

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4381977号
(P4381977)

(45) 発行日 平成21年12月9日(2009.12.9)

(24) 登録日 平成21年10月2日(2009.10.2)

(51) Int.Cl.	F 1
A 6 1 K 39/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/02
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04 1 7 1

請求項の数 8 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2004-520621 (P2004-520621)	(73) 特許権者	597011463
(86) (22) 出願日	平成15年7月14日(2003.7.14)		ノバルティス アクチエンゲゼルシャフト
(65) 公表番号	特表2005-536500 (P2005-536500A)		スイス国、4056 バーゼル、リヒトシ
(43) 公表日	平成17年12月2日(2005.12.2)		ユトラーセ 35
(86) 国際出願番号	PCT/EP2003/007605	(74) 代理人	100062007
(87) 国際公開番号	W02004/006953		弁理士 川口 義雄
(87) 国際公開日	平成16年1月22日(2004.1.22)	(72) 発明者	サロニウス, キラ
審査請求日	平成17年3月7日(2005.3.7)		カナダ国、プリンス・エドワード・アイラ
(31) 優先権主張番号	0216414.3		ンド・シー・オー・エイ・2・ジー・オー
(32) 優先日	平成14年7月15日(2002.7.15)		、ビクトリア、ハワード・ストリート・2
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		2
(31) 優先権主張番号	0220100.2	(72) 発明者	グリフィス, ステイブ・ガレス
(32) 優先日	平成14年8月29日(2002.8.29)		カナダ国、ニュー・ブランズウィック・イ
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		ー・1・シー・5・ダブリュ・8、モンク
微生物の受託番号	ATCC 55921		トン、ウエルドン・ストリート・239
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アースロバクター細胞に基づくサケリケッチャ敗血症に対するワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

魚類のピシリケッチャ症を治療または予防するための免疫原としての生アースロバクター細胞の使用。

【請求項 2】

魚類がサケ科の魚類である請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

ピシリケッチャ症がサケリケッチャ敗血症 (SR S) である請求項 1 または 2 に記載の使用。

【請求項 4】

アースロバクター細胞が ATCC 55921 の受託番号で寄託されている菌株または均等菌株に由来する請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の使用。

【請求項 5】

魚類がギンザケ (Oncorhynchus kisutch) である請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の使用。

【請求項 6】

生アースロバクター細胞及び免疫賦活剤を医薬的に許容され得る担体と共に含む、魚類のピシリケッチャ症を治療または予防するためのワクチン組成物。

【請求項 7】

免疫賦活剤が死滅細菌細胞材料を含む請求項 6 に記載のワクチン組成物。

10

20

【請求項 8】

細胞材料が死滅アースロバクター細胞に由来する請求項 7 に記載のワクチン組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、サケリケッチア敗血症（SR S）を治療または予防する薬剤の製造におけるアースロバクターの生菌株の使用、及び前記細菌に基づくワクチンに関する。

【背景技術】

【0002】

ピシリケッチア・サルモニス（Piscirickettsia salmonis）はサケ科魚類において全身性敗血症（サケリケッチア症候群（SR S）またはピシリケッチア症）を引き起こすグラム陰性の真正の細胞内細菌である。現在、ピシリケッチア様細菌は世界中の淡水及び海水産のいろいろな他の魚類でもしばしば認められるようになっている。ピシリケッチア症及びピシリケッチア症様疾患は水産養殖物の生産性、収益性、大量養殖に適合する種及び魚の輸送に悪影響を与える。チリの水産養殖業界だけでも 1 年でピシリケッチア症のために 150,000 万ドルの損失を被っている。チリでは、前記症候群のために主たる養殖種が商業的により望ましいギンザケから余り好まれていないがピシリケッチア症に対して耐性のタイセイヨウサケに移行している。

【0003】

抗菌剤が SR S に対する治療として試験されてきたが、必ずしも成功していない。他の示唆されている方法としては、ストック密度を下げ、死んだ魚を遅れることなく水槽から除去することにより魚のストレスを下げる試みが挙げられる。SR S 流行に対する最も実地的な解決法は第 1 にこの病気を予防するための有効なワクチンを見つけることであろう。P. salmonis 由来の不活化バクテリン調製物は若干の防御効果を有することが判明しており、多価オイル調節物として共投与するための唯一の適当な方法であり得るが、商業的規模で製造するにはかなり高価である。P. salmonis 由来の組換え抗原に基づくワクチンはまだ市場に出ていない。

【0004】

従って、魚類におけるピシリケッチア症に起因する死亡率をかなり低下させることができるワクチンを利用できるようにすることが緊急に要望されている。本発明は、既存の市販されているワクチン製品が上記した病気を予防するのにかなり有効であるという驚くべき知見に基づいている。このワクチンは“Renogen（商品名）”の名前で市販されており、アースロバクターの非ビルレント生菌株からなる。現在、このワクチンはサケ及び他の養殖魚類を細菌性腎疾患（BK D）から防御するために適用されている。この菌株の特徴は、本明細書中に参考として援用されている国際特許出願公開第 98/33884 号パンフレットに開示されている。

【発明の開示】

【0005】

本発明の第 1 態様で、魚類におけるピシリケッチア症を治療または予防する薬剤の製造における生アースロバクター細胞の使用が提供される。この薬剤の好ましい標的は SR S 感染の危険に曝されているサケ科魚類である。アースロバクター細胞が ATCC 59921 の受託番号で寄託されている菌株、または均等菌株に由来することが好ましい。

【0006】

本発明の第 2 態様で、生アースロバクター細胞、死滅細菌性免疫賦活剤、及び医薬的に許容され得る担体を含むワクチン組成物が提供される。本発明の別の態様では、死滅アースロバクター細胞材料を含むワクチン組成物及び免疫賦活剤としての死滅アースロバクター細胞材料の使用が提供される。死滅アースロバクター細胞材料が ATCC 59921 の受託番号で寄託されている菌株、または均等菌株に由来することが好ましい。

【0007】

本発明の更に別の態様で、生アースロバクター細胞及び不活化ピシリケッチア・サルモ

10

20

30

40

50

ニス (P i s c i r i c k e t t s i a s a l m o n i s) 抗原を含むワクチン組成物が提供され、前記ワクチンは場合により、凍結乾燥したアースロバクター生細胞培養物及び不活化 P. s a l m o n i s 抗原を含む無菌希釈剤を含むキットの形態で提供される。

【0008】

本発明の更に別の態様で、治療を要する魚類に生アースロバクター細胞を含むワクチンを投与することを含む魚類におけるピシリケッチア症を治療または予防する方法が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

R e n o g e n (商品名) はサケ科魚類において細菌性腎疾患 (BKD) に対処するためにかなりの間使用されてきた。このワクチンは、水産養殖業で使用するために認可された最初の生培養物である点で独自のものであり、1996年12月20日にバージニア州マナッサスの B o u l e v a r d 大学の アメリカーン・タイプ・カルチャー・コレクション に A T C C 55921 の受託番号で寄託されているアースロバクター s p. n o v. の生培養物を含む。アースロバクターは魚類にとって病原性でない。また、BKDの病原物質 (レニバクテリウム・サルモニアルム (R e n i b a c t e r i u m s a l m o n i n a r u m)) でもない。

【0010】

当業界の1現場でBKDに罹患する危険性のあるサケ集団に R e n o g e n (商品名) を使用すると非処置魚に比して死亡率が劇的に低下することが観察された。 R e n o g e n 処置群の平均体重増加は非処置魚群よりも18%高かった。SRSは前記現場で共通して見られ、本発明者らは R e n o g e n (商品名) がBKDのみならずSRSにも隠れた防御効果を与え得ると推測した。

【0011】

この考えを試験するために、実施例2に記載されているように水槽に入れた魚を R e n o g e n (商品名) を用いて免疫化した後、P. s a l m o n i s で攻撃誘発した。食塩液を注射したネガティブコントロール群では、殆どすべての魚がSRSで死んだ。 R e n o g e n (商品名) ワクチンを投与した試験群は471dd (degree day (度日)) 後に非常に低い死亡率を示し、相対生残率 (RPS) は88~100%になった。(海水中での1年に相当する) 1411dd後でも、試験群は69~85%のRPSを有していた。これに対して、不活化 P. s a l m o n i s “ゴールド基準” 群では48.6%に過ぎなかった。

【0012】

R e n o g e n (商品名) のワクチン接種の可能性は、家兎ポリクローナル抗アースロバクター抗体を用いてプローブしたときの P. s a l m o n i s 抗原の交差反応性により立証されている (実施例1)。

【0013】

本発明者らは、 R e n o g e n (商品名) がSRSの予防において他の公知のワクチンよりも有効であることを知見した。生アースロバクター細菌は細胞に進入し、限られた時間で複製し得ることが公知である。本発明者らは、このことから P. s a l m o n i s のT細胞エピトープに十分な相同性を有する炭水化物及びタンパク質の両抗原を抗原プロセッシングすると、ビルレント P. s a l m o n i s での直接的な攻撃誘発に対して高レベルの防御を与えることができると考える。

【0014】

従って、本発明は、魚類、特にサーモン種及びトラウト種を含めたサケ科魚類、特にギンザケ (O n c o r h y n c u s k i s u t c h)、マスノスケ (O n c o r h y n c h u s t s h a w y t s c h a)、サクラマス (O n c o r h y n c u s m a s o u)、カラフトマス (O n c o r h y n c h u s g o r b u s c h a)、ニジマス (O n c o r h y n c h u s m y k i s s) 及びタイセイヨウサケ (S a l m o n s a l a r) におけるピシリケッチア症を治療または予防する薬剤の製造におけるアースロバク

10

20

30

40

50

ー細胞の使用を提供する。しかしながら、ピシリケッチア症または他の類似の病気にかかりやすい他の魚種、例えばティラピア (Tilapia) 種、ブラックシーバス (Dicentrarchus sp.)、ホワイトシーバス (Attractoscion nobilis)、ハタ、カワスズメ等にも有効であり得る。

【0015】

Renogen (商品名) はアースロバクターの特定寄託菌株 (ATCC 59921) に基づくものである。本発明を実施する際、この菌株及び均等のアースロバクター菌株が使用され得る。均等アースロバクター菌株はアースロバクター ATCC 59921 の同定特性を有する。これらの均等菌株は SRS に対して同様の防御能を示す。同一の 16S rDNA 配列を有するかまたは菌株 ATCC 59921 と 3% 未満しか異ならない 16S rDNA 配列を有するアースロバクター種は均等と見做される。この 16S rDNA 配列は Genbank 受託番号 AF099202 で寄託されている。均等菌株は、S. G. Griffiths ら, Fish & Shellfish Immunology, 8: 607-619 (1998) に記載されているような F-12-373 プライマー (5'-ACGGTACCAAG-3') を用いる RAPD アッセイによっても規定される。このアッセイをアースロバクター ATCC 59221 及び均等菌株に対して実施すると、約 373 bp の特有の断片が生ずる。プライマー Rsx11-67f (5'-CTGTGCTTGCAACGGGGGATTAA-3') 及び Rsx11-284r (5'-GTGGCCGGTCAACCTCTCAG-3') を用いた同一文献に記載されている別の RAPD をアースロバクター ATCC 59221 または均等菌株に対して実施すると、260 bp の断片が生ずる。

【0016】

アースロバクター属の種は多数あり、海洋環境を含めた多種多様の生育地に豊富に存在する。多くのアースロバクター菌株は市販の寄託機関から入手可能である。本明細書で同定した特性及び／または SRS 免疫原性について公知の菌株または新しく単離した菌株の選択をスクリーニングすることは当業者にとって過度の負担とならない。SRS 免疫原性は、上記パラグラフに記載したスクリーニングアッセイにより及び／または実施例 1 及び実施例 2 に記載の実験方法により同定され得る。

【0017】

ワクチンの好ましい投与ルートは腹腔への注射であるが、食物に含めて経口で、皮内または筋肉内注射、或いは海水または淡水への浸漬を含めた他の投与方法もある。注射によりワクチンを接種する前に魚は通常麻酔にかけられる。本発明のワクチンを腹腔内注射により投与するためには魚の体重が 10 g 以上であることが推奨される。浸漬または経口投与の場合には少なくとも 2 g の体重が好ましい。

【0018】

ワクチンの有効用量は対象の大きさ及び種に応じ、投与モードに従って変更され得る。最適用量は獣医師または水産養殖の専門家により試行錯誤により決定され得る。適当な用量は、1 回投与あたり約 $10^2 \sim 10^9$ cfu、好ましくは約 $10^4 \sim 10^7$ cfu、より好ましくは約 $10^5 \sim 10^6$ cfu、最も好ましくは約 10^5 cfu であり得る。しかしながら、より高量またはより低量も有効であり得る。処置対象の魚に対して 1 回投与することが好ましい。小さい魚に対しては約 $10^4 \sim 10^7$ cfu/ml の用量を、例えば約 60 秒間の接触時間でディップ (浸漬) 投与され得る。浸漬投与の場合、ワクチンは魚を入れいている水槽またはケージに添加する前に 1～10 倍の水で希釈され得る。

【0019】

注射のために好ましい投与容量は約 0.05～0.5 ml、好ましくは 0.075～0.25 ml、より好ましくは 0.1～0.2 ml、最適には 0.1 ml である。

【0020】

免疫発生は水温に依存するので、本発明のアースロバクターワクチンを接種してから少なくとも 400 dd (dd = 日数 × 平均水温 (°C)) まで、魚を SRS 感染に曝さないことが好ましい。

【0021】

本発明の1実施態様では、生アースロバクター細胞は医薬組成物中に医薬的に許容され得る担体またはビヒクルと組み合わされる。好適な担体／ビヒクルには慣用の賦形剤が含まれ、例えば溶媒（例えば、水、油または食塩液）、デキストロース、グリセロール、湿潤または乳化剤、増量剤、コーティング、結合剤、充填剤、崩壊剤、希釈剤、滑沢剤、pH緩衝剤、または慣用のアジュバント（例えば、ムラミルジペプチド、アブリジン、水酸化アルミニウム）、油（例えば、鉱油）、サポニン、ブロックコポリマー及び当業界で公知の他の物質であり得る。好ましい医薬組成物は食塩液希釈剤を含む。

【0022】

典型的には、ワクチンは注射用または水中デリバリー用に液体溶液または懸濁液として調製される。液体ビヒクル中に溶解乃至懸濁させるかまたは投与前に固体食物と混合するのに適した固体（例えば、粉末）形態で調製してもよい。

10

【0023】

好ましくは、ワクチンは凍結乾燥培養物である。この形態のワクチンは無菌免疫希釈剤を用いて再構成するのに適している。例えば、凍結乾燥細胞は0.9% 食塩液（場合により包装ワクチン製品の一部として準備されている）中で再構成され得る。本発明の医薬ワクチン組成物は即時放出または遅延放出させる形態で投与され得る。

【0024】

1態様で、本発明のアースロバクターワクチンは免疫賦活剤を含む。この免疫賦活剤は任意の公知の免疫賦活剤であり得るが、死滅細菌性調製物が好ましい。好ましくは、免疫賦活剤は死滅アースロバクター細胞材料であるが、この材料は場合により熱死滅されていても、または場合によりアースロバクターATCC 59921の培養物に由来していてもよい。死滅細菌性調製物の好適な例には、“Peptimune”（熱死滅させたアースロバクターATCC 59921培養物）及び“Ultracorn”（超音波処理したコリネバクテリウム・クティス（*Corynebacterium cutis*）溶解物）が含まれる。（ワクチン1回投与あたりの）死滅細菌性免疫賦活剤の最適用量は1～100μg、好ましくは5～50μg、より好ましくは10～20μg、最適には約12μgの細胞材料である。死滅細菌性免疫賦活剤は、場合により凍結乾燥した生アースロバクター細胞と混合するために無菌希釈剤（例えば、食塩液）中に溶解または懸濁される。

20

【0025】

本発明は、1態様で生アースロバクター細胞を含み、更に少なくとも1つの他の免疫原（ここで、“免疫原”は魚において特異的免疫応答を生じさせ得る抗原のような分子として定義される）を含むワクチン組成物を提供する。前記免疫原は、任意にピシリケッチア・サルモニス（*Pischirckettsia salmonis*、*P. salmonis*と略す）から作製した不活化抗原、組換え*P. salmonis*抗原及び発現可能な*P. salmonis*抗原を有する核酸ベクターからなる群から選択される。場合により、SR Sを治療または予防するために、本発明のRenogen（商品名）ワクチンを慣用されているSR Sワクチン（*P. salmonis*バクテリン、組換え抗原ワクチンまたは核酸ワクチン）と別々に、逐次または同時に投与するためのキット中で両成分を組み合わせることが望ましいことがある。

30

40

【0026】

好ましい実施態様において、本発明は、生アースロバクター細胞、不活化*P. salmonis*抗原及び場合により免疫賦活剤として死滅アースロバクター細胞材料を含むワクチンに関する。*P. salmonis*抗原は任意の公知の不活化剤を用いて不活化することにより作製され得るが、ホルマリン不活化により作製することが好ましい。*P. salmonis*抗原は任意の細菌の単離物から作製され得る。場合により、ATCC VR-1361で寄託されている菌株LF-89または該菌株に由来する菌株が不活化抗原を作製するために使用される。

【0027】

*P. salmonis*抗原を不活化するための好適方法は、*P. salmonis*感染

50

CHSE-14細胞培養物から上清を収集し、ホルマリン（37%ホルムアルデヒド溶液）を0.125%（v/v）の最終濃度まで添加することによる。培養液／ホルマリン混合物を均質になるまで攪拌した後、一定攪拌しながら $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ で最低72時間保持する。収集した不活化材料を滅菌限外濾過により濃縮してもよい。抗原の $\text{OD}_{405/490}$ ／標準物質の $\text{OD}_{405/490}$ として表される酵素免疫アッセイ（EIA）比により規定されるP. salmonis抗原調製物の適当な最終濃度は 15 ± 0.2 単位である。

【0028】

1つのワクチン中にアースロバクター成分とP. salmonis成分を組み合わせると、SR Sに対する防御が生アースロバクター細胞ワクチンのみと比較して有意に強化される。実施例2に記載されていると同様のSR S攻撃誘発トライアルで、長期間にわたる（過去1400dd）2価ワクチンは1価生アースロバクターワクチンと比較してRPA（相対生残%）を20ポイント高める。

10

【0029】

好ましくは、上記ワクチンは、生アースロバクター細胞の凍結乾燥培養物を不活化P. salmonis抗原（及び場合により死滅細菌性免疫賦活剤）が溶解または懸濁している無菌希釈剤、例えば食塩液と一緒に含むキットの形態で作製され、販売される。例えば、上記したように作製したP. salmonis抗原は約10～約150ml/L、好ましくは約20～約100ml/L、最も好ましくは約75ml/Lの濃度で希釈剤と混合され得る。

【0030】

20

生アースロバクター細胞及びP. salmonis以外の病原菌由来の抗原を含む多価ワクチンを作製することも本発明の範囲内である。

【0031】

アースロバクター生細胞を含む本発明のワクチンはいずれもSR Sを防御するだけでなく、BK D感染から魚類を防御する。

【実施例】

【0032】

（実施例1）

P. salmonis抗原と抗アースロバクターポリクローナル抗体の交差反応性

CHSE-214細胞培養物から収集した3回洗浄済みP. salmonis細菌細胞（約25μg）をLaemmli緩衝液（100μl）と混合し、 95°C で3分間加熱した。サンプル（10μl）を9%アクリルアミドゲルに充填し、150ボルトで1時間電気泳動にかけて、タンパク質を分離した。このタンパク質を半乾燥トランスブロッター（BIO RAD）を用いて100%ニトロセルロース膜に移した。タンパク質の移動は20ボルトで50分間実施した。

30

【0033】

ブロットを1%カゼイントリスボレート食塩液（cTBS）（15ml）中で家兎抗アースロバクターポリクローナル抗体（20μl）と45分間インキュベートした。次いで、ブロットをヤギ抗家兎免疫グロブリンアルカリホスファターゼ（GAR-AP）（5μl）に更に曝し、展開した。ブロット上で数個のタンパク質が明示された。このことから、抗アースロバクタータンパク質抗体が特定のP. salmonisタンパク質に対して強い親和性を有していることが分かる。この結果は2Dウェスタンブロットでも確認された。

40

【0034】

本実験は特定のP. salmonisタンパク質とアースロバクタータンパク質が交差反応することを示している。このことから、アースロバクタータンパク質が免疫系をプライムして、P. salmonisビルレント細菌を認識し、この細菌に対して防御し得る抗体が産生され得ることが分かる。

【0035】

（実施例2）

50

アースロバクターワクチンのSR Sに対する防御

ギンザケ（治療群あたり110匹、平均体重10g）を12℃で一般的な操作手順に従って水槽水中に正常な養殖条件下で維持した。1週間の順化後、第1群、第2群及び第3群のそれぞれに対して食塩液希釈剤中で再構成した 10^5 、 10^6 及び 10^7 cfu／用量の凍結乾燥アースロバクター sp. nov 細胞（Renogen（商品名））0.1mlを腹腔内にワクチン接種した。第4群及び第5群は、食塩液希釈剤中に12.2µg及び50µg／用量の“Peptimmune”を添加する以外は第1群と同様に処置した。Peptimmuneは、液体培養物（MTSBブロス）中で $>1 \times E9$ の細胞密度まで増殖させた熱死滅アースロバクターの調製物であり、12及び50µg／投与を投与するようにタンパク質アッセイにより標準化されている。第6群及び第7群は、P. salmoni s バクテリアをワクチン接種したポジティブコントロールであった。前記バクテリアはP. salmoni s 型菌株LF-89を感染させたCHSE-14細胞培養物の上清から4℃において0.125%ホルマリンを用いて少なくとも72時間かけて作製した。U/F濃縮を用い、濃縮上清を8µg（タンパク質）／0.1ml用量を取り込むように使用した。バクテリアワクチンは1匹の魚あたり20µg（第6群）及び100µg（第7群）のUltracorn（フランス国のVirbac）を用いてデリバリーした。Ultracornは、超音波処理したコリネバクテリウム・クティス（Corynebacterium cutis）溶解物に基づく免疫賦活剤である。注射前に抗原を等容量の鉱油アジュバントで乳化した。ネガティブコントロール群（第8群）には食塩液を注射した。

10

20

【0036】

処置群〔（投与用量（0.1ml／魚），20ml）について表1に要約する。

【0037】

【表 1】

群	処置	抗原濃縮物 (ml)	Ultracorn (20mg/ml)	食塩液 (ml)	油アジゴバント (ml)
1	10^5 cfu Renogen ^(TM)	—	—	1 バイアル / 1000 ml	
2	10^6 cfu Renogen ^(TM)	—	—	1 バイアル / 1 ml (99 ml 食塩液)	
3	10^7 cfu Renogen ^(TM)	—	—	2 バイアル / 2 ml (18 ml 食塩液)	
4	$10^5 + 100$ ml (12.2 μ g / 投与の Peptimmune)			1 と同じ	
5	$10^5 + 400$ ml (50 μ g / 投与の Peptimmune)			1 と同じ	
6	P. salmonis バクテリン 20 μ g - 3x	3	0.2	6.8	10
7	P. salmonis バクテリン 100 μ g - 3x	3	1.0	5.8	10
8	食塩液			0.1	

【0038】

攻撃誘発方法：

ワクチン接種から 471 dd 及び 1441 dd に、2 重化群の魚類 (25 匹 / 処置) に
ビルレント P. salmonis を腹腔内注射して攻撃誘発した。ビルレント P. salmonis
は CHSE-14 細胞上で最低 2 ~ 3 週間培養した。少なくとも 50% CPE
に達する培養物の上清を腹腔内注射のために用いた。ビルレント P. salmonis
は 10^{-2} 以上の希釈度で 0.1 ml / 魚 (n = 25) の量を注射した。攻撃誘発した魚
は 12℃ で維持した。

【0039】

攻撃誘発 1 の終了前に、第 1 群、第 7 群及び第 8 群（この群では 8 匹の魚のみが生残した）の生残集団から 10 匹の魚を殺し、脾臓及び腎臓組織のサンプル 0.5 g を採取し、ホモジナイズし、組織培地（10 ml）に希釈した。集密 CHSE-214 細胞を含む 96 ウェルプレート上で TCID₅₀ を測定した。

【0040】

結果及び考察：

【0041】

【表 2】

表 1：安全性及び前攻撃誘発期間中 9～12℃に維持した 28 日の安全性試験中の死亡率					
群	処置	水槽	損失／処置 (匹)	総数 (匹)	死亡率 (%)
1	10 ⁵ ／投与 Renogen ^(TM)	11	0	110	0
2	10 ⁶ ／投与 Renogen ^(TM)	12	0	110	0
3	10 ⁷ ／投与 Renogen ^(TM)	13	7	110	6.3
4	10 ⁵ ／投与 Renogen ^(TM) +	14	1	110	0.9
5	12.2 μg Peptimune ^(TM) 10 ⁵ ／投与 Renogen ^(TM) +	15	4	110	3.6
6	50 μg Peptimune ^(TM) P.salmonis 20U／油	16	0	110	0
7	P.salmonis 100U／油	17	0	110	0
8	食塩液	18	0	110	0

【0042】

安全性の研究中、第 3 群の魚が 28 日の安全性期間の終わり近くに若干の損失（6.3 %）を被ったことが観察された。研究者は、細菌性えら病のために 3 日間ホルマリン処置した集団のすべての魚を処置した。第 5 群の死亡率（3.6 %）は最初の 3 日間 p v の間に記録された。このことは、希釈剤の 40 %として Peptimune の配合が多少毒性

10

20

30

40

50

であったことを示している。安全性期間中のロスから、生ワクチン株または付随的な細菌培養物のいずれに関してもポジティブプレートは培養されなかった。

【0043】

【表3】

表2：12℃でビルレントP. salmonisを腹腔内注射（TCID₅₀ 3×10². 9/魚）して攻撃誘発したとき
Atrabacter sp. nov細胞（第1群～第5群）、不活化SRSSワクチンまたは食塩液をワクチン接種して
から471ddのギンザケ（平均体重10g）の累積死亡率及び相対生存率

群	処置	水槽	損失／ 2水槽（匹）	総数	損失／処置	死亡率 （％）	RPS
1	10 ⁵ ／投与 Renogen ^(TM)	L1, L2	0／25, 1／25	50	1／50	2	97.6
2	10 ⁶ ／投与 Renogen ^(TM)	L3, L4	1／26, 0／24	50	1／50	2	97.6
3	10 ⁷ Renogen ^(TM)	L5, L6	2／25, 3／25	50	5／50	10	88.1
4	10 ⁵ ／投与 Renogen ^(TM) + 12.2μg Peptimune	L7, L8	0／25, 0／25	50	0／50	0	100
5	10 ⁵ ／投与 Renogen ^(TM) + 50μg Peptimune	L9, L10	0／25, 0／25	50	0／50	0	100
6	P. salmonis 20U／油	L11, L12	9／25, 12／25	50	21／50	42	50.0
7	P. salmonis 100U／油	L13, L14	7／25, 6／25	50	13／50	26	69.1
8	食塩液	L15, L16	19／25, 23／25	50	42／50	84	—

10

20

30

40

50

【0044】

ワクチン接種から471ddに、第1群の魚は32日間にわたり*P. salmonis*の直接感染から高い防御レベルの97.6%という相対生残率(RPS)を有していた。食塩液コントロール群の死亡率は84%であった。これは、それぞれ50%及び69%のRPS値を示した一般的な不活化ワクチンをワクチン接種した群(第6群及び第7群)で得られた防御よりも優れていた。

【0045】

第1群、第7群及び第8群における生残魚のTCID₅₀分析

感染から32日後471ddの攻撃誘発から生残した魚(n=7~10)の組織サンプルにおけるSRS感染レベル

10

【0046】

【表4】

群	処置	魚の% TCID ₅₀ > 10 ² /ml	平均TCID ₅₀
1	Renogen ^(TM)	20	104.5/ml
7	<i>P. salmonis</i> 100U/油	44	104.6/ml
8	食塩液	50	104.7/ml

20

30

40

【0047】

Renogen(商品名)群からサンプリングした魚のTCID₅₀は不活化ワクチン

50

群よりも低く、いずれの群も食塩液コントロールよりも低かった。これは、平均化したとき高力価群の寄与は低感染性用量を無効にするので明白な臨床的関連性はない。しかしながら、Renogen（商品名）群は、 10^{1-2} 未満のサンプルはSR Sに臨床的に感染されていないと見做されたように最低のポジティブ%（ $<20\%$ ）を有していた。これは、魚の50%がSR Sに対してポジティブであった食塩液コントロール群からの同一サンプルに勝り、有利には魚の44%がSR Sに対してポジティブであった不活化ワクチン群にも勝る。

【0048】

【表 5】

表3：12℃でビルレントP. salmonisを腹腔内注射（TCID₅₀ 3×10². 9/魚）して攻撃誘発したとき
 Athrobacter sp. nov細胞（第1群～第5群）、不活化SR5ワクチンまたは食塩液をワクチン接種して
 から1441ddのギンザケ（平均体重10g）の累積死亡率及び相対生存率

群	処置	水槽	損失/ 2水槽 (匹)	総数	損失/処置	死亡率 (%)	RPS
1	10 ⁵ /投与 Renogen ^(TM)	L1, L2	8/25, 3/25	50	11/50	22	69.4
2	10 ⁶ /投与 Renogen ^(TM)	L3, L4	2/24, 3/25	49	5/49	10.2	85.8
3	10 ⁷ /投与 Renogen ^(TM)	L5, L6	3/19, 2/19	38	5/38	13.2	81.7
4	10 ⁵ /投与 Renogen ^(TM) + 12.2μg Peptimune	L7, L8	4/25, 5/25	52	9/52	17.2	76.1
5	10 ⁵ /投与 Renogen ^(TM) + 50μg Peptimune	L9, L10	2/24, 5/24	48	7/48	14.6	79.7
7	P.salmonis 100U/油	L11, L12	10/23, 7/23	46	17/43	37	48.6
8	食塩液	L13, L14	20/25, 16/25	50	36/50	72	—

【0049】

表注：長期間有効性研究を意図した第6群のバックアップ用魚は、水槽（17）中の水

10

20

30

40

50

流の偶発的遮断により失われてしまった。

【0050】

1140ddの経過期間後、最初の試験期間（471dd）に観察された防御の期間応答を評価した。食塩液コントロール群で72%の死亡率が観察された第2攻撃誘発の結果から、防御レベルはRenogen（商品名）処置魚（69.4% RPS）で依然として高く、より高い用量は長期間防御を改善し得る（ 10^6 及び 10^7 cfu／投与はそれぞれ85.8及び81.7のRPSを有していた）。希釈剤に12及び50 µgの免疫賦活剤Peptimmuneを添加すると、各量で産生物の効率が改善された（それぞれ76.1及び79.7%）。一般的な基準ワクチン（第6群）の偶発的ロスは第7群のみに匹敵し得、この群は48.6%のRPSを有していた。

10

【0051】

結論：

Renogenは、ワクチン摂取後471dd及び1441ddにP. salmonisの直接攻撃誘発に対して十分な防御を与えた。このワクチンは一般的な油ワクチンによる防御よりも優れていた。本発明者らは、Renogen（商品名）群では、より少ない数の生残魚が臨床的にP. salmonisに感染することを立証できた。この研究から、アースロバクターsp. nov. 生ワクチンはP. salmonis感染に対して高度の防御を与えること及び防御効果が長期間であることが立証される。ワクチン中に死滅アースロバクター調製物を配合すると免疫促進効果が生じ、生残率が改善された。

フロントページの続き

前置審査

審査官 菊池 美香

(56)参考文献 国際公開第98／033884 (WO, A1)

An efficacious recombinant subunit vaccine against the salmonid rickettsial pathogen *Piscirickettsia salmonis*, Vaccine, 2001年, Vol.19, No.17-19, p.2337-44

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 39/02

A61K 39/39

A61P 31/04

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq