(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4346821号
(P4346821)

(45)発行日　平成21年10月21日(2009.10.21)　(24)登録日　平成21年7月24日(2009.7.24)

(51)Int.Cl.		F I	
A61K 39/106	(2006.01)	A61K	39/106
A61K 39/39	(2006.01)	A61K	39/39
A61P 31/04	(2006.01)	A61P	31/04
C07K 14/205	(2006.01)	C07K	14/205
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02

請求項の数 7　(全 25 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号	特願2000-547233 (P2000-547233)
(86)(22)出願日	平成11年4月30日 (1999.4.30)
(65)公表番号	特表2002-513812 (P2002-513812A)
(43)公表日	平成14年5月14日 (2002.5.14)
(86)国際出願番号	PCT/IB1999/000851
(87)国際公開番号	WO1999/057278
(87)国際公開日	平成11年11月11日 (1999.11.11)
審査請求日	平成14年2月22日 (2002.2.22)
審判番号	不服2006-9420 (P2006-9420/J1)
審判請求日	平成18年5月10日 (2006.5.10)
(31)優先権主張番号	9809398.2
(32)優先日	平成10年4月30日 (1998.4.30)
(33)優先権主張国	英国 (GB)
(31)優先権主張番号	9820976.0
(32)優先日	平成10年9月25日 (1998.9.25)
(33)優先権主張国	英国 (GB)

(73)特許権者　592243793
カイロン　ソチエタ　ア　レスポンサビリタ　リミタータ
イタリア国　イ－５３１００　シエナ，ビア　フィオレンテイーナ　１
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　デル　ジュディス，　ジュセッペ
イタリア国　イ－５３１００　シエナ，４４，　ストラダ　ディ　コール　ピンズト

最終頁に続く

(54)【発明の名称】Ｈ．Ｐｙｌｏｒｉによる感染に対する免疫化および処置

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

有効量のＨ．ピロリ（Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ）抗原ＶａｃＡ、ＣａｇＡおよびＮＡＰの組み合わせを含む、Ｈ．ピロリ（Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ）による感染に対する防御または処置のための筋肉内投与のための薬学的組成物であって、該組成物は横隔膜下に投与されないものであり、該抗原が精製された抗原である、組成物。

【請求項２】

動物において防御的免疫応答を惹起する、請求項１に記載の薬学的組成物。

【請求項３】

前記動物が哺乳動物である、請求項２に記載の薬学的組成物。

【請求項４】

アジュバントをさらに含む、請求項１～３のいずれか１項に記載の薬学的組成物。

【請求項５】

前記アジュバントが水酸化アルミニウムである、請求項４に記載の薬学的組成物。

【請求項６】

１つ以上の薬学的に受容可能な賦形剤を含む、請求項１～５のいずれか１項に記載の薬学的組成物。

【請求項７】

前記哺乳動物がヒトである、請求項３に記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【０００１】
本出願は、英国特許出願　ＧＢ　９８０９３９８．２（１９９８年４月３０日出願）およびＧＢ　９８２０９７６．０（１９９８年９月２５日出願）（この出願は、参考としてその全体が本明細書において援用されている）に関連する。
【０００２】
（技術分野）
本発明は、Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ感染に対する防御または処置のための方法に関する。この方法は、１つ以上のＨ．ｐｙｌｏｒｉ抗原の有効量の非粘膜投与を含む。
【０００３】
（発明の背景）
Ｈ．ｐｙｌｏｒｉは、Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ　ｊｅｊｕｎｉを増殖させるために開発された微小好気性条件を用いて、Ｂ．ＭａｒｓｈａｌｌおよびＪ．Ｗａｒｒｅｎにより１９８２年に単離された。Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ菌は、Ｓ字形状のグラム陰性桿菌で２～３．５μｍの長さでかつ０．５～１μｍの幅である（Ｂｌａｓｅｒ，Ｍ．Ｊ．およびＪ．Ｐａｒｓｏｎｎｅｔ．１９９４．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９４：４～８）。Ｈ．ｐｙｌｏｒｉでの感染が世界で最も通常の感染であることは現在（つい最近になって）公知である。後進国では、人口の８０％が２０歳で細菌に感染しているが、先進国においては、Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ感染は年齢に応じて、３０歳の人での２０％未満から６０歳の人での５０％より大きくまで増加する（Ａｘｏｎ，ＡＴ．１９９５．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｈｅｒ．９：５８５～５８８；ＢｌａｓｅｒおよびＰａｒｓｏｎｎｅｔ，１９９４）。この感染は、口－糞便経路または口－口経路のいずれかにより移される（ＢｌａｓｅｒおよびＰａｒｓｏｎｎｅｔ，１９９４）。感染は、生後、初年に生じ、そして永続する。一旦樹立されれば、この感染は、慢性的であり、おそらく永続する。感染の危険性要因は、群がること、不衛生および宿主特異的な遺伝要因である。
【０００４】
Ｈ．ｐｙｌｏｒｉの完全なゲノム配列は、公表されている（Ｔｏｍｂ，Ｊ．－Ｆ．ら、１９９７．Ｎａｔｕｒｅ　３８８：５３９～５４７）。この文献の簡略な概説およびＨ．ｐｙｌｏｒｉの生物学の一般的概説は、Ｄｏｏｌｉｔｔｌｅ，Ｒ．Ｆ．１９９７．Ｎａｔｕｒｅ　３８８：５１５～５１６において見出され得る。
【０００５】
Ｈ．ｐｙｌｏｒｉによるヒト胃腸十二指腸粘膜の慢性感染は、しばしば、慢性胃腸炎、十二指腸潰瘍に関連し、そして腺癌および低級Ｂ細胞リンパ腫のような胃の悪性腫瘍の発現の危険性を上昇する（ＢｌａｓｅｒおよびＰａｒｓｏｎｎｅｔ，１９９４；Ｐａｒｓｏｎｎｅｔ，Ｊら、１９９１．Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３２５：１１２７～１２３１；Ｐａｒｓｏｎｎｅｔ，Ｊ．ら、１９９４．Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３３０：１２６７～１２７１）。ほとんどの感染は、無症候性のままであるが、症候性の重篤な疾患は、Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ株のサブセット（Ｉ型と呼ばれる）による感染と疫学的に相関する（Ｂｌａｓｅｒ，Ｍ．Ｊ．ら、１９９５．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５５：２１１１～２１１５；Ｃｏｖａｃｃｉ　Ａら、１９９７．Ｔｒｅｎｄｓ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．５：２０５～２０８；Ｃｏｖａｃｃｉ，Ａ．ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．９０：５７９１～５７９５；Ｅｃｋ，Ｍら、１９９７．Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌｏｇｙ．１１２：１４８２～１４８６；Ｘｉａｎｇ，Ｚら、１９９５．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．６３：９４～９８）。株のこのサブセットは、インビトロおよびインビボにおいて胃の上皮細胞に対して細胞変性である、生物学的に活性な毒素（ＶａｃＡ）の発現（Ｇｈｉａｒａ，Ｐ．ら１９９５．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．６３：４１５４～４１６０；Ｈａｒｒｉｓ，Ｐ．Ｒ．ら、１９９６．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．６４：４８６７～４８７１；Ｔｅｌｆｏｒｄ，Ｊ．Ｌ．ら、１９９４．Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７９：１６５３～１６５８）、ならびにまた、胃の上皮細胞による好中球走化性サイトカインＩＬ－８の合成の誘導（Ｃｅｎｓｉｎｉら、１９９６）に対して責任を追ういくつかの毒性因子をコードする遺伝子のセットを含む、ｃａｇと呼ばれる、病原性の島（ＰＡＩ）の獲得（Ｃｅｎ

ｓｉｎｉ，Ｓら、１９９６．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．９３：１４６４８～１４６５３）に起因して、増大した毒性を付与される。

【０００６】

これまでに同定されたＨ．Ｐｙｌｏｒｉの因子は、以下を含む：粘膜層をこえて移動するためにおそらく必要とされる鞭毛（例えば、Ｌｅｙｉｎｇら、１９９２．Ｍｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．６：２８６３～２８７４を参照のこと）；胃の酸性環境を中和するため、そして初期コロニー化を可能にするために必要とするウレアーゼ（例えば、Ｃｕｓｓａｃら、１９９２．Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１７４：２４６６～２４７３，Ｐｅｒｅｚ－Ｐｅｒｅｚら、１９９２．Ｊ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．６０：３６５８～３６６３，Ａｕｓｔｉｎ，ら、１９９２．Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１７４：７４７０～７４７３，ＷＯ９０／０４０３０を参照のこと）；Ｈ．Ｐｙｌｏｒｉ細胞毒素（それが空胞形成を生じる場合、時にＶａｃＡといわれる）（例えば、ＷＯ９３／１８１５０，Ｔｅｌｆｏｒｄ，Ｊ．Ｌ．ら、１９９４．Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７９：１６５３～１６５８、Ｃｏｖｅｒら、１９９２．Ｊ．Ｂｉｏ．Ｃｈｅｍ．２６７：１０５７０～１０５７５，Ｃｏｖｅｒら、１９９２．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９０：９１３～９１８，Ｌｅｕｎｋ，１９９１．Ｒｅｖ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．１３：５６８６～５６８９を参照のこと）；Ｈ．Ｐｙｌｏｒｉの熱ショックタンパク質（ｈｓｐ）（例えば、ＷＯ９３／１８１５０，Ｅｖａｎｓら、１９９２．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．６０：２１２５～２１２７，Ｄｕｎｎら、１９９２．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．６０：１９４６～１９５１，Ａｕｓｔｉｎら、１９９２、を参照のこと）；ならびに細胞毒素関連タンパク質であるＣａｇＡ（例えば、ＷＯ　９３／１８１５０，Ｃｏｖａｃｃｉ，Ａら、１９９３．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９０：５７９１～５７９５，Ｔｕｍｍｕｒｕ，Ｍ．Ｋ．ら、１９９４．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．６１：１７９９～１８０９を参照のこと）。

【０００７】

現在、Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ株は、少なくとも２つの主要な群に分割され得る。これは、細胞毒素（ＶａｃＡ）およびＣａｇＡタンパク質を発現する（Ｉ型）か、または発現しない（ＩＩ型）のいずれかである。Ｉ型株は、ＣａｇＡおよび毒素遺伝子を含み、そしてこれらの抗原の活性な形態を産生する。ＩＩ型株は、ＣａｇＡ遺伝子座を欠失し、そして細胞毒素を発現し得ない。ＣａｇＡ遺伝子の存在と細胞毒性との間の関係は、ＣａｇＡ遺伝子の産生が細胞毒素の転写、折り畳み、輸送または機能に必要であることを示唆する。疫学的分析は、Ｉ型細菌が十二指腸の潰瘍形成、胃潰瘍および活性な胃炎の重篤な形態に関連することを示す。

【０００８】

消化性潰瘍におけるＨ．ｐｙｌｏｒｉの病原的な役割の一般的概説については、Ｔｅｌｆｏｒｄ，Ｊ．Ｌ．ら（１９９４）ＴＩＢＴＥＣＨ　１２：４２０～４２６を参照のこと。

【０００９】

Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ培養上清は、１２０ｋＤａ、１２８ｋＤａまたは１３０ｋＤａの分子量を有する抗原を含むことが種々の著者らにより示されている（Ａｐｅｌら、１９８８．Ｚｅｎｔｒａｌｂｌａｔ　ｆｕｅｒ　Ｂａｋｔｅｒｉｏｌ．Ｍｉｃｒｏｂ．Ｕｎｄ　Ｈｙｇｉｅｎｅ　２６８：２７１～２７６；Ｃｒａｂｔｒｅｅら、１９９２．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｐａｔｈｏｌ．４５：７３３～７３４；Ｃｏｖｅｒら、１９９０．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．５８：６０３～６１０；Ｆｉｇｕｒａら、１９９０．「Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ，ｇａｓｔｒｉｔｉｓ　ａｎｄ　ｐｅｐｔｉｃ　ｕｌｃｅｒ」（Ｍａｌｆｒｔｈｅｉｎｅｒら編）Ｓｐｒｉｎｇｅｒ　Ｖｅｒｌａｇ，Ｂｅｒｌｉｎ）。記載された抗原のサイズの違いが、同じタンパク質の分子量を評価することにおける実験の間の差、同じ抗原のサイズ可変性、または実際の異なるタンパク質に起因するか否かは、明確ではなかった。このタンパク質は、感染したヒトにおいて非常に免疫原性である。なぜなら、特異的な抗体が、Ｈ．ｐｙｌｏｒｉに感染した事実上すべての患者の血清において検出されるからである（Ｇｅｒｓｔｅｎｅｃｋｅｒら、１９９２、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．１１：５９５～６０１）。

【００１０】
Ｉ型株およびＩＩ型株の両方において見出される、ＮＡＰ（好中球活性化タンパク質－Ｅｖａｎｓ　Ｄ．Ｊ．ら１９９５．Ｇｅｎｅ　１５３：１２３～１２７；ＷＯ　９６／０１２７２およびＷＯ　９６／０１２７３、特に配列番号６；ＷＯ　９７／２５４２９も参照のこと）として公知のタンパク質は、Ｈ．ｐｙｌｏｒｉマウスモデルにおいて試験された場合、防御的であるようである（Ｍａｒｃｈｅｔｔｉ、Ｍら、１９９５．Ｓｃｉｅｎｃｅ．２６７：１６５５～１６５８）。ＮＡＰは、１５ｋＤａサブユニットのホモ十量体であり、そして多量体の複合体が六方晶系の準結晶構造を自然に形成する環状構造を有することが提唱されている。アセンブルされたタンパク質は、ヒト好中球のスフィンゴ糖脂質レセプターと相互作用するようである。

【００１１】
他の多数のＨ．ｐｙｌｏｒｉ抗原が、ＷＯ　９８／０４７０２に記載されている。これには、ウレアーゼＢ（配列番号４）、ＨｏｐＸ（配列番号２１）、ＨｏｐＹ（配列番号２１）、３６ｋＤａ（配列番号２６）、４２ｋＤａ（配列番号２５）、および１７ｋＤａ（配列番号２７）が挙げられる。ウレアーゼはまた、例えば、ＥＰ－Ｂ－０３６７６４４（ウレアーゼ活性を有するタンパク質）、ＥＰ－Ａ－０６１０３２２（ウレアーゼＥ、Ｆ、Ｇ、ＨおよびＩ）、ＥＰ－Ａ－０６２５０５３（ウレアーゼタンパク質）およびＥＰ－Ａ－０８３１８９２（ウレアーゼのマルチマー性形態）に記載される。他のＨ．ｐｙｌｏｒｉ抗原としては、ＥＰ－Ａ－０７９３６７６に記載される、５４ｋＤａ（配列番号２）タンパク質、および５０ｋＤａ（配列番号１）タンパク質が挙げられる。

【００１２】
Ｈ．ｐｙｌｏｒｉの種々の毒性因子の考察は、例えば、ＥＰ－Ａ－９３９０５２８５．８およびＥＰ－Ａ－９６９０８３００．５に見出され得る。

【００１３】
Ｈ．ｐｙｌｏｒｉによる胃の粘膜のコロニー形成は、今日、ヒトにおける急性および慢性の胃十二指腸病理学の主要な原因として認識されている（ＢｌａｓｅｒおよびＰａｒｓｏｎｎｅｔ，１９９４；Ｃｏｖａｃｃｉら、１９９７）。病気の感染状態の認識は、抗Ｈ２ブロッカーによる症状の処置から抗菌性レジメによる細菌感染の根絶へと変化している、疾患の処置において主要な影響を有している。

【００１４】
抗生物質処置で達成される疑う余地のない成功にもかかわらず、このような処置が、長期間の場合、抗生物質を無効とする耐性株の発生を必然的に導くということは記憶されるべきである。これは、分類的に、大集団において感染性疾患を予防および制御するのに最も有効な手段であるワクチン接種が、感染の予防に、および可能性としては疾患の処置にも用いられ得ることを示唆する。

【００１５】
広範な種々の胃病理学の誘導におけるＨ．ｐｙｌｏｒｉの重要性の増大は、効果的な予防的ストラテジーおよび／または治療的ストラテジーの開発のための主要なチャレンジを示している。細菌と宿主との間の相互作用をよりよく理解するために、多くの努力が天然のヒトの感染の局面を再現する適切な動物感染モデルの開発に対して集中している。

【００１６】
感染および疾患のいくつかの動物モデルが、感染の病原因子、ならびに予防的ストラテジーおよび治療的ストラテジーの開発を研究する目的で開発されている。これらのモデルの多くは非常に非実際的である。なぜなら、サル（Ｄｕｂｏｉｓ，Ａら、１９９４．Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌｏｇｙ．１０６：１４０５～１４１７）または純粋隔離（すなわち、無菌）条件下で保持される種、例えば、無菌のイヌまたは仔ブタ（Ｋｒａｋｏｗｋａ，Ｓら、１９８７．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．５５：２７８９～２７９６；Ｒａｄｉｎ，Ｍ．Ｊ．ら、１９９０．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．５８：２６０６～２６１２）を使用するからである。純粋隔離仔ブタのコロニー化（Ｋｒａｋｏｗｋａら、１９８７）は、胃十二指腸疾患を有する患者から単離されたＨ．ｐｙｌｏｒｉ株を用いて報告されている。

しかし、仔ブタは、主にその栄養要求に起因して、２ケ月をこえて無菌条件下で保持され得ない（Ｒａｄｉｎら、１９９０）。

【００１７】

特定の病原体なしの（ＳＰＦ）ネコの成功裏の感染は、従来のネコから単離された株を用いて記載された（Ｆｏｘ，Ｊ．Ｇ．ら、１９９５．Ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｉｔｙ．６３：２６７４～２６８１；Ｈａｎｄｔ，Ｌ．Ｋ．ら、１９９５．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．３３：２２８０～２２８９）。純粋隔離のビーグル仔イヌがまた、ヒトH．ｐｙｌｏｒｉ単離体で感染され、そして３０日間、無菌条件下で保持された。しかし、このモデルにおいて、H．ｐｙｌｏｒｉでの長期感染に対して利用可能なデータはない（Ｒａｄｉｎら、１９９０）。他の実験動物モデルとしては、無胸腺のｎｕ／ｎｕマウスまたは無菌マウスが挙げられる（Ｋａｒｉｔａ，Ｍら、１９９１．Ａｍ．Ｊ．Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ．８６：１５９６～１６０３）。

【００１８】

しかし、これらの実験的感染の主な欠点は、洗練されかつ高価な収納系が必要とされ、そしてより重要なことには、純粋隔離宿主または免疫欠損宿主の特有の免疫学的状態が使用されることである。より近年では、ヒトの胃十二指腸の生検から新鮮に単離されたH．ｐｙｌｏｒｉは、生体異物のマウスの胃粘膜を永続的にコロニー化するのに適合されている（Ｍａｒｃｈｅｔｔｉら、１９９５）。このモデルは、防御的ワクチン接種（Ｍａｎｅｔｔｉ、Ｒら、１９９７．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．６５：４６１５～４６１９；Ｍａｒｃｈｅｔｔｉら、１９９５；Ｍａｒｃｈｅｔｔｉ，Ｍら、１９９８．Ｖａｃｃｉｎｅ １６：３３～３７；Ｒａｄｃｌｉｆｆ，Ｆ．Ｊ．，ら、１９９７．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．６５：４６６８～４６７４）か、または治療的ワクチン接種（Ｇｈｉａｒａ，Ｐら、１９９７．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．６５：４９９６～５００２）のいずれかの可能性を評価するために、ならびに抗－H．ｐｙｌｏｒｉの抗菌剤のインビボのスクリーニング（Ｌｅｅ，Ａら、１９９７．Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ．１１２：１３８６～１３９７）のため、および感染の病原を研究（Ｓａｋａｇａｍｉ，Ｔら、１９９６．Ｇｕｔ．３９：６３９～６４８）するために、特に有用であることが証明されている。しかし、胃の感染を評価するため、マウスは屠殺されなければならない；従って、慢性感染により誘導された病原学的変化および／または治療的レジメもしくは免疫化レジメの効果は、同じ個体動物において追跡され得る。

【００１９】

英国特許出願ＧＢ　９８０１０００．２（１９９８年1月１６日出願）および関連の国際特許出願　ＰＣＴ／ＩＢ９９／００２１７（１９９９年1月１５日出願）において、ヒトにおけるH．ｐｙｌｏｒｉでの感染の急性期に明白に関連した症状を再現し得る動物モデルが最初に記載されている（Ｍａｒｓｈａｌｌ，Ｂ．Ｊ．ら、１９８５．Ｍｅｄ．Ｊ．Ａｕｓｔｒａｌｉａ．１４２：４３６～４３９；Ｍｉｔｃｈｅｌｌ，Ｊ．Ｄ．ら、１９９２．Ａｍ．Ｊ．Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ．８７：３８２～３８６；Ｍｏｒｒｉｓ，Ａ．，およびＧ．Ｎｉｃｈｏｌｓｏｎ．１９８７．Ａｍ．Ｊ．Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ．８２：１９２～１９９；Ｓｏｂａｌａ，Ｇ．Ｍ．ら、１９９１．Ｇｕｔ ３２：１４１５～１４１８）。ＧＢ９８０１０００．２およびＰＣＴ／ＩＢ９９／００２１７に記載された発明は、H．ｐｙｌｏｒｉが従来の生体異物イヌの胃粘膜に永続的にコロニー化し得るという発見、およびこのコロニー化が急性症状、組織病理学的な病変を生じ、そして特定の免疫応答を誘発するという発見に基づく。従って、ＧＢ９８０１０００．２およびＰＣＴ／ＩＢ９９／００２１７に提供された動物モデルは、H．ｐｙｌｏｒｉ感染の処置の有効性を研究するために理想的である。

【００２０】

H．ｐｙｌｏｒｉは、細菌が周囲の宿主細胞には侵入しない、粘膜に関した感染なので、疾患に対するワクチンまたは処置を開発する試みは粘膜投与に、特に胃腸管への経口投与に集中していた。

【００２１】

従って、Ｈ．ｐｙｌｏｒｉの感染部位で局所（粘膜）処置が必要であると以前には考えられていたため、この領域における研究の突出は、予防剤／治療剤の粘膜投与による粘膜対応型の抗Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ抗体を開発することであった（例えば、以下を参照のこと：Ｃｈｅｎ，Ｍら、１９９２．Ｌａｎｃｅｔ ３３９：１１２０～１１２１；Ｆｅｒｒｅｒｏ．Ｒ．Ｌ．ら１９９４．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．６２：４９８１～４９８９；Ｍｉｃｈｅｔｔｉ，Ｐら、１９９４．Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌｏｇｙ １０７：１００２～１０１１；Ｌｅｅ，Ａら、１９９４．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．６２：３５９４～３５９７；Ｄｏｉｄｇｅ，Ｃら、１９９４．Ｌａｎｃｅｔ ３４３：９７４～９７９；Ｍａｒｃｈｅｔｔｉら、１９９５．；Ｌｅｅ，Ｃ．Ｋ．ら、１９９５．Ｊ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．１７２：１６１～１７２；Ｃｏｒｔｈｅｓｙ－Ｔｈｅｕｌａｚ，Ｉら、１９９５．Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌｏｇｙ １０９：１１５～１２１；Ｃｕｅｎｃａ，Ｒ．ら，１９９６．Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌｏｇｙ １１０：１７７０～１７７５；Ｒａｄｃｌｉｆｆ，Ｆ．Ｊ．ら１９９６．Ｖａｃｃｉｎｅ １４：７８０～７８４；Ｓｔａｄｔｌａｎｄｅｒ，Ｃ．Ｔ．Ｋ．Ｈ．ら１９９６．Ｄｉｇ．Ｄｉｓ．Ｓｃｉ．４１：１８５３～１８６２；Ｆｅｒｒｅｒｏ，Ｒ．Ｌ．ら、１９９７．Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌｏｇｙ １１３：１８５～１９４；Ｗｅｌｔｚｉｎ，Ｒ，ら、１９９７．Ｖａｃｃｉｎｅ １５：３７０～３７６；Ｒａｄｃｌｉｆｆら、１９９７；Ｇｈｉａｒａら、１９９７；Ｍａｒｃｈｅｔｔｉら、１９９８）。

【００２２】

しかし、本発明において、感染性Ｈ．ｐｙｌｏｒｉでのチャレンジに対する全身的な防御効果が、非粘膜的に投与されたＨ．ｐｙｌｏｒｉ抗原含有組成物を用いて予想外に達成され得ることが示されている。特に、例えば、全Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ細胞溶解物での筋肉内（ｉ．ｍ．）免疫化が感染性Ｈ．ｐｙｌｏｒｉでのチャレンジに対してイヌを防御し得ること、および非粘膜経路の例としてのこのｉ．ｍ．経路が、予想外に、この細菌に対するワクチン接種であると考えられ得ることが示されている。このような方法はまた、すでに樹立されたＨ．ｐｙｌｏｒｉ感染の処置において治療上有用であり得る。

【００２３】

本出願において言及されるすべての文献（特許、特許出願、研究論文および書籍を含む）は、参考としてその全体が本明細書に援用される。

【００２４】

（発明の要旨）

それゆえ、本出願は、Ｈ．ｐｙｌｏｒｉに対するＨ．ｐｙｌｏｒｉ抗原含有組成物が、非粘膜的に投与され得、そして依然としてＨ．ｐｙｌｏｒｉ細菌が粘膜と結合するという事実にもかかわらず疾患からの有効な（全身的な）防御を生じるという知見に基づく。

【００２５】

本発明によって、一つ以上の、有効な量のＨ．ｐｙｌｏｒｉ抗原の非粘膜投与を含むＨ．ｐｙｌｏｒｉによる感染に対する防御または処置の方法が提供される。

【００２６】

用語「～を含有する」は、「～を含む」および「～からなる」を意味する。

【００２７】

好ましくは、投与は、非経口、より好ましくは、筋肉内である。

【００２８】

投与される一つ以上の抗原は、別々にまたは組み合わせで、動物において、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトにおいて防御免疫応答を惹起し得る。

【００２９】

少なくとも一つの抗原は、Ｈ．ｐｙｌｏｒｉの病原性因子であり得る。そのような病原性因子の例は、ＶａｃＡ、ＣａｇＡ、ＮＡＰまたはウレアーゼを含む。他の好ましい抗原は、ＨｏｐＸ、ＨｏｐＹ、３６ｋＤａ、４２ｋＤａ、および１７ｋＤａの抗原（ＷＯ ９８／０４７０２を参照のこと）または５０ｋＤａの抗原（ＥＰ－Ａ－０７９３６７６を参照のこと）を含む。投与されるＨ．ｐｙｌｏｒｉの病原性因子は、好ましくはＶａｃＡ、Ｃ

ａｇＡ、ＮＡＰおよびウレアーゼを含む。より好ましくは、病原性因子は、ＶａｃＡ、ＣａｇＡ、およびＮＡＰを含む。もっとも好ましくは、病原性因子は、ＣａｇＡおよびＮＡＰを含む。

【００３０】

投与されるＨ．ｐｙｌｏｒｉ抗原は、病原性因子のみからなっていてもよいし、あるいは以下のような病原性因子の特定の組み合わせのみからなっていてもよい：ＶａｃＡ、ＣａｇＡ、ＮＡＰおよびウレアーゼ；ＶａｃＡ、ＣａｇＡ、およびＮＡＰ；またはＣａｇＡおよびＮＡＰ。

【００３１】

投与される抗原はまた、非Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ抗原を含み得る。

【００３２】

一つ以上の抗原は、好ましくは、精製された抗原または細胞全体の免疫原である。用語「精製された」は、少なくとも一つの精製工程が実施され、その結果精製された抗原が、その天然の状況での同じ抗原よりも純粋であることを意味する。しかし、そのような精製された抗原と会合しているいくつかの夾雑物が存在し得る。用語「精製された」は、抗原が「単離される」状況を含む。この場合、抗原は、一般的にＨ．ｐｙｌｏｒｉによる感染に対する防御能力または処置能力に有害に影響を与え得る任意の他の物質と会合していない。従って、用語「単離された」は、もっとも高い程度の精製を意味する。

【００３３】

抗原は、種々の通常の方法（すなわち、細胞培養物からの精製／単離、組換え技術、または化学合成による）により得られる。細胞全体の免疫原は、好ましくはＨ．ｐｙｌｏｒｉ細胞から抽出することにより調製される。抽出は、Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ細胞の溶解または超音波破壊あるいは任意の他の適切な方法により実行され得る。細胞全体の免疫原は、不活化Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ細胞であり得るか、またはそれを含み得る。

【００３４】

アジュバントは、好ましくは、１つ以上のＨ．ｐｙｌｏｒｉ抗原と同時に投与される。好ましくは、アジュバントは、水酸化アルミニウムまたはＭＦ５９™（ＷＯ　９０／１４８３７；ＥＰ－Ｂ－０３９９８４３；Ｏｔｔら、Ｖａｃｃｉｎｅ　Ｄｅｓｉｇｎ：Ｔｈｅ　ｓｕｂｕｎｉｔ　ａｎｄ　ａｄｊｕｖａｎｔ　ａｐｐｒｏａｃｈ、第１０章、ＰｏｗｅｌｌおよびＮｅｗｍａｎ編、Ｐｌｅｎｕｍ　Ｐｒｅｓｓ　１９９５を参照のこと）である。

【００３５】

１つ以上の抗原はまた、１つ以上の薬学的に受容可能な賦形剤と会合し得る。

【００３６】

本発明はまた、Ｈ．ｐｙｌｏｒｉによる感染に対する防御または処置のための非粘膜的投与のための医薬の製造における有効な量の１つ以上のＨ．ｐｙｌｏｒｉ抗原の使用を提供する。

【００３７】

本発明は、１つ以上のＨ．ｐｙｌｏｒｉ抗原および１つ以上の薬学的に受容可能な賦形剤を含む非粘膜投与のための薬学的組成物をさらに提供する。これは、好ましくは免疫原性組成物である。

【００３８】

薬学的組成物の１つ以上の抗原は、別々に、または組み合わせで、動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトにおいて、防御免疫応答を誘発し得る。

【００３９】

好ましくは、抗原の少なくとも１つが、Ｈ．ｐｙｌｏｒｉの病原性因子である。そのような病原性因子の例は、他の好ましい抗原の例と共に上記に提供される。

【００４０】

薬学的組成物は、好ましくは、少なくともＶａｃＡ、ＣａｇＡ、ＮＡＰおよびウレアーゼという病原性因子を含む。より好ましくは、薬学的組成物は、少なくともＶａｃＡ、ＣａｇＡ、およびＮＡＰという病原性因子を含む。最も好ましくは、薬学的組成物は、少なく

ともＣａｇＡおよびＮＡＰという病原性因子を含む。
【００４１】
薬学的組成物のＨ．ｐｙｌｏｒｉ抗原は、病原性因子のみから、またはＶａｃＡ、ＣａｇＡ、ＮＡＰおよびウレアーゼ、ＶａｃＡ、ＣａｇＡ、およびＮＡＰ、あるいはＣａｇＡおよびＮＡＰのような病原性因子の特定の組み合わせのみからなり得る。
【００４２】
薬学的組成物の抗原はまた、非Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ抗原を含み得る。
【００４３】
１つ以上の抗原は、好ましくは上記のような、精製された抗原または細胞全体の免疫原である。
【００４４】
薬学的組成物はまた、アジュバントをさらに含み得る。好ましくは、アジュバントは、水酸化アルミニウムまたはＭＦ５９™である。
【００４５】
本発明の薬学的組成物は、限定されないが、ワクチンのような免疫原性組成物であり得る。
【００４６】
従って、本発明はまた、１つ以上のＨ．ｐｙｌｏｒｉ抗原および１つ以上の薬学的に受容可能な賦形剤を含む、非粘膜的投与のための免疫原性組成物を提供する。
【００４７】
本発明による免疫原性組成物およびワクチンは、予防的（すなわち、感染を妨害するため）、または治療的（すなわち、感染後に疾患を処置するため）のいずれかで有り得る。そのようなワクチンは、抗原を通常「薬学的に受容可能なキャリア」との組み合わせで含む。このキャリアは、それ自体は、組成物を受けた個体に有害な抗体の産生を誘導しない任意のキャリアを含む。適切なキャリアは、代表的に、大きく、ゆっくりと代謝される高分子（例えば、タンパク質、ポリサッカリド、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマーアミノ酸、アミノ酸コポリマー、脂質凝集体（例えば、油滴またはリポソーム）、および不活性ウイルス粒子）である。そのようなキャリアは、当業者に周知である。さらに、これらのキャリアは、免疫刺激剤（「アジュバント」）のように機能し得る。さらに、抗原は、細菌トキソイドと結合され得る。
【００４８】
組成物の有効性を増強する好ましいアジュバントは、以下を含むがそれらに限定されない：（１）アルミニウム塩（ミョウバン）、例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムなど；（２）水中油型エマルジョン処方物（ムラミルペプチドまたは細菌細胞壁成分のような特異的な他の免疫刺激剤を伴って、または伴わずに）、例えば、（ａ）ＭＦ５９™（マイクロフルイダイザーを用いてサブミクロン粒子中に処方される、５％スクアレン、０．５％　Ｔｗｅｅｎ™８０および０．５％　Ｓｐａｎ８５を含む（必要に応じて、種々の量のＭＴＰ－ＰＥを含有するが、必要ではない））、（ｂ）ＳＡＦ（サブミクロンエマルジョン中へマイクロフルイダイズされるか、またはボルテックスされてより大きな粒子サイズのエマルジョンを生成するかのいずれかの、１０％スクアレン、０．４％　Ｔｗｅｅｎ　８０、５％のプルロニック（ｐｌｕｒｏｎｉｃ）ブロックポリマーＬ１２１、およびｔｈｒ－ＭＤＰを含む）、ならびに（ｃ）Ｒｉｂｉ™アジュバントシステム（ＲＡＳ）（２％スクアレン、０．２％　Ｔｗｅｅｎ８０、および以下からなる群由来の１つ以上の細菌細胞壁成分：モノホスホリルリピドＡ（ｍｏｎｏｐｈｏｓｐｈｏｒｙｌｉｐｉｄ　Ａ）（ＭＰＬ）、トレハロースジミコレート（ＴＤＭ）、および細胞壁骨格（ＣＷＳ）、好ましくはＭＰＬ＋ＣＷＳ（Ｄｅｔｏｘ™））；（３）サポニンアジュバント（例えば、Ｓｔｉｍｕｌｏｎ™を用い得るかまたはそれから作製される（例えば、ＩＳＣＯＭ（免疫刺激複合体））（４）フロイント完全アジュバントおよびフロイント不完全アジュバント（ＣＦＡおよびＩＦＡ）；（５）インターロイキン（例えば、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－１２など）、インタ

ーフェロン（例えば、ＩＦＮγ）、マクロファージコロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）などのようなサイトカイン；ならびに（６）組成物の効力を増強する免疫刺激剤として作用する他の物質。ミョウバンおよびＭＦ５９[TM]が好ましい。

【００４９】

上記のように、ムラミルペプチドは、以下を含むがそれらに限定されない：Ｎ－アセチル－ムラミル－Ｌ－スレオニル－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（ｎｏｒ－ＭＤＰ）、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（ｈｕｙｄｒｏｘｙ）ホスホリルオキシ）－エチルアミン（ＭＴＰ－ＰＥ）など。

【００５０】

代表的に、免疫原性組成物（例えば、抗原、薬学的に受容可能なキャリアおよびアジュバント）は、水、生理食塩水、グリセロール、エタノールなどのような希釈剤を含む。さらに、湿潤剤および乳化剤、ｐＨ緩衝化物質などのような補助物質は、そのようなビヒクル中に存在し得る。

【００５１】

代表的に、免疫原性組成物は、注射可能物質として、液体溶液またはエマルジョンのいずれかとして調製される；注射の前に液体のビヒクル中に溶解または懸濁するのに適切な固体形態もまた、調製され得る。調製物はまた、上記のようなアジュバント活性の効果を増強するためにリポソーム中に乳化またはカプセル化され得る。

【００５２】

ワクチンとして使用される免疫原性組成物は、免疫学的に有効な量の抗原性ポリペプチド、および必要な場合、上記の任意の他の成分を含む。「免疫学的に有効な量」とは、単回用量または一連のものの一部のいずれかでの、個体へのその量での投与が、処置または予防に有効であることを意味する。この量は、処置されるべき個体の健康状態および身体状態、処置されるべき個体の分類学的グループ（例えば、ヒト以外の霊長類、霊長類など）、個体の免疫系の抗体生成能、所望される防御の程度、ワクチンの処方、医療状況の処置医の評価、および他の関連因子に依存して変化する。この量は、慣用的な治験を通して決定され得、相対的に広範にわたることが予想される。

【００５３】

免疫原性組成物は、非粘膜的に、より詳細には非経口的に（例えば、注射により）、皮下にまたは筋内にのいずれかで投与される。経皮投与（ｔｒａｎｓｄｅｒｍａｌ　ｏｒ　ｔｒａｎｓｃｕｔａｎｅｏｕｓ　ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ）もまた用いられ得る。投薬処置は、単回用量計画または複数用量計画であり得る。ワクチンは、他の免疫調節剤とともに投与され得る。

【００５４】

本発明により、上記のような薬学的組成物の使用または上記のような免疫原性組成物の使用が、Ｈ．ｐｙｌｏｒｉによる感染に対する防御または処置のためにさらに提供される。

【００５５】

（発明の詳細な説明）

（全細胞Ｈ．ｐｙｌｏｒｉワクチン）

本発明の１実施態様として、全細胞Ｈ．ｐｙｌｏｒｉワクチン（すなわち、Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ細胞溶解物）を用いて従来のイヌを免疫化することの実行可能性が、調査された。このような調製物は、感染性のＨ．ｐｙｌｏｒｉを用いる、より遅いチャレンジに対する保護効果を提供する免疫性を誘発し得ることが、示される。

【００５６】

免疫原性。全細胞Ｈ．ｐｙｌｏｒｉワクチンの保護効果は、感染性のＨ．ｐｙｌｏｒｉを用いてチャレンジされるイヌにおいて調査された。続く実験手順の詳細は後述される。時間０およびコントロールイヌに対して比較して、ｉ．ｍ．免疫化は、表１に示されるように非常に高力価の血清ＩｇＧ抗体を誘導した。Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ溶解物を用いるｉ．ｍ．

免疫化はまた、抗原特異的な血清ＩｇＡ抗体の産生を誘導した。

【００５７】

症状。コントロールイヌ＃２およびコントロールイヌ＃３は、最後のチャレンジ後の第１週の間に下痢をした。コントロール＃２は嘔吐もした。ｉ．ｍ．群において、Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ感染の症状は存在しなかった。

【００５８】

胃（洞（ａｎｔｒａｌ））の生検および胃洗浄液に対するウレアーゼ試験。このアッセイは最後のチャレンジの１０日後に採取された洞生検および胃洗浄液に対して実施され、このアッセイは、２４時間後であっても、以下の表２で示されるようにコントロール群において陽性であり、そしてｉ．ｍ．群において陰性であった。これらのデータはまた、チャレンジの４２日後において確認された。

【００５９】

【表１】

【００６０】
【表２】

表１

ビーグル犬に対して筋肉内に４回与えられた

Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ溶解物の免疫原性

仅番号	免疫化経路	以下に対する血清IgG力価						以下に対する血清IgA力価	
		H. pylori 溶解物		CagA		NAP		H. pylori 溶解物	
		前*	後-4	前	後-4	前	後-4	前	後 -4
1	nil（コントロール）	< 100§	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 20	< 20
2	nil（コントロール）	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 20	< 20
3	nil（コントロール）	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 20	< 20
4	筋肉内	< 100	≥ 25000	< 100	12800	< 100	≥ 12800	< 20	1280
5	筋肉内	< 100	≥ 25000	< 100	12800	< 100	≥ 12800	< 20	320
6	筋肉内	< 100	≥ 25000	< 100	6400	< 100	≥ 12800	< 20	640

*前：免疫化の前に得られた血清サンプル；後－４：チャレンジの前の４回の免疫化の後に得られた血清サンプル。

§力価は、０．２以上の光学密度を与える最後の血清希釈物として表現される。力価＜１００（ＩｇＧ）および力価＜２０（ＩｇＡ）は、陰性と見なされる。

40 30 20 10

表２

群	仔番号	生検	胃洗浄
コントロール	1	+	+
	2	+	+
	3	+	+
筋肉内	1	-	-
	2	-	-
	3	-	-

内視鏡、組織学、および免疫組織化学の結果。保護されたイヌは、チャレンジの４２日後での内視鏡試験において、光沢がありかつ滑らかな表面を有し、充血の兆候も水腫の兆候も有さない、正常な粘膜を示した（図１Ａ）。逆に、コントロール（感染された）イヌにおいて、胃粘膜は、濃い赤色でかつ水腫状であり、そしてひだの外観を伴う波状の表面を有した（図１Ｂ）。これは、以前に観察され、そして特許出願ＧＢ９８０１０００．２およびＰＣＴ／ＩＢ９９／００２１７に記載される結節性（小胞性）胃炎を示唆した。

【００６１】

組織学的に、保護されたイヌの胃粘膜は、表面および粘膜下組織の両方においてインタクトな構造を保存した（図２Ａ）が、感染したイヌにおいては、充血（図２Ｂ、矢印）、水腫（図２Ｂ、アステリスク）、炎症性の細胞性湿潤（図２Ｂ、矢尻および図２Ｃ）の外観が存在した。Ｈ．ｐｙｌｏｒｉはまた、粘液性の層において容易に同定された（図２Ｄ）。

【００６２】

これらの全データは、抗ＶａｃＡモノクローナル抗体を用いて免疫組織化学によって確認された。この抗体は、感染されたイヌの上皮細胞を濃く染色した（図３Ｂ、矢印）が、保護されたイヌの上皮細胞は濃く染色しなかった（図３Ａ）。

【００６３】

結論。これらのデータを合わせると、Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ溶解物を用いるｉ．ｍ．免疫化が、イヌを、感染性のＨ．ｐｙｌｏｒｉを用いるチャレンジに対して保護し得ること、およびｉ．ｍ．経路がこの細菌に対するワクチン接種のために考慮され得ることを示す。

【００６４】

（精製Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ抗原ワクチン）

本発明のさらなる実施態様において、精製Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ抗原での、従来のイヌの免疫の実行可能性もまた研究した。このような調製は、感染性Ｈ．ｐｙｌｏｒｉを用いた後期チャレンジに対する防御効果を提供する免疫を誘発し得ることが示される。

【００６５】

（免疫原性）精製Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ抗原（特に、ＶａｃＡ、ＣａｇＡおよびＮＡＰ）の防御効果を、感染性Ｈ．ｐｙｌｏｒｉでチャレンジされたイヌにおいて調査した。従った実験手順の詳細は、以降に記載する。これらの抗原での免疫は、たった２用量のみ後に、各抗原に特異的な、非常に強力な血清ＩｇＧ抗体応答を誘導した。力価は、３回目の用量の後に増加した。５０μｇおよび１０μｇの用量の抗原は、高力価の抗原特異的抗体を誘導するのに、２５０μｇと同じく良好であった。比較的に、より低い抗体力価が、Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ溶解物で免疫されたイヌにおいて検出可能であった（図５を参照のこと）。

【００６６】

これらの抗原での免疫化はまた、高力価の、抗原特異的血清ＩｇＧ１抗体およびＩｇＧ２抗体を誘導した。このことは、この免疫が、Ｔｈ１型およびＴｈ２型両方の免疫応答を誘導し、感染したマウスおよびイヌにおいてすでに観察されたこと（圧倒的なＴｈ１型免疫応答が明らかである）とは異なることを示唆する（図６を参照のこと）。

【００６７】

この様式で免疫されたイヌもまた、検出可能な力価の抗原特異的ＩｇＡ抗体を血清中に有した（図７を参照のこと）。

【００６８】

（内視鏡検査、組織学および免疫組織化学の結果）防御された動物において（表３を参照のこと－この表は、内視鏡検査（胃鏡検査）、組織学および免疫組織化学を含む、総合された全てのパラメーターに基づいて、防御に対する最終的結果を示す）、胃粘膜は、内視鏡検査で、組織学で、そして免疫組織化学で正常であった（図８Ａ、９Ａおよび１０Ａを、それぞれ参照のこと）。防御されていなかった（感染した）動物は、内視鏡検査で、充血性の、ひどくｆｌｏｇｉｓｔｉｃな胃粘膜の面を示し（図８Ｂ）、拡散した浸潤物が、リンパ様の小胞構造中に凝集された単核細胞を伴い、（図９Ｂ）、これにより正常な腺構造を破壊していた。図１０Ｂは、抗ＶａｃＡモノクローナル抗体を使用する免疫組織化学での強力な防御を示す。

【００６９】

（結論）まとめると、これらのデータは、Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ抗原でのｉ．ｍ．免疫化が、感染性Ｈ．ｐｙｌｏｒｉでのチャレンジに対してイヌを防御し得ることを示す。

【００７０】

【表３】

表３

精製した抗原を用いる筋肉内免疫化は、
Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ ｐｙｌｏｒｉ
を用いるチャレンジに対してイヌを保護する

群	イヌ#	保護
コントロール	1	-
	2	-
	3	-
	4	-
VacA/CagA/NAP	5	+
各250μg	6	+
	7	+
	8	-
VacA/CagA/NAP	9	+
各50μg	10	+
	11	+
	12	+
VacA/CagA/NAP	13	+
各10μg	14	+
	15	+
	16	+
全細胞溶解物	17	-
25mg	18	+
	19	+
	20	+
全細胞溶解物	21	+
5mg	22	+
	23	-
	24	+

（実験）
Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ株。ＳＰＭ３２６ｓ（マウスに適合されたＨ．ｐｙｌｏｒｉ Ｉ型（ＣａｇＡ＋／ＶａｃＡ＋）のＳＰＭ３２６株のストレプトマイシン耐性誘導株）を、以前に記載（Ｍａｒｃｈｅｔｔｉら、１９９５）のように増殖させ、そしてイヌをチャレンジするために使用した。Ｈ．ｐｙｌｏｒｉのＣＣＵＧ株は、当該分野で周知である。
【００７１】
動物。６匹の４～６月齢の生体異物の（ｘｅｎｏｂｉｏｔｉｃ）ビーグル犬（全て雌）（Ｍｏｒｉｎｉ ｓ．ａ．ｓ．、Ｓ．Ｐｏｌｏ Ｄ’Ｅｎｚａ、Ｉｔａｌｙ）を、抗原として全細菌溶解物を使用するウェスタンブロット（ＷＢ）分析においてＨｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ ｓｐｐ．に対する検出可能な血清ＩｇＧがないことに基づいて選択した（以下を

参照のこと）。この選択された６匹のイヌを、標準的条件で飼育し、そして乾燥食料の食餌（ＭＩＬ、Ｍｏｒｉｎｉ　ｓ．ａ．ｓ）および水道水を自由に取らせて維持した。本研究者らの動物設備に到着した際に、血清に対するさらなるＷＢ分析により、これらのイヌのＨ．ｐｙｌｏｒｉの状態を確認した。これらのイヌを、個別のゲージで飼育し、そして１ヶ月間新しい環境に適応させた。この適応の月の間に、腸寄生生物または一般の腸内病原細菌の存在を評価するために、２つの試験を糞便サンプルに対して行った。

【００７２】

Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ溶解物の調製。２つの５リットルファーメンター（Ｏｌｉｖｉｅｒｉ，Ｒら、１９９３、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．３１：１６０～１６２）から、Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ　ＣＣＵＧ株の２つのペレットを得た。各ペレットを、５０ｍｌの超音波処理用緩衝液（５０ｍＭ　Na_2HPO_4・$2H_2O$、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．８）中に再懸濁した後、この２つの再懸濁ペレットを混合した。この混合再懸濁物のOD_{530nm}を測定し、細菌濃度を決定した（＝３．２×10^{10}ＣＦＵ／ｍｌ）。この再懸濁物を、超音波処理用緩衝液で希釈して、濃度を２×10^{10}ＣＦＵ／ｍｌにした。超音波処理の前に、顕微鏡下で観察すると、細菌は、古典的螺旋形態を有していた。次いで、この再懸濁された細菌の超音波処理を、氷上で以下のように行った：４分間を２サイクル、そして５分間を２サイクル、各サイクル間で１分間休止。超音波処理後、顕微鏡下で観察すると、全ての細菌は、破壊されたことを示した。次いで、Ｂｒａｄｆｏｒｄ法を使用して、タンパク質濃度を決定した（＝５７．５ｍｇ／ｍｌタンパク質）。次いで、この細胞溶解物のアリコートを、調製し、そして使用するまで－８０℃で凍結した。

【００７３】

免疫化。３匹のイヌを、１ｍｇの水酸化アルミニウム（Ｃｈｉｒｏｎ　Ｂｅｈｒｉｎｇ　ＧｍｂＨ＆Ｃｏ．、Ｍａｒｂｕｒｇ、Ｇｅｒｍａｎｙ；Ｌｏｔ　Ｎｏ．２７７３４５）に吸収させた、調製したＨ．ｐｙｌｏｒｉ溶解物（１０^{10}ＣＦＵ／ｍｌのＨ．ｐｙｌｏｒｉの等価物（＝２８ｍｇ／用量））の１ｍｌ容量で０日目に筋肉内に（ｉ．ｍ．）免疫した。免疫化を、７日、１４日、および２２日に反復した。血清サンプルを、０日、２１日（免疫後３）および４３日目（免疫後４）に採取した。他の３匹のイヌを、コントロール群として、Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ溶解物の代わりに生理食塩水を使用したこと以外は同一に処置した。

【００７４】

（感染性Ｈ．ｐｙｌｏｒｉでのチャレンジ）次いでイヌを以下のように、マウスに適応したＨ．ｐｙｌｏｒｉのＳＰＭ３２６株を用いて４９、５１および５３日目にチャレンジした：それぞれのチャレンジの２４時間前、イヌを絶食させた。細菌接種の２時間前、イヌに１０ｍｇ／ｋｇのシメチジン（Ｔａｇａｍｅｔ（登録商標）２００；Ｓｍｉｔｈ　Ｋｌｉｎｅ＆Ｆｒｅｎｃｈ，ＵＳＡ）を筋肉内（ｉ．ｍ．）投与した。チャレンジの際には、イヌを４０μｇ／ｋｇのメデトミジンクロリデート（Ｄｏｍｉｔｏｒ（登録商標）；Ｃｅｎｔｒａｌｖｅｔ－Ｖｅｔｅｍ　ｓ．ｐ．ａ．，Ｍｉｌａｎｏ，Ｉｔａｌｙ）および５ｍｇ／ｋｇのケタミン（Ｋｅｔａｖｅｔ（登録商標）、Ｇｅｌｌｉｎｉ，Ｌａｔｉｎａ，Ｉｔａｌｙ）の混合物で、静脈内（ｉ．ｖ．）麻酔した；次いで、胃洗浄を１００ｍｌの０．２Ｍ　$NaHCO_3$滅菌溶液で実施し、次に、接種手順の直前に調製した、滅菌生理食塩水中のＨ．ｐｙｌｏｒｉ株ＳＰＭ３２６（微好気的条件（以下参照）下で培養した）の１０^{9}ＣＦＵの新鮮調製した３ｍｌの懸濁液での経口チャレンジを実施した。細菌接種の終了時、２００μｇ／ｋｇの麻酔拮抗剤アチパメゾール（Ａｎｔｉｓｅｄａｎ（登録商標）；Ｃｅｎｔｒａｌｖｅｔ－Ｖｅｔｅｍ　ｓ．ｐ．ａ．，Ｍｉｌａｎｏ，Ｉｔａｌｙ）を投与し、次いで、再びイヌをシメチジンで処置し、そして２時間後給餌した。

【００７５】

（チャレンジ後、追跡）最後のチャレンジから１０日後および４２日後、胃の内視鏡検査を、４．９ｍｍ直径のＰｅｎｔａｘ小児用気管支鏡（Ｐｅｎｔａｘ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｚａｖｅｎｔｅｍ，Ｂｅｌｇｉｕｍ）を用いて実施した。同時に、胃の生検を、ウレアーゼ試験のためならびに細菌学分析、組織病理学分析および免疫組織化学分析のた

めに、洞、本体底および噴門で、可撓性のピンチー生検鉗子を用いて、内視鏡検査の間に採取した。それぞれの内視鏡検査の前に、装置全体および可撓性の鉗子を４５分間、４％のグルタルアルデヒドに浸漬し、次いで、滅菌生理食塩水中ですすいだ。異なる部位で採取される生検の間の交差汚染を避けるため、鉗子を水道水で洗浄し、そしてそれぞれの生検サンプルの採集の前に軽度に火炎滅菌した。上記の実験プロトコールは、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ ＰｉｓａのＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ ａｎｄ Ｅｔｈｉｃａｌ Ｃｏｍｉｔｅｅにより承認され、そしてＩｔａｌｉａｎ Ｍｉｎｉｓｔｒｙ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ（Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｖｅｔｅｒｉｎａｒｙ Ｈｅａｌｔｈ，Ｆｏｏｄ ａｎｄ Ｎｕｔｒｉｔｉｏｎ）から公式の認可を受けた（ＤＭ Ｎｏ．２１／９７－Ｃ）。

【００７６】

（迅速ウレアーゼ試験）洞の生検および胃洗浄からの液体を、リン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ６．５）中１％フェノールレッド液（Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ，ＵＳＡ）２滴を添加した、蒸留水中の１ｍｌの１０％尿素溶液中で２４時間までインキュベートした。陽性の検定は培地の色の変化（オレンジ色から暗いピンクへ）により示される；色の変化に要する時間を記録する。０時点で、内視鏡検査を６匹のイヌに実施し、そして洞の生検をウレアーゼ検査のために採取した。６匹のイヌ全てにおいて、ウレアーゼ検査は、０時点で陰性であった。

【００７７】

（組織病理学および透過型電子顕微鏡）組織学的、免疫組織学的および超微細構造的試験のためのサンプルを、微生物学的分析に利用されるものに隣接する部位の生検から採取した。このサンプルを、１０％緩衝化ホルマリン中に固定し、そしてパラフィン中に包埋した。３μｍの切片を、ヘマトキシリン－エオシン（Ｈ＆Ｅ）ならびにアルシアンおよび過ヨウ素酸シッフ（ＰＡＳ）染色を用いて、組織学的試験のための標準的な手順を使用して染色した。類似の切片もまた、Ｈ．ｐｙｌｏｒｉに特異的なモノクローナル抗体（Ｍａｂ）（Ｂｉｏｇｅｎｅｓｉｓ Ｌｔｄ，Ｐｏｏｌｅ，Ｅｎｇｌａｎｄ，ＵＫ）または精製したネイティブのＨ．ｐｙｌｏｒｉ ＶａｃＡでＢａｌｂ／ｃマウスを免疫化することによって得た抗ＶａｃＡマウスモノクローナル抗体（Ｃ１Ｇ９）（ＢｕｒｒｏｎｉおよびＴｅｌｆｏｒｄ、未公開の知見）を用いる、アビジン－ビオチン－複合体（ＡＢＣ）－ペルオキシダーゼ技術を使用する、免疫組織学的分析のために使用した。ビオチン化ウマ抗マウス抗体を、二次抗体として使用した。この反応を、３－１－ジアミノベンジジン－クロルヒドレート（ＤＡＢ）（Ｓｉｇｍａ）を用いて、細菌抗原の同定および位置決定のために発色させた。電子顕微鏡試験のために、他のサンプルを、Ｋａｒｎｏｗｓｋｙ中に固定し、OsO_4中で後固定し、そしてＥｐｏｎ－Ａｒａｌｄｉｔｅ（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｉｎｃ．Ｗａｒｒｉｎｇｔｏｎ，ＰＡ，ＵＳＡ）中に包埋した。半薄切片を、細胞損傷の評価のためにトルイジンブルーで染色し、一方、超薄切片を、ウラニルアセテートおよびクエン酸鉛で染色し、次いでＰｈｉｌｌｉｐｓ ＥＭ３０１透過型電子顕微鏡（ＴＥＭ）を８０ＫＶで操作して試験した。

【００７８】

（抗Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ抗体の検出）Ｈ．ｐｙｌｏｒｙ（ＳＰＭ３２６ｓ株）のＳＤＳ－ＰＡＧＥおよび血清のＷＢ分析を、以前に公開された手順（Ｍａｒｃｈｅｔｔｉら、１９９５）に従って行った。簡単に述べると、イヌ血清を、１：２００に希釈し、そして室温にて２時間インキュベートした。次いで、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）結合体化ウサギ抗イヌＩｇＧ抗体（Ｎｏｒｄｉｃ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｔｉｂｕｒｇ，Ｔｈｅ Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）を、２時間、１：２，０００希釈で添加し、そしてこの反応を、４－α－クロロナフトールを基質として用いて発色させた。Ｈ．ｐｙｌｏｒｉに対する抗体のＥＬＩＳＡによる検出を、免疫化に使用される調製されたＣＣＵＧ株溶解物（５μｇ／ウェル）または精製したネイティブのＣａｇＡもしくはＮＡＰ（０．２μｇ／ウェル）を用いて、４℃にて一晩コートした９６ウェルプレートにおいて行った。コートされたウェルを、５％脱脂粉乳を含むＰＢＳでブロックした。二倍連続希釈の血清を、３７℃にて２時間インキュベートし、次いでＰＢＳで洗浄し

た。抗原特異的ＩｇＧ力価を、１：４，０００希釈のＨＲＰ結合体価ヤギ抗イヌＩｇＧ抗体（Ｂｅｔｈｙｌ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．Ｍｏｎｔｇｏｍｅｒｙ，ＴＸ，ＵＳＡ）を３７℃にて２時間使用して決定した。抗原に結合した抗体を、ｏ－フェニレンジアミンジヒドロクロリド（Ｓｉｇｍａ）を基質として添加することによって明らかにした。抗体力価を、以前に記載の記載されたように（Ｇｈｉａｒａら、１９９７）決定した。

【００７９】

（精製Ｈ．ｐｙｌｏｒｉ抗原を用いたイヌの筋肉内（ｉ．ｍ．）免疫化）ＶａｃＡおよびＣａｇＡを、Ｇｈｉａｒａら、１９９７に記載されるように、発現させ、そして精製した。ＮＡＰを、初期の特許出願ＧＢ９８０７７２１．７およびＰＣＴ／ＩＢ／９９／００６９５に記載されるように、発現させ、そして精製した。表４に示したように、４匹のイヌのグループを、以下を用いてｉ．ｍ．免疫化した：

（ｉ）水酸化アルミニウムに吸着された組換えＶａｃＡ、ＣａｇＡ、およびＮＡＰ（２５０、５０または１０μｇの各抗原）の混合物（１ｍｇ用量）；

（ｉｉ）水酸化アルミニウムに吸着された、１用量当たり２５または５ｍｇの、ＣＣＵＧ溶解物（上記のように調製した）（１ｍｇ用量）；

（ｉｉｉ）水酸化アルミニウム単独（１ｍｇ用量）。

【００８０】

イヌを、１週間間隔で４回免疫化した。Ｈ．ｐｙｌｏｒｉでのチャレンジを、既に記載したように、４週後に行った。サンプル（血液、生検など－以前に記載した）を、免疫化の前、第２回、第３回および第４回の免疫化の後、次いで最後のチャレンジの２～３週および８週後に採取した。

【００８１】

【表４】

表４
免疫化プロトコル
ミョウバンをアジュバントとして用いて筋肉内に与えられた全抗原

群	イヌ	経路	免疫原	用量	アジュバント (mg)	容量
1	4	コントロール(IM)	nil (食塩水)	-	AlOH (1 mg)	1 ml
2	4	IM	VacA + CagA + NAP	各250 μg (合計. 750 μg)	AlOH (1 mg)	1 ml
3	4	IM	VacA + CagA + NAP	各50 μg (合計. 150 μg)	AlOH (1 mg)	1 ml
4	4	IM	VacA + CagA + NAP	各10 μg (合計. 30 μg)	AlOH (1 mg)	1 ml
5	4	IM	CCUG 溶解物	25 mg	AlOH (1 mg)	1 ml
6	4	IM	CCUG 溶解物	5 mg	AlOH (1 mg)	1 ml

【図面の簡単な説明】

【図１】　図１は、Ｈ．ｐｙｌｏｒｉを用いるチャレンジの４２日後の保護されたイヌ（図１Ａ）およびコントロール（感染された）イヌ（図１Ｂ）の洞領域（ａｎｔｒａｌ　ｒｅｇｉｏｎ）の内視鏡試験を示す。

【図２】　図２は、Ｈ．ｐｙｌｏｒｉを用いるチャレンジの４２日後の保護されたイヌ（図２Ａ、倍率＝１０倍）およびコントロール（感染された）イヌ（図２Ｂ、倍率＝１０倍

；図２Ｃ、倍率＝４０倍；図２Ｄ、倍率＝１００倍）の洞領域から採取された生検の組織学的試験（ヘマトキシリン－エオシン（ＨＥ）染色）を示す。

【図３】　図３は、Ｈ．ｐｙｌｏｒｉを用いるチャレンジの４２日後の保護されたイヌ（図３Ａ）およびコントロール（感染された）イヌ（図３Ｂ）の洞領域から採取された生検の免疫組織学的試験を示す（倍率＝４０倍）。

【図４】　図４は、ビーグル犬が、ｉ．ｍ．で与えられた、精製された抗原を使用する、Ｈ．ｐｙｌｏｒｉを用いるチャレンジに対して保護され得るか否かを決定するための実験のスケジュールを示す。

【図５Ａ】　図５Ａは、精製された抗原または全細胞溶解物を用いる、ｉ．ｍ．の第１の免疫化の前、ならびに第２、第３、および第４の免疫化の後の、組換えＶａｃＡ（図５Ａ）に対する血清抗体力価（平均）を示す。水平の矢印は、陽性ＥＬＩＳＡの結果についての下限を特徴付ける。

【図５Ｂ】　図５Ｂは、精製された抗原または全細胞溶解物を用いる、ｉ．ｍ．の第１の免疫化の前、ならびに第２、第３、および第４の免疫化の後の、ＣａｇＡ（図５Ｂ）に対する血清抗体力価（平均）を示す。水平の矢印は、陽性ＥＬＩＳＡの結果についての下限を特徴付ける。

【図５Ｃ】　図５Ｃは、精製された抗原または全細胞溶解物を用いる、ｉ．ｍ．の第１の免疫化の前、ならびに第２、第３、および第４の免疫化の後の、ＮＡＰ（図５Ｃ）に対する血清抗体力価（平均）を示す。水平の矢印は、陽性ＥＬＩＳＡの結果についての下限を特徴付ける。

【図６Ａ】　図６は、上記（図５）と同時点における血清ＩｇＧ抗体サブクラスＩｇＧ１およびＩｇＧ２の、ＣａｇＡ（図６Ａ）およびＮＡＰ（図６Ｂ）への力価（精製された抗原または全細胞溶解物を用いてｉ．ｍ．で免疫化された群あたりの平均力価）を示す。

【図６Ｂ】　図６は、上記（図５）と同時点における血清ＩｇＧ抗体サブクラスＩｇＧ１およびＩｇＧ２の、ＣａｇＡ（図６Ａ）およびＮＡＰ（図６Ｂ）への力価（精製された抗原または全細胞溶解物を用いてｉ．ｍ．で免疫化された群あたりの平均力価）を示す。

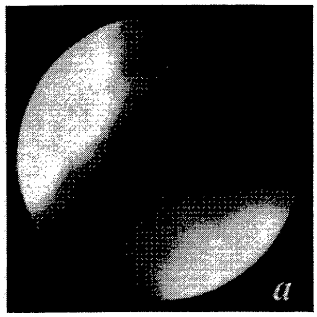
【図７】　図７は、免疫化の前および第３の免疫化の後の精製された抗原（ＶａｃＡ、ＣａｇＡおよびＮＡＰ）または全細胞溶解物を用いてｉ．ｍ．で免疫化されたビーグル犬（一匹のイヌ－図７Ａ～７Ｆ）における、ｐ９５（組換えＶａｃＡ）に対する血清ＩｇＡ抗体力価を示す（同様の血清ＩｇＡ抗体力価が、ＣａｇＡに対して観察された）。

【図８】　図８は、チャレンジの約８週後に採取された保護されたイヌ（図８Ａ）および保護されていない（感染された）イヌ（図８Ｂ）の内視鏡画像を示す。

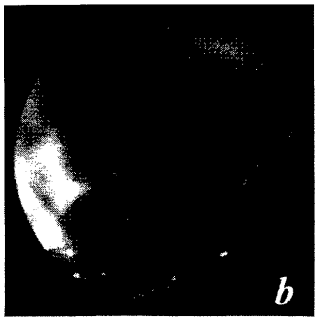
【図９】　図９は、チャレンジの約８週後に採取された保護されたイヌ（図９Ａ）および保護されていない（感染された）イヌ（図９Ｂ）からの胃粘膜の組織学（ＨＥ染色、倍率＝１０倍）を示す。図９Ａにおいて、正常の粘膜および粘膜下組織を示す。逆に、図９Ｂにおいて、大きなリンパ様小節、粘膜および粘膜下組織の構造の破壊が、示され得る。

【図１０】　図１０は、チャレンジの約８週後に採取された抗ＶａｃＡモノクローナル抗体を用いる免疫組織化学を示す（倍率＝１０倍）。保護されたイヌにおける陰性染色（図１０Ａ）および保護されていない（感染された）イヌにおける濃厚な陽性染色（図１０Ｂ）を示す。

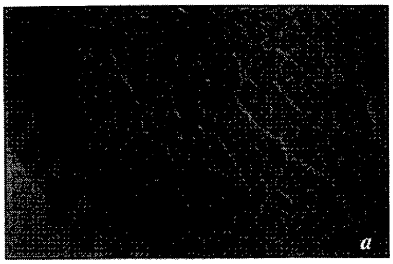
【図１Ａ】
FIG. 1A



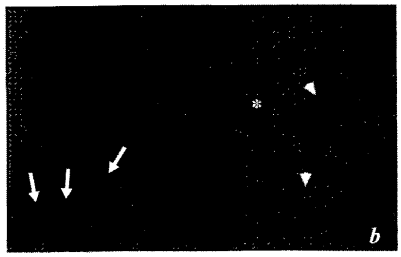
【図１Ｂ】
FIG. 1B



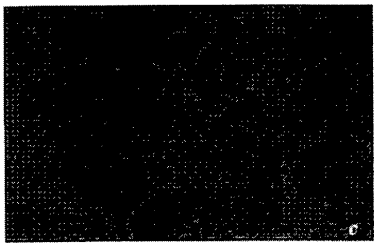
【図２Ａ】
FIG. 2A



【図２Ｂ】
FIG. 2B



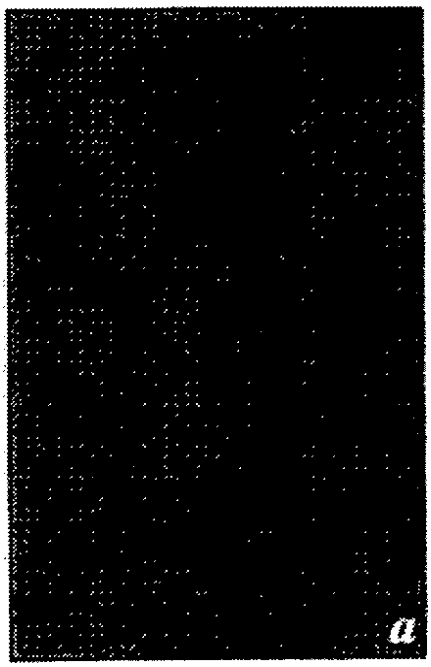
【図２Ｃ】
FIG. 2C



【図２Ｄ】
FIG. 2D



【図３Ａ】
FIG. 3A



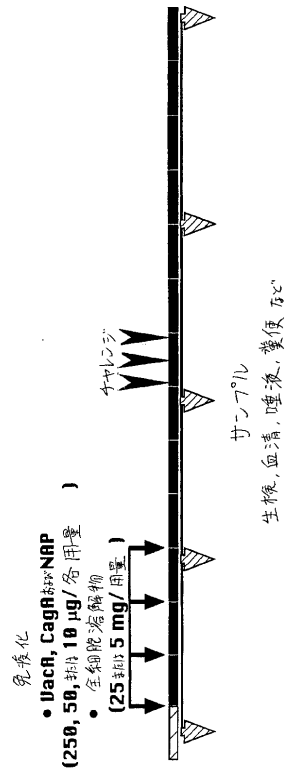
【図３Ｂ】

FIG. 3B



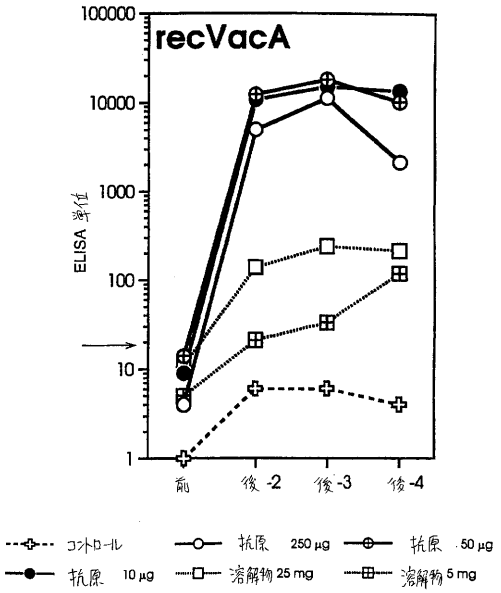
【図４】

FIG. 4



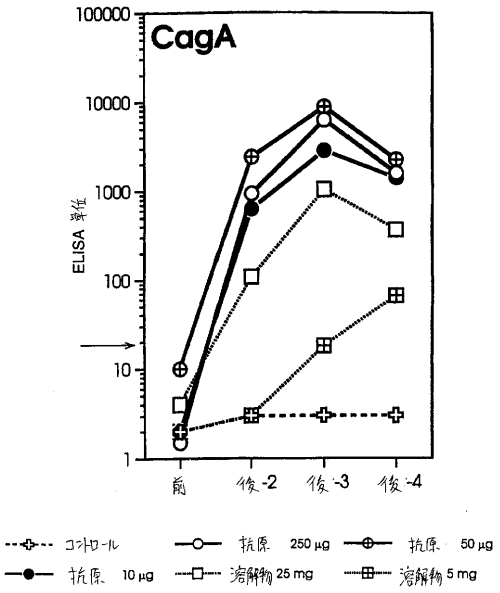
【図５Ａ】

FIG. 5A



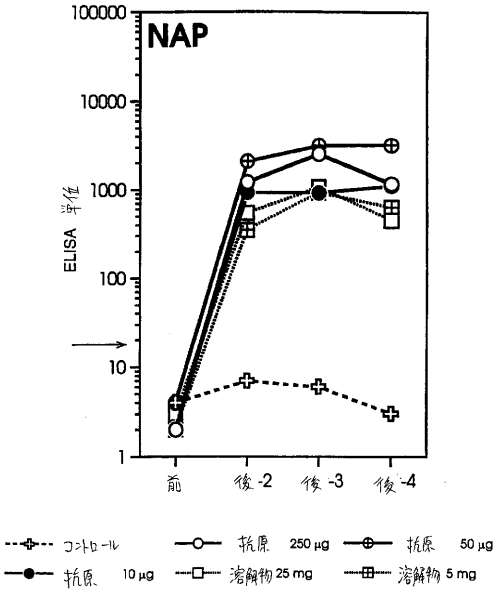
【図５Ｂ】

FIG. 5B



【図５Ｃ】

FIG. 5C



【図６Ａ】

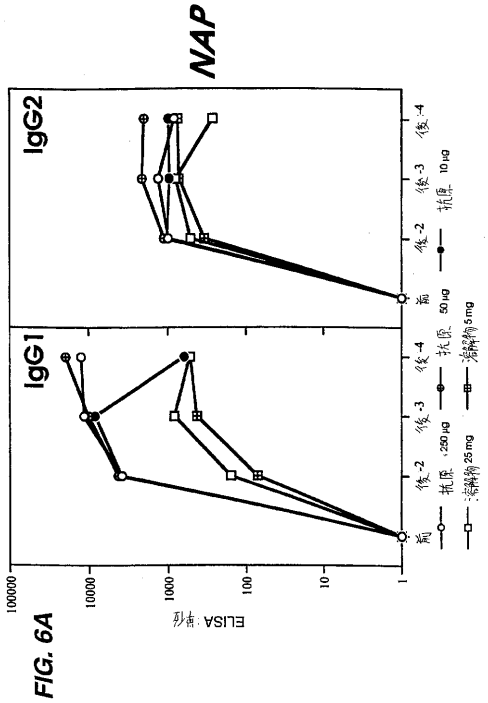


FIG. 6A

【図６Ｂ】

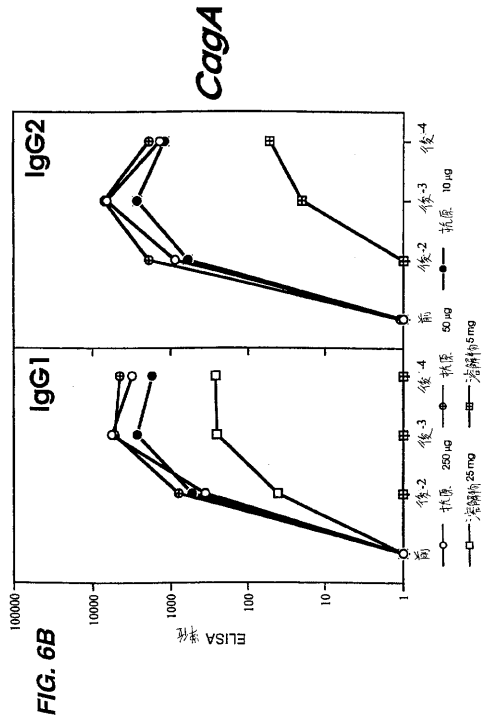
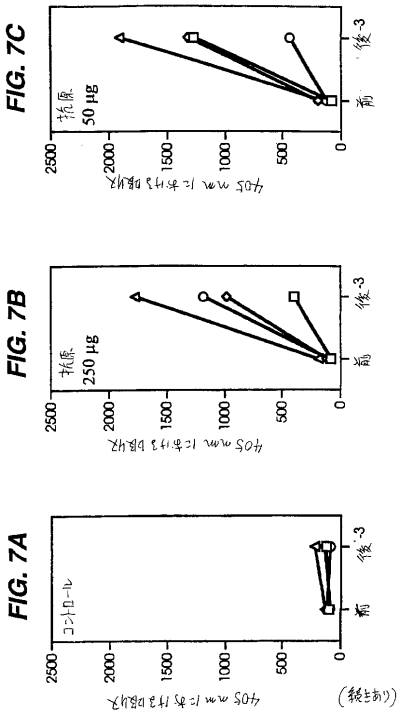
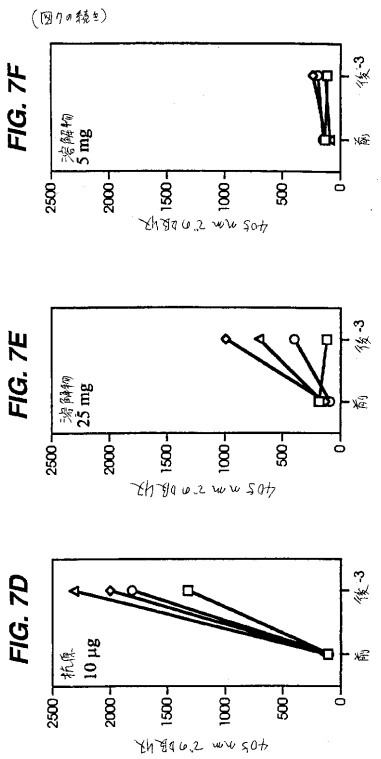


FIG. 6B

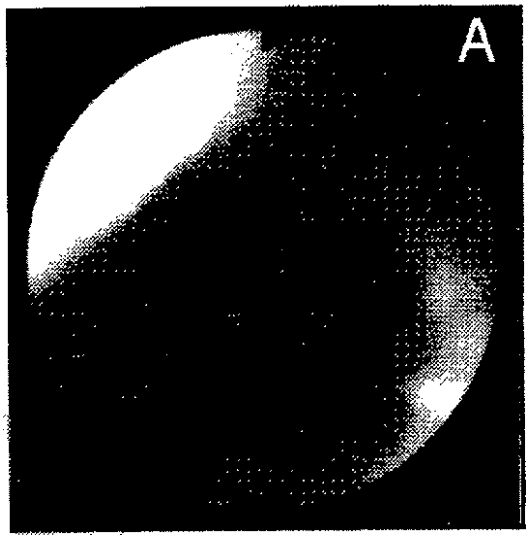
【図７】





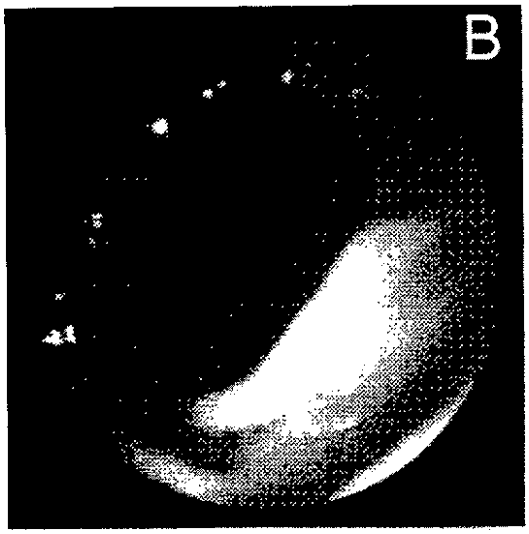
【図８Ａ】

FIG. 8A



【図８Ｂ】

FIG. 8B



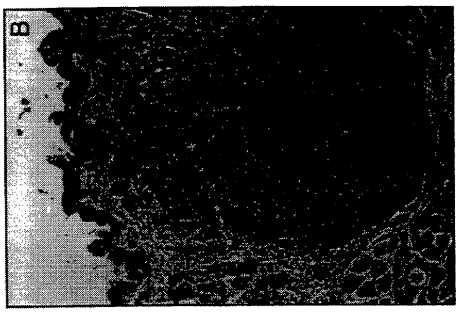
【図９Ａ】

FIG. 9A



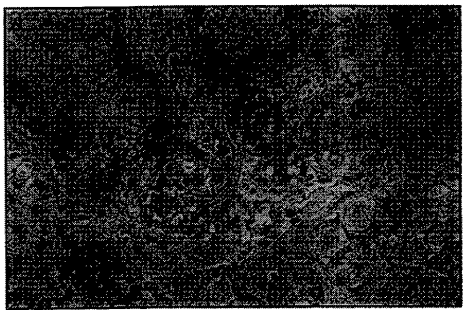
【図９Ｂ】

FIG. 9B



【図１０Ａ】

FIG. 10A



【図１０Ｂ】

FIG. 10B



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
Ｃ１２Ｎ 15/09 (2006.01) Ｃ１２Ｎ 15/00 Ａ

(72)発明者 ラップオリ, リノ
イタリア国 イ－５３０１０ バグリアグリ, １, ストラダ デル ロチェ

合議体
審判長 森田 ひとみ
審判官 伊藤 幸司
審判官 内田 淳子

(56)参考文献 特表平１０－５００８６４（ＪＰ, Ａ）
特表平７－５０３２５５（ＪＰ, Ａ）
特表平７－５００８４５（ＪＰ, Ａ）
特表２００２－５１２６１９（ＪＰ, Ａ）
Ｉｎｆｅｃｔ Ｉｍｍｕｎ, １９９７, Ｖｏｌ. ６５, Ｎｏ. １２, ｐｐ. ４９９６－５００２
Ｓｃｉｅｎｃｅ, １９９５, Ｖｏｌ. ２６７, Ｎｏ. ５２０４, ｐｐ. １６５５－８

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
A61K39/106
PubMed