(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3907204号
(P3907204)
(45)発行日　平成19年4月18日(2007.4.18)　(24)登録日　平成19年1月26日(2007.1.26)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C07K 14/045	(2006.01)	C07K	14/045	
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00	
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21	
G01N 33/569	(2006.01)	G01N	33/569	L

請求項の数 22　(全 51 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平8-503773
(86)(22)出願日　平成7年5月15日(1995.5.15)
(65)公表番号　特表平10-502253
(43)公表日　平成10年3月3日(1998.3.3)
(86)国際出願番号　PCT/IT1995/000073
(87)国際公開番号　WO1996/001321
(87)国際公開日　平成8年1月18日(1996.1.18)
審査請求日　平成14年5月13日(2002.5.13)
(31)優先権主張番号　T094A000543
(32)優先日　平成6年7月1日(1994.7.1)
(33)優先権主張国　イタリア(IT)

(73)特許権者
アボツト・ラボラトリーズ
アメリカ合衆国、イリノイ・６００６４－３５００、アボツト・パーク、アボツト・パーク・ロード・１００、チヤド・０３７７／エイ・ピー・６・デイ－２
(73)特許権者
ランデイーニ，マリア・パオラ
イタリー国、イ－４０１２７・ボローニヤ、ビア・エツセ・アポロニア、２
(73)特許権者
リパルチ，アレツサンドロ
イタリー国、イ－４０１２７・ボローニヤ、ビア・ペトラルカ、２５

最終頁に続く

(54)【発明の名称】酵素的イムノアッセイにより人血清中のサイトメガロウイルス特異的ＩｇＭを検出するための組換えモノおよびポリ抗原

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ヒトサイトメガロウイルス（ＨＣＭＶ）に対する抗体と結合することのできる組換えタンパク材料であって、融合タンパクを含み、そのアミノ酸配列の少なくとも一部がヌクレオチド００１から９００まで読む配列番号１のヌクレオチド配列またはヌクレオチド００１から９０６まで読む配列番号３のヌクレオチド配列によりコードされることを特徴とする、組換えタンパク材料。

【請求項２】

前記融合タンパクが少なくともβ－ガラクトシダーゼの一部を含む、請求項１に記載の組換えタンパク材料。

【請求項３】

請求項１に記載の融合タンパクを含んでなることを特徴とする、血清学的方法によりＨＣＭＶ感染を診断するための診断薬。

【請求項４】

請求項３に記載の診断薬を含み、当該診断薬が固体媒体に吸着されていることを特徴とする、ヒトサイトメガロウイルス（ＨＣＭＶ）に対する抗体の存在を血清学的方法により検出するための診断キット。

【請求項５】

ヒト血清中においてサイトメガロウイルス特異的ＩｇＭをエンザイムイムノアッセイにより検出するための組換え抗原の混合物であって、

（ｉ）ウイルスタンパクｐｐ５２のａａ２０２とａａ４３４との間（両端を含む）のアミノ酸配列（Ｈ１０）を有する第１の領域、ウイルスタンパクｐｐ１５０のａａ１００６とａａ１０４８との間（両端を含む）のアミノ酸配列（Ｆ３）を有する第２の領域、および同じウイルスタンパクｐｐ１５０のａａ５９５とａａ６１４との間（両端を含む）のアミノ酸配列（Ａ１Ｃ２）を有する第３の領域を含んでなる第１の融合タンパクであって、そのアミノ酸の少なくとも一部がヌクレオチド００１から９００まで読む配列番号１のヌクレオチド配列またはヌクレオチド００１から９０６まで読む配列番号３のヌクレオチド配列によりコードされることを特徴とする第１の融合タンパク、
（ｉｉ）ウイルス遺伝子ＵＬ８３によりコードされているウイルス主要マトリックスタンパクｐｐ６５のａａ２９７とａａ５１０との間（両端を含む）のアミノ酸配列を含む免疫原領域を含む第２の融合タンパク、および
（ｉｉｉ）ウイルス遺伝子ＵＬ８０ａによりコードされているウイルス集合タンパクｐｐ３８のａａ１１７とａａ３７３との間（両端を含む）のアミノ酸配列を含む免疫原領域を含む第３の融合タンパクを組合わせて含むことを特徴とする前記混合物。

【請求項６】
前記領域が第１の領域Ｈ１０、第２の領域Ｆ３、第３の領域Ａ１Ｃ２、タンパクｐｐ６５およびタンパクｐｐ３８のそれぞれの全長アミノ酸配列を含む、請求項５に記載の組換え抗原の混合物。

【請求項７】
前記融合タンパクが少なくともタンパクＣＫＳの一部を含む、請求項５に記載の組換え抗原混合物。

【請求項８】
請求項５に記載の融合タンパクの混合物を含んでなることを特徴とする、エンザイムイムノアッセイによりヒト血清中においてサイトメガロウイルス特異的ＩｇＭを検出するための診断薬。

【請求項９】
請求項５に記載の第１の融合タンパクを含むことを特徴とする、エンザイムイムノアッセイによりヒト血清中においてサイトメガロウイルス特異的ＩｇＭを検出するための診断薬。

【請求項１０】
請求項５に記載の混合物の融合タンパクの少なくとも１つで各微粒子が被覆されている複数の微粒子を含んでなることを特徴とする、エンザイムイムノアッセイによりヒト血清中のサイトメガロウイルス特異的ＩｇＭを検出するための診断キット。

【請求項１１】
請求項５に記載の３つの融合タンパクを含む混合物で各微粒子が被覆されている複数の微粒子を含んでなることを特徴とする、エンザイムイムノアッセイによりヒト血清中においてサイトメガロウイルス特異的ＩｇＭを検出するための診断キット。

【請求項１２】
ヌクレオチド００２から９０７までの配列番号１のＤＮＡ配列がＳｍａＩ部位に挿入されている発現ベクターｐＲＯＳを含む、原核生物または真核生物宿主生物体に挿入することのできるプラスミド。

【請求項１３】
ウイルスタンパクｐｐ５２のａａ２０２とａａ４３４との間（両端を含む）のアミノ酸配列（Ｈ１０）を有する第１の領域、ウイルスタンパクｐｐ１５０のａａ１００６とａａ１０４８との間（両端を含む）のアミノ酸配列（Ｆ３）を有する第２の領域、および同じウイルスタンパクｐｐ１５０のａａ５９５とａａ６１４との間（両端を含む）のアミノ酸配列（Ａ１Ｃ２）を有する第３の領域を含んでなる融合タンパクを産生することのできる、請求項１２に記載のプラスミドを含む組換え宿主生物体。

【請求項１４】
以下のプラスミド、

－請求項１２に記載のプラスミド、
－ウイルス遺伝子ＵＬ８３にコードされるＨＣＭＶ主要マトリックスタンパクｐｐ６５のａａ２９７とａａ５１０（両端を含む）との間にあるＨＣＭＶ特異的ＩｇＭに結合する少なくとも１つのエピトープをコードし、タンパクＣＫＳのアミノ酸１から２４０（両端を含む）の配列をコードする第２の配列の３’末端に連結しているＤＮＡ配列を含む、原核生物もしくは真核生物宿主生物体に挿入され得るプラスミド、および
－ウイルス遺伝子ＵＬ８０ａにコードされるＨＣＭＶ集合タンパクｐｐ３８のａａ１１７とａａ３７３（両端を含む）との間にあるＨＣＭＶ特異的ＩｇＭに結合する少なくとも１つのエピトープをコードしタンパクＣＫＳのアミノ酸１から２４０（両端を含む）の配列をコードする第２の配列の３’末端に連結しているＤＮＡ配列を含む、原核生物もしくは真核生物宿主生物体に挿入され得るプラスミド、
の少なくとも１つが挿入されている宿主生物体内において発現される融合タンパクの混合物を含む、ヒトサイトメガロウイルス（ＨＣＭＶ）特異的抗体と結合することのできる組換えタンパク材料。
【請求項１５】
前記宿主生物体が大腸菌である、請求項１２に記載のプラスミド。
【請求項１６】
ＨＣＭＶのタンパクｐｐ５２のａａ２０２とａａ４３４との間（両端を含む）のＨＣＭＶ特異的ＩｇＭに結合する少なくとも１つのエピトープをコードする第１のＤＮＡ配列、タンパクｐｐ１５０のａａ１００６とａａ１０４８との間（両端を含む）のＨＣＭＶ特異的ＩｇＭに結合する少なくとも１つのエピトープをコードする第２のＤＮＡ配列、およびタンパクｐｐ１５０のａａ５９５とａａ６１４との間（両端を含む）のアミノ酸配列をコードする第３のＤＮＡ配列を組合わせて含み、配列番号３または配列番号１のＤＮＡ配列の完全長を含む、原核生物または真核生物宿主体に挿入され得るプラスミド。
【請求項１７】
原核生物または真核生物宿主生物体に挿入することのできる、発現ベクターを含むプラスミドであって、ヌクレオチド００１から９０６までの配列番号３のＤＮＡ配列が挿入されているプラスミド。
【請求項１８】
配列番号２の配列を含む融合タンパクを含む、血清学的方法によりＨＣＭＶ感染を診断するための診断薬。
【請求項１９】
配列番号４の配列を含む融合タンパクを含む、血清学的方法によりＨＣＭＶ感染を診断するための診断薬。
【請求項２０】
ヒト血清中においてサイトメガロウイルス特異的ＩｇＭをエンザイムイムノアッセイにより検出する方法であって、
（ｉ）ウイルスタンパクｐｐ５２のａａ２０２とａａ４３４との間（両端を含む）のアミノ酸配列（Ｈ１０）を有する第１の領域、ウイルスタンパクｐｐ１５０のａａ１００６とａａ１０４８との間（両端を含む）のアミノ酸配列（Ｆ３）を有する第２の領域、および同じウイルスタンパクｐｐ１５０のａａ５９５とａａ６１４との間（両端を含む）のアミノ酸配列（Ａ１Ｃ２）を有する第３の領域を含んでなる第１の融合タンパクであって、そのアミノ酸の少なくとも一部がヌクレオチド００１から９００まで読む配列番号１のヌクレオチド配列またはヌクレオチド００１から９０６まで読む配列番号３のヌクレオチド配列によりコードされることを特徴とする第１の融合タンパク、
（ｉｉ）ウイルス遺伝子ＵＬ８３によりコードされているウイルス主要マトリックスタンパクｐｐ６５のａａ２９７とａａ５１０との間（両端を含む）のアミノ酸配列を含む免疫原領域を含む第２の融合タンパク、および
（ｉｉｉ）ウイルス遺伝子ＵＬ８０ａによりコードされているウイルス集合タンパクｐｐ３８のａａ１１７とａａ３７３との間（両端を含む）のアミノ酸配列を含む免疫原領域を

含む第３の融合タンパク
を組合わせて含む融合タンパクの混合物を準備する工程、
ヒト血清のサンプルを当該混合物と接触させて反応混合物を調製する工程、
当該反応混合物を、抗体および酵素を含む複合体と接触させる工程、
当該酵素の基質を加える工程、および
複合体と基質の反応を測定して血清中のサイトメガロウイルス特異的ＩｇＭの濃度を決定する工程を含む前記方法。
【請求項２１】
ヒト血清中においてサイトメガロウイルス特異的ＩｇＭをエンザイムイムノアッセイにより検出する診断用キットを調製するための融合タンパク質の混合物を含む固形媒体を調製する方法であって、
（ｉ）ウイルスタンパクｐｐ５２のａａ２０２とａａ４３４との間（両端を含む）のアミノ酸配列（Ｈ１０）を有する第１の領域、ウイルスタンパクｐｐ１５０のａａ１００６とａａ１０４８との間（両端を含む）のアミノ酸配列（Ｆ３）を有する第２の領域、および同じウイルスタンパクｐｐ１５０のａａ５９５とａａ６１４との間（両端を含む）のアミノ酸配列（Ａ１Ｃ２）を有する第３の領域を含んでなる第１の融合タンパクであって、そのアミノ酸の少なくとも一部がヌクレオチド００１から９００まで読む配列番号１のヌクレオチド配列またはヌクレオチド００１から９０６まで読む配列番号３のヌクレオチド配列によりコードされることを特徴とする第１の融合タンパク、
（ｉｉ）ウイルス遺伝子ＵＬ８３によりコードされているウイルス主要マトリックスタンパクｐｐ６５のａａ２９７とａａ５１０との間（両端を含む）のアミノ酸配列を含む免疫原領域を含む第２の融合タンパク、および
（ｉｉｉ）ウイルス遺伝子ＵＬ８０ａによりコードされているウイルス集合タンパクｐｐ３８のａａ１１７とａａ３７３との間（両端を含む）のアミノ酸配列を含む免疫原領域を含む第３の融合タンパク
を組合わせて含む混合物を準備する工程、
当該反応混合物を少なくとも１つの固形媒体に吸着させる工程を含む前記方法。
【請求項２２】
前記混合物の各融合タンパクの各々が個別に異なった固形媒体に、媒体当たり１つのタンパクとして吸着されている請求項２１に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
技術分野
本発明は、精製ウイルス粒子の代わりに、人血清中のＨＣＭＶ特異性イムノグロブリン、特にＩｇＭを検出することのできるモノおよびポリエピトープ人工抗原として有用な組換えタンパク材料に関する。特に、本発明は、組換え法により得られる三つの異なる融合タンパク、すなわち、５２ｋＤ（ｐｐ５２）の非構造ＤＮＡ結合ウイルスタンパクおよび１５０ｋＤ（ｐｐ１５０）の構造リンタンパクの両方からの高免疫原性エピトープを含む第１の融合タンパク、人サイトメガロウイルス（ＨＣＭＶ）の主要マトリックスタンパク、すなわちウイルス遺伝子ＵＬ８３によりコードされている６５ｋＤ（ｐｐ６５）のウイルスタンパクからの免疫原性エピトープを含む第２の融合タンパク、およびウイルス遺伝子ＵＬ８０ａによりコードされている３８ｋＤ（ｐｐ３８）の集合タンパクからの免疫原性エピトープを含む第３の融合タンパクの組み合せ使用に関する。本発明は、さらに、診断キット（ｋｉｔ）およびそれから誘導される診断試薬ならびに前記組換え抗原を発現するプラスミドに関する。
従来技術
人サイトメガロウイルス（ＨＣＭＶ）は、人において広範に存在するヘルペスウイルスである。それは、健康な成人においては滅多に病原とならないが、（ＨＩＶに感染した人々および移植を受けた人達のような）免疫無防備状態の個体における複数の病気と関係する。さらに、ＨＣＭＶは人における先天性感染の最も一般的な原因である。精神遅滞の既知の原因としては、ダウン症候群を除いて子宮内一次感染が主要な原因である。厳しさがよ

り緩い合併症は、二次感染の結果である。感染は無症候性またはＨＣＭＶに特異的でない症状（発熱および白血球減少のようなもの）を伴うので、実験室的技術が急性ＨＣＭＶ感染を診断する唯一の手段である。ＨＣＭＶ感染は、病理学的材料中のウイルスまたはウイルス成分を直接示すことにより、または血清学により間接的に診断することができる［１］。一次ＨＣＭＶ感染の診断には、必ず血清学的方法を伴う、すなわち以前は血清陰性（セロネガティブ）の被検者におけるＨＣＭＶへの抗体の出現が示される。ＨＣＭＶ特異的ＩｇＭは免疫応答性被検者における一次ＨＣＭＶ感染の鋭敏かつ特異的な指示薬であるが、それは移植を受けた者における活性ウイルスの再活性化中にしばしば生成される［２－４］。しかしながら、その検出は広範に変化し、異なる市販のキットを用いて得られる結果中において一致は殆どない見られない。

ＥＰ２６２５３１から、ウイルスゲノムのＨｉｎｄ　ＩＩＩ－Ｙ／Ｎフラグメント中に局在している遺伝子によりコードされている１５０ｋＤのＨＣＭＶ構造リンタンパクの免疫原性部分が知られており；その欧州特許によれば、そのようなｐｐ１５０の免疫原性部分は、特に、ＡＤ１６９菌株のＨＣＭＶゲノムからのＥｃｏＲＩ－Ｙフラグメントの領域中に局在している約１．５ｋｂのＥｃｏＲＩ－ＰｓｔＩフラグメントによりコードされているということである。しかしながら、その後のより熱心な研究により、１．５ｋｂよりかなり長く、とにかくＡＤ１６９菌株のＥｃｏＲＩ－Ｙフラグメント中に限定され得るようなＥｃｏＲＩ－ＰｓｔＩフラグメントの全く外側にあるＵＬ３２によりタンパクｐｐ１５０がコードされている点（図１）おいて、前述の推論が不正確であることが示された。さらに、ＥｃｏＲＩ－Ｙフラグメントは、Ｈｉｎｄ　ＩＩＩ－Ｙ／Ｎフラグメントの（特に、NH_2末端に向かう側において）全く外側である。従って、出願人によれば、前記欧州特許（それは、しかしながら、ポリペプチドの不正確な同定のために、実質的に決定されないままとなる原因となった）において言及されたタンパク材料の免疫原特性と、ＵＬ３２ヌクレオチド１７８３～１８４２（５’→３’方向）によりコードされているエピトープＡ１Ｃ２のペプチド、すなわち後に同定された（ノヴァック（Ｎｏｖａｋ　Ｊ．Ｐ．）ら，１９９１年，Ｍａｐｐｉｎｇ　ｏｆ　ｓｅｒｏｌｏｇｉｃａｌｌｙ　ｒｅｌｅｖａｎｔ　ｒｅｇｉｏｎｓ　ｏｆ　ｈｕｍａｎ　ｃｙｔｏｍｅｇａｌｏｖｉｒｕｓ　ｐｈｏｓｐｈｏｐｒｏｔｅｉｎ　ｐｐ１５０　ｕｓｉｎｇ　ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ　ｐｅｐｔｉｄｅｓ，Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．，７２巻；１４０９～１４１３頁）ｐｐＵＬ３２のアミノ酸５９５～６１４に相当する領域、中に含まれることとの間に関係があるとしている。

分子生物学またはペプチド化学により製造された単一の良く特徴付けられたウイスルタンパクまたはその部分からなる抗原材料が、血清学的診断の向上に有望な道具であることが分かってきた［６－１４］。自然感染中に誘発される液性免疫反応の分析により、ＵＬ３２（ｐｐＵＬ３２）［１５］によりコードされウイルス被包中に局在している１５０ｋＤの塩基性リンタンパクは高度に免疫原性であり、略１００％の試験されたＨＣＭＶ血清陽性被検者からの血清により認められることが繰返し示されている［６，１６］。この分子において、少なくとも二つのエピトープが同定され、人イムノグロブリンと効率的に反応することが示された。特に、複数のｐｐＵＬ３２融合タンパクの分析により、分子（ａａ１００６～１０４８）の５’→３’方向に読むａａ１００６とａａ１０４８との間の配列中に局在している領域が、８０％を越えるＩｇＭ陽性血清と反応することが示された［９，１１］。化学的に合成すると、ａａ５９５と６１４との間に局在するもう一つの領域が、略１００％のＩｇＧ陽性血清と反応した［１７］。組換えタンパクとして発現されると、この領域はＨＣＭＶ特異性ＩｇＭとも非常に効率的に反応することがわかった［１２］。最近、二つのコード領域が融合され、ＩｇＭ結合能において全ｐｐ１５０分子に取って換わることのできる二重エピトープ融合タンパクを製造することが示された［１２］。

ＩｇＭと非常に良好に反応するもう一つのＨＣＭＶタンパクは、ウイルス遺伝子ＵＬ４４（ｐｐＵＬ４４）によりコードされている［７，１１］、５２ｋＤ非構造ＤＮＡ結合リンタンパク［１８］である。分子のＣＯＯＨ部分は、効率的なＩｇＭ結合を示し、（主にNH_2半部分に存在する）Ｈｅｒｐｅｓｖｉｒｉｄａｅファミリーの他の要素の相同タンパクと交差反応する関連するアミノ酸配列を含まない［１９］。このタンパクのＣＯＯＨ半

部分を発現させ人血清を用いて試験した。この領域を発現するＤＮＡ配列を実際に（ＬａｃＺの垂直に切断した（truncated）配列を有する）プラスミドｐ－ＲＯＳ中ＳｍａＩ部位に挿入し、Ｅ．ｃｏｌｉ中にクローニングし、良好な結果を提供する融合タンパクＨ１０を得た［２１］。

ｐｐＵＬ３２およびｐｐＵＬ４４以外に、他の二つのＨＣＭＶタンパク、すなわちウイルス遺伝子ＵＬ８３（ｐｐＵＬ８３）によりコードされている６５ｋＤの主要マトリックスリンタンパクと、ウイルス遺伝子ＵＬ８０ａ（ｐｐＵＬ８０ａ）によりコードされている３８ｋＤの集合リンタンパクとが良く知られている。最初のものは強力なＩｇＭ反応を誘発することが知られており、一次感染中のこのタンパクのみに反応する抗体が示された［７］。同様に、この第２のタンパクへのＩｇＭは、ウイルス再活性化しているＨＣＭＶ血清陽性移植患者において検出される第１のマーカーであることが非常に多い［クラート（Ｋｒａａｔ）ら，１９９５，提出された原稿］。さらに、出願人の一部は、先天的に感染した新生時におけるこのタンパクへの強力なＩｇＭ反応性を観察した（ラッツァロット（Ｌａｚｚａｒｏｔｔｏ）およびランディニ（Ｌａｎｄｉｎｉ），非公開観察）。

しかしながら、前記研究は、近年利用されている診断キットにおいてウイルスまたはウイルス成分（精製ウイルス粒子）に実際に取って換わることのできるような組換えタンパク材料の製造において今まで成功していなかった。

発明の開示

本発明の主要な目的は、ウイルスおよび／または感染細胞溶解物と実質的に同じ効率で、人サイトメガロウイルスに対して生成される抗体特にＩｇＭ及びＩｇＧと免疫反応により結合することができ、関連する血清学的試験においてそのような抗体を検出するための抗原として用いることができる組換えタンパク材料、特に融合タンパクを提供することにある。

本発明のさらなる目的は、前記タンパク材料から誘導される診断薬およびキットを提供することにある。

本発明のさらなる目的は、前記組換えタンパク材料を融合タンパクとして発現するように原核生物および／または真核生物宿主生物中に挿入することのできるプラスミドを提供することにある。

酵素的イムノアッセイにより人血清中においてサイトメガロウイルス特異的ＩｇＭを検出するための組換え抗原、特に融合タンパクを提供することも本発明の目的である。

本発明のさらなる目的は、前記タンパク材料から誘導される診断薬およびキットを提供することにある。

最後に、本発明のさらなる目的は、前記組換えタンパク材料を融合タンパク、特にＣＫＳタンパクと融合した融合タンパクとして発現するように原核生物および／または真核生物宿主生物中に挿入することのできるプラスミドを提供することにある。

本発明によれば、人サイトメガロウイルス（ＨＣＭＶ）に対する抗体と結合することができる組換えタンパク材料であって、タンパクｐｐ５２の５’→３’方向に読むａａ２０２とａａ４３４との間の配列の少なくとも一部を有する第１の領域、ｐｐ１５０の５’→３’方向に読むａａｌ００６とａａ１０４８との間の配列の少なくとも一部を有する第２の領域、およびｐｐ１５０の５’→３’方向のａａ５９５と６１４との間の配列の少なくとも一部を有する第３の領域を含む融合タンパクからなり、前記領域は融合タンパク内において互いに関して並べ変えることができるものであることを特徴とする組換えタンパクが提供される。

前記領域は、好ましくは前記ｐｐ５２およびｐｐ１５０の全長の配列を含み、好ましいが限定されない態様によれば、本発明の融合タンパクは、５’→３’の方向に連なっている前記第１の領域、そこから直ぐ下流に位置する前記第３の領域および前記第２の領域を含んでなり、前記第３の領域の下流において前記第３と第２の領域との間にブリッジ配列が挿入されている。

前記ブリッジ配列は、５’→３’の方向に、次の一連のアミノ酸ｌｙｓ　ｌｅｕ　ｇｌｎ　ｇｌｕ　ｐｈｅ、を含んでなる。

本発明は、さらに、先に定義した融合タンパクを含むことを特徴とする血清学的方法によりＨＣＭＶ感染を診断するための試薬を提供する。
特に、この診断薬は、配列番号：１として挙げられている配列中に示されるヌクレオチド００１からヌクレオチド９００に読むヌクレオチド配列によりコードされているアミノ酸の少なくとも一部分からなる融合タンパクを含んでなる。
本発明は、また、前記融合タンパクに対する少なくとも一つのモノ特異性ポリクローナル血清またはモノクローナル抗体（ＭａＢ）を含んでなる、血清学によりＨＣＭＶを直接検出するための診断薬にも関する。
最後に、本発明は、原核生物または真核生物宿主生物中に挿入することのできるプラスミドであって、ＨＣＭＶのタンパクｐｐ５２の５’→３’方向に読むａａ２０２とａａ４３４との間の配列の少なくとも一部をコードする第１のＤＮＡ領域、タンパクｐｐ１５０の５’→３’方向に読むａａ１００６とａａ１０４８との間の配列の少なくとも一部をコードする第２のＤＮＡ領域、およびタンパクｐｐ１５０の５’→３’方向のａａ５９５とａａ６１４との間のアミノ酸配列をコード化する第３のＤＮＡ領域を組み合わせて含むことを特徴とするプラスミドに関する。
特に、前記プラスミドは、配列番号：１として挙げられている配列中に示されるヌクレオチド００２からヌクレオチド９０７のヌクレオチド配列、または配列番号：３として示されているものを含む。
さらに、本発明の改良された観点によれば、人血清中においてサイトメガロウイルス特異的ＩｇＭを酵素的イムノアッセイにより検出するための組換え抗原の混合物であって、
（ｉ）ウイルスタンパクｐｐ５２の５’→３’方向に読むａａ２０２とａａ４３４との間の配列の少なくとも一部に相当するアミノ酸配列（Ｈ１０）を有する第１の領域、ウイルスタンパクｐｐ１５０の５’→３’方向に読むａａ１００６とａａ１０４８との間の配列の少なくとも一部に相当するアミノ酸配列（Ｆ３）を有する第２の領域、および同じウイルスタンパクｐｐ１５０の５’→３’方向に読むａａ５９５とａａ６１４との間の配列の少なくとも一部に相当するアミノ酸配列（Ａ１Ｃ２）を有する第３の領域を含んでなる第１の融合タンパクであって、前記領域は第１の融合タンパク内において互いに関して並べ変えることができるものである第１の融合タンパク、
（ｉｉ）ウイルス遺伝子ＵＬ８３によりコードされている主要マトリックスタンパクｐｐ６５の５’→３’方向に読むａａ２９７とａａ５１０との間の配列の少なくとも一部に相当するアミノ酸の配列にある免疫原性領域を含む第２の融合タンパク、および
（ｉｉｉ）ウイルス遺伝子ＵＬ８０ａによりコードされているウイルス集合タンパクｐｐ３８の５’→３’方向に読むａａ１１７とａａ３７３との間の配列の少なくとも一部に相当するアミノ酸の配列にある免疫原性領域を含む第３の融合タンパクを組み合わせて含むことを特徴とする混合物が提供される。
特に、前記領域は、タンパクＣＫＳまたは少なくともその一部分と融合している、ｐｐ５２、ｐｐ１５０、ｐｐ６５およびｐｐ３８の全長の前記アミノ酸配列を含む。
本発明は、さらに、原核生物または真核生物宿主生物中に挿入することのできるプラスミドであって、ウイルス遺伝子ＵＬ８３によりコードされているＨＣＭＶ主要マトリックスタンパクｐｐ６５の５’→３’方向に読むａａ２９７とａａ５１０との間の配列の少なくとも一部をコードするＤＮＡ配列を含み、前記配列が、タンパクＣＫＳをコードするものを含むアミノ酸１からアミノ酸２４０までの配列に相当する第２の配列の３’末端において結合されたものであることを特徴とするプラスミドに関する。
本発明は、また、原核生物または真核生物宿主生物中に挿入することのできるさらなるプラスミドであって、ウイルス遺伝子ＵＬ８０ａによりコードされているＨＣＭＶ集合タンパクｐｐ３８の５’→３’方向に読むａａ１１７とａａ３７３との間の配列の少なくとも一部をコードするＤＮＡ配列を含み、前記配列が、タンパクＣＫＳをコードするものを含むアミノ酸１からアミノ酸２４０までの配列に相当する第２の配列の３’末端において結合されたものであることを特徴とするプラスミドにも関する。
最後に、本発明は、人血清中においてサイトメガロウイルス特異性ＩｇＭを酵素的イムノ

アッセイにより検出するためのモノおよびポリエピトープ融合タンパクの混合物の使用であって、前記混合物が、
（ｉ）ウイルスタンパクｐｐ５２の５’→３’方向に読むａａ２０２とａａ４３４との間の配列の少なくとも一部に相当するアミノ酸配列（Ｈ１０）を有する第１の領域、ウイルスｐｐ１５０の５’→３’方向に読むａａ１００６とａａ１０４８との間の配列の少なくとも一部に相当するアミノ酸配列（Ｆ３）を有する第２の領域、および同じウイルスタンパクｐｐ１５０の５’→３’方向に読むａａ５９５とａａ６１４との間の配列の少なくとも一部に相当するアミノ酸配列（Ａ１Ｃ２）を有する第３の領域を含んでなる第１の融合タンパクであって、前記領域は第１の融合タンパク内において互いに関して並べ変えることができるものである第１の融合タンパク、
（ｉｉ）ウイルス遺伝子ＵＬ８３によりコードされている主要マトリックスタンパクｐｐ６５の５’→３’方向に読むａａ２９７とａａ５１０との間の配列の少なくとも一部に相当するアミノ酸の配列にある免疫原性領域を含む第２の融合タンパク、および
（ｉｉｉ）ウイルス遺伝子ＵＬ８０ａによりコードされているウイルス集合タンパクｐｐ３８の５’→３’方向に読むａａ１１７とａａ３７３との間の配列の少なくとも一部に相当するアミノ酸の配列にある免疫原性領域を含む第３の融合タンパクを組み合わせて含むことを特徴とする使用に関する。
本発明は、さらに、人血清中においてサイトメガロウイルス特異的ＩｇＭを酵素的イムノアッセイにより検出するための診断キットを製造するための前記融合タンパクの混合物の使用に関する。
その内容がここで参考として組み込まれる出願人の一部のポリエピトープ融合タンパクについての研究から始まった本発明の第１の観点［１２］によれば、マニアティス（Ｍａｎｉａｔｉｓ）らにより記載された良く知られている技術（１９８２年版モレキュラー・クローニング（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｃｌｏｎｉｎｇ）：ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバー在コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー社（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）の実験室マニュアル）によるような、プラスミドｐ－ＲＯＳとともに作用する一連のクローンが調製され、これらのクローンは一旦Ｅ．ｃｏｌｉに挿入されＩＰＴＧで活性化されるとβ－ガラクトシダーゼ（β－Ｇａｌ）の一部を含む融合タンパクの全範囲を製造することができ、次にそれを、異なる検出水準を確かめるために移植を受けた患者からのＨＣＭＶ特異的ＩｇＭおよびＩｇＧについて既知の技術（ウエスタンブロット、イムノブロット、ＥＬＩＳＡ等）を用いてＨＣＭＶ陽性血清と比較試験を行った。
特に、アミノ酸配列Ａ１Ｃ２を発現することのできる第１のプラスミドであるｐＭＢ２８、ウイルスタンパクｐｐ１５０のＣＯＯＨ末端の最後の４４アミノ酸を含んでおり５’→３’方向の３０１３から３１４４のＵＬ３２ヌクレオチドによりコードされているｐｐＵＬ３２の新規免疫原性配列Ｆ３を発現することのできる第２のプラスミドであるｐＧＴ１、およびβ－Ｇａｌを有する単一の融合タンパクとしてＡ１Ｃ２およびＦ３を発現することのできる第３のプラスミドであるｐＭＢ３４が調製されたが、前記第１のプラスミドは、プラッチター（Ｐｌａｔｃｈｔｅｒ）ら（１９９２年版「デテクション・オブ・サイトメガロウイルス．．．（Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　ｏｆ　ｃｙｔｏｍｅｇａｌｏｖｉｒｕｓ．．．）」；Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．３０巻；２０１～２０６頁）に従って原核生物発現ベクターｐ－ＲＯＳのポリクローン化部位のＨｉｎｄＩＩＩ部位とＳａｌＩ部位との間に修飾かつＰＣＲ増幅されたＤＮＡフラグメントを挿入することにより得られ、前記第２のプフスミドは、停止コドンを対応するＥｃｏＲＩ部位で置き換えるように、ベクターｐ－Ａｌｔｅｒを利用して突然変異により適当に変化させたＬａｍｂｄａＧＴ１１クローンからのＤＮＡ　ＥｃｏＲＩフラグメントをｐ－ＲＯＳのＳｍａＩ部位に挿入することにより得た。第３のプラスミドは、ＳｔｕＩ部位においてｐＧＴ１のために用いられるＦ３をコードする同じ７８ｂｐ（塩基対）ＥｃｏＲＩフラグメントをプラスミドｐＭＢ２８に挿入し、Ａ１Ｃ２とＦ３をコードする前記二つのＤＮＡ配列の間に、５つのアミノ酸：ｌｙｓ　ｌｅｕ　ｇｌｎ　ｇｌｕ　ｐｈｅ（ＩＵＰＡＣによるとＫ，Ｌ，Ｑ，Ｅおよ

びＦ）からなるブリッジ配列を存在させることにより得た。さらに、タンパクそれ自体のＣＯＯＨ末端の最後の２３３アミノ酸からなるウイルスタンパクｐｐ５２の既知の高度に免疫原性のエピトープ（Ｈ１０）も比較に入れた。

この目的のために、ファージＬａｍｂｄａ　ＧＴ１１のゲノム中のｌａｃＺの直ぐ上流の二つのすぐ近くのＥｃｏＲＩ制限部位の間に含まれるヌクレオチド配列Ｈ１０を、バーグ（Ｂｅｒｇ）およびカイザー（Ｋａｉｓｅｒ）により記載された良く知られている技術に従って、ＥｃｏＲＩで消化することにより得、続いて、ＤＮＡポリメラーゼの存在下に充填操作により、対になっていないアデニン／チミン塩基（Ａ／Ｔ）を相補ヌクレオチドで対にして、付着末端を平滑化する。一方では、プラスミドｐ－ＲＯＳをＳｍａＩで消化して線状化し、次に、Ｌａｍｂｄａ　ＧＴ１１のＥｃｏＲＩ　Ｈ１０フラグメントおよび開いたプラスミドをＤＮＡリガーゼの存在下に一緒にインキュベートし、それにより、ｐ－ＲＯＳ内にある適当なＳｍａＩ部位にフラグメントＨ１０を挿入しプラスミドｐＧＨ１０を組み立てる。後者を次にエレクトロフォレーションによりＥ．ｃｏｌｉに挿入しクローニングした。

最後に、Ａ１Ｃ２およびＦ３をコードするＤＮＡ配列とＨ１０をコードするものの両方を含む最後の「混合」プラスミドを、先のプラスミドから調製した。この目的のために、それぞれｐＧＨ１０およびｐＭＢ３４のために一対のオリゴヌクレオチドを合成し、それらの配列を、それぞれ配列Ｈ１０およびＡ１Ｃ２－Ｆ３のＰＣＲによる鎖増幅のために用いるが、前記オリゴヌクレオチド対は、５’末端において（ＥｃｏＲＩの点における場合）所定の制限酵素のための適当な確認部位を導入することのできる配列を含んでおり、また、β－Ｇａｌとの融合タンパクとして発現されるべきエピトープのためのｐＲＯＳのＳｍａＩ部位における点の場合、それぞれ反対側の末端におけるＨ１０およびＡ１Ｃ２－Ｆ３の５’と３’との間の共通の配列を用いて、既に所望の読み枠中にあり発現ベクターのターゲット部位におけるクローニングの準備ができている前記三つのエピトープを含む単一のＤＮＡフラグメントを増幅させた。従って、最後の分析において、得られるプラスミドであるｐＭＢ４０は、ＳｍａＩ部位に、最も高い免疫原性の既知のｐｐ１５０（Ａ１Ｃ２）のエピトープおよび最も高い免疫原性の既知のｐｐ５２（Ｈ１０）のエピトープの両方を同時に含む新らしい融合タンパクをコードするヌクレオチド００２～９０７に相当するＤＮＡ配列配列番号：１、および前記タンパクのＣＯＯＨ末端における最後の２５アミノ酸（配列Ｄ１）からなる既知のｐｐ１５０のエピトープへの更なる１９アミノ酸の添加から誘導されるｐｐ１５０（Ｆ３）の新しい免疫原性エピトープを含んでいる。

驚くべきことに、前記新規融合タンパクであるＨ１０／Ａ１Ｃ２／Ｆ３は、三つの異なるエピトープを含むタンパクを単一の試験キットにおいて適当に組み合わせることにより得られるものよりも更に高度のＩｇＧおよびＩｇＭ反応性を有することが分かった。従って、同じウイルスタンパク（例えばｐｐＵＬ３２のＡ１Ｃ２およびＦ３）においてまたは異なるタンパク（ｐｐＵＬ４４のＨ１０のようなもの）においてさえ、通常は遠く離れているエピトープを互いに密接に並べることにより、最初の完全なウイルスタンパク中におよび／またはウイルス粒子上に存在していそうなエピトープ立体配座に似せられたという事実がおそらく原因で相乗効果が生じる。

前記配列を含む新規融合タンパクは、実際、感染被検者のＩｇＧおよびＩｇＭとの結合において精製ウイルス粒子と同様に活性であり、最終的に、ＨＣＭＶ感染血清学的診断のための診断キットの調製において実際に精製ウイルス粒子および／または感染細胞に取って換わることのできる品質および量の両方について標準化された抗原を提供することが分かった。明らかに、本発明によるような既述のエピトープは、現行では好ましいものである配列配列番号：２または任意の他の配列の順番で新規融合タンパク中に含まれるようにしてもよいし、また、配列番号：１のヌクレオチド７５７～７７１に相当するもののようにブリッジ配列をそれらの間に挿入させてもよい。

そのようなタンパクを発現するプラスミドｐＭＢ４０は、Ｅ．ｃｏｌｉのような原核生物宿主生物中に挿入することができる。さらに、「混合」フラグメントを得るために記載された特定の方法により、特にＥｃｏＲＩでの消化後に、ベクターｐＨＩＬ－Ｓ１の相当す

る部位において、異なるベクター中でクローニングが行われ、それにより、培地において酵母細胞の外側への分泌信号を表す短いペプチドと融合した組換えタンパクをＰｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ中に発現させるプラスミドｐＨＩＬ－Ｄ１が得られる。そのような発現方法により、就中、Ｅ．ｃｏｌｉ中における発現に用いられるようなＩＰＴＧの代わりにメタノールを添加することにより、すなわちかなり費用のかからない方法により誘導タンパクの製造が誘発される。その結果、本発明によるようなポリエピトープ融合タンパクの製造は大規模、簡単かつ経済的になり得る。

本発明のさらなる要旨によりまた前述の結果から出発し、本発明の第１の観点によるポリエピトープタンパクをさらに研究し、前記領域を異なる方法で並べ、タンパクＣＫＳと共に融合して発現された前記組換え材料を、他のＨＣＭＶタンパクの免疫原性領域と組み合わせ、ＩｇＭに対して高度に効果的に融合タンパクの混合物を得た。

抗ＨＣＭＶ　ＩｇＭ、特に本発明の主要な無症候性相中に生成されるものを効率的に結合する能力は実質的に１００％であるので、ＨＣＭＶ特異的抗体の血清学的検出のための診断薬の直接調製のために、本発明による融合タンパクは単独で用いることができる、または本発明の主要な観点によれば混合して用いることができる。そのような試薬は、本発明の融合タンパクの混合物を、結局は他のＨＣＭＶ抗原または、多数回繰り返され相互に組み合わされる免疫原性配列を含むより複合的な融合タンパクと組み合わせて含み得る。

本発明による融合タンパクに代表されるタンパク材料は、人サイトメガロウイルスの血清学的検出のための診断試薬および／または特異的ポリクローナル血清によりもしくは本発明のタンパクに対する多くの異なる方法により得られるモノクローナル抗体（ＭａＢ）により示されるその検出のための抗原を，既知の技術により調製するためにさらに用いられ得る。

本発明のタンパクを含む前記診断薬は、試薬がニトロセルロース紙上に吸着（ブロッティング）される、人サイトメガロウイルス（ＨＣＭＶ）への抗体の出現を血清学的方法により示すための診断キットの製造のために用いることができる。最後に、本発明のタンパクは、精製後に、ＥＬＩＳＡアッセイ、ラテックス凝集試験、ＲＩＡ、ならびに手動および部分的もしくは完全に自動化されたＨＣＭＶ特異性ＩｇＧおよびＩｇＭの存在を血清学的にスクリーニングする全ての既知の方法において用いることができる。

【図面の簡単な説明】

図１は、ウイルス菌株ＡＤ１６９のＥｃｏＲＩ－Ｙフラグメント中に含まれる遺伝子ＵＬ３２における、本発明の融合タンパクの一つを特徴付ける二つの部分をコードするＤＮＡフラグメントの位置を概略的に示す。

図２および５は、本発明で用いられるプラスミドを調製する方法を概略的に示す。

図３および４は、プラスミドｐＭＢ２８：ｌａｃＺ－Ａ１Ｃ２およびｐＭＢ３４：ｌａｃＺ－Ａ１Ｃ２Ｆ３の構築を概略的に示す。

図６および７は、本発明の第１の要旨によるものを含む異なる組換え融合タンパクまたは全ウイルスを用いてＥＬＩＳＡアッセイによりＨＣＭＶ感染被検者からＩｇＧおよびＩｇＭを検出することに関する実験データを比較する二つの表を示す。

図８は、プラスミドｐＪＯ２１０およびｐＪＯ２１５の構築を概略的に示す。

図９は、プラスミドｐＭＣ２００の構築を概略的に示す。

図１０は、プラスミドｐＪＯ２００の構築を概略的に示す。

図１１は、プラスミドｐＭＢ３８：ｌａｃＺｐｐ３８（１０６～３７３ａａ）の構築を概略的に示す。

図１２は、プラスミドｐＣＭＶ－１Ａ：ＣＫＳ－Ａ１Ｃ２Ｆ３－ＣＫＳの構築を概略的に示す。

図１３Ａは、Ａ１Ｃ２Ｆ３およびＨ１０
ＤＮＡ配列を含むＰＣＲフラグメントの調製を示す。

図１３Ｂは、ｐｐ６５（２９７～５１０ａａ）およびｐｐ３８（１１７～３７３ａａ）ＤＮＡ配列を含むＰＣＲフラグメントの調製を示す。

図１３Ｃは、プラスミドｐＣＭＶ－３Ｂ：ＣＫＳ－Ｈ１０、プラスミドｐＣＭＶ－４：Ｃ

ＫＳ－Ａ１Ｃ２Ｆ３－Ｈ１０、プラスミドｐＣＭＶ－９：ＣＫＳ－ｐｐ６５（２９７～５１０ａａ）、およびプラスミドｐＣＭＶ－２６：ＣＫＳ－ｐｐ３８（１１７～３７３ａａ）の構築を概略的に示す。
図１４Ａは、プラスミドｐＪＯ２００－ΔＭｌｕＩの構築を概略的に示す。
図１４Ｂ，Ｃ，Ｄは、それぞれ、プラスミド残部１５１～１８０（５’－３’）において意図する修飾部位を含むプラスミドｐＪＯ２００のヌクレオチド配列、プラスミドｐＪＯ２００／ＭｌｕＩ／ＣＩＡＰ中に結合するために合成される突然変異オリゴヌクレオチド５’ＣＧＣＧＡＣＧＴ３’の二重鎖構造、および変性残部１５１～１８０（５’－３’）を含むプラスミドｐＪＯ２００ΔＭｌｕＩのヌクレオチド配列を示す。
図１５は、プラスミドｐＦＦ１の構築を概略的に示す。
図１６Ａは、Ａ１Ｃ２Ｆ３－Ｈ１０、ｐｐ６５（２９７～５１０ａａ）、およびｐｐ３８（１１７～３７３ａａ）ＤＮＡ配列を含むＰＣＲフラグメントの調製を示す。
図１６Ｂは、プラスミドｐＣＭＶ－２７：ＣＫＳ－Ａ１Ｃ２Ｆ３－Ｈ１０－ＣＫＳ、プラスミドｐＣＭＶ－２８：ＣＫＳ－ｐｐ６５（２９７～５１０ａａ）－ＣＫＳ、およびプラスミドｐＣＭＶ－２９：ＣＫＳ－ｐｐ３８（１１７～３７３ａａ）－ＣＫＳの構築を概略的に示す。
図１７Ａおよび図１７Ｂは、それぞれ一次および二次ＨＣＭＶ感染している６人の移植を受けた人の経過を示し、グラフＡ１およびＡ２は腎臓移植を受けた人に関し、グラフＡ３，Ｂ１，Ｂ２およびＢ３は心臓移植を受けた人に関する。
図１８～２５は、ＥＩＡによりＩｇＭを検出することに関する実験データを比較する表を示す。

本発明を実施するための最良の形態

本発明を、添付の図面を参照して限定しない実施例によりさらに説明する。

実施例

試薬、酵素および培地　－　制限酵素、Ｔ４ＤＮＡリガーゼ、子ウシの腸のアルカリ性ホスファターゼ（ＣＩＡＰ）、ポリヌクレオチドキナーゼ、およびＤＮＡポリメラーゼＩのクレノウフラグメントを、マサチューセッツ州バーバリー在ニュー・イングランド・バイオラブ社（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｉｎｃ．）またはインジアナ州インジアナポリス在ベーリンガー・マンハイム社（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ　Ｃｏｒｐ．）から購入した。ＤＮＡおよびタンパク分子量標準、ダリチ（Ｄａｌｉｃｈｉ）プレキャスト傾斜ポリアクリルアミドゲル、および緩衝液を有する半乾燥ブロッティングシステムを、マサチューセッツ州ナティック在インテグレイテッド・セパレイション・システムズ社（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　Ｓｅｐａｒａｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｉｎｃ．）から得た。イソプロピル－β－Ｄ－チオガラクトシド（ＩＰＴＧ）、アクリルアミド、Ｎ－Ｎ’－メチレン－ビス－アクリルアミド、Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチルエチレンジアミン（ＴＥＭＥＤ）、４－クロロ－１－ナフトール、およびドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）を、カリフォルニア州リッチモンド在バイオラッド・ラボラトリーズ社（Ｂｉｏｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）から購入した。ワサビダイコンペルオキシダーゼ（ＨＲＰＯ）標識化抗体を、メリーランド州ガイザーブルク在キルケゴール・アンド・ペリー・ラボラトリー社（Ｋｉｒｋｅｇｅａｒｄ　＆　Ｐｅｒｒｙ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　Ｉｎｃ．）から購入した。「ＥＰＩＣＵＲＥＡＮ　ＣＯＬＩ　ＸＬ－１　Ｂｌｕｅ」（ｒｅｃＡ１、ｅｎｄＡ１、ｇｙｒＡ９６、ｔｈｉ－１、ｈｓｄＲ１７、ｓｕｐＥ４４、ｒｅｌＡ１、ｌａｃ［Ｆ’ｐｒｏＡＢ　ｌａｌ^{q}ＺｄＭ１５Ｔｎ１０（Ｔｅｔ^{r}）］）スーパーコンピテントＥ．ｃｏｌｉ細胞、ＤＮＡ単離キット、ＲＮＡ単離キット、およびＺＡＰ－ｃＤＮＡ合成キットを、カリフォルニア州ラ・ジョラ在ストラタジーン・クローニング・システムズ社（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｉｎｃ．）から得た。ＧｅｎｅＡｍｐ試薬キットおよびＡｍｐｌｉＴａｑ　ＤＮＡポリメラーゼを、コネチカット州ノーウォーク在パーキン・エルマー・セタス社（Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ　Ｃｅｔｕｓ）から購入した。シークエナーゼ（Ｓｅｑｕｅｎａｓｅ）および７－ｄｅａｚａ－ｄＧＴＰで配列しているＤＮＡのためのヌクレオチドキットお

よびシークエナーゼバージョン２．０ＤＮＡポリメラーゼを、オハイオ州クリーブランド在ユーエス・バイオケミカル社（Ｕ．Ｓ．Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｒｐ．）から得た。ＰｏｌｙＡ＋ｍＲＮＡ精製キットを、ニュージャージー州ピスキャットアウェイ在ファーマシア・エルケイビー・バイオテクノロジー社（Ｐｈａｒｍａｃｉａ ＬＫＢ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｃ．）から購入した。アンピシリンを含むルリア・ブロス（Ｌｕｒｉａ Ｂｒｏｔｈ）プレート（ＬｉＳａｍＰプレート）を、イリノイ州ロムバード在マイクロ・ダイアグノシティクス社（Ｍｉｃｒｏ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ，Ｉｎｃ．）から購入した。「ＯＰＴＩ－ＭＥＭ」培地、ウシ胎児血清、リン酸エステル緩衝塩水（ＰＢＳ）、コンピテントＥ．ｃｏｌｉＤＨ５α（Ｆ’φ８０ｄｌａｃＺｄＭ１５ｄ（ｌａｃＺＹＡ－ａｒｇＦ）Ｕ１６９ ｄｅｏＲ ｒｅｃＡ１ ｅｎｄＡ１ ｐｈｏＡ ｈｓｄＲ１７ ｓｕｐＥ４４ λ⁻ ｔｈｉ－１ ｇｙｒＡ９６ ｒｅｌＡ１）および「ＵＬＴＲＡＰＵＲＥ」アガロースを、ニューヨーク州グランドアイランド在ギブコＢＲＬ社（ＧＩＢＣＯ ＢＲＬ Ｉｎｃ．）から購入した。バクト（Ｂａｃｔｏ）－トリプトン、バクト－酵母抽出物、およびバクト－寒天を、ミシガン州デトロイト在ディフコ・ラボラトリーズ社（Ｄｉｆｃｏ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）から購入した。「ＮＺＹ」ブロスを、メリーランド州クッキーズヴィル在ベクトン・ディキンソン・マイクロバイオロジー・システムズ社（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ）から購入した。サケ精液ＤＮＡ、リソチーム、アンピシリン、Ｎ－ラウロイルサルコシン、チメロサール、緩衝液、カゼイン酸加水分解産物、尿素、「ＴＷＥＥＮ ２０」のような界面活性剤、ジエチルピロカルボネート（ＤＥＰＣ）および無機塩を、ミズーリ州セントルイス在シグマ・ケミカル社（Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．）から購入した。「ＳＵＰＥＲＢＲＯＴＨ ＩＩ」は、トリプトン１１．２５ｇ／Ｌ、酵母抽出物２２．５ｇ／Ｌ、二塩基リン酸カリウム１１．４ｇ／Ｌ、一塩基リン酸カリウム１．７ｇ／Ｌ、グリセリン１０ｍｌ／Ｌを含んでおり、水酸化ナトリウムでｐＨを７．２に調節した。トリス緩衝塩水（ＴＢＳ）は、トリス２０ｍＭおよびＮａＣｌ １５０ｍＭを含んでおりｐＨは７．５であった。トリス緩衝塩水「ＴＷＥＥＮ ２０」は、ＴＢＳ＋０．０５％「ＴＷＥＥＮ ２０」からなっていた。薄膜ブロック溶液は、ＴＢＳ中に１％ウシ血清アルブミン、１％カゼイン酸加水分解産物、０．０５％「ＴＷＥＥＮ ２０」を含んでなっていた。ルバチーム検体希釈緩衝液（Ｒｕｃａｚｙｍｅ ＳＤＢ）は、トリス１００ｍＭ，ｐＨ７．５、ＮａＣｌ１３５ｍＭ、ＥＤＴＡ１０ｍＭ、０．２％「ＴＷＥＥＮ ２０」、０．０１％チメロサール、および４％子ウシ血清からなっていた。ルバチーム複合希釈液希釈緩衝液は、トリス１００ｍＭ，ｐＨ７．５、ＮａＣｌ １３５ｍＭ、０．０１％チメロサール、および１０％子ウシ血清からなっていた。「ＨＲＰ」発色溶液は、ＴＢＳ中の０．０６％４－クロロ－１－ナフトール、０．０２％H_2O_2、および０．２％メタノールからなる。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ添加緩衝液（ｌｏａｄｉｎｇ ｂｕｆｆｅｒ）は、トリス６２ｍＭ，ｐＨ６．８、２％ＳＤＳ（ドデシル硫酸ナトリウム）、１０％グリセリン、５％β－メルカプトエタノール、および０．１％ブロモフェノールブルーからなっていた。ＴＥ緩衝液は、トリス１０ｍＭ、ＥＤＴＡ１ｍＭ，ｐＨ８．０からなっていた。

ウイルス増殖およびｃＤＮＡの調製 － ＣＭＶ菌株ＡＤ１６９およびタウネ（Ｔｏｗｎｅ）を、５％ウシ胎児血清を加えた「ＯＰＴＩ－ＭＥＭ」培地中で成長した人線維芽細胞中で培養した。感染後６日間後に、感染細胞を遠心分離により採取し、ＰＢＳで洗い、ガラスＰＴＦＥ（「テフロン」）ホモジナイザーで均質化した。全ウイルスＤＮＡを、モカルスキー（Ｍｏｃａｒｓｋｉ Ｅ．Ｓ．）らのＰｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ８２巻：１２２６頁，１９８５年版に記載されているように単離した。全ＲＮＡを、ＲＮＡ単離キット（カリフォルニア州ラ・ジョラ在ストラタジーン・クローニング・システムズ社（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｓｙｓｔｅｍｓ Ｉｎｃ．）製）を用いて均質化細胞から単離し、ｍＲＮＡ単離キット（ニュージャージー州ピスキャットアウェイ在ファーマシア・バイオテック社（Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ）製）を用いてポリＡ＋ＲＮＡを単離した。ＨＣＭＶ ｃＤＮＡを、「ＺＡＰ－ｃＤＮＡ」合成キット（カリフォルニア州ラ・ジョラ在ストラタジーン・クローニング・システムズ社（Ｓｔｒａ

ｔａｇｅｎｅ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｓｙｓｔｅｍｓ Ｉｎｃ.）製）を用いて精製ウイルスｍＲＮＡから合成した。

一般的方法　－全てのＤＮＡの酵素的消化は、供給者の指示に従って行った。ＤＮＡの１マイクログラム当たり少なくとも５単位の酵素を使用し、十分なインキュベーション時間が与えられてＤＮＡが完全に消化した。種々のキットによるＤＮＡおよびＲＮＡの操作、またＰＣＲおよびＤＮＡの配列決定は供給者のプロトコールに従った。以下のために標準的手順を用いた。（１）Ｅ．ｃｏｌｉからのプラスミドＤＮＡの小規模調製および大規模調製、（２）ファージλで感染したＥ．ｃｏｌｉ細胞からのファージ溶解産物ＤＮＡの調製、（３）抗Ｅ．ｃｏｌｉ抗体の吸収のためのファージ溶解産物の調製、（４）フェノール－クロロホルムによる抽出、（５）エタノールによるＤＮＡの沈殿、（６）アガロースゲル上のＤＮＡの制限分析、（７）アガロースおよびポリアクリルアミドゲルからのＤＮＡフラグメントの精製、（８）ＤＮＡポリメラーゼＩのクレノウフラグメントを用いて制限酵素によりＤＮＡの消化により形成した陥没３’末端を充填すること、（９）ＤＮＡフラグメントをＴ４　ＤＮＡリガーゼと結合すること、および（１０）サムブロック（Ｓａｍｂｒｏｃｋ）、フリッシュ（Ｆｒｉｔｓｃｈ）およびマニアティス（Ｍａｎｉａｔｉｓ）のモレキュラー・クローニング（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ）：ア・ラボラトリー・マニュアル（Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ），第２版，ニューヨーク：コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ）１９８９年版（その内容をここで参考として組み込む）に記載されているようなコンピテントＥ．ｃｏｌｉ ＴＢ１細胞（Ｆ⁻ａｒａ ｄ（ｌａｃ－ｐｒｏＡＢ） ｒｐｓＬ φ８０ｄｌａｃＺｄＭ１５ ｈｓｄＲ１７）の調製。ＰＣＲ増幅により生成されたプラスミド内へのクローニングのためのＤＮＡフラグメントをフェノール－クロロホルムで抽出し、ＰＣＲ反応混合物の制限酵素的消化の前にエタノールで沈殿させた。ＰＣＲおよびＤＮＡ配列決定のためのオリゴヌクレオチドを、製造者のプロトコールに従ってアプライド・バイオシステムズ・オリゴヌクレオチド・シンセサイザー（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｚｅｒ）モデル３８０Ｂまたは３９４上で合成した。

実施例１

ｌａｃＺ－Ｈ１０発現ベクターｐＲＯＳＨ１０の構築

マニアティス（Ｍａｎｉａｔｉｓ）らの（１９８２年版モレキュラー・クローニング（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ）：ア・ラボラトリー・マニュアル（Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ），ニューヨーク州コールド・スプリング・ハーバ在コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー社（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）出版）により記載されているような組換えＤＮＡ標準法により操作して、その著者（エリンガー（Ｅｌｌｉｎｇｅｒ）ら）により供給されるプラスミドｐＲＯＳから、ＣＭＶ陽性血清と高反応性のβ－ガラクトシダーゼとの融合タンパクを生成するファージＬａｍｂｄａ Ｇｔ１１を発現する初期遺伝子（ｅａｒｌｙ ｇｅｎｅ）から得られるゲノムクローンを精製した。次に、ファージにより発現されたＤＮＡフラグメントを抽出するためにゲノムを制限酵素ＥｃｏＲＩで消化した。フラグメントを次にベクターｐＵＣ１８内にクローニングし、配列決定した。配列は、ｐｐ５２（ＵＬ４４）のＣＯＯＨ末端において２３３アミノ酸を発現する６９９塩基対のフラグメントを示した。次に、フラグメントを、図２に概略的に示すように、フラグメントのＥｃｏＲＩ末端を充填した後、発現ベクターｐＲＯＳのＳｍａＩ部位においてクローニングした。このように得られたプラスミドをｐＲＯＳＨ１０と名付けた。

実施例２

ｌａｃＺ－Ｆ３発現ベクターｐＧＴ１の構築

実施例１に記載の方法により操作して、ＣＭＶ陽性血清と高反応性のβ－ガラクトシダーゼとの融合タンパクを生成するファージＬａｍｂｄａ Ｇｔ１１を発現する初期遺伝子から得られたゲノムクローンを精製した。次に、ファージにより発現されるＤＮＡフラグメントを抽出するためにゲノムを制限酵素ＥｃｏＲＩで消化した。フラグメントを次にベク

ターｐＵＣ１８内にクローニングし、配列決定した。配列は、ｐ１５０（ＵＬ３２）のＣＯＯＨ末端において４４アミノ酸を発現する１３２塩基対のフラグメントを示した。次に、フラグメントを、実施例１で言及した図２に概略的に示すように、フラグメントのＥｃｏＲＩ末端を充填した後、発現ベクターｐＲＯＳのＳｍａＩ部位においてクローニングした。このように得られたプラスミドをｐＧＴ１と名付けた。

実施例３

ｌａｃＺ－Ａ１Ｃ２Ｆ３発現ベクターｐＭＢ３４の構築

プラスミドｐＭＢ３４は、エリンガー（Ｅｌｌｉｎｇｅｒ）らのＪ．Ｃｌｉｎ．Ｍｉｃｒｏ．２７巻：９７１頁，１９８９年版に記載されているｌａｃＺ発現ベクターｐＲＯＳの誘導体である。このベクターは、ｌａｃＺ遺伝子の下流に位置するポリリンカークローニング部位を有する垂直に切断した形状（ｔｒｕｎｃａｔｅｄ）のｌａｃＺ遺伝子（１－３７５アミノ酸）を含む。ｐＭＢ３４プラスミドを、１５０ｋＤのＨＣＭＶの塩基性リンタンパクをコードするｐｐＵＬ３２の二つの領域をｐＲＯＳ中のｌａｃＺ遺伝子の３’末端に結合することにより二段階で組み立てた。

Ａ．ｐＭＢ２８：ｌａｃＺ－Ａ１Ｃ２の構築

プラスミドｐＭＢ２８は図３に示すようにプラスミドｐＲＯＳの誘導体である。このプラスミドを、ｐｐ１５０のアミノ酸５９５～６１４（ヌクレオチド１７６３～１８４２）をコードするｐｐＵＬ３２の領域からの人サイトメガロウイルス（ＨＣＭＶ）ゲノムＤＮＡのＰＣＲ増幅により得られるＨＣＭＶ－Ａ１Ｃ２含有ＤＮＡフラグメントを、ｐＲＯＳ中のポリリンカー領域内にクローニングすることにより組み立てた。大きなプラスミドＤＮＡ（ｐＲＯＳ）を、一般的方法に記載されているように操作してＤＨ５α細胞から単離した。プラスミドｐＲＯＳをＳｍａＩおよびＨｉｎｄＩＩＩで消化し、ベクター骨格をアガロースゲル上で精製した。ＳａｌＩ部位を含むｐｐＵＬ３２のヌクレオチド１７８３において開始するセンスプライマー、およびＨｉｎｄＩＩＩ部位を含むｐｐＵＬ３２のヌクレオチド１８４２において開始するアンチセンスプライマーを合成し、ゲノムＨＣＭＶＤＮＡを含むＰＣＲ反応混合物に添加した。ＰＣＲ増幅後に、反応混合物をＳｍａＩおよびＨｉｎｄＩＩＩで消化し、Ａ１Ｃ２を含む６０塩基対フラグメント（ヌクレオチド１７３３～１８４２）をアガロースゲル上で精製した。次に、この精製したフラグメントを精製ｐＲＯＳ／ＳａｌＩ／ＨｉｎｄＩＩＩに１６℃で一晩結合（ｌｉｇａｔｅ）した。次の日に、結合混合物をコンピテントＤＨ５α細胞内にトランスフォームした。小さい調製ＤＮＡを、トランスフォーマントから調製し、ｌａｃＺ遺伝子の末端のｐＲＯＳ中における６０塩基対フラグメントの存在をスクリーニングした。Ａ１Ｃ２フラグメントを含むプラスミドｐＭＢ２８を単離した。ｐＭＢ２８中のＡ１Ｃ２のＤＮＡ配列を確認すると、Ａ１Ｃ２コード領域はｌａｃＺコード配列を有する枠内にあった。

Ｂ．ｐＭＢ３４：ｌａｃＺ－Ａ１Ｃ２Ｆ３の構築

プラスミドｐＭＢ３４は図４に示すようにプラスミドｐＭＢ２８の誘導体である。このプラスミドｐＭＢ３４を、モカルスキー（Ｍｏｃａｒｓｋｉ　Ｅ．Ｓ．）らのＰｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ　８２巻：１２２６頁，１９８５年版のλｇｔ１１ライブラリーから誘導されたｐｐＵＬ３２のアミノ酸１００６～１０４３（ヌクレオチド３０１６～３１４４）をコードするｐｐＵＬ３２のλｇｔ１１サブクローンから得られるＨＣＭＶ－Ｆ３含有ＤＮＡフラグメントを、Ａ１Ｃ２　ＤＮＡ配列の直ぐ下流のｐＭＢ２８のポリリンカー領域内にクローニングすることにより組み立てた。大きなプラスミドＤＮＡ（ｐＭＢ２８）を、一般的方法に記載されているようにＤＨ５α細胞から単離した。ファージ溶解産物ＤＮＡを、一般的方法に記載されているようにファージλｇｔ１１クローンλ－Ｆ３から調製した。プラスミドｐＭＢ２８をＳｔｕＩで消化し、平滑末端を有するベクター骨格をアガロースゲル上で精製した。ファージλ－Ｆ３　ＤＮＡをＥｃｏＲＩで消化し、陥没３’末端をＤＮＡポリメラーゼＩのクレノウフラグメントを用いて充填して平滑末端を残した。平滑末端化１２９塩基対λ－Ｆ３フラグメントをアガロースゲル上で精製し、次に、平滑末端をｐＭＢ２８／ＳｔｕＩに１６０℃で一晩結合した。次の日に、結合混合物をコンピテントＤＨ５α細胞内にトランスフォームした。小さい調製ＤＮＡを、トランス

フォーマントから調製し、正しい方向のｌａｃＺ遺伝子の末端のｐＭＢ２８中における１２９塩基対フラグメントの存在をスクリーニングした。正しい方向のＦ３フラグメントを含むプラスミドｐＭＢ３４を単離した。ｐＭＢ３４中のＦ３のＤＮＡ配列を確認すると、Ｆ３コード領域はｌａｃＺ－Ａ１Ｃ２コード配列を有する枠内にあった。ｐＭＢ３４中に形成されたｌａｃＺＡ１Ｃ２Ｆ３のコード領域は、アミノ酸のための国際標準一文字符号化法（それによれば、ＬはＬｅｕ、ＱはＧｌｎ、ＫはＬｙｓ、ＥはＧｌｕ、ＦはＰｈｅを表す。）を用いて以下に示すようにＡ１Ｃ２とＦ３との間に５アミノ酸のブリッジを含む。

（１）ｌａｃＺ（１－３７５ａａ）－Ａ１Ｃ２（５９５～６１４ａａ、ｐｐ１５０）－Ｋ－Ｌ－Ｑ－Ｅ－Ｆ－Ｆ３（１００６～１０４８ａａ、ｐｐ１５０）

実施例４

ｌａｃＺ－Ｈ１０Ａ１Ｃ２Ｆ３発現ベクターｐＭＢ４０の構築

先に記載したプラスミドから開始して、前記実施例１，２および３に記載され図５に示されるような方法により操作して、二対のオリゴヌクレオチドを合成し、その配列を、それぞれプラスミドｐＧＨ１０およびｐＭＢ３４内に局在しているＨ１０およびＡ１Ｃ２－Ｆ３配列の、ＰＣＲによる鎖増幅に用いた。前記プライマーを含むオリゴヌクレオチド配列は以下の如くである。

$_{Eco}$Ｈ１０：GAA TTC ACA GCC AAT AAC CGC GTC AGT TTC ；

Ｈ１０$_{A1C2}$：AGG CGT CGG CGT GCC GCA CTT TTG CTT CTT GGT GTT

ｐＧＨ１０からのＨ１０を増幅するため、ＥｃｏＲＩ部位を増幅した配列の５’に導入し、Ａ１Ｃ２に相同性の１２塩基対の配列を増幅したフラグメントの３’に導入；および

$_{H10}$Ａ１Ｃ２：　CAA AAG TGC GGC ACG CCG ACG CCT GTC AAT CCT TCC；

Ｆ３$_{Eco}$：　GAA TTC CTA TTC CTC CGT GTT CTT AAT CTT

ｐＭＢ３４からのＡ１Ｃ２－Ｆ３フラグメントを増幅するため、増幅した生成物の５’にＨ１０に相同性の配列を、および３’にＥｃｏＲＩ部位を導入。

前記二つの増幅から得られた二つのフラグメント（$_{ECO}$Ｈ１０$_{A1C2}$および$_{H10}$Ａ１Ｃ２－Ｆ３$_{ECO}$）を、外部プライマー$_{ECO}$Ｈ１０およびＦ３$_{ECO}$と共に混合し、さらに増幅した。配列３’$_{ECO}$Ｈ１０$_{A1C2}$および５’$_{H10}$Ａ１Ｃ２－Ｆ３$_{ECO}$が相補的であるので、増幅生成物は三つの全てのエピトープを含み、各末端にＥｃｏＲＩ部位を有する。

次に、増幅配列をｐＲＯＳ内にクローン化すると、それから誘導されるｐＭＢ４０と称するプラスミドは、対応するＳｍａＩ部位とともに、ヌクレオチド００２～９０７に相当するＤＮＡ配列配列番号：１を含んでいた。

実施例５

前記実施例１～４に記載のプラスミドを、エレクトロポレーションによりＥ．ｃｏｌｉ内に挿入しクローニングし、次に、ＩＰＴＧの添加により所望の融合タンパクの合成を誘発し、そのように得られたタンパクを細菌細胞の溶解ならびにＳＤＳおよびβ－メルカプトエタノールによる細胞溶解物の変性によりコンピテントにし、次に、タンパクをＳＤＳ－ＰＡＧＥにより９％～１２％アクリルアミドゲル中を通し、次にニトロセルロースに移して免疫反応を起こし、ミニブロッター（Ｍｉｎｉｂｌｏｔｔｅｒ）（米国ケンブリッジ－マス（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ－Ｍａｓｓ）製イムネティクス（Ｉｍｍｕｎｅｔｉｃｓ））により多くの血清サンプルの予備スクリーニングを行い、精製ＩｇＧ（オーストリア国ウイーン在イムノ・アーゲー（Ｉｍｍｕｎｏ　ＡＧ）製「ＥＮＤＯＢＵＬＩＮ」）および一群

のＩｇＭ高度陽性血清の両方を、１：１００の希釈で用いた。ＩｇＧおよびＩｇＭの検出のために個々の人血清サンプルを１：８０に希釈し、ペルオキシダーゼ結合抗－ｇまたは抗－μ鎖を第２の抗体として用いた。二つの群の人血清サンプルを用いた：第１群の血清は、１７のＨＣＭＶ陽性サンプルからなり、ＥＬＩＳＡにより検出すると、そのうち８つはＨＣＭＶに高ＩｇＧ価を有しており７つはＨＣＭＶ特異的ＩｇＧが中間／低水準であり、ＨＣＭＶ特異的ＩｇＧの存在をイムノブロッティングにより確認した。第２群の血清は、１９のＨＣＭＶ陽性サンプルからなり、ＥＬＩＳＡにより検出すると、そのうち１０はＨＣＭＶに高ＩｇＭ価を有しており９つはＨＣＭＶ特異的ＩｇＭが中間／低水準であり、この場合においても、ＨＣＭＶ特異的ＩｇＭの存在をイムノブロッティングにより確認した。

抗－ＨＣＭＶ　ＩｇＧの評価を、エムエイ・バイオプロダクツ（Ｍ．Ａ．Ｂｉｏｐｒｏｄｕｃｔｓ）（米国メリーランド州ウォーカーズビル在）のＣＭＶキットにより行い、「ｍｉｃｒｏＥＬＩＳＡ」自動読取機（米国バーニジア州アレキサンドリア在ダイナテック・プロダクツ（Ｄｙｎａｔｅｃｈ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ）製）上でプレートを読んだ。線型回帰分析を行い試験の実行を標準化するために、各プレートは三つの校正血清を含んでいた。抗－ＨＣＭＶ　ＩｇＭの評価は、テクノジェネティクス社（Ｔｅｃｈｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ）（独国ハンブルク在）のＣＭＶ　ＩｇＭ「ＥＬＡ」キットを用いて行った。結果は製造者により指示されているように解釈した。

誤った陽性の結果を避けるために、全てのサンプルについて、ラテックス凝集（英国タートフォード在ウェルカム社（Ｗｅｌｌｃｏｍｅ）のリューマ－ウェルコ試験（Ｒｈｅｕｍａ－Ｗｅｌｌｃｏ　ｔｅｓｔ））によるリューマチ性因子の検出のための試験も行い、陰性のサンプルのみを比較に用いた。結果を図６（ＩｇＧ）および図７（ＩｇＭ）の表１および２に示す。

示されたデータから明らかなように、Ｈ１０／Ａ１Ｃ２／Ｆについて得られた結果が、他の融合タンパクで得られたものと、ＩｇＧおよびＩｇＭの両方について比較して明らかに向上しているのみならず、全ウイルスからなる抗原について得られた結果に十分に合致している。

実施例６

ＣＫＳ発現ベクターｐＪＯ２００の構築

ＣＫＳ発現ベクターｐＪＯ２００は、組換えタンパクを融合してＣＭＰ－ＫＤＯシンセターゼ（ＣＫＳ）タンパクとする。ＣＫＳ（ｋｄｓＢ遺伝子）をコードする構造遺伝子のためのＤＮＡ配列は、ゴールドマン（Ｇｏｌｄｍａｎ）らのＪ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６１巻：１５８３１頁，１９８６年版に公表されている。ＤＮＡ配列から誘導されたＣＫＳの合計２４８のアミノ酸配列は同じ出版物に記載されている。このｐＪＯ２００ベクターは、ボーリング（Ｂｏｌｌｉｎｇ）およびマンデッキ（Ｍａｎｄｅｃｋｉ）のバイオテクニーク（Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅ），８巻：４６８頁，１９９０年版に記載されているプラスミドｐＴＢ２０１（図８）を用いて開始する３段階の手順により構築される。プラスミドｐＪＯ２００のための組立プランは、二つの制限酵素の除去、およびＣＫＳ遺伝子の３’末端におけるマルチクローニング部位の添加を含む。これは、ＣＫＳの３’末端におけるタンパク抗原をコードするＨＣＭＶ（人サイトメガロウイルス）のクローニングを容易化する。完成ベクターは、合計２６０のアミノ酸となる、ポリリンカーＤＮＡ配列により寄与されるＣＫＳ遺伝子の末端における最初のｋｄｓＢ遺伝子の２４０アミノ酸＋更なる２０アミノ酸のコード配列を含む。

Ａ．ｐＪＯ２１０の構築

プラスミドｐＪＯ２１０は、ＣＫＳ発現ベクターｐＴＢ２０１の誘導体である。このプラスミドは、ｐＴＢ２０１中ＣＫＳ遺伝子のためのプロモーターの上流に存在する単一のＥｃｏＲＩ部位を除去することにより組み立てた。大きなプラスミドＤＮＡ（ｐＴＢ２０１）を、前述の「一般的方法」に記載の技術を用いてＴＢ１細胞から単離した。ＤＮＡをＥｃｏＲＩで完全に消化してポリアクリルアミドゲル上で精製した。次に、精製ｐＴＢ２０１／ＥｃｏＲＩフラグメントを、デオキシヌクレオチドトリホスファーゼの存在下にＤＮ

Ａポリメラーゼ Ｉのクレノウフラグメントを用いて処理した。この酵素は、ＥｃｏＲＩで消化した後に形成された陥没３’末端を充填し、平滑末端を残す。クレノウフラグメントで処理した後、ＤＮＡをフェノール／クロロホルム抽出し、エタノールで沈殿させ、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼ緩衝液中に再懸濁させ、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼと室温で４時間結合させた。結合混合物をコンピテントＴＢ１細胞内にトランスフォームした。小さな調製ＤＮＡをトランスフォーマントから調製し、ＥｃｏＲＩ部位の損失をスクリーニングした。ＥｃｏＲＩ部位を損失したプラスミドｐＪＯ２１０を単離した。

Ｂ．ｐＪＯ２１５の構築

プラスミドｐＪＯ２１５は、プラスミドｐＪＯ２１０の誘導体である（図８）。このプラスミドは、ブリッジ突然変異（マンデッキ（Ｍａｎｄｅｃｋｉ，Ｗ．）のＰｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，８３７１７７，１９８６年版）により、ＣＫＳ遺伝子のためのプロモーター中に位置する単一のＢａｍＨ－Ｉ部位を除去することにより組み立てた。大きなプラスミドＤＮＡ（ｐＴＢ２１０）を、一般的方法に記載のようにＴＢ１細胞から単離した。ＤＮＡをＢａｍＨ－Ｉで完全に消化してポリアクリルアミドゲル上で精製した。次に、精製ｐＴＢ２１０／ＢａｍＨ－Ｉフラグメントを、以下の突然変異性オリゴヌクレオチドと混合した。

（２）５’ＧＧＡＴＡＡＣＡＡＴ　ＴＧＧＧＣＡＴＣＣＡ　ＧＴＡＡＧＧＡＧＧＴ３’

これは、ＢａｍＨ－Ｉ部位に及ぶ領域におけるｐＪＯ２１０のＤＮＡストランドの一つに相補的である。このオリゴヌクレオチドはアンダーラインしている一つの塩基変化を含み、それは、プラスミドｐＪＯ２１０に組み込んだときにＢａｍＨ－Ｉ部位を破壊する。突然変異性オリゴヌクレオチドをｐＪＯ２１０／ＢａｍＨ－Ｉと混合した後、混合物を３分間沸騰させ、５分間室温に冷却し、次にコンピテントＴＢ１細胞内にトランスフォームした。小さな調製ＤＮＡを、トランスフォーマントから調製し、ＢａｍＨ－Ｉ部位の損失をスクリーニングした。ＢａｍＨ－Ｉ部位を損失したプラスミドｐＪＯ２１５を単離した。

Ｃ．ｐＭＣ２００の構築

プラスミドｐＭＣ２００は、マンデッキ（Ｍａｎｄｅｃｋｉ）およびボーリング（Ｂｏｌｌｉｎｇ）のＧｅｎｅ，６８巻：１０１頁，１９８８年版に記載のプラスミドｐＭＷ５０７の誘導体である（図９）。このプラスミドは、マンデッキおよびボーリングにより１９８８年に記載された遺伝子合成のＦｏｋＩ法を用いてｐＭＷ５０７内に、マルチクローニング部位を含む合成オリゴヌクレオチドをクローニングすることにより組み立てた。大きなプラスミドＤＮＡ（ｐＭＷ５０７）を、一般的方法に記載のようにＴＢ１細胞から単離した。ＤＮＡをＳｍａＩで完全に消化して、次に、以下のオリゴヌクレオチドと混合した。

（３）５’ＡＧＧＡＴＧＣＧＧＡ　ＴＣＣＣＣＧＡＴＣＴ　ＣＧＡＣＣＣＧＴＣＧ　ＡＣＧＡＡＴＴＣＧＡ　ＧＣＴＣＧＧＴＡＣＣ　ＣＧＧＧＧＡＴＣＣＴ　ＣＴＡＧＡＣＴＧＣＡ　ＧＧＣＡＴＧＣＴＡＡ　ＧＴＡＡＧＴＡＧＡＴ　ＣＧＧＧＡＡＴＴＣＡ　ＣＡＴＣＣＧ３’

これは、以下のように、末端にＦｏｋＩアームおよび複数の制限酵素部位を含む。

（４）５’ＦｏｋＩアーム－ＢｇＩＩＩ付着末端－ＳａｌＩ／ＡｃｃＩ／ＨｉｎｃＩＩ－ＥｃｏＲＩ－ＳｓｔＩ－ＫｐｎＩ－ＳｍａＩ／ＸｍａＩ－ＢａｍＨ－Ｉ－ＸｂａＩ－ＰｓｔＩ－ＳｐｈＩ－停止コドン－ＢｇＩＩＩ付着末端－ＦｏｋＩアーム３’オリゴヌクレオチドをｐＭＷ５０７／ＳｍａＩと混合した後、混合物を３分間沸騰させ、５分間室温に冷却し、次にコンピテントＴＢ１細胞内にトランスフォームした。小さな調製ＤＮＡをトランスフォーマントから調製し、マルチクローニング部位の存在をスクリーニングした。マルチクローニング部位を含むプラスミドｐＭＣ２００を単離した。マルチクローニング部位のＤＮＡ配列を確認した。

Ｄ．ｐＪＯ２００の構築

プラスミドｐＭＣ２００は、プラスミドｐＪＯ２１５の誘導体である（図１０）。このプラスミドは、ｐＭＣ２００からマルチクローニング部位を除去しｐＪＯ２１５内のＣＫＳ遺伝子の３’末端においてこの部位をクローニングすることにより組み立てた。大きなプ

ラスミドＤＮＡ（ｐＭＣ２００およびｐＪＯ２１５）を、一般的方法に記載のようにＴＢ１細胞から単離した。プラスミドｐＪＯ２１５をＢｇＩＩＩで完全に消化し、次に、結合反応中にプラスミドが再環化することを防止するために子ウシ腸アルカリ性ホスファターゼ（ＣＩＡＰ）で処理した。プラスミドｐＭＣ２００をＦｏｋＩで消化し、次に、ｐＪＯ２１５／ＢｇＩＩＩ／ＣＩＡＰ　ＤＮＡおよびマルチクローニング部位（１０６塩基対）を含むｐＭＣ２００ＦｏｋＩ　ＤＮＡをポリアクリルアミドゲル上で精製した。プラスミドｐＭＣ２００をＦｏｋＩで消化することにより、プラスミドからマルチクローニング部位が離される。このＤＮＡは、ＢｇＩＩＩで消化されたｐＪＯ２１５　ＤＮＡ内に容易に結合されるＢｇＩＩＩ付着末端を含む。これら精製ＤＮＡフラグメントを混合し、Ｔ４ＤＮＡリガーゼと１６℃で一晩結合した。次の日に、結合混合物をコンピテントＴＢ１細胞内にトランスフォームした。小さな調製ＤＮＡをトランスフォーマントから調製し、ＢｇＩＩＩ部位において正しい方向のマルチクローニング部位の存在をスクリーニングした。正しい方向のマルチクローニング部位を含むプラスミドｐＪＯ２００を単離した。ＢｇＩＩＩ部位におけるｐＪＯ２００内のマルチクローニング部位のＤＮＡ配列を確認した。

実施例７

ｌａｃＺ－ｐｐ３８（１０６～３７３ａａ）発現ベクターｐＭＢ３８の構築

プラスミドｐＭＢ３８は、ｌａｃＺ発現ベクターｐＲＯＳの誘導体である（図１１）。このプラスミドは、ｐｐ３８のアミノ酸１０６～３７３ａａ（ヌクレオチド３１６～１１１９）をコードするｐｐＵＬ８０ａの領域からのゲノムＨＣＭＶ　ＤＮＡをＰＣＲ増幅することにより得られるＨＣＭＶ－ｐｐ３８（１０６～３７３ａａ）含有ＤＮＡフラグメントを、ポリリンカー領域ｐＲＯＳ内にクローニングすることにより組み立てた。ｐｐＵＬ８０ａ領域はＨＣＭＶの３８ｋＤのリンタンパクをコードする。プラスミドｐＲＯＳをＳａｌＩおよびＨｉｎｄＩＩＩで消化し、ベクター骨格をアガロースゲル上で精製した。ＳａｌＩ部位を含むｐｐＵＬ８０ａのヌクレオチド３１６で開始するセンスプライマー、およびＨｉｎｄＩＩＩ部位を含むｐｐＵＬ８０ａのヌクレオチド１１１０で開始するアンチセンスプライマーを合成し、ゲノムＨＣＭＶ　ＤＮＡを含むＰＣＲ反応混合物に添加した。ＰＣＲ増幅後、反応混合物をＳａｌＩおよびＨｉｎｄＩＩＩで消化し、ｐｐ３８（１０６～３７３ａａ）を含む８０４塩基対フラグメントをアガロースゲル上で精製した。この精製フラグメントを、次に、精製ｐＲＯＳ／ＳａｌＩ／ＨｉｎｄＩＩＩに１６℃で一晩結合した。次の日に、結合混合物をコンピテントＤＨ５α細胞内にトランスフォームした。小さな調製ＤＮＡを、トランスフォーマントから調製し、ｌａｃＺ遺伝子の末端におけるｐＲＯＳ内の８０４塩基対ｐｐ３８（１０６～３７３ａａ）フラグメントの存在をスクリーニングした。ｐｐ３８（１０６～３７３ａａ）フラグメントを含むプラスミドｐＭＢ３８を単離した。ｐＭＢ３８内のｐｐ３８（１０６～３７３ａａ）のＤＮＡ配列を確認すると、ｐｐ３８（１０６～３７３ａａ）コード領域はｌａｃＺコード配列を有する枠内にあった。

実施例８

ｐＪＯ２００を基礎とするＣＫＳ－ＣＭＶ発現ベクターの構築

ＣＫＳ発現ベクターｐＪＯ２００は、一連の５つのＣＫＳ－ＣＭＶ遺伝子融合組立物のための構成ブロックである。二つのタイプのＣＫＳ－ＣＭＶ遺伝子融合プラスミドを組み立てた。一つのタイプのＣＫＳ－ＣＭＶ遺伝子融合プラスミドを組み立てたが、そこで以下に示すようにｐＪＯ２００のヌクレオチド６３８（ＣＫＳのアミノ酸１７１）においてＣＫＳ遺伝子内にＣＭＶ遺伝子配列が包含されている。

（５）ＣＫＳ（１～１７１ａａ）－ＣＭＶ－ＣＫＳ（１７１～２６０ａａ）

このＣＫＳ－ＣＭＶ遺伝子融合組立の方法は、エピトープ包含（ｅｐｉｔｏｐｅ－ｅｍｂｅｄｄｉｎｇ）と呼ばれる。このタイプの組立からのＥ．ｃｏｌｉ中に発現される融合タンパクは、ＣＫＳアミノ酸配列内に完全に包含される抗原のエピトープを含む。プラスミドｐＣＭＶ－１Ａはこのようにして組み立てた。

もう一つのタイプのＣＫＳ－ＣＭＶ遺伝子融合プラスミドを組み立てたが、そこで以下に示すようにアミノ酸２４８においてＣＫＳ遺伝子の３’末端にＣＭＶ遺伝子ＤＮＡ配列が

結合されている。
（６）ＣＫＳ（１－２４８ａａ）－ＣＭＶ
プラスミドｐＣＭＶ－３Ｂ、ｐＣＭＶ－４、ｐＣＭＶ－９およびｐＣＭＶ－２６はこのようにして組み立てた。以下に記載するような構築のための一般的方法を用いて大きいプラスミドＤＮＡ（ｐＪＯ２００）を単離した。
Ａ．ｐＣＭＶ－１Ａ：ＣＫＳ－Ａ１Ｃ２Ｆ３－ＣＫＳの構築
プラスミドｐＣＭＶ－１ＡはプラスミドｐＪＯ２００の誘導体である（図１２）。このプラスミドは、プラスミドｐＭＢ３４内に含まれるＡ１Ｃ２Ｆ３　ＤＮＡのＰＣＲ増幅により得られるＨＣＭＶ－Ａ１Ｃ２Ｆ３含有ＤＮＡフラグメントをｐＪＯ２００のＳｔｕＩ部位にクローニングすることにより組み立てた。大きなプラスミドＤＮＡ（ｐＭＢ３４）を、一般的方法により単離した。プラスミドｐＪＯ２００をＳｔｕＩおよびＢａｍＨ－Ｉで消化し、ベクター骨格をポリアクリルアミドゲル上で精製した。この消化により、結合反応中に回復するＣＫＳ遺伝子の３’末端の部分が除去される。このベクター骨格内に、三つの方法による結合反応において、二つのＰＣＲ誘導ＤＮＡフラグメントをクローニングされる。Ａ１Ｃ２Ｆ３をＳｔｕＩ／ＭｌｕＩ　ＤＮＡフラグメントとしてクローニングし、ＣＫＳ遺伝子の残っている３’部分をＭｌｕＩ／ＢａｍＨ－Ｉ　ＤＮＡフラグメントとしてクローニングして、完全ＣＫＳ遺伝子を回復する。ＳｔｕＩ部位を含むｐｐＵＬ３２のヌクレオチド１７８３で開始するセンスプライマー、およびＭｌｕＩ部位を含むｐｐＵＬ３２のヌクレオチド３１４４で開始するアンチセンスプライマーを合成し、プラスミドｐＭＢ３４を含むＰＣＲ反応混合物に添加した。ＰＣＲ増幅後、反応混合物をＳｔｕＩおよびＭｌｕＩで消化し、Ａ１Ｃ２Ｆ３を含む２０４塩基対フラグメントをアガロースゲル上で精製した。ＭｌｕＩ部位を含むｐＪＯ２００のヌクレオチド６４０で開始するセンスプライマー、およびＢａｍＨ－Ｉ部位を含むＰＪＯ２００のヌクレオチド９０５で開始するアンチセンスプライマーを合成し、プラスミドｐＪＯ２００を含むＰＣＲ反応混合物に添加した。ＰＣＲ増幅後、反応混合物をＭｌｕＩおよびＢａｍＨ－Ｉで消化し、ＣＫＳ遺伝子の３’部分を含む２６６塩基対フラグメントをゲル精製した。これらの精製されたＰＣＲ誘導ＤＮＡフラグメントを、次に、ｐＪＯ２００／ＳｔｕＩ／ＢａｍＨ－Ｉに１６℃で一晩結合した。次の日に、結合混合物をコンピテントＸＬ－１　Ｂｌｕｅ細胞内にトランスフォームした。小さな調製ＤＮＡを、トフンスフォーマントから調製し、ｐＪＯ２００のＳｔｕＩ部位において挿入されたＡ１Ｃ２Ｆ３の存在をスクリーニングした。ＳｔｕＩ部位において挿入されたＡ１Ｃ２Ｆ３を含むプラスミドｐＣＭＶ－１Ａを単離した。Ａ１Ｃ２Ｆ３およびＣＫＳ遺伝子の３’末端のＤＮＡ配列を確認した。ｐＣＭＶ－１Ａ内のＣＫＳ－Ａ１Ｃ２Ｆ３－ＣＫＳ構築物のコード領域は、ＣＫＳの３’末端とＡ１Ｃ２Ｆ３との間のＭｌｕＩ部位から寄与される２アミノ酸（トレオニンおよびアルギニン）のブリッジを含む。さらに、ＣＫＳのアミノ酸１７１は以下に示すように構築物中で二回繰り返される。
（７）ＣＫＳ（１～１７１ａａ）－Ａ１Ｃ２－Ｋ－Ｌ－Ｑ－Ｅ－Ｆ－Ｆ３－Ｔ－Ｒ－ＣＫＳ（１７１～２６０ａａ）
Ｂ．ｐＣＭＶ－３ｂ：ＣＫＳ－Ｈ１０の構築
プラスミドｐＣＭＶ－３ＢはプラスミドｐＪＯ２００の誘導体である（図１３Ａおよび１３Ｃ）。このプラスミドは、実施例１に記載［リパルティ（Ｒｉｐａｌｔｉ）らのＪ．Ｖｉｒｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｍｅｔｈｏｄｓ，４６巻：３９頁，１９９４年版も参照］のプラスミドｐＲＯＳＨ１０からのＨＣＭＶ－Ｈ１０を含むＤＮＡフラグメントをｐＪＯ２００内にクローニングすることにより構築した。Ｈ１０　ＤＮＡ配列は、ＨＣＭＶの５２ｋＤのリンタンパクをコードするｐｐＵＬ４４から誘導される。ｐＲＯＳＨ１０内のｐｐＵＬ４４のＨ１０部分は、ヌクレオチド６０４～１２９９（アミノ酸２０２～４３４）を含む。Ｈ１０はリンタンパクｐｐ５２のＣ－末端半部分をコードする。プラスミドｐＣＭＶ－３Ｂは、Ｈ１０　ＤＮＡ配列のＰＣＲ増幅により得られたｐＲＯＳＨ１０からのＨ１０　ＤＮＡフラグメントを、ｐＪＯ２００のＳｃａＩ／ＢａｍＨ－Ｉ部位内にクローニングすることにより構築した。プラスミドｐＪＯ２００をＳａｃＩおよびＢａｍＨ－Ｉで消化し

、ベクター骨格をアガロースゲル上で精製した。ＳａｃＩ部位を含むｐｐＵＬ４４のヌクレオチド６０４で開始するセンスプライマー、およびＨ１０コード配列の末端における停止コドンおよびＢａｍＨ－Ｉ部位を含むｐｐＵＬ４４のヌクレオチド１２９９で開始するアンチセンスプライマーを合成し、プラスミドｐＲＯＳＨ１０を含むＰＣＲ反応混合物に添加した。ＰＣＲ増幅後、反応混合物をＳａｃＩおよびＢａｍＨ－Ｉで消化し、Ｈ１０を含む６９６塩基対フラグメントをアガロースゲル上で精製し、次に、ｐＪＯ２００／ＳａｃＩ／ＢａｍＨ－Ｉに１６℃で一晩結合した。次の日に、結合混合物をコンピテントＸＬ－１　Ｂｌｕｅ細胞内にトランスフォームした。小さな調製ＤＮＡを、トランスフォーマントから調製し、ＳａｃＩ／ＢａｍＨ－Ｉ部位におけるｐＪＯ２００中の６９６塩基対フラグメントの存在をスクリーニングした。ＣＫＳ遺伝子を含む枠内に融合したＨ１０フラグメントを含むプラスミドｐＣＭＶ－３Ｂを単離した。ＣＫＳ遺伝子の３’末端およびＨ１０のＤＮＡ配列を確認した。このＣＫＳ－ＣＭＶ融合構築物を以下に示す。

（８）ＣＫＳ（１～２４８ａａ）－Ｈ１０

Ｃ．ｐＣＭＶ－４：ＣＫＳ－Ａ１Ｃ２Ｆ３－Ｈ１０の構築

プラスミドｐＣＭＶ－４はｐＪＯ２００の誘導体である（図１３Ａおよび１３Ｃ）。このプラスミドは、それぞれｐＭＢ３４およびｐＲＯＳＨ１０から誘導されたＨＣＭＶ－Ａ１Ｃ２－Ｋ－Ｌ－Ｑ－Ｅ－Ｆ－Ｆ３（簡潔にＡ１Ｃ２Ｆ３）およびＨＣＭＶ－Ｈ１０を含むＰＣＲ増幅ＤＮＡフラグメントをｐＪＯ２００内にクローニングすることにより構築した。プラスミドｐＪＯ２００をＳａｃＩおよびＢａｍＨ－Ｉで消化し、ベクター骨格をアガロースゲル上で精製した。このベクター骨格内に、三つの方法による結合反応において、二つのＰＣＲ誘導ＤＮＡフラグメントをクローニングする。Ａ１Ｃ２－ブリッジ－Ｆ３をＳａｃＩ／ＰｓｔＩ　ＤＮＡフラグメントとしてクローニングし、Ｈ１０をＰｓｔＩ／ＢａｍＨ－Ｉ　ＤＮＡフラグメントとしてクローニングする。ＳａｃＩ部位を含むｐｐＵＬ３２のヌクレオチド１７８３で開始するセンスプライマー、およびＰｓｔＩ部位を含むｐｐＵＬ３２のヌクレオチド３１４４で開始するアンチセンスプライマーを合成し、プラスミドｐＭＢ３４を含むＰＣＲ反応混合物に添加した。ＰＣＲ増幅後、反応混合物をＳａｃＩおよびＰｓｔＩで消化し、Ａ１Ｃ２Ｆ３を含む２０４塩基対フラグメントをアガロースゲル上で精製した。ＰｓｔＩ部位を含むｐｐＵＬ４４のヌクレオチド６０４で開始するセンスプライマー、およびＨ１０コード配列の末端における停止コドンおよびＢａｍＨ－Ｉ部位を含むｐｐＵＬ４４のヌクレオチド１２９９で開始するアンチセンスプライマーを合成し、プラスミドｐＲＯＳＨ１０を含むＰＣＲ反応混合物に添加した。ＰＣＲ増幅後、反応混合物をＰｓｔＩおよびＢａｍＨ－Ｉで消化し、Ｈ１０を含む６９６塩基対フラグメントをアガロースゲル上で精製した。次に、これら精製したＰＣＲ誘導ＤＮＡフラグメントをｐＪＯ２００／ＳａｃＩ／ＢａｍＨ－Ｉに１６℃で一晩結合した。次の日に、結合混合物をコンピテントＸＬ－１　Ｂｌｕｅ細胞内にトランスフォームした。小さな調製ＤＮＡを、トランスフォーマントから調製し、ｐＪＯ２００内のＳａｃＩ／ＢａｍＨ－Ｉ部位において挿入されているＡ１Ｃ２Ｆ３およびＨ１０の存在をスクリーニングした。ｐＪＯ２００内のＣＫＳ遺伝子の末端にＡ１Ｃ２Ｆ３およびＨ１０を含むプラスミドｐＣＭＶ－４を単離した。Ａ１Ｃ２－Ｋ－Ｌ－Ｑ－Ｅ－Ｆ－Ｆ３およびＨ１０のＤＮＡ配列を確認した。ｐＣＭＶ－４内のＣＫＳ－Ａ１Ｃ２Ｆ３－Ｈ１０構築体のコード領域は、Ａ１Ｃ２Ｆ３とＨ１０との間のＰｓｔＩ部位から寄与される２アミノ酸のブリッジを含む。このＣＫＳ－ＣＭＶ融合構築物を以下に示す。

（９）ＣＫＳ（１～２４８ａａ）－Ａ１Ｃ２－Ｋ－Ｌ－Ｑ－Ｅ－Ｆ－Ｆ３－Ｌ－Ｑ－Ｈ１０

Ｄ．ｐＣＭＶ－９：ＣＫＳ－ｐｐ６５（２９７～５１０ａａ）の構築

プラスミドｐＣＭＶ－９はｐＪＯ２００の誘導体である（図１３Ｂおよび１３Ｃ）。このプラスミドは、ｐｐ６５のアミノ酸２９７～５１０（ヌクレオチド８８９～１５３０）をコードするｐｐＵＬ８３の領域からのＨＣＭＶ　ｃＤＮＡのＰＣＲ増幅により得られるＨＣＭＶ－ｐｐ６５（２９７～５１０ａａ）を含むＤＮＡフラグメントをｐＪＯ２００内にクローニングすることにより構築した。プラスミドｐＪＯ２００をＳａｃＩおよびＢａｍ

Ｈ－Ｉで消化し、ベクター骨格をアガロースゲル上で精製した。以下のように、ＨＣＭＶ　ｃＤＮＡをテンプレートとして用いて、二段階単化（ｎｅｓｔｅｄ）ＰＣＲ反応を使用してＨＣＭＶ－ｐｐ６５（２９７～５１０ａａ）ＤＮＡフラグメントを生成した。外側巣（ｎｅｓｔ）ＰＣＲ増幅反応のために、ｐｐＵＬ８３のヌクレオチド８０７で開始するセンスプライマー、およびｐｐＵＬ８３のヌクレオチド１５７２で開始するアンチセンスプライマーを合成し、ＨＣＭＶ　ｃＤＮＡを含むＰＣＲ反応混合物に添加した。ＰＣＲ増幅後、外側巣ＰＣＲ反応混合物を、内側巣ＰＣＲ増幅反応のためのテンプレートＤＮＡとして用いた。内側巣ＰＣＲ増幅反応のために、ＰａｃＩ部位を含むｐｐＵＬ８３のヌクレオチド８８９で開始するセンスプライマー、およびｐｐ６５（２９７～５１０ａａ）コード配列の末端における停止コドンおよびＢａｍＨ－Ｉ部位を含むｐｐＵＬ８３のヌクレオチド１５３０で開始するアンチセンスプライマーを合成し、外側巣増幅ＤＮＡを含むＰＣＲ反応混合物に添加した。ＰＣＲ増幅後、反応混合物をＳａｃＩおよびＢａｍＨ－Ｉで消化し、ｐｐ６５（２９７～５１０ａａ）を含む６４２塩基対フラグメントをアガロースゲル上で精製した。次に、この精製ＤＮＡフラグメントをｐＪＯ２００／ＳａｃＩ／ＢａｍＨ－Ｉに１６℃で一晩結合した。次の日に、結合混合物をコンピテントＸＬ－１　Ｂｌｕｅ細胞内にトランスフォームした。小さな調製ＤＮＡを、トランスフォーマントから調製し、ｐＪＯ２００のＳａｃＩ／ＢａｍＨ－Ｉ部位において挿入されているｐｐ６５（２９７～５１０ａａ）の存在をスクリーニングした。ｐＪＯ２００内のＣＫＳ遺伝子の末端にｐｐ６５（２９７～５１０ａａ）を含むプラスミドｐＣＭＶ－９を単離した。ｐｐ６５（２９７～５１０ａａ）のＤＮＡ配列を確認した。このＣＫＳ－ＣＭＶ融合構築物を以下に示す。

（１０）ＣＫＳ（１～２４８ａａ）－ｐｐ６５（２９７～５１０ａａ）

Ｅ．ｐＣＭＶ－２６：ＣＫＳ－ｐｐ３８（１１７～３７３ａａ）の構築

プラスミドｐＣＭＶ－２６はｐＪＯ２００の誘導体である（図１３Ｂおよび１３Ｃ）。このプラスミドは、ｐＭＢ３８から誘導されるｐｐ３８のアミノ酸１１７～３７３（ヌクレオチド３４９～１１１９）をコードするｐｐＵＬ８０ａの領域からのｐｐ３８ＤＮＡのＰＣＲ増幅により得られるＨＣＭＶ－ｐｐ３８（１１７～３７３ａａ）を含むＤＮＡフラグメントをｐＪＯ２００内にクローニングすることにより構築した。大きなプラスミドＤＮＡ（ｐＭＢ３４）を一般的方法に記載されているように単離した。プラスミドｐＪＯ２００をＳａｃＩおよびＢａｍＨ－Ｉで消化し、ベクター骨格をアガロースゲル上で精製した。ＳａｃＩ部位を含むｐｐＵＬ８０ａのヌクレオチド３４９で開始するセンスプライマー、およびＢａｍＨ－Ｉ部位を含むｐｐＵＬ８０ａのヌクレオチド１１１９で開始するアンチセンスプライマーを合成し、ｐＭＢ３８ＤＮＡを含むＰＣＲ反応混合物に添加した。ＰＣＲ増幅後、反応混合物をＳａｃＩおよびＢａｍＨ－Ｉで消化し、ｐｐ３８（１１７～３７３ａａ）を含む７７１塩基対フラグメントをアガロースゲル上で精製した。次に、この精製ＤＮＡフラグメントをｐＪＯ２００／ＳａｃＩ／ＢａｍＨ－Ｉに１６℃で一晩結合した。次の日に、結合混合物をコンピテントＸＬ－１　Ｂｌｕｅ細胞内にトランスフォームした。小さな調製ＤＮＡを、トランスフォーマントから調製し、ｐＪＯ２００のＳａｃＩ／ＢａｍＨ－Ｉ部位において挿入されているｐｐ３８（１１７～３７３ａａ）の存在をスクリーニングした。ｐＪＯ２００内のＣＫＳ遺伝子の末端にｐｐ３８（１１７～３７３ａａ）を含むプラスミドｐＣＭＶ－２６を単離した。ｐｐ３８（１１７～３７３ａａ）のＤＮＡ配列を確認した。このＣＫＳ－ＣＭＶ融合構築物を以下に示す。

（１１）ＣＫＳ（１～２４８ａａ）－ｐｐ３８（１１７～３７３ａａ）

実施例９

ＣＫＳエピトープ包含発現ベクターｐＥＥ１の構築

ＣＫＳエピトープ包含発現ベクターｐＥＥ１は、以下に示すように、エピトープ含有組換えタンパクをＣＫＳタンパク内に包含させる。

（１２）ＣＫＳ（１～１７１ａａ）－組換えタンパク－Ｔ－Ｒ－ＣＫＳ（１７１～２６０ａａ）

このｐＥＥ１ベクターは、ＣＫＳ発現ベクターｐＪＯ２００を用いて開始して二段階で行

った。第１段階において、ｐＪＯ２００のＣＫＳ遺伝子の５’末端の近くに位置する一対の隣接ＭｌｕＩ部位内に突然変異性オリゴヌクレオチドをクローニングして、ＭｌｕＩ部位とＳａｌＩ部位の両方を除去した。このｐＪＯ２００への修飾により、次の工程でＣＫＳ遺伝子内の更なる下流に導入される唯一のＭｌｕＩクローニング部位を用いることができる。第２段階において、ｐＣＭＶ－１ＡからのＤＮＡのフラグメントがこの修飾ｐＪＯ２００ベクター内にクローニングされて、ＳｔｕＩ／ＭｌｕＩフラグメントとしての遺伝子がＣＫＳ遺伝子内に包含される。

Ａ．ｐＪＯ２００－ΔＭｌｕＩの構築

プラスミドｐＪＯ２００－ΔＭｌｕＩは、ＣＫＳ発現ベクターｐＪＯ２００の誘導体である（図１４Ａ）。このプラスミドは、突然変異性オリゴヌクレオチドを用いて、以下に示すｐＪＯ２００　ＤＮＡ配列内のヌクレオチド１６１～１７４（１１～１５アミノ酸）に位置するＳａｌＩ部位および一対の隣接ＭｌｕＩ部位を除去することにより構築した。

（１３）

MluI SalI MluI

∇ ∇ ∇

^{151}CCC GCG CGC TAC GCG TCG ACG CGT CTG CCC^{180}

pro Ala Arg Tyr Ala Ser Thr Arg Leu Pro

５’→３’の方向に取り出した天然ｐＪＯ２００ＤＮＡ配列ヌクレオチド１５１～１８０プラスミドｐＪＯ２００をＭｌｕＩで消化し次にエタノールで沈殿させ、アルカリ性ホスファターゼ緩衝液中に再懸濁させた。プラスミドｐＪＯ２００／ＭｌｕＩを次に、自己結合を防止するために、子ウシ腸アルカリ性ホスファターゼ（ＣＩＡＰ）で処理して５’ホスファターゼ群を除去した。ＣＩＡＰで処理した後、ＤＮＡをフェノール－クロロホルムで抽出し、エタノールで沈殿させ、ＴＥ緩衝液中に再懸濁させ、次にベクター骨格をアガロースゲル上で精製した。ｐＪＯ２００／ＭｌｕＩ／ＣＩＡＰへの結合の操作において以下の突然変異性オリゴヌクレオチドを合成した。

（１４）５’ＣＧＣＧＡＣＧＴ３’

このオリゴヌクレオチドはその３’末端において自己相補性であり、熱変性工程およびその後のアニーリング工程の後に以下の二重鎖構造を形成する。

（１５）

５’ Ｃ Ｇ Ｃ Ｇ Ａ Ｇ Ｃ Ｔ ３’

３’ Ｔ Ｃ Ｇ Ａ Ｇ Ｃ Ｇ Ｃ ５’

このオリゴヌクレオチドは、ＭｌｕＩ消化ｐＪＯ２００　ＤＮＡへの結合を生じさせるＭｌｕＩ付着末端を含む。このオリゴヌクレオチドの配列は、前記ｐＪＯ２００配列（１３）内のアンダーラインを付した「Ｔ」および「Ａ」残基がアンダーラインを付しているように突然変異性オリゴヌクレオチド中で逆転しているという点において天然ｐＪＯ２００ＤＮＡ配列と異なる。すなわち、突然変異性オリゴヌクレオチドは、ｐＪＯ２００のＭｌｕＩ部位内にクローニングされた場合、ＭｌｕＩ部位およびＳａｌＩ部位の両方を破壊する。オリゴヌクレオチドの合成後、合成オリゴヌクレオチドを、ポリヌクレオチドキナーゼを用いて、５’末端においてリン酸化した。この酵素で処理した後、リン酸化オリゴヌクレオチドを６５℃で２０分間加熱してキナーゼを不活性化した。室温に冷却した後、リン酸化オリゴヌクレオチドをｐＪＯ２００／ＭｌｕＩ／ＣＩＡＰと混合し、６５℃で５分間加熱し、次に徐々に室温まで冷却してリン酸化オリゴヌクレオチドをアニーリングした。次に結合緩衝液およびＴ４　ＤＮＡリガーゼを混合液に添加し、２０℃～４℃の温度範囲で一晩インキュベートした。次の日に、結合混合物をコンピテントＸＬ－１Ｂｌｕｅ細胞内にトランスフォームした。小さな調製ＤＮＡを、トランスフォーマントから調製し、ＭｌｕＩおよびＳａｌＩ部位の損失についてスクリーニングした。これらの制限酵素部位を失ったプラスミドｐＪＯ２００ΔＭｌｕＩを単離した。ＣＫＳ遺伝子の５’末端のＤＮＡ配列を確認した。ＭｌｕＩおよびＳａｌＩ部位の除去に加えて、突然変異性オリゴヌクレオチドは、ヌクレオチド１６６～１７１によりコードされるアミノ酸を、以下に示すようにＳｅｒ－ＴｈｒからＴｈｒ－Ｓｅｒに変える。

（１３’）

^{151}CCC GCG CGC TAC GCG ACG TCG CGT CTG CCC^{180}
pro Ala Arg Tyr Ala Thr Ser Arg Leu Pro

５’→３’の方向に取り出したｐＪＯ２００ΔＭｌｕＩＤＮＡ配列ヌクレオチド１５１～１８０

Ｂ．ｐＥＥ１の構築

プラスミドｐＥＥ１は、プラスミドｐＪＯ２００ΔＭｌｕＩの誘導体である（図１５）。このプラスミドは、ＣＫＳ遺伝子内に包含されたＨＣＭＶ－Ａ１Ｃ２Ｆ３を含むｐＣＭＶ－１ＡからのＳｔｕＩ／ＢａｍＨ－Ｉフラグメントを、ｐＪＯ２００ΔＭｌｕＩのＳｔｕＩ／ＢａｍＨ－Ｉ部位内にクローニングすることにより構築した。ｐＪＯ２００ΔＭｌｕＩ内に存在するＣＫＳコード領域内のＳｔｕＩ／ＢａｍＨ－Ｉ　ＤＮＡフラグメントを、ｐＣＭＶ－１AからのＳｔｕＩ／ＢａｍＨ－Ｉフラグメントにより置き換えることにより、得られるプラスミドｐＥＥ１は、ＣＫＳ遺伝子内に包含されたＨＣＭＶ－Ａ１Ｃ２Ｆ３を含む。プラスミドｐＥＥ１は、ｐＥＥ１が、ＣＫＳ遺伝子の５’末端に存在する上流ＭｌｕＩ部位を含まないという点においてｐＣＭＶ－１Ａと異なる。従って、ＳｔｕＩおよびＭｌｕＩによるｐＥＥ１の消化により、ＨＣＭＶ－Ａ１Ｃ２Ｆ３　ＤＮＡが離され、アガロースゲル上での精製後に、平滑／ＭｌｕＩ融和性（ｃｏｍｐａｔｉｂｌｅ）付着末端ＤＮＡフラグメントとしてＣＫＳ遺伝子内に他の遺伝子を包含させることのできるベクター骨格が提供される。大きいプラスミドＤＮＡ（ｐＪＯ２００ΔＭｌｕＩおよびｐＣＭＶ－１Ａは）一般的方法に記載しているように単離した。プラスミドｐＣＭＶ－１Ａは、ＳｔｕＩおよびＢａｍＨ－Ｉにより消化し、Ａ１Ｃ２Ｆ３およびＣＫＳ遺伝子の３’末端を含む４６１塩基対フラグメントをアガロースゲル上で精製した。プラスミドｐＪＯ２００ΔＭｌｕＩは、ＳｔｕＩおよびＢａｍＨ－Ｉにより消化し、ベクター骨格をアガロースゲル上で精製した。次に、これら精製ＤＮＡフラグメントを一緒に混合し、１６℃で一晩結合させた。次の日に、結合混合物をコンピテントＸＬ－１　Ｂｌｕｅ細胞内にトランスフォームした。小さな調製ＤＮＡを、トランスフォーマントから調製し、ｐＪＯ２００ΔＭｌｕＩ内における４６１塩基対Ａ１Ｃ２Ｆ３　ＤＮＡフラグメントの存在についてスクリーニングした。Ａ１Ｃ２Ｆ３　ＤＮＡフラグメントを含み、ＣＫＳ遺伝子の５’末端にＭｌｕＩ部位を有さないプラスミドｐＥＥ１を単離した。ＣＫＳ遺伝子の３’末端およびＡ１Ｃ２Ｆ３フラグメントのＤＮＡ配列を確認した。プラスミドｐＥＥ１をＳｔｕＩおよびＢａｍＨ－Ｉにより消化し、次にアガロースゲル上でベクター骨格を精製することにより、他のＤＮＡフラグメントとの結合のための操作において、Ａ１Ｃ２Ｆ３　ＤＮＡフラグメントが完全に除去される。この精製ベクター骨格は、以下のように、正しい読み枠内のＣＫＳ遺伝子内にＤＮＡフラグメントを包含させることができる。

（１６）５’Ｘ－目的の遺伝子－Ｙ３’

ここでＸは平滑末端およびＹはＭｌｕＩ融和性付着末端、例えばＭｌｕＩまたはＢｓｓＨＩＩである。

実施例１０

ｐＥＥ１に基づくＣＫＳエピトープ包含発現ベクターの構築

ＣＫＳベクターｐＥＥ１は一連の三つのＣＫＳ－ＣＭＶ－ＣＫＳ遺伝子融合構築体のための構成ブロックである。各構築体において、プラスミドｐＥＥ１をＳｔｕＩおよびＭｌｕＩで消化し、ベクター骨格を精製した。この骨格は、５’末端にＳｔｕＩ部位および３’末端にＭｌｕＩ部位を有するＰＣＲにより生成されたＣＭＶ遺伝子フラグメントを受け入れることができる。ＳｔｕＩおよびＭｌｕＩで消化した後、ＰＣＲフラグメントをｐＥＥ１／ＳｔｕＩ／ＭｌｕＩ骨格内に枠内にクローニングする。これらのベクターから発現されるＣＫＳ－ＣＭＶ－ＣＫＳ融合タンパクを以下に示すが、ここでＴおよびＲは、ベクター内に導入される合成ＭｌｕＩ部位によりコードされているそれぞれトレオニンおよびアルギニンである。

（１７）ＣＫＳ（１～１７１ａａ）－ＣＭＶ－Ｔ－Ｒ－ＣＫＳ（１７１～２６０）

Ａ．ｐＣＭＶ－２７：ＣＫＳ－Ａ１Ｃ２Ｆ３－Ｈ１０－ＣＫＳの構築

プラスミドｐＣＭＶ－２７はｐＥＥ１の誘導体である（図１６Ａおよび１６Ｂ）。このプラスミドは、ｐＣＭＶ－４から誘導されるＨＣＭＶ－Ａ１Ｃ２Ｆ３－Ｈ１０を含む（従って、Ａ１Ｃ２とＦ３との間にブリッジＫＬＱＥＦを含む）ＰＣＲ増幅ＤＮＡフラグメントをｐＥＥ１内にクローニングすることにより組み立てた。大きなプラスミドＤＮＡ（ｐＥＥ１およびｐＣＭＶ－４）を、一般的方法により操作して単離した。プラスミドｐＥＥ１をＳｔｕＩおよびＭｌｕＩで消化し、ベクター骨格をアガロースゲル上で精製した。ＳｔｕＩ部位を含むｐｐＵＬ３２のヌクレオチド１７８３で開始するセンスプライマー、およびＭｌｕＩ部位を含むｐｐＵＬ４４のヌクレオチド１２９９で開始するアンチセンスプライマーを合成し、プラスミドｐＣＭＶ－４を含むＰＣＲ反応混合物に添加した。ＰＣＲ増幅後、反応混合物をＳｔｕＩおよびＭｌｕＩで消化し、Ａ１Ｃ２Ｆ３－Ｈ１０を含む９０６塩基対フラグメントをアガロースゲル上で精製した。この精製されたＤＮＡフラグメントを、ｐＥＥ１／ＳｔｕＩ／ＭｌｕＩに１６℃で一晩結合した。次の日に、結合混合物をコンピテントＸＬ－１　Ｂｌｕｅ細胞内にトランスフォームした。小さな調製ＤＮＡを、トランスフォーマントから調製し、ｐＥＥ１のＳｔｕＩ／ＭｌｕＩ部位において挿入されたＡ１Ｃ２Ｆ３－Ｈ１０フラグメントの存在をスクリーニングした。ｐＥＥ１のＳｔｕＩ／ＭｌｕＩ部位において包含されたＡ１Ｃ２Ｆ３－Ｈ１０を含むプラスミドｐＣＭＶ－２７を単離した。Ａ１Ｃ２Ｆ３－Ｈ１０のＤＮＡ配列およびＣＫＳの隣接ＤＮＡ配列を確認した。このＣＫＳ－ＣＭＶ－ＣＫＳ融合構築体を以下に示すが、ここでＬ，ＱおよびＴ，Ｒは、ベクター内に導入される合成ＰｓｔＩおよびＭｌｕＩ部位によりコードされているそれぞれロイシン、グルタミンおよびトレオニン、アルギニン残基である。

（１８）ＣＫＳ（１～１７１ａａ）－Ａ１Ｃ２－Ｋ－Ｌ－Ｑ－Ｅ－Ｆ－Ｆ３－Ｌ－Ｑ－Ｈ１０－Ｔ－Ｒ－ＣＫＳ（１７１～２６０ａａ）

Ｂ．ｐＣＭＶ－２８：ＣＫＳ－ｐｐ６５（２９７～５１０ａａ）－ＣＫＳの構築

プラスミドｐＣＭＶ－２８はｐＥＥ１の誘導体である（図１６Ａおよび１６Ｂ）。このプラスミドは、ｐＣＭＶ－９から誘導されるＨＣＭＶ－ｐｐ６５（２９７～５１０ａａ）を含むＰＣＲ増幅ＤＮＡフラグメントをｐＥＥ１内にクローニングすることにより構築した。大きなプラスミドＤＮＡ（ｐＥＥ１およびｐＣＭＶ－９）を、一般的方法により単離した。プラスミドｐＥＥ１をＳｔｕＩおよびＭｌｕＩで消化し、ベクター骨格をアガロースゲル上で精製した。ＳｔｕＩ部位を含むｐｐＵＬ８３のヌクレオチド８８９で開始するセンスプライマー、およびＭｌｕＩ部位を含むｐｐＵＬ８３のヌクレオチド１５３０で開始するアンチセンスプライマーを合成し、プラスミドｐＣＭＶ－９を含むＰＣＲ反応混合物に添加した。ＰＣＲ増幅後、反応混合物をＳｔｕＩおよびＭｌｕＩで消化し、ｐｐ６５（２９７～５１０ａａ）を含む６４２塩基対フラグメントをアガロースゲル上で精製した。この精製されたＤＮＡフラグメントを、ｐＥＥ１／ＳｔｕＩ／Ｍｌｕ１に１６℃で一晩結合した。次の日に、結合混合物をコンピテントＸＬ－１　Ｂｌｕｅ細胞内にトランスフォームした。小さな調製ＤＮＡを、トランスフォーマントから調製し、ｐＥＥ１のＳｔｕＩ／ＭｌｕＩ部位において挿入されたｐｐ６５（２９７～５１０ａａ）ＤＮＡフラグメントの存在をスクリーニングした。ｐＥＥ１のＳｔｕＩ／ＭｌｕＩ部位において包含されたｐｐ６５（２９７～５１０ａａ）を含むプラスミドｐＣＭＶ－２８を単離した。ｐｐ６５（２９７～５１０ａａ）のＤＮＡ配列およびＣＫＳの隣接ＤＮＡ配列を確認した。このＣＫＳ－ＣＭＶ－ＣＫＳ融合構築体を以下に示すが、ここでＴおよびＲは、ベクター内に導入される合成ＭｌｕＩ部位によりコードされているそれぞれトレオニンおよびアルギニン残基である。

（１９）ＣＫＳ（１～１７１ａａ）－ｐｐ６５（２９７～５１０ａａ）－Ｔ－Ｒ－ＣＫＳ（１７１～２６０ａａ）

Ｃ．ｐＣＭＶ－２９：ＣＫＳ－ｐｐ３８（１１７～３７３ａａ）－ＣＫＳの構築

プラスミドｐＣＭＶ－２９はｐＥＥ１の誘導体である（図１６Ａおよび１６Ｂ）。このプラスミドは、ｐＣＭＶ－２６から誘導されるＨＣＭＶ－ｐｐ３８（１１７～３７３ａａ）を含むＰＣＲ増幅ＤＮＡフラグメントをｐＥＥ１内にクローニングすることにより構築し

た。大きなプラスミドＤＮＡ（ｐＥＥ１およびｐＣＭＶ－２６）を、一般的方法により単離した。プラスミドｐＥＥ１をＳｔｕＩおよびＭｌｕＩで消化し、ベクター骨格をアガロースゲル上で精製した。ＳｔｕＩ部位を含むｐｐＵＬ８０ａのヌクレオチド３４９で開始するセンスプライマー、およびＭｌｕＩ部位を含むｐｐＵＬ８０ａのヌクレオチド１１１９で開始するアンチセンスプライマーを合成し、プラスミドｐＣＭＶ－２６を含むＰＣＲ反応混合物に添加した。ＰＣＲ増幅後、反応混合物をＳｔｕＩおよびＭｌｕＩで消化し、ｐｐ３８（１１７～３７３ａａ）を含む７７１塩基対フラグメントをアガロースゲル上で精製した。この精製されたＤＮＡフラグメントを、ｐＥＥ１／ＳｔｕＩ／ＭｌｕＩに１６℃で一晩結合した。次の日に、結合混合物をコンピテントＸＬ－１　Ｂｌｕｅ細胞内にトランスフォームした。小さな調製ＤＮＡを、トランスフォーマントから調製し、ｐＥＥ１のＳｔｕＩ／ＭｌｕＩ部位において挿入されたｐｐ３８（１１７～３７３ａａ）ＤＮＡフラグメントの存在をスクリーニングした。ｐＥＥ１のＳｔｕＩ／ＭｌｕＩ部位において包含されたｐｐ３８（１１７～３７３ａａ）を含むプラスミドｐＣＭＶ－２９を単離した。ｐｐ３８（１１７～３７３ａａ）のＤＮＡ配列およびＣＫＳの隣接ＤＮＡ配列を確認した。このＣＫＳ－ＣＭＶ－ＣＫＳ融合構築体を以下に示すが、ここでＴおよびＲは、ベクター内に導入される合成ＭｌｕＩ部位によりコードされているそれぞれトレオニンおよびアルギニン残基である。

（２０）ＣＫＳ（１～１７１ａａ）－ｐｐ３８（１１７～３７３ａａ）－Ｔ－Ｒ－ＣＫＳ（１７１～２６０ａａ）

実施例１１

Ａ．ＨＣＭＶ遺伝子の発現

実施例１０のＨＣＭＶ融合タンパクを発現する細菌クローン、非融合ＣＫＳを発現する対照細菌菌株、および実施例８のＨＣＭＶ融合タンパクを発現する細菌クローンを、アンピシリン１００μｇ／ｍｌを含む「ＳＵＰＥＲＢＲＯＴＨ　ＩＩ」培地において対数相まで増殖させ、ＣＫＳ－ＨＣＭＶ融合タンパクの合成を、前述のようにＩＰＴＧを添加することにより誘発した［２２］。誘発後４時間の後、細胞を採取し、細胞ペレットをタンパクの精製まで－８０℃で貯蔵した。全ての発現タンパクの関連データを表３に示す。

Ｂ．非融合ＣＫＳおよび組換えＣＫＳ－ＨＣＭＶ融合タンパクの精製

非溶解性ＣＫＳ－ＨＣＭＶ融合タンパク（ｒｐＣＭＶ－１Ａ，ｒｐＣＭＶ－３Ｂ，ｒｐＣＭＶ－４，ｒｐＣＭＶ－９，ｒｐＣＭＶ、２７，ｒｐＣＭＶ－２８，ｒｐＣＭＶ－２９）を、界面活性剤洗浄を組み合わせることにより溶解し、その後に８Ｍ尿素中で可溶化して精製した。８Ｍ尿素中での可溶化後、融合タンパクをＱ－セファローズクロマトグラフィー（ニュージャージー州ピシキャットアウェイ在ファーマシア・バイオテック社（Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）製）により精製した。融合タノパク４（ｒｐＣＭＶ－４）および９（ｒｐＣＭＶ－９）を、セファクリル　Ｓ－２００クロマトグラフィー（ニュージャージー州ピシキャットアウェイ在ファーマシア・バイオテック社（Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）製）によりさらに精製した。可溶性ＣＫＳ－ＨＣＭＶ融合タンパク２６（ｒｐＣＭＶ－２６）を細胞溶解後にＢＩＯ－Ｒａｄ　Ｐｒｅｐ　Ｃｅｌｌ（カリフォルニア州リッチモンド在バイオ－ラッド社（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）製）を利用して分取ＳＤＳ－ＰＡＧ上で精製した。可溶性ＣＫＳタンパクを細胞溶解後に硫酸アンモニウム沈殿およびその後のＤＥＡＥクロマトグラフィーにより精製した。

実施例１２

自動ＨＣＭＶ　ＩｇＭイムノアッセイ

ＨＣＭＶのｐｐＵＬ３２、ｐｐＵＬ４４、ｐｐＵＬ８３およびｐｐＵＬ８０ａ領域内にエピトープを含む組換えポリペプチドを用いることにより、ウイルスからのエピトープを用いるＨＣＭＶ　ＩｇＭイムノアッセイよりも感受性が増加しより特異的な免疫学的アッセイが提供される。

自動ＨＣＭＶ　ＩｇＭイムノアッセイにおいて、ＨＣＭＶゲノムの四つの異なる領域を示す、三つのＥ．ｃｏｌｉ発現組換えタンパク、ＣＫＳ－Ａ１Ｃ２Ｆ３－Ｈ１０－ＣＫＳ（ｒｐＣＭＶ－２７）、ＣＫＳ－ｐｐ６５－ＣＫＳ（ｒｐＣＭＶ－２８）およびＣＫＳ－ｐ

ｐ３８－ＣＫＳ（ｒｐＣＭＶ－２９）を用いた。これらの組換えポリペプチドのそれぞれを実施例１０（Ａ，ＢおよびＣ）および１１に従って調製した。自動イムノアッセイにおいて、これらの組換え抗原のそれぞれを別々にポリスチレン微粒子に、一つの微粒子に一つの抗原として塗布した。自動イムノアッセイは操作の連続モードまたは操作の組み合わせモードで行うことができる。自動イムノアツセイの修正法において、これら三つの組換え抗原を同じポリスチレン微粒子に一緒に塗布することができる。修正された自動イムノアッセイは操作の組み合わせモードで行うことができる。

蒸留水中のポリスチレン微粒子（２．６５μｍ）を、トリス５０ｍＭ、塩化ナトリウム１３７ｍＭ、０．１％アジ化ナトリウム，ｐＨ７．５を含む溶液中に導入した。次にポリスチレン微粒子をｒｐＣＭＶ－２７、ｒｐＣＭＶ－２８およびｒｐＣＭＶ－２９を表す三つの別々のビンに分散した。ｐＨ８．５のトリス５０ｍＭ中の組換えｒｐＣＭＶ－２７を、ｒｐＣＭＶ－２７を含むビンに添加して最終濃度２５～１００μｇ／ｍｌとした。ｐＨ８．５のトリス５０ｍＭ中の組換えｒｐＣＭＶ－２８を、ｒｐＣＭＶ－２８を含むビンに添加して最終濃度２５～１００μｇ／ｍｌとした。ｐＨ８．５のトリス５０ｍＭ中の組換えｒｐＣＭＶ－２９を、ｒｐＣＭＶ－２９を含むビンに添加して最終濃度２５～１００μｇ／ｍｌとした。各ビン中のポリスチレン微粒子の最終濃度は固形分１～３％であった。ビンを室温（１９～２２℃）で上下に2時間回転させ（３０－５０ｒｐｍ）、次に１０００～１５０００×ｇで室温において１０分間遠心分離した。次に、ペレット状の微粒子を、トリス９０ｍＭ、塩化ナトリウム１３５ｍＭ、ＥＤＴＡナトリウム１００ｍＭ、６％スクロース、０．１８％「ＴＷＥＥＮ－２０」、５０％ウシ胎児血清（ＣＭＶ抗体非含有）、ＣＫＳタンパク３５μｇ／ｍｌを含むｐＨ７．５の混合物中に再懸濁させて、最終濃度を固形分０．１～０．２５％とした。次に微粒子をプラスチックビンに仕込んだ。

ｒｐＣＭＶ－２７、ｒｐＣＭＶ－２８およびｒｐＣＭＶ－２９で被覆したポリスチレン微粒子を、ＡＢＢＯＴＴ「ＩＭｘ」（Ｒｅｓｉｓｔｅｒｅｄ）装置（イリノイ州アボットパーク在アボット・ラボラトリーズ社（Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）製）において行われる自動イムノアッセイにおける抗体捕捉フォーマットにおいて用いた。前述の被覆微粒子は、ＡＢＢＯＴＴ「ＡｘＳＹＭ」（Ｒｅｓｉｓｔｅｒｅｄ）装置（イリノイ州アボットパーク在アボット・ラボラトリーズ社（Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）製）において行われる自動イムノアッセイにおける抗体捕捉フォーマットにおいても用いることができる。

これらのシステムは、血清サンプルおよび試薬を自動的に分配するピペット装置を用いる。これら装置は、サンプルマトリックスから４４８ｎｍにおける蛍光反射率を測定することのできる光学的読取機を用いる。操作の連続モードにおいては、血清サンプルは三つの被覆微粒子についてそれぞれに別々に培養される。操作の組み合わせモードにおいては、等容積の各々の三つの被覆微粒子を、血清サンプルで培養する前に混合する。いずれのモードにおいても、適当な量の微粒子をプラスチックビンに分配し、装置にかける。

好ましい複合体はヤギ抗－人ＩｇＭアルカリ性ホスファターゼ複合体である。１～５μｇ／ｍｌの実施濃度を決めるために複合体を滴定する。複合体希釈液は、トリス９０ｍＭ、塩化ナトリウム１３５ｍＭ、５％ウシ胎児血清、０．１％アジ化ナトリウムを含みｐＨ７．４である。複合体を滅菌濾過し、プラスチックビンに満たし、装置にかけた。複合体のための好ましい基質はリン酸４－メチルウンベリフェリルである。

ＨＣＭＶへの抗体に陽性の血漿ユニットから抗－ＨＣＭＶ陽性指数カリブレーターを調製する。ユニット貯留は、ｒｐＣＭＶ－２７、ｒｐＣＭＶ－２８およびｒｐＣＭＶ－２９に反応性の抗体を有する血漿を含む。貯留ユニットを再石灰化（ｒｅｃａｌｃｉｆｉｅｄ）し、少量に分け、－２０℃でまたは２～８℃で貯蔵する。各ロットの陽性指数カリブレーターのために、防腐剤として０．１％アジ化ナトリウムを含む陰性対照で貯蔵溶液を希釈する。最終材料を滅菌濾過しプラスチックビン内に満たす。

抗－ＨＣＭＶ陰性対照を、ＨＣＭＶのｒｐＣＭＶ－２７、ｒｐＣＭＶ－２８およびｒｐＣＭＶ－２９タンパクへの抗体に陰性の再石灰化人血漿から調製する。血漿は、人免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）への抗体に陰性であり、Ｂ型肝炎表面抗原（ＨＢｓＡｇ）に陰性であ

る。ユニットを貯留し、０．１％アジ化ナトリウムを防腐剤として添加する。最終材料を滅菌濾過し、プラスチックビンに満たす。
試験すべき血清サンプルを装置の反応容器に分配した。自動ＣＭＶＩｇＭイムノアッセイを起動させる適当なコードを入力し、アッセイを開始する。装置は、血清サンプルをライン希釈液（リン酸ナトリウム０．１Ｍ，０．１％アジ化ナトリウム，ｐＨ７．５または塩化ナトリウム０．３Ｍ，トリス０．１Ｍ，０．１％アジ化ナトリウム，ｐＨ７．５）にて希釈し、次に微粒子を希釈血清サンプルに添加する。５～１０分間培養した後、混合物を反応容器マトリックスに移す。マトリックスをライン希釈液で洗い、次に反応容器マトリックスに複合体を加える。８～１０分間培養した後、マトリックスをライン希釈液で洗い、次に複合体のための基質を加える。サンプルマトリックスからの４４８ｎｍにおける蛍光反射率を直ちに読み、装置は、各サンプルについて割合計測値（ｒａｔｅ　ｃｏｕｎｔ　ｖａｌｕｅ）と指数値の両方を報告する。指数値は、サンプルの割合計測値を陽性指数カリブレーターの割合計測値で割ったものに等しい。
許容できるアッセイ特異性を維持するために、アッセイの境界値は、陰性サンプルの指数値の平均より少なくとも３～４標準偏差上でなくてはならない。自動ＨＣＭＶ　ＩｇＭイムノアッセイの境界値は指数値０．６にに設定した。０．５以上の指数値のサンプルはリューマチ因子中和薬により処理しなくてはならず、それから再度装置に戻す。０．６以上の指数値のサンプルはＨＣＭＶ　ＩｇＭ抗体に陽性であると考えた。０．５００～０．５９９の指数値のサンプルは、はっきりしないと考え、０．５００より低い指数値のサンプルはＨＣＭＶ　ＩｇＭ抗体に陰性であると考えた。アッセイで使用した融合タンパクの特徴付けは表３に示す。

自動ＨＣＭＶ　ＩｇＭイムノアッセイの実施

自動ＨＣＭＶ　ＩｇＭイムノアッセイの実施は、７つのＨＣＭＶ　ＩｇＭ陰性血清サンプルおよび１１のＨＣＭＶ　ＩｇＭ陽性血清サンプルを試験することにより評価した。これらサンプルのためのＨＣＭＶ　ＩｇＭ抗体の力価は、実施例１３に記載のＨＣＭＶ　ＩｇＭ微量力価組換えＥＩＡを用いて最初に決めた。全てのＨＣＭＶ　ＩｇＭ陽性サンプルは、精製ウイルス抗原を用いたウエスタンブロットにより陽性であると確認された（表５参照）。全てのＨＣＭＶ　ＩｇＭ陽性サンプルを、下記のイムノアッセイ（ａ）および（ｂ）で実施する前にリューマチ因子中和薬で処理した。

（ａ）操作の連続モード

自動イムノアッセイの操作の連続モードにおいて、ｒｐＣＭＶ－２７被覆微粒子、ｒｐＣＭＶ－２８被覆微粒子およびｒｐＣＭＶ－２９被覆微粒子を用いて各血清／血漿サンプルを別々に試験する。
操作の連続モードにおいて、ｒｐＣＭＶ－２７被覆微粒子またはｒｐＣＭＶ－２８被覆微粒子またはｒｐＣＭＶ－２９被覆微粒子サンプルのいずれについてもサンプルの指数値が０．６以上である場合、サンプルをＨＣＭＶ　ＩｇＭ抗体に対して陽性であると考える。
操作の連続モードにおいて、ｒｐＣＭＶ－２７被覆微粒子またはｒｐＣＭＶ－２８被覆微粒子またはｒｐＣＭＶ－２９被覆微粒子サンプルについてサンプルの指数値が０．５００～０．５９９である場合、サンプルをＨＣＭＶ　ＩｇＭ抗体に対してあいまいであると考える。
操作の連続モードにおいて、ｒｐＣＭＶ－２７、ｒｐＣＭＶ－２８およびｒｐＣＭＶ－２９被覆微粒子についてサンプルの指数値が０．５００より低い場合、サンプルをＨＣＭＶ　ＩｇＭ抗体に対して陰性であると考える。表４および５に示すように、ＨＣＭＶ　ＩｇＭ自動イムノアッセイの操作の連続モードにおいて、全ての陰性サンプルは、ＨＣＭＶ　ＩｇＭ抗体に対して陰性であると決定され、全ての陽性サンプルは、ＨＣＭＶ　ＩｇＭ抗体に対して陽性であると決定された。

（ｂ）操作の組み合わせモード

自動イムノアッセイの操作の組み合わせモードにおいて、ｒｐＣＭＶ－２７、ｒｐＣＭＶ－２８およびｒｐＣＭＶ－２９被覆微粒子（貯留微粒子）の等容積混合物を用いて各血清／血漿サンプルを試験する。操作の組み合わせモードにおいて、貯留微粒子を用いてサン

プルの指数値が０．６以上である場合、サンプルをＨＣＭＶ　ＩｇＭ抗体に対して陽性であると考える。操作の組み合わせモードにおいて、貯留微粒子を用いてサンプルの指数値が０．５００～０．５９９である場合、サンプルをＨＣＭＶ　ＩｇＭ抗体に対してあいまいであると考える。操作の組み合わせモードにおいて、貯留微粒子を用いてサンプルの指数値が０．５００より低い場合、サンプルをＨＣＭＶ　ＩｇＭ抗体に対して陰性であると考える。表４および５に示すように、ＨＣＭＶ　ＩｇＭ自動イムノアッセイの操作の組み合わせモードにおいて、全ての陰性サンプルは、ＨＣＭＶ　ＩｇＭ抗体に対して陰性であると決定され、全ての陽性サンプルは、ＨＣＭＶ　ＩｇＭ抗体に対して陽性であると決定された。

実施例１３

マニュアル操作ＨＣＭＶ　ＩｇＧ／ＩｇＭイムノアッセイ

１．ＨＣＭＶ血清学

１．１－従来のＥＩＡ（ｃｏｎｖ－ＥＩＡ）

抗－ＨＣＭＶ　ＩｇＧの評価を、市販のキット（独国マーブルク在ベーリン社（Ｂｅｈｒｉｎｇ　ＡＧ）の「ＥＮＺＹＧＮＯＳＴ」抗－ＨＣＭＶ／ＩｇＧ　ＥＩＡアルファ法）を用いて行った。プレートは、ミクロＥＩＡ自動読取機（独国マーブルク在ベーリン社（Ｂｅｈｒｉｎｇ　ＡＧ）製）上で読み取った。抗－ＨＣＭＶ　ＩｇＭの評価を、「ＥＮＺＹＧＮＯＳＴ」抗－ＨＣＭＶ／ＩｇＭキット（独国マーブルク在ベーリン社製）を用いて行った。いずれのキットも、製造者の指示に従って使用し結果を解釈した。

１．２－ウエスタンブロッティング（ＷＢ）

精製ウイルス粒子（タウネ（Ｔｏｗｎｅ）菌株）からのタンパク抽出物を９％アクリルアミドゲルに入れ、電気泳動により分離したポリペプチドをニトロセルロース紙に移した。細胞の感染、ウイルス精製、タンパク抽出、ブロッティングおよび血清との免疫反応は、先に詳細に説明したように行った［１６］。

１．３－組換えＥＩＡ（ｒｅｃ－ＥＩＡ）

ＥＩＡを、市販のキットＥｎｒｙｇｎｏｓｔ抗－ＨＣＭＶ／ＩｇＧおよびＩｇＭ（独国マーブルク在ベーリン社製）の試薬を使用し手順に従って行った。簡単に言えば、重炭酸塩緩衝液（ｐＨ９．６）中のウエル当たり０．０５μｇの精製組換えタンパクを用いてＥＩＡプラスチックプレート（デンマーク国ロスキルデ（Ｒｏｓｋｉｌｄｅ）在Ａ／Ｓ　ＮＵＮＣ製）を被覆した。４℃で一晩インキュベートした後、プレートをＰＢＳ－「ＴＷＥＥＮ２０」（０．０５％）で３回洗い、重炭酸塩緩衝液（ｐＨ９．６）中ＢＳＡ（１％）でインキュベートした。室温で１時間インキュベートした後、ウエルをＰＢＳ－「ＴＷＥＥＮ２０」（０．０５％）で３回洗い、ＩｇＧおよびＩｇＭについてそれぞれＰＢＳ中１：１００および１：４０の希釈率（最終体積５０μｌ）の人血清サンプルと共に、３７℃で２時間インキュベートした。ＰＢＳ－「ＴＷＥＥＮ２０」で３回洗った後、ペルオキシダーゼヤギ抗－人ＩｇＧまたはＩｇＭ抗体複合体をウエル内に入れ、プレートを３７℃で１．５時間インキュベートした。ＰＢＳ－「ＴＷＥＥＮ２０」で３回洗った後、色素ＴＭＢ（テトラメチレン　ベンジジン　ジヒドロクロライド）の添加により免疫反応を確証した。１時間後、硫酸（０．５Ｎ）の添加により反応を停止し、結果を、「ＭＩＣＲＯＥＩＡ」自動読取機上で読み取った。各サンプルについて、免疫反応レベルは測定した吸光度間の差（ｒｅｃ抗原－対照抗原）であると考えた。個々の融合タンパクについての境界値は、ＨＣＭＶに対するＩｇＭを含まない２１０血清を試験することにより決定した（ｃｏｎｖ－ＥＩＡおよびＷＢの両方を用いて決めた）。各融合タンパクについての境界値を表３に示す。ＩｇＭ抗体を決めるために、「ＲＦ吸収剤」（独国マーブルク在ベーリン社製）を用いて血清サンプルからリューマチ因子を除去した。線型回帰分析を行い試験の実行を標準化するために、全てのプレートは三つの血清カリブレーターを含んでいた。反応性が既に四つの独立した実験により検査されている６つの標準血清を各ＥＩＡプレートに含むことにより再現性を制御した。平均値を既に算出している二つの標準偏差の間隔内に内部対照血清の値がある場合に試験の実行が許容できると考えた。

２．人血清サンプル

この作業において多くの群の人血清サンプルを使用した。境界値を決めるために用いた最初のサンプル群は血液ドナー（１５０）および健康な成人（６０）からの２１０血清からなっていた。ｃｏｎｖ－ＥＩＡおよびウエスタンブロッティングの両方により判断して６８の血清はＩｇＧ／ＩｇＭ－であり、１４２はＩｇＧ＋／ＩｇＭ－であった。第２のサンプル群は、イムノコンピテン被検体からの１５０ＨＣＭＶ陽性サンプルからなっていた（ｃｏｎｖ－ＥＩＡにより検出したＨＣＭＶに対する高ＩｇＭ力価のものが５０、中間ＩｇＭ水準のものが５０、および低水準のＨＣＭＶ特異性ＩｇＭのものが５０）。この血清の群におけるＨＣＭＶ特異性ＩｇＭの存在はｃｏｎｖ－ＥＩＡにより決定しウエスタンブロッティングにより確認した。第３の血清群は、妊婦からの５１の血清からなっていた（ＨＣＭＶ非感染女性からのものが１８、ＨＣＭＶに感染し感染を伝達していない女性からのものが２６、およびＨＣＭＶに感染し感染を伝達した妊婦からのものが７）。全てのこれらの血清は、妊娠２２～２４週の間で得られた。３５の新生児からの３５の血清の群も試験したが、６っの血清サンプルは６人の先天的感染新生児から生後第１週目に得、１９の血清は新生児（生後１～８月）から得、ウイルスを尿から繰返し単離した。１２人の新生児は異なる症状（斑丘発疹、脳障害、成長遅滞）を示し、他の者は無症候のシェダー（ｓｈｅｄｄｅｒ）であった。最後に、１０の血清は、生後最初の８月中のＨＣＭＶ非感染新生児からのものであった。もう一つのサンプル群は、移植後最初の３月中のＨＣＭＶ感染した２３人の移植患者（２０人は心臓移植、３人は腎臓移植を受けた者）からの１０４の血清からなっていた。８人の患者が一次感染しており、１５人はウイルス的に再活性化した。最後の群は、移植後および妊娠中にＨＣＭＶをモニターするために診断所に来た腎臓移植を受けた者（１５０）および妊婦（１５０）からの血清中からランダムに選択した２００の血清サンプルからなっていた。

３．妊婦および新生児におけるＨＣＭＶ感染の決定

妊婦におけるＨＣＭＶ感染を、以下のパラメーターの一またはそれ以上により決定した。尿、唾液、血液からのウイルス単離、抗－ＨＣＭＶ抗体のためのセロコンバージョン。新生児における先天的ＨＣＭＶ感染を、生後第１週中に尿からＨＣＭＶを単離することにより決定した。新生児におけるＨＣＭＶ感染は、尿からのウイルス単離により決定した。

４．移植患者におけるＨＣＭＶ感染の決定

移植患者におけるＨＣＭＶ感染を、間接的免疫蛍光検査により決められる末梢血液中のｐｐ６５陽性ＰＭＮＬ（抗原血）の存在およびＰＣＲにより決められる同じ細胞中のＨＣＭＶゲノムの存在により決定した。

５．ＨＣＭＶのウイルス学的検出

ＨＣＭＶ単離

尿素および唾液からのＨＣＭＶの単離のために「外皮ウイルス」手順［２３］を用いた。接種された細胞を接種後２４～２８時間固定し、ＨＣＭＶ－ＩＥ１／ＩＥ２遺伝子生成物（ＩＥ３、仏国パリ在ビオリン社（Ｂｉｏｌｉｎｅ）から得られるもの）と反応するモノクローナル抗体を用いて間接的免疫蛍光検査（ＩＩＦ）において着色した。

抗原血

ＰＭＮＬ中のＨＣＭＶ－ｐｐ６５（ｐｐＵＬ８３）の存在を、ＩＩＦ試験において、二つのモノクローナル抗体のＨＣＭＶ－ｐｐ６５特異性貯留物（独国フランクフルト在ビオテスト社（Ｂｉｏｔｅｓｔ）製）を用いて、シャーム（Ｓｃｈｉｒｍ）らにより最初の記載され［２４］、レベロ（Ｒｅｖｅｌｌｏ）らにより修正された［２５］方法により決定した。

ＰＣＲによるＨＣＭＶゲノムの存在の決定

5×10^5ＰＭＮＬをＰＣＲ緩衝液（ＫＣｌ　５０ｍＭ、トリス－ＨＣｌ　１０ｍＭ，ｐＨ８．３、$MgCl_2$　２ｍＭ、ゼラチン０．０１％）１００μｌ中に非イオン性洗剤と共に再懸濁させ、プロテナーゼＫ．サンプルを６０℃で１時間培養し、次に９５℃で２０分間培養してプロテナーゼを不活性化した。各サンプル３０ｍｌを、ＫＣｌ　５０ｍＭ、トリス－ＨＣｌ　１０ｍＭ，ｐＨ８．３、$MgCl_2$　２ｍＭ、４つのデオキシヌクレオチドトリホスフェートの各０．２ｍＭ、各プライマー５０ピコモルおよび天然Ｔａｑ　Ｄ

ＮＡポリメラーゼ（米国コネチカット州ノーウォーク在パーキン・エルマー社（Ｐｅｒｋｉｎ　ＥｌｍｅｒＣｅｔｕｓ）製）を含む反応緩衝液２０μｌに添加した。ＨＣＭＶ特異性プライマーはジェンセット（Ｇｅｎｓｅｔ）（仏国パリス在）により合成した。配列は、ＨＣＭＶ極初期遺伝子（ｉｍｍｅｄｉａｔｅ　ｅａｒｌｙ　ｇｅｎｅ）（ＡＤ１６９菌株のＥｃｏＲＩ　Ｊ　フラグメント）の４番目のエクソンでヌクレオチド１７６７～１７８６に相当するものから、およびヌクレオチド１８９４～１９１３からのものである。これらのプライマーを用いて、１４７塩基対のフラグメントを増幅した。ヌクレオチド１８０７～１８４７からなる第３のオリゴヌクレオチドは、他のオリゴヌクレオチドの結合部位の間の領域内のアンチセンスＤＮＡ鎖に相補的であり、ハイブリッド化に用いた［２６］。増幅反応は、ＤＮＡサーマルサイクラー（ｔｈｅｒｍａｌ　ｃｙｃｌｅｒ）（米国コネチカット州ノーウォーク在パーキン・エルマー社（Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ／Ｃｅｔｕｓ）製）内で３５サイクル行った。各サンプルを、最初に、側面にＨＬＡ－ＤＱａ遺伝子座の保存領域を有するオリゴヌクレオチドプライマーＧＨ２６およびＧＨ２７（パーキン・エルマー社製）（各２０ｐｍｏｌ）を用いた分析に付し、ＤＮＡが増幅される能力を決定した。１５μｌの反応混合物を、１．２％「ＮＵＳＩＥＶＥ」ＧＴＧ－アガロースおよび０．４％シーケム（Ｓｅａｋｅｍ）ＬＥ－アガロース（米国メイン州ロックランド在エフエムシー・バイオプロダクツ社（ＦＭＣ　Ｂｉｏｐｒｏｄｕｃｔｓ）製）ゲル上での電気泳動に付した。ＤＮＡを、臭化エチジウム（ｅｔｈｉｄｉｕｍ）着色後に紫外線蛍光法により可視化した。標準的手順を用いて核酸を変性し中和し、次に、トランス－ブロット装置（カリフォルニア州サンフランシスコ在ホーフェル・サイエンティフィック・インストルメンツ社（Ｈｏｅｆｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）製）を用いてナイロン薄膜（英国アマーシャム在マイボンド社（Ｍｙｂｏｎｄ　Ｎ）製）に移した。末端標識化オリゴヌクレオチドによるハイブリッド化を、市販のキット（英国アマーシャム在ＥＣＬ製３’オリゴ標識化および検出システム（３’－ｏｌｉｇｏｌａｂｅｌｌｉｎｇ　ａｎｄ　ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　ｓｙｓｔｅｍ））により製造者により指示されているように行った。ＰＣＲ反応の感受性および特異性を、前述の作業において記載しているように行った［２７］。

６．結果

表３に要約しているように、５つの異なる融合タンパクを比較試験した。

第１の融合タンパク（ｒｐＣＭＶ－１Ａ）は一緒に融合している二つのｐｐＵＬ３２主要抗原領域を有している。第２の融合タンパク（ｒｐＣＭＶ－３Ｂ）はｐｐＵＬ４４のＣＯＯＨ半部分を有している。第３の融合タンパク（ｒｐＣＭＶ－４）は一緒に融合している三つの領域（ｐｐＵＬ３２の二つの領域およびｐｐＵＬ４４の一つの領域）を有している。融合タンパクｒｐＣＭＶ－９およびｒｐＣＭＶ－２６は、それぞれｐｐＵＬ８３およびｐｐＵＬ８０ａの大きなフラグメントを有している。各組換えタンパクについてのマニュアルアッセイの境界値は表３に報告されており、２１０血清サンプルから得られた最大値より高い光学濃度の値（それらは、平均値＋４～５標準偏差に略相当する）に相当する。ｒｅｃ－ＥＩＡの感受性を評価するために、１５０の血清サンプルを数百の血清から選択したが、それはｃｏｎｖ－ＥＩＡおよびＷＢの両方についてＩｇＭ陽性の結果を提供するのでＨＣＭＶに対するＩｇＭが必ず含まれているからである。血清を、ＨＣＭＶ特異性ＩｇＭに対するｃｏｎｖ－ＥＩＡ力価を基準にして三つの群に分けた。特に、２１０と４００との間のＯＤ値を有する血清は低ＩｇＭ力価を有すると考え、４０１～８００のＯＤ（$\times 10^{3}$）のものは中くらいの力価を有し、８００を越えるＯＤ（$\times 10^{3}$）のものは高ＩｇＭ力価を有すると考えた。表６に要約されているように、ＨＣＭＶに対して中くらいおよび高いＩｇＭ力価を有する全ての血清は一またはそれ以上の融合タンパクと反応した。低いＩｇＭ力価を有する血清中においては、いかなる融合タンパクによっても二つしか検出されなかった。従って反応性の％は９８％より高い。得られる最も高い反応性は、融合タンパクｒｐＣＭＶ－３ＢおよびｒｐＣＭＶ－４に対するもので、ｒｐＣＭＶ－４、ｒｐＣＭＶ－９およびｒｐＣＭＶ－２６の組み合わせにより９８％の反応性が得られた。一つの血清のみがこの組み合わせと反応せず、融合タンパクｒｐＣＭＶ－３Ｂのみと反応性が

あることがわかった。
組換えＥＩＡの高感受性を決定したので、異なる群の被検者から得られる複数の血清を試験した。表７は、妊婦から得た５１の血清を用いて組換えＥＩＡにより得られた結果と、同じ血清を用いてｃｏｎｖ－ＥＩＡにより得られた結果を比較している。１８のＨＣＭＶ非感染妊婦中において、従来のものによっても組換えＥＩＡによってもＩｇＭ陽性であるものは見つからなかった。これに対して、子孫に感染を伝達しなかった２６のＨＣＭＶ感染妊婦中において、２０の場合において組換えＥＩＡがＩｇＭを検出し、ｃｏｎｖ－ＥＩＡは１２の場合においてしかＩｇＭを検出しなかった。感染を伝達した８人のＨＣＭＶ感染妊婦の群中において、組換え体により８人全てが、ｃｏｎｖ－ＥＩＡにより６人がＩｇＭ陽性であることがわかった。最も高い反応性は、常に、３重抗原融合タンパク（融合タンパクｒｐＣＭＶ－４）について得られた。タンパクｒｐＣＭＶ－４、ｒｐＣＭＶ－９およびｒｐＣＭＶ－２６の組み合わせは最高の反応性を提供する。表７に示されるように、融合タンパクｒｐＣＭＶ－４に対するＩｇＭ力価において、感染を伝達しなかったＨＣＭＶ感染妊婦（低力価）と感染を伝達した妊婦（高力価）との間に大きな相違が見られた。あまり重要ではないが、ｒｐＣＭＶ－２６に対するＩｇＭ力価も二つの群において異なっていた（表７）。融合タンパクｒｐＣＭＶ－３ＢおよびｒｐＣＭＶ－９に対する力価の相違は大きくなかった。
新生児からの３５の血清の群も試験した（表８）。１０人のＨＣＭＶ非感染新生児中において、従来法によっても組換えＥＩＡによってもＩｇＭ陽性のものは見つからなかった。これに対して、生後第１週中の６人の先天的感染新生児から得られる六つの血清中において、二つがｒｅｃ－ＥＩＡにより陽性反応を示し、従来法の試験によっては何も陽性を示さなかった。観察された最大ＩｇＭ反応性は融合タンパクｒｐＣＭＶ－９およびｒｐＣＭＶ－２６に対して特異的である。生後１年中に尿中に継続的にＨＣＭＶを分泌している新生児（これら新生児は出産時にＨＣＭＶの検査をしていない）からの１９の血清のもう一つの群において、ｒｅｃ－ＥＩＡは１０の場合においてＩｇＭを検出したがｃｏｎｖ－ＥＩＡは二つの場合においてしかＩｇＭを検出しなかった。得られる最大ＩｇＭ反応性は、ｒｐＣＭＶ－４およびｒｐＣＭＶ－２６に対してであり、ｒｐＣＭＶ－４、ｒｐＣＭＶ－９およびｒｐＣＭＶ－２６の組み合わせは最高の反応性を提供する。
移植を受けた者におけるＨＣＭＶ感染のウイルス学的および血清学的モニターの代表例を図１７Ａおよび１７Ｂに示す。図１７Ａにおいて三つの一次感染および図１７Ｂにおいて三つの二次ＨＣＭＶ感染が示されている。Ａ１およびＡ２は腎臓移植患者の追跡、Ａ３、Ｂ１，２およびＢ３は心臓移植患者の追跡である。Ｓ＋Ｔは症状およびガンシクロビル処置を意味し、ＰＣＲ＋はポリモルホニュークリアー細胞中のＨＣＭＶゲノムの陽性検出を意味する。
示されたデータから、融合タンパクｒｐＣＭＶ－４が、健康成人、妊婦、感染新生児および移植を受けた者からの血清中に現れるＩｇＭ抗体への最も高い反応性を提供するものであった。しかしながら、融合タンパクｒｐＣＭＶ－４のみが、抗－ＨＣＭＶ　ＩｇＭと反応するウイルス抗原の完全複合体を示すことができなかった。これに対して、融合タンパクｒｐＣＭＶ－４、ｒｐＣＭＶ－９およびｒｐＣＭＶ－２６の組み合わせは、ＩｇＭ検出において効果的にウイルスに取って換わることができる。実際、表９および１０に示すように、９９．６％のＩｇＭ陽性血清が、これら融合タンパクの一またはそれ以上と陽性ＩｇＭ反応を示した。三つのクローンを用いるｒｅｃＥＩＡをｃｏｎｖ－ＥＩＡおよびＷＢと比較すると、ｒｅｃＥＩＡおよびＷＢは同じ結果を示し、いずれの手順もｃｏｎｖ－ＥＩＡより感受性が高かった。このことは、本発明によるｒｅｃＥＩＡの感受性および特異性が、ＨＣＭＶ－ＩｇＭ検出のための非常に感受性が高くかつ特異性の強い手順であるＷＢに非常に類似している［３０，３１］。

参考文献

1. Landini M. P. New approaches and perspectives in cytomegalovinus diagnosis. Prog. Med Mirol 1993; 4, 157-177.

2. Nielsen St, Sorensen I, Andersen ELK. Kinetics of specific immunoglobulins M,E,A and G in congenital, primary, and secondary cytomegalovirus infection studied by antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay. J clin Microbiol 1988; 26: 654-661.

3. Basson J, Tardy JC, Aymard M. Pattern of anti-cytomegalovirus IgM antibodies determined by immunoblotting. A study of kidney graft recipients developing a primary or recurrent CMV infection. Arch Virol 1989; 108: 259-270.

4. Drew WL. Nonpulmonary manifestations of cytomegalovirus infection in immuno-compromized patients. Clin Microphiol Rev 1992; 5: 204-210.

5. Lazzarotto T, Dalla Casa B, Campisi B, Landini NIP. Enzyme-linked immunoadsorbent assay for the detection of cytomegalovirus-IgM: Comparison between eight commercial kits, immunofluorescence and

immunoblotting. J Clin Lab Anal 1992; 6: 216-218.

6. Jahn O, Scholl BC, Traupe B, Fleckenstein B. The two major phosphoproteins (pp65 and pp150) of human cytomegalovirus and their antigenic properties. J Gen Virol 1987; 68, 1327-1337.

7. Landini MP., Lazzarotto T, Ripalti A, Guan MX, La Placa M. Antibody response to recombinant Lambda gt11 fusion proteins in Cytomegalovirus infection. J Clin Microbiol1989; 27: 2324-2327.

8. Landini MP, Guan MX, Jahn G, Lindenmeier W, Mach M, Ripalti A, Necker A, Lazzarotto T, Plachter B. Large scale screening of human sera with Cytomegalovirus recombinant antigens. J Clin Microbiology 1990; 28:1375-1379.

9. Landini MP, Ripalti A, Sra K , Pouletty P. Human cytomegalovirus structural proteins: immune reaction against pp150 synthetic peptides. J Clin Microbiol 1991; 29: 1868-1872.

10. Plachter B, Wieczorek L, Scholl B-C, Ziegelmaler R and Jahn G. Detection of Cytomegalovirus antibodies by an enzyme linked immunosorbent assay using recombinant polypeptides of the large phosphorylated tegument protein pp150. J Clin Microbiol 1992; 30:201-206.

11. Ripalti A, Landini MP, Mocarski ES and La Placa M. identification and preliminary use of recombinant lambda gt11 fusion proteins in Cytomegalovirus diagnosis. J GenVirol 1989; 70:1247-1251.

12. Ripalti A, Ruan Q, Boccuni MC, Campanini F, Bergamini G and

Landini MP. Construction of a polyepitope fusion antigens of human cytomegalovirus ppUL32: reactivity with human antibodies J Clin Microbiol 1994 ; 32: 358-363.

13. Scholl BC, Von Hintzestein B, Borisch B, Traupe B, Broker M, Jahn G. Procaryotic expression of immunogenic polypeptides of the large phosphoprotein (pp150) of human cytomegalovirus J Gen Virol 1988; 69:1195-1204.

14. Vornhagen R, Plachter B, Hinderer W, The TH, Van Zanten J, Matter L, Schmidt CA, Sonneborn HH, Jahn G. Early serodiagnosis of acute cytomegalovirus infection by Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigens. J Clin Microbiol 1994; 32: 981-986.

15. Jahn G, Kouzarides T, Mach M, Scholl BC, Plachter B, Traupe B, Preddie E, SatchweilSC, Fleckenstein B, Barrell BO. Map position and nucleotide sequence of the gene for the large structural phosphoprotein of human cytomegalovirus . J Virol 1987; 61:1358-1367.

16. Landini MP, Mirolo G, Baldassarri B, La Placa M. Human immune response to Cytomegalovirus structural polypeptides studied by immunoblotting. J Med Virol 1985; 17:303-311.

17. Novak I, Sova P, Krchnak V, Hamsikova E, Zavadova H E Mapping of serologicallyrelevant regions of human cytomegalovirus phosphoprotein pp150 using synthetic peptides. J GenVirol 1991; 72:1409-1413.

18. Mocarski ES, Pereira L, Michael N. Precise localisation of genes on

large animal genomes: use of lamba gt11 and monoclonal antibodies to map the gene for a Cytomegalovirus protein family. Proceedings of the National Academy of Science (USA) 1985; 82:1266-1270

19. Karlin 5, Mocarski ES, Schachtel GA. Molecular evolution of herpes viruses: genomic and protein sequence comparisons. Journal of Virology 1994; 68: 1886-1902.

20. Bolling TY, Mandecki M. An Escherichia coli expression vector for high-level production of heterologous proteins in fusion with CVP-KDO synthetase. Bio/Techniques 1990; 8: 488-490.

2l. Ripalti A, Dal Monte P, Boccuni, MC, Campanini, F, Lazzarotto T, Campisi B, Ruan Q, Landini MP. Prokaryotic expression of a large fragment of the most antigenic cytomegalovirusDNA-binding protein (ppUL44) and its reactivity with human antibodies. J Virol Methods 1994;46: 39-50.

22. Robinson IM, Pilot-Matias TI, Pratt SD, Patel CB, Bevirt TS, Hunt IC. Analysis of the humoral response to the flagellin protein of Borrelia burgdorferi: cloning of regions capable of differentiating lyme disease from syphilis. J Clin Microbiol 1993; 3 1: 629-635.

23. Gleaves CA, Smith TF, Shuster EA, Pearson &R. Rapid detection of cytomegalovirus in MRC5 cells inoculated with urine specimens by use of low speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen. J Clin Microbiol 1984; 19: 917-919.

24. Van der Biji, Torensma R, Son WJ, Schirm J, Tegzess AM, The

TH. Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody staining of blood leukocytes. J Med Virol 1988; 25:179-188.

25. Revello MG, Zavattoni M, Percivalle E, Grossi P, Gerna G. Correlation between immunofluorescent detection of human cytomegalovirus immediate early antigens in polymorphonuclear leukocytes and viremia. J inf Dis 1989; 160:159-160.

27. Lazzarotto T, Furlini 6, Re MC, Ramazzotti E, Campisi B, Landini MP. Human cytomegalovinus replication correlates with differentiation in a hematopoletic progenitor cell line and can be modulated by HtV. Arch Virol 1994135:13-28.

30. Gold D, Ashley R, Handsfield HH, Verdon M, Leach L, Mills I, Drew L, Corey L. Immunoblot analysis of the humoral immune response in primary cytomegalovirus infection. J Inf Dis 1988157: 3t9-325.

31. Re MC, Landini MP. IgM to human cytomegalovirus: Comparison of two enzyme immunoassays and IgM reactivity to viral polypeptides detected by immunoblotting. J Clin LabAnal 1989; 3:169-173.

配列表
（１）配列番号：１：
（ｉ）配列特徴
（Ａ）長さ：９０８塩基対
（Ｂ）型：核酸
（Ｃ）鎖の数：二重
（Ｄ）トポロジー：線状
（ｉｉ）配列の種類：ＤＮＡ（ゲノム）
（ｉｉｉ）パイポセティカル：ＮＯ
（ｉｉｉ）アンチセンス：ＮＯ
（ｉｘ）特徴
（Ａ）名称／キー：ＣＤＳ
（Ｂ）位置：１．．９００
配列番号：１：

```
GAA TTC ACA GCC AAT AAC CGC GTC AGT TTC CAC GGC GTA AAA AAC ATG      48
Glu Phe Thr Ala Asn Asn Arg Val Ser Phe His Gly Val Lys Asn Met
 1               5                  10                  15

CGT ATC AAC GTG CAG CTG AAG AAC TTC TAC CAG ACG CTG CTC AAT TGC      96
Arg Ile Asn Val Gln Leu Lys Asn Phe Tyr Gln Thr Leu Leu Asn Cys
            20                  25                  30

GCC GTC ACC AAA CTA CCG TGC ACG CTG CGT ATA GTT ACG GAG CAC GAC     144
Ala Val Thr Lys Leu Pro Cys Thr Leu Arg Ile Val Thr Glu His Asp
        35                  40                  45

ACG CTG TTG TAC GTG GCC AGC CGC AAC GGT CTG TTC GCC GTG GAG AAC     192
Thr Leu Leu Tyr Val Ala Ser Arg Asn Gly Leu Phe Ala Val Glu Asn
    50                  55                  60

TTT CTC ACC GAG GAA CCT TTC CAG CGT GGC GAT CCC TTC GAC AAA AAT     240
Phe Leu Thr Glu Glu Pro Phe Gln Arg Gly Asp Pro Phe Asp Lys Asn
65                  70                  75                  80

TAC GTC GGG AAC AGC GGC AAG TCG CGT GGC GGC GGC GGT GGT GGC GGC     288
Tyr Val Gly Asn Ser Gly Lys Ser Arg Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
                85                  90                  95

AGC CTC TCT TCG CTG GCC AAT GCC GGC GGT CTG CAC GAC GAC GGC CCG     336
Ser Leu Ser Ser Leu Ala Asn Ala Gly Gly Leu His Asp Asp Gly Pro
            100                 105                 110

GGT CTG GAT AAC GAT CTC ATG AAC GAG CCC ATG GGT CTC GGC GGT CTG     384
Gly Leu Asp Asn Asp Leu Met Asn Glu Pro Met Gly Leu Gly Gly Leu
        115                 120                 125

GGA GGA GGT GGC GGC GGT GGC GGC AAG AAG CAC GAC CGC GGT GGC GGC     432
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Lys Lys His Asp Arg Gly Gly Gly
    130                 135                 140
```

```
GGT GGT TCC GGT ACG CGG AAA ATG AGC AGC GGT GGC GGC GGC GGT GAT      480
Gly Gly Ser Gly Thr Arg Lys Met Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Asp
145                 150                 155                 160

CAC GAT CAC GGT CTT TCC TCC AAG GAA AAA TAC GAG CAG CAC AAG ATC      528
His Asp His Gly Leu Ser Ser Lys Glu Lys Tyr Glu Gln His Lys Ile
                165                 170                 175

ACC AGT TAC CTG ACG TCC AAA GGT GGA TCG GGC GGC GGC GGA GGA GGA      576
Thr Ser Tyr Leu Thr Ser Lys Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly
            180                 185                 190

GGA GGC GGC GGT TTG GAT CGC AAC TCC GGC AAT TAC TTC AAC GAC GCG      624
Gly Gly Gly Gly Leu Asp Arg Asn Ser Gly Asn Tyr Phe Asn Asp Ala
        195                 200                 205

AAA GAG GAG AGC GAC AGC GAG GAT TCT GTA ACG TTC GAG TTC GTC CCT      672
Lys Glu Glu Ser Asp Ser Glu Asp Ser Val Thr Phe Glu Phe Val Pro
    210                 215                 220

AAC ACC AAG AAG CAA AAG TGC GGC ACG CCG ACG CCT GTC AAT CCT TCC      720
Asn Thr Lys Lys Gln Lys Cys Gly Thr Pro Thr Pro Val Asn Pro Ser
225                 230                 235                 240

ACG GCC CCC GCT CCG GCC CCG ACA CCT ACC TTC GCG AAG CTT CAG GAA      768
Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Pro Thr Phe Ala Lys Leu Gln Glu
                245                 250                 255

TTC GGA TCG TCG CCC CAG AAG AGC GGT ACG GGG CCG CAA CCG GGT TCT      816
Phe Gly Ser Ser Pro Gln Lys Ser Gly Thr Gly Pro Gln Pro Gly Ser
            260                 265                 270

GCC GGC ATG GGG GGC GCC AAA ACG CCG TCG GAC GCC GTG CAG AAC ATC      864
Ala Gly Met Gly Gly Ala Lys Thr Pro Ser Asp Ala Val Gln Asn Ile
        275                 280                 285

CTC CAA AAG ATC GAG AAG ATT AAG AAC ACG GAG GAA TAGAATTC             908
Leu Gln Lys Ile Glu Lys Ile Lys Asn Thr Glu Glu
    290                 295                 300
```

（２）配列番号：２：

（ｉ）配列特徴

（Ａ）長さ：３００アミノ酸

（Ｂ）型：アミノ酸

（Ｄ）トポロジー：線状

（ｉｉ）配列の種類：タンパク

配列番号：２：

```
Glu Phe Thr Ala Asn Asn Arg Val Ser Phe His Gly Val Lys Asn Met
 1               5                  10                  15

Arg Ile Asn Val Gln Leu Lys Asn Phe Tyr Gln Thr Leu Leu Asn Cys
            20                  25                  30

Ala Val Thr Lys Leu Pro Cys Thr Leu Arg Ile Val Thr Glu His Asp
        35                  40                  45

Thr Leu Leu Tyr Val Ala Ser Arg Asn Gly Leu Phe Ala Val Glu Asn
```

```
     50                  55                  60

Phe Leu Thr Glu Glu Pro Phe Gln Arg Gly Asp Pro Phe Asp Lys Asn
 65                  70                  75                  80

Tyr Val Gly Asn Ser Gly Lys Ser Arg Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
                 85                  90                  95

Ser Leu Ser Ser Leu Ala Asn Ala Gly Gly Leu His Asp Asp Gly Pro
            100                 105                 110

Gly Leu Asp Asn Asp Leu Met Asn Glu Pro Met Gly Leu Gly Gly Leu
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Lys Lys His Asp Arg Gly Gly Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Ser Gly Thr Arg Lys Met Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Asp
145                 150                 155                 160

His Asp His Gly Leu Ser Ser Lys Glu Lys Tyr Glu Gln His Lys Ile
                165                 170                 175

Thr Ser Tyr Leu Thr Ser Lys Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly
            180                 185                 190

Gly Gly Gly Gly Leu Asp Arg Asn Ser Gly Asn Tyr Phe Asn Asp Ala
        195                 200                 205

Lys Glu Glu Ser Asp Ser Glu Asp Ser Val Thr Phe Glu Phe Val Pro
    210                 215                 220

Asn Thr Lys Lys Gln Lys Cys Gly Thr Pro Thr Pro Val Asn Pro Ser
225                 230                 235                 240

Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Pro Thr Phe Ala Lys Leu Gln Glu
                245                 250                 255

Phe Gly Ser Ser Pro Gln Lys Ser Gly Thr Gly Pro Gln Pro Gly Ser
            260                 265                 270

Ala Gly Met Gly Gly Ala Lys Thr Pro Ser Asp Ala Val Gln Asn Ile
        275                 280                 285

Leu Gln Lys Ile Glu Lys Ile Lys Asn Thr Glu Glu
    290                 295                 300
```

（３）配列番号：３：
（ｉ）配列特徴
（Ａ）長さ：９０６塩基対
（Ｂ）型：核酸
（Ｃ）鎖の数：二重
（Ｄ）トポロジー：線状
（ｉｉ）配列の種類：ＤＮＡ（ゲノム）
（ｉｉｉ）ハイポセティカル：ＮＯ
（ｉｘ）アンチセンス：ＮＯ
（ｖ）フラグメント型：内部
（ｖｉ）最初の原料：
（Ａ）生物体：人サイトメガロウイルス（ＨＣＭＶ）
（ｖｉｉ）直接の原料：
（Ｂ）クローン：ｐＣＭＶ－２７

（ｉｘ）特徴
（Ａ）名称／キー：ＣＤＳ
（Ｂ）位置：１．．９０６
（Ｄ）他の情報：／機能＝「ＨＣＭＶ抗原」／生成物＝「融合タンパク　ａ１ｃ２ｆ３ｈ１０」
（ｘｉ）配列記載：配列番号：３：

```
ACG CCG ACG CCT GTC AAT CCT TCC ACG GCC CCC GCT CCG GCC CCG ACA          48
Thr Pro Thr Pro Val Asn Pro Ser Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr
  1               5                  10                  15

CCT ACC TTC GCG AAG CTT CAG GAA TTC GGA TCG TCG CCC CAG AAG AGC          96
Pro Thr Phe Ala Lys Leu Gln Glu Phe Gly Ser Ser Pro Gln Lys Ser
            20                  25                  30

GGT ACG GGG CCG CAA CCG GGT TCT GCC GGC ATG GGG GGC GCC AAA ACG         144
Gly Thr Gly Pro Gln Pro Gly Ser Ala Gly Met Gly Gly Ala Lys Thr
        35                  40                  45

CCG TCG GAC GCC GTG CAG AAC ATC CTC CAA AAG ATC GAG AAG ATT AAG         192
Pro Ser Asp Ala Val Gln Asn Ile Leu Gln Lys Ile Glu Lys Ile Lys
    50                  55                  60

AAC ACG GAG GAA CTT CAG GAA TTC ACA GCC AAT AAC CGC GTC AGT TTC         240
Asn Thr Glu Glu Leu Gln Glu Phe Thr Ala Asn Asn Arg Val Ser Phe
65                  70                  75                  80

CAC GGC GTA AAA AAC ATG CGT ATC AAC GTG CAG CTG AAG AAC TTC TAC         288
His Gly Val Lys Asn Met Arg Ile Asn Val Gln Leu Lys Asn Phe Tyr
                85                  90                  95

CAG ACG CTG CTC AAT TGC GCC GTC ACC AAA CTA CCG TGC ACG CTG CGT         336
Gln Thr Leu Leu Asn Cys Ala Val Thr Lys Leu Pro Cys Thr Leu Arg
            100                 105                 110

ATA GTT ACG GAG CAC GAC ACG CTG TTG TAC GTG GCC AGC CGC AAC GGT         384
Ile Val Thr Glu His Asp Thr Leu Leu Tyr Val Ala Ser Arg Asn Gly
        115                 120                 125

CTG TTC GCC GTG GAG AAC TTT CTC ACC GAG GAA CCT TTC CAG CGT GGC         432
Leu Phe Ala Val Glu Asn Phe Leu Thr Glu Glu Pro Phe Gln Arg Gly
    130                 135                 140

GAT CCC TTC GAC AAA AAT TAC GTC GGG AAC AGC GGC AAG TCG CGT GGC         480
Asp Pro Phe Asp Lys Asn Tyr Val Gly Asn Ser Gly Lys Ser Arg Gly
145                 150                 155                 160

GGC GGC GGT GGT GGC GGC AGC CTC TCT TCG CTG GCC AAT GCC GGC GGT         528
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Leu Ser Ser Leu Ala Asn Ala Gly Gly
                165                 170                 175

CTG CAC GAC GAC GGC CCG GGT CTG GAT AAC GAT CTC ATG AAC GAG CCC         576
```

```
Leu His Asp Asp Gly Pro Gly Leu Asp Asn Asp Leu Met Asn Glu Pro
            180                 185                 190

ATG GGT CTC GGC GGT CTG GGA GGA GGT GGC GGC GGT GGC GGC AAG AAG      624
Met Gly Leu Gly Gly Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Lys Lys
        195                 200                 205

CAC GAC CGC GGT GGC GGC GGT GGT TCC GGT ACG CGG AAA ATG AGC AGC      672
His Asp Arg Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Thr Arg Lys Met Ser Ser
    210                 215                 220

GGT GGC GGC GGC GGT GAT CAC GAT CAC GGT CTT TCC TCC AAG GAA AAA      720
Gly Gly Gly Gly Gly Asp His Asp His Gly Leu Ser Ser Lys Glu Lys
225                 230                 235                 240

TAC GAG CAG CAC AAG ATC ACC AGT TAC CTG ACG TCC AAA GGT GGA TCG      768
Tyr Glu Gln His Lys Ile Thr Ser Tyr Leu Thr Ser Lys Gly Gly Ser
                245                 250                 255

GGC GGC GGC GGA GGA GGA GGA GGC GGC GGT TTG GAT CGC AAC TCC GGC      816
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Leu Asp Arg Asn Ser Gly
            260                 265                 270

AAT TAC TTC AAC GAC GCG AAA GAG GAG AGC GAC AGC GAG GAT TCT GTA      864
Asn Tyr Phe Asn Asp Ala Lys Glu Glu Ser Asp Ser Glu Asp Ser Val
        275                 280                 285

ACG TTC GAG TTC GTC CCT AAC ACC AAG AAG CAA AAG TGC GGC              906
Thr Phe Glu Phe Val Pro Asn Thr Lys Lys Gln Lys Cys Gly
    290                 295                 300
```

（４）配列番号：４：

（ｉ）配列特徴

（Ａ）長さ：３０２アミノ酸

（Ｂ）型：アミノ酸

（Ｄ）トポロジー：線状

（ｉｉ）配列の種類：タンパク

（ｘｉ）配列記載：配列番号：４：

```
Thr Pro Thr Pro Val Asn Pro Ser Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr
 1               5                  10                  15

Pro Thr Phe Ala Lys Leu Gln Glu Phe Gly Ser Ser Pro Gln Lys Ser
            20                  25                  30

Gly Thr Gly Pro Gln Pro Gly Ser Ala Gly Met Gly Gly Ala Lys Thr
        35                  40                  45

Pro Ser Asp Ala Val Gln Asn Ile Leu Gln Lys Ile Glu Lys Ile Lys
    50                  55                  60

Asn Thr Glu Glu Leu Gln Glu Phe Thr Ala Asn Asn Arg Val Ser Phe
65                  70                  75                  80

His Gly Val Lys Asn Met Arg Ile Asn Val Gln Leu Lys Asn Phe Tyr
                85                  90                  95

Gln Thr Leu Leu Asn Cys Ala Val Thr Lys Leu Pro Cys Thr Leu Arg
            100                 105                 110
```

Ile Val Thr Glu His Asp Thr Leu Leu Tyr Val Ala Ser Arg Asn Gly
115 120 125

Leu Phe Ala Val Glu Asn Phe Leu Thr Glu Glu Pro Phe Gln Arg Gly
130 135 140

Asp Pro Phe Asp Lys Asn Tyr Val Gly Asn Ser Gly Lys Ser Arg Gly
145 150 155 160

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Leu Ser Ser Leu Ala Asn Ala Gly Gly
165 170 175

Leu His Asp Asp Gly Pro Gly Leu Asp Asn Asp Leu Met Asn Glu Pro
180 185 190

Met Gly Leu Gly Gly Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Lys Lys
195 200 205

His Asp Arg Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Thr Arg Lys Met Ser Ser
210 215 220

Gly Gly Gly Gly Gly Asp His Asp His Gly Leu Ser Ser Lys Glu Lys
225 230 235 240

Tyr Glu Gln His Lys Ile Thr Ser Tyr Leu Thr Ser Lys Gly Gly Ser
245 250 255

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Leu Asp Arg Asn Ser Gly
260 265 270

Asn Tyr Phe Asn Asp Ala Lys Glu Glu Ser Asp Ser Glu Asp Ser Val
275 280 285

Thr Phe Glu Phe Val Pro Asn Thr Lys Lys Gln Lys Cys Gly
290 295 300

【図１】

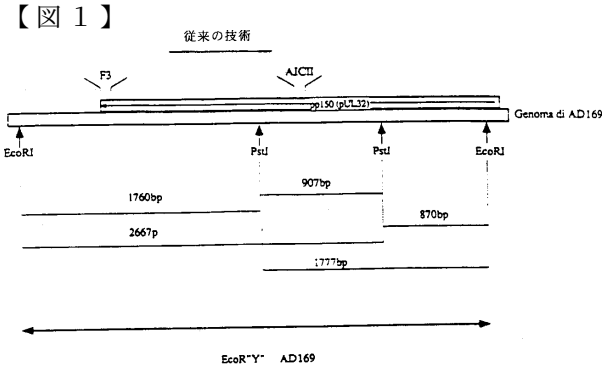


Fig. 1

【図２】

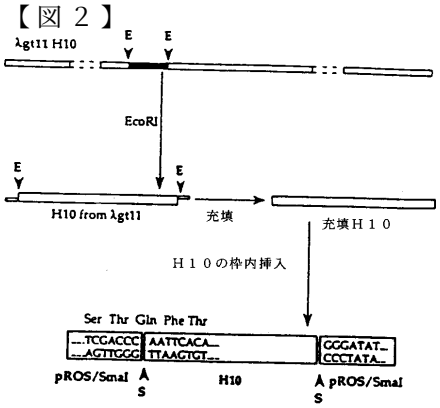


Fig. 2

【図５】

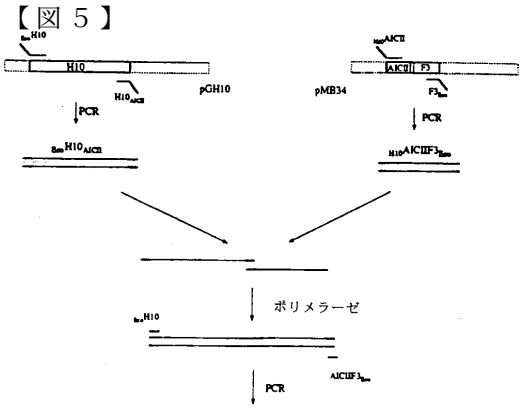


Fig. 5

【図３】

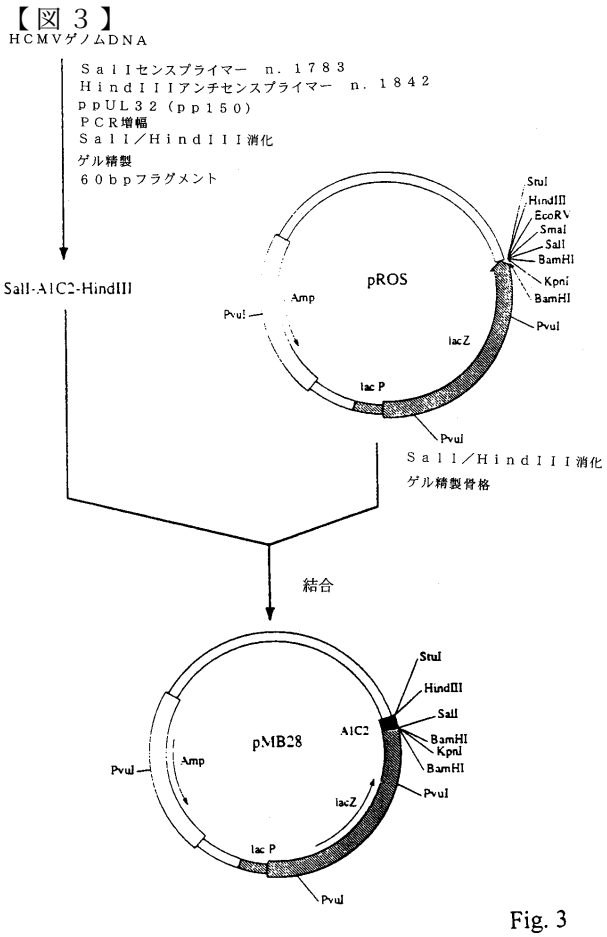


Fig. 3

【図４】

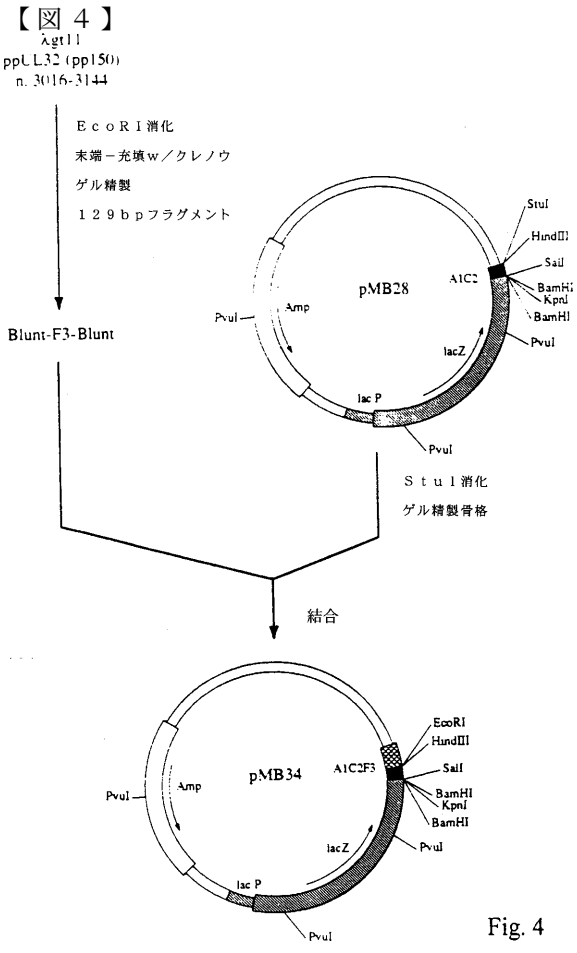


Fig. 4

【図６】

表1

全CMVを用いるELISAによるまたは個々の融合タンパクを用いる組換えELISAによるIgG検出間の比較

全CMVを用いるELISA（IgG）		以下の融合タンパクを用いるELISA（IgG）											
		F3		A1C2		A1C2/F3		H10		A1C2/F3/H10			
N	平均力価（範囲）	N. 陽性	平均力価（範囲）	N. 陽性	平均力価（範囲）	N. 陽性	平均力価（範囲）	N. 陽性	平均力価（範囲）	N. 陽性	平均力価（範囲）		
28	291 (242-330)	19	75 (17-180)	10	41 (17-43)	20	172 (40-490)	19	214 (168-501)	27	176 (140-641)		
40	576 (434-705)	40	434 (53-2079)	22	110 (12-440)	40	825 (230-2209)	39	611 (206-1038)	40	880 (120-2160)		
40	1161 (690-2138)	38	796 (50-2461)	22	114 (25-275)	38	805 (50-2351)	40	758 (300-2120)	40	940 (120-2405)		
108	合計	98 (90,7%)		54 (50%)		97 (89,8%)		98 (90,7%		107(99,1%)			
14	0.18 (0.2-5)	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—		

Fig. 6

【図７】

表2

全CMVを用いるELISAによるまたは個々の融合タンパクを用いる組換えELISAによるIgM検出間の比較

全CMVを用いるELISA（IgM）		以下の融合タンパクを用いるELISA（IgM）											
		F3		A1C2		A1C2/F3		1110		A1C2/F3/1110			
N.	平均力価（範囲）	N. 陽性	平均力価（範囲）	N. 陽性	平均力価（範囲）	N. 陽性	平均力価（範囲）	N. 陽性	平均力価（範囲）	N. 陽性	平均力価（範囲）		
20	294 (242-389)	10	521 (232-1171)	10	317 (85-612)	14	797 (210-1417)	19	578 (432-724)	20	517 (386-815)		
24	516 (210-2297)	18	1090 (210-2297)	16	467 (143-1141)	22	1278 (370-2561)	23	887 (209-2270)	24	767 (298-1973)		
20	1341 (881-2000)	16	1163 (451-2339)	14	1021 (202-2260)	16	1707 (521-2249)	20	1065 (579-2471)	20	1121 (421-2243)		
64	合計 陽性	44 (68,75%)		40 (62,5%)		52 (81,25%)		62 (96,87%)		64 (100%)			
5	27 (1-56)	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—		

Fig. 7

【図８】

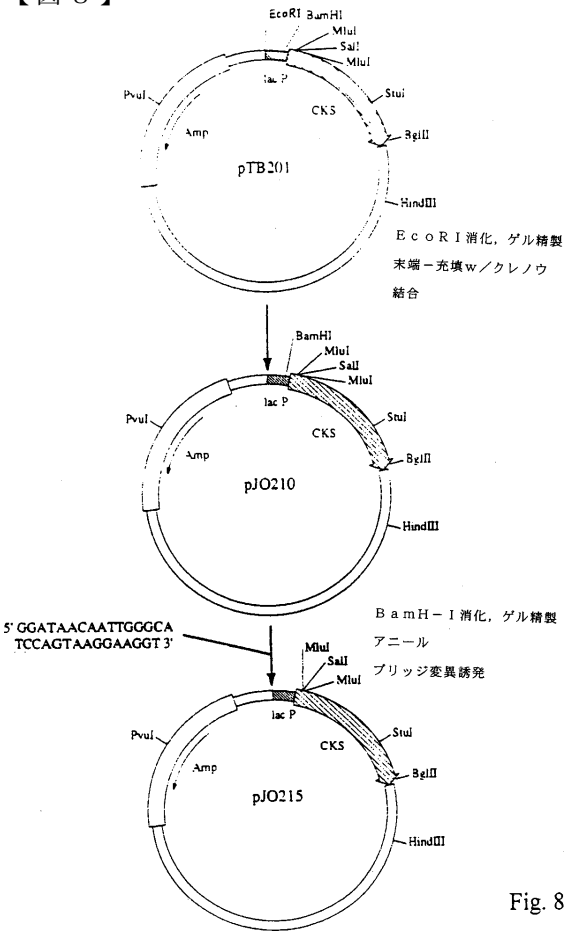


Fig. 8

【図９】

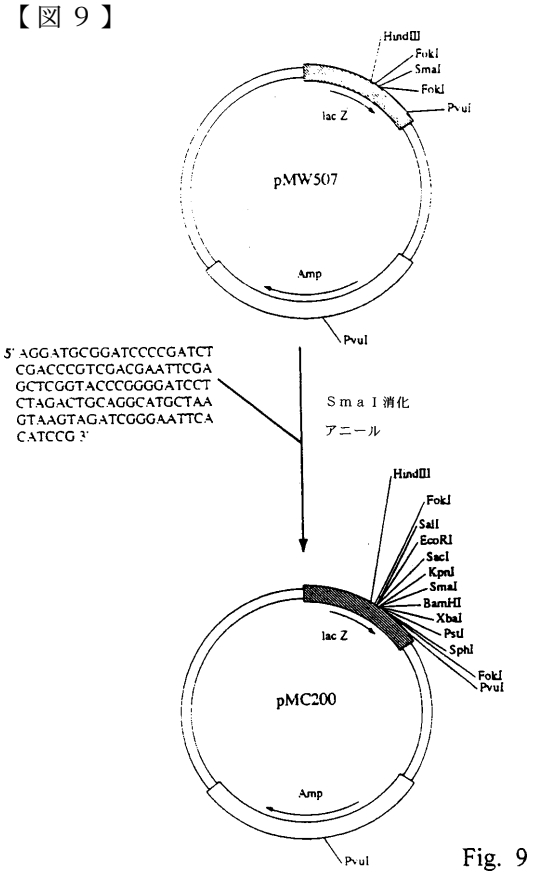


Fig. 9

【図１０】

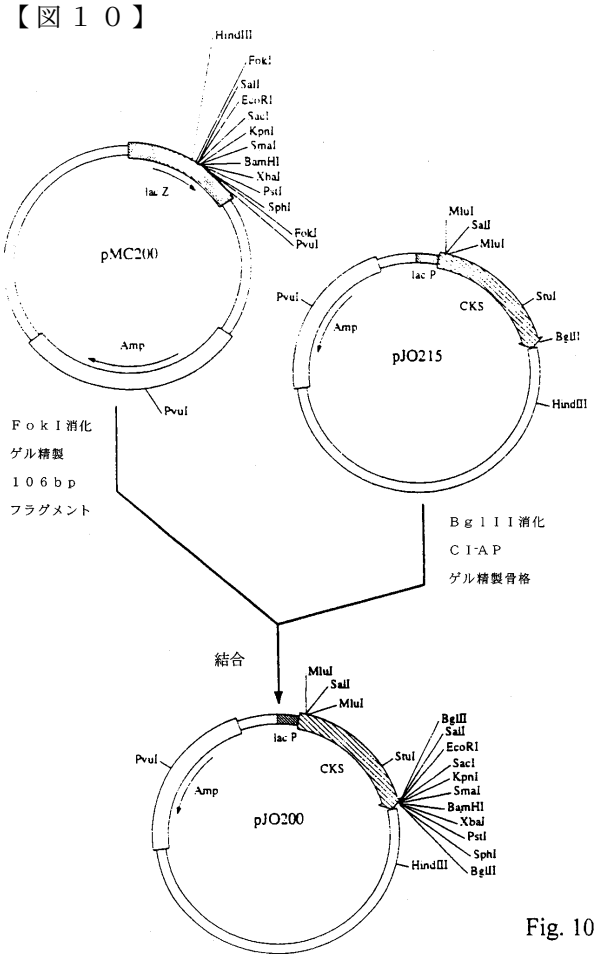


Fig. 10

【図１１】

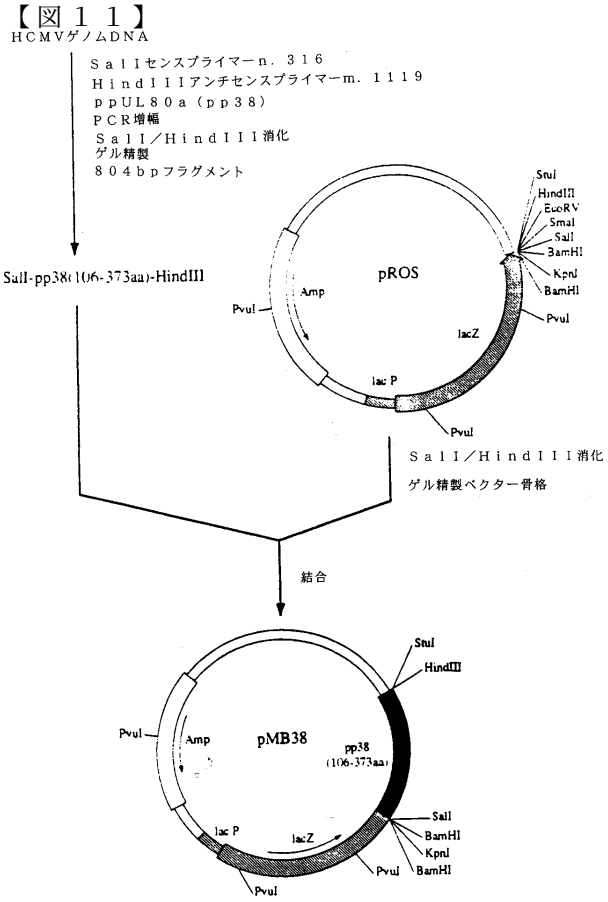


Fig. 11

【図１２】

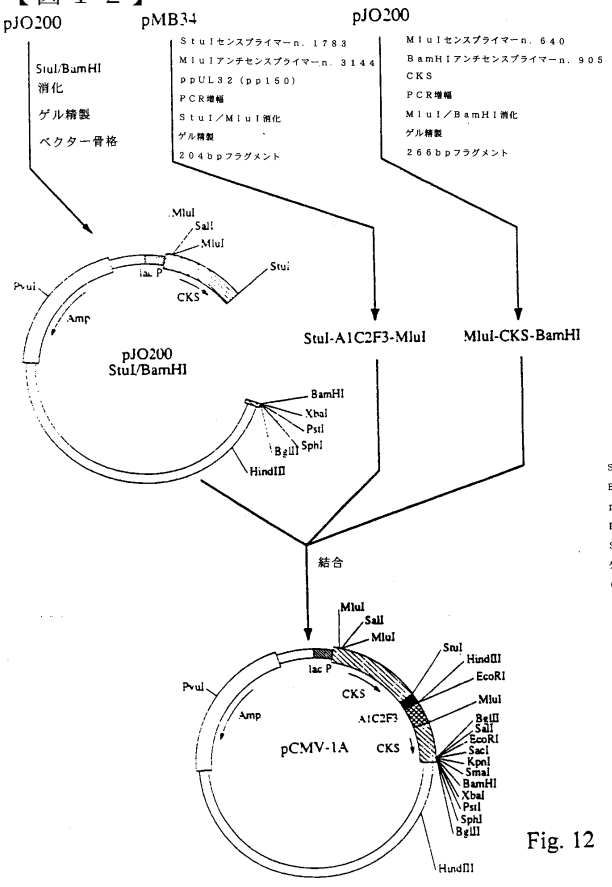


Fig. 12

【図１３Ａ】

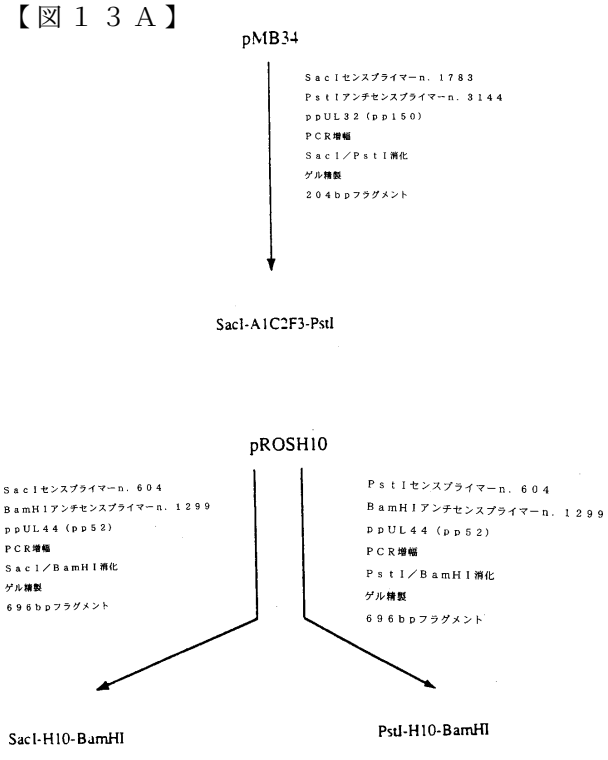


Fig. 13A

【図１３Ｂ】

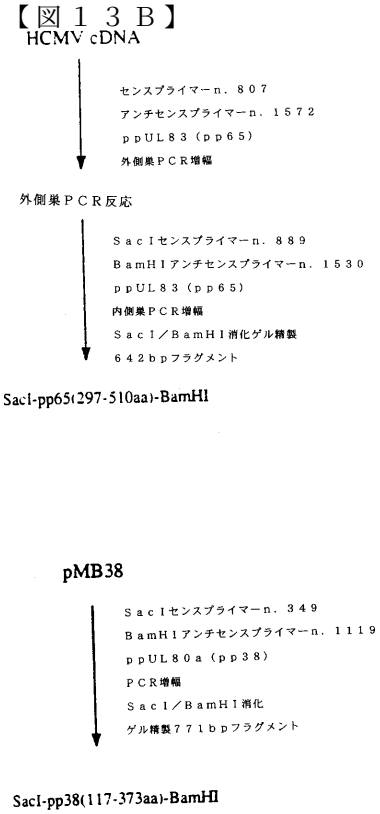


Fig. 13B

【図１３Ｃ】

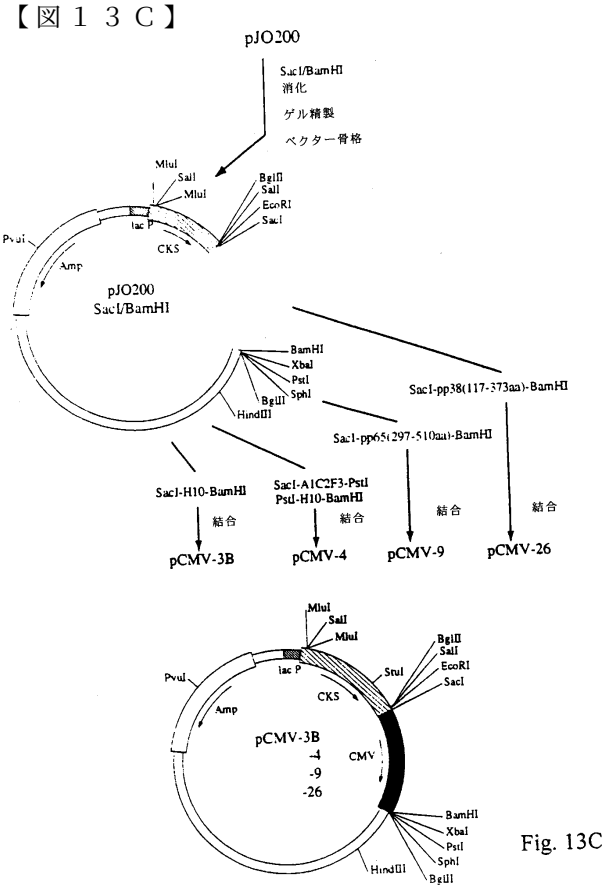


Fig. 13C

【図１４Ａ】

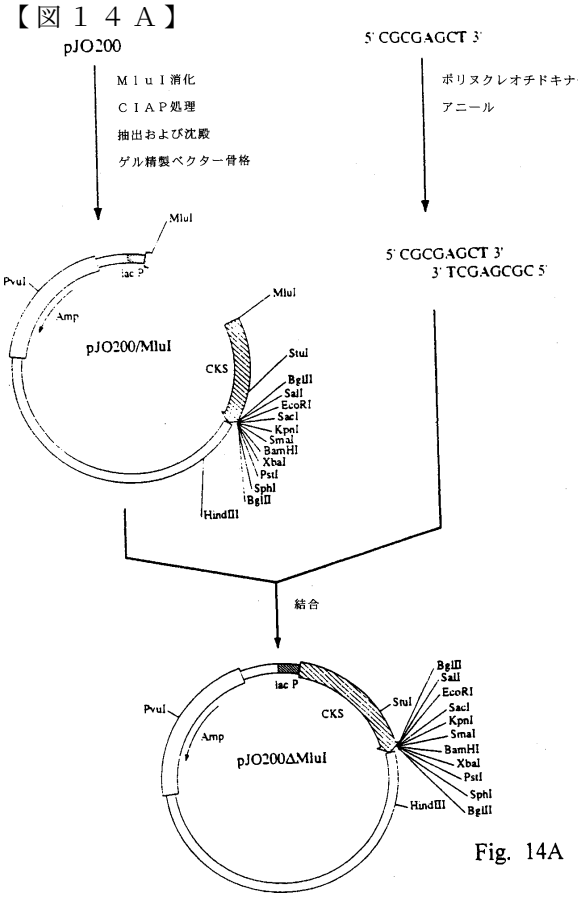


Fig. 14A

【図１４Ｂ】

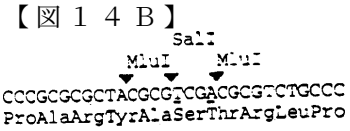


Fig. 14B

【図１４Ｃ】

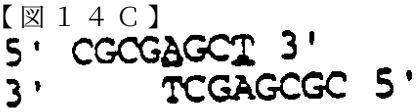


Fig. 14C

【図１４Ｄ】

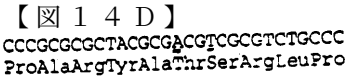


Fig. 14D

【図１５】

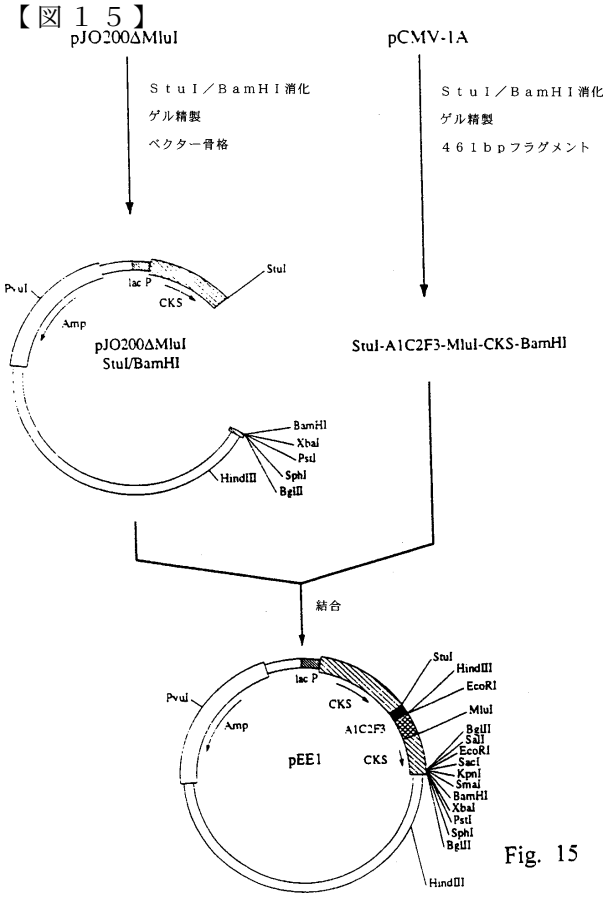


Fig. 15

【図１６Ａ】

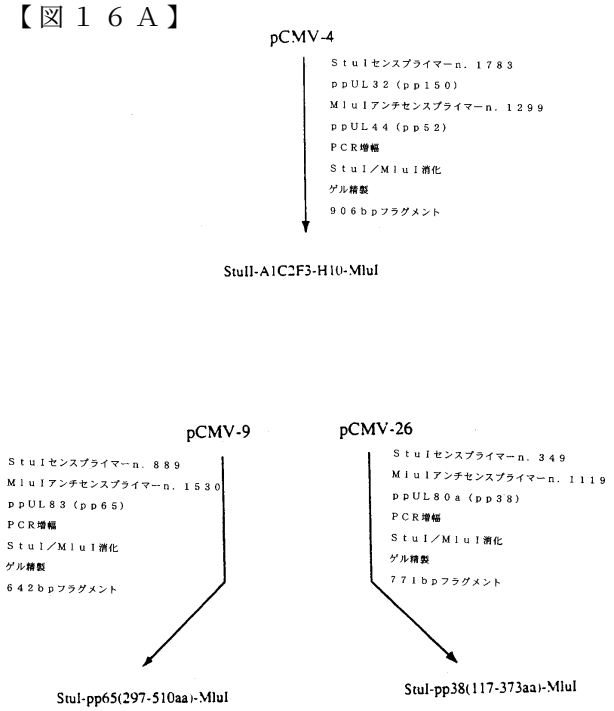


Fig. 16A

【図１６Ｂ】

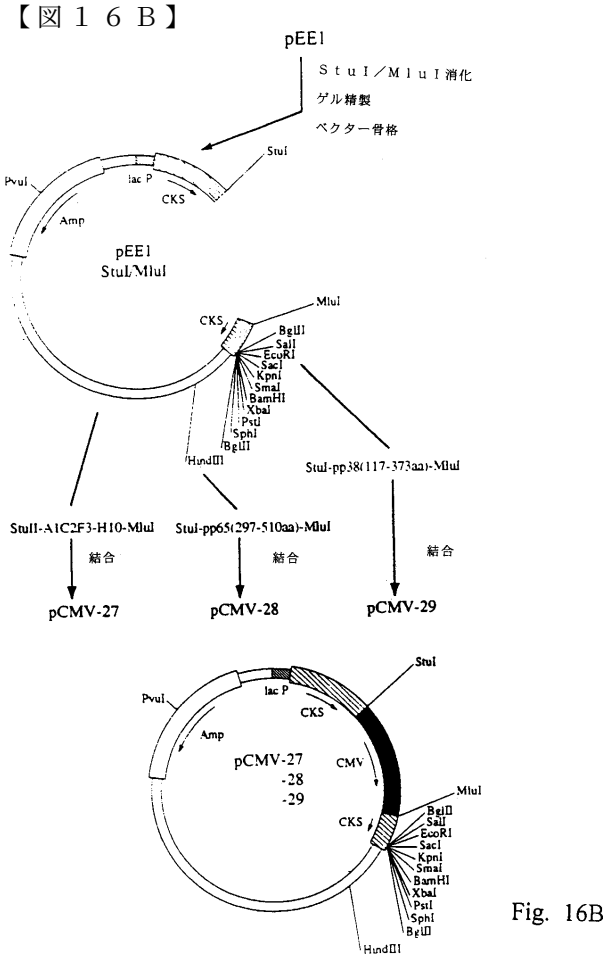


Fig. 16B

【図１７Ａ】

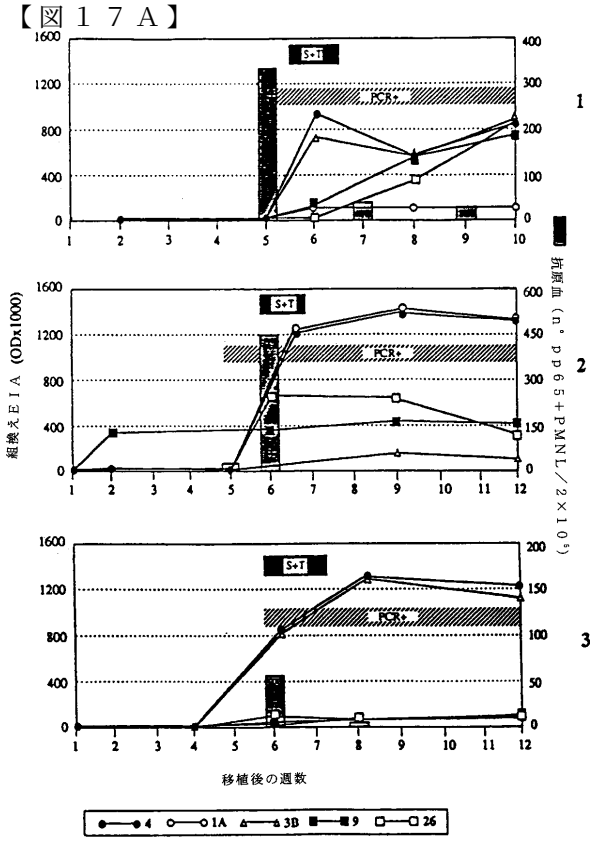


Fig. 17A

【図１７Ｂ】

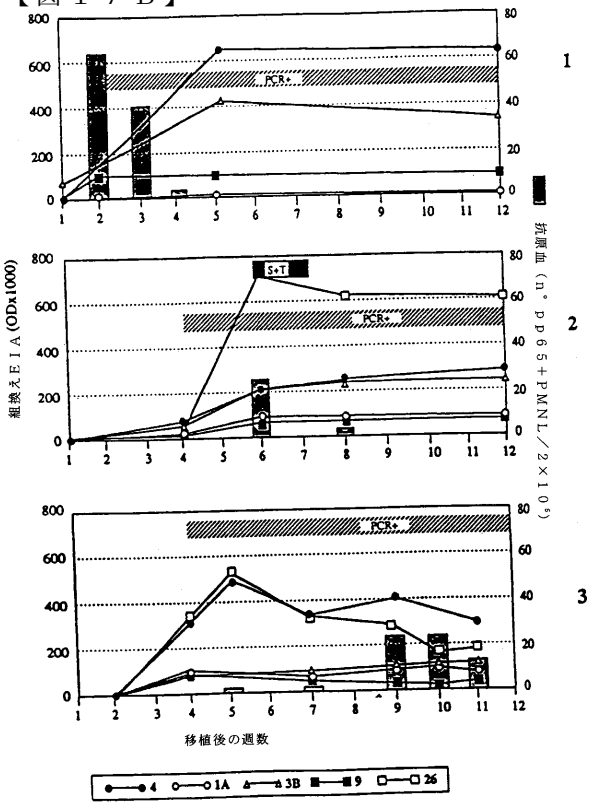


Fig. 17B

【図１８】

表3

ウイルスタンパク	融合タンパク			タンパクデータ		アッセイ結果	
	融合タンパク分子量MW x10³ kD	自動試験	手動試験	スクレオチド	アミノ酸	手動試験 OD x 10³	自動試験
ppUL32+ppUL44	58		rpCMV-4	1783-1842+3016-3144(ppUL32)+604-1299(ppUL44)	595-616 + 1006-1048(ppUL32)+202-434(ppUL44)	180	
			rpCMV-26	340-1119	117-373	180	
ppUL80a	54						
ppUL32	36			1783-1842+3016-3144	595-614 + 1006-1048	130	
ppUL44	51		rpCMV-1A	604-1299	202-434	170	
ppUL83	51		rpCMV-3B	889-1530	297-510	110	
ppUL32+ppUL44	60	rpCMV-27	rpCMV-9	1783-1842+3016-3144(ppUL32)+604-1299(ppUL44)	595-616 + 1006-1048(ppUL32)+202-434(ppUL44)		0 6
ppUL83	53	rpCMV-28		889-1530	297-510		0 6
ppUL80a	55	rpCMV-29		349-1119	117-373		0 6

Fig. 18

【図１９】

表4
別々に被覆された微粒子を用いる連続的および組み合わせで実施した7HCMV IgM陰性血清の試験により得られた自動HCMV IgMイムノアッセイの結果

サンプル	被覆微粒子を用いるサンプル指数値				サンプル結果(陽性または陰性)	
	27	28	29	27+28+29	連続	組み合わせ
BT10578	0.076	0.071	0.106	0.075	陰性	陰性
BS18323	0.099	0.044	0.090	0.104	陰性	陰性
BT12170	0.202	0.070	0.140	0.167	陰性	陰性
BT12155	0.044	0.059	0.123	0.065	陰性	陰性
BT12173	0.204	0.111	0.316	0.255	陰性	陰性
BT12162	0.436	0.251	0.200	0.476	陰性	陰性
BT12267	0.198	0.141	0.496	0.296	陰性	陰性

Fig. 19

【図２０】

表5
別々に被覆された微粒子を用い連続的および組み合わせで実施した
11HCMV IgM陰性血清の試験により得られた自動HCMV IgMイムノアッセイの結果

サンプル	ウイルスWB	被覆微粒子を用いるサンプル指数値				サンプル結果(陽性または陰性)	
		27	28	29	27+28+29	連続	組み合わせ
495	150,65,55,38	3.860	0.894	4.049	4.550	陽性	陽性
530	150,65,55,38	1.437	1.416	2.395	1.647	陽性	陽性
705	150,65,55,38	1.752	0.120	0.560	2.091	陽性	陽性
525	150	0.784	0.214	0.438	0.833	陽性	陽性
587	150,38	0.824	1.144	4.780	2.011	陽性	陽性
316	150,38	0.629	0.047	0.724	0.653	陽性	陽性
498	150,38	0.616	0.084	1.502	0.787	陽性	陽性
317	150,65	0.036	1.041	0.109	0.973	陽性	陽性
472	150,65	0.960	1.988	0.572	0.632	陽性	陽性
457	150,65	2.768	0.744	0.717	3.127	陽性	陽性
301	150,65	2.888	0.157	0.658	2.214	陽性	陽性

Fig. 20

【図23】

表8
新生児における従来および組換えＥＩＡの比較

被検者の群	数	検出された陽性サンプル数							
		融合タンパクを用いたＲｅｃ－ＥＩＡ							従来のＥＩＡ
		1A	3B	4	9	26	4+9+26	全	
先天的に感染した新生児＊	6	0	1	1	2	2	2	2	0
生後一年中ＨＣＭＶを分泌する新生児＊＊	19	0	4	7	1	7	10	10	2
ＨＣＭＶ非感染新生児＊＊	10	0	0	0	0	0	0	0	0

＊血清は生後１～７日に得た
＊＊血清は生後１～１２月に得た

Fig. 23

【図21】

表6
１５０ＩｇＭ陽性血清を試験して得られた組換えＥＩＡ結果

血清の数	HCMV 血清法＊ IgG	IgM	陽性血清の数 1A	3B	4	9	26	4+9+26	全融合タンパク
50	+	高	42	49	49	44	39	50	50
50	+	中	31	47	44	42	37	50	50
50	+	低	29	40	42	31	32	47	48
合計150			102	136	135	117	108	147(98%)	148(98.7%)

＊ＥＩＡ－ＩｇＭ値に基づき血清を３群に分類
全血清をウエスタンブロッティングによりＩｇＭ確認。
ＥＩＡに示されるようにそれらは全てＩｇＧ陽性。

Fig. 21

【図24】

表9
異なる群の被検者からの２５３ＩｇＭ陽性血清中に得られる５つの融合タンパクへの累積ＩｇＭ反応

組換えタンパク	陽性サンプルの数 ＩｇＭ＋血清 (n148)	感染妊婦＊ (n20)	感染妊婦＊＊ (n8)	感染新生児° (n2)	感染新生児'' (n2)	感染移植患者 (n65) 群§ I 2	II 15	III 17	IV 11	V 15	VI 5	合計数 (%)
1A	102	1	1	0	0	1	5	7	4	7	0	128(50.6)
3B	136	15	6	1	4	1	7	13	9	10	2	204(80.6)
4	135	19	8	1	7	1	12	17	11	14	3	228(90.1)
9	117	9	3	0	1	2	8	7	8	7	2	164(64.8)
26	108	10	6	2	7	1	11	15	6	10	3	179(70.7)
4+9	144	20	8	1	7	2	14	17	11	14	3	241(95.2)
4+26	142	19	8	2	10	1	13	17	11	15	5	243(96.0)
4+9+26	147	20	8	2	10	2	15	17	11	15	5	252(99.6)

＊感染を伝達していないＨＣＭＶ感染妊婦
＊＊感染を伝達したＨＣＭＶ感染妊婦
§表５に示す群
° 血清は生後１週間中に得た
'' 血清は生後１～１２月に得た

Fig. 24

【図22】

表7
妊婦における従来および組換えＥＩＡの比較　個々の融合タンパクのＩｇＭ力価

被検者の群	数	検出された陽性サンプル数 融合タンパクを用いたＲｅｃ－ＥＩＡ 1A	3B	4	9	26	4+9+26	全	従来のEIA	検出されたＩｇＭ力価 (OD×10³) 融合タンパクを用いたＲｅｃ－ＥＩＡ 3B	4	9	26
感染を伝達していないＨＣＭＶ感染妊婦＊	2.5	1	15	19	9	10	20	20	12	461(±211)	838(±324) p=0.012	164(±59)	487(±220) p=0.023
感染を伝達したＨＣＭＶ感染妊婦＊	8	1	6	8	3	6	8	8	6	724(±344)	1450(±379)	191(±52)	1064(±490)
ＨＣＭＶ非感染妊婦＊	18	0	0	0	0	0	0	0	0	nd	nd	nd	nd

＊サンプルは妊娠２２～２４週に得た

Fig. 22

【図２５】

表１０
従来および組換えＥＩＡ（融合タンパク４，９および２６）の比較
および腎臓移植患者および妊婦からランダムに選択された２００の血清におけるウエスタンブロッティング

			組換えＥＩＡ		ウエスタンブロッティング	
			陽性	陰性	陽性	陰性
従来のＥＩＡ	陽性	８８	８６	２	８６	２
	陰性	１１２	５０	６２	５１	６１
	合計	２００	１３６	６４	１３７	６３

Fig. 25

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G01N 33/577 (2006.01) G01N 33/577 B

(74)代理人
弁理士 川口 義雄
(74)代理人
弁理士 中村 至
(74)代理人
弁理士 船山 武
(74)代理人
弁理士 伏見 直哉
(72)発明者 ランデイーニ, マリア・パオラ
イタリー国、イ－４０１２７・ボローニヤ、ビア・エツセ・アポロニア、２
(72)発明者 リパルチ, アレツサンドロ
イタリー国、イ－４０１２７・ボローニヤ、ビア・ペトラルカ、２５
(72)発明者 メイン, グレゴリー・テイー
アメリカ合衆国、イリノイ・６００３１、ガーニー、コンステイチユーシヨン・アベニユー・５７４３
(72)発明者 フランダース, リチヤード・テイー
アメリカ合衆国、イリノイ・６００３０、グレイズレイク、ウツドランド・ドライブ・３５８

審査官 飯室 里美

(56)参考文献 Journal of Clinical Microbiology, Feb. 1994, Vol.32, No.2, pp.358-363
Journal of Virological Methods, Lan. 1994, Vol.46, pp.39-50
Journal of General Virology, Jan. 1994, Vol.75, pp.189-192
Virology, 1991, Vol.182, pp.220-228
Journal of Clinical Microbiology, Vol.28, No.6, pp.1229-1235
Journal of Virology, May 1994, Vol.68, No.5, pp.2937-2946
Journal of Virology, 1993, Vol.67, No.1, pp.497-506
The Journal of Biological Chemistry, May 1994, Vol.269, No.20, pp.14337-14340
Journal of Clinical Microbiology, 1989, Vol.27, No.10, pp.2324-2327

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N 15/09
C07K 14/045
C07K 19/00
C12N 1/21
G01N 33/569
G01N 33/577
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)