGCGG GTTGCAAGTG TGTTCCAGGC CACACAATCA  
CPV-0421 AAAAATCCCA TCCAAAAAAC AATTCAGCGG GTTGCAAGTG TGTTCCAGGC CACACAATCA 3  
PR-0421 AAAAATCCCA TCCAAAAAAC AATTCAGCGG GTTGCAAGTG TGTTCCAGGC CACACAATCA 1  
W3A-0421 AAAAATCCCA TCCAAAAAAC AATTCAGCGG GTTGCAAGTG TGTTCCAGGC CACACAATCA  
WR-0421 AAAAATCCCA TCCAAAAAAC AATTCAGCGG GTTGCAAGTG TGTTCCAGGC CACACAATCA  
  
CV-0481 CTAGGAACGG CAGTCAAGC AGITGAAAGT CACATTAACCA GTGTCAGTAC TGCGCAATT  
CPV-0481 CTAGGAACGG CAGTCAAGC AGITGAAAGT CACATTAACCA GTGTCAGTAC TGCGCAATT 2  
PR-0481 CTAGGAACGG CAGTCAAGC AGITGAAAGT CACATTAACCA GTGTCAGTAC TGCGCAATT 1  
W3A-0481 CTAGGAACGG CAGTCAAGC AGITGAAAGT CACATTAACCA GTGTCAGTAC TGCGCAATT 1  
WR-0481 CTAGGAACGG CAGTCAAGC AGITGAAAGT CACATTAACCA GTGTCAGTAC TGCGCAATT 1

ページ2/6

## 【図10A.3】

CV-0541 ACAGCAGCCA ATTGTAGGGC CCAGAGTGT ATCATTGGCT CAATCTGAA TCTCAATTG  
CPV-0541 ACAGCAGCCA ATTGTAGGGC CCAGAGTGT ATCATTGGCT CAATCTGAA TCTCAATTG 3  
PR-0541 ACAGCAGCCA ATTGTAGGGC CCAGAGTGT ATCATTGGCT CAATCTGAA TCTCAATTG  
W3A-0541 ACAGCAGCCA ATTGTAGGGC CCAGAGTGT ATCATTGGCT CAATCTGAA TCTCAATTG  
WR-0541 ACAGCAGCCA ATTGTAGGGC CCAGAGTGT ATCATTGGCT CAATCTGAA TCTCAATTG  
  
CV-0601 ACCGAGTTGA CAACTATCTT CCACATCAA ATTACAANCC CTGCAATTGAG TCTCAATTACA  
CPV-0601 ACCGAGTTGA CAACTATCTT CCACATCAA ATTACAANCC CTGCAATTGAG TCTCAATTACA 1  
PR-0601 ACCGAGTTGA CAACTATCTT CCACATCAA ATTACAANCC CTGCAATTGAG TCTCAATTACA  
W3A-0601 ACCGAGTTGA CAACTATCTT CCACATCAA ATTACAANCC CTGCAATTGAG TCTCAATTACA 2  
WR-0601 ACCGAGTTGA CAACTATCTT CCACATCAA ATTACAANCC CTGCAATTGAG TCTCAATTACA 2  
  
CV-0661 ATTCAGGTT TAAGGAGCTT ACTGGGGAGT ACCTTGCGGA CTGTGGTGG AAAATCTTC  
CPV-0661 ATTCAGGTT TAAGGAGCTT ACTGGGGAGT ACCTTGCGGA CTGTGGTGG AAAATCTTC 3  
PR-0661 ATTCAGGTT TAAGGAGCTT ACTGGGGAGT ACCTTGCGGA CTGTGGTGG AAAATCTTC  
W3A-0661 ATTCAGGTT TAAGGAGCTT ACTGGGGAGT ACCTTGCGGA CTGTGGTGG AAAATCTTC  
WR-0661 ATTCAGGTT TAAGGAGCTT ACTGGGGAGT ACCTTGCGGA CTGTGGTGG AAAATCTTC  
  
CV-0721 ATATCCCGAA TAATGCGAGG TGAGCTCTC TCATCAGGT TCTTCAGGG CCAGATTTG  
CPV-0721 ATATCCCGAA TAATGCGAGG TGAGCTCTC TCATCAGGT TCTTCAGGG CCAGATTTG 1  
PR-0721 ATATCCCGAA TAATGCGAGG TGAGCTCTC TCATCAGGT TCTTCAGGG CCAGATTTG 1  
W3A-0721 ATATCCCGAA TAATGCGAGG TGAGCTCTC TCATCAGGT TCTTCAGGG CCAGATTTG 1  
WR-0721 ATATCCCGAA TAATGCGAGG TGAGCTCTC TCATCAGGT TCTTCAGGG CCAGATTTG 1  
  
CV-0781 GGATTTAGATT TGACCTATAT GGAGATGGTC ATAAAATTTG AGCTGCCAAC TTAAACTGTA  
CPV-0781 GGATTTAGATT TGACCTATAT GGAGATGGTC ATAAAATTTG AGCTGCCAAC TTAAACTGTA 1  
PR-0781 GGATTTAGATT TGACCTATAT GGAGATGGTC ATAAAATTTG AGCTGCCAAC TTAAACTGTA  
W3A-0781 GGATTTAGATT TGACCTATAT GGAGATGGTC ATAAAATTTG AGCTGCCAAC TTAAACTGTA  
WR-0781 GGATTTAGATT TGACCTATAT GGAGATGGTC ATAAAATTTG AGCTGCCAAC TTAAACTGTA

ページ3/6

## 【図10A.4】

CV-0841 CAACCTGCAA CCCAGATCAT AGATCTGGCC ACCATTCTCG CATTCTTAA CAATCAAGRA  
CPV-0841 CAACCTGCAA CCCAGATCAT AGATCTGGCC ACCATTCTCG CATTCTTAA CAATCAAGRA 1  
PR-0841 CAACCTGCAA CCCAGATCAT AGATCTGGCC ACCATTCTCG CATTCTTAA CAATCAAGRA  
W3A-0841 CAACCTGCAA CCCAGATCAT AGATCTGGCC ACCATTCTCG CATTCTTAA CAATCAAGRA  
WR-0841 CAACCTGCAA CCCAGATCAT AGATCTGGCC ACCATTCTCG CATTCTTAA CAATCAAGRA  
  
CV-0901 GTCACTGGCCC AATTACCAAC AGCTGTATTAT GTGACTGCGA GCTTGTATCA AGCCATATCCC  
CPV-0901 GTCACTGGCCC AATTACCAAC AGCTGTATTAT GTGACTGCGA GCTTGTATCA AGCCATATCCC 1  
PR-0901 GTCACTGGCCC AATTACCAAC AGCTGTATTAT GTGACTGCGA GCTTGTATCA AGCCATATCCC  
W3A-0901 GTCACTGGCCC AATTACCAAC AGCTGTATTAT GTGACTGCGA GCTTGTATCA AGCCATATCCC 1  
WR-0901 GTCACTGGCCC AATTACCAAC AGCTGTATTAT GTGACTGCGA GCTTGTATCA AGCCATATCCC 1  
  
CV-0961 GCATGCCAA GCACATTAC ACCCGAACAT GTGTAACGTA GTATTAATGA TGCCCCAGTA  
CPV-0961 GCATGCCAA GCACATTAC ACCCGAACAT GTGTAACGTA GTATTAATGA TGCCCCAGTA 2  
PR-0961 GCATGCCAA GCACATTAC ACCCGAACAT GTGTAACGTA GTATTAATGA TGCCCCAGTA  
W3A-0961 GCATGCCAA GCACATTAC ACCCGAACAT GTGTAACGTA GTATTAATGA TGCCCCAGTA 1  
WR-0961 GCATGCCAA GCACATTAC ACCCGAACAT GTGTAACGTA GTATTAATGA TGCCCCAGTA 1  
  
CV-1021 CTCTCAGAG ATAGATGGC TTGGCTTCCAA GTGTAACGTA CAAGATGCACT TTCTCTCCCA  
CPV-1021 CTCTCAGAG ATAGATGGC TTGGCTTCCAA GTGTAACGTA CAAGATGCACT TTCTCTCCCA  
PR-1021 CTCTCAGAG ATAGATGGC TTGGCTTCCAA GTGTAACGTA CAAGATGCACT TTCTCTCCG 1  
W3A-1021 CTCTCAGAG ATAGATGGC TTGGCTTCCAA GTGTAACGTA CAAGATGCACT TTCTCTCCCA 1  
WR-1021 CTCTCAGAG ATAGATGGC TTGGCTTCCAA GTGTAACGTA CAAGATGCACT TTCTCTCCCA 1  
  
CV-1081 GTGGTTGGGA GGTTCATCAC TGGAATTGCGT CGTTTGGATG GAATAGTTTA TGCAAAATTC  
CPV-1081 GTGGTTGGGA GGTTCATCAC TGGAATTGCGT CGTTTGGATG GAATAGTTTA TGCAAAATTC 1  
PR-1081 GTGGTTGGGA GGTTCATCAC TGGAATTGCGT CGTTTGGATG GAATAGTTTA TGCAAAATTC  
W3A-1081 GTGGTTGGGA GGTTCATCAC TGGAATTGCGT CGTTTGGATG GAATAGTTTA TGCAAAATTC  
WR-1081 GTGGTTGGGA GGTTCATCAC TGGAATTGCGT CGTTTGGATG GAATAGTTTA TGCAAAATTC

ページ4/6

## 【図10A.5】

CV-1141 AGGTGCGATGC TGTGCAAGTG CATGCAACCT GCTGCCGTGA TCTTCAGGCC GAGTTCATCC  
CPV-1141 AGGTGCGATGC TGTGCAAGTG CATGCAACCT GCTGCCGTGA TCTTCAGGCC GAGTTCATCC 5  
PR-1141 AGGTGCGATGC TGTGCAAGTG CATGCAACCT GCTGCCGTGA TCTTCAGGCC GAGTTCATCC 4  
W3A-1141 AGGTGCGATGC TGTGCAAGTG CATGCAACCT GCTGCCGTGA TCTTCAGGCC GAGTTCATCC 2  
WR-1141 AGGTGCGATGC TGTGCAAGTG CATGCAACCT GCTGCCGTGA TCTTCAGGCC GAGTTCATCC 2  
  
CV-1201 CCTGTAACGTG TCATTCGACAT GCACAAATGT GTGAGCTGCG AGCTTGACGA TCTTCAGATTC  
CPV-1201 CCTGTAACGTG TCATTCGACAT GCACAAATGT GTGAGCTGCG AGCTTGACGA TCTTCAGATTC 2  
PR-1201 CCTGTAACGTG TCATTCGACAT GCACAAATGT GTGAGCTGCG AGCTTGACGA TCTTCAGATTC 2  
W3A-1201 CCTGTAACGTG TCATTCGACAT GCACAAATGT GTGAGCTGCG AGCTTGACGA TCTTCAGATTC 2  
WR-1201 CCTGTAACGTG TCATTCGACAT GCACAAATGT GTGAGCTGCG AGCTTGACGA TCTTCAGATTC 2  
  
CV-1261 ACCATCAACTA AATTGGCCAA TGATGGCAAGT AAATGGCGCA CGAGCTTGCA TCTTCAGCCAG  
CPV-1261 ACCATCAACTA AATTGGCCAA TGATGGCAAGT AAATGGCGCA CGAGCTTGCA TCTTCAGCCAG 1  
PR-1261 ACCATCAACTA AATTGGCCAA TGATGGCAAGT AAATGGCGCA CGAGCTTGCA TCTTCAGCCAG  
W3A-1261 ACCATCAACTA AATTGGCCAA TGATGGCAAGT AAATGGCGCA CGAGCTTGCA TCTTCAGCCAG 1  
WR-1261 ACCATCAACTA AATTGGCCAA TGATGGCAAGT AAATGGCGCA CGAGCTTGCA TCTTCAGCCAG 1  
  
CV-1321 ATCTTGCCTA TTAGTCGGTT GGATATATCCG CAGAATTTG CGTGGGTGAA TAAAGAGTCTA  
CPV-1321 ATCTTGCCTA TTAGTCGGTT GGATATATCCG CAGAATTTG CGTGGGTGAA TAAAGAGTCTA 2  
PR-1321 ATCTTGCCTA TTAGTCGGTT GGATATATCCG CAGAATTTG CGTGGGTGAA TAAAGAGTCTA 1  
W3A-1321 ATCTTGCCTA TTAGTCGGTT GGATATATCCG CAGAATTTG CGTGGGTGAA TAAAGAGTCTA 3  
WR-1321 ATCTTGCCTA TTAGTCGGTT GGATATATCCG CAGAATTTG CGTGGGTGAA TAAAGAGTCTA 1  
  
CV-1381 AGTGTGCACT TACACAACTT AGCACAAGT GACACATACC TTTCAGTCAT CACATCAGCT  
CPV-1381 AGTGTGCACT TACACAACTT AGCACAAGT GACACATACC TTTCAGTCAT CACATCAGCT  
PR-1381 AGTGTGCACT TACACAACTT AGCACAAGT GACACATACC TTTCAGTCAT CACATCAGCT  
W3A-1381 AGTGTGCACT TACACAACTT AGCACAAGT GACACATACC TTTCAGTCAT CACATCAGCT 1  
WR-1381 AGTGTGCACT TACACAACTT AGCACAAGT GACACATACC TTTCAGTCAT CACATCAGCT 1

ページ5/6

【図10A.6】

CV-1441 AGGACTACAA CGTGTATTTC CATAATAGCA ATCTGTTCTG GATGGTAGG TTAAATACIA  
CPV-1441 AGGACTACAA GGTTGATATC CATAATAGCA ATCTGTTCTG GATGGTAGG TTAAATACIA  
PR-1441 AGGACTACAA GGTTGATATC CATAATAGCA ATCTGTTCTG GATGGTAGG TTAAATACIA 1  
W3A-1441 AGGACTACAA GGTTGATATC CATAATAGCA ATCTGTTCTG GATGGTAGG TTAAATACIA  
WR-1441 AGGACTACAA GGTTGATATC CATAATAGCA ATCTGTTCTG GATGGTAGG TTAAATACIA  
CV-1501 ATAATCTGC TCAGTGTTAGT TGTTGGAAG TTATTGACCA TTGTCGCTGC TAATCGAAT  
CPV-1501 ATAATCTGC TCAGTGTTAGT TGTTGGAAG TTATTGACCA TTGTCGCTGC TAATCGAAT 1  
PR-1501 ATAATCTGC TCAGTGTTAGT TGTTGGAAG TTATTGACCA TTGTCGCTGC TAATCGAAT 1  
W3A-1501 ATAATCTGC TCAGTGTTAGT TGTTGGAAG TTATTGACCA TTGTCGCTGC TAATCGAAT 1  
WR-1501 ATAATCTGC TCAGTGTTAGT TGTTGGAAG TTATTGACCA TTGTCGCTGC TAATCGAAT  
CV-1561 AGAATGGAGA ATTITGTTTA TCATAATACA GCATTCACCC ACCCCAGGATC TGATCTCAT  
CPV-1561 AGAATGGAGA ATTITGTTTA TCATAATACA GCATTCACCC ACCCCAGGATC TGATCTCAT 2  
PR-1561 AGAATGGAGA ATTITGTTTA TCATAATACA GCATTCACCC ACCCCAGGATC TGATCTCAT 1  
W3A-1561 AGAATGGAGA ATTITGTTTA TCATAATACA GCATTCACCC ACCCCAGGATC TGATCTCAT 3  
WR-1561 AGAATGGAGA ATTITGTTTA TCATAATACA GCATTCACCC ACCCCAGGATC TGATCTCAT 3  
W3AとWRの終止コドン(TAA) 1  
CV-1621 GAGAAAAAATC AACCTGCAC TCTTGACAA AGATAA // (配列番号49)  
CPV-1621 GAGAAAAAATC AACCTGCAC TCTTGACAA AGATAA // (配列番号25)  
PR-1621 GAGAAAAAATC AACCTGCAC TCTTGACAA AGATAA // (配列番号27)  
W3A-1621 GAGAAAAAATC AACCTGCAC TCTTGACAA AGATAA // (配列番号29)  
WR-1621 GAGAAAAAATC AACCTGCAC TCTTGACAA AGATAA // (配列番号31)

ページ6/6

【図10B.1】

CV 001 MSTIIQELVV SCLLAGAGSL DPALMQLGV IPTNVRQLMY YEASSAFIV VKLMPPTIDSP 4  
CPV 001 MGTIIQELVV SCLLAGAGSL DPALMQLGV IPTNVRQLMY YEASSAFIV VKLMPPTIDSP 4  
PR 001 MGTIIQELVV SCLLAGAGSL DPALMQLGV IPTNVRQLMY YEASSAFIV VKLMPPTIDSP 2  
W3A 001 MGTIIQELVV SCLLAGAGSL DPALMQLGV IPTNVRQLMY YEASSAFIV VKLMPPTIDSP 2  
WR 001 MGTIIQELVV SCLLAGAGSL DPALMQLGV IPTNVRQLMY YEASSAFIV VKLMPPTIDSP 3  
CV 061 ISGCNITIS SYNATVTKLL QPIGENLEI RNQLIPTTRR RRFAGVVIQL AALGVATAAQ 2  
CPV 061 ISGCNITIS SYNATVTKLL QPIGENLEI RYQLIPTTRR RRFAGVVIQL AALGVATAAQ 2  
PR 061 ISGCNITIS SYNATVTKLL QPIGENLEI RNQLIPTTRR RRFAGVVIQL AALGVATAAQ 2  
W3A 061 ISGCNITIS SYNATVTKLL QPIGENLEI RNQLIPTTRR RRFAGVVIQL AALGVATAAQ 2  
WR 061 ISGCNITIS SYNATVTKLL QPIGENLEI RNQLIPTTRR RRFAGVVIQL AALGVATAAQ 2  
CV 121 VTAAYVALVKA NENTAAILNL KNAIQTNAA VADVQATQS LGTAVQAQVD HINSVSPAI 4  
CPV 121 VTAAYVALVKA NENDAAILNL KNAIQTNAA VADVQATQS LGTAVQAQVD HINSVSPAI 4  
PR 121 VTAAYVALVKA NENDAAILNL KNAIQTNAA VADVQATQS LGTAVQAQVD HINSVSPAI 3  
W3A 121 VTAAYVALVKA NENDAAILNL KNAIQTNAA VADVQATQS LGTAVQAQVD HINSVSPAI 2  
WR 121 VTAAYVALVKA NENDAAILNL KNAIQTNAA VADVQATQS LGTAVQAQVD HINSVSPAI 2  
CV 181 TAANCKAQDN IIGSINILYL TELETTIPNNQ ITNPALSPIT IQALRILGQ TLPTVVEKSF 1  
CPV 181 TAANCKAQDN IIGSINILYL TELETTIPNNQ ITNPALSPIT IQALRILGQ TLPTVVEKSF 1  
PR 181 TAANCKAQDN IIGSINILYL TELETTIPNNQ ITNPALSPIT IQALRILGQ TLPTVVEKSF 1  
W3A 181 TAANCKAQDN IIGSINILYL TELETTIPNNQ ITNPALSPIT IQALRILGQ TLPTVVEKSF 1  
WR 181 TAANCKAQDN IIGSINILYL TELETTIPNNQ ITNPALSPIT IQALRILGQ TLPTVVEKSF 1  
CV 241 NTQISAEELL SSGLITQIVG GLDLYTMQMV IKIELPLTV QPATQIIDLA TISAFINNQE 1  
CPV 241 NTQISAEELL SSGLITQIVG GLDLYTMQMV IKIELPLTV QPATQIIDLA TISAFINNQE 1  
PR 241 NTQISAEELL SSGLITQIVG GLDLYTMQMV IKIELPLTV QPATQIIDLA TISAFINNQE 1  
W3A 241 NTQISAEELL SSGLITQIVG GLDLYTMQMV IKIELPLTV QPATQIIDLA TISAFINNQE 1  
WR 241 NTQISAEELL SSGLITQIVG GLDLYTMQMV IKIELPLTV QPATQIIDLA TISAFINNQE 1  
CV 301 VVAQQLPRTVI VTGSLIQAYF ASQCIIPTPV VCYCRNDQV LSDDTMACLQ GNLRCTFSP 1  
CPV 301 VVAQQLPRTVI VTGSLIQAYF ASQCIIPTPV VCYCRNDQV LSDDTMACLQ GNLRCTFSP 1  
PR 301 VVAQQLPRTVI VTGSLIQAYF ASQCIIPTPV VCYCRNDQV LSDDTMACLQ GNLRCTFSP 1  
W3A 301 VVAQQLPRTVI VTGSLIQAYF ASQCIIPTPV VCYCRNDQV LSDDTMACLQ GNLRCTFSP 1  
WR 301 VVAQQLPRTVI VTGSLIQAYF ASQCIIPTPV VCYCRNDQV LSDDTMACLQ GNLRCTFSP 1  
CV 361 VVGSFLTRFV LFDPGIVYANC RSMLCCKMOP AAVILQPSSS PVTVIDMVKC VSLQLDMLRF 2  
CPV 361 VVGSFLTRFV LFDPGIVYANC RSMLCCKMOP AAVILQPSSS PVTVIDMVKC VSLQLDMLRF 2  
PR 361 VVGSFLTRFV LFDPGIVYANC RSMLCCKMOP AAVILQPSSS PVTVIDMVKC VSLQLDMLRF 2  
W3A 361 VVGSFLTRFV LFDPGIVYANC RSMLCCKMOP AAVILQPSSS PVTVIDMVKC VSLQLDMLRF 2  
WR 361 VVGSFLTRFV LFDPGIVYANC RSMLCCKMOP AAVILQPSSS PVTVIDMVKC VSLQLDMLRF 2  
ページ1/2

【図10B.2】

CV 421 TITOLANVITY NSTIKLETSQ ILP1DPLDIS ONLAAVNKL SDALQHQAOS DTYLSAITSA 1  
CPV 421 TITOLANVITY NSTIKLETSQ ILP1DPLDIS ONLAAVNKL SDALQHQAOS DTYLSAITSA 1  
PR 421 TITOLANVITY NSTIKLETSQ ILP1DPLDIS ONLAAVNKL SDALQHQAOS DTYLSAITSA 1  
W3A 421 TITOLANVITY NSTIKLETSQ ILP1DPLDIS ONLAAVNKL SDALQHQAOS DTYLSAITSA 2  
WR 421 TITOLANVITY NSTIKLETSQ ILP1DPLDIS ONLAAVNKL SDALQHQAOS DTYLSAITSA 1  
CV 481 TTTSVLSIIIA ICIGS1GLIL IIIISVWWK LLTIVAAANRN RMENFVYHNS AFHFRPSOLS 1  
CPV 481 TTTSVLSIIIA ICIGS1GLIL IIIISVWWK LLTIVAAANRN RMENFVYHNS AFHFRPSOLS 1  
PR 481 TTTSVLSIIIA ICIGS1GLIL IIIISVWWK LLTIVAAANRN RMENFVYHNS AFHFRPSOLS 3  
W3A 481 TTTSVLSIIIA ICIGS1GLIL IIIISVWWK LLTIVAAANRN RMENFVYHNS AFHFRPSOLS 3  
WR 481 TTTSVLSIIIA ICIGS1GLIL IIIISVWWK LLTIVAAANRN RMENFVYHNS AFHFRPSOLS 2  
CV 541 EKNQPATLGT R ← 551 AA (配列番号12)  
CPV 541 EKNQPATLGT R ← 551 AA (配列番号26)  
PR 541 EKNQPATLGT R ← 551 AA (配列番号28)  
WR 541 EKNQPATLGT R ← 551 AA (配列番号30)  
WR 541 EKNQPATLGT R ← 551 AA (配列番号32)

ページ2/2

【図11】

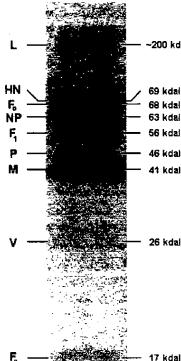


Fig. 11

【図12】



Fig. 12A

Fig. 12B

【図13】

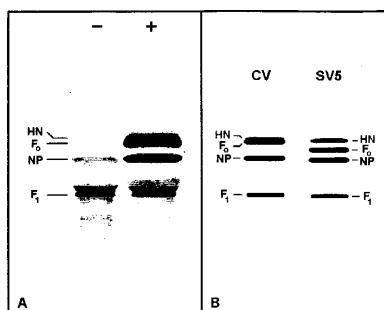
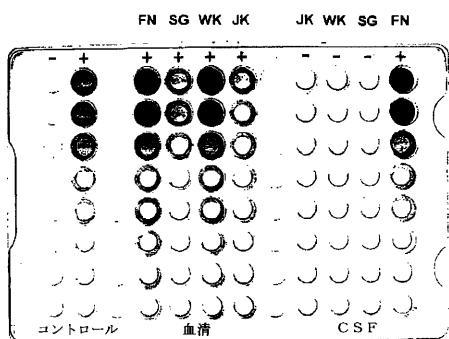


Fig. 13

【図 14】



【図 16】

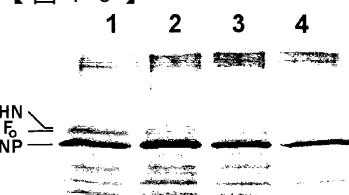
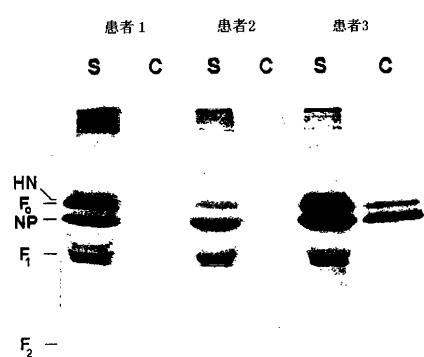


Fig. 16

【図 15】



【図 17】

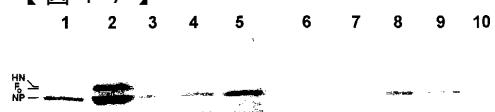


Fig. 17

【図 18】

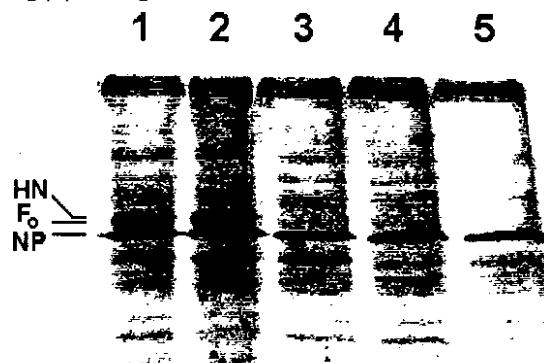


Fig. 18

【図 19】

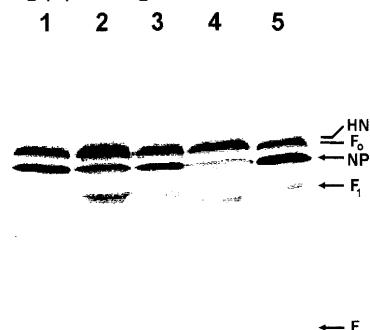
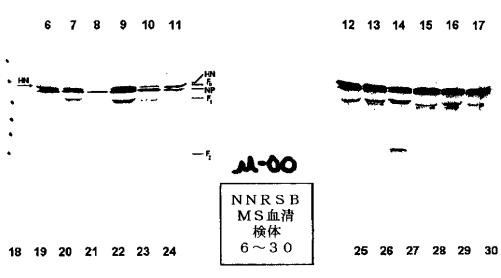


Fig. 19

【図 20】



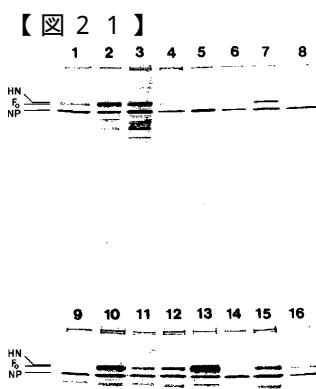


Fig. 24



【図 2 4】

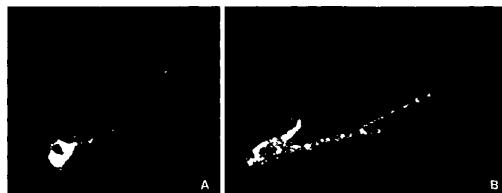


Fig. 24

【図 2 5 A】

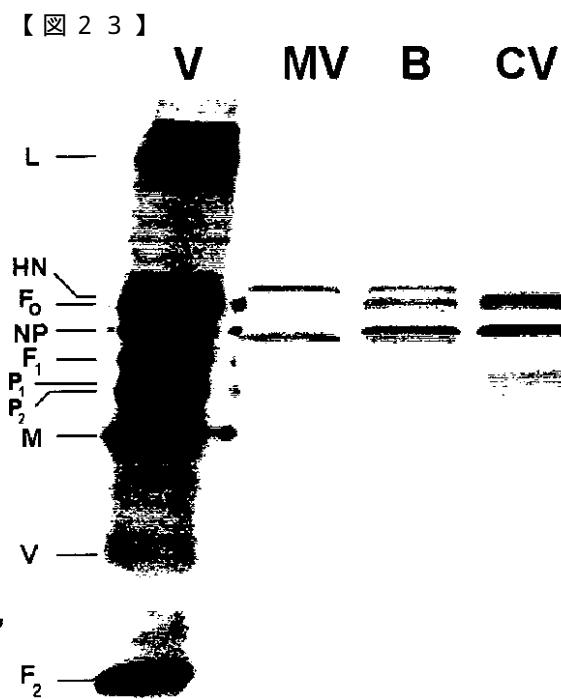
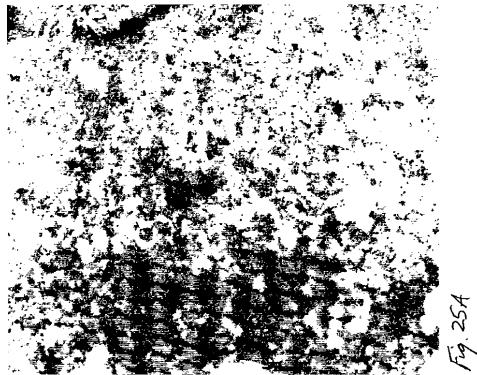
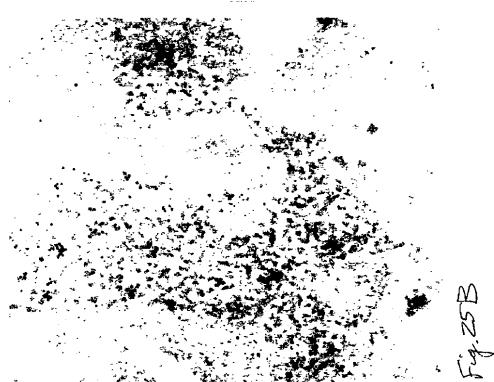


Fig. 23

【図 2 5 B】



【配列表】

0004324379000001.app

## フロントページの続き

			F I		
C 1 2 N	5/06	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	E
C 1 2 N	7/00	(2006.01)	C 1 2 N	7/00	
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
A 0 1 K	67/027	(2006.01)	A 0 1 K	67/027	
A 6 1 K	39/155	(2006.01)	A 6 1 K	39/155	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	S
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	31/14	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 P	31/14	
G 0 1 N	33/569	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	M
			G 0 1 N	33/569	L
			C 1 2 P	21/08	

(74)代理人 100074228

弁理士 今城 俊夫

(74)代理人 100084009

弁理士 小川 信夫

(74)代理人 100082821

弁理士 村社 厚夫

(74)代理人 100086771

弁理士 西島 孝喜

(74)代理人 100084663

弁理士 箱田 篤

(72)発明者 ロビンス スティーヴン ジェイ

アメリカ合衆国 カンザス州 66006 ポルドワイン シティー テンス ストリート 13  
15 クリブティック アフリクションズ リミテッド ライアビリティ カンパニー

審査官 引地 進

(56)参考文献 Paterson R.G. et al., Simian parainfluenza virus 5 nucleocapsid protein (NP), V protein and phosphoprotein (V/P), membrane protein (M), fusion protein (F), small hydrophobic protein (SH), hemagglutinin-neuraminidase protein(HN), and L protein (L) genes, complete cds., Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], 1998年12月16日, Accession No.A F052755, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?2981085:NCBI:854396>>

藤永薰, 遺伝子增幅PCR法 - 基礎と新しい展開 -, 共立出版株式会社, 1990年, pp.207-213

Ito M. et al., *Bacillus firmus* multiple resistance and pH regulation related operon, complete sequence., Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], 2000年 1月 1日, Accession No.AF097740, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?6650382:OLD03:262578>>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00- 3/00

C12N 15/00-15/90

C07K 1/00-19/00

C12N 1/00- 7/08  
JSTPlus(JDreamII)  
WPI/BIOSIS(DIALOG)  
PubMed  
Science Direct  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq