

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3635580号

(P3635580)

(45) 発行日 平成17年4月6日(2005.4.6)

(24) 登録日 平成17年1月14日(2005.1.14)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 N 1/20
 A 6 1 K 39/02
 G 0 1 N 33/15
 G 0 1 N 33/569
 //(C 1 2 N 1/20

C 1 2 N 1/20 A
 C 1 2 N 1/20 E
 A 6 1 K 39/02
 G 0 1 N 33/15 B
 G 0 1 N 33/569 F

請求項の数 5 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-512682
 (86) (22) 出願日 平成7年10月4日(1995.10.4)
 (65) 公表番号 特表平10-507346
 (43) 公表日 平成10年7月21日(1998.7.21)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1995/012986
 (87) 国際公開番号 W01996/011257
 (87) 国際公開日 平成8年4月18日(1996.4.18)
 審査請求日 平成14年9月27日(2002.9.27)
 (31) 優先権主張番号 318,409
 (32) 優先日 平成6年10月5日(1994.10.5)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 08/538,544
 (32) 優先日 平成7年10月3日(1995.10.3)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者
 アンテックス バイオロジクス インコー
 ポレーテッド
 アメリカ合衆国 20879 メリーラン
 ド州, デイザーズバーグ, プロフェッショ
 ナル ドライブ 300
 (74) 代理人
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人
 弁理士 石井 貞次
 (72) 発明者
 ベイス, ジョン, エル.
 アメリカ合衆国 20874 メリーラン
 ド州, ジャーマンタウン, サッカリー プ
 レイス 13117

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 増強された抗原性ヘリコバクター s p. の作出方法およびそれを含むワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

増強された抗原特性を有するヘリコバクター (Helicobacter) 菌の作出方法であって、ヘリコバクター菌の培養物を in vitro で、

a) 約0.05%～約3%の胆汁、または約0.025%～約0.6%の1種以上の胆汁酸もしくはその塩；

b) 約30℃と約42℃の間の温度；および

c) 空气中または微好気性条件下、ここで微好気性条件は、i) 約5%～約20%のCO₂と約80%～約95%の空気であるか、またはii) 約5%～約10%のO₂と約10%～約20%のCO₂と約70%～約85%のN₂である；

を含む条件の組合せのもとで、該培養物が早期対数期付近、早期対数期と定常期の間、または定常期付近の成長相に至るように十分な時間成長させることを含んでなる方法。

【請求項2】

前記条件の組合せが、

a) 約0.05%のグリコール酸塩である胆汁塩または約0.1%～約0.2%の胆汁；

b) 約37℃の温度；

c) 約10%～約20%のCO₂と約80%～約90%の空气中、または約10%のCO₂と約5%のO₂と約85%のN₂中；

を含み、前記培養物が対数期に至るように十分な時間該培養物を成長させる、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

増強された抗原特性を有するヘリコバクター菌であって、

a) 約0.05%～約3%の胆汁、または約0.025%～約0.6%の1種以上の胆汁酸もしくはその塩；

b) 約30℃と約42℃の間の温度；および

c) 空气中または微好気性条件下、ここで微好気性条件は、i) 約5%～約20%のCO₂と約80%～約95%の空気であるか、またはii) 約5%～約10%のO₂と約10%～約20%のCO₂と約70%～約85%のN₂である；

を含む条件の組合せのもとでin vitroで成長させたヘリコバクター菌の培養物から回収され、該ヘリコバクター菌の培養物が早期対数期付近、早期対数期と定常期の間または定常期付近にある、ヘリコバクター菌。

10

【請求項 4】

前記条件の組合せが、

a) 約0.05%のグリコール酸塩である胆汁塩または約0.1%～約0.2%の胆汁；

b) 約37℃の温度；

c) 約10%～約20%のCO₂と約80%～約90%の空气中、または約10%のCO₂と約5%のO₂と約85%のN₂中；

を含み、前記培養物が対数期付近にある、請求項3に記載のヘリコバクター菌。

【請求項 5】

請求項3または4に記載のヘリコバクター菌を含有するワクチン。

20

【発明の詳細な説明】

本出願は、1994年10月5日付けの係属中の米国特許出願第08/318,409号の一部継続出願である。

1. 発明の分野

本発明は、一般的には、腸内細菌の抗原および／または毒力因子(virulence factor)の発現を誘導または増強することによって抗原的に増強された腸内細菌を作出するin vitro方法、抗原的に増強された腸内細菌を用いる方法、ならびに抗原的に増強された腸内細菌を含有するワクチンに関する。

2. 発明の背景

従来の培地と条件を使ってin vitroで培養した細菌は、その天然の棲息場所(動物宿主内の正常な微生物相または病原体のin vivo棲息を含む)での成長中に発現される特性とは異なる特性を発現することが広く認められている。したがって、このようにin vitroで成長させた病原性細菌はワクチン成分として使用するには好適でないかもしれない。しかし、毒力因子、問題となる生理学的特性、または外表面抗原を含めた抗原の発現を誘導または増強する条件を規定することが可能であれば、重要な生産物や治療剤(例えば、ワクチン用の新抗原、抗生物質用の新標的、および診断に応用できる新規な細菌の特性)がすみやかに同定されるだろう。

30

細菌の毒力決定因子の発現に影響を与える環境要因がいくつか確認されている(Mekalanos, J.J., J.Bacteriol. 174:1-7, 1992)。例えば、鉄と細菌の毒力との関係を研究する歴史は長く、特に、Shigella(赤痢菌)(Payne, Mol. Microbiol., 3:1301-1306, 1989)、Neis

40

seria(ナイセリア)(Payne and Finkelstein, J.Clin. Microbiol., 6:293-297, 1977)およびPasteurella(パスツレラ菌)(Gilmourら, Vaccine, 9:137-140, 1991)に関して研究されている。

植物と動物のさまざまな細菌の同調調節される毒力決定因子の発現をコントロールすることが判明した他の環境シグナルとして、フェノール性化合物、単糖、アミノ酸、温度、容量オスモル濃度、その他のイオン類がある(Makalanos, J.Bacteriol., 174:1-7, 1992)。腸から(すなわち、経口的に)動物宿主に侵入する病原菌は、細菌の生理や毒力因子の発現に影響を及ぼしうる数多くの宿主環境成分および条件に出くわす。こうした成分および条件には、胆汁、胆汁酸またはその塩、胃pH、微好気性条件(腸内は高CO₂で低O₂である)、容量オスモル濃度、そしてまだ確定されていない多くの他の要因が含まれる。侵襲性

50

の腸内病原菌は内在化を行うためにde novoタンパク質合成を必要とする(Headley and Payne, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:4179-4183, 1990)。それゆえ、細菌はin vitroでは通常存在しないある種の環境シグナルに応答するときだけこれらの侵入因子を最適に生産する。この仮説は、従来の方法で成長させた*C. jejuni*に特異的な抗血清がin vitro内在化を阻止するのに不十分な効果しか発揮しないという報告により支持される(Konkelら, J. Infect. Dis., 168:948-954, 1993)。しかし、侵入を増強する条件である上皮細胞の単層の存在下で成長させた*Campylobacter* (カンピロバクター菌)の抽出物でウサギを免疫すると、結果的にこの細菌の内在化を顕著に阻害する抗血清が産生された。

問題となる毒力因子を同定するために、研究者らは腸内環境のもとでの細菌の成長を研究してきた。例えば、ウサギの回腸ループ内で成長させた*Campylobacter* 81-176株は、通常の実験室のin vitro培養条件下では発現しなかったタンパク質を発現する(Panigrahiら, Infect. Immun., 60:4938-4944, 1992)。INT407細胞の単層とともに培養した*Campylobacter* では、上皮細胞の不在下で培養した該細菌と比べて、タンパク質の新たな合成または増強された合成が見られた(Konkelら, J. Infect. Dis., 168:948-954, 1993)。さらに、こうした変化は*C. jejuni*の侵襲力増加とも一時的に関連していた。*C. jejuni*の無毒性株においては、その他の変化、例えば細胞の形態、鞭毛の消失、新しい外膜タンパク質の発現、細胞表面の炭水化物の変化などが、ニワトリの胚に静脈内および漿尿膜通過させるとき、誘導または増強された(Fieldら, J. Med. Microbiol., 38:293-300, 1993)。

胆汁酸やその塩のような他の腸内成分は一部の細菌にとって抑制的であることが知られているが、胆汁酸は細菌による毒力発現に影響を与えることによって別の役割を果たしているのかもしれない。

PopeとPayne (93rd Am. Soc. Microbiol., B-147, 1993) は、ケノデオキシコール酸ナトリウムを含有する培地で成長させた*Shigella flexneri* (フレクスナー赤痢菌)が3~5倍高いHeLa細胞単層への感染力を示したと報告した。しかし、彼らは、他の胆汁塩や界面活性剤、例えばコール酸塩、グリココール酸塩、タウロデオキシコール酸塩、CHAPS系列、ジギトニン、トリトンX100およびそのナトリウム塩などは*S. flexneri*の侵襲力に全く影響を及ぼさなかったと報告した。その上、ケノデオキシコール酸塩を含有する彼らの培地は*E. coli*や他の*Shigella*の無毒性株の侵襲力に対して何も影響を及ぼさなかった。

*S. flexneri*の新タンパク質の合成はまた、増殖培地のpH、温度およびイオン組成を変えることによって誘導される(Mekalanos, J. Bacteriol. 174:1-7, 1992)。

1993年11月11日に公開されたPCT出願公開番号W0 93/22423には、ホスファチジルセリンのような脂質または粘液の存在下で細菌を増殖させる方法、およびホスファチジルセリンの存在下で増殖させることにより発現が高められたタンパク質を単離する方法が記載されている。この文献は増強された毒力または抗原特性を有する腸内細菌を作出するという本発明の方法を開示も示唆もしていない。

*Campylobacter*や*Shigella*などの多くの腸内病原菌に対するワクチンは今のところ入手不能であるが、これらの病原菌の疫学によれば、こうしたワクチンが重要な目標となる。細菌性赤痢は世界中に広がっている風土病であり、開発途上国では毎年下痢により死亡する500万人の子供の約10%を占めている。*Campylobacter*は、つい最近腸内病原菌であると同定されたものであるが、今では開発途上国と低開発国の両方において下痢疾患の主要な原因の一つであると理解されている。*Campylobacter*による下痢は毎年概算で4~5億の症例が発症しており、200万以上の症例が米国で発生している。

細菌性赤痢は結腸粘膜の細菌侵襲の結果である。この侵襲はすべての侵襲性分離株に見られるプラスミドの存在と関連している(Sensonettiら, Infect. Immun., 35:852-860, 1982)。このプラスミドの断片は侵入プラスミド抗原(Ipa)遺伝子のIpa A, -B, -Cおよび-Dを含んでいる。Ipa B, -Cおよび-Dタンパク質は侵入過程において不可欠である(Baudryら, J. Gen. Microbiol., 133:3403-3413, 1987)。

Ipaタンパク質は論理にかなったワクチン候補であるが、その防御効果は明確には確立されていない。Ipa BとIpa Cは免疫優性タンパク質である(Haleら, Infect. Immun., 50:620-629, 1985)。さらに、62kDaのIpa Bタンパク質(細胞侵入を開始させ、膜結合ファゴサ

10

20

30

40

50

イト液胞の溶解において機能するインベージン) (Highら, EMBO J., 11:1991-1999, 1992) は、Shigella菌種の間で高度に保存されている。Shigella Ipaに対する重要な粘膜抗体を持ち合わせていない発育不良の子供たちに観察された長期の病気は、Ipaに対する粘膜抗体の存在が感染の広がりや重症度を制限しうることを示唆している。

Shigellaの多数のワクチン候補がヒトと動物において試験されたが、成功したものはまだ存在しない。毒力におけるIpaタンパク質の潜在的重要性にもかかわらず、細菌性赤痢に対して開発された大部分のワクチン候補は血清型特異的決定基をもっているリポ多糖抗原に基づくものである。非経口的に投与される多糖-タンパク質複合ワクチンも開発されたが、これはまだ動物において有意な防衛を示していない (Robbonsら, Rev. Inf. Dis., 13; S3 62-365, 1991)。同様に投与されるリボソームワクチンは粘膜免疫を引き出すが、その防

10

御効力はまだ証明されずに残っている (Levensonら, Arch. Allergy Appl. Immunol., 87:25-31, 1988)。
Campylobacter感染の病因はShigella感染ほどにはよく理解されていない。in vitro細胞侵入研究 (Konkelら, J. Infect. Dis., 168:948-954, 1993) および組織病理学的検査 (Russellら, J. Infect. Dis., 168:210-215, 1993) から、結腸への侵入も重要であることが提唱された。この結論は、Campylobacterにより引き起こされる下痢が重症であり、血便を伴うという観察と一致する。これらの作用は免疫優性の62kDaのフラジェリタンパク質と関係があるらしい。最近の報告から、Campylobacterが分極した上皮細胞単層を通過するには鞭毛の存在が不可欠であることがわかった (Grantら, Infect. Immun., 61:1764-1771, 1993)。

20

特定のCampylobacter抗原はどれも防御抗原として確立されていない。しかし、低分子量 (28-31kDa) タンパク質、つまりPEBタンパク質、および免疫優性鞭毛タンパク質はこれに関して有望であると考えられる (Pavlovskisら, Infect. Immun., 59:2259-2264, 1992; Blaser and Gotschilch, J. Bio. Chem., 265:14529-14535, 1990)。鞭毛タンパク質の重要性は腸のコロニー形成およびLiorサブグループ内の感染に対する交差菌株防御との関連により示される (Pavlovskisら, Infect. Immun., 59:2259-2264, 1992)。しかしながら、鞭毛タンパク質をベースとするCampylobacterワクチンは、8-10の最も臨床的に関係のあるLior血清グループに由来する鞭毛タンパク質抗原を含む必要があるかもしれない。

したがって、本発明の対象は、1) 侵入活性および／またはある種の細胞特性 (細胞表面特性を含む) を最適に誘導または増強する、腸内細菌を培養または処理するためのin vitro培養条件; 2) 相互に関連のある改変された侵入性または細胞特性 (抗原プロファイルの変化を伴う表面特性を含む); 3) 小動物モデルにおけるこれらの微生物の増大した毒力; および4) 従来の方法で成長させた細菌に対する抗血清よりもin vitroまたはin vivoチャレンジに用いた生存微生物を中和するのに有効である、侵入性を増強したまたは特性 (表面特性を含む) を改変した微生物に対する抗血清; を包含する。本発明はこれらのおよび他のニーズに対処するものである。

30

上述した文献はどれも本発明のin vitro方法と抗原的に増強された腸内細菌を含有する本発明のワクチンを教示も示唆もしていない。本節または本明細書の他の節で引用した文献は、かかる文献が本発明に対する先行技術として利用可能であることを示すものと解釈されるべきでない。

40

3. 発明の概要

本発明は、毒力因子およびその他の抗原の存在を誘導または増強するための、腸内細菌の増殖培地に組み入れる成分および規定された培養条件を提供する。好ましくは、こうした抗原は免疫原性がある。より好ましくは、免疫原性のある抗原は毒力指数と関係がある。腸内細菌は該細菌が自然界でさらされるいくつかのin vivo状態を模倣する状態および成分の存在下で成長させる。本発明の方法は、細胞あたりの総タンパク質量の増加、新タンパク質または増加した個々のタンパク質、表面炭水化物の変化または増加、表面リポ多糖の変化、付着力の増加、侵入力の増加および／または細胞内遊走 (swarming) の増加といった表現型の変化を伴う、抗原的に増強された腸内細菌をもたらす。さらに、本発明の方法は商業的使用のために実際的なスケールアップ発酵に適応させることができる。

50

前記の抗原的に増強された腸内細菌は、不活化全細胞ワクチンやサブユニットワクチンのような防御ワクチンをつくるために、抗体の産生や病原性腸内細菌の検出といった診断目的に、または抗生物質の生産に用いることができる。さらに、本発明の増強された腸内細菌により誘導された抗体は受身ワクチンとして使用することができる。

したがって、本発明の目的は、増強された抗原特性を有する *Campylobacter* sp. (カンピロバクター sp.)、*Yersinia* sp. (エルシニア sp.)、*Helicobacter* sp. (ヘリコバクター sp.)、*Gastrospirillum* sp. (ガストロスピリラム sp.)、*Bacteroides* sp. (バクテロイデス sp.)、*Klebsiella* sp. (クレブシエラ sp.)、*Enterobacter* sp. (エンテロバクター sp.)、*Salmonella* sp. (サルモネラ sp.)、*Shigella* sp. (シゲラ sp.)、*Aeromonas* sp. (アエロモナス sp.)、*Vibrio* sp. (ビブリオ sp.)、*Clostridium* sp. (クロストリジウム sp.)、*Enterococcus* sp. (エンテロコッカス sp.) および *Escherichia coli* (エシェリキア・コリ) より成る群から選ばれる腸内細菌の作出方法であって、該方法は、腸内細菌を、a) 0.05～3%の胆汁または0.025～0.6%の1以上の胆汁酸もしくはその塩、30～42℃の温度で、早期対数増殖期付近、早期対数期と定常期の間、または定常期付近の成長相まで、空气中または微好気性条件下 (例えば5～20%CO₂と80～95%空気、5～20%CO₂と80～95%N₂、または5～10%O₂と10～20%CO₂と70～85%N₂) で、場合により2価カチオンキレート剤 (例えば、限定するものではないが、0～100μM、好ましくは25μMのBAPTA/AM、0～10mMのEGTA、および0～100μMのEGTA/AM) の存在下で；またはb) 2価カチオンキレート剤 (例えば、1.0～100μM、好ましくは25μMのBAPTA/AM、0.5～10mMのEGTA、および1～100μMのEGTA/AM) の存在下、および胆汁、胆汁酸または胆汁塩の非存在下で行うことを除いてa) と同じ条件；を含む組合せ条件を用いてin vitroで成長させることを含んでなる。

本発明によれば、各胆汁酸またはその塩の濃度は0.025～0.6%、好ましくは0.05～0.5%、より好ましくは0.05～0.2%であり、0.05%または0.1%が最適である。胆汁酸またはその塩がデオキシコール酸 (塩) またはグリココール酸 (塩) を含む方法が好適である。

本発明の更なる目的は、増強された抗原特性を引き出すために、a) 0.05～3%の胆汁または0.025～0.6%の1以上の胆汁酸もしくはその塩、30～42℃の温度で、早期対数増殖期付近、早期対数期と定常期の間、または定常期付近の成長相まで、空气中または微好気性条件下 (例えば5～20%CO₂と80～95%空気、5～20%CO₂と80～95%N₂、または5～10%O₂と10～20%CO₂と70～85%N₂) で、場合により2価カチオンキレート剤 (例えば、限定するものではないが、0～100μM、好ましくは25μMのBAPTA/AM、0～10mMのEGTA、および0～100μMのEGTA/AM) の存在下で；またはb) 2価カチオンキレート剤 (例えば、1.0～100μM、好ましくは25μMのBAPTA/AM、0.5～10mMのEGTA、および1～100μMのEGTA/AM) の存在下、および胆汁、胆汁酸または胆汁塩の非存在下で行うことを除いてa) と同じ条件；を含む組合せ条件のもとでin vitroで成長させてなる、*Campylobacter* sp.

(カンピロバクター sp.)、*Yersinia* sp. (エルシニア sp.)、*Helicobacter* sp. (ヘリコバクター sp.)、*Gastrospirillum* sp. (ガストロスピリラム sp.)、*Bacteroides* sp. (バクテロイデス sp.)、*Klebsiella* sp. (クレブシエラ sp.)、*Enterobacter* sp. (エンテロバクター sp.)、*Salmonella* sp. (サルモネラ sp.)、*Shigella* sp. (シゲラ sp.)、*Aeromonas* sp. (アエロモナス sp.)、*Vibrio* sp. (ビブリオ sp.)、*Clostridium* sp. (クロストリジウム sp.)、*Enterococcus* sp. (エンテロコッカス sp.) および *Escherichia coli* (エシェリキア・コリ) より成る群から選ばれる腸内細菌である。

本発明の別の目的は、増強された抗原特性を有する *Campylobacter* sp. (カンピロバクター sp.)、*Yersinia* sp. (エルシニア sp.)、*Helicobacter* sp. (ヘリコバクター sp.)、*Gastrospirillum* sp. (ガストロスピリラム sp.)、*Bacteroides* sp. (バクテロイデス sp.)、*Klebsiella* sp. (クレブシエラ sp.)、*Enterobacter* sp. (エンテロバクター sp.)、*Salmonella* sp. (サルモネラ sp.)、*Shigella* sp. (シゲラ sp.)、*Aeromonas* sp. (アエロモナス sp.)、*Vibrio* sp. (ビブリオ sp.)、*Clostridium* sp. (クロストリジウム sp.)、*Enterococcus* sp. (エンテロコッカス sp.) および *Escherichia coli* (エシェリキア・コリ) より成る群から選ばれる完全な腸内細菌もしくはその構成成分、またはその免疫原

10

20

30

40

50

性断片もしくは誘導体、および場合により製剤学的に許容される担体または希釈剤、を含有するワクチンである。

不活化された抗原的に増強された腸内細菌を含有するワクチンが好適である。本発明の更なる目的は、アジュバントをさらに含むワクチンである。

本発明の更なる目的は、本発明の腸内細菌の少なくとも1つの抗原決定基に特異的に結合することができる抗体（抗血清、精製IgGまたはIgA抗体、Fab断片などを含むが、これらに限らない）に向けられる。このようなポリクローナルおよびモノクローナル抗体は、動物または動物由来の生物学的サンプル中に存在する腸内細菌を検出するためのイムノアッセイ試薬として有用である。また、本発明のポリクローナルおよびモノクローナル抗体は、腸内細菌による感染および疾病の防衛に用いる受身ワクチンとしても有用である。

10

本発明の更なる目的は、*Campylobacter* sp.（カンピロバクターsp.）、*Yersinia* sp.（エルシニアsp.）、*Helicobacter* sp.（ヘリコバクターsp.）、*Gastrospirillum* sp.（ガストロスピリラムsp.）、*Bacteroides* sp.（バクテロイデスsp.）、*Klebsiella* sp.（クレブシェラsp.）、*Enterobacter* sp.（エンテロバクターsp.）、*Salmonella* sp.（サルモネラsp.）、*Shigella* sp.（シゲラsp.）、*Aeromonas* sp.（アエロモナスsp.）、*Vibrio* sp.（ビブリオsp.）、*Clostridium* sp.（クロストリジウムsp.）、*Enterococcus* sp.（エンテロコッカスsp.）および*Escherichia coli*（エシェリキア・コリ）より成る群から選ばれる、増強された抗原特性を有する腸内細菌を潜在的な抗菌剤と接触させ、殺菌または静菌効果を調べる工程を含んでなる、潜在的な抗菌剤のin vitroアッセイ法である。

本発明のさらに他の目的は、宿主由来の生物学的サンプルを、*Campylobacter* sp.（カンピロバクターsp.）、*Yersinia* sp.（エルシニアsp.）、*Helicobacter* sp.（ヘリコバクターsp.）、*Gastrospirillum* sp.（ガストロスピリラムsp.）、*Bacteroides* sp.（バクテロイデスsp.）、*Klebsiella* sp.（クレブシェラsp.）、*Enterobacter* sp.（エンテロバクターsp.）、*Salmonella* sp.（サルモネラsp.）、*Shigella* sp.（シゲラsp.）、*Aeromonas* sp.（アエロモナスsp.）、*Vibrio* sp.（ビブリオsp.）、*Clostridium* sp.（クロストリジウムsp.）、*Enterococcus* sp.（エンテロコッカスsp.）および*Escherichia coli*（エシェリキア・コリ）より成る群から選ばれる、増強された抗原特性を有する本発明の腸内細菌、その抗原またはそれに対する抗体と接触させ、抗体：抗原相互作用をスクリーニングする工程を含んでなる、宿主の抗体産生を検出するための、または動物もしくは動物由来の生物学的サンプル中の腸内細菌を検出するためのin vitro法である。

20

30

本発明の別の目的は、*Campylobacter* sp.（カンピロバクターsp.）、*Yersinia* sp.（エルシニアsp.）、*Helicobacter* sp.（ヘリコバクターsp.）、*Gastrospirillum* sp.（ガストロスピリラムsp.）、*Bacteroides* sp.（バクテロイデスsp.）、*Klebsiella* sp.（クレブシェラsp.）、*Enterobacter* sp.（エンテロバクターsp.）、*Salmonella* sp.（サルモネラsp.）、*Shigella* sp.（シゲラsp.）、*Aeromonas* sp.（アエロモナスsp.）、*Vibrio* sp.（ビブリオsp.）、*Clostridium* sp.（クロストリジウムsp.）、*Enterococcus* sp.（エンテロコッカスsp.）および*Escherichia coli*（エシェリキア・コリ）より成る群から選ばれる、増強された抗原特性を有する腸内細菌またはそれに対する抗体、および他の全ての必須キット成分を含んでなる、腸内細菌に対する宿主の抗体産生を検出するための、または腸内細菌を検出するための診断用キットに関する。

40

本発明の種々の面に関係する好適な腸内細菌は、*Campylobacter jejuni*（カンピロバクター・ジェジュニ）、*Campylobacter coli*（カンピロバクター・コリ）、*Yersinia enterocolitica*（エルシニア・エンテロコリチカ）、*Yersinia pestis*（ペスト菌）、*Yersinia pseudotuberculosis*（偽結核エルシニア菌）、*Escherichia coli*（エシェリキア・コリ）、*Shigella flexneri*（フレクスナー赤痢菌）、*Shigella sonnei*（ソネ赤痢菌）、*Shigella dysenteriae*（志賀赤痢菌）、*Shigella boydii*（ボイド赤痢菌）、*Helicobacter pylori*（ヘリコバクター・ピロリ）、*Helicobacter felis*（ヘリコバクター・フェリス）、*Gastrospirillum hominus*（ガストロスピリラム・ホミヌス）、*Vibrio cholerae*（コレラ菌）、*Vibrio parahaemolyticus*（ビブリオ・パラヘモリチクス）、*Vibrio vulnificus*（ビブリオ・バルニフィクス）、*Bacteroides fragilis*（バクテロイデス・フラギリス）、Cl

50

ostroidium difficile (クロストリジウム・ディフィシル)、*Salmonella typhimurium* (ネズミチフス菌)、*Salmonella typhi* (チフス菌)、*Salmonella gallinarum* (トリチフス菌)、*Salmonella pullorum* (サルモネラ・プロラム)、*Salmonella choleraesuis* (豚コレラ菌)、*Salmonella enteritidis* (腸炎菌)、*Klebsiella pneumoniae* (肺炎杆菌)、*Enterobacter cloacae* (エンテロバクター・クロアカ)、および *Enterococcus faecalis* (エンテロコッカス・フェーカリス) である。好適な *Escherichia coli* (エシェリキア・コリ) としては腸管毒性株、腸管出血性株、腸管侵入性株、腸管病原性株、または他の菌株があり、これらに限らない。

本発明は、一部には、本発明の抗原的に増強された腸内細菌が、従来の培養条件を用いて成長させた同じ腸内細菌により誘導される免疫応答よりも、同一細菌種のより広範囲の菌株または血清型に対して交差防御的な免疫応答を誘導するという驚くべき発見に基づいている。少なくとも一例において、本発明の抗原的に増強された腸内細菌により誘導された免疫応答は、腸内細菌の異なる種に対して交差防御的である。

【図面の簡単な説明】

図1A、1Bおよび1Cは、*C.jejuni*81-176の表面抽出物の加水分解産物からの単糖類の高速液体クロマトグラフィーの結果をグラフにより示す。図1A:標準品:フコース "Fuc"、N-アセチルガラクトサミン "GalNac"、N-アセチルグルコサミン "GlcNac"、ガラクトース "Gal"、グルコース "Glc"、マンノース "Man"。図1B:従来の方法で成長させた細菌の表面抽出物 "BHI"。図1C:本発明の方法で成長させた細菌の表面抽出物 "DOC"。

図2は、従来の方法 "BHI" で成長させた、または本発明の方法 (0.8% 0xgall胆汁酸 "OX" または 0.1% デオキシコール酸塩 "DOC") で成長させた *C.jejuni*81-176 の全細胞 (カラム 1、2 および 3) または表面抽出物 (カラム 5 および 6) のタンパク質の比較を示すドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) の結果である。

図3は、*C.jejuni*81-176 の全細胞を感染させることにより産生されたフェレット IgA 含有粘液により結合されたタンパク質の比較を示すウエスタンブロット分析の結果である。従来の方法で成長させた *C.jejuni*81-176 の全細胞 "1"; または本発明の方法で成長させた *C.jejuni*81-176 の全細胞: 0.8% 0xgall胆汁酸 "2" または 0.1% デオキシコール酸塩 "3"; または従来の方法で成長させた *C.jejuni*81-176 の表面抽出物 "4"; 本発明の方法 (0.1% デオキシコール酸塩) で成長させた *C.jejuni*81-176 の表面抽出物 "5"。

図4は、本発明の方法で成長させた "3"、従来の方法で成長させた "2"、または本発明の方法により発酵槽内で成長させた "1" *C.jejuni*81-176 の全細胞由来のフラジェリン特異的モノクローナル抗体により結合されたタンパク質の比較を示すウエスタンブロット分析の結果である。

図5は、従来の方法で成長させた (カラム "1")、または本発明の方法 (0.1% デオキシコール酸塩) で成長させた (カラム "2") *S.flexneri*2457T の全細胞のリポ多糖類 (LPS) の比較を示す SDS-PAGE の結果である。

図6は、本発明の方法で成長させた *C.jejuni*81-176 の免疫交差反応性の増強をグラフにより示す。従来の本発明で、または実施例 5 に示すように本発明の方法 (DOC) で成長させた *C.jejuni*81-176 細胞を用いて抗体を誘導した。種々の *C.jejuni* 血清型に対する 2 種類の抗体 (すなわち、BHI で培養したときの抗 *C.jejuni*81-176 および DOC で培養したときの抗 *C.jejuni*81-176) の凝集活性を示す。詳細については第 9 節の実施例 32 を参照のこと。

図7A、7B および 7C は、*C.jejuni*81-176 生存細胞の鼻腔内投与チャレンジからマウスを防御する場合の不活化 *C.jejuni*81-176 全細胞含有ワクチンの効力をグラフにより示す。リン酸緩衝溶液 (PBS; 実線)、PBS+LT アジュバント (アジュバント; 破線)、実施例 5 にしたがって成長させ回収したアジュバント不含有 (CWC; 白丸/実線) または LT アジュバント含有 (CWC+アジュバント; 黒丸/実線) のホルマリン不活化 *C.jejuni*81-176 全細胞をマウスに接種した。ワクチンの効力は腸管定着アッセイを用いて試験した。図7A (上のパネル) は、1 回につき 10^5 個の不活化細菌粒子を 3 回経口接種することにより付与された防御の結果を示す。図7B (中のパネル) は、1 回につき 10^7 個の不活化細菌粒子を 3 回経

10

20

30

40

50

口接種することにより付与された防御の結果を示す。図7C（下のパネル）は、1回につき 10^9 個の不活化細菌粒子を3回経口接種することにより付与された防御の結果を示す。詳細については第11節の実施例34を参照のこと。

図8A、8Bおよび8Cは、*C.jejuni*81-176生存細胞の経口投与チャレンジからマウスを防御する場合の不活化*C.jejuni*81-176全細胞含有ワクチンの効力をグラフにより示す。図7A、7Bおよび7Cの簡単な説明に記載したとおりにマウスにワクチンを接種した。ワクチンの効力は腸管定着アッセイを用いて試験した。図8A（上のパネル）は、1回につき 10^5 個の不活化細菌粒子を3回経口接種することにより付与された防御の結果を示す。図8B（中のパネル）は、1回につき 10^7 個の不活化細菌粒子を3回経口接種することにより付与された防御の結果を示す。図8C（下のパネル）は、1回につき 10^9 個の不活化細菌粒子を3回経口接種することにより付与された防御の結果を示す。実験の詳細については第9節の実施例34を参照のこと。

10

図9は、*Shigella flexneri*2457T細胞の侵入性に及ぼす*Shigella flexneri*培養物の成長相の影響をグラフにより示す。*Shigella flexneri*2457T細胞は従来の方法（BHI）、または実施例9に示した本発明の方法（DOC-EL）（培養物が早期対数期にあるとき細胞を収穫する）、または実施例9に従うが培養物を後期対数期に至らせた後に細胞を収穫する方法（DOC-LL）で成長させた。これらの異なる細胞調製物の侵入性を示す。詳細については第12節の実施例35を参照のこと。

図10は、*Shigella*細胞を本発明の方法を用いて培養したときの該細胞の侵入性の増強をグラフにより示す。*S.sonnei*と*S.dysenteriae*3818を従来の方法（BHI）、または実施例9に示した本発明の方法により培養した。INT-407細胞に対するこれらの異なる*Shigella*細胞調製物の侵入性を示す。詳細については第12節の実施例35を参照のこと。

20

図11は、本発明の方法にしたがって成長させた*Shigella*の免疫交差反応性の増強をグラフにより示す。実施例9に示した本発明の方法により成長させた*S.flexneri*2457Tを用いて抗体を誘導した。従来の方法（BHI）、または実施例9に示した本発明の方法により成長させた*S.flexneri*、*S.sonnei*、*S.dysenteriae*および*S.boydii*に対する誘導抗体の凝集活性を示す。詳細については第12節の実施例36を参照のこと。

図12は、*Helicobacter pylori* NB3-2細胞の付着性に及ぼす胆汁濃度および*Helicobacter pylori*培養物の成長相の影響をグラフにより示す。0%、0.025%、0.05%または0.1%の胆汁を含む培地で*H.pylori* NB3-2細胞を成長させ、接種の8、10、12および18時間後に収穫した。*H.pylori* NB3-2細胞のこれらの異なる調製物のINT-407細胞に対する侵入を示す。詳細については第14節の実施例38を参照のこと。

30

図13は、*Helicobacter pylori* G1-4細胞の付着性に及ぼす胆汁濃度および*Helicobacter pylori*培養物の成長相の影響をグラフにより示す。0%、0.1%または0.2%の胆汁を含む培地で*H.pylori* G1-4細胞を成長させ、接種の6、8、10、12、14および16時間後に収穫した。*H.pylori* G1-4細胞のこれらの異なる調製物のINT-407細胞に対する侵入を示す。詳細については第15節の実施例38を参照のこと。

5. 発明の詳細な説明

本発明の方法は、抗原および／または毒力因子の発現を誘導または増強するために選択された、ある種の条件とある種の成分との組合せの存在下で腸内細菌をin vitroで成長させることに関する。

40

本明細書および請求の範囲で用いる「腸内」とは、動物の胃腸管のいずれかの部分に常在するかまたはそれと関連している細菌、および動物の胃腸管のいずれかの部分において感染を引き起こす細菌を指す。このような腸内細菌にはグラム陽性とグラム陰性の両方の細菌が含まれる。

本明細書および請求の範囲で用いる「成分」および「条件」とは、腸内細菌の天然のin vivo環境およびその他の要因と関連している多くの要因を指す。このような成分および条件として、胆汁、胆汁酸またはその塩またはコレステロールなどのその生物学的前駆物質、pH、微好気性条件、容量オスモル濃度、所望の細菌成長相で細菌を収穫または回収することなどがある。

50

本明細書および請求の範囲で用いる「抗原」とは、細胞の形態または細胞の運動性に関与する巨大分子、タンパク質、特に表面タンパク質、リポ多糖類および炭水化物を含むがこれらに限らない抗原を指す。かかる抗原は免疫原性があることが好ましい。

本明細書および請求の範囲で用いる「免疫原性」とは、本発明により作出された全細菌または全細菌の断片を含有する組成物に動物をさらした後に、該動物の体内で抗体産生を誘導する能力のことである。

本明細書および請求の範囲で用いる「抗原的に増強された」または「増強された抗原特性」または「増強された」とは、本発明の方法にしたがって成長させた腸内細菌の抗原状態をいう。このような細菌は、従来の方法を用いて成長させた同一の細菌と比べて、より高いレベルの特定の免疫原性抗原および／または新たな免疫原性抗原を有する。

10

本明細書および請求の範囲で用いる「従来」とは、先行技術において知られているものを指す。

本明細書および請求の範囲で用いる「微好気性条件」とは、嫌気性条件または上昇したCO₂濃度、例えば5～20%CO₂と80～95%空気、5～20%CO₂と80～95%N₂、または5～10%O₂と10～20%CO₂と70～85%N₂を指す。

本明細書および請求の範囲で用いる「毒力」とは、宿主に付着しかつ／または宿主内に侵入しかつ／または宿主内で生存しかつ／または病理学的状態を引き起こす能力と関連した腸内細菌の因子を指す。

本明細書および請求の範囲で用いる「免疫交差防御」とは、ある細菌株または血清型（全細胞または他のもの）により誘導された免疫応答が同一属の異なる細菌株、血清型または種による同一宿主の感染を防止または軽減できることを意味する。

20

本明細書および請求の範囲で用いる「免疫交差反応」とは、ある細菌株または血清型（全細胞または他のもの）により誘導された体液性免疫応答（すなわち、抗体）が同一属の異なる細菌株、血清型または種と交差反応（すなわち、抗体結合）することができることを意味する。免疫交差反応性は細菌免疫原の免疫交差防御能力を示しており、その逆もいえる。

本明細書および請求の範囲で用いる「宿主」とは、動物におけるin vivoまたは動物細胞培養物におけるin vitroのいずれかを指す。本明細書および請求の範囲で用いる「動物」としては、哺乳類や鳥類（例えば、ニワトリ、シチメンチョウ、アヒルなど）のような全ての温血動物が含まれるが、これらに限らない。

30

本発明によると、抗原的に増強された腸内細菌またはその免疫原性断片もしくは誘導体を含有するワクチンにおいて、腸内細菌は生きている細菌であっても不活化されていてもよく、ミョウバン、油－水エマルジョン、毒素原性大腸菌由来の熱不安定性トキシン（LT）、その非毒性形態（例えば、mLT）および／またはその各サブユニット、カルメット・ゲラン菌（BCG）、またはフロイントアジュバントのようなアジュバントをさらに含むことができ、また、生理食塩水、デキストロースまたは他の水溶液を含むがこれらに限らない適当な製剤上の担体をさらに含むことができる。他の適当な製剤上の担体はこの分野での標準的な参考書であるRemington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Companyに記載されている。本明細書および請求の範囲で用いる「ワクチン」は、病原菌（その感染または疾病の防御が求められている）と特異的に結合する抗体を含有する「受身ワクチン」をも包含する。

40

本明細書および請求の範囲で用いる「不活化細菌」とは、感染能および／または定着能のない腸内細菌のことであり、死滅した細菌ばかりでなく弱毒化されたものをも含む。弱毒化細菌は複製しうるが、感染や疾病を引き起こすことはない。細菌の不活化は当業者に知られたどのような方法で行ってもよい。例えば、細菌を化学的に（例えばホルマリン固定により）不活化することができ、また、物理的に（例えば熱処理、音波処理、照射により）不活化することもできる。こうして細胞は複製能および／または感染能および／または病気を引き起こす能力を失うこととなる。

有効量のワクチンが投与されるべきであり、ここで「有効量」とは被験者において免疫応答を生じさせることができる腸内細菌またはその免疫原性断片もしくは誘導体の量として

50

定義される。必要とされる量は用いる細菌、断片または誘導体の抗原性、並びにワクチンを接種すべき被験者の種および体重により変化するであろうが、標準的な手法を用いて確かめることができる。本発明の好適な非限定的実施態様では、有効量のワクチンが抗細菌抗体の抗体価をワクチン接種前の抗体価の少なくとも2倍に上昇させる。本発明の好適な特定の非限定的実施態様では、約 10^7 から 10^{11} の細菌、好ましくは 10^8 から 10^{10} の細菌が宿主に投与される。不活化された全細菌を含有するワクチンが好適である。

受身ワクチンに適用される「有効量」とは、細菌による疾病または感染を防止または軽減することができる抗体の量である。必要とされる量は抗体の種類および抗体価、並びにワクチンを接種すべき被験者の種および体重により変化するであろうが、標準的な手法を用いて確かめることができる。

本発明のワクチンは、静脈内、皮下、筋肉内、腔内、鼻腔内、経口または他の粘膜経路を含むがこれらに限らない当技術分野で公知の方法により局所的におよび／または全身的に投与することができる。

ワクチンは適当な無毒性の製剤上の担体とともに投与しても、マイクロカプセル内に保持させても、かつ／または持続放出インプラント内に保持させてもよい。

抗体レベルを維持するためにワクチンを間隔をおいて数回投与することが望ましい。

本発明のワクチンは他の殺菌法または静菌法と併用することができる。

本発明の抗体は、Antibodies A Laboratory Manual (E.Harlow,D.Lane,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)に記載の方法を含むがこれに限定されない、当業者に公知の従来法により得られる。一般的には、動物（広範囲の脊椎動物種を使用でき、通常はマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギである）をアジュバントまたは免疫原の有効性を増強しうる物質の非存在下または存在下で本発明の抗原的に増強された腸内細菌の全細胞または免疫原性断片もしくは誘導体により免疫し、一定の間隔で追加免疫を施す。好適な方法で所望の抗体の存在について動物の血清をアッセイする。この動物の血清または血液をポリクローナル抗体の供給源として使用することができる。

モノクローナル抗体に関しては、動物を上記のように処置する。許容できる抗体価が検出されたら、動物を安楽死させ、融合のために脾臓を無菌的に摘出する。脾細胞を特に選択された不死のミエローマ細胞系と混合し、次に細胞の融合を促進する薬剤（典型的にはポリエチレングリコールなど）にこの混合物をさらす。これらの状況のもとではランダムな選択で融合が起こり、得られる産物は各タイプの未融合細胞と融合細胞の混合物である。用いるミエローマ細胞系は、HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン）のような選択培地の使用により、融合混合物から培養下で生き残る細胞が免疫したドナー由来の細胞とミエローマ細胞とのハイブリッド細胞だけになるように特別に選ばれる。融合後、細胞を希釈して選択培地で培養する。所定の抗原に対して所望の特異性を有する抗体の存在について培地をスクリーニングする。最適の抗体を含む培養物を、その細胞培養物の起源が1個の細胞であることを提示できるようになるまで限界希釈法でクローニングする。本発明の抗体は腸内細菌による感染および疾病に対する受身ワクチンとして有用である。

宿主中の抗体または上記細菌の検出法としてはイムノアッセイがある。このようなイムノアッセイは当技術分野で公知であり、例えばラジオイムノアッセイ（RIA）、エンザイム結合イムノソルベントアッセイ（ELISA）、蛍光イムノアッセイおよび蛍光偏光イムノアッセイ（FPIA）が含まれるが、これらに限らない。

別の実施態様として、本発明にしたがって所望のイムノアッセイを行うために必要不可欠な試薬類をすべて含んでなる診断用キットがある。この診断用キットは必要な試薬類を保持する1以上の容器の組合せとして商業包装形態で提供され得る。かかるキットは、本発明の腸内細菌および／または本発明のモノクローナルもしくはポリクローナル抗体を、いくつかの通常のキット成分とともに含んでなる。通常のキット成分は当業者には明白であり、Antibodies A Laboratory Manual (E.Harlow,D.Lane,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)を含めた多数の刊行物に記載されている。通常のキット成分としては、例えばマイクロタイタープレート、アッセイ混合物のpHを維持する緩衝液、例えばTris、HE

10

20

30

40

50

PESなど、複合第二抗体、例えばペルオキシダーゼ結合抗マウスIgG（または第一抗体を誘導させた動物に対する抗IgG）、その他の標準試薬類といった品目がある。

本発明の方法は、腸内細菌を、適当な基礎必須培地で、例えばブレインハートインフュージョン培地（BHI）、ルリア培地（LB）、ヒツジ血液寒天（SBA）、プルセラ培地、ミュラーヒントン培地、プロテオースペプトンビーフ抽出物培地などで、種々の条件および成分を用いて、例えば0.05～3%の胆汁または0.025～0.6%の1以上の胆汁酸もしくはその塩またはコレステロールのようなその生物学的前駆物質、30～42℃の温度で、早期対数増殖期付近、早期対数期と定常期の間、または定常期付近の成長相まで、空气中または微好気性条件下（例えば5～20%CO₂と80～95%空気、5～20%CO₂と80～95%N₂、または5～10%O₂と10～20%CO₂と70～85%N₂）で、場合により2価カチオンキレート剤、例えば、
限定するものではないが、0～100μM、好ましくは25μMのBAPTA/AM（2'（エチレンジオキシ）ジアニリンn,n',n'-四酢酸／アセトキシメチルエステル；Molecular Probes,Eugene,OR）、0～10mMのEGTA（エチレンビス（オキシエチレンニトリロ）－四酢酸；Sigma Chemical Co.,St.Louis,MO）、または0～100μMのEGTA/AM（エチレンビス（オキシエチレンニトリロ）－四酢酸／アセトキシメチルエステル；Molecular Probes,Eugene,OR）の存在下で成長させることを含む。こうした条件および成分の組合せが抗原的に増強された腸内細菌を生み出す。

10

別の実施態様によると、本発明の方法はまた、2価カチオンキレート剤、例えば、限定するものではないが、1.0～100μM、好ましくは25μMのBAPTA/AM、0.5～10mMのEGTA、または1.0～100μMのEGTA/AMの存在下で、かつ胆汁、胆汁酸または胆汁塩の非存在下で行うことを除いて上記のように腸内細菌を成長させることを含む。

20

本発明にとって有用な胆汁、胆汁酸またはその塩としては、肝臓から分泌されて通常は胆嚢で濃縮される天然の胆汁化合物、当業者には公知の合成胆汁酸、例えば“OXGALL”（Difco Laboratories,Detroit,Michigan）、ウシ胆汁（Sigma Chemicals,St.Louis,Missouri）または他の市販されている調製物、コール酸、デオキシコール酸、タウロコール酸およびグリココール酸がある。一部の腸内細菌がコロニーを形成している遠位小腸および大腸部位にin vivoで存在している、市販の胆汁酸であるデオキシコール酸（DOC）が好適である。グリココール酸（GC）も好ましい。

本発明によると、Campylobacter sp.（カンピロバクターsp.）、Yersinia sp.（エルシニアsp.）、Helicobacter sp.（ヘリコバクターsp.）、Gastrospirillum sp.（ガストロスピリラムsp.）、Bacteroides sp.（バクテロイデスsp.）、Klebsiella sp.（クレブシエラsp.）、Enterobacter sp.（エンテロバクターsp.）、Salmonella sp.（サルモネラsp.）、Shigella sp.（シゲラsp.）、Aeromonas sp.（アエロモナスsp.）、Vibrio sp.（ビブリオsp.）、Clostridium sp.（クロストリジウムsp.）、Enterococcus sp.（エンテロコッカスsp.）およびEscherichia coli（エシェリキア・コリ）より成る群から選ばれる腸内細菌培養物を当業者には公知の方法で凍結ストックとして調整して、将来の使用のために－80℃で維持することができる。例えば、Campylobacter jejuniのストックは、該微生物を、5%脱繊維素ヒツジ赤血球を含むトリプチカーゼソイ寒天（SBA）上で5%O₂、10%CO₂、85%N₂（微好気性条件，“MC”）中37℃で20時間成長させることにより調製できる。Escherichia coli、Salmonella typhimurium、Helicobacter pyloriおよびShigella flexneriのストックは、該微生物をブレインハートインフュージョン培地（BHI）中で成長させることにより調製できる。凍結のために細菌を収穫するには公知の方法を使用し、例えば、培養物をスワブで集めて取り出し、30%グリセロール含有BHI中に再懸濁する。分析実験用または生産発酵用の培養物を調製するには、公知の方法で、例えば、微生物を1.5%寒天含有BHIで37℃でMCまたは大気条件下に成長させ、次に単一のコロニーを培地に移して、ここに記載の本発明の方法にしたがって培養する。細菌を使用する際には、当業者に公知の方法で、例えば遠心分離により収穫することができる。

30

40

好ましい実施態様では、Campylobacter sp.（好ましくはjejuniまたはcoli種、最も好ましくはjejuni81-176株）の抗原的に増強された細胞を基礎必須培地、好ましくは約0.1%DOCまたは約0.8%胆汁を追加的に含むBHI培地中37℃で約10～20%CO₂と約80～90%空気の

50

混合気体下に成長させ、該培養物の成長がだいたい後期対数期から定常期に達した後（典型的には接種の約20時間後）に収穫する。

その他の好ましい実施態様では、*Shigella* sp.（好ましくは*flexneri*または*dysenteriae*種、最も好ましくは*flexneri*2457T株）の抗原的に増強された細胞を基礎必須培地、好ましくは約0.1%DOCまたは約0.8%胆汁を追加的に含むBHI培地中37℃で空気下に成長させ、該培養物の成長がだいたい早期対数期に達した後（典型的には早期から中間対数期にある培養物を接種した約30分後）に収穫する。

更なる好ましい実施態様では、*Helicobacter pylori*（好ましくはATCC 49503株、NB3-2またはG1-4）の抗原的に増強された細胞を基礎必須培地、好ましくは約0.05~0.2%胆汁または約0.05%グリココール酸（GC）を追加的に含むBHI培地中37℃で約5~20%CO₂と約80~95%空気または約10%CO₂と約5%O₂と約85%N₂の混合気体下に成長させ、該培養物の成長がだいたい対数期または定数期に達した後で収穫する。より好ましい実施態様では、該培養物がだいたい対数期に達した後で細胞を収穫する。

本発明の方法で培養した腸内細菌は改変された形態および／または細胞運動性を有し、かつ／また、いくつかの新しいタンパク質、リポ多糖類および／または炭水化物および／または基礎培地のみで培養した細胞と比べて変化したレベルの上記巨大分子を産生する。細胞の収量および病原性指数を高める最適な培養条件を同定することができる。これらの培養条件を用いて、増強または誘導される毒力関連抗原を同定することができる。

運動性と全体的な形態の変化は未処理のまたは染色した細菌の顕微鏡検査により観察し得る。本発明の方法からは電子顕微鏡や蛍光顕微鏡によって見ることもできるような他の形態変化が生じる可能性がある。

本発明の方法で培養した腸内細菌の形態および粘液様特性は、莢膜および／または表面層の発現が誘導されうることを示唆する。莢膜の生産を試験するために、タンパク質、炭水化物、リポ多糖類などの表面成分のフェノール抽出物を調製することができる。増加した炭水化物は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で調べることができる。

毒力を増強する本発明の成長条件下で成長させた腸内細菌から調製された外膜のタンパク質プロファイルをドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）で特徴づけて、従来の培地で成長させた微生物から得られたものと比較することができる。SDS-PAGEは、抗原を増強するまたは変化させる条件に応答して細菌細胞タンパク質および抽出タンパク質において生じた変化を評価するために行われる。これらのデータは、増大した侵入性または改変された抗原性と関連した表面変化に関する定性的および定量的情報を提供する。

誘導または改変されたタンパク質抗原の免疫原能力はウエスタンブロッティングで確認することができる。SDS-PAGEにより同定された、誘導または改変された細菌タンパク質の免疫原性は、後述するような、一般的に受け入れられているウエスタンブロッティングの手法を用いて評価しうる。回復期の免疫ウサギまたはフェレット血清（従来の方法または本発明の方法で成長させた生存微生物を経口的に感染させた動物由来の抗体の供給源）、腸粘液（IgA抗体の供給源）、ポリクローナル抗血清、またはモノクローナル抗体、例えば*C.jejuni*フラジェリンと交差反応するもの、などの抗体のどのような供給源も細菌抗原のアッセイに使用できる。

これらの細菌抗原のいくつかの生産増加は毒力と関連した性質の増強と同時に起こる。こうした性質としては、培養したヒト腸上皮細胞への付着と侵入、およびコンゴレッド色素の結合がある。コンゴレッド色素結合アッセイは毒力を予測するための一般的に認められている方法で、後述されるが、Andrewsら（*Infect.Immun.*,60:3287-3295,1992）およびYoder（*Avian Dis.*,33:502-505,1989）に記載されている。細菌のコンゴレッド結合はヘミン結合能を示し、このヘミン結合能は毒力と相関関係がある。コンゴレッド結合はまた上皮細胞の増大した細菌侵入とも関連している。

以前、従来法で成長させた*C.jejuni* Lior血清型はほとんどが免疫交差反応性でないことが明らかにされている。この情報に基づくと、*Campylobacter*に対する広範な防御を得るために、数種のLior血清型株のワクチンを多数作るかまたは混合ワクチンを作って投与す

10

20

30

40

50

ることが必要であろう。本発明の方法により作出された抗原的に増強されたCampylobacterは、従来法で成長させたCampylobacterを用いて得られたものより広範囲のLior血清型に対して免疫交差反応性を示す。同様に、本発明の方法により作出された抗原的に増強されたShigellaは、従来法で成長させたShigellaを用いて得られたものより広範囲のShigella種に対して免疫交差反応性で、免疫交差防御的である。これらの免疫交差反応および免疫交差防御の特性は、後述する凝集アッセイとワクチン研究の結果により示される。

抗原的に増強された腸内細菌を作出する本発明の方法は小動物モデルでの増強された毒力に相関する。ヒトのCampylobacter疾患のモデルとして数種類の家畜を使用することができる。免疫感作の有効性の観点からいけば多く研究されたものは可逆的な腸管結紮で、Caldwellらの成熟ウサギ下痢症（RITARDモデル）（Infect.Immun.,42:1176-1182,1983）である。このモデルはLior血清型と交差菌株防御との関連をも実証した。しかし、このモデルは病気に対する抵抗性よりもむしろ定着（コロナイゼーション）に対する抵抗性を判定するものである。Bellらのフェレットモデル（Infect.Immun.,58:1848-1852,1990）はより有望なモデルかもしれない。なんとなれば、この動物はヒトのCampylobacter疾患の症状によく似た症状を呈するからである。比較的最近のモデルはBagarのマウス・コロナイゼーションモデル（Infection and Immunity,63:3731-3735,1995）である。このモデルは、免疫感作とこれに続く免疫マウスへの生存Campylobacterによる鼻または経口チャレンジ、その後に糞便中のCampylobacterの存在をモニターすることによる腸管定着の試験を必要とする。Shigellaに関しては、Malettらにより記載されたマウス鼻チャレンジアッセイ（下記の第13節参照）を用いて毒力とワクチンの有効性を評価する。Helicobacter pyloriに関してはChenら（Lancet,339:1120-1121,1992）により記載されたHelicobacter felis胃コロナイゼーションモデルを用いて、本発明の方法により作出されたH.pyloriのワクチン効力を評価する。

腸内細菌の侵入および感染に関係した他の動物モデルも存在し、それらは本発明の方法により増強された腸内細菌のワクチン効力を試験するために用いられる。

本発明の方法により作出された抗原的に増強された腸内細菌を用いて、基本型の死滅全細胞ワクチンまたはサブユニットワクチンを調製する。これらのワクチンは、動物に投与したとき抗体を誘導し、かくしてワクチンの防御能を樹立することがわかる。細菌細胞におけるこれら抗原の増強または誘導は、より有効なワクチンをつくる細胞をもたらす。

本発明の方法により作られたワクチン候補調製物は、腸の免疫応答を引き出すために種々の粘膜免疫法とともに使用することができる。その後、抗原性を増強させたまたは増強させてない病原菌でチャレンジした動物を保護するために、成功した免疫感作プロトコルを用いる。また、ワクチンを混合ワクチンとして調製し、試験することもできる。例えば、Shigella細胞とCampylobacter細胞またはそれらの構成成分を単一のワクチンとして組み合わせることができる。

下記の実験的手法は表面抗原の変化と他の特性（増強された侵入性と関連している特性）の変化の検出を可能にする。これらの変化は定性的かつ定量的である。最も重要なことは、こうした実験により、本発明の方法が侵入性を増強しかつ免疫原として関わりのある抗原を誘導する、ということが確立されたことである。このような抗原的に増強された細菌は、従来法で成長させた細菌と比べて、より広範囲の細菌株、血清型および／または種による感染に対して防衛的な免疫応答を引き出し、それゆえ、有効なワクチンとして使用しうる。

当業者には公知の十分に確立されたモデルがいくつか存在しており、これらは後述するように増強された抗原特性、細菌の毒力およびワクチンの効力を評価するのに有用である。本発明の非限定的な実施例を以下に記載する。

6.実施例：増強された抗原性細菌の作出方法

実施例 1

Campylobacter jejuni 81-176株を血液寒天プレート（トリプチカーゼソイ寒天および5%脱繊維素ヒツジ赤血球を含有）上にストリークし、微好気性GasPakジャー（BBL,Cockeysville,MD）中37°Cで20時間インキュベーションした。細菌叢をスワブで取り上げ、0.8%

10

20

30

40

50

OXGALL (Difco, Detroit, MI) を含む10%CO₂、90%空気に前平衡化されたBHI培地 1 リットルを含有するフラスコ中に接種した。培養物を、密閉フラスコ中10%CO₂、90%空気、37℃で振盪しながら、20時間インキュベーションし、ついで上記のとおり収穫した。

実施例 2

Campylobacter jejuni81-176株を血液寒天プレート（トリプチカーゼソイ寒天および5%脱繊維素ヒツジ赤血球を含有）上にストリークし、微好気性GasPakジャー（BBL, Cockeysville, MD）中37℃で20時間インキュベーションした。細菌叢をスワブで取り上げ、0.01%～0.1%デオキシコール酸ナトリウム（DOC）を含む10%CO₂に前平衡化されたBHI培地 1 リットルを含有するフラスコ中に接種した。（該BHI培地とは別のストック溶液としてDOCを調製し、高圧滅菌し、該細菌の接種直前に、最終濃度が0.01%～0.1%になるまでそれをBHI培地に無菌的に加えることが重要である。）。培養物を、5%O₂、10%CO₂、85%N₂中37℃で振盪しながら、20時間までの種々の時間インキュベーションし、ついで上記のとおり収穫した。

10

実施例 3

Campylobacter jejuni81-176株を血液寒天プレート（トリプチカーゼソイ寒天および5%脱繊維素ヒツジ赤血球を含有）上にストリークし、微好気性GasPakジャー（BBL, Cockeysville, MD）中37℃で20時間インキュベーションした。細菌叢をスワブで取り上げ、0.01%～0.1%デオキシコール酸ナトリウムを含む10%CO₂に前平衡化されたブルセラ培地 1 リットルを含有するフラスコ中に接種した。培養物を、5%O₂、10%CO₂、85%N₂中37℃で振盪しながら、20時間インキュベーションし、ついで上記のとおり収穫した。

20

実施例 4

Campylobacter jejuni81-176株を血液寒天プレート（トリプチカーゼソイ寒天および5%脱繊維素ヒツジ赤血球を含有）上にストリークし、微好気性GasPakジャー（BBL, Cockeysville, MD）中37℃で20時間インキュベーションした。細菌叢をスワブで取り上げ、0.01%～0.1%デオキシコール酸ナトリウムを含む10%CO₂に前平衡化されたミューラー・ヒントン培地 1 リットルを含有するフラスコ中に接種した。培養物を、5%O₂、10%CO₂、85%N₂中37℃で振盪しながら、20時間インキュベーションし、ついで上記のとおり収穫した。

実施例 5

Campylobacter jejuni81-176株を血液寒天プレート（トリプチカーゼソイ寒天および5%脱繊維素ヒツジ赤血球を含有）上にストリークし、微好気性GasPakジャー（BBL, Cockeysville, MD）中37℃で20時間インキュベーションした。細菌叢をスワブで取り上げ、0.1%デオキシコール酸ナトリウムを含む10%CO₂に前平衡化されたBHI培地 1 リットルを含有するフラスコ中に接種した。培養物を、10%CO₂、90%空気中37℃でゆっくり攪拌しながら、20時間インキュベーションし、ついで上記のとおり収穫した。

30

実施例 6

Vibrio choleraeをBHI寒天プレート（トリプチカーゼソイ寒天および5%脱繊維素ヒツジ赤血球を含有）上にストリークし、空気中37℃で20時間インキュベーションした。細菌叢をスワブで取り上げ、0.1%デオキシコール酸ナトリウムを含むBHI培地 1 リットルを含有するフラスコ中に接種した。培養物を、空気中37℃で振盪しながら20時間インキュベーションし、ついで上記のとおり収穫した。

40

実施例 7

Salmonella cholerasiusをBHI寒天プレート上にストリークし、空気中37℃で20時間インキュベーションした。細菌叢をスワブで取り上げ、0.1%デオキシコール酸ナトリウムを含むBHI培地 1 リットルを含有するフラスコ中に接種した。培養物を、空気中37℃で振盪しながら20時間インキュベーションし、ついで上記のとおり収穫した。

実施例 8

Salmonella typhimuriumをルリアブロス寒天プレート上にストリークし、空気中37℃で20時間インキュベーションした。細菌叢を、0.1%デオキシコール酸ナトリウムを含むBHI培地 1 リットルを含有するフラスコ中に接種した。培養物を、10%CO₂、90%空気中37℃で

50

振盪しながら20時間インキュベーションした。0.1%DOCを含有するLB1リットルにコロニー1個を移し、ゆっくり振盪しながら上端密閉フラスコ中37℃でインキュベーションした。12時間後、該培養物60mlを同じ新鮮な加温培地1リットル中に希釈し、さらに30分インキュベーションし、ついで上記のとおり収穫した。

実施例9

*Shigella flexneri*2457Tをコンゴレッド寒天プレート上にストリークし、空气中37℃で20時間インキュベーションした。BHI培地1リットルを含有するフラスコ中に赤色コロニー1個を接種し、振盪しながら12時間インキュベーションした。ついで、この培養物50mlを用いて、0.1%デオキシコール酸ナトリウムを含有する加温BHI培地250mlに接種した。振盪しながら空气中37℃で4時間、該培養物をインキュベーションした。ついで、OD₆₀₀が約0.17になるまで、0.1%DOCを含有する加温BHIでこの培養物を希釈し、空气中37℃で振盪しながら30分間インキュベーションし、ついで上記のとおり収穫した。

10

実施例10

*Campylobacter jejuni*81-176、81-116またはHC（30%グリセロールを含むBHI中）を急速解凍し、ヒツジ血液寒天（SBA、0.1ml/プレート）上にプレーティングした。CampyPack Plus微好気性環境ジェネレーターの付いたGasPakジャー（BBL,Cockeysville,MD）中37℃で20時間、該接種プレートをインキュベーションした。該細菌叢をスワブにより該プレートから取り、該細菌をBHI10mlに再懸濁した。2リットルフラスコ中10%CO₂、90%空気に前平衡化した、BHI培地単独または0.1%DOCを含有するBHI培地1リットルに該細菌懸濁液を接種した。OD₆₂₅が0.05に等しくなるまで、該接種物を前平衡化培地に加えた。該接種フラスコを10%CO₂、90%空気に戻し、37℃で20時間、ゆっくり攪拌した。この時点で上記のとおり該細菌を収穫した。

20

実施例11

4%子ウシ血清を含むBHI培地に*Helicobacter pylori*を加えた。接種後、該フラスコを5%O₂、10%CO₂、85%N₂でフラッシュし、振盪しながら37℃で22時間インキュベーションした。このインキュベーションの後、4%子ウシ血清を含むBHI培地またはさらに0.05%グリココール酸ナトリウムを含有する同じ培地を含有するフラスコへ該培養物2.5mlを移した。これらの培養物を微好気性気体混合物（5%O₂、10%CO₂、85%N₂）で再度フラッシュし、37℃で20～24時間インキュベーションした。該細胞を上記のとおり収穫した。

実施例12

Salmonella typhimurium（30%グリセロールを含むLB中）をLB寒天プレート上にストリークし、空气中37℃で18～20時間培養した。コロニー1個を拾い、10%CO₂、5%CO₂、85%N₂でフラッシュしたフラスコ中のLBまたは0.1%DOC含有LB1リットル中へ移し、密閉し、振盪しながら37℃で12時間インキュベーションした。ついで、OD₆₀₀が0.17になるまで同じ培地中で該細菌を希釈し、該培養物が初期対数期に達するまで、典型的には希釈後30分間、同じ条件下でインキュベーションした。細胞を上記のとおり収穫した。

30

実施例13

*Salmonella typhimurium*をLB寒天プレート上にストリークし、空气中37℃で18～20時間培養した。コロニー1個を拾い、LBまたは0.1%DOC含有LB1リットル中へ移し、空气中37℃で12時間インキュベーションした。ついで、該培養物を同じ新鮮培地中で希釈（1/5）し、同じ条件下でさらに4時間インキュベーションした。ついで、OD₆₀₀が0.17になるまで同じ新鮮培地中で該培養物を希釈し、該培養物が対数期に達するまで、典型的には希釈後30分間、同じ条件下でインキュベーションした。細胞を上記のとおり収穫した。

40

実施例14

*Klebsiella pneumoniae*をBHI寒天プレート上にストリークし、空气中37℃で18～20時間インキュベーションした。コロニー1個を拾い、BHIまたは0.1%DOC含有BHI1リットルに接種し、空气中37℃で12時間振盪した。ついで、OD₆₀₀が0.17になるまで同じ培地中で該細菌を希釈し、さらに30分間増殖させ、ついで上記のとおり収穫した。

実施例15

*Enterobacter cloacae*をBHI寒天プレート上にストリークし、空气中37℃で18～20時間イ

50

ンキュベーションした。コロニー 1 個をBHIまたは0.1%DOC含有BHI1リットルに接種し、37°Cで12時間振盪した。ついで、 OD_{600} が0.17になるまで同じ培地中で該細菌を希釈し、さらに30分間増殖させ、ついで上記のとおり収穫した。

実施例16

Escherichia coli 0157:H7株をヒツジ血液寒天プレート上にストリークし、空气中37°Cで18~20時間インキュベーションした。コロニー 1 個を1リットルのBHIまたは0.1%~0.2%DOC含有BHIを含むフラスコ中に接種し、37°Cで12時間振盪した。ついで、 OD_{600} が0.17になるまで該細菌を希釈し、さらに30分間増殖させ、ついで上記のとおり収穫した。

実施例17

*Enterococcus faecalis*をヒツジ血液寒天プレート上にストリークし、空气中37°Cで18~20時間インキュベーションする。コロニー 1 個を1リットルのBHIまたは0.1%DOC含有BHIを含むフラスコ中に接種し、37°Cで12時間振盪する。ついで、 OD_{600} が0.17になるまで該細菌を希釈し、さらに30分間増殖させ、ついで上記のとおり収穫する。

実施例18

Clostridium difficile (30%グリセロールを含む改良細切肉培地) を、1.5%寒天を含む嫌気性菌用ビーフ肝臓培地のプレート上にストリークし、微好気性条件下(5%CO₂および95%N₂) 37°Cで培養する。コロニー 1 個を改良細切肉培地または0.1%DOCを含む同じ培地の1リットルに移す。該細菌を微好気性条件下37°Cで12時間培養し、上記のとおり収穫する。

実施例19

Bacteroides fragilis (30%グリセロールを含む改良細切肉培地) を、改良細切肉培地寒天プレート上にストリークし、微好気性条件下(5%CO₂および95%N₂) 37°Cで培養する。コロニー 1 個を改良細切肉培地または0.1%DOCを含む同じ培地の1リットルに移す。該細菌を微好気性条件下37°Cで12時間培養し、上記のとおり収穫する。

実施例20

Yersinia pseudotuberculosis (30%グリセロールを含有するルリア培地) をルリア培地寒天プレート上にストリークし、30°Cでインキュベーションする。コロニー 1 個をLB1リットルへ移し、30°Cで12時間インキュベーションする。この培養物をLBまたは0.1%DOC含有LB中で希釈(1/5)し、37°Cで4時間インキュベーションする。ついで、 OD_{600} が0.17になるまで同じ培地中で該培養物を希釈し、さらに30分間インキュベーションし、ついで上記のとおり収穫する。

実施例21

4%子ウシ血清を含むBHI培地に*Helicobacter pylori*を加えた。接種後、該フラスコを5%O₂、10%CO₂、85%N₂でフラッシュし、振盪しながら37°Cで22時間インキュベーションした。このインキュベーションの後、4%子ウシ血清を含むBHI培地またはさらに約0.1%~約0.2%ウシ胆汁を含有する同じ培地を含有するフラスコへ該培養物2.5mlを移した。これらの培養物を微好気性気体混合物(5%O₂、10%CO₂、85%N₂)で再度フラッシュし、37°Cで20~24時間インキュベーションした。該細胞を上記のとおり収穫した。

7. 実施例：増強された抗原性細菌

実施例22

湿封入(wet mounted)細菌の顕微鏡的検査により、運動性および全形態を観察した。墨汁(ニグロシン(nigrosine))による莢膜染色により表面層を観察した。風乾後、該細胞をクリスタルバイオレット(crystal violet)により対比染色した。すべての観察は1000倍の倍率で行った。

本発明方法により培養した細菌(以下、「増強」細菌と称する)形態は、基礎培地単独中で培養したもの(従来法で成長させた)と比べて変化していた。例えば、「増強」*C. jejuni*は集合し、細胞の大きなクランプを形成したのに対し、従来法で成長させた細胞は単生のものが優勢であった。細菌表面の変化が本発明方法で培養することにより起こったことは莢膜染色(データは示していない)から明らかであった。実際、この表面変化の結果、該染色からのニグロシン粒子の「増強」細胞による結合が増加した。該「増強」細菌の運

10

20

30

40

50

動性は高く維持された。

実施例23

フェノール抽出により、C.jejuni表面成分を分析した。抽出物は、従来法で成長させたか、または上記実施例2により培養したC.jejuni81-176から得た。上記のとおり遠心分離により培地からC.jejuni細胞を収穫した。室温で2時間、1%フェノールで該細胞ペレットを抽出した。45分間の遠心分離により無傷細胞を抽出物から分離した。抽出された細菌表面成分を含有する上清を、蒸留水に対して一晚透析した。該保持物質を105,000×g、4℃で3時間遠心分離した。該抽出ペレットを10%NaCl中に再溶解し、2倍容の冷95%エタノールで沈殿させた。該沈殿を繰り返し、該サンプルを凍結乾燥した。ついで、さらに分析するために、該サンプルを水に1mg/mlで溶解した。

グルコースを基準に用いる一般に許容されているフェノール-硫酸法により、該抽出物の炭水化物含量を測定した。カルバゾール試薬を用いるDischeの方法により、該抽出物のウロン酸含量を測定した。ピシチン酸(bicichinoic)アッセイキット(Pierce Chem.Co., Rockford,IL)を用いて該フェノール抽出物の総タンパク含量を評価した。

該抽出物にウロン酸が存在しないことは注目に値した。多数の典型的な細菌莢膜はウロン酸ポリマーよりなる。驚くべきことに、C.jejuni81-176の表面抽出物は実際にはタンパク質が優勢であった。しかしながら、該「増強された」細胞抽出物の総炭水化物含量は、通常に増殖させた細胞に対して増加していた。

該抽出物のタンパク質に対する炭水化物の比率を以下の表1に示す。

表1. 通常に増殖させた(BHI)または実施例2の方法により増殖させた(増強)C. jejuniの細胞表面抽出物の炭水化物：タンパク質比率

添加後時間(時間)	B H I	増強
1	0.02	0.02
2	0.02	0.10
4	0.02	0.15
6	0.03	0.29

該培地中のDOCの含有量と該細菌からの表面抽出可能炭水化物の増強されたレベルとの間には直線的関係があった(表1)。本発明の方法により培養した細菌では、表面抽出可能炭水化物は8倍以上増加したのに対し、通常に増殖させた細菌では増加が全く見られなかった。DOC培地中で培養した細菌細胞の凝集は、該表面抽出物の成分に起因するようであった。

再水和に際して、該抽出物は水中で高いゲル化能を有し、これは該溶液を高粘性かつ粘液状にするものであり、該凝集細菌と類似の性質であった。該抽出物のこの機能性はムチン様糖タンパク質に類似していた。

個々の単糖類を分析するために、密閉バイアル中1Nトリフルオロ酢酸中で抽出物を加水分解した。該サンプルを窒素下で2時間乾燥し、蒸留水に再懸濁した。Dionex Corpクロマトグラフィーマトリックスおよび溶媒として3%の0.5N NaOH/97% H₂Oよりなる溶媒系を用いるHPLCにより糖を分離した。電流滴定検出により分離された単糖類を定量した。また、フコース、ガラクトサミン、グルコサミン、ガラクトース、グルコースおよびマンノースよりなる真正単糖類標品をHPLC分析に付して比較した。

該加水分解表面抽出物のHPLC分析により、種類の単糖類の存在が示された(図1)。通常に増殖させたかまたは上記実施例2の方法により増殖させた細菌からの抽出物の炭水化物組成に、定性的相違は全くないようであった。しかしながら、主要ではない定量的相違は明らかであった。

実施例24

SDS-PAGEおよびウエスタンブロッティングにより細菌タンパク質を分析した。Lugtenbergら (FEBS Letters 58:254-258,1975) のゲル系を用いた。該ゲル系は、低アクリルアミド (典型的には4%) スタッキングゲル (pH6.8) およびより高い割合のアクリルアミド分離ゲル (pH8.8) よりなる不連続ゲルである。両ゲルおよび用いたすべての緩衝液にSDS (0.1%) が含まれていた。タンパク質分離は分子の大きさにより行い、8または12%アクリルアミド分離ゲルを用いた。分離タンパク質の可視化は固定ゲルの銀染色により、分子の大きさの測定は標準として用いた公知タンパク質の M_r 値に基づいて行った。SDS-PAGEによりC.jejuni細胞タンパク質を分離し、銀染色により可視化した。62kDaのタンパク質を含む4つのタンパク質が、DOCを用いて培養した細胞中で誘導または増強された (図2)。

10

実施例25

フェノール抽出によりS.flexneri LPSを分析した。通常に増殖させたまたは上記実施例9で例示される本発明により増殖させたS.flexneri細胞を、上記のとおり遠心分離により培地から収穫した。WestphalおよびJann (R.Whistler編, Methods in Carbohydrate Chemistry, vol 5;p.83,1965) の方法により、リポ多糖 (LPS) を抽出した。簡単に言えば、BHI中でまたは上記実施例9で例示したとおりに培養した細胞を遠心分離により収穫し、PBS中で1回洗浄した。ついで、水中の45%フェノールを用いて68℃で15分間、該細胞を抽出した。該抽出物を10℃に冷却し、遠心分離した。LPS含有上部水相を吸引し、蒸留水に対して透析した。該保持物質を80,000×g、4℃、7時間で1回、およびそれぞれ105,000×g、3時間で3回遠心分離した。該最終ペレットを凍結乾燥した。分析前に、該LPSを水に再懸濁した (1mg/ml)。該精製LPSを上記のとおり炭水化物含量に関して、および下記および図5に示すとおりのデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により特徴づけした。

20

この特定のSDS-PAGE系を用いて分析した場合には、S.flexneriタンパク質プロフィールは、通常培養細胞と「増強」細胞との間の大きな相違を全く示さなかった。「増強」細胞からのLPSに対する炭水化物の乾燥重量比は、BHI細胞からの抽出物と比べて減少した。しかしながら、S.flexneri LPSのSDS-PAGEについて酸化および銀染色により、LPS構造の大きな変化が示された (図5)。該ゲルのレーン「2」に示されるとおり、「増強」S.flexneriからのLPSのO-抗原画分は、長さが減少した。この結果は、炭水化物/「増強」細胞からのLPSの乾燥重量比の減少という知見を補足するものであった。

30

これらの結果は、「増強」細胞上のより短いO-抗原側鎖の提示を示唆し、潜在的に該細菌をより疎水性にするかもしれない。より疎水性の細菌は、腸管内の疎水性表面とのより大きな相互作用を有しうる。

実施例26

ウエスタンブロットによりタンパク質の免疫原性を定量した。通常に増殖させたまたは上記実施例1または5に例示される本発明方法により増殖させた細菌からのタンパク質をSDS-PAGEにより分離し、ついで電気泳動的にニトロセルロースまたはPVDF膜に移し、標準ブロッキング剤 [3% BSA、50mM トリス (pH8.5)、50mM NaCl、0.2% TWEEN20] でブロッキングした。第1抗体をブロッキング緩衝液中に適用し、ついで該ブロットを洗浄し、第2抗体リポーター同族体を適用した。洗浄後、光またはクロモフォア生成基質で該ブロットを可視化した。用いたリポーター部分は西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼであった。

40

図3は、IgA含有免疫ウサギ粘液によるウエスタンブロッティングからのタンパク質を示す。該62kDaタンパク質は主要抗原であったことがわかる。DOCまたは胆汁を用いて培養した細胞中では、該62kDaタンパク質の抗原性が非常に増強されていた。また、このタンパク質は、DOCを用いて培養した細胞の表面抽出物中の優勢抗原であった。

Campylobacterフラジェリンと交差反応するマウスモノクローナル抗体を用いて、該増強タンパク質はC.jejuniフラジェリンであることが示された (図4)。C.jejuniフラジェリンが病原に関与しており該細菌の侵入性に関連していることが数名の研究者により示され

50

ているため、これは重要な知見であった。

実施例27

コンゴレッド染料結合により毒力を測定した。BHI寒天プレート（0.025%コンゴレッド含有）上で通常に増殖させた（BHI）または本発明方法により増殖させた（「増強」）腸内細菌を蒸留水に再懸濁し、アセトンで10分間抽出した。遠心分離により細胞残渣をペレット化し、40%アセトン、60%水のブランク溶液を用いて該染料のOD₄₈₈を測定した。660nmでの該染料の吸光度を該細胞の吸光度と比較し、OD₄₈₈/OD₆₆₀の比率として表した。該データを以下の表2に示す。

表2. 通常に増殖させた（BHI）または本発明方法により増殖させた（増強）腸内病原性細菌のコンゴレッド染料結合

株	染料吸収	
	BHI	増強
C. jejuni 81-176	0.07	0.49
C. jejuni 81-116	0.06	0.49
S. typhimurium SR11	0.05	0.30
S. flexneri 2457T	0.02	0.13
V. cholera 569b	0.70	2.00

表2は、本発明方法により培養した数種の腸内細菌の場合にはコンゴレッド染色結合が増強されたことを示す。これらの結果は、本発明のin vitro法が、毒力および他の細菌種に関するin vivo病原性と相関していることが知られている他の性質を誘導するのに有用であることを示す。

実施例28

培養上皮細胞への細菌付着を分析した。GalanおよびCurtiss（Proc.Natl.Acad.Sci.USA,86:6383-6387,1989）により記載されているとおりに細菌付着をアッセイした。組織培養細胞（INT-407またはヘンレ細胞（ATCC# CCL6）およびCaCo-2（ATCC# HTB37）ヒト小腸細胞系）を24-ウェル組織培養プレート（37℃、5%CO₂）上、60~80%の密度で培養した。該培地は用いる細胞系によるが、ヘンレ細胞には10%ウシ胎児血清およびそれぞれ50mg/mlのペニシリンGおよびストレプトマイシンを含むダルベッコの改良イーグル（Dulbecco's modified Eagle's）培地を使用し、CaCo-2細胞の培養には10%ウシ胎児血清およびそれぞれ50mg/μlのペニシリンGおよびストレプトマイシンを含むRPMI1640培地を使用した。アッセイの少なくとも3時間前に、該培地を除き、マグネシウムおよびカルシウムを含むハanks平衡塩溶液（HBSS）で該細胞を2回洗浄した。ついで、抗生物質を含まない増殖培地で単層を重層した。

付着アッセイのために、該細菌を以下のとおり調製した。Campylobacter、Helicobacterなどの増殖の遅い腸内細菌の場合、OD₆₂₅が0.1になるまで新鮮な前平衡化培地で該細菌培養密度を希釈し、ついで該アッセイに用いた。Shigellaおよび他の増殖の速い腸内細菌の場合、OD₆₂₅が0.17になるまで新鮮な前平衡化培地で該細菌培養を希釈し、ついで該アッセイに用いた。飽和を避けるために10細菌/細胞の感染多重度にて該細菌を該上皮細胞に加えた。該組織培養ウェル中に接種した細菌の数をプレート計数により計算した。5%CO₂下、Campylobacterの場合には2時間の、Shigellaの場合には30分間の感染の後、0.1%デオキシコール酸塩による該単層の溶解および付着測定のためのプレーティングの前にHBSSで洗浄することにより、非結合細菌を除いた。

通常に増殖させたまたは上記実施例5に例示される本発明方法により増殖させたC.jejuni

10

20

30

40

50

81-176によるINT-407細胞への付着に対する温度の影響を、以下の表3に示す。
通常に増殖させたまたは本発明方法により増殖させたC.jejuniのいくつかの株の付着の相違を、以下の表4に示す。

パーセント付着は、該単層から回収したコロニー形成単位（CFU）数を該単層上へ接種したCFU数で割り100倍した数として表されている。

表3：通常に増殖させた（BHI）または本発明方法により増殖させた（増強）C. jejuniによるINT-407細胞への付着に対する温度の影響

温度	BHI (%粘着)	増強 (%粘着)
37℃	5.5	62.3
42℃	5.5	11.2

10

表4．通常に増殖させた（BHI）または本発明方法により増殖させた（増強）C. jejuniの異なる株によるINT-407への付着（増加倍）

株	BHI	増強
81-176	1.0	8.4
81-116	1.0	12.5
HC	1.0	28.2

20

侵入アッセイでは、付着アッセイについて上記した方法により上皮細胞を増殖させ調製した。飽和を避けるために10細菌／細胞の感染多重度にて、通常に増殖させたまたは本発明方法により増殖させた細菌を該上皮細胞に加えた。該組織培養ウェル中に接種した細菌の数をプレート計数により計算した。5%CO₂下、Campylobacterの場合には2時間の、Shigellaの場合には30分間の感染の後、該感染細菌を吸引し、すべての細胞外細菌を殺すためゲンタマイシンを含有する増殖培地で該単層を重ねた。この時点で残っているすべての培養可能細菌は、該上皮細胞単層に侵入している。C.jejuni感染細胞の場合には3時間、Shigella感染細胞の場合には1.5時間、CO₂下で該インキュベーションを継続した。単層をHBSSで洗浄してゲンタマイシンを除き、0.1%デオキシコール酸塩を加えることにより溶解した。プレート計数により該ライゼート中の細菌を数え、接種細菌数と比較したゲンタマイシン耐性細菌の数としてパーセント侵入を表した。

30

侵入は、ゲンタマイシン処理後に該単層から回収したコロニー形成単位（CFU）数を該単層上へ接種したCFU数で割り100倍した数として求めた、該単層に侵入する細胞のパーセントとして表している。

40

通常に増殖させたまたは上記実施例5の方法により増殖させたC.jejuni81-176によるINT-407細胞への侵入に対する温度の影響を、以下の表5に示す。

通常に増殖させたまたは本発明方法により増殖させたC.jejuniのいくつかの株によるINT-407細胞への侵入における相違を、以下の表6に示す。

通常に増殖させたまたは上記実施例5の方法により増殖させたC.jejuni81-176によるINT-407細胞への付着および侵入に対するDOCの影響を、以下の表7に示す。

通常に増殖させたまたは上記実施例5の方法により増殖させたShigellaによるINT-407細胞への付着および侵入に対するDOCの影響を、以下の表8に示す。

50

表 5 : 通常に増殖させた (BHI) または本発明方法により増殖させた (増強) *C. jejuni* 81-176 による INT-407 細胞への侵入に対する温度の影響

温度	BHI (%侵入)	増強 (%侵入)
37℃	2.5	49.5
42℃	4.0	7.1

10

表 6 . 通常に増殖させた (BHI) または本発明方法により増殖させた (増強) *C. jejuni* の異なる株による INT-407 細胞への侵入 (増加倍)

株	BHI	増強
81-176	1.0	9.2
81-116	1.0	10.0
HC	1.0	26.7

20

表 7 . 通常に増殖させた (BHI) または本発明方法により増殖させた (増強) *C. jejuni* 81-176 による INT-407 細胞への付着および侵入に対する DOC 濃度の影響

処理	粘着 (%)	侵入 (%)
BHI	9.3	6.3
増強; 0.025% DOC	18.3	17.4
増強; 0.1% DOC	52.6	37.0

30

表 8 : 通常に増殖させた (BHI) または本発明方法により増殖させた (増強) INT-407 細胞への *S. flexneri* 侵入 (パーセント) または付着 (パーセント) に対する DOC の影響

40

性質	BHI	増強
付着	1.0	140.0 ^a
侵入	1.0	94.4

a 該アッセイ中の細菌増殖のため、最初に加えた細菌を上回る細菌が回収された。

50

C.jejuni（すなわち81-116、81-176およびHC）のいくつかのヒト単離物による培養INT-407細胞への付着および侵入は、該培地への胆汁またはデオキシコール酸塩の添加により非常に増強された（表4および6を参照されたし）。最も効果的なDOC用量は0.1%であった（表7）。42°C（Campylobacterを通常に増殖させる温度）でなく37°Cで最大反応が得られた（表3および5）。

Shigella flexneriで同様の知見を得た（表8）。本発明方法により増殖させたShigellaは、非常に増強された付着能および侵入能を共に有していた。

これらのデータは、本発明方法が腸内病原体の侵入および付着を増強することを示す。

実施例29

免疫交差反応性を示すために、急速スライド凝集アッセイを用いた。通常に増殖させたまたは実施例5に例示される本発明方法により増殖させたC.jejuni株を、通常にまたは本発明方法（例、実施例5）のいずれかにより増殖させたC.jejuni81-176（Lior5）で免疫した動物からの血清IgGにさらした。該IgG抗体をプロテインAコートラテックスビーズ上に固定化した。試験血清型とLior5血清型に対して生成した抗体との間に交差反応エピトープがあれば、該細胞のほとんど即時性のクランピング（すなわち凝集）を見ることができる。該反応を短時間進行させた後、0～3のスケール（ここで、0は観察可能なクランピングが全くないことを意味し、3は高度の凝集を意味する）に基づきこのクランピングを評価した。4株の結果を以下の表9に示す。

10

表 9. 通常に増殖させた (B H I) または本発明方法により増殖させた (増強) Lior血清型の交差反応性

培養物	増殖条件	ビーズ	反応性	
81-176 (L5)	BHI	抗BHI ^a	1	10
"	"	抗ENH ^b	2	
"	増強	抗BHI	2	
"	"	抗ENH	2.5	
L2	BHI	抗BHI	1	20
"	"	抗ENH	1.5	
"	増強	抗BHI	0	
"	"	抗ENH	1.5	
L8	BHI	抗BHI	2	30
"	"	抗ENH	1	
"	増強	抗BHI	1	
"	"	抗ENH	2.5	
L21	BHI	抗BHI	0	40
"	"	抗ENH	2	
"	DOC	抗BHI	0	
"	"	抗ENH	2	
培地	BHI	抗BHI	0	50
"	"	抗ENH	0	

a 通常に増殖させた 8 1 - 1 7 6 により誘導された抗体

b 実施例 5 に例示される本発明方法により増殖させた 8 1 - 1 7 6 により誘導された抗体

表 9 は、増強 C.jejuni 81-176 Lior 血清型 L5 で免疫した動物から生成した抗体と交差反応させた 4 つの試験 Lior 血清型 (L5, L2, L8, L21) のすべてを示す。IgA よりなる、C.jejuni 81-176 に感染させたウサギの腸からの粘液洗浄物は、Lior 5 血清型株に対する抗体と交差反応した (以下の表 16 を参照されたし)、本発明方法により増殖させた C.jejuni の 10 個の主要臨床血清型 (すなわちヒト病原体) のうちの 8 個と反応した。この結果は、本発明方法が、C.jejuni の Lior 5 血清型株で免疫した動物からの抗血清と交差反応する Lior 血清型の数を有意に増加させることを示す。

また、通常に増殖させたのではなく本発明方法により増殖させた Shigella のいくつかの種は、DOC を用いて増殖させた Shigella flexneri 2457T で免疫した動物からの IgG 抗体と交差反応する。

8 実施例：ワクチンの効力

実施例30

ヒトで見られる3つの疾病発現のうちの2つがフェレットの感染により再現可能に生じるため、コロニー形成および／または疾病に対する防御におけるワクチンの効力を評価するためのモデルとして、Campylobacterの病原性を調べるためのフェレットモデルを用いることができる。

24匹の7～9週齢の雄のフェレットを、PBS（対照として）、または通常に増殖させた（BHI）または実施例5の方法により増殖させた（増強）ホルマリン固定C.jejuni81-176株のいずれかで経口的に免疫した。血清を単離し、ベースラインIgG力価を測定した。アジュバントLTの存在下、1週間間隔で2回（0日目および7日目、「ワクチン接種」）、すべてのワクチンおよびPBSを投与した。1週間後（14日目）（「ワクチン接種後」）に血清を集め、IgG抗体力価を測定した。ワクチン接種4週間後（チャレンジ）、該フェレットをACEプロマジン-ケタミンで麻酔し、生きたC.jejuni81-176（ 1×10^{10} CFU）を含有する10ml PBS溶液で経口的にチャレンジした。その後毎日、粘液性下痢、菌血症、Campylobacterの糞便放出、体重変化、潜血および糞便白血球について該動物を監視した。麻酔したフェレットの頸動脈から1～2mlの血液を取り、該試料を通気トリプチカーゼソイ培地培養中でインキュベーションすることにより菌血症を検出した。チャレンジ後2、5および7日目に、血液寒天プレートの継代培養を行った。免疫前（ベースライン）、第2免疫の1週間後およびチャレンジ時およびチャレンジの1週間後に血清サンプルを集めてIgG力価を測定した。

糞便材料をヘマカルトカード（hemacult card）上で調べることにより、潜血を検出した。糞便白血球を検出するために、糞便材料をスライド上塗抹標本にしメチレンブルーで染色した。Campylobacterの糞便放出は、直腸スワブからの塗抹をCampylobacter選択性培地プレート（トリプチカーゼソイ寒天、5%ヒツジ血液、トリメトプリム、バンコマイシン、ポリミキシンB、セファロチンおよびアンホテリシンB、Remel, Lenexa, KS）上で培養することにより確認した。これらの実験からの結果を以下の表10および11に示す。

表10：フェレットにおいて、ワクチン接種はC. jejuni 81-176 に対して防御する。

ワクチン	チャレンジ後5日目の陽性コロニー形成 ^a	病気 ^b
PBS	6/6	1/6
BHI	0/6	2/6
増強	0/5 ^c	0/6

a 陽性コロニー形成数／試験数

b 緑色粘液／未形成／水便で示す

c 病態判定後コロニー形成評価前に該群の動物1匹が死亡

表 11 : フェレット血清 I g G 幾何平均力価

群	ベースライン	ワクチン接種 1 週間後	チャレンジ時	チャレンジ 1 週間後
PBS	6.4	4.9	6.4	1380.4
BHI	6.4	94.0	94.0	26505.3
強化	6.8	234.4	1621.8	56234.1*

a 5 匹の生存動物についての平均力価

表10は、生のチャレンジに際して、本発明の不活化全細胞ワクチンで免疫した動物がコロニー形成および疾病に対して防御されたことを示す。表11のデータは、通常に増殖させた腸内細菌（BHI）からよりも一層高いIgG抗体力価が本発明のワクチン（増強）から得られることを示す。

これらの結果は、本発明のワクチンにより免疫原性（表11）および感染からの防御（表10）が得られ、これらは、通常に増殖させた細菌を用いて動物にワクチン接種した場合に見られるものより大きいことを示す。したがって、本発明方法により生産される細菌は、哺乳動物を感染から防御するワクチンとして有用である。

実施例31

マウスは、フェレットのように自然にはCampylobacterまたはShigella感染症を発症しないが、免疫動物の経口チャレンジの際の腸コロニー形成に対する抵抗性または免疫動物の肺感染による疾病に対する抵抗性を示すために当業者に用いられている。したがって、他の動物やヒトで使用するためのワクチンの効力を予測するために、マウス鼻腔内接種モデルを用いることができる。このアッセイは、Malletら（*Vaccine*, 11:190-196, 1993）により記載されている。

10匹の約16週齢の雌Balb/cマウスの群をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）、通常に増殖させたC.jejuni（BHI）または実施例5により増殖させたC.jejuni（増強）により、約 10^7 CFUまたは 10^9 CFUにて経口的に免疫し、ついでチャレンジした。各群の小腸内粘液からのIgA力価をELISA法で測定した。これを以下の表12に示す。

表12. マウスにおける (10^7 または 10^9) *Campylobacter*全細胞ワクチンによる経口免疫後のIgA応答

免疫	洗浄物IgA力価 ^a	%応答動物 ^b
PBS	23	14
増強(10^7)	114	75
増強(10^9)	78	75
BHI(10^7)	40	25
BHI(10^9)	32	12

a 洗浄物力価は、マウスの各個体群について得た平均抗*C. jejuni* IgA力価を示す。

b 応答動物は、終点力価がPBS単独投与動物の平均を2標準偏差上回った動物と定義する。

表12は、本発明方法により増殖させた細菌で免疫した動物が、通常に増殖させた細菌で免疫した動物より高い小腸IgA抗体力価を有する（これは応答動物のより大きいパーセントで示される）ことを示す。

9 実施例:DOCによる抗原変化または増強の機構

実施例32

本発明がいずれかの特定の作用機構により限定されることを意図するものではないが、本発明者らは、デオキシコール酸塩 (DOC) が腸内細菌の抗原性の変化または増強で2倍の作用を有するようだと示唆する証拠を得た。証拠が示すところによれば、DOCはカルシウムに結合し培地中のカルシウム濃度を低下させるため、DOCの作用の1つの態様はカルシウム依存性作用により仲介される。その証拠は以下のとおりである。*C. jejuni* 81-176を膜透過性カルシウムキレート剤BAPTA/AMを用い、かつ、DOCを用いないで培養する場合、INT-407細胞へのその侵入性は約10倍増強される（以下の表13を参照されたし）。しかしながら、BAPTA/AM処理単独では、*C. jejuni* 81-176細胞の免疫交差反応性を増強しない。表13に示す結果は、0.1%DOCの代わりに25 μ M BAPTA/AMを使用する以外は実施例5に記載したプロトコルに従い培養した*C. jejuni* 81-176を用いて得た。該侵入アッセイは、上記第7節の実施例28に記載のとおりに行い評価した。

表13 通常に増殖させた (BHI) またはBAPTA/AMを用いて増殖させた*C. jejuni*によるINT-407細胞への侵入

株	培養条件	
	BHI	BAPTA/AM
<i>C. jejuni</i> 81-176	3.0	36.9

胆汁またはDOCなどの胆汁塩により抗原増強または変化を受けやすいいくつかの細菌属（例、*Campylobacter*、*Shigella*、*Helicobacter*）は、*Yersinia*からの低カルシウム応答 (Icr) 遺伝子と相同な遺伝子を有する。該Icr座は、低カルシウムレベルに応答して*Yersini*

10

20

30

40

50

aの毒力を調節することが知られている。侵入に必要なフラジェリン発現および組立てに関与している2つのCampylobacter遺伝子 (flaA, flbA) は、Icr産物により一部調節されている。通常に増殖させたまたは本発明の毒力増強条件下で増殖させたCampylobacter flaAおよびflbB突然変異体の挙動分析により、侵入（コンゴレッド染料結合または交差反応性の増加ではなく）はカルシウム依存的であることが示されている（以下の表14を参照されたし）。

表14に示す結果は、通常に培養したまたは実施例5で例示される本発明方法により培養したC.jejuniを用いて得た。該侵入アッセイは上記実施例28に記載のとおりに行い評価した。

表14：通常に増殖させた（BHI）または本発明方法により増殖させた（増強）C. jejuni突然変異体によるINT-407細胞への侵入 10

株	培養条件	
	BHI	増強
C. jejuni 81-176	3.5	40.8
C. jejuni flaA	0.05	0.05
C. jejuni flbA	0.01	0.04

該C.jejuni flaAおよびflbA突然変異体は、DOCを用いて培養した場合には、有意に増強されたコンゴレッド結合および免疫交差反応性を示さない（それぞれ表15および図6を参照されたし）。表15および図6に示す結果は、通常に培養したまたは上記実施例5で例示される本発明方法により培養したC.jejuniを用いて得た。コンゴレッド染料結合アッセイ（表15にその結果を示す）は、上記実施例26に記載のとおりに行った。免疫交差反応性（図6にその結果を示す）は、上記実施例29に記載のとおりに行った。

表15：通常に増殖させた（BHI）または本発明方法により増殖させた（増強）C. jejuni突然変異体によるコンゴレッド染料結合 30

株	培養条件	
	BHI	増強
C. jejuni 81-176	0.07	1.68
C. jejuni flaA	0.10	1.60
C. jejuni flbA	0.12	0.80

該flaA突然変異体は、フラジェリンを発現することができない。該flaA突然変異体およびflaA-flaB二重突然変異体（C.Grant, NIHから得た）は共にDOC処理後であっても非侵入性であり、このことは侵入にはフラジェリンが必要であることを示す。興味深いことに、これらのfla突然変異体の同系親株とC.jejuniの他のあるLior血清型との間で観察された正常に発現された（すなわちDOCで誘導していない）免疫交差反応性は該突然変異体にはない。しかしながら、DOC処理により、これらフラジェリンの無い突然変異体を誘導して、増強された免疫交差反応性およびコンゴレッド結合を発現させることができる。

これらの知見は、DOCがカルシウム依存的（例、侵入性）およびカルシウム非依存的（例、コンゴレッド染料結合）機構により腸内細菌における毒力機能を調節することを示す 50

。さらに、これらの知見は、DOCにより誘導される免疫交差反応性およびコンゴアレッド結合の増強が少なくとも部分的にはフラジェリン非依存的であることを示唆する。

10 実施例:DOCは、*Campylobacter jejuni*の増強された血清型および種免疫交差反応性を誘導する

実施例33

本発明方法により増殖させた*Campylobacter jejuni*の血清型免疫交差反応性を急速スライド凝集アッセイにより調べた。このアッセイでは、免疫および非免疫ウサギからの小腸粘液を用いて、*Campylobacter*の非相同株の交差反応性に対する培養条件の変化の影響を判定した。通常に増殖させた生きた*C.jejuni*81-176でウサギを免疫した。該粘液抗体の凝集活性は、BHI-YE培地中で通常に増殖させたまたは実施例5で例示される本発明方法により増殖させた、18の血清型によりなる24の*Campylobacter*株に対して試験した。

10

該凝集アッセイの結果は、非相同*Campylobacter*株の交差凝集は、該株を本発明方法により増殖させた場合には通常に増殖させた場合より広く、多くの場合、強いことを示す。特に、非相同的凝集反応性では2倍を越える増加があった。すなわち、抗81-176免疫粘液において、通常に増殖させた非相同の24株のうちの6株が+またはそれを越えるレベルで凝集したのに対し、DOC条件下で増殖させた同じ24株のうちの14株が+またはそれを越えるレベルで凝集した。さらに、18株の非相同株は、通常に増殖させた場合には弱い(±)凝集を示したかまたは全く凝集を示さなかったが、増強培養条件(例、DOC含有培地)下で増殖させた場合にはこれらの同じ株の11株が増強された凝集応答を示した。

表16は、通常に増殖させた(BHI-YE)または実施例5の方法により増殖させた(増強)22株よりなる19の非相同Lior血清型に対する抗81-176免疫ウサギ粘液の交差反応性を示す。この実験が公知のLior血清型の画分をアッセイするにすぎない場合であっても、この結果は、本発明方法がLior血清型間の実質的な免疫交差反応性を誘導することを示す。この結果はさらに、*Campylobacter*におけるDOC増強または誘導抗原が、*Campylobacter*による腸感染に対する抵抗性およびこれからの回復に関連した分泌IgA応答に重要と思われることを示す。

20

さらに、Lior血清型8の株が、異なる種である*Campylobacter coli*であることに注目すべきである。抗81-176免疫ウサギ粘液において、この血清型の2株の一方(VC167)は強く凝集する(3+)。この結果は、*C.jejuni*株(例、Lior5)由来のワクチンが、同種内のみならず他の*Campylobacter*種(例、*Campylobacter coli*)の非相同血清型に対しても交差防御することを示す。Lior血清型1、2、4、9および11が世界的に最も一般的な疾病関連血清型に挙げられることにも注目する価値がある。それらはすべて、このアッセイで検出可能な交差反応性を示した。

30

表 1 6. 通常に増殖させた (BHI-YE) または本発明方法により増殖させた (増強) 20 の *Campylobacter* 血清型の、非免疫^b または抗 81-176^a 免疫ウサギ粘液に対する凝集応答

株	Lior血清型	凝集応答°				
		非免疫粘液		免疫粘液		
		BHI-YE	強化	BHI-YE	強化	
134	1	-	-	-	++	10
195	2	-	-	-	±	
1	4	-	-	-	+++	
170	5	-	-	+++	++++	
81-176	5	-	-	++++	++++	
6	6	-	-	++++	+++	20
81-116	6	-	-	+	++	
35	7	-	-	-	+	
52	8	-	+	+	++	
VC-167	8	-	-	+	+++	
VC-159	8	-	-	±	-	
88	9	-	-	-	±	
244	11	-	-	±	+++	
556	17	-	-	+	-	
563	18	-	-	-	-	
544	19	-	++	-	++	30
699	21	-	-	±	++	
1180	28	-	-	+	+++	
1982	29	-	-	-	-	
910	32	-	++	-	++	
2074	36	-	-	-	-	
HC	36	-	+	-	+	
2984	46	-	-	-	-	50
79171	72	-	-	-	-	

a 該抗 81-176 粘液は、通常に増殖させた生きた *C. jejuni* 81-176 に感染させたウサギから得た。

b 該非免疫粘液は、非感染ウサギから得た。

c 該凝集応答は、無し(-)から、非常に弱い(±)、非常に強い(++++)の範囲をとる。

11 実施例: *Campylobacter* のワクチンの効力の追加的実験

実施例 34

本発明方法により増殖させたホルマリン固定全細胞 *Campylobacter jejuni* の防御的効力は、Bagar (*Infect. & Immun.*, 63:3731-3735, 1995) により報告されているマウスコロニー形成モデルを用いて判定した。

C. jejuni 81-176 は、実施例 5 に従い増殖させ収穫し、上記のとおり 0.075% ホルマリンに

10

20

30

表17に示すとおり、 5.0×10^8 個の不活化C.jejuni粒子の単一の腹腔内用量により、生きたC.jejuniチャレンジに対して動物を防御するのに十分な免疫応答が誘導された。

表 1 7 : 本発明方法により調製した V 2 不活化 C. jejuni の腹腔内投与により得られた防御

用量	死亡率					生存動物
	日	1	2	3	4	
1.3×10^{10}		0	4	0	0	16
2.5×10^9		0	0	0	0	20
5.0×10^8		0	0	0	0	20
1.0×10^8		11	7	0	0	2
5.0×10^7		10	6	2	0	2
PBS対照		4	3	2	0	1

12 実施例: Shigella の DOC 増強侵入性、コンゴレッド結合および免疫交差反応性
実施例 35

in vitro で増殖させた Shigella sp. の侵入性は、培養の増殖期に影響される。通常に増殖させた (BHI) または実施例 9 で例示される本発明方法により増殖させた (ここでは、該細胞は初期対数増殖期からのものである) (DOC-EL)、または実施例 9 により増殖させた (ただし、該細胞を収穫する前に該培養を後期対数増殖期に到達させた) (DOC-LL) Shigella flexneri 2457T 細胞の侵入性を、実施例 28 に記載の方法により調べた。その結果は、DOC による培養が侵入性を増強し、初期対数増殖期に最大増強が得られることを示す (図 9 を参照されたし)。

本発明方法による DOC を用いた培養は、他の Shigella 種である S. sonnei および S. dysenteriae の侵入性も増強する (図 10 を参照されたし)。分極上皮細胞では、増強された Shigella の侵入性は、該細菌が該上皮細胞に基底外側で感染した場合にのみ観察された。この知見は、in vivo で観察される侵入過程と一致する。

比較研究は、本発明方法により増殖させた Shigella が、Pope ら (Infect. & Immun., 63:3642-3648 1995) により記載されている方法により調製した Shigella より約 10 倍高い侵入性を有することを示す。

実施例 36

本発明方法により培養した Shigella は増強されたコンゴレッド結合も示す。通常に増殖させた (BHI) または実施例 9 で例示される本発明方法により増殖させた S. flexneri 2457T および S. sonnei を、それらの染料結合能について上記実施例 26 に記載の方法によりアッセイした。その結果は、DOC 中の増殖がその 2 つの Shigella 種によるコンゴレッド結合を 10~20 倍増強したことを示す (表 18 を参照されたし)。

10

20

30

40

表18：通常に増殖させた（BHI）または本発明方法により増殖させた（増強）*S. flexneri*および*S. sonnei*によるコンゴレッド結合

株	培養条件	
	BHI	増強
<i>S. flexneri</i> 2457T	0.04	0.44
<i>S. sonnei</i>	0.02	0.40

10

Shigellaは4つの種および種々の血清型に分けられる。本発明方法により増殖させたShigella flexneriの免疫交差反応性を、実施例28に記載の凝集アッセイにより検討した。該アッセイでは、免疫ウサギからの抗血清を使用して、異なるShigella種の免疫交差反応性に対する培養条件の影響を判定した。実施例9の方法により増殖させたホルマリン固定Shigella flexneri2457Tで該ウサギを免疫した。該免疫動物から得たIgG抗体の凝集活性を、BHI培地中で通常に増殖させたまたは本発明方法（例、実施例9）により増殖させた4つのShigella種すべてに対して調べた。該凝集アッセイの結果は、DOCを用いた増殖が、抗*S. flexneri*抗体に対する相同Shigella flexneriの凝集活性ならびに3つの非相同Shigella種の凝集活性を有意に増強したことを示す（図11を参照されたい）。

20

13 実施例:Shigellaのワクチン効力

実施例37

本発明方法により増殖させたホルマリン固定全細胞Shigella flexneriの防御効力を、C.P. Mallettら（Vaccine, 11:190-196, 1993）により開発されたマウス鼻内チャレンジモデルを用いて判定した。簡単に言えば、実施例9で例示される方法によりShigella flexneriを増殖させ収穫し、実施例30に記載のとおり0.075%ホルマリンで不活化した。約 10^7 個の不活化細菌粒子を用いて、14~16週齢の雌Balb/cマウスにワクチン接種した。エンドトキシンを含まない無菌PBSに該不活化*S. flexneri*を 10^8 粒子/mlの濃度で懸濁し、この物質35 μ lを10匹の軽く麻酔した動物群に鼻内投与した。14日間隔で合計3回の免疫を行った。

30

Shigella全細胞ワクチンの防御能に対するアジュバントの影響を調べるために、不活化ワクチンおよび*E. coli*からの5 μ gの熱不安定エンテロトキシン（LT）を含有する懸濁液を用いて動物群を免疫した。第3免疫の14日後に、生きた*S. flexneri*または*S. sonnei*のいずれかの亜致死消耗用量（sublethal wasting dose）（ 10^5 CFU）で動物を鼻内チャレンジした。該チャレンジ直前および該チャレンジ後1、2、5、および7日目に動物の体重を測り、平均群体重を求めた。結果を表19に示す。

表19：不活化Shigella flexneri全細胞ワクチンは、生きたS. flexneriまたはS. sonneiによる鼻内チャレンジに対してマウスを防御する。

チャレンジ生物	ワクチン接種	チャレンジ後体重変化 (%)			
		1日目	2日目	5日目	7日目
S. flexneri	PBS	- 8.1	-18.2	-17.7	-18.3
	ワクチン	- 5.4	- 2.9	- 2.5	- 1.6
	ワクチン+アジュバント	- 7.0	- 2.0	- 1.5	1.5
S. sonnei	PBS	- 8.1	-17.5	- 9.3	- 6.4
	ワクチン	- 6.7	-11.3	- 6.5	- 6.0
	ワクチン+アジュバント	- 6.4	- 5.2	- 1.3	- 2.1

実施例9に従い増殖させた 10^7 の不活化S. flexneriよりなるワクチンで、各群の10匹のマウスを3回鼻内免疫した。

本発明方法により増殖させた不活化S. flexneriよりなるワクチンで免疫したマウスは、生きたS. flexneri生物によるチャレンジに対して防御されていた。それらのマウスは、ワクチン接種を受けていないマウス（すなわち、疑似対照群）と比べて、体重減少が少なく、体重の回復が速かった。驚くべきことに、S. flexneriワクチンは、生きたS. sonneiによるチャレンジに対してもマウスを防御した。興味深いことに、LTアジュバントなしでワクチンを単独で投与された動物は、アジュバント化ワクチンを投与された動物と同程度に、相同S. flexneriチャレンジに対して防御された。また、S. flexneriワクチンは単独で、S. sonneiによる非相同チャレンジに対する防御を与えた。しかしながら、該LTアジュバントを含有させることにより、S. sonneiによるチャレンジに対する防御が増強されたことは注目に値する。これらの知見は、本発明方法により調製された不活化Shigellaよりなるワクチンが、認められたShigella疾病モデルに有効であり、種々のShigella感染を予防または弱めるのにアジュバントは必要でないことを示す。

14 実施例：動物細胞に対するH. pyloriの付着性に影響を及ぼす因子

実施例38

H. pyloriの付着は、グリココール酸塩または胆汁中の増殖により強化される。H. pyloriのNB3-2またはG1-4株の細胞を、4%子ウシ血清を含むBHI培地へ加えた。接種後、該フラスコを10%CO₂-5%O₂-85%N₂でフラッシュし、振盪しながら37℃で22時間インキュベーションした。このインキュベーションの後、種々の濃度（0.025%~0.2%）のウシ胆汁を含有する4%子ウシ血清を含むBHI培地1リットルを含有するフラスコへ1~10倍に該培養物を希釈した。これらの培養物を同じ気体混合物で再度フラッシュし、37℃でインキュベーションした。18時間までの種々の時点で該細胞を収穫し、実施例28に記載した方法により、INT-407細胞に対するそれらの付着をアッセイした。その結果は、胆汁と共に培養することにより、INT-407細胞に対するH. pyloriの付着性が増強されることを示す（図12および13を参照されたし）。NB3-2株の場合、ピーク付着（非増強培養物の付着に対して4~6倍の増加）は増殖の約8時間後に生じた（図12）。G1-4株では、ピーク付着（非増強培養物の付着に対して2~3倍の増加）は0.2%胆汁中で12~14時間の増殖の間に生じた（図13）。一般に、これらの「ピーク」時は、各株の培養が対数増殖期にある時期に対応する。

15 実施例：本発明方法により増殖させたHelicobacterのワクチン効力

実施例39

本発明方法により増殖させたホルマリン固定全細胞*Helicobacter pylori*の防御効力を、Cohenら（*Lancet*, 339:1120-1121, 1992）により記載されているマウス*Helicobacter felis*胃コロニー形成モデルを用いて判定した。4%子ウシ血清を含有するBHI培地中、10%CO₂、90%空気下37℃で22時間、*Helicobacter pylori*G1-4株を種培養として増殖させた。

この培養物のアリコートを用いて、0.1% (v/v) ウシ胆汁を含有する10倍容の同じ培地に接種した。37℃で12~14時間増殖させた後、該細胞を遠心分離により収穫し、室温にて原容量の1/10のハンクス平衡塩溶液（HBSS）に再懸濁した。細胞を再度遠心分離し、原容量の1/100のHBSSに再懸濁した。該緩衝化細胞懸濁液にホルマリンを0.075%の濃度になるまで加え、該懸濁液を室温で6時間攪拌し次いで該溶液を4℃で18時間冷却することにより該細胞を不活化した。

*Helicobacter*を有さない6~8週齢の雌Balb/cマウスにこの不活化全細胞ワクチンの3用量を、0、7および14日目または0、7および21日目に経口投与することにより、ルーチンに防御潜在性を測定した。1用量あたり10⁹個の細菌粒子の用量を*E. coli*の熱不安定エンテロトキシンと組み合わせて評価した。第3免疫量投与の14日後に、生きた*H. felis*の単一用量（10⁷CFU/用量）で動物を経口チャレンジした。

チャレンジの2週間後に該動物を犠牲にし、ウレアーゼ活性に関して洞胃セグメント（antral stomach segment）を分析して*H. felis*の存在を判定した。ウレアーゼ活性は、洞組織サンプルをスチュアートウレアーゼ培地（Remel）0.5ml中室温で4~24時間インキュベーションすることにより測定した。この時間内に生じた透明から赤への変色を陽性ウレアーゼの結果とみなした。

表20に示すとおり、*H. pylori*G1-4株を用いて調製した増強*Helicobacter*全細胞ワクチンの投与により、*H. felis*経口チャレンジに対して動物が防御された。

表20：本発明方法により増殖させた不活化*H. pylori*よりなるワクチンによる*Helicobacter*感染症に対する防御

免疫剤 ^a	チャレンジ生物(10 ⁷ CFU)	コロニー形成/合計	防御(%)
<u>実験1</u>			
<i>H. pylori</i> ^b	<i>H. felis</i>	4/13	71
PBS + LT	<i>H. felis</i>	9/9	0
<u>実験2</u>			
<i>H. pylori</i> ^b	<i>H. felis</i>	2/15	87
PBS + LT	<i>H. felis</i>	10/10	0

a すべての免疫剤は10 μg LT（ETECの不安定毒素）アジュバントと共に3経口用量として7日間隔で投与

b G1-4株の1×10⁹CFUとして0.25ml用量で投与

これらの実験の結果は、増強された腸内細菌の性質とin vivo免疫原性との関連性を示す。

本発明の方法は、防御的免疫応答誘導能を有する細菌を生産するため、ワクチンとして有用である。

16 微生物の寄託

以下の微生物は、American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville,

10

20

30

40

50

Maryland 20852, USAに寄託されており、以下に示す受託番号を有する。

微生物

受託番号

寄託日

Helicobacter pylori NB3-2

1995年9月29日

Helicobacter pylori G1-4

1995年9月29日

当業者であれば本発明の方法の他の均等物を容易に決めることができ、かかる均等物も本発明に包含されると意図される。以上の開示は、特許請求する発明を当業者が実施するのを可能にするために必須と考えられるすべての情報を含む。該引用特許または刊行物はさらに有用な情報を提供しうるため、本明細書中に引用した資料はその全体を出典明示により本明細書の一部とする。

10

国際出願番号：PCT／

微 生 物	
6 1 頁 3 0 - 3 8 行に記載した微生物に関する任意のシート	
A. 寄 託 物 の 表 示	
他の寄託物は別のシートに表示する	
寄託機関の名称	
アメリカン タイプ カルチャー コレクション	
寄託機関のあて名	
アメリカ合衆国 2 0 8 5 2 メリーランド州, ロックビル, パークローン ドライブ 1 2 3 0 1	
寄託日	受託番号
1 9 9 5 年 9 月 2 9 日	

20

30

PCT／RO／1 3 4 (1 9 8 1 年 1 月)

国際出願番号：PCT／

PCT／RO／134 （続き）

アメリカン タイプ カルチャー コレクション

アメリカ合衆国 メリーランド州，ロックビル

パークローン ドライブ 12301

10

受託番号

寄託日

1995年 9月29日

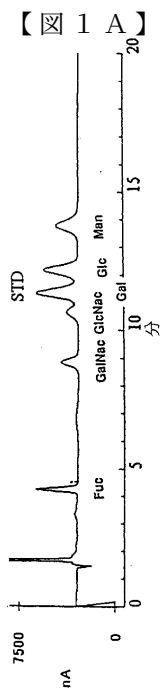


FIGURE 1A

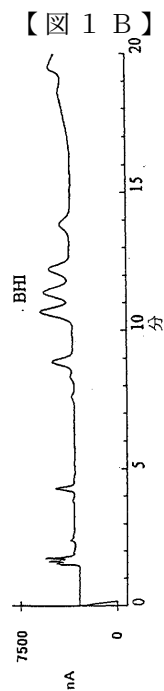
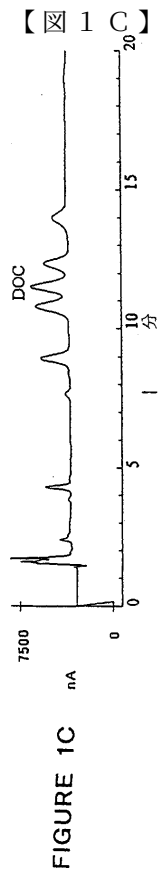
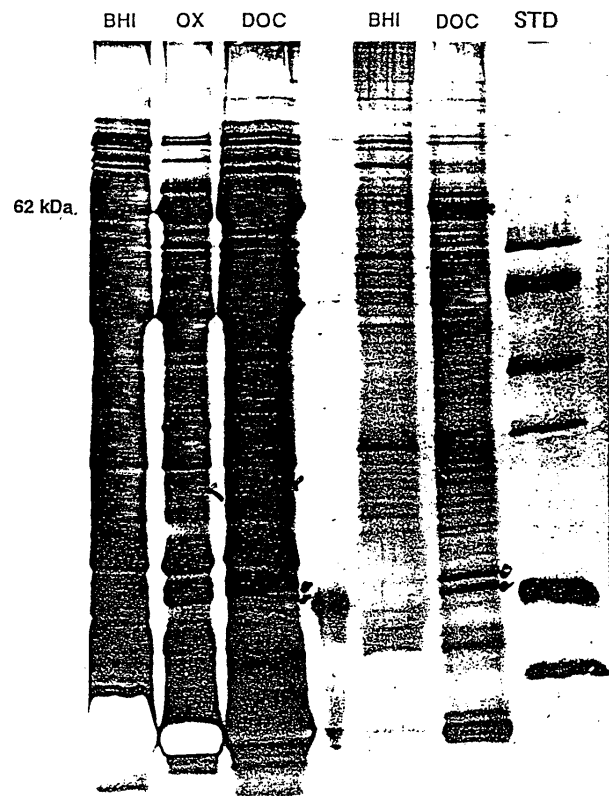


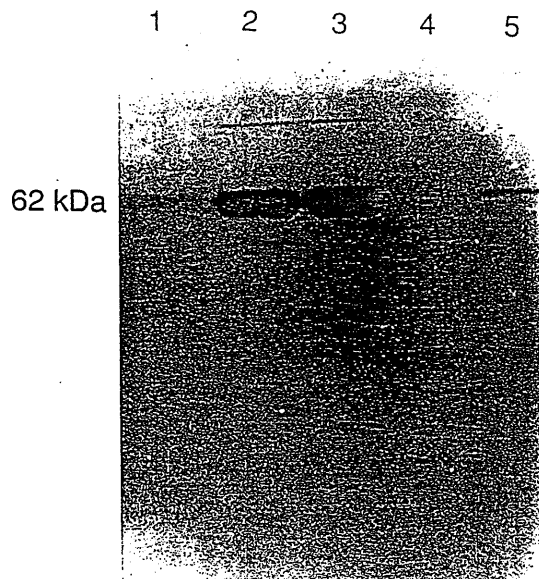
FIGURE 1B



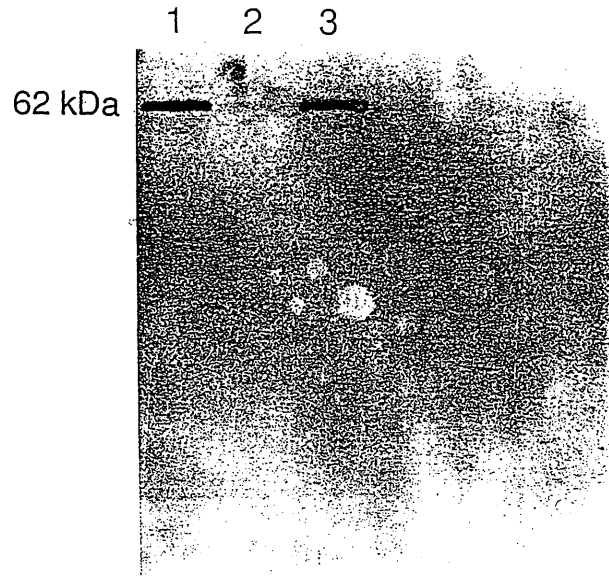
【図 2】
FIGURE 2



【図 3】
FIGURE 3



【図 4】
FIGURE 4



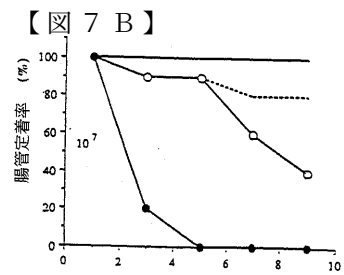
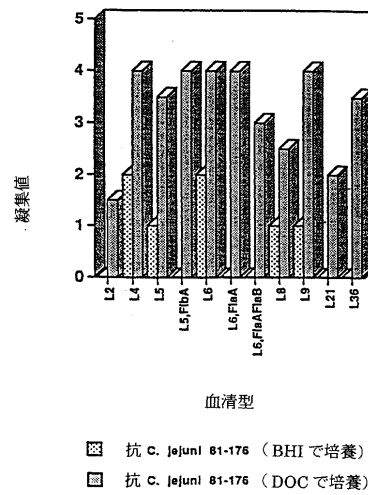
【図 5】
FIGURE 5【図 6】
FIGURE 6

FIGURE 7B

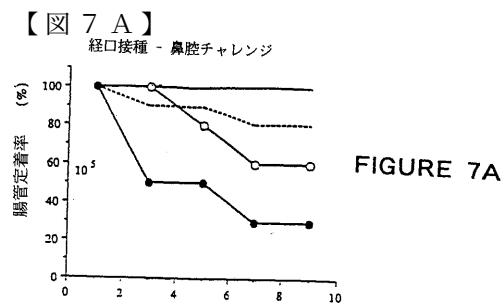


FIGURE 7A

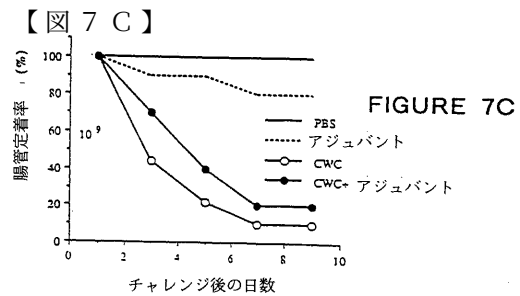


FIGURE 7C

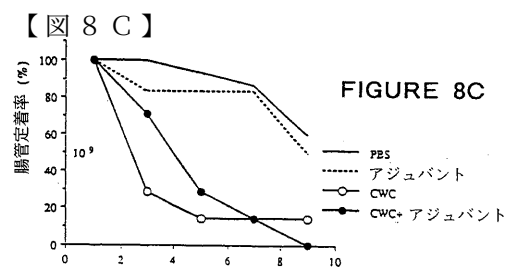


FIGURE 8C

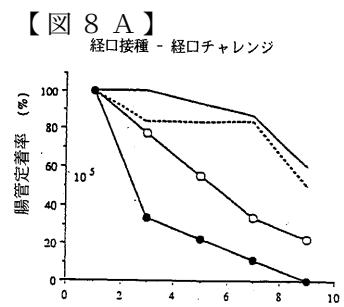


FIGURE 8A

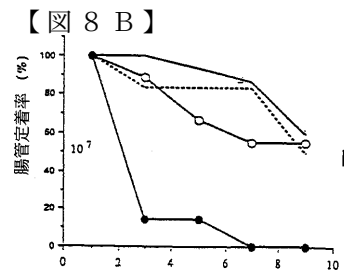
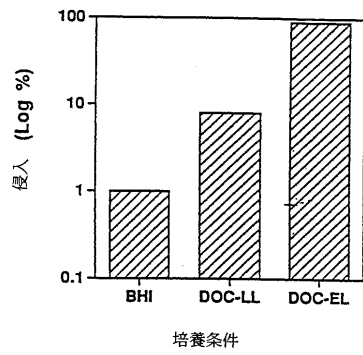
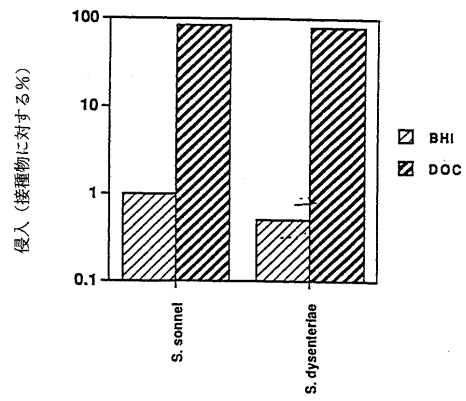
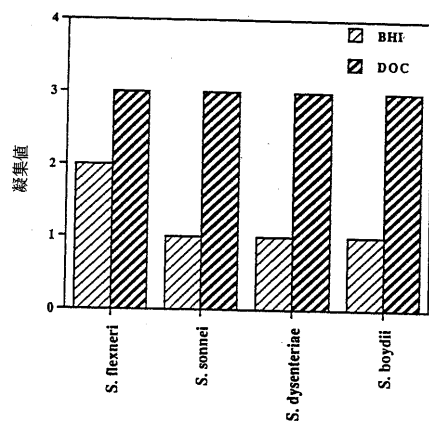
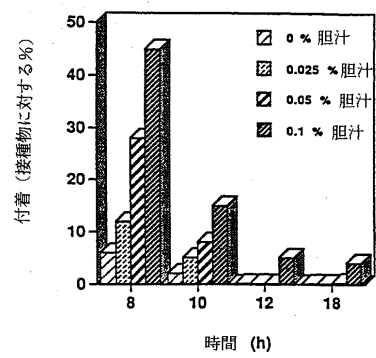
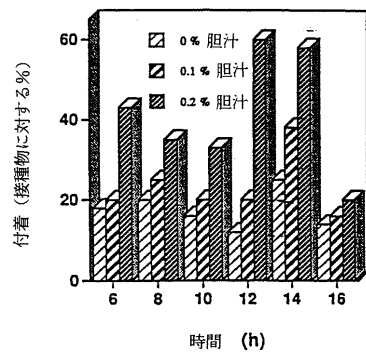


FIGURE 8B

【図 9】
FIGURE 9【図 10】
FIGURE 10【図 11】
FIGURE 11【図 12】
FIGURE 12

【図 13】
FIGURE 13



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷ F I
C 1 2 R 1:01) C 1 2 N 1/20
C 1 2 R 1:01

(72)発明者 ウォーカー, リチャード, アイ.
アメリカ合衆国 2 0 8 7 8 メリーランド州, ゲイザーズバーグ, ブリスコー ストリート 1
2 0

(72)発明者 フレイ, スティーヴン, エム.
アメリカ合衆国 2 0 8 7 4 メリーランド州, ジャーマンタウン, クロス リッジ ウェイ 1
2 5 2 9

審査官 胡田 尚則

(56)参考文献 特表平07-504565 (JP, A)
特開平5-260955 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
C12N 1/20
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)