(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第5775005号
(P5775005)
(45)発行日　平成27年9月9日(2015.9.9)　(24)登録日　平成27年7月10日(2015.7.10)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 39/085	(2006.01)	A61K	39/085	ZNA
A61K 47/48	(2006.01)	A61K	47/48	
A61P 31/04	(2006.01)	A61P	31/04	

請求項の数 13　(全 71 頁)

(21)出願番号	特願2012-9225(P2012-9225)
(22)出願日	平成24年1月19日(2012.1.19)
(62)分割の表示	特願2007-531712(P2007-531712)の分割
原出願日	平成17年9月20日(2005.9.20)
(65)公開番号	特開2012-107028(P2012-107028A)
(43)公開日	平成24年6月7日(2012.6.7)
審査請求日	平成24年2月15日(2012.2.15)
(31)優先権主張番号	0421082.9
(32)優先日	平成16年9月22日(2004.9.22)
(33)優先権主張国	英国(GB)
(31)優先権主張番号	0421078.7
(32)優先日	平成16年9月22日(2004.9.22)
(33)優先権主張国	英国(GB)

(73)特許権者　305060279
グラクソスミスクライン　バイオロジカルズ　ソシエテ　アノニム
ベルギー　ベー－１３３０　リクセンサール　リュ　ドランスティテュ　８９
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節
(74)代理人　100122389
弁理士　新井　栄一
(74)代理人　100111741
弁理士　田中　夏夫
(74)代理人　100120905
弁理士　深見　伸子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】免疫原性組成物

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
ａ）(i) ClfA；または、(ii)フォワードプライマー：5'-CGCGGATCCAGTGAAAATAGTGTTACGCAATC-3'およびリバースプライマー：5'-CCCAAGCTTTTACTCTGGAATTGGTTCAATTTC-3'を用いて配列番号63に示される二本鎖配列から増幅されるPCR産物によってコードされるClfAを由来とする断片を含むClfAの免疫原性断片である、少なくとも１つの単離されたブドウ球菌細胞外成分結合タンパク質またはその免疫原性断片；および
ｃ）αトキシン（Hla）、αトキシンH35L突然変異体、およびαトキシンH35R突然変異体からなる群より選択される少なくとも１つの単離されたブドウ球菌の毒素；
を含む、ブドウ球菌感染を治療または予防するための免疫原性組成物。
【請求項２】
さらにｂ）免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitCおよびNi ABC輸送体、ならびに少なくとも100個以上の連続したアミノ酸からなるその免疫原性断片からなる群より選択される少なくとも１つの単離されたブドウ球菌輸送体タンパク質またはその免疫原性断片を含む、請求項１に記載の免疫原性組成物。
【請求項３】
黄色ブドウ球菌由来の少なくとも１つのタンパク質または免疫原性断片を含む、請求項１または２に記載の免疫原性組成物。
【請求項４】
表皮ブドウ球菌由来の少なくとも１つのタンパク質または免疫原性断片を含む、請求項

１～３のいずれか１項に記載の免疫原性組成物。
【請求項５】
PIA多糖またはオリゴ糖をさらに含む、請求項１～４のいずれか１項に記載の免疫原性組成物。
【請求項６】
黄色ブドウ球菌由来のＶ型および／またはVIII型莢膜多糖またはオリゴ糖をさらに含む、請求項１～５のいずれか１項に記載の免疫原性組成物。
【請求項７】
表皮ブドウ球菌由来のI型、および／またはII型および／またはIII型莢膜多糖もしくはオリゴ糖をさらに含む、請求項１～６のいずれか１項に記載の免疫原性組成物。
【請求項８】
ブドウ球菌莢膜多糖をタンパク質担体と結合させる、請求項５～７のいずれか１項に記載の免疫原性組成物。
【請求項９】
前記タンパク質担体が、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、CRM197、インフルエンザ菌プロテインＤ、ニューモリシンならびにαトキソイドからなる群より選択される、請求項８に記載の免疫原性組成物。
【請求項１０】
黄色ブドウ球菌および表皮ブドウ球菌に対して有効な免疫応答を生じさせる、請求項１～９のいずれか１項に記載の免疫原性組成物。
【請求項１１】
請求項１～１０のいずれか１項に記載の免疫原性組成物と、薬学的に許容される賦形剤を含むブドウ球菌感染を治療または予防するためのワクチン。
【請求項１２】
抗原を混合して、請求項１～１０のいずれか１項に記載の免疫原性組成物を調製した後、薬学的に許容される賦形剤を添加する各ステップを含む、ブドウ球菌感染を治療または予防するためのワクチンの製造方法。
【請求項１３】
ブドウ球菌感染を治療または予防するためのワクチンの製造における、請求項１～１０のいずれか１項に記載の免疫原性組成物の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ブドウ球菌免疫原性組成物およびワクチン、それらの製造、ならびにこのような組成物の医薬における使用の分野に関する。さらに具体的には、本発明は、ブドウ球菌感染の治療または予防のための、抗原の組合せを含むワクチン組成物に関する。また、このようなワクチンを医薬に使用する方法、およびそれらの調製方法も提供する。
【背景技術】
【０００２】
静脈内装置の使用の増加に伴い、地域および病院獲得感染の数はいずれも近年増加の一途をたどっている。病院獲得（院内）感染は、特に、毎年２百万人以上の患者が罹患する米国では、罹病および死亡の主な原因となっている。様々な研究から、米国人患者の約６％が入院中に感染するとされる。米国における経済的負担は、1992年に45億ドルを超えると推定された（EmoriおよびGaynes, 1993, Clin. Microbiol. Rev. 6; 428）。最も頻度が高い感染は、尿管感染（UTI：感染の33％）、次いで肺炎（15.5％）、外科手術部位感染（14.8％）および主要血流感染（13％）が続く（EmoriおよびGaynes, 1993, Clin. Microbiol. Rev. 6; 428）。
【０００３】
黄色ブドウ球菌、血液凝固酵素陰性ブドウ球菌（ほとんどが表皮ブドウ球菌）、腸球菌、大腸菌および緑濃菌は、主な院内病原体である。これらの病原体はほぼ同数の感染を引

き起こすが、これらが生み出しうる障害の重症度と、抗生物質耐性分離菌の頻度を考え合わせると、このような順位、すなわち、黄色ブドウ球菌および表皮ブドウ球菌を最も有意な院内病原体とする順位になる。

【０００４】

黄色ブドウ球菌は、院内感染の最も一般的な病原体であり、有意な罹病率および死亡率を有する（Romero-Vivasら、1995, Infect, Dis. 21; 1417）。これは、場合によっては、骨髄炎、心内膜炎、敗血性関節炎、肺炎、膿瘍およびトキシックショック症候群の原因となることがある。

【０００５】

表皮ブドウ球菌は、通常の皮膚共生生物であり、これは、移植した医療装置の感染および手術部位での感染を引き起こす重要な日和見性病原体でもある。表皮ブドウ球菌が感染する医療装置として、心臓ペースメーカー、髄液シャント、持続携帯式腹膜透析カテーテル、整形外科装置および人工弁が挙げられる。

【０００６】

黄色ブドウ球菌および表皮ブドウ球菌感染は、抗生物質を用いて治療し、その際、選択される薬剤はペニシリンであるが、メチシリン耐性分離菌の場合にはバンコマイシンが用いられる。抗生物質に対して広範なスペクトル耐性を示すブドウ球菌株のパーセンテージは1980年代から益々優勢となっており（Panlinoら、Infect, Control. Hosp. Epidemiol. 13; 582）、有効な抗菌治療に脅威をもたらしている。加えて、近年、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌が出現したため、有効な治療法がみあたらないメチシリン耐性黄色ブドウ球菌株が出現および拡大するのではないかと危惧され始めた。

【０００７】

受動免疫療法でブドウ球菌抗原に対する抗体を用いる別の手法が研究されている。ポリクローナル抗血清の投与を含む治療法（WO 00/15238、WO 00/12132）、ならびにリポテイコ酸（WO 98/57994）に対するモノクローナル抗体による治療も開発中である。

【０００８】

別の手法は、活性ワクチン接種を用いて、ブドウ球菌に対する免疫応答を生じさせることである。ワクチン成分として含有させるいくつかの候補が確認されている。このような成分として、フィブロネクチン結合タンパク質（米国特許第5840846号）、MHC II類似体（米国特許第5648240号）、フィブロネクチン結合タンパク質（米国特許第6008341号）、GehD（米国特許第2002/0169288号）、コラーゲン結合タンパク質（米国特許第6288214号）、SdrF、SdrGおよびSdrH（WO 00/12689）、突然変異体SEAおよびSEB外毒素（WO 00/02523）および52kDaビトロネクチン結合タンパク質（WO 01/60852）が挙げられる。

【０００９】

黄色ブドウ球菌ゲノムは配列決定され、コード配列の多くが同定されている（欧州特許第786519号、（WO 02/094868）。表皮ブドウ球菌についても同じことが言える（WO 01/34809）。この手法を改良したものとして、ブドウ球菌に感染した患者から超免疫血清により認識されるタンパク質もみいだされている（WO 01/98499、WO 02/059148）。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１０】

黄色ブドウ球菌または、これが産生する外タンパク質に対してターゲッティングしたワクチンの最初の作製は限定的にしか成功しなかった（Lee 1996 Trends Microbiol. 4; 162）。依然として、ブドウ球菌感染に対し有効なワクチンを開発する必要がある。

【課題を解決するための手段】

【００１１】

従って、本発明は、少なくとも２つの異なるタンパク質またはその免疫原性断片を含む免疫原性組成物を提供するが、その際、該タンパク質またはその免疫原性断片は、以下の群から選択される、タンパク質またはその免疫原性断片の少なくとも２つの群より選択される：

ａ群）ラミニン受容体、SitC/MntC/唾液結合タンパク質、EbhA、EbhB、エラスチン結合タンパク質（EbpS）、EFB（FIB）、SBI、自己溶解素、ClfA、SdrC、SdrG、SdrH、リパーゼGehD、SasA、FnbA、FnbB、Cna、ClfB、FbpA、Npase、IsaA/PisA、SsaA、EPB、SSP-1、SSP-2、HBP、ビトロネクチン結合タンパク質、フィブリノーゲン結合タンパク質、血液凝固酵素、FigおよびMAPからなる群より選択される少なくとも１つのブドウ球菌細胞外成分結合タンパク質またはその免疫原性断片；

ｂ群）免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitCおよびNi ABC輸送体からなる群より選択される少なくとも１つのブドウ球菌輸送体タンパク質またはその免疫原性断片；

ｃ群）αトキシン（Hla）、αトキシンH35R突然変異体、RNA III活性化タンパク質（RAP）からなる群より選択される少なくとも１つのブドウ球菌のビルレンス調節物質、毒素またはその免疫原性断片。

【図面の簡単な説明】

【００１２】

【図１．１】好ましいタンパク質のポリペプチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。

【図１．２】好ましいタンパク質のポリペプチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。

【図１．３】好ましいタンパク質のポリペプチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。

【図１．４】好ましいタンパク質のポリペプチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。

【図１．５】好ましいタンパク質のポリペプチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。

【図１．６】好ましいタンパク質のポリペプチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。

【図１．７】好ましいタンパク質のポリペプチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。

【図１．８】好ましいタンパク質のポリペプチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。

【図１．９】好ましいタンパク質のポリペプチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。

【図１．１０】好ましいタンパク質のポリペプチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。

【図１．１１】好ましいタンパク質のポリペプチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。

【図２．１】好ましいタンパク質をコードするヌクレオチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。

【図２．２】好ましいタンパク質をコードするヌクレオチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。

【図２．３】好ましいタンパク質をコードするヌクレオチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。

【図２．４】好ましいタンパク質をコードするヌクレオチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。

【図２．５】好ましいタンパク質をコードするヌクレオチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。

【図２．６】好ましいタンパク質をコードするヌクレオチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。

【図２．７】好ましいタンパク質をコードするヌクレオチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。

【図２．８】好ましいタンパク質をコードするヌクレオチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。
【図２．９】好ましいタンパク質をコードするヌクレオチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。
【図２．１０】好ましいタンパク質をコードするヌクレオチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。
【図２．１１】好ましいタンパク質をコードするヌクレオチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。
【図２．１２】好ましいタンパク質をコードするヌクレオチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。
【図２．１３】好ましいタンパク質をコードするヌクレオチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。
【図２．１４】好ましいタンパク質をコードするヌクレオチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。
【図２．１５】好ましいタンパク質をコードするヌクレオチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。
【図２．１６】好ましいタンパク質をコードするヌクレオチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。
【図２．１７】好ましいタンパク質をコードするヌクレオチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。
【図２．１８】好ましいタンパク質をコードするヌクレオチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。
【図２．１９】好ましいタンパク質をコードするヌクレオチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。
【図２．２０】好ましいタンパク質をコードするヌクレオチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。
【図２．２１】好ましいタンパク質をコードするヌクレオチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。
【図２．２２】好ましいタンパク質をコードするヌクレオチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。
【図２．２３】好ましいタンパク質をコードするヌクレオチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。
【図２．２４】好ましいタンパク質をコードするヌクレオチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。
【図２．２５】好ましいタンパク質をコードするヌクレオチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。
【図２．２６】好ましいタンパク質をコードするヌクレオチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。
【図２．２７】好ましいタンパク質をコードするヌクレオチド配列を示す。表１は、各配列番号で表示するタンパク質情報を提供する。
【図３】天然の条件下でのαトキシンの精製を示す。パネルＡは、αトキシンの精製時に調製したサンプルのクマシー染色SDS-PAGEを示す。レーン１－分子量マーカー、レーン２－過剰発現したαトキシンを含む可溶性画分、レーン３－Ni-NTAカラムからの素通り画分、レーン４－10％バッファーＢで溶離した画分、レーン５－20％バッファーＢで溶離した画分、レーン６－30％バッファーＢで溶離した画分、レーン７－50％バッファーＢで溶離した画分、レーン８－75％バッファーＢで溶離した画分、レーン９および10－100％バッファーＢで溶離した画分、レーン11－誘導前のＴ＝０時点での細菌、レーン12－誘導後のＴ＝４時間の時点での細菌、レーン13－細胞溶解物、レーン14－可溶性画分、レーン15－不溶性画分。パネルＢは、10、５、２および１μlの精製αトキシンのクマシー染色SDS-PAGEを示す。

【図４】変性条件下でのSdrCの精製を示す。パネルＡは、αトキシンの精製時に調製したサンプルのクマシー染色SDS-PAGEを示す。レーンＭ－分子量マーカー、出発レーン－過剰発現したSdrCを含む不溶性画分から形成した上清、レーンFT1－Ni-NTAカラムからの素通り画分、レーンＣ－洗浄バッファーＣで溶離した画分、レーンＤ－バッファーＤで溶離した画分、レーンＥ－バッファーＥで溶離した画分。パネルＢは、１、２、５および10μｌの精製SdrCのクマシー染色SDS-PAGEを示す。

【図５．１】精製タンパク質をコーティングしたプレートにおけるブドウ球菌タンパク質に対する抗血清についてのELISA結果を示す。プールマウス（免疫前）：接種前のマウスから抽出したプール血清を用いて得られた結果。プールマウス（III免疫後）：接種後に抽出したプールマウス血清を用いて得られた結果。プールウサギ（免疫前）：接種前のウサギから抽出したプール血清を用いて得られた結果。プールウサギ（III免疫後）：接種後に抽出したプールウサギ血清を用いて得られた結果。Blc：負の対照。

【図５．２】精製タンパク質をコーティングしたプレートにおけるブドウ球菌タンパク質に対する抗血清についてのELISA結果を示す。プールマウス（免疫前）：接種前のマウスから抽出したプール血清を用いて得られた結果。プールマウス（III免疫後）：接種後に抽出したプールマウス血清を用いて得られた結果。プールウサギ（免疫前）：接種前のウサギから抽出したプール血清を用いて得られた結果。プールウサギ（III免疫後）：接種後に抽出したプールウサギ血清を用いて得られた結果。Blc：負の対照。

【図５．３】精製タンパク質をコーティングしたプレートにおけるブドウ球菌タンパク質に対する抗血清についてのELISA結果を示す。プールマウス（免疫前）：接種前のマウスから抽出したプール血清を用いて得られた結果。プールマウス（III免疫後）：接種後に抽出したプールマウス血清を用いて得られた結果。プールウサギ（免疫前）：接種前のウサギから抽出したプール血清を用いて得られた結果。プールウサギ（III免疫後）：接種後に抽出したプールウサギ血清を用いて得られた結果。Blc：負の対照。

【図５．４】精製タンパク質をコーティングしたプレートにおけるブドウ球菌タンパク質に対する抗血清についてのELISA結果を示す。プールマウス（免疫前）：接種前のマウスから抽出したプール血清を用いて得られた結果。プールマウス（III免疫後）：接種後に抽出したプールマウス血清を用いて得られた結果。プールウサギ（免疫前）：接種前のウサギから抽出したプール血清を用いて得られた結果。プールウサギ（III免疫後）：接種後に抽出したプールウサギ血清を用いて得られた結果。Blc：負の対照。

【図５．５】精製タンパク質をコーティングしたプレートにおけるブドウ球菌タンパク質に対する抗血清についてのELISA結果を示す。プールマウス（免疫前）：接種前のマウスから抽出したプール血清を用いて得られた結果。プールマウス（III免疫後）：接種後に抽出したプールマウス血清を用いて得られた結果。プールウサギ（免疫前）：接種前のウサギから抽出したプール血清を用いて得られた結果。プールウサギ（III免疫後）：接種後に抽出したプールウサギ血清を用いて得られた結果。Blc：負の対照。

【図６．１】死滅ブドウ球菌をコーティングしたプレートにおけるブドウ球菌タンパク質に対するマウス抗血清についてのELISA結果を示す。パネルＡは、黄色ブドウ球菌血清型５死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。パネルＢは、黄色ブドウ球菌血清型８死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。パネルＣは、表皮ブドウ球菌死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。正方形を付けた線は、表示したブドウ球菌タンパク質で３回免疫したマウスからの血清を用いたELISA結果を示す。ひし形を付けた線は免疫前のマウス血清についてのELISA結果を示す。

【図６．２】死滅ブドウ球菌をコーティングしたプレートにおけるブドウ球菌タンパク質に対するマウス抗血清についてのELISA結果を示す。パネルＡは、黄色ブドウ球菌血清型５死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。パネルＢは、黄色ブドウ球菌血清型８死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。パネルＣは、表皮ブドウ球菌死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。正方形を付けた線は、表示したブドウ球菌タンパク質で３回免疫したマウスからの血清を用いたELISA結果を示す。ひし形を付けた線は免疫前のマウス血清についてのELISA結果を示す。

【図６．３】死滅ブドウ球菌をコーティングしたプレートにおけるブドウ球菌タンパク質に対するマウス抗血清についてのELISA結果を示す。パネルＡは、黄色ブドウ球菌血清型５死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。パネルＢは、黄色ブドウ球菌血清型８死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。パネルＣは、表皮ブドウ球菌死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。正方形を付けた線は、表示したブドウ球菌タンパク質で３回免疫したマウスからの血清を用いたELISA結果を示す。ひし形を付けた線は免疫前のマウス血清についてのELISA結果を示す。

【図６．４】死滅ブドウ球菌をコーティングしたプレートにおけるブドウ球菌タンパク質に対するマウス抗血清についてのELISA結果を示す。パネルＡは、黄色ブドウ球菌血清型５死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。パネルＢは、黄色ブドウ球菌血清型８死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。パネルＣは、表皮ブドウ球菌死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。正方形を付けた線は、表示したブドウ球菌タンパク質で３回免疫したマウスからの血清を用いたELISA結果を示す。ひし形を付けた線は免疫前のマウス血清についてのELISA結果を示す。

【図６．５】死滅ブドウ球菌をコーティングしたプレートにおけるブドウ球菌タンパク質に対するマウス抗血清についてのELISA結果を示す。パネルＡは、黄色ブドウ球菌血清型５死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。パネルＢは、黄色ブドウ球菌血清型８死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。パネルＣは、表皮ブドウ球菌死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。正方形を付けた線は、表示したブドウ球菌タンパク質で３回免疫したマウスからの血清を用いたELISA結果を示す。ひし形を付けた線は免疫前のマウス血清についてのELISA結果を示す。

【図７．１】死滅ブドウ球菌でコーティングしたプレートにおけるブドウ球菌タンパク質に対するウサギ抗血清についてのELISA結果を示す。パネルＡは、黄色ブドウ球菌血清型５死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。パネルＢは、黄色ブドウ球菌血清型８死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。パネルＣは、表皮ブドウ球菌死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。正方形の符号を付けた線は、表示したブドウ球菌タンパク質で３回免疫した（１回の免疫しか投与していないHarAを除いて）ウサギからの血清を用いたELISA結果を示す。ひし形を付けた線は免疫前のウサギ血清についてのELISA結果を示す。

【図７．２】死滅ブドウ球菌でコーティングしたプレートにおけるブドウ球菌タンパク質に対するウサギ抗血清についてのELISA結果を示す。パネルＡは、黄色ブドウ球菌血清型５死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。パネルＢは、黄色ブドウ球菌血清型８死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。パネルＣは、表皮ブドウ球菌死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。正方形の符号を付けた線は、表示したブドウ球菌タンパク質で３回免疫した（１回の免疫しか投与していないHarAを除いて）ウサギからの血清を用いたELISA結果を示す。ひし形を付けた線は免疫前のウサギ血清についてのELISA結果を示す。

【図７．３】死滅ブドウ球菌でコーティングしたプレートにおけるブドウ球菌タンパク質に対するウサギ抗血清についてのELISA結果を示す。パネルＡは、黄色ブドウ球菌血清型５死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。パネルＢは、黄色ブドウ球菌血清型８死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。パネルＣは、表皮ブドウ球菌死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。正方形の符号を付けた線は、表示したブドウ球菌タンパク質で３回免疫した（１回の免疫しか投与していないHarAを除いて）ウサギからの血清を用いたELISA結果を示す。ひし形を付けた線は免疫前のウサギ血清についてのELISA結果を示す。

【図７．４】死滅ブドウ球菌でコーティングしたプレートにおけるブドウ球菌タンパク質に対するウサギ抗血清についてのELISA結果を示す。パネルＡは、黄色ブドウ球菌血清型５死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。パネルＢは、黄色ブドウ球菌血清型８死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。パネルＣは、表皮ブドウ球菌死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。正方形の符号を付けた線は、表示したブドウ

球菌タンパク質で３回免疫した（１回の免疫しか投与していないHarAを除いて）ウサギからの血清を用いたELISA結果を示す。ひし形を付けた線は免疫前のウサギ血清についてのELISA結果を示す。
【図７．５】死滅ブドウ球菌でコーティングしたプレートにおけるブドウ球菌タンパク質に対するウサギ抗血清についてのELISA結果を示す。パネルＡは、黄色ブドウ球菌血清型５死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。パネルＢは、黄色ブドウ球菌血清型８死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。パネルＣは、表皮ブドウ球菌死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。正方形の符号を付けた線は、表示したブドウ球菌タンパク質で３回免疫した（１回の免疫しか投与していないHarAを除いて）ウサギからの血清を用いたELISA結果を示す。ひし形を付けた線は免疫前のウサギ血清についてのELISA結果を示す。
【図７．６】死滅ブドウ球菌でコーティングしたプレートにおけるブドウ球菌タンパク質に対するウサギ抗血清についてのELISA結果を示す。パネルＡは、黄色ブドウ球菌血清型５死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。パネルＢは、黄色ブドウ球菌血清型８死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。パネルＣは、表皮ブドウ球菌死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。正方形の符号を付けた線は、表示したブドウ球菌タンパク質で３回免疫した（１回の免疫しか投与していないHarAを除いて）ウサギからの血清を用いたELISA結果を示す。ひし形を付けた線は免疫前のウサギ血清についてのELISA結果を示す。
【図７．７】死滅ブドウ球菌でコーティングしたプレートにおけるブドウ球菌タンパク質に対するウサギ抗血清についてのELISA結果を示す。パネルＡは、黄色ブドウ球菌血清型５死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。パネルＢは、黄色ブドウ球菌血清型８死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。パネルＣは、表皮ブドウ球菌死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。正方形の符号を付けた線は、表示したブドウ球菌タンパク質で３回免疫した（１回の免疫しか投与していないHarAを除いて）ウサギからの血清を用いたELISA結果を示す。ひし形を付けた線は免疫前のウサギ血清についてのELISA結果を示す。
【図７．８】死滅ブドウ球菌でコーティングしたプレートにおけるブドウ球菌タンパク質に対するウサギ抗血清についてのELISA結果を示す。パネルＡは、黄色ブドウ球菌血清型５死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。パネルＢは、黄色ブドウ球菌血清型８死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。パネルＣは、表皮ブドウ球菌死滅全細胞をコーティングしたプレートを用いる。正方形の符号を付けた線は、表示したブドウ球菌タンパク質で３回免疫した（１回の免疫しか投与していないHarAを除いて）ウサギからの血清を用いたELISA結果を示す。ひし形を付けた線は免疫前のウサギ血清についてのELISA結果を示す。
【発明を実施するための最良の形態】
【００１３】
詳細な説明
本発明は、ブドウ球菌抗原の特定の組合せを開示し、これらを組み合わせることにより、ブドウ球菌感染を治療または予防するのに有効な免疫原性組成物を製造することができる。本発明の免疫原性組成物は、様々なブドウ球菌機能に関与する抗原を好適に組み込む。このような免疫原性組成物は、ブドウ球菌機能の様々な側面に対する免疫応答をターゲッティングするため、特に有効な免疫応答を誘発することができる。
【００１４】
ブドウ球菌感染は、いくつかの異なる段階を経て進行する。例えば、ブドウ球菌生活環は、共生生物コロニー形成、隣接する組織または血流への進入による感染の開始、血液中の嫌気的増殖、黄色ブドウ球菌ビルレンス決定因子と宿主防御機構間の相互作用、さらには、心内膜炎、転移性膿瘍形成および敗血症候群などの合併症の誘発を含む。細菌の表面における様々な分子が、感染周期の様々な段階に関与すると考えられる。ブドウ球菌感染の様々な過程に関与する具体的抗原の有効量の組合せに対する免疫応答をターゲッティン

グすることにより、増強された効力のブドウ球菌免疫原性組成物またはワクチンを達成することができる。

【００１５】

特に、異種クラス由来の特定の抗原（そのうちのいくつかは宿主細胞との接着に関与し、またいくつかは鉄獲得または輸送機能に関与し、さらにいくつかは毒素、またはビルレンスの調節因子および免疫優性抗原である）の組合せにより、複数の感染段階から防御する免疫応答を誘発することができる。

【００１６】

免疫応答の有効性は、実施例に記載するような動物モデルアッセイにおいて、および／または実施例に記載するようなオプソニン食作用アッセイを用いて、測定することができる。

【００１７】

本発明の別の利点は、本発明に従い、免疫原性組成物に様々なファミリーのタンパク質由来の抗原を組み合わせることにより、さらに広範囲の菌株からの保護を可能にすることである。

【００１８】

本発明は、ブドウ球菌内に様々な機能を有する、少なくとも２つの異なるカテゴリーのタンパク質から選択した複数のタンパク質を含んでなる免疫原性組成物に関する。このようなカテゴリーのタンパク質の例として、細胞外結合タンパク質、輸送体タンパク質（例えば、Fe獲得タンパク質）、毒素もしくはビルレンス調節因子、ならびにその他の免疫優性タンパク質が挙げられる。本発明のワクチン組合せは、相同的ブドウ球菌株（抗原が誘導された菌株）、ならびに好ましくは異種ブドウ球菌株に対して有効である。

【００１９】

本発明の免疫原性組成物は、以下の群の２つまたは３つから選択された２、３、４、５もしくは６以上の数のタンパク質を含む：

ａ群）ラミニン受容体、SitC/MntC/唾液結合タンパク質、EbhA、EbhB、エラスチン結合タンパク質（EbpS）、EFB（FIB）、SBI、自己溶解素(autolysin)、ClfA、SdrC、SdrG、SdrH、リパーゼGehD、SasA、FnbA、FnbB、Cna、ClfB、FbpA、Npase、IsaA/PisA、SsaA、EPB、SSP-1、SSP-2、HBP、ビトロネクチン結合タンパク質、フィブリノーゲン結合タンパク質、血液凝固酵素(coagulase)、FigおよびMAPからなる群より選択される少なくとも１つのブドウ球菌細胞外成分結合タンパク質またはその免疫原性断片；

ｂ群）免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitCおよびNi ABC輸送体からなる群より選択される少なくとも１つのブドウ球菌輸送体タンパク質またはその免疫原性断片；

ｃ群）αトキシン（Hla）、αトキシンH35R突然変異体、RNA III活性化タンパク質（RAP）からなる群より選択される少なくとも１つのブドウ球菌のビルレンス調節因子、毒素、もしくはその免疫原性断片。

【００２０】

例えば、第１のタンパク質をａ群）、ｂ群）もしくはｃ群）から選択し、また第２のタンパク質を、第２のタンパク質を含まないａ群）、ｂ群）およびｃ群）から選択する。

【００２１】

好ましい実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、ａ群）から選択した少なくとも１つのタンパク質と、ｂ群）および／またはｃ群）から選択した別のタンパク質を含む。

【００２２】

別の実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、ｂ群）から選択した少なくとも１つの抗原と、ｃ群）および／またはａ群）から選択した別のタンパク質を含む。

【００２３】

さらに別の実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、ｃ群）から選択した少なくとも１つの抗原と、ａ群）および／またはｂ群）から選択した別のタンパク質を含む。

【００２４】

本発明の免疫原性組成物は、黄色ブドウ球菌(S. aureus)および／または表皮ブドウ球菌(S. epidermidis)を含むのが好適である。

【００２５】

タンパク質

本発明の免疫原性組成物は、図１のいずれかの配列のアミノ酸配列に対し、少なくとも85％の同一性、好ましくは少なくとも90％の同一性、さらに好ましくは少なくとも95％の同一性、最も好ましくは少なくとも97～99％の同一性もしくは完全な同一性を有するアミノ酸配列を含む単離タンパク質を含んでなる。

【００２６】

本明細書でタンパク質について具体的に述べるとき、これは、好ましくは、あらゆるシグナル配列が除去された天然または組換え、全長タンパク質、あるいは場合により成熟タンパク質を意味する。タンパク質は、ブドウ球菌株から直接単離してもよいし、組換えDNA技術により作製してもよい。タンパク質の免疫原性断片を本発明の免疫原性組成物に組み込んでもよい。これらは、タンパク質のアミノ酸配列から連続的に取り出した少なくとも10個のアミノ酸、好ましくは20個のアミノ酸、さらに好ましくは30個のアミノ酸、さらに好ましくは40個または50個のアミノ酸、最も好ましくは100個のアミノ酸を含む断片である。加えて、このような免疫原性断片は、ブドウ球菌タンパク質に対して産生された抗体、またはブドウ球菌への哺乳動物宿主の感染により産生された抗体と、免疫学的に反応性である。免疫原性断片はまた、有効な用量で投与される（単独で、または担体に結合したハプテンとして）と、ブドウ球菌感染に対する防御免疫応答を誘発し、さらに好ましくは、黄色ブドウ球菌および／または表皮ブドウ球菌感染に対して防御的である。このような免疫原性断片としては、例えば、Ｎ末端リーダー配列を欠失したタンパク質、および／または膜貫通ドメインおよび／またはＣ末端アンカードメインが挙げられる。好ましい形態では、本発明の免疫原性断片は、図１から選択した配列のアミノ酸配列に対し、断片配列の長さ全体にわたって、少なくとも85％の同一性、好ましくは少なくとも90％の同一性、さらに好ましくは少なくとも95％の同一性、最も好ましくは少なくとも97～99％の同一性を有するタンパク質の細胞外ドメインの実質的に全部を含む。

【００２７】

本発明の免疫原性組成物には、ブドウ球菌タンパク質、またはブドウ球菌タンパク質の免疫原性断片からなる融合タンパク質も含まれる。このような融合タンパク質は、組換えにより作製することができ、少なくとも２、３、４、５もしくは６種のブドウ球菌タンパク質の１部を含んでいてもよい。あるいは、融合タンパク質は、少なくとも２、３、４、５もしくは６種のブドウ球菌タンパク質の複数部を含んでいてもよい。これらは、様々なブドウ球菌タンパク質またはその免疫原性断片を組み合わせたものでもよい。前記以外に、本発明は、異種配列との融合タンパク質としての、ブドウ球菌タンパク質またはその免疫原性断片の個々の融合タンパク質も含み、このような異種配列として、Ｔ細胞エピトープまたは精製タグの供給物（例えば、βグラクトシダーゼ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質（GFP））、エピトープタグ（例えば、FLAG、mycタグ、ポリヒスチジン）、もしくはウイルス表面タンパク質（例えば、インフルエンザウイルス赤血球凝集素）、あるいは細菌タンパク質（例えば、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、CRM197）が挙げられる。

【表１】

名称	タンパク質配列	DNA配列
免疫優性ABC輸送体		
SA	配列番号1	配列番号34
SE	配列番号2	配列番号35
ラミニン受容体		
SA	配列番号3	配列番号36
SE	配列番号4	配列番号37
分泌抗原A SsaA		
SA 1	配列番号5	配列番号38
SA 2	配列番号6	配列番号39
SE	配列番号7	配列番号40
SitC		
SA	配列番号8	配列番号41
SE	配列番号9	配列番号42
IsaA / PisA (IssA)		
SA	配列番号10	配列番号43
SE	配列番号11	配列番号44
EbhA / B		
SA EbhA	配列番号12	配列番号45
SA EbhB	配列番号13	配列番号46
SE EbhA	配列番号14	配列番号47
SE EbhB	配列番号15	配列番号48
蓄積－会合タンパク質Aap		
SA	配列番号16	配列番号49
SE	配列番号17	配列番号50
RNA III活性化タンパク質RAP		
SA	配列番号18	配列番号51
SE	配列番号19	配列番号52
FIG / SdrG		
SA	配列番号20	配列番号53
SE	配列番号21	配列番号54
エラスチン結合タンパク質		
EbpS	配列番号22	配列番号55
SA	配列番号23	配列番号56
SE		
細胞外タンパク質EFB SA	配列番号24	配列番号57
αトキシンSA	配列番号25	配列番号58
SBI SA	配列番号26	配列番号59
IsdA SA	配列番号27	配列番号60
IsdB SA	配列番号28	配列番号61
SdrC SA	配列番号29	配列番号62
ClfA SA	配列番号30	配列番号63
FnbA SA	配列番号31	配列番号64

【００２８】

ClfB SA	配列番号32	配列番号65
血液凝固酵素SA	配列番号33	配列番号66
FnbB SA	配列番号67	配列番号71
MAP SA	配列番号68	配列番号72
SdrC SA	配列番号69	配列番号73
SdrG SA	配列番号70	配列番号74

【００２９】

上の表に、図１および図２にそれぞれ示す好ましいタンパク質配列およびDNA配列の配列番号を記載する。SAは黄色ブドウ球菌由来の配列を、またSEは表皮ブドウ球菌由来の配列を示す。

【００３０】

細胞外成分結合タンパク質

細胞外成分結合タンパク質とは、宿主細胞外成分に結合するタンパク質である。この用語は、アドヘジンを含むが、これに限定されるわけではない。

【００３１】

細胞外成分結合タンパク質の例として、以下のものが挙げられる：ラミニン受容体（Naiduら、J. Med. Microbiol. 1992, 36; 177）、SitC/MntC/唾液結合タンパク質（米国特

許第5801234号、WiltshireおよびFoster Infec. Immun. 2001, 69; 5198）、EbhA（Williamsら、Infect. Immun. 2002, 70; 6805）、EbhB、エラスチン結合タンパク質（EbpS）（Parkら、1999, J. Biol. Chem. 274; 2845）、EFB（FIB）（WastfeltおよびFlock 1995, J. Clin. Microbiol. 33; 2347）、SBI（Zhangら、FEMS Immun. Med. Microbiol. 2000, 28; 211）、自己溶解素（Ruppら、2001, J. Infect. Dis. 183; 1038）、ClfA（米国特許第6008341号、McDevittら、Mol. Microbiol. 1994, 11; 237）、SdrC、SdrG（McCreaら、Microbiology 2000, 146; 1535）、SdrH（McCreaら、Microbiology 2000, 146; 1535）、リパーゼGehD（米国特許第2002/0169288号）、SasA、FnbA（Flockら、Mol Microbiol. 1994, 12; 599, 米国特許第6054572号）、FnbB（WO 97/14799, Boothら、2001 Infec. Immun. 69; 345）、コラーゲン結合タンパク質Cna（Visaiら、2000, J. Biol. Chem. 275; 39837）、ClfB（WO 99/27109）、FbpA（Phonimdaengら、1988 J. Gen Microbiol.134; 75）、Npase（Flock 2001 J. Bacteriol. 183; 3999）、IsaA/PisA（Lonenzら、FEMS Immuno. Med. Microbiol. 2000, 29; 145）、SsaA（Langら、FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2000, 29; 213）、EPB（Hussain およびHermann symposium on Staph Denmark 14-17th 2000）、SSP-1（Veenstraら、1996, J. Bacteriol. 178; 537）、SSP-2（Veenstraら、1996, J. Bacteriol. 178; 537）、17 kDaヘパリン結合タンパク質HBP（Fallgrenら、2001, J. Med. Microbiol. 50; 547）、ビトロネクチン結合タンパク質（Liら、2001, Curr. Microbiol. 42; 361）、フィブロネクチン結合タンパク質、血液凝固酵素、Fig（WO 97/48727）およびMAP（米国特許第5648240号）。

【００３２】

SitC/MntC/唾液結合タンパク質

これは、肺炎球菌（S. pneumoniae）のアドヘジンPsaAの相同体であるABC輸送体タンパク質である。これは、高度に免疫原性の32kDaリポタンパク質であり、細菌の細菌壁全体に分布する（Cockayneら、Infect, Immun. 1998 66; 3767）。これは、黄色ブドウ球菌および表皮ブドウ球菌に32kDaリポタンパク質として発現され、40kDa相同体がスタフィロコッカス・オミニス（S. hominis）に存在する。表皮ブドウ球菌においては、これは鉄調節オペロンの成分である。これは、ストレプトコッカス・パラサングイスのFimAを含むアドヘジンと、証明されたまたは推定された金属イオン輸送機能を備えるABC輸送体ファミリーのリポタンパク質の両方に対して相当の相同性を示す。従って、SitCは細胞外結合タンパク質および金属イオン輸送体として含まれる。

【００３３】

米国特許第5,801,234号に開示されている唾液結合タンパク質もSitCの形態であり、本発明の免疫原性組成物に含有させることができる。

【００３４】

ClfAおよびClfB

これらのタンパク質はいずれも、フィブリノーゲン結合活性を有し、血漿の存在下で黄色ブドウ球菌を誘発して凝集塊を形成させる。両タンパク質は、細胞壁関連タンパク質に共通のLPXTGモチーフを含む。

【００３５】

ClfAは米国特許第6008341号に記載され、ClfBはWO 99/27109に記載されている。

【００３６】

血液凝固酵素（FbpA）

これは、フィブリノーゲン結合タンパク質であり、血漿の存在下で黄色ブドウ球菌を誘発して凝集塊を形成させる。このタンパク質については、血液凝固酵素に関する以下の参照文献に記載されている：Phonimdaengら（J. Gen. Microbio. 1988, 134:75-83）、Phonimdaengら（Mol Microbiol 1990; 4:393-404）、Cheungら（Infect Immun 1995; 63:1914-1920）およびShopsinら（J. Clin. Microbiol. 2000; 38:3453-3456）。

【００３７】

本発明の免疫原性組成物に含有させるのに好ましい断片として、シグナルペプチドが除去された成熟タンパク質（アミノ酸27からC末端まで）が挙げられる。

【００３８】
血液凝固酵素は、３つの異なるドメインを有する。すなわち、超らせん領域であるアミノ酸59～297、プロリンおよびグリシンが豊富な領域であるアミノ酸326～505、ならびに、βシートコンホメーションを有するアミノ酸506から645までのＣ末端ドメインである。これらドメインはいずれも本発明の好ましい断片である。
【００３９】
SdrG-Fbe-EfB/FlG
Fbeは、表皮ブドウ球菌の多くの分離菌に存在するフィブリノーゲン結合タンパク質であり、その推定分子量は119 kDaである（Nilssonら、1998、Immun. 66; 2666）。その配列は、黄色ブドウ球菌由来の凝集因子（ClfA）のそれに関連する。Fbeに対する抗体は、フィブリノーゲンをコーティングしたプレートおよびカテーテルへの表皮ブドウ球菌の結合を阻止することができる（PeiおよびFlock 2001, J. Infect. Dis. 184; 52）。このタンパク質は、WO 00/12689においてSdrGとしても記載されている。SdrGは凝集酵素陰性ブドウ球菌に存在し、LPXTG配列を含む細胞壁関連タンパク質である。
【００４０】
SdrGは、シグナルペプチド（アミノ酸１～51）、フィブリノーゲン結合部位とコラーゲン結合部位を含む領域（アミノ酸51～825）、２つのCnaBドメイン（アミノ酸627～698と738～809）、SD反復領域（アミノ酸825～1,000）、ならびにアンカードメイン（アミノ酸1009～1056）を含んでいる。
【００４１】
Fbeは、アミノ酸51と52の間に切断部位を有する推定シグナル配列を有する。従って、Fbeの好ましい断片は、アミノ酸52からＣ末端（アミノ酸1,092）まで延びるFbeの成熟形態を含む。
【００４２】
アミノ酸52からアミノ酸825までのFbeのドメインはフィブリノーゲン結合を担当する。従って、Fbeの好ましい断片は、アミノ酸52～825から構成されるか、またはこれらを含む。
【００４３】
Fbeのアミノ酸373から516までの領域は、FbeとClfAの間に最大の保存を示す。従って、好ましい断片は、Fbeのアミノ酸373～516を含むことになる。
【００４４】
Fbeのアミノ酸825～1,041は、タンデムに反復するアスパルギン酸およびセリン残基からなる高度の反復領域を含む。
【００４５】
SdrGの好ましい断片としては、シグナルペプチドおよび／またはSD反復単位ならびにアンカードメインが除去されたポリペプチドがある。このようなものとして、以下のものをを含む、またはこれらからなるポリペプチドが挙げられる：アミノ酸50～825、アミノ酸50～633、アミノ酸50～597（WO 03/76470の配列番号２）、アミノ酸273～597（WO 03/76470の配列番号３）、アミノ酸273～577（WO 03/76470の配列番号６）、配列番号70のアミノ酸１～549、アミノ酸219～549、アミノ酸225～549、アミノ酸219～528、アミノ酸225～528。
【００４６】
好ましくは、配列番号70、20もしくは21に対し少なくとも80％、85％、90％、92％、95％、97％、98％、99％もしくは100％相同の配列を有するSdrGポリペプチドを本発明の免疫原性組成物に組み込む。
【００４７】
本発明の組成物は、随意に、前記SdrGポリペプチドの断片を含む。
【００４８】
好ましい断片は、シグナルペプチドおよび／またはSD反復ドメインおよび／またはアンカードメインを欠失している。例えば、配列番号76のアミノ酸１～713、１～549、225～5

49、225～529、24～717、１～707、１～690、１～680、１～670、１～660、１～650、１～640、１～630、１～620、１～610、１～600、34～707、44～697、36～689に対応する配列、あるいは、配列番号70もしくは20または21に対し、85％、90％、92％、95％、97％、98％、99％もしくは100％の同一性を有する配列が挙げられる。

【００４９】

シグナルペプチドを欠失した好ましい断片は、正しい翻訳を確実にするために、該断片のＮ末端にメチオニン残基を有する。

【００５０】

さらに好ましい断片は以下の配列を有する：

MEENSVQDVKDSNTDDELSDSNDQSSDEEKNDVINNNQSINTDDNNQIIKKEETNNYDGIEKRSEDRTESTTNVDENEAT
FLQKTPQDNTHLTEEEVKESSSVESSNSSIDTAQQPSHTTINREESVQTSDNVEDSHVSDFANSKIKESNTESGKEENTI
EQPNKVKEDSTTSQPSGYTNIDEKISNQDE

LLNLPINEYENKARPLSTTSAQPSIKRVTVNQLAAEQGSNVNHLIKVTDQSITEGYDDSEGVIKAHDAENLIYDVTFEVD
DKVKSGDTMTVDIDKNTVPSDLTDSFTIPKIKDNSGEIIATGTYDNKNKQITYTFTDYVDKYENIKAHLKLTSYIDKSKV
PNNNTKLDVEYKTALSSVNKTITVEYQRPNENRTANLQSMFTNIDTKNHTVEQTIYINPLRYSAKETNVNISGNGDEGST

IIDDSTIIKVYKVGDNQNLPDSNRIYDYSEYEDVTNDDYAQLGNNNDVNINFGNIDSPYIIKVISKYDPNKDDYTTIQQT
VTMQTTINEYTGEFRTASYDNTIAFSTSSGQGQGDLPPEKTYKIGDYVWEDVDKDGIQNTNDNEKPLSNVLVTLTYPDGT
SKSVRTDEDGKYQFDGLKNGLTYKITFETPEGYTPTLKHSGTNPALDSEGNSVWVTINGQDDMTIDSGFYQTPKYSLGNY

VWYDTNKDGIQGDDEKGISGVKVTLKDENGNIISTTTTDENGKYQFDNLNSGNYIVHFDKPSGMTQTTTDSGDDDEQDAD
GEEVHVTITDHDDFSIDNGYYDDE

EbhAおよびEbhB

EbhAおよびEbhBは、黄色ブドウ球菌および表皮ブドウ球菌に発現し（ClarkeおよびFoster Infect. Immun. 2002, 70; 6680；Williamsら、Infect. Immun. 2002, 20; 6805）、かつ、フィブロネクチンに結合するタンパク質である。フィブロネクチンは細胞外マトリックスの重要な成分であることから、EbhAおよびEbhBは、ブドウ球菌を宿主細胞外マトリックスに接着させる上で重要な機能を有する。

【００５１】

Ebhタンパク質は大きく、分子量が1.1メガダルトンである。生産および製剤化が容易であるため、完全な配列よりも、Ebhタンパク質の断片を用いる方が有利である。該タンパク質の中央領域は、フィブロネクチン結合部位を含む不完全な反復配列を含む。以下に記載する１以上の反復ドメインを含む断片は、本発明の免疫原性組成物に組み込むのに好ましい断片である。

【００５２】

Ebhタンパク質は、以下の共通配列を含むことを特徴とする、長さ127アミノ酸の不完全な反復配列単位を含んでいる：

L.G.{10}A.{13}Q.{26}L…M..L.{33}A

好ましくは、

.{19}L.G.{10}A.{13}Q.{26}L…M..L.{33}A.{12}

さらに好ましくは、

.....I/V..A...I/V..AK.ALN/DG..NL..AK..A.{6}L..LN.AQK..L..QI/V..A..V..V.{6}A..LN/D.AM..L...I/V.D/E...TK.S.NY/F.N/DAD..K..AY/F..AV..A..I/V.N/D.......

尚、上記配列において、‘.’は任意のアミノ酸を意味し、‘.{10}’は任意の10アミノ酸を意味し、I/Vは他のアミノ酸選択を示す。

【００５３】

Kurodaら（2001）Lancet 357; 1225-1240、ならびに表２に開示された配列を参照することにより、Ebhタンパク質内の反復単位が容易に導き出される。

【００５４】

本発明の免疫原性組成物に含有させるのに好ましい断片として、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、10個もしくはそれ以上の127アミノ酸反復単位を含むポリペプチドが挙げられる。このような断片は、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、10個もしくはそれ以上の127アミノ酸反復領域から構成されるものでもよいし、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個、10個もしくはそれ以上の反復単位から構成され、しかも、該断片のいずれか一端または両端に別のアミノ酸が存在するものでもよい。別の好ましい断片は、Clarkeら、Infecttion and Immunity 70, 6680-6687, 2002に記載されるように、３つの反復単位（アミノ酸3202～3595）にわたる約44 kDaのH2ポリペプチドである。このような断片は、好ましくは、フィブロネクチンに結合する、および／または全Ebhタンパク質に対して反応性である抗体を誘発することができる。

【００５５】

Ebhポリペプチドは、フィブロネクチンに結合することができる。これらポリペプチド配列の好ましい断片は、フィブロネクチンに結合する能力を保持する。フィブロネクチンとの結合は、Clarkeら（Infecttion and Immunity 70; 6680-6687, 2002）に記載されているように、ELISAにより評価することができる。

【００５６】

さらに別の断片は、Ｂ細胞またはＴヘルパーエピトープを含むものであり、例えば、表３および４に記載の断片／ペプチドが挙げられる。

【００５７】

表２：Ebhの全長配列内の反復配列

Kurodaら（2001）Lancet 357; 1225-1240に、Ebhの全長配列が開示されている。以下の表は、全長配列内で127アミノ酸反復配列が開始および終了するアミノ酸残基を示す。

【表２】

	開始	終了
1	3204	3330
2	3331	3457
3	3457	3583
4	3583	3709
5	3709	3835
6	3835	3961
7	3961	4087
8	4200	4326
9	4326	4452
10	4452	4578
11	4578	4704
12	4704	4830
13	4830	4956
14	4956	5082
15	5082	5208
16	5208	5334
17	5334	5460
18	5460	5586
19	5585	5711
20	5711	5837
21	5837	5963
22	5963	6089
23	6089	6215
24	6215	6341
25	6341	6467
26	6467	6593
27	6593	6719
28	6719	6845
29	6845	6971
30	6971	7097
31	7097	7223
32	7223	7349
33	7349	7475
34	7475	7601
35	7601	7727
36	7727	7853
37	7852	7978
38	7978	8104

【００５８】

39	8104	8230
40	8230	8356
41	8356	8482
42	8482	8608
43	8604	8730
44	8858	8984

【００５９】

表３：127アミノ酸反復配列についてのＢ細胞エピトープ推定

Kurodaら（2001）Lancet 357; 1225-1240に、全長配列が開示されている。全長配列のアミノ酸3204～3331によりコードされる、これら反復配列の１つを選択し、エピトープ推定を実施した：

MDVNTVNQKAASVKSTKDALDGQQNLQRAKTEATNAITHASDLNQAQKNALTQQVNSAQNVHAVNDIKQTTQSLNTAMTG
LKRGVANHNQVVQSDNYVNADTNKKNDYNNAYNHANDIINGNAQHPVI

【表３】

開始	終了	エピトープ配列	開始	終止
5	10	TVNQKA	3208	3213
14	19	KSTKDA	3217	3222
21	33	DGQQNLQRAKTEA	3224	3236
42	51	DLNQAQKNAL	3245	3254
66	74	DIKQTTQSL	3269	3277
100	112	ADTNKKNDYNNAY	3303	3315
117	123	DIINGNA	3320	3326

【００６０】

-「開始」および「終了」の縦列は、127アミノ酸反復配列において推定したＢ細胞エピトープの位置を示す。

【００６１】

-「開始」および「終止」の縦列は、Ebh全長配列において推定したＢ細胞エピトープの位置を示す。

【００６２】

表４：EbhにおけるT細胞エピトープ推定

TrEMBLデータベースに、全長配列、基準配列Q8NWQ6が開示されている。全長配列のアミノ酸3204～3331によりコードされる、これら反復配列の１つを選択し、エピトープ推定を実施した：

MDVNTVNQKAASVKSTKDALDGQQNLQRAKTEATNAITHASDLNQAQKNALTQQVNSAQNVHAVNDIKQTTQSLNTAMTG
LKRGVANHNQVVQSDNYVNADTNKKNDYNNAYNHANDIINGNAQHPVI

【表４】

反復配列位置	エピトープ配列	配列位置
1	MDVNTVNQK	3204
3	VNTVNQKAA	3206
6	VNQKAASVK	3209
26	LQRAKTEAT	3229
37	ITHASDLNQ	3240
43	LNQAQKNAL	3246
51	LTQQVNSAQ	3254
55	VNSAQNVHA	3258
61	VHAVNDIKQ	3264
64	VNDIKQTTQ	3267
67	IKQTTQSLN	3270
74	LNTAMTGLK	3277
78	MTGLKRGVA	3281
81	LKRGVANHN	3284
85	VANHNQVVQ	3288
91	VVQSDNYVN	3294
92	VQSDNYVNA	3295
97	YVNADTNKK	3301
98	VNADTNKKN	3302
108	YNNAYNHAN	3311
112	YNHANDIIN	3315
118	IINGNAQHP	3321
119	INGNAQHPV	3322

【００６３】

－「反復配列位置」の縦列は、反復配列において推定したT細胞エピトープの位置を示す。

【００６４】

－「配列位置」の縦列は、Ebh全長配列において推定したT細胞エピトープの位置を示す。

【００６５】

本発明のポリペプチドの断片を用いて、ペプチド合成により、対応する全長ポリペプチドを作製することができ；従って、これらの断片を中間体として用いて、本発明の全長ポリペプチドを作製することができる。

【００６６】

数個、５～10個、１～５個、１～３個、１～２個もしくは１個のアミノ酸を任意に組み合わせて置換、欠失、もしくは付加した変異体が特に好ましい。

【００６７】

エラスチン結合タンパク質（EbpS）

EbpSは、486個のアミノ酸を含む、分子量が83 kDaのタンパク質である。これは、黄色ブドウ球菌の細胞質膜に関連し、膜にタンパク質を保持する３つの疎水領域を有する（Downerら、2002, J. Biol. Chem. 277; 243；Parkら、1996, J. Biol. Chem. 271; 15803）。

【００６８】

アミノ酸１～205と343～486の間の２つの領域は、細胞質膜の外側表面が露出している。EbpSのリガンド結合ドメインは、N末端で残基14～34の間に位置する（Parkら、1999, J. Biol. Chem. 274；2845）。

【００６９】
本発明の免疫原性組成物に含有させるのに好ましい断片は、エラスチン結合領域を含む表面露出断片（アミノ酸１～205）である。いくつかの好ましい断片は、全露出ループを含まないが、エラスチン結合領域（アミノ酸14～34）は含まなければならない。用いることができる別の断片は、第２の表面露出ループを形成するアミノ酸（アミノ酸343～486）からなる。これ以外にも、一端または両端のアミノ酸が１、２、５、10、20、50個まで少ない別の断片を用いることも可能である。
【００７０】
ラミニン受容体
黄色ブドウ球菌のラミニン受容体は、病原性に重要な役割を果たす。感染特有の特徴は、血流侵入であり、これによって、転移性膿瘍形成が拡大する。血流侵入には、血管基底膜を介して血液を溢出させる能力が必要である。これは、ラミニン受容体を介したラミニンとの結合により達成される（Lopesら、Science 1985, 229; 275）。
【００７１】
ラミニン受容体は表面露出であり、黄色ブドウ球菌および表皮ブドウ球菌を含む多くのブドウ球菌株に存在する。
【００７２】
SBI
Sbiは、IgG結合領域と、アポリポタンパク質H結合ドメインとを有するタンパク質であり、ほとんどの黄色ブドウ球菌株に発現する（Zhangら、1998, Microbiology 144; 985）。
【００７３】
Sbiの配列のＮ末端は、アミノ酸29の後に切断部位を備えた典型的なシグナル配列を有する。従って、本発明の免疫原性組成物に含有させるのに好ましいSbiの断片は、Sbi、例えば、配列番号26のアミノ酸残基30、31、32もしくは33から出発し、そのＣ末端まで続くものである。
【００７４】
SbiのIgG結合ドメインは、アミノ酸41～92からタンパク質のＮ末端に向かう領域として同定されている。このドメインは、プロテインＡのIgG結合ドメインと相同である。
【００７５】
Sbiの最小IgG結合ドメインは次の配列を含む：
【化１】

```
QTTQNNYVTDQQKAFYQVLHLKGITEEQRNQYIKTLREHPERAQEVFSESLK
          ** ***  *        ***  *  *   *         *  *
```

【００７６】

尚、上記配列において、*はIgG結合ドメイン間で類似するアミノ酸を示す。
【００７７】
本発明の免疫原性組成物に含有させるのに好ましいSbiの断片は、IgG結合ドメインを含む。この断片は、上記配列において*で示すIgG結合ドメインの共通配列を含む。該断片は、上記の完全な配列を含むか、または該完全な配列からなるのが好ましい。さらに好ましくは、この断片は、Sbi、例えば、配列番号26のアミノ酸30～92、33～92、30～94、33～94、30～146、33～146、30～150、33～150、30～160、33～160、33～170、33～180、33～190、33～200、33～205もしくは33～210を含むか、またはこれらアミノ酸からなる。
【００７８】
好ましい断片は、示した配列から１、２、３、４、５、６、７、８、９、10のアミノ酸置換を含んでもよい。
【００７９】

好ましい断片は、IgG結合ドメインの複数（２、３、４、５、６、７、８、９もしくは10）の反復配列を含んでもよい。

【００８０】

EFB-FIB

Fibは、19 kDaフィブリノーゲン結合タンパク質であり、黄色ブドウ球菌により細胞外媒質に分泌される。これは、被験黄色ブドウ球菌分離菌から産生される（WastfeltおよびFlock 1995, J. Clin. Microbiol. 33; 2347）。

【００８１】

黄色ブドウ球菌は、フィブリノーゲンの存在下で凝集し、フィブリノーゲン被覆表面に結合する。この能力により、カテーテルおよび内皮細胞でのブドウ球菌コロニー形成が促進される。

【００８２】

Fibは、アミノ酸約30に推定切断部位を備えるタンパク質のＮ末端にシグナル配列を含む。従って、本発明の免疫原性組成物に含有させるのに好ましい断片は、成熟タンパク質の配列（該タンパク質のアミノ酸約30からＣ末端まで）を含む。

【００８３】

IsaA/PisA

IsaAは29 kDaタンパク質であり、PisAとしても知られ、入院患者の敗血症における免疫優性ブドウ球菌タンパク質であることがわかっている（Lorenzら、2000, FEMS Immunol. Med. Microb. 29; 145）。

【００８４】

IsaA配列の最初の29個のアミノ酸は、シグナル配列であると考えられる。従って、本発明の免疫原性組成物に含有させるのに好ましいIsaA断片は、コードされた配列のアミノ酸残基30から、末端まで含む。

【００８５】

フィブロネクチン結合タンパク質

フィブロネクチン結合プロテインＡ（FnbA）は、米国特許第5320951およびSchenningsら（1993, Microb. Pathog. 15; 227）に記載されている。フィブロネクチン結合プロテインＡは、フィブロネクチンとの結合に関与する数個のドメインを含む（WO 94/18327）。これらは、D1、D2、D3およびD4と呼ばれる。フィブロネクチン結合プロテインＡまたはＢの好ましい断片は、D1、D2、D3、D4、D1-D2、D2-D3、D3-D4、D1-D3、D2-D4もしくはD1-D4を含むか、あるいはこれらからなる（WO 94/18327に記載の通り）。

【００８６】

フィブロネクチン結合タンパク質は、36アミノ酸シグナル配列、例えば、次の配列を含む：

VKNNLRYGIRKHKLGAASVFLGTMIVVGMGQDKEAA

随意に、このシグナル配列を除去した成熟タンパク質を本発明の免疫原性組成物に含有させる。

【００８７】

輸送体タンパク質

グラム陽性細菌の細胞壁は、代謝物が細菌に自由に拡散するのを阻止するブロック壁として作用する。一ファミリーのタンパク質は、細菌内への必須栄養素の経路を組織化するため、細菌の生存に必須である。「輸送体タンパク質」という用語は、代謝物（例えば、鉄）との結合の初期段階に関与するタンパク質、ならびに細菌内への代謝物の実際の輸送に関与するタンパク質を包含する。

【００８８】

分子鉄は細菌増殖の必須補因子である。遊離鉄に結合するサイドロホア(siderophore)は、分泌された後、細胞膜を横断する輸送のために鉄を送達する細菌表面受容体により捕捉される。鉄獲得は、ヒト感染の確立のために重要であることから、このクラスのタンパク質に対する免疫応答が発生すれば、ブドウ球菌生存能の喪失につながる。

【００８９】
輸送体タンパク質の例として、免疫優性ABC輸送体（Burnieら、2000 Infect. Immun. 68; 3200）、IsdA（Mazmanianら、2002 PNAS 99; 2293）、IsdB（Mazmanianら、2002 PNAS 99; 2293）、Mg2+輸送体、SitC（WiltshireおよびFoster 2001 Infect. Immun. 69; 5198）およびNi ABC輸送体が挙げられる。
【００９０】
免疫優性ABC輸送体
免疫優性ABC輸送体は、良好に保存されたタンパク質であり、これは、様々なブドウ球菌株に対して交差防御的な（cross-protective）免疫応答を生み出すことができる（Meiら、1997, Mol. Microbiol. 26; 399）。このタンパク質に対する抗体は、敗血症の患者にみいだされている（Burnieら、2000 Infect. Immun. 68; 3200）。
【００９１】
免疫優性ABC輸送体の好ましい断片としては、ヒト免疫系により認識されるエピトープを含む配列であることから、次のペプチドが挙げられる：DRHFLN、GNYD、RRYPF、KTTLLK、GVTTSLS、VDWLR、RGFL、さらに好ましくはKIKVYVGNYDFWYQS、TVIVVSHDRHFLYNNVおよび／またはTETFLRGFLGRMLFS。
【００９２】
IsdA-IsdB
黄色ブドウ球菌のisd遺伝子（鉄調節表面決定因子）は、ヘモグロビン結合および細胞質へのヘム鉄の輸送を担当するタンパク質をコードし、該細胞質においてヘム鉄は必須栄養素として作用する。IsdAおよびIsdBは、ブドウ球菌の細胞壁内に位置する。IsdAは、プロテイナーゼK消化を被りやすいため、細菌の表面に露出していると考えられる。IsdBは一部が消化されていたことから、細菌の表面に一部露出していることを示唆している（Mazmanianら、2003 Science 299; 906）。
【００９３】
IsdAおよびIsdBはいずれも、ヘムに結合する29 kDaタンパク質である。これらの発現は、Furリプレッサーを介した鉄の利用性により調節される。これらの発現は宿主への感染時に高くなり、その際、宿主における鉄の濃度は低くなる。
【００９４】
また、上記タンパク質は、FrpAおよびFrpBとしても知られる（Morrisseyら、2002, Infect. Immun. 70; 2399）。FrpAおよびFrpBは、高い電荷を有する主要表面タンパク質である。これらは、プラスチックへの接着に大きく寄与することがわかっている。
【００９５】
一実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、WO 01/98499またはWO 03/11899に記載されているIsdAおよび／またはIsdBの断片を含む。
【００９６】
毒素およびビルレンス調節物質
このタンパク質ファミリーのメンバーには、αトキシン、溶血素、エンテロトキシンBおよびTSST-1のような毒素、ならびに、RAPのような毒素の産生を調節するタンパク質が含まれる。
【００９７】
αトキシン（Hla）
αトキシンは、ほとんどの黄色ブドウ球菌により産生される重要なビルレンス決定因子である。これは、溶血活性を有する細孔形成毒素である。αトキシンに対する抗体は、動物モデルにおいてαトキシンの有害および致死作用を中和することが示されている（Adlamら、1977 Infect. Immun. 17; 250）。ヒト血小板、内皮細胞および単核細胞はαトキシンの作用を受けやすい。
【００９８】
αトキシンには高い毒性があるため、免疫原として用いる前に解毒する必要がある。これは、化学的処理、例えば、ホルムアルデヒド、他の架橋試薬のグルタルアルデヒドで処

理するか、もしくは後述するように細菌多糖と化学的に結合させることにより、達成することができる。

【００９９】

毒性を除去する別の方法は、毒素の抗原性は保持しながら、毒性を除去する点突然変異を導入するものである。αトキシンのアミノ酸35に点突然変異を導入し、そこでヒスチジン残基をロイシン残基で置換することにより、毒素の抗原性は保持しながら、毒性を除去する（MenziesおよびKernodle 1996; Infect. Immun. 64; 1839）。ヒスチジン35は、細孔形成に必要な適正なオリゴマー化に重要であると考えられ、この残基の突然変異により、毒性が失われる。

【０１００】

本発明の免疫原性組成物に含有させる場合には、His 35の突然変異、最も好ましくは、His 35をLeuまたはArgで置換することにより、解毒するのが好ましい。別の実施形態では、免疫原性組成物の別の成分、好ましくは、莢膜多糖、最も好ましくは、黄色ブドウ球菌Ｖ型多糖および／または黄色ブドウ球菌VIII型多糖および／またはPNAGとの結合により、αトキシンの解毒を実施する。

【０１０１】

RNA III活性化タンパク質（RAP）

RAPはそれ自体毒素ではないが、発病因子の発現の調節物質である。RAPは、黄色ブドウ球菌により産生および分泌される。これは、別のブドウ球菌のagr調節系を活性化し、溶血素、エンテロトキシンＢおよびTSST-1のような発病因子の発現および後の放出を活性化する。

【０１０２】

RAPに対して生み出される免疫応答は、細菌を死滅させないが、細菌の病原性を妨害する。これは、新たな耐性菌株が出現するための低選択性圧力をもたらすという利点がある。

【０１０３】

これには、感染の罹患率を低減する上で役立つ免疫応答を生み出すという第２の利点もある。

【０１０４】

具体的には、別の抗原が、細菌を死滅させることができる免疫応答をもたらす場合に、ワクチンにRAPと別の抗原を組み合わせれば特に有利である。

【０１０５】

その他のタンパク質

蓄積関連タンパク質（Aap）

Aapは、表面への表皮ブドウ球菌株の蓄積に必須の140 kDaタンパク質である（Hussainら、Infect. Immun. 1997, 65; 519）。このタンパク質を発現する菌株は有意に多量のバイオフィルムを産生するため、Aapはバイオフィルム形成に関与すると考えられる。Aapに対する抗体はバイオフィルム形成を阻害し、表皮ブドウ球菌の蓄積を阻害することができる。

【０１０６】

Aapの好ましい断片は、アミノ酸550～1069を含むか、またはこれらからなる保存ドメインである。

【０１０７】

ブドウ球菌分泌抗原SsaA

SsaAは、黄色ブドウ球菌および表皮ブドウ球菌の両方に存在する30 kDaの強度に免疫原性のタンパク質である（Langら、2000 FEMS Immunol. Med. Microbiol. 29; 213）。心内膜炎におけるその発現は、感染性疾患の病因に特異的なビルレンスを有することを示唆している。

【０１０８】

SsaAは、Ｎ末端リーダー配列およびシグナルペプチダーゼ切断部位を含む。リーダーペ

プチドの後に、残基30から残基130までの約100個のアミノ酸からなる親水領域が続く。
【０１０９】
本発明の免疫原性組成物に含有させるのに好ましいSsaAの断片は、成熟タンパク質（アミノ酸27からＣ末端またはアミノ酸30からＣ末端）からなる。
【０１１０】
別の好ましい断片は、アミノ酸30からアミノ酸130までのSsaAの親水領域を含む。
【０１１１】
好ましい組合せ
本発明の免疫原性組成物における好ましいタンパク質の組合せは、ラミニン受容体と、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、αトキシン、αトキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。
【０１１２】
本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、SitCと、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、αトキシン、αトキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。
【０１１３】
本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、EbhAと、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、αトキシン、αトキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。
【０１１４】
本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、EbhBと、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、αトキシン、αトキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。
【０１１５】
本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、EbhSと、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、αトキシン、αトキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。
【０１１６】
本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、EFB（FIB）と、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、αトキシン、αトキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。
【０１１７】
本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、SBIと、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、αトキシン、αトキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。
【０１１８】
本発明の免疫原性組成物における好ましいタンパク質の組合せは、自己溶解素と、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、αトキシン、αトキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。
【０１１９】
本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、ClfAと、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、αトキシン、αトキシンH

35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。

【０１２０】

本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、SdrCと、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、αトキシン、αトキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。

【０１２１】

本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、SdrGと、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、αトキシン、αトキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。

【０１２２】

本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、SdrHと、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、αトキシン、αトキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。

【０１２３】

本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、リパーゼGehDと、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、αトキシン、αトキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。

【０１２４】

本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、SasAと、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、αトキシン、αトキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。

【０１２５】

本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、FnbAと、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、αトキシン、αトキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。

【０１２６】

本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、FnbBと、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、αトキシン、αトキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。

【０１２７】

本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、Cnaと、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、αトキシン、αトキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。

【０１２８】

本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、ClfBと、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、αトキシン、αトキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。

【０１２９】

本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、FbpAと、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、αトキシン、αトキシンH

35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。

【０１３０】

本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、Npaseと、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、αトキシン、αトキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。

【０１３１】

本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、IsaA/PisAと、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、αトキシン、αトキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。

【０１３２】

本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、SsaAと、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、αトキシン、αトキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。

【０１３３】

本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、EPBと、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、αトキシン、αトキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。

【０１３４】

本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、SSP-1と、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、αトキシン、αトキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。

【０１３５】

本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、SSP-2と、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、αトキシン、αトキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。

【０１３６】

本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、HPBと、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、αトキシン、αトキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。

【０１３７】

本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、ビトロネクチン結合タンパク質と、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、αトキシン、αトキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。

【０１３８】

本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、フィブリノーゲン結合タンパク質と、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、αトキシン、αトキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。

【０１３９】

本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、血液凝固酵素と、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、αトキシン、α

トキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。

【０１４０】

本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、Figと、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、αトキシン、αトキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。

【０１４１】

本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、MAPと、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、αトキシン、αトキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。

【０１４２】

本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、免疫優性ABC輸送体と、ラミン受容体、SitC/MntC/唾液結合タンパク質、EbhA、EbhB、エラスチン結合タンパク質（EbpS）、EFB（FIB）、SBI、自己溶解素、ClfA、SdrC、SdrG、SdrH、リパーゼGehD、SasA、FnbA、FnbB、Cna、ClfB、FbpA、Npase、IsaA/PisA、SsaA、EPB、SSP-1、SSP-2、HBP、ビトロネクチン結合タンパク質、フィブリノーゲン結合タンパク質、血液凝固酵素、Fig、MAP、αトキシン、αトキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。

【０１４３】

本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、IsdAと、ラミン受容体、SitC/MntC/唾液結合タンパク質、EbhA、EbhB、エラスチン結合タンパク質（EbpS）、EFB（FIB）、SBI、自己溶解素、ClfA、SdrC、SdrG、SdrH、リパーゼGehD、SasA、FnbA、FnbB、Cna、ClfB、FbpA、Npase、IsaA/PisA、SsaA、EPB、SSP-1、SSP-2、HBP、ビトロネクチン結合タンパク質、フィブリノーゲン結合タンパク質、血液凝固酵素、Fig、MAP、αトキシン、αトキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。

【０１４４】

本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、IsdBと、ラミン受容体、SitC/MntC/唾液結合タンパク質、EbhA、EbhB、エラスチン結合タンパク質（EbpS）、EFB（FIB）、SBI、自己溶解素、ClfA、SdrC、SdrG、SdrH、リパーゼGehD、SasA、FnbA、FnbB、Cna、ClfB、FbpA、Npase、IsaA/PisA、SsaA、EPB、SSP-1、SSP-2、HBP、ビトロネクチン結合タンパク質、フィブリノーゲン結合タンパク質、血液凝固酵素、Fig、MAP、αトキシン、αトキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。

【０１４５】

本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、SitCと、ラミン受容体、SitC/MntC/唾液結合タンパク質、EbhA、EbhB、エラスチン結合タンパク質（EbpS）、EFB（FIB）、SBI、自己溶解素、ClfA、SdrC、SdrG、SdrH、リパーゼGehD、SasA、FnbA、FnbB、Cna、ClfB、FbpA、Npase、IsaA/PisA、SsaA、EPB、SSP-1、SSP-2、HBP、ビトロネクチン結合タンパク質、フィブリノーゲン結合タンパク質、血液凝固酵素、Fig、MAP、αトキシン、αトキシンH35L OR H35R突然変異体、RAP、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。

【０１４６】

本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、αトキシンと、ラミン受容体、SitC/MntC/唾液結合タンパク質、EbhA、EbhB、エラスチン結合タンパク質（EbpS）、EFB（FIB）、SBI、自己溶解素、ClfA、SdrC、SdrG、SdrH、リパーゼGehD、SasA、FnbA、FnbB、Cna、ClfB、FbpA、Npase、IsaA/PisA、SsaA、EPB、SSP-1、SSP-2、HBP、ビトロネクチン結合タンパク質、フィブリノーゲン結合タンパク質、血液凝固酵素、Fig

、MAP、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。

【０１４７】

本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、αトキシンH35L OR H35R変異体と、ラミン受容体、SitC/MntC/唾液結合タンパク質、EbhA、EbhB、エラスチン結合タンパク質（EbpS）、EFB（FIB）、SBI、自己溶解素、ClfA、SdrC、SdrG、SdrH、リパーゼGehD、SasA、FnbA、FnbB、Cna、ClfB、FbpA、Npase、IsaA/PisA、SsaA、EPB、SSP-1、SSP-2、HBP、ビトロネクチン結合タンパク質、フィブリノーゲン結合タンパク質、血液凝固酵素、Fig、MAP、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。

【０１４８】

本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、RAPと、ラミン受容体、SitC/MntC/唾液結合タンパク質、EbhA、EbhB、エラスチン結合タンパク質（EbpS）、EFB（FIB）、SBI、自己溶解素、ClfA、SdrC、SdrG、SdrH、リパーゼGehD、SasA、FnbA、FnbB、Cna、ClfB、FbpA、Npase、IsaA/PisA、SsaA、EPB、SSP-1、SSP-2、HBP、ビトロネクチン結合タンパク質、フィブリノーゲン結合タンパク質、血液凝固酵素、Fig、MAP、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、AapおよびSsaAからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。

【０１４９】

本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、Aapと、ラミン受容体、SitC/MntC/唾液結合タンパク質、EbhA、EbhB、エラスチン結合タンパク質（EbpS）、EFB（FIB）、SBI、自己溶解素、ClfA、SdrC、SdrG、SdrH、リパーゼGehD、SasA、FnbA、FnbB、Cna、ClfB、FbpA、Npase、IsaA/PisA、SsaA、EPB、SSP-1、SSP-2、HBP、ビトロネクチン結合タンパク質、フィブリノーゲン結合タンパク質、血液凝固酵素、Fig、MAP、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、RAP、αトキシンおよびH35L OR H35Rαトキシンからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。

【０１５０】

本発明の免疫原性組成物における別の好ましいタンパク質の組合せは、SsaAと、ラミン受容体、SitC/MntC/唾液結合タンパク質、EbhA、EbhB、エラスチン結合タンパク質（EbpS）、EFB（FIB）、SBI、自己溶解素、ClfA、SdrC、SdrG、SdrH、リパーゼGehD、SasA、FnbA、FnbB、Cna、ClfB、FbpA、Npase、IsaA/PisA、SsaA、EPB、SSP-1、SSP-2、HBP、ビトロネクチン結合タンパク質、フィブリノーゲン結合タンパク質、血液凝固酵素、Fig、MAP、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、RAP、αトキシンおよびH35L OR H35Rαトキシンからなる群より選択される１、２、３、４もしくは５の別の抗原とを含む。

【０１５１】

本発明者らは、抗原を混合した場合、特定の抗原が、特に有効な免疫応答を生み出すことを証明している。従って、本発明の実施形態は、IsaAとブドウ球菌輸送体タンパク質、またはIsaAとブドウ球菌ビルレンスもしくは毒素調節物質を含むか、あるいはSbiとブドウ球菌輸送体タンパク質、またはSbiとブドウ球菌ビルレンスもしくは毒素調節物質を含むか、あるいは、SdrCとブドウ球菌輸送体タンパク質、またはSdrCとブドウ球菌ビルレンスもしくは毒素調節物質、またはIsaAとSbi、またはIsaAとSdrC、またはIsaAと自己溶解素、またはIsaAとEbh、またはSbiとSdrC、またはSbiと自己溶解素、またはSbiとEbh、またはSdrCと自己溶解素、またはSdrCとEbh、または自己溶解素－グルコサミニダーゼとEbhを含む免疫原性組成物である。これら組合せの各々について、タンパク質は、全長または断片のいずれでもよく、図１の配列に対し少なくとも85％、90％、95％、98％もしくは100％同一の配列を有する。

【０１５２】

前述および後述の組合せにおいて、指定したタンパク質は、前述したように、断片または融合タンパク質として随意に本発明の免疫原性組成物に含有させることができる。

【０１５３】

本発明の好ましい免疫原性組成物は、WO 02/094868に開示するタンパク質配列を含まない。

【０１５４】

３つのタンパク質の組合せ

本発明の好ましい免疫原性組成物は、αトキシン、細胞外成分結合タンパク質（好ましくは、アドヘジン(adhesin)）および輸送体タンパク質（好ましくは鉄結合タンパク質）を組み合わせた３つのタンパク質を含む。

【０１５５】

このような組合せの場合、αトキシンは、化学的に、または点突然変異、好ましくはHis35Leu点突然変異の導入により遺伝子的に解毒することができる。αトキシンは、遊離タンパク質として存在するか、あるいは、免疫原性組成物の多糖またはLTA成分に結合している。

【０１５６】

好ましい組合せを以下に挙げる：

αトキシン、IsdAと、ラミン受容体、SitC/MntC/唾液結合タンパク質、EbhA、EbhB、エラスチン結合タンパク質（EbpS）、EFB（FIB）、SBI、自己溶解素、ClfA、SdrC、SdrG、SdrH、リパーゼGehD、SasA、FnbA、FnbB、Cna、ClfB、FbpA、Npase、IsaA/PisA、SsaA、EPB、SSP-1、SSP-2、HBP、ビトロネクチン結合タンパク質、フィブリノーゲン結合タンパク質、血液凝固酵素、FigおよびMAPからなる群より選択される細胞外成分結合タンパク質とを含む免疫原性組成物。

【０１５７】

αトキシン、IsdBと、ラミン受容体、SitC/MntC/唾液結合タンパク質、EbhA、EbhB、エラスチン結合タンパク質（EbpS）、EFB（FIB）、SBI、自己溶解素、ClfA、SdrC、SdrG、SdrH、リパーゼGehD、SasA、FnbA、FnbB、Cna、ClfB、FbpA、Npase、IsaA/PisA、SsaA、EPB、SSP-1、SSP-2、HBP、ビトロネクチン結合タンパク質、フィブリノーゲン結合タンパク質、血液凝固酵素、FigおよびMAPからなる群より選択される細胞外成分結合タンパク質とを含む免疫原性組成物。

【０１５８】

αトキシン、IsdAと、ラミン受容体、EbhA、EbhB、エラスチン結合タンパク質（EbpS）、EFB（FIB）、ClfA、SdrC、SdrG、SdrH、自己溶解素、FnbA、FnbB、Cna、ClfB、FbpA、Npase、SSP-1、SSP-2、ビトロネクチン結合タンパク質、フィブリノーゲン結合タンパク質、血液凝固酵素、FigおよびMAPからなる群より選択されるアドヘジンとを含む免疫原性組成物。

【０１５９】

αトキシン、IsdBと、ラミン受容体、EbhA、EbhB、エラスチン結合タンパク質（EbpS）、EFB（FIB）、自己溶解素、ClfA、SdrC、SdrG、SdrH、FnbA、FnbB、Cna、ClfB、FbpA、Npase、SSP-1、SSP-2、ビトロネクチン結合タンパク質、フィブリノーゲン結合タンパク質、血液凝固酵素、FigおよびMAPからなる群より選択されるアドヘジンとを含む免疫原性組成物。

【０１６０】

αトキシン、IsdAおよびラミン受容体を含む免疫原性組成物。

【０１６１】

αトキシン、IsdAおよびEbhAを含む免疫原性組成物。

【０１６２】

αトキシン、IsdAおよびEbhBを含む免疫原性組成物。

【０１６３】

αトキシン、IsdAおよびEbpSを含む免疫原性組成物。

【０１６４】
αトキシン、IsdAおよびFEB（FIB）を含む免疫原性組成物。
【０１６５】
αトキシン、IsdAおよびSdrGを含む免疫原性組成物。
【０１６６】
αトキシン、IsdAおよびClfAを含む免疫原性組成物。
【０１６７】
αトキシン、IsdAおよびClfBを含む免疫原性組成物。
【０１６８】
αトキシン、IsdAおよびFnbAを含む免疫原性組成物。
【０１６９】
αトキシン、IsdAおよび血液凝固酵素を含む免疫原性組成物。
【０１７０】
αトキシン、IsdAおよびFigを含む免疫原性組成物。
【０１７１】
αトキシン、IsdAおよびSdrHを含む免疫原性組成物。
【０１７２】
αトキシン、IsdAおよびSdrCを含む免疫原性組成物。
【０１７３】
αトキシン、IsdAおよびMAPを含む免疫原性組成物。
【０１７４】
IsaAとSbiを含む免疫原性組成物。
【０１７５】
IsaAとIsdBを含む免疫原性組成物。
【０１７６】
IsaAとIsdAを含む免疫原性組成物。
【０１７７】
IsaAとSdrCを含む免疫原性組成物。
【０１７８】
IsaAとEbhまたは前述したその断片を含む免疫原性組成物。
【０１７９】
SbiとSdrCを含む免疫原性組成物。
【０１８０】
SbiとEbhまたは前述したその断片を含む免疫原性組成物。
【０１８１】
IsaA、SbiもしくはSdrCを含む免疫原性組成物。
【０１８２】
様々なクローン系統に発現させた抗原の選択
黄色ブドウ球菌の集団構造に関する発病因子発生の分析から、黄色ブドウ球菌の天然の集団に発病遺伝子が不定に存在することがわかった。
【０１８３】
黄色ブドウ球菌の臨床分離菌のうち、少なくとも５つのクローン系統が極めて優勢であることがわかった（Boothら、2001 Infect Immun. 69(1):345-52）。α溶血素（hla）、フィブロネクチン結合プロテインA（fnbA）および凝集因子(clumping factor) A（clfA）は、系統同一性に関係なく、ほとんどの分離菌に存在することが明らかになり、これは、黄色ブドウ球菌の生存にこれらのタンパク質が重要な役割を有することを示唆している（Boothら、2001 Infect Immun. 69(1):345-52）。さらに、Peacockら、2002によれば、fnbA、clfA、血液凝固酵素、spa、map、pvl（パントン－バレンチンロイコシジン）、hlg（γトキシン）、αトキシンおよびicaは、基礎となるクローン構造とは無関係のようであり、これは、これら遺伝子の相当な水平移動を示唆している。

【０１８４】
対照的に、フィブロネクチン結合プロテインＢ（fnbB）、β溶血素（hlb）、コラーゲン結合タンパク質（can）、TSST-1（tst）およびメチシリン耐性遺伝子（mecA）は、特定の系統と強く関連している（Boothら、2001 Infect Immun. 69(1):345-52）。同様に、Peacockら、2002（Infect Immun. 70(9):4987-96）は、集団内でのエンテロトキシン、tst、エキスホラチン（etaおよびetb）、βおよびδトキシン、sdr遺伝子（sdrD、sdrEおよびbbp）、cna、ebpSおよびefbの分布がすべて、MLST由来のクローン複合体に極めて有意に関連することを明らかにした。
【０１８５】
MLSTデータは、院内感染病の原因である菌株が、地域獲得疾病を起こす菌株、または無症候性保菌者から回収した菌株からの独特なサブ集団を呈示する証拠を提供していない（Feilら、2003 J Bacteriol. 185(11):3307-16）。
【０１８６】
本発明の好ましい免疫原性組成物は、様々なクローン系統由来のブドウ球菌に対して有効である。
【０１８７】
一実施形態では、これは、ブドウ球菌のほとんどの分離菌に発現する１、２、３、４、好ましくは１以上のタンパク質を含有させることにより達成される。このようなタンパク質の例として、α溶血素（hla）、フィブロネクチン結合プロテインＡ（fnbA）および凝集因子Ａ（clfA）、血液凝固酵素、spa、map、pvl（パントン－バレンチンロイコシジン）、hlg（γトキシン）およびicaが挙げられる。本発明者らはまた、以下に挙げるものも同定した：ABC輸送体、RAP、自己溶解素（Ruppら、2001, J. Infect. Dis. 183; 1038）、ラミニン受容体、SitC、IsaA/PisA、SPOIIIE ()、SsaA、EbpS、SasF（Rocheら、2003, Microbiology 149; 643）、EFB（FIB）、SBI、ClfB、IsdA、IsdB、FnbB、Npase、EBP、骨シアロ結合タンパク質II、IsaB/PisB（Lorenzら、FEMS Immuno. Med. Microb. 2000, 29; 145）、SasH（Rocheら、2003, Microbiology 149; 643）、MRPI、SasD（Rocheら、2003, Microbiology 149; 643）、SasH（Rocheら、2003, Microbiology 149; 643）、オーレオリシン（AUR）／Sepp1および新規の自己溶解素。
【０１８８】
別の実施形態では、異なるセットのクローン系統に発現する２以上のタンパク質を本発明の免疫原性組成物に含有させる。好ましくは、多数のクローン系統、最も好ましくは、すべてのクローン系統に対して有効である、抗原の組合せにより、免疫応答を発生させる。好ましい組合せを以下に挙げる：FnbBとβ溶血素、FnbBとCna、FnbBとTSST-1、FnbBとmecA、FnbBとSdrD、FnbBとSdrF、FnbBとEbpS、FnbBとEfb、β溶血素とCna、β溶血素とTSST-1、β溶血素とmecA、β溶血素とSdrD、β溶血素とSdrF、β溶血素とEbpS、β溶血素とEfb、CnaとTSST-1、CnaとmecA、CnaとSdrD、CnaとSdrF、CnaとEbpS、CnaとEfb、TSST-1とmecA、TSST-1とSdrD、TSST-1とSdrF、TSST-1とEbpS、TssT-1とEfb、MecAとSdrD、MecAとSdrF、MecAとEbpS、MecAとEfb、SdrDとSdrF、SdrDとEbpS、SdeDとEfb、SdrFとEbpS、SdrFとEfb、およびEbpSとEfb。
【０１８９】
以上挙げた好ましい組合せを後述する別の成分と組み合わせてもよい。
【０１９０】
様々な増殖期に発現する抗原の選択
ブドウ球菌は、特定のセットのタンパク質が発現する対数増幅期を経て増殖する。これらのタンパク質には、多くの細胞外成分結合タンパク質および輸送体タンパク質が含まれる。対数増幅期の後、ブドウ球菌は、後対数期に戻り、その間、増殖は低速になり、タンパク質発現が調節される。その際、対数増幅期に発現したタンパク質の多くがダウンレギュレートされるのに対し、酵素や大部分の毒素（αトキシンを含む）などその他のタンパク質は、より高いレベルで発現する。
【０１９１】

本発明の好ましい免疫原性組成物は、対数増幅期に、より高いレベルで発現するタンパク質と、後対数増幅期に、より高いレベルで発現するタンパク質を含む。

【０１９２】

ここで、「より高いレベル」とは、ある時期における発現レベルが、他の時期と比較して高いことを意味する。

【０１９３】

好ましい実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、αトキシンおよび細胞外成分結合タンパク質（好ましくは、FnbA、FnbB、ClfAおよびClfB）または輸送体タンパク質を含む。

【０１９４】

さらに好ましくは、本発明の免疫原性組成物は、αトキシンまたはCnaもしくはリパーゼGehDと、ラミン受容体、SitC/MntC/唾液結合タンパク質、エラスチン結合タンパク質（EbpS）、EFB（FIB）、SBI、自己溶解素、ClfA、SdrC、SdrG、SdrH、SasA、FnbA、FnbB、ClfB、FbpA、Npase、IsaA/PisA、SsaA、EPB、SSP-1、SSP-2、HBP、ビトロネクチン結合タンパク質、フィブリノーゲン結合タンパク質、血液凝固酵素、FigおよびMAP、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、AapおよびSsaAからなる群より選択されるタンパク質とを含む。

【０１９５】

以上記載した組合せにおいて、前述のように、αトキシンを遺伝子的または化学的に解毒することができ、これを後述するように多糖に結合させても、させなくてもよい。

【０１９６】

多糖

本発明の免疫原性組成物は、さらに、莢膜多糖、例えば、１以上のPIA（また、PNAGとしても知られる）および／または黄色ブドウ球菌Ｖ型および／またはVIII型莢膜多糖および／または表皮ブドウ球菌Ｉ型、および／またはII型および／またはIII型莢膜多糖を含むのが好ましい。

【０１９７】

PIA（PNAG）

PS/A、PIAおよびSAAとして同定される様々な形態のブドウ球菌表面多糖は同じ化学的実体－PNAGである（Maria-Litranら、Vaccine 22; 872-879 (2004)）。従って、PIAまたはPNAGという用語は、これらすべての多糖、またはそれらに由来するオリゴ多糖を包含する。

【０１９８】

PIAは、多糖細胞間アドヘジンであり、N-アセチルおよびO-スクシニル成分で置換したβ-(1→6)-結合グルコサミンのポリマーからなる。この多糖は、黄色ブドウ球菌および表皮ブドウ球菌の両方に存在し、いずれの供給源からも単離することができる（Joyceら、2003, Carbohydrate Research 338; 903; Maira-Litranら、2002, Infect. Imun. 70; 4433）。例えば、PNAGは黄色ブドウ球菌株MN8,（WO 04/43407）から単離することができる。

【０１９９】

表皮ブドウ球菌から単離したPIAは、バイオフィルムの不可欠な成分である。これは、細胞間接着の仲介を担当し、恐らくはまた、宿主の免疫応答から成長するコロニーを保護する機能も果たすと考えられる。

【０２００】

ポリ-N-スクシニル-β-(1→6)-結合グルコサミン（PNSG）として以前から知られる多糖は、N-スクシニル化の同定が間違っていたため、予想していた構造をしていないことが近年わかった（Maria-Litranら、2002, Infect. Immun. 70; 4433）。従って、これまでPNSGとして知られ、現在PNAFであることが認められた多糖も用語「PIA」に含まれる。

【０２０１】

PIA（またはPNAG）は、400 kDaを超えるものから、75～400 kDaまで、10～75 kDaまで、30以下の反復単位からなるオリゴ糖（N-アセチルおよびO-スクシニル成分で置換したβ

-(1→6)-結合グルコサミンからなる）まで、様々なサイズのものでよい。本発明の免疫原性組成物には、あらゆるサイズのPIA多糖またはオリゴ糖を用いてよいが、40 kDaを超えるものが好ましい。サイジングは当分野で周知のあらゆる方法、例えば、マイクロ流動体化、超音波照射もしくは化学的切断（WO 03/53462、欧州特許第497,524号、欧州特許第495,525号）により達成することができる。

【０２０２】

PIA（またはPNAG）の好ましいサイズの範囲は、40～400 kDa、40～300 kDa、50～350 kDa、60～300 kDa、50～250 kDaおよび60～200 kDaである。

【０２０３】

PIA（PNAG）は、酢酸基によるアミノ基での置換によって、様々な程度のアセチル化を有しうる。in vitroで生産したPIAは、アミノ基でほぼ完全に（95～100％）置換されている。あるいは、60％以下、好ましくは50％、40％、30％、20％、10％以下のアセチル化を有する脱アセチル化PIA（PNAG）を用いることもできる。PNAGの非アセチル化エピトープは、オプソニンによるグラム陽性菌、好ましくは黄色ブドウ球菌および／または表皮ブドウ球菌の死滅を仲介するのに効果的であるため、脱アセチル化PIA（PNAG）を用いるのが好ましい。最も好ましくは、PIA（PNAG）は、40 kDa～300 kDaのサイズを有し、60％、50％、40％、30％もしくは20％以下のアミノ基がアセチル化されるように、脱アセチル化する。

【０２０４】

用語「脱アセチル化PIA（dPNAG）」とは、60％、50％、40％、30％、20％もしくは10％以下のアミノ基がアセチル化されているPNAG多糖またはオリゴ糖を意味する。

【０２０５】

一実施形態では、天然の多糖を化学的に処理することにより、PNAGを脱アセチル化して、dPNAGを形成する。例えば、天然PNAGを塩基性溶液で処理し、pHが10を超えるようにする。例えば、0.1～５M、0.2～４M、0.3～３M、0.5～２M、0.75～1.5Mまたは１M NaOH、KOHもしくはNH_4OHでPNAGを処理する。処理は、20～100、25～80、30～60もしくは30～50または35～45℃の温度で、少なくとも10または30分、あるいは１、２、３、４、５、10、15もしくは20時間実施する。　　dPNAGは、WO 04/43405に記載されているように調製することもできる。

【０２０６】

本発明の免疫原性組成物に含有させる多糖は、好ましくは、後述するように担体タンパク質と結合させるか、あるいは、結合させない。

【０２０７】

<u>黄色ブドウ球菌由来の５型または８型多糖</u>

ヒトへの感染を引き起こす黄色ブドウ球菌のほとんどの菌株が、５型または８型多糖のいずれかを含む。約60％のヒト菌株が８型であり、約30％が５型である。５型および８型莢膜多糖抗原の構造は、Moreauら、Carbohydrate Res. 201; 285 (1990)および Fournierら、Infect. Immun. 45; 87 (1984) に記載されている。両者とも、その反復配列にFucNAcpと、スルフヒドリル基を導入するのに用いることができるManNAcAを有する。これらの構造は以下のように報告されていた：

５型

→4)-β-D-ManNAcA(3OAc)-(1 →4)-α-L-FucNAc(1 →3)-β-D-FucNAc-(1 →

８型

→3)-β-D-ManNAcA(4OAc)-(1 →3)-α-L-FucNAc(1 →3)-β-D-FucNAc-(1 →

近年（Jones, Carbohydrate Research 340, 1097-1106 (2005)）、NMR分光学的方法により、以下に示す構造に訂正された：

５型

→4)-β-D-ManNAcA-(1 →4)-α-L-FucNAc(3OAc)-(1 →3)-β-D-FucNAc-(1 →

８型

→3)-β-D-ManNAcA(4OAc)-(1 →3)-α-L-FucNAc(1 →3)-α-D-FucNAc(1 →

多糖は、当業者には周知の方法（例えば、米国特許第6294177号に記載の方法）を用いて、黄色ブドウ球菌の好適な菌株から抽出することができる。例えば、ATCC 12902は５型黄色ブドウ球菌株であり、ATCC 12605は８型黄色ブドウ球菌株である。

【０２０８】

多糖は天然のサイズでもよいし、あるいは、例えば、マイクロ流動体化、超音波照射もしくは化学処理によりサイジングしてもよい。本発明はまた、黄色ブドウ球菌由来の５および８型多糖から誘導したオリゴ多糖も包含する。

【０２０９】

本発明の免疫原性組成物に含有させる５および８型多糖は、好ましくは、後述するように、担体タンパク質と結合させるか、あるいは、結合させない。

【０２１０】

あるいはまた、本発明免疫原性組成物は、５型または８型多糖のいずれかを含有する。

【０２１１】

黄色ブドウ球菌336抗原

一実施形態では、本発明免疫原性組成物は、米国特許第6294177号に記載の黄色ブドウ球菌336抗原を含む。

【０２１２】

336抗原は、β結合ヘキソサミンを含み、Oアセチル基を一切含まず、ATCC 55804で寄託された黄色ブドウ球菌336型に対する抗体に特異的に結合する。

【０２１３】

一実施形態では、336抗原は、天然のサイズの多糖であるか、あるいは、例えば、マイクロ流動体化、超音波照射もしくは化学処理によりサイジングしてもよい。本発明はまた、336抗原から誘導したオリゴ多糖も包含する。

【０２１４】

336抗原は、本発明の免疫原性組成物に含有させる場合、好ましくは、後述するように、担体タンパク質と結合させるか、あるいは、結合させない。

【０２１５】

表皮ブドウ球菌由来のI、IIおよびIII型多糖

表皮ブドウ球菌の菌株ATCC-31432、SE-360およびSE-10は、３つの異なる莢膜タイプ：それぞれI、IIおよびIII型を特徴とする（IchimanおよびYoshida 1981, J. Appl. Bacteriol. 51; 229）。表皮ブドウ球菌の各血清型から抽出した莢膜多糖は、I、IIおよびIII型多糖を形成する。多糖は、いくつかの方法（例えば、米国特許第4197290に記載の方法、またはIchimanら、1991, J. Appl. Bacteriol. 71; 176に記載の方法など）により抽出することができる。

【０２１６】

本発明の一実施形態では、本免疫原性組成物は、表皮ブドウ球菌由来のIおよび／またはIIおよび／またはIII型多糖もしくはオリゴ糖を含む。

【０２１７】

多糖は、天然のサイズの多糖であるか、あるいは、例えば、マイクロ流動体化、超音波照射もしくは化学的切断によりサイジングしてもよい。本発明はまた、表皮ブドウ球菌株から抽出したオリゴ多糖も包含する。

【０２１８】

これらの多糖は、非結合であるか、好ましくは、後述するように結合している。

【０２１９】

多糖の結合

ワクチン接種への多糖の使用に伴う問題として、多糖はそれ自体では不十分な免疫原であることが挙げられる。この免疫原性の不足を解消するために設計されてきた戦略には、バイスタンダー（bystander）Ｔ細胞の助けをもたらす大きなタンパク質担体と多糖を結合させるものがある。本発明で用いる多糖は、バイスタンダーＴ細胞の助けをもたらすタンパク質担体と結合するのが好ましい。多糖免疫原に結合しうるこのような担体の例を以

下に挙げる：ジフテリアおよび破傷風トキソイド（それぞれDT、DT crm197およびTT）、スカシガイヘモシアニン（KLH）、ならびに、ツベルクリン精製タンパク質誘導体（PPD）、緑膿菌エキソプロテインＡ（rEPA）、インフルエンザ菌由来のプロテインＤ、ニューモリシン、もしくはこれらのうちいずれかの断片。用いるのに適した断片として、Ｔヘルパーエピトープを含む断片が挙げられる。特に、プロテインＤ断片は、タンパク質のＮ末端1/3を含んでいるのが好ましい。プロテインＤは、インフルエンザ菌（EP 0 594 610 B1）由来のIgD結合タンパク質であり、有望な免疫原である。

【０２２０】

この他に、ブドウ球菌タンパク質は、本発明の多糖コンジュゲートにおける担体タンパク質として用いてもよい。以下に記載するブドウ球菌タンパク質を担体タンパク質として用いることができる：例えば、ラミン受容体、SitC/MntC/唾液結合タンパク質、EbhA、EbhB、エラスチン結合タンパク質（EbpS）、EFB（FIB）、SBI、ClfA、SdrC、SdrG、SdrH、リパーゼGehD、SasA、FnbA、FnbB、Cna、ClfB、FbpA、Npase、IsaA/PisA、SsaA、EPB、SSP-1、SSP-2、HBP、ビトロネクチン結合タンパク質、フィブリノーゲン結合タンパク質、血液凝固酵素、Fig、MAP、免疫優性ABC輸送体、IsdA、IsdB、Mg2+輸送体、SitC、Ni ABC輸送体、αトキシン（Hla）、αトキシンH35R突然変異体、RNA III活性化タンパク質（RAP）、もしくはこれらの断片。

【０２２１】

ブドウ球菌ワクチンの場合に使用するのに特に有利な新規の担体タンパク質は、ブドウ球菌αトキソイドである。これは、結合の過程で毒性が低減することから、天然形態を多糖と結合させてもよい。残留毒性が低減するため、His35LeuまたはHis35Arg変異体のような遺伝子的に解毒したαトキシンを用いるのが好ましい。あるいは、架橋試薬、ホルムアルデヒドもしくはグルタルアルデヒドでの処理により、αトキシンを化学的に解毒する。随意に、遺伝子的に解毒したαトキシンを、好ましくは、架橋試薬、ホルムアルデヒドもしくはグルタルアルデヒドでの処理により化学的に解毒し、毒性をさらに低減する。

【０２２２】

周知の方法（例えば、Likhiteによる米国特許第4,372,945号、Armorらによる米国特許第4,474,757号、およびJenningsら、米国特許第4,356,170号）のいずれかにより多糖を担体タンパク質に結合させてもよい。好ましくは、CDAP結合化学を実施する（WO 95/08348参照）。

【０２２３】

CDAPでは、シアニル化試薬1-シアノ－ジメチルアミノピリジニウムテトラフルオロボレート（CDAP）を多糖－タンパク質コンジュゲートの合成に用いるのが好ましい。シアニル化反応は、比較的穏やかな条件下でで行なうことができ、これによって、アルカリ感受性多糖の加水分解を阻止する。この合成により、担体タンパク質に直接結合させることができる。

【０２２４】

多糖は水溶液または塩水に可溶性にする。CDAPをアセトニトリルに溶解させ、多糖溶液に直接添加する。CDAPは、多糖のヒドロキシル基と反応して、シアネートエステルを形成する。活性化ステップの後、担体タンパク質を添加する。リシンのアミノ基が活性化多糖と反応して、イソ尿素共有結合を形成する。結合反応後、多量の過剰グリシンを添加することにより、残留活性化官能基をクエンチングする。生成物をゲル透過カラムに通過させ、非反応担体タンパク質と残留試薬を除去する。

【０２２５】

結合は、担体タンパク質と多糖の直接結合を形成するものが好ましい。随意に、担体タンパク質と多糖の間にスペーサー（アジピン酸二水素化物（ADH））を導入してもよい。

【０２２６】

黄色ブドウ球菌および表皮ブドウ球菌からの防御

本発明の好ましい実施形態では、免疫原性組成物は、ブドウ球菌の１以上の菌株、好ましくは、黄色ブドウ球菌および表皮ブドウ球菌の両方に由来する菌株に対して、有効な免

疫応答をもたらす。さらに好ましくは、ブドウ球菌の５型および８型血清型に対し、防御免疫応答を生み出す。さらに好ましくは、表皮ブドウ球菌の複数の菌株、例えば、表皮ブドウ球菌の血清型Ｉ、IIおよびIIIの少なくとも２つの菌株に対し、防御免疫応答を生み出す。

【０２２７】

一実施形態では、本発明の免疫原性組成物の使用は、病院での治療の前に、接種することにより、院内感染を予防することを目的とする。この段階で、どのブドウ球菌株に患者がさらされるかを正確に予測することは難しい。従って、ブドウ球菌の様々な菌株に対して有効な免疫応答を生み出すことができるワクチンを接種するのが有利である。

【０２２８】

有効な免疫応答は、実施例に記載するようなマウスチャレンジモデルまたはオプソニン食作用アッセイにおいて有意な防御をもたらす免疫応答として定義する。マウスチャレンジモデルにおける有意な防御、例えば、実施例５のそれは、担体を接種したマウスと比較して、LD50の少なくとも10％、20％、50％、100％もしくは200％の増加として定義する。コトンラットチャレンジモデルにおける有意な防御、例えば、実施例８のそれは、平均観測LogCFU／鼻の少なくとも10％、20％、50％、70％もしくは90％の低下として定義される。オプソニン作用抗体の存在は、防御と相関することが知られており、従って、有意な防御は、オプソニン食作用アッセイ、例えば、実施例７のアッセイにおいて、細菌数の少なくとも10％、20％、50％、70％もしくは90％の減少により示される。

【０２２９】

免疫優性ABC輸送体、RNA III活性化タンパク質、ラミニン受容体、SitC、IsaA/PisA、SsaA、EbhA/EbhB、EbpSおよびAapは、黄色ブドウ球菌と表皮ブドウ球菌の間で良好に保存され、実施例８から、IsaA、ClfA、IsdB、SdrG、HarA、FnbpAおよびSbiが、交差反応性免疫応答（例えば、少なくとも１つの黄色ブドウ球菌と少なくとも１つの表皮ブドウ球菌株との間の交差反応性）を生み出しうることがわかる。PIAもまた、黄色ブドウ球菌と表皮ブドウ球菌の間で良好に保存され、交差防御免疫応答を誘発することができる。

【０２３０】

従って、好ましい実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、２、３もしくは４の前記タンパク質を含み、好ましくは、さらにPIA（PNAG）を含む。

【０２３１】

ポリヌクレオチドワクチン

別の態様では、本発明は、ブドウ球菌感染の治療、予防もしくは診断における図２のポリヌクレオチドの使用に関する。このようなポリヌクレオチドとしては、図１のアミノ酸配列に対し、配列の全長にわたって、少なくとも70％の同一性、好ましくは少なくとも80％の同一性、さらに好ましくは少なくとも90％の同一性、さらにまた好ましくは少なくとも95％の同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチドが挙げられる。これに関し、少なくとも97％の同一性を有するポリペプチドが非常に好ましいが、少なくとも98～99％の同一性を有するものはさらに好ましく、少なくとも99％の同一性を有するものが最も好ましい。

【０２３２】

本発明において有用な別のポリヌクレオチドとして、本発明のタンパク質をコードするヌクレオチド配列に対し、配列の全長にわたって、少なくとも70％の同一性、好ましくは少なくとも80％の同一性、さらに好ましくは少なくとも90％の同一性、さらにまた好ましくは少なくとも95％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチドが挙げられる。これに関し、少なくとも97％の同一性を有するポリペプチドが非常に好ましいが、少なくとも98～99％の同一性を有するものはさらに好ましく、少なくとも99％の同一性を有するものが最も好ましい。

【０２３３】

その他のポリヌクレオチドとして、図１の配列に対し、少なくとも70％の同一性、好ましくは少なくとも80％の同一性、さらに好ましくは少なくとも90％の同一性、さらにまた

好ましくは少なくとも95％の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチドが挙げられる。これに関し、少なくとも97％の同一性を有するポリペプチドが非常に好ましいが、少なくとも98～99％の同一性を有するものはさらに好ましく、少なくとも99％の同一性を有するものが最も好ましい。上記ポリヌクレオチドは好適なプラスミドまたは組換え微生物ベクターに挿入して、免疫に用いることができる（例えば、Wolffら、Science 247:1465-1468 (1990)；Corrら、J. Exp. Med. 184:1555-1560 (1996)；Doeら、Proc. Natl. Acad. Sci. 93:8578-8583 (1996)参照）。

【０２３４】

本発明は、本発明の前記タンパク質をコードする核酸、ならびに薬剤におけるその使用を提供する。好ましい実施形態では、本発明の単離ポリヌクレオチドは、一本鎖（コードまたはアンチセンス）もしくは二本鎖のいずれでもよく、また、DNA（ゲノム、cDNAもしくは合成）またはRNA分子のいずれでもよい。本発明のポリヌクレオチド内に別のコードまたは非コード配列が存在してもよいが、必ずしも必要ではない。別の関連する実施形態では、本発明は、図２に開示する配列と実質的に同一のポリヌクレオチド変異体を提供するが、該変異体は、本明細書に記載の方法（例えば、標準パラメーターを用いたBLAST分析）を用いて、本発明のポリヌクレオチドと比較して、少なくとも70％の配列同一性、好ましくは少なくとも75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、もしくは99％以上の配列同一性を有する。関連する実施形態では、本発明の単離されたポリヌクレオチドは、図１のアミノ酸配列に対し、図１のアミノ酸配列の全長にわたって、少なくとも90％、好ましくは95％以上の同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；または前記の単離されたポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列を含む。

【０２３５】

本発明はまた、前記ポリヌクレオチドのすべてと相補的なポリヌクレオチドの使用も考慮する。

【０２３６】

本発明はまた、被験者に投与すると、図１のポリヌクレオチドと同じ免疫原性を有する本発明のポリヌクレオチドの断片の使用も提供する。

【０２３７】

本発明は、本明細書ですでに定義した図１のタンパク質の免疫原性断片をコードするポリヌクレオチドの使用も提供する。また、図２に記載したポリヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチド配列の免疫原活性レベルの少なくとも約50％、好ましくは少なくとも約70％、さらに好ましくは少なくとも約90％の免疫原活性レベルを有するこのような断片の使用も考えられる。

【０２３８】

本発明に従い使用するポリペプチド断片は、本明細書に記載のポリペプチド組成物（例えば、前記のもの）の少なくとも約５、10、15、20、25、50もしくは100個以上（その間に含まれる長さをすべて含む）の連続したアミノ酸を含むのが好ましい。

【０２３９】

本発明で用いるポリヌクレオチドは、ヒト発癌前または腫瘍組織（例えば、肺）の細胞におけるmRNA由来のcDNAライブラリーから、標準的クローニングおよびスクリーニング技術を用いて、取得することができる（例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第２版、Cold Spring harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, N.Y. (1989)）。本発明のポリヌクレオチドは、ゲノムDNAライブラリーのような天然の供給源からも得られ、あるいは、周知で、かつ商業的に入手可能な技術を用いて、合成することもできる。

【０２４０】

全長cDNAを取得する、または短いcDNAを伸長するために利用可能で、かつ当業者には周知のいくつかの方法、例えば、cDNA末端の迅速増幅（RACE）方法に基づく方法がある（例えば、Frohmanら、PNAS USA 85, 8998-9002, 1988参照）。例えば、Marathon（商標）技術（Clontech Laboratories Inc.）など、近年の技術の改良により、さらに長いcDNAの検

索が有意に単純化された。Marathon（商標）技術では、選択した組織から抽出し、その両端に「アダプター」配列を結合したmRNAからcDNAが作製されている。次に、核酸増幅（PCR）を実施して、遺伝子特異的およびアダプター特異的オリゴヌクレオチドプライマーの組合せを用いて、cDNAの「ミッシング（missing）」5’末端を増幅する。次に、「ネスティッド（nested）」プライマー、すなわち、増幅した産物内でアニーリングするよう設計されたプライマー（典型的には、アダプター配列において別の3’をアニーリングするアダプター特異的プライマー、および既知遺伝子配列において別の5’をアニーリングする遺伝子特異的プライマー）を用いてPCR反応を繰り返す。次に、この反応の産物をDNA配列決定により分析し、既存のcDNAに該産物を直接結合して完全な配列を取得するか、あるいは、5’プライマー設計のための新しい配列情報を用いて、個別の全長PCRを実施するかのいずれかにより、全長cDNAを構築する。

【０２４１】

このようなDNAを含むベクター、これにより形質転換した宿主、ならびに、後述のように発現させた末端切断型タンパク質またはハイブリッドタンパク質そのものは、すべて本発明の範囲に含まれる。

【０２４２】

発現系は、生きた組換え微生物、例えば、ウイルスまたは細菌でもよい。目的の遺伝子を生きた組換えウイルスまたは細菌のゲノムに挿入することができる。この生きたベクターを用いた接種およびin vivo感染により、抗原のin vivo発現および免疫応答の誘発が起こる。

【０２４３】

従って、特定の実施形態では、多数の周知のウイルスベースの系のいずれかを用いて、本発明に従い使用する免疫原性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、発現のための好適な哺乳動物宿主細胞に導入する。例えば、一実施形態では、レトロウイルスは、遺伝子送達系のために好都合かつ有効なプラットフォームを提供する。本発明で使用するのに選択した、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列をベクターに挿入し、当分野で周知の技術を用いて、レトロウイルス粒子にパッケージングすることができる。次に、組換えウイルスを単離し、被験者に送達する。多数のレトロウイルス系の例が記載されている（例えば、米国特許第5,219,740号；MillerおよびRosman (1989) BioTechniques 7:980-990；Miller, A. D. (1990) Human Gene Therapy 1:5-14；Scarpaら、(1991) Virology 180:849-852；Burnsら、(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-8037；ならびに、 Boris-LawrieおよびTemin (1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109）。

【０２４４】

加えて、多数のアデノウイルスベースの系の例も記載されている。宿主ゲノムに組み込むレトロウイルスとは違い、アデノウイルスは、染色体外で生存し続けるため、挿入突然変異誘発に伴う危険性が最小限に抑えられる（Haj-AhmadおよびGraham (1986) J. Virol. 57:267-274；Bettら、(1993) J. Virol. 67:5911-5921；Mitterederら、(1994) Human Gene Therapy 5:717-729；Sethら、(1994) J. Virol. 68:933-940；Barrら、(1994) Gene Therapy 1:51-58；Berkner, K. L. (1988) BioTechniques 6:616-629；およびRichら、(1993) Human Gene Therapy 4:461-476）。

【０２４５】

多様なアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター系も、ポリヌクレオチド送達のために作製されている。AAVベクターは、当業者には周知の技術を用いて、容易に構築することができる。例えば、以下の文献を参照されたい：米国特許第5,173,414号および第5,139,941号；国際公開番号WO 92/01070およびWO 93/03769；Lebkowskiら、(1988) Molec. Cell. Biol. 8:3988-3996；Vincentら、(1990) Vaccines 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press)；Carter, B. J. (1992) Current Opinion in Biotechnology 3:533-539；Muzyczka, N. (1992) Current Topics in Microbiol. and Immunol. 158:97-129；Kotin, R. M. (1994) Human Gene Therapy 5:793-801；ShellingおよびSmith (1994) Gene Therapy 1:165-169；ならびにZhouら、(1994) J. Exp. Med. 179:1867-1875。

【０２４６】
遺伝子伝達により、本発明で用いるポリペプチドをコードする核酸分子を送達するのに有用な別のウイルスベクターとして、ポックスファミリーのウイルス、例えば、ワクシニアウイルスおよびトリポックスウイルス由来のものが挙げられる。例として、目的の分子を発現するワクシニアウイルス組換え体を次のように構築することができる。最初に、ポリペプチドをコードするDNAを好適なベクターに挿入することにより、これが、ワクシニアプロモーターとフランキングワクシニアDNA配列（例えば、チミジンキナーゼ（TK）をコードする配列）に隣接するようにする。次に、このベクターを用いて、細胞をトランスフェクションすると同時に、これら細胞をワクシニアに感染させる。相同組換えを用いて、ワクシニアプロモーターに加え、目的のポリペプチドをコードする遺伝子をウイルスゲノムに挿入する。5-ブロモデオキシウリジンの存在下で細胞を培養し、これに耐性のウイルスプラークを採取することにより、得られたTK.sup.(-)組換え体を選択することができる。

【０２４７】
生物の宿主細胞において、本明細書に記載する１以上のポリペプチドの誘導性、一過性発現または共発現を達成するために、ワクシニアを用いた感染／トランスフェクション系を用いるのが好都合である。この具体的系では、最初に、バクテリオファージT7 RNAポリメラーゼをコードするワクシニアウイルス組換え体に細胞をin vitroで感染させる。このポリメラーゼは、T7プロモーターを有する鋳型しか転写しないという鋭敏な特異性を示す。感染後、T7プロモーターにより駆動した目的の（単数または複数の）ポリヌクレオチドで細胞をトランスフェクションする。ワクシニアウイルス組換え体由来の細胞質に発現したポリメラーゼは、トランスフェクションしたDNAをRNAに転写するが、これは次に、宿主の翻訳機構によりポリペプチドに翻訳される。この方法は、大量のRNAの高レベルな一過性細胞質生産と、その翻訳産物をもたらす。例えば、Elroy-SteinおよびMoss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:6743-6747；Fuerstら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83:8122-8126を参照のこと。

【０２４８】
あるいは、アビポックスウイルス（例えば、鶏痘およびカナリアポックスウイルスなど）を用いて、目的のコード配列を送達することもできる。哺乳動物病原体由来の免疫原を発現する組換えアビポックスウイルスは、非トリ種に投与すると、防御免疫を賦与することが知られている。アビポックス属は、感受性の高いトリ種でしか生産的に複製することができず、従って、哺乳動物細胞には感染性でないため、アビポックスベクターの使用はヒトおよびその他の哺乳動物種において特に望ましい。組換えアビポックスウイルスを作製する方法は、当分野では周知であり、ワクシニアウイルスの作製に関しては、前述のように、遺伝子組換えを用いる。例えば、WO 91/12882；WO 89/03429；およびWO 92/03545を参照。

【０２４９】
また、多数のアルファウイルスベクターのいずれかを用いて、本発明で用いるポリヌクレオチド組成物を送達することができ、このようなベクターは例えば、米国特許第5,843,723号；第6,015,686号；第6,008,035号および第6,015,694号に記載されている。ベネズエラウマ脳炎（VEE）に基づく特定のベクターも用いることができ、それらの例は米国特許第5,505,947号および第5,643,576号に記載されている。

【０２５０】
さらに、分子コンジュゲートベクター、例えば、Michaelら、J. Biol. Chem. (1993) 268:6866-6869およびWagnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:6099-6103に記載したアデノウイルスキメラベクターを、本発明に従う遺伝子送達に用いることもできる。

【０２５１】
これ以外にも、前記およびその他の周知のウイルスを用いた送達系について実例を示す情報は、例えば、以下の文献にみいだすことができる：Fisher-Hochら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:317-321, 1989；Flexnerら、Ann. N.Y. Acad. Sci. 569:86-103, 1989；

Flexnerら、Vaccine 8:17-21, 1990；米国特許第4,603,112号、第4,769,330号および第5,017,487号；WO 89/01973；米国特許第4,777,127号；GB 2,200,651；欧州特許第0,345,242号；WO 91/02805；Berkner, Biotechniques 6:616-627, 1988；Rosenfeldら、Science 252:431-434, 1991；Kollsら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:215-219, 1994；Kass-Eislerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11498-11502, 1993；Guzmanら、Circulation 88:2838-2848, 1993；ならびにGuzmanら、Cir. Res. 73:1202-1207, 1993。

【０２５２】

前述の生きた組換え微生物は毒性でもよいし、あるいは、生ワクチンにするために様々な方法で弱毒化してもよい。このような生ワクチンも本発明の範囲に含まれる。

【０２５３】

特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、標的細胞のゲノムに組み込むことができる。この組込みは、相同性組換え（遺伝子置換）を介した特定の位置および配向で行なっても、あるいは、ランダムな非特定位置（遺伝子添加）に組み込んでもよい。さらに別の実施形態では、ポリヌクレオチドは、DNAの個別のエピソームセグメントとして、細胞中に安定して維持することができる。このようなポリヌクレオチドセグメント、すなわち、「エピソーム」は、宿主細胞周期とは独立に、またはこれと同期して、維持および複製を可能にするのに十分な配列をコードする。発現構築物を細胞に送達し、細胞中にポリヌクレオチドを維持する様式は、用いた発現構築物の種類によって変わる。

【０２５４】

本発明の別の実施形態では、ポリヌクレオチドを「ネイキッド」DNAとして投与／送達するが、これは、例えば、Ulmerら、Science 259:1745-1749, 1993に記載され、Cohen, Science 259:1691-1692, 1993により総説されている。ネイキッドDNAの取込みは、生物分解性ビーズにDNAをコーティングすることにより増加することができ、細胞に該ビーズを効率的に輸送する。

【０２５５】

別の実施形態では、本発明の組成物をパーティクルボンバードメント手法により送達するが、これらの多くは記載されている。一実施例では、ガス駆動粒子加速を、装置（例えば、Powderject Pharmaceuticals PLC（英国オックスフォード）およびPowderject Vaccines Inc.（ウィスコンシン州マディソン）製装置）で達成するが、そのいくつかの例が以下の文献に記載されている：米国特許第5,843,796号；第6,010,487号；第5,865,796号；第5,584,807号；および欧州特許第0500 799号。この手法は、針のない送達手法を提供し、その際、手で保持した装置により生成されるヘリウムガスジェット内で、顕微鏡的粒子（例えば、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド粒子）の乾燥粉末製剤を高速まで加速し、粒子を目的の標的組織中に噴射する。

【０２５６】

関連する実施形態では、本発明の組成物のガス駆動針なし注射に有用なその他の装置および方法として、Bioject, Inc.（オレゴン州ポートランド）により提供されるものが挙げられ、その例が、米国特許第4,790,824号；第5,064,413号；第5,312,335号；第5,383,851号；第5,399,163号；第5,520,639号および第5,993,412号に記載されている。

【０２５７】

ワクチン

好ましい実施形態では、本発明の免疫原性組成物を、薬学的に許容される賦形剤、さらに好ましくはアジュバントと混合することにより、ワクチンを形成する。

【０２５８】

本発明のワクチンにアジュバントを添加するのが好ましい。好適なアジュバントとして、アルミニウム塩、例えば、水酸化アルミニウムゲル（ミョウバン）またはリン酸アルミニウムが挙げられるが、カルシウム、マグネシウム、鉄もしくは亜鉛の塩でもよく、あるいは、アシル化チロシン、アシル化糖、カチオン性もしくはアニオン性に誘導体化した多糖またはポリホスホスファゼンの不溶性懸濁液でもよい。

【０２５９】

TH1またはTH2型応答のいずれかの優先的誘発物質となるようなアジュバントを選択するのが好ましい。高レベルのTh1型サイトカインは、所与の抗原に対する細胞性免疫応答の誘発を助ける傾向があるのに対し、高レベルのTh2型サイトカインは、該抗原に対する体液性免疫応答の誘発を助ける傾向がある。

【０２６０】

Th1およびTh2型免疫応答の区別は絶対的ではないことに留意する必要がある。実際には、個体は、主にTh1または主にTh2として表示される免疫応答を支持する。しかし、多くの場合、MosmannおよびCoffmanによりマウスCD4 +veＴ細胞クローンに記載されている（Mosmann, T.R.およびCoffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, p145-173）ような表現でサイトカインのファミリーを考えるのが好都合である。伝統的には、Th1-型応答は、T-リンパ球によるINF-γおよびIL-2サイトカインの生産と関連している。Th1-型免疫応答の誘発に直接関連することが多いその他のサイトカインは、Ｔ細胞（例えば、IL-12）により生産されない。対照的に、Th2型応答は、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10の分泌に関連する。主にTh1型応答を促進する好適なアジュバント系を以下に挙げる：モノホスホリルリピドＡまたはその誘導体、具体的には3-デ-O-アシル化モノホスホリルリピドＡ（3D-MPL）（その調製については、GB2220211 Aを参照）；ならびに、モノホスホリルリピドＡ、好ましくは、アルミニウム塩（例えば、リン酸アルミニウムまたは水酸化アルミニウム）もしくは水中油型エマルションのいずれかと、3-デ-O-アシル化モノホスホリルリピドＡとの組合せ。このような組合せの場合、同じ粒状構造に抗原と3D-MPLを含有させることにより、抗原および免疫刺激シグナルのさらに効率的な送達が可能になる。様々な研究から、3D-MPLはミョウバン吸着抗原の免疫原性をさらに増強できることが明らかにされた［Thoelenら、Vaccine (1998) 16:708-14; EP 689454-B1］。

【０２６１】

増強された系には、モノホスホリルリピドＡとサポニンの組合せ、特に、WO 94/00153に開示されているようなQS21と3D-MPLの組合せ、もしくは、WO 96/33739に開示されているように、QS21をコレステロールでクエンチングする低反応原性（less reactogenic）組成物が含まれる。水中油型エマルションにQS21、3D-MPLおよびトコフェロールを含む特に効力の高いアジュバントがWO 95/17210に記載されており、これは好ましい製剤である。好ましくは、前記に加え、ワクチンはサポニン、さらに好ましくはQS21を含む。製剤は、さらに水中油型エマルションとトコフェロール（WO 95/17210）を含んでもよい。本発明は、薬学的に許容される賦形剤、例えば、3D-MPLと一緒に本発明のタンパク質を混合することを含む、ワクチン製剤の製造方法も提供する。非メチル化CpG含有オリゴヌクレオチド（WO 96/02555）もまたTH1応答の好ましい誘導物質であり、本発明における使用に適している。

【０２６２】

本発明の好ましい組成物は、リポソーム構造を形成する組成物である。ステロール／免疫学的には活性のサポニン画分がISCOM構造を形成する組成物も本発明の一形態をなす。

【０２６３】

QS21：ステロールの比は、典型的におよそ１：100～１：１重量/重量(w/w)である。好ましくは、過剰ステロールが存在し、QS21：ステロールの比は、少なくとも１：２w/wである。ヒトへの投与のために、典型的には、QS21とステロールは、１用量当たり約１μg～約100μg、好ましくは約10μg～約50μgの範囲でワクチンに存在する。

【０２６４】

リポソームは、好ましくは、中性脂質、例えば、ホスファチジルコリンを含み、これは、室温で非晶質であるのが好ましく、例えば、卵黄ホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリンもしくはジラウリルホスファチジルコリンである。リポロームはまた、飽和脂質からなるリポソームのリポソーム－QS21構造の安定性を高める荷電脂質を含んでもよい。これらのケースでは、荷電脂質の量は好ましくは１～20%w/w、最も好ましくは５～10%である。ステロールとリン脂質の比は１～50%（モル／モル）、最も好まし

くは20～25％である。

【０２６５】

好ましくは、本発明の組成物は、MPL（3-脱アシル化モノ-ホスホリルリピドＡ、3D-MPLとしても知られる）を含む。3D-MPLは、３種類の脱-O-アシル化モノホスホリルリピドAと４、５もしくは６のアシル化鎖との混合物としてGB 2 220 211（Ribi）から知られ、Ribi Immunochem（モンタナ州）により製造される。好ましい形態は、国際公開出願番号92/116556に開示されている。

【０２６６】

本発明の好適な組成物は、初めに、MPLなしでリポソームを調製し、次に、好ましくは100 nm粒子としてMPLを添加する。従って、MPLは小胞膜内に含まれない（MPLアウトとして知られる）。MPLが小胞膜内に含まれる（MPLインとして知られる）組成物も本発明の一形態をなす。抗原は、小胞膜内または小胞膜外のいずれに含有させてもよい。可溶性抗原は膜外にあるのが好ましく、また、疎水性もしくは脂質化抗原は膜内または外のいずれに含有させてもよい。

【０２６７】

本発明のワクチン製剤を用いて、全身または粘膜経路を介した該ワクチンの投与により、感染しやすい哺乳動物を防御または治療することができる。このような投与としては、筋内、腹腔内、皮内もしくは皮下経路；または、口内／消化管、気道、尿生殖管への粘膜投与が挙げられる。肺炎または耳炎媒体の治療のためにはワクチンの鼻内投与が好ましい（肺炎球菌の鼻咽頭保有は、より有効に予防することができ、従って、早期段階で感染を軽減するため）。本発明のワクチンは単一用量として投与することもできるが、その成分を同時に、または時間を変えて共投与してもよい（例えば、免疫応答相互の最適な協調を達成するために、肺炎球菌多糖は、ワクチンの細菌タンパク質成分の投与と同時に、またはその１～２週間後、別々に投与することができる）。共投与のために、任意のTh1アジュバントを様々な投与形態の一部または全部に存在させてもよいが、これは、ワクチンの細菌タンパク質成分と組み合わせて含有する場合に好ましい。単一の投与経路以外にも、２つの異なる投与経路を用いてもよい。例えば、多糖をIM（またはID）投与し、細菌タンパク質をIN（またはID）投与することができる。さらには、本発明のワクチンを初回免疫ではIM投与し、追加免疫ではIN投与することも可能である。

【０２６８】

各ワクチン用量におけるコンジュゲート抗原の量は、典型的なワクチンにおいて有意な有害副作用を起こさずに、免疫防御性応答を誘発する量として選択する。このような量は、どの具体的免疫原を用いたか、またどのようにそれが提示されるかに応じて変動する。一般に、各用量は、0.1～100μgの多糖、好ましくは0.1～50μgの多糖コンジュゲート、好ましくは0.1～10μg、さらに好ましくは１～10μgの多糖を含み、中でも１～５μgがさらに好ましい範囲である。

【０２６９】

タンパク質抗原の含量は、典型的には１～100μg、好ましくは５～50μg、最も典型的には５～25μgの範囲にある。最初のワクチン接種後、適切な間隔をおいて、１または複数回の追加免疫を被験者に実施してもよい。

【０２７０】

ワクチン製剤は、Vaccine Design（“The subunit and adjuvant approach”(Powell M.F.およびNewman M.J.編)(1995 Plenum Press New York)に概要が記載されている。リポソーム内への包膜はFullertonにより、米国特許第4,235,877号に記載されている。

【０２７１】

本発明のワクチンは溶液として、または凍結乾燥させて保存することができる。好ましくは、スクロース、トレハロースもしくはラクトースのような糖の存在下で溶液を凍結乾燥する。さらには、凍結乾燥し、使用前に即座に再構成するのが好ましい。凍結乾燥によって、さらに安定した組成物（ワクチン）が得られ、3D-MPLの存在下で、しかもアルミニウム主体のアジュバントの非存在下で、より高い抗体力価を達成できると考えられる。

【０２７２】
抗体および受動免疫
本発明の別の態様は、本発明のワクチンで受容者を免疫し、該受容者から免疫グロブリンを単離する各ステップを含む、ブドウ球菌感染の予防または治療に用いるための免疫グロブリンの調製方法である。この方法により調製した免疫グロブリンもまた本発明の別の態様である。本発明の免疫グロブリンと薬学的に許容される担体を含む医薬組成物は、ブドウ球菌疾患の治療または予防のための薬剤の製造に用いることができる本発明の別の態様である。有効な量の本発明の医薬調製物を患者に投与するステップを含む、ブドウ球菌感染の治療または予防方法も、本発明の別の態様である。
【０２７３】
ポリクローナル抗体生産のための接種物は、典型的に、生理学的に許容される希釈液（例えば、塩水）、またはヒトへの使用に適したその他のアジュバントに抗原性組成物を分散させて、水性組成物を形成することにより調製する。免疫刺激量の接種物を哺乳動物に投与した後、抗原性組成物が防御抗体を誘発するのに十分な時間、接種した哺乳動物を維持する。
【０２７４】
周知の技術（例えば、アフィニティークロマトグラフィー）により所望の程度まで抗体を単離することができる（HarlowおよびLane, Antibodies; a laboratory manual 1988）。
【０２７５】
抗体としては、通常用いられる多種の動物、例えば、ヤギ、霊長類、ロバ、白鳥、ウマ、モルモット、ラットもしくはヒトに由来する抗血清製剤が挙げられる。動物から採血し、血清を回収する。
【０２７６】
本発明に従い生産される免疫グロブリンとしては、全抗体、抗体フラグメントもしくはサブフラグメントが挙げられる。抗体は、あらゆるクラス、例えば、IgG、IgM、IgA、IgDもしくはIgEの全免疫グロブリン、キメラ抗体、もしくは本発明の２以上の抗原に対し二重特異性を有するハイブリッド抗体でよい。これらはまた、フラグメント、例えば、F(ab’)2、Fab’、Fab、Fvなど（ハイブリッドフラグメントを含む）でもよい。また、免疫グロブリンには、特定の抗原に結合して、複合体を形成することにより、抗体のように作用する天然、合成もしくは遺伝子工学により作製したタンパク質も含まれる。
【０２７７】
本発明のワクチンを受容者に投与することもでき、この後、該受容者は、具体的ワクチンからのチャレンジに応答して産生される免疫グロブリンの供給源としての役割を果たす。このような処理を受けた被験者が血漿を供与し、この血漿から、通常の血漿分画方法によって超免疫グロブリンが得られる。ブドウ球菌感染に対する耐性を賦与するか、またはそのような感染を治療するために、上記超免疫グロブリンを別の被験者に投与する。本発明の免疫グロブリンは、特に、小児、免疫弱体化個体の治療または予防、あるいは治療が必要な場合および個体がワクチン接種に応答して抗体を産生する時間がない場合に有用である。
【０２７８】
本発明の別の形態は、本発明の免疫原性組成物の少なくとも２つの成分に対して反応性の２以上のモノクローナル抗体（もしくはそのフラグメント；好ましくは、ヒトまたはヒト化）を含む医薬組成物であり、これを用いて、グラム陽性菌、好ましくは、ブドウ球菌、さらに好ましくは黄色ブドウ球菌または表皮ブドウ球菌の感染を治療または予防することができる。
【０２７９】
このような医薬組成物はモノクローナル抗体を含み、該モノクローナル抗体は、本発明の２以上の抗原に対し特異性を有する、あらゆるクラス（例えば、IgG、IgM、IgDもしくはIgE）の全免疫グロブリン、キメラ抗体もしくはハイブリッド抗体でよい。これらはま

た、フラグメント、例えば、F(ab’)2、Fab’、Fab、Fvなど（ハイブリッドフラグメントを含む）でもよい。

【０２８０】

モノクローナル抗体を製造する方法は当分野では周知であり、骨髄腫細胞と脾細胞の融合物を含む（KohlerおよびMilstein 1975 Nature 256; 495; Antibodies - a laboratory manual Harlow and Lane 1988）。あるいは、モノクローナルFvフラグメントは、好適なファージ展示ライブラリーをスクリーニングすることにより得られる（Vaughan TJら、1998 Nature Biotechnology 16; 535）。モノクローナル抗体は、周知の方法によりヒト化または一部をヒト化することができる。

【０２８１】

方法

本発明は、本発明の免疫原性組成物およびワクチンを製造する方法も包含する。

【０２８２】

本発明の好ましい方法は、抗原を混合して、本発明の免疫原性組成物を製造し、薬学的に許容される賦形剤を添加する各ステップを含む、ワクチンの製造方法である。

【０２８３】

治療方法

本発明はまた、ブドウ球菌感染、特に、病院で獲得する院内感染の治療方法も包含する。

【０２８４】

本発明の免疫原性組成物またはワクチンは、選択的外科手術の患者に用いるのが特に有利である。このような患者は、手術日を事前に知っているため、前もって接種することができる。黄色ブドウ球菌または表皮ブドウ球菌感染に患者が暴露されるかどうかはわからないため、前述したように、両方を防御する本発明のワクチンを接種するのが好ましい。好ましくは、選択的外科手術を待機中の16歳以上の成人を本発明の免疫原性組成物およびワクチンで治療する。

【０２８５】

本発明のワクチンで保健機関職員を接種するのも有利である。

【０２８６】

本発明のワクチン製剤を用いて、全身または粘膜経路から上記ワクチンを投与することにより、感染しやすい哺乳動物を防御または治療することができる。このような投与として、筋内、腹腔内、皮内もしくは皮下経路；または、口内／消化管、気道、尿生殖管への粘膜投与が挙げられる。

【０２８７】

各ワクチン用量における抗原の量は、典型的なワクチンにおいて有意な有害副作用を起こすことなく、免疫防御性応答を誘発する量として選択する。このような量は、どの具体的免疫原を用いたか、またどのようにそれが提示されるかに応じて変動する。ワクチンのタンパク質含量は、典型的には１～100μg、好ましくは５～50μg、最も典型的には10～25μgの範囲にある。一般に、各用量は、0.1～100μgの多糖（存在する場合には）、好ましくは0.1～50μgの多糖、好ましくは0.1～10μgの多糖を含み、中でも１～５μgが最も好ましい範囲である。具体的ワクチンについての最適量は、被験者における適切な免疫応答の観察を含む標準的試験により確認することができる。最初のワクチン接種後、適切な間隔をおいて、１または数回の追加免疫を被験者に実施することができる。

【０２８８】

本発明のワクチンはあらゆる経路により投与することができるが、皮膚内（ID）への前記ワクチンの投与は、本発明の一実施形態を形成する。ヒトの皮膚は、角質層と呼ばれる、外側の「角質」表皮を含み、これは表皮を覆っている。この表皮の下に、真皮と呼ばれる層があり、この層は皮下組織を覆っている。研究者らは、皮膚、特に真皮にワクチンを注射すると、免疫応答を刺激することを明らかにしたが、これも多くのさらなる利点を伴うと考えられる。本明細書に記載するワクチンの皮内接種は、本発明の好ましい形態であ

る。

【０２８９】

皮内注射の通常の方法、すなわち、「マントウー法」は、皮膚を清浄した後、一方の手で引き伸ばし、狭いゲージ針（26～31ゲージ）の斜端を上方に向け、10～15°の角度で針を挿入する。針の斜端を挿入したら、針の軸を下げ、わずかに圧力を加えながらさらに進め、皮膚の下で持ち上げる。次に、極めてゆっくりと液体を挿入することにより、皮膚表面に水泡または隆起を形成した後、針をゆっくりと引き抜く。

【０２９０】

さらに近年になり、皮膚内または皮膚を介した液体薬剤投与のために専用に設計された装置が記載されており、例えば、WO 99/34850および欧州特許第1092444に記載されている装置、また、例えば、以下の文献に記載のジェット式注射装置が挙げられる： WO 01/13977；米国特許第5,480,381号、米国特許第5,599,302号、米国特許第5,334,144号、米国特許第5,993,412号、米国特許第5,649,912号、米国特許第5,569,189号、米国特許第5,704,911号、米国特許第5,383,851号、米国特許第5,893,397号、米国特許第5,466,220号、米国特許第5,339,163号、米国特許第5,312,335号、米国特許第5,503,627号、米国特許第5,064,413号、米国特許第5,520,639号、米国特許第4,596,556号、米国特許第4,790,824号、米国特許第4,941,880号、米国特許第4,940,460号、WO 97/37705およびWO 97/13537。ワクチン製剤の皮内投与の別の方法として、従来の注射器と針、固体ワクチンのバリスチックデリバリー（ballistic delivery）のために設計された装置（WO 99/27961）、または経皮パッチ（WO 97/48440；WO 98/28037）；もしくは、皮膚の表面に適用するもの（経皮送達：WO 98/20734；WO 98/28037）。

【０２９１】

本発明のワクチンを皮膚、あるいはさらに具体的には真皮に投与する場合には、ワクチンは低液量、具体的には、約0.05 ml～0.2 mlの量である。

【０２９２】

本発明の皮膚または皮内ワクチンにおける抗原の含量は、筋内ワクチンに存在する通常の用量（前記参照）と同様でよい。しかし、製剤が「低用量」であることが皮膚または皮内ワクチンの特徴である。従って、「低用量」ワクチンにおけるタンパク質抗原は、１用量当たり0.1～10μg、好ましくは0.1～５μgほどの少量存在するのが好ましく；多糖（好ましくは結合した）抗原は、１用量当たりの多糖が0.01～１μg、好ましくは0.01～0.5μgの範囲で存在しうる。

【０２９３】

本明細書で用いる用語「皮内送達」とは、皮膚における真皮の領域にワクチンを送達することを意味する。しかし、ワクチンは、必ずしも真皮だけに位置させるわけではない。真皮は、ヒトの皮膚表面から約1.0～約2.0 mmの間に位置する皮膚であるが、個体間や、身体の各部でいくらか差がある。一般に、皮膚の表面から1.5 mm下に進めば真皮に到達すると考えられる。真皮は、表面の角質層および表皮と、下方の皮下層との間に位置する。送達方法に応じて、ワクチンは最終的に真皮内だけ、または主に真皮内に位置させることもあり、あるいは、最終的に表皮および真皮内に分布させることもある。

【０２９４】

本発明の好ましい実施形態は、ブドウ球菌感染または疾患を予防または治療する方法であって、本発明の免疫原性組成物またはワクチンを、それが必要な患者に投与するステップを含む、上記方法である。

【０２９５】

好ましい実施形態では、患者は選択的手術を待機中である。

【０２９６】

本発明の別の好ましい実施形態は、ブドウ球菌感染または疾患、好ましくは手術後のブドウ球菌感染を治療または予防するためのワクチンの製造に本発明の免疫原性組成物を用いることである。

【０２９７】

用語「ブドウ球菌感染」は、哺乳動物、好ましくはヒト宿主に感染を引き起こすことができる黄色ブドウ球菌および／または表皮ブドウ球菌ならびにその他のブドウ球菌株により引き起こされる感染を包含する。

【０２９８】

本明細書の用語「含んでなる」、「含む」は、本発明者らによれば、すべてのケースで、それぞれ「～から構成された」、「～からなる」で随意に言い換えることができるものとする。

【０２９９】

本明細書に引用する参照文献および特許出願はすべて、本明細書に参照として組み込むものとする。

【０３００】

本発明がさらによく理解されるように、以下に実施例を記載する。これらの実施例は、説明を目的にするにすぎず、いかなる意味でも本発明の範囲を限定するものとして解釈すべきではない。

【実施例】

【０３０１】

実施例１：組換えタンパク質を発現させるためのプラスミドの構築

Ａ：クローニング

ブドウ球菌遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチドに作製した適切な制限部位により、大腸菌発現プラスミドpET24dまたはpQE-30にPCR産物の定方向クローニングを可能にし、これによって、タンパク質が、ＮまたはＣ末端で(His)6アフィニティークロマトグラフィータグを含む融合タンパク質として発現できるようにする。

【０３０２】

用いたプライマーは以下の通りであった：

αトキシン － 5’-CGCGGATCCGCAGATTCTGATATTAATATTAAAAC-3’および5’CCCAAGCTTTTAATTTGTCATTTCTTCTTTTTC-3’

EbpS - 5’-CGCGGATCCGCTGGGTCTAATAATTTTAAAGATG-3’および5’CCCAAGCTTTTATGGAATAACGATTTGTTG-3’

ClfA - 5’-CGCGGATCCAGTGAAAATAGTGTTACGCAATC-3および5’CCCAAGCTTTTACTCTGGAATTGGTTCAATTTC-3’

FnbpA - 5’-CGCGGATCCACACAAACAACTGCAACTAACG-3’および5’CCCAAGCTTTTATGCTTTGTGATTCTTTTTCAAAC3’

Sbi - 5’-CGCGGATCCAACACGCAACAAACTTC-3および5’GGAACTGCAGTTATTTCCAGAATGATAATAAATTAC-3’

SdrC - 5’-CGCGGATCCGCAGAACATACGAATGGAG-3’および5’CCCAAGCTTTTATGTTTCTTCTTCGTAGTAGC-3’

SdrG - 5’-CGCGGATCCGAGGAGAATTCAGTACAAG-3’および5’CCCAAGCTTTTATTCGTCATCATAGTATCCG-3’

Ebh - 5’-AAAAGTACTCACCACCACCACCACC-3’および5’AAAAGTACTCACTTGATTCATCGCTTCAG-3’

Aaa - 5’-GCGCGCCATGGCACAAGCTTCTACACAACATAC-3’および5’GCGCGCTCGAGATGGATGAATGCATAGCTAGA-3’

IsaA - 5’-GCATCCATGGCACCATCACCATCACCACGAAGTAAACGTTGATCAAGC-3’および5’-AGCACTCGAGTTAGAATCCCCAAGCACCTAAACC-3’

HarA - 5’-GCACCCATGGCAGAAAATACAAATACTTC-3’および5’TTTTCTCGAGCATTTTAGATTGACTAAGTTG-3’

自己溶解素グルコサミニダーゼ- 5’-CAAGTCCCATGGCTGAGACGACACAAGATCAAC-3’および5’-CAGTCTCGAGTTTTACAGCTGTTTTTGGTTG-3’

自己溶解素アミダーゼ- 5’-AGCTCATATGGCTTATACTGTTACTAAACC-3’および5’GCGCCTCGAGTTTATATTGTGGGATGTCG-3’

IsdA - 5’-CAAGTCCCATGGCAACAGAAGCTACGAACGCAAC-3’および5’ACCAGTCTCGAGTAATTCTTTAGCTTTAGAGCTTG-3’
IsdB - 5’-TATTCTCGAGGCTTTGAGTGTGTCCATCATTTG-3’および5’ GAAGCCATGGCAGCAGCTGAAGAAACAGGTGG-3’
MRPII - 5’-GATTACACCATGGTTAAACCTCAAGCGAAA-3’および5’AGGTGTCTCGAGTGCGATTGTAGCTTCATT-3’

最初に、製造者の指示に従い、上位10の細菌細胞を用いて、pGEM-Tクローニングベクター（Novagen）にPCR産物を導入した。この中間構築物を用いて、発現ベクターへのクローニングを促進させた。DNA挿入片を含む形質転換体を制限酵素分析により選択した。消化後、アガロースゲル電気泳動（トリス－酢酸－EDTA（TAE）バッファー中の0.8％アガロース）により反応物の約20μlアリコートを分析した。ゲル電気泳動および臭化エチジウム染色後、UV照射によりDNA断片を視覚化した。試験サンプルと平行して、DNA分子サイズ標準体（１kbラダー、Life Technologies）を電気泳動させ、これを用いて、DNA断片のサイズを推定する。次に、各クローニングについて選択した形質転換体から精製したプラスミドを、製造者（Life Technologies）の推奨する好適な制限酵素で完了まで連続的に消化した。消化したDNA断片を、シリカゲルを用いたスピンカラムにより精製した後、pET24dまたはpQE-30プラスミドと結合させる。pET24dプラスミド を用いて、Ebh（H2断片）、AaA、IsdA、IsdB、HarA、Atl-アミダーゼ、Atl-グルコサミン、MRP、IsaAのクローニングを、またpQE-30プラスミドを用いて、ClfA、SdrC、SdrE、FnbpA、SdrG/Fbe、αトキシンおよびSbiのクローニングをそれぞれ実施した。

【０３０３】

Ｂ：発現ベクターの作製

結合のための発現プラスミドpET24dまたはpQE-30を調製するために、適切な制限酵素で、完了までこれを消化した。調製したベクターの約５倍モル過剰量の消化断片を用いて、結合反応をプログラムした。当分野で周知の方法により、T4 DNAリガーゼ（約2.0単位／反応、Life Technologies）を用いて、標準的約20μl結合反応（約16℃、約16時間）を実施した。結合物のアリコート（約５μl）を用いて、M15（pREP4）またはBT21::DE3エレクトロ－コンピテント細胞を形質転換した。約1.0 mlのLBブロスにおいて37℃で約２～３時間成長させた後、形質転換細胞を、アンピシリン（100μg／ml）および／またはカナマイシン（30μg／ml）含有のLB寒天プレートで平板培養した。

【０３０４】

抗生物質を選択（selection）に加えた。プレートを37℃で一晩~16時間インキュベートした。個々のApR/KanRコロニーを滅菌楊枝で採取し、新鮮なLB ApR/KanRプレート、ならびに~10 ml LB Ap/Kanブロス培養物を「パッチ」接種した。パッチプレートおよびブロス培養物の両方を37℃で、標準的インキュベーター（プレート）または振盪水浴のいずれかで一晩インキュベートした。形質転換体がDNA挿入片を含むことを確認するために、全細胞PCR分析を用いた。ここで、約1.0 mlの一晩のLB Ap/Kanブロス培養物を1.5 mlポリプロピレン管に移し、Beckmannミクロ遠心分離機（約３分、室温、約12,000 X g）での遠心分離により細胞を回収した。細胞ペレットを約200μlの滅菌水に懸濁させ、約10μlアリコートを用いて、フォワードおよびリバース増幅プライマーを含む約50μl最終量のPCR反応をプログラムした。最初の95℃変性ステップを３分まで延長することにより、細菌細胞の熱破壊とプラスミドDNAの遊離を確実にした。ABIモデル9700サーマルサイクラーおよび32サイクル、３段階熱増幅プロフィール（すなわち、95℃、45秒；55~58℃、45秒、72℃、１分）を用いて、溶解した形質転換体サンプルからBASB203断片を増幅した。熱増幅後、~20μlアリコートの反応物をアガロースゲル電気泳動（トリス－酢酸（TAE）バッファー中0.8％アガロース）により分析した。ゲル電気泳動および臭化エチジウム染色後、UV照射によりDNA断片を視覚化した。試験サンプルと平行して、DNA分子サイズ標準体（１Kbラダー、Life Technologies）を電気泳動させ、これを用いて、PCR産物のサイズを推定した。推定サイズのPCR産物を産生した形質転換体を、タンパク質発現構築物を含む菌株として識別した。次に、発現プラスミド含有菌株を組換えタンパク質の誘導性発現について分析

した。

【０３０５】

Ｃ：PCR陽性形質転換体の発現分析

一晩の種培地のアリコート（約1.0 ml）を、約25 mlのLB Ap/Kanブロスを含む125 ml三角フラスコに接種し、培養物濁度が約0.5の O.D.600、すなわち中期対数期に達するまで（通常、約1.5～2.0時間）、振盪（約250 rpm）しながら、37℃で増殖させた。この時点で、培養物の約半分（約12.5 ml）を第２の125 mlフラスコに移し、IPTG（滅菌水で調製した1.0 M原液、Sigma）を最終濃度1.0 mMまで添加することにより、組換えタンパク質の発現を誘導した。IPTG誘導および非誘導培養物両者のインキュベーションを振盪しながら、37℃でさらに約４時間継続した。誘導時間後、誘導および非誘導培養物両者のサンプル（約1.0 ml）を取り出し、室温で約３分、ミクロ遠心分離機での遠心分離により細胞を回収した。個々の細胞ペレットを約50μlの滅菌水に懸濁させた後、2-メルカプトエタノールを含む等量の2X Laemelli SDS-PAGEサンプルバッファーと混合し、沸騰水浴に約３分導入することによりタンパク質を変性させた。いずれも等量（約15μl）の粗IPTG誘導および非誘導細胞溶解物を同一の12%トリス／グリシンポリアクリルアミドゲル（厚さ１mmのMini-gels、Novex）に添加した。標準的SDS／トリス／グリシンランニングバッファー（BioRad）を用いて、通常の条件下で、前染色した分子重量マーカー（SeeBlue, Novex）と一緒に、誘導および非誘導細胞溶解物を電気泳動させた。電気泳動後、１つのゲルをクマシーブリリアントブルーR250（BioRad）で染色した後、脱染することにより新たなIPTG誘導性タンパク質を視覚化する。BioRad Mini-Protean IIブロッティング装置およびトウビン（Towbin）メタノール（20%）トランスファーバッファーを用いて、第２のゲルをPVDF膜（孔径0.45ミクロン、Novex）に４℃で約２時間エレクトロブロッティングした。膜のブロックおよび抗体インキュベーションを当分野で周知の方法に従い実施した。モノクローナル抗RGS(His)3抗体、次に、HRP（QiaGen）に結合させた第２ウサギ抗マウス抗体を用いて、組換えタンパク質の発現および同一性を確認した。ABT不溶性基質、またはAmersham ECL化学発光系を含むハイパーフィルムのいずれかを用いて、抗His抗体反応性パターンの視覚化を達成した。

【０３０６】

実施例２：組換えタンパク質の生産

細菌株

プラスミド（pQE30）を含む大腸菌の組換え発現菌株M15（pREP4）またはブドウ球菌タンパク質をコードするpET24dプラスミドを含むBL21::DE3を用いて、細胞塊を生産させ、組換えタンパク質を精製した。

【０３０７】

培地

組換えタンパク質の生産に用いた発酵培地は、100μg／ml Apおよび／または30μg／ml Kmを含む2X YTブロス（Difco）からなる。発酵槽用の培地に消泡剤（Antifoam 204, Sigma）を0.25 ml／Ｌ添加した。組換えタンパク質の発現を誘導するために、IPTG（イソプロピルβ-D-チオガラクトピラノシド）を発酵槽に添加した（最終濃度１mM）。

【０３０８】

組換えタンパク質の生産

天然の条件下

IPTGを最終濃度１mMまで添加し、培養物をさらに４時間生育した。次に、培養物を6,000 rpmで10分遠心分離し、ペレットを、プロテアーゼインヒビターカクテルを含むリン酸バッファー（50 mM K2HPO4、K2HPO4（pH 7））に再懸濁させた。このサンプルを、圧力1,500バールのフレンチプレス溶解に付した（２ラン）。15,000 rpmで30分の遠心分離後、上清をさらに精製するために保存し、NaClを0.5Mまで添加した。次に、50 mM K2HPO4、K2HPO4（pH 7）でコンディショニングしたNi-NTA樹脂（XK 16カラム：Pharmacia、Ni-NTA樹脂：Qiagen）にサンプルを添加した。サンプルを添加した後、カラムをバッファーA（0.2M NaH2PO4 pH7、0.3M NaCl、10%グリセロール）で洗浄した。結合タンパク質を溶離

するために、比率を変えながらバッファーＢ（0.2M NaH2PO4（pH7）、0.3M NaCl、10%グリセロールおよび200 mMイミダゾール）をバッファーＡに添加する、段階的勾配を用いた。バッファーＢの比率は、10％～100％まで徐々に増加させた。精製後、タンパク質を含む溶出画分をプールし、濃縮してから、0.002M K2HPO4／K2HPO4（pH 7）、0.15M NaClに対して透析した。

【０３０９】

この方法を用いて、ClfA、SdrG、IsdA、IsaB、HarA、Atl-グルコサミンおよびαトキシンを精製した。

【０３１０】

変性条件下

IPTGを最終濃度１mMまで添加し、培養物をさらに４時間生育した。次に、培養物を6,000 rpmで10分遠心分離し、ペレットを、プロテアーゼインヒビターカクテルを含むリン酸バッファー（50 mM K2HPO4、K2HPO4（pH 7））に再懸濁させた。このサンプルを圧力1,500バールのフレンチプレス溶解に付した（２ラン）。15,000 rpmで30分の遠心分離後、１M尿素を含むリン酸バッファーでペレットを洗浄した。サンプルを15,000 rpmで30分遠心分離した後、８M尿素、0.1M NaH2PO4（pH7）、0.5M NaCl、0.01Mトリス－HCl（pH8）にペレットを再懸濁させ、室温で一晩維持した。サンプルを15,000 rpmで20分遠心分離した後、上清をさらに精製するために保存した。次に、８M尿素、0.1M NaH2PO4 pH7、0.5M NaCl、0.01Mトリス－HCl（pH8）でコンディショニングしたNi-NTA樹脂（XK 16カラム：Pharmacia、Ni-NTA樹脂：Qiagen）にサンプルを添加した。フロースルーの通過後、カラムをバッファーＡ（８M尿素、0.1M NaH2PO4、0.5M NaCl、0.01Mトリス（pH8.0））、バッファーC（８M尿素、0.1M NaH2PO4、0.5M NaCl、0.01Mトリス（pH6.3））、バッファーＤ（８M尿素、0.1M NaH2PO4、0.5M NaCl、0.01Mトリス（pH5.9））およびバッファーＥ（８M尿素、0.1M NaH2PO4、0.5M NaCl、0.01Mトリス（pH4.5））で洗浄した。バッファーＤおよびＥでの洗浄中、カラムから組換えタンパク質を溶離した。変性した組換えタンパク質は、尿素を全く含まない溶液中に溶解させることができた。この目的のために、８M尿素に含まれる変性タンパク質を４M尿素、0.1M NaH2PO4、0.01Mトリス－HCl（pH7.1）、２M尿素、0.1M NaH2PO4、0.01Mトリス－HCl（pH7.1）、0.5Mアルギニンおよび0.002M K2HPO4／K2HPO4（pH 7.1）、0.15M NaCl、0.5Mアルギニンに対して透析した。

【０３１１】

この方法を用いて、Ebh（H2断片）、AaA、SdrC、FnbpA、Sbi、Atl-アミダーゼおよびIsaAを精製した。

【０３１２】

精製したタンパク質をSDS-PAGEにより分析した。天然の条件下で精製した１タンパク質（αトキシン）および変性条件下で精製した１タンパク質（SdrC）についての結果を図３および４に示す。

【０３１３】

実施例３：多糖の調製

Joyceら、2003, Carbohydrate Research 338; 903-922に記載されているように、PIA（PNAG）を調製した。

【０３１４】

Infection and Immunity 58(7);2367に記載されているように、５型および８型多糖を抽出した。

【０３１５】

活性化および結合化学：

天然の多糖をNaCl 2Mまたは水に溶解させる。すべての血清型について最適多糖濃度を評価したところ、２mg／ml～５mg／mlであった。

【０３１６】

アセトニトリル中100 mg／ml原液から、CDAP（CDAP／PS比：0.75 mg／mg PS）を多糖溶液に添加する。1.5分後、0.2Mトリエチルアミンを添加して、特定の活性化pH（pH 8.5～1

0.0）を得る。このpHおよび25℃で２分多糖の活性化を実施する。活性化多糖に、１／１モル比を達成するのに十分な量の担体タンパク質を添加し、特定のpHで１時間結合反応を実施する。

【０３１７】

次に、グリシンを用いて、25℃で30分、続いて４℃で一晩反応をクエンチングする。

【０３１８】

0.2M NaClで平衡したSephacryl 500 HRゲル濾過カラムを用いて、ゲル濾過によりコンジュゲートを精製する。

【０３１９】

溶出画分の炭水化物およびタンパク質含量を決定する。コンジュゲートをプールし、0.22μm滅菌膜で滅菌濾過する。コンジュゲート調製物におけるPS／タンパク質比を決定する。

【０３２０】

特性決定：

タンパク質および多糖含量について各コンジュゲートを特性決定する。

【０３２１】

多糖含量はレソルシノール（Resorcinol）試験により、またタンパク質含量はローリー（Lowry）試験によりそれぞれ測定する。濃度の比により最終PS／PD比（w/w）を決定する。

【０３２２】

残留DMAP含量（ng／μg PS）：

CDAPによる多糖の活性化により、シアネート基が多糖に導入され、DMAP（4-ジメチルアミノ－ピリジン）が遊離する。GSKで開発および確認された特定のアッセイにより残留DMAP含量を決定する。

【０３２３】

遊離多糖の含有率（％）：

４℃で維持した、または37℃で７日保存したコンジュゲートの遊離多糖含有率を、α担体抗体および飽和硫酸アンモニウムと一緒にインキュベーション後遠心分離により得られた上清について決定する。

【０３２４】

上清の遊離多糖の定量にはα-PS／α-PS ELISAを用いる。また、コンジュゲートの非存在もα担体／α-PS ELISAにより制御する。

【０３２５】

実施例４：製剤化

アジュバント組成物

前記実施例から得たタンパク質を個別、または一緒に、ブドウ球菌多糖の組合せと製剤化することができ、アジュバントとして、該製剤は、3脱-O-アシル化モノホスホリルリピドＡ（3D-MPL）と水酸化アルミニウム、または3脱-O-アシル化モノホスホリルリピドＡ（3D-MPL）とリン酸アルミニウム、もしくは、随意に油／水エマルションにおける3D-MPLおよび／またはQS21を含んでもよく、さらには、随意に、コレステロール、またはアルミニウム塩だけ、好ましくはリン酸アルミニウムと一緒に製剤化してもよい。

【０３２６】

3D-MPL：これは、グラム陰性菌サルモネラ・ミンネソタ（Salmonella minnesota）のリポ多糖（LPS）の化学的に解毒された形態である。

【０３２７】

GSK Biologicalsで実施された実験から、様々なビヒクルと組み合わせた3D-MPLは、液体性およびTH1型細胞免疫の両方を強度に増強することがわかった。

【０３２８】

QS21：これは、バラ科キラヤ（Quillaja Saponaria Molina）の樹皮の粗抽出物から精製した１種のサポニンであり、強いアジュバント活性を有する。これは、抗原特異的リンパ

球増殖および数種の抗原に対するCTLの両方を活性化する。

【０３２９】

3D-MPLとミョウバン(alum)を含む本発明の抗原を含有するワクチンは、WO 93/19780または92/16231に記載の方法と同様に調製することができる。GSK Biologicalsで実施された実験から、液体性およびTH1型細胞免疫両方の誘導において3D-MPLとQS21の組合せの明らかな相乗効果が証明されている。このような抗原を含むワクチンは、米国特許第5750110号に記載されている。

【０３３０】

油／水エマルションは、２種の油（トコフェロールとスクアレン）、および乳化剤としてTween 80を含むPBSから構成されるものでよい。５％スクアレンと５％トコフェロールおよび0.4%Tween 80を含んでなり、平均粒径が180 nmのエマルションが、SB62として知られている（WO 95/17210を参照）。

【０３３１】

GSK Biologicalsで実施された実験により、MPL／QS21にＯ／Ｗエマルションを添加すると、免疫刺激性がさらに高まることが証明されている。

【０３３２】

エマルションSB62の調製（２倍濃縮物）

Tween 80をリン酸緩衝食塩水（PBS）に溶解することにより、PBSにおける２％溶液を調製する。100 mlの２倍濃縮エマルションを取得するために、５ｇのDLαトコフェロールと５mlのスクアレンを攪拌し、完全に混合する。90 mlのPBS／Tween溶液を添加し、完全に混合する。得られたエマルションをシリンダーに通過させ、M110Sマイクロフルーディクス機を用いて、最終的にマイクロ流動体化する。こうして得られた液滴のサイズは約180 nmである。

【０３３３】

実施例５

動物実験

生後８～10週間の雌CD-1マウスをCharles River Laboratories（マサチューセッツ州キングストン）から入手する。致死率試験のために、CSAプレートで生育した黄色ブドウ球菌の連続的希釈物で、１グループが９～11匹のCD-1マウスからなる５グループを腹腔内（i.p.）チャレンジした。接種材料のサイズは、約10^{10}～10^{8}CFU／マウスである。3日間毎日死亡率を評価する。用量応答関係のプロビットモデルを用いることにより、50%致死用量（LO_{50}）を評価する。公算比試験により、共通LO_{50}の帰無仮説(null hypothesis)を試験した。約２×10^{6} CFU／マウスの静脈内（i.v.）経路、または約２×10^{7} CFU／マウスのi.p.経路で、８～20匹のマウスのグループをチャレンジすることにより、致死量以下の菌血症を開始する。接種後、指定時間に、各グループのマウスの尾から採血し、５％ヒツジ血液を含むトリプシン処理ダイズ寒天プレート上で２回繰り返して実施した定量平板菌数カウント（Beckton Dickinson Microbiology Systems）により、菌血レベルを評価する。非対合スチューデントｔ検定のウェルチ（Welch）改良法を用いて統計的有意性を決定する。

【０３３４】

実施例６

各種哺乳動物において抗体応答を決定する一般的方法

ELISAにより、ブドウ球菌多糖に対するIgG抗体について血清を試験した。手短には、ATCC（Rockville, Md. 20852）からの精製莢膜多糖を、リン酸緩衝食塩水（PBS）中25μｇ／mlで、高度結合マイクロタイタープレート（Nunc Maxisorp）に４℃で一晩コーティングする。プレートを10％ウシ胎仔血清（FCS）で１時間37℃にてブロックする。20μｇ／ml細胞壁多糖（Statens Serum Institute、コペンハーゲン）および10%FCSで血清サンプルを30分室温にて前インキュベートすることにより、この抗原に対する抗体を中和する。次に、マイクロプレート上のサンプルをPBS中の10%FCSで２倍希釈し、攪拌しながら１時間室温で平衡する。洗浄後、PBS中の10%FCSで１：4,000希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒ

トIgG Fcモノクローナル抗体（HP6043-HRP、Stratech Scientific Ltd）でマイクロプレートを１時間室温で攪拌しながら平衡させた。ELISAを実施することにより、１：5,000のJackson ImmunoLaboratories Inc. ペルオキシダーゼ結合AffiniPureヤギ抗ラットIgG（H+L）（コード112-035-003）を用いて、ラットIgGを測定する。SoftMax Proによるロジスティック対数比較を用いて、各血清について、滴定曲線を標準血清と対照する。ELISAプレートをコーティングするのに用いた多糖濃度は10～20μg／mlである。14μl H202を含むpH 4.5 0.1Mクエン酸バッファー10 ml当たり４mgのOPD（Sigma）を用いて、室温および暗所で発色させる。反応を50μl HClで停止し、650 nmに対する490 nmで光学濃度を読み取る。SoftMax Proソフトウエアにより計算した4-パラメーターロジスティック対数等式を用いてモデル化した較正曲線と滴定点の対照により、IgG濃度を決定する。

【０３３５】

ブドウ球菌多糖に対するマウスおよびラットIgGを測定するELISAは下記を除いて前記と同様である。Jackson ImmunoLaboratories Inc. ペルオキシダーゼ結合affiniPureヤギ抗マウスIgG（H+L）およびAffiniPureヤギ抗ラットIgG（H+L）を用いて、結合IgGを検出した。

【０３３６】

下記の変更を除いて、多糖ELISAと同様にタンパク質ELISAを実施する。PBS中2.0μg／mlのタンパク質をコーティングする。10％ウシ胎仔血清と0.1％ポリビニルアルコールを含むPBSで血清サンプルを希釈する。ヒトIgG Fcに対するSigmaペルオキシダーゼ結合ヤギアフィニティー精製抗体（対照標準A-2290）を用いて、結合ヒト抗体を検出する。

【０３３７】

実施例７

オプソニン食作用アッセイ

Xuら、1992 Infect. Immun. 60; 1358に記載のように、ヒト多形核白血球（PMN）による、黄色ブドウ球菌のin vitroオプソニン食作用での死滅を実施する。３％デキストランT-250における沈降によりヘパリン化血液からヒトPMNを調製する。オプソニン反応混合物（１ml）は、10％熱不活性化ウシ胎仔血清を補充したRPMI 1640培地中の約10^6 PMN、約10^8 CFUの黄色ブドウ球菌、および0.1 mlの試験血清またはIgG調製物を含む。超免疫したウサギ血清を正の対照として用い、0.1 mlの非免疫ウサギ血清をIgGサンプルの完全な供給源として用いた。反応混合物を37℃でインキュベートし、細菌サンプルを０分、60分、および120分後に水に移し、希釈してから、トリプシンダイズ寒天プレートに塗布し、37℃でインキュベートし、一晩インキュベートした後、細菌数をカウントする。

【０３３８】

実施例８

マウスおよびウサギにおけるブドウ球菌タンパク質の免疫原性

精製したブドウ球菌タンパク質で動物を免疫することにより、超免疫血清を産生させる。Specolに添加した10μgの各タンパク質で３回（第０日、14日および28日）マウスを免疫した。ウサギは、Specolに添加した20μgの各タンパク質で３回（第０日、21日および42日）免疫した。免疫血清を回収し、抗タンパク質および抗死滅全細胞ELISAで評価した。

【０３３９】

抗タンパク質ELISA：

精製タンパク質をリン酸緩衝食塩水（PBS）中１μg／mlで、高度結合マイクロプレート（Nunc Maxisorp）に４℃で一晩コーティングした。攪拌しながら室温で30分プレートをPBS-BSA１％でブロックした。次に、試験サンプルを１／1,000希釈し、攪拌しながら室温で１時間インキュベートした。洗浄後、PBS-Tween 0.05％に１：5,000希釈したJackson ImmunoLaboratories Inc. ペルオキシダーゼ結合affiniPureヤギ抗マウスIgG（H+L）（参照番号：115-035-003）またはAffiniPureヤギ抗ウサギIgG（H+L）（参照番号：11-035-003）を用いて、結合マウスまたはウサギ抗体を検出した。検出抗体を攪拌しながら室温で30分インキュベートした。pH 4.5 0.1Mクエン酸バッファー10 ml当たり４mgのOPD（Sigma）＋５μlのH202を用いて、室温の暗所で15分発色させた。反応を50μl のHClで停止し、

650 nmに対する490 nmで光学濃度を読み取った。Post IIIの１／1,000希釈物についてのO.D.を、前免疫血清の同じ希釈物で得たO.D.と比較した。

【０３４０】

マウスおよびウサギ血清を用いて得られた結果を図５に示す。各抗原に対して優れたセロコンバージョンが観察された。SBIに対し指令された血清の評価は、このタンパク質のIg結合活性のために損なわれた。

【０３４１】

抗死滅全細胞ELISA：

５型および８型黄色ブドウ球菌または表皮ブドウ球菌株Hay由来の死滅全細胞（熱またはホルムアルデヒド不活性化）をリン酸緩衝食塩水（PBS）中20μg／mlで、蒸発により、高度結合マイクロプレート（Nunc Maxisorp）に４℃で一晩コーティングした。攪拌しながら、室温で30分プレートをPBS-BSA１％でブロックした。PBS-Tween 0.05％で希釈した10μg／mlのアフィニティー精製ニワトリ抗プロテインＡ（ICL参照番号：CPA-65A-2）の添加により、プロテインＡを中和した後、室温で１時間インキュベートした。次に、１／10の出発希釈物から、PBS- Tween 0.05％で試験サンプルをマイクロプレート上で２倍希釈し、攪拌しながら室温で１時間インキュベートした。洗浄後、PBS-Tween 0.05％で１：5,000希釈したJackson ImmunoLaboratories Inc. ペルオキシダーゼ結合affiniPureヤギ抗マウスIgG（H+L）（参照番号：115-035-003）またはAffiniPureヤギ抗ウサギIgG（H+L）（参照番号：11-035-003）を用いて、結合マウスまたはウサギ抗体を検出した。検出抗体を攪拌しながら室温で30分インキュベートした。pH 4.5 0.1Mクエン酸バッファー10 ml当たり４mgのOPD（Sigma）＋５μlの H2O2を用いて、室温の暗所で15分発色させた。反応を50μlのHClで停止し、650 nmに対する490 nmで光学濃度を読み取った。

【０３４２】

ブドウ球菌におけるタンパク質の発現レベルは、培養条件に応じて変動しうることに留意すべきである。従って、陰性の結果は、免疫原性の不足というより、不適正な培養条件の選択を反映していると考えられる。

【０３４３】

マウス血清を用いた結果を表５に示し、該グラフのいくつかを図６に示す。黄色ブドウ球菌株５の弱い認識がSdrC、FnbpA、Ebh、SbiおよびIsaAに対する血清で認められる。黄色ブドウ球菌株８の認識は、Sbiに対する血清にしか認められない。表皮ブドウ球菌株Hayの弱い認識が、Atlアミダーゼ、MRP、IsdA、IsaA、Ebh、AaaおよびSbiに対する血清に認められる。

【０３４４】

ウサギ血清を用いて得られた結果の抜粋を図７に示し、表６にまとめる。３つの菌株の非常に優れた認識がIsaAおよびIsdBで認められた。動物は、他のタンパク質に用いた３回の注射ではなく、１回の注射しか受けていなかったが、３つの菌株の弱い認識がHarAで認められた。

【表５】

タンパク質名	SA5での反応	SA8での反応	SE Hayでの反応
IsaA	(+)	(+)	(+)
ClfA	−	(+)	(+)
Atlアミダーゼ	−	−	++
SdrG	−	−	−
グルコサミダーゼ	−	−	−
IsdA	−	−	++
αトキシン	−	−	−
SrdC	++	(+)	−
Ebh	+	−	+
AaA	−	−	++
MRP	−	−	++
Sbi	++	++	+++
FnbpA	+	+	(+)

【表６】

タンパク質名	SA5での反応	SA8での反応	SE Hayでの反応
IsaA	+++	+++	+++
ClfA	+	++	++
Atlアミダーゼ	−	++	+
IsdB	+++	+++	+++
SdrG	+	+	+
グルコサミダーゼ	−	−	−
HarA（注射１回）	+	+	+
IsdA	−	−	−
αトキシン	−	−	+
SrdC	−	−	−
Ebh	−	+	−
AaA	−	−	−
MRP	−	−	++
Sbi	−	+++	−
FnbpA	−	++	++

【０３４５】

実施例９

鼻内コロニー形成モデルにおけるブドウ球菌タンパク質の組合せの効能

１グループにつき３匹のコトン(cotton)ラットからなる15のグループに８種のブドウ球菌抗原の組合せを接種し、対照として用いる５匹のコトンラットは抗原で処理しなかった。これら16のグループは以下の通りである：

グループ１：Atl-グルコサミン、Atl-アミダーゼ、AAA、αトキシン、SdrC、SdrG、Ebh、Sbi

グループ２：Atl-グルコサミン、Atl-アミダーゼ、IsdA、IsdB、ClfA、SdrC、Ebh、FnbpA

グループ３：Atl-グルコサミン、Atl-アミダーゼ、HarA、IsdA、MPR、IsdB、AAA、αトキシン

グループ４：Atl-グルコサミン、HarA、IsdA、AAA、ClfA、IsaA、Ebh、Sbi

グループ５：HarA、MPR、AAA、αトキシン、ClfA、SdrC、Ebh、FnbpA

グループ６：IsdA、IsdB、AAA、αトキシン、ClfA、SdrG、Sbi、FnbpA

グループ７：Atl-アミダーゼ、IsdA、MPR、AAA、IsaA、SdrG、Ebh、FnbpA

グループ８：対照
グループ９：Atl-グルコサミン、IsdA、MPR、αトキシン、IsaA、SdrG、Sbi、FnbpA
グループ10：Atl-グルコサミン、MRP、IsdB、AAA、ClfA、IsaA、SdrC、SdrG
グループ11：Atl-アミダーゼ、MPR、IsaB、αトキシン、ClfA、IsaA、Ebh、Sbi
グループ12：Atl-グルコサミン、HarA、IsdB、αトキシン、IsaA、SdrG、Ebh、FnbpA
グループ13：Atl-アミダーゼ、HarA、IsdB、AAA、IsaA、SdrG、Sbi、FnbpA
グループ14：Atl-グルコサミン、Atl-アミダーゼ、HarA、、MRP、ClfA、SdrC、Sbi、FnbpA
グループ15：Atl-アミダーゼ、HarA、IsdA、αトキシン、ClfA、IsaA、SdrG
グループ16：HarA、IsdA、MRP、IsdB、SdrC、SdrG、Ebh、Sbi

抗原の各混合物には、MPLとQS21を含むリポソームからなるアジュバントと混合した３μgの各抗原を含有させた。実験の第１、14および28日に、コトンラットに計３回接種した。接種から２週間後、Kokai-Kunら（2003）Antimicrob. Agents. Chemother. 47；1589-1597に記載のように、鼻内コロニー形成アッセイを用いて、免疫の効力を評価した。

【０３４６】

「デザインエキスパート（Design Expert）６」ソフトウエアを用いて、古典的な多重線形回帰分析を実施した。抗原の存在を＋１として、また抗原の非存在を－１としてそれぞれ符号化した。モデルの等式を用いて、どの抗原が、１匹当たりの鼻内コロニー数の大幅な減少をもたらした主要抗原であるかを決定することができた。

【０３４７】

結果

鼻内コロニー形成アッセイの結果を表７に示す。対照グループは、一匹当たりの平均対数CFUが3.51335であり、ブドウ球菌タンパク質を接種したコトンラットの全グループについて鼻内コロニー形成の減少が認められた。グループ４、９および13は、１匹当たりのCFU減少が２対数（log）を超えるという、最も大きな減少を示した。グループ12および16も良好な結果をもたらし、１匹当たりCFUの約２対数の減少を示している。

【表７】

グループ	平均観察対数CFU／鼻	予測対数CFU／鼻
1	1.77527	2.03560
2	2.90435	2.52684
3	1.96556	2.23033
4	1.27748	1.21872
5	1.67304	1.93128
6	2.79745	2.98193
7	2.21481	2.30705
8	3.51355	3.47317
9	1.22480	1.44080
10	2.03085	1.93204
11	2.02522	1.81581
12	1.53402	1.70996
13	1.36063	1.49100
14	2.31201	1.73909
15	2.22979	1.98223
16	1.58109	1.44004

【０３４８】

鼻内コロニー形成データの多重線形回帰分析を用いて、抗原混合物内の具体的抗原の分布を計算した。最終モデルは、７つの最良抗原を含む。これらの抗原についての結果を表８に示す。タンパク質混合物に関しては、HarAの含有により、鼻内コロニー形成の最大の

減少が達成され、これにIsaA、Sbi、SdrC、自己溶解素－グルコサミン、MRPおよびEbhが続く。

【表８】

モデルにおける７つの最良抗原についての対数CFU／鼻の差およびCFU／鼻の比への作用と、対応するｐ値

抗原	prob >F	作用の推定	減少比	累積作用	累積比
HarA	0.033	-0.596	3.9	-0.596	3.9
IsaA	0.046	-0.558	3.6	-1.154	14.3
Sbi	0.077	-0.491	3.1	-1.645	44.2
SdrC	0.22	-0.337	2.2	-1.982	96.0
Atl-グルコサミン	0.238	-0.324	2.1	-2.306	202.2
MRP	0.239	-0.323	2.1	-2.629	425.3
Ebh	0.297	-0.286	1.9	-2.914	821.0

【図１．１】

配列番号１ポリペプチド配列
MLQVTDVSLRFGDRKLFEDVNIKFTEGNCYGLIGANGAGKSTFLKILSGELDSQTGHVSLGKNERLAVLKQDHYAYEDER
VLDVVIKGHRELYEVMKRKDEIYMKPDFSDEDGIRAAELKGEFAEMNGWNAEADAANLLSGLGIDPTLHDKKMAELENNQ
KIKVLLAQSLFGEPDVLLLDEPTNGLDIPAISWLEDFLINFDNTVIVVSHDRHFLNNVCTHIADLDFGKIKVYVGNYDFW
YQSSQLAQKMAQEQNKKKEEKMKELQDFIARFSANASKSKQATSRKKQLEKIELDDIQPSSRRYPFVKFTPERERIGNDLL
IVQNLSKTIDGEKVLDNVSFTMNPNDKAILIGDSEIAKTTLLKILAGEMEPDEGSFKWGVTTSLSYFPKDNSEFPEGVNM
NLVDWLRQYAPEDEQTETFLRGFLGRMLFSGEEVKKKASVLSGGEKVRCMLSKMMLSSANVLLLDEPTNHLDLESITAVN
DGLKSFKGSIIFTSYDFEFINTIANRVIDLNKQGGVSKEIPYEEYLQEIGVLK

配列番号２ポリペプチド配列
MLQVTDVSLRFGDRKLFEDVNIKFTEGNCYGLIGANGAGKSTFLKILSGEIDSQTGHVSLGKDERLAVLKQDHFAYEDER
VLDVVIKGHERLYQVMKEKDEIYMKPDFSDEDGIRAAELKGEFAEMNGWNAEADAANLLSGLGIEPDLHDKNMSELENNQ
KVKVLLAQSLFGDPDVLLLDEPTNGLDIPAISWLEDFLINFENTVIVVSHDRHFLNNVCTHIADLDFGKIKLYVGNYDFW
YQSSQLAQKMAQEQNKKKEEKMKELQDFIARFSANASKSKQATSRKKQLEKIELDDIQPSSRRYPYVKFTPERERIGNDLL
TVENLSKTIDGEKVLDNVSFTMNPNDKAILVGDSEIAKTTLLKILAGEMEPDEGTFKWGVTTSLSYFPKDNSEFFDGVDM
NLVBWLRQYAPEDEQTETFLRGFLGRMLFSGEEVKKKASVLSGGEKVRCMLSKMMLSSANVLLLDEPTNHLDLESITAVN
DGLKSFKGSIIFTSYDFEFINTIANRVIDLNQAGALSKEVPYBEYLQSIGVLQNN

配列番号３ポリペプチド配列
MPIITDVYAREVLDSRGNPTVEVEVLTESGAFGRALVPSGASTGEHEAVELRDGDKSRYLGKGVTKAVENVNEIIAPKII
EGEFSVLDQVSIDKMMIALDGTPNKGKLGANAILGVSIAVARAAADLLGQPLYKYLGGFNGKQLPVPMMNIVNGGSHSDA
PIAFQEFMILPVGATTFKESLRWGAEIFHNLKSILSERGLETAVGDEGGFAPKFEGTEDAVETIIQAIEAAGYKPGEEVF
LGFDCASSEFYENGVYDYSKFEGEHGAKRTAAEQVDYLEQLVDKYPIITIEDGMDENDWDGWKQLTERIGDRVQLVGDDL
FVTNTEILSKGIEQGIGNSILIKVNQIGTLTETFDAIEMAQKAGYTAVVSHRSGETEDTTIADIAVATNAGQIKTGSLSR
TDRIAKYNQLLRIEDELFET
AKYDGIKSFYNLDK

配列番号４ポリペプチド配列
MPIITDVYAREVLDSRGNPTVEVEVLTESGAFGRALVPSGASTGEHEAVELRDGDKSRYLGKGVTKAVENVNEMIAPEIV
EGEFSVLDQVSIDKMMIQLDGTHNKGKLGANAILGVSIAVARAAADLLGQPLYKYLGGFNGKQLEVPMMNIVNGGSHSDA
PIAFQEFMILPVGAESFKESLRWGAEIFHNLKSILSERGLETAVGDEGGFAPRFEGTEDAVETIIKAIEKAGYKPGEDVF
LGFDCASSEFYENGVYDYTKFEGEHGAKRSAAEQVDYLEELIGKVPIITTEDGMDENDWEGWKQLTDRIGDKVQLVGDDL
FVTNTEIISKGIEQGIGNSLIIKVNQIGTLTETFDAIEMAQKAGYTAVVSHRSGETEDTTIADIAVATNAGQIKTGSLSR
TDRIAKYNQLLRIEDELYETAKFEGIKSFYNLDK

配列番号５ポリペプチド配列
MKKIVTATIATAGLATIAFAGHDAQAAEQNNNGYNSNDAQSYSYTYTIDAQGNYHYTWTGNWNPSQLTQNNTYYYNNYNT
YSYNNASYNNYYNHSYQYNNYTNNSQTATNNYYTGGSGASYSTTSNNVHVTTTAAPSSNGRSISNGYASGSNLYTSGQCT
YYVFDRVGGKIGSTWGNASNWANAAASSGYTVNNTPKVGAIMQTTQGYYGHVAYVEGVNSNGSVRVSEMNYGHGAGVVTS
RTISANQAGSYNFIH

配列番号６ポリペプチド配列
MKKIATATIATAGFATIAIASGNQAHASEQDNYGYNPNDPTSYSYTYTIDAQGNYHYTWKGNWHPSQLNQDNGYYSYYYY
NGYNNYNNYNNGYSYNNYSRYNNYSNNNQSYNYNNYNSYNTNSYRTGGLGASYSTSSNNVQVTTTMAPSSNGRSISSGYT
SGRNLYTSGQCTYYVFDRVGGKIGSTWGNASNWANAAARAGYTVNNTPKAGAIMQTTQGAYGHVAYVESVNSNGSVRVSE
MNYGYGPGVVTSRTISASQAAGYNFIH

配列番号７ポリペプチド配列
MKKIATATIATAGIATFAFAHHDAQAAEQNNDGYNPNDPVSYSYTYTIDAEGNYHYTWKGNWSPDRVNTSYNYNNYNNYN
YYGYNNYSNYNNYSNYNNYNNYQSNNTQSQRTTQPTGGLGASYSTSSSNVHVTTTSAPSSNGVSLSNARSASGNLYTSGQ
CTYYVFDRVGGKIGSTWGNANNWANAAARSGYTVNNSPAKGAILQTSQGAYGHVAYVEGVNSNGSIRVSEMNYGHGAGVV

【図１．２】

TSRTISASQAASYNYIH

配列番号８ポリペプチド配列
MKKLVPLLLALLLLVAACGTGGKQSSDKSNGKLKVVTTNSILVDMAKNVGGDNVDIHSIVPVGQDPHEYEVKPKDIKKLT
DADVILYNGLNLETGNGWFEKALEQAGKSLKDKKVIAVSKDVKPIYLNGERGNKDKQDPHAWLSLDNGIKYVKTIQQTFI
DNDKKHKADYEKQGNKVIAQLEKLNNDSKDKFNDIPKEQRAMITSEGAFKYFSKQYGITPGYIWEINTEKQGTPEQMRQA
IEFVKKHKLKHLLVETSVDKKAMESLSEETKKDIFGEVTDSIGKEGTKGDSYYKMMKSNIETVHGSMK

配列番号９ポリペプチド配列
MKKILALAIAFLIILAACGNNSHHEHHSHEGKLKVVTTNSILYDMVKRVGGNKVDVHSIVPVGQDPHEYEVKPKDIKALT
DADVVFYNGLNLETGNGWFEKALDQAGKSTKDKNVIAASNNVKPIYLNGHEGNKNKQDPHAWLSLENGIKYVKTIQKSLE
HEDKKDKSTYEKQGNAYISKLEELNKDSKNKFDDIPKNQRAMMTSEGAFKYFAQQFDVKPGYIWEINTEKQGTPGQMKQA
IKFVKDNHLKHLLVETSVDKKAMQSLSEETKKDIYGEVFTDSIGKEGTKGDSYYKMMKSNIDTIHGSMK

配列番号１０ポリペプチド配列
MKKTIMASSLAVALGVTGYAAGTGHQAHAAEVNVDQAHLVDLAAHNHQDQLNAAPIKDGAYDIHFVKDGFQYNFTSNGTTW
SWSYEAANGQTAGFSNVAGADYTTSYNQGSDVQSVSYNAQSSNSNVSAVSAPTYHNYSTSTTSSSVRLSNGNTAGATGSS
AAQIMAQRTGVSASTWAAIIARESNGQVNAYNPSGASGLFQTMPGWGPTNTVDQQINAAVKAYKAQGLGANGF

配列番号１１ポリペプチド配列
MKKTVIASTLAVSLGIAGYGLSGHEAHASETTNVDKAHLVDLAQHNPEELNAKPVQAGAYDIHFVDNGYQYNFTSNGSEW
SWSYAVAGSDADYTESSSNQEVSANTQSSNTNVQAVSAPTSSESRSYSTSTTSYSAPSHNYSSHSSSVRLSNGNTAGSVG
SYAAAQMAARTGVSASTWSHIIARESNGQLHARNASGAAGLFQTMPGWGSTGSVNDQINAAYKAYKAQGLSAWGM

配列番号１２ポリペプチド配列
MNYRDKIQKFSIRKVTVGTFSTVIATLVFLGFNTSQAHAAETNQPASVVKQKQQSNNEQTENRESQVQNSQNSQNSQSLS
ATHENEQPNNSQANLVNQKVAQSSTTNDHQPASQNVNTKKDSATAATTQPDKEESKHKQNESQSANKNGNDNRAAHVENH
EANVVTASDSSDNGNVQHDRNELQAFFDANYHDYRFIDRENADSQTFNYVKGIFDKINTLLGSNDPINNKDLQLAYKELE
QAVALLRTMPQRQQTSRRSNRIQTRSVRSRAAEPRSVSDYQNANSSYYVENANDGSGYPVGTTINASSKGAPVNLPTTPW
NTLKASDSKEIALMTAKQTGDGYQWVIKFNKGHAPHQNMIFWFALPADQVPVGRTDPVIVNSDGTNVQWSHGAGAGANKP
LQQMWEYGVNDPDRSHDFKIRNRSGQVIYSWPTVHVYSLEDLSRASDYFSEAGATPATKAPGRQNFEYINGQKPAESPGV
PKVVTFIGQGDASYTISFKTQGPTVNKLYYAAGGRALEYNQLFMYSQLYVESTQDHQQRLNGLRQVVNRTYRIGTTKRVE
VSQGNVQTKKVLESTNLNLDDFVDDPLSYVKTPSNKVLGFYPTNANTNAFRPGGVQELNEYQLSQLFTDQKLQEAARTRN
PIRLMIGFDYPDGYGNSETLVPVNLTVLPEIQHNIKFFKNDDTQNIAEKPFSKQAGHPVFYVAGNQGNASVNLGGSVTS
IQPLRINLTSNENFTDKDWQITGIPRTLHIENSTNRTNNARERNIELVGNLLPGDYFGTIRFGRKEQLFEIRVKPHTPTI
TTTABQLRGTALQKVPVNISGIPLDPSALVYLVAPTNQTTNGGSEADQIPSGYTILATGTPDGVHNTITIRPQDYVVFIP
PVGKQIRAVVYYNKVVASNMSNAVTILPDDIPPTINNPVGINAKYRGDEVNFTMGVSDRHSGIKNTTITTLPSGWTSNL
TKSDNKNGSLAITGRVSMNQAFNSDITFKVSATDNVNNTTNDSQSKHVSIHVGKISEDAHPIVLGNTEKVVVVNPTAVSN
DEKQSIITAFMNKNQNIRGYLASTDPVTVDNNGNVTLHYRDGSSTTLDATNVMTYEPVVKSEYQTANAAKTATVTIAKGQ
SFNIGDIKQYFTLSNGQAIPNGTFTNITSDRTIPTAQEVSQMNAGTQLYHIVASNAYHKDTEDFYISLKIVDVKQPEGDQ
RVYRTSTYDLTTDEISKVKQAFINANRDVITLAEGDISVTNTPNGANVSTITVNINKGRLTKSFASNLANMNFLRWVNFP
QDYTVTWTNAKIANRPTDGGLSWSDDHKSLIYRYDATLGTQITTNDILTMLKATTTVPGLRNNITGNEKAQAEAGGRPNY
RTTGYSQSNATTDQGRQFTLNGQVIQILDIINPSNGYGGQPVTNSNTRANHSNSTVVNVNEPAANGAGAFTIDHVVKSNS
TFNASDAVYKAQLYLTPYGPKQYVEHLNQNTGNTTDAINIYFVPSDLVNPTISVGNYTNHQVFSGETFTNTITANDNFGV
QSVTVPNTSQITGTVDNNHQHVSATAPNVTSATSKTINLLATDTSGNTATTSFNVTVKPLRDKYRVGTSSTAANPVRIAN
ISNNATVSQADQTTIINSLTTSNAPNRNYATASANEITSKTVSNVSRTGNNANVTVTVTHQDGTTSTVTVPVKHVIPEI
VAHSHYTVQGQDFPAGNGSSAADYFKLSNGSAIPDATITWVSGQAPNKDNTRIGEDITVTAHILIDGETTPITKTATYKV
VRTVPKHVFETARGVLYPGVSDMYDAKQYVKPVNNSWSTNAQHMNFQFVGTYGPNKDVVGISTRLIRVTYDNRQTEDLTI
LSKVKPDPPRIDANSVTYKAGLTNQEIKVNNVLNNSSVKLFKADNTPLNVTNITHGSGPSSVVTVSDALPNGGIKAKSSI
SMNNVTYTTQDEHGQVVTVTRNESVDSNDSASVTVTPQLQATTEGAVFIKGGDGFDPGHVERFIQNPPHGATVAWHDSPD
TWKNTVGNTHKTAVVTLPSGQGTRNVSVPVKVYPVANAKAPSRDVKGQNLTHGTNAIDYITFDPNTNTNGITAAWANRQQ
PNNQQAGVQHLNVDVTYPGISAAKRVPVTVNVYQFEPQTTYTTTVGGTLASGTQASGYAHMQNASGLPTDGFTYKWNRD
TTGTNDANWAAMNKPNTAQVVNAKYDVIYNGHTFATSLPAKFVVKDVQPAKPTVTETAAGAITIAPGANQTVWFHAGNVT
TYADKLVIKRNGNVVTTFTRENNTSPWVKEASADNVTGIVGTNNGITVAAGTFNPADTIQVVATQGSGGTISDEQRSDDF
TVVAPQPNQATTKIWQNGHIDITPNNPSGHLINPTQAMDIAYTEKVGNGAEHSKTINVVRGQNNQWTIANXPDYVTLDAQ
TGKVTFNANTIKPNSSITITPKAGTGHSVSSNPSTLTAPAAHTVNTTEIVKDYGSNVTAAEINNAVQVANKRTATIKNGT
AMPTNLAGGSTTTIPVTVTYNDGSTREVQESIFTKADKRELITAKWHLDDPVSTEGKKPGTITQYNNAMHNAQQQTNTAK
TEAQQVINNERATPQQVSDALTKVRAAQTKIDQAKALLQNKEDNSQLVTSKNNLQSSVNQVPSTAGMTQQSIDNYNAKKR
EAETEITAAQRVIDNGDATAQQISDEKHRVDNALATALNQAKHDLTADTHALEQAVQQLNRTGTTTGKKPASITAYNNSIR

【図１．３】



配列番号 13 ポリペプチド配列

MGNLQTAINDKSGTLASQNFLDADEQKRNAYNQATSAATILNKQTGFNTAKTAVEQALNNVNSAKHALNGTQNLNNAKQ
AAITAINGASDLNQKQKDALKAQANGAQRVSNANDVQRNATELNTAMGQLQHAIADKTNTLASSKVVNADSTKQNAYTTK
VTNAEHIISGTPTVVTTPSEVTAAANQVNSAKQELNSDRERLRVAXQNANTAIDALTQLNTPQKAKLKEQVGQANRLEDVQ
SVQTNGQSGLNNAMKGLRDSINAETTVKASQNYTDASPNNQSTYNSAVSNAKGIINQTNNPTMDTSAITQATTQVNNAKNG
LNGAENLRNAQNTAKQNLNTLSHLTNNQKSAISSQIDRAGHVSEVTAAKNAATELNAQMGNDLSQAHDQNTVKGQVNFTD
ADKAKRDAYTNAVSRAETLINKTQGANTSKQDVEBAAIQNVTSAKNAALNNLTSINNAQKRDLTTKIDQATVAGVEAVSN
KIDQATTVAGVEAVSNTGTQLNTAMANLQNGINDKANTLASSNYHDADSDKKTAYTQAVTNAFNILNKNGSGNLDKAAVE
NALSQVTNAKGALNGNHNLEQAKSNANTTINGLQLATVAQKDKLKQGVQQAQNVAGVTTVKSAKNLAQGTNNLTQAKQTA
NTATKNGQNVLDATERNKTNYNNAVDSANGVINATSNPNMDANALNQIATQVTSTKNALDGTHNLTQAKQTATNAIDGATT
NLNKAQKDALKAQVTSAQRVVANVTSIQQTRNELNTAMGQLQHGIDDENATKQTQKVRDABAQSKKTAYQDAVAAKAILNK
QTGSNSDEKAAVDRALQQVTSTKDALNGDAKLAHAEKAAAROMLGTLNHITNAQRTALEGQINQATTVDGVNTVKTNANTLD
GAWNSLQGAINDKDATLRNQNYLDADSEKNAYTQAVTAABGILNKQTGGNTSKADVDNALNAVTRAKAALNGAENNLRNA
KTSANTTINGLPNLTQLQKDNLKHQVEQAQNNVGVNGVKDKGWTNTNTAMGALRTSIQNDNTTKTSQNYLDASDSNKNNVN
TAVNNANGVINATNNPNMDANAINDMANQVNTTKAALNGAQNLAQAKTNATNTINNAQDLKQKQKDALKTQVNNAQRVSD
ANNVQHTATNELNGAMTALKAAIADKERTKASGNYVNADQERQAYDSKVTNAERNIINGTPNATLTVNDVNSAASQVNAAK
TALNGDNNLRVAKEHANNTIDGLAQLNNVQKAKLKEQVSQATTLDGVQTVKNSSQTLTAMKGLRDSINAETTKAGQNY
TDASPNNRNEYDSAVTAAKAIINQTSNPTMEPNTITQATSQVTTKEHALNGAQNLAQAKTTAKNNLNNLTSINNAQKDAL
TRNIDGATTVAGVNQSTAKATELNNAMHSLQNGINDETQTKQTQKVLDAEPSKKSAYDQAVNAAKAILTKASGNDVDKAA
VEQALQNVNSTKTAINGDAKLNEAKAAAKQTLGTLTHINNAQRNALDNEITQATNVEGVNTVKAKAQQLDGAMGQLETSI
RDKDTTLSQSQNYQDADDAKRTAYSQAVNAAATILNKTAGGNTPKADVRRAMQAVTQANTALNGIQNLERAKQAANTAITN
ASDLNTKQKEALKAQVTSAGRVVSAANGVEHTATNELNTAMTALKRAIADKADTKASGNYVNADANKRQAYDEKVTAAEHIV
SGTPTTTLTPSDVTNAATQVTNAKTQLNGNHNLEVAKQNANTAIDGLTSLNGPQKAKLKEQVGQATTLPNVQTVRDNAQT
LNTAMKGLRDSINAEATIKAGQNYTDASQNKQNDYNNAVTAAKAIIGQTTSPSMIAQEINQAKDQVTAKQQALNGQENLR
TAQTNAKQHLNGLSDLTNAQKDAAKRQIEGATHVNEVTQACQNNADALNTAMTNLKNGIQDQNTIKQGVNFTDADEAKRNA
YTNAVTQAEQILNKAQGPNTAKDGVETALQNVQRAKNELNGNQNVANAKTTAKNALNNLTSINNAQKAALKSQIEGATTV
AGVNQVSTMASELNTAMSNLQRGINDEAATKAAQKYTEADRDKQTAYNDAVTAAKTLDKTAGSNDNKVAVEQALQRVNT
AKTALNGDARLNEARNTAKQQLATMSHLTNAQKANLTEQIERGTTVAGVQGIQANAGTLNQAMNQLRQSIASKDATKSSE
DYQDANADLQANYNDAVTNAEGIISATNNPEMNPDTINQKASQVNSAKSALNGDEKLAAVKQTAKSDIGRLTDLNNAQRT
AANAEVDQAPNLAAVTAAKNKATSLNTAMGNLKHALAEKDNTKRSVNYTDADQPKQQAYDTAVTQAEAITNANGSNANET
QVQAALNQLNQAKNDLNGDNKVAQAKSTAKRALASYSNLNNAQSTAATSQIDNATVPADVTAAQNTANEINTAMSQLQNG
INDQNTVKQQVNFTDADQGKKDAYTNAVTNAQGILDKANGQNMTKAQVEAALNQVTTAKNALNGDANVRQAKSDAKANLG
TLTHLNNAQKQDLTSQIEGATTVNGVNSVKTKAQDLDGAMQRLESAIANKDQTKSANYTAFDNAITQAESY
LNKDHGTNKDKQAVEQAIQSVTSTENALNGDANLQCAKTEATQAIDNLTQLNTPQKTALKQQVNAAQRVSGVTDLKNSAT
SLNNAMDQLKQAIGDHDTIVAGSNYTNASPDKQGAYTDAYNAAKNIVNGSPNVITNAADVTAATQRVNNARTSLNGDTNL
ATAKQQAKDALRQMTHLSDAQKQSITTGQIDSATQVTGVQSVKDNATNLDNAMNQLRNSIANKDEVKASQPYVDADTDKQN
AYNTAVTSAENIINATSQPTLDPSAVTQAANQVNTNKTALNGAQNLANKKQRTTANINRLSHLNNAQKQDLNTQVTNAPN
ISTVNQVKTKAEQLDGAMERLINGIQDKDQVKQSVNFTDADPEKQTAYNNAVTAAENINQANGTNANQSQVEAALSTVT
TTKQALNGDRKVTDAKNNANQTLSTLDNLNNAQKGAVTGNINQAHTVAEVTQAIQTAQENLNTAMGNLKNSLNDKDTTLGS
QNFADADPEKKNAYNEAVNAENINLNKSTGTNVPKDQVEAAMNQVNTTKAALNGTQNLEKAKQHANTAIDGLSHLTNAQK
EALKQLVQQSTTVAEAQGNEQKANNVDAAMDKLRQSIADNATTKQNQNYTDASPNKKDAYNAVTTAQQIDQATNPSILD
PTVINQAAGQVSTSKNALNGNENLEAAKQQATQSLGSLDNLNNAQKQAVTNQINGAHTVDEANQTKQANTAMGNLKSAIT
QAIADKDATKATVNFTDADQAKQQAYNTAVTNAENIISKANGGNAITQTEVSAQIQVVNAAQALNGNANVQPAKDEATAL
INNSNDLNQAQKDALKQQVQNATTVAGVNNVKQTAQELNNAMTQLKQGIADKEQTKADGNYNQAVAKAEIINQTNPSLD
ALISGTPDVVVTPSEITAALNKVTQAKNDLNGNTNLATAKQNVQHAIDQLPNLNQAQRDEYSKQTTQATLVPNVNAIQQA

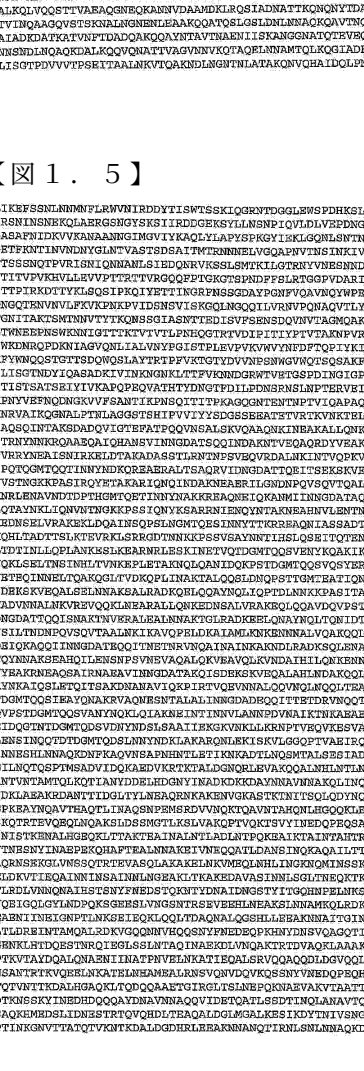
【図１．４】



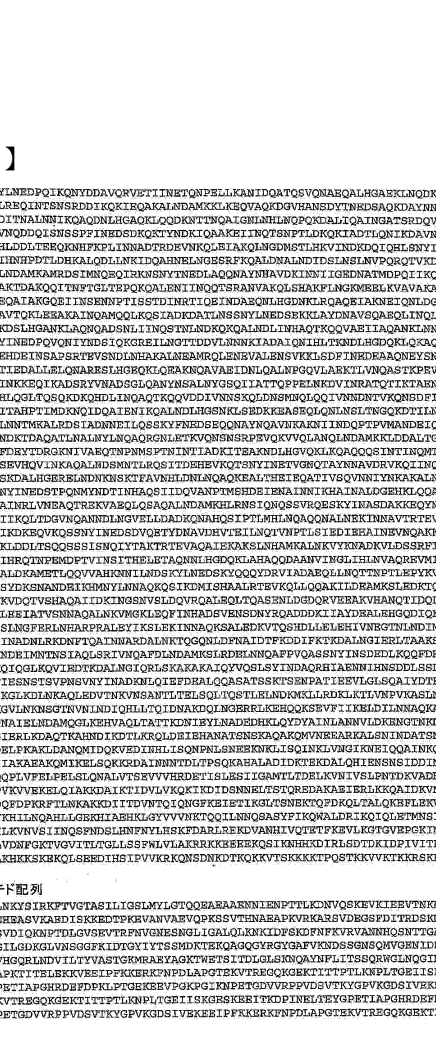
配列番号 14 ポリペプチド配列

MKWRDKLQKFSIRKYAIGTPTVIATLVPMGINTMSASADSLNQRQKLIKQLAQTDDTDSETTRQRSINKEIAQKLAQIQE
LRSSYSQGQAADLSDQFKTDNTRDQQLNFVDTDENQSSEANMNNEDLAVIDESTMAQASEIVSDSTGMASHSSHSSLT
TSNVLASSSSASKNDKEKESHLQSKDKSQQVPPDLKNALQAFFDASYHDVRMIDRDSADATSYQKVESTPDYVNDLLSNNQ
NIPSEQLVSAVQQLEKALELARTLPQQSTTRKRGRSTRSEVPNAIEQFKAKIAQAVQDVKQVQALIDSIDQNPNLT
NLTDEKKQALKDRINQILQQGNNDINNAGTKREISQAAQAQALQDIELDVKAKNAKQDVDKQVQALIDSIDQNPNLT
DLTDEKKQALKDRINQILQQGNNDINNAGTKREISQAAQAQALQDIELDVKAKNAKQDVDKQVQALIDSIDQNPNLT
QDLIAHITNLTQLSARVIDTPSTAGIISGSLTAKIEVTLDSSKVIVNVPVKVFKESLSVVQQAISSIENAAQQKIDEIN
NSVELTLQSKNAAIAEVSKLKQQAIDRVNNAPDVHSVEEIQQQSQAYIHQFNPEQFTIRQAKSNAIKSIEDAIQHMIDEI
KANTDLTDKKEQAIAKLSQLKSAVIAIQRAQSISEITEQLFQQYKQMKAAMPTAKELAKEKQSAISRTKDSFSNKKINS
IRNSEIQTDAEKQAAWHQINRIVNSITIDTINRAFNTLQQVEAALANSGIARISAVQIVISDSAQQSGTQNRSNSHLTIGVG
TANSFPNSSTTIGHKKKLDEDDDIDPLRMRFSSNPNGNVINAIGVVSISGLLASFWFPIAKRKREDRESEELRIRDNMKD
SIKSTLDDTKHLPLLFAKRRKEEDRSDVTPVRKKDSIANGSSDLDKVKEPDFFLPKRRKKDEDDVSVTNRNTDEKVLKDME
HSPLLPARKRKEHDVETTTSIHSSDEDDVPLLAKKENQKTDESQSDDKESASPNTSEKVAAKKKKKSKSKENKK

【図１．５】



【図１．６】



配列番号 15 ポリペプチド配列

MSGTLHNTVGGSKIFYQQSIRIKUTSNEPIDSSWSITGYPWTLTLQNAVGRTNNATKKNLALVGHIDPGNYFTVKPDD
KVEQFEISKSFTPRIITSAWELSGHNHNEPSIAVTDIPNDTTASIKSAVMGSTDGSNDPSINPVTVPSRNYTVVASAYHEN
DPSRNGVTLTPESDYIKDLPLSGSLKAVYYYNQVVSGNFESSVPPSSDTTPTTNEPAGLVHKYYRGDHVETILPVTDWT
GSGGLRDVWNLPQGWTXTFIPNPNNNTRGTLKLIGNIPSMAANTTYKFNITADNGSTTPARTFRIVVGKLADDLN
PVGLSSDLQLQLVTDPPSSLSNSERNEVDKRIGEAANNISVLLQNNDTIAGVSGDVTSYTYDGSTDVIDAENVITYEPSKK
SIPSEWGNTNKEAVTITASGQYTTIGPNLEKYFSLSNGSDLPNRDFTSISATGSLPSSSEISRLVFGKTYRVRVNANNAY
HKTQQELNLKLKIVEVHAPTGNNRVYRVSTYNLVNDSINIKIQAFKAAWSGLNLNNDITVSNDFDHRNVSSVTVIIRKG

【図１．７】

【図１．８】

【図1．7】

TPTLKNPLTGEIISKGESKEEITKDPINELTEYGPETITPGHRDEFDPKLPTGEKEEVPGKPGIKNPETGDVVRPPVDSV
TKYGPVKGDSIVEKEEIPFEKERKFNPDLAPGTEKVTREGQKGEKTITTPTLKNPLTGEIISKGESKEEITKDPVNELTE
FGGEKIPQGHKDIFDPNLPTDQTEKVPGKPGIKNPDTGKVIEEPVDDVIKHGPKTGTPETKTVEIPFETKREFNPKLQPG
EERVKQEGQPGSKTITTPITVNPLTGEKVGEGQPTEEITKQPVDKIVEFGGEKPKDPKGPENPEKPSRPTHPSGPVNPNN
PGLSKDRAKPNGPVHSMDKNDKVKKSKIAKESVANQEKKRAELPKTGLESTQKGLIFSSIIGIAGLMLLARRRKN

配列番号 17 ポリペプチド配列
MGKRRQGPINKKVDFLPNKLNKYSIRKFTVGTASILLGSTLIFGSSSHEAKAAEEKQVDPITQANQNDSSERSLENTNQP
TVNNEAPQMSSTLQAEEGSNAEAPNVPTIKANSDNDTQTQFSEAPTRNDLARKEDIPAVSKNEELQSSQPNTDSKIEPTT
SEPVNLNYSSPFMSLLSMPADSSSNNTKNTIDIPPTTVKGRDNYDFYGRVDIQSNPTDLNATNLTRYNYGQPPGTTTAGA
VQFKNQVSFDKDFDFNIRVANNRQSNTTGADGWGFMFSKKDGDDFLKNGGILREKGTPSAAGFRIDTGYYNNDPLDKIQK
QAGQGYRGYGTFVKNDSQGNTSKVGSGTPSTDFLNYADNTTNDLDGKFHGQKLNNVNLKYNASNQTFTATYAGKTWTATL
SELGLSPTDSYNFLVTSSQYGNGNSGTYADGVMRADLDGATLTYTPKAVDGDPITSTKEIPFNKKREFDPNLAPGTEKVV
QKGEPGIETTTTPTYVNPNTGEKVGEGTPTTKITKQPVDEIVHYGGEEIKPGHKDEFDPNAPKGSQTTQPGKPGVKNPDT
GEVVTPPVDDVTKYGPVDGDPITSTEEIPFDKKREFNPDLKPGEERVKQKGEPGTKTITTPTTKNPLTGEKVGEGEPTEK
ITKQPVDEITEYGGEEIKPGHKDEFDPNAPKGSQEDVPGKPGVKNPDTGEVVTPPVDDVTKYGPVDGDPITSTEEIPFDK
KREFDPNLAPGTEKVVQKGEPGTKTITTPTTKNPLTGEKVGEGEPTEKITKQPVDEIVHYGGEEIKPGHKDEFDPNAPKG
SQEDVPGKPGVKNPDTGEVVTPPVDDVTKYGPVDGDPITSTEEIPFDKKREFNPDLKPGEERVKQKGEPGTKTITTPTTK
NPLTGEKVGEGEPTEKVTKQPVDEIVHYGGEEIKPGHKDEFDPNAPKGSQEDVPGKPGVKNPDTGEVVTPPVDDVTKYGP
VDGDPITSTEEIPFDKKREFDPNLAPGTEKVVQKGEPGTKTITTPTTKNPLTGEKVGEGEPTEKITKQPVDEIVHYGGEE
IKPGHKDEFDPNAPKGSQTTQPGKPGVKNPDTGEVVTPPVDDVTKYGPVDGDPITSTEEIPFDKKREFDPNLAPGTEKVV
QKGEPGTKTITTPTTKNPLTGEKVGEGEPTEKITKQPVDEIVHYGGEQIPQGHKDEFDPNAPVDSKTEVPGKPGVKNPDT
GEVVTPPVDDVTKYGPKVGNPITSTEEIPFDKKRVFNPDLKPGEERVKQKGEPGTKTITTPILVNPITGEKVGEGKSTEK
VTKQPVDEIVEYGPTKAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGTPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPG
TPAEPGKPAEPGKPAEPGKPAEPGTPAEPGKPAEPGTPAEPGKPAEPGTPTQSGAPEQPNRSMHSTDNKNQLPDTGENRQ
ANEGTLVGSLLAIVGSLFIFGRRKKGNEK

配列番号 18 ポリペプチド配列
MKKLYTSYGTYGFLHQIKINNPTHQLFQFSASDTSVIFEETDGETVLKSPSIYEVIKEIGEFSEHHFYCAIFIPSTEDHA
YQLEKKLISVDDNFRNFGGFKSYRLLRPAKGTTYKIYFGFADRHAYEDFKQSDAFNDHFSKDALSHYFGSSGQHSSYFER
YLYPIKE

配列番号 19 ポリペプチド配列
MYLYTSYGTYQFLNQIKLNHQERSLFQFSTNDSSIILEESEGKSILKHPSAYQVIDSTGEFNEHHFYSAIFVPTSEDHRQ
QLEKKLLLVDVPLRNFGGFKSYRLLKPTEGSTYKIYFGFANRTAYEDFKASDIFNENFSKDALSQYFGASGQHSSYFERY
LYPIEDH

配列番号 20 ポリペプチド配列
MINRDNKKAITKKGMISNRLNKFSIRKYTVGTASILVGTTLIFGLGNQEAKAAENTSTENAKQDDATTSDNKEVVSETEN
NSTTENDSTNPIKKETNTDSQPEAKEESTTSSTQQQQNNVTATTETKPQNIEKENVKPSTDKTATEDTSVILEEKKAPNY
TNNDVTTKPSTSEIQTKPTTPQESTNIENSQPQPTPSKVDNQVTDATNPKEPVNVSKEELKNNPEKLKELVRNDNNTDRS
TKPVATAPTSVAPKRLNAKMRFAVAQPAAVASNNVNDLITVTKQTIKVGDGKDNVAAAHDGKDIEYDTEFTIDNKVKKGD
TMTINYDKNVIPSDLTDKNDPIDITDPSGEVIAKGTFDKATKQITYTFTDYVDKYEDIKARLTLYSYIDKQAVPNETSLN
LTFATAGKETSQNVSVDYQDPMVHGDSNIQSIFTKLDENKQTIEQQIYVNPLKKTATNTKVDIAGSQVDDYGNIKLGNGS
TIIDQNTEIKVYKVNPNQQLPQSNRIYDFSQYEDVTSQFDNKKSFSNNVATLDFGDINSAYIIKVVSKYTPTSDGELDIA
QGTSMRTTDKYGYYNYAGYSNFIVTSNDTGGGDGTVKPEEKLYKIGDYVWEDVDKDGVQGTDSKEKPMANVLVTLTYPDG
TTKSVRTDANGHYEFGGLKDGETYTVKFETPAGYLPTKVNGTTDGEKDSNGSSITVKINGKDDMSLDTGFYKEPKYNLGD
YVWEDTNKDGIQDANEPGIKDVKVTLKDSTGKVIGTTTTDASGKYKFTDLDNGNYTVEFETPAGYTPTVKNTTAEDKDSN
GLTTTGVIKDADNMTLDSGFYKTPKYSLGDYVWYDSNKDGKQDSTEKGIKDVKVTLLNEKGEVIGTTKTDENGKYRFDNL
DSGKYKVIFEKPAGLTQTVTNTTEDDKDADGGEVDVTITDHDDFILDNGYFEEDTSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDS
DSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDS
DSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDAGKHTPVKPMSTTKDHHNKAKALPETGSENNGSNNATLF
GGLFAALGSLLLFGRRKKQNK

配列番号 21 ポリペプチド配列
MINKKNNLLTKKKPIANKSNKYAIRKFTVGTASIVIGATLLFGLGHNEAKAEENSVQDVKDSNTDDELSDSNDQSSDEEK
NDVINNNQSINTDDNNQIIKKEETNNYDGIEKRSEDRTESTTNVDENEATFLQKTPQDNTHLTEEEVKESSSVESSNSSI
DTAQQPSHTTINREESVQTSDNVEDSHVSDFANSKIKESNTESGKEENTIEQPNKVKEDSTTSQPSGYTNIDEKISNQDE
LLNLPINEYENKARPLSTTSAQPSIKRVTVNQLAAEQGSNVNHLIKVTDQSITEGYDDSEGVIKAHDAENLIYDVTFEVD

【図1．8】

DKVKSGDTMTVDIDKNTVPSDLTDSFTIPKIKDNSGEIIATGTYDNKNKQITYTFTDYVDKYENIKAHLKLTSYIDKSKV
PNNNTKLDVEYKTALSSVNKTITVEYQRPNENRTANLQSMFTNIDTKNHTVEQTIYINPLRYSAKETNVNISGNGDEGST
IIDDSTIIKVYKVGDNQNLPDSNRIYDYSEYEDVTNDDYAQLGNNNDVNINFGNIDSPYIIKVISKYDPNKDDYTTIQQT
VTMQTTINEYTGEFRTASYDNTIAFSTSSGQGQGDLPPEKTYKIGDYVWEDVDKDGIQNTNDNEKPLSNVLVTLTYPDGT
SKSVRTDEDGKYQFDGLKNGLTYKITFETPEGYTPTLKHSGTNPALDSEGNSVWVTINGQDDMTIDSGFYQTPKYSLGNY
VWYDTNKDGIQGDDEKGISGVKVTLKDENGNIISTTTTDENGKYQFDNLNSGNYIVHFDKPSGMTQTTTDSGDDDEQDAD
GEEVHVTITDHDDFSIDNGYYDDESDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSD
SDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSD
SDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDNDSDLGNSSDKSTKDKLPDTGANEDYGSKGTLLGTLFAGL
GALLLGKRRKNRKNKN

配列番号 22 ポリペプチド配列
MSNNFKDDFEKNRQSIDTNSHQDHTEDVEKDQSELEHQDTIENTEQQFPPRNAQRRKRRRDLATNHNKQVHNESQTSEDN
VQNEAGTIDDRQVESSHSTESQEPSHQDSTPQHEEEYYNKNAFAMDKSHPEPIEDNDKHETIKDAENNTEHSTVSDKSIA
EQSQQPKPYFATGANQANTSKDKHDDVTVKQDKDESKDHHSGKKGAAIGAGTAGVAGAAGAMGVSKAKKHSNDAQNKSNS
DKSNNSTEDKASQDKSKDHHNGKKGAAIGAGTAGLAGGAASKSASAASKPHASNNASQNHDEHDNHDRDKERKKGGMAKV
LLPLIAAVLIIGALAIFGGMALNNHNNGTKENKIANTNKNNADESKDKDTSKDASKDKSKSTDSDKSKEDQDKATKDESD
NDQNNANQANNQAQNNQNQQQANQNQQQQQQRQGGGQRHTVNGQENLYRIAIQYYGSGSPENVEKIRRANGLSGNNIRNG
QQIVIP

配列番号 23 ポリペプチド配列
MIELIKMEGMIVVSNNNFKDDFEKNRQSINPDEQQTELKEDDKTNENKKEADSQNSLSNNSNQQFPPRNAQRRKRRRETA
TNQSKQQDDKHQKNSDAKTTEGSLDDRYDEAQLQQQHDKSQQQNKTEKQSQDNRMKDGKDAAIVNGTSESPEHKSKSTQN
RPGPKAQQQKRKSESTQSKPSTNKDKKAATGAGIAGAAGVAGAAETSKRHHNKKDKQDSKHSNHENDEKSVKNDDQKQSK
KGKKAAVGAGAAAGVGAAGVAHHNNQNKHHNEEKNSNQNNQYNDQSEGKKKGGFMKILLPLIAAILILGAIAIFGGMALN
NHNDSKSDDQKIANQSKKDSDKKDGAQSEDNKDKKSDSNKDKKSDSDKNADDDSDNSSSNPNATSTNNNDNVANNNSNYT
NQNQQDNANQNSNNQQATQGQQSHTVYGQENLYRIAIQYYGEGTQANVDKIKRANGLSSNNIHNGQTLVIPQ

配列番号 24 ポリペプチド配列
MKNKLIAKSLLTIAAIGITTTTIASTADASEGYGPREKKPVSINHNIVEYNDGTFKYQSRPKFNSTPKYIKFKHDYNILE
FNDGTFEYGARPQFNKPAAKTDATIKKEQKLIQAQNLVREFEKTHTVSAHRKAQKAVNLVSFEYKVKKMVLQERIDNVLK
QGLVR

配列番号 25 ポリペプチド配列
MKTRIVSSVTTTLLLGSILMNPVANAADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKKLLV
IRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGG
LIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAAENFLDPN
KASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWTDRSSERYKIDWEKEEMTN

配列番号 26 ポリペプチド配列
MHMKNKYISKLLVGAATITLATMISNGEAKASENTQQTSTKHQTTQNNYVTDQQKAFYQVLHLKGITEEQRNQYIKTLRE
HPERAQEVFSESLKDSKNPDRRVAQQNAFYNVLKNDNLTEQEKNNYIAQIKENPDRSQQVWVESVQSSKAKERQNIENAD
KAIKDFQDNKAPHDKSAAYEANSKLPKDLRDKNNRFVEKVSIEKAIVRHDERVKSANDAISKLNEKDSIENRRLAQREVN
KAPMDVKEHLQKQLDALVAQKDAEKKVAPKVEAPQIQSPQIEKPKAESPKVEVPQSKLLGYYQSLKDSFNYGYKYLTDTY
KSYKEKYDTAKYYYNTYYKYKGAIDQTVLTVLGSGSKSYIQPLKVDDKNGYLAKSYAQVRNYVTESINTGKVLYTFYQNP
TLVKTAIKAQETASSIKNTLSNLLSFWK

配列番号 27 ポリペプチド配列
MTKHYLNSKYQSEQRSSAMKKITMGTASIILGSLVYIGADSQQVNAATEATNATNNQSTQVSQATSQPINFQVQKDGSSE
KSHMDDYMQHPGKVIKQNNKYYFQTVLNNASFWKEYKFYNANNQELATTVVNDNKKADTRTINVAVEPGYKSLTTKVHIV
VPQINYNHRYTTHLEFEKAIPTLADAAKPNNVKPVQPKPAQPKTPTEQTKPVQPKVEKVKPTVTTTSKVEDNHSTKVVST
DTTKDQTKTQTAHTVKTAQTAQEQNKVQTPVKDVATAKSESNNQAVSDNKSQQTNKVTKHNETPKQASKAKELPKTGLTS
VDNFISTVAFATLALLGSLSLLLFKRKESK

配列番号 28 ポリペプチド配列
MNKQQKEFKSFYSIRKSSLGVASVAISTLLLLMSNGEAQAAAEETGGTNTEAQPKTEAVASPTTTSEKAPETKPVANAVS
VSNKEVEAPTSETKEAKEVKEVKAPKETKAVKPAAKATNNTYPILNQELREAIKNPAIKDKDHSAPNSRPIDFEMKKENG
EQQFYHYASSVKPARVIFTDSKPEIELGLQSGQFWRKFEVYEGDKKLPIKLVSYDTVKDYAYIRFSVSNGTKAVKIVSST

【図1．9】

HFNNKEEKYDYTLMEFAQPIYNSADKFKTEEDYKAEKLLAPYKKAKTLERQVYELNKIQDKLPEKLKAEYKKKLEDTKKA
LDEQVKSAITEFQNVQPTNEKMTDLQDTKYVVYESVENNESMMDTFVKHPIKTGMLNGKKYMVMETTNDDYWKDFMVEGQ
RVRTISKDAKNNTRTIIFPYVEGKTLYDAIVKVHVKTIDYDGQYHVRIVDKEAFTKANTDKSNKKEQQDNSAKKEATPAT
PSKPTPSPVEKESQKQDSQKDDNKQLPSVEKENDASSESGKDKTPATKPTKGEVESSSTTPTKVVSTTQNVAKPTTASSK
TTKDVVQTSAGSSEAKDSAPLQKANIKNTNDGHTQSQNNKNTQENKAKSLPQTGEESNKDMTLPLMALLALSSIVAFVLP
RKRKN

配列番号 29 ポリペプチド配列
MNNKKTATNRKGMIPNRLNKFSIRKYSVGTASILVGTTLIFGLSGHEAKAAEHTNGELNQSKNETTAPSENKTTEKVDSR
QLKDNTQTATADQPKVTMSDSATVKETSSNMQSPQNATASQSTTQTSNVTTNDKSSTTYSNETDKSNLTQAKNVSTTPKT
TTIKQRALNRMAVNTVAAPQQGTNVNDKVHFTNIDIAIDKGHVNKTTGNTEFWATSSDVLKLKANYTIDDSVKEGDTFTF
KYGQYFRPGSVRLPSQTQNLYNAQGNIIAKGIYDSKTNTTTYTFTNYVDQYTNVSGSFEQVAFAKRENATTDKTAYKMEV
TLGNDTYSKDVIVDYGNQKGQQLISSTNYINNEDLSRNMTVYVNQPKKTYTKETFVTNLTGYKFNPDAKNFKIYEVTDQN
QFVDSFTPDTSKLKDVTGQFDVIYSNDNKTATVDLLNGQSSSDKQYIIQQVAYPDNSSTDNGKIDYTLETQNGKSSWSNS
YSNVNGSSTANGDQKKYNLGDYVWEDTNKDGKQDANEKGIKGVYVILKDSNGKELDRTTTDENGKYQFTGLSNGTYSVEF
STPAGYTPTTANAGTDDAVDSDGLTTTGVIKDADNMTLDSGFYKTPKYSLGDYVWYDSNKDGKQDSTEKGIKGVKVTLQN
EKGEVIGTTETDENGKYRFDNLDSGKYKVIFEKPAGLTQTGTNTTEDDKDADGGEVDVTITDHDDFTLDNGYYEEETSDS
DSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSESDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDS
DSDSDSDSDSDSDSDSDSDNDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDS
DSDSDSDSDSDSDAGKHTPTKPMSTVKDQHKTAKALPETGSENNNSNNGTLFGGLFAALGSLLLFGRRKKQNK

配列番号 30 ポリペプチド配列
MNMKKKEKHAIRKKSIGVASVLVGTLIGFGLLSSKEADASENSVTQSDSASNESKSNDSSSVSAAPKTDDTNVSDTKTSS
NTNNGETSVAQNPAQQETTQSSSTNATTEETPVTGEATTTTTNQANTPATTQSSNTNAEELVNQTSNETTSNDTNTVSSV
NSPQNSTNAENVSTTQDTSTEATPSNNESAPQNTDASNKDVVSQAVNPSTPRMRAFSLAAVAADAPAAGTDITNQLTDVK
VTIDSGTTVYPHQAGYVKLNYGFSVPNSAVKGDTFKITVPKELNLNGVTSTAKVPPIMAGDQVLANGVIDSDGNVIYTFT
DYVDNKENVTANITMPAYIDPENVTKTGNVTLTTGIGTNTASKTVLIDYEKYGQFHNLSIKGTIDQIDKTNNTYRQTIYV
NPSGDNVVLPALTGNLIPNTKSNALIDAKNTDIKVYRVDNANDLSESYYVNPSDFEDVTNQVRISFPNANQYKVEFPTDD
DQITTPYIVVVNGHIDPASTGDLALRSTFYGYDSNFIWRSMSWDNEVAFNNGSGSGDGIDKPVVPEQPDEPGEIEPIPED
SDSDPGSDSGSDSNSDSGSDSGSDSTSDSGSDSASDSDSASDSDSASDSDSASDSDSASDSDSASDSDSASDSDSASDSD
SASDSDSASDSDSASDSDSASDSDSASDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSD
SDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSASDSDSDSDSESDSDSDSDSDSDSDSDSD
SESDSDSDSDSDSESDSDSDSDSDSDSASDSDSGSDSDSSSDSDSDSTSDTGSDNDSDSDSNSDSESGSNNNVVPPNSPK
NGTNASNKNEAKDSKEPLPDTGSEDEANTSLIWGLLASLGSLLLFRRKKENKDKK

配列番号 31 ポリペプチド配列
MKNNLRYGIRKHKLGAASVFLGTMIVVGMGQDKEAAASEQKTTTVEENGNSATDNKTSETQTTATNVNHIEETQSYNATV
TEQPSNATQVTTEEAPKAVQAPQTAQPANVETVKEEEKPQVKETTQPQDNSGNQRQVDLTPKKVTQNQGTETQVEVAQPR
TASESKPRVTRSADVAEAKEASDVSEVKGTDVTSKVTVESGSIEAPQGNKVEPHAGQRVVLKYKLKFADGLKRGDYFDFT
LSNNVNTYGVSTARKVPEIKNGSVVMATGEILGNGNIRYTFTNEIEHKVEVTANLEINLFIDPKTVQSNGEQKITSKLNG
EETEKTIPVVYNPGVSNSYTNVNGSIETFNKESNKFTHIAYIKPMNGNQSNTVSVTGTLTEGSNLAGGQPTVKVYEYLGK
KDELPQSVYANTSDTNKFKDVTKEMNGKLSVQDNGSYSLNLDKLDKTYVIHYTGEYLQGSDQVNFRTELYGYPERAYKSY
YVYGGYRLTWDNGLVLYSNKADGNGKNGQIIQDNDFEYKEDTAKGTMSGQYDAKQIIETEENQDNTPLDIDYHTAIDGEG
GYVDGYIETIEETDSSAIDIDYHTAVDSEVGHVGGYTESSEESNPIDFEESTHENSKHHADVVEYEEDTNPGGGQVTTES
NLVEFDEESTKGIVTGAVSDHTTIEDTKEYTTESNLIELVDELPEEHGQAQGPIEEITENNHHISHSGLGTENGHGNYGV
IEEIEENSHVDIKSELGYEGGQNSGNQSFEEDTEEDKPKYEQGGNIVDIDFDSVPQIHGQNKGDQSFEEDTEKDKPKYEH
GGNIIDIDFDSVPQIHGFNKHNEIIEEDTNKDKPNYQFGGHNSVDFEEDTLPKVSGQNEGQQTIEEDTTPPTPPTPEVPS
EPETPMPPTPEVPSEPETPTPPTPEVPSEPETPTPPTPEVPSEPETPTPPTPEVPSEPETPTPPTPEVPAEPGKPVPPAK
EEPKKPSKPVEQGKVVTPVIEINEKVKAVAPTKKAQSKKSELPETGGEESTNKGMLFGGLFSILGLALLRRNKKNNKA

配列番号 32 ポリペプチド配列
MKKRIDYLSNKQNKYSIRRFTVGTTSVIVGATILFGIGNHQAQASEQSNDTTQSSKNNASADSEKNNMIETPQLNTTAND
TSDISANTNSANVDSTTKPMSTQTSNTTTTEPASTNETPQPTAIKNQATAAKMQDQTVPQEANSQVDNKTTNDANSIATN
SELKNSQTLDLPQSSPQTISNAQGTSKPSVRTRAVRSLAVAEPVVNAADAKGTNVNDKVTASNFKLEKTTFDPNQSGNTF
MAANFTVTDKVKSGDYFTAKLPDSLTGNGDVDYSNSNNTMPIADIKSTNGDVVAKATYDILTKTYTFVFTDYVNNKENIN
GQFSLPLFTDRAKAPKSGTYDANINIADEMFNNKITYNYSSPIAGIDKPNGANISSQIIGVDTASGQNTYKQTVFVNPKQ
RVLGNTWVYIKGYQDKIEESSGKVSATDTKLRIFEVNDTSKLSDSYYADPNDSNLKEVTDQFKNRIYYEHPNVASIKFGD
ITKTYVVLVEGHYDNTGKNLKTQVIQENVDPVTNRDYSIFGWNNENVVRYGGGSADGDSAVNPKDPTPGPPVDPEPSPDP
EPEPTPDPEPSPDPEPEPSPDPDPDSDSDSDSGSDSDSGSDSDSESDSDSDSDSDSDSDSDSDSESDSDSESDSDSDSDSDSDS
DSDSDSESDSDSDSDSDSDSDSDSESDSDSESDSESDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSESDSDSDS

【図1．10】

DSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDS
DSDSRVTPPNNEQKAPSNPKGEVNHSNKVSKQHKTDALPETGDKSENTNATLFGAMMALLGSLLLFRKRKQDHKEKA

配列番号 33 ポリペプチド配列
MKKQIISLGALAVASSLFTWDNKADAIVTKDYSKESRVNEKSKKGATVSDYYYWKIIDSLEAQFTGAIDLLEDYKYGDPI
YKEAKDRLMTRVLGEDQYLLKKKIDEYELYKKWYKSSNKNTNMLTFHKYNLYNLTMNEYNDIFNSLKDAVYQFNKEVKEI
EHKNVDLKQFDKDGEDKATKEVYDLVSEIDTLVVTYYADKDYGEHAKELRAKLDLILGDTDNPHKITNERIKKEMIDDLN
SIIDDFFMETKQNRPNSITKYDPTKHNFKEKSENKPNFDKLVEETKKAVKEADESWKNKTVKKYEETVTKSPVVKEEKKV
EEPQLPKVGNQQEVKTTAGKAEETTQPVAQPLVKIPQETIYGETVKGPEYPTMENKTLQGEIVQGPDFLTMEQNRPSLSD
NYTQPTTPNPILEGLEGSSSKLEIKPQGTESTLKGIQGESSDIEVKPQATETTEASQYGPRPQFNKTPKYVKYRDAGTGI
REYNDGTFGYEARPRFNKPSETNAYNVTTNQDGTVSYGARPTQNKPSETNAYNVTTHANGQVSYGARPTQKKPSKTNAYN
VTTHANGQVSYGARPTQKKPSKTNAYNVTTHANGQVSYGARPTYKKPSETNAYNVTTHANGQVSYGARPTQKKPSETNAY
NVTTHADGTATYGPRVTK

配列番号 67 ポリペプチド配列
MKSNLRYGIRKHKLGAASVFLGTMIVVGMGQEKEAAASEQNNTTVEESGSSATESKASETQTTTNNVNT
IDETQSYSATSTEQPSKSTQVTTEEAPTTVQAPKVETEMKSQEDLPSEKVADKETTGTQVDIAQPSNVS
EIKPRMKRSADVTAVSEKEVAEEAKATGTDVTNKVEVTESSLEGHNKDSNIVNPHNAQRVTLKYKWKFG
EGIKAGDYFDFTLSDNVETHGISTLRKVPEIKS
STEDKVMANGQVINERTIRYTFTDYINNKKDLTAELNLNLFIDPTTVTKQGSQKVEVTLGQNKVSKEFD
IKYLDGVKDRMGVTVNGRIDTLNKEEGKFSHFAYVKPNNQSLTSVTVTGQVTSGYKQSANNPTVKVYKH
IGSDELAESVYAKLDDTSKFEDVTEKVNLSYTSNGGYTLNLGDLDNSKDYVIKYEGEYDQNAKDLNFRT
HLSGYHKYYPYYPYYPYYPVQLTWNNGVAFYSN
NAKGDGKDKPNDPIIEKSEPIDLDIKSEPPVEKHELTGTIEESNDSKPIDFEYHTAVEGAEGHAEGIIE
TEEDSIHVDFEESTHENSKHHADVVEYEEDTNPGGGQVTTESNLVEFDEESTKGIVTGAVSDHTTVEDT
KEYTTESNLIELVDELPEEHGQAQGPIEEITENNHHISHSGLGTENGHGNYGVIDEIEENSHVDIKSEL
GYEGGQNSGNQSFEEDTEEDKPKYEQGGNIVDI
DFDSVPQIHGQNNGNQSFEEDTEEDKPKYEQGGNIIDIDFDSVPQIHGFNKHNEIIEEDTNKDKPNYQF
GGHNSVDFEEDTLPKVSGQNEGQQTIEEDTTPPTPPTPEVPSEPETPTPPTPEVPSEPGEPTPPKPEVP
SEPETPVPPTPEVPSEPGKPVPPAKEEPKKPSKPVEQGKVVTPVIEINEKVKAVAPTKQKQSKKSELPE
TGGEESTNKGMLFGGLFSILGLVLLRRNKKNNK
A

配列番号 68 ポリペプチド配列
MKFKSLITTTLALGVIASTGANFNTNEASAAAKPLDKSSSTLHHGHSNIQIPYTITVNGTSQNILSSLT
FNKNQNISYKD
IENKVKSVLYFNRGISDIDLRLSKQAEYTVHFKNGTKRVIDLKSGIYTADLINTSDIKAISVNVDTKKQ
PKDKAKANVQV
PYTITVNGTSQNILSNLTFNKNQNISYKDLEGKVKSVLESNRGITDVDLRLSKQAKYTVNFKNGTKKVI
DLKSGIYTANL
INSSDIKSININVDTKKHIENKAKRNYQVPYSINLNGTSTNILSNLSFSNKPWTNYKNLTSQIKSVLKH
DRGISEQDLKY
AKKAYYTVYFKNGGKRILQLNSKNYTANLVHAKDVKRIEITVKTGTKAKADRYVPYTIAVNGTSTPILS
KLKISNKQLIS
YKYLNDKVKSVLKSERGISDLDLKFAKQAKYTVYFKNGKKQVVNLKSDIFTPNLFSAKDIKKIDIDVKQ
YTKSKKKINKS
NNVKFPVTINKFENIVSNEFVFYNASKITINDLSIKLKSAMANDQGITKHDIGLAERAVYKVYFKNGSS
KYVDLKTEYKD
ERVFKATDIKKVDIELKF

配列番号 69 ポリペプチド配列
MNNKKTATNRKGMIPNRLNKFSIRKYSVGTASILVGTTLIFGLSGHEAKAAEHTNGELNQ
SKNETTAPSENKTTKKVDSRQLKDNTQTATADQPKVTMSDSATVKETSSNMQSPQNATAN
QSTTKTSNVTTNDKSSTTYSNETDKSNLTQAKDVSTTPKTTTIKPRTLNRMAVNTVAAPQ
QGTNVNDKVHFSNIDIAIDKGHVNQTTGKTEFWATSSDVLKLKANYTIDDSVKEGDTFTF
KYGQYFRPGSVRLPSQTQNLYNAQGNIIAKGIYDSTTNTTTYTFTNYVDQYTNVRGSFEQ
VAFAKRKNATTDKTAYKMEVTLGNDTYSEEIIVDYGNKKAQPLISSTNYINNEDLSRNMT
AYVNQPKNTYTKQTFVTNLTGYKFNPNAKNFKIYEVTDQNQFVDSFTPDTSKLKDVTDQF

【図１．１１】

DVIYSNDNKTATVDLMKGQTSSNKQYIIQQVAYPDNSSTDNGKIDYTLDTDKTKYSWSNS
YSNVNGSSTANGDQKKVNLGDYVWEDTNKDGKQDANEKGIKGVYVILKDSNGKELDRTTT
DENGKYQFTGLSNGTYSVEFSTPAGVTPTTANVGTDLDVDSGLTTTGVIKDADNMTLDS
GFYKTPKYSLGDYVWYDSNKDGKQDSTEKGIKGVKVTLQNEKGEVIGTTETDENGKYRFD
NLDSGKYKVIFEKPAGLTQTGNTTEDDKDADGGKVDVTITDHDDFTLDNGYYEEETSDS
DSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDS
DSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDS
DSDSDSDSDSDSDSDNDSDSDSDSDSDSDAGKHTPAKPMSTVKDQHKTAKALPE
TGSENNNSNNGTLFGGLFAALGSLLLFGRRKKQNK

配列番号 70 ポリペプチド配列

EENSVQDVKDSNTDDELSDSNDQSSDEEKNDVINNNQSINTDDNNQIIKKEETNNYDGIE
KRSEDRTESTTNVDENEATFLQKTPQDNTHLTEEEVKESSSVESSNSSIDTAQQPSHTTI
NEESVQTSDNVEDSHVSDPANSKIKESNTSGKEENTIEQPNKVKEDSTTSQPSGYTNI
DEKISNQDELLNLPINEYENKARPLSTTSAQPSIKRVTVNQLAAEQGSNVNHLIKVTDQS
ITEGYDDSEGVIKAHDAENLIYDVTFEVDDKVKSGDTMTVDIDKNTVPSDLTDSFTIPKI
KDNSGEIIATGTYTDNKNKQITYTFTDYVDKYENIKAHLKLTSYIDKSKVPNNNTKLDVEY
KTALSSVNKTITVEYQRPNENRTANLQSMFTNIDTKNHTVEQTIYINPLRYSAKETNVNI
SGNGDEGSTIIDDSTIIKVYKVGDNQNLPDSNRIYDYSEYEDVTNDDYAQLGNNNDVNIN
FGNIDSPYIIKVISKYDPNKDDYTTIQQTVTMQTTINEYTGEFRTASYDNTIAFSTSSGQ
GQGDLPPEKTYKIGDYVWEDVDKDGIQNTNDNEKPLSNVLVTLTYPDGTSKSVRTDBDGK
YQFDGLKNGLTYKITFETPRGYTPTLKHSGTNPALDSGNSVWVTINGQDDMTIDSGFYQ
TPKYSLGNYVWYDTNKDGIQGDDEKGISGVKVTLKDENGNIISTTTTDENGKYQFDNLNS
GNYIVHFDKPSGMTQTTTDSGDDDEQDADGEEVHVTITDHDDFSIDNGYYDDE

【図２．１】

配列番号 34 ポリヌクレオチド配列

ATGTTACAAGTAACTGATGTGAAGTTTACGGTTTGGAGATCGTAAACTATTTGAAGATGTAAATATAAATTTACAGAAGG
TAATTGTTATGGATTAATTGGTGCGAATGGTGCAGGTAAATCAACATCTTTAAAAATATTATCTGGTGAATTAGATTCTC
AAACAGGACATGTTCATTAGGTAAAAATGAACGTCTAGCTGTTTAAAACAGGACCACIATGCTTATGAAGATGAACGC
GTGCTTGATGTTGTAATTAAAGGTCACGAACGTCTTTATGAGGTTATGAAGAAAAAGATGAAATCTATATGAAGCCAGA
TTTCAGTGATGAAGAATGGATCGTGCTGCTGCTGAACTTGAAGGTGAATTGCAGAAATGAATCGTTGAAGTCGTGAACG
ATGCTGCTAACCTTTTATCTGGTTTAGGTATCGATCCAACTTTACAGGATAAAAAAATGGCTGAATTAGAAAACACCAA
AAAATTAAAGTATCTATTAGCGCAAGTTTATTCCGGTGAACCAGACGTACTATTACTGGATGAGCCTACTAACGGTCTCGA
TATTCCAGCAACTCAGTTGGTTAGAGATTTCTTAATCTAACTTTAATAATACTGTTATCGTAGTATCGCATGACCGTCATT
TCTTAAATAATGTATGTACTCATATCGCTGATTTAGACTTCGGTAAAATTAAAGTTTATGTTGGTAACTATGATTTTGG
TATCAAGCTAGTCAGTTAGCTCAAAAGATGGCTCAAGAACAAAACAGAAAAAGAAGAAAAAATGAAAGATTTACAGGA
CTTATATGCAGTTTCTCAGCTAACGTCTAAATCTAAACAAGCAACAAGTCGTAAAAAACACTTGAGAAAATTGAAAT
TAGATGATATTCAACCATCATCAGAGAAGATATCCTTCGTTAAATCTCACGCCTGAGCATTGGATAACGACTTATTA
ATCGTTCAAAATCTTTCTAAAACAATTGACGCGCAAAAAAGTATTAGATAATGTATCATTCACAATAGAATCCAAATGATAA
AGCGATTTTAATGGAGATAGTGAAATTGCAAAAACAACATTACTTAAAATATTAGCTGAGCAAATGGAACGAGCGAAG
GTTCATTTAAAATGGGGTGTTACTCATCATTAAGTTACTTCCCTAAAGGTAACTCGAGTTCTTGACGTGTGAAATATG
AATCTCGTTGATTGGTTAAGACAATATGCTCCTGAAGATGAACAAACAGAAACATTTTTACGTCGTTTCTAGTTCGTAT
GTTATTTAGTTGTGAAGAAGTTAAGAAAAAAGCTAGTGTCCTTCAGGTGGAGAAAAAGTACGTTGTATGCTAAGTAAA
TGAATTTATCAAGTGCGAATGTACCTTTACTTGACGAACCTACTAACCACTTAGACTTAGAACGTATATACTGCTTCAAT
GATGGTCTTAAATCATTTAAAGGTTCTATCATCTTTACTTCTTATGACTTCGAATTTATCAACACGATTCGCAAACCGTGT
TATCGATTTAAATAAACAAGGCGGCGTTTCAAAAGAAATTCCATATGAAGAATACTTGCAACGAAATCGGCGTTTTAAAAT
AA

配列番号 35 ポリヌクレオチド配列

ATGTTACAAGTAACTGATGTGAAGTTTACGGTTTGGTGATCGTAAACTATTTGAAGATGTAAATATAAATTTACAGAGGG
CAATTGTTATGGATTAATTGGTGCGAATGGTGCAGGTAAATCAACTACATTCTTGAAGATTTATCAGGCGAAATTGATTCAC
AGACTGGTCATGTATCTCTAGGTAAAGATGAGCGTTTGGCTGTTTTAAACAAGACTATTTGCTATGAAGATGAACGT
GTTTTAGATGTTGTAATTAAAGGACATGAACGTTTGTATCAAGTGATGAAAGAGAAAAATGAAATTTATATGAAACCTGA
TTTCAGCGATGAGGACGGCTATTGCGCTGCAGAACTTGAAGGAGAATTGCAGAAATGAATCGTTGAAGTCGTGAACGTG
ATGCTGCTAACTTATTATCTGGAGATTGCTTGAAGGAAATTGCAGATTATGAAGCCTGGATGCTGAAGCTGGATGCTGC
TAACCTTTTATCTGGTTTAGGTATTGATCCAACTTTACAGGATAAAAAAATGGCTGAATTAGAAAACACCAAAAAATTA
AAGTATCTATTAGCGCAAGTTTATTCCGGTGAACCAGACGTACTATTACTGGATGAGCCTACTAACGGTCTCGATATTC
CAGCAACTCAGTTGGTTAGAGATTTCTTAATCTAACTTTAATAATACTGTTATCGTAGTATCGCATGACCGTCATTTCTT
AAATAATGTATGTACTCATATCGCTGATTTAGACTTCGGTAAAATTAAAGTTTATGTTGGTAACTATGATTTTGGTATC
AAGCTAGTCAGTTAGCTCAAAAGATGGCTCAAGAACAAAACAGAAAAAGAAGAAAAAATGAAAGATTTACAGGACTTA
TATGCAGTTTCTCAGCTAACGTCTAAATCTAAACAAGCAACAAGTCGTAAAAAACACTTGAGAAAATTGAAATTAGATG
ATATTCAACCATCATCAGAGAAGATATCCTTCGTTAAATCTCACGCCTGAGCATTGGATAACGACTTATTAATCGTTCAA
AATCTTTCTAAACAATTGACGCGCAAAAAAGTATTAGATAATGTATCATTCACAATAGAATCCAAATGATAAAGCGATTT
TAATGGAGATAGTGAAATTGCAAAAACAACATTACTTAAAATATTAGCTGAGCAAATGGAACGAGCGAAGGTTCATTTA
AAATGGGGTGTTACTCATCATTAAGTTACTTCCCTAAAGGTAACTCGAGTTCTTGACGTGTGAAATATGAATCTCGTTG
ATTGGTTAAGACAATATGCTCCTGAAGATGAACAAACAGAAACATTTTTACGTCGTTTCTAGTTCGTATGTTATTTAGTT
GTGAAGAAGTTAAGAAAAAAGCTAGTGTCCTTCAGGTGGAGAAAAAGTACGTTGTATGCTAAGTAAATGAATTTATCA
AGTGCGAATGTACCTTTACTTGACGAACCTACTAACCACTTAGACTTAGAACGTATATACTGCTTCAATGATGGTCTTA
AATCATTTAAAGGTTCTATCATCTTTACTTCTTATGACTTCGAATTTATCAACACGATTCGCAAACCGTGTTATCGATTT
AAATAAACAAGGCGGCGTTTCAAAAGAAATTCCATATGAAGAATACTTGCAACGAAATCGGCGTTTTAAAATAA

配列番号 36 ポリヌクレオチド配列

ATGCCAATTATTACAGATGTTTACGCTCGCGAAGTCTTAGACTCTCGTGGTAACCCAACTGTTGAAGTAGAAGTATTAAC
TGAAAGTGGCGCATTTGGTCGTGCATTAGTACAACAGGTCGTCAACTGGTGAACACGAAGCTGTTGAATTACGTGATG
GAGACAATACAGTATACGTCGTAAGATGAACCTTACGTGAACTTTACTCCTGAAGGTAAATTTGACATCGCACCAGAAATTATT
GAAGTTAAATTTCAGTATTAGATCAAGTTATCTATTGATAAAATGATGGTCGCATGACGTACTCCAAACAAAGGTAA
APTAGGTGCAAATGCTATTTTAGGTGTATCTATCGCAGTAGCACGTGCAGCAGCTGACTTATTAGGTCAACCACTTTACA
AATATTTAGGTGGATTTAATGGTAAGCAGTTACAGTACCAATGATGAACATCGTTAATGGTGGTTCTCACTCAGATGCA
CCAATTGCTTTCCAAGAGTTCATGATTTTACCTGTAGGTGCTGAGTCATTCAAAGAATCATTACGTTGGGGTGCAGAAAT
CTTCCATAACCTTAAATCAATCTTAAGTGAACGTGGTTTAGAAACTGCAGTAGGTGATGAAGGTGGTTTCGCTCCTAGAT
TTGAAGGCACTGAAGACGCTGTAGAAACTATTATTAAAGCTATCGAAAAAGCAGGATACAAACCAGGTGAAGATGTATTC
TTAGGATTTGACTGTGCTTCTTCTGAATTCTATGAAAATGGTGTTTATGATTACACTAAATTCGAAGGTGAACACGGTGC
TAAACGTAGTGCAGCAGAGCAAGTTGACTACTTAGAAGAATTAATAGTGGTAAATATCCAATCATCACTATTGAAGATGGTA
TGGATGAAAACGATTGGGAAGGTTGGAAACAATTAACTGATCGTATCGGTGATAAAGTTCAATTAGTTGGTGATGATTTA
TTCGTAACTAACACTGAAATTTTATCTAAAGGTATCGAACAAGGTATTGGTAACTCAATCTTAATCAAAGTAAACCAAAT
CGGTACATTAACTGAACATTCGATGCTATTGAAATGGCTCAAAAAGCTGGATATACTGCGGTTGTATCTCACCGTTCTG
GTGAAACTGAAGATACTACAATTGCTGATATCGCAGTTGCTACAAATGCAGGCCAAATTAAAACAGGTTCATTATCTAGA
ACTGACCGTATTGCTAAATACAATCAATTATTACAGTATTGAAGATGAATTATACGAAACAGCTAAATTTGAAGGAATTAA
ATCTTTCTACAATTTAGATAAATAA

配列番号 37 ポリヌクレオチド配列

ATGCCAATTATTACAGATGTTTACGCTCGCGAAGTCTTAGACTCACGTGGTAACCCAACAGTTGAAGTTGAAGTATTAAC
TGAAAGCGGTGCTTTCGGACGTGCATTAGTACTTCTGGTGCTTCTACTGGTGAACATGAAGCAGTTGAATTACGTGATG
GAGATAAATCACGTTATTTAGGTAAAGGTGTGACTAAAGCGGTAGAAAATGTTAACGAAATGATCGCACCAGAAATCGTT
GAAGGTGAATTTTCAGTTTTAGATCAAGTATCTATTGATAAAATGATGATTCAATTAGACGGTACACACAACAAAGGTAA
ATTAGGTGCAAATGCCATTTTAGGTGTTTCTATTGCCGTAGCTCGTGCAGCTGCTGACTTATTAGGTCAACCATTATATA
AATATTTAGGTGGATTTAATGGTAAACAATTGCCAGTACCTATGATGAATATTGTTAATGGTGGTTCTCACTCAGATGCA
CCAATTGCTTTCCAAGAGTTCATGATTTTACCTGTAGGTGCTGAGTCATTCAAAGAATCATTACGTTGGGGTGCAGAAAT
CTTCCATAACCTTAAATCAATCTTAAGTGAACGTGGTTTAGAAACTGCAGTAGGTGATGAAGGTGGTTTCGCTCCTAGAT
TTGAAGGCACTGAAGACGCTGTAGAAACTATTATTAAAGCTATCGAAAAAGCAGGATACAAACCAGGTGAAGATGTATTC
TTAGGATTTGACTGTGCTTCTTCTGAATTCTATGAAAATGGTGTTTATGATTACACTAAATTCGAAGGTGAACACGGTGC
TAAACGTAGTGCAGCAGAGCAAGTTGACTACTTAGAAGAATTAATAGTGGTAAATATCCAATCATCACTATTGAAGATGGTA
TGGATGAAAACGATTGGGAAGGTTGGAAACAATTAACTGATCGTATCGGTGATAAAGTTCAATTAGTTGGTGATGATTTA
TTCGTAACTAACACTGAAATTTTATCTAAAGGTATCGAACAAGGTATTGGTAACTCAATCTTAATCAAAGTAAACCAAAT
CGGTACATTAACTGAACATTCGATGCTATTGAAATGGCTCAAAAAGCTGGATATACTGCGGTTGTATCTCACCGTTCTG
GTGAAACTGAAGATACTACAATTGCTGATATCGCAGTTGCTACAAATGCAGGCCAAATTAAAACAGGTTCATTATCTAGA
ACTGACCGTATTGCTAAATACAATCAATTATTACAGTATTGAAGATGAATTATACGAAACAGCTAAATTTGAAGGAATTAA
ATCTTTCTACAATTTAGATAAATAA

配列番号 38 ポリヌクレオチド配列

ATGAAAAAAAATCGTTACAGCTACAATCGCTACAGCAGGACTTGCCACTATCGCATTTGCAGGACATGATGCACAAGCCGC
AGAACAAAATACAATGGATATAATTCTAATGACGCTCAATCATACAGCTATACGTATACGTATACAGCAAGGTAATT
ATCATTACACTTGGACAGGAAATTGGAATCCAAGTCAATTAACGCAAAACAACACATACTACACAACAACTACAATACT
TATAGTTATAACAATGCATCACTTACAAATAACTACTATAATCATTCATATCAATACAATAACTATACAACAACAGTACCAAAC
AGCAACAAATAACTATTATACTGGTGGTTCAGGTGCAAGTTATAGCACAACAAGTAATAATGTTCATGTGACTACAACTG
CAGCGCCATCTTCAAATGGTCGTTCAATTTCTAATGGTTATGCATCAGGAAGTAACTTATATACTTCAGGACAATGTACT
TATTATGTATTTGATCGTGTTGGTGGGAAAATTGGTTCAACATGGGGTAACGCAAGTAATTGGGCTAACGCAGCTGCATC
ATCTGGCTATACAGTGAACAATACACCAAAAGTTGGTGCTATCATGCAAACAACAAGGCTATTACGGTCATGTTGCTT
ACGTTGAAGGCGTTACAGCAACGGTTCTGTTCGTGTTTCAGAAATGAACTATGGACATGGTGCTGGTGTGGTTACGTCT
CGTACAATTTCAGCAAACCAAGCAGGTTCATATAATTTCATTCATTAA

配列番号 39 ポリヌクレオチド配列

ATGAAGAAAATCGCTACAGCTACTATCGCAACTGCAGGATTCGCTACAATCGCAATTGCATCAGGAAATCAAGCTCATGC
TTCTGAGCAAGATAACTACGGTTATAATCCAAACGACCCAACATCATATAGCTATACTTACACTATTGATGCACAAGGTA
ACTACCATTACACATGGAAAGGTAACTGGCATCCAAGTCAATTAAACCAAGATAATGGCTACTACAGCTATTACTACTAC
AATGGCTACAATAACTACAACAATTACAACAATGGTTATAGCTACAATAATTACAGCCGTTACAACAACTACTCAAATAA
TAATCAATCATATAACTACAATAACTATAATAGTTACAACACAAACAGCTACCGTACTGGTGGTTTAGGTGCAAGCTACA
GCACTTCAAGCAACAATGTTCAAGTAACTACAACTATGGCTCATCATCAAATGGCCGTTCAATCTCAAGTGGTTATACT
TCAGGACGTAACTTATACACTTCTGGTCAATGTACATACTACGTATTTGATCGTGTAGGTGGTAAAATCGGTTCAACTTG
GGGCAATGCAAGTAACTGGGCTAACGCAGCTGCAAGAGCTGGTTACACAGTGAACAATACACCAAAAGCTGGTGCAATTA
TGCAAACAACTCAAGGTGCATACGGTCACGTTGCAATACGTTGAAAGTGTTACAGCAATGGTTCAGTAAGAGTTTCAGAA
ATGAACTATGGTTATGGCCCAGGTGTTGTAACTTCACGTACAATCTCAGCTAGCCAAGCTGCTGGTTATAACTTCATTCA
CTAA

配列番号 40 ポリヌクレオチド配列

ATGAAAAAAAATCGCTACAGCTACAATTGCAACTGCAGGAATCGCTACTTTCGCATTTGCACACCATGACGCACAAGCAGC
AGAACAAAATAATGATGGGTACAATCCAAACGACCCTTTATTCATATAGCTACACTTACACAATCGATGCTGAAGGTAACT
ACCACTACACTTGGAAAGGTAACTGGAGTCCAGATCGTGTAAATACTTCATATAACTATACACCAAAAGCTGGTGCAATTA
TACTAATGGTTACAATAACTATAGCAACTACAATAACTACAGTAATTACAACAATTACAACAACTACTATCAATCAAACAACAC
GCAATCACAAAGAACAACTCAACCGACTGGTGGTTTAGGCGCAAGCTATTCAACATCAAGTAGTAATGTTCACGTTACAA

CAACTTCTGCGCCATCATCAAACGGTGTATCTTTATCAAACGCTCGCTCAGCATCTGGTAACTTATACACTTCAGGTCAA
TGTACATATTATGTATTTGACAGAGTAGGTGGCAAAATCGGTTCAACGTGGGGTAACGCAAACAACTGGGCAAACGCTGC
AGCACGTTCTGGTTACACAGTAACAATTCGCCTGCTAAAGGTGCATCTATACAAACGTCACAAGGTGCATACGGACACG
TAGCATACGTTGAAGGTGTAAACAGCAATGGTTCAATCAGAGTTTCAGAAATGAACTACGGTCACGGTGCAGGTGTTGTC
ACTTCACGTACAATCTCTGCGAGCCAAGCTGCTTCATATAACTATATTCACTAA

配列番号 41 ポリヌクレオチド配列

ATGAAAAAATTAGTACCTTTATTATTAGCCTTATTACTTCTAGTTGCTGCATGTGGTACTGGTGGTAAACAAAGCAGTGA
TAAGTCAAATGGCAAATTAAAAGTAGTAACGACGAATTCAATTTTATATGATAGCTCAAATCTTACAAACGTCACAAGGTG
TCGATATTCATAGTATTGTACCTGTTGGTCAAGATCCTCATGAATATGAAGTTAAACCTAAAGATATTAAAAAGTTAACT
GACGCTGACGTTATTTTATACAACGGATTAAATTTAGAGACTGGTAACGGTTGGTTTGAAAAGCCTTAGAACAGGCTGG
TAAATCATTAAAAGATAAAAAAGTTATCGCAGTATCAAAAGATGTTAAACCTATCTATTTAAACGGTGAAGAGGCAACA
AAGATAAACAAGATCCACACGCATGGTTAAGTTTAGATAATGGTATTAAATACGTAAAAACAATTCAACAAACATTTATC
GATAACGACAAAAAACATAAAGCAGATTATGAAAGCAAGGTAACAAATACATTGCTCAATTGGAAAATTAAATAATGA
CAGTAAAGACAAATTTAATGACATTCCAAAAGAACACAACGTGCCATGATACAAGTGGTAACTCAAATACATTTATC
AACAATACGGTATTACACCAGGTTATATTTGGGAAATTAACACTGAAAACAAGGTACACCTGAACAAATGAGACAAGCT
ATTGAGTTTGTAAAAAGCAACAAATTAAAACACTTATTAGTAGAAACAAGCGTAGATAAAAAGACAATGGAAAGTTTATC
CCAATTGCATTCCAAGAATTCATGATTTTACCTGTAGGTGCTACACGTTCAAAGAATCATTACGTTGGGGTACTGAAAT
TTTCCACAACTTAAAATCAATTTTAAGCAAAGGTGGTTTAGAAACTGCAGTAGGTGACGAAGGTGGTTTCGCTCCTAAAT
TTGAAGGTACTGAAGATGCTGTTGAAACAATTATCCAAGCAATCGAAGCAGCTGGTTATCAAACAGGTGAAGAAGTATTC

配列番号 42 ポリヌクレオチド配列

GTGAAAAAAATTCTCGCTTTAGCAATAGCATTTTTAATTATCCTTGCCGCATGTGGGAATCACAGTAACCATGAACATCA
CTCACATGAAGGAAAATTAAAAGTTGTAACTACAAACTCTATTCTGTACATGGTTAAACGTGTGCTGGTGGAAAATAAGG
TCGATGTTCATAGCATCGTTCCAGTAGGACAAGACCCACATGAATATGAGGTTAAACCTAAAGATATTAAGCATTAACA
GATGCTGACGTTGTATTTTATACAACGGTTAAACCTAGAAACTGGAAATGGTTGGTTTGAAAAGCCTAAAGATATTAAAG
AAAACCAACAAAGATAAAAATGTGATAGCAGCATCAAATAATGTTAAACCAATATACTTAAATGGTGAGGAAGGTAACA
AAAACAAACAAGATCCACATGCATGGTTAAGTTTAGAGAATGGAATTAATACGTAAAAACAATACAAAAATCACTAGAA
CATCATGATAAAAAAGATAAGTCTACATATGAAAAACAGGGAATGCATATATATCAAAATTAGAAGAACTTAATAAAGA
TAGTAAAAATAAATTTGATGACATACCCAAAAATCAACGTGCCATGATGACAAGTGGAAGGTGCATTTAAATATTTGCTC
AACAATTCGATGTTAAACCAGGTTATATTTGGGAGATAAACACAGAAAAACAAGGTACACCTGGTCAAATGAAACAAGCC
ATTAAATTTGTTAAAGATAATCATTTAAAACATTTATTAGTCGAAACAAGCGTAGATAAAAAGACAATGGAAAGTTTATC
AGAAGAAACTAAGAAAGATATTTATGGTGAAGTATTTACCGACTCTATAGGTAAGGAAGGTACTAAAGGTGACTCATACT
ATAAAATGATGAAATCTAATATTGATACAATACATGGTAGTATGAAATAA

配列番号 43 ポリヌクレオチド配列

ATGAAAAAGACAATTATGGCATCATCATTAGCAGTGGCATTAGGTGTAACAGGTTACGCAGCAGGTACAGGACATCAAGC
ACACGCTGCTGAAGTAAACGTGATCAAGCACACTAGTTGACTAGCGACATAATCACCAAGATCAATTAAATGCAGCTC
CAATCAAAGATGGTGCATATGACATCCACTTTGTAAAAGATGGTGTTCCAATATAACTTTACTTCAAATGGTACTACATGG
TCATGGAGCTATGAAGCAGCTAATGGTCAAACTGCTGGTTTCTCAAAGTTCGACGGTGCAGACTACACTACTTCATACAA
CCAAGGTTCAGATGTACAATCAGTAAGCTACAATGCACAATCAAGTAACTCAAACGTTGAAGCTGTTTCAGCTCCAACTT
ACCATAACTACAGCACTTCAACTACTTCAAGTTCAGTGAGATTAAGCAATGGTAATACTGCAGGTGCTACTGGTTCATCA
GCAGCTCAAATCATGGCTCAACGTACTGGTGTTTCAGCTTCTACATGGGCTGCAATCATCGCTCGTGAATCAAATGGTCA
AGTAAATGCTTACAACCATCAGGTGCTTCAGGTTATTCCAAACTATGCCGTTCAATCTCAAGTGGTTATACTTCAGGACG
TAACTTATACACTTCTGGTCAATGTACATACTACGTATTTGATCGTGTAGGTGGTAAAATCGGTTCAACTTGGGGCAATG
CAAGTAACTGGGCTAACGCAGCTGCAAGAGCTGGTTACACAGTGAACAATACACCAAAAGCTGGTGCAATTATGCAAACA
ACTCAAGGTGCATACGGTCACGTTGCAATACGTTGAAAGTGTTACAGCAATGGTTCAGTAAGAGTTTCAGAAATGAACTA
TGGTTATGGCCCAGGTGTTGTAACTTCACGTACAATCTCAGCTAGCCAAGCTGCTGGTTATAACTTCATTCACTAA

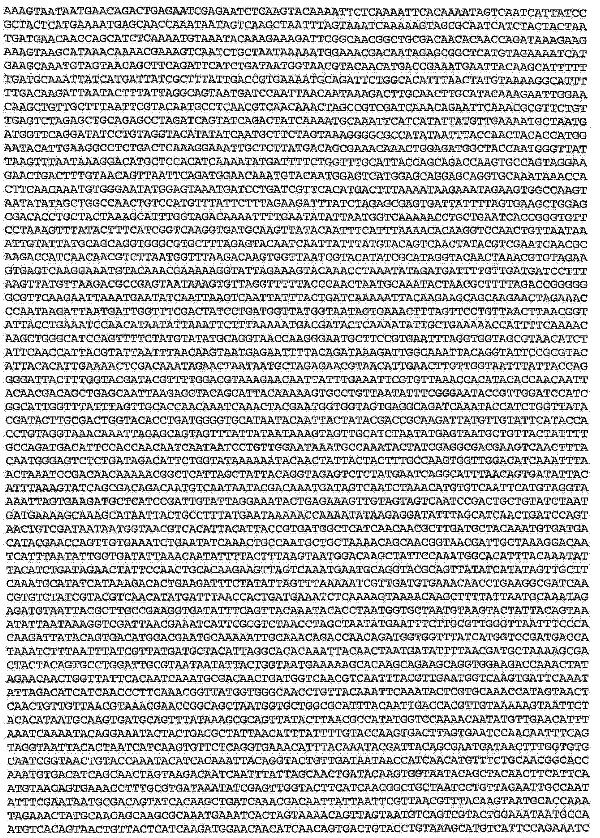
配列番号 44 ポリヌクレオチド配列

ATGAAAAAAACAGTTATCGCTTCTACATTAGCAGTATCTTTAGGAATTGCAGGTTACGGTTTATCAGGACATGAAGCACA
CGCTTCAGAAACTACAAACGTTGATAAAGCACACTTAGTAGATTTAGCACAACATAATCCTGAAGAATTAAATGCTAAAC
CAGTTCAAGCTGGTGCTTACGATATTCATTTCGTAGAGACAATGGATACCAATACACTTCACTTCAATGGTTCTGAATGG
TCATGGAGCTACGCTGTAGCTGGTTCAGATGCTGATTACACAGAATCATCATCAACCAAGAAGTAAGTGCAAATACACA
ATCTAGTAACACAAATGTACAAGCTGTTTCAGCTCCAACTTCTTCAGAAAGTCGTAGCTACAGCACATCAACTACTTCAT
ACTCAGCACCCAAGCCATTAACTACAGCTCTCACAGTAGTTCAGTAAGATTATCAAATGGTAATACTGCTGGTTCTGTAGGT
TCATATGCTGCTCAAATCATGGCTCAACGTACTGGTGTTTCAGCTTCTACATGGGCTGCAATCATCGCTCGTGAATCAAA
TGGTCAAGTAAATGCTTACAACCATCAGGTGCTTCAGGTTATTCCAAACTATGCCGTTCAATCTCAAGTGGTTATACTT
CAGGACGTAACTTATACACTTCTGGTCAATGTACATACTACGTATTTGATCGTGTAGGTGGTAAAATCGGTTCAACTTG
GGGCAATGCAAGTAACTGGGCTAACGCAGCTGCAAGAGCTGGTTACACAGTGAACAATACACCAAAAGCTGGTGCAATTA
TGCAAACAACTCAAGGTGCATACGGTCACGTTGCAATACGTTGAAAGTGTTACAGCAATGGTTCAGTAAGAGTTTCAGAA
ATGAACTATGGTTATGGCCCAGGTGTTGTAACTTCACGTACAATCTCAGCTAGCCAAGCTGCTGGTTATAACTTCATTCA
CTAA

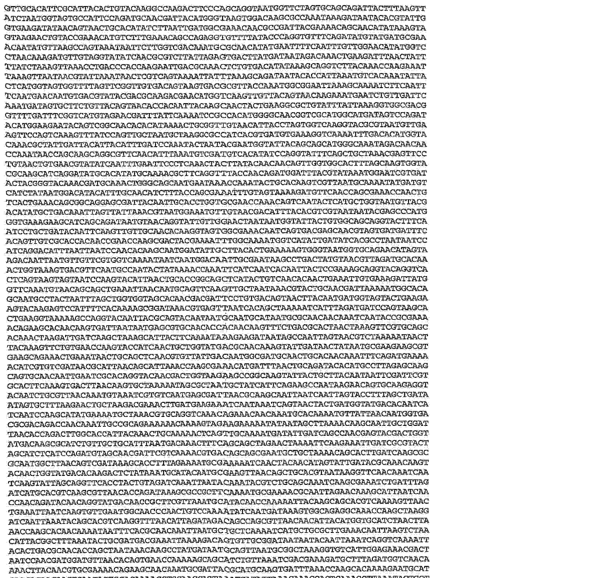
配列番号 45 ポリヌクレオチド配列

GTGAATTATCGTGATAAAATTCAAAAGTTTAGTATTCGTAAATATACAGTTGGTACATTTTCAACTGTCATTGCGACATT
GGTATTTTTAGGATTCAATACATCACAAGCACATGCTGCTGAAACAAATCAACCAGCAAGCGTGGTTAAACAGAAACAAC

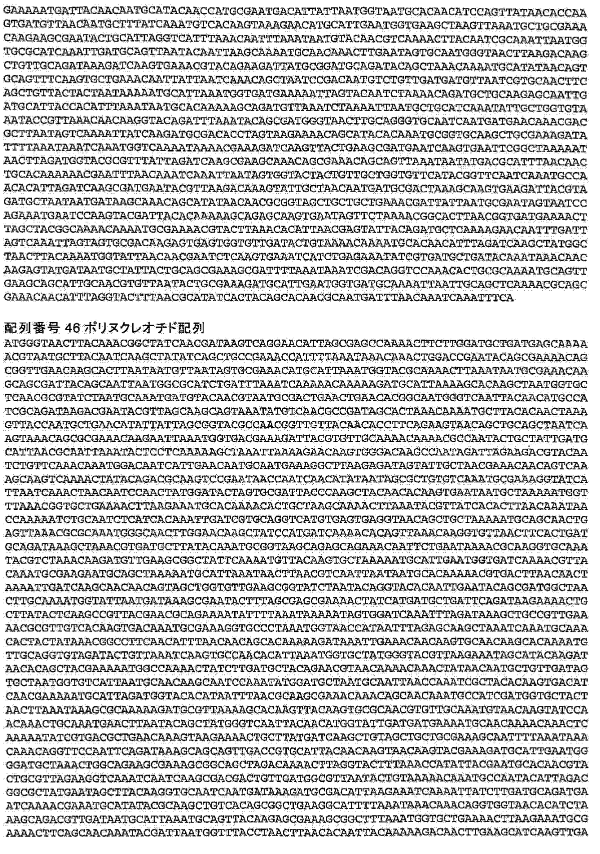
【図２．４】



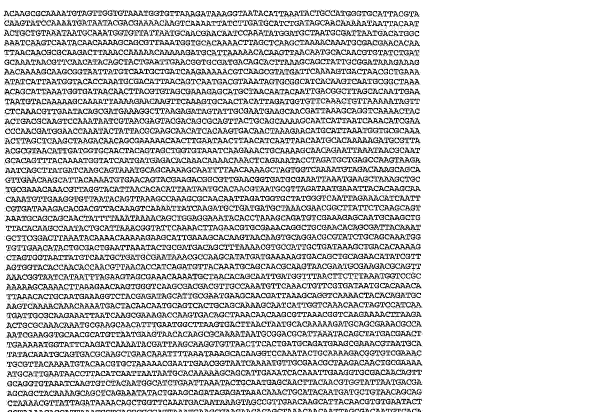
【図２．５】



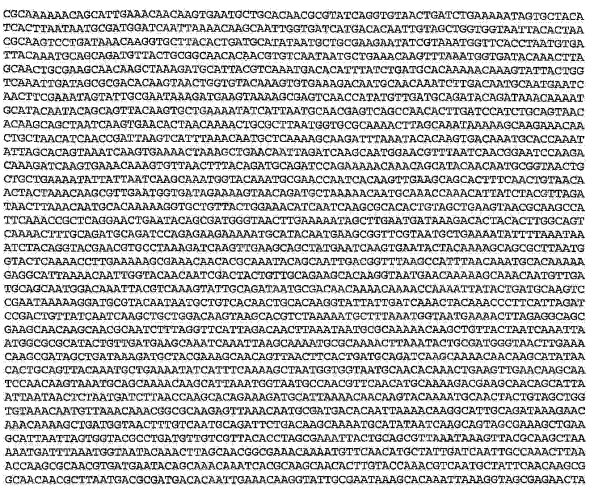
【図２．６】



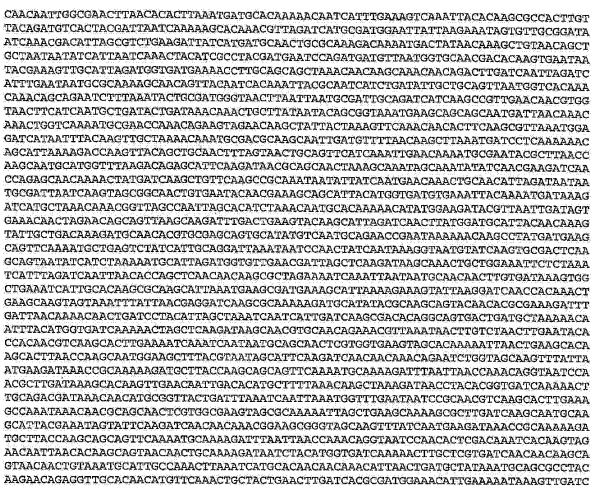
【図２．７】



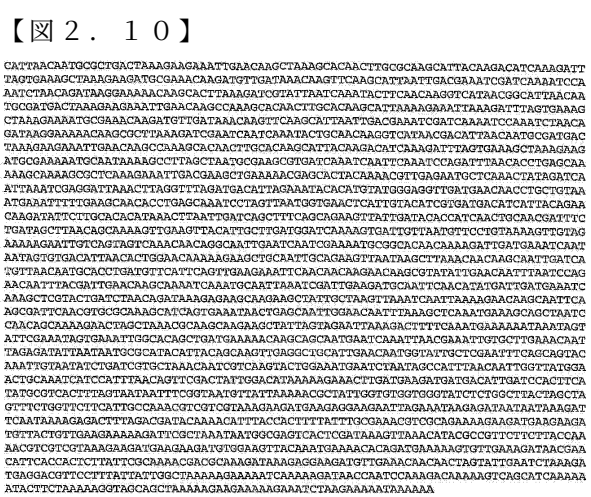
【図２．８】



【図２．９】

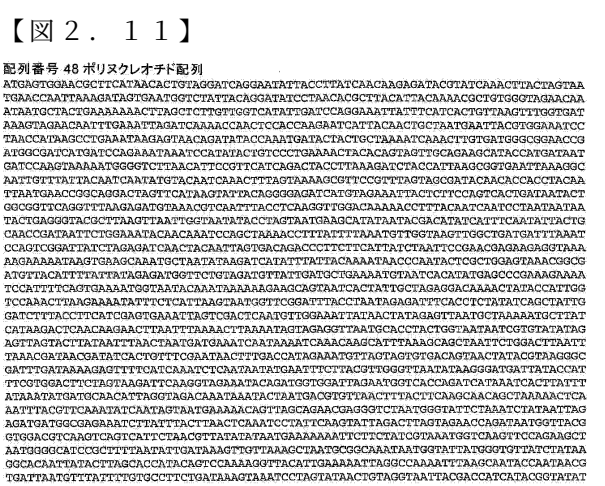


【図２．１０】



【図２．１１】

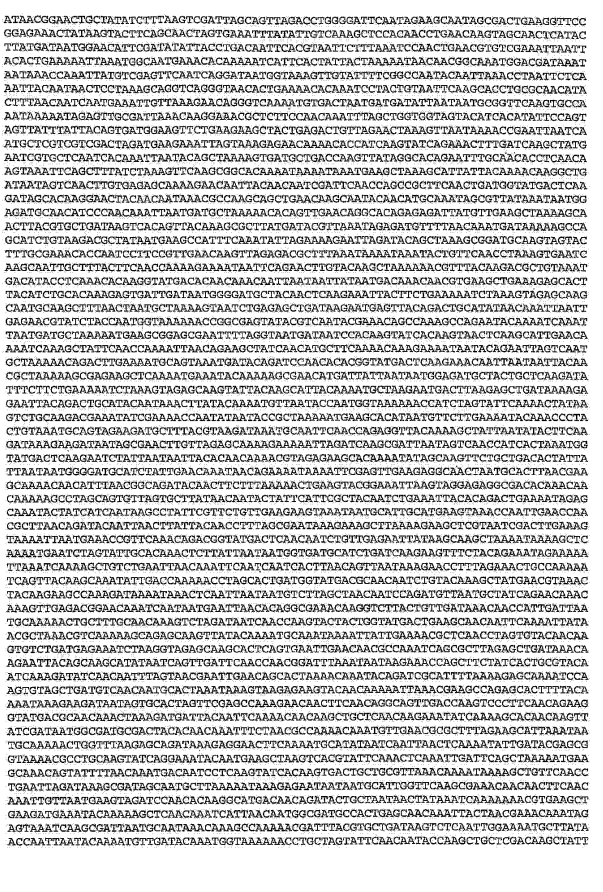
配列番号 48 ポリヌクレオチド配列



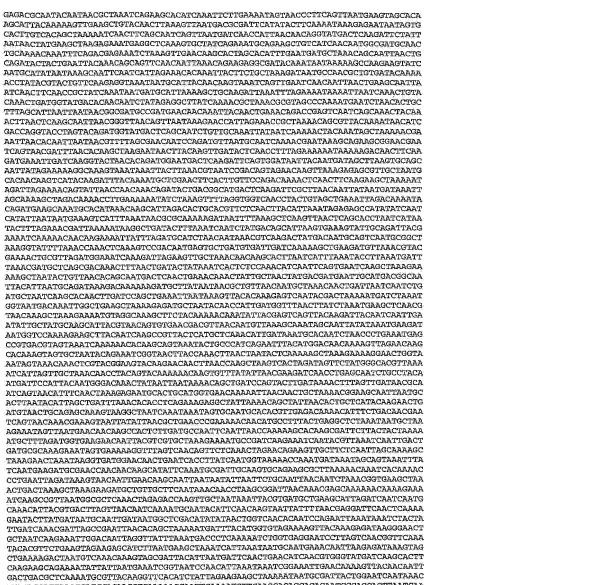
配列番号 47 ポリヌクレオチド配列



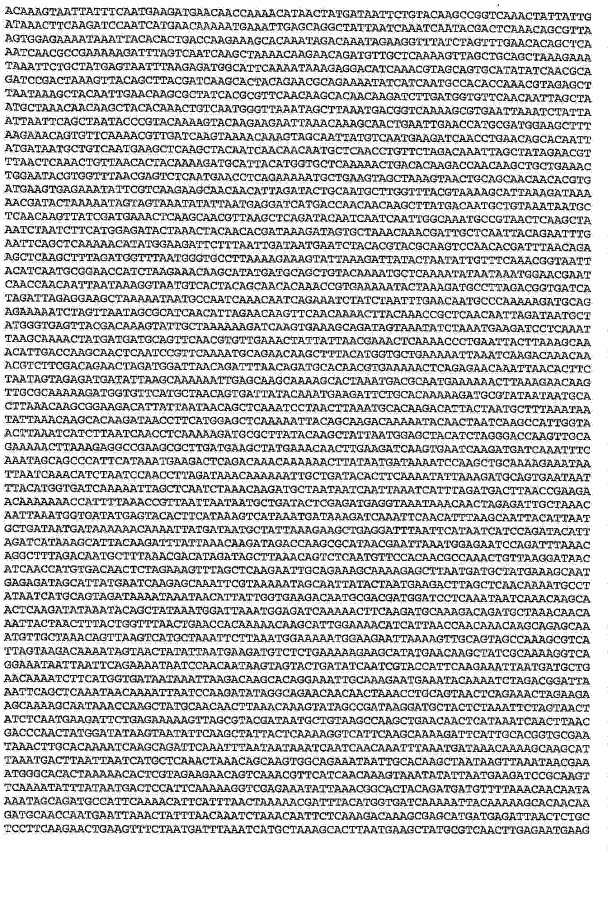
【図２．１２】



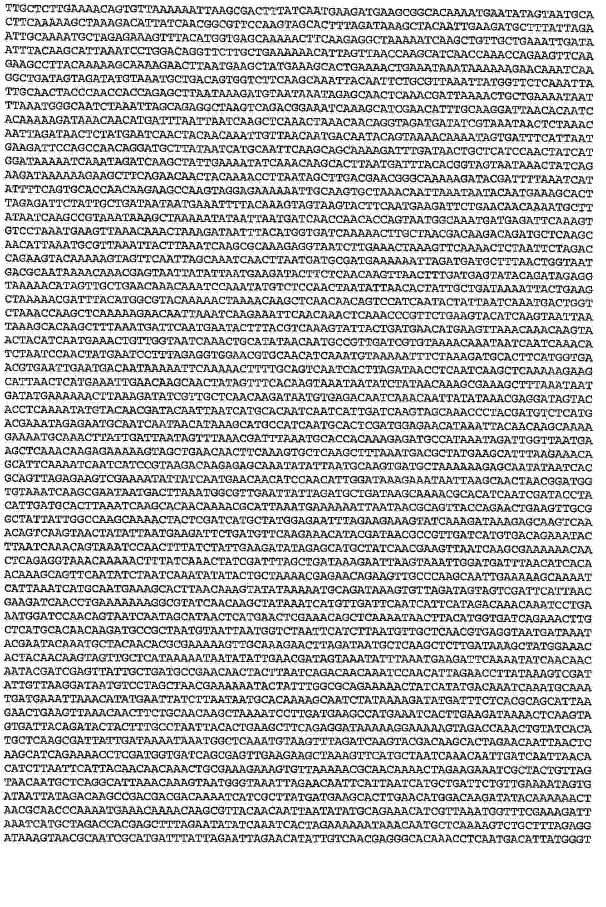
【図２．１３】



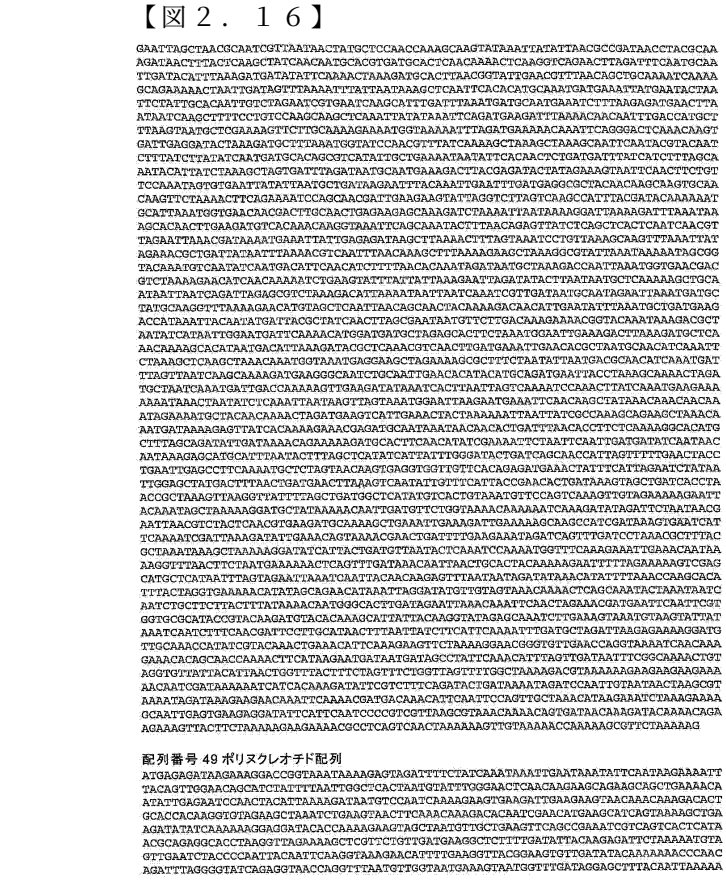
【図２．１４】



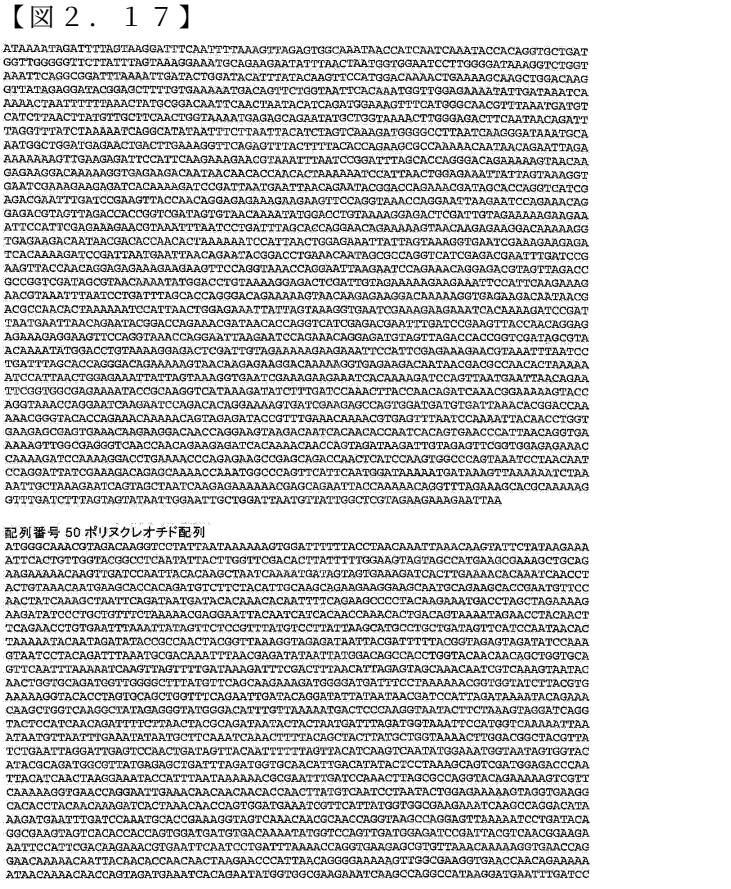
【図２．１５】



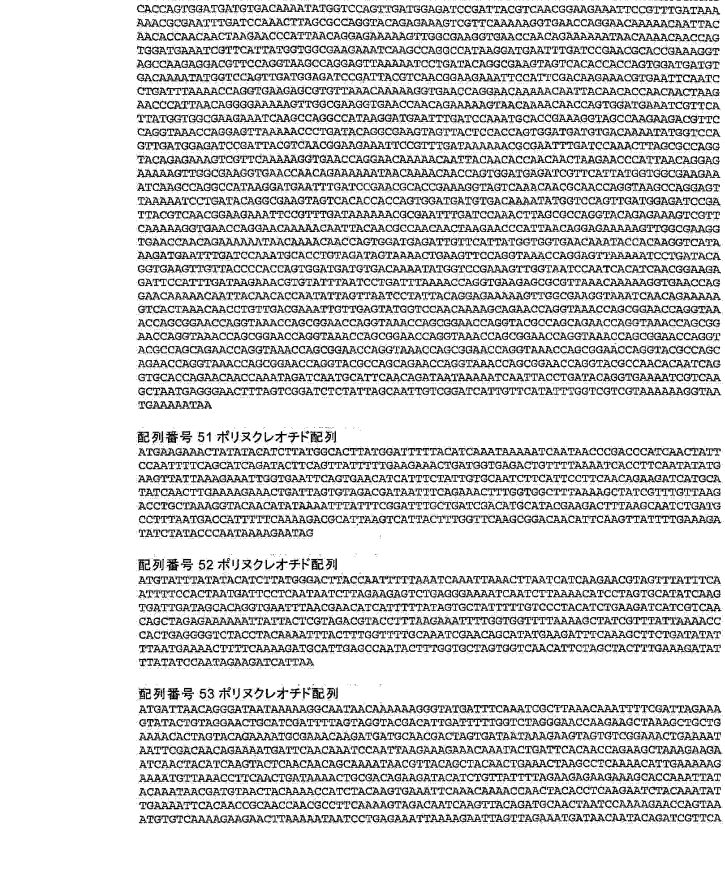
【図２．１６】



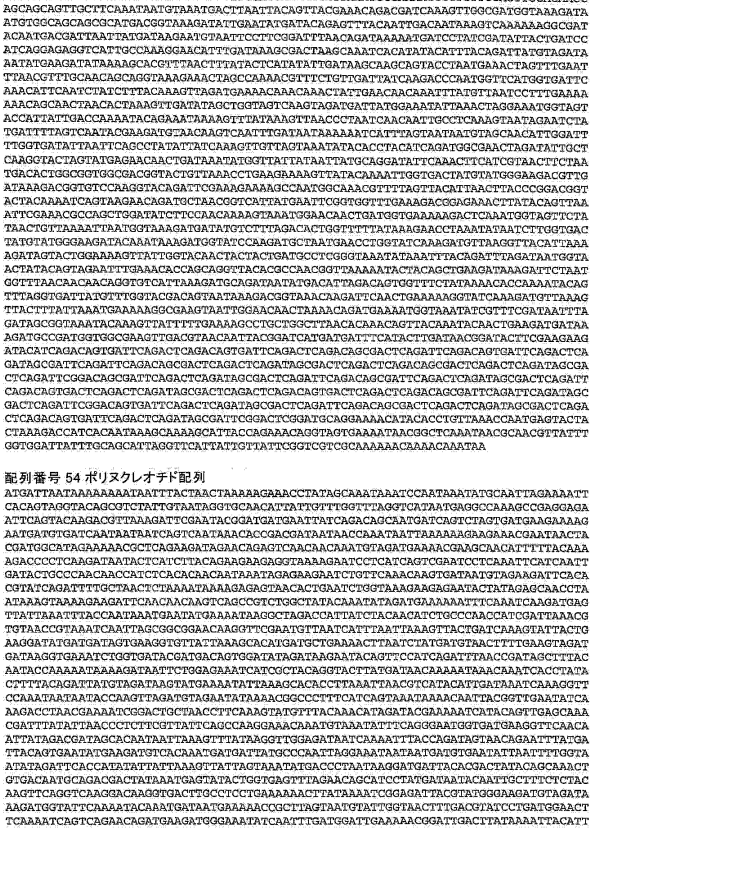
【図２．１７】



【図２．１８】



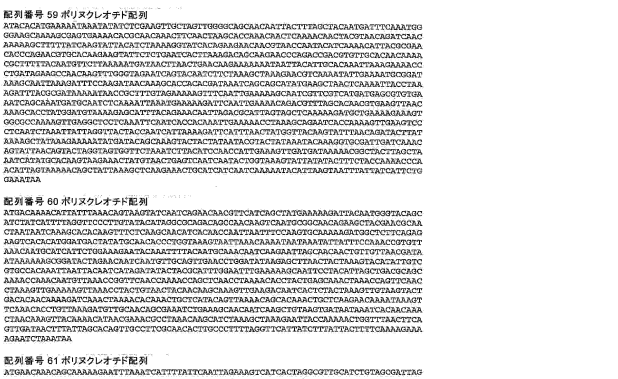
【図２．１９】



【図２．２０】



【図２．２１】



【図２．２２】



【図２．２３】



【図２．２４】

GGTTATGTTGATGGGTATATTGAAACAATAGAAGAAACGGATTCATCAGCTATTGATATCGATTACCATACTGCTGTGGA
TAGTGAAGTGGGTCACGTTGGAGGATACACTGAGTCCTCTGAGGAATCAAATCCAATTGACTTTGAAGAATCGACACATG
AAAATTCAAAACATCACGCTGATGTTGTTGAATATGAAGAGGATACAAATCCAGGTGGTGGCCAAGTAACAACTGAGTCT
AACTTAGTTGAATTTGACGAAGAGTCTACAAAAGGTATTGTAACTGGCGCAGTGAGCGACCATACAACAATTGAAGATAC
GAAAGAATATACGACTGAAAGTAATCTGATTGAACTAGTAGATGAACTACCTGAAGAACATGGTCAAGCACAAGGACCAA
TCGAGGAAATTACTGAAAACAATCATCATATTTCTCATTCTGGTTTAGGAACTGAAAATGGTCACGGTAATTATGGCGTG
ATTGAAGAAATCGAAGAAAATAGCCACGTTGATATTAAGAGTGAATTAGGTTACGAAGGTGGCCAAAATAGCGGTAACCA
GTCATTCGAGGAAGACACAGAAGAAGACAAACCTAAATATGAACAAGGTGGCAATATCGTAGATATCGATTTCGACAGTG
TACCTCAAATTCATGGTCAAAATAAAGGTGACCAGTCATTCGAAGAAGATACAGAGAAAGACAAGCCTAAATATGAACAT
GGCGGTAATATCATTGATATCGACTTCGACAGTGTGCCACAAATTCATGGATTCAATAAGCATAATGAAATTATTGAAGA
AGATACAAACAAAGATAAACCTAATTATCAATTCGGTGGACACAATAGTGTTGACTTTGAAGAAGATACACTTCCAAAAG
TAAGCGGCCAAAATGAAGGTCAACAAACGATTGAAGAAGATACAACGCCGCCAACGCCACCGACACCAGAAGTACCGAGT
GAGCCGGAAACACCAATGCCACCGACACCAGAAGTACCGAGTGAGCCGGAAACACCAACGCCACCAACACCAGAGGTACC
AAGTGAGCCGGAAACACCAACACCACCGACTCCGGAAGTACCAAGTGAGCCGGAAACACCAACACCACCGACACCAGAAG
TGCCGAGTGAGCCAGAAACACCAACACCGCCAACACCAGAGGTACCAGCTGAACCTGGTAAACCAGTACCACCCGCAAAA
GAAGAACCTAAAAAGCCTTCTAAACCAGTGGAACAAGGTAAAGTAGTAACACCTGTTATTGAAATCAATGAAAAGGTTAA
AGCAGTGGCACCAACTAAAAAAGCACAATCTAAGAAATCTGAACTACCTGAAACAGGTGGAGAAGAATCAACAAACAAAG
GTATGTTGTTCGGCGGATTATTCAGCATTCTAGGTTTAGCATTATTACGCAGAAATAAAAAGAATAACAAAGCATAA

配列番号 65 ポリヌクレオチド配列

TTGAAAAAAAGAATTGATTATTTGTCGAATAAGCAGAATAAGTATTCGATTAGACGTTTTACAGTAGGTACCACATCAGT
AATAGTAGGGGCAACTATACTATTTGGGATAGGCAATCATCAAGCACAAGCTTCAGAACAATCGAACGATACAACGCAAT
CTTCGAAAAATAATGCAAGTGCAGATTCCGAAAAAAACAATATGATAGAAACACCTCAATTAAATACAACGGCTAATGAT
ACATCTGATATTAGTGCAAACACAAACAGTGCGAATGTAGATAGCACAACAAAACCAATGTCTACACAAACGAGCAATAC
CACTACAACAGAGCCAGCTTCAACAAATGAAACACCTCAACCGACGGCAATTAAAAATCAAGCAACTGCTGCAAAAATGC
AAGATCAAACTGTTCCTCAAGAAGCAAATTCTCAAGTAGATAATAAAACAACGAATGATGCTAATAGCATAGCAACAAAC
AGTGAGCTTAAAAATTCTCAAACATTAGATTTACCACAATCATCACCACAAACGATTTCCAATGCGCAAGGAACTAGTAA
ACCAAGTGTTAGAACGAGAGCTGTACGTAGTTTAGCTGTTGCTGAACCGGTAGTAAATGCTGCTGATGCTAAAGGTACAA
ATGTAAATGATAAAGTTACGGCAAGTAATTTCAAGTTAGAAAAGACTACATTTGACCCTAATCAAAGTGGTAACACATTT
ATGGCGGCAAATTTTACAGTGACAGATAAAGTGAAATCAGGGGATTATTTTACAGCGAAGTTACCAGATAGTTTAACTGG
TAATGGAGACGTGGATTATTCTAATTCAAATAATACGATGCCAATTGCAGACATTAAAAGTACGAATGGCGATGTTGTAG
CTAAAGCAACATATGATATCTTGACTAAGACGTATACATTTGTCTTTACAGATTATGTAAATAATAAAGAAAATATTAAC
GGACAATTTTCATTACCTTTATTTACAGACCGAGCAAAGGCACCTAAATCAGGAACATATGATGCGAATATTAATATTGC
GGATGAAATGTTTAATAATAAAATTACTTATAACTATAGTTCGCCAATTGCAGGAATTGATAAACCAAATGGCGCGAACA
TTTCTTCTCAAATTATTGGTGTAGATACAGCTTCAGGTCAAAACACATACAAGCAAACAGTATTTGTTAACCCTAAGCAA
CGAGTTTTAGGTAATACGTGGGTGTATATTAAAGGCTACCAAGATAAAATCGAAGAAAGTAGCGGTAAAGTAAGTGCTAC
AGATACAAAACTGAGAATTTTTGAAGTGAATGATACATCTAAATTATCAGATAGCTACTATGCAGATCCAAATGACTCTA
ACCTTAAAGAAGTAACAGACCAATTTAAAAATAGAATCTATTATGAGCATCCAAATGTAGCTAGTATTAAATTTGGTGAT
ATTACTAAAACATATGTAGTATTAGTAGAAGGGCATTACGACAATACAGGTAAGAACTTAAAAACTCAGGTTATTCAAGA
AAATGTTGATCCTGTAACAAATAGAGACTACAGTATTTTCGGTTGGAATAATGAGAATGTTGTACGTTATGGTGGTGGAA
GTGCTGATGGTGATTCAGCAGTAAATCCGAAAGACCCAACTCCAGGGCCGCCGGTTGACCCAGAACCAAGTCCAGACCCA
GAACCAGAACCAACGCCAGATCCAGAACCAAGTCCAGACCCAGAACCGGAACCAAGCCCAGACCCGGATCCGGATTCGGA
TTCAGACAGTGACTCAGGCTCAGACAGCGACTCAGGTTCAGATAGCGACTCAGAATCAGATAGCGATTCGGATTCAGACA
GTGATTCAGATTCAGACAGCGACTCAGAATCAGATAGCGATTCAGAATCAGATAGCGACTCAGATTCAGATAGCGATTCA
GATTCAGATAGCGATTCAGAATCAGATAGCGATTCGGATTCAGACAGTGATTCAGATTCAGACAGCGACTCAGAATCAGA
TAGCGACTCAGAATCAGATAGTGAGTCAGATTCAGACAGTGACTCGGACTCAGACAGTGATTCAGACTCAGATAGCGATT
CAGACTCAGATAGCGATTCAGACTCAGACAGCGATTCAGATTCAGACAGCGACTCAGAATCAGACAGCGACTCAGACTCA
GATAGCGACTCAGACTCAGACAGCGACTCAGATTCAGATAGCGATTCAGACTCAGACAGCGACTCAGACTCAGACAGCGA
CTCAGACTCAGATAGCGATTCAGACTCAGACAGCGACTCAGATTCAGATAGCGATTCGGACTCAGACAGCGATTCAGATT
CAGACAGCGACTCAGACTCGGATAGCGATTCAGATTCAGACAGCGACTCAGACTCGGATAGCGACTCGGATTCAGATAGT
GACTCCGATTCAAGAGTTACACCACCAAATAATGAACAGAAAGCACCATCAAATCCTAAAGGTGAAGTAAACCATTCTAA
TAAGGTATCAAAACAACACAAAACTGATGCTTTACCAGAAACAGGAGATAAGAGCGAAAACACAAATGCAACTTTATTTG
GTGCAATGATGGCATTATTAGGATCATTACTATTGTTTAGAAAACGCAAGCAAGATCATAAAGAAAAAGCGTAA

配列番号 66 ポリヌクレオチド配列

ATGAAAAAGCAAATAATTTCGCTAGGCGCATTAGCAGTTGCATCTAGCTTATTTACATGGGATAACAAAGCAGATGCGAT
AGTAACAAAGGATTATAGTAAAGAATCAAGAGTGAATGAGAAAAGTAAAAAGGGAGCTACTGTTTCAGATTATTACTATT
GGAAAATAATTGATAGTTTAGAGGCACAATTTACTGGAGCAATAGACTTATTGGAAGATTATAAATATGGAGATCCTATC
TATAAAGAAGCGAAAGATAGATTGATGACAAGAGTATTAGGAGAAGACCAGTATTTATTAAAGAAAAAGATTGATGAATA
TGAGCTTTATAAAAAGTGGTATAAAAGTTCAAATAAGAACACTAATATGCTTACTTTCCATAAATATAATCTTTACAATT

【図２．２５】

TAACAATGAATGAATATAACGATATTTTTAACTCTTTGAAAGATGCAGTTTATCAATTTAATAAAGAAGTTAAAGAAATA
GAGCATAAAAAATGTTGACTTGAAGCAGTTTGATAAAGATGGAGAAGACAAGGCAACTAAAGAAGTTTATGACCTTGTTTC
TGAAATTGATACATTAGTTGTAACTTATTATGCTGATAAGGATTATGGGGAGCATGCGAAAGAGTTACGAGCAAAACTGG
ACTTAATCCTTGGAGATACAGACAATCCACATAAAATTACAAATGAGCGTATAAAAAAAGAAATGATCGATGACTTAAAT
TCAATTATAGATGATTTCTTTATGGAGACTAAACAAAATAGACCGAATTCTATAACAAAATATGATCCAACAAAACACAA
TTTTAAAGAGAAGAGTGAAAATAAACCTAATTTTGATAAATTAGTTGAAGAAACAAAAAAAGCAGTTAAAGAAGCAGACG
AATCTTGGAAAAATAAAACTGTCAAAAAATACGAGGAAACTGTAACAAAATCTCCTGTTGTAAAAGAAGAGAAGAAAGTT
GAAGAACCTCAATTACCTAAAGTTGGAAACCAGCAAGAGGTTAAAACTACGGCTGGTAAAGCTGAAGAAACAACACAACC
AGTGGCACAGCCATTAGTAAAAATTCCACAAGAAACAATCTATGGTGAAACTGTAAAAGGTCCAGAATATCCAACGATGG
AAAATAAAACGTTACAAGGTGAAATCGTTCAAGGTCCCGATTTTCTAACAATGGAACAAAACAGACCATCTTTAAGCGAT
AATTATACTCAACCGACGACACCGAACCCTATTTTAGAAGGTCTTGAAGGTAGCTCATCTAAACTTGAAATAAAACCACA
AGGTACTGAATCAACGTTGAAAGGTATTCAAGGAGAATCAAGTGATATTGAAGTTAAACCTCAAGCAACTGAAACAACAG
AAGCTTCTCAATATGGTCCGAGACCGCAATTTAACAAAACACCTAAGTATGTGAAATATAGAGATGCTGGTACAGGTATC
CGTGAATACAACGATGGAACATTTGGATATGAAGCGAGACCAAGATTCAACAAGCCAAGTGAAACAAATGCATACAACGT
AACGACAAATCAAGATGGCACAGTATCATACGGAGCTCGCCCAACACAAAACAAGCCAAGTGAAACAAACGCATATAACG
TAACAACACATGCAAATGGTCAAGTATCATACGGTGCTCGCCCAACACAAAAAAAAGCCAAGCAAAACAAATGCATACAAC
GTAACAACACATGCAAATGGTCAAGTATCATATGGCGCTCGCCCGACACAAAAAAAAGCCAAGCAAAACAAATGCATATAA
CGTAACAACACATGCAAATGGTCAAGTATCATACGGAGCTCGCCCGACATACAAGAAGCCAAGCGAAACAAATGCATACA
ACGTAACAACACATGCAAATGGTCAAGTATCATATGGCGCTCGCCCGACACAAAAAAAAGCCAAGCGAAACAAACGCATAT
AACGTAACAACACATGCAGATGGTACTGCGACATATGGGCCTAGAGTAACAAAATAA

配列番号 71 ポリヌクレオチド配列

GTGAAAAGCAATCTTAGATACGGCATAAGAAAACACAAATTGGGAGCGGCCTCAGTATTCTTAGGAACAATGATCGTTGT
TGGAATGGGACAAGAAAAAGAAGCTGCAGCATCGGAACAAAACAATACTACAGTAGAGGAAAGTGGGAGTTCAGCTACTG
AAAGTAAAGCAAGCGAAACACAAACAACTACAAATAACGTTAATACAATAGATGAAACACAATCATACAGCGCGACATCA
ACTGAGCAACCATCAAAATCAACTCAAGTAACAACAGAAGAAGCACCAACAACTGTGCAAGCACCAAAAGTAGAAACCGA
AATGAAATCACAAGAAGATTTACCATCAGAAAAAGTTGCTGATAAGGAAACTACAGGAACTCAAGTTGACATAGCTCAAC
CAAGTAACGTCTCAGAAATTAAACCAAGAATGAAAAGATCAGCTGACGTTACAGCAGTTTCAGAGAAAGAAGTAGCGGAA
GAAGCTAAAGCGACAGGTACAGATGTAACAAATAAAGTGGAAGTTACTGAAAGCTCTTTAGAAGGACATAATAAAGATTC
GAATATTGTTAATCCGCATAATGCTCAAAGAGTAACTTTAAAATACAAATGGAAATTTGGAGAAGGAATTAAGGCAGGAG
ATTATTTTGATTTCACATTAAGTGATAATGTTGAAACACATGGTATATCAACACTGCGTAAAGTTCCGGAGATAAAAAGT
TCAACAGAAGATAAAGTTATGGCAAATGGTCAAGTTATAAATGAACGTACAATTCGCTATACATTTACTGATTATATAAA
TAACAAAAAAGATTTAACTGCTGAATTAAACTTAAACCTATTCATTGACCCAACAACAGTGACAAAGCAAGGGAGTCAAA
AAGTTGAAGTAACACTAGGTCAAAATAAAGTCTCAAAAGAATTTGATATCAAATATTTAGACGGCGTTAAAGATAGAATG
GGTGTTACTGTTAATGGTCGTATTGATACTTTGAATAAAGAAGAGGGTAAATTTAGCCATTTTGCATATGTGAAGCCTAA
CAACCAGTCGTTAACTTCTGTCACAGTAACTGGTCAAGTAACATCTGGATATAAACAAAGTGCTAATAATCCAACAGTCA
AAGTATATAAACACATTGGTTCAGATGAATTAGCTGAAAGTGTTTATGCAAAGCTTGATGATACCAGTAAATTTGAAGAT
GTGACTGAAAAAGTAAATCTATCTTACACAAGTAATGGTGGGTACACATTGAACCTTGGCGATTTAGATAATTCGAAAGA
CTATGTAATTAAATATGAAGGTGAATATGATCAAAATGCTAAGGATCTAAATTTCCGAACACATCTTTCAGGATATCATA
AATACTACCCATACTATCCTTATTACCCGTATTATCCAGTTCAATTAACTTGGAACAACGGTGTTGCATTTTACTCTAAT
AATGCTAAAGGCGATGGTAAAGATAAACCAAATGATCCTATCATTGAGAAGAGTGAACCAATTGATTTAGACATTAAATC
AGAGCCACCAGTGGAGAAGCATGAATTGACTGGTACAATCGAAGAAAGTAACGATTCTAAGCCAATTGATTTTGAATATC
ATACAGCTGTTGAAGGTGCAGAAGGTCATGCAGAAGGTATTATTGAAACTGAAGAAGATTCTATTCATGTGGATTTTGAA
GAATCTACACATGAAAATTCAAAACATCACGCTGATGTTGTTGAATATGAAGAGGATACAAACCCAGGTGGTGGCCAAGT
AACAACTGAGTCTAACTTAGTTGAATTTGACGAAGAGTCTACAAAAGGTATTGTAACTGGCGCAGTGAGCGACCATACAA
CAGTTGAAGATACGAAAGAATATACAACTGAAAGTAATCTGATTGAATTAGTGGATGAATTACCTGAAGAACATGGTCAA
GCACAAGGGCCAATCGAGGAAATTACTGAAAACAATCATCATATTTCTCATTCTGGTTTAGGAACTGAAAATGGTCACGG
TAATTATGGCGTGATTGATGAAATCGAAGAAAATAGCCACGTTGATATTAAGAGTGAATTAGGTTATGAAGGTGGCCAAA
ATAGCGGTAATCAGTCATTCGAGGAAGACACAGAAGAAGATAAACCTAAATATGAACAAGGTGGTAATATCGTAGATATC
GATTTCGACAGTGTACCTCAAATTCATGGTCAAAATAATGGTAACCAGTCATTCGAGGAAGACACAGAAGAAGACAAGCC
TAAGTATGAACAAGGTGGTAACATCATTGATATCGACTTCGACAGTGTGCCACAAATTCATGGATTCAATAAGCATAATG
AAATTATTGAAGAAGATACAAACAAAGATAAACCTAATTATCAATTTGGTGGACACAACAGTGTTGATTTTGAAGAAGAT
ACACTTCCAAAAGTAAGTGGTCAAAATGAAGGTCAACAAACGATTGAAGAAGATACAACGCCGCCAACACCGCCAACACC
AGAGGTACCAAGTGAGCCGGAAACACCAACACCACCAACACCAGAAGTACCGAGTGAGCCAGGCGAACCAACGCCACCAA
AACCGGAAGTACCAAGTGAGCCGGAAACACCAGTACCACCAACACCAGAGGTACCATCTGAACCTGGTAAACCAGTACCA
CCTGCTAAAGAAGAACCTAAAAAACCTTCTAAACCAGTGGAACAAGGTAAGGTAGTAACACCTGTTATTGAAATCAATGA
AAAGGTTAAAGCAGTGGCACCAACTAAACAAAAACAATCTAAGAAATCTGAACTACCTGAAACAGGTGGAGAAGAATCAA
CAAACAAAGGTATGTTGTTCGGCGGATTATTCAGCATTCTAGGTTTAGTATTATTACGCAGAAATAAAAAGAATAACAAA
GCATAA

【図２．２６】

配列番号 72 ポリヌクレオチド配列

ATGAAATTTAAGTCATTGATTACAACAACATTAGCATTAGGCGTTATAGCATCAACAGGAGCAAACTTTAATACTAACGA
AGCATCTGCCGCAGCTAAGCCATTAGATAAATCATCAAGTACATTACACCATGGACATTCTAACATCCAGATTCCATATA
CAATTACTGTGAACGGTACAAGCCAAAACATTTTATCAAGCTTAACATTTAATAAGAATCAAAATATTAGTTATAAAGAT
ATAGAGAATAAAGTTAAATCAGTTTTATACTTTAATAGAGGTATTAGTGATATCGATTTAAGACTTTCAAAGCAAGCGGA
ATATACGGTTCATTTTAAAAATGGAACAAAAAGAGTTATCGATTTGAAATCAGGTATCTACACAGCTGACTTAATCAATA
CAAGTGACATTAAAGCTATCAGTGTTAACGTAGATACTAAAAAGCAACCTAAAGATAAAGCTAAAGCAAATGTTCAAGTG
CCATATACAATCACAGTGAACGGCACAAGCCAAAACATTTTATCAAACCTAACATTTAATAAAAATCAAAATATTAGTTA
CAAAGATTTAGAGGGTAAAGTTAAATCAGTTTTAGAATCAAATAGAGGTATTACTGATGTTGATTTAAGACTTTCGAAGC
AAGCGAAATATACAGTTAATTTTAAAAATGGAACGAAGAAAGTTATCGATTTGAAATCAGGTATTTACACAGCGAATTTA
ATCAATTCAAGTGATATTAAAAGTATCAATATTAACGTAGATACAAAAAAACATATCGAAAATAAAGCTAAAAGAAACTA
TCAAGTTCCATATTCAATTAATCTAAATGGTACATCTACAAACATTTTATCGAATCTTTCATTTTCAAATAAACCTTGGA
CAAATTACAAAAATTTAACTAGTCAAATAAAATCAGTACTGAAGCATGATAGAGGTATTAGTGAACAAGATTTAAAATAT
GCTAAGAAAGCTTATTATACTGTTTATTTTAAAAATGGTGGTAAAAGAATCTTACAGTTAAATTCAAAAAATTACACAGC
AAACTTAGTTCATGCGAAAGATGTTAAGAGAATTGAAATTACTGTTAAAACAGGAACTAAAGCGAAAGCAGACAGATATG
TACCATACACAATTGCAGTAAATGGCACATCAACACCAATTTTATCAAAACTAAAAATTTCGAATAAACAATTAATTAGT
TACAAATATTTAAACGACAAAGTGAAATCTGTATTAAAAAGTGAAAGAGGTATCAGTGATCTTGACTTAAAATTTGCGAA
ACAAGCAAAATATACAGTATATTTCAAAAATGGAAAGAAACAAGTAGTGAATTTAAAATCAGACATCTTTACACCTAATT
TATTTAGTGCCAAAGATATTAAAAAGATTGATATTGATGTAAAACAATACACTAAATCAAAAAAAAAAAATAAATAAATCT
AATAATGTGAAATTCCCAGTAACAATAAATAAATTTGAAAACATAGTTTCAAATGAATTTGTGTTCTATAATGCAAGCAA
AATTACAATTAATGATTTAAGTATAAAACTTAAATCAGCAATGGCAAATGATCAAGGGATAACTAAACATGACATAGGAC
TTGCTGAACGCGCAGTGTATAAAGTGTATTTTAAAAATGGTTCGTCAAAATATGTAGACTTAAAAACTGAGTATAAAGAT
GAAAGAGTATTTAAAGCAACTGACATTAAAAAGGTAGATATTGAACTTAAATTCTAA

配列番号 73 ポリヌクレオチド配列

ATGAATAATAAAAAGACAGCAACAAATAGAAAAGGCATGATACCAAATCGATTAAACAAA
TTTTCGATAAGAAAGTATTCTGTAGGTACTGCTTCAATTTTAGTAGGGACAACATTGATT
TTTGGGTTAAGTGGTCATGAAGCTAAAGCGGCAGAACATACGAATGGAGAATTAAATCAA
TCAAAAAATGAAACGACAGCCCCAAGTGAGAATAAAACAACTAAAAAAGTTGATAGTCGT
CAACTAAAAGACAATACGCAAACTGCAACTGCAGATCAGCCTAAAGTGACAATGAGTGAT
AGTGCAACAGTTAAAGAAACTAGTAGTAACATGCAATCACCACAAAACGCTACAGCTAAT
CAATCTACTACAAAAACTAGCAATGTAACAACAAATGATAAATCATCAACTACATATAGT
AATGAAACTGATAAAAGTAATTTAACACAAGCAAAAGATGTTTCAACTACACCTAAAACA
ACGACTATTAAACCAAGAACTTTAAATCGCATGGCAGTGAATACTGTTGCAGCTCCACAA
CAAGGAACAAATGTTAATGATAAAGTACATTTTTCAAATATTGACATTGCGATTGATAAA
GGACATGTTAATCAGACTACTGGTAAAACTGAATTTTGGGCAACTTCAAGTGATGTTTTA
AAATTAAAAGCAAATTACACAATCGATGATTCTGTTAAAGAGGGCGATACATTTACTTTT
AAATATGGTCAATATTTCCGTCCAGGATCAGTAAGATTACCTTCACAAACTCAAAATTTA
TATAATGCCCAAGGTAATATTATTGCAAAAGGTATTTATGATAGTACAACAAACACAACA
ACATATACTTTTACGAACTATGTAGATCAATATACAAATGTTAGAGGTAGCTTTGAACAA
GTTGCATTTGCGAAACGTAAAAATGCAACAACTGATAAAACAGCTTATAAAATGGAAGTA
ACTTTAGGTAATGATACATATAGCGAAGAAATCATTGTCGATTATGGTAATAAAAAAGCA
CAACCGCTTATTTCAAGTACAAACTATATTAACAATGAAGATTTATCGCGTAATATGACT
GCATATGTAAATCAACCTAAAAATACATATACTAAACAAACGTTTGTTACTAATTTAACT
GGATATAAATTTAATCCAAATGCAAAAAACTTCAAAATTTACGAAGTGACAGATCAAAAT
CAATTTGTGGATAGTTTCACCCCTGATACTTCAAAACTTAAAGATGTTACTGATCAATTC
GATGTTATTTATAGTAATGATAATAAAACAGCTACAGTCGATTTAATGAAAGGCCAAACA
AGCAGCAATAAACAATACATCATTCAACAAGTTGCTTATCCAGATAATAGTTCAACAGAT
AATGGAAAAATTGATTATACTTTAGACACTGACAAAACTAAATATAGTTGGTCAAATAGT
TATTCAAATGTGAATGGCTCATCAACTGCTAATGGCGACCAAAAGAAATATAATCTAGGT
GACTATGTATGGGAAGATACAAATAAAGATGGTAAACAAGATGCCAATGAAAAAGGGATT
AAAGGTGTTTATGTCATTCTTAAAGATAGTAACGGTAAAGAATTAGATCGTACGACAACA
GATGAAAATGGTAAATATCAGTTCACTGGTTTAAGCAATGGAACTTATAGTGTAGAGTTT
TCAACACCAGCCGGTTATACACCGACAACTGCAAATGTAGGTACAGATGATGCTGTAGAT
TCTGATGGACTAACTACAACAGGTGTCATTAAAGACGCTGACAACATGACATTAGATAGT
GGATTCTACAAAACACCAAAATATAGTTTAGGTGATTATGTTTGGTACGACAGTAATAAA
GATGGTAAACAAGATTCGACTGAAAAAGGAATTAAAGGTGTTAAAGTTACTTTGCAAAAC
GAAAAAGGCGAAGTAATTGGTACAACTGAAACAGATGAAAATGGTAAATACCGCTTTGAT
AATTTAGATAGTGGTAAATACAAAGTTATCTTTGAAAAACCTGCTGGCTTAACTCAAACA
GGTACAAATACAACTGAAGATGATAAAGATGCCGATGGTGGCGAAGTTGATGTAACAATT

【図２．２７】

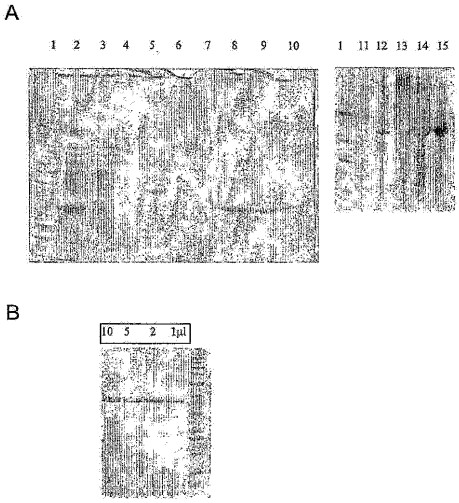
ACGGATCATGATGATTTCACACTTGATAATGGCTACTACGAAGAAGAAACATCAGATAGC
GACTCAGATTCTGACAGCGATTCAGACTCAGATAGCGACTCAGATTCAGATAGCGACTCA
GATTCAGACAGCGATTCAGACAGCGACTCAGACTCAGATAGCGATTCAGATTCAGACAGC
GACTCAGACTCAGACAGCGATTCAGACTCGGATAGCGACTCAGACTCAGATAGCGACTCA
GATTCGGATAGCGACTCAGACTCAGATAGCGATTCAGATTCAGATAGCGATTCGGACTCA
GACAGTGATTCAGATTCAGACTCAGATAGCGACTCAGATTCTGACAGCGATTCAGACTCA
GACAGCGACTCAGACTCAGACAGTGATTCAGATTCAGACAGCGACTCAGATTCAGATAGC
GACTCAGACTCAGATAGCGACTCAGATTCAGATAGCGATTCGGACTCAGACAACGACTCA
GATTCAGATAGCGATTCAGATTCAGATAGCGACTCAGATTCGGACAGCGATTCAGACTCA
GATAGCGATTCAGACTCAGACAGCGATTCAGATTCAGATAGCGACTCAGACTCAGATAGC
GACTCAGACTCGGATAGCGATTCAGATTCAGACAGCGACTCAGATTCAGATAGCGATTCG
GACTCAGACAACGACTCAGATTCAGATAGCGATTCAGATTCAGATGCAGGTAAACATACT
CCGGCTAAACCAATGAGTACGGTTAAAGATCAGCATAAAACAGCTAAAGCATTACCAGAA
ACAGGTAGTGAAAATAATAATTCAAATAATGGCACATTATTCGGTGGATTATTCGCGGCA
TTAGGATCATTATTGTTATTCGGTCGTCGTAAAAAACAAAATAAATAA

配列番号 74 ポリヌクレオチド配列

GAGGAGAATTCAGTACAAGACGTTAAAGATTCGAATACGGATGATGAATTATCAGACAGC
AATGATCAGTCTAGTGATGAAGAAAAGAATGATGTGATCAATAATAATCAGTCAATAAAC
ACCGACGATAATAACCAAATAATTAAAAAAGAAGAAACGAATAACTACGATGGCATAGAA
AAACGCTCAGAAGATAGAACAGAGTCAACAACAAATGTAGATGAAAACGAAGCAACATTT
TTACAAAAGACCCCTCAAGATAATACTCATCTTACAGAAGAAGAGGTAAAAGAATCCTCA
TCAGTCGAATCCTCAAATTCATCAATTGATACTGCCCAACAACCATCTCACACAACAATA
AATAGAGAAGAATCTGTTCAAACAAGTGATAATGTAGAAGATTCACACGTATCAGATTTT
GCTAACTCTAAAATAAAAGAGAGTAACACTGAATCTGGTAAAGAAGAGAATACTATAGAG
CAACCTAATAAAGTAAAAGAAGATTCAACAACAAGTCAGCCGTCTGGCTATACAAATATA
GATGAAAAAATTTCAAATCAAGATGAGTTATTAAATTTACCAATAAATGAATATGAAAAT
AAGGCTAGACCATTATCTACAACATCTGCCCAACCATCGATTAAACGTGTAACCGTAAAT
CAATTAGCGGCGGAACAAGGTTCGAATGTTAATCATTTAATTAAAGTTACTGATCAAAGT
ATTACTGAAGGATATGATGATAGTGAAGGTGTTATTAAAGCACATGATGCTGAAAACTTA
ATCTATGATGTAACTTTTGAAGTAGATGATAAGGTGAAATCTGGTGATACGATGACAGTG
GATATAGATAAGAATACAGTTCCATCAGATTTAACCGATAGCTTTACAATACCAAAAATA
AAAGATAATTCTGGAGAAATCATCGCTACAGGTACTTATGATAACAAAAATAAACAAATC
ACCTATACTTTTACAGATTATGTAGATAAGTATGAAAATATTAAAGCACACCTTAAATTA
ACGTCATACATTGATAAATCAAAGGTTCCAAATAATAATACCAAGTTAGATGTAGAATAT
AAAACGGCCCTTTCATCAGTAAATAAAACAATTACGGTTGAATATCAAAGACCTAACGAA
AATCGGACTGCTAACCTTCAAAGTATGTTTACAAACATAGATACGAAAAATCATACAGTT
GAGCAAACGATTTATATTAACCCTCTTCGTTATTCAGCCAAGGAAACAAATGTAAATATT
TCAGGGAATGGTGATGAAGGTTCAACAATTATAGACGATAGCACAATAATTAAAGTTTAT
AAGGTTGGAGATAATCAAAATTTACCAGATAGTAACAGAATTTATGATTACAGTGAATAT
GAAGATGTCACAAATGATGATTATGCCCAATTAGGAAATAATAATGATGTGAATATTAAT
TTTGGTAATATAGATTCACCATATATTATTAAAGTTATTAGTAAATATGACCCTAATAAG
GATGATTACACGACTATACAGCAAACTGTGACAATGCAGACGACTATAAATGAGTATACT
GGTGAGTTTAGAACAGCATCCTATGATAATACAATTGCTTTCTCTACAAGTTCAGGTCAA
GGACAAGGTGACTTGCCTCCTGAAAAAACTTATAAAATCGGAGATTACGTATGGGAAGAT
GTAGATAAAGATGGTATTCAAAATACAAATGATAATGAAAAACCGCTTAGTAATGTATTG
GTAACTTTGACGTATCCTGATGGAACTTCAAAATCAGTCAGAACAGATGAAGATGGGAAA
TATCAATTTGATGGATTGAAAAACGGATTGACTTATAAAATTACATTCGAAACACCTGAA
GGATATACGCCGACGCTTAAACATTCAGGAACAAATCCTGCACTAGACTCAGAAGGTAAT
TCTGTATGGGTAACTATTAATGGACAAGACGATATGACGATTGATAGTGGATTTTATCAA
ACACCTAAATACAGCTTAGGGAACTATGTATGGTATGACACTAATAAAGATGGTATTCAA
GGTGATGATGAAAAAGGAATCTCTGGAGTTAAAGTGACGTTAAAAGATGAAAACGGAAAT
ATCATTAGTACAACTACAACCGATGAAAATGGAAAGTATCAATTTGATAATTTAAATAGT
GGTAATTATATTGTTCATTTTGATAAACCTTCAGGTATGACTCAAACAACAACAGATTCT
GGTGATGATGACGAACAGGATGCTGATGGGGAAGAAGTTCATGTAACAATTACTGATCAT
GATGACTTTAGTATAGATAACGGATACTATGATGACGAA

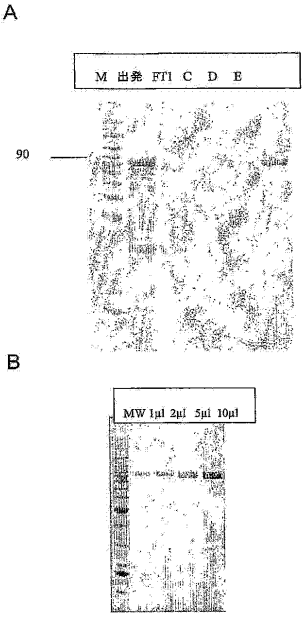
【図３】

αトキシンの精製

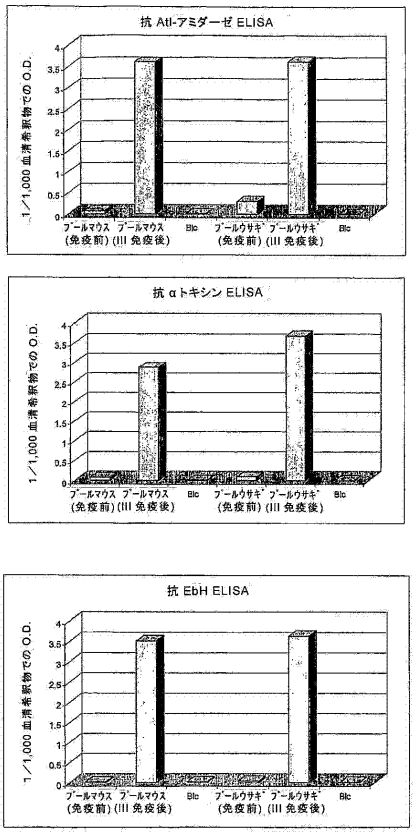


【図４】

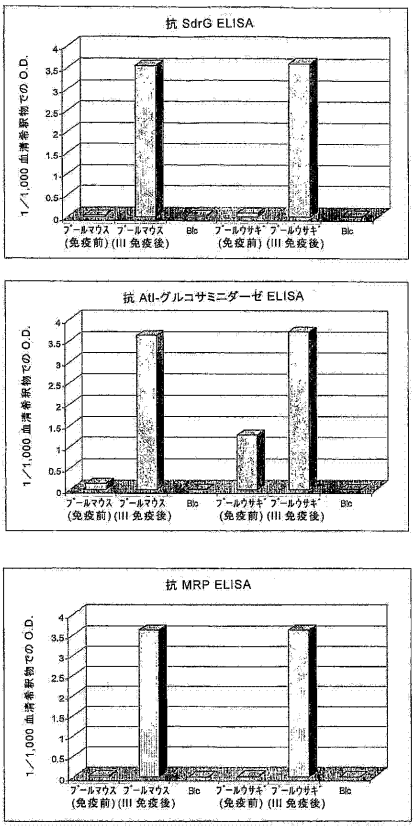
SdrC の精製



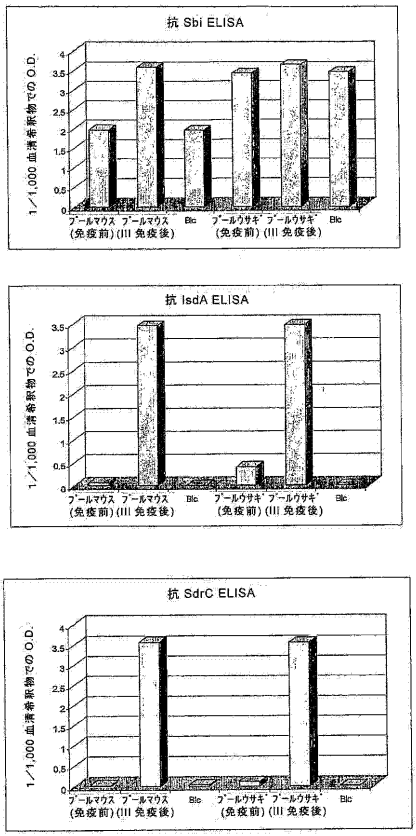
【図５．１】



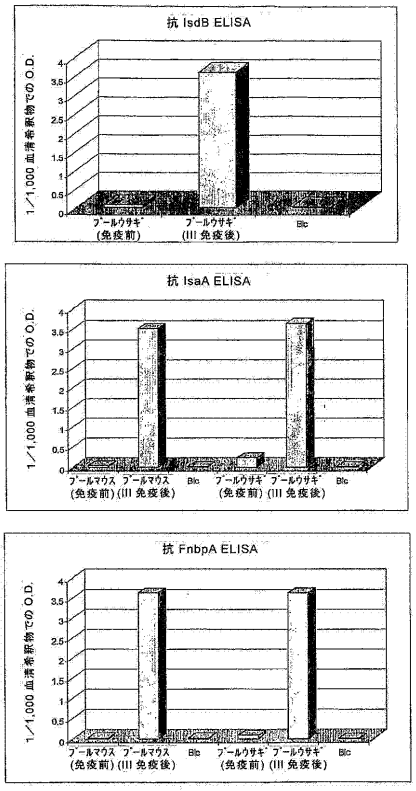
【図５．２】



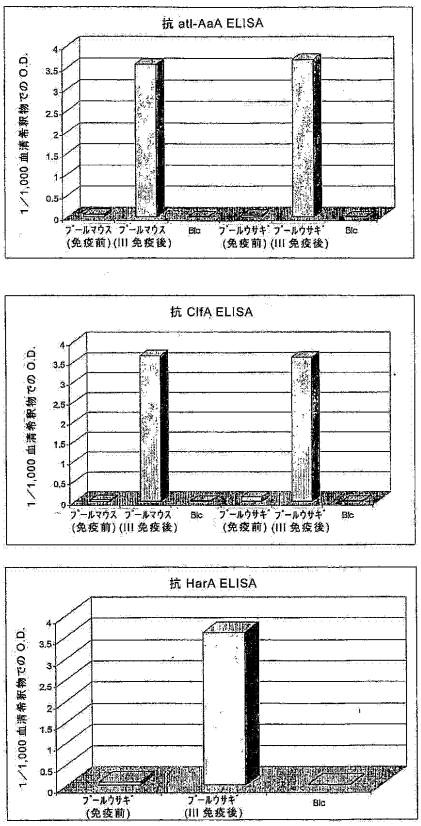
【図５．３】



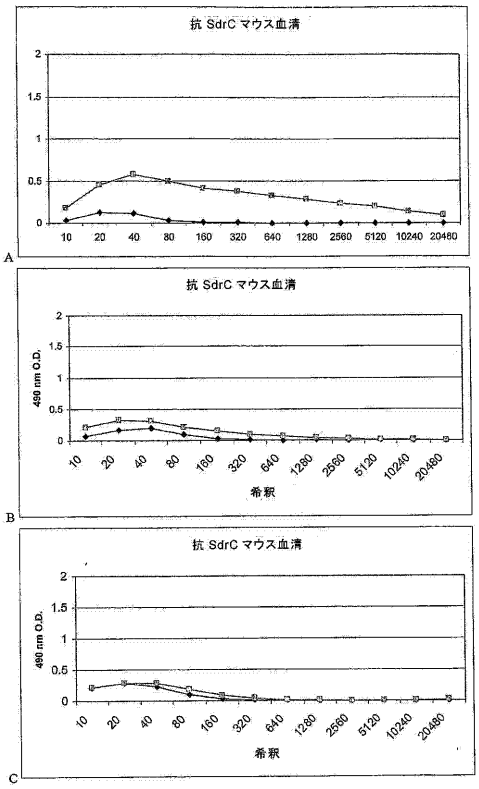
【図５．４】



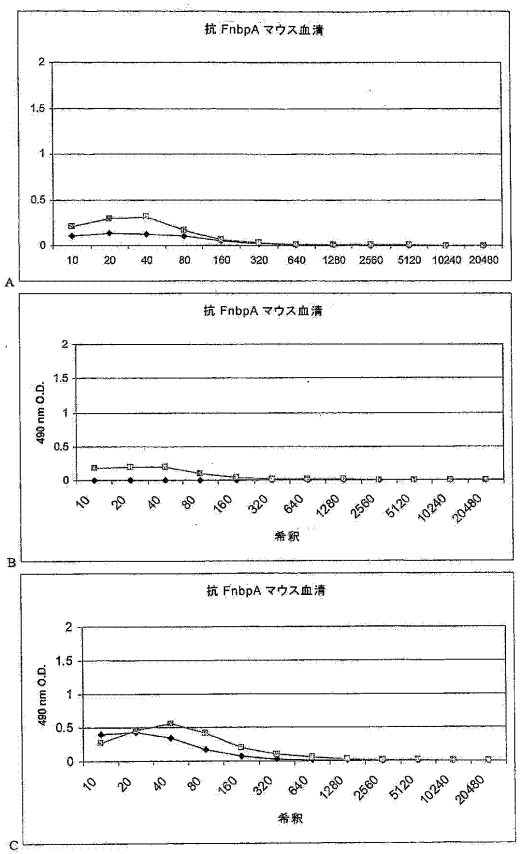
【図５．５】



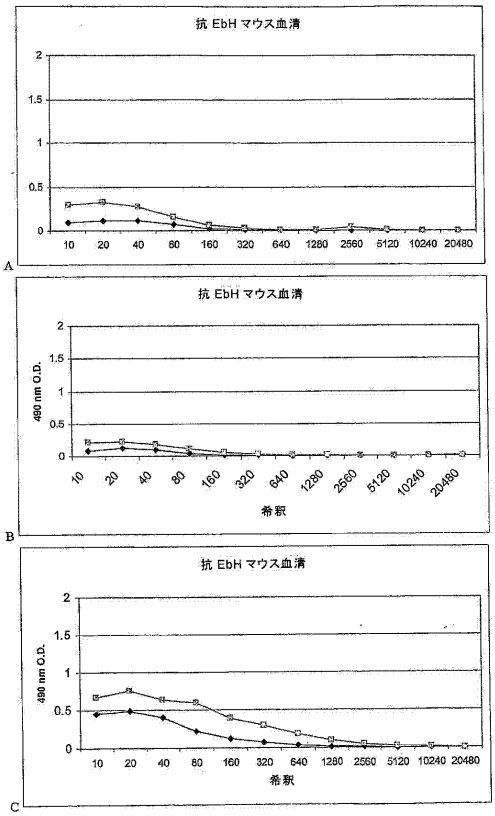
【図６．１】



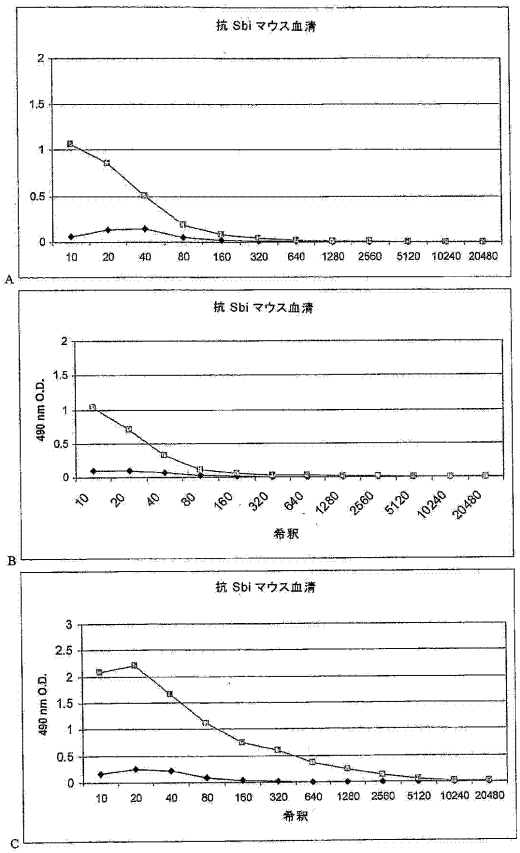
【図６．２】



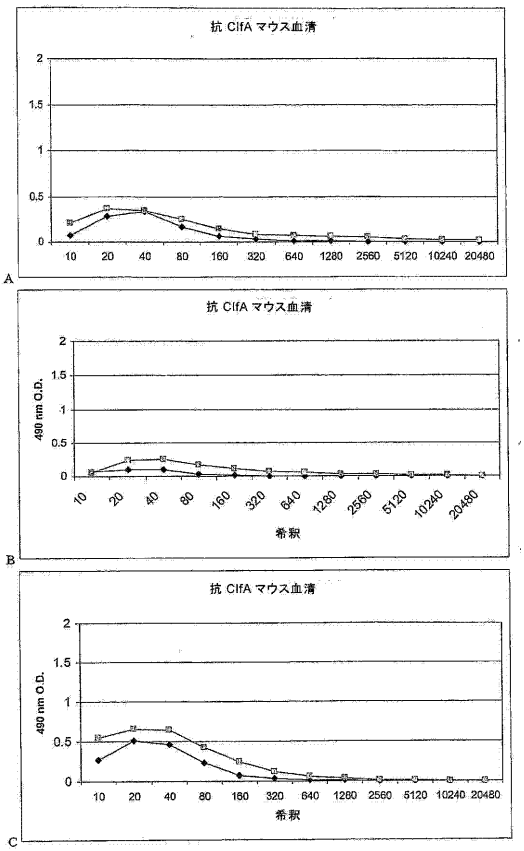
【図６．３】



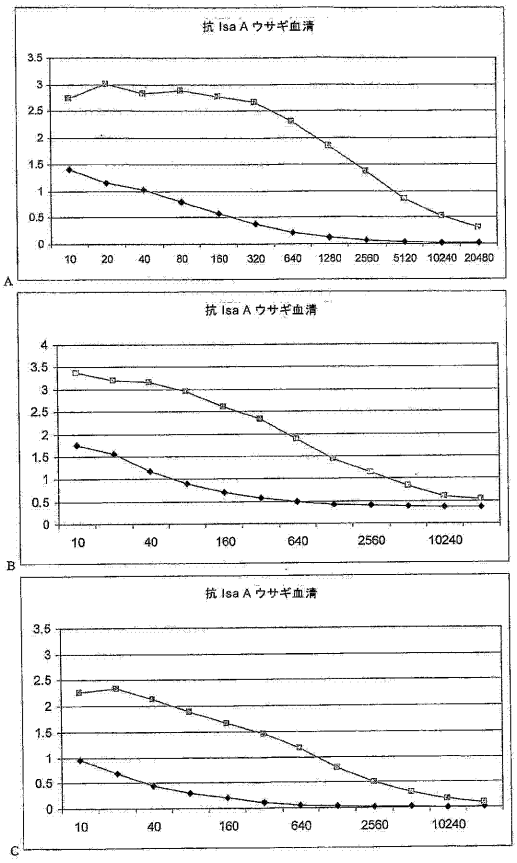
【図６．４】



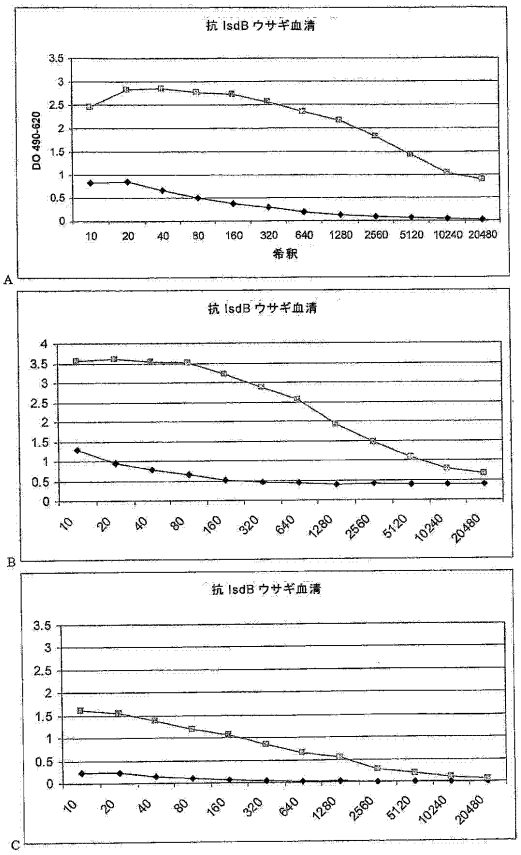
【図６．５】



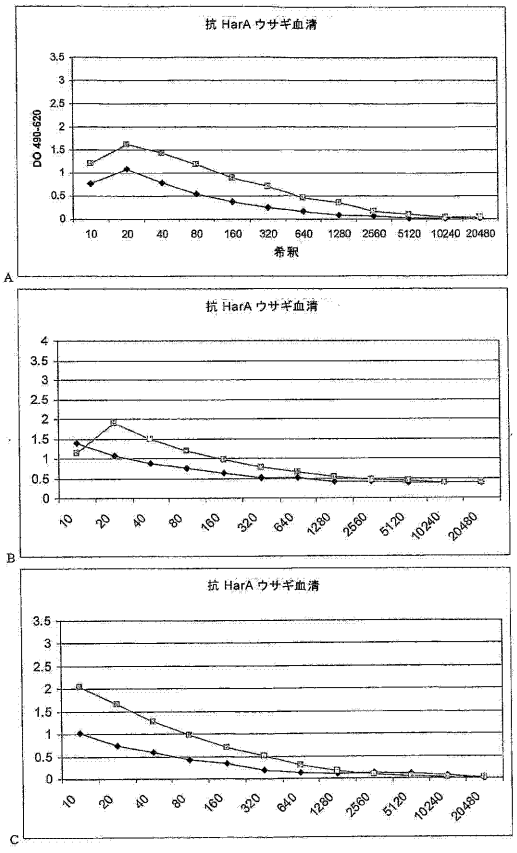
【図７．１】



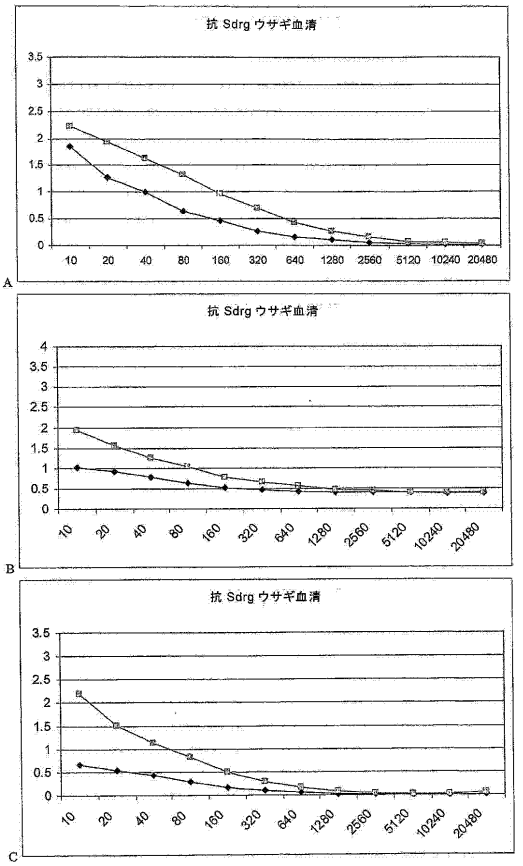
【図７．２】



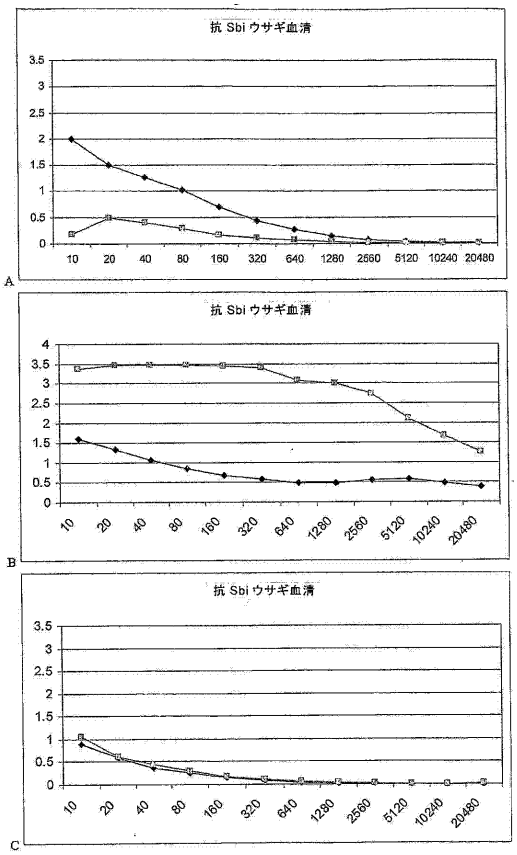
【図７．３】



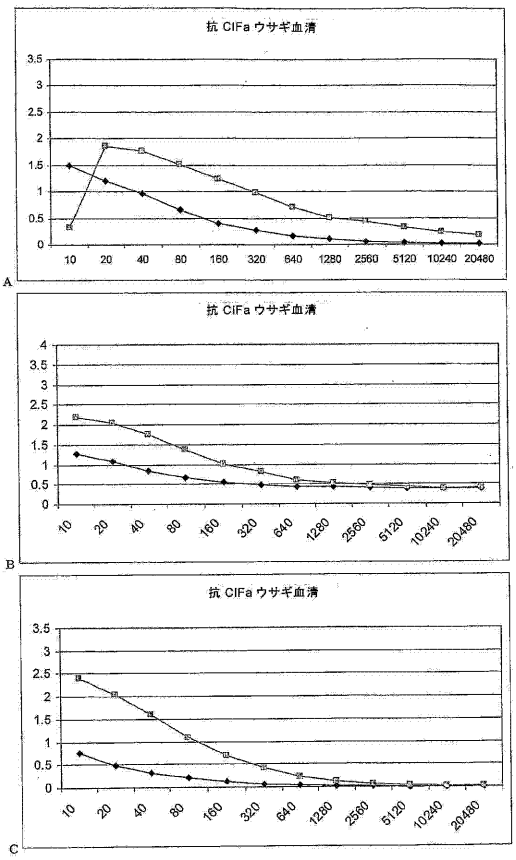
【図７．４】



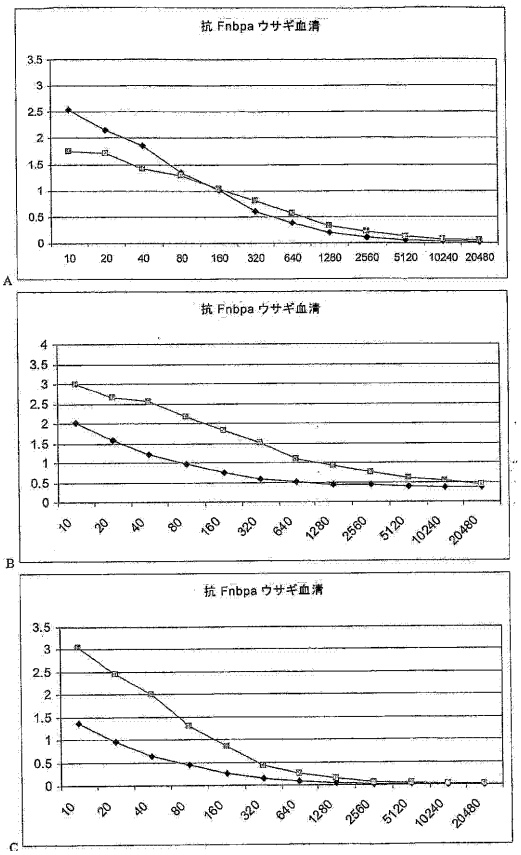
【図７．５】



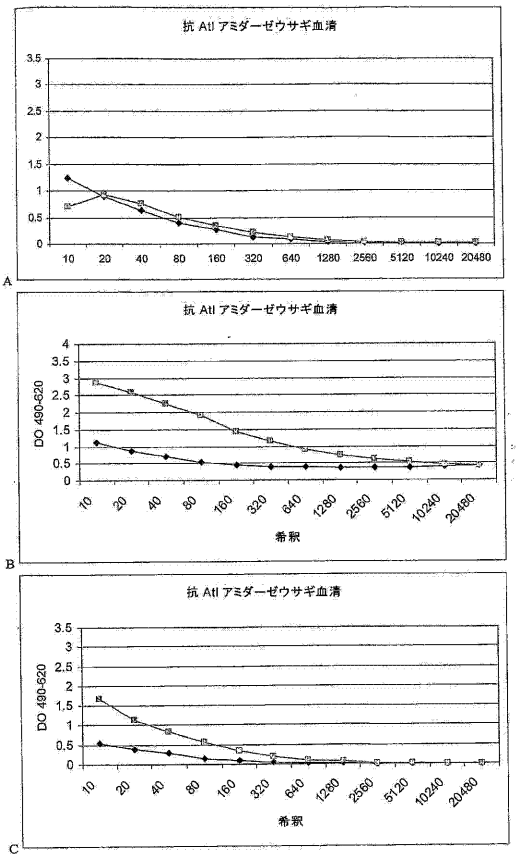
【図７．６】



【図７．７】



【図７．８】



【配列表】
0005775005000001.app

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 0421081.1
(32)優先日 平成16年9月22日(2004.9.22)
(33)優先権主張国 英国(GB)
(31)優先権主張番号 0421079.5
(32)優先日 平成16年9月22日(2004.9.22)
(33)優先権主張国 英国(GB)
(31)優先権主張番号 0503143.0
(32)優先日 平成17年2月15日(2005.2.15)
(33)優先権主張国 英国(GB)

前置審査

(72)発明者 カスタード, シンディ
ベルギー国 ビー－１３３０ リキセンザール, リュ ド ランスティテュ ８９, グラクソスミスクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム
(72)発明者 レクレニエール, ニコラス, ピエール, フェルナンド
ベルギー国 ビー－１３３０ リキセンザール, リュ ド ランスティテュ ８９, グラクソスミスクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム
(72)発明者 ネイト, セシル, アンヌ
ベルギー国 ビー－１３３０ リキセンザール, リュ ド ランスティテュ ８９, グラクソスミスクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム
(72)発明者 プールマン, ジャン
ベルギー国 ビー－１３３０ リキセンザール, リュ ド ランスティテュ ８９, グラクソスミスクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

審査官 安藤 公祐

(56)参考文献 特表２００２－５２３４７３（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００２／１０２８２９（WO，Ａ１）
Infection and Immunity, ２０００年, Vol.68, No.6, p.3200-3209
Infection and Immunity, ２００１年, Vol.69, No.11, p.6702-6706
MENZIES BARBARA E, INFECTION AND IMMUNITY, １９９６年 5月, V64 N5, P1839-1841

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ ３９／００
Ａ６１Ｋ ３１／７１５
Ａ６１Ｋ ３１／７３９
Ａ６１Ｋ ３８／００
Ａ６１Ｋ ３９／３９５
Ａ６１Ｋ ４７／４２
Ａ６１Ｋ ４７／４８
Ａ６１Ｐ ３１／０４
Ｃ０７Ｋ １６／００
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）