

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-519123  
(P2005-519123A)

(43) 公表日 平成17年6月30日(2005.6.30)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00 Z N A	4 B O 2 4
A 6 1 K 35/74	A 6 1 K 35/74 A	4 B O 6 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/00 G	4 C O 8 4
A 6 1 K 38/22	A 6 1 K 39/08	4 C O 8 5
A 6 1 K 38/43	A 6 1 P 1/00	4 C O 8 7
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-573134 (P2003-573134)  
 (86) (22) 出願日 平成15年3月7日(2003.3.7)  
 (85) 翻訳文提出日 平成16年11月8日(2004.11.8)  
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2003/000966  
 (87) 国際公開番号 W02003/074681  
 (87) 国際公開日 平成15年9月12日(2003.9.12)  
 (31) 優先権主張番号 0205376.7  
 (32) 優先日 平成14年3月7日(2002.3.7)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

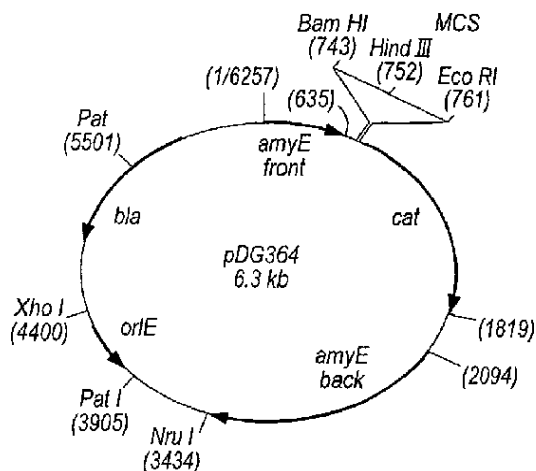
(71) 出願人 504339387  
 ロイヤル ホロウェイ アンド ベッドフ  
 ォード ニュー カレッジ  
 イギリス国 ティーダブリュ20 オイー  
 エックス サリー, エガム (番地なし)  
 )  
 (74) 代理人 100109726  
 弁理士 園田 吉隆  
 (74) 代理人 100101199  
 弁理士 小林 義教

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換え胞子

(57) 【要約】

治療的活性化化合物および標的配列または栄養細胞タンパク質をコードする一つ以上の遺伝構築物を含む遺伝暗号により遺伝子改変された胞子(芽胞)を提供する。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

治療的活性化合物および標的配列または栄養細胞タンパク質をコードする一つ以上の遺伝構築物を含んだ遺伝暗号により遺伝子改変された胞子。

## 【請求項 2】

治療的活性化合物が、抗原または医薬若しくは抗原または医薬の前駆物質であることを特徴とする請求項 1 に記載の胞子。

## 【請求項 3】

遺伝構築物がキメラ遺伝子であることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の胞子。

## 【請求項 4】

胞子がバシラス属またはクロストリジウム属であることを特徴とする請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の胞子。

## 【請求項 5】

遺伝子改変が遺伝子構築物を含んだベクターを用いた母細胞の形質転換、次いで母細胞による請求項 1 からのいずれか一項に記載の胞子の生産の誘発によってなされることを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の胞子。

## 【請求項 6】

遺伝子構築物が一または複数の誘発可能なプロモーター、プロモーターまたは強力なプロモーターまたは改変プロモーターの各々または個々独立の制御下にあることを特徴とする請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の胞子。

## 【請求項 7】

遺伝子構築物がエンハンサー要素またはそれに結合した上流アクチベーター配列を有することを特徴とする請求項 6 に記載の胞子。

## 【請求項 8】

遺伝子構築物が誘発可能な発現系を含むことを特徴とする請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の胞子。

## 【請求項 9】

胞子がヒトまたは動物の身体の腸管の十二指腸及び / 又は空腸で発芽することを特徴とする請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の胞子。

## 【請求項 10】

治療的活性化合物が使用時に免疫応答を誘発するように適応される抗原であることを特徴とする請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の胞子。

## 【請求項 11】

抗原が少なくとも破傷風毒素断片 C または易分性毒素 B サブユニットの断片であることを特徴とする請求項 10 に記載の胞子。

## 【請求項 12】

タンパク質が細胞障壁にて発現されるタンパク質であることを特徴とする請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の胞子。

## 【請求項 13】

タンパク質が栄養細胞で常時発現されることを特徴とする請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の胞子。

## 【請求項 14】

タンパク質が OppA または rrrn0 であることを特徴とする請求項 13 に記載の胞子。

## 【請求項 15】

タンパク質が栄養細胞で間欠的に発現されることを特徴とする請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の胞子。

## 【請求項 16】

タンパク質が可溶性細胞質栄養細胞タンパク質であることを特徴とする請求項 1 から請求項 11 のいずれか一項に記載の胞子。

## 【請求項 17】

10

20

30

40

50

タンパク質がrrnOであることを特徴とする請求項16に記載の孢子。

【請求項18】

可溶性細胞質タンパク質の遺伝構築物の全体または一部がシグナル配列を含むことを特徴とする請求項16または17に記載の孢子。

【請求項19】

シグナル配列が栄養細胞の特定部分に治療的活性化合物を標的にするように適応されることを特徴とする請求項1から11のいずれか一項に記載の孢子。

【請求項20】

シグナル配列が分泌（好ましくは能動的分泌、より好ましくはI型、II型またはIII型分泌）のための、または栄養細胞による翻訳後プロセッシング（好ましくはグリコシル化）のための治療的活性化合物に向けられることを特徴とする請求項19に記載の孢子。

10

【請求項21】

治療的活性化合物が生物学的前駆物質の形質転換が可能な一又は複数の酵素である抗原前駆物質であって、発芽時に、前記一又は複数の酵素が発現され、前記生物学的前駆物質の形質転換により一又は複数の抗原を合成することを特徴とする請求項1から20のいずれか一項に記載の孢子。

【請求項22】

生物学的前駆物質がホルモン、ステロイドホルモン、鎮痛剤またはプロドラッグであることを特徴とする請求項21に記載の孢子。

【請求項23】

治療的活性化合物がタンパク質、ワクチンまたはエンドルフィンである医薬である請求項1から20のいずれか一項に記載の孢子。

20

【請求項24】

医学的症状が好ましくは炎症、疼痛、ホルモンのアンバランス及び/又は腸の障害である、医学的症状の治療のために使用されることを特徴とする請求項1から23のいずれか一項に記載の孢子。

【請求項25】

請求項1から24のいずれか一項に記載の少なくとも二つの異なる孢子を含む組成物であって、前記少なくとも二つの異なる孢子が少なくとも二つの異なる治療的活性化合物を発現することを特徴とする組成物。

30

【請求項26】

組成物が更に製薬的に許容される賦形剤または担体を含むことを特徴とする請求項25に記載の組成物。

【請求項27】

製薬的に許容される賦形剤または担体に結合した請求項1から請求項24のいずれか一項に記載の孢子を含む組成物。

【請求項28】

医学的症状が好ましくは炎症、疼痛、ホルモンのアンバランス及び/又は腸の障害である、医学的症状の治療に使用するための請求項25から27のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項29】

医学的症状が好ましくは炎症、疼痛、ホルモンのアンバランス及び/又は腸の障害である、医学的症状の治療に用いるための医薬の製造における請求項1から24のいずれか一項に記載の孢子の使用。

【請求項30】

a)処置を必要とするヒトまたは動物に請求項1から24のいずれか一項に記載の孢子を投与し、

b)前記孢子が腸管にて栄養細胞に発芽し、

c)前記栄養細胞が処置で用いるための治療的活性化合物を発現するステップを含む医療方法。

50

## 【請求項 3 1】

胞子が経口、鼻腔内または直腸で投与されることを特徴とする請求項 3 0 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【発明の開示】

## 【0001】

本発明は胞子(芽胞)の発芽に関し、特にバシラス属の菌の胞子および該胞子の使用に関するが、該胞子に限定されるものではない。

## 【0002】

感染はヒト集団において死亡の主要原因である。過去100年間、公衆衛生に最も寄与したものは衛生設備およびワクチン接種の二つであり、この二つにより感染症による死亡が激減した。

## 【0003】

更に改良したワクチン接種法の開発が常に最重要な課題となっている理由はいくつかある。

## 【0004】

第一に、主に粘膜面を介して身体に侵入する病原菌に対して、より高度な免疫を提供するためである。通常、ワクチンは非経口投与される。しかし、疾患の多くは主な侵入口として胃腸(GI)管を利用する。従って、コレラや腸チフスは、病原菌であるチフス菌(*Salmonella typhi*)やコレラ菌(*Vibrio cholera*)が摂取され、次に粘膜上皮(GI管内側を覆う部分)にてコロニー形成(*V.cholera*)し、または粘膜上皮に渡って転移(*S.typhi*)することにより発症する。同様に、TB(結核)は初めに結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)による肺感染により発症する。注射による免疫では顕著なIgG反応を含む血清反応(体液性免疫)が生じ、これは感染予防に対し有効性が最も低い。これが、ワクチンの多くが部分的にしか有効でなかったり、その予防期間が短かったりする理由の一つである。

## 【0005】

第二に、注射針を用いない投与経路を提供するためである。現在のワクチン接種プログラムの最大の問題は、少なくとも1回、注射が必要なことである。破傷風ワクチンを例に挙げる。予防効果は10年間継続するが、小児は当初3回注射を受け、引続き5年毎に追加免疫を受けることになっている。先進国では「注射の恐怖」のために追加免疫を受けないようにする人が多い。対照的に、破傷風による死亡率が高い発展途上国では、再利用されたり、殺菌処理を施したりしない注射針を使用することに問題がある。

## 【0006】

第三に、安全性を向上させ、有害な副作用を最小限にするためである。ワクチンの多くは非病原性(弱毒化)にした、生きている生物、または何らかの方法で不活化された生物からなる。原則的にこれは安全であると考えられているが、より安全な方法を開発しなければならないことを示す根拠がある。例えば、1949年に(京都事件)68人の小児が汚染されたジフテリアワクチンを受けて死亡した(Health誌、1996)。同様に、1995年のCutter事件では105人の小児がポリオを発症した。ポリオワクチンがホルマリンにより適正に不活化されてなかったことが判明した。他の多くのワクチン、例えばMMR(麻疹・風疹・流行性耳下腺炎)ワクチンや百日咳ワクチン(Health誌、1996)は、副作用の風評に曝されている。

## 【0007】

第四に、保存施設および輸送施設の不足により有効な免疫プログラム妨げられている発展途上国に対し、経済的なワクチンを提供するためである。ワクチンを輸入しなければならない発展途上国では、ワクチンは適正に保存・配給されることが想定されている。ワクチンを冷蔵し、適正な衛生条件に維持するための関連費用は、発展途上国には多大である。経口ポリオワクチンやBCGワクチンのような一部のワクチンは、2~8 にて一年間しか持続しない(Health誌、1996)。周囲温度にて無期限に保存可能な強固なワクチンの必要性は、発展途上国にとって今や最優先課題である。この種のワクチンは耐熱性であり、温度および乾燥の大きな変動に耐え得ることが理想である。最後に、生産が容易なワクチンであれば発展途上国に多大な利点が得られ、発展途上国において生産可能性がある。

10

20

30

40

50

## 【0008】

本発明の目的は、栄養細胞に発芽したときに薬物を生成するように遺伝子改変された胞子を提供することである。

## 【0009】

従って、本発明は、治療的活性化合物および標的配列または栄養細胞タンパク質をコードする、少なくとも一つの遺伝構築物を含む遺伝暗号により遺伝子改変された胞子を提供する。

## 【0010】

本発明の利点は、ワクチン投与に胞子を用いて注射の必要性、および発展途上国における注射針に関連する問題が解消されることである。加えて、胞子は安定しており、熱および乾燥に対して耐性を有するため、発展途上国におけるワクチン保存の問題を克服できる。胞子は生産が容易であり、低コストで生産可能であるため、本発明に基づくワクチン生産は経済的になり、最終的には非病原菌として、また経口プロバイオティックとして現在使用されていることから、枯草菌(*Bacillus subtilis*)を用いることにより、現在利用できるワクチンより安全なワクチン系となる。

10

## 【0011】

本発明の更なる利点は、胞子が粘膜において免疫応答を誘発することである。これによりワクチン接種は、例えば*S. typhi*, *V. cholera*および*M. tuberculosis*のような粘膜病原菌に対してより効果的となる。

## 【0012】

粘膜面に送達されたワクチンは、粘膜経路を介して感染する疾患に対抗するのにより効果的であろう。ワクチン投与の粘膜経路には経口、鼻腔内及び/又は直腸経路であろう。

20

## 【0013】

本発明の更なる利点は、前記胞子が動物に投与されると、前記胞子は栄養細胞に発芽し、前記栄養細胞は前記キメラ遺伝子を発現し、前記キメラ遺伝子は前記抗原に対して免疫応答を誘発するべく、前記薬物および前記タンパク質を含むことである。

## 【0014】

本発明の更なる利点は、*B. subtilis*細胞を用いて粘膜免疫が実現可能なことである。粘膜の食細胞(マクロファージ/樹状細胞)との相互作用能を高めるために、*B. subtilis*細胞を操作しなければならないと想定されていた。この想定は、異種抗原提示を用いる一部のワクチン系が、抗原送達に(乳酸菌(*Lactobacilli*)または連鎖球菌(*Streptococci*)のような)コロニー形成細菌を用いるという事実に基づいている。米国特許第5,800,821号では、粘膜との相互作用を促進すべく、*B. subtilis*細胞にペスト菌(*Yersinia pestis*)侵襲タンパク質(*Inv*)を発現させる必要性が明確に記載された。本発明ではこの想定は根拠がなく、不必要であることを示している。

30

## 【0015】

好ましくは、治療的活性化合物は抗原または薬物、または抗原もしくは薬物の前駆物質である。好ましくは、遺伝子構築物はキメラ遺伝子である。好ましくは、胞子はバシラスまたはクロストリジウムの胞子である。

## 【0016】

当業者には周知の標準的方法により、キメラ遺伝子を含むベクターを用い、母細胞の形質転換により遺伝子改変を行い、次に母細胞を誘発して本発明に基づく胞子を生成する。

40

## 【0017】

遺伝子構築物は、一つまたは複数の誘発可能なプロモーター、プロモーターまたは強力なプロモーターまたは改変プロモーターの各々または別々の制御下にあり得る。遺伝子構築物は、一つ以上のエンハンサー要素もしくは上流アクチベーター配列およびそれに関連する同類物を有し得る。

## 【0018】

遺伝子構築物は誘発可能な発現系を含み得る。誘発可能な発現系とは、前記胞子が栄養細胞に発芽するときに、例えばpHまたは薬剤のような外部刺激に曝されなければ治療的活

50

性化合物が発現されないような発現系である。

【0019】

一般的に、胞子は腸管で発芽する。より好ましくは、胞子は腸管の十二指腸及び/又は空腸で発芽する。

【0020】

遺伝暗号はDNA及び/又はcDNAを含み得る。遺伝暗号という用語は、コドン使用の縮重を包含するように意図されていると理解されたい。

【0021】

意外であるが、経口投与前に胞子を発芽させるために初回抗原刺激をする必要がないことが判明している。これは特にバシラス属の胞子に当てはまる。

【0022】

投与前に胞子を熱不活化しない。

【0023】

栄養細胞は胞子からの発芽後にのみキメラ遺伝子産物を発現する。これは、例えば栄養状態でのみ発現されるタンパク質(例えば、膜関連タンパク質OppA)の遺伝構築物を有する抗原の遺伝構築物を作製することにより実現され得る。このタンパク質は胞子コートタンパク質ではない。

【0024】

好ましくは、抗原は少なくとも破傷風毒素断片Cまたは易分性毒素Bサブユニットの断片である。

【0025】

本発明のこの態様により、抗原は免疫応答を誘発するようにヒトまたは動物の身体に曝されることが可能になる。

【0026】

好ましくは、抗原は使用時に免疫応答を誘発するように適合された抗原である。

【0027】

使用タンパク質は栄養状態でのみ発現される任意のタンパク質でよい。タンパク質は細胞障壁で発現されるタンパク質でよい。

【0028】

細胞障壁で発現されるタンパク質という場合、細胞内または細胞外のいずれかで、細胞膜で、または細胞膜に関連して発現される任意のタンパク質(リポタンパクおよび糖タンパクを含む)を意味し、細胞膜と一体化して発現されるタンパク質、細胞膜周辺腔内または細胞壁の外部のいずれかで細胞壁に関連するタンパク質、または細胞壁と一体化して発現されるタンパク質がある。

【0029】

この態様により、胞子は経口投与されて抗原を送達することが可能になる。また、胞子は鼻腔内または直腸経路を介して投与してもよい。

【0030】

抗原は異なる栄養細胞タンパク質を有するキメラでよい。一つ以上の異なる栄養細胞タンパク質をコードする遺伝構築物を有する抗原をコードする遺伝構築物を有することにより、抗原を時間的に発現させることが可能である。例えば、薬物は常時発現される栄養細胞タンパク質、例えばOppAまたはrrn0、を有するキメラとして発現可能であるため、抗原を常時「投与」することになる。

【0031】

また、抗原をコードする遺伝構築物は、間欠的に発現される栄養細胞タンパク質をコードする遺伝構築物を有してもよく、従って、キメラの発現と同時に前記キメラは時間調整した薬物投与が可能である。薬物をコードする遺伝構築物は、当初に高濃度で発現されるが、その後時間の経過とともに濃度低下する栄養細胞タンパク質の遺伝構築物を有してもよく、従って、発現時にキメラは初回に抗原を高用量にて投与可能である。

【0032】

10

20

30

40

50

時間的投与は、例えば一つ以上の上記遺伝構築物を用いることによりカスタマイズ可能であろう。

【0033】

また、抗原をコードする遺伝構築物は、可溶性細胞質栄養細胞タンパク質、例えばrrn0、をコードする遺伝構築物を有してもよい。

【0034】

抗原が可溶性細胞質タンパク質を有するキメラとして発現されるとき、前記可溶性細胞質タンパク質は受動的機序(例えば拡散)により、引続く分泌のために細胞膜周辺腔にキメラ全体を標的にするように機能し得る。また、可溶性タンパク質は能動的機序、例えばI型、II型またはIII型により、分泌のためにキメラを標的にし得る。

10

【0035】

可溶性細胞質タンパク質の遺伝構築物は、全部または一部がシグナル配列を含み得る。

【0036】

第二の態様に基づき、本発明は抗原およびシグナル配列をコードする遺伝構築物を含む遺伝暗号により遺伝子改変された胞子を提供し、前記シグナル配列は栄養細胞の特定部分に前記抗原を標的にするように適合される。例えば、シグナル配列は分泌、例えば能動的分泌(I型、II型またはIII型分泌)のために、または栄養細胞による翻訳後プロセシング、例えばグリコシル化のために、薬物に指示し得る。

【0037】

栄養細胞は腸管にて溶解し、続いてキメラとして抗原を放出し得る。

20

【0038】

抗原が栄養細胞障壁タンパク質とともに発現されるとき、一般的に抗原は栄養細胞の直近において免疫系による局所免疫応答を誘発し得る。また、抗原が細胞質で発現され、引続き栄養細胞が溶解し抗原を放出し、または抗原が栄養細胞により分泌されるとき、一般的に前記抗原は栄養細胞の直近部よりも広範な領域で拡散免疫応答を誘発し得る。

【0039】

本発明に基づく胞子は、生物学的前駆物質の形質転換が可能な一つ以上の酵素を含むように遺伝子操作されることにより、発芽時に前記一つ以上の酵素が発現され、前記生物学的前駆物質の形質転換により一つ以上の抗原を合成し得る。例えば、

- a)生物学的前駆物質、例えばホルモンの処理による。ホルモンは栄養細胞で発現されるキメラタンパク質、例えば細胞障壁タンパク質でよく、これが活性化するためには引続きプロセシングが必要である(即ち、酵素開裂部位を介しての細胞からの放出)。または、
- b)非タンパク質化合物、例えば利用可能な生物学的前駆物質から合成されたステロイドホルモンおよび鎮痛剤の生合成もしくはプロセシング、またはプロドラッグの活性薬剤へのプロセシングによる。

30

【0040】

更なる態様に基づき、本発明は本発明に基づく胞子を提供し、前記胞子はキメラ遺伝子として薬物および栄養細胞タンパク質をコードする、少なくとも一つの遺伝構築物を含む遺伝暗号により遺伝子改変される。

【0041】

薬物は一つ以上の、

- a)酵素、抗原、抗体、ホルモンまたは代謝性前駆物質を含むタンパク質
- b)ワクチン
- c)エンドルフィンおよび同類物

でよい。

40

【0042】

更なる態様に基づき、本発明は本発明に基づき、医学的症状の治療に用いられる胞子を提供する。

【0043】

更なる態様に基づき、本発明は本発明に基づく、少なくとも二つの異なる胞子を含む組

50

成物、および任意に製薬的に許容される賦形剤を提供し、前記少なくとも二つの異なる胞子は少なくとも二つの異なる抗原または薬物を発現し、これは特に医学的症状の治療に用いられる。

【0044】

更なる態様に基づき、本発明は本発明に基づき、医学的症状の治療のための薬物の製造において、胞子の使用法を提供する。

【0045】

第三の態様に基づき、本発明は製薬的に許容される賦形剤または担体に結合した、本発明に基づく胞子を含む組成物を提供する。

【0046】

製薬的に許容される妥当な担体は、当業者には周知であろう。

【0047】

更なる態様に基づき、本発明は本発明に基づき、医学的治療の方法に用いられる組成物を提供する。

【0048】

本発明は医学的症状の治療に用いられる薬物の製造において、本発明に基づく組成物の使用法も提供する。

【0049】

医学的治療法は医学的症状、例えば疾患の治療、またはワクチン投与を含むであろう。本発明による治療のための医学的症状は、例えば炎症、疼痛、ホルモンのアンバランス及び/又は腸の障害を含む。

【0050】

更なる態様に基づき、本発明は医学的治療法を提供し、この方法は、

- a) 本発明に基づく胞子を、医学的治療を必要とするヒトまたは動物に経口投与し、
- b) 前記胞子が腸管にて栄養細胞に発芽し、
- c) 前記栄養細胞が医学的治療用の治療的活性化化合物を発現するステップ

を含む。

【実施例】

【0051】

本発明は添付図を参照する単なる例示により記述される。

【0052】

更に、本発明は以下の非限定的実施例を参照して示される。

【0053】

(実施例1)

組換え遺伝子の構築

次の例では組換え遺伝子の構築にoppA遺伝子を用いている。この遺伝子はよく研究されており、オペロンの一部を形成する。OppAはオリゴペプチド・パーミアーゼによる初期のペプチド取込みのための受容体として作用する。B. subtilisにおけるOppAタンパク質はよく発現され、応答能および胞子形成に關与する(Spo0Kと呼ばれる)。

【0054】

細胞質膜において遺伝子配列がoppAの3'末端に融合すると、組換えタンパク質(タンパク質X)の発現が可能になり、OppAタンパク質Xは膜の外面に露出したC末端ドメイン(融合ドメインを保有)とともに膜中に凝集する。グラム陽性菌では、これは抗原が膜とペプチドグリカン壁との間の腔に露出されるということであろう。

【0055】

oppAは胞子形成に關与するため、このタンパク質に対する改変は無処置コピーに対してトランスに行わなければならない。即ち、染色体に一コピーのoppAを無処置の状態におかななければならない。このために、amyE座(アミラーゼをコード)を用いてキメラ遺伝子を運搬する。従って、oppA-genXキメラは、通常の染色体位置にて無処置oppA遺伝子(およびopp座)を保有する細胞のamyE座に配置される。また別の座にthrCがあり、これに対して

10

20

30

40

50

クローニングベクターが利用できる。

【0056】

本発明の好適な実施例において、グラム陽性菌 *Bacillus subtilis* を用いる。この微生物に関する優れた遺伝的特徴および熱心なゲノム研究により、この菌は大腸菌 (*Escherichia coli*) に次いで最も研究された原核生物になっている。この微生物は非病原菌とみなされ、ヒトおよび動物双方が摂取するプロバイオティックとして現在用いられている新規な食料に分類される。この微生物の唯一際立った特徴は、栄養物が不足すると発育生命周期の一部として内生孢子を形成することである。成熟孢子は母細胞から放出されると、何千年とまではいかなくとも何百年も代謝的に休止状態で生存可能である。

【0057】

a) 遺伝子キメラの構築

i) amyE::oppA-TTFC TTFC(破傷風毒素断片C)は破傷風菌 (*Clostridium tetani*) が産生する破傷風毒素の47kDaの成分である。TTFCをoppAに融合し、amyE座に導入した。

【0058】

i) 47kDaのTTFC断片をコードするtetC遺伝子(ベクターpTet8にて運搬)の妥当な配列、ii) プロモーターを含むoppA遺伝子の5'領域、を増幅するのにPCR法を用いた。oppAおよびtetCのPCR産物を、(PCRプライマーの包埋切断部位を用いて)制限消化および3'末端ならびに5'末端の連結により融合した。次に多重クローニング部位にてpDG364ベクター中にoppA-TTFC断片をクローニングした(図1)。

【0059】

図1はプラスミドpDG364を示し、このベクターについては他でも記載される。このベクターの最も重要な特徴は、amyE遺伝子の左右の側方腕である(amyE前部およびamyE後部と呼ぶ)。クローニングされたDNA(即ち、cot-抗原キメラ)は、一般的なPCR法により多重クローニング部位に導入される。クローンを検証し、バックボーン配列を認識する酵素(例えば、PstI)を用いた消化によりプラスミドクローンを線形化する。次に、線形化DNAを用い、プラスミドが有する抗生物質耐性(クロラムフェニコール耐性)を選択することにより、*B. subtilis*の形質転換受容性細胞を形質転換する。図2に示すように、線形化プラスミドは、組換えのためのamyEの前部および後部側方腕を用いた二重交叉型組換えイベントを介してのみ完全体になる。この過程で、クローニングされたDNAがamyE遺伝子に導入され、amyE遺伝子は不活化される。この方法により、染色体に対する損傷が最小限にされ、細胞の発育、代謝や孢子形成が阻害されない。

【0060】

DNAシーケンシングによりジャンクション全体にわたりクローンが検証され、ベクターが線形化され、次に二重交叉型組換えにより*B. subtilis*の染色体に導入された(図2)。クロラムフェニコール耐性の選択、およびアミラーゼ陰性コロニーのスクリーニングにより、図2に示すような二重交叉が確実になされ、これは他でも記載される。図3に示すように、TTFCに対するポリクローナル抗血清を用い、ウエスタンブロッティング法によりamyEにおいてこの構築物を保有する細胞をTTFCの存在を調べるために検査した。

【0061】

ii) amyE::oppA-TTFC thrC::cotA0-LTB この構築物はamyE座およびthrC座に配置された二つの構築物を保有した。

【0062】

この構築物では、*Escherichia coli*の11kDaの易分性毒素断片B(LTB)に融合されたcotA遺伝子のキメラ遺伝子融合を保有するプラスミドを用いた。LTBおよびcotA配列を増幅し、インフレームでこれらを融合するのにPCR法を用いた。CotAは孢子コートの上層から主要タンパク質65kDaをコードする。第一段階でベクターpDG1664を用いてcotA-LTBキメラを構築した。pDG1664はpDG364(図1)に類似しているが、エリスロマイシン耐性遺伝子(erm)を保有する。従って、二重交叉型組換えイベントの選択はErm<sup>R</sup>の選択によりなされる。pDG1664の第二の重要な特徴は、挿入にはthrC座の前部および後部(左右)腕を用い、thrC座の挿入および破壊が可能になることである。この方法により、thrC::cotA-LTB細胞を作製し

10

20

30

40

50

、これらが孢子形成するように誘発し、次にLTBに対するマウスポリクローナル血清を用い、孢子コートタンパク質を検査してCotA-LTBの存在を調べた(図3)。孢子表面にCotA-LTBキメラが十分に発現していることを立証した後、amyE::oppA-TTFCを保有する菌株の形質転換受容性細胞を形質転換するために、thrC::cotA-LTBの染色体DNAを用いた。Erm<sup>R</sup>が選択され、形質転換体はoppA-TTFCおよびcotA-LTBの二つのキメラ遺伝子を保有すると考えられる。両キメラの存在は、抗TTFC血清を用いた栄養細胞および抗LTB血清を用いた孢子コートタンパク質のウエスタンブロッティング法により確認された。

【0063】

b) 複数の抗原の提示

孢子コートに複数の抗原提示をするには、pDG364およびpDG1664プラスミドベクターを用いることが必要である。pDG364にて一つのキメラ遺伝子が作製されてamyE座に導入され、pDG1664にてもう一つのキメラが作製されthrC座に導入される。これが可能なのは、各形質転換イベントには別の抗生物質耐性の選択が必要なためである。

【0064】

孢子表面にLTBを発現させ、栄養細胞内にTTFCを発現させるためにこの方法を用いた。この特徴は興味深く、二種混合ワクチン接種に利用できよう。また、孢子におけるTTFC発現(CotAに融合)と、更に栄養細胞由来のTTFC(OppAに融合)を用いることにより、更に高用量にすることができよう。

【0065】

c) 菌株の検証

本方法では、キメラ遺伝子産物が表面上、即ち細胞の最上層に示されていると判定することが必要であるとは判断しない(これはFACS解析もしくは別の種類のフローサイトメトリー、または免疫蛍光法により可能であろう)。本方法では、栄養細胞と粘膜との相互作用が不可欠であると想定しており、そうすることにより抗原が表面上または表面近位にあれば免疫を刺激することが可能であろう。これにはマクロファージまたは樹状細胞による孢子の食作用に由来する細胞媒介免疫が含まれ得る。本理論では、実際には抗原が細胞外皮内にて部分的に防御されることに利点があり得る。更なる展開には粘膜免疫による免疫原性の立証で十分である。

【0066】

d) 非経口免疫

二つの免疫を実施した。第一に、OppA-TTFCを発現しているホルマリン不活化細胞(約 $5 \times 10^9$ 個)によるC57純系ブラックマウス(8匹群)の腹腔内免疫である。図5はこれら免疫から生じる血清IgG濃度を示し、OppA-TTFCキメラの提示および免疫原性の成功を示す。OppA-TTFCおよびCotA-LTBを保有する二重構築物の免疫原性を検証すべく、孢子および栄養細胞を作製し、IP経路により8匹群のマウスを免疫し(約 $1 \times 10^9$ 個)、免疫応答を追跡した。再び両経路により高濃度の血清IgGが得られた。

【0067】

e) 粘膜免疫

粘膜免疫を実施すべく、C57純系ブラックマウス8匹群の経口投与を用いた。図5~7に例をいくつか示す。

【0068】

第一に、OppA-TTFCを発現している高濃度の孢子( $1.7 \times 10^{10}$ 個)の投与である。図に示すように、ほぼ防御レベルにて(通常、 $10^3$ を超える力価により表される)血清抗TTFC特異性IgG応答を実現することができた。IgG応答を実現し得る唯一の方法は、免疫に至る有意レベルの孢子の発芽が生じていることが条件になる。

【0069】

第二に、CotA-LTBおよびOppA-TTFCを保有する孢子によるマウスの経口投与は(図6および図7)、LTBおよびTTFCの双方に対し高濃度の血清IgGを示した。これは、免疫を生じさせるために複数の抗原を提示し用いることが可能であることを示し、二種混合ワクチンとして展開する道を開くことになる。

10

20

30

40

50

## 【0070】

他の応用

1)この方法を用いて任意の生物学的に活性化した分子を示すことが可能であろう。例えば、産業に応用する酵素である。

## 【0071】

2)本発明に基づき、胞子をアジュバントと併用して発芽細胞の免疫応答を高めることも可能であろう。これらにはコレラ毒素、キトサンまたはアプロトニンが含まれよう。

## 【0072】

栄養細胞における発現のための任意の細胞外皮タンパク質とともに、胞子発現のための胞子コートタンパク質を任意に組み合わせることが可能である。即ち、CotAまたはOppAに限定されない。これまでに同定した胞子コート発現のための主な候補は、CotA,CotB,CotC,CotD,CotEおよびCotGである。

10

## 【0073】

他の細胞表面提示経路

主に簡便性および高度な発現に基づき、OppAタンパク質を提示の実例として用いている。他の細胞外皮タンパク質を用いることも可能であり、これには走化性、溶質の取込み等に関するタンパク質が含まれる。唯一の基準は、

- i)抗原がタンパク質の露出ドメインに融合可能であり、
- ii)タンパク質が高濃度で膜に存在すること

である。

20

## 【0074】

これらのタイプのタンパク質を用いるためには、一つずつ体系的に提示を試みる実証的方法が必要であろう。もう一つの方法は、細胞外皮、即ち細胞壁自体のペプチドグリカンに関連するタンパク質を用いることである。グラム陽性菌の多くには、細胞質膜および細胞壁のペプチドグリカンの双方に共有結合的に付着した「細胞壁に固着した表面タンパク質」群が存在する。

## 【0075】

(実施例2)

菌株

SC2362は他で記載されており<sup>1)</sup>、rrn0-lacZ遺伝子、およびクロラムフェニコール(5mg/ml)に対する耐性をコードするcat遺伝子を保有する。rrn0はrRNAをコードする、増殖的に発現される遺伝子である。この菌株ではプロモーターを保有するrrn0の5'領域がE.coliのlacZ遺伝子に融合された。PY79はSC2362の原栄養的かつ同質遺伝的祖先であり、Spo+である<sup>2)</sup>。DL169(rrn0-lacZ gerD-cwlB D::neo)は、SC2362由来の染色体DNAによりTB1菌株(gerD-cwlB D::neo)の形質転換受容性細胞を形質転換し、次にrrn0-lacZカセットが保有するクロラムフェニコール耐性を選択することにより作製された。TB1はネオマイシン耐性遺伝子に置換された染色体のgerD-cwlB領域を有し、この菌株の胞子は同質遺伝的野性型PY79菌株に比し、発芽率が0.0015%に低下することが見出された(E.Ricca;私信)。

30

## 【0076】

胞子および栄養細胞の調製

40

他で<sup>3)</sup>記載されているような取り尽くし法(exhaustion method)により、DSM(ディフコ胞子形成培地)培地にて胞子形成させた。胞子形成開始後22時間に胞子形成培養物を採取した。残留胞子嚢細胞を分解するためにリゾチーム処理を用い、NicholsonおよびSetlow<sup>3)</sup>が記載するように胞子の精製懸濁液を作製し、続いて1M NaCl,1M KClにて、次に水(2回)にて連続的に洗浄した。タンパク質分解を阻害するため、洗浄液にPMSF(10mM)を含めた。水における最後の懸濁後、残留細胞を死滅させるために68℃にて1時間、胞子を処理した。次に、-20℃にてアリコート凍結する前に、cfu/ml値を得るために胞子懸濁液を即座に滴定した。

## 【0077】

5% D-グルコースおよび0.2% L-グルタミンを含むLBにおける発育により、約109cfu

50

/mlに相当するOD600nm値になるまで*B. subtilis*栄養細胞を調製し即座に使用した。これらの条件下での発育により不測の孢子形成が阻止される<sup>4)</sup>。

#### 【0078】

糞便組織および腸内組織において生存可能な細菌の解析

汚食症を防止するために格子床が付いたケージにマウスを個々に収容することにより、糞便の数を測定した。全糞便を適当な時間に採取し、クロラムフェニコール(5mg/ml)含有DSM(ディフコ孢子形成培地<sup>5)</sup>)寒天プレートおよびXgal(DSMCX)に連続希釈物をプレートする前に、PBSにて均質化してSC2362細胞を選択した。屠殺したマウスから腸内組織を回収し、DSMCXに連続希釈物をプレートする前に、ガラスビーズ(0.5mm; 4 × 30秒バースト(se cond bursts)、4 )を用いてPBSにて均質化した。

10

#### 【0079】

擬似胃腸管(GIT)条件

LBプロスにて約10<sup>9</sup>細胞/mlに相当する細胞濃度まで細菌を発育させ、採取し、擬似胃液(1mg/mlペプシン{ブタ胃粘膜、Sigma社}、pH2.0)}または小腸液(0.2%胆汁塩{50%コール酸ナトリウム:50%デオキシコール酸ナトリウム;Sigma社},pH7.4)にて懸濁した。懸濁液を37 °Cにてインキュベートし、試料を除去して連続的に希釈し、cfu/ml値を得るためにLB寒天プレートにプレートした。

#### 【0080】

b-ガラクトシダーゼ特異性血清抗体を検出する間接ELISA法

50ml/ウェルの精製されたb-ガラクトシダーゼ(Sigma社、炭酸/重炭酸緩衝剤にて2mg/ml)でプレートを被覆し、常温にて一晩放置した。37 °Cにて1時間、2%BSA含有PBSにてブロックした後、ELISA希釈緩衝剤(0.1M Tris-HCl,pH7.4;3%(w/v)NaCl;0.5%(w/v)BSA;10%(v/v)羊血清(Sigma社);0.1%(v/v)Triton-X-100;0.05%(v/v)Tween-20)にて、1/40希釈から開始する連続2倍希釈により検体を加えた。各プレートは、陰性対照群(1/40に希釈された免疫前血清)および陽性対照群(マウス抗b-ガラクトシダーゼ(Sigma社))の同型ウェルを保有した。抗マウスHRP接合体(Sigma社)の添加前に、37 °Cにて2時間、プレートをインキュベートした。37 °Cにて更に1時間、プレートをインキュベートし、次に基質TMB(3,3',5,5'-テトラメチル-ベンジジン;Sigma社)を用いて展開した。2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を用いて反応を停止した。各検体に対して希釈曲線を描き、エンドポイント力価は免疫前プール血清の1/40希釈と同じ吸光度を生じる希釈として算出した。群間の統計上の比較はMann-Whitney U検査により実施した。P>0.05は有意でないと考えられた。糞便IgAを測定すべく、前記のように類似のELISAプロトコルを引続き実施した<sup>6)</sup>。PBS/2% BSA/0.05% Tween20にて不希釈糞便抽出物から開始する連続2倍希釈により検体を加えた。エンドポイント力価は、不希釈免疫前糞便抽出物と同じ吸光度を生じる希釈として算出した。6.0以上のエンドポイント力価は「陽性」であると考えられた。

20

30

#### 【0081】

孢子コートタンパク質および栄養細胞溶解物の抽出

他で詳細に記載されているようなSDS-DTT抽出緩衝剤を用い<sup>3)</sup>、高濃度(1×10<sup>10</sup>孢子/ml)にあるPY79菌株の孢子の懸濁液から孢子コートタンパク質を抽出した。栄養細胞溶解物では、PY79菌株をLB培地にて1.5のOD600nmまで発育し、細胞懸濁液を洗浄して次に超音波処理により溶解し、続いて高速遠心分離を実施した。抽出したタンパク質はSDS-PAGEにより統合性を評価し、BioRad DCタンパク質測定キットを用いて濃度を評価した。

40

#### 【0082】

免疫

8匹のマウス群(雌、BALB/C、8週齢)にPY79,SC2362またはDL169のいずれかの菌株の孢子または栄養細胞の懸濁液(0.2ml)を経口投与した。ハロタンでマウスを軽度麻酔した。未処置非免疫対照群を含めた。0,1,2,20,21,22,41,42および43日に胃内胃管栄養法により経口免疫を実施した。-1,18,40および60日に血清検体を採取し、-1,18,40および58日に新鮮糞便ペレットを採取した。糞便検体(0.1g)を4 °Cで1ml PBS/1% BSA/1mM PMSF(フェニルメチルスルホニルフッ化物、Sigma社)にて一晩インキュベートし、次に全ての固形物

50

を粉碎するためにボルテックスし、13,000rpmにて10分間、遠心分離した。血清および糞便抽出物は使用するまで - 20 ℃ にて保存した。

#### 【 0 0 8 3 】

##### 免疫蛍光顕微鏡検査

LB培地にて*B. subtilis*菌株(PY79およびSC2362)を中型ログ(mid-log)まで発育させた。2.4%(w/v)パラホルムアルデヒド、0.04%グルタルアルデヒドおよび0.03M Na-PO<sub>4</sub>緩衝液pH7.5を用い(最終的濃度)、常温にて10分間、次に氷上にて50分間、検体を原位置で固定した。固定した細菌を常温でPBS pH7.4 にて3回洗浄し、次にGTE-リゾチーム(50mMグルコース、20mM Tris-HCl pH7.5、10mM EDTA、リゾチーム2mg/ml)にて再懸濁した。0.01%(w/v)ポリ-L-リジン(Sigma社)で処理された顕微鏡カバーガラス(BDH)にアリコート(10ml)を即座に付着した。4分後、カバーガラスから液体を吸引し、常温にて2時間、完全に乾燥させた。カバーガラスをPBS pH7.4にて3回洗浄し、常温でPBSにて15分間、2% BSAでブロックし、次に更に9回洗浄した。検体を常温にて45分間、1:200希釈の一次抗体(マウス抗*b*-ガラクトシダーゼ)で標識化し、3回洗浄し、次に常温にて45分間、抗マウスIgG-TRITC接合体(Sigma社)により更にインキュベートした。3回洗浄した後、カバーガラスを顕微鏡のスライドに装着し、BioRad Radiance 2100レーザーシステムを具備したNikon Eclipse蛍光顕微鏡下で観察した。LaserSharpソフトウェアを用いて撮像し、Confocal Assistantプログラムで画像処理した。レーザー出力はGreen HeNeで30%であり、スキャン速度は50lpsであった。画像の大きさは10x10mmであった。

#### 【 0 0 8 4 】

##### 結果 胃腸管における*B. subtilis*の生存

経口経路による異種抗原送達のための胞子を開発する第一ステップとして、マウスモデルの胃腸管における*B. subtilis*の栄養細胞および胞子の生存を評価した。栄養細胞の口バスター性を評価すべく、2純系マウス群(Balb/c)の各群にSC2362(*rrn0-lacZ*)菌株の $2.4 \times 10^{10}$ 個の栄養細胞を接種した。投与後24時間、個々に収容されたマウスから回収した糞便に存在するSC2362の生存数を得るために6匹のマウスからなる一群を評価した(図8A)。本研究では、Lac<sup>+</sup>表現型およびクロラムフェニコール耐性(*cat*遺伝子がコードし、*rrn0-lacZ*構築物が保有する)を用い、*rrn0-lacZ*マーカーにより単純化された同定および生存コロニーのスクリーニングが可能になった。当初の投与量の0.00016%に相当するSC2362の最大数が投与後6時間に認められたが、これはその後、最初の24時間までには有意でないレベルに急速に減少した。最初の24時間に糞便にて回収されたSC2362の平均累積数は、接種量の0.00025%に相当した。第二群のマウス(12匹)では、3, 6, 9, 12, 18および24時間に二匹を屠殺して、小腸および大腸を除去し、均質化し、SC2362の生存可能ユニットを計数するためにプレートした。図8Aに示すように、小腸で認められたSC2362の数は非常に少なく、3時間にて最大数が認められた(約100個)。大腸では3時間により多くの数が認められたが(接種量の0.00016%)、この数はその後減少した。

#### 【 0 0 8 5 】

胞子の生存を検討すべく、上記の実験に類似した実験を実施したが、SC2362菌株の $2.1 \times 10^8$ 個の胞子をマウス毎に経口投与した(図8B)。プレートする前に糞便を熱処理せず、従って胞子および発芽した胞子(栄養細胞)の双方の数が含まれ得るという点において、本アッセイ法はこれまでの研究<sup>7)</sup>とは異なるものであった。6匹のマウス群由来の糞便数は、糞便中に存在し生存可能なSC2362の数を6時間にて有意に示し、12時間にて最大レベル(接種量の~12%)に達した。24時間までにも著しい数のSC2362(~4%)が糞便中に存在した。小腸および大腸における数は、栄養型細菌(3時間にて最大数)の投与と類似した動態を示したが、生存可能ユニットのレベルは有意により高かった。未処置対照群として5匹のマウス群も用い、糞便数を得るためにその中の一匹のマウスを検査し、小腸および大腸での数を解析するために適当な時点にて他の四匹を検査した。それぞれの場合で数は復元されず、本アッセイ法が立証されることになる。

#### 【 0 0 8 6 】

##### 擬似GIT環境における*B. subtilis*の生存

次に、栄養型*B. subtilis*および無処置孢子の生存にGIT内の条件がどのような影響を与えるかを、インビトロアッセイを用いて検討した。GIT内の条件をシミュレートするこれまでの研究に基づき<sup>8-12)</sup>、胃および小腸の二つの環境を再現した。胃に認められる擬似条件はペプシン(1mg/ml)からなり、LB培地にてpH2.0であり、小腸はパンクレアチン(1mg/ml)含有0.2%胆汁塩からなり、LBにてpH7.4であった。しかし、孢子の生存を評価するために、栄養豊富なLB培地は孢子の発芽を促進するかもしれないため、LBをPBSに置換した。約108~109cfu/mlのSC2362菌株の栄養型*B. subtilis*細胞または孢子の懸濁液を、擬似胃条件または小腸条件下で37℃にてインキュベートし、プレートアウトおよびcfu/mlの測定により生存を判定した。

#### 【0087】

対照群として*E. coli*(BL21菌株)および腸粘膜肥厚症菌(*Citrobacter rodentium*)(ATCC 51459)の二つの腸内細菌種も含み、後者は小腸に感染するマウス病原菌である<sup>13)</sup>。図9に示すように、擬似胃条件は*B. subtilis*(図9A)、*E. coli*(図9B)および*C. rodentium*(図9C)の栄養細胞の生存可能性を有意に低下させることになり、1時間以内にほぼ完全に生存可能性が喪失した。しかし、孢子はほぼ影響を受けなかった(図9D)。しかし、小腸に認められる胆汁塩は栄養型*B. subtilis*の生存可能性に有意に影響を与えることが見出され、最初の1時間後に当初の接種菌の僅か0.0002%が生存した(図10A)。しかし、*E. coli*および*C. rodentium*は影響を受けずにこの条件下で発育でき、細胞数が中程度に増加した(図10Bおよび10C)。しかし、パンクレアチンが存在しない場合でも細胞生存可能性がほぼ同じレベルに低下したため、*B. subtilis*に対する影響は主に胆汁塩に起因する(データは示さない)。最後に、胆汁塩は無処置孢子には全く影響を与えなかった(図10D)。

#### 【0088】

擬似腸条件における孢子の発芽

孢子は十二指腸に侵入すると発芽することが示されている<sup>1,7)</sup>。この領域は胆汁塩に富み、本研究で細胞生存可能性に対する胆汁塩の影響を示しているため、孢子の発芽に対して胆汁塩がどのような影響を与えるかについて検討した。樹立した方法により<sup>3)</sup>、0.2%胆汁塩の有無で発芽を評価した。AGK(アラニン-グルコース-KC1)と呼ばれる特異性発芽刺激物質の存在下、純粋孢子(野性型PY79菌株)の懸濁液を37℃にてインキュベートした。孢子の発芽を誘発するため、10mM(最終濃度)にてL-アラニンを添加し、OD600nm値を測定した(図11)。孢子が発芽するに従ってOD値は減少するが、これは明相孢子が屈折性を喪失し、より発育するためである<sup>14,15)</sup>。本結果(2回反復)は、AGK存在下で孢子の発現は極度に速く、最初の90分にてOD600nm値が32.4%低下した。しかし、0.2%胆汁塩の存在下で孢子の発芽は阻害されたが根絶はされず、90分間経過後、OD600nm値が42.8%低下した。孢子の発芽に対するこの影響はこれまでの研究で観察されており<sup>16)</sup>、本願でのより詳細な知見と一致する。本願では示されない研究において、孢子の発芽が擬似胃条件にて影響を受けない(即ち、発芽しない)ことを認めた。

#### 【0089】

抗原送達媒体としての孢子

本研究では、孢子が胃障壁を通過しても生存するために十分機能的であることを示す。異種抗原送達のために孢子を利用できるのかという課題に取り組むべく、SC2362にて運搬されるrrn0-lacZ遺伝子を用いた。rrn0-lacZ自体は、*E. coli*のlacZ遺伝子に融合し、かつsAに認識される強力なrrn0プロモーターを含むキメラ遺伝子である<sup>1)</sup>。対照群として発芽突然変異体であるDL169を構築したが、これは孢子の発芽に重要な染色体領域gerD-cwIBにおける欠失(gerD-cwIB Δ::neo)とともにrrn0-lacZを保有した。gerD-cwIBにて欠失を保有する孢子は発芽能が重度に阻害される(野性型孢子の0.0015%に減少)(E. Ricca、私信)。図12Aに示すように、α-ガラクトシダーゼに対してポリクローナル血清を用い、免疫蛍光法によりSC2362の栄養細胞にlacZが発現されることを実証した。同質遺伝的野性型PY79菌株には検出可能な発現は認められなかった。SC2362およびDL169細胞の断片化全細胞抽出物のSDS-PAGE解析により(図12B)、α-ガラクトシダーゼの大きさに相当する顕著なバンドが117kDにて示された。これは抗α-ガラクトシダーゼポリクローナル抗体を用いた

10

20

30

40

50

ウエスタンブロッティング法により確認され、多くの高mw.分解産物が示されたが、他では明らかな分解は示されなかった。

【0090】

rrn0-lacZを発現しているSC2362細胞に発現される  $\beta$ -ガラクトシダーゼの定量は、精製された  $\beta$ -ガラクトシダーゼ(Sigma社)および*B. subtilis*のPY79, SC2362およびDL169菌株の全細胞抽出物の連続希釈を用い、ドットプロット実験により得られた(図5c)。タンパク質は、抗  $\beta$ -ガラクトシダーゼポリクローナル抗体と、次にアルカリホスファターゼに接合した二次抗体と反応させ、BCIP/NBTまたはECLシステム(Bio-Rad社)により着色した。濃度測定解析により  $\beta$ -ガラクトシダーゼはPY79細胞にて検出可能でないことが示された。SC2362およびDL169細胞抽出物では、SC2362では  $\beta$ -ガラクトシダーゼ量は総抽出タンパクの3.14%(31.4ng/mg)と同等であり、DL169では総抽出タンパクの2.4%(24ng/mg)と同等であった(平均0.43mg)。これらの菌株にて産生される高レベルの  $\beta$ -ガラクトシダーゼは、SDS-PAGE解析により確認され(図12B)、異種遺伝子発現に対するrrn0プロモーターの有効性を示す。

10

【0091】

rrn0-lacZを保有する胞子の経口送達後の抗  $\beta$ -ガラクトシダーゼ血清反応  
7匹の純系マウス群にSC2362, DL169またはPY79の胞子または栄養細胞を経口投与した。これまでに経口免疫を最適化した投与計画を用い<sup>6)</sup>、各免疫投与量は $2 \times 10^{10}$ 個の胞子または $3 \times 10^{10}$ 個の栄養細胞のいずれかを含んだ。濃度測定解析から(上記の「抗原送達媒体としての胞子」という標題の節を参照)、1投与量のSC2362またはDL169栄養細胞が約0.43mgの  $\beta$ -ガラクトシダーゼを含有すると規定することができた。

20

【0092】

抗  $\beta$ -ガラクトシダーゼIgG検索のためELISA法により血清抗体を解析し(図13)、サンプリングのため対照群として7匹の非免疫マウス群も含めた。図13に示すように、SC2362(rrn0-lacZ)胞子によるマウスの経口免疫では、40日以降、非組換え胞子(PY79)を投与したマウスまたは未処置対照群より有意に高い( $P < 0.05$ )エンドポイント力価が得られた。しかし、DL169胞子は免疫マウスで抗体陽転を生じず、抗  $\beta$ -ガラクトシダーゼ力価は非組換え胞子(PY79)を投与したマウスまたは未処置対照群と有意に( $P > 0.05$ )異なることはなかった。これは、経口送達後にSC2362の一部の胞子が発芽し、引き続きrrn0-lacZの発現に至ったに相違あるまい。DL169胞子の送達後にこれらの反応を示さないことは、これらの液性反応を生じるためには胞子の発芽が不可欠であることがわかる。この段階では、抗体反応のレベルというより抗原送達に胞子の発芽を用いことができるという根拠に関心がある。各菌株の栄養細胞を用いた免疫を対照群として組み込み、SC2362またはDL169細胞を投与したマウスで抗  $\beta$ -ガラクトシダーゼIgG反応を検出し、幾分意外であった。反応レベルはSC2362胞子の投与から得られた反応に類似し(図13)、この反応の類似性は、この投与計画により免疫原として  $\beta$ -ガラクトシダーゼを用いるときに、閾値レベルに達しているということであろう。

30

【0093】

SC2362胞子(図14A)、SC2362栄養細胞(図14B)およびDL169栄養細胞(図14C)により免疫したマウス由来の血清も検査し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ特異性IgG1, IgG2aおよびIgG2bサブクラスの存在を検討した。SC2362またはDL169の栄養細胞による免疫は、20日にて最初に検出可能なサブクラスIgG2aを示し、その後IgG1が漸増した。SC2362胞子の投与ではIgG1およびIgG2aの早期の増加を示した。3例全てにおいてIgG2bレベルは緩徐に増加した。

40

【0094】

rrn0-lacZを保有する胞子の経口送達後の抗  $\beta$ -ガラクトシダーゼ粘膜反応  
SC2362胞子を服用した8匹のマウス群のうち1匹のみが、58日に16.8の陽性力価を示した。同菌株の栄養細胞で免疫したマウス群における抗  $\beta$ -ガラクトシダーゼ特異性糞便IgAは、8匹のマウスのうち3匹、1匹および4匹が、それぞれ18日、40日および58日に陽性反応を示し、より抗体レベルが高かった(データは示さない)。最後に、DL169胞子で免疫したマウス群は全く陽性反応を示さず、DL169栄養細胞では18日に1回のみ陽性反応を示した。他

50

のマウス群では陽性力価は全く認められなかった。

【0095】

考察

実施例2の目的は、*B. subtilis*の胞子を経口ワクチン送達系として評価することである。本理論は、胞子が特に有望なワクチン媒体となり得る、幾つかの特性に基づく。第一に、ヒトおよび動物に対するプロバイオティックとして現在使用されていることである。第二に、この菌は土壌に普通に認められる非病原性微生物である。第三に、頑健かつ不活の生命形態として乾燥(胞子)状態で長期間の保存に適していよう。第四に、単細胞分化(胞子形成)生物モデルとして、この生物の遺伝解析は比類がなく、卓越したクローニング技術で支えられている。最後に、この生物は胞子状態で経口投与されると、小腸にて発芽し、限定された回数の複製および細胞成長をした後に排泄される。GITにおける胞子の発芽能に基づき、発芽する胞子を異種抗原送達の機序として検討した。本方法の論理および新規性は、胞子が胃を通過しても生存可能であるかもしれず、その後発芽し、次に栄養型相にて異種抗原を発現するであろう、ということである。

【0096】

特異的液性反応を評価する前に、GIT管における胞子および栄養細胞の生存を評価した。マウスのインビボ解析により、胞子は経口投与されるときにほぼ影響を受けず、大部分が24時間後に排泄されることを見出した。対照的に、栄養型*B. subtilis*細胞はマウスGITにおける生存率が非常に低い。概算として0.0005%未満の栄養細胞がGIT通過を生き延びると推定する。胃は栄養型*B. subtilis*に対し最初で最も厳しい障壁であり、これは小腸で回収される生存可能数レベルが極度に低いことにより裏付けられる。生存する細菌は投与後最初の3時間内に胃を通過したようであり、6時間目までには糞便中に存在した。

【0097】

胃または小腸を模倣した擬似条件で胞子または栄養細胞の生存を評価するインビトロアッセイにより、これらの所見を裏付けた。これらの結果により、栄養型*B. subtilis*は胃または小腸における長期的生存の機会が限定されることが示された。擬似胃環境は*B. subtilis*のみならず、*E. coli*および*C. rodentium*のような他の腸内細菌にも不良環境を提供するようであった。*B. subtilis*では、これは小腸組織の直接計数実験から示され、明らかに何パーセントかの細胞が胃の通過を生き残った。これは、恐らくインビボでは凝集効果、通過時間および胃の組成によるものである。*B. subtilis*では、胆汁塩の影響からなる第二の障壁が胃の出口に提示され、これは生存をほぼ全く否定するとともに上記のインビボ実験により裏付けられ、0.0005%未満の栄養型細菌がGIT通過を生き延びることができると推定する。予想されるように、胞子はこのような厳しい条件で有害作用を受けずに生存可能である。

【0098】

*B. subtilis*に対する胆汁塩の影響により、この生物が腸内微生物とは対照的にGITで長期的に生存することが不可能であることが示される。胞子および栄養細胞に対する胆汁塩の影響は興味深かった。栄養細胞に対しては殺菌性であるが、胞子に対する胆汁塩の影響は軽度な発芽阻害であった。従って、当初、胃から出る胞子は発芽を阻害されるだろうが、発芽する胞子は死滅されるであろう。しかし、この相反する影響は腸管腔の緻密な組成および胃出口後の通過距離により調節されるであろう。

【0099】

本ワクチン仮説を評価するために抗原モデルとして - ガラクトシダーゼを用いているが、それはこのタンパク質が新規のワクチン送達系を評価するのに成功裡に用いられているためである<sup>17,18)</sup>。経口送達される胞子に対する抗 - ガラクトシダーゼIgG全身反応の解析により、胞子が確かに発芽し、観察される抗体陽転を生じるのに十分な免疫原を合成することが立証される。これにより、本仮説が実証されるとともに胞子のワクチン媒体としての可能性が示されよう。胞子の一部が小腸で発芽可能であることを示し、恐らくこれらがこの領域にてGALTに侵入する。また、無処置胞子は粘膜を通過してGALT内にて(例えば、パイヤー斑にて)発芽し得る。これは、胞子粒子が小サイズ(1~1.2ミクロン)であ

10

20

30

40

50

って、M細胞に取り込まれるほどに小さいため、確かな可能性となる。

【0100】

分泌性IgA反応の発生は如何なる粘膜ワクチンに対しても明らかに有利であり、*B. lactis* - ガラクトシダーゼに対する局所反応は本試験的研究では低かったが、一部のマウスは実際に反応を示した。恐らくこれは、*B. lactis* - ガラクトシダーゼの比較的低い免疫原性を表すが、投与計画も反映するのかもしれない。興味深いことに、抗原送達に栄養細胞を用いたときに類似の反応を得た。これらの細胞は対照群として用い、胃内にてほぼ100%の細胞死を予測したという事実にも関わらず、観察された抗 *B. lactis* - ガラクトシダーゼIgG力価を生じるのに十分な *B. lactis* - ガラクトシダーゼを送達できた。抗原の経口投与を約0.43mgと推定でき、これを9回投与した。恐らく、観察した反応は胃を通過して小腸に侵入した無処置栄養細胞に由来し、小腸は経口投与される抗原の液性反応の発生に關与する。死滅した*B. subtilis*細胞が観察された液性反応を発生し得るか否かは本研究からは示せないが、細胞の生死は問題ではないと予想しよう。一見したところ、両形態とも局所および全身の反応を誘発し得るため、孢子状態がなぜ有利であるのかが明確でないかもしれない。しかし、孢子状態は周囲温度にて乾燥状態での長期保存(恐らく数十年単位)の利点を提供する。

【0101】

文献

[1]Casula,G. and S.M.Cutting. *Bacillus* Probiotics:Spore Germination in the Gastrointestinal Tract.Applied and Environmental Microbiology 2002;68:2344-2352.

[2]Youngman,P.,J.Perkins,and R.Losick.Construction of a cloning site near one end of Tn917 into which foreign DNA may be inserted without affecting transposition in *Bacillus subtilis* or expression of the transposon-borne *erm* gene.Plasmid 1984;12:1-9.

[3]Nicholson,W.L. and P.Setlow,Sporulation,germination and outgrowth.,in Molecular Biological Methods for *Bacillus*.,C.R.Harwood.and S.M.Cutting.,Editors.1990,John Wiley & Sons Ltd.:Chichester,UK.p.391-450.

[4]Schaeffer,P.,J.Millet,and J.Aubert.Catabolic repression of bacterial sporulation.Proceedings of the National Academy of Sciences USA 1965;54:704-711.

[5]Cutting,S.M. and P.B.Vander-Horn,Genetic Analysis,in Molecular Biological Methods for *Bacillus*.,C.R.Harwood and S.M.Cutting,Editors.1990,John Wiley & Sons Ltd.:Chichester,England.p.27-74.

[6]Robinson,K.,et al.Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*.Nature Biotechnology 1997;15:653-657.

[7]Hoa,T.T.,et al.The Fate and Dissemination of *B. subtilis* spores in a murine model.Applied and Environmental Microbiology 2001;67:3819-3823.

[8]Almirall,M. and E.Esteve-Garcia.The stability of a  $\beta$ -glucanase preparation from *Trichoderma longibrachiatum* and its effect in a barley based diet fed to broiler chicks.Animal Feed Science & Technology 1995;54:149-158.

[9]Araujo,A.H.,et al.In vitro digestibility of globulins from cowpea(*Vigna unguiculata*) and xerophitic algaroba(*Prosopis juliflora*) seeds by mammalian digestive proteinases:a comparative study.Food Chemistry 2002;78:143-147.

[10]Aungst,B.J. and S.Phang.Metabolism of a neurotensin(8-13) analog by intestinal and nasal enzymes,and approaches to stabilize this peptide at these absorption sites.International Journal of Pharmaceutics 1994;117:95-100.

[11]Freund,O.,et al.In vitro and in vivo stability of new multilamellar

10

20

30

40

50

vesicles. Life Sciences 2000;67:411-419.

[12] Lebet, V., E. Arrigoni, and R. Amado. Digestion procedure using mammalian enzymes to obtain substrates for in vitro fermentation studies. Lebensm. Wiss. u. Technol. 1998;31:509-515.

[13] Higgins, L. M., et al. *Citrobacter rodentium* infection in mice elicits a mucosal Th1 cytokine response and lesions similar to those in murine inflammatory bowel disease. Infect. Immun. 1999;67:3031-3039.

[14] Higgins, L. M., et al. *Citrobacter rodentium* infection in mice elicits a mucosal Th1 cytokine response and lesions similar to those in murine inflammatory bowel disease. Infect. Immun. 1999;67:3031-3039.

[15] James, W. and J. Mandelstam. spoVIC, a new sporulation locus in *Bacillus subtilis* affecting spore coats, germination and the rate of sporulation. Journal of General Microbiology 1985;131:2409-2419.

[16] Spinosa, M. R., et al. On the fate of ingested *Bacillus* spores. Research in Microbiology 2000;151:361-368.

[17] Barletta, R. G., et al. Recombinant BCG as a candidate oral vaccine vector. Research in Microbiology 1990;141:931-939.

[18] Gheradi, M. M. and M. Esteban. Mucosal and systemic immune responses induced after oral delivery of vaccinia virus recombinants. Vaccine 1999;17:1074-1083.

【図面の簡単な説明】

【0102】

【図1】 マルチクローニング部位、cat遺伝子、およびamyE遺伝子の前部ならびに後部を示す、pDG364クローニングベクターのマップを示す概略図である。

【図2】 クローニングベクターpDG364を用いて部分的二倍体を生じさせる、二重交叉型組換えイベントを示す概略図である。

【図3】 a. サイズ分画した(12%SDS-PAGE)タンパク質のウエスタンブロットを示す図である。TTFCに対するポリクローナル抗血清を用いた。レーン1は非組換えPY79菌株の栄養細胞、レーン2はamyE::oppA-TTFCを保有するPY79菌株、レーン3は精製されたTTFCタンパク質である。 b. 非組換えPY79の胞子の胞子面(レーン1)、CotA::LTBを発現している胞子(レーン2)、および精製されたLTBタンパク質から抽出され、サイズ分画した(12%SDS-PAGE)タンパク質のウエスタンブロットを示す図である(レーン2に用いた菌株は遺伝子型amyE::oppA-TTFC thrC::cotA-LTBを保有したことに留意)。 c. 超音波処理された栄養細胞抽出物由来のサイズ分画したタンパク質に対するポリクローナル抗TTFC血清を用いたウエスタンブロットを示す図である。レーン1は非組換えPY79細胞、レーン2はamyE::oppA-TTFC thrC::cotA-LTB細胞、レーン3は精製されたTTFCタンパク質である。

【図4】 組換え*B. subtilis*栄養細胞による腹腔内免疫後の抗TTFC血清IgG力価を示すグラフである。 $1 \times 10^9$ 個の野性型( )またはOppA-TTFCを発現している*B. subtilis*細胞( )により腹腔内免疫した( )8匹のマウス群由来の個々の検体を、TTFC特異性IgG検索のためにELISA法により検査した。未処置対照群( )由来の血清も測定した。エンドポイント力価は、免疫前プール血清の1/40希釈と同じ吸光度を生じる血清希釈として算出した。

【図5】 組換え*B. subtilis*の胞子による経口免疫後の抗TTFC血清IgG力価を示すグラフである。 $1.7 \times 10^{10}$ 個の野性型( )またはOppA-TTFC組換え*B. subtilis*の胞子( )により経口免疫した( )8匹のマウス群由来の個々の検体を、TTFC特異性IgG検索のためにELISA法により検査した。未処置対照群( )由来の血清も測定した。エンドポイント力価は、免疫前プール血清の1/40希釈と同じ吸光度を生じる血清希釈として算出した。

【図6】 組換え*B. subtilis*の胞子による経口免疫後の抗TTFC血清IgG力価を示すグラフである。 $1.7 \times 10^{10}$ 個の野性型( )またはOppA-TTFC CotA-LTB組換え*B. subtilis*の胞子( )により経口免疫した( )8匹のマウス群由来の個々の検体を、TTFC特異性IgG検索のためにELISA法により検査した。未処置対照群( )由来の血清も測定した。エンドポイント力価

10

20

30

40

50

は、免疫前プール血清の1/40希釈と同じ吸光度を生じる血清希釈として算出した。

【図7】組換え*B. subtilis*の孢子による経口免疫後の抗LTB血清IgG力価を示すグラフである。1.7×10<sup>10</sup>個の野性型( )またはOppA-TTFC CotA-LTB組換え*B. subtilis*の孢子( )により経口免疫した( )8匹のマウス群由来の個々の検体を、TTFC特異性IgG検索のためにELISA法により検査した。未処置対照群( )由来の血清も測定した。エンドポイント力価は、免疫前プール血清の1/40希釈と同じ吸光度を生じる血清希釈として算出した。

【図8A】マウスモデルのGITにおける栄養細胞と孢子の生存を示すグラフである。純系BALB/Cマウス群に*B. subtilis* SC2362菌株の栄養細胞または孢子を経口投与した。糞便検体および腸検体を測定し、指示時点における総生菌数を求めた。図8Aは2.4×10<sup>10</sup>個の栄養細胞の経口投与である。データは算術手段として提示され、エラーバーは標準偏差であった。

【図8B】マウスモデルのGITにおける栄養細胞と孢子の生存を示すグラフである。純系BALB/Cマウス群に*B. subtilis* SC2362菌株の栄養細胞または孢子を経口投与した。糞便検体および腸検体を測定し、指示時点における総生菌数を求めた。図8Bは2.1×10<sup>8</sup>個の孢子の経口投与である。データは算術手段として提示され、エラーバーは標準偏差であった。

【図9A】擬似胃条件における栄養細胞と孢子の生存を示すグラフである。*B. subtilis*の栄養細胞を擬似胃条件下にて処理し( )、指示時点において未処理( )検体と比較して生存能力を評価した。百分率は当初の接種菌と比較した計数である。データは繰返しの独立した実験の算術手段として提示された。

【図9B】擬似胃条件における栄養細胞と孢子の生存を示すグラフである。大腸菌(*E. coli*)の栄養細胞を擬似胃条件下にて処理し( )、指示時点において未処理( )検体と比較して生存能力を評価した。百分率は当初の接種菌と比較した計数である。データは繰返しの独立した実験の算術手段として提示された。

【図9C】擬似胃条件における栄養細胞と孢子の生存を示すグラフである。腸粘膜肥厚症菌(*C. rodentium*)の栄養細胞を擬似胃条件下にて処理し( )、指示時点において未処理( )検体と比較して生存能力を評価した。百分率は当初の接種菌と比較した計数である。データは繰返しの独立した実験の算術手段として提示された。

【図9D】擬似胃条件における栄養細胞と孢子の生存を示すグラフである。*B. subtilis*の孢子の栄養細胞を擬似胃条件下にて処理し( )、指示時点において未処理( )検体と比較して生存能力を評価した。百分率は当初の接種菌と比較した計数である。データは繰返しの独立した実験の算術手段として提示された。

【図10A】擬似腸条件における栄養細胞と孢子の生存を示すグラフである。*B. subtilis*の栄養細胞を擬似腸条件下にて処理し( )、指示時点において未処理( )検体と比較して生存能力を評価した。百分率は当初の接種菌と比較した計数である。データは繰返しの独立した実験の算術手段として提示された。

【図10B】擬似腸条件における栄養細胞と孢子の生存を示すグラフである。*E. coli*の栄養細胞を擬似腸条件下にて処理し( )、指示時点において未処理( )検体と比較して生存能力を評価した。百分率は当初の接種菌と比較した計数である。データは繰返しの独立した実験の算術手段として提示された。

【図10C】擬似腸条件における栄養細胞と孢子の生存を示すグラフである。*C. rodentium*の栄養細胞を擬似腸条件下にて処理し( )、指示時点において未処理( )検体と比較して生存能力を評価した。百分率は当初の接種菌と比較した計数である。データは繰返しの独立した実験の算術手段として提示された。

【図10D】擬似腸条件における栄養細胞と孢子の生存を示すグラフである。*B. subtilis*の孢子の栄養細胞を擬似腸条件下にて処理し( )、指示時点において未処理( )検体と比較して生存能力を評価した。百分率は当初の接種菌と比較した計数である。データは繰返しの独立した実験の算術手段として提示された。

【図11】擬似腸条件下の孢子の発芽を示すグラフである。*B. subtilis* PY79菌株の孢子懸濁液を検査し、胆汁塩が有る( )または無い( )AGK溶液における発芽を調べた。発芽

10

20

30

40

50

を誘発するためにL-アラニンを追加した後、指示時点においてOD600nm測定値を求めた。百分率は当初の懸濁液と比較したOD測定値である。データは繰返しの独立した実験の算術手段として提示される。

【図12】発現されたb-ガラクトシダーゼの発現および定量化を示す図である。図12A：LBにて発育したPY79およびSC2362(*rrn0-lacZ*)の検体を、マウス抗b-ガラクトシダーゼ抗体で標識化し、続いて抗マウスIgG-TRITC接合体(赤色フルオレセイン)で標識化した。図12B：PY79(*spo+*)、SC2362(*rrn0-lacZ*)およびDL169(*gerD-cwlBD D::neo rrn0-lacZ*)由来の断片化細胞抽出物の、クーマシー染色した10%SDS-PAGE(上側パネル)、および抗b-ガラクトシダーゼ特異性ウエスタンブロット法(下側パネル)プロファイル。矢印は予想分子量117kDaにおけるb-ガラクトシダーゼを示す。図12C：PY79菌株(*spo+*)、SC2362(*rrn0-lacZ*)およびDL169(*gerD-cwlBD D::neo rrn0-lacZ*)由来の細胞抽出物におけるb-ガラクトシダーゼの指示濃度(mg)にて実施したドットブロット実験。精製b-ガラクトシダーゼ希釈物(ng)が左側(レーン+)に認められる。抗b-ガラクトシダーゼの一次抗体および二次抗ウサギペルオキシダーゼ抱合抗体を用いた。実施例2の材料および方法の項に記載のように、ECLにより反応を可視化した。

10

【図13】*rrn0-lacZ*遺伝子を保有する胞子の経口送達後の全身反応を示すグラフである。純系BALB/Cマウス群に*B. subtilis*の $2 \times 10^{10}$ 胞子/用量または $3 \times 10^{10}$ 栄養細胞/用量を経口投与した。個々の血清検体をELISA法により検査し、抗b-ガラクトシダーゼ特異性IgGを調べた。PY79胞子(○)、PY79栄養細胞(u)、SC2362胞子(l)、SC2362栄養細胞(n)、DL169胞子(◇)およびDL169栄養細胞(黒三角)を投与したマウスとともに、未処置非免疫対照群(□)由来の血清も含まれた。データは算術手段として提示され、エラーバーは標準偏差であった。

20

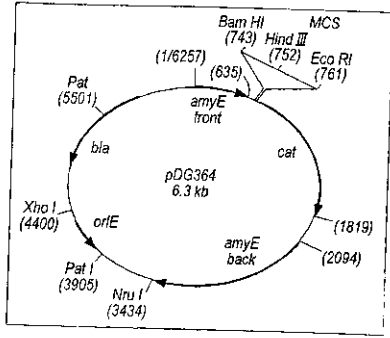
【図14A】抗b-ガラクトシダーゼIgGサブクラスの解析を示すグラフである。純系BALB/Cマウス群に*B. subtilis* SC2362菌株の $2 \times 10^{10}$ 胞子/用量を経口投与した(-)。個々の血清検体をELISA法により検査し、抗b-ガラクトシダーゼ特異性IgG1(○)、IgG2a(◇)およびIgG2b(◇)サブクラスを調べた。データは算術手段として提示され、エラーバーは標準偏差であった。

【図14B】抗b-ガラクトシダーゼIgGサブクラスの解析を示すグラフである。SC23623菌株の $3 \times 10^{10}$ 栄養細胞/用量を経口投与した(-)。個々の血清検体をELISA法により検査し、抗b-ガラクトシダーゼ特異性IgG1(○)、IgG2a(◇)およびIgG2b(◇)サブクラスを調べた。データは算術手段として提示され、エラーバーは標準偏差であった。

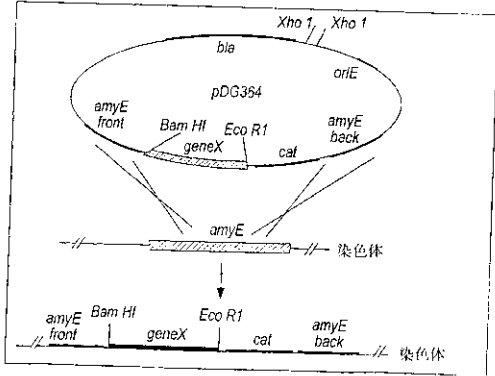
30

【図14C】抗b-ガラクトシダーゼIgGサブクラスの解析を示すグラフである。DL169菌株の栄養細胞を経口投与した(-)。個々の血清検体をELISA法により検査し、抗b-ガラクトシダーゼ特異性IgG1(○)、IgG2a(◇)およびIgG2b(◇)サブクラスを調べた。データは算術手段として提示され、エラーバーは標準偏差であった。

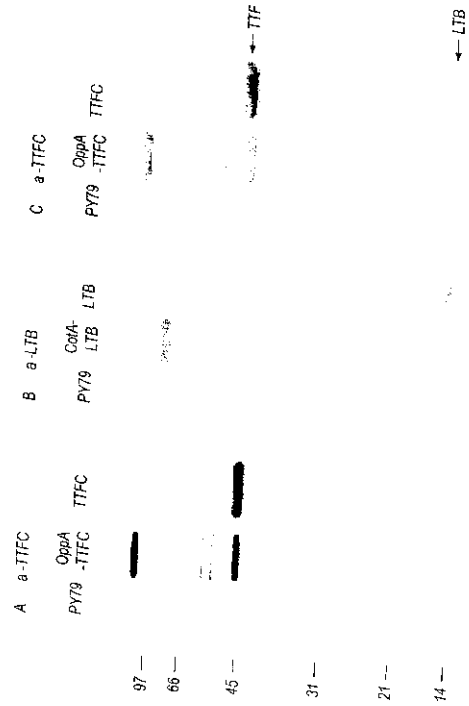
【 図 1 】



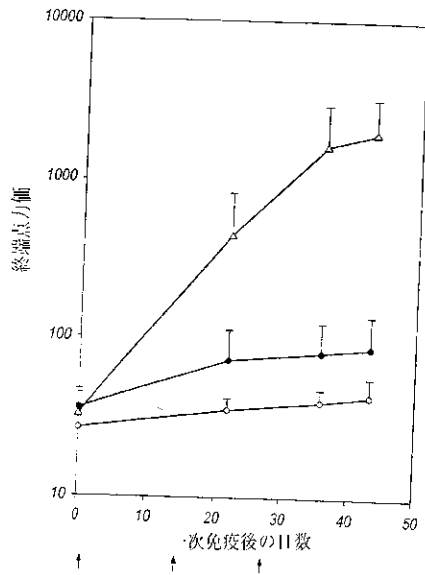
【 図 2 】



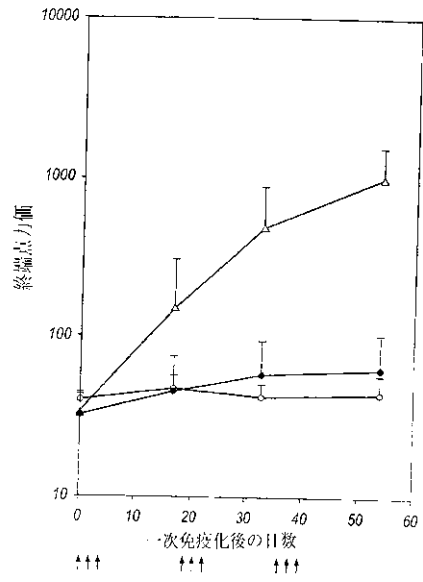
【 図 3 】



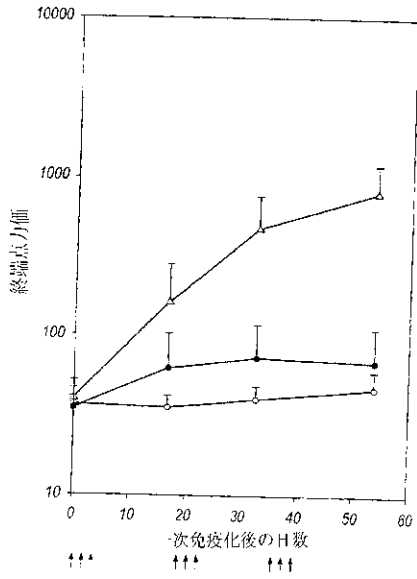
【 図 4 】



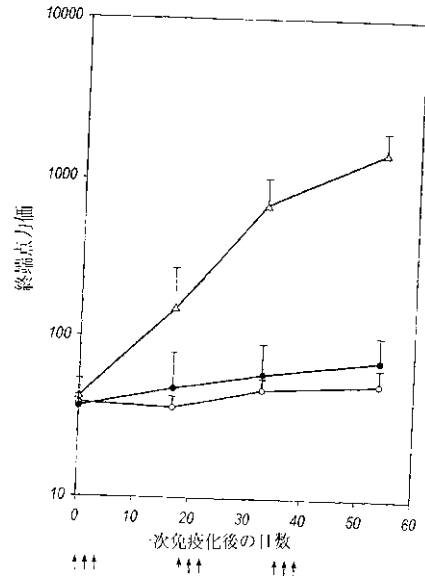
【 図 5 】



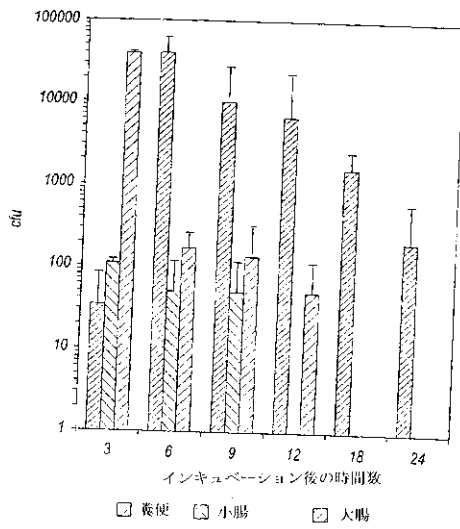
【 図 6 】



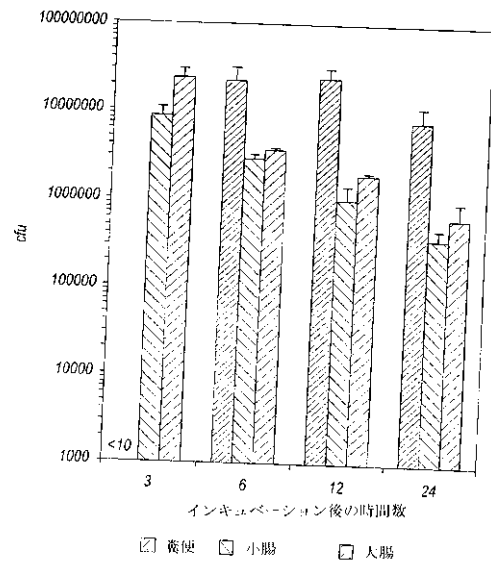
【 図 7 】



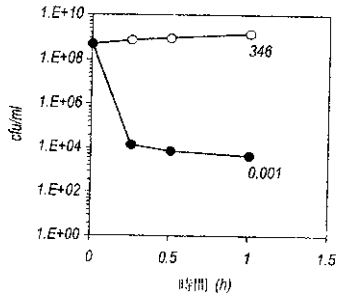
【 図 8 A 】



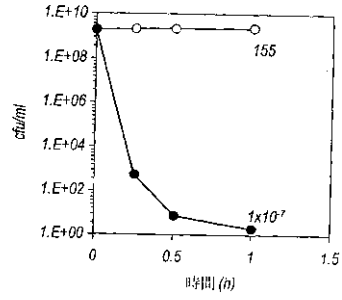
【 図 8 B 】



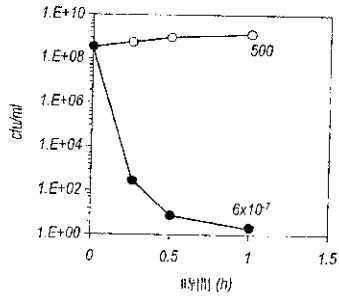
【 図 9 A 】



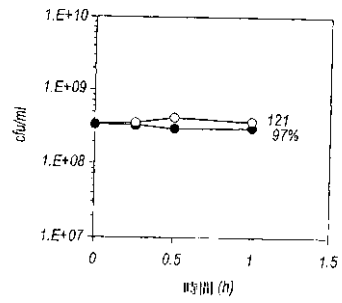
【 図 9 C 】



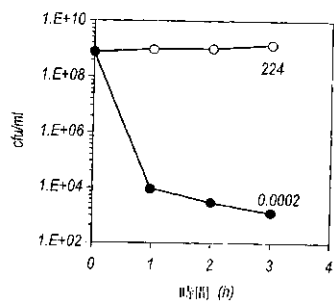
【 図 9 B 】



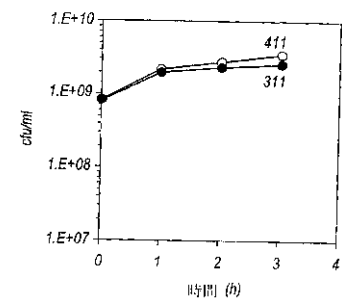
【 図 9 D 】



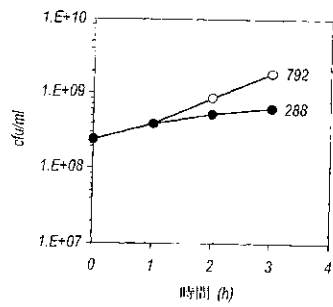
【 図 10 A 】



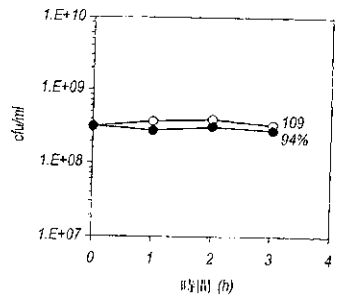
【 図 10 C 】



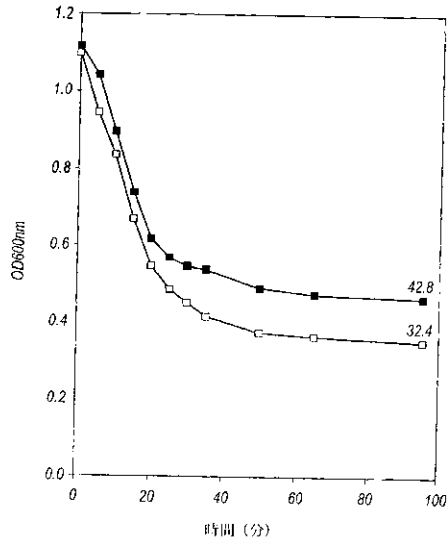
【 図 10 B 】



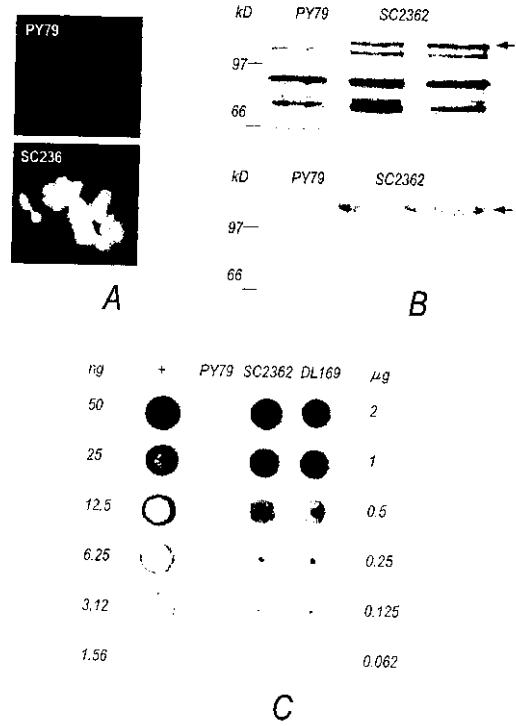
【 図 10 D 】



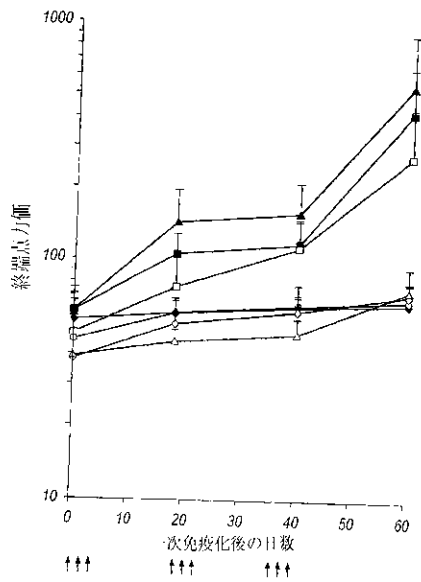
【 図 1 1 】



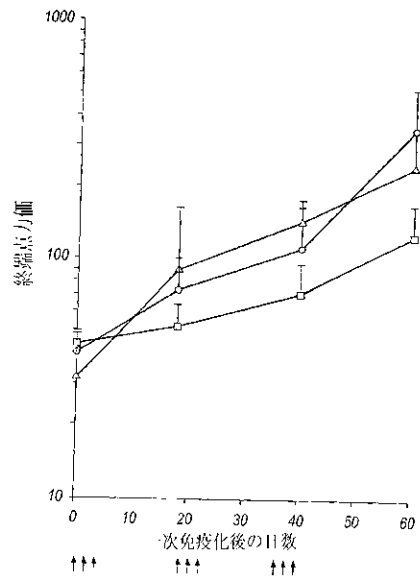
【 図 1 2 】



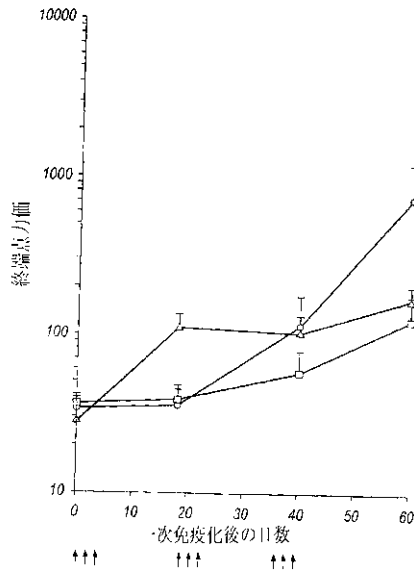
【 図 1 3 】



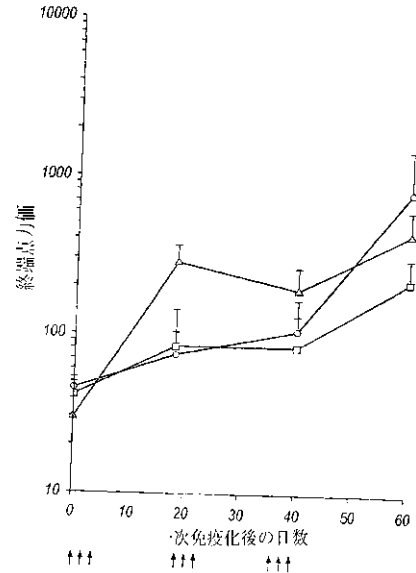
【 図 1 4 A 】



【図 1 4 B】



【図 1 4 C】



## 【手続補正書】

【提出日】平成16年2月25日(2004.2.25)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

治療的活性化合物および標的配列または栄養細胞タンパク質をコードする一つ以上の遺伝構築物を含んだ遺伝暗号により遺伝子改変された、治療的処置のための経口投与で使用するためのパシラス属の胞子。

【請求項2】

治療的活性化合物が、抗原または医薬若しくは抗原または医薬の前駆物質であることを特徴とする請求項1に記載の胞子。

【請求項3】

遺伝構築物がキメラ遺伝子であることを特徴とする請求項1または2に記載の胞子。

【請求項4】

遺伝子改変が遺伝子構築物を含んだベクターを用いた母細胞の形質転換、次いで母細胞による請求項1からのいずれか一項に記載の胞子の生産の誘発によってなされることを特徴とする請求項1から3のいずれか一項に記載の胞子。

【請求項5】

遺伝子構築物が一または複数の誘発可能なプロモーター、プロモーターまたは強力なプロモーターまたは改変プロモーターの各々または個々独立の制御下にあることを特徴とする請求項1から4のいずれか一項に記載の胞子。

## 【請求項 6】

遺伝子構築物がエンハンサー要素またはそれに結合した上流アクチベーター配列を有することを特徴とする請求項 5 に記載の孢子。

## 【請求項 7】

遺伝子構築物が誘発可能な発現系を含むことを特徴とする請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の孢子。

## 【請求項 8】

孢子がヒトまたは動物の身体の腸管の十二指腸及び / 又は空腸で発芽することを特徴とする請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の孢子。

## 【請求項 9】

治療的活性化合物が使用時に免疫応答を誘発するように適応される抗原であることを特徴とする請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の孢子。

## 【請求項 10】

抗原が少なくとも破傷風毒素断片 C または易分性毒素 B サブユニットの断片であることを特徴とする請求項 9 に記載の孢子。

## 【請求項 11】

タンパク質が細胞障壁にて発現されるタンパク質であることを特徴とする請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の孢子。

## 【請求項 12】

タンパク質が栄養細胞で常時発現されることを特徴とする請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の孢子。

## 【請求項 13】

タンパク質が *OppA* または *rrn0* であることを特徴とする請求項 12 に記載の孢子。

## 【請求項 14】

タンパク質が栄養細胞で間欠的に発現されることを特徴とする請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の孢子。

## 【請求項 15】

タンパク質が可溶性細胞質栄養細胞タンパク質であることを特徴とする請求項 1 から請求項 10 のいずれか一項に記載の孢子。

## 【請求項 16】

タンパク質が *rrn0* であることを特徴とする請求項 15 に記載の孢子。

## 【請求項 17】

可溶性細胞質タンパク質の遺伝構築物の全体または一部がシグナル配列を含むことを特徴とする請求項 15 または 16 に記載の孢子。

## 【請求項 18】

シグナル配列が栄養細胞の特定部分に治療的活性化合物を標的にするように適応されることを特徴とする請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の孢子。

## 【請求項 19】

シグナル配列が分泌（好ましくは能動的分泌、より好ましくは I 型、II 型または III 型分泌）のための、または栄養細胞による翻訳後プロセッシング（好ましくはグリコシル化）のための治療的活性化合物に向けられることを特徴とする請求項 18 に記載の孢子。

## 【請求項 20】

治療的活性化合物が生物学的前駆物質の形質転換が可能な一又は複数の酵素である抗原前駆物質であって、発芽時に、前記一又は複数の酵素が発現され、前記生物学的前駆物質の形質転換により一又は複数の抗原を合成することを特徴とする請求項 1 から 19 のいずれか一項に記載の孢子。

## 【請求項 21】

生物学的前駆物質がホルモン、ステロイドホルモン、鎮痛剤またはプロドラッグであることを特徴とする請求項 20 に記載の孢子。

## 【請求項 22】

治療的活性化合物がタンパク質、ワクチンまたはエンドルフィンである医薬である 請求項 1 から 1 9 いずれか一項に記載の孢子。

【請求項 2 3】

医学的症状が好ましくは炎症、疼痛、ホルモンのアンバランス及び / 又は腸の障害である、医学的症状の治療のために使用されることを特徴とする 請求項 1 から 2 2 のいずれか一項に記載の孢子。

【請求項 2 4】

請求項 1 から 2 3 のいずれか一項に記載の少なくとも二つの異なる孢子を含む組成物であって、前記少なくとも二つの異なる孢子が少なくとも二つの異なる治療的活性化合物を発現することを特徴とする組成物。

【請求項 2 5】

組成物が更に製薬的に許容される賦形剤または担体を含むことを特徴とする 請求項 2 4 に記載の組成物。

【請求項 2 6】

製薬的に許容される賦形剤または担体に結合した 請求項 1 から 請求項 2 3 のいずれか一項に記載の孢子を含む組成物。

【請求項 2 7】

医学的症状が好ましくは炎症、疼痛、ホルモンのアンバランス及び / 又は腸の障害である、医学的症状の治療に使用するための 請求項 2 4 から 2 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 8】

医学的症状が好ましくは炎症、疼痛、ホルモンのアンバランス及び / 又は腸の障害である、医学的症状の治療に用いるための医薬の製造における 請求項 1 から 2 3 のいずれか一項に記載の孢子の使用。

【請求項 2 9】

a) 処置を必要とするヒトまたは動物に 請求項 1 から 2 3 のいずれか一項に記載の孢子を投与し、

b) 前記孢子が腸管にて栄養細胞に発芽し、

c) 前記栄養細胞が処置で用いるための治療的活性化合物を発現するステップを含む医療方法。

【請求項 3 0】

孢子が経口、鼻腔内または直腸で投与されることを特徴とする 請求項 2 9 に記載の方法。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intern: Application No PCT/JP 03/00966
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N3/00 C12N15/00 A61K39/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02 00232 A (MAXYGEN INC ;GOLDMAN STANLEY (US); WHALEN ROBERT G (US); LATHROP S) 3 January 2002 (2002-01-03)	1-8, 10-12, 17, 18, 23-31
Y	in particular, examples and claims. the whole document	11
X	WO 01 94599 A (KATAGIHALLIMATH NAINESH ;MUKHERJEE KAKOLI (IN); SMITTSKYDDSSINSTITU) 13 December 2001 (2001-12-13)	1-13, 15-20, 23-31
Y	the whole document	11
	--- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search  26 May 2003		Date of mailing of the international search report  10/06/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Rojo Romeo, E

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Intern: Application No  
 PCT, JP 03/00966

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ROBINSON K ET AL: "ORAL VACCINATION OF MICE AGAINST TETANUS WITH RECOMBINANT LACTOCOCCUS LACTIS" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US, vol. 15, no. 7, 15 July 1997 (1997-07-15), pages 653-657, XP001093957 ISSN: 1087-0156 the whole document	11
X	MINTON NIGEL P ET AL: "Chemotherapeutic tumour targeting using clostridial spores." FEMS MICROBIOLOGY REVIEWS, vol. 17, no. 3, 1995, pages 357-364, XP002242524 ISSN: 0168-6445 the whole document	21,22

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/GB 03/00966

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 30 and 31 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB 03/00966

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0200232	A	03-01-2002	AU 7300901 A	08-01-2002
			EP 1299115 A2	09-04-2003
			WO 0200232 A2	03-01-2002
			US 2002150594 A1	17-10-2002
WO 0194599	A	13-12-2001	AU 6448801 A	17-12-2001
			EP 1292686 A1	19-03-2003
			WO 0194599 A1	13-12-2001

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/00	A 6 1 P 5/00	
A 6 1 K 39/08	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 P 1/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 5/00	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 25/04	C 1 2 N 1/21	
A 6 1 P 29/00	C 1 2 N 15/00	A
A 6 1 P 37/04	A 6 1 K 37/02	
C 1 2 N 1/21	A 6 1 K 37/48	
C 1 2 N 15/09	A 6 1 K 37/24	
// C 1 2 N 3/00	C 1 2 N 3/00	
( C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 R 1:125 )	C 1 2 R 1:125	
( C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 R 1:145 )	C 1 2 R 1:145	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 カッティング, サイモン, マイケル

イギリス国 ティーダブリュ 2 0 0 イーエックス サリー, エガム (番地なし), ロイヤル  
 ホロウェイ アンド ベッドフォード ニュー カレッジ ユニバーシティ オブ ロンドン,  
 スクール オブ バイオロジカル サイエンシズ

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA01 BA31 BA38 CA02 DA07 EA04 FA02 FA06 GA11  
 4B065 AA19X AA23X AB01 AC13 AC14 BA01 CA44 CA45  
 4C084 AA02 AA13 BA44 DB01 DB06 MA52 MA59 MA60 NA13 ZA08  
 ZA66 ZB09 ZC03  
 4C085 AA03 BA12 BB07 BB11 CC07 CC08 CC21 CC31 DD62 EE01  
 GG08 GG10  
 4C087 AA01 AA02 BC64 BC68 CA12 MA52 MA59 MA60 NA13 ZA08  
 ZA66 ZB09 ZC03