

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2011-177173

(P2011-177173A)

(43) 公開日 平成23年9月15日(2011.9.15)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 12 N 7/00 (2006.01)	C 12 N 7/00	4 B 0 6 3
C 12 Q 1/68 (2006.01)	C 12 Q 1/68 A	4 B 0 6 5
C 12 N 1/15 (2006.01)	C 12 N 1/15	4 C 0 8 5
C 12 N 1/19 (2006.01)	C 12 N 1/19	4 H 0 4 5

審査請求 有 請求項の数 71 O L (全 86 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-50982 (P2011-50982)	(71) 出願人	503257871 ヴィロノヴァティブ、ペスローテン ヴェ ンノートシャップ オランダ国 3015 ジーイー ロッテ ルダム、ルーム イーイー 1989, ド クター モルウォータープレイン 50
(22) 出願日	平成23年3月9日 (2011.3.9)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(62) 分割の表示	特願2002-557978 (P2002-557978) の分割 原出願日 平成14年1月18日 (2002.1.18)	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(31) 優先権主張番号	01200213.5	(74) 代理人	100122389 弁理士 新井 栄一
(32) 優先日	平成13年1月19日 (2001.1.19)	(74) 代理人	100111741 弁理士 田中 夏夫
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
(31) 優先権主張番号	01203985.5		
(32) 優先日	平成13年10月18日 (2001.10.18)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】感受性哺乳動物において気道疾患を引き起こすウイルス

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】パラミクソウイルス科のニューモウイルス亜科に含まれ、系統学的にメタニューモウイルス属に該当するものとして同定される、単離された哺乳動物性のネガティブセンス一本鎖RNAウイルス (MPV)、ならびにその成分を提供する。

【解決手段】単離されたネガティブセンス一本鎖RNAメタニューモウイルス。前記ウイルスを含む、免疫原性組成物。MPV単離体のNタンパク質のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする単離された核酸。核酸とサンプルとを接触させることを含む、該サンプル中の哺乳動物メタニューモウイルスの検出方法。MPV感染の治療または予防方法における使用のための医薬組成物。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

単離された、本質的に哺乳動物性のネガティブセンス一本鎖RNAウイルス(MPV)であって、パラミクソウイルス科のニューモウイルス亜科に属し、系統学的にメタニューモウイルス属に該当するものとして同定される上記ウイルス。

【請求項 2】

単離されたネガティブセンス一本鎖RNAウイルス(MPV)であって、パラミクソウイルス科のニューモウイルス亜科に属するものであり、かつ、そのウイルスの核酸配列を決定し、その配列を、最尤系統樹を100のブートストラップおよび3のジャンブルを用いて作製する系統樹解析で試験し、それが、鳥類の鼻気管炎の原因物質である七面鳥鼻気管炎ウイルス(TRTV)としても知られるトリ・ニューモウイルス(APV)のウイルス単離体に該当するというよりも、CNCM(パリ)にI-2614として寄託されているウイルス単離体に系統学的により近いものとして該当することを見出すことによって、系統学的にメタニューモウイルス属に該当するものとして同定される上記ウイルス。

10

【請求項 3】

トリ・ニューモウイルスがAPV C型(APV-C)からなる、請求項2に記載のウイルス。

【請求項 4】

前記核酸配列が、前記ウイルスのウイルスタンパク質をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載のウイルス。

20

【請求項 5】

前記オープンリーディングフレームがN、P、MおよびFタンパク質をコードするORFの群から選ばれる、請求項4に記載のウイルス。

【請求項 6】

前記オープンリーディングフレームがSHまたはGタンパク質をコードするORFの群から選ばれる、請求項5に記載のウイルス。

【請求項 7】

図6に示す配列に系統学的に対応する核酸または機能性断片を含む、請求項1～6のいずれか一項に記載のウイルス。

【請求項 8】

CNCM(パストール研究所、パリ)にI-2614として寄託されているMPV単離体または系統学的にそれに該当するウイルス単離体を含む、請求項1～7のいずれか一項に記載のウイルス。

30

【請求項 9】

気道疾患に罹患しているヒトから単離される、請求項8に記載のウイルス。

【請求項 10】

請求項1～9のいずれか一項に記載のウイルスから得られる、単離された核酸もしくは組換え核酸またはそのMPV特異的機能性断片。

【請求項 11】

請求項10に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 12】

請求項10に記載の核酸または請求項11に記載のベクターを含む宿主細胞。

40

【請求項 13】

請求項10に記載の核酸によりコードされる、単離されたタンパク質様分子もしくは組換えタンパク質様分子またはそのMPV特異的機能性断片。

【請求項 14】

請求項13に記載のタンパク質様分子またはそのMPV特異的機能性断片を含む抗原。

【請求項 15】

請求項14に記載の抗原に対して特異的な抗体。

【請求項 16】

ウイルス単離体をMPVとして同定する方法であって、そのウイルス単離体またはその成

50

分を、請求項 1 5 に記載の抗体と反応させることを含む上記方法。

【請求項 1 7】

ウイルス単離体をMPVとして同定する方法であって、そのウイルス単離体またはその成分を、請求項 1 0 に記載の核酸と反応させることを含む上記方法。

【請求項 1 8】

前記MPVがヒトMPVを含む、請求項 1 6 または 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

請求項 1 6 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の方法により、パラミクソウイルス科のニューモウイルス亜科に含まれ、系統学的にメタニューモウイルス属に該当するものとして同定される哺乳動物性のネガティブセンス一本鎖RNAウイルスとして同定されるウイルス単離体。10

【請求項 2 0】

哺乳動物のMPV感染をウイルス学的に診断する方法であって、その哺乳動物のサンプルを請求項 1 0 に記載の核酸または請求項 1 5 に記載の抗体と反応させることにより、そのサンプル中のウイルス単離体またはその成分の存在を判定することを含む上記方法。

【請求項 2 1】

哺乳動物のMPV感染を血清学的に診断する方法であって、その哺乳動物のサンプルを請求項 1 3 に記載のタンパク質様分子もしくはその断片または請求項 1 4 に記載の抗原と反応させることにより、そのサンプル中のMPVまたはその成分に対して特異的な抗体の存在を判定することを含む上記方法。20

【請求項 2 2】

MPV感染を診断するための診断キットであって、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のウイルス、請求項 1 0 に記載の核酸、請求項 1 3 に記載のタンパク質様分子もしくはその断片、請求項 1 4 に記載の抗原、および / または請求項 1 5 に記載の抗体を含む上記キット。

【請求項 2 3】

医薬組成物を製造するための、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のウイルス、請求項 1 0 に記載の核酸、請求項 1 1 に記載のベクター、請求項 1 2 に記載の宿主細胞、請求項 1 3 に記載のタンパク質様分子もしくはその断片、請求項 1 4 に記載の抗原、または請求項 1 5 に記載の抗体の使用。30

【請求項 2 4】

MPV感染の治療または予防のための医薬組成物を製造するための、請求項 2 3 に記載の使用。

【請求項 2 5】

気道疾患の治療または予防のための医薬組成物を製造するための、請求項 2 3 または 2 4 に記載の使用。

【請求項 2 6】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のウイルス、請求項 1 0 に記載の核酸、請求項 1 1 に記載のベクター、請求項 1 2 に記載の宿主細胞、請求項 1 3 に記載のタンパク質様分子もしくはその断片、請求項 1 4 に記載の抗原、または請求項 1 5 に記載の抗体を含む医薬組成物。40

【請求項 2 7】

請求項 2 6 に記載の医薬組成物を個体に投与することを含む、MPV感染の治療または予防方法。

【請求項 2 8】

請求項 2 6 に記載の医薬組成物を個体に投与することを含む、気道疾患の治療または予防方法。

【請求項 2 9】

前記個体がヒトを含む、請求項 2 7 または 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

10

20

30

40

50

気道疾患の治療に有用な抗ウイルス剤を得る方法であって、請求項1～9のいずれか一項に記載のウイルスを含む細胞培養物または実験動物を樹立し、その培養物または動物を候補の抗ウイルス剤で処理し、そのウイルスまたはその培養物もしくは動物の感染に及ぼすその剤の効果を判定し、目的とする効果を有する抗ウイルス剤を選び出すことを含む上記方法。

【請求項31】

請求項30に記載の方法により得られる、抗ウイルス剤。

【請求項32】

医薬組成物を製造するための、請求項31に記載の抗ウイルス剤の使用。

【請求項33】

10 気道疾患の治療のための医薬組成物を製造するための、請求項33に記載の使用。

【請求項34】

MPV感染の治療のための医薬組成物を製造するための、請求項32または33に記載の使用。

【請求項35】

請求項31に記載の抗ウイルス剤を含む医薬組成物。

【請求項36】

請求項35に記載の医薬組成物を個体に投与することを含む、MPV感染の治療または予防方法。

【請求項37】

20 請求項35に記載の医薬組成物を個体に投与することを含む、気道疾患の治療または予防の方法。

【請求項38】

前記個体がヒトを含む、請求項36または37に記載の方法。

【請求項39】

動物のMPV感染をウイルス学的に診断する方法であって、その動物のサンプルをトリ・ニューモウイルス(APV)の成分と特異的に反応する核酸もしくは抗体と反応させることにより、そのサンプル中のウイルス単離体もしくはその成分の存在を判定することを含み、但し、その核酸もしくは抗体がMPVの成分と交差反応性である、上記方法。

【請求項40】

30 動物のMPV感染を血清学的に診断する方法であって、その動物のサンプルをAPV単離体もしくはその成分から誘導されるタンパク質様分子もしくはその断片または抗原と反応させることにより、そのサンプル中のMPVもしくはその成分に対する抗体の存在を判定することを含み、但し、その分子、断片または抗原が、MPVの成分と本質的に相同であるように選ばれる、上記方法。

【請求項41】

鳥類のAPV感染をウイルス学的に診断する方法であって、その鳥類のサンプルを請求項10に記載の核酸または請求項15に記載の抗体と反応させることにより、そのサンプル中のウイルス単離体もしくはその成分の存在を判定することを含み、但し、その核酸もしくは抗体がAPVの成分と交差反応性である、上記方法。

【請求項42】

40 鳥類のAPV感染を血清学的に診断する方法であって、その鳥類のサンプルを請求項13に記載のタンパク質様分子もしくはその断片または請求項14に記載の抗原と反応させることにより、そのサンプル中のAPVもしくはその成分に特異的な抗体の存在を判定することを含み、但し、その分子、断片または抗原が、本質的にAPVの成分と相同であるように選ばれる、上記方法。

【請求項43】

前記APVがAPV-Cを含む、請求項39～42のいずれか一項に記載の方法。

【請求項44】

APV特異的抗体を検出するように設計された診断試験の、MPVに対する抗体を検出するた

50

めの使用。

【請求項 4 5】

前記試験が、酵素免疫アッセイ（EIA）を含む、請求項 4 4 に記載の使用。

【請求項 4 6】

APV特異的抗体を検出するように設計された診断試験においてサンプルを試験することを含む、サンプル中のMPVに対する抗体の検出方法。

【請求項 4 7】

前記試験が酵素免疫アッセイ（EIA）を含む、請求項 4 6 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0 0 0 1】

発明の分野

本発明は、ウイルス学の分野に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

過去何十年もの間、哺乳動物の疾患、特にヒトにおける気道疾患（RTI）の幾つかの原因物質が同定されてきた⁷。哺乳動物に罹患するRTIの古典的な原因物質は、ヒト（hRSV）およびウシやヒツジなどの反芻動物（bRSVおよび／またはoRSV）に見られるニューモウイルス（Pneumovirus）属に属する呼吸器合胞体ウイルスである。ヒトRSVでは、相互交差中和アッセイ（reciprocal cross neutralization assay）、免疫学的アッセイにおけるGタンパク質の反応性、およびG遺伝子のヌクレオチド配列における違いを用いて、2つのhRSV抗原亜群が定義される。それらの亜群内では、アミノ酸（aa）配列は94%（亜群A）または98%（亜群B）の同一性を示すが、亜群間では53%のアミノ酸配列同一性しか見られない。モノクローナル抗体、RT-PCRアッセイおよびRNase保護アッセイによれば、亜群内では更なる変異性が見られる。両者の亜群のウイルスは、世界的に分布しており、1シーズンの間存在できる。感染は、すでに免疫が存在している場合にも起こり、抗原性変異は再感染を起こすのに厳密には必要ではない。例えば、Sullender, W.M., Respiratory Syncytial Virus Genetic and Antigenic Diversity. Clinical Microbiology Reviews, 2000. 13(1):p.1-15 ; Collins, P.L., McIntosh, K. および Chanock, R.M., Respiratory syncytial virus. Fields virology, B.N. Knipe, Howley, P.M. 編, 1996, Philadelphia: Lippencott-raven. 1313-1351 ; Johnson, P.R., ら, The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. Proc Natl Acad Sci USA, 1987. 84(16):p.5625-9 ; Collins, P.L., The molecular Biology of Human Respiratory Syncytial virus (RSV) of the Genus Pneumovirus, in The Paramyxoviruses, D.W. Kingsbury, 編. 1991, Plenum Press: New York. p.103-153を参照されたい。

20

【0 0 0 3】

もう1つの古典的なニューモウイルスは、マウス肺炎ウイルスであり、通常は実験用マウスだけに見られる。しかし、哺乳動物で見られる疾患の中には、依然として既知の病原体が原因であるとすることができないものがある。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0 0 0 4】

【非特許文献 1】 Sullender, W.M., Respiratory Syncytial Virus Genetic and Antigenic Diversity. Clinical Microbiology Reviews, 2000. 13(1):p.1-15

【非特許文献 2】 Collins, P.L., McIntosh, K. および Chanock, R.M., Respiratory syncytial virus. Fields virology, B.N. Knipe, Howley, P.M. 編, 1996, Philadelphia: Lippencott-raven. 1313-1351

【非特許文献 3】 Johnson, P.R., ら, The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigeni

40

50

cally related proteins. Proc Natl Acad Sci USA, 1987. 84(16):p.5625-9

【非特許文献4】Collins, P.L., The molecular Biology of Human Respiratory Syncytial virus (RSV) of the Genus Pneumovirus, in The Paramyxoviruses, D.W. Kingsbury, 編. 1991, Plenum Press: New York. p.103-153

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、パラミクソウイルス科 (Paramyxoviridae) のニューモウイルス亜科 (Pneumovirinae) に属し、系統学的にはメタニューモウイルス (Metapneumovirus) 属に該当するものとして同定可能である、単離された、本質的に哺乳動物性のネガティブセンス一本鎖RNAウイルス (MPV) を提供する。このウイルスは、そのウイルスの核酸配列を決定し、その配列を系統学的解析（例えば、最尤系統樹を100のブートストラップおよび3のジャンブルを用いて作製する）において試験し、それが、鳥類の鼻気管炎の原因物質である七面鳥鼻気管炎ウイルス (TRTV) としても知られるトリ・ニューモウイルス (APV) の本質的に鳥類性のウイルス単離体に該当するというよりも、CNCM (パリ) にI-2614として寄託されているウイルス単離体に系統学的により近いものとして該当することを見出すことによって、系統学的にメタニューモウイルス属に該当するものとして同定されうる。この系統学的解析では、比較対照のアウトグループとして非MPVの核酸配列を得ることがしばしば有用であり、非常に有用なアウトグループの単離体は、例えば本明細書の図5に示すように、トリ・ニューモウイルスの血清型C (APV-C) から得ることができる。

10

20

30

40

【0006】

系統学的解析は、ウイルスをMPVとして同定するための便利な方法を提供するが、本明細書では、そのウイルスまたはそのウイルス由来のウイルスタンパク質もしくは核酸を同定するための、（もっと粗雑ではあるが）おそらくもっと簡単な他の方法も幾つか提供される。経験的に、MPVは、本明細書において配列または寄託により特定した単離体、ウイルスタンパク質または核酸と比較した場合の、同定しようとするウイルス、たんぱく質または核酸の相同性のパーセンテージにより同定することができる。一般に、ウイルス種、特にRNAウイルス種は、そのウイルスのクラスターがそのメンバー間で異質性 (heterogeneity) を示す擬似種を構成することが多いことが知られている。したがって、各単離体は、本明細書中で提供される種々の単離体のうちの1つと、多少異なる関係 (%) を有する可能性があると予期される。

【0007】

寄託ウイルスI-2614と比較しようとする場合に、本発明は、単離された、本質的に哺乳動物性のネガティブセンス一本鎖RNAウイルス (MPV) であって、パラミクソウイルス科のニューモウイルス亜科に属し、かつ、そのウイルスのアミノ酸配列を決定し、そのアミノ酸配列が、APV-Cと比較して、CNCM (パリ) にI-2614として寄託されているウイルス単離体と、Lタンパク質、Mタンパク質、Nタンパク質、Pタンパク質またはFタンパク質について、本明細書に記載されたパーセンテージよりも本質的に高いアミノ酸相同性のパーセンテージを有することを判定することによって、系統学的にメタニューモウイルス属に該当するものとして同定されうる上記ウイルスを提供する。あるいは、同様に、パラミクソウイルス科のニューモウイルス亜科に属する、単離された、本質的に哺乳動物性のネガティブセンス一本鎖RNAウイルス (MPV) が、そのウイルスの核酸配列を決定し、その核酸配列が、APV-Cと比較して、CNCM (パリ) にI-2614として寄託されているウイルス単離体に対して、本明細書の後記で特定されるLタンパク質、Mタンパク質、Nタンパク質、Pタンパク質またはFタンパク質をコードする核酸について本明細書中で特定されるパーセンテージよりも本質的に高い核酸同一性のパーセンテージを有することを判定することによって系統学的にメタニューモウイルス属に該当すると同定されうるものとして提供される。

【0008】

ここでもまた、経験的に、MPVは、同定が必要な単離体またはその単離体のウイルスタンパク質もしくは核酸が、単離体00-1または99-1をそれぞれの比較の単離体として両者の

50

それぞれの群について本明細書中で特定される相同性のパーセンテージの境界に含まれる相同性のパーセンテージを有するならば、本明細書中で同定されるMPVの2つの血清学的群の一方に属する、と考えることができる。しかし、相同性のパーセンテージがそれより小さいか、あるいは更にウイルス単離体を例えればAPV-Cと区別する必要がある場合は、本明細書で特定される系統学的解析を用いることが更に好ましく推奨される。

【0009】

ここでもまた、相同性のパーセンテージの決定に他の单離体が選択される場合、上記のパーセンテージは多少変動する可能性があることに留意すべきである。

【0010】

このMPVが提供されると、本発明は、特に哺乳動物における疾患、更にはヒトにおける疾患、特に呼吸系疾患の診断および／または治療に用いられる診断手段および方法ならびに治療手段および方法を提供する。しかし本発明はまた、本質的に哺乳動物性のMPVと本質的に鳥類性のAPV（特にAPV-C）との遺伝学的関連（遠縁ではあるが）に基づき、トリの疾患の診断および治療に用いられる手段および方法も提供する。ウイルス学では、特定のウイルス感染の診断および／または治療は、その感染を引き起こすその特定のウイルスに最も特異的な試薬を用いて実施することが最も推奨される。この場合、これは、上記のMPV感染の診断および／または治療が、MPVに最も特異的な試薬を用いて実施されるのが好ましいことを意味する。しかし、これは、例えばもっと容易に入手可能であり当面の課題に十分に対処するという理由から、それほど特異的ではないが十分に交差反応性である試薬が代わりに用いられる可能性を決して排除するものではない。本明細書では、例えば、APVから誘導される試薬（特にAPV-Cから誘導される試薬）を用いて哺乳動物においてMPV感染のウイルス学的および／または血清学的な診断を行うことが提供され、本明細書の「詳細な説明」では、例えば、哺乳動物におけるMPV感染の十分に信頼できる血清学的診断が、トリにおいてAPV抗体を検出するように特に設計されたELISAを用いることによって達成可能であることが示されている。この目的のための特定の有用な試験としては、（例えば血清または卵黄中の）APV抗体の検出用に設計されたELISA試験であり、その1つの商業的に入手可能なものは、SVANOVA Biotech AB (Uppsala Science Park Glunten SE-751 83 Uppsala Sweden) により製造されているAPV-Ab SVANOVIR（登録商標）として知られている。逆の状況も該当し、本明細書では、例えば、MPVから誘導される試薬を用いて、哺乳動物におけるAPV感染のウイルス学的および／または血清学的な診断を実施することが提供され、本明細書の「詳細な説明」では、例えば、鳥類におけるAPV感染の十分に信頼できる血清学的診断が、MPV抗体を検出するように設計されたELISAを用いることによって達成可能であることが示されている。抗原および抗体が「鍵と鍵穴（lock-and - key）」関係を有していることを考慮すれば、種々の抗原の検出は、十分な交差反応性を有する適切な抗体を選択することにより達成できる。勿論、そのような交差反応性に基づく場合、種々のウイルスの種々の（糖）タンパク質間に存在するアミノ酸相同性の指標に基づいて試薬（例えば抗原または抗体）を選ぶことが最も良く、その結果最も相同的なタンパク質に関連する試薬が、上記の交差反応性に基づく試験で使用するのに最も有用である。

【0011】

核酸検出の場合、種々のウイルスの異種の核酸配列に基づいてプライマーまたはプローブを設計する（すなわち、本質的に哺乳動物性または鳥類性のメタニューモウイルス間の差異を検出するプライマーまたはプローブを設計する）のではなく、高い相同性を示すウイルス特異的核酸配列のストレッチに基づいてプライマーまたはプローブを設計または選択すればよいので、本発明の方法はさらに簡単である。一般に、核酸配列の場合、90%以上の相同性パーセンテージがあれば、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件を用いる診断試験においてその試験が依存する交差反応性が十分確保される。

【0012】

本発明は、例えば、動物、特に哺乳動物、更に具体的にはヒトのMPV感染をウイルス学的に診断する方法であって、その動物のサンプルを本発明によるMPV特異的核酸または抗体と反応させることによって、そのサンプル中のウイルス单離体またはその成分の存在を

10

20

30

40

50

判定することを含む上記方法、ならびに哺乳動物のMPV感染を血清学的に診断する方法であって、その哺乳動物のサンプルを本発明によるMPV特異的タンパク質様分子もしくはその断片または抗原と反応させることによって、そのサンプル中のMPVまたはその成分に対して特異的な抗体の存在を判定することを含む上記方法を提供する。また、本発明は、MPV感染を診断するための診断キットであって、本発明によるMPV、MPV特異的核酸、タンパク質様分子もしくはその断片、抗原および／または抗体を含み、さらに好ましくはそのMPV、MPV特異的核酸、タンパク質様分子もしくはその断片、抗原および／または抗体の検出手段をも含む上記キットを提供する。なおこの検出手段としては、例えば、蛍光团などの励起可能な基、または当業界で使用される酵素的検出システム（好適な診断キット様式の例としては、IF、ELISA、中和アッセイ、RT-PCRアッセイが含まれる）が挙げられる。未同定のウイルス成分またはその合成類似体（例えば核酸、タンパク質様分子もしくはその断片など）をMPV特異的なものとして同定できるか否かを判定するためには、その成分の核酸またはアミノ酸の配列を、例えばその核酸またはアミノ酸のストレッチ（好ましくは、（それぞれ）少なくとも10、更に好ましくは少なくとも25、更に好ましくは少なくとも40のヌクレオチドまたはアミノ酸からなるもの）について、例えば本明細書中で提供されるような系統学的解析を用いて既知のMPV配列および既知の非MPV配列（APV-Cが好ましく使用される）との配列相同性比較により解析すればよい。そのMPV配列または非MPV配列との関連性の程度に応じて、その成分または合成類似体が同定できる。

10

【0013】

本発明はまた、哺乳動物のMPV感染をウイルス学的に診断する方法であって、その哺乳動物のサンプルをAPV（好ましくは血清型C）から誘導される交差反応性核酸またはそのAPVと反応性である交差反応性抗体と反応させることによって、そのサンプル中のウイルス単離体またはその成分の存在を判定することを含む上記方法、ならびに、哺乳動物のMPV感染を血清学的に診断する方法であって、その哺乳動物のサンプルをAPVから誘導されるタンパク質様分子またはその断片または抗原と反応させることによって、そのサンプル中のAPVとも反応する交差反応性抗体またはその成分の存在を判定することを含む上記方法を提供する。更に、本発明は、本来はAPVまたはAPV抗体の検出用に設計された診断キットの、MPV感染を診断するため、特にヒトにおけるMPV感染を検出するための使用を提供する。

20

【0014】

また、本発明は、鳥類におけるAPV感染をウイルス学的に診断する方法であって、その鳥類のサンプルをMPVから誘導される交差反応性核酸またはMPVと反応性である交差反応性抗体と反応させることによって、そのサンプル中のウイルス単離体またはその成分の存在を判定することを含む上記方法、ならびに、鳥類のAPV感染を血清学的に診断する方法であって、その鳥類のサンプルをMPVから誘導されるタンパク質様分子もしくはその断片または抗原と反応させることによって、そのサンプル中のMPVとも反応する交差反応性抗体またはその成分の存在を判定することを含む上記方法を提供する。更に、本発明は、本来はMVPまたはMVP抗体の検出用に設計された診断キットの、APV感染を診断するため、特にニワトリ、アヒルまたは七面鳥などの家禽におけるAPV感染を検出するための使用を提供する。

30

【0015】

上記で述べたように、治療の場合、見出された交差反応性を用いて同様の使用を実施することが可能であるが、これは特に、当面の状況によって、より相同性の高い方法がそれほど簡単ではない場合に実施されうる。MPV感染に対する緊急のワクチン接種のように、待つことができないワクチン接種は、例えば、より相同性の高いMPVワクチンが入手不可能な場合は、APV（好ましくはC型）の単離体から誘導されるワクチン製剤を用いて行うことが可能であり、またその逆に、APV感染に対するワクチン接種をMPVから誘導されるワクチン製剤を用いて行うことも考えられる。また、逆遺伝学的技法により、ワクチンとして有用なキメラAPV-MPVウイルス構築物の作製が可能になり、これはそれぞれの株の各々の単離体を望ましいレベルまで弱毒化する分野とは十分に異なるものである。同様の逆遺伝

40

50

学的技法により、ワクチン製剤において使用するためのキメラパラミクソウイルス-メタニューモウイルス構築物（例えばRSV-MPVまたはPI3-MPV構築物）を作製することも可能になる。こうした構築物は、気道疾患を撲滅するための混合ワクチンとして特に有用である。

【0016】

したがって、本発明は、新規な原因物質、すなわち、パラミクソウイルス科のニューモウイルス亞科に属するが、古典的なニューモウイルスとしては同定されず、かつ、メタニューモウイルス属に属する、単離された本質的に哺乳動物性のネガティブセンス一本鎖RNAウイルス（本明細書中ではMPVとも呼ぶ）、ならびにMPV特異的成分またはその合成類似体を提供する。メタニューモウイルスに類似する哺乳動物性ウイルス、すなわち本質的にそのウイルスの天然の宿主として機能する哺乳動物から単離できるメタニューモウイルス、あるいはその哺乳動物において疾患を引き起こすメタニューモウイルスは、現在のところ、見出されていない。メタニューモウイルスは、天然の宿主または疾患の原因物質によって基本的には家禽に限定されると一般には考えられており、トリ・ニューモウイルスとしても知られている。近年、アヒルのAPV単離体が記載され（FR 2 801 607）、APV感染が天然の宿主として基本的に鳥類に限られることを更に実証している。

【0017】

本発明は、ニューモウイルス属のものとは異なる遺伝子順序およびアミノ酸配列を有し、且つパラミクソウイルス科のニューモウイルス亞科に含まれるメタニューモウイルス属と近縁であり、その系統学的関連を考慮するとその属に属すると思われる、単離された哺乳動物ニューモウイルス（本明細書中ではMPVとも呼ぶ）を提供する。今まで、メタニューモウイルスは鳥類からしか単離されていなかったが、本発明により、哺乳動物などの他の動物種においても、関連する（しかし物質的には異なる）ウイルスが同定できることが示される。ここで、本発明者らは、ヒトからのMPVの反復単離を示すが、そのような報告はAPVに関しては存在しない。更に、APVとは違って、MPVは基本的にニワトリや七面鳥において全く、または殆ど複製しないが、カニクイザルにおいては容易に複製する。哺乳動物におけるAPVの複製に関する報告は見られない。更に、MPVに対して生起させた特異的抗血清はMPVを中和するが、APV A、BまたはCに対して生起させた抗血清はそれと同程度にはMPVを中和せず、そして、このように完全な交差反応性が備わっていないことは、MPVが異なるメタニューモウイルスであることのもう1つの証拠となっている。更に、APVとMPVとはほぼ同様の遺伝子順序を有するが、MPVのGおよびSHタンパク質は、それらがアミノ酸レベルでも核酸レベルでも有意な配列相同性を示さない、という点で、APVでの知見とは大きく異なっている。APV単離体とMPV単離体、またはこれらの異なるウイルスに対する抗体同士を区別する診断アッセイは、これらのタンパク質の一方または双方に基づいて有利に開発できる（例えばIF、ELISA、中和アッセイ、RT-PCRアッセイ）。しかし、MPVのより関連するN、P、M、FおよびLタンパク質から得られる配列および／または抗原性情報、ならびにAPVのそれぞれのタンパク質との配列相同性の解析もまた、APVとMPVとを区別するのに用いることができる。例えば、MPVから得られる配列情報の系統学的解析から、MPVおよびAPVが2種の異なるウイルスであることが明らかになった。特に、系統樹は、APVおよびMPVが2種の異なるウイルスの系列であることを示している。また、本発明者らは、MPVがヒト集団において少なくとも50年間にわたって広まってきており、そのために、種間伝播は恐らく少なくとも50年前から起こっていて、ありふれた事象ではないことも示した。MPVのCPEは、tMKまたは他の細胞培養物中でhRSVもしくはhPIV-1により引き起こされるCPEとは実際には区別不能だったので、MPVは今まで余り注目されていなかったと思われる。tMK（サル腎三次細胞、すなわち細胞培養の第三継代のMK細胞）は、初代または二代培養物と比較してコストが少なくて済むので、好ましく使用される。CPEは、古典的なパラミクソウイルス科の幾つかの場合と同様に、合胞体形成し、その後で細胞が急速な内部破壊を示し、続いて細胞が单層から剥離することを特徴とする。細胞は通常（しかしこれでもない）、初期材料から3代継代した後、接種後10～14日でCPEを示し、これはhRSVまたはhPIV-1などの他のウイルスにより起こるCPEよりも幾分遅い。

10

20

30

40

50

【0018】

従来、影響力の大きい疾患原因として、パラミクソウイルスは毎年世界的に多くの動物やヒトの死亡の原因となっている。パラミクソウイルス科はモノネガウイルス目（ネガティブセンス一本鎖RNAウイルス）に含まれる科を形成し、パラミクソウイルス亜科（Paramyxovirinae）とニューモウイルス亜科（Pneumovirinae）とからなる。後者の亜科は現在のところ、分類学上、ニューモウイルス属とメタニューモウイルス属とに分類される¹。ヒト呼吸器合胞体ウイルス(hRSV)は、ニューモウイルス属の典型種であり、世界的に幼年期および初期小児期の下部気道感染の最も重要な単独原因である²。ニューモウイルス属の他のメンバーとしては、ウシおよびヒツジの呼吸器合胞体ウイルスおよびマウス肺炎ウイルス(PVM)が挙げられる。

10

【0019】

七面鳥鼻気管炎ウイルス(TRTV)としても知られるトリ・ニューモウイルス(APV)は、鳥類の鼻気管炎、七面鳥の上部気道感染の原因物質であり³、近年になって区分されたメタニューモウイルス属の唯一のメンバーであり、上記で述べたように、これまで哺乳動物の感染と、ましてや疾患とも関係付けられていなかった。APVの血清学的亜群は、G糖タンパク質のヌクレオチド配列もしくはアミノ酸配列、およびG糖タンパク質をも認識するモノクローナル抗体を用いた中和試験に基づいて区別できる。亜群A、BおよびDの中で、G糖タンパク質は、亜群内では98.5%～99.7%のアミノ酸配列同一性を示すが、亜群間ではたった31.2～38%のアミノ酸同一性しか見られない。例えば、Collins, M.S., Gough, R.E. およびAlexander, D.J., Antigenic differentiation of avian pneumovirus isolates using polyclonal antisera and mouse monoclonal antibodies. *Avian Pathology*, 1993. 22:p.469-479; Cook, J.K.A, Jones, B.V., Ellis, M.M., Antigenic differentiation of strains of turkey rhinotracheitis virus using monoclonal antibodies. *Avian Pathology*, 1993.22:p.257-273; Bayon-Auboyer, M.H.,ら, Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. *J Gen Virol*, 2000.81(Pt 11):p.2723-33; Seal, B.S., Matrix Protein gene nucleotide and predicted amino acid sequence demonstrate that the first US avian pneumovirus isolate is distinct from European strains. *Virus Res*, 1998.58(1-2):p.45-52; Bayon-Auboyer, M.H.,ら, Comparison of F-, G- and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus. *Arch Virol*, 1999.144(6):p.1091-109; Juhasz, K. およびA.J. Easton, Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. *J Gen Virol*, 1994.75(Pt 11):p.2873-80を参照されたい。

20

【0020】

APVのもう1つの亜群はW000/20600に提供されており、そこでは、APVのコロラドで得られた単離体を記載しており、それを*in vitro*血清中和試験を用いて既知のAPVまたはTRTと比較した。まず、コロラドの単離体を、認識されたTRT単離体に対する单一特異的ポリクローナル抗血清に対して試験した。コロラドの単離体は、TRT株のいずれに対する单一特異的抗血清によっても中和されなかった。しかし、それは、亜群A株に対して作った超免疫抗血清によって中和された。この抗血清は、相同なウイルスを1:400の力価まで、コロラド単離体を1:80の力価まで中和した。次に、上記の方法を用いて、コロラドの単離体をTRTモノクローナル抗体に対して試験した。それぞれの場合において、逆中和の力価は10未満であった。コロラドの単離体に対して生起させた单一特異的抗血清は、両者の亜群のTRT株に対しても試験した。試験したTRT株はいずれも、コロラドの単離体に対する抗血清によって中和されなかった。

30

【0021】

APVのコロラド株は、TRTウイルスの亜群A株または亜群B株によるチャンレンジに対してSPFニワトリを保護しなかった。これらの結果から、コロラドの単離体が、Bayon-Auboyerら(*J. Gen. Vir.* 81:2723-2733 (2000))によっても示唆されているように、トリ・ニュ

40

50

ー モウイルスのさらなる血清型の最初の例である可能性があることが示唆される。

【 0 0 2 2 】

1つの好ましい実施態様において、本発明は、分類学的には（これに関しては未知の哺乳動物の）メタニューモウイルスに該当し、パラミクソウイルス科のニューモウイルス亜科に含まれるニューモウイルスのものとは異なる遺伝子順序を含む、単離されたMPVを提供する。これら2種の属の分類は、主に、遺伝子の位置に基づいている。メタニューモウイルスには一般に、NS1またはNS2などの非構造タンパク質が欠けており（Randhawaら，J. Vir. 71:9849-9854 (1997)も参照されたい）、遺伝子の順序はニューモウイルスとは異なっている（RSV：'3-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5' : APV : '3-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5'）^{4,5,6}。本発明により提供されるMPVまたは分類学的にそれに該当するウイルス単離体は、EM分析を行ったところ、パラミクソウイルス様の粒子であることが判明した。この分類と一致して、MPVまたは系統学的もしくは分類学的にそれに該当するウイルス単離体は、クロロホルムによる処理に対して感受性であり、tMK細胞または機能的にそれと同等の細胞において最適に培養され、大部分の細胞培養物において基本的にトリプシン依存性である。更に、典型的なCPEや、最も古典的に用いられる赤血球での赤血球凝集活性がないことから、本発明で提供されるウイルスが、（遠縁ではあるが）RSVなどの古典的なニューモウイルスと関連することが示唆される。多くのパラミクソウイルスは赤血球凝集活性を有するが、ニューモウイルスの大部分は有していない¹³。本発明によるMPVは、例えばAhmadianら，J. Gen. Vir. 80:2011-2016(1999)において示されているような多くの他のニューモウイルスが一般的にそうであるように、M2タンパク質をコードする核酸断片の内部に第2の重複するORF (M2-2) も含んでいる。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 3 】

本発明により提供されるような別のウイルス単離体を見出すためには、サンプル（場合によっては罹患している動物またはヒトから得たもの）を、ニューモウイルス亜科のウイルスの存在について試験し、こうして得られたウイルスを、（機能性の）NS1またはNS2をコードする遺伝子の存在について試験するか、あるいは既に上記で既に述べたようにRSVなどのニューモウイルスのものとは異なる遺伝子順序を実証すればよい。更に、系統学的にMPVに該当し、したがって分類学的にMPVに該当するウイルス単離体は、ここで提供されるMPV単離体からの核酸を用いる交差ハイブリダイゼーション実験により、あるいはMPV単離体に対して特異的なモノクローナル抗体および／またはMPV単離体から特異的に誘導される抗原および／もしくは免疫原を用いる古典的な交差血清学実験で見出すことができる。

【 0 0 2 4 】

新たに単離されたウイルスは、本発明者らのプロトタイプMPV単離体と十分に類似する遺伝子順序および／またはアミノ酸配列を含んでいるならば、系統学的にMPVに該当し、したがって分類学的にMPVに該当し、あるいは構造的にMPVと対応し、ニューモウイルス亜科のメタニューモウイルス属と近い関連を示す。MPVと現在既知の同じ科の他のウイルスのいずれか（APVの亜型C）との間での、最大のアミノ配列相同性および個々のタンパク質レベルで構造的対応の規定は、図6に示す配列を他のウイルス（特にAPV-C）の配列と比較した場合に推定できるように、マトリックスについては87%、核タンパク質については88%、リン酸化タンパク質については68%、融合タンパク質については81%、ポリメラーゼタンパク質の一部については56～64%である。これらの記載する最大値よりも高い相同性をそれぞれ有する個々のタンパク質またはウイルス単離全体は、系統学的にMPVに該当し、したがって分類学的にMPVに該当しており、構造的に図6に示す配列に該当する核酸配列を含む。ここで、本発明は、寄託されたウイルスに系統学的に該当するウイルスを提供する。他のウイルスと同様に、ここで提供される各種の単離された本質的に哺乳動物性のネガティブセンス一本鎖RNAウイルス単離体の間で、ある程度の変異性が見られることに注目すべきである。系統樹において、本発明者らは、L、M、NおよびF遺伝子の一部の比較配列解析に基づいて、ウイルス単離体の少なくとも2つの遺伝的クラスターを同定した。ウイルスの核酸配列またはアミノ酸配列（ウイルス配列）におけるヌクレオチドおよびアミノ酸の違いと、RSVなどの他のニューモウイルスとの類似性に基づくと、これらのMPVの遺伝

子型はMPVの亜型に該当する。MPV単離体の遺伝的クラスターの各々の中で、ヌクレオチドレベルでの同一性のパーセンテージは、Lについては94～100、Mについては91～100、Nについては90～100、Fについては93～100であり、アミノ酸レベルでの同一性のパーセンテージは、Lについては91～100、Mについては98～100、Nについては96～100、Fについては98～100であることが判った。更なる比較は、図18～28に見ることができる。これまでに同定されたここで提供される単離された本質的に哺乳動物性のネガティブセンス一本鎖RNAウイルス（MPV単離体）のグループ全体についてのヌクレオチドレベルでの最低の同一性のパーセンテージは、LおよびMについては81であり、Nについては83であり、Fについては82であった。アミノ酸レベルでは、このパーセンテージは、LおよびNについては91であり、Mについては94であり、Fについては95であった。本発明で提供されるMPV単離体または単離されたMPVのF遺伝子のウイルス配列は、例えば、Sealら、Vir. Res. 66:139147(2000)により提供されるAPV-Cの融合遺伝子（F）のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列に対して、それぞれ81%未満のヌクレオチド配列同一性または82%未満のアミノ酸配列同一性を示す。

10

【0025】

また、本発明で提供されるMPV単離体または単離されたMPVのL遺伝子のウイルス配列は、例えば、Randhawaら、J. Gen. Vir. 77:3047-3051(1996)により提供されるAPV-Aのポリメラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列に対して、61%未満のヌクレオチド配列同一性または63%未満のアミノ酸配列同一性を示す。

20

【0026】

世界中のMPV株の配列多様性は、他のウイルスと同様に多少高めである可能性がある。したがって、2つの可能性のある遺伝的クラスターは、9種のウイルス単離体のN、M、FおよびLのORFにおける部分ヌクレオチド配列の分析により同定される。1つのクラスター内で、90～100%のヌクレオチド同一性が見られ、クラスター間では81～88%の同一性が見られた。更なるウイルス単離体について得られた配列情報から、2つの遺伝子型の存在が確認された。クラスターAのプロトタイプとしてのウイルス単離体ned/00/01、およびクラスターBのプロトタイプとしてのウイルス単離体ned/99/01を交差中和アッセイで用いて、それらの遺伝子型が異なる血清型または亜群と関連するか否かを調べた。これらのデータから、単離体I-2614に対してLについては64より、M2については87より、Nについては88より、Pについては68より、Fについては81より、M-1については84より、またはM2-2については58より高いアミノ酸相同性のパーセンテージを示す本質的に哺乳動物性のウイルス単離体は、本発明で提供される単離された本質的に哺乳動物性のネガティブセンス一本鎖RNAウイルスとして分類できる、と結論づけられる。特に、一般にヌクレオチド配列レベルでは、本発明で提供されるプロトタイプMPV単離体と、LおよびMについては81、Nについては83且つ／またはFについては82、という最低の同一性のパーセンテージを有するウイルス単離体は、本発明で提供されるMPV単離体のグループのメンバーである。アミノ酸レベルでは、これらのパーセンテージは、LおよびNについては91、Mについては94、且つ／またはFについては95である。所与のウイルス単離体についてのアミノ酸配列相同性のパーセンテージが、LおよびNについては90より、Mについては93より、またはFについては94より高い場合、そのウイルス単離体は、図5に示すMPV単離体のグループと同じものである。所与のウイルス単離体についてのアミノ酸配列相同性のパーセンテージが、Lについては94より、Nについては95より、またはMおよびFについては97より高い場合、そのウイルス単離体は、図5に示す遺伝子型クラスターの1つに属すると同定できる。これらの相同性のパーセンテージ（これにより遺伝的クラスターが規定される）が、RSVの対応する遺伝子の遺伝的クラスター間で見られる相同性の程度とほぼ同じであることに注目すべきである。

30

【0027】

つまり、本発明は、単離された、本質的に哺乳動物性のネガティブセンス一本鎖RNAウイルス（MPV）であって、パラミクソウイルス科のニューモウイルス亜科に属するものであり、かつ、そのウイルスのゲノムの適当な断片の核酸配列を決定し、それを、最尤系統樹が100のブートストラップおよび3のジャンブルを用いて作製される系統樹解析で試験し

40

50

、それが、鳥類の鼻気管炎の原因物質である七面鳥鼻気管炎ウイルス（TRTV）としても知られるトリ・ニューモウイルス（APV）のウイルス単離体に該当するというよりも、CNCM（パリ）にI-2614として寄託されているウイルス単離体に系統学的により近いものとして該当することを見出すことにより、系統学的にメタニューモウイルス属に該当するとして同定されうる上記ウイルスを提供する。

【0028】

こうした系統樹解析にそれぞれ有用な好適な核酸ゲノム断片は、例えば、本明細書の「詳細な説明」において開示されるRAP-PCR断片1～10のいずれかであり、本明細書において図4または5に開示されるような種々の系統樹解析が導かれる。MPVの核タンパク質（N）、リン酸化タンパク質（P）、マトリックスタンパク質（M）および融合タンパク質（F）の遺伝子の系統樹解析を行ったところ、APV血清型C（アメリカ合衆国で主に鳥類で見られるトリ・ニューモウイルス）と、最も高い配列相同意性を示すことが判明した。
10

【0029】

1つの好ましい実施形態において、本発明は、単離された、本質的に哺乳動物性のネガティブセンス一本鎖RNAウイルス（MPV）であって、パラミクソウイルス科のニューモウイルス亜科に属するものであり、かつ、そのウイルスのゲノムの適当な断片の核酸配列を決定し、それを、最尤系統樹が100のブートストラップおよび3のジャンブルを用いて作製される系統樹解析で試験し、それが、鳥類の鼻気管炎の原因物質である七面鳥鼻気管炎ウイルス（TRTV）としても知られるトリ・ニューモウイルス（APV）のウイルス単離体に該当するというよりも、CNCM（パリ）にI-2614として寄託されているウイルス単離体に系統学的により近いものとして該当することを見出すことにより、系統学的にメタニューモウイルス属に該当するとして同定可能であり、但し、その適当な断片がそのウイルスのウイルスタンパク質をコードするオープニングフレームを含む、上記ウイルスを提供する。
20

【0030】

好適なオープニングフレーム（ORF）は、Nタンパク質をコードするORFを含む。単離体I-2614のNタンパク質に対して分析したNタンパク質に少なくとも91%、好ましくは少なくとも95%の全体のアミノ酸同一性が見られる場合、分析したウイルス単離体は、本発明による好ましいMPV単離物を含んでいる。図示されているように、MPVのゲノム地図中の第1の遺伝子は、394アミノ酸（aa）のタンパク質をコードし、他のニューモウイルスのNタンパク質と広範にわたる相同意性を示す。NのORFの長さは、APV-CのNのORFの長さと同じであり（表5）、他のパラミクソウイルスの長さ（Barrら, 1991）よりは短い。アミノ酸配列の分析から、APV-Cとは最も高い相同意性（88%）を有し、他のパラミクソウイルスとは7～11%しか有しないことが判明した（表6）。
30

【0031】

Barrら（1991）は、モノネガウイルス目（Mononegavirales）に属するウイルスの間で類似性を示す3つの領域：A、BおよびCを同定した（図8）。類似性はウイルス科内では最も高いが、これらの領域はウイルス科の間でも高度に保存されている。3つ全ての領域において、MPVは、APV-Cと97%、APV-Bと89%、APV-Aと92%、RSVおよびPVMと66～73%のアミノ酸配列同一性を有することが判明した。アミノ酸残基160～340の領域は、メタニューモウイルス間では高度に保存されており、ニューモウイルス亜科に対してはそれより多少低い程度であると思われる（Miyaharaら, 1992；Liら, 1996；Barrら, 1991）。これは、MPVがメタニューモウイルスであることと一致しており、この特定の領域はAPV Cと99%の類似性を示す。
40

【0032】

系統学的解析において有用なもう1つの好適なオープニングフレーム（ORF）は、Pタンパク質をコードするORFを含む。分析したPタンパク質と単離体I-2614のPタンパク質との間に少なくとも70%、好ましくは少なくとも85%の全体アミノ酸同一性が見られる場合、分析したウイルス単離体は、本発明による好ましいMPV単離体を含んでいる。ゲノム地図中のこの第2のORFは、APV-CのPタンパク質と68%のアミノ酸配列相同意性を有し、RSVの
50

Pタンパク質とは22～26%しか有しない294アミノ酸のタンパク質をコードする（表6）。MPVのP遺伝子は、1個の実質的なORFを含み、それに関しては、多くの他のパラミクソウイルス由来のPと同様である（LambおよびKolakofsky, 1996；Seldmeierら, 1998を参照のこと）。APV-AおよびBならびにPVMとは違って、しかしRSVおよびAPV-Cとは同様に、MPVのORFにシステイン残基が欠けている。Ling(1995)は、全てのニューモウイルス間で高い類似性がある領域（アミノ酸185～241）がRNA合成プロセスまたはヌクレオカプシド複合体の構造的完全性の維持において役割を担っていることを示唆した。この高い類似性の領域は、特に同類置換を考慮に入れる場合、MPVにおいてもみとめられ（図9）、APV-Cとは100%、APV-AおよびBとは93%、RSVとは約81%の類似性を示す。MPVのPタンパク質のC末端は、APVについて記載されているのと同様に（Lingら, 1995）、グルタミン酸残基に富んでいる。

10

【0033】

系統学的解析において有用であるもう1つの好適なオープンリーディングフレーム（ORF）は、Mタンパク質をコードするORFを含む。分析したMタンパク質と単離体I-2614のMタンパク質との間に少なくとも94%、好ましくは少なくとも97%の全体アミノ酸同一性が見られる場合、分析したウイルス単離体は、本発明による好ましいMPV単離体を含んでいる。ゲノム地図中のこの第3のORFは、254アミノ酸のタンパク質をコードし、これは他のニューモウイルスのMのORFと同様である。MPVのMのORFは、他のメタニューモウイルスのMのORFと全く同じ大きさであり（表5）、APVのマトリックスタンパク質と高いアミノ酸配列相同意（76～87%）を示し、RSVおよびPVMのものとはそれより低い相同意（37～38%）を示し、他のパラミクソウイルスのものとは10%以下の相同意を示す（表6）。Easton(1997)は、全てのニューモウイルスのマトリックスタンパク質の配列を比較し、残基14～19において保存されたヘキサペプチドを見出した。このヘキサペプチドはMPVにおいても保存されている（図10）。RSV、PVMおよびAPVでは、Mの第1のORF内に、またはそのORFと重複して、小さな二次的なORFが同定されている（bRSVでは52アミノ酸および51アミノ酸、RSVでは75アミノ酸、PVMでは46アミノ酸、APVでは51アミノ酸）（Yuら, 1992；Eastonら, 1997；Samalら, 1991；Satakeら, 1984）。本発明者らは、MPVのMのORFの中の2つの小さなORFに注目した。54アミノ酸残基の1つの小さなORFは、第1のMのORF内に見出され、ヌクレオチド2281から始まるものであり、33アミノ酸残基の1つの小さなORFは、第1のMのORFと重複して見出され、ヌクレオチド2893から始まっている（データは示さず）。RSVおよびAPVの第2のORFと同様に、これらの第2のORFと他のニューモウイルスの第2のORFとの間に有意な相同意はなく、明確な開始シグナルまたは停止シグナルがない。更に、APVおよびRSVのこれらの第2のORFに対応するタンパク質の合成についての証拠は報告されていない。

20

【0034】

系統学的解析において有用であるもう1つの好適なオープンリーディングフレーム（ORF）は、Fタンパク質をコードするORFを含む。分析したFタンパク質と単離体I-2614のFタンパク質との間に少なくとも95%、好ましくは少なくとも97%の全体アミノ酸同一性が見られる場合、分析したウイルス単離体は、本発明による好ましいMPV単離体を含んでいる。MPVのFのORFは、MのORFに隣接して位置しており、これはメタニューモウイルス属のメンバーの特徴である。MPVのF遺伝子は539アミノ酸のタンパク質をコードし、これはAPV-CのFよりもアミノ酸残基2個分だけ長い（表5）。このアミノ酸配列の分析から、APV-Cとは81%、APV-AおよびBとは67%、ニューモウイルスFタンパク質とは33～39%、他のパラミクソウイルスとは僅か10～18%の相同意があることが判明した（表6）。パラミクソウイルスのFタンパク質間で保存されている特徴の1つで、MPVでも見られるものは、システイン残基の分布である（Morrison, 1988；Yuら, 1991）。メタニューモウイルスは、F1中に12個のシステイン残基（内、7個は全てのパラミクソウイルス間で保存されている）、そしてF2中に2個（内、1個は全てのパラミクソウイルス間で保存されている）を有する。MPVのFのORF内に存在する3つの可能性のあるN-結合グリコシル化部位のうち、RSVと共に通するものはなく、2つ（66位および389位）はAPVと共に通している。MPVの第3のユニークな可能性のあるN結合グリコシル化部位は、206位に位置する（図11）。MPVのFタンパク質については

30

40

50

、他のパラミクソウイルスとの配列相同性は低いものの、他のパラミクソウイルス科のメンバーのFタンパク質について記載されているもの(Morrison, 1988)と一致する典型的な融合タンパク質の特徴が明らかになった。パラミクソウイルスのメンバーのFタンパク質は、不活性な前駆体(F0)として合成され、それが宿主細胞のプロテアーゼにより切断されて、アミノ末端側のF2サブユニットと大きなカルボキシ末端側のF1サブユニットを生じる。提案されている切断部位(Collinsら, 1996)は、パラミクソウイルス科の全てのメンバー間で保存されている。MPVの切断部位は、残基RQSRを含む。2つのアルギニン(R)残基はAPVおよびRSVと共有するが、グルタミン(Q)およびセリン(S)残基は、ヒト・パラインフルエンザウイルス1型、センダイウイルスおよび麻疹ウイルスなどの他のパラミクソウイルスと共有していない(データは示さず)。F1のアミノ末端にある疎水性領域は、膜融合ドメインとして機能すると考えられ、パラミクソウイルスおよび麻疹ウイルスの間では高い配列類似性を、ニューモウイルスではそれより低い配列類似性を示す(Morrison, 1988)。これらの26の残基(137~163位、図11)は、MPVとAPV-Cとの間では保存されており、このことは、この領域がメタニューモウイルス間で高度に保存されていることと一致する(Naylorら, 1998; Sealら, 2000)。

10

【0035】

APVおよび他のパラミクソウイルスのF2サブユニットについて判るように、MPVは、RSVと比較して22個のアミノ酸残基が欠失していることが判明した(107~128位、図11)。更に、RSVおよびAPVでは、シグナルペプチドおよびアンカードメインが亜型内で保存されていることが判り、亜科間では高い多様性を示した(Plowsら, 1995; Naylorら, 1998)。MPVのF2のアミノ末端にあるシグナルペプチド(アミノ酸10~35、図11)は、APV-Cとある程度の配列類似性を示し(26個のアミノ酸残基のうち18個が類似)、他のAPVともRSVともあまり保存されていない。F1のカルボキシ末端にある膜アンカードメインでは、ずっと高い多様性が見られるが、それでもAPV-Cとは多少の相同性が見られる。

20

【0036】

系統学的解析において有用であるもう1つの好適なオープニングフレーム(ORF)は、M2タンパク質をコードするORFを含む。分析したM2タンパク質と単離体I-2614のM2タンパク質との間に少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%の全体アミノ酸同一性が見られる場合、分析したウイルス単離体は、本発明による好ましいMPV単離体を含んでいる。M2遺伝子は、ニューモウイルス亜科に固有のものであり、全てのニューモウイルスにおいて2つの重複するORFがみつかっている。第1の主要なORFはM2-1タンパク質に該当し、これはウイルスピリメラーゼのプロセッシビティ(Collinsら, 1995; Collins, 1996)およびその遺伝子間領域のリードスルーハードィング(Hardyら, 1998; Fearnら, 1999)を増大させる。MPVのM2-1領域は、F遺伝子に隣接して位置し、187アミノ酸のタンパク質をコードし(表5)、APV-CのM2-1と最も高い(84%)相同性を示すことが判る(表6)。全てのニューモウイルスのM2-1タンパク質を比較したところ、そのタンパク質のアミノ末端側の半分において最も高度に保存されていることが判明し(Collinsら, 1990; Zamoraら, 1992; Ahmadianら, 1999)、このことは、MPVが、そのタンパク質の最初の80個のアミノ酸残基において、APV-Cと100%の類似性を示すという知見と一致している(図12A)。MPVのM2-1タンパク質は、最初の30個のアミノ酸残基の内部に位置する3個のシステイン残基を含み、それは全てのニューモウイルス間で保存されている。そのような濃度のシステインは、亜鉛結合タンパク質ではよく見られる(Ahmadianら, 1991; Cuestaら, 2000)。

30

【0037】

ニューモウイルスのM2-1のORFと重複する第2のORF(M2-2)は、位置においては保存されているが、配列は保存されておらず、ウイルスRNAの複製と転写の切り替えの調節に関与すると考えられる(Collinsら, 1985; Elangoら, 1985; Baybuttら, 1987; Collinsら, 1990; Lingら, 1992; Zamoraら, 1992; Alansariら, 1994; Ahmadianら, 1999; Berminghamら, 1999)。MPVでは、M2-2のORFは、M2-1のORF内のヌクレオチド512から始まり(図7)、これはAPV-Cの場合と全く同じ開始位置である。M2-2のORFの長さはAPV-CおよびMPVと同じで、77個のアミノ酸残基からなる(表5)。M2-2のORFの配列比較(図12B)から、MPV

40

50

とAPV-Cの間では56%のアミノ酸配列相同性があり、MPVとAPV-AおよびBとの間では26～27%の配列相同性しかないことが判った（表6）。

【0038】

系統学的解析において有用であるもう1つの好適なオーブンリーディングフレーム（ORF）は、Lタンパク質をコードするORFを含む。分析したLタンパク質と単離体I-2614のLタンパク質との間に少なくとも91%、好ましくは少なくとも95%の全体アミノ酸同一性が見られる場合、分析したウイルス単離体は、本発明による好ましいMPV単離体を含んでいる。他のネガティブ鎖ウイルスと同様に、MPVゲノムのこの最後のORFは、複製および転写複合体のRNA依存性RNAポリメラーゼ成分である。MPVのL遺伝子は、2005アミノ酸のタンパク質をコードし、これはAPV-Aのタンパク質よりも残基1個分だけ長い（表5）。MPVのLタンパク質は、APV-Aとは64%、RSVとは42～44%、他のパラミクソウイルスとは約13%の相同性を有する（表6）。Pochら（1989；1990）は、非セグメント化ネガティブ鎖RNAウイルスのLタンパク質内の6つの保存されたドメインを同定し、その中のドメインIIIは、ポリメラーゼの機能に必要不可欠であると考えられる4つのコアポリメラーゼモチーフを含んでいた。これらのモチーフ（A、B、CおよびD）は、MPVのLタンパク質ではよく保存されている。モチーフA、BおよびCでは、MPVは全てのニューモウイルスと100%の類似性を有し、モチーフDでは、MPVはAPVと100%、RSVとは92%の類似性を有する。ドメインIII全体（LのORFのアミノ酸625～847）では、MPVは、APVとは83%、RSVとは67～68%、他のパラミクソウイルスとは26～30%の同一性を有する（図15）。ニューモウイルスのLタンパク質は、ポリメラーゼモチーフに加えて、共通ATP結合モチーフK(X)₂₁GEGAGN(X)₂₀Kに合致する配列を含んでいる（Stec, 1991）。MPVのLのORFは、APVとほぼ同様のモチーフを含んでおり、介在残基の間隔は1個分だけ離れている：K(X)₂₂GEGAGN(X)₁₉K。

10

20

30

【0039】

系統学的解析において有用である、更に好ましい好適なオーブンリーディングフレーム（ORF）は、SHタンパク質をコードするORFを含む。分析したSHタンパク質と単離体I-2614のSHタンパク質との間に少なくとも30%、好ましくは少なくとも50%、更に好ましくは少なくとも75%の全体アミノ酸同一性が見られる場合、分析したウイルス単離体は、本発明による好ましいMPV単離体を含んでいる。MPVのM2に隣接して位置するこの遺伝子は、183アミノ酸のタンパク質をコードする（図7）。ヌクレオチド配列およびその推定アミノ酸配列の分析から、他のRNAウイルス遺伝子または遺伝子産物とは明確な相同性はないことが判った。MPVのSHのORFは、現時点で知られている最も長いSHのORFである（表5）。SHのORFのアミノ酸残基の組成は、APV、RSVおよびPVMのものと比較的類似しており、トレオニンおよびセリンの割合（%）が高い（MPV、APV、RSV A、RSV B、bRSVおよびPVMについて、それぞれ22%、18%、19%、20.0%、21%および28%のセリン／トレオニン含量）。MPVのSHのORFは、10個のシステイン残基を含んでいるが、APVのSHは16個のシステイン残基を含んでいる。全てのニューモウイルスは、ほぼ同数の潜在的なN-グリコシル化部位を有する（MPVは2、APVは1、RSVは2、bRSVは3、PVMは4）。

40

【0040】

MPVのSHタンパク質ならびにAPVおよびRSVのSHについての疎水性度プロフィールは、ほぼ同様の構造的な特徴があることが判った（図13B）。APVおよびMPVのSHのORFは、親水性のN末端（アミノ酸1～30）、潜在的な膜貫通ドメインとしての役割を果たし得る中央の疎水性ドメイン（アミノ酸30～53）、残基160付近の第2の疎水性ドメイン、および親水性C末端を有する。これに対し、RSVのSHは、APVおよびMPVのORFのC末端側の半分を欠いていると思われる。全てのニューモウイルスのSHタンパク質において、疎水性ドメインは塩基性アミノ酸に隣接しており、これはMPVのSHのORFにおいても見られる（アミノ酸29および54）。

50

【0041】

系統学的解析において有用である、もう1つの更に好ましい好適なオーブンリーディングフレーム（ORF）は、Gタンパク質をコードするORFを含む。分析したGタンパク質と単離体I-2614のGタンパク質との間に少なくとも30%、好ましくは少なくとも50%、更に好まし

50

くは少なくとも75%の全体アミノ酸同一性が見られる場合、分析したウイルス単離体は、本発明による好ましいMPV単離体を含んでいる。MPVのGのORFは、SH遺伝子に隣接して位置しており、236アミノ酸のタンパク質をコードする。このORFのすぐ後に、第2の小さなORFが見られ、これは68個のアミノ酸残基(6973~7179位)を潜在的にコードするが、開始コドンが欠けている。別のリーディングフレーム内に存在する194アミノ酸残基の第3の主要なORF(断片4、図7)は、これらのORFの両者と重複しているが、これもまた開始コドンが欠けている(スクレオチド6416~7000)。この主要なORFの後ろには、同じリーディングフレーム内に第4のORFが存在し(nt7001~7198)、65個のアミノ酸残基をコードする可能性があるが、これもまた開始コドンが欠けている。最後に、可能性のある97アミノ酸残基のORF(開始コドンが欠けている)が、第3のリーディングフレーム内に見られる(nt6444~6737、図1)。第1のORFとは違って、それ以外のORFは、明確な遺伝子開始配列または遺伝子終結配列を持たない(後記を参照)。236アミノ酸残基のGのORFは、MPVの接着タンパク質の少なくとも一部に該当すると思われるが、更なるコード配列が、何らかのRNA編集事象により別のタンパク質または接着タンパク質の一部として発現されることも除外できない。APVおよびRSVでは、第1のGのORFの後ろに第2のORFが同定できなかったこと、しかしAPVもRSVもGの主たるORF内に第2のORFを有していることに注目すべきである。しかし、これらのORFの発現に関する証拠はなく、異なるウイルスの推定アミノ酸配列間に相同性はない(Lingら, 1992)。MPVのGにおける第2のORFは、他のGタンパク質の特徴を示さず、この別のORFが発現されるか否かについては、更なる調査が必要である。この4つのORF全てを用いたBLAST分析から、スクレオチドレベルでもアミ

ノ酸配列レベルでも、他の既知のウイルス遺伝子または遺伝子産物との明確な相同性は示されなかった。このことは、他のGタンパク質についてhRSV AおよびB(53%) (Johnsonら, 1987)ならびにAPV AおよびB(38%) (Juhaszら, 1994)などの低い配列相同性が見られることと一致する。MPVのORFの多くは、長さにおいても配列においてもAPVのものと類似しているが、MPVのGのORFはAPVのGのORFよりもかなり小さい(表5)。アミノ酸配列から、セリンおよびトレオニンの含量が34%であることが判明し、これはRSVでの32%やAPVでの24%よりも高い。また、GのORFは8.5%のプロリン残基も含んでおり、これはRSVでの8%やAPVでの7%より高い。APV、RSVおよびMPVのGタンパク質ではプロリン残基が並外れて豊富であることは、ムチン源である糖タンパク質(タンパク質の三次元構造の主な決定要因)においても見られている(Collinsら, 1983; Wertzら, 1985; Jentoft, 1990)。MPVのGにおける可能性のあるN結合グリコシル化部位の数は、他のニューモウイルスとほぼ同じである(MPVは5つであるが、hRSVは7つ、bRSVは5つ、APVは3~5つ)。

【0042】

MPVのGの推定される疎水性度プロフィールは、他のニューモウイルスと同様の特徴を示した。アミノ末端は親水性領域を含み、その後ろに短い疎水性領域(アミノ酸33~53)および主に親水性のカルボキシ末端と続く(図14B)。この全体的構成は、アンカー型II型膜貫通ドメインと一致し、APVおよびRSVのGタンパク質のこれらの領域に十分に対応する。MPVのGのORFは、RSVやAPV(それぞれ5個および20個)とは違って、1個のシステイン残基しか含まない。

【0043】

例えばFrancki, R.I.B., Fauquet, C.M., Kundson, D.L.およびBrown, F., Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Arch Virol, 1991. Supplement 2:p. 140-144から知られているような古典的な血清学的分析によれば、MPV単離体はまた、本発明で提供される血清型に属するものとして同定可能であり、動物の抗血清(例えば「詳細な説明」に示されているようにしてフェレットまたはモルモットから得たもの)を用いる定量的中和により決定した場合のその免疫学的特徴に基づいて定められる。そのような血清型は、他のものと交差反応しないか、あるいは両方向において16を超える同種・異種力価比を示す。中和が2種のウイルス間で一方または両方向にある程度の交差反応を示す場合は(8または16の同種・異種力価比)、DNAの実質的な生物物理学的/生化学的相違が存在する場合には、血清型は

10

20

30

40

50

区別されるものとみなされる。中和が2種のウイルス間で一方または両方向に明らかな程度の交差反応を示す場合は(8未満の同種同士・異種同士の力価比)、検討される単離体の血清型が同一であるとみなされる。上記で述べたように、単離体I-2614(本明細書中ではMPV単離体00-1としても知られる)などの有用なプロトタイプ単離体が本発明において提供される。

【0044】

ウイルスの、本発明で提供される単離された本質的に哺乳動物のネガティブセンス一本鎖RNAウイルスとしての更なる分類は、Gおよび/またはSHタンパク質に対する相同性に基づいて行うことができる。一般に、APV(トリから単離されたもの)とMPV(ヒトから単離されたもの)のN、P、M、F、M2およびLのORFにおける全体アミノ酸配列同一性は64~88%であり、ヌクレオチド配列相同性は、APVゲノムとMPVゲノムの非コード領域間で見られ、ヒト単離体(MPV)のORFの2つと他のパラミクソウイルスのORFのいずれかとの間には本質的に明確なアミノ酸配列相同性は見られなかった。ウイルスゲノムにおけるこれらのORFのアミノ酸含量、疎水性度プロフィールおよび位置から、それらがGタンパク質およびSHタンパク質の類似体に該当することが示される。APVとMPVとの配列相同性、それらの類似のゲノム構成(3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5')、ならびに系統学的解析から、MPVを最初の哺乳動物メタニューモウイルスとして分類する提案の更なる証拠が得られる。したがって、新規なMPV単離体は、例えば、ウイルス単離、およびtMKもしくは他の細胞についての特性決定により、RT-PCRおよび/または配列解析とそれに続く系統樹解析により、そしてウイルス中和アッセイ、間接免疫蛍光アッセイ、直接免疫蛍光アッセイ、FAC分析または他の免疫学的技法などの血清学的技法により、同定される。好ましくは、これらの技法は、SHおよび/またはGタンパク質類似体に対するものである。

10

20

30

40

50

【0045】

例えば、本発明は、本明細書中において、本発明において提供されるMPVの更なる単離体の同定方法を提供するものであり、その方法は、本質的にMPV非感染の、または特定の病原体を含まないモルモットまたはフェレットに、プロトタイプ単離体I-2614または関連する単離体を接種することを含む(「詳細な説明」では、この動物は鼻腔内接種されるが、筋肉内または皮内接種などの他の方法で接種してもよく、他の実験動物を用いてもよい)。0日目、接種後2週間目および3週間目に、血清をその動物から採取する。その更なる単離体の免疫学的検出では、ウイルス中和(VN)アッセイおよびそれぞれの単離体I-2614に対する間接IFAで測定した場合に特異的に血清転換を起こした動物、ならびにその血清転換を起こした動物からの血清が用いられる。

【0046】

一例として、本発明は、ヒトにおいて重篤なRTIを引き起こす可能性のあるパラミクソウイルス科の新規なメンバー、ヒトのメタニューモウイルスまたはメタニューモウイルス様ウイルス(その最終的な分類は、ウイルス分類委員会による討議を待っているところなので、MPVはここでは、例えば分類学的にAPVに相当するものとして記載している)(MPV)の特性決定を提供する。MPVによって引き起こされる疾患の臨床的所見は、咳、筋肉痛、嘔吐、発熱、細気管支炎(broncholitis)もしくは肺炎、可能性のある結膜炎、またはそれらの組合せなどのhRSVにより引き起こされるものと本質的に類似している。hRSVに感染した小児で見られるように、特に非常に年少の小児は入院が必要になる場合がある。一例として、2001年1月19日付でCNCM(パストール研究所、パリ)にI-2614として寄託されたMPVまたは系統学的にそれに該当するウイルス単離体が、本発明で提供される。それと共に、本発明は、図6a、6b、6cに記載の核酸配列、または構造的にそれらに該当する核酸配列に系統学的に該当する核酸またはその機能性断片を含むウイルスを提供する。特に、本発明は、最尤系統樹が100のブートストラップおよび3のジャンブルを用いて作製される系統樹解析でそれを試験した後で、それが、鳥類の鼻気管炎の原因物質である七面鳥鼻気管炎ウイルス(TRTV)としても知られるトリ・ニューモウイルス(APV)のウイルス単離体に該当するというよりも、CNCM(パリ)にI-2614として寄託されているウイルス単離体に系統学的により近いものとして該当することが見出されることを特徴とするウイルス

を提供する。AVP-Cウイルス単離体を、上記の系統樹解析におけるアウトグループとして使用することが特に有用であり、それは本質的に非哺乳動物性のウイルスであるが、最も近縁である。

【0047】

本発明者らは、この新規なヒト・ウイルスを、複数の知見に基づいて、ヒト・メタニューモウイルスまたはメタニューモウイルス様ウイルス(MPV)と命名することを提案する。EM分析から、パラミクソウイルス様粒子が示された。分類と一致して、MPVは、クロロホルムによる処理に対して感受性であると思われる。MPVはtMK細胞において最適に培養され、トリプシン依存性である。MPVにより引き起こされる臨床的症状、ならびに典型的なCPEおよび赤血球凝集活性がないことから、このウイルスが、hRSVに近縁であることが示唆された。多くのパラミクソウイルスが赤血球凝集活性を有するが、ニューモウイルスの多くはその活性を有していない¹³。

10

【0048】

一例として、本発明は、重篤なRTIに罹患している28人の小児から採取した鼻咽頭吸引物サンプルからの、これまで同定されていなかったパラミクソウイルスを提供する。これらの小児の臨床的症状は、hRSVにより引き起こされるものと非常に類似していた。患者のうち27人が5歳以下の小児であり、その半分が1~12ヶ月齢であった。それ以外に18歳の患者がいた。全ての個体は上部RTIに罹患しており、咳、筋肉痛、嘔吐および発熱から気管支炎および重篤な肺炎までにわたる症状を示していた。これらの患者の大部分は1~2週間にわたり入院した。

20

【0049】

これらの患者からのウイルス単離体は、陰性造影電子顕微鏡でパラミクソウイルスの形態を有していたが、既知のヒトおよび動物のパラミクソウイルスに対する特異的抗血清とは反応しなかった。それらは全て、単離体のうち2つに対して作った血清を用いた間接免疫蛍光アッセイ(IFA)により測定したところ、互いに近縁であった。これらの単離体のうち9種の配列解析を行ったところ、このウイルスがAPVとある程度関連していることが判明した。ウイルス学的データ、配列相同性ならびにゲノム構成に基づいて、本発明者らは、このウイルスがメタニューモウイルス属のメンバーであることを提案する。血清学的調査から、このウイルスは、オランダでの血清陽性率(seroprevalence)は5歳までの年齢のヒトでは100%に達しているので、比較的一般的な病原体であることが示された。更に、血清陽性率は、1958年にヒトから採取した血清では等しく高いことが判り、このことは、このウイルスが、ヒト集団の間で40年以上にもわたって広まっていることを示している。ここで、ウイルス性気道感染の診断アッセイの手段および方法または試験キットならびにワクチンまたは血清または抗体組成物、ならびにMPV感染の治療に有用な抗ウイルス剤の試験またはスクリーニングの方法を開発するための、この提案されたメタニューモウイルス属の新規メンバーの同定が提供される。

30

【0050】

この範囲で、本発明は、とりわけ、本発明によるウイルスから得ることができる単離された核酸もしくは組換え核酸またはそのウイルス特異的な機能性断片を提供する。特に、本発明は、MPVの核酸の同定に適するプライマーおよび/またはプローブを提供する。

40

【0051】

更に、本発明は、本発明による核酸を含むベクターを提供する。まず、MPVのゲノム(の一部)を含むプラスミドベクター、MPVのゲノム(の一部)を含むウイルスベクター(例えば、限定するものではないが、他のパラミクソウイルス、ワクシニアウイルス、レトロウイルス、バキュロウイルスなど)、または他のウイルスもしくは他の病原体のゲノム(の一部)を含むMPVなどのベクターが提供される。更に、2つの重要なパラメーターに基づく、組換えネガティブ鎖ウイルスを作製するための様々な逆遺伝学的技法が記載された。まず第1に、そのようなウイルスの作製は、ネガティブセンスウイルスRNA(vRNA)ゲノムまたはその相補的なコピー(cDNA)の部分または完全長コピーの複製に基づく。このvRNAまたはcDNAは、感染ウイルスから単離してもよいし、in-vitro転写により産生させても

50

よいし、あるいは核酸のトランスフェクションの際に細胞内で產生させててもよい。第2に、組換えネガティブ鎖ウイルスの作製は、機能性ポリメラーゼ複合体に基づく。典型的には、ニューモウイルスのポリメラーゼ複合体は、N、P、L、そして恐らくはM2タンパク質から構成されるが、必ずしもそれらに限定されない。ポリメラーゼ複合体またはその成分は、ウイルス粒子から単離してもよいし、その成分の1種以上を発現している細胞から単離してもよいし、あるいは特定の発現ベクターのトランスフェクションにより產生させててもよい。

【0052】

MPVの感染性コピーは、上記のvRNA、cRNA、またはこれらのRNAを発現しているベクターが上記のポリメラーゼ複合体により複製される場合に得ることができる^{16, 17, 18, 19, 20, 21, 22}。ミニレプリコン、すなわちMPVゲノムの全部または一部を含む完全長コピーを作製するための逆遺伝学的な系を作製する場合は、例えばAPV(Randhawaら, 1997)またはMPV自体から得ることができる3'末端および/または5'末端の核酸配列を使用すればよい。

10

【0053】

また、本発明は、本発明による核酸またはベクターを含む宿主細胞を提供する。MPVのポリメラーゼ成分(多分、N、P、LおよびM2、しかし必ずしもそれらに限定されない)を含んでいるプラスミドまたはウイルスベクターは、適切な細胞型(細菌、昆虫細胞、真核細胞)内でその成分を発現するように原核細胞内で作製される。MPVゲノムの完全長または部分コピーを含むプラスミドまたはウイルスベクターは、ウイルス核酸をin-vitroまたはin-vivoで発現させるために原核細胞内で作製される。後者のベクターは、キメラウイルスまたはキメラウイルスタンパク質の作製のために他のウイルス配列を含んでいてもよいし、複製欠損ウイルスの作製のためにはウイルスゲノムの一部が欠失していてもよいし、弱毒ウイルスの作製のためには突然変異、欠失または挿入を含んでいてもよい。

20

【0054】

MPVの感染性コピー(野生型、弱毒化型、複製欠損型またはキメラ型)は、上記に記載されている現時点での最新技術によりポリメラーゼ成分の共発現により作製できる。

【0055】

更に、1種以上の完全長または部分MPVタンパク質を一過性または安定に発現する真核細胞が使用できる。そのような細胞は、トランスフェクション(タンパク質または核酸ベクター)、感染(ウイルスベクター)またはトランスタクション(ウイルスベクター)により作製でき、上記で述べた野生型、弱毒化型、複製欠損型またはキメラ型のウイルスを相補するのに有用となり得る。

30

【0056】

キメラウイルスは、2種以上のウイルスに対して防御する組換えワクチンの作製に特に使用できる^{23, 24, 26}。例えば、RSVの1種以上のタンパク質を発現するMPVウイルスベクターまたはMPVの1種以上のタンパク質を発現するRSVベクターは、双方のウイルス感染に対してそのようなベクターがワクチン接種された個体を保護すると考えられる。PI3または他のパラミクソウイルスについても同様の方法が考えられる。弱毒型または複製欠損型のウイルスは、他のウイルスについて示唆されているように^{25, 26}、生ワクチンによるワクチン接種の目的で使用できる。

40

【0057】

1つの好ましい実施形態において、本発明は、本発明による核酸によりコードされるタンパク質様分子またはメタニューモウイルス特異的ウイルスタンパク質またはそれらの機能性断片を提供する。有用なタンパク質様分子は、例えば、本発明によるウイルスに由来する遺伝子またはゲノム断片のいずれかから誘導される。ここで提供されるそのような分子またはその抗原性断片は、例えば、診断の方法もしくはキットまたは医薬組成物(例えばサブユニットワクチン)において有用である。特に有用なのは、抗原またはサブユニット免疫原として封入するためのF、SHおよび/もしくはGタンパク質またはそれらの抗原性断片であるが、不活化されているウイルス全体も使用可能である。また、系統学的解析で同定される組換え核酸断片によりコードされるタンパク質様物質も特に有用であり、勿論

50

、系統学的解析において有用なORFの好ましい範囲に含まれるもののが好ましく、特にはMPV特異的抗体をin-vivo（例えは保護目的または診断用の抗体を提供するため）またはin-vitro（例えはファージ提示法または合成抗体を作製するのに有用な別の方法による）で生起させるためのものである。

【0058】

また、本発明では抗体も提供され、それは、本発明によるタンパク質様分子またはそのMPV特異的機能性断片を含む抗原と特異的に反応する天然のポリクローナルもしくはモノクローナルもしくは合成（例えは（ファージ）ライブラリー由来の結合性分子の）抗体である。そのような抗体は、ウイルス単離体またはその成分を本発明で提供される抗体と反応させることを含む、ウイルス単離体をMPVとして同定する方法において有用である。これは、例えは、精製または非精製のMPVまたはその一部（タンパク質、ペプチド）を用い、ELISA、RIA、FACSまたは同様の抗原検出アッセイフォーマット（Current Protocols in Immunology）を用いることにより達成可能である。あるいはまた、感染細胞または細胞培養物を用いて、古典的な免疫蛍光法または免疫組織化学法を用いたウイルス抗原の同定を行うことも可能である。

10

【0059】

ウイルス単離体をMPVとして同定するためのもう1つの方法は、そのウイルス単離体またはその成分を本発明によるウイルス特異的核酸と反応させることを含んでなり、特に、その哺乳動物のウイルスはヒト・ウイルスを含む。

20

【0060】

このようにして、本発明は、本発明の方法によって同様にパラミクソウイルス科のニューモウイルス亜科に含まれるメタニューモウイルス属に属するものとして同定されうる分類学的にネガティブセンス一本鎖RNAウイルスに該当する哺乳動物のウイルスとして同定可能なウイルス単離体を提供する。

30

【0061】

この方法は、哺乳動物のMPV感染をウイルス学的に診断するための方法、例えは、動物のサンプルを本発明による核酸または抗体と反応させることによって、そのサンプル中のウイルス単離体またはその成分の存在を判定することを含んでなる方法において有用である。例は「詳細な説明」に更に示してあり、例えはPCR（または当業界で周知の他の增幅またはハイブリダイゼーション技術）の使用、または免疫蛍光検出（または当業界で公知の他の免疫学的技術）の使用が挙げられる。

【0062】

また、本発明は、哺乳動物のMPV感染を血清学的に診断するための方法であって、その動物のサンプルを本発明によるタンパク質様分子またはその断片または抗原と反応させることによって、そのサンプル中のMPVまたはその成分に対して特異的な抗体の存在を判定することを含んでなる上記方法を提供する。

40

【0063】

本発明で提供される方法および手段は、MPV感染を診断するための診断用キットにおいて特に有用であり、これはウイルス学的または血清学的診断によるものである。そのようなキットまたはアッセイは、例えは、本発明によるウイルス、核酸、タンパク質様分子もしくはその断片、抗原および／または抗体を含む。また、医薬組成物、例えは特にヒトにおけるMPV感染の治療もしくは予防および／または気道疾患の治療もしく予防のための医薬組成物を製造するための、本発明によるウイルス、核酸、タンパク質様分子もしくはその断片、抗原および／または抗体の使用も提供される。ウイルスの弱毒化は、この目的で開発された確立されている方法により達成でき、限定するものではないが、他の種の関連ウイルスの使用、実験動物および／または組織／細胞培養物による連続継代、分子クローンの部位指定突然変異誘発、および関連ウイルス間での遺伝子または遺伝子断片の交換が挙げられる。

【0064】

本発明によるウイルス、核酸、タンパク質様分子もしくはその断片、抗原および／また

50

は抗体を含む医薬組成物は、例えば、本発明による医薬組成物を個体に投与することを含んでなる、MPV感染および／または気道疾患の治療または予防の方法において使用できる。これは、その個体がヒトである場合、とりわけ、そのヒトが5歳以下である場合に最も有用である。何故ならば、そのような幼児および若年の小児は、本発明で提供されるヒトMPVに最も感染しやすいからである。一般に、急性期では、患者は上部呼吸器症状に苦しみ、他の呼吸器疾患および他の疾患に罹患し易くなる。また、下部呼吸器疾患が起こることもあり、更に他の重篤な症状に懸かり易くなる。

【0065】

また、本発明は、気道疾患の治療に有用な抗ウイルス剤を得る方法であって、本発明によるウイルスを含む細胞培養物もしくは実験動物を樹立し、その培養物もしくは動物を候補の抗ウイルス剤で処理して、その剤がもつそのウイルスに対する効果、またはその培養物もしくは動物のその感染に及ぼす効果を判定することを含む上記方法を提供する。そのような抗ウイルス剤の一例は、本発明で提供されるMPV中和抗体またはその機能性成分を含むが、他の性質の抗ウイルス剤も同様にして得られる。本発明はまた、医薬組成物の製造、特に気道疾患（とりわけMPV感染により引き起こされる疾患）を治療するための医薬組成物の製造のための、本発明による抗ウイルス剤の使用を提供し、さらには、MPV感染または呼吸器疾患の治療または予防の方法において有用な、本発明による抗ウイルス剤を含む医薬組成物を提供し、但しこの方法はそのような医薬組成物を個体に投与することを含む。

10

【0066】

「詳細な説明」により本発明を更に説明するが、それらに限定されない。

20

【図面の簡単な説明】

【0067】

【図1a】図1Aは、「表1：単離体00-1とニューモウイルス亜科の他のメンバーのアミノ酸配列間で見られる相同性のパーセンテージ」である。パーセンテージ（×100）は、N、P、M、FおよびLにおける2種のRAP-PCR断片（L8およびL9/10）のアミノ酸配列について示してある。この分析で用いたアクセシション番号は「材料および方法」のセクションに記載されている。

【図1b】図1Bは、「表2：免疫蛍光アッセイおよびウイルス中和アッセイを用いた、年齢群で分類したヒトにおけるMPVの血清陽性率」である。

30

【図2】図2：ウイルス単離体00-1についてRAP-PCRおよびRT-PCRを用いて得られた断片の位置および大きさを含む、APVのゲノムの概略図。断片1～10は、RAP-PCRを用いて得た。断片Aは、RAP-PCR断片1および2中のプライマーと、APVおよびRSVのリーダー配列およびトレイラー配列のアライメントに基づいて設計されたプライマーとを用いて得た⁶。断片Bは、RAP-PCRの断片1および2ならびにRAP-PCRの断片3中に設計されたプライマーを用いて得た。断片Cは、RAP-PCRの断片3ならびにRAP-PCRの断片4、5、6および7中に設計されたプライマーを用いて得た。

【図3-1】図3。ニューモウイルス亜科のメンバーおよびウイルス単離体00-1の間でのN、P、MおよびFのORFの比較。図3-1は、核タンパク質およびリン酸化タンパク質のアライメントを示す。アライメントは、ウイルス単離体00-1の完全なN、P、MおよびFタンパク質ならびにLタンパク質の一部のアミノ酸配列を示す。単離体00-1と他のウイルスとの間で異なるアミノ酸を示し、同一であるアミノ酸はピリオドで表わし、ギャップはダッシュで表わす。数字はそれらタンパク質におけるアミノ酸の位置に該当する。分析に用いたアクセシション番号は、「材料および方法」のセクションに記載されている。APV-A、BまたはC：トリ・ニューモウイルスA型、B型およびC型、b-またはhRSV：ウシまたはヒトの呼吸器合胞体ウイルス、PVM：マウス肺炎ウイルス。L8：L内に位置するRAP-PCRを用いて得られた断片8、L9/10：L内に位置するRAP-PCRを用いて得られた断片9と10との共通配列。Pのアライメントでは、APV-B配列はGenbankから入手できなかった。Lのアライメントでは、bRSV、hRSVおよびAPV-Aの配列だけが入手できた。全ての系統樹において、（図3～5の）DNA配列はClustalWソフトウェアパッケージを用いてアラインして、最尤系統樹は、Phylip 3

40

50

.5プログラムのDNA-MLソフトウェアパッケージを使用し、100のブートストラップおよび3のジャンブルを用いて作製した¹⁵。系統樹の作製に用いた先に公表されている配列は、Genbankから次のアクセション番号で入手可能である：全ORFについて：hRSV : NC001781；bRSV : NC001989；FのORFについて：PVM、D11128；APV-A、D00850；APV-B、Y14292；APV-C、AF187152；NのORFについて：PVM、D10331；APV-A、U39295；APV-B、U39296；APV-C、AF176590；MのORFについて：PVM、U66893；APV-A、X58639；APV-B、U37586；APV-C、AF262571；PのORFについて：PVM、09649；APV-A、U22110；APV-C、AF176591。MPVの9種の異なるウイルス単離体についての系統学的解析は、アウトグループとしてAPV C株を用いて行った。図中で用いた略語：hRSV：ヒトRSV；bRSV：ウシRSV；PVM：マウス肺炎ウイルス；APV-A、BおよびC：トリ・ニューモウイルスA型、B型およびC型。

10

【図3-2】図3-1の続きである。図3-2は、マトリックスタンパク質および融合タンパク質のアライメントを示す。

【図3-3】図3-1及び図3-2の続きである。図3-3は、Lタンパク質のPCR断片8およびPCR断片9/10のアライメントを示す。

【図4】図4：ニューモウイルス属のメンバーおよびウイルス単離体00-1のN、P、MおよびFのORFの系統学的解析。系統学的解析は、次の遺伝子からのウイルス配列について行った：F（パネルA）、N（パネルB）、M（パネルC）およびP（パネルD）。系統樹は、100のブートストラップおよび3のジャンブルを用いた最尤法解析に基づくものである。ヌクレオチドの変化の数を表わすスケールバーを各系統樹について示す。

20

【図5】図5：9種の主なMPV単離体とAPV-C（遺伝的に最も近縁である）とのF（パネルA）、N（パネルB）、M（パネルC）およびL（パネルD）のORFの部分の系統学的関係。系統樹は、最尤法解析に基づくものである。ヌクレオチドの変化の数を表わすスケールバーを各系統樹に示す。APV-Cのアクセション番号：パネルA：D00850；パネルB：U39295；パネルC：X58639；パネルD：U65312。

【図6A-1】図6A：MPV単離体00-1のゲノムの3'末端からのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の情報。ORFを示す。N：核タンパク質のORF；P：リン酸化タンパク質のORF；M：マトリックスタンパク質のORF；F：融合タンパク質のORF；GE：遺伝子の終点；GS：遺伝子の開始点。

【図6A-2】図6Aは、MPV単離体00-1のゲノムの3'末端からのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の情報を示す。図6A-2は図6A-1の続きである。

30

【図6A-3】図6Aは、MPV単離体00-1のゲノムの3'末端からのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の情報を示す。図6A-3は図6A-2の続きである。

【図6B】図6BおよびC：MPV単離体00-1のポリメラーゼ遺伝子（L）内の断片から得られたヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の情報。断片のL内での位置は、APV-C（アクセション番号U65312）とのタンパク質相同性に基づくものである。翻訳された断片8（図6B）は、アミノ酸番号8～243に位置し、断片9と10との共通配列（図6C）は、APV-CのLのORFのアミノ酸番号1358～1464に位置する。

40

【図6C】図6BおよびC：MPV単離体00-1のポリメラーゼ遺伝子（L）内の断片から得られたヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の情報。断片のL内での位置は、APV-C（アクセション番号U65312）とのタンパク質相同性に基づくものである。翻訳された断片8（図6B）は、アミノ酸番号8～243に位置し、断片9と10との共通配列（図6C）は、APV-CのLのORFのアミノ酸番号1358～1464に位置する。

【図7】図7：MPV単離体00-1のゲノム地図。開始コドンおよび停止コドンのヌクレオチド位置は、各ORFの下に示してある。LのORFを横切る二重線は、L遺伝子を短く表わしたこと示す。地図の下の3つのリーディングフレームは、第1のG ORF（ヌクレオチド(nt) 6262～6972）、および重複した、可能性のある第2のORFを表わす。

【図8】図8：MPVと他のニューモウイルスの核タンパク質の推定アミノ酸配列のアライメント。Barr (1991) によって同定された保存領域は、枠で囲んで表わし、A、BおよびCと標記した。ニューモウイルス間での保存領域（Li, 1996）は、灰色の影を付けて示す。ギャップはダッシュで示し、ピリオドはMPVと比較して同一であるアミノ酸残基の位置を示

50

す。

【図9】図9：MPVのリン酸化タンパク質と他のニューモウイルスのリン酸化タンパク質のアミノ酸配列比較。高度に類似する領域(Ling, 1995)は枠で囲み、グルタミン酸に富む領域は灰色の影を付けてある。ギャップはダッシュで表わし、ピリオドはMPVと比較して同一であるアミノ酸残基の位置を示す。

【図10】図10：MPVのマトリックスタンパク質と他のニューモウイルスのマトリックスタンパク質の推定アミノ酸配列の比較。保存されたヘキサペプチド配列(Easton, 1997)は、灰色の影を付けてある。ギャップはダッシュで表わし、ピリオドはMPVと比較して同一であるアミノ酸残基の位置を示す。

【図11】図11：MPVの融合タンパク質と他のニューモウイルスの融合タンパク質の推定アミノ酸配列のアライメント。保存されたシステインは枠で囲んであり、N-結合グリコシル化部位には下線を引いてあり、F0の切断部位には二重下線を引いてあり、融合ペプチド、シグナルペプチドおよび膜アンカードメインは灰色の影をつけてある。ギャップはダッシュで示し、ピリオドはMPVと比較して同一であるアミノ酸残基の位置を示す。

【図12】図12：MPVのM2のORFと他のニューモウイルスのM2のORFのアミノ酸配列比較。M2-1のORFのアライメントをパネルAに示し、保存されたアミノ末端(Collins, 1990; Zamora, 1999)は灰色の影をつけてある。3つの保存されたシステイン残基は太字で印字し、#で示してある。M2-2のORFのアライメントをパネルBに示す。ギャップはダッシュで表わし、ピリオドはMPVと比較して同一であるアミノ酸残基の位置を示す。

【図13】図13：MPVのSHのORFのアミノ酸配列解析。(A) MPVのSHのORFのアミノ酸配列であり、セリン残基およびトレオニン残基には灰色の影を付けてあり、システイン残基は太字とし、疎水性領域には二重下線が引いてある。可能性のあるN-結合グリコシル化部位には一本下線が引いてある。数字は、疎水性ドメインに隣接する塩基性アミノ酸の位置を示す。(B) MPV、APV-AおよびhRSV-BのSHタンパク質の疎水性度プロットのアライメント。17のアミノ酸からなるウィンドウで、KyteおよびDoolittle法(1982)を用いた。矢印は、強疎水性のドメインを示す。ORF内の位置はX軸に示す。

【図14】図14：MPVのGのORFのアミノ酸配列解析。(A) MPVのGのORFのアミノ酸配列であり、セリン残基、トレオニン残基およびプロリン残基には灰色の影を付けてあり、システイン残基は太字とし、疎水性領域には二重下線が引いてある。可能性のあるN-結合グリコシル化部位には一本下線が引いてある。(B) MPV、APV-AおよびhRSV-BのGタンパク質の疎水性度プロットのアライメント。17のアミノ酸からなるウィンドウで、KyteおよびDoolittle法(1982)を用いた。矢印は、強く疎水性の領域を示し、ORF内の位置はX軸に示す。

【図15】図15：MPVおよび他のパラミクソウイルスのポリメラーゼ遺伝子の保存されたドメインのアミノ酸配列の比較。ドメインIIIは、ドメインIII内の枠で囲った4つの保存されたポリメラーゼモチーフ(A、B、CおよびD)(Poch 1998, 1999)と共に示す。ギャップはダッシュで表わし、ピリオドはMPVと比較して同一であるアミノ酸残基の位置を示す。hPIV3：ヒト・パラインフルエンザウイルス3型；SV：センダイウイルス；hPIV-2：ヒト・パラインフルエンザウイルス2型；NDV：ニューカッスル病ウイルス；MV：麻疹ウイルス；nipah：ニパウイルス。

【図16】図16：MPVおよび選択したパラミクソウイルスのM2-1およびLのORFの系統学的解析。M2-1のORFを、ニューモウイルス属の他のメンバーのM2-1のORFとアライメントし(A)、LのORFを、図15(B)の説明に記載されているニューモウイルス属のメンバーおよび選択された他のパラミクソウイルスのLのORFとアライメントした(B)。系統樹は、100のブートストラップおよび3のジャンブルを用いた最尤法解析により作製した。ヌクレオチド変化の数を表わすスケールバーを各系統樹に示す。系統樹内の番号は、共通系統樹に基づくブートストラップ値を示す。

【図17】図17：hMPV単離体00-1の非コード配列。(A) ORF間およびゲノム末端の非コード配列をポジティブセンス鎖で示している。左から右へ向かって、記載したORFの停止コドン、続いて非コード配列、記載した後続のORFの遺伝子開始シグナルおよび開始コドン

10

20

30

40

50

を示している。数字は、hMPV地図における開始コドンおよび停止コドンの最初の位置を示す。公表されている遺伝子終結シグナルと類似性を示す配列には下線を引いてあり、UAAG AAU/A/Cと類似性を示す配列には、配列の上に線を引いて表わす。(B) hMPVのゲノム末端のヌクレオチド配列。hMPVのゲノム末端をAPVのゲノム末端と互いにアライメントした。下線を引いた領域は、RT-PCRアッセイで用いた、APVおよびRSVの3'末端および5'末端に基づくプライマー配列を表わす(Randhawaら, 1997; Minkら, 1991)。太字のイタリック体で示したヌクレオチドは、N遺伝子の遺伝子開始シグナルの一部である。Le:リーダー、Tr:トレイラー。

【図18a】図18:2種のプロトタイプのhMPV単離体とAPV-AおよびAPV-Cとの比較；各種のウイルスタンパク質をコードする核酸についてのDNA類似性マトリックス。
10

【図18b】図18:2種のプロトタイプのhMPV単離体とAPV-AおよびAPV-Cとの比較；各種のウイルスタンパク質をコードする核酸についてのDNA類似性マトリックス。

【図19】図19:2種のプロトタイプのhMPV単離体とAPV-AおよびAPV-Cとの比較；各種のウイルスタンパク質についてのタンパク質類似性マトリックス。

【図20】図20:2種のプロトタイプのhMPV単離体の核タンパク質のアミノ酸アライメント。

【図21】図21:2種のプロトタイプのhMPV単離体のリン酸化タンパク質のアミノ酸アライメント。

【図22】図22:2種のプロトタイプのhMPV単離体のマトリックスタンパク質のアミノ酸アライメント。
20

【図23】図23:2種のプロトタイプのhMPV単離体の融合タンパク質のアミノ酸アライメント。

【図24】図24:2種のプロトタイプのhMPV単離体のM2-1タンパク質のアミノ酸アライメント。

【図25】図25:2種のプロトタイプのhMPV単離体のM2-2タンパク質のアミノ酸アライメント。

【図26】図26:2種のプロトタイプのhMPV単離体の短い疎水性タンパク質のアミノ酸アライメント。

【図27】図27:2種のプロトタイプのhMPV単離体の接着糖タンパク質のアミノ酸アライメント。
30

【図28】図28:2種のプロトタイプのhMPV単離体のポリメラーゼタンパク質のN末端のアミノ酸アライメント。

【図29】図29:ned/00/01および/またはned/99/01を接種した12匹のモルモットの咽喉スワブおよび鼻スワブについてのRT-PCRアッセイの結果。+ = 陽性；- = 陰性；T = 咽喉スワブ；NO = 鼻スワブ；N = 実施せず；? = 不確定；D = 死亡；0~12:感染後の日数。鼻スワブについては2回目の感染だけを試験する。

【図30A】図30A:ned/00/01に感染させ、ned/00/01(GP4、5、6)またはned/99/01(GP1、3)で再感染させたモルモットについてのned/00/01およびned/99/01に対するIgG応答。

【図30B】図30B:ned/99/01に感染させ、ned/00/01(GP8、9)またはned/99/01(GP10、11、12)のいずれかで再感染させたモルモットについてのned/00/01およびned/99/01に対するIgG応答。
40

【図31】図31:ned/00/01またはned/99/01に感染させたモルモットから採取した血清についてのned/00/01およびned/99/01ELISAの特異性。

【図32】図32:3匹の同種感染(00-1/00-1)、2匹の同種感染(99-1/99-1)、2匹の異種感染(99-1/00-1)および2匹の異種感染(00-1/99-1)させたモルモットのned/00/01およびned/99/01ELISAに対する平均IgG応答。

【図33】図33:hMPVに感染させたモルモットのAPV抑制の平均パーセンテージ。

【図34】図34:ned/00/01およびned/99/01に感染したモルモットのned/00/01、ned/99/01およびAPV-Cに対するウイルス中和力値。
50

【図35】図35 ned/00/01を(2回)接種したカニクイザルの咽喉スワブについてのRT-PCRアッセイの結果。+ = 陽性；- = 陰性；N = 実施せず；? = 不確定；0~10：感染後の日数。

【図36】図36A(上の2枚のパネル)：ned/00/01に(再)感染させた2匹のカニクイザルのned/00/01に対するIgA、IgMおよびIgG応答。図36B(下の2枚のパネル)：ned/00/01に感染させた2匹のカニクイザルのAPVに対するIgG応答。

【図37】図37：ヒト血清においてIgG抗体を検出するためのhMPV ELISAおよびAPV抑制ELISAの使用の比較。

【発明を実施するための形態】

【0068】

10

詳細な説明

ウイルス単離および特性決定

1980年から2000年までに、本発明者らは、重篤な呼吸性疾患に罹患している患者から、28種の未同定のウイルス単離体を見出した。これら28種の未同定のウイルス単離体は、tMK細胞ではゆっくり増殖したが、VERO細胞およびA549細胞ではあまり増殖せず、MDCKまたはニワトリ胚形成線維芽細胞では全くまたは殆ど増殖できなかった。これらのウイルス単離体の多くは、tMK細胞で3代継代した後、10日目～14日目にCPEを誘発した。このCPEは、tMKまたは他の細胞培養物においてhRSVまたはhPIVにより誘発されるものとほとんど区別できず、合胞体形成が起こった後で細胞が急速な内部破壊を示し、続いて細胞が単層から剥離することを特徴とする。細胞は通常(時には後に)、ウイルスを初期材料から3代継代した後、接種後10～14日目にCPEを示し、これはhRSVやhPIVなどの他のウイルスにより引き起こされるCPEよりも多少遅い。

20

【0069】

感染tMK細胞の上清を用いてEM分析を行ったところ、13～17nmの短いエンベロープ突起を有する150～600nmのパラミクソウイルス様ウイルス粒子の存在が明らかになった。パラミクソウイルス科などのエンベロープウイルスの生化学的特性と一致して、標準的なクロロホルムまたはエーテルでの処理⁸を行ったところ、tMK細胞ではTCID50が10⁴を超える感染度の低下が起こった。ウイルス感染tMK細胞培養物の上清は、七面鳥、ニワトリおよびモルモットの赤血球では赤血球凝集活性を示さなかった。培養の間、ウイルスの複製は、被験細胞についてトリプシン依存性のようであった。これらのウイルス学的数据を組合せて、新たに同定されたウイルスを分類学的にパラミクソウイルス科の1メンバーとして分類することができた。

30

【0070】

パラミクソウイルス亜科⁹、hPIV 1～4、センダイウイルス、サルウイルス5型、ニューカッスル病ウイルス、hRSV、麻疹ウイルス、おたふくかぜウイルス、ニパウイルス、ヘンドラウイルス、ツパイウイルスおよびマプエラウイルスに特異的なプライマー-セットを用いた逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)分析のために、未同定のウイルス単離体のうちの15種に感染させたtMK細胞からRNAを単離した。RT-PCRアッセイは、関連する可能性のあるウイルスを検出するために低ストリングエンシーにて行い、同種のウイルスストックから単離されたRNAを対照として用いた。入手可能な対照はそれぞれのウイルス特異的プライマーと陽性に反応したが、新たに同定されたウイルス単離体はどのプライマーセットとも反応せず、このことは、そのウイルスが被験ウイルスと近縁ではないことを示した。

40

【0071】

ウイルス感染tMK細胞培養物の上清を2種用いて、モルモットおよびフェレットに鼻腔内接種した。接種の0日目、2週間後および3週間後に、これらの動物から血清を採取した。動物は臨床的症状を示さなかつたが、ウイルス中和(VN)アッセイおよび同種ウイルスに対する間接IFAで測定したところ、全てが血清転換を起こしていた。血清は、間接IFAでは上記に記載されている既知のパラミクソウイルスおよびPVMのいずれとも反応しなかつた。次に、モルモットおよびフェレットの感染前および感染後の血清を用いて、これまで未

50

同定だったウイルス単離体をスクリーニングしたところ、そのうちの28種が、感染後血清を用いた間接IFAにより明らかに陽性を示し、それらが血清学的に近縁であるかまたは同一であることが示唆された。

【0072】

RAP PCR

未知のウイルス単離体についての配列情報を得るために、RAP-PCR¹⁰として知られるランダムPCR増幅戦略を用いた。このために、tMK細胞を、ウイルス単離体の1つ（単離体00-1）ならびに対照としてのhPIV-1に感染させた。両者の培養物が同様のCPEレベルを示した後、培養物上清中のウイルスを連続20～60%ショ糖勾配で精製した。勾配画分を、EMによりウイルス様粒子について調べ、約50%のショ糖を含む画分からRNAを単離したところ、その中にヌクレオカプシドが見られた。双方のウイルス画分から単離した等量のRNAをRAP-PCRに用い、その後でサンプルを3%NuSieveアガロースゲル上で並べて泳動した。次に、未同定のウイルスに特異的な20の差示的に現れるバンドをゲルから精製し、プラスミドpCR2.1 (Invitrogen) にクローニングし、ベクター特異的プライマーを用いて配列決定した。これらの配列を用い、BLASTソフトウェア (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) を用いてGenbankデータベースの配列に対する相同性を検索したところ、20の断片のうち10がAPV/TRTV配列に対して類似性を示した。

【0073】

これら10の断片は、核タンパク質 (N；断片1および2)、マトリックスタンパク質 (M；断片3)、融合タンパク質 (F；断片4、5、6、7) およびポリメラーゼタンパク質 (L；断片8、9、10) をコードする遺伝子内に位置していた（図2）。次に、PCRプライマーを設計して、本発明者らのRAP PCR断片ならびに公表されているニューモウイルス亜科のリーダーおよびトレイラー配列⁶に基づいて、ウイルスゲノムの3'末端についての配列情報を完成させた。3つの断片を増幅した。そのうち、断片AはNのオープンリーディングフレーム (ORF) の3'最末端を含み、断片Bはリン酸化タンパク質 (P) のORFを含み、断片CはMとFのORFのギャップに近傍であった（図2）。これら3つの断片の配列解析から、ウイルスゲノムの3'最末端にNS1およびNS2のORFが存在せず、FのORFの位置はMのORFのすぐ隣であることが判明した。このゲノム構成は、メタニューモウイルスAPVのゲノム構成と類似しており、これもまた、配列相同性と一致している。N、P、MおよびFのORFの翻訳配列全体が、平均して、ニューモウイルス属のメンバーと30～33%、メタニューモウイルス属のメンバーと66～68%の相同性を示した。SHおよびGのORFでは、これらの属のいずれのメンバーとも、認識できる相同性は見られなかった。Nについて見られるアミノ酸相同性は、hRSVとは約40%、APV-C（遺伝的に最も近縁である）とは88%の相同性を示し、これは例えば図3のアミノ酸配列と他のウイルスのそれぞれのNタンパク質のアミノ酸配列との比較から推定できる。Pのアミノ酸配列は、hRSVとは約25%、APV-Cとは約66～68%の相同性を示し、MはhRSVとは約36～39%、APV-Cとは約87～89%の相同性を示し、FはhRSVとは約40%、APV-Cとは約81%の相同性を示し、M2-1はニューモウイルスとは約34～36%、APV-Cとは約84～86%の相同性を示し、M2-2はニューモウイルスとは約15～17%、APV-Cとは56%の相同性を示し、Lにおいて得られる断片は、平均してニューモウイルスとは44%、APV-Cとは64%の相同性を示した。

【0074】

系統学

未同定のウイルス単離体から得たヌクレオチド配列を用いたBLAST検索から、主にニューモウイルス亜科のメンバーとの相同性が明らかになったが、タンパク質配列に基づく相同性からは、他のバラミクソウイルスともある程度の類似性があることが判った（データは示さず）。新たに同定されたウイルス単離体とニューモウイルス亜科のメンバーとの関係の指標として、これらのウイルスのN、P、MおよびFのORFに基づいて系統樹を構築した。全4つの系統樹において、新たに同定されたウイルス単離体は、APVに最も近縁であった（図4）。記載されているAPVの4種の血清型¹¹から、アメリカ合衆国で主に鳥類において見られるメタニューモウイルスであるAPV血清型Cが、その新たに同定されたウイルスに最

10

20

30

40

50

も近い類似性を示した。しかし、APV血清型Dでは部分配列情報しか利用できなかったことに注意すべきである。

【0075】

本発明者らの種々の新たに同定されたウイルス単離体の関係を調べるために、8~9種の単離体（Fについて8種、N、MおよびLについて9種）から得られる配列情報に基づいて系統樹を構築した。この目的のために、N、M、FおよびLのORF内の短い断片を増幅するように設計されたプライマーを使用するRT-PCRを用い、続いて直接配列決定した。予め血清学的な意味で関連していることが判っている9種のウイルス単離体（上記を参照）は、遺伝的にも近縁であることが判った。実際に、全9種の単離体は、APVに対してよりも、互いに対しての方が近縁であった。これらの系統樹に用いた配列情報は限られていたが、9種の単離体は2つのグループに分類できると思われ、単離体94-1、99-1および99-2が一方のグループに入り、他の6種の単離体（94-2；93-1；93-2；93-3；93-4；00-1）は他方のグループに入る（図5）。 10

【0076】

血清陽性率

ヒト集団におけるこのウイルスの血清陽性率を調べるために、異なる年齢のカテゴリーのヒトからの血清を、未同定のウイルス単離体の1つに感染させたtMK細胞を用いる間接IFAにより試験した。この分析から、6ヶ月~12ヶ月の小児の25%がそのウイルスに対する抗体を有しており、5歳までにほぼ100%の小児が血清陽性となることが判明した。間接IFAにより試験した全部で56の血清サンプルをVNアッセイにより試験した。これらのサンプルの51（91%）において、VNアッセイの結果（力値>8）は間接IFAにより得られた結果（力値>32）と一致した。IFAで陽性と判明した4種のサンプルがVN試験では陰性であり（力値<8）、一方、1種の血清がIFAでは陰性に（力値<32）、VN試験では陽性に（力値16）に反応した（表2）。 20

【0077】

1958年にヒトから採取した72の血清を用いて行ったIFA（年齢は8~99歳）^{12,27}では、100%の血清陽性率が示されており、ヒト集団において40年以上にもわたってこのウイルスが広まってきたことを示している。更に、これらの血清の幾つかをVNアッセイで用いて、IFAデータを確認した（表2）。

【0078】

N、M、PおよびF遺伝子の遺伝学的解析から、MPVが、ニューモウイルス属（平均で30%）と比較して、近年提案されたメタニューモウイルス属に対してより高い配列相同性（平均で63%）を有することが明らかになり、したがって、APV/TRTVと同様であり類似したゲノム構成であることが実証された。RSVのゲノム構成（'3-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5'）とは違って、メタニューモウイルス（3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5'）はNS1とNS2の遺伝子を欠失しており、MとLの間の遺伝子の配置が異なっている。本発明者らのウイルス単離体ではM遺伝子とF遺伝子の間にORFが欠けていること、Nの隣にNS1とNS2が欠けていること、そしてAPVとの高いアミノ酸配列相同性を示すことを理由として、ヒトから単離されたMPVを哺乳動物起源、特にヒト起源のメタニューモウイルス属の最初のメンバーとして分類することが提案される。 40

【0079】

系統学的解析から、配列情報が得られた9種のMPV単離体が近縁であることが明らかになった。配列情報は限られていたが、それらは実際に、トリ・メタニューモウイルスのいずれに対してよりも、お互いに対しての方が近縁であった。記載されているAPVの4種の血清型のうち、血清型Cが、N、P、MおよびF遺伝子に基づいて、MPVに最も近縁であった。しかし、血清型Dについて、GenbankからF遺伝子についての部分配列しか入手できず、血清型Bについては、M、NおよびFの配列しか入手できなかっことに注意しなければならない。本発明者らのMPV単離体は、系統樹において2つのクラスターを形成した。hRSVおよびAPVの両者については、異なる遺伝学的および血清学的亜型が記載されている。MPV単離体の2つの遺伝的クラスターが、機能的にも異なる血清学的亜群に該当するか否かは、現在のと 50

ころ不明である。本発明者らの血清学的調査から、MPVがありふれたヒトの病原体であることが示された。このウイルスが重篤なRTIに罹患している小児の臨床サンプルからたびたび単離されたことは、MPVの臨床的かつ経済的なインパクトが大きいものと思われるこことを示す。ウイルス検出および血清学に基づいた新規な診断アッセイは、このウイルス病原体の罹患率ならびに臨床的および経済的インパクトをより詳細に分析することを可能にする。

【0080】

IFAとVNの結果（5つのサンプル）が僅かに異なるのは、IFAではIgG血清抗体だけが検出されたが、VNアッセイでは抗体のクラスおよびサブクラスの両方が検出されるという事実によるのかもしれないし、あるいはその違いは、両者のアッセイの感度の違いによるのかもしれない。IFAではカットオフ値16が使用され、VNではカットオフ値8が使用される。

10

【0081】

一方、IFAとVNアッセイとの違いは、この新たに同定されたウイルスの異なる血清型の間で違いがある可能性を示しているのかもしれない。MPVはAPVに最も近縁であると思われる所以、このヒトウイルスの起源が鳥類だったことが推測される。1958年のヒトから採取した血清サンプルの分析によれば、MPVが40年以上にわたってヒト集団に広がってきたことが明らかにされ、これは、ゾーノシス（人獣共通感染）仮説事象が1958年よりもずっと以前から起こってきたことを示している。

【0082】

材料および方法

20

試料の採取

過去何十年もにわたって、本発明者らの研究室は、RTIに罹患している小児から鼻咽頭吸引物を集めてきており、それについてウイルスの存在についてルーチンに試験してきた。全ての鼻咽頭吸引物は、直接免疫蛍光アッセイ（DIF）により、インフルエンザウイルスA型およびB型、hRSVならびにヒト・パラインフルエンザウイルス（hPIV）1～3型に対する蛍光標識抗体を用いて試験した。鼻咽頭吸引物は、VERO細胞、カニクイザル腎三次（tM K）細胞、ヒト肺内皮（HEL）細胞およびイヌ腎（marbin dock kidney；MDCK）細胞を含む各種の細胞系について迅速シェル-バイアル法¹⁴を用いて、ウイルス単離用に処理を行った。二代または三代の継代後に細胞変性効果（CPE）を示し、DIFで陰性であったサンプルを、間接免疫蛍光アッセイ（IFA）により、インフルエンザウイルスA型、B型およびC型、hRSV A型およびB型、麻疹ウイルス、おたふくかぜウイルス、ヒト・パラインフルエンザウイルス（hPIV）1～4型、センダイウイルス、サルウイルス5型、ならびにニューカッスル病ウイルスに対するウイルス特異的抗体を用いて試験した。多くの場合は原因物質を同定できたが、幾つかの試料は試験したこれら全ての被験ウイルスに対して陰性であった。

30

【0083】

直接免疫蛍光アッセイ（DIF）

RTIに罹患している患者からの鼻咽頭吸引物サンプルを、記載されているようなDIFおよびウイルス単離^{14, 15}に用いた。サンプルは-70℃で保存した。簡単に述べると、鼻咽頭吸引物を5mlのダルベッコMEM（BioWhittaker, Walkersville, MD）で希釈し、ボルテックスミキサーで1分間にわたり十分に混合した。次に、懸濁液を840×gで10分間遠心分離した。沈殿物をマルチスポットスライド（Nutacon, Leimuiden, The Netherlands）に広げ、上清はウイルス単離に用いた。乾燥した後、細胞を、アセトン中で室温にて1分間固定した。洗浄した後、スライドを、インフルエンザA型およびB型、hRSVならびにhPIV1～3型（Dako, Glostrup, Denmark）のような市販のFITC標識ウイルス特異的抗血清と共に、37℃で15分間インキュベートした。PBS中で3回、水道水で1回洗浄した後、スライドをグリセロール/PBS溶液（Citiifluor, UKC, Canterbury, UK）に入れ、カバーをした。スライドを、Axioscop蛍光顕微鏡（Carl Zeiss B.V, Weesp, The Netherlands）を用いて分析した。

40

【0084】

ウイルス単離

50

ウイルス単離では、tMK細胞 (RIVM, Bilthoven, The Netherlands) を、スライドガラス (Costar, Cambridge, UK) が入った24ウェルプレートで、10%ウシ胎仔血清 (BioWhittaker, Vervier, Belgium) を補充した下記の培地を用いて培養した。インキュベートする前に、プレートをPBSで洗浄し、ハンクス塩 (ICN, Costa mesa, CA) を含むイーグルMEMを加えた [そのイーグルMEMの1/2リットルに、0.26gのNaHCO₃、0.025M Hepes (Biowhittaker)、2mM L-グルタミン (Biowhittaker)、100単位のペニシリン、100 μgストレプトマイシン (Biowhittaker)、0.5gラクトアルブミン (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, The Netherlands)、1.0g D-グルコース (Merck, Amsterdam, The Netherlands)、5.0gペプトン (Oxoid, Haarlem, The Netherlands) および0.02%トリプシン (Life Technologies, Bethesda, MD) を補充した]。そのプレートに鼻咽頭吸引サンプルの上清を接種し (0.2ml / ウェルで、それぞれ3連ずつ)、続いて840 × gで1時間遠心分離した。接種後、プレートを37 °Cで最大14日間、培地を1週間に一度交換しながらインキュベートし、また、培養物をCPEについて毎日チェックした。14日後、二代目の継代から細胞を搔き集め、14日間インキュベートした。この工程を三継代にわたり繰り返した。スライドガラスを用いて、後記に記載する間接IFAによりウイルスの存在を示した。

10

【 0 0 8 5 】

動物の免疫

新たに見出されたウイルスに対するフェレットおよびモルモットに特異的な抗血清を、特定の病原体を保有しない2匹のフェレットおよび2匹のモルモットに実験的に鼻腔内感染させることにより生成させて、それらの動物は別々の加圧グローブボックスに収容した。2~3週間後、全ての動物から心臓穿刺により採血し、それらの血清を参照血清として用了いた。その血清は、先に記載されている全てのウイルスについて、後記に記載されている間接IFAにより試験した。

20

【 0 0 8 6 】

間接IFAによる抗原の検出

感染tMK細胞を載せたスライドについて、間接IFAを行った。PBSで洗浄した後、スライドを、ウイルス特異的抗血清と共に、37 °Cで30分間インキュベートした。上記で記載されているように、インフルエンザA型、B型およびC型、hPIV1~3型ならびにhRSVに対するモノクローナル抗体をDIFで用了いた。hPIV4型については、おたふくかぜウイルス、麻疹ウイルス、センダイウイルス、サルウイルス5型、ニューカッスル病ウイルスのポリクローナル抗体 (RIVM)、ならびにフェレットおよびモルモットの参考血清を用了いた。PBSで3回、水道水で1回洗浄した後、スライドを、最初のインキュベーションに用了いた血清に対する二次抗体で染色した。ポリクローナル抗血清の二次抗体は、ヤギ-抗-フェレット (KPL, Guildford, UK, 40倍希釈したもの)、マウス-抗-ウサギ (Dako, Glostrup, Denmark, 20倍希釈したもの)、ウサギ-抗-ニワトリ (KPL, 20倍希釈したもの)、およびマウス-抗-モルモット (Dako, 20倍希釈したもの)を用了いた。スライドは、DIFについて記載されているようにして処理した。

30

【 0 0 8 7 】

間接IFAによるヒトにおける抗体の検出

ウイルス特異的抗体を検出するために、感染tMK細胞をカバーガラス上で冷アセトンで固定し、PBSで洗浄し、1~16倍の希釈度の血清サンプルで染色した。次に、サンプルを、PBS (Dako) 中に80倍希釈したFITC標識ウサギ-抗ヒト抗体で染色した。スライドを上記に記載されているようにして処理した。

40

【 0 0 8 8 】

MPVのウイルス培養

上記で記載した培地中のサブコンフルエント (sub-confluent) な单層のtMK細胞に、24ウェルプレートで二代または三代継代した後でCPEを示したサンプルの上清を接種した。培養物は毎日CPEについてチェックし、週に一度培地を交換した。CPEは单離体ごとに異なっていたので、全ての培養物を、12~14日目に間接IFAにより新規なウイルス单離体に対するフェレット抗体を用いて試験した。陽性の培養物を3回凍結融解した後、低速遠心分

50

離により上清を清澄化し、アリコートをとり、-70℃で凍結保存した。培養上清中のウイルスの50%組織培養感染量(TCID50)を、記載¹⁶されているようにして測定した。

【0089】

ウイルス中和アッセイ

VNアッセイは、ヒトおよび動物の血清の、8倍希釈から出発する連続2倍希釈物を用いて行った。希釈した血清を、TCID50が100のウイルスと共に1時間インキュベートした後、96ウェルプレート内で増殖させたtMK細胞を接種し、その後、プレートを840×gで遠心分離した。3日後および6日後に培地を交換し、接種後8日目にMPVに対するフェレット抗体を用いてIFAを行った。VN力価は、IFAが陰性となり細胞培養物中でCPEが抑制される血清サンプルの最低希釈度として定義した。

10

【0090】

ウイルスの特性決定

赤血球凝集アッセイおよびクロロホルム感受性試験を記載^{8,14}のようにして行った。EM分析では、ウイルスは、感染細胞培養物の上清から17000×gで4℃での微量遠心分離で濃縮した後、ペレットをPBSに再懸濁し、陰性造影EMにより調べた。RAP-PCRのために、ウイルスは、感染tMK細胞上清から、60%ショ糖クッショニングでの超遠心分離(150000×g、4℃で2時間)により濃縮した。次に、60%ショ糖境界画分をPBSで希釈し、20~60%の連続ショ糖勾配に上層し、これを275000×gで4℃にて16時間遠心分離した。ショ糖勾配画分を、EMおよびポリアクリルアミドゲル電気泳動、続いて銀染色により、ウイルス様粒子の存在について調べた。ヌクレオカプシドを含むと思われる約50%のショ糖画分をRNA単離およびRAP-PCRに用いた。

20

【0091】

RNAの単離

RNAは、感染細胞培養物の上清またはショ糖勾配画分から高純度RNA単離キットを用いて製造元(Roche Diagnostics, Almere, The Netherlands)の説明書に従って単離した。

【0092】

RT-PCR

既知のパラミクソウイルスについてのRT-PCRアッセイのためのウイルス特異的オリゴヌクレオチド配列は、追記1に記載されている。ワンステップRT-PCRを、50mM Tris-HCl(pH 8.5)、50mM NaCl、4mM MgCl₂、2mMジチオトレイトル、200 μM 各dNTP、10単位の組換えRNasin(Promega, Leiden, the Netherlands)、10単位のAMV RT(Promega, Leiden, The Netherlands)、5単位のAmpliTaq Gold DNAポリメラーゼ(PE Biosystems, Nieuwerkerk aan de IJssel, The Netherlands)および5 μl RNAを含む50 μlの反応物中で行った。サイクル条件は、42℃で45分および95℃で7分を1回、95℃で1分、42℃で2分、72℃で3分を40回繰り返し、72℃で10分を1回とした。

30

【0093】

RAP-PCR

RAP-PCRは、本質的に記載¹⁰のようにして行った。オリゴヌクレオチド配列は、追記2に記載されている。RT反応では、2 μlのRNAを、10ng/μlのオリゴヌクレオチド、10mMジチオトレイトル、500 μmの各dNTP、25mM Tris-HCl(pH 8.3)、75mM KClおよび3mM MgCl₂を含む10 μlの反応物中で用いた。反応混合物を70℃で5分間、37℃で5分間インキュベートした後、200単位のSuperscript RT酵素(Life Technologies)を添加した。37℃でのインキュベーションを55分間継続し、72℃で5分間のインキュベーションにより反応を停止させた。RT混合物を希釈して、8ng/μlのオリゴヌクレオチド、300 μmの各dNTP、15mM Tris-HCl(pH 8.3)、65mM KCl、3.0mM MgCl₂および5単位のTaq DNAポリメラーゼ(PE Biosystems)を含む50 μlのPCR反応物とした。サイクル条件は、94℃で5分、40℃で5分および72℃で1分を1回、続いて94℃で1分、56℃で2分および72℃で1分を40回繰り返し、72℃で5分を1回とした。RAP-PCRの後、15 μlのRT-PCR産物を3% NuSieveアガロースゲル(FMC BioProducts, Heerhugowaard, The Netherlands)上で並べて泳動した。差示的に現れるMVP特異的断片をゲルからQiaquick Gel Extractionキット(Qiagen, Leusden, The Netherla

40

50

nds) を用いて精製し、pCR2.1ベクター (Invitrogen, Groningen, The Netherlands) に製造元の説明書に従ってクローニングした。

【0094】

配列解析

ベクターpCR2.1 (Invitrogen) にクローニングしたRAP-PCR産物を、M13特異的オリゴヌクレオチドを用いて配列決定した。RT-PCRにより得られたDNA断片を、アガロースゲルからQiaquick Gel Extractionキット (Qiagen, Leusden, The Netherlands) を用いて精製し、PCRに用いたのと同じオリゴヌクレオチドを用いて直接配列決定した。配列解析は、Dynamic ETターミネーターシークエンシングキット (Amersham Pharmacia Biotech, Roosendaal, The Netherlands) およびABI373自動DNAシーケンサー (PE Biosystems) を用いて行った。全ての方法は、製造元の説明書に従って行った。10

【0095】

RT-PCRによるMPVのゲノム断片の作製

RAP-PCR断片間のギャップA,BおよびCにまたがるPCR断片 (図2) を作製するために、ウイルス単離体00-1から単離したRNAについて、先に記載したようなRT-PCRアッセイを用いた。次のプライマーを用いた。

【0096】

断片Aについて：リーダー中に設計されたTR1 : (5' -AAAGAATTCACGAGAAAAAACGC-3') およびNにおいて得られるRAP-PCR断片の3'末端に設計されたN1 (5' -CTGTGGTCTCTAGTCCTACTTC-3')20。

【0097】

断片Bについて：Nにおいて得られるRAP-PCR断片の5'末端に設計されたN2 : (5' -CATGCAAGCTTATGGGC-3') およびMにおいて得られるRAP-PCR断片の3'末端に設計されたM1 : (5' -CAGAGTGGTTATTGTCAGGGT-3')20。

【0098】

断片Cについて：Mにおいて得られるRAP-PCR断片の5'末端に設計されたM2 : (5' -GTGAACTAGGAGCATATG-3') およびFにおいて得られるRAP-PCR断片の3'末端に設計されたF1 : (5' -TCCCCAATGTAGATACTGCTTC-3')30。

【0099】

断片は、前記で記載したようにして、ゲルから精製し、クローニングし、配列決定した30。

【0100】

MPVを診断するためのRT-PCR

9種のMPV単離体のN、M、FおよびLのORFの一部を増幅して配列決定するために、それにつき、プライマーN3 (5' -GCACTCAAGAGATAACCCTAG-3') およびN4 (5' -AGACTTTCTGCTTGCTGCCTG-3') を用いて151ヌクレオチドの断片を増幅し、M3 (5' -CCCTGACAATAACCACTCTG-3') およびM4 (5' -GCCAACTGATTGGCTGAGCTC-3') を用いて252ヌクレオチドの断片を増幅し、F7 (5' -TGCACATCTCCTCTGGGCTTTG-3') およびF8 (5' -TCAAAGCTGCTTGACACTGGCC-3') を用いて221ヌクレオチドの断片を増幅し、L6 (5' -CATGCCCACTATAAAAGGTCAG-3') およびL7 (5' -CACCCAGTCTTCTTGAAA-3') を用いて173ヌクレオチドの断片を増幅した。RT-PCR、ゲル精製および直接配列決定は上記で記載したようにして行った。更に、用いたプローブは次のとおりとした。40

【0101】

Mにおいて用いたプローブ : 5' -TGCTTGTACTTCCCAAAG-3'

Nにおいて用いたプローブ : 5' -TATTTGAACAAAAAGTGT-3'

Lにおいて用いたプローブ : 5' -TGGTGTGGATATTAACAG-3'

系統学的解析

全ての系統樹について、ClustalWソフトウェアパッケージを用いてDNA配列をアライメントし、最尤系統樹は、Phylip3.5プログラムのDNA-MLソフトウェアパッケージを使用し、100のブートストラップおよび3のジャンブルを用いて作製した¹⁵。系統樹の作製に用い50

た先に公表されている配列は、Genbankから次のアクセッション番号で入手できる：全ORFについて：hRSV : NC001781 ; bRSV : NC001989 ; FのORFについて : PVM、D11128 ; APV-A、D00850 ; APV-B、Y14292 ; APV-C、AF187152 ; NのORFについて : PVM、D10331 ; APV-A、U39295 ; APV-B、U39296 ; APV-C、AF176590 ; MのORFについて : PVM、U66893 ; APV-A、X58639 ; APV-B、U37586 ; APV-C、AF262571 ; PのORFについて : PVM、09649 ; APV-A、U22110 ; APV-C、AF176591。MPVの9種の異なるウイルス単離体についての系統学的解析は、アウトグループとしてAPV C株を用いて行った。

【 0 1 0 2 】

図中で用いた略語 : hRSV : ヒトRSV ; bRSV : ウシRSV ; PVM : マウス肺炎ウイルス ; APV-A、BおよびC : トリ・ニューモウイルスA型、B型およびC型。

10

【 0 1 0 3 】

MPVの同定方法の実施例

試料の採取

ウイルス単離体を見出すために、好ましくはヒトなどの哺乳動物、肉食動物（イヌ、ネコ、イタチ（mustellids）、アザラシなど）、ウマ、反芻動物（ウシ、ヒツジ、ヤギなど）、ブタ、ウサギ、トリ（家禽、ダチョウなど）からの鼻咽頭吸引物、咽喉および鼻のスワブ、気管支肺胞洗浄液を調べなければならない。トリの排泄腔スワブおよび糞からも調べることができる。ELISAなどの免疫学的アッセイおよびウイルス中和アッセイのためには、血清を採取しなければならない。

【 0 1 0 4 】

採取したウイルス試料は、5mlのダルベッコMEM培地（BioWhittaker, Walkersville, MD）で希釈し、ボルテックスミキサーで1分間にわたり完全に混合した。次に、懸濁液を840×gで10分間遠心分離した。沈殿物は免疫蛍光技法用としてマルチスポットスライド（Nutacon, Leimuiden, The Netherlands）に広げ、上清はウイルス単離に用いた。

20

【 0 1 0 5 】

ウイルス単離

ウイルス単離では、tMK細胞（RIVM, Bilthoven, The Netherlands）を、スライドガラス（Costar, Cambridge, UK）を含む24ウェルプレートで、10%ウシ胎児血清（BioWhittaker, Vervier, Belgium）を補充した下記の培地を用いて培養した。インキュベートする前に、プレートをPBSで洗浄し、0.52g/LのNaHCO₃、0.025M Hepes（Biowhittaker）、2mM L-グルタミン（Biowhittaker）、200単位/Lのベニシリン、200μg/Lのストレプトマイシン（Biowhittaker）、1g/Lのラクトアルブミン（Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, The Netherlands）、2.0g/LのD-グルコース（Merck, Amsterdam, The Netherlands）、10g/Lのペプトン（Oxoid, Haarlem, The Netherlands）および0.02%トリプシン（Life Technologies, Bethesda, MD）を補充したHanks'塩（ICN, Costa Mesa, CA）を有するイーグルMEM（Eagle's MEM）を供給した。プレートに鼻咽頭吸引サンプルの上清を接種し（0.2ml/ウェルで3連ずつ）、続いて840×gで1時間遠心分離した。接種後、プレートを37℃最大14日間インキュベートし、培地を1週間に一度交換し、培養物をCPEについて毎日チェックした。14日後、二代目の継代から細胞を剥がし、更に14日間インキュベートした。この工程を三継代にわたり繰り返した。スライドガラスを用いて、後記に記載する間接IFAによりウイルスの存在を示した。

30

【 0 1 0 6 】

CPEは概して、第三代継代後、単離体によって8~14日目に見られた。CPEは実際には、tMK細胞または他の細胞培養物においてhRSVもしくはhPIVにより引き起こされるものとは区別できなかった。しかし、hRSVは4日目付近を起点としてCPEを誘導する。CPEは、合胞体形成を特徴とし、その後で細胞は急速な内部破壊を示し、続いて細胞が単層から離脱した。幾つかの単離体では、CPEを観察することが難しく、IFAを用いてこれらの培養物中のウイルスの存在を確認した。

40

【 0 1 0 7 】

MPVのウイルス培養

50

上記で記載した培地中のサブコンフルエントな(sub-confluent)単層のtMK細胞に、24ウェルプレートで二代または三代継代した後でCPEを示したサンプルの上清を接種した。培養物を、CPEについて毎日チェックし、1週間に一度培地を交換した。CPEは単離体ごとに異なっていたので、全ての培養物を、12~14日目に間接IFAにより新規なウイルス単離体に対するフェレット抗体を用いて試験した。陽性の培養物を3回凍結融解した後、低速遠心分離により上清を清澄化し、アリコートをとり、-70℃で凍結保存した。培養物上清中のウイルスの50%組織培養感染量(TCID50)を、当該分野で用いられる確立された技法¹⁶に従って測定した。

【0108】

ウイルスの特性決定

血液凝集アッセイおよびクロロホルム感受性試験を、十分に確立され記載されている当該分野で用いられる技法¹⁴に従って行った。EM分析では、ウイルスを17000×gで4℃での微量遠心分離で感染細胞培養上清から濃縮した後、ペレットをPBSに再懸濁し、陰性造影EMにより調べた。

【0109】

間接IFAによる抗原の検出

採取した被験体は、記載されているようにして処理し、サンプルの沈殿物をマルチスロットスライドに広げた。乾燥した後、細胞をアセトン中で室温で1分間固定した。

【0110】

あるいはまた、ウイルスは、スライドガラスを含む24ウェルスライド内のtMK細胞において培養した。これらのスライドガラスをPBSで洗浄し、アセトン中で室温で1分間固定した。

【0111】

PBSで洗浄した後、スライドを、PBSで1:50~1:100に希釈したポリクローナル抗体と共に、37℃で30分間インキュベートした。本発明者らは、免疫したフェレットおよびモルモットを用いてポリクローナル抗体を得たが、これらの抗体は種々の動物において生起させることができ、ポリクローナル抗体の実施希釈度は各免疫について変えることができる。PBSで3回、水道水で1回洗浄した後、スライドを、FITC標識ヤギ-抗フェレット抗体(KP L, Guilford, UK, 40倍希釈したもの)と共に、37℃で30分間インキュベートした。PBSで3回、水道水で1回洗浄した後、スライドを、グリセロール/PBS溶液(Citifluor, UKC, Canterbury, UK)に入れ、覆った。スライドは、Axioscop蛍光顕微鏡(Carl Zeiss B.V., Weesp, the Netherlands)を用いて分析した。

【0112】

間接IFAによるヒト、哺乳動物、反芻動物または他の動物における抗体の検出

ウイルス特異的抗体を検出するために、MPVを保有する感染tMK細胞をカバーガラス上でアセトンで固定し(上記で記載したとおり)、PBSで洗浄し、希釈度1~16の血清サンプルと共に37℃で30分間インキュベートした。PBSで2回、水道水で1回洗浄した後、スライドを使用する種に対するFITC標識二次抗体(Dako)と共に37℃30分間インキュベートした。スライドは上記で記載したようにして処理した。

【0113】

抗体は蛍光色素で直接標識でき、そうすれば直接免疫蛍光アッセイが行えるだろう。FITCは、任意の蛍光色素で代用できる。

【0114】

動物の免疫

新たに見出されたウイルスに対するフェレットおよびモルモットの特異的抗血清は、2匹の特定の病原体を保有しないフェレットおよび2匹のモルモットの実験的鼻腔内感染により作製し、別々の加圧グローブボックスに収容した。2~3週間後、動物から心臓穿刺により採血し、それらの血清を参照血清として用いた。血清は、全ての先に記載されているウイルスについて、後記に記載されているようにして間接IFAにより試験した。特異的抗体調製物の作製には、他の動物種も適しており、他の抗原調製物も使用可能である。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 5 】

ウイルス中和アッセイ（VNアッセイ）

VNアッセイは、ヒトおよび動物の血清の、8倍希釈から出発する連続2倍希釈物を用いて行った。希釈した血清を、TCID₅₀が100のウイルスと共に1時間インキュベートした後、96ウェルプレート内で増殖させたtMK細胞を接種し、その後、プレートを840×gで遠心分離した。上記で記載したのと同じ培地を使用した。3日後および6日後に培地を交換し、8日にIF_Aを行った（上記を参照）。VN力価は、IF_Aが陰性で細胞培養物中でCPEの抑制が起る血清サンプルの最低希釈度として定義した。

【 0 1 1 6 】

RNAの単離

RNAは、感染細胞培養物の上清またはショ糖勾配画分から高純度RNA単離キットを用いて製造元（Roche Diagnostics, Almere, The Netherlands）の説明書に従って単離した。RNAは、当該分野で公知の他の手順に従って単離することもできる（Current Protocols in Molecular Biology）。

【 0 1 1 7 】

RT-PCR

ワンステップRT-PCRを、50mM Tris-HCl(pH 8.5)、50mM NaCl、4mM MgCl₂、2mMジチオトレイトル、200 μM 各dNTP、10単位の組換えRNAsin（Promega, Leiden, the Netherlands）、10単位のAMV RT（Promega, Leiden, The Netherlands）、5単位のAmpliTaq Gold DNAポリメラーゼ（PE Biosystems, Nieuwerkerk aan de IJssel, The Netherlands）および5 μl RNAを含む50 μlの反応物中で行った。サイクル条件は、42℃で45分および95℃で7分を1回、95℃で1分、42℃で2分、および72℃で3分を40回繰り返し、72℃で10分を1回とした。

【 0 1 1 8 】

診断PCRで用いたプライマー：

核タンパク質では、N3（5'-GCACTCAAGAGATAACCCTAG-3'）およびN4（5'-AGACTTTCTGCTTTGCTGCCTG-3'）を用いて151ヌクレオチドの断片を増幅した。マトリックスタンパク質では、M3（5'-CCCTGACAATAACCACTCTG-3'）およびM4（5'-GCCAACTGATTGGCTGAGCTC-3'）を用いて252ヌクレオチドの断片を増幅した。ポリメラーゼタンパク質では、L6（5'-CATGCCACTATAAAAGGTCAG-3'）およびL7（5'-CACCCCAGTCTTCTTGAAA-3'）を用いて173ヌクレオチドの断片を増幅した。他のプライマーはMPVの配列に基づいて設計でき、特定の目的には異なる緩衝液およびアッセイ条件が使用できる。

【 0 1 1 9 】

配列解析

配列解析は、Dyenamic ETターミネーターシークエンシングキット（Amersham Pharmacia Biotech, Roosendaal, The Netherlands）およびABI373自動DNAシーケンサー（PE Biosystem）を用いて行った。全ての技法は、製造元の説明書に従って行った。PCR断片は、PCRにおいて使用したのと同じオリゴヌクレオチドを用いて直接配列決定するか、あるいは、断片をゲルからQiaquick Gel Extractionキット（Qiagen, Leusden, The Netherlands）を用いて精製し、pCR2.1ベクター（Invitrogen, Groningen, The Netherlands）に製造元の説明書に従ってクローニングし、次にM13特異的オリゴヌクレオチドを用いて配列決定した。

【 0 1 2 0 】

ゲノムの3'末端（NS1 / NS2が欠けている）の分析に用いたオリゴヌクレオチド

プライマーTR1（5'-AAAGAATTCACGAGAAAAAACGC-3'）は、公表されているhRSVおよびAPVのトレイラーおよびリーダーの配列（Randhawa (1997)により公表）に基づいて設計し、プライマーN1（5'-CTGTGGTCTCTAGTCCCACTTC-3'）は、Nタンパク質において得られた配列に基づいて設計した。RT-PCRアッセイおよび配列決定は上記に記載されているようにして行った。

【 0 1 2 1 】

10

20

30

40

50

RT-PCRにより、約500塩基対の産物が得られた。これは2種のORFの情報を含むにしては短く、これらの配列を翻訳しても、ORFは明らかにならなかった。

【0122】

ELISAによるヒト、哺乳動物、反芻動物または他の動物における抗体の検出

パラミクソウイルス科において、Nタンパク質は最も豊富なタンパク質であり、このタンパク質に対する免疫応答は感染の初期に起こる。これらの理由から、MPVに対する抗体を検出するためのELISAアッセイの開発には、Nタンパク質の組換え供給源が好ましく使用される。抗体検出に適する抗原としては、MPVウイルスに暴露された、またはMPVウイルスに感染した患者のMPV特異的抗体のいずれかと結合するあらゆるMPVタンパク質が含まれる。本発明の好ましい抗原としては、MPVに暴露された患者において主に免疫応答を生じさせるものが挙げられ、したがって、それらは典型的には患者の抗体により最も容易に認識される。特に好ましい抗原としては、MPVのN、FおよびGタンパク質が挙げられる。免疫学的技法において使用される抗原は、未変性の抗原とすることができますか、あるいはそれらの修飾バージョンとすることができます。周知の分子生物学の技法を用いて、MPV抗原のアミノ酸配列を改変して、免疫学的技法において使用可能なその抗原の修飾バージョンを產生することができる。

10

【0123】

遺伝子のクローニング方法、発現ベクターへの、または発現ベクターからの遺伝子の操作方法、および異種宿主における遺伝子によりコードされるタンパク質の発現方法は周知であり、それらの技法を用いて、診断アッセイに使用するための組換え抗原を产生するための発現ベクター、宿主細胞、および宿主内での抗原をコードするクローン化遺伝子の発現を提供することができる。例えば、Molecular cloning, A laboratory manual and Current Protocols in Molecular Biologyを参照されたい。MPV抗原の产生には種々の発現系が使用可能である。例えば、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞および哺乳動物細胞においてタンパク質を产生させるのに適する種々の発現ベクターが記載されており、そのいずれもが、暴露された患者において抗MPV抗体を検出するのに適するMPV抗原の产生に使用可能である。

20

【0124】

バキュロウイルス発現系には、必要なタンパク質のプロセシングを提供するという利点があり、そのために好ましい。この系は、MPV抗原の発現を指令するのにポリヘドリンプロモーターを利用する (Matsuuraら, 1987, J. Gen. Virol. 68:1233-1250)。

30

【0125】

組換えバキュロウイルスにより产生される抗原は、患者において抗MPV抗体を検出するための種々の免疫学的アッセイに使用できる。組換え抗原が、実際にウイルス特異的抗体を検出するための免疫学的アッセイにおいて天然ウイルスの代わりに使用できることは、十分に確立されている。このアッセイとしては、直接および間接アッセイ、サンドイッチアッセイ、固相アッセイ（特にプレートもしくはビーズを使用するものなど）、ならびに液相アッセイが挙げられる。好適なアッセイとしては、一次および二次抗体を使用するもの、ならびにプロテインAなどの抗体結合試薬を使用するものが挙げられる。更に、本発明では種々の検出方法が使用可能であり、比色、蛍光、リン光、化学発光、発光および放射性の方法が挙げられる。

40

【実施例】

【0126】

実施例1：組換えNタンパク質を用いる間接抗MPV IgG EIA

抗原として組換えNタンパク質（昆虫（Sf9）細胞内で組換えバキュロウイルスを用いて产生したもの）を使用する間接IgG EIAが実施できる。抗原調製物として、Sf9細胞を組換えバキュロウイルスに感染させ、感染後3～7日目に収集する。細胞懸濁液をPBS (pH 7.2)で2回洗浄し、細胞密度を 5.0×10^6 細胞 / mlに調整し、3回凍結融解する。大きな細胞デブリを低速遠心分離（ $500 \times g$ で15分間）によりペレット化し、上清を集め、使用するまで-70℃で保存する。陰性对照抗原として、未感染細胞を同様に処理する。

50

【0127】

100 μlの凍結融解溶解物を1:50~1:1000の範囲の希釈度で用いて、マイクロタイラプレートをコーティングする。未感染細胞の溶解物を2連ずつウェルに入れ、陰性対照として使う。一夜インキュベートした後、プレートをPBS / 0.05% Tweenで2回洗浄する。試験血清をELISA緩衝液（2%正常ヤギ血清および0.5%ウシ血清アルブミンならびに0.1%ミルクを補充したPBS）で1:50~1:200に希釈し、続いてウェルを37℃で1時間インキュベートする。

【0128】

プレートをPBS / 0.05% Tweenで2回洗浄する。西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト（または他の種に対するもの）IgGをELISA緩衝液で1:3000~1:5000に希釈し、ウェルに加え、37℃で1時間インキュベートする。次に、プレートをPBS / 0.05% Tweenで2回、水道水で1回洗浄し、Sigmaから入手したような酵素基質TMB（3,3',5,5'テトラメチルベンジジン）と共に室温で15分間インキュベートし、反応を100 μlの2Mリン酸により停止する。比色読取は、自動マイクロタイラプレート読取装置を用いて450nmで測定する。

10

【0129】

実施例2：組換え核タンパク質を用いる捕捉抗MPV IgM EIA

抗原として組換え核タンパク質または任意の他の組換えタンパク質を使用する捕捉IgM EIAは、先にErdmanら（1990）によりJ. Clin. Microb. 29:1466-1471に記載されているアッセイに変更を加えることにより実施できる。

20

【0130】

アフィニティ精製抗ヒトIgM捕捉抗体（または他の種に対するもの）（例えばDakoから入手したもの）を、マイクロタイラプレートのウェルに、0.1M炭酸緩衝液（pH 9.6）中で250ng / ウェルの濃度で添加する。室温で一夜インキュベートした後、プレートをPBS / 0.05% Tweenで2回洗浄する。ELISA緩衝液で1:200~1:1000に希釈した100 μlの試験血清を、3連ずつウェルに添加し、37℃で1時間インキュベートする。次に、プレートをPBS / 0.05% Tweenで2回洗浄する。

20

【0131】

凍結融解した（組換えウイルスに感染させた）Sf21細胞溶解物を、ELISA緩衝液で1:100~1:500に希釈し、ウェルに添加し、37℃で2時間インキュベートする。未感染細胞溶解物は陰性対照として使用し、2連ずつウェルに入れる。次に、プレートをPBS / 0.05% Tweenで3回洗浄し、ELISA緩衝液で最適希釈度にした100 μlのMPVに対するポリクローナル抗体と共に37℃で1時間インキュベートする。PBS / 0.05% Tweenで2回洗浄した後、プレートを西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ標識二次抗体（例えばウサギ抗フェレット）と共にインキュベートし、プレートを37℃で20分間インキュベートする。

30

【0132】

次に、プレートをPBS / 0.05% Tweenで5回洗浄し、酵素基質TMB（3,3',5,5'テトラメチルベンジジン）（例えば「Sigma」から入手したもの）と共に室温で15分間インキュベートし、反応を100 μlの2Mリン酸で停止させる。比色読取は、自動マイクロタイラプレート読取装置を用いて450nmで測定する。

30

【0133】

組換え核タンパク質（または他の組換えタンパク質）およびMPVウイルス全体を用いる捕捉IgM EIAの感度を、臨床的MPVウイルス感染に罹患している患者からの急性期および回復期の血清対を用いて比較する。組換え核タンパク質捕捉EIAの特異性は、健常なヒトおよび他のパラミクソウイルス感染に罹患しているヒトからの血清被験体を試験することにより決定する。

40

【0134】

バキュロウイルス発現により産生された組換えMPV融合タンパク質および糖タンパク質のタンパク質を用いることに関するEIAの可能性

糖タンパク質GおよびFは、MPVビリオンの2種の膜貫通エンベロープ糖タンパク質であり、主要な中和および保護抗原を表す。これらの糖タンパク質をベクターウイルス系（例え

50

ばバキュロウイルス系)で発現させると、MPV特異的抗体を検出するためのアッセイで使用する組換え抗原の供給源が得られる。更に、それらを例えれば核タンパク質と組み合せて使用すると、MPVに対する抗体の検出における酵素免疫アッセイの感度がさらに増大する。

【0135】

種々の他の免疫学的アッセイ(*Current Protocols in Immunology*)は、本明細書で記載されているものの代替の方法として使用可能である。

【0136】

ウイルス単離体を見出すためには、好ましくは(限定するものではないが)ヒト、肉食動物(イヌ、ネコ、アザラシなど)、ウマ、反芻動物(ウシ、ヒツジ、ヤギなど)、ブタ、ウサギ、トリ(家禽、ダチョウなど)からの鼻咽頭吸引物、咽喉および鼻のスワブ、気管支肺胞洗浄液を調べればよい。トリからは、排泄腔および腸管のスワブならびに糞も調べることができる。全てのサンプルについて、ウイルスを検出するために、血清学(抗体および抗原の検出など)、ウイルス単離および核酸検出技法を行うことができる。

10

【0137】

モノクローナル抗体は、マウス(または他の動物)を精製したMPVまたはその部分(タンパク質、ペプチド)で免疫し、次に確立されたハイブリドーマ技術(*Current Protocols in Immunology*)を用いることにより作製できる。あるいはまた、ファージディスプレイ技術もこの目的に使用できる(*Current Protocols in Immunology*)。同様に、ポリクローナル抗体は、感染しているヒトもしくは動物、または免疫したヒトもしくは動物から得ることができる(*Current Protocols in Immunology*)。

20

【0138】

NS1タンパク質およびNS2タンパク質の存在又は不在の検出は、種々の抗体調製物を用いるウェスタンブロッティング、IFA、免疫沈降技法を用いて行うことができる。ウイルス単離体におけるNS1遺伝子およびNS2遺伝子またはそれらの相同体の存在または不在の検出は、既知のNS1および/またはNS2遺伝子に基づいて設計されたプライマーセットを使用するPCRならびに種々の核酸ハイブリダイゼーション技法を用いて行うことができる。

20

【0139】

NS1遺伝子およびNS2遺伝子がウイルスゲノムの3'末端に存在するか否かを判定するため、ゲノムのこの3'末端に特異的なプライマーを用いてPCRを行うことができる。本発明者らの場合、本発明者らはウイルスゲノムの3'非翻訳領域に特異的なプライマーおよびNのORF内のプライマーを使用した。同じ目的のために、他のプライマーを設計してもよい。NS1/NS2遺伝子の不在は、PCR産物の長さおよび/またはヌクレオチド配列から明らかになる。NS1および/またはNS2遺伝子に特異的なプライマーは、ウイルスゲノムの3'末端の他の部分(例えば非翻訳領域またはN、MもしくはFのORF)に特異的なプライマーと組み合せて使用して、NS1またはNS2遺伝子の存在の陽性の同定を可能にすることができる。PCRだけでなく、分子クローニング、核酸ハイブリダイゼーションなどの種々の技法が同じ目的に使用可能である。

30

【0140】

実施例3：MPVの各種の血清型／亜群

40

2つの可能性のある遺伝的クラスターが、9種のウイルス単離体のN、M、FおよびLのORFの部分ヌクレオチド配列の分析によって同定される。1つのクラスター内では90~100%のヌクレオチド同一性が見られ、クラスター間では81~88%の同一性が見られた。更なるウイルス単離体について得られた配列情報から、2つの遺伝子型の存在が確認された。クラスターAのプロトタイプとしてのウイルス単離体ned/00/01、およびクラスターBのプロトタイプとしてのウイルス単離体ned/99/01を交差中和アッセイで使用して、遺伝子型が異なる血清型または亜群に関連するか否かを試験した。

【0141】

結果

50

ポリメラーゼ遺伝子内に位置するプライマーを使用するRT-PCRアッセイを用いて、本発

明者らは鼻咽頭吸引サンプルから30種の更なるウイルス単離体を同定した。これらの新たな単離体のマトリックス遺伝子およびポリメラーゼ遺伝子の部分ならびに先の9種の単離体のものの配列情報を用いて、系統樹を構築した(図16)。これらの系統樹の分析から、2種の遺伝的クラスターの存在が確認された。すなわち、A群のプロトタイプウイルスとしてのウイルス単離体ned/00/00-1およびB群のプロトタイプウイルスとしてのウイルス単離体ned/99/01である。1つの群の中でのヌクレオチド配列同一性は92%を上回り、一方、クラスター間では同一性は81~85%であった。

【0142】

ウイルス単離体ned/00/01およびned/99/01を用いてフェレットに接種して、ウイルス特異的抗血清を生起させた。これらの抗血清は、両者のウイルスを用いるウイルス中和アッセイに用いた。

【0143】

表3:

ウイルス中和力値

	単離体 00-1	単離体 99-1
前血清 フェレットA (00-1)	□ 2	□ 2
フェレットA 22dpi (00-1)	6 4	□ 2
前血清 フェレットB (99-1)	□ 2	□ 2
フェレットB 22dpi (99-1)	4	6 4

単離体 00-1 では、力値は 32 (64/2) 倍違う。

単離体 99-1 では、力値は 16 (64/4) 倍違う。

更に、6匹のモルモットにウイルス(ned/00/01とned/99/01)のいずれか一方を接種した。鼻咽頭吸引サンプルについてRT-PCRアッセイを行ったところ、感染後2日目から10日目までウイルスの複製を示した。感染後70日目に、モルモットを同種または異種のウイルスでチャレンジしたところ、全4種の場合について、ウイルス複製が認められた。

【0144】

10

20

30

40

表4

	初回感染	ウイルスの複製	2回目の感染	ウイルスの複製
モルモット1～3	00-1	3匹のうち2匹	99-1	2匹のうち1匹
モルモット4～6	00-1	3匹のうち3匹	00-1	3匹のうち1匹
モルモット7～9	99-1	3匹のうち3匹	00-1	2匹のうち2匹
モルモット10～12	99-1	3匹のうち3匹	99-1	3匹のうち3匹

注：2回目の感染では、モルモット2および9はもはや生存していなかった。

10

1回目のチャレンジ後の抗血清を用いたウイルス中和アッセイでは、フェレットを用いて行ったVNアッセイと本質的に同じ結果が示された（VN力値の差は16倍を上回る）。

【0145】

この実施例で示される結果から、2つの遺伝子型の存在が確認される。それらはMPVの2つの血清型に対応し、異種および同種のウイルスによる繰り返し感染の可能性を示している。

【0146】

実施例4：更なる配列決定

この実施例では、MPVのオープンリーディングフレーム（ORF）の配列および遺伝子間配列、ならびにゲノム末端の部分配列の更なる分析を記載する。

【0147】

MPVの核タンパク質（N）、リン酸化タンパク質（P）、マトリックスタンパク質（M）および融合タンパク質（F）の遺伝子の配列解析から、APV血清型C（アメリカ合衆国で主に鳥類において見られるトリ・ニューモウイルス）と最も高い程度の配列相同性があることが明らかになった。また、これらの分析から、ウイルスゲノムの3'末端において非構造タンパク質NS1およびNS2が存在せず、マトリックスタンパク質のすぐ隣に融合タンパク質が位置することも明らかになった。ここで、本発明者らは、22K（M2）タンパク質、小さな疎水性（SH）タンパク質、接着（G）タンパク質およびポリメラーゼ（L）タンパク質の遺伝子、遺伝子間領域ならびにトレイラー配列の配列を示す。ここで示す配列を、先に記載されている配列と組み合せれば、ゲノム末端の先端の12～15ヌクレオチドを除くMPVのゲノム配列が完全なものになり、MPVのゲノム構成が確立される。MPVゲノムの配列をAPV亜型A、BおよびC、RSV亜型AおよびB、PMVならびに他のパラミクソウイルスの配列と並べて比較すれば、MPVがメタニューモウイルス属に分類されることの強力な証拠が得られる。

【0148】

結果

配列ストラテジー

MPV単離体00-1（van den Hoogenら，2001）を、三次サル腎（tMK）細胞内で増殖させ、接種後3週間目に上清から単離されたRNAをRT-PCR分析の錆型として用いた。プライマーは、MPV00-1について入手できる部分配列情報（van den Hoogenら，2001）ならびにAPVおよびRSVのリーダー配列およびトレイラー配列（Randhawaら，1997；Minkら，1991）に基づいて設計した。初めに、先に得られた産物の間の断片（長さが500bp～4Kbの範囲の大きさ）をRT-PCR增幅により作製し、直接配列決定した。次に、MPVゲノム全体に該当する一連の重複するRT-PCR断片（500～800bpの範囲の大きさ）を作製することにより、ゲノム配列を確認した。全てのPCR断片について、両方の鎖を直接配列決定して、增幅および配列決定の誤差を最小限にした。このヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を用いて、Genbankデータベースの配列との相同性をBLASTソフトウェア（www.ncbi.nih.gov/blast）を用いて検索した。タンパク質の名称は、既知のウイルス遺伝子との相同性ならびにそれらのゲノム内での位置に基づき、オープンリーディングフレーム（ORF）に対して割り当てた。この情報に基づいて、MPVのゲノム地図を構築した（図7）。MPVのゲノムの長さは13378又

20

30

40

50

クレオチドであり、その構成はAPVのゲノム構成と類似する。以下に、本発明者らはMPVのORFおよび非コード配列と他のパラミクソウイルスのものとの間の比較を示し、重要な類似点と差異点について述べる。

【0149】

核タンパク質(N)遺伝子

示すように、MPVのゲノム地図の最初の遺伝子は、394アミノ酸(aa)のタンパク質をコードするものであり、他のニューモウイルスのNタンパク質と広い相同性を示す。NのORFの長さは、APV-CのNのORFの長さと同じであり(表5)、他のパラミクソウイルスのもの(Barrら, 1991)よりも短い。アミノ酸配列の分析から、APV-Cと最も高い相同性(88%)を示し、他のパラミクソウイルスとは7~11%しか示さないことが明らかになった(表6)。10

【0150】

Barrら(1991)は、他のモノネガウイルス目に属するウイルスA、BおよびCの間で類似する3つの領域を同定した(図8)。これらの領域は、類似性はウイルス科内では最も高いが、ウイルス科間では高度に保存されている。3つの領域全てにおいて、MPVは、APV-Cと97%、APV-Bと89%、APV-Aと92%、ならびにRSVおよびPVMと66~73%のアミノ酸配列同一性があることが判明した。アミノ酸残基160~340の間の領域は、メタニューモウイルス間で高度に保存されており、ニューモウイルス亜科ではそれより多少低いと思われる(Miyaharaら, 1992; Liら, 1996; Barrら, 1991)。これは、MPVがメタニューモウイルスであり、APV-Cと100%の類似性を示すことと一致する。20

【0151】

リン酸化タンパク質(P)遺伝子

ゲノム地図の第2のORFは、294アミノ酸のタンパク質をコードするものであり、このタンパク質はAPV-CのPタンパク質と68%のアミノ酸配列相同性を共有するが、RSVのPタンパク質とは22~26%しかない(表6)。MPVのP遺伝子は1つの実質的なORFを含んでおり、それに関しては多くの他のパラミクソウイルス由来のPと類似する(LambおよびKolakofsky, 1996; Sedlmeierら, 1998に概説されている)。30

【0152】

APVのAおよびBならびにPVMとは異なり、RSVおよびAPV-Cとは同様に、MPVのPのORFはシステイン残基が欠けている。Ling(1995)は、全てのニューモウイルス間で高い類似性がある領域(アミノ酸185~241)がRNA合成プロセスまたはヌクレオカプシド複合体の構造の完全性の維持においてある役割を担っていることを示唆していた。この高い類似性のある領域はMPVにおいても、特に保存的置換を考慮に入れた場合に見られており(図9)、APV-Cと100%、APV-AおよびBと93%、ならびにRSVと約81%の類似性を示す。MPVのPタンパク質のC末端はグルタミン酸残基に富み、これはAPVについても記載されている(Lingら, 1995)。30

【0153】

マトリックス(M)タンパク質遺伝子

MPVゲノムの第3のORFは254アミノ酸のタンパク質をコードするものであり、これは他のニューモウイルスのMのORFと類似している。MPVのMのORFの大きさは他のメタニューモウイルスのMのORFと全く同じであり(表5)、APVのマトリックスタンパク質と高いアミノ酸配列相同性(78~87%)を示し、RSVおよびPVMのものとはそれより低い相同性(37~38%)を示し、および他のパラミクソウイルスのものとは10%以下の相同性を示す(表6)。40

【0154】

Easton(1997)は、全てのニューモウイルスのマトリックスタンパク質の配列を比較し、残基14~19において保存されたヘプタペプチドを見出した。このヘプタペプチドはMPVにおいても保存されている(図10)。RSV、PVMおよびAPVでは、Mの主要なORFの内部に、またはそれと重複して、小さな第2のORFが同定されている(bRSVでは52アミノ酸および51アミノ酸、RSVでは75アミノ酸、PVMでは46アミノ酸、およびAPVでは51アミノ酸)(Yuら, 1992; Eastonら, 1997; Samalら, 1991; Satakeら, 1984)。本発明者らは、MPVのMのORF内にある2つの小さなORFに注目した。一方の小さなORF(54のアミノ酸残基)は、主要な

MのORF内部に見られ(断片1、図7)、ヌクレオチド2281から始まっており、もう一方の小さなORF(33のアミノ酸残基)はMの主要なORFと重複して見られ、ヌクレオチド2893から始まっていた(断片2、図7)。RSVおよびAPVの第2のORFと同様に、これらの第2のORFと他のニューモウイルスの第2のORFとの間に有意な相同意性はなく、開始シグナルまたは停止シグナルが欠けていると思われる。更に、APVおよびRSVのこれらの第2のORFに相当するタンパク質の合成についての証拠は報告されていない。

【0155】

融合タンパク質(F)遺伝子

MPVのFのORFはMのORFに隣接して位置しており、これはメタニューモウイルス属のメンバーの特徴である。MPVのF遺伝子は539アミノ酸のタンパク質をコードし、これはAPV-CのFよりもアミノ酸残基2個ぶんだけ長い(表5)。アミノ酸配列の分析から、APV-Cと81%、APV-AおよびBと67%、ニューモウイルスのFTンパク質と33~39%、および他のパラミクソウイルスとは僅か10~18%の相同意性があることが明らかになった(表6)。パラミクソウイルスのFTンパク質間で保存されている、MPVでも見られる特徴の1つは、システイン残基の分布である(Morrison, 1988; Yuら, 1991)。メタニューモウイルスは、F1において12個のシステイン残基(7個は全てのパラミクソウイルス間で保存されている)、およびF2において2個のシステイン残基(1個はすべてのパラミクソウイルス間で保存されている)を共有している。MPVのFのORF内に存在する3つの可能性のあるN結合グリコシル化部位のうち、RSVと共有するものはなく、2つ(74位および389位)がAPVと共有する。MPVの第3のユニークな可能性のあるN結合グリコシル化部位は206位に位置している(図11)。

10

20

30

【0156】

他のパラミクソウイルスとは配列相同意性が低いにもかかわらず、MPVのFTンパク質は、他のパラミクソウイルス科のメンバーのFTンパク質について記載されている(Morrison, 1988)ものと一致する、典型的な融合タンパク質の特徴を示した。パラミクソウイルス科のメンバーのFTンパク質は、不活性な前駆体(F0)として合成され、それが宿主細胞のプロテアーゼにより切断されて、アミノ末端F2サブユニットおよび大きなカルボキシ末端F1サブユニットを生じる。提案される切断部位(Collinsら, 1996)は、パラミクソウイルス科の全てのメンバー間で保存されている。MPVの切断部位は、残基RQSRを含む。双方のアルギニン(R)残基はAPVおよびRSVで共有しているが、グルタミン(Q)残基およびセリン(S)残基はヒト・パラインフルエンザウイルス1型、センダイウイルスおよび麻疹ウイルスなどの他のパラミクソウイルスと共有する(データは示さず)。

【0157】

F1のアミノ末端にある疎水性領域は、膜融合ドメインとして機能すると考えられ、パラミクソウイルスおよび麻疹ウイルスの間で高い配列類似性を、ニューモウイルスに対してはそれより低い程度の配列類似性を示す(Morrison, 1988)。これらの26個の残基(137~163位、図11)は、MPVとAPV-Cとの間で保存されており、これは、この領域がメタニューモウイルス間で高度に保存されていること(Naylorら, 1998; Sealら, 2000)と一致している。

【0158】

APVおよび他のパラミクソウイルスのF2サブユニットについて見られるように、MPVはRSVと比較して22個のアミノ酸残基(107~128位、図11)が欠失していることが明らかになった。更に、RSVおよびAPVでは、シグナルペプチドおよびアンカードメインが亜型内で保存されていることが判り、亜型間で高い多様性を示した(Plowsら, 1995; Naylorら, 1998)。F2のアミノ末端にあるMPVのシグナルペプチド(アミノ酸10~35、図11)は、APV-Cとある程度の配列類似性を示し(26個のアミノ酸残基のうち18個が類似する)、他のAPVまたはRSVとはあまり保存されていない。F1のカルボキシ末端にある膜アンカードメインでは、ずっと高い多様性が見られるが、APV-Cとはある程度の相同意性がなお見られる。

40

【0159】

22K(M2)タンパク質

M2遺伝子はニューモウイルス亞科に固有のものであり、全てのニューモウイルスで2つ

50

の重複するORFが見られる。第1の主要なORFはM2-1タンパク質を示し、これはウイルスポリメラーゼの処理機能 (Collinsら, 1995; Collins, 1996) およびその遺伝子間領域のリードスルー(readthrough) (Hardyら, 1998; Fearnら, 1999) を増大させる。MPVのM2-1遺伝子は、F遺伝子に隣接して位置しており、187アミノ酸のタンパク質をコードし (表5)、APV-CのM2-1と最も高い相同意性 (84%) を示す (表6)。全てのニューモウイルスのM2-1タンパク質の比較から、そのタンパク質のアミノ末端側の半分において最も高く保存されていることが明らかとなっており (Collinsら, 1990; Zamoraら, 1992; Ahmadianら, 1999)、これはMPVがそのタンパク質の最初の80個のアミノ酸残基においてAPV-Cと100%の類似性を示すという知見と一致する (図12A)。MPVのM2-1タンパク質は、最初の30個のアミノ酸残基内に位置する3個のシステイン残基を含んでおり、それらは全てのニューモウイルス間で保存されている。そのようなシステインの集中は、亜鉛結合タンパク質においてよく見られる (Ahmadianら, 1991; Cuestaら, 2000)。

10

【0160】

第2のORF (M2-2) は、ニューモウイルスのM2-1のORFと重複し、これは位置については保存されているが、配列においては保存されておらず、ウイルスのRNAの複製と転写との間の切り替えの制御に関与すると考えられる (Collinsら, 1985; Elangoら, 1985; Baybuttら, 1989; Collinsら, 1990; Lingら, 1992; Zamoraら, 1992; Alansariら, 1994; Ahmadianら, 1999; Birminghamら, 1999)。MPVでは、M2-2のORFは、M2-1のORFのヌクレオチド512から出発しており (図7)、これはAPV-Cと全く同じ出発位置である。M2-2のORFの長さは、APV-CとMPVとは同じであり、77個のアミノ酸残基である (表5)。M2-2のORFの配列比較 (図12B) から、MPVとAPV-Cとの間には64%のアミノ酸配列相同意性があり、MPVとAPV-AおよびBとの間には44~48%のアミノ酸配列相同意性しかないことが明らかになった (表6)。

20

【0161】

小さな疎水性タンパク質 (SH) のORF

hMPVのM2に隣接して位置する遺伝子は、183アミノ酸のSHタンパク質をコードすると思われる (図1および7)。このORFと他のRNAウイルス遺伝子または遺伝子産物との間には認識できるような配列同一性はない。これは驚くことではない。何故ならば、ニューモウイルスのSHタンパク質間での配列類似性は一般に低いからである。hMPVの推定のSHのORFは、現在までに知られている最も長いSHのORFである (表1)。SHのORFのアミノ酸組成は、APV、RSVおよびPVMのものと比較的類似しており、トレオニン残基およびセリン残基の割合が高い (hMPV、APV、RSV A、RSV B、bRSVおよびPVMについて、それぞれ22%、18%、19%、20.0%、21%および28%)。hMPVのSHのORFは、10個のシステイン残基を含むが、APVのSHは16個のシステイン残基を含む。hMPVのSHのORFは、2個の可能性のあるN結合グリコシル化部位 (アミノ酸76および121) を含むが、APVは1個であり、RSVは2個または3個であり、PVMは4個である。

30

【0162】

推定のhMPVのSHタンパク質ならびにAPVおよびRSVのSHの親水性プロフィールから、類似する特徴が明らかになった (図7B)。APVおよびhMPVのSHのORFは、親水性のN末端、中心部の疎水性ドメイン (可能性のある膜貫通ドメインとして機能する可能性がある) (hMPVではアミノ酸30~53)、第2の疎水性ドメイン (アミノ酸151~179)、および親水性のC末端を有する。これに対して、RSVのSHでは、APVおよびhMPVのORFのC末端部が欠けている。全てのニューモウイルスのSHタンパク質において、疎水性ドメインは塩基性のアミノ酸残基に隣接しており、これはhMPVのSHのORFでも見られる (アミノ酸29および54)。

40

【0163】

接着糖タンパク質 (G) のORF

hMPVの推定のGのORFは、推定のSH遺伝子に隣接して位置し、236アミノ酸のタンパク質 (ヌクレオチド6262~6972、図1) をコードする。第2の小さなORFがこのORFのすぐ後ろに見られ、68個のアミノ酸残基 (ヌクレオチド6973~7179) をコードする可能性があるが、開始コドンが欠けている。194アミノ酸残基の第2のリーディングフレームにある第3の可

50

能性のあるORFは、これらのORFの両者と重複しているが、これもまた開始コドンが欠けている（ヌクレオチド6416～7000）。このORFに続いて、同じリーディングフレームに65アミノ酸残基の可能性のある第4のORFがあり（ヌクレオチド7001～7198）、これもまた開始コドンが欠けている。最後に、97アミノ酸残基の可能性のあるORF（しかし開始コドンが欠けている）が、第3のリーディングフレーム内部に見られる（ヌクレオチド6444～6737、図1）。第1のORFとは違って、他のORFは明確な遺伝子開始配列も遺伝子終結配列も有していない（下記を参照）。236アミノ酸のGのORFはhMPVの接着タンパク質の少なくとも一部を示すと思われるが、更に別のコード配列があるRNA編集事象によって別のタンパク質または接着タンパク質の一部として発現されることは除外できない。APVおよびRSVの場合、主要なGのORFの後ろに第2のORFは同定されていないこと、しかしAPVおよびRSVの両者が、Gの主要なORFの内部に第2のORFを有していることに注目すべきである。しかし、これらのORFの発現の証拠はなく、異なるウイルスの推定されるアミノ酸配列の間に配列同一性はない（Lingら、1992）。hMPVのGにおける第2のORFは、他のGタンパク質の特徴を示さず、更なるORFが発現されるか否かについては、更に調べる必要がある。

10

【0164】

全てのORFを用いたBLAST分析から、ヌクレオチドレベルまたはアミノ酸配列レベルで、他の既知のウイルスの遺伝子または遺伝子産物と認識できる配列同一性がないことが判明した。これは、hRSV AおよびB（53%）（Johnsonら、1987）ならびにAPV AおよびB（38%）（JuhaszおよびEaston、1994）のもののような他のGタンパク質について見られる配列同一性の割合が低いことと一致する。

20

【0165】

hMPVのORFのほとんどが、長さおよび配列の両方においてAPVのものと類似するが、hMPVの236アミノ酸残基の推定のGのORFは、APVのGのORFよりもかなり短い（表1）。アミノ酸配列から、セリンおよびトレオニンの含量が34%であることが判明したが、これはRSVの32%およびAPVの24%よりもなお高い。また、推定のGのORFは、8.5%のプロリン残基も含んでおり、これはRSVの8%およびAPVの7%よりも高い。APV、RSVおよびhMPVのGタンパク質中にプロリン残基が異常に豊富であることは、ムチン起源の糖タンパク質においても見られており、それはタンパク質の三次元構造の主な決定要因である（CollinsおよびWertz、1983；Wertzら、1985；Jentoft、1990）。hMPVのGのORFは5個の可能性のあるN結合グリコシル化部位を含むが、hRSVは7個、bRSVは5個、APVは3～5個を有する。

30

【0166】

hMPVのGの推定される親水性プロフィールから、他のニューモウイルスに類似した特性が示された。N末端は親水性領域を含み、続いて短い疎水性領域（hMPVではアミノ酸33～53）および主に疎水性のC末端を含む（図8B）。この全体的な構成は、アンカー化II型の膜貫通タンパク質の構成と一致し、APVおよびRSVのGタンパク質のこれらの領域に十分に対応する。hMPVの推定のGのORFは、RSVおよびAPVとは違って（それぞれ5個および20個）、1個のシステイン残基しか含んでいない。注目すべきことに、G遺伝子内の4つの第2のORFのうち2つだけが、1個の追加のシステイン残基を含み、これらの4つの可能性のあるORFでは、セリン残基とトレオニン残基が12～20%、プロリン残基が6～11%であることが明らかになった。

40

【0167】

ポリメラーゼ遺伝子（L）

他のマイナス鎖ウイルスと同様に、MPVゲノムの最後のORFは、複製および転写の複合体のRNA依存性RNAポリメラーゼ成分である。MPVのL遺伝子は2005アミノ酸のタンパク質をコードし、これはAPV-Aのタンパク質よりも残基1個分だけ長い（表5）。MPVのLタンパク質は、APV-Aと64%、RSVと42～44%、他のパラミクソウイルスと約13%の相同性を共有する（表6）。Pochら（1989；1990）は、非セグメント化マイナス鎖RNAウイルスのLタンパク質内の6つの保存されたドメインを同定し、その中で、ドメインIIIは、ポリメラーゼの機能に必要不可欠と考えられる4つのコアポリメラーゼモチーフを含んでいた。これらのモチーフ（A、B、CおよびD）は、MPVのLタンパク質において十分に保存されている。モチーフ

50

A、BおよびCでは、MPVは全てのニューモウイルスと100%の類似性を共有し、モチーフDでは、MPVはAPVと100%の類似性、およびRSVと92%の類似性を共有する。ドメインIII全体（LのORF内部のアミノ酸627～903）では、MPVはAPVと77%の同一性、RSVと61～62%の同一性、および他のパラミクソウイルスと23～27%の同一性を共有する（図15）。ポリメラーゼモチーフに加えて、ニューモウイルスのLタンパク質は、共通ATP結合モチーフK(X)₂₁GEGAGN(X)₂₀Kとして確認される配列を含む（Stec, 1991）。MPVのLのORFは、APVと類似のモチーフを含み、中間の残基の間隔は1個だけ離れている：K(x)₂₂GEGAGN(X)₁₉K。

【0168】

系統学的解析

MPVとニューモウイルス亜科のメンバーとの関係の指標として、N、P、MおよびFのORFに基づく系統樹が先に構築されており（van den Hoogenら, 2001）、MPVとAPV-Cとが近縁関係であることが明らかとなった。MPVのSH遺伝子およびG遺伝子と他のパラミクソウイルスのものとの相同性は低いので、これらの遺伝子についての信頼性のある系統樹は構築できない。更に、ニューモウイルス属のメンバーとメタニューモウイルス属のメンバーとの間のゲノム構成は異なっているので、ゲノム配列全体に基づく系統樹を作製することは不可能である。そこで、本発明者らは、先に公表されているものに加えて、M2遺伝子およびL遺伝子の系統樹だけを構築した。これら双方の系統樹から、ニューモウイルス亜科内でAPVとMPVとが近縁関係であることが確認された（図16）。

【0169】

MPVの非コード配列

パラミクソウイルスのゲノムの遺伝子接合部は、各遺伝子の開始部および終結部に短くて高度に保存されたヌクレオチド配列を含み（遺伝子開始シグナルおよび遺伝子終結シグナル）、これらは転写の開始および終結においてある役割を担っていると思われる（Curranら, 1999）。MPVの全ての遺伝子間の遺伝子間配列の比較から、N、P、M、F、M2およびGの遺伝子開始シグナルについての共通配列：GGGACAAGU（図17A）が明らかとなったが、これはメタニューモウイルスの共通遺伝子開始シグナルと同一である（Lingら, 1992；Yuら, 1992；Liら, 1996；Bayon-Auboyerら, 2000）。MPVのSH遺伝子およびL遺伝子の遺伝子開始シグナルは、この共通配列と僅かに異なることが判った（SH：GGGAUAAA、L：GAGACA AAU）。APVでは、またLの遺伝子開始シグナルが共通配列と異なることが判った：AGGACCA AT（APV-A）（Randhawaら, 1996）、およびGGGACCAGT（APV-D）（Bayon-Auboyerら, 2000）。

【0170】

MPVとAPVの類似する遺伝子開始配列とは異なって、APVの共通遺伝子終結配列UAGUUAAAU（Randhawaら, 1996）は、MPVの遺伝子間配列には見ることができなかった。G-L遺伝子間領域を除くほとんどの遺伝子に見られる反復配列はU AAAAU U/A/Cであったが、これは遺伝子終結シグナルとして作用する可能性がある。しかし、本発明者らはmRNAではなくウイルスRNAを配列決定したので、決定的な遺伝子終結シグナルを割り当てることができず、そのため更なる調査が必要である。ニューモウイルスの遺伝子間領域は、大きさや配列が様々に異なる（Curranら, 1999；Blumbergら, 1991；Collinsら, 1983）。MPVの遺伝子間領域は、APVおよびRSVのものと相同性を示さなかつたが、大きさは10～228ヌクレオチドの範囲である（図17B）。MPVのMおよびFのORFの間の遺伝子間領域は、第2のORFの一部を含み、これは主要なMのORF内で出発している（上記を参照）。SHとGとの間の遺伝子間領域は192ヌクレオチドを含み、3つ全てのリーディングフレーム内に多くの停止コドンが存在することに基づくと、コード能力を有するとは思われない。GとLとの間の遺伝子間領域は241ヌクレオチドを含み、もう1つのORFを含んでいる可能性がある（上記を参照）。興味深いことに、LのORFの開始点はこれらの第2のORF内に位置する。APVのL遺伝子は、その前にあるGのORF内では開始させないが、またRSVのLのORFはその前にあるM2遺伝子内で開始する。パラミクソウイルスのゲノムの3'および5'最末端において、短い遺伝子外領域はリーダー配列およびトレイラー配列と呼ばれ、リーダーのほぼ最初の12ヌクレオチドおよびトレイラーの最後の12ヌクレオチドが相補的であり、これはそれらがそれぞれ、ウイル

10

20

30

40

50

スプロモーターの基本エレメントを含んでいるためであると思われる (Curranら, 1999; Blumbergら, 1991; Minkら, 1986)。MPVおよびAPVの3'側リーダーは双方とも、長さが41ヌクレオチドであり、両者のウイルスのヌクレオチド16と41の間の領域にはある程度の相同意が見られる (26ヌクレオチドのうち18) (図17B)。上記で述べたように、MPVのゲノム地図の最初の15ヌクレオチドは、APVゲノムに基づくプライマー配列に基づいている。MPVの5'側トレイラーの長さ (188ヌクレオチド) は、RSVの5'側トレイラーの大きさ (155ヌクレオチド) と似ており、これはAPVのもの (40ヌクレオチド) よりもかなり長い。MPVのトレイラーおよびAPVのトレイラーの先端の40ヌクレオチドのアライメントをとったところ、APVのゲノム配列に基づくプライマー配列を表す先端の12ヌクレオチドは別として、32ヌクレオチドのうち21が相同であることが判明した。本発明者らの配列解析から、NS1遺伝子およびNS2遺伝子がゲノムの3'末端に存在せず、ゲノム構成がメタニューモウイルスの構成と似ていることが明らかになった (3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5')。MPV遺伝子とAPV遺伝子との間に見られる高い配列相同性は、これら2種のウイルスが近縁関係であることを更に強調する。MPVのN、P、M、F、M2-1およびM2-2遺伝子では、APV-Cに対する全体のアミノ酸相同性が79%であることが判る。事実、これらの遺伝子では、APV-CとMPVとは配列相同性を示し、それらはRSV-AおよびBまたはAPV-AおよびBなどの他の属の亜群間で見られる配列相同性と同じ範囲であった。APV-CとMPVとの間のこの近縁関係は系統学的解析でも見られ、そこでは、MPVとAPV-Cが常に同じ分岐上にあり、APV-AおよびBを含む分岐とは離れていることが明らかになった。同一のゲノム構成、配列相同性および系統学的解析は全て、MPVを哺乳動物から単離されうるメタニューモウイルス属の最初のメンバーとして分類することに適する。N、M、FおよびL遺伝子においてMPVの各種のウイルス単離体間で見られる配列の多様性は、異なる遺伝子型が存在する可能性を示したことによればるべきである (van den Hoogenら, 2001)。MPVとAPV-Cとが近縁関係であることは、宿主の範囲では反映されない。何故ならば、MPVとは違って、APVは鳥類に感染するからである (van den Hoogenら, 2001)。この宿主範囲の違いは、高度に分岐している両者のウイルスのSHタンパク質とGタンパク質との間の違いにより決定される可能性がある。MPVのSHタンパク質およびGタンパク質は、その他のいずれのウイルスのSHタンパク質およびGタンパク質とも有意なアミノ酸配列相同性を示さなかった。アミノ酸含量および疎水性プロットはこれらのORFをSHおよびGとして規定するのに適するが、それらの機能を評価するためには実験データが必要である。そのような分析もまた、これらのSH遺伝子およびG遺伝子内の更に重複するORFの役割の解明に役立つだろう。更に、APV-CのSHおよびG遺伝子の配列解析により、MPVのSHおよびGタンパク質の機能およびそれらとAPV-Cのものとの関係における更に詳細な見解が得られるかもしれない。MPVの非コード領域は、APVのものとかなり類似していることが判った。APVおよびMPVの3'側リーダー配列および5'側トレイラー配列は高い程度の相同性を示した。遺伝子間領域の長さは必ずしもAPVとMPVとで同じではなかったが、ほとんどのORFの共通遺伝子開始シグナルは同一であることが判った。これに対して、APVの遺伝子終結シグナルは、MPVゲノムでは見られなかった。本発明者らは、ほとんどの遺伝子間領域内に反復配列 (U AAAA U/A/C) を見出したが、それらの遺伝子終結配列を正式に概説するためには、ウイルスmRNAの配列解析が必要である。3'最末端にある15ヌクレオチドおよび5'最末端にある12ヌクレオチドについての配列情報が、変更したcDNA末端の迅速増幅 (RACE) 手順を用いることにより得られることに注目すべきである。この技法は、他の研究者によって、関連ウイルスについても成功していることが明らかにされている (Randhawa, J.S.ら, Rescue of synthetic minireplicons establishes the absence of the NS1 and NS2 genes from avian pneumovirus. *J. Virol.*, 71, 9849-9854(1997); Mink, M.A.ら, Nucleotide sequences of the 3' leader and 5' trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA. *Virology* 185, 615-24(1991))。3'vRNAリーダー配列の配列を決定するためには、ポリ-A-ポリメラーゼを用いてホモポリマーAテイルを精製vRNAに付加し、次にリーダー配列をPCRによりポリ-TプライマーおよびN遺伝子内のプライマーを用いて増幅する。5'vRNAトレイラー配列の配列を決定するためには、トレイラー配列のcDNAコピーを逆転写酵素およびL遺伝子内のプライマーを用いて作製し、次に

10

20

30

40

50

そのcDNAをターミナルトランスフェラーゼを用いてホモポリマー-dGのテーリング(tailing)を行う。次に、ポリ-CプライマーおよびL遺伝子内のプライマーを用いてトレイラー領域を増幅する。別のストラテジーとしては、vRNAをそれ自体または合成リンカーに連結し、その後、LおよびN遺伝子内のプライマーおよびリンカー特異的プライマーを用いてリーダー領域およびトレイラー領域を増幅する。5'トレイラー配列については、精製したvRNAの直接ジデオキシヌクレオチドシーケンシングも実行可能である(Randhawa, 1997)。これらの方針を用いて、本発明者らはhMPVゲノムの末端の正確な配列を分析できる。ここで提供される配列情報は、MPVおよびMPV感染に対する診断試験、ワクチンおよび抗ウイルス剤の作製に重要である。

【0171】

10

材料および方法配列解析

ウイルス単離体00-1は、先の記載(van den Hoogenら, 2001)のようにして、三次サル腎細胞において高力価(約10,000のTCID₅₀/ml)まで増殖させた。ウイルスRNAは、感染細胞の上清から高純度RNA単離キットを用いて、製造元(Roch Diagnostics, Almere, The Netherlands)の説明書に従って単離した。プライマーは、APV/RSVのリーダーおよびトレイラーについて公表されている配列(Randhawaら, 1997; Minkら, 1991)に加え、先に公表されている配列(van den Hoogenら, 2001)に基づいて設計したが、それらは必要により入手可能である。RT-PCRアッセイは、ウイルスRNAを用い、ワンチュープアッセイを用いて、50mM Tris(pH 8.5)、50mM NaCl、4.5mM MgCl₂、2mM DTT、1μl 順方向プライマー、1μl 逆方向プライマー、0.6mM dNTP、20単位のRNasin(Promega, Leiden, The Netherlands)、10U AMV逆転写酵素(Promega, Leiden, The Netherlands)および5単位のTaq Polymerase(PE Applied Biosystems, Nieuwerkerk aan de IJssel, The Netherlands)を含む全容量50μlで行った。逆転写を42℃で30分間行い、続いて95℃で8分間不活性化した。cDNAは、95℃で1分、42℃で2分、72℃で3分を40サイクル、最後の伸長を72℃で10分行う間に増幅した。1%アガロースゲルで調べた後、RT-PCR産物をゲルからQiaquick Gel Extractionキット(Qiagen, Leusden, The Netherlands)を用いて精製し、Dyenamic ETターミネーターシーケンシングキット(Amersham Pharmacia Biotech, Roosendaal, the Netherlands)およびABI 373自動DNAシーケンサー(PE Applied Biosystem, Nieuwerkerk aan den IJssel, the Netherlands)を用いて、製造元の説明書に従って直接配列決定した。

20

30

30

【0172】

配列アライメントは、BioEditバージョン5.0.6.(<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>; hall, 1999)のソフトウェアパッケージで利用可能なclustalソフトウェアパッケージを用いて行った。

【0173】

40

系統学的解析

系統樹を構築するために、ClustalWソフトウェアパッケージを用いてDNA配列をアライメントし、最尤系統樹はPhylip 3.5プログラムのDNA-MLソフトウェアパッケージを用い、100のブートストラップおよび3のジャンブルを用いて作製した。ブートストラップ値は、共通パッケージ(Felsenstein, 1989)を用いて作製した共通系統樹(consensus tree)についてコンピューターで算出した。

【0174】

50

MPVのゲノム配列は、Genbankからアクセスション番号AF371337で入手可能である。ここで使用する全ての他の配列は、Genbankから次のアクセスション番号で入手可能である: AB046218(麻疹ウイルス、全てのORF)、NC-001796(ヒト・パラインフルエンザウイルス3型、全てのORF)、NC-001552(センダイウイルス、全てのORF)、X57559(ヒト・パラインフルエンザウイルス2型、全てのORF)、NC-002617(ニューカッスル病ウイルス、全てのORF)、NC-002728(ニパウイルス、全てのORF)、NC-001989(bRSV、全てのORF)、M11486(hRSV A、L以外の全てのORF)、NC-001803(hRSV、LのORF)、NC-001781(hRSV B、全

てのORF)、D10331 (PVM、NのORF)、U09649 (PVM、PのORF)、U66893 (PVM、MのORF)、U66893 (PVM、SHのORF)、D11130 (PVM、GのORF)、D11128 (FのORF)。PVMのM2のORFは、Ahmadian (1999) から採用した。AF176590 (APV-C、NのORF)、U39295 (APV-A、NのORF)、U39296 (APV-B、NのORF)、AF262571 (APV-C、MのORF)、U37586 (APV-B、MのORF)、X58639 (APV-A、MのORF)、AF176591 (APV-C、PのORF)、AF325443 (APV-B、PのORF)、U22110 (APV-A、PのORF)、AF187152 (APV-C、FのORF)、Y14292 (APV-B、FのORF)、D00850 (APV-A、FのORF)、AF176592 (APV-C、M2のORF)、AF35650 (APV-B、M2のORF)、X63408 (APV-A、M2のORF)、U65312 (APV-A、LのORF)、S40185 (APV-A、SHのORF)。

【0175】

10

表5：MPVおよび他のパラミクヅウイルスのORFの長さ

	N ¹	P	M	F	M2-1	M2-2	SH	G	L
MPV	394	294	254	539	187	71	183	236	2005
APV A	391	278	254	538	186	73	174	391	2004
APV B	391	279	254	538	186	73	- ²	414	- ²
APV C	394	294	254	537	184	71	- ²	- ²	- ²
APV D	- ²	389	- ²						
hRSV A	391	241	256	574	194	90	64	298	2165
hRSV B	391	241	249	574	195	93	65	299	2166
bRSV	391	241	256	569	186	93	81	257	2162
PVM	393	295	257	537	176	77	92	396	
その他 ³	418-542	225-709	335-393	539-565	- ⁴	- ⁴	- ⁴	- ⁴	2183-2262

脚注：

1. アミノ酸残基の長さ

2. 配列が入手できなかった

3. その他：ヒト・パラインフルエンザウイルス2型および3型、センダイウイルス、麻疹ウイルス、ナパウイルス、アザラシジステンパーウイルス、およびニューカッスル病ウイルス

4. ウィルスゲノム内に存在しないORF

20

30

表6: MPV の ORF と他のパラミクソウイルスの ORF との間のアミノ酸配列同一性¹

	N	P	M	F	M2-1	M2-2	L	
APV A	69	55	78	67	72	26	64	
APV B	69	51	76	67	71	27	- ²	
APV C	88	68	87	81	84	56	- ²	
hRSV A	42	24	38	34	36	18	42	
hRSV B	41	23	37	33	35	19	44	10
bRSV	42	22	38	34	35	13	44	
PVM	45	26	37	39	33	12	- ²	
その他 ³	7-11	4-9	7-10	10-18	- ⁴	- ⁴	13-14	

脚注:

1. 既知の G および SH タンパク質との配列相同意性は見られなかつたので、除外した。

2. 配列は入手不可能。

3. 表 5 の一覧の脚注 3 を参照。

4. ウィルスゲノム内に存在しない ORF。

20

【0176】

引用文献

Current Protocols in Molecular Biology, 第1-3巻 (1994-1998). Ausubel, F.M., Brent, R., Kinston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. および Struhl, K. 編, John Wiley and sons, Inc., USA 発行.

Current Protocols in Immunology, 第1-3巻. Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M. および Strober, W. 編, John Wiley and sons, Inc., USA 発行

30

Sambrookら Molecular cloning, a laboratory manual, 第二版, 第1-3巻, (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).

Fields, Virology. 1996. 第1-2巻、第三版, Fields, B.N., Knipe, D.M. および Howley, P.M. 編, Lippincott-Raven, Philadelphia, USA.

1. Pringle, C.R. Virus taxonomy at the Xith international congress of virology, Sydney, Australia 1999. Arch.Virolog. 144/2, 2065-2070(1999).

2. Domachowske, J.B. & Rosenberg, H.F. Respiratory syncytial virus infection: immune response, immunopathogenesis, and treatment. Clin.Microbiol.Rev. 12(2), 298-309 (1999). 概説.

40

3. Giraud, P., Bennejean, G., Guittet, M. & Toquin, D. Turkey rhinotracheitis in France: preliminary investigations on a ciliostatic virus. Vet.Rec. 119, 606-607 (1986).

4. Ling, R., Easton, A.J. & Pringle, C.R. Sequence analysis of the 22K, SH and G genes of turkey rhinotracheitis virus and their intergenic regions reveals a gene order different from that of other pneumoviruses. J.Gen.Virolog. 73, 1709-1715 (1992).

5. Yu, Q., Davis, P.J., Li, J. & Cavanagh, D. Cloning and sequencing of the matrix protein(M) gene of turkey rhinotracheitis virus reveal a gene order different from that of respiratory syncytial virus. Virology 186, 426-434 (1992).

50

6. Randhawa, J.S., Marriott, A.C., Pringle, C.R. & Easton, A.J. Rescue of synthetic minireplicons establishes the absence of the NS1 and NS2 genes from avian paramovirus. *J.Viro.* 71, 9849-9854 (1997).
7. Evans, A.S. In: *Viral Infections of Humans. Epidemiology and control.* 第3版(Evans, A.S.編) 22-28 (Plenum Publishing Corporation, New York, 1989).
8. Osterhaus, A.D.M.E., Yang, H., Spijkers, H.E.M., Groen, J., Teppema, J.S. & van Steenis, G. The isolation and partial characterization of a highly pathogenic herpesvirus from the Harbor Seal (*Phoca vitulina*). *Arch.of Virol.* 86, 239-251 (1985).
9. K.B. Chuaら Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science* 288, 1432-1435 (2000). 10
10. Welsh, J., Chada, K., Dalal, S.S., Cheng, R., Ralph, D. & McClelland, M. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *NAR.* 20, 4965-4970 (1992).
11. Bayon-Auboyer, M., Arnauld, C., Toquin, D. & Eterradossi, N. Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. *J. of Gen. Virol.* 81, 2723-2733 (2000).
12. Mulder, J. & Masurel, N. Pre-epidemic antibody against 1957 strain of Asiatic influenza in serum of older people living in The Netherlands. *The Lancet*, April 19, 810-814 (1958).
13. Pringle, C.R. In: *The Paramyxoviruses.* 第1版(D.W. Kingsbury編) 1-39 (Plenum Press, New York, 1991). 20
14. Rothbarth, P.H., Groen, J., Bohnen, A.M., Groot, de R., & Osterhaus, A.D.M.E. Influenza virus serology-a comparative study. *J. of Virol. Methods* 78, 163-169 (1999).
15. Brandenburg, A.H., Groen, J., van Steensel-Moll, H.A., Class, E.J.C., Rothbarth, P.H., Neijens, H.J. & Osterhaus, A.D.M.E. Respiratory syncytial virus specific serum antibodies in infants under six months of age: limited serological response upon infection. *J.Med.Viro.* 52, 97-104 (1997).
16. Lennette, D.A. & In: *Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections.* 第7版. (Lennette, E.H., Lennette, D.A. & Lennette, E.T.編) 3-25 ; 37-138; 431-463; 481-494; 539-563 (American public health association, Washington, 1995). 30
15. Felsenstein, J. Department of Genetics, University of Washington.
<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>
16. Schnellら EMBO J 13, 4195-4203, 1994
17. Collins, P.L., Hill, M.G., Camargo, E., Grosfeld, H., Chanock, R.M. & Murphy, B.R. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *PNAS* 92, 11563-11567 (1995). 40
18. Hoffmann, E., Neumann, G., Kawakao, Y., Hobom, G. & Webster, R.G. A DNA transfection system for generation of influenza virus from eight plasmids. *PNAS* 97, 6108-6113 (2000).
19. Bridgen, A., Elliot, R.M. Rescue of a segmented negative-strand virus entirely from cloned complementary DNAs. *PNAS* 93, 15400-15404 (1996).
20. Palese, P., Zheng, H., Engelhardt, O.G., Pleschka, S. & Garcia-Sastre, A. Negative-strand RNA viruses: genetic engineering and applications. *PNAS* 93, 11354-11358 (1996).
21. Peeters, B.P., de Leeuw, O.S., Koch, G. & Gielkens, A.L. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein 50

- n is a major determinant for virulence. *J.Viro.* 73, 5001-5009 (1999).
22. Durbin, A.P., Hall, S.L., Siew, J.W., Whitehead, S.S., Collins, P.L. & Murphy, B.R. Recovery of infectious human parainfluenza virus type 3 from cDNA. *Virology* 235, 323-332 (1997).
23. Tao, T., Durbin, A.P., Whitehead, S.S., Davoodi, F., Collins, P.L. & Murphy, B.R. Recovery of a fully viable chimeric human parainfluenza virus (PIV) type 3 in which the hemagglutinin-neuraminidase and fusion glycoproteins have been replaced by those of PIV type 1. *J.Viro.* 72, 2955-2961 (1998).
24. Durbin, A.P., Skiadopoulos, M.H., McAuliffe, J.M., Riggs, J.M., Surman, S.R., Collins, P.L. & Murphy, B.R. Human parainfluenza virus type 3 (PIV3) expressing the hemagglutinin protein of measles virus provides a potential method for immunization against measles virus and PIV3 in early infancy. *J.Viro.* 74, 6821-6831 (2000). 10
25. Skiadopoulos, M.H., Durbin, A.P., Tatem, J.M., Wu, S.L., Paschalidis, M., Tao, T., Collins, P.L. & Murphy, B.R. Three amino acid substitutions in the L protein of the human parainfluenza virus type 3 cp45 live attenuated vaccine candidate contribute to its temperature-sensitive and attenuation phenotypes. *J.Viro.* 72, 1762-1768 (1998).
26. Teng, N., Whitehead, S.S., Birmingham, A., St.Claire, M., Elkins, W.R., Murphy, B.R. & Collins, P.L. *J.Viro.* 74, 9317-9321 (2000). 20
27. Masurel, N. Relation between Hong Kong virus and former human A2 isolates and the A/EQU12 virus in human sera collected before 1957. *The Lancet* May 3, 907-910 (1969).

実施例4で使用される更なる引用文献

- AHMADIAN, G., CHAMBERS, P. および EASTON, A.J. (1996). Detection and characterization of proteins encoded by the second ORF of the M2 gene of pneumoviruses. *J Gen Virol* 80, 2011-6.
- ALANSARI, H. および POTGIETER, L.N. (1994). Molecular cloning and sequence analysis of the phosphoprotein, nucleocapsid protein, matrix protein and 22K(M2) protein of the ovine respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 75, 3597-601. 30
- BARR, J., CHAMBERS, P., PRINGLE, C.R. および EASTON, A.J. (1991). Sequence of the major nucleocapsid protein gene of pneumonia virus of mice: sequence comparisons suggest structural homology between nucleocapsid proteins of pneumoviruses, paramyxoviruses, rhabdoviruses and filoviruses. *J Gen Virol* 72, 677-85.
- BAYBUTT, H.N. および PRINGLE, C.R. (1987). Molecular cloning and sequencing of the F and 22K membrane protein genes of the RSS-2 strain of respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 68, 2789-96.
- BAYON-AUBOYER, M.H., ARNAULD, C., TOQUIN, D. および ETERRADOSSI, N. (2000). Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. *J Gen Virol* 81, 2723-33. 40
- BERMINGHAM, A. および COLLINS, P.L. (1999). The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11259-64.
- BLUMBERG, B.M., CHAN, J. および UDEM, S.A. (1991). Function of Paramyxovirus 3' and 5' end sequences: In theory and practice. In 「the Paramyxoviruses」 (D. Kingsbury編), pp. 235-247. Plenum, New York.
- COLLINS, P.L. および WERTZ, G.W. (1983). cDNA cloning and transcriptional mapping of nine polyadenylated RNAs encoded by the genome of human respiratory syncytial virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3208-12.
- COLLINS, P.L. および WERTZ, G.W. (1985). The envelope-associated 22K protein of 50

human respiratory syncytial virus: nucleotide SEQUENCE of the mRNA and a related polytranscript. *J Virol* 54, 65-71.

COLLINS, P.L., DICKENS, L.E., BUCKLER-WHITE, A., OLMSTED, R.A., SPRIGGS, M.K., CAMARGO, E.およびCOELINGH, K.V.W. (1986). Nucleotide sequences for the gene junctions of human respiratory syncytial virus reveal distinctive features of intergenic structure and gene order. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4594-98.

COLLINS, P.L., HILL, M.G.およびJOHNSON, P.R. (1990). The two open reading frames of the 22K mRNA of human respiratory syncytial virus: sequence comparison of antigenic subgroups A and B and expression in vitro. *J Gen Virol.* 71, 3015-20.

COLLINS, P.L., HILL, M.G., CAMARGO, E., GROSFELD, H., CHANOCK, R.M.およびMURPHY, B.R. (1995). Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 11563-7. 10

COLLINS, P.L., MCINTOSH, K.およびCHANOCK, R.M. (1996). 「Respiratory syncytial virus.」 In: *Fields virology* (B.N. Knipe, Howley, P.M.編) Lippencott-Raven, Philadelphia.

COOK, J.K. (2000). Avian rhinotracheitis. *Rev Sci Tech* 19, 602-13.

CUESTA, I., GENG, X., ASENJO, A.およびVILLANUEVA, N. (2000). Structural phosphoprotein M2-1 of the human respiratory syncytial virus is an RNA binding protein. *J. Gen. Virol.* 74, 9858-67. 20

CURRAN, J.およびKOLAKOFSKY, D. (1999). Replication of paramyxoviruses. *Adv. Virus Res.* 50, 403-422.

EASTON, A.J.およびCHAMBERS, P. (1997). Nucleotide sequence of the genes encoding the matrix and small hydrophobic proteins of pneumonia virus of mice. *Virus Res.* 48, 27-33.

ELANGO, N., SATAKE, M.およびVENKATESAN, S. (1985). mRNA sequence of three respiratory syncytial virus genes encoding two nonstructural proteins and a 22K structural protein. *J Virol* 55, 101-10.

FEARNS, R.およびCOLLINS, P.L. (1999). Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J Virol* 73, 5852-64. 30

FELSENSTEIN, J. (1989). 「PHYLIP-Phylogeny Inference Package (Version 3.2. Cladistics 5.)」.

GIRAUD, P., BENNEJEAN, G., GUITTET, M.およびTOQUIN, D. (1986). Turkey rhinotracheitis in France: preliminary investigations on a ciliostatic virus. *Vet Rec* 119, 606-7.

HALL, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95-98.

HARDY, R.W.およびWERTZ, G.W. (1998). The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junctions during viral transcription. *J Virol* 72, 520-6. 40

HORVATH, C.M.およびLAMB, R.A. (1992). Studies on the fusion peptide of a paramyxovirus fusion glycoprotein: roles of conserved residues in cell fusion. *J Virol* 66, 2443-55.

JENTHOFT, N. (1990). Why are proteins O-glycosylated? *Trends Biochem Sci* 15, 291-4.

JOHNSON, P.R., JR., OLMSTED, R.A., PRINCE, G.A., MURPHY, B.R., ALLING, D.W., WALSH, E.E.およびCOLLINS, P.L. (1987). Antigenic relatedness between glycoproteins of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: evaluation of the cont 50

- ributions of F and G glycoproteins to immunity. *J Virol* 61, 3136-6.
- JUHASZ, K. および EASTON, A.J. (1994). Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. *J Gen Virol* 75, 2873-80.
- Kyte, J. および Doolittle, R.F. (1982). A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-142.
- LAMB, R.A. および KOLAKOFSKY, D. (1996). 「Paramyxoviridae: the viruses and their replication」. In: *Fields virology* (B.N. Knipe, Howley, P.M. 編) Lippencott-Raven, Philadelphia.
- LI, J., LING, R., RANDHAWA, J.S., SHAW, K., DAVIS, P.J., JUHASZ, K., PRINGLE, C.R., EASTON, A.J. および CAVANAGH, D. (1996). Sequence of the nucleocapsid protein gene of subgroup A and B avian pneumoviruses. *Virus Res* 41, 185-91. 10
- LING, R., EASTON, A.J. および PRINGLE, C.R. (1992). Sequence analysis of the 22K, SH and G genes of turkey rhinotracheitis virus and their intergenic regions reveals a gene order different from that of other pneumoviruses. *J Gen Virol* 73, 1 709-15.
- LING, R., DAVIS, P.J., YU, Q., WOOD, C.M., PRINGLE, C.R., CAVANAGH, D. および EASTON, A.J. (1995). Sequence and in vitro expression of the phosphoprotein gene of avian pneumovirus. *Virus Res.* 36, 247-57.
- MARRIOT, A.C., SMITH, J.M. および EASTON, A. (2001). Fidelity of leader and trailer sequence usage by the respiratory syncytial virus and avian pneumovirus replication complexes. *J. Virol.* 75, 6265-72. 20
- MINK, M.A., STEC, D.S. および COLLINS, P.L. (1991). Nucleotide sequences of the 3' leader and 5' trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA. *Virology* 185, 615-24.
- MIYAHARA, K., KITADA, S., YOSHIMOTO, M., MATSUMURA, H., KAWANO, M., KOMADA, H., TSURUDOME, M., KUSAGAWA, S., NISHINO, M. および ITO, Y. (1992). Molecular evolution of human paramyxoviruses. Nucleotide sequence analyses of the human parainfluenza type 1 virus NP and M protein genes and construction of phylogenetic trees for all the human paramyxoviruses. *Arch Virol* 124, 255-68. 30
- MORRISON, T.G. (1988). Structure, function, and intracellular processing of paramyxovirus membrane proteins. *Virus Res.* 10, 113-35.
- NAYLOR, C.J., BRITTON, P. および CAVANAGH, D. (1998). The ectodomains but not the transmembrane domains of the fusion proteins of subtypes A and B avian pneumovirus are conserved to a similar extent as those of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 79, 1393-8.
- PLOWS, D.J. および PRINGLE, C.R. (1995). Variation in the fusion glycoprotein gene of human respiratory syncytial virus subgroup A. *Virus Genes* 11, 37-45.
- POCH, O., BLUMBERG, B.M., BOUGUELERET, L. および TORDO, N. (1990). Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *J Gen Virol* 71, 1153-62. 40
- POCH, O., SAUVAGET, I., DELARUE, M. および TORDO, N. (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *Embo J* 8, 3867-74.
- RANDHAWA, J.S., MARRIOTT, A.C., PRINGLE, C.R. および EASTON, A.J. (1997). Rescue of synthetic minireplicons establishes the absence of the NS1 and NS2 genes from avian pneumovirus. *J Virol* 71, 9849-54.
- RANDHAWA, J.S., WILSON, S.D., TOLLEY, K.P., CAVANAGH, D., PRINGLE, C.R. および EASTON, A.J. (1996). Nucleotide sequence of the gene encoding the viral polymerase of avian pneumovirus. *J Gen Virol* 77, 3047-51. 50

SAMAL, S.K. およびZAMORA, M. (1991). Nucleotide sequence analysis of a matrix and small hydrophobic protein dicistronic mRNA of bovine respiratory syncytial virus demonstrates extensive sequence divergence of the small hydrophobic protein from that of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 72, 1715-20.

SATAKE, M. およびVENKATESAN, S. (1984). Nucleotide sequence of the gene encoding respiratory syncytial virus matrix protein. *J Virol* 50, 92-9.

SEAL, B.S., SELLERS, H.S. およびMEINERSMANN, R.J. (2000). Fusion protein predicted amino acid sequence of the first US avian pneumovirus isolate and lack of heterogeneity among other US isolates. *Virus Res* 66, 139-47.

SEDLMEIER, R. およびNEUBERT, W.J. (1998). The replicative complex of paramyxoviruses: structure and function. *Adv. Virus Res* 50, 101-39. 10

STEC, D.S., HILL, M.G., 3RD およびCOLLINS, P.L. (1991). Sequence analysis of the polymerase L gene of human respiratory syncytial virus and predicted phylogeny of nonsegmented negative-strand viruses. *Virology* 183, 273-87.

VAN DEN HOOGEN, B.G., DE JONG, J.C., GROEN, J., KUIKEN, T., DE GROOT, R., FOUCHE, R.A. およびOSTERHAUS, A.D. (2001). A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 7(6), 719-24.

VIRUS TAXONOMY (2000). Seventh report of the international Committee on Taxonomy of Viruses.

WERTZ, G.W., COLLINS, P.L., HUANG, Y., GRUBER, C., LEVINE, S. およびBALL, L.A. (1985). Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 4075-9. 20

Yu, Q., DAVIS, P.J., BARRETT, T., BINNS, M.M., BOURSSELL, M.E. およびCAVANAGH, D. (1991). Deduced amino acid sequence of the fusion glycoprotein of turkey rhinotracheitis virus has greater identity with that of human respiratory syncytial virus, a pneumovirus, than that of paramyxoviruses and morbilliviruses. *J Gen Virol* 72, 75-81.

Yu, Q., DAVIS, P.J., LI, J. およびCAVANAGH, D. (1992). Cloning and sequencing of the matrix protein (M) gene of turkey rhinotracheitis virus reveal a gene order different from that of respiratory syncytial virus. *Virology* 186, 426-34. 30

ZAMORA, M. およびSAMAL, S.K. (1992). Sequence analysis of M2 mRNA of bovine respiratory syncytial virus obtained from an F-M2 dicistronic mRNA suggests structural homology with that of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 73, 737-41.

既知のパラミクソウイルスのRT-PCR検出に用いたプライマー。hPIV-1~4、おたふくかぜ、麻疹、ツバイ、マプエラおよびヘンドラのためのプライマーは、社内で、入手可能な配列のアライメントに基づいて開発する。ニューカッスル病ウイルスのためのプライマーは、Seal, J., J.ら ; Clin. Microb., 2624-2630, 1995から採用する。ニバのためのプライマーおよび一般的なパラミクソウイルス-PCRは、Chua, K.B.ら ; Science, 288, 2000年5月26日から採用する。 40

【 0 1 7 7 】

ウイルス	プライマー	タンパク質中の位置	
HPIV-1	順方向 5' -TGTTGTCGAGACTATTCCAA-3'	HN	
	逆方向 5' -TGTTG(T/A)ACCAGTTGCAGTCT-3'		
HPIV-2	順方向 5' -TGCTGCTTCTATTGAGAAACGCC-3'	N	
	逆方向 5' -GGTGAC/TTC(T/C)AATAGGGCCA-3'		
HPIV-3	順方向 5' -CTCGAGGTTGTCAGGATATAG-3'	NH	
	逆方向 5' -CTTTGGGAGTTGAACACAGTT-3'		
HPIV-4	順方向 5' -TCC(A/G)GTTTAGCTGCTTACG-3'	N	50

	逆方向	5' -AGGCAAATCTCTGGATAATGC-3'		
ムンプス	順方向	5' -TCGTAAGCTCTCGTGACC-3'	SH	
	逆方向	5' -GGAGATCTTCTAGAGTGAG-3'		
NDV	順方向	5' -CCTTGGTGAiTCTATCCGIAG-3'	F	
	逆方向	5' -CTGCCACTGCTAGTTGiGATAATCC-3'		
ツパイ	順方向	5' -GGGCTTCTAACGCGACCCAGATCTTG-3'	N	
	逆方向	5' -GAATTCCTTATGGACAAGCTCTGTGC-3'		
マブエラ	順方向	5' -GGAGCAGGAACCTCAAGACCTGGAG-3'	N	
	逆方向	5' -GCTCAACCTCATCACATACTAACCC-3'		
ヘンドラ	順方向	5' -GAGATGGCGGGCAAGTGCACAGAACAG-3'	N	10
	逆方向	5' -GCCTTGCAATCAGGATCAAATTGGG-3'		
ニバ	順方向	5' -CTGCTGCAGTTCAAGGAAACATCAG-3'	N	
	逆方向	5' -ACCGGATGTGCTCACAGAACTG-3'		
HRSV	順方向	5' -TTTGTTATAGGCATATCATTG-3'	F	
	逆方向	5' -TTAACCCAGCAAAGTGTAA-3'		
麻疹	順方向	5' -TTAGGGCAAGAGATGGTAAGG-3'	N	
	逆方向	5' -TTATAACAATGATGGAGGG-3'		
一般的なパラミクソウイルス科	順方向	5' -CATTAAAAAGGGCACAGACGC-3'	P	
	逆方向	5' -TGGACATTCTCCGCAGT-3'		20

RAP-PCR用のプライマー：

ZF1 : 5' -CCCAACCACCAAGAGAGAAA-3'
ZF4 : 5' -ACCACCAGAGAGAAACCC-3'
ZF7 : 5' -ACCAGAGAGAAACCCACC-3'
ZF10 : 5' -AGAGAGAAACCCACCACC-3'
ZF13 : 5' -GAGAAACCCACCACCA-3'
ZF16 : 5' -AAACCCACCACCAAGAGAG-3'
CS1 : 5' -GGAGGCAAGCGAACGCAA-3'
CS4 : 5' -GGCAAGCGAACGCAAGGA-3'
CS7 : 5' -AAGCGAACGCAAGGAGGC-3'
CS10 : 5' -CGAACGCAAGGAGGCAG-3'
CS13 : 5' -ACGCAAGGAGGCAGCGA-3'
CS16 : 5' -CAAGGAGGCAGCGAACG-3'

30

うまく精製・配列決定された20の断片：

APVにおいて配列相同意があることが判った10の断片：

断片1	ZF7、335bp	N遺伝子	
断片2	ZF10、235bp	N遺伝子	
断片3	ZF10、800bp	M遺伝子	
断片4	CS1、1250bp	F遺伝子	
断片5	CS10、400bp	F遺伝子	40
断片6	CS13、1450bp	F遺伝子	
断片7	CS13、750bp	F遺伝子	
断片8	ZF4、780bp	L遺伝子(タンパク質レベル)	
断片9	ZF10、330bp	L遺伝子(タンパク質レベル)	
断片10	ZF10、250bp	L遺伝子(タンパク質レベル)	

プロトタイプ単離体からの核酸のRAP-PCRに用いたプライマー：

実施例5hMPVの2つの亜型の異なる検査

これまでに得たhMPVの各種の単離体の系統学的解析に基づいて、ウイルス単離体00-1(遺伝子型Aのプロトタイプ)および単離体99-1(遺伝子型Bのプロトタイプ)を用いて、2

50

つの遺伝子型を同定した。

【0178】

本発明者らは、これらの遺伝子型が亜型に関連し、そして両者の亜群のウイルスによる再感染は前もって存在する免疫の存在下で起こり、抗原の多様性は再感染を起こすのに厳密には必要ない可能性がある、と仮説を立てた。更に、hMPVは、トリ・ニュー・モウイルス（主に家禽で見られるウイルス）と近縁であると思われる。両者のウイルスのヌクレオチド配列は、SHタンパク質およびGタンパク質以外は高い相同性（%）を示す。ここで、これらのウイルスが試験において交差反応することを示すが、これは主に核タンパク質およびマトリックスタンパク質に基づくものであるが、それらは試験では異なった様式で応答し、それは接着タンパク質に基づくものである。ウイルス中和力価に違いがあることは、hMPVの2つの遺伝子型が1つのウイルスの2つの異なる血清型であることの更なる証拠となる。但し、APVは異なるウイルスである。

10

【0179】

2つの血清型間の交差反応およびAPVとhMPVとの交差反応

方法

hMPVについてのIgG、IgAおよびIgM抗体検出のプロトコール

hMPVについての間接IgG EIAは、マイクロタイタープレートで、本質的に先に記載 (Rothbarth, P.H.ら, 1999; Influenza virus serotype-a comparative study. J. of Vir. Methods 78 (1999) 163-169) のようにして行った。

20

【0180】

簡単に説明すると、濃縮したhMPVを、1%のTriton X-100による処理により可溶化し、チエッカーボード滴定により最適実施希釈度を決定した後、PBS中でマイクロタイタープレートに室温で16時間コーティングした。次に、EIA緩衝液中の1:100に希釈したヒト血清サンプル100 μl容量をウェルに加え、37℃で1時間インキュベートした。ヒトIgGの結合は、ヤギ抗ヒトIgGペルオキシダーゼコンジュゲート (Biosource, USA) の添加により検出した。

【0181】

基質としてTMBを添加してプレートを開封し、ODを450nmで測定した。結果はODのS(シグナル)/N(ネガティブ)比として表わした。S/N比がネガティブ対照 + (基準値 × 3倍)を上回るならば、血清はIgGについて陽性であると考える。

30

【0182】

IgMクラスおよびIgAクラスのhMPV抗体は、本質的に先に記載 (Rothbarth, P.H.ら, 1999; Influenza virus serotype-a comparative study. J. Vir. Methods 78 (1999) 163-169) のような捕捉EIAにより血清中で検出した。IgAおよびIgMの検出では、抗ヒトIgMまたはIgA特異的モノクローナル抗体でコーティングした市販のマイクロタイタープレートを使用した。血清は1:100に希釈し、37℃で1時間インキュベートした後、最適実施希釈度のhMPVを各ウェルに添加し (100 μl)、37℃で1時間インキュベートした。洗浄した後、ペルオキシダーゼで標識したポリクローナル抗hMPVを添加し、プレートを37℃で1時間インキュベートした。基質としてTMBを添加することによりプレートを開封し、ODを450nmで測定した。結果はODのS(シグナル)/N(ネガティブ)比として表わした。S/N比がネガティブ対照 + (基準値 × 3倍)を上回るならば、血清はIgGについて陽性であると考える。

40

【0183】

APV抗体は、APV抑制アッセイで検出した。APV抑制試験のプロトコールは、APV-Ab SVANOVIR (登録商標) 酵素免疫アッセイ (SVANOVA Biotech AB, Uppsala Science Park Glunten SE-751 83 Uppsala Sweden)により製造されたもの)を含む。結果はODのS(シグナル)/N(ネガティブ)比として表わした。S/N比がネガティブ対照 + (標準 × 3倍)を上回るならば、血清はIgGについて陽性であると考える。

【0184】

1. モルモット

A. hMPVの2つの亜型によるモルモットの(再)感染

50

ウイルス単離体ned/00/01(亜型A)およびned/99/01(亜型B)を用いて、亜型当たり6匹のモルモットに接種した(経気道、鼻および眼)。

【0185】

6匹のモルモットをhMPV00-1に感染させた(10e6.5、TCID50)

6匹のモルモットをhMPV99-1に感染させた(10e4.1、TCID50)

初回感染の54日後、モルモットに、同種または異種の亜型を接種した(10e4 TCID50)

。

【0186】

2匹のモルモット：初回の感染は00-1；2度目の感染は99-1(異種)

10

3匹のモルモット：初回の感染は00-1；2度目の感染は00-1(同種)

2匹のモルモット：初回の感染は99-1；2度目の感染は00-1(異種)

3匹のモルモット：初回の感染は99-1；2度目の感染は99-1(同種)

感染後の12日間(初回の感染)または8日間(2度目の感染)にわたり咽喉および鼻のスワブを採取し、RT-PCRアッセイによりウイルスの存在について試験した。

【0187】

RT-PCRアッセイの結果：図29

結果のまとめ：ウイルス単離体ned/00/01を接種したモルモットは、感染後1～10日で上部気道に感染を示す。ned/99/01を接種したモルモットは、感染後1～5日で上部気道に感染を示す。ned/99/01による感染は、ned/00/01による感染ほど重篤ではないと思われる。モルモットの異種ウイルスによる2度目の接種により、4匹のモルモットのうち3匹に再感染が起こり、同種ウイルスでは6匹のモルモットのうち2匹に再感染が起こる。再感染を起こした動物では、臨床的症状は全く、あるいは殆ど気付かず、再感染から防御された動物では、臨床的症状は全く見られなかった。これは、野生型ウイルスの場合でさえも初回感染の保護効果を明らかであることを実証しており、ワクチンとして異種(もちろん同種も)の単離体が、たとえ弱毒化された形態であっても、使用できる可能性を示している。

20

【0188】

hMPVの両者の亜型は、モルモットに感染させることができるが、亜型B(ned/99/01)による感染は、亜型A(ned/00/01)による感染ほど重篤ではない(鼻および咽喉におけるウイルスの存在期間が短い)と思われる。これは、亜型Aが高い投薬量で与えられたためか、あるいは亜型Bの毒性が低いためであると思われる。

30

【0189】

前もって存在する免疫の存在は、同種ウイルスによるものも異種ウイルスによるものも再感染を完全に防御しないが、ウイルスの存在期間がより短く、全ての動物がウイルス陽性にはならない、という点で、感染はそれほど顕著ではないと思われる。

【0190】

B. hMPVの2つの亜型に感染させたモルモットの血清学

0、52、70、80、90、110、126および160日目に、血清をモルモットから採取し、1:100の希釈度で、ned/00/01抗原およびned/99/01抗原に対する全ウイルスELISAにおいて試験した。

40

【0191】

図30AおよびB： IgGは、個々のモルモットについてned/00/01およびned/99/01に対して応答する。

【0192】

図31： ned/00/01およびned/99/01のELISAの特異性。同種再感染させたモルモットからのデータだけを用いた。

【0193】

図32： 3匹の同種(00-1/00-1)、2匹の同種(99-1/99-1)、2匹の異種(99-1/00-1)および2匹の異種(00-1/99-1)感染させたモルモットのned/00/01およびned/99/01のELISAに対する平均IgG応答。

50

【0194】

結果のまとめ

上記2つの異なるELISAに応答して僅かな差異しか見られない。00-1または99-1に対する全ウイルスELISAは、それら2つの亜型を区別するのには使用できない。

【0195】

C. APV抗原を保有するモルモットにおいてhMPVに対して生起させた血清の反応

感染モルモットから採取した血清を、APV抑制ELISAを用いて試験した。

【0196】

図33: hMPV感染モルモットのAPV抑制の平均割合(%)

結果のまとめ

モルモットにおいてhMPVに対して生起させた血清は、hMPV IgG ELISAにおいて反応するのと同様にして、APV抑制アッセイにおいて反応する。

【0197】

ned/99/01に対して生起させた血清は、APV抑制ELISAにおいて、ned/00/01に対して生起させた血清よりも低い抑制率(%)を示す。ned/99/01に感染させたモルモットは、ned/00/01の場合よりも(hMPV ELISAで見られるのと同様に)低い力値を有する可能性があるか、あるいはned/99/01とAPVとの交差反応が低い。それでも、APV-Ab抑制ELISAは、モルモットにおけるhMPV抗体の検出に使用できる。

【0198】

D. モルモットにおいてhMPVに対して生起させた血清を用いたウイルス中和アッセイ

感染後0、52、70および80日目に採取した血清を、ned/00/01、ned/99/01およびAPV-Cを用いたウイルス(交差)中和アッセイに用いた。出発希釈度は1~10であり、ウェル当たり100のTCID50のウイルスを用いた。中和後、ウイルスをtMK細胞に15分間接觸させ、3500 rpmで遠心分離し、その後、培地を新しいものと交換した。

【0199】

APV被験体は4日間増殖させ、hMPV被験体は7日間増殖させた。細胞を80%アセトンで固定し、FITC標識したサル抗hMPVを用いてIFAを行った。染色において陰性だったウェルは、力値を中和したと考えた。各ウイルスについて、ウイルストックの10対数滴定および実施溶液の2倍滴定を含めた。

【0200】

図34: ned/00/01およびned/99/01に感染させたモルモットのned/00/01、ned/99/01およびAPV-Cに対するウイルス中和力値。

【0201】

2. カニクイザル

A. hMPVの2つの亜型によるカニクイザルの(再)感染

ウイルス単離体ned/00/01(亜型A)およびned/99/01(亜型B)($1^{\circ}5$ TCID50)を用いて、亜型当たり2匹のカニクイザルに接種した(経気道、鼻および眼)。初回感染の6ヶ月後、2回目として、サルにned/00/01を接種した。咽喉のスワブを感染後の14日間(初回の感染)または8日間(二回目の感染)採取し、RT-PCRアッセイによりウイルスの存在について試験した。

【0202】

図35: ned/00/01を(2回)接種したカニクイザルの咽喉スワブについてのRT-PCRアッセイの結果。

【0203】

結果のまとめ: ウィルス単離体ned/00/01を接種したカニクイザルは、感染後1~10日で上部気道に感染を示す。臨床的症状としては、化膿性鼻炎が挙げられる。サルに同種のウイルスで二回目の接種を行ったところ、PCRにより示されるように、再感染が起こるが、臨床的症状は全く見られなかった。

【0204】

B. hMPVに感染させたカニクイザルの採取血清についての血清学

ned/00/01を投与したカニクイザルから、初回感染後の6ヶ月間にわたり血清を採取した(

10

20

30

40

50

再感染はサル3については240日目に起こり、サル6については239日目に起こった)。

【0205】

血清を用いて、ned/00/01またはAPVに対するIgG抗体の存在、ならびにned/00/01に対するIgA抗体およびIgM抗体の存在について試験した。

【0206】

結果：図36A

ned/00/01に(再)感染させた2匹のカニクイザルの、ned/00/01に対するIgA、IgMおよびIgGの応答。

【0207】

図36B

10

ned/00/01に感染させた2匹のカニクイザルの、APVに対するIgGの応答。

【0208】

結果のまとめ

2匹のカニクイザルがned/00/01にうまく感染し、ned/00/01に対する抗体の存在下ではその同種ウイルスに再感染した。IgA抗体およびIgM抗体の応答は、初回の感染後にIgM抗体を増大させたが、それは再感染後には見られない。IgA抗体は再感染後にだけ検出され、これは初回の感染後の免疫応答が即時性であることを示している。APV抑制ELISAで試験したサルにおいてhMPVに対して生起した血清は、hMPV IgG ELISAと同様の応答を示す。

【0209】

考察 / 結論

20

カニクイザル内のhMPV抗体は、APV抑制ELISAにより、hMPV ELISAの場合と同様の感度で検出され、したがって、APV抑制EIAは、ヒトのサンプルをhMPV抗体の存在について試験するのに適する。

【0210】

C. hMPV感染カニクイザルから採取した血清を用いたウイルス(交差)中和アッセイ

結果のまとめ：初回感染後0日目～229日目に採取した血清は、ned/00/01に対して低いウイルス中和力値しか示さず(0～80)、2回目の感染後に採取した血清はned/00/01に対して高い中和力値を示す(>1280)。2回目の感染後に採取した血清だけが、ned/99/01に対して中和力値を示し(80～640)、どの血清もAPV Cウイルスを中和しない。

【0211】

30

ウイルス(交差)中和アッセイにおいて、APV-CとhMPVとの間で交差反応は起こらず、抗体応答をブーストした後でned/00/01とned/99/01との間に交差反応が起こる。

【0212】

3. ヒト

6ヶ月令未満～20歳以上の患者の血清を、予めIFAおよびned/00/01に対するウイルス中和アッセイで試験しておいた(特許の表1を参照)。

【0213】

ここで、これらの血清の幾つかを、ned/00/01に対するELISAでIgG、IgMおよびIgA抗体の存在について試験し、それらのサンプルをAPV抑制ELISAで試験した。

【0214】

40

結果：図37 ヒト血清におけるIgG抗体検出のためのhMPV ELISAとAPV抑制ELISAの使用の比較。IgG HMPV試験とAPV-Ab試験との間には強い相関関連があり、したがって、APV-Ab試験は、本質的にヒトにおけるhMPVに対するIgG抗体を検出できる。

【0215】

4. 家禽

96羽のニワトリを、APV抑制ELISAおよびned/00/01 ELISAの双方において、APVに対するIgG抗体の存在について試験した。

【0216】

結果のまとめ：hMPV ELISAもAPV抑制ELISAも、APVに対する抗体を検出する(データは示さず)。

50

【0217】

結果のまとめ

本発明者らは、ned/00/01（亜群Aのプロトタイプ）およびned/99/01（亜群Bのプロトタイプ）という、hMPVの2つの遺伝子型を見出した。

【0218】

「古典的な血清学的解析（例えば、公知のFrancki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.L. およびBrown, F., Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international Committee on Taxonomy of Viruses. Arch Virol, 1991. 付録2:p. 140-144）によれば、動物の血清を用いた定量的中和アッセイで判定した場合に、その免疫学的な違いに基づいて2つの亜型が定義できる。2つの異なる血清型は、互いに交差反応しないか、あるいは両方向で16を上回る異種・同種力価比を示す。中和が2種のウイルス間で一方向または両方向である程度の交差反応を示す場合（同種・異種力価比が8または16）、血清型の違い（特徴）は、DNAの実質的な生物物理学的／生化学的な差異が存在するか否かであると思われる。中和が2種のウイルス間で一方向または両方向で明らかな交差反応を示す場合（同種・異種力価比が8未満）、研究対象である単離体の血清型は同一であると推定される。」

10

【0219】

RSVの場合、（同種、異種、共に）以前より存在している免疫の存在下で再感染が起こることが知られている。モルモットおよびカニクイザルをhMPVの同種血清型および異種血清型の両者に感染させたところ、このことがhMPVについても当てはまることが明らかになった。更に、hMPVに対するIgAおよびIgMのELISAからは、IgA抗体の反応が再感染の後にだけ起こることが明らかになった。hMPVまたはAPVに対して生起させた血清は、APVおよびhMPVのELISAにおいて同じように応答する。ヌクレオチド配列の比較から、これらのウイルスが、N、P、MおよびF遺伝子について約80%のアミノ酸相同性を示すことが判る。ELISAでは、Nタンパク質およびMタンパク質が、反応する主な抗原である。ウイルス中和アッセイ（表面の糖タンパク質G、SHおよびFに対して反応することが知られる）は、2つの異なる血清間の違いを示している。APVとhMPVはELISAで交差反応するが、hMPVとAPVのヌクレオチド配列の系統学的解析、これら2種の異なるウイルスに対して生起された血清のウイルス中和力価の違い、および宿主利用の違いからも、APV-CおよびhMPVが2種の異なるウイルスであることが明らかにされる。これらの結果に基づけば、哺乳動物におけるhMPV感染が、鳥類から哺乳動物へのゾーノシス事象により起こった可能性があると推測される。しかし、これらのウイルス（すなわちGおよびSHタンパク質）は、鳥類におけるAVPの存在を考慮すると、再来（哺乳動物から鳥類への）ゾーノシス事象がまず起こらないような様式で順応してきた。

20

【0220】

30

追記ニューモウイルス亜科に関する背景情報

パラミクソウイルス科は2つの亜科：パラミクソウイルス亜科およびニューモウイルス亜科を含む。ニューモウイルス亜科は2つの属：ニューモウイルスおよびメタニューモウイルスからなる。ニューモウイルス属は、ヒト、ウシ、ヒツジおよびヤギの呼吸器合胞体ウイルスならびにマウス・肺炎ウイルス（PVM）を含む。メタニューモウイルス属は、トリ・ニューモウイルス（APV、TRTVとも呼ばれる）を含む。

40

【0221】

ニューモウイルス亜科における属の分類は、古典的なウイルスの特徴、遺伝子の順序および遺伝子の布置（constellation）に基づいている。ニューモウイルス属のウイルスは、パラミクソウイルス科の中でも独特であり、ゲノム（3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5'）の3'末端に2個の非構造タンパク質を有する。これに対して、メタニューモウイルス属のウイルスにはNS1遺伝子およびNS2遺伝子が欠けており、MとLのコード領域の間にある遺伝子の構成が異なる（3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5'）。

【0222】

50

パラミクソウイルス亜科の全てのメンバーは赤血球凝集活性を有しているが、この機能はニューモウイルス亜科を決定付ける特徴ではなく、RSVおよびAPVでは存在しないが、PV Mには存在する。ノイラミニダーゼ活性は、パラミクソウイルス属およびルプラウイルス属（パラミクソウイルス亜科）のメンバーには存在するが、麻疹ウイルス属（パラミクソウイルス亜科）ならびにニューモウイルス属およびメタニューモウイルス属（ニューモウイルス亜科）には存在しない。

【0223】

ニューモウイルス亜科の第2の目立った特徴は、RSVによるmRNA内の選択的ORF (alternative ORFs) の利用が明らかに制限されていることである。これに対して、センダイウイルスおよび麻疹ウイルスなどのパラミクソウイルス亜科の幾つかのメンバーは、リン酸化タンパク質 (P) をコードするmRNA内の選択的ORFを利用して、新規なタンパク質の合成を指令する。10

【0224】

ニューモウイルス亜科のGタンパク質は、パラミクソウイルス亜科のHNタンパク質またはHタンパク質と配列上の関連性も構造的な類似性も持たず、それらの鎖長のほぼ半分の大きさしかない。更に、Nタンパク質およびPタンパク質は、パラミクソウイルス亜科のNタンパク質およびPタンパク質よりも小さく、明確な配列相同性がない。多くの非セグメント化ネガティブ鎖RNAウイルスは、単一のマトリックス (M) タンパク質を有する。

【0225】

ニューモウイルス亜科のメンバーは、例外的に、2種のそうしたタンパク質 (MおよびM2) を有している。このMタンパク質はパラミクソウイルス亜科のMタンパク質よりも小さく、パラミクソウイルス亜科と配列上の関連性を持たない。20

【0226】

細胞培養物中で増殖させると、ニューモウイルス亜科のメンバーは典型的な細胞変性効果を示す。それらは特徴的な細胞の合胞体形成を誘発する。

【0227】

(Collinsら, 1996)

ニューモウイルス亜科、ニューモウイルス属

hRSVはニューモウイルス属の基準種であり、幼児期～若年小児時の下部気道疾患の世界的に広がっている主な原因物質である (Selwyn, 1990)。更に、hRSVは、免疫不全の個体や老人を含む他の患者群において重要な病原体として次第に認識されてきている。また、RSVは、あらゆる年齢の入院成人の市中肺炎の重要な原因物質である (Englund, 1991; Falsey, 2000; Dowell, 1996)。RSVの2つの主な抗原型 (AおよびB) が、それらのモノクローナルおよびポリクローナル抗体との反応性の違いに基づいて、核酸配列解析により同定されている (Anderson, 1985; Johnson, 1987; Sullender, 2000)。特に、Gタンパク質は、それら2つの亜型を区別するのに使用される。RSV-AとBとは、Gにおいては53%のアミノ酸配列相同性しか示さないが、他のタンパク質はそれらの亜型間でそれより高い相同性を示す (表1) (Collins, 1996)。30

【0228】

RSV感染の検出は、免疫蛍光法 (DIF、IFA)、ウイルス中和アッセイおよびELISAもしくはRT-PCRアッセイにおいてモノクローナルおよびポリクローナル抗体を用いて記載されている (Rothbarth, 1988; Van Milaan, 1994; Coggins, 1998)。hRSVと近縁であるものは、ウシ (bRSV)、ヒツジ (oRSV) およびヤギRSV (oRSV) であり、中でもbRSVは最も広範に研究してきた。hRSVとの配列相同性に基づいて、反芻動物のRSVはニューモウイルス亜科のニューモウイルス属に分類される (Collins, 1996)。反芻動物のRSV感染の診断および亜型同定は、血清学、抗原検出、ウイルス単離およびRT-PCRアッセイを組合せて使用することがベースである (Uttenthal, 1996; Valarcher, 1999; Oberst, 1993; Vilcek, 1994)。40

【0229】

bRSVの分子構成についての幾つかの解析が、ヒトおよびウシの抗血清、モノクローナル

10

20

30

40

50

抗体およびcDNAプローブを用いて行われてきた。これらの解析から、hRSVおよびbRSVのタンパク質組成が非常に類似しており、bRSVのゲノム構成がhRSVのものと似ていることが明らかになった。bRSVでもhRSVでも、Gタンパク質およびFタンパク質は、主な中和および保護抗原になっている。Gタンパク質は、hRSVの亜型間およびhRSVとbRSVとの間で非常に異なっている（それぞれ53%および28%）（Prozzi, 1997；Lerch, 1990）。hRSVおよびbRSVの株のFタンパク質は、同等の構造特性および抗原関連性を示している。bRSVのFタンパク質はhRSVと80～81%の相同性を示し、一方、2つのhRSVの亜型はFにおいて90%の相同性を示す（Walravens, K. 1990）。

【0230】

hRSVおよびbRSVに特異的なモノクローナル抗体の使用に基づく研究から、bRSVには異なる抗原亜型が存在することが示唆された。亜型A、BおよびABは、Gタンパク質に特異的なモノクローナル抗体の反応パターンに基づいて区別される（Furze, 1994；Prozzi, 1997；Elvander, 1998）。bRSVの疫学は、hRSVのものと非常に類似している。若齢のウシにおける自然発生的な感染は重篤な呼吸性の徴候と結びつく場合が多く、一方、実験的感染では、一般に、僅かな病理学的变化を伴う軽度の疾患となる（Elvander, 1996）。

10

【0231】

また、RSVは、自然に感染したヒツジ（oRSV）（LeaMaster, 1983）およびヤギ（cRSV）（Lehmkuhl, 1980）からも単離されている。両者の株は、ウシRSVとヌクレオチド配列が96%共通しており、抗原性交差反応性である。したがって、これらのウイルスもまた、ニューモウイルス属の中に分類される。

20

【0232】

ニューモウイルス亜科、ニューモウイルス属のもう1つのメンバーはマウス肺炎ウイルス（PVM）である。

【0233】

PVMは、実験動物コロニー、特に無胸腺マウスを含む該コロニーにおいて一般的な病原体である。自然に獲得した感染は無症候性であると考えられるが、マウスの肺で継代すると、上部気道感染から致命的な肺炎にまで及ぶ疾患の明らかな徴候が出てくる（Richter, 1988；Weir, 1988）。

30

【0234】

PVMおよびhRSVのヌクレオカプシドタンパク質（N）とリン酸化タンパク質（P）との間の制限された血清学的交差反応性は記載されているが、どの外部タンパク質も交差反応性を示さず、これらのウイルスはウイルス中和アッセイにおいて互いに区別できる（Chambers, 1990a；Gimenez, 1984；Ling, 1989a）。PVMの糖タンパク質は、それらのグリコシル化のパターンに関して、他のパラミクソウイルスのものとは異なり、RSVのものとは類似していると思われる。しかし、それらは、プロセッシングに関しては異なっている。RSVとは違って、しかし他のパラミクソウイルスと同様に、PVMはネズミ赤血球を用いた場合に赤血球凝集活性を有し、それにGタンパク質が関与していると思われる。何故ならば、このタンパク質に対するモノクローナル抗体は赤血球凝集を抑制するからである（Ling, 1989b）。

40

【0235】

PVMのゲノムはhRSVのものと類似しており、その3'末端に2つの非構造タンパク質を含み、同じようなゲノム構成を有する（Chambers, 1990a；Chambers, 1990b）。PVMのNS1/NS2遺伝子のヌクレオチド配列はhRSVのものとは検出可能なほど相同ではない（Chambers, 1991）。PVMのタンパク質の中には、hRSVと強い相同意を示すものもあるが（N：60%、F：38～40%）、Gははっきり異なる（アミノ酸配列は31%長い）（Barr, 1991；Barr, 1994；Chambers, 1992）。PVMのP遺伝子は、RSVやAPVのものとは異なり、第2のORFをコードすることが報告されており、ユニークなPVMタンパク質となっている（Collins, 1996）。新規なPVMの単離体は、ウイルス単離、赤血球凝集アッセイ、ウイルス中和アッセイおよび種々の免疫学的蛍光法により同定される。

50

【0236】

追記の表；ニューモウイルス亜科ニューモウイルス属の各種ウイルス間のアミノ酸相同意性

遺伝子	hRSV	bRSV	oRSV対 hRSV	bRSV対 hRSV	bRSV対 oRSV	PVM 対 hRSV
NS1	87			68~69	89	*
NS2	92			83~84	87	*
N	96		93			60
P			81			
M	—		89			
F	89			80~81		38~40
G	53	88~100	21~29	38~41	60~62	*
M2	92		94			41
SH	76		45~50		56	
L	—					

* 配列相同意性は検出不可

10

20

30

40

50

メタニューモウイルス属

トリ・ニューモウイルス(APV)は、七面鳥鼻気管炎の原因物質として同定され(McDougall, 1986; Collins, 1988)、したがって、七面鳥鼻気管炎ウイルス(TRTV)と呼ばれることが多い。この疾患は七面鳥の上部気道感染であり、高い罹患率と、変動性の(しかししばしば高い)死亡率となる。雌の七面鳥では、このウイルスは実質的な産卵の低下を引き起こすこともある。同じウイルスがニワトリにも感染できるが、この種では、このウイルスの主な病原体としての役割はそれほど明確に定義されていないが、一般には繁殖ニワトリにおいて頭部膨張症候群(SHS)と関連する(Cook, 2000)。ビリオンは多面体(pleiomorphic)であるが、主に球状であり、大きさは70~600nmであり、ヌクレオカプシドは、線状の非セグメント化ネガティブセンスRNAゲノムを含んでおり、らせん対称を示す(Collins, 1986; Giraud, 1986)。この形態は、パラミクソウイルス科のメンバーのものと類似している。APVコード化タンパク質およびRNAの解析から、この科の2つの亜科(パラミクソウイルス亜科とニューモウイルス亜科)の中で、APVはニューモウイルス亜科に最も近く類似していることが示唆された(Collins, 1988; Ling, 1988; Cavanagh, 1988)。

【0237】

APVは、非構造タンパク質(NS1およびNS2)を有さず、遺伝子の順序(3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5')は、RSVなどの哺乳動物のニューモウイルスのものとは異なる。したがって、APVは近年、新しいメタニューモウイルス属の基準種として分類された(Pringle, 1999)。

【0238】

中和パターン、ELISAおよびモノクローナル抗体との反応性の違いから、APVの異なる抗原型の存在が明らかになった。G遺伝子のヌクレオチド配列から、2つのウイルス亜科(AおよびB)が定義され、それらは38%のアミノ酸相同意性しか示さない(Collins, 1993; Juhasz, 1994)。アメリカ合衆国コロラド州から単離されたAPV(Cook, 1999)は、亜型AおよびBのウイルスとあまり交差中和しないことが示され、配列情報に基づいて新たな亜型Cと命名された(Seal, 1998; Seal, 2000)。フランスで2種の非A/非B APVが単離され、それらは亜型A、BおよびCとは抗原性が異なることが示された。F、LおよびG遺伝子のアミノ酸配列に基づいて、これらのウイルスもまた、新たな亜型Dとして分類された(Bayon-Auboyer, 2000)。

【0239】

APV感染の診断は、ニワトリまたは七面鳥の気管(tracheal organ)培養物(TOC)またはVero細胞培養物におけるウイルス単離により達成できる。細胞変性効果(CPE)は通常、更に一代または二代継代した後で見られる。このCPEは、散在している病巣領域の細胞

が丸く膨れて合胞体形成を引き起こすことを特徴とする (Buys, 1989)。IFおよびウイルス中和アッセイを含む幾つかの血清学的アッセイが開発されている。ELISAによるAPVに対する抗体の検出は、最も一般的に使用されている方法である (O'Loan, 1989; Gulati, 2000)。近年、APV感染の診断に、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) が用いられている。食道から採取したスワブは、出発物質として使用できる (Bayon-Auboyer, 1999; Shin, 2000)。

【0240】

- Alansari, H and Potgieter, L.N.D. 1994. Nucleotide and predicted amino acid sequence analysis of the ovine respiratory syncytial virus non-structural 1C and 1B genes and the small hydrophobic protein gene. *J. Gen. Virol.* 75: 401-404. 10
- Alansari, H., Duncan R.B., Baker, J.C. およびPotgieter, L.N. 1999. Analysis of ruminant respiratory syncytial virus isolates by RNase protection of the G glycoprotein transcripts. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11:215-20.
- Anderson, L.J., Hierholzer, J.C., Tsou, C., Hendry, R.M., Fornic, B.F., Stone, Y. およびMcIntosh, K. 1985. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J. Inf. Dis.* 151:626-633.
- Barr, J., Chambers, Pringle, C.R., Easton, A.J. 1991. Sequence of the major nucleocapsid protein gene of pneumonia virus of mice: sequence comparisons suggest structural homology between nucleocapsid proteins of pneumoviruses, paramyxoviruses, rhabdoviruses and filoviruses. *J. Gen. Virol.* 72:677-685. 20
- Barr, J., Chambers, P., Harriott, P., Pringle, C.R. およびEaston, A.J. 1994. Sequence of the phosphoprotein gene of pneumonia virus of mice: expression of multiple proteins from two overlapping reading frames. *J. Virol.* 68:5330-5334.
- Bayon-Auboyer, M.H., Jestin, V., Toquin, D., Cherbonnel, M. およびEteradossi, N. 1999. Comparison of F-, G- and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus. *Arch. Vir.* 144: 1091-1109.
- Bayon-Auboyer, M.H., Arnauld, C., Toquin, D. およびEteradossi, N. 2000. Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APC subgroup. *J. Gen. Virol.* 81: 2723-2733. 30
- Buys, S.B., Du Preez, J.H. およびEl's, H.J. 1989. The isolation and attenuation of a virus causing rhinotracheitis in turkeys in South Africa. *Onderstepoot J. Vet. Res.* 56:87-98
- Cavanagh, D. およびBarrett, T. 1988. Pneumovirus-like characteristics of the mRNA and proteins of turkey rhinotracheitis virus. *Virus Res.* 11:241-256.
- Chambers, P., Pringle, C.R. およびEaston, A.J. 1990a. Molecular cloning of pneumonia virus of mice. *J. Virol.* 64:1869-1872.
- Chambers, P., Matthews, D.A., Pringle, C.R. およびEaston, A.J. 1990b. The nucleotide sequences of intergenic regions between nine genes of pneumonia virus of mice establish the physical order of these genes in the viral genome. *Virus Res.* 18:263-270. 40
- Chambers, P., Pringles, C.R. およびEaston, A.J. 1991. Genes 1 and 2 of pneumonia virus of mice encode proteins which have little homology with the 1C and 1B proteins of human respiratory syncytial virus. *J. Gen. Vir.* 72:2545-2549.
- Chambers, P. Pringle CR, Easton AJ. 1992. Sequence analysis of the gene encoding the fusion glycoprotein of pneumonia virus of mice suggests possible conserved secondary structure elements in paramyxovirus fusion glycoproteins. *J. Gen. Virol.* 73:1717-1724.
- Coggins, W.B., Lefkowitz, E.J. およびSullender, W.M. 1998. Genetic variability among group A and group B respiratory syncytial viruses in a children's hospital 50

I. J. Clin. Microbiol. 36:3552-3557.

Collins, M.S. および Gough, R.E., Lister, S.A., Chettle, N. および Eddy, R. 1986. Further characterisation of a virus associated with turkey rhinotracheitis. Vet. Rec. 119:606.

Collins, M.S. および Gough, R.E. 1988. Characterisation of a virus associated with turkey rhinotracheitis. J. Gen. Virol. 69:909-916.

Collins, M.S., Gough, R.E. および Alexander, D.J. 1993. Antigenic differentiation of avian pneumovirus isolates using polyclonal antisera and mouse monoclonal antibodies. Avian Pathology 22:469-479.

Collins, P.L., McIntosh, K., Chanock, R.M. 196. Respiratory syncytial virus. P. 1313-1351. In: B.N. Fields, D.M. Knipe および P.M. Howley (編). Fields virology, 第3版, 第1巻 Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa, USA. 10

Cock, J.K.A., Huggins, M.B., Orbell, S.J. および Senne, D.A. 1999. Preliminary antigenic characterization of an avian pneumovirus isolated from commercial turkeys in Colorado, USA. Avian pathol. 28:607-617.

Cook, J.K.A. 2000. Avian rhinotracheitis. Rev. Sci. tech. offint. Epiz. 19:602-613.

Dowell, S.F., Anderson, L.J., Gary, H.E., Erdman, D.D., Plouffe, J.F., File, T.M., Marston, B.J. および Breiman, R.F. 1006. Respiratory syncytial virus is an important cause of community-acquired lower respiratory infection among hospitalized adults. J. Infect. Dis. 174:456-462. 20

Elvander, M. 1996. Severe respiratory disease in dairy cows caused by infection with bovine respiratory syncytial virus. Vet. Rec. 138:101-105.

Elvander, M., Vilcek, S., Baule, C., Utenthal, A., Ballagi-Pordany, A. および Belak, S. 1998.

Genetic and antigenic analysis of the G attachment protein of bovine respiratory syncytial virus strains. J. Gen. Virol. 79:2939-2946.

Englund, J.A., Anderson, L.J. および Rhame, F.S. 1991. Nosocomial transmission of respiratory syncytial virus in immunocompromised adults. J. Clin. Microbiol. 29: 115-119. 30

Falsey, A.R. および Walsh, E.E. 2000. Respiratory syncytial virus infection in adults. Clin. Microb. Rev. 13:371-84.

Furze, J., Wertz, G., Lerch, R. および Taylor, G. 1994. Antigenic heterogeneity of the attachment protein of bovine respiratory syncytial virus. J. Gen. Virol. 75:363-370.

Gimenez, H.B., Cash, P. および Melvin, W.T. 1984. Monoclonal antibodies to human respiratory syncytial virus and their use in comparison of different virus isolates. J. Gen. Virol. 65:963-971.

Gulati, B.R., Cameron, K.T., Seal, B.S., Goyal, S.M., Halvorson, D.A. および Njenga, M.K. 2000.

Development of a highly sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant matrix protein for detection of avian pneumovirus antibodies. J. Clin. Microbiol. 38:4010-4. 40

Johnson, P.R., Spriggs, M.K., Olimsted, R.A. および Collins, P.L. 1987. The G glycoprotein of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5625-5629.

Juhasz, K. および Easton, A.J. 1994. Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. J. Gen. Virol. 75:2873-2880. 50

LeaMaster, B.R., Evermann, J.F., Mueller, M.K., Prieur, M.K. および Schlie, J.V. 1983. Serologic studies on naturally occurring respiratory syncytial virus and Haemophilus sommus infections in sheep. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticicians 26:265-276.

LeHmkuhl, H.D., Smith, M.H., Cutlip, R.C. 1980. Morphogenesis and structure of caprine respiratory syncytial virus. Arch. Vir. 65:269-76.

Lerch, R.A., Anderson, K および Wertz, G.W. 1990. Nucleotide sequence analysis and expression from recombinant vectors demonstrate that the attachment protein G of bovine respiratory syncytial virus is distinct from that of human respiratory syncytial virus. J. Virol. 64:5559-5569. 10

Ling, R. および Pringle, C.R. 1988. Turkey rhinotracheitis virus: in vivo and in vitro polypeptide synthesis. J. Gen. Virol. 69:917-923.

Ling, R. および Pringle, C.R. 1989a. Polypeptides of pneumonia virus of mice. I. Immunological cross-reactions and post-translational modifications. J. Gen. Virol. 70:1427-1440.

Ling, R. および Pringle, C.R. 1989b. Polypeptides of pneumonia virus of mice. II. Characterization of the glycoproteins. J. Gen. Virol. 70:1441-1452.

McDougall, J.S. および Cook, J.K.A. 1986. Turkey rhinotracheitis: preliminary investigations. Vet. Rec. 118:206-207.

Oberst, R.D., M.P. Hays, K.J. Hennessy, L.C. Stine, J.F. Evermann および Kelling, C.L. 1993. Characteristic differences in reverse transcription polymerase chain reaction product of ovine, bovine and human respiratory syncytial viruses. J. Vet. Diagn. Investg. 5:322-328. 20

O'Loan, C.J., Allan, G., Baxter-Hohne, C. および McNulty, M.S. 1989. An improved ELISA and serum neutralisation test for the detection of turkey rhinotracheitis virus antibodies. J. Virol. Meth. 25:271-282.

Paccaud, M.F. および Jacquier, C., 1979. A respiratory syncytial virus of bovine origin. Arch. Ges. Virusforsch. 30:327-342.

Pringle, C.R. 1999 Virus taxonomy at the Xith international congress of virology. Sydney, Australia 1999. Arch. Virol. 144/2:2065-2070. 30

Prozzi, D., Walravens, K., Langedijk, J.P.M., Daus, F., Kramps, J.A. および Letesson, J.J. 1997. Antigenic and molecular analysis of the variability of bovine respiratory syncytial virus G glycoprotein. J. Gen. 78:359-366.

Randhawa, J.S., Marriott, A.C., Pringle, C.R. および A.J. Easton 1997. Rescue of synthetic minireplicons establish the absence of the NS1 and NS2 genes from avian pneumoviruses. J. Virol. 71:9849-9854.

Richter, C.B., Thigpen, J.E., Richter, C.S. および Mackenzie, J.M. 1988. Fatal pneumonia with terminal emaciation in nude mice caused by pneumonia virus of mice. Lab. Anim. Sci. 38:255-261.

Rothbarth, P.H., Habova, J.J. および Masurel, N. 1988. Rapid diagnosis of infections caused by respiratory syncytial virus. Infection 16:252.

Seal, B.S. 1988. Matrix protein gene nucleotide and predicted amino acid sequence demonstrate that the first US avian pneumovirus isolate is distinct from European strains. Virus Res. 58:45-52.

Seal, B.S., Sellers, H.S., Meinersmann, R.J. 2000. Fusion protein predicted amino acid sequence of the first US avian pneumovirus isolate and lack of heterogeneity among other US isolates. Virus Res. 66:139-147.

Selwyn, B.J. 1990. The epidemiology of acute respiratory tract infection in young children: comparison findings from several developing countries. Rev. Infect. Dis. 12:S870-S888. 50

- Shin, H.J., Rajashekara, G., Jirjis, F.F., Shaw, D.P., Goyal, S.M., Halvorson, D.A. および Nagaraja, K.V. 2000. Specific detection of avian pneumovirus (APV) US isolates by RT-PCR. *Arch. Virol.* 145:1239-1246.
- Sullender, W.M. 2000. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. *Clin. Microb. Rev.* 13:1-15.
- Trudel, M., Nadon, F., Sinnard, C., Belanger, F., Alain, R., Seguin, C. および Lussier, G. 1989. Comparison of caprine, human and bovine strains of respiratory syncytial virus. *Arch. Vir.* 107:141-149.
- Uttenthal, A., Jensen, N.P.B. および Blom, J.Y. 1996. Viral aetiology of enzootic pneumonia in Danish dairy herds, diagnostic tools and epidemiology. *Vet. Rec.* 139, 114-117.
- Valarcher, J., Bourhy, H., Gelfi, J. および Schelcher, F. 1999. Evaluation of a nested reverse transcription-PCR assay based on the nucleoprotein gene for diagnosis of spontaneous and experimental bovine respiratory syncytial virus infections. *J. Clin. Microb.* 37:1858-1862.
- Van Milaan, A.J., Sprenger, J.J., Rothbarth, P.H., Brandenburg, A.H., Masurel, N. および Claas, E.C. 1994. Detection of respiratory syncytial virus by RNA-polymerase chain reaction and differentiation of subgroups with oligonucleotide probes. *J. Med. Virol.* 44:80-87.
- Vilcek, S., Elvander, M., Ballagi-Pordany, A. および Belak, S. 1994. Development of nested PCR assays for detection of bovine respiratory syncytial virus clinical samples. *J. Clin. Microb.* 32:2225-2231.
- Walravens, K., Kettmann, R., Collard, A., Coppe, P. および Burny, A., 1990. Sequence comparison between the fusion protein of human and bovine respiratory syncytial viruses. *J. Gen. Virol.* 71: 3009-3014.
- Weir, E.C., Brownstein, D.G., Smith, A.L. および Johnson, E.A. 1988. Respiratory disease and wasting in athymic mice infected with pneumonia virus of mice. *Lab. Anim. Sci.* 34:35-37.

(図 1 a)

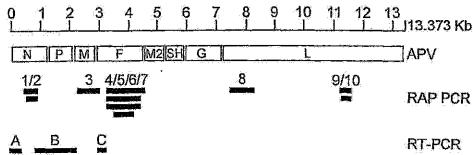
M	00-1	hRSV	bRSV	PVM	APV-A	APV-C	APV-B
00-1	1,00	0,37	0,37	0,37	0,77	0,87	0,75
hRSV	---	1,00	0,91	0,41	0,37	0,37	0,37
bRSV	---	---	1,00	0,42	0,35	0,36	0,35
PVM	---	---	---	1,00	0,37	0,38	0,38
APV-A	---	---	---	---	1,00	0,78	0,89
APV-C	---	---	---	---	---	1,00	0,77
APV-B	---	---	---	---	---	---	1,00
N	00-1	hRSV	bRSV	PVM	APV-A	APV-C	APV-B
00-1	1,00	0,20	0,22	0,21	0,40	0,52	0,40
hRSV	---	1,00	0,59	0,30	0,18	0,21	0,18
bRSV	---	---	1,00	0,31	0,21	0,23	0,21
PVM	---	---	---	1,00	0,21	0,23	0,21
APVA	---	---	---	---	1,00	0,42	1,00
APVC	---	---	---	---	---	1,00	0,42
APVE	---	---	---	---	---	---	1,00
F	00-1	hRSV	bRSV	PVM	APV-A	APV-C	APV-B
00-1	1,00	0,32	0,33	0,37	0,67	0,80	0,66
hRSV	---	1,00	0,62	0,40	0,35	0,35	0,35
bRSV	---	---	1,00	0,41	0,34	0,36	0,34
PVM	---	---	---	1,00	0,38	0,38	0,39
APV-A	---	---	---	---	1,00	0,72	0,84
APV-C	---	---	---	---	---	1,00	0,72
APV-B	---	---	---	---	---	---	1,00
P	00-1	hRSV	bRSV	PVM	APV-A	APV-C	APV-B
00-1	1,00	0,25	0,26	0,27	0,55	0,67	0,66
hRSV	---	1,00	0,81	0,30	0,28	0,26	0,26
bRSV	---	---	1,00	0,29	0,28	0,26	0,26
PVM	---	---	---	1,00	0,23	0,27	0,27
APV-A	---	---	---	---	1,00	0,52	0,64
APV-C	---	---	---	---	---	1,00	0,64
L9	00-1	hRSV	bRSV	APV-A	APV-C	APV-B	APV-D
00-1	1,00	0,36	0,35	0,56	0,55	0,67	0,66
hRSV	---	1,00	0,79	0,36	0,36	0,36	0,36
bRSV	---	---	1,00	0,35	0,35	0,35	0,35
APV-A	---	---	---	1,00	0,52	0,64	0,64
L9/10	00-1	hRSV	bRSV	APV-A	APV-C	APV-B	APV-D
00-1	1,00	0,30	0,30	0,53	0,53	0,65	0,65
hRSV	---	1,00	0,83	0,34	0,34	0,34	0,34
bRSV	---	---	1,00	0,32	0,32	0,32	0,32
APV-A	---	---	---	1,00	0,52	0,64	0,64

【 図 1 b 】

免疫蛍光アッセイおよびウイルス中和アッセイを用いた、年齢群で分類したヒトにおけるhMPVの血清陽性率					
免疫蛍光アッセイ			ウイルス中和アッセイ		
年齢（才）	試験したN	陽性のN	試験したN	陽性のN	力価範囲
< 1	20	5	12	3	16～32
1～2	20	11	13	4	16～32
2～5	20	14	8	3	16～512
5～10	20	20	4	4	32～256
10～20	20	20	4	3	32～128
>20	20	20	4	3	32～128
8～99 ¹	72	72	11	11	16～128

³ 1958年に採取した血清を用いた血清考古学的分析

【 図 2 】



【図3-1】

核タンパク質

リン酸化タンパク質

【 図 3 - 2 】

マトリックスタンパク質

融合名著与新解

P-ANNAREARPOMYINTINTENLWS-SKK-KR-L-GU-L-G-S-DAS-I-VS-VUM-G-NR-LS-K-VS-S-S-TSK-JD-19
PSV LSKK-KR-L-GU-L-G-LS-VQ-L-VQ-L-DR-VN-VS-T-MS-KV-DO-16

000-1 F DVSQSLTRNQGSDAIDLWGSFSGNSRNTAWVRSQDSUNAGTPIASLDLMTDAKARVNSPSCQTKMFLRNPVNRNGFELIVGSS-26

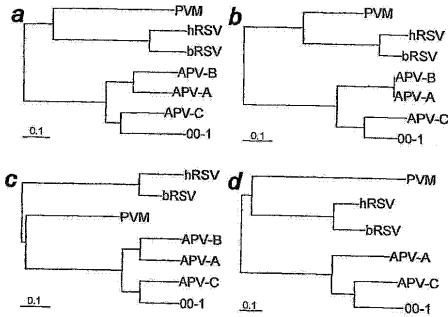
MP-B	Y.	E.	T.	A.	K.	W.D.Y.	L.E.W.G.	Y.	S.K.	35
PR-C	Y.	E.	R.V.L.	—	REINER	—	EW.P.	—	H.	36
PR-C	Y.	V.	K.	L.	—	D.	V.A.	EW.P.	H.	36
GRSV	LNV.	Y.	KLACZ.	L.TIN.	E.SNL.	T.Y.R.	VSFT.	QST.	RSR.	36
GRSV	LNV.	Y.	KLACZ.	L.TIN.	E.SNL.	T.Y.R.	VSFT.	QST.	RSR.	36
PR-B	LNV.	Y.	KLACZ.	L.TIN.	E.SNL.	T.Y.R.	VSFT.	QST.	RSR.	36
FVW	YVVY	—	L.M.	D.	B.	VERSED	—	HIMAG.	LESLY	35
FVW	YVVY	—	L.M.	D.	B.	VERSED	—	HIMAG.	LESLY	35

【 図 3 - 3 】

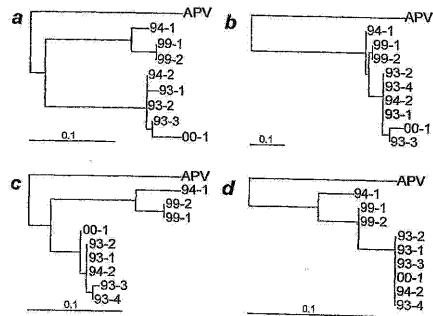
レポリメラーゼRAP PCR断片 8

LポリメラーゼRAP PCR断片 9 / 10

【 図 4 】



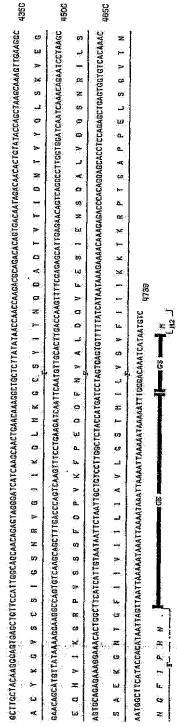
〔 四 5 〕



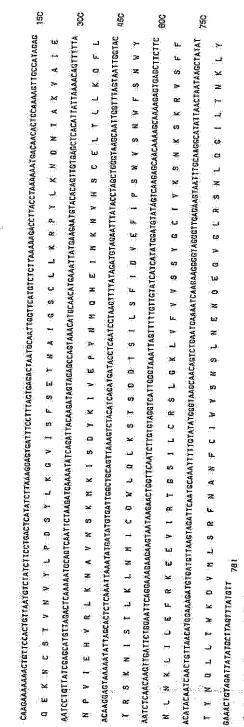
【 図 6 A - 1 】

【図 6 A - 2】

【図6A-3】



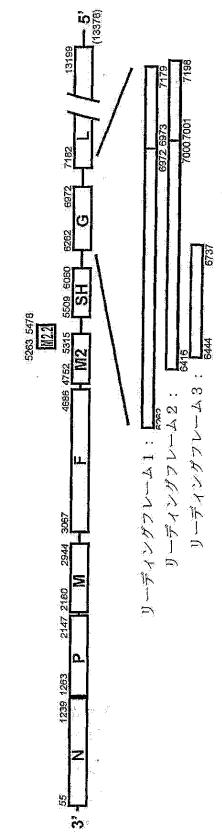
【図6B】



【図6C】

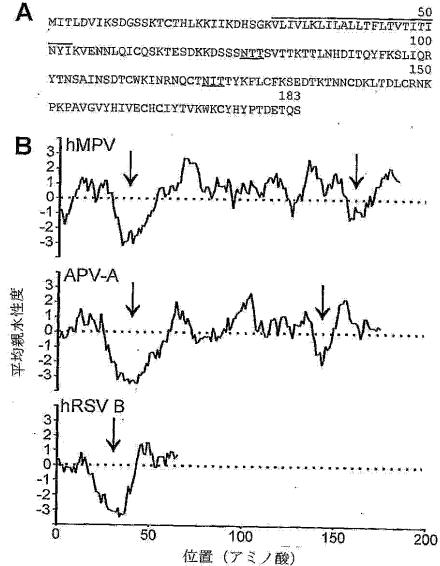
At a first stage of the manufacturing process, the substrate is provided with a base layer of photoresist. This is followed by a second stage of the manufacturing process, which involves the formation of a conductive pattern on the substrate. The conductive pattern is formed by applying a conductive ink onto the substrate. The conductive ink is applied using a screen printing technique. The conductive pattern is then cured under heat and pressure. Finally, the conductive pattern is etched to form the desired shape. The conductive pattern is then used to connect the various components on the substrate.

【図7】



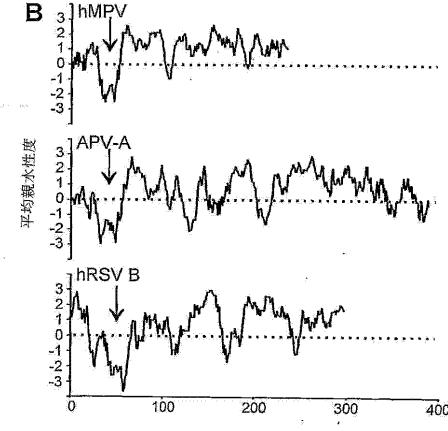
【 図 1 2 】

【 図 1 3 】



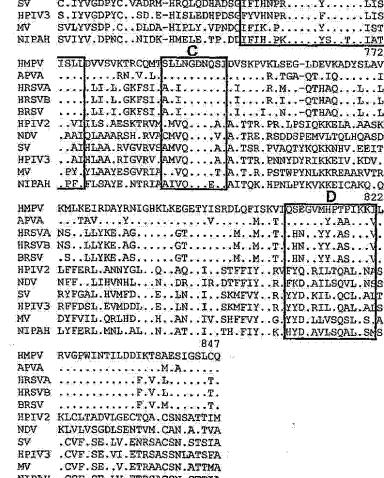
【 义 1 4 】

A MEVKVNEINTIDMLKARVKNRVARSKCFANASLVLIGITTLSTIALNLYLI 50
100 INYKMQNTSESEHHTSSSPMMESSRPTVFTNDSTNTPSOPHTFOOSTE 150
150 GSTLYFAAASSPTEPTSTPDTNRPFFVDTHTTPPSAGRTKTSPAVHT 200
200 KNNPRTTSRHSNPERATTRTARRTTILRTSSTRKRESTASVQPDISATT
236 KNEEASPAQPTQSATTRIQRKSVEANTSTTYNOTS

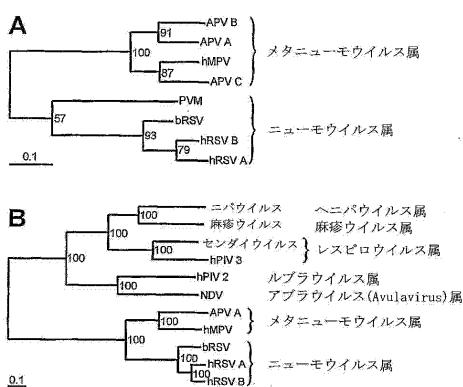


(义 15)

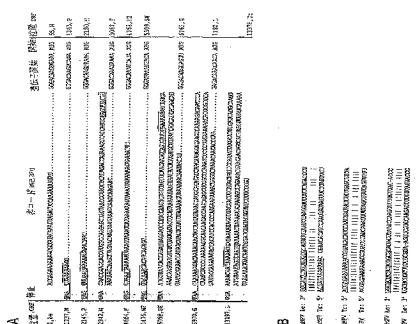
		A	674
HMPV	NVIAR21STV1SKRNQAI	YETTAICADVADELLRGTSQFLGIVNHLIVV	
APVA		SV.	T.SS
HRNSVA	. SKG . I.	SC . S . L . V . . F .	
HRSBV	. SKG . I.	SC . S . L . V . . S . T . L .	
BRBV	. SKG . I.	SC . S . L . V . . S . T . F .	
HPIV2	FELSAFGT . A . YCLQ .	O . IRFLH . RTINHRY . VPH . E . RIM	
NDV	RRRVAAT . C . QYCLNA .	HAHQ . M . LPH . E . RIM	
HRV	YVYV . K . VYV .	YVYV . K . VYV .	
HPIV3	YETSYCDS . K . VCLNA .	S . LGFGTQPC . LNK . N . PRLEG	
MV	YFTS . F . T . K . VCLNA .	ISLF . ORIN . YL . F . O . . KRLTY	
NIPAP	PDFTVS . FLT . K . CLNN .	SM . F . ERBL . YY . LGPS . N . KRLTY	
		B	723
HMPV	TTMICRAHAPPENG . PDIYDNGE . CGLYRHHGGEGCNO . CQHNTT		
APVA T	F	
HRNSVA YIRHNT . LNNUV .	F	
HRSBV	V . I . T	FZ DHVNLBNMVE .	
BRBV	A . V	YIRHNT . LN . VU .	
HPIV2	S . LYVGDFPN . ARTD-A . L .	VLNQI . FIVSKV	
NDV FVGDFPN	L . M	
	DC . LSVRND	IS	
	YIYVBAR		



【図 16】



【図 17】



【図 18 a】

DNA類似性マトリックス					
N	00-1	99-1	APVC	APVA	
00-1	1,000	0,862	0,757	0,660	
99-1	---	1,000	0,757	0,663	
APVC	---	---	1,000	0,656	
APVA	---	---	---	1,000	

DNA類似性マトリックス					
P	00-1	99-1	APVC	APVA	
00-1	1,000	0,811	0,677	0,588	
99-1	---	1,000	0,674	0,593	
APVC	---	---	1,000	0,584	
APVA	---	---	---	1,000	

DNA類似性マトリックス					
M	00-1	99-1	APVC	APVA	
00-1	1,000	0,865	0,766	0,695	
99-1	---	1,000	0,773	0,707	
APVC	---	---	1,000	0,705	
APVA	---	---	---	1,000	

DNA類似性マトリックス					
F	00-1	99-1	APVC	APVA	
00-1	1,000	0,838	0,706	0,662	
99-1	---	1,000	0,716	0,655	
APVC	---	---	1,000	0,685	
APVA	---	---	---	1,000	

DNA類似性マトリックス					
M2-1	00-1	99-1	APVC	APVA	
00-1	1,000	0,863	0,754	0,668	
99-1	---	1,000	0,744	0,657	
APVC	---	---	1,000	0,670	
APVA	---	---	---	1,000	

DNA類似性マトリックス					
M2-2	00-1	99-1	APVC	APVA	
00-1	1,000	0,861	0,648	0,486	
99-1	---	1,000	0,675	0,486	
APVC	---	---	1,000	0,463	
APVA	---	---	---	1,000	

DNA類似性マトリックス					
SH	00-1	99-1	APVC	APVA	
00-1	1,000	0,688	N.A.	0,421	
99-1	---	1,000	N.A.	0,380	
APVC	---	---	N.A.	N.A.	
APVA	---	---	---	1,000	

DNA類似性マトリックス					
G	00-1	99-1	APVC	APVA	
00-1	1,000	0,543	N.A.	0,262	
99-1	---	1,000	N.A.	0,263	
APVC	---	---	N.A.	N.A.	
APVA	---	---	---	1,000	

【図 18 b】

5'L : 99-1の最初の1500ヌクレオチドだけが入手できた
N.A. : 配列を入手できなかった

【図 19】

タンパク質類似性マトリックス

タンパク質類似性マトリックス					
N	00-1	99-1	APVC	APVA	
00-1	1,000	0,949	0,880	0,685	
99-1	---	1,000	0,883	0,682	
APVC	---	---	1,000	0,700	
APVA	---	---	---	1,000	

タンパク質類似性マトリックス					
P	00-1	99-1	APVC	APVA	
00-1	1,000	0,860	0,683	0,552	
99-1	---	1,000	0,676	0,549	
APVC	---	---	1,000	0,528	
APVA	---	---	---	1,000	

タンパク質類似性マトリックス					
M	00-1	99-1	APVC	APVA	
00-1	1,000	0,976	0,874	0,775	
99-1	---	1,000	0,874	0,763	
APVC	---	---	1,000	0,775	
APVA	---	---	---	1,000	

タンパク質類似性マトリックス					
F	00-1	99-1	APVC	APVA	
00-1	1,000	0,938	0,810	0,677	
99-1	---	1,000	0,803	0,674	
APVC	---	---	1,000	0,719	
APVA	---	---	---	1,000	

タンパク質類似性マトリックス					
M2-1	00-1	99-1	APVC	APVA	
00-1	1,000	0,946	0,844	0,719	
99-1	---	1,000	0,834	0,703	
APVC	---	---	1,000	0,704	
APVA	---	---	---	1,000	

タンパク質類似性マトリックス					
M2-2	00-1	99-1	APVC	APVA	
00-1	1,000	0,902	0,563	0,246	
99-1	---	1,000	0,577	0,232	
APVC	---	---	1,000	0,191	
APVA	---	---	---	1,000	

タンパク質類似性マトリックス					
SH	00-1	99-1	APVC	APVA	
00-1	1,000	0,570	N.A.	0,178	
99-1	---	1,000	N.A.	0,162	
APVC	---	---	N.A.	N.A.	
APVA	---	---	---	1,000	

タンパク質類似性マトリックス					
G	00-1	99-1	APVC	APVA	
00-1	1,000	0,326	N.A.	0,094	
99-1	---	1,000	N.A.	0,107	
APVC	---	---	N.A.	N.A.	
APVA	---	---	---	1,000	

タンパク質類似性マトリックス					
S	00-1	99-1	APVC	APVA	
00-1	1,000	0,921	N.A.	0,600	
99-1	---	1,000	N.A.	0,594	
APVC	---	---	N.A.	N.A.	
APVA	---	---	---	1,000	

5'L : 99-1の最初の500アミノ酸残基だけが入手できた

N.A. : 配列を入手できなかった

【図20】

核タンパク質 (N)

	10	20	30	40	50	60
00-1	MSLQGIHLSDLISYKHAILEKESQTTIKRDVGTTAVTPSSLQQEITLLCGEILYTKHEDYK	60				
99-1	MSLQGIHLSDLISYKHAILEKESQTTIKRDVGTTAVTPSSLQQEITLLCGEILYTKHEDYK	60				
	70	80	90	100	110	120
00-1	YAAEIGIQYISTALGSEERVQQTIDRNSGEVQWVITRTYSLGKTKNNKGEDLQMLDIHGVE	120				
99-1	YAAEIGIQYISTALGSEERVQQTIDRNSGEVQWVITRTYSLGKTKNNKGEDLQMLDIHGVE	120				
	130	140	150	160	170	180
00-1	KSWEEIDKEARKTWTLLKESSGNIPQNQRPSAPDTPILLCVGALIFTKLASTIEVGL	180				
99-1	KSWEEIDKEARKTWTLLKESSGNIPQNQRPSAPDTPILLCVGALIFTKLASTIEVGL	180				
	190	200	210	220	230	240
00-1	ETTVRANRVLSDALKRYPRMDPKIARSFYDLFEQKVYHRSLFIEYKGALGSSSTGSKA	240				
99-1	ETTVRANRVLSDALKRYPRIDPKIARSFYELFEQKVYHRSLFIEYKGALGSSSTGSKA	240				
	250	260	270	280	290	300
00-1	ESLFVNIFMQAYGAGOTMLRWGVIARSSNNIMLGHSVSVQAEELKQVIEVYDVLREMGPESG	300				
99-1	ESLFVNIFMQAYGAGOTMLRWGVIARSSNNIMLGHSVSVQSELKQVIEVYDVLREMGPESG	300				
	310	320	330	340	350	360
00-1	LLHLRQSPKAGLISIANCPNFASVVLGNASGLGIIIGMYRGRVPNTLEFSAAESYAKSLKE	360				
99-1	LLHLRQSPKAGLISIANCPNFASVVLGNASGLGIIIGMYRGRVPNTLEFSAAESYARSLKE	360				
	370	380	390			
00-1	SNKINFSSLGTDDEKEAAEHFLNVS	394				
99-1	SNKINFSSLGTDDEKEAAEHFLNMS	394				

【図21】

リソ酸化タンパク質 (P)

	10	20	30	40	50	60
00-1	MSFPEGKDILEMGNEAKLAEAFQKSLEK	60				
99-1	MSFPEGKDILEMGNEAKIAEAFQKSLEK	60				
	70	80	90	100	110	120
00-1	ETPSEPKLAWNDKGCPKEDKOMVMPDPIREFESTEKVLPSSDGKTPAEKK	120				
99-1	STPSEPKLAWNDKGCPKEDKOMVMPDPIREFESTEKVLPSSDGKTPAEKK	120				
	130	140	150	160	170	180
00-1	NKKKVSPTNEBPGKTYLKEKDALLSNEEDDAEASSILTEERDTSSLSIEARLESIE	180				
99-1	SKKKVSPTNEBPGKTYLKEKDALLSNEEDDAEASSILTEERDTSSLSIEARLESIE	180				
	190	200	210	220	230	240
00-1	EKLSMILGSLRITLNITATAGPTAARDGIRDAMIGVREELIADIIKEAKGKAABMMEEMSQ	240				
99-1	EKLSMILGSLRITLNITATAGPTAARDGIRDAMIGVREELIADIIKEAKGKAABMMEEMSQ	240				
	250	260	270	280	290	
00-1	RSKIGNGSVKLTKEAKELNKIVEDESTSGSEEEEPKDTQDNSCDDIYQLIM	294				
99-1	RSKIGNGSVKLTKEAKELNKIVEDESTSGSEEEEPKETQDNSCDDIYQLIM	294				

【図22】

マトリックスタンパク質 (M)

	10	20	30	40	50	60
00-1	MESYLVDITYGIPYTAAVQVDLIEKDLLPASLTIWFPLFOQANTPPAVLQLKTLITTL	60				
99-1	MESYLVDITYGIPYTAAVQVDLVEKDLLPASLTIWFPLFOQANTPPAVLQLKTLITTL	60				
	70	80	90	100	110	120
00-1	YAAQSNGPTILKVNASAQGAAMSVLPKFPEVNAVALDEYSKLDFDKLTVCDCVTVLTTM	120				
99-1	YAAQSNGPTILKVNASAQGAAMSVLPKFPEVNAVALDEYSKLDFDKLTVCDCVTVLTTM	120				
	130	140	150	160	170	180
00-1	KPYGMVSKFVSSAKSVEGKTHDLIALCDFMDEKNTPTVTPAFIKSVSIKESESATVAA	180				
99-1	KPYGMVSKFVSSAKSVEGKTHDLIALCDFMDEKNTPTVTPAFIKSVSIKESESATVAA	180				
	190	200	210	220	230	240
00-1	ISSEBADQALTQAKIAPYAGLIMIMTMNNPKGIFKKLGAGTQVIVELGAYVQAESISICK	240				
99-1	ISSEBADQALTQAKIAPYAGLIMIMTMNNPKGIFKKLGAGTQVIVELGAYVQAESISICK	240				
	250					
00-1	TWSHQGTRYVVLKSR	254				
99-1	WSHQGTRYVVLKSR	254				

【図23】

融合タンパク質 (F)

	10	20	30	40	50	60
00-1	MSWKVVIISLLITPOHGLKESYLEECSCTITECYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVNLT	60				
99-1	MSWKVMIISLLITPOHGLKESYLEECSCTITECYLSVLRTGWYTNVFTLEVGDVNLT	60				
	70	80	90	100	110	120
00-1	ADGPSLITKLEDTIKSALRELRTVSDQLAIRECQIENPRQSRFVLGAIALGVATAAVTA	120				
99-1	ADGPSLITKLEDTIKSALRELRTVSDQLAIRECQIENPRQSRFVLGAIALGVATAAVTA	120				
	130	140	150	160	170	180
00-1	GVAIAKTRIRLESEPVIAINAKKTNBAVSTLQNGVRLATAVRELKFVSKNLTKAINKN	180				
99-1	GIAIAKTRIRLESEPVIAINAKQTNEAVSTLQNGVRLATAVRELKFVSKNLTKAINKN	180				
	190	200	210	220	230	240
00-1	KCDIADLKMAVSFSQNRFLNVQRFSDNAGITPAISLDLMTDAAELARAVSNMPTSAGO	240				
99-1	KCDIADLKMAVSFSQNRFLNVQRFSDNAGITPAISLDLMTDAAELARAVSNMPTSAGO	240				
	250	260	270	280	290	300
00-1	IKMLLENRANVRRKGFCIGIVGSSVIVYMWQLPIRGVIDTPCWIVKAAPSCSCKGNYA	300				
99-1	IKMLLENRANVRRKGFCIGIVGSSVIVYMWQLPIRGVIDTPCWIVKAAPSCSCKGNYA	300				
	310	320	330	340	350	360
00-1	CLLRDQGWYCQAGSTVYYPNEDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTNTY	360				
99-1	CLLRDQGWYCQAGSTVYYPNEDCETRGDHVFCDTAAGINVAEQSKECNINISTNTY	360				
	370	380	390	400	410	420
00-1	CKVSTGRHPISMVALSPGLALVACYKGVSICISGSNQVGIKQIUKGCSCYITNQDADPTVTI	420				
99-1	CKVSTGRHPISMVALSPGLALVACYKGVSICISGSNQVGIKQIUKGCSCYITNQDADPTVTI	420				
	430	440	450	460	470	480
00-1	DNTVYQLSKVGEQHVVKGRPVSSSDFVKEPDQFNPVALDQFESIENSQALVDQSNKI	480				
99-1	DNTVYQLSKVGEQHVVKGRPVSSSDFVKEPDQFNPVALDQFESIENSQALVDQSNKI	480				
	490	500	510	520	530	
00-1	LSSAEKGNTRGPITVLLAVLGTSMIUSVIIKKKTRKPTGAPPELSCVNNQFIPHNS	539				
99-1	LSSAEKGNTRGPITVLLAVLGTSMIUSVIIKKKTRKPTGAPPELNGVNNQFIPHNS	539				

【 図 2 4 】

【 図 2 5 】

M2-2タンパク質 (M2-2)

	10	20	30	40	50	60
00-1	MTLHMPCKTVKALIKCSEHGPFTITIE	VDDMIWTHKDLKPALSDGIVKSHTNIYNCYLEN	60			
99-1	MTLHMPCKTVKALIKCSKGPFITIE	FDDMIWTHKELKPLSDGIVKSHTNIYSCYLEN	60			
	70					
00-1	IEIYYVK E YLS	71				
99-1	IEIYYVK E YLS	71				

【 図 2 8 】

ポリメラーゼタンパク質 (L) の末端

	10	20	30	40	50	60
00-1	MDFPENESTVNVYLPDSYLGKVISFSETNAIGSCLLKRPYLKDNTAKV AILENPVIEHVRLL	60				
99-1	MDFPENESTVNVYLPDSYLGKVISFSETNAIGSCLLKRPYLKDNTAKV AIVENPVVEHVRLL	60				
	70	80	90	100	110	120
00-1	KNAVNSKMKISDYKIVEPVNMQHEIMKNVHSCELTLLKQFLTRSKN ISTLKLKNMNICDWLQ	120				
99-1	RNAVETMKMKISDYKVVPEPVNMQHEIMKNHSCETLTLKKQFLTRSKN ISSLKLKNMNICDWLQ	120				
	130	140	150	160	170	180
00-1	LKSTSDTSILSFLDVEFIPFQWVSNWFSNWYNLNKLILLEFRKEE VIRTGSILCRSLGKLV	180				
99-1	LKSTSDNTSILSFLDVEFIPFQWVSNWFSNWYNLNKLILLEFRKEE VIRTGSILCRSLGKLV	180				
	190	200	210	220	230	240
00-1	FVSSYGCIVVKRSNSKRSRFFTYNQLITWKDMLSRSEFNANFCI WVWSNLSNQEGGLIRS	240				
99-1	FIVSSYGCIVVKRSNSKRSRFFTYNQLITWKDMLSRSEFNANFCI WVWSNLSNQEGGLIRS	240				
	250	260	270	280	290	300
00-1	NLQGMLTNKLYETVDYMLSLCCNEGFSILVKEPFGFIMSEILR ITEHQFQSTRFRNTLIG	300				
99-1	NLQGMLTNKLYETVDYMLSLCCNEGFSILVKEPFGFIMSEILR ITEHQFQSTRFRNTLIG	300				
	310	320	330	340	350	360
00-1	LTDQMLTKMKNPKRVEGTIVLENNDPYMEVVLKLLGDTL CIKLILNKRNLENAAELYI	360				
99-1	LTEQMLTKMKNPKRVEGTIVLENNDPYMEVVLKLLGDTL CIKLILNKRNLENAAELYI	360				
	370	380	390	400	410	420
00-1	FRIFGHPMVDERAMDIAVKGNNNEITKILR ESLTELRAFGAFILRIIKGFDVDDNNKKRPKINK	420				
99-1	FRIFGHPMVDERAMDIAVKGNNNEITKILR ESLTELRAFGAFILRIIKGFDVDDNNKKRPKINK	420				
	430	440	450	460	470	480
00-1	LKVLSKRWMYFKAKSYPSQLELSQDFLELAIAQFEQEFSV PEKTNLEMVLNDKAISPP	480				
99-1	LKVLSKRWMYFKAKSYPSQLELSQDFLELAIAQFEQEFSV PEKTNLEMVLNDKAISPP	480				
	490					
00-1	KRLIIVSWYPKNLYLPKTIKK	499				
99-1	KRLIIVSWYPKNLYLPKTIKK	499				

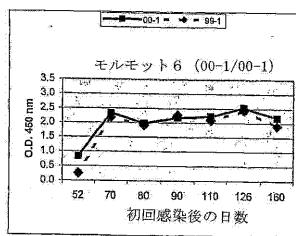
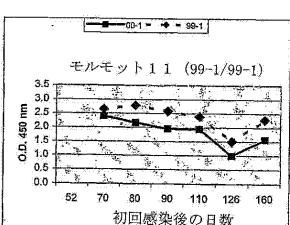
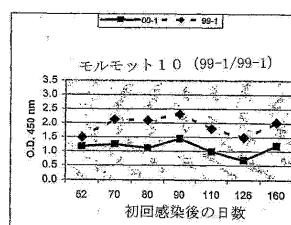
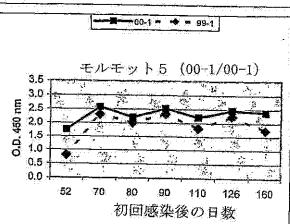
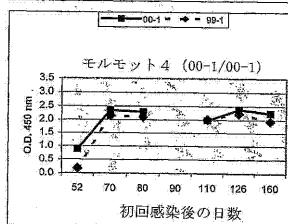
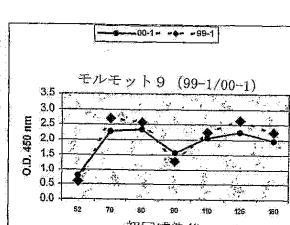
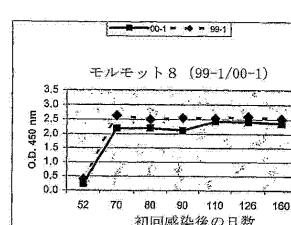
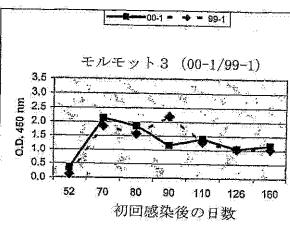
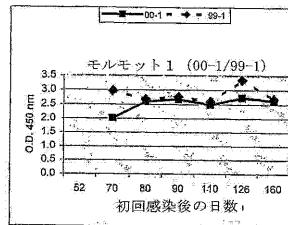
【 図 2 6 】

(27)

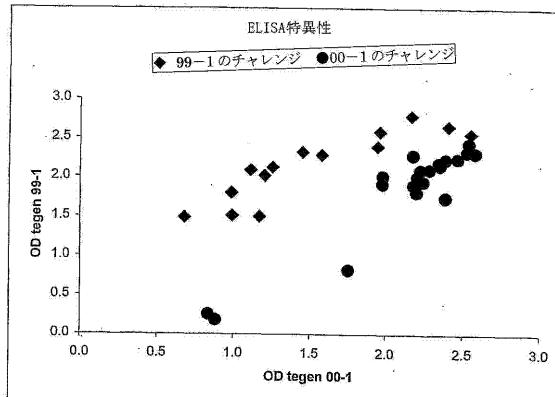
接着糖タンパク質 (G)
 10 20 30 40 50 60
 00-1 MEVKVBNIRP~~I~~DMEKARVKRNRP~~S~~KCFKNAISLVIGIITLSIALNLYLIIN~~K~~WQKNTS 60
 99-1 MEVRVENIRP~~I~~DMEKAKXKRNRP~~S~~RSCRYRNATLILIGITALSMALNIFLIDFATIRNMI 60
 70 80 90 100 110 120
 00-1 ESEHTT~~S~~SP~~E~~RS~~E~~RE~~T~~PTV~~P~~DNSDIN~~N~~SP~~C~~HET~~T~~ST~~S~~TYAASASSE~~F~~EST 120
 99-1 KTEN~~A~~MP~~A~~PE~~S~~SK~~K~~PT~~M~~SP~~A~~GENT~~K~~NP~~O~~QT~~T~~WT~~T~~SP~~S~~PVA~~C~~PECHY~~H~~GT~~T~~ 120
 130 140 150 160 170 180
 00-1 S~~D~~TT~~T~~RE~~P~~FE~~V~~PD~~T~~TPPSASR~~R~~K~~S~~SPAVIT~~K~~NP~~R~~TS~~S~~NTHS~~H~~SP~~R~~PR~~T~~TR~~A~~RT~~T~~ETS 180
 99-1 SD~~T~~TT~~P~~CT~~T~~DP~~T~~KT~~H~~PL~~K~~ST~~N~~EC~~T~~QT~~T~~TER~~T~~TR~~T~~TT~~T~~K~~E~~KGREN~~T~~NOT~~S~~TA~~A~~OTT 180
 190 200 210 220 230
 00-1 S~~K~~RK~~P~~TA~~S~~VG~~P~~DL~~S~~AT~~N~~NE~~E~~AS~~E~~AE~~T~~Q~~T~~S~~S~~STR~~W~~ORK~~V~~EEAN~~S~~ITY~~Q~~NTS 236
 99-1 NT~~S~~IN~~R~~NR~~N~~AS~~E~~ST~~T~~—~~I~~NT~~S~~SP~~R~~ND~~T~~TO~~S~~CE~~T~~SP~~S~~SP~~H~~FA~~T~~ 224

【 図 29 】

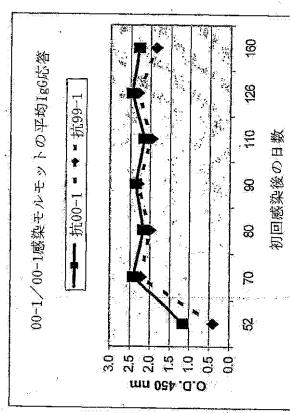
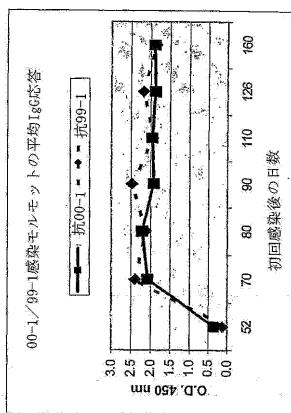
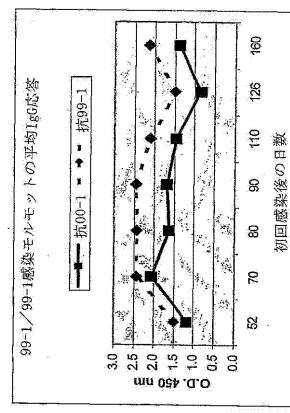
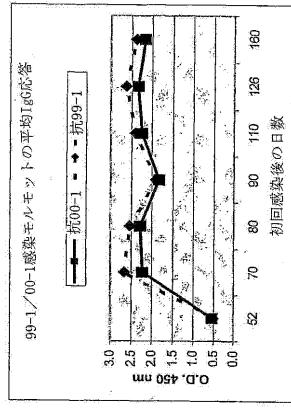
【図 30A】



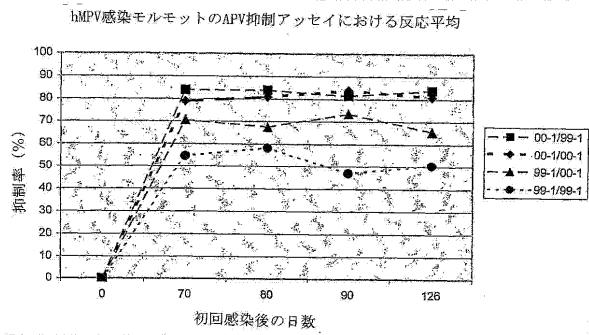
【図 31】



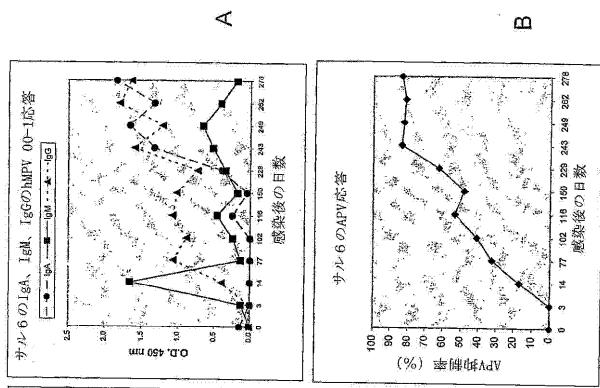
【図 32】



【図 3 3】



【図 3 6】



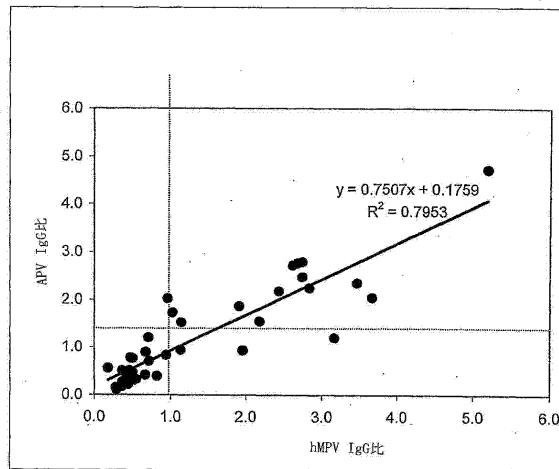
【図 3 4】

	抗001-1	抗99-1	抗APV-C
00-1で一度感染			
00-1で二度感染			
99-1で一度感染			
99-1で二度感染			

【図 3 5】

番号	1回目の 感染	2回目の 感染																
		0	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12						
3	00-1	-	-	+	+	+	+	+	N	-	-	+	+	+	+	-	?	-
6	00-1	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-

【図 3 7】



【配列表】2011177173000001.app**【手続補正書】****【提出日】**平成23年3月9日(2011.3.9)**【手続補正1】****【補正対象書類名】**特許請求の範囲**【補正対象項目名】**全文**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【特許請求の範囲】****【請求項1】**

単離されたネガティブセンス一本鎖RNAメタニューモウイルスであって、該ウイルスのNタンパク質のアミノ酸配列が、図20に示された00-1または99-1 MPV単離体のNタンパク質のアミノ酸配列に対して少なくとも91%の同一性を有し、但しその配列同一性はBLASTソフトウェアを用いてNタンパク質の全長にわたって決定されるものであり、かつ、該ウイルスは(i)哺乳動物細胞に感染することができ、(ii)感染した哺乳動物細胞の合胞体形成を引き起こすことができ、(iii)150～600nmのウイルス粒子を形成し、(iv)クロロホルム感受性であり、そして(v)該ウイルスに感染したtMK細胞は赤血球凝集活性を示さない、前記ウイルス。

【請求項2】

単離されたネガティブセンス一本鎖RNAメタニューモウイルスであって、以下のタンパク質：

(i) 図20に示された00-1または99-1 MPV単離体のNタンパク質のアミノ酸配列に対して少なくとも91%のアミノ酸配列同一性を有するNタンパク質；

(ii) 図21に示された00-1または99-1 MPV単離体のPタンパク質のアミノ酸配列に対して少なくとも85%のアミノ酸配列同一性を有するPタンパク質；

(iii) 図22に示された00-1または99-1 MPV単離体のMタンパク質のアミノ酸配列に対して少なくとも94%のアミノ酸配列同一性を有するMタンパク質；

(iv) 図23に示された00-1または99-1 MPV単離体のFタンパク質のアミノ酸配列に対して少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するFタンパク質；

(v) 図24に示された00-1または99-1 MPV単離体のM2-1タンパク質のアミノ酸配列に対して少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有するM2タンパク質；

(vi) 図28に示された00-1 MPV単離体のLタンパク質のアミノ酸配列に対して少なくとも91%のアミノ酸配列同一性を有するLタンパク質；

(vii) 図26に示された00-1または99-1 MPV単離体のSHタンパク質のアミノ酸配列を有するSHタンパク質；および

(viii) 図27に示された00-1または99-1 MPV単離体のGタンパク質のアミノ酸配列を有するGタンパク質；

のうちの少なくとも2つのタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むゲノムを有し、但し前記配列同一性はBLASTソフトウェアを用いてそれぞれのタンパク質の全長にわたって決定されるものであり、かつ、該ウイルスは(i)哺乳動物細胞に感染することができ、(ii)感染した哺乳動物細胞の合胞体形成を引き起こすことができ、(iii)150～600nmのウイルス粒子を形成し、(iv)クロロホルム感受性であり、そして(v)該ウイルスに感染したtMK細胞は赤血球凝集活性を示さない、前記ウイルス。

【請求項3】

単離されたネガティブセンス一本鎖RNAメタニューモウイルスであって、以下のタンパク質：

(i) 図20に示された00-1または99-1 MPV単離体のNタンパク質のアミノ酸配列を有するNタンパク質；

(ii) 図21に示された00-1または99-1 MPV単離体のPタンパク質のアミノ酸配列を有

するPタンパク質；

(iii) 図22に示された00-1または99-1 MPV単離体のMタンパク質のアミノ酸配列を有するMタンパク質；

(iv) 図23に示された00-1または99-1 MPV単離体のFタンパク質のアミノ酸配列を有するFタンパク質；

(v) 図24に示された00-1または99-1 MPV単離体のM2-1タンパク質のアミノ酸配列を有するM2-1タンパク質；

(vi) 図25に示された00-1または99-1 MPV単離体のM2-2タンパク質のアミノ酸配列を有するM2-2タンパク質；

(vii) 図28に示された00-1または99-1 MPV単離体のLタンパク質のアミノ酸配列を有するLタンパク質；

(viii) 図26に示された00-1または99-1 MPV単離体のSHタンパク質のアミノ酸配列を有するSHタンパク質；および

(ix) 図27に示された00-1または99-1 MPV単離体のGタンパク質のアミノ酸配列を有するGタンパク質；

のうちの少なくとも2つのタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むゲノムを有し、但し前記配列同一性はBLASTソフトウェアを用いてそれぞれのタンパク質の全長にわたって決定されるものであり、かつ、該ウイルスは(i)哺乳動物細胞に感染することができ、(ii)感染した哺乳動物細胞の合胞体形成を引き起こすことができ、(iii)150～600nmのウイルス粒子を形成し、(iv)クロロホルム感受性であり、そして(v)該ウイルスに感染したtMK細胞は赤血球凝集活性を示さない、前記ウイルス。

【請求項4】

単離されたネガティブセンス一本鎖RNAメタニューモウイルスであって、該ウイルスのゲノムが、CNCM(パリ)にI-2614として寄託されているウイルス単離体に該当する00-1 MPV単離体のゲノムにストリングエントな条件でハイブリダイズする、前記ウイルス。

【請求項5】

弱毒化ウイルスである、請求項1～4のいずれか1項に記載のウイルス。

【請求項6】

請求項1～4のいずれか1項に記載のウイルスを含む、免疫原性組成物。

【請求項7】

前記ウイルスが弱毒化ウイルスである、請求項6に記載の免疫原性組成物。

【請求項8】

図20に示された00-1または99-1 MPV単離体のNタンパク質のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質をコードしており、但しその配列同一性はBLASTソフトウェアを用いて決定されるものである、単離された核酸。

【請求項9】

図21に示された00-1または99-1 MPV単離体のPタンパク質のアミノ酸配列に対して少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質をコードしており、但しその配列同一性はBLASTソフトウェアを用いて決定されるものである、単離された核酸。

【請求項10】

図22に示された00-1または99-1 MPV単離体のMタンパク質のアミノ酸配列に対して少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質をコードしており、但しその配列同一性はBLASTソフトウェアを用いて決定されるものである、単離された核酸。

【請求項11】

図23に示された00-1または99-1 MPV単離体のFタンパク質のアミノ酸配列に対して少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質をコードしており、但しその配列同一性はBLASTソフトウェアを用いて決定されるものである、単離された核酸。

【請求項12】

図24に示された00-1または99-1 MPV単離体のM2-1タンパク質のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質をコードしており、但し

その配列同一性はBLASTソフトウェアを用いて決定されるものである、単離された核酸。

【請求項 1 3】

図25に示された00-1または99-1 MPV単離体のM2-2タンパク質のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質をコードしており、但しその配列同一性はBLASTソフトウェアを用いて決定されるものである、単離された核酸。

【請求項 1 4】

図28に示された00-1 MPV単離体のLタンパク質のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質をコードしており、但しその配列同一性はBLASTソフトウェアを用いて決定されるものである、単離された核酸。

【請求項 1 5】

図26に示された00-1または99-1 MPV単離体のSHタンパク質のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする、単離された核酸。

【請求項 1 6】

図27に示された00-1または99-1 MPV単離体のGタンパク質のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする、単離された核酸。

【請求項 1 7】

CNCM(パリ)にI-2614として寄託されているウイルス単離体のゲノムもしくはアンチゲノムの核酸に対して高ストリンジエンシー条件下で特異的にハイブリダイズする、単離された核酸。

【請求項 1 8】

請求項17に記載の核酸とサンプルとを接触させることを含む、該サンプル中の哺乳動物メタニューモウイルスの検出方法。

【請求項 1 9】

哺乳動物メタニューモウイルスが、ヒト・メタニューモウイルスである、請求項18に記載の方法。

【請求項 2 0】

請求項8～17のいずれか1項に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 2 1】

請求項8～17のいずれか1項に記載の核酸を含む宿主細胞。

【請求項 2 2】

以下のアミノ酸配列を含む、単離されたタンパク質：

(i) 図20に示された00-1または99-1 MPV単離体のNタンパク質のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列；

(ii) 図21に示された00-1または99-1 MPV単離体のPタンパク質のアミノ酸配列に対して少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列；

(iii) 図22に示された00-1または99-1 MPV単離体のMタンパク質のアミノ酸配列に対して少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列；

(iv) 図23に示された00-1または99-1 MPV単離体のFタンパク質のアミノ酸配列に対して少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列；

(v) 図24に示された00-1または99-1 MPV単離体のM2-1タンパク質のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列；

(vi) 図25に示された00-1または99-1 MPV単離体のM2-2タンパク質のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列；

(vii) 図28に示された00-1 MPV単離体のLタンパク質のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列；

(viii) 図26に示された00-1または99-1 MPV単離体のSHタンパク質のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列；および

(ix) 図27に示された00-1または99-1 MPV単離体のGタンパク質のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列。

【請求項 2 3】

以下のアミノ酸配列を含む、単離されたタンパク質：

- (i) 図20に示された00-1または99-1 MPV単離体のNタンパク質のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列；
- (ii) 図21に示された00-1または99-1 MPV単離体のPタンパク質のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列；
- (iii) 図22に示された00-1または99-1 MPV単離体のMタンパク質のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列；
- (iv) 図23に示された00-1または99-1 MPV単離体のFタンパク質のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列；または
- (v) 図28に示された00-1 MPV単離体のLタンパク質のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列。

【請求項24】

請求項1～5のいずれか1項に記載のウイルスに特異的に結合するモノクローナル抗体。

【請求項25】

以下のタンパク質のいずれかに特異的に結合するモノクローナル抗体：

- (i) 図20に示された00-1または99-1 MPV単離体のNタンパク質のアミノ酸配列を有するNタンパク質；
- (ii) 図21に示された00-1または99-1 MPV単離体のPタンパク質のアミノ酸配列を有するPタンパク質；
- (iii) 図22に示された00-1または99-1 MPV単離体のMタンパク質のアミノ酸配列を有するMタンパク質；
- (iv) 図23に示された00-1または99-1 MPV単離体のFタンパク質のアミノ酸配列を有するFタンパク質；
- (v) 図24に示された00-1または99-1 MPV単離体のM2-1タンパク質のアミノ酸配列を有するM2-1タンパク質；
- (vi) 図25に示された00-1または99-1 MPV単離体のM2-2タンパク質のアミノ酸配列を有するM2-2タンパク質；または
- (vii) 図28に示された00-1 MPV単離体のLタンパク質のアミノ酸配列を有するLタンパク質。

【請求項26】

以下のタンパク質のいずれかに特異的に結合するモノクローナル抗体：

- (i) 図20に示された00-1または99-1 MPV単離体のNタンパク質のアミノ酸配列に対して少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するNタンパク質；
- (ii) 図21に示された00-1または99-1 MPV単離体のPタンパク質のアミノ酸配列に対して少なくとも85%のアミノ酸配列同一性を有するPタンパク質；
- (iii) 図22に示された00-1または99-1 MPV単離体のMタンパク質のアミノ酸配列に対して少なくとも97%のアミノ酸配列同一性を有するMタンパク質；
- (iv) 図23に示された00-1または99-1 MPV単離体のFタンパク質のアミノ酸配列に対して少なくとも97%のアミノ酸配列同一性を有するFタンパク質；
- (v) 図24に示された00-1または99-1 MPV単離体のM2-1タンパク質のアミノ酸配列に対して少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有するM2タンパク質；
- (vi) 図28に示された00-1 MPV単離体のLタンパク質のアミノ酸配列に対して少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するLタンパク質；
- (vii) 図26に示された00-1または99-1 MPV単離体のSHタンパク質のアミノ酸配列を有するSHタンパク質；または
- (viii) 図27に示された00-1または99-1 MPV単離体のGタンパク質のアミノ酸配列を有するGタンパク質。

【請求項27】

請求項25または26に記載の抗体とサンプルとを接触させることを含む、該サンプル

中の哺乳動物メタニьюモウイルスの検出方法。

【請求項 28】

請求項 18 または 27 に記載の方法により、パラミクソウイルス科のニュー モウイルス亜科に含まれる哺乳動物ネガティブセンス一本鎖RNAウイルスとして同定され、かつ系統学的にメタニьюモウイルス属に該当するものとして同定される、CNCM(パリ)にI-2614として寄託されているウイルス単離体。

【請求項 29】

哺乳動物のMPV感染をウイルス学的に検出する方法であって、請求項 17 に記載の核酸とサンプルとを接触させることにより、該哺乳動物のサンプル中のウイルス単離体またはその成分の存在を判定することを含む、前記方法。

【請求項 30】

哺乳動物のMPV感染を血清学的に検出する方法であって、請求項 22 または 23 に記載のタンパク質、または請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のウイルスと、該哺乳動物由来のサンプルとを反応させることにより、該サンプル中のMPVもしくはその成分に対して特異的な抗体の存在を検出することを含む、前記方法。

【請求項 31】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のウイルスのゲノムをコードする核酸であって、該ウイルスがCNCM(パリ)にI-2614として寄託されているウイルス単離体に該当する、核酸。

【請求項 32】

(i) 請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の単離された哺乳動物ネガティブセンス一本鎖RNAウイルスMPVと(ii) 製薬上許容される担体とを含む、MPV感染の治療または予防方法における使用のための医薬組成物。

【請求項 33】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の哺乳動物ネガティブセンス一本鎖RNAウイルスMPVのゲノムをコードする核酸を含み、かつ該ゲノムが弱毒化ウイルスの作製のための突然変異または欠失を含有しうるものである、MPV感染の治療または予防方法における使用のための医薬組成物。

【請求項 34】

請求項 23 に記載の単離タンパク質、またはそのMPV特異的断片。

【請求項 35】

請求項 34 に記載のタンパク質またはそのMPV特異的断片を含む抗原。

【請求項 36】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のウイルス、請求項 34 に記載のタンパク質もしくはその断片、請求項 35 に記載の抗原、または請求項 25 または 26 に記載の抗体を含む、MPV感染を診断するための診断用キット。

【請求項 37】

前記ネガティブセンス一本鎖RNAメタニьюモウイルスが、哺乳動物由来である、請求項 1 ~ 5 に記載のウイルス。

【請求項 38】

呼吸器疾患の治療または予防方法における使用のための、請求項 32 または 33 に記載の組成物。

【請求項 39】

前記核酸が少なくとも18ヌクレオチド長、少なくとも20ヌクレオチド長、少なくとも23ヌクレオチド長、または少なくとも25ヌクレオチド長である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 40】

重篤な呼吸器疾患に罹患している被験体における哺乳動物メタニьюモウイルス感染のリスクを評価する方法であって、下記(i) ~ (iii) :

(i) 細胞と、該被験体から得たサンプルとを接触させ、

(ii) 該細胞に対する細胞変性効果を、その細胞変性効果がhRSVまたはhPIVの細胞変性

効果と類似するかどうかモニターし、そして

(iii) PIV、インフルエンザウイルス、およびRSVの存在について試験することを含み、ここでPIV、インフルエンザウイルス、およびRSVが該サンプル中に存在しなければすなわち哺乳動物メタニューモウイルスが該サンプル中に存在する、前記方法。

【請求項 4 1】

重篤な呼吸器疾患に罹患しているヒトにおけるヒト・メタニューモウイルス感染のリスクを評価する方法であって、下記(i)～(iii)：

(i) 細胞と、該ヒトから得たサンプルとを接触させ、

(ii) 該細胞に対する細胞変性効果を、その細胞変性効果がhRSVまたはhPIVの細胞変性効果と類似するかどうかモニターし、そして

(iii) hPIV 1型、hPIV 2型、hPIV 3型、hPIV 4型、hRSV、インフルエンザウイルスA型、およびインフルエンザウイルスB型の存在について試験することを含み、ここでhPIV 1型、hPIV 2型、hPIV 3型、hPIV 4型、hRSV、インフルエンザウイルスA型、およびインフルエンザウイルスB型が該サンプル中に存在しなければすなわちヒト・メタニューモウイルスが該サンプル中に存在する、前記方法。

【請求項 4 2】

重篤な呼吸器疾患に罹患している被験体における哺乳動物メタニューモウイルス感染のリスクを評価する方法であって、下記(i)～(iii)：

(i) 細胞と、該被験体から得たサンプルとを接触させ、

(ii) 該細胞に対する細胞変性効果を、その細胞変性効果がhRSVまたはhPIVの細胞変性効果と類似するかどうかモニターし、そして

(iii) PIV、インフルエンザウイルス、およびRSVの存在について試験することを含み、ここでPIV、インフルエンザウイルス、およびRSVが該サンプル中に存在しなければすなわち該被験体には哺乳動物メタニューモウイルスに感染するリスクがある、前記方法。

【請求項 4 3】

重篤な呼吸器疾患に罹患している被験体における哺乳動物メタニューモウイルス感染のリスクを評価する方法であって、下記(i)～(iii)：

(i) 細胞と、該被験体から得たサンプルとを接触させ、

(ii) 該細胞に対する細胞変性効果を、その細胞変性効果がhRSVまたはhPIVの細胞変性効果と類似するかどうかモニターし、そして

(iii) パラミクソウイルス、hPIV 1型、hPIV 2型、hPIV 3型、hPIV 4型、センダイウイルス、サルウイルス5型、ニューカッスル病ウイルス、hRSV、麻疹ウイルス、おたふくかぜウイルス、ニパウイルス、 Hendraウイルス、ツパイウイルス、およびマブエラウイルスの存在について試験することを含み、ここでパラミクソウイルス、hPIV 1型、hPIV 2型、hPIV 3型、hPIV 4型、センダイウイルス、サルウイルス5型、ニューカッスル病ウイルス、hRSV、麻疹ウイルス、おたふくかぜウイルス、ニパウイルス、 Hendraウイルス、ツパイウイルス、およびマブエラウイルスが該サンプル中に存在しなければすなわち哺乳動物メタニューモウイルスが該サンプル中に存在する、前記方法。

【請求項 4 4】

細胞変性効果が、合胞体形成とそれに続く急速な内部破壊およびその後の単層からの細胞の剥離によって特徴付けられる、請求項 4 0～4 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記細胞が、前記細胞と前記サンプルとを接触させてから3代継代した後に細胞変性効果を示す、請求項 4 0～4 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記細胞がtMK細胞、VERO細胞、またはA549細胞である、請求項 4 0～4 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記の試験工程が、PIV、RSVおよび／またはインフルエンザウイルスの核酸を検出することを含む、請求項40～43のいずれか1項に記載の方法。

【請求項48】

前記の試験工程が、低ストリンジエンシーでのRT-PCRアッセイを含む、請求項47に記載の方法。

【請求項49】

前記の試験工程が、PIV、RSVおよび／またはインフルエンザウイルスのタンパク質を検出することを含む、請求項40～43のいずれか1項に記載の方法。

【請求項50】

前記の試験工程が免疫蛍光アッセイを含む、請求項49に記載の方法。

【請求項51】

請求項8～17のいずれか1項に記載の核酸と前記サンプルとを接触させることをさらに含む、請求項40～43のいずれか1項に記載の方法。

【請求項52】

請求項24～26のいずれか1項に記載の抗体と前記サンプルとを接触させることをさらに含む、請求項40～44のいずれか1項に記載の方法。

【請求項53】

細胞変性効果が、hRSVまたはhPIVの細胞変性効果と同じである、請求項40～43のいずれか1項に記載の方法。

【請求項54】

ヒト細胞に感染することができる、請求項1に記載の単離されたネガティブセンス一本鎖RNAウイルスMPV。

【請求項55】

請求項1～4のいずれか1項に記載の哺乳動物MPVのヌクレオチド配列を含む、キメラパラインフルエンザ3型(PI3)ウイルス。

【請求項56】

請求項1～4のいずれか1項に記載の哺乳動物MPVのポリペプチドを含む、キメラパラインフルエンザ3型(PI3)ウイルス。

【請求項57】

キメラPI3ウイルスが第2のヌクレオチド配列をさらに含み、該第2のヌクレオチド配列が呼吸器合胞体ウイルス(RSV)由来のものである、請求項55に記載のキメラPI3ウイルス。

【請求項58】

キメラPI3ウイルスが第2のヌクレオチド配列をさらに含み、該第2のヌクレオチド配列がトリ・ニューモウイルス(APV)由来のものである、請求項56に記載のキメラPI3ウイルス。

【請求項59】

パラミクソウイルス科のニューモウイルス亜科に属し、系統学的にメタニューモウイルス属に該当するものとして同定される単離されたネガティブセンス一本鎖RNAウイルスMPVであって、該ウイルスは哺乳動物細胞に感染することができ、かつ該ウイルスはCNCM(パリ)にI-2614として寄託されているウイルス単離体に該当するヒトMPV単離体00-1である、前記ウイルス。

【請求項60】

弱毒化ウイルスである、請求項59に記載のウイルス。

【請求項61】

請求項59に記載のウイルスを含む、免疫原性組成物。

【請求項62】

以下のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする、単離された核酸：

- (i) 図20に示されたNタンパク質のアミノ酸配列；
- (ii) 図21に示されたPタンパク質のアミノ酸配列；

- (iii) 図22に示されたMタンパク質のアミノ酸配列；
- (iv) 図23に示されたFタンパク質のアミノ酸配列；
- (v) 図24に示されたM2-1タンパク質のアミノ酸配列；
- (vi) 図25に示されたM2-2タンパク質のアミノ酸配列；
- (vii) 図28に示されたLタンパク質のアミノ酸配列；
- (viii) 図26に示されたSHタンパク質のアミノ酸配列；または
- (ix) 図27に示されたGタンパク質のアミノ酸配列。

【請求項63】

請求項62に記載の核酸のいずれかに対して高ストリンジェンシー条件下で特異的にハイブリダイズする、単離された核酸。

【請求項64】

請求項62～63のいずれか1項に記載の核酸のいずれかとサンプルとを接触させることを含み、該核酸がCNCM(パリ)にI-2614として寄託されているウイルス単離体中に存在するものである、該サンプル中のヒトメタニューモウイルスの検出方法。

【請求項65】

哺乳動物のMPV感染をウイルス学的に検出する方法であって、請求項62～63のいずれか1項に記載の核酸のいずれかとサンプルとを接触させることにより、該哺乳動物のサンプル中のウイルス単離体またはその成分の存在を判定することを含み、該核酸がCNCM(パリ)にI-2614として寄託されているウイルス単離体中に存在するものである、前記方法。

【請求項66】

哺乳動物のMPV感染を血清学的に検出する方法であって、請求項60に記載のウイルスと該哺乳動物由来のサンプルとを反応させることにより、該サンプル中のMPVもしくはその成分に対して特異的な抗体の存在を検出することを含む、前記方法。

【請求項67】

前記核酸が他のウイルスの配列をさらにコードする、請求項59に記載のウイルスのゲノムをコードする核酸。

【請求項68】

請求項60に記載の弱毒化ウイルスのゲノムをコードする核酸。

【請求項69】

(i) 請求項59に記載の単離されたウイルスと(ii) 製薬上許容される担体とを含む、MPV感染の治療または予防方法における使用のための医薬組成物。

【請求項70】

(i) 請求項59に記載のヒトMPVウイルスと(ii) 製薬上許容される担体とを含む、MPV感染の治療または予防方法における使用のための医薬組成物。

【請求項71】

請求項59に記載のウイルス、または請求項62～63のいずれか1項に記載の核酸を含む、MPV感染を診断するための診断用キット。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1
C 0 7 K 14/115 (2006.01)	C 0 7 K 14/115	
C 0 7 K 16/10 (2006.01)	C 0 7 K 16/10	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
A 6 1 K 39/155 (2006.01)	A 6 1 K 39/155	
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	G 0 1 N 33/569	L

(74)代理人 100170221

弁理士 小瀬村 晓子

(72)発明者 デ ジョン , ジャン , コルネリウス

オランダ国 エヌエル - 2 8 0 6 イーエイチ ホウダ , クルゲルラーン 2 0 5

(72)発明者 フォッチャー , ロナルダス , アドリアナス , マリア

オランダ国 エヌエル - 3 0 2 1 エーアール ロッテルダム , エッセンブルグシングル 4 4 エ

-

(72)発明者 ヴァン デン フーゲン , ベルナデッタ , ゲラルダ

オランダ国 エヌエル - 3 0 2 1 エーアール ロッテルダム , エッセンブルグシングル 4 4 エ

-

(72)発明者 オステルハウス , アルベルタス , ドミニクス , マルセリナス , エラスムス

オランダ国 エヌエル - 3 9 8 1 シーエイチ ブンニック , ドクトル . ブレヴェーシュトラート
1 6

(72)発明者 グルーン , ジャン

オランダ国 エヌエル - 3 4 4 6 ピーエム ウオエルデン , アンホルツケード 2

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA14 BA32 BA51 CA04 CA20 DA02 EA02 GA11

4B063 QA01 QA18 QQ10 QQ42 QR08 QR62 QR77 QS25

4B065 AA90X AA95X AA95Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46

4C085 AA03 BA57 CC08 DD23 EE01

4H045 AA11 CA01 CA40 DA76 DA86 EA20 EA53 FA74

专利名称(译)	在易感哺乳动物中引起呼吸道疾病的病毒		
公开(公告)号	JP2011177173A	公开(公告)日	2011-09-15
申请号	JP2011050982	申请日	2011-03-09
[标]申请(专利权)人(译)	VIE俄罗斯新星恢复拜丢10埃因霍温笔记本闭嘴		
申请(专利权)人(译)	VIE俄罗斯新星恢复，Besuroten埃因霍温笔记本闭嘴		
[标]发明人	デジョンジョンコルネリウス フォッチャーロナルダスアドリアナスマリア ヴァンデンフーゲンベルナデッタゲラルダ オステルハウスアルベルタスドミニクスマルセリナスエラスムス グルーンジャン		
发明人	デジョン,ジョン,コルネリウス フォッチャー,ロナルダス,アドリアナス,マリア ヴァンデン フーゲン,ベルナデッタ,ゲラルダ オステルハウス,アルベルタス,ドミニクスマルセリナス,エラスムス グルーン,ジャン		
IPC分类号	C12N15/09 C12N7/00 C12Q1/68 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K14/115 C07K16/10 C12Q1/02 A61K39/155 A61P31/14 A61P37/04 A61P11/00 G01N33/569 G01N33/53 A61K31/7105 A61K35/64 A61K35/74 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K48/00 C07K C07K14/11 C07K14/135 C12N7/01 C12N15/86 C12Q1/70 G01N33/50 G01N33/543		
CPC分类号	A61K39/12 A61K39/155 A61K2039/5254 A61K2039/5256 A61P11/00 A61P31/14 A61P37/04 C07K14 /005 C07K16/1027 C12N7/00 C12N15/86 C12N2760/18321 C12N2760/18322 C12N2760/18334 C12N2760/18343 C12N2760/18622 C12N2840/203 C12Q1/701 G01N33/5008 G01N33/502 G01N33 /5091 G01N33/56983 C12Q2600/158		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N7/00 C12Q1/68.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C07K14/115 C07K16/10 C12Q1/02 A61K39/155 A61P31/14 A61P37/04 A61P11/00 G01N33/569.L C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/86.P C12N15/86.Z C12N5/10 C12N7/01		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA14 4B024/BA32 4B024/BA51 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024 /EA02 4B024/GA11 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ10 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QS25 4B065/AA90X 4B065/AA95X 4B065/AA95Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/BA57 4C085 /CC08 4C085/DD23 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/CA01 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA53 4H045/FA74		
代理人(译)	荒井英一		
优先权	2001200213 2001-01-19 EP 2001203985 2001-10-18 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

分离的哺乳动物负义单链RNA病毒（MPV），属于副粘病毒科的肺病毒亚科，在系统发育上被鉴定为属于偏肺病毒科）及其成分。分离的负义单链RNA偏肺病毒。包含病毒的免疫原性组合物。分离的核酸，其编码包含与MPV分离物的N蛋白的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列的蛋白。一种用于检测样品中的哺乳动物偏肺病毒的方法，其包括使样品与核酸接触。用于治疗或预防MPV感染的方法的药物组合物。[选择图]无

ウイルス中和力価

	単離体 00-1	単離体 99-1
前血清 フェレットA (00-1)	□ 2	□ 2
フェレットA 22dpi (00-1)	6 4	□ 2
前血清 フェレットB (99-1)	□ 2	□ 2
フェレットB 22dpi (99-1)	4	6 4

単離体 00-1 では、力価は 32 (64/2) 倍違う

単離体 99-1 では、力価は 16 (64/4) 倍違う