

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5508252号
(P5508252)

(45) 発行日 平成26年5月28日 (2014.5.28)

(24) 登録日 平成26年3月28日 (2014.3.28)

(51) Int.Cl.		F I		
C 1 2 N	7/00	(2006.01)	C 1 2 N	7/00 Z N A
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00 A
A 6 1 K	39/145	(2006.01)	A 6 1 K	39/145
A 6 1 P	31/16	(2006.01)	A 6 1 P	31/16

請求項の数 10 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2010-502098 (P2010-502098)	(73) 特許権者	510226831
(86) (22) 出願日	平成20年3月28日 (2008.3.28)		セバ サンテ アニマル ソシエテ アノ ニム
(65) 公表番号	特表2010-532157 (P2010-532157A)		フランス国, エフ-33501 リポーヌ セデ, ベーペー 126, ゾーヌ アン デュストリエル ラ バラスティエール
(43) 公表日	平成22年10月7日 (2010.10.7)	(74) 代理人	100099759
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/004070		弁理士 青木 篤
(87) 国際公開番号	W02008/121329	(74) 代理人	100077517
(87) 国際公開日	平成20年10月9日 (2008.10.9)		弁理士 石田 敬
審査請求日	平成23年3月28日 (2011.3.28)	(74) 代理人	100087871
(31) 優先権主張番号	11/729, 978		弁理士 福本 積
(32) 優先日	平成19年3月30日 (2007.3.30)	(74) 代理人	100087413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 鳥インフルエンザ遺伝子を含有する組み換え七面鳥ヘルペスウイルス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

鳥インフルエンザウイルスのヘマグルチニン遺伝子とサイトメガロウイルス前初期プロモーターを含有し、ヘマグルチニン遺伝子が当該プロモーターの支配下にある組み換え七面鳥ヘルペスウイルス。

【請求項 2】

ヘマグルチニン遺伝子とプロモーターが七面鳥ヘルペスウイルスゲノムの非必須領域に存在する請求項 1 記載の組み換え七面鳥ヘルペスウイルス。

【請求項 3】

非必須領域が、七面鳥ヘルペスウイルスゲノムのUL45とUL46との間である請求項 2 記載の組み換え七面鳥ヘルペスウイルス。

【請求項 4】

鳥インフルエンザウイルスがH5亜型である請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の組み換え七面鳥ヘルペスウイルス。

【請求項 5】

鳥インフルエンザウイルスがA/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9) 株である請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の組み換え七面鳥ヘルペスウイルス。

【請求項 6】

ヘマグルチニン遺伝子の塩基配列が配列番号 1 記載のものである請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の組み換え七面鳥ヘルペスウイルス。

10

20

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の組み換え七面鳥ヘルペスウイルスを含有するワクチン。

【請求項 8】

アジュバント及び/又は緩衝剤を更に含む、請求項 7 に記載のワクチン。

【請求項 9】

鳥類において、ワクチン投与の 5 週間後に、50 より高い幾何学平均赤血球凝集抑制価を生じさせる、請求項 7 又は 8 に記載のワクチン。

【請求項 10】

高赤血球凝集抑制価を鳥類に与えるための薬剤の製造のための、請求項 1 に記載の組換え七面鳥ヘルペスウイルスの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、概して鳥インフルエンザ（以下AIという）に対する鳥類用ワクチンに関する。より具体的には、本発明はプロモーターの支配下に置かれた鳥インフルエンザウイルスのヘマグルチニン（以下HAという）蛋白をコードするcDNAが存在するように改変された組み換え七面鳥ウイルスを提供する。

【背景技術】

【0002】

鳥インフルエンザは、オルトミクソウイルス科A型インフルエンザウイルス属に分類される鳥インフルエンザウイルスにより引き起こされる。鳥インフルエンザウイルスのゲノムは一本鎖マイナス鎖RNAの 8 本の分節からなる。ウイルスゲノムは10種類の蛋白質をコードしているが、そのうち 8 つの蛋白質は、HAやノイラミニダーゼ（以下NAという）を含む構造蛋白であり、残りの 2 つは非構造蛋白である。A型インフルエンザウイルスはHA蛋白とNA蛋白の抗原性に基づいて複数の亜型に分類されている。これまでに 16 種類のHA抗原と 9 種類のNA抗原が認識されている。HAはトリの体内で防御抗体を誘起できる主要な抗原であると考えられている。

【0003】

鳥類の A 型インフルエンザウイルスは病原性に基づいて 2 つの病原型に分類される。高病原性鳥インフルエンザ（以下HPAIという）ウイルスと低病原性鳥インフルエンザ（以下LPAIという）ウイルスである。ほとんどの鳥インフルエンザウイルスは低病原性であるが、いくつかのH5もしくはH7亜型のウイルスは高い致死率を示す激しい全身性疾患を引き起こす。H5もしくはH7亜型に属する鳥インフルエンザウイルスのうち高病原性を示すものは限られるが、低病原性のウイルスが変異によって病原性を増す危険性があるため、すべてのH5、H7ウイルスが国際獣疫事務局（OIE）によって届出義務のある法定鳥インフルエンザウイルスとして指定されている。

【0004】

1990年代の後半から、AIの発生件数及び、それらの発生例で感染する鶏の数が著しく増加している（I. Capua et al., 2004, Avian Pathology, 33: 393-404）。最も顕著な例として、中国、東南アジアで起こった一連のH5N1亜型ウイルスによるHPAIの流行が挙げられる。現在はヨーロッパ、中東、アフリカなどの世界の他の地域にも広がりを見せている。この流行では、明白なヒトからヒトへの感染は確認されていないが、2003年以降10カ国以上の国で160もの人命が失われている。これらの近年の流行は、養鶏業界に多大な経済的損失をもたらし、またヒトでの大流行への恐れがあることから、人々の懸念が高まっている。

【0005】

AIに対するワクチン接種は近年までは広く実施されていなかった。これはいわゆる“Stamping-out（根絶）”政策が最優先に実施されてきたためである。この“Stamping-out”政策では、AIに感染した群の全ての鶏は殺処分される。過去には、ほとんどのAIの発生は

10

20

30

40

50

この“Stamping-out”によって根絶、または制御されてきた。しかしながら、近年のAIの流行、特にH5N1の流行では、殺処分に伴う経済的損失が耐えられないこと、またいわゆる backyard chicken（個人の庭で飼育されている鶏）が広く存在していることなどの理由から、大規模な殺処分は実際的、実現可能でない場合がみられている。そのような状況においては、ワクチン接種は、AI根絶、もしくは制御計画を支える適切で効果的な手段として考えられている。

【0006】

これは、ワクチン接種は家禽類をAIの症状及び致死から防御すること、またワクチン接種鶏においてウイルスの環境放出を抑制し、それによりウイルスの伝播を減少させることが示されているためである（D.E. Swayne, 2003, *Developments in Biologicals*, 114: 201-212）。AI根絶計画もしくはAI制御計画においてワクチンを使用するためには、防疫及び調査目的のためにワクチン接種された鳥が野外ウイルスに感染した鳥から区別できることが重要である。

【0007】

実際的には、ワクチン接種された鶏群における野外株の曝露は、単純な血清学的試験で検出されなければならない。そうでなければ、野外ウイルスはワクチン接種された鶏群の中で潜伏して広まっていくかもしれない。また、ワクチン接種を受けた鶏群のなかで、大部分もしくは全ての個体が適切にワクチン接種されたことを確認するために、ワクチン接種の証拠が単純な試験により検出できることも重要である。

【0008】

現在入手可能な市販ワクチンは、油性アジュバンドを加えた不活化AIウイルス抗原と組み換え鶏痘ウイルスベクターワクチンである。どちらのワクチンも効果を示すことが示されているが、それぞれの個体を手で扱う、労働集約的で費用の高い注射によるワクチン接種が必要となる。不活化AIワクチンは、“Differentiation of infected from vaccinated animals（感染個体とワクチン接種済個体との区別）”（以下DIVAという）と呼ばれるプログラムにおいて用いられたことがあるが、大量使用に供することのできる市販の試験はない。また、組み換え鶏痘ウイルスベクターAIワクチンについては、野外での感染もしくは通常の鶏痘ワクチン接種により鶏痘ウイルスに対する免疫を既に受けた鶏に接種した場合、AIに対する防御免疫が均一的に付与されないことが示されている（D.E. Swayne et al., 2000, *Avian Diseases*, 44: 132-137）。

【0009】

さらに組み換え鶏痘ウイルスベクターAIワクチンは、赤血球凝集抑制（以下HIという）試験によって検出可能な血清学的応答を一貫して引き起こすことができないことが報告されている（D.E. Swayne et al., 1997, *Avian Diseases*, 41: 910-922）。それゆえ、投与が容易で、簡単に野外ウイルス感染と区別できるワクチンの開発が養鶏業界において望まれている。

【0010】

市販されている組み換え鶏痘ウイルスベクターAIワクチンは、A/turkey/Ireland/1378/83（H5N8）株のHA遺伝子を保持している（J.R. Taylor et al., 1988, *Vaccine*, 6: 504-508）。いくつか他に試験的な組み換え鶏痘ウイルスベクターワクチンが開発され、試験的条件下でAIウイルスの攻撃に対して有効であることが示されている。これらの組み換え鶏痘ウイルスベクターワクチンに含まれているAIウイルスの遺伝子は、A/Chicken/Scotland/59（H5N1）株のHA遺伝子（C.W. Beard et al., 1991, *Avian Diseases*, 35: 356-359）、A/Goose/Guangdong/3/96（H5N1）株のHA及びNA遺伝子（C. Qiao et al., 2003, *Avian Pathol.*, 32: 25-31）が含まれる。

【0011】

M. Mingxiaoらは、H5N1亜型とH7N1亜型からのHA遺伝子を接続して単一の読み取り枠を形成させ、鶏のインターロイキン-18とともに組み換え鶏痘ウイルスに挿入した（M. Mingxiao et al., 2006, *Vaccine*, 24: 4304-4311）。AIウイルスのH5亜型間では、幅広い交差防御が観察されている。H5亜型のAIウイルスに対する組み換え鶏痘ウイルスベクターAI

10

20

30

40

50

ワクチン及び不活化AIウイルスワクチンは、予想されるHAアミノ酸配列の相同性が低いものでは87%になる多様なH5亜型のAIウイルスの攻撃に対して、鶏を防御することが証明されている (D.E. Swayne et al., 2000, Veterinary Microbiol., 74: 165-172)。

【 0 0 1 2 】

開発中の次世代ワクチンには、組み換えニューカッスル病ウイルスワクチン (D.E. Swayne et al., 2003, Avian Diseases, 47: 1047-1050 ; J. Veits et al., 2006, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 103: 8197-8202 ; M. Park et al., 2006, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 103: 8203-8208 ; 及び J. Ge et al., 2007, J. Virol. 81: 150-158)、組み換え伝染性喉頭気管炎ウイルスワクチン (D. Luschow et al., 2001, Vaccine, 19: 4249-4259 and J. Veits et al., 2003, J. Gen. Virol. 84: 3343-3352)、組み換えアデノウイルスワクチン (W. Gao et al., 2006, J. Virol. 80: 1959-1964)、バキュロウイルスで発現させたサブユニット型ワクチン (J. Crawford et al., 1999, Vaccine, 17: 2265-2274 and D.E. Swayne et al., 2001, Avian Diseases, 45: 355-365)、及びDNAワクチン (U.S. Pat. No. 5, 916, 879 and M. Cherbonnel et al., 2003, Avian Diseases, 47: 1181-1186) が含まれる。

【 0 0 1 3 】

組み換えニューカッスル病ウイルスワクチン、組み換え伝染性喉頭気管炎ウイルスワクチン、組み換えアデノウイルスワクチンは、特定病原体不在 (以下、SPFという) 鶏において、AIの攻撃に対して部分的もしくはほぼ完全な防御を与えることができたが、ベクターウイルスもしくはAIに対する移行抗体を保有する鶏、もしくはベクターウイルスによる先立っての感染またはワクチン接種を受けた鶏における効果は証明されていない。DNAワクチンもまた鶏において防御免疫を与えることが示されているが、最低2回のワクチン接種及び個体に対する個別なワクチン接種が必要となる。バキュロウイルス由来のサブユニット型ワクチンも、個体に対する個別なワクチン接種が必要となる。

【 0 0 1 4 】

七面鳥ヘルペスウイルス (以下HVTという) とマレック病ウイルス (以下MDVという) 血清型3は、鳥類の病原体からの抗原を発現するためのベクターとして使われてきている。野生型のHVTもしくは組み換えHVTは、孵化場において、発生後期の鶏胚に対して卵内接種もしくは初日齢雛に対する皮下接種によって投与できる。細胞内型の組み換えHVTワクチンは、挿入された抗原に対する移行抗体を保有する胚もしくは初日齢雛に接種された後でも、移行抗体の影響を克服し、移行抗体レベルが低下するにつれて接種鶏に防御免疫を付与できることが証明されている (米国特許 No. 6, 764, 684 及び米国特許 No. 6,866,852)。

【 0 0 1 5 】

組み換えHVTによって、長い免疫持続期間が達成されることも示されている (米国特許 No. 6,866,852)。これはおそらくHVTが潜伏期に入り、ワクチン接種鶏の中に一生留まるためである。このように、HVTは鳥類の病原体に対する優秀なベクターであると考えられている。これまでにAIの抗原を含む組み換えHVTもしくはMDVを構築したとの報告はない。米国特許 No. 6,866,852の請求項15はAIウイルスのポリペプチド遺伝子をHVTゲノムのEcoRI #9断片に相当する領域に挿入した組み換えウイルスを記載しているが、AI抗原を持つ組み換えHVTを構築する実際の例は挙げていない。哺乳類では、米国特許 No. 6,225,111において馬インフルエンザウイルスのHA遺伝子を含む馬ヘルペスウイルスの構築が記載されているが、これらの組み換え体のワクチン効果に関するデータは示されていない。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 6 】

本発明者等は、いくつかの組み換え体を作製して鶏での免疫付与試験を行った結果、サイトメガロウイルス前初期プロモーター (以下CMVプロモーターという) の支配下にAIウイルスのHA遺伝子を組み込んだ組み換えHVTが最も免疫付与能が高く、当組み換えHVTがDIVAに用いられることを見出し、本発明を完成させるに至った。

10

20

30

40

50

【課題を解決するための手段】

【0017】

かくして本発明によれば、プロモーターの支配下にAIウイルスのHAタンパク質をコードするcDNAが存在することにより改変された組み換えHVTを提供する。この組み換えHVTは、HI試験により容易に検出できるものの、市販されている診断用ELISAキットでは検出されない血清学的応答を引き起こすことができる。組み換えワクチンのこの性質により、ワクチン接種と野外ウイルスの感染を容易に区別することができる。当該組み換えHVTを含む鳥類用ワクチンも提供される。

以下に本発明を詳述する。

【図面の簡単な説明】

10

【0018】

【図1】プラスミドpGICMVpAの構築過程を説明した図である。

【図2】組み換えプラスミドp45CMVH5Wis68の構築過程を説明した図である。

【図3】プラスミドpGIBacpA2ndの構築過程を説明した図である。

【図4】組み換えプラスミドp45BacH5Wis68の構築過程を説明した図である。

【図5】組み換えプラスミドp45PecH5Wis68の構築過程を説明した図である。

【図6】組み換えHVTによるHA蛋白の発現を検出するウェスタンブロット試験の結果を示した図である。

【0019】

【図7】HA遺伝子を保持する組み換えHVTワクチンを接種した鶏でのHI価の推移を示した図である。

20

【図8】HA遺伝子を保持する組み換えHVTワクチンを接種した鶏でのELISA抗体価（IDEXX LABORATORIES, FLOCKCHEK AIV）の推移を示した図である。

【図9】HA遺伝子を保持する組み換えHVTワクチンを接種した鶏でのELISA抗体価（SYNBIO TICS, PROFLOK AIV Ab test kit）の推移を示した図である。

【図10】動物試験2におけるHA遺伝子を保持する組み換えHVTワクチンを接種した鶏でのHI価の推移を示した図である。

【発明を実施するための形態】

【0020】

鳥インフルエンザウイルス ヘマグルチニン遺伝子

30

HA遺伝子は、AIウイルスのどの亜型、どの株由来のものでもかまわない。好ましくは、HA遺伝子はH5亜型のAIウイルスから取得される。より好ましくは、HA遺伝子はH5N9亜型のAIウイルスから取得される。さらに好ましくは、HA遺伝子はAIウイルス A/Turkey/Wisconsin/68（H5N9）株から取得される。A/Turkey/Wisconsin/68（H5N9）株のHA遺伝子の塩基配列は配列番号1に記載されている。配列番号1記載の配列はA/Turkey/Wisconsin/68（H5N9）株のHA遺伝子の発表された配列（M. Garcia et al., 1997, Virus Res. 51: 115-124, GenBank Accession # U79456）と数塩基異なる。これらの違いは、おそらくRNAゲノムを持つAIウイルスの遺伝的に不安定な性質によるものと思われる。そのため、配列番号1記載の配列は1つの例に過ぎず、本発明はこの配列によって限定されるべきではない。

40

【0021】

プロモーター

HVTゲノム中のHA遺伝子に近接して、通常HA遺伝子の5'領域に、プロモーターと呼ばれる調節DNA配列が、HA遺伝子の転写、さらに発現（HA蛋白質の生成）を制御するために含まれる。遺伝子の転写、すなわち発現がプロモーターに制御される場合、その遺伝子は当該プロモーターの支配下にあると言う。本発明においては、HA遺伝子はCMVプロモーターの支配下にある。本発明者等は、CMVプロモーターとの組み合わせでHA遺伝子を含む組み換えHVTが、鶏 - アクチンプロモーター（T.A.Kost et al., 1983, Nucleic Acids Res. 11: 8287-8301）や改変された鶏 - アクチンプロモーター（米国特許 No.6,866,852）などの他のプロモーターを含む組み換えHVTよりも、より高く均一的なHI血清抗体価を

50

付与できることを見出した。

【 0 0 2 2 】

CMVプロモーターの塩基配列はM. Boshart et al., 1985, Cell 41: 521-530, GenBank Accession # K03104に記述されている。しかしながら、プロモーターが鳥類の細胞もしくは体内で機能的である限り、プロモーターの塩基配列は発表されたものと同一である必要はない。配列番号3に配列が記載されているCMVプロモーターは、本発明者によりわずかに改変されているが、HA遺伝子を効果的に発現することが証明された。

【 0 0 2 3 】

七面鳥ヘルペスウイルス

HVTは、ヘルペスウイルス科アルファヘルペスウイルス亜科に属する二重鎖線状DNAウイルスである。HVTは飼育されている七面鳥に偏在しており、また非発癌性である。MDVの血清型3に分類されている。マレック病を予防するため、HVTの鶏へのワクチン接種が広く行われている。本発明において用いる七面鳥ヘルペスウイルスは、鶏に毒性を示さない株であればよく、具体的には、FC126、PB-THV 1、H-2、YT-7、WTHV-1、HPRS-26などが挙げられる。これらの中でもFC126が本発明での使用に好ましい。

10

【 0 0 2 4 】

挿入部位

本発明では、HA遺伝子とCMVプロモーターはHVTのDNAゲノムに挿入される。好ましくは、HA遺伝子とCMVプロモーターはウイルスの増殖に非必須なゲノム領域（以下、非必須領域という）に挿入される。言い換えれば、非必須領域は、その部位の改変や外来遺伝子の挿入がウイルスのin vitro、in vivoでの増殖を妨げない領域と定義できる。HVTゲノムの非必須領域はいくつか報告されている。例えば、HA遺伝子とCMVプロモーターはUL43（WO 89/01040）、US2（WO 93/25665）またはUL44からUL46の間の非翻訳領域（WO 99/18215）に挿入できるが、これらの部位に限定されるわけではない。より好ましくは、HA遺伝子とCMVプロモーターはUL45とUL46の間の非翻訳領域に挿入される。

20

【 0 0 2 5 】

本発明では、新たな非必須領域は次のような一般的方法で同定される。すなわち、HVTのゲノムDNA断片をE. coliのプラスミドにクローニングし、その制限酵素地図を作成し、その適当な制限酵素サイトにプロモーターとともにマーカー遺伝子を組み込んだ組み換えプラスミドを構築する。もし当該組み換えプラスミドとの相同組み換えにより挿入されたマーカー遺伝子を発現する組み換えウイルスが得られ、その組み換えウイルスがin vitro、in vivoで安定であれば、最初に選んだDNA断片はHA遺伝子とCMVプロモーターの挿入に適した非必須領域である。

30

【 0 0 2 6 】

組み換えHVTの作製方法

組み換えHVTの作製方法は、既に知られている一般的な方法でよい。その一例は次の如くである。（1）まず、上述した非必須領域を含むHVTのゲノムDNA断片がクローニングされたプラスミドを得、このプラスミド中の当該非必須領域に、上述したHA遺伝子を挿入し、組み換えプラスミドを構築する。この際、HA遺伝子の5'上流にプロモーターを、3'下流にポリA付加シグナルを付けてHA遺伝子とともに挿入するのがより好ましい。（2）構築した組み換えプラスミドをHVT感染鶏胚繊維芽細胞（以下CEFという）に導入する、あるいは、HVTから調製した感染性ゲノムDNAとともに組み換えプラスミドをCEFに導入する。これらの導入方法はエレクトロポレーションなど一般的に用いられている方法でよい。（3）組み換えプラスミドを導入したCEFを培養皿にまき、プラークが十分大きくなるまで培養する。（4）このプラークには組み換えウイルスと野生型ウイルスが混合して存在しているので、挿入外来遺伝子の発現を検出する一般的に知られた方法により、ここから目的とする組み換えウイルスを純化する。

40

【 0 0 2 7 】

AI、マレック病用二価ワクチン

HA蛋白はAIウイルスの防御抗原であり、またHVTは生マレック病用ワクチンであること

50

から、本発明のHA遺伝子を含む組み換えHVTは、AIと同時にマレック病にも有効な二価ワクチンもしくはAIに対する一価ワクチンとして用いることができる。

【0028】

本発明の組み換えHVTを主成分とするワクチンは、細胞や培地成分、燐酸緩衝液、HEPES緩衝液などの緩衝液、サイトカインやCpGオリゴデオキシヌクレオチドなどのアジュバンドなどを含んでいても構わない。この組み換えウイルス以外の成分は、保存安定剤など薬理的に問題のない成分であれば特に限定されない。更に、組み換えウイルス以外の成分として、他の組み換えあるいはMDV-1又はMDV-2のワクチン株などの非組み換えウイルスを混合しても良い。

【0029】

本発明の鶏二価ワクチンの調製方法は特に限定されないが、たとえば次の方法によって調製される。本発明の組み換えHVTを当該ウイルスが増殖可能なCEF細胞などに感染させ増殖させた後、感染細胞をスクレーパーまたはトリプシンではがし、遠心分離によって細胞と上清に分離する。得られた細胞をジメチルスルフォキシド(DMSO)を含む培養用培地に懸濁させ、ゆっくりと凍結させた後、液体窒素中に保存する。もしくは、組み換えHVTはショ糖やウシ血清アルブミンなどの安定剤を含む希釈液中で感染細胞を破碎することにより、細胞から放出される。この放出されたHVTを細胞外HVTと呼ぶ。細胞外HVTは凍結乾燥して4℃で保存することが可能である。

【0030】

本発明の鶏二価ワクチンの鶏への投与方法も特に限定されず、マレック病ワクチンに用いられている一般的な方法が使用できる。即ち、 $10 \sim 10^5$ 、好ましくは $10^2 \sim 10^4$ PFU/doseになるように緩衝液成分、糖類、色素を含む希釈液で希釈し、初日齢の鶏の頸部皮下に、あるいは孵化前の卵に注射や接種用機器を使って投与する。

【0031】

本発明の鶏二価ワクチンを投与された鶏群には、ワクチン接種5週後までに50を超えるHI価(幾何学的平均)を示す抗体価が付与される。この際、HI試験には4単位の不活化相同AIウイルス抗原からなる赤血球凝集素が用いる。また、本発明の鶏二価ワクチンは高病原性AIウイルスの攻撃に対して、優秀な防御効果を示す。

【実施例】

【0032】

以下に実施例を挙げて、本発明を説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

本発明のプラスミド構築は特に記載がない限り、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001)記載の標準的な分子生物学手法を用いて行った。組み換えHVTの作製にはFC126株を使用した(R.L. Witter et al. 1970, Am. J. Vet. Res. 31, 525-538)。

【0033】

例1. AIウイルスH5亜型からのHA遺伝子の取得

SPF鶏胚の漿尿膜で増殖させたAIウイルス A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9)株より、RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Cat # 74104)を用いて全ゲノムRNAを抽出した。Super Script First-Strand System for RT-PCR (Invitrogen, Cat # 11904-018)を用いてcDNAを合成した後、得られたcDNAをテンプレートとして、PfuUltra High-Fidelity DNA Polymerase (Stratagene, Cat# 600380)とDNAオリゴプライマーを使ったポリメラーゼ連鎖反応(以下、PCRという)によりHA遺伝子を増幅した。このPCRに用いたプライマーはBamHA-Fプライマー(配列番号4)とSalHA-Rプライマー(配列番号5)で、それぞれHA遺伝子の開始配列または終止配列に結合し、5'末にBamHIもしくはSalIの制限酵素認識配列を含む。PCR反応後、3'末端にアラニンを付加するために、Taqポリメラーゼ(Promega, Cat # M2665)をPCR反応液に添加した。

【0034】

増幅された1.8 kbのHA cDNA断片をpCR2.1-TOPO vector (Invitrogen, Cat # K4500-01

10

20

30

40

50

)に挿入し、プラスミドpCR2.1-H5Wis68を構築した。pCR2.1-H5Wis68プラスミド数クローン及びPCR産物のHA遺伝子の塩基配列を、ABI PRISM 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems) 及び以下に示す6種類のプライマーを用いて決定した。BamHA-Fプライマー(配列番号4)、SalHA-Rプライマー(配列番号5)、M13 Forwardプライマー(配列番号6)、M13 Reverseプライマー(配列番号7)、HA-Fプライマー(配列番号8)及びHA-Rプライマー(配列番号9)。

【0035】

pCR2.1-H5Wis68プラスミド数クローン中のHA遺伝子の配列はすべて同一であり、PCR産物の配列とも完全に一致した。推定されるアミノ酸配列は、A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9)株の報告された配列(M. Garcia et al., 1997, Virus Res. 51: 115-124, GenBank Accession # U79456)と4アミノ酸異なるが、我々が得た配列は大部分のH5亜型のHA遺伝子配列と一致する。A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9)株から取得したHA遺伝子の塩基配列及び推定されるアミノ酸配列は、配列番号1及び配列番号2に示されている。

【0036】

例2. 組み換えプラスミドの構築

2-1. 組み換えプラスミドと組み換えHVTの概要

本発明では、CMVプロモーター、鶏 - アクチンプロモーター(Bacプロモーター)及び改変型鶏 - アクチンプロモーター(Pecプロモーター)の3つのプロモーターがAIウイルス A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9)株のHA遺伝子の発現制御に用いられた。まず、HA遺伝子と上述プロモーターの一つを持つ組み換えプラスミドを構築し、その組み換えプラスミドを用いて組み換えHVTを作製した。これらの異なるプロモーターを持つ組み換えHVTを鶏に接種し、AIに対する血清抗体価の付与能を例6に記載されているように比較した。CMVプロモーターを持つ組み換えHVTを実施例、BacプロモーターもしくはPecプロモーターを持つ組み換えHVTを対照例とする。本発明で用いられている組み換えプラスミド及び組み換えHVTを以下の表1に示す。

【0037】

【表1】

表1. 組み換えプラスミド及び組み換えHVTの一覧

番号	組み換えプラスミド	組み換えHVT	プロモーター	実施例もしくは対照例
1	p45CMVH5Wis68	rHVT/CMVH5Wis68	CMV プロモーター	実施例
2	p45BacH5Wis68	rHVT/BacH5Wis68	Bac プロモーター	対照例
3	p45PecH5Wis68	rHVT/PecH5Wis68	Pec プロモーター	対照例

【0038】

2-2. プラスミドpGICMVpAの構築

CMVプロモーターはプラスミドpBK-CMV (Stratagene, Cat # 212209) から取得した。プラスミド構築過程を容易にするため、CMVプロモーター中にある3箇所のBglII制限酵素部位を4対のプライマーを用いたPCRによるin vitro変異により取り除いた。用いたプライマー対を以下に示す。PrCMV1プライマー(配列番号10)とPrCMV3プライマー(配列番号12)、PrCMV4プライマー(配列番号13)とPrCMV5プライマー(配列番号14)、PrCMV6プライマー(配列番号15)とPrCMV2'プライマー(配列番号11)及びPrCMVVo1プライマー(配列番号16)とPrCMVR1プライマー(配列番号17)である。

【0039】

それぞれのプライマー対とpBK-CMVを用いて4つのPCR反応を別々に行った後、4つのPCR

産物を混同してPrCMV1プライマーとPrCMV1プライマーで再度PCRを行い、改変CMVプロモーター配列を持つ604塩基の断片を得た。HA遺伝子の発現に用いたCMVプロモーターの塩基配列は配列番号3に提供されている。CMVプロモーター断片をPstIとXbaIで処理し、同じくPstIとXbaIで処理されたプラスミドpUC18polyASfi（米国特許 No.6,866,852）に挿入してプラスミドpGICMV（-）を構築した。

【0040】

SV40ポリAシグナルもプラスミドpBK-CMVからPolyA-SalKpnプライマー（配列番号18）とPolyA-SfiF2プライマー（配列番号19）を用いたPCRにより取得した。SV40ポリAシグナルを含むPCR産物をSalIとSfiIで処理し、同じくSalIとSfiIで処理したプラスミドpGICMV（-）に挿入してプラスミドpGICMVpAを構築した（図1）。

10

【0041】

2-3. 組み換えプラスミドp45CMVH5Wis68の構築

CMVプロモーターとSV40ポリAシグナル（940塩基）をプラスミドpGICMVpAからBglIを用いて切り出し、SfiIで処理したプラスミドp45/46Sfi（米国特許 No.6,866,852）に挿入してプラスミドp45/46CMVpAを構築した。さらにプラスミドpCR2.1-H5Wis68からSalI及びBamHIを用いて切り出したA/Turkey/Wisconsin/68（H5N9）株のHA遺伝子（1701塩基）を、同じくSalI及びBamHIで処理したプラスミドp45/46CMVpAに挿入してプラスミドp45CMVH5Wis68を得た（図2）。このp45CMVH5Wis68は組み換えHVTを作製する組み換えプラスミドとして用いられた。

【0042】

20

2-4. プラスミドpGIBacpA2ndの構築

Bacプロモーターは、CEFのゲノムDNAをテンプレートとして、PrBac1プライマー（配列番号20）とPrBac2'プライマー（配列番号21）を用いたPCRにより取得した。得られた1.5 kbのDNA断片をPstIとXbaIで切り出し、プラスミドpUC18polyASfiに挿入してプラスミドpGIBac2を得た。さらに、PolyA-SalKpnプライマー（配列番号18）とPolyA-SfiF2プライマー（配列番号19）を用いたPCRにより取得したSV40ポリAシグナルをSalI及びSfiIで処理し、プラスミドpGIBac2に挿入してプラスミドpGIBacpA2ndを得た（図3）。

【0043】

2-5. 組み換えプラスミドp45BacH5Wis68の構築

BacプロモーターとSV40ポリAシグナル（1866塩基）をプラスミドpGIBacpA2ndからBglIを用いて切り出し、SfiIで処理したp45/46Sfiに挿入してプラスミドp45/46BacpAを構築した。さらにpCR2.1-H5Wis68からSalI及びBamHIを用いて切り出したA/Turkey/Wisconsin/68（H5N9）株のHA遺伝子を、同じくSalI及びBamHIで処理したプラスミドp45/46BacpAに挿入してプラスミドp45BacH5Wis68を得た（図4）。

30

【0044】

2-6. 組み換えプラスミドp45PecH5Wis68の構築

Pecプロモーターの構築は米国特許 No.6,866,852に記載されている。Pecプロモーターは鶏 - アクチンプロモーターの一部をCMVプロモーターのエンハンサー領域と繋げて合成された。PecプロモーターはプラスミドpGIPec（米国特許 No.6,866,852）からPstIとBamHIを用いて切り出され、その断片をPstIとBamHIで処理した例2-4に記載のプラスミドp45/46BacpA2ndに挿入してプラスミドp45/46PecpA2ndを構築した。さらにpCR2.1-H5Wis68からSalI及びBamHIを用いて切り出したA/Turkey/Wisconsin/68（H5N9）株のHA遺伝子を、同じくSalI及びBamHIで処理したp45/46PecpAに挿入してp45PecH5Wis68を得た（図5）。

40

【0045】

例3. 組み換えHVTの作製と純化

Morganらの方法（R.W. Morgan et al., 1990, Avian Diseases, 34: 345-351）によって、HVT FC126株のDNAを調製した。

【0046】

1 × 10⁷個のCEFをSalineG（0.14 M塩化ナトリウム、0.5 mM塩化カリウム、1.1 mMリン酸一水素ナトリウム、1.5 mMリン酸二水素ナトリウム0.5 mM塩化マグネシウム・6水

50

和物、0.011%グルコース)に懸濁し、電気穿孔法によりHVT DNAと5から25 µgの組み換えプラスミド(p45CMVH5Wis68, p45BacH5Wis68, もしくはp45PecH5Wis68)を導入した。電気穿孔にはジーンパルサー(BIO-RAD社製)を用いた。細胞を室温で10分間静置した後、96穴培養プレートに移した。プラークが出るまで、37 °C、4 ~ 5 %CO₂インキュベーター中で7日程度培養した後、プレートの各wellの細胞をトリプシン処理して、新鮮なCEF細胞を追加して96穴培養プレート2枚の各ウエルに移した。こうして作製したレプリカプレートをプラークが出現するまで3 ~ 4日程度培養した。

【0047】

スクリーニングはHA蛋白を発現するプラークのみを染色するブラックプラーク法にて行った。すなわち、2枚のプレートのうち1枚をメタノール:アセトン混合液(1:2)で固定し、鶏抗HA血清を加えてインキュベートした。次に、ビオチン化抗鶏IgG抗体(Vector LABORATORIES, Cat # BA-9010)、さらに続いてVECTASTAIN ABC-AP kit(Vector LABORATORIES, Cat# AK-5000)を加えてインキュベートした後、BCIP/NBT溶液(Bio-Rad LABORATORIES, Cat # 170-6539及び170-6532)を加えることにより、HA蛋白を発現するプラークを染色した。染色された組み換えHVTのプラークを含むウエルに相当するレプリカプレートのウエルから細胞をトリプシン処理により回収、希釈し、新鮮なCEFと混合して96穴プレートに分注することにより、一回目の純化を完了した。

【0048】

この純化過程の繰り返しを、全てのプラークがブラックプラーク法で染色することが確認できるまで行った。こうして純化した組み換えHVTのうち、CMVプロモーターの支配下にHA遺伝子を持つ組み換えウイルスをrHVT/CMVH5Wis68(本発明)、またBacプロモーターもしくはPecプロモーターを持つと組み換えウイルスを、それぞれrHVT/BacH5Wis68、rHVT/PecH5Wis68(対照例)と命名した。

【0049】

例4. 組み換えHVTのゲノム構造の確認とその安定性試験

4.1 サザンブロット試験

HA遺伝子が意図された挿入部位に挿入されていることを確認するため、サザンブロット試験を実施した。まず、組み換えウイルスrHVT/CMVH5Wis68もしくはHVT FC126株を100mm径培養皿中のCEFに感染させた。感染細胞をスクレーパーで培養皿から剥がしたのち、遠心分離(913 × g、5分)して回収した。PBSで洗浄後1.0mlのLysis Buffer(0.5% Triton X-100、100mM 2-メルカプトエタノール、20mM EDTAがPBSに入ったもの)に再懸濁し、30秒間ボルテックスしたのち、15分間室温で静置した。

【0050】

2,060 × g、5分間延伸して細胞核、残渣を除去し、上澄を1.5mlチューブに移したのち、20,800 × g、20分間、4 °Cで遠心してウイルスを回収した。沈殿をNuclease 溶液(12.5mM Tris-Cl(pH7.5)、1 µg/ml DNaseI、1 µg/ml RNaseA)を0.33mlで再懸濁して、37 °C、30分間静置した。その後、SDS-protease 溶液(50mM EDTA、5% SDS、0.5mg/ml Protease K、25mM 2-メルカプトエタノール)を83 µl加えて、55 °C、30分間静置し、ウイルスのエンベロープを破壊した。フェノール/クロロホルムで2回抽出したのち、水層の2.5倍量の(-20 °Cで冷やした)100%エタノール及び最終濃度が0.16Mになるように塩化ナトリウムを加えてDNAを沈殿させた。20,800 × g、30分間の遠心分離で沈殿させた沈殿物(DNA)を70%エタノールで洗浄後、乾燥させ、TE緩衝液(10mM Tris-Cl(pH8.0)、1mM EDTA)に溶かした。

【0051】

こうして回収されたウイルスDNAと組み換えプラスミド(陽性対照)を制限酵素XhoI、BamHI、SpeIで切断し、0.6%アガロースゲル電気泳動を行った。分離されたDNA断片をBIOD YNEAナイロンメンブレン(PALL, Cat # BNXF3R)にブロットしたのち、Digoxigenin(DIG)で標識されたHAプローブもしくはIS45/46プローブにてハイブリダイゼーションを行った。これらのプローブはPCR DIG Probe Synthesis Kit(Roche Applied Science, Cat # 11636090910)の試薬を用い、HA1-P-Fプライマー(配列番号22)とHA1-P-Rプライマー(配

10

20

30

40

50

列番号23)もしくは45/46-Fプライマー(配列番号24)と45/46-Rプライマー(配列番号25)を使って調製した。

【0052】

メンブレンを2×SSC溶液で室温において洗浄した後、次に0.5×SSC溶液で68にて洗浄した。ブロッキングしたのち、anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (Roche Applied Science, Cat # 11093274910)を加えて室温で30分静置した。マレイン酸洗浄液(0.1Mマレイン酸、0.15M塩化ナトリウム、0.3% Tween20, pH7.5)で2回洗浄した後、BCIP/NBT溶液を加えることにより、プローブと結合したDNAのバンドを可視化した。HAプローブでは組み換えウイルスDNAと組み換えプラスミドで3.6kbのバンドが検出され、HVT親株においてはバンドは全く検出されなかった。IS45/46プローブでは、組み換えウイルスDNAと組み換えプラスミドで3.6kb及び1.2kbのバンドが検出され、HVT親株においては2.3kbのバンドが検出された。これらの結果は、例3で得られたrHVT/CMVH5Wis68が予測されたゲノム構造を持っていることを示している。

10

【0053】

rHVT/Bach5Wis68とrHVT/PecH5Wis68のサザンプロット試験もrHVT/CMVH5Wis68と同様に行われたが、rHVT/Bach5Wis68に関してはXhoIとSpeIが制限酵素として用いられた。rHVT/Bach5Wis68では、HAプローブによって組み換えウイルスDNAと組み換えプラスミドで4.9kbのバンドが検出された。一方、HVT親株においては、バンドは全く検出されなかった。IS45/46プローブを用いた場合は、組み換えウイルスDNAと組み換えプラスミドで4.9kb及び0.8kbのバンドが検出され、HVT親株においては2.3kbのバンドが検出された。

20

【0054】

rHVT/PecH5Wis68では、HAプローブを用いた場合組み換えウイルスDNAと組み換えプラスミドで3.6kbのバンドが検出され、HVT親株においては、バンドは全く検出されなかった。IS45/46プローブを用いた場合は、組み換えウイルスDNAと組み換えプラスミドで3.6kb及び1.2kbのバンドが検出され、HVT親株においては2.3kbのバンドが検出された。これらの組み換えウイルスについても予測された構造を示すことが証明された。

【0055】

4.2 ゲノム安定性試験

rHVT/CMVH5Wis68、rHVT/Bach5Wis68、rHVT/PecH5Wis68をCEF細胞で20代継代した組み換えウイルスについても前記4.1と同様にサザンプロット試験を実施した。20代継代後の組み換えウイルスから抽出したDNAから検出されたバンドは例4.1に記載されたバンドと同一であり、これらの組み換えウイルスは20代継代後も安定であることが確認された。

30

【0056】

例5. 組み換えHVTによるHA蛋白の発現確認

組み換えウイルス rHVT/CMVH5Wis68、rHVT/Bach5Wis68、rHVT/PecH5Wis68によるHA蛋白の発現確認は、ブラックプラーク試験、ウェスタンプロット試験により行われた。ブラックプラーク試験の手順は例3に記載されている。ウェスタンプロット試験は、組み換えウイルスの感染CEF細胞及び鶏抗HA血清を用いて行われた。すなわち、組み換えウイルスもしくはHVT FC126株を100mm径培養皿中のCEFにmultiplicity of infection約0.01で感染させたのち、2、3日後に感染細胞をスクレーパーで培養皿から剥がしたのち、遠心分離(913xg、5分)して回収した。

40

【0057】

細胞のペレットをPBSで2回洗浄後50から100µlのPBSで再懸濁した。同量の2xSDSサンプルバッファー(130mM Tris-Cl (pH6.8)、6% SDS、20% Glycerol、10% 2-メルカプトエタノール、0.01% プロモフェノールブルー)を加えた後、5分間ボイルした。サンプルを8% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEで分離したのち、PVDFメンブレン(Immobilon-P, Millipore)にトランスファーした。このメンブレンを完全に乾燥させたあと、鶏抗HA血清でインキュベートし、さらに洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識抗鶏IgG Fc抗体(Bethyl, Cat # A30-104AP)でインキュベートした。鶏抗HA血清が結合した蛋白はBCIP/NBT溶液を加えることにより可視化した。図3に示すとおり、予測される

50

非修飾のHA蛋白のサイズと一致する74キロダルトンのバンドが組み換えウイルス感染細胞のみで見られた。

【 0 0 5 8 】

例 6 . 組み換えHVTを接種した鶏での血清抗体価の評価 (動物試験 1)

組み換えウイルス rHVT/CMVH5Wis68、rHVT/BacH5Wis68、rHVT/PecH5Wis68を接種した鶏でのAIに対する血清学的応答を以下のように評価した。まず、初日齢のSPF鶏 (SPAFAS ,F lock T-10) に組み換えウイルスを皮下接種した。グループ 1、2 はそれぞれ 1 ドース (0 .2ml) あたり1638pfuもしくは375pfuのrHVT/CMVH5Wis68を接種した。グループ 3、4 はそれぞれ2800pfuもしくは550pfuのrHVT/PecH5Wis68による接種を受けた。グループ 5、6 に関してはそれぞれ4350pfuもしくは720pfuのrHVT/BacH5Wis68を接種した。一群の鶏は非接種陰性対照群 (グループ 8) として用いられ、さらにもう一群の鶏については3週齢において不活化A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9) ワクチンの皮下接種し、不活化ワクチン対照群とした (グループ 7)。

10

【 0 0 5 9 】

3週齢から7週齢にかけて毎週採血を行い、採取した血清をAI HI試験とAIV ELISA試験で評価した。AI HI試験はSwayneらの方法 (D.E. Swayne et al., 1998, Avian Influenza . In: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, 150-155) に従って行った。その際、赤血球凝集素としては、組み換えHVTのHA遺伝子を取得したA/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9) 株を用いた不活化AIウイルス抗原4単位を用いた。すなわち、HI試験に先立って、不活化A/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9) 抗原の赤血球凝集単位を、完全な赤血球凝集を示す最高希釈倍率として決定し、25µl中に4単位の抗原を含むように希釈した。

20

【 0 0 6 0 】

U底96穴プレートを用い、血清はまずPBSで1:5に希釈した後、1ウェルあたり25µlの血清希釈液を含むように2倍階段希釈した。4単位 (25µl) の赤血球凝集素を各ウェルに加え、室温で30分静置した。最後に、50µlの0.5%鶏赤血球 (PBSにて希釈) を各ウェルに加え、室温で40分ほど静置した。HI価は、赤血球の凝集を抑制する血清の最高希釈倍率とし、10以上のHI価を陽性とみなした。ELISA試験は、米国で入手のできる2種類の市販AIV ELISAキット (IDEXX LABORATORIES , FLOCKCHE AIV及びSYNBIOTICS, PROFLOK AIV Ab test kit) を用いた。

30

【 0 0 6 1 】

表 3 及び図 7 で示すように、rHVT/CMVH5Wis68の接種を受けた鶏 (グループ 1、2) は、接種3週後でも高いHI価を示し始め、6週後までには幾何平均HI価は100に達した。また接種3週後では80%以上の個体が、5週後以降はすべての個体が陽性なHI価を示した。市販の鶏痘ウイルスベクターAIワクチンでは高いレベルのHI価は常時観察されておらず、これは容易に達成できるものではない。グループ 1 と 2 での投与ドースの違い (1368 pfuと375pfu) は血清学的応答に大きな影響を与えなかった。驚くことに、高いHI価を示した接種3週から7週後までのrHVT/CMVH5Wis68接種鶏からの血清を市販のAIV ELISAキットで評価したところ、いずれも陰性であった。一方、不活化ワクチン対照群 (グループ 7) から取得した血清はどちらの市販AIV ELISAキットでも非常に高い陽性のELISA抗体価を示した (図 8 及び 9)。

40

【 0 0 6 2 】

rHVT/CMVH5Wis68のこの特長を利用することにより、ワクチン接種による血清学的応答と、野外ウイルスによる感染を容易に区別でき、またワクチン接種した鶏を追跡することも容易である。rHVT/PecH5Wis68 (グループ 3 及び 4) もしくはrHVT/BacH5Wis68 (グループ 5 及び 6) による接種を受けた鶏血清の幾何平均HI価はrHVT/CMVH5Wis68に比べて低く、また図 3 に示すように、HI価は個体間でばらつきが見られ、一貫していない。非接種陰性対照群 (グループ 8) はHI価、ELISA価とも観察期間中陰性であった。

【 0 0 6 3 】

まとめると、CMVプロモーターと組み合わせてHA遺伝子を保持する組み換えHVT (rHVT/C

50

MVH5Wis68) は、対照例として挙げるBacプロモーター (rHVT/BacH5Wis68) もしくはPecプロモーター (rHVT/PecH5Wis68) を持つ組み換えHVTに比べて、高くより均一的なHI血清抗体価を付与することができた。rHVT/CMVH5Wis68接種鶏からの血清は、高い陽性HI価を示すにもかかわらず、市販のAIV ELISAキットでは陰性であり、ワクチン接種と野外感染による血清学的応答を容易に区別することが可能である。

【 0 0 6 4 】

例 7. 組み換えHVTを接種した鶏での血清抗体価の評価 (動物試験 2)

HA遺伝子を保持する組み換えHVTの免疫付与能をさらに評価するため、再度血清学的評価試験を実施した。この試験ではSPF鶏 (SPAFAS, Flock -105) は4つのグループに分けられた (表 4)。グループ 1 に対するワクチン接種は、1 ドース (0.1ml) 辺り980pfuのrHVT/CMVH5Wis68による発育鶏卵の18日胚への卵内接種にて実施した。グループ 2、3 は初日齢にてそれぞれ 1 ドース (0.2ml) 辺り695pfuのrHVT/CMVH5Wis68もしくは1155pfuのrHVT/BacH5Wis68を皮下接種した。グループ 4 は非接種陰性対照群とした。鶏からの採血は2週齢から7週齢にかけて行われ、血清はAI HI試験、AIV ELISA試験で評価した。AI HI試験は4単位のA/Turkey/Wisconsin/68 (H5N9) 株不活化抗原を用いて、Swayneらの方法 (D.E. Swayne et al., 1998, Avian Influenza. In: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, 150-155) に従って行った。

【 0 0 6 5 】

表 5 と図10に示すように、rHVT/CMVH5Wis68を皮下接種したグループ 2 は動物試験 1 でも見られたように優秀な免疫付与能を示した。幾何平均HI価は3週齢までに達し、高いレベルのHI価は7週齢まで維持された。また、この試験ではrHVT/CMVH5Wis68の卵内接種を行ったグループ 1 のHI価は皮下接種のグループ 2 と同等であり、卵内接種した場合でもrHVT/CMVH5Wis68は皮下接種と同等の免疫付与能を示すことを見出すことができた。rHVT/BacH5Wis68を接種した鶏群 (グループ 3) のHI価は、5週齢で一度他のグループより高いHI価を示したのを除けば、rHVT/CMVH5Wis68よりも若干低かった。非接種陰性対照群は観察期間中常に陰性のHI価を示した。

【 0 0 6 6 】

例 8. 組み換えHVTの高病原性AIウイルス (H5N1亜型) による攻撃に対する効果 (動物試験 3)

3 番目の試験では、HA遺伝子を保持する組み換えHVTの高病原性AIウイルス (H5N1亜型) に対する効果を調べた。この試験ではSPF鶏を4つのグループに分けた (表 6)。グループ 1、2 は初日齢にてそれぞれ 1 ドース (0.2ml) 辺り1075pfuのrHVT/CMVH5Wis68もしくは1080pfuのrHVT/BacH5Wis68を皮下接種した。グループ 3 (非ワクチン接種攻撃陽性対照群) は初日齢でワクチン希釈液を接種し、4週齢で攻撃した。グループ 4 は非ワクチン接種非攻撃陰性対照群である。

【 0 0 6 7 】

4週齢のグループ 1、2 及び 3 の鶏に、 $10^{5.0}$ EID₅₀ (200 LD₅₀) の高病原性AIウイルス A/Viet Nam/1203/04 (H5N1) 株を点鼻接種にて攻撃した。ワクチン防御は、AIに伴う致死、臨床的症状の有無で評価した。グループ 3 の非ワクチン接種攻撃陽性対照群は、2日以内に全ての個体が死亡しており、攻撃の激しさを確認できる (表 7)。rHVT/CMVH5Wis68を接種したグループ 1 では95% (20羽中19羽) が防御し、このワクチンの優れた防御効果を示している。

【 0 0 6 8 】

一方、rHVT/BacH5Wis68を接種したグループ 2 の防御率は65% (20羽中13羽) に過ぎない。グループ 4 (非ワクチン接種非攻撃陰性対照群) においては、AIによる臨床的症状は確認されなかった。2度実施された血清学的評価試験 (例 6 及び例 7 に記述) と同様、CMVプロモーターと組み合わせてHA遺伝子を保持する組み換えHVT (rHVT/CMVH5Wis68) は、対照例として挙げるBacプロモーター (rHVT/BacH5Wis68) を持つ組み換えHVTに比べて、高病原性AIウイルス (H5N1) による攻撃に対してはるかに優れた防御効果を示した。

【 0 0 6 9 】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2. 動物試験 1 の群分け

群 #	処理群	プロモーター	ワクチン接種時期	ワクチン接種量 (pfu ¹)	ワクチン投与経路	鶏の数
1	rHVT/CMVH5W1s68	CMV (Ex ²)	1 日齢	1638	SQ ³	17
2	rHVT/CMVH5W1s68	CMV (Ex)	1 日齢	375	SQ	17
3	rHVT/PecH5W1s68	Pec (CE ⁴)	1 日齢	2800	SQ	17
4	rHVT/PecH5W1s68	Pec (CE)	1 日齢	550	SQ	17
5	rHVT/BacH5W1s68	Bac (CE)	1 日齢	4350	SQ	17
6	rHVT/BacH5W1s68	Bac (CE)	1 日齢	720	SQ	17
7	不活性化H5N9ワクチン	N/A ⁵	3 週齢	0.5 ml ⁶	SQ	17
8	陰性対照	N/A	N/A	無し	N/A	10

pfu¹ = プラーク形成ユニット

Ex² = 実施例

SQ³ = 皮下投与

CE⁴ = 比較例

N/A⁵ = 不適用

ml⁶ = ミリリットル

表 3. 動物試験 1 の HI 価の推移

群 #	3 週		4 週		5 週		6 週		7 週	
	陽性/合計	GMT タイター ²	陽性/合計	GMT タイター	陽性/合計	GMT タイター	陽性/合計	GMT タイター	陽性/合計	GMT タイター
1	16/17 (94%)	23.5	15/17 (88%)	47.1	17/17 (100%)	62.6	17/17 (100%)	94.2	17/17 (100%)	70.8
2	14/17 (82%)	18.4	17/17 (100%)	47.1	17/17 (100%)	53.2	16/16 (100%)	113.1	16/16 (100%)	118.1
3	15/17 (88%)	17.7	16/17 (94%)	24.5	16/17 (94%)	28.9	17/17 (100%)	38.4	16/17 (94%)	47.1
4	14/17 (82%)	23.5	16/17 (94%)	28.9	15/17 (88%)	23.5	13/17 (76%)	23.2	14/17 (82%)	28.9
5	16/17 (94%)	35.4	16/17 (94%)	32.6	15/17 (88%)	25.5	14/17 (82%)	21.4	13/17 (76%)	28.5
6	11/17 (65%)	11.0	11/17 (65%)	11.6	12/17 (71%)	9.5	10/17 (59%)	13.9	10/16 (63%)	10.9
7	N/A ³	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	17/17 (100%)	294.9	17/17 (100%)	461.9
8	0/10 (0%)	N/A	0/10 (0%)	N/A	0/10 (0%)	N/A	0/10 (0%)	N/A	0/10 (0%)	N/A

陽性¹ = 10以上のHIタイターを陽性とした。

GMTタイター² = 幾何学的平均タイター

N/A³ = 不適用

【表 4】

表 4. 動物試験 2 の群分け

群 #	処理群	プロモーター	ワクチン接種時期	ワクチン接種量 (pfu)	ワクチン投与経路	鶏の数
1	rHVT/CMVH5W1s68	CMV (Ex ²)	18日齢の胚	980	In ovo	18
2	rHVT/CMVH5W1s68	CMV (Ex)	1日齢	695	SQ ³	10
3	rHVT/BacH5W1s68	Bac (CE ⁴)	1日齢	1155	SQ	10
4	陰性対照	N/A ⁵	N/A	無し	N/A	10

pfu¹ = プラーク形成ユニット

Ex² = 実施齢

SQ³ = 皮下投与

CE⁴ = 比較例

N/A⁵ = 不適用

【表 5】

表 5. 動物試験 2 の HI 価の推移

群 #	2 週		3 週		4 週		5 週		6 週		7 週	
	陽性 ¹ /合計	GMT タイター ²	陽性/合計	GMT タイター								
1	12/18 (67%)	8.3	18/18 (100%)	66.0	18/18 (100%)	83.1	18/18 (100%)	148.1	18/18 (100%)	201.6	18/18 (100%)	179.6
2	9/10 (90%)	17.0	10/10 (100%)	105.6	10/10 (100%)	171.5	10/10 (100%)	91.9	10/10 (100%)	105.6	10/10 (100%)	80.0
3	7/10 (70%)	7.1	10/10 (100%)	45.9	10/10 (100%)	65.0	10/10 (100%)	211.1	10/10 (100%)	60.6	10/10 (100%)	49.2
4	0/10 (0%)	N/A ³	0/10 (0%)	N/A								

陽性¹ = 10以上のHIタイターを陽性とした。

GMT titer² = 幾何学的平均タイター

N/A³ = 不適用

【表 6】

表 6. 高病原性AIウイルスに対する効果試験の群分け

群 #	処理群	プロモーター	ワクチン接種時期	ワクチン接種量 (pfu ¹)	ワクチン投与経路	鶏の数
1	rHVT/CMVH5Wis68	CMV (Ex ²)	1 日齢	1075	SQ ³	20
2	rHVT/BacH5Wis68	Bac (CE ⁴)	1 日齢	1080	SQ	20
3	チャレンジ対照	N/A ⁵	N/A	無し	N/A	20
4	陰性対照	N/A	N/A	無し	N/A	5

pfu¹ = プラーク形成ユニット

Ex² = 実施例

SQ³ = 皮下投与

CE⁴ = 比較例

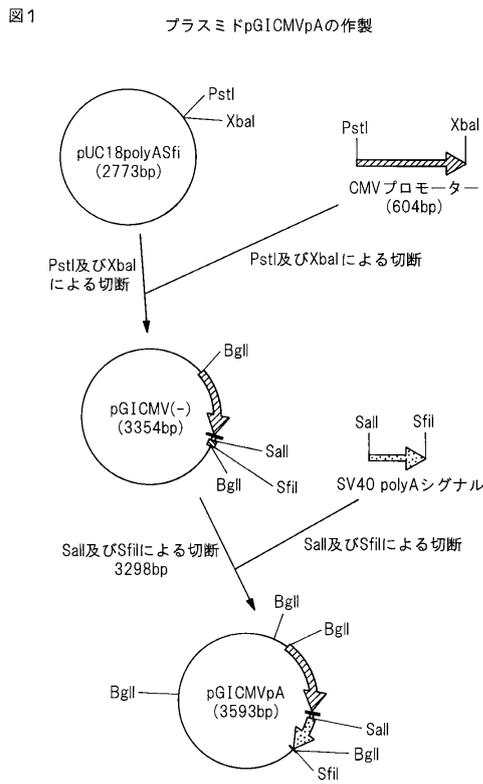
N/A⁵ = 不適用

【表 7】

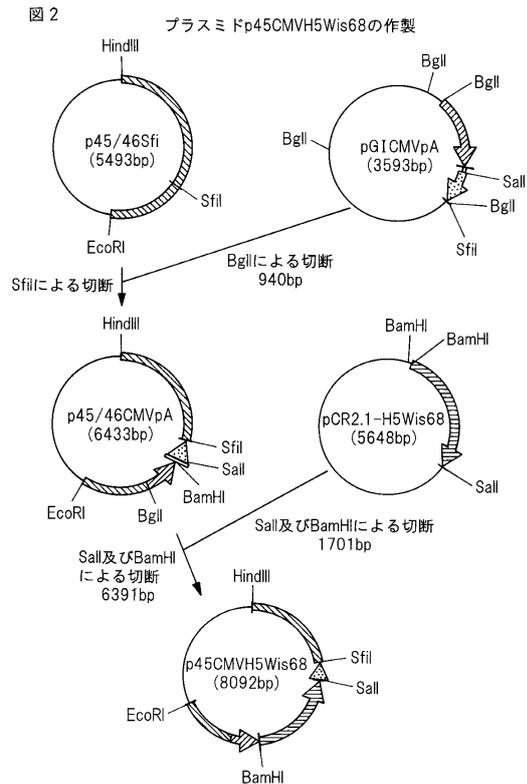
表7. HAを持つ組み換えHVTの高病原性AIウイルスに対する効果

群 #	処理群	保護された数/合計	保護%
1	rHVT/CMVH5Wis68	19/20	95%
2	rHVT/BachH5Wis68	13/20	65%
3	チャレンジ対照	0/10	0%
4	陰性対照	5/5	100%

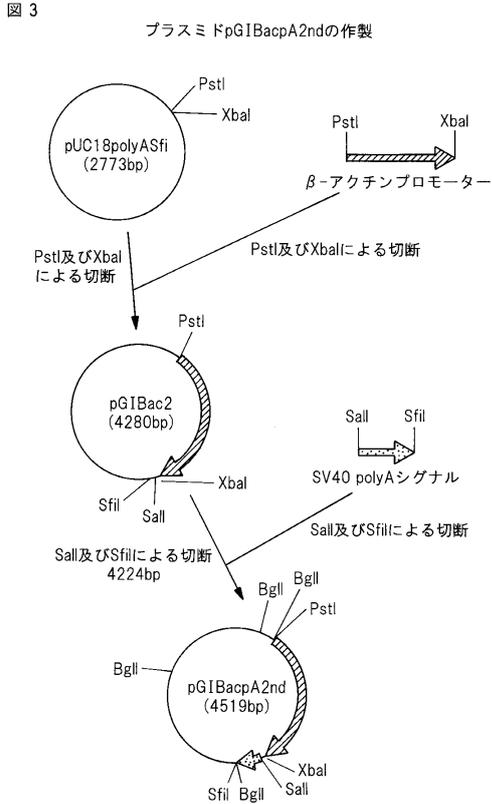
【図 1】



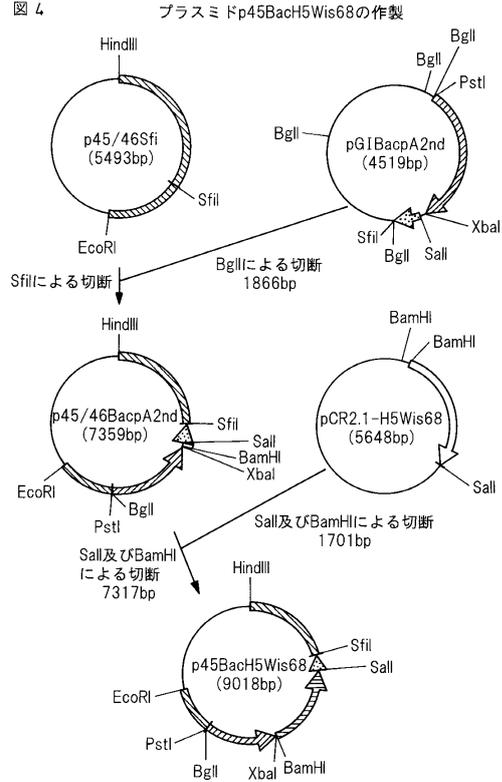
【図 2】



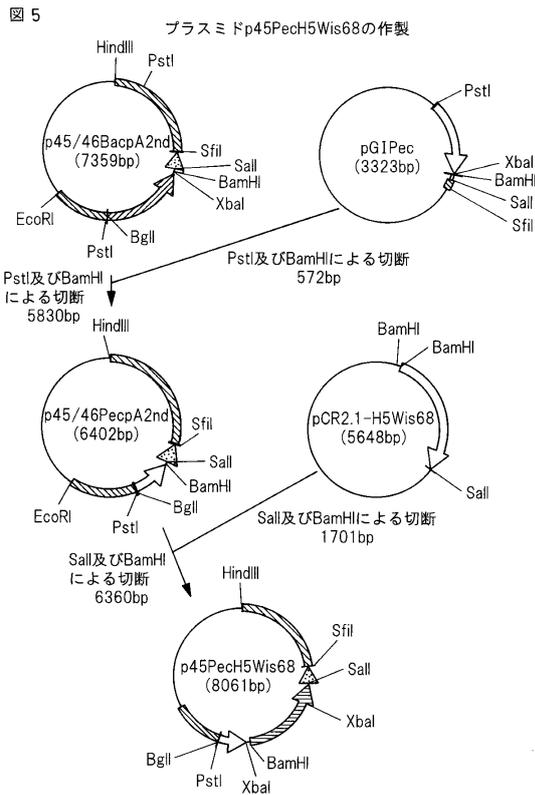
【 図 3 】



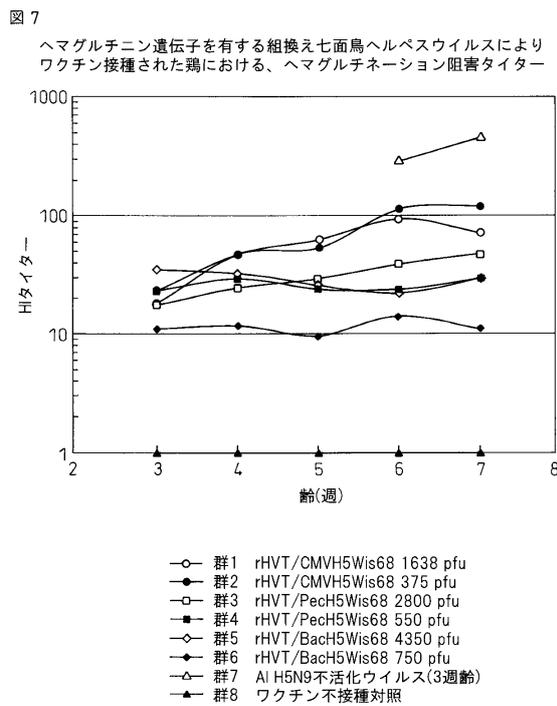
【 図 4 】



【 図 5 】

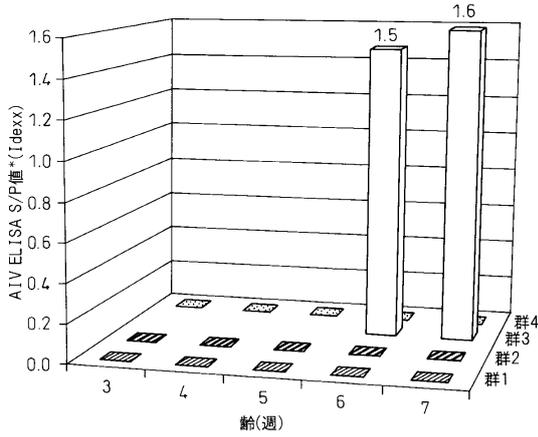


【 図 7 】



【 図 8 】

図 8
ヘマグルチニン遺伝子を有する組換え七面鳥ヘルペスウイルスによりワクチン接種された鶏における、市販のELISAキットによるタイター (Idexx Laboratories FlockChek AIV)

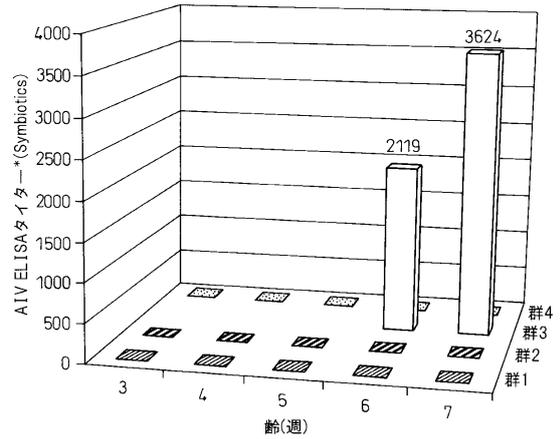


S/P値*=0.5以上のS/P値を陽性とする

- 群1 rHVT/CMVH5Wis68 1638 pfu
- 群2 rHVT/CMVH5Wis68 375 pfu
- 群3 AI H5N9不活化ウイルス(3週齢)
- 群4 ワクチン不接種対照

【 図 9 】

図 9
ヘマグルチニン遺伝子を有する組換え七面鳥ヘルペスウイルスによりワクチン接種された鶏における、市販のELISAキットによるタイター (ProFLOK AIV Abテストキット)

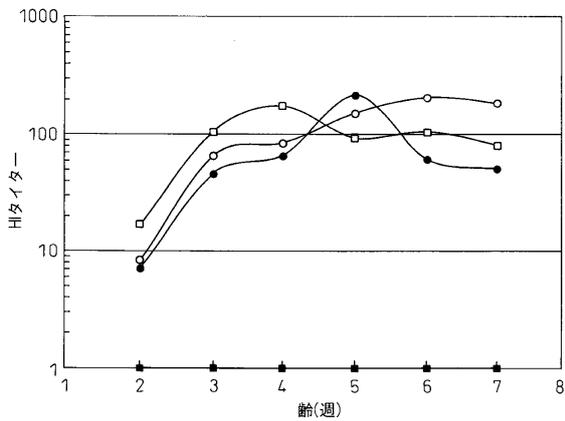


S/P値*=0.5以上のS/P値を陽性とする

- 群1 rHVT/CMVH5Wis68 1638 pfu
- 群2 rHVT/CMVH5Wis68 375 pfu
- 群3 AI H5N9不活化ウイルス(3週齢)
- 群4 ワクチン不接種対照

【 図 10 】

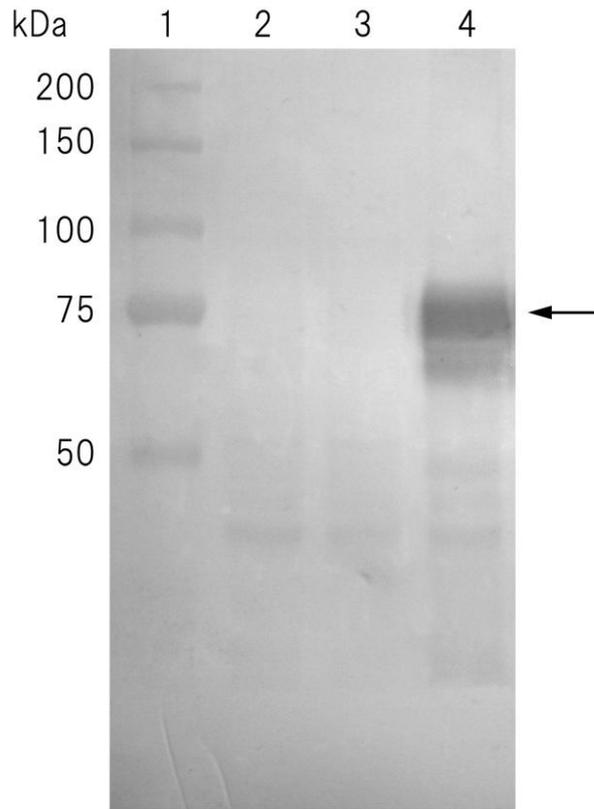
図 10
ヘマグルチニン遺伝子を有する組換え七面鳥ヘルペスウイルスによりワクチン接種された鶏における、ヘマグルチネーション阻害タイター (第二試行)



- 群1 rHVT/CMVH5Wis68 in ovo
- 群2 rHVT/CMVH5Wis68 subcutaneous
- 群3 rHVT/BacH5Wis68 subcutaneous
- 群4 ワクチン不接種対照

【 図 6 】

図6



【 配列表 】

[0005508252000001.app](#)

フロントページの続き

- (74)代理人 100108903
弁理士 中村 和広
- (74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
- (74)代理人 100141977
弁理士 中島 勝
- (72)発明者 ドーシー, クリスティー エム
アメリカ合衆国, カンザス 66215 レネクサ, ローズヒル ロード 8906, シー/オー
バイオミューン カンパニー
- (72)発明者 イェンセン, ローレン エリザベス
アメリカ合衆国, カンザス 66215 レネクサ, ローズヒル ロード 8906, シー/オー
バイオミューン カンパニー
- (72)発明者 江崎 素之
アメリカ合衆国, カンザス 66215 レネクサ, ローズヒル ロード 8906, シー/オー
バイオミューン カンパニー

審査官 吉田 知美

- (56)参考文献 特開平11-192093(JP, A)
国際公開第2007/022151(WO, A1)
国際公開第00/035476(WO, A1)
米国特許第07132291(US, B1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00 - 15/90