

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4623964号
(P4623964)

(45) 発行日 平成23年2月2日(2011.2.2)

(24) 登録日 平成22年11月12日(2010.11.12)

(51) Int.Cl.	F 1	
C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00
A 61 K 35/76	(2006.01)	A 61 K 35/76
C 12 N 5/10	(2006.01)	C 12 N 5/00
A 61 K 39/12	(2006.01)	A 61 K 39/12
A 61 P 31/20	(2006.01)	A 61 P 31/20

請求項の数 19 (全 55 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-550754 (P2003-550754)
(86) (22) 出願日	平成14年12月11日(2002.12.11)
(65) 公表番号	特表2005-511075 (P2005-511075A)
(43) 公表日	平成17年4月28日(2005.4.28)
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/039646
(87) 国際公開番号	W02003/049703
(87) 国際公開日	平成15年6月19日(2003.6.19)
審査請求日	平成17年12月8日(2005.12.8)
(31) 優先権主張番号	60/340,775
(32) 優先日	平成13年12月12日(2001.12.12)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	60/424,840
(32) 優先日	平成14年11月8日(2002.11.8)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者 501326584
バージニア テック インテレクチュアル
プロパティーズ インコーポレーテッド
アメリカ合衆国 24060 バージニア
州 ブラックスバーグ スイート 105
O クラフト ドライブ 2200

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】キメラ感染性DNAクローン、キメラブタサーコウイルスおよびそれらの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

感染性、非病原性PCV1をコードする核酸分子を含むことを特徴とするブタサーコウイルスの感染性キメラ核酸分子であって、

病原性PCV2の免疫原性オーブンリーディングフレーム(ORF)遺伝子を、PCV1核酸分子のORF遺伝子の代わりに含み、

免疫原性PCV2のORF遺伝子が、PCV1核酸分子における同じORF遺伝子位置で置換されており、

免疫原性ORF遺伝子がORF2キャプシド遺伝子であること
を特徴とするキメラ核酸分子。

【請求項2】

該キメラ核酸分子が配列番号2に記載の核酸配列、その相補鎖もしくは配列番号2の核酸配列と少なくとも95%の相同性を持つ核酸配列を含むことを特徴とする請求項1に記載のキメラ核酸分子。

【請求項3】

請求項2に記載のキメラ核酸分子を含むことを特徴とするプラスミドもしくはウイルスベクター。

【請求項4】

ATCCC特許寄託物番号PTA-3912を含むことを特徴とする請求項3に記載のプラスミド。

【請求項 5】

請求項 2 に記載のキメラ核酸分子を含むことを特徴とするベクターによってトランスフェクトされた適当なホスト細胞。

【請求項 6】

請求項 2 に記載のキメラ核酸分子を含む細胞によって產生されることを特徴とする無毒性、感染性キメラブタサーコウイルス。

【請求項 7】

キメラ核酸分子を含む前記細胞が、 A T C C 特許寄託物 P T A - 3 9 1 2 中に含まれる、あるいはそれから得られることを特徴とする請求項 6 に記載の感染性キメラブタサーコウイルス。

10

【請求項 8】

免疫原性ポリペプチド産物の產生のための方法であって、前記ポリペプチド産物の発現を許容する方法にて請求項 2 に記載の核酸分子でトランスフェクトされた原核もしくは真核ホスト細胞を、適当な栄養条件下で増殖させ、次いで、前記核酸分子の発現による所望のポリペプチド産物を単離することを含むことを特徴とする方法。

【請求項 9】

P C V 2 によって引き起こされるウイルス感染もしくは離乳後多臓器性発育不良症候群 (P M W S) からブタを予防するウイルスワクチンであって、非毒性で生理学的に許容される担体および免疫原性量の :

- (a) 配列番号 2 に記載の核酸配列、もしくはその相補鎖を含むキメラ核酸分子 ;
- (b) 該キメラ核酸分子、もしくはその相補鎖を含むプラスミドもしくはウイルスベクター ;
- (c) 請求項 1 に記載のキメラ核酸分子を含む無毒性、感染性のキメラブタサーコウイルス ;
- (d) A T C C 特許寄託物番号 P T A - 3 9 1 3 を含む感染性 P C V 2 分子 D N A クローンもしくはそれに由来する P C V 2 D N A クローン ; および
- (e) A T C C 特許寄託物番号 P T A - 3 9 1 3 を含む感染性 P C V 2 分子 D N A クローンもしくはそれに由来する P C V 2 D N A クローンを含むプラスミドもしくはウイルスベクター

からなる群から選択される成分を含むことを特徴とするウイルスワクチン。

30

【請求項 10】

前記のワクチンが生キメラブタサーコウイルスを含むことを特徴とする請求項 9 に記載のウイルスワクチン。

【請求項 11】

P C V 2 によって引き起こされるウイルス感染もしくは離乳後多臓器性発育不良症候群 (P M W S) からブタを防衛する方法であって、防衛を必要とするブタに免疫学的有効量の請求項 9 に記載のワクチンを投与することを含むことを特徴とする方法。

【請求項 12】

ブタに該キメラ核酸分子もしくは生キメラブタサーコウイルスを投与することを含むことを特徴とする請求項 1 1 に記載の方法。

40

【請求項 13】

ブタに該ワクチンを、非経口的に、鼻腔内に、皮内にもしくは経皮的に投与することを含むことを特徴とする請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 14】

ブタに該ワクチンをリンパ内もしくは筋内に投与することを含むことを特徴とする請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 15】

感染性、非病原性 P C V 1 をコードする核酸分子のオープンリーディングフレーム (O R F) 遺伝子を除去し；病原性 P C V 2 由来の免疫原性 O R F 遺伝子 O R F 2 で P C V 1 の O R F 遺伝子位置を置換し；次いでキメラ核酸分子を回収することを含むことを特徴と

50

する、請求項 1 に記載の P C V 2 の感染性キメラ核酸分子を調製する方法。

【請求項 1 6】

前記 P C V 2 の O R F 2 遺伝子が、 A T C C 特許寄託物番号 P T A - 3 9 1 3 を含む発現ベクターに含まれる P C V 2 の核酸分子より得られることを特徴とする、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

A T C C 特許寄託物番号 P T A - 3 9 1 3 を含むことを特徴とする P C V 2 分子 D N A クローン、もしくはそれを由来とする P C V 2 D N A クローン。

【請求項 1 8】

請求項 1 7 に記載の感染性 P C V 2 分子 D N A クローンを含むことを特徴とするプラスミドもしくはウイルスベクター。

10

【請求項 1 9】

P C V 2 核酸分子の O R F 2 遺伝子の代わりに非病原性 P C V 1 由来の免疫原性 O R F 2 遺伝子を含む、感染性、病原性 P C V 2 をコードする核酸分子を含むことを特徴とする P C V 2 - 1 の感染性交互キメラ核酸分子。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

(米国出願に関連した出願)

この本出願は、2001年12月12日出願の米国仮出願第 6 0 / 3 4 0 7 7 5 号についての 35 U.S.C. § 119(e) に基づく利益を主張する、2002年11月8日出願の米国仮出願第 6 0 / 4 2 4 8 4 0 号 35 U.S.C. § 119(e) に基づく利益を主張する。2つの先行出願は、参照により、全体として本明細書に組み込まれる。

20

【0 0 0 2】

(連邦委託研究および開発に関する記述)

適用不可。

【0 0 0 3】

(「配列表」の参照)

本出願において提供される配列表ファイルを含む1枚のコンパクトディスク上のデータは、参照として組み込まれる。作成日は 2003 年 _____ 日であり、そのサイズは約 _____ である。

30

【0 0 0 4】

(本発明の背景)

発明の分野

本発明は、ワクチンとして有用な感染性ブタサーコウイルス 1 型 (P C V 1) および 2 型 (P C V 2) D N A クローン、キメラ P C V 1 - 2 感染性 D N A クローンおよび該 D N A クローン由来の生キメラウイルスに関する。

【0 0 0 5】

関連技術の記載

本明細書において引用された全ての特許および出版物は、全体として参照のため本明細書に組み込まれる。

40

【0 0 0 6】

ブタサーコウイルス (P C V) は、もともと、ブタ腎臓細胞株 P K - 1 5 細胞培養汚染物として単離された (I. Tischer et al., "A very small porcine virus with circular single-stranded DNA," Nature 295:64-66 (1982); I. Tischer et al., "Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines," Zentralbl. Bakteriol. Hyg. Otg. A. 226(2):153-167 (1974))。 P C V は、約 1.76 k b の一本鎖環状 D N A ゲノムを含む小型正二十面体の非エンベロープウイルスである。 P C V は、他の 3 種の動物サーコウイルス (ニワトリ貧血ウイルス (C A V) 、オウム嘴羽病ウイルス (P B F D V) および近年ハトから発見されたハトサーコウイル

50

ス (CoCV) ならびに 3 種植物サーコウイルス (バナナ萎縮病ウイルス、ヤシ葉腐朽ウイルス (coconut foliar decay virus) およびサブタレニアンクローバ矮化ウイルス (subterranean clover stunt virus)) を含むサーコウイルス科 (Circoviridae) に分類される (M. R. Bassami et al., "Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses, and chicken anemia virus," *Virology* 249:453-459 (1998); J. Mankertz et al., "Transcription analysis of porcine circovirus (PCV)," *Virus Genes* 16:267-276 (1998); A. Mankertz et al., "Cloning and sequencing of columbid circovirus (CoCV), a new circovirus from pigeons," *Arch. Virol.* 145:2469-2479 (2000); B. M. Meehan et al., "Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses," *J. Gen. Virol.* 78:221-227 (1997); B. M. Meehan et al., "Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs," *J. Gen. Virol.* 79:2171-2179 (1998); D. Todd et al., "Comparison of three animal viruses with circular single-stranded DNA genomes," *Arch. Virol.* 117:129-135 (1991)). Members of the three previously recognized animal circoviruses (PCV, CAV, and PBFDV) do not share nucleotide sequence homology or antigenic determinants with each other (上記の M. R. Bassami et al., 1998; 上記の D. Todd et al., 1991)。新たに同定された CoCV のゲノムは、約 40 % のヌクレオチド配列の相同性を PCV のゲノムと共有していた (A. Mankertz et al., "Cloning and sequencing of columbid circovirus (CoCV), a new circovirus from pigeons," *Arch. Virol.* 145:2469-2479 (2000))。近年、トランسفュージョントランスマッテッドウイルス (transfusion transmitted virus) または TT ウイルス (TTV) と名付けられた、環状ゲノムを持つ新たなヒトサーコウイルスが、輸血後肝炎に感染した人から同定された (H. Miyata et al., "Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus," *J. Virol.* 73:3582-3586 (1999); T. Nishizawa et al., "A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241:92-97 (1997))。さらに、ヒト TTV 様ミニウイルス (human TTV-like mini virus) (TLMV) は、正常血液提供者から同定され (P. Biagini et al., "Genetic analysis of full-length genomes and subgenomic sequences of TT virus-like mini virus human isolates," *J. Gen. Virol.* 82: 379-383 (2001); K. Takahashi et al., "Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediate related to TT virus and chicken anemia virus," *Arch. Virol.* 145:979-93 (2000))、第 3 の新たなサーコウイルスも、SEN ウイルス (SENV) として知られており、輸血後肝炎に感染した人から発見された (T. Umemura et al., "SENV infection and its relationship to transfusion-associated hepatitis," *Hepatology* 33:1303-1311 (2001))。ヒト TTV および TLMV のゲノムの構成はいずれも、CAV のものと類似していた (上記の P. Biagini et al., 2001; 上記の H. Miyata et al., 1999; 上記の K. Takahashi et al., 2000)。PCV に対する抗体は、ヒト、マウス、ウシおよびブタを含む様々な動物種で見つかっているが (G. M. Allan et al., "Production, preliminary characterization and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus," *Vet. Immunol. Immunopathol.* 43:357-371 (1994); G. C. Dulac and A. Afshar, "Porcine circovirus antigens in PK-15 cell line (ATCC CCL-33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs," *Can. J. Vet. Res.* 53:431-433 (1989); S. Edwards and J. J. Sands, "Evidence of circovirus infection in British pigs," *Vet. Rec.* 134:680-1 (1994); J. C. Harding and E.G. Clark, "Recognizing and diagnosing postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)," *Swine Health and Production* 5:201-203 (1997); R. K. Hines and P. D. Lukert, "Porcine circovirus: a serological survey of swine in the United States," *Swine Health and Production* 3:71-73 (1995); G. P. Nayar et al., "Evidence for circovirus in cattle with re

spiratory disease and from aborted bovine fetuses," Can. Vet. J. 40:277-278 (1999); I. Tischer et al., "Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms," Arch. Virol. 140:737-743 (1995); I. Tischer et al., "Presence of antibodies reacting with porcine circovirus in sera of humans, mice, and cattle," Arch. Virol. 140:1427-1439 (1995))、これらの動物種における P C V の病原論に関してはほとんど知られていない。 P K - 15 細胞由来の P C V でブタを実験的に感染させたが臨床疾患にならなかつたことから、このウイルスはブタにとって病原性はないと考えられる (G. M. Allan et al., "Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material," Vet. Microbiol. 44:49-64 (1995); I. Tischer et al., "Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus," Arch. Virol. 91:271-276 (1986))。汚染した P K - 15 細胞株由来の非病原性 P C V は、ブタサルコウイルス 1 型もしくは P C V 1 と名付けられた。

(0 0 0 7)

temic wasting syndrome in the Netherlands," *Vet. Quart.* 22:167-72 (2000))、アジアのいくつかの国 (C. Choi et al., "Porcine postweaning multisystemic wasting syndrome in Korean pig: detection of porcine circovirus 2 infection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction," *J. Vet. Diagn. Invest.* 12:151-153 (2000); A. Onuki et al., "Detection of porcine circovirus from lesions of a pig with wasting disease in Japan," *J. Vet. Med. Sci.* 61:1119-1123 (1999)) におけるブタにおいて存在が認められている。PMWSは、世界中の豚産業に対する深刻な経済的衝撃を潜在的に持っている。

【0008】

PMWS主要な病原体は、ブタサーコウイルス2型もしくはPCV2と命名されたPCVの病原性株である (G. M. Allan et al., "Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes," *Vet. Rec.* 142:467-468 (1998); G. M. Allan et al., "Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe," *J. Vet. Diagn. Invest.* 10:3-10 (1998); G. M. Allan et al., "Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland," *Vet. Microbiol.* 66:115-23 (1999); 上記のG. M. Allan and J. A. Ellis, 2000; 上記のJ. Ellis et al., 1998; 上記のA. L. Hamel et al., 1998; 上記のB. M. Meehan et al., 1998; 上記のI. Morozov et al., 1998)。PMWSに関連したPCV2の完全なゲノム配列が決定された (M. Fenaux et al., "Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2," *J. Clin. Microbiol.* 38:2494-503 (2000); 上記のA. L. Hamel et al., 1998; 上記のJ. Mankertz et al., 1998; 上記のB. M. Meehan et al., 1997; 上記のB. M. Meehan et al., 1998; 上記のI. Morozov et al., 1998)。

【0009】

PCV1はブタに広く存在しているが、ブタにとって病原性はない。一方、遺伝学的に関連したPCV2は病原性があり、ブタにおいてPMWSを引き起す。配列解析により、PMWSに関連したPCV2は、非病原性PCV1と約75%しかヌクレオチド配列の相同性を有していないことが明らかとなった。非病原性PCV1および病原性PCV2遺伝子のORF2遺伝子はいずれも、主要な免疫原性ウイルスキャップシッドタンパク質をコードしている (P. Nawagitgul et al., "Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based ELISA for the detection of antibodies to PCV," *Immunol. Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1:33-40 (2002); P. Nawagitgul et al., "Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein," *J. Gen. Virol.* 81:2281-2287 (2000))。

【0010】

PCV2接種による、臨床的PMWSを従来のブタにおいて再現するための最初の試みは成功しなかった (M. Balasch et al., "Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome," *J. Comp. Pathol.* 121:139-148 (1999); M. Fenaux et al., "Cloned Genomic DNA of Type 2 Porcine Circovirus (PCV-2) Is Infectious When Injected Directly into the Liver and Lymph Nodes of SPF Pigs: Characterization of Clinical Disease, Virus Distribution, and Pathologic Lesions," *J. Virol.* 76:541-551 (2002))。ノトバイオートブタ、ならびに自然発生したPMWSブタ由来の組織破碎物およびPCV2の増殖した培養細胞をもつ従来のブタにおける臨床的PMWSの実験的再現により、混合した結果が得られた。臨床的PMWSは、PCV2およびブタパルボウイルスを共接種した、ノトバイオート(SPF)ブタならびに初乳を奪われ帝王切開で生まれたブタにおいて (G. M. Allan et al., "Experimental reproduction of severe wasting disease by

co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus," *J. Comp. Pathol.* 121:1-11 (1999); S. Krakowka et al., "Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus," *Vet. Pathol.* 37:254-263 (2000))、PCV2を接種したノトバイオートブタにおいて、その免疫系が、フロイント不完全アジュvant中のスカシ貝ヘモシアニンによって活性化されたときに (S. Krakowka et al., "Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2)," *Vet. Pathol.* 38:31-42 (2001)) 再現された。

【0011】

10

臨床的PMWSは、PCV2を単独で接種した帝王切開で生まれた／初乳を奪われたブタ(CD/CD)において (P. A. Harms et al., "Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus," *Vet. Pathol.* 38:528-539 (2001))、およびPCVとブタパルボウイルス(PPV)もしくはブタ繁殖・呼吸障害症候群ウイルス(PPRSV)のいずれかを共接種した従来のブタにおいて (A. Rivora et al., "Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2," *J. Virol.* 76: 3232-3239 (2002)) 再現された。PPRSV/PCV2の共接種の場合、リンパ球の減少、肉芽腫性炎症および壊死性肝炎のようなPMWSに特徴的な病理学的兆候は、PPRSVによってではなく、PCV2によって誘導される(上記のP. A. Harms et al., 2001)。しかし、臨床的PMWSはPCV2を単独で感染させたノトバイオートブタにおいては再現されなかつた (G. M. Allan et al., "Experimental infection of colostrums deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication," *Arch. Virol.* 145:2421-2429 (2000) ; G. M. Allan et al., "A sequential study of experimental infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus: immunostaining of cryostat sections and virus isolation," *J. Vet. Med.* 47:81-94 (2000); G. M. Allan et al., "Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus," *J. Comp. Pathol.* 121:1-11 (1999); 上記のM. Balasch et al., 1999; J. Ellis et al., "Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets," *J. Vet. Diagn. Invest.* 11:13-14 (1999); S. Kennedy et al., "Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus" *J. Comp. Pathol.* 122: 9-24 (2000); 上記のS. Krakowka et al., 2001; 上記のS. Krakowka et al., 2000; R. M. Pogranichnyy et al., "Characterization of immune response of young pigs to porcine circovirus type 2 infection," *Viral. Immunol.* 13:143-153 (2000))。本研究で使用されたウイルス接種物は、自然発生したPMWSブタ由来の組織破碎物、もしくはPK-15培養細胞中で増殖したウイルスである (G. M. Allan et al., "Experimental infection of colostrums deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication," *Arch. Virol.* 145:2421-2429 (2000); G. M. Allan et al., "A sequential study of experimental infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus: immunostaining of cryostat sections and virus isolation," *J. Vet. Med.* 47:81-94 (2000); G. M. Allan et al., "Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus," *J. Comp. Pathol.* 121:1-11 (1999); 上記のM. Balasch et al., 1999; 上記のJ. Ellis et al., 1999; 上記のS. Kennedy et al., 2000; 上記のS. Krakowka et al., 2001; 上記のS. Krakowka et al., 2000; 上記のR. M. Pogranichnyy et al., 2000)。組織破碎物

20

30

40

50

は、PPVおよびブタ繁殖・呼吸障害症候群ウイルス（PRRSV）のごとき他の共通のブタ病原体を含むこともあり（G. M. Allan et al., "Experimental infection of colostrums deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication," Arch. Virol. 145:2421-2429 (2000); G. M. Allan et al., "Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus," J. Comp. Pathol. 121:1-11 (1999); 上記のG. M. Allan and J. A. Ellis, 2000; J. A. Ellis et al., "Coinfection by porcine circoviruses and porcine parvovirus in pigs with naturally acquired postweaning multisystemic wasting syndrome," J. Vet. Diagn. Invest. 12:21-27 (2000); 上記のC. Rosell et al., 2000）、PCV2の増殖に使用したATCC PK-15細胞株は、PCV1に永続的に感染していたため（上記のG. C. Dulac and A. Afshar, 1989）、臨床疾病および病理的損傷は、PCV2感染単独によるものではないかもしれない（G. M. Allan et al., "Experimental infection of colostrums deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication," Arch. Virol. 145:2421-2429 (2000); G. M. Allan et al., "A sequential study of experimental infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus: immunostaining of cryostat sections and virus isolation, J. Vet. Med. 47:81-94 (2000); G. M. Allan et al., "Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus," J. Comp. Pathol. 121:1-11 (1999); 上記のG. M. Allan and J. A. Ellis, 2000; 上記のJ. A. Ellis et al., 2000）。

【0012】

臨床的PMWSは、PCV2接種CDCDブタにおいて、マイコプラズマ・ヒオニューモニア（Mycoplasma hyopneumoniae）でワクチンした時にも再現されている（G. M. Allan et al., "Immunostimulation, PCV-2 and PMWS," Vet. Rec. 147:171-172 (2000)）。G. M. Allan et al. "Neonatal vaccination for Mycoplasma hyopneumoniae and postweaning multisystemic wasting syndrome: a field trial," Pig J. 48:34-41 (2001)、およびS. C. Kyriakis et al. "The effects of immuno-modulation on the clinical and pathological expression of postweaning multisystemic wasting syndrome," J. Comp. Pathol. 126:38-46 (2002)による2つの最近のフィールド・スタディーによって、固有群（endemic herds）におけるPMWSの進行に対するマイコプラズマ・ヒオニューモニア（Mycoplasma hyopneumoniae）ワクチンによる免疫調節の効果が試験され、ワクチン接種した動物と比較して、未ワクチン群におけるPMWS症例の有意な減少が示された。しかし、制御された実験室の条件下で従来のSPF子ブタを用いたもう1つの近年の研究は、M.ニューモニア（M. hyopneumoniae）での予防接種は潜在的に臨床的PMWSの進行に影響するが、明らかにPCV2感染に対する第2の役割であることを示唆する効果を再現することができなかった。これらおよび他の研究をもとに、PCVはやはりPMWSの主要病原体であるが、それだけが病原体ではないと考えられる。

【0013】

生物学的に純粋な形態のPCV2の感染性ウイルスストックの欠如によって、PCV2の病原性およびPMWSにおける病因的役割の理解が妨げられる。PPVあるいはPRRSVに対する予防接種は、PCV2感染ブタにおいてPMWSの開始を予防していると貫して示されていない。従って、PMWSを特異的に狙った安全で有効なワクチンを見つけることは困難であった。獣医学分野において、有効で安全なPCV2およびPMWSに対するワクチンを作成するための、明確な当該分野で認識された必要性が存在する。

【0014】

米国特許第6,287,856号(Poet et al.)およびWO99/45956は、鳥類に感染するサコウイルスであるオウム嘴羽病ウイルス（PBFDV）、およびブタサコウイルス（PCV）の核酸に関連している。該特許は、裸のDNAもしくはmRNAを

含むワクチン組成物を提案し、核酸配列と作動可能に結合したヒトサイトメガロウイルス即時型もしくは初期遺伝子エンハンサーもしくはプロモーター由来のシス作用転写もしくは翻訳調節配列を含む真核細胞において、P C Vを一過的発現させるための核酸ベクターを開示している。しかし、P C VのD N Aは、単にP K - 15細胞株由来であるため、上記のI. Tischer et al., 1974によって約30年前に発見された非病原性P C V 1を含むようであり、そのため、P C V 2もしくはP C V 2によって引き起こされる感染に対する免疫反応を誘発するのに有效ではないようである。オープンリーディングフレームを含むベクターから作製された組み換えタンパク質のサブユニットワクチンは、あまり特徴がないまたはそれぞれ区別がつかない。P C VのD N A源はP K - 15細胞であるため、P C V 1のオープンリーディングフレームを含むベクターから作製されたタンパク質は、確実な免疫原特性を有していないか、有していてもP C V 2に対するものは有していないであろう。

【 0 0 1 5 】

米国特許第6,217,883号(Allan et al.)およびフランス特許第2,781,159B号は、カナダ、カリフォルニアおよびフランス(ブリタニー)においてPMWSに感染したブタから採取した肺または神経節サンプルからの5つのP C V株の単離、および免疫原性組成物において1つ以上のブタパルボウイルス抗原と組み合わせたそれらの使用に関するものである。ORF 1～ORF 13からなるP C V 2オープンリーディングフレーム(ORF)によってコードされたタンパク質は、該特許に広く記載されているが、免疫原特性を示す特定のタンパク質の例示は何もなかった。さらに、該特許はD N Aプラスミド、直鎖状D N A分子、およびP C V抗原をコードする核酸分子を含み、in vivoで発現する組み換えウイルスからなるベクターを開示している。他のいくつかの参考文献、例えば、米国特許第6,391,314 B1号、米国特許第6,368,601 B1号、フランス特許第2,769,321号、フランス特許第2,769,322号、WO 01/96377 A2、WO 00/01409、WO 99/18214、WO 00/77216 A2、WO 01/16330 A2、WO 99/29871などにも、P C V 1もしくはP C V 2ポリペプチドもしくは様々な株のポリペプチドをコードする核酸の投与について記載されている。

【 0 0 1 6 】

しかし、非病原性P C V 1は、P C V 2の感染および当技術分野において記載された病原性P C V 2株に対して有効ではなく、例え減毒されても、有毒状態に戻る生ウイルスの通常の傾向のため限られた値であろう。従って、今でも当該技術分野において、深刻な感染もしくはP C V 2によって引き起こされるPMWSに対する、有効かつ動物ワクチン中で安全なままである、ブタに接種するための、生きた、感染性の、非病原性抗原への長期にわたる要求が存在する。これらのゴールは、I. Tischerらによって約30年前に単離された非病原性P C V 1のゲノム骨格をもとにした、本明細書に記載された新しい生キメラブタサーコウイルスの構築によって達成される。本発明の新しいキメラブタサーコウイルスは、単独かつ有利にP C V 1の非病原性形質を保持するが、病原性P C V 2に対する免疫応答を誘発することによって、長期的な要求を満たすことが可能である。

【 0 0 1 7 】

(発明の概要)

本発明は、ワクチンとして有用なブタサーコウイルス(P C V)の感染性キメラDNAクローンおよびD N Aクローン由来の生キメラウイルスに関する。新しい生きたキメラの、遺伝的に無毒性のウイルスは、典型的には、同じ対応部位において、病原性P C V 2株の免疫原性遺伝子でP C V 1遺伝子を置換した、非病原性P C V 1のゲノム構造から作製される。本発明は、本明細書に記載した新しい組み換え核酸分子を含む生物学的に機能的なプラスミド、ウイルスベクターおよびその類似物、該D N Aを含むベクターによってトランسفェクトされた適切なホスト細胞、ならびに免疫原性ポリペプチド発現産物を包含する。さらに本発明の範囲内に含まれるものは、ブタをウイルス感染もしくはP C V 2によって引き起こされる離乳後多臓器性発育不良症候群(P M W S)から守る新しい方法であ

10

20

30

40

50

り、該方法は、かかる防御が必要なブタに、例えば、プラスミドにおいてクローン化したキメラDNA、キメラDNAクローン由来のキメラウイルス、本明細書に記載したDNAから発現されたポリペプチド産物などを含む、免疫学的有効量のワクチンを投与することを含む。本発明は、さらに、この新しい無毒性ワクチンを得る、または特徴づける際に実験モデルとしての用途を見つけた、新しい感染性PCV2分子DNA、およびPCVの交互キメラDNAクローンを提供する。

【0018】

本発明の背景およびその技術的進歩は、添付の図面を参考に以下にさらに記載される。

【0019】

(発明の詳細な説明)

10

本発明によって、ブタサーコウイルス(PCV)の感染性分子およびキメラ核酸分子、キメラ核酸分子から作られる生キメラウイルス、ブタをウイルス感染もしくはPCV2によって引き起こされる離乳後多臓器性発育不良症候群(PMWS)から防御するための動物ワクチンが提供される。本発明は、さらに、ワクチンとして用いられ得る免疫原性ポリペプチド発現産物を提供する。

【0020】

PCVの新たな無毒性、感染性キメラDNA分子(PCV1-2)は、PCV1ゲノム中のORF遺伝子の代わりに病原性PCV2の免疫原性オーブンリーディングフレーム(ORF)遺伝子を含んだ、感染性、非病原性PCV1をコードする核酸分子を含む。該感染性キメラPCV1-2DNAクローンは、感染性非病原性PCV1DNAクローンのゲノム骨格内に、PCV2DNAクローンの免疫原性キャプシド遺伝子(ORF2)を含んでいることが好ましい。通常、非病原性PCV1ゲノム構造において、PCV2DNAのキャプシド遺伝子はPCV1DNAのORF2遺伝子に置換するが、位置の変更の多様性が、他の無毒化もしくは弱毒化キメラDNAクローンを得るために遺伝子操作を通じて構築されるであろうと考えられる。PCV1およびPCV2間の交互キメラ感染性PCV2-1は、本発明のキメラPCV1-2の解析のための対照として開示され、病原性PCV2感染性DNA骨格クローン中に、PCV2のキャプシド遺伝子をPCV1のもので置換することによって構築される。実験モデルであることに加え、交互キメラPCV2-1は、特別注文のワクチンの作成における用途があり得る。

20

【0021】

30

本明細書に記載されたPCV2のクローン化されたゲノムDNAは、PK-15細胞へトランスフェクトした場合およびブタに与えた場合、in vitroおよびin vivoにおいて感染性を示す。感染性PCV2DNAクローンは、ブタにおけるPMWSに特徴的な病理学的損傷を生み出し、臨床疾患の改善された特徴づけおよび組織細胞におけるウイルスの分布の理解を可能にする。この新しい、容易に再現できる病原体は、ブタにおけるPMWSを予防するための適切なワクチン接種プログラムの開発に役立つ。

【0022】

新しいキメラPCV1-2DNAクローンも、PK-15細胞のin vitroトランスフェクションおよびブタへのin vivo投与のいずれによっても感染することができる。トランスフェクトしたPK-15細胞において、キメラPCV1-2DNAクローンは、PCV2-1キャプシド抗原(PCV2の免疫原性キャプシドタンパク質)を発現するが、交互キメラPCV2-1DNAクローンは、PCV1キャプシド抗原を発現することが、PCV1もしくはPCV2キャプシド抗原に特異的な抗体を用いた免疫蛍光アッセイ(IFA)によって証明された。PCV2特異的抗体へのセロコンバージョンは、感染性PCV2クローンをキメラPCV1-2クローンと共に接種したブタにおいて検出される。PCV2特異的抗体へのセロコンバージョンの検出は、キメラPCV1-2DNAクローンが、感染したブタにおいてPCV2特異的抗体を誘導し、次に、PCV2の感染から接種したブタを守るために働くことを立証している。

40

【0023】

以下の例は、接種したブタにおけるキメラDNAクローンの免疫原性および病原性の評

50

価を、さらに詳細に記載している。本質的に P C V 2 の O R F 2 抗原に対する抗体へのセロコンバージョンは、P C V 2 DNA クローン（グループ 3）およびキメラ P C V 1 - 2 DNA クローン（グループ 4）を接種されたブタにおいて検出される。P C V 1 クローンおよび交互キメラ P C V 2 - 1 DNA クローン（それぞれ、グループ 2 および 5）を接種した全てのブタは、P C V 1 抗体へセロコンバートする。それぞれの群から選択されたブタから回収したウイルスを、部分的に配列解読し、本当に接種に用いたそれぞれの感染性 DNA クローンであるかを確認した。P C V 2 DNA クローンを接種した動物のさまざまな組織における全体および微細な損傷は、P C V 1、キメラ P C V 1 - 2 および交互キメラ P C V 2 - 1 DNA クローンを接種したブタで観察されたものより、かなり深刻であった。

10

【 0 0 2 4 】

驚くべきことに、また有利なことに、非病原性 P C V 1 ゲノム骨格内にクローン化された病原性 P C V 2 の免疫原性キャプシド遺伝子（O R F 2）もつ、キメラ P C V 1 - 2 感染性 DNA クローンは、病原性 P C V 2 キャプシド抗原に対する特定の免疫応答を誘導するが、ブタ中で非病原性 P C V 1 の性質を単独で保持する。キメラ P C V 1 - 2 感染性 DNA クローンを接種された動物では、P C V 感染動物に類似した緩やかな感染を示したが、病原性 P C V 2 の O R F 2 キャプシドタンパク質に対する抗体へのセロコンバートが生じた。P C V 1 およびキメラ P C V 1 - 2 を接種された動物において観察されたウイルス血症の平均的な長さは、それぞれ 0.6 2 5 週および 1 週となり、病原性 P C V 2 を接種された動物の約 2.1 2 週よりも短かった。いくつかの接種された動物における検出可能なキメラ P C V 1 - 2 ウイルス血症の不足は、P C V 1 - 2 を接種されたブタ（グループ 4）において、P C V 2 の O R F 2 キャプシドタンパク質に対する抗体へのセロコンバージョンに影響しなかった。この結果は、キメラ P C V 1 - 2 ウイルス血症がいくつかの接種した動物において短いまたは検出不可能であっても、キメラ P C V 1 - 2 ウイルスは P C V 2 の O R F 2 キャプシドタンパク質に対する免疫応答を誘導できることを示す。未だブタに非病原的である P C V 2 免疫原性 O R F 2 キャプシドタンパク質に特異的な免疫反応を誘導するための、キメラ P C V 1 - 2 感染性 DNA クローンの特別な能力によって、キメラ P C V 1 - 2 クローンは、遺伝子操作された生弱毒化ワクチンおよび他のワクチンとして、特に有用なものになる。

20

【 0 0 2 5 】

30

新しい、精製および単離された本発明の核酸分子は、配列番号 2 に記載され、図 9 に示され、および特許寄託物番号 PTA-3912 として American Type Culture Collection に寄託された、クローン化されたキメラ P C V 1 - 2 の全長 DNA 配列、その相補鎖（すなわち、逆向きかつ反対の塩基対）、またはキメラヌクレオチド配列と少なくとも 95% の相同性をもつ核酸配列（すなわち、遺伝子全体の主要な有効成分）を含む。当該技術でよく知られた従来の方法、例えば当該技術で認められた標準もしくは高いストリンジエンシーのハイブリダイゼーション技術を、相補鎖もしくは高い相同性を持つ核酸配列を作製するため用いることができる。クローン化されたキメラ P C V 1 - 2 DNA の免疫原性キャプシド遺伝子 DNA 配列を含む精製および単離した核酸分子も、配列番号 3 および図 10 に記載されている。

40

【 0 0 2 6 】

キメラ核酸分子を含む適当な細胞は、単独で、生きた、感染性のキメラブタサーコウイルスを産生する。生きた、感染性のキメラウイルスは、本明細書で図解されたような *in vitro* および *in vivo* のトランスフェクションを介した P K - 1 5 細胞のトランスフェクトによるキメラ DNA クローン由来のものである。クローン化されたキメラ P C V 1 - 2 DNA の好ましい例は、配列番号 2 および図 9 に記載された核酸配列である。さらに、本発明は、キメラウイルスが、キメラ核酸配列の相補鎖もしくは少なくとも 95% の高い相同性を持つ核酸配列由来であることを想定している。

【 0 0 2 7 】

生物学的に機能的な本明細書に記載された新たな組み換え核酸分子を含むプラスミド、

50

ウイルスベクターおよびその類似物、該キメラおよび分子DNAクローンを含むベクターによってトランスフェクトされた適切なホスト細胞、ならびに該免疫原性ポリペプチド発現産物も、本発明の範囲内に含まれる。特に好ましい免疫原性タンパク質は、配列番号4および図11に記載のアミノ酸配列を持つ。さらに、その生物学的に活性のある変種は、本発明により想定されている。通常の技術を有する者は、ポリペプチド配列からアミノ酸の修飾、置換、欠失させる、および親配列と同じもしくは本質的に同じ活性を保持した生物学的に活性のある変種を過度な努力を必要とせず作製する方法を知っているであろう。

【0028】

本発明の免疫原性ポリペプチド産物を作製するための過程は、以下の手順：前記ポリペプチド産物の発現を許容する方法にて、本明細書に記載の新たな組み換え核酸分子でトランスフェクトされた原核もしくは真核ホスト細胞を適当な栄養条件下で生育させる手順、および前記核酸分子が発現した所望のポリペプチド産物を、当該技術において知られた標準的な方法によって単離する手順を含んでいてもよい。免疫原性タンパク質は、他の技術、例えば生化学的合成およびその他の類似技術のごとき他の技術によって調製されてもよい。

【0029】

キメラウイルスおよび分子DNAクローンのワクチン、ならびにこれらを用いた方法も本発明の範囲内に含まれる。予防接種したブタは、深刻なウイルス感染およびPCV2によって引き起こされるPMWSから守られる。新たな方法は、ブタに免疫学的有効量の本発明に記載のワクチン、例えば免疫原性量のキメラPCV1-2DNA、クローン化されたキメラウイルス、PCV1-2のキメラDNAを含むプラスミドもしくはウイルスベクター、ポリペプチド発現産物、組み換えPCV2DNA等を含むワクチンを投与することによって、ウイルス感染もしくはPMWSの予防を必要とするブタを守る。ウイルス感染に対する広範囲の防御を提供するために、PRRSV、PPV、他のブタ感染性病原体および免疫賦活薬のごとき他の抗原を、ブタに同時に与えてもよい。

【0030】

該ワクチンは、非毒性、生理学的に許容される担体および、任意で1つもしくはそれ以上のアジュバントとの組み合わせで、例えば、感染性キメラPCV1-2DNA、pSKベクターのごとき適当なプラスミドもしくはベクター中でクローン化されたPCVキメラDNAゲノム、無毒性のキメラ生ウイルス、不活化キメラウイルス等を含む。該ワクチンは、本明細書に記載の感染性PCV2分子DNAクローンも含む。感染性キメラPCV1-2DNA、感染性キメラウイルスゲノムを含むプラスミドDNA、および生キメラウイルスが好ましく、生キメラウイルスが最も好ましい。本発明の無毒性の生ウイルスワクチンは、有毒状態に復帰する危険を冒す弱毒化した生ウイルス、もしくはウイルス疾患の予防に十分な抗体免疫応答を誘導しないかもしれないウイルス全体を増殖させた死細胞培養物のいずれかを用いた従来のウイルスワクチンに対する利点を提供する。

【0031】

本発明のワクチンと共に投与されうるアジュバントは、ワクチンに対するブタの免疫応答を増大させる物質である。該アジュバントは、同時およびワクチンと同じ部位にて、または異なる時、例えばブースターとして投与されてもよい。アジュバントも、ワクチンが投与された手順もしくは部位と異なる手順もしくは部位にて、ブタに都合よく投与されてもよい。好ましいアジュバントは、水酸化アルミニウム(alum)、免疫賦活性複合体(ISCOMS)、非イオン性プロック重合体もしくは共重合体、サイトカイン(IL-1、IL-2、IL-7、IFN- α 、IFN- β 等のよう)、サボニン、モノホスホリル脂質A(MLA)、ムラミルジペプチド(MDP)およびその類似物を含むがそれらに限定されない。他の適切なアジュバントは、例えば、硫酸アルミニウムカリウム、エシェリキア・コリ(*Escherichia coli*)から単離された易熱性もしくは熱安定性エンテロトキシン、コレラ毒素もしくはそのBサブユニット、ジフテリア毒素、破傷風毒素、百日咳毒素、フロイント完全もしくは不完全アジュバント等を含む。毒素、例えばジフテリア毒素、破傷風毒素、百日咳毒素をもとにしたアジュバントは、使用前に、例えば、ホルムアルデヒドでの

10

20

30

40

50

処理によって不活化してもよい。

【0032】

さらに、該ワクチンは、のごとき感染性キメラP C V D N A クローンの免疫活性を促進するさらなる抗原、例えばブタ繁殖・呼吸障害症候群ウイルス (P R R S V) 、ブタパルボウイルス (P P V) 、他のブタ感染性病原体、および免疫賦活薬を含む。

【0033】

本発明の新たなワクチンは、特定の型もしくは調製方法に全く限定されない。クローン化ウイルスは、感染性D N A ワクチン（すなわち、D N A をブタに直接接種するためにプラスミド、ベクターもしくは他の従来の担体を用いること）、生ワクチン、修飾された生ワクチン、不活化ワクチン、サブユニットワクチン、弱毒化ワクチン、遺伝子操作されたワクチン等を含むがそれらに限定されない。これらのワクチンは、当該分野において知られた標準的な方法によって調製される。

【0034】

生ウイルスワクチンは、ワクチンを受けた人において、全身性、局所性、体液性および細胞性免疫反応を含む全ての可能な免疫反応が活性化されるため、通常最も望ましいワクチンである。一方、不活化ワクチンは体液性免疫応答のみを誘導できる。しかしながら、最も望ましい生ウイルスワクチンには、生きた外来ウイルス病原体での汚染の潜在的危険、もしくはその場でウイルスが有毒なものに戻りうる危険のような不利な点が数点ある。注目すべきことに、本発明の固有のP C V 1 - 2 D N A によってこれら不利な点を克服することができる。P C V 2 の免疫原性遺伝子のみを用いた場合、キメラD N A は、非病原性であるが、病原性P C V 2 ウィルスに対する生ウイルスワクチンの完全かつ有益な免疫応答を誘発する生きた複製性のキメラウイルスを構築する。キメラウイルスをもとにした生ウイルスワクチンには、病原性形質に復帰する機会があるとしてもわずかである。よって、非病原性P C V 1 の構造をもとにした新たなキメラウイルスには、P C V 2 の感染に対する免疫性のための、あらゆる組み換えP C V 2 D N A ウィルス、あらゆる弱毒化P C V 2 生ワクチンもしくはP C V 2 に単独で基づくあらゆる型のワクチンに対して、巨大な利点がある。

【0035】

生ウイルスワクチンは最も好ましいが、ブタに新しいキメラウイルスおよび本明細書に記載の他の抗原を接種するために、他の型のワクチンを使用してもよい。不活化ウイルスワクチンを調製すること、例えば、感染性D N A クローンからのウイルス増殖は、当業者に知られたもしくは本明細書に記載の方法によって行われる。一連のウイルスの不活化は、一般的に知られたプロトコルによって最適化される。

【0036】

不活化ウイルスワクチンは、ホルマリンもしくは疎水性溶媒、酸等のごとき不活化剤で、紫外線光もしくはX線照射によって、加熱によってなど、クローン化P C V のD N A 由来のキメラウイルスを処理することにより、調製されてもよい。不活化は、当技術分野において理解された方法で行われる。例えば、化学的不活化において、ウイルスを含む適当なウイルスサンプルもしくは血清サンプルを、不活化するのに十分な時間の長さで、十分な量もしくは濃度の不活化剤で、十分な高さ（もしくは低さ、不活化剤による）の温度もしくはp Hにて処理する。熱による不活化は、ウイルスを不活化するのに十分な温度および時間にて行われる。照射による不活化は、ウイルスを不活化するのに十分な時間にて、光もしくはその他エネルギー源の波長を用いて行われる。ウイルスは、感染可能な細胞に感染することができないならば、不活化されたと考えられる。

【0037】

典型的には、サブユニットワクチンの調製は、修飾した生ワクチンもしくは不活化ワクチンの調製と異なる。サブユニットワクチンの調製前に、ワクチンの保護性もしくは抗原性成分が同定されなければならない。かかる保護性もしくは抗原性成分は、ブタにおいて特定の強い保護性もしくは免疫性応答を上昇させる、ウイルスキャプシドタンパク質のあるアミノ酸の部分もしくは断片； 1つもしくは複数のウイルスキャプシドタンパク質自身

10

20

30

40

50

、それらのオリゴマー、およびウイルスの基礎構造または同一のかかる基礎構造の部分もしくはユニットを形成するウイルスキャプシドタンパク質のより高次構造を有する会合体；ウイルスの表面もしくは表面付近またはウイルス基本構造中に存在するオリゴグリコシド、糖脂質もしくは糖タンパク質、例えばウイルス等と結合したリボタンパク質もしくは脂肪基を含む。好ましくは、ORF2遺伝子によってコードされたような、キャプシドタンパク質が、サブユニットワクチンの抗原成分として用いられる。感染性DNAクローンによってコードされた他のタンパク質を用いてもよい。これらの免疫原性成分は、当業者に知られた方法によって容易に同定される。一度同定された、保護性もしくは抗原性のウイルスの部分（いわゆる「サブユニット」）は、次いで、当業者に知られた手順によって精製および／またはクローン化される。サブユニット、例えばウイルスの高純度のサブユニットは、ウイルス全体よりも毒性が少ないため、サブユニットワクチンによって、生ワクチンをもとにした他のワクチンに対する利点が提供される。

【0038】

サブユニットワクチンが遺伝子組み換え法によって生産される場合、クローン化サブユニット、例えば、ORF2（キャプシド）遺伝子の発現は、当業者に知られた方法によって最適化されてもよい（例えば、Maniatis et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, MA., 1989を参照）。使用されるサブユニットがウイルスの完全な構造的特徴、例えば全体のキャプシドタンパク質を示す場合、ウイルスからのその単離手順は最適化されなければならない。いずれの場合においても、不活化プロトコルの最適化後に、製造前にサブユニット精製プロトコルは最適化してもよい。

【0039】

病原性クローンからの弱毒化ワクチンの調製のために、順応させられた、生きた病原性PCV2組織培養は、まず、当業者に知られた方法によって、一般的には連続継代細胞培養によって、弱毒化される（非病原性もしくは無害にされる）。病原性クローンの弱毒化は、遺伝子欠失もしくはウイルス産生遺伝子の変異によって作られてもよい。このとき、該弱毒化PCVウイルスは、PCV1の非病原性形質を保持するが、組み換え技術を通じてPCV2ゲノムから選択される免疫原性形質の強さにおいて多様となりうる、さらなるキメラPCV1-2ウイルスを構築するために用いられてもよい。

【0040】

最も好ましいワクチンは、生キメラウイルスDNAクローン、特に、非病原性PCV1の骨格にPCV2の免疫原性遺伝子を含むクローンを使用する。有利には、遺伝子操作を通じて構築された場合にも本来無毒性である生キメラウイルスは、時間のかかる弱毒化手順を必要としない。該ウイルスは、病原性PCV2に対する全範囲の免疫応答を誘導することのできる、PCV2に対する免疫原性タンパク質をウイルス複製の間生産する、生きているが非病原性の複製ウイルスとして、独自に働く。

【0041】

さらなる利点として、好ましい本発明の生キメラウイルスによって、他の弱毒化ワクチンよりも作製、保存および送達が容易である、遺伝学的に安定したワクチンが提供される。キメラウイルスをもとにした無毒性もしくは弱毒化ワクチンは、通常、従来の修飾した生ワクチンよりも安全でなくとも、同じくらい安全であるとみなされる（J. Arroyo et al., "Molecular basis for attenuation of neurovirulence of a yellow fever Virus/Japanese encephalitis virus chimera vaccine (ChimeriVax-JE)," J. Virol. 75(2):934-942 (2001); F. Guirakhoo et al., "Recombinant chimeric yellow fever-dengue type 2 virus is immunogenic and protective in nonhuman primates," J. Virol. 74(12):5477-5485 (2000); S. Tang et al., "Toward a poliovirus-based simian immunodeficiency virus vaccine: correlation between genetic stability and immunogenicity," J. Virol. 71(10):7841-7850 (1997)）。例えば、日本脳炎ウイルス（JEV）に対するChimeriVax-JEワクチンは、黄熱ウイルスワクチンYFV17Dの構造タンパク質prMおよびEをコードする遺伝子を、弱毒化JEV SA14-14-2株の対応遺伝子で置換したYFV17Dの遺伝子組み換

10

20

30

40

50

え派生物であり、長期経過後に *in vitro* および *in vivo* いずれにおいても遺伝学的に安定であることが示されていた(上記のJ. Arroyo et al., 2001)。もう一つのデングウイルス2型に対するキメラウイルスワクチンChimeriVax-D2も、弱毒化黄熱(YF) - デングウイルス2型(デング-2)ウイルスであり、遺伝学的に安定である;ベロ(Vero)細胞において18回継代後、その配列が変化していないことが報告されている(上記のF. Guirakhoo et al., 2000)。

【0042】

本発明のもう1つの好ましいワクチンは、ブタに非病原性キメラDNAクローンをデリバリーするために適当なプラスミドを用いる。ウイルス全体を増殖させた、生きたもしくは死んだ培養細胞を用いる従来のワクチンとは逆に、本発明は、感染性キメラウイルスゲノムを含むプラスミドDNAでのブタの直接接種を提供する。

10

【0043】

本発明において望ましいさらなる遺伝子組み換えワクチンは、当業者に知られた技術によって生産される。かかる技術は、さらなる組み換えDNAの操作、アミノ酸配列の修飾もしくは置換、および類似技術を含むがそれらに限定されない。

【0044】

組み換えDNA技術をもとにした遺伝子組み換えワクチンは、例えば、ブタにおける強い免疫もしくは保護応答の誘導の原因であるタンパク質をコードするウイルス遺伝子の別の部分(例えば、ORF3、ORF4等由来のタンパク質)の同定によって作られる。かかる同定された遺伝子もしくは免疫優性断片を、標準的なタンパク質発現ベクター、例えば、バキュロウイルスベクターにクローン化し、適切なホスト細胞の感染に用いることができる(例えば、O'Reilly et al., "Baculovirus Expression Vectors: A Lab Manual," Freeman & Co., 1992を参照)。ホスト細胞は、培養され、そして望ましい程度に精製され、適当なワクチン製品に処方されうる所望のワクチンタンパク質を発現する。

20

【0045】

該クローンが、疾病を引き起こす望ましくない天然の能力を保持している場合、毒性の原因となるウイルスゲノム中の核酸配列を特定し、遺伝子操作、例えば部位特異的変異誘発によりウイルスを無毒にすることも可能である。部位特異的変異誘発は、1つもしくはそれ以上のヌクレオチドを不可、欠失、置換することもできる(例えば、Zoller et al., DNA 3:479-488, 1984を参照)。オリゴヌクレオチドを、所望の変異を含めて合成し、一本鎖ウイルスDNAの部分にアニールさせる。この手順によって生じた該ハイブリッド分子を用いて、バクテリアを形質転換する。そして、適切な変異を含む単離された二本鎖DNAを用いて、次に適当な培養細胞へトランスフェクトされる後者の制限酵素断片と連結させて全長DNAを作製する。移動のための適当なベクターへのゲノムの連結は、当業者に知られたあらゆる標準的な技術によって行われてもよい。ウイルス子孫の產生のためのホスト細胞への該ベクターのトランスフェクションは、あらゆる従来の方法、例えばリン酸カルシウムもしくはDEAE-デキストランを介したトランスフェクション、エレクトロポーレーション、プロトプラスト融合および他の周知の技術を用いて行われてもよい(例えば、Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)。そして、クローン化されたウイルスは、所望の変異を示す。あるいは、適切な変異を含む2つのオリゴヌクレオチドを合成することもできる。これらをアニールさせて、二本鎖DNAを得て、全長DNAを作製するためにウイルスDNAに挿入してもよい。

30

【0046】

ワクチンにおいて有用である遺伝子組み換えタンパク質は、例えば、昆虫細胞、酵母細胞もしくは哺乳類細胞において発現されてもよい。従来の方法によって精製もしくは単離された遺伝子組み換えタンパク質を、PCV2によって引き起こされるウイルス感染もしくは離乳後多臓器性発育不良症候群(PMWS)から守るために、ブタに直接接種することができる。

40

【0047】

50

ウイルスから得られた、もしくは1つもしくはそれ以上のウイルスの免疫優性タンパク質をコードするウイルスゲノムから複製された核酸分子を含むトランスファーベクターで、昆虫細胞株(HI-FIVEのような)をトランスフェクトすることができる。トランスファーベクターは、例えば、直鎖状バキュロウイルスDNA、および所望のポリヌクレオチドを含むプラスミドを含む。組み換えバキュロウイルスを作製するために、ホスト細胞株を直鎖状バキュロウイルスDNAおよびプラスミドで同時トランスフェクトしてもよい。

【0048】

あるいは、PMWSに病んでいる関連ブタから得られた、1つもしくはそれ以上のキャプシドタンパク質をコードするDNA、感染性PCV2分子DNAクローンもしくはクローン化されたPCVキメラDNAゲノムを、ポックスウイルスもしくはアデノウイルスのごとき生ベクター(live vector)へ挿入し、ワクチンとして用いることができる。

10

【0049】

免疫学的有効量の本発明のワクチンは、ウイルス感染もしくはPMWSに対する防御を必要とするブタに投与される。定期試験によって、ブタに接種する免疫学的有効量もしくは免疫学的量を、容易に決定もしくは難なく力価判定することができる。有効量とは、ワクチンに対する十分な免疫応答が、PMWSを引き起こすウイルスにさらされたブタを防御するに達する量のことである。ウイルス病の有害な生理学的症状または作用が、著しく減少、改善もしくは完全に予防される程度にブタを防御することが好ましい。

【0050】

該ワクチンを、単回投与もしくは反復投与にて投与することができる。投与量は、例えば、1から1000μgの範囲の感染性キメラDNAゲノムを含むプラスミドDNAでもよいが(ワクチンの免疫活性成分の濃度による)、副作用もしくはウイルスの生理学的症状を引き起こすのに十分な量のウイルスベースの抗原を含んではならない。ブタの体重をもとにした活性のある抗原剤の適当な用量、抗原の濃度および他の典型的な要素の決定もしくは力価判定のための方法は、当業者に知られている。感染性キメラウイルスDNAクローンをワクチンとして使用する、または生きた感染性キメラウイルスをin vitroで産生し、そして該生キメラウイルスをワクチンとして用いるのが好ましい。その場合、100~200μgのクローン化キメラPCV DNAもしくは約10,000の50%組織培養感染量(TCID₅₀)の生キメラウイルスをブタに与えることができる。

20

【0051】

該ワクチンを、PCVウイルスにさらされていないブタに投与することが望ましい。キメラPCV1-2感染性DNAもしくは他のその抗原型を含むワクチンを、鼻腔内に、経皮的に(すなわち、全身吸収のための皮膚表面上もしくは皮膚表面における投与)、非経口的に等、都合よく投与することができる。投与の非経口経路は、筋肉内、静脈内、腹腔内、皮内およびそれらの類似経路を含むがそれらに限定されない。予防接種の筋肉内および皮内経路は、ウイルス感染性DNAクローンを用いた他の研究において成功していたことから(E. E. Sparger et al., "Infection of cats by injection with DNA of feline immunodeficiency virus molecular clone," *Virology* 238:157-160 (1997); L. Willems et al., "In vivo transfection of bovine leukemia provirus into sheep," *Virology* 189:775-777 (1992))、実際的な鼻腔内投与経路に加えて、これらの経路が最も好ましい。より都合よくないが、リンパ内接種経路によって該ワクチンをブタに与えることも考えられる。ユニークで、かなり好ましい投与方法は、PCV1-2キメラを含むプラスミドDNAを、筋肉内、皮内、リンパ内等に直接注入することを必要とする。

30

【0052】

液体として投与する場合、本ワクチンは、水性溶液、シロップ、エリキシル、チンキおよびその類似物の形に調製されてもよい。かかる処方は、当業者に知られており、適当な担体もしくは溶媒系中で抗原および他の典型的な添加物の溶解によって典型的に調製される。適当な担体もしくは溶媒は、水、塩水、エタノール、エチレングリコール、グリセロール等を含むがそれらに限定されない。典型的な添加物は、例えば、認可染料、香料、甘味料およびチメロサール(エチル水銀チオサリチル酸ナトリウム)のような抗菌性防腐剤

40

50

である。かかる溶液は、例えば、部分加水分解ゼラチン、ソルビトールもしくは細胞培養培地の添加によって安定化され、当業者に知られた試薬、例えばリン酸水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素カリウム、リン酸二水素カリウム、それらの混合物およびそれらの類似物を用いた従来の方法によって緩衝されてもよい。

【0053】

液剤は、他の標準的なコフォーミュラント (co-formulant) と組み合わせた懸濁剤もしくは乳化剤を含む懸濁液および乳化液を含んでいてもよい。これらの種類の液剤は、従来の方法によって調製されてもよい。懸濁液を、例えば、コロイドミルを用いて調製してもよい。乳化液を、例えば、ホモジエナイザーを用いて調製してもよい。

【0054】

体液系に注入するために設計された非経口剤は、適切な等張性およびブタの体液の対応するレベルに pH を緩衝することを必要とする。等張性は、塩化ナトリウムおよび必要な他の塩で適切に調製されうる。エタノールやプロピレングリコールのごとき適当な溶媒を用いて、製剤中の成分の溶解度および液体調製の安定性を増大させることができる。本発明で使用されたさらなる添加物は、デキストロース、通常の抗酸化剤および通常のキレート剤、例えばエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を含むがそれらに限定されない。非経口剤形は、使用前に滅菌もされなくてはいけない。

【0055】

本発明のもう1つの態様は、感染性非病原性 P C V 1 をコードするオーブンリーディングフレーム (ORF) 遺伝子の核酸分子を除去し、同部位を感染性病原性 P C V 2 をコードする免疫原性 ORF 遺伝子の核酸分子で置換し、次いでキメラ核酸分子を回収することを含む、P C V 1 - 2 の感染性、非病原性キメラ核酸分子の新たな調製方法に関する。該核酸分子は、典型的に DNA である。好ましい方法は、非病原性 P C V 1 DNA の ORF 2 遺伝子を、本明細書に記載の P C V 2 の感染性病原性 DNA の免疫原性 ORF 2 キャプシド遺伝子で置換する。他の ORF 部分もしくはそれらの免疫原性断片を、P C V 1 および P C V 2 DNA 間で交換して、本明細書に記載の方法に従って弱毒化感染性キメラ DNA クローンを構築することができると考えられる。

【0056】

組み換え核酸分子を用いて、P C V 1 の非病原性性質を有利に保持し、病原性 P C V 2 の免疫原性 ORF 2 タンパク質を発現し、病原性 P C V 2 に対する完全な免疫応答を誘発する、本発明の生きた感染性の複製性キメラウイルスを構築した。P C V 1 - 2 DNA クローンは、ブタにおける P C V 2 の感染および P M W S に対する遺伝子操作された無毒性の生ワクチンとして役に立つことが望ましい。

【0057】

P C V 2 の感染性 DNA クローンは、本明細書に記載のように構築されていることから、生物学的に純粋かつ均一な感染性ウイルスストックを、病原研究および非病原性キメラワクチンの開発のために产生することができる。P C V 2 感染と関連した臨床疾病、ウイルスの分配および病理学的の病変の進行は、この分子 DNA クローン、ならびに生物学的に純粋および均一な該分子 DNA クローン由来の感染性 P C V 2 ウイルスストックを用いることによって過去に観察されたものよりも明確に特徴付けされ、本発明の所望のワクチン産物の開発に役に立つ。

【0058】

P C V 2 分子クローンは、2 コピーの完全な P C V 2 ゲノムを直列にして p S K ベクターへ連結することにより得られる。従来技術において開示された單一コピーゲノムとは著しく対照的に、本明細書に記載の方法によって作製された感染性 DNA P C V 2 クローンは、直列反復において共に連結された P C V 2 ゲノムの2つの完全なコピーを含む。2 コピーのゲノムを直列に連結することによって、P C V 2 の通常の環状ゲノムを真似した類似の環状ゲノムが提供される。感染性 DNA P C V 2 クローンにおいて、2 コピーのゲノムを直列に持つことの利点は、感染性 DNA クローンが *in vitro* および *in vivo* においてトランスフェクトされる際に、複製を最大化できることである。よって、

10

20

30

40

50

本発明のクローンは、以前の單一コピーゲノムよりも、より効率よく効果的に作用する。

【0059】

分子ウイルスクローンでの動物の感染は、ウイルス複製およびホストにおける毒性の遺伝的な決定を研究する際に実に有用である。2型ブタサーコウイルス (PCV2) は、離乳後多臓器性発育不良症候群 (PMWS) の病原体としてみなされてきた。PMWSは、ブタにおける複合病症候群であり、複数の要因がPMWSの臨床症状において関与しているかもしれない。しかし、病気のブタの組織破碎物中の他の一般的な物質が存在することによる、生物学的に純粋な形のPCV2を生産する際の困難は、PCV2感染単独に起因する臨床疾病および病理学的病変の明確な特徴づけを妨げてきた。PCV2の感染性分子DNAクローンが構築され、また、該分子クローンでのブタの直接的 *in vitro* 10 トランスフェクションによって、PCV2感染と関連した疾病的特徴づけおよび病理学的病変に用いられたのは、今回が初めてである。

【0060】

分子クローン由来の均一なPCV2の生ウイルスストックは、PK-15細胞へトランスフェクトされた場合、*in vitro*において感染性があることが示されている。クローン化PCV2ゲノムDNAも、特定病原体不在 (SPF) ブタの肝臓およびへ浅腸骨リンパ節 (superficial iliac lymph nodes) へ直接注射した場合、感染性がある。クローン化PCV2プラスミドDNAで注射した動物は、均一な、感染性PCV2の生ウイルスストックで鼻腔内接種することにより誘導されるものと類似した感染および疾病が進行する。PCV2特異的抗体へのセロコンバージョンは、接種後35日の接種集団のブタの20 大半で検出された。

【0061】

キメラPCV1-2DNAクローンを接種されたブタにおけるウイルス血症の開始と継続は、非病原性PCV1DNAクローンを接種されたブタのものと類似していたが、PCV2クローンを接種されたブタにおけるウイルス血症は、より早く、より長く継続したようである。接種後14日にて開始し、約2~4週間継続したウイルス血症は、PCV2接種動物の大多数において検出された。同じく、接種後35日に検死された接種されたブタの大多数が、PCV2抗体にセロコンバートしていた。PCV抗原は、接種されたブタの様々な組織および臓器において検出された。肉眼的病変は、肺およびリンパ節に限られ、体系的に肥大化した褐色のリンパ節、虚脱しなかった肺、ならびに軽度の多巣性褐色硬化病巣 (multifocal tan-colored foci of consolidation) によって特徴づけられる。非病原性PCV1およびキメラPCV1-2接種ブタいずれにおいても、リンパ節に影響する肉眼的病変は、穏やかかつ少数の動物だけに限られたが、病原性PCV2接種ブタの全てで、中程度から重度の腫れ、およびリンパ組織の変色が起こっている (表9、下側)。統計的解析により、キメラPCV1-2を接種した動物のリンパ節における肉眼的病変のスコアが、非病原性PCV1接種ブタのものと類似していることが示される。接種後21日にて、PCV2接種ブタにおいて、PCV1およびキメラPCV1-2接種ブタのものよりも、統計学的により重度の肉眼的病変が起きている。組織病理学的病変およびPCV2特異的抗原は、接種された (感染した) ブタの脳、肺、心臓、腎臓、扁桃、リンパ節、脾臓、回腸および肝臓を含む多くの組織および臓器において検出された。PMWSのものと類似した多くの組織および臓器における組織病理学的病変は、分子DNAクローンから *in vitro* で調製された感染性ウイルスと同じくPCV2分子DNAクローンで再現される。顕微鏡的に、接種後21日および49日いずれにおいても、キメラPCV1-2接種動物では、PCV2接種動物よりも顕微鏡的病変が統計的に少ない。キメラPCV1-2接種ブタのリンパ節における顕微鏡的病変スコアは、非病原性PCV1、交互キメラPCV2-1、および未接種の対照動物のものと類似していた。中程度から重度の顕微鏡的病変は、肺、肝臓、リンパ節、脾臓、脳、心臓、腎臓および病原性PCV2接種動物の多くの組織において見られた。しかし、キメラPCV1-2接種動物において、中程度から重度の顕微鏡的病変は、肝臓、リンパ節および腎臓組織に限られる (表10、下側50 参照)。

【0062】

対照もしくは接種されたブタのいずれにおいても、PMWSの注目すべき臨床兆候はない。クローン化PCV2プラスミドDNA（感染性PCV2 DNAクローン）もしくは生物学的に純粋な感染性ウイルスストックで、PMWSの特徴的な臨床症状は観察されなかつたが、PCV2は明らかに、以下に図示された例において再現されたPMWS様の組織病理学的病変の原因である。PCV2は、臨床的PMWSの始まりの原因となる単独ではなく初期の病原体であると通常考えられている。

【0063】

本発明は、PCV2感染にのみ起因する臨床経過および病理学的病変を明確に特徴づける。下に図示した例における本発明のデータは、容易に再現された、クローン化PCV2ゲノムDNAが、PCV2の病原論および予防注射の研究のための感染性ウイルスを置換できることを示す。PCV2はPMWSの進行に不可欠であるとして示されるが、他の成分もしくは病原体、例えばPRRSV, PPV等は、PMWSの進行例と関連した臨床兆候および病変の全ての範囲の誘導に必要であるかもしれない。しかし、PCV2が主要因であるという知見とともに、本発明の新たな感染性、複製ウイルスクリーンを、所望の最適な免疫原性効果を得るために、免疫学および分子遺伝学における当業者に知られた方法にて、さらに修飾し、遺伝子操作することができる。

【0064】

本明細書に記載のPCV2の感染性DNAの有用性は、ブタにおけるPCV2およびPMWSを予防するための遺伝子操作された弱毒化ワクチンの開発を可能にする。PCV2は、本来の感染の間に、リンパ節、肺および肝臓において複製し、主な病的効果の一つは、リンパ構造の分解による免疫系の損傷であることが知られている（上記のS. Krakowka et al., 2001; 上記のG. M. Allan and J. A. Ellis, 2000; 上記のS. Kennedy et al., 2000; 上記のG. J. Wellenberg et al., 2000; G. M. Allan et al., "Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus," *J. Comp. Pathol.* 121:1-11 (1999); J. Ellis et al., "Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets," *J. Vet. Diagn. Invest.* 11:3-14 (1999); 上記のJ. C. Harding and E.G. Clark, 1997）。この新たな感染性PCV2分子DNAクローンを用いることによって、PCV2感染による臨床疾病、病原性病変およびウイルスの分布が、より明確に特徴づけられる。

【0065】

PCV遺伝子の構造的および機能的相関は、本明細書に記載のPCV2、PCV1、キメラPCV1-2、および交互キメラPCV2-1感染性DNAクローンの利用可能性によってさらに理解される。Will et al., "Cloned HBV DNA causes hepatitis in chimpanzees," *Nature* 299:740-742 (1982)は、クローン化B型肝炎ウイルスDNAを用いて、直接in vivoの注射によってチンパンジーを感染させられることを初めて示した。それ以来、このアプローチは、ウイルスの複製および他の数種類のウイルスの病原性を研究するために用いられてきた（T. W. Dubensky et al., "Direct transfection of viral and plasmid DNA into the liver or spleen of mice," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:7529-7533 (1984); R. Girones et al., "Complete nucleotide sequence of a molecular clone of woodchuck hepatitis virus that is infectious in the natural host," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1846-1849 (1989); N. L. Letvin et al., "Risks of handling HIV," *Nature* 349:573 (1991); C. Seeger et al., "The cloned genome of ground squirrel hepatitis virus is infectious in the animal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:5849-5852 (1984); E. E. Sparger et al., "Infection of cats by injection with DNA of feline immunodeficiency virus molecular clone," *Virology* 238:157-160 (1997); R. Sprengel et al., "Homologous recombination between hepadnaviral genomes following in vivo DNA transfection: implications for studies of viral infectivity," *Virology* 159:454-456 (1987); 上記のH. Will et al., 1982; L. Willems et al.

10

20

30

40

50

I., "In vivo transfection of bovine leukemia provirus into sheep," *Virology* 189: 775-777 (1992)).

【0066】

感染性 P C V 2 分子 D N A クローンの構築、ならびに本発明に関連したブタの肝臓およびリンパ節へのクローン化 P C V 2 プラスミド D N A を直接注射することによる感染の実証は、P C V 2 の研究のために有利である。この in vivo トランスフェクション系は、ウイルス複製およびホスト中の発病における P C V 2 遺伝子の役割に関して、P C V 2 遺伝子の異なる領域を試験するために、in vitro において構築された組み換えプラスミドを用いる、P C V 2 遺伝子の構造および機能の相関についての研究を促進するであろう。P C V 2 の複製および病原論を、培養細胞内で P C V 2 を増殖させることによって、感染性ウイルスストックなしで in vivo で研究することもできる。これは、連続継代細胞培養はウイルス変種を選抜するため、有利である。動物研究のために、ウイルスの代わりにクローン化 P C V 2 ゲノム D N A を用いるもう 1 つの利点は、接種量の定量が比較的容易であることである。動物の接種のためのクローン化 P C V 2

D N A の使用量は、分光光度計によって容易に決定できるが、生 P C V 2 ウィルスの投与量は、培養細胞における感染力価測定および I F A による感染の確認を必要とする。クローン化 P C V 2 プラスミド D N A での動物の直接的な注射は、動物の研究における組織破碎物接種物中の他のブタ固有病原体の存在と関連した問題を排除する。

【0067】

本発明において、免疫原性 O R F 2 キャプシド遺伝子は、キメラ P C V 1 - 2 感染性 D N A クローン独自の構造を作り出すため、病原性 P C V 2 および非病原性 P C V 1 の間に連結されている。驚くべきことに、かつ有利なことに、キメラ P C V 1 - 2 感染性 D N A クローンは、複製し、免疫原性 O R F 2 キャプシド抗原を in vivo および in vitro において発現し、P C V 2 の O R F 2 に対する特異的免疫応答を誘導したが、P C V 1 の非病原的性質を保持していた。キメラ P C V 1 - 2 感染性 D N A クローンは、強い免疫応答を誘導することができる一方で、非病原性 P C V 1 のものと類似した穏やかな病原性病変と限られた感染を誘導した。ワクチンの開発のための、クローン化 D N A の比較的容易な貯蔵および安定化、ならびに大規模な組み換え P C V 2 プラスミド D N A およびキメラ P C V 1 - 2 D N A クローン生産の節約は、ブタに、生の感染性ウイルス D N A ワクチンもしくは遺伝子操作された弱毒化ウイルスワクチンを与えることの魅力的な意味を提供する。よって、本発明に記載のキメラ P C V 1 - 2 感染性 D N A クローンは、P C V 2 感染および P M W S に対する有用なワクチンの候補である。

【0068】

当然のことながら、本明細書で使用された全ての科学技術用語は、当業者において共通に理解されるものと同じ意味を持つものと理解される。本発明の目的のために、「感染性がある」という語は、ウイルスが病気を引き起こすか否か関係なく、ウイルスがブタ内で複製することである。「S P F」は、特定病原体不在ブタのことである。「ノトバイオートの」ブタとは、病原菌不在のブタのことである。「P C V 2 プラスミド D N A」、「P C V 2 ゲノム D N A」および「P C V 2 分子 D N A」は、同じクローン化された核酸配列に關して互換的に用いられている。

【0069】

感染性 P C V 1 / P C V 2 キメラ D N A クローン（菌株表示「P C V 1 - 2 キメラ」）、感染性 P C V 2 分子 D N A クローン（菌株表示「P C V 2 クローン」）、および重度の P M W S に冒されたブタから単離され、単離体番号（isolate number）4 0 8 9 5（菌株表示「P C V 2 # 4 0 8 9 5」）として同定された P C V 2 のアイオワサンプル（Iowa sample）由来の生物学的に純粋かつ均一な P C V 2 ストックは、37 C.F.R. § 1.808によって規定された条件下で寄託され、ブダペスト条約に従って American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, U.S. A. にて維持される。本明細書に記載された D N A 配列は、Bluescript SK(+) vector (pSK) (Stratagene Inc., La Jolla, CA) 中にクローン化された 6 4 9 0 b p のプラスミド中

10

20

30

40

50

に含まれ、エシェリキア・コリ (*Escherichia coli*) DH5 コンピメントセルへ形質転換される。感染性キメラ PCV1-2 DNA クローン（「キメラブタサーコウイルス 1 型 (PCV1) および 2 型 (PCV2) 感染性 DNA クローン」として同定された）ならびに感染性 PCV2 分子 DNA クローン（「2 型ブタサーコウイルス (PCV2) の感染性 DNA クローン」として同定された）は、2001 年 12 月 7 日に ATCC において寄託され、それぞれに ATCC 特許寄託物番号 PTA-3912 および PTA-3913 が付与されている。当然のことながら部位特異的変異誘発および本明細書に記載の技術を用いて容易に構築される他のプラスミドも、本発明の範囲内に包含される。単離体番号 (isolate number) 40895（「2 型ブタサーコウイルス (PCV2)」として単離された）も、2001 年 12 月 7 日に ATCC において寄託され、ATCC 特許寄託物番号 PTA-3914 が付与されている。単離体番号 (isolate number) 40895 の PCV2 のゲノム (核酸) 配列は、Genbank データベースに寄託され、2000 年 7 月 23 日より受託番号 AF264042 にて公に入手可能となっている。

【0070】

以下の例は、本発明のある態様を説明する。しかしながら、これらの例は説明のためだけであって、本発明の条件および範囲に関して完全には限定的なものでないことは当然である。典型的な反応条件（例えば、温度、反応時間等）が与えられれば、一般的にはあまり都合のよくないことであるが、特定の範囲の上および下いずれの条件も使用できる。実施例は、室温（約 23 ~ 約 28）および常圧にて行われる。本明細書中に示される全ての部分およびパーセントは、重量をもとにしたものであり、全ての温度は、特に断りのない限り摂氏温度にて表記されている。

【0071】

以下の限定されない例より本発明のさらなる理解が得られるであろう。

【実施例】

【0072】

実施例 1

PCV1 に汚染されていない PK-15 細胞株の產生

PCV2 単離の原料は、自然発生の PMWS に冒されたブタの脾臓組織サンプル由来である（PCV2 シリアル識別番号 40895 であり、「単離体 (isolate) 40895」として示される）（上記の M. Fenaux et al., 2000）。PCV2 特異的抗体での免疫組織科学的染色 (IHC) によって、組織内の PCV2 抗原の存在が確認された。脾臓組織は使用まで -80 にて保存した。

【0073】

American Type Culture Collection (ATCC アクセッション番号 CCL-33) より購入した PK-15 細胞株は、PCV1 で持続的に感染させた（上記の G. C. Dulac and A. Afshar, 1989）。PK-15 細胞のサブ集団のみを持続的に感染させた（ID.）ため、終点希釈によって PCV1 の汚染のない PK-15 細胞株が產生された。プロトコルは、以下のものである：PK-15 細胞を、Earle's salts および L-グルタミン (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY) を加え、10% ウシ胎児血清 (FBS) および 1 x 抗生物質 (Life Technologies, Inc.) を添加した MEM 中で生育させる。集密になった細胞の単層をトリプシン処理後、細胞を計数し、終点が 1 細胞 / 0.2 ml になるように連続希釈した。終点希釈を 96 ウェルプレートに撒き、単一の細胞から開始して単層へ成長するようにした。各ウェルの細胞を、PCV1 および PCV2 の検出および区別できる PCR-RFLP アッセイを用いて、PCV1 DNA の試験をした（上記の M. Fenaux et al., 2000）。PCR-RFLP アッセイによって、PCV1 が陰性であると判定されたウェルの PK-15 細胞を、次に増殖させた。PCV1 のない PK-15 細胞株を、さらに 5 回継代し、各継代時に PCV によって PCV1 DNA 陰性であることを確認した。

【0074】

PCV1 汚染が陰性であった 4 つの細胞株を、ATCC からの持続的感染 PK-15 細胞の終点希釈によって作製した。細胞株は、追加の 5 回継代後も PCV 陰性のままである

10

20

30

40

50

ことが、P C R によって判明した。該細胞株の 1 つを増殖させ、細胞を P C V 2 分子 D N A クローン（図 2）でトランスフェクトする、および P C V ウィルスに感染させた場合、該細胞株は P C V 2 の複製を補助できることがわかった。さらに、クローン化された細胞を、P C V 2 分子 D N A クローンの *in vitro* トランスフェクションに用いて、動物の接種実験のための生物学的に純粋なウイルスストックを產生した。

【0075】

実施例 2

P C V 2 感染性 D N A クローンの構築

P C V 2 分子 D N A クローンを構築するために、P C V 2 単離体 (isolate) 4 0 8 9 5 (上記の M. Fenaux et al., 2000) の公開配列をもとに 1 対の P C R プライマー：配列番号 5 に示される順方向プライマー F - P C V S A C 2 (5'-GAACCGCGGGCTGGCTGAACCTTTG AAAGT-3')、および配列番号 6 に示される逆方向プライマー R-PCVSAC2 (5'-GCACCGCGGA AATTTCTGACAAACGTTACA-3') を設計した。この対のプライマーは、単一の S a c I I 制限酵素サイト（図 1）を含む重複領域を持つ完全な P C V 2 のゲノムを増幅する。D N A を、QIAamp DNA Minikit (Qiagen, Inc., Valencia, CA) を用いて、自然発生の P M W S に冒されたブタの脾臓組織サンプル（単離体 (isolate) 40895）（上記の M. Fenaux et al., 2000）から抽出した。抽出した D N A を、AmpliTaq Gold polymerase (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) を用いた P C R により増幅した。P C R 反応は、95°C で 9 分間の最初の酵素活性化処理、次いで、35 サイクルの 94°C で 1 分間の変成、48°C で 1 分間のアニーリング、72°C で 3 分間の伸長、および 72°C で 7 分間の最後の伸長からなる。予想される大きさの P C R 産物を、ゲル電気泳動によって分離し、Geneclean Kit (Bio 101, Inc., La Jolla, CA) を用いたガラスミルク処理で精製した。

【0076】

P C V 2 ゲノムの直列 2 量体を含む分子 D N A クローンを構築するために、完全な P C V 2 ゲノムを含む P C R 産物を、まず advanTAge プラスミドベクター (Clontech, Palo Alto, CA) に連結した。イー・コリ (E. Coli) D H 5 コンピテントセルを形質転換した。組み換えプラスミドを、制限酵素消化によって確認した。全長 P C V 2 ゲノム D N A を、S a c I I 制限酵素での消化によって、advanTAge ベクターから切り出した。消化した P C V 2 ゲノム D N A を、直列 2 量体の生成に好ましい T 4 D N A リガーゼで 37°C で 10 分間だけ処理して連結した。次に、直列 2 量体を、pBluescript SK(+) ベクター (pSK) (Stratagene Inc., La Jolla, CA) にクローニングした（図 1）。P C V 2 ゲノム（本明細書中では P C V 2 分子 D N A クローンと示す）の直列 2 量体を含む組み換えプラスミドを、P C R、制限酵素消化および D N A 配列解読によって確認した。組み換えプラスミドの D N A 濃度を分光光度計によって測定した。

【0077】

特異的に、P C V 2 の完全なゲノム（単離体 (isolate) 4 0 8 9 5）は、感染性 P C V 2 分子 D N A クローンを構築するために、P C R によって増幅された。2 コピーの完全な P C V 2 ゲノムを、直列に、p S K ベクターへ連結し、P C V 2 分子 D N A クローン（図 2）を得た。P C V 2 分子 D N A クローンの感染性は、P K - 1 5 細胞の *in vitro* トランスフェクションによって測定した。該分子 D N A クローンは *in vitro* において感染性であり、約 10 ~ 15 % の P K - 1 5 細胞がトランスフェクトされたことが、P C V 2 特異的抗体での I F A によって認められた。P C V 2 特異的抗原は、核において、それより少ないとトランスフェクトされた細胞の細胞質において、I F A によって可視化された（図 2）。空の p S K ベクターで擬似的にトランスフェクトされた細胞は、P C V 2 抗体について陰性であった。

【0078】

実施例 3

P C V 2 分子 D N A クローンでの *in vitro* トランスフェクションおよび生物学的に純粋かつ均一な P C V 2 感染性ウイルスストックの產生

In vitro における該分子 D N A クローンの感染性を試験するために、P C V 1

10

20

30

40

50

で汚染されていないPK-15細胞を8ウェルLabTek chamber slidesにおいて生育させた。PK-15細胞が約85%の集密度に達した時、Lipofectamine Plus Reagentsを用いて、製造者(Life Technologies, Inc)によって提供されたプロトコルに従って、細胞を該分子DNAクローンでトランスフェクトした。空のpSKベクターで擬似的にトランスフェクトされた細胞は、対照として含まれた。トランスフェクションの3日後、4で20分間、80%アセトンおよび20%メタノールを含む溶液で細胞を固定した後、PCV2特異的ウサギポリクローナル抗血清を用いて免疫蛍光アッセイを行い、In vitroにおける該分子DNAクローンの感染性を測定した(下記参照)。

【0079】

動物の接種実験のための、生物学的に純粋かつ均一なPCV2感染性ウイルスストックを産生するために、PCV1に汚染されていないPK-15細胞をT-25培養フラスコ中で培養し、PCV2分子DNAクローンでトランスフェクトした。PK-15細胞を、T-25培養フラスコ中で、約85%の集密度に生育した。トランスフェクションの前に、細胞を滅菌PBSバッファーで1回洗浄した。T-25フラスコにおける各トランスフェクション反応のために、12μgのPCV2プラスミドDNAを、0.35mlMEM培地で、16μlのPlus Reagentと混合した。空のpSKベクターで擬似的にトランスフェクトされた細胞のフラスコは、負の対照として含まれた。室温で15分間インキュベートした後、0.35mlMEM培地で希釈した50μlのLipofectamine Reagentを混合物に加え、室温でさらに15分間インキュベートした。次に、トランスフェクション混合物を、2.5mlの新鮮なMEM培地を含むPK-15細胞のT-25フラスコに加えた。37で3時間培養後、培地を、2%FBSおよび1×抗生素質を含む新鮮なMEM培地と交換した。トランスフェクトされた細胞を、トランスフェクション3日後に回収し、使用するまで-80で保存した。ウイルスストックの感染力価をIFAによって測定した(下記参照)。

【0080】

基本的に、生物学的に純粋かつ均一なPCV2感染性ウイルスストックは、PK-15細胞を、PCV2分子DNAクローンでトランスフェクトすることによって産生される。トランスフェクトされた細胞の溶解物をPK-15細胞の感染にうまく使用することができるため、in vitroトランスフェクションによって生じるPCV2ビリオンは、感染性があった。よって、PCV2分子DNAクローンは、in vitroでトランスフェクトされた時、感染性PCV2ビリオンを産生することができる。トランスフェクトされた細胞から調製された均一なPCV2ウイルスストックの感染力価は、 $1 \times 10^4 \cdot 5$ TCID₅₀/mlと測定された。このウイルスストックを用いて、グループ2においてブタに接種した。空のpSKベクターで擬似的にトランスフェクトされた細胞の溶解物は、PK-15細胞に感染できなかった。

【0081】

実施例4

免疫蛍光アッセイ(IFA)によるウイルス力価測定

均一なPCV2ウイルスストックの感染力価を測定するために、PK-15細胞を8ウェルLabTek chamber slides上で培養した。ウイルスストックを、MEM中で10倍に連続的希釈し、各希釈物を、LabTek chamber slide上で生育した10ウェルの単層PK-15細胞に接種した。非接種細胞のウェルは、対照として含まれる。接種後3日に、感染細胞を、4で20分間、80%アセトンおよび20%メタノールを含む溶液で固定した。細胞をPBSバッファーで洗浄した後、感染細胞を1:1000に希釈したPCV2特異的ウサギポリクローナル抗体(S. D. Sorden et al., "Development of a polyclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of type 2 porcine circovirus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue," J. Vet. Diagn. Invest. 11:528-530 (1999))と、37で1時間インキュベートした。その後、細胞をPBSバッファーで洗浄し、2次FITC標識ヤギ抗ウサギIgG (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc, Gaithersburg, MD)と、37で45分間インキュベートした。スライドグラスをP

10

20

30

40

50

B S バッファーで3回洗浄した後、スライドグラスをフルオロマウントG (fluoromount-G)で封じ込み、カバーガラスをかけ、蛍光顕微鏡の下で観察した。50%組織培養感染量 (T C I D₅₀ / ml) を計測した。初めは、細胞は單一コピーのP C V 2ゲノムを含むプラスミド構築物でトランスフェクトされたが、單一ゲノム構築物由来の感染性P C V 2の力価は、直列ゲノムをもつものよりもはるかに低かった。従って、2量体型のP C V 2ゲノムを含むプラスミド構築物を、*in vitro*および*in vivo*トランスフェクション実験に使用した。

【0082】

実施例5

分子DNAクローニングでのブタの*in vivo*トランスフェクションおよび均一P C V 10 感染性ウイルスストックでのブタの実験的接種

4週齢の特定病原菌不在 (S P F) ブタ40匹を、無作為に10匹ずつ4部屋に割り当てた。接種の前に、S P Fブタは、P C V、P R R S V、P P Vおよびブタ肝炎Eウイルスに対する抗体について検査された。グループ1のブタは未接種であり、負の対照とされた。グループ2のブタは、それぞれ、約 1.9×10^5 T C I D₅₀ のP C V 2分子DNAクローニング由来のP C V 2感染性ウイルスストックで、鼻腔内に接種された。グループ3のブタは、P C V 2分子クローニングの組み換えプラスミドDNAの直接肝内注射を受けた。それぞれのブタは、計 $200 \mu\text{g}$ の組み換えプラスミドDNA (クローニングP C V 2プラスミドDNA) で、超音波誘導技術を通して、肝臓の6力所の異なる部位へ注射された。グループ4のブタは、それぞれ、計 $200 \mu\text{g}$ の組み換えP C V 2プラスミドDNAを、直接浅腸骨リンパ節 (superficial iliac lymph nodes) へ注射され、各リンパ節は2つの独立した注射を受けた。疾病的臨床兆候に関して、動物を毎日監視した。血清サンプルは、接種後日数 (D P I) 0、7、14、21、28、35の各動物から回収した。21 D P Iに、5匹のブタが無作為に選抜され、検死された。各グループ中の残りの5匹の動物は、35 D P Iに検死された。様々な組織および臓器が検死中に回収され、組織学的試験および免疫組織科学的染色のために処理した (下記参照)。

【0083】

結果を以下の表1に示す。グループ2、3および4の全ての感染したブタは、0 D P Iに、P C V 2抗体について陰性であった。未接種の対照グループ1内の2匹のブタは、0 D P Iに、検出可能なP C V 2母系抗体を持っていた。これらの2匹の子ブタにおける母系抗体は、7 D P Iまでに減少した。10匹の未接種の対照のブタのいずれにおいても、P C V 2抗体へのセロコンバージョンは検出されなかった。P C V 2感染性ウイルスを鼻腔内に接種されたグループ2のブタにおいて、21 D P Iまでに1匹の子ブタはP C V 2抗体へセロコンバートした。35 D P Iまでに、グループ2の残りの5匹のブタのうち4匹が、セロコンバートしていた。グループ3および4の感染した動物におけるセロコンバージョンは、28 D P Iに初めて出現した。35 D P Iまでに、グループ3の残り5匹のブタの5匹、およびグループ4残り5匹のブタの3匹が、P C V 2抗体へセロコンバートしていた。

【0084】

3および21 D P Iに全てのブタ、接種後35日に残りのブタにおいて、P P V抗体の検査をした。ブタ共通の病原体であるP P Vに対する母系抗体は、S P F子ブタにおいて検出された。3 D P I (平均力価1:2665) から21 D P I (平均力価1:246) にかけて、明らかに減少した1匹のブタ以外の全てのブタにおけるP P V H I抗体力価は、これらのブタにおいて検出された抗体が受動的に生成されたことを示すものである。1匹の子ブタのP P V H I力価は、3 D P Iにおいて1:32であったものが21 D P Iにおいて1:64にわずかに上昇したが、これは検査のばらつきのためであると思われる。0、21および35 D P Iに全てのブタから血清を採取し、公開されたP C Rアッセイ (J. M. Soucie et al., "Investigation of porcine parvovirus among persons with hemophilia receiving Hyate: C porcine factor VIII concentrate," Transfusion 40:708-711 (2000)) で、さらにP P Vを検査した。いずれのD P IのいずれのブタからもP P

10

20

30

40

50

Vウイルス血症は検出されなかったことから、ブタはPCVに感染していないことがさらに示された。

【0085】

【表1】

表1. PCV2の生ウイルスで接種された、もしくはクローン化PCV2プラスミドDNAで直接注射されたブタにおけるPCV2特異的抗体へのセロコンバージョン

グループ	接種物	接種経路	接種後日数						10
			0	7	14	21	28	35	
1	なし		2/10 ^a	0/10	0/10	0/10	0/5	0/5	
2	PCV2 生ウイルス ^b	鼻腔内	0/10	0/10	0/10	1/10	1/5	4/5	
3	PCV2 DNA ^c	肝臓内	0/10	0/10	0/10	0/10	1/5	5/5	
4	PCV2 DNA ^c	リンパ内	0/10	0/10	0/10	0/10	1/5	3/5	20

^aPCV2抗体はELISAによって測定した。陽性数／試験数。

^bPCV2分子DNAクローンでのPK-15細胞のトランスフェクションにより得られた、生物学的に純粹かつ均一なPCV2ウイルスストック。

^cpSKプラスミドに入ったクローン化PCV2ゲノムDNA。

【0086】

30

実施例6

PCR-RFLP解析

PCV2分子DNAクローンに感染したブタ、およびPCV2感染性ウイルスストックに感染したブタにおけるPCV2ウイルス血症を測定するために、異なるDPIに採取した血清サンプルを、前述のPCR-RFLP解析の通常の方法(上記のM. Fenaux et al., 2000)によって、PCV2 DNAの存在について検査した。DNAZol(登録商標) reagentを用いて、製造者(Molecular Research Center, Cincinnati, OH)により提供された方法に従って、ウイルスDNAを各血清サンプル50 μlから抽出した。抽出されたDNAを、DNAアーゼ、RNアーゼ、およびプロテイナーゼの含まれない水に再懸濁し、PCR-RFLP(同文献)によってPCV2 DNAについて検査した。選択された動物由来のPCR産物を配列解読し、ブタに感染したウイルスの起源を確認した。

40

【0087】

0、7、14、21、28および35DPIに、血清サンプルを、全ての対照および接種された動物から回収し、PCV2 DNA検出(同文献)によってPCV2ウイルス血症検査を行った。結果を以下の表2に示す。PCV2 DNAは、いずれのDPIでもグループ1の未接種の対照のブタにおいて検出されなかった。ウイルス血症は、14DPIにグループ2の7/10のブタにおいて、および35DPIまでに8/10のブタにおいて検出された。グループ2の残りの5匹全てのブタにおいて28DPIおよび35DPIで、PCV2 DNAが検出不能であったことから、ウイルス血症はわずか数週間しか継続しなかった。PCV2分子DNAクローンを肝臓内に注射されたグループ3のブタにお

50

いて、8/10のブタが14 DPIでウイルス血症となり、35 DPIまでに9/10のブタが検出可能なウイルス血症にかかっていた。グループ4のブタは、PCV2分子DNAクローンでリンパ節へ注射された。14 DPIではグループ4の10匹中2匹のブタが、21 DPIでは10匹中8匹のブタがウイルス血症であった。その結果、PCV2分子DNAクローンは、SPFブタの肝臓および浅腸骨リンパ節 (superficial iliac lymph nodes) へ直接注射された場合、感染性があることが示された。選抜された動物由来のPCR産物は、PCV2分子DNAクローンの対応領域と同じであった。

【0088】

【表2】

10

表2. 接種および対照ブタの血清におけるPCRによる
ウイルス血症 (PCV2 DNA) の検出

グループ	接種物	接種経路	接種後日数						合計
			0	7	14	21	28	35	
1	なし		0/10 ^a	0/10	0/10	0/10	0/5	0/5	0/10
2	PCV2生ウイルス ^b	鼻腔内	0/10	0/10	7/10	5/10	0/5	0/5	8/10
3	PCV2 DNA ^c	肝臓内	0/10	0/10	8/10	6/10	3/5	3/5	9/10
4	PCV2 DNA ^c	リンパ内	0/10	0/10	2/10	8/10	2/5	0/5	8/10

^a各グループ10匹、陽性数/試験数

^bPCV2分子DNAクローンでのPK-15細胞のトランスフェクションにより得られた、生物学的に純粋かつ均一なPCV2ウイルスストック。

^cpSKプラスミドに入ったクローン化PCV2ゲノムDNA。

20

30

【0089】

実施例7

臨床評価

0 DPIおよび検死時にブタを計量した。直腸温度および臨床的呼吸器疾患スコアは、0から6(0=正常、6=重度)の範囲にわたり(P. G. Halbur et al., "Comparison of the pathogenicity of two U.S. porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus," Vet. Pathol. 32:648-660 (1995))、0から35 DPIの1日おきに記録した。中枢神経疾患、肝臓病(黄疸)、筋骨格疾患、および体調の変化を含む臨床観察を毎日記録した。

40

【0090】

肉眼的病理学および組織病理学を評価するために、各グループから5匹の豚を、21および35 DPIにおける検死のために無作為に選択した。検死班は、検死時にブタの感染状況が見えなかった。全てのブタで、完全な検死が行われた。評価された肉眼で見える肺炎に冒された肺の割合を、前記スコア系(同文献)をもとに、各ブタについて記録した。スコア系は、およそその体積をもとにしている。スコア系は、各肺葉が肺全体に占めるおよそその体積に基づく:右上葉、右中葉、左上葉の上部および左上葉の下部は、それぞれ肺の全体積の10%を、副葉(accessory lobe)はそれぞれ5%、ならびに右および左下葉はそれぞれ27.5%を占める。リンパ節の肥大のような他の病変は、別に記録した。組織病理学的試験のための切片を、鼻甲介、肺(7切片)(同上)、心臓、脳、リンパ節

50

(気道内、腸骨、腸間膜、鼠径下部 (subinguinal))、扁桃、胸腺、肝臓、胆嚢、脾臓、関節、小腸、大腸、胰臓、および腎臓より採取した。組織は盲検法にて検査され、肺、リンパ節および肝臓病変の主観的スコアを与えられた。肺のスコアは 0 (正常) から 3 (重度リンパ組織球性 (lymphohistiocytic) 間質性肺炎) にわたった。肝臓のスコアは、0 (正常) から 3 (重度リンパ組織球性 (lymphohistiocytic) 肝炎) にわたった。リンパ節のスコアは、小節のリンパ枯渇予測値のために、0 (正常もしくはリンパ枯渇のない) から 3 (重度のリンパ枯渇および小節の組織球の置換) にわたっている。

【0091】

血清学のプロトコルは、11から12日齢に達したとき、および0、7、14、21、28、および35 D P I の全てのブタから血液を採取する際に用いられた。Herd Check P RRSV ELISA (IDEXX Laboratories, Westbrook, MA) を用いて、P R R S V に対する血清抗体を検査した。hemagglutination inhibition (HI) assay (H. S. Joo et al., "A standardized haemagglutination inhibition test for porcine parvovirus antibody," Aust. Vet. J. 52:422-424 (1976)) によって P P V に対する血清抗体を検出した。P C V 2 に対する血清抗体を、P C V 2 の組み換えORFタンパク質をもとに、修正された間接的ELISA (P. Nawagitgul et al., "Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based ELISA for the detection of antibodies to PCV," Immunol. Clin. Diagn. Lab Immunol. 1:33-40 (2002)) によって検出した。部分的に精製されたP C V 2 抗原を、P C V 2 の主要キャップシドORF2タンパク質 (P. Nawagitgul et al., "Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein," J. Gen. Virol. 81:2281-2287 (2000)) を含む組み換えバキュロウイルスに感染させた H i F i v e 細胞 (Invitrogen, Carlsbad, CA) から調製した。野生型バキュロウイルスに感染した H i F i v e 細胞の細胞溶解物を、同様に調製し、負の対照抗原とした。Immulon 2 HB polystyrene microtiter plates (Dynex Technologies Inc, Chantilly, VA) を、4 で 36 時間、最適な濃度の正および負の対照抗原で覆った。100 μ l の 5 % ミルク希釈剤 (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.) で 1 : 100 に希釈した各血清サンプルを、各ウェルに加えた。血清サンプルを 4 連 : 負の対照抗原のための 2 ウェル、および P C V 抗原のための 2 つの平行したウェル、で試験した。正の対照および負の対照血清は、各プレートに含まれている。血清を 37 で 30 分間インキュベート後、0.1% Tween-20 を含む 0.1 M PBS バッファーで 5 回洗浄した。ペルオキシダーゼ標識 2 次抗ブタ IgG (Sigma Co, St. Louis, MO) を、37 で 30 分間インキュベートした。プレートを再び洗浄し、発色のために 2,2'-アジノ-ジ-(3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸) (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc) と 37 で 15 分間インキュベートした。405 nm の吸光度 (OD) を測定した。各試験および対照血清の修正後の OD を、負の抗原を含むウェルの平均 OD 値を、P C V 2 抗原を含む平行ウェルの値から引いて計算した。試験した血清サンプルの修正した OD 値 (S) を、正の対照の血清の値 (P) で割ることによってデータを標準化し、S / P 値として報告した。S / P 値が 0.12 以下、0.12 から 0.2、および 0.2 より大きいサンプルは、それぞれ陰性、どちらでもない、および陽性と考えられる。

【0092】

臨床評価の結果から、対照および接種したブタの中で 1 匹も、臨床的な P M W S の兆候に似た病気の明確な兆候が見られなかった。4 つのグループのいずれの間でも体重増加もしくは平均直腸温度に違いはなかった。グループ 1 の対照のブタは、実験の間中、正常のままであった。8 から 14 D P I に、P C V 2 ウィルスを感染させたグループにおけるブタの大半が軽度の一過性呼吸器疾患であった。これは、ブタの各個体において 1 ~ 2 日継続し、グループとして 5 ~ 6 日継続する、軽度の呼吸困難 (1 から 2 の臨床呼吸器スコア) によって特徴づけられた。

【0093】

検死時に、対照のブタにおいて肉眼的病変は観察されなかった。3 つの接種グループのブタには、肺およびリンパ節に限定される肉眼的病変があった (以下の表 3 参照)。病変

10

20

30

40

50

は、P C V 2 プラスミド D N A 感染およびP C V 2 ウイルス感染グループ間で類似していた。肺は虚脱せず、任意で、多病巣性の、適度に区別された、黄褐色から紫の硬化した領域が、2 1 D P I に肺の0 ~ 2 %を、3 5 D P I に0 ~ 1 3 %を占めた。2 1 および3 5 D P I いずれにおいても、3 つの全てのP C V 2 接種グループのブタの大半においてリンパ節は、正常の大きさの2 ~ 5倍に組織的に肥大し、硬化、褐色となった(図3)。

【0094】

顕微鏡検査により、対照のブタの肝臓を除くいずれの組織においても、病変は発見されなかった。8匹中10匹の対照のブタは、肝臓の門脈周囲の領域において、目立って非常に軽度の多巣性肉芽腫性炎症を起こしていたが、これは正常ブタにおいて共通して見られるものであり、正常のバックグラウンドであると考えられる(上記のP. G. Halbur et al., 2001)。

10

【0095】

2つのP C V 2 プラスミド D N A でトランスフェクトされたグループ(肝臓内およびリンパ内)、ならびにP C V 2 ウイルスに感染させたグループ(鼻腔内)のブタは、脳、肺、心臓、リンパ組織(扁桃、リンパ節、脾臓)、回腸および肝臓において、類似した病変を起こしていた(以下の表4を参照)。脳の病変は、3つの接種されたグループの2 3 / 3 0 のブタにおいて観察され、血管周囲の肥厚および神経膠症を伴う軽度~中程度の多巣性リンパ形質細胞性髄膜脳炎として特徴づけられる。肺の病変は、3つの接種されたグループの2 8 / 3 0 のブタにおいて観察され、軽度~中程度の細気管支周囲リンパ形質細胞性および組織球性細気管支間質性(bronchointerstitial)肺炎として特徴づけられる(図3 C)。2 1 D P I に検死されたP C V ウイルス感染グループ2のうち1匹のブタ、および3 5 D P I に検死された2つのP C V 2 プラスミド D N A 感染グループのうち1匹のブタは、粘膜固有層および気管支の細気管支周囲における線維増殖症および肉芽腫性炎を伴う潰瘍性および増殖性細気管支炎に冒されていた。軽度の多巣性リンパ形質細胞性心筋炎も、1 8 / 3 0 のP C V 2 感染したブタにおいて観察された。1 4 / 3 0 のP C V 2 に感染したブタにおいて、軽度~中程度の多巣性リンパ形質細胞性間質性腎炎が観察された。胸腺において、病変は観察されなかった。P C V 2 感染ブタの8 / 3 0 の扁桃、7 / 3 0 の脾臓、および2 6 / 3 0 のリンパ節において、軽度~中程度のリンパ枯渇(図4 B)およびリンパ小節の組織球性置換(histiocytic replacement)が観察された。2 1 D P I に、P C V 2 ウイルスを鼻腔内に接種された3匹のブタそれぞれにおいて、および3 5 D P I に、P C V 2 プラスミドを鼻腔内にトランスフェクトされたグループ1匹のブタにおいて、巨細胞に伴う中程度の肉芽腫性リンパ節炎(図4 C)が観察された。3 / 5 のP C V 2 ウイルスに感染したブタ、3 / 5 のP C V 2 プラスミド D N A で肝臓内にトランスフェクトされたブタ、1 / 5 のP C V 2 プラスミド D N A をリンパ内にトランスフェクトされたブタにおいて、3 5 D P I に、軽度のリンパ形質細胞性および組織球性腸炎が観察された。P C V 2 プラスミド D N A でトランスフェクトされたグループそれぞれにおける、1匹のブタは、パイエル板において、組織球性置換(histiocytic replacement)および少数の巨細胞を伴う軽度のリンパ枯渇に冒されていた。2 9 / 3 0 の3つのP C V 2 接種ブタにおいて、軽度~中程度のリンパ形質細胞性肝炎が観察された。P C V 2 プラスミド D N A でトランスフェクトされたグループそれぞれの1匹のブタにおいて、2 1 D P I に、リンパ組織球性炎症(lymphohistiocytic inflammation)によって囲まれた、少数の広く分散した個々に壊死性の肝細胞が観察された。他の組織における病変は顕著ではなかった。

20

【0096】

肺、肝臓およびリンパ節における顕微鏡的病変は、公開された評価系に従って評価した(以下の表4)(上記のP. G. Halbur et al., 2001; 上記のP. G. Halbur et al., 1995)。他の組織および臓器のための許容できる評価系はなかった。3つのP C V 2 を接種されたグループのブタにおける、肺およびリンパ節における病変の平均スコアは、グループ1の対照のブタにおけるものと、統計学的に異なった。3つのP C V 2 を接種されたグループのブタにおける、肝臓の病変平均スコアは対照のブタのものと統計学的に異なってはい

30

40

50

なかつた。

【0097】

【表3】

表3. 対照およびPCV2接種ブタにおける肺およびリンパ節の肉眼的病変

グループ	接種物	接種経路	21 DPI		35 DPI		10
			リンパ節	肺	リンパ節	肺	
1	なし		0/5 ^a	0/5	0/5	0/5	
2	PCV2生ウイルス ^b	鼻腔内	5/5	1/5(0-1) ^c	5/5	4/5(0-5)	
3	PCV2 DNA ^d	肝臓内	2/5	2/5(0-2)	5/5	2/5(0-13)	
4	PCV2 DNA ^d	リンパ内	4/5	5/5(0-1)	3/5	1/5(0-9)	20

^a各グループより5匹のブタを21DPIに検死し、残りの5匹を35DPIに検死した。陽性数／試験数。

^bPCV2分子DNAクローンでのPK-15細胞のトランスフェクションにより得られた、生物学的に純粋かつ均一なPCV2ウイルスストック。

^c病変を持つ数／試験数（肉眼的に可視の肺炎病変に冒された肺の推定パーセントの範囲

^dpSKプラスミド中、クローン化ゲノムDNA。

【0098】

【表4】

表4. 対照およびPCV2接種群における組織病理学的病変の分布

グループ	Inocula	接種経路	DPI ^a	肺 ^b	肝臓 ^c	LN ^d	脾臓	胸腺	回腸	脳	心臓	腎臓	扁桃
1	なし		21	0/5(0.0)	4/5(0.8)	0/5(0.0)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2	PCV2ウイルス	鼻腔内	35	0/5(0.0)	4/5(0.8)	0/5(0.0)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
3	PCV2 DNA	肝臓内	35	3/5(0.6)	4/5(1.0)	4/5(0.8)	3/5	0/5	3/5	4/5	0/5	1/5	3/5
4	PCV2 DNA	リンパ内	21	5/5(1.0)	5/5(1.0)	5/5(1.0)	1/5	0/5	0/5	5/5	4/5	1/5	0/5
			35	5/5(1.2)	5/5(1.0)	4/5(1.0)	2/5	0/5	3/5	3/5	4/5	5/5	3/5
			35	5/5(1.2)	5/5(1.0)	5/5(0.8)	0/5	0/5	0/5	4/5	4/5	3/5	0/5
			35	5/5(1.0)	5/5(1.2)	5/5(1.4)	0/5	0/5	1/5	3/5	3/5	3/5	2/5

^a接種後日数(DPI)：各グループより5匹の動物を21DPIに検死し、各グループの残りの5匹を35DPIに検死した。^b陽性数／試験数 (平均組織学的肺スコア：0=正常、1=軽度間質性肺炎、2=中程度、3=重度)^c陽性数／試験数(平均組織学的肝臓スコア：0=正常、1=軽度肝炎、2=中程度、3=重度)^d陽性数／試験数 (平均組織学的リンパ(LN)枯渇スコア：0=正常、1=軽度、2=中程度、3=重度)

実施例 8

免疫組織化学

P C V 2 特異的抗原の免疫組織化学 (IHC) 検出は、DPI 21 および 35 における検死中に採取された全ての組織について行われた。ウサギポリクローナル P C V 2 特異的抗血清を IHC に使用し、一般的な手順は前に記載されている(上記のS. D. Sorden et al., 1999)。

【0100】

P C V 2 の検出および組織内分布のために、P C V 2 抗原の IHC 染色を、21 および 35 DPI に検死された全てのブタの脳、肺、鼻甲介、心臓、腎臓、扁桃、リンパ節、脾臓、胸腺、回腸、肝臓、胆嚢および脾臓を行った。対照のブタ由来の全ての組織は、P C V 2 抗原陰性であった。3つのP C V を接種されたグループにおける、P C V 2 抗原の組織内分布は類似していた(以下の表5 参照)。脳において、P C V 2 抗原は、髄膜および脈絡叢の単核細胞、線維芽細胞様細胞、および内皮細胞において優位に、大脳および小脳の内皮細胞および血管周囲の単核細胞においては、それより少なく見られた。肺において、P C V 2 抗原は、肺胞および隔膜マクロファージ内、ならびに気道の固有層内の線維芽細胞様細胞において検出された(図3D)。心臓において、P C V 2 抗原は、広く分散したマクロファージおよび内皮細胞において検出された。腎臓において、P C V 2 抗原は、尿細管上皮細胞および間質の単核細胞に内で検出された。リンパ組織(リンパ節、脾臓、扁桃およびパイラー板)において、P C V 2 抗原は、初めにマクロファージおよび樹状細胞様細胞およびリンパ小節内の巨細胞内で検出された(図4D)。P C V 2 抗原は、小腸の固有層におけるマクロファージ内でも検出された。肝臓において、P C V 2 抗原は、単核細胞およびクッパー細胞内で検出された。P C V 2 抗原は、胸腺、鼻甲介または胆嚢において検出されなかった。

【0101】

10

20

【表5】

表5. 免疫組織化学による対照およびPCV2接種群におけるPCV2特異的抗原の検出および分布

群	接種物	接種経路	DPI ^a	肺	肝臓	LN	脾臓	胸腺	回腸	脳	心臓	腎臓	扁桃	
1	なし		21	0/5 ^b	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
2	PCV2ウイルス	鼻腔内	35	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
3	PCV2 DNA	肝臓内	21	4/5	5/5	5/5	3/5	0/5	3/5	3/5	1/5	1/5	2/5	
4	PCV2 DNA	リンパ内	35	1/5	2/5	3/5	2/5	0/5	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5	
			35	4/5	4/5	3/5	4/5	0/5	3/5	4/5	2/5	2/5	3/5	
			35	4/5	4/5	5/5	5/5	0/5	0/5	5/5	1/5	0/5	2/5	
			35	3/5	4/5	5/5	4/5	0/5	2/5	3/5	1/5	0/5	3/5	

^a接種後日数(DPI)：各グループより5匹の動物を21DPIに検死し、各グループの残りの5匹を35DPIに検死した。

^b陽性数／試験数

実施例 9

非病原性 P C V 1 感染性 D N A クローンの構築

P C V 1 感染性 D N A クローンの構築に用いた手順は、本明細書に記載された P C V 2 のものと本質的に同じである。1対のプライマー、配列番号 7 に記載のKPNPCV1.U および配列番号 8 に記載のKPNPCV1.L (以下の表 6 参照) を、P C V 1 の公開された配列をもとに設計した。このプライマーペアは、単一の Kpn I 制限酵素サイトを含む重複部分をもつ P C V 1 の完全なゲノムを増幅する。P C V 1 ウィルスの D N A は、American Type Culture Collection (ATCC受託番号 CCL-33) より得られた、汚染した ATCC PK-15 細胞株より抽出された。P C V 1 D N A を、QIAamp DNA Minikit (Qiagen, Inc., Valencia, CA) を用いて、持続的に P C V 1 に感染した ATCC PK-15 細胞より抽出した。
10 抽出された D N A を AmpliTaq Gold Polymerase (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) を用いた P C R によって増幅した。P C R 反応は、95 で 9 分間の最初の酵素活性化処理、次いで、35 サイクルの 94 で 1 分間の変性、48 で 1 分間のアニーリング、72 で 2 分間の伸長、および 72 で 7 分間の最後の伸長からなる。予想される大きさの P C R 産物を、ゲル電気泳動によって分離し、Geneclean Kit (Bio 101, Inc., La Jolla, CA) を用いたガラスミルク処理で精製した。完全な P C V 1 ゲノムを含む精製した P C R 産物を、まず、advanTAge プラスミドベクター (Clontech, Palo Alto, CA) に連結した。イー・コリ (E. Coli) DH5 コンピテントセルを形質転換した。組み換えプラスミドを、制限酵素消化によって確認した。全長 P C V 1 ゲノム D N A を、Kpn I 制限酵素での消化によって、advanTAge ベクターから切り出した。全長 P C V 1 ゲノム D N A を、T 4 D N A リガーゼで、37 にて一晩処理して、pBluescript SK(+) ベクター (pSK) (Stratagene Inc., La Jolla, CA) に連結した。全長 P C V 1 ゲノムを含む組み換えプラスミドを、Qiagen plasmid mini kit (Qiagen, Valencia, CA) によって単離し、制限酵素消化および D N A 配列解読によって確認した。全長 P C V 1 ゲノム D N A を、Kpn I 消化によって pSK ベクターから切り出し、2 量体化し、前の実施例 2 に記載の P C V 2 感染性クローニングのように、P C V 1 感染性 D N A クローンを作製した。これらの直列 2 量体を作製したのは、2 量体化直列 D N A クローンを、細胞にトランスフェクトさせ、感染性ビリオンを得ることが、より簡単であることが有利に判明したからである。P C V 1 D N A の直列 2 量体を作製するために、消化した P C V 1 ゲノム D N A を、直列 2 量体の生成に好ましい T 4 D N A リガーゼで、37 で 10 分間だけ処理して連結した。次に、直列 2 量体を、pBluescript SK(+) ベクター (pSK) (Stratagene Inc., La Jolla, CA) にクローニングした。P C V 1 ゲノムの直列 2 量体を含む組み換えプラスミド (本明細書中では P C V 1 D N A クローンと示す) を、P C R、制限酵素消化および D N A 配列解読によって確認した。組み換えプラスミドの D N A 濃度を分光光度計によって測定した。
20
30

【 0 1 0 3 】

【表6】

プライマー	方向	プライマー配列	用途
構築プライマー:			
KPNPCV1.U.	> ^a	5'-TTGGTACCCGAAGGCCGATT-3' (配列番号 7に対応)	PCV1 DNA クローン構築
KPNPCV1.L.	<	5'-ATTGGTACCTCCGGATTGGTCT-3' (配列番号 8に対応)	PCV1 DNA クローン構築
Hpa I-2	<	5'-GAAGTTAACCTAAATGAATAAAATAAAACATTACG-3' (配列番号 9に対応)	PCV1-2 DNA クローン構築
Nar I-3	>	5'-GGTGGCGCCTCCCTGGATACTCATCTATAAAAGTG-3' (配列番号 10に対応)	PCV1-2 DNA クローン構築
Psi I-5	>	5'-AGGTTATAAGTGGGGTCTTTAAGATTAA-3' (配列番号 11に対応)	PCV1-2 DNA クローン構築
Acl I-6	<	5'-GGAAACGTTACCGAGAAAGAACACCC-3' (配列番号 12に対応)	PCV1-2 DNA クローン構築
Bgl II-ORF2	>	5'-ACTATAGATCTTATTCAATTAGGGTCTTTCAAG-3' (配列番号 13に対応)	PCV2-1 DNA クローン構築
SpH-I-ORF2	<	5'-TACGGGCATGCACTGACGTGCCAAGGGAGG-3' (配列番号 14に対応)	PCV2-1 DNA クローン構築
Bgl II-PCV2	<	5'-AGACGGAGATCTATGAATAATAAAACCATTAGGAAG-3' (配列番号 15に対応)	PCV2-1 DNA クローン構築
SpH-I-PCV2	>	5'-CGTAAGCATGCAAGCTGAAAAGAAAGTG-3' (配列番号 16に対応)	PCV2-1 DNA クローン構築
検出プライマー:			
MCV1	>	5'-GCTGAACCTTTGAAAGTGACGGGG-3' (配列番号 17に対応)	PCV1 および PCV2 の検出
MCV2	<	5'-TCACACAGTCTCAGTACATCCCCA-3' (配列番号 18に対応)	PCV1 および PCV2 の検出
Orf.PCV1	<	5'-CCAACCTTGTAACCCCCTCCA-3' (配列番号 19に対応)	PCV1 および PCV2-1 の検出
Gen.PCV1	>	5'-GTGGACCCACCCCTGTGCC-3' (配列番号 20に対応)	PCV1 および PCV1-2 の検出
Nested.Orf.PCV1	<	5'-CCAGCTGGCTCAATTAA-3' (配列番号 21に対応)	PCV1 および PCV2-1 の検出
Nested.Gen.PCV1	>	5'-TTCCCATAAAATTACTGAGTCTT-3' (配列番号 22に対応)	PCV1 および PCV1-2 の検出
Orf.PCV2	<	5'-CAGTCAGAACGCCCTCCTG-3' (配列番号 23に対応)	PCV2 および PCV1-2 の検出
Gen.PCV2	>	5'-CCTAGAAACAAGTGGTGGGATG-3' (配列番号 24に対応)	PCV2 および PCV2-1 の検出
Nested.Orf.PCV2	<	5'-TTGTAACAAAGGCCACAGC-3' (配列番号 25に対応)	PCV2 および PCV1-2 の検出
Nested.Gen.PCV2	>	5'-GTGTGATCGATTCATTGACTG-3' (配列番号 26に対応)	PCV2 および PCV2-1 の検出

^aプライマーの方向

【0104】

実施例10

ウイルス汚染のないPK-15細胞へトランスフェクトした場合のPCV1 DNAクローンの感染性の評価

PCV1分子DNAクローンの感染性は、PK-15細胞のin vitroトランスフェクションによって測定した。PCV1特異的モノクローナル抗体(Dr. Gordon Allan, Belfast, U.K.から贈与された)でのIFAによって、PCV1分子DNAクロー

ンはPK-15細胞において感染性があることが確認された。PCV1特異的抗原は、核において、それより少ないがトランスフェクトされた細胞の細胞質において、IFAによって可視化された(図2)。空のpSKベクターで擬似的にトランスフェクトされた細胞は、PCV1抗体について陰性であった。

【0105】

実施例11

キメラPCV1-2ウイルスDNAクローンの構築

キメラウイルスは、非病原性PCV1およびPMWSと関連したPCV2の間で、PCV1およびPCV2の感染性DNAクローンを用いて構築された。キメラPCV1-2DNAクローンを構築するために、非病原性PCV1のORF2キャプシド遺伝子をPCV1感染性DNAクローンから除去し、PCV1ゲノム骨格において、病原性PCV2の免疫原性ORF2キャプシド遺伝子で置換した(図5および6参照)。二対のPCRプライマーを設計した。PCV2 ORF2用の1つ目のプライマーペアは、配列番号11に記載のPsi I-5および配列番号12に記載のAcl I-6であり、プライマーの5'末端における点変異を用いて制限酵素サイトAcl IおよびPsi Iを生じさせて、PCV2のORF2遺伝子を増幅し、点変異により隣接するPsi IおよびAcl I制限酵素サイトを導入する。PCV2 ORF2増幅のためのPCR反応は、95度9分間の最初の酵素活性化処理、次いで、38サイクルの95度1分間の変性、48度1分間のアニーリング、72度1分間の伸長、および72度7分間の最後の伸長で構成された。

【0106】

2つめの対のPCRプライマーは、配列番号9に記載のHpa I-2、および配列番号10に記載のNar I-3であり、pSK+ベクターおよびそのPCV1ゲノム挿入物の増幅のために設計された。点変異をPCRプライマーの5'末端に導入して、隣接したNar IおよびHpa I制限酵素サイトを作った。このプライマーペアで、pSK+ベクターおよびORF2キャプシド遺伝子を欠いたその挿入PCV1ゲノムDNA、つまり、PCV1ゲノムマイナスPCV1 ORF2(pSK-PCV1 ORF2)を、PCV1感染性DNAクローンをPCRの錫型として用いて増幅した。PCR反応は、95度9分間の最初の酵素活性化処理、次いで、38サイクルの95度1分間の変性、48度1分間のアニーリング、72度1分間の伸長、および72度7分間の最後の伸長で構成された。PCV2 ORF2のPCR産物を、Acl IおよびPsi Iで消化し、導入された点変異を除去した。pSK-PCV1 ORF2産物(pSKベクター-PCV1のORF遺伝子を欠くPCV1ゲノムPCR産物)を、Nar IおよびHpa Iで消化し、PCRで導入された点変異を除去した。後者の消化によって、Acl IおよびPsi I制限酵素により消化されたPCV2 ORF2のPCR産物に相補的な、粘着末端と平滑末端が得られた。消化されたPCV2 ORF2産物、およびORF2欠失pSK-PCV1産物を、T4DNAリガーゼで連結し、PCV1のORF2遺伝子がPCV2のORF2遺伝子で置換された、キメラPCV1-2ゲノムDNAクローンを作製した。一度、2つのPCR産物を消化し再連結すれば、生じたキメラクローンにおいて、クローニングをしやすくするために用いられたすべてのPCRで導入された点変異が除去された。エシェリキア・コリ(Escherichia coli)DH5⁺(コンピテントセルを形質転換した。キメラDNAクローンを含む組み換えプラスミドを単離し、PCR、制限酵素消化および部分的なDNA配列解読によって確認した。全長キメラPCV1-2 DNAゲノムを、pSK+ベクター(組み換えプラスミド)から、Kpn I消化によって切り出した。次いで、PCV1-2キメラ感染性DNAクローン(図6)を得るために、キメラDNAゲノムを、直列2量体の形成を好むT4リガーゼでの、短い10分間の連結反応によって2量体化した。2コピーのキメラウイルスゲノムを含む組み換えプラスミドを、PCR、制限酵素消化およびDNA配列解読によって確認した。

【0107】

実施例12

PCV1-2キメラDNAクローンのin vitro感染性の評価

10

20

30

40

50

キメラ P C V D N A クローン (P C V 2 の免疫原性キャプシド遺伝子をもつ非病原性 P C V 1) の生存性を、 P K - 1 5 細胞において試験した。 P K - 1 5 細胞をキメラウイルス D N A クローンでトランスフェクトしたとき、トランスフェクション約 2 日後において、 I F A によって、 P C V 2 O R F 2 キャプシドに特異的なウイルス抗原が検出された。 P C V 1 キャプシド抗原は、トランスフェクトされた細胞において検出されなかった。この実験によって、キメラ D N A が in vitro において感染性があり、 P K - 1 5 細胞において複製し、免疫原性キャプシドタンパク質を產生していることが示された。

【 0 1 0 8 】

実施例 1 3

交互キメラ P C V 2 - 1 D N A クローンの構築

10

相互 P C V 2 - 1 キメラ D N A クローンを構築するために、 P C V 2 の O R F 2 キャプシド遺伝子を、非病原性 P C V 1 のものにより、病原性 P C V 2 ゲノム骨格において置換した(図 6)。2 対の P C R プライマーを設計した：配列番号 1 3 に記載の B g 1 - I I - O R F 、および配列番号 1 4 に記載の S p H - I - O R F 2 の対は、 P C V 1 O R F 2 遺伝子を増幅し、点変異によって、隣接した B g 1 I I および S p H I 制限酵素サイトを導入する。2 つめのプライマーペアは、配列番号 1 5 に記載の B g 1 - I I - P C V 2 、および配列番号 1 6 に記載の S p H - I - P C V 2 であり、 P C R の鑄型として P C V 2 感染性 D N A クローンを用いることによって、 p S K ベクターおよび O R F 2 遺伝子のない P C V 2 ゲノム(p S K - P C V 2 O R F 2)を増幅し、点変異によって、隣接した B g 1 I I および S p H I 制限酵素サイトを導入する。 p S K - P C V 2 O R F 2 産物および P C V 2 O R F 2 の P C R 産物を、 B g 1 I I および S p H I 制限酵素によって消化し、相補的付着および平滑末端を得て、互いを連結した。イー・コリ(E. Col i)細胞へ形質転換した後、正しい組み換えプラスミドを単離し、制限酵素消化および D N A 配列解読によって確認した。全長交互キメラ P C V 2 - 1 ゲノムを、 S a c I I 消化によって組み換えプラスミドから切り出し、本明細書に記載のように 2 量体化し、交互キメラ P C V 2 - 1 感染性クローンを得た。

20

【 0 1 0 9 】

実施例 1 4

P C V 1 、 P C V 2 、 P C V 1 - 2 および P C V 2 - 1 D N A クローンでの P K - 1 5 細胞の in vitro トランスフェクション

30

P C V 2 クローンの in vitro および in vivo における感染性は、前記実施例 3 ~ 5 において明らかにされた。 P C V 1 および 2 つのキメラクローンの in vitro における感染性を試験するために、実施例 1 の方法によって調製された P C V 1 汚染のない P K - 1 5 細胞を、 8 ウエル LabTek chambers slides (Nalge Nunc Int., Denmark)において生育した。 P K - 1 5 細胞が約 8 0 % の集密度に達したとき、 Lipofectamine Plus Reagent を用いて、製造者(Life Technologies, Inc)によって提供されたプロトコルに従って、細胞をそれぞれ P C V 1 、 P C V 2 、 P C V 1 - 2 および P C V 2 - 1 D N A クローンでトランスフェクトした。空の p S K ベクターで擬似的にトランスフェクトされた細胞は、対照として含まれた。トランスフェクションから 3 日後に、 8 0 % アセトンおよび 2 0 % メタノールを含む溶液で、 4 ℃ で 2 0 分間処理して細胞を固定した。 P C V 1 および P C V 2 - 1 D N A クローンでトランスフェクトされた細胞における感染性およびウイルス複製の証拠は、 Dr. G. M. Allan (G. M. Allan et al., "Production, preliminary characterization and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus," Vet. Immunol. Immunopathol. 43:357-371 (1994)) によって早く提供してもらった、 P C V 1 O R F 2 キャプシド遺伝子に対するモノクローナル抗体を用いた間接免疫蛍光アッセイによって確認された。固定された細胞を、リン酸緩衝食塩水(P B S)で洗浄し、 1 : 2 0 に希釈した P C V 1 モノクローナル抗体と、 3 7 ℃ で 1 時間インキュベートした。その後、細胞を P B S バッファーで 3 回洗浄し、フルオレセインイソチオシアネート(F I T C)標識ヤギ抗マウスイムノグロブリン G (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Md.) と、 3 7 ℃ で 4 5 分間インキュベートした。 P B

40

50

S バッファーで 3 回洗浄した後、スライドグラスをフルオロマウント G (fluoromount-G) で封じ込み、カバーガラスをかけ、蛍光顕微鏡の下で試験した。P C V 2 および P C V 1 - 2 DNA クローンでトランスフェクトされた細胞の感染性は、実施例 4 に記載されたように、P C V 2 に特異的な抗体を用いた I F A によって確認された。

【 0 1 1 0 】

P C V 1、キメラ P C V 1 - 2 DNA および交互キメラ P C V 2 - 1 DNA クローンの感染性を、P K - 15 細胞の *in vitro* トランスフェクションによって実証した。完全な P C V 1 ゲノムの 2 つの同一コピーを、直列に p S K ベクターに連結することによって P C V 1 DNA クローンを得た。キメラ P C V 1 - 2 DNA クローンは、非病原性 P C V 1 ゲノム骨格において、病原性 P C V 2 のものによって置換された P C V 1 の ORF 2 キャプシド遺伝子を持つ(図 6)。交互キメラ P C V 2 - 1 DNA クローンは、病原性 P C V 2 ゲノム骨格において、非病原性 P C V 1 のものによって置換された P C V 2 の ORF 2 キャプシド遺伝子を持つ。In vitro において感染性があるならば、P K - 15 細胞において、キメラ P C V 1 - 2 DNA クローンは、P C V 2 の ORF 2 キャプシド抗原を産生するであろうし、交互キメラ P C V 2 - 1 DNA クローンは、P C V 1 ORF 2 キャプシド抗原を発現するであろう。結果は、P C V 1、キメラ P C V 1 - 2 および交互キメラ P C V 2 - 1 DNA クローンは、驚くべきことに、P K - 15 細胞へトランスフェクトされた場合に、全てが感染性であり、P C V 1 もしくは P C V 2 に特異的な抗体を用いた I F A によって証明されるように、それぞれのウイルスキャプシドタンパク質を発現することを示した。P C V 1 ORF 2 に対するモノクローナル抗体および P C V 2 に対する抗体を用いた I F A によって、P C V 1 DNA および P C V 1 - 2 DNA クローンは感染性であることが確認された。P C V 1 ORF 2 特異的モノクローナル抗体を用いた I F A によって、P C V 1 - 2 キメラ DNA クローンも感染性であることが示された。トランスフェクトされた P K - 15 細胞の約 10 ~ 20 % は、P C V 1 キャプシド抗原および P C V 2 抗原について陽性であり、トランスフェクトされた細胞の核内において、P C V 1 ORF 2 抗原を発現した(図 7)。

【 0 1 1 1 】

実施例 15

P C V 1、P C V 2、キメラ P C V 1 - 2 および交互キメラ P C V 2 - 1 クローンでの
ブタの実験的接種

キメラ DNA クローンの免疫原性および病原性を評価するために、40 匹の 4 ~ 6 週齢の特定病原体不在 (SPF) ブタを、無作為に 8 匹ずつ 5 部屋に割り当てた。接種前に、動物を、P C V、P R R S V、P P V、およびブタ肝炎 E ウィルスに対する抗体について検査した。さらに、接種前の血清サンプルを、P C R によって、P C V 1 および P C V 2 核酸について検査し、ブタがウイルスのいずれかに自然感染していないことを確認した。P C V 1、P C V 2、P C V 1 - 2 および P C V 2 - 1 DNA クローン全てを、プラスミド DNA の、ブタ浅腸骨リンパ節 (superficial iliac lymph nodes) への直接注射によって接種した。グループ 1 のブタは、リン酸緩衝食塩水 (P B S バッファー) を接種され、負の対照とされた。グループ 2 のブタは、それぞれ、浅腸骨リンパ節 (superficial iliac lymph nodes) に、200 µg の感染性 P C V 1 DNA クローンを注射された。グループ 3 のブタは、それぞれ、200 µg の感染性 P C V 2 DNA クローンで注射された。グループ 4 のブタは、それぞれ、200 µg の感染性キメラ P C V 1 - 2 DNA クローンの注射を受けた。グループ 5 のブタは、それぞれ、200 µg の感染性相互 P C V 2 - 1 DNA クローンを注射された。疾病的臨床兆候のため、動物を毎日監視した。接種後 (D P I) - 2、7、14、21、28、35、42 および 49 において、それぞれの動物から血清を採取した。21 D P I において、各グループから 4 匹の無作為に選択された動物を検死した。各グループに残った 4 匹の動物は、49 D P I に検死された。実施例 7 に記載したように、様々な組織および臓器を検死中に採取し、組織学的試験を行った。

【 0 1 1 2 】

10

20

30

40

50

PCV1、PCV2およびキメラ感染性DNAクローンの免疫原性を、ブタにおいて試験した。-2(0)、7、14、21、28、35、42および49DPIに、全ての対照および接種された動物から採取した血清を、PCV1、PCV2、PCV1-2およびPCV2-1ウイルス血症について、クローン特異的DNA配列のPCR検出によって、抗PCV1抗体についてIFAによって、ならびに抗PCV2 ORF2抗体についてはELISAによって検査した。接種前の-2DPIに、5つ全てのグループのブタは、PCV1およびPCV2いずれについても陰性であることを、PCRによって検査されている

【0113】

負の対照動物は、研究を通してずっと、PCV1およびPCV2ウイルス血症いずれについても陰性であった（以下の表7を参照）。-2DPIにおいて、未接種の対照グループにおける5匹のブタは、検出可能なPCV2母系抗体を持っており、7DPIにおいて2匹のブタは検出可能なPCV1母系抗体を持っていた（以下の表8参照）。子ブタにおける、PCV1およびPCV2いずれに対する母系抗体も、21DPIまでに消滅した。研究を通して、8匹の未接種の対照のブタのいずれにおいても、PCV1またはPCV2へのセロコンバージョンは検出されなかった。

【0114】

PCV1接種グループにおいて、ウイルス血症は、7DPIに初めて接種されたブタにおいて検出され（以下の表7）、最後は35DPIに検出された。PCV1感染性DNAクローンで接種された8匹の動物のうち5匹は、PCV1ウイルス血症について陽性であった。PCV1ウイルス血症が継続した平均の長さは、0.625週であった。PCV1接種グループ中全ての動物が、21DPIまでにPCVへセロコンバートし、49DPIの研究終了時までPCV1抗体に対して陽性のままであった。

【0115】

PCV2 DNAクローンは、ブタにおいて感染性であると本明細書に示されている。PCV2 DNAクローンを接種されたグループにおいて、PCV2ウイルス血症は、7DPIに初めて検出された（以下の表7）。21DPIまでに、全てのPCV2接種グループ3の動物は、PCV2ウイルス血症について陽性となった。PCV2ウイルス血症が継続した平均の長さは、2.12週であった。PCV2接種グループ中2匹のブタは、7DPIにおいて、母系PCV2抗体を検出可能な程度持っていたが（以下の表8）、これらの子ブタにおける母系抗体は14DPIまでに消滅した。PCV2特異的ELISAによって検査されるPCV2へセロコンバージョンは、35DPIにおいて初めて検出された。42DPIまでに、PCV2感染性DNAクローンで接種された全てのブタは、PCV2へセロコンバートした。

【0116】

PCV1-2キメラ感染性DNAクローンで接種されたグループ4のブタにおいて、キメラウイルス特異的なウイルス血症は、14DPIに初めて検出された（以下の表7）。接種された動物の7匹中4匹は、14DPIと42DPIの間にPCV1-2に対するウイルス血症となった。キメラPCV1-2ウイルス血症が継続した平均の長さは、1週であった。1匹のブタは、7および14DPIにおいて、検出可能なレベルの母系PCV2抗体を持っていたが、母系抗体は21DPIまでに消滅した（以下の表8）。PCV2 ORF2特異的抗体へのセロコンバージョンは、28DPIに初めて起こった。49DPIまでに、キメラPCV1-2 DNAクローンで接種された全てのブタが、PCV2 ORF2特異的抗体へセロコンバートした。

【0117】

交互キメラPCV2-1 DNAクローンで接種されたブタにおいて、PCV2-1キメラウイルスに特異的なウイルスDNAは、血清サンプルにおいて検出されなかった（以下の表7）。しかし、21DPIまでに、グループ5の全ての動物が、PCV1抗体へセロコンバートした。各グループから選択されたブタより増幅されたPCR産物を、配列解読したところ、それぞれのグループにおいて接種に用いられたそれぞれの感染性クローン

10

20

30

40

50

そのものであることが確認された。

【0118】

【表7】

表7. 接種および対照ブタの血清中のウイルス血症のネステッドPCRによる検出

グループ	接種物	DPI							合計
		-2	7	14	21	28	35	42	
1	PBS ^a	0/8 ^b	0/8	0/8	0/8	0/4	0/4	0/4	0/8
2	PCV1 DNA ^c	0/8	1/8	1/8	2/8	0/4	2/4	0/4	0/4
3	PCV2 DNA ^c	0/8	3/8	6/8	7/8	1/4	2/4	2/4	0/4
4	PCV1-2 DNA ^c	0/7	0/7	1/7	2/7	2/4	2/4	2/4	0/4
5	PCV2-1 DNA ^c	0/8	0/8	0/8	0/8	0/4	0/4	0/4	0/8

^aリン酸緩衝食塩水(PBS)は負の対照として用いた

^b各グループにつき8匹のブタ; 陽性数/試験数

^cpSKプラスミド中のクローン化ゲノムPCVもしくはキメラPCV DNA

【0119】

20

【表8】

表8. PCV2もしくはキメラPCV1-2DNAクローンを接種されたブタにおけるPCV2に対する抗体へのセロコンバージョン、およびPCV1もしくはキメラPCV2-1DNAクローンを接種されたブタにおけるPCV1に対する抗体へのセロコンバージョン

グループ	接種物 ^a	試験された抗体 ^b	DPI ^c					
			-2	7	14	21	28	35
1	PBS	PCV1	NA	2/8	2/8	1/8	0/4	0/4
		PCV2	5/8	5/8	2/8	0/8	0/4	0/4
		PCV1 ORF2	NA	3/8	2/8	8/8	4/4	4/4
2	PCV1 DNA	PCV2 完全ウイルス	3/8	2/8	0/8	0/8	0/4	4/4
	PCV2 DNA	PCV2 完全ウイルス	2/8	1/8	0/8	1/4	1/4	4/4
3	PCV1-2 DNA	PCV1 ORF2	NA	3/8	3/8	8/8	3/4	3/4
4	PCV1-2 DNA	PCV1 ORF2	NA	3/8	3/8	8/8	3/4	4/4
5	PCV2-1 DNA	PCV1 ORF2	NA	3/8	3/8	8/8	3/4	4/4

^aリン酸緩衝食塩水 (PBS) は負の対照として用いた。接種物は、pSKプラスミド中クローン化ゲノムPCVもしくはPCVキメラDNAであった。

^bORF2に対するPCV1抗体を、PCV1抗原に特異的な間接免疫蛍光アッセイで測定した。PCV2抗体は、酵素結合免疫吸着検定法によって測定された。

^c接種後日数；陽性数／試験数。

実施例 16

臨床評価

0 D P I および検死時に、ブタを計量した。直腸温度および臨床的呼吸器疾患スコアは、0 から 6 (0 = 正常、6 = 重度) の範囲にわたり (P. G. Halbur et al., "Comparison of the pathogenicity of two U.S. porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus," *Vet. Pathol.* 32:648-660 (1995)) 、0 から 49 D P I の 1 日おきに記録した。中枢神経疾患、肝臓病 (黄疸)、筋骨格疾患、および体調の変化を含む臨床観察を毎日記録した。二人組で全ての臨床評価を行った。

【0121】

対照または感染したブタは、1 匹も、広範囲の臨床的 P M W S の明確な兆候を示さなかった。いずれのグループ間でも、体重増加もしくは平均直腸温度に違いはなかった。接種 1 日後に、P C V 1 - 2 で接種されたグループ 3 のブタのうち 1 匹が死亡した。検死および臨床分析後、病原体は検出されず、死は接種手順もしくはキメラ P C V 1 - 2 ウィルスと関連していなかった。

【0122】

実施例 17

肉眼的病理学および組織病理学

各グループより 4 匹のブタが、それぞれ 21 および 49 D P I に検死された。検死班は、検死時にブタの感染状況がわからないようにした。全てのブタで、完全な検死が行われた。評価された肉眼で見える肺炎に冒された肺の割合を、前記のスコア系 (上記の P. G. Halbur et al., 1995) をもとに、各ブタについて記録した。リンパ節の肥大のような他の病変は、別に記録した。組織病理学的試験のための切片を、鼻甲介、肺 (7 切片) (同上)、心臓、脳、リンパ節 (気道内、腸骨、腸間膜、鼠径下部 (subinguinal))、扁桃、胸腺、肝臓、胆嚢、脾臓、関節、小腸、大腸、脾臓、および腎臓より採取した。実施例 7 に記載のように、組織を盲検法にて試験し、肺、リンパ節および肝臓の病変に主観的スコアを与えた。肺のスコアは 0 (正常) から 3 (重度リンパ組織球性 (lymphohistiocytic) 間質性肺炎) にわたった。肝臓のスコアは、0 (正常) から 3 (重度リンパ組織球性 (lymphohistiocytic) 肝炎) にわたった。リンパ節のスコアは、小節のリンパ枯渇予測値のために、0 (正常もしくはリンパ枯渇のない) から 3 (重度のリンパ枯渇および小節の組織球の置換) にわたっている。

【0123】

ブタにおける P C V 1、P C V 2、キメラ P C V 1 - 2 および交互キメラ P C V 2 - 1 感染性 D N A クローンの病原性を判定するために、まず肉眼的病変を検査した。結果を以下の表 9 に示す。未接種対照グループ 1 の動物のリンパ節は、21 および 49 D P I いずれにおいても正常であった。4 つの接種グループのブタの、リンパ節に限定された肉眼的病変の程度は多様であった。P C V 1 接種グループ 2 のブタにおいて、21 D P I にはリンパ節は正常であったが、49 D P I に軽度～中程度のリンパ節の腫れおよび変色が検出された。P C V 2 接種グループ 3 の全てのブタのリンパ節は、21 および 49 D P I いずれにおいても、正常の大きさの 2～5 倍に肥大し、硬化および黄褐色に変色していた。

キメラ P C V 1 - 2 接種グループ 4 の動物のリンパ節は、7 匹中 5 匹のブタで、21 および 49 D P I いずれにおいても、軽度～中程度に腫れおよび変色していた。P C V 2 - 1 クローンで接種されたグループ 5 のブタにおいて、8 匹中 1 匹の動物のリンパ節が、21 D P I に腫れおよび変色していた。21 および 49 D P I いずれにおいても、キメラ P C V 1 - 2 クローンで接種されたブタにおけるリンパ節の肉眼的病変の平均スコアは、統計的にグループ 1、2 および 5 のものと異なるが、病原性 P C V 2 接種グループ 3 のものとも統計学的に異なっていた。P C V 1、P C V 2 および P C V 1 - 2 接種動物から得られた 49 D P I におけるリンパ球の平均肉眼的病変スコアは、互いに統計的に異なるものであったが、全てグループ 1 および 5 の平均肉眼的病変スコアとも統計的に異なっていた。

【0124】

次いで、顕微鏡的病変を検査した。結果を以下の表 10 に示す。いずれの D P I でも、

10

20

30

40

50

未接種対照グループ1、もしくはPCV1接種グループ2のブタのいずれにおいても、顕微鏡的病変は検出されなかった。軽度の細気管支周囲リンパ形質細胞性および組織球性細気管支間質性(bronchointerstitial)肺炎を特徴とする顕微鏡的な肺の病変は、PCV接種動物の8匹中1匹で観察された。PCV1-2およびPCV2-1接種動物において、肺における顕微鏡的病変は観察されなかった。いずれの接種ブタの胸腺においても、病変は観察されなかった。軽度の多巣性リンパ形質細胞性心筋炎は、PCV2接種グループの8匹中2匹において観察された。PCV1-2およびPCV2-1接種動物の心臓組織に、顕微鏡的病変はなかった。PCV2接種グループの8匹中4匹、PCV1-2接種ブタの7匹中2匹、PCV2-1接種ブタの8匹中1匹において、軽度の多巣性リンパ形質細胞性間質性腎炎が観察された。軽度から中程度のリンパ枯渇およびろ胞の組織球性置換(histiocytic replacement)は、PCV2接種グループの8匹中5匹の扁桃、8匹中3匹の脾臓、および8匹中8匹のリンパ節において観察された。キメラPCV1-2接種動物において、軽度から中程度のリンパ枯渇およびろ胞の組織球性置換(histiocytic replacement)は、7匹中2匹のリンパ節で観察されたが、脾臓もしくは扁桃いずれにおいても検出されなかった。交互キメラPCV2-1接種動物のリンパ節、脾臓もしくは扁桃において、軽度から中程度のリンパ枯渇およびろ胞の組織球性置換(histiocytic replacement)は観察されなかった。軽度から中程度のリンパ形質細胞性肝炎は、PCV2接種ブタの8匹中7匹において観察された。軽度から中程度のリンパ形質細胞性肝炎は、キメラPCV1-2接種ブタの7匹中2匹において観察された。交互キメラPCV2-1接種ブタにおいて、リンパ形質細胞性肝炎は観察されなかった。他の組織における病変は、顕著ではなかった。10

【0125】

肺、肝臓およびリンパ節における顕微鏡的病変は、公開されたスコア系(上記のP. G. Halbur et al., 1995)に従って点数をつけた。結果を以下の表10に示す。キメラPCV1-2接種グループ4のブタのリンパ節における病変の平均スコアは、グループ1、2および5のものと類似していたが、病原性PCV2接種グループ3のブタのものとは、21および49DPIいずれにおいても、統計的に異なっていた。21DPIにおけるキメラPCV1-2接種グループの平均顕微鏡的肝臓病変スコアは、PCV2接種グループ3のものと統計的に異なっていたが、21DPIにおけるグループ1、2および5のものと類似していた。49DPIにおいて、グループ4のキメラPCV1-2接種ブタの平均顕微鏡的肝臓病変スコアは、グループ1、2、3および5のものと統計的に異なってはいなかった。他の組織および臓器のための許容できる評価系はなかった。20

【0126】

【表9】

表9. 対照および接種ブタにおけるリンパ節の肉眼的病変

グループ	接種物 ^a	DPI ^b	
		21	49
1	PBS	0/4(0.0)	0/4(0.0)
2	PCV1 DNA	0/4(0.0)	4/4(1.5)
3	PCV2 DNA	4/4(2.5)	4/4(2.25)
4	PCV1-2 DNA	2/3(0.66)	3/4(1.25)
5	PCV2-1 DNA	1/4(0.25)	0/4(0.0)

^aリン酸緩衝食塩水(PBS)は負の対照として用いた。接種物は、pSKプラスミド中クローン化ゲノムPCVもしくはPCVキメラDNAであった。

^b21DPIに各グループ4匹のブタを検死し、49DPIに残りのブタを検死した；陽性数/試験数。病変数/試験数(リンパ節肥大の推定重症度の範囲)

40

50

【表10】

表10. 対照および接種ブタの異なる組織／臓器における組織病理学的病変の分布

グループ	接種物 ^a	DPI ^b	肺 ^c	肝臓 ^d	リンパ節 ^e	脾臓	胸腺	回腸	脳	心臓	腎臓	扁桃
1	PBS	21	0/4(0.0)	0/4(0.0)	0/4(0.0)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
		49	0/4(0.0)	0/4(0.0)	0/4(0.0)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
2	PCV1 DNA	21	0/4(0.0)	0/4(0.0)	0/4(0.0)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
		49	0/4(0.0)	0/4(0.0)	0/4(0.0)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
3	PCV2 DNA	21	0/4(0.0)	4/4(1.5)	4/4(1.75)	3/4	0/4	0/4	1/4	1/4	2/4	3/4
		49	1/4(0.25)	3/4(0.75)	4/4(1.0)	0/4	0/4	0/4	1/4	1/4	2/4	2/4
4	PCV1-2 DNA	21	0/3(0.0)	1/3(0.33)	1/3(0.33)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
		49	0/4(0.0)	1/4(0.25)	1/4(0.25)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
5	PCV2-1 DNA	21	0/4(0.0)	0/4(0.0)	0/4(0.0)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
		49	0/4(0.0)	0/4(0.0)	1/4(0.25)	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

^aリン酸緩衝食塩水(PBS)は負の対照として用いた。接種物は、pSKプラスミド中クローン化ゲノムPCVもしくはPCVキメラDNAであった。

^b各グループ4匹のブタを21DPIに検死し、残りのブタを49DPIに検死した。

^c陽性数／試験数(平均組織学的肺スコア：0=正常、1=軽度間質性肺炎、2=中程度、3=重度)

^d陽性数／試験数(平均組織学的肝臓スコア：0=正常、1=軽度肝炎、2=中程度、3=重度)

^e陽性数／試験数(平均組織学的リンパ節スコア：0=正常、1=軽度、2=中程度、3=重度)

実施例 18

血清学

- 2、7、14、21、28、35、42および49DPIに、全てのブタから血液を採取した。PRRSVに対する血清抗体を、Herd Check PRRSV ELISA (IDEXX Laboratories, Westbrook, MA)を用いて検査した。PPVに対する血清抗体を、赤血球凝集抑制(HI)アッセイ(H. S. Joo et al., "A standardized haemagglutination inhibition test for porcine parvovirus antibody," Aust. Vet. J. 52:422-424 (1976))によって検出した。PCV2に対する血清抗体を、前記のPCV2の組み換えORF2キャップシドタンパク質をもとにした、修正間接ELISA(P. Nawagitgul et al., "Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based ELISA for the detection of antibodies to PCV," Immunol. Clin. Diagn. Lab Immunol. 1:33-40 (2002)も参照)によって検出した。PCV1に対する血清抗体を、間接的免疫蛍光アッセイ(IFAT)によって検出した。PCV1に感染したPK-15細胞を、8ウェルLabTek chamber slides上で生育させた。感染したPK-15細胞が、約95~100%の集密度に近づいた時、感染した細胞を、80%アセトンおよび20%メタノールを含む溶液で、4~20分間固定した。固定された細胞を、PBSバッファーで1回洗浄した。100μlの1:10にPBSで希釈したブタ血清サンプルを、チャンバーに加え、37で1時間インキュベートした。その後、PBSで3回洗浄し、細胞をPBSで3回洗浄し、FITC標識ヤギ抗ブタ2次抗体と、37で45分間インキュベートした。スライドグラスをPBSバッファーで3回洗浄した後、スライドグラスをフルオロマウントG (fluoromount-G)で封じ込み、カバーガラスをかけ、蛍光顕微鏡の下で試験した。正の対照として、感染した細胞を希釈したPCV1特異的モノクローナル抗体(Dr. G. M. Allanからから贈与された)とインキュベートし、次いで、FITC標識ヤギ抗マウスIgG (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Md.)と、37で45分間インキュベートした。負の対照として、PCVに感染した細胞を、1:10希釈のPCV1およびPCV2抗体を含まない血清とインキュベートし、次いで、FITC標識ヤギ抗マウスIgG (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Md.)と、インキュベートした。

【0128】

実施例 19

30

PCR検出

接種されたブタの血清におけるPCV1、PCV2、キメラPCV1-2および交互キメラPCV2-1 DNAウイルス血症を検出するために、血清サンプルを異なるDPIに採取し、PCRによって試験した。各血清サンプル100μlから、DNAzol reagentを、製造者(Molecular Research Center, Cincinnati, OH)によって提供されたプロトコルに従って用いて、ウイルスDNAを抽出した。抽出したDNAを、DNアーゼ、RNアーゼおよびプロテイナーゼを含まない水に再懸濁した。PCV1、PCV2、キメラPCV1-2および交互キメラPCV2-1のクローン特異的ゲノム配列を増幅するために、2セットのネスティッドPCRプライマーペアを設計した(上記表6)。1つめのネスティッドプライマーのセットは、公開されたPCV1の配列をもとに設計した。配列番号20に記載のGen.PCV1プライマー、および配列番号19に記載のOrf.PCV1のプライマーは、PCV1ゲノムの存在下において、400bpの断片を増幅した。配列番号22に記載のnested.Gen.PCV1、および配列番号21に記載のnested.Orf.PCV1のネスティッドプライマーは、220bpの断片を増幅した。

【0129】

PCV2ウイルス血症を検出するために、配列番号24に記載のGen.PCV2、および配列番号23に記載のOrf.PCV2のプライマーペアは、1回目のPCRにおいて、PCV2の存在下で、900bpの断片を増幅した。配列番号26に記載のnested.Gen.PCV2、および配列番号25に記載のnested.Orf.PCV2のプライマーは、ネスティッドPCRにおいて、600bpの断片を増幅した。

50

【0130】

キメラ P C V 1 - 2 ウイルス血症を検出するために、1回目の P C R 反応に配列番号 20 に記載の P C V 1 特異的プライマー-Gen.PCV1、および配列番号 23 に記載の P C V 2 O R F 2 特異的プライマー-Orf.PCV2を用いて、580 bp のキメラ断片を増幅した。ネステッド P C R には、配列番号 22 に記載の P C V 1 特異的プライマー-nested.Gen.PCV1、および配列番号 25 に記載の P C V 2 O R F 2 特異的プライマー-nested.Orf.PCV2を用いて、370 bp のキメラ断片を増幅した。

【0131】

交互キメラ P C V 2 - 1 ウイルス血症を検出するために、1回目の P C R 反応に、配列番号 24 に記載の P C V 2 特異的プライマー-Gen.PCV2、および配列番号 19 に記載の P C V 1 O R F 2 特異的プライマー-Orf.PCV1を用いて、700 bp のキメラ断片を増幅した。ネステッド P C R には、配列番号 26 に記載の P C V 2 特異的プライマー-nested.Gen.PCV2、および配列番号 21 に記載の P C V 2 O R F 1 特異的プライマー-nested.Orf.PCV1を用いて、460 bp のキメラ断片を増幅した。全ての P C R パラメーターは、本質的に同一であり、38 サイクルの 94 度 1 分間の変性、45 度 1 分のアニーリング、および 72 度 1.5 分の伸長から構成された。負の対照のブタの全ての血清サンプルを、前記のように(M. Fenaux et al., "Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2," J. Clin. Microbiol. 38: 2494-503 (2000))、P C V 1 および P C V 2 の両方を検出および分離できる P C R - R F L P 診断アッセイによって検査した。各グループより選択された動物の P C R 産物を、配列解読し、ブタに感染したウイルスの起源を確認した。

【0132】

実施例 20

免疫組織化学 (IHC)

P C V 2 特異的抗原の I H C 検出は、21 および 49 D P I 検死された全てのブタから採取したリンパ節組織にて行われた。P C V 2 に対するウサギポリクローナル抗血清を、前記の通常の手順(S. D. Sorden et al., "Development of a polyclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of type 2 porcine circovirus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue," J. Vet. Diagn. Invest. 11:528-530 (1999))に従って、I H C に使用した。

【0133】

P C V 2 特異的抗原の I H C 染色に基づき、未接種対照、P C V 1 および P C V 2 - 1 接種ブタのリンパ組織は、P C V 2 抗原について陰性であった。P C V 2 抗原は、P C V 2 接種グループの 8 匹の動物中 7 匹のリンパ組織において検出された。P C V 2 抗原は、キメラ P C V 1 - 2 接種グループの 7 匹中 1 匹のブタのリンパ組織においても検出された。

【0134】

前記において、説明のために、本発明の特定の具体例の詳細な記載が提供されているが、限定するものではない。本発明に基づいて、当業者にとって明らかな他の修正、派生、等価物の全ては、請求される本発明の範囲内に含まれることは理解されよう。

【0135】

10

20

30

40

【表 1-1】

Applicant's or agent's file reference	AM100878	International Bureau (N)
---------------------------------------	----------	--------------------------

(Sheet 1/3)

**INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL**

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page 30, line 22-27 (chimeric PCV1-2 DNA)		10
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT		Further deposits are identified on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>
Name of depositary institution American Type Culture Collection (ATCC)		
Address of depositary institution (including postal code and country) 10801 University Blvd. Manassas, VA 20110-2209 US		
Date of deposit 07 December 2001 (07/12/01)	Accession Number PTA-3912	20
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable)		This information is contained on an additional sheet <input type="checkbox"/>
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)		
30		
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)		
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Arrestion Number of Deposit")		

For receiving Office use only	
<input checked="" type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer S. HOSTAD	Authorized officer

40

【表 1-2】

Applicant's or agent's file reference	AM100878	International Application No.
---------------------------------------	----------	-------------------------------

(Sheet 2/3)

**INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL**

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page 30, line 22-27 (PCV2 DNA clone)		10
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT		Further deposits are identified on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>
<p>Name of depository institution American Type Culture Collection (ATCC)</p> <p>Address of depository institution (including postal code and country) 10801 University Blvd. Manassas, VA 20110-2209 US</p>		
Date of deposit 07 December 2001 (07/12/01)	Accession Number PTA-3913	20
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable)		This information is contained on an additional sheet <input type="checkbox"/>
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)		
30		
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)		
<p>The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g. "Arrangement Number of Deposit")</p>		

<p>For receiving Office use only</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This sheet was received with the international application</p> <p>Authorized officer S. HOSTAD</p>		<p>For International Bureau use only</p> <p><input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:</p> <p>Authorized officer</p>	
--	--	--	--

10

20

30

40

【表 1 3 】

Applicant's or agent's file reference	AM100878	International Application No.
---------------------------------------	----------	-------------------------------

(Sheet 3/3)

**INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL**

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page 30 line 29-31 (PCV2 sample #40895)		10
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT		Further deposits are identified on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>
Name of depositary institution American Type Culture Collection (ATCC)		
Address of depositary institution (including postal code and country) 10801 University Blvd. Manassas, VA 20110-2209 US		
Date of deposit 07 December 2001 (07/12/01)	Accession Number PTA-3914	20
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable)		This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/>
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)		
30		
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)		
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit")		

For receiving Office use only		For International Bureau use only	
<input checked="" type="checkbox"/>	This sheet was received with the international application	<input type="checkbox"/>	This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer S. HOSTAD		Authorized officer	

【図面の簡単な説明】

【0136】

【図1】図1は、感染性PCV2分子DNAクローンの構築物を表す。完全PCV2ゲノムを増幅するために用いたプライマーペアの相対的な位置は、矢印で示される（逆方向プライマー PCVSAC2、正方向プライマー PCVSAC2）。PCRによって増幅されたPCV2

50

ゲノムDNAは、Sac I I制限酵素で切断され、精製される。精製され、Sac I Iで切断されたゲノムDNAを連結し、コンカテマーを形成した。連結したコンカテマーを、ゲル電気泳動によって分離し、PCV2の直列ゲノムダイマーを精製し、あらかじめSac I Iで切断したpSKベクターへクローニングして、分子PCV2クローンを作製した。

【図2A-2B】図2A～2Bは、PK-15細胞においてin vitroでトランスフェクトされた場合、クローニングPCV2プラスミドDNAは感染性があることを示している。図2Aは、クローニングPCV2プラスミドDNAでトランスフェクトされたPK-15細胞における、免疫蛍光アッセイ(IFA)によるPCV2抗原の検出を示す。PCV2抗原の強い免疫標識は、核において見られ、またそれ以下ではあるが、トランスフェクトされた細胞の細胞質において見られた。図2Bは、擬似的にトランスフェクトされたPK-15細胞を示す。

【図3A-3D】図3Aは、PCV2 DNAでリンパ内に接種された21DPIのブタの肺を示す。肺は弹性があり、虚脱せず、赤褐色に斑点ができている。気管気管支リンパ節は、著しく肥大し、褐色になっている(矢印)。図3Bは、対照のブタの正常な肺の顕微鏡切片を表す。図3Cは、図3Aのブタの肺の顕微鏡切片を表す(25X)。細気管支周囲リンパ組織球性(peribronchiolar lymphohistiocytic)炎症および穏やかな壊死性細気管支炎(25X)に注意する。図3Dは、図3Aにおける肺の免疫組織化学的染色を示す。気管の周囲のマクロファージ(矢印)および纖維芽様細胞(矢じり)PCV2抗原に注意する(64X)

【図4A-4D】図4Aは、対照のブタの正常なリンパ節を示す。はっきりしたリンパ小節(矢印)に注意する(25X)。図4Bは、21日前にリンパ内にクローニングPCV2ゲノムDNAで接種した図3Aのブタの気道内のリンパ節の顕微鏡切片を表す。リンパ小節はあまりはっきりせず、軽度～中程度のリンパ枯渇および軽度多巣性肉芽腫性炎症が起きている(25X)。図4Cは、図4Bにおけるリンパ節の1小節をさらに拡大した顕微鏡切片を表す。マクロファージ、および小節リンパ球に取って代わった巨細胞(矢印)と、あまりはっきりしない小節に注意する(64X)。図4Dは、図4Bと同じリンパ節における、PCV2抗原の免疫組織化学的検出を示し、小節におけるマクロファージ(矢印)および巨細胞(小矢じり)、および樹状様細胞(大矢じり)である(64X)。

【図5】図5は、病原性PCV2の免疫原性ORF2キャップシド遺伝子をもった非病原性PCV1ゲノムを伴ったキメラPCV1-2(PCV1/PCV2)DNAクローンの構築物を示す。2量体化したDNAクローンを、PCV2のORF2タンパク質を発現する生キメラウイルスを得るために、PK-15細胞のin vitroトランスフェクション、および活性を確認するためのin vivoの動物実験に使用した。

【図6】図6は、感染性PCV1、PCV2、キメラPCV1-2および交互キメラPCV2-1分子DNAクローンの構築物および構成を示す。PCV2 DNAクローンは、2つの全長直鎖状PCV2ゲノムを、直列に、前記の一般的な方法(上記のM. Fenaux et al., 2002)により、Bluescript SKベクター(pSK)へ連結することによって構築される。PCV1 DNAクローンは、2つの全長直鎖状PCV1ゲノムを、直列に、pSKベクターへ連結することによって構築される。キメラPCV1-2 DNAクローンは、pSKベクター中の非病原性PCV1ゲノム骨格において、PCV1のORF2キャップシド遺伝子を、PCV2のもので置換することによって構築される。交互キメラPCV2-1 DNAクローンは、pSKベクター中の病原性PCV2ゲノム骨格において、病原性PCV2のORF2キャップシド遺伝子を、非病原性PCV1のもので置換することによって構築される。いずれのキメラクローンも、pSKベクター内において2量体である。矢印は、接種された動物において、PCV1、PCV2、PCV1-2およびPCV2-1のウイルス血症を検出するためのPCRプライマーの相対的位置である。

【図7A-7J】図7A-7Jは、PCV1、PCV2、キメラPCV1-2および交互キメラPCV2-1分子DNAクローンは、感染性であり、in vitroでPK-15細胞をトランスフェクトした時に、それぞれのウイルス抗原を発現することを示してい

10

20

30

40

50

る。左のパネル(7A、7C、7E、7Gおよび7I)は、PCV1のORF2に対するモノクローナル抗体で染色されている。右のパネル(7B、7D、7F、7Hおよび7J)は、PCV2に対する抗体で染色されている。パネル7Aおよび7Bは、擬似的にトランスフェクトされたPK-15細胞である。パネル7Cおよび7Dは、PCV1 DNAクローニングでトランスフェクトされたPK-15細胞である。パネル7Eおよび7Fは、PCV2 DNAクローニングでトランスフェクトされたPK-15細胞である。パネル7Gおよび7Hは、キメラPCV1-2 DNAクローニングでトランスフェクトされたPK-15細胞である。パネル7Iおよび7Jは、交互キメラPCV2-1 DNAクローニングでトランスフェクトされたPK-15細胞である。

【図8】図8は、クローニングPCV2ゲノムDNA(配列番号1に対応)の全長DNA配列を示す。 10

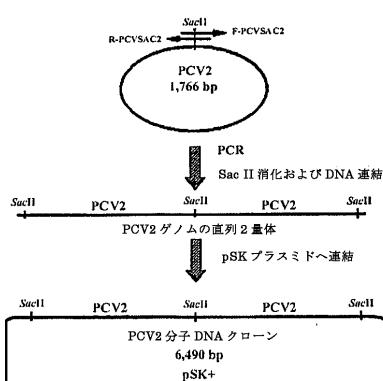
【図9】図9は、クローニングキメラPCV1-2 DNA(配列番号2に対応)の全長DNA配列を示す。

【図10】図10は、クローニングキメラPCV1-2 DNAの免疫原性ORF2キャップシド遺伝子(配列番号3に対応)の全長DNA配列を示す。

【図11】図11は、クローニングキメラPCV1-2 DNAの免疫原性ORF2キャップシド遺伝子(配列番号3に対応)の推定アミノ酸翻訳を示す。

【図1】

Fig. 1



【図2B】

2B

Fig. 2B

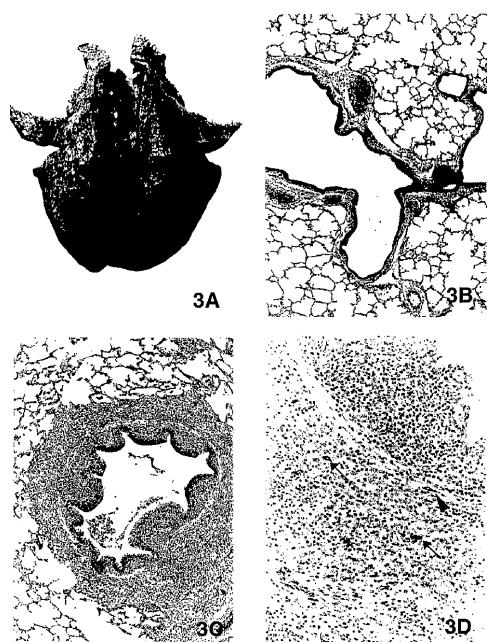
【図2A】

2A

Fig. 2A

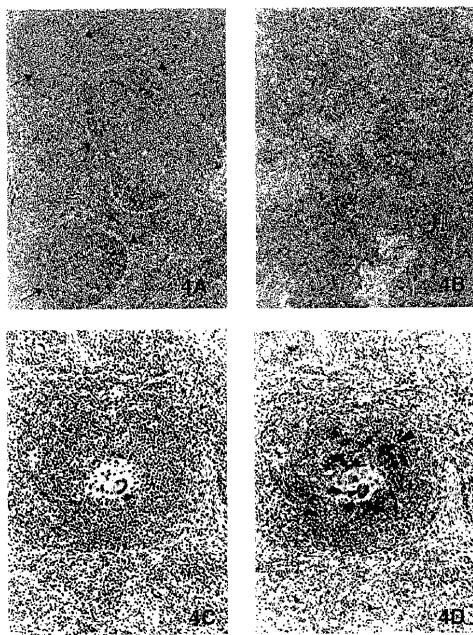
【図3A-3D】

Figs. 3A - 3D



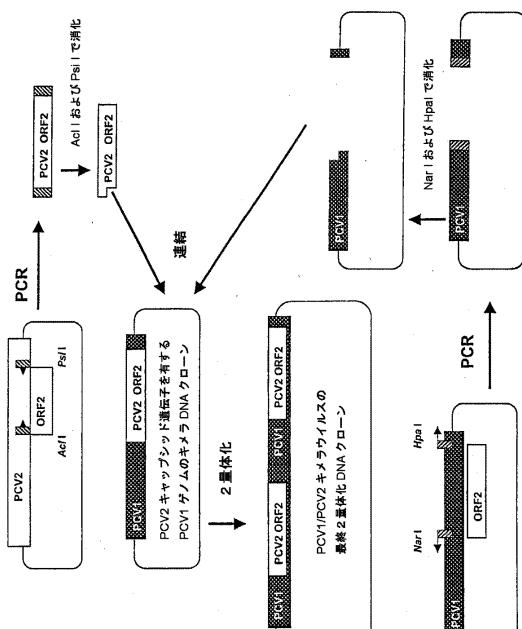
【图 4 A - 4 D】

Figs. 4A - 4D



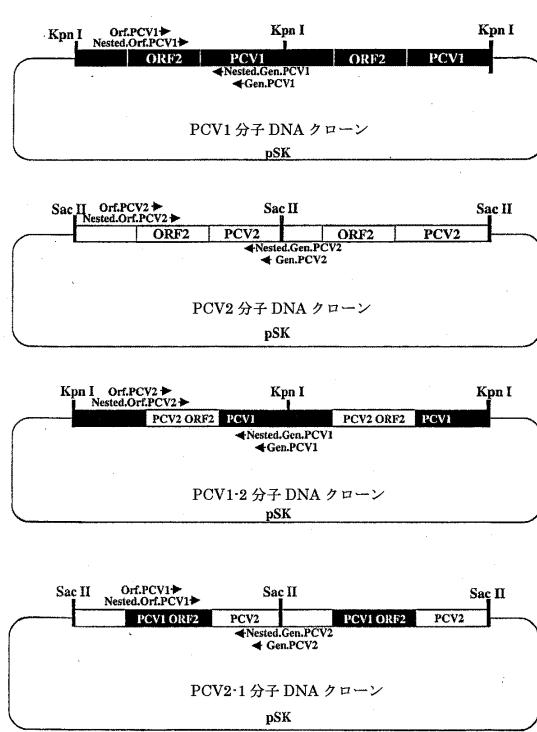
【図5】

Fig. 5



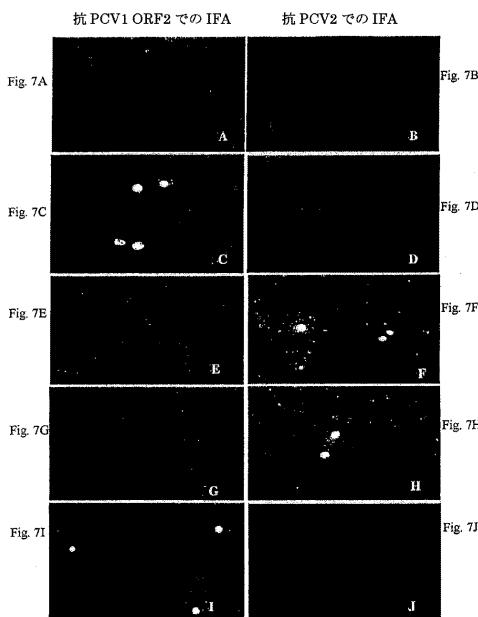
【図6】

Fig. 6



【 図 7 】

Figs. 7A - 7J



【図 10】

Fig. 10

【図11】

Fig. 11

MTYPRRRYRRRRRHPRSHLGQILRRRPWLVHPRHRYRWRKNGIFNTRLSRTFGYTVKAT
TVRTPSWAVMMRFINDDFVPPGGGTNKISIPFEYRIRKVVFWPCSPITQGDRGVGS
TAIVLDDNFVTKATLTDYDPVYNSSRHTTPQFSYHRSYRFTPKPVLDSTIDYFQPNKNR
NOLWMPBTOSPRVNUWGTCAEEENLYDOPVYRBLWVWYDPEENLVDPPKRD*

*translation termination codon

【 図 8 】

Fig. 8

【 四 9 】

【図7】 Figs. 7A-7J
【図8】 Fig. 8

【配列表】

0004623964000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 7 1
C 0 7 K	14/01	(2006.01)	C 0 7 K 14/01
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02
C 1 2 N	7/04	(2006.01)	C 1 2 N 7/04
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P 21/02 C

(31)優先権主張番号 10/314,512

(32)優先日 平成14年12月9日(2002.12.9)

(33)優先権主張国 米国(US)

微生物の受託番号 ATCC PTA-3912

微生物の受託番号 ATCC PTA-3913

微生物の受託番号 ATCC PTA-3914

前置審査

(73)特許権者 304057287

アイオワ・ステイト・ユニバーシティ・リサーチ・ファウンデイション・インコーポレイテッド
 Iowa State University Research Foundation, Inc.

アメリカ合衆国 5 0 0 1 1 - 2 1 3 1 アイオワ州エイムス、ラボラトリ－・オブ・メカニックス 3
 1 0

(74)代理人 100081422

弁理士 田中 光雄

(74)代理人 100084146

弁理士 山崎 宏

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(74)代理人 100127638

弁理士 志賀 美苗

(72)発明者 シャン-ジン・メン

アメリカ合衆国 2 4 0 6 0 バージニア州ブラックスバーグ、クレイグ・ドライブ 4 0 1 番

(72)発明者 マーティジン・フェノー

アメリカ合衆国 9 4 0 6 2 カリフォルニア州レッドウッド・シティ、アーリントン・ロード 2 0 7
 ビー 番

(72)発明者 パトリック・ジー・ハルバー

アメリカ合衆国 5 0 0 1 4 アイオワ州エイムス、キングマン・ロード 3 2 1 1 番

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 J. Virology, (1993), Vol. 67, No. 8, p. 4797-4803

J. Virology, (1988), Vol. 62, No.7, p. 2329-2336

J. General Virology, (2000), Vol. 81, p. 1815-1824

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 15/00

C07K 14/01

C12N 1/15

C12N 1/19

C12N 1/21

C12N 5/00

C12N 7/00

C12P 21/02

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPI/DS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed