

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4153423号
(P4153423)

(45) 発行日 平成20年9月24日 (2008. 9. 24)

(24) 登録日 平成20年7月11日 (2008. 7. 11)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 N 1/20 (2006. 01)
A 6 1 K 39/04 (2006. 01)
A 6 1 P 31/04 (2006. 01)
A 6 1 P 31/06 (2006. 01)

C 1 2 N 1/20 A
A 6 1 K 39/04
A 6 1 P 31/04
A 6 1 P 31/06

請求項の数 4 (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願2003-517253 (P2003-517253)
(86) (22) 出願日 平成14年7月30日 (2002. 7. 30)
(65) 公表番号 特表2004-535827 (P2004-535827A)
(43) 公表日 平成16年12月2日 (2004. 12. 2)
(86) 国際出願番号 PCT/ES2002/000381
(87) 国際公開番号 W02003/012075
(87) 国際公開日 平成15年2月13日 (2003. 2. 13)
審査請求日 平成17年4月6日 (2005. 4. 6)
(31) 優先権主張番号 P 200101824
(32) 優先日 平成13年7月31日 (2001. 7. 31)
(33) 優先権主張国 スペイン (ES)

(73) 特許権者 504041723
ユニバーシダッド デ ザラゴザ
スペイン国, イー-50005 ザラゴザ
, (エントレスエロ), シー/バルタサル
グラシアン 1
(74) 代理人 100074192
弁理士 江藤 剛
(72) 発明者 マルチン モンタネス カルロス
スペイン国, イー-50005 ザラゴザ
, (エントレスエロ), シー/バルタサル
グラシアン 1, ユニバーシダッド デ
ザラゴザ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ミコバクテリウム結核菌の毒力の減少および p h o P 遺伝子の不活性化による結核菌に対する保護

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

p h o P 遺伝子を不活性化させることによりその毒力が弱められたミコバクテリウム菌株 (Mycobacterium strain) から成る哺乳動物におけるミコバクテリウム結核菌 (Mycobacterium tuberculosis) の感染を防ぐためのワクチン。

【請求項 2】

哺乳動物がヒトである請求項 1 に記載のワクチン。

【請求項 3】

ミコバクテリウム菌株 (Mycobacterium strain) がフランス国, パリのパスツール研究所の国立微生物培養コレクションに寄託されている相応細菌である請求項 1 または 2 に記載のワクチン。

【請求項 4】

ワクチンが遺伝子組換えワクチンである請求項 1 乃至 3 のいずれか 1 項に記載のワクチン。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は微生物学の分野に属するもので、ミコバクテリウム結核菌の毒力の減少および p h o P 遺伝子の不活性化による結核菌に対する保護に関するものである。

10

20

【背景技術】

【0002】

結核菌を処理するための遺伝子手段の最近の発展は我々に特殊な遺伝子の突然変異体を形成することを容認する。

【0003】

サルモネラ菌のような他の細胞内病原菌微生物において、p h o P 遺伝子が毒力を含んでいることが示されている。この遺伝子の不活性化はヒトのサルモネラ症に対するワクチンとして研究された弱毒化した突然変異体を形成することを我々に許した。

【0004】

ヒトに単離されたミコバクテリウム結核菌複合体の菌株における我々の以前の研究結果（サラゴサ大学）はおそらく非常に有毒である菌株が p h o P 遺伝子 のようなミコバクテリウム結核菌ゲノムに記録された遺伝子の制御において変質を現わすことを示した。

【0005】

ミコバクテリウム結核菌の毒力における p h o P 遺伝子 の関連性を研究するために、遺伝子が臨床的単離において不活性化され、そして我々は大食細胞（マクロファージ）およびマウスにおいて増殖する能力および生き続ける能力を研究した。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の目的は p h o P 遺伝子 を不活性化させることによりその毒力を弱めると共に、哺乳動物の大食細胞（マクロファージ）における毒力を減少し、p h o P の突然変異体が、大食細胞（マクロファージ）ならびにマウスの両方において除去されることなく生き続けるミコバクテリウム結核菌株を提供することにある。

【0007】

本発明において、同族遺伝子組換え技術により臨床的に単離されたミコバクテリウム結核菌から生じる p h o P 遺伝子 中の突然変異体の構造はマウス骨髄大食細胞（マクロファージ）においてその毒力を減じる。更に p h o P 突然変異体は実験マウスモデルにおいてその毒力を減少させる。前記 p h o P 突然変異体は大食細胞（マクロファージ）とマウスの双方において除去されることなく生き残ることができる。p h o P 突然変異体を接種したマウスはミコバクテリウム結核菌感染に対して保護される。p h o P 遺伝子または p h o P により調節された遺伝子を不活性化させたミコバクテリアの突然変異体はヒト及び動物結核菌に対するワクチン並びに他の病原菌に対する遺伝子組換えワクチンとなる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

カナマイシン抵抗遺伝子を導入することにより、ミコバクテリウム結核菌 p h o P 遺伝子を不活性化したベクターを生成した。該ベクターはミコバクテリウム結核菌の臨床分離集団に形質変換され、不活性化 p h o P 遺伝子を有する菌株を得た。これらの構造の詳細はサラゴサ大学のミコバクテリウム遺伝学グループおよびパリのパスツール研究所のユニットナイト・デ・ジェネティケ・ミコクテリアエヌの1998年ないし1999年の研究所ワークブック（the laboratory workbooks for the years 1998 - 1999 of the Mycobacterial Genetic Group of the Zaragoga University and of the Unite de Genetique Mycocterienne of the Pasteur Institute in Paris）に現れている。

【0009】

ミコバクテリウム結核菌 p h o P 突然変異体は、フランス国、75724パリ、セデックス15、ドクター・ロー通り28のパリ（1-2622）のパスツール研究所（the Pasteur Institute of Paris（1-2622），28，rue due Dr．Roux，75724 Paris Cedex 15，Fran

10

20

30

40

50

c e) の培養コレクションに 2 0 0 0 年 1 1 月 2 7 日に委託された。

【 0 0 1 0 】

ミコバクテリウム結核菌を研究しかつそれをマウス骨髄の大食細胞培養において 7 日間ミコバクテリウム結核菌の p h o P 菌株の突然変異体と比較したとき、突然変異体が哺乳動物マクロファージにそれ自体複製することができないことを観察した。1 4 日間突然変異体の培養を継続したとき、それが生き続けることを観察した。

【 0 0 1 1 】

マウスに突然変異体菌株を感染させた後、病原菌が 3 週間後または 6 週間後のいずれも増殖しないことを観察したが、バクテリアの数は最初の接種したものに関連して、脾臓、肝臓または肺において減少しなかった。

10

【 0 0 1 2 】

大食細胞 (マクロファージ) およびマウスにおけるミコバクテリウム結核菌の p h o P 菌株による実験の結果は 2 0 0 0 年のサラゴサ大学のミコバクテリウム遺伝学グループおよびパリのパスツール研究所のユニットナイト・デ・ジェネティケ・ミコクテリエヌの研究所ワークブックに現れている。

【 0 0 1 3 】

これらの結果にマウス保護研究を加える。ミコバクテリウム結核菌 p h o P 突然変異体を皮下に接種させた。8 週間後、マウスはミコバクテリウム結核菌 H 3 7 R v が静脈内に感染された。感染の 4 週間後のバクテリアの再カウントは、p h o P 突然変異体が B C G ワクチン制御に比較し得る有効性によりミコバクテリウム結核菌の増殖に対して保護することを明らかに示した。実験の結果は 2 0 0 1 年ないし 2 0 0 2 年のパリのパスツール研究所のユニットナイト・デ・ジェネティケ・ミコクテリエヌのワークブックに現れている。

20

【 0 0 1 4 】

図 1 はミコバクテリウム結核菌 H 3 7 R v 感染に対するミコバクテリウム結核菌 p h o P 突然変異体の保護を示している。

【 0 0 1 5 】

B a l b / c マウスには B C G 結核菌に対する制御ワクチンまたはミコバクテリウム結核菌 p h o P 突然変異体のワクチン候補のいずれかの 10^7 集団形成単位 (C F U ' s) が皮下に接種された。

30

【 0 0 1 6 】

8 週間後、マウスはミコバクテリウム結核菌 H 3 7 R v (10^7 C F U ' s) が静脈内で感染された。

【 0 0 1 7 】

感染後 4 週間、動物は殺されそして脾臓 (図 1 A) および肺 (図 1 B) において、C F U ' s をカウントした。各値は幾何学的平均 + / - S E M . [s i c] を示している。

【 図面の簡単な説明 】

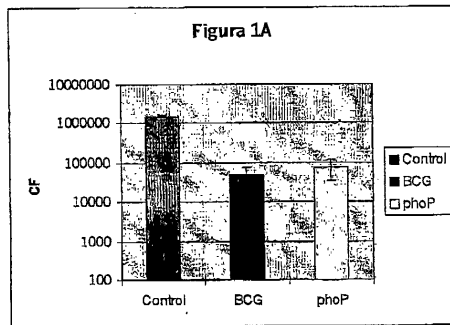
【 0 0 1 8 】

【 図 1 A 】 ミコバクテリウム結核菌 H 3 7 R v 感染に対するミコバクテリウム結核菌 p h o P 突然変異体の保護を脾臓について示す図である。

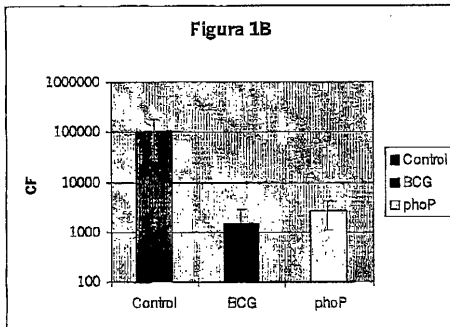
40

【 図 1 B 】 ミコバクテリウム結核菌 H 3 7 R v 感染に対するミコバクテリウム結核菌 p h o P 突然変異体の保護を肺について示す図である。

【図 1 A】



【図 1 B】



フロントページの続き

(72)発明者 ジクエル ブリジット

フランス国, エフ - 7 5 7 2 4 パリ セデックス 15, リュ ドゥ ドクトル ルー, アン
ティチュ パステヌル 25, ユニテ デ ジェネティク ミコバクテリアネ

(72)発明者 ペレス ヘラン エステル

スペイン国, イー - 5 0 0 0 5 ザラゴザ, (エントレスエロ), シーノパルタサル グラシアン
1, ユニバーシダッド デ ザラゴザ

審査官 森井 隆信

(56)参考文献 特表平04 - 504204 (JP, A)

特表平04 - 504504 (JP, A)

Mol. Microbiol., 米国, 2001年 7月 1日, Vol.41, No.1, 179-187

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/20

A61K 39/00

A61P 31/00

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

PubMed