

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 9 月 4 日 (04.09.2003)

PCT

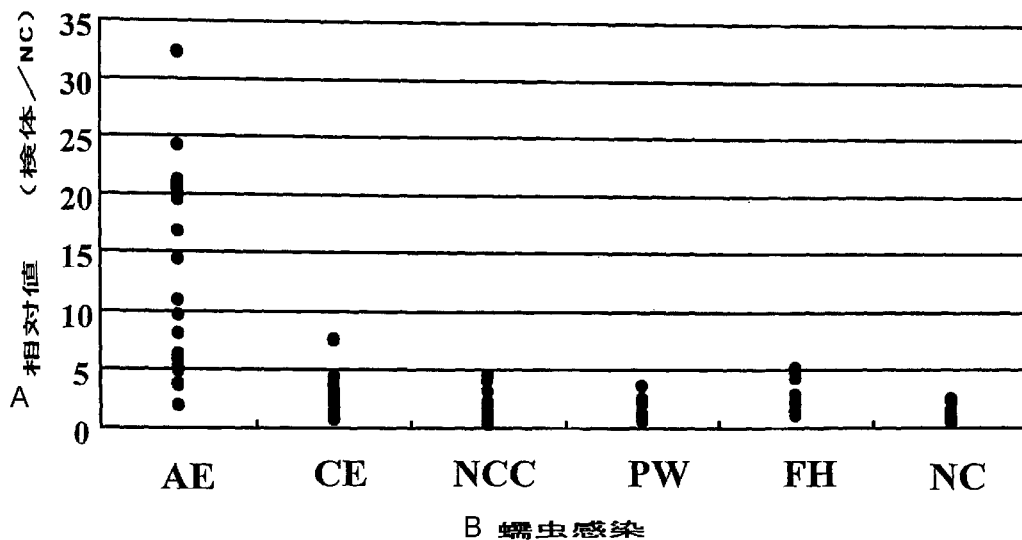
(10) 国際公開番号
WO 03/072782 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/30, 1/21, C07K 14/44, G01N 33/53, 33/569
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/05094
- (22) 国際出願日: 2002 年 5 月 27 日 (27.05.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-52151 2002 年 2 月 27 日 (27.02.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 藤田 修 (FUJITA, Osamu) [JP/JP]; 〒204-0012 東京都 清瀬市 中清戸 1-4 5 4-1 4 1-2-1 0 1 Tokyo (JP). 野崎 智義 (NOZAKI, Tomoyoshi) [JP/JP]; 〒132-0035 東京都 江戸川区 平井 4-2 2-2-1 1 4 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 佐伯 憲生 (SAEKI, Norio); 〒103-0027 東京都 中央区 日本橋三丁目 1 5 番 2 号 高愛ビル 9 階 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: ECHINOCOCCUS ANTIGEN, GENE ENCODING THE SAME AND METHOD OF DIAGNOSING HUMAN HYDATIDOSIS

(54) 発明の名称: 多包虫抗原およびそれをコードする遺伝子およびヒト多包虫症の診断方法



A...RELATIVE VALUE (SPECIMEN/NC)
B...WORM-INFECTION

(57) Abstract: It is intended to provide an examination method, a diagnostic method, etc. relating to hydatidosis which are excellent in sensitivity and specificity and economically advantageous owing to the use of gene recombination techniques. A gene encoding an *Echinococcus*-origin actin-modular protein (AMP); an immunoassay method of detecting an antibody against a polypeptide comprising this antigen protein or a part thereof; and a method of diagnosing human hydatidosis.

(57) 要約: 本発明は、感受性及び特異性に優れ、かつ、遺伝子組換え技術を利用することによりコスト的にも有利であるような、多包虫症に関する検査方法、診断方法等を

[続葉有]



WO 03/072782 A1



(81) 指定国 (国内): CA, US.

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

規則4.17に規定する申立て:

- すべての指定国のための不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則4.17(v))

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て

提供することを目的とする。 本発明は、多包虫由来のアクチン調節蛋白質(Actin-modular protein:AMP) をコードする遺伝子、この抗原蛋白質又は一部分から成るポリペプチドに対する抗体を検出する免疫学的測定方法、及びヒト多包虫症の診断方法に関する。

明 細 書

多包虫抗原およびそれをコードする遺伝子およびヒト多包虫症の診断方法

技術分野

本発明は、新規な多包虫抗原蛋白質及びそれをコードする遺伝子、この抗原蛋白質又は一部分から成るポリペプチドに対する抗体を検出する免疫学的測定方法、及びヒト多包虫症の診断方法に関する。

背景技術

多包虫症は、北緯40度以北特に、日本国内では北海道のほぼ全域及び青森県にも見られ、キツネ、イヌ、ネコ及びタヌキ等を終宿主とする多包条虫 (*Echinococcus multilocularis*) の虫卵が偶発的にヒトに感染することによって引き起こされる疾患である。世界における多包虫症患者は10万～30万人と推定され、日本でも1998年までの患者累計が373名となっている。

多包虫の寄生部位は、主に、肝臓、時には肺及び脳であり、多包虫症は肝機能障害等を引き起こし、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」では4類感染症に分類される、致死率の高い疾患である。

その病態としては、無症状期が10年と長く、血液検査でも異常なしとされることが多く、感染後10年以上経過した進行期では、肝腫大、及びき肋骨部不快感が見られ、末期では肝腫が顕著となり、肝機能障害が進行し、腹水及び門脈圧亢進症状、黄疸、及び悪液質が見られ、肝性昏睡に陥り危篤状態となる。

多包虫症に対する効果的な薬物治療はなく、根治治療としては、現在のところ外科的切除以外にはない。

発明の開示

多包虫症の診断方法としては、問診、免疫学的診断、腹部単純撮影、超音波検査及びCTスキャン等がある。

特に、従来行われてきた免疫学的診断としては、多包虫から分離・精製したE

m 2（糖蛋白質）と組換え蛋白質であるサイトビリン（cytovillin）との混合抗原を使用したELISA法がある。該診断方法は感度が高いものの、近縁種との交叉反応がかなり認められ（単包虫症とは約25%）、更に高い精製度の蛋白質が必要とされるために高価であり、感染者の一次スクリーニング及び確定・除外診断には適当ではなかった。

又、多包虫の粗抗原を用いたELISA法も検討されているが、該方法はコスト面では有利であるものの、粗抗原を使用しているために非特異的反応が多く、確定・鑑別診断として使用するには問題があった。

本発明者は、感受性及び特異性に優れ、かつ、遺伝子組換え技術を利用することによりコスト的にも有利であるような、多包虫症に関する検査方法、診断方法等を提供すべく、鋭意研究の結果、多包虫由来の新規な蛋白質及び該蛋白質をコードする遺伝子を見出し、本発明を完成した。

即ち、本発明は、以下の各態様に係るものである。

1. 多包虫由来のアクチン調節蛋白質(Actin-modulator protein:AMP)をコードするDNA。

2. 以下の(a)又は(b)の蛋白質をコードする塩基配列又はその部分配列を含有するDNA:

(a) 配列番号1に示されるアミノ酸配列から成る蛋白質、

(b) アミノ酸配列(a)において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、多包虫のアクチン調節活性を有する蛋白質。

3. 以下の(a)又は(b)の塩基配列又はその部分配列を含むDNA:

(a) 配列番号1で示される塩基配列、

(b) 塩基配列(a)からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ、多包虫のアクチン調節活性を有する蛋白質をコードする塩基配列。

4. 上記1乃至3のいずれか一項に記載のDNAを含有する組換え発現ベヒクル(Vehicle)。尚、組換え発現ベヒクルは当業者に周知の任意の遺伝子工学的手法によって調製することが出来、その種類としては、例えば、各種プラスミドベター

及びウイルスベクター等の発現ベクター、コスミド、並びにファージ等を挙げる事が出来る。

5. 発現ベクターである上記4に記載の組換え発現ベヒクル。

6. pBR322由来発現ベクターである上記5に記載の組換え発現ベヒクル。

7. 上記4、5又は6に記載の発現ベヒクルによって形質転換された、細菌等の原核細胞、並びに、酵母及び哺乳動物細胞等の各種真核細胞である形質転換体。

8. 細菌である上記7に記載の形質転換体。

9. 大腸菌である上記8に記載の形質転換体。

10. 多包虫由来のアクチン調節蛋白質、特に、組換え体である該蛋白質。

11. 以下の(a)又は(b)のアクチン調節蛋白質、特に、組換え体である該蛋白質。

(a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列から成る蛋白質、

(b) アミノ酸配列(a)において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、多包虫のアクチン調節活性を有する蛋白質。

12. 上記10又は11記載の蛋白質の一部分から成るポリペプチド。

13. 上記10又は11記載の蛋白質を活性成分として含む多包虫症診断用試薬。

14. 上記12記載のポリペプチドを活性成分として含む多包虫症診断用試薬。

15. 上記13又は14記載の多包虫症診断用試薬を含むキット。このキットには、例えば、反应用プレート、各種緩衝液、希釈液、洗浄液、ブロッキング用溶液、各種酵素結合血清等の2次試薬、及び反応試薬(発色化合物)等の、一般に検査キットに必要な当業者には周知のその他の任意の成分の中から、診断に用いる反応原理に基づき、適宜選択して含ませる事が出来る。

16. 更に、多包虫の他の抗原蛋白質を診断用試薬として含む、上記15記載の多包虫症診断用キット。

17. 多包虫の他の抗原蛋白質がサイトビリンである、上記16記載の多包虫症診断用キット。

18. 上記9又は10記載の蛋白質を抗原として用い、被検体中の該蛋白質に対する抗体を検出することを特徴とする、当業者には公知の各種の免疫学的測定方

法。

19. E L I S A法であることを特徴とする、上記18記載の測定方法。
20. イムノブロット法であることを特徴とする、上記18記載の測定方法。
21. 検体が被験者の血清であることを特徴とする、上記18乃至20のいずれか一項に記載の測定方法。
22. 上記11又は12記載のポリペプチドを抗原として用い、被検体中の上記9又は10記載の蛋白質に対する抗体を検出することを特徴とする、免疫学的測定方法。
23. E L I S A法であることを特徴とする、上記22記載の測定方法。
24. イムノブロット法であることを特徴とする、上記22記載の測定方法。
25. 検体が被験者の血清であることを特徴とする、上記22乃至24のいずれか一項に記載の測定方法。
26. 上記9又は10記載の蛋白質を抗原として用い、被験者の体液中の該蛋白質に対する抗体を検出することを特徴とする、多包虫症患者の診断方法。
27. 体液が血清であることを特徴とする、上記26記載の診断方法。
28. 上記11又は12記載のポリペプチドを抗原として用い、被験者の体液中の上記9又は10記載の蛋白質に対する抗体を検出することを特徴とする、多包虫症患者の診断方法。
29. 体液が血清であることを特徴とする、上記28記載の診断方法。

図面の簡単な説明

第1図は、抗原Em粗抗原について、E L I S A法による測定系で得られた結果を示す。

第2図は、抗原組換えサイトピリンについて、E L I S A法による測定系で得られた結果を示す。

第3図は、抗原組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼについて、E L I S A法による測定系で得られた結果を示す。

第4図は、抗原組換えアクチン調節蛋白質について、E L I S A法による測定系で得られた結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明に係るDNA及び蛋白質などは、当該技術分野に於いて周知の技術を用いて取得調製することができる。

更に、本発明の診断用試薬及びキットも当業者であれば本願明細書中の実施例の記載などに基づき容易に製造することができる。

又、本発明の免疫学的測定方法も、当業者に公知である様々な原理、手法に基づき実施することができる。

尚、本発明の多包虫由来のアクチン調節蛋白質のアミノ酸配列（343個）、及びそれをコードするDNAの塩基配列（1092塩基対）は下記に示した。

実施例

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

実施例1（多包虫由来のアクチン調節蛋白質をコードするDNAの取得・塩基配列の決定）

（1）幼虫組織からの全RNAの抽出

国立感染症研究所で継代維持しているスナネズミ腹腔内より回収した多包虫（幼虫組織）を細切し、RNAqueous Kit（Ambion, USA）を用いて、その常法に従いtotal RNA（7.4 μ g/370 μ l）を抽出した。

（2）cDNAの合成、発現ライブラリーの作成

cDNAの合成はZAP Express cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit（Stratagene, USA）を用いて、その常法に従い行った。先に抽出したtotal RNAより合成した

cDNAはZAP Express vector（pBK-CMV phagemid vector）のXho I siteへ挿入し（Xho I; New England Biolabs, USA）、それらが大腸菌XL1-Blue MRF'株に導入し、形質転換を行った。

（3）多包虫症患者血清を用いた反応クローンの選択

形質転換を行った大腸菌の培養プレートに形成されたプラークをHybond-N; positively charged nylon membrane (Amersham Pharmacia Biotech, UK)にて鋳型を取り、これらを多包虫症患者血清を用いて抗原抗体反応で陽性反応を示すプラークを選択した。

(4) 抗原遺伝子の塩基配列の決定等

陽性反応を示したプラークからPlasmid Mini Kit (QIAGEN, Germany)を用いてプラスミドDNAを精製した。挿入断片のDNAシーケンスはアプライドバイオシステムズABI Prism 300 (Applied Biosystems, USA)を用いて決定した。得られたDNA塩基配列の解析は、National Center for Biotechnology Information (NCBI)のSequence Information Survey (BLAST)を用いて行った。その結果、今回、新たに見出した3種類を含む全8種類のcDNAを得ることができた。

それらを以下の表1に示す。

表 1

獲得した主要な抗原遺伝子

		同一性
サイトビルリン (=Em10, 抗原 II /3)	<i>E. multilocularis</i>	100%
グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST)	<i>E. multilocularis</i>	100%
<u>アクチン-フィラメント断片蛋白質**</u>	<i>Echinococcus granulosus</i> *	97%
<u>チオレドキシンのペルオキシダーゼ</u>	<i>E. granulosus</i>	96%
<u>タニンの軽鎖</u>	<i>Drosophila melanogaster</i>	85%
アタムスAS (=抗原6)	<i>E. granulosus</i>	80%
カルシウム結合蛋白質	<i>Schistosoma</i> spp.	48%
アクチニン	human alpha-actinin2	36%

*部分的なアミノ酸配列の同一性が最も高い種名

**今回の研究で多包虫 (*E. multilocularis*) より獲得した新規の抗原遺伝子はアンダーラインで示した。

実験例 2 (組換えアクチン調節蛋白質(Actin-modulator protein:AMP)の作成)

(1) 発現ベクターの作成、及び各ベクターを用いた組換え蛋白質の発現

実験例 1 (4) で得られた挿入断片を P C R 法にて増幅し、制限酵素 (BamHI; New England Biolabs, USA) で切断した p G E X - 2 T ベクター (GST 融合タンパク質発現用ベクター; Amersham Pharmacia Biotech, UK) に挿入し、さらに大腸菌 (DH5 α) にて形質転換させ、I P T G (イソプロピル- β -D(-)-チオガラクトピラノシド; ナカライ、日本) を添加し、大量の組換え蛋白を作成した。

(2) 発現蛋白質の分離・精製等

G S T 融合蛋白質を合成した大腸菌細胞は超音波破碎し、Gluathione Sepharose 4B カラム (Amersham Pharmacia Biotech, UK) を通すことにより G S T 融合蛋白質のみをカラムに吸着させた。0.1% トライトン・P B S でカラムを洗浄後、Thrombin (Amersham Pharmacia Biotech, UK) にて組換え蛋白質画分を溶出された。

実験例 3 (E L I S A キットの作成及び検出)

(1) E L I S A 法による測定系の開発

組換え蛋白質濃度を 5 u g / m l になるようアルカリ溶液 (0.05M Bicarbonate buffer) で希釈し、96 穴マイクロタイター・プレート (Immulon 2HB; Dynex Technologies, USA) に 100 u l ずつ各ウェルに滴下し、37℃で2時間プレートへ蛋白の固相化を行う。0.05% Tween 20-PBS (PBS/T) で3回洗浄し、使用時まで-30℃に保存した。

(2) 各キットによる測定

予備実験にて1次及び2次血清の希釈倍率を決定した。抗原を添加した各プレートを1% B S A i n P B S / T でブロッキングし、次に1% B S A i n P B S / T で200倍希釈した1次血清 (各患者血清)、次いで2000倍希釈した2次血清 (抗ヒトIgG ペルオキシダーゼ結合; Cappel, USA) を各々37℃で40分間反応させた。A B T S (2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)ニアンモニウム; Sigma, USA) で発色させた後、1.25% フッ化ナトリウム (Sigma, USA) にて停止。その後、E L I S A マイクロプレート・リーダー (Model 550; BIO-RAD, USA) で吸光度 414 nm にて測定した。

上記のキットにて使用した抗原の種類を以下の表 2 に示す。

表 2

E L I S A 法

用いた抗原

Em 粗抗原

組換えサイトビリン（主要表面抗原）

組換えグルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）

組換えアクチン調節蛋白質（AMP）

交叉反応を検討した各蠕虫症患者血清

			検体数
AE	多包性エキノコックス症	<i>E. multilocularis</i>	22
CE	単包性エキノコックス症	<i>E. granulosus</i>	23
NCC	有鉤囊虫症	<i>Teania solium</i>	20
PW	ウェステルマン肺吸虫症	<i>Paragonimus westermani</i>	10
FH	肝蛭症	<i>Fasciola sp.</i>	10
NC	ネガティブコントロール		41

各抗原について得られた結果を第 1 図～第 4 図に示す。

更に、それらの結果をまとめて以下の表 3 に示す。

表 3

抗原	選択率 交叉反応陽性 (%)	
	閾値; 95%	閾値; 100%
Em 粗抗原	2.4% (M+7SD) 2 (PW2検体)	0% (M+8SD)
サイトヒ・リン	0% (M+13SD)	0% (M+12SD)
GST	28% (M+7SD) 24 (CE10;NCC3;PW4;FH7)	20% (M+8SD) 20 (CE8;NCC3;PW4;FH5)
AMP	3.5% (M+7SD) 3 (CE1;FH2)	2.4% (M+10SD) 2 (CE1;FH1)

各抗原使用時に、多包虫患者の95%あるいは100%を陽性としたE L I S A値を各々の閾値として、その値より高い値を示した他の蠕虫症患者血清を交叉反応陽性 (false positive)とした。その%と各検体数を示した。

産業上の利用可能性

本発明により、感受性及び特異性に優れ、かつ、経済的にも優れた、多包虫症に関する検査方法、診断方法等が提供される。

請 求 の 範 囲

1. 多包虫由来のアクチン調節蛋白質をコードするDNA。
2. 以下の(a)又は(b)の蛋白質をコードする塩基配列又はその部分配列を含有するDNA：
 - (a) 配列番号1に示されるアミノ酸配列から成る蛋白質、
 - (b) アミノ酸配列(a)において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、多包虫のアクチン調節活性を有する蛋白質。
3. 以下の(a)又は(b)の塩基配列又はその部分配列を含むDNA：
 - (a) 配列番号1で示される塩基配列、
 - (b) 塩基配列(a)からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ、多包虫のアクチン調節活性を有する蛋白質をコードする塩基配列。
4. 請求の範囲第1項乃至第3項のいずれか一項に記載のDNAを含有する組換え発現ベヒクル。
5. 発現ベクターである請求の範囲第4項に記載の組換え発現ベヒクル。
6. pBR322由来発現ベクターである請求の範囲第5項に記載の組換え発現ベヒクル。
7. 請求の範囲第4項、第5項又は第6項に記載の発現ベヒクルによって形質転換された形質転換体。
8. 細菌である請求の範囲第7項に記載の形質転換体。
9. 大腸菌である請求の範囲第8項に記載の形質転換体。
10. 多包虫由来のアクチン調節蛋白質。
11. 以下の(a)又は(b)のアクチン調節蛋白質。
 - (a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列から成る蛋白質、
 - (b) アミノ酸配列(a)において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、多包虫のアクチン調節活性を有する蛋白質。

12. 請求の範囲第10項又は第11項記載の蛋白質の一部分から成るポリペプチド。
13. 請求の範囲第10項又は第11項記載の蛋白質を活性成分として含む多包虫症診断用試薬。
14. 請求の範囲第12項記載のポリペプチドを活性成分として含む多包虫症診断用試薬。
15. 請求の範囲第13項又は第14項記載の多包虫症診断用試薬を含むキット。
16. 更に、多包虫の他の抗原蛋白質を診断用試薬として含む、請求の範囲第15項記載の多包虫症診断用キット。
17. 多包虫の他の抗原蛋白質がサイトビリンである、請求の範囲第16項記載の多包虫症診断用キット。
18. 請求の範囲第9項又は第10項記載の蛋白質を抗原として用い、被検体中の該蛋白質に対する抗体を検出することを特徴とする、免疫学的測定方法。
19. ELISA法であることを特徴とする、請求の範囲第18項記載の測定方法。
20. イムノプロット法であることを特徴とする、請求の範囲第18項記載の測定方法。
21. 検体が被験者の血清であることを特徴とする、請求の範囲第18項乃至第20項のいずれか一項に記載の測定方法。
22. 請求の範囲第11項又は第12項記載のポリペプチドを抗原として用い、被検体中の請求の範囲第9項又は第10項記載の蛋白質に対する抗体を検出することを特徴とする、免疫学的測定方法。
23. ELISA法であることを特徴とする、請求の範囲第22項記載の測定方法。
24. イムノプロット法であることを特徴とする、請求の範囲第22項記載の測定方法。
25. 検体が被験者の血清であることを特徴とする、請求の範囲第22項乃至第24項のいずれか一項に記載の測定方法。

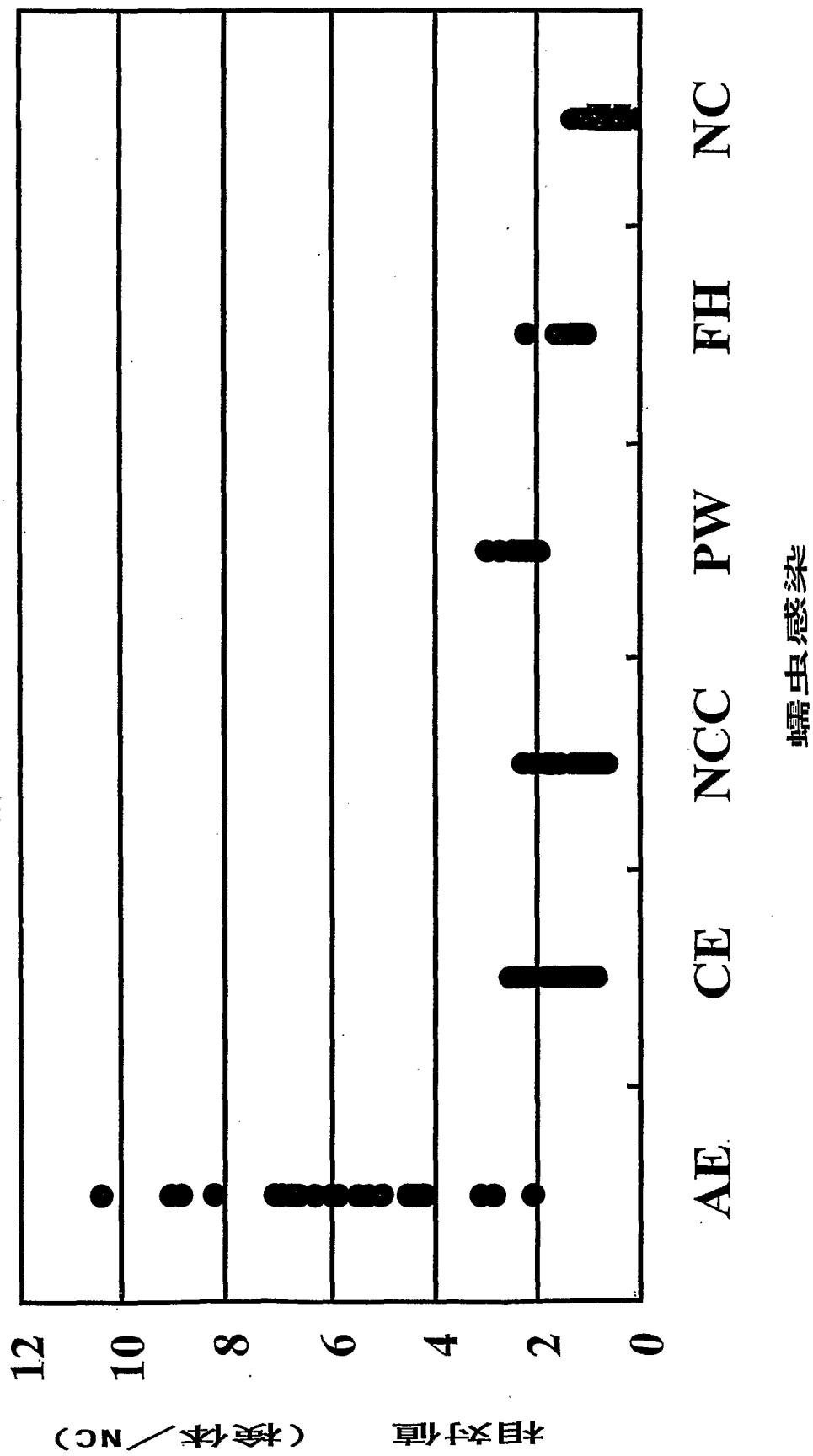
26. 請求の範囲第9項又は第10項記載の蛋白質を抗原として用い、被験者の体液中の該蛋白質に対する抗体を検出することを特徴とする、多包虫症患者の診断方法。

27. 体液が血清であることを特徴とする、請求の範囲第26項記載の診断方法。

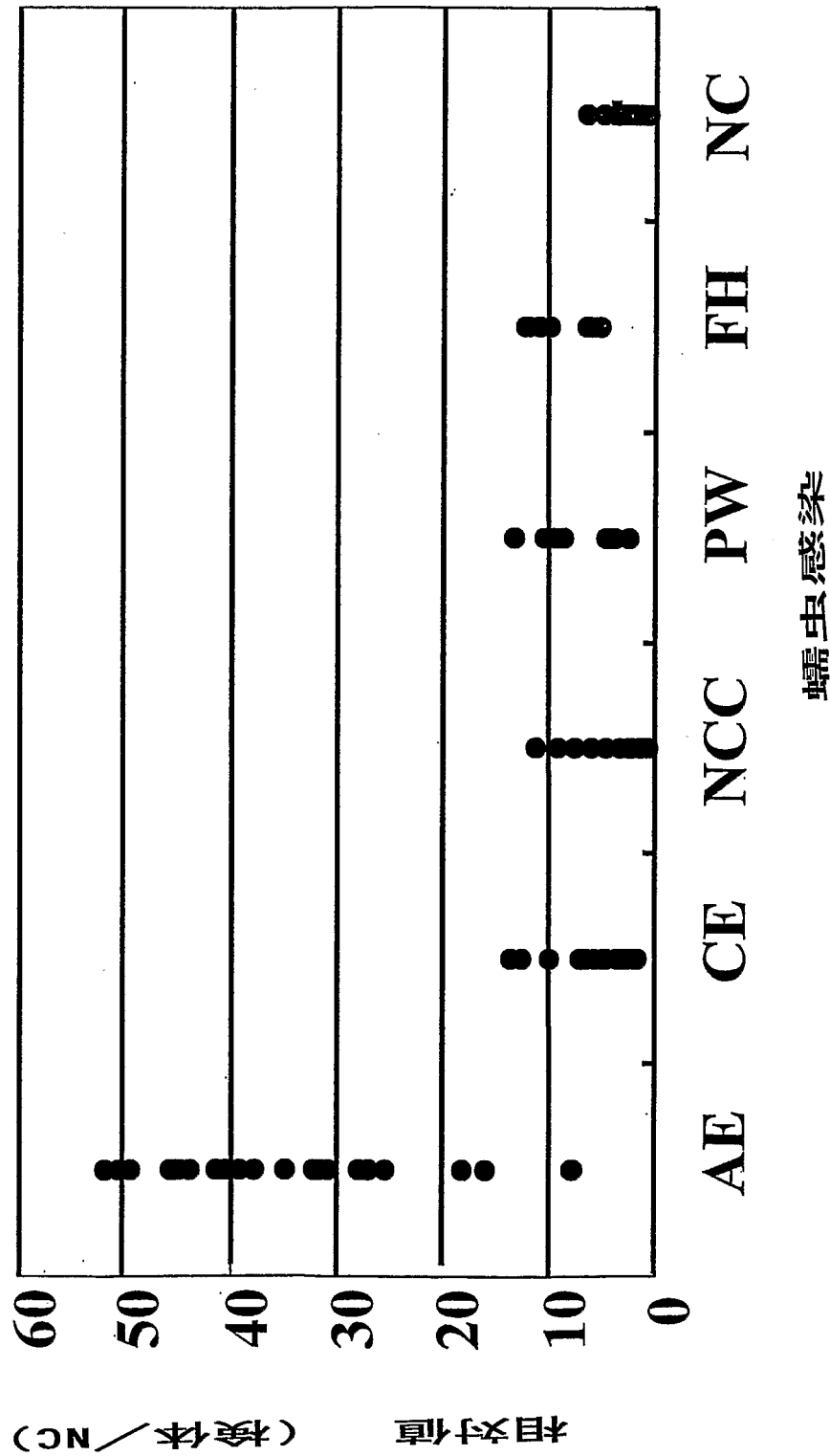
28. 請求の範囲第11項又は第12項記載のポリペプチドを抗原として用い、被験者の体液中の請求の範囲第9項又は第10項記載の蛋白質に対する抗体を検出することを特徴とする、多包虫症患者の診断方法。

29. 体液が血清であることを特徴とする、請求の範囲第28項記載の診断方法。

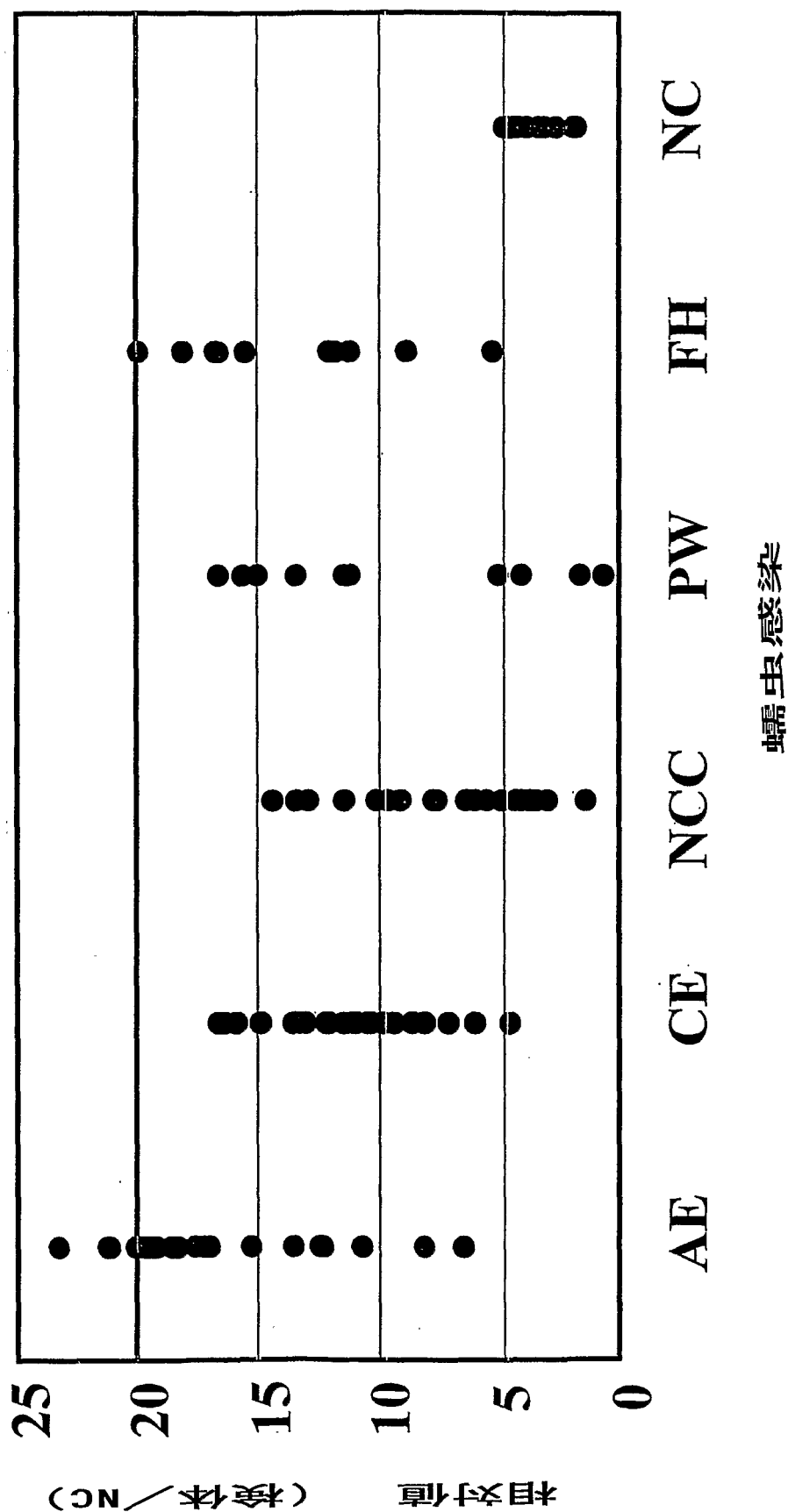
第 1 図



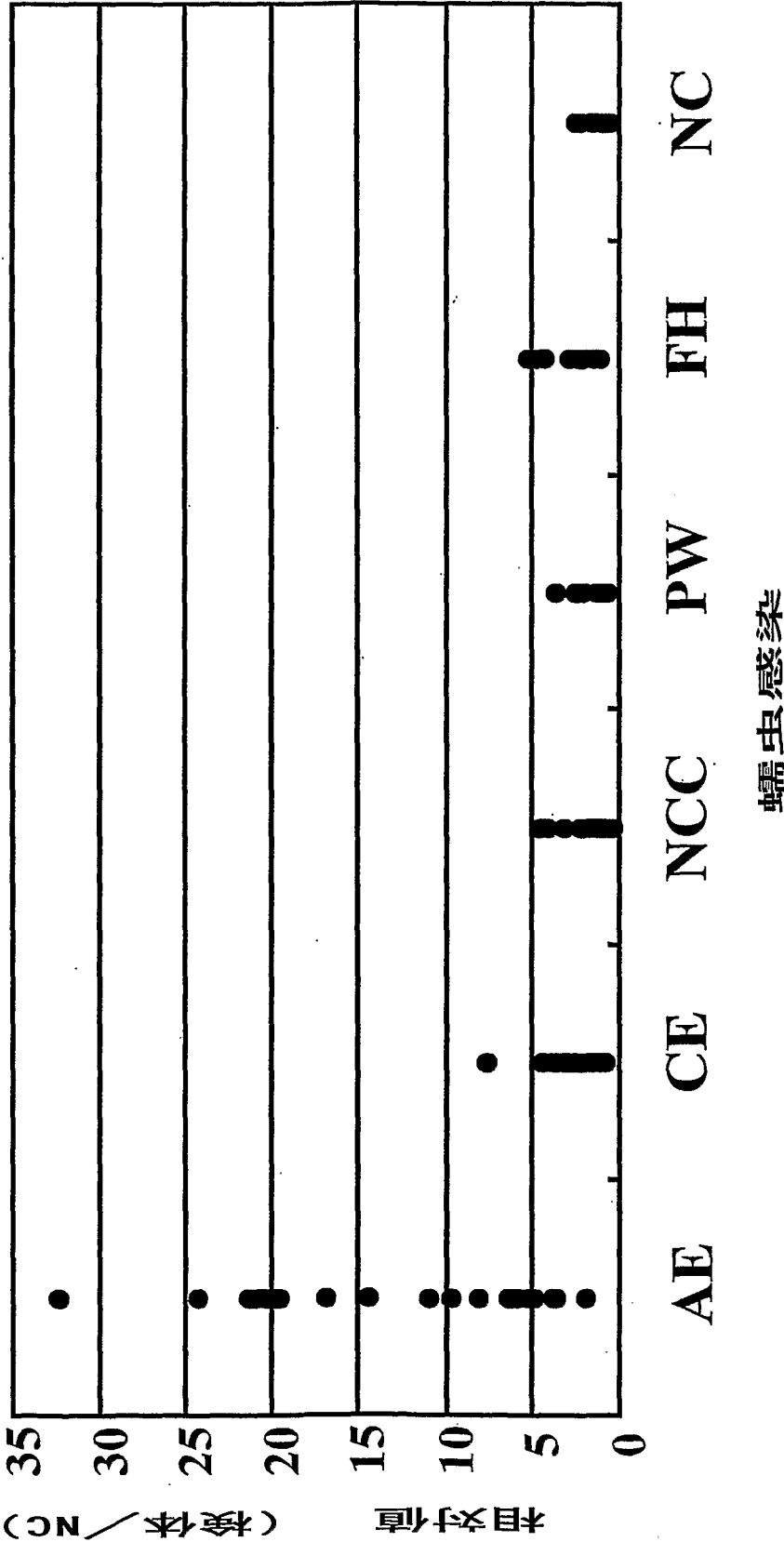
第 2 図



第 3 図



第 4 图



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<110> National Institute of Infectious Diseases

<120> Echinococcus multilocularis antigen and its gene and
diagnostic method of echinococcosis.

<130> JA900577

<150> JP2002-052151

<151> 2002-02-27

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1092

<212> DNA

<213> Echinococcus multilocularis

<220>

<221> CDS

<222> (31)..(1059)

<300>

<400> 1

gactctaacg ttgccgacat cggctcagcg atg gac aga ggg gtt aag aag gag 54

Met Asp Arg Gly Val Lys Lys Glu

1

5

tcc gcg atg acg gag aag tgt tgg gag cct gtt ggc aga gca acg tcg 102

Ser Ala Met Thr Glu Lys Cys Trp Glu Pro Val Gly Arg Ala Thr Ser

10

15

20

ccc ttc ctc atg gtc tgg cgt gtc aat caa ttt acc ctc gag ccg gtc 150

Pro Phe Leu Met Val Trp Arg Val Asn Gln Phe Thr Leu Glu Pro Val

25

30

35

40

ccc agt gat gaa att ggg aat ttc tac aat ggc gat tcc tac gtc atc 198

Pro Ser Asp Glu Ile Gly Asn Phe Tyr Asn Gly Asp Ser Tyr Val Ile

45

50

55

tgc aag gca acg aga agc cct ggt ggt gac aag ctg ctc tac aat gtc 246

Cys Lys Ala Thr Arg Ser Pro Gly Gly Asp Lys Leu Leu Tyr Asn Val

60

65

70

cat ttc tgg att ggc aag cac agc aca gct gat gaa tac ggt acc gct 294

His Phe Trp Ile Gly Lys His Ser Thr Ala Asp Glu Tyr Gly Thr Ala

75

80

85

gcc tac aaa act gtc gaa ttg gac acc ttc ctc gat gat gct gcc gtc 342

Ala Tyr Lys Thr Val Glu Leu Asp Thr Phe Leu Asp Asp Ala Ala Val

90

95

100

caa cat cgc gag gtc gaa ggc tat gag tcg caa ctc ttc aag agc tac 390

Gln His Arg Glu Val Glu Gly Tyr Glu Ser Gln Leu Phe Lys Ser Tyr

105 110 115 120

ttt gac aag ctt gtc atc cta aag ggt ggc tac gcc tct ggt ttc cgc 438

Phe Asp Lys Leu Val Ile Leu Lys Gly Gly Tyr Ala Ser Gly Phe Arg

125 130 135

cat gta aag ccg gac gag tac agg cca cgt ttg ttg cgc ttc tgc aag 486

His Val Lys Pro Asp Glu Tyr Arg Pro Arg Leu Leu Arg Phe Cys Lys

140 145 150

gag ggt aaa acc acc tat atg cgc cag gtg gcc ttc agc aag caa tcc 534

Glu Gly Lys Thr Thr Tyr Met Arg Gln Val Ala Phe Ser Lys Gln Ser

155 160 165

gtc cac tct ggt gac gtc ttc att ctg gac ctg ggc agc cgg gcc tat 582

Val His Ser Gly Asp Val Phe Ile Leu Asp Leu Gly Ser Arg Ala Tyr

170 175 180

cag ttt aac ggc tcc acg tgc tct gct ttt gag aag agc ttg gct gca 630

Gln Phe Asn Gly Ser Thr Cys Ser Ala Phe Glu Lys Ser Leu Ala Ala

185 190 195 200

gct ttt ctg cag gat ttg gag agc aag cgt aat gga cgc tgc aat act 678

Ala Phe Leu Gln Asp Leu Glu Ser Lys Arg Asn Gly Arg Cys Asn Thr

205 210 215

tcc gtc tta gat gaa gcc gac aca cca cag gat cac gaa ttc tgg act 726
Ser Val Leu Asp Glu Ala Asp Thr Pro Gln Asp His Glu Phe Trp Thr
220 225 230

gcg cta cct gat gta cct gtg aaa gag tta gaa cct ccc aaa gaa gtt 774
Ala Leu Pro Asp Val Pro Val Lys Glu Leu Glu Pro Pro Lys Glu Val
235 240 245

atc aag tcg ctc tac aag ttg tct gac tct agt gga aaa ttg gag ttg 822
Ile Lys Ser Leu Tyr Lys Leu Ser Asp Ser Ser Gly Lys Leu Glu Leu
250 255 260

acg att gtg agc gag gga tcg gct tcc aag cat gac att aag ccc gac 870
Thr Ile Val Ser Glu Gly Ser Ala Ser Lys His Asp Ile Lys Pro Asp
265 270 275 280

gat gtc tac ata atc ctc acc aag gag ggt ctc ttc gtc tac ata ggc 918
Asp Val Tyr Ile Ile Leu Thr Lys Glu Gly Leu Phe Val Tyr Ile Gly
285 290 295

aag ggt tgc tct gtt ttg gag aag aga aac gct ctt tct aat gcc cac 966
Lys Gly Cys Ser Val Leu Glu Lys Arg Asn Ala Leu Ser Asn Ala His
300 305 310

aaa ttc tta cag acc tgc ccc aac ccc ttc ttg ccc atc acc gtt gtg 1014
Lys Phe Leu Gln Thr Cys Pro Asn Pro Phe Leu Pro Ile Thr Val Val
315 320 325

act gat gag cag gcg gaa tca ttc cta aag ggc att tgg gat gag 1059

Thr Asp Glu Gln Ala Glu Ser Phe Leu Lys Gly Ile Trp Asp Glu
330 335 340

taggcaagcg gtgtaagatt cgtctcgact tcg 1092

<210> 2

<211> 343

<212> PRT

<213> Echinococcus multilocularis

<400> 3

Met Asp Arg Gly Val Lys Lys Glu Ser Ala Met Thr Glu Lys Cys Trp
1 5 10 15

Glu Pro Val Gly Arg Ala Thr Ser Pro Phe Leu Met Val Trp Arg Val
20 25 30

Asn Gln Phe Thr Leu Glu Pro Val Pro Ser Asp Glu Ile Gly Asn Phe
35 40 45

Tyr Asn Gly Asp Ser Tyr Val Ile Cys Lys Ala Thr Arg Ser Pro Gly
50 55 60

Gly Asp Lys Leu Leu Tyr Asn Val His Phe Trp Ile Gly Lys His Ser
65 70 75 80

Thr Ala Asp Glu Tyr Gly Thr Ala Ala Tyr Lys Thr Val Glu Leu Asp
85 90 95

Thr Phe Leu Asp Asp Ala Ala Val Gln His Arg Glu Val Glu Gly Tyr
100 105 110

Glu Ser Gln Leu Phe Lys Ser Tyr Phe Asp Lys Leu Val Ile Leu Lys
115 120 125

Gly Gly Tyr Ala Ser Gly Phe Arg His Val Lys Pro Asp Glu Tyr Arg
130 135 140

Pro Arg Leu Leu Arg Phe Cys Lys Glu Gly Lys Thr Thr Tyr Met Arg
145 150 155 160

Gln Val Ala Phe Ser Lys Gln Ser Val His Ser Gly Asp Val Phe Ile
165 170 175

Leu Asp Leu Gly Ser Arg Ala Tyr Gln Phe Asn Gly Ser Thr Cys Ser
180 185 190

Ala Phe Glu Lys Ser Leu Ala Ala Ala Phe Leu Gln Asp Leu Glu Ser
195 200 205

Lys Arg Asn Gly Arg Cys Asn Thr Ser Val Leu Asp Glu Ala Asp Thr
210 215 220

Pro Gln Asp His Glu Phe Trp Thr Ala Leu Pro Asp Val Pro Val Lys
225 230 235 240

Glu Leu Glu Pro Pro Lys Glu Val Ile Lys Ser Leu Tyr Lys Leu Ser

245

250

255

Asp Ser Ser Gly Lys Leu Glu Leu Thr Ile Val Ser Glu Gly Ser Ala

260

265

270

Ser Lys His Asp Ile Lys Pro Asp Asp Val Tyr Ile Ile Leu Thr Lys

275

280

285

Glu Gly Leu Phe Val Tyr Ile Gly Lys Gly Cys Ser Val Leu Glu Lys

290

295

300

Arg Asn Ala Leu Ser Asn Ala His Lys Phe Leu Gln Thr Cys Pro Asn

305

310

315

320

Pro Phe Leu Pro Ile Thr Val Val Thr Asp Glu Gln Ala Glu Ser Phe

325

330

335

Leu Lys Gly Ile Trp Asp Glu

340

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2002年05月23日（23.05.2002）木曜日 18時01分50秒

VIII-5-1	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て（規則4.17(v)及び51の2.1(a)(v)）	本国際出願に関し、 科学技術振興事業団、国立感染症研究所長が代表する日本国、藤田 修、野崎 智義は、本国際出願の請求項に記載された対象が以下のように開示されたことを申し立てる。
VIII-5-1 (i)	開示の種類	その他：インターネット
VIII-5-1 (ii)	開示の日付：	2001年09月25日（25.09.2001）
VIII-5-1 (iii)	開示の名称：	American Society of Tropical Medicine and Hygiene 50th Annual Meeting
VIII-5-1 (iv)	開示の場所：	http://www.astmh.org/meetings/50th_call_for_papers
VIII-5-1 (v)	本申立ては、次の指定国のためになされたものである。：	すべての指定国

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/05094

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/30, C12N1/21, C07K14/44, G01N33/53, G01N33/569

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/30, C12N1/21, C07K14/44, G01N33/53, G01N33/569

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Elizabeth Cortez-Herrera et al., Echinococcus garanulosus: Cloning and Functional in Vitro Characterization of an Actin Filament Fragmenting Protein, Experimental Parasitology, 2001, Vol.97, pages 215 to 225, especially, page 217, right column, 3rd paragraph and Fig. 2	1-25
Y	Carl W. Dieffenbach et al., Cloning of Murine Gelsolin and Its Regulation during Differentiation of Embryonal Carcinoma Cells, The Journal of Biological Chemistry, 1989, Vol.264, No.22, pages 13281 to 13288, especially, page 13281, right column, line 31 to page 13282, left column, line 3 and Fig. 2	1-25

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
12 July, 2002 (12.07.02)Date of mailing of the international search report
30 July, 2002 (30.07.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/05094

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Edward K.KOEPP et al., Equus caballus gelsolin cDNA sequence and protein structural implications, Eur.J.Biochem, 1998, Vol.251, pages 613 to 621, especially, Fig. 2 and Table 2	1-25
Y	Petra M. Frosch et al., Cloning and characterization of an immunodominant major surface antigen of Echinococcus multilocularis, Molecular and Biochemical Parasitology, 1991, Vol.48, No.2, pages 121 to 130, especially, Fig. 2	16,17
Y	Ossi Turunen et al., Ezrin Has a COOH-Terminal Actinbinding Site That is Conserved in the Ezrin Protein Family, The Journal of Cell Biology, 1994, Vol.126, No.6, pages 1445 to 1453	16,17
Y	R.Felleisen et al., Analysis of a Cytovillin-Related Antigen from Echinococcus Multilocularis and E.Granulosus, Experientia, 1994, Vol.50, pA76	16,17
A	Elisabeth Andre et al., Severin, Gelsolin, and Villin Share a Homologous Sequence in Regions Presumed to Contain F-actin Severing Domains, The Journal of Biological Chemistry, 1988, Vol.263, No.2, pages 722 to 727	1-25
A	C.P.J. Maury et al., Finnish hereditary amyloidosis, Amino acid sequence homology between the amyloid fibril protein and human plasma gelsoline, FEBS Lett., 1990, Vol.260, No.1, pages 85 to 87	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/05094

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 26-29

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 26 to 29 pertain to diagnostic methods to be practiced on the human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N 15/30, C12N 1/21, C07K 14/44, G01N 33/53,
G01N 33/569

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N 15/30, C12N 1/21, C07K 14/44, G01N 33/53,
G01N 33/569

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Swissprot/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Elizabeth Cortez-Herrera et al, <i>Echinococcus garanulosus</i> : Cloning and Functional <i>in Vitro</i> Characterization of an Actin Filament Fragmenting Protein, Experimental Parasitology, 2001, Vol. 97, p215-225, especially page 217, right column, 3rd paragraph and FIG. 2	1-25
Y	Carl W. Dieffenbach et al, Cloning of Murine Gelsolin and Its Regulation during Differentiation of Embryonal Carcinoma Cells,	1-25

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.07.02

国際調査報告の発送日

30.07.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

4B

9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1989, Vol. 264, No. 22, p13281-13288, especially page 13281, right column, line 31 ~page 13282, left column, line 3 and FIG. 2	
Y	Edward K. KOEPF et al, <i>Equus caballus</i> gelsolin cDNA sequence and protein structural implications, Eur. J. Biochem, 1998, Vol. 251, p613-621, especially Fig. 2 and Table 2	1-25
Y	Petra M. Frosch et al, Cloning and characterisation of an immunodominant major surface antigen of <i>Echinococcus</i> <i>multilocularis</i> , Molecular and Biochemical Parasitology, 1991, Vol. 48, No. 2, p121-130, especially Fig. 2	16, 17
Y	Ossi Turunen et al, Ezrin Has a COOH-Terminal Actin- binding Site That Is Conserved in the Ezrin Protein Family, The Journal of Cell Biology, 1994, Vol. 126, No. 6, p1445-1453	16, 17
Y	R. Felleisen et al, ANALYSIS OF A CYTOVILLIN-RELATED ANTIGEN FROM <i>ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS</i> AND <i>E. GRANULOSUS</i> , Experientia, 1994, Vol. 50, pA76	16, 17
A	Elisabeth Andre et al, Severin, Gelsolin, and Villin Share a Homologous Sequence in Regions Presumed to Contain F-actin Severing Domains, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1988, Vol. 263, No. 2, p722-727	1-25
A	C. P. J. Maury et al, Finnish hereditary amyloidosis, Amino acid sequence homology between the amyloid fibril protein and human plasma gelsoline, FEBS Lett., 1990, Vol. 260, No. 1, p85-87	1-25

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 26-29 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲 26-29 は、人の身体の診断方法であるから、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。

2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

专利名称(译)	多毛cha蠕虫抗原，编码该抗原的基因以及诊断人多毛cha蠕虫疾病的方法		
公开(公告)号	JP2003250555A6	公开(公告)日	2004-09-02
申请号	JP2002052151	申请日	2002-02-27
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构 日本国立感染症研究所		
申请(专利权)人(译)	科学技术振兴事业团 国立感染症研究所所长		
[标]发明人	藤田修 野崎智義		
发明人	藤田 修 野崎 智義		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/569 C07K14/435 C12N15/09 C12N15/30 C12N1/21 G01N33/543		
CPC分类号	C07K14/4355 G01N33/56966		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/435 C12N1/21 G01N33/53.D G01N33/543.501.A G01N33/543.545.A G01N33/569.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA08 4B024/HA11 4B065/AA26 4B065/AA90 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/BA41 4H045/CA51 4H045/EA50 4H045/FA73 4H045/FA74		
代理人(译)	佐伯 宪生		
其他公开文献	JP2003250555A		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种用于多汗症的测试方法，诊断方法等，其利用基因重组技术具有优异的灵敏度和特异性，并且还具有成本优势。为了这个目的。本发明提供了一种编码来源于多毛蠕虫的肌动蛋白调节蛋白（AMP）的基因，用于检测针对由该抗原蛋白或其一部分组成的多肽的抗体的免疫测定，以及 诊断人多囊性疾病的方法技术领域本发明涉及一种诊断人多囊性疾病的方法。[选择图]图4