

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4361606号
(P4361606)

(45) 発行日 平成21年11月11日 (2009.11.11)

(24) 登録日 平成21年8月21日 (2009.8.21)

(51) Int. Cl. F I
A 6 1 K 39/09 (2006.01) A 6 1 K 39/09
A 6 1 P 31/10 (2006.01) A 6 1 P 31/10

請求項の数 8 (全 42 頁)

(21) 出願番号	特願平9-526301	(73) 特許権者	508159488
(86) (22) 出願日	平成9年1月21日 (1997.1.21)		リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ
(65) 公表番号	特表2000-513709 (P2000-513709A)		オブ ミネソタ
(43) 公表日	平成12年10月17日 (2000.10.17)		アメリカ合衆国, ミネソタ 55455,
(86) 国際出願番号	PCT/US1997/001056		ミネアポリス, サウスイースト チャーチ
(87) 国際公開番号	W01997/026008		ストリート 100
(87) 国際公開日	平成9年7月24日 (1997.7.24)	(74) 代理人	100099759
審査請求日	平成16年1月16日 (2004.1.16)		弁理士 青木 篤
(31) 優先権主張番号	08/589,756	(74) 代理人	100077517
(32) 優先日	平成8年1月22日 (1996.1.22)		弁理士 石田 敬
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100087871
微生物の受託番号	ATCC 98225		弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 連鎖球菌 C 5 a ペプチダーゼワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

野生型連鎖球菌 C 5 a ペプチダーゼ (SCP) に比較してアミノ酸配列が変更されており、酵素活性を示さないが、免疫原性量の SCP またはその断片もしくは変異体を、生理学的に許容される非毒性の賦形剤と共に含んで成るワクチンであって、前記量が 溶血連鎖球菌属に対して感受性哺乳類を免疫するのに有効な量であるワクチン。

【請求項 2】

有効量の免疫アジュバントを更に含んで成る、請求項 1 に記載のワクチン。

【請求項 3】

前記哺乳類がヒト、イヌ、ウシ、ブタおよびウマから成る群より選ばれる、請求項 1 に記載のワクチン。

【請求項 4】

前記哺乳類がヒトである、請求項 3 に記載のワクチン。

【請求項 5】

前記 溶血連鎖球菌属が A 群連鎖球菌属、B 群連鎖球菌属、C 群連鎖球菌属および G 群連鎖球菌属から成る群より選ばれる、請求項 1 に記載のワクチン。

【請求項 6】

前記 溶血連鎖球菌属が A 群連鎖球菌属である、請求項 5 に記載のワクチン。

【請求項 7】

ペプチドに接合または連結された連鎖球菌 C 5 a ペプチダーゼまたはその断片もしくはは

10

20

変異体を含んで成る、請求項 1 に記載のワクチン。

【請求項 8】

多糖に接合または連結された連鎖球菌 C 5 a ペプチダーゼまたはその断片もしくは変異体を含んで成る、請求項 1 に記載のワクチン。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

今までに同定されている 溶血連鎖球菌には数種類の菌種が存在する。A 群連鎖球菌とも呼ばれるストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*) は、普通のヒト病原菌である。主として小児の病気で、それはヒトに咽頭炎、膿痂疹および敗血症を含む種々の感染症を引き起こす。感染後、リウマチ熱や急性糸球体腎炎のような自己免疫合併症をヒトに引き起こし得る。この病原体はしょうこう熱、壊死性筋膜炎および中毒性ショックのような重度の急性疾患も引き起こす。

「連鎖球菌性咽頭炎」ともよばれる A 群連鎖球菌により引き起こされる咽喉炎は、季節によって、一般病院における全来院者の少なくとも 16% を占める。Hope-Simpson, E., "Streptococcus pyogenes in the throat: A study in a small population, 1962-1975," *J. Hyg. Camb.*, 87:109-129 (1981)。この種は最近の北米と別の 4 大陸における壊死性筋膜炎を伴う中毒性ショックの再流行の原因でもある。Stevens, D.L., "Invasive group A streptococcus infections," *Clin. Infect. Dis.*, 14:2-13 (1992)。C 群と G 群の連鎖球菌も連鎖球菌性咽頭炎の発生および時には中毒性ショックの発生に関係あるとされる。Hope-Simpson, E., "Streptococcus pyogenes in the throat: A study in a small population, 1962-1975," *J. Hyg. Camb.*, 87:109-129 (1981)。

ストレプトコッカス・アガラクティエ (*Streptococcus agalactiae*) としても知られる B 群連鎖球菌は、新生児敗血症および髄膜炎の原因である。T.R. Marin 他、"The effect of type-specific polysaccharide capsule on the clearance of group B streptococci from the lung of infant and adult rats", *J. Infect Dis.*, 165:306-314 (1992)。しばしば新生児 1000 人あたり成人女性 0.1~0.5 人の膣粘膜微生物叢のメンバーは出産中の感染後に重い病気を発症する。B 群連鎖球菌感染からの高死亡率にもかかわらず、発病のメカニズムはあまり解明されていない。Martin, T.R. 他、"The effect of type-specific polysaccharide capsule on the clearance of Group B streptococci from the lung of infant and adult rats", *J. Infect Dis.*, 165:306-314 (1992)。

連鎖球菌感染は現在のところ抗体療法により治療されている。しかしながら、治療した者の 25~30% が病気を再発しそして / または粘膜分泌液中に微生物を放出する。今のところ連鎖球菌感染を予防する手段は全く利用できない。歴史的に、連鎖球菌ワクチン開発は細菌の細胞表面 M タンパク質に集中していた。Bessen, D. 他、"Influence of intranasal immunization with synthetic peptides corresponding to conserved epitopes of M protein on mucosal colonization by group A streptococci," *Infect. Immun.*, 56:2666-2672 (1988); Bronze, M.S. 他、"Protective immunity evoked by locally administered group A streptococcal vaccines in mice," *Journal of Immunology*, 141:2767-2770 (1988)。

2 つの主な問題が M タンパク質ワクチンの使用、販売、そしておそらく FDA の許可を制限するだろう。第一に、S. ピオゲネスには 80 以上の異なる M 血清型が存在し、新規血清型も次々と生まれてきている。Fischetti, V.A., "Streptococcal M protein: molecular design and biological behavior," *Clin. Microbiol. Rev.*, 2:285-314 (1989)。よって、ある血清型特異的 M タンパク質による接種は多分別の M 血清型に対する防御に効果的でないだろう。第二の問題は、M タンパク質ワクチンの安全性に関する。M タンパク質の幾つかの領域はヒト組織、特に心臓組織と免疫交差反応する抗原エピトープを含む。M タンパク質の N 末端は高度に配列が可変的であり、抗原特異性である。この可変配列を代表する 80 種以上のペプチドをワクチン中に含めることが、A 群連鎖球菌感染に対する広域防御を獲得するために必要であろう。新たな変異型 M タンパク質がまだ発生し続けるだろうから、連鎖球菌疾患の進行中サーベイランスおよびワクチン組成の変化を必要とするだろ

う。対照的に、Mタンパク質のカルボキシル末端は配列が保存される。しかしながら、Mタンパク質のこの領域はヒト心臓組織と免疫交差反応性であるアミノ酸配列を含む。Mタンパク質のこの性質はリウマチ熱に伴う心臓弁の損傷の原因であると考えられる。P. Fenderson他、"Tropomyosin shares immunologic epitopes with group A streptococcal M proteins," J. Immunol. 142:2475-2481 (1989)。初期試験では、1979年にMタンパク質をワクチン接種した子供はリウマチ熱および関連の心臓弁障害の発生率が10倍高かった。Massell, B.F.他、"Rheumatic fever following streptococcal vaccination," JAMA, 207:1115-1119 (1969)。

ワクチン開発検討中の別のタンパク質は、発赤毒素である連鎖球菌発熱外毒素Aおよび連鎖球菌発熱外毒素Bである。Lee, P.K.他、"Quantification and toxicity of group A streptococcal pyrogenic exotoxins in an animal model of shock syndrome-like illness," J. Clin. Microb., 27:1890-1892 (1989)。それらのタンパク質に対する免疫は中毒性ショックの致死的症状を防ぐことができるが、連鎖球菌による定着を防止せず、おそらく連鎖球菌性咽頭炎の発生も低減しないだろう。中毒性ショック感染の発生率は人口100,000人あたり10~20例であると見積もられており、従って、総人口を免疫するためのそれらのタンパク質の使用は、実用的でないし経済的に適当でもない。

よって、連鎖球菌感染を予防または改善するための有効な手段が引き続き求められている。より具体的には、連鎖球菌による宿主組織への定着(コロニー形成)を予防または改善し、それによって連鎖球菌性咽頭炎および膿痂疹の発生を少なくするためのワクチンとして有用な組成物を開発する必要がある。リウマチ熱、急性糸球体腎炎、敗血症、中毒性ショックおよび壊死性筋膜炎といった続発症の除去は、急性感染症の発生と生物体の伝染を減少させることの直接結果である。全ての溶血連鎖球菌種、すなわちA, B, CおよびG群により引き起こされる感染を予防または改善するためのワクチンに有用である組成物を開発する必要性もある。

発明の要約

本発明は、感受性の哺乳類(ヒトを含む)および家畜類(例えばイヌ、ウシ、ブタおよびウマ)において溶血連鎖球菌属(Streptococcus)の発生を予防または改善するのに有効なワクチンとワクチン接種方法を提供する。該ワクチンは、生理学的に許容される非毒性の賦形剤と共に、免疫原性量の連鎖球菌C5aペプチダーゼ(SCP)、またはその1もしくは複数の免疫原性断片もしくは変異体を含む。該ワクチンは、SCP酵素活性を持たない断片または変異体SCP(dSCP)を含んでもよい。それは免疫アジュバントを含んでもよい。該ワクチンはA群連鎖球菌属、B群連鎖球菌属、C群連鎖球菌属またはG群連鎖球菌属の定着を予防するために使うことができる。該ワクチンは、免疫原性ペプチドにもしくは免疫原性多糖に接合または連結された、免疫原性組換え連鎖球菌C5aペプチダーゼを含んで成ることができる。

連鎖球菌C5aペプチダーゼワクチンは皮下または筋肉注射により投与することができる。あるいは、該ワクチンは経口摂取または鼻内接種により投与することができる。

下記の実施例に記載するように、SCP遺伝子(scxA49)をE. コリ発現ベクター(pGEX-4T-1)中にクローニングした。E. コリクローンからトランスフェラーゼ-SCP融合タンパク質を発現させ、それを精製した。精製した組換えSCP(dSCP)をマウスの免疫処置に使用した。ワクチン接種したマウスと対照マウスグループを野性型連鎖球菌属でチャレンジした。組換えSCPワクチンを投与したマウスは、感染後すぐに連鎖球菌から免れたが、一方対照グループの30~50%は何日間も培養陽性であった。従って、組換えSCPは溶血連鎖球菌属に対するワクチンとして効果的であった。

また、scxA49遺伝子の2908bp断片であるSCPA49を発現ベクターpGEX-4T-1に連結せしめ、E. コリ中で発現させた。精製したタンパク質は、相同M49連鎖球菌血清型、並びに非相同血清型M1, M6およびM12に関連したペプチダーゼ活性を試験管内で中和することができる高力価のウサギ抗体を誘導した。SCPA49免疫原でのマウスの鼻内免疫処置は、相当なレベルの唾液IgAおよび血清IgG特異抗体を刺激し、野性型M1, M2, M6, M11およびM49連鎖球菌の定着力を低下させた。かくしてSCPタンパク質は連鎖球菌の数

10

20

30

40

50

種類の血清型に対するワクチンとして効果的であった。

【図面の簡単な説明】

図1。溶血連鎖球菌からのC5aペプチダーゼの構造。Dはアスパラギン酸残基；Hはヒスチジン残基；Sはセリン残基；Lはロイシン残基；Pはプロリン残基；Tはスレオニン残基；そしてNはアスパラギン残基を表す。R₁、R₂、R₃およびR₄は反復配列を表す。数字はペプチダーゼ中のアミノ酸残基位置を示す。

図2。A群連鎖球菌株49、A群連鎖球菌株12およびB群連鎖球菌（それぞれ配列番号1、2および3）からのSCPのアミノ酸配列の整列。配列は指摘のアミノ酸位置を除いて同一である。三角形（△）はシグナルペプチドの推定開裂位置を表す。酵素活性部位にあると推定されるアミノ酸は星印（*）により表される。アミノ酸配列中の欠失はドットにより表され枠で囲まれている。

図3。SCP挿入および欠失変異体の作製。黒い箱は欠失領域を表す。

図4。単色FACS分析。PMN上でのゲート操作により蛍光データを解析した。第二ゲートは、第一ゲートにより限定された高染色細胞を計数するために設定した。気嚢に1×10⁶ CFUを接種した。

図5。鼻内感染後の野性型およびSCP A⁻の存続。

図6。SPCAタンパク質でのCD-1マウスの鼻内免疫処置はM型49連鎖球菌による口腔定着を抑制する。

図7。鼻内感染後のマウスにおけるA群連鎖球菌のSCP A⁻およびM⁻変異体の定着力の比較。2×10⁷ CFUのM6連鎖球菌を接種したBALB/cマウス（各実験グループにつき10匹）を比較する。ストレプトマイシンを含む血液寒天平板上で咽頭スワブを1日培養した。平板が1つの溶血コロニーを含んだ場合、マウスを陽性とみなした。²検定によりデータを統計分析した。

図8。SCPA49ワクチンの作製および免疫処置プロトコール。

図9。精製 SCPA49タンパク質でのマウスの鼻内免疫処置後の血清IgGおよび唾液IgA反応。SCPA49特異的IgGの血清濃度と唾液濃度を間接ELISAにより測定した。各マウスからの血清はPBS中に1：2,560希釈し、そして唾液はPBS中に1：2希釈した。

図10。免疫処置および非免疫処置CD1雌マウスへの血清型M49連鎖球菌の定着力の比較。

各実験グループは、2.0×10⁸ CFUで鼻内（i.n.）感染させた13匹のマウスを含んだ。

²検定によりデータを統計分析した。* P < 0.05、** P < 0.01、*** P < 0.001。

発明の詳細な説明

様々な細菌病原体による感染に対する重要な第一防御ラインは、感染部位における食作用性多形核白血球（PMN）および単核細胞の蓄積である。それらの細胞の誘引は走化性刺激因子、例えば宿主因子または侵略生物により分泌される因子により媒介される。C5a化学誘引物質は哺乳類におけるこの炎症反応の刺激の中枢である。C5aは補体の第5成分（C5）から開裂される74残基の糖ペプチドである。食細胞は直接的にC5aの勾配に応答し、感染部位に蓄積する。C5aは炎症過程中最も直接の食細胞誘引物質であるかもしれない。PMNが炎症病巣に浸潤するにつれて、それらは別のケモカイン、例えばIL8を分泌し、それが更に炎症反応を増強する。

連鎖球菌C5aペプチダーゼ（SCP）は、C5aが局所的に生産されると、病原性連鎖球菌の表面上に存在しそこでC5aを分解するタンパク質酵素である。SCPは、C5a走化性因子をPMN結合部位のところ（C5aのHis⁶⁷-Lys⁶⁸残基の間）で特異的に開裂せしめ、C5aの最もC末端の7残基を遊離させる。PMN結合部位のこの開裂は走化性シグナルを除去する。Cleary, P.他、“Streptococcal C5a peptidase is a highly specific endopeptidase,” *Infect. Immun.*, 60:5219-5223 (1992); Wexler, D.E.他、“Mechanism of action of the group A streptococcal C5a inactivator,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:8144-8148 (1985)。

A群連鎖球菌からのSCPは、124,814ダルトンのM_rを有し、且つ多数のグラム陽性菌表面タンパク質に共通である細胞壁固定モチーフを有するサブチリシン様セリンプロテアーゼである。C5aペプチダーゼの構造を図1に示す。ストレプトコッカス・ピオゲネスの

10

20

30

40

50

連鎖球菌 C 5 a ペプチダーゼ遺伝子の完全ヌクレオチド配列は既に発表されている。Chen, C. & Cleary, P., "Complete nucleotide sequence of the streptococcal C5a peptidase gene of *Streptococcus pyogenes*," *J. Biol. Chem.*, 265:3161-3167 (1990)。サブチリシンとは異なり、SCP は非常に狭い基質特異性を有する。この狭い特異性は、両者の触媒領域間に顕著な類似性があることから見ると驚くべきことである。Cleary, P. 他、"Streptococcal C5a peptidase is a highly specific endopeptidase," *Infect. Immun.* 60:5219-5223 (1992)。結合ポケットの両側の残基のように、電荷移動に関係する残基は保存されているが、しかし SCP の残りの残基はサブチリシンの残基とは無関連である。A 群連鎖球菌の40種以上の血清型が SCP タンパク質を生産するかまたはその遺伝子を所有することがわかった。Cleary, P. 他、"Streptococcal inactivator of chemotaxis: a new virulence factor specific to group A streptococci," *Recent Advances in Streptococci and Streptococcal Disease* p.179-180 (S. Kotami および Y. Shiokawa 編; Reedbooks Ltd., Berkshire, England; 1984); Podbielski, A. 他、"The group A streptococcal virR49 gene controls expression of four structural vir regulon genes," *Infect. Immun.*, 63:9-20 (1995)。

10

B 群連鎖球菌に関連する C 5 a ペプチダーゼ酵素も同定されている。Hill, H.R. 他、"Group B streptococci inhibit the chemotactic activity of the fifth component of complement," *J. Immunol.* 141:3551-3556 (1988)。scpB ヌクレオチド配列の制限マッピングと比較は、scpB が scpA と 97 ~ 98 % 同じであることを示した。A 群連鎖球菌株 49、A 群連鎖球菌株 12 および B 群連鎖球菌株からの SCP のアミノ酸配列 (それぞれ配列番号 1, 2 および 3) の比較については図 2 を参照のこと。B 群連鎖球菌の全血清型に相当する 30 株以上が scpB 遺伝子を担持する。Cleary, P. 他、"Similarity between the Group B and A streptococcal C5a Peptidase genes," *Infect. Immun.*, 60:4239-4244 (1992); Suvorov A.N. 他、"C5a peptidase gene from group B streptococci," *Genetics and Molecular Biology of Streptococci, Lactococci, and Enterococci*, p.230-232 (G. Dunne, P. Cleary & L McKay 編; American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1991))。

20

G 群および C 群連鎖球菌のヒト分離株も scpA 様遺伝子を所有する。幾つかの G 群株はそれらの表面上に C 5 a 特異的プロテアーゼ活性を発現することが証明された。Cleary, P.P. 他、"Virulent human strains of group G streptococci express a C5a peptidase enzyme similar to that produced by group A streptococci," *Infect. Immun.*, 59:2305-2310 (1991)。従って、A 群連鎖球菌、B 群連鎖球菌、C 群連鎖球菌および G 群連鎖球菌の全血清型 (> 80) が SCP 酵素を生産する。

30

SCP は、感染部位への貧食白血球の流入を阻害することにより、連鎖球菌が潜在的感染部位 (例えば鼻咽頭粘膜) に定着するのを助ける。これは宿主による連鎖球菌の初期クリアランスを妨げる。プロテアーゼ構造遺伝子中に明確に限定された変異を有する連鎖球菌株を使って、炎症、C 5 a 白血球走化性および連鎖球菌ビルレンス (毒力) に対する SCP の影響を調べた。標的プラスミド挿入によりおよび特定の内部欠失を含む scpA と野性型遺伝子との置換により SCP 変異体を作製した。該変異体は C 5 a プロテアーゼ活性を欠き、C 5 a に対するヒトまたはマウス PMN の試験管内走化性応答を阻害しなかった。

40

マウス結合組織気嚢 (air sac) モデルを使って、SCP が貧食細胞の流入および感染部位からの連鎖球菌のクリアランスを遅らせることを確かめた。結合組織気嚢は、25ゲージ注射針を使って少量の空気と PBS (その中に連鎖球菌を含むかまたは含まない) をマウスの背中の皮下に注入することにより作製する。Boyle, M.D.P. 他、"Measurement of leukocyte chemotaxis in vivo," *Meth. Enzymol.* 162:101-115 (1988)。実験の終わりに、マウスを頸部脱臼により安楽死させ、マウスから気嚢を切開し、気嚢を緩衝液中でホモジナイズした。気嚢モデルの利点は、気嚢が数日間膨張したままであり且つ刺激物質を注射しない限り炎症から免れることである。よって、注入した細菌およびそれから生じる炎症反応が短期感染期間に渡って局在化されたままである。

野性型 SCP⁺ と SCP⁻ 連鎖球菌 (すなわち、非機能的な変異型 SCP を有する A 群連鎖

50

球菌)のクリアランスを比較しそして感染の初期の細胞浸潤物を分析するために気嚢モデルを変更した。血液寒天平板上での生存可能連鎖球菌について組織懸濁液を分析し、蛍光標示式細胞分取法(FACS)により細胞浸潤物を分析した。FACS分析法では、懸濁液中の個々の細胞を単一特異性蛍光抗体で標識する。標識細胞のアリコートでFACS-Scan流動細胞計測器または蛍光標示式細胞分取器(特有の蛍光に基づいて細胞を計数する)中に注入する。気嚢モデルを使った実験は、SCP⁺連鎖球菌がSCP⁻連鎖球菌よりも一層毒性であることを示した。

ヒト血清および唾液中のSCPに対するヒト抗体(IgGとIgAの両方)の生産を測定する実験を行った。O'Connor, SP他、"The Human Antibody Response to Streptococcal C5a Peptidase," J. Infect. Dis. 163:109-116 (1991)。一般に、未感染の乳幼児からの血清および唾液はSCPに対する抗体を欠いていた。対照的に、健康な成人からの血清試料と唾液試料の大部分が、測定可能なレベルの抗SCP IgGおよびSCP特異的分泌IgA(抗SCP IgA)を有した。連鎖球菌性咽頭炎を有する患者からの急性および回復期の対合血清は、健康な固体からの血清には含まれなかった高レベルの抗SCP IgGを有した。高濃度の抗SCP免疫グロブリンを含む血清はSCP活性を中和することができた。連鎖球菌性咽頭炎に最近かかった小児から得られた唾液試料の>90%においてこの抗体が検出されたことは、小児が抗体応答を生じ得ることを証明した。

ヒト被検者が自然連鎖球菌感染に应答してSCPに対するIgGおよびIgAを生産したとしても、抗SCP免疫グロブリンが感染に対する何らかの防御を提供するかどうかは未知であった。更にSCPタンパク質が溶血連鎖球菌の定着または感染に対するワクチンとして作用できるかどうかもわからなかった。まず第一に、鼻咽頭への定着に際するSCPの役割を調べるために実験を行った。生存A群連鎖球菌による鼻内感染の後、10日目まで毎日咽頭培養物を採取した。野性型連鎖球菌および同系SCP欠損変異型連鎖球菌を、この10日間に渡り咽頭に存続する能力について比較した。予想通り、SCP欠損変異型連鎖球菌の方がより迅速に鼻咽頭から浄化された。

同じ鼻内マウスモデルを使って、定着を予防する免疫を誘導するSCPの能力を試験した。組換えscpA49遺伝子の変異型(該遺伝子の5'末端から848-1033ヌクレオチドと3'末端から3941-4346ヌクレオチドを欠いている)を高発現ベクターpGEM-4T-1中にクローニングし、そこから発現させた。酵素活性欠損型SCPタンパク質(dSCP)をアフィニティークロマトグラフィーによりE.コリ組換え体から精製した。このタンパク質製剤を皮内にワクチン接種したウサギの血清は、試験管内でSCP活性を中和した。精製タンパク質(40 µg)を5週間に渡りマウスに鼻内投与した。免疫処置マウスは1~2日間で連鎖球菌を行かし、一方で非免疫処置マウスの咽頭培養物は10日間まで陽性のままであった。3種の異なるSCPタンパク質製剤をワクチン接種した3組のマウスにおいてこの実験を繰り返した。

ある1つのA群血清型の連鎖球菌C5aペプチダーゼを使った動物の免疫処置が非相同の血清型による定着を予防するかどうかを調べるために別の実験を行った。scpA49遺伝子の2908bp断片を発現ベクター中でクローニングし、E.コリ中で発現させた。アフィニティー精製したSCPA49タンパク質は、マウスおよびウサギにおいて高度に免疫原性であることが証明された。精製SCPA49免疫原は酵素活性を欠くけれども、それはM1, M6, M12およびM49連鎖球菌に関連したペプチダーゼ活性を試験管内で中和することができる高力価のウサギ抗体を誘導した。これにより、抗ペプチダーゼ抗体が交差中和抗体活性を有することが確認された。次いで、4組のマウスをSCPA49で免疫処置し、各々を別の血清型のA群連鎖球菌によりチャレンジした。欠失型SCPA49タンパク質によるマウスの免疫処置は、有意なレベルの特異的唾液IgA抗体と血清IgG抗体の生産を刺激し、そして野性型M1, M2, M6, M11およびM49連鎖球菌の定着力(コロニー形成活性)を減少させた。この実験は、連鎖球菌C5aペプチダーゼワクチンによる免疫処置が鼻咽頭への定着を予防するのに有効であることを確認した。

従って、本発明は、溶血連鎖球菌属の定着または感染に対して哺乳類を防御するために用いられるワクチンを提供する。本発明の一態様では、ワクチンに通例であるように、連

10

20

30

40

50

鎖球菌 C 5 a ペプチダーゼ、その変異体または断片は薬理的に許容される賦形剤中で哺乳類に投与することができる。当業者の認識する通り、必ずしも完全なタンパク質を使用する必要はない。該ポリペプチドの特定部分（例えば、連鎖球菌 C 5 a ペプチダーゼの一部に相当する合成免疫原性ポリペプチド）を使用することができる。

同じく当業者の認識する通り、生来の S C P アミノ酸配列と全く同一であるポリペプチドを使用する必要はない。免疫原性ポリペプチドのアミノ酸配列は生来の S C P アミノ酸配列に本質的に一致すればよい。本明細書中で用いる「本質的に一致する」とは、生来の S C P によって誘導される免疫応答と少なくとも実質的に等価である防御免疫応答を惹起するであろうポリペプチド配列を言う。組成物またはワクチンに対する免疫応答は、着目のポリペプチドまたはワクチンに対する宿主による細胞性免疫および/または抗体媒介免疫

10

応答の発生である。通常、そのような応答は、着目の組成物またはワクチン中に含まれる 1 もしくは複数の抗原に特異的に向けられた、宿主産生抗体、B 細胞、ヘルパー T 細胞、サプレッサー T 細胞および/または細胞毒性 T 細胞から成る。本発明のワクチンは、免疫応答を増強することが知られている有効量の免疫アジュバントを含むこともできる。あるいは、S C P を別のペプチドにもしくは多糖に接合または連結せしめることができる。例えば、当業界で周知である免疫原性タンパク質（「担体」としても知られる）を使うことができる。有用な免疫原性タンパク質としては、アオガイヘモシアニン（K L H）、ウシ血清アルブミン（B S A）、オボアルブミン、ヒト血清アルブミン、ヒト グロブリン、ニワトリ免疫グロブリン G、およびウシ グロブリンが挙げられる。有用な免疫原性多糖類としては、A 群連鎖球菌多糖、B 群連鎖球菌からの多糖 C、または肺炎連鎖球菌（*Streptococci pneumoniae*）の莢膜多糖が挙げられる。あるいは、ワクチンとして用いられる別の病原体の多糖を S C P に接合または連結せしめることができる。

20

被検体を免疫処置するために、S C P またはその免疫活性断片もしくは変異体は、非経口的に、通常は適当な賦形剤中での筋肉もしくは皮下注射により、投与される。しかしながら、別の投与方法、例えば経口投与または鼻内投与も受け入れられる。ワクチン製剤は賦形剤中に有効量の活性成分を含有するだろう。その有効量は当業者により容易に決定され得る。活性成分は典型的には組成物の約 1 % ~ 約 95 % (w/w) の範囲であり、または適当ならばそれより多くまたは少なくともよい。投与すべき量はワクチン接種を考えている動物またはヒトの年齢、体重および体調といった要因に依存する。投与すべき量は抗体を作る動物の免疫系の能力、および所望する防御の度合にも依存する。有効量は用量応答曲線を作成する通常の試験を通して当業者により容易に決定することができる。まず 1 または複数回での S C P またはその断片を投与することにより被検者を免疫する。連鎖球菌に対する免疫の状態を維持するために必要とされるように複数回量投与してもよい。

30

鼻内用製剤は、鼻粘膜に刺激を引き起こしたり繊毛機能を有意に妨害したりしない賦形剤を含むことができる。希釈剤、例えば水、水性食塩溶液または既知の他の物質を本発明と共に使用できる。鼻用製剤は、非限定的にクロロブタノールや塩化ベンザルコニウムのような保存剤を含んでもよい。鼻粘膜による目的タンパク質の吸収を高めるために界面活性剤が存在してもよい。

経口液体製剤は、例えば、水性もしくは油性の懸濁液剤、液剤、乳剤、シロップ剤もしくはエリキシル剤の形であってもよく、あるいは錠剤形に乾燥した製品としてまたは使用前に水もしくは他の適当な賦形剤で再構成される製品として提供してもよい。そのような液体製剤は、懸濁剤、乳化剤、非水性賦形剤（食用油を含んでもよい）または保存剤のような常用の賦形剤を含んでもよい。

40

ワクチンを調製するために、精製 S C P、そのサブユニットまたは変異体を単離し、凍結乾燥しそして安定化することができる。次いで S C P ペプチドを適当な濃度に調整し、所望により適当なワクチンアジュバントと組合せ、そして使用のために包装することができる。適当なアジュバントとしては、非限定的例として、界面活性剤、例えばヘキサデシルアミン、オクタデシルアミン、リゾレシチン、臭化ジメチルジオクタデシルアンモニウム、N, N - ジオクタデシル - N' , N - ビス (2 - ヒドロキシエチルプロパンジアミン)、メトキシヘキサデシルグリセロール、およびブルロニックポリオール；ポリアニオン

50

、例えばピラン、硫酸デキストラン、ポリIC、ポリアクリル酸、カルボポール；ペプチド、例えばムラミルジペプチド、ジメチルグリシン、タフトシン、油状乳剤、ミョウバン、並びにそれらの混合物が挙げられる。別の考えられるアジュバントとしては、E・コリ熱不安定性毒素のまたはコレラ毒素のBペプチドサブユニットが挙げられる。McGhee, J. R.他、“On vaccine development,” *Sem. Hematol.* 30:3-15 (1993)。最終的に、免疫原性生成物はワクチン製剤用のリボソーム中に組み込まれるか、あるいはアオガイヘモシアニン(K L H)もしくはヒト血清アルブミン(H S A)のようなタンパク質または他のポリマーに接合することができる。

定着に対する哺乳類のワクチン接種のためのSCP、そのサブユニットまたは変異体の使用は、他のワクチン候補を上回る利点を提供する。単一タンパク質の接種による定着または感染の予防は、連鎖球菌性咽頭炎および膿痂疹のごく一般的な問題の発生を減らすだけでなく、リウマチ熱、急性糸球体腎炎、敗血症、中毒性ショックおよび壊死性筋膜炎といった続発症も排除するだろう。

下記の実施例は本発明を例証するためのものであって制限するためのものではない。

実施例 1

scpA49およびscpA6の挿入および欠失変異体の作成

a) 菌株および培養条件。S・ピオゲネスCS101株は、血清型M49でO F⁺の株である。CS159は、M遺伝子クラスターとscpAを通して広がる欠失を有する臨床分離株である。CS101株の自然ストレプトマイシン耐性誘導体であるCS101Smは、ストレプトマイシン(200 µg/ml)を含むトリプトース血液寒天培地上で定常期培養物から連鎖球菌を平板培養することにより選択された。CS101::pG⁺host5は、未知の位置であるがただしscpAとemm遺伝子クラスターの外側においてpG⁺host5が染色体中に組み込まれているCS101株である。エシェリキア・コリ(*Escherichia coli*) ER1821株(New England Biolabs, Inc., Beverly, MAから)を、自己不活化ベクタープラスミドpG⁺host5のための受容細胞として使用した。プラスミドpG⁺host5はAppligene, Inc., Pleasanton, CAから入手した。連鎖球菌は2%ネオペプトンもしくは1%酵母エキ스가補足されたトッド・ヒューイトブロス中で、または5%ヒツジ血液を有するトリプトース寒天平板上で増殖させた。プラスミドpG⁺host5を含むE・コリER1821株は、エリスロマイシン(300 µg/ml)を含むLBブロス中で増殖させた。プラスミドpG⁺host5を含む連鎖球菌は、1 µg/mlのエリスロマイシン(Erm)含有1%酵母エキ스가補足されたトッド・ヒューイトブロス(T H Y)中で増殖させた。

SCPは、一般的に溶血連鎖球菌属からの連鎖球菌C5aペプチダーゼのことを言う。SCPA12, SCPA49およびSCPA6はそれぞれA群連鎖球菌M型12, 49および6株からの特異的ペプチダーゼである。scpAという語は、A群連鎖球菌からのSCPをコードする遺伝子のことを言う。scpA12, scpA6およびscpA49は、それぞれSCPA12, SCPA49およびSCPA6ペプチダーゼをコードする遺伝子である。SCPBおよびscpBは、B群連鎖球菌からのペプチダーゼと遺伝子である。SCPA49(配列番号1)、SCPA12(配列番号2)およびSCPB(配列番号3)のアミノ酸配列は図2に与えられる。

b) scpA挿入変異体の作製。プラスミド挿入および遺伝子置換法を使って、明確に限定されたscpA挿入変異体を作製した。挿入標的である内部scpA49 BglII-BamHI断片を、熱感受性シャトルベクターpG⁺host5中に連結せしめてプラスミドpG::scpA1.2を作製し、それをE・コリER1821中に形質転換せしめた(図3)。pG⁺host5ベクターは、39で活性であるE・コリ複製開始点、温度感受性グラム陽性(Gram⁺)複製開始点(連鎖球菌中で30で活性であるが39で不活性である)、および選択用のエリスロマイシン耐性遺伝子を含む。高温は、10⁻² ~ 10⁻³の頻度の頻度で起こる相同組換えによりA群連鎖球菌の染色体DNA中に該プラスミドを強引に組み込ませる。

組換えプラスミドDNA pG::scpA1.2をCS101受容細胞中にエレクトロポレーション移入せしめた。形質転換体を1 µg/mlエリスロマイシンを含むT H Y - 寒天平板上で30にて選択した。プラスミド挿入断片と染色体scpAとの間での組換えから生じた染色体組込み体を、39でのエリスロマイシン耐性により選択した。2つの挿入変異体M14とM16を分析した。抗生物質を含まないT H Y中での30での継代によりM14およびM16株のEmrS復帰

10

20

30

40

50

変異体を得、最後にErm選択を使わずに37℃で平板培養した。プラスミドを失ってしまったコロニーを単離して、変異体の表現型が無関係の自然変異ではなくてscpA49中へのプラスミドの挿入に起因することを確認した。

c) scpA中への限定された欠失の導入。scpA中への挿入が正反対であるために下流遺伝子（細菌のビルレンスに寄与する可能性もある未知の遺伝子）の発現を低下させ得るという可能性を取り除くために、scpAの内部に明確に限定された欠失を有する変異体株を作製した。まず第一に、プライマー1（5'-GGGGGGGAATTCGTTAGCGGGTATCATGGGAC-3'；配列番号4）およびプライマー2（5'-GGGGGGGAATTCGGGTGCTGCAATATCTGGC-3'；配列番号5）を使った裏返し（inside-out）PCR法によりscpAのBglII-HindIII断片中に限定欠失を作った。下線を引いたヌクレオチドは、それぞれ座標2398および2322を有するscpA配列に相当し、そしてボールド体のヌクレオチドはEcoRI認識部位に相当する。これらのプライマーは、scpA遺伝子中に枠内（in-frame）欠失を生成するために選択された。これらのプライマーは反対方向でプラスミドDNAを複製し、欠失の境界を限定する。Innis, M.A.他編、PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, 1990)。

プラスミドpG::scpA1.2 DNAを鋳型として使った。

増幅生成物をEcoRIで消化し、プラスミドpG⁺host5中に連結せしめた。得られたプラスミドpG::scpA1.1は、scpAの内部に76bpの欠失を含んだ。この枠内欠失は、セリンプロテアーゼの推定触媒中心の一部を構成するセリンを含む、25アミノ酸を除去した。Chen, C. & Cleary, P., "Complete nucleotide sequence of the streptococcal C5a peptidase gene of *Streptococcus pyogenes*," J. Biol. Chem., 265:3161-3167 (1990)。欠失の間際にEcoRV部位が作製された。この欠失部と重複するDNAを配列決定して、欠失の境界を確認した。

欠失を含むプラスミドpG::scpA1.1をE. コリER1821中に形質転換せしめた。ErmRについてコロニーを選択し、次いでEcoRIによって制限したミニプレブプラスミドDNAを使って適当なscpA欠失についてスクリーニングした。正確な欠失境界線をDNA配列分析により確認した。プラスミドpG::scpA1.1を上述のCS101Sm株中にエレクトロポレーションにより導入し、次いで39℃でのErm上での増殖により組込み体を選択した。M49株CS101Smの染色体中へのプラスミドの組込みは高温選択を使った。PCRにより挿入位置を確認した。エリスロマイシン選択を使わない低温でのCS101Sm (pG::scpA1.1) の増殖は、ランダム欠失現象によるかまたは挿入によって生じる重複したscpA配列間での組換えから起こる切除によりプラスミドを失ってしまったErmS復帰変異体の高頻度分離を引き起こした。2つの欠失変異体、MJ2-5およびMJ3-15が同定され、それらを更に研究した。プラスミドpG::scpA1.1の組換え切除により後に残された染色体欠失を、PCR法とEcoRVで消化したDNAへのサザンハイブリダイゼーション法により明らかにした。

d) SCPに対する試験管内効果。SCP抗原の発現およびペプチダーゼ活性に対する挿入と欠失の影響をウエスタンブロットおよびPMN付着アッセイにより評価した。連鎖球菌を100mlのTHY中で37℃にて一晩インキュベートした。培養ペレットを5mlの冷0.2M酢酸ナトリウム (pH5.2) 中で2回洗浄し、次いで1mlのTE-ショ糖緩衝液 (20%ショ糖, 10mM Tris, 1mM EDTA, pH7.0) および40μlのムタノリシン中に懸濁した。この混合物を37℃で2時間回転させ、次いで4500rpmで5分間遠心分離した。上清はプロテアーゼ阻害剤として100mMフェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF) を含んだ。Laemmli, U. K., "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4" Nature 227:680-685 (1970) に記載された通りに、電気泳動およびウエスタンブロット法を実施した。コロニーブロットには、コロニーをTHY-寒天平板上で増殖させ、ニトロセルロース膜へと移し (BioBlot-Nc, Costar, Cambridge, MA)、赤外線ランプ下で10分間固定し、そして抗体に暴露した。O'Connor, S.P. & Cleary, P.P., "In vivo *Streptococcus pyogenes* C5a peptidase activity," J. Infect. Dis. 156:495-506 (1987)。ウエスタンブロットおよびコロニーブロット上でSCPタンパク質を検出するために用いる一次抗血清は、精製済の組換えSCPタンパク質でのウサギの免疫処置によって調製した。結合は抗ウサギ抗体-アルカリホスファターゼ接合体により検出した。

10

20

30

40

50

C5aペプチダーゼ活性はPMN付着アッセイを使って測定した。Booth, S.A.他、“Dapsone suppresses integrin-mediated neutrophil adherence function,” *J. Invest. Dermatol.* 98:135-140 (1992)。C5a (Sigma, St. Louis, MO)を連鎖球菌抽出物または精製プロテアーゼと共にインキュベートした後、残余C5aはPMNを活性化してBSA被覆ウエルに付着させることができる。初めに、マイクロタイタープレートウエルをPBS中0.5%BSAで被覆し、37℃で1時間インキュベートした。フィコール-ハイパック (Ficoll-Hypaque) (Sigma, St. Louis, MO)中での遠心分離によりヒトPMNを単離した。40μlのそのままの連鎖球菌またはタンパク質抽出物を、1%グルコースと0.1%CaCl₂を含むPBS 340μl中で、20μlの5μM C5aと共に37℃で45分間インキュベートした。BSA被覆ウエルをPBSで洗浄し、PMNを再懸濁させ、次いでウエルに残余C5aを添加した。この混合物を7%CO₂中で37℃で45分間インキュベートした。最後に、ウエルを洗浄して非付着性PMNを除去した。付着性PMNをクリスタルバイオレットで染色し、ELISAリーダー中でOD_{570nm}を読み取った。光学濃度は残余C5aの量に比例し、またはSCP活性の量に反比例する。

挿入変異体は完全にSCPA49抗原を欠いていた。一方、MJ2-5およびMJ3-15欠失変異体は予想通りSCP抗原を生産した。完全な細胞もM14, M16, MJ2-5およびMJ3-15からのムタノリシン (mutanolysin) タンパク質抽出物も両方とも、マイクロタイタープレートへのrC5a活性化PMN付着を破壊する能力を欠いていた。変異体抽出物に関連した少量の残余阻害活性 (10~15%) は、好中球に対する該抽出物の毒性効果によるのかもしれない。

実施例 2

SCPは食細胞の漸増および皮下感染部位からの連鎖球菌のクリアランスを遅らせる

SCPがC5aの不活性化を招くことを確かめるために、上記実施例1に記載した通りにscpAの挿入変異体および欠失変異体を作製し、そして活性試験した。scpA中に挿入または欠失を導入すると、変異体SCPはマイクロタイタープレートへのPMNのC5a活性化付着を破壊することができなかった。

ビルレンスに対するscpA変異の影響を、連鎖球菌が局在化されたままでありそして炎症細胞の流入を分析することができる動物モデルを使って試験した。SCPがごく初期に生物体の初期クリアランスを遅らせる働きをするという仮定を検証するために、結合組織気嚢の接種後ちょうど4時間目にSCP⁺およびSCP⁻連鎖球菌の量を比較した。更に、この感染から短期間後のリンパ節および脾臓への連鎖球菌の散在も評価した。Charles River Breeding Laboratory, Wilmington, MAから入手したCD1非近交系雄マウス (25g) を全ての実験に使用した。結合組織気嚢は、25ゲージの注射針を使ってマウスの背中の皮膚の下に空気0.9mlとPBS中に希釈したA群連鎖球菌0.1mlを注入することにより作製した。ある実験では、陽性対照としてSCP⁺CS101::pG⁺host5を使った。別の実験では陽性対照としてCS101Sm株を使った。感染後4時間目に頸部脱臼によりマウスを安楽死させた。指示した場合、4つの鼠径部リンパ節、脾臓および気嚢を動物から切開し、PBS中でホモジナイズした。組織懸濁液を、1μg/mlエリスロマイシンまたは200μg/mlストレプトマイシンを含む血液寒天平板上で生存可能コロニー形成単位 (CFU) についてアッセイした。

予備実験において、気嚢をスライド上で固定し、ライト染料により染色し、顕微鏡検査した。この方法による顆粒球数は信頼できないけれども、固定化組織中の残余SCP⁺は野性型連鎖球菌よりも有意に少ないように見えた。この差を測るための試みとして追加の実験を行った。気嚢をPBS中で粉碎することにより気嚢の分散細胞集団を調製し、それらをナイロンモノフィラメントメッシュ (TETKO Co, New York) に通した。

300×gで5分間の遠心により細胞をペレットにし、それをFACS緩衝液 (フェノールレッドを含まないハンス平衡塩類溶液、0.1%NaN₃、1.0%BSA画分V) 中に5×10⁶/mlの密度に再懸濁した。細胞 (1.0×10⁶個) を1μgのFITC抗マウスMac-1で直接染色するかまたは1μgのビオチン接合抗マウスGr-1に続いて蛍光もしくはFITCで標識した1μgのストレプトアビジンにより間接標識した。モノクローナル抗体Mac-1とGr-1はPharmacia, Inc.

、CAから入手した。標識細胞を1.0%パラホルムアルデヒド中で固定した。FAC-Scan流動細胞計測器（フローサイトメーター）とConsort 32ソフトウェア（Becton Dickinson）を使って蛍光プロフィールを作成した。マウスPMNを全血からフィコール-ハイパック密度勾配遠心により精製し、混成細胞集団中の限定PMNのための標準として使用した。特異的に標識された細胞の測定用に、各抗体マーカーについて平均蛍光を測定し、強く標識された細胞を映し出すためにゲートを設定した。対照は未染色の細胞、およびストレプトアビジン-FITCにのみ暴露された細胞を含んだ。

2つの実験を実施した。第一はscpA49挿入変異体M16をそのSCP⁺親株であるCS101株と比較した。第二はscpA49欠失変異体MJ3-15を、その親であるCS101Sm株と比較した（表1）。両実験とも、SCP⁺連鎖球菌を接種したマウスからホモジナイズした気嚢は、野性型連鎖球菌を接種した気嚢よりも、4時間後の連鎖球菌の数が少なかった。第一の実験は2分の1への減少を示し、第二の実験は4分の1への減少を示した。その差は、不対（Unpaired）t検定を使った場合にそれぞれ $P < 0.05$ および $P < 0.001$ で統計的に有意であった。野性型SCP⁺連鎖球菌が8匹のマウスのうちの7匹および8匹のマウスのうちの6匹からの脾臓ホモジネートにおいて検出され；一方、SCP⁻変異体は脾臓中にまれにしか検出されなかった。リンパ節ホモジネートの場合は全く逆であった。

SCP⁺連鎖球菌を接種した16匹のマウスのうち10匹からのリンパ節が生存可能な連鎖球菌を有していたのに対し、野性型連鎖球菌を感染させた16匹のマウスのうちのわずか4匹のリンパ節が生存可能菌を含んでいた。この差はフィッシャーの精密検定を使って $P < 0.05$ において統計的に有意であると決定された。

表1：気嚢感染後4時間目のSCP⁺およびSCP⁻連鎖球菌の分布

株	マウスの数 ^a	陽性培養物の数		ホモジナイズした気嚢 ^c
		脾臓 ^b	リンパ節	
CS101pG (SCP ⁺)	8	7	2	$1.3 \times 10^8 \pm 2.2 \times 10^7$
M16 (SCP ⁻)	8	0	5	$6.0 \times 10^7 \pm 1.3 \times 10^7$
CS101Sm (SCP ⁺)	8	6	2	$1.6 \times 10^8 \pm 2.6 \times 10^7$
MJ3-15 (SCP ⁻)	8	1	5	$3.7 \times 10^7 \pm 1.5 \times 10^7$

^a 各マウスに定常期の連鎖球菌 3×10^8 CFUを接種した。

^b SCP⁻連鎖球菌に対比した脾臓からのSCP⁺連鎖球菌の単離の頻度の差は、フィッシャー精密検定により各実験について統計的に有意（ $P < 0.05$ ）であった。

^c ホモジナイズした気嚢から単離されたCFUの差（平均値 \pm SEM）は、不対t検定により各実験についてCS101pG (SCP⁺)とM16 (SCP⁻)とMJ3-15 (SCP⁻)株で有意（ $P < 0.001$ ）であった。

気嚢からの連鎖球菌のより迅速なクリアランスはPMNの強力な漸増に起因していた。気嚢中の全細胞集団数、Mac-1陽性顆粒球の比率〔Springer, G.他、“Mac-1: macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody,” *Eur. J. Immunol.* 9:301-306 (1979)〕、およびGr-1陽性PMNの比率〔Brunner, E.他、“Immunological activation of polymorphonuclear neutrophils for fungal killing: studies with murine cells and blastomyces dermatitidis in vitro,” *J. Leuko. Bio.* 36:505-520 (1984)〕を、単色FACS分析により比較した。Clark, J.M., “A new method for quantitation of cell-mediated immunity in the mouse,” *J. Reticuloendothel. Soc.* 25:255-267 (1979)）。簡単に言えば、FACS分析において、懸濁液中の個々の細胞を特異的な蛍光単一抗体で

標識する。標識された細胞のアリコートにFAC-Scan流動細胞計測器または蛍光標示式細胞分取器に注入し、それらの特有の蛍光に基づいて細胞数を計測する。

S C P⁻欠失変異体を感染させた気嚢は、S C P⁺連鎖球菌を接種したものの2倍の数の炎症細胞を含んでいた(図4)。接種サイズを100倍にしてもこの差に変化はなかった。1 × 10⁶個のS C P⁻細胞(MJ3-15株)を感染させた気嚢は、S C P⁺培養株を接種したものの3倍の数のGr-1陽性細胞を含んでいた。S C P⁺連鎖球菌を接種した気嚢では、細胞の約6%がP M Nであり21%が別の種のMac-1⁺顆粒球(P M Nを含む)であった。対比して、S C P⁻連鎖球菌を接種した気嚢は卓越的にP M Nを含んでいた。Gr-1陽性細胞はMac-1陽性細胞の数に等しいかまたはそれより多数であった。流動細胞計測器のゲートを高染色性顆粒球のみを測定するように設定した。いずれの抗体でも染色されなかった残りの70~80%の細胞は多分、低染色性顆粒球、赤血球またはリンパ球のいずれかであるだろう。ライト染料で染色した気嚢調製物中に多数のリンパ球が顕微鏡下で観察された。

脾臓ホモジネートから現れた連鎖球菌のS C P⁺コロニーは、多くが莢膜に包まれており、水滴に似ていた。対照的に、リンパ節から生じた少数のS C P⁻コロニーは、より接種材料に似ていた。それらは非粘液性コロニーと中程度に粘液性のコロニーの混合物であった。これらのデータは、M⁺S C P⁺莢膜封入連鎖球菌が感染後4時間以内に適応し、増殖しそして血流中に侵入することを示唆する。変異型連鎖球菌と野性型連鎖球菌の差別的往来(trafficking)の基本は、S C P⁻菌に反応した食細胞の激しい流入のためであるかもしれない。マクロファージおよび/または皮膚樹状細胞がS C P連鎖球菌をより迅速に吸い込み、そしてそれらをリンパ節に運ぶのかもしれない。野性型に比較した変異型連鎖球菌の減少は意外な発見である。何故なら、S C P⁻連鎖球菌はM⁺であり、試験管内のヒト好中球による食作用に耐性であるからである。

実施例 3

S C Pはマウス鼻咽頭への定着に必要である

野性型(S C P⁺)およびS C P⁻連鎖球菌が鼻咽頭に定着する相対能力を評価するためにマウスの鼻内に接種した。ストレプトマイシン耐性M49株CS101および欠失変異体MJ3-15をこの実験に使用した。独特にマウス毒性であるが、存続がもはやMタンパク質および/またはS C Pに依らないかもしれない変異体の選択を避けるために、培養物をマウスに継代しなかった。

CD1非近交系マウスに2 × 10⁸ C F Uの定常期連鎖球菌を鼻内に接種した。麻酔したマウスの鼻咽頭を8~10日間毎日スワブ標本をとり、ストレプトマイシンを含む血液寒天上に画線した。S C P⁺とS C P⁻の差は第1日目までに明らかであったが、しかし統計的に有意な差は第3日および第4日目までは観察されなかった(図5)。第4日目までに、M⁺S C P⁺連鎖球菌を感染させたマウスの18匹中9匹が陽性の咽喉培養物を生じたのに対して、M⁺S C P⁻連鎖球菌を感染させたマウスの18匹中2匹しか咽喉中に連鎖球菌を保持していなかった。18匹中4匹のマウスがS C P⁺連鎖球菌感染後に死亡した。S C P⁻連鎖球菌感染後には1匹も感染により死ななかった。血液寒天平板上のコロニーの数もS C P⁻連鎖球菌の一層迅速なクリアランスと一致していた。例えば、第3日目に、7匹のマウスからの培養物が>100 S C P⁺ C F Uを含んだのに対し、S C P⁻連鎖球菌を接種したマウスでは1匹だけが>100 C F Uを含んでいた。

M49連鎖球菌は皮膚感染に頻繁に関連づけられるので、上記実験をM6株、すなわち咽喉感染と頻繁に関連づけられる血清型、を使って上記実験を繰り返した。M6株UAB200と実施例1に上述した方法を使って、挿入変異体AK1.4株を作製した。AK1.4株もまた、野性型M6培養物よりも迅速に鼻咽頭から浄化された。上記実験は、マウス鼻咽頭中でのA群連鎖球菌の存続がS C Pに依存するということを確認する。上記実験に使用した全てのS C P⁻変異体がM⁺であり、すなわち新鮮なヒト血液による食作用に耐性であった。それでもなお、それらは鼻咽頭から浄化された。

実施例 4

精製組換えSCPA49によるマウスの鼻内免疫処置は鼻内チャレンジ後の定着を防止する

scpA49遺伝子の欠失形に相当するP C R断片を、CS101 M49型A群連鎖球菌(dSCP)から

10

20

30

40

50

クローニングした。この断片を、ヌクレオチド1033で始まる正プライマーとヌクレオチド3941で始まる逆プライマーを使ってP C Rにより増幅させた〔番号付け法はChen, C. & Cleary, P., "Complete nucleotide sequence of the streptococcal C5a peptidase gene of *Streptococcus pyogenes*," *J. Biol.Chem.*, 265:3161-3167 (1990)の方法に従った〕。該P C R断片をPharmacia Inc.からのpGEX-4T-1高発現ベクター上のグルタチオントランスフェラーゼ遺伝子のトロンビン結合部位に連結せしめた。scpAを含むpJC6と命名したプラスミドをブタペスト条約の規定に基づいて1996年10月15日にATCC (アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション) (12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 20852, USA)に寄託し、ATCC受託番号98225が付与された。

大腸菌クローンからトランスフェラーゼ - S C P融合タンパク質を発現させ、グルタチオン - セファロース 4 b カラム上でのアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。全ての方法が製造業者 (Pharmacia) により記載されている。ハイブリッドタンパク質からトロンビン消化により d S C Pを開裂せしめた。ベンズアミジン - セファロース 6 B カラム (Pharmacia) 上でのクロマトグラフィーにより溶出 S C Pからトロンビンを除去した。アフィニティー精製されたタンパク質はSDS-PAGEとウエスタンブロットにより純粋なSCPA49であることが確認された。ウサギを使って精製SCPA49に対して向けられた高度免疫抗血清を調製した。組換え S C Pはペプチダーゼとして機能的でなかった。

合計40 µgのタンパク質を5週間に渡り10 µlの容量で各外鼻孔に4回投与することにより、2グループのマウスを免疫した。対照マウスにはP B Sのみを投与した。感染前に5匹のマウスのグループからプールした血清は、ELISAにより高力価の抗SCPA49抗体を含むことが決定された。表2を参照のこと。

10

20

表 2
SCPに対する抗体 (I g G) の力価

実験	試料	免疫処置前	免疫処置後
I	ブール I	<1:10	1:320-1:640
	ブール II	<1:10	1:320
	ブール III	<1:10	1:640-1:1,280
SCP			
I	ブール I	<1:10	<1:10
	ブール II	<1:10	<1:10
	ブール III	<1:10	<1:10
PBS			
II	ブール I	<1:10	1:5,120
	ブール II	<1:10	1:2,560
	ブール III	<1:10	1:5,120
SCP			
II	ブール I	<1:10	<1:10
	ブール II	<1:10	<1:10
	ブール III	<1:10	<1:10
PBS			
III	ブール I	<1:10	1:800
	ブール II	<1:10	1:800
	ブール I	<1:10	<1:10
SCP			
III PBS	ブール I	<1:10	<1:10

最後の予防ブースター注射の7日後に、マウスを 3×10^8 C F U の野性型CS101Sm株によりチャレンジした。2つの別々の実験において、免疫マウスは感染の48時間後には連鎖球菌を含まなかった(図6;表3および4)。対照的に、ワクチン接種しなかった対照の30~50%は、6日間培養陽性のままであり、ある対照は感染から10日後にもまだ陽性であった

10

20

30

40

50

。それらの差はフィッシャー精密検定により統計的に有意であると決定された。免疫処置マウスと対照マウスの第三グループの感染も同様な結果を生じた。

この変異型SCPA49タンパク質に対して向けられた高力価ウサギ血清は、試験管内において完全なM1, M12およびM6連鎖球菌に関連するペプチダーゼ活性を中和することができた。これは該ペプチダーゼが血清型特異性を欠いていることを確証する。従って、ペプチダーゼとして機能的でないSCPであってもワクチンとして有効である。鼻腔内(i.n.)接種前のM49連鎖球菌とウサギ抗SCPとの予備インキュベーションがコロニー形成を減少させなかったことに注目すべきである。

表3: E. コリ DH5 α 中で発現させたSCPまたはPBSを鼻内にワクチン接種したマウスの鼻内チャレンジ後の連鎖球菌の咽喉培養物(ワクチン接種後のCFU)

10

マウス	チャレンジ後の日数									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PBSCT-II										
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	77	>200	150	4	11	3	0	51	97	53
4	9	>200	>200	3	11	3	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	4	6	45	47	3	>200	29	>200	83	70
7	15	194	>200	9	172	10	5	3	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	32	4	4	0	0	0	0	0	0
10	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	127	4	0	0	0	0	0	0	0	0
陽性の数	8	6	5	5	4	4	2	3	2	2
SCPAD-II										
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	35	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	21	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
陽性の数	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0

20

30

40

表 4 : E. コリ DH5 α 中で発現させたSCPまたはPBSを鼻内にワクチン接種したマウスの鼻内チャレンジ後の連鎖球菌の咽喉培養物（ワクチン接種後のCFU）

		チャレンジ後の日数									
マウス*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
PBSCT-I											
1	112	143	85	16	0	0	0	0	0	0	10
2	127	27	18	89	3	7	7	7	70	3	
3	>200	>200	>200	>200	>200	>200	>200	108	>200	66	
4	31	200	4	2	0	0	0	0	0	0	
5	4	0	0	3	3	0	0	0	0	0	
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
7	>200	>200	120	125	91	145	>200	>200	>200	166	
8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
11	37	>200	194	16	>200	47	>200	101	>200	>200	
陽性の数	8	6	6	7	5	4	4	4	4	4	
SCPAD-I											
1	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
2	105	41	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6	9	0	11	0	0	0	0	0	0	0	
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
8	26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
9	0	19	0	0	5	57	0	0	21	91	
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
11	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
陽性の数	7	2	1	0	1	1	0	0	1	1	30

* 1 回目の接種での細菌量が低すぎたためにマウスに2回接種した。

実施例 5

B 群連鎖球菌からの C 5 a ペプチダーゼは M12 および M49 A 群連鎖球菌からのものと配列がほとんど同じである

B 群連鎖球菌 C 5 a ペプチダーゼ (SCP B) 遺伝子をクローニングし、配列決定し、そして A 群連鎖球菌 M12 および M49 血清型からのものと比較した。上記実施例 4 に記載の方法を使って scpA12 配列の部分に相当するプライマーを用いた PCR により scpB 遺伝子全体を増幅させた。SCP B 遺伝子は、126,273 ダルトンの M_r を有する 1150 アミノ酸のタンパク質を特定する 3450bp の転写解読枠 (ORF) をコードする。SCP B のアミノ酸配列を図 2 に示す。M12 および M49 の A 群連鎖球菌からのものに対する scpBヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列の比較は、それぞれ 98% および 97% という高い類似性を示した。scpB は 2 つの C 末端反復配列と重なった 50bp の欠失を含み、scpA 遺伝子に対比して幾つかの別のわずかな相違を有した。両配列の整列は、scpA12 が実際は scpA49 よりも scpB の方に系統発生的に近いことを示した。血清型 III, III / R, II, I a / c, NT / c, NT / c / R1 を表す 30 個の株は 1 コピーの scpB を担持している。

発現ベクタープラスミド pGEX-4T-1 (ATCC 受託番号 98225) を使って組換え SCP を E. コリ中で発現させると、親の B 群連鎖球菌株 78-471 (型 II a + b) から抽出された酵素と同一であることがわかった。ウエスタンブロット分析は、組換え SCP が B 群連鎖球菌から

10

20

30

40

50

以前に精製された C 5 ase酵素と同じであることを示唆した。

実施例 6

SCPによる鼻内免疫処置は連鎖球菌感染に対する血清型無関係の免疫を誘導する

a) 菌株。連鎖球菌株CS101, CS210およびCS463は、血清乳白度陽性 (O F⁺) で、クラス IIで、それぞれ血清型 M49、M 2 および M11株の自然ストレプトマイシン耐性誘導体である。上記実施例 1 に記載した MJ3-15は、SCPA49遺伝子中に内部枠内欠失を有するCS101株である。連鎖球菌90-131株とUAB200株はO F⁻で、クラス Iで、それぞれ A 群連鎖球菌の血清型 M 1 および M 6 ヒト分離株の自然ストレプトマイシン耐性誘導体である。連鎖球菌は 2 % ネオペプトンもしくは 1 % 酵母エキスが補足されたトッド - ヒューイットブロス (T H Y) 中で、またはヒツジ血液寒天上で培養した。幾つかの実験では、ストレプトマイシン (200 μg/ml) またはエリスロマイシン (1 μg/ml) を含む培地中で連鎖球菌を増殖させた。エシェリキア・コリ (*Escherichia coli*) ER1821株 (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) を、熱感受性自己不活化ベクタープラスミド pG⁺host5のための受容細胞として使用した。プラスミド pG⁺host5はAppligene, Inc., Pleasanton, CAから入手した。プラスミド pG⁺host5を含む E . コリ ER1821は、300 μg/mlのエリスロマイシン (Erm) を含むルリア - ベルタニ (Luria-Bertani) ブロス中で39 °Cで増殖させた。

b) scpA挿入変異体の作製。scpA6挿入変異体AK1.4は実施例 1 に上述した通りに作製した。組換えプラスミド D N A pG::scpA1.2はscpA遺伝子の内部BglIII-HindIII断片を含有する。このプラスミドをUAB200受容細胞中にエレクトロポレーションにより導入し、形質転換体をエリスロマイシン含有 T H Y 寒天平板上で30 °Cにて選択した。プラスミド挿入断片と染色体 scpA6の間の組換えから生じた pG::scpA1.2の染色体組込み体であるAK1.4株を、エリスロマイシン含有寒天培地上での増殖により39 °Cにて選択した。scpA6中への挿入は、プローブとして scpA を使ったサザンブロット法と、該プラスミドに特異的な M13 万能プライマー (5' -GTAAAACGACGGCCAGT-3') (配列番号 6) と G A S の染色体 scpA に特異的な scpA For835プライマー (5' -AAGGACGACACATTGCGTA-3') (配列番号 7) を使った P C R により確かめた。

c) SCPAの作製、発現および精製。scpA49の2.9kb断片 (1033bpから3941bpまで) を、BamHI 認識配列を含む scpA 正プライマー (5' -CCCCCGGATCCACCAAAACCCACAAACTC-3') (配列番号 8) と scpA 逆プライマー (5' -GAGTGGCCCTCCAATAGC-3') (配列番号 9) を使った P C R により増幅せしめた。得られた P C R 生成物から SCPA タンパク質のシグナルペプチドと膜固定領域をコードする配列を削除した。まず P C R 生成物を BamHI で消化し、Pharmacia Inc. (Piscataway, NJ) からの pGEX-4T-1 高発現ベクター上のグルタチオン S - トランスフェラーゼ遺伝子のトロンピン認識部位に連結せしめた。得られた組換えプラスミドを E . コリ DH5 中に形質転換せしめた。1つの形質転換体 E . コリ (pJC6) からの SCPA 融合タンパク質を、グルタチオン - セファロース 4 B カラム上でのアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。トロンピンでの消化後、ベンズアミジン - セファロース 6 B カラム上でのクロマトグラフィーによりトロンピンを除去した。発現および精製方法は製造業者により記載された通りであった。このアフィニティー精製された、端が切り取られた SCPA タンパク質は、P M N 付着アッセイ (上記実施例 1 に記載) により試験するとペプチダーゼ活性を欠いていた。

d) ウエスタンブロット技術。連鎖球菌からのムタノリシン抽出物を上記実施例 1 に記載の通りに調製した。概説すると、連鎖球菌一晚培養物100mlをペレット化し、氷冷0.2M酢酸ナトリウム (pH5.2) 中で2回洗浄した。該ペレットを1mlの T E - ショ糖緩衝液 (1mM Tris, 1mM EDTA および 20% ショ糖) 中に40 μl のムタノリシンと共に懸濁した。該混合物を37 °Cで2時間回転した後、1500 × g で5分間遠心分離した。得られた上清にフェニルメチルスルホニルフルオリド (100mM) を添加した。上記実施例 1 に記載したのと同様にウエスタンブロットを実施した。アフィニティー精製した組換え SCPA タンパク質を使ったウサギの免疫処置により、抗SCP A抗体を調製した。

e) P M N 付着アッセイおよび中和アッセイ。P M N 付着アッセイを使って SCPA 活性を測定した。組換えヒト C 5 a (rhC5a; C5788; Sigma, St. Louis, Mo) を完全な細菌細胞と

10

20

30

40

50

共に37℃で45分間インキュベートした。PMNを活性化する能力〔マイクロタイタープレートの上清血清アルブミン(BSA)被覆ウエルに付着するようになる〕により残余rhC5aを測定した。S.A. Booth他、“Dapsone Suppresses Integrin-Mediated Neutrophil Adherence Function,” *J. Invest. Dermatol.*, 98, 135-140頁(1992)。PMNは上記実施例1に記載した通りにフィコール-ハイパック中での密度勾配遠心により新鮮なヒト血液から単離した。PMN付着アッセイを使ってウサギ抗SCPA血清によるSCPA活性の中和をアッセイした。0.5% BSA-PBS中の約 1×10^7 個の加熱不活性化した死菌を1.4mlのウサギ抗SCPA49血清または正常ウサギ血清と共に37℃で1時間回転させた。次いで40 μ lの0.5% BSA-PBS緩衝液中に再懸濁し、rhC5aと共に45分間インキュベートした後、PBS付着アッセイにより残余の走化性因子を測定した。

10

f) 食作用アッセイ。試験管内ヒト血液食作用アッセイは、R.C. Lancefield, “Differentiation of Group A Streptococci with a Common R Antigen into Three Serological Types, with Special Reference to Bactericidal Test,” *J. Exp. Med.*, 106:525-685頁(1957)に記載された通りに実施した。簡単に言えば、A群連鎖球菌の対数期培養物をTHY中で $10^3 \sim 10^4$ CFU/mlに希釈した。希釈した培養物の1/10mlとヒト血液0.9mlを混合し、37℃で3時間回転させた。血液寒天培地上での希釈試料の平板培養により、初期生存菌数と3時間回転後の生存菌数を測定した。

g) マウス鼻内感染モデル。20%正常ウサギ血清を含むトッド-ヒューイトブロス中で増殖させそして10 μ lのPBS中に再懸濁したチャレンジ用連鎖球菌株の16時間培養物($1 \times 10^8 \sim 9 \times 10^8$ CFU)を、体重25gの雌CD1マウス(Charles River Breeding Laboratories, Inc., Wilmington, MA)またはBALB/cマウス(Sasco, Omaha, NE)の鼻内に投与した。血液寒天平板上での培養物希釈液の平板培養により生存菌数を測定した。麻酔したマウスから接種後6~10日間に渡り毎日咽喉スワブ標本を採取し、200ug/mlストレプトマイシンを含む血液寒天平板上に画線した。37℃で一晩インキュベーションした後、平板上の溶血コロニーの数を計数した。ストレプトマイシン耐性により全てのチャレンジ株をマーキングして、それらの株と正常微生物叢中に存続するかもしれない溶血菌とを区別した。咽喉スワブ標本をストレプトマイシン含有の血液寒天上で培養した。1つの溶血コロニーの存在を陽性培養とみなした。

20

h) 免疫処置およびチャレンジプロトコール。4週齢の非近交系CD1雌マウスを、10 μ lのPBS中の20 μ gのアフィニティー精製済SCPA49を各々の外鼻孔に投与することにより免疫処置した。マウスを1日おきに3回免疫処置し、3回目の免疫処置から3週間後に再び追加免疫した。2週間あけた後、マウスを再び追加免疫した。D. Bessen他、“Influence of Intranasal Immunization with Synthetic Peptides Corresponding to Conserved Epitopes of M Protein on Mucosal Colonization by Group A Streptococci,” *Infect. Immun.*, 56, 2666-2672頁(1988)。対照マウスにはPBSのみを投与した。感染前に、SCPAタンパク質で免疫処置した全てのマウスをELISAにより測定すると、それらの血清および唾液中に高力価のSCPA抗原に対する抗体を有していた。A群連鎖球菌のCS101株(2.0×10^8 CFU)、CS210株(3.6×10^8 CFU)、CS463株(7.8×10^8 CFU)、90-131株(3.4×10^8 CFU)およびUAB200株(9.6×10^8 CFU)を使って、最終ワクチン追加免疫の7日後にマウスを鼻内チャレンジした。動物実験はNational Institutes of Healthのガイドラインに従って実施した。

30

40

i) 試料採取およびELISA。免疫処置後に麻酔したマウスから血液試料と唾液試料を採取した。全ての血清を上記した通りにELISAによってSCPA49抗体の存在について試験した。S.P. O'Connor他、“The Human Antibody Response to Streptococcal C5a Peptides,” *J. Infect. Dis.*, 163, 109-116頁(1990)。0.05M炭酸水素塩緩衝液(pH9.6)中500ngの精製タンパク質を添加することにより、精製済SCPA49タンパク質をマイクロタイターウエルに結合させた。4℃で一晩インキュベーションした後、ウエルを洗浄し、PBS中0.5% BSAを使って1時間ブロックした。100 μ lの0.1%ピロカルピン(Sigma)溶液の皮下注射によりマウスにおいて唾液分泌を刺激した。唾液試料を採取し、エッペンドルフ超遠心管中で14,000rpmにて5分間回転させた。その上清をSCPA49タンパク質に対する分

50

泌型IgAの存在についてELISAにより試験した。ELISA力価は、 OD_{405} 0.1を有した各血清および唾液の最大希釈度を表す。

j) 統計分析。動物実験からのデータを解析するのに²検定を使った。＜0.05のP値を有意とみなした。

初めに、マウスの鼻咽頭における野性型および同系SCPA⁻変異型連鎖球菌の定着（コロニー形成）能力を調べた。親培養物と変異体培養物からの細胞表面タンパク質のムタノリン抽出物を、SCPA特異血清を使ったウエスタンブロット法により分析した。変異体がSCPAを欠くことを確かめた。SCPA⁻変異体AK1.4およびMJ3-15の抽出物は抗SCPA血清と反応しなかった。野性型CS101株とUAB200株からの抽出物においては予想通りのサイズのSCPAタンパク質が観察された。rhC5aを破壊する能力を比較することにより、変異株AK1.4とMJ3-15がC5aペプチダーゼ活性を生産できないことが確認された。単離されたPMNをrhC5aに暴露すると、それらをBSA被覆マイクロタイターウエルに付着するように誘導した。連鎖球菌または精製SCPAとのインキュベーションはrhC5aを特異的に開裂せしめ、PMNを活性化するその能力を変更した。残余rhC5aに反応しそしてBSA被覆ウエルに結合したPMNを染色し、次いで分光光度測定した。rhC5aと親培養物UAB200およびCS101とのインキュベーションは、rhC5aを破壊し、PMN付着をそれぞれ58.8%および54.5%阻害した。対照的にSCPA⁻変異体AK1.4およびMJ3-15は、rhC5aを変更せずまたはBSA被覆ウエルへのPMNの付着を変更しなかった（表5）。この実験は上記ウエスタンブロットの結果を確認し、そしてSCPA⁻培養物がrhC5aを分解するかもしれない別のプロテアーゼを含まないことを証明した。

表5：野性型株および変異型株の食作用アッセイとPMN付着アッセイ

株	タイプ	コロニー形成単位 cfu/ml		cfu/ml の増加 倍率	C5aで誘導 されるPMN 付着の阻害率*
		時間=0 h	時間=3 h		
UAB200	M6 ⁺ , SCPA ⁺	1.8×10^3	7.2×10^4	40	58.8
AK1.4	M6 ⁺ , SCPA ⁻	1.2×10^3	4.5×10^4	37.5	0
CS101	M49 ⁺ , SCPA ⁺	1.0×10^4	4.9×10^5	49	54.5
MJ3-15	M49 ⁺ , SCPA ⁻	1.5×10^4	2.1×10^5	14	0

* 阻害率 = $\left[\left(C5a \text{ のみにより活性化されたPMNの } OD_{570nm} - \text{細菌と予備インキュベートしたC5aにより活性化されたPMNの } OD_{570nm} \right) / \left(C5a \text{ のみにより活性化されたPMNの } OD_{570nm} \right) \right] \times 100 \%$

Mタンパク質発現がscpA中の突然変異により影響されるとは思われなかったけれども、SCPA⁻変異体連鎖球菌がまだMタンパク質を発現するかどうかおよび食作用に耐える能力を有するかどうかを評価するためにアッセイを実施した。3時間インキュベーションによる新鮮なヒト血液中での連鎖球菌の増殖は、その表面上に抗食作用性Mタンパク質が存在することの現れである。R.C. Lancefield, "Differentiation of Group A Streptococci with a Common R Antigen into Three Serological Types, with Special Reference to Bactericidal Test," J. Exp. Med., 106, 525-685頁 (1957)。予想通り、親の連鎖球菌UAB200とCS101はそれぞれ40倍と49倍増加した（表5）。M⁺SCPA⁻培養株AK1.4およびMJ3-15は、それぞれ37.5倍と14倍増加した。このことは、scpA変異がMタンパク質発現にもヒト全血中での食作用に対する耐性にもほとんど影響がなかったことを確認する。循環血液中での2つの変異体株の幾分弱い増殖は再現性があり、予想外であった。ヒト血漿中での変異体と親培養物の増殖速度は区別不可能であった。SCPAの不活性化がC5aを循環血液中に蓄積させ、次いでそれがPMNを活性化するのかもしれない。活性化されたPMNはより一層食作用力があり、より多くM⁺連鎖球菌を殺すことができる。抗M49抗血清と抗M6抗血清を使ったウエスタンブロットにより分析すると表面タンパク質抽出物はM6およ

びM49抗原を含んでおり、これはSCPA中の変異がMタンパク質発現を変更しないことを確認した。

次に、鼻咽頭への定着にC5aペプチダーゼが必要であるかどうかを調べた。鼻咽頭に定着する野性型およびSCPA⁺連鎖球菌の相対能力を評価するためにCD-1非近交系マウスに鼻内接種した。麻酔したマウスから1～10日間に渡り毎日咽喉スワブ標本を採取し、問題の株に選択的な抗生物質を含有する血液寒天平板上に画線した。M6株UAB200を使った先行研究を確かめるためにこの株の感染用にBALB/cマウスを使った。D. Bessen他、“Influence of Intranasal Immunization with Synthetic Peptides Corresponding to Conserved Epitopes of M Protein on Mucosal Colonization by Group A Streptococci,” *Infect. Immun.*, 56, 2666-2672頁(1988)。5日目までにマウスの約50%の定着を生じる接種材料サイズを最初に決定した。接種後3～9日目にM⁺SCPA⁺型とM⁺SCPA⁻型の間に有意な差が観察された。4日目まで、株CS101を感染させたマウスの50%(18匹のうちの9匹)がまだ陽性咽喉培養物を生じ、一方でMJ3-15を感染させたマウスの11%(18匹のうち2匹)だけがそれらの咽喉中に連鎖球菌を保持していた。血液寒天平板上でのコロニーの数の差も、M⁺SCPA⁻型連鎖球菌の迅速なクリアランスと一致していた。野性型連鎖球菌を感染させたマウスからの陽性培養物の59%(54匹のうち31匹)が>100CFUを含んだのに対し、SCPA⁻型連鎖球菌を感染させた動物からの陽性培養物のわずか14%(14匹のうち2匹)が>100CFUを含んでいた(P<0.001で統計的に有意)。更に、M⁺SCPA⁺型連鎖球菌感染からマウスの22%(18匹のうち2匹)が死亡した。M⁺SCPA⁻型連鎖球菌感染からは1匹のマウスも死亡しなかった。この差も統計的に有意であった(P<0.05)。CS101株のSCP A49⁺変異体とSCPA49⁻変異体の比較をもう2回繰り返したが同様な結果を生じた。

OF⁺株とOF⁻株により生じる病気のスペクトルが有意に異なるために、OF⁻血清型であるM6型によるコロニー形成に対するSCPAの効果も調べた(図7)。同様にSCPA⁻株AK1.4は親株のUAB200よりも迅速に浄化された。感染後4日目には全てのマウスが咽喉から完全にSCPA⁻連鎖球菌を浄化したのに対して、野性型連鎖球菌を感染させたマウスの30%が培養陽性のままであった。全ての陽性培養物の98%以上が、血液寒天平板上で複数個のコロニーを形成した。この実験では、接種後5日目までに全てのマウスが連鎖球菌から開放された。

次の段階は動物を免疫処置するのにSCPが使用できるかどうかを調べることであった。初めに、免疫処置実験用にSCPA49タンパク質の酵素的不活性形態を作製した。PCRにより追加のBamHI認識配列を有する2908bp scpA49断片を得、それをBamHIとSmaIで消化しておいたプラスミドpGEX-4T-1中に連結せしめた。プラスミドpJC6と称するこの構成物中、scpA49配列はグルタチオントランスフェラーゼ遺伝子に枠内融合された。連鎖球菌挿入断片はscpAシグナル配列または細胞壁固定配列を含まなかった(図8)。精製 SCPA49タンパク質のワクチン製剤をSDS-PAGEとウエスタンブロットにより評価して純度を確認した。精製 SCPA49製剤中の幾つかのタンパク質バンドが、組換え SCPA49タンパク質に対して向けられたポリクローナルウサギ抗血清と反応した。その主要バンドのサイズは、SCPA49の欠失形態の推定サイズに相当する約100kDであった。それより小さいバンドはSCPAの分解生成物であると思われる、これはE. コリ中で過剰発現されるタンパク質に共通の特徴である。抗血清は、連鎖球菌挿入断片を持たないE. コリDH5 (pGEX-4T-1)から単離されたとのタンパク質とも反応しなかった。上述した手順は、定期的に1Lの培養物から2～3mgの高純度 SCPA49タンパク質を与えた。精製 SCPA49タンパク質はPMN付着アッセイにより評価するとC5aペプチダーゼ活性を持たないことがわかった。

第二に、サブユニット SCPA49ワクチンの免疫原性を評価した。ウサギを精製 SCPA49により免疫処置した。ELISAにより測定するとそのウサギは SCPA49タンパク質に対する高レベルの抗体を産生した。精製 SCPA49免疫原は機能的活性を欠いているにもかかわらず、高度免疫ウサギ抗血清は試験管内で精製済の野性型SCPA49酵素のペプチダーゼ活性を中和することができた。更に、SCPA49タンパク質に対する未希釈のウサギ抗血清は、非相同の血清型に関連するC5aペプチダーゼ活性を中和することができた。無傷のM1, M6およびM12連鎖球菌に関連するC5aペプチダーゼ活性がこの抗血清によって阻害され

10

20

30

40

50

たことは、SCPA49タンパク質に対する抗体が多くの異なる血清型に対して広い交差反応性を有するということの確証である。

また、10匹の免疫処置マウスと10匹の対照マウスから血清試料と唾液試料を採取し、アジュバントを使わない鼻内ルートによって投与した時のSCPA49タンパク質の免疫原性を評価した。精製SCPA49タンパク質で免疫処置したマウスは、PBSを投与した対照マウスに比べて高力価のSCPA特異的IgGを血清中に産生した。SCPA49に対して向けられた血清IgGの力価は、1:10,240~1:20,480であった。対比して、対照マウスのSCPA特異的IgG力価は血清中に検出できなかった。精製SCPA49タンパク質で免疫処置したマウスは、対照マウスに比較してSCPA49特異的唾液IgAの有意な増加も示した。免疫処置マウスの唾液中の特異的IgA力価は1:16よりも大きかった。対比して、対照マウスの唾液中のSCPA49特異的IgAは検出できなかった。それぞれ1/2560希釈した血清中および1/2希釈した唾液中のIgGおよびIgAの相対濃度を図9に示す。これらの結果は、精製SCPA49タンパク質が、鼻内投与するとマウスに特異的な全身性および分泌型抗体応答を誘導する有効な免疫原であることを証明する。

第三に、C5aペプチダーゼでの免疫処置が鼻咽頭からの連鎖球菌の浄化（クリアランス）を増強するかどうかを調べるために実験を行った。高レベルの抗SCPA抗体を含む高度免疫ウサギ血清およびヒト血清の両方が試験管内でSCPA活性を中和することができる。S.P. O'Connor他、"The Human Antibody Response to Streptococcal C5a Peptidase," J. Infect. Dis., 163, 109-116 (1990)。SCPAが口腔粘膜への定着を有意に促進するという事実は、精製SCPA49によるマウスの免疫処置が連鎖球菌の鼻咽頭定着能力を低下できることを示唆する。この可能性を調査するために、アフィニティー精製した遺伝子不活性化SCPAによりマウスを鼻内で免疫処置した。端が切り取られたタンパク質SCPA49をアジュバントも担体も使わずに鼻内に投与した。野性型M⁺SCPA⁺連鎖球菌によるワクチン接種マウスの咽頭定着は、精製SCPA49タンパク質の2種類の別製剤を使ってワクチン接種したマウスを使う3つの独立した実験において、PBSを投与したマウスとは有意に異なっていた（代表的データは図10に示される）。SCPA49タンパク質で免疫処置した13匹のマウスのうちの1匹だけが、接種後10日目に連鎖球菌について培養陽性であった（図10）。対比して、ワクチン接種しない対照マウスの30~58%が6日間培養陽性のままであり、何匹かは感染後10日目にまだ陽性であった。血液寒天平板上の溶血型でストレプトマイシン耐性のコロニーの数も、SCPA49ワクチン接種マウスと対照マウスとの間に有意差を示した。別の免疫処置マウスのグループは、非免疫処置対照よりも鼻咽頭から有意に迅速に血清型M49連鎖球菌を浄化した。

最後に、ある血清型のSCPが別の血清型からの感染に対して動物を予防するかどうかを調べた。A群連鎖球菌の血清型は80種類以上存在する。有効なワクチンは複数の連鎖球菌血清型による感染を予防するものである。血清型M2, M11, M1およびM6のA群連鎖球菌のコロニー形成に対する交差感染防御が観察された。血清型M49連鎖球菌からのSCPA49タンパク質に対して向けられたウサギ血清が数種類の異なる血清型に関連したペプチダーゼ活性を中和したという事実は、単一のサブユニットワクチンによる鼻内免疫処置がそれらの血清型による咽頭定着を低減または排除するかもしれないということを示唆した。この可能性を調査するために、上述のアフィニティー精製したSCPA49タンパク質の鼻内接種により20匹のマウスから成る4グループを免疫処置した。対照マウスにはPBSを投与した。連鎖球菌でチャレンジする前に、無作為に選んだ免疫処置マウスと対照マウスからの血清試料と唾液試料を抗SCPA抗体についてアッセイした。試験した全ての免疫処置マウスが強力な血清抗体応答と測定可能な唾液抗体応答を発生していた。4つの血清型の菌株によるSCPA49タンパク質で免疫処置したマウスの咽頭コロニー形成が全て、非免疫処置対照に比較して減少した。その差は接種後3日目および5日目に有意であった（表6）。

表 6 : 免疫防御は血清型無関係である

	接種後 3 日目				接種後 5 日目			
	非免疫 (+ / 合計) %	免疫 (+ / 合計) %	非免疫 (+ / 合計) %	免疫 (+ / 合計) %	非免疫 (+ / 合計) %	免疫 (+ / 合計) %	非免疫 (+ / 合計) %	免疫 (+ / 合計) %
M2	10 / 19	52.6	2 / 19*	10.5	3 / 19	15.8	1 / 19	5.2
M11	17 / 20	85	11 / 20*	55	8 / 20	40	2 / 20*	10
M1	16 / 19	84.2	11 / 19	57.9	7 / 19	37	2 / 19*	10.5
M6	14 / 20	70	12 / 19	63.2	8 / 20	40	4 / 19	21.1

＋は培養陽性マウスを意味する。＊免疫マウスと非免疫マウスの間の差が統計的に有意である ($P < 0.05$)。P 値は χ^2 検定により計算した。

血清型 M 2 , M11および M 1 株を接種した免疫処置マウスと対照マウスとの間に統計的に有意な差が観察された。しかしながら、O F +血清型 M 2 および M11は O F - 株の M 1 および M 6 よりも一層効率的に除去された。免疫処置マウスの M 1 連鎖球菌定着は、対照マウスに比較してかなり減少した。免疫処置マウスのわずか10.5%が感染後5日目に培養陽性であった。対比して、対照マウスの37%がこの株に関して培養陽性であった。免疫処置マウスは M 6 連鎖球菌をより迅速に除去したように見えるけれども、その差は統計的に有意でなかった。予備実験と同様に、血液寒天平板上の溶血連鎖球菌コロニーの数は対照動物から採取した試料よりもワクチン接種したマウスから採取した試料のほうが有意に少なかった。よって、SCPA49タンパク質は別の連鎖球菌血清型に対して交差防御免疫を提供する有効なワクチンであった。

本発明を様々な特定の好ましい態様と技術に関して記載してきたが、本発明の範囲内において様々な変更および修正を行い得るということを理解すべきである。

配 列 表

一般情報

出願人の名称 : Regents of the University of Minnesota

発明の名称 : 連鎖球菌 C 5 a ペプチダーゼワクチン

配列の総数 : 9

優先権の基礎となる出願 :

出願番号 : 08/589,756

出願日 : 1996年 1 月22日

配列番号 : 1

配列の長さ : 1164アミノ酸

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Leu Arg Lys Lys Gln Lys Leu Pro Phe Asp Lys Leu Ala Ile Ala Leu
 1 5 10 15
 Met Ser Thr Ser Ile Leu Leu Asn Ala Gln Ser Asp Ile Lys Ala Asn
 20 25 30
 Thr Val Thr Glu Asp Thr Pro Ala Thr Glu Gln Ala Val Glu Thr Pro
 35 40 45
 Gln Pro Thr Thr Val Ser Glu Glu Val Pro Ser Ser Lys Glu Thr Lys
 50 55 60
 Thr Pro Gln Thr Pro Asp Asp Ala Glu Glu Thr Val Ala Asp Asp Ala
 65 70 75 80
 Asn Asp Leu Ala Pro Gln Ala Pro Ala Lys Thr Pro Asp Thr Ser Ala
 85 90 95
 Thr Ser Lys Ala Thr Ile Arg Asp Leu Asn Asp Pro Ser Gln Val Lys
 100 105 110

Thr Leu Gln Glu Lys Ala Gly Lys Gly Ala Gly Thr Val Val Ala Val
 115 120 125
 Ile Asp Ala Gly Phe Asp Lys Asn His Glu Ala Trp Arg Leu Thr Asp
 130 135 140
 Lys Ala Lys Ala Arg Tyr Gln Ser Lys Glu Asp Leu Glu Lys Ala Lys
 145 150 155 160
 Lys Glu His Gly Ile Thr Tyr Gly Glu Trp Val Asn Asp Lys Val Ala
 165 170 175
 Tyr Tyr His Asp Tyr Ser Lys Asp Gly Lys Thr Ala Val Asp Gln Glu
 180 185 190
 His Gly Thr His Val Ser Gly Ile Leu Ser Gly Asn Ala Pro Ser Glu
 195 200 205
 Thr Lys Glu Pro Tyr Arg Leu Glu Gly Ala Met Pro Glu Ala Gln Leu
 210 215 220
 Leu Leu Met Arg Val Glu Ile Val Asn Gly Leu Ala Asp Tyr Ala Arg
 225 230 235 240
 Asn Tyr Ala Gln Ala Ile Arg Asp Ala Val Asn Leu Gly Ala Lys Val
 245 250 255
 Ile Asn Met Ser Phe Gly Asn Ala Ala Leu Ala Tyr Ala Asn Leu Pro
 260 265 270
 Asp Glu Thr Lys Lys Pro Phe Val Tyr Ala Lys Ser Lys Gly Val Arg
 275 280 285
 Ile Val Thr Thr Ala Gly Asn Asp Ser Ser Phe Gly Gly Lys Thr Arg
 290 295 300
 Leu Pro Leu Ala Asp His Pro Asp Tyr Gly Val Val Gly Thr Pro Ala
 305 310 315 320
 Ala Ala Asp Ser Thr Leu Thr Val Ala Ser Tyr Ser Pro Asp Asn Gln
 325 330 335
 Leu Thr Glu Thr Ala Met Val Lys Thr Asp Asp Gln Gln Asp Lys Glu
 340 345 350
 Met Pro Val Leu Ser Thr Asn Arg Phe Glu Pro Asn Lys Ala Tyr Asp
 355 360 365
 Tyr Ala Tyr Ala Asn Arg Gly Met Lys Glu Asp Asp Phe Lys Asp Val
 370 375 380
 Lys Gly Lys Ile Ala Leu Ile Glu Arg Ser Asp Ile Asp Phe Thr Asp
 385 390 395 400

10

20

30

40

Lys Ile Ala Asn Ala Lys Lys Ala Gly Ala Val Gly Val Leu Ile Tyr
 405 410 415
 Asp Asn Gln Asp Lys Gly Phe Pro Ile Glu Leu Pro Asn Val Asp Gln
 420 425 430
 Met Pro Ala Ala Phe Ile Ser Arg Lys Asp Gly Leu Leu Leu Lys Asp
 435 440 445
 Asn Ser Gln Lys Thr Ile Thr Phe Asn Ala Thr Pro Lys Val Leu Pro
 450 455 460
 Thr Ala Ser Gly Thr Lys Leu Ser Arg Phe Ser Ser Trp Gly Leu Thr
 465 470 475 480
 Ala Asp Gly Asn Ile Lys Pro Asp Ile Ala Ala Pro Gly Gln Asp Ile
 485 490 495
 Leu Ser Ser Ala Ala Asn Asn Lys Tyr Ala Lys Leu Ser Gly Thr Ser
 500 505 510
 Met Ser Ala Pro Leu Val Ala Val Ile Met Gly Leu Leu Gln Lys Gln
 515 520 525
 Tyr Glu Thr Gln Tyr Pro Asp Met Thr Gln Ser Glu Arg Leu Asp Leu
 530 535 540
 Ala Lys Lys Val Leu Met Ser Ser Ala Thr Ala Leu Tyr Asp Glu Asp
 545 550 555 560
 Glu Lys Ala Tyr Phe Ser Pro Arg Gln Gln Gly Ala Gly Ala Val Asp
 565 570 575
 Ala Lys Lys Ala Ser Glu Ala Thr Met Tyr Val Thr Asp Lys Asp Asn
 580 585 590
 Thr Ser Ser Lys Val His Leu Asn Asn Val Ser Asp Lys Phe Glu Val
 595 600 605
 Thr Val Thr Val His Asn Lys Ser Asp Lys Pro His Glu Leu Tyr Tyr
 610 615 620
 Gln Ala Thr Val Gln Thr Asp Lys Val Asp Gly Lys His Phe Ala Leu
 625 630 635 640
 Ala Pro Lys Ala Leu Ile Glu Thr Ser Trp Gln Lys Ile Thr Ile Pro
 645 650 655
 Ala Asn Ser Ser Lys Gln Val Thr Ile Pro Ile Asp Ile Ser Gln Phe
 660 665 670
 Ser Lys Asp Leu Leu Ala Gln Met Lys Asn Gly Tyr Phe Leu Glu Gly
 675 680 685

10

20

30

40

Phe Val Arg Ile Lys Gln Asp Pro Thr Lys Glu Glu Leu Met Ser Ile
 690 695 700
 Pro Tyr Ile Gly Phe Arg Gly Asp Phe Gly Asn Leu Ser Ala Leu Glu
 705 710 715 720
 Lys Pro Leu Tyr Asp Ser Lys Asp Gly Ser Ser Tyr Tyr His Glu Glu
 725 730 735
 Ile Ser Asp Ala Lys Asp Gln Leu Asp Gly Asp Gly Leu Gln Phe Tyr
 740 745 750
 Ala Leu Lys Asn Asp Phe Thr Ala Leu Thr Thr Glu Ser Asn Pro Trp
 755 760 765
 Thr Ile Ile Asn Val Val Lys Glu Gly Val Glu Asn Ile Glu Asp Ile
 770 775 780
 Glu Ser Ser Glu Ile Thr Glu Thr Ile Phe Ala Gly Thr Phe Ala Lys
 785 790 795 800
 Gln Asp Asp Asp Arg His Tyr Tyr Ile His Arg His Ala Asn Gly Lys
 805 810 815
 Pro Tyr Ala Ala Ile Ser Pro Asn Gly Asp Gly Asn Arg Asp Tyr Val
 820 825 830
 Gln Phe His Gly Thr Phe Leu Arg Asn Ala Lys Asn Leu Val Ala Glu
 835 840 845
 Val Leu Asp Lys Glu Gly Asn Val Val Trp Thr Ser Glu Val Thr Glu
 850 855 860
 Gln Val Val Lys Asn Tyr Asn Asn Asp Leu Ala Ser Thr Leu Gly Ser
 865 870 875 880
 Thr Arg Phe Glu Ile Ser Arg Trp Asp Gly Lys Asp Lys Asp Ala Lys
 885 890 895
 Val Val Ala Asn Gly Thr Tyr Thr Tyr Arg Val Arg Tyr Thr Pro Ile
 900 905 910
 Ser Ser Gly Ala Lys Glu Gln His Thr Asp Phe Asp Val Ile Val Asp
 915 920 925
 Asn Thr Thr Pro Glu Val Ala Thr Ser Ala Thr Phe Ser Thr Glu Asp
 930 935 940
 Arg Arg Leu Thr Leu Ala Ser Lys Pro Gln Thr Ser Gln Pro Val Tyr
 945 950 955 960
 Arg Glu Arg Ile Ala Tyr Thr Tyr Met Asp Glu Asp Leu Pro Thr Thr
 965 970 975

10

20

30

40

Glu Tyr Ile Ser Pro Asn Glu Asp Gly Thr Phe Thr Leu Pro Glu Glu
980 985 990

Ala Glu Thr Met Glu Gly Ala Thr Val Pro Leu Lys Met Ser Asp Phe
995 1000 1005

Thr Tyr Val Val Glu Asp Met Ala Gly Asn Ile Thr Tyr Thr Pro Val
1010 1015 1020

Thr Lys Leu Leu Glu Gly His Ser Asn Lys Pro Glu Gln Asp Gly Ser
1025 1030 1035 1040

Asp Gln Ala Pro Asp Lys Lys Pro Glu Thr Lys Pro Glu Gln Asp Gly
1045 1050 1055

Ser Asp Gln Ala Pro Asp Lys Lys Pro Glu Thr Lys Pro Gly Gln Asp
1060 1065 1070

Gly Ser Gly Gln Thr Pro Asp Lys Lys Pro Glu Thr Lys Pro Glu Lys
1075 1080 1085

Asp Ser Ser Gly Gln Thr Pro Gly Lys Thr Pro Gln Lys Gly Gln Pro
1090 1095 1100

Ser Arg Thr Leu Glu Lys Arg Ser Ser Lys Arg Ala Leu Ala Thr Lys
1105 1110 1115 1120

Ala Ser Thr Arg Asp Gln Leu Pro Thr Thr Asn Asp Lys Asp Thr Asn
1125 1130 1135

Arg Leu His Leu Leu Lys Leu Val Met Thr Thr Phe Phe Leu Gly Leu
1140 1145 1150

Val Ala His Ile Phe Lys Thr Lys Arg Thr Glu Asp
1155 1160

10

20

30

配列番号 : 2

配列の長さ : 1167アミノ酸

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Leu Arg Lys Lys Gln Lys Leu Pro Phe Asp Lys Leu Ala Ile Ala Leu
 1 5 10 15
 Met Ser Thr Ser Ile Leu Leu Asn Ala Gln Ser Asp Ile Lys Ala Asn
 20 25 30
 Thr Val Thr Glu Asp Thr Pro Val Thr Glu Gln Ala Val Glu Thr Pro
 35 40 45
 Gln Pro Thr Ala Val Ser Glu Glu Val Pro Ser Ser Lys Glu Thr Lys
 50 55 60
 Thr Pro Gln Thr Pro Asp Asp Ala Glu Glu Thr Ile Ala Asp Asp Ala
 65 70 75 80
 Asn Asp Leu Ala Pro Gln Ala Pro Ala Lys Thr Ala Asp Thr Pro Ala
 85 90 95
 Thr Ser Lys Ala Thr Ile Arg Asp Leu Asn Asp Pro Ser Gln Val Lys
 100 105 110
 Thr Leu Gln Glu Lys Ala Gly Lys Gly Ala Gly Thr Val Val Ala Val
 115 120 125
 Ile Asp Ala Gly Phe Asp Lys Asn His Glu Ala Trp Arg Leu Thr Asp
 130 135 140
 Lys Thr Lys Ala Arg Tyr Gln Ser Lys Glu Asp Leu Glu Lys Ala Lys
 145 150 155 160
 Lys Glu His Gly Ile Thr Tyr Gly Glu Trp Val Asn Asp Lys Val Ala
 165 170 175
 Tyr Tyr His Asp Tyr Ser Lys Asp Gly Lys Thr Ala Val Asp Gln Glu
 180 185 190
 His Gly Thr His Val Ser Gly Ile Leu Ser Gly Asn Ala Pro Ser Glu
 195 200 205
 Thr Lys Glu Pro Tyr Arg Leu Glu Gly Ala Met Pro Glu Ala Gln Leu
 210 215 220
 Leu Leu Met Arg Val Glu Ile Val Asn Gly Leu Ala Asp Tyr Ala Arg
 225 230 235 240
 Asn Tyr Ala Gln Ala Ile Arg Asp Ala Val Asn Leu Gly Ala Lys Val
 245 250 255
 Ile Asn Met Ser Phe Gly Asn Ala Ala Leu Ala Tyr Ala Asn Leu Pro
 260 265 270
 Asp Glu Thr Lys Lys Ala Phe Asp Tyr Ala Lys Ser Lys Gly Val Ser
 275 280 285

10

20

30

40

Ile Val Thr Ser Ala Gly Asn Asp Ser Ser Phe Gly Gly Lys Thr Arg
 290 295 300
 Leu Pro Leu Ala Asp His Pro Asp Tyr Gly Val Val Gly Thr Pro Ala
 305 310 315 320
 Ala Ala Asp Ser Thr Leu Thr Val Ala Ser Tyr Ser Pro Asp Lys Gln
 325 330 335
 Leu Thr Glu Thr Ala Met Val Lys Thr Asp Asp Gln Gln Asp Lys Glu
 340 345 350
 Met Pro Val Leu Ser Thr Asn Arg Phe Glu Pro Asn Lys Ala Tyr Asp
 355 360 365
 Tyr Ala Tyr Ala Asn Arg Gly Met Lys Glu Asp Asp Phe Lys Asp Val
 370 375 380
 Lys Gly Lys Ile Ala Leu Ile Glu Arg Gly Asp Ile Asp Phe Lys Asp
 385 390 395 400
 Lys Val Ala Asn Ala Lys Lys Ala Gly Ala Val Gly Val Leu Ile Tyr
 405 410 415
 Asp Asn Gln Asp Lys Gly Phe Pro Ile Glu Leu Pro Asn Val Asp Gln
 420 425 430
 Met Pro Ala Ala Phe Ile Ser Arg Lys Asp Gly Leu Leu Leu Lys Asp
 435 440 445
 Asn Pro Gln Lys Thr Ile Thr Phe Asn Ala Thr Pro Lys Val Leu Pro
 450 455 460
 Thr Ala Ser Gly Thr Lys Leu Ser Arg Phe Ser Ser Trp Gly Leu Thr
 465 470 475 480
 Ala Asp Gly Asn Ile Lys Pro Asp Ile Ala Ala Pro Gly Gln Asp Ile
 485 490 495
 Leu Ser Ser Val Ala Asn Asn Lys Tyr Ala Lys Leu Ser Gly Thr Ser
 500 505 510
 Met Ser Ala Pro Leu Val Ala Gly Ile Met Gly Leu Leu Gln Lys Gln
 515 520 525
 Tyr Glu Thr Gln Tyr Pro Asp Met Thr Pro Ser Glu Arg Leu Asp Leu
 530 535 540
 Ala Lys Lys Val Leu Met Ser Ser Ala Thr Ala Leu Tyr Asp Glu Asp
 545 550 555 560
 Glu Lys Ala Tyr Phe Ser Pro Arg Gln Gln Gly Ala Gly Ala Val Asp
 565 570 575

10

20

30

40

Ala Lys Lys Ala Ser Ala Ala Thr Met Tyr Val Thr Asp Lys Asp Asn
580 585 590

Thr Ser Ser Lys Val His Leu Asn Asn Val Ser Asp Lys Phe Glu Val
595 600 605

Thr Val Thr Val His Asn Lys Ser Asp Lys Pro Gln Glu Leu Tyr Tyr
610 615 620

Gln Ala Thr Val Gln Thr Asp Lys Val Asp Gly Lys His Phe Ala Leu
625 630 635 640

Ala Pro Lys Val Leu Tyr Glu Ala Ser Trp Gln Lys Ile Thr Ile Pro
645 650 655

Ala Asn Ser Ser Lys Gln Val Thr Val Pro Ile Asp Ala Ser Arg Phe
660 665 670

Ser Lys Asp Leu Leu Ala Gln Met Lys Asn Gly Tyr Phe Leu Glu Gly
675 680 685

Phe Val Arg Phe Lys Gln Asp Pro Thr Lys Glu Glu Leu Met Ser Ile
690 695 700

Pro Tyr Ile Gly Phe Arg Gly Asp Phe Gly Asn Leu Ser Ala Val Glu
705 710 715 720

Lys Pro Ile Tyr Asp Ser Lys Asp Gly Ser Ser Tyr Tyr His Glu Ala
725 730 735

Asn Ser Asp Ala Lys Asp Gln Leu Asp Gly Asp Gly Leu Gln Phe Tyr
740 745 750

Ala Leu Lys Asn Asn Phe Thr Ala Leu Thr Thr Glu Ser Asn Pro Trp
755 760 765

Thr Ile Ile Lys Ala Val Lys Glu Gly Val Glu Asn Ile Glu Asp Ile
770 775 780

Glu Ser Ser Glu Ile Thr Glu Thr Ile Phe Ala Gly Thr Phe Ala Lys
785 790 795 800

Gln Asp Asp Asp Ser His Tyr Tyr Ile His Arg His Ala Asn Gly Glu
805 810 815

Pro Tyr Ala Ala Ile Ser Pro Asn Gly Asp Gly Asn Arg Asp Tyr Val
820 825 830

Gln Phe Gln Gly Thr Phe Leu Arg Asn Ala Lys Asn Leu Val Ala Glu
835 840 845

Val Leu Asp Lys Glu Gly Asn Val Val Trp Thr Ser Glu Val Thr Glu
850 855 860

10

20

30

40

Gln Val Val Lys Asn Tyr Asn Asn Asp Leu Ala Ser Thr Leu Gly Ser
 865 870 875 880
 Thr Arg Phe Glu Lys Thr Arg Trp Asp Gly Lys Asp Lys Asp Gly Lys
 885 890 895
 Val Val Ala Asn Gly Thr Tyr Thr Tyr Arg Val Arg Tyr Thr Pro Ile
 900 905 910
 Ser Ser Gly Ala Lys Glu Gln His Thr Asp Phe Asp Val Ile Val Asp
 915 920 925
 Asn Thr Thr Pro Glu Val Ala Thr Ser Ala Thr Phe Ser Thr Glu Asp
 930 935 940
 Arg Arg Leu Thr Leu Ala Ser Lys Pro Lys Thr Ser Gln Pro Val Tyr
 945 950 955 960
 Arg Glu Arg Ile Ala Tyr Thr Tyr Met Asp Glu Asp Leu Pro Thr Thr
 965 970 975
 Glu Tyr Ile Ser Pro Asn Glu Asp Gly Thr Phe Thr Leu Pro Glu Glu
 980 985 990
 Ala Glu Thr Met Glu Gly Ala Thr Val Pro Leu Lys Met Ser Asp Phe
 995 1000 1005
 Thr Tyr Val Val Glu Asp Met Ala Gly Asn Ile Thr Tyr Thr Pro Val
 1010 1015 1020
 Thr Lys Leu Leu Glu Gly His Ser Asn Lys Pro Glu Gln Asp Gly Ser
 1025 1030 1035 1040
 Gly Gln Thr Pro Asp Lys Lys Pro Glu Ala Lys Pro Glu Gln Asp Gly
 1045 1050 1055
 Ser Asp Gln Ala Pro Asp Lys Lys Pro Glu Ala Lys Pro Glu Gln Asp
 1060 1065 1070
 Gly Ser Gly Gln Thr Pro Asp Lys Lys Pro Glu Thr Lys Pro Glu Lys
 1075 1080 1085
 Asp Ser Ser Gly Gln Thr Pro Gly Lys Thr Pro Gln Lys Gly Gln Pro
 1090 1095 1100
 Ser Arg Thr Leu Glu Lys Arg Ser Ser Lys Arg Ala Leu Ala Thr Lys
 1105 1110 1115 1120
 Ala Ser Thr Arg Asp Gln Leu Pro Thr Thr Asn Asp Lys Asp Thr Asn
 1125 1130 1135
 Arg Leu His Leu Leu Lys Leu Val Met Thr Thr Phe Phe Phe Gly Leu
 1140 1145 1150
 Val Ala His Ile Phe Lys Thr Lys Arg Gln Lys Glu Thr Lys Lys
 1155 1160 1165

配列番号 : 3

配列の長さ : 1150アミノ酸

配列の型 : アミノ酸

10

20

30

40

50

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

Leu Arg Lys Lys Gln Lys Leu Pro Phe Asp Lys Leu Ala Ile Ala Leu
 1 5 10 15

Met Ser Thr Ser Ile Leu Leu Asn Ala Gln Ser Asp Ile Lys Ala Asn
 20 25 30

Thr Val Thr Glu Asp Thr Pro Ala Thr Glu Gln Thr Val Glu Thr Pro
 35 40 45

10

Gln Pro Thr Ala Val Ser Glu Glu Ala Pro Ser Ser Lys Glu Thr Lys
 50 55 60

Thr Pro Gln Thr Pro Ser Asp Ala Gly Glu Thr Val Ala Asp Asp Ala
 65 70 75 80

Asn Asp Leu Ala Pro Gln Ala Pro Ala Lys Thr Ala Asp Thr Pro Ala
 85 90 95

Thr Ser Lys Ala Thr Ile Arg Asp Leu Asn Asp Pro Ser Gln Val Lys
 100 105 110

20

Thr Leu Gln Glu Lys Ala Gly Lys Gly Ala Gly Thr Val Val Ala Val
 115 120 125

Ile Asp Ala Gly Phe Asp Lys Asn His Glu Ala Trp Arg Leu Thr Asp
 130 135 140

Lys Thr Lys Ala Arg Tyr Gln Ser Lys Glu Asp Leu Glu Lys Ala Lys
 145 150 155 160

Lys Glu His Gly Ile Thr Tyr Gly Glu Trp Val Asn Asp Lys Val Ala
 165 170 175

30

Tyr Tyr His Asp Tyr Ser Lys Asp Gly Lys Thr Ala Val Asp Gln Glu
 180 185 190

His Gly Thr His Val Ser Gly Ile Leu Ser Gly Asn Ala Pro Ser Glu
 195 200 205

Thr Lys Glu Pro Tyr Arg Leu Glu Gly Ala Met Pro Glu Ala Gln Leu
 210 215 220

Leu Leu Met Arg Val Glu Ile Val Asn Gly Leu Ala Asp Tyr Ala Arg
 225 230 235 240
 Asn Tyr Ala Gln Ala Ile Arg Asp Ala Ile Asn Leu Gly Ala Lys Val
 245 250 255
 Ile Asn Met Ser Phe Gly Asn Ala Ala Leu Ala Tyr Ala Asn Leu Pro
 260 265 270
 Asp Glu Thr Lys Lys Ala Phe Asp Tyr Ala Lys Ser Lys Gly Val Ser
 275 280 285
 Ile Val Thr Ser Ala Gly Asn Asp Ser Ser Phe Gly Gly Lys Thr Arg
 290 295 300
 Leu Pro Leu Ala Asp His Pro Asp Tyr Gly Val Val Gly Thr Pro Ala
 305 310 315 320
 Ala Ala Asp Ser Thr Leu Thr Val Ala Ser Tyr Ser Pro Asp Lys Gln
 325 330 335
 Leu Thr Glu Thr Val Arg Val Lys Thr Ala Asp Gln Gln Asp Lys Glu
 340 345 350
 Met Pro Val Leu Ser Thr Asn Arg Phe Glu Pro Asn Lys Ala Tyr Asp
 355 360 365
 Tyr Ala Tyr Ala Asn Arg Gly Thr Lys Glu Asp Asp Phe Lys Asp Val
 370 375 380
 Lys Gly Lys Ile Ala Leu Ile Glu Arg Gly Asp Ile Asp Phe Lys Asp
 385 390 395 400
 Lys Ile Ala Lys Ala Lys Lys Ala Gly Ala Val Gly Val Leu Ile Tyr
 405 410 415
 Asp Asn Gln Asp Lys Gly Phe Pro Ile Glu Leu Pro Asn Val Asp Gln
 420 425 430
 Met Pro Ala Ala Phe Ile Ser Arg Lys Asp Gly Leu Leu Leu Lys Asp
 435 440 445
 Asn Pro Gln Lys Thr Ile Thr Phe Asn Ala Thr Pro Lys Val Leu Pro
 450 455 460
 Thr Ala Ser Gly Thr Lys Leu Ser Arg Phe Ser Ser Trp Gly Leu Thr
 465 470 475 480
 Ala Asp Gly Asn Ile Lys Pro Asp Ile Ala Ala Pro Gly Gln Asp Ile
 485 490 495
 Leu Ser Ser Val Ala Asn Asn Lys Tyr Ala Lys Leu Ser Gly Thr Ser
 500 505 510

10

20

30

40

Met Ser Ala Pro Leu Val Ala Gly Ile Met Gly Leu Leu Gln Lys Gln
515 520 525

Tyr Glu Thr Gln Tyr Pro Asp Met Thr Pro Ser Glu Arg Leu Asp Leu
530 535 540

Ala Lys Lys Val Leu Met Ser Ser Ala Thr Ala Leu Tyr Asp Glu Asp
545 550 555 560

Glu Lys Ala Tyr Phe Ser Pro Arg Gln Gln Gly Ala Gly Ala Val Asp
565 570 575

Ala Lys Lys Ala Ser Ala Ala Thr Met Tyr Val Thr Asp Lys Asp Asn
580 585 590

Thr Ser Ser Lys Val His Leu Asn Asn Val Ser Asp Lys Phe Glu Val
595 600 605

Thr Val Asn Val His Asn Lys Ser Asp Lys Pro Gln Glu Leu Tyr Tyr
610 615 620

Gln Ala Thr Val Gln Thr Asp Lys Val Asp Gly Lys His Phe Ala Leu
625 630 635 640

Ala Pro Lys Val Leu Tyr Glu Ala Ser Trp Gln Lys Ile Thr Ile Pro
645 650 655

Ala Asn Ser Ser Lys Gln Val Thr Val Pro Ile Asp Ala Ser Arg Phe
660 665 670

Ser Lys Asp Leu Leu Ala Gln Met Lys Asn Gly Tyr Phe Leu Glu Gly
675 680 685

Phe Val Arg Phe Lys Gln Asp Pro Lys Lys Glu Glu Leu Met Ser Ile
690 695 700

Pro Tyr Ile Gly Phe Arg Gly Asp Phe Gly Asn Leu Ser Ala Leu Glu
705 710 715 720

Lys Pro Ile Tyr Asp Ser Lys Asp Gly Ser Ser Tyr Tyr His Glu Ala
725 730 735

Asn Ser Asp Ala Lys Asp Gln Leu Asp Gly Asp Gly Leu Gln Phe Tyr
740 745 750

Ala Leu Lys Asn Asn Phe Thr Ala Leu Thr Thr Glu Ser Asn Pro Trp
755 760 765

Thr Ile Ile Lys Ala Val Lys Glu Gly Val Glu Asn Ile Glu Asp Ile
770 775 780

Glu Ser Ser Glu Ile Thr Glu Thr Ile Leu Ala Gly Thr Phe Ala Lys
785 790 795 800

10

20

30

40

Gln Asp Asp Asp Ser His Tyr Tyr Ile His Arg His Ala Asn Gly Lys
 805 810 815
 Pro Tyr Ala Ala Ile Ser Pro Asn Gly Asp Gly Asn Arg Asp Tyr Val
 820 825 830
 Gln Phe Gln Gly Thr Phe Leu Arg Asn Ala Lys Asn Leu Val Ala Glu
 835 840 845
 Val Leu Asp Lys Glu Gly Asn Val Val Trp Thr Ser Glu Val Thr Glu
 850 855 860
 Gln Val Val Lys Asn Tyr Asn Asn Asp Leu Ala Ser Thr Leu Gly Ser
 865 870 875 880
 Thr Arg Phe Glu Lys Thr Arg Trp Asp Gly Lys Asp Lys Asp Gly Lys
 885 890 895
 Val Val Ala Asn Gly Thr Tyr Thr Tyr Arg Val Arg Tyr Thr Pro Ile
 900 905 910
 Ser Ser Gly Ala Lys Glu Gln His Thr Asp Phe Asp Val Ile Val Asp
 915 920 925
 Asn Thr Thr Pro Glu Val Ala Thr Ser Ala Thr Phe Ser Thr Glu Asp
 930 935 940
 Arg Arg Leu Thr Leu Ala Ser Lys Pro Lys Thr Ser Gln Pro Val Tyr
 945 950 955 960
 Arg Glu Arg Ile Ala Tyr Thr Tyr Met Asp Glu Asp Leu Pro Thr Thr
 965 970 975
 Glu Tyr Ile Ser Pro Asn Glu Asp Gly Thr Phe Thr Leu Pro Glu Glu
 980 985 990
 Ala Glu Thr Thr Glu Gly Ala Thr Val Pro Leu Lys Met Ser Asp Phe
 995 1000 1005
 Thr Tyr Val Val Glu Asp Met Ala Gly Asn Ile Thr Tyr Thr Pro Val
 1010 1015 1020
 Thr Lys Leu Leu Glu Gly His Ser Asn Lys Pro Glu Gln Asp Gly Ser
 1025 1030 1035 1040
 Asp Gln Ala Pro Asp Lys Lys Pro Glu Ala Lys Pro Glu Gln Asp Gly
 1045 1050 1055
 Ser Gly Gln Thr Pro Asp Lys Lys Thr Glu Thr Lys Pro Glu Lys Asp
 1060 1065 1070

10

20

30

40

Ser Ser Gly Gln Thr Pro Gly Lys Thr Pro Gln Lys Gly Gln Pro Ser
 1075 1080 1085

Arg Thr Leu Glu Lys Arg Ser Ser Lys Arg Ala Leu Ala Thr Lys Ala
 1090 1095 1100

Ser Thr Arg Asp Gln Leu Pro Thr Thr Asn Asp Lys Asp Thr Asn Arg
 1105 1110 1115 1120

Leu His Leu Leu Lys Leu Val Met Thr Thr Phe Phe Leu Gly Leu Val
 1125 1130 1135

10

Ala His Ile Phe Lys Thr Lys Arg Gln Lys Glu Thr Lys Lys
 1140 1145 1150

配列番号：4

配列の長さ：31塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジ：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列：

GGGGGGGAAT TCGTAGCGGG TATCATGGGA C

31

20

配列番号：5

配列の長さ：31塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジ：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列：

GGGGGGGAAT TCGGGTGCTG CAATATCTGG C

31

配列番号：6

配列の長さ：17塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジ：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列：

GTAAAACGACG GCCAGT

17

配列番号：7

配列の長さ：19塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジ：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列：

AAGGACGACAC ATTGCGTA

19

配列番号：8

配列の長さ：31塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジ：直鎖状

50

配列の種類：cDNA

配列：

CCCCCGGAT CCACCAAAAC CCCACAACT C

31

配列番号：9

配列の長さ：18塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列：

GAGTGGCCCT CCAATAGC

18

10

国際出願番号 PCT/US 97/ 01056

微 生 物	
明細書の 27 33 頁 11-14 19 行目に言及した微生物に関する任意用紙	
A. 寄託の特定	
他の寄託が別紙に記載されている。 <input type="checkbox"/>	
寄託機関の名称	
American Type Culture Collection	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）	
12301 Parklawn Drive Rockville, MD 20852, United States of America	
寄託日	受託番号
1996年10月15日	98225
B. 追加記載（該当しない場合には空白にしておく。）この情報は添付別紙に続いている。 <input type="checkbox"/>	
ヨーロッパ及び／又はオーストラリア特許が求められるこれらの寄託に関し、寄託された微生物のサンプルは、その特許出願の係属の間、該サンプルを要求する人によって指名された専門家にのみ提供される（Rule 28 (4) EPC/Regulation 3.25 of Australia Statutory Rules 1991 No 71）	
C. この記載が目的とする指定国（すべての指定国を目的としないとき）	
D. 別個の表示の届出（該当しない場合には空白にしておく。）	
下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する。）	
E. <input type="checkbox"/> この用紙は国際出願と共に出願時に受理された。（受理官庁が点検する。）	
署 名	
(権限のある職員)	
<input type="checkbox"/> 国際事務局が（出願人から）受理した日	
(権限のある職員)	

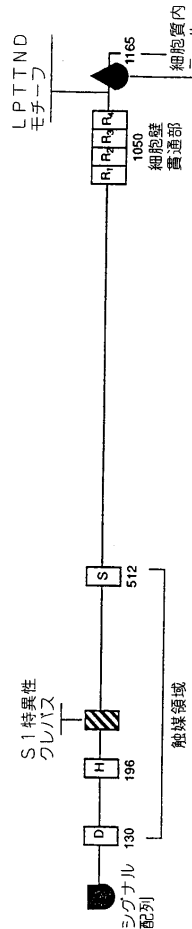
10

20

30

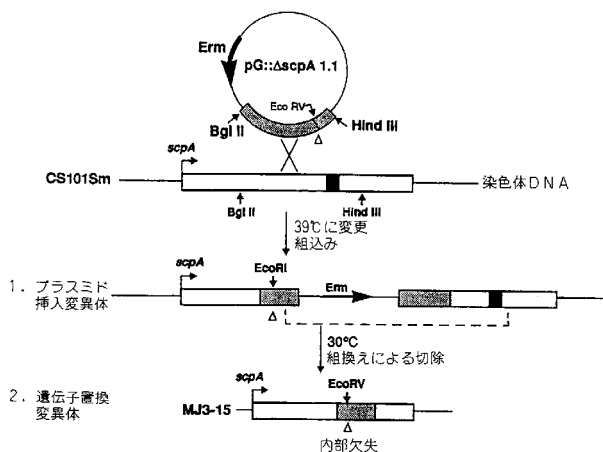
【図 1】

Figure 1. β 溶血連鎖球菌からの C5a ペプチダーゼの構造



【図 3】

FIGURE 3



【図 4】

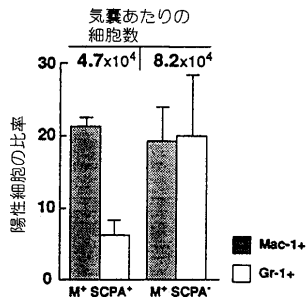


FIGURE 4

【図 2】

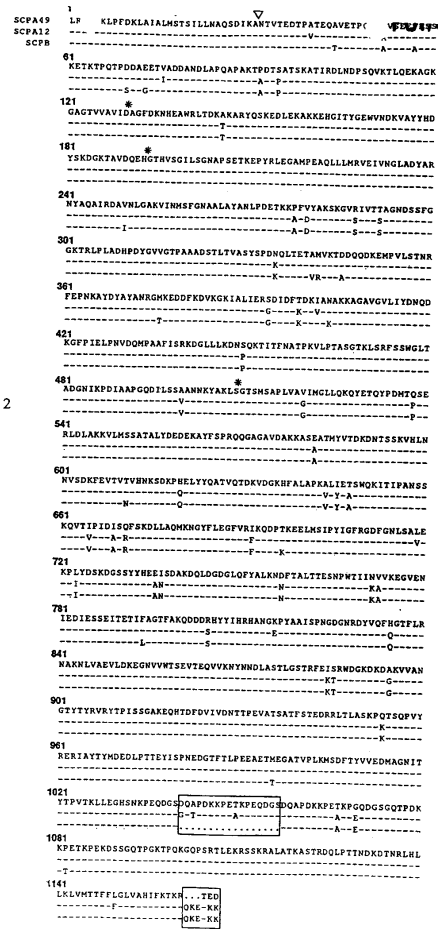
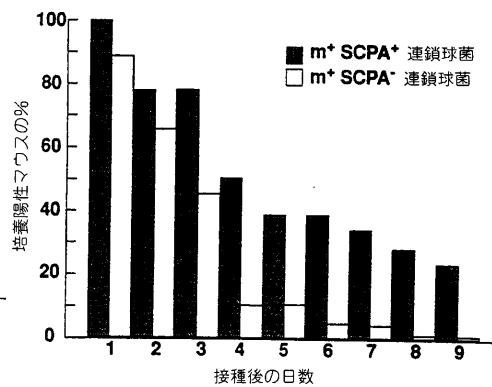


FIGURE 2

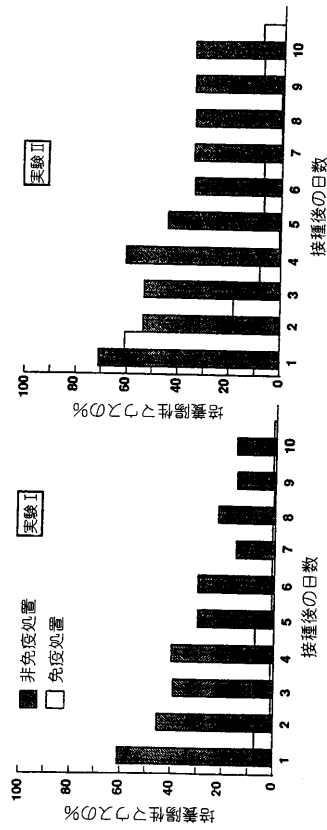
【図 5】

FIGURE 5



【図 6】

FIGURE 6

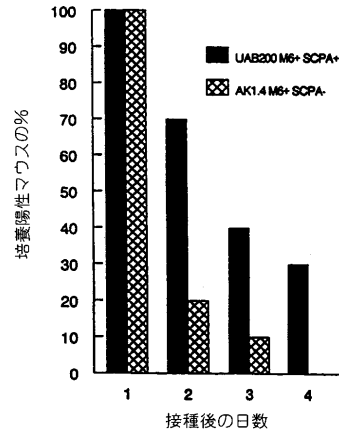


【図 7】

培養陽性マウスの%

接種後の日数

Figure 7



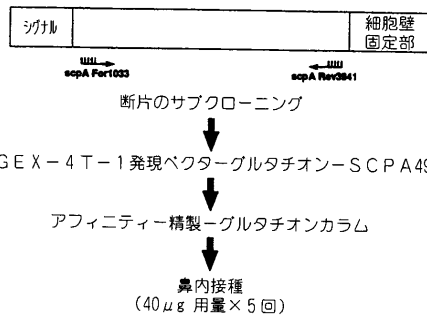
【図 8】

pGEX-4T-1 発現ベクター-グルタチオン-SCPA49 融合

アフィニティー精製-グルタチオンカラム

鼻内接種
(40 μ g 用量 \times 5 回)

Figure 8



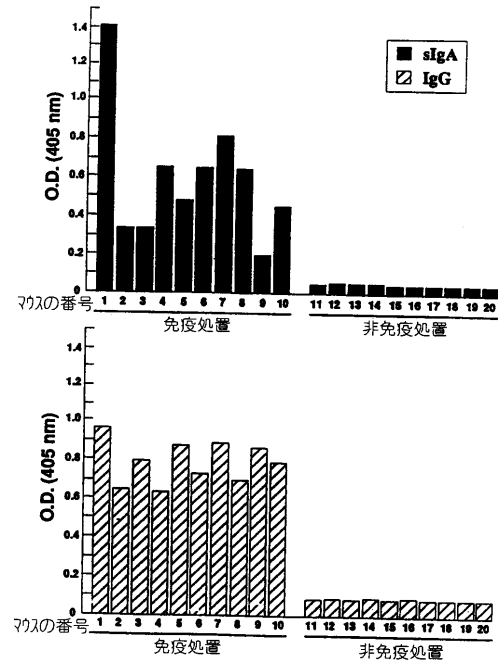
【図 9】

マウスの番号

免疫処置

非免疫処置

Figure 9



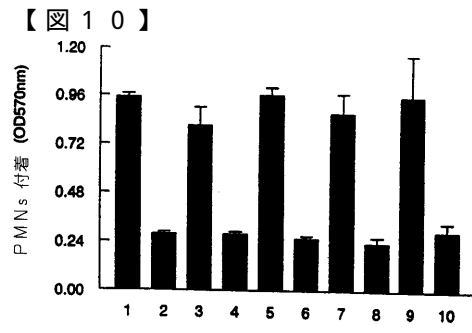


Figure 10

フロントページの続き

(74)代理人 100108903

弁理士 中村 和広

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100127085

弁理士 越阪部 倫子

(72)発明者 クリアリー, ポール ピー.

アメリカ合衆国, ミネソタ 5 5 1 1 2, ショアビュー, ジャンサ ドライブ 2 8 8

審査官 長部 喜幸

(56)参考文献 国際公開第 9 4 / 0 1 0 3 1 7 (WO, A 1)

特開平 0 7 - 2 0 6 7 0 7 (JP, A)

P. PATRICK CLEARY, INFECTION AND IMMUNITY, 1 9 9 2 年, Vol.60, No.10, Pages 4239-4244

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 39/00

BIOSIS(STN)

CA(STN)

EMBASE(STN)

MEDLINE(STN)