

(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 I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 14/115 (2006.01)

C O 7 K 14/115

C O 7 K 16/10 (2006.01)

C O 7 K 16/10

C O 7 K 19/00 (2006.01)

C O 7 K 19/00

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 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) 国際出願番号 PCT/US2002/004117
 (87) 国際公開番号 W02002/077211
 (87) 国際公開日 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
 ボルドウィン シティ テンス スト
 リート 1315
 (74) 代理人 100059959
 弁理士 中村 稔
 (74) 代理人 100067013
 弁理士 大塚 文昭
 (74) 代理人 100082005
 弁理士 熊倉 禎男
 (74) 代理人 100065189
 弁理士 穴戸 嘉一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ルブラウイルス (RUBULAVIRUS) 属に属するニューロビルレントウイルス (NEUR
 OVIRULENT) (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、ストリンジェ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、ストリンジェ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、
 を含む単離核酸。

【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 3 1 4 1 ~ 4 2 7 1 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 4 5 3 0 ~ 6 1 8 2 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 4 5 8 7 ~ 6 1 8 2 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 4 5 8 7 ~ 4 8 3 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、

(ix) (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、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 4 2 7 2 ~ 6 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、

(xi) (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、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 6 5 8 4 ~ 8 2 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、並びに

(xiii) (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、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 1 5 ヌクレオチドから 5 0 0 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 1 5 ヌクレオチドから 5 0 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 1 5 ヌクレオチドから 3 5 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 152 ~ 1678 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 1850 ~ 2515 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 2339 と (配列番号 1) のヌクレオチド位置 2340 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 1850 ~ 3023 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 3141 ~ 4271 のヌクレオチド、又はその縮重コード配列、

10

(E) (配列番号 1) の塩基番号 4530 ~ 6182 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 4587 ~ 6182 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 4587 ~ 4835 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 4836 ~ 6182 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 6303 ~ 6434 のヌクレオチド、又はその縮重コード配列、

20

(J) (配列番号 1) の塩基番号 6584 ~ 8278 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 8414 ~ 15178 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 RNA 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。

30

【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 152 ~ 1678 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 1850 ~ 2515 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 2339 と (配列番号 1) のヌクレオチド位置 2340 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 1850 ~ 3023 のヌクレオチド、又は縮重コード配列、

40

(D) (配列番号 1) の塩基番号 3141 ~ 4271 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 4530 ~ 6182 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 4587 ~ 6182 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 4587 ~ 4835 のヌクレオチド、又は縮重コード配列、

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 2 0】

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プタンパク質である、請求項 1 9 に記載のキメラタンパク質。

【請求項 2 1】

クリプトウイルス特異抗体産生における請求項 1 6 又は請求項 1 9 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 2 2】

ワクチン製造における請求項 1 6 又は請求項 1 9 に記載のタンパク質の使用。

【請求項 2 3】

請求項 1 6 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 2 4】

請求項 2 3 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 2 5】

(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プタンパク質を特異的に結合する、請求項 2 3 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 2 6】

前記抗体がポリクローナル性である、請求項 2 3 に記載の抗体。

【請求項 2 7】

前記抗体がモノクローナル性である、請求項 2 3 に記載の抗体。

【請求項 2 8】

前記抗体がキメラである、請求項 2 3 に記載の抗体。

【請求項 2 9】

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 2 3 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 RNA 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 RNA 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 RNA 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 RNA 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、RNA 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ェ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 RNA 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 RNA 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 RNA 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、RNA 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RNA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RNA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RNAをゲノムとするウイルスである。

【請求項44】

前記生物材料が細胞材料である、請求項41、42、又は43のいずれかに記載の方法。

【請求項45】

前記生物材料が血液又は血清である、請求項41、42、又は43のいずれかに記載の方法。

【請求項46】

前記生物材料が脳脊髄液である、請求項41、42、又は43のいずれかに記載の方法。

【請求項47】

前記生物材料がリンパ組織である、請求項41、42、又は43のいずれかに記載の方法。

【請求項48】

前記生物材料が神経組織である、請求項41、42、又は43のいずれかに記載の方法。

【請求項49】

前記神経組織が脳組織である、請求項48に記載の方法。

【請求項50】

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16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、

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51】

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19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、

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52】

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17のエンベロープタンパク質に接触させる工程、

10

20

30

40

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 5 3】

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 3 2 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 5 4】

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 4 1、4 2、4 3、5 0、5 1、5 2、又は 5 3 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 5 5】

前記哺乳類がヒトである、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

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を有する、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記ヒトが、原発性気道及び / 又はリンパ節腫脹関連疾患を有する、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 8】

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 A V₃ / S S P E 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 5 9】

クリプトウイルスビ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中で培養する工程、

（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中で共培養する工程、

（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中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産生方法であって、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】

前記ヒト羊膜細胞がAV₃細胞である、請求項62に記載の方法。

30

【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NONO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産生する方法、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 の方法によって産生される、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産生される、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。

【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、

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、

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。

【請求項 7 7】

前記非ヒト哺乳類が非ヒト霊長類である、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／又は神経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ボ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

10

20

30

40

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 80】

予防薬候補のインビボ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 81】

前記予防薬候補が免疫予防薬である、請求項 80 記載の方法。

【請求項 82】

前記非ヒト哺乳類が齧歯類又はウサギ類である、請求項 79 請求項 80 に記載の方法。

【請求項 83】

前記非ヒト哺乳類が非ヒト霊長類である、請求項 79 又は請求項 80 に記載の方法。

【請求項 84】

前記ヒト疾患が神経学的、神経変性、及び/又は神経精神医学的疾患である、請求項 79 又は請求項 80 に記載の方法。

【請求項 85】

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 33 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 86】

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 85 に記載の抗クリプトウイルス抗体検出キット。

【請求項 87】

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 16 又は請求項 19 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 88】

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 87 に記載の抗クリプトウイルス抗体検出キット。

【請求項 89】

前記フラグメント (C) が、(配列番号 34)、(配列番号 35)、(配列番号 36)、(配列番号 38)、(配列番号 39)、(配列番号 40)、(配列番号 41)、(配列番号 42)、(配列番号 43)、(配列番号 44)、(配列番号 45)、(配列番号 46)、(配列番号 47)、又は(配列番号 48)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 90】

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ブ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ブラウイルス属（図 1 を参照）は、一本マイナス鎖 RNA 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。いくつかのルブ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。これらの神経性ルブラウイルスは、イヌパラインフルエンザウイルスタイプ 2、ブタルブラウイルス（別名、La Piedad-Michoacan-Mexico ウイルス）、並びにメナングルウイルス（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、共通先祖であるルブ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（CPIV 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

ブタルブラウイルス（別名、La Piedad-Michoacan-Mexico ウイルスまたは 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枢神経系に残存する（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

メナングルウイルスは、1997 年にオーストラリアで初めて同定された出現ルブラウイルスである（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、メナングルウイルス封入体（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。

多数のヒトルブラウイルスは、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、もう一方のルブラウイルスである、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）。

10

【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。

20

30

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、議論の的となった。（Vandvik, B. とNorrbby, 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。

40

多発性硬化症は、最も一般的には若年及び初中年成人（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

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髄性疾患))。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Tourtellotte 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)" Wolfgarm 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することができる。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、または躯幹周囲の痺れ感、または刺痛(parathesias)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髄性疾患)) 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兆候)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髄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

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とテンカンとは、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違いを訂正している。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。

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、これらの疾病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。

【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、並びに環境的因子が対処される場合にのみ、至適となり得る。

もう一つのテンカン様疾患は、稀かつ致死的な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、Meulens, "Comp. Virol." 18:105~159, 1983、Dyken, "Neurol. Clin." 3:179~196,

10

20

30

40

50

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(Jabbourら, "J. A. M. A." 220:959~962, 1972)では一年あたり100万人の人口(cmpy)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3.40~7.70cmpy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患者の中枢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

8: 674~691, 1978、Ohuchiら, "Microbiol. Immunol." 25: 887~893 [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: 321~333, 1972、KimotoとBaba, "Biken Journal" 18: 123~133, 1975、de Feliciら, "Annales Microbiologie" 126: 523~538, 1975、Ohuchiら, "Microbiol. Immunol." 23: 877~888, 1979)。

10

【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: 85~88, 1965、Matsumoto, Bull. "Yamaguchi Med. School" 13: 167~189, 1966、Nakaiら, "Virology" 38: 50~67, 1969、NakaiとImagawa, "J. Virol." 3: 187~197, 1969)。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: 176~182, 1971、Dubois-Dalcqら, "Arch. Neurol." 31: 355~364, 1974)。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: 321~333, 1972、Makinoら, "Microbiol. Immunol." 21: 193~205, 1977; Uedaら, "Biken Journal" 18: 113~122, 1975、Burnsteinら, "Infect. Immun." 10: 1378~1382, 1974、Mirchamsyら, "Intervirology" 9: 106~118, 1978、Schotttら, "Revue Neurologie" 135: 653~664, 1979)、そのいくつかは係る構造のみを含む(Doiら, Japan. "J. Med. Sci. Biol." 25: 321~333, 1972、Thormarら, "J. Exp. Med." 148: 674~691, 1978)。

20

30

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産生された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: 241~250, 1974、Brownら, "Acta Neuropathologica" 50: 181~186, 1980)。さらに興味深いことには、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: 181~186, 1980)。

40

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: 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、Modieら, "South African Med. J." 58: 964~967, 1980、Dick, "Brit. Med. J." 3: 359~360, 1973、J

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; Affective 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

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, Neurally 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 (看護師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必要がある。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)のルブラウイルス(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、または本発明のシュ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ビ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

。

さらに、本発明は、クリプトウイルスビ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単核細胞（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ビリオンが放出される。上清に見いだされるクリプトウイルスビ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ビ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ビリオンに曝露し、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、クリプトウイルスビ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産生される。

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産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、齧歯類または霊長類の羊膜細胞）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、末梢血単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産生される。

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[CFSS]）、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、哺乳類の治療に有効であり得る薬剤を発見するために、抗ウイルス薬剤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ビ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mRNAからのタンパク質合成、産生されるクリプトウイルスビ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ビ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

50

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で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。

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。

本発明のその他の特色、目的、及び利点は、付随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ブ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は、Collins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、原型であるルブラウイルスシミアンウイルス5から区別するために、3つのルブラウイルス種(ブタルブラウイルス、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、改訂版のルブ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

10

20

30

40

50

タルブラウイルスの「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対してよりも、互いにさらに密接に関連している (図 10 を参照)。

図 5 は、還元条件下で 10 % アクリルアミド Laemmli スラブラゲルによる 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 [^{35}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ガラス上に継代培養される前に、麻疹ウイルスエドモントン株で感染された AV₃/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) 時にブランク精製クリプトウイルス (BBR 株、図 7 A) またはシミアンウイルス 5 の NIH 21005-2WR 株 (SV5、図 7 B) 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) 時にブランク精製クリプトウイルス (BBR 株、図 8 A) で脳内接種された 3 ヶ月後、及び新生児 (生後 2 日目) 時にブランク精製クリプトウイルスで脳内接種された 6 ヶ月後 (図 8 B) 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 5 W3A 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、ルブラウイルス F タンパク質ヌクレオチド (図 10 A、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 10 B) 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、イヌパラインフルエンザウイルスタイプ 2 (「CPV」[T1 株]、Ito ら, "J. Gen. Virol." 81: 719~727, 2000 を参照) を示し、三番目のラインは、ブタルブラウイルス (「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]、Patterson ら, "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 81: 6706~6710,

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]、Itora, "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Ver o細胞において産生された勾配・精製 $[^{35}\text{S}]$ -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、F₀ = 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、F₁ = 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、F₂ = 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5 kD)は、ゲルを流出してしまっただ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、 $[^{35}\text{S}]$ -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トン株で急性感染された $[^{35}\text{S}]$ -メチオニン標識CV-1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-1細胞の沈降結果のRIPを示す。レーンVは、 $[^{35}\text{S}]$ -メチオニン標識勾配・精製クリプトウイルスビリオンの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 $[^{35}\text{S}]$ -メチオニン標識CV-1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っ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った(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と同一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 $[^{35}\text{S}]$ -メチオニン標識CV-1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F₀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。コントロール血清は、偽感染されたCV-1。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」であると評価され、レーン4は「クリプトウイルス陰性」であると評価された。

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ブタンパク質(F₀、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^[35S]-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、^[35S]-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 = ^[35S]-メチオニン標識クリプトウイルス感染CV-1。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、エンベロブ関連タンパク質の一つ、F₀ = 非切断型融合タンパク質、第二のエンベロブ性糖タンパク質、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、F₁ = 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、F₂ = 切断型融合タンパク質の小型フラグメント。注: 小型エンベロブ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だけ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AV₃/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。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プシドの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プ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プシドの15nm金ビーズによる標識を示す。倍率は約500,000倍である。

【0014】

好ましい実施形態の詳細な説明

本願に記述される新ウイルスは、培養ヒト細胞中で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ブ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)及びプタルウイルス(La-Piedad-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では知られていない。

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。

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)の特異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)の特異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の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。

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にではない、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

10

20

30

40

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」と診断かつレット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。種々のルブラウイルスF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ビリオンであり、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。好ましい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ってよく、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、またはインビトロまたはインビボ使用に適する任意のそ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その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。適切なキャリアのその他の例は、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。

クリプトウイルスビ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PBMNC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中で培養する。

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 Ver o (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、pH6.8~7.8、最も好ましくはpH6.8~7.2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））を培地に加えてもよい。従来量のペニシリンまたはストレプトマイシンのような抗生物質をまた培地に加えてもよい。

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、またはアンモニウム塩などのような、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 5 mM 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 2.5 mM であり、最も好ましくは、約 0.75 ~ 約 1.25 mM である。濃度が約 5 mM 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 10 mg / L、さらに好ましくは約 2 ~ 約 6 mg / L、そして最も好ましくは約 3 ~ 約 5 mg / 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 0.25 mg / L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ に当量であり、さらに好ましくは、約 0.10 ~ 約 0.20 mg / 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 0.15 mg / 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、Kielar 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 ~ 100 ppm NO、さらに好ましくは約 4 ~ 80 ppm NO、そして最も好ましくは約 20 ~ 40 ppm 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当な濃度で含む。

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

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⁺、NO⁰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（Feilisch, 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-Schmiedeberg's 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を産生し、あるNOドナーは、NOを遊離するためには、例えば、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IS-5-N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-ペニシラミン（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-オキサジアゾリウム、例えば塩化物塩）、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、ニトロプルシドナトリウム（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

、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）、スベルミン - 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]ブチル） - 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、プロリ - NONOエート（PROLI/NO、1（[2 - カルボキシラト]ピロリジン - 1 - yl）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シルホン酸 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1～10mM NaOH（好ましくは約pH12）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。（Ferraroら[1999]、Salom, J. B. ら, Relaxant effects of sodium nitroprusside and NONOates in rabbit basilar artery（ニトロプ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、ニトロプルシドナトリウム、DEA/NO及びSPR/NOの比較的影響）、"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プルシドナトリウム及びNONOエートの弛緩薬効果は

10

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. Cardiovasc. 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ویل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。

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。

本発明によるクリプトウイルス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産生の方法において、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、霊長類、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、霊長類細胞、即ち、霊長類を源とする細胞である。霊長類は、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。

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。

好ましい霊長類羊膜細胞は、ヒト羊膜細胞、例えばAV₃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、AV₃/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。本方法に従って、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。

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、Ver_o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-1_o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。

10

20

30

40

50

ブランク滴定アッセイ：単層の哺乳類上皮細胞（例えば、BHK、Vero、またはCV-1_c）上に肉眼で可視なブランク形成を使って、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：ブランク形成は、臨床血清検体及びウサギで産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）0.2 mLあたり約100～200ブラン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0.2 mLの希釈ウイルス-血清（またはCSF）混合物を、典型的には単層の感受性細胞（例えば、VeroまたはCV-1）に播種して、細胞を部分的CO₂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分ごとに接種物を撈拌する）。インキュベーション期間の終わりに、接種された単層は、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 ペニシリン/mL及び/または100 µg 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、MEMZO培地）で、10～12日間継続するようにオーバーレイされる（即ち、単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ブランク数を次に列挙して、PRD₅₀を計算する（PRD₅₀ = ブランク減少希釈度、コントロール[ウイルスと生理食塩水のみを含む試験管]上に形成されたブランク数を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CV1_c）並びに非増殖型感染（例えば、AV₃/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：トランスミッションまたは走査型電子顕微鏡のような電子顕微鏡は、本発明のクリプトウイルスビリオン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100 nm～約120 nm、らせん状ヌクレオカプシドを含む、エンペロープ型多形性ビリオン）。増殖型（例えば、Vero及びCV-1_c）並びに非増殖型感染（例えば、AV₃/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、[³⁵S]-メチオニン標識した未感染、非

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 1 1 と図 1 2 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 細胞において産生された、勾配・精製 [³⁵S]-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である。図 1 1 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。MW が約 5 k D である小型エンベロッ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。

10

免疫 - 超微細構造分析 (I m m u n o g o l d 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ヌクレオカプシド特異抗体、例えば過免疫ウサギ抗体、並びに間接的 I m m u n o g o l d 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。

先述は、本発明の単離クリプトウイルスビ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ビ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、ヒト末梢血単核細胞 (P B M N C) 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 G M P による誘導後の P B M N C 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 P B M N C からのウイルスの回収 (R o b b i n s ら , " J . I n f e c t . D i s . " 1 4 3 : 3 9 6 ~ 4 0 3 , 1 9 8 1 を参照)、並びに (3) 1 8 ヶ月の期間に渡り、S S P E 患者から採取された P B M N C から反復してウイルスを回収できること、を含む。

【 0 0 2 1 】

30

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 (A V₃) 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、V e r o 及び C V - 1_c、R o b b i n s ら , " J . I n f e c t . D i s . " 1 4 3 : 3 9 6 ~ 4 0 3 , 1 9 8 1 , 及び R o b b i n s と R a p p , " A r c h . V i r o l " 7 1 : 8 5 ~ 9 1 , 1 9 8 2 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 A V₃ 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ップタンパク質 (F , H N 及び S H) の極度な発現低下、あるいは非発現に関連する (R o b b i n s と R a p p , " A r c h . V i r o l . " 7 1 : 8 5 ~ 9 1 , 1 9 8 2 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 E B V 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 E B V 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確認することによって)、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 C C R F - C E M 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、である単離核酸及び単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、その他のルブ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「アライン」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/)のようなゲノム科学/プロテオミ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., Power BLAST: a new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation (PowerBLAST: インタラクティブまたは自動配

40

50

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と配列ホモロ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、アフィニティークロマトグラフィー、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】

30

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)のようなペンダント成分を含むもの、インターカレーター(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ジェンシー

50

条件下で行われるがその後、異なる、しかしより高い、ストリンジェ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（ストリンジェンシー）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ェ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、中程度ストリンジェントな条件は、50%ホルムアミド、5x デンハート液、5x SSPE、0.2% SDS中、42 でハイブリダイゼーションを行い、0.2x SSPE、0.2% SDS中、65 で洗浄を行う場合のストリンジェンシーにほぼ等価な条件である。

10

「高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション」という表現は、0.018M NaCl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0.018M NaCl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ェンシー条件下で安定ではない）。高ストリンジェンシー条件は、例えば、50%ホルムアミド、5x デンハート液、5x SSPE、0.2% SDS中、42 でハイブリダイゼーションを行い、0.1x SSPE、0.1% SDS中、65 で洗浄を行うことによって提供され得る。

「低ストリンジェ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、5x デンハート液、6x SSPE、0.2% SDS中、42 でハイブリダイゼーションを行い、1x 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。

20

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、23、33、または34)のいずれかに相補な配列、または(配列番号3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、33、または34)のいずれかの縮重コード配列はまた、核酸フラグメントによって包含される。

10

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含むが、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、核酸増幅反応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., *ら*, *Oligonucleotides 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増幅に使用することができる), "DNA Cell Biol." 13(1): 75~82[1994])。

20

30

【0025】

本発明のプロブは、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ブとして使用するために標識され得る。

40

プライマーまたはプロ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

50

ド位置 6 1 9 1 ~ 6 2 0 8 (配列番号 4 3 と指定)、配列番号 1 の隣接ヌクレオチド位置 7 5 0 1 ~ 7 5 1 8 (配列番号 4 6 と指定)、配列番号 1 の隣接ヌクレオチド位置 7 5 1 7 ~ 7 5 3 4 (配列番号 4 7 と指定)、あるいは、前述の配列番号 3 5 ~ 4 7 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 4 2 9 2 ~ 4 5 4 9 を含む核酸 (配列番号 4 8 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 4 2 7 2 ~ 6 5 1 5 (配列番号 3 4 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、クリプトウィ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、クリプトウィ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、クリプトウィ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

【 0 0 2 6 】

「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で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で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役する。

「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、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^3H 、または ^{15}O のようなラジオアイソトープであり得る。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、DeLuca、"Immunofluorescence 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することができる。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ー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]）。

【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（プラズミド及びレトロウイルスまたはアデノウイルスベ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、プラズミド、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

10

20

30

40

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に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 Maus 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、及び遺伝子の増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、プラス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を含む。

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と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(Invitrogen), 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(クローンテック(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、アデノウイルスートランスフェリン/ポリリジン-DNA(TfAdp1DNA)ベクター複合体(Wagnerら, 1992, "PNAS", USA, 89:6099~6103、Curie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スミド発現ベクターをTfAdp1DNA複合体において使用してもよい。

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「ウイルスベクター」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):862~863[2000]を参照)。これらのウイルスベクターは、例えば、単純ヘルペスウイルスベクター(例えば、Gellerら, 1988, "Science", 241:1667~1669)、ワクシニアウイルスベクター(例えば、Picciniら, 1987, "Meth. in Enzymology", 153:545~563)、サイトメガロウイルスベクター(Mocarskiら、Viral Vectors(ウイルスベクター), 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ベクター(Danosら, 1980, "PNAS", USA, 85:6469)、アデノウイルスベクター(例えば、Loganら, 1984, "PNAS", USA

10

20

30

40

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WO92/07573、WO90/06997、WO89/05345、WO92/05266、及びWO92/14829、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】

好ましいウイルスベクターは、モロニー Maus 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 Maus 白血病ウイルスと呼ばれるモロニーウイルス由来のシュードタイプレトロウイルスベクターである。最も好ましいウイルスベクターは、HIVウイルス由来のシュードタイプ(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., ら, *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ボ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プラスミド発現系によって産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。第二プラスミドは、異種エンベロープタンパク質(envelope)、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。第三のプラスミドは、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(EGFP)、青色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、蛍光フィコビリントタンパク質、 β -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シュ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ボ実験は、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、脾臓細胞におけるインビボ発現は、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, W.F., *Human Gene Therapy* (ヒト遺伝子療法), "Nature" (Suppl.) 392: 25~30 [1998])。

20

30

40

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

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カーを供給する。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。

【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、ホスホリ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戦略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-hexadecyl glycerol: synthesis and anti-ras activity in radiation-resistant cells (最少ホスホリ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レーター、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、アポトーシスを誘導し、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 oligodeoxynucleotide of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human cervical carcinoma cell line (グリセル

10

20

30

40

50

アルデヒド-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-beta1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]、Scala, S.ら, Adenovirus-mediated suppression of HMGI(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HMGI(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ロチオアートオリゴデオキシヌクレオチドによるダウレギュレーション), "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ボ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

10

20

30

40

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バク
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. Gen
e Ther.", 8(14):1667~74 [1997]、Hirao, T.ら, A
ntisense epidermal growth factor receptor
delivered by adenoviral vector blocks tumo
r 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 [1
999]、Wang, X. Y.ら, Antisense inhibition of
protein kinase Calpha reverses the transfo
rmed phenotype in human lung carcinoma cell
s (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 antisen
se-mediated growth inhibition of a mammary
adenocarcinoma from MMTV-neu transgenic mi
ce (MMTV-neut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
ビボアンチセンス媒介による成長抑制), "Gene Ther.", 5(3):38
8~93 [1998]、Leonetti, C.ら, Antitumor effect
of c-myc antisense phosphorothioate oligod
eoynucleotides 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ロ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 [199
6]、Laird, A. D.ら, Inhibition of tumor growth
in liver epithelial cells transfected wit
h a transforming growth factor alpha antise
nse 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, Tre
atment of glioblastoma U-87 by systemic adm
inistration of an antisense protein kinase
C-alpha phosphorothioate oligodeoxynucleo
tide (アンチセンスタンパク質キナーゼC - ホスホロ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, Antisens
e oligonucleotides as therapeutics for mal
ignant 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 [199
7]、Muller
, M.ら, Antisense phosphorothioate oligodeo
xynucleotide down-regulation of the insuli
n-like growth factor I receptor in ovarian c
ancer cells (卵巣ガン細胞におけるアンチセンスホスホロチオアートオリゴ
デオキシヌクレオチドによるインスリン様成長因子I受容体のダウンレギュレーション)
, "Int. J. Cancer", 77(4):567~71 [1998]、Elez
, R.ら, Polo-like kinase1, a new target for a
ntisense 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, Antitu

10

20

30

40

50

mor activity of a phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotide targeted against C-rf kinase (C-rf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。

「単離クリプトウイルスタンパク質」という表現は、インビボ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。

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、

(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、

(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のプロセッシング中に起こり、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、

(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ビ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、

(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)タンパク質ををコードする縮重コード配列、

(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(F₀)タンパク質ををコードする縮重コード配列、

(vii) (配列番号 1) の隣接ヌクレオチド位置 4 5 8 7 ~ 4 8 3 5 (配列番号 1 5 とともに指定される)、または切断型 F₂ 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 4 8 3 6 ~ 6 1 8 2 (配列番号 1 7 とともに指定される)、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 2 2 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 F₁ 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 6 3 0 3 ~ 6 4 3 4 (配列番号 1 9 とともに指定される)、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 S H 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 6 5 8 4 ~ 8 2 7 8 (配列番号 2 1 とともに指定される)、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 (H N) 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 8 4 1 4 ~ 1 5 1 7 8 (配列番号 2 3 とともに指定される)、またはクリプトウイルスの最大ヌクレオカプ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。

【 0 0 3 2 】

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) N P 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	
			20					25					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	30
				85				90					95			
Ala	Asp	Ile	Glu	Arg	Val	Glu	Ile	Asp	Gly	Phe	Glu	Glu	Gly	Ser	Phe	
			100					105					110			
Arg	Leu	Ile	Pro	Asn	Ala	Arg	Ser	Gly	Met	Ser	Arg	Gly	Glu	Ile	Asn	
			115				120					125				
Ala	Tyr	Ala	Ala	Leu	Ala	Glu	Asp	Leu	Pro	Asp	Thr	Leu	Asn	His	Ala	
			130			135				140						
Thr	Pro	Phe	Val	Asp	Ser	Glu	Val	Glu	Gly	Thr	Ala	Trp	Asp	Glu	Ile	
145				150					155					160		
Glu	Thr	Phe	Leu	Asp	Met	Cys	Tyr	Ser	Val	Leu	Met	Gln	Ala	Trp	Ile	40
			165					170				175				
Val	Thr	Cys	Lys	Cys	Met	Thr	Ala	Pro	Asp	Gln	Pro	Ala	Ala	Ser	Ile	
			180				185					190				
Glu	Lys	Arg	Leu	Gln	Lys	Tyr	Arg	Gln	Gln	Gly	Arg	Ile	Asn	Pro	Arg	
			195				200				205					
Tyr	Leu	Leu	Gln	Pro	Glu	Ala	Arg	Arg	Ile	Ile	Gln	Asn	Val	Ile	Arg	
			210			215					220					
Lys	Gly	Met	Val	Val	Arg	His	Phe	Leu	Thr	Phe	Glu	Leu	Gln	Leu	Ala	
225				230						235				240		
Arg	Ala	Gln	Ser	Leu	Val	Ser	Asn	Arg	Tyr	Tyr	Ala	Met	Val	Gly	Asp	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				10
	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				20
	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				30
	485	490	495	
Thr Asp Asp Leu Asn Ala Ala Leu Gly Asp Leu Asp Ile				
	500	505	510	／／（配列番号４）、

【 0 0 3 3 】

（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	15
Ile Glu Thr Gly Leu Asn Thr Val Glu Tyr Phe Thr Ser Gln Gln Val	
20	30
Thr Gly Thr Ser Ser Leu Gly Lys Asn Thr Ile Pro Pro Gly Val Thr	
35	45
Gly Leu Leu Thr Asn Ala Ala Glu Ala Lys Ile Gln Glu Ser Ile Asn	
50	60
His Gln Lys Gly Ser Val Gly Gly Gly Thr Asn Pro Lys Lys Pro Arg	
65	80
Ser Lys Ile Ala Ile Val Pro Ala Asp Asp Lys Thr Val Pro Glu Lys	
85	95
Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Pro Ser Thr Gln	
100	110

10

20

30

40

50

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
 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)、

【 0 0 3 4 】

(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
 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 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 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
 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

10

20

30

40

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
 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 1 0) 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

10

20

30

40

50

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 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
 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 1 0) 、

【 0 0 3 6 】

(v) F は以下のアミノ酸配列 (配列番号 1 2) 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
 Gln Pro Ile Gly Glu Asn Leu Glu Thr Ile Arg Asn Gln Leu Ile Pro
 85 90 95
 Thr Arg 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
 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

225 230 235 240
 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 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 1 2) 、

【 0 0 3 7 】

(vi) F0は以下のアミノ酸配列 (配列番号 1 4) 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
 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
 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
 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
 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

10

20

30

40

50

Ala Gln Ser Asp Thr Tyr Leu Ser Ala Ile Thr Ser Ala Thr Thr Thr
 450 455 460
 Ser Val Leu Ser Ile Ile Ala Ile Cys Leu Gly Ser Leu Gly Leu Ile
 465 470 475 480
 Leu Ile Ile Leu Leu Ser Val Val Val Trp Lys Leu Leu Thr Ile Val
 485 490 495
 Ala Ala Asn Arg Asn Arg Met Glu Asn Phe Val Tyr His Asn Ser Ala
 500 505 510
 Phe His His Pro Arg Ser Asp Leu Ser Glu Lys Asn Gln Pro Ala Thr
 515 520 525
 Leu Gly Thr Arg
 530 / / (配列番号 1 4) 、

【 0 0 3 8 】

(vii) F2は以下のアミノ酸配列 (配列番号 1 6) 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 1 8) 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
 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

10

20

30

40

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
 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
 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
 Leu Leu Ser Val 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

10

20

30

// (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

40

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 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

10

20

30

40

50

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 2 2)

10

20

また

【 0 0 4 2 】

(xi) L は以下のアミノ酸配列 (配列番号 2 4) を有する、
配列

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

30

40

50

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
 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
 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
 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
 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

10

20

30

40

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
 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
 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 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
 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
 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

10

20

30

40

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
 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
 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
 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
 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

10

20

30

40

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
 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
 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
 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
 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

10

20

30

40

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 2 4) 。

【 0 0 4 3 】

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 1 0)、(配列番号 1 2)、(配列番号 1 4)、(配列番号 1 6)、(配列番号 1 8)、(配列番号 2 0)、(配列番号 2 2)、または(配列番号 2 4)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 8 0 %、さらに好ましくは約 9 0 % のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列を意味し、約 9 5 % 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「アライン」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]) 。

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

10

20

30

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一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。

【 0 0 4 4 】

「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ラ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 - i m - 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、ゲル濾過、イオン交換、逆相及びアフィニティー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。その他の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産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産生され、組換えによって得ることができる。組換

え法は公知であり、例えば、S a m b r o o kら、前記、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、組換え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。

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'末端と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産生される。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。

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産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に便利である。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ポ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)。

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産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能力を意味する。「免疫原性」タンパク質は、アジュバント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

10

20

30

40

50

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、エンペローブタンパク質、即ち、F、F₀、F₂、F₁、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。

【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。

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、エンペローブタンパク質F、F₀、F₂、F₁、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。

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、トレハロースジミコラート、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

10

20

30

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その他の製剤は、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5 µg~約250 µg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、及び霊長類を含む、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であり、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。

本発明はまた、クリプトウイルスNP、V、P、M、F、F₀、F₂、F₁、SH、HN、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産生するリンパ球（例えば、ハイブリドーマ）によって産生された一つの抗体中に発見される鎖と相同である。

【0048】

「単離された」抗体は、例えば、ポリクローナル抗体であり、それを産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「単離」抗体は、その産生が、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産生され得る。（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]、Ausubel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産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')₂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_c 部分を欠如する、H及びL鎖の部分の意味する。「Fab」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_c 部分を欠如する $F(ab')_2$ 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「Fab」及び $F(ab')_2$ フラグメントを産生する方法は、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、Fabまたは $F(ab')_2$ フラグメントでもあり得る。

V_H 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(dAb)」もまた有用である。dAbは、 V_L 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。dAb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産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、クリプトウイルスヌクレオカプシドタンパク質をに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増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、及び骨髓腫を含む。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

【0050】

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 ')₂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 ')₂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 ')₂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ブ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 (b i n d i n g) または結合 (b o n d i n g) 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 (b i n d i n g) または結合 (b o n d i n g) 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ピリオンに直接的に

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、E L I S A、放射性免疫沈降法、免疫ブロット法、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、免疫ビーズ等）によって、ウイルスの主要エンベロープタンパク質（F₀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PBMNCのPCR増幅を行うこと、のいずれかによって、係るサンプルのPBMNC中に検出することができる。

【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PBMNC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。

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。

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、Fab及び／またはF(ab')₂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、クリプトウイルスビリオンであり、好ましい実施形態では、クリプトウイルスビリオンは、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-1₀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産生される。

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

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 a b 及び/またはF (a b ')₂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。

【 0 0 5 2 】

例えば、E L I S A、R I A、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、シリンジ、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その他の有用な成分を含む。

キットにアSEMBL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、末梢血単核細胞（P B M N C）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R N A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

。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、もしあるとすれば、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、アクトチン、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産生するために、サンプル中のクリプトウイルス特異的RNA鋳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（*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。

30

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PBMNCにおける検出可能なクリプトウイルス運搬率を1:10⁵ PBMNC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AV₃/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, 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, 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, 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, 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、適切なストリンジェ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ツ(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、ノーザンプロットティング)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ー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ー電気泳動による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ー電気泳動による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 (キャピラリー電気泳動による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ー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 (キャピラリー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 (短キャピラリーを用いる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、膈上皮、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、または任意組織由来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、末梢血単核細胞)、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、膵臓、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-シヨ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、一晚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連する尿物質の同定), "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、典型的に振戦、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、または非ヒト霊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、ゴフアー、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ビ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、AV₃/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 of のいずれであってもよい。神経学的、神経変性、

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、クリプトウイルス及びオ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、例えば、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。（例えば、B. Malfroy Camine, Method for increasing blood brain barrier permeability by administering a bradykinin agonist of blood brain 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、Inamura, 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 monocrySTALLINE particles delivered intrarterially 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, Longterm 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 (

10

20

30

40

50

RMP-7を使用する実験的脳腫瘍へのヘルペスウイルスベ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/または神経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ヌス(例えば、振戦、筋攣縮、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。

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(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。

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。

対照的に、本発明の動物モデルは、真に相同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

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 臨床試験）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試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、AV₃/SSPE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ッシングとアセンブリを標的する（例えば、F₀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、AV₃/SSPE）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（お多福風邪）ワクチンが多く个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に影響することが公知である既存の抗ウイルス薬（例えば、ピラゾール（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パ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ように、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ビ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mRNA由来のタンパク質合成、または産生されるクリプトウイルスビリオン数の減少、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一キャリア)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

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, Mo-
 lecular 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 Labo-
 ratory Press, Cold Spring Harbor, New York,
 USA (1989)、Davisら, Basic Methods in Molecu-
 lar 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 C-
 loning 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)、Oligonuc-
 leotide 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 Cel-
 l 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) (I-
 RL Press, 1986)、B. Perbal, A Practical Guid 20
 e To Molecular Cloning (分子クローニングの実用ガイド) (19
 84)、the series, Methods In Enzymology (酵素学
 方法) (Academic Press, Inc.)、Gene Transfer Ve-
 ctors 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 Spr-
 ing Harbor Laboratory), Methods in Enzymol-
 ogy (酵素学方法) 第154巻と155巻 (それぞれ、Wu and Grossma-
 nとWu編集), MayerとWalker編集 (1987), Immunoche-
 mical 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, L 30
 ondon), Scopes, (1987), Protein Purificati-
 on 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- 40 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(末梢血単核細胞: 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(AV₃)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_c)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PBM 50

NCは、フィコール - ハイパック (Ficoll-Hypaque) (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RPMI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(1000rpm x 5分)。ペレット化したPBMNCを次に 2×10^5 細胞/mLまで10%ウシ胎児血清と1mMサイクリックGMP (ナトリウム塩) を含むRPMI培地で希釈して、37℃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 (IMEMZO) (インスリン、亜鉛、HEHES緩衝液 2mM L-グルタミン、200U ペニシリン/mL、100pg 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AV₃細胞と共に、最終細胞濃度が 2×10^5 細胞/mL (培養中の全細胞) になるように播種し、37℃で再インキュベートした。いったん培養がコンフルエントに達したら(2~3日)、単層を、0.02% (重量/容量) EDTA CMF-PBS (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IMEMZO中で 2×10^5 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)コンフルエントになったときに、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、細胞質中で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CV-1細胞と共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PBMNC/AV₃培養物を最終濃度が 2×10^5 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CV-1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(CPE: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。培養がコンフルエントになる前にCPE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CPEが発生しなかった場合は、培養物は廃棄した。

いったんCPEが観察されたら、全培養物を-70℃で冷凍、解凍して、細胞を分散させて1.0mL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 (NaCMC) の半流動性溶液で重層した単層のCV-1細胞上に滴定することによりブランク精製した。この培養物を部分的CO₂大気(5% 容量/容量)中37℃でインキュベートした。ブランクは8~12日で形成され、次に前述のように選択かつ再ブランク形成させた。いったんブランクの三重精製を行ったら、ウイルスのアリコートを25~75cm²細胞培養フラスコ中のCV-1単層(5%ウシ胎児血清と前述のサプリメントを含むIMEMZO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CPE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℃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Robbinsらの方法によって滴定した。(Robbinsら, "J. Infect. Disease" 143: 396~403, 1981)。

密度勾配精製法: 増殖型 (Vero及びCV1c) 並びに非増殖型 (AV₃/SSPE) 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CsCl勾配 (ヌクレオカプシド) 上で、Robbinsらの方法によってさらに精製した (Robbinsら, "J. Infect. Disease" 143: 396~403, 1981、RappとRobbins, "Intervirology" 16: 160~167, 1981、RobbinsとRapp, "Arc

10

20

30

40

50

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、Ver o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、三重精製プラークであり、CV-1と命名されたCV-1細胞のクローン化亜株中で増殖させた。感染ウイルスの至適産生は、インスリン、亜鉛、HEHES緩衝液、2mM L-グルタミン、200U ペニシリン/mL、100μg ストレプトマイシン/mL、5~10%（容量/容量）ウシ胎児血清、pH6.8~7.0を補充したIMEZOを用いる場合に生じる。

組織培養培地中におけるインスリン、並びにオプシオ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価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うまく増殖しなかった。対照的に、霊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（1mM、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）。

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、2000rpm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10,000rpm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（10mMトリス、5mMEDTA、pH7.2）上に重層して、Beckman SW-28ローターに入れて、約130,000xG、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35,000rpm（280,000xG）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、41,000rpm、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。

【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1.0mLシリンジで、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

10

20

30

40

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。

10

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)免疫ブロット法、(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以上の同種中和力価を有した(PRD₅₀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AV₃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。

20

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「力価」は、特に決定されなかったが、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ビ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プタンパク質を強く沈降することが発見された。

30

クリプトウイルスビリオンに対して作製された抗血清と、SV5のNIH 2WR-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った。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SV5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SV5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 21005-2WR株に対して個別に作製され、またPurnell Chopplin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。

40

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パ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)交差反応性があった。

【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24Aに示すように、クリプトウイ

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 (AV₃/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要素を有する、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、AV₃/SSPE/MV (エドモントン株麻疹ウイルスで実験的に感染されたAV₃細胞と共培養されたSSPE患者のPBMNC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-1)及び非増殖型並びに持続感染細胞(AV₃/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 Felicis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

40

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-1)上での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。プラーク形成は、臨床血清検体及びウサギで産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PRD₅₀を決定するためにプラーク滴定アッセイを行った。

【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プ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

50

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 - C S F）混合物を、次に単層の感受性細胞（例えば、V e r oまたはC V - 1。）に播種して、細胞を部分的C O₂大気（例えば5 %（容積 / 容積））中37 °C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ス溶液で、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、H E P E S緩衝液、2 m M L - グルタミン、200 U ペニシリン / m L及び / または100 µ g ストレプトマイシン / m L、p H約6.8 ~ 約7.0を含む、I M E M Z O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プラーク数を次に数え上げて、P R D₅₀を計算した。

特に、各ウイルスのプラーク形成単位（P F U）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B B R株及びS V 5のN I H 21005-2 W R株のウイルスストックを無血清最少必須培地（2 m M L - グルタミン、200 U ペニシリン / m L、100 µ g ストレプトマイシン / m Lを含むイーグルM E MをN a H C O₃でp H6.8 ~ 7.0に調整したもの）で1 mLあたり1,000 P F Uの力価になるように希釈した（希釈及びプレATING後に100 P F U / 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M E M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、緩やかにボート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（N U N C）中のC V - 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C O₂インキュベーター（5 % C O₂ 容量 / 容量）内で37 °C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 m M L - グルタミン、200 U ペニシリン / m L、100 µ g ストレプトマイシン / m Lを含むイーグルM E M（N a H C O₃でp H6.8 ~ 7.0に調整））を10.0 mL重層して、動かさないようにして、C O₂インキュベーター（5 % C O₂容量 / 容量）内で37 °C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 °C] 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。単層上のプラークは、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、プラーク形成数を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S V 5、抗S V 5抗血清対クリプトウイルス及び抗S V 5抗血清対S V 5）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S V 5及び抗S V 5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S V 5抗血清対S V 5）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。 A V₃ /

10

20

30

40

50

SSPE/MV細胞（麻疹ウイルスエドモントン株で持続的且つ非増殖型感染されたAV₃/SSPE細胞）、AV₃/SSPE細胞、並びにクリプトウイルスBBR株で急性感染されたCV-1細胞は、2%ホルムアルデヒド及びピクリン酸並びに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（カバーグラス上で）インサイツ固定された。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グ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BBR株及びAV₃/SSPE細胞で急性感染されたCV-1細胞の染色薄片を電子顕微鏡で検査した。感染CV-1細胞では、直径100～120nm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15～17nm）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。AV₃/SSPE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。

AV₃/SSPE/MV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、密閉加湿チェ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（20mM トリス, 0.5M NaCl, 20mM 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（抗エドモントン麻疹ウイルスまたは抗クリプトウイルスBBR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（10～15nm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Lead（発光素子）クエン酸塩で薄く対比染色してから、JEOL 1200EX 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、ウサギ抗エドモントン麻疹ウイルスと15nm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BBR株）と10nm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（15nm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（10nm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（RIP）アッセイ： ドデシル硫酸ナトリウムゲルポリアクリルアミド電

10

20

30

40

50

気泳動 (SDS - PAGE、以下参照) により、 $[^{35}\text{S}]$ -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霊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。

CV-1、またはVero細胞単層を、他で説明されている (RobbinsとRapp, "Virology" 106:317~326, 1981) 方法を用いて、1~2 PFU/細胞の多重感染度で、クリプトウイルスのBBR株、SV5のNIH 21005-2WR株または麻疹ウイルスエドモントン株で感染した。

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MEM (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℃で60~90分インキュベートした。飢餓期間後、培養物を、100 mCi/mL $[^{35}\text{S}]$ -メチオニン (Amersham (アマシャム社)) を含有する飢餓培地で標識した。標識は、37℃、5% CO₂ 大気条件で5~6時間行った。免疫沈降法は、Lambら, "Virology" 91:60~78, 1978の方法に従って行われた。

SDS - PAGE: ビリオンと免疫沈降物は、10% (または極めて小さいペプチド種 [例えば、SH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 (Laemmli, 1970)。電気泳動後、ゲルを蛍光溶液 (Amersham) 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SDS - PAGEによって分析した (図11、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 $[^{35}\text{S}]$ -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 (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。注釈は、図面の簡単な説明で定義されている。MWが約5 kD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 (以下参照)。

SHタンパク質。明らかにSH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、SHタンパク質は、クリプトウイルスのBBR株及びSV5のNIH 21005-2WR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 (BioRad) 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 (BioRad) で染色した際に、SHタンパク質として同定された、約5 kDのM_rを有する小型タンパク質がクリプトウイルス及びSV5ビリオン調製物中に発見された。クリプトウイルスのBBR株、SV5のNIH 21005-2WR株のSHタンパク質の移動に検出可能な差異はなかった。

F₀ 及びHN の異常な同時移動。多数のルブラウイルス (例えば、SV5) の主要エンベロープタンパク質 (F₀及びHN) は、SDS - PAGE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F₀タンパク質 (即ち、+22アミノ酸) は、本タンパク質 (M_r = 69 kD) にしては有意に低い移動度を起因した。図13A、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13Aと13Bは、主要クリプトウイルスエンベロープタンパク質F₀及びHNの移動パターンの写真を示す。図13Aは、主要クリプトウイルスエンベロープタンパク質F₀及びHNの観察されたほぼ同時移動を示す。図13AのCSF陽性患者 (右レーン) からのRIPの拡大は、クリプトウイルスF₀及びHN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F₀及びHN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13Bに示す。

【0068】

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。細胞で調製）及び生存非増殖型感染 A V₃ / S S P E 細胞を使って、実験用マウス 2 系（Q u a c k e n b u s h 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、 5×10^4 P F U 無細胞クリプトウイルスまたは 5×10^3 非増殖型感染ヒト羊膜細胞（A V₃ / 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、p H 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、振戦、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。クリプトウイルスビ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 V₃ / 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 V₃ / 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：

Q u a c k e n b u s h マウス。 5×10^4 P F U 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（エドモントン株）（8 個体）を脳内接種した二腹の 1～2 日齢の Q u a c k e n b u s h 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候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、顕性な症候を発症しなかった成熟メス Q u a c k e n b u s h 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

40

【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 5×10^4 P F U 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。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

50

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ったが、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トン株、偽感染CV-1。細胞、またはホモジナイズドAV₃/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。反復行動がまた突発的に観察され、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観を維持したが、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／うなっ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った。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った。

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った（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、 $p = 0.069$ 、片側フィッシャー正確検定)。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、 $p = 0.044$ 、両側フィッシャー正確検定)。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AV₃/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AV₃/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AV₃/SSPE細胞(各6匹)または生存またはホモジナイズドAV₃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AV₃/SSPE細胞、生存AV₃細胞、またはホモジナイズドAV₃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AV₃/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AV₃/SSPE細胞、AV₃細胞、またはホモジナイズドAV₃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(F₀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。細胞において産生された[³⁵S]-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って判別された。図12Aと12Bは、SDS-PAGE(還元)後の臨床CSF検体によって[³⁵S]-メチオニン標識急性感染CV-1。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[³⁵S]メチオニン標識CV-1。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。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。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。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

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係する

クリプトウイルスは、拒食症、多発性硬化症（MS）、テンカン、亜急性硬化性全脳炎（SSPE）、自閉症、精神遅滞、情動障害、情緒異常（臨床的鬱病）、精神分裂病、強迫性神経症、躁鬱病（双極性障害）、慢性疲労症候群（CFS）、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CSF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CSF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（F₀とHN）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。

クリプトウイルス血清陽性は、必ずしもCSF陽性（即ち、CSF中のクリプトウイルスF₀及びHN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、CSF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、SSPE、MS、CFS、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。

免疫ブロット法によって分析された2つのCSF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（ELISA、図14を参照）によって分析された血清とCSF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CSF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、CSF検体中にウイルスに対する抗体を有さなかったが、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った患者のCSF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った。

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PBMC中に非増殖型、不顕性、しかし誘導可能な状態にあるウイルスを潜伏している。

個々の患者のPBMC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ったが、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PBMCのCNS中への漏入）を介して、またはその他のCNS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CNSへの漏出、トロイの馬現象）によってCNS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照は、PBMC検査を受け、そのCSF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PBMC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。

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CSF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）（NNRSB）、ロサンゼルス、CA提供）について、放射標識した急性感染CV-1。細胞からのクリプトウイルスF₀とHNタンパク質を沈降する能力についてRIP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CSF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、CNS組織の

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。

【 0 0 7 2 】

(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 12 B 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して診断された 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価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 5 2 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。E E G 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 3 6 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 2 7 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 2 3 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 1 4 才の時から情緒異常が始まり、E B V 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った。

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 6 6 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 1 7 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 5 5 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（ C F S ）と診断されていた。

30

コレクション 1 の 6 6 の C S F 検体中の 1 0 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（ 1 5 % ）。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 1 2 B を参照）。（ 2 ）成人男性 - 小脳性運動失調症（図 1 2 B を参照）、（ 3 ）女兒 - 非定型ウイルス性髄膜炎、（ 4 ）成人男性 - 刺痛、及び（ 5 ）図 1 7 に関連して説明した患者 - 水頭症、テンカン及び C F S 。

5 6 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（ 1 2 才以下）から得られた 2 0 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 1 8 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来した。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。

【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、プリズベンのMS患者に由来した。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。

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提供のその他の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AV₃/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（F₀、HN）に対する抗体を有さない小児患者の血清）によって³⁵S]-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。

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、³⁵S]-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 = ³⁵S]-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

のCSF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、SSPE CSF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HNタンパク質（レーンMV）及びクリプトウイルスのHN及びF₀タンパク質（レーンCV）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CSFサンプル（例えば、MS、CFS、またはテンカン患者由来）のいずれも、麻疹ウイルスHN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CSF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RIPプロファイルは、現在までに試験されたMS患者、CFS患者及び特発性テンカン患者の「クリプトウイルス陽性」CSFによって産生されるプロファイルに象徴的であった（図12Aと17を比較）。F₀及びHN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、F₁とF₂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係する可能性があり（即ち、F₀タンパク質は、ある患者では効率的に切断されて、F₁とF₂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】

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（CSF）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CSF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）。

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CNS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。

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CNS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）の間には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CNS兆候スペクトルははるかに広域に渡る。

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、CNS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（CNS）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。

CSF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：

- (1) 亜急性硬化性脳炎 (S S P E) : 検査された 4 つの C S F のうち 4 検体 (1 0 0 %)、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 S F のうち 6 検体 (8 5 . 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 (M S) : 試験された 3 0 の C S F のうち 2 9 検体 (9 6 . 7 %)、全て成人、並びに
- (4) 慢性疲労症候群 (C F S) / 臨床型躁鬱病 : 検査された 1 2 の C S F のうち 1 1 検体 (9 1 . 7 %)、全て成人。

これらの結果は、C S F 中のクリプトウイルス特異抗体と C N S 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 S S P E 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、初期ステージ M S は、C F S 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の特徴である。C F S 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])。

【 0 0 7 6 】

(1) 重症テンカン様疾患を患う患者の年齢 (S S P E 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、M S 及び C F S 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、S S P E 及び M S 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 (C N S 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 C N S 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。S S P E 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証) した。S S P E は、両ウイルスによる広域 C N S 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 C N S 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 M S は、C N S 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 C N S 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 S F 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を有する乳児、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を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) ウイルスが C N S 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 C N S の発生段階、(5) 感染を受けた C N S の場所、(6) 遺伝的因子 (例えば、免疫系欠損、神経機能不全、C N S 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

10

20

30

40

50

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ブ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。

【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、改訂版のルブ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 $[^{35}\text{S}]$ -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】図6は、ローダミン・イソチ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)時にブラン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)時にブラン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)時にブラン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。

【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、ルブラウイルス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。

【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、 $[^{35}\text{S}]$ -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 $[^{35}\text{S}]$ -メチオニン標識CV-1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・精製ピリオンの主要な対応構

10

20

30

40

50

造タンパク質の移動を図によって示している。

【図 1 4】図 1 4 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 4 人の血清陽性の神経科 / 神経外科患者からの C S F 検体の E L I S A を示す。

【図 1 5】図 1 5 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 C S F (C) を用いた R I P アッセイの写真である。

【図 1 6】図 1 6 は、慢性疲労症候群 (C F S) と診断された患者からの 4 つの C S F 検体を用いた R I P 分析後のオートラジオグラム写真である。

【図 1 7】図 1 7 は、「コレクション 1」(以下参照)として得られた C S F サンプルを用いた R I P 分析後のオートラジオグラム写真である。

【図 1 8】図 1 8 は、「コレクション 2」(以下参照)として得られた C S F サンプルを用いた R I P 分析後のオートラジオグラム写真である。

10

【図 1 9】図 1 9 は、(3 8 サンプル中から選ばれた) 5 人の M S 患者から得られた血清サンプルについて R I P アッセイを実施後のオートラジオグラム写真である。

【図 2 0】図 2 0 は、(3 8 サンプル中から選ばれた) 2 5 人のさらなる M S 患者から得られた血清サンプルについて R I P アッセイを実施後のオートラジオグラム写真である。

【図 2 1】図 2 1 は、1 6 人の M S 患者から得られた 1 6 の C S F 検体について R I P アッセイ実施後のオートラジオグラム写真である。

【図 2 2】図 2 2 は、6 人のオーストラリア人 S S P E 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 ~ 1 2、クリプトウイルス主要エンベロープタンパク質 (F₀、及び H N) に対する抗体を有さない小児患者の血清) によって [³⁵S]-メチオニン標識細胞から沈降されたクリプトウイルス N P タンパク質 (p 6 3) の R I P 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

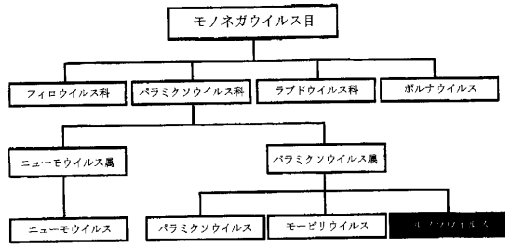
【図 2 3】図 2 3 は、S S P E と診断された年齢 1 1 才の男児からの C S F によって、[³⁵S]-メチオニン標識麻疹ウイルス感染 C V - 1。細胞 (レーン M V)、クリプトウイルス感染 C V - 1。細胞 (レーン C V)、または両方の混合物 (レーン B) から沈降された麻疹ウイルス特異的及びクリプトウイルス特異的タンパク質の R I P プロファイルのオートラジオグラム写真である。

【図 2 4】図 2 4 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。

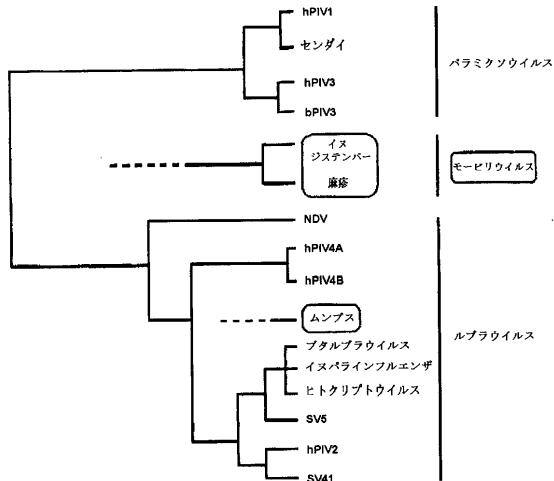
【図 2 5】図 2 5 は、持続性感染 A V₃ / S S P E / M V 細胞におけるクリプトウイルスと麻疹ウイルスの細胞内ヌクレオカプシドの分別 i m m u n o g o l d 標識の写真を示す。

30

【 図 3 】



【圖 2】



【 図 4 】

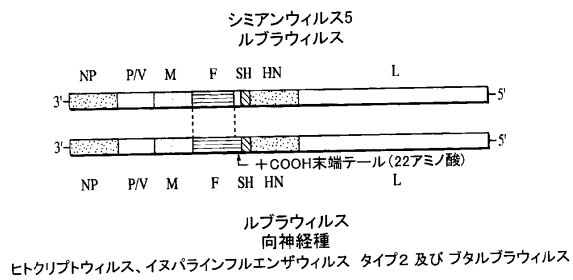
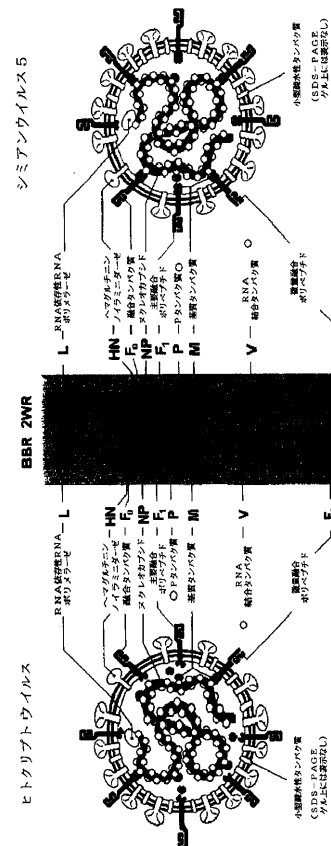
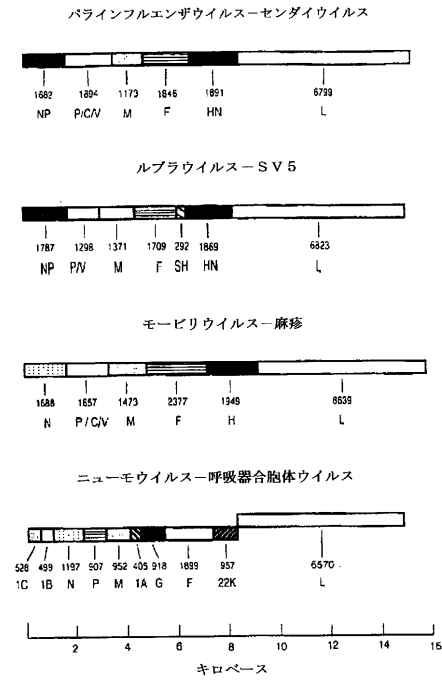


FIG. 4

【 図 5 】



【図 6】

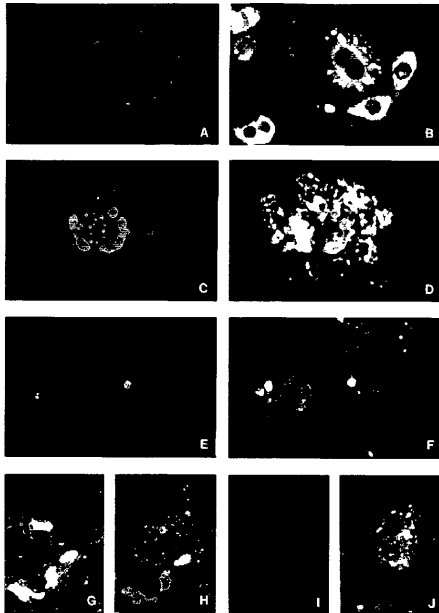


Fig. 6

【図 7】

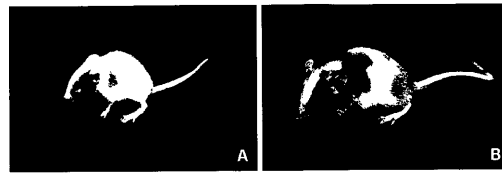


Fig. 7

【図 8】

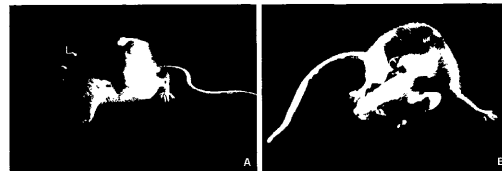


Fig. 8

【図 9 . 1】

```

00001  ACCAAGGGGA  AAATGAAGTG  GTGACTCAA  TCATCGAAGA  CCCTCGAGAT  TACATGGGTC
00001  ACCAAGGGGA  AAATGAAGTG  GTGACTCAA  TCATCGAAGA  CCCTCGAGAT  TACATGGGTC
                                NP mRNA開始 (→)

00061  CGGAACCTAT  GGCCTTCGTG  ACCGACCTCG  AGTCAGAGTA  GTTCAATAAG  GACCTATCAA
00061  CGGAACCTAT  GGCCTTCGTG  ACCGACCTCG  AGTCAGAGTA  GTTCAATAAG  GACCTATCAA

00121  GTTTGGGCAA  TTTTTCGTCC  CTGACACAAA  ATGTCATCC  GTGCTTAAAG  CATATGAGCG  Arg
00121  GTTTGGGCAA  TTTTTCGTCC  CTGACACAAA  ATGTCATCC  GTGCTTAAAG  CATATGAGCG
                                (→ NP タンパク質開始)

00181  ATTCAGCTC  ACTCAAGAAC  TGCAAGATCA  GAGTGAAGAA  GGACAATCC  CACCTACAAC  Thr
00181  ATTCAGCTC  ACTCAAGAAC  TGCAAGATCA  GAGTGAAGAA  GGTACAATCC  CACCTACAAC  Cys Gly

00241  ACTAAACCG  GTTATCAGGG  TATTTTACT  AACCTCTAAT  AATCCAGAGC  TAAGATCCCG  Val
00241  ACTAAACCG  GTTATCAGGG  TATTTTACT  AACCTCTAAT  AATCCAGAGC  TAAGATCCCG  Ile→Val

```

ページ 1 / 2 5

【図 9 . 2】

```

00301  GCTTCTTCTA  TTCTGCCTAC  GGATTGTCT  CAGTAATGGT  GCAAGGGATT  CCCATCGCTT
00301  GCTTCTTCTA  TTCTGCCTAC  GGATTGTCT  CAGTAATGGT  GCAAGGGATT  CCCATCGCTT

00361  TGGAGCAITA  CTCACAATGT  TTTGCTACC  ATCAGCTACA  ATGCTCAATC  ATGCAAAATT  Leu Ala
00361  TGGAGCAITA  CTCACAATGT  TTTGCTACC  ATCAGCTACA  ATGCTCAATC  ATGCAAAATT

00421  AGCTGACCAG  TCACCAGAAG  CTGATATCGA  AAGGTAGAG  ATCGATGCGT  TTGAGGAGGG
00421  AGCTGACCAG  TCACCAGAAG  CTGATATCGA  AAGGTAGAG  ATCGATGCGT  TTGAGGAGGG

00481  ATCATTCCGC  TTAATCCCA  ATGCTGCTC  AGGTATGACC  CGTGGAGAGA  TCAATGCCTA  Ile Ala Arg
00481  ATCATTCCGC  TTAATCCCA  ATGCTGCTC  AGGTATGACC  CGTGGAGAGA  TCAATGCCTA

00541  TGCTGCACIT  GCAGAAGATC  TACCTGACAC  ACTAACCAT  GCAACACCTT  TCGTTGATTC
00541  TGCTGCACIT  GCAGAAGATC  TACCTGACAC  ACTAACCAT  GCAACACCTT  TCGTTGATTC

00601  CGAAGTCGAG  GGAAGTCAT  GGAAGGAGAT  TGAGACTTTC  TTAGATATGT  GTTACAGTGT  Asp
00601  CGAAGTCGAG  GGAAGTCAT  GGAAGGAGAT  TGAGACTTTC  TTAGATATGT  GTTACAGTGT

00661  CCTAATGCAG  GCATGGATAG  TGACTTGCAA  GTGCATGACT  GCGCCAGACC  AACCTGCTGC
00661  CCTAATGCAG  GCATGGATAG  TGACTTGCAA  GTGCATGACT  GCGCCAGACC  AACCTGCTGC

00721  TTCTATTGAG  AAACGCGCTG  AAAAAATATG  TCAGCAAGGC  AGGATCAACC  CAAGATATCT  Pro
00721  TTCTATTGAG  AAACGCGCTG  AAAAAATATG  TCAGCAAGGC  AGGATCAACC  CAAGATATCT

00781  CCTGCACCG  GAGGCTCGAC  GAATAATCCA  GAATGTAAAT  CGGAAGGGAA  TGGTGGTCAG
00781  CCTGCACCG  GAGGCTCGAC  GAATAATCCA  GAATGTAAAT  CGGAAGGGAA  TGGTGGTCAG

00841  ACATTTCCTC  ACCTTTGAAC  TGCAGCTTGC  CCGAGCACAA  AGCCTTGTAT  CAAATAGSTA
00841  ACATTTCCTC  ACCTTTGAAC  TGCAGCTTGC  CCGAGCACAA  AGCCTTGTAT  CAAATAGSTA

00901  TTATGCTATG  GTAGGGGATG  TTGGAAAGTA  TATAGAGAAT  TGTGGAATGG  GAGGCTTCTT
00901  TTATGCTATG  GTAGGGGATG  TTGGAAAGTA  TATAGAGAAT  TGTGGAATGG  GAGGCTTCTT

```

ページ 2 / 2 5

【図 9 . 3】

00961 TTGACACTA AAATATGAT TAGGAACAG ATGGCCGACA CTGGCTTAG CTGACTTTTC 1
 00961 TTGACACTA AAATATGAT TAGGAACAG ATGGCCGACA CTGGCTTAG CTGACTTTTC
 01021 AGGAGAGCTA ACAAGCTAA AGTCCTCAT GGCATTGTAC CAGACCCCTG GTGAGCAGGC 1
 01021 AGGAGAGCTA ACAAGCTAA AGTCCTCAT GGCATTGTAC CAGACCCCTG GTGAGCAGGC
 01081 CGATATTTG GCCCATTGG AGTCACCACA CTGATGGAT TTGCTGCAG CAAACTATCC 2
 01081 CGATATTTG GCCCATTGG AGTCACCACA CTGATGGAT TTGCTGCAG CAAACTATCC
 01141 ACTGCTATAT AGCTATGCTA TGGGAATAGG CTATGTGTTA GATGTCAACA TGAGGAACCTA 1
 01141 ACTGCTATAT AGCTATGCTA TGGGAATAGG CTATGTGTTA GATGTCAACA TGAGGAACCTA
 01201 CGCTTTCTCC AGATCATACA TGAACAAAGC ATATTTCCAA TTGGGAATGG AAACCTGCAAG 1
 01201 CGCTTTCTCC AGATCATACA TGAACAAAGC ATATTTCCAA TTGGGAATGG AAACCTGCAAG
 01261 AAAACACAGC GTGCGAGTTG ACATGAGGAT GGCAGAGAT CTGGCTTAA CTCAAGCCGA 1
 01261 AAAACACAGC GTGCGAGTTG ACATGAGGAT GGCAGAGAT CTGGCTTAA CTCAAGCCGA
 01321 ACGCACCGAG ATGGCAAAAT CACTTGCCAA ATTGACCACA GCAAAATGAG GGGCAGACAC 1
 01321 ACGCACCGAG ATGGCAAAAT CACTTGCCAA ATTGACCACA GCAAAATGAG GGGCAGACAC
 01381 CAGGGGAGGA GTCAACCCGT TCTCATCTGT CACTGGGACA ACTCAGTGC CCCTGTCAGC 1
 01381 CAGGGGAGGA GTCAACCCGT TCTCATCTGT CACTGGGACA ACTCAGTGC CCCTGTCAGC
 01441 AACAGGTGAC ACATCTCGGA GTTACATGCG AGCGATCGCA CTGAGGCAGA GATATGCTGA 1
 01441 AACAGGTGAC ACATCTCGGA GTTACATGCG AGCGATCGCA CTGAGGCAGA GATATGCTGA
 01501 TGCAGGCACC CATGATGATG AGATGCCACC ATTGAAGAG GAGGAAGAGG ACGACACATC 1
 01501 TGCAGGCACC CATGATGATG AGATGCCACC ATTGAAGAG GAGGAAGAGG ACGACACATC
 01561 TGCAGGTCCA CGCACTGAGC CAACTCTTGA ACAAGTGGCC TTGGACATCC AGAACGACGC 3
 01561 TGCAGGTCCA CGCACTGAGC CAACTCTTGA ACAAGTGGCC TTGGACATCC AGAACGACGC
 ページ 3 / 25

【図 9 . 4】

01621 AGTTGGAGCT CCATCCATA CAGAGGACCT GAATGCCGA CTAGTGATC TTGACATCTA 2
 01621 AGTTGGAGCT CCATCCATA CAGAGGACCT GAATGCCGA CTAGTGATC TTGACATCTA
 01681 ACAATTGAG ATCCCAATCC TAAATTGATA TACCTATTG ATTATTTAGA TGGAACTACA 3
 01681 ACAATTGAG ATCCCAATCT AAAATTGACA TACCTATTG ATTATTTAGA TGGAACTACA
 01741 GTGGATTCCA TAAGGTTCCT GCTTACCATC GGTCTTAAAG AAAAATTTG GCCCGACGG 1
 01741 GTGGATTCCA TAAGGTTCCT GCTTACCATC GGTCTTAAAG AAAAATTTG GCCCGACGG
 01801 GTTAGCAACA AGCGACTGCC GATGCCAACA GCGCAATCCA CAACTACAA TGGATCCAC 1
 01801 GTTAGCAACA AGCGACTGCC GATGCCAACA GCGCAATCCA CAACTACAA TGGATCCAC
 01861 TGATCTGAGC TTCTCCCGAG ATGAGATCAA TAAGTCTATA GAGACAGGCC TGAATACTGT 1
 01861 TGATCTGAGC TTCTCCCGAG ATGAGATCAA TAAGTCTATA GAGACAGGCC TGAATACTGT
 01921 GCAGTATTTT ACTTCCCAAC AAGTACAGG AACATCTCTT CTGGAAAGA ATACATACC 1
 01921 AGAGTATTTT ACTTCCCAAC AAGTACAGG AACATCTCTT CTGGAAAGA ATACATACC
 01981 ACCAGGGGTC ACAGGACTAC TAACCAATGC TGCAGAGGCA AAGATCCAAG AGTCAATCAA 2
 01981 ACCAGGGGTC ACAGGACTAC TAACCAATGC TGCAGAGGCA AAGATCCAAG AGTCAATCAA
 02041 CCATCAGAAAG GGTCTCAGTG GTGGGGGTAC AAACCCAAAG AAACCCGCGG CAAAATTTGC 4
 02041 CCATCAGAAAG GGTCTCAGTG GTGGGGGTGC AAACCCAAAG AAACCCGCGG CAAAATTTGC
 02101 CATTGTGCGA GCAGATGACA AAACAGTGCC GGAAGAGCGG ATCCCAAAAC CTCTACTAGG 2
 02101 CATTGTGCGA GCAGATGACA AAACAGTGCC GGAAGAGCGG ATCCCAAAAC CTCTACTAGG
 02161 TCTGAGCTCC ACCCGAGCA CCCAAAGCTG GCTTGATCTA AGTGGAAAA CATTACATC 1
 02161 TCTGAGCTCC ACCCGAGCA CCCAAAGCTG GCTTGATCTA AGTGGAAAA CATTACATC
 ページ 4 / 25

【図 9 . 5】

02221 AGGATCCTAT AAGGGGGTTA AGCTTGGGAA ATTGGGAAA GAAATCTGA TGACACGGTT 1
 02221 AGGATCCTAT AAGGGGGTTA AGCTTGGGAA ATTGGGAAA GAAATCTGA TGACACGGTT
 02281 CATCGAGGAA CCGACAGAGA ATCTATGCG AACCACTGCC CCATCGATT TTAAGAGGGG 1
 02281 CATCGAGGAA CCGACAGAGA ATCTATGCG AACCACTGCC CCATCGATT TTAAGAGGGG
 02341 CAGGGATACC GCGGGTTCC ATAGAAGGA GTACTCAATC GGATGGGTGG GAGATGAAGT 2
 02341 CAGGGATACC GCGGGTTCC ATAGAAGGA GTACTCAATC GGATGGGTGG GAGATGAAGT
 02401 CAAGGTCACT GAGTGTGCGA ATCCATCTG TTCTCCATC ACCGCTGCAG CAAGGCGATT 1
 02401 CAAGGTCACT GAGTGTGCGA ATCCATCTG TTCTCCATC ACCGCTGCAG CAAGGCGATT
 02461 TAAATGCACT TGTCACTGAT GTCCAGTGC TTGCTCTGAA TGTGAACGAG ATACTTAA 2
 02461 TGAATGCACT TGTCACTGAT GTCCAGTGC TTGCTCTGAA TGTGAACGAG ATACTTAA
 02521 CAGTGAGAAA TTGGACTCT CGATGAATC AACTGGAGAC AAAGTAGAT CGCATCTCT 1
 02521 CAGTGAGAAA TTGGACTCT CGATGAATC AACTGGAGAC AAAGTAGAT CGCATCTCT
 02581 CATCTCAGT TCTAATCAG ACCATCAAG ATGACATAA TGGACTTAAA GCGGGGATG 1
 02581 CATCTCAGT TCTAATCAG ACCATCAAG ATGACATAA TGGACTTAAA GCGGGGATG
 02641 CTACTTTAGA AGGAATGATT ACAACTGGA AAATCATGGA CCGGGGAGTT CCGAGTAATG 1
 02641 CTACTTTAGA AGGAATGATT ACAACTGGA AAATCATGGA CCGGGGAGTT CCGAGTAATG
 02701 TTAAGTGGGA AGATGTACGC AGAAGAACTA GTAACCATGC TGTGTGTG CCAGAAATCAT 1
 02701 TTAAGTGGGA AGATGTACGC AGAAGAACTA GTAACCATGC TGTGTGTG CCAGAAATCAT
 02761 TCAATGATAG TTCTTGACT CAATCTGAG ATGTAATTTT ACTTGATGAG TTGGCTGAC 1
 02761 TCAATGATAG TTCTTGACT CAATCTGAG ATGTAATTTT ACTTGATGAG TTGGCTGAC
 02821 CAACTGCAAC AAGTGTTAG AAGATTGTA GGAAGGTTCC TCTCAGAGG GATCTGACTG 1
 02821 CAACTGCAAC AAGTGTTAG AAGATTGTA GGAAGGTTCC TCTCAGAGG GATCTGACTG
 ページ 5 / 25

【図 9 . 6】

02881 GATTGAGAT CACACTAGAG CAATTGGCAA AGGATTGCAT CAGCAACCG AAGATGAGGG 1
 02881 GATTGAGAT TACACTAGAG CAATTGGCAA AGGATTGCAT CAGCAACCG AAGATGAGGG
 02941 AAGATATCT CCTCAAGATC AACCAAGGCT CTAGTGAGG TCACTAATG GACCTCAAGA 3
 02941 AAGATATCT CCTCAAAATC AACCAAGGCT CCAATGAGG TCACTAATG GACCTCAAGA
 03001 AAGCAATCAT CCGCATGCA ATTTGCAAA GAAACACCA ATTACACTAC ACTGATATGA 1
 03001 AAGCAATCAT CCGCATGCA ATTTGCAAA GAAACACCA ATTACACTAC ACTGATATGA
 03061 CACTGTACTA ACCCTGAGG TTTTAGAAAA AGCGATTAC GATAAATAA CCGCAACACT 1
 03061 CACTGTACTA ACCCTGAGG TTTTAGAAAA AGCGATTAC GATAAATAA CCGCAACACT
 03121 ACATCTACC TGAGGCAGCC ATCCATCCA TCAGCATTC CCGACAGCCC ACCAATCCAC 1
 03121 ACACACTACC TGAGGCAGCC ATCCATCCA TCAGCATTC CCGACAGCCC ACCAATCCAC
 03181 GTCAATCAAT AAAAGCGTTC CCAATTGTGA TTAACAGTGA TGGGGGTGAG AAAGGCGGCT 1
 03181 GTCAATCAAT AAAAGCGTTC CCAATTGTGA TTAACAGTGA TGGGGGTGAG AAAGGCGGCT
 03241 TGGTTAAACA ACTACGTACA ACCTACTTGA ATGACCTAGA TACTCATGAG CCACTGGTGA 1
 03241 TGGTTAAACA ACTACGTACA ACCTACTTGA ATGACCTAGA TACTCATGAG CCACTGGTGA
 03301 CATTCTTAAA TACCTATGGA TTCTATCAG AACAGATGG GGGGAATGCC ATTGTCCGAG 3
 03301 CATTCTTAAA TACCTATGGA TTCTATCAG AACAGATGG GGGGAATGCC ATTGTCCGAG
 03361 AGGATCACT TGGGAAGAAA AGAGAGGCTG TGACGCTGC AATGCTTACC CTGGATGTC 1
 03361 AGGATCACT TGGGAAGAAA AGAGAGGCTG TGACGCTGC AATGCTTACC CTGGATGTC
 03421 GGCCTAATCT ACCATCAITA GGAATGTCC TGAACAACT GAGTGAATTC CAACTCAITG 3
 03421 GGCCTAATCT ACCATCAITA GGAATGTCC TGAACAACT GAGTGAATTC CAACTCAITG
 ページ 6 / 25

【図 9 . 7】

03481 TTAGGAAGAC ATCCAGCAA GCGGAAGAGA TGGTCTTGA AATTGTTAAG TATCCGAGAA
 03481 TTAGGAAGAC ATCCAGCAA GCGGAAGAGA TGGTCTTGA AATTGTTAAG TATCCGAGAA

03541 TATTTGGGG TCATACATTA ATCCAGAAG GACTAGTCTG TGTCTCCGCA GAAAAATTG
 03541 TATTTGGGG TCATACATTA ATCCAGAAG GACTAGTCTG TGTCTCCGCA GAAAAATTG

Ile→Val
 03601 TTAAGTCACC AGGGAAGTA CAATCTGGAA TGGACTATCT CTTCATTCCG ACATTCTCTG 1
 03601 TTAAGTCACC AGGGAAGTA CAATCTGGAA TGGACTATCT CTTCATTCCG ACATTCTCTG

Tyr
 03661 CACTGACTTA TGTCTCAGCT GCAATCAAA TTCAGGTACC TGGGCCCATG TTGAAATGA 1
 03661 CACTGACTTA TGTCTCAGCT GCAATCAAA TTCAGGTACC TGGGCCCATG TTGAAATGA

Arg
 03721 GGTCAAGATA CACTCAGGC TTCAACTTG AACTAATGAT AAGAATCCTG TGTAAAGCCG 1
 03721 GATCAAGATA CACTCAGGC TTCAACTTG AACTAATGAT AAGAATCCTG TGTAAAGCCG

Thr→Ile
 03781 ATTGCCACT TATGAAGTC CATATCCCTG ACAAGGAGG AAGAGGATGT CTGTATCAG 1
 03781 ATTGCCACT TATGAAGTC CATATCCCTG ACAAGGAGG AAGAGGATGT CTGTATCAG

03841 TATGGCTGCA TGTATGCAAC ATCTTCAAA CAGGAACAA GAATGGCAGT GAGTGGCAGG
 03841 TATGGCTGCA TGTATGCAAC ATCTTCAAA CAGGAACAA GAATGGCAGT GAGTGGCAGG

03901 AATACTGGAT GAGAAAGTGT GCTAACATGC AACTTGAAGT GTGATTGCA GATATGTGGG
 03901 AATACTGGAT GAGAAAGTGT GCTAACATGC AACTTGAAGT GTGATTGCA GATATGTGGG

03961 GACCAACTAT CATAAATCAT GCCAGAGGTC ACATTCCCAA AAGTGCTAAG TTGTTTTTGG
 03961 GACCAACTAT CATAAATCAT GCCAGAGGTC ACATTCCCAA AAGTGCTAAG TTGTTTTTGG

Val→Ile
 04021 GAAAGGTTGG ATGAGGCTGC CATCCACTTC ACGAAATTTG TCCAAGTCTC ACTAAACAC 1
 04021 GAAAGGTTGG ATGAGGCTGC CATCCACTTC ACGAAATTTG TCCAAGTCTC ACTAAACAC

Val Glu
 04081 TATGGTCCGT AGGTTCTGAA ATTACAAGG CGAAGGCAAT AATACAAGAG AGTAGCATCT 2
 04081 TATGGTCCGT AGGTTCTGAG ATTACAAGG CGAAGGCAAT AATACAAGAG AGTAGCATCT

ページ 7 / 25

【図 9 . 8】

04141 CTCTTCTGCT GGAGACTACT GACATCATAA GTCCAAAAGT TAAAAATTCA TCTAAGCATC 1
 04141 CTCTTCTGCT GGAGACTACT GACATCATAA GTCCAAAAGT CAAAATTTCG TCTAAGCATC

Val→Gly Leu
 04201 GCGGCTTTGG GAAATCAAA TGGGGTCTGT TCAAGAAAAC TAAATCACTA CTTAACCTTA 2
 04201 GCGGCTTTGT GAAATCAAA TGGGGTCTGT TCAAGAAAAC TAAATCACTG CTTAACCTGA

04261 CGAGCTTGA ATGACTGACC TCTAATCGAG ATTACACCAA CTCAACTAT AGGTGGGTAG 5
 04261 CGAGCTTGA ATGACTGACC TCTAATCGAG ACTACACCCG CGCAAACTAT AGGTGGGTGG

Mタンパク質停止 ←
 04321 TACCCGAGTG ATTAATCTGT CAACCTACTGA TCGTTGGCTA CAACACACCA ATATTATCCA 4
 04321 TACCTCAGTG ATTAATCTGT TAAGCACTGA TCGTAGGCTA CAACACACTA ATATTATCCA

04381 GATTAGAGAG CTAAATTAAC TCTGTATTAA TAATAACACT ACTATTCCAA TAACCTGGAAT 1
 04381 GATTAGAGAG CTAAATTAGC TCTGTATTAA TAATAACACT ACTATTCCAA TAACCTGGAAT

04441 TACCAGCTTG ATTATCTCC AAAATGATTC AAAGAAATCA GATCATATTA AGACTACCT 3
 04441 CACCAGCTTG ATTATCTCC AAAATGATTC AAAGAAATCA AATCATATTA AGACTATCCT

Gly→Ser Phe→Ser
 04501 AAGCAGCAAC CCATATCGTC CTTCAAATCA TGAACCACTAT AATTCATCT CTGGTGGTCT 3
 04501 AAGCAGCAAC CCATATCGTC CTTCAAATCA TGGGTACTAT AATTCATCT CTGGTGGTCT

→ F mRNA開始 → Fタンパク質開始
 04561 CCTGTCTATT GGCAGGAGCA GGCAGCCTTG ATCCAGCAGC CCTCATGCAA ATCGGTGTCA
 04561 CCTGTCTATT GGCAGGAGCA GGCAGCCTTG ATCCAGCAGC CCTCATGCAA ATCGGTGTCA

04621 TTCCAACAAA TGTCCGGCAA CTATGTATT ATACTGAGCG CTCATCAGCA TTCATTGTG 1
 04621 TTCCAACAAA TGTCCGGCAA CTATGTATT ATACTGAGCG CTCATCAGCA TTCATTGTG

04681 TGAAGTTAAT GCCTACAATT GACTGCCGCA TTAGTGGATG TAATATAACA TCAATTTCAA
 04681 TGAAGTTAAT GCCTACAATT GACTGCCGCA TTAGTGGATG TAATATAACA TCAATTTCAA

04741 GCTATAATGC AACAGTGACA AAACCTCTAC AGCCGATCGG TGAGAAATTG GAGACGATTA
 04741 GCTATAATGC AACAGTGACA AAACCTCTAC AGCCGATCGG TGAGAAATTG GAGACGATTA

ページ 8 / 25

【図 9 . 9】

04801 GGAACCAATT GATTCCAAT CGAGGAGAC GCGGTTTTG AGGGTGGTG ATTGGATTAG
 04801 GGAACCAATT GATTCCAAT CGAGGAGAC GCGGTTTTG AGGGTGGTG ATTGGATTAG

Gln Val Val
 04861 CTGCATTAGG AGTAGTACT GCCGACAGAG TCACTGCCG AGTAGCACTA GTTAAGGCCA 3
 04861 CTGCATTAGG AGTAGTACT GCCGACAGAG TCACTGCCG AGTAGCACTA GTTAAGGCCA

Ala→Thr
 04921 ATGAAATATG TGGGGCTATA CTCAAATCTCA AATATGCAAT CCAAAAAACA AATGCAGCAG 1
 04921 ATGAAATATG TGGGGCTATA CTCAAATCTCA AATATGCAAT CCAAAAAACA AATGCAGCAG

04981 TTGCAGATGT GGTCCAGGCC ACACAATCAC TAGGAACGCC AGTTCAAGCA GTTCAAGATC
 04981 TTGCAGATGT GGTCCAGGCC ACACAATCAC TAGGAACGCC AGTTCAAGCA GTTCAAGATC

Val→Ile
 05041 ACATAAAGAG TGTGTAAGT CCAGCAATTA CAGCAGCCAA TTGTAAGGCC CAAGATGCTA 1
 05041 ACATAAAGAG TGTGTAAGT CCAGCAATTA CAGCAGCCAA TTGTAAGGCC CAAGATGCTA

Thr
 05101 TCATTGGCTC AATCTCAAT CTCTATTGA CGAGTTGAC AACTCTTTC CAAATCAAAA 1
 05101 TCATTGGCTC AATCTCAAT CTCTATTGA CGAGTTGAC AACTCTTTC CAAATCAAAA

Pro
 05161 TTACAAACCC TGCATTAGT CCTATTACAA TTCAAGCTTT AAGGATCCTA CTGGGGAGTA 1
 05161 TTACAAACCC TGCATTAGT CCTATTACAA TTCAAGCTTT AAGGATCCTA CTGGGGAGTA

05221 CCTTGGCAG TGTGGTCGAA AATCTTTCA ATACCCAGAT AAGTGCAGCT GAGCTTCTCT
 05221 CCTTGGCAG TGTGGTCGAA AATCTTTCA ATACCCAGAT AAGTGCAGCT GAGCTTCTCT

Leu
 05281 CATCAGGCTT GTTGACAGC CAGATTCTGG GATTAGATT GACCTATATG CAGATGGTCA 1
 05281 CATCAGGCTT GTTGACAGC CAGATTCTGG GATTAGATT GACCTATATG CAGATGGTCA

05341 TAAAAATTGA GTGCCAACT TTAAGTGTAC AACCTGCAAC CCAGATCATA GATCTGGCCA
 05341 TAAAAATTGA GTGCCAACT TTAAGTGTAC AACCTGCAAC CCAGATCATA GATCTGGCCA

Met→Ile
 05401 CCATTTCTGC ATTCAATTAAC AATCAAGAG TCATGGCCCA ATTACAACA CGGTGTATG 1
 05401 CCATTTCTGC ATTCAATTAAC AATCAAGAG TCATGGCCCA ATTACAACA CGGTGTATG

ページ 9 / 25

【図 9 . 10】

05461 TGACTGGCAG CTTGATCCAA GCCTATCCCG CATCGCAATG CACTATTACA CCCAACACTG 1
 05461 TGACTGGCAG CTTGATCCAA GCCTATCCCG CATCGCAATG CACTATTACA CCCAACACTG

Thr
 05521 TGTACTGTAG GTATAATGAT GCCCAAGTAC TCTCAGATGA TACGATGGCT TGGCTCCAA 1
 05521 TGTACTGTAG GTATAATGAT GCCCAAGTAC TCTCAGATGA TACTATGGCT TGGCTCCAA

05581 GTAACCTGAC AAGATGCACC TTCTCTCCAG TGGTGGGAG CTTTCTCACT CGATTCTGTC
 05581 GTAACCTGAC AAGATGCACC TTCTCTCCAG TGGTGGGAG CTTTCTCACT CGATTCTGTC

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

Ala Tyr→His
 05701 CTGCTGTGAT CCTACAGCG AGTTCAATCC CTGTAACTGT CATTGACATG GCAATATGTC 2
 05701 CTGCTGTGAT CCTACAGCG AGTTCAATCC CTGTAACTGT CATTGACATG TACAAATGTC

Asn→Asp
 05761 TGAGTCTGCA GCTTGACGAT CTCAGATTCA CCATCACTCA ATTGCCCAAT GTAACCTACA 1
 05761 TGAGTCTGCA GCTTGACGAT CTCAGATTCA CCATCACTCA ATTGCCCAAT GTAACCTACA

Ser→Thr Ser→Pro
 05821 ATAGCACCAT CAAGCTTGAA ACATCCGAGA TCTTGGCTAT TGATCCGTTG GATATATCCC 2
 05821 ATAGCACCAT CAAGCTTGAA TCATCCGAGA TCTTGGCTAT TGATCCGTTG GATATATCCC

Gln Leu
 05881 AGAATTATAG TGGGGTGAAT AAGAGTCTAA GTGATGCACT ACAACACTTA GCACAAGGTG 2
 05881 AAAATCTAGC TGGGGTGAAT AAGAGTCTAA GTGATGCACT ACAACACTTA GCACAAGGTG

Tyr
 05941 ACACATAGCT TTCTGCAATC ACATCAGCTA CGACTACAAG TGTATTATCC ATAATAGCAA 1
 05941 ACACATATCT TTCTGCAATC ACATCAGCTA CGACTACAAG TGTATTATCC ATAATAGCAA

06001 TCTGTCTTGG ATCGTTAGGT TTAATATTAA TAATCTTGT CAGTGTAGTT GTGTGGAAGT
 06001 TCTGTCTTGG ATCGTTAGGT TTAATATTAA TAATCTTGT CAGTGTAGTT GTGTGGAAGT

ページ 10 / 25

【図 9. 1 1】

06061 TATTGACCAT TGTGGTGGCT AATCGAATA GAATGGAGAA TTTGTCTTAT CATTAATTGAG 3
 06061 TATTGACCAT TGTGGTGGCT AATCGAATA GAATGGAGAA TTTGTCTTAT CATTAATTGAG 3
 シミアンウイルス 5W3 A株 Fタンパク質停止 ←
 06121 CATTCACCA CCGACGATCT GATCTCAGTG AGAAAAATCA ACCTGCAACT CTGGGAACAA 1
 06121 CATTCACCA CCGACGATCT GATCTCAGTG AGAAAAATCA ACCTGCAACT CTGGGAACAA 1
 ヒトクリプトウイルス BBR株 Fタンパク質停止
 06181 GATTAAGACAG TCATCCATTA GTAATCTCAA AGAAAAATC GATGGACCG AACTAGTAGT 4
 06181 GATTAAGACAG TCATCCATTA GTAATCTCAA AGAAAAATC GATGGACCG AACTAGTAGT 4
 F mRNAの終止 ← → SH mRNA開始
 06241 TGAAGAAGCT GTCTCGGTCA ATTTAGGTAA TCGAGCTGAT ACCGTCTCGG AAAGCTCAAA 2
 06241 TGAAGAAGCT GTCTCGGTCA ATTTAGGTAA TCGAGCTGAT ACCGTCTCGG AAAGCTCAAA 2
 Lys Ala→Thr
 06301 TCATCTGCTGCT TGATCCGGAA GATCCGGAAA GCAAAAAGC TACAAGGAGA ACAGGAAACC 2
 06301 TCATCTGCTGCT TGATCCGGAA GATCCGGAAA GCAAAAAGC TACAAGGAGA ACAGGAAACC 2
 → SHタンパク質開始
 06361 TAATTATCTG CTTCCTATTC ATCTCTCTTC TGTGTGTAAC CTTCATTGTT CCAACTCTAA 1
 06361 TAATTATCTG CTTCCTATTC ATCTCTCTTC TGTGTGTAAC CTTCATTGTT CCAACTCTAA 1
 Leu Ser
 06421 GACACTTGGT ATCTGATAC CTGCGATAGG CTATCCACTG CATCATCTCT TCTGCCATAC 4
 06421 GACACTTGGT ATCTGATAC CTGCGATAGG CTATCCACTG CATCATCTCT TCTGCCATAC 4
 SHタンパク質停止 ←
 06481 TTCTACTCA CATCATATCT ATTTAAAGA AAAAGTGGC CGGAACACTA ATCGTGCCGG 1
 06481 TTCTACTCA CATCATATCT ATTTAAAGA AAAAGTGGC CGGAACACTA ATCGTGCCGG 1
 SH mRNAの終止 ← → HN mRNAの開始
 06541 CAGTGGCACT GCACACACAA CACTACACAT ACRATACACT ATATCTGATT CAGAAGATGC 1
 06541 CAGTGGCACT GCACACACAA CACTACACAT ACRATACACT ACRATGCTG CAGAAGATGC 1
 → HNタンパク質開始
 06501 CCCTGTTAAG GGCACCTTGGC GAGTATTATT TCGACAACA ACTTTAATTT TCTCATGCAC 4
 06501 CCCTGTTAAG GGCACCTTGGC GAGTATTATT TCGACAACA ACTTTAATTT TCTCATGCAC 4
 Arg→Lys Ala→Gly Arg Ile
 ページ 1 1 / 2 5

【図 9. 1 2】

06661 ACTACTAGCA TTAAGCATCT CTATCCTTTA TGAGAGTTTA ATAACCCAAA AGCAAAATCAT 1
 06661 ACTACTAGCA TTAAGCATCT CTATCCTTTA TGAGAGTTTA ATAACCCAAA AGCAAAATCAT 1
 Ser Ser→Gly Ile
 06721 GAGTCAAGCA GGCTCAACTG GATCTAATTC TGGATTAGGA GGTATCTACTG ATCTCTCTAA 3
 06721 GAGTCAAGCA GGCTCAACTG GATCTAATTC TGGATTAGGA AGTATCTACTG ATCTCTCTAA 3
 Leu
 06781 TAATATTCTT TCTGTGCGAA ATCAGATTAT ATATACTCTT GCAGTGCCTC TACCTCTACA 1
 06781 TAATATTCTT TCTGTGCGAA ATCAGATTAT ATATACTCTT GCAGTGCCTC TACCTCTACA 1
 06841 ATTGGACACT CTTGAATCAA CACTCCTTAC AGCCATTAA TCTCTTCAAA CCAAGTGACAA 1
 06841 ATTGGACACT CTTGAATCAA CACTCCTTAC AGCCATTAA TCTCTTCAAA CCAAGTGACAA 1
 Ser→Gly
 06901 GCTAGAAGCA AACCTGCTGT GGGGTGCTGC ACTGATTAA TATAATAGAT ACATTAAATG 1
 06901 GCTAGAAGCA AACCTGCTGT GGGGTGCTGC ACTGATTAA TATAATAGAT ACATTAAATG 1
 Phe
 06961 CATCAATCAG TTCATTTTCT CAATTGCTGA GGGTGGCAAT CTGACACTTG GCCCACTTCT 1
 06961 CATCAATCAG TTCATTTTCT CAATTGCTGA GGGTGGCAAT CTGACACTTG GCCCACTTCT 1
 Met→Ile
 07021 TAATATACCT AGTTTCATTC CAACTGCCAC GACACAGAG GGTGCGACA GATGCCATC 1
 07021 TAATATGCTT AGTTTCATTC CAACTGCCAC GACACAGAG GGTGCGACA GATGCCATC 1
 Thr
 07081 ATTCTGCTC ACTAAGACAC ACTGGTGTGA TACGACAAAT GTTATCTGTA ATGGATGCCA 1
 07081 ATTCTGCTC ACTAAGACAC ACTGGTGTGA TACGACAAAT GTTATCTGTA ATGGATGCCA 1
 07141 GGATCATGTA TCCTCAATC AATTGTGTTT CATGGGAATC ATTGAACCCA CTCTGCGCG 1
 07141 GGATCATGTA TCCTCAATC AATTGTGTTT CATGGGAATC ATTGAACCCA CTCTGCGCG 1
 Phe→Ser
 07201 GTTCCATCTT TTTCGAACCT TAAAGACTCT ATATCTCAGC GATGGGCTCA ATCGTAAGAG 1
 07201 GTTCCATCTT TTTCGAACCT TAAAGACTCT ATATCTCAGC GATGGGCTCA ATCGTAAGAG 1
 Val
 07261 CTGCTCTATC AGTACAGTTC CGGGGGGTG TATGATGTAC TGTTTTGTCT CTACTCAACC 1
 07261 CTGCTCTATC AGTACAGTTC CGGGGGGTG TATGATGTAC TGTTTTGTCT CTACTCAACC 1
 ページ 1 2 / 2 5

【図 9. 1 3】

07321 AGAGAGGGAT GACTACTTTT CTACCGCTCC TCCAGAACAA CGAATTATTA TAATGTACTA 1
 07321 AGAGAGGGAT GACTACTTTT CTACCGCTCC TCCAGAACAA CGAATTATTA TAATGTACTA 1
 Asp
 07381 TAATGATACA ATCGTGGAGC GCATTAATTA TCCACCGGGG GTACTAGATG TATGGGCAAC 1
 07381 TAATGATACA ATCGTGGAGC GCATTAATTA TCCACCGGGG GTACTAGATG TATGGGCAAC 1
 07441 ATTGAACCCA GGAACAGGAA SCGGGGTATA TTATTAGGT TGGGTGCTCT TTCAATATA 1
 07441 ATTGAACCCA GGAACAGGAA SCGGGGTATA TTATTAGGT TGGGTGCTCT TTCAATATA 1
 Gly→Asn Phe Ile
 07501 TGGCGGCGTG ATTAATAATA CGAGTTTATG GAATAATCAA GCAATAAAT ACTTCATGCC 4
 07501 TGGCGGCGTG ATTAATAATA CGAGTTTATG GAATAATCAA GCAATAAAT ACTTCATGCC 4
 07561 CCAGATGGTT GCTGCTCTCT GCTCAACAAA CCAGCAACT CAAGTCCAAA ATGCTAAGTC 1
 07561 CCAGATGGTT GCTGCTCTCT GCTCAACAAA CCAGCAACT CAAGTCCAAA ATGCTAAGTC 1
 Cys
 07621 ATCATACTAT AGCAGCTGGT TTGGCAATCG AATGATTCAG TCTGGGATCC TGGCATGCC 1
 07621 ATCATACTAT AGCAGCTGGT TTGGCAATCG AATGATTCAG TCTGGGATCC TGGCATGCC 1
 Arg→Gln
 07681 TCTTCAACAG GATCTAACCA ATGAGTGTTC AGTCTGCCCC TTTTCTAATG ATCAGGTGCT 1
 07681 TCTTCAACAG GATCTAACCA ATGAGTGTTC AGTCTGCCCC TTTTCTAATG ATCAGGTGCT 1
 Tyr
 07741 TATGGGTGCT GAAGGGAGAT TATATAIGTA TGGTGACTCG GGTATTACT ACCAAGAGAG 1
 07741 TATGGGTGCT GAAGGGAGAT TATATAIGTA TGGTGACTCG GGTATTACT ACCAAGAGAG 1
 07801 CAATAGTTGG TGGCTATGTA CCATGCTGTA TAAGTAACG ATAACATTTA CTAATGTGTA 1
 07801 CAATAGTTGG TGGCTATGTA CCATGCTGTA TAAGTAACG ATAACATTTA CTAATGTGTA 1
 Ser
 07861 GCCATCGCT ATATCAGCTC AGAATGTGCG CACACAGAG GTCCCTAGAG CTGGGACAGG 1
 07861 GCCATCGCT ATATCAGCTC AGAATGTGCG CACACAGAG GTCCCTAGAG CTGGGACAGG 1
 Ala Ala
 07921 AGACTGCTTT GCAACCAATA GATGTCGCGG TTTTGTGCTG ACAGGAGTGT ATGCTGATGC 1
 07921 AGACTGCTTT GCAACCAATA GATGTCGCGG TTTTGTGCTG ACAGGAGTGT ATGCTGATGC 1
 ページ 1 3 / 2 5

【図 9. 1 4】

07981 TTGGTTACTG ACCAACCCCTT CGTCTACCAG TACATTGGA TCGAAGCAAA CCTTCACTGG 2
 07981 TTGGTTACTG ACCAACCCCTT CGTCTACCAG TACATTGGA TCGAAGCAAA CCTTCACTGG 2
 Thr→Ala
 08041 TTCTTATCTC AACCGACCAA CTCAGCGTAT CAATCCGAGC ATGTATATCG CGAACACAC 1
 08041 TTCTTATCTC AACCGACCAA CTCAGCGTAT CAATCCGAGC ATGTATATCG CGAACACAC 1
 08101 ACAGATCATA AGCTCACAGC AATTGGATC AAGCGGTCAA GAAGCAGCAT ATGGCCACAC 1
 08101 ACAGATCATA AGCTCACAGC AATTGGATC AAGCGGTCAA GAAGCAGCAT ATGGCCACAC 1
 Thr
 08161 AACCTGTGTT AGGGACACAG GCTCTGTAT GGTATCTGT ATCTATATTA TTGAATTGTC 1
 08161 AACCTGTGTT AGGGACACAG GCTCTGTAT GGTATCTGT ATCTATATTA TTGAATTGTC 1
 08221 CTCATCTCTC TTAGGACAA TTCAGATTGT CCCATTATC CGTCAGGTGA CACTATCTCA 1
 08221 CTCATCTCTC TTAGGACAA TTCAGATTGT CCCATTATC CGTCAGGTGA CACTATCTCA 1
 HNタンパク質停止 ←
 08281 TGGGAGGAAG CCTCCAGATC TGACCTAGCC AATCAAGCA TTATACAGCA CCATGGAATG 3
 08281 TGGGAGGAAG CCTCCAGATC TGACCTAGCC AATCAAGCA TTATACAGCA CCATGGAATG 3
 08341 CATACCAAC ATTATTGACA CTAATGACAC ACAAATTTGG TTTTAAGAAA ACCAAGAGA 1
 08341 CATACCAAC ATTATTGACA CTAATGACAC ACAAATTTGG TTTTAAGAAA ACCAAGAGA 1
 HN mRNAの終止 ←
 08401 ACAATAAGCC AGAATGCTG GGTCTCGGGA GATATTACTC CCTGAAGTCC ATCTCAATTC 1
 08401 ACAATAAGCC AGAATGCTG GGTCTCGGGA GATATTACTC CCTGAAGTCC ATCTCAATTC 1
 → L mRNA開始
 08461 ACCAATTGTA AAGCATRAGC TATACTATTA CATTCTACTT GGAAACCTCC CAATGAGAT 1
 08461 ACCAATTGTA AAGCATRAGC TATACTATTA CATTCTACTT GGAAACCTCC CAATGAGAT 1
 Leu→Ile Gln
 08521 CGACATTGAC GATTATAGTC CATTACATTA TCAAAATTTG AATCAATAG CACATGAAGA 2
 08521 CGACATTGAC GATTATAGTC CATTACATTA TCAAAATTTG AATCAATAG CACATGAAGA 2
 08581 GTCTAACTTA GCTCAACGCT TGGTAATGT AAGAAATTTT CTAATACCC ACATCCCTGA 1
 08581 GTCTAACTTA GCTCAACGCT TGGTAATGT AAGAAATTTT CTAATACCC ACATCCCTGA 1
 ページ 1 4 / 2 5

【図 9 . 1 5】

08641 TCTTAGAAG GGCCATTGGC AAGAGTATGT **Val** AAATGTAATA CTGTGGCCGC GAATTCCTCC 1
08641 TCTTAGAAG GGCCATTGGC AAGAGTATGT CAATGTAATA CTGTGGCCGC GAATTCCTCC
08701 CTGTATCCCG GATTTPAAAA TCAATGACCA ATTGCTCTCG CTCAAAAATT GGGACAAGTT
08701 CTGTATCCCG GATTTPAAAA TCAATGACCA ATTGCTCTCG CTCAAAAATT GGGACAAGTT
08761 AGTTAAGAA TCAATGTCAG TAATCAATGC **Ala** GGGTACTTCC CAGTGCATTG AGAATCTCAG 1
08761 AGTTAAGAA TCAATGTCAG TAATCAATGC AGGTACTTCC CAGTGCATTG AGAATCTCAG
08821 CTATGGACTG ACAGGTCGTG GGAACCTCTT TACACGATCA CGTGAACCTC CTGTGACCG
08821 CTATGGACTG ACAGGTCGTG GGAACCTCTT TACACGATCA CGTGAACCTC CTGTGACCG
08881 CAGGGATATT GATCTTAAGA **Thr** CGTGTGTGGC AGCATGGCAT GACTCAGACT GGAAAAGAAT 1
08881 CAGGGATATT GATCTTAAGA CAGTGTGTGGC AGCATGGCAT GACTCAGACT GGAAAAGAAT
08941 AACTGATTTT TGGATTATGA TCAAAATCCA GATGAGACAA TTAATTGTGA GGCACACAGA
08941 AACTGATTTT TGGATTATGA TCAAAATCCA GATGAGACAA TTAATTGTGA GGCACACAGA
09001 TCATATATGAT **Ser→Pro** CCTGATTAA TCACGTATAT CGAAAATAGA GAAGGCATAA TCATCATPAAC 1
09001 TCATATATGAT CCTGATTAA TCACGTATAT CGAAAATAGA GAAGGCATAA TCATCATPAAC
09061 CCCTGAACTG GTAGCATTAAT **Asn** TTAACACTGA GAATCATACA CTAACATACA TGACCTTTGA 1
09061 CCCTGAACTG GTAGCATTAAT TTAACACTGA GAATCATACA CTAACATACA TGACCTTTGA
09121 AATTGTAAGT ATGGTTTCAG ATATGTACGA AGGTGCTCAC AACATTTTAT CACTATGCGC
09121 AATTGTAAGT ATGGTTTCAG ATATGTACGA AGGTGCTCAC AACATTTTAT CACTATGCGC
09181 AGTTAGCACT TACCTGAATC CTCTGAAGAA AGAATAACA TATTTATTGA GCCTGTGAGA
09181 AGTTAGCACT TACCTGAATC CTCTGAAGAA AGAATAACA TATTTATTGA GCCTGTGAGA

ページ 15 / 25

【図 9 . 1 6】

09241 TAACTTAGCT TTTCAGATAG GTGATGCTGT ATATAACATA ATTGCTTTGC TAGAATCCTT
09241 TAACTTAGCT TTTCAGATAG GTGATGCTGT ATATAACATA ATTGCTTTGC TAGAATCCTT
09301 TGTATATGCA CAGTTGCAAA TGTGAGATCC CATCCAGAA CTCAGAGGAC AATTCCATGC
09301 TGTATATGCA CAGTTGCAAA TGTGAGATCC CATCCAGAA CTCAGAGGAC AATTCCATGC
09361 ATTCTGATGT TCTGAGATTG TTGATGCACT **Arg** AAGGGGAAT AATAGTTTCA CCCAGGATGA 1
09361 ATTCTGATGT TCTGAGATTG TTGATGCACT AAGAGGAAT AATAGTTTCA CCCAGGATGA
09421 ATTAAGAACT GTGACAACTA ATTTGATATC CCCATTCCAA GATCTGACCC CAGATCTTAC
09421 ATTAAGAACT GTGACAACTA ATTTGATATC CCCATTCCAA GATCTGACCC CAGATCTTAC
09481 GGTGGAATTG CTCTGTATAA TGAGGCTTTG GGGACACCC ATGCTCACTG CCAGTCAAGC
09481 GGTGGAATTG CTCTGTATAA TGAGGCTTTG GGGACACCC ATGCTCACTG CCAGTCAAGC
09541 **Ala** TGCAGGAAG GTACCGGAGT CTATGTGTGC **Gly** TGGGAAAGTA **Leu** CTGGACTTTC **Thr** CCACATTAT 5
09541 TGCAGGAAG GTACCGGAGT CTATGTGTGC TGGGAAAGTA TTAGACTTTC CCACATTAT
09601 GAAAACACTA GCCTTTTTCC ATACTATTCT GATCAATGGA TACAGGAGGA AGCATCATGG
09601 GAAAACACTA GCCTTTTTCC ATACTATTCT GATCAATGGA TACAGGAGGA AGCATCATGG
09661 AGTATGGCCA CCCTTAACT **Pro** TACCGGTAA TGCTTCAAG GGTCTCACAG AACTTATGAA 2
09661 AGTATGGCCA CCCTTAACT TACCGGTAA TGCTTCAAG GGTCTCACAG AACTTATGAA
09721 TGACAACT **Asn** GAGATAAGCT ATGAATTCAC ACTTAAGCAT TGAAGGAA **Val→Ile** TCTCTCTTAT 3
09721 TGACAACT GAGATAAGCT ATGAATTCAC ACTTAAGCAT TGAAGGAG TCTCTCTTAT
09781 AAAATTCAAG AAATGTTTTG ATGCGACGC AGGTGAGGAA CTCAGTATAT TTATGAAGAA
09781 AAAATTCAAG AAATGTTTTG ATGCGACGC AGGTGAGGAA CTCAGTATAT TTATGAAGAA
09841 **Lys** TAAAGCAAT AGTCCCAAA **Ala** AAGAGCTG GATGAGTGTG TTTAGAAGAA GCCTAATCAA 1
09841 TAAAGCAAT AGTCCCAAA AAGAGCTG GATGAGTGTG TTTAGAAGAA GCCTAATCAA
ページ 16 / 25

【図 9 . 1 7】

09901 ACAGCGCCAT CAGCATCATC AGGTCCCTCT ACCAAATCCA TTCAATCGAC GGTCTATTGCT 1
09901 ACAGCGCCAT CAGCATCATC AGGTCCCTCT ACCAAATCCA TTCAATCGAC GGTCTATTGCT
09961 AAACCTTCTC GGAGTAGACA AATTCGACCC GAATGTGGAG CTACAGTATG TAACATCAGG
09961 AAACCTTCTC GGAGTAGACA AATTCGACCC GAATGTGGAG CTACAGTATG TAACATCAGG
10021 TGAGTATCTA CATGAGACA CGTTTTGTGC ATCATATTCA CTAAGAGAGA AGGAAATTA
10021 TGAGTATCTA CATGAGACA CGTTTTGTGC ATCATATTCA CTAAGAGAGA AGGAAATTA
10081 ACCTGATGGT CGAATTTTTG CAAAGTTGAC TAAGAGAATG AGATCATGTC AAGTTATAGC
10081 ACCTGATGGT CGAATTTTTG CAAAGTTGAC TAAGAGAATG AGATCATGTC AAGTTATAGC
10141 AGAATCTCTT TTAGCGAACC ATGCTGGGAA GTTAATGAAA GAGAATGGTG TTGTGATGAA
10141 AGAATCTCTT TTAGCGAACC ATGCTGGGAA GTTAATGAAA GAGAATGGTG TTGTGATGAA
10201 TCAGCTATCA TTAACAAAT CACTATTAA CAGTATGAGC ATTGGAATAA TATCCGAGAG 1
10201 TCAGCTATCA TTAACAAAT CACTATTAA CAGTATGAGC ATTGGAATAA TATCCGAGAG
10261 AGCTAGAAAG TCAACTCGAG ATAACAATA TCAACTGGT TTCCAGAATA TCCAGAGAAA 2
10261 AGCTAGAAAG TCAACTCGAG ATAACAATA TCAACTGGT TTCCAGAATA TCCAGAGAAA
10321 TAATCAGAT CACTCCAGC AAGTCAATCA GCGAGATCCA AGTATGACT TTGAATTGGC
10321 TAATCAGAT CACTCCAGC AAGTCAATCA GCGAGATCCA AGTATGACT TTGAATTGGC
10381 AGCATCTTTT TTAACACTG ATCTCAAAA ATATTGTTTA CAATGGAGGT **Asn** ACCAGACAAT 1
10381 AGCATCTTTT TTAACACTG ATCTCAAAA ATATTGTTTA CAATGGAGGT ACCAGACAAT
10441 TATCCCAATT GCTCAATCAC **Leu** TAAACAGAA GTATGTTAT CCTCATCTCT TCGAGTGGAT 2
10441 TATCCCAATT GCTCAATCAC TAAACAGAA GTATGTTAT CCTCATCTCT TCGAGTGGAT

ページ 17 / 25

【図 9 . 1 8】

10501 TCACTTAGCG CTAATGGCTA GTACACTTTA **Asp** CGTGGGGAG CCCTTCAACC CACCAGCAGA 2
10501 TCACTTAGCG CTAATGGCTA GTACACTTTA CGTGGGGAG CCCTTCAACC CACCAGCAGA
10561 TACCAGTCAA TTTGATCTAG ATAAAGTAAT TAATGGAGAT ATCTTCATTG TATCACCAG
10561 TACCAGTCAA TTTGATCTAG ATAAAGTAAT TAATGGAGAT ATCTTCATTG TATCACCAG
10621 AGGTGGAAT GAAGGCTGT GTCAAAAGC **Lys** TTGGACAATG **Ala→Ser** ATATCTATCT CTGTGATAT 2
10621 AGGTGGAAT GAAGGCTGT GTCAAAAGC TTGGACAATG ATATCTATCT CTGTGATAT
10681 TCTATCTGCC ACAGAGCTG GCACACGAGT AATGAGTAG GTGAGGAGG ATAATCAAGC 1
10681 TCTATCTGCC ACAGAGCTG GCACACGAGT AATGAGTAG GTGAGGAGG ATAATCAAGC
10741 AATTGCTGTC ACCACAGAG TACCAAGGAG CCGCGCAGT CTGAGAGAAA AGACTATTGC
10741 AATTGCTGTC ACCACAGAG TACCAAGGAG CCGCGCAGT CTGAGAGAAA AGACTATTGC
10801 TTTTAGATCT TGTAAATAT TCTTTGAGAG GTTAAATGT AATAATTTTG GATTAGGTCA 1
10801 TTTTAGATCT TGTAAATAT TCTTTGAGAG GTTAAATGT AATAATTTTG GATTAGGTCA
10861 CCATTTGAAA GAACAGAGA CTATCATTAG TCTCACTTC TTTGTTTATA GCAAGAGAA 1
10861 CCATTTGAAA GAACAGAGA CTATCATTAG TCTCACTTC TTTGTTTATA GCAAGAGAA
10921 ATTCTATCAG GGGAGGATTC TAACGCAAGC CTAAAAAAT GCTAGTAAGC TCTGCTTGC
10921 ATTCTATCAG GGGAGGATTC TAACGCAAGC CTAAAAAAT GCTAGTAAGC TCTGCTTGC
10981 AGCTGATGTC CTAGAGAAAT GCACCAATC ATCATCTTCT AATCTTGCAA CTACTGTCT
10981 AGCTGATGTC CTAGAGAAAT GCACCAATC ATCATCTTCT AATCTTGCAA CTACTGTCT
11041 GAGGTAACT GAGATGTTG TTGAAAAAG TATCTGTTTC TACTTGAATA TCTATATGAC
11041 GAGGTAACT GAGATGTTG TTGAAAAAG TATCTGTTTC TACTTGAATA TCTATATGAC
11101 CATCAACAG CTCTCTATG ATATCATCTT CCTCAAGTG TCGATTCTCG GAGATCAGAT 1
11101 CATCAACAG CTCTCTATG ATATCATCTT CCTCAAGTG TCGATTCTCG GAGATCAGAT
ページ 18 / 25

【図 9 . 19】

11161 CACATTAGAA TACATAAATA ATCCACACCT GGTATACGA TTGGCTCTTT TACCATCCCA 1
11161 CACATTAGAA TACATAAATA ATCCACACCT GGTATACGA TTGGCTCTTT TGCCATCCCA
11221 GTTAGGAGGT CTAACTACT TGTCAATGAG TAGGCTGTTC AATCGAACA TAGGGACCC 2
11221 GTTAGGAGGT CTAACTACC TGTCAATGAG TAGGCTGTTC AATCGAACA TAGGGACCC
11281 GGTGGTTTCC GCAGTTGCAG ATCTTAAGAG ATTAATTAA TCAGGATGTA TGGATTACTG
11281 GGTGGTTTCC GCAGTTGCAG ATCTTAAGAG ATTAATTAA TCAGGATGTA TGGATTACTG
11341 GATCCTTTAT AACTTATTAG GGAGAAACCC GGGAAACGCC TCATGGGCTA CTITAGCAGC
11341 GATCCTTTAT AACTTATTAG GGAGAAACCC GGGAAACGCC TCATGGGCTA CTITAGCAGC
11401 TGACCCGTAC TCAATCAATA TAGAGTATCA ATACCCGCCA ACTACAGCTC TTAAGAGGCA 1
11401 TGACCCGTAC TCAATCAATA TAGAGTATCA ATACCCGCCA ACTACAGCTC TTAAGAGGCA
11461 CACCCACAA GTCCTGATGG AACTCAATG GAATCCAATG TTACGTGGCA TATCTCTGA 1
11461 CACCCACAA GTCCTGATGG AACTCAATG GAATCCAATG TTACGTGGCA TATCTCTGA
11521 CAATGCACAG GCAGAGAAATA ATAAGCTTCC TAGGTTTCTC CTGGATAGGG AGGTGATCTT 1
11521 CAATGCACAG GCAGAGAAATA ATAAGCTTCC TAGGTTTCTC CTGGATAGGG AGGTGATCTT
11581 TCCGGGTGTA GCTCACATCA TCATTGAGCA AACCAGTGC GGGAGGAGAA AGCAGATTCA 1
11581 TCCGGGTGTA GCTCACATCA TCATTGAGCA AACCAGTGC GGGAGGAGAA AGCAGATTCA
11641 AGGATATTGG GATTCAACTA GATCGATAAT GAGGAATCA CTGCAATTA AGCCCTTATC 2
11641 AGGATATTGG GATTCAACTA GATCGATAAT GAGGAATCA CTGCAATTA AGCCCTTATC
11701 CAATAGGAAG CTTAATGAAA TACTGGATTA CAACATCAAT TACTAGCTT ACAATTGGC 1
11701 CAATAGGAAG CTTAATGAAA TACTGGATTA CAACATCAAT TACTAGCTT ACAATTGGC

ページ 19 / 25

【図 9 . 20】

11761 ATTACTCAAG AATGCTATTG AACCTCCGAC TTATTGAAG GCAATGACCC TTGAACATG 1
11761 ATTACTCAAG AATGCTATTG AACCTCCGAC TTATTGAAG GCAATGACAC TTGAACATG
11821 TAGCATCGAC ATTGCAAGGA GCTCTCCGAA GCTCTCTGG GCCCAGCTCT TGGGTGGGAG 1
11821 TAGCATCGAC ATTGCAAGGA ACCTCCGAA GCTCTCTGG GCCCAGCTCT TGGGTGGGAG
11881 AAATCTTGAA GGACTAGAGA CGCCAGATCC CATTGAATC ACTGCAGGAG CATTAAATTG 2
11881 AAATCTTGAA GGATTAGAGA CGCCAGATCC CATTGAATC ACTGCAGGAG CATTAAATTG
11941 TGGATCGGGC TACTGTGAAC AGTGTGCTGC AGGAGACAA CGATTACAT GGTITTTCTT
11941 TGGATCGGGC TACTGTGAAC AGTGTGCTGC AGGAGACAA CGATTACAT GGTITTTCTT
12001 GCCATCTGGT ATCGAGATAG GAGGGGATCC CGGTATAAT CCTCTATCC GTGTACCGTA
12001 GCCATCTGGT ATCGAGATAG GAGGGGATCC CGGTATAAT CCTCTATCC GTGTACCGTA
12061 CATTGGCTCC AGGACTGATG AGAGGAGGGT AGCCTCAAT GCATACATCA GGGGTGCCTC
12061 CATTGGCTCC AGGACTGATG AGAGGAGGGT AGCCTCAAT GCATACATCA GGGGTGCCTC
12121 AAGTAGCCTA AAAGCAGTTC TTAGACTGCG GGGAGTGTA ATCTGGGATC TCGGAGATAC 2
12121 GAGTAGCTTA AAAGCAGTTC TTAGACTGCG GGGAGTGTA ATCTGGGATC TCGGAGATAC
12181 TCTGGAGAAT TGGTAGATG CACTGGATT GTCTCACAT AGAGTTAACA TCACATTGA
12181 TCTGGAGAAT TGGTAGATG CACTGGATT GTCTCACAT AGAGTTAACA TCACATTGA
12241 ACAGTTCGAA TCCCTCACCC CACTTCCAC CTCTGCCAAT CTACCCATC GGTGGATGA 2
12241 ACAGTTCGAA TCCCTCACCC CACTTCCAC CTCTGCCAAT CTACCCATC GGTGGATGA
12301 TGGCACAAT ACCCTAAAGT TTAAGCTGCG AAGCTCTTAC ACCTTTCAA GTTCACTCA 1
12301 TGGCACAAT ACCCTAAAGT TTAAGCTGCG AAGCTCTTAC ACCTTTCAA GTTCACTCA
12361 TATATCAAT GATGAGCAAT ATCTGACAA TAATGACAAA ACTGCAGATT CAATATATAT 1
12361 TATATCAAT GATGAGCAAT ACTGACAA TAATGACAAA ACTGCAGATT CAATATATAT

ページ 20 / 25

【図 9 . 21】

12421 CTACCAACAG TTAATGATCA CTGGAATCGG GATCTTAGAA ACATGGAATA ATCCCCAAT 1
12421 CTACCAACAG TTAATGATCA CTGGAATCGG AATCTTAGAA ACATGGAATA ATCCCCAAT
12481 CAATAGAACA TTGGAAGAAT CTACCTTACA TTTCACACT GGTGCATCAT GTTGTGTCGG
12481 CAATAGAACA TTGGAAGAAT CTACCTTACA TTTCACACT GGTGCATCAT GTTGTGTCGG
12541 ACCTGTGGAC TCGTGATTA TCTCAGAAGC ATTAACAGTC AAGCCACATA TTACAGTACC 1
12541 ACCTGTGGAC TCGTGATTC TCTCAGAAGC ATTAACAGTC AAGCCACATA TTACAGTACC
12601 GTACAGCAAT AAATTTGTAT TTGATGAGCA CCGGTATCT GAATATGAAA CTGCAAAACT 2
12601 GTACAGCAAT AAATTTGTAT TTGATGAGCA CCGGTATCT GAATATGAAA CTGCAAAACT
12661 GGAATCGTA TCATTCCAAG CCCAATTAGG CAACATTGAT GCTGTAGATA TGACAGGTAA
12661 GGAATCGTA TCATTCCAAG CCCAATTAGG CAACATTGAT GCTGTAGATA TGACAGGTAA
12721 ATTAACATTA TTGTCCCAAT TCACCTGAAG GCAGATTATC AATGCAATCA CTGGAATCGA
12721 ATTAACATTA TTGTCCCAAT TCACCTGAAG GCAGATTATC AATGCAATCA CTGGAATCGA
12781 TGAGTCTGT TCTCTACTA ATGATGCCAT TGTGATCA GACTATGCT CCAATTGGAT 1
12781 TGAGTCTGT TCTCTACTA ATGATGCCAT TGTGATCA GACTATGCT CCAATTGGAT
12841 TAGTGAATGC ATGTATACCA AATTAGATGA ATTATTTATG TATTGTGGT GGGAACTACT
12841 TAGTGAATGC ATGTATACCA AATTAGATGA ATTATTTATG TATTGTGGT GGGAACTACT
12901 ATTGGAAC TAATCAAAA TGTATTATCT GAGGTAGT GGGTGGAGTA ATATAGTGA
12901 ATTGGAAC TAATCAAAA TGTATTATCT GAGGTAGT GGGTGGAGTA ATATAGTGA
12961 TTATTCTTAC ATGATCTTGA GAAGAAATCC GGGTGCAGCA TTAACAATC TGGCATCTAC
12961 TTATTCTTAC ATGATCTTGA GAAGAAATCC GGGTGCAGCA TTAACAATC TGGCATCTAC
13021 ATTAAGTCAT CCAAACTTT TCCGACGAGC TATCAACCTA GATATAGTTG CCCCCTTAAA
13021 ATTAAGTCAT CCAAACTTT TCCGACGAGC TATCAACCTA GATATAGTTG CCCCCTTAAA

ページ 21 / 25

【図 9 . 22】

13081 TGTCTCTCAT TTGGAATCTC TGGACTACAT CAAGATGAGT ATGATGCAA TACTCTGGG 1
13081 TGTCTCTCAT TTGGAATCTC TGGACTACAT CAAGATGAGT ATGATGCAA TACTCTGGG
13141 CTGTAAAGA GTCATCAATG TGCTCTCAA TGGAGGGGAC TTAGATTAG TTGTGACATC
13141 CTGTAAAGA GTCATCAATG TGCTCTCAA TGGAGGGGAC TTAGATTAG TTGTGACATC
13201 TGAAGATAGC CTATTCTCA GTGACCGATC CATGAATCTC ATTGCAAGGA AATTAACTTT
13201 TGAAGATAGC CTATTCTCA GTGACCGATC CATGAATCTC ATTGCAAGGA AATTAACTTT
13261 ATTATCACTG ATTACCAATA ATGGTTTGA ACTACCAAG ATTAAAGGGT TCTCTCTGA
13261 ATTATCACTG ATTACCAATA ATGGTTTGA ACTACCAAG ATTAAAGGGT TCTCTCTGA
13321 TGAGAAGTGT TTGCTTTGA CAGAAATTTT GAGGAAAGTG GTGAATCTAG GGTGAGTTTC
13321 TGAGAAGTGT TTGCTTTGA CAGAAATTTT GAGGAAAGTG GTGAATCTAG GGTGAGTTTC
13381 AATAGAGAAC CTATCAAAAT TTATGTACRA TGTGGAAC CCACGGCTTG CAGATTTCG
13381 AATAGAGAAC CTATCAAAAT TTATGTACRA TGTGGAAC CCACGGCTTG CAGATTTCG
13441 CAGCAACAAT TACTACCTGA CCAGAAAATT ATTGAATCA ATACGAGATA CTGAGTCAG 1
13441 CAGCAACAAT TACTACCTGA CCAGAAAATT ATTGAATCA ATACGAGATA CTGAGTCAG
13501 TCAAGTAGCA GTACCTCAT ATTATGAATC ATTAGAATAT ATTGAATCT TTAAGTAAAC
13501 TCAAGTAGCA GTACCTCAT ATTATGAATC ATTAGAATAT ATTGAATCT TTAAGTAAAC
13561 CCAACATGTC CTTGGCACT CATGCAATGA GGATGATAG CTATGTACAA ATGATACAT
13561 CCAACATGTC CTTGGCACT CATGCAATGA GGATGATAG CTATGTACAA ATGATACAT
13621 AATCTGATC ATAGAGCTA ATGCAAACT GGAGAAATG CCAATTCOA ATAGCCCTGA
13621 AATCTGATC ATAGAGCTA ATGCAAACT GGAGAAATG CCAATTCOA ATAGCCCTGA
13681 GGATGATTC AATTTCOA ACTTTAAGT GAATGCTCA TCGACCAATA CCTACGCC
13681 GGATGATTC AATTTCOA ACTTTAAGT GAATGCTCA TCGACCAATA CCTACGCC

ページ 22 / 25

【図 9.23】

13741 ^{Ser} ATTAGGTTG TCATCAGCTG CTTGGTATAA GGTATAAGC TGCTGCAGGT ACCTTGAGCG 1
 13741 ATTAGGTTG TCATCAGCTG CTTGGTATAA GGTATAAGC TGCTGCAGGT ACCTTGAGCG

 13801 ATTAAGGCTA CCACAAGGTG ATCATTTATA TATTGCAGAA GGTAGTGGTG CAGTATGAC
 13801 ATTAAGGCTA CCACAAGGTG ATCATTTATA TATTGCAGAA GGTAGTGGTG CAGTATGAC

 13861 AATCATAGAA TACCTATTCC CAGGAAGAAA GATATATTAC AATCTTTAT TTAGTAGTGG
 13861 AATCATAGAA TACCTATTCC CAGGAAGAAA GATATATTAC AATCTTTAT TTAGTAGTGG

 13921 TGACAATCCC CCACAAGAAA ATTATGCACC AATGCCACT CAGTTCATTG AGAGTGTCCC
 13921 TGACAATCCC CCACAAGAAA ATTATGCACC AATGCCACT CAGTTCATTG AGAGTGTCCC

 13981 ATACAAGCTC TGCCAGGAC ACACAGATCA ATATCCGAG ATTTTGGAG ACTTCATCCC
 13981 ATACAAGCTC TGCCAGGAC ACACAGATCA ATATCCGAG ATTTTGGAG ACTTCATCCC

 14041 TCTATGGAAC GGAAGCCGC CCATGACTGA CATAGGAATG ACAGCTTGTG TAGAATTCAT
 14041 TCTATGGAAC GGAAGCCGC CCATGACTGA CATAGGAATG ACAGCTTGTG TAGAATTCAT

 14101 ^{Val} CATCAATCGA GTTGGCCCAA GGACTTCGAG TTTAGTACAT GTAGATTGGG AATCAAGTGC 1
 14101 CATCAATCGA GTTGGCCCAA GGACTTCGAG TTTAGTACAT GTAGATTGGG AATCAAGTGC

 14161 AAGCTTAAT CAACATGCC TGICAAAGCC GATAATTAAT GCTATCATCA CTGCTACAAC
 14161 AAGCTTAAT CAACATGCC TGICAAAGCC GATAATTAAT GCTATCATCA CTGCTACAAC

 14221 TGTTTGTGCG CCTCATGGGG TGCTTATCTT GAAATATAGT TGGTTGCCAT TTACTAGATT
 14221 TGTTTGTGCG CCTCATGGGG TGCTTATCTT GAAATATAGT TGGTTGCCAT TTACTAGATT

 14281 TAGTACTTTG ATCACTTTCT TAIGGTGCTA CTTTGAGAGA ATCACTGTTC TTAGAGCAC
 14281 TAGTACTTTG ATCACTTTCT TAIGGTGCTA CTTTGAGAGA ATCACTGTTC TTAGAGCAC

ページ 23 / 25

【図 9.24】

14341 ATATTCTGAT CCAGCTAATC ATGAGGTTTA TTTAATTGT ATCCTTGCCA ACAACTTTGC
 14341 ATATTCTGAT CCAGCTAATC ATGAGGTTTA TTTAATTGT ATCCTTGCCA ACAACTTTGC

 14401 ^{Thr} ATTCAGACT GTCTGCAGG CAACAGGAAT GCGCATGACT TTAACCATC AAGGGTTTAC 1
 14401 ATTCAGACT GTCTGCAGG CAACAGGAAT GCGCATGACT TTAACCATC AAGGGTTTAC

 14461 ^{Thr} ^{Leu} CTGATATCA CCTGAAGAA TAAATCAGTA TTGGATGGT CACTTAAGC AAGAAGCTAT 2
 14461 TTTGATATCA CCTGAAGAA TAAATCAGTA TTGGATGGT CACTTAAGC AAGAAGCTAT

 14521 CGTAGCAGAA GCAATTGATA AGGTGGTCT AGSAGAAAT GCTCTATTTA ATTGAGTGA
 14521 CGTAGCAGAA GCAATTGATA AGGTGGTCT AGSAGAAAT GCTCTATTTA ATTGAGTGA

 14581 ^{Leu} TAATGAATTA ATTCTCAAT GTGGAGGAC ACCAAATGCA CGGAATCTTA TCGATATCGA 1
 14581 TAATGAATTA ATTCTCAAT GTGGAGGAC ACCAAATGCA CGGAATCTTA TCGATATCGA

 14641 ^{Leu} GCCAGTCGCA ACTTTCATAG AATTGAAACA ACTTAATCTGC ACAATGTGA CAACCAACTT 2
 14641 GCCAGTCGCA ACTTTCATAG AATTGAAACA AATTGATCTGC ACAATGTGA CAACCAACTT

 14701 GAAGGAAATA ATTGATATAA CAAGGTCTGG AACCAGGAT TATGAAAGTT TATTACTCAC
 14701 GAAGGAAATA ATTGATATAA CAAGGTCTGG AACCAGGAT TATGAAAGTT TATTACTCAC

 14761 TCCTTACAAT TTAGTCTTC TTGGTAAAT CAGTACGATA GTGAGATTAT TAACGAAAG
 14761 TCCTTACAAT TTAGTCTTC TTGGTAAAT CAGTACGATA GTGAGATTAT TAACGAAAG

 14821 GATTCTAAT CATACTATCA GGAATGGTT GATCTCCCA CCTTGGCTCC AGATGATCGT
 14821 GATTCTAAT CATACTATCA GGAATGGTT GATCTCCCA CCTTGGCTCC AGATGATCGT

 14881 GAAGCAGGAC TTGGAATTCG GCATATTCAG GATTACTTCC ATCTCAATT CTGATCGGTT
 14881 GAAGCAGGAC TTGGAATTCG GCATATTCAG GATTACTTCC ATCTCAATT CTGATCGGTT

 14941 ^{Lys} ^{Ala→Thr} CCTGAACCTT TCTCCAAATA GGAATACCTT GATTACACAA TTAACCTGAC GCTACATTAG 2
 14941 CCTGAACCTT TCTCCAAATA GGAATACCTT GATTACACAA TTAACCTGAC GCTACATTAG

ページ 24 / 25

【図 9.25】

15001 ^{Cys} GAAATTGATT GAGGGGGATT GAAATATCGA TCTAACGAGA CCTATCCAAA AGCAAATCTG 1
 15001 GAAATTGATT GAGGGGGATT GAAATATCGA TCTAACGAGA CCTATCCAAA AGCAAATCTG

 15061 ^{Tyr} GAAAGCATTG GGTGTGTAG TCTAGTGTCA GATCCAATG GATCAAAGGG AGTCAACAGA 1
 15061 GAAAGCATTG GGTGTGTAG TCTAGTGTCA GATCCAATG GATCAAAGGG AGTCAACAGA

 15121 GTTTATTGAT ATAAATATTA ATGAAGAAAT AGACCGCGGG ATCGATGGCG AGGAATCTA
 15121 GTTTATTGAT ATAAATATTA ATGAAGAAAT AGACCGCGGG ATCGATGGCG AGGAATCTA
 Lタンパク質停止 ←
 15181 ^{Ala} ^{GAG} GAAATATCAA GAATCAGAAAT TAAATTTAAGA AAAAGGAGC GGATTAATCT TGGTTTCCC 3
 15181 GAAATATCAA GAATCAGAAAT TAAATTTAAGA AAAAGGAGC GGATTAATCT TGGTTTCCC
 L mRNA 終止 ←
 15241 CTTGGT // (配列番号1)
 15241 CTTGGT // (配列番号2)

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 W3A株の配列間には237ヌクレオチドの不一致がある(1.55%不一致、98.45%ホモロジー)

ページ 25 / 25

【図 10A.1】

CV-0001 ATGAGCACTA TAATCAATC TCTGGTGGC TCTGTCTAT TGGCAGGAGC AGGCAGCCT
 CPV-0001 ATGAGCACTA TAATCAATC TCTGGTGGC TCTGTCTAT TGGCAGGAGC AGGCAGCCT 5
 PR-0001 ATGAGCACTA TAATCAATC TCTGGTGGC TCTGTCTAT TGGCAGGAGC AGGCAGCCT 3
 W3A-0001 ATGAGCACTA TAATCAATC TCTGGTGGC TCTGTCTAT TGGCAGGAGC AGGCAGCCT 3
 WR-0001 ATGAGCACTA TAATCAATC TCTGGTGGC TCTGTCTAT TGGCAGGAGC AGGCAGCCT 4

 CV-0061 GATCCAGCAG CCTCATGCA AATCGGTGTC ATTCCACAA ATGTCCGGCA ACTTATGTAT
 CPV-0061 GATCCAGCAG CCTCATGCA AATCGGTGTC ATTCCACAA ATGTCCGGCA ACTTATGTAT
 PR-0061 GATCCAGCAG CCTCATGCA AATCGGTGTC ATTCCACAA ATGTCCGGCA ACTTATGTAT
 W3A-0061 GATCCAGCAG CCTCATGCA AATCGGTGTC ATTCCACAA ATGTCCGGCA ACTTATGTAT
 WR-0061 GATCCAGCAG CCTCATGCA AATCGGTGTC ATTCCACAA ATGTCCGGCA ACTTATGTAT 1

 CV-0121 TATAGTGAGG CCTCATGAGC ATTCATTGTT GTGAAGTTAA TGCCTACAA TGAATCGCGG
 CPV-0121 TATAGTGAGG CCTCATGAGC ATTCATTGTT GTGAAGTTAA TGCCTACAA TGAATCGCGG 1
 PR-0121 TATAGTGAGG CCTCATGAGC ATTCATTGTT GTGAAGTTAA TGCCTACAA TGAATCGCGG
 W3A-0121 TATAGTGAGG CCTCATGAGC ATTCATTGTT GTGAAGTTAA TGCCTACAA TGAATCGCGG
 WR-0121 TATAGTGAGG CCTCATGAGC ATTCATTGTT GTGAAGTTAA TGCCTACAA TGAATCGCGG 1

 CV-0181 ATTAGTGGAT GTAATATAC ATCAATTICA AGCTATAATG CAACAGTGAC AAAACTCCCTA
 CPV-0181 ATTAGTGGAT GTAATATAC ATCAATTICA AGCTATAATG CAACAGTGAC AAAACTCCCTA 4
 PR-0181 ATTAGTGGAT GTAATATAC ATCAATTICA AGCTATAATG CAACAGTGAC AAAACTCCCTA
 W3A-0181 ATTAGTGGAT GTAATATAC ATCAATTICA AGCTATAATG CAACAGTGAC AAAACTCCCTA
 WS-0181 ATTAGTGGAT GTAATATAC ATCAATTICA AGCTATAATG CAACAGTGAC AAAACTCCCTA

ページ 1 / 6

【図10A.2】

CV-0241 CAGCGGATCG GTGAGAAITT GGAGACGATT AGGAACCACT TGATTCCAACT TGGGAGGAGA
 CPV-0241 CAGCGGATCG GTGAGAAITT AGAGACGATT AGGAACCACT TGATTCCAACT TGGGAGGAGA 2
 PR-0241 CAGCGGATCG GTGAGAAITT GGAGACGATT AGGAACCACT TGATTCCAACT TGGGAGGAGA 1
 W3A-0241 CAGCGGATCG GTGAGAAITT GGAGACGATT AGGAACCACT TGATTCCAACT TGGGAGGAGA
 WR-0241 CAGCGGATCG GTGAGAAITT GGAGACGATT AGGAACCACT TGATTCCAACT TGGGAGGAGA 1

CV-0301 CGCGGGTTTG CAGGGGTGGT GATTGGATTA GGTGCATTAG GAGTAGCTAC TGGCGGACAG
 CPV-0301 CGCGGGTTTG CAGGGGTGGT GATTGGATTA GGTGCATTAG GAGTAGCTAC TGGCGGACAG 3
 PR-0301 CGCGGGTTTG CAGGGGTGGT GATTGGATTA GGTGCATTAG GAGTAGCTAC TGGCGGACAG 1
 W3A-0301 CGCGGGTTTG CAGGGGTGGT GATTGGATTA GGTGCATTAG GAGTAGCTAC TGGCGGACAG 1
 WR-0301 CGCGGGTTTG CAGGGGTGGT GATTGGATTA GGTGCATTAG GAGTAGCTAC TGGCGGACAG 1

CV-0361 GTCACTGCGG CAGTAGCACT AGTAAAGGCA AATGAAATTA CTGCGGCTAT ACTCAATCTC
 CPV-0361 GTCACTGCGG CAGTAGCACT AGTAAAGGCG AATGAAATTA CTGCGGCTAT ACTCAATCTC 5
 PR-0361 GTCACTGCGG CAGTAGCACT AGTAAAGGCA AATGAAATTA CTGCGGCTAT ACTCAATCTC 3
 W3A-0361 GTCACTGCGG CAGTAGCACT AGTAAAGGCA AATGAAATTA CTGCGGCTAT ACTCAATCTC 3
 WR-0361 GTCACTGCGG CAGTAGCACT AGTAAAGGCA AATGAAATTA CTGCGGCTAT ACTCAATCTC 2

CV-0421 AAAAATGCAA TCCAAAACAA AATGACAGCA GTTGACAGTG TGGTCCAGGC CACACAATCA
 CPV-0421 AAAAATGCAA TCCAAAACAA AATGACAGCA GTTGACAGTG TGGTCCAGGC CACACAATCA 3
 PR-0421 AAAAATGCAA TCCAAAACAA AATGACAGCA GTTGACAGTG TGGTCCAGGC CACACAATCA 1
 W3A-0421 AAAAATGCAA TCCAAAACAA AATGACAGCA GTTGACAGTG TGGTCCAGGC CACACAATCA
 WR-0421 AAAAATGCAA TCCAAAACAA AATGACAGCA GTTGACAGTG TGGTCCAGGC CACACAATCA

CV-0481 CTAGGACGCG CAGTTCAGC AGTTCAGAT CACATAAACA GTGTGTAAG TCCAGCAATT
 CPV-0481 CTAGGACGCG CAGTTCAGC AGTTCAGAT CACATAAACA GTGTGTAAG TCCAGCAATT 2
 PR-0481 CTAGGACGCG CAGTTCAGC AGTTCAGAT CACATAAACA GTGTGTAAG TCCAGCAATT 1
 W3A-0481 CTAGGACGCG CAGTTCAGC AGTTCAGAT CACATAAACA GTGTGTAAG TCCAGCAATT 1
 WR-0481 CTAGGACGCG CAGTTCAGC AGTTCAGAT CACATAAACA GTGTGTAAG TCCAGCAATT 1

ページ 2 / 6

【図10A.3】

CV-0541 ACAGCAGCCA ATTGTAAAGC CCAAGATGCT ATCATTGGCT CAATCTCAA TCTCTATTG
 CPV-0541 ACAGCAGCCA ATTGTAAAGC CCAAGATGCT ATCATTGGCT CAATCTCAA TCTCTATTG 3
 PR-0541 ACAGCAGCCA ATTGTAAAGC CCAAGATGCT ATCATTGGCT CAATCTCAA TCTCTATTG
 W3A-0541 ACAGCAGCCA ATTGTAAAGC CCAAGATGCT ATCATTGGCT CAATCTCAA TCTCTATTG
 WR-0541 ACAGCAGCCA ATTGTAAAGC CCAAGATGCT ATCATTGGCT CAATCTCAA TCTCTATTG

CV-0601 ACCGAGTTGA CAACATCTT CACAATCAA ATTACAACCC CTGCATTGAG TCCATTATCA
 CPV-0601 ACCGAGTTGA CAACATCTT CACAATCAA ATTACAACCC CTGCATTGAG TCCATTATCA 1
 PR-0601 ACCGAGTTGA CAACATCTT CACAATCAA ATTACAACCC CTGCATTGAG TCCATTATCA
 W3A-0601 ACCGAGTTGA CAACATCTT CACAATCAA ATTACAACCC CTGCATTGAG TCCATTATCA 2
 WR-0601 ACCGAGTTGA CAACATCTT CACAATCAA ATTACAACCC CTGCATTGAG TCCATTATCA 2

CV-0661 ATTCAAGCTT TAAGGATCCT ACTGGGGAGT ACCTTGCCGA CTGTGGTGA AAAATCTTTC
 CPV-0661 ATTCAAGCTT TAAGGATCCT ACTGGGGAGT ACCTTGCCGA CTGTGGTGA AAAATCTTTC 3
 PR-0661 ATTCAAGCTT TAAGGATCCT ACTGGGGAGT ACCTTGCCGA CTGTGGTGA AAAATCTTTC
 W3A-0661 ATTCAAGCTT TAAGGATCCT ACTGGGGAGT ACCTTGCCGA CTGTGGTGA AAAATCTTTC
 WR-0661 ATTCAAGCTT TAAGGATCCT ACTGGGGAGT ACCTTGCCGA CTGTGGTGA AAAATCTTTC

CV-0721 AATACCCAGA TAAGTGCAGC TGAGCTTCTC TCATCAGGCT TGTTCACAGC CCAGATTGTG
 CPV-0721 AATACCCAGA TAAGTGCAGC TGAGCTTCTC TCATCAGGCT TGTTCACAGC CCAGATTGTG 1
 PR-0721 AATACCCAGA TAAGTGCAGC TGAGCTTCTC TCATCAGGCT TGTTCACAGC CCAGATTGTG 1
 W3A-0721 AATACCCAGA TAAGTGCAGC TGAGCTTCTC TCATCAGGCT TGTTCACAGC CCAGATTGTG 1
 WR-0721 AATACCCAGA TAAGTGCAGC TGAGCTTCTC TCATCAGGCT TGTTCACAGC CCAGATTGTG 1

CV-0781 GGATTAGATT TGACCTATAT GCAGATGCTC ATAAAAATG AGCTGCCAC TTTAACTGTA
 CPV-0781 GGATTAGATT TGACCTATAT GCAGATGCTC ATAAAAATG AGCTGCCAC TTTAACTGTA 1
 PR-0781 GGATTAGATT TGACCTATAT GCAGATGCTC ATAAAAATG AGCTGCCAC TTTAACTGTA
 W3A-0781 GGATTAGATT TGACCTATAT GCAGATGCTC ATAAAAATG AGCTGCCAC TTTAACTGTA
 WR-0781 GGATTAGATT TGACCTATAT GCAGATGCTC ATAAAAATG AGCTGCCAC TTTAACTGTA

ページ 3 / 6

【図10A.4】

CV-0841 CAACCTGCAA CCCAGATCAT AGATCTGGCC ACCATTTCGT CATTCAATTA CAATCAAGAA
 CPV-0841 CAACCTGCAA CCCAGATCAT AGATCTGGCC ACCATTTCGT CATTCAATTA CAATCAAGAA 1
 PR-0841 CAACCTGCAA CCCAGATCAT AGATCTGGCC ACCATTTCGT CATTCAATTA CAATCAAGAA
 W3A-0841 CAACCTGCAA CCCAGATCAT AGATCTGGCC ACCATTTCGT CATTCAATTA CAATCAAGAA
 WR-0841 CAACCTGCAA CCCAGATCAT AGATCTGGCC ACCATTTCGT CATTCAATTA CAATCAAGAA

CV-0901 GTCATGGCCC AATTACCAAC AGCTGTATT GTGACTGGCA GCTTGATCCA AGCTATCCC
 CPV-0901 GTCATGGCCC AATTACCAAC AGCTGTATT GTGACTGGCA GCTTGATCCA AGCTATCCC 1
 PR-0901 GTCATGGCCC AATTACCAAC AGCTGTATT GTGACTGGCA GCTTGATCCA AGCTATCCC
 W3A-0901 GTCATGGCCC AATTACCAAC AGCTGTATT GTGACTGGCA GCTTGATCCA AGCTATCCC 1
 WR-0901 GTCATGGCCC AATTACCAAC AGCTGTATT GTGACTGGCA GCTTGATCCA AGCTATCCC 1

CV-0961 GCATCGCAAT GCATATTAC ACCCAACACT GTGTACTGTA GGTATAATGA TGCCCAAGTA
 CPV-0961 GCATCGCAAT GCATATTAC ACCCAACACT GTGTACTGTA GGTATAATGA TGCCCAAGTA 2
 PR-0961 GCATCGCAAT GCATATTAC ACCCAACACT GTGTACTGTA GGTATAATGA TGCCCAAGTA
 W3A-0961 GCATCGCAAT GCATATTAC ACCCAACACT GTGTACTGTA GGTATAATGA TGCCCAAGTA 1
 WR-0961 GCATCGCAAT GCATATTAC ACCCAACACT GTGTACTGTA GGTATAATGA TGCCCAAGTA 1

CV-1021 CTCTCAGATG ATACGATGGC TTGGCTCCAA GGTAACTTGA CAAGATGCAC CTCTCTCCCA
 CPV-1021 CTCTCAGATG ATACGATGGC TTGGCTCCAA GGTAACTTGA CAAGATGCAC CTCTCTCCCA
 PR-1021 CTCTCAGATG ATACGATGGC TTGGCTCCAA GGTAACTTGA CAAGATGCAC CTCTCTCCCA 1
 W3A-1021 CTCTCAGATG ATACGATGGC TTGGCTCCAA GGTAACTTGA CAAGATGCAC CTCTCTCCCA 1
 WR-1021 CTCTCAGATG ATACGATGGC TTGGCTCCAA GGTAACTTGA CAAGATGCAC CTCTCTCCCA 1

CV-1081 GTGGTGGGGA GCTTTCTCAC TCGATTCTGT CTGTTGCGAT GAATAGTTTA TGCAAATTCG
 CPV-1081 GTGGTGGGGA GCTTTCTCAC TCGATTCTGT CTGTTGCGAT GAATAGTTTA TGCAAATTCG 1
 PR-1081 GTGGTGGGGA GCTTTCTCAC TCGATTCTGT CTGTTGCGAT GAATAGTTTA TGCAAATTCG 1
 W3A-1081 GTGGTGGGGA GCTTTCTCAC TCGATTCTGT CTGTTGCGAT GAATAGTTTA TGCAAATTCG
 WR-1081 GTGGTGGGGA GCTTTCTCAC TCGATTCTGT CTGTTGCGAT GAATAGTTTA TGCAAATTCG

ページ 4 / 6

【図10A.5】

CV-1141 AGGTCGATGC TGTGCAAGTG CATGCAACCT GCTGCGTGA TCCATCAGCC GAGTTCATCC
 CPV-1141 AGGTCGATGC TGTGCAAGTG CATGCAACCT GCTGCGTGA TCCATCAGCC GAGTTCATCC 5
 PR-1141 AGGTCGATGC TGTGCAAGTG CATGCAACCT GCTGCGTGA TCCATCAGCC GAGTTCATCC 4
 W3A-1141 AGGTCGATGC TGTGCAAGTG CATGCAACCT GCTGCGTGA TCCATCAGCC GAGTTCATCC 2
 WR-1141 AGGTCGATGC TGTGCAAGTG CATGCAACCT GCTGCGTGA TCCATCAGCC GAGTTCATCC 2

CV-1201 CCTGTAACTG TCATTGACAT GCACAAATGT GTGAGTCTGC AGCTTGACGA TCTCAGATTC
 CPV-1201 CCTGTAACTG TCATTGACAT GCACAAATGT GTGAGTCTGC AGCTTGACGA TCTCAGATTC 2
 PR-1201 CCTGTAACTG TCATTGACAT GCACAAATGT GTGAGTCTGC AGCTTGACGA TCTCAGATTC 2
 W3A-1201 CCTGTAACTG TCATTGACAT GCACAAATGT GTGAGTCTGC AGCTTGACGA TCTCAGATTC 2
 WR-1201 CCTGTAACTG TCATTGACAT GCACAAATGT GTGAGTCTGC AGCTTGACGA TCTCAGATTC 2

CV-1261 ACCATCACTC AATTGGCCAA TGTAACTTAC AATAGCACA TCAGACTTGA ACATCCAG
 CPV-1261 ACCATCACTC AATTGGCCAA TGTAACTTAC AATAGCACA TCAGACTTGA ACATCCAG 1
 PR-1261 ACCATCACTC AATTGGCCAA TGTAACTTAC AATAGCACA TCAGACTTGA ACATCCAG
 W3A-1261 ACCATCACTC AATTGGCCAA TGTAACTTAC AATAGCACA TCAGACTTGA ACATCCAG 1
 WR-1261 ACCATCACTC AATTGGCCAA TGTAACTTAC AATAGCACA TCAGACTTGA ACATCCAG 1

CV-1321 ATCTTGCCCTA TTGATCCGTT GGATATATCC CAGAAITTAG CTGGGTGAA TAAGAGTCTA
 CPV-1321 ATCTTGCCCTA TTGATCCGTT GGATATATCC CAGAAITTAG CTGGGTGAA TAAGAGTCTA 2
 PR-1321 ATCTTGCCCTA TTGATCCGTT GGATATATCC CAGAAITTAG CTGGGTGAA TAAGAGTCTA 1
 W3A-1321 ATCTTGCCCTA TTGATCCGTT GGATATATCC CAGAAITTAG CTGGGTGAA TAAGAGTCTA 3
 WR-1321 ATCTTGCCCTA TTGATCCGTT GGATATATCC CAGAAITTAG CTGGGTGAA TAAGAGTCTA 1

CV-1381 AGTGATGCAC TACACACTT AGCACAAGT GACACATACC TTTCTGCAAT CACATCAGCT
 CPV-1381 AGTGATGCAC TACACACTT AGCACAAGT GACACATACC TTTCTGCAAT CACATCAGCT
 PR-1381 AGTGATGCAC TACACACTT AGCACAAGT GACACATACC TTTCTGCAAT CACATCAGCT
 W3A-1381 AGTGATGCAC TACACACTT AGCACAAGT GACACATACC TTTCTGCAAT CACATCAGCT 1
 WR-1381 AGTGATGCAC TACACACTT AGCACAAGT GACACATACC TTTCTGCAAT CACATCAGCT 1

ページ 5 / 6

【図10A.6】

CV-1441 ACGACTACAA GTGATTATC CATAATGCA ATCTGCTTG GATCGTTAG TTTAATATTA
 CPV-1441 ACGACTACAA GTGATTATC CATAATGCA ATCTGCTTG GATCGTTAG TTTAATATTA
 PR-1441 ACGACTACAA GTGATTATC CATAATGCA ATCTGCTTG GATCGTTAG TTTAATATTA
 W3A-1441 ACGACTACAA GTGATTATC CATAATGCA ATCTGCTTG GATCGTTAG TTTAATATTA
 WR-1441 ACGACTACAA GTGATTATC CATAATGCA ATCTGCTTG GATCGTTAG TTTAATATTA

CV-1501 ATAATCTTGC TCAAGTGTAG TGTGTGGAAG TTATTGACCA TTGTGCTGC TAATCGAAAT
 CPV-1501 ATAATCTTGC TCAAGTGTAG TGTGTGGAAG TTATTGACCA TTGTGCTGC TAATCGAAAT
 PR-1501 ATAATCTTGC TCAAGTGTAG TGTGTGGAAG TTATTGACCA TTGTGCTGC TAATCGAAAT
 W3A-1501 ATAATCTTGC TCAAGTGTAG TGTGTGGAAG TTATTGACCA TTGTGCTGC TAATCGAAAT
 WR-1501 ATAATCTTGC TCAAGTGTAG TGTGTGGAAG TTATTGACCA TTGTGCTGC TAATCGAAAT

CV-1561 AGAATGGAGA ATTITGTTTA TCATAATTC GCATTCCACC ACCCAGATC TGAITCTCAGT
 CPV-1561 AGAATGGAGA ATTITGTTTA TCATAATTC GCATTCCACC ACCCAGATC TGAITCTCAGT
 PR-1561 AGAATGGAGA ATTITGTTTA TCATAATTC GCATTCCACC ACCCAGATC TGAITCTCAGT
 W3A-1561 AGAATGGAGA ATTITGTTTA TCATAATTC GCATTCCACC ACCCAGATC TGAITCTCAGT
 WR-1561 AGAATGGAGA ATTITGTTTA TCATAATTC GCATTCCACC ACCCAGATC TGAITCTCAGT

W3AとWRの終止コドン (TAA)

CV-1621 GAGAAATATC AACCTGCAAC TCTTGGAAAC AGATAA // (配列番号49)
 CPV-1621 GAGAAATATC AACCTGCAAC TCTTGGAAAC AGATAA // (配列番号25)
 PR-1621 GAGAAATATC AACCTGCAAC TCTTGGAAAC AGATAA // (配列番号27)
 W3A-1621 GAGAAATATC AACCTGCAAC TCTTGGAAAC AGATAA // (配列番号29)
 WR-1621 GAGAAATATC AACCTGCAAC TCTTGGAAAC AGATAA // (配列番号31)

CV, PR, 及びCPVの終止コドン (TAA)

ページ6/6

【図10B.1】

CV 001 MSTIIQSLVV SCLLAGAGSL DPALMQIGV IPTNVRLMY YTEASSAFIV VKLMPTIDS 4
 CPV 001 MSTIIQSLVV SCLLAGAGSL DPALMQIGV IPTNVRLMY YTEASSAFIV VKLMPTIDS 4
 PR 001 MSTIIQSLVV SCLLAGAGSL DPALMQIGV IPTNVRLMY YTEASSAFIV VKLMPTIDS 2
 W3A 001 MSTIIQSLVV SCLLAGAGSL DPALMQIGV IPTNVRLMY YTEASSAFIV VKLMPTIDS 2
 WR 001 MSTIIQSLVV SCLLAGAGSL DPALMQIGV IPTNVRLMY YTEASSAFIV VKLMPTIDS 3

CV 061 ISGCNITSIS SYNATVKLL QFIGNLETI RNQLPTRRR RRFAGVIVGL AALGVATAAQ 2
 CPV 061 ISGCNITSIS SYNATVKLL QFIGNLETI RNQLPTRRR RRFAGVIVGL AALGVATAAQ 2
 PR 061 ISGCNITSIS SYNATVKLL QFIGNLETI RNQLPTRRR RRFAGVIVGL AALGVATAAQ 2
 W3A 061 ISGCNITSIS SYNATVKLL QFIGNLETI RNQLPTRRR RRFAGVIVGL AALGVATAAQ 3
 WR 061 ISGCNITSIS SYNATVKLL QFIGNLETI RNQLPTRRR RRFAGVIVGL AALGVATAAQ 2

CV 121 VTAVALVKA NENTAAILNL KNAIQKTNAA VADVQATQS LGTAVQAVQD HINSVISPAI 4
 CPV 121 VTAVALVKA NENTAAILNL KNAIQKTNAA VADVQATQS LGTAVQAVQD HINSVISPAI 4
 PR 121 VTAVALVKA NENTAAILNL KNAIQKTNAA VADVQATQS LGTAVQAVQD HINSVISPAI 3
 W3A 121 VTAVALVKA NENTAAILNL KNAIQKTNAA VADVQATQS LGTAVQAVQD HINSVISPAI 2
 WR 121 VTAVALVKA NENTAAILNL KNAIQKTNAA VADVQATQS LGTAVQAVQD HINSVISPAI 2

CV 181 TAANCKAQDA IIGSILNLVY TELTTIFHQ ITNPALSPIT IQALRILLGS TLPTVVEKSF
 CPV 181 TAANCKAQDA IIGSILNLVY TELTTIFHQ ITNPALSPIT IQALRILLGS TLPTVVEKSF
 PR 181 TAANCKAQDA IIGSILNLVY TELTTIFHQ ITNPALSPIT IQALRILLGS TLPTVVEKSF
 W3A 181 TAANCKAQDA IIGSILNLVY TELTTIFHQ ITNPALSPIT IQALRILLGS TLPTVVEKSF
 WR 181 TAANCKAQDA IIGSILNLVY TELTTIFHQ ITNPALSPIT IQALRILLGS TLPTVVEKSF

CV 241 NTQISAEELL SGLLITGQIV GLDLYMQMV IKIELPTLV OPATQIIDLA TISAFINQOE 1
 CPV 241 NTQISAEELL SGLLITGQIV GLDLYMQMV IKIELPTLV OPATQIIDLA TISAFINQOE 1
 PR 241 NTQISAEELL SGLLITGQIV GLDLYMQMV IKIELPTLV OPATQIIDLA TISAFINQOE 1
 W3A 241 NTQISAEELL SGLLITGQIV GLDLYMQMV IKIELPTLV OPATQIIDLA TISAFINQOE 2
 WR 241 NTQISAEELL SGLLITGQIV GLDLYMQMV IKIELPTLV OPATQIIDLA TISAFINQOE 2

CV 301 VMAQLPTRVI VTGSLIQAYP ASQCTITPNT VYCRYNDAQV LSDDTMACIQ GNLTRCTFSP
 CPV 301 VMAQLPTRVI VTGSLIQAYP ASQCTITPNT VYCRYNDAQV LSDDTMACIQ GNLTRCTFSP
 PR 301 VMAQLPTRVI VTGSLIQAYP ASQCTITPNT VYCRYNDAQV LSDDTMACIQ GNLTRCTFSP
 W3A 301 VMAQLPTRVI VTGSLIQAYP ASQCTITPNT VYCRYNDAQV LSDDTMACIQ GNLTRCTFSP
 WR 301 VMAQLPTRVI VTGSLIQAYP ASQCTITPNT VYCRYNDAQV LSDDTMACIQ GNLTRCTFSP

CV 361 VVGSFLTRFV LFDGIYVANC RSMCLKMQP AAVILQPSSS PVTVIDMHC VSLQDLNLF 2
 CPV 361 VVGSFLTRFV LFDGIYVANC RSMCLKMQP AAVILQPSSS PVTVIDMHC VSLQDLNLF 2
 PR 361 VVGSFLTRFV LFDGIYVANC RSMCLKMQP AAVILQPSSS PVTVIDMHC VSLQDLNLF 3
 W3A 361 VVGSFLTRFV LFDGIYVANC RSMCLKMQP AAVILQPSSS PVTVIDMHC VSLQDLNLF 2
 WR 361 VVGSFLTRFV LFDGIYVANC RSMCLKMQP AAVILQPSSS PVTVIDMHC VSLQDLNLF 2

ページ1/2

【図10B.2】

CV 421 TITQLANVTY NSTIKLETSQ ILPIDELDIS QNLAANVKS L SDAHQHLAGS DTYLSAITS 1
 CPV 421 TITQLANVTY NSTIKLETSQ ILPIDELDIS QNLAANVKS L SDAHQHLAGS DTYLSAITS 1
 PR 421 TITQLANVTY NSTIKLETSQ ILPIDELDIS QNLAANVKS L SDAHQHLAGS DTYLSAITS 2
 W3A 421 TITQLANVTY NSTIKLETSQ ILPIDELDIS QNLAANVKS L SDAHQHLAGS DTYLSAITS 2
 WR 421 TITQLANVTY NSTIKLETSQ ILPIDELDIS QNLAANVKS L SDAHQHLAGS DTYLSAITS 1

CV 481 TTTSVLSIIA ICLGSLGLL IILLSVVVWK LTIIVANRN RMENFVYHK AFHHSRDL 1
 CPV 481 TTTSVLSIIA ICLGSLGLL IILLSVVVWK LTIIVANRN RMENFVYHK AFHHSRDL 1
 PR 481 TTTSVLSIIA ICLGSLGLL IILLSVVVWK LTIIVANRN RMENFVYHK AFHHSRDL 3
 W3A 481 TTTSVLSIIA ICLGSLGLL IILLSVVVWK LTIIVANRN RMENFVYHK AFHHSRDL 3
 WR 481 TTTSVLSIIA ICLGSLGLL IILLSVVVWK LTIIVANRN RMENFVYHK AFHHSRDL 2

CV 541 EKNQPAITLGT R ← 551 AA (配列番号12)
 CPV 541 EKNQPAITLGT R ← 551 AA (配列番号26)
 PR 541 EKNQPAITLGT R ← 551 AA (配列番号28)

ページ2/2

【図12】

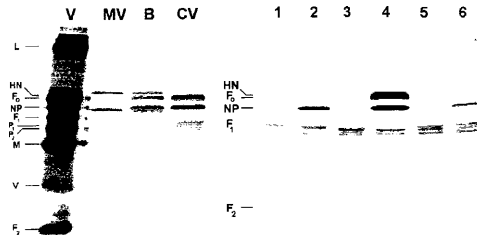


Fig. 12A

Fig. 12B

Fig. 12

【図13】

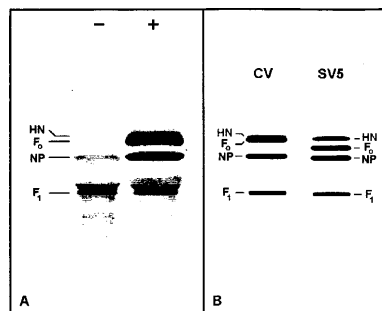


Fig. 13

【図11】

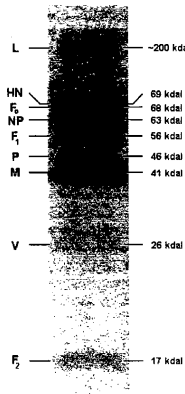
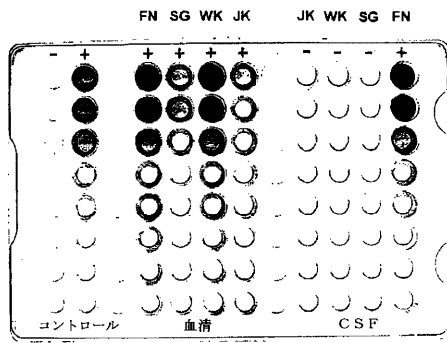
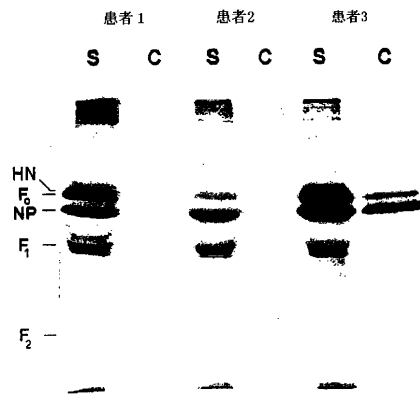


Fig. 11

【図14】



【図15】



【図18】

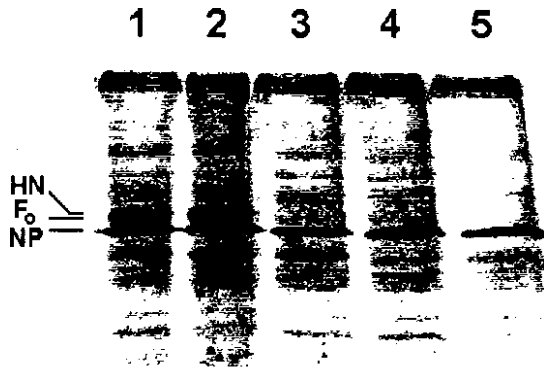


Fig. 18

【図16】

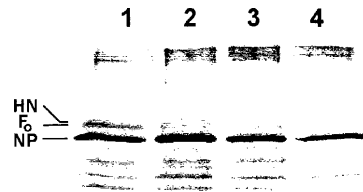


Fig. 16

【図17】

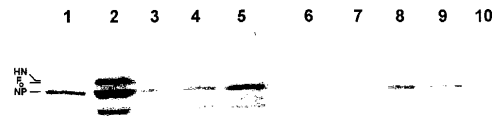


Fig. 17

【図19】

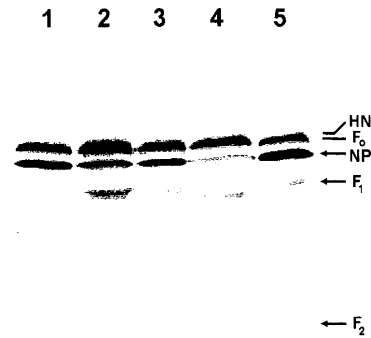
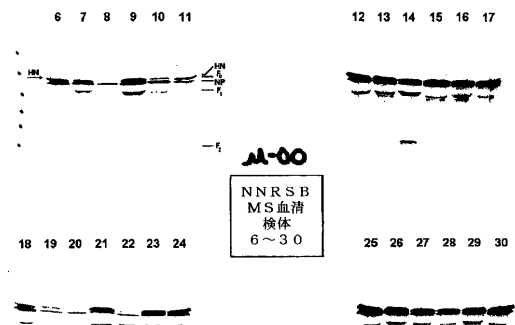


Fig. 19

【図20】



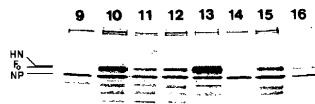
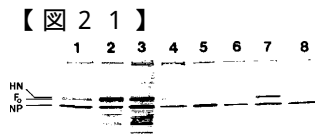


Fig. 21



Fig. 22

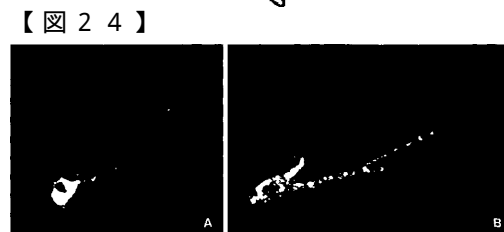


Fig. 24

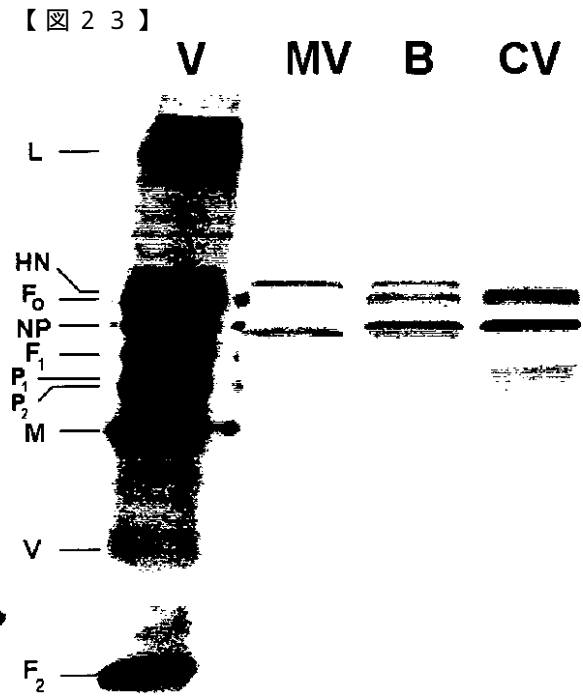
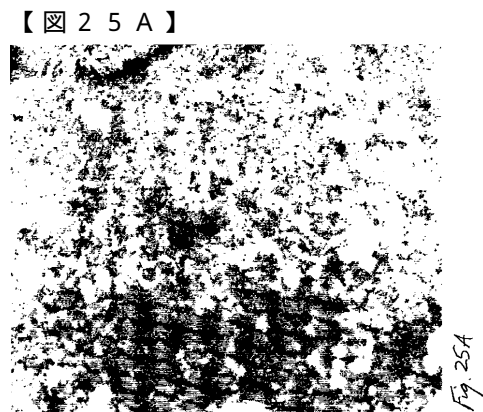
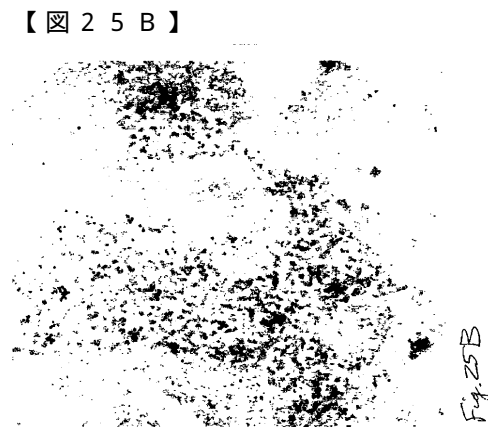


Fig. 23



【配列表】

0004324379000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		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 33/569	M
	C 1 2 P 21/08	L

(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 ロビンズ スティーヴン ジェイ

アメリカ合衆国 カンザス州 6 6 0 0 6 ボルドウィン シティー テンス ストリート 1 3
1 5 クリプティック アプリケーションズ 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>>

藤永薫, 遺伝子増幅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., D B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