

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 510559

(P2003 - 510559A)

(43)公表日 平成15年3月18日(2003.3.18)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
G 0 1 N 33/571	ZNA	G 0 1 N 33/571	4 B 0 6 4
A 6 1 K 39/02		A 6 1 K 39/02	4 C 0 8 5
C 0 7 K 14/20		C 0 7 K 14/20	4 H 0 4 5
16/12		16/12	
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	D

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 79数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 503496(P2001 - 503496)

(86) (22)出願日 平成12年6月14日(2000.6.14)

(85)翻訳文提出日 平成13年12月14日(2001.12.14)

(86)国際出願番号 PCT/US00/16425

(87)国際公開番号 W000/077486

(87)国際公開日 平成12年12月21日(2000.12.21)

(31)優先権主張番号 60/138,981

(32)優先日 平成11年6月14日(1999.6.14)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 アメリカ合衆国
アメリカ合衆国ジョージア州、アトランタ、
エクゼクティブ、パーク、ビルディング、
4、スウィート、1103、テクノロジー、トラ
ンスファー、オフィス、センターズ、フォ
ー、ディジーズ、コントロール、アンド、
プリベンション

(72)発明者 リュー フシ
アメリカ合衆国 ジョージア州 タッカー
キャセージ ロード 2077

(74)代理人 弁理士 清水 初志 (外 1 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 梅毒トレポネーマを検出するための組成物および方法

(57)【要約】

梅毒トレポネーマ (Treponema pallidum) に特有な特異的抗原蛋白質およびペプチドの使用を含む、梅毒トレポネーマ感染症の特異的で感度の高い検出のための方法を提供する。特に、酸性リピート蛋白質の認識に基づく検出アッセイ法を提供する。本発明の方法は、第1期梅毒を感染早期に発見するために特に有用である。加えて、本発明の方法および組成物は、特定のトレポネーマ性疾患の原因病原体、すなわち梅毒に関する梅毒トレポネーマパリダム亜種 (Treponema pallidum subspecies pallidum)、イチゴ腫に関する梅毒トレポネーマペルテニュー亜種 (Treponema pallidum subspecies pertenue) およびベジエルに関する梅毒トレポネーマエンデミカム亜種 (Treponema pallidum subspecies endemicum) の同定を可能にする、特定のトレポネーマ感染症の鑑別的発見に向けられる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の段階を含む、生物試料における梅毒トレポネーマ (*Treponema pallidum*)、抗トレポネーマ抗体、またはその両方の存在を検出するための方法：

(a) 酸性リピート蛋白質 (acidic repeat protein)、または酸性リピート蛋白質の1つもしくは複数の単離された免疫原性梅毒トレポネーマペプチドと、抗体を含む生物試料とを接触する段階；および

(b) 免疫原性蛋白質またはペプチドと抗体との間の複合体を形成する検出であって、該複合体の存在によって梅毒トレポネーマの存在が示される段階。

【請求項2】 免疫原性ペプチドが、配列番号：2、4、6～18からなる群より選択されるアミノ酸配列、およびその保存的変形物を含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】 免疫原性ペプチドが、配列番号：1、3および5からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされる、請求項1記載の方法。

【請求項4】 免疫原性ペプチドが、配列番号：15の配列を有するアミノ酸配列を含む、請求項1記載の方法。

【請求項5】 梅毒トレポネーマが (*Treponema pallidum*)、梅毒トレポネーマパリダム亜種 (*Treponema pallidum* subspecies *pallidum*)、梅毒トレポネーマペルテニュー亜種 (*Treponema pallidum* subspecies *pertenue*)、および梅毒トレポネーマエンデミカム亜種 (*Treponema pallidum* subspecies *endemicum*) からなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項6】 複合体の存在が検出されることによって、梅毒、イチゴ腫およびベジエルからなる群より選択される疾患の存在が示される、請求項1記載の方法。

【請求項7】 免疫原性ペプチドが、配列番号：2の配列を有するアミノ酸配列を含む、請求項1記載の方法。

【請求項8】 免疫原性ペプチドが配列番号：4を含むアミノ酸を含み、複合体の存在によってイチゴ腫の存在が示される、請求項1記載の方法。

【請求項9】 免疫原性ペプチドが配列番号：6を含むアミノ酸配列を含み

、複合体の存在によってペプシドの存在が示される、請求項1記載の方法。

【請求項10】 ペプシドが固相に結合している、請求項1記載の方法。

【請求項11】 ペプシドが標識されている、請求項1記載の方法。

【請求項12】 標識が、電気化学発光性標識、化学発光性標識、酵素性標識、生物発光性標識および蛍光性標識からなる群より選択される、請求項11記載の方法。

【請求項13】 ペプシド-抗体複合体をペプシドに対して特異的な二次抗体とインキュベートする段階をさらに含み、二次抗体が検出可能な標識で標識され、ペプシド-抗体複合体と結合する、請求項1記載の方法。

【請求項14】 生物試料が、創傷、血液、組織、唾液、精液、膣分泌物、涙液、尿、骨、筋肉、軟骨、CSF、皮膚、または任意のヒト組織もしくは体液を含む、請求項1記載の方法。

【請求項15】 配列番号：2、4、6～18からなる群より選択されるアミノ酸配列、およびその保存的変形物を含む免疫原性ペプシドである、単離された免疫原性梅毒トレポネーマペプシド。

【請求項16】 梅毒トレポネーマが、梅毒トレポネーマパリダム亜種、梅毒トレポネーマペルテニュー亜種、および梅毒トレポネーマエンデミカム亜種からなる群より選択される、請求項15記載の免疫原性ペプシド。

【請求項17】 梅毒トレポネーマ酸性リピート蛋白質、または酸性リピート蛋白質の免疫原性ペプシドと結合しうる抗体。

【請求項18】 免疫原性ペプシドが、配列番号：2、4、6～18からなる群より選択アミノ酸配列、およびその保存的変形物を含む、請求項17記載の単離された抗体。

【請求項19】 免疫原性ペプシドが、配列番号：1、3および5からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされる、請求項17記載の単離された抗体。

【請求項20】 抗体がモノクローナル抗体である、請求項17記載の単離された抗体。

【請求項21】 薬学的に許容される担体、および哺乳動物において梅毒ト

レポネーマに対する防御的免疫応答を誘発させるのに十分な量の単離された免疫原性梅毒トレポネーマペプチドを含む免疫原性組成物であって、該免疫原性ペプチドが配列番号：2、4、6～18からなる群より選択されるアミノ酸配列およびその保存的変形物を含む組成物。

【請求項22】 梅毒トレポネーマが、梅毒トレポネーマパリダム亜種、梅毒トレポネーマペルテニユ亜種、および梅毒トレポネーマエンデミカム亜種からなる群より選択される、請求項21記載の組成物。

【請求項23】 哺乳動物における梅毒トレポネーマの存在によって梅毒、イチゴ腫、またはベジエルを含む疾患が引き起こされる、請求項21記載の組成物。

【請求項24】 免疫原性ペプチドが担体蛋白質と結合している、請求項21記載の組成物。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は、米国疾病管理予防センター（Centers for Disease Control and Prevention）でなされた。このため、米国政府は本発明において一定の権利を有する。

【0002】**発明の分野**

本発明は、微生物学および免疫学の分野に関し、より詳細には、梅毒などの梅毒トレポネーマ（*Treponema pallidum*）に起因する疾患を診断するための組成物および方法に関する。特に、本発明は、梅毒トレポネーマに固有な特異的抗原蛋白質およびペプチドの検出に関する。

【0003】**発明の背景**

梅毒トレポネーマ（*T. pallidum*）は、さまざまな臨床症状を呈する全身性病である梅毒の原因となる微好気性スピロヘータである。その他の密接な関連のあるトレポネーマは、ピンタ（ピンタトレポネーマ（*Treponema carateum*））、イチゴ腫（梅毒トレポネーマペルテニユ亜種（*Treponema pallidum* subspecies *pertenu*e））、およびベジェル（梅毒トレポネーマエンデミカム亜種（*Treponema pallidum* subspecies *endemicum*））の原因となる。

【0004】

米国では1996年に11,000例を超える第1期および第2期の梅毒患者が米国疾病管理予防センターにおいて報告されている。初期感染では感染部位に潰瘍が生じる；しかし、この細菌は全身中を移動し、時間の経過に伴って多くの臓器に障害を及ぼす。初期にはペニシリンによる治療が奏功することもあるが、梅毒の初期症状は極めて軽症の場合があり、多くの患者は最初に感染した際には治療のために受診しようとしなない。晩期梅毒における臓器障害は回復不能であるため、この受診の遅れは有害である。また、梅毒によって生じた開放性潰瘍を介して、AIDSの原因となるヒト免疫不全症ウイルス（HIV）の伝染および獲得が起こるリスクに対する懸念も増している。

【0005】

医学の専門家は、梅毒の経過を第1期、第2期、潜伏性、および第3期（晩期）のステージに分けて記載している。治療を受けていない感染者は、通常1～2年続く最初の2つのステージの期間中に他人を感染させるおそれがある。この細菌は感染者の一次潰瘍から、性パートナーの陰部の皮膚もしくは粘膜、口部、または肛門に伝播する。この細菌は身体他の部分にある皮膚損傷部を通過する可能性もある。未治療の梅毒は晩期になると、伝染性ではないものの、重篤な心臓異常、精神障害、失明、他の神経障害、さらには死亡を引き起こすおそれがある。

【0006】

第1期梅毒の最初の症状は、下疳と呼ばれる潰瘍である。下疳は曝露から10日～3カ月以内に出現する可能性があるが、一般には2～6週以内に出現する。下疳は通常、陰茎、陰門または膣などの、パートナーの潰瘍に曝露された身体部分に認められる。下疳が頸部、舌、口唇または身体他の部分に生じることもある。下疳は疼痛を伴わないこともあり、身体内部で生じることもあるため、気づかれないことがある。下疳は患者が治療されるか否かにかかわらず数週間以内に消失するが、感染症が初期の間に治療されなければ、感染者の約3分の1は慢性期の梅毒へと進行する。

【0007】

第2期梅毒ではしばしば、1ペニー銅貨程度の大きさの褐色のびらんを特徴とする皮疹が認められる。皮疹は下疳が出現して3～6週後にあらゆる場所から出現する。皮疹が全身を覆うこともあるが、最も多く発現する部位は手掌および足底である。これらのびらんには活動性の細菌が存在するため、性的であるか否かにかかわらず、感染者の皮膚損傷部と何らかの物理的接触を生じることによってこの時期には感染が伝播する可能性がある。皮疹は通常、数週間または数カ月以内に治癒する。軽度の発熱、疲労、頭痛、咽頭炎、斑状脱毛、および全身のリンパ節腫大といった他の症状が生じることもある。これらの症状は極めて軽度のことがあり、第1期梅毒の下疳と同じように治療を行わずに消失すると考えられる。

【0008】

第2期梅毒の徴候はその後1～2年にわたって再燃と寛解を繰り返すことがある

。未治療の場合、梅毒は潜伏期に入ることがあり、この期間中は疾患は伝染性ではなく、症状も存在しない。治療を受けていない多くの個体では疾患による結果がさらに生じることはないが、第2期梅毒の患者の約3分の1は晩期または第3期の梅毒を発症する。

【0009】

第3期の梅毒では、細菌は心臓、眼、脳、神経系、骨、関節、または身体の他のほとんどすべての部分に障害をもたらす。このステージは最後の数年間、または数十年にわたる可能性がある。晩期梅毒は精神病、失明、他の神経障害、心疾患、さらには死も引き起こすおそれがある。

【0010】

感染の早期には、梅毒病原体は神経系もしばしば侵し、梅毒の治療を受けていない者の約3～7%は神経梅毒を発症する。しかし、神経梅毒の発症には最長20年間かかることがあり、神経梅毒の患者の一部は全く症状を起こさない。症状を呈する患者は、頭痛、頸部硬直、および発熱を来すことがあるが、これらは脳の被膜の炎症に起因する。神経梅毒の患者では発作および知覚麻痺、脱力または視覚障害などの脳卒中の症状が起こることもある。神経梅毒は治療可能であるが、治療は比較的難しいことがあり、HIVに感染した患者ではその経過は異なると考えられる。

【0011】

妊娠女性における梅毒の影響は、胎児に対する間接的影響の点から特に切実である。活動性梅毒に罹患した未治療の妊娠女性では、感染症が胎児に伝播する可能性が高い。これらの妊娠の約25%では、死産または新生児の死亡が結果として起こると考えられる。また、このような妊娠の40～70%では梅毒に感染した乳児が生まれると考えられる。先天性梅毒の乳児の一部には出生時から症状がみられることがあるが、ほとんどは産後2～3週の間症状が起こる。これらの症状には、皮膚びらん、皮疹、発熱、肝臓および脾臓の腫大、黄疸、貧血、ならびに種々の奇形が含まれる。湿性びらんは感染性であるため、先天性梅毒の乳児の取り扱いには注意を払う必要がある。稀には、梅毒の症状が乳児で発見されないことがある。感染した乳児が年長の小児およびティーンエイジャーになるに伴い、彼

らは骨、歯、眼、耳および脳の障害を含む、晩期梅毒の症状を呈するようになる。

【0012】

梅毒感染は時に重篤で生命にかかわる影響があり、HIVの伝染または罹患のリスクもあるため、感染の特異的かつ早期の診断が不可欠である。しかし、梅毒は初期症状が多く他の疾患のものと類似しているため、時に「卓越した模倣者 (the great imitator)」と呼ばれる。このため、医師は通常、梅毒の徴候および症状が認められるかどうかには頼らず、梅毒病原体の顕微鏡的同定および血液検査の両方を行う。

【0013】

細菌の顕微鏡的同定によって梅毒を診断するために、医師が潰瘍または下疳の表面から擦過標本を採取し、微生物を検出するために特別な「暗視野」顕微鏡下でそれを観察することもある。しかし、暗視野顕微鏡にはかなりの技能が要求される他、解釈の誤りも起こりやすい。これらの理由から、梅毒の大部分の症例は血清学的に診断されている。梅毒の証拠を検出するために用いられることが最も多い血液検査は、VDRL (性病研究所 (Venereal Disease Research Laboratory)) 試験およびRPR (急速血漿レアギン試薬 (rapid plasma reagent)) 試験である。これらの非トレポネーマ試験では、活動性梅毒感染時の非特異的抗原に対する抗体を検出するために、天然脂質であるカルジオリピンおよびレシチンを用いる。

【0014】

しかし、非トレポネーマ試験に関する欠点の一つは、トレポネーマ試験と比べて特異性に欠けることである。非トレポネーマ試験を用いた場合には偽陽性および偽陰性の結果が伴うため、通常は複数の血液検査が必要になる。自己免疫疾患、ある種のウイルス感染症、およびかなりの組織破壊または肝病変を伴う疾患の患者では、偽陽性の頻度および多数の血液検査の必要性が高くなる。蛍光トレポネーマ抗体吸収試験 (FTA-ABS) および梅毒トレポネーマ血球凝集アッセイ法 (TPHA) などのトレポネーマに基づく検査を陽性の検査結果の確認のために用いてもよいが、トレポネーマに基づく検査は非トレポネーマ試験よりも費用がかかり

、用いるのが難しい。また、トレポネーマ試験は感染が駆除された後も結果が陽性であり続けるため、これを治療後の治癒に関する検査として用いることはできない。

【0015】

現在用いられているトレポネーマ試験のいくつかは、梅毒トレポネーマの細胞膜に係留された蛋白質の検出に依拠している。梅毒トレポネーマ膜の構造は一般的でなく、これらの蛋白質を「遮蔽」して検出されにくくする傾向のある脂質から主として構成されるため、このような蛋白質の検出は特に困難である。この遮蔽効果はしばしば宿主の免疫応答を遅らせ、偽陰性の血清学的結果を高い頻度で生じさせる。

【0016】

現在用いるトレポネーマ試験は主として、細胞膜に係留されたリポ蛋白質に対する抗体の検出に依存している。外膜が主として脂質からなり、蛋白質が乏しいことによる表面露出の不足のため、これらの蛋白質に対する反応は遅れることが一般的である。検査ではしばしば解釈に迷う不正確な結果が得られることがあるが、これはこれらのリポ蛋白質の抗原性が高く、トレポネーマ試験における長期的な反応の原因となる可能性があるためである。この後者の性質のため、トレポネーマ試験では現在の感染を過去の感染と鑑別することができない。

【0017】

梅毒は通常、注射によって投与されるペニシリンによって治療される。ペニシリンに対するアレルギーのある患者を治療するためには他の抗生物質が用いられる。患者は一般に治療開始から24時間以内に梅毒の伝染能力を失う。しかし、一部の感染個体は通常量のペニシリンには反応しない。このため、梅毒の治療を受けている患者に対しては、感染性病原体が完全に破壊されたことを確認するための定期的な血液検査によるモニタリングが重要である。神経梅毒の患者には治療後最長2年にわたって再検査を行う必要があると思われる。

【0018】

梅毒のすべてのステージにおいて、適切な治療を行えば疾患は治癒する可能性があるが、身体臓器にすでに生じた障害は回復しない。進行期の梅毒疾患を予防

するためにとりうる少数の選択肢のうち一つは、感染個体のスクリーニングおよび治療、または二次予防である。妊娠初期における検査および治療は、乳児の梅毒を予防するための最善の方法であり、出生前管理のルーチンの要素とする必要がある。梅毒の適切な治療および予防において極めて重要な要素は、梅毒トレポネーマの感染を早期かつ正確に発見することである。

【0019】

他のトレポネーマ感染に関連した疾患

ピンタトレポネーマ (*Treponema carateum*) が原因で起こるピンタは非常に稀になっており、高温乾燥地域の熱帯アメリカ (特にメキシコ、中央アメリカおよびコロンビア) に限局している。本疾患は第1期および第2期の病変形態を呈する。第1期病変は四肢、顔面、頸部、胸部または腹部に生じる融合性の掻痒性丘疹であり、数年間続くことがある。第2期病変は播種性の小さな鱗屑性丘疹であり、ピンタ疹と呼ばれる。これらは色素異常 (すなわち、皮膚の正常な色調からの変化) となることもある。晩期病変は色素欠乏性 (色素がなくなる) である。

【0020】

梅毒トレポネーマエンデミカム亜種が原因で起こるベジェルは、性行為感染性ではなく小児に起こる梅毒の一病型として、現地語でさまざまな名称で知られている。伝染は直接的な接触によることもあり、飲み物容器および食器を共有している場合のように (他のすべてのトレポネーマ性疾患とは対照的に) 媒介物を介することもある。おそらくは口腔粘膜内にあると思われる第1期病変がほとんど観察されないという事実を除き、本疾患はゴム種、コンジロームおよび骨膜炎を伴う梅毒と事実上同一である。

【0021】

梅毒トレポネーマペルテニユ亜種 (*Treponema pallidum* subspecies *pertenue*) が原因で起こるイチゴ腫は、高温多湿の熱帯地域で発生する。イチゴ腫も主として病変の形態で現れる。第1期病変は自然に治癒する乳頭腫性皮膚病変であるが、結局はその後に、皮膚表面に広く分布する大きな乳頭腫性小結節である第2期病変が生じる。本疾患の晩期はさまざまな骨および鼻咽腔のゴム腫のほか、皮膚、リンパ節および骨の破壊性病変を特徴とする。ゴム腫の上部にある皮膚は潰

瘍性のことがある。本疾患は南米、中央アフリカおよび東南アジアの未開の熱帯地域にみられ、感染皮膚との直接的な接触によって伝播する。

【0022】

トレポネーマ感染症に対する治療法はいくつかあるが、トレポネーマ性疾患の防除は人から人への伝播をなくすことによって行われる。したがって、トレポネーマ感染症の早期発見は、関連疾患の広範囲にわたる流行を抑えるために極めて重要である。

【0023】

必要とされているものは、梅毒トレポネーマ感染症の効率的で正確な早期診断のための改良された方法および組成物；ならびに梅毒トレポネーマ療法のモニタリングのための方法である。

【0024】

発明の概要

トレポネーマ感染症の発見のための効率的で感度の高い方法および組成物を提供する。特に、梅毒トレポネーマ (*T. pallidum*) の検出のための方法および組成物を提供する。本方法によれば、酸性リピート蛋白質 (acidic repeat protein) (arp) 遺伝子などの特定の遺伝子の蛋白質産物の存在に関して試料を分析する。詳細には、感染個体における特定のペプチド、および/または酸性リピート蛋白質遺伝子の分泌産物、ならびにこれらの蛋白質/ペプチドに対する抗体の検出に基づいて梅毒トレポネーマを検出するための方法を提供する。

【0025】

加えて、抗体-抗原複合体が形成される条件下で、試料を、免疫原性蛋白質などの梅毒トレポネーマ抗原に対して特異的な抗体と混合する方法も提供する。より詳細には、試料をarp遺伝子の蛋白質またはペプチドと混合する方法を提供する。抗体の検出により、患者における梅毒トレポネーマの存在が示される。

【0026】

本発明の1つの好ましい態様では、抗原配列の種々の遺伝子産物の検出のための方法を含むアッセイ法が提供される。

【0027】

本発明のもう1つの好ましい態様では、arp遺伝子、酸性リピート蛋白質の検出に関して特異的な方法が提供される。

【0028】

本発明のさらなる態様では、トレポネーマ感染症の鑑別診断のための方法および組成物が提供される。特に、梅毒トレポネーマパリダム亜種、梅毒トレポネーマペルテニュー亜種、および梅毒トレポネーマエンデミカム亜種の特異的同定を可能とする方法が提供される。

【0029】

したがって、本発明の1つの目的は、梅毒トレポネーマの検出のための高感度アッセイ法を提供することである。

【0030】

本発明のもう1つの目的は、梅毒トレポネーマの抗原性遺伝子産物を含む蛋白質を検出するアッセイ法を提供することである。

【0031】

本発明のさらにもう1つの目的は、第1期梅毒の早期発見のための方法を提供することである。

【0032】

本発明のもう1つの目的は、梅毒、イチゴ腫およびベジェルの鑑別診断のための方法および組成物を提供することである。

【0033】

本発明のさらにもう1つの目的は、梅毒トレポネーマに対して特異的な抗体を提供することである。

【0034】

本発明の1つのさらなる目的は、生物試料中の梅毒トレポネーマを検出するための自動化使用時点 (point-of-use) 分析のためのキットを提供することである。

【0035】

本発明のもう1つの目的は、感染性病原体の細胞膜中に全体が含まれる抗原蛋白質に依存しない、梅毒トレポネーマの早期検出のための方法を提供することである。

ある。

【0036】

本発明のさらにもう1つの目的は、梅毒トレポネーマの抗原性遺伝子産物に対して産生された抗体の使用を含む、梅毒トレポネーマ感染症を治療するための方法を提供することである。

【0037】

本発明の1つのさらなる目的は、梅毒トレポネーマの抗原性遺伝子産物の検出のためのイムノアッセイ法を提供することである。

【0038】

本発明のもう1つの目的は、酸性リピート蛋白質を検出するための方法を提供することである。

【0039】

本発明のさらにもう1つの目的は、酸性リピート蛋白質および/またはそのペプチド誘導体を用いる、梅毒、イチゴ腫またはベジエルの発見のためのイムノアッセイ法を提供することである。

【0040】

本発明のもう1つの目的は、梅毒トレポネーマのラピッドフローサイトメトリー型 (rapid-flow cytometry-type) 診断に用いる固相粒子を提供することである。

【0041】

本発明のさらにもう1つの目的は、梅毒トレポネーマ感染症の迅速診断のための凝集型アッセイ法に用いる固相粒子を提供することである。

【0042】

本発明のさらにもう1つの目的は、酵素的増幅 (ELISA) を含む、梅毒トレポネーマを検出するための方法を提供することである。

【0043】

梅毒トレポネーマに対する抗体を検出するアッセイ法を提供することは、本発明のもう1つの目的である。

【0044】

本発明のさらにもう1つの目的は、生物試料中の抗梅毒トレポネーマ抗体を検出することを目的とする自動化使用時点（point-of-use）分析のためのキットを提供することである。

【0045】

本発明のもう1つの目的は、梅毒トレポネーマに対する抗体の検出のためのイムノアッセイ法を提供することである。

【0046】

本発明のもう1つの目的は、酸性リピート蛋白質に対する抗体の検出のための方法を提供することである。

【0047】

さらに、本発明のもう1つの目的は、梅毒、イチゴ腫またはベジエルに感染した人々における酸性リピート蛋白質に対する抗体を、それに由来する酸性リピート蛋白質および/またはペプチドを用いて検出するためのイムノアッセイ法を提供することである。

【0048】

本発明のもう1つの目的は、arp蛋白質またはペプチドを用いる梅毒トレポネーマ感染症のラピッドフローサイトメトリー型の診断に用いる固相粒子を提供することである。

【0049】

本発明のさらにもう1つの目的は、酵素的増幅（ELISA）を含む、抗梅毒トレポネーマ抗体を検出するための方法を提供することである。

【0050】

本発明の上記およびその他の目的、特徴、ならびに利点は、以下に開示する態様および添付する特許請求の範囲の詳細な説明を吟味することによって明らかになると考えられる。

【0051】

発明の詳細な説明

本発明は、本明細書に含まれる特定の態様に関する以下の詳細な説明を参照することによってより容易に理解されられると思われる。本発明をその特定の態様の具

体的な詳細を参照しながら説明しているが、このような詳細は本発明の範囲を制限するものとみなされるべきではない。本明細書に言及する参考文献の原文はすべてその全体が参照として本明細書に組み入れられる。

【0052】

定義

本明細書で用いる「1つの(a)」「1つの(an)」および「その(the)」は、その文脈で不適切でない限り、「1つまたは複数の」を意味し、且つ複数形も含むものと定義される。

【0053】

本明細書で用いる「検出すること」または「検出された」という用語は、免疫化学的または組織学的な方法などの生体分子の検出のための既知の技法を用いることを意味し、調べている生体分子の存在または濃度を定性的または定量的に決定することを意味する。

【0054】

「単離された」とは、生体分子が、それが天然にみられる状態で付随する成分の少なくともいくつかを含まないことを意味する。

【0055】

本明細書で用いる「可溶性の」という用語は、水性溶液中に部分的または完全に溶解することを意味する。

【0056】

梅毒トレポネーマの検出に用いるためのペプチドおよび蛋白質

本発明の方法は、梅毒トレポネーマ感染症によって引き起こされる疾患、主に梅毒を診断するための検出アッセイ法に利用される、これまで同定されていない抗原蛋白質の使用を含む。梅毒トレポネーマによる蛋白質産物はこれまで数多く梅毒の診断に用いられているが、梅毒の正確な早期診断、または梅毒、イチゴ腫およびベジェルの鑑別診断のために有用な特異的蛋白質はこれまで同定されていない。

【0057】

先行技術のアッセイ法に具体的に利用されている蛋白質には、47kDリポ蛋白質

、17kDリポ蛋白質、および15kDリポ蛋白質が含まれ、そのほとんどは通常は蛋白質の脂質修飾によって生じたアミノ末端脂質部分を介して係留されることにより、細胞膜中に係留されるように思われる。これらの蛋白質はいずれも梅毒トレポネーマに大量に存在する上に抗原性が高いが、それらの診断のための使用には、それらがトレポネーマ全体で反応性の主要な蛋白質を構成しており、このためトレポネーマ細胞全体を用いた場合よりも迅速な陽性診断が得られるわけではないという重大な欠点がある。

【0058】

本発明者らは以下の理論に拘束されることを望むものではないが、梅毒トレポネーマの通常ではない外膜構造は梅毒感染に対する宿主反応の大きな遅れの原因となり、このために第1期梅毒の早期例はしばしばトレポネーマに対して血清学的に陰性を示すと考えられている。梅毒トレポネーマの外膜または外被は主として、極めて少数の蛋白質しか伴わない脂質から構成されているように思われる。さらに、細胞膜中に係留された蛋白質は宿主免疫系から遮蔽され、このために免疫応答の遅延または低下が生じると考えられている。この結果、膜アンカー型蛋白質に基づく検出アッセイ法にはしばしば血清学的反応性の遅延が認められ、一部の第1期梅毒患者では偽陰性の検査が得られる。

【0059】

梅毒トレポネーマ検出アッセイ法にこれまで利用されていた蛋白質とは異なり、本発明の蛋白質およびペプチドは、梅毒トレポネーマ感染症を早期に正確に診断することを可能とする。本発明者らは以下の理論に拘束されることを望むものではないが、本発明の方法による分泌蛋白質の検出は、梅毒トレポネーマ外膜構造に伴う従来の問題を克服するものであり、このため、クローニングされた膜遮蔽型抗原に依拠する以前のアッセイ法よりも特に有利である。さらに、分泌された抗原蛋白質は膜遮蔽型抗原と比べて検出可能な免疫応答を生じ、その結果、対応する抗体の認識による診断が容易になる可能性が高い。加えて、この蛋白質の反復性のためにその抗原性は非常に高くなり、このため梅毒の早期発見に適したものとなる。

【0060】

早期発見は、より重症で症状の治療が難しくなることを特徴とする第2期および第3期の形態の梅毒へとその後に悪化することを予防しうするため、治療上極めて重要である。したがって、本発明の方法は、梅毒の血清学においてこれまで重大な問題となっていた分野である第1期梅毒の早期発見を取り扱う。

【0061】

梅毒トレポネーマのニコルス株は、梅毒トレポネーマ (*T. pallidum* ssp. *pallidum*) の基準株である。本発明者らによる本明細書に記載の通り、この菌株は、長さが各60塩基対の特有の反復配列を含んでおり、その結果、蛋白質の内部にそれぞれ20アミノ酸から構成される14個の反復部を含む蛋白質が生じている(図6参照)。酸性リピート蛋白質(またはarp)という名称は、この反復領域がグルタミン酸に関する6個のコドンを含み、蛋白質産物のpIが約4.3と推定されることにちなんでいる。20アミノ酸からなる反復配列には若干の違いはあるが、ニコルス株では最後の2つの反復まで反復配列が少なくとも90%保存されている(稀にみられる置換は一般に保存的である)。酸性リピート蛋白質のヌクレオチド配列は配列表に配列番号:1として提示されており(図5も参照)、アミノ酸配列は配列番号:2に提示されている(図6も参照)。

【0062】

本発明者らは以下の理論に拘束されることを望むものではないが、arp遺伝子産物である酸性リピート蛋白質は、膜アンカー型または分泌型として存在する蛋白質を構成すると考えられている。酸性リピート蛋白質の構造上の特徴を図2に示すが、これには蛋白質の疎水性プロフィールのほか、梅毒トレポネーマのニコルス株由来の反復配列の1つが示されている。この蛋白質には、弱い塩基性のアミノ末端に続いて、膜アンカー型のための膜貫通ドメインを構成すると思われる疎水性のアミノ酸鎖がある。膜貫通ドメインの可能性のあるものの末端の少し後には4つのアラニンが並んでおり、これはシグナルペプチダーゼI切断部位の可能性はある。梅毒トレポネーマのニコルス株では、蛋白質の残りの部分の大半は反復配列によって占められており、それがこの菌株における全リーディングフレームの約3分の2を構成している。

【0063】

酸性リピート蛋白質の免疫原性領域の活性部分は、酸性リピート蛋白質からの切断型ペプチドを単離または合成し、続いて当業者に知られた技法および方法を用いてペプチドを免疫原性活性に関して検討することによって同定可能である。本発明は特に、酸性リピート蛋白質の免疫原性ドメインの活性部分を対象としている。

【0064】

例えば、酸性リピート蛋白質の好ましい活性部分は、配列番号：1に示された蛋白質のほぼ128～407位のアミノ酸、より好ましくは同じく配列番号：1に示された168～187位のアミノ酸、最も好ましくは配列番号：15に示されたアミノ酸配列を有するペプチドを含む。

【0065】

本発明の1つの態様において、本発明の方法に従って用いるために好ましい蛋白質またはペプチドは、配列番号：1に示されたヌクレオチド配列によってコードされる酸性リピート蛋白質またはその免疫原性断片を含む。

【0066】

本発明のもう1つの態様において、本発明の方法に従って用いるために好ましい蛋白質またはペプチドは、配列番号：15に示されたアミノ酸配列を有する、酸性リピート蛋白質の免疫原性断片を含む。

【0067】

本発明の1つの代替的な態様において、本発明の方法に従って用いるために好ましい蛋白質またはペプチドは、配列番号：9に示されたアミノ酸配列を有する酸性リピート蛋白質arp 3ペプチドの免疫原性断片を含む。

【0068】

本発明のもう1つの態様において、本発明の方法に従って用いるために好ましいペプチドは、配列番号：13に示されたアミノ酸配列を有する酸性リピート蛋白質の活性断片を含む。

【0069】

本発明のさらにもう1つの態様において、本発明の方法に従って用いるために好ましいペプチドは、配列番号：7～18のいずれかに示されたアミノ酸配列を有

する酸性リピート蛋白質の活性断片を含む。

【0070】

当業者は、コードされる配列中の単一のアミノ酸またはわずかな比率のアミノ酸（典型的には5%未満、より典型的には1%未満）が変化、付加または欠失する個々の置換物、欠失物、または付加物も、その変更によって化学的に類似したアミノ酸の置換が生じる場合には、保存的に改変された変形物であることを理解すると考えられる。

【0071】

本発明の方法の1つの態様によれば、抗体-抗原複合体が形成される条件下で、試料を、反復遺伝子配列の蛋白質またはペプチド産物に対して特異的な蛋白質と混合する。抗原捕捉法を用いて複合体が検出されることにより、患者における梅毒トレポネーマの存在が示される。または、プローブとして抗原を用いた抗原-抗体複合体の検出により、過去または現時点で梅毒トレポネーマが存在していることが示される。反復遺伝子配列の蛋白質産物は、酸性リピート蛋白質またはその抗原性ペプチド断片であることが好ましい。

【0072】

ペプチドまたは蛋白質断片

この酸性リピート蛋白質は、実施例の項に記載の通りに、梅毒トレポネーマ菌体から単離するか、または細胞培養、組換え遺伝子発現およびペプチド合成などの化学的方法もしくは生物的方法によって合成される。組換え法には、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いたDNA源からの遺伝子増幅、および逆転写酵素/PCRを用いたRNA源からの遺伝子増幅が含まれる。酸性リピート蛋白質のアミノ酸配列は配列番号：2に示されている。酸性リピート蛋白質のペプチドおよび蛋白質断片は、配列番号：2に示されたアミノ酸配列中のアミノ酸配列を有することが好ましい。

【0073】

酸性リピート蛋白質は、上記の方法に従って製造し、当業者に知られた技法および方法を用いて免疫原性または抗原活性に関して検討することができる。例えば、バキュロウイルス遺伝子発現系を用いて、または完全arp遺伝子を含む発現

ベクタープラスミドによる形質転換がなされた大腸菌を用いて、完全長組換え酸性リピート蛋白質を産生させることもできる。完全長蛋白質を個別のドメインに切断すること、またはエンジョージ (Enyoji) ら (Biochemistry 34 : 5725 ~ 5735 (1995)) によって記載された方法などの種々の方法を用いて消化することができる。エンジョージ (Enyoji) らの方法によれば、組換え酸性リピート蛋白質をヒト好中球エラスターゼなどの消化酵素で処理し、断片を得るためにヘパリンカラムを用いて消化物を精製し、続いて免疫原性に関して検討することができる。

【0074】

または、1回に1つのアミノ酸を除去するために、完全な蛋白質または免疫原性活性を呈するその長い断片を消化することによって断片を調製する。続いて、連続的に短くなった各断片を免疫原性活性に関して検討する。同様に、さまざまな長さの断片を合成し、免疫原性活性に関して検討することもできる。断片の長さを延長または短縮することにより、当業者は、当業者に既知のルーチン的な消化、合成、およびスクリーニング法を用いて、免疫原性活性のために必要な蛋白質内部のアミノ酸の正確な数、同一性、および配列を決定しうると思われる。

【0075】

本明細書で用いる「ポリペプチド」「ペプチド」および「蛋白質」という用語は、互換的であり、ペプチド結合によって連結した2つまたはそれ以上のアミノ酸配列から構成される生体分子を意味する。

【0076】

「ペプチド」という用語は、1つのアミノ酸の炭素のカルボキシル基ともう1つのアミノ酸の炭素のアミノ基との間の縮重反応によって形成されたペプチド結合によって炭素が連結したアミノ酸 (典型的にはL-アミノ酸) の鎖のことを意味する。鎖の一方の端 (すなわち、アミノ末端) にある末端アミノ酸は遊離アミノ基を有し、鎖の他方の端 (すなわち、カルボキシル末端) にある末端アミノ酸は遊離カルボキシル基を有する。このため、「アミノ末端」(N末端と略記) という用語は、ペプチドのアミノ末端にあるアミノ酸上の遊離 -アミノ基、またはペプチド内部の他のいずれかの位置にあるアミノ酸の -アミノ基 (ペプチ

ド結合に關与している場合はイミノ基)のことを指す。同様に、「カルボキシル末端」(C末端)という用語は、ペプチドのカルボキシル末端にあるアミノ酸上の遊離カルボキシル基、またはペプチド内部のいずれかの位置にあるアミノ酸のカルボキシル基のことを指す。

【0077】

典型的には、ペプチドを構成するアミノ酸には、アミノ末端から始まってペプチドのカルボキシル末端の向きに増えていく順序で番号が付けられる。したがって、1つのアミノ酸がもう1つの「後が続く」という場合、そのアミノ酸は、先行するアミノ酸よりもペプチドのカルボキシル末端に近い側に位置する。

【0078】

「残基」という用語は、本明細書において、アミド結合によってペプチド中に組み入れられたアミノ酸を指すために用いられる。このため、アミノ酸は天然のアミノ酸でもよく、別に限定されない限り、天然のアミノ酸に類似した様式で機能する天然型アミノ酸の既知の類似体(すなわち、アミノ酸模倣物)も含まれる。さらに、アミド結合模倣物には、当業者に周知のペプチド骨格修飾物が含まれる。

【0079】

「本質的に~からなる (consisting essentially of)」という語句は、本明細書において、この語句が言及しているペプチドの本質的な性質を実質的に変化させると思われるいかなる要素も除外する目的で用いられる。したがって、「本質的に~からなる」ペプチドという表現は、そのペプチドの生物活性を実質的に変化させると思われるアミノ酸置換、付加、または欠失の可能性を除外するものである。

【0080】

さらに上記の通り、当業者は、コードされる配列中の単一のアミノ酸またはわずかな比率のアミノ酸(典型的には5%未満、より典型的には1%未満)が変化、付加または欠失した個々の置換物、欠失物、または付加物も、その変更によって化学的に類似したアミノ酸の置換が生じる場合には、保存的に改変された変形物であることを理解すると考えられる。機能的に類似したアミノ酸が得られる保存

的置換の表は当技術分野で周知である。以下の6つの群はそれぞれ、互いに保存的な置換物であるアミノ酸を含んでいる：

- 1) アラニン (A)、セリン (S)、トレオニン (T)；
- 2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)；
- 3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)；
- 4) アルギニン (R)、リジン (K)；
- 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)；および
- 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)。

【0081】

「単離された」または「生物的に純粋な」という語句は、天然の状態で通常それに付随する成分を実質的または本質的に含まない物質のことを指す。したがって、本明細書に記載のペプチドは、その生体内環境で通常付随する物質を含まない。典型的には、本明細書に記載の単離された免疫原性ペプチドの純度は、銀染色ゲル上でのバンド強度による評価で少なくとも約80%、通常は少なくとも約90%であり、好ましくは少なくとも約95%である。

【0082】

蛋白質の純度または均一性は、蛋白質試料のポリアクリルアミドゲル電気泳動に続いて、染色して可視化するといった当技術分野で周知の数多くの方法によって示すことができる。ある種の目的のためには高い分解能が必要と考えられ、HPLCまたは精製のための類似の手段が用いられる。

【0083】

免疫原性ペプチドの長さが比較的短い場合には（すなわち、約50アミノ酸未満）、それらはしばしば、標準的な化学ペプチド合成法を用いて合成される。

【0084】

配列のC末端アミノ酸を不溶性支持体に結合させた後に、配列中の残りのアミノ酸の逐次付加を行う固相合成法は、本明細書に記載の免疫原性ペプチドの化学合成のための好ましい方法である。固相合成のための技法は当技術分野において既知である。

【0085】

または、本明細書に記載の免疫原性ペプチドは組換え核酸の手法を用いて合成される。これには一般に、ペプチドをコードする核酸配列を作製する段階、特定のプロモーターの制御下にある発現カセット中に核酸を配置する段階、宿主内でペプチドを発現させる段階、発現されたペプチドまたはポリペプチドを単離する段階、および必要に応じて、ペプチドを再生させる段階が含まれる。当業者にこのような手順を指導するための技法は文献中に記載されている。

【0086】

ひとたび発現されれば、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティーカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などを含む、標準的な手順に従って組換えペプチドを精製する。治療薬として用いるためには、均一性が約50～95%の実質的に純粋な組成物が好ましく、均一性が80～95%またはそれ以上であるものが最も好ましい。

【0087】

当業者は、化学合成、生物的発現、または精製後に、免疫原性ペプチドが成分ペプチドの天然のコンフォメーションとは実質的に異なるコンフォメーションを有する可能性があることを理解すると考えられる。この場合には、免疫原性ペプチドの変性および還元を行い、続いてペプチドを生物学的および生化学的に活性のあるコンフォメーションにリフォールディングさせることがしばしば必要となる。蛋白質の還元および変性ならびにリフォールディング誘導の方法は当業者に周知である。

【0088】

精製された蛋白質の抗原性は、例えば、実験動物に産生させた抗arp血清または梅毒トレポネーマ免疫血清との反応を示すことによって確認しうる。

【0089】

本発明者らは以下の理論に拘束されることを望むものではないが、例えばイムノアッセイ法による酸性リピート蛋白質の認識によって、梅毒の診断における本蛋白質の有用性、患者の免疫状態の決定、および疾患の進行の評価が得られるため、本発明は特に望ましい。

【0090】

本発明のもう1つの非常に有利な局面は、クローニングされた遺伝子から所望の蛋白質を大量に生産可能なことにある。上記の通り、続いてこの蛋白質を抗体認識、抗原捕捉による梅毒検出の診断アッセイ法に、または梅毒の治療用のワクチンの開発のために用いることができる。

【0091】

抗梅毒トレポネーマ抗原抗体

本明細書で用いる「抗体 (antibody)」および「複数の抗体 (antibodies)」という用語には、モノクローナル抗体、ポリクローナル性、キメラ性、一本鎖、二重特異性、サル化およびヒト化抗体、ならびにFab免疫グロブリン発現ライブラリーの産物を含むFab断片が含まれる。

【0092】

「抗原」という用語は、哺乳動物において免疫応答を誘導可能な実体またはその断片のことを指す。この用語には、抗原性または抗原決定基の原因となる免疫原および領域が含まれる。

【0093】

本明細書で提供される抗体は、免疫原性領域を代表する蛋白質またはペプチドを含む梅毒トレポネーマ抗原に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である。好ましい遺伝子標的には、arp遺伝子またはarp遺伝子ファミリーのメンバーが含まれる。好ましい抗体はモノクローナル抗体であり、これは抗原に対するその特異性が高いことによる。本抗体はarp蛋白質に対して特異的であり、他の梅毒トレポネーマ蛋白質またはペプチドとの交差反応性は極めて少ないか皆無である。好ましくは、本抗体は、arp遺伝子によってコードされる分泌蛋白質、酸性リピート蛋白質、またはその抗原性ペプチド断片に対して特異的である。

【0094】

好ましいモノクローナル抗体は、マウス、ラットまたはウサギなどの動物に対して、酸性リピート蛋白質またはそのペプチドなどの遺伝子産物蛋白質の全体による免疫処置を行うことによって調製される。免疫処置を行った動物から脾細胞

を回収し、感作された脾細胞をマウスSP2/O骨髓腫細胞(ATCC、Manassas、VA)などの骨髓腫細胞株と融合させることによってハイブリドーマを作製する。細胞の融合はポリエチレングリコールの添加によって誘導する。ハイブリドーマは、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン(HAT)を含む選択培地中にある状態で細胞の平板培養を行うことによって化学的に選択する。

【0095】

続いて、ハイブリドーマを、梅毒トレポネーマ免疫原性蛋白質に対するモノクローナル抗体を産生する能力に関してスクリーニングする。スクリーニングの目的に用いる免疫原性蛋白質は、分析した標本から入手する。または、このような蛋白質には、当業者に既知の方法に従って作製した組換えペプチドも含まれる。免疫原性蛋白質標本と結合する抗体を産生するハイブリドーマのクローニングを行い、増殖させて、将来の産生のために凍結保存する。好ましいハイブリドーマは、IgGアイソタイプを有するモノクローナル抗体を産生するものである。

【0096】

好ましいポリクローナル抗体は、マウスまたはウサギなどの動物に対して、上記の免疫原性蛋白質またはペプチドによる免疫処置を行うことによって調製される。その後、動物から採血し、血清中の抗体を免疫原性蛋白質、好ましくは上記のモノクローナル抗体と反応する抗原に対する結合反応性に関してスクリーニングする。

【0097】

以下に述べるように、生物試料中の梅毒トレポネーマの同定のために、モノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体、またはその両方を検出可能な標識で直接的に標識してもよい。イムノアッセイ法に用いるための標識は当業者に一般に知られており、これには酵素、放射性同位体、ならびにコロイド金およびラテックスビーズなどの着色粒子を含む蛍光性、発光性および発色性物質が含まれる。イムノアッセイ法における非反応成分からの抗体-抗原複合体の分離を容易にするために、抗体を固相に結合させてもよい。固相物質の例には、マイクロタイタープレート、試験管、磁性、プラスチック製またはガラス製のビーズおよびスライドが非制限的に含まれる。抗体を固相に結合させるための方法は当業者に周

知である。

【0098】

または、プロテインAもしくはGまたは二次抗体などの、免疫グロブリンに対する親和性のある標識物質との反応によって抗体を間接的に標識してもよい。抗体を第2の物質と結合させ、抗体と結合した第2の物質に対する親和性のある標識した第3の物質を用いて検出してもよい。例えば、抗体をビオチンと結合させ、標識したアビジンまたはストレプトアビジンを用いて抗体-ビオチン結合物を検出することができる。同様に、抗体をハプテンと結合させ、標識した抗ハプテン抗体を用いて抗体-ハプテン結合物を検出することもできる。抗体およびアッセイ結合物を標識する上記およびその他の方法は当業者に周知である。

【0099】

1つの好ましい態様においては、検出可能な標識で標識した二次抗体との反応により、抗体を間接的に標識する。二次抗体は、好ましくは、モノクローナル抗体の由来となった動物の抗体と結合するものである。言い換えると、モノクローナル抗体がマウス抗体である場合には、標識した二次抗体は抗マウス抗体である。以下に記載のイムノアッセイ法にモノクローナル抗体を用いる場合、この標識は好ましくは抗体でコーティングされたビーズ、特に磁性ビーズである。本明細書に記載のイムノアッセイ法にポリクローナル抗体を用いる場合、標識は好ましくは、放射性、蛍光性、または電気化学発光性の物質などの検出可能な分子である。

【0100】

梅毒トレポネーマのイムノアッセイ法

上記の梅毒トレポネーマ抗体の検出のために1つもしくは複数の組換えもしくは単離された蛋白質またはペプチドを用いる、高感度の梅毒トレポネーマ用イムノアッセイ法を提供する。本イムノアッセイ法は、さまざまな試料、特にヒトまたは動物の体液などの生物試料における梅毒トレポネーマ感染の存在を検出するために有用である。試料は梅毒トレポネーマの菌体が存在する可能性のある任意の供給源から入手しうる。

【0101】

第1の好ましい態様では、梅毒トレポネーマ抗体の存在を検出するために抗原蛋白質またはペプチドを用いるイムノアッセイ法をデザインする。これは、蛋白質またはペプチドで固相をコーティングすることによって実現される。その後、生物試料を、コーティングされた表面とともにインキュベートし、抗体を蛋白質/ペプチドと結合させる。一例となる手順は、室温を上回る温度、好ましくは約20 ~ 45 の温度で約10 ~ 150分間、生物試料およびコーティングされた表面をインキュベートすることである。より好ましくは、生物試料およびコーティングされた表面を、約37 の温度で約60分間にわたり暗所下でインキュベートする。このイムノアッセイ法の結果から、梅毒トレポネーマ感染に関する直接的な指標が得られる。

【0102】

当業者は、梅毒トレポネーマ感染の検出のための任意の不均一性または均一性（競合性）イムノアッセイ法に、上記の抗原（arpペプチドまたは蛋白質）の1つまたは複数を用いることを理解すると考えられる。上記の通り、本明細書で提供するイムノアッセイ法に用いるために、ペプチドを固相にコーティングするが、固相にはこのような用途に適した任意の物品が含まれる。適した物品は当業者に周知であり、これにはラテックス粒子、濾紙、およびガラスビーズが含まれるがこれらに限定されることはない。好ましい固相は、ダイネックステクノロジーズ（Dynex Technologies）社（Chantilly, Virginia）が販売しているImmunlon 2HB（商標）プレートなどの市販のELISAマイクロタイタープレートである。

【0103】

この好ましい方法によれば、固相に結合した抗原、および抗体を含む液体を、抗体と抗原との結合が促される条件下で十分な期間にわたって反応させる。イムノアッセイ試薬およびおよび試料をさまざまな組み合わせおよび順序で反応させることを当業者は理解すると考えられる。

【0104】

固相に結合した試薬を結合していない試薬から分離するためには、粒子の濾過、コーティングされたチューブまたはウェルからの反応溶液のデカンテーション、磁気分離、毛管作用、および当業者に既知の他の手段などの物理的手段を用い

る。固相の分離洗浄を本方法に含めてもよいことは理解されると考えられる。

【0105】

イムノアッセイ法において形成された抗原-抗体複合体は、当業者に知られた方法を用いて検出される。複合体を、検出マーカーで標識した抗ヒト免疫グロブリン抗体に曝露させる。このようなマーカーには、西洋ワサビペルオキシダーゼなどの化学発光性標識；FITCなどの電気化学発光性標識；ならびにアルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、および西洋ワサビペルオキシダーゼなどの酵素性標識が含まれる。好ましくは、検出抗体をペルオキシダーゼ標識の添加によって修飾する。

【0106】

続いて、標識された複合体を、用いた標識に対して特異的な検出法または装置を用いて検出する。好ましくは、ペルオキシダーゼの検出用にセレス (Ceres) 900 HDL (BioTek Instrument, Inc., Winooski, Vermont) などのELISA読み取り機を用いて複合体を分析する。または、FITC標識の検出のためにベクトン-ディッキンソン (Becton-Dickinson) 社のFACSソーター (Franklin Lakes, New Jersey) を用いてもよい。また、アッセイ法で分析する試料のバックグラウンド値を決定するために、同じアッセイ形式において、可溶性の抗原または抗体を非特異的抗体でコーティングした磁性ビーズとインキュベートすることもできる。

【0107】

第2の好ましい態様では、生体液における梅毒トレポネーマ由来のarpペプチドおよび/または蛋白質の存在を検出するために抗arpモノクローナル抗体 (またはポリクローナル抗体) を用いるイムノアッセイ法をデザインする。これは、蛋白質またはペプチドを抗体と結合させるために生物試料をインキュベートすることによって実現される。一例となる手順は、室温を上回る温度、好ましくは約20~45の温度で約10~150分間、より好ましくは約37で60分間、暗所下でインキュベートすることである。このイムノアッセイの結果から、梅毒トレポネーマ感染の存在に関する直接的な指標が得られる。

【0108】

梅毒トレポネーマ感染の検出のための任意の不均一性または均一性、競合性イ

ムノアッセイ法に上記の抗体の1つまたは複数を用いることを当業者は理解すると考えられる。上記の通り、本明細書で提供するイムノアッセイ法に用いるためには、抗体を検出可能な標識で標識する、または固相に結合させる。モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の両方をアッセイ法に用い、モノクローナル抗体を固相に結合させ、ポリクローナル抗体を検出可能な標識で標識することが好ましい。固相には、ラテックス粒子、濾紙、およびガラスビーズを含むがこれらに限定されることはない、このような用途に適した当業者に周知の任意の粒子が含まれうる。好ましい固相は、ダイネックステクノロジーズ (Dyner Technologies) 社 (Chantilly, Virginia) が販売している Immunolon 2HB (商標) プレートなどの市販のELISAマイクロタイタープレートである。

【0109】

この好ましい方法によれば、試料、および固相と結合した抗体を、抗体と試料中の免疫原性蛋白質との結合が促される条件下で十分な期間にわたって反応させる。免疫原性蛋白質には、好ましくは酸性リピート蛋白質が含まれる。イムノアッセイ試薬およびおよび試料をさまざまな組み合わせおよび順序で反応させうることを当業者は理解すると考えられる。固相に結合した試薬を結合していない試薬から分離するためには、粒子の濾過、コーティングされたチューブまたはウェルからの反応溶液のデカンテーション、磁気分離、毛管作用、および当業者に知られた他の手段などの物理的手段を用いる。固相の分離洗浄を本方法に含めてもよいことは理解されると考えられる。

【0110】

イムノアッセイ法において形成された抗原-抗体複合体は、サンドイッチイムノアッセイ法および競合イムノアッセイ法を含む、当業者に知られた方法を用いて検出される。抗体-抗原複合体を、抗原の捕捉のために用いたものと類似している抗体であって、ここでは検出可能な標識で標識した抗体に曝露させる。適した標識には、西洋ワサビペルオキシダーゼなどの化学発光性標識；ルテニウムおよびエクオリンなどの電気化学発光性標識；ルシフェラーゼなどの生物発光性標識；FITCなどの蛍光性標識；ならびにアルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼおよび西洋ワサビペルオキシダーゼなどの酵素性標識が含まれる。好まし

くは、標識を電気化学発光によって検出する。最も好ましくは、検出抗体をペルオキシダーゼ標識の添加によって修飾する。

【0111】

続いて、標識された複合体を、用いた標識に対して特異的な検出法または装置を用いて検出する。好ましくは、ペルオキシダーゼの検出用にセレス (Ceres) 900 HDL (BioTek Instrument, Inc., Winooski, Vermont) などのELISA読み取り機を用いて複合体を分析する。または、FITC標識の検出のためにベクトン-ディッキンソン (Becton-Dickinson) 社のFACSソーター (Franklin Lakes, New Jersey) を用いてもよい。また、アッセイ法で分析する試料のバックグラウンド値を決定するために、同じアッセイ形式において、可溶性の抗原または抗体を非特異的抗体または特異的抗体でコーティングした磁性ビーズとインキュベートすることもできる。

【0112】

アッセイ法の特徴

本明細書で提供するイムノアッセイ法により、試料中の梅毒トレポネーマを検出することが可能となり、それによって疾患の症状発現に関して感染の転帰を現実的に示すことが可能になる。

【0113】

本明細書に記載の検出アッセイ法は、それが特定の遺伝子配列を代表する免疫原性もしくは抗原性蛋白質、またはそのような蛋白質に対する抗体の検出に基づいているために有効である。先行技術の方法とは異なり、本発明の検出アッセイ法は、梅毒トレポネーマに一般に付随する膜結合型抗原蛋白質には関係しておらず、すなわち検出には分泌蛋白質の認識を用いることから、その結果は細胞膜に係留または遮蔽された蛋白質によって妨げられない。分泌蛋白質に基づく検出は、膜アンカー型蛋白質と比べて早期の免疫応答を誘発する可能性が高いことから好ましい。

【0114】

本アッセイ法は、患者における感染のレベルを同定するために用いるため、疫学的な理由からも有用である。例えば、酸性リピート蛋白質が高レベルである

ことは、進行期の疾患と相関すると思われる。疾患の早期での診断は有効な治療の早期開始につながり、その後、より重篤な状態に悪化するのを防ぐことができるため、これは特に重要である。本明細書に記載のアッセイ法とは異なり、梅毒トレポネーマに対して現在用いるアッセイ法は、多大な処理時間を要し、典型的には膜結合型蛋白質である抗原性マーカーの検出に依拠しているため、一般に不正確であり、有効でないと考えられる。

【0115】

当技術分野で現在用いられているアッセイ法とは異なり、本明細書に記載の方法では、分泌された抗原蛋白質またはそのような蛋白質に対する抗体の認識によって梅毒トレポネーマを検出する。この種の認識の利点は、アッセイ法が、粒子状態にある寄生体を認識することにも、通常は宿主免疫系から遮蔽されている膜結合型蛋白質の存在を検出することにも依存しないことにある。分泌蛋白質抗原の存在に基づく検出により、方法の感度が高まるとともに正確な診断のための期間も短縮され、これによって第1期梅毒の発見が可能となる。

【0116】

梅毒トレポネーマ感染症の鑑別診断

梅毒トレポネーマパリダム亜種に関するヌクレオチド配列およびアミノ酸配列（それぞれ配列番号：1および2）を提供することに加えて、本発明は、梅毒トレポネーマペルテニユ亜種（それぞれ配列番号：3および4、ならびに図6）、および梅毒トレポネーマエンデミカム亜種（それぞれ配列番号：5および6、および図7）に対応する、これまで同定されていなかったヌクレオチドおよびアミノ酸配列も提供する。したがって、当業者は、本発明によって開示される梅毒トレポネーマ感染症の鑑別診断のための技法を用い、それによって疾患の原因病原体が梅毒トレポネーマパリダム亜種、梅毒トレポネーマペルテニユ亜種、または梅毒トレポネーマエンデミカム亜種であると同定しうる。この発見は、それによって疾患のそれ以上の拡がりを抑制することが容易となるため、感染症の早期発見および同定のために特に有意義である。加えて、トレポネーマの亜種のそれぞれを特異的に同定することにより、治療的処置に用いる特異的抗体の開発も可能となる。個々の亜種を特異的に同定するもう1つの利点は、梅毒、イチゴ腫またはベ

ジェルといった特定の疾患の発現を予測し、種々の症状を予防する、または少なくとも軽減するための適切な方策をとることが可能になると思われることである。

【0117】

本発明者らは以下の理論に拘束されることを望むものではないが、arp蛋白質に対する抗体価は菌体が消失すれば低下すると考えられている。このことは、抗トレポネーマ抗体の免疫的検出のためにarpペプチド/蛋白質を用いるアッセイ法を、現在の感染と以前の感染との鑑別に用いる可能性を示唆する。

【0118】

以下の実施例によって本発明をさらに例示するが、これはいかなる意味でもその範囲を制限するものとみなされるべきではない。その反対に、本明細書の説明を読むことにより、当業者には本発明の精神を逸脱することなく、このような手段に対してさまざまな他の態様、改変、および同等物を想定しうることが明らかに理解されるべきである。

【0119】

実施例1

酸性リピート蛋白質の特徴

梅毒トレポネーマ(ニコルス株、CDC-2株、およびボスニア株)から酸性リピート蛋白質をコードする遺伝子をクローニングした。ヌクレオチド配列は、配列番号:1、3および5に示されている(Genebankアクセッション番号AF015824)。

【0120】

ニコルス株のarp蛋白質は、1つの膜貫通ドメイン、1つのシグナルペプチダーゼI切断部位、および14個のほぼ同一な反復配列を特徴とする(図2参照)。図2の上部は、その一次配列による蛋白質の疎水性プロットを表している。蛋白質の大部分は親水性であり、このことから、本発明者らは以下の理論に拘束されることを望むものではないが、この特性は蛋白質の抗原性指数に対応すると考えられている(図2の下部)。N末端には疎水性アミノ酸の連鎖(aa27~aa43)があり、疎水性プロットにおける陥凹部を構成している。この領域は膜貫通ドメインと考えられる。膜貫通ドメインのすぐ後にはシグナルペプチダーゼI切断部位と考え

られるものがある。arp蛋白質の最大の特徴は、それぞれ長さ20アミノ酸のほとんど同一な14個の反復配列である。この反復配列にはグルタミン酸が非常に多く、予想されるpIが4.3と低い原因になっている。この反復配列はそれらの類似性に従って4つの種類に分類される。II型反復配列は反復配列全体の42%（14個中6個）を占める主要なタイプである。梅毒トレポネーマ種のほとんどはこの種の反復配列を有すると予想されている。本発明者らは、この反復領域から生じるペプチドが血清診断に最も有用であることを見いだした。このことを以下に示す。

【0121】

実施例2

梅毒の診断におけるarp蛋白質の考えられる使用法

以下の検討は、免疫原性ペプチドの領域に重点を置いてarp蛋白質の特徴をさらに明らかにする目的で行った。新たに同定された免疫原性ペプチドは、改善された優れた感度を有する免疫的診断キットを作製するための標的として役立つ。

【0122】

まず、arp蛋白質の疎水性プロットおよびその蛋白質配列から予想された抗原性指数を見いだした後、本発明者らは、arp蛋白質における特定の領域に免疫原性があると仮定した。蛋白質の反復配列からペプチド断片を調製し、ウサギへの免疫処置に用いた。ペプチド免疫処置を行ったウサギから得た血清は、arp遺伝子を含むプラスミドから発現された組換え蛋白質を認識することが明らかになった。さらに、トレポネーマに感染したウサギからの血清もこの組換え蛋白質を認識した（図1にウエスタンプロット分析の結果を示している：レーン1=抗梅毒トレポネーマ血清によって認識された、梅毒トレポネーマ全蛋白質；レーン2=梅毒トレポネーマ全蛋白質抽出物中のarpを同定できなかった、抗ペプチド[1,2,3]血清；レーン3=抗arpペプチド血清によって同定された、組換えarp蛋白質；レーン4=抗梅毒トレポネーマ血清によって同定された、arp蛋白質；レーン5=抗原処置前採血（pre-bled）（抗原注射直前に採血した）対照）。

【0123】

実施例3

梅毒トレポネーマリピート蛋白質のペプチドに対する免疫応答

この実験には、arp蛋白質の異なる領域から設計したペプチドを用いた（表1参照）。これらのペプチド断片に対する反応性を決定するために、梅毒性ヒト血清をELISAアッセイ法にて用いた。梅毒性血清は、市販のRPR検査キットによれば、急速血漿リアギン（RPR）陽性または陰性（RPR+またはRPR-）のいずれかであった。RPR+血清のほとんどはarpペプチド3、7および9と強く反応するが、RPR-血清はいずれもどのペプチドとも反応しないことが見いだされた。反応性は1：100の希釈度で検出された（市販のほとんどのELISAキットは検出用に1：20の希釈度を用いている）。

【0124】

その他のペプチド（ペプチド1～12、ただし3、7および9は除く）は、arp蛋白質のN末端もしくはC末端、またはI型、III型、もしくはIV型反復配列のいずれかに由来するものであった。本発明者らは以下の記載に拘束されることを望むものではないが、これらの梅毒性血清とペプチドとの反応性に基づく分析は、免疫原性領域の1つがアミノ酸DVPKに限局していることを示している。

【0125】

この検討の結果を図3に図示している。

【0126】

【表1】

ペプチド番号	アミノ酸配列	配列番号
arp 1	LVSPREVEDAPKVVVEPAS	配列番号： 7
arp 2	SREVEDAPKVVVEPASEREGG	配列番号： 8
arp 3	PKVVVEPASEREGGEREVEDA	配列番号： 9
arp 4	PKNTAVEISNLEKNAKAQAVV	配列番号： 10
arp 5	GHAGIPGLLVSLAPAAAQLGIGVY	配列番号： 11
arp 6	VPARPAQRDPLSSPPAGHTVPEYRD	配列番号： 12
arp 7	VVEPASEREGGEREVEDVVKV	配列番号： 13
arp 8	VVEPASGHEGGEREVASQHTKQPSHS	配列番号： 14
arp 9	EVEDVVKVVVEPASEREGGER	配列番号： 15
arp 10	EVENVVKVVVEPASEREGGER	配列番号： 16
arp 11	EVEDAPKVVVEPASEREGGER	配列番号： 17
arp 12	EVEDVPGVVVEPASGHEGGER	配列番号： 18

【0127】

実施例4

梅毒トレポネーマ亜種のarp蛋白質の間の配列比較

梅毒トレポネーマの亜種である梅毒トレポネーマベルテニユ亜種および梅毒トレポネーマエンデミカム亜種のそれぞれからのCDC-2株およびボスニア株という2つの菌株のarp遺伝子をクローニングして検討した。遺伝子配列からは梅毒トレポネーマパリダム亜種のニコルス株との著明な相同性が認められた。3つの亜種の遺伝子の5'末端および3'末端は完全に同一であったが、反復領域には若干の違

いが認められた。興味深い観察所見は、2つの亜種の翻訳されたarp蛋白質で、単一の種類の反復配列、すなわちニコルス株において主要なタイプであるII型の反復配列が認められたことであった。この所見は、主要なタイプの反復配列（II型）を有する領域で合成されたペプチドに免疫原性があることを裏づける（図4に示す通り）。他の反復配列（I型、III型およびIV型）も免疫原性である。

【0128】

以上の詳細な説明から、当業者には本方法の改変および変形が明らかであると考えられる。このような改変および変形は添付する特許請求の範囲の範囲に含まれるものとする。

【0129】

実施例5

arpペプチドを用いたELISAアッセイ法により、梅毒感染症が2つの異なるステージに分類された

この実験にはペプチドarp#9（配列番号：15）を用いた（図8）。梅毒に現在感染している患者から採取した血清をELISAアッセイ法にて検討した。この試験の患者はすべて潰瘍標本におけるPCR反応が陽性であった。患者を早期感染（IgM陽性）、間欠的感染（IgMおよびIgGがいずれも陽性）および晩期感染（IgGのみ陽性）に分類しうることが明らかになった。

【0130】

実施例6

梅毒感染の迅速フローサイトメトリー分析

免疫学検査室ではフローサイトメーターがルーチンのように用いられている。Luminex（商標）社は、多数の疾患および疾患マーカーの診断を同時に容易に行えるシステムを開発している。現在すでに開発済みの検査または開発中の検査には、ヒトサイトカイン（IL-2、3、4、6など）ならびにウイルス性および細菌性感染（HIV、肝炎など）に関するものが含まれる。arp#9ペプチドをビオチン分子と結合させた。このビオチン化ペプチドをさらに、Luminex（商標）社が販売しているストレプトアビジンと結合させた。このシステムで2種類の血清を検討した。RPR+血清は本アッセイ法にて強く反応するが、RPR-の正常血清は蛍光反応のバツ

クグラウンドレベルが非常に低いことが明らかであった(図9)。この結果から、ルミネックス社のシステムを用いて、本発明者らのarpペプチドビーズを他の臨床検査と組み合わせられる可能性が示された。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> The Government of the United States ...

<120> Compositions and Methods for Detecting *Treponema Pallidum*

<130> 03063-0621WP

<140>

<141>

<150> 60/138,981

<151> 1999-06-14

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2945

<212> DNA

<213> *Treponema pallidum*

<220>

<221> CDS

<222> (919)..(2217)

<220>

<223> Subspecies: pallidum (Nichols strain)

<400> 1

gtcgatgcac agctgacgct ctcaggctct gcacatattg cgcggctggt gccgacatct 60
ctcctgccac ctgctacagt gtcaggttca tcggggaatt gaggaaactg ttatccgcgc 120
tccccatctt ccgatactgg atcgggtgctg gggggagttag gagggggaa gcgtctgtgc 180
tgtatcgcgc tggatgatgcg cgcgttctgg tacctcagtg cgaagggagt cagtategct 240
tacgtgcccg ttcctcgcag tggggctct caagattcga gcatgagcac agcagtgggc 300
gatacgcctc ttaacgcctt cttcagcag ggaatggtgg ttacggcagt accgccgggt 360
gtacacgacg gccagactat agcagaaatt gctgcatggt ttgaagtaat gcccgattac 420
gcgttgttgg tgcagtttca ttccgctcgt ctccctggtg gggaaagccc tacctcccgt 480
gcccgccggcg cttggtcttc agagaggttc cgtgctgtgt ggacattagt ggatttgcac 540
acgcagcgcg cgtgtgtcta tgcgtgtgtc gcccataca gggagagtat tcccgtttct 600
gagtggttgg acgtcgttac ccgttgtatt gcggagcagg caatttcgta catacgggtg 660
ggcacgagca ccgatacagc cggagttcag ttatagaaaa tagggaatac gtaaggtgtc 720
tgcagcgtcg cttcagctgg gaggagtctt atgattaaac gccacatggt cgcaaaaagg 780

gggtgcaaag gaagatctta cctgggttagg gtgaacactg cgttcttagt gctttgtgtt 840

gcttctgtca cgccgctttg ggctgtgtgg gaaggaatg cagaaattgg cccccaggga 900

agttttctgc aggacggc atg ttt gtg cgc agt gac atg ttc ccc aaa aac 951

Met Phe Val Arg Ser Asp Met Phe Pro Lys Asn

1 5 10

act gct gtt gaa att agc aac tta gaa aag aat gcc aag gct cag gca 999

Thr Ala Val Glu Ile Ser Asn Leu Glu Lys Asn Ala Lys Ala Gln Ala

15 20 25

gtg gtt att ggg cac gca ggg atc ccc ggt ctt cta gtt agc ctt gca 1047

Val Val Ile Gly His Ala Gly Ile Pro Gly Leu Leu Val Ser Leu Ala

30 35 40

ccc gct gct gca gca cag ctt ggg att ggc gta tac caa gct gtg cgt 1095

Pro Ala Ala Ala Ala Gln Leu Gly Ile Gly Val Tyr Gln Ala Val Arg

45 50 55

gta cgc gta cgt acc ttg ggt acc gtg cgc ggt ggg tct caa aca agt 1143

Val Arg Val Arg Thr Leu Gly Thr Val Arg Gly Gly Ser Gln Thr Ser

60 65 70 75

cag gac gga ctg tcc ctt gca tct ttg ccg tcc cgt gtg cct gcg cgc 1191

Gln Asp Gly Leu Ser Leu Ala Ser Leu Pro Ser Arg Val Pro Ala Arg

80 85 90

ccc gcg cag cgt gat cct ctg tca tcc ccg ccg gca ggt cac act gta 1239

Pro Ala Gln Arg Asp Pro Leu Ser Ser Pro Pro Ala Gly His Thr Val
 95 100 105

ccg gaa tat cgc gat acg gtt att ttc gat gac ccg cgt ttg gtt tcc 1287
 Pro Glu Tyr Arg Asp Thr Val Ile Phe Asp Asp Pro Arg Leu Val Ser
 110 115 120

cct ttg tct cgt gag gtg gag gac gcg ccg aag gta gtg gag ccg gcc 1335
 Pro Leu Ser Arg Glu Val Glu Asp Ala Pro Lys Val Val Glu Pro Ala
 125 130 135

tct gag cgt gag gga ggg gag cgt gag gtg gag gac gcg ccg aag gta 1383
 Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Ala Pro Lys Val
 140 145 150 155

gtg gag ccg gcc tct gag cgt gag gga ggg gag cgt gag gtg gag gac 1431
 Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp
 160 165 170

gtg ccg aag gta gtg gag ccg gcc tct gag cgt gag gga ggg gag cgt 1479
 Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg
 175 180 185

gag gtg gag gac gcg ccg aag gta gtg gag ccg gcc tct gag cgt gag 1527
 Glu Val Glu Asp Ala Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu
 190 195 200

gga ggg gag cgt gag gtg gag gac gtg ccg aag gta gtg gag ccg gcc 1575
 Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala

205	210	215	
tct gag cgt gag gga ggg gag cgt gag gtg gag aac gtg ccg aag gta	1623		
Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asn Val Pro Lys Val			
220	225	230	235
gtg gag ccg gcc tct gag cgt gag gga ggg gag cgt gag gtg gag gac	1671		
Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp			
	240	245	250
gcg ccg aag gta gtg gag ccg gcc tct gag cgt gag gga ggg gag cgt	1719		
Ala Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg			
	255	260	265
gag gtg gag gac gcg ccg aag gta gtg gag ccg gcc tct gag cgt gag	1767		
Glu Val Glu Asp Ala Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu			
	270	275	280
gga ggg gag cgt gag gtg gag gac gtg ccg aag gta gtg gag ccg gcc	1815		
Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala			
	285	290	295
tct gag cgt gag gga ggg gag cgt gag gtg gag gac gtg ccg aag gta	1863		
Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val			
300	305	310	315
gtg gag ccg gcc tct gag cgt gag gga ggg gag cgt gag gtg gag gac	1911		
Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp			
	320	325	330

gtg ccg aag gta gtg gag ccg gcc tct gag cgt gag gga ggg gag cgt 1959
 Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg
 335 340 345

gag gtg gag gac gtg ccg aag gta gtg gag ccg gcc tct gag cgt gag 2007
 Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu
 350 355 360

gga ggg gag cgt gag gtg gag gac gtg ccg ggg gta gtg gag ccg gcc 2055
 Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Gly Val Val Glu Pro Ala
 365 370 375

tct ggg cat gaa gga ggg gag cgt gag gtg gag gac gtg ccg ggg gta 2103
 Ser Gly His Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Gly Val
 380 385 390 395

gtg gag ccg gcc tct ggg cat gaa gga ggg gag cgt gag gtc gct tct 2151
 Val Glu Pro Ala Ser Gly His Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Ala Ser
 400 405 410

cag cat acg aag cag cca tcc cac tcg gtt tcc aac tca gct ccc aat 2199
 Gln His Thr Lys Gln Pro Ser His Ser Val Ser Asn Ser Ala Pro Asn
 415 420 425

cag ttt cgg aaa ccc tga gggggaactc ccctttacgc tccctgacct 2247
 Gln Phe Arg Lys Pro
 430

atccgagtca gaaattgtgg ttccggagga acagaaagga cgtgcgcata cccaggtgat 2307

acccgagggt gcgccacgtg gactgcaacc tgggtgaatac tacgtacaga ttgcagtctt 2367

tcatgaagct atccaggtgc agagcattgt ccaccgttac ggggtagaat accccatcgc 2427

agtggagcag gacatccatg aaggttaaggc gcgtttcacc gtatgcgtcg gtctctgcca 2487

aaaagacgaa cgcggcgcgg tactagagaa cttccaaagg tttggattca aggagcctt 2547

tctgaaaaag gcgcatgat caggtcggcc ctctcttcc cctcgtgacc gtggtgactc 2607

gccccgaagg gggcgcacag agccccgaagg aacggaaggg aaggggcaga cttactatt 2667

tctttgtttt ttgagcagc taaaacggcg ccctctcctt tgaaggcttt cctgcgcgg 2727

gagcggccat gtagcgaacg gagttactgt ctatcagctc gtacagctct ttctcgtcgc 2787

gtgccttcga ttgctccgag gacacaagcg agagtccgac aattccgtct tcacgtacca 2847

tcacgtacc gcgatacgtc agaggagaag gtgccgactt cttctcaagg gcaagctcta 2907

ccttttgccg agtgccatcc gcgttgaacg tcacagtc 2945

<210> 2

<211> 432

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

<400> 2

Met Phe Val Arg Ser Asp Met Phe Pro Lys Asn Thr Ala Val Glu Ile

1 5 10 15

Ser Asn Leu Glu Lys Asn Ala Lys Ala Gln Ala Val Val Ile Gly His

20 25 30

Ala Gly Ile Pro Gly Leu Leu Val Ser Leu Ala Pro Ala Ala Ala Ala

35 40 45

Gln Leu Gly Ile Gly Val Tyr Gln Ala Val Arg Val Arg Val Arg Thr

50 55 60

Leu Gly Thr Val Arg Gly Gly Ser Gln Thr Ser Gln Asp Gly Leu Ser

65 70 75 80

Leu Ala Ser Leu Pro Ser Arg Val Pro Ala Arg Pro Ala Gln Arg Asp

85 90 95

Pro Leu Ser Ser Pro Pro Ala Gly His Thr Val Pro Glu Tyr Arg Asp

100 105 110

Thr Val Ile Phe Asp Asp Pro Arg Leu Val Ser Pro Leu Ser Arg Glu

115 120 125

Val Glu Asp Ala Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly

130 135 140

Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser
 305 310 315 320

Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val
 325 330 335

Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val
 340 345 350

Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu
 355 360 365

Val Glu Asp Val Pro Gly Val Val Glu Pro Ala Ser Gly His Glu Gly
 370 375 380

Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Gly Val Val Glu Pro Ala Ser
 385 390 395 400

Gly His Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Ala Ser Gln His Thr Lys Gln
 405 410 415

Pro Ser His Ser Val Ser Asn Ser Ala Pro Asn Gln Phe Arg Lys Pro
 420 425 430

<210> 3

<211> 699

<212> DNA

<213> *Treponema pallidum*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(699)

<220>

<223> Subspecies: *pertenue* (CDC-2 strain)

<400> 3

```

atg ttt gtg cgc agt gac atg ttc ccc aaa aac act gct gtt gaa att   48
Met Phe Val Arg Ser Asp Met Phe Pro Lys Asn Thr Ala Val Glu Ile
   1             5             10             15

agc aac tta gaa aag aat gcc aag gct cag gca gtg gtt att ggg cac   96
Ser Asn Leu Glu Lys Asn Ala Lys Ala Gln Ala Val Val Ile Gly His
           20             25             30

gca ggg atc ccc ggt ctt cta gtt agc ctt gca ccc gct gct gca gca  144
Ala Gly Ile Pro Gly Leu Leu Val Ser Leu Ala Pro Ala Ala Ala Ala
           35             40             45

cag ctt ggg att ggc gta tac caa gct gtg cgt gta cgc gta cgt acc  192
Gln Leu Gly Ile Gly Val Tyr Gln Ala Val Arg Val Arg Val Arg Thr
           50             55             60

ttg ggt acc gtg cgc ggt ggg tct caa aca agt cag gac gga ctg tcc  240
Leu Gly Thr Val Arg Gly Gly Ser Gln Thr Ser Gln Asp Gly Leu Ser
           65             70             75             80

```


ccg aag gta gtg gag ccg gcc tct gag cgt gag gga ggg gag cgt gag 624
 Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu
 195 200 205

gtc gct tct cag cat acg aag cag cca tcc cac tog gtt tcc aac tca 672
 Val Ala Ser Gln His Thr Lys Gln Pro Ser His Ser Val Ser Asn Ser
 210 215 220

gct ccc aat cag ttt egg aaa ccc tga 699
 Ala Pro Asn Gln Phe Arg Lys Pro
 225 230

<210> 4

<211> 232

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

<400> 4

Met Phe Val Arg Ser Asp Met Phe Pro Lys Asn Thr Ala Val Glu Ile
 1 5 10 15

Ser Asn Leu Glu Lys Asn Ala Lys Ala Gln Ala Val Val Ile Gly His
 20 25 30

Ala Gly Ile Pro Gly Leu Leu Val Ser Leu Ala Pro Ala Ala Ala Ala
 35 40 45

Gln Leu Gly Ile Gly Val Tyr Gln Ala Val Arg Val Arg Val Arg Thr

50	55	60
Leu Gly Thr Val Arg Gly Gly Ser Gln Thr Ser Gln Asp Gly Leu Ser		
65	70	75
Leu Ala Ser Leu Pro Ser Arg Val Pro Ala Arg Pro Ala Gln Arg Asp		
	85	90
		95
Pro Leu Ser Ser Pro Pro Ala Gly His Thr Val Pro Glu Tyr Arg Asp		
	100	105
		110
Thr Val Ile Phe Asp Asp Pro Arg Leu Val Ser Pro Leu Ser Arg Glu		
	115	120
		125
Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly		
	130	135
		140
Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser		
	145	150
		155
		160
Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val		
	165	170
		175
Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val		
	180	185
		190
Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu		
	195	200
		205

Val Ala Ser Gln His Thr Lys Gln Pro Ser His Ser Val Ser Asn Ser
 210 215 220

Ala Pro Asn Gln Phe Arg Lys Pro
 225 230

<210> 5

<211> 939

<212> DNA

<213> *Treponema pallidum*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(939)

<220>

<223> Subspecies: *endemicum* (Bosnia strain)

<400> 5

atg ttt gtg cgc agt gac atg ttc ccc aaa aac act gct gtt gaa att 48

Met Phe Val Arg Ser Asp Met Phe Pro Lys Asn Thr Ala Val Glu Ile

1 5 10 15

agc aac tta gaa aag aat gcc aag gct cag gca gtg gtt att ggg cac 96

Ser Asn Leu Glu Lys Asn Ala Lys Ala Gln Ala Val Val Ile Gly His

20 25 30

gca ggg atc ccc ggt ctt cta gtt agc ctt gca ccc gct gct gca gca 144

Ala Gly Ile Pro Gly Leu Leu Val Ser Leu Ala Pro Ala Ala Ala Ala
 35 40 45

cag ctt ggg att ggc gta tac caa gct gtg cgt gta cgc gta cgt acc 192
 Gln Leu Gly Ile Gly Val Tyr Gln Ala Val Arg Val Arg Val Arg Thr
 50 55 60

ttg ggt acc gtg cgc ggt ggg tct caa aca agt cag gac gga ctg tcc 240
 Leu Gly Thr Val Arg Gly Gly Ser Gln Thr Ser Gln Asp Gly Leu Ser
 65 70 75 80

ctt gca tct ttg ccg tcc cgt gtg cct gcg cgc ccc gcg cag cgt gat 288
 Leu Ala Ser Leu Pro Ser Arg Val Pro Ala Arg Pro Ala Gln Arg Asp
 85 90 95

cct ctg tca tcc ccg ccg gca ggt cac act gta ccg gaa tat cgc gat 336
 Pro Leu Ser Ser Pro Pro Ala Gly His Thr Val Pro Glu Tyr Arg Asp
 100 105 110

acg gtt att ttc gat gac ccg cgt ttg gtt tcc cct ttg tct cgt gag 384
 Thr Val Ile Phe Asp Asp Pro Arg Leu Val Ser Pro Leu Ser Arg Glu
 115 120 125

gtg gag gac gtg ccg aag gta gtg gag ccg gcc tct gag cgt gag gga 432
 Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly
 130 135 140

ggg gag cgt gag gtg gag gac gtg ccg aag gta gtg gag ccg gcc tct 480
 Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser

145	150	155	160	
gag cgt gag gga ggg gag cgt gag gtg gag gac gtg ccg aag gta gtg				528
Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val				
	165	170	175	
gag ccg gcc tct gag cgt gag gga ggg gag cgt gag gtg gag gac gtg				576
Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val				
	180	185	190	
ccg aag gta gtg gag ccg gcc tct gag cgt gag gga ggg gag cgt gag				624
Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu				
	195	200	205	
gtg gag gac gtg ccg aag gta gtg gag ccg gcc tct gag cgt gag gga				672
Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly				
210	215	220		
ggg gag cgt gag gtg gag gac gtg ccg aag gta gtg gag ccg gcc tct				720
Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser				
225	230	235	240	
gag cgt gag gga ggg gag cgt gag gtg gag gac gtg ccg aag gta gtg				768
Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val				
	245	250	255	
gag ccg gcc tct gag cgt gag gga ggg gag cgt gag gtg gag gac gtg				816
Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val				
	260	265	270	

ccg aag gta gtg gag ccg gcc tet gag cgt gag gga ggg gag cgt gag 864
 Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu
 275 280 285

gtc gct tct cag cat acg aag cag cca tcc cac tcg gtt tcc aac tca 912
 Val Ala Ser Gln His Thr Lys Gln Pro Ser His Ser Val Ser Asn Ser
 290 295 300

gct ccc aat cag ttt cgg aaa ccc tga 939
 Ala Pro Asn Gln Phe Arg Lys Pro
 305 310

<210> 6

<211> 312

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

<400> 6

Met Phe Val Arg Ser Asp Met Phe Pro Lys Asn Thr Ala Val Glu Ile
 1 5 10 15

Ser Asn Leu Glu Lys Asn Ala Lys Ala Gln Ala Val Val Ile Gly His
 20 25 30

Ala Gly Ile Pro Gly Leu Leu Val Ser Leu Ala Pro Ala Ala Ala Ala
 35 40 45

Gln Leu Gly Ile Gly Val Tyr Gln Ala Val Arg Val Arg Val Arg Thr
 50 55 60

Leu Gly Thr Val Arg Gly Gly Ser Gln Thr Ser Gln Asp Gly Leu Ser
 65 70 75 80

Leu Ala Ser Leu Pro Ser Arg Val Pro Ala Arg Pro Ala Gln Arg Asp
 85 90 95

Pro Leu Ser Ser Pro Pro Ala Gly His Thr Val Pro Glu Tyr Arg Asp
 100 105 110

Thr Val Ile Phe Asp Asp Pro Arg Leu Val Ser Pro Leu Ser Arg Glu
 115 120 125

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

Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser
 145 150 155 160

Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val
 165 170 175

Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val
 180 185 190

Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu
 195 200 205

Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly
 210 215 220

Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser
 225 230 235 240

Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val
 245 250 255

Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu Asp Val
 260 265 270

Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu
 275 280 285

Val Ala Ser Gln His Thr Lys Gln Pro Ser His Ser Val Ser Asn Ser
 290 295 300

Ala Pro Asn Gln Phe Arg Lys Pro
 305 310

<210> 7

<211> 19

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

<400> 7

Leu Val Ser Pro Leu Arg Glu Val Glu Asp Ala Pro Lys Val Val Glu
 1 5 10 15

Pro Ala Ser

<210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

<400> 8

Ser Arg Glu Val Glu Asp Ala Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu
 1 5 10 15

Arg Glu Gly Gly
 20

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

<400> 9

Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu
 1 5 10 15

Val Glu Asp Ala

20

<210> 10

<211> 21

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

<400> 10

Pro Lys Asn Thr Ala Val Glu Ile Ser Asn Leu Glu Lys Asn Ala Lys

1

5

10

15

Ala Gln Ala Val Val

20

<210> 11

<211> 25

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

<400> 11

Gly His Ala Gly Ile Pro Gly Leu Leu Val Ser Leu Ala Pro Ala Ala

1

5

10

15

Ala Ala Gln Leu Gly Ile Gly Val Tyr

20

25

<210> 12

<211> 25

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

<400> 12

Val Pro Ala Arg Pro Ala Gln Arg Asp Pro Leu Ser Ser Pro Pro Ala

1

5

10

15

Gly His Thr Val Pro Glu Tyr Arg Asp

20

25

<210> 13

<211> 21

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

<400> 13

Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Glu

1

5

10

15

Asp Val Pro Lys Val

20

<210> 14

<211> 26

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

<400> 14

Val Val Glu Pro Ala Ser Gly His Glu Gly Gly Glu Arg Glu Val Ala

1 5 10 15

Ser Gln His Thr Lys Gln Pro Ser His Ser

20 25

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

<400> 15

Glu Val Glu Asp Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu

1 5 10 15

Gly Gly Glu Arg

20

<210> 16

<211> 20

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

<400> 16

Glu Val Glu Asn Val Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu
 1 5 10 15

Gly Gly Glu Arg
 20

<210> 17

<211> 20

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

<400> 17

Glu Val Glu Asp Ala Pro Lys Val Val Glu Pro Ala Ser Glu Arg Glu
 1 5 10 15

Gly Gly Glu Arg
 20

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> *Treponema pallidum*

<400> 18

Glu Val Glu Asp Val Pro Gly Val Val Glu Pro Ala Ser Gly His Glu
 1 5 10 15

Gly Gly Glu Arg
 20

【図面の簡単な説明】

【図1】 梅毒性ウサギ血清が組換えarp蛋白質を認識しうることを示す、ウエスタンブロットゲルの図面である。

【図2】 酸性リピート蛋白質の構造を示したものであり、膜貫通ドメインと考えられるもの、シグナルペプチダーゼI切断部位と考えられる位置、蛋白質の親水性プロット、および蛋白質の抗原性指数と考えられるものを示している。

【図3】 酸性リピート蛋白質の異なる領域から単離した種々のペプチド（黒四角は配列番号：9を表し、白丸は配列番号：10、黒丸は配列番号：13を表し、白三角は配列番号：14を表す）と梅毒ヒト血清との反応を示したグラフを提示している。

【図4】 ヒトにおける抗arp抗体の存在を検出するためのERISAの結果を示したグラフである。

【図5】 梅毒トレポネーマのヌクレオチド配列を提示している。

【図6】 梅毒トレポネーマパリダム亜種 (*Treponema pallidum* subspecies *pallidum*) の完全アミノ酸配列表 (配列番号：2) を提示しており、配列中に認められるさまざまな種類の反復配列も示している。

【図7】 梅毒トレポネーマペルテニュー亜種 (*Treponema pallidum* ssp. *Perthense*) (CDC-2株) のヌクレオチド配列を提示している。

【図8】 梅毒トレポネーマペルテニュー亜種CDC-2株の完全アミノ酸配列表 (配列番号：4) を提示しており、配列中に認められるさまざまな種類の反復配列も示している。

【図9】 梅毒トレポネーマエンデミカム亜種 (*Treponema pallidum* ssp. *endemicum*) (ボスニア株) のヌクレオチド配列を提示している。

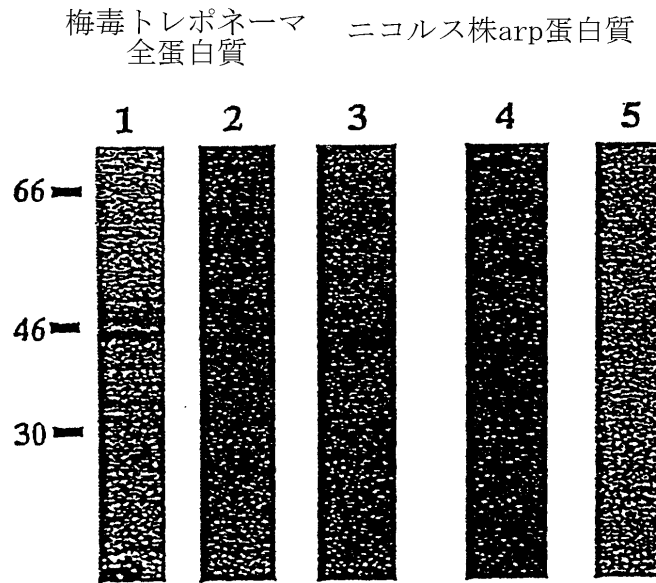
【図10】 梅毒トレポネーマエンデミカム亜種のボスニア株の完全アミノ酸配列表 (配列番号：6) を提示しており、配列中に認められるさまざまな種類の反復配列も示している。

【図11】 本発明の好ましいarp蛋白質の蛋白質配列を提示している。

【図12】 最近の梅毒感染 (第1期梅毒) がarpペプチドに対する血清学的反応に基づいて3つのステージに分けられることを示した2つのグラフである。

【図13】 arpペプチドを用いたヒト梅毒血清のフローサイトメトリー分析の結果を示した代表的なグラフである。

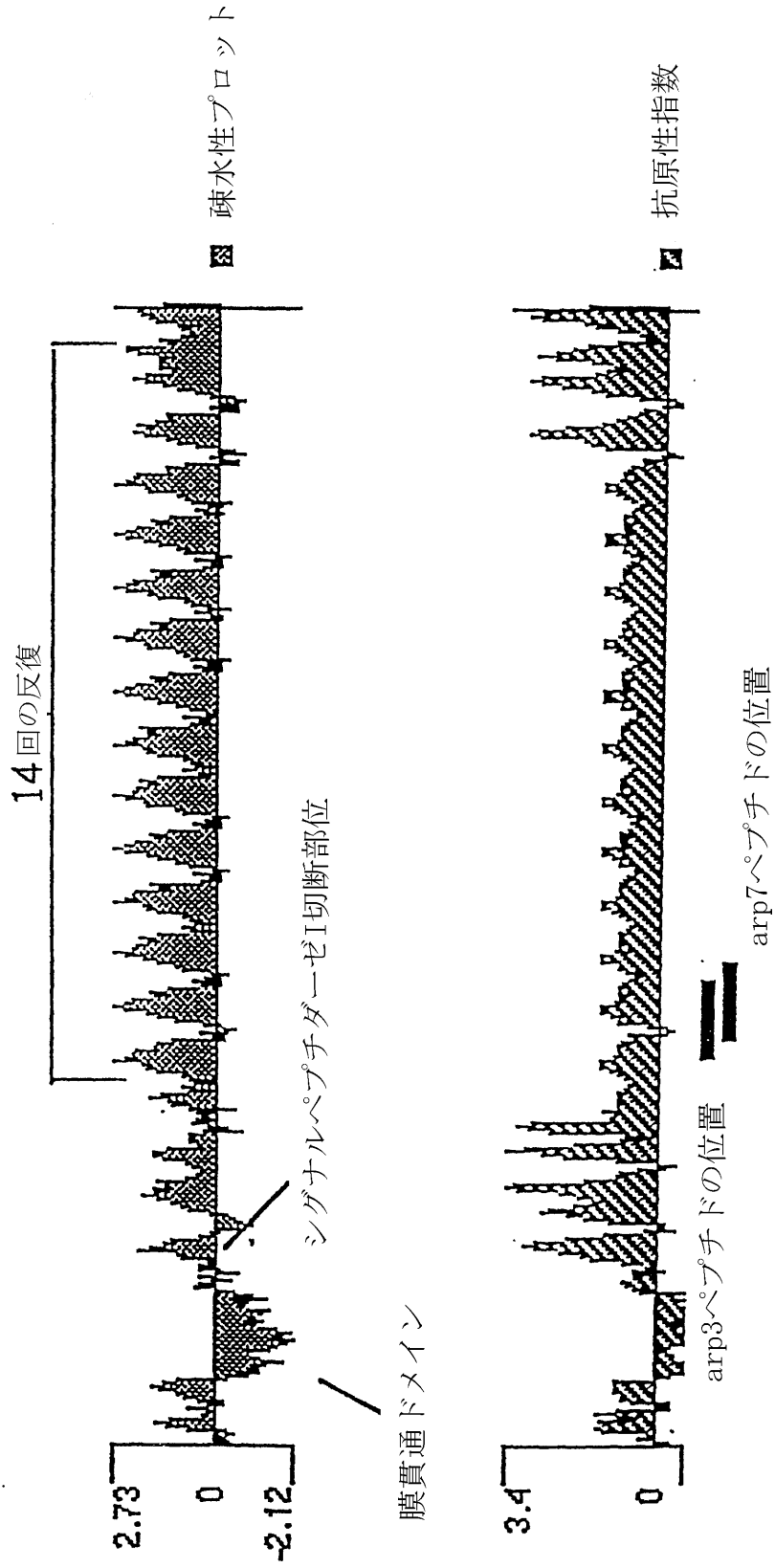
【図1】



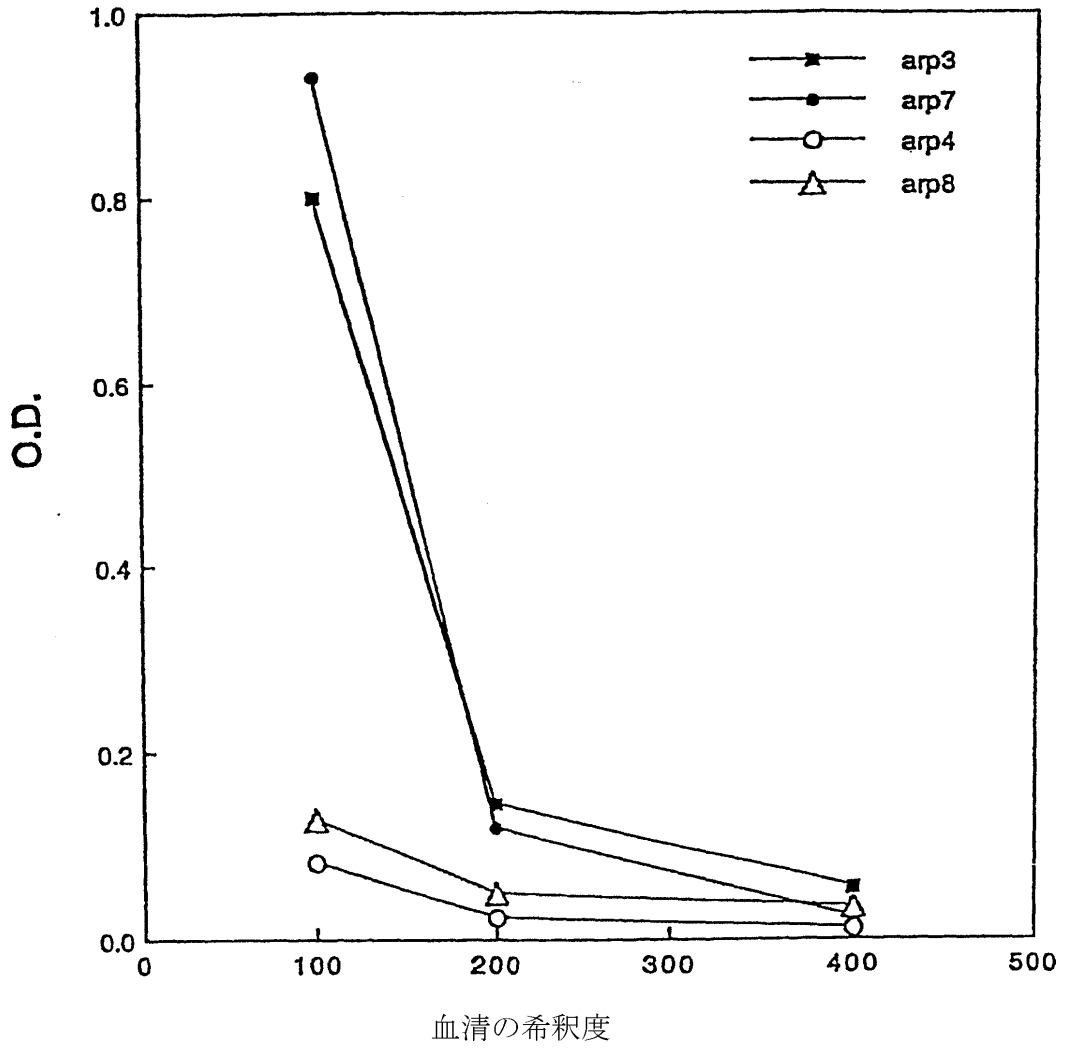
- 1, 4 抗梅毒トレポネーマ血清
- 2, 3 抗arpペプチド抗体
- 5 抗原処置前採血(pre-bled) (ウサギ)

【図2】

arp蛋白質の特徴

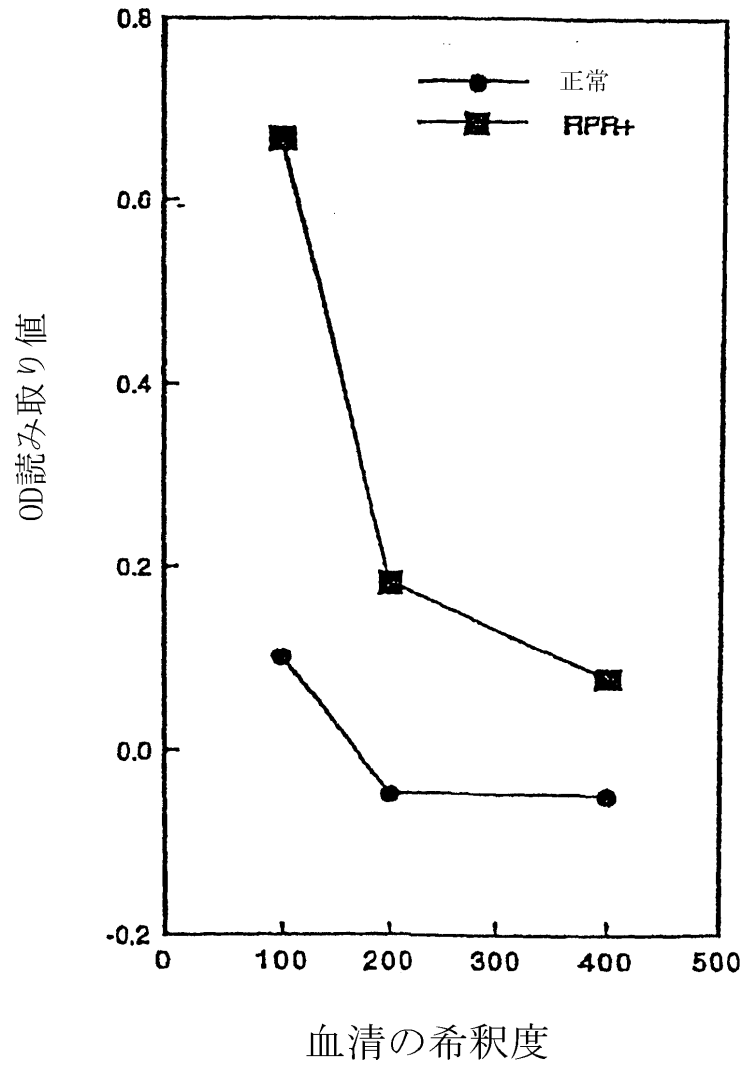


【図3】



【図4】

ペプチドarp#3を用いた
ヒト血清における抗arp抗体の検出



【図7】

梅毒トレポネーマペルテニユ亜種(*T. pallidum* ssp. *Pertenuis*) (CDC-2) ノクレオチド配列

ATGTTTGTGC	GCAGTGACAT	GTTCCCCAAA	AACACTGCTG	TTGAAATTAG
CAACTTAGAA	AAGAATGCCA	AGGCTCAGGC	AGTGGTTATT	GGGCACGCAG
GGATCCCCGG	TCTTCTAGTT	AGCCTTGAC	CCGCTGCTGC	AGCACAGCTT
GGGATTGGCG	TATACCAAGC	TGTGCCGTGA	CGCGTACGTA	CCTTGGGTAC
CGTGCCGGGT	GGGTCTCAA	CAAGTCAGGA	CGGACTGTCC	CITGCACTTT
TGCCGTCCCC	TGTGCCCTGCG	CGCCCCGGC	AGCGTGATCC	TCTGTCAATCC
CCGCCGGCAG	GTCACACTGT	ACCGGAATAT	CGCGATACGG	TTATTTTCGA
TGACCCGGGT	TTGGTTTCCC	CITTTGTCTCG	TGAGGTGGAG	GACGTGCCCGA
AGGTAGTGGA	GCCGGCCTCT	GAGCGTGAGG	GAGGGGAGCG	TGAGGTGGAG
GACGTGCCGA	AGGTAGTGA	GCCGGCCTCT	GAGCGTGAGG	GAGGGGAGCG
TGAGGTGGAG	GACGTGCCGA	AGGTAGTGA	GCCGGCCTCT	GAGCGTGAGG
GAGGGGAGCG	TGAGGTGGAG	GACGTGCCGA	AGGTAGTGA	GCCGGCCTCT
GAGCGTGAGG	GAGGGGAGCG	TGAGGTGGAG	TCTCAGCATA	CGAAGCAGCC
ATCCCACTCG	GTTCCAACT	CAGCTCCCAA	TCAGTTTTCGG	AAACCCTGA

梅毒トレポネーマペルテニューム種 (*T. pallidum ssp. Pertenuae*)
(CDC-2) arp 蛋白質の配列

MFVRS DMFPK NTA VEISNLE KNAKAQA VVI GHAGIPGLLV SLAPAAAAQL
GIGVYQAVRV RVRTLGTVRG GSQTSQDGLS LASLPSRVPA RPAQRDPLSS
PPAGHTVPEY RDTVIFDDPR LVSPLSR

EVE DVPKVVVEPAS EREGGER
EVE DVPKVVVEPAS EREGGER
EVE DVPKVVVEPAS EREGGER
EVE DVPKVVVEPAS EREGGER

EVA SQHTKQPSHS VSNSAPNQFR KP

梅毒トレポネーマエンゼミカム亜種(*T. pallidum* ssp. *endemicum*) (ボスニア株)の
ヌクレオチド配列

ATGTTTGTGC	GCAGTGACAT	GTCCCCAAA	AACACTGCTG	TTGAAATTAG
CAACTTAGAA	AAGAATGCCA	AGGCTCAGGC	AGTGGTTATT	GGGCACGCAG
GGATCCCCGG	TCTTCTAGTT	AGCCTTGCAC	CCGCTGCTGC	AGCACAGCTT
GGGATTGGCG	TATACCAAGC	TGTGCGTGTA	CGCGTACGTA	CCTTGGGTAC
CGTGCGCGGT	GGGTCTCAA	CAAGTCAGGA	CGGACTGTCC	C TTGCATCTT
TGCCGTCCCG	TGTGCCCTGCG	CGCCCCGCGC	AGCGTGATCC	TCTGTCAATCC
CCGCCCGGCAG	GTCACACTGT	ACCGGAATAT	CGCGATAACGG	TTATTTTCGA
TGACCCCGCGT	TTGGTTTCCC	CTTTGTCTCG	TGAGGTGGAG	GACGTGCCCGA
AGGTAGTGGA	GCCGGCCTCT	GAGCGTGAGG	GAGGGGAGCG	TGAGGTGGAG
GACGTGCCCGA	AGGTAGTGGG	GCCGGCCTCT	GAGCGTGAGG	GAGGGGAGCG
TGAGGTGGAG	GACGTGCCCGA	AGGTAGTGGG	GCCGGCCTCT	GAGCGTGAGG
GAGGGGAGCG	TGAGGTGGAG	GACGTGCCCGA	AGGTAGTGGG	GCCGGCCTCT
GAGCGTGAGG	GAGGGGAGCG	TGAGGTGGAG	GACGTGCCCGA	AGGTAGTGGG
GCCGGCCTCT	GAGCGTGAGG	GAGGGGAGCG	TGAGGTGGAG	GACGTGCCCGA
AGGTAGTGGA	GCCGGCCTCT	GAGCGTGAGG	GAGGGGAGCG	TGAGGTGGAG
GACGTGCCCGA	AGGTAGTGGG	GCCGGCCTCT	GAGCGTGAGG	GAGGGGAGCG
TGAGGTGGAG	GACGTGCCCGA	AGGTAGTGGG	GCCGGCCTCT	GAGCGTGAGG
GAGGGGAGCG	TGAGGTGGCT	TCTCAGCATA	CGAAGCAGCC	ATCCCCACTCG
GTTTCCAAC	CAGCTCCCAA	TCAGTTTCCG	AAACCCCTGA	

梅毒トレポネーマエーミカム亜種 (*T. pallidum ssp. endemicum*)
(ボスニア株) arp蛋白質の配列

MFVRSDFPK NTA VEISNLE KNAKAQAVVI GHAGIPGLLV SLAPAAAQQL
GIGVYQAVRV RVRTLGTVRG GSQTSQDGLS LASLPSRVPA RPAQRDPLSS
PPAGHTVPEY RDTVIFDDPR LVSPLSR

EVE DVPKVVVEPAS EREGGER
EVE DVPKVVVEPAS EREGGER
EVE DVPKVVVEPAS EREGGER
EVE DVPKVVVEPAS EREGGER
EVE DVPKVVVEPAS EREGGER
EVE DVPKVVVEPAS EREGGER
EVE DVPKVVVEPAS EREGGER
EVE DVPKVVVEPAS EREGGER

EVA SQHTKQPSHS VSNSAPNQFR KP

【図11】

arp #1

配列番号 : 7

LVSPL REVEDAPKVVEPAS-

arp #2

配列番号 : 8

-SR-EVED APKVVEPASEREGG-

arp #3

配列番号 : 9

-PK VVEPASEREGGEREVEDA-

TP-arp #4

配列番号 : 10

PKNTAVEISNLE KNAKAQAVV

TP-arp #5

配列番号 : 11

GHAGIPGLLV SLAPAAAAQLGIGVY

TP-arp #6

配列番号 : 12

VPA RPAQRDPLSS PPAGHTVPEY RD

TP-arp #7

配列番号 : 13

VVEPAS EREGGEREVE DVPKV

TP-arp #8

配列番号 : 14

VVEPASGHEGGEREVA SQHT KQPSHS

TP-arp #9

配列番号 : 15

EVEDVPKVVEPASEREGGER

TP-arp #10

配列番号 : 16

EVENVPKVVEPASEREGGER

TP-arp #11

配列番号 : 17

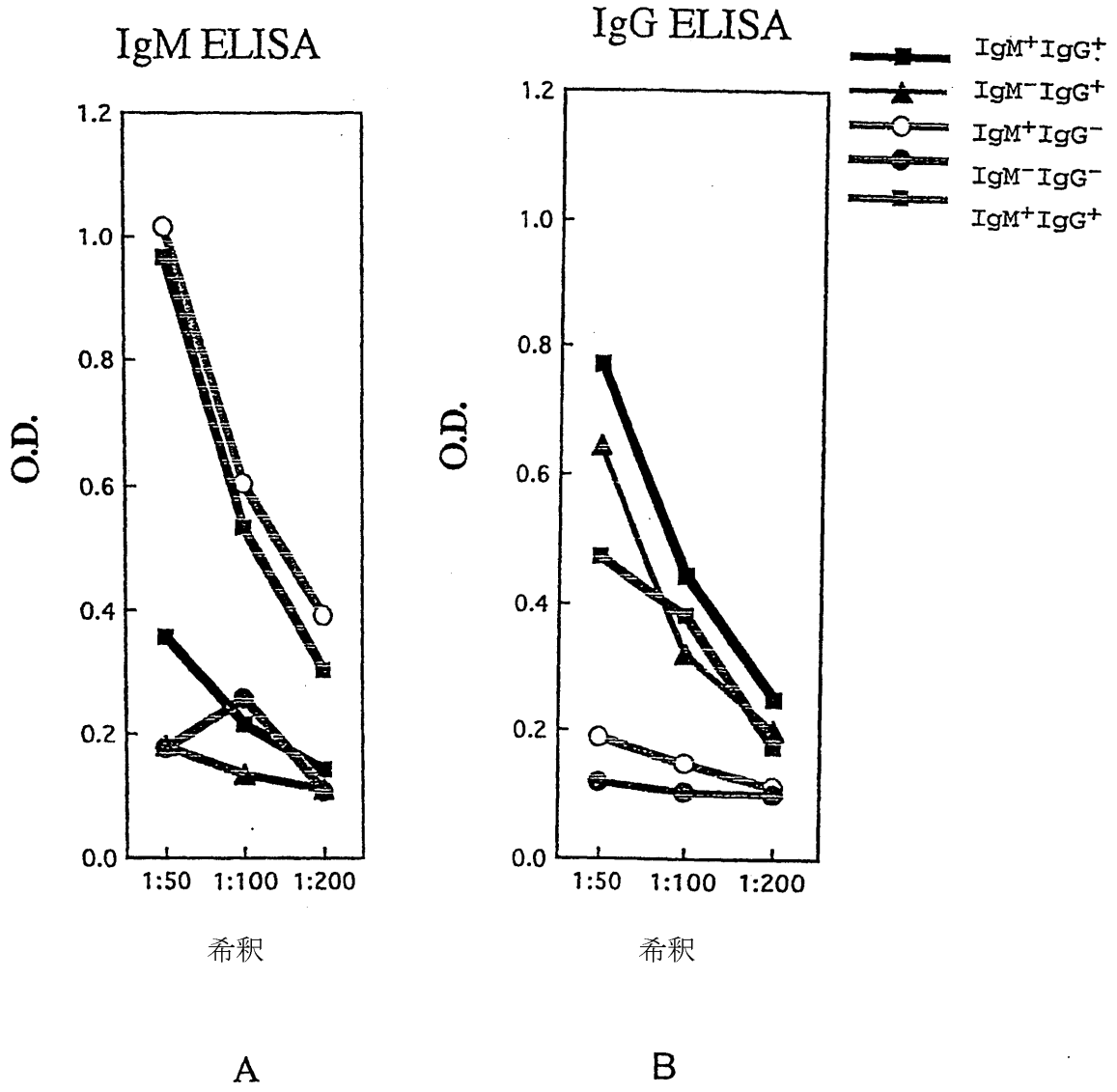
EVEDAPKVVEPASEREGGER

TP-arp #12

配列番号 : 18

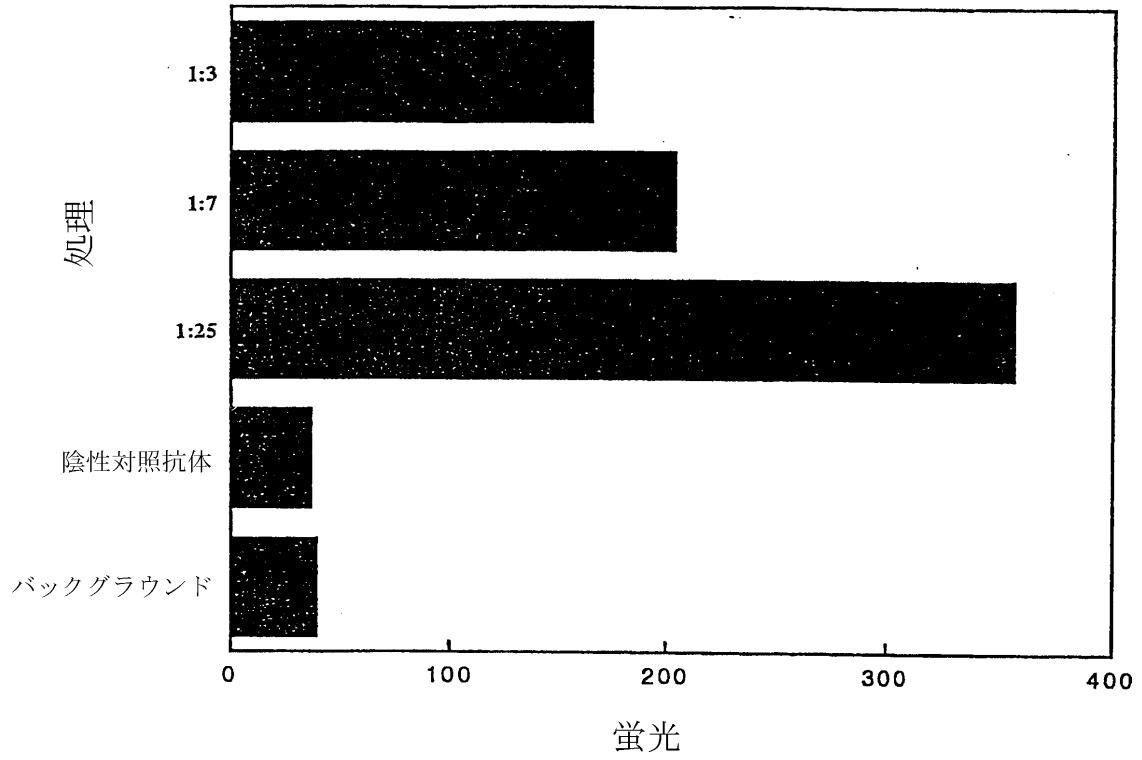
EVEDVPGVVEPASGHEGGER

【図12】



【図13】

arp9のフローサイトメトリー分析



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/US 00/16425
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7 G01N33/569 G01N33/571 C07K14/20 C07K16/12		
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) IPC 7 G01N C07K		
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 practical, search terms used) CHEM ABS Data, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PILLAY A. ET AL: "Molecular subtyping of <i>Treponema pallidum</i> subspecies <i>pallidum</i> ." SEXUALLY TRANSMITTED DISEASES, (1998) 25/8 (408-414). XP001051930	15-24
Y	the whole document	1-14
Y	WO 95 02186 A (SHIELD DIAGNOSTICS LIMITED ; GRANT IAN KENNETH (GB); MIJOVIC JANE E) 19 January 1995 (1995-01-19) abstract	1-14
	--- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*T* 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
E earlier document but published on or after the international filing date		*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
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)		*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.
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*&* document member of the same patent family
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 2 January 2002		Date of mailing of the international search report 14/01/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gundlach, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PC1/US 00/16425

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FRASER, CLAIRE M. ET AL: "Complete genome sequence of Treponema pallidum, the syphilis spirochete" SCIENCE (WASHINGTON, D. C.) (1998), 281(5375), 375-388 , XP000910239 the whole document -----	15-18, 20-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 00/16425

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9502186 A	19-01-1995	AU 7128594 A WO 9502186 A1	06-02-1995 19-01-1995

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	FI	テ-マ-コ-ト' (参考)
// C 1 2 P 21/08		C 1 2 P 21/08	
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
(72)発明者	スタイナー ブレット アメリカ合衆国 ジョージア州 シャンプリー ロッカウェイ ロード 3075		
(72)発明者	ローデス ベルタ スペイン国 マドリード 1ピソ 8 - 7 シーノラ ヒルエラ		
Fターム(参考)	4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA15 4C085 AA03 BA46 BB24 4H045 AA11 BA10 CA11 DA76 DA86 EA52 FA72		

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2003510559A5	公开(公告)日	2007-03-29
申请号	JP2001503496	申请日	2000-06-14
[标]申请(专利权)人(译)	美国政府		
申请(专利权)人(译)	美国		
当前申请(专利权)人(译)	美国		
[标]发明人	リユーフシ スタイナープレット ローデスベルタ		
发明人	リユー フシ スタイナー プレット ローデス ベルタ		
IPC分类号	G01N33/571 A61K39/02 C07K14/20 C07K16/12 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	G01N33/571 C07K14/20 G01N2333/20		
FI分类号	G01N33/571.ZNA A61K39/02 C07K14/20 C07K16/12 G01N33/53.D C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA15 4C085/AA03 4C085/BA46 4C085/BB24 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA52 4H045/FA72		
优先权	60/138981 1999-06-14 US		
其他公开文献	JP2003510559A		

摘要(译)

提供了一种特异性和灵敏地检测梅毒螺旋体感染的方法，该方法包括使用梅毒螺旋体特有的特异性抗原蛋白和肽。特别地，提供了基于对酸性重复蛋白的识别的检测测定。本发明的方法对于在感染的早期阶段检测1期梅毒特别有用。另外，本发明的方法和组合物提供了某些梅毒螺旋体疾病的病原体，即梅毒的梅毒螺旋体亚种，草莓的梅毒螺旋体亚种。pertenuis) 和bejer用于特异的螺旋体感染的差异检测，从而可以鉴定苍白密螺旋体亚种。