

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5911421号
(P5911421)

(45) 発行日 平成28年5月18日(2016.5.18)

(24) 登録日 平成28年4月8日(2016.4.8)

(51) Int.Cl.

F 1

AO 1 N	63/02	(2006.01)
AO 1 P	3/00	(2006.01)
A 6 1 K	39/395	(2006.01)
A 6 1 P	31/04	(2006.01)
C 0 7 K	16/12	(2006.01)

AO 1 N	63/02	Z N A Z
AO 1 P	3/00	
A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 P	39/395	N
A 6 1 P	31/04	

請求項の数 30 (全 138 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-502303 (P2012-502303)
 (86) (22) 出願日 平成22年3月26日 (2010.3.26)
 (65) 公表番号 特表2012-522010 (P2012-522010A)
 (43) 公表日 平成24年9月20日 (2012.9.20)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2010/028902
 (87) 國際公開番号 WO2010/126670
 (87) 國際公開日 平成22年11月4日 (2010.11.4)
 審査請求日 平成25年3月25日 (2013.3.25)
 (31) 優先権主張番号 61/164,154
 (32) 優先日 平成21年3月27日 (2009.3.27)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

前置審査

(73) 特許権者 506190555
 ゴジョ・インダストリーズ・インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国オハイオ州44311, アクロン, スート500, ワン・ゴジョ・プラザ
 (74) 代理人 100077861
 弁理士 朝倉 勝三
 (72) 発明者 マシング デービッド アール
 アメリカ合衆国 オハイオ 44224
 ストウ ベケット・リッジ 5168
 (72) 発明者 ピンガム ジェームス エドムンド
 アメリカ合衆国 オハイオ 44313
 アクロン キャスル・ブルバード 33

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】組成物及び胞子-表面の相互作用と拮抗する化合物をスクリーニングする方法及び使用する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子が素地表面に結合することを妨げる方法であつて、当該方法は、

a) i) CD 1067、CD 3620、CD 1581、CD 598、及びCD 2401からなる群から選ばれる少なくとも1の胞子表面タンパク質を含んでなるクロストリジウム・ディフィシレの胞子に暴露される危険がある無生物素地表面を有する対象（ここで、前記素地表面はクロストリジウム・ディフィシレの胞子の特定の結合部位を含むものであり、及び暴露の結果、胞子の素地表面の特定の結合部位への結合を生ずる可能性が高く、これによって、微生物の感染及び/又はコロニー形成を生ずる）；及びii) 少なくとも1の拮抗性化合物を含んでなる感染制御組成物（ここで、前記拮抗性化合物は、前記少なくとも1の胞子表面タンパク質に対する親和性を有するものであり、前記抗体は前記少なくとも1の胞子表面タンパク質を使用することによって生成されたものであり、及び前記少なくとも1の胞子表面タンパク質は組換え発現を介して產生されたものである）を用意し；

b) 微生物の暴露以前に、前記組成物を、前記対象の素地表面に結合させて、前記拮抗性化合物がクロストリジウム・ディフィシレの胞子の素地表面の特定の結合部位への結合に拮抗するように微生物感染バリヤーを形成することを含んでなる、方法。

【請求項 2】

10

20

微生物感染バリヤーが微生物の感染を低減する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子表面タンパク質が胞子表面ペプチドを含んでなり、感染制御組成物が、配列番号 1 のアミノ酸配列を有するペプチドに対する抗体を含んでなる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子表面タンパク質が、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11 及び配列番号 13からなる群から選ばれるアミノ酸配列を有する胞子表面ペプチドを含んでなる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

組成物が、胞子表面タンパク質上の構造に特異的に結合しうる抗体を含んでなる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

組成物が、さらに、キャリヤーを含んでなる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子表面タンパク質が胞子表面ペプチドを含んでなり、感染制御組成物が、配列番号 1 のアミノ酸配列の相同体に対する抗体を含んでなり、前記配列番号 1 のアミノ酸配列の相同体が、配列番号 1 と少なくとも 75 % の同一性である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子表面タンパク質が胞子表面ペプチドを含んでなり、感染制御組成物が、配列番号 1 のアミノ酸配列の相同体に対する抗体を含んでなり、前記配列番号 1 のアミノ酸配列の相同体が、配列番号 1 と少なくとも 85 % の同一性である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子表面タンパク質が胞子表面ペプチドを含んでなり、感染制御組成物が、配列番号 1 のアミノ酸配列の相同体に対する抗体を含んでなり、前記配列番号 1 のアミノ酸配列の相同体が、配列番号 1 と少なくとも 95 % の同一性である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 10】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子表面タンパク質が胞子表面ペプチドを含んでなり、感染制御組成物が、配列番号 2 によってコード化されるアミノ酸配列を有するペプチドに対する抗体を含んでなる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 11】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子表面タンパク質が胞子表面ペプチドを含んでなり、感染制御組成物が、配列番号 2 の相同体によってコード化されるアミノ酸配列を有するペプチドに対する抗体を含んでなり、前記配列番号 2 のアミノ酸配列の相同体が、配列番号 2 と少なくとも 50 % の同一性であり、鎖長少なくとも 100 bp である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 12】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子表面タンパク質が胞子表面ペプチドを含んでなり、感染制御組成物が、配列番号 2 の相同体によってコード化されるアミノ酸配列を有するペプチドに対する抗体を含んでなり、前記配列番号 2 のアミノ酸配列の相同体が、生物学的に活性なクロストリジウム属菌の胞子表面タンパク質のアミノ酸配列をコード化するオリゴヌクレオチド配列である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 13】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子表面タンパク質が、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 及び配列番号 14からなる群から選ばれる核酸配列によってコード化されるアミノ酸配列を有する胞子表面ペプチドを含んでなる、請求項 1 記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 14】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子表面タンパク質が、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12及び配列番号14からなる群から選ばれる核酸配列の相同体によってコード化されるアミノ酸配列を有する胞子表面ペプチド（ここで、前記相同体が、生物学的に活性なクロストリジウム属菌の胞子表面タンパク質のアミノ酸配列をコード化する核酸配列である）を含んでなる、請求項1記載の方法。

【請求項 15】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子表面タンパク質が胞子表面ペプチドを含んでなり、拮抗性化合物が、配列番号21及び配列番号23からなる群から選ばれるアミノ酸配列を有するペプチドに対する抗体である、請求項1記載の方法。 10

【請求項 16】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子表面タンパク質が胞子表面ペプチドを含んでなり、拮抗性化合物が、配列番号22及び配列番号24からなる群から選ばれる核酸配列によってコード化されるペプチドに対する抗体である、請求項1記載の方法。

【請求項 17】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子表面タンパク質が、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配列番号37及び配列番号39からなる群から選ばれるアミノ酸配列を有する、請求項1記載の方法。

【請求項 18】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子表面タンパク質が、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号38及び配列番号40からなる群から選ばれる核酸配列によってコード化される、請求項1記載の方法。 20

【請求項 19】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子表面タンパク質が胞子表面ペプチドを含んでなり、拮抗性化合物が、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号79、配列番号80、配列番号81及び配列番号82からなる群から選ばれるアミノ酸配列を有する配列番号1の短縮ペプチドフラグメントに対する抗体である、請求項1記載の方法。 30

【請求項 20】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子表面タンパク質が胞子表面ペプチドを含んでなり、拮抗性化合物が、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号104、配列番号105、配列番号106、配列番号107、配列番号108、配列番号109、配列番号110、配列番号111、配列番号112、配列番号113、配列番号114、配列番号115、配列番号116、配列番号117、配列番号118、配列番号119、配列番号120、配列番号121、配列番号122及び配列番号123からなる群から選ばれるアミノ酸配列を有する配列番号3の短縮ペプチドフラグメントに対する抗体である、請求項1記載の方法。 40

【請求項 21】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子表面タンパク質が胞子表面ペプチドを含んでなり、拮抗性化合物が、配列番号124、配列番号125、配列番号126、配列番号127、配列番号128、配列番号129、配列番号130、配列番号131、配列番号132、配列番号133、配列番号134及び配列番号135からなる群から選ばれるアミノ酸配列を有する配列番号5の短縮ペプチドフラグメントに対する抗体である、請求項1記載の方法。

【請求項 22】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子表面タンパク質が、配列番号136、配列番号137、配列番号138、配列番号139、配列番号140、配列番号141、配列番号142、配列番号143、 50

配列番号144、配列番号145、配列番号146、配列番号147、配列番号148、配列番号149、配列番号150、配列番号151、配列番号152、配列番号153、配列番号154、配列番号155、配列番号156、配列番号157、配列番号158、配列番号159、配列番号160、配列番号161、配列番号162、配列番号163、配列番号164、配列番号165及び配列番号166からなる群から選ばれるアミノ酸配列を有する配列番号7の短縮ペプチドフラグメントを有する胞子表面ペプチドを含んでなる、請求項1記載の方法。

【請求項23】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子表面タンパク質が、配列番号167、配列番号168、配列番号169、配列番号170、配列番号171、配列番号172、配列番号173、配列番号174、配列番号175、配列番号176及び配列番号177からなる群から選ばれるアミノ酸配列を有する配列番号9の短縮ペプチドフラグメントを有する胞子表面ペプチドを含んでなる、請求項1記載の方法。

10

【請求項24】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子表面タンパク質が、配列番号178、配列番号179、配列番号180、配列番号181、配列番号182、配列番号183、配列番号184、配列番号185、配列番号186、配列番号187、配列番号188、配列番号189、配列番号190、配列番号191、配列番号192、配列番号193、配列番号194、配列番号195、配列番号196、配列番号197、配列番号198、配列番号199、配列番号200、配列番号201、配列番号202、配列番号203、配列番号204、配列番号205、配列番号206、配列番号207、配列番号208、配列番号209、配列番号210、配列番号211及び配列番号212からなる群から選ばれるアミノ酸配列を有する配列番号11の短縮ペプチドフラグメントを有する胞子表面ペプチドを含んでなる、請求項1記載の方法。

20

【請求項25】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子表面タンパク質が、配列番号213、配列番号214、配列番号215、配列番号216、配列番号217、配列番号218、配列番号219、配列番号220、配列番号221、配列番号222、配列番号223、配列番号224、配列番号225、配列番号226、配列番号227、配列番号228、配列番号229、配列番号230、配列番号231、配列番号232、配列番号233、配列番号234、配列番号235、配列番号236、配列番号237、配列番号238、配列番号239、配列番号240、配列番号241、配列番号242及び配列番号243からなる群から選ばれるアミノ酸配列を有する配列番号13の短縮ペプチドフラグメントを有する胞子表面ペプチドを含んでなる、請求項1記載の方法。

30

【請求項26】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子表面タンパク質が、配列番号244、配列番号245、配列番号246、配列番号247、配列番号248、配列番号249、配列番号250、配列番号251、配列番号252、配列番号253、配列番号254、配列番号255、配列番号256、配列番号257、配列番号258、配列番号259、配列番号260、配列番号261、配列番号262、配列番号263、配列番号264、配列番号265、配列番号266、配列番号267、配列番号268、配列番号269、配列番号270、配列番号271、配列番号272、配列番号273、配列番号274、配列番号275、配列番号276、配列番号277、配列番号278、配列番号279、配列番号280、配列番号281、配列番号282、配列番号283、配列番号284、配列番号285、配列番号286、配列番号287、配列番号288、配列番号289、配列番号290、配列番号291、配列番号292、配列番号293、配列番号294、配列番号295、配列番号296、配列番号297、配列番号298、配列番号299、配列番号300、配列番号301、配列番号302、配列番号303、配列番号304及び配列番号305からなる群から選ばれるアミノ酸配列を有する短縮ペプチドフラグメントを有する胞子表面ペプチドを含んでなる、請求項1記載の方法。

40

【請求項27】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子表面タンパク質が、配列番号306、配列番号307、配列番号308、配列番号309、配列番号310、配列番号311、配列番号312、配列番号313、配列番号314、配列番号315、配列番号316、配列番号317、配列番号318、配列番号319、配列番号320、配列番号321、配列番号322、配列番号323、配列番号324、配列番号325、配列

50

番号326、配列番号327、配列番号328、配列番号329、配列番号330、配列番号331、配列番号332、配列番号333、配列番号334、配列番号335、配列番号336、配列番号337、配列番号338、配列番号339、配列番号340、配列番号341、配列番号342、配列番号343、配列番号344、配列番号345、配列番号346、配列番号347、配列番号348、配列番号349、配列番号350、配列番号351、配列番号352、配列番号353、配列番号354、配列番号355、配列番号356、配列番号357、配列番号358、配列番号359、配列番号360、配列番号361、配列番号362、配列番号363、配列番号364及び配列番号365からなる群から選ばれるアミノ酸配列を有する短縮ペプチドフラグメントを有する胞子表面ペプチドを含んでなる、請求項1記載の方法。

【請求項28】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子表面タンパク質が、配列番号366、配列番号367、配列番号368、配列番号369、配列番号370、配列番号371、配列番号372、配列番号373、配列番号374、配列番号375、配列番号376、配列番号377、配列番号378、配列番号379、配列番号380、配列番号381、配列番号382、配列番号383、配列番号384、配列番号385、配列番号386、配列番号387、配列番号388、配列番号389、配列番号390、配列番号391、配列番号392、配列番号393、配列番号394、配列番号395、配列番号396、配列番号397、配列番号398、配列番号399、配列番号400、配列番号401、配列番号402、配列番号403、配列番号404、配列番号405、配列番号406、配列番号407、配列番号408、配列番号409、配列番号410、配列番号411、配列番号412、配列番号413、配列番号414、配列番号415、配列番号416、配列番号417、配列番号418、配列番号419、配列番号420及び配列番号421からなる群から選ばれるアミノ酸配列を有する短縮ペプチドフラグメントを有する胞子表面ペプチドを含んでなる、請求項1記載の方法。

【請求項29】

抗体が单クロナール性抗体である、請求項1記載の方法。

【請求項30】

抗体が多クロナール性抗体である、請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、感染の制御の分野に係る。特に、本発明は、無菌状態の維持、細菌の除染、及び／又は細菌暴露の予防のための組成物及び方法に係る。1具体例では、本発明は、微生物の胞子が素地表面に結合することを阻害する感染制御組成物を意図するものである。例えば、阻害は、微生物の胞子の素地表面との相互作用、付着及び／又は安定化を乱し及び／又は排除する。

【背景技術】

【0002】

胞子形成性細菌は、院内感染、食品の腐敗及び／又は飲食に起因する健康被害の問題を含む（これらに限定されない）汚染の原因となり得る。最小限加工され、冷蔵保存された製品は、効果的かつ無菌となるため、バックグラウンドのミクロフローラは排除される。このような細菌は、最終的に、これら製品の保存寿命を制限する胞子形成性生物である。胞子形成性細菌は、缶詰の食品、パン、真空パックした肉類、殺菌した乳製品、及び果汁類の腐敗の原因となると疑われる。これらのタイプの製品のいずれかに含まれる成分における高レベルでの細菌の胞子の存在は、最終製品の腐敗の可能性を増大させる。

【0003】

医療環境では、胞子形成性細菌は、しばしば、院内の下痢、破傷風、及び壊疽を含む感染症の原因となる。クロストリジウム・ディフィシレ (*Clostridium difficile*) は、抗生素質関連下痢及び偽膜性腸炎の原因となる胞子形成性の嫌気性細菌である。増大された寄与罹患率及び死亡率をもつ高度に病原性の流行菌株の近年における出現は、さらに、この院内の病原体をさらに増大させるものである。快復時間を劇的に改善し、これによって、患者の退院の促進を可能にするために、病院スタッフ - 患者間の病原菌の伝染の低減が

10

20

30

40

50

期待されている。これは、患者の健康及び社会コストの両方の観点から有益である。微生物の伝染を阻止するために消毒剤の使用を増大するための医学界の努力にもかかわらず、患者の感染及び再感染の発生は、不必要的罹患率及び死亡率につながっている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

宿主細胞において発芽以前に数十年間休眠状態で存在できる胞子を形成する細菌は、食品工業又は医療にかかわらず、予期しない汚染の原因となり得る。さらに、細菌の内生胞子は、皮膚及び表面の消毒剤に対して抵抗性であり、このように、防菌手段は、大部分は無効である。求められているものは、微生物の胞子による宿主への付着、従って感染を排除し及び／又は防止する感染制御組成物をスクリーニングする方法である。10

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、感染の制御の分野に係る。特に、本発明は、無菌状態の維持、細菌の除染、及び／又は細菌暴露の予防のための組成物及び方法に係る。1具体例では、本発明は、微生物の胞子が素地表面に結合することを阻害する感染制御組成物を意図するものである。例えば、阻害は、微生物の胞子の素地表面との相互作用、付着及び／又は安定化と拮抗し、乱し及び／又は排除する。

【0006】

1具体例では、本発明は、微生物の胞子の素地表面への結合を遮り及び／又は阻害できる感染制御組成物を意図するものである。1具体例では、組成物は小さい有機分子を含んでなる。1具体例では、組成物はタンパク質を含んでなる。1具体例では、タンパク質は、クロストリジウム菌の胞子表面タンパク質に由来のものである。1具体例では、クロストリジウム菌の胞子表面タンパク質は、クロストリジウム・ディフィシレの胞子表面タンパク質を含んでなる。1具体例では、タンパク質は、バシラス属菌の胞子表面タンパク質に由来のものである。1具体例では、バシラス菌の胞子表面タンパク質は、バシラス・アンスラシス (*Bacillus anthracis*) の胞子表面タンパク質を含んでなる。1具体例では、バシラス・アンスラシスの胞子表面タンパク質は、配列番号 (SEQ ID NO:) 1又は配列番号1の同属体を含んでなる。1具体例では、胞子表面タンパク質は、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7 及び配列番号 15 からなる群から選ばれる。1具体例では、組成物は抗体を含んでなる。1具体例では、抗体は多クローナル性抗体である。1具体例では、抗体は単クローナル性抗体である。1具体例では、組成物は合成タンパク質を含んでなる。1具体例では、組成物は無機イオン錯体を含んでなる。1具体例では、組成物はタンパク質ミメティックを含んでなる。1具体例では、素地表面は無生物の表面を含んでなる。1具体例では、素地表面は生物の表面を含んでなる。1具体例では、生物の表面は体組織表面を含んでなる。1具体例では、体組織表面は上皮表面を含んでなる。1具体例では、上皮表面は哺乳類の皮膚表面を含んでなる。1具体例では、無生物の表面はステンレス鋼を含んでなる。1具体例では、無生物の表面はセラミックを含んでなる。1具体例では、無生物の表面はビニールを含んでなる。1具体例では、無生物の表面はタイルを含んでなる。1具体例では、組成物は、さらに、少なくとも 1 つの抗菌薬を含んでなる。1具体例では、組成物は、さらに、少なくとも 1 つのキャリヤーを含んでなる。1具体例では、キャリヤーは、さらに、洗浄剤を含んでなる。1具体例では、キャリヤーは、無菌のものであり、ヒトへの投与に適するものである。1具体例では、キャリヤーは、抗菌性の皮膚クリーナーを含んでなる。1具体例では、皮膚クリーナーはハンドウォッシュクリーナーを含んでなる。1具体例では、キャリヤーは、抗菌性の表面クリーナーを含んでなる。3040

【0007】

1具体例では、本発明は、素地表面への微生物の胞子の結合を阻止および／又は阻害できるアミノ酸配列を含んでなり、前記アミノ酸配列が、微生物の胞子の表面タンパク質との十分な相同性を有するものである感染制御組成物を意図するものである。1具体例では、十分な相同性は、約 75 % の相同性、好ましくは 85 % の相同性、最も好ましくは 9050

%又は95%の相同性である。1具体例では、表面タンパク質は胞子の表面タンパク質を含んでなる。1具体例では、胞子の表面タンパク質は、クロストリジウム属菌の胞子の表面タンパク質を含んでなる。1具体例では、クロストリジウム属菌の胞子の表面タンパク質は、クロストリジウム・ディフィシレの胞子の表面タンパク質を含んでなる。1具体例では、胞子の表面タンパク質は、バシラス属菌の胞子の表面タンパク質を含んでなる。1具体例では、バシラス属菌の胞子の表面タンパク質は、バシラス・アンスラシスの胞子の表面タンパク質を含んでなる。1具体例では、表面タンパク質は胞子の表面ペプチドを含んでなる。1具体例では、ペプチドがクロストリジウム菌の表面タンパク質に由来するものである。1具体例では、クロストリジウム菌の表面タンパク質が、クロストリジウム・ディフィシレの表面タンパク質を含んでなる。1具体例では、ペプチドがバシラス属菌の表面タンパク質に由来するものである。1具体例では、バシラス属菌の表面タンパク質が、バシラス・アンスラシスの表面タンパク質を含んでなる。1具体例では、クロストリジウム・ディフィシレの表面ペプチドは、配列番号1又は配列番号1の相同体を含んでなる。1具体例では、胞子の表面ペプチドは、配列番号3、配列番号5、配列番号7、及び配列番号15からなる群から選ばれるものである。1具体例では、アミノ酸配列は、胞子の表面タンパク質のC末端に由来するものである。1具体例では、アミノ酸配列は、胞子の表面タンパク質のN末端に由来するものである。1具体例では、組成物は、さらに、キャリヤーを含んでなる。1具体例では、キャリヤーは、さらに、洗浄剤を含んでなる。1具体例では、組成物は、さらに、少なくとも1つの抗菌剤を含んでなる。1具体例では、キャリヤーは、ヒトへの投与に適するものである。1具体例では、組成物は、さらに、抗菌性の皮膚クリーナーを含んでなる。1具体例では、皮膚クリーナーはハンドウォッシュクリーナーを含んでなる。1具体例では、組成物は、さらに、抗菌性の表面クリーナーを含んでなる。1具体例では、組成物は、さらに、皮膚バリヤーを含んでなる。1具体例では、組成物は、さらに、表面バリヤーを含んでなる。

【0008】

1具体例では、本発明は、拮抗性化合物を含んでなり、前記化合物が、微生物の胞子の表面タンパク質に対する親和性を有するものである感染制御組成物を意図するものである。1具体例では、親和性は、素地表面の特定の結合部位領域に向けられるものである。1具体例では、化合物は抗体を含んでなる。1具体例では、化合物は、小さい有機分子を含んでなる。1具体例では、胞子の表面タンパク質は、ペプチドフラグメントを含んでなる。1具体例では、ペプチドフラグメントは、胞子の表面タンパク質のC末端に由来するものである。1具体例では、ペプチドフラグメントは、胞子の表面タンパク質のN末端に由来するものである。1具体例では、胞子の表面タンパク質がクロストリジウム菌の表面タンパク質である。1具体例では、クロストリジウム菌の表面タンパク質が、クロストリジウム・ディフィシレの表面タンパク質である。1具体例では、胞子の表面タンパク質がバシラス属菌の表面タンパク質である。1具体例では、バシラス属菌の表面タンパク質が、バシラス・アンスラシスの表面タンパク質である。1具体例では、組成物は、さらに、少なくとも1つの抗菌剤を含んでなる。1具体例では、組成物は、さらに、キャリヤーを含んでなる。1具体例では、キャリヤーは、ヒトへの投与に適するものである。

1具体例では、組成物は、さらに、抗菌性のハンドクリーナーを含んでなる。1具体例では、組成物は、さらに、抗菌性の表面クリーナーを含んでなる。

【0009】

1具体例では、本発明は、(a) i) 微生物に暴露される危険がある対象(ここで、暴露により、微生物感染を生ずる可能性が高い)及びii) 感染制御組成物を準備し；(b) 微生物の暴露前の対象に、微生物感染バリヤー(「微生物感染バリヤー」とは、微生物の胞子が素地表面に結合することを妨げる又は阻害することを介して、微生物に感染することを低減又は阻止する防壁をいう)が形成される条件下で、前記組成物を投与することを含んでなる方法を意図するものである。1具体例では、微生物感染バリヤーは微生物感染を低減するものである。1具体例では、微生物感染バリヤーは微生物感染を阻止するものである。1具体例では、微生物は細菌を含んでなる。1具体例では、細菌は、クロストリ

ジウム菌、バシラス属菌、デスルホトマキュラム属菌 (*Desulfotomaculum*)、スポロラクトバシラス属菌 (*Sporolactobacillus*)、サポロサルチナ属菌 (*Sporosarcina*)、又はテルモアクチノミセス属菌 (*Thermoactinomyces*) からなる群から選ばれる。1具体例では、細菌は細菌の胞子を含んでなる。1具体例では、細菌の胞子は、少なくとも1つの胞子の表面タンパク質を含んでなる。1具体例では、クロストリジウムの胞子の表面タンパク質が、クロストリジウム・ディフィシレの胞子の表面タンパク質である。1具体例では、バシラス属菌の胞子の表面タンパク質が、バシラス・アンスラシスの胞子の表面タンパク質である。1具体例では、感染制御組成物はアミノ酸配列を含んでなる。1具体例では、アミノ酸配列が微生物の胞子の表面タンパク質に由来するものである。1具体例において、アミノ酸配列が、微生物の胞子の表面タンパク質との十分な相同性を有するものである。1具体例において、感染制御組成物が、素地表面への微生物の胞子の結合を阻害、拮抗、中断、終了及び／又は阻止できるものである。1具体例では、感染制御組成物は、さらに、拮抗性化合物を含んでなり、前記化合物は微生物の胞子の表面タンパク質のアミノ酸配列に対する親和性を有するものである。1具体例では、組成物は、さらに、キャリヤーを含んでなる。1具体例では、感染制御組成物は、さらに、少なくとも1つの抗菌剤を含んでなる。1具体例では、危険にさらされる対象が医療従事者である。1具体例では、危険にさらされる対象が医療ファーストレスポンダーである。1具体例では、危険にさらされる対象が医療患者である。1具体例では、患者が医療環境にいる者である。1具体例では、医療患者が少なくとも1つの抗生物質を投与された者である。1具体例では、危険にさらされる対象が消防士である。1具体例では、危険にさらされる対象が警察官である。1具体例では、危険にさらされる対象が軍人である。1具体例では、危険にさらされる対象が食品を扱う者である。1具体例では、危険にさらされる対象が無生物の表面及び／又は物体である。1具体例では、投与が、局所、経口、非経口、肺、肛門、膣、眼、又は経鼻からなる群から選ばれる。

【0010】

1具体例では、本発明は、(a)i)微生物に暴露された対象(ここで、暴露により、微生物感染を生ずる可能性が高い)及びii)感染制御組成物を準備し；(b)微生物の暴露後の対象に、微生物感染が低減される条件下で、前記組成物を投与することを含んでなる方法を意図するものである。1具体例では、微生物は細菌を含んでなる。1具体例では、細菌は、クロストリジウム菌、バシラス属菌、デスルホトマキュラム属菌、スポロラクトバシラス属菌、サポロサルチナ属菌、又はテルモアクチノミセス属菌からなる群から選ばれる。1具体例では、細菌は細菌の胞子を含んでなる。1具体例では、細菌の胞子は、少なくとも1つの胞子の表面タンパク質を含んでなる。1具体例では、クロストリジウム属菌の胞子の表面タンパク質が、クロストリジウム・ディフィシレの胞子の表面タンパク質である。1具体例では、バシラス属菌の胞子の表面タンパク質が、バシラス・アンスラシスの胞子の表面タンパク質である。1具体例では、感染制御組成物はアミノ酸配列を含んでなる。1具体例において、アミノ酸配列が微生物の胞子の表面タンパク質に由来するものである。1具体例において、アミノ酸配列が、微生物の胞子の表面タンパク質との十分な相同性を有するものである。1具体例において、感染制御組成物が、素地表面への微生物の胞子の結合を阻害、拮抗、中断、終了及び／又は阻止できるものである。1具体例では、感染制御組成物は、さらに、拮抗性化合物を含んでなり、前記化合物は微生物の胞子の表面タンパク質のアミノ酸配列に対する親和性を有するものである。1具体例では、組成物は、さらに、キャリヤーを含んでなる。1具体例では、感染制御組成物は、さらに、少なくとも1つの抗菌剤を含んでなる。1具体例では、暴露される対象が医療従事者である。1具体例では、暴露される対象が消防士である。1具体例では、暴露される対象が警察官である。1具体例では、暴露される対象が軍人である。1具体例では、投与が、局所、経口、非経口、肺、肛門、膣、眼、又は経鼻からなる群から選ばれる。1具体例では、暴露される対象が無生物の表面及び／又は物体である。

【0011】

10

20

30

40

50

1 具体例では、本発明は、(a) i) 単離されたペプチド(ここで、ペプチドは、微生物の胞子の表面タンパク質に由来するものである)及びii)ペプチドとの相互作用性を有すると疑われる感染制御テスト化合物を準備し；(b)ペプチドと感染制御テスト化合物とを接触させ；(c)ペプチドと感染制御テスト化合物との相互作用を検出することを含んでなる方法を意図するものである。1具体例では、方法は、さらに、単離されたペプチドを付着させ得る素地を含んでなる。1具体例では、ペプチドが、クロストリジウム属菌の胞子の表面タンパク質に由来するものである。1具体例では、クロストリジウム属菌の胞子の表面タンパク質は、クロストリジウム・ディフィシレの外膜を含んでなる。1具体例では、ペプチドが、バシラス属菌の胞子の表面タンパク質に由来するものである。1具体例では、バシラス属菌の外膜が、バシラス・アンスラシスの胞子の表面タンパク質を含んでなる。1具体例では、ペプチドが胞子の表面ペプチドを含んでなる。1具体例では、クロストリジウム・ディフィシレの胞子の表面ペプチドが、配列番号1又は配列番号1の同属体を含んでなる。1具体例では、胞子の表面ペプチドが、配列番号3、配列番号5、配列番号7、及び配列番号15からなる群から選ばれるものである。1具体例では、感染制御テスト化合物が小さい有機分子を含んでなる。1具体例では、感染制御テスト化合物が合成ペプチドを含んでなる。1具体例では、感染制御テスト化合物がタンパク質ミメイックを含んでなる。1具体例では、感染制御テスト化合物が抗体を含んでなる。

【0012】

1具体例では、本発明は、(a) i) 単離されたラベル化微生物の胞子の表面ペプチド(ここで、前記ペプチドは、第1の蛍光強度パターンを創出する)及びii)前記ペプチドと相互作用できる感染制御テスト化合物を準備し；(b)前記ペプチドと前記感化合物とを接触させて、第2の蛍光強度パターンを有する縮小したペプチドを生成し；(c)前記第1の蛍光強度パターンを第2の蛍光強度パターンと比較することを含んでなる方法を意図するものである。1具体例では、方法は、さらに、(d)第1の蛍光強度パターンと第2の蛍光強度パターンとの差異を検出することを含んでなる。1具体例では、差異は、前記化合物が前記ペプチドに結合することを示す。1具体例では、ペプチドが、微生物の胞子の表面タンパク質に由来するものである。1具体例では、微生物の胞子の表面タンパク質が、クロストリジウム属菌の胞子の表面タンパク質に由来するものである。1具体例では、クロストリジウム属菌の胞子の表面タンパク質は、クロストリジウム・ディフィシレの胞子の表面タンパク質を含んでなる。1具体例では、細菌の胞子の表面タンパク質が、バシラス属菌の胞子の表面タンパク質に由来するものである。1具体例では、バシラス属菌の胞子の表面タンパク質が、バシラス・アンスラシスの胞子の表面タンパク質を含んでなる。1具体例では、胞子の表面ペプチドがペプチドフラグメントを含んでなる。1具体例では、ペプチドが、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、及び配列番号9からなる群から選ばれるものである。1具体例では、ラベルが、4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)、アニリノナフタレンスルホネート(ANS)、ビス-ANS(ビス-アニリノナフタレンスルホネート)、N-フェニル-1-ナフタレン(NPN)、ルテニウムレッド、クレゾールバイオレット、及び4-(ジシアノビニル)ユーロリジン(DCVJ)からなる群から選ばれる。

【0013】

1具体例では、本発明は、(a) i) 組換え発現ベクターを含んでなる細菌(ここで、前記ベクターは、胞子の表面オリゴヌクレオチド配列の少なくとも一部を含んでなる)及びii)感染制御活性を有すると疑われる化合物を準備し；(b)前記ベクターを発現させて、微生物の膜で、胞子の表面タンパク質を出現させ；(c)前記微生物を前記化合物と接触させ；及び(d)前記化合物の感染制御活性を検出することを含んでなる方法を意図するものである。1具体例では、感染制御活性は、前記化合物と前記出現されたタンパク質との結合ペアの形成を含んでなる。1具体例では、オリゴヌクレオチド配列が配列番号2を含んでなる。1具体例では、オリゴヌクレオチド配列は、配列番号4、配列番号6、配列番号8及び配列番号16からなる群から選ばれる。1具体例では、組換え発現ベクターが、さらに、融合配列(ここで、融合配列は、レポーター配列を含んでなる)を含んで

10

20

30

40

50

なる。1具体例では、レポーター配列は -ガラクトシダーゼ配列である。

【0014】

1具体例では、本発明は、サンプル中における、微生物の胞子の表面タンパク質遺伝子の少なくとも一部をコード化するオリゴクレオチド配列の存在を検出する方法であって、(a)i)配列番号2の少なくとも一部及びii)胞子の表面オリゴヌクレオチドを含有すると疑われるサンプルを準備し；(b)前記並列番号2の一部及び前記サンプルとを接触させて、配列番号2の一部と胞子の表面オリゴヌクレオチド配列との間で、交配複合体を形成させ；及び(c)前記交配複合体微生物を検出することを含んでなる方法を意図するものである。1具体例では、胞子の表面オリゴヌクレオチドが微生物の胞子に由来するものである。1具体例では、胞子がクロストリジウム属菌に由来するものである。1具体例では、胞子がバシラス属菌に由来するものである。1具体例では、オリゴヌクレオチド配列がRNAである。1具体例では、オリゴヌクレオチド配列がDNAである。

【0015】

1具体例では、本発明は、感染制御組成物及び細菌の胞子を含む素地表面を準備し；組成物を表面に適用することを含んでなり、胞子の少なくとも50%、好ましくは60%、さらに好ましくは70%、さらに好ましくは80%、最も好ましくは90%、又は100%が表面から除去される方法を意図するものである。1具体例では、表面は、皮膚、体組織、無機表面（例えば、ステンレス鋼、花こう岩、プラスチック、タイル、セラミック等）、グローブ、実験室用コート、又は医療用器具からなる群から選ばれる。

【0016】

1具体例では、本発明は、感染制御組成物及び細菌の胞子の結合の危険性が高い素地表面を準備し；組成物を表面に適用することを含んでなり、細菌の胞子の結合が、少なくとも50%、好ましくは60%、さらに好ましくは70%、さらに好ましくは80%、最も好ましくは90%、又は100%阻止される方法を意図するものである。1具体例では、表面は、皮膚、体組織、無機表面（例えば、ステンレス鋼、花こう岩、プラスチック、タイル、セラミック等）、グローブ、実験室用コート、又は医療用器具からなる群から選ばれる。

【0017】

1具体例では、本発明は、微生物の胞子のタンパク質への結合について、複数の感染制御組成物スクリーニングする方法であって、(a)前記微生物の胞子のタンパク質を担持するビーズを含んでなるクロマトグラフィーカラムを準備し；(b)前記複数の感染制御組成物と前記ビーズとを、前記感染制御組成物の少なくとも1つが前記ビーズと結合ペアを形成するような条件したで接触させ；(c)前記の少なくとも1つの結合した感染制御組成物を前記ビーズから制御可能に開放し；(d)前記の少なくとも1つの結合した感染制御組成物を検出することを含んでなる方法を意図するものである。1具体例では、前記の結合ペアは、微生物の胞子の表面タンパク質を含んでなる。1具体例では、少なくとも1つの結合した感染制御組成物の検出が、蛍光シグナルの発生を含むものである。1具体例では、少なくとも1つの結合した感染制御組成物の検出が、酵素-基質生成物の形成を含むものである。1具体例では、制御可能での開放が、ビーズを放出剤に露出することを含んでなる。1具体例では、放出剤は、光、酸及び塩基からなる群から選ばれる。

【0018】

1具体例では、本発明は、タンパク質ミメティック化合物及びキャリヤーを含んでなる感染制御組成物であって、ここで、タンパク質ミメティックは、素地表面に対して第1の特有の結合部位パターンを有しており、第1の結合パターンは、アミノ酸配列の第2の特有の結合部位パターンに対して、少なくとも50%の強さ、好ましくは60%の強さ、さらに好ましくは70%の強さ、さらに好ましくは80%の強さ、最も好ましくは90%の強さ、又は100%強さを有し、配列は、微生物の胞子の表面タンパク質に対して充分な相同性を有するものである感染制御組成物を意図するものである。1具体例では、タンパク質ミメティック化合物は小さい有機分子を含んでなる。1具体例では、タンパク質ミメティック化合物は合成ペプチドを含んでなる。1具体例では、タンパク質ミメティック化合

10

20

30

40

50

物は無機イオン錯体を含んでなる。1具体例では、表面タンパク質は胞子の表面タンパク質を含んでなる。1具体例では、微生物の胞子の表面タンパク質は、クロストリジウム属菌の胞子の表面タンパク質に由来するものである。1具体例では、クロストリジウム属菌の胞子の表面タンパク質は、クロストリジウム・ディフィシレの胞子の表面タンパク質である。1具体例では、胞子の表面タンパク質は、バシラス属菌の胞子の表面タンパク質に由来するものである。1具体例では、バシラス属菌の胞子の表面タンパク質は、バシラス・アンスラシスの胞子の表面タンパク質である。1具体例では、アミノ酸配列は、微生物の胞子の表面タンパク質のC末端に由来するものである。1具体例では、アミノ酸配列は、微生物の胞子の表面タンパク質のN末端に由来するものである。1具体例では、素地表面が生物の表面を含んでなる。1具体例では、素地表面が無生物の表面を含んでなる。1具体例では、生物の表面が体組織表面を含んでなる。1具体例では、体組織表面は哺乳類の皮膚表面を含んでなる。1具体例では、無生物の表面はステンレス鋼を含んでなる。1具体例では、無生物の表面はセラミックを含んでなる。1具体例では、無生物の表面はビニールを含んでなる。1具体例では、無生物の表面はタイルを含んでなる。1具体例では、キャリヤーは洗浄剤を含んでなる。1具体例では、組成物は、さらに、少なくとも1つの抗菌薬を含んでなる。1具体例では、キャリヤーは、無菌のものであり、ヒトへの投与に適するものである。1具体例では、キャリヤーは、抗菌性の皮膚クリーナーを含んでなる。1具体例では、キャリヤーは抗菌性の表面クリーナーを含んでなる。

【0019】

ここで使用するように、「薬学上又は薬理学的に許容される」とは、動物又はヒトに投与される際、分子成分及び組成物が、不利益、アレルギー又は他の有害な反応を生じないことをいう。

【0020】

ここで使用するように、用語「薬学上許容されるキャリヤー」とは、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール等を含む）、その好適な混合物、及び植物油、コーティング、等張性及び吸収遅延剤、リポソーム、市販のクレンザー等を含む（ただし、これらに限定されない）全ての溶媒又は分散媒体を含む。

【0021】

ここで使用するように、用語「精製した」又は「単離した」とは、ペプチド組成物を処理（例えば、分別）に供して、各種の他の成分を除去し、処理後の組成物が、その過剰な生物学的活性を実質的に保持していないことをいう。用語「実質的に精製した」を使用する場合は、タンパク質又はペプチドが、組成物の成分の大部分を構成する、例えば、組成物の約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%以上（例えば、質量/質量及び/又は質量/容量）を構成することをいう。用語「精製して同質とする」は、組成物を「外見上同質」となるまで精製して、単一のタンパク質種が存在する（例えば、SDS-PAGE又はHPLC分析に基づく）ようにすることをいう。表現「精製された組成物」とは、極微量の不純物が残っていてもよいことを意味するものではない。

ここで使用するように、用語「実質的に精製した」とは、分子、核酸配列又はアミノ酸配列が、その自然界から取り出され、単離又は分離され、必然的に同伴される他の成分の少なくとも60%、好ましくは75%、より好ましくは少なくとも90%が除去されていることをいう。従って、「単離されたポリヌクレオチド」は、実質的に精製されたポリヌクレオチドである。

【0022】

ここで使用するように、「核酸配列」又は「ヌクレオチド配列」は、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド、及びフラグメント又はその一部をいい、及び1本鎖又は2本鎖であるゲノム系又は合成系であり、センス鎖又はアンチセンス鎖を表すDNA又はRNAをいう。

【0023】

ここで使用するように、用語「単離された核酸」とは、その天然状態から取り出された

10

20

30

40

50

核酸（例えば、細胞から取り出され、好適な具体例では、他のゲノム系核酸を含まない）をいう。

【0024】

ここで使用するように、用語「機能的に同等のコドン」とは、同じアミノ酸をコード化する異なったコドンをいう。この現象は、しばしば、遺伝子暗号の「縮重」と称される。例えば、6個の異なったコドンが、アミノ酸のアルギニンをコード化する。

【0025】

ここで使用するように、用語「アミノ酸配列」及び「ポリペプチド配列」は同義語であり、アミノ酸の配列をいう。

【0026】

ここで使用する用語「胞子の表面タンパク質」とは、各種の細菌の胞子の外膜タンパク質に由来するか、又は相当の類似性を有する（すなわち、同属体である）各種のタンパク質又はペプチドフラグメントをいう。微生物の胞子の表面タンパク質は、発芽を誘発するに十分な条件となるまで、微生物の胞子を無生物及び／又は生物の表面に付着させ、不動化させるものと考えられる。

【0027】

ここで使用するように、用語「由来する」とは、化合物又は配列の源をあらわすものである。1観点では、化合物又は配列は、生物又は特定の種に由来する。他の観点では、化合物又は配列は、より大きい錯体又は配列に由来する。

【0028】

ここで使用するように、「BcIA」又は「BcIAポリペプチド」又は「BcIAタンパク質」又は「BcIA相同体」は、各種の種、特に、グラム陰性、グラム陽性、好気性及び嫌気性の細菌を含む各種の細菌種から得られた、又は天然、合成、半合成又は組換えの各種の源から得られた実質的に精製されたバシラス属菌タンパク質のアミノ酸配列を表示するために、相互に交換可能にしようするものである。例えば、クロストリジウム・ディフィシレのBcIA相同体は、バシラス・アンスラシスのBcIAペプチドと同じ機能及び活性を有する。

【0029】

タンパク質の「変異体」は、ポリペプチド配列（例えば、配列番号1）又はポリペプチド配列の各種の相同体とは、1以上のアミノ酸で異なるアミノ酸配列として定義される。変異体は「保存された」変化を有し、ここで、置換されたアミノ酸は同様の構造特性又は化学特性を有する（例えば、ロイシンのイソロイシンによる交換）。稀には、変異体は「非保存的な」変化を有する（例えば、具利親のトリプシンによる交換）。同様の少数の変異体は、アミノ酸の欠失又は挿入（例えば、付加）、又はその両方を含むこともできる。生物学的又は免疫学的活性が失われることなく、アミノ酸残基のいずれか及びいくつかが置換され、挿入され、又は欠失されるかの決定に関するガイドンスは、DNAStar（登録商標）ソフトウェアを含む（ただし、これに限定されない）コンピュータープログラムを使用することによって見られる。

【0030】

ヌクレオチドの「変異体」は、欠失、挿入又は置換により、対照のオリゴヌクレオチドとは相違する新規なヌクレオチド配列として定義される。これらは、各種の方法（例えば、配列決定アッセイ、ハイブリダイゼーションアッセイ等）を使用して検出される。この定義内には、クロストリジウム属菌の胞子の表面タンパク質をコード化するゲノムDNA配列への変性〔例えば、配列番号2にハイブリダイズできる制限酵素フラグメントのパターンにおける変性（RFLP分析）；配列番号2の選択されたフラグメントが、高いストリンジエンシー条件下において、ゲノムDNAのサンプル（例えば、アレル特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用する）にハイブリダイズできないこと；及び不適切な又は予期しないハイブリダイゼーション、例えば、クロストリジウム属菌の胞子の表面遺伝子のための正常な染色体座以外の遺伝子座へのハイブリダイゼーション（例えば、蛍光in situハイブリダイゼーション法（FISH）を使用する）〕が含まれる。

【0031】

10

20

30

40

50

「欠失」は、1以上のヌクレオチド又はアミノ酸残基が、それぞれ、不在であるヌクレオチド又はアミノ酸配列として定義される。

【0032】

「挿入」又は「付加」は、例えば、天然のクロストリジウム属菌の胞子の表面タンパク質と対比して、それぞれ、1以上のヌクレオチド又はアミノ酸残基の追加が生ずるヌクレオチド又はアミノ酸配列における変化である。

【0033】

「置換」は、1以上のヌクレオチド又はアミノ酸の、それぞれ、異なるヌクレオチド又はアミノ酸による置き換えから生ずる。

【0034】

ここで使用するように、用語「誘導」とは、核酸又はアミノ酸の各種の化学的変形をいう。このような変性の実例は、アルキル、アシル、又はアミノ基による水素の置換である。例えば、核酸誘導体は、本質的な微生物学的特性を保有するポリペプチドをコード化する。

10

【0035】

ここで使用するように、タンパク質に関連して使用する場合（「特定のタンパク質の部分」のように）、用語「部分」は、当該タンパク質のフラグメントをいう。フラグメントは、サイズ的には、アミノ酸残基4個から（全アミノ酸配列 - アミノ酸1個）までの範囲である。例えば、「配列番号1のアミノ酸配列の少なくとも部分を含んでなる」タンパク質は、全長さのクロストリジウム属菌の胞子のタンパク質及び4個以上のアミノ酸のからなるそのフラグメントを含む。

20

【0036】

ヌクレオチド配列に関連して使用する場合、用語「部分」は、当該ヌクレオチド配列のフラグメントをいう。フラグメントは、サイズ的には、ヌクレオチド残基5個から（全ヌクレオチド配列 - ヌクレオチド配列1個）までの範囲である。

【0037】

用語「生物学的に活性な」とは、各種の分子が、構造的、調節性又は生化学的機能を有していることをいう。例えば、胞子の表面タンパク質の生物学的活性は、例えば、胞子の表面タンパク質活性を欠く細胞（例えば、胞子の表面タンパク質ヌル細胞及びノックアウト細胞）における野生型増殖の復元性によって決定される。胞子の表面タンパク質活性を欠く細胞は、多くの方法（例えば、点突然変異及びフレームシフト突然変異）によって生成される。補完は、胞子の表面タンパク質活性を欠く細胞に、胞子の表面タンパク質、その誘導体、又はその部分を発現する発現ベクターを移入することによって達成される。

30

【0038】

用語「免疫学的に活性な」とは、天然、組換え又は合成のペプチド（例えば、胞子の表面タンパク質）、又はその各種のオリゴペプチドが、適切な動物又は細胞において特殊な免疫応答を惹起する及び又は特殊な抗体と結合する能力を有することをいう。

【0039】

ここで使用するように、用語「抗原決定基」は、特別な抗体（例えば、エピトープ）によって認識される分子の部分をいう。宿主動物を免疫するためにタンパク質又はタンパク質のフラグメントを使用する場合、タンパク質の多くの領域が、タンパク質上の特定の領域又は三次元構造に特異的に結合する抗体の生産を惹起できる。これらの領域又は構造は、抗原決定基と称される。抗原決定基は、抗体への結合に関して、無傷抗原（すなわち、誘発させるために使用される免疫原）と競合する。

40

【0040】

用語「免疫原」、「抗原」、「免疫原性の」及び「抗原性の」は、動物に導入される際、抗体を発生させる各種の物質をいう。この定義により、免疫原は少なくとも1つのエピトープ（免疫応答を引き起こすことができる特殊な生化学的ユニット）を含有していなければならず、一般的にはより多くを含有する。タンパク質は、免疫原として、最も頻繁に

50

使用される。後者の錯体は、いくつかのエピトープを持つより小さい分子が、それ自身によって、十分な免疫応答を誘発できない場合には、しばしば有用である。

【0041】

用語「抗体」とは、動物において、免疫原（抗原）によって惹起された免疫グロブリンをいう。抗体は免疫原に含有されるエピトープに対して特異性を示すことが望ましい。養母「多クローニング抗体」は、プラズマ細胞の複数のクローニングから生成される免疫グロブリンをいう。これに対して、「单クローニング抗体」とは、プラズマ細胞の單一クローニングから生成される免疫グロブリンをいう。

【0042】

抗体及びタンパク質又はペプチドの相互作用について使用する場合の用語「特異的結合」又は「特異的に結合する」は、相互作用が、タンパク質における特別な構造（例えば、抗原決定基又はエピトープ）の存在に左右されることを意味する。換言すれば、抗体は、一般的なタンパク質に対するよりもむしろ、特殊なタンパク質構造を認識し、結合することを意味する。例えば、抗体がエピトープ「A」に対して特異的であるとすると、ラベル化「A」及び抗体が関与する反応におけるエピトープ「A」（すなわち、フリーの非ラベル化A）を含有するタンパク質の存在は、抗体に結合するラベル化Aの量を低減するであろう。

【0043】

ここで使用するように、用語「組換えDNA分子」は、分子生物学的技術によって結合されたDNAセグメントからなるDNA分子をいう。

10

20

【0044】

ここで使用するように、用語「組換えタンパク質」又は「組換えポリペプチド」は、組換えDNA分子を使用して発現されるタンパク質分子をいう。

【0045】

ここで使用するように、用語「ベクター」及び「ビヒクル」は、DNAセグメントを1つの細胞から他の細胞に移動させる核酸分子について同義語として使用される。

【0046】

ここで使用するように、用語「発現ベクター」又は「発現カセット」は、特別な宿主生物において、所望のコード化配列及び操作可能に結合したコード化配列の発現に必要な好適な核酸配列を含有する組換えDNA分子をいう。原核生物における発現に必要な核酸配列は、通常、プロモーター、オペレーター（任意）、及びリボソーム結合部位を含む（しばしば他の配列と共に）。真核細胞は、プロモーター、エンハンサー、及び終結及びポリアデニル化シグナルを利用することが知られている。

30

【0047】

ここで使用するように、用語「操作可能な組合せで」、「操作可能な順序で」及び「操作可能に結合した」とは、所定の遺伝子の転写及び／又は所望のタンパク質分子の合成を命令できる核酸配列が生成されるような核酸配列の結合をいう。また、この用語は機能性タンパク質が生成されるようなアミノ酸の結合をいう。

【0048】

ここで使用するように、用語「形質移入」とは、外来DNAの細胞への導入をいう。形質移入は、リン酸カルシウム-DNA共沈法、エレクトロポレーション法、ミクロインジェクション法、リポソーム法、リポフェクション法、プロトプラス融合法、レトロウイルス感染法、微粒子銃（すなわち、粒子衝突）等を含む当分野において公知の各種手段によって達成される。

40

【0049】

ここで使用するように、用語「相補的」又は「相補性」は、塩基対合則によって関連付けられる「ポリヌクレオチド」及び「オリゴヌクレオチド」（これらは同義語であり、又クレオチドの配列をいう）について使用される。例えば、「配列「C-A-G-T」は配列「G-T-C-A」に対して相補的である」とのように使用する。相補性は、「部分的」又は「全体的」であってもよい。「部分的」相補性とは、1以上の核酸塩基が塩基対合側に従って適合し

50

ない場合をいう。核酸の間における「全体的」又は「完全な」相補性とは、各々のかつ全ての核酸液が、塩基対合側のもとで他の塩基と適合する場合をいう。核酸鎖間の相補度は、核酸鎖間のハイブリダイゼーションの効率及び強さに対して有意の影響を有する。こえ
rは、核酸の間の結合に左右される検出法と同様に、増幅反応において特に重要である。

【0050】

ここで使用するように、ヌクレオチド配列についての用語「相同性」及び「相同的」とは、他のヌクレオチド配列との相補性の度合いをいう。部分的相同性及び完全相補性（すなわち、同一性）がある。核酸配列に対して部分的に相補性、すなわち、「実質的に相同性」であるヌクレオチド配列は、完全な相補性の配列が目標の核酸配列へハイブリダイズすることを少なくとも部分的に阻害するものである。完全な相補性の配列の目標の配列へのハイブリダイゼーションの阻害は、低いストリンジエンシーの条件下でのハイブリダイゼーションアッセイ（サザン又はノーザンプロット、液相ハイブリダイゼーション等）を使用して試験される。実質的に相補性の配列又はプローブは、低いストリンジエンシーの条件下において、完全に相補性の配列の目標の配列への結合について競合及び阻害する。低いストリンジエンシーの条件とは非特異的結合を許容するものであると言っているわけではなく；低いストリンジエンシー条件は、2つの配列の相互結合が特異的な（すなわち、選択的な）相互反応であることを要求する。非特異的結合の不在は、相同性の部分的度合いを欠く（例えば、同一性約30%未満）第2の目標配列を使用することによってテストされる。非特異的な結合の不在下では、プローブは第2の非相補性目標とはハイブリダイズしない。

10

【0051】

ここで使用するように、アミノ酸配列についての用語「相同性」及び「相同的」とは、2つのアミノ酸配列の間の一次構造の同一性の度合いをいう。このような同一性の度合いは、各アミノ酸配列の一部、又はアミノ酸の長さ全体に係る。「実質的に相同性」である2つ以上のアミノ酸配列は、少なくとも50%の同一性、好ましくは、少なくとも75%の同一性、さらに好ましくは、少なくとも85%の同一性、最も好ましくは、少なくとも95%の同一性、あるいは100%の同一性有する。

20

【0052】

クロストリジウム属菌の胞子の表面タンパク質の核酸配列（例えば、配列番号2）の相同体であるオリゴヌクレオチド配列は、ここでは、100 bp以上の鎖長を有する配列を比較する場合、配列番号2の配列に対して50%以上の同一性を示すオリゴヌクレオチド配列として定義される。あるいは、配列番号2の相同体は、クロストリジウム属菌の胞子の表面タンパク質の生物学的に活性なアミノ酸配列をコード化するオリゴヌクレオチド配列として定義される。例えば、クロストリジウム属菌の胞子の表面タンパク質の相同体は、胞子の表面タンパク質をコード化するオリゴヌクレオチド配列の一部を含んでなることができる。

30

【0053】

低ストリンジエンシー条件は、5×SSPE (43.8 g/L NaCl、6.9 g/L Na₂H₂PO₄・H₂O及び1.85 g/L EDTA、pH: NaOHにより7.4に調節)、0.1% SDS、5×デンハルト試薬（50×デンハルト試薬は、500 ml当たり、Ficoll（タイプ400、Pharmacia）5 g、BSA（Fraction V、Sigma）5 gを含有する）、及び変性したサケの精液DNA 100 μg/mlからなる溶液における42°での結合又はハイブリダイゼーションと同等の条件をふくんでなり、鎖長約500ヌクレオチドのプローブを使用する場合には、続いて、42°において、5×SSPE、0.1% SDSを含んでなる溶液での洗浄が使用される。低ストリンジエンシー条件を構成するために、多くの同等の条件も使用される。ハイブリダイゼーション溶液の成分と同様に、プローブの鎖長及び種類（DNA、RNA、塩基組成物）及びターゲットの種類（DNA、RNA、塩基組成物、溶液中に存在する又は不動化されている）及び塩及び他の成分の濃度（例えば、ホルムアミド、デキストラヌスルフェート、ポリエチレングリコールの存在又は不存在）のようなファクターは、上述の条件とは異なる（ただし、同等）低ストリンジエンシーハイブリダイゼーションの条件を創生するように変動される。さらに、高いストリ

40

50

ンジエンシーの条件において、ハイブリダイゼーションを促進する条件（多追えば、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄工程の温度を上昇させること、ハイブリダイゼーション溶液においてホルムアミドを使用すること等）も使用できる。

【0054】

ここで使用するように、用語「ハイブリダイゼーション」は、各種の方法（該方法により、塩基対合を介して、核酸鎖を相補的な鎖と結合させて、ハイブリダイゼーション複合体が形成される）による相補的核酸の対合について使用される。ハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションの強さ（すなわち、核酸間の会合の強さ）は、核酸間の相補性の度合い、関与する条件のストリンジエンシー、形成されるハイブリドのT_m、及び核酸におけるG:Cの比のようなファクターによって影響される。10

【0055】

ここで使用するように、用語「ハイブリダイゼーション複合体」とは、相補性G及びC塩基間及び相補性A及びT塩基間での水素結合の形成によって、2つの核酸配列間で形成された複合体をいう。これらの水素結合は、さらに、塩基スタッキング相互反応によって安定化される。2つの相補性核酸配列は、アンチパラレルの配置で水素結合する。ハイブリダイゼーション複合体は、溶液中で（例えば、C₀t又はR₀t分析）又は溶液中に存在する1つの核酸配列と、固体支持体（例えば、サザン及びノーザンプロティング、ドットプロティングにおいて使用されるようなナイロン膜又はニトロセルロースフィルター又はFISH（蛍光in situハイブリダイゼーション）を含むin situハイブリダイゼーションにおいて使用されるようなガラススライド）に不動化された他の核酸配列との間で形成される。20

【0056】

ここで使用するように、用語「T_m」は「融解温度」について使用される。融解温度は、二本鎖拡散配列の集団が半解離して一本鎖となる温度である。鎖の参考文献によって示されるように、T_m値の簡単な概算は、核酸が1M NaCl水溶液中に存在する場合、次の式：

$$T_m = 81.5 + 0.41 (\%G + C)$$

によって算定される（Andersonら、「定量的フィルターハイブリダイゼーション」，Nucleic Acid Hybridization (1985)）。より精巧な計算法は、T_mの算定について、配列特性と共に、構造を考慮している。

【0057】

ここで使用するように、用語「ストリンジエンシー」は、核酸のハイブリダイゼーションが行われる際の、温度、イオン強度、及び有機溶媒のような他の化合物の存在の条件について使用される。「ストリンジエンシー」は、代表的には、20までの約T_mから25

未満のT_mまでの範囲で生ずる。「厳重なハイブリダイゼーション」は、同一のポリヌクレオチド配列を同定又は検出するため又は同様の又は関連するポリヌクレオチド配列を同定又は検出するために使用される。例えば、配列番号2のフラグメントが、厳重な条件下でのハイブリダイゼーション反応に使用される場合には、唯一の配列（すなわち、配列番号2と非相同性であるか、配列番号2との相同性又は相補性約50%以下を含有する領域）を含有する配列番号2のフラグメントのハイブリダイゼーションが好まれる。あるいは、「弱い」又は「低い」ストリンジエンシーの条件が使用される場合には、ハイブリダイゼーションは、一般的に様々な生物に由来する核酸（すなわち、相補性配列の頻度は、このような生物間では、通常低い）を使用して行われる。40

【0058】

ここで使用するように、用語「增幅可能な核酸」は、增幅法によって増幅され得る核酸について使用される。「増幅可能な核酸」とは、通常、「サンプルテンプレート」を含んでなるものと理解される。

【0059】

ここで使用するように、用語「サンプルテンプレート」とは、対象の目標配列の存在について分析されるサンプルが起源である核酸をいう。これに対して、「バックグラウンドテンプレート」は、アンプル中に存在するか又は存在しないサンプルテンプレート以外の核酸について使用される。バックグラウンドテンプレートは、しばしば、偶発性である。50

これはキャリーオーバーの結果であるか、又はサンプルから精製除去されははずの核酸汚染物の存在によるものである。例えば、検出されるべきもの以外の生物からの核酸が、テストサンプル中にはバックグラウンドとして存在し得る。

【0060】

「増幅」は、核酸配列の追加のコピーの製造として定義され、一般に、ポリメラーゼ連鎖反応を使用して行われる (Dieffenbach C.W. 及び G.S. Dveksler (1995) PCR Primer, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y.)。

【0061】

ここで使用されるように、用語「ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)」は、米国特許第4,683,195号及び第4,683,202号に記載のK. B. Mullisの方法（これら特許明細書には、クローニング又は精製なしで、ゲノムDNAの混合物中における目標配列のセグメントの濃度を増大させる方法が記載されている；これら特許の内容を、参照することによって、本明細書に含める）をいう。所望の葉目標配列の増幅されたセグメントの鎖長は、2つのオリゴヌクレオチドプライマーの相互の相対的位置によって決定され、従って、この長さは制御可能なパラメーターである。方法の反復性のため、この方法は、「ポリメラーゼ連鎖反応」（以下、「PCR」と表示する）と呼ばれる。目標配列の所望の増幅されたセグメントが、混合物において、優勢な（濃度の点から）配列となるため、これらは「PCR増幅された」といわれる。PCRにより、いくつかの異なった方法論（例えば、ラベル化プローブとのハイブリダイゼーション；アビジン - 酵素複合体検出を伴うビオチン化したプライマーの取り込み；増幅したセグメントへのdCTP又はdATPのような³²Pラベル化デオキシヌクレオチドトリホスフェートの取り込み）によって、検出可能なレベルまで、ゲノムDNAにおける特定の目標配列の單一コピーを増幅することができる。特に、PCR法自体によって創生された増幅セグメントは、それら自体、配列PCR増幅の異なったテンプレートである。

10

20

【0062】

ここで使用するように、用語「プライマー」は、精製された制限消化におけるような天然の又は合成的に製造された、核酸配列に対して相補的であるプライマー伸展生成物の合成が惹起される条件下（すなわち、ヌクレオチド及びDNAポリメラーゼのような誘発剤の存在下、好適な温度及びpHにおいて）に置かれる場合に、合成の開始点として作用できるオリゴヌクレオチドをいう。プライマーは、好ましくは増幅における最大効率のため、一本鎖であるが、あるいは、二本鎖であってもよい。二本鎖である場合には、プライマーは、まず、伸展生成物を調製するために使用される前に、その鎖を分離するために処理される。好ましくは、プライマーはオリゴデオキシリボヌクレオチドである。プライマーは、誘発剤の存在下伸展生成物の合成を刺激するように十分に長いものでなければならない。プライマーの正確な長さは、温度、プライマーの源及び使用する方法を含む多くのファクターに左右される。

30

【0063】

ここで使用するように、用語「プローブ」は、精製された制限消化におけるような天然の又は合成的、組換えにより又はPCR増幅によって製造された、対象の他のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズできるオリゴヌクレオチド（すなわち、ヌクレオチドの配列）をいう。プローブは、一本鎖又は二本鎖である。プローブは、検出、同定及び特別な遺伝子配列の単離において有用である。本発明において使用される各種のプローブは、各種の「リポーター分子」にてラベル化され、これによって、酵素系（例えば、酵素系組織化学的アッセイと同様に、ELISA）、蛍光系、ラジオアクティブ系、及び発光系を含む（ただし、これらに限定されない）各種の検出系によって検出可能であることも含まれる。本発明は、いずれかの特別な検出系又はラベルに限定されるものではない。

40

【0064】

ここで使用するように、用語「制限エンドヌクレアーゼ」及び「制限酵素」は、それぞれ、特殊なヌクレオチド配列の部分又は近くで二本鎖DNAを切断する細菌の酵素をいう。

【0065】

DNA分子は、モノヌクレオチドが反応して、1つのモノヌクレオチドペントース環の5'

50

ホスフェートが、ホスホジエステル結合を介して、1つの方向で、その近傍の3'酸素に付着するようにオリゴヌクレオチドを作成するため、「5'末端」及び「3'末端」を有するといわれる。従って、オリゴヌクレオチドの末端は、その5'ホスフェートがモノヌクレオチドペントース環の3'酸素に結合しない場合には、「5'末端」と呼ばれる。オリゴヌクレオチドの末端は、その3'酸素が他のモノヌクレオチドペントース環の5'ホスフェートに結合しない場合には、「3'末端」と呼ばれる。ここで使用するように、核酸配列は、より大きいオリゴヌクレオチドであって、5'及び3'末端を有するということができる。直鎖状又は環状DNA分子において、個々のエレメントは、「下流」エレメント又は3'エレメントの「上流」又は5'にあるといわれる。この用語法は、転写がDNA鎖に沿つて5' to 3'様式で進行するとの事実を反映する。結合した遺伝子の転写を命令するプロモーター及びエンハンサーエレメントは、一般に、コード化遺伝子の5'又は上流に位置付けられる。しかし、エンハンサーエレメントは、プロモーターエレメント及びコード化領域の3'に位置付けられる場合であっても、それらの効果を発揮できる。

【0066】

ここで使用するように、用語「遺伝子をコード化するヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチド」は、遺伝子のコード化領域を含んでなる核酸配列、すなわち、遺伝子産物をコード化する核酸配列を意味する。コード化遺伝子は、cDNA、ゲノムDNA又はRNA形で存在する。DNA形で存在する場合、オリゴヌクレオチドは一本鎖（すなわち、センス鎖）又は二本鎖である。転写の適切な開始及び/又はプライマリーRNAトランスクリプトの正確なプロセシングを可能にするために必要であれば、エンハンサー/プロモーター、スプライスジャンクション、ポリアデニル化シグナル等のような好適な調節エレメントを遺伝子のコード化領域に近い位置に配置できる。あるいは、本発明の発現ベクターにおいて利用されるコード化領域は、内在性のエンハンサー/プロモーター、スプライスジャンクション、介在配列、ポリアデニル化シグナル等、又は内在性の調節エレメント及び外因性の調節エレメントの両方の組み合わせを含有できる。

【0067】

ここで使用するように、用語「制御配列」は、核酸配列の発現のいくつかの態様を制御する遺伝子エレメントをいう。例えば、プロモーターは、操作可能に結合したコード化領域の転写の開始を容易なものとする制御エレメントである。他の制御エレメントは、スプライシングシグナル、ポリアデニル化シグナル、終結シグナル等である。

【0068】

真核生物における転写調節シグナルは、「プロモーター」及び「エンハンサー」エレメントを含んでなる。プロモーター及びエンハンサーは、転写に関与する細胞タンパク質と特異的に相互作用するDNA配列の短いアレイからなる (Maniatis, T.ら, Science 236: 1237 (1987))。プロモーター及びエンハンサーエレメントは、植物、酵母、昆虫及び哺乳類の細胞及びウイルス中の遺伝子を含む広範な真核生物源から単離されている（類似の調節エレメント、すなわち、プロモーターが、原核生物中でも認められる）。特別はプロモーター及びエンハンサーの選択は、対象のタンパク質を発現させるために如何なるタイプの細胞が使用されるかに左右される。

【0069】

発現ベクター上における「スプライシングシグナル」の存在によって、しばしば、より高いレベルの組換えトランスクリプトの発現が生ずる。スプライシングシグナルは、プライマリーRNAトランスクリプトからのイントロンの除去を仲介し、スプライスドナー及びアクセプター部位からなる (Sambrook, J.ら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク, (1989), pp. 16.7-16.8)。一般的に使用されるスプライスドナー及びアクセプター部位は、SV 40の16S RNAからのスプライスジャンクションである。

【0070】

ここで使用するように、用語「ポリAサイト」又は「ポリA配列」は、新生DNAトランスクリプトの終結及びポリアデニル化の両方を命令するDNA配列を意味する。組換えトラ

10

20

30

40

50

ンスクリプトの効果的なポリアデニル化は、ポリAテールを欠くトランスクリプトが不安定であり、迅速に分解されるため、望ましい。発現ベクターにおいて利用されるポリAシグナルは、「異種性」又は「内在性」である。内在性ポリAシグナルは、通常、ゲノムにおいて所定の遺伝子のコード化領域の3'末端に認められるものである。異種性のポリAシグナルは、1の遺伝子から単離され、他の遺伝子の3'に置かれたものである。真核細胞における組換えDNA配列の効果的な発現は、結果として生じたトランスクリプトの効果的な終結及びポリアデニル化命令するシグナルの発現を含む。転写終結シグナルは、一般に、ポリアデニル化シグナルの下流に認められ、数百ヌクレオチドの長さである。

【0071】

用語「形質移入」又は「形質移入された」とは、外来DNAの細胞への導入をいう。

10

【0072】

ここで使用するように、用語「コード化する核酸分子」、「コード化するDNA配列」、及び「コード化するDNA」とは、デオキシリボ核酸の鎖に沿うデオキシリボヌクレオチドの順序又は配列をいう。これらのデオキシリボヌクレオチドの順序は、ポリペプチド(タンパク質)の鎖に沿ったアミノ酸の順序を決定する。このようにDNA配列は、アミノ酸配列をコード化する。

【0073】

ここで使用するように、用語「アンチセンス」は、特定のRNA(例えば、mRNA)に対して相補的であるRNA配列について使用される。アンチセンスRNAは、コード化鎖の合成を可能にするウイルスのプロモーターに、逆の配向性で対象の遺伝子をスプライスすることによる合成を含む各種の方法で生成される。細胞に導入されると、この転写された鎖は、細胞によって生産された自然のmRNAと結合して二本鎖を形成する。ついて、これらの二本鎖は、更なるmRNAの転写又はその翻訳を妨げる。このように、変異表現型が生成される。用語「アンチセンス鎖」は、「センス鎖」に対して相補的である核酸鎖について使用される。符号(-)(例えば、「負」)は、アンチセンス鎖について使用され、符号(+)はセンス(すなわち、「正」)鎖について使用される。

20

【0074】

用語「サザンプロット」は、ゲルからニトロセルロース又はナイロン膜のような固体支持体へのDNAの移動及び不動化を伴う、サイズに従ってDNAを分別するためのアガロースゲル又はアクリルアミドゲル上でのDNAの分析をいう。不動化されたDNAを、ついで、ラベル化オリゴデオキシリボヌクレオチドプローブ又はDNAプローブにて探索して、使用したプローブに対して相補的であるDNA種を検出する。電気泳動前に、DNAを制限酵素によって切断できる。電気泳動に続いて、固体支持体への移動の前に又は移動の間に、DNAを部分的に脱プリン化及び変性させることができる。サザンプロットは、分子生物学者の標準的なツールである(J. Sambrookら, (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, ニューヨーク, pp 9.31-9.58)。

30

【0075】

ここで使用するように、用語「ノーザンプロット」は、ゲルからニトロセルロース又はナイロン膜のような固体支持体へのRNAの移動を伴う、サイズに従ってRNAを分別するためのアガロースゲル上でのRNAの電気泳動によるRNAの分析をいう。不動化されたDNAを、ついで、ラベル化オリゴデオキシリボヌクレオチドプローブ又はDNAプローブにて探索して、使用したプローブに対して相補的であるRNA種を検出する。ノーザンプロットは、分子生物学者の標準的なツールである(J. Sambrookら, (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, ニューヨーク, pp 7.39-7.52)。

40

【0076】

ここで使用するように、用語「逆ノーザンプロット」は、分別されたDNAのゲルからニトロセルロース又はナイロン膜のような固体支持体への移動を伴う、サイズに従ってDNAを分別するためのアガロースゲル上でのDNAの電気泳動によるDNAの分析をいう。不動化されたDNAを、ついで、ラベル化オリゴリボヌクレオチドプローブ又はRNAプローブにて探索して、使用したリボプローブに対して相補的であるDNA種を検出する。

50

【0077】

ここで使用するように、用語「コード化領域」は、構造遺伝子について使用される場合、mRNA分子の翻訳の結果として新生ポリペプチド中に認められるアミノ酸をコード化するヌクレオチド配列をいう。コード化配列は、真核生物では、5'側において、開始剤のメチオニンをコード化するヌクレオチドトリプレット「ATG」によって、及び3'側において、終止コドンを特定する3つのトリプレット（すなわち、TAA、TAG、TGA）によって結合される。

【0078】

ここで使用するように、用語「構造遺伝子」は、RNA又はタンパク質をコード化するDNAをいう。これに対して、「調節遺伝子」は、他の遺伝子の発現を調節する生成物（例えは、転写因子）をコード化する構造遺伝子である。10

【0079】

ここで使用するように、用語「遺伝子」は、構造遺伝子のコード化領域を含んでなり、約1kbの距離の5'及び3'の両末端上のコード化領域に隣接して、いずれかの末端上に位置する配列を含むデオキシリボヌクレオチド配列を意味し、従って、遺伝子はmRNAの長さに相当する。コード化領域の5'に位置する配列及びmRNA上に存在する配列は、5'非翻訳配列と呼ばれる。コード化領域の3'又は下流に位置する配列及びmRNA上に存在する配列は、3'非翻訳配列と呼ばれる。用語「遺伝子」は、cDNA及びゲノム形の遺伝子の両方を含む。遺伝子のゲノム形又はクローンは、非翻訳配列終端の「イントロン」又は「介在領域」又は「介在配列」にて中断された翻訳領域を含有する。イントロンは、ヘテロ核RNA（hnRNA）に転写される遺伝子のセグメントである。イントロンは、エンハンサーのような制御エレメントを含有できる。イントロンは、核又はプライマリートランスクriptから除去又は切り出される。従って、イントロンは、メッセンジャーRNA（mRNA）トランスクript中では不在である。mRNAは翻訳の間に機能して、新生ポリペプチドにおけるアミノ酸の配列及び順序を特定する。20

【0080】

イントロンを含有することに加えて、遺伝子のゲノム形は、RNAトランスクript上に存在する配列の5'及び3'末端の両方に位置する配列も含むことができる。これらの配列は、隣接配列又は領域と呼ばれる（これらの隣接配列は、mRNAトランスクript上に存在する非翻訳配列に対して5'又は3'に位置する）。5'隣接領域は、遺伝子の転写を調節する又は影響を及ぼすプロモーター及びエンハンサーのような制御配列を含有できる。3'隣接領域は、転写の集結、転写後切断及びポリアデニル化を命令する配列を含有できる。30

【0081】

ここで使用するように、用語「サンプル」は、その最も広い意味で使用され、環境サンプル及び生物学的サンプルを含む。環境サンプルは、土壤及び水のような環境からの物質を含む。生物学的サンプルは、ヒトを含む動物、液体（例えは、血液、血漿、血清）、固体（例えは、便）、組織、液体食品（例えは、ミルク）及び固体食品（例えは、野菜）である。胞子の表面タンパク質をコード化する核酸を含有することが疑われる生物学的サンプルは、細胞、組織抽出物、体液、細胞から単離された染色体又は染色体外のエレメント、ゲノムDNA（サザンプロット分析用のような溶液中又は固体支持体に結合したもの）、RNA（ノーザンプロット分析用のような溶液中又は固体支持体に結合したもの）、cDNA（溶液中又は固体支持体に結合したもの）等を含んでなる。40

【0082】

用語「感染制御組成物」は、組成物の不在下における生物（例えは、微生物（微生物に由来する胞子を含む））の増殖速度と比べて、生物の増殖速度を妨げ及び／又は低減させる各種の化合物をいう。感染制御組成物は、天然（例えは、細菌、ウイルス、菌類、藻類、カビ等のような微生物から誘導されたもの）、合成、又は遺伝子組み換えによるものである。感染制御組成物は、微生物の胞子のタンパク質及び／又は微生物の胞子の表面タンパク質の拮抗性阻害剤である。あるいは、感染制御組成物は、微生物の胞子のタンパク質50

及び／又は微生物の胞子の表面タンパク質と一緒に、安定な及び／又は一過性の結合ペアを形成できる。「感染制御組成物」は、抗細菌剤及び／又は抗微生物剤及び又は薬（例えば、抗生物質）も含むことができる。その結果、「感染制御活性」は、感染制御組成物を表面に適用した結果としての微生物の増殖の低減及び／又は阻止を意味すると解釈される。

【0083】

用語「抗細菌性」及び「抗微生物性」は、同義語的に、組成物の不在下における生物の増殖速度と比べて、生物の増殖速度を妨げ及び／又は低減する組成物について使用される。抗細菌性及び／又は抗微生物性組成物は、静菌性、殺菌性の両方又はいずれかである。抗細菌性及び／又は抗微生物性組成物は、阻害される細胞の生存率に影響を及ぼすことなく、細胞分裂を阻害する場合には、静菌性である。抗細菌性及び／又は抗微生物性組成物は、細胞死を引き起こす場合には、殺菌性である。細胞死は、一般に、液体増殖培地（例えば、混濁の不在）又は固体表面（例えば、寒天上におけるコロニー形成の不在）における細胞増殖の不在によって検出される。抗細菌性及び／又は抗微生物性組成物は、ウイルス、カビ及び菌類についての増殖率の低減及び／又は細胞死の発生に有効である。所定の濃度で静菌性である組成物は、より高い濃度では、殺菌性であることがあるが、他のある種の静菌性組成物は、いかなる濃度においても、殺菌性ではない。

【0084】

用語「細菌」は、全ての原核生物（原核生物界における全ての系統内のものを含む）をいう。この用語は、クロストリジウム属菌、バシラス属菌、マイコプラズマ属菌（Mycoplasma）、クラミジア属菌（Chlamydia）、アクチノミセス属菌（Actinomycetes）、ストレプトミセス属菌（Streptomyces）、及びリケッチャ属菌（Rickettsia）を含む（ただし、これらに限定されない）細菌と考えられる全ての微生物を含む。この定義には、球菌、桿菌、スピロヘータ、スフェロプラスト、胞子等を含む細菌の全ての形が含まれる。また、この定義には、グラム陰性又はグラム陽性である原核生物も含まれる。「グラム陰性」及び「グラム陽性」は、グラム染色法による染色パターンをいう（Finegold及びMartin, Diagnostic Microbiology, 6版, (1982), C.V. Moaby St. Louis, pp 13-15）。「グラム陽性細菌」は、グラム染色において使用される一次染料を保持し、顕微鏡下、染色された細胞が暗青色 - 紫色を呈する細菌である。「グラム陰性細菌」は、グラム染色において使用される一次染料を保持しないが、対比染色によって染色される。このように、グラム陰性細菌は赤色を呈する。

【0085】

用語「被検剤」とは、ここに記載するアッセイの1以上においてスクリーニングされる剤をいう。剤は、ほとんど、各種の化学化合物である。剤は、単一の単離された化合物として存在できるか、又は化学ライブラリー（例えば、コンピナトリアル）のメンバーである。特に好適な具体例では、被検剤は小さい有機分子である。

【0086】

ここで使用するように、用語「小さい有機分子」とは、一般的に医薬品において使用される有機分子に匹敵するサイズの各種分子をいう。この用語は、生物学的マクロ分子（例えば、タンパク質、核酸等）を含まない。好適な小さい有機分子は、約10 - 約5000 Da、最も好ましくは2000 Da以下、最も好ましくは約1000 Da以下のサイズ範囲である。

【0087】

ここで使用するように、用語「ラベル」又は「検出可能なラベル」は、分光分析、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的又は化学的手段によって検出可能な各種の組成物をいう。このようなラベルは、染色用ビオチン - ラベル化ストレプトアビシン複合物、磁気ビーズ（例えば、Dyabeads（登録商標））、蛍光染料（例えば、フルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパク質等）、放射性ラベル（例えば、³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、³²P）、酵素（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、及びELISAにおいて一般に使用されるもの）、コロイド金又は着色ガラス又はプラスチック（例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックス等）ビーズ

10

20

30

40

50

のような比色ラベルを含む。このようなラベルの使用を教示する特許としては、米国特許第3,817,837号、第3,850,752号、第3,939,350号、第3,996,345号、第4,277,437号、第4,275,149号、及び第4,366,241号が含まれる（ただし、これらに限定されない；これら特許の内容を参照して、本明細書に含める）。本発明において使用されるラベルは、多くの方法によって検出される。例えば、放射性ラベルは、写真用フィルム又はシンチレーションカウンターを使用して検出され、蛍光マーカーは、放出された光を検出すために光検出器を使用して検出される。酵素ラベルは、一般的には、酵素に基質を提供し、基質に対する酵素の作用によって生成した反応性生物を検出することによって検出され、及び比色ラベルは、着色したラベルを単に可視化することによって検出される。

【0088】

10

ここで使用するように、「プライマリー界面活性剤」は、置換フェノールに対して作用する又は置換フェノールと併用されて、さらに置換フェノールの感染制御活性を増大させるか、又は置換フェノールの感染制御活性を少なくともあまり低減させないような各種の界面活性剤をいう。

【0089】

ここで使用するように、用語「阻害する」、「破壊する」、「置き換える」、「拮抗する」、又は「妨げる」は、微生物の胞子及び／又は微生物の胞子の表面タンパク質が素地表面への付着しないように除去される及び／又は阻止されるとの意味をいう。

【0090】

20

ここで使用するように、用語「拮抗剤」は、微生物（例えば、細菌、ウイルス、カビ、菌類等）及び／又は微生物の生殖成分（例えば、胞子）の表面への付着を阻止できる各種の化合物をいう。「拮抗剤」は、微生物及び又は微生物の生殖成分による競合性置換によって又は結合ペア（例えば、安定性又は一過性）の形成によって付着を阻止する。例えば、拮抗剤は、胞子の表面タンパク質に結合することによって、細菌の胞子の表面への付着を阻止する。

【0091】

ここで使用するように、用語「結合性拮抗剤」は、微生物の胞子のnap層タンパク質（例えば、クロストリジウム属菌の胞子の表面タンパク質）又は素地表面とで結合ペアを形成できる各種の化合物をいう。いずれかの結合ペアの形成は、微生物の胞子の素地表面への付着を阻止及び／又は終了させる。

30

【0092】

ここで使用するように、用語「素地表面」は、微生物の胞子の表面タンパク質の付着のための部位を含む各種の物質をいう。素地表面は、生物の表面及び／又は無生物の表面を含む（ただし、これらに限定されない）。

【0093】

ここで使用するように、用語「無生物表面」とは、各種の非生存物質をいう。例えば、無生物表面としては、ビニール、ステンレス鋼、プラスチック、木材、セラミック、ガラス、クロム、タイルが含まれる（ただし、これらに限定されない）。一般的に見られるこのような表面としては、調理台、椅子、テーブル、手術用機器、医療機器、床、壁、窓、流し台、キャビネット等が含まれる（ただし、これらに限定されない）。

40

【0094】

ここで使用するように、用語「生物表面」とは、各種の生きているものをいう。例えば、生物表面としては、表皮表面、粘膜上皮組織表面、及び／又は内臓表面が含まれる（ただし、これらに限定されない）。ここで使用するように、用語「生物表面」には、さらに、果実表面（例えば、イチゴ、りんご、オレンジ、タンジェリン等）、野菜表面（なす、かぼちゃ、トマト、ジャガイモ等）、マメ科植物表面（例えば、ピーナッツ、カシュー、豆等）、穀物表面（例えば、小麦、大豆、米、ライ麦等）、花表面、幹表面、茎表面、葉表面、樹皮表面、葉身表面、枝表面を含む（ただし、これらに限定されない）野菜表面も含まれる。

【0095】

50

ここで使用するように、用語「相互作用拮抗剤」とは、微生物の胞子のnap層タンパク質／素地表面結合ペアの形成を妨げることができる各種の化合物をいう。

【0096】

ここで使用するように、用語「結合性」とは、感染制御組成物と表面との間の各種の相互作用をいう。このような表面は「結合性表面」として定義される。結合が可逆的又は非可逆的である。このような結合は、非共有結合、共有結合、イオン結合、ファンデルワールス力等である（ただし、これらに限定されない）。感染制御組成物は、懸濁液、溶液、又は混合物として含浸、組み込み、被覆される場合に、表面に結合される。

【0097】

ここで使用するように、用語「感染制御被検組成物」とは、微生物の胞子が表面に結合することを阻止する能力についてスクリーニングされる化合物のコレクションをいう。このような被検組成物としては、化学剤、化学剤の混合物、例えば、多糖類、小さい有機又は無機分子、生物学的マクロ分子、例えば、ペプチド、タンパク質、核酸、又は細菌、植物、菌類、動物細胞又は組織のような生物学的物質から調製された抽出物、天然又は合成の組成物が含まれる（ただし、これらに限定されない）。

10

【0098】

ここで使用するように、用語「危険にさらされた状態で」とは、ヒト又は無生物表面が微生物に汚染されたものとなる平均的な可能性より大きい可能性（すなわち、50%より大）を有することをいう。「危険にさらされた状態で」の暴露の可能性は、消防士、警察官、救命医療従事者を含む（ただし、これらに限定されない）ファーストレスポンダーのような職業において認められる。「危険にさらされた状態で」の暴露の可能性は、医師、ナース、病棟勤務者、病院清掃スタッフ等を含む（ただし、これらに限定されない）医療従事者のような職業において認められる。「危険にさらされた状態で」の暴露の可能性は、陸軍兵、海軍兵、空軍兵、海兵隊、国家警備兵、海上保安兵を含む（ただし、これらに限定されない）軍人のような職業において認められる。「危険にさらされた状態で」の暴露の可能性は、免疫不全患者、火傷患者、銃創患者等を含む（ただし、これらに限定されない）医療従事者のような職業において認められる。

20

【0099】

ここで使用するように、用語「特殊な結合部位パターン」とは、身体表面又は無生物表面における結合部位の再現可能なセットをいう。このような結合部位は、微生物の胞子、感染制御組成物、又は上述の小さい有機マクロ分子を含む（ただし、これらに限定されない）組成物に対する固有の親和性を有する。本発明のメカニズムを理解することは必要ではないが、このような結合パターンは、組成物に対して三次元的に適合する（例えば、立体特異性化学基の相互作用を介して）表面化学基及び／又はトポグラフィーの独特的配置の結果であると考えられる。さらに、特殊な結合パターンは、所定の表面区域内に非特異的結合（すなわち、専用のレセプターによって仲介されない結合）の配置を予測するものと考えられる」。

30

【図面の簡単な説明】

【0100】

【図1】長く、波状の、又は糸状の外膜突出（矢印）を有するクロストリジウム・スポロゲネス（C. sporogenes）の内生胞子の模範的な走査電子顕微鏡写真である。表面に面する突起は頑強な接触を形成する。

40

【図2】活性化（挿入）前では平滑な表面を持ち、活性化後では外膜の突起（矢印）で覆われるクロストリジウム・ディフィシレ43594の橢円形の内生胞子を示す模範的な走査電子顕微鏡写真である。

【図3】発芽の進行につれて、外膜が低い隆起で覆われる及び1つの局（テール（T）領域）における厚いアンカー構造を示すクロストリジウム・ディフィシレ43594の胞子模範的な走査電子顕微鏡写真である。

【図4】18 kDaバンド（矢印参照）に存在する胞子タンパク質全体を同定するSDS-PAGEゲルを示す模範的なデータである。この18 kDaバンドは、クロストリジウム・ディフィ

50

シレ抗体をハイブリダイズできるウエスタンプロット 18 kDa バンドと一致する。

【図 5】140、150 及び 160 kDa バンド（p1、p2、及び p3 参照）に存在する胞子タンパク質全体を同定する SDS-PAGE ゲルを示す模範的なデータである。これらの 140、150、及び 160 kDa バンドは、それぞれ、クロストリジウム・ディフィシレ抗体をハイブリダイズできるウエスタンプロット 140、150、及び 160 kDa バンドと一致する。

【図 6 A】約 300 kDa（矢印 1）、275 kDa（矢印 2）、250 kDa（矢印 3）、160 kDa（矢印 4）、150 kDa（矢印 5）、140 kDa（矢印 6）、35 kDa（矢印 7）、28 kDa（矢印 8）、及び 15 kDa（矢印 9）バンドにおけるクロストリジウム・ディフィシレの外膜タンパク質全体を同定する SDS-PAGE ゲルを示す模範的なデータである。他の 6 つの非ハイブリダイズ性バンド（矢印 10 - 15）も、非免疫反応性外膜タンパク質を決定するために同定した。
10

【図 6 B - 6 C】図 6 A に示すバンドに相当する約 300 kDa（矢印 1）、275 kDa（矢印 2）、250 kDa（矢印 3）、160 kDa（矢印 4）、150 kDa（矢印 5）、140 kDa（矢印 6）、35 kDa（矢印 7）、28 kDa（矢印 8）、及び 15 kDa（矢印 9）バンドへのクロストリジウム・ディフィシレ抗体のハイブリダイゼーションを証明するウエスタンプロットを示す模範的なデータである。

【図 7】それぞれ、BcIA（緑色）及び Clp（ふじ色）モノマー（A 及び B）及びそれらの重複像（C）に関する構造の 1 具体例を示す。N 及び C 末端及び - 鎖はラベル化される。
。

【図 8】側部から及び上部から見た BcIA 及び Clp（B）トリマーの 1 具体例を示す。各トリマーを含んでなる 3 つのモノマーは、青色、緑色及び赤色に着色される。
20

【図 9 A】バシラス・セレウス（*B. cereus*）ATCC 10876 の胞子の模範的な透過電子顕微鏡写真である。

【図 9 B】外膜から突出する nap 層を示すバシラス・アンスラシスの胞子の模範的な透過電子顕微鏡写真である。

【図 9 C】BcIA nap 層及び内側基底膜を示すバシラス・アンスラシスの外膜の模範的なクローズアップである。

【図 10】素地表面（例えば、皮膚表面）との微生物の胞子の相互作用を示す具体例の説明図である。図 10 A は、哺乳類の皮膚上皮層への微生物の胞子の nap 層の付着（例えば、少子の表面タンパク質突起による）を説明する。図 10 B は、素地表面及び素地表面への微生物の胞子の表面タンパク質の付着を乱すことができる各種の感染制御組成物への微生物の胞子の表面タンパク質の付着を説明する。
30

【図 11】胞子の表面タンパク質を含んである pET-19b プラスミドの 1 具体例の概略図である。

【図 12】pET-19b ベクターからの組換え CD 1067（赤色矢印）発現の SDS-PAGE 電気泳動分離を示す模範的なデータである。レーン 1 : MW 基準ラダー、レーン 2 : 1 時間サンプル、レーン 3 : 2 時間サンプル、レーン 4 : 3 時間サンプル、レーン 5 : 4 時間サンプル、レーン 6 : 5 時間サンプル、レーン 7 : 6 時間サンプル。タンパク質染色：クーマシープルー。

【図 13】pET-19b ベクターからの組換え CD 1067（赤色矢印）発現のウエスタンプロット分析を示す模範的なデータである。レーン 1 : MW 基準ラダー、レーン 2 : 1 時間サンプル、レーン 3 : 2 時間サンプル、レーン 4 : 3 時間サンプル、レーン 5 : 4 時間サンプル、レーン 6 : 5 時間サンプル、レーン 7 : 6 時間サンプル。図 13 A : F1373 抗 - クロストリジウム・ディフィシレ抗体を使用する検出。図 13 B : 抗 - HIS 抗体を使用する検出。
40

【図 14】pET-19b ベクターからの組換え CD 3620（赤色矢印）発現の SDS-PAGE 電気泳動分離を示す模範的なデータである。レーン 1 : MW 基準ラダー、レーン 2 : 0 時間サンプル、レーン 3 : 1 時間サンプル、レーン 4 : 2 時間サンプル、レーン 5 : 3 時間サンプル、レーン 6 : 4 時間サンプル、レーン 7 : 4.5 時間サンプル。タンパク質染色：クーマシープルー。

【図 15】pET-19b ベクターからの組換え CD 3620（赤色矢印）発現のウエスタンプロット
50

分析を示す模範的なデータである。レーン1：MW基準ラダー、レーン2：0時間サンプル、レーン3：1時間サンプル、レーン4：2時間サンプル、レーン5：3時間サンプル、レーン6：4時間サンプル、レーン7：4.5時間サンプル。図15A：F1373抗-クロストリジウム・ディフィシレ抗体を使用する検出。図15B：抗-HIS抗体を使用する検出。

【図16】pET-19bベクターからの組換えCD 3620（赤色矢印）発現に関する抗体検出制御データを示す模範的なデータである。レーン1：MW基準ラダー、レーン2：6時間pJEB02サンプル、レーン3：4.5時間pJEB03サンプル。図16A：組換えCD 1062（頂部赤色矢印）及び組換えCD 3620（底部赤色矢印）を同定するSDS-PAGEクーマシープルー対照電気泳動分離。図16B：免疫前F1373を使用する検出を使用するウエスタンプロット分析。

図16C：免疫前F1997検出を使用するウエスタンプロット分析。図16D：F1997抗-クロストリジウム・ディフィシレ抗体検出を使用するウエスタンプロット分析。

【図17】クロストリジウム・ディフィシレの外膜コートを除去するための方法のいくつかの具体例を示す図である（実施例9参照）。

【図18A】原料として使用される代表的なクロストリジウム・ディフィシレ630の胞子を示す写真である。

【図18B】外膜を除去した後の代表的なクロストリジウム・ディフィシレ630を示す写真である。

【図18C】取り出し後に精製及び濃縮した代表的なクロストリジウム・ディフィシレ630の胞子の外膜を示す写真である。

【発明を実施するための形態】

【0101】

本発明は、感染の制御の分野に係る。特に、本発明は、無菌状態の維持、細菌の除染、及び／又は細菌暴露の予防のための組成物及び方法に係る。1具体例では、本発明は、微生物の胞子が素地表面に結合することを阻害する感染制御組成物を意図するものである。例えば、阻害は、微生物の胞子の素地表面との相互作用、付着及び／又は安定化を乱し及び／又は排除する。

【0102】

約70年間、細菌感染に対する第一線の防御は抗生物質であった。第1の抗生物質は1940年代及び1950年代に臨床に使用され、それ以後、その使用は明らかに増加していた。有益な進展ではあるが、抗生物質及び抗菌剤治療はいくつかの課題を示した。第1に、抗生物質は胞子に対しては無効である。第2に、抗生物質耐性の発生が、重大かつ生命を脅かす世界的に重大な事象である。例えば、いくつかの微生物菌株は、使用可能な抗生物質の多くに対して免疫することが知られている（Travis, Science 264: 360-362 (1994)）。他の医薬耐性生物の中には、肺炎及び髄膜炎を引き起こす肺炎球菌、下痢を引き起こすクリプトスボリジウム属菌（Cryptosporidium）及び大腸菌（E. coli）及び血流、手術創及び尿路感染を引き起こす腸球菌がある（Berkelmanら, J. Infect Dis. 170: 272-277 (1994)）。本発明は、微生物の胞子の汚染及び一般的な抗生物質の投与に対する微生物感染の臨床的耐性に関する課題を解消することを目的とする組成物及び方法を意図するものである。

【0103】

I. 微生物の胞子

いくつかの微生物は、生育及び増殖に適さない環境に暴露される際に休眠相に入る胞子を発生する。胞子の生存は、固体表面への付着及び／又は接着が行われる場合に増大される。環境条件が再び生育及び増殖に適するように変化する際、微生物の胞子は発芽し、周囲領域を汚染するようになる。増殖中の新たな微生物と接触するヒト又は動物は、あらかじめ汚染されていることが知られていなかった区域から感染されるようになる。いくつかのケースでは、ヒト及び／又は動物が微生物の胞子と接触すると、接触後、接触位置において、発芽及び感染が進行する。あるいは、気付かれていなかった胞子の発芽によって、食品の腐敗が発生し、これによって、食物媒介性の病気の発生が開始される。化学剤及び物理

10

20

30

40

50

的な殺菌手段に対する抵抗性のため、これらの細菌の胞子は、湿潤及び乾燥加熱、UV照射、及び過酸化水素を伴う処理について、殺菌作用のインジケーターとして使用される (Itōら, 「無菌システムを使用する包装材料の殺菌」, *Food Technol.*, 38: 60-62 (1984))。

【0104】

細菌の胞子の表面特性及びその無生物及び生物素地との相互作用を理解することは、包装材料の選択、及び食品、医薬品、及び医療用品の包装において使用される表面殺菌法の評価にとって重要である。例えば、細菌（すなわち、栄養細胞）の不活性物質表面への接着における疎水的相互作用の役割は良好に受け入れられる。しかし、比較的少数ではあるが、いくつかの研究は、微生物の胞子の表面疎水性又は無生物素地への胞子の接着を徹底的に検討している。細菌の胞子の疎水性は、栄養細胞の疎水性を測定するために使用される方法を応用することによって測定される。表面疎水性を測定するための確立された技術としては、i) 炭化水素への接着 (Beckら, 「スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) の表面変化及び疎水性に対する生育の影響」, *Ann. Inst. Pasteur/Micribiol.* (Paris) 139: 655-664 (1988))、ii) 疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) (Doyleら, 「バシラス属菌の胞子の疎水特性」, *Curr. Microbiol.* 10: 329-332 (1984))、iii) 塩凝集 (Takuboら, バシラス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*) の最外層欠損変異胞子の単離及び特徴づけ, *Microbiol. Immunol.* 6: 673-979 (1988))、iv) 接触角の測定 (Minagiら, 「接触角及び炭化水素接着法によって測定されるカンジダ属菌の細胞表面の疎水性」, *J. Gen. Microbiol.* 132: 1111-1115 (1986))、及びヘキサデカンへのバクテリアの接着 (BATH) (Wienekら, 「バシラス属菌及びクロストリジウム属菌の胞子の疎水性」, *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2600-2605 (1990)) が含まれる（ただし、これらに限定されない）。

【0105】

研究では、胞子の疎水性は、菌種及び菌株の間で異なることが証明されている。しかし、各有機体に関して、胞子の疎水性は、栄養細胞の疎水性よりも大きいと考えられる。さらに、穏やかな熱処理は、多くのバシラス属菌の疎水性を増大させる。1つの仮説では、熱処理後の胞子の疎水性の増大は、外胞子殻又は外膜タンパク質の破壊によって生ずるものであることが示唆されている。

【0106】

本発明のメカニズムを理解することは必要ではないが、細菌の胞子の増大した疎水性は、栄養細胞のペプチドグリカンと比較して、外胞子殻及び外膜におけるタンパク質の相対的な豊富さによるものと考えられる (Doyleら, 「バシラス属菌の胞子の疎水特性」, *Curr. Microbiol.* 10: 329-332 (1984); Matzら, 「バシラス・セレウスの胞子からの外膜の化学組成」, *J. Bacteriol.* 101: 196-201 (1970); 及びTakumiら, 「クロストリジウム・ボツリヌム (*Clostridium botulinum*) タイプAの高度に胞子形成性の変異体の胞子からの外膜の単離及び部分的特徴付け」, *Microbiol. Immunol.* 28: 443-454 (1979))。胞子の疎水性と外膜の存在との関連は、最近、いくつかのバシラス属菌について報告されている (Kjelleberg, S., 「無生物表面への付着」, *Microbial adhesion and aggregation*, pp 51-70, K.C. Marshall編, Springer-Verlag KG, Berlin (1984))。胞子表面が化学処理によって除去される際に、バシラス・セレウスのT胞子の胞子疎水性が低減することが観察されている (Kutimaら, 「バシラス・セレウスのT胞子の発芽における胞子表面の関与」, *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 47-52 (1987))。胞子の疎水性の低減は、バシラス・メガテリウム (*B. megaterium*) のノックアウト外胞子殻陰性変異体 (QMB 1551: A TCC 12872) においても認められている (Takuboら, 「バシラス・メガテリウムの最外層欠損変異体胞子の単離及び特徴付け」, *Microbiol. Immunol.* 9: 973-979 (1988); 及びKoshikawaら, 「バシラス属菌の胞子の表面疎水性」, *J. Gen. Microbiol.* 135: 2717-2722 (1989))。これらの観察から、外膜の外胞子殻が、胞子の疎水性に関与することが示唆される。

【0107】

10

20

30

40

50

1具体例では、本発明は、医療、医薬品、及び／又は食品産業において使用される表面の衛生、器具の殺菌及び／又は包装材料を改善するための組成物及び方法を意図するものである。

【0108】

A . クロストリジウム・ディフィシレの胞子の表面タンパク質

クロストリジウム属の細菌は、ガス壊疽、傷感染、ボツリヌス中毒、破傷風、偽膜性大腸炎、敗血症、又は院内下痢症を含む（ただし、これらに限定されない）疾患を発生させると考えられる。この属の菌は、不都合な条件下では、熱、化学剤、及び放射線照射に対して高度に抵抗性である脱水内生胞子を形成することによって良好に生き延びる。これらの胞子は、土壤中に認められ、風で運ばれ、哺乳類の消化管及び尿生殖路から回収され、成育条件が胞子の活性化及び発芽を支持するようになるまで、非常に長い期間、休眠を持続する能力を有する。

10

【0109】

クロストリジウム・ディフィシレは、医療環境及び病院環境において蔓延している。クロストリジウム・ディフィシレの胞子は、生物及び／又は無生物表面において長期間生存し、多くの殺菌剤及び抗生物質に対して抵抗性であり、患者から患者へと容易に伝達される。胞子形成及び発芽と共に、クロストリジウム・ディフィシレの胞子の表面への付着を理解することは、クロストリジウム・ディフィシレに関連する疾患の予防、制御及び治療に役立つである。例えば、クロストリジウム・ディフィシレは、バシラス属菌における胞子形成プロセスを引き起こすリン酸リレー系に関与するいくつかの遺伝子が欠けている。このような及び他のクロストリジウム属菌における胞子形成系の様態は、最近になって検討されている（Paredesら、「クロストリジウムの発芽及び生理機能の比較ゲノム検討」，Nat. Rev. Microbiol. 3: 969-978 (2005)）。さらに、クロストリジウム・ディフィシレは、ほとんどのバシラス属菌及びクロストリジウム属菌に、通常、存在するトリリストロンgerオペロンを欠いている（Moirら、「胞子の発芽」 Cell Mol. Life Sci. 59: 403-409 (2002)；及びBroussolleら、「クロストリジウム・ボツリヌム及びクロストリジウム・スポロゲネスにおける胞子の発芽の分子及び生理学的特徴付け」，Anaerobe 8: 89-100 (2002)）。これらの観察から、クロストリジウム・ディフィシレの発芽レセプターは、他のクロストリジウム属菌及びバシラス属菌とは実質的に異なり、他のクロストリジウム属菌及びバシラス属菌との配列の類似性に基づいて同定されるべきではないことが示唆される。

20

【0110】

微生物の胞子の、熱、溶媒、酵素、洗浄剤、紫外線及び電離放射線、水酸化ナトリウム、エタノール、過ギ酸、フェノール、寒さに対する抵抗性により、条件が最適である際に接触的に生育する能力と共に、微生物は、動物、特にヒトの健康に対する重大な脅威となっている（Tipperら、「細菌の内生胞子の構造」 Spores V, H. Hanvorson, R. Hanson及びL. Campbell編, Amer. Soc. Microbio., Bethesda, Maryland, 3-12 (1972)；及びRussell, A., 「細菌の胞子及び殺胞子化学剤」 Clin. Microbiol. Rev., 3, 99-119 (1990)）。病院内及びナーシングホームにおけるクロストリジウム・ディフィシレ感染の院内発生は、胞子が壁、床、用具、ベッドシーツの上に、及び医療施設の介護者の手の上に認められるため、重大な疫学的問題を提起する。胞子は、i) 抗生物質治療から変性した腸内フローラを有する者、ii) 易感染性免疫系を有する者、又はiii) 診断テスト又は処置に関連して多数の浣腸剤を必要とする者を含む（ただし、これらに限定されない）個人を容易に感染させるように思われる（Zaleznik, D., 「クロストリジウム・ディフィシレ：1990年代の重要な院内病原体」，Clin. Microbiol. Newsletter 13, 145-152 (1991)）。

30

【0111】

クロストリジウム属菌（例えば、クロストリジウム・スポロゲネスATCC 3584及びクロストリジウム・ディフィシレATCC 9689及びATCC 43594）の胞子の2つの種類からの外膜は、付着、発芽及び／又はコロニー形成に関与する（Panessa-Warrenら、「クロストリジウム・スポロゲネス及びクロストリジウム・ディフィシレの外膜の可塑性」，Tissue & Cel

40

50

I 29: 449-461 (1997)。超微細構造変化は、クロストリジウム・ビファーメンタンス (*Clostridium bifermentans*) の胞子の発芽及び胞子付属体の成長に関連したが、特定の機能は認められなかった (Samsonoffら, 「付属体を有するクロストリジウム属菌の胞子の発芽及び成長に関する超微細構造変化」, *J. Bacteriol.*, 101, 1038-1045 (1970))。薄切片透過電子顕微鏡観察によるクロストリジウム属菌の胞子の検査では、毛状突起をもつ外膜の外層が認められたが、クロストリジウム属菌のコロニー形成に関連する分布、機能、又は出現についての検討は示されていない (Hoenigerら, 「クロストリジウム・スポロゲネスにおける胞子の発芽及び成長の超微細構造的態様」, *Can. J. Microbiol.*, 15, 1 061-1065 (1969))。透過電子顕微鏡観察による薄切片の再構築は、一度に多数の胞子の外膜の形態を観察及び解明する場合の重大な課題、及びこのような小さく、繊細な薄断片を得ること、及び乏しい染色性、栄養基材への胞子の付着に関連する課題を有することが知られている。
10

【0112】

クロストリジウム・スポロゲネスは、休眠状態が崩壊すると、特別な形態学的ステージを呈し、外膜は、良好な結果の発芽、成長、増殖、及び素地表面結合部位のコロニー形成に積極的な役割を果たすと思われる (Panessa-Warrenら, 「クロストリジウム・スポロゲネスの内生胞子の付着及び発芽の電子顕微鏡観察」, *Scanning* 16, 227-240 (1994))。クロストリジウム属菌の外膜は、胞子の外側の「膜状」層と考えられるが、発芽においては、消極的な関係物質として記載されていた。しかし、一旦、休眠状態が崩壊すると、クロストリジウム・スポロゲネスATCC 3584胞子は、走査電子顕微鏡観察 (SEM) によって見られる非常に特殊な外膜の形態学的構造を形成すると思われ、胞子の素地又は他の胞子への付着 (例えば、胞子の共凝集) を促進するように思われる。外膜突起は、その後、胞子の遠位 (例えば、テール領域) から伸びる単一の柄によって置き換わり、栄養細胞の発達及び成長の最終ステージにおいて胞子を繫留するように思われる。
20

【0113】

クロストリジウム・スポロゲネスの付着の初期ステージにおいて、外膜の繊細な糸状の突起は、表面に付着するより短い突起のいくつかと一緒に、外方に伸びる (図1において、白い矢印参照)。外膜から通常長いフィラメント状の突起が、胞子の頂部又は側部から発生し、表面又は最も近い胞子に向かって伸び、胞子を一緒に結合する (共凝集)。外膜突起は、クロストリジウム・スポロゲネスの活性化された外方表面の全体に現れ、最終的には、表面に向かって伸びる単一の、厚い付着構造に発展し、胞子を繫留すると思われる。
30

【0114】

クロストリジウム・スポロゲネスとは異なり、クロストリジウム・ディフィシレは少ない数の付着胞子を有し、付着を発生させるためにより長いインキュベーション時間を必要とする。休眠状態のクロストリジウム・ディフィシレの胞子は、小さく (長さ約 2.0 gm × 幅 1.1 gm)、楕円形であり、主に平滑である (図2参照)。一旦、活性化が開始すると、胞子は、外膜を覆う低い突出物を示す (図3参照)。付着の早期のステージでは、クロストリジウム・ディフィシレ43594は、細長い胞子の表面全体を覆う外膜隆起及びこぶを発生する。これらの胞子は、テール領域において、より細長い外膜突起を発生し、この突起は、その後、発芽サイクルの間に、厚くなった繫留構造によって置き換わる (図3の黒い矢印)。クロストリジウム・スポロゲネスとは異なり、クロストリジウム・ディフィシレは、より少ない外膜の伸展を示すが、胞子のテール末端において発生する厚い外膜伸展を生ずる。
40

【0115】

水又は緩衝液における攪拌 (例えば、300 rpmの遠心) の間、クロストリジウム・スポロゲネス及びクロストリジウム・ディフィシレの胞子が寒天表面に付着したままでいるとの事実は、これらの胞子が、表面へ接着及び / 又は付着の強力な手段を有することを強く示唆している。理想的な条件下では、クロストリジウム・スポロゲネスの寒天表面への付着が、インキュベーション後 27 分以内に起こることが観察された。予め還元した寒天上
50

、嫌気的条件下では、88 - 105分内で、クロストリジウム・スポロゲネスの胞子の最大の付着が生ずることが観察された。クロストリジウム・ディフィシレの胞子の付着は、かなり長い時間がかかり、例えば、クロストリジウム・ディフィシレ9689では105分及びクロストリジウム・ディフィシレATCC 43594では180分である。

【0116】

一旦付着すると、胞子は、頑強に固体表面に対する繫留状態を持続できる。クロストリジウム・ディフィシレ43594は、胞子が非常にゆっくりと付着するとの特異性を示す。しかし、クロストリジウム・ディフィシレは、生物表面に露出された後は付着を促進するとの適応反応を有することができる。例えば、腸運動が増大された患者及び多数浣腸を受けた者において、クロストリジウム・ディフィシレの院内感染の発生率の増加が報告されている(Bartlett, J. 「イントロダクション」, Clostridium Difficile: 長疾患におけるその役割, R. Rolfe及びS. Finegold編, Academic Press, New York, pp. 1-13 (1988); Silva, J. Jr., 「クロストリジウム・ディフィシレ関連腸疾患の防止」, Clostridium Difficile: 長疾患におけるその役割, R. Rolfe及びS. Finegold編, Academic Press, New York, pp. 368-378 (1988); 及びMcFarlandら, 「クロストリジウム・ディフィシレ感染の院内獲得」, New Engl. J. Med., 320: 204-210 (1989))。クロストリジウム・ディフィシレの胞子は、健常者、非症候性の者の消化管に日常的に見られる。従って、腸への付着を開始し、感染プロセスを開始するトリガー機構は、正常なフローラの減少(例えば、抗生素、疾患又は反復する浣腸によって発生する)及び/又は大腸の運動機能亢進の組合せであろう。

10

【0117】

クロストリジウム属菌の胞子の外膜付着成長物は、一般的には、直径約7 nmを有し、長さは0.1 - 2.9 nmの範囲で変動する。これらの成長物は、通常、長さが200 nm未満であり、極めて纖細である原纖維を含む(Hancock, I., 「微生物細胞の表面の構造」, Microbial Cell Surface Analysis, N. Mozes, P. Handley, H. Busscher及びP. Rouxh et編, VCH Publishers, New York, pp. 23-59 (1991))。通常、クロストリジウム・スポロゲネスの外膜成長物は幅85 - 1015 nmであるが、いくつかの成長物、特に共凝集付着を含むものは、2000 nmのも長さである。クロストリジウム・スポロゲネスの外膜からのこぶ様の突起は直径68 - 75 nmであり、発芽の末期ステージにおいて見られる腫大した突起は180 - 240 nmもの直径である。

20

【0118】

明らかなように、以前から発芽における消極的な関連物質であると考えられていた胞子の外膜が、クロストリジウム・スポロゲネス及びクロストリジウム・ディフィシレの胞子の付着及びコロニー形成に積極的な役割を果たすことが認められる。1具体例では、クロストリジウム・ディフィシレのタンパク質は、外膜の表面層(ここで、外膜の層はクロストリジウム・ディフィシレの胞子の最外側のタンパク質を含む)に由来するものである。1具体例では、本発明は、クロストリジウム・ディフィシレの胞子の最外側の少なくとも1つの表面タンパク質を含んでなる組成物を意図するものである。1具体例では、表面タンパク質は、胞子の表面タンパク質を含んでなる。本発明のメカニズムを理解することは必要ではないが、これらの胞子の表面タンパク質は、微生物の胞子と素地表面の結合部位との間の相互作用を提供するものと考えられる。また、i) 胞子と生物表面との間、及びii) 胞子と無生物表面との間を含む(ただし、これらに限定されない)間ににおける分子付着反応を規定するために、これらのタンパク質が使用されるものと考えられる。クロストリジウム・ディフィシレの外膜タンパク質のサイズ的特徴を表1に示す。

30

40

【表1】

代表的なクロストリジウム・ディフィシレの外膜タンパク質のサイズ的特徴

タンパク質(代替名)	サイズ(kDa)	BAS遺伝子番号	GI
CD 1581	20	1581	126699184
CD 1067	47	1067	126698654
CD 3620	14	3620	126701246
CD 1613	35	1613	126699217
CD 1711	12	1711	126699318
推定上の胞子の表面タンパク質	22	598	126698176
推定上の胞子の表面タンパク質	22	2401	126700016
スーパーオキシドジスムターゼ	27	1631	126699235
推定上のプロリンラセマーゼ	24	3237	126700857
60kDaシャペロニン	58	0194	126697767
シャペロンタンパク質	67	2461	126700078
10kDa シャペロニン	10	0193	126697766
ピルビン酸-フラボドキシン酸化還元酵素	130	2682	126700296
CD 0881	36	0881	126698458
CD 1511	35	1511	126699115
細胞表面タンパク質	76	2793	126700409
3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドログナーゼ	31	1058	126698642
推定上の胞子皮質溶菌酵素	47	0551	126698130
推定上の脂肪族スルホネートABCトランスポーター, 基質結合リポタンパク質	36	1484	126699088
推定上のフルクトース-ビスホスフェートアルドラーーゼ	33	0403	126697972
ジピコリネートシンターゼ, サブユニットB	21	2967	126700588
推定上のインドールピルビン酸酸化還元酵素サブユニットB	21	2380	126699995
電子伝達フラボタンパク質α-サブユニット	36	1056	126698640
推定上のファージ関連細胞壁ヒドロラーゼ	28	1898	126699508
細胞表面タンパク質	66	2791	126700407
ギ酸テトラヒドロ葉酸リガーゼ	60	0718	126698298
オリゴペプチドABCトランスポーター, 基質結合タンパク質	58	2672	126700286
γ-アミノ酪酸代謝デヒドラターゼ/イソメラーゼ	56	2341	126699959
NAD特異性グルタミン酸デヒドログナーゼ	46	0179	126697752
推定上のアミノアシルヒスチジンジペチダーゼ	53	0708	126698287

プロリンリダクターゼサブユニットプロタンパク質	68	3244	126700863
グリシン/サルコシン/ペタインリダクターゼ複合体成分C β ユニット	55	2349	126699967
グリシンデヒドロゲナーゼサブユニット2	54	1658	126699262
アセチルCoAアセチルトランスフェラーゼ	41	1059	126698643
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ	45	1339	126698938
推定上の二官能性タンパク質：ペルオキシドレドキシン/キチナーゼ	82	1433	126699037
グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ	36	3174	126700794
ブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ	41	1054	126698638
d-リボースABCトランスポーター, 基質結合タンパク質	35	0300	126697872
推定上のルベレリスリン	20	1474	126699078
コハク酸セミアルデヒドヒドロゲナーゼ	51	2342	126699960
酸化還元酵素, チアミンジP-結合サブユニット	39	0116	126697688

10

20

30

【0119】

1 具体例では、クロストリジウム・ディフィシレのタンパク質は、全胞子タンパク質標本を、精製されたインタクトのクロストリジウム・ディフィシレの胞子に対する抗体にて探索し、ハイブリダイズしたタンパク質・抗体複合体を創生することによって同定される。 1 具体例では、クロストリジウム・ディフィシレの胞子の表面タンパク質としては、CD 1067、CD 3620、CD 1581、CD598又はCD 2401が含まれる（ただし、これらに限定されない）。 1 具体例では、クロストリジウム・ディフィシレの酵素は、クロストリジウム・ディフィシレの胞子の表面タンパク質標本と提携される。

【0120】

1 具体例では、クロストリジウム属菌の仮定上のタンパク質（CD 1581）は、分子量 18、140、150又は160 kDaを含む分子量（これらに限定されない）をもつハイブリダイズした抗体・タンパク質複合体として単離される（図 4 - 6 参照）。 1 具体例では、仮説上のタンパク質（~20 kDa）は、クロストリジウム属菌の仮説上の核酸配列：配列番号 2

【化1】

```

1      atggaaaata aaaaatgtta ttcaagaat tggtatgaaa gaggagaatc tacagctaaa
61     tggttccaaa atgatagaga agaatatgaa agagaaggcat atgatgaaga tagagaaaga
121    agaggttcaa actgtggatg ttcaagattca ggagaaaata gaccttagaaa ctgtgaaaga
181    tttagaagag aagctgagat aagagaaaaga gaagcaagag aagcattctg tgaatcttca
241    gagaaaaaaga aagaggcatt agcatatgaa tgtgaagcta gaaaattatg ggaagaagca
301    gaaaaaatact gggatgaata ttcaaaaatac aactataaag gaatcgaata ttttagcagaa
361    gctgctagat tatttgatga aggtatggaa tgtgaagcta gaagaaaatgg aaataatgga
421    ggaaacaata ataattgttgc ccataaatgc cataaaatgtt attgtaactg ctgtagaaaa
481    taa

```

40

によってコード化されるアミノ酸配列：配列番号 1

【化 2】

1 MENKKCYSED WYERGESTAK WFQNDREEYE REAYDEDRER RGSNCGCSDS
51 GENRPRNCER FRREAEIRER EAREAFCESS EKKKEALAYE CEARKLWEEA
101 EKYWDEYSKY NYKGIEYLAE AARLFDEGME CEARRNGNNG GNNNNCCCHKC
151 HKCNCNCCRK

(受託番号:YP 001055081; GI: 126699184)を含んでなる。

[0 1 2 1]

1 具体例では、クロストリジウム属菌の仮定上のタンパク質 (CD 1067) は、分子量140
、150又は160 kDaを含む分子量（これらに限定されない）をもつハイブリダイズした抗体
- タンパク質複合体として単離される（図5、6 参照）。1 具体例では、仮説上のタンパ
ク質（~47 kDa）は、クロストリジウム属菌の仮説上の核酸配列：配列番号 4 10

【化 3】

1 atgcaagatt ataaaaaaaaaaa taaaagaaga atgtatcatac agccaatgtc tacaatgaat
61 gaagaagaag tgtatcatac tgaaataaat tcagaagaca tgagggttt taaaaatca
121 caccatcata atggatgtaa tactgataat aagtgtgagt gccatgtga ttgcaatccca
181 tgcaacccat gtaatccatg taaacctaac ccatgcaatc catgaaacc taatccatgt
241 gatgacaatt gtggatgcca tgacaattgtt aaatgtgatt gtgaaccatg tgaaatggat
301 tcagatgaat gtttgaaaa caaatgtgga ccagaatgtc gtaatccat atctccaaga
361 aacttcctg latcaaatgc agtgcattt gcaatagagg ctaatagaat atttgatact
421 atgcaattcc aaacatttc agatgcaaca ggaccaaattt gagagccattt aacttttgaa
481 acagaagtag tagaagttt tggtcgtt ccaagtgcag gtcaagcaag tgtaactata
541 gaaaaaatat gcttaagttt tgatggatc gtatagaca caggaatgac aacttttgaa
601 gatttcgattt tagacccattt aggagatata gtaggaagaa actgtgaaac aacttttgaa
661 ttgcgtttt gtggagaaag aaacttcgtg tgctgttagac aagggaaaagg caaatcgta
721 gcttataaac aaagaggattt aactgttagca gttcgtaattt tagtactaga gctaagaggt
781 agatgtggat gtacagagttt cggtgcattt gcttcccag cagtttaggc aggagggtt
841 tgtaagagaa gagttgtatc tgtagaaattt acttttaaca cacttcagc accaatatgc
901 ttgcagctg acggaagagc tgttactta agacaagaat atcaaactaa cttaaactgt
961 gattgtatag gaaaatctat attaaaattt gaatgcacg aatgtgtga acctttctat
1021 gaattaattt taccaaatgtatc tatagattt gtacttgc tacaagaaac agttgcaca
1081 ttaataagtgc aacaaatgtt agtttttagca tcaccaatc caatccaacc aagacttgtt
1141 gatacttcctt ctaaaagtgtatc tgattttcg caatgtggac ctaatcatgg aagtggaaag
1201 ccaagttgcc acagatgt

10

20

30

によってコード化されるアミノ酸配列：配列番号 3

【化 4】

1 MQDYKKNKR MMNQPMSTMN EEEVYTDEN SEDMRGFKKS HHHNGCTDN
51 KCECHDDCP CNPCNPCKPN PCNPCKPNPC DDNCGHDNC KCDCEPCEMD
101 SDECfenKCG PECCNPISPR NFSVSNAVPF AIEANRIFTD MQFQTFTDAT
151 GPNGEPLTFE TEVVEVFGSV PSAQQA8VTI EKJCLSNBDGI VDTGMTTLE
201 DFDFDPLGLDIVGRNCETTFEFAVCGERNSECCRQGKGKSVAJKQRGLTV
251 VRNLVLELRG RCGCTEFVAL APPAVRAGGG CKRRVDYVEF TFNTLSAPIC
301 LPADGRAVTL RQEYQTNLTV DCIGKSILKL ECNECCPEFY ELIIPNDIDL
351 VLCLQETVST LISEQIVVLA SPNPIQPRLV DTFSKVCDFS QCGPNHGSGK
401 PSCHR

49

(受託番号:YP 001087551; GI: 126698654)を含んでなる。

【 0 1 2 2 】

1具体例では、クロストリジウム属菌の仮定上のタンパク質(CD 3620)は、分子量140 kDaを含む分子量(これに限定されない)をもつハイブリダイズした抗体-タンパク質複合体として単離される(図5、6参照)。1具体例では、仮説上のタンパク質(~14 kDa)は、クロストリジウム属菌の仮説上の核酸配列:配列番号6

【化 5】

ttatactaaa ggtgttcta tttagttagt aaaaaggaat ttatgacaat gaccatcatt
aacagttagt ttcacacata ttaagtgaat gtgttatca gttccaggta ttctaatlgc
tggccctgtt gtaacacata tcctatgaaa atggtcaagg aatctacat tatcatttat
tttagaaca tgatttgtac ctccattat tggtataget tcaccagtaa cccctgtge
acggtggtta tgcatactcc cacatttcc tgcataactta acatcttg aatatttcgt
acatgtgtc atttcctcat aatcattata gcacttggtg cacttattgt atttataatc
atcatacac

によってコード化されるアミノ酸配列：配列番号 5

【化 6】

10

1 MYDDYKYNKC NKCYNDYEEM THVHEYSESV KLAEECEDRH NHRAAGVTGE
51 AIPINGGTNH VHKINDNVDF LDHFHKICVT TGPAIRPGT DKHIHLICGE
101 TTVNDGHCHK FLTTQIEAP LV

(受託番号:YP 001090143; GI: 126701246)を含んでなる。

【 0 1 2 3 】

1具体例では、クロストリジウム属菌の仮定上のタンパク質（CD 1613）は、ハイブリダイズした抗体 - タンパク質複合体として単離される。1具体例では、仮説上のタンパク質は、クロストリジウム属菌の仮説上の核酸配列：配列番号 8

【化 7】

20

1 ttatgaata taatctatag aatctacaca tacaaggat attcttgaat cattagaatt
61 tccaaagtact ataacatcat ttttcttacc tagaacttca acaccaggta gaaccaaact
121 accagctact acagtaactt gatttttat atttgacata taaaggattat cttagatacc
181 ttattacaa cagcaatcat cacaatcgc gttacaatta catttttgt aatgttttt
241 atcaagatag taacctaaag atgctaigaa atcttcataa tctgcaggta taatataaa
301 tgcaacagct ttaagattac acaatgtgc taaatctacg ttgtctaattg gagtagatgc
361 agcaagtata aaatcaatta tagcagaag tattgcattt aataatagccc caaggctat
421 cgttaggagga ataactgcattt caataagtgc aattaattca getactctgg gtatagtcc
481 tatagtattt attaatccctt caagagttaa agggactggaa ataggataag atactctacc
541 agcttatatctt attaaatcac agttacaagc agaaaatctt tcaaaagtac catcaagttcc
601 agataaaattt tcttttggag gagetgaaag atcttataacctt accaaatttag cacctactat
661 aaagaaaatctt gagataaaag caaattgttcaaaatgttaca aaaggtcttta gagcalcata
721 tctttagaagt tctaaggctt ctctcataactt tttttacaa caacatgtt ttatttttagg
781 ttctttat ttattttggat aattatagta tctatcagctt acttgataat tticatagta
841 ttcttcattt gtattttggat aatcttcctc atattttgtt gtaaaatctaa agtctctct
901 acatttttataa ttttccac

30

によってコード化されるアミノ酸配列：配列番号 7

【化 8】

1 mennkcredf rftqeyedy pntneryyen yqvadryyny pnkykepkik qccckksmre
61 alellrydal rpfvnfuqfa fisdffivga nlvgidlsap pkdnlsqldg tferfsacnc
121 dlidiagrvs yipipvpltle glintigtip gvaelialid avipptidlg aildailaai
181 idfilaastp lanvdslaslc nlkavafdit padyedfias lgyyldkkhy kecnncdcd
241 deccnkngild nlymsnninq vtvvagslvl tgvevlgkkn dvivilgnsnd sriyfcvds
301 idyia

40

(受託番号:YP 001088114)を含んでなる。

[0 1 2 4]

1具体例では、クロストリジウム属菌の仮定上のタンパク質（CD 1711）は、ハイブリダイズした抗体 - タンパク質複合体として単離される。1具体例では、仮説上のタンパク質は、クロストリジウム属菌の仮説上の核酸配列：配列番号 1 0

【化9】

1 atgttaatag taactacaga aaaagttagaa gtaaaaaga tatcaaagg ttaggatta
 gtgagaggaa
 71 gtacaataag agcaaaacat gttggaaaag atataggagc aagtttaaa aatcttgtt
 gaggagaact 141 tactggatat aatgaatgc tcactgaagc aagacaaattt gccaataggta
 gaatggttga agatgcagaa 211 gctaaagggtt caaacgcagt aatgcattt agactgttt
 cagtcgtatgcaaggg gcagcagaaaa 281 tgcttgctta tggaaacagca gttgttttag
 aagatgataa tagtattctt gaaaaataaa

によってコード化されるアミノ酸配列：配列番号9

10

【化10】

1 mlivtekve gkkiskvlg l vrgstirakh vgkdigasfk nlvggelgy
 51 nemltarqi aigrmvvedae akganaviaf rlssasvmqg aaemlaygta
 101 vvleddnsil ek:

を含んでなる。

【0125】

1 具体例では、クロストリジウム属菌の仮定上のタンパク質（CD 0881）は、ハイブリダイズした抗体 - タンパク質複合体として単離される。1 具体例では、仮説上のタンパク質は、クロストリジウム属菌の仮説上の核酸配列：配列番号12

20

【化11】

1 atgggtacta aaattgttt aagtattgtt ttaatagtag tagtcgtac aataagttt
 61 acttgtataa gagttataaa acaatctaaa gtaggtataa taatgagact tggtaagttt
 121 caaaaagtgg ctgaaacagg tgtacatttc ttaataccat tttagataa aatggcatat
 181 gtaattgacc ttagagaaat ttaatagat ttccacaccc aaccagttt aactaaagat
 241 aatgtacta tgcagattga tacagtgtt tattataaag ttacagaccc agttagat
 301 gtgttgaga tagtaatcc aatagctgct attgaaaatt taacagctac aacactaaga
 361 aatataattt gtgaacttga tttagatgaa acatataacat caagagat aataaatgtt
 421 aaaatgagaa ctattcttga tgaagcaaca gataaatggg gtataaaagt aatagagat
 481 gagttaaaaa atataatgcc tcctcaggat attcaagttt caatggaaaa acaaatacgaa
 541 gcagaaagag aaagaagaga ggcaatactt caagcagaag gtaataagtc agctgcaata
 601 ctcaagctg aagggtggaaa acaatctgtt atattaaacag cagaaggccaa aaaagaagct
 661 atggtaatgtt tagcagaagg tggaaaaagaa tctgttat ttagtggcaga aggtgaagct
 721 gaagctataa gacagacagc tattgtttaag gcacaagggtt aagctgaaat gataaaaaaaa
 781 actcaatgg caacagcaga aggtttttt ttagttttt cagcaatgaa agaggctgtat
 841 atagacaata atattcttgc attaaaatctt atggaagctc ttggaaaaat ggctgaaggt
 901 aagtcaacaa aactggttt accttcagaa gcagttattt tccttaggaac attcaaaaggaa
 961 ataaaggaaat ttagtggatgaa tgataacaaa gaagtactt atataaaaaga agttttaaat
 1001 gataatgaaat cattaaaaaaa ataa

30

によってコード化されるアミノ酸配列：配列番号11

【化12】

40

1 mgtkivlsiv livvvvaisl tcirvikqsk vgiimrlgkf qkvaetvhflipfldkmay
 61 vidlreivid fppqpvitkd nvtmqidtvv yykvtdpvry vfeianpiaa ienltattlr
 121 niigeldlde tltsrdiinv kmrtildeat dkwgikvnrv elknimppqd iqvamekqmr
 181 aererreal qaegnksaai lqaegekqsa iltaeakkea mrvvaegeke sailvaegea
 241 eairqtaiak aqgeaemikr tqmataeglk lvfsamkead idnnilalks mealekmaeg
 301 kstklvlpse avnflgtfkg ikevmsddnk evldikevln dneslkk

を含んでなる。

【0126】

1 具体例では、クロストリジウム属菌の仮定上のタンパク質（CD 1511）は、ハイブリ

50

ダイズした抗体 - タンパク質複合体として単離される。1具体例では、仮説上のタンパク質は、クロストリジウム属菌の仮説上の核酸配列：配列番号14

【化13】

```

1 ttacatgttt ttataactct ccaatattct aatataatga ttgcctc ttaaaacatg
61 gtctgtaaa agtggtaata ttatagattt tatcttacac tttcttattc ctgtatgcctc
121 tgcttccta aaatcttaa actcaacagt tcattttaga gtttcttctg taatgttctt
181 gatattagaa tcagtcattt cgttgtttt ttcaattaat tcattaaattt ttatagcaaa
241 atcattgaa gtatttataa gtcacettc tgagggtct agtaatcctc tcataaacag
301 agcatgttcc atcataatat ggtcccagaa taattctattt tcttttagcgt ttttgactc
361 aataatctttt tttttcaaa ggtcaactac ataagaacga tataaaatgtt ctcatgtat
421 tataatgttca agaagtagag ggttagttga tgtaaatata gtacatgata gtacaccatc
481 taagacttctt tttttaaaat taataagccc atcaagtaat citattgcat cagagttaa
541 ttgagctaca tagttcaacta aatttgacc aactttggg tttacaccac tttttagatt
601 taattctttt gtagttagt ttttttttat ttctatccct gttaactctt ctgtttttt
661 ttctgaaactt gatgtgagag tagttacaag ttcttctgaa tataatataat caggcttaat
721 tataccatta ctggacttaa cagtgtatga taataaatct tcaaattgct tttttagtgc
781 gtcagttcc atagcaagat tataattttt attttgtgaat cctttttctt aaaaaagagc
841 atgcttttc ataaatcttg aaaaaaataaa atgttaattctt agtgataaaaa taacatattt
901 ttgattatctt atcat

```

10

によってコード化されるアミノ酸配列：配列番号13

【化14】

20

```

1 midnqkyvil slehlffsr imkehafle agftnkynl ameādhykkq fedllsytv
61 asngiirpdi lyseelvttl tsvaeqktee ftgieinkni ttrelnlqsg vnpqvgqdlv
121 nyvaqlnsda irlldglinf kervldgvls ctiftsnyp11ehiihean 1yrsyvvde
181 nkidieskna keielfWdhi mmehalfinrg lldpsegeli ntsndfaikf neliektnem
241 tdsniknite etlnetvefk dfkeagasgi eqckiksiiplladvlre anhyiriles
301 yknm

```

を含んでなる。

【0127】

30

B. クロストリジウム・ディフィシレのコラーゲン様タンパク質

バシラス・アンスラシスの外膜タンパク質BcIAを、クロストリジウム・ディフィシレのゲノムを対比し、ここで、3つのクロストリジウム・ディフィシレのゲノム領域が、バシラス・アンスラシスのBcIAと相同であると同定された。

【0128】

1具体例では、クロストリジウム属菌の胞子の表面相同体タンパク質は、クロストリジウム属菌の胞子の表面相同体核酸配列：配列番号16

【化 1 5】

10

20

30

によってコード化されるアミノ酸配列：配列番号 15

【化 1 6】

mmiilylnd dtfishkypd knfsnldy whole igskcsnsfv keklitffkv ripdilkdk
ilkaelfihi dsnknhi fke kvdieikris eyynlritw ndrvsmenir gylpigisdt
snyiclnitg tikawamnk ynyglalsln ypyqilefts srgcnkpyil vtfedriidn
10 cypkcecpri ritgpmgprg atgstgpmgv tgptgstgat gsigptgptg ntgatgsigp
tgvtgptgst gatgsigptg vtgptgntgv tgsigptgat gptgntgvtg sigptgvtgp
tgntgeipt gatgptgvtg sigptgatgp tgeigptgat gatgsigptg atgptgatgv
tgeigptgei gptgatgptg vtgsigptga tgptgatgei gptgatgptg vtgsigptga
tgptgatgei gptgatgptg vtgeigptga tgptgntgvt geigptgatg ptgntgvtge
15 igptgatgpt gvtgeigptg ntgatgsigp tgvtgptgat gsigptgatg atgvtgptgp
tgatgnssqp vanflvnaps pq1nngdai tgwqtiiigns ssitvdtngt ftvqengvyy
isvsvalqpg sssinqysfa ilspilggkd laglttepgg ggvlsgysfag flfggtfti
nnfssttvgi rnqqsagtaa tltfriadt vmt

40

(受託番号:CAJ 67154)を含んでなる。

【 0 1 2 9 】

1 具体例では、クロストリジウム属菌の胞子の表面相同体タンパク質は、クロストリジ

50

ウム属菌の胞子の表面相同体核酸配列：配列番号 1 8

【化 1 7】

10

20

30

によってコード化されるアミノ酸配列：配列番号 17

【化 1 8】

mllimsmky fgpfddndyn ngydkyddcn ngrddynscl chhccppscv gptgpmgprg
rtgptgptgp tgpgvgatgp tgptgptgpt gntgntgatg 1rgptgatga tgptgatgai
gfgvtgptgp tgatgatgad gvtgptgptg atgadgitgp tgatgatgfg vtgptgptga
tgvgvtgatg ligptgatgt pgatgptgai gatgigitgp tgatgatgad gatgvtgptg
ptgatgadgv tgptgatgat gigitgptgp tgatgigitg atgligptga tgtpgatgpt
gatgptgvgv tgatgatgat gadgatgvtg ptgatgatga ng1vgptgat gaagtpgatg
ptgatgptgv gitgatgatg atgptgadga tgptgatgnt gadvgagptg atgntgadga
tgptgatgat gadgatgptg atgatgvaga tgatgptgat gadgatgptg atgatgadga
tgptgatgat gvtgatgptg ptgatgatga tgasaiipfa sgip1slti agg1vgtpgf
vgfgssapgl1 sivggvidlt naagltnfa fsmprdgtilt sisayfstta als1vgstt
itadyqsta pnnsftavpg atvt1aplt gilsvgsiss givtg1nbia taqtprdqrqai

40

(受託番号:CAJ 70248)を含んでなる。

【 0 1 3 0 】

1 具体例では、クロストリジウム属菌の胞子の表面相同体タンパク質は、クロストリジウム属菌の胞子の表面相同体核酸配列：配列番号 20

50

【化 1 9】

10

20

によってコード化されるアミノ酸配列：配列番号 19

【化 2 0】

msdisgpsly qdvgtgptg atgptgptgp rgatgatgan gitgptgntg atgangitgp
tgnmgatgpn gttgstgptg ntgatgangi tgptgntgat gangitgptg nkgtgangi
tgstgptgnt gatgangitg ptgntgatga tgptgltgat gatgangitg ptgntgatga
ngvgtatgpt gntgatgpt sigatgatgt tgatgptgat gatgadgevg ptgavgtatg
dglvgptgpt gptgatgang lvgptgptga tganglvgpt gatgatgvag aigptgavga
tgptgadgav gptgatgatg angatgptga vgatgangva gpigptgptg engvagatga
tgatgangat gptgavgtg angvagaipg tgptgangat gatgatgatg angatgptga
tgatgvlaan naqftvssss lvnntlvfn ssfingtnit fPtsstnla vggjynvsfg
iratlsLAGf msittnfngv tqnnfiakav ntlssdvsv slsflvdara aavtlsftfg
sgtgtsaag yvsvyriq

30

(受託番号:CAJ 70128)を含んでなる。

40

【 0 1 3 1 】

A. クロストリジウム・ディフィシレの胞子のタンパク質

1. 推定上のクロストリジウム属菌の胞子のタンパク質

1 具体例では、クロストリジウム属菌の推定上の胞子タンパク質 (CD 2401) は、分子量140、150又は160 kDaを含む分子量（これらに限定されない）をもつハイブリダイズした抗体 - タンパク質複合体として単離される（図5及び6参照）。1 具体例では、仮説上のタンパク質（~22 kDa）は、クロストリジウム属菌の推定上の胞子タンパク質核酸配列：配列番号22

【化21】

```

1 atgtggatat atcagaaaac tataacaacac ccagttataa taaaaacttg tgaccctaga
61 atggctaaat ttcttataac tcaatttgtt gggccaaatg ggaaacttgc tgcattttta
121 agatattaa gccaaagata tacaatgcct actggtaata tgcgtgcact tttaacagat
181 atlggtacag aagaactagc tcacgttgag ctatatgtt ctaggtttt tcaact
241 tctgtatgcaa gcccagaaga gttaaaagct gcaggcttg gttcaaaacta tgctcaaaat
301 ggtatggaa ttatccaac agattcaaat ggtgtccat ttgtatgtt acctatacgca
361 gttatgtcaa atcccgtaac cgatttacat gaggatgtt cagctgaaca aaaagcactt
421 gcaacttatt atcaacttat aaacctaaca gatgacgtt atgttataga tgtttaaaa
481 ttctgggtc aaagagaaat aattcaactat caaagattt gtgaagctt aatggatgct
541 tacgagttt aagaatctca aaaaatgtt taa

```

10

によってコード化されるアミノ酸配列：配列番号21

【化22】

```

1 MWIYQKTIQH PVNIKTC DPR MAKFLITQFG GPNGELAASL RYLSQR YTMP
51 TGNMRALLTD IGTEELAHVE LICTMVYQLT SDASPEELKA AGLGSNYAQN
101 GYGIYPTDSN GVPFDVRPIA VMSNPVTDLH EDMAAEQKAL ATYYQLINLT
151 DDVDVIDVLK FLGQREIIHY QRFGEALMDA YELEESQKMF

```

(受託番号：YP 001088913； GI：126700016)を含んでなる。

【0132】

1 具体例では、クロストリジウム属菌の推定上の胞子タンパク質（CD 598）は、分子量
140、150又は160 kDaを含む分子量（これらに限定されない）をもつハイブリダイズした
抗体 - タンパク質複合体として単離される（図5及び6参照）。1具体例では、仮説上の
タンパク質（~22 kDa）は、クロストリジウム属菌の推定上の胞子タンパク質核酸配列
：配列番号24

20

【化23】

```

1 atgtggattt atcaaaaaac actggAACat ccagttaca taagacaagc agaccctaga
61 atggcaaaat atatcatgac tcagttggg gggccaaatg gtgagttggc agctgcaact
121 gatacttc aacaaagata tactatgcca actggaaaat ctctgtgcact tttaactgtat
181 taggtacag agggaaatggc tcatgttgag ataattttt cagtgttata tcaattaata
241 gcaattgtt ctccagaaga gcttaaggt gctggacttg gttagtaattt tgcttaattt
301 ggacatggtc ttccagccagt agattctaattt ggagttaaact ttactacaag ttatattat
361 gtcittggcg attcggtaac tgatattacat gaggatgtt ctgtgaaca aaaagcattt
421 gctacgtact atcaattaat aaatttaact gatgaccctg atttggaaaga tatattgaga
481 tttttgggtt agagggaaatg agttcaactat caaagattt gtgaagcattt aatggatgtt
541 tatgattttta cagagtgcac gcatcagttt taa

```

30

によってコード化されるアミノ酸配列：配列番号23

【化24】

```

1 MWIYQKTLEH PVNIRQADPR MAKYIMTQLG GPNGELAAAT RYLQQRYTMLP
51 TGKSRAALLTD IGTEEMAHVE IISSVLYQLI GNCTPEELKA AGLGSNYANF
101 GHGLQPVDSN GVNFETTSYIN VFGDSVTDLH EDMAAEQKAL ATYYQLINLT
151 DDPPDLKDILR FLGEREVVHY QRFGEALMDV YEFTECKHQF

```

40

(受託番号：YP 001087073； GI：126698176)を含んでなる。

【0133】

2. ピルビン酸 - フラボドキシン酸化還元酵素

1具体例では、クロストリジウム属菌の胞子のタンパク質は、クロストリジウム属菌の
ピルビン酸 - フラボドキシン酸化還元酵素核酸配列：配列番号26

【化 2 5】

2881 ttgagcagta ccacgagcaa ctggatgatt tggagataaa gcattatctc taaatcttg
 2941 aactgttca aagttaata aacttgcata atcttcattt tctagaatt caacttttg
 3001 gatttcatgt gaagttctga atccatcaaa gaaatgtata aatggtaatc taccttctat
 3061 tgcaagctaaa tggcaacag gtgctatctc agtacttctc tgaactgaac cagaagctaa
 3121 taatcacat ccagttgtc tagcagccat aacgtttgg tgatccccaa atatgtataa
 3181 cgcttgat getaaagcac gagcacttac atggaatact cctggtaata actctctg
 3241 aactttatac atgttaggtta tcattaataa taaaccgtga galgtgtaa aagttagaagt
 3301 taaagctct ccttgtaaag aaccgtggaa tgttctgtat gcacctgtt ctgactgcat
 3361 ttcaacaaca ttaactgttt gtccaaatat attttttctt ccttgtatgc cccactcate
 3421 aactacttca gccatagttg aagatgggtt gattggatata gatgtgtt catctgtaaa
 3481 cgcattaggca acatgagctg cagctgtatt tccatcaagt gtttcataaa acttagccat

10

によってコード化されるアミノ酸配列：配列番号 25

【化 26】

1 MAKFMKTL DG NTAAAHVAYA FTDVAAIYPI TPSSTMAEVV DEWASQGRKN
 51 IFGQTVNVVE MQSEAGASGT FHGSLQGGAL TSTFTASQGL LLMIPNMYKV
 101 AGELLPGVFH VSARALASQA LSIFGDHQDV MAARQTGCVL LASGSVQEVA
 151 DIAPVAHLAA IEGRLPFIHF FDcJFRTSHEI QKVELLENED YASLLNFEAV
 201 QAFRDNALSP NHPVARGTAQ NPDIYFQTR ASNKYYQNIV GIVEKYMEKM
 251 SNLTGRKHSL FDYYGAEDAK YVLIAMGSVT ETIEETIDYL NAKGEKYGLV
 301 KVHLYRPFMSM KHFLDAMPST VERICVLDRT KEPGSTGEPL YLDVRDVFYG
 351 KENAPMIIGG RYGLGSKDTT PSDIKTVFDN LVSEQPKNGF TVGIVDDVTN
 401 TSLTPSEPIK IASKGTIRCK FWGLGSDGTV GANKQAIKII GDHTEKYAQA
 451 YFDYDSKKSG GITMSHLRFG DTPIRATYLI DEADYIACHK QSYYVQYDLL
 501 KGLKKGGTFV LNTIWDQAGL EEHLP_AHBMKQ YIAKNDIKFY TVNAVKLQGE
 551 IGLGNRINMI MQSAFFKLA E IIPEEADAVKY LKDSIVKAYG KKGEKIVNMN
 601 YAAVDAGINA LVKVEVPASW ENAVDADKGE VKEPEFIKNI LRPMTAQEGN
 651 ZNLPVSTFNGI EDGTFPCGTA AYEKRGIAVD VPEWIIDNCI QCNCQCSFICP
 701 HACIRPVVL VEEELANAP EG FEAKKALGKG LEGLKRYRIQV SPLDCTGCGN
 751 CADICPAKEK ALVMKPIDTQ LDTELDNWAF AVNPDEVAPK VDVM PANTVK
 801 GSQFRQPLME FSGACAGCGE TAYIKVVTQL YGDRMMIANA TGCSSIWGAS
 851 APSIPYTCNH EGKGPSWANS LFEDNAEYGF GMYTAVKQIR NKIVDAMTEL
 901 VSMDICEDAK AVFTEWLDSR NDGEASKVAS AKVVELLEKP ACDCTDEKAK
 951 ELVKA1KDRK DYLVKRSQWI LGGDGWAYDI GYGGLDHVLA SGEDVNVLVF
 1001 DTEVYSNTGG QASKATPAAAMAKFAASGKK SRKKDLGMMAMTYGNVYVAQ
 1051 VAMGADKNQF IKAVLEAEKH DGPSLIIAYAPCINHGLKEG MGRTVANEAQ
 1101 AVACGYWHLY RFNPEVKAEK KNPFILDSKE PTASFKDFIL AQVRYSAIAK
 1151 QFPEEADGLF AKAEDAKER YEGYKKLAE

20

30

(受託番号 : YP 001089193 ; GI : 126700296) によって表記されるタンパク質ピルビン酸-フラボドキシン酸化還元酵素 (CD 2682) を含んでなる。

【0134】

3 . -アミノ酪酸代謝デヒドラターゼ / イソメラーゼ

1 具体例では、クロストリジウム属菌の胞子のタンパク質は、クロストリジウム属菌の-アミノ酪酸代謝デヒドラターゼ / イソメラーゼ核酸配列：配列番号 28

【化 2 7】

1 ttataaaattt aaagcttcct cttttttat tcccgcaatt ttcttagcta attctttct
61 ttgatttag ttccttgte tgaaatcat tattcttga gcttgtggtg aacctgcccc
121 atgcattgac tcagtctat accaacacg agatgaacca agccatatat ttctaaaga
181 tcttaatatt ctcatcttt ctctgttg aageactgaa gaagcttaa aatacttgtt
241 acataacttcg ccaatagtc ttccacttgt tccaaactta aggtctgatt taaaagctt
301 ttctgaaggc atagtaacca taagecccte agctatact tctgcaagtc ttactattic
361 ataaggaaat cttagttacat ttgtttaca cacatttgc caagaatggaaat ctatttgata
421 gttccagct tctgtttgt gaccttctga tgaacatgct ataccacagc aatataagct
481 ttctttaagg tgagtctttt ctattgtttt atcttttata tgtgaagctt tgtttgcetcc
541 attataatca gctgttcaaag ctgctgttcc tattttaca tcacciaactc ctactttaca
601 tccaccataa ctgttcttat gglatcttc aaatctctt actaacaatac cagagaaatc
661 ccattctcca cataagaaaa ttcttcattt tggaacaaat acattatcaa atactactaa
721 agcttcttgat cttccaaact ctttattttca taaaatcaaca tctgcaccc ttcttaattt
781 tetagtgtca caagattgtc ttccatataat cataaacaact ctttcagcat ctgaaggaaac
841 tgcaaatgtat acagcgttagt ctttatctgc ttcatgttata cttagttagt gcattataag
901 gtgtcatgtt gaatttttg aaccaggttt atgtgcctt tgccttca caattatccc
961 atcttctttt ctttctacta tatgaaggaa catatctggg tcagggttgag cactaggtga
1021 tagacttcta tttcccttag ggtcagtcat agctccatca actactaaat cgttttcttg
1081 tatataagtt aagtattttt caaaaattttc atgataatta ttccatggg ctttatcaca
1141 ctcaaatgtt ttgtgaataca ctgcattaaa cgcacatccata ccaacacatc ttggaaaca
1201 agaagctgtt ttgtgaccac atagtcattt cattttact tttttataatca aatcatcaac
1261 acttttgatga agatgaccaa atcttattttt ttttccactt gtgatatttg aagtaactgt
1321 cattaaatctt gcatattctg ggtcatgagc taagtcataa ttgtgtctca cacaatttt
1381 agatggctca atcataggat ggtcaacccaa attcttaacc tttccacca acatataaaac
1441 ctttagtattt aattttctca aactttcaat atatttgatctt cttgttcattt atgcccatt

10

20

によってコード化されるアミノ酸配列：配列番号 27

【化 2 8】

1 MALMTGAQYI ESLRLNTKV YMFGEEVKNW VDHPMIRPSI NCVAATYDLA
51 HDPEYADLMT VTSNITGEKI NRGHLHQSV DDLIKKVKMQ RLCGQKTASC
101 FQRCVGMDAF NAVYSTTFEC DKAHGTYHD NFVKYLTYIQ ENDLVVDGAM
151 TDPKGDRSL S PSAQPDPMF LHIVERREDG IIVRGAKAHQ TGSINSHEHL
201 IMPTISMTEA DKDYAVSFAV PSDAEGVFM YGRQSCDRK LEEGADVDLG
251 NKEFGGQEAL VVFNDNVVPN DRIFLCGEWD FSGMLVERFA GYHRQSYYGGC
301 KVGVGDVIIG AAALAADYNG ANKASHIKDK LIEMTHLNES LYCCGIACSS
351 EGHKTEAGNY QIDLLANVC KQNVTRFPYE JVRLAEDIAG GLMVTMPSEK
401 DFKSDLKVGT SGMTIGEVCN KYFKASSVAS TEERMRLRF LENICLGSSA
451 VGYRTESMHG AGSPOAORIM ISROGNINOK KELAKKIAGI KKEALNL

30

(受託番号: YP 001088856 ; GI: 126699959) によって表記されるタンパク質 - アミノ酸代謝デヒドラターゼ / イソメラーゼ (CD 2341) を含んでなる。

[0 1 3 5]

4. ブチリルCoAデヒドロゲナーゼ

1 具体例では、クロストリジウム属菌の胞子のタンパク質は、クロストリジウム属菌のブチリルCoAデヒドロゲナーゼ核酸配列：配列番号 3 0

40

【化 2 9】

1 atggatttaa attctaaaaa atatcagatg cttaaagagc tatatgtaa cttcgctgaa
61 atatgaagtta aaccctttagc aacagaacctt gatgaagaag aaagatttcc ttatgaaaca
121 gtggaaaaaaa tggcaaaggc aggaatgtatg ggtataccat atccaaaaga atatggtgaa
181 gaagggtggag acactgttagg atatataatg gcagttgaag aatgtcttag agtttgtggat
241 actacaggag ttatattatc agctcataca tctcttggtt catggccat atatcaaat
301 ggtatatgaag aacaaaaaca aaaatttcta agaccactag caagtggaga aaaatttagga
361 gcatitggtc ttactgagcc taatgttgtt acagatgcgt ctggccaaca aacaactgtt
421 gtttttagacg gggatgaata catacttaat ggctaaaaaa tatttataac aaacgcataa
481 gctggtgaca tatatgttagt aatggcaatg actgataaat ctaaggggaa caaaggaata
541 tcagcattt tagtgtaaaaa aggaactctt gggtttagct ttggagttaa agaaaagaaaa
601 atgggtataa gaggttcagc tacgagtgaa ttaatatttg aggattgcag aatacctaaa
661 gaaaattttac ttggaaaaaga aggtcaagga tttaagatag caatgtctac tcttgatgg
721 ggttagaattt gtagactgc acaagctttt ggttttagcac aagggtgcct tgatgaaact
781 gttaaatatg taaaagaaaag agtacaattt ggttagaccat tatccaaaattt cccaaaataca
841 caattccaat tagctgatataa ggaagttaaatg gtacaagcgg ctagacaccc tttatataatca
901 gcagctataa ataaaagactt aggaaaaaccc tttggaggtag aagcagcaat ggcggaaaattt
961 ttgcagctg aaacagctat ggaagttactt acaaaaagctg tacaacttca tggaggatata
1021 ggatacactc gtgactatcc agtagaaaaga algalgagag atgctaagat aactgaaata
1081 tatgaaggaa ctatgtaaatg tcaaaggatg gttatttcag gaaaactattt aaaaatag

10

によってヨード化されるアミノ酸配列：配列番号 29

20

【化 3 0】

1 MDLNSKKYQM LKELYVSAE NEVKPLATEL DEEERFPYET VEKMAKAGMM
51 GIPYPKEYGG EGGDTVGYIM AVEELSRVCG TTGVILSAHT SLGSWPIQY
101 GNEEQKQKFL RPLASGEKLG AFLTEPNAG TDASGQQTTA VLDGDEYILN
151 GSKIFITNAI AGDIYVVMAM TDKSKGNKGI SAFIVEKGTP GFSFGVKEKK
201 MGIRGSATSE LIFEDCRIPK ENLLGKEGQG FKIAMSTLDG GRIGIAAQAL
251 GLAQGALDET VKYVKERVQF GRPLSKFQNT QFQLADMEVK VQAARHI.VYQ
301 AAINKDLGKP YGVEAAMAKL FAAETAMEVT TKAVQLHGGY GYTRDYPVER
351 MMRDAKITEI YEGTSEVORM VISGKLLK

(受託番号: YP 001087535; GI: 126698638)によって表記されるタンパク質ブチリルCoAデヒドロゲナーゼ(CD 1054)を含んでなる。

30

[0 1 3 6]

5. アミノ酸トランスアミナーゼ

1 具体例では、クロストリジウム属菌の胞子のタンパク質は、クロストリジウム属菌のアミノ酸トランスアミナーゼ核酸配列：配列番号32

【化31】

1 ttaagctct acacccatag ctcttttaa tacagctgct atattttttta tacccttat
 61 tattttct tctggcatat ttgaatagtt aagtctgaaa gtatttctc taccaccatt
 121 agggagaat cctcctccag caacataagc aacattctt tctaaacatt ttggcattaa
 181 ttcttagca tttaaattac ttgaaagctc taccatgt aataatccac cttctggatg
 241 agtaaatact aatcctctg ggaacttcc ttccatagtc ttaagcatta catctctacg
 301 tttaacataa actgcttta ttgtcaac atgtgcacat aggtcataca tatccataaa
 361 ttgcctact tccatttgag atatgtta tgcttgaag tctgcacett gtttgcaaa
 421 gttaaactta gataaaattt ctggagaagc acaagtcac cctaattctgt atcctggca
 481 gaatttta gagaaagttc ctaagaatat tactaatctt ttgtatcca ttgattttaa
 541 agatggtaaa gtctctcctt caaatcttaa atctccatat ggattatctt ctattactgg
 601 tatttcaaattt tatttacta ttccatgaa tttttacgt cttaaagtg gccaaggct
 661 tcctgttggaa ttgttggaaat caggtattac gtaaattcattt ttattctat cagttgttcc
 721 tagtatctt tctaattctt ccattatcat tccatcagaa tctgttggaa catctatgaa
 781 tttagggttga taagattaa atgcgtttat agctctatg taagatggac ttacataaa
 841 aattacatca ccctcatcaa tgaatactttt ccctgcaaaa tctagacctt gttgagaacc
 901 acttgtaact aatatacat ctgttttac attagtttg ttttatcat tcattctacg
 961 tgctattttt tctttaatg gttcatatcc ttctgttga gtatattgca tagctgatct
 1021 tccattttt tcaagcactg caactgatac tttttcattt tccctcaactg gaaataactc
 1081 tggagccggc aitccaccag caaaagatat tatttgggt tggatgataa gttttaaaag
 1141 ctcacgtatt tctgtatcc ttaatccctt catttttgcattttaa ctgcacat

10

20

によってコード化されるアミノ酸配列：配列番号31

【化32】

1 MAVKYAKRMQ GLQGSEIREL LKLTQQPQII SFAGGMPAPE LFPVEEMKKV
 51 SVAVLEENGR SAMQYTITEG YEPREKIAA RMNDKNKTNV NKDDILVTSG
 101 SQQGLDFAGK VFIDEGDVIL CESPSYIGAI NAFKSYQPKF IDVPTDSGGM
 151 IMEELEKILE TTDRIKMIYV IPDFQNPTGR TWPLERRKKF MEIVNKFEIP
 201 VIEDNPYGYDL RFEGETLPSL KSMDTKGLVI FLGTFSKIFC PGYRLGWTCA
 251 SPEILSKFNF AKQGADLQAS TISQMEVSKF MDMYDLDAAHV DKIKAVYVKR
 301 RDVMLKTMEE EFPEGLVFTH PEGGLFTWVE LPSNLNAKEEL MPKCLDKNVA
 351 YVAGGGFFPN GGRENTFLN YSNMPEEKII EGKNIAAVL KEAMGVEA

(受託番号：YP 001090189 ; GI：126701292) によって表記されるタンパク質アミノ酸ト
ランスアミナーゼ (CD 3664) を含んでなる。

30

【0137】

6. コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ1 具体例では、クロストリジウム属菌の胞子のタンパク質は、クロストリジウム属菌の
コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ核酸配列：配列番号34

【化 3 3】

ttatccccaa agtgttcat ctgttagggac ttccattttct ggcataataat aagcaattct
61 agaaaatatta atttagatgct tataatcaag atttcagag atgctgttat ttccccaaga
121 accacaacct agagtattag taggtcaag accattaaag aaacttcctc cagcactagt
181 agcacaacal tgattaataa caaatctiga tacttctata ttcccttcg catalctat
241 attttaact gtatttgaat gtatagatac actatgtcct ttcccttcia catttaatt
301 tgcttttgcata atagctacac ttcttc当地 accttttatac ttgtatgc当地 atataactgg
361 acacattttt tcttttgc当地 taataatccctc ttccctcggtt ccatcagctt ctattactat
421 tattttgttatacttgc当地 tctcaacacc tgcaattttt gcaatgtat gaactgattg
481 acctactgca tcttttattca tagatttatac tacaaacala gcatttc当地 aagcttctt
541 ttgtacttta tctctaacta taaaacctt gttattttta aattcatcca ttattttatc
601 aaacattttct tctgtacta ttactgactg ttccaccctgaa caaatgatac cattatcaaa
661 aatttttct getatgattt taggtactgc ttctttaatg tctacatctc tatctatgat
721 acattgaaca ttccctgccctt ctacaccaag tgctgggtt ccacttgatg acgcagctt
781 taccattccc attccctccag tggcaattac tacatctgc gatgaaatta aatttctgt
841 attttctt gattttgtt gtaagttttg tattaaattt tctggaggctc ctatttttc
901 taatttttca ttaatcatct ctacagttt tgtaactacat ccaattgtt tatgtgagg
961 tgtaataacttgcatttc ttcccttaag tgcaaaacattt gcaattgttca taggtgttac
1021 gattggattt gtaaaggag ttatttgc当地 tactactcca actgttttag ctacattttgt
1081 tattccaggat tctctatcttataattt accaactgtat tttttattttt ttaaattttt
1141 atatataacttgcatttgc ttttttttt agtacaccca tcttc当地 ctcccttcc
1201 agtctttctt acagcaagtt tagctaaataa ttccaggat ttaatcatctt cttttccaaac
1261 tatttttactt attttattcttatacttgc当地 tactactcca actgttttag ctacattttgt
1321 tcttgc当地 tcaatataac catataatgtt ttcccttccat ttaaattttt
1381 ttttttccat ttttttccat

10

によってコード化されるアミノ酸配列：配列番号 33

【化 3 4】

MEKAVENFED LSKEYINGYI ERARKAQREF ECYTQEVDK IVKIVGKVYY
51 YNAEYLAKLA VEETGMGVYE DVAKNNSKA KVIYNNLDK KSVGIIDIR
101 ETGITKVAKP VGVVAITPC TNPIVTPMSN AMFALKGRNA IIITPHHKAI
151 GCSTKTVEMI NEELEKIGAP ENLIQILDQQ SRENTRNLIS SADVIATGG
201 MGMVKAAYSS GKPALGVGAG NVQCIIIRDV DIKEAVPKII AGRIFDNGII
251 CSGEQSVIVA EEMFDKIMDE FKNNKGFIWR DKVQKEAFRN AMFVNKSMMK
301 DAVGQSHTI AKIAGVEIPE DTKIIVIEAD GPGGEEDIIAK EKMCPVISAY
351 KYKSPEEGVA IAKANLNVEG KGHSVSIHSN TVKNIEYAGE NIEVSRFVIN
401 QCCATSAGGS FFNGLAPTNT LGCGSWGNNS ISENLDYKHL INISRIAYYM
451 PEDEVPTDEE LWG

30

(受託番号:YP 001088857; GI: 126699960)によって表記されるタンパク質コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(CD 2342)を含んでなる。

[0 1 3 8]

7. ルブレリスリン

1 具体例では、クロストリジウム属菌の胞子のタンパク質は、クロストリジウム属菌のルブリスリン核酸配列：配列番号 3 6

【化 3 5】

1 atggaaaaat ttgttgtac agtatgtgga tatatacatg aaggagatgc tgcaccagca
61 caatgtccag tatgtaaagt tggagctgat aaatttgaag aaatgaaagg cggaaatggtt
121 tggcgtatg aacatagaat aggagtagct caaggtgttag atgcagaaat aatcgaaggaa
181 ttaagagcta acitttactgg tgagtgtaca gaagtaggaa tgtatttagc aatgagtaga
241 caagctgata gagaaggta tccagaagta gctgaagcgta ataagagaat agctttggaa
301 gaggctgaac atgctgctaa atttgcgaaa ctcttggag aagttgttagt tgcagatata
361 aaagaaaaact taagagttag agttgtatgt gaggatggta caactgtatgg aaaattaaaa
421 tttagctaaaga gagctaaaga atttaggatta gtatgtatatac atgatacagt acaatgaaatg
481 tggtaaagacg aagcttagaca tggtaaagca ttcgttggat tattaaacag acatlltgga
541 aaataa

40

によってコード化されるアミノ酸配列：配列番号 35

【化 3 6】

1 MKKFVCTVCG YIHEGDAAPA QCPVCKVGAD KFEEMKGEMV WADEHRIGVA
51 QGVDAEIIEG LRLANFTGECT EVGMYLAMSR QADREGYPEV AEAYKRIA
101 EAEHAAKFAELLGEVVVADTKENLRVRVDAEYGATDGKLKLAKRAKELGL
151 DAIHDTVHEM CKDEARHGKA FLGLLNRHFG K

(受託番号:YP 001088025; GI: 126699128)によって表記されるタンパク質ルブレリス
リン(CD 1524)を含んでなる。

【 0 1 3 9 】

8. フラボタンパク質 サブユニット

1 具体例では、クロストリジウム属菌の胞子のタンパク質は、クロストリジウム属菌の
フラボタンパク質 サブユニット核酸配列：配列番号 3 8

【化 3 7】

1 atgggttaacg ttttagttagt aatagaacaa agagaaaatg taattcaaac tggttcttta
61 gaattactag gaaaggctac agaaatagca aaagattatg atacaataagt ttctgcatta
121 cttttagtta gtaaggttaga aggtaata gatacattag cacactatgg tgcagatgag
181 gtaatagtag tagatgtatg acgttttagca gtgtatacaa ctgaaccata tacaaaagca
241 gcttatgaag caataaaaagc agctgaccct atagttgtat tattttgtgc aacttcaata
301 ggttagagatt tagtccttag agttctgtc agaatacata caggcttac tgcgtactgt
361 acaggcttgc cagtagctga agataaaaaa ttattttaa tgacaagacc tgcattttgt
421 gaaaaatataa tggcaacaat agtttgtaaa gatttcagac ctcaaatgtc tacagttaga
481 ccaggggtta tgaagaaaaa tgaacctgtat gaaactaaag aagctgtataa taaccgtttc
541 aaggttagaat ttaatgtatgc tgataaaattt gttcaagttg tacaagtaat aaaagaagct
601 aaaaaacaag ttaaaataga agatgctaag atattgtttt ctgctggacg tggaaatgggt
661 gaaaaagaaa acttagacat actttatgaa tttagtggaa ttatagggttgg agaagttct
721 ggttctcggt ccactataga tgcagggtgg tttagataaag caagacaagt tggtaact
781 gttaaaactg taagaccaga ccattatata gcatgtggta tatctggacg aataacaat
841 atagctggta tggaaatgc tgagttata gttgcataaa ataaaaatcc agaagctcca
901 atatttaaat atgctgtatgt tggtagtgg ggagatgttc ataaaatgtctccagaactt
961 atcgtcagt taagtgtgc aaaagaaaaa ggtgaagttt tagctacta a

によってコード化されるアミノ酸配列：配列番号 37

【化 3 8】

1 MGNVLVVIQE RENVIQTVSL ELLGKATEIA KDYDTKVSL LLGSKVEGLI
51 DTLAHYGADE VIVVDDALEA VYTTEPYTKA AYEAIKAADP IVVLFAGTSI
101 GRDLAPRVSARIHTGLTADCTGLAVAEDTKLLLMTPAFGGNIMATIVCK
151 DFRPQMSTVR PGVMKKNEPD ETKEAVINRF KVEFNDADKL VQVVQVIEKA
201 KKQVKIEDAK ILVSAGRGMG GKENLDILYE LAEHIIGGEVS GS RATIDAGW
251 LDKARQVGQT GKTVRPDLYI ACGISGAIQH IAGMEDAEFI VAINKNPEAP
301 IFKYADVGIV GDVHKVLPEL ISQLSVAKEK GEVLAN

(受託番号: YP 001087535; GI: 126698640)によって表記されるタンパク質フラボタンパク質サブユニット(CD 1056)を含んでなる。

[0 1 4 0]

9. 2-ケトイソ吉草酸フェレドキシンリダクターゼ

1 具体例では、クロストリジウム属菌の胞子のタンパク質は、クロストリジウム属菌の
2 -ケトイソ吉草酸フェレドキシンリダクターぜ核酸配列：配列番号 4 0

【化39】

1 atggctaaga tacttatgaa aggttaacgaa gcatttggaa aagcagctat agaagcttgt
 61 tgc当地tattt tttcggtt cccataact ccacaaatgt aattaccaga atatttatca
 121 agagagttaatcataagg tggagcgttc gttcaagctg aatcagaatgt ttctgcgata
 181 aacatggttt atggggggc aggtgcagga gcaagagtt tgacttcctt atcttcacca
 241 ggagttgtttaaagcaaga aggtataaca tatgcagtag gagcagaatgt tccttggtt
 301 gtacttaatgt taatgagagg tggccagga ctggaaatgt tacaaccctt acaagctgac
 361 tactttatgt ctacaagagg tggaggaaat ggagactaca gaactecagt attcgcacca
 421 gctacagttc aagaagctgt tgatatgata atgaaagctt ttgacgttgc agattattac
 481 agatcaccag ttatggtagt tgcatgtt atgataggc aaatgatgga gccagttgaa
 541 tttagagctc ctgagaagaa aagagaattt cttccctaaag attggcaac ttttggaaact
 601 aaagaaaaaa gaaaacctaa tttataaaac tctctataact tagagccaga agtactagaa
 661 gaccattttt ggcatttaca agaaaaattt gatgcaatgg aaaagaatga agtacaatac
 721 gaaatglaca aaacagaaga tgctgaattt gtatttgcag ctatggaaac tacttcaaga
 781 gtagaaaaaa ggcatttgcata tatattaaga gaagaaggaa taaaaggcagg tttataaga
 841 cttaaagtat tatggccatt cccattcggaa gcatcaacc aaattccctaa tgctgaaac
 901 atattgactg ttgaaatgag tatgggacaa atgggaaatgt atgtaaaat ggcagtagaa
 961 ggttaatttac cagtttactt ccatggaaga ccaggaggaa tgactccaac accagcagaa
 1021 atagttgaaa aagctaaaaa aattttgcc ggagaatttgg ttgcaggagg tgctgataaa

10

によってコード化されるアミノ酸配列：配列番号39

【化40】

20

1 MAKILMKGNE AFGKAAIEAG CKYFFGYPIT PQSELPEYLS RELPKIGGAF
 51 VQAESEVSAI NMVYGGAGAG ARVMTSSSP GVALKQEGIT YAVGAEVPCV
 101 VLNVMRGPG LGSIQPSQAD YFMSTRGGGN GDYRTPVFAP ATVQEAVDMI
 151 MEAFDVADYY RSPVMVVADG MIGQMMEPVE FRAPEKREL PPKDWATVGT
 201 KGKRKPNVIN SLYLEPEVLE DHCWHLQEKF DAMEKNEVQY EMYKTEDAEF
 251 VFAAYGTTSR VVKSAIDILR EEGIKAGLIR PKVLWPFPFE AFNQIPNARN
 301 ILTVEMSMGQ MVEDVKMAVE GKLPVYFHGR PGGMTPTPAE IVEKAKKIIA
 351 GELVAGGAR

(受託番号：YP 001086585 ; GI：126697688)によって表記されるタンパク質2-ケトイソ吉草酸フェレドキシンリダクターゼ(CD 116)を含んでなる。

【0141】

30

D. バシラス属菌のBcIAタンパク質及び相同体

バシラス属は、土壤及び水中に広く見られる桿状、グラム陽性、好気性又は嫌気性（いくつかの条件下では）の細菌からなる。バシラス属の多くの菌株はヒトに対して病原性ではなく、土壤生物としての役割において偶然にヒトに感染するのみである。しかし、注目すべき例外はバシラス・アンスラシスである。バシラス・アンスラシスは、ヒト及び家畜において炭疽病を引き起こすと考えられる。自然発生的な病原体としての役割に加えて、バシラス・アンスラシスは、生物兵器としても使用される。バシラス・アンスラシスからの胞子は、生物兵器として最も使用され易い生物の1つである。バシラス・アンスラシスの胞子は、多くの殺菌剤に対して高度に抵抗性であることが知られており、効果的な殺菌には、通常、ホルムアルデヒド又は次亜塩素酸ナトリウム（すなわち、漂白剤）のような毒性かつ刺激性の化学剤の使用が要求される。その結果、家庭及び軍隊の両方での適用のための現在の汚染浄化法に対する改善が強く求められている。本発明は、効果的かつ非毒性のバシラス属菌汚染制御、特に、生物及び無生物表面の両方についてのバシラス・アンスラシス汚染浄化のための方法及び組成物を提供すること意図するものである。

40

【0142】

1. BcIA

1 具体例では、バシラス・アンスラシスのBcIA胞子表面タンパク質は、バシラス・アンスラシスのBcIA核酸配列：配列番号42

【化41】

atgtcaaata ataattttc aaatggatta aaccccgatg aatctttatc agctagtgc
 ttggacccta atcttgttagg acctacatta ccacccgatac caccatttac ctttcctacc
 ggaccaactg ggccgactgg accgactggg ccgactggc caactggacc aactggggcg
 actggggccaa ctggaccaac tggccaaact ggagacactg gtactactgg accaactggg
 ccgactgggc caactggacc aactggggca actggagaca ctggactac tggaccaact
 gggccaaactg gaccaactgg gcccactggg ccaactggac caactggggca gactggggca
 actggaccaaa ctggccaaac tggaccaact ggaccaactg ggcacactgg accaactgg
 ccaactgggc caactggaga cactggact actggaccaaa ctggaccaac tggaccaact
 ggaccaactg ggccgactgg accgactggg ccgactggc caactggacc aactggggcg
 actggggccaa ctggaccaac tggccaaact ggagacactg gtactactgg accaactgg
 ccaacttgac caactggacc aactggggca actggagaca ctggactac tggaccaact
 gggccaaactg gaccaactgg accaactggg ccaactggac caactggggca aactgggtgc
 accggactga ctggacccac tggaccgact gggccatccg gactaggact tccagcagga
 ctatatcat ttaactccgg tgggattct ttagatttag gaataatga tccagtagca
 ttaataactg ttggatctca gttttgtaca gcaatttctc aatttagatgc tgatacttc
 gtaatttagtg aaactggatt ctataaaatt actgttatcg ctaataactgc aacagcaagt
 gtattaggag gctttacaat ccaagtgaat ggagtacctg taccaggtac tggatcaagt
 ttgatitc ac tggagcacc tategttatt caagcaatta cgaaattac gacaactcca
 tcattatgtt aagtaattgt tacaggcctt ggactatcac tagctttgg cacgagtgca
 tccattatata ttgaaaaagt tgcttaa

(受託番号 : AY 995120) によってコード化されるアミノ酸配列 : 配列番号41

【化42】

10

msnnnysngl npdeslsasa fdpnlgvptl ppippftlpt gptgptgptg ptgptgptgp
 tgptgptgpt gdtgttgptg ptgptgptg tgdtgttgpt gptgptgptg ptgptgptgp
 tgptgptgpt gptgptgptg ptgptgdtgt tgptgptgpt gptgptgptg ptgptgptgp
 15 tgptgptgpt gdtgttgptg ptgptgptg tgdtgttgpt gptgptgptg ptgptgptga
 tgltgptgpt gpsglglpag lyafnsggis ldlgindpvp fntvgsqfgt aisqldadtf
 visetgyki tviantatas vlggltiqvn gvpvpgtgss lislgapiivi qaitqittt
 slvevivtgl glslalgtsa siiiekva

(受託番号 : AAY 15450) を含んでなる。

【0143】

BcIAタンパク質は、その中心区域に、複数の胞子表面GXX反復を含有し、マウス抗 - 胞子多クローニング抗体にて検索された外膜タンパク質を分離する主要な免疫プロットバンドによって同定された外膜の毛状napの構成成分であると思われる (Sylvestreら, 「コラーゲン様の表面糖タンパク質は、バシラス・アンスラシスの外膜の構成成分である」, Mol. Microbiol. 45: 169-178 (2002))。

30

【0144】

BcIAタンパク質は、高度にグリコシル化されており、外膜フィラメントの構成成分を提供するバシラス・アンスラシスの胞子の表面の免疫優性の抗原であると考えられる (Daubenspeckら, J. Biol. Chem. 279: 30945-30953 (2004))。bIca遺伝子の長さは、異なるサイズのタンパク質をコード化するバシラス・アンスラシスの菌株の間で異なる。多くのBcIAタンパク質は、各種の長さのGXX反復（例えば、約17 - 91個のGXX反復）の内部の胞子表面領域 (CLR) (大量のGPTトリプレットを含む)を持つ。BcIA胞子表面領域の長さはフィラメントの長さの変動に左右されることが示されている (Boydstonら, 「バシラス・アンスラシスのコラーゲン様等タンパク質の外膜内における配向及び構造安定性」, J. Bacteriol. 187, 5310-5317 (2005))。1つのバシラス・アンスラシスBcIAは70個のGPI反復を含んでなり、6回反復するアミノ酸21個からなる配列 ((GPT)₅GDTGTT; 配列番号43) を有する。BcIA多型は、17 - 91個で変動するいくつかの隣接GXXトリプレットをもつCLRをコード化する配列に位置できる。1つのレポートでは、bIca遺伝子が、異なったCLRを有する菌株間で交換され、產生された外膜が電子顕微鏡によって調査されている。データは、BcIAタンパク質CLRがnapフィラメントの長さを制御するとの結論を支持している (Sylvestreら, 「バシラス・アンスラシスBcIAタンパク質のコラーゲン領域に

40

50

おける多型が外膜フィラメントの長さにおける変化の原因となる」, *J. Bacteriol.* 185: 1555-1563 (2003))。

【 0 1 4 5 】

CLRは微生物では稀であるが、いくつかの細菌及びウイルスでは同定されている (Rasmussenら, *J. Biol. Chem.* 278, 32313-32316 (2003))。その機能は一般的に不明であるが、表面タンパク質において認められる。バシラス・アンスラシスに近い菌株であるバシラス・セレウス及びバシラス・チューリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*) は、いずれも、その外膜にBcIAに関連するタンパク質を所有する (Toddら, *J. Bacteriol.* 185, 337 3-3378 (2003))。しかし、BcIAのC末端部分と既知の構造のタンパク質との間に配列の類似性は存在しない。

10

【 0 1 4 6 】

BcIAタンパク質鎖のC末端の2/3は、ゼリーロールトポロジーをもつ全構造に折り重なる (図7参照)。タンパク質のTNF-likeにおける同様の折り重なり、エクトジスプラシンEda-A1 (DALI: Z-スコア16.1) 及びCIq (DEJAVU; DALI Z-スコア14.6) は、強い構造上の関連性を示す (Holmら, *J. Mol. Biol.* 233: 123-138 (1993); 及びKleywegtら, International Tables for Crystallography (Rossmann, M. G. 及びArnold, E. 編) Vol. F, pp. 353-356, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherland (2001))。

【 0 1 4 7 】

12個の -鎖 (TNF-likeに関する慣習に従って、順次、A、A''、A'、B'、B、C、D、E、F、G、G' と符号を付した) を、Greek-keyトポロジーと結合させ、それぞれ、5つの鎖 A'AHCF又はB'BGDEを含有する2つの -シートを形成した。TNF-likeの他のメンバーとの主な差異は、一緒にAA' 及びGHループをパックする二本鎖アンチパラレル -シートを形成する余分なA'' 及びG' 鎖の存在である。

20

【 0 1 4 8 】

結晶学的対称性によって関連付けられる3つのモノマーは、直径 ~ 50 の堅固で球形のトリマーを形成する。トリマー形成によって覆い隠された全表面は1411 / モノマーであり、中心に、溶媒分子で充満された2つの小さい空洞を持つ。C末端及びN末端は、一緒にトリマーの底部側に向かって進み、非コラーゲン部分のN末端残基は絡み合い、ついで、外側を指す (図8参照)。円二色性分光法は、正にN及びC末端残基 (後者について、親和性タグの初めの2つのHis残基のみが見られる) を除き、完全なトリマー構造を示す。モノマー当り7つの残基は、2つの交互立体配座、すなわち、i) 結晶学的2回軸に近いトリマーの表面上に位置する4つ、及びii) 2つの空洞の1つ内におけるトリマー界面に位置する3つを有する。明らかに、BcIAトリマーアセンブリーは、他のTNF-likeトリマーと非常に類似している。より短い突き出たループのため、BcIAトリマーの全体形状は、TNFの形状よりも多少丸く、CIqよりもわずかに (直径において ~ 5) 小さい。トリマーのフォーメーションについて、覆い隠された表面4234 Å^2 は、CIq (5490 Å^2) 又はコラーゲンVIII NCIの同等の表面積 (6150 Å^2) よりも小さい。これは、いずれも、そのわずかに小さい全体サイズによるものであるが、主として、トリマーの中心における溶媒充満空洞の存在によるものである。

30

【 0 1 4 9 】

40

1 具体例では、BcAタンパク質 (BAS 1130) は、アミノ酸配列：配列番号 4 4
【 化 4 3 】

```

1      msnnnysngl npdeslsasa fdpnlgvptl ppippftlpt gptgptgptg ptgptgptgp
61     tgptgptgpt gptgptgptg dtgttgptgp tgptgptgpt gdtgttgptg ptgptgptgp
121    tgptgptgpt gptgptgdtg ttgptgptgp tgptgptgdt gttgptgptg ptgptgptgp
181    tgptgptgpt gptgptgptg ptgdgttgpt tgptgptgpt gptgdgttg ptgptgptgp
241    tgptgptgpt gatgltgptg ptgpsglglp aglyafnsgg isldlgindp vpfntvgsqf
301    gtaisqldad tfvisetgry kitviantat asvlggltiq vngvpvpktg sslislgap
361    viqaitqitt tpslvevivt glglslalgt sasiiiekva

```

(受託番号 : YP 027402) を含んでなる。

50

【0150】

1 具体例では、変性バシラス・アンスラシスのタンパク質 (B1cA) は、アミノ酸配列：配列番号 45

【化44】

```
MSNNNNYSNGLNPDESLSASAFDPNLVGPTLPIPPFTLPTGPTGPTGPTGPT
GPTGDTGTTGPTGPTGPTGATGLTGPTGPTGPGSLGLPAGLYAFNSGG
ISLDI.GINDPVPFNTVGSQFGTAISQLADTFVISETGFYKITVIANTATASV
LGGLTIQVNGVPVPGTGSSLISLGAPIVIQAITQITTPSLVEVIVTGLGLSLA
LGTSASHIEKVA
```

を含んでなり、ここで、変性は配列番号 41 のフラグメントを含んでなる。

10

【0151】

2 . BcIB

1 具体例では、B1cBタンパク質 (BAS 2281) は、アミノ酸配列：配列番号 46

【化45】

```
1      mkqndklwld kgiigpenig ptfiwlppih iptgitgatg atgitgatgp tggatgat
61     gitgvtgatg itgvtgatgi tgvtgatgit gvtgatgitg vtgptgatg tgptgatgt
121    gptgdtaglag atgptgatgl agatgptgdt gatgptgatg lagatgptga tgltgatgat
181    gatgggaiip fasgtpall vnavlantgt llgfefsqpg iapvgggtl ilpgvvgdya
241    fvaprdgiit slagffsata alapltpvqi qmqifiapaa sntftpvapp 111tpalpai
301    aigttatgiq aynvpvvagd kilvyvsltg aspiaavagfvsaglniv
```

20

(受託番号 : YP 028542) を含んでなる。

【0152】

D . バシラス属菌の外膜タンパク質

バシラス属は、必須の栄養素が欠乏する際に胞子を形成するグラム陽性、桿状、好気性細菌の多様なコレクションを含む (Errington, 「バシラス・サチリス (*Bacillus subtilis*) の胞子形成：遺伝子発現の調節及び形態形成の制御」, *Microbiol. Rev.* 57: 1-33 (1993); 及びPriest, F.G., 「バシラス属菌の体系及び生態学」, *Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria, Biochemistry, physiology, and molecular genetics*, pp3-16, A.L. Sonenshein, J.A. Hoch 及びR. Losick編, Washington, D.C. (1993))。

30

この方法では、飢餓状態の栄養細胞の対称性の中隔形成は、それぞれ、母細胞及び前胞子と呼ばれる大きい及び小さいゲノム収容コンパートメントを形成する。ついで、母細胞は前胞子を貧食し、これによって、前胞子を 2 つの対立する細胞膜で包囲する。2 つの膜の間で、皮質と呼ばれる変性ペプチドグリカンの厚い層が合成され、母細胞において合成されたタンパク質は、皮質を覆う胞子表面の多数の層を形成する。コートは、いくつかの菌株（例えば、バシラス・サチリス）の胞子については、最も外側の検出可能な層を形成し、他では（例えば、バシラス・アンスラシス）、胞子は、外膜と呼ばれる追加の層（母細胞によって合成された、突き出した、ゆったりとした、バルーン様の層）によって取り囲まれる (Henriquesら, 「細菌の内生胞子表面の構造及びアセンブリー」, *Methods* 20: 9 5-110 (2000))。

40

【0153】

バシラス・セレウス、バシラス・アンスラシス及びバシラス・チューリングンシスは、外膜を有すると考えられるバシラス属菌の代表的なものである (Ohyeら, 「バシラス・セレウスTにおける外膜及び胞子表面の形成」, *J. Bacteriol.* 115: 1179-1190 (1973); 及びAndersen G., 「バシラス・アンスラシスをバシラス・セレウス及びバシラス・チューリングンシスを区別するゲノムの差異」, *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2755-2764 (2003)) (図 9A 及び 9B 参照)。しかし、胞子表面の極めて外側のぴったりとした層が、尿素 - メルカプトエタノールにて、いくらかのコート物質を胞子から抽出した後に可視化され、外膜と判断されるとのレポートは存在しないが、バシラス・サチリスは、明確な、別個の外膜を欠いている (Sousaら, 「バシラス・サチリスの胞子における外膜様外皮」, N

50

ature 263: 53-54 (1976)）。バシラス・セレウスの外膜は、外側の前胞子膜に近接している（ただし、接触していない）母細胞における小さいラメラ構造として初めに観察された。2つの構造は成熟した胞子ないにおいて明確に分離されているが、胞子鏡面内で同時に合成される。外胞子は、通常、タンパク質 53%、アミノ及び中性の多糖 20%、脂質 18% 及び灰分約 4% を含んでなる六方晶様の基底層を含有する。外膜は、胞子の約 2%（乾燥質量）を占める。バシラス・メガテリウムQMB 1551の胞子の疎水性は、不完全な外膜を持つ又は外膜のない胞子が、非常に低減されているヘキサデカンに対する親和性が示すため、外膜によって決定さられると考えられる（Koshikawaら、「バシラス属菌の胞子の表面疎水性」, J. Gen. Microbiol. 135: 2717-2722 (1989)）。

【0154】

10

成熟期の最終ステージの後、母細胞を溶解して、休眠状態にあり、発芽シグナルに遭遇するまで長年土壤中に存在できる成熟胞子を放出させる。多くのバシラス属菌は、ヒトに対して病原性ではない。最も顕著な例外は、炭疽病の原因物質であるバシラス・アンスラシスである（Mockら、「炭疽病」, Annu. Rev. Microbiol. 55: 647-671 (2001)）。米国におけるテロリストの兵器としてのバシラス・アンスラシスの胞子の最近の使用及び多くの国における大量破壊の兵器としてのこれらの胞子の開発に鑑み、迅速な検出に使用され、除染、炭疽病の治療及び予防を対象となるように、胞子の成分について、さらに学びたいとの強い要求がある（Inglesbyら、「生物兵器としての炭疽病, 2002: 管理についての最新の提言」, JAMA 287: 2236-2252 (2002)）。

【0155】

20

このような成分の1つが、胞子のための一次透過バリヤーとして及び胞子表面抗原の源として作用する外膜である（Gerhardt, P., 「バシラス・アンスラシスの細胞学」, Fed. Proc. 26: 1504-1517 (1967)）。胞子の最も外側の表面として、外膜は、土壤環境、収集及び検出装置、哺乳類宿主における胞子結合ターゲット細胞、及び宿主の防御物と相互作用する。現在、外膜の構造及び機能に関する詳細な情報は限られている。外膜についての過去の研究は、バシラス・アンスラシスの胞子及び日和見的ヒト病原体のバシラス・セレウスに集中していた。これらの種は、バシラス・チューリングンシス（昆虫の病原体）、及びバシラス・ミコイデス（*Bacillus mycoides*）と共に、密接に関連するバシラス・セレウスグループを構成する。このグループのすべてのメンバーが、基底層及びnagasa外部の600まで伸張する毛状napを含んでなる構造的に類似した外膜を持つ胞子を產生する（Gerhardtら、「バシラス・セレウスの胞子を包囲する外膜の超微細構造」, J. Bacteriol. 88: 1774-1789 (1964)；及びHachisukaら、「バシラス・アンスラシスの胞子の外膜の外側における微細フィラメント」, J. Bacteriol. 91: 2382-2384 (1966)）。基底層は、それぞれ、六角形の穿孔格子構造を示す4つの準結晶サブレーヤーを含有する。毛状のnapは、種ごとに及び菌株ごとに、長さが異なる（beamenら、「バシラス・セレウスの可溶化外膜から再凝集された準結晶シート」, J. Bacteriol. 107: 320-324 (1971)；及びKramerら、「バシラス・アンスラシスのSterne及びVollum 菌株の外膜における微細構造の差異」, Can. J. Microbiol. 14: 1297-1299 (1968)）。

30

【0156】

40

外膜はレクチンと反応し、毛状nap内に位置する多糖を結合するとと思われる（Coleら、「バシラス・アンスラシス及び他のバシラス属菌のレクチンによる区別」, J. Clin. Microbiol. 19: 48-53 (1984)；Matzら、「バシラス・セレウスの胞子を覆う外膜の化学的微細構造」, Bacteriol. Proc., p. 31 (1965)）。外膜は胞子の質量の2%を構成し、ほぼ、たんぱく質 50%、脂質 20%、中性の多糖 20% 及び他の成分 10% を含有する（Matzら、「バシラス・セレウスの胞子からの外膜の化学組成」, J. Bacteriol. 101: 196-201 (1970)）。

【0157】

50

外膜は、皮質及びコートと一緒に合成される多数のタンパク質を含有する（Desrsierら、「バシラス・セレウスの胞子形成の間ににおける外膜の合成」, L. Gen. Microbiol. 130: 935-940 (1984)；及びHhyeら、「バシラス・セレウスTにおける外膜及び胞子表面の形

成」, *J. Bacteriol.* 115: 1179-1190 (1973))。より最近の研究では、個々の外膜タンパク質を同定することが試みられている。見掛け上 72 kDa 糖タンパク質が、バシラス・チューリングエンシスの胞子の外膜又はコートの成分として同定されている (Garcia-Patronら, 「バシラス・チューリングエンシスの胞子嚢からの糖タンパク質マルチマー：サブユニットへの解離及び糖組成物」, *Mol. Cell. Biochem.* 145: 29-37 (1995))。3つの他のタンパク質 (GroEL及びInA及びRocAの相同体) が、おそらくバシラス・セレウスの外膜の構成成分ではないが、バシラス・セレウスの外膜に関連することが認められた (Charltonら, 「バシラス・セレウスの外膜の特徴付け」, *J. Microbiol.* 87: 241-245 (1999))。

【0158】

バシラス属菌の胞子自体は、環境刺激に対して応答性であると考えられる。1レポートでは、乾燥対多湿環境に曝される際、胞子の形態における種特異的变化を同定するために原子間力顯微鏡観察法が使用されている。例えば、サイズの変化は、種、成長管理体制、及び環境条件に左右されると考えられる。一般に、胞子の幅は、これらのファクターの相互作用に左右されて、500 - 3000 nm の間で変動する (Plompら, 「バシラス属菌の胞子の高解像能構築及び構造動力学」, *Biophys J* 88: 603-608 (2005))。さらに、BcIAに加えて、バシラス・アンスラシスの外膜は、4つの他の主要なタンパク質：すなわち、i) アラニンラセマーゼ、ii) 鉄 / マンガン過酸化物ジスムターゼ、iii) 未知の機能を有する 9174 Da のタンパク質、及び iv) 未知の機能を有する 17331 Da のタンパク質を含有するものと考えられる (Steichenら, 「バシラス・アンスラシスの外膜の免疫優性のタンパク質及び他のタンパク質の同定」, *J. Bacteriol.* 185: 1903-1910 (2003))。

【0159】

細菌の成熟胞子の外側層が成熟するにつれて、外膜は、胞子、環境、及び・又は宿主の間の接触表面を示す。外膜は免疫原性、環境 / 宿主付着及び安定性、又は発芽応答を含む（ただし、これらに限定されない）機能に応答するタンパク質を含んでなる。（Redmondら, 「バシラス・アンスラシスの外膜におけるタンパク質の同定」, *Microbiol.* 150: 355-363 (2004))。

【0160】

例えば、細菌の外膜タンパク質としては、推定上のコートタンパク質（例えば、遺伝子 cotJC1 又は cotJC2）、仮定上の外膜タンパク質、BcIAタンパク質、BcIBタンパク質、BcISterneタンパク質、変性BcIA又はBcIBタンパク質、ExsFタンパク質、CotBタンパク質、ExsYタンパク質、CotYタンパク質ExsKタンパク質、イノシンヒドロラーゼ、アラニンラセマーゼ、ピルビン酸 - フラボドキシン酸化還元酵素（例えば、遺伝子 nifJ）、-アミノ酸代謝デヒドロラーゼ / イソメラーゼ（例えば、遺伝子 abfD）、ブチリルCoAデヒドロゲナーゼ（例えば、遺伝子 bcd2）、アミノ酸トランスマニナーゼ、コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ（例えば、遺伝子 sucD）、ルブレリスリン、フラボタンパク質 サブユニット（例えば、遺伝子 etfA2）、又は 2-ケトイソ吉草酸フェレドキシンリダクターゼが含まれる（ただし、これらに限定されない）。代表的な外膜タンパク質のサイズ特性を表 2 に示す。

10

20

30

【表2】

各種の外膜タンパク質のサイズ的特徴

タンパク質（代替名）	サイズ(kDa)	BAS遺伝子番号
アラニンラセマーゼ	43,662	238
BclA	36,836	1130
BxpA	27,702	2008
BxpB(ExsF)	17,331	1144
BxpC(BA2332)	14,379	2174
CotB-1	19,422	340
CotB-2	16,830	341
CotY(CotZ-2)	16,842	1145
ExsK	12,034	2377
ExsY(CotZ, CotZ-1)	16,146	1141
イノシン-ウリジンヌクレオシドヒドロラーゼ	36,276	2693
スーパーオキシドジスムターゼ	36,162	1378

【0161】

1. アラニンラセマーゼ

1 具体例では、バシラス・チューリングンシス serovar kurstaki 菌株 1.175 アラニンラセマーゼ（例えば、遺伝子 alrA）（受託番号：DQ402058）は、核酸配列（配列番号：48）

10

20

【化 4 6】

10

20

30

によってコード化されるアミノ酸配列（配列番号：47）

【化 4 7】

MEEAPPFYRDTWVEVLDANNVTHIKEFIPSNVEIFAVVKANA YGHDYV
PVAKTALEAGATRLAVAFLDEALVLRRAGITEPILVLGPSPRDVNVAEEN
DVALTVFQKEWVEEAIKLWDGSSVMKFHINFDSGMGRIGIRERKELKEFL
KSLEGAPFLELEGVYTHIFATADEVETSYFDKQYNTFLEQLSWLKEFGVDP
KFVHTANSAAATLRFQGITFNAVRIGIAMYGLSPSVEIRPFLPFELEPALSLHT
KVAHIKQVIKGDGISYNVTYRTKAEEWIATVAIGYADGWLRRLQGFEVLI
NGKRVPIVGRVTMDQFMILPCEVPLGIKVTLIGRQGDEYISATEVAEYS
GTINYELIATISFRVPRJFIRNGK VVEIJNYLNJI

40

を含んでなる。

【 0 1 6 2 】

2 . Sterneタンパク質

1 具体例では、バシラス・アンスラシス *str. Sterne* タンパク質 (BAS 3290) は、アミノ酸配列 (配列番号: 49)

【化48】

1 msekylilhg talepnligp tlppippstspngptgitgp tcatgftigig itgptgvtp
 61 tgigitptg atglgilpvf gtittdvgig fsvivnntn flpgpvsgt tlnpvdnsii
 121 inttgvysvs fsivfviqai ssilnltn dsiqfaiesr igggpgvrat sartdlsln
 181 qgdvlrvir eatgdiyasn aslvskvd

を含んでなる（受託番号：YP 029547）。

【0163】

1 具体例では、バシラス・アンスラシスstr. Sterneタンパク質（BAS 3557）は、アミノ酸配列（配列番号：50）

10

【化49】

1 msryddsqnk fskpcfpssa griplntsip vikaqlrtfr aiiidltkii pklfanpspq
 61 niedlidtl llskficsld aasslkaqgl aiiknltil knptfvasav fielqnliny
 121 llisitklfri dpcrlqellk liaalqtalv nsasfiqgpt gptgptgptg pagatgatgp
 181 qgvqgpagat gatgpqgvqg pagatgatgp qgaqgpagat gatgpqgaqg pagatgatgp
 241 qgiqgpagat gatgpqgvqg ptgatgigt gptgpsggpa gatgpqgpqg ntgatgpqgi
 301 qgpagatgat gpqgaqgpag atgatgpqgv qgptgatgig vtgptgpsgp sfpvativvt
 361 nniqtvlfqf nnfifntain vnniifnqtd tvtvinagiy visvsistta pgcaplgvgi
 421 singavatdn fssnligdls sfttieita ganisvqstl neitipatgn tnirltvfri
 481 a

20

を含んでなる（受託番号：YP 029811）。

【0164】

1 具体例では、コラーゲン三重らせん反復ドメインを有するバシラス・アンスラシスstr. Sterneタンパク質は、アミノ酸配列（配列番号：51）

【化50】

1 minmsswrnn ingycscnnq ngvhvdscf scdgtpklg ptgptgatga tgatgvtgvt
 61 gvtgatgtg atgitgatgi tgvtgptgat gitgatgatg ptgatgptga tgitgatgat
 121 gatgatgvtg vtgatgtga tgitgvtgpt gatgatgatg ptgatgatga tgptgvtgts
 181 itatyafann tsgtaisvll ggtnvplpnn qnigpgitvs ggntvftvan agnyyisityi
 241 nitaslvvss ritngapla gtinspavat tsfsatiitt laagsaislq lfglavatl
 301 sttpgavlt iirls

30

を含んでなる（受託番号：YP 030670）。

【0165】

1 具体例では、コラーゲン三重らせん反復ドメインを有するバシラス・アンスラシスstr. Sterneタンパク質は、アミノ酸配列（配列番号：52）

【化51】

1 mvkvvegngg kskiksplns nkiksdlv ptfppvptgm tgitgstgat gntgptgetg
 61 atgsagitgs tgptgntggt gstdgptgntg atgstgvtgs tgvtgstgvt gstdgvtgstd
 121 ptgetggtgs tgvtgstgat gstdgvtgntg ptgstgatgn tgsigetggt gsmgptgetg
 181 vtgstggtgs tgvtgntgpt gstdgvtgstd tgvtgstgts tgvtgstgpt gstdgvtgstd
 241 vtgnmgptgs tgvtgntgat gttgatgetg pmgstgatgt tgptgetget getggtgstg
 301 ptgntgatgs tgvtgntgat gstdgvtgatg ptgstgatgn tgptgetget gstdgatgstd
 361 vtgntgptgs tgvtgntgat getgptgntg atgntgptg tgvtgntgpt getgvtgntg
 421 ptgntgatge tgatgvtgat gntgatge tgatgvtgatg tgatgvtgnt gptgatgatg
 481 atgatgvtgat gntgatge tgatgvtgatg tgatgvtgnt gptgatgatg
 541 nnqniqpgit vsggnvftv anagnyyiay tinltagllv ssritvngsp lagtinsptv
 601 atgatgatge tgatgvtgat gntgatge tgatgvtgatg tgatgvtgnt gptgatgatg

40

を含んでなる（受託番号：YP 030869）。

【0166】

50

1 具体例では、バシラス・アンスラシスstr. Sterneタンパク質（BAS 2280）は、アミノ酸配列（配列番号：53）

【化52】

```

1 mkkqknllsl aleiilpyrl tgptgitgpt gitgptgitg ptgftgpnit tnsmfannl
61 ggpisvlgg triplsnmqs 19nftvnasn diftipvtgr yylyqvntt tallagtrll
121 lnsstplsgs ifspaistsn ynnnliinli agntis1qlf gvlsivnlvg ggstgaslti
181 irid

```

を含んでなる（受託番号：YP 028541）。

【0167】

3. 変性タンパク質

10

1 具体例では、変性バシラス・アンスラシスstr. CEBタンパク質は、アミノ酸配列（配列番号：54）

【化53】

```

MAFDPNLVGPTLPPIPPFPLPTGPTGPTGPTGPTGPTGPTGDTGTTGPT
GPTGPTGPTGPTGATGLTGGPTGPSGLGLPAGLYAFNSGGISLDLGNDP
VPFNTVGSQFGTAISQLDADTFVISETGFYKITVIANTATASVLGGLTIQVN
GVPVPGTGSSLISLGAPIVIQAITQITTPSLVEVIVTGLGLSLALGTSASHIIE
KVA

```

を含んでなり、ここで、変性は、短縮リーダー配列及びHis-6 Tagの追加を含んでなるものである。

20

【0168】

4. ExsAタンパク質

1 具体例では、本発明は、バシラス属菌の胞子の表面タンパク質（ここで、タンパク質はExsAタンパク質を含んでなる）を含んでなる組成物を意図するものである。ExsAタンパク質は、外膜及び細菌のコートの両方に存在し、バシラス・サチリスのSafA（SpoVID関連因子）タンパク質に関連する。SafAは、コート構築の初期ステージにおいて、SpoVIDと相互作用する（Ozinら、「バシラス・サチリスにおいて、SpoVIDはSafAを胞子表面に案内する」，J. Bacteriol. 183: 3041-3049 (2001)）。SpoIVA及びSpoVIDは、いずれも、SafAの局在化のためと考えられ、両方の相同体はバシラス・セレウスゲノムにおいてコード化される。類推すれば、それらはExsAの局在化を援助するものと予測される。ExsAは、バシラス・セレウスにおいて、SafAがバシラス・サチリスにおいて果たす役割よりも大きい役割を果たし、バシラス・サチリスSafA検出変異体について、あまり極端ではないコートの構築欠陥が報告されている。exsA変異体と同様に、safA変異体胞子はリゾチームに敏感であるが、exsA胞子の構造は、むしろ混乱が少ないように思われる。

30

【0169】

ExsAタンパク質は、N末端及びC末端領域から離れたSafAとは、アミノ酸配列において非常に異なる。SafAとExsAとの間の大きな差異を前提とすると、保存の局部的領域は、SafA及びExsAの両方において保存される機能について重要であるように思われ、バシラス・サチリスにおいて定方向突然変異誘発によって探索される。ExsAにおける多数のプロリンリッチタンデム反復配列は、伸張された配座に存在するように思われるが、その機能は未知であり、これらは、他のコートタンパク質の結合用の反復領域であるか、又は他のコートタンパク質を結合する領域間のスペーサーとして機能できるであろう。推測では、これは、外皮層の間にいくらかの距離を提供する機構であるが、このような3つの領域（それぞれ、それ自体の配列反復を持つ）が存在する理由は明らかではない。バシラス・セレウス／バシラス・アンスラシス／バシラス・チューリングンシスにおける異なる種および菌株のゲノム配列における反復の数はわずかに異なるが、配列はほとんど同一である。バシラス・ハロデュランス（Bacillus halodurans）及びオセアノバシラス・イヘイエンシス（Oceanobacillus iheyensis）の両方において、コード化SafA相同体も、多数の短い反復（その配列は、種の間では保存されないが、バシラス・セレウスにおけるほど多数ではなく

40

50

、その重要性は未知である)を含有することができる(Bailey-Smithら、「胞子表面におけるコート及び外膜の構築には、バシラス・セレウスのExsAタンパク質が要求される」, *J. Bacteriol.* 187: 3800-3806 (2005))。

【0170】

5 . ExsFタンパク質

1 具体例では、本発明は、バシラス属菌の胞子の表面タンパク質(ここで、前記タンパク質はExsFタンパク質を含んでなるものである)を含んでなる組成物を意図するものである。ExsFタンパク質(例えば、ExsF、ExsFA、及びExsFB)は、バシラス属菌の胞子の表面上のBcIAフラグメントの好適な局在化及び外膜の結晶層の安定性に関与するものと考えられる外膜成分である。これらのタンパク質は、おそらく、ScIAを含む他の外膜成分との多量体の複合体として組織化される。タンパク質ExsFAはBcIAと相互作用することができ、胞子の表面に局在化することを保証する。ExsFの寄与はあまり明白ではないが、1つの仮説では、ExsFB及びExsFAは、結晶性基底層の両アレイの成分と相互作用し、その安定性を保証する。あるいは、突然変異ExsFノックアウト菌株における2つの胞子成分(35又は37kDa)の不在は、ExsF類タンパク質が画尾膜構成西部ツンの構築又は胞子についての維持に関与することを示唆している(Sylvestreら、「胞子表面上におけるBcIAの局在化及びバシラス・アンスラシスの外膜の安定性に対するExsFA及びExsFBタンパク質の寄与」, *J. Bacteriol.* 187: 5122-5128 (2005))。このような役割は、バシラス・サチリスのコートの構築に関与するSpoIVIA及びSpoVIDのようないくつかの形態形成コートタンパク質について記載されたものと似ている(Driks A., 「最大の遮蔽物：細菌の胞子表面の構築物及び機能」, *Trends Microbiol.* 10: 251-254 (2002))。

【0171】

6 . BxpBタンパク質

1 具体例では、本発明は、バシラス属菌の胞子の表面タンパク質(ここで、前記タンパク質はBxpBタンパク質を含んでなる)を含んでなる組成物を意図するものである。BxpBは、バシラス・アンスラシスのSterne菌株から単離された外膜の精製サンプル中に存在するいくつかのタンパク質の1つとして発見されたものである(Steichenら、「バシラス・アンスラシスの外膜の免疫優性タンパク質及び他のタンパク質の同定」, *J. Bacteriol.* 185: 1903-1910 (2003))。殊に、BxpBは、化学的に脱グリコシル化された外膜のサンプル中において高いレベルで認められたものである。この結果は、BxpBがグリコシル化されるか、又はグリコシル化された物質と結合しているかを示唆する。しかし、BxpBは糖タンパク質ではないが、BcIA糖タンパク質及びExsY又はCotY(いずれもバシラス属菌の外膜において認められる)を含む他のタンパク質(ただし、これらに限定されない)と高分子質量の複合体を形成する。抗-BxpB MAbの研究では、BxpBが不可欠の基底層タンパク質であることが示唆されている。例えば、抗-BxpB MAbのSterne胞子への結合は、BcIAを欠くbcl-a胞子について検出されるよりも弱い。Sterne胞子への低減されたMAbの結合は、主にBcIAのタンパク質成分によるものであり、おそらく、緊密なBxpB-BcIAの相互作用を反映するものであろう。BcIAを欠く胞子(例えば、bpxB変異体)は、正常なBcIAレベルの存在にもかかわらず、毛状のnapを欠いている外膜によって囲まれている。しかし、この非常に少量のBcIAは、xpB胞子に関連する(例えば、Sterne胞子について認められるレベル~2%) (Steichenら、「バシラス・アンスラシスの外膜基底層タンパク質BxpBの特徴付け」, *J. Bacteriol.* 187: 5868-5876 (2005))。

【0172】

従って、BxpBは、胞子の基底層へのBcIAの付着及び毛状napの構築を仲介することは明らかである。最近の研究では、この付着がBcIAの38-アミノ末端残基ドメイン(NTD)を介して起こり、胞子の表面BcIAタンパク質の残りは胞子から伸張することが示されている(Boydstonら、「バシラス・アンスラシスのコラーゲン様糖タンパク質BcIAの外膜内における配向及び構造安定性」, *J. Bacteriol.* 187: 5310-5317 (2005))。明らかなように、このNTDの最初の19個のアミノ酸は、胞子から単離された成熟BcIAでは不在であり、おそらく、タンパク分解プロセッシングの発生によるものであろう(Steichenら、「バシ

ラス・アンスラシス外膜の免疫優性タンパク質及び他のタンパク質の同定」, J. Bacteriol. 185: 1903-1910 (2005); 及びBylvestreら, 「コラーゲン様糖タンパク質はバシリス・アンスラシスの構成成分である」, Mol. Microbiol. 45: 169-178 (2002))。本発明の機構を理解することは必要ではないが、このプロセシングの発生は、BcIAの外膜の基底層への付着（おそらくBxpBへの直接の共有結合を介する）に関連するであろう。

【 0 1 7 3 】

1 具体例では、BxpB外膜タンパク質は、アミノ酸配列（配列番号：55）

【化 5 4】

mfssdceftkicdeakpastlpafgsafuasapqfaslftpllpsvsnpnitvpind
tvsvgdgirilragiyqisytltisldnspvapeagrfflsgtpaniipgsgtavrsnv
igtgevdvssgvilinlnpgdflirivpveligtvdiraaltaqis

10

を含んでなる。

【 0 1 7 4 】

7. ExsJタンパク質

1 具体例では、ExsJ外膜タンパク質（バシラス・セレウス）は、核酸配列：配列番号 5
7

【化 5 5】

20

によってコード化されるアミノ酸配列：配列番号 5-6

【化 5 6】

MKHNDCFDHNCNPIVFSADCCKNPQSVITREQLSQLITLLNSLVS AISAFF
ANPSNANRLVLLDLFNQFLIFLNLLPSPEVNFLKQLTQSIIVLLQSPAPNLG
QLSTLLQQFYSLAQFFFALDLIPISCNSNVDSATLQLLFNLLIQLINATPGAT
GPTGPTGPTGPTGAGPTGATGATGATGPTGATGPAGTGGATGATG
ATGVTGATGATGATGPTGPTGATGPTGATGATGATGPTGATGPTGATGLT
GATGAAGGGAIIPFASGTPSALVNALVANTGTLGFGFSQPGVALGGTSI
TLALGVGDYAFVAPRAGTITSAGFFSATAALAPISPVQVQIQLTAPAA
NTFTVQGAPLLTPAFAAIAIGSTASGIIAEAI
PVAGDKII.LYVSI.TAASPIAAV
AGFVSAGINIV

50

(受託番号:AY 183116.1)を含んでなる。

【 0 1 7 5 】

8 . ExsHタンパク質

1 具体例では、ExSH外膜タンパク質（バシラス・セレウス）は、核酸配列：配列番号5

9

【化 5 7】

1 gtttccatt ttaagtcaat atataacata ttttttaca actttatgt ccttataata
61 gaaaaaaactc aaatataaaa caagtaagga ggacataaat gacaacaat aattgttttg
121 gtcataacca ctgcaataat cegattgtt tcactccaga ttgctgtaac aatccacaaa
181 cagttccaat tactagttaga caatttaggtt gattaattac ttfactaaac tctttaatag
241 cggctattgc agcggtttt gcaaatccaa gtgatgaaa cagalttagct ttaactcaat
301 tgtttactca actattgaac ttactaaatg aatttagcacc ttccccagaa gggaaattct
361 taaaacaatt aattcaaaatg attattaatt tactacaatc tccaaaccca aatctaagtc
421 aattacitc ttatttacaa caattctaca gtgccttgc accattttc ttcttttaa
481 ttattgaccc tgaagtttca caacttttat taaaacttatt aactcaatta atttgtgcta
541 ctccaggagg cggagcaaca ggtccaaacag gtccaaacagg tccaggaggc ggagcaacag
601 gtccaaacagg tccaaacagggt ccaggaggcg gagegacagg tccaaacaggc ccaacaggag
661 cgacagggtcc agcagggtact ggtggagcaa caggttaac aggagcaaca ggtttaaacag
721 gagcaacagg cttAACAGGA GCGACAGGCC CAACGGGAGC AACAGGTtA ACAGGAGCAA
781 CAGGTtAAc AGGAGCAACA GGETTAACAG GAGGACAGG TCCAACAGGA GCAACAGGtC
841 CAACAGGAGC AACAGGTtA ACAGGAGCA CtggtgcAAC TGGTGGCGGA GCTATTATTC
901 CATTGCTtC AGGTACAACA CCATCTGCTG TAGTTAACGC GTTAATAGtC AATACAGGAA
961 CTCTTCTGG ATTtGGATTt AGTCAGGCTG GTGTagCTT AACTGGTGA ACAAGtATCA
1021 CATTAGCATT AGGTGTagGT GATTATGCAt TTGTagCACC ACGCGCAGGG GTTATTACGT
1081 CATTAGCTGG TTCTTCTAGt GCAACAGGtC CATTAGCTCC ATTATCACt GTCAAGtGC
1141 AAATAACAAAT ATTAAACTGCA CCTGCAAGCAA GCAATAACGTT TACAGTACAA GGCGCACtC
1201 TTTATTAAAC ACCAGCATT GCGCATAAG CGATTGGTtC TACAGCATCA GGAATCATAc
1261 CTGAAGCTAT TCCAGTAGCA GCTGGGGATA AAATAACTGTT ATATGTTtCA TTAACAGCAG
1321 CAAGTCCAAAT AGCTGCAGtT GCTGGATTG TAAGTGCAGG TATTAAATtC GTTAAATTtG
1381 TTACAATGTT TA

10

20

によってコード化されるアミノ酸配列：配列番号 58

【化 5 8】

30

MKHNDCFDHNNCNPIVFSADCCNPQSVPITREQLSQLITLLNSLVSAISAFF
ANPSNANRLVLLDLFNQFLIFLNLLPSPEVNFLKQLTQSHVLLQSPAPNLG
QLSTLLQQFYSLAQFFFALDLIPISCNSVDSATLQLLFNLLIQLINATPGAT
GPTGPTGPTGPTGPAGTGAGPTGATGATGATGPTGATGPAGTGGATGATG
ATGVTGATGATGATGATGPTGPTGATGPTGATGATGATGATGPTGATGPTGATGLT
GATGAAGGGAIIPFASGTPSALVNALVANTGTLLGFQFSQPGVALTGGTSI
TLALGVGDYAFVAPRAGTITSLAGFFSATAALAPIPVQVQIQLTAPAAASNT
FTVQGAPLLTPAFAAIAIGSTASGIIAEAPIVAAGDKILLYVSLTAASPIAAV
AGFVSAGINIV

を含んでなる。

〔 0 1 7 6 〕

9. CotBタンパク質

1 具体例では、本発明は、核酸配列：配列番号 6-1

【化 5 9】

1 gatcattlaa glattttagt aatgcgtgaa aatgggtatt cgcgaaaaaa ggcacaatta
61 ggctattgaa ttatgtcaac aaataaatgt gacacgtata tatcagtat gtttatcatc
121 tatgtataag tgactaggag gaatttgaat gagcaagagg agaatgaaat atcattcaa
181 taatgaaaata tcgttattata acttttgca ctcaatg.

40

によってコード化されるアミノ酸配列：配列番号 60

【化 6 0】

MSKRRMKYHSNNEISYYNFLHSM

を含んでなるCotB外膜タンパク質（バシラス・サチリス；受託番号：AY 186996）を意図するものである。

【 0 1 7 7 】

10. CotYタンパク質

1 具体例では、本発明は、核酸配列：配列番号 6 3

【化 6 1】

1 caattttca gaggaaagaaa attagatata tctcgaaaa tatatactgt gcgaaaagat
61 ttacctgaaa agacatccac taaataagga tgcctttt tatatcacgc tatgtacatc
121 ctcctatat aaattcccttg ttttatcgta gagaattaac gtaatatcg ccatatccca
181 ctcatatgtt aatagtgtat gtcagaactc acgagaagga gtgaacalaa tgagctgc
241 tttgtatgaa gatcatcaac atggatgtga ttcaactgt gtatcgaaatc tcgttc
301 tatacatgaa ctacaagaat gtgcacgc aacatgtgg tctggcg aagttccatt
361 ttaggtgcataacaatg catcagtagc gaatacacgt cttttatttatacacaaaa
421 aacccggagaa ctttgcgaag catttgcacc atcttcaagc cttactagtt gcccgc
481 cattttccgc gtagaaagta tagatgtatc cgactgtgt gtattgcgtg tattaaactgt
541 agtttttaggt gatgttaccc ctgttaccacc tggtgacgac ccaactgtatc cgtttttac
601 tggatccaaat gcaagactaa tatcaaccctc cacttgcatt actgttgcatt taagtgttgc
661 ctgcgttatttataatgttac gttatgtttc tattttaa

10

によってコード化されるアミノ酸配列：配列番号 62

【化 6 2】

MSCNCNEDHQHECDFNCVSNVRFIHELQEATTTCGSGCEVPFLGAHN
NASVANTRPFILYTKTGEFAFAPSSSLTCSRSPIFRVESIDDDCAVLRVL
TVVLGDGTAVPPGDDPICTFLAVPNARLJSTSTCITVDLSCFCAIQCLRDVSI

を含んでなるCotY外膜タンパク質（バシラス・セレウス）を意図するものである。

【 0 1 7 8 】

11.ExsYタンパク質

¹ 具体例では、ExsY外膜タンパク質（バシラス・セレウス）は、核酸配列：配列番号 6

5

【化 6 3】

1 aaatagtatg agagatatta ggttgttat agatgatatac caatcgattt gtatggccgg
61 ttttaaataa tgaaagggtg gtagaaagct ttaccaccc caatagtttt ttagttact
121 ttacgataga aacgtcgctt aagcaitgaa tcgcacagaa acagcttaaa tcaacagtaa
181 tgcaagtagt tgttagatattt aatcttgcattt ttggcacacg taaaaacgta caaatggat
241 cgtcaccagg tggtaacttggaa gaactgtcac ctaatactac agttaatacaca cgttagcacag
301 cacagctatc atcatctaca ctttccacac ggaaaattgg agatcgccag cttagtaaggc
361 ttgtgtatgg tgcaaatgtt tcaaaaagggtt ttccagttttt tttgtataaaa ataaaaggc
421 gtttattttgc tacgtatgtca gtattgtgtt cacctaaaaa tgggatttca caaccagatc
481 cacatgttgtt tgtagaaacaa ttgtttaattt cattgtatggaa ttttacaacg tcaactacac
541 aatgagaaga gccatgggtt ttatgttgc tacaactcat taatgtcact ccttatacttc
601 ttgtttgtat ttacattaaat aagatattgg agtcgaggag atttggtcaac aatctcaaga
661 cttttttttt taaataggcg aaagaggata agggaaagggtg aaattatgtt gtttacaacg
721 tggtttttat tttttattttt cgcgtagca gtttttaggc tcaactcgttt aatgttat
781 gataaaaataa cagccctttt gcgaagacca ttatgtatg aa

40

によってコード化されるアミノ酸配列：配列番号 64

【化64】

MSCNENKHHGSSHCVVDVVKFINELQDCSTTCGSGCEIPFLGAHNTASV
ANTRPFILYTKTGEAFAPSASLTSCRSPIFRVESVDDDSCAVRLVLTVV
LGDSSPVPPGDDPICTFLAVPNARLISTTICITVDLSCFCAIQCLRDVSIVK

(受託番号 : AY 121973) を含んでなる。

【0179】

1 具体例では、クロストリジウム・パーフリンジエンス (*Clostridium perfringens*) の胞子の表面相同性タンパク質は、アミノ酸配列：配列番号 6 6

【化65】

10

MIRKIYNPNRYYDDYNRYNCYDRYNCYDDEYCQDDYYCKEDCYCKDDC
YLEINCNCDCCKPGPRGPQGPQGPQGPQGPQGMCGQGERGPIGPMGPM
GPIGPQGPQGDQGLTGPQGPAGPQGEQGPQGDQGPVGPQGPQGEQGL
TGPQGPAGSQGPQGPQGPQGTGAQGDQGPVGPQGPQGAQGPQ
GPQGPQGAQGPQGPQGPQGNQGPAGPQGPVGPQGPQGEQGPVDFDDTLV
SYSSLTSQNVNANGIFTYNIQNPNNGSTFTAITANIANGTFTINEPGRYLFMW
SFNLNDNTNNNTASAIVSLFRNGSRVFLSGTPRVAPGEIGVVNGSIAVNANA
GDVFALVNNSTRNVLSQIISSPISVTPAILGESTGINSGIGSWVQIVRVSD

(受託番号 : YP 695648) を含んでなる三重らせん反復ドメインを含んでなる。

【0180】

20

II. 微生物胞子の結合の抗体阻止

1 具体例では、本発明は、抗体を使用して、微生物の胞子が無生物及び / 又は生物表面へ結合及び / 又は付着することを阻止することを意図するものである。1 具体例では、抗体はクロストリジウム属菌の胞子の結合を阻止する。これらの抗体としては、多クローナル性及び单クローナル性の抗体が含まれる（ただし、これらに限定されない）。さらに、キメラ交代は、例えば、マウスの抗体遺伝子をヒトの工程遺伝子にスプライスすることによって産生される。抗体分子のペプシン消化によって又はFabフラクションのジスルフィド架橋の還元によって発生される抗体と共に、单鎖抗体も含まれる。

【0181】

A. 抗体の產生法

30

本発明は、単離した抗体及びそのフラグメント（例えば、多クロナール、单クロナール及び / 又はFab）を提供する。1 具体例では、本発明は、特に、微生物の胞子の表面タンパク質の各種の表面（例えば、生物表面及び / 又は無生物表面）への結合を阻害する单クロナール性抗体を提供する。

【0182】

本発明のタンパク質に対する抗体は、タンパク質を認識できるものであれば、单クロナール性又は多クロナール性のいずれでもよい。抗体は、一般的な抗体又は抗血清の調製法に従い、抗原として本発明のタンパク質を使用することによって産生される。本発明の方法及び組成物において使用される抗体を产生するために、ここに開示するものを含む（ただし、これらに限定されない）各種の好適な方法が使用される。例えば、单クロナール性抗体の产生のために、タンパク質は、そのままで又は好適なキャリヤーと一緒に、抗体の产生（例えば、免疫化）を許容する条件下で動物（例えば、哺乳動物）に投与される。通常、タンパク質は、2週間ごとに1回の割合で、6週まで、計約2 - 10回投与される。このような方法での使用に適する動物としては、靈長類、ウサギ、犬、モルモット、マウス、ラット、羊、ヤギ等が含まれ（ただし、これらに限定されない）、全鎖長のタンパク質又は免疫原性を保持する各種の部分、フラグメント又はオリゴペプチドを注射することによって免疫化される。宿主の種に応じて、免疫応答を増大させるために、各種のアジュバントを使用できる。抗体の產生能力を増大させるために、完全又は不完全フロイントアジュバントが投与される。このようなアジュバントとしては、フロイント、水酸化アルミニウムのような無機質ゲル、リゾレシチン、フルロニックポリオール、ポリアニオン、ペ

40

50

プチド、油エマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、及びジニトロフェノールのような表面活性物質が含まれる（ただし、これらに限定されない）。BCG（バシラス カルメット・ゲラン）及びコリネバクテリウム・バルバム（*Corynebacterium parvum*）が潜在的に有用なアジュバントである。

【0183】

培養における連続セルラインによる抗体分子の產生を提供する各種の技術を使用して、单クロナール性抗体が調製される。このような技術としては、ハイブリドーマ技術が含まれる（ただし、これに限定されない）（Koehlerら, *Nature* 256: 495-497 (1975); Kosborら, *Immunol Today* 4: 72 (1983); Coteら, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 2026-2030 (1983); Coleら, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R Liss Inc., New York, N.Y., pp 77-96 (1985); これらすべての文献を参照して、本明細書に含める）。

【0184】

单クロナール性抗体產生細胞を調製するため、その抗体価が確認されている動物を選択し、最終の免疫化後2-5日の時点で、その脾臓及びリンパ液を採取し、その中に含まれる抗体產生細胞を骨髓腫細胞と融合させて、所望の单クロナール性抗体プロデューサーハイブリドーマを調製する。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後述するように、ラベル化タンパク質及び抗血清を反応させ、ついで交代に結合したラベル化剤の活性を測定することによって行われる。細胞融合は、公知の方法、例えば、Koehler及びMilsteinによって記載された（*Nature* 256: 495 (1975)）に従って行われる。融合プロモーターとしては、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）及びSendaiウイルス（HVJ）が使用され、好ましくはPEGが使用される。

【0185】

骨髓腫細胞の例としては、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1等が含まれる。使用する抗体プロデューサー細胞（例えば、脾臓細胞）の数及び骨髓腫細胞の数の割合は、好ましくは、約1:1-約20:1である。PEG（好ましくは、PEG 1000-PEG 6000）は、好ましくは、約10-約80%の濃度で添加される。細胞融合は、両細胞の混合物を、約20-40、好ましくは、約30-37において約1-10分間インキュベーションすることによって効果的に行われる。

【0186】

抗体（例えば、本発明の腫瘍抗原又は自己抗体に対する）を產生するハイブリドーマについてのスクリーニングのためには、各種の方法が使用される。例えば、ハイブリドーマの上澄みを固体相（例えば、ミクロプレート）に添加し、抗体を直接又はキャリヤーと一緒に固体相に吸着させ、ついで、放射性物質又は酵素でラベル化した抗-免疫グロブリン抗体（細胞融合において、マウスの細胞が使用される場合には、抗-マウス免疫グロブリンが使用される）又はProtein Aを添加して、固体相に結合したタンパク質に対する单クロナール性抗体を検出する。あるいは、ハイブリドーマの上澄みを固定相に添加し、抗-免疫グロブリン抗体又はProtein Aを固体相に吸着させ、ついで、放射性物質又は酵素でラベル化したタンパク質を添加して、固体相に結合したタンパク質に対する单クロナール性抗体を検出する。

【0187】

单クロナール性抗体の選別は、各種の既知の方法又はその変法に従って行われる。通常、動物細胞用の培地（HAT（ヒポキサンチン、アミノブテリン、チミジン）が添加される）が使用される。ハイブリドーマが成長できるものであれば、いかなる選別及び成長培地も使用できる。例えば、ウシ血清1-20%、好ましくは、10-20%を含有するRPMI 1640培地、ウシ胎児血清1-10%を含有するGIT培地、ハイブリドーマの培養のための血清フリー培地（SFM-101, Nissui Seiyaku）等が使用できる。通常、培養は、約5%CO₂ガスの存在下、20-40、好ましくは、37において、約5日-3週間、好ましくは、1-2週間で行われる。ハイブリドーマ培養基の上澄みの抗体価は、抗血清中の抗-タンパク質の抗体価について上述したものと同じ様式に従って測定される。

【0188】

10

20

30

40

50

单クロナール性抗体の選別及び精製は、免疫グロブリンの選別及び精製のような一般的な多クロナール性抗体の選別及び精製と同様にして、例えば、塩析、アルコール析出、等電点析出、電気泳動、イオン交換樹脂（例えば、DEAE）による吸着及び脱離、超遠心、ゲルfiltration、又は抗体のみを、抗原・結合固体相、Protein A又はProtein Gのような活性吸着剤にて集め、結合を解離して抗体を得るような特殊な精製法に従って行われる。

【0189】

多クロナール性抗体は、各種の公知の方法又はタンパク質から抗体を得ることを含むこれら公知の方法の変法によって調製される。例えば、免疫原（抗・タンパク質抗原）及びキャリヤータンパク質の複合体を調製し、上述の单クロナール抗体の調製について記載したものと同じ様式に従って、この複合体によって、動物を免疫化する。抗体を含有する物質を免疫化した動物から回収し、抗体を分離し、精製する。10

【0190】

動物の免疫化に使用される免疫原及びキャリヤータンパク質の複合体について、ハプテンに対する抗体（キャリヤー上に結合されており、免疫化に使用される）が効果的に産生される限り、いかなるキャリヤー及びキャリヤー及びハプテンのいかなる割合も使用できる。例えば、ウシ血清アルブミン、ウシシクログロブリン、キーホールリンペットヘモシアニン等が、ハプテン1部当たり約0.1 - 約20部、好ましくは、約1 - 約5部の質量比で、ハプテンと結合される。

【0191】

さらに、ハプテン及びキャリヤーの結合のためには、各種の縮合剤が使用される。例えば、本発明では、グルタルアルデヒド、カルボジイミド、マレイミド活性化エチル、チオール基又はジチオピリジル基を含有する活性化エチル剤等が使用される。縮合生成物は、そのままで又は好適なキャリヤー又は希釈剤と一緒に、抗体産生可能な動物の部位に投与される。抗体産生能力を増大させるために、完全又は不完全フロイントアジュvantが投与される。通常、タンパク質は、2 - 6週間ごとに1回の割合で、計約3 - 約10回投与される。20

【0192】

上述の方法によって免疫化した動物の血液、腹水等から多クロナール性抗体が回収される。抗血清における抗体価は、ハイブリドーマの培養基の上澄みについて上述したものと同じ様式に従って測定される。交代の選別及び精製は、上述の单クロナール性抗体について上述したものと同じ免疫グロブリンの選別及び精製法に従って行われる。30

【0193】

免疫原としてここで使用するタンパク質は、特殊なタイプの免疫原に限定されない。例えば、免疫原として、ウイルス感染の結果として発現されるタンパク質（さらに、部分的に変性された核酸配列を有する遺伝子を含む）が使用される。フラグメントは、遺伝子のフラグメントの発現、タンパク質の酵素処理、化学合成等を含む（ただし、これらに限定されない）各種の方法によって得られる。

【0194】

本発明における抗体の產生のためには、ここで検討するアミノ酸配列（例えば、配列番号：1、3、5、7又は9）を有する微生物の胞子のタンパク質の各種の抗原性部分を、単独で又は他のタンパク質（例えば、キメラ分子に対する抗体を产生するためにはグルタチオン）のアミノ酸と融合して、使用される。このような抗体としては、多クロナール性、单クロナール性、キメラ性、单鎖性、Fabフラグメント及びFab発現ライブラリーによって產生されたフラグメントが含まれる（ただし、これらに限定されない）。特に、診断剤及び治療剤のためには、中和性抗体、すなわち、二量体の形成を阻止するのが好ましい。

【0195】

抗体の誘発に使用されるポリペプチドは、生物学的活性を保持している必要はない。しかし、タンパク質フラグメント又はオリゴペプチドは抗原性でなければならない。特赦名交代を誘発するために使用されるペプチドは、少なくとも5つのアミノ酸、好ましくは少4050

なくとも 10 個のアミノ酸を含んでなるアミノ酸配列を有することができる。好ましくは、それらは、天然タンパク質のアミノ酸配列の一部に似たものでなければならず、小さい天然の分子の完全アミノ酸配列を含有することができる。アミノ酸配列の短いストレッチは、キーホールリンペットヘモシアニン及びキメラ分子に対して産生される抗体を含む（ただし、これらに限定されない）他のタンパク質と融合される。

【0196】

抗体は、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、放射免疫アッセイ（RIA）及び蛍光標識細胞分取（FACS）を含む（ただし、これらに限定されない）技術を使用して、体液、細胞抽出物、組織抽出物を含む（ただし、これらに限定されない）サンプル中のポリペプチドを検出するためにも使用される。ポリペプチド - 抗体結合の検出を容易にするため、レポーター分子をポリペプチド及び抗体に加えることができる。10

【0197】

B. 微生物の胞子の表面タンパク質の抗体阻害法

1 具体例では、本発明は、クロストリジウム属菌の胞子の表面タンパク質に対する親和性を有する单クロナール性及び / 又は多クロナール性抗体を含むスクリーニング法を意図するものである。

【0198】

バシラス・セレウスTの胞子及びクロストリジウム・スポロゲネスPA 3679の胞子の 1 : 1 混合物にて免疫化されたマウスはハイブリドーマ397個を產生し、これらを、バシラス・セレウスの胞子 10^7 個との反応性について及びクロストリジウム・スポロゲネスの胞子 10^7 個との反応性についてスクリーニングしたことが報告されている。明らかなように、9つのハイブリドーマがクロストリジウム・スポロゲネスの胞子に特異的な抗体を產生した。7つのハイブリドーマは、バシラス・セレウスT及びクロストリジウム・スポロゲネスの胞子と交叉反応する抗体を產生した（Quinlanら、「バシラス属菌及びクロストリジウム属菌の胞子の検出に使用される单クロナール性抗体」, Appl. Environ. Microbiol. 63: 482-487 (1997)）。クロストリジウム・スポロゲネスの胞子に特異的な抗体を產生するハイブリドーマの内の 2 つをC33及びC225と表示する。20

【0199】

ドットプロットフォーマットを使用して、抗体を、バシラス属菌、クロストリジウム属菌及びデスルホトマキュラム属菌の範囲の胞子との反応性について、定性的に（視覚的に）検討した。抗体C33は、クロストリジウム・スポロゲネスと強く反応し、クロストリジウム・パーフリンジェンスの胞子とは弱く反応した。抗体C225は、バシラス・メガテリウムの胞子と弱く反応し、バシラス・ステアロサーモフィラス（*Bacillus stearothermophilus*）、クロストリジウム・パーフリンジェンス及びクロストリジウム・スポロゲネスの胞子と強く反応した。30

【0200】

クロストリジウム・スポロゲネスの胞子の抗原について利用できる情報は少ないが、特殊な胞子抗原が植物性抗原から区別されることが証明された（Norris J., 「細菌の胞子抗原：レビュー」, J. Gen. Microbiol. 28: 393-408 (1962); 及び Princewill, T., 「クロストリジウム・スポロゲネスの胞子抗原」, J. Med. Microbiol. 12: 29-41 (1979)）。本発明の気候を理解することは必要ではないが、クロストリジウム属菌の胞子抗原によって產生される多クローン性抗体は、クロストリジウム属菌の 1 つ以上に共通である（Foegedingら、「細菌の胞子を検出するための酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）における多クローン性抗体」, J. Rapid Methods Automat. Microbiol. 2: 135-150 (1993)）。40

【0201】

1 具体例では、本発明は、クロストリジウム属菌の胞子の表面への結合を崩壊させるために、クロストリジウム属菌の胞子の表面タンパク質に対する親和性を有する单クローン性及び / 又は多クローン性抗体を使用する方法を意図するものである。1 具体例では、表面は、プラスチック、セラミック、ステンレス鋼、鉄鋼、ビニール、タイル、合板、皮膚（例えば、ブタ皮膚）、体内組織、衣服、又は環境保護スーツを含む（ただし、これらに50

限定されない)群から選ばれる。

【0202】

C. 微生物の胞子の結合の抗体阻害

クロストリジウム・ディフィシレの胞子のヒト皮膚代用物(例えば、ブタ皮膚)に結合する能力を評価するために、変性カップスクラップ法を使用した(実施例10参照)。初めに、非抗菌性セッケンを使用してブタ皮膚を30分間洗浄し、ついで、水で30分間すすいだ。ブタ皮膚の洗浄後、胞子50μl以下を、皮膚の表面上の直径20mmの区域に添加した。胞子を1時間以下で乾燥し、ついで、カップスクラップ法に従って除去した。この実験は、クロストリジウム・ディフィシレの胞子のヒト皮膚代用物に結合する能力を測定するものである。一次データでは、胞子の80%以下がブタ皮膚の表面から除去されルことを示した。続く実験では、皮膚表面に適用する前に、初めに、胞子をクロストリジウム・ディフィシレの胞子の表面抗体と反応させた。皮膚から胞子を除去する能力を、再度、カップスクラップ法を使用して測定した。一次データは、胞子の80%より大を除去できル力10脳性を示した。これは、抗体が、胞子が皮膚に結合することを阻止することを示唆している。

【0203】

III. 微生物の胞子の結合の微生物胞子の表面タンパク質阻害

1具体例では、本発明は、感染制御剤を使用して微生物胞子の結合を阻害することを含んでなる方法であって、感染制御剤が、微生物の胞子タンパク質の少なくとも一部を含むものである方法を意図するものである。本発明の機構を理解することは必要ではないが、感染制御剤は、表面結合部位(この部位に対して、微生物の胞子が同様の親和性を有する)を得るために競合するものと考えられる。さらに、得られた競合的結合は、既に結合していた微生物の胞子を表面結合部位から追放させる、及び/又は微生物の胞子の表面タンパク質の少なくとも一部の存在により、結合することを立体的に防止するものと考えられる。20

【0204】

1具体例では、胞子の表面タンパク質は、細菌、ウイルス、真菌、藻類、又はカビを含んでなる群から選ばれる微生物に由来するものである。1具体例では、方法は、さらに、胞子の表面タンパク質により、微生物の胞子の表面への結合を防止することを含んでなる。1具体例では、胞子の表面タンパク質は、小さい分子、タンパク質、又は核酸を含んでなる群から選ばれる非-胞子表面タンパク質と配合される。1具体例では、胞子の表面タンパク質は、界面活性剤、セッケン、洗浄剤、起泡剤、湿潤剤、エーロゾル化剤を含む(ただし、これらに限定されない)表面活性剤と配合される。1具体例では、化合部は、溶媒として知られている化合物のクラスから選ばれる。30

【0205】

A. 胞子の全長の表面タンパク質

1具体例では、微生物の胞子の表面タンパク質の少なくとも一部は、微生物の胞子の全長の表面タンパク質を含んでなる。1具体例では、微生物の胞子の全長の表面タンパク質は、クロストリジウム属菌の胞子の表面タンパク質を含んでなる。1具体例では、クロストリジウム属菌の胞子の表面タンパク質は、クロストリジウム・ディフィシレの胞子の全長の表面タンパク質を含んでなる。1具体例では、クロストリジウム・ディフィシレの胞子の全長の表面タンパク質は、配列番号：1、3、5、7、9を含んでなる群から選ばれる。40

【0206】

1具体例では、微生物の胞子全長の表面タンパク質は、バシラス属菌の胞子の表面タンパク質を含んでなる。1具体例では、バシラス属菌の胞子の表面タンパク質は、バシラス・アンスラシスの胞子の全長の表面タンパク質を含んでなる。1具体例では、バシラス・アンスラシスの胞子の全長の表面タンパク質は、配列番号：41、43、45、47、49を含んでなる群から選ばれる。

【0207】

50

B . 胞子の短縮表面タンパク質

1 具体例では、微生物の胞子の表面タンパク質の少なくとも一部は、微生物の胞子の短縮表面タンパク質を含んでなる。本発明の機構を理解することは必要ではないが、このような微生物の胞子の短縮表面タンパク質は、微生物の胞子の表面タンパク質をコード化する核酸配列の一部がベクター内に組み込まれ、競合プロモーターと操作可能に組み合わせて配置されている組換えタンパク質発現プラットフォーム (infra) によって構成されるものと考えられる。あるいは、このような微生物の胞子の短縮表面タンパク質は、既に報告されているペプチダーゼ酵素のいずれか 1 以上を使用して、微生物の胞子の全長の表面タンパク質を消化することによっても創生される。このようなペプチダーゼ酵素は、エンドペプチダーゼ、エキソペプチダーゼ、アミノペプチダーゼ及び / 又はカルボキシペプチダーゼを含む（ただし、これらに限定されない）酵素を含んでなる。

【 0 2 0 8 】

1 具体例では、微生物の胞子の短縮表面タンパク質は、クロストリジウム属菌の胞子の表面タンパク質に由来するものである。1 具体例では、クロストリジウム属菌の胞子の短縮表面タンパク質は、クロストリジウム・ディフィシレの胞子の短縮表面タンパク質を含んでなる。1 具体例では、クロストリジウム・ディフィシレの胞子の短縮表面タンパク質は、下記の表 3 に示すようなクロストリジウム属菌の仮定上のタンパク質 (CD 1581) に由来するものである。

【表 3】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子の表面タンパク質の短縮ペプチドフラグメント

10

20

ペプチドフラグメント	配列番号
MENKKCYSED	SEQ ID NO: 67
WYERGESTAK	SEQ ID NO: 68
WFQNDREEYE	SEQ ID NO: 69
REAYDEDRER	SEQ ID NO: 70
RGSNCGCSDS	SEQ ID NO: 71
GENPRRNCR	SEQ ID NO: 72
FRREAEIRER	SEQ ID NO: 73
EAREAFCESS	SEQ ID NO: 74
EKKKEALAYE	SEQ ID NO: 75
CEARKLWEEA	SEQ ID NO: 76
EKYWDEYSKY	SEQ ID NO: 77
NYKGIEYLAE	SEQ ID NO: 78
AARLFDEGME	SEQ ID NO: 79
CEARRNGNNG	SEQ ID NO: 80
GNNNNCCCHKC	SEQ ID NO: 81
HKCNCNCCRK	SEQ ID NO: 82

30

【 0 2 0 9 】

1 具体例では、クロストリジウム・ディフィシレの胞子の短縮表面タンパク質は、下記の表 4 に示すようなクロストリジウム属菌の仮定上のタンパク質 (CD 1067) に由来するものである。

40

【表4】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子の表面タンパク質の短縮ペプチドフラグメント

ペプチドフラグメント	配列番号
MQDYKKNKRR	SEQ ID NO: 83
MMNQPMSTMN	SEQ ID NO: 84
EEEVYTDEIN	SEQ ID NO: 85
SEDMRGFKKS	SEQ ID NO: 86
HHHNGCNDTN	SEQ ID NO: 87
KCECHDDCNP	SEQ ID NO: 88
CNPCNPCKPN	SEQ ID NO: 89
PCNPCKPNPC	SEQ ID NO: 90
DDNCGCHDNC	SEQ ID NO: 91
KCDCEPCEMD	SEQ ID NO: 92
SDECENKCG	SEQ ID NO: 93
PECCNPISPR	SEQ ID NO: 94
NFSVSNAVPF	SEQ ID NO: 95
AIEANRIFDT	SEQ ID NO: 96
MQFQTFTDAT	SEQ ID NO: 97
GPNGEPLTFE	SEQ ID NO: 98
TEVVEVFGSV	SEQ ID NO: 99
PSAGQASVTI	SEQ ID NO: 100
EKICLNSNDGI	SEQ ID NO: 101
VIDTGMTTLE	SEQ ID NO: 102
DFDLDPLGDI	SEQ ID NO: 103
VGRNCETTFE	SEQ ID NO: 104
FAVCGERNSE	SEQ ID NO: 105
CCRQGKGKSV	SEQ ID NO: 106
AYKQRGLTVA	SEQ ID NO: 107
VRNLVLELRG	SEQ ID NO: 108
RCGCTEFVAL	SEQ ID NO: 109
AFPAVRAGGG	SEQ ID NO: 110
CKRRVDYVEF	SEQ ID NO: 111
TFNTLSAPIC	SEQ ID NO: 112
LPADGRAVTL	SEQ ID NO: 113
RQEYQTNLTV	SEQ ID NO: 114
DCIGKSILKL	SEQ ID NO: 115
ECNECCEPFY	SEQ ID NO: 116
ELIIPNDIDL	SEQ ID NO: 117
VLCLQETVST	SEQ ID NO: 118
LISEQIVVLA	SEQ ID NO: 119
SPNPIQPRLV	SEQ ID NO: 120
DTFSKVCDFS	SEQ ID NO: 121
QCGPNHGSGK	SEQ ID NO: 122
PSCHR	SEQ ID NO: 123

【0210】

1 具体例では、クロストリジウム・ディフィシレの胞子の短縮表面タンパク質は、下記の表5に示すようなクロストリジウム属菌の仮定上のタンパク質（CD 3620）に由来するものである。

【表5】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子の表面タンパク質の短縮ペプチドフラグメント

ペプチドフラグメント	配列番号
MYDDYKYNKC	SEQ ID NO: 124
NKCYNDYEEM	SEQ ID NO: 125
THVHEYSESV	SEQ ID NO: 126
KLAEECEDRH	SEQ ID NO: 127
NHRAAGVTGE	SEQ ID NO: 128
AIPINGGTNH	SEQ ID NO: 129
VHKINDNVDF	SEQ ID NO: 130
LDHFHKICVT	SEQ ID NO: 131
TGPAIRIPGT	SEQ ID NO: 132
DKHIHLICGE	SEQ ID NO: 133
TTVNDGHCHK	SEQ ID NO: 134
FLFTTQIEAPLV	SEQ ID NO: 135

10

【0211】

1 具体例では、クロストリジウム・ディフィシレの胞子の短縮表面タンパク質は、下記の表6に示すようなクロストリジウム属菌の仮定上のタンパク質（CD 1613）に由来するものである。

20

【表6】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子の表面タンパク質の短縮ペプチドフラグメント

ペプチドフラグメント	配列番号
MENNKCREDF	SEQ ID NO: 136
RFTQEYEEDY	SEQ ID NO: 137
PNTNERYYEN	SEQ ID NO: 138
YQVADRYYNY	SEQ ID NO: 139
PNKYKEPKIK	SEQ ID NO: 140
QCCCCKKSMRE	SEQ ID NO: 141
ALELLRYDAL	SEQ ID NO: 142
RPFVNFNQFA	SEQ ID NO: 143
FISDFFIVGA	SEQ ID NO: 144
NLVGIDL SAP	SEQ ID NO: 145
PKDNLSGLDG	SEQ ID NO: 146
TFERFSACNC	SEQ ID NO: 147
DLIDIAGRVS	SEQ ID NO: 148
YPIPVPLTLE	SEQ ID NO: 149
GLINTIGTIP	SEQ ID NO: 150
GVAELIALID	SEQ ID NO: 151
AVIPPTIDLG	SEQ ID NO: 152
AILDAILAAI	SEQ ID NO: 153
IDFILAASSTP	SEQ ID NO: 154
LANVDLASIC	SEQ ID NO: 155
NLKAVAFDT	SEQ ID NO: 156
PADYEDFIAS	SEQ ID NO: 157
LGYYLDKKHY	SEQ ID NO: 158
KECNCCDCD	SEQ ID NO: 159
DCCCNKGILD	SEQ ID NO: 160
NLYMSNINNNQ	SEQ ID NO: 161
VTVVAGSLVL	SEQ ID NO: 162
TGVEVLGKKN	SEQ ID NO: 163
DVIVLGNNSND	SEQ ID NO: 164
SRIYFVCVDS	SEQ ID NO: 165
IDYIA	SEQ ID NO: 166

10

20

30

【0212】

1 具体例では、クロストリジウム属菌の胞子の短縮表面タンパク質は、下記の表7に示すような仮定上のタンパク質(CD 1711)に由来するものである。

【表7】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子の表面タンパク質の短縮ペプチドフラグメント

ペプチドフラグメント	配列番号
MLIVTTEKVE	SEQ ID NO: 167
GKKISKVLGL	SEQ ID NO: 168
VRGSTIRAKII	SEQ ID NO: 169
VGKDYGASFK	SEQ ID NO: 170
NLVGGELTGY	SEQ ID NO: 171
NEMLTEARQI	SEQ ID NO: 172
AIGRMVEDAE	SEQ ID NO: 173
AKGANAVIAF	SEQ ID NO: 174
RLSSASVMQG	SEQ ID NO: 175
AAEMLAYGTA	SEQ ID NO: 176
VVLEDDNSILEK	SEQ ID NO: 177

10

【0213】

1 具体例では、クロストリジウム属菌の胞子の短縮表面タンパク質は、下記の表8に示すような仮定上のタンパク質(CD 0881)に由来するものである。

【表8】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子の表面タンパク質の短縮ペプチドフラグメント

ペプチドフラグメント	配列番号
MGTKIVLSIV	SEQ ID NO: 178
LIVVVVAISL	SEQ ID NO: 179
TCIRVIKQSK	SEQ ID NO: 180
VGIIMRLGKF	SEQ ID NO: 181
QKVAETGVHF	SEQ ID NO: 182
LIPFLDKMAY	SEQ ID NO: 183
VIDLREIVID	SEQ ID NO: 184
FPPQPVITKD	SEQ ID NO: 185
NVTMQIDTVV	SEQ ID NO: 186
YYKVTDPPVRY	SEQ ID NO: 187
VFEIANPIAA	SEQ ID NO: 188
IENLTATTLR	SEQ ID NO: 189
NIIGELDLDE	SEQ ID NO: 190
TLTSRDIINV	SEQ ID NO: 191
KMRTILDEAT	SEQ ID NO: 192
DKWGIKVNRV	SEQ ID NO: 193
ELKNIMPPQD	SEQ ID NO: 194
IQVAMEKQMR	SEQ ID NO: 195
AERERREAIL	SEQ ID NO: 196
QAEGNKSAAI	SEQ ID NO: 197
LQAEGEKQSA	SEQ ID NO: 198
ILTAEAKKEA	SEQ ID NO: 199
MVRVAEGERKE	SEQ ID NO: 200
SAILVAEGEREA	SEQ ID NO: 201
EAIRQTAIAK	SEQ ID NO: 202
AQGEAEAMIKR	SEQ ID NO: 203
TQMATAEGLK	SEQ ID NO: 204
LVFSAMKEAD	SEQ ID NO: 205
IDNNILALKS	SEQ ID NO: 206
MEAILEKMAEG	SEQ ID NO: 207
KSTKLVLPS	SEQ ID NO: 208
AVNFLGTFKG	SEQ ID NO: 209
IKEVMSDDNK	SEQ ID NO: 210
EVLDIKEVLN	SEQ ID NO: 211
DNESLKK	SEQ ID NO: 212

【0214】

1 具体例では、クロストリジウム属菌の胞子の短縮表面タンパク質は、下記の表9に示すような仮定上のタンパク質(CD 1511)に由来するものである。

10

20

30

40

【表9】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子の表面タンパク質の短縮ペプチドフラグメント

ペプチドフラグメント	配列番号
MIDNQKYVIL	SEQ ID NO: 213
SLELHLFFSR	SEQ ID NO: 214
IMKEHALFLE	SEQ ID NO: 215
AGFTNKNYNL	SEQ ID NO: 216
AMEADHYKKQ	SEQ ID NO: 217
FEDLLSYTWS	SEQ ID NO: 218
ASN GHIRPDI	SEQ ID NO: 219
LYSEELVTTL	SEQ ID NO: 220
TSVAEQKTEE	SEQ ID NO: 221
FTGIEINKNI	SEQ ID NO: 222
TTRELNLQSG	SEQ ID NO: 223
VNPQVGQDLV	SEQ ID NO: 224
NYVAQLNSDA	SEQ ID NO: 225
IRLLDGLINF	SEQ ID NO: 226
KERVLDGVLS	SEQ ID NO: 227
CTIFTSNYPL	SEQ ID NO: 228
LLEHIIHEAN	SEQ ID NO: 229
LYRSYVVVDLE	SEQ ID NO: 230
NKIDIESKNA	SEQ ID NO: 231
KEIELFWDH	SEQ ID NO: 232
MMEHALFMRG	SEQ ID NO: 233
LLDPSEGELI	SEQ ID NO: 234
NTSNDFAIKF	SEQ ID NO: 235
NELIEKTNEM	SEQ ID NO: 236
TDSNIKNITE	SEQ ID NO: 237
ETLNETVEFK	SEQ ID NO: 238
DFKEAGASGI	SEQ ID NO: 239
EQCKIKSIIL	SEQ ID NO: 240
PLLADHVLR	SEQ ID NO: 241
ANHYIRILES	SEQ ID NO: 242
YKNM	SEQ ID NO: 243

【0215】

1 具体例では、クロストリジウム・ディフィシレの胞子の短縮表面タンパク質は、下記の表10に示すようなコラーゲン様タンパク質に由来するものである。

【表10】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子の表面タンパク質の短縮ペプチドフラグメント

ペプチドフラグメント	配列番号
MRNIILYLND	SEQ ID NO: 244
DTFISKKYPD	SEQ ID NO: 245
KNFSNLDYCL	SEQ ID NO: 246
IGSKCSNSFV	SEQ ID NO: 247
KEKLITFFKV	SEQ ID NO: 248
RIPDILKDKS	SEQ ID NO: 249
ILKAELFIHI	SEQ ID NO: 250
DSNKNHIFKE	SEQ ID NO: 251
KVDIEIKRIS	SEQ ID NO: 252
EYYNLRTITW	SEQ ID NO: 253
NDRVSMENIR	SEQ ID NO: 254
GYLPIGISDT	SEQ ID NO: 255
SNYICLNITG	SEQ ID NO: 256
nKAWAMNKY	SEQ ID NO: 257
PNYGLALSLN	SEQ ID NO: 258
YPYQILEFTS	SEQ ID NO: 259
SRGCNKPYIL	SEQ ID NO: 260
VTFEDRIIDN	SEQ ID NO: 261
CYPKCECPPI	SEQ ID NO: 262
RITGPMGPRG	SEQ ID NO: 263
ATGSTGPMGV	SEQ ID NO: 264
TGPTGSTGAT	SEQ ID NO: 265
GSIGPTGPTG	SEQ ID NO: 266
NTGATGSIGP	SEQ ID NO: 267
TGVTGPTGST	SEQ ID NO: 268
GATGSIGPTG	SEQ ID NO: 269
VTGPTGNTGV	SEQ ID NO: 270
TGSIGPTGAT	SEQ ID NO: 271
GPTGNTGVTG	SEQ ID NO: 272
SIGPTGVTGP	SEQ ID NO: 273
TGNTGEIGPT	SEQ ID NO: 274
GATGPTGVTG	SEQ ID NO: 275
SIGPTGATGP	SEQ ID NO: 276
TGEIGPTGAT	SEQ ID NO: 277
ATGPTGATGV	SEQ ID NO: 278
TGEIGPTGEI	SEQ ID NO: 279
GPTGATGPTG	SEQ ID NO: 280
VTGEIGPTGA	SEQ ID NO: 281
TGPTGNTGVT	SEQ ID NO: 282
GEIGPTGATG	SEQ ID NO: 283
PTGNTGVTGE	SEQ ID NO: 284
IGPTGATGPT	SEQ ID NO: 285
GVTGEIGPTG	SEQ ID NO: 286
NTGATGSIGP	SEQ ID NO: 287

10

20

30

40

TGVTGPTGAT	SEQ ID NO: 288
GSIGPTGATG	SEQ ID NO: 289
ATGVTGPTGP	SEQ ID NO: 290
TGATGNSSQP	SEQ ID NO: 291
VANFLVNAPS	SEQ ID NO: 292
PQTLNNGDAI	SEQ ID NO: 293
TGWQTIIGNS	SEQ ID NO: 294
SSITVDTNGT	SEQ ID NO: 295
FTVQENGVYY	SEQ ID NO: 296
ISVSVALQPG	SEQ ID NO: 297
SSSINQYSFA	SEQ ID NO: 298
ILFPILGGKD	SEQ ID NO: 299
LAGLTTEPGG	SEQ ID NO: 300
GGVLSGYFAG	SEQ ID NO: 301
FLFGGTTFTI	SEQ ID NO: 302
NNFSSTTVGI	SEQ ID NO: 303
RNGQSAGTAA	SEQ ID NO: 304
TLTIFRIADTVMT	SEQ ID NO: 305

【 0 2 1 6 】

1 具体例では、クロストリジウム・ディフィシレの胞子の短縮表面タンパク質は、下記 20 の表 1-1 に示すようなコラーゲン様タンパク質に由来するものである。

【表 11】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子の表面タンパク質の短縮ペプチドフラグメント

ペプチドフラグメント	配列番号
MLLIMSRNKY	SEQ ID NO: 306
FGPFDDNDYN	SEQ ID NO: 307
NGYDKYDDCN	SEQ ID NO: 308
NGRDDYNSCD	SEQ ID NO: 309
CHHCCPPSCV	SEQ ID NO: 310
GPTGPMGPRG	SEQ ID NO: 311
RTGPTGPTGP	SEQ ID NO: 312
TGPGVGATGP	SEQ ID NO: 313
TGPTGPTGPT	SEQ ID NO: 314
GNTGNTGATG	SEQ ID NO: 315
LRGPTGATGA	SEQ ID NO: 316
TGPTGATGAI	SEQ ID NO: 317
GFGVTGPTGP	SEQ ID NO: 318
TGATGATGAD	SEQ ID NO: 319
GVTGPTGPTG	SEQ ID NO: 320
ATGADGITGP	SEQ ID NO: 321
TGATGATGFG	SEQ ID NO: 322
VTGPTGPTGA	SEQ ID NO: 323
TGVGVTGATG	SEQ ID NO: 324
LIGPTGATGT	SEQ ID NO: 325
PGATGPTGAI	SEQ ID NO: 326
GATGIGITGP	SEQ ID NO: 327
TGATGATGAD	SEQ ID NO: 328
GATGVTGPTG	SEQ ID NO: 329
PTGATGADGV	SEQ ID NO: 330
TGPTGATGAT	SEQ ID NO: 331
GIGITGPTGP	SEQ ID NO: 332
TGATGIGITG	SEQ ID NO: 333
ATGLIGPTGA	SEQ ID NO: 334
TGTPGATGPT	SEQ ID NO: 335
GATGPTGVGV	SEQ ID NO: 336
TGATGATGAT	SEQ ID NO: 337
GADGATGVTG	SEQ ID NO: 338
PTGATGATGA	SEQ ID NO: 339
NGLVGPTGAT	SEQ ID NO: 340
GAAGTPGATG	SEQ ID NO: 341
PTGATGPTGV	SEQ ID NO: 342
GITGATGATG	SEQ ID NO: 343
ATGPTGADGA	SEQ ID NO: 344
TGPTGATGNT	SEQ ID NO: 345
GADGVAGPTG	SEQ ID NO: 346
ATGNTGADGA	SEQ ID NO: 347
TGPTGATGAT	SEQ ID NO: 348
GVTGATGPTG	SEQ ID NO: 349

10

20

30

40

PTGATGATGA	SEQ ID NO: 350
TGASAIIPFA	SEQ ID NO: 351
SGIPLSLTTI	SEQ ID NO: 352
AGGLVGTPGF	SEQ ID NO: 353
VGFGSSAPGL	SEQ ID NO: 354
SIVGGVIDLT	SEQ ID NO: 355
NAAGTLTNFA	SEQ ID NO: 356
FSMPRDGTIT	SEQ ID NO: 357
SISAYFSTTA	SEQ ID NO: 358
ALSLVGSTIT	SEQ ID NO: 359
ITATLYQSTA	SEQ ID NO: 360
PNNSFTAVPG	SEQ ID NO: 361
ATVTLAPPNT	SEQ ID NO: 362
GILSVGSISS	SEQ ID NO: 363
GIVTGLNIAA	SEQ ID NO: 364
TAQTPDRQYAI	SEQ ID NO: 365

【 0 2 1 7 】

1 具体例では、クロストリジウム・ディフィシレの胞子の短縮表面タンパク質は、下記の表 1-2 に示すようなコラーゲン様タンパク質に由来するものである。

【表 12】

クロストリジウム・ディフィシレの胞子の表面タンパク質の短縮ペプチドフラグメント

ペプチドフラグメント	配列番号
MSDISGPSLY	SEQ ID NO: 366
QDVGPTGPTG	SEQ ID NO: 367
ATGPTGPTGP	SEQ ID NO: 368
RGATGATGAN	SEQ ID NO: 369
GITGPTGNTG	SEQ ID NO: 370
ATGANGITGP	SEQ ID NO: 371
TGNMGATGPN	SEQ ID NO: 372
GTTGSTGPTG	SEQ ID NO: 373
NTGATGANGI	SEQ ID NO: 374
TGPTGNTGAT	SEQ ID NO: 375
GANGITGPTG	SEQ ID NO: 376
NKGATGANGI	SEQ ID NO: 377
TGSTGPTGNT	SEQ ID NO: 378
GATGANGITG	SEQ ID NO: 379
PTGNTGATGA	SEQ ID NO: 380
TGPTGLTGAT	SEQ ID NO: 381
GATGANGITG	SEQ ID NO: 382
PTGNTGATGA	SEQ ID NO: 383
NGVTGATGPT	SEQ ID NO: 384
GN TGATGPTG	SEQ ID NO: 385
SIGATGATGT	SEQ ID NO: 386
TGATGPIGAT	SEQ ID NO: 387
GATGADGEVG	SEQ ID NO: 388
PTGAVGATGP	SEQ ID NO: 389
DGLVGPTGPT	SEQ ID NO: 390
GPTGATGANG	SEQ ID NO: 391
LVGPTGPTGA	SEQ ID NO: 392
TGANGLVGPT	SEQ ID NO: 393
GATGATGVAG	SEQ ID NO: 394
AIGPTGAVGA	SEQ ID NO: 395
TGPTGADGAV	SEQ ID NO: 396
GPTGATGATG	SEQ ID NO: 397
ANGATGPTGA	SEQ ID NO: 398
VGATGANGVA	SEQ ID NO: 399
GPIGPTGPTG	SEQ ID NO: 400
ENGVAGATGA	SEQ ID NO: 401
TGATGANGAT	SEQ ID NO: 402
GPTGAVGATG	SEQ ID NO: 403
ANGVAGAIGP	SEQ ID NO: 404
TGPTGANGAT	SEQ ID NO: 405
GATGATGATG	SEQ ID NO: 406
ANGATGPTGA	SEQ ID NO: 407
TGATGVLAAN	SEQ ID NO: 408
NAQFTVSSSS	SEQ ID NO: 409

10

20

30

40

LVNNNTLVTFN	SEQ ID NO: 410
SSFINGTNIT	SEQ ID NO: 411
FPTSSTINLA	SEQ ID NO: 412
VGGIYNVSFG	SEQ ID NO: 413
IRATLSSLGF	SEQ ID NO: 414
MSITTNFNGV	SEQ ID NO: 415
TQNNFIKAV	SEQ ID NO: 416
NTLTSSDVSV	SEQ ID NO: 417
SLSFLVDARA	SEQ ID NO: 418
AAVTLSFTFG	SEQ ID NO: 419
SGTTGTSAAAG	SEQ ID NO: 420
YVSVYRIQ	SEQ ID NO: 421

10

【0218】

1具体例では、微生物の胞子の短縮表面タンパク質は、バシラス属菌の胞子の全長の表面タンパク質に由来するものである。1具体例では、バシラス属菌の胞子の短縮表面タンパク質は、バシラス・アンスラシスの胞子の短縮表面タンパク質を含んでなるものである。1具体例では、バシラス・アンスラシスの胞子の短縮表面タンパク質は、下記の表13に示すようなBcIAタンパク質に由来するものである。

【表13】

20

バシラス・アンスラシスの胞子の表面タンパク質の短縮ペプチドフラグメント

ペプチドフラグメント	配列番号
MSNNNNYSNGL	SEQ ID NO: 422
NPDESLSASA	SEQ ID NO: 423
FDPNLVGPTL	SEQ ID NO: 424
PPIPPFTLPT	SEQ ID NO: 425
GPTGPTGPTG	SEQ ID NO: 426
PTGPTGPTGP	SEQ ID NO: 427
TGPTGPTGPT	SEQ ID NO: 428
GDTGTTGPTG	SEQ ID NO: 429
TGDTGTTGPT	SEQ ID NO: 430
PTGPTGDTGT	SEQ ID NO: 431
PTGPTGPTGA	SEQ ID NO: 432
TGLTGPTGPT	SEQ ID NO: 433
GPSGLGLPAG	SEQ ID NO: 434
LYAFNSGGIS	SEQ ID NO: 435
FNTVGSQFGT	SEQ ID NO: 436
AISQLDADTF	SEQ ID NO: 437
VISETGFYKI	SEQ ID NO: 438
TVIANTATAS	SEQ ID NO: 439
GVPVPGTGSS	SEQ ID NO: 440
LISLGAPIVI	SEQ ID NO: 441
QAITQITTP	SEQ ID NO: 442
SLVEVIVTGL	SEQ ID NO: 443
GLSLALGTSAA	SEQ ID NO: 444
SIIIIEKVA	SEQ ID NO: 445

30

【0219】

C. 胞子の表面タンパク質模倣体

1具体例では、本発明は、組成物及び微生物の胞子の表面タンパク質模倣体を含んでなる感染制御組成物を製造する方法及び使用する方法を意図するものである。1具体例では、タンパク質模倣体はアミノ酸配列を含んでなる。1具体例では、アミノ酸配列は、環状

40

50

の三次構造を含んでなる。1具体例では、タンパク質模倣体は小さい有機分子を含んでなる。

【0220】

認識に必要な配座を模倣し、本発明のペプチドに結合する活性な部位に結合する小さい有機分子も、本発明の範囲に含まれるものである。例えば、微生物の胞子の表面タンパク質及び／又はペプチドフラグメントの模倣が意図される。このような模倣体について各種のデザインが可能である。例えば、特に、結合のための必要な配座が非ペプチドによって安定化されている環状及び／又は線状タンパク質及び／又はペプチドフラグメントが考えられる。Loblらの米国特許第5,192,746号、Burke. Jr.らの米国特許第5,169,862号、Bischoffらの米国特許第5,539,085号、Aversaらの米国特許第5,576,423号、Shashouaの米国特許第5,051,448号、及びGaetaらの米国特許第5,559,103号は、このような化合物の製造法を開示するものである（これらのすべてを、参照して、本明細書に組み込む）。

【0221】

ペプチド配列を模倣する非ペプチド化合物の合成も当分野において知られている。例えば、いくつかの非ペプチド拮抗剤はArg-Gly-Asp配列を模倣する（Eldredら, J. Med. Chem. 37: 3882 (1994)）。同様に、Kuらは、さらに、一連のこのような化合物の合成を説明している（J. Med. Chem. 38: 9 (1995)）。微生物の胞子の表面タンパク質及び／又はペプチドフラグメントを模倣するこのような非ペプチド化合物は、特に、本発明によって考慮されるものである。

【0222】

本発明は、また、関連したペプチド配列を反復する多量体化合物である合成の模倣性化合物を意図するものである。当分野において知られているように、ペプチドは、ジシクロヘキシリカルビジイミド（DCC）のようなカップリング剤との反応によって活性化された駆る簿記知る気にアミノ基を結合させることによって合成される。活性化されたカルボキシルに対する遊離アミノ基の攻撃は、ペプチド結合の形成及びジシクロヘキシリル尿素の放出を生ずる。反応させたいアミノ基及びカルボキシル基以外の潜在的に反応性基を保護することが必要である。例えば、活性化されたカルボキシル基を含有する成分の -アミノ基は、3級ブチルオキシカルボニルによって保護される。この保護基は、その後、ペプチドを希酸に暴露することによって除去される（ペプチド結合は無傷のまま残る）。

【0223】

この方法によれば、ポリスチレンビーズのような不溶性マトリックスに結合された成長する鎖に、段階的にアミノ酸を添加することによって、ペプチドが固体相法で容易に合成される。所望のペプチド配列のカルボキシ末端アミノ酸（アミノ保護基を持つ）は、初めに、ポリスチレンビーズに固定される。ついで、アミノ酸の保護基が除去される。次のアミノ酸（保護基を持つ）を、カップリング剤と一緒に添加する。これに続いて、洗浄サイクルを行う。必要に応じてサイクルを繰り返す。

【0224】

1具体例では、本発明の模倣体は、上述の微生物の胞子の表面ペプチド及び／又はペプチドフラグメントと相同性の配列を有するペプチドである。配列の相同、性及びより重要な統計学的有意の類似性を評価する1つの一般的方法は、Z値を得るためにLipman及びPearsonによって書かれたアルゴリズムを使用するMonte Carlo分析法を使用することである。この分析法によれば、6より大きいZ値は、ほぼ確実な有意性を示し、10より大きいZ値は、統計学的に有意であると判断される（W.R. Pearson及びD.J. Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 85: 2444-2448 (1988); D.J. Lipman及びW.R. Pearson, Science, 27: 1435-1441 (1985)）。本発明において、微生物の除染及び微生物感染の問題の解消において有用な合成ペプチドは、統計学的に有意な配列の相同性及び類似性を持つ（Monte Carlo分析法におけるLipman及びPearsonアルゴリズムのZ値が6を越える）ペプチドである。

【0225】

1 具体例において、本発明は、微生物の胞子と無生物及び／又は生物表面との結合を阻害する、拮抗する、妨げる、置き換える及び／又は破壊する感染制御組成物をスクリーニングする工程を含む方法を意図するものである。

【 0 2 2 6 】

1 具体例において、本発明は、微生物の胞子の表面タンパク質と無生物及び／若しくは生物表面との結合を阻害する、拮抗する、妨げる、置き換える並びに／又は破壊する感染制御組成物をスクリーニングする工程を含む方法を意図するものである。

【 0 2 2 7 】

1 具体例において、生物表面は、皮膚、ヒト体組織及び／又はヒト細胞からなる群より選択してもよい。1 具体例において、無生物表面には、硬質表面が含まれ、セラミック、タイル、花こう岩及び／又はステンレス鋼を挙げることができるが、これらに限定されない。1 具体例において、微生物の胞子には、クロストリジウム属菌の胞子が含まれる。1 具体例において、クロストリジウム属菌の胞子には、クロストリジウム・ディフィシレの胞子が含まれる。1 具体例において、スクリーニングした感染制御組成物は、微生物の胞子の表面タンパク質と結合することが可能である。本発明の機構を理解することは必要ではないが、感染制御組成物は、表面と結合することで、微生物の胞子の表面タンパク質との結合を抑止すると考えられる。本発明の機構を理解することは必要ではないが、このような感染制御組成物には、ウィルス源、細菌源、真菌源、植物源及び動物源から分離した天然化合物、並びに合成化合物を挙げることができるが、これらに限定されないと考えられる。さらに、感染制御組成物の前記供給源、化学構造そして作用機構はいずれも本発明にとって必要不可欠なものではないと考えられる。

10

20

【 0 2 2 8 】

A . 表面に結合された微生物の胞子を検出するアッセイ

1 . 標準的な増殖アッセイ

1 具体例において、本発明は、a) i) 少なくとも 1 つの微生物の胞子で汚染されている疑いがある素地表面、ii) 前記少なくとも 1 つの微生物の胞子と結合することが可能な複数の感染制御組成物を収容した胞子採取装置、及びiii) 前記少なくとも 1 つの微生物の胞子の増殖を支援できる胞子成長プレートを提供し；b) 前記胞子採取装置を前記素地表面と接触させて、前記少なくとも 1 つの微生物の胞子を前記装置に付着させ；c) 前記胞子採取装置を前記胞子成長プレートと接触させ；d) 前記胞子成長プレート上の前記少なくとも 1 つの微生物の胞子を検出することを含んでなる微生物の胞子及び／又は微生物の胞子のタンパク質の検出方法を意図するものである。1 具体例において、感染制御組成物は、微生物の胞子のタンパク質ペプチドフラグメントを含んでいる。1 具体例において、前記微生物の胞子のタンパク質ペプチドフラグメントは、クロストリジウム属菌の胞子のタンパク質ペプチドフラグメント又はバシラス属菌の胞子のタンパク質ペプチドフラグメントからなる群より選択される。1 具体例において、微生物の胞子は、クロストリジウム・ディフィシレの胞子である。1 具体例において、微生物の胞子は、バシラス・アンスラシスの胞子である。

30

【 0 2 2 9 】

本発明の機構を理解することは必要ではないが、増殖アッセイは、あらゆる微生物の胞子を用いて行うことができると考えられる。例えば、以下の方法ではクロストリジウム・スプロゲネスを用いて、汚染された表面からの採取後に胞子の増殖を検出しているが、任意の微生物の胞子に置き換えてよく、微生物の胞子がそれぞれ有効に採取及び検出されることが分かるであろう（すなわち、例えば、クロストリジウム・ディフィシレ抗体）。

40

【 0 2 3 0 】

a . カップスクラブ法

この方法は、ヒト又は動物の皮膚から常在性微生物及び一過性の微生物を回収するのに適している。例えば、この方法は、臨床試験計画書において現場で使用しても、又は摘出した皮膚若しくは皮膚等価物を用いる研究においてインビトロで使用してもよい。ASTM International, 「カップスクラブ法を用いた、皮膚からの微生物の回収に関する標準試験

50

法」E1874-09(2009)。簡潔に言えば、常在性微生物又は一過性の微生物(すなわち、例えば試験部位に予め適用した微生物)は、回収液体を硬質シリンダー内に密封するのに十分な圧力で皮膚に硬質シリンダーを押し当てて、回収液体をシリンダーに注入することで、当該部位から回収される。その後、皮膚表面を、ガラス棒、ラバーポリスマン又は他の好適な装置で所定の時間、機械的に擦る。追加分析用に、流体をシリンダーから試験管又は他の好適な容器にピペットにより分取する。

【0231】

スクラブ法の手順を本明細書中の方法の記述に組み込んで、試験表面(すなわち、例えば無傷の表皮)上の微生物の胞子の数を激減させることを目的とした感染制御組成物含有試験材料を評価することも可能である。前記手順はまた、残留抗菌作用の判定の目安とするために使用してもよい。10

【0232】

b. 細胞培養試験

クロストリジウム・ディフィシレの内生胞子の懸濁液のアリコートを、予備還元した(すなわち、例えば酸素を除去した)BCDC、TCCFA及びTSA上で35において嫌気培養する。対照プレート及び実験プレートには胞子の懸濁液を同様に播種するが、ある対照プレート群は、各実験中、静置状態で培養して増殖する。

【0233】

付着実験は次のようにして行う。寒天を充填したシャーレの底に環(すなわち、例えばターゲット領域)を置き、このプレートのターゲット領域にクロストリジウム・ディフィシレの胞子の懸濁液5又は10μlを直接播種して、前記胞子を嫌気性フード(Forma Scientific、オハイオ州マリエッタ)内の予備還元プレート上で27分間、99分間、150分冠及び360分間培養する。培養終了後、プレートを取り出し、各培養プレートに滅菌蒸留水を4mlずつ加える。次に、プレートを300 rpmで10分間振盪した後、搅拌溶液を寒天表面から滅菌状態でピペットにより除去し、このプレートを再び24、48及び72時間嫌気培養する。プレートが汚染されたかどうかを確かめるに、無作為に抽出したコロニーでスライドガラス上に光学顕微鏡検査用スメアを作製して光学顕微鏡で写真を撮り、そしてプレートは、好気性条件下で播種し培養することで好気性汚染物質を同定する。20

【0234】

胞子が寒天にまだ付着していないことを確認するため、それらが寒天表面から容易に分離して洗い落とせることを証明するために、搅拌水溶液(プレートを振盪してから取り出したもの)でも胞子の存在をチェックする。前記水溶液のアリコートは、(i)位相差顕微鏡法でスクリーニングして、(ii)寒天プレートに画線し、また、(iii)BacTec NR6Aプロス(メリーランド州コッキーズビルのBD Microbiology Systems製の血液嫌気培養プロス)に注入して、前記プレートと前記プロスから、24時間後及び48時間後の細菌増殖の存在を読み取る。30

【0235】

2. 抗胞子表面抗体アッセイ

1具体例において、本発明は、a) i)少なくとも1つの微生物の胞子で汚染される疑いのある素地表面、及びii)前記少なくとも1つの微生物の胞子と結合することが可能な抗胞子表面抗体を提供し；b)前記抗胞子表面抗体を、前記抗体が前記少なくとも1つの微生物の胞子と結合するような条件下で、前記素地表面又は胞子表面と接触させて、抗体/胞子複合体を生成し；c)前記抗体/胞子複合体を検出することを含んでなる微生物の胞子の検出方法を意図するものである。1具体例において、抗体には、多クローン性抗体(すなわち、例えば、F1997)が含まれる。1具体例において、抗胞子表面抗体が標識を含んでいる。1具体例において、前記標識には蛍光標識が含まれる。1具体例において、微生物の胞子は、クロストリジウム・ディフィシレの胞子である。1具体例において、微生物の胞子は、バシリス・アンスラシスの胞子である。40

【0236】

1具体例において、本発明は、a) i)少なくとも1つの微生物の胞子で汚染されてい50

る疑いがある素地表面、ii) 前記少なくとも1つの微生物の胞子と結合することが可能な抗胞子表面抗体、及びiii) 増殖アッセイプレートを提供し；b) 前記抗胞子表面抗体と前記抗体とを結合して、抗体／胞子複合体を生成し；c) 前記抗体／胞子複合体を前記素地表面と接触させ；d) 前記表面から前記抗体／胞子複合体試料を（すなわち、例えば、カップスクラップ法で）採取し；e) 前記試料で前記増殖アッセイプレートに画線することを含んでなる微生物の胞子の検出方法を意図するものである。1具体例において、抗体には、多クローナル性抗体（例えば、F1997）が含まれる。1具体例において、素地表面には、ブタ皮膚表面が含まれる。1具体例において、前記標識には蛍光標識が含まれる。1具体例において、微生物の胞子は、クロストリジウム・ディフィシレの胞子である。1具体例において、微生物の胞子は、バシラス・アンスラシスの胞子である。

10

【0237】

a. 抗体開発

本発明の機構を理解することは必要ではないが、抗胞子表面抗体は、胞子表面上のエピトープ（すなわち、タンパク質か、他の抗原構造のいずれか）を対象とすることが可能であると考えられる。例えば、クロストリジウム・スポロゲネスの胞子を以下の方法で用いると抗胞子单クローナル性及び多クローナル性表面抗体が生成されるが、どのような微生物の胞子で置き換えるても、それぞれの微生物の胞子に対する抗体がうまく産生されることが分かるであろう（例えば、クロストリジウム・ディフィシレの抗体）。

【0238】

クロストリジウム・スポロゲネスの胞子に対するマウス多クローナル性抗血清及び单クローナル性抗体は、 10^8 個の不活性化胞子（4v/v%のホルムアルデヒド中、37℃で4時間培養したもの）を数回注入して生成した。单クローナル性抗体は、Kohler及びMilstein（1975）の手順に従って生成した。簡潔に言えば、多クローナル性抗体の場合、マウスは、21日目と42日目にブースト免疫を行って50日目に失血させ、又は单クローナル性抗体の場合は、50日目にブースト免疫を行って53日目に融合目的で屠殺した。胞子ストックは、クロストリジウム・スポロゲネス細胞を加工肉培地において35℃で増殖し、また、クリストリジウム・パーフリンジエンス細胞を嫌気性条件下、チオグリコレート液体培地において37℃で増殖して調製する。

20

【0239】

クロストリジウム・スポロゲネスPA 3579の胞子ストックの前記ホルマリン不活性化処理によって調製された抗原は、位相差顕微鏡法で観察したところ、栄養細胞物質を含んでいなかった（Phillipsら、「バシラス・アンスラシス及びバシラス・セレウスの胞子の直接及び間接分析における各細菌の免疫蛍光法測定評価」，J. Appl. Bacteriol., 53: 223-231 (1982)）。クロストリジウム・スポロゲネスの胞子合計 1×10^7 個を抗原として用いる。

30

【0240】

单クローナル性抗体は、多数の手順の一つで生成する（Kohlerら、「所定の特異性を有する抗体を分泌する融合細胞の連続培養」，Nature 296: 495-497 (1975)：参照して、その全部を本明細書に組み込む）。クロストリジウム・スポロゲネスの胞子との反応性について、ハイブリドーマをスクリーニングする。反応性であることが分かったハイブリドーマを、植物細胞との反応性についてもスクリーニングする。

40

【0241】

ドットプロット免疫測定フォーマットを使用することによって、单クローナル性抗体のアイソタイピングを行う。胞子をドットプロット装置内のImmobilon-P（登録商標）膜（Millipore Corp.、マサチューセッツ州ベッドフォード）に適用する。次に、胞子を好適な組織培養上澄み100 mlを用いて培養する。BioRad（カリフォルニア州ハーキュリーズ）から入手したウサギ抗-マウスのサブクラス特異性抗血清を使用することによって、胞子に結合した单クローナル性抗体をアイソタイピングする。

【0242】

次に、クロストリジウム・スポロゲネスの胞子をImmobilon-P膜に適用し、その後、前

50

記で生成した抗体と一緒に培養した。同様に、クロストリジウム属菌の栄養細胞 10^6 個も、前記膜に適用した後、前記抗体と培養する。反応性は、ヤギ抗 - マウス免疫グロブリン G (IgG) - 西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体 (Sigma、A 4416) 又はヤギ抗 - マウス IgM - 西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体 (Sigma、A 8786) で検出する。不溶性基質 3 - アミノ - 9 - エチルカルバゾール (Biomeda Corp.) で着色してもよい。

【0243】

ついで、培養上澄みを Tris 緩衝食塩水 (TBS) (0.01 M Tris、0.15 M NaCl、pH 7.4) にて 1 : 32 及び 1 : 238 で希釈する。希釈した培養上澄みのアリコートを等容積の胞子抗原 (胞子 4×10^9 個/ml) と 48 ℃ で一晩、ゆっくりと転回させて混合する。滅菌蒸留水を加えた希釈培養上澄みは、陽性の対照とする。胞子に吸着された抗体を遠心分離で取り除く (約 $4,000 \times g$ で 10 分間)。上澄み液は、先に詳述した通り、免疫プロット法で使用する。

【0244】

組織培養上澄みの硫酸アンモニウム沈降によって、抗体を濃縮する (Halowら、「抗体の貯蔵と精製」, Antibodies: A Laboratory Manual, p. 283-318, E. Halow 及び D. Lane 編, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1988))。濃縮したタンパク質を、N-ヒドロキシスクシンイミドビオチン (Sigma Chemical Co.) (約 100 mg / 試料中の抗体 mg) を用いて、室温で 4 時間培養してビオチン化する。1 M 塩化アンモニウム (20 ml / ビオチン 250 mg) を加えて、反応を停止させ、ビオチン化タンパク質を、pH 7.0 のリン酸緩衝食塩水 (0.1 M リン酸ナトリウム、0.8 % NaCl) (PBS) で十分に透析する。免疫細胞化学的局在を調べるため。

【0245】

タンパク質 A カラム (Pierce Chemical Co.、イリノイ州ロックフォード) を使用することによって、メーカーの指示通りに、組織培養上澄部から IgG 抗体を精製する。ヤギ抗 - マウス IgM 抗体カラム (Pierce Chemical Co.) を使用することによって、培養上澄みから IgM 抗体を精製する。組織培養上澄みを PBS で 1 : 1 希釈し、ヤギ抗 - マウス IgM カラムに適用し、PBS で平衡化する。メーカーの指示通りに、カラムから抗体の洗浄及び溶離を行う。タンパク質含有フラクションをプールし、Centricon 10 マイクロコンセントレーター (Amicon、マサチューセッツ州ダンヴァーズ) で濃縮し、 $3,000 \times g$ で 30 分間遠心分離する。

【0246】

3. 抗 - 胞子表面タンパク質抗体のアッセイ

1 具体例において、本発明は、a) i) 少なくとも 1 つの微生物の胞子で汚染されている疑いがある素地表面であって、前記胞子が少なくとも 1 つの表面タンパク質を含むもの、及び ii) 前記少なくとも 1 つの表面タンパク質と結合することが可能な抗 - 表面タンパク質抗体を提供し； b) 前記抗 - 表面タンパク質抗体を、前記抗体が前記少なくとも 1 つの表面タンパク質と結合するような条件で、前記素地表面と接触させて、抗体 / タンパク質複合体を生成し； c) 前記抗体 / タンパク質複合体を検出することを含んでなる微生物の胞子の検出方法を意図するものである。1 具体例において、前記胞子の表面タンパク質としては、CD 1067、CD 1581、CD 3520、CD 0372 又は CD 1613 が挙げられるが、これらに限定されない。1 具体例において、抗 - 表面タンパク質抗体が標識を含んでいる。1 具体例において、前記標識には蛍光標識が含まれる。1 具体例において、前記表面タンパク質は、クロストリジウム・ディフィシレの表面タンパク質である。1 具体例において、前記表面タンパク質は、バシラス・アンスラシスの表面タンパク質である。

【0247】

本発明の機構を理解することは必要ではないが、微生物の表面タンパク質抗体は、胞子の表面タンパク質上の特異的エピトープ (すなわち、アミノ酸配列か他の抗原構造のいずれか) を対象とすることが可能であると考えられる。例えば、特異的クロストリジウム・ディフィシレの胞子の表面タンパク質を以下の方法で用いると、多クローナル性抗体と単クローナル性抗体が生成されるが、どのような微生物の胞子の表面タンパク質で置き換えても

10

20

30

40

50

よく、その場合、微生物の胞子の表面タンパク質それぞれを対象とする多クローナル性抗体及び／又は単クローナル性抗体が上手く生成されることが分かるであろう。

【0248】

クロストリジウム・ディフィシレの仮想タンパク質（配列番号1）に対するマウス多クローナル性抗血清及び単クローナル性抗体は、単離した仮想タンパク質を数回注入することによって得られる（例えば、1回の注入に付きタンパク質約 10^{-8} 個）。単クローナル性抗体は、Kohler及びMilsteinの手順（Kohler and Milstein, 1975）に従って產生される。簡潔に言えば、多クローナル性抗体の場合、マウスを21日目及び42日目にブースト免疫を行い、50日目に失血するか、又は、単クローナル性抗体の場合には、50日目にブースト免疫を行、53日目に融合目的で屠殺することができる。クロストリジウム・ディフィシレの胞子との反応性について、ハイブリドーマをスクリーニングできる。反応性であることが分かったハイブリドーマを、栄養細胞との反応性についてもスクリーニングする。10

【0249】

ドットプロット免疫測定フォーマットを使用することによって、単クローナル性抗体のアイソタイピングを行う。胞子をドットプロット装置内のImmobilon-P膜（Millipore Corp., マサチューセッツ州ベッドフォード）に適用する。次に、胞子を、好適な組織培養上澄み100 mlと一緒に培養する。BioRadから入手したウサギ抗-マウスサブクラス特異性抗血清を使用することによって、胞子に結合した単クローナル性抗体をアイソタイプ化する。

【0250】

1具体例において、本発明は、a) i) 少なくとも1つの微生物の胞子で汚染されている疑いがある素地表面であって、前記胞子が少なくとも1つの表面タンパク質を含むもの、及びii) 前記少なくとも1つの表面タンパク質と結合することが可能な抗-表面タンパク質単クローナル性抗体を提供し；b) 前記抗-表面タンパク質単クローナル性抗体を、前記単クローナル性抗体が前記少なくとも1つの表面タンパク質と結合するような条件で、前記素地表面と接触させて、単クローナル性抗体／タンパク質複合体を生成し；c) 前記単クローナル性抗体／タンパク質複合体を検出することを含んでなる微生物の胞子の検出方法を意図するものである。1具体例において、前記胞子の表面タンパク質としては、CD 1067、CD 1581、CD 3520、CD 0372又はCD 1613が挙げられるが、これらに限定されない。1具体例において、抗-表面タンパク質単クローナル性抗体が標識を含んでいる。1具体例において、前記標識には蛍光標識が含まれる。1具体例において、前記表面タンパク質は、クロストリジウム・ディフィシレの表面タンパク質である。1具体例において、前記表面タンパク質は、バシラス・アンスラシスの表面タンパク質である。2030

【0251】

B. 表面上に結合する微生物の胞子の表面タンパク質を検出するアッセイ

本明細書では、有望な感染制御組成物をスクリーニングするために、結合する胞子の表面タンパク質を検出する幾つかの方法を提供する。

【0252】

感染制御組成物開発用の化合物をスクリーニングする方法及び装置を提供するために、本発明は、一般に、感染制御組成物を要求している特定の微生物系をインピトロで模倣する、インピトロモデル系を包含している。感染制御組成物がスクリーニングできる前記系は広範に及ぶ。例えば、感染微生物に関連する重要事象を抑止し、緩慢にし、又はそうでなければ阻止する効果について、有望な感染制御組成物を必要に応じてスクリーニングする。例えば、胞子形成か又は胞子と表面（例えば皮膚、体組織、花こう岩、ステンレス鋼、セラミックを含む）との結合に（少なくとも一部）関連している系を抑止する能力について、有望な感染制御試験組成物を必要に応じてスクリーニングする。これらスクリーニング試験法で有望な効果を表す感染制御試験組成物を、引き続き、微生物感染症又はその症状の治療に有効な薬物を特定するために追加試験を行ってもよい。40

【0253】

1. 結合スクリーニング

最も簡単な形式の本発明の方法及び装置で用いられる感染制御組成物スクリーニングモ50

デルは、感染制御組成物と生化学系成分との相互作用（例えば受容体 - リガンド相互作用、酵素 - 基質相互作用等）をスクリーニングするものであろう。この種のスクリーニングモデルは、一般に、前記系の2つの相互作用成分を含んでいる（例えば、細菌胞子のタンパク質と感染制御組成物との相互作用、又は微生物の酵素と感染制御組成物との相互作用）。

【0254】

1 具体例において、前記方法は、微生物の胞子のタンパク質と感染制御試験組成物とを接觸させて微生物の胞子と表面との残留結合を分析することにより、感染制御試験組成物が、微生物の胞子のタンパク質と表面との結合相互作用に効果が発揮するどうかを判定する工程を含んでいる。残留表面結合量を、次に、対照表面結合（例えば、感染制御組成物不存在下で行った同様の結合分析結果）と比較する。通常、このような結合分析では、スクリーニング系のパラメータを測定する必要がある。「スクリーニング系のパラメータ」とは、測定可能な証拠をいい、例としては、（例えば、結合反応や輸送スクリーニングにおける）標識化された群の有無又は分子量変化の有無、（基質のターンオーバー測定における）反応生成物又は基質の有無、或いは（一般には、標識化合物の溶出時間の変化で検出される）電気泳動移動度の変化が挙げられる。10

【0255】

ここまで2成分スクリーニング系について説明してきたが、前記方法及び装置は、はあるかに複雑な系のエフェクターであって、該系の結果又は最終産物が既知であるとともににある程度（例えば酵素経路、胞子の表面シグナル経路等）までアッセイ可能なエフェクターをスクリーニングするためにも利用できる。或いは、本明細書に記載の方法及び装置は、生化学系の単一成分と相互作用する化合物（例えば、受容体、リガンド、酵素、核酸、構造上の巨大分子等のような特定の生化学化合物と特異的に結合する化合物）をスクリーニングするのに使用される場合もある。20

【0256】

いくつかの具体例において、本発明のアッセイには、2以上の成分間の相互作用を対象とする場合がある。2成分間の相互作用を対象とするアッセイは、「結合対」の構成員間の結合のエンハンサー又は阻害剤に関するアッセイとみなすことができる。好ましい結合対としては、微生物の胞子のタンパク質／有機小分子、微生物の胞子のタンパク質／核酸、微生物の胞子のタンパク質／感染制御組成物（すなわち、例えばクロストリジウム属菌の胞子の表面タンパク質フラグメント）が挙げられるが、これらに限定されない。1具体例において、結合対の構成員のいずれか一方は固定する（すなわち、例えば表面に付着する）ことができるのに対し、もう一方の構成員は、表面と接した溶液中に含まれている。別の実施形態において、両方の構成員をそれぞれ別々の表面に付着させてから、平行分析してもよい。30

【0257】

従って、一態様では、本発明は、受容体分子と結合対を成す感染制御組成物をスクリーニングするのに有用でもあるが、この場合、前記結合対は、受容体分子と表面との間の相互作用に影響を及ぼす。本明細書で用いるとき、用語「受容体」は、一般に、結合対の一構成員を指す（例えば、微生物の胞子の表面タンパク質）。結合対のもう一方の構成員は、「感染制御組成物」と呼ぶ。従って、受容体／リガンド対には、典型的なタンパク質受容体であって、通常は膜結合性のものと、その天然リガンドであって、例えば別のタンパク質又は小分子とが包含される場合がある。受容体／リガンド対としては更に、抗体／抗原結合対、相補的核酸、核酸結合タンパク質及びそれらの核酸リガンドも包含され得る。40

【0258】

従来、受容体／リガンド間の相互作用（すなわち、例えば微生物の胞子の表面タンパク質／感染制御組成物間の相互作用）のエフェクターをスクリーニングする方法では、試験化合物の存在下で受容体／リガンド結合対を培養する必要があった。その後、受容体／リガンド対の結合度合いを陰性及び／又は陽性の対照と比較する。正常な結合に低下が観られれば、試験化合物は、受容体／リガンド結合の阻害剤であると判断される。正常な結合50

に増大が観られれば、試験化合物は前記相互作用のエンハンサー又は誘導剤であると判断される。ただし、本発明では、受容体／リガンド間の相互作用は、受容体と表面との残留結合量を感染制御組成物存在下で測定することで分析されると考えられる。

【0259】

1 具体例において、高性能スクリーニングアッセイには、大量の有望な感染制御組成物を同時に並行スクリーニングできる、マルチウェルリアクションプレート（例えば、マルチウェルマイクロプレート）が含まれていてよい。

【0260】

同様の（おそらく重複している）生化学系としては、微生物の酵素とその基質との間の相互作用を挙げることができる。本明細書で使用するとき、「酵素」という用語は、一般に、他の化合物又は「基質」内で化学変化を引き起こす触媒の作用をするタンパク質を指す。従来、基質に対する酵素活性のエフェクターは、スクリーニングしようとする化合物の存在下及び不存在下で、しかも酵素活性の変化を検出するのに最適な条件下で、酵素を基質と接触させることによってスクリーニングされる。一定時間反応させた後、反応生成物の存在又は基質の量の減少について前記混合物を評価する。触媒作用を受けた基質の量を、対照（すなわち、試験化合物の不存在下又は既知のエフェクターの存在下で酵素を基質と接触させたもの）と比較する。上述と同様に、基質に対する酵素活性を減少させる化合物は「阻害剤」と呼ぶが、活性を増強する化合物は「誘導剤」と呼ぶ。

【0261】

実施する特定の実施形態に応じて、感染制御試験組成物は、限定されないが、注入、溶液への遊離、キャリヤーへの付着、固体支持体（すなわち、例えばビーズ）への付着を包含する方法によって、多種多様な媒体に供給される。試験化合物の固定には、いくつかの好適な固体支持体が用いられる。好適な固体支持体の例としては、寒天、セルロース、デキストラン（すなわち、セファデックス、セファロースとして市販されているもの）、カルボキシメチルセルロース、ポリスチレン、ポリエチレングリコール（PEG）、濾紙、ニトロセルロース、イオン交換樹脂、プラスチックフィルム、ガラス玉、ポリアミンメチルビニルエーテル マレイン酸コポリマー、アミノ酸コポリマー、エチレン マレイン酸コポリマー、ナイロン、シリク等が挙げられる。さらに、本明細書に記載の方法及び装置では、試験化合物を個別に又はグループでスクリーニングする。グループスクリーニングは、特定のグループにおいて、2つ以上の有効な結果が期待されないほど有望な試験化合物の命中率が低いと見込まれる場合に特に有用である。或いは、このようなグループスクリーニングは、種々の試験化合物の効果が単一システム内で別々に検出されるばあいに用いられる。

【0262】

2. イムノアッセイ

1 具体例において、本発明は、2つ以上の関連する免疫学的薬剤（すなわち、例えば抗原と抗体）の間で反応が生じる場合の免疫検査を意図するものである。そのため、例えば、試料中に特定の抗原又は抗体が、どの程度の量、残存しているかを判断しようとする場合には、抗原を含む疑いがある試料を免疫学的結合対と反応させてみる必要がある。本発明の機構を理解することは必要ではないが、反応が生じる場合には、その反応を視覚化することで、元の試験流体中に抗原又は抗体が含まれていたことの証拠となると考えられる。

【0263】

1 具体例において、抗体／抗原結合対は、指示薬又はキャリヤー粒子を用いて視覚化することが可能である。1つの好適な方式には、適した抗原（すなわち、例えば微生物の胞子のタンパク質フラグメント）又は抗体（すなわち、例えば微生物の胞子のタンパク質フラグメントに親和性を示すもの）を吸着した吸着剤として合成樹脂粒子、表面又はマトリックスを用いる、高分子粒子法が含まれる。

【0264】

イムノアッセイフォーマットとしては、競合アッセイ（例えば、ELISA、ハプテン阻止

10

20

30

40

50

等)と非競合アッセイが挙げられるが、これらに限定されない。様々なイムノアッセイフォーマットが報告されている(米国特許第4,366,241号、同第4,376,110号、同第4,517,288号及び同第4,837,168号; Asai (1993) Methods in Cell Biology, Vol. 37; Antibodies in Cell Biology, Academic Press Inc., N.Y., Sites & Terr編 (1991), Basic and Clinical Immunology 第7版等及びこれらの中で引用された参考文献を参照; これらはすべてを、参照して、本明細書に組み込む)。

【0265】

3. 核酸結合アッセイ

他の具体例では、本発明の材料及び方法は、核酸結合タンパク質アッセイで成分を固定するのに用いられる。このようなアッセイは、主として、核酸の結合を1つ以上の結合タンパク質で検出するものである。前記アッセイは、一般に、核酸結合を増強(特異性若しくは親和性)又は阻止する薬剤を、1つ以上の特定の核酸結合タンパク質でスクリーニングするのに用いられる。核酸結合タンパク質としては、エンドヌクレアーゼ、ポリメラーゼ、核内転写因子受容体、APIタンパク質(例えば、fos及びjun)が挙げられるが、これらに限定されない。核酸結合アッセイは、タンパク質結合部位又は結合タンパク質自体のいずれかを含有する核酸を表面に付着させると円滑に進む。

【0266】

4. 生理学的適合溶液中の結合アッセイ

前記アッセイでは、対象アッセイ成分(例えば、酵素)が、所望の活量を維持するために特定の条件を必要とする場合があることが分かるであろう。このようなアッセイは、通常、成分の活量にとって重要な要素(例えば、pH、イオン組成)が生理学的適合条件を維持するように最適化される。

【0267】

かなり有利なことに、本発明の感染制御組成物は、生理学的濃度の大抵のイオン種(例えば、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等)に対して安定している。従って、前記アッセイは、標準的な生理学的適合組成物(例えば、リン酸緩衝食塩水(PBS)、標準リングル液等)中で行ってよい。

【0268】

本発明の感染制御組成物はまた、結合対用の前記部分(例えば、ポリペプチド(類))の精製にも利用できる。具体的にいうと、感染制御組成物は、実質上どのような陰イオン又は陽イオン交換樹脂とも併用することが可能である。好適な陰イオン及び陽イオン交換樹脂は市販されている。例えば、陽イオン交換樹脂としては、限定されないが、カルボキシメチルセルロースが挙げられ、また一方、陰イオン交換樹脂としては、限定されないが、DEAEセルロース、DEAEセファロース(SEPHAROSE)ゲル濾過用イオン交換剤、ヘパリン等が挙げられる。

【0269】

好みしい1具体例において、感染制御組成物と微生物の胞子の表面タンパク質との相互作用を精製目的で利用してもよい。これは、陽イオン交換樹脂に似た方法、或いは陽イオン交換樹脂又はニッケル樹脂それぞれの代わりに雲母を用いるポリヒスチジン/ニッケル分離システムに似た方法で行った。1具体例において、雲母は、試料が流れる床(雲母薄片又は粉末のいずれか)として供給される。雲母床は、任意の様々な好適な容器に収容されており、前記容器としては、シリソジやクロマトグラフィーカラム等に取り付け可能なカートリッジが挙げられる。微生物の胞子の表面タンパク質は雲母床と結合するが、試料の他の成分は押し流される。非特異的な結合成分は、微生物の胞子の表面タンパク質を保持しながら不必要な成分を放出するのに十分な濃度の塩溶液を用いて溶出することができる。感染制御組成物は、微生物の胞子の表面タンパク質と結合すると、十分な塩濃度及び/又は必要に応じて他の適切な溶媒混合液を適用することで放出できる。

【0270】

5. 連続流動アッセイシステム

1具体例において、本発明の方法及び装置は、連続流動アッセイシステムを用いて感染

10

20

30

40

50

制御試験組成物をスクリーニングするのに使用される。このような連続流動アッセイシステムの利用は、表面と結合する胞子の表面タンパク質のスクリーニングに限らないが、酵素活量に対する阻害剤又は誘導剤或いは受容体・リガンド結合に対する作用薬又は拮抗薬をスクリーニングするのにも容易に利用され得る。

【0271】

簡潔に言えば、連続流動アッセイシステムは、流体管路（すなわち、例えばマイクロアレイ、クロマトグラフィーカラム又は微細加工経路）に沿って特定の生化学系を連続流動させる必要がある。本明細書で使用するとき、用語「連続」とは、一般に、絶え間なく流れている特定の組成物の切れ目のない又は連続的な流れをいう。例えば、連続流には、固定速度の連続流体流、或いはシステム全体の流量の一時停止を含む流体流であって、一時停止以外にフローストリームを中断しないようなものが挙げられる。10

【0272】

6. 検出可能な標識

1 具体例において、機能性スクリーニングシステムには、検出可能な事象又は信号の発生が含まれる。このような検出可能な信号には、光学検出可能な発色又は蛍光信号が挙げられるが、これらに限定されない。酵素系では、このようない信号は酵素の触媒作用の産物によって、例えば発色性又は蛍光性基材上に現れることがある。結合系（例えば、受容体・リガンド間の相互作用又は微生物の胞子表面と表面との結合）では、主に、標識化リガンドと受容体との結合又はその逆によって信号が生じる。

【0273】

本発明の実施形態において、様々な他の検出可能な信号及び標識を使用してもよい。前記発色又は蛍光標識以外に、放射性崩壊、電子密度、pHの変化、溶媒の粘度、温度及び塩濃度も適宜測定される。20

【0274】

標識は大抵、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的又は化学的手段によって通常検出され得る。例えば、有用な核酸の標識としては、³²P、³⁵S、蛍光染料、電子密度の高い試薬、酵素（例えば、ELISAで通常使用されるようなもの）、ビオチン、ジオキシゲニン、又は抗血清若しくは单クローリン性抗体を利用するハプテン及びタンパク質が挙げられる。生物学的要素の標識化に適した様々な標識は周知であり、科学文献と特許文献の両方に詳細に記されており、しかも、生物学的要素を標識化するために、本発明にも通常応用できる。好適な標識としては、場合により、放射性核種、酵素、基質、補助因子、阻害剤、蛍光成分、化学発光成分、磁性粒子等が挙げられるが、これらに限定されない。標識薬剤としては、場合により、例えば单クローリン性抗体、多クローリン性抗体、タンパク質、又は親和性マトリックス、炭化水素若しくは脂質のような他のポリマーも挙げられる。30

【0275】

標識の検出は様々な方法で行うことができ、放射性マーカー又は蛍光マーカーの分光測定追跡又は光学追跡、或いは大きさ、電荷又は親和性に基づいて分子を追跡する他の方法が挙げられるが、これらに限定されない。検出できる成分は、検出可能な物理的又は化学的性質を持ったあらゆる物質であってよい。このような検出可能な標識は、ゲル電気泳動、カラムクロマトグラフィー、固体基質、分光法等の分野で認められ、また一般に、このような方法に有用な標識は本発明にも応用できる。40

【0276】

従って、標識は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学熱的又は化学的手段で検出できるあらゆる組成物であってよい。一部の実施形態において、標識としては、蛍光染料（例えば、フルオレセインイソチオシアネート、テキサス・レッド、ローダミン等）、放射性標識（例えば、³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、³²P又は³³P）、酵素（例えば、LacZ、CAT、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等であって、マーカー産物としてやELISAで検出できる酵素として通常使用されるもの）、核酸インターラーゲーター（例えば、臭化工チジウム）、及び金コロイド、着色ガラス若50

しくはプラスチック製（例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックス等）のビーズのような比色測定用標識が挙げられるが、これらに限定されない。

【0277】

1 具体例において、本発明は、主として次のうち：すなわち、高感度、高安定性、低バックグラウンド、低環境敏感性、及び標識化特異性が高いことのうち1つ以上を特徴とする蛍光標識を意図するものである。本発明の標識に組み込まれるこのような蛍光成分は、1-及び2-アミノナフタレン、p,p'-ジアミノスチルベン、ピレン、4級フェナントリジン塩、9-アミノアクリジン、p,p'-ジアミノベンゾフェノンイミン、アントラセン、オキサカルボシアニン、メロシアニン、3-アミノエキレニン、ペリレン、ビスベンゾキサゾール、ビス-p-オキサゾリルベンゼン、1,2-ベンゾフェナジン、レチノール、ビス-3-アミノピリジニウム塩、ヘレブリゲニン、テトラサイクリン、ステロフェノール、ベンズイミダゾリルフェニルアミン、2-オキソ-3-クロメン、インドール、キサンテン、7-ヒドロキシクマリン、フェノキサジン、サリチレート、ストロファンチジン、ポルフィリン、トリアリールメタン及びフラビンを挙げることができるが、これらに限定されない。本発明の具体例によって検出できる成分と結合する官能基を有しているか又は修飾によってそのような官能基を組み込むことができる個々の蛍光化合物としては、塩化ダンシリル、フルオレセイン（例えば、3,6-ジヒドロキシ-9-フェニルキサントハイドロール）、ローダミンイソチオシアナート、N-フェニル1-アミノ-8-スルホナトナフタレン、N-フェニル2-アミノ-6-スルホナトナフタレン、4-アセトアミド-4-イソチオシアナト-スチルベン-2,2'-ジスルホン酸、ピレン-3-スルホン酸、2-トルイジノナフタレン-6-スルホネート、N-フェニル-N-メチル-2-アミノナフタレン-6-スルホネート、臭化工チジウム、ステブリン、オーラミン-0,2-(9'-アントロイル)パルミテート、ダンシリホスファチジルエタノールアミン、N,N'-ジオクタデシルオキサカルボシアニン、N,N'-ジヘキシルオキサカルボシアニン、メロシアニン、4-(3'ピレニル)ステアレート、d-3-アミノデオキシエキレニン、12-(9'-アントロイル)ステアレート、2-メチルアントラセン、9-ビニルアントラセン、2,2'(ビニレン-p-フェニレン)ビスベンゾオキサゾール、p-ビス(2-(4-メチル-5-フェニル-オキサゾリル))ベンゼン、6-ジメチルアミノ-1,2-ベンゾフェナジン、レチノール、ビス(3'-アミノピリジニウム)1,10-デカンジイルジヨーダイド、ヘリブリエニンのスルホナフチルヒドラゾン、クロロテトラサイクリン、N-(7-ジメチルアミノ-4-メチル-2-オキソ-3-クロメニル)マレイミド、N-(p-(2-ベンズイミダゾリル)-フェニル)マレイミド、N-(4-フルオランチル)マレイミド、ビス(ホモバニリン酸)、レザズリン、4-クロロ-7-ニトロ-2,1,3-ベンゾオキサジアゾール、メロシアニン540、レゾルフィン、ローズベンガル及び2,4-ジフェニル-3(2H)-フラノンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0278】

多くの蛍光タグは、例えば、SIGMA chemical company（ミズーリ州セント・ルイス）、Molecular Probes、R & D systems（ミネソタ州ミネアポリス）、Pharmacia LKB Biotechnology（ニュージャージー州ピスカタウェイ）、CLONTECH Laboratories, Inc.（カリフォルニア州パロ・アルト）、Chem Genes Corp.、Aldrich Chemical Company（ウィスconsin州ミルウォーキー）、Glen Research, Inc.、GIBCO BRL Life Technologies, Inc.（メリーランド州ガイザーズバーグ）、Fluka Chemica-Biochemika Analytika（Fluka Chemie AG, Buchs, スイス国）及びApplied Biosystems（カリフォルニア州フォスター・シティ）から市販されている。

【0279】

蛍光標識は、約300 nm超、好ましくは約350 nm超、更に好ましくは、約400 nm超の光を吸収することが望ましく、通常は、吸収した光の波長よりも約10 nm高いよりも大きな波長で発光する。結合標識の吸収及び発光特徴が非結合標識のものと異なっていてもよいことは分かるであろう。従って、標識の様々な波長範囲及び特徴を指す場合は、適用された通りの標識を意味し、非共役でしかも任意溶媒中で特性付けられる標識を意味するものではない。蛍光標識は、光を照射すると複数の発光が生じ得ることから、検出可能である

10

20

30

40

50

。化学発光源及び生物発光源から検出できる信号が得られる場合もある。

【0280】

化学発光源には、化学反応によって電子的に励起され、そのあと、検出できる信号となる光又は蛍光受容体にエネルギーを与える光を放出しうる化合物が挙げられる。様々な条件下で化学発光する多種多様な化合物群が知られている。化合物の一つは、2,3-ジヒドロ-1,4-フタラジンジオンである。最も有名な化合物はルミノール、すなわち5-アミノ化合物である。他の化合物としては、5-アミノ-6,7,8-トリメトキシ類似体及びジメチルアミノ[ca]ベンズ類似体が挙げられる。これら化合物は、アルカリ性過酸化水素又は次亜塩素酸カルシウムと塩基を用いて発光させることが可能である。別の化合物は2,4,5-トリフェニルイミダゾールであり、この親製品の一般名称はロフインである。化学発光類似体には、パラ-ジメチルアミノ置換体及びパラ-メトキシ置換体が含まれる。化学発光は、また、オキサレート、通常はオキサリル活性エステル（例えば、p-ニトロフェニル）と過酸化物（例えば、過酸化水素）とを用いて塩基性条件下で生じる場合もある。他の有用な化学発光化合物も周知であり、入手可能であって、-N-アルキルアクリジニウムエステル（塩基性H₂O₂）及びジオキセタンが挙げられる。或いは、ルシフェリンをルシフェラーゼ又はルシゲニンと併用して、生物発光を発生させてよい。

【0281】

標識は、多数の方法により、検出しようとする分子（産物、基質又は酵素など）と直接又は間接的に結合していてよい。上述のように、要求される感度、化合物の共役容易性、安定性要件、利用可能な器具及び処分条件に応じて多種多様な標識を使用する。非放射性標識は、間接的な方法で付着させる場合が多い。一般に、リガンド分子（例えば、ビオチン）はポリマーと共有結合する。リガンドは、その後、本質的に検出可能な抗リガンド（例えば、ストレプトアビシン）分子と結合するか、或いは信号系（例えば、検出可能な酵素、蛍光化合物又は化学発光化合物）と共有結合する。多数のリガンド及び抗リガンドが使用できる。リガンドが天然の抗リガンド（例えば、ビオチン、チロキシン及びコルチゾール）である場合、標識化した抗リガンドと併用してもよい。或いは、ハプテン性又は抗原性の化合物を抗体と組み合わせて用いてよい。標識はまた、例えば酵素又はフルオロフォアと共に役させることによって、信号を発生する化合物と直接結合してもよい。標識として重要な酵素は、主に加水分解酵素（特に、フォスファターゼ、エステラーゼ及びグリコシダーゼ）又は酸化還元酵素（特に、ペルオキシダーゼ）である。蛍光化合物としては、フルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン等が挙げられる。化学発光化合物としては、ルシフェリン及び2,3-ジヒドロフタラジンジオン（例えば、ルミノール）が挙げられる。

【0282】

標識の検出手段は、標識の種類によって決まる。つまり、例えば標識が放射性標識の場合は、検出手段として、オートラジオグラフィーで使用されるようなシンチレーションカウンター又は写真用フィルムを挙げることができるが、これらに限定されない。標識が蛍光標識の場合は、検出手段として、蛍光色素を好適な波長の光で励起して、生じる蛍光発光を、例えば顕微鏡法、目視検査及び写真用フィルムで検出することや、デジタルカメラ、電荷結合素子（CCD）若しくは光電子増倍管及び光電管等の電子検出を利用して検出することが挙げられるが、これらに限定されない。蛍光標識及び検出法を用いる場合、顕微鏡法や分光法を検出システムに組み入れることが多い。同様に、酵素標識は、好適な基質に酵素を供給して、生じる反応産物を検出することによって検出されることもある。最後に、単純な比色測定用標識は、標識応じた色を観察するだけで検出されることが多い。例えば、結合した金はピンク色に見えることが多いが、種々の結合ビーズには、ビーズの色が現れる。

【0283】

1 具体例において、連続流動スクリーニングシステムは一定信号を発生しているが、この信号は、システムに影響を及ぼす試験化合物が導入されたときにだけ変化する。特に、システム成分は、システム内を流れているので、検出領域で比較的一定の信号レベルを発

する。試験化合物（例えば、感染制御組成物）は、周期的に溝に注入されてシステム成分と混ざると、検出領域で一定の信号レベルからのずれを生じさせる。その結果、このずれが、スクリーニングされる特定の試験化合物と相関しうる。

【0284】

D. 微生物の胞子の表面タンパク質と表皮タンパク質との結合の検出

1 具体例において、本発明は、表皮層に結合した微生物の胞子の表面タンパク質を検出する方法を意図するものである。1 具体例において、表皮層は皮膚由来のものである。1 具体例において、表皮層は内蔵由来のものである。1 具体例において、表皮層は粘膜由来のものである。1 具体例において、表皮層は皮膚タンパク質を含んでいる。1 具体例において、皮膚タンパク質はインボルクリンを含んでいる。1 具体例において、皮膚タンパク質はロリクリンを含んでいる。1 具体例において、皮膚タンパク質は、サイトケラチンを含んでいる（図10参照）。 10

【0285】

酵素結合免疫吸着法用のプレートに、穴1個当たりPBS 100 μl中のヒトケラチン5 mgを4で一晩コーティングした。その後、穴をPBSで3回洗浄し、次にPBS中、1%ウシ血清アルブミンで1時間封鎖してから、胞子を加えた。胞子（上述と同様にして調製したクロストリジウム・ディフィシレ）は、600 nmでの吸光度が1.0となる濃度（胞子約 5×10^7 個/ml）までPBSで希釈してから、FITCで標識化した。穴1個につき標識化胞子100 μlを添加し、プレートを37で1時間培養した。1時間培養後の穴1個当たりの総蛍光発光（F_{total}）を、Fluoroskan II 蛍光発光リーダー（Labsystems、マサチューセッツ州ビヴァリー）を用いて_{ex}=485 nm及び_{em}=535 nmで測定した。穴をPBSで3回洗浄して未結合の胞子を除去し、そして残留蛍光発光（F_{test}）を測定した。付着性は次のようにして計算した。 20

【0286】

$$\text{付着性} = F_{\text{test}} / F_{\text{total}}$$

抗体又は感染制御組成物の不存在下での標識化細胞の付着性を100%基準とした。ウシ血清アルブミンでコーティングした穴を、陰性対照として用いた。阻害アッセイでは、FITC標識化胞子を先ず抗-胞子抗体又は感染制御組成物と共に37で1時間培養してから、この混合物をケラチンコーティングした穴に加えた。 30

【0287】

別法として、EpiDerm（登録商標）Skin Model plate（24穴又は96穴）では、胞子を添加する前に、PBS中1%ウシ血清アルブミンで1時間封鎖した。胞子（上述と同様にして調製したクロストリジウム・ディフィシレ）は、600 nmでの吸光度が1.0となる濃度（胞子約 5×10^7 個/ml）までPBSで希釈してから、FITCで標識化した。穴1個につき標識化胞子100 μlを添加し、プレートを37で1時間培養した。1時間培養後の穴1個当たりの総蛍光発光（F_{total}）を、Fluoroskan II 蛍光発光リーダー（Labsystems、マサチューセッツ州ビヴァリー）を用いて_{ex}=485 nm及び_{em}=535 nmで測定した。穴をPBSで3回洗浄することで未結合の胞子を除去し、そして残留蛍光発光（F_{test}）を測定した。付着性は次のようにして計算した。 40

【0288】

$$\text{付着性} = F_{\text{test}} / F_{\text{total}}$$

抗体又は感染制御組成物の不存在下での標識化細胞の付着性を100%基準とした。ウシ血清アルブミンでコーティングした穴を、陰性対照として用いた。阻害アッセイでは、FITC標識化胞子を先ず抗-胞子抗体と共に37で1時間培養してから、この混合物をEpiDerm（登録商標）Skin Model plateに加えた。 40

【0289】

E. 感染制御組成物の高速大量処理スクリーニング

1 具体例において、本発明は、感染制御組成物の高速大量処理スクリーニングアッセイを含む方法を意図するものである。例えば、タンパク質及び/又は核酸に関する高速大量処理結合分析が開発されている。i) タンパク質の抗処理スクリーニングアッセイ（米国 50

特許第5,559,410号)、ii) 核酸結合(すなわち、アレイ中の結合)の高速大量処理スクリーニング法(米国特許第5,585,639号)及びiii) リガンド/抗体結合の高速大量処理スクリーニング法(米国特許第5,576,220号及び同第5,541,061号)(特許の全てを、参照して本明細書に組み込む)。また、高速大量処理スクリーニングシステムは市販されている(例えば、Zymark Corp.(マサチューセッツ州ホプキンソン)、Air Technical Industries(オハイオ州メンター)、Beckman Instruments, Inc.(カリフォルニア州フラートン)、Precision Systems(マサチューセッツ州ナティック)等を参照のこと)。これらのシステムは、主に、全ての試料及び試薬のピペットによる分取、液体分配、経時インキュベーション及びアッセイに適した検出器でのマイクロプレートの最終読み取り操作を含む手順が全て自動化されている。これらを設定で変更できるシステムは、処理能力が高く、迅速に起動するだけでなく、高度の順応性をもたらし、しかもカスタマイズ可能である。このようなシステムのメーカーは、詳細な手順書に高処理能力をいろいろと規定している。そのため、例えば、Zymark Corp.は、遺伝子転写やリガンド結合等の変調を検出するスクリーニングシステムについて記載した技術報告書を提供している。10

【0290】

従来、有用な特性を持った新規化学物質は、所望の特性又は活性を有する化合物(「リード化合物」とも呼ばれる)の同定と、リード化合物の異型の作製、そしてその異型化合物の特性と活性の評価によって作り出される。しかし、現在では、ドラックデリバリーのどの局面でもタイムスケールを短縮する傾向にある。大量の試験を迅速にかつ効率良く行う性能から、高速大量処理スクリーニング(HTS)法が従来のリード化合物同定法に代わりつつある。20

【0291】

好ましい1具体例において、高速大量処理スクリーニング法は、大量の有望な治療化合物(候補化合物)を収容したライブラリーを提供する必要がある。そこで、このような「組み合わせ化学ライブラリー」を、本明細書で説明しているようにして1つ以上のアッセイでスクリーニングすると、所望の特徴的な活性を表すライブラリー構成員(特に、化学種又はサブクラス)が同定される。こうして同定された化合物は、従来の「リード化合物」の代わりに用いるか、又はそれ自体を有望な若しくは実際の治療剤として用いることができる。

【0292】

1. コンビナトリアルケミストリーライブラリー
近年、新規リード化合物の創出に役立つコンビナトリアルケミストリーライブラリーの利用が注目されている。コンビナトリアルケミストリーは、試薬のように、多数の化学「構成成分」を組み合わせて化学合成か又は生物合成によって生成された多種多様な化合物を集めたものである。例えば、ポリペプチドライブラリーのように直鎖状のコンビナトリアルケミストリーは、アミノ酸と呼ばれる一連の化学構成成分を特定の化合物長(すなわち、ポリペプチド化合物中のアミノ酸の数)で考えられるあらゆるやり方で組み合わせることで構成されている。化学構成成分をこのようにコンビナトリアル混合することで、無数の化合物が合成され得る。例えば、100個の代替可能な化学構成成分を系統的にコンビナトリアル混合すると、理論上、1億個の4量体化合物又は100億個の5量体化合物が得られることが可能である。40

【0293】

コンビナトリアルケミストリーライブラリーとしては、ペプチドライブラリーが挙げられるが、これらに限定されない(米国特許第5,010,175号; Furkら, Int. J. Pept. Prot. Res., 37:487-493 (1991); 及びHoughtonら, Nature 354: 84-88 (1991): すべての文献を、参照して本明細書に組み込む)。ペプチド合成は、本発明と共に使用することを想定しつつそれを対象とした方法ばかりとは限らない。多様な化学ライブラリーを創生する他の化学物質を利用してもよい。このような化学物質としては、ペプトイド(国際特許出願公開W091/19735: 1991年12月26日)、コード化ペプチド(国際特許出願公開W093/20242 (1993年10月14日))、ランダムバイオオリゴマー(国際特許出願公開W092/050

0091 (1992年1月9日)）、ベンゾジアゼピン（米国特許第5,288,514号：参照して本明細書に組み込む）、ヒダントイン、ベンゾジアゼピン及びジペプチドのようなダイバーソマー（Hobbsら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6909-6913 (1993)）、ビニル性ポリペプチド（Hagiharaら, J. Amer. Chem. Sci. 114: 6568 (1992)）、-D-グルコース骨格を有する非ペプチド性ペプチドミメティック（Hirschmannら, J. Amer. Chem. Sci. 114: 9217-9218 (1992)）、小さな化合物ライブラリーの類似有機合成物（Chenら, J. Amer. Chem. Sci. 116: 2661 (1994)）、オリゴカルバメート（Choら, Science 261: 1303 (1993)）及び／又はホスホン酸ペプチジル（Campbellら, J. Org. Chem. 59: 658 (1994)）、核酸ライブラリー、ペプチド核酸ライブラリー（米国特許第5,539,083号）、抗体ライブラリー（Vaughnら, Nature Biotechnology 14(3): 309-314 (1996)国際特許出願PCT/US96/10287）、炭水化物ライブラリー（Liangら, Science 274: 1520-1522 (1996) 及び米国特許第5,593,853号）、及び小型有機分子ライブラリー - ベンゾジアゼピン（Baum, C&EN January 18, p. 33 (1993)）；イソプレノイド（米国特許第5,569,588号：参照して本明細書に組み込む）；チアゾリジノン及びメタチアザノン（米国特許第5,549,974号）；ピロリジン（米国特許第5,525,735号及び同第5,519,134号）；モルホリノ化合物（米国特許第5,506,337号）；ベンゾジアゼピン（米国特許第5,288,514号）等が挙げられるが、これらに限定されない（参考文献を、いずれも、参照して本明細書に組み込む）。

【0294】

コンピナトリアルライブラリーを調製する装置は市販されている（例えば、357 NIPS及び390 NTS（Advanced Chem Tech（ケンタッキー州ルイスビル））、Symphony（Rainin（マサチューセッツ州ウォバーン））、433 A（Applied Biosystems（カリフォルニア州フォスター・シティ））、9050 Plus（Millipore（マサチューセッツ州ベッドフォード）参照）。

【0295】

液相化学については、多数のロボットシステムが開発されている。これらシステムとしては、Takeda Chemical Industries Ltd.（日本、大阪府）が開発した自動合成装置のような自動化ワークステーションや、化学者が行った手動合成手順を模倣する、ロボットアームを使った多数のロボットシステム（Zymate II（Zymark Corporation：マサチューセッツ州ホプキンソン）、Orca（Hewlett-Packard：カリフォルニア州パロ・アルト）が挙げられる。前記装置はいずれも本発明で利用するのに適している。さらに、多数のコンピナトリアルライブラリー自体も市販されている（ComGenex（ニュージャージー州プリンストン）、Asinex（ロシア・モスクワ）、Tripos, Inc.（ミズーリ州セント・ルイス）、ChemStar, Ltd.（ロシア・モスクワ）、3D Pharmaceuticals（ペンシルバニア州エクストン）又はMartek Biosciences（メリーランド州コロンビア））。

【0296】

2. 化学ライブラリーの高速大量処理アッセイ

本明細書に記載の、細菌の胞子の付着を阻止する化合物に関するアッセイはいずれも、高速大量処理スクリーニングに適している。上述のように、好ましい実施形態において、アッセイによって、微生物の胞子の表面タンパク質と相互作用する薬剤をスクリーニングする。

【0297】

本明細書に記載のアッセイの高速大量処理の実現は、せいぜいアッセイフォーマットのルーチン変更（例えば、ロボットマニピュレータや大型ブレートリーダー等に適合するようにする）程度で行うことができる。様々な高速大量処理スクリーニングシステム（例えば、タンパク質結合、核酸結合等を目的としたもの）が記載されている（米国特許第5,559,410号、同第5,585,639号、同第5,576,220号及び同第5,541,061号：いずれも参照して本明細書に組み込む）。

【0298】

さらに、高速大量処理スクリーニングシステムは市販されている（Zymark Corp.（マサチューセッツ州ホプキンソン）、Air Technical Industries（オハイオ州メンター）、Be

10

20

30

40

50

ckman Instruments, Inc. (カリフォルニア州フラートン) 又はPrecision Systems (マサチューセッツ州ナティック))。これらのシステムでは、主に、全ての試料及び試薬のピペットによる分取、液体分配、経時インキュベーション及びアッセイに適した検出器内のマイクロプレートの最終読み取り操作を含む手順を全て自動化している。これらを設定で変更できるシステムは、処理能力が高く、迅速に起動するだけでなく、高度の順応性をもたらし、しかも、カスタマイズ可能である。このようなシステムのメーカーは、詳細な手順書に高処理能力をいろいろと規定している。そのため、例えば、Zymark Corp. は、遺伝子転写やリガンド結合等の変調を検出するスクリーニングシステムについて記載した技術報告書を提供している。

【 0 2 9 9 】

10

V . 感染制御試験化合物の検出

1 具体例において、本発明は、微生物の胞子の表面タンパク質と感染制御試験化合物との間の相互作用の量又は速度を検出及び / 又は定量化する方法を意図するものである。一部の実施形態において、検出方法として、ビデオ顕微鏡法、DAPI 蛍光変化、蛍光共鳴エネルギー移動又は遠心分離が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 3 0 0 】

A . 顕微鏡法

1 具体例において、感染制御試験化合物を顕微鏡法で（例えば、直接目視観察により又はビデオ若しくは写真記録装置を用いて）検出する。顕微鏡による視覚化を伴うアッセイでは、標識化したもの（例えば、蛍光標識化したもの）を含む、クロストリジウム属菌の胞子の表面ペプチド及び / 又は別の微生物の胞子の表面タンパク質を利用してよい。1 具体例において、ペプチド及び / 又はタンパク質を固体支持体（例えば、スライドガラス）のすぐ近くに配置して、感染制御試験化合物を含む溶液に暴露する。ペプチド及び / 又はタンパク質と固体支持体との付着は、顕微鏡（例えば、走査型電子顕微鏡）を用いて直接目視観察することが可能である。

20

【 0 3 0 1 】

顕微鏡は、必要に応じて静止カメラ又はビデオカメラを装備していてもよく、タンパク質及び / 又はペプチド付着の相対依存量を定量化するために画像収集や解析ソフトウェアを装備していてもよい。

【 0 3 0 2 】

30

顕微鏡で目視観察できる標識はいずれも、この種の検出と併用してよい。このような標識としては、蛍光標識（例えば、フルオレセイン、ローダミン等）、比色測定用標識、及び放射性標識（好適なシンチレーションスクリーンを有するもの）等が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の一部の実施形態において、マイクロチューブは、標識を用いずに（例えば、微分干渉顕微鏡によって）目視観察することも可能である。

【 0 3 0 3 】

B . DAPI 蛍光変化

別の具体例において、感染制御試験化合物とクロストリジウム属菌の胞子の表面ペプチド及び / 又は別の微生物の胞子の表面タンパク質との相互作用を、DAPIを含む標識を用いた蛍光変化によって判断してもよい。DAPI 蛍光発光の速度低下又は発光量の減少が、試験化合物と微生物の胞子の表面タンパク質との間の相互作用の指標となる。試験化合物による蛍光変化を、陰性対照及び / 又は陽性対照の反応の観察結果と比較する。

40

【 0 3 0 4 】

他の標識としては、アニリノナフタレンスルホネート (ANS)（例えば、Molecular Probesの製品番号A-47、A-50、T-53等）、ビス-ANS (Molecular Probesの製品番号B-153)、N - フェニル - 1 - ナフタレン (NPN) (Molecular Probesの製品番号P65)、DCVJ (Molecular Probesの製品番号D-3923)、ルテニウムレッド及びクレゾールバイオレットが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 3 0 5 】

C . 蛍光共鳴エネルギー移動

50

クロストリジウム属菌の胞子の表面ペプチド及び／又は別の微生物の胞子の表面タンパク質と感染制御試験化合物との間の相互作用の度合いは、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)で測定してもよい。蛍光共鳴エネルギー移動は、吸収スペクトルと発光スペクトルとが重なり合う2つのフルオロフォアがすぐ近くに位置する(例えば、7mmも離れていない)場合に生じる現象である(Styerら, Ann. Rev. Biochem. 47: 819-846 (1978))。1具体例において、本発明は、FRETを用いたタンパク質・タンパク質間の相互作用の検出にも関する(Taylorら, J. Cell Biol. 89: 362-367 (1981))。

【0306】

1具体例において、様々に標識化された微生物の胞子の表面タンパク質と感染制御試験ペプチド化合物とを等モル割合で混合する(例えば、それぞれ、フルオレセイン標識化したものとローダミン標識化したもの)。蛍光発光は、微生物の胞子の表面ペプチドとペプチド試験化合物が相互作用すると消光する可能性があり、この消光が、結合蛍光色素それがエネルギー移動を生じるほど十分に近接していることを示している。試験化合物と対照との反応で生じた蛍光発光の速度及び／又は発光量との比較も可能である。

10

【0307】

VI. 微生物の胞子の表面タンパク質とペプチドとの組換え体発現

1具体例において、クロストリジウム属菌の胞子の表面ペプチド及び／又は別の微生物の胞子の表面タンパク質を、組換えDNA法を用いて合成する。一般に、この方法は、タンパク質をコード化するDNA配列を作成する工程と、前記DNAを特定のプロモーターの支配下で発現カセットに入れる工程と、宿主内でタンパク質を発現させる工程と、発現したタンパク質を分離する工程と、必要に応じて、タンパク質を復元する工程とを含んでなる。本発明にかかるペプチド及び／又はタンパク質をコード化するDNAは、多数の好適な方法で調製でき、例えば、相当配列のクローニングと制限、又はNarangらのホスホトリエステル法(Meth. Enzymol., 68: 90-99 (1979))；Brownらのリン酸ジエステル法(Meth. Enzymol., 68: 109-151 (1979))；Beaucageらのジエチルホスホロアミダイト法(Tetra. Lett. 22: 1859-1862 (1981))；及び米国特許第4,458,066号に記載の固形担体法等の方法による直接化学合成が挙げられる(参考文献の全てを、参照して本明細書に組み込む)。

20

【0308】

一般に、以降で用いる命名法や細胞培養における実験手順、分子遺伝学、並びに後述する核酸化学及びハイブリダイゼーションは当業者には分かるであろう。組換え核酸法、ポリヌクレオチド合成、並びに微生物培養及び形質転換(例えば、電気穿孔法、リポフェクション法)には標準的な方法を使用する。一般に、酵素反応及び精製工程は、市販キットに同梱されたメーカーの仕様書に従って行う。方法と手順は、一般に、当該技術分野及び様々な一般参考のにおける従来法に従って行う(Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)；及びCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc., N.Y. (1996)；これらを、参照して本明細書に組み込む)。

30

【0309】

本発明は、胞子の表面ポリペプチド配列又はその変異体をコード化するあらゆる核酸配列に関し、これら核酸配列を用いて、胞子の表面タンパク質を発現する組換え分子を作製する。例えば、遺伝子暗号が縮重すると、多くの核酸配列に胞子の表面ポリペプチドのコード化を容認されることとなる。その結果、配列番号2、4、6又は8以外のコドンを用いると、胞子の表面ヌクレオチド配列の発現速度が増強されうる。別法として、真核生物発現宿主内では、他のコドンを用いて、別の性質(例えば、より長い又はより短い半減期)を持った組換えRNA転写のスプライス変異を発生させる可能性もある。さらに、制限酵素部位を変更するために又は翻訳されたポリペプチドの糖鎖付加パターンを変更するためには、真核生物発現宿主内で、様々なコドンが好ましい場合もある。

40

【0310】

微生物の胞子の表面タンパク質ヌクレオチド配列の変異体(例えば、クロストリジウム属菌の胞子の表面タンパク質)も本発明の範疇に含まれる。これら変異体としては、ヌク

50

レオチド配列の翻訳産物の生物活性が維持されているのであれば、様々なヌクレオチド又はヌクレオチド類似体が欠損、挿入又は置換されたヌクレオチド配列が挙げられるが、これらに限定されない。本発明は、クロストリジウム属菌の胞子の表面タンパク質核酸配列（例えば、配列番号2）に限らず、具体的には、様々なストリンジェンシーのハイブリダイゼーションによって配列番号2並びにその一部、変異体及び誘導体へハイブリダイズ可能な核酸相同体（例えば、配列番号3、5及び7のバシラス相同体）が包含される。例えば、高いストリンジェンシーによって、配列番号2と他の核酸配列との間の非特異的結合が抑制又は排除されうる。それに対し、低いストリンジェンシーによって、配列番号2とは別の相同体を有する更に大きな核酸配列が検出されうる。配列番号2のフラグメント（すなわち、一部ともいう）も本発明の範疇にあると考えられる。1具体例において、フラグメント長は、ヌクレオチド10個以上であり、配列番号2とは50%超の相同性を示す。
10

【0311】

本発明は、また、配列番号2のポリヌクレオチドの少なくとも一部又は胞子の表面タンパク質をコード化するポリヌクレオチドの少なくとも一部と相補的な核酸配列を含むアンチセンス分子にも関する。本発明は、更に、配列番号2又は1つ以上の異種配列と結縁した胞子の表面タンパク質をコード化するポリヌクレオチドから成る群より選択される核酸の少なくとも一部、変異体、誘導体及び/又は相同体を含む融合遺伝子にも関する。本発明の機構を理解することは必要ではないが、そのような融合遺伝子は、核酸配列の発現を検出しうると考えられる。異種配列の例としては、-ガラクトシダーゼ又はルシフェラーゼ等の酵素をコード化するレポーター配列が挙げられるが、これらに限定されない。融合遺伝子は、発現したタンパク質の精製を促す可能性もある。例えば、タンパク質Aの異種配列は、固定化イムノグロブリン上での融合タンパク質の精製を可能にする。他の親和性トラップを用いて、発現した融合タンパク質を精製することも可能である。例えば、pGEXベクター（Promega（ウィスコンシン州マディソンプロメガ））を用いて、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）との融合タンパク質としての胞子の表面タンパク質を発現させることも可能である。一般に、このような融合タンパク質は可溶性であり、グルタチオン-塞天ビーズに吸着させてから遊離グルタチオン存在下で溶出することで、溶解細胞から簡単に精製することができる。このようなシステムで生成されるタンパク質は、ヘパリン、トロンビン又は第Xa因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計されるので、対象とするクローン化ポリペプチドを自由自在にGST部分から遊離することができる。
20
30

【0312】

A. 代表的な胞子の表面タンパク質の組換え発現

1具体例において、本発明は、微生物の胞子の表面タンパク質の組換え発現方法を意図するものである。1具体例において、前記方法は、微生物の胞子の表面タンパク質の少なくとも一部をコード化するプラスミドを構築する工程を含む。1具体例において、前記方法は、前記プラスミドを有する好適な生物を移入する工程を含む。1具体例において、好適な生物は、大腸菌である。

【0313】

本明細書に示すデータは、クロストリジウム・ディフィシレの胞子の表面タンパク質の少なくとも一部をコード化する核酸を含むプラスミドを有する、形質移入した大腸菌の良好なクローニングを示している。1具体例において、胞子の表面タンパク質はCD 167である。1具体例において、胞子の表面タンパク質はCD 3620である。次の実験は、本発明の実施形態の単なる例示であって、本発明の実施形態を限定するものではないことから、後述する基本技術を用いて別の胞子の表面タンパク質の核酸コンストラクトから同様の結果が得られる可能性もある。
40

【0314】

クロストリジウム・ディフィシレの疑似表面タンパク質のクローニングを、大腸菌Rose tta-gami発現菌株中、10個のアミノ酸Hisタグを有するpET-19bプラスミド（Novagen, 製品番号69677-3）を介して行った。特に、pET-19bとCD 1067の組み合わせ（pJEB02）又
50

はpET-19bとCD 3620との組み合わせ（pJEB03）を、大腸菌Rosetta-gami細胞を含む培養液中で一夜（すなわち、12時間）培養した（図11参照）。

【0315】

形質移入した大腸菌培養液約2mlを、LB培地50mlにアデノシンーリン酸（AMP）100μg/mlとクロラムフェニコール34μg/mlとを加えた発現培地に転移した。培地のOD₆₂₅が約0.5-0.6となるまで増殖させてから、1mMのIPTGでpETプラスミドの発現を誘発した。IPTG誘発後、約1時間毎に培地試料1mlを採取した。試料を遠心分離して（例えば、約10,000×gで1分間）、得られた沈殿物をNovex溶液100μl（2倍SDS-PAGE試料緩衝液を45μlとH₂Oを45μlと2Mジチオスレイトールを10μlとの混合溶液）に再懸濁して、約5分間煮沸した。煮沸後の沈殿物懸濁液約20μlを、最初は4-12%のTris-グリシンSDS-PAGEゲルで展開させて、単離した疑似組換えタンパク質約10μlをウェスタンプロット法に使用した。
10

【0316】

pJEB02プラスミドは、405個のアミノ酸を有する分子量約44kDaのタンパク質を発現すると予想された。この予想は、SDS-PAGEゲル電気泳動法での分離により、約50kDaのタンパク質の発現がIPTG誘発後1時間以内に現れ、しかもそれ以降の試料（すなわち、2-6時間後の試料）では強度が増強することで確認される（図12参照）。この予備分離は、ウェスタンプロット法により、F 1373抗-クロストリジウム・ディフィシレ抗体又は抗-His抗体のいずれかを検出することで確認した（図13A及び図13B参照）。

【0317】

pJEB03プラスミドは、122個のアミノ酸を有する分子量約14kDaのタンパク質を発現すると予想された。この予想は、SDS-PAGEゲル電気泳動法での分離により、約20kDaのタンパク質の発現がIPTG誘発後1時間以内に現れ、しかも、それ以降の試料（すなわち、2-4.5時間後の試料）では、強度が増強することで確認される（図14参照）。この予備分離は、ウェスタンプロット法を用いて、F 1373抗-クロストリジウム・ディフィシレ抗体又は抗-His抗体のいずれかを検出することで確認した（図15A及び図15B参照）。

【0318】

F 1373抗-クロストリジウム・ディフィシレ抗体又はF 1997抗-クロストリジウム・ディフィシレ抗体の両方の免疫前ウェスタンプロット法の対照試料（例えば、胞子の表面をターゲットとした特注の市販製剤：Strategic Diagnostics, Inc.）からは、pJEB02とpJEB03両方の発現プロファイルに結合特異性が無いことが示された（図16A-D参照）。これらデータからは、CD 1067とCD 3620を大腸菌にクローニングする場合、免疫前対照検出は、組換えCD 1067タンパク質又は組換えCD 3620タンパク質のどちらとも反応しないことが分かる。これに対し、クロストリジウム・ディフィシレの胞子の表面の抗体（例えば、F 1373又はF 1997）は、組換えCD 1067タンパク質及び組換えCD 3620タンパク質と特異的に反応する。これらタンパク質の特異的発現は、組換えCD 1067タンパク質及び組換えCD 3620タンパク質の両方のMWに相当する発現プラスミドコンストラクトに付着したHis₁₀タグを検出することで確認された。
30

【0319】

B. 核酸配列合成法

本発明にかかる核酸配列は、化学合成法を用いて生成してもよい。オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドシンセサイザー（Applied BioSystems）において、メーカーが提供する仕様書に従って合成することができる（Sinhaら, Nucleic Acid Res. 12: 4539 (1984)）。合成後、相補的オリゴヌクレオチドは、NaCl (200 mM) 含有する10mMのTris-塩酸緩衝液（pH 8.0）中で90まで加熱してから室温まで徐々に冷却することにより、アニールされ得る。結合及び代謝回転アッセイでは、天然ポリアクリルアミド（15%w/v）ゲルから二本鎖DNAを精製する。二本鎖DNAに相当するバンドを励起させて、EDTA（1mM）含有0.30M酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0）中に一晩浸漬する。浸漬後、上澄み液をフェノール／クロロホルム（体積比1/1）で抽出して、エタノールで沈殿させる。
40
50

^{3 2} P-ATPとT4ポリヌクレオチドキナーゼで処理することで、DNA基質の5'-OH基に放射性標識を付与する。塩及び取り込まれなかつたヌクレオチドは、セファデックスGカラムを装備したクロマトグラフィーで除去する。

【0320】

合成されたヌクレオチド配列は、酵素を含む市販のキットを用いて確認してよく、前記酵素としては、DNAポリメラーゼIのKlenowフラグメント、Sequenase（登録商標））、Taq DNAポリメラーゼ又は耐熱性T7ポリメラーゼが挙げられるが、これらに限定されない。毛管電気泳動法を用いて核酸配列の大きさを調べて、当該配列の核酸合成産物を確認することも可能である。合成された配列は次の方法で増殖してもよい。i) ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）（Mullisらの米国特許第4,683,195号及び同第4,683,202号）；リガーゼ連鎖／増幅反応（LCR/LAR）（Baranyら, Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 189 (1991); Baranyら, PCR Method and Applic., 1: 5 (1991); 及びWuら, Genomics 4: 560 (1989)）。

【0321】

本発明の胞子の表面タンパク質ヌクレオチド配列は様々な方法に利用できる。例えば、少なくとも約10bp、通常は少なくとも約15bp、そして最大で配列全体（すなわち、全長配列を含む）の配列フラグメントは、バシラス属菌、クロストリジウム属菌並びに他の細菌から相補的ゲノムDNA配列を検出及び分離するためのプローブとしても利用可能である。胞子の表面タンパク質核酸配列の全て又は一部で、細菌のDNAを収容したゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより、ゲノムの配列を分離する。ゲノムライブラリーのスクリーニング以外に、胞子の表面タンパク質核酸配列はまた、細菌RNAを用いて作製されたcDNAライブラリーのスクリーニングにも使用できる。胞子の表面タンパク質核酸配列はまた、胞子の表面タンパク質の合成管理にも有用である。胞子の表面タンパク質抗体は、胞子の表面タンパク質と哺乳類細胞、哺乳類皮膚、硬質表面等との相互作用を拮抗するにも使用してよい。胞子の表面タンパク質は、胞子の表面タンパク質を発現する細菌で感染を検出するといった診断目的で、胞子の表面タンパク質抗体の産生にも利用できることが分かる。さらに、胞子の表面タンパク質核酸配列は、結合アンタゴニストのスクリーニングや、胞子の表面タンパク質を含む微生物の検出にも有用である。

【0322】

化学合成では、通常、標準的な一本鎖オリゴヌクレオチドが生成される。これは、相補的配列とのハイブリダイゼーションによって又はテンプレートとして1本鎖を用いたDNAポリメラーゼとの重合によって、二本鎖DNAに転換することが可能である。DNAの化学合成は、塩基数約100の配列では普通に行われるが、それより長い配列は、短い配列を連結することで生成してもよい。

【0323】

別法としては、部分列をクローニングしてもよく、また、好適な部分列を適切な制限酵素を用いて切断してもよい。その後、そのフラグメントを連結して、所望のDNA配列を產生してもよい。

【0324】

1具体例において、微生物の胞子の表面タンパク質核酸は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）等のDNA增幅法を用いてクローニングすることが可能である。そのため、例えば核酸配列又は部分列は、1つの制限部位（例えば、Hdel）を含むセンスプライマーと別の制限部位（例えば、Hind III）を含むアンチセンスプライマーとを用いてPCR増幅する。これにより、末端に制限部位を含む所望のタンパク質をコード化する核酸が産生される。その結果、この核酸は、第二分子をコード化しつつ適切な対応制限部位を有する核酸を含むベクターに容易に連結できる。

【0325】

本明細書に記載の配列情報を用いて好適なPCRプライマーを見つけ出すことができる。適切な制限部位は、タンパク質を解重合又は供給する微小管をコード化する核酸に部位特異的突然変異誘発法で付加してもよい。核酸をコード化するタンパク質を解重合又は供給する微小管を含むプラスミドは、適切な制限エンドヌクレアーゼで切断してから、標準的

10

20

30

40

50

な方法で第二分子をコード化するベクターに連結する。

【0326】

クロストリジウム属菌の胞子の表面ペプチド及び／又は他の微生物の胞子の表面タンパク質をコード化する核酸配列は、様々な宿主細胞内で発現可能であって、前記宿主細胞としては、大腸菌、他の細菌性宿主、イースト菌、そしてCOS細胞株、CHO細胞株、HeLa細胞株及び骨髄腫細胞株等の様々な高等真核生物細胞が挙げられる。組換えタンパク質遺伝子を、通常は、宿主毎に適した発現対照配列と操作可能なように結合する。大腸菌の場合、好ましいプロモーターとしては、T7プロモーター、trpプロモーター又はラムダプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。その上、リボソーム結合部位と転写終結信号は発現ベクターの一部分でもある。真核生物細胞の場合、対照配列としては、プロモーター、好ましくはイムノグロブリン遺伝子由来のエンハンサーであるSV 40及びサイトメガロウィルス等、並びにポリアデニル化配列が挙げられ、しかもスプライス供与部位及び受容体配列を包含する場合もある。10

【0327】

本発明のプラスミドは、制限されないが、塩化カルシウム法、リン酸カルシウム法又は電気穿孔法等の方法によって、選択された宿主細胞に移植することが可能である。プラスミドの転換先の細胞は、プラスミドに含まれる遺伝子（例えば、遺伝子amp、gpt、neo及びhyg）が与える抗生物質耐性によって選択され得る。

【0328】

発現後、組換えタンパク質は、標準的な手順で精製してよく、例えば硫酸アンモニウム沈殿法、アフィニティカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動法等が挙げられるが、これらに限定されない（R. Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y. (1982)；及びDeutscherら, Method in Enzymology, 182巻(1990)）。少なくとも約90 - 95 %の均一性を有する実質上純粋な組成物が好ましく、98 - 99 %以上の均一性を有する実質上純粋な組成物が最も好ましい。ポリペプチドは、部分的に又は要望通りの均一性まで精製してから（例えば、抗体産生用の免疫原として）利用してもよい。20

【0329】

VII. クロストリジウム属菌感染

クロストリジウム・ディフィシレ（グラム陽性の嫌気性菌）は、しばしば、入院患者の罹患の原因となり、抗生物質起因性の下痢や偽膜性大腸炎の病原因子と考えられている（Borrielloら, 「クロストリジウム・ディフィシレの病原因子」, Rev. Infect. Dis. 12: S185-S191 (1990)；Cerquettiら, 「様々なクロストリジウム・ディフィシレ臨床分離株起源の表層タンパク質の特性評価」, Microb. Pathog. 28:363-372 (2000)；及びKuipersら, 「乳酸菌中のクオラムセンシング制御された遺伝子発現」, J. Biotechnol. 64: 15-21 (1998)）。前記疾患の発症へのクロストリジウム・ディフィシレの関与について、次の2つの要因が検討されている：i) 抗生物質の投与による常在腸内細菌叢の抑制（Freemanら, 「抗生物質とクロストリジウム・ディフィシレ」, Microbes Infect. 1: 377-384 (1999)；及びGeorge W., 「抗菌剤起因性大腸炎及び下痢：歴史的背景及び臨床面」, Rev. Infect. Dis. 6: S208-S213 (1984))、及びii) 細菌による2つの高分子量(MW)毒素（毒素A及びB）の産生（Pothoulakisら, 「微生物と微生物由来毒素：微生物 - 粘膜間の相互作用におけるパラダイムII、クロストリジウム・ディフィシレ毒素に対する腸の統合反応」, Am. J. Physiol.- Gastroint. Liver Physiol. 280: G178-G183 (2001)；及びWren B.ら, 「クロストリジウム・ディフィシレ毒素A及びBの分子特徴」, Rev. Med. Microbiol. 3: 21-27 (1992)）。3040

【0330】

他の腸内毒素原性病原菌の場合と同様に、クロストリジウム・ディフィシレは、腸内コロニー形成後に毒素を送達して、細菌を粘膜に付着させる。シリア系ハムスターのクリンダマイシン起因性疾患モデルでは、異なるクロストリジウム・ディフィシレ菌株による様々な腸内コロニー形成効率と、空腸から結腸にまでの消化管部位におけるその能力との間の相互関係が報告されている。これら変動のうちの少なくとも一部は、毒素産生以外の要50

因に起因するものと考えられた。毒性の弱い菌株の小腸粘膜への付着は粗毒素調合液を投与することで増加したが、これは、おそらく、細胞が損傷した後に受容体部位がマスキングされていなかったことが原因であった。

【0331】

クロストリジウム・ディフィシレ由来の2つの毒性因子は、外毒素、すなわち毒素A (TcdA) と毒素B (TcdB3) であることが分かっているが、前記付着やコロニー形成のプロセスに関与する他の因子についてはほとんど知られていない (Vothら, 「クロストリジウム・ディフィシレ毒素：病気における作用機構と役割」, *Clin. Microbiol. Rev.* 18: 247-263 (2005))。この点が、大腸菌、サルモネラ菌及び赤痢菌等の他の腸内微生物とは異なる。これは、恐らく、クロストリジウム・ディフィシレ研究用に十分に開発された突然変異誘発システムがないことで、ある程度は説明されるかもしれない。クロストリジウム・ディフィシレを理解するための対処法では、病原性と関与する可能性のある因子の遺伝子位置を同定する必要がある。クロストリジウム・ディフィシレ菌株630 (流行性X群；有毒性で、しかも多剤耐性を有するもの) の完全ゲノム配列は報告されている (Wustら, 「様々なタイピング法による抗生物質起因性大腸炎発症の研究」, *Clin. Microbiol.* 16: 1096-1101 (1982))。

【0332】

クロストリジウム・ディフィシレ菌株630のゲノムには、4,290,252 bpの環状染色体と7,881 bpのプラスミドpCD630が含まれている。前記染色体は、3,776の推定暗号配列 (CDS) をコード化している。他の低GC含量のグラム陽性菌と同様に、前記染色体は強いコーディングイアスを有し、その場合、CDSの82.1%がリーディング鎖にコード化されている。プラスミドは11個のCDSを有しているが、どれも全く機能しない。配列決定したクロストリジウム属菌の4つのゲノム (クロストリジウム・アセトブチリカム、クロストリジウム・ボツリヌス、クロストリジウム・パーフリンジエンス及び破傷風菌) に関する相反性FASTA解析からは、クロストリジウム・ディフィシレのCDSの567個 (15%) だけが、配列決定された全てのクロストリジウム属菌と共通しているが、1,893個 (50%) はクロストリジウム属菌に固有であることが分かった。保存されているクロストリジウム属菌のCDSは主に必須機能をコード化するのに対し、クロストリジウム・ディフィシレ固有のCDSは多数の補助機能や可動要素をコード化する (Sebaihiaら, 「多剤耐性ヒト病原体クロストリジウム・ディフィシレが高移動性モザイクゲノムを有すること」, *Nature Genetics* 38: 779-786 (2006))。

【0333】

精製されたクロストリジウム・ディフィシレの表層タンパク質 (SLP) の結合は、ヒト上皮細胞と胃腸組織の両方で見つかっている (Calabiら, 「クロストリジウム・ディフィシレの表層タンパク質と胃腸組織との結合」, *Infect Immune* 70: 5770-5778 (2002))。細胞同士及び組織同士の結合は、酸で抽出したSLPでも、可溶性組換え高分子量サブユニットでも観察される。これに対し、組換え高分子量サブユニットと同じ条件で発現させて精製した可溶性の組換え低分子量SLPサブユニットには、結合がほとんど又は全く観られない。抗 - 高MWサブユニット血清がクロストリジウム・ディフィシレとHEp-2細胞との付着を部分的に阻害することが原因で、SLPが全細菌と上皮細胞との付着に関与するものと考えられる。これらタンパク質の元来の構造は、次の理由から、付着中保持されていると考えられる：i) 天然SLP製剤と組換えSLP製剤がいずれも、ペプチドグリカン加水分解活性を保持していること、ii) 酸で抽出したSLPが、カルシウムを加えると、高次構造まで重合可能であること、そして、iii) 両方の組換えサブユニットに対する抗血清が、高タイマーでは全クロストリジウム・ディフィシレ細胞と反応すること。

【0334】

クロストリジウム・パーフリンジエンスは、ガス壊疽を引き起こす疑いがあり、重症型壊疽 (組織死、これは壊死性皮膚感染ともいう) である。ガス壊疽は、ストレプトコッカスspp及びビブリオ・バルニフィカスによる感染によって発症する可能性もある。

【0335】

10

20

30

40

50

ガス壊疽は、通常、クロストリジウム・パーフリンジエンス属菌に感染した結果生じるものであり、クロストリジウム・パーフリンジエンス属菌が嫌気性（低酸素）条件下で毒素を产生し、その毒素が組織死や随伴症状をもたらす。米国では、ガス壊疽は珍しく、毎年1,000 - 3,000例しかない。ガス壊疽は、一般に、外傷部位又は少し前の外科損傷部で生じるが、内発することもある。内発的にガス壊疽を発症した患者は、限定されないが、血管性の基礎疾患（例えば、アテローム性動脈硬化症若しくは動脈硬化）、糖尿病又は大腸癌を包含する高いリスクファクターを有する場合が多い。

【0336】

ガス壊疽は、一般に、突然劇的に発症する。蒼白ないし茶褐色の感染部位で炎症が生じて、激しい痛みを伴う組織腫脹が生じる。腫脹部位を指で押すと、組織内でガスがパチパチ音を立てるような感じがするかもしれない。感染部位の縁は拡張し易く、その結果、数分間にわたって変化が見られる。病変組織は完全に壊死する。

【0337】

クロストリジウム・パーフリンジエンス属菌は多種多様な毒素を产生するが、そのうちの4つ（すなわち、
、
及び
）が致死性の症候群を引き起こしうる。さらに、これらは、組織死（例えば、壊死）、血球破壊（例えば、溶血反応）、血液循環の局部減弱（例えば、血管収縮）及び血管漏出（例えば、血管透過性亢進）も引き起こす。

【0338】

クロストリジウム・パーフリンジエンス毒素は、局部的な組織破壊と全身症状（全身で生じるその他の症状）の両方に関与している。全身症状は、ガス壊疽感染初期に発症するものであって、腫脹、発熱及び不安神経症が挙げられるが、これらに限定されない。治療せずに放置すると、患者は、限定されないが、血圧低下（例えば、低血圧）、腎不全、こん睡を含むショック様の症状を発症し、そして、最後には死に至る。その他のガス壊疽症状としては、皮膚損傷部周辺の中等度の痛みないし激痛、皮膚損傷部周辺の進行性腫脹、中等度の発熱ないし高熱、皮膚の色が最初は青白いが、後に浅黒くなり、暗赤色ないし紫色へと変わっていくこと、黄疸、小胞形成、小胞の癒着が結合して生じる大きな疱疹、茶褐色の体液が詰まった疱疹、組織からの悪臭のする茶褐色ないし真っ赤な体液（例えば、漿液血液状分泌物）の排膿、心拍数増加（例えば、頻拍）、発汗、肺気腫（例えば、皮下に空気が溜まること）又は捻髪音（例えば、組織内に空気が溜まること）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0339】

或いは、患者は、進行マヒ、四肢冷感、低血圧又は頻脈を含むショック状態に陥る場合もある。最終的には、全身に及ぶ全身感染症を発症しうる（例えば、全身毒性又は全身性敗血症）。ガス壊疽の存在を判定する他の方法としては、感染部位の体液のグラム染色によってグラム陽性桿菌（例えば、クロストリジウム属菌）を表示する方法、感染を引き起こす細菌培養液を増殖させる方法、血液培養により感染細菌を増殖させる方法、嫌気性組織及び／又は液体の培養を少なくともクロストリジウム属菌上に露呈させる方法、又は感染部位をX線撮影、コンピュータ断層撮影若しくは磁気共鳴映像処理して組織中のガスを表示する方法が挙げられるが、これらに限定されない。

【0340】

ガス壊疽の治療では、一般に、死んだ組織、損傷を受けた組織及び感染した組織を迅速に外科的切除（例えば、創面切除）する必要がある。感染症の拡大を抑制するために腕又は下肢の切除が適応される場合もある。従来の抗生物質（例えば、ペニシリン）を初回のボーラス注射として静脈注射し、続いて長期間経口療法を行ってもよい。

【0341】

VIII. 細菌感染

炭疽病は、1世紀以上前に初めて報告された病気であり、細菌が原因と断定された最初の病気の一つである。その感染はバシラス・アンスラシスの胞子によって伝播されるものであり、バシラス・アンスラシスは、経口摂取、接種又は吸入によって哺乳類宿主に入り込む可能性がある。感染後期が最も重篤で、病気の進行が速く、大抵は死に至る（Dixo

10

20

30

40

50

nら, N. Engl. J. Med. 341: 815-826 (1999)。前記胞子は、耐化学薬品性と熱や日照り等の環境因子に対する高い抵抗性とを特徴とする休眠細胞型の微生物であって、生物をその環境下で数十年間生存させる。バシラス・アンスラシスの胞子は、宿主組織に入り込んだ後、致死性の栄養型へと発芽する。バシラス・アンスラシス感染の初期段階や肺での宿主防衛の役割は未だ明らかになっていない。共焦点顕微鏡法による研究からは、胞子がマクロファージ内で発芽すると、桿菌が、致死因子、防御抗原及び浮腫因子を包む毒素を産生し始めることが分かる (Guidi-Rontaniら, Mol. Microbiol. 31:9-17 (1999))。これら毒素が産生すると、マクロファージのアポトーシスと血流への栄養型桿菌の放出が生じて、敗血症を発症し、そして死に至る (Dixonら, Cell. Microbiol. 2: 453-463 (2000))。

10

【0342】

反対に、マクロファージは、胞子を排出することで、胞子の吸入が原因の感染から動物を守ると考えられている (Coteら, Microb. Pathog. 37:169-175 (2004))。宿主の吸入によってバシラス・アンスラシスの胞子が遭遇するもう一つの保護バリアは肺胞上皮であり、これは、肺表面活性物質の薄層で覆われている。肺表面活性物質は脂質 - タンパク質複合体であり、次の2つの働きをする : i) 肺胞内の表面張力を力学的に低下させる (すなわち、呼息時に肺胞が圧潰されるのを防ぐ) こと、及び ii) 感染に対する肺防御を与えること (McCormackら, J. Clin. Invest. 109: 707-712 (2002))。この免疫機能は表面タンパク質 (SP) に起因しており、前記SPとしては、SP-A及びSP-Dが挙げられるが、これらに限定されない。SP-A及びSP-Dは親水性捕集成分であって、病原体表面に作用して、その崩壊を速めることで感染を予防し得る (Crouchら, Annu. Rev. Physiol. 63: 521-554 (2001))。上記以外の2つの表面タンパク質SP-B及びSP-Cは極めて疎水性であり、後者は細菌性リボ多糖と結合して細胞効果を調節することが分かっている (Augustoら, J. Biol. Chem. 277: 23484-23492 (2002); Augustoら, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 168: 335-341 (2003))。

20

【0343】

IX. 予防的用途と治療用途

A. 病院の除染

院内細菌（例えば、クロストリジウム・ディフィシレ）は、病院のスタッフ及び入院患者集団双方の細菌感染の大部分に関与している。このような感染は、限定されないが、重度の下痢等の症状を発症する可能性があり、易感染性患者（例えば、免疫不全者）が感染すると死に至る可能性もある。そのため、病院の施設とスタッフ双方の消毒メンテナンスを強化すれば、患者の回復が速まり、そして入院期間の短縮によって医療費全体が削減されよう。

30

【0344】

一般的な皮膚及び表面用消毒剤に対して高い耐性が証明された胞子を産生する細菌もある（例えば、クロストリジウム・ディフィシレ）。現在、病院の施設表面と病院のスタッフの皮膚（すなわち、表皮層）の両方に利用できるクレンザーは、細菌の胞子を死滅させたり及び／又は除去したりするのには効果がない。嫌気性細菌（例えば、クロストリジウム・ディフィシレ）は、取り扱って操作するのに特殊な装置及び取扱技術が必要である。そのため、これまでのところ、嫌気性細菌仕様の「胞子除去ハンドウォッシュ」を開発するのは決して容易ではない。

40

【0345】

実際、クロストリジウム・ディフィシレは、抗生物質関連下痢の全ての症例のうち 15 ~ 25 %に関与している。この種の下痢の再発は、深刻で、厄介な、未解決の管理上の問題であり、入院期間を長期化して、入院費用全体を増大させていている。クロストリジウム・ディフィシレ感染による再入院は、同様の細菌亜型による再感染と異なる細菌亜型による再感染との割合が 50 : 50 であることが、大部分の研究から実証されている。この種の再発の適切な対処は、手洗い、環境の除染及び腸管隔離等の抗菌手段の品質にかかっている。環境の除染と胞子の残留性も実証されており、交叉感染にも関与していた (Barbutら

50

, 「クロストリジウム・ディフィシレ関連下痢の再発又は再感染に関する疫学」, J. Clin. Microbiol. 38: 2386-2388 (2000))。

【0346】

1 具体例において、本発明は、嫌気性細菌の胞子の最外タンパク質成分を少なくとも1つ含む組成物を意図するものである。1具体例において、嫌気性細菌は、クロストリジウム・ディフィシレの胞子を含む。1具体例において、タンパク質成分は外膜層由来のものである。1具体例において、タンパク質成分は胞子の表面タンパク質を含む。本発明の機構を理解することは必要ではないが、嫌気性細菌の胞子の最外タンパク質成分は、胞子と生物の組織（例えば、皮膚又は腸）との付着又は胞子と無生物の硬質表面（例えば、ステンレス鋼、花こう岩、皮、ビニル、セラミック等）との付着を管理すると考えられる。 10

【0347】

1 具体例において、本発明は、嫌気性胞子のタンパク質と組織又は無生物の表面との間の付着相互作用を阻止することが可能な組成物のスクリーニング工程を含む方法を意図するものである。1具体例において、嫌気性細菌の胞子の最外タンパク質成分は、このような組成物のスクリーニングのための分子標識として働く。

【0348】

クロストリジウム・ディフィシレの外膜由来の胞子の表面タンパク質は、標準的な方法で発現及び精製することが可能である（上記参照）。従って、精製及び分離した胞子の表面タンパク質を用いれば、無傷のクロストリジウム・ディフィシレ生物を処置する必要もなく、簡単なスクリーニングアッセイを利用して嫌気性胞子除去製品（例えば、ハンドウォッシュ、無生物の表面用クレンザー、全身除染液）を開発することが可能である。これにより、大規模な嫌気性装置に対する前記要件がなくなって、事実上、スクリーニングブロセスが縮小される。 20

【0349】

B. 緊急時ファーストレスポンダー

1 具体例において、本発明は、細菌汚染に対処する救急隊員（例えば、ファーストレスポンダー）の予防的処置と治療上の処置を意図するものである。1具体例において、緊急時ファーストレスポンダーには、救命士（EMT）、消防士、婦人消防士、警察官、婦人警官、ジャーナリスト、警察犬又は警察馬を挙げることができるが、これらに限定されない。 30

【0350】

未知の物質の回収及び同定は、危険でしかも一般に時間のかかる手順であり得る。特に、細菌の分析には、一般に実験室に特殊な装置が必要である。近年、世界的テロの増加に伴い、毒素物質（例えば、炭疽菌）と遭遇するリスクが高まっており、緊急時ファーストレスポンダーの汚染を迅速に予防及び／又は処置する必要がある。さらに、スクリーニング及び／又は試験プロトコルは、特殊な装置を用いずに利用し易くする必要もある。

【0351】

近年、世界中でテロ活動が加速するにつれて、ファーストレスポンダーは、細菌感染を特異的に予防する化合物を含む、すぐに利用できる組成物を必要としている。緊急時ファーストレスポンダーに対するこのような予防の必要性は、テロ攻撃以外にも、限定されないが、自然災害、トラックの衝突事故及び業務災害を包含する事象にまで拡大している。これらの事象は、微生物をまき散らす可能性があり、また、微生物源の明細書や警告表示等が剥がれた又は破れたことで迅速に同定することがほぼ不可能な場合がある。 40

【0352】

微生物の正体が分からなければ、緊急時ファーストレスポンダーは、本人、家族及び第三者だけでなく、彼らが手当てしている人をも汚染する高いリスクにさらすことになる。緊急時ファーストレスポンダーはまた、手当てしている人の症状を引き起こしている原因を知らないと正確に手当てできないし、しかも、ファーストレスポンダーがその人が暴露した物質を知らないと、悪い意味で、未知の物質と反応するかもしれない薬剤でその人を処置する恐れもあるので、手当てしている人が何に暴露したのかを知る必要がある。 50

【0353】

緊急時ファーストレスポンダーは、未知の物質を迅速にかつ効率良く分析し、予防し、そして処置しなければならない人ばかりではない。予防や処置を受ける必要のある人々及び／又は未知の物質を迅速に分析しなければならない人々の例としては、工場用地を清掃する廃棄物清掃員、液漏れ荷物を見つける郵便仕分け室の事務員、容疑者の車の中で未知の物質を見つけた警官、そして化学物質の入ったラベルのない瓶の横で意識を失った子供を見つけた教師が挙げられるが、これらに限定されない。

【0354】

未知の物質を試験するのに用いられる現行法は、多くの場合、専門研究所でしか利用できない。試料を移動して、訓練を受けた職員組織が試験を行うまでに貴重な時間を無駄にする。従って、本発明は、標識化微生物DNAのアレイと、試料DNA抽出溶液と、標識を定量化できる検出器と、を備えたキットを意図するものである。このようなキットは、前記タイプの微生物汚染を現場で判定することができる。

10

【0355】

非特異的な除染は、重労働で、しかも時間のかかる仕事であるが、微生物の胞子が存在する場合は効果がない場合がある。本発明は、少なくとも1つの胞子の表面タンパク質に由来する複数のペプチドフラグメントを含む、すぐに利用できる除染組成物を意図するものである。このようなフラグメントによって、固体表面（例えば、建物の壁、天井、階段、オフィス家具等）からだけでなく、緊急時ファーストレスポンダーの外側上皮層（例えば、皮膚）からも細菌の胞子が取り除かれる。さらに、ヒト及び／又は動物に投与する非経口組成物、鼻腔投与組成物、肺投与組成物又は経口組成物によって、体組織（例えば、口、喉、鼻腔、肺、胃、腸、嚢又は結腸）からも細菌の胞子が取り除かれる。従って、本発明は、胞子の表面タンパク質に親和性を示す化合物を含む組成物であって、前記タンパク質が、微生物の胞子と表面（例えば、人工的な固体表面又は皮膚表面）との付着に関与するものに関するものである。

20

【0356】**C. 軍事用途**

1具体例において、本発明は、微生物汚染に関する軍関係者（例えば、ファーストレスポンダー）の予防的治療及び治療上の処置を意図するものである。1具体例において、軍関係者には、歩兵、パイロット、騎兵、海軍、海兵隊員、特殊部隊、後方支援者、請負業者又はジャーナリストを挙げることができるが、これらに限定されない。

30

【0357】

本発明は、少なくとも1つの胞子の表面タンパク質に由来する複数のペプチドフラグメントを含む、すぐに利用できる除染組成物を意図するものである。このようなフラグメントにより、固体表面（例えば、テント、ジープ、戦車、武器、制服等）からだけでなく、軍関係者の外側上皮層（例えば、皮膚）からも細菌の胞子が取り除かれる。さらに、ヒト及び／又は動物に投与する非経口組成物、鼻腔投与組成物、肺投与組成物又は経口組成物によって、体組織（例えば、口、喉、鼻腔、肺、胃、腸、嚢又は結腸）からも細菌の胞子が取り除かれる。従って、本発明は、胞子の表面タンパク質に親和性を示す化合物を含む組成物であって、前記タンパク質が、微生物の胞子と表面（例えば、人工的な固体表面又は皮膚表面）との付着に関与するものを意図するものである。

40

【0358】

1具体例において、本発明は、バリスティック織物の日常的な除染方法を意図するものである。現在、バリスティック織物製の衣類は、冷水と中性洗剤で手洗いし、十分にすすいで洗剤痕跡を全て取り除いている。きちんと洗い流すことで、水を吸収してある種のバリスティック織物の防弾性を低下させる可能性のある残留セッケン被膜の蓄積が防げる。このような方法は時間と手間がかかるが、必要不可欠である。というのも、機械洗浄又は乾燥は織物を傷つけ、その結果、その弾道衝撃性能を損なう可能性があるためである。その上、一部の洗剤、ドライクリーニング溶剤、漂白剤及び洗濯用のりも衣類の防弾性レベルを低下させうるので、ほとんどのメーカーは、それらを使用しないように強く勧めてい

50

る。さらに、大部分のバリスティック織物メーカーは、バリスティック織物を水浸しにしたりしないように、又はある種のバリスティック織物は紫外線によって劣化するため、木陰であっても戸外で乾燥させたりしないように強く勧めている。

【0359】

同様に、軍用の出動服や、膝当て、スキンガード、肩パッド等の他の防護アイテムのような防護服の手入れ及びクリーニングには手間と時間がかかる。クリーニングを繰り返すと、このような衣類の耐用年数は低下する可能性がある。

【0360】

バリスティック織物製の防護服と衣類の両方に共通する問題は、着用者の汗である。汗が除去されていないと、真菌及び／又は細菌が徐々に増殖する可能性がある。この真菌及び／又は細菌の増殖は、最終的に、前記物品の防護性能を低下させて、有害な匂いを発生し、そして着用者に長期にわたって健康問題を引き起こす場合もある。特に軍用の出動服に関しては、軍用防護服の構造に用いられる織物及び部品が全て、最低性能要件に合格していなければならない。そのため、軍関係者仕様の防護服の裏地は、武器から出る火及び／又は炎並びに高温に晒される危険があるため、通常はアラミド繊維及びアラミド糸で製造される。

10

【0361】

1具体例において、本発明は、バリスティック織物製の物品及び他の軍用防護服の除染方法であって、前記物品及び前記服が、限定されないが、アラミド、ポリベンザゾール又は高性能ポリエチレン繊維を包含する成分を含む方法を意図するものである。1具体例において、前記物品及び／又は前記服は、胞子の表面タンパク質に親和性を示す化合物を含む組成物で除染される。前記組成物は簡単でコスト効率の良い方法で、前記物品に直接適用しても、前記繊維に適用しても、又は織物仕上げ剤として適用してもよい。

20

【0362】

X . 抗菌ペプチド

感染制御研究には、新規の抗菌ペプチド及び抗菌性有機化合物の探索が含まれている。抗菌ペプチドが、植物、昆虫、魚類、両生類、鳥類及び哺乳類から分離されている (Gallo, J. Invest. Dermatol. 111: 739-743 (1998) ; 及びGanzら, Pharmac. Ther. 66: 191-205 (1998))。これらペプチドは、微生物病原体が微生物の細胞膜内で胞子を産生しないようにする宿主固有の主成分であると考えられる (Orenら, Biopolymers 47(6): 451-463 (1998))。さらに、抗菌ペプチドは、動物細胞を刺激することで作用して、シンデカンの発現、走化性及び塩化物の分泌等の特性をも変化させる (Gallo, J. Invest. Dermatol. 111: 739-743 (1998))。微生物に触れると、脊椎動物の皮膚、気管及び舌上皮はペプチド抗生物質を産生すると報告されている (Russellら, Infect Immun. 64(5): 1565-1568 (1996))。ただし、抗菌ペプチドが微生物の胞子に有効であることは、一般に認められていない。

30

【0363】

高等真核生物の抗菌ペプチドは、長年、先天性免疫機構の成分とみなされているが、当初は、原始的で臨床的優位性がほとんどないと考えられていた。しかし、これらペプチドの相対的な単純さは、一次微生物感染の予防に重要なだけでなく、その後の免疫修飾における重要性ともそぐわないように思われる (Browman, 「先天性免疫におけるペプチド抗生物質とその役割」, Annu. Rev. Immunol., 13: 61-92 (1995))。その上、分子の小サイズは、多くの微生物耐性の機構に対する感受性の低減を示唆している。

40

【0364】

抗菌ペプチドは、一般に、細菌と一部の真菌を死滅させる。これらは、哺乳類の細胞にも様々な毒性を発現する。本発明の機構を理解することは必要ではないが、抗菌ペプチドは、脂質二重層と相互作用し、その結果、細菌細胞膜の完全性を低下させる可能性があると考えられる (Hwangら, Biochem Cell Biol. 76: 235-246 (1998))。

【0365】

SMAP 29は、本来はヒツジ骨髄DNAの3'RACE分析によって同定された、カテリシジン型ヒ

50

ツジ抗菌ペプチドである (Mahoney, FEBS Lett. 377: 519-522 (1995))。RCAP 18は、本来は顆粒球から同定された、カテリシジン型オオカミ抗菌ペプチドである (Hirataら, Infect. Immun. 62: 1421-1426 (1994))。SMAP 29及びRCAP 18ペプチドは、一部の薬物耐性菌株にタンパク質を供給するものと考えられる。例えば、SMAP 29組成物は、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、アルカリゲネス・キシリソオキシダンス (*Alcaligenes xylosoxidans*) 及びステノトロホモナス・マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*) による抗生物質耐性感染を制御することができる。

【0366】

全長抗菌ペプチドの抗菌能は、その骨格に沿った疎水性勾配と直接相関し、そのアニオニン性残基の相対依存量とは逆相関しているが、トリフルオロエタノール中のらせん形成範囲とは相関していないと考えられる。 10

【0367】

従って、本発明は、微生物の胞子が固体表面と相互作用したり、固体表面に付着したり及び／又は固体表面で安定化するのを阻止できる組成物のスクリーニング及び同定方法を意図するものである。さらに、これらのスクリーニング方法は、微生物の胞子が宿主生物(例えば、

ヒト、家畜、家畜動物等)と相互作用したり、宿主生物に付着したり及び／又は宿主生物で安定化するのを阻止できる化合物も同定するものと考えられる。

【0368】

XI. 栄養細胞 / 胞子複合抗菌性組成物

20

本発明は、汎用抗生物質に対する抗菌剤耐性に関する課題を解決する方法を意図するものである。みかけの抗菌剤耐性とは、汎用抗生物質が微生物の胞子に対して効き目がないことである。すなわち、従来の抗菌性化合物で「除染」した後に微生物の胞子がまだ存在すると、胞子は、活性な微生物増殖に切り替わる。これは、繰り返し発生する微生物の存在が、実は不完全な除染技術のためである場合に、「微生物抵抗性」と(間違って)解釈される可能性がある。1具体例において、本発明は、細菌の胞子の表面ペプチドに親和性を示す化合物と1以上の従来の抗菌剤又は抗生物質とを組み合わせて含む組成物を意図するものである。

【0369】

本発明の機構を理解することは必要ではないが、微生物の胞子の表面ペプチドと親和性を示す化合物及び／又は1つ以上の従来の抗菌剤又は抗生物質を含む組成物は、活性な微生物(例えば、栄養細胞)を効率良く死滅させるだけでなく、微生物の胞子を固体表面及び／又は体組織から取り除くものと考えられる。さらに、この組み合わせ戦略は、抗菌剤だけでは除染できない殺菌水準をもたらすとも考えられる。 30

【0370】

耐性が確認されている細菌株の一覧を表XIVに記す。

【表14】

抗菌剤耐性を有する微生物のメカニズム

抗菌剤	耐性を引き起こすメカニズム	生物の例	
アミノグリコシド	修飾酵素： アセチルトランスフェラーゼ、 アデニリルトランスフェラーゼ (ヌクレオチジルトランスフェラーゼ)、ホスホトランスフェラーゼ リボソーム耐性 (ストレプトマイシン、スペクチノマイシン) 不十分な薬物輸送	腸内細菌群、緑膿菌、黄色ブドウ球菌、フェカリス菌、フェカリス菌、腸内細菌群、結核菌、緑膿菌 フェカリス菌、緑膿菌、嫌気性菌	10
β-ラクタム	酵素不活性化 低親和性PBP 外膜への浸透不良	黄色ブドウ球菌、フェカリス菌、腸内細菌群、緑膿菌、ナイセリア属、インフルエンザ菌 肺炎球菌、淋菌、黄色ブドウ球菌、緑膿菌、腸内細菌群	
クロラムフェニコール	アセチル化 浸透不良	腸内細菌群、黄色ブドウ球菌、連鎖球菌、バクテロイデス・ユニフォルミス 緑膿菌	20
クリンダマイシン、エリスロマイシン、リンコマイシン	rRNAのメチル化によるリボソーム耐性 エステラーゼによる不活性化 浸透低下	連鎖球菌、フェカリス菌、 腸内細菌群 腸内細菌群、スタフィロコッカス・ホミニス	
フルオロキノロン類	取り込み低下 改変ターゲット部位 (DNAジャイレース)	腸内細菌群、緑膿菌、ブドウ球菌 腸内細菌群、緑膿菌	30
リンコマイシン	不活性化	黄色ブドウ球菌	
スルホンアミド類	改変ターゲット部位又は代替ターゲット部位 (ジヒドロプロテロイン酸合成酵素) の合成 浸透不良 PABAの産生過剰	腸内細菌群、ナイセリア菌、緑膿菌 嫌気性菌 ナイセリア属、黄色ブドウ球菌	
テトラサイクリン	薬物流出 テトラサイクリンからのリボソームの保護 不活性化	腸内細菌群、ブドウ球菌、連鎖球菌 連鎖球菌、フェカリス菌、ナイセリア菌、マイコプラズマ属 バクテロイデス・フラジリス内で見つかった潜在性遺伝子、大腸菌内での耐性発現	40
トリメトプリム	改変ターゲット部位又は代替ターゲット部位 (ジヒドロ葉酸還	腸内細菌群、コレラ菌、ブドウ球菌	

	元酵素) の合成 浸透不良 別経路使用能力 ジヒドロ葉酸還元酵素の產生過剩	綠膿菌 腸球菌 インフルエンザ菌
パンコマイシン	? ?ターゲット部位の封鎖	ペディオコッカス属、ロイコノストック属（内因性） 腸球菌（後天性）

Lorian, Antibiotics in Laboratory Medicine, Satterfield 編, Williams & Wilkins,
フィラデルフィア, pp. 558-559 (1991)

10

【0371】

1具体例において、本発明は、微生物の胞子の表面ペプチドに親和性を示す化合物を含む組成物であって、前記化合物が、様々な細菌種及び細菌株に由来するペプチドに親和力を示すものに関する。1具体例において、様々な細菌種は、大部分の抗生物質に耐性を有する。1具体例において、本発明の組成物は、安定な医薬製剤を含んでいる。1具体例において、前記製剤は、製薬上容認できるキャリヤーを更に含んでいてもよい。その上、前記製剤は、ヒト又は動物に投与してもよく、加工食品、医薬製剤、医薬用品及び医薬品、化粧品、衛生用品、洗浄剤及び清潔剤並びに前記組成物を散布又は付着できるあらゆる材料であって、望ましくはそのような材料上で微生物の胞子の付着やその後の増殖を阻止するものに組み込むことも可能であると考えられる。

20

【0372】

微生物の付着やその後の成長及び増殖を防ぐのに必要な本発明の組成物の正確な適用量は、たくさんの因子によって決まり、前記因子には、存在しうる細菌の種類、前記組成物が導入される環境、及び組成物が特定部位に残留すると想定される時間が挙げられる。

【0373】

しかも、本発明の組成物は、抗菌剤又は抗生物質と組み合わせて用いることでそれらの活性を高める可能性もあると考えられる。本発明の組成物と他の試薬との組み合わせは、毒性に関する問題に配慮して少ない投与量の抗生物質を用いる場合や、有効性が低下した抗生物質の活性を増強する場合、又は成分間に相乗効果を生じさせることで、組み合わせた方が各成分単独の有効性の合計よりも有効である場合に有用であり得る。

30

【0374】

発明の組成物と併用療法で組み合わせられる抗生物質としては、ペニシリン、アンピシリン、アモキシシリン、パンコマイシン、サイクロセリン、バシトラシン、セファロスボリン、イミペネム、コリスチン、メチシリン、ストレプトマイシン、カナマイシン、トブラマイシン、ゲンタマイシン、テトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、ドキシサイクリン、クロラムフェニコール、リンコマイシン、クリンダマイシン。エリスロマイシン、オレアンドマイシン、ポリミキシン、ナリジクス酸、リファマイシン、リファンピシン、ガントリシン、トリメトプリム、イソニアジド、パラ-アミノサリチル酸及びエタンプトールが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0375】

1具体例において、本発明は、例えば、抗生物質に対する細菌の耐性を低下させることにより又は微生物若しくは細菌を死滅させるために、抗菌剤に対する微生物の耐性を低下させることであって、一般には、有効量の抗生物質若しくは抗菌剤と、微生物の胞子の表面ペプチドに親和性を示す、ある量の組成物との組み合わせに微生物若しくは細菌を接触させて微生物若しくは細菌の付着及び/又はその後の増殖を阻止することにより抗菌剤に対する微生物の耐性を低下させることに関する。「微生物」と「細菌」という用語は、分かりやすくするために用いており、本発明が微生物集団への使用に適していることが分かるであろう。

【0376】

50

微生物（例えば、細菌）又はその集団には、インピトロ接触させても、インピボ接触させててもよい。インピボ接触は、微生物若しくは細菌に汚染されているか又は汚染された疑いのある動物（ヒト患者を含む）への投与で遂行でき、治療上有効量の製薬上容認できる製剤には、微生物の胞子の表面ペプチドに親和性を示す化合物のみを有する組成物、又は前記化合物と治療量の製薬上容認できる処方の抗生物質との組み合わせを有する組成物が含まれている。従って、本発明は、前記試薬の組み合わせを全身循環に導入することによつて或いは前記試薬の組み合わせを（例えば、傷口や熱傷部位又は目、耳若しくは他の感染部位等の特定部位に局所的に）適用することによって、全身性及び局所的な微生物及び細菌感染をいずれも治療するのに使用可能である。

【0377】

10

本発明の組成物を抗菌剤又は抗生物質と組み合わせて使用する場合、「有効量の抗菌剤又は抗生物質」とは、通常与えられる又は規定された範囲内の量（又は一回用量）を表す。このような範囲は、日常的臨床業務では十分に実証されているので、当業者には既知であろう。適切な一回用量及び処方計画については、本明細書中で更に詳述する。表XV参照。当然のことながら、微生物の胞子の表面ペプチドに親和性を示す化合物に最適な治療用量を確認する場合、最初の動物実験とその後の臨床試験は、当該技術分野で通常実施されているのと同様にして行われる（実施例II参照）。

【表 15】

汎用抗生物質と常用経口量の抗生物質投与量

抗生物質	投与量	
ペニシリンV	2	
Rugby (ジェネリック) V-cillin K	50 mg qid	
ジクロキサシリン Glenlawn (ジェネリック) Dynapen	250 mg qid	10
クロキサシリン (Tegopen) アモキシシリン Rugby (ジェネリック) Polymox Ampicillin Moore (ジェネリック) Polycillin		
オウグメンチン	Tid 250 mg 錠 チュアブルタイプ (250 mg) 125 mg (懸濁液) チュアブルタイプ (125 mg)	
カルビニシリソ	382mg qid (1錠) 2錠 qid	20
セファレキシン Rugby (ジェネリック) ケフレックス	250 mg qid	
Rugby (ジェネリック) ケフレックス	500 mg qid	
セファドロキシル Rugby (ジェネリック) Duricef	1 mg bid	
セフラジン Rugby (ジェネリック) Velosef	250 mg qid 500 mg qid	30
セファクロル Ceclor	250 mg tid	
セフロキシムアキセチル Ceftin	125 mg bid 250 mg bid 500 mg bid	
セフィキシム Suprax	400 mg q24h	
セフプロジル Cefzil	250 mg q12h	
ロラカルベフ (Lorabid)	200 mg bid	40
セフポドキシムプロキセチル (Vantin)	200 mg bid	
クリンダマイシン Cleocin	300 mg q8h	
TMP／SMZ バクトリム	1複効錠 bid	

セプトラ (ジェネリック)	
トリメトプリム Rugby (ジェネリック) Proprim	100 mg bid
エリスロマイシン (基剤) Abbott E-mycin (遅延放出性)	250 mg qid
ステアリン酸エリスロマイシン Rugby (ジェネリック)	250 mg qid
アジスロマイシン Zithromax	1 g を 1 度だけ ; 1 日目に 500 mg、そして 2~5 日目に 250 mg
クラリスロマイシン Biaxin	250 mg bid 500 mg bid
テトラサイクリン塩酸塩 Mylan Sumycin 250	250 mg qid
ドキシサイクリン Lederle (ジェネリック) ビブラマイシン	100 mg qd (初回量は 200 mg)
バンコマイシン バンコシン HCl	カプセル (経口で 125 mg q6h、経口溶液／粉末)
メトロニダゾール Rugby (ジェネリック) Fragyl	250 mg qid
ノルフロキサシン Noroxin	400 mg bid
シプロフロキサシン Cipro	250 mg bid 500 mg bid 750 mg bid
オフロキサシン フロキシン (Floxin)	200 mg bid 300 mg bid 400 mg bid
ロメフロキサシン Moxaquin	400 mg qid を 1 度

10

20

30

qid (1日4回)、tid (1日3回)、bid (1日2回)、qd (1日1回)、q4h (4時間毎)、
q6h (6時間毎) 及び q8h (8時間毎)

【0378】

提示した組成物及び / 又は当該組成物と他の抗菌剤との組み合わせを安全に使用するために必要なLD₅₀ / ED₅₀比は、LD₅₀(半数致死量)とED₅₀(半数効果用量)とを実験動物で求めて決定する。その後、臨床試験でその範囲を微調整して、被験者の最適用量を規定する。LD₅₀については、通常は阻害剤をマウス又はラットに(経口で又は腹腔内に)致死範囲を数回(通常4~5回)投与する。用量(mg/kg)を死亡率(%)に対してプロットし、死亡率50%での投与量をLD₅₀とする。ED₅₀も同様の方法で求める。

【0379】

臨床試験では、治療量は、患者への効用を最大限にし、同時に副作用又は随伴する毒性を最小限に抑えて決定される。治療量を本明細書に記載した範囲内で最適化するとき、臨床試験では、患者の不均一性という理由から前記範囲の上限を始点として用いない。少量の又は中程度の投与量から始めて、投与量を増加していくと、特定の患者又は患者の小集団で毒性又は有害反応を引き起こす可能性が制限される。大抵の有用な薬物が特定の患者にはある程度の望ましくない作用を生じさせることは周知の事実でもあるので、言うまでもないが、一部の副作用又は特定の毒性反応の存在自体で本発明の利用を制限するものではない。

【0380】

動物又は患者を併用療法で治療する場合、利用され得る各種の好適な処方及び処方計画

40

50

が存在する。例えば、胞子の表面ペプチドに親和性を示す化合物を含む組成物と少なくとも1つの追加の抗菌剤とを、動物に同時に（例えば、前記化合物と追加の薬剤とを含む单一処方の形で、又は最低2つの別個の製剤を用いて）投与してもよい。胞子の表面ペプチドに親和性を示す化合物を、追加の薬剤の前に動物に投与しても、又はその逆であってもよい。

【0381】

本発明の更なる具体例では、胞子の表面ペプチドに親和性を示す少なくとも1つの化合物と少なくとも1つの追加の抗菌剤及び／又は抗生物質とを含む医薬組成物を好適な容器手段に入れた、治療用キットが包含される。前記化合物、抗菌剤及び／又は抗生物質は、单一の容器手段に入れてもよく、又は複数の別個の容器を用いてもよい。

10

【0382】

抗菌剤は、環境に応じて、経口処方計画で用いても、非経口処方計画で用いてもよい。適切な一回用量を求める方法は、様々な刊行物に記載されている（Reese及びBetts, A Practical Approach to Infection Diseases, (第3版)、Boston, Little Brown, (1993)）。

【0383】

XII. 抗菌クレンザー組成物

抗菌クレンザー組成物は、一般に、使用者の腕や手を洗浄して、使用者の腕又は手に付いているかもしれない細菌及び任意の他の微生物を死滅させるのに用いられる。前記組成物は、ヘルスケア業界では、スタッフ職員同士又はスタッフ職員と患者との間の感染予防のために病院のスタッフや他の医療従事者に手洗いクレンザーとして広く用いられている。前記組成物は特に、医療従事者（例えば、外科医、看護師及び細菌と接触する恐れのある他の医療関係者等）が利用するに向いている。前記組成物はまた、外食産業及び食肉加工業界の職員が利用するのにも適しており、一般には、公共での手や腕の殺菌洗浄にも用いられている。

20

【0384】

クレンジング組成物に現在使用できる活性な抗菌剤はいくつか存在する。例えば、多くの抗菌クレンジング組成物には、ジグルコン酸クロルヘキシジン（CHG）等のビスピグアニド細菌物質が含まれている。別のクレンジング組成物は、フェノール化合物を用いている。ただし、これらの物質の抗菌作用は、一緒に用いられる界面活性剤又は他の成分の種類に左右されることが多く、そのため、これら抗菌物質と同じの成分を使用しても、必ずしも同じ結果が得られるわけではない。例えば、CHGを活性な抗菌剤として用いる場合、クレンジング組成物には主成分として、限定されないが、アルキルポリグリコシド及び非イオン性アルコールエトキシレートを含む場合がある。しかし、活性な抗菌剤としてパラクロロメタキシレノール（PCM_X；4-クロロ-3,5-ジメチルフェノール）等の置換フェノールを含む組成物中では、非イオン性アルコールエトキシレートは大抵、PCM_X抗菌作用を増強するよりも阻害する。PCM_Xは、グラム陽性菌とグラム陰性菌の初期減少だけでなく、真菌の初期減少も高める場合があり、数時間手を洗わなくても十分な残効性を付与することができる。一般に、クレンジング組成物にPCM_Xを用いる場合、約0.1-4質量%の濃度で使用する。しかし、大部分の処方では1質量%以下で含有されている。

30

【0385】

活性な抗菌剤として置換フェノールを含む抗菌クレンジング組成物には、更に、アニオニン性洗剤、セッケン、界面活性剤等だけでなく、フェノール化合物の抗菌作用を低下させる可能性のある他の化合物（非イオン性エトキシル化界面活性剤、ポリエチレングリコール等）も含まれている。置換フェノール化合物、アニオニン性界面活性消毒剤又はせっけんのアルコール液、そして水性キャリヤーもまた有用である。その上、エチレンジアミン四酢酸（以降、EDTAという）等のキレート剤が添加される場合もある（Winicovら、米国特許第3,824,190号及び再発行特許第28,778号：参照して本明細書に組み込む）。

40

【0386】

マイルドな特性を示す抗菌組成物は、限定されないが、置換フェノール（いわゆる、PC

50

MX)、アニオン性洗剤、増粘剤(例えば、エチレングリコールモノステアレート)及び発泡ビルダー(例えば、脂肪酸アルカノールアミド)を含む場合がある。増粘剤や脂肪酸アルカノールアミド並びにアニオン性界面活性剤は、フェノール化合物の抗菌作用を阻止する疑いがある(Garabedianら, 米国特許第4,632,772号: 参照して本明細書に組み込む)。別のPCM^X組成物は、界面活性剤混合物中に無水混合物を含んでいる(Cortiら, 米国特許第5,114,978号: 参照して本明細書に組み込む)。

【0387】

PCM^Xは、高濃度の水又は水性組成物に可溶化できる。PCM^X組成物としては、脂肪酸のジエタノールアミン、及びアルキルポリオキシエチル硫酸のジエタノールアミン塩等のアニオン性界面活性剤が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0388】

アルコール系抗菌組成物は、限定されないが、PCM^X又はCHG、ヒドロプロピルセルロース、アルコール、皮膚軟化剤及び水を含む場合がある。本発明の機構を理解することは必要ではないが、組成物中に溶媒又はキャリヤーとしてアルコールを用いると、皮膚を脱脂して、皮膚に乾燥や刺激作用を生じさせ得ることが分かっていると考えられる(Whiteら, 米国特許第5,288,486号: 参照して本明細書に組み込む)。

【0389】

従って、PCM^Xの微生物に対する有効性は、CHG及び他の置換フェノールと同様に、抗菌クレンザー組成物中に含まれるキャリヤーや他の化学成分に大きく左右される。PCM^Xは、キレート剤であるエチレンジアミン四酢酸(EDTA)及び/若しくは金属イオン封鎖剤であるヘキサメタリン酸ナトリウムを加えると、緑膿菌に対する抗菌作用が高まる場合があるが、一部の有機物質の存在下では緑膿菌に対する抗菌作用が減少し、そして/又はアニオン界面活性剤の濃度を抑えることもある。PCM^Xと、非イオン性界面活性剤、ポリエチレンギリコール及びポリエチレンギリコールステアレートとの間の可逆的相互作用が原因で、抗菌作用が失われる場合もある。同様に、PCM^Xの抗菌効力の低下は、様々な巨大分子(すなわち、メチルセルロース、ポリエチレンギリコール6000及びポリソルベート80)との相互作用が直接の原因であることも分かっている。

20

【0390】

本発明は、PCM^X及びCHGのような標準的な抗菌クレンザー組成物に限定されない。1具体例において、本発明は、置換フェノールを含む抗菌組成物であって、従来のアニオン性界面活性剤又は置換フェノールの抗菌作用に悪影響を及ぼす他の化学成分を含まないものに関する。1具体例において、抗菌クレンジング組成物は、置換フェノールと少なくとも1つの一次界面活性剤とを含んでいる。1具体例において、前記組成物は、置換フェノールを組成物全体の約0.1-約4質量%の量、好ましくは組成物全体の約0.3-1質量%の量で含んでいる。1具体例において、前記組成物は、置換フェノールを、抗菌剤の4質量%超の量で含んでいる。本発明の機構を理解することは必要ではないが、抗菌剤の上限量は、皮膚に対し毒性も刺激もないと考えられている置換フェノールの量と関連していると考えられる。

30

【0391】

本発明の組成物には、水又は他の非アルコール溶剤(例えば、トリエチレンギリコール、ポリプロピレングリコール、ヘキシレングルコール等)に溶解するあらゆる置換フェノールを使用してよい。1具体例において、置換フェノールとしては、アルキル置換フェノール、ハロゲン置換フェノール、フェノール置換フェノール、アルキルハロ置換フェノール、ベンジルアルキル置換フェノール、フェニルエチルアルキル置換フェノール及びベンジルハロ置換フェノール、アルキル置換ビスフェノール、ハロゲン置換ビスフェノール及びアルキルハロ置換ビスフェノール、ビス(ヒドロキシフェニル)アルカン、アミノ置換フェノール、レゾルシノール誘導体、三価フェノール誘導体、ナフトール誘導体並びにカルボン酸置換フェノール(例えば、サリチル酸及びサリチル酸エステル)を挙げができるが、これらに限定されない。1具体例において、置換フェノールには、クロロ置換フェノール、すなわちパラクロロメタキシレノール(PCM^X)が含まれる。本発明の機構を理

40

50

解することは必要ではないが、PCMXは、様々な細菌に対する抗菌作用が非置換フェノールの60倍である可能性があり、しかも、約3質量%未満の濃度ではヒト皮膚に対し毒性も刺激もないとみなすものと考えられている（Fendlerら、米国特許第5,635,462号（発明の名称：抗菌クレンジング組成物）：参照して本明細書に組み込む）。

【0392】

1具体例において、本発明の感染制御クレンザー組成物には、限定されないが、アミンオキシド、リン脂質、部分的に中和されたカルボン酸及び二塩基酸、ベタイン、又はエトキシリ化メチルグルコシド、並びに／又はこれらの混合物を包含する群からなる群より選択される、少なくとも1つの一次界面活性剤が含まれている。本発明の機構を理解することは必要ではないが、本発明の組成物に添加される一次界面活性剤の量は、添加される一次界面活性剤の数にいくらか左右されると考えられる。1具体例において、前記組成物は、複数の一次界面活性剤を含んでおり、前記一次界面活性剤の合計量は、組成物の約20質量%未満である。10

【0393】

1具体例において、前記組成物は、一次界面活性剤を含んでおり、例えばアミンオキシド又はアルキルアミンオキシドが挙げられるが、これらに限定されない。1具体例において、アミンオキシドは、前記組成物に約0（含まず）-約10質量%までの量、好ましくは約5-7質量%までの範囲の量で添加される。1具体例において、組成物は、アミンオキシドを唯一の一次界面活性剤として含んでおり、当該アミンオキシドは約1-約10質量%までの量で添加される。1具体例において、アミンオキシドのアルキル鎖長は約C₈-C₁₆であるが、鎖長はC₁₂-C₁₄である。20

【0394】

本発明の機構を理解することは必要ではないが、本発明に関するアミンオキシドは両性界面活性とみなすものと考えられる。本発明に好適であると認められるアミンオキシドの例としては、ラウラミンオキシド・C₁₂アルキルアミンオキシド（Mackamine LO（登録商標））及びコカミンオキシド・C₁₂-C₁₄アルキルアミンオキシド（Mackamine CO（登録商標））（McIntire Chemical Co. Ltd.、イリノイ州市シカゴ）、並びにC₁₄アルキルアミンオキシド（Barlox 14（登録商標））及びC₁₂アルキルアミンオキシド（Barlox 12（登録商標））（Lonza、ニュージャージー州フェアーレーン）が挙げられるが、これらに限定されない。或いは、本明細書で検討している組成物には、アミドプロピルアミンオキシドが適しており、Standamox LAO（登録商標）又Mackamine CAO（登録商標）（Henkel Corp.、ニュージャージー州ホーボーケン）が挙げられるが、これらに限定されない。30

【0395】

さらに、コカミド等のアルキルアミドをアミンオキシド又は他の一次界面活性剤と併用して、発泡を促進し、そして組成物の粘度を増大してもよい。粘度調整剤及び／又は発泡安定化剤としては、Standamine CD（登録商標）、Standamine SD（登録商標）及びCocamide DEA（登録商標）（Henkel Corp.、ニュージャージー州ホーボーケン）を挙げができるが、これらに限定されない。

【0396】

本発明の機構を理解することは必要ではないが、アミンオキシドは、置換フェノールの抗菌作用をそれほど抑制せず、しかも、PCMXと組み合わせて微生物を死滅させるのにも有効だと分かっているものと考えられる。40

【0397】

1具体例において、本発明は、リン脂質及びベタイン等の双性イオン／両性界面活性剤を一次界面活性剤として含む感染制御組成物を意図するものである。1具体例において、リン脂質及び／又はベタインは、アミンオキシドの代わりに使用しても、アミンオキシドと併用してもよい。1具体例において、前記組成物は、リン脂質とベタインを約10質量%までの量で含んでいてよい。

【0398】

1具体例において、感染制御クレンザー組成物は、アルキルホスファチジルPG-ジモニ50

ウムクロライドリンを含む脂質を含んでなる。1具体例において、アルキルホスファチジルPG - ジモニウムクロライドは、コカミドプロピルホスファチジルPG - ジモニウムクロライド(Phospholipid PCT(登録商標) : MONA Industries, Inc.、ニュージャージー州ピーターソン)、ステアラミドプロピルホスファチジルPG - ジモニウムクロライド(Phospholipid PTS(登録商標) : MONA Industries, Inc.)、リノレアミドプロピルホスファチジルPG - ジモニウムクロライド(Phospholipid EFA(登録商標) : MONA Industries, Inc.)及びステアラミドプロピルホスファチジルPG - ジモニウムクロライド / セチルアルコール(Phospholipid SV(登録商標) : MONA Industries, Inc)からなる群より選択される。1具体例において、アルキルホスファチジルPG - ジモニウムクロライドが、組成物に、組成物全体の0(含まず) - 約10質量%までの範囲の量で配合される。

10

【0399】

1具体例において、本発明は、ベタイン脂質を一次界面活性剤として単独で又は他の一次界面活性剤と併用して含む、感染制御クレンザー組成物を意図するものである。1具体例において、ベタイン脂質には、炭素原子数8 - 18までのアルキルアンモニオカルボキシレートが含まれている。1具体例において、前記組成物は、組成物全体の最大10質量%を占めるアルキルアンモニオカルボキシレートを含んでいる。1具体例において、アルキルアンモニオカルボキシレートは、ココベタインを含んでいる(Mackam CB-35(登録商標) : Macintyre Chemical Co.、イリノイ州シカゴ)。

【0400】

1具体例において、本発明は、一次界面活性剤として使用可能な、少なくとも1つの部分的に中和されたカルボン酸及び/又は二塩基酸(例えば、乳酸カプロイルナトリウム)の混合物を含む、感染制御クレンザー組成物を意図するものである。1具体例において、カルボン酸及び/又は二塩基酸は、前記クレンジング組成物に0(含まず) - 約5質量%までの量で添加される。本発明の機構を理解することは必要ではないが、部分的に中和されたカルボン酸及び二塩基酸はアニオン性界面活性剤をいくらか含有していてよいが、アニオン性界面活性剤は十分にプロトン化した酸特徴を有しているため、「従来のアニオン性界面活性剤」という用語からは明らかに除外されると考えられる。

20

【0401】

1具体例において、本発明は、非イオン性一次界面活性剤を含む感染制御組成物を意図するものである。1具体例において、非イオン性一次界面活性剤には、エトキシリ化イオン性メチルグルコシドが含まれる。1具体例において、エトキシリ化非イオン性メチルグリコシドが、組成物に0(含まず) - 約10質量%までの量で添加され得る。

30

【0402】

組成物は、また、他の添加物、例えば、増粘剤、皮膚軟化剤、キレート剤及び金属イオン封鎖剤、香料、着色剤、乳白剤、真珠光沢剤、ビタミン等を含んでいてもよい。例えば、組成物に高分子増粘剤又は増粘剤(例えば、ヒドロキシエチルセルロース)を加えることで、組成物を審美的に美しくしてもよい。他の好適な高分子増粘剤の例としては、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース及びカルボキシメチルセルロースが挙げられるが、必ずしもこれらに限定されない。

【0403】

40

グリコールは、置換フェノールの溶解速度を増強するために皮膚軟化剤及び/又は保湿剤として添加してもよい。グリコールとしては、プロピレングリコール、トリエチレングリコール及びヘキシレングリコールが挙げられるが、これらに限定されない。グリコールは、組成物に、組成物全体の0(含まず) - 約10質量%までの量で、更に好ましくは約3質量%の量で添加してよい。1具体例において、PCMx及び/又は別の置換フェノールをグリコールの少なくとも一部に溶解してから、この溶液に他の成分を添加する場合もある。1具体例において、組成物は、PCMx : グリコールを25% / 75%の割合で含む。

【0404】

1具体例において、本発明は、キレート剤及び/又は金属イオン封鎖剤を最大約1質量%含む感染制御クレンザー組成物を意図するものである。本発明の機構を理解することは

50

必要ではないが、キレート剤及び／又は金属イオン封鎖剤は水性組成物を軟化するために添加され得ると考えられる。1具体例において、本発明に好適なキレート剤には、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)(例えば、EDTA二ナトリウム)が含まれる。

【0405】

本発明の組成物は、更に、少量だが有効量の他の従来の添加物、例えば、香料、着色料、乳化剤、真珠光沢剤、ビタミン等を含んでいてもよい。特別な真珠光沢剤の例としては、エチレングリコールジステアレートが挙げられるが、必ずしもこれに限定されない。一般に、これら添加物は、前記組成物の感染制御特性に関する基本的性質を損なわない量で用いられる。

【0406】

最適な抗菌効力に關し、組成物のpHは4-8、好ましくは5.5-6.5であろう。組成物のpHを調節するために、組成物の成分と相溶する任意の酸を使用してよい。酸としては、乳酸、クエン酸、酢酸、グリコール酸又はグルコン酸を挙げることができるが、これらに限定されない。一般に、これらの酸を1質量%未満用いると、適正なpHバランスが得られる。

【0407】

組成物の残りの成分は、通常、組成物を100質量%とするための水であるが、他の水溶性化合物でも適している(例えば、アルコール)。

【0408】

本明細書に示す質量百分率は全て、活性な組成物の割合に基づいている。そのため、例えば5質量%ラウラミンオキシドを使用し、ラウラミンオキシドをメーカーから入手するか又は30%活性溶液となるように溶液希釈した場合、推奨される5質量%を手に入れるために16.7%の溶液を用いる必要がある。

【0409】

本発明の感染制御組成物は、一般に、置換フェノール、すなわちPCMXを前述のようにグリコールに溶解し、この溶液を前記一次界面活性剤のうち1つ以上に水中で添加して調製する。特に、一次界面活性剤又は界面活性剤及び他の成分(すなわち、例えば香料、キレート剤、真珠光沢剤等)は、前記溶液に攪拌しながら添加する。組成物のpHは、乳酸又は同様の酸で調節する。その後、好ましくは、シックナー／増粘剤を加えて、溶液を完全に均質化するまで混合する。pHをチェックし、必要があれば再度調節する。必要あがれば、このプロセスを加熱しながら又は加熱せずに増粘剤の水和を増強させてもよい。

【0410】

XIII. 胞子の表面タンパク質ヌクレオチド配列を含む微生物の検出

本発明は、胞子の表面タンパク質ヌクレオチド配列(例えば、配列番号2)及び／又は胞子の表面タンパク質ヌクレオチド配列(例えば、配列番号4、6又は8)を含む微生物の検出方法を提供する。ヌクレオチド配列を含む微生物は、様々な手段で同定可能である。これら手順としては、DNA-DNA又はDNA-RNAハイブリダイゼーション、並びにDNAプローブ(例えば、オリゴヌクレオチド又はオリゴマープローブ若しくはアンプライマー)、mRNAプローブ及び対象配列のフラグメントを用いた增幅(例えば、PCR)が挙げられるが、これらに限定されない。これらプローブ及びフラグメントは、多種多様な技術を用いて作製することが可能であり、化学合成、制限消化及び発現ベクター中のヌクレオチド配列若しくはそのいずれか一部の発現が挙げられるが、これらに限定されない。合成又は発現プローブとヌクレオチド配列フラグメントは、オリゴ標識化、末端標識化、又は標識化ヌクレオチドを用いたPCR增幅を利用して標識化してよい。

【0411】

生成した標識化プローブを用いる場合、単離したプラスミド全細胞DNAのサザン解析又はその逆のノーザン解析を用いるか又はmRNAのノーザン解析を用いて、ヌクレオチド配列の存在下で生体サンプルに含まれている微生物を試験することが可能である。微生物はそのまま又は一晩培養してから、フィルター上で増殖させるか又はフィルターにスポット配置してよい(Moseleyら, J. Infect. Dis. 142: 892-898 (1980); Perineら, J. Infect.

10

20

30

40

50

Dis. 152(1): 59-63 (1985); 及びGootzら, Antimicrob. Agents and Chemother 28(1): 69-73 (1985)。簡潔に言えば、ニトロセルロース紙若しくはナイロン膜等の固体担体に、臨床検査材料を播種するか、又は細菌を含む疑いのある臨床検査材料のプロス培養を播種する。細胞をニトロセルロース紙上で溶解させて、例えば、NaOHで処理する等によってDNAを変性させた。担体は、プロナーゼとクロロホルムで処理して、DNAプローブヒコロニー素材とのバックグラウンド非特異的結合を減弱させる。次いで、標準的な技法を用いてフィルター(すなわち、担体)とオリゴヌクレオチド、オリゴマー又は部分ヌクレオチド配列とのプレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションを行う。ハイブリダイゼーションは、X線フィルムを用いた放射活性プローブの画像処理(すなわち、オートラジオグラフィー)等の多数の利用可能な方法のいずれか一つを利用して検出する。

10

【0412】

表面から得た試料に微生物の胞子の表面タンパク質ヌクレオチド配列を寄生させる細菌を検出することで、微生物の胞子の表面タンパク質と表面との結合を変化させる感染制御組成物を投与することが有益である、と実証される。その上、このような検出は、感染制御組成物の投与中や投与後に細菌の有無について表面をモニターすることも可能にする。

【0413】

1具体例において、本発明に関するスクリーニング法(すなわち、例えば分析法)は、分析試料の1つ以上の成分が固体表面に付着している固相中で行うことが可能である。固相分析では、分析試料の1つ以上の成分が固体表面に付着している。表面の物質が分析試薬と相溶し、しかも分析成分の反応性を必要以上に変化させずに当該成分を表面に付着できるのであれば、ほぼ全ての固体表面が適している。一部の成分は、固相中で活性の低下を示す可能性があるが、感染制御試験化合物と相互作用するのに十分な活性があれば、一般に許容される。

20

【0414】

固体担体には、基本的にあらゆる固体表面が含まれ、ガラス玉、平面ガラス、細孔制御ガラス、プラスチック、多孔質プラスチック、金属、又は分子を付着できる樹脂が挙げられるが、これらに限定されない。固体担体は、官能基(例えば、ヒドロキシル、アミン、カルボキシル、エステル及びスルフヒドリル)で誘導体化して反応部位にリンカーを付着させるか又は成分を直接付着させることができる。

【0415】

30

分析試料成分(例えば、胞子の表面タンパク質)の固体担体への付着は、直接的であっても、間接的であってもよい(すなわち、特定の化合物が担体と結合しており、分析試料成分は、固体担体とよりもこの化合物と結合する)。前記成分は、次のいずれかによって固定することができる。i) 共有的に固定する(例えば、タンパク質成分を固定する場合は、システインの反応性チオール基を利用して共有的に固定する; Colliuodら, Bioconjugate Chem. 4: 528-536 (1993))、ii) 非共有的だが特異的に固定する(例えば、固定した抗体又は他の特異的結合タンパク質によって非共有的だが特異的に固定する; Schumannら, Adv. Mater. 3: 388-391 (1991); 及びLuら, Anal. Chem. 67: 83-87 (1995))、iii) ビオチン/ストレプトアビシン系によって固定する(Iwaneら, Biophys. Biochem. Res. Comm. 230: 76-80 (1997))、iv) 金属キレート・ラングミュアーブロジェット膜を用いて固定する(Ngら, Langmuir 11: 4048-4055 (1995); 及びSchmittら, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35: 317-320 (1996))、並びにv) ポリヒスチジン融合タンパク質と結合する場合は、金属キレート自己組織化膜を用いて固定する(Sigalら, Analytical Chem., 68:490-497 (1996))。

40

【0416】

XIV. 胞子の表面タンパク質を含む微生物の検出

1具体例において、本発明は、微生物の胞子のタンパク質及び/又はペプチドフラグメントを検出する工程を含む方法を意図するものである。1具体例において、微生物の胞子のタンパク質及び/又はペプチドフラグメントには、微生物の胞子の表面タンパク質及び/又はペプチドフラグメントが含まれる。1具体例において、微生物の胞子の表面タンパ

50

ク質及び／又はペプチドフラグメントには、クロストリジウム属菌の胞子の表面タンパク質及び／又はペプチドフラグメントが含まれる。1具体例において、クロストリジウム属菌の胞子の表面タンパク質及び／又はペプチドフラグメントには、クロストリジウム・ディフィシレの胞子の表面タンパク質及び／又はペプチドフラグメントが含まれる。

【0417】

任意の発生源から得たタンパク質及び／又はペプチドフラグメントは、様々なふさわしい方法で検出してよい。一部の実施形態において、タンパク質及び／又はペプチドフラグメントは、免疫組織化学法によって検出される。他の実施形態において、タンパク質及び／又はペプチドフラグメントは、タンパク質に対する抗体と結合することで検出される。

【0418】

抗体結合は、多種多様な技法で検出可能であり、例えば、ラジオイムノアッセイ、ELISA(酵素結合性免疫吸着検定法)、「サンドイッチ」免疫測定法、免疫放射定量測定法、ゲル内沈降反応、免疫拡散法、現場イムノアッセイ(例えば、金コロイド、酵素又は放射性同位元素標識を使用する)、ウェスタンプロット法、沈降反応法、凝集検定法(例えば、ゲル凝集反応、血球凝集検定法等)、補体結合法、免疫蛍光検査法、タンパク質Aアッセイ及び免疫電気泳動法が挙げられるが、これらに限定されない。

【0419】

1具体例において、抗体結合は、一次抗体上で標識を検出することで検出される。別の実施形態において、一次抗体は、二次抗体又は試薬と一次抗体との結合を検出することで検出される。更なる実施形態において、二次抗体を標識化する。

【0420】

一部の実施形態において、自動検出法を用いる。自動免疫測定法としては、米国特許第5,885,530号、同第4,981,785号、同第6,159,750号及び同第5,358,691号に記載の方法が挙げられる(各特許を、参照して本明細書に組み込む)。いくつかの具体例では、結果の解析と表示も自動化する。例えば、一部の実施形態において、癌マーカーに相当する一連のタンパク質の有無に基づいて予測をする、ソフトウェアを利用する。

【0421】

他の実施形態において、免疫測定法は、米国特許第5,599,677号及び同第5,672,480号に記載されている(各特許を、参照して本明細書に組み込む)。

【0422】

他の具体例では、本発明は、タンパク質及び／又は核酸を検出及び特性評価するためのキットを提供する。一部の実施形態において、キットには、検出試薬と緩衝液の他に、対象遺伝子から発現したタンパク質に特異的な抗体が収容されている。別の実施形態において、キットには、mRNA又はcDNAの検出に特異的な試薬(例えば、オリゴヌクレオチドプローブ又はプライマー)が収容されている。好みしい実施形態において、キットには、全ての対照群、アッセイ実施説明書、及び結果の解析と表示に必要な任意のソフトウェアを含む、検出分析を行うのに必要な要素が全て収容されている。

【0423】

XV. 医薬製剤

本発明の活性組成物には、従来の医薬製剤が包含されていてよい。本発明によるこれら製剤は、ターゲット組織が入手できるのであれば、どのような一般経路からも投与できる。これには、局所投与、経口投与、鼻腔投与、口腔投与、直腸投与、腔内投与又は局所投与が挙げられる。別法としては、同所注入、皮内注射、皮下注射、筋肉注射、腹腔内注射又は静脈注射によって投与されてもよい。このような製剤は、通常、製薬上容認できる組成物として投与されよう。

【0424】

A. 経口又は非経口投与用溶液

本発明に関する前記製剤、組成物、並びに他の試薬及び薬剤は、活性な化合物であってよく、非経口投与しても経口投与してもよい。遊離塩基又は製薬上容認できる塩としての活性な化合物の溶液は、ヒドロキシプロピルセルロース等の界面活性剤が適切に混合され

10

20

30

40

50

た水中で調製することが可能である。分散液は、グリセロール中、液体ポリエチレングリコール中及びこれらの混合物中、並びにオイル中でも調製可能である。通常の貯蔵及び使用条件下では、これら製剤に防腐剤を加えてもよい。

【0425】

注入に適した医薬製剤としては、滅菌水溶液又は分散液、及び無菌注射剤若しくは分散液を即時調製するための滅菌粉末が挙げられるが、これらに限定されない。1具体例において、前記製剤は滅菌状態にある。1具体例において、前記製剤は、シリンドリを用いて操作し易いように流動特性を備えている。1具体例において、前記製剤は、製造及び／又は貯蔵条件下で安定である。1具体例において、前記製剤はまた、溶剤又は分散媒体等のキャリヤーを含んでいてもよく、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール及び液体ポリエチレングリコール等）、好適なこれらの混合液、並びに植物油が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、レシチン等のコーティング剤を用いて適度な流動性を維持してもよく、また、分散液の場合は要求される粒径の維持や界面活性剤の使用によって適度な流動性を維持してもよい。微生物の作用は、様々な抗菌剤及び抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサール等）で制御してよい。多くの場合、等張剤（例えば、糖類又は塩化ナトリウム）を包含するのが好ましい。組成物に吸収遅延剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチン）を加えることで、注射用組成物の吸収を遅延させることも可能である。10

【0426】

無菌注射溶剤は、必要量の活性な化合物を、必要に応じて先に挙げた他の様々な成分と共に好適な溶剤に混入させた後、滅菌する（例えば、濾過、放射線及び／又はエチレンオキサイド暴露による）ことで調製してよい。一般に、分散液は、様々な滅菌活性成分を、基本分散媒体と先に挙げたものから選択される他の必須成分とを含む滅菌溶媒に混入することで調製され得る。無菌注射溶剤調製用の滅菌粉末の場合、好ましい調製法は真空乾燥法及び凍結乾燥法であって、これらによって、活性成分と任意の所望の追加成分とを併せた粉末が、それらを含む予備滅菌濾過溶液から得られる。20

【0427】

経口投与の場合、微生物の胞子の表面タンパク質に親和性を示す本発明の組成物は、賦形剤が組み込まれていてもよく、また、摂取不可のマウスウォッシュ及び歯磨き剤の形態で用いてもよい。マウスウォッシュは、必要量の活性成分をホウ酸ナトリウム溶液（すなわち、例えばドーベル液）等の適切な溶剤に混入させて調製され得る。別法としては、活性成分を、ホウ酸ナトリウムとグリセリンと重炭酸カリウムとを含む殺菌洗浄剤に混入してもよい。活性成分は、歯磨き剤に分散してもよく、歯磨き剤には、ゲル状、ペースト状、粉末状及びスラリー状のものが挙げられる。活性成分を治療上有効な量で歯磨きペーストに添加してもよく、歯磨きペーストには、水、結合剤、研磨剤、香味料、発泡剤及び保湿剤が含まれていてよい。30

【0428】

本発明の組成物は、中性又は塩の形態で処方してもよい。製薬上容認できる塩としては、酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ酸から形成されるもの）が挙げられ、例えば、塩酸若しくはリン酸等の無機酸、又は酢酸、シウ酸、酒石酸若しくはマンデル酸等の有機酸から形成される。遊離カルボキシル基から形成される塩は、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム又は水酸化第二鉄等の無機塩基、及びイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカイン等の有機塩基から得ることも可能である。40

【0429】

調製後の溶液は、剤形にふさわしい方法でかつ治療上有効な量で投与する。製剤は、注射溶剤、薬物放出カプセル等の様々な剤形で簡単に投与される。投与経路は、静脈内、動脈内、口内、腹腔内、筋肉内、皮下、経口、局所、直腸、膣内、鼻腔及び眼内から選択可能である。

【0430】

10

20

30

40

50

水溶液の非経口投与では、例えば、溶液を必要に応じて適切に緩衝剤処理して、得られた希釈液を先ず十分な生理食塩水又はグルコースで等浸透圧にする必要がある。これら特殊な水溶液は特に、静脈投与、筋肉内投与、皮下投与及び腹腔内投与に適している。これに関連して、使用可能な滅菌水性媒体は、本開示内容を考慮すれば当業者には分かるであろう。例えば、1回用量をNaCl等張液1mlに溶解して、それを皮下注入液1000mlに添加するか又は候補に挙げた注入部位に注射してよい(Remington's Pharmaceutical Science , 15版, 1035-1038頁及び1570-1580頁(参照して本明細書に組み込む))。投薬量は、処置を受ける対象の状態に応じて必然的にいくらか変動する。いずれにしても、投与責任者が、対象それぞれに適切な投与量を決定することができる。さらに、ヒトに投与する場合、製剤は、米国食品医薬品局の生物製剤基準(FDA Office of Biologics standards)に義務付けられている滅菌性基準、発熱性基準、一般的安全性基準及び純度基準を満たす必要がある。

10

【0431】

B . 局所又は非経口投与用リポソーム

1具体例において、本発明は、微生物の胞子の表面タンパク質に親和性を示す化合物を含有するリポソーム製剤を含む処方を意図するものである。1具体例において、前記化合物はリポソームで被包されており、その場合、化合物の耐用年数が従来のドラッグデリバリーシステムよりも長くなる。

【0432】

「リポソーム」は、封入された脂質二重層の創出によって形成される様々な単層脂質小胞及び多重膜脂質小胞を含む総称として一般に用いられている。例えばリポソームを調製するのにリン脂質を用いてもよく、また、リン脂質は、正味の正電荷若しくは正味の負電荷を有していても、中性であってもよい。リン酸ジセチルを用いると、リポソームに負電荷を与えることができ、また、ステアリルアミンを用いると、リポソームに正電荷を与えることができる。リポソームは、リン脂質二分子膜と内部水媒体を特徴とする場合がある。多重層リポソームは、水媒体で分離された複数の脂質層を有している。リポソームは、通常、リン脂質を過剰の水溶液に懸濁させると自然に生じる。本発明の機構を理解することは必要ではないが、脂質成分は、閉鎖構造を形成する前に自己再構成して、脂質二重層間に水と溶解溶質を取り込むものと考えられる(Ghoshら, 「特異受容体とリガンドとを用いた、肝疾患を対象とした診断法及び治療法」, Wo G. 及びWu C. 編、ニューヨーク, Marcel Dekker, 87-104頁, (1991))。さらに、カチオン性脂質-核酸複合体、例えば、リポフェクタミン-核酸複合体も考えられる。本発明の特定の実施形態において、リポソームは、センダイウィルス(HVJ)と複合体を形成する可能性がある。HVJは、細胞膜との融合を促して、細胞を侵入し易くすることが分かっている(Kanedaら, J. Biol. Chem. 264: 12126-12129 (1989))。

20

【0433】

本発明によるリポソームの作製に好適な脂質は、市販供給源から入手可能である。例えば、ジミリストチルホスファチジルコリン(DMPC)はSigma Chemical Co.から入手可能であり、リン酸ジセチル(DCP)はK & K Laboratories(ニューヨーク州ブレーンヴュー)から入手され、コレステロール(Chol)はCalbiochem-Behringから入手され、ジミリストチルホスファチジルグリセロール(DMPG)及び他の脂質は、Avanti Polar Lipids, Inc.(アラバマ州バーミンガム)から入手可能である。脂質のクロロホルム貯蔵液、クロロホルム/メタノール貯蔵液又はt-ブタノール貯蔵液は、約-20°で貯蔵可能である。クロロホルムはメタノールよりも蒸発し易いので、最適な溶媒として好ましく用いられる。

30

【0434】

天然源由来のリン脂質、例えば、卵若しくは大豆ホスファチジルコリン、脳ホスファチジン酸、脳又は植物性フォスファチジルイノシトール、心臓カルジオリビン、並びに植物性若しくは細菌性フォスファチジルエタノールアミンは、産生されるリポソームが不安定で漏出し易いので、できれば一次ホスファチド(すなわち、リン脂質組成物全体の50%以上を構成するもの)として使用しない。

40

50

【0435】

本発明によって用いられるリポソームは、様々な方法で製造され得る。リポソームの寸法は合成方法に応じてさまざまである。水溶液に懸濁されたリポソームは、一般に、球形の小胞形態であり、脂質二分子層から構成される1層以上の同心円層を有している。各層は、式X-Yで表される分子の平行アレイで構成されている（式中、Xは親水性部分であり、Yは疎水性部分である）。水性懸濁液中では、同心円層を編成することで、親水性部分は水層と接触したままになる傾向があり、また、疎水性領域は自己会合する傾向がある。例えば、水層がリポソームの内側と外側の両方に存在するとき、脂質分子は、X-Y-Y-Xと配置された、ラメラとしても知られる二分子膜を形成する。

【0436】

10

本発明の範疇にあるリポソームは、多数の実験技術によって調製され得る。1具体例において、リポソームは、リポソーム脂質を容器（例えば、ガラス製の梨型フラスコ）内で溶剤に混合することで調製される。容器は、予想されるリポソーム懸濁液の体積より10倍超大きな容積のものでなければならない。ロータリーエバボレータを用いて、溶剤を約40で減圧除去する。溶剤は通常、リポソームの所望の体積に応じて約5分-2時間で除去される。組成物は、デシケータ内で更に真空乾燥してもよい。乾燥した脂質は経時劣化し易いので、一般に約1週間後には廃棄する。

【0437】

20

乾燥した脂質は、脂質膜が全て再懸濁するまで振盪することで、発熱物質を含まない滅菌水中に約25-50mMリン脂質で水和してよい。この水性リポソームを次に等分に分けて、それぞれバイアル瓶に入れて凍結乾燥し、そして真空密封してもよい。

【0438】

別法では、上記以外の手順に従ってリポソームを調製してもよい（Banghamら，J. Mol. Biol. 13: 238-252 (1965)；Gregoriadis（編），「生物学及び医学における薬物担体」，287-341頁（1979）；Deamerら，「リポソームの調製：方法とメカニズム」，Liposomes, M.Ostro編（1983）；及びSzokaら，Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 75: 4194-4198 (1978)：全ての内容を、参照して本明細書に組み込む）。これらの方法は、水性材料の取り込み能力や、それぞれの水性空間と脂質との割合が異なる可能性がある。

【0439】

30

上述のようにして調製された乾燥脂質又は凍結乾燥リポソームは、核酸溶液中で再構成し、そして好適な溶剤（例えば、DPBS）で適切な濃度まで希釈してよい。続いて、この混合液をボルテックスミキサーで激しく震盪する。被包されていない核酸を29,000×gで遠心分離して取り除いて、リポソーム沈殿物を洗浄する。洗浄したリポソームを再懸濁して、適切な総リン脂質濃度（例えば、約50-200mM）にする。被包された核酸の量は、標準的な方法で測定できる。リポソーム調製で被包された核酸の量を測定した後、リポソームは、適切な濃度まで希釈して、使用するまで4で貯蔵してよい。

【0440】

40

1具体例において、脂質ジオレオイルホスファチジルコインを用いてリポソーム製剤を製造する。1具体例において、微生物の胞子の表面ペプチドに親和性を示す組成物を、過剰t-ブタノール存在下で脂質と混合する。この混合液は、ボルテックス混合した後、アセトン／ドライアイス浴で凍結させた。凍結した混合物を凍結乾燥させて、HEPES緩衝食塩水（1mM HEPES、10mM NaCl、pH7.5）で一晩水和してから、リポソームを浴槽式超音波処理器で10-15分間超音波処理した。ペプチド-リポソームの寸法は、サブミクロン粒径分析計・自動希釈モデル370（Nicomp.、カリフォルニア州サンタバーバラ）で測定すると、通常は直径200-300nmである。

【0441】

胞子の表面ペプチドに親和性を示す感染制御組成物を含む、精製した組成物は、それ以上手を加えずに使用してもよいが、製薬上容認できるキャリヤーで希釈してもよい。感染制御組成物は、単独で使用しても、他の抗菌薬と組み合わせて使用してもよい。組成物は安定しているので、本発明によりヒト又は動物に投与してもよく、加工食品、医薬製剤、

50

医薬用品及び医薬品、化粧品、衛生用品、洗浄剤及び清潔剤並びに前記組成物を散布又は付着できるあらゆる材料であって、望ましくはそのような材料上で微生物の胞子の付着やその後の増殖を阻止するものに組み込むことも可能であると考えられる。

【実施例】

【0442】

以降の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために挙げている。これら実施例は、本発明の特定の実施形態を実施できる方法を表すものである。ただし、開示する特定の実施形態では多数変更することも可能であり、それら変更により、本発明の精神及び範囲を逸脱することなく同等の又は同様の結果を得ることも可能である。

【0443】

10

[実施例I]

胞子の表面ペプチドの合成

本発明に係る胞子の表面ペプチドは、ペプチド合成装置 (Applied Biosystems製モデル433A) 及びFastmoc法を用いて、0.1 mM規模で合成することが可能である。ペプチドは、Vydac 218TP1022 (2.2 × 250 mm) カラムを使用するWaters Delta Prep上での逆相HPLCで精製してもよい。分離は、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液（溶媒A）及び0.085%トリフルオロ酢酸含有100%アセトニトリル（溶媒B）のグラジエントシステムで行う。Bが0 - 100%までの線形グラジエントを70分間適用し、0.2分毎に画分を採取する。画分を、その後、Vydac 218T54 (4.6 × 250 mm) カラムを使用するBeckman Gold System上での逆相HPLCにより、定組成溶離条件下、流量0.5 ml / 分でモニターする。選択画分を併せて凍結乾燥し、そして質量分析法と毛管電気泳動法によってペプチドを更に特性評価する。質量測定は、フローインジェクション法により、エレクトロスプレーイオン化源を装備したHewlett-Packard モデル1100 MSDを用い、0.05%トリフルオロ酢酸含有64%アセトニトリル中、0.1 ml / 分のフローインジェクションで行う。

20

【0444】

毛管電気泳動法は、75 μm (ID) × 8.5 cm (全長) の拡張光路溶融シリケートカラムを備えるHewlett-Packard 3D装置で行う。毛管電気泳動実験は、18において100 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.9) 中、20,000 Vで行う。ペプチド濃度は、定量的アミノ酸分析法によってBeckman 6300アミノ酸アナライザーで測定する。

【0445】

30

[実施例II]

細菌株及び胞子の調製

次のクロストリジウム・ディフィシレ菌株を使用した (ATCC 700057、ATCC BAA-1382 (菌株630)、ATCC 43594及びATCC 9689)。胞子嚢は、ブルセラ菌培養 - 血液寒天オキシラーゼプレート (BBAO) において35度で2日間嫌気性増殖した後、BBAOに再度画線して產生させた。胞子は、35度で4日間増殖させてから、1倍PBS 1.5 ml及び0.1%Tween-80 (PBST) に捕集した。胞子は、4において3000 × gで20分間遠心分離し、(PBST) 1.5 mlで3回洗浄して、HistoDenz (Sigma) 1.0 mlに再懸濁させた。懸濁液は50%Histodenz溶液1.5 mlの水面で層状化して濃度勾配を形成した。この濃度勾配を4において5000 × gで15分間遠心分離処理した。沈殿物を前記PBST 1.5 mlで3回洗浄し、PBST 5 mlに再懸濁させた。続いて、試料をパワーレベル0.5で5秒間ずつ2回超音波処理して、栄養母細胞を溶解させた。その後、前記HistoDenz手順を繰り返した。最終胞子懸濁液は4度貯蔵した。

40

【0446】

[実施例III]

薄片の透過電子顕微鏡観察

試料調製と電子顕微鏡観察には次の手順を用いた。

1. 試料を、2.5%グルタルアルデヒド、2%パラホルムアルデヒド、0.01 Mリン酸緩衝液、2.5%DMSOに室温で2時間定着

2. 0.1Mリン酸緩衝液で洗浄 (15 - 30分の経過時間中に3回)

50

3 . 1 %四酸化オスミウム水溶液と1 . 5 %フェロシアン化カリウムの混合液により、室温で1時間

4 . 室温においてDDWで洗浄(15 - 30分の経過時間中に3 - 4回)

5 . ブロック染色: 0 . 5 %酢酸ウラニル水溶液により、4で一晩

6 . 脱水(例えば、エタノールによる脱水)、各工程10 - 15分ずつ:a) 30%、b) 50%、c) 70%(できれば4で一晩)、d) 80%、e) 90%、f) 95%、g) 99%、及びh) 100%

7 . プロピレンオキサイド(PO)処理: 各工程15 - 30分ずつ

a) エタノール: PO = 50 : 50

b) エタノール: PO = 25 : 75

c) PO = 100%

10

8 . エポン処理: 各工程2時間ずつ

a) エポン: PO = 30 : 70

b) エポン: PO = 50 : 50

c) エポン: PO = 75 : 25

d) エポン = 100%

e) エポン = 100%

9 . 重合(例えば、60 - 70で48時間加熱)

10 . 薄片の作成

20

11 . 酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色

12 . 炭素コーティング

13 . 電子顕微鏡観察(JOEL製1200 EX又はZeiss製902)

[実施例IV]

クロストリジウム・ディフィシレ外膜調製

胞子約10⁹個を、チルド冷却した(4)フレンチプレスにおいて20,000 lb/in²で一回加圧した(図17参照)。透過型電子顕微鏡(TEM)観察からは、この手順が、加圧していない对照外膜フラグメントと比べると、残りの胞子に検出可能な損傷を与えるに大きな外膜フラグメントを取り除いたことが確認された。除去前後の胞子の写真を、添付する精製後の外膜の写真と並べて比較する(図18A及び18B参照)。フレンチプレスから押し出された試料を4において9,000×gで5分間遠心分離して、上澄みを保存した。沈殿物を冷TEP緩衝液10mlに再懸濁して、前述と同様にして遠心分離した。沈殿物は、TEP緩衝液10mlに再懸濁して-20で保存し、一方、上澄みは、前回の遠心分離の上澄みと併せて、4において9,500×gで15分間遠心分離した。

30

【0447】

得られた上澄みを、次に、Amicon超遠心分離濾過装置(Millipore)を用いて4において5000×gで約60分間遠心分離し、最終体積500μlまで濃縮した。この外膜試料の電子顕微鏡観察からは、胞子がほぼ存在しないことを確認した(図18C参照)。

【0448】

[実施例V]

外膜の可溶化、タンパク質の電気泳動、及び免疫プロット法

40

外膜試料10μlを、2倍Novex Tris-グリシンSDSサンプル緩衝液(Invitrogen)4.5μl、水3.5μl及び200 mMジチオスレイトール10μl中で5分間煮沸して可溶化した。可溶化したタンパク質を、4 - 12%Tris-グリシングルを用いてSDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE)で分離した。免疫プロット法では、タンパク質を電気泳動法によってSDS - ポリアクリルアミドゲルからポリフッ化ビニリデン膜へ移動させて、ウェスタン・ブリーズ・アッセイ・キット(Invitrogen)でマニュアルに記載通りに処理した。簡潔に言えば、各プロットを固定し、1:1000の一次MAb希釈で1時間測定し、そして洗浄した。その後、各プロットは、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗 - ウサギIgG二次抗体で30分間測定し、洗浄し、そしてアルカリホスファターゼ展開液で展開した。

【0449】

50

[実施例VI]

アミノ末端タンパク質配列解析と質量分析

SDS-PAGE試料片を水で洗浄し、そしてアセトニトリルで脱水させた。次に、得られたバンドをヨードアセトアミドでアルキル化してからゲル内消化させた。全バンドをトリプシン（50 mM重炭酸アンモニウム中 20 µg / µlトリプシン）5 µl中、室温で一晩培養して、ゲル内消化させた。產生したペプチドをポリアクリルアミドから抽出して、5 %ギ酸含有 50 %アセトニトリル 30 µlの2つのアリコートに分けた。これら抽出物を併せて、Speedvacで 10 µl未満まで蒸発させてから 1 %酢酸に再懸濁させて、LC-MS分析用に最終体積を約 30 µlとした。

【0450】

10

LC-MSシステム（Finnigan LTQ）には、セルフパック式 9 cm × 直径 75 µm の Phenomenex Jupiter C18逆相毛管HPLCカラムが収容されていた。抽出物 10 µl（体積）を注入し、溶出したペプチドを質量分析器のオンラインソースに導入した。全スキャン領域の質量スペクトルが得られる前記装置のデータ依存マルチタスク性能を用いて前記消化物を分析してペプチド分子量と産物のイオンスペクトルを測定することで、連続機器走査によりアミノ酸配列を求めた。この分析モードでは、約2500という桁違いに広範囲のイオン種の衝突誘起解離（CID）スペクトルが得られる。

【0451】

実験で収集したCIDスペクトルを全て用いてデータ解析し、哺乳類分類フィルターを利用したMascot検索プログラムによってNCBI非冗長データベースを検索した。適合するスペクトルを全てマニュアル判定で検証した。この解釈プロセスは、必要に応じて、Sequest プログラム及びBlast プログラム（Cleveland Clinic for Mass Spectrometry and Protein Sequencing）を利用した追加検索で支援した。

20

【0452】

[実施例VII]

CD分光法

円偏光二色性（CD）分光法は、熱電温度制御を備えたAVIV 62 DS分光計（AVIV Associates、ニュージャージー州レイクウッド）において 25 °で測定され得る。試料は、50 mMリン酸ナトリウム中ペプチド（pH 7.0）0.11 - 0.24 mg / mlを含み、一部の試料は更に、40 %トリフルオロエタノール又は 0.1% (0.22 mM) リポ多糖体（LPS）も含んでいた。スペクトルは、0.5 nm間隔でデータ点当たり平均 2 秒かけて、光路長 0.1 cmを利用して測定する。スペクトルは、プロットする前に 5 データ点毎に一回スムージングして、スペクトル毎に 2 回のスキャンの平均を表示する。データは、2 回のバッファースキャンの平均を差し引いてからスムージングする。フラグメントのらせん含量は、平均残差構造率測定値と 25 °における同一長さの100%らせん形ペプチドの平均残差構造率との比から算出した（Luo及びBaldwin (1997)）。

30

【0453】

[実施例VIII]

ペプチドの疎水性モーメントと疎水性の計算

ペプチドの疎水性と疎水性モーメントは、正規化コンセンサス疎水性スケールを用いて算出する（Eisenbergら, J. Cell Biochem. 31: 11-17 (1986)）。

40

【0454】

[実施例IX]

クロストリジウム・スポロゲネス外膜の除去

クロストリジウム・スポロゲネスの胞子からBraunホモジナイザーでの均質化を利用すると 30 秒毎に最大合計 150 秒間で外膜が除去されるが、クリスタルバイオレット染色と光学顕微鏡検査で判定するので、最適な外膜除去には更に 120 - 150 秒必要である（Duら、「バシラス・チューリングンシス HD-73 の胞子が表面処理による局在化 Cry1Ac 毒素を有すること：生理学的影響と病原の影響」, Appl. Environ. Microbiol. 62: 3722-3726 (1996)）。

50

【0455】

胞子を抽出して、胞子の表面成分及び外膜成分を取り除く (Aronsonら、「胞子表面の比較構造と機能面」, Spores VII. American Society of Microbiology, 54-61頁, G. Chambliss及びJ. C. Vary編, Washington D.C. (1978))。クロストリジウム・スポロゲネスの胞子 (1.1×10^9 個) を 5 mMシクロヘキシリアミノエタンスルホン酸 - 8 M尿素 - 50 mM - メルカプトエタノール - 0.8 % ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 中、pH 9.8において 37°C で 90 分間抽出する。胞子を $12,000 \times g$ で 10 分間遠心分離し、そして上澄み抽出物を 5 分間煮沸する。抽出物を 6 M尿素含有 SDS - ポリアクリルアミドゲルに直接適用する。分子量を求めるために、ゲルをポアサイズ 0.2 mm のニトロセルロースに移す。
プロットを TBS 中 3 % ウシ血清アルブミン (pH 7.4) で固定する。次に、プロットを、0.05% Tween 20 含有 TBS で 1 : 1,000 に希釈した、適切なビオチニル化抗体 (例えば、C33 及び / 又は C225、又はクロストリジウム・スポロゲネスに対する D89) と培養する。0.05% Tween 20 含有 TBS で 1 : 1,000 に希釈したアビジン標識化ペルオキシダーゼ (Sigma、A7419) を用いて、抗原を不溶性基質 4-ナフトール (Bio-Rad) で検出する。

【0456】

糖タンパク質測定は、過ヨウ素酸 - シッフ染色を用いて行う。ゲルを一晩定着させ、そして 0.7 % 過ヨウ素酸で 2 時間、次いで、0.2 % メタ重亜硫酸塩で 2 時間処理する。次に、ゲルを、塩基性フクシンとメタ重亜硫酸ナトリウムと塩酸を含むシッフ試薬 (Fisher Scientific、ペンシルバニア州ピッツバーグ) に暴露させる。胞子抽出物から糖タンパク質として陽性染色されたタンパク質の移動度を測定して、ウェスタンプロット法で求めた抗原の移動度と比較する。

【0457】

金コロイドによる免疫学的標識化処理のために、胞子の極薄 (約 100 nm) 低温切開片を作製する (Changら、「バシラス・セレウス T の胞子における抗原の免疫細胞化学的局在」, J. Rapid Methods Automat. Microbiol., 2: 229-233 (1993))。抗原に使用したのと同じストックのクロストリジウム・スポロゲネス PA 3679 の胞子を、この実験でも使用する。低温切開片を、5 % ウシ胎仔血清含有 PBS に浮かべ、その後、PBS、0.1 M 塩化アンモニウム含有 PBS、そして PBS に順に室温で 5 ~ 10 分ずつ浮かべる。切開片を一次試薬 (1 : 100 に希釈した好適な单クローニング抗体) 滴剤に 1 - 2 時間浮かべてから、PBS で 5 分ずつ 6 回洗浄する。次に、切開片を二次試薬滴剤に 20 - 30 分間浮かべる。二次試薬は、直径 10 nm の金コロイドに結合したヤギ抗 - マウス IgG + ヤギ抗 - マウス IgM であり、希釈率 1 : 10 で使用する。切開片を再び PBS で 6 回洗浄してから、蒸留水で 3 回洗浄する。これらを約 20 % (vol / vol) 飽和酢酸ウラニル水溶液含有 2.3 M メチルセルロース 滴剤に浮かべることで染色して、メチルセルロースに埋め込む。グリッドをループ状に取り出して、排水して風乾させる。これらを Philips 電子顕微鏡 EM 300 で観察する。陰性対照群は、細菌の胞子とは反応しなかった IgG₁ 及び IgM アイソタイプの单クローニング抗体で処理した胞子である。

【0458】

[実施例 X]

クロストリジウム・ディフィシレの胞子と表面との結合に関するカップスクラブ法

本実施例は、表面に結合する胞子を評価できる方法の 1 具体例を説明するものである。本実施例では、クロストリジウム・ディフィシレの胞子を表面に結合して、カップスクラブ法で分析する (ATSM International、「カップスクラブ法を用いた、皮膚からの微生物の回収に関する標準試験法」E1874-09 (2009))。

【0459】

材料

滅菌器 - 滅菌条件を作り出すことができる任意の好適な蒸気滅菌器

スクラブカップ - 好適な組成の滅菌シリンドラーであって、好ましくは安定化を促す、高さ約 2.5 cm 及び使いやすい内径のロッドハンドルが付いたもの。有用な寸法は約 1.5 - 4.0 cm である。

10

20

30

40

50

【0460】

研磨ガラスロッド又はラバーポリスマン - 実験室で成形可能なものの、又は購入したもの
分注器 - 適切な容積を注入するための、使い捨てチップの付いたもの
カップスクラブ試験用液体を入れるための滅菌ビーカー、試験管又は他の容器。

【0461】

微生物培養液 - 本試験方法は、あらゆる微生物培養液を対象としたプロトコルで利用可能である。

【0462】

サンプリング及び希釈液 - 滅菌Butterfieldリン酸緩衝液、又は好適な組成の他の採取液。これは、試験部位に存在する恐れがある任意の抗菌剤に特異的な抗菌剤不活性化因子を含んでいる必要があり、不活性化因子の効果は、試験方法で測定すべきである。10

【0463】試験対照及びベースライン皮膚部位

皮膚部位は、クロストリジウム・ディフィシレの増殖に適したところを選択し、反対側の試料部位を対照として用いる。本アッセイで選択される対象（ヒト又は動物）の数は、予測試験結果に必要な統計的信頼度、実験中に生じる変動、及び評価できる任意の抗菌剤の相対的効力によって決まる。対象には、利用可能な部位が複数存在する場合もあり、試料バイアスを抑えるためにランダム化する必要がある。効果の差別化に必要な再現回数は、プロトコル範囲内の対照の妥当性と型式によってある程度決まる。摘出した皮膚又は同等物へのこの方法の活用は、手順を効率的に行うための試験部位の固定にかかっている。20

【0464】インビオ試料採取

サンプリングしようとする面積を、滅菌サンプリングシリンダーで描写する。試料液が採取部位から漏れないように、サンプリング中はシリンダーを皮膚表面にしっかりと押し付ける。滅菌サンプリング液のアリコート（産物の中和剤を含むもの又は含まないもの）最低 1.5 ml をシリンダーにピペットにより分取する。次に、面積全体を、滅菌磨きガラス棒又はラバーポリスマンを用いて中程度の圧力で 60 ± 6 秒間擦る。擦った後、サンプリング液を滅菌サンプル管にピペットで移し替える。サンプル液の未使用アリコートを用いて、この手順を 1 回以上繰り返す。サンプル液は溜めておく。この手順をサンプリング部位毎に繰り返す。いずれの部位の洗浄にも同様のピペッタ、シリンダー、ガラス棒及びポリスマンを用いるが、部位毎に新しい滅菌器材を用いる。試料回収後、ペーパータオルで部位を拭いて、乾燥させる。本方法では、試料を採取しなかった隣接部位にサンプル液がこぼれないように注意すべきである。全サンプリング終了後、微生物マーカーを用いる場合は、サンプリング部位を 70 - 90 % イソプロパノール又は同等物、そして、次いで 4 % クロルヘキシジンスクラブを用いて除染する必要がある。30

【0465】分離した皮膚又は皮膚同等物試料の回収

カップスクラブ法では定量的な微生物数が得られる。試験試料と対照飼料にこの手順を用いる。サンプリングシリンダーを配置してこれを有効に活用するために、サンプルを配置して、必要に応じて固定する。サンプリングしようとする面積を、滅菌サンプリングシリンダーで描写する。試料液がサンプリング部位から漏れないように、サンプリング中はシリンダーを試料表面にしっかりと押し付ける。生成物中和剤を含む又は含まない滅菌サンプリング液のアリコート最少 1.5 ml をシリンダーにピペットにより分取する。次に、面積全体を、滅菌磨きガラス棒又はラバーポリスマンを用いて中程度の圧力で 60 ± 6 秒間擦る。擦った後、サンプリング液を滅菌サンプル管にピペットで移し替える。サンプル液の未使用アリコートを用いて、この手順を 1 回以上繰り返す。サンプル液は溜めておく。この手順をサンプリング部位毎に繰り返す。いずれの部位の洗浄にも同様のピペッタ、シリンダー、ガラス棒及びポリスマンを用いるが、部位毎に新しい滅菌器材を用いる。同一の分離組織片に複数のサンプリング部位がある場合、このプロセスの間、試料を採取しなかった隣接部位にサンプル液がこぼれないように注意すべきである。4050

【0466】

微生物数

各試料は十分に混合する。各試料の10倍連続希釈を、希釈液で調製する。反復定量型混濁又は播種プレートは、好適な中和剤を含む大豆カゼイン消化寒天を用いて調製する。板状試料は、好適な増殖温度(62℃)で24-72時間又はコロニーがプレート上に現れるまで培養する。

【0467】

[実施例XI]

胞子付着アッセイ - 皮膚タンパク質

本実施例では、胞子と皮膚タンパク質との付着を分析する1具体例について記載する。
例示目的のために、本実施例では、クロストリジウム・ディフィシレの付着性を調べるためにインボルクリン皮膚タンパク質の產生について説明する。

【0468】

プラスミド

本アッセイに適合するプラスミドとしては、pIsA lsdA過剰発現ベクター、pMK4大腸菌-黄色ブドウ球菌シャトルベクター、pSRC001 rlsdA相補性ベクター、pNZ8148ラクトコッカス・ラクティス(*L. lactis*)発現プラスミド、pL lsdA lsdA発現ベクター、pL NEAT lsaA NEAT発現ベクター、pL C IsaA C発現ベクター、pQE30過剰発現プラスミド(Qiagen)、pヒトK、pQE30ヒトサイトケラチン10発現、pCMC-SPORT6-INV インボルクリン cDNAクローン4749952(IMAGE consortium、MRC Geneservice)、pQE30-INV6His-標識化インボルクリン又はpET11a-LOR 口リクリン cDNAクローンを挙げることができるが、これらに限定されない(Clarkら、「黄色ブドウ球菌のlsdAはプロードなスペクトルの鉄調節付着である」, Mol. Microbiol. 51: 1509-1519 (2004); Clarkeら、「黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)の表面タンパク質lsdAはヒト皮膚の先天的防御抵抗性を媒介する」, Cell Host Microbe 1: 199-212 (2007); Sullivanら、「挿入したフラグメントを迅速に検出できる枯草菌及び大腸菌用の新規シャトルベクター」, Gene 29: 21-26 (1984); Kuipers, O.P., G.G.A.deRuyter, M. Kleerebezem及びW.M.deVos, 「乳酸菌によるタンパク質過剰生産の抑制」, J. Biotechnol. 64: 15-21 (1998); Sullivanら、「挿入されたフラグメントを迅速に検出できる枯草菌及び大腸菌用の新規シャトルベクター」, Gene 29: 21-26 (1984); 及びWalshら、「クランピング因子B、黄色ブドウ球菌のフィブリノゲン結合MSRAMM(付着マトリックス分子を認識する微生物の表面成分)アドヘシンが、更に、I型サイトケラチン10のテール領域とも結合する」, J. Biol. Chem. 279: 50691-50699 (2004))。

【0469】

クロストリジウム・ディフィシレをLB培地でカナマイシン(50μg/ml)を用いて増殖させると、適切なクロストリジウム・ディフィシレ菌株が、ブレインハートインキュビション培地(Oxoid)又は既知組成のCL培地で増殖する(Horsburghら、「黄色ブドウ球菌中では、Furは、PerRとの相互作用調整因子であり、毒性の一因となり、また、カタラーゼと鉄とのホメオスタシスの正の制御による酸化的ストレス耐性に不可欠なものである」, J. Bacteriol. 183: 468-475 (2001))。抗生素質を含む場合は、次の濃度で添加する:エリスロマイシン5μg/ml、リンコマイシン2.5μg/ml及びテトラサイクリン2.5μg/ml。クロストリジウム・ディフィシレ培養液は37℃で増殖してもよい。

【0470】

インボルクリン遺伝子のクローニング

インボルクリンのコード化配列は、pCMV-SPORT6-INVからPCR法により、Pfuポリメラーゼと、BamHI部位(下線部)を組み込んだ順方向プライマー

C G C G G A T C C A T G T C C C A G C A A C A C A C A C

(配列番号446)及びHindIII部位(下線部)を組み込んだ逆方向プライマー

C C C A A G C T T T A T T T A T G T T G G G T G G C C A C

(配列番号447)を用いて増殖させる。前記フラグメントは、BamHI部位とHindIII部位でp

10

20

30

40

50

QE30カットにクローニングして、pQE30-INVを形成する。

【0471】

組換えタンパク質の発現と精製

100 μMイソプロピル-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を増殖している細胞に加えると、ヘキサヒスチジン標識化組換えIsdA(rIsdA)とサイトケラチン10とインボルクリンとが発現する。精製は、ニッケルキレートクロマトグラフィーを用い、Hi-Trapシステム(Amersham biosciences)を利用して行う。組換えロリクリンは、アフィニティ-標識化で処理しても、又は溶解大腸菌T4037から精製してもよい。

【0472】

リガンド結合のELISA分析

10

酵素結合性免疫吸着検定法(ELISA)を用いて、rIsdAのリガンド結合能を分析する(Clarkeら、「Ebh、黄色ブドウ球菌の1,1-メガダルトン細胞壁接合フィブロネクチン結合性タンパク質の分析」, Infect. Immun. 70: 6680-8887 (2002))。簡潔に言えば、リン酸緩衝食塩水(PBS)中の適切なリガンド又はウシ血清アルブミン(BSA)(5 μg/ml)100 μlを96穴マイクロタイタープレート(Nunc)の穴に4で一晩入れておく。このプレートを、PBST(0.05% (vol/vol) Tween 20含有PBS)で3回洗浄して、残留タンパク質結合部位をPBS中、5% (wt/vol) BSAを用いて室温で2時間固定する。プレートを再度PBSTで3回洗浄し、PBS中、0.1% (wt/vol) BSAで希釈した様々な濃度の精製rIsdA(例えば、0 - 15 μM)を加えた。プレートを更に1時間培養してから3回洗浄して、抗IsdA(1:1,000に希釈したもの)を、PBS中、0.1% (wt/vol) BSAに加えた後、1時間培養する。

20

【0473】

結合したIsdAを検出するのに用いられるマウス抗体は、報告されている方法によって產生してもよい(Clarkeら、「黄色ブドウ球菌のIsdAがブロードなスペクトルの鉄調節付着である」, Mol. Microbiol. 51: 1509-1519 (2004))。プレートを更に3回洗浄して、PBS中、0.1% (wt/vol) BSAで1:30,000に希釈したアルカリホスファターゼが結合した抗-マウス抗体を加えて、プレートを1時間培養する。最後に結合抗体を、Sigma Fastリン酸p-ニトロフェニルシステム(Sigma)を用いて検出する。Victorマイクロタイタープレートリーダー(Wallac)において405 nmでプレートを読み取る。

30

【0474】

結合阻止に関する実験は、rIsdAを様々な濃度の阻害剤又はBSA(0 - 10 μM)と、室温でPBS中、0.1% (wt/vol) BSA中において1時間培養することで実施する。その後、反応混合物をリガンドでコーティングした穴に加えて、結合したタンパク質を検出する。

【0475】

原子間力顕微鏡法

原子間力顕微鏡観察(AFM)用のチップと支持体は、次のようにしてIsdA及びロリクリン分子で機能化する。AFMカンチレバー(Microlevers、Veeco Methology Group(カリフォルニア州サンタバーバラ))とシリコンウェハー(Siltronix、フランス、シルトロニクス)に、電子ビーム蒸着を利用して5 nm厚のCr層と30 nm厚のAu層を順にコーティングする。使用する前に、金コーティングした表面をエタノールで洗い流して、穏やかな窒素流で乾燥させ、そして、UV/Oゾン処理(Jelight Co.(カリフォルニア州アーバン))によって15分間クリーニングする。金チップと金支持体を、0.05 mMニトリロトリアセテート末端アルカンチオール(5%) (Prochimia)とトリ(エチレンギリコール)(トリ(EG))末端アルカンチオール(95%)を含有するエタノール溶液に一晩浸漬し、そして、エタノールで洗い流す。短時間の超音波処理により、吸着する恐れのあるアルカンチオール凝集物を除去する。次に、SAM(自己組織化单分子膜)コーティングされた表面を、40 mM NiSO₄水溶液(pH 7.2)に1時間浸漬し、そして、PBSで洗い流す。最後に試料を、2 μM His標識化IsdAを含むPBS中で2時間培養し、更にPBSで数回洗い流す。ロリクリンとBSAのために、金支持体を、オリゴ(EG)(OEG)プロピオン酸末端アルカンチオールとOEGプロピオン酸末端アルカンチオールの20 μM混合物(95モル:5モル)を含むエ

40

50

タノール溶液に36時間浸漬する。エタノールで洗い流してから、短時間の超音波処理で、吸着する恐れのあるアルカンチオール凝集物を除去する。支持体を、20g/lのN-ヒドロキシスクシンアミド(NHS)(Aldrich)と50g/lの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(EDC)(Sigma)を含有するMilliQ water(Millipore)に30分間浸漬し、MilliQ waterで洗い流して、10μg/lのロリクリン又はBSAを含むPBS中で3時間培養し、更に洗い流した後、すぐに使用する。

【0476】

AFM画像と原子間力-距離曲線は、PBS中、室温で、PicoForce Multimode AFM(Veeco Methology Group(カリフォルニア州サンタバーバラ))を用いて入手した。支持体は、小さな接着テープ片を用いてスチール製試料パックに固定した。取り付けた試料をすぐに、乾燥させないようにしながらAFM液体セルに移した。原子間力曲線は全て、最大450 pNの応力を加えて記録した。カンチレバーのバネ定数は、熱雑音法(PicoForce; Veeco Methology Group(カリフォルニア州サンタバーバラ))を用いて測定して、メーカーの公表値(0.01 N/m)よりもわずかに大きな値(0.011 N/m)を得た。生体分子の柔軟性を説明するために、チップの収縮速度(nm/秒)に破壊ピークの勾配(pN/nm)を乗じて、付加速度(pN/秒)を試算した。

【0477】

固定リガンドとの微生物相互作用

対数増殖期中期の細胞と固定リガンドとの結合は、前述の方法を用いて測定してよい(Ni Eidhinら、「クランピング因子B(ClfB)、黄色ブドウ球菌の新規の表面局在化フィブリノゲン結合性付着」, Mol. Microbiol. 30: 245-257 (1998))。また、扁平細胞は、健常人ドナーの前鼻孔から採取したものであってよく、鉄を含まない培地で増殖したクロストリジウム・ディフィシレの結合が分析される(O'Brienら、「黄色ブドウ球菌クランピング因子B(Clfb)がヒトI型サイトケラチン10との付着を促進する: 鼻腔コロニー形成に対する影響」, Cell Microbiol. 4: 759-770 (2002))。菌株同士の比較はスチュードントt検定を利用して行った。

【0478】

[実施例XII]

組換え外膜タンパク質の発現と精製

N-末端ポリヒスチジン標識化した組換え外膜タンパク質を含む発現構造物を作製して、大腸菌内に形質転換した。組換えタンパク質は、1Lの培地(100μg/mlを補充したもの)に前記発現構造物の一晩培養液10mlを播種して產生した。37度2.5時間増殖させた後、イソプロピル-D-チオ糖を最終濃度0.2mMまで添加してタンパク質を発現させ、そして培地を更に3時間増殖させた。遠心分離によって集菌し、上澄み液をデカンテーションして、細胞沈殿物をPBSに再懸濁してから、-80度貯蔵した。その後、前記懸濁液を大気温度の水層中において30分で解凍し、細胞を、フレンチプレスを用いて溶解した。不溶性細胞残屑を28,000×gで20分間の遠心分離で除去してから、0.45mmメンプランで濾過した。次いで、組換え外膜タンパク質は、先ず、金属キレートクロマトグラフィーを利用して精製した。細菌溶解物は、5mlのNi₂₊-充填HiTrapキレートカラム(Amersham Pharmacia Biotech)に適用して、4mMのTris-塩酸中0-200mMイミダゾール(100mMのNaCl、pH7.9)の200ml線形グラジエントを利用し、流量5ml/分で結合タンパク質を溶出させた。組換え発現タンパク質に相当する画分を、SDS-PAGEで確認しながら貯留して、25mMのTris-塩酸(pH8.0)で透析した後、イオン交換クロマトグラフィーで更に精製した。透析後のタンパク質を5mlのHiTrapQカラム(Amersham Pharmacia Biotech)に加えて、25mMのTris-塩酸中0-0.5MのNaCl(pH8.0)の200ml線形グラジエントを利用して流量5ml/分で結合タンパク質を溶出させた。精製された外膜タンパク質を含む画分は、SDS-PAGEで同定して、純度90%と推定した。

【0479】

[実施例XIII]

外膜タンパク質付着アッセイ

10

20

30

40

50

外膜タンパク質とヒト皮膚タンパク質及び / 又はEpiDerm (登録商標) 分化ヒトケラチノサイトとの結合は、FITC結合胞子を外膜タンパク質と置き換えたこと以外は、本質的に実施例X及びXIの記載と同様にして行った。結合タンパク質は、フルオロセイン結合ストレプトアビジン (Rockland Immunochemicals) を用いて検出した。穴1個当たりの総蛍光発光 (F_{total}) は、1時間恒温放置した後、fluoroskan II 蛍光発光リーダー (Labsystems (マサチューセッツ州ビヴァリー)) を用いて $\lambda_{ex} = 495 \text{ nm}$ 及び $\lambda_{em} = 528 \text{ nm}$ で測定した。

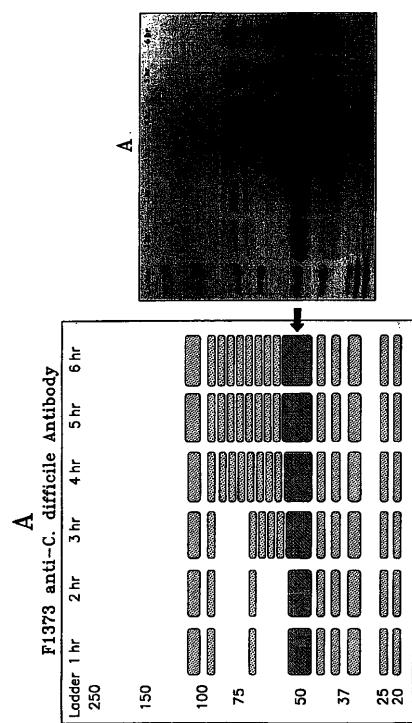
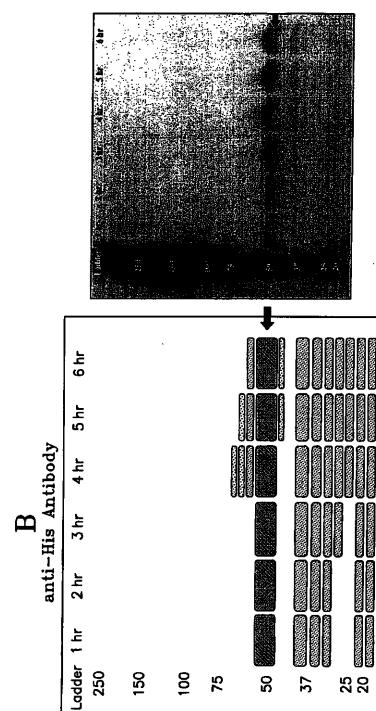
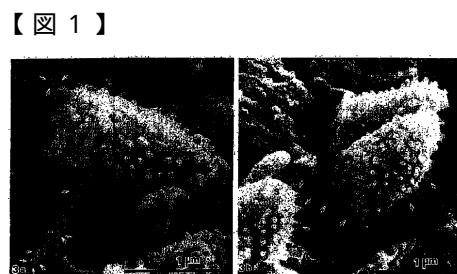
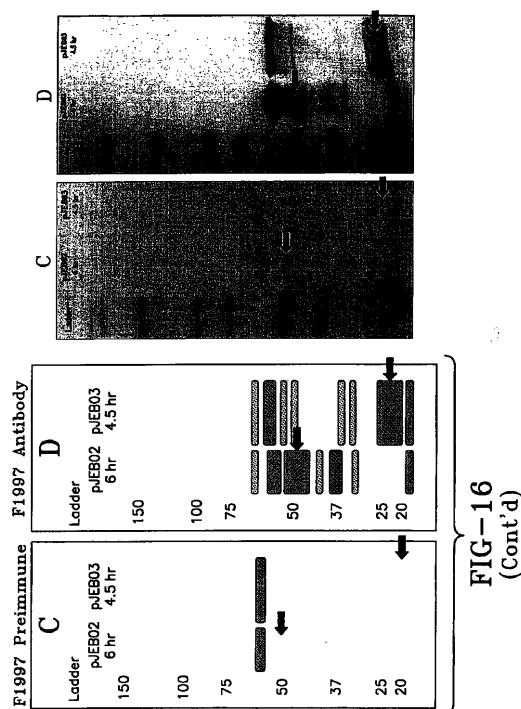
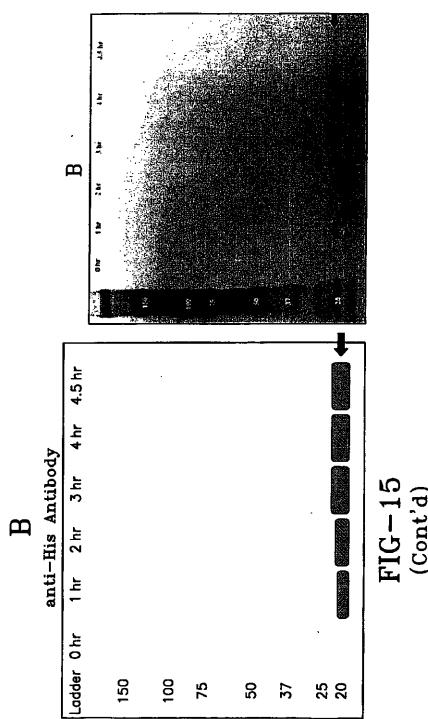
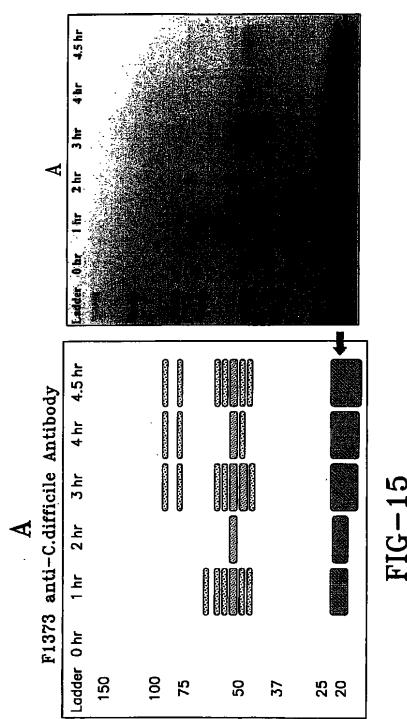


FIG-13

FIG-13
(Cont'd)



【図2】



FIGURE 2

【図3】



FIGURE 3

【図4】

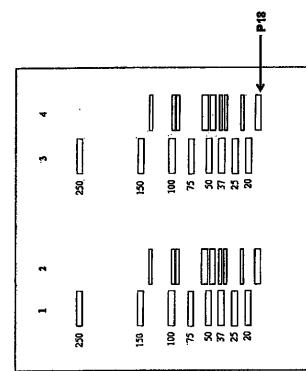


FIGURE 4



【図5】

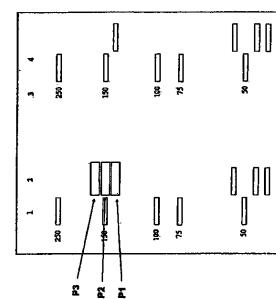


FIGURE 5



JP 5911421 B2 2016.5.18

【図 6 A】

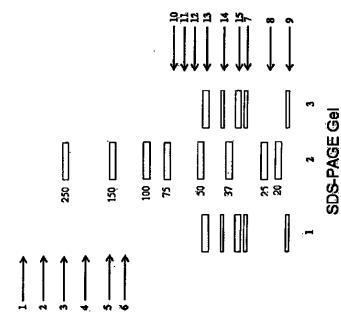


FIGURE 6A

【図 6 B - 6 C】

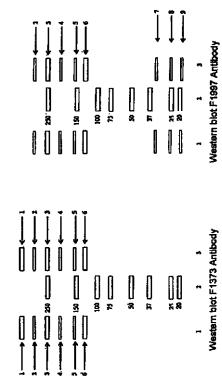
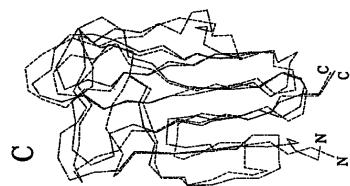


FIGURE 6B

FIGURE 6C

【図 7 C】



【図 8 A】

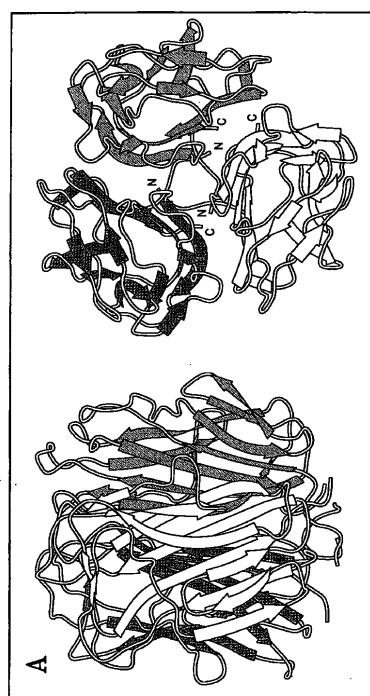
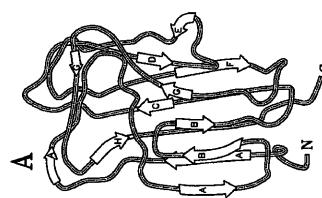
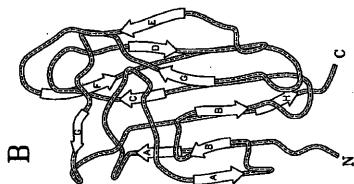


FIG-8

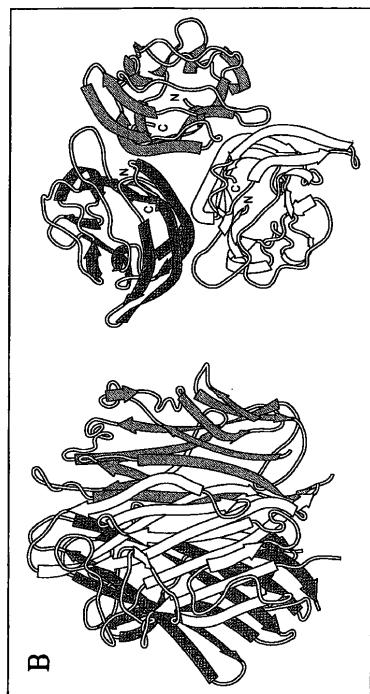
【図 7 A】



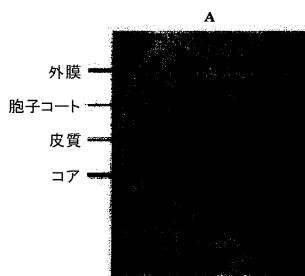
【図 7 B】



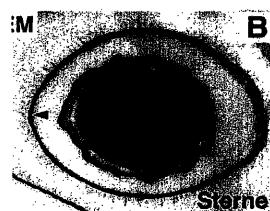
【図 8 B】

FIG-8
(Cont'd)

【図 9 A】



【図 9 B】

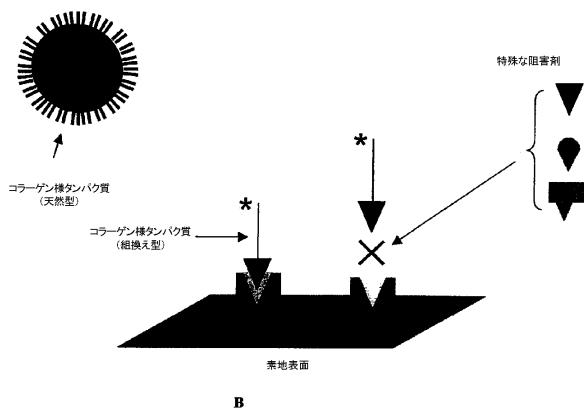


【図 9 C】



FIGURE 9B

【図 10 B】



【図 11】

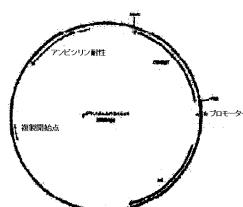


FIGURE 9C

【図 10 A】

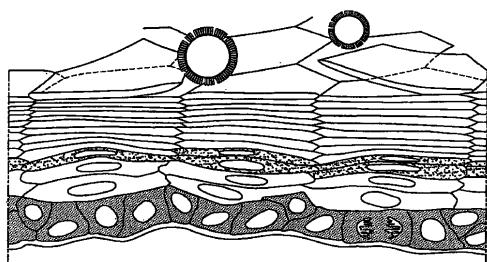


FIG-10A

【図12】

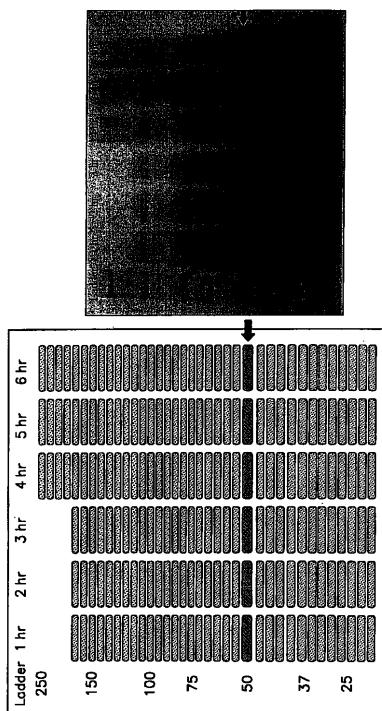
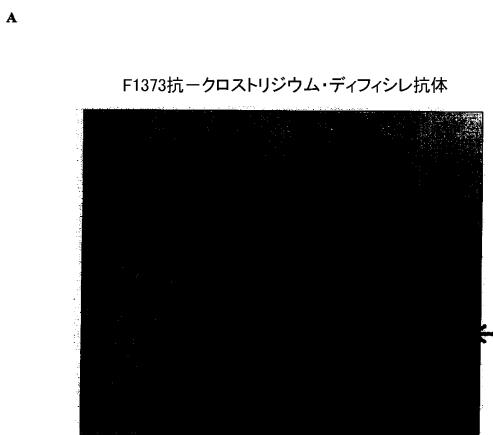


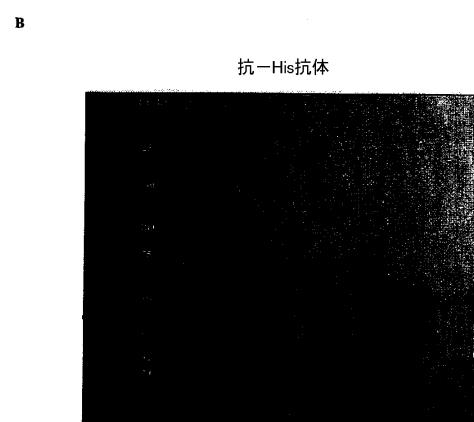
FIG-12

【図13A】



F1373抗－クロストリジウム・ディフィシレ抗体

【図13B】



抗-His抗体

【図14】

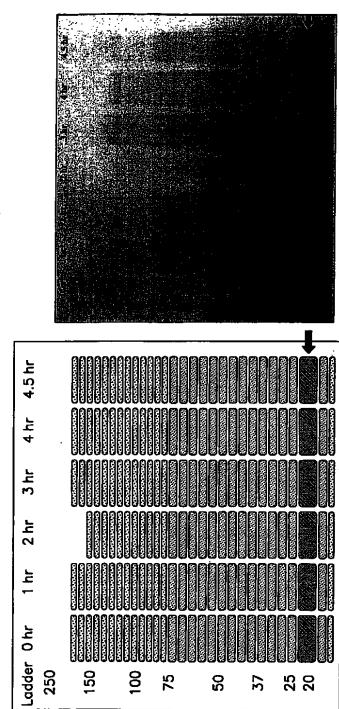
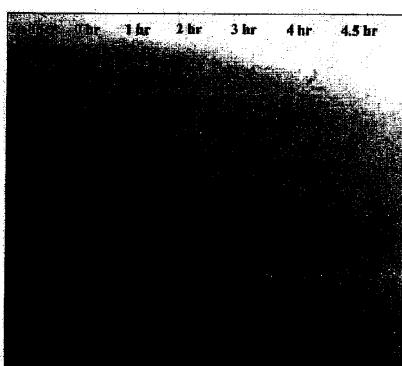


FIG-14

【図 15 A】

A

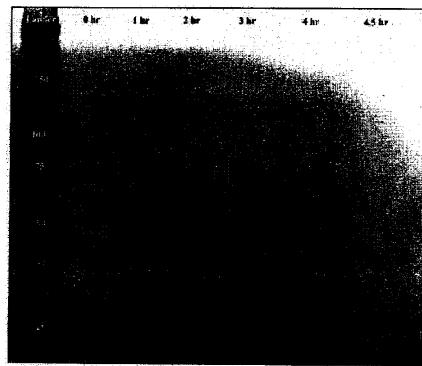
F1373抗一クロストリジウム・ディフィシル抗体



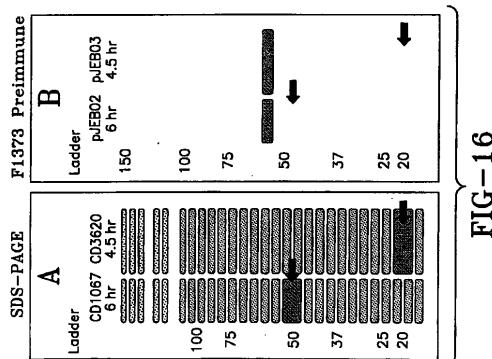
【図 15 B】

B

抗-His抗体

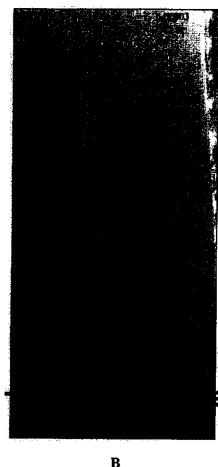


【図 16 A】



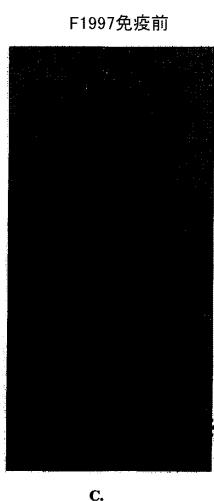
【図 16 B】

F1373免疫前



B

【図 16 C】



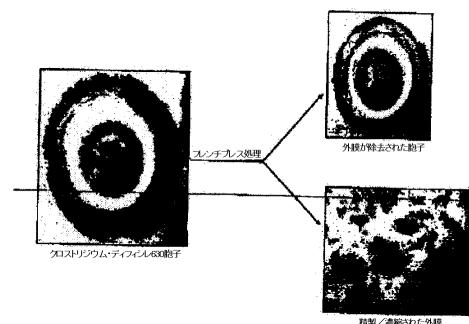
C.

【図 16 D】

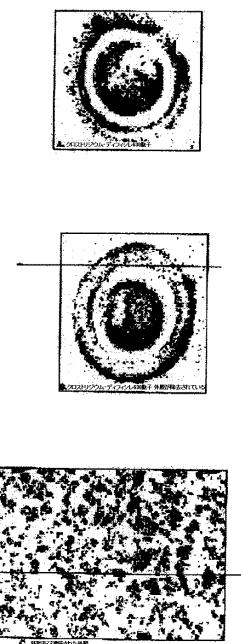


D.

【図 17】



【図 18】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 7 K 16/12

(72)発明者 エドモンズ サラ エル
アメリカ合衆国 オハイオ 44614 キャナル・フルトン エメラルド・ヒル・ストリート・
エヌダブリュ 9829

審査官 山本 昌広

(56)参考文献 國際公開第2009/108652 (WO, A1)
特表2008-502710 (JP, A)
NATURE GENETICS, 2006年, Vol.38, No.7, p.779-786

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 0 1 N 6 3 / 0 0 - 6 3 / 0 4
A 0 1 P 3 / 0 0
A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4
A 6 1 P 3 1 / 0 0 - 3 1 / 2 2
C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6