

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010 年 4 月 22 日(22.04.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/044451 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 39/00 (2006.01) A61P 33/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/067876
- (22) 国際出願日: 2009 年 10 月 16 日(16.10.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2008-267669 2008 年 10 月 16 日(16.10.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人愛媛大学(National University Corporation Ehime University) [JP/JP]; 〒7908577 愛媛県松山市道後樋又 10 番 13 号 Ehime (JP). 明治製菓株式会社(Meiji Seika Kaisha, Ltd.) [JP/JP]; 〒1048002 東京都中央区京橋二丁目 4 番 16 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 北村 真一 (KITAMURA Shinichi) [JP/JP]; 〒7908577 愛媛県松山市文京町 3 番 愛媛大学沿岸環境科学研究センター内 Ehime (JP). 宋 準榮(SONG Junyoung) [KR/JP]; 〒7908577 愛媛県松山市文京町 3 番 愛媛大学沿岸環境科学研究センター内 Ehime (JP).
- (74) 代理人: 森田 憲一, 外(MORITA Kenichi et al.); 〒1730004 東京都板橋区板橋二丁目 6 7 番 8 号 板橋中央ビル 5 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロシヤ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: VACCINE FOR TREATMENT/PREVENTION OF SCUTICOCILIATOSIS IN FISH

(54) 発明の名称: 魚類のスクーチカ症予防治療ワクチン

(57) Abstract: Disclosed is an effective prophylactic/therapeutic vaccine which can protect from scuticociliatosis, particularly can protect from the infection by *Philasterides dicentrarchi* that has a high mortality rate. The vaccine comprises (1) an inactivated product of a strain having the same serum type as that of *P. dicentrarchi* strain Iyo I, (2) an inactivated product of a strain having the same serum type as that of *P. dicentrarchi* strain Nakajima, and (3) an inactivated product of a strain having the same serum type as that of *P. dicentrarchi* strain Mie0301 as active ingredients.

(57) 要約: スクーチカ症、特に、斃死率の高い *Philasterides dicentrarchi* に対して、感染防御をもつ有効的な予防・治療のワクチンを提供する。前記ワクチンは、(1) *P. dicentrarchi* Iyo I 株と同じ血清型を示す株の不活化物、(2) *P. dicentrarchi* Nakajima 株と同じ血清型を示す株の不活化物、及び(3) *P. dicentrarchi* Mie0301 株と同じ血清型を示す株の不活化物を有効成分とする。



WO 2010/044451 A1

明 細 書

発明の名称： 魚類のスクーチカ症予防治療ワクチン

技術分野

[0001] 本発明は、スクーチカ症の予防又は治療に有効なワクチンに関するものである。

背景技術

[0002] 魚類寄生虫病の1つであるスクーチカ症は、日本では1990年に初めてヒラメで発症が認められている。我が国の2004年の養殖ヒラメ生産額は約93億円である。このうち約20%を占める愛媛県の魚病指導センターにおけるヒラメ魚病診断件数に占めるスクーチカ症の診断率は年間15～20%程度と高く、本症による死亡率は30～70%と推定されている。本症に対する治療・予防法は確立されておらず、本症の発生が原因でヒラメ養殖の廃業を余儀なくされる業者もあるなど、ヒラメ養殖業にとって重要な魚病となっているのが現状である。その後、日本国内だけではなく、韓国においてもヒラメの養殖場において発症例が確認されている。そのため、ヒラメの養殖現場において最も開発が望まれている感染症である。これまで本症の原因となるスクーチカ虫は、*Urone ma marinum*であると報告されていたが、その後、スクーチカ症のヒラメから様々な種類のスクーチカ虫が分離されている。

[0003] 近年、本発明者のグループが形態学的・遺伝子的同定を行った結果、*Phila sterides dicentrarchi*（本学名は*Miamiensis avidus*とシノニムである）が本症の主原因であることを明らかにした（非特許文献1）。さらには、本発明者のグループは、*P. dicentrarchi*を用いた実験感染により、ヒラメに対する本虫の高い病原性を確認している（非特許文献2）。

[0004] この*P. dicentrarchi*を含むスクーチカ虫を駆除するために、種々の治療方法が試験されている。例えば、ホルマリンなどによる浸漬による殺虫効果（非特許文献3）を確認したり、過酸化水素を含む薬浴による治療方法による効果（特許文献1）を確認したりしているが、*P. dicentrarchi*の場合は内部

寄生性で宿主魚類の脳内にまで侵入するために、十分な効果が得られているとは言えない。

そのような状況の中で本虫のホルマリン不活化ワクチンがスクーチカ症に有効であること（特許文献2、非特許文献4および5）や特定の金属を欠如させた淡水浴による予防・治療方法が報告されている（特許文献3）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特許第3882939号明細書

特許文献2：国際公開第WO2008/084125号公報

特許文献3：特開2006-306834号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：平成16年度日本魚病学会大会講演要旨集、65頁、2004年

非特許文献2：Diseases of Aquatic Organisms、73巻、227～234頁、2007年

非特許文献3：愛媛県水産試験場研究報告、第6号、65～70頁、1997年

非特許文献4：平成17年度日本魚病学会大会講演要旨集、A-29、37頁、2005年

非特許文献5：Journal of Fish Pathology, (韓国), 19巻、2号、173～181頁、2006年

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] しかしながら、スクーチカ症に有効であるといわれる従来のワクチンであっても、その効果は十分なものであるとは言えず、更なる有効性の高いワクチンの開発が望まれている。特に、本発明者のグループは、本発明において、*P. dicentrarchi*に3つの血清型が存在し、単一のワクチンでは、その他の

血清型の本虫の感染を予防できないことを明らかにした。そこで、本発明は、スクーチカ症、特に、斃死率の高い*P. dicentrarchi*の感染に対して、有効的に予防・治療可能なワクチンを提供することを目的とするものである。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは鋭意研究を進めた結果、3種類の異なる血清型の本虫によって得られるワクチンを組合せてなる本発明の混合ワクチンが、*P. dicentrarchi*に対する有効性を飛躍的に向上させるものであり、単一のワクチンでは予防できない本虫の感染に対しても、有効な予防・治療を発揮することを見出し、本発明の混合ワクチンを完成させたものである。

[0009] 本発明は、

[1] (1) フィラステリデス・ディセントラーチ (*Philasterides dicentrarchi*) Iyo 1株と同じ血清型を示す株の不活化物、(2) フィラステリデス・ディセントラーチ Nakajima株と同じ血清型を示す株の不活化物、及び(3) フィラステリデス・ディセントラーチ Mie0301株と同じ血清型を示す株の不活化物を有効成分とする、スクーチカ症の予防又は治療用の混合ワクチン；

[2] フィラステリデス・ディセントラーチ Iyo 1株と同じ血清型を示す株が、Iyo 1株、JF05To株、RF05To株、及びSK05Kyo株からなる群から選んだ株である、[1]に記載の混合ワクチン；

[3] [1] 又は [2] に記載の混合ワクチンを、スクーチカ症の予防又は治療の必要な対象に、有効量で投与することを含む、スクーチカ症の予防又は治療方法；

[4] (1) フィラステリデス・ディセントラーチ Iyo 1株と同じ血清型を示す株、(2) フィラステリデス・ディセントラーチ Nakajima株と同じ血清型を示す株、及び(3) フィラステリデス・ディセントラーチ Mie0301株と同じ血清型を示す株の、スクーチカ症の予防又は治療用の混合ワクチンの製造における使用；

[5] (1) フィラステリデス・ディセントラーチ Iyo 1株と同じ血清型を

示す株、（２）フィラステリデス・ディセントラーチ Nakajima株と同じ血清型を示す株、及び（３）フィラステリデス・ディセントラーチ Mie0301株と同じ血清型を示す株を、それぞれ単独で、あるいは、２つ以上を組合せて、不活化する工程、並びに、

得られた不活化物を混合する工程

を含むことを特徴とする、〔１〕又は〔２〕に記載の混合ワクチンの製造方法

に関する。

発明の効果

[0010] 本発明は、斃死率の高い*P. dicentrarchi*の感染を含むスクーチ力症の予防・治療に対する有効性の高いワクチンである。より詳細には、本発明によれば、食品を前提に飼育されている養殖魚類に投与しても問題のない安全な魚類用ワクチンを提供できる。本発明の不活化ワクチンは、その抗原を得る過程において*P. dicentrarchi*が容易に量産できること、及び不活化方法も単純であることから簡便かつ低コストの工程で製造することができる。さらに、製造されたワクチンは、*P. dicentrarchi*に起因するスクーチ力症に対する感染防御能力を誘導することができる。したがって、養殖産業とその関連産業における生産性と品質向上、および養殖における環境衛生の改善に多大に寄与できる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1] Iyo 1株（レーン１）、JF05To株（レーン２）、RF05To株（レーン３）、SK05Kyo株（レーン４）、Nakajima株（レーン５）、Mie0301株（レーン６）および抗Iyo 1株、SK05Kyo株、Nakajima株、Mie0301株血清を用いたウェスタンブロッティングの結果を示した図である。図のA、B、C、Dはそれぞれ抗Iyo 1株、SK05Kyo株、Nakajima株、Mie0301株血清の反応プロファイルである。なお、図１の最左側のレーンは分子量マーカを表す。

[図2] ３種混合ワクチンを接種したヒラメへのIyo 1株（ 4.03×10^4 cells/fish）による攻撃試験の経日的累積死亡率変化を示したグラフである。■は３種混

合ワクチン接種区を示し、◆はMEM対照区を示している。

[図3] 3種混合ワクチンを接種したヒラメへのNakajima株 (4.03×10^4 cells/fish) による攻撃試験の経日的累積死亡率変化を示したグラフである。■は3種混合ワクチン接種区を示し、◆はMEM対照区を示している。

[図4] 3種混合ワクチンを接種したヒラメへのMie0301株 (4.03×10^5 cells/fish) による攻撃試験の経日的累積死亡率変化を示したグラフである。■は3種混合ワクチン接種区を示し、◆はMEM対照区を示している。

[図5] Iyo I、Nakajima及びMie0301の各単一ワクチンを接種したヒラメへのIyo I株 (6.12×10^5 cells/fish) による攻撃試験の経日的累積死亡率変化を示したグラフである。●、■、▲、○は、Iyo I株、Nakajima株、Mie株、MEM対照区を示している。

[図6] Iyo I、Nakajima及びMie0301の各単一ワクチンを接種したヒラメへのNakajima株 (6.12×10^5 cells/fish) による攻撃試験の経日的累積死亡率変化を示したグラフである。●、■、▲、○は、Iyo I株、Nakajima株、Mie株、MEM対照区を示している。

[図7] Iyo I、Nakajima及びMie0301の各単一ワクチンを接種したヒラメへのMie株 (6.12×10^5 cells/fish) による攻撃試験の経日的累積死亡率変化を示したグラフである。●、■、▲、○は、Iyo I株、Nakajima株、Mie株、MEM対照区を示している。

[図8] 3種混合ワクチンを接種したヒラメへのIyo I株 (3.06×10^5 cells/fish) による攻撃試験の経日的累積死亡率変化を示したグラフである。●は3種混合ワクチン接種区を示し、■はMEM対照区を示している。

発明を実施するための形態

- [0012] 本発明に使用される各株の不活化物、すなわち、不活化ワクチンは、常法に従って調製することができ、例えば、次のように調製することができる。P. dicentrarchi (以下、本虫という。)に魚類株化細胞CHSE-214 (ATCC No. CRL-1681; 北海道大学大学院水産科学研究院海洋応用生命科学部門 吉水永守教授より分与) を摂食させ、20℃で5日間静置培養する。魚類

株化細胞CHSE-214は、CHSE-214細胞用培地〔10%牛胎児血清を処方したイーグルMEM (Minimum Essential Medium) 培地（日水製薬製：製品コード05900）を炭酸水素ナトリウムでpH7.3に調整したもの〕を用いて20℃で単層になるまで培養する。このように培養した本虫を遠心分離により集め、不活化剤、例えば、ホルマリン、グルタルアルデヒド、 β -プロピオラクトンなどを加えて不活化する。たとえば、ホルマリンの例では、35%ホルマリン液を終濃度が0.3%となるように加え、4℃の温度下で一晩不活化する。ただし、不活化により、抗原性が損なわれる場合は不活化条件を緩和する。たとえば、不活化剤の減量、pH緩衝剤の添加、不活化温度を低下する等が挙げられる。

[0013] ここで使用する原虫としては、(1) *Philasterides dicentrarchi* Iyo I株と同じ血清型を示す株、(2) Nakajima株と同じ血清型を示す株、及び(3) Mie0301株と同じ血清型を示す株、すなわち、互いに異なる血清型を示す3種類の株を使用する。Iyo I株と同じ血清型を示す株としては、例えば、JF05To株、RF05To株、SK05Kyo株を使用することができる。

これらの株は、本発明者のグループが単離・同定したものであり、その詳細を表1に示す。

[0014] [表1]

分離株	起源	産地	分離した年	GenBank Accession No.
Iyo I	ヒラメ／脳	愛媛県	2006	EU831227
Nakajima	ヒラメ／脳	愛媛県	2006	EU831226
JF05To	ヒラメ／脳	鳥取県	2005	EU831231
Mie0301	ヒラメ／脳	三重県	2003	EU831233
RF05To	メイタガレイ／脳	鳥取県	2005	EU831230
SK05Kyo	イシガキダイ	京都府	2005	EU831232

[0015] Iyo I型（セロタイプI型）では、抗Iyo I株ウサギ抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った時（図1A及び図1B）、30kDaに強く反応するタンパク質が検出される（レーン1～4）。一方、抗Nakajima株ウサギ抗体（

図 1 C) および抗Mie0301株ウサギ抗体 (図 1 D) では、このようなタンパク質が検出されない。

Nakajima型 (セロタイプII型) では、抗Nakajima株ウサギ抗体および抗Mie0301株ウサギ抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った時 (図 1 C 及び図 1 D)、38kDaに強く反応するタンパク質が検出される (レーン5)。

Mie0301型 (セロタイプIII型) では、抗Nakajima株ウサギ抗体および抗Mie0301株ウサギ抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った時 (図 1 C 及び図 1 D)、34kDaに強く反応するタンパク質が検出される (レーン6)。

[0016] 本発明で用いる本虫の形態学的特徴は、約 $30 \times 400 \mu\text{m}$ の楕円形で、繊毛を有する。他の繊毛虫と異なり、組織食性であり、細菌類だけではなく、動物細胞 (例: 魚類株化細胞) を摂食する。また、本虫は分類学上、アンキスツルム目 (Scuticociliatida)、フィラスタ亜目 (Philasterina)、フィラスター科 (Philasteridae) に分類される。

本発明で用いる本虫の継代培養は、 20°C の保存下で一ヶ月に一度、フレッシュな細胞に継代する。少なくとも数日に一度、顕微鏡下で本虫を観察し、虫体が小さくなってきた場合には、一ヶ月以内でも継代を行う。前記継代による病原性変化は5年間安定であることを確認している。また、継代による抗原性の変化も認められていない。

[0017] 本発明の3種混合ワクチンとは、上記血清型の異なる3種類の不活化ワクチン (好ましくはホルマリン不活化ワクチン) を組み合わせたものである。その組合せの比率は特に限定されるものではないが、例えば、最も少量の単一ワクチンに対して、細胞数に関して1~5倍、好ましくは1~3倍の量で、各単一ワクチンを使用することができ、特に好ましくは、各々単一ワクチンが1:1:1の比率で混合されたものがよい。

本発明の混合ワクチンの濃度としては、特に限定する必要はない。使用場面に応じて適宜濃度を調整して使用することができる。特に、各ワクチンの合計量として、 10^5 cells/fish 以上であれば、十分な有効性が得られる。

[0018] なお、出願人は、*Philasterides dicentrarchi* のIyo I株、Nakajima株、Mi

e0301株の各株を平成20年7月24日付で、*Philasterides dicentrarchi*のJF05To株、RF05To株、SK05Kyo株の各株を平成20年10月7日付で、特許庁長官の指定する寄託機関である独立行政法人産業技術総合研究所の特許生物寄託センターへ寄託申請を行ったところ、平成20年8月1日付並びに平成20年10月16日付で受託できないとして寄託受託証不交付通知を受けた。よって、本発明で用いられる原虫は自己寄託として取扱い、特許法施行規則第27条の3の分譲については出願人が保証するものとする。

[0019] 本発明の混合ワクチンを適応することができる魚種としては、スクーチカ症が発症する可能性のある魚種である限り特に限定されるものではないが、ヒラメ、ターボット、マダイ、イシダイ、イシガキダイ、メイタガレイなどが挙げられる。また、いずれの魚種についても、感染の可能性がある任意の年齢または任意のサイズの魚類に使用できる。使用法は、たとえば、経口投与、筋肉内投与、皮下投与、腹腔内投与、浸漬処理などの方法が挙げられる。その中でも、腹腔内投与は少ない抗原量で十分な免疫を誘導することができる。

本発明の混合ワクチンによって有効な予防・治療ができる原虫としては、*Philasterides dicentrarchi* Iyo I株、Nakajima株、Mie0301株、JF05To株、RF05To株、SK05Kyo株などが挙げられる。

実施例

[0020] 以下、実施例に基づいて、更に本発明を具体的に説明するが、本発明を限定するものではない。

[0021] 参考例 1

異なる魚種、異なる地域で分離された*Philasterides dicentrarchi*の抗原性を比較するために、非動化アッセイおよびウエスタンブロッティングを行った。

(1) 非動化アッセイ

*Philasterides dicentrarchi*のIyo I、Nakajima、Mie0301、SK05Kyoの各分離株を選択し、家兎血清を作製した。供試株には、Iyo I株、Nakajima株、Mi

e0301株、JF05To株、RF05To株、SK05Kyo株を用いた。非動化アッセイには、上記の抗血清を20、40、80、160、320、640、1280および2560倍に希釈したものを、*Philasterides dicentrarchi*のそれぞれの株（約100虫体）と感作し、顕微鏡下で凝集および非動化を観察し、非動化力価を求めた。

[0022] その結果を表2に示した。抗Iyo I株血清（抗体）は、Iyo I株、JF05To株、RF05To株、SK05Kyo株に対して、それぞれ80倍以上の凝集抗体価を示した。しかし、Nakajima株およびMie0301株においては20倍以下であった。一方、抗Nakajima株血清（抗体）は、Nakajima株に対しては1280倍の凝集抗体価を示したものの、残りの5株に対しては、20倍以下であった。抗Mie0301株血清（抗体）においても抗Nakajima株血清（抗体）の結果と同様に、ホモの系であるMie0301株のみで高い非動化が認められた。

[0023] [表2]

分離株	家兎血清			
	Iyo I	SK05Kyo	Nakajima	Mie0301
Iyo I	640	80	<20	<20
JF05To	320	20	<20	<20
RF05To	320	40	<20	<20
SK05Kyo	80	40	<20	<20
Nakajima	20	20	1280	<20
Mie0301	<20	<20	<20	320

[0024] (2) ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングは定法により以下の方法で行った。抗血清および株は上記の非動化アッセイと同様のものを用いた。

本虫を、イーグルMEM培地「ニッスイ」（日水製薬株式会社製）に10%牛胎児血清（FBS）を配合し、7.5%の炭酸水素ナトリウム水でpH 7.3に調整した培地で単層に培養した魚類株化細胞CHSE-214細胞上で、5日間培養した。

本虫を培養後、遠心分離（500×g、20℃、5分）にて本虫を回収し

、FBSを含まないイーグルMEM培地で洗浄後、Tris-EDTA緩衝液に懸濁させた。懸濁液に同量の10%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を含むSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）サンプルバッファーを混合し、ヒートブロック上で100℃、3分加熱した。その懸濁液からSDS-PAGEによりゲル上でタンパク質を分離した。このゲルを25%メタノール-10%酢酸含有のクマシーブリリアントブルー（和光純薬製）で染色した。

[0025] その後、SDS-PAGE上で分離したタンパク質をポリフッ化ビニリデン（PVDF）膜に転写し、その膜を10%のスkimミルク含有TBS-Tで2時間ブロッキングし、TBS-Tで洗浄した。

次に、ブロッキングした膜を一次抗体として抗血清とともに1時間反応させ、TBS-T（Tris-Buffered Saline-Tween）で洗浄した。さらに、二次抗体として、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgGを用いて1時間反応させた。その膜をTBS-Tで洗浄し、HRP（horseradish peroxidase）Conjugate substrateキット（バイオ・ラッド・ラボラトリーズ社製）でバンドを可視化した。

[0026] その結果は、非動化アッセイを支持する結果となった（図1）。すなわち、Iyo株（図1のレーン1）、JF05To株（レーン2）、RF05To株（レーン3）、SK05Kyo株（レーン4）の30kDaのタンパク質が、抗Iyo株血清（図1A）および抗SK05Kyo株血清（図1B）の各抗体において、強い反応性を示した。しかし、Nakajima株（レーン5）およびMie0301株（レーン6）ではこのバンドは認められなかった。また、抗SK05Kyo抗体（B）では、Mie0301株において34kDaに強い反応が認められた。

一方、抗Nakajima株血清（図1C）および抗Mie0301株血清（図1D）を用いた場合には、Nakajima株、Mie0301株でそれぞれ38kDa、34kDaで強いバンドを示した。

[0027] これらの非動化アッセイおよびウエスタンブロッティングの結果から、*Phyllosteryx dicentrarchi*は少なくとも3つのセロタイプが存在することが明

らかになった（serotype I；Iyo I、JF05To株、RF05To株、SK05Kyo株、serotype II；Nakajima株、serotype III；Mie0301株）。

[0028] 実施例 1：3 種混合ワクチンの有効性試験

（1）ワクチンの作製

（a）供試魚

ヒラメの稚魚 200 匹を、おとひめヒラメ用海産種苗用飼料（日清丸紅飼料社製）を用いて 2 週間給餌して、平均体重 10.3 g になるまで予備飼育したものを使用した。

[0029] （b）本虫の培養

本虫は、イーグル MEM 培地「ニッスイ」（日水製薬株式会社製）に 10 % 牛胎児血清を配合し、7.5 % の炭酸水素ナトリウム水で pH 7.3 に調整した培地で単層に培養した魚類株化細胞 CHSE-214 細胞上で、5 日間培養した。

[0030] （c）ホルマリン不活化ワクチンの調製

上記培養した本虫（Iyo I 株、Nakajima 株及び Mie0301 株） $1.65 \times 10^6 \sim 9.85 \times 10^6$ cells を、終濃度が 0.3 % となるように 35 % ホルマリン（ナカライテスク製）を加え、4 °C で一昼夜不活化させて、3 種類のホルマリン不活化ワクチンを調製した。そして、上記の 3 種類のワクチンを同一比率で加えて混合ワクチンを調製した。

[0031] （2）ワクチン接種

上記（1）で作製したホルマリン不活化ワクチンをヒラメ（平均体重 10.3 g）に 6.76×10^5 cells / fish の濃度となるように、100 μ L を腹腔内接種した。そして、2 週間後、追加免疫として 9.85×10^5 cells / fish の濃度で免疫を行った。

また、対照として細胞培養で用いた MEM 培地そのものを 100 μ L 腹腔内に接種した。

[0032] （3）安全性試験

ワクチン接種後、供試魚を 10 L の水槽に收容し、流水を行いながら、2

ヶ月間飼育観察を行い、安全性を確認した。飼育期間中は前記と同様に給餌した。

[0033] (4) 攻撃試験（有効性の判定）

最終免疫して4日目に、混合ワクチンで免疫したヒラメ（ワクチン接種区）および免疫を行わなかったヒラメ（対照区）を、それぞれ4つの区に分け、各区15匹で試験を行った。Iyo 1株、Nakajima株及びMie0301株の各株により感染させた。また、比較するため、ワクチン接種区および対照区に本虫を感染させない区を入れた。Iyo 1株およびNakajima株では、 4.03×10^4 cells/fishで100 μ Lとなるように腹腔内接種した。また、Mie0301株では、予備試験の結果から他の2株よりも病原性が低いことが明らかにされたことから 4.03×10^5 cells/fishで同様に腹腔内接種した。

ワクチンの有効性は（1－ワクチン接種区の死亡率／対照区の死亡率） $\times$ 100%の式により、有効率として求めた。

[0034] (5) 試験結果

結果（経日的累積死亡率の変化）を図2（Iyo 1株による攻撃）、図3（Nakajima株による攻撃）、図4（Mie0301株による攻撃）に示す。

3種混合ワクチンを接種したヒラメは各原虫の攻撃（Iyo 1株、Nakajima株及びMie0301株）に対し、14日間の攻撃日数での有効率はそれぞれ75%、73.3%及び92.9%とともに良好な免疫効果を示した。Iyo 1株及びNakajima株では5%以下の危険率で有意差が認められた。Mie0301株では1%以下の危険率で有意差が認められた。

[0035] 比較例1：単一ワクチンの有効性試験

(1) ワクチンの作製

供試魚および本虫の培養は実施例と同様の方法で行った。ホルマリン不活化ワクチンの調製は上記培養した本虫（Iyo 1株、Nakajima株及びMie0301株） $1.65 \times 10^6 \sim 9.85 \times 10^6$ cellsを、終濃度が0.3%となるように35%ホルマリン（ナカライテスク製）を加え、4℃で一昼夜不活化させて、3種類のホルマリン不活化ワクチンを調製した。

[0036] (2) ワクチン接種

上記(1)で作製した3種のホルマリン不活化ワクチンをヒラメ(平均体重10.05g)に $1.65 \times 10^5 \text{ cells/fish}$ の濃度となるように、100 μL を腹腔内接種した。そして、2週間後、追加免疫として $3 \times 10^5 \text{ cells/fish}$ の濃度で免疫を行った。

また、対照として細胞培養で用いたMEM培地そのものを100 μL 腹腔内に接種した。

[0037] (3) 安全性試験

ワクチン接種後、供試魚を10Lの水槽に収容し、流水を行いながら、2ヶ月間飼育観察を行い、安全性を確認した。飼育期間中は前記と同様に給餌した。

[0038] (4) 攻撃試験(有効性の判定)

最終免疫して4日目に、3種のホルマリン不活化ワクチンで各々免疫したヒラメ(ワクチン接種区)および免疫を行わなかったヒラメ(対照区)を、それぞれ4つに分け、16区とし、各区15匹で試験を行った。Iyo 1株、Nakajima株及びMie0301株の各株により感染させた。感染力価は、 $6.12 \times 10^5 \text{ cells/fish}$ で100 μL となるように腹腔内接種した。

ワクチンの有効性は(1-ワクチン接種区の死亡率/対照区の死亡率) $\times$ 100%の式により、有効率として求めた。

[0039] (5) 試験結果

結果(経日的累積死亡率の変化)を図5(Iyo 1株による攻撃)、図6(Nakajima株による攻撃)、図7(Mie0301株による攻撃)に示す。

Iyo 1株によるワクチンを接種したヒラメは各原虫の攻撃(Iyo 1株、Nakajima株及びMie0301株)に対し、13日間の攻撃日数での有効率はそれぞれ41.7%、0%及び0%であり、同じ血清型のものでも効果が低かった。Iyo 1株だけが対照区に対して、1%以下の危険率で有意差が認められた。

また、Nakajima株によるワクチンを接種したヒラメは各原虫の攻撃(Iyo 1株、Nakajima株及びMie0301株)に対し、13日間の攻撃日数での有効率は0

%、21.4%、及び0%であり、同様に同じ血清型のものでも効果が低かった。全ての株とも対照区に対して、有意差はなかった。

さらに、Mie0301株によるワクチンを接種したヒラメは各原虫の攻撃（Iyo 1株、Nakajima株及びMie0301株）に対し、13日間の攻撃日数での有効率はそれぞれ33.3%、25.0%及び33.3%であり、同じ血清型のものでも効果が低かった。Mie0301株及びIyo 1株だけが対照区に対して、5%以下の危険率で有意差が認められた。

[0040] 実施例2：高濃度一回免疫による3種混合ワクチンの有効性試験

(1) ワクチンの作製

(a) 供試魚

ヒラメの稚魚160匹を、おとひめヒラメ用海産種苗用飼料（日清丸紅飼料社製）を用いて2週間給餌して、平均体重12.5gになるまで予備飼育したものを使用した。

[0041] (b) 本虫の培養

本虫は、イーグルMEM培地「ニッスイ」（日水製薬株式会社製）に10%牛胎児血清を配合し、7.5%の炭酸水素ナトリウム水でpH7.3に調整した培地で単層に培養した魚類株化細胞CHSE-214細胞上で、5日間培養した。

[0042] (c) ホルマリン不活化ワクチンの調製

上記培養した本虫（Iyo 1株、Nakajima株及びMie030株） $4.30 \times 10^6 \sim 8.85 \times 10^6$ cellsを、終濃度が0.3%となるように35%ホルマリン（ナカライテスク製）を加え、4℃で一昼夜不活化させて、3種類のホルマリン不活化ワクチンを調製した。そして、上記の3種類のワクチンを同一比率で加えて混合ワクチンを調製した。

[0043] (2) ワクチン接種

上記(1)で作製した各種のホルマリン不活化ワクチンをヒラメに 2.15×10^6 cells/fishの濃度となるように、100 μ Lを腹腔内接種した。また、対照として細胞培養で用いたMEM培地そのものを100 μ L腹腔内

に接種した。

[0044] (3) 安全性試験

ワクチン接種後、供試魚を10Lの水槽に収容し、流水で、2ヶ月間飼育観察を行い、安全性を確認した。飼育期間中は前記と同様に給餌した。

[0045] (4) 攻撃試験（有効性の判定）

免疫して11日目に、混合ワクチンで免疫したヒラメ（ワクチン接種区）および免疫を行わなかったヒラメ（対照区）を、それぞれ2つの区に分け、各区30匹で試験を行った。3. 6×10^5 cells/fishでIyo 1株を腹腔内接種で感染させた。また、ワクチン接種区および対照区に本虫を感染させない区を入れた。

ワクチンの有効性は（1－ワクチン接種区の死亡率／対照区の死亡率）×100%の式により、有効率として求めた。

[0046] (5) 試験結果

結果（経日的累積死亡率の変化）を図8に示す。

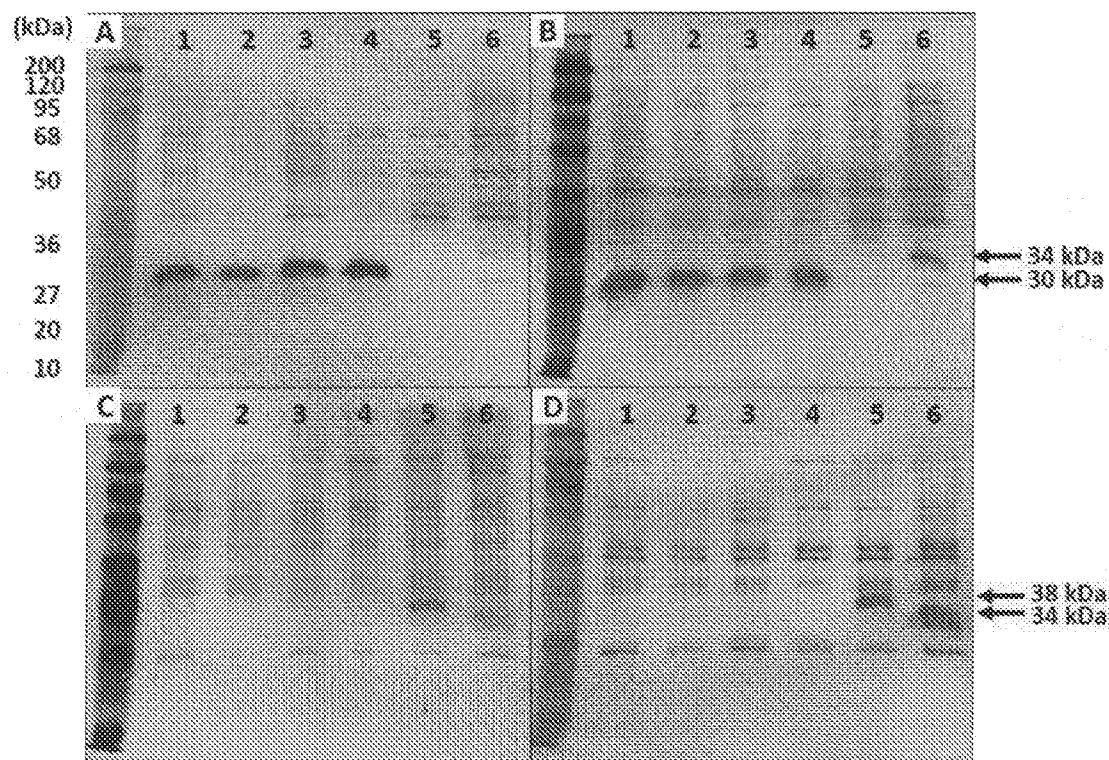
3種混合ワクチンを接種したヒラメはIyo 1株の攻撃に対し、14日間の攻撃日数での有効率はそれぞれ68.5%と良好な免疫効果を示し、5%以下の危険率で有意差が認められた。3種混合ワクチンおよび対照区の非感染区は、斃死が認められなかったため、図8から省略した。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

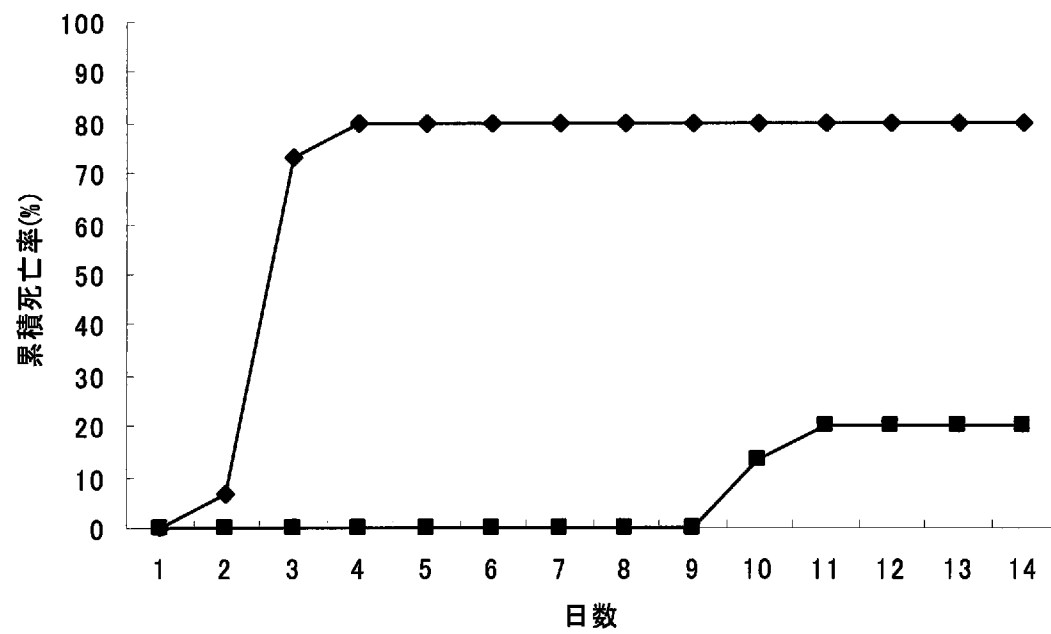
請求の範囲

- [請求項1] (1) フィラステリデス・ディセントラーチ (Philasterides denticulatus) Iyo 1株と同じ血清型を示す株の不活化物、(2) フィラステリデス・ディセントラーチ Nakajima株と同じ血清型を示す株の不活化物、及び(3) フィラステリデス・ディセントラーチ Mie0301株と同じ血清型を示す株の不活化物を有効成分とする、スクーチカ症の予防又は治療用の混合ワクチン。
- [請求項2] フィラステリデス・ディセントラーチ Iyo 1株と同じ血清型を示す株が、Iyo 1株、JF05To株、RF05To株、及びSK05Kyo株からなる群から選んだ株である、請求項1に記載の混合ワクチン。
- [請求項3] 請求項1又は2に記載の混合ワクチンを、スクーチカ症の予防又は治療の必要な対象に、有効量で投与することを含む、スクーチカ症の予防又は治療方法。
- [請求項4] (1) フィラステリデス・ディセントラーチ Iyo 1株と同じ血清型を示す株、(2) フィラステリデス・ディセントラーチ Nakajima株と同じ血清型を示す株、及び(3) フィラステリデス・ディセントラーチ Mie0301株と同じ血清型を示す株の、スクーチカ症の予防又は治療用の混合ワクチンの製造における使用。
- [請求項5] (1) フィラステリデス・ディセントラーチ Iyo 1株と同じ血清型を示す株、(2) フィラステリデス・ディセントラーチ Nakajima株と同じ血清型を示す株、及び(3) フィラステリデス・ディセントラーチ Mie0301株と同じ血清型を示す株を、それぞれ単独で、あるいは、2つ以上を組合せて、不活化する工程、並びに、得られた不活化物を混合する工程を含むことを特徴とする、請求項1又は2に記載の混合ワクチンの製造方法。

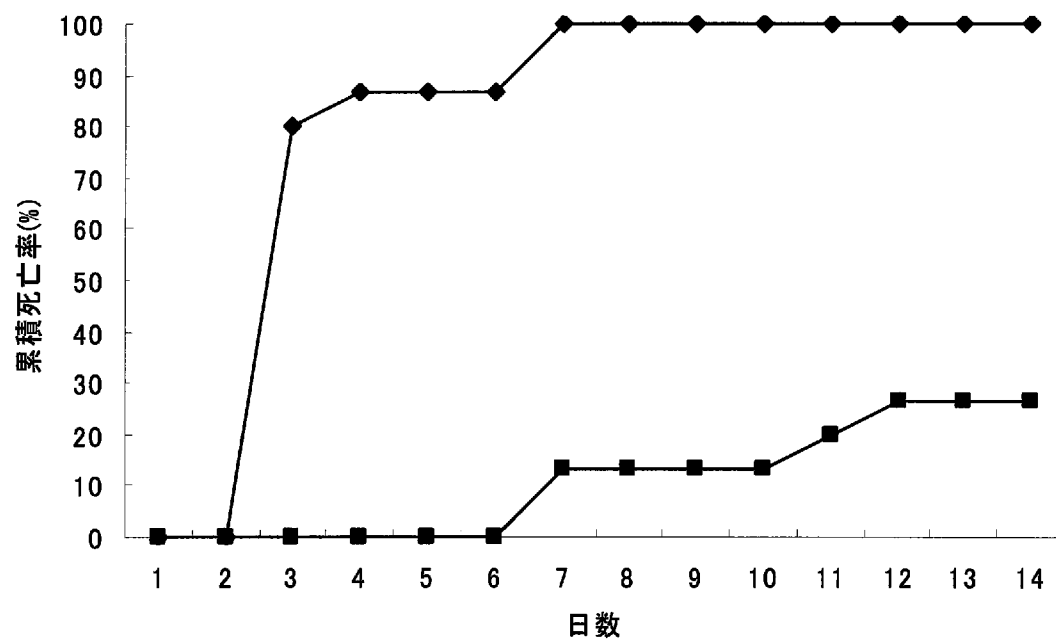
[図1]



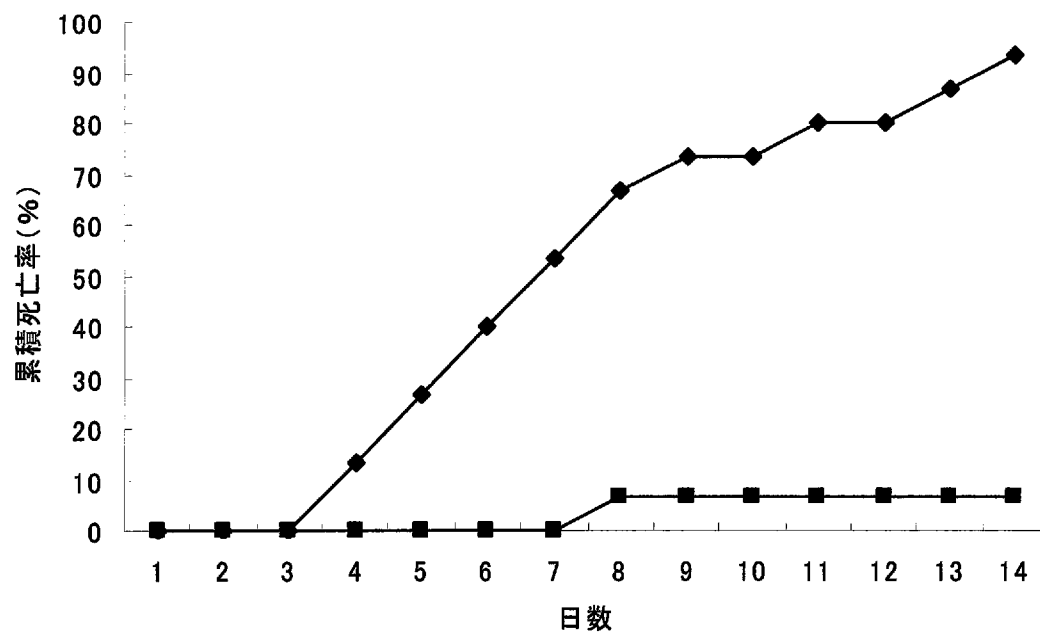
[図2]



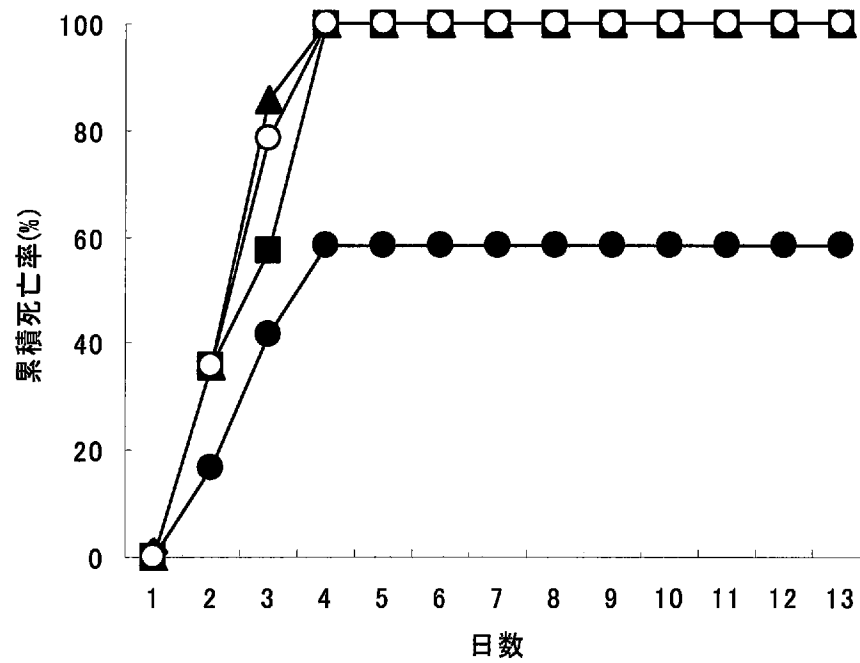
[図3]



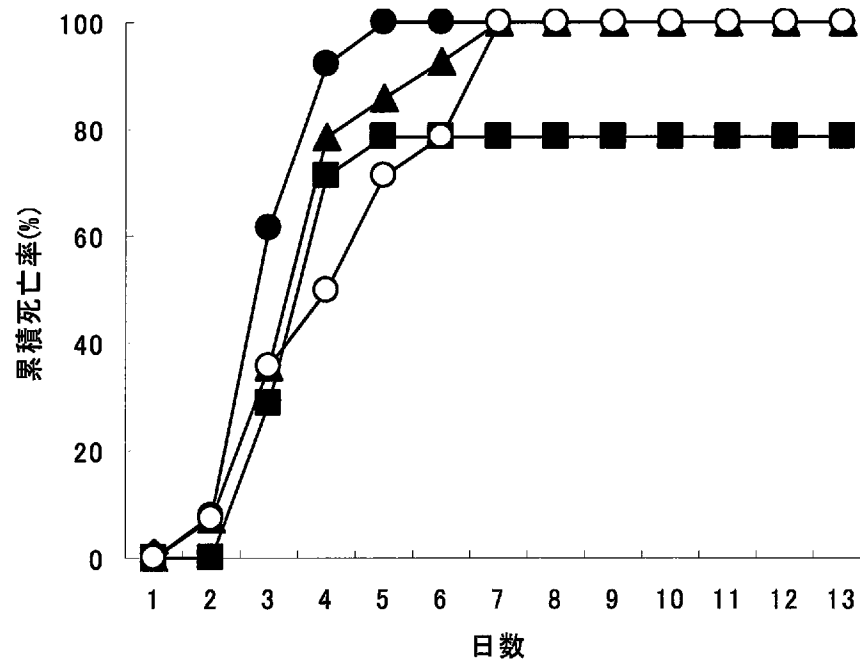
[図4]



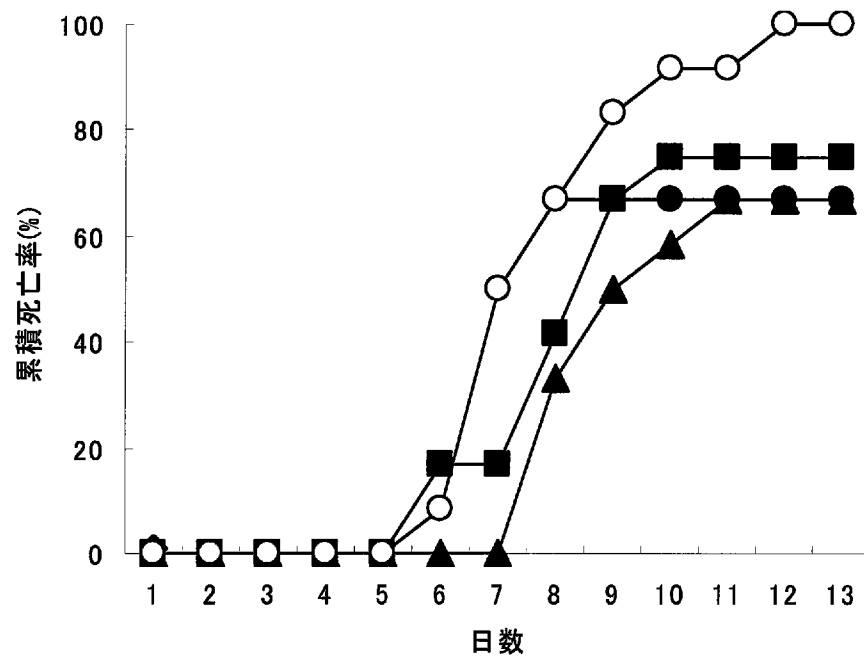
[図5]



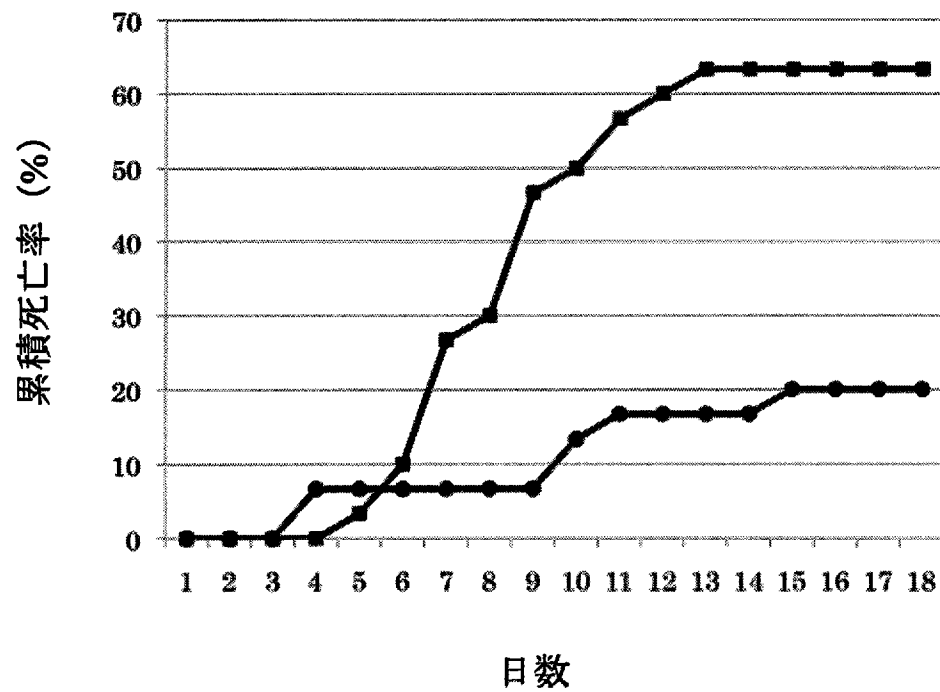
[図6]



[図7]



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/067876

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K39/00 (2006.01) i, A61P33/00 (2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K39/00, A61P33/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

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

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Lee, Eun Hye et.al., Immobilization antigen-independent protection of olive flounder (Paralichthys olivaceus) against Philasterides dicentrarchi (Ciliophora : Scuticociliatia) infection, Aquaculture, 2008.07, Vol. 279, No. 1-4, pp. 211-213	1, 2, 4, 5
A	Piazzon, C. et. al., Antigenic and cross-protection studies on two turbot scuticociliate isolates, Fish & Shellfish Immunology, 2008.06, Vol.25, No.4, pp.417-424	1, 2, 4, 5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 December, 2009 (14.12.09)

Date of mailing of the international search report
28 December, 2009 (28.12.09)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/067876

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Lee, Eun Hye et. al., Can the surface immobilization antigens of Philasterides dicentrarchi (Ciliophora: Scuticociliatida) be used as target antigens to develop vaccines in cultured fish?, Fish & Shellfish Immunology, 2007.10, Vol.24, No.1, p.142-146	1, 2, 4, 5
P, A	Song J. Y. et. al., Antigenic differences of scuticociliate Miamiensis avidus isolated in Japan, Fifth International Symposium of The Japanese Society for Fish Pathology, 2008.10.18, Vol.2008, p.99	1, 2, 4, 5
T	Song J-Y et. al., Antigenic differences of the the scuticociliate Miamiensis avidus from Japan, Journal of fish diseases, 2009.12, Vol. 32, No. 12, pp. 1027-34	1, 2, 4, 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/067876

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☒ Claims Nos.: 3
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 3 includes the methods for treatment of the human body or animal body by surgery or therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

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

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Claims 1, 2, 4 and 5 relate to a vaccine comprising, as an active ingredient, *Philasterides dicentrarchi* which is defined by its serum type as follows: "an inactivated product of a strain having the same serum type as that of *Philasterides dicentrarchi* strain Iyo I"; "a strain having the same serum type as that of *Philasterides dicentrarchi* strain Nakajima"; or "a strain having the same serum type as that of *Philasterides dicentrarchi* strain Mie0301".

These claims include all types of *Philasterides dicentrarchi* having the above-mentioned serum types. However, only strain Iyo I, strain Nakajima and strain Mie0301 are supported by the description in the meaning within PCT Article 6 and disclosed in the meaning within PCT Article 5.

Further, with regard to strains having the same serum types as those of strain Iyo I, strain Nakajima and strain Mie0301, even though the common technical knowledge at the time of filing the present application is taken into consideration, it is impossible to specify the scope of the strains having those properties. Therefore, these claims do not comply with the requirement of clarity under PCT Article 6, either.

Such being the case, in this international search report, the inventions relating to *Philasterides dicentrarchi* strain Iyo I, strain Nakajima and strain Mie0301 were searched.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K39/00(2006.01)i, A61P33/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K39/00, A61P33/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 9 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 9 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 9 年

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

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)、JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	Lee, Eun Hye et.al., Immobilization antigen-independent protection of olive flounder(Paralichthys olivaceus) against Philasterides dicentrarchi(Ciliophora : Scuticociliatia) infection, Aquaculture, 2008.07, Vol. 279, No. 1-4, pp. 211-213	1, 2, 4, 5
A	Piazzon, C. et. al., Antigenic and cross-protection studies on two turbot scuticociliate isolates, Fish & Shellfish Immunology, 2008.06, Vol.25, No.4, pp.417-424	1, 2, 4, 5

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 4 . 1 2 . 2 0 0 9

国際調査報告の発送日

2 8 . 1 2 . 2 0 0 9

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 聖子

4 C

9 0 5 1

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	Lee, Eun Hye et. al., Can the surface immobilization antigens of <i>Philasterides dicentrarchi</i> (Ciliophora: Scuticociliatida) be used as target antigens to develop vaccines in cultured fish?, <i>Fish & Shellfish Immunology</i> , 2007.10, Vol.24, No.1, p.142-146	1, 2, 4, 5
PA	Song J. Y. et. al., Antigenic differences of scuticociliate <i>Miamiensis avidus</i> isolated in Japan, <i>Fifth International Symposium of The Japanese Society for Fish Pathology</i> , 2008.10.18, Vol.2008, p.99	1, 2, 4, 5
T	Song J-Y et. al., Antigenic differences of the scuticociliate <i>Miamiensis avidus</i> from Japan, <i>Journal of fish diseases</i> , 2009.12, Vol. 32, No. 12, pp. 1027-34	1, 2, 4, 5

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

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

1. ☒ 請求項 _____ 3 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項3は「手術又は治療による人体又は動物の体の処置方法」を包含するものである。

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

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

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

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

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

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

請求項 1、2、4 及び 5 は、「フィラステリデス・ディセントラーチ Iyo I 株と同じ血清型を示す株の不活性化物」、「フィラステリデス・ディセントラーチ Nakajima 株と同じ血清型を示す株」、「フィラステリデス・ディセントラーチ Mie0301 株と同じ血清型を示す株」なる、有する血清型により定義されたフィラステリデス・ディセントラーチを有効成分とするワクチンに係るものである。

これらの請求項は、そのような血清型を有する、あらゆるフィラステリデス・ディセントラーチを包含するものであるが、PCT 6 条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT 5 条の意味において開示されているのは、Iyo I 株、Nakajima 株、Mie0301 株にすぎない。

また、Iyo I 株、Nakajima 株、Mie0301 株と同じ血清型を示す株は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する株の範囲を特定できないから、これらの請求項は、PCT 6 条における明確性の要件も欠いている。

よって、本国際調査報告では、フィラステリデス・ディセントラーチ Iyo I 株、Nakajima 株、Mie0301 株に係る発明について調査を行った。