

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4716542号  
(P4716542)

(45) 発行日 平成23年7月6日(2011.7.6)

(24) 登録日 平成23年4月8日(2011.4.8)

(51) Int. Cl.	F I
<b>A 6 1 K 39/108 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/108 Z N A
<b>A 6 1 K 35/74 (2006.01)</b>	A 6 1 K 35/74 A
<b>A 6 1 K 39/02 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/02
<b>A 6 1 K 39/102 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/102
<b>A 6 1 K 39/112 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/112

請求項の数 9 外国語出願 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-159455 (P2000-159455)	(73) 特許権者	500561355
(22) 出願日	平成12年5月30日 (2000.5.30)		ユニバーシティ・オブ・ロード・アイランド
(65) 公開番号	特開2001-39890 (P2001-39890A)		ド
(43) 公開日	平成13年2月13日 (2001.2.13)		アメリカ合衆国、ロード・アイランド・オ
審査請求日	平成19年5月21日 (2007.5.21)		2881、キングストン、リビット・ロ
(31) 優先権主張番号	328859		ード・1
(32) 優先日	平成11年6月9日 (1999.6.9)	(74) 代理人	100062007
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 川口 義雄
		(74) 代理人	100105393
			弁理士 伏見 直哉
		(74) 代理人	100114188
			弁理士 小野 誠
		(74) 代理人	100140523
			弁理士 渡邊 千尋

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ワクチンに使用するための生きた弱毒細菌

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

病原細菌感染又はその病原作用に対する動物の防御用弱毒生ワクチンであって、*cra* 遺伝子における突然変異の結果として機能的 *Cra* タンパク質を発現することができない生きた弱毒細菌と、医薬的に許容可能なキャリアーとを含み、且つ、前記病原細菌が エシエリヒア (Escherichia)、サルモネラ (Salmonella)、アクチノバシラス (Actinobacillus)、ヘモフィラス (Haemophilus)、エアロモナス (Aeromonas)、パステウレラ (Pasteurella)、ストレプトコッカス (Streptococcus) 及び エルシニア (Yersinia) 属のいずれかに属することを特徴とする弱毒生ワクチン。

【請求項 2】

生きた弱毒細菌がヘテロ遺伝子をもつことを特徴とする請求項 1 に記載の弱毒生ワクチン。

【請求項 3】

アジュバントを含むことを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の弱毒生ワクチン。

【請求項 4】

凍結乾燥形態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弱毒生ワクチン。

【請求項 5】

病原細菌感染又は感染の病原作用に対する動物の防御用ワクチンの製造のための、*cra*

a 遺伝子における突然変異の結果として機能的 C r a タンパク質を発現することができない生きた弱毒細菌の使用であって、前記病原細菌が エシエリヒア ( E s c h e r i c h i a )、サルモネラ ( S a l m o n e l l a )、アクチノバシラス ( A c t i n o b a c i l l u s )、ヘモフィラス ( H a e m o p h i l u s )、エアロモナス ( A e r o m o n a s )、パステウレラ ( P a s t e u r e l l a )、ストレプトコッカス ( S t r e p t o c o c c u s ) 及び エルシニア ( Y e r s i n i a ) 属のいずれかに属することを特徴とする使用。

【請求項 6】

生きた弱毒細菌がヘテロ遺伝子をもつことを特徴とする請求項 5 に記載の使用。

【請求項 7】

生きた弱毒細菌を医薬的に許容可能なキャリアーと混合することを含む請求項 1 に記載のワクチンの製造方法。

【請求項 8】

病原細菌感染に対して動物を免疫するための医薬組成物であって、請求項 1 に記載のワクチンを含むことを特徴とする医薬組成物。

【請求項 9】

請求項 1 に記載のワクチンを、ヒトを除く動物に投与することを含む病原細菌感染に対する動物の免疫方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は医薬に使用するための生きた弱毒細菌、微生物による疾病の予防に有用な前記細菌を使用したワクチン、ヘテロ遺伝子をもつ生きた弱毒細菌、及び前記ワクチンと細菌の製造方法に関する。

【0002】

【従来技術及び発明が解決しようとする課題】

温血動物が微生物による疾病を克服する手段は複雑なプロセスである。微生物による疾病に対する免疫は、温血動物が発病を避けるか又は症状を軽減する手段の 1 つである。所与病原体に対する免疫が不完全である結果、病原体に暴露される集団に罹病又は死亡が生じる。生きた弱毒微生物を使用したワクチン（弱毒生ワクチン）は非常に有効な型の免疫応答を誘導することが一般に認められている。このようなワクチンは、一度動物宿主に接種すると、病原微生物の宿主侵入により早期の細胞性又は体液性免疫の促進誘発を誘導し、感染が臨床的に重大な程度に達する前に微生物の増殖を抑制できるという利点がある。殺した病原体を使用したワクチン（死菌ワクチン）ではこの種の応答が得られないことが一般に認められている。しかし、生きた病原体を含むワクチンは弱毒程度によっては、接種した宿主が接種後に防御の対象となる疾病に罹患する危険がある。従って、生きた微生物の免疫特性をもちながら、ワクチン接種後に望ましくない副作用を生じることのないワクチンを手に入れることが望ましい。

【0003】

細菌を弱毒化するための一般的なアプローチは 1 種以上のビルレンス因子の除去である。しかし、殆どの場合、ビルレンス因子も免疫誘導に加担している。このような場合、ビルレンス因子を除去すると、細菌の免疫能を損なうことは避けられない。これは当然望ましくない状況である。生ワクチンは野生型株の抗原補体を維持していることが好ましい。

【0004】

更に、生ワクチンは許容できない疾病作用を避けるために十分に非病原性であると共に、宿主に十分なレベルの免疫を誘導することが必要である。最後に、弱毒生ワクチン株はビルレント野生型株に戻る可能性が実質的にないことが好ましい。

【0005】

多くの細菌属で主要炭水化物代謝に関与することが知られているタンパク質をコードする遺伝子を欠失させると、このような細菌の *i n v i v o* 生存可能性を損なわずに *i n*

10

20

30

40

50

*in vivo*弱毒性を誘導できることが今般意外にも判明した。この遺伝子を欠失する細菌は意外にも弱毒性を示す。更に、この遺伝子によりコードされるタンパク質は免疫誘導に負担しないので、この遺伝子を欠失する細菌の抗原量は野生型と同一である。従って、このような細菌は意外にも医薬製造分野、より特定的には弱毒生ワクチンの製造に有利に使用できる。

#### 【0006】

本発明により欠失させることができ、欠失突然変異体の *in vivo*弱毒性を誘導する遺伝子は、以前は *fruR* 遺伝子として知られていたが、現在では *cra* 遺伝子と呼ばれる遺伝子である。この遺伝子を欠失する突然変異体は、*Cra* 活性の不足に起因する欠乏を増殖培地に補償しないと *in vitro* 増殖できないことが判明した。従って、増殖培地には *Cra* 欠失突然変異体の増殖を可能にする栄養が存在していなければならない。

10

#### 【0007】

一般に、病原細菌は利用可能な栄養にその代謝を適応させるという意味で自立性である。*cra* 遺伝子は多くの主要代謝経路（下記参照）でこのような適応機能を果たす。しかし、*cra* 遺伝子を欠失させた突然変異体は炭素源としてのグルコース及び他の多くの糖類の存在下で完全に十分に増殖することができる。宿主動物ではこのような糖類を利用できるので、*cra* 遺伝子が *in vivo* 条件下で機能的であるとは予想されなかった。従って、*Cra* 突然変異体が宿主で弱毒性を示すとは予想されなかった。そのため、このような突然変異体は当技術分野で知られていたが、弱毒生ワクチンの候補として示唆されていなかった。

20

#### 【0008】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明の1態様は、ワクチンで使用するための、*cra* 遺伝子における突然変異の結果として機能的 *Cra* タンパク質を発現することができない生きた弱毒細菌に関する。

#### 【0009】

##### 【発明の実施の形態】

（以前は *FruR*（フルクトースリプレッサータンパク質）として知られており、現在では *Cra*（異化リプレッサー/アクチベータータンパク質）として知られる）遺伝子産物は炭水化物代謝の多くの主要経路における調節タンパク質である。

#### 【0010】

*cra* 遺伝子産物 *Cra* は主要炭素代謝を調節する。より詳細には、*Cra* は生合成及び酸化酵素（例えば *TCA* 回路、グリオキサル酸回路、糖新生経路及び電子輸送における主要酵素）をコードする遺伝子のプロモーターの上流に結合することによりこれらの遺伝子の転写を正に調節し、解糖酵素（例えば *Embden-Meyerhof* 及び *Entner-Doudoroff* 経路における主要酵素）をコードする遺伝子の転写を負に調節する。

30

#### 【0011】

炭水化物代謝におけるその重要な地位が故に、*cra* 遺伝子とその遺伝子産物 *Cra* は細菌界に広く存在している。*Cra* タンパク質は高度に保存されたタンパク質である。例えば大腸菌、*Salmonella enterica* 種（例えば血清型 *Typhimurium*、*Enteritidis* 及び *Dublin*）、*Actinobacillus* 種（例えば *A. pleuropneumoniae*）、*Haemophilus* 種（例えば *H. paragallinarum*）、*Aeromonas salmonicidae*、*Pasteurella* 種（例えば *P. piscida* 及び *P. multocida*）、*Streptococcus* 種（例えば *S. equi* 及び *S. suis*）及び *Yersinia* 種（例えば *Y. pestis*）に認められる。

40

#### 【0012】

*Salmonella* と *Escherichia* における遺伝子自体とその完全ヌクレオチド配列は1991年に *Jahreis, K.* ら (*Mol. Gen. Genet.* 226: 332-336 (1991)) により明らかにされている。*Jahreis* は、*Sal*

50

*monella enterica*、血清型 *Typhimurium* 及び大腸菌における *Cra* タンパク質が4つの位置でしか相違せず、そのうちの2個も保存的交換であることを示した。これは、特に大腸菌とサルモネラにおいて進化中にさほど分岐していない細菌炭水化物代謝における非常に多くの普遍経路に加担するタンパク質に予想されたことに当然一致する。*Cra* タンパク質の結合メカニズムは *Ramseier, T. M.* ら (*J. Mol. Biol.* 234: 28 - 44 (1993)) により少なくとも部分的に明らかにされている。*Cra* タンパク質 (異化リプレッサー / アクチベータータンパク質) の役割と機能は文献に広く記載されており、例えば最近では *Saier, M. H.* と *Ramseier, T. M.* (*Journ. Bacteriol.* 178: 3411 - 3417 (1996)) による短い論文に記載されている。

10

## 【0013】

このような突然変異は機能的 *Cra* タンパク質を発現させないものであれば、挿入、欠失、置換又はその組み合わせのいずれでもよい。機能的 *Cra* タンパク質とは野生型タンパク質の調節特性をもつタンパク質を意味する。従って、その機能の少なくとも1つを欠損する *Cra* タンパク質は非機能的 *Cra* タンパク質であるとみなされる。

## 【0014】

本発明により使用される生きた弱毒細菌は数種の方法で得ることができる。このような細菌を得る方法の1例は *cra* 遺伝子をもつ野生型細菌を塩基類似体等の突然変異誘発物質で処理したり、紫外線処理又は温度処理するなどの旧来の方法である。

## 【0015】

機能的 *Cra* タンパク質を産生しない株は容易に確認できる。これらの株は炭素源としてのグルコース及び他の糖類の存在下でのみ最少培地で増殖する (この点が *cya* 及び *crp* 突然変異体から区別される) が、単独炭素源としての糖新生基質の存在下では増殖することができない (*Chin* ら, *J. Bacteriol.* 169: 897 - 899 (1987))。従って、これらの株は非常に容易に *in vitro* 選択することができる。

20

## 【0016】

旧来の突然変異技術により生じる突然変異の種類は不明である。点突然変異ではないかと思われるが、点突然変異は、可能性は低いとしても野生型に戻ることもある。この小さな危険を避けるためには、トランスポゾン突然変異誘発が良好な代案であると思われる。トランスポゾン突然変異誘発も当技術分野で周知の突然変異誘発技術である。これは染色体中の局在部位で実施される突然変異である。トランスポゾン挿入は特定遺伝子を標的にすることができない。しかし、*cra* 突然変異体は *Cra* 活性欠失の栄養補償なしには *in vitro* 増殖しないので、*cra* 突然変異体を確認することは非常に容易である。従って、ランダムにトランスポゾン突然変異した細菌のプールから容易に選択することができる。予め決められた部位にランダムでなく計画的に突然変異を導入することが可能な手段は組換えDNA技術により得られる。このような突然変異は、突然変異遺伝子が機能的 *Cra* をコードしない限り、挿入、欠失、1個のヌクレオチドを別のヌクレオチドで置換又はその組み合わせのいずれでもよい。このような突然変異は例えば多数の核酸の欠失により実施することができる。核酸10個程度の非常に小さい欠失でも *Cra* を非機能的にすることができる。たった1個の核酸の欠失でも、このような突然変異の結果として他の核酸が適正な読み枠から外れる場合には *Cra* を非機能的にすることができる。3で割り切れない数の核酸の欠失又は挿入によりこのようなフレームシフトが生じる。もっと長い配列 (例えば核酸100個) を欠失させるとより好ましい。完全 *cra* 遺伝子を欠失させると更に好ましい。当然のことながら、機能的 *Cra* をコードしない株を得るために非常に適しているのは、特にオープンリーディングフレームに停止コドンを導入する突然変異や、オープンリーディングフレームにフレームシフトを生じる突然変異である。

30

40

## 【0017】

*Cra* 突然変異体を構築するための全技術は周知標準技術である。これらの技術は、*cra* 遺伝子のクローニング、部位特異的突然変異誘発による遺伝子配列の改変、制限酵素消化後の再連結又はPCRアプローチに続き、野生型 *cra* 遺伝子を突然変異遺伝子で置

50

換する（対立遺伝子交換又は対立遺伝子置換）。プラスミドにおける *cra* 遺伝子のクローニング、遺伝子の制限酵素消化後のエンドヌクレアーゼ処理、再連結及び宿主株における相同組換え等の標準組換え DNA 技術は全て当技術分野で公知であり、例えば *Maniatis / Sambrook (Sambrook, J.ら, Molecular cloning: a laboratory manual. ISBN 0-87969-309-6)* に記載されている。部位特異的突然変異は例えば *Clontech* から市販されている *Transformer*（登録商標）キットを使用して *in vitro* 部位特異的突然変異誘発により実施することができる。PCR 技術は *Dieffenbach & Drexler, PCR primers, a laboratory manual. ISBN 0-87969-447-3* 及び *ISBN 0-87969-447-5* に詳細に記載されている。

10

## 【0018】

*cra* 遺伝子は *Cra* タンパク質をコードする遺伝子だけでなく、プロモーター等の直接配列も含む。更に、*Cra* mRNA の適正な翻訳に必須の部位（例えばリボソーム結合部位）も含む。

## 【0019】

従って、コーディング領域の突然変異だけでなく、適正な転写及び翻訳に必須な配列の突然変異も本発明の範囲に含むものとする。

## 【0020】

好ましい態様において、本発明はワクチンで使用するための *Escherichia*、*Salmonella*、*Actinobacillus*、*Haemophilus*、*Aeromonas*、*Pasteurella*、*Streptococcus* 及び *Yersinia* 属の生きた弱毒細菌に関する。

20

## 【0021】

本発明のより好ましい形態において、本発明の生きた弱毒細菌は *Shigella* 血清型 *Typhimurium*、*Enteritidis*、*Choleraesuis*、*Dublin*、*Typhi*、*Gallinarum*、*Abortusovae*、*Abortusequi*、*Pullorum*、*E. coli* 又は *Y. pestis* から構成される群から選択される。これらの細菌属はヒト及び種々の動物に病原性の多数の種を含む。

## 【0022】

更に好ましい形態において、本発明の生きた弱毒細菌は *S. enterica*、*E. coli* 又は *Y. pestis* である。

30

## 【0023】

更に好ましい形態において、本態様は *cra* 遺伝子における突然変異を組換え DNA 技術により実施した本発明の生きた弱毒細菌に関する。

## 【0024】

*cra* 遺伝子のフラグメントもしくは完全遺伝子の欠失又はヘテロ DNA フラグメントの挿入又はその両者を含む明確且つ計画的になされた突然変異は、旧来通りに誘導した突然変異に比較して野生型状態に戻らないという利点がある。

## 【0025】

従って、より好ましい形態において、本発明のこの態様は *cra* 遺伝子が挿入及び/又は欠失を含む生きた弱毒細菌に関する。

40

## 【0026】

今日ではペットと家畜の両者に多量のワクチンが投与されているので、単にワクチン接種費用の低減のためだけでも数種のワクチンの併用投与が望ましいことは明白である。従って、他の病原微生物又はウイルスから選択される抗原をコードするヘテロ遺伝子の組換えキャリアーとして生きた弱毒細菌を使用することは非常に有利である。このような組換えキャリアーを投与すると、2種以上の疾病に対する免疫が同時に誘導されるという利点がある。*Cra* タンパク質をコードする遺伝子をヘテロ遺伝子の挿入部位として使用することができるので、ワクチンで使用するための本発明の生きた弱毒細菌はヘテロ遺伝子の非

50

常に適切なキャリアーとなる。c r a 遺伝子を挿入部位として使用すると、c r a 遺伝子が不活化されると同時に、新たに導入したヘテロ遺伝子を（ホモ細菌遺伝子と同時に）発現させることができるという利点がある。このような組換えキャリアーの構築は対立遺伝子交換等の標準的な分子生物学技術を使用して常法により実施することができる。従って、本発明の別の態様は機能的C r a タンパク質を産生せず、ヘテロ遺伝子を挿入した好ましくはE s c h e r i c h i a、S a l m o n e l l a、A c t i n o b a c i l l u s、H a e m o p h i l u s、A e r o m o n a s、P a s t e u r e l l a、S t r e p t o c o c c u s 及びY e r s i n i a 属の生きた弱毒組換え細菌に関する。このようなヘテロ遺伝子は上述のように例えば他の病原微生物又はウイルスから選択される抗原をコードする遺伝子とすることができる。このような遺伝子は病原性ヘルペスウイルス（例えばヘルペスウイルスの構造タンパク質をコードする遺伝子）、レトロウイルス（例えばg p 1 6 0 エンベロープタンパク質）、アデノウイルス等から誘導することができる。ヘテロ遺伝子は病原細菌からも得られる。例えば、A c t i n o b a c i l l u s p l e u r o p n e u m o n i a e 毒素、C l o s t r i d i u m 毒素、外膜タンパク質等の細菌毒素をコードする遺伝子が非常に適切な細菌ヘテロ遺伝子である。あるいは、インターロイキン又はインターフェロン等の免疫系の開始に関与するタンパク質をコードする遺伝子や、免疫調節に関与する別の遺伝子を挿入してもよい。

10

## 【0027】

ヘテロ遺伝子をc r a 遺伝子に挿入すると、ヘテロ遺伝子の挿入部位を見つけだす必要がないと同時にc r a 遺伝子を欠損させるので有利である。

20

## 【0028】

従って、この態様の好ましい形態では、ヘテロ遺伝子をc r a 遺伝子に挿入する。ヘテロ遺伝子はc r a 遺伝子のどこかに挿入でき、部分的又は完全に欠失しているc r a 遺伝子の部位に挿入してもよい。

## 【0029】

ワクチンで使用するための本発明の細菌は予想外のi n v i v o における弱毒性であるが免疫原性を有するという特性により、弱毒生ワクチンの主成分として非常に適切である。従って、本発明の更に別の態様は野生型形態がc r a 遺伝子を含む細菌による感染に対して動物及びヒトを防御するための弱毒生ワクチンに関する。

## 【0030】

30

このようなワクチンは免疫原として有効な量のワクチンで使用するための本発明の生きた弱毒細菌又は本発明の生きた組換えキャリアー細菌と、医薬的に許容可能なキャリアーを含む。

## 【0031】

ワクチンはE s c h e r i c h i a、S a l m o n e l l a、A c t i n o b a c i l l u s、H a e m o p h i l u s、A e r o m o n a s、P a s t e u r e l l a、S t r e p t o c o c c u s 及びY e r s i n i a の群から選択される本発明の生きた弱毒細菌を含むことが好ましい。

## 【0032】

免疫原として有効とは、ワクチン接種時の生きた弱毒細菌の投与量が細菌のビルレント形態に対する有効な免疫応答を宿主に誘導するために十分であることを意味する。

40

## 【0033】

免疫原として有効な量の上記生きた弱毒細菌に加え、本発明のワクチンは医薬的に許容可能なキャリアーも含む。このようなキャリアーは単に水でもよいし、例えば細菌を培養した培養液でもよい。別の利用可能なキャリアーは例えば生理的塩濃度の溶液である。

## 【0034】

有用な投与量は年齢、体重及びワクチン接種する動物、投与方法並びにワクチン接種の対象となる病原体の種類によって異なる。

## 【0035】

ワクチンは免疫応答を誘導するために十分な任意用量の細菌を含むことができる。例えば

50

、細菌  $10^3 \sim 10^{10}$  個が非常に適切な用量である。

【0036】

場合により、アジュバント活性をもつ1種以上の化合物をワクチンに加えてもよい。アジュバントは免疫系の非特異的的刺激剤である。アジュバントはワクチンに対する宿主の免疫応答を高める。当技術分野で公知のアジュバントの例はフロイント完全及び不完全アジュバント、ビタミンE、非イオン性ブロックポリマー、ムラミルジペプチド、ISCOM (免疫刺激複合体、例えばヨーロッパ特許第EP109942号参照)、サポニン、鉱油、植物油及びカルボポールである。

【0037】

粘膜投与に特に適したアジュバントは例えば大腸菌熱変性性毒素(LT)又はコレラ毒素(CT)である。

10

【0038】

他の利用可能なアジュバントは例えば水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム又は酸化アルミニウム、オイルエマルジョン(例えばBayol F(登録商標)又はMarcol 52(登録商標))、サポニン又はビタミンE可溶分である。

【0039】

従って、好ましい形態において、本発明のワクチンはアジュバントを含む。

【0040】

本発明で有用な医薬的に許容可能なキャリアー又は希釈剤の他の例としては安定剤が挙げられ、例えばSPGA、炭水化物(例えばソルビトール、マンニトール、澱粉、スクロース、グルコース、デキストラン)、タンパク質(例えばアルブミン又はカゼイン)、タンパク含有物質(例えばウシ血清又は脱脂乳)及び緩衝液(例えばリン酸緩衝液)である。

20

【0041】

特にこのような安定剤をワクチンに加えると、ワクチンは非常に凍結乾燥し易くなる。従って、より好ましい形態では、ワクチンは凍結乾燥形態である。

【0042】

動物又はヒトに投与するには、本発明のワクチンは特に鼻腔内、皮内、皮下、経口、エアゾール又は筋肉内の経路で投与することができる。家禽に投与するには、羽板及び点眼投与が非常に適切である。

【0043】

更に別の態様は、野生型細菌感染又は感染の病原作用に対する動物及びヒトの防御用ワクチンの製造のための、本発明のワクチン用細菌又は組換え細菌の使用に関する。

30

【0044】

本発明の更に別の態様は、本発明のワクチンの製造方法に関する。このような方法は、本発明の生きた弱毒細菌又は本発明の生きた組換えキャリアー細菌と医薬的に許容可能なキャリアーを混合することを特徴とする。

【0045】

【実施例】

実施例1

*S. typhimurium* SR-11 Fad<sup>-</sup>における突然変異遺伝子の同定、クローニング及び配列決定

40

突然変異体 *S. typhimurium* SR-11 Fad<sup>-</sup> のトランスポゾン突然変異遺伝子を同定、クローニング及び配列決定した。

【0046】

前記SR-11 Fad<sup>-</sup> を非病原性にする突然変異遺伝子のヌクレオチド配列を配列番号1に示す。

【0047】

配列番号2は配列番号1のヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質分子のアミノ酸配列を示す。

【0048】

50

*S. typhimurium* SR-11 Fad<sup>-</sup> は *cra* 遺伝子における突然変異体であることが分かった。トランスポゾン挿入点は *cra* 翻訳停止コドンの 3' 末端から約 45 塩基対の範囲内に位置することが判明した。

【0049】

1.9 kb の *S. typhimurium* SR-11 DNA フラグメントと、1.1 kb の *S. typhimurium* SR-11 DNA フラグメントに挟まれた 1.5 kb の Tn 10d Cam インサートを含む 4.5 kb の Pst I フラグメントを p Bluescript II SK(+) の Pst I 部位に挿入した。得られたプラスミド p JHA7 をエレクトロポレーションにより大腸菌 HB101 に導入した。Tn 10d Cam インサートの両側の領域をサンガージデオキシ熱サイクリング法により配列決定した。Tn 10d Cam インサートのすぐ両側のヌクレオチド配列は *S. typhimurium* *cra* (*fruR*) 遺伝子に 100% 相同であることが判明し、挿入点は *cra* 翻訳停止コドンの 3' 末端から 45 ヌクレオチドであることが判明した。これは、*S. typhimurium* SR-11 Fad<sup>-</sup> が *cra* 突然変異体であることを示唆している。

10

【0050】

SR-11 と異なり、SR-11 Fad<sup>-</sup> はクエン酸、オレイン酸、ピルビン酸、酢酸、コハク酸及びフマル酸を含む M9 最少寒天プレートで増殖することができなかった。

【0051】

*S. typhimurium* SR-11 野生型 *cra* (*fruR*) を PCR により増幅し、pBR322 のアンピシリン耐性遺伝子の Pst I 部位に挿入した。得られたプラスミド p JHA8 は炭素源として上記化合物の各々を利用してそれらの野生型親と同様に増殖する *S. typhimurium* SR-11 Fad<sup>-</sup> の能力を回復した。これらの実験は、*S. typhimurium* SR-11<sup>-</sup> が *cra* (*fruR*) 突然変異体であることを裏付けている。

20

【0052】

SR-11 Fad<sup>-</sup> はバクテリオファージ P22HT105int により LT-2 のミニトランスポゾン突然変異体からクロラムフェニコール耐性を SR-11 に形質導入することにより構築した。従って、可能性は低いだが、SR-Fad<sup>-</sup> の非病原性は欠損 *cra* 遺伝子に起因するのではなく、形質導入後に一部の SR-11 DNA が損失、例えば病原性島が損失したためであるとも考えられた。そこで、以下に記載するように、SR-Fad<sup>-</sup> に存在すると同一の突然変異を *cra* 遺伝子を含む以外は SR-11 と同一の株（以下、SR-11 Cra<sup>m.o.d</sup> AX-2 と呼ぶ）を対立遺伝子交換により構築した。

30

【0053】

アンピシリン耐性遺伝子とテトラサイクリン耐性遺伝子 (*tetA*R) の両者を含む自殺ベクターである pLD55 の Pst I 部位に SR-11 Fad<sup>-</sup> 突然変異 *cra* 遺伝子 (クロラムフェニコール耐性遺伝子を含む *cra*) を含む 4.3 kb の Pst I SR-11 Fad<sup>-</sup> DNA フラグメントを挿入した。これを pMJN10 と命名した。pMJN10 をエレクトロポレーションにより大腸菌 S17-1 *pir* に導入した。大腸菌 S17-1 *pir* (pMJN10) を SR-11 と交配後、数種のアンピシリン、テトラサイクリン及びクロラムフェニコール SR-11 接合体がオレイン酸、クエン酸、酢酸、ピルビン酸、コハク酸及びフマル酸を単独炭素源として利用できるか否かを試験した。相同配列を使用する単一交差により pMJN10 を染色体に組み込んだ場合、即ち突然変異及び野生型 *cra* 対立遺伝子の両者が染色体に存在する場合には、全接合体は予想通りこれらの化合物を利用することができた。これらの「組込体」のうちの 5 個について遊離プラスミドとして pMJN10 が存在するか否かを試験した処、存在するものは皆無であり、プラスミドが SR-11 染色体に挿入されたことが更に示唆された。5 個の組込体の各々をクロラムフェニコール添加ルリア寒天プレートで画線培養した。この場合には、2 回目の交差を行った細胞は、染色体に残っている *cra* 対立遺伝子がクロラムフェニコール耐性遺伝子を含む突然変異対立遺伝子である場合にしか生存しない。次に、画線培養した

40

50

組込体の試料をテトラサイクリン感受性選択寒天(TSS寒天)で画線培養した。TSS寒天はフマル酸を含んでおり、テトラサイクリン感受性細胞即ち自殺プラスミドを失った細胞は染色体中にプラスミドを維持しているテトラサイクリン耐性細胞に比較して非常に大きいコロニーとして増殖する。クロラムフェニコール耐性、アンピシリン及びテトラサイクリン感受性、並びにオレイン酸、酢酸、ピルビン酸、クエン酸、コハク酸及びフマル酸を単独炭素源として利用する能力について合計34個の大きいコロニーを試験した。34個の単離株のうち、6個はクロラムフェニコール耐性、アンピシリン及びテトラサイクリン感受性であり、上記化合物を単独炭素源として利用することができなかった。単離株のうち1個(SR-11 *Cra<sup>m°d</sup>* AX-2 (AXは対立遺伝子交換を意味する)と呼ぶ)をpBR322又はpJHA8 (pJHA8は野生型*cra*遺伝子を含む)で形質転換し、両者株がグルコース、グリセロール、オレイン酸、酢酸、ピルビン酸、クエン酸、コハク酸及びフマル酸を単独炭素源として利用する能力を試験した。SR-11 *Cra<sup>m°d</sup>* AX-2 (pBR322)と異なり、SR-11 *Cra<sup>m°d</sup>* AX-2 (pJHA8)は上記化合物を単独炭素源として利用することができ、SR-11 *Cra<sup>m°d</sup>* AX-2が*cra*突然変異体であることが示唆された。どちらの株も予想通り、グルコースとグリセロールを単独炭素源として利用することができた。

10

## 【0054】

機能的*cra* (*fruR*) 遺伝子が*S. typhimurium* SR-11をビルレントにするか否かを調べるために、以下の実験を実施した。

## 【0055】

20

BALB/cマウス4頭にSR-11 ( $2.1 \times 10^8$  cfu/頭)、5頭にSR-11 *Cra<sup>m°d</sup>* AX-2 ( $2.8 \times 10^8$  cfu/頭)を経口感染させた。感染後8日までに全4頭のSR-11感染マウスは死亡したが、SR-11 *Cra<sup>m°d</sup>* AX-2を感染させた全5頭は健康であった(表1)。SR-11 *Cra<sup>m°d</sup>* AX-2は、*cra*にSR-11 *Cra<sup>m°d</sup>*と同一の突然変異が存在する以外はSR-11と同一であるので、LT-2株からの形質導入によるSR-11 *Cra<sup>m°d</sup>*の構築中にそのビルレンス低下の原因となるような*cra*に無関係の異常が発生したとは考えられない。

## 【0056】

*cra* 遺伝子にクロラムフェニコール耐性カセットを挿入した結果、下流遺伝子に極性作用を生じたので、SR-11 *Fad<sup>-</sup>*の弱毒は欠損*cra* 遺伝子に起因しないとも考えられる。そこで、SR-11 *Cra<sup>m°d</sup>* (pJHA8)がビルレンスを回復したか否かを調べるために、野生型*cra* 遺伝子のみを含むpJHA8でSR-11 *Cra<sup>m°d</sup>*を相補した。対照として、pJHA8の構築に使用したベクターであるpBR322でSR-11 *Cra<sup>m°d</sup>*を相補した。BALB/cマウス4頭にSR-11 *Cra<sup>m°d</sup>* (pBR322)  $3.1 \times 10^8$  cfu/頭、4頭にSR-11 *Fad<sup>-</sup>* (pJHA8)  $4.3 \times 10^8$  cfu/頭を経口感染させた。感染後9日までに、SR-11 *Cra<sup>m°d</sup>* (pJHA8)を感染させた4頭のうち3頭が死亡したが、SR-11 *Cra<sup>m°d</sup>* (pBR322)を感染させた4頭は健康であった(表1)。死亡した全マウスの肝臓と脾臓は臓器当たり $10^8$  cfuを上回るSR-11 *Fad<sup>-</sup>* (pJHA8)を含んでいた。この結果、クロラムフェニコールカセットによる*cra* 遺伝子の不活化が非病原性を誘導する下流作用を生じるという可能性はなくなり、SR-11ビルレンスには機能的*cra* 遺伝子が必要であることが明らかである。

30

40

## 【0057】

## 【表1】

S.typhimurium 株	感染数 <sup>a</sup>	生存数
SR-11	4	0
SR-11 Cra <sup>mod</sup> AX-2	5	5
SR-11 Cra <sup>mod</sup> (pBR322)	4	4
SR-11 Cra <sup>mod</sup> (pJHA8)	4	1

<sup>a</sup> 菌株に応じて  $2.0 \times 10^8$  cfu/頭～ $5.0 \times 10^8$  cfu/頭をマウスに経口感染させた。死亡した全マウスは感染後9日までに死亡した。生存した全マウスは完全に回復した。

10

### 【0058】

種々の細菌属における *cra* 遺伝子の検出

4種の *S. typhimurium* 株と、*S. enteritidis*、*S. gallinarum*、*S. dublin* 及び *S. choleraesuis* 株各1種について、サザンハイブリダイゼーションにより *cra* 遺伝子を試験した。いずれの場合も SR-11 と同一寸法の 4.3 kb Pst I DNA フラグメントに *cra* 遺伝子が存在していた。6種の異なる病原性大腸菌株を試験した処、全株に *cra* 遺伝子が検出されたが、6種の株で3種の異なる寸法の Pst I フラグメントに存在していた。更に、*Aeromonas salmonicida* 株と、*Actinobacillus*、*Haemophilus*、*Pasteurella*、*Streptococcus* 及び *Yersinia* 細菌属株も試験した処、全株に *cra* 遺伝子が検出された。

20

### 【0059】

上記細菌における *cra* 遺伝子の存在は次のように検出した。これらの株のゲノムDNAを Pst I (Promega) 20単位で37℃で一晩消化した。ゲル電気泳動(0.7%アガロース、1×TAE)を使用して各種寸法の Pst I DNA フラグメントを分離した。分離したDNAをS&S Turboblotter システム (Schleicher and Schuell) によりアルカリ条件下で3時間かけて正荷電ナイロンにトランスファーした。膜を30分間90℃で焼付け、DNAを膜に結合した。次に、*Salmonella typhimurium* の *cra* 遺伝子の700塩基対フラグメントをDIG標識し、膜をプローブするために使用した。5×SSC、0.1%N-ラウロイルサルコシン、0.02%SDS、1.5%ブロッキング剤を含むハイブリダイゼーション緩衝液(CSPDによるDIG Detection Starter Kit II, Boehringer Mannheim)中62℃で2～4時間(回転びんハイブリダイゼーションオープンで)膜をプレハイブリダイズした。標識プローブを変性させ、新鮮なハイブリダイゼーション緩衝液に加え、プロットを62℃で16～20時間インキュベートした。プロットを62～65℃で5分間2×SSC、0.1%SDSで2回洗浄した。次に、プロットを60℃で15分間0.1%SDS、0.5×SSCで2回洗浄した。推奨条件を次のように変更してプロットを展開した。ブロッキング溶液では2%ブロッキング剤を使用し(通常は1%使用)、プロットを1時間ブロックし(通常ブロッキング時間は30分間)、DIG標識プローブの検出に低濃度抗体を使用した(通常は70%濃度を使用)。これらの変更は低バックグラウンドシグナルについて製造業者により推奨されている。

30

40

### 【0060】

実施例2

Cra<sup>+</sup> *Salmonella typhimurium* 株 SR11 Cra<sup>mod</sup> によるニワトリのワクチン接種

ワクチン接種効果。 *Salmonella* 株の増殖条件は実施例1に記載したと同様に行

50

った。第1の実験ではブロイラー20羽2群(3日齢)に *Salmonella* t. SR11 Cra<sup>mod</sup>  $6 \times 10^7$  CFUをPBSに加えて経口接種した。一方の群は11日後に同一株  $8.3 \times 10^7$  CFUをブースター投与した。18日後に、両群をビルレント野生型株細菌  $1.9 \times 10^9$  個で皮下、筋肉内及び経口攻撃した。結果を表2に示す。

【0061】

【表2】

	SR11 Cra <sup>mod</sup>	SR11 Cra <sup>mod</sup>	対照
1日目ワクチン用量	$6.0 \times 10^7$	$6.0 \times 10^7$	--
11日目ワクチン用量	--	$8.3 \times 10^7$	--
18日目攻撃用量	$1.9 \times 10^9$	$1.9 \times 10^9$	$1.9 \times 10^9$
死亡率 (%)	15	10	100

10

【0062】

併用ワクチン接種安全性及び効果実験。第2の実験では、ワクチンの効果とワクチンの安全性の両方を調べた。ワクチンの安全性は成長抑制に基づいて測定した。ブロイラー15羽1群に *Salmonella* t. SR11 Cra<sup>mod</sup>  $2.7 \times 10^8$  CFUを培地に加えて経口接種した。ブロイラー15羽の別の群には同一株  $1.3 \times 10^8$  CFUをPBS中に加えて経口接種した。18日後に両群をビルレント野生型株細菌  $6.5 \times 10^8$  個で皮下、筋肉内及び経口攻撃した。結果を表3に示す。

20

【0063】

【表3】

	SR11 Cra <sup>mod</sup> (i)	SR11 Cra <sup>mod</sup> (ii)	対照
1日目ワクチン用量	$2.7 \times 10^8$	$1.3 \times 10^8$	--
7日目体重	178	ND	185
18日目体重	733	722	749
18日目攻撃用量	$6.5 \times 10^8$	$6.5 \times 10^8$	$6.5 \times 10^8$
死亡率 (%)	0	13	100

30

i = 培地。 ii = PBS。

【0064】

結果：2つの試験から明らかなように、高用量で攻撃したにも拘わらず、Cra<sup>+</sup> *Salmonella* typhimurium株では非常に高レベルの防御が得られる。更に、ワクチン接種の結果として有意成長抑制は認められない。従って、Cra<sup>+</sup> *Salmonella* typhimurium株は野生型細菌感染に対する家禽の防御用弱毒生ワクチンで使用するのに非常に適切であると結論することができる。

40

【0065】

実施例3

序論

*Salmonella choleraesuis* Cra<sup>+</sup> ノックアウト (KO) 株 34682及び35276の安全性をcra<sup>+</sup> 親株34682及び35276と比較検討するために、ブタ攻撃試験を実施した。これらのノックアウト突然変異株はCra<sup>mod</sup> AX-2の構築について上述したと同一のプラスミド及び方法を使用して作製した。

【0066】

1. ブタ安全性試験

A. 動物及び飼育

50

*Salmonella*病歴のない養豚場から*Salmonella*ワクチンを接種したことのない5～6週齢ブタ20頭を購入した。ブタを5頭ずつ4群に分けた。全試験を通してブタは4個の隔離室で飼育した。

【0067】

B．攻撃

各群5頭に5～6週齢で攻撃した。ブタを鼻腔内(0.5ml/鼻孔)及び経口(1.0ml培養物+4.0ml細菌希釈剤)攻撃した。攻撃培養物は約 $9.0 \times 10^8$  CFU/mlとした。攻撃後にブタの体重減少、下痢及び直腸体温上昇等の*Salmonella*感染の典型的臨床徴候を毎日観察した。

【0068】

C．屠殺

攻撃から7日後にブタを安楽死させた。ブタを解剖し、肺、肝臓、脾臓、腸間膜リンパ節(MLN)及び回腸を培養し、*S. choleraesuis*を増殖させた。

【0069】

D．体重増加

初期体重を最終体重から引き、攻撃から屠殺までの日数で割ることにより、1日平均増加(ADG)を計算した。群ADGは個体ブタADGの平均である。

【0070】

2．マウス安全性試験

*cra*<sup>+</sup>親株34682及び35276と*cra*<sup>-</sup>ノックアウト(KO)株34682及び35276の各*S. choleraesuis*株のLD<sub>50</sub>を調べるためにマウス試験を実施した。

【0071】

A．動物

体重16～20gのCF-1 Sascoマウス200頭を10頭ずつ20群に分け、マウス安全性試験を行った。全試験を通してマウスは同一室内で別タブに入れて飼育した。

【0072】

B．攻撃

各群10頭からなる5サブ群に各株を投与した。5種の異なる希釈率の株( $10^{-3}$ ～ $10^{-7}$ )を使用してこれらのサブ群を0.25mlで腹腔内(IP)攻撃した。4種の株の各々の凍結種子を $10^{-3}$ ～ $10^{-7}$ に希釈した。これらの希釈液の各々をマウス10頭に腹腔内(0.25ml)注射した。

【0073】

結果

I．ブタ安全性試験

A．体重増加

ブタの体重増加を図1に示す。これらのデータはKO株で攻撃したブタと親株で攻撃したブタの間の差を明白に示している。データは更に、動物の総合健康差も示している。親株で攻撃した両群のブタは攻撃時から屠殺まで体重が減少したが、KO株で攻撃したブタは約0.75kg/日増加した。

【0074】

II．マウス安全性試験

A．死亡

マウス試験の結果を下表4に示す。右欄は各株のLD<sub>50</sub>をCFUで示す。ノックアウト株は明白に高弱毒レベルを示す。

【0075】

【表4】

10

20

30

40

株	LD <sub>50</sub> cfu
35276 親	<7.7cfu
35276 ノックアウト	1.5E + 04cfu
34682 親	12.5 cfu
34682 ノックアウト	>9.0E + 04cfu

## 【0076】

10

## 結論

ブタ安全性試験から明らかなように、Craノックアウト(KO)株は親株に比較して攻撃後に有意に高い体重増加を生じる。これはCra KO突然変異株の弱毒性を裏付けている。ブタ安全性試験に加え、マウス安全性試験もCra KO株が弱毒株であることを示しており、KO突然変異株のLD<sub>50</sub>は親株よりも著しく高い。

## 【0077】

## 実施例4

## 序論

本実施例の目的は、KO-34682 Cra突然変異株の安全性を親株と比較評価し、ヘテロビルレントSalmonella株35276攻撃に対するSalmonella株KO-34682の効果調べることであった。更に、KO-34682 Cra突然変異株の効果非ワクチン接種対照と比較した。

20

## 【0078】

## 動物及び飼育

Salmonella病歴のない養豚場からSalmonellaワクチンを接種したことのない3週齢ブタ20頭を購入した。ブタを5頭ずつ4群に分け、4個の別々の隔離室で飼育した。

## 【0079】

## ワクチン及びワクチン接種

Salmonella choleraesuis株KO-34682、34682親約 $1 \times 10^9$  CFU/mlを3週齢のブタに経口接種するか、又は接種せずにおいた。

30

## 【0080】

## 攻撃

ワクチン接種から21日後にビルレントSalmonella choleraesuis株35276でブタを鼻腔内(0.5ml/鼻孔)及び経口(1.0ml培養物+4.0ml細菌希釈剤)攻撃した。35276攻撃株は攻撃前にナリジクス酸(Nal)耐性にし、Nalを加えたプレートを使用すると、攻撃株をワクチン株から区別できるようにした。攻撃後、ブタの体重減少、下痢及び直腸体温上昇等のSalmonella感染の典型的臨床徴候を毎日観察した。糞便を毎日培養することにより、Salmonella排出期間を調べた。

40

## 【0081】

攻撃から9日後にブタを安楽死させた。ブタを解剖し、ナリジクス酸80µg/mlを加えたHektoen enteric(HE)寒天プレートで肺、肝臓、脾臓、腸間膜リンパ節(MLN)及び回腸を培養し、Salmonella choleraesuisを増殖させた。

## 【0082】

## 下痢得点

攻撃後に下痢を生じた日毎に各ブタに1点を与えることにより下痢得点を計算した。試験終了時に、試験中の得点の合計を攻撃から屠殺までの日数で割った。この数に100を掛けて下痢日数の百分率とした。

50

## 【0083】

## Salmonella排出

ブタの糞便を毎日採取し、ワクチン接種後と攻撃後のSalmonella choleraesuis排出期間を調べた。マイナス結果の2日後に糞便採取を停止した。糞便はHEプレート上で滴定単離した。試料の各希釈後に観察される増殖に相関して得点を与えた。得点は次のように割り当てた。

## 【0084】

10 <sup>-1</sup>	1点	
10 <sup>-2</sup>	2点	
10 <sup>-3</sup>	3点	10
10 <sup>-4</sup>	4点	
10 <sup>-5</sup>	5点	

## 【0085】

## 体重増加

初期体重を最終体重から引き、攻撃から屠殺までの日数で割ることにより、1日平均増加(ADG)を計算した。群ADGは個体ブタADGの平均である。

## 【0086】

## 結果：

## ワクチン接種後死亡

Salmonella choleraesuis野生型親株34682をワクチン接種したブタ2頭はワクチン接種後に死亡した。この群の残りの3頭は試験終了時まで生存した。

20

## 【0087】

## Salmonella単離/剖検得点

図2は各種臓器のS.c.単離結果を示す。全臓器でKOワクチンを接種したブタ群は親及び非ワクチン接種群と対照的にどの臓器からも単離されなかった。非ワクチン接種群は全5頭から回腸とMLNでSalmonella choleraesuisが単離されたが、親株ではこれらのどちらの臓器でも単離されなかった。Salmonella choleraesuisが単離された各臓器に1点を割り当てることにより、各群の単離得点を計算した。その結果、KOワクチンを接種したブタは親株を接種したブタよりも得点が低く、非ワクチン接種群より有意に低かった。

30

## 【0088】

## 下痢得点

1日平均下痢得点を図3に示す。同図は、他の3群に比較してKO得点の有意差を示している。KO群は明白に最低得点を示した。

## 【0089】

## Salmonella排出

ワクチン接種後及び攻撃後のブタのSalmonella排出を図4及び5に示す。ワクチン接種後のグラフによると親の排出レベルが最高である。攻撃後のグラフでは、非ワクチン接種群が最も長期間にわたってSalmonella choleraesuisを排出し、最高得点を示した。

40

## 【0090】

## 体重増加

ブタの体重増加を図6に示す。これらのデータは各群間の差を明白に示している。動物間の総合健康差も示している。非ワクチン接種群は平均0.15kg/日減少したが、KO群は平均0.6kg/日増加した。

## 【0091】

## 考察

Salmonella choleraesuisノックアウト株34682は効果的で安全なワクチン株であることが判明した。剖検時のSalmonellaの単離はノック

50

アウト株では完全に陰性であった。非ワクチン接種群は再単離が最高であった。攻撃後の1日平均体重増加については、ロックアウト株は体重増加が最高であり、非ワクチン接種群は体重増加が有意に低かった。

【0092】

結論

KO-34682 *Salmonella choleraesuis* 生ワクチン株は安全且つ有効である。

【図面の簡単な説明】

【図1】USポンドで表した攻撃後ブタ1頭1日当たりの1日平均体重増加。この体重に0.4536を掛けると、kgで表した体重が得られる。

【図2】*Salmonella choleraesuis*を各種組織から再単離することができたブタの百分率（MLN = 腸間膜リンパ節）。

【図3】攻撃後下痢得点の平均百分率。

【図4】ワクチン接種後の1日平均*Salmonella*排出。

【図5】攻撃後の1日平均細菌排出

【図6】USポンドで表した攻撃後のブタ1頭1日当たりの1日平均体重増加。

【図1】

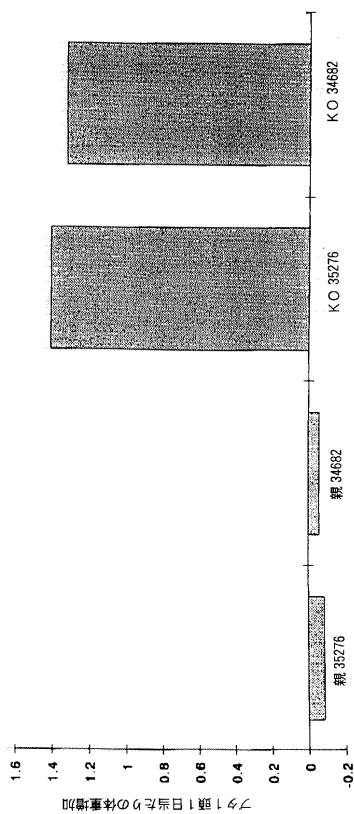


Figure 1

【図2】

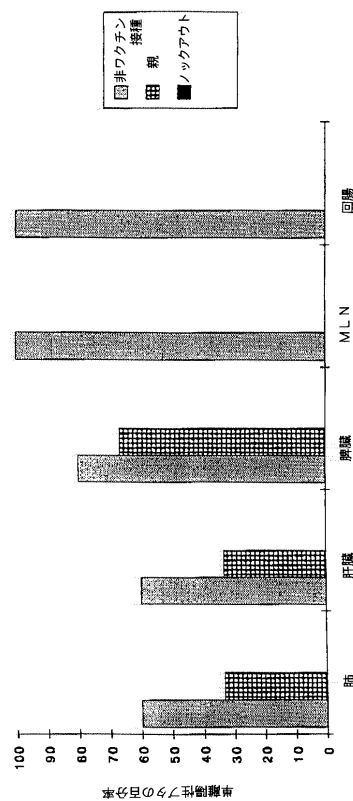


Figure 2

【 図 3 】

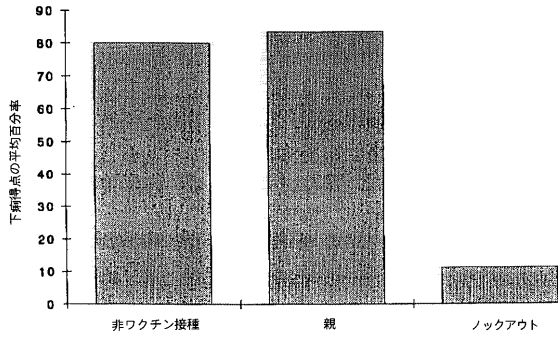


Figure 3

【 図 5 】

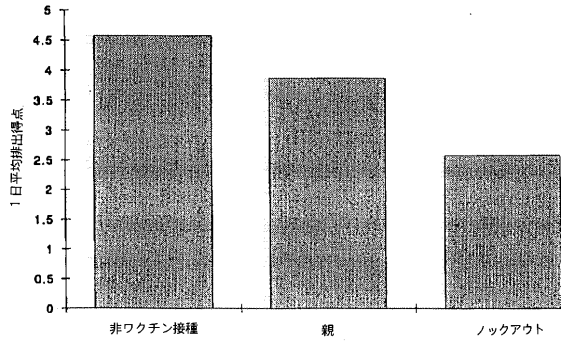


Figure 5

【 図 4 】

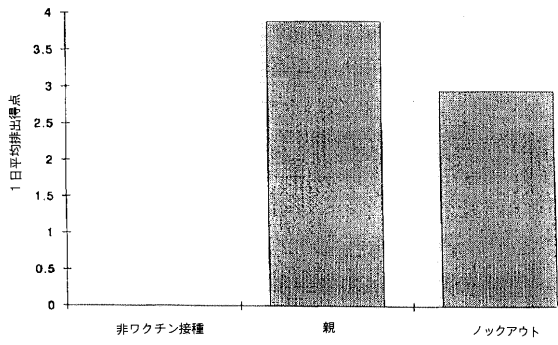


Figure 4

【 図 6 】

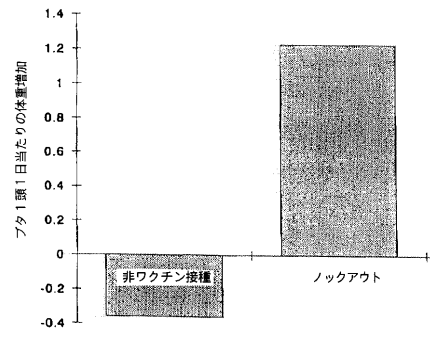


Figure 6

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 39/09	(2006.01)	A 6 1 K 39/09	
A 6 1 K 31/04	(2006.01)	A 6 1 K 31/04	
A 6 1 P 31/04	(2006.01)	A 6 1 P 31/04	1 7 1
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 1 2 N 1/00	(2006.01)	C 1 2 N 1/00	L
C 1 2 N 1/20	(2006.01)	C 1 2 N 1/20	A
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 1/20	E
		C 1 2 N 15/00	A

(74)代理人 100119253

弁理士 金山 賢教

(74)代理人 100103920

弁理士 大崎 勝真

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(73)特許権者 506196247

インターベツト・インターナショナル・ベー・ベー

オランダ国、5 8 3 1・アー・エヌ・ボツクスメール、ウイム・ドウ・コルベルストラート・3 5

(74)代理人 100062007

弁理士 川口 義雄

(74)代理人 100114188

弁理士 小野 誠

(74)代理人 100140523

弁理士 渡邊 千尋

(74)代理人 100119253

弁理士 金山 賢教

(74)代理人 100103920

弁理士 大崎 勝真

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 ポール・エス・コーエン

アメリカ合衆国、ロード・アイランド、ナラガンセット・0 2 8 8 2、ホイットニー・コート・2

(72)発明者 デイビッド・シー・ロー

アメリカ合衆国、ロード・アイランド、ナラガンセット・0 2 8 8 2、ロビンソン・ストリート・7 4

(72)発明者 ペトラス・ヨハネス・マリア・ナイテン

オランダ国、5 8 3 1・エル・デー・ボツクスメール、デ・リンデ・1 0

審査官 馬場 亮人

(56)参考文献 FEMS Microbiology Letters, 1 9 9 8年, vol.163, p.129-134

Journal of Bacteriology, 1 9 8 7年, vol.169, no.2, p.897-899

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

A61K 39/108

A61K 31/04

A61K 35/74  
A61K 39/02  
A61K 39/09  
A61K 39/102  
A61K 39/112  
A61P 31/04  
A61P 43/00  
C12N 1/00  
C12N 1/20  
C12N 15/09  
BIOSIS(STN)  
CAplus(STN)  
EMBASE(STN)  
MEDLINE(STN)