(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4476543号
(P4476543)

(45)発行日　平成22年6月9日(2010.6.9)　(24)登録日　平成22年3月19日(2010.3.19)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 7/00	(2006.01)	C12N	7/00	
C12N 7/04	(2006.01)	C12N	7/04	
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
A61K 39/17	(2006.01)	A61K	39/17	
A61P 31/12	(2006.01)	A61P	31/12	171

請求項の数 18　(全 33 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2002-539375 (P2002-539375)
(86)(22)出願日　平成13年10月30日 (2001.10.30)
(65)公表番号　特表2004-517612 (P2004-517612A)
(43)公表日　平成16年6月17日 (2004.6.17)
(86)国際出願番号　PCT/EP2001/012573
(87)国際公開番号　WO2002/036617
(87)国際公開日　平成14年5月10日 (2002.5.10)
審査請求日　平成16年8月9日 (2004.8.9)
(31)優先権主張番号　00203814.9
(32)優先日　平成12年11月2日 (2000.11.2)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)

(73)特許権者　506196247
インターベツト・インターナシヨナル・ベー・ベー
オランダ国、５８３１・アー・エヌ・ボツクスメール、ウイム・ドウ・コルベルストラート・３５
(74)代理人　100062007
弁理士　川口　義雄
(74)代理人　100114188
弁理士　小野　誠
(74)代理人　100140523
弁理士　渡邊　千尋
(74)代理人　100119253
弁理士　金山　賢教

最終頁に続く

(54)【発明の名称】マーカーワクチンとしての、組み換えニューカッスル病ウイルス核タンパク質の突然変異体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ＮＤＶ突然変異体が核タンパク質（ＮＰ）の領域内に位置するエピトープを欠いており、該領域が配列番号１で表される４４７～４５５位のアミノ酸配列を有することを特徴とする、ＮＤＶタンパク質をコードする遺伝子の突然変異の結果、ＮＤＶタンパク質上の主要エピトープを欠いたニューカッスル病ウイルス（ＮＤＶ）突然変異体。

【請求項２】

ＮＤＶ突然変異体が、４４７～４５５位のＮＰのアミノ酸領域中に位置する主要エピトープと反応する抗体を欠いた抗血清を、ニワトリ中に誘導することを特徴とする請求項１に記載のＮＤＶ突然変異体。

【請求項３】

ニワトリ中に誘導される抗血清が、配列番号２で表される４４３～４６０位のＮＰアミノ酸配列を有する１８量体ペプチドと反応する抗体を欠いていることを特徴とする請求項２に記載のＮＤＶ突然変異体。

【請求項４】

突然変異体が、４４７～４５５位のアミノ酸配列を有するＮＰ遺伝子の領域内で、１つまたは複数のアミノ酸の欠失または置換を含むことを特徴とする請求項１から３に記載のＮＤＶ突然変異体。

【請求項５】

４４３±１～４６０±１のアミノ酸が欠失していることを特徴とする請求項４に記載の

ＮＤＶ突然変異体。
【請求項６】
４４３～４６０のアミノ酸が欠失していることを特徴とする請求項５に記載のＮＤＶ突然変異体。
【請求項７】
前記領域内の１つまたは複数のアミノ酸をコードするヌクレオチドが、ポリペプチドの主要エピトープをコードしている異種の核酸配列によって置換されていることを特徴とする請求項４に記載のＮＤＶ突然変異体。
【請求項８】
ＮＤＶ突然変異体が追加の弱毒化性突然変異を含むことを特徴とする請求項１から７に記載のＮＤＶ突然変異体。
【請求項９】
ＮＤＶ突然変異体が、鳥類病原体の抗原をコードする異種の核酸配列をさらに含むことを特徴とする請求項１から８に記載のＮＤＶ突然変異体。
【請求項１０】
請求項１から９のいずれかで定義した生または不活化形のＮＤＶ突然変異体、および薬剤として許容される担体または希釈剤を含むことを特徴とする、家禽類のニューカッスル病に対するワクチン。
【請求項１１】
ワクチンが、ＮＤに対する防御、または他の鳥類病原体に対する防御を誘導することができるワクチン株をさらに含むことを特徴とする請求項１０に記載のワクチン。
【請求項１２】
追加のワクチン株が、ＮＤＶのＦまたはＨＮタンパク質を発現することができる組み換えワクチンベクターであることを特徴とする請求項１１に記載のワクチン。
【請求項１３】
組み換えワクチンベクターがＨＶＴであることを特徴とする請求項１２に記載のワクチン。
【請求項１４】
追加のワクチン株が胚に安全なワクチン株であることを特徴とする請求項１１から１３に記載のワクチン。
【請求項１５】
卵内投与用の家禽類のニューカッスル病に対するワクチンを製造するための、請求項１から９で定義したＮＤＶ　ＮＰ突然変異体の使用。
【請求項１６】
請求項１０から１４に記載のワクチンを動物に投与することを含む、ニューカッスル病に対して家禽類を防御するための方法。
【請求項１７】
卵内経路によって胚にワクチンを投与することを特徴とする請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
ワクチンを接種した動物と自然界に存在するＮＤＶに感染した動物を区別するためのニューカッスル病の防疫計画における、請求項１０から１４で定義したワクチンの使用。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
ニューカッスル病ウイルス（ＮＤＶ）は、家禽類の最も破壊的な病気の１つの原因であり、家禽類産業に相当な経済的影響がある。ニワトリ、特に商業的に消費するために飼育されているニワトリのワクチン接種は、世界中で行われている。有効な生または不活化ＮＤワクチンは現在利用可能であるが、ウイルスは商業用の群には依然として脅威であり続けている。
【０００２】
約１５ｋｂの長さである、ＮＤＶのマイナス鎖ＲＮＡウイルスゲノムは、６つの主要な構

造タンパク質：核タンパク質（ＮＰ）、リンタンパク質（Ｐ）、マトリックスタンパク質（Ｍ）、融合タンパク質（Ｆ）、ヘマグルチニン－ノイラミニダーゼ（ＮＨ）およびＲＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼ（Ｌ）をコードする６つの遺伝子を含む。ＲＮＡとＮＰ、ＰおよびＬタンパク質は、ＲＮＡ合成用の鋳型として働くリボ核タンパク質複合体（ＲＮＰ）形成する。すべてのマイナス鎖ウイルス（ＮＳＶ）に共通する特徴は、ＲＮＰの形でのみそれらの遺伝情報が存在していることである。裸のＲＮＡではなくＲＮＰが、転写および複製用の鋳型として働く。

【０００３】

ＮＰは、ポリメラーゼタンパク質、ＰおよびＬと共に、ＲＮＡをキャプシドで包む際に、ＲＮＡを酵素による分解から防御する際に、優れた役割を果たす。さらにＮＰは、Ｐのみと、ＰおよびＬ（ＲＮＡポリメラーゼ）と、あるいはそれ自体（ＮＰ－ＮＰ相互作用）で相互作用することによって、ウイルスゲノムの転写および複製を調節する。センダイパラミクソウイルスについては、ＮＰの保存されているＮ末端領域が、ＮＰ－ＲＮＡおよびＮＰ－ＮＰ相互作用と関連があることが示され（Ｂｕｃｈｈｏｌｚ他、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６７、５８０３－５８１２、１９９３）、一方カルボキシ末端ドメインは、鋳型機能に必要とされることが示された（Ｃｕｒｒａｎ他、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６７、４３５８－６４）。したがってＮＰの大部分は、ＲＮＰの集合および生物学的活性においてＮＰが多種多様な関与をしているために、ウイルスの複製には絶対に必要である。

【０００４】

多くの国々では、ＮＤＶの大発生を制御するための法律が既に存在している。いくつかの国々では、感染した鳥を強制的に除去することによる根絶政策が実施されている。首尾の良い国際的な家禽類の貿易を続けるために、系統的なＮＤ制御対策を導入することが望ましい。しかしながら、現在使用されている完全にウイルスベースである生または不活化ＮＤワクチンにはすべて、ワクチン接種した動物を、赤血球凝集阻止反応（ＨＩ）またはウイルス中和試験（ＶＮ）のような標準的な血清学的検査によって、感染した動物と区別することができないという重大な欠点がある。したがって、少なくとも１つの主要エピトープが欠けているＮＤＶタンパク質を含む、ＮＤＶに免疫原性がある物質が必要とされている。エピトープとは、抗体と相互作用する抗原上の小さな構造領域である。エピトープは、ポリペプチドの少なくとも３つのアミノ酸からなっていてよいが、通常は５～１０個、またはある場合はそれを超えるアミノ酸を含む。

【０００５】

近年、「マーカーワクチン」と名付けられたワクチンが、特異的な病気の根絶が国家的または国際的な関心である獣医学の分野で人気を得ている。マーカーワクチンは、診断試験に関して、ワクチン接種した動物と感染した動物を血清学的に区別することができるワクチンとして定義される。

【０００６】

マーカーワクチンを開発するための手法は、１つまたは複数の不要ではあるが免疫原性がある遺伝子を欠失させることを含む。この手法は主に、いくつかの重要でない遺伝子を含むＤＮＡウイルス（たとえばヘルペスウイルス）に適用できる。ＲＮＡウイルスについては、大部分の遺伝子が必須であるか、あるいは不要である遺伝子は免疫原性がない。ＮＤＶ、マイナス鎖ＲＮＡウイルスは、６つの主要な構造遺伝子を含み、これらはすべてウイルスの増殖に必須である。１つまたは複数の遺伝子を欠失させることによって、生物学的活性の低下を引き起こすことが予想される。実際、動物中の他のウイルス感染病に関するこのような防疫計画が開発されているが、本発明より前には、ＮＤの防疫計画に適合すると思われる、ＮＤＶワクチン株を主成分とするワクチンは記載されていない。

【０００７】

マーカーワクチンを開発するための代替的な手法は、「サブユニットワクチン」を使用することである。この手法は、２つの糖タンパク質、融合タンパク質（Ｆ）およびヘマグルチニン－ノイラミニダーゼ（ＮＨ）を特定することによりＮＤＶに関して実施されており、感染防御免疫を誘導することに関する。ＮＤＶＦおよび／またはＨＮを発現する七面鳥

のヘルペスウイルス（ＨＶＴ）および鶏痘ウイルス（ＦＰＶ）などの組み換えベクターは、首尾よく構築されており、それらの安全性および効力は広く研究されている。

【０００８】

マイナス鎖ＲＮＡウイルス（ＮＳＶ）の核タンパク質（ＮＰ）は、本来非常に免疫原性があり、診断用ＥＬＩＳＡにおいて抗原として使用されている。これらは狂犬病ウイルス、はしかウイルス、牛疫ウイルス、水疱性口内炎ウイルス、およびＮＤＶを含む。これらの試験は、ワクチン接種プログラムを監視するため主に使用された。ＮＤＶ－ＨＮサブユニットワクチンに関しては、ＮＰ系免疫測定法も、ワクチン接種した動物と感染した動物を区別する際の診断試験として記載された（Ｍａｋｋａｙ他、Ｖｅｔ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．６６、２０９－２２２、１９９９）。しかしながら、全ＮＳＶ系マーカーワクチン、特にＮＤＶワクチンに関するＮＰ免疫測定法は存在しない。それは主に、非常に重要な遺伝子を遺伝的に改変することにより、ウイルスの複製および感染性に有害な結果を与えることが予想されるという事実によるものである。

【０００９】

しかしながら、ＮＤＶサブユニットワクチンの欠点は、ＮＤＶＦまたはＨＮタンパク質を発現する組み換えウイルスの効力が、商業用のニワトリでは母親由来抗体（ＭＤＡ）の存在下で大幅に下がることである。対照的に、完全なウイルス調製物を主成分とする従来のＮＤワクチンは、ＭＤＡの存在下でさえも、完全な防御をもたらす。

【００１０】

いくつかの組み換えベクターの他の一般的な欠点は、感染防御免疫の開始が遅れることである。従来の生ＮＤワクチンは一般に、ワクチン接種の６～７日後に完全な防御をもたらし、一方、ＮＤＶＦタンパク質を発現する組み換えＨＶＴを主成分とするワクチンによって誘導される免疫の開始は、ワクチン接種後１４日と２１日の間に起こることが示された（Ｍｏｒｇａｎ他、Ａｖｉａｎ　Ｄｉｓ．３７、１０３２－１０４０、１９９３）。

【００１１】

ＮＤサブユニットワクチンのこれらの欠点を鑑みると、そのＦおよびＨＮタンパク質を本来の形で保持しており、野生型および伝統的なワクチンウイルスと血清学的に区別することができる完全なウイルスを主成分とする、ＮＤマーカーワクチンが必要である。

【００１２】

国際出願ＷＯ９９／６６０４５は、ＮＤＶタンパク質上で主要エピトープが欠けている遺伝的に改変されたＮＤＶ突然変異体を主成分とする、ＮＤＶマーカーワクチンを開示している。しかしながらこのワクチンウイルスは、ハイブリッドＨＮタンパク質を含み、ＮＤＶからのこのＨＮタンパク質のわずか４分の１の部分はＮＤＶから構成されるが、ＨＮタンパク質の残り部分は関係の無い鳥類のパラミクソウイルスのタイプ２または４に由来するものである。ＮＤＶＨＮ領域の大部分を除去することによって、ＮＤＶ防御抗体を誘導する際にＨＮによって果たされる役割がおそらく減ると思われる。

【００１３】

現在利用可能な生ＮＤＶワクチンは、飲料水、エアロゾル、目薬によって、あるいは非経口的経路により、孵化したニワトリにのみ投与することができる。これらの施用法には、いくつか欠点がある。最も重要なのは、それらの施用に必要とされる労力のために、これらの方法が高くつくことである。近年、胚ワクチンとしてのワクチンの使用が、有効であり経済的であることが分かってきた（Ｓｈａｒｍａ　ａｎｄ　Ｂｕｒｍｅｓｔｅｒ、Ａｖｉａｎ　Ｄｉｓｅａｓｅｓ２６、１３４－１４９、１９８２およびＳｈａｒｍａ、Ａｖｉａｎ　Ｄｉｓｅａｓｅｓ２９、１１５５－１１６９、１９８５）。さらに、胚にワクチン投与することは、特異的な病気に対する初期の耐性があり、多数の注射ヘッドを有する半自動機器を使用してそれぞれの卵内に均一な用量のワクチンを投与するために、有利であることが分かった。

【００１４】

鳥類の孵化後のワクチン接種用に従来使用されている多くのワクチンは、卵内ワクチン接種用には使用することができなかったことに注意しなければならない。後期の胚は、生後

１日の孵化した雛において安全に使用することができるワクチンウイルスを含めた、検査された大部分のワクチンウイルスに非常に感染しやすい。したがって、従来のワクチンを卵内投与用に使用することはできない。

【００１５】

現在、主に２つの最も穏やかな市販のＮＤＶワクチン株：ＮＤＷ（米国特許第５，１４９，５３０号）およびＣ２（米国特許第５，７５０，１１１号）に関して胚の死亡率が高レベルであるために、卵内に施用することができる適切な市販のＮＤワクチンは存在しない。

【００１６】

米国特許第５，４２７，７９１号（Ｒｅｇｅｎｔｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｍｉｎｎｅｓｏｔａ）は、後期の胚に病原性がないＨｉｔｃｈｎｅｒ Ｂ１株のＮＤＶ突然変異体を生み出すための、化学的突然変異誘発剤の使用を開示している。エチルメタンスルホン酸（ＥＭＳ）でＢ１株を化学的に処理することによって、突然変異体ウイルスＮＤＶ－Ｂ１－ＥＭＳが結果として生じ、これは胚形成１８日目のニワトリの卵に安全に投与することができた。しかしながら不利なことに、この株のそれぞれの卵の継代ステップは、胚に安全ではない親Ｂ１株に戻る突然変異体の性質のために、突然変異誘発剤ＥＭＳの存在下で行わなければならない。

【００１７】

本発明の目的は、野生型ＮＤＶに感染した動物または従来のＮＤＶワクチン株でワクチン接種した動物と、このＮＤＶ突然変異体を主成分とするワクチンで免疫性を与えた動物との区別を可能にするための、全ウイルス系のＮＤマーカーワクチンの活性成分として使用することができる、ＮＤＶ突然変異体を提供することである。

【００１８】

本発明の他の目的は、孵化後の若鳥に投与することができるだけでなく、卵内に安全に投与することもできる、ワクチンの活性成分として使用することができるＮＤＶ突然変異体を提供することである。

【００１９】

ここに記載した本発明は、主要エピトープをＮＰから除去したために、知られているＮＤＶ（ワクチン）株とは異なる遺伝子工学的に処理したＮＤＶ突然変異体を提供することによって、これらの目的に見合うものとなっており、このエピトープは血清学的にＮＤＶ感染と非常に関連はあるが、その欠失は新たなＮＤＶ突然変異体の防御性に悪影響を与えることはない。

【００２０】

本発明は、ＮＤＶ突然変異体が核タンパク質（ＮＰ）の領域内に位置するエピトープを欠いており、領域が配列番号１中に示すアミノ酸配列（４４７～４５５）を有することを特徴とする、タンパク質をコードしている遺伝子の突然変異の結果として、ＮＤＶタンパク質上に主要エピトープが欠けているＮＤＶ突然変異体を提供する。

【００２１】

ＮＤＶゲノムのヌクレオチド１４６０～１４８６によってコードされている、ＮＰのアミノ酸配列（４４７～４５５）Ｐｈｅ Ｌｅｕ Ａｓｐ Ｌｅｕ Ｍｅｔ Ａｒｇ Ａｌａ Ｖａｌ Ａｌａは、ＮＤ ＶＮＰの主要エピトープを含むことが分かっている。すなわち、ＮＤＶに感染したほぼすべてのニワトリから得られる抗血清は、この領域内に位置するエピトープと相互作用する。抗血清は前述のアミノ酸とは相互作用するが、この領域の側面に位置するアミノ酸とは実質的に相互作用しない。

【００２２】

さらに、生および不活化である従来のＮＤＶ株によって誘導されたニワトリの抗血清は、アミノ酸（４４３～４６０）Ｇｌｙ Ｇｌｕ Ｔｈｒ Ｇｌｎ Ｐｈｅ Ｌｅｕ Ａｓｐ Ｌｅｕ Ｍｅｔ Ａｒｇ Ａｌａ Ｖａｌ Ａｌａ Ａｓｎ Ｓｅｒ Ｍｅｔ Ａｒｇ Ｇｌｕ（配列番号２）が広がっており、（４４７～４５５）領域を含む１８量体ペプチドと反応することが図２で実証されている。この領域を含むアミノ酸配列を比較すること

によって、ｖｅｌｏｇｅｎｉｃ Ｔｅｘａｓ ＧＢ株、ｍｅｓｏｇｅｎｉｃ Ｂｅａｕｄｅｔｔｅ Ｃ株およびｌｅｔｏｇｅｎｉｃ Ｃｌｏｎｅ－３０株の中の１００％のアミノ酸同一性が明らかになっている。したがって、マーカーワクチンを開発するための１つの重要な規準、すなわちニワトリの免疫系によって認識される、従来のＮＤＶ株のタンパク質によって発現されるエピトープの同定が実現する。

【００２３】

ＮＤＶゲノム上のヌクレオチド位置およびＮＤＶタンパク質中のアミノ酸残基を同定するために、本明細書で使用する括弧内の番号付けは、Ｒｏｍｅｒ－Ｏｂｅｒｄｏｒｆｅｒ他、Ｊ．Ｇｅｎ Ｖｉｒｏｌ．８０、２９８７－２９９５、１９９９、ＥＭＢＬ 受託番号Ｙ１８８９８）によって記載されたものである。

【００２４】

予想外なことに、ＮＰはＮＤＶ複製に関する必須タンパク質であるという事実があるにもかかわらず、アミノ酸（４４７～４５５）はウイルス複製に関して必要とされないことがさらに分かっている。この領域中に位置するＮＰエピトープを発現しない感染性の組み換えＮＤＶ突然変異体は、「逆遺伝的な」技術を使用して適切なプラスミドを用いてこれらの細胞をトランスフェクトした後に、細胞から首尾よく回収され、これはニワトリの卵内で効率良く増殖させることができた。

【００２５】

本発明によるＮＤ ＶＮＰタンパク質は、ＮＰ遺伝子の突然変異を導入し、その結果主要エピトープが、アミノ酸配列（４４３～４６０）を有する１８量体ペプチド中に位置するエピトープと反応性がある抗体を、ニワトリ中で誘導する能力を失わせたことによって作製した。実施例２および３は、（ｉ）本発明によるＮＤ ＶＮＰ突然変異体は、完全なウイルス抗原と反応するＨＩ抗体およびポリクローナル性のニワトリの抗－ＮＤＶ血清を誘導することができるが、（ｉｉ）これらの抗血清は１８量体ペプチド中に位置するエピトープとは反応性がないことを実証している。

【００２６】

本発明によるＮＤ ＶＮＰ突然変異体に対して生じたニワトリの抗－ＮＤＶ血清は、抗血清と（４４７～４５５）領域中に位置するエピトープの相互作用を調べることによって、天然に存在するＮＤＶ株および従来のＮＤＶワクチン株に対して生じたニワトリの血清と区別することができるという観察により、このＮＤ ＶＮＰ突然変異体はマーカーワクチンの適切な候補となる。詳細には本発明は、（４４７～４５５）領域中に位置する主要エピトープが欠けているＮＤ ＶＮＰ突然変異体も含み、この突然変異体は、この領域中に位置する主要エピトープと特異的に結合するモノクローナル抗体の存在下で、突然変異体抗血清と（４４７～４５５）領域を含むペプチドの相互作用を調べることによって、従来のＮＤＶ株によって誘導された抗血清と区別することができる抗血清をニワトリ中で誘導する。後者の場合、通常その検査は免疫学的競合または遮断検査法である。

【００２７】

したがって、本発明による個々のＮＤ ＶＮＰ突然変異体は、ＮＰのアミノ酸領域（４４７～４５５）中に位置する主要エピトープと反応する抗体が欠けている抗血清を、ニワトリ中で誘導することを特徴とする。

【００２８】

より好ましい実施形態では、配列番号２中に示すＮＰアミノ酸配列（４４３～４６０）を有する１８量体ペプチドと反応する抗体が欠けている抗血清を、ニワトリ中で誘導するＮＤ ＶＮＰ突然変異体を提供する。

【００２９】

「～と反応する抗体が欠けている抗血清をニワトリ中で誘導する」という語は、感染した／ワクチン接種したニワトリから得られる血清試料が、直接的または遮断的ＮＰ酵素結合免疫吸着検査法（ＥＬＩＳＡ）において陰性であると記録されることを意味する。

【００３０】

典型的には、陽性試料と陰性試料を区別するためのＮＰのＥＬＩＳＡに関する、吸光度（

ＯＤ）のカットオフ値は、ＳＰＦニワトリからの陰性対照試料の平均Ｐ／Ｎ比を超える３標準偏差に設定する（この場合、Ｐはキャリア分子に結合した関連ペプチドでコーティングされたウエルからの試料のＯＤ、Ｎはキャリア分子でコーティングされたウエルからの試料のＯＤ）。キャリア分子はキャリアタンパク質、ＢＳＡ、オバルブミン、ＫＬＨなど、炭水化物鎖または合成アミノ酸鎖であってよい。

【００３１】

ＮＰ遺伝子は、ＮＤＶゲノム上のヌクレオチド位置５６～１８０１に位置している（ＮＤＶ株Ｃｌｏｎｅ３０（登録商標））。ＮＤＶのＮＰはアミノ酸４８９個の長さであり、ｌｅｎｔｏｇｅｎｉｃ、ｍｅｓｏｇｅｎｉｃおよびｖｅｌｏｇｅｎｉｃ株内で充分に保存されている。このＮＤＶ株のＮＰ遺伝子の、ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、配列番号３および４中に示す。Ｃｌｏｎｅ３０のＮＰの演繹アミノ酸配列と、ＮＤＶのｖｅｌｏｇｅｎｉｃ Ｔｅｘａｓ ＧＢおよびｍｅｓｏｇｅｎｉｃ Ｂｅａｕｄｅｔｔｅ Ｃ株の対応する配列を比較することによって、１００％および９９．３％の同一性が明らかになっている。特定のＮＤＶ株Ｃｌｏｎｅ３０からの特定のアミノ酸配列を参照することによって、あるポリペプチド領域を本明細書で定義する場合、この領域は、他のＮＤＶ株の異なったアミノ酸配列を有する対応する領域を含むとみなす。

【００３２】

突然変異は、「野生型」すなわち元のＮＰを発現することができる親ＮＤＶ株の非改変型ＮＰ遺伝子の、遺伝情報の変化であると理解され、その結果ＮＤＶ突然変異体によって発現されるＮＰは、ＮＰの（４４７～４５５）領域中に位置する主要エピトープが欠ける。

【００３３】

ＮＰ遺伝子において導入される突然変異の他の要件は、変異したＮＰが、ＮＤＶについて「逆遺伝的な」技術を使用し適切なプラスミドを用いてこれらの細胞をトランスフェクトした後に、細胞培養物から感染性ＮＤＶを回収することを可能になることである。実施例１および２では、変異したＮＰがＮＤＶ抗体を誘導する能力、および適切なプラスミドを用いてトランスフェクトした細胞培養物から回収可能な感染性ウイルスを生み出すための突然変異の許容度を決定するのに適した実験を記載する。

【００３４】

突然変異とは、たとえば核酸の置換、欠失、挿入、またはこれらの組合せである。

【００３５】

本発明の好ましい実施形態では、ＮＤ ＶＮＰの突然変異体は、配列番号１中に示すアミノ酸配列（４４７～４５５）を有するＮＰの領域内の、１つまたは複数のアミノ酸の欠失または置換を含む。

【００３６】

主要エピトープのコード配列を含むＮＰ遺伝子の領域中の、すべての欠失が許容されるわけではないことが分かった。ＮＰアミノ酸４４３～４６０に対応するヌクレオチドの欠失（ＮＤＶ－Δ１８突然変異体）は、適切なプラスミドを用いたトランスフェクトの後に、細胞培養物からの感染性ＮＤＶ突然変異体の回収につながったが、ＮＰアミノ酸４４４～４５５（ＮＤＶ－Δ１２突然変異体）および４４２～４８９（ＮＤＶ－Δ４８突然変異体）に対応するヌクレオチドの欠失では、そうはならなかった。

【００３７】

タンパク質の二次構造を分析することによって（Ｇａｒｎｉｅｒ－Ｏｓｇｕｔｈｏｒｐｅ－Ｒｏｂｓｏｎ分析）、ＮＰのアミノ酸位置４４４～４５９はαヘリックスを形成することが示された。完全なヘリックスおよび側面に位置するヌクレオチド（Δ４４３～４６０）を除去することによって、生命力のある感染性組み換えＮＤＶの生成が妨げられることはなく、一方でＮＰタンパク質の部分的なヘリックス構造または追加的な部分を除去することが、細胞培養物からの感染性ＮＤＶの回収につながらなかったことが分かっている。

【００３８】

したがって、本発明による好ましいＮＤＶ突然変異体は、アミノ酸４４３±１～４６０±１の欠失を含む。

【００３９】
本発明のこの実施形態の特に好ましい態様では、アミノ酸４４３～４６０の欠失を含む、ＮＤ　ＶＮＰ突然変異体を提供する。
【００４０】
本発明による特に有利なＮＤＶ突然変異体は、追加的な弱毒化した突然変異体を含む、前述のＮＤＶ突然変異体である。
【００４１】
このようなＮＤＶ突然変異体は、任意の従来のＮＤワクチン株に由来するものであってよい。市販のＮＤワクチン中に存在するこのような適切なＮＤＶワクチン株の例はＣｌｏｎｅ３０（登録商標）、Ｌａ　Ｓｏｔａ、Ｈｉｔｃｈｎｅｒ　Ｂ１、ＮＤＷ、Ｃ２およびＡＶ４であり、Ｃｌｏｎｅ３０（登録商標）が好ましいワクチン株である。
【００４２】
この実施形態の他の態様では、本発明は、前述のＮＤＶ突然変異体を主成分とする組み換えベクターウイルスを提供する。このような組み換えベクターウイルスは、ＮＤＶに対するワクチンを作製するためだけでなく、他の家禽類の感染病に対するワクチンを作製するためにも使用することができる。あるいは、このような組み換えベクターウイルスによって、診断試験においてさらなる安全性がもたらされる可能性もあり、組み換えウイルスは魅力的な二重性のマーカー候補となる。
【００４３】
ＮＤＶベクターは、前に定義したＮＰの主要エピトープをコードしている領域を、ＮＰ以外のポリペプチド、たとえば他の鳥類病原体のポリペプチドの主要エピトープをコードしている異種の核酸配列でインフレーム置換（全体的または部分的）することにより得ることができる。この主要エピトープは、あるポリペプチド（を含む組成物）によって誘導されるほぼすべての抗血清と相互作用するこのポリペプチドの領域を表す。
【００４４】
本発明による好ましいＮＤＶベクターでは、ＮＰのアミノ酸配列４４４～４５９または４４４～４５５をコードしているヌクレオチドは、異種のヌクレオチド配列によって、詳細にはそれぞれ１６個または１２個のアミノ酸をコードしている異種のヌクレオチド配列によって置換されている。
【００４５】
実施例５では、ＮＤＶと無関係なウイルスのＢ細胞エピトープを使用して、ＮＤＶのＮＰ主要エピトープを交換することができることが示される。組み換えＮＤＶベクターは、ＮＰ上の主要エピトープを対象とする抗体を誘導することなく、外来性のエピトープに対する特異的な抗体を誘導することができた。さらに、発現した外来性のエピトープは、対応する野生型ウイルスによる抗原投与（ｃｈａｌｌｅｎｇｅ）に対する防御を誘導することができることが示される。
【００４６】
ＮＤＶベクターは、他の鳥類病原体のポリペプチドをコードしている異種の核酸配列を、ＮＤＶ突然変異体の非翻訳領域に挿入することによって得ることもできる。この目的に適した非翻訳領域は、ＮＰ遺伝子のゲノムプロモーターと開始部の間、ＮＰ／Ｐ、Ｐ／Ｍ、Ｍ／Ｆ、Ｆ／ＨＮおよびＨＮ／Ｌ遺伝子接合部、およびＬ遺伝子の端部とアンチゲノムプロモーターの間に位置している。異種の核酸配列は、感染性滑液包嚢病ウイルス、感染性気管支炎ウイルス、マレック病ウイルス、鳥類脳脊髄炎ウイルス、鳥レオウイルス、鳥インフルエンザウイルス、ニワトリ貧血ウイルスなどの鳥類病原体、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｓｐｐ．、Ｅ．ｃｏｌｉ、およびＥｉｍｅｒｉａ　ｓｐｐ．の抗原をコードしていてよい。
【００４７】
本発明によるＮＤ　ＶＮＰ突然変異体は、非分節状のマイナス鎖ＲＮＡウイルスの遺伝的改変を可能にする、充分に確立された「逆遺伝的な」方法によって作製することができる（Ｃｏｎｚｅｌｍａｎｎ、Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｇｅｎｅｔ．３２、１２３－１６２、１９

９８、およびＲｏｂｅｒｔｓ ａｎｄ Ｒｏｓｅ、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ２４７、１－６、１９９８によって概説されている）。

【００４８】

さらに、ＮＤＶに関するこのような方法は、Ｐｅｅｔｅｒｓ他（Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ７３、５００１－５００９、１９９９）およびＲｏｍｅｒ－Ｏｂｅｒｄｏｒｆｅｒ他（Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．８０、２９８７－２９９５、１９９９）によっても記載されており、実施例１にこれを記載する。

【００４９】

望ましい突然変異は、当分野で一般的に知られているこの目的のための方法によって、ＮＤＶゲノム中に導入することができる。詳細には、突然変異は部位特定変異導入法によって導入する。このような方法を本明細書に記載するが、当分野においてもこれは一般的に使用されている（Ｐｅｅｔｅｒｓ他、１９９９上記；Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、ｅｄｓ．：Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌ他、Ｗｉｌｅｙ Ｎ．Ｙ．、１９９５版、ページ８．５．１．－８．５．９．およびＫｕｎｋｅｌ他、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ Ｖｏｌ．１５４、３７６－３８２、１９８７）。

【００５０】

本発明によるＮＤ ＶＮＰ突然変異体が、天然に存在するＮＤＶ株によって誘導される応答と区別することができるニワトリの抗体応答を誘導することができるという予期せぬ発見に加えて、前述のＮＤ ＶＮＰ突然変異体が、防御的免疫応答を誘導することができることも分かっている。

【００５１】

したがって、本発明の他の実施形態では、生または不活化形である前に定義したＮＤ ＶＮＰ突然変異体、および薬剤として許容される担体または希釈剤を含む、家禽類のニューカッスル病に対するワクチンを提供する。

【００５２】

本発明によるワクチンは、市販の生または不活化ＮＤＶワクチンについて一般的に使用されている方法などの、従来の方法によって作製することができる。

【００５３】

簡潔には、感染しやすい基質をＮＤ ＶＮＰ突然変異体に接種し、ウイルスが望ましい力価に複製するまで増殖させ、その後ＮＤＶ含有物質を採取する。その後、採取した物質を、免疫性を有する薬剤調製物に調合する。

【００５４】

ニワトリ胚繊維芽細胞（ＣＥＦ）またはニワトリ腎臓細胞（ＣＫ）などの初代（鳥類）細胞培養物、ＶＥＲＯ細胞系またはベビーハムスターの腎臓（ＢＨＫ）細胞系などの哺乳動物の細胞系を含めた、ＮＤウイルスの複製を促進することができるそれぞれの基質を、本発明において使用することができる。

【００５５】

ＮＤ ＶＮＰ突然変異体を増殖させることができる非常に適切な基質は、ＳＰＦ胚含有卵である。卵１個当たり少なくとも$10^{2.0}$ＥＩＤ$_{50}$を含む胚含有卵には、たとえば０．２ｍｌのＮＤＶ含有尿膜腔液を接種することができる。

【００５６】

生後９～１１日の胚含有卵に約$10^{5.0}$ＥＩＤ$_{50}$で接種し、その後３７℃で２～４日間培養することが好ましい。２～４日後、好ましくは尿膜腔液を回収することによって、ＮＤウイルスの生成物を採取することができる。その後この液体を２５００ｇで１０分間遠心分離し、次にフィルタ（１００μｍ）を介して上澄みを濾過することができる。

【００５７】

本発明によるワクチンは、ＮＤ ＶＮＰ突然変異体、およびこのような組成物に関して習慣的に使用される、薬剤として許容される担体または希釈剤を含む。

【００５８】

生ウイルスを含むワクチンを作製し、懸濁液の形か凍結乾燥させた形で市場に出すことができる。担体には安定剤、防腐剤および緩衝液がある。希釈剤には水、水性緩衝液およびポリオールがある。

【００５９】

望むならば、本発明による生ワクチンはアジュバントを含んでよい。アジュバント活性を有する適切な化合物および組成物の例は、不活化ＮＤＶワクチンについて以下に述べるものと同じである。

【００６０】

注射による投与、たとえば本発明による生ワクチンを筋肉内注射、皮下注射することは可能であるが、ＮＤＶワクチン接種に一般に使用される安価の大量施用技法によって、ワクチンを投与することが好ましい。ＮＤＶワクチン接種については、これらの技法には水を飲むこと、およびスプレー式のワクチン接種がある。

【００６１】

本発明によるＮＤ　ＶＮＰ突然変異体のさらなる予想外の性質は、ニワトリ胚に関するその毒性が、それを卵内投与することができるほど充分弱いことである。したがって本発明は、卵内ワクチン接種に使用することができる、前述のＮＤ　ＶＮＰ突然変異体を主成分とするワクチンも提供する。

【００６２】

ＮＤ　ＶＮＰ突然変異体を含むワクチンは、従来の卵内ワクチン接種法にしたがって、胚含有卵に注射することができる。通常は、胚形成の後期中に、一般には培養期間の最後の４分の１（第１５～２１日）に、好ましくは培養期間の第１８日または第１９日に、ワクチンを胚含有卵に注射する。培養している卵への注射の機構は特に重要なわけではない。ただし、それは胚の組織および器官を過度に害することがないものとする。たとえば、殻の大きな端部に、注射器に取り付けられた針（１～１．５インチ、約２２ゲージ）によって、小さな穴をあけ、ワクチンを内殻膜および漿尿膜の下に注射する。その後、ワクチン接種した胚含有卵を、孵化のための培養器に移す（米国特許第４，４５８，６３０号、５，４２７，７９１号、ＷＯ９８／５６４１３およびＷＯ９５／３５１２１）。胚のワクチン接種プロセスはすべて、市販のＩｎｏｖｏｊｅｃｔ（登録商標）などの、自動式ワクチン接種システムを使用して行うことが好ましい。

【００６３】

本発明の他の態様では、不活化形であり、ＮＤ　ＶＮＰ突然変異体を含むワクチンを提供する。不活化ワクチンの主な利点は、その安全性、および誘導することができる長期の防御抗体が高レベルであることである。

【００６４】

増殖ステップ後に採取したウイルスを不活化させる目的は、ウイルスの繁殖を失くすことである。これは一般に、よく知られている化学的または物理的手段によって行うことができる。

【００６５】

本発明による不活化ＮＤ　ＶＮＰ突然変異体を含むワクチンは、たとえばこの目的に適した、１つまたは複数の前述の薬剤として許容される担体または希釈剤を含むことができる。

【００６６】

本発明による不活化ワクチンは、アジュバント活性を有する１つまたは複数の化合物を含むことが好ましい。この目的に適した化合物または組成物には、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウムまたは酸化アルミニウム、たとえば鉱油を主成分とする水中油型または油中水型エマルジョン、Ｂａｙｏｌ　Ｆ（登録商標）またはＭａｒｃｏｌ　５２（登録商標）など、ビタミンＥアセテート、およびサポニンなどの植物油がある。

【００６７】

本発明によるワクチンは、活性成分としての有効用量のＮＤ　ＶＮＰ突然変異体、すなわち、ワクチン接種した鳥において毒性ウイルスによる抗原投与に対して免疫性を誘導する

であろう一定量の免疫性ＮＤＶ物質を含む。本明細書では免疫性を、ワクチン接種後に非ワクチン接種群と比べて、鳥類の個体群において斃死および臨床症状に対する非常に高レベルの防御を誘導することとして定義する。詳細には本発明によるワクチンは、ワクチン接種した動物の大群を、病気の臨床症状および斃死の発生に対して防御する。

【００６８】

典型的には、生ワクチンは、$10^{2.0}$－$10^{8.0}$の胚感染用量（EID_{50}）、好ましくは$10^{4.0}$－$10^{7.0}$$EID_{50}$の範囲の用量で投与することができる。不活化ワクチンは、$10^{4.0}$－$10^{9.0}$$EID_{50}$の抗原相当物を含んでよい。

【００６９】

通常不活化ワクチンは、非経口的に、たとえば筋肉内注射または皮下注射によって投与する。

【００７０】

本発明によるＮＤＶワクチンは、ニワトリに効果的に使用することができるが、七面鳥、ハト、ウズラ、キジ、ホロホロチョウおよびパートリッジなどの他の家禽類にも、このワクチンを接種することができる。ニワトリにはブロイラー用、繁殖用ストックおよび産卵用ストックがある。

【００７１】

本発明による生または不活化ワクチンを孵化後に与えた動物の年齢は、従来の生または不活化ＮＤＶワクチンを与えた動物の年齢と同じである。たとえばブロイラー、特にＭＤＡのレベルが高いブロイラーには、生後１日齢または１～３週齢でワクチン接種することができる。産卵用ストックまたは繁殖用ストックには、１～１０日齢でワクチン接種することができ、６～１２および１６～２０週齢で生または不活化ワクチンを追加接種することができる。

【００７２】

本発明は、本発明によるＮＤ　ＶＮＰ突然変異体に加えて、ＮＤおよび他の鳥類病原体に対する防御を誘導することができるワクチン株を含む、混合ワクチンも含む。

【００７３】

混合ワクチンは、マレック病ウイルス（ＭＤＶ）、感染性気管支炎ウイルス（ＩＢＶ）、ニューカッスル病ウイルス（ＮＤＶ）、産卵低下症候群（ＥＤＳ）ウイルス、七面鳥鼻気管炎ウイルス（ＴＲＴＶ）またはレオウイルスの、１つまたは複数のワクチン株をさらに含むことが好ましい。

【００７４】

混合ワクチン中の追加的なＮＤワクチン株は、ＮＤＶのＦまたはＨＮタンパク質を発現することができる組み換え（ウイルス）ワクチンベクターであることが好ましい。このようなウイルスワクチンベクターはよく知られており、それらの安全性および効力は広く研究されている：Ｍｏｒｇａｎ他、Ａｖｉａｎ　Ｄｉｓｅａｓｅｓ３６、８５８－８７０、１９９２およびＡｖｉａｎ　Ｄｉｓｅａｓｅｓ３７、１０３２－１０４０、１９９３；Ｈｅｃｋｅｒｔ他、Ａｖｉａｎ　Ｄｉｓｅａｓｅｓ４０、７７０－７７７、１９９６；Ｓａｋａｇｕｃｈｉ他、Ｖａｃｃｉｎｅ１６、４７２－４７９、１９９８およびＳｏｎｏｄａ他、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７４、３２１７－３２２６、２０００。

【００７５】

最も好ましい実施形態では、本発明による混合ワクチン中の組み換えワクチンベクターは、ＮＤＶのＦまたはＨＮタンパク質を発現することができる組み換えＨＶＴベクターである。

【００７６】

混合ワクチンが卵内経路によって投与される場合、追加のワクチン株は胚に安全なワクチン株でなければならない。すなわち、生ワクチン株は、胚形成の１８日にＳＰＦ卵に接種される場合、胚含有卵の少なくとも７０％の孵化率をもたらす結果となる。

【００７７】

前述のＮＤＶマーカーワクチンは、診断法に関しては、それをワクチンを接種した動物と

、自然界に存在するＮＤＶ株に感染した動物、または従来のＮＤワクチンを接種した動物を区別することができる。

【００７８】

本発明は、大規模な撲滅プログラムに適用した場合ＮＤＶの根絶につながる可能性がある、ＮＤ制御対策を監視するための非常に貴重なツールも提供する。このツールは、アミノ酸配列（４４７～４５５）を有するＮＰの領域中に位置する主要エピトープと反応性がある抗体の有無について動物の試料を検査するステップを含む、家禽類のＮＤＶ感染を判定するための方法に関する。

【００７９】

この方法で使用する動物の試料は、その中にＮＤＶ抗体を検出することができる任意の試料、たとえば血液、血清または組織試料であってよく、血清試料が好ましい。

【００８０】

このような方法を使用する際の抗原としての抗原は、唯一のエピトープ含有領域として（４４７～４５５）領域を含むＮＰの断片でできている。したがって、動物のＮＤＶ感染を判定するための好ましい方法は、以下のステップを含む：

（ｉ）抗ＮＤＶ抗体を含む疑いがある試料を、唯一のエピトープ含有領域としてアミノ酸領域（４４７～４５５）を含むＮＰの断片と共に培養するステップ、

（ｉｉ）抗体－抗原複合体の形成を可能にするステップ、および

（ｉｉｉ）抗体－抗原複合体の存在を検出するステップ。

【００８１】

特に好ましい診断法では、ＮＰの断片は、アミノ酸配列３６０～４７０を有するポリペプチド、または領域（４４７～４５５）を含むその一部分である。

【００８２】

最も好ましい診断法では、使用する抗原は、アミノ酸配列４４３～４６０を有する１８量体ペプチドである。

【００８３】

免疫測定法の設計は変わる可能性がある。たとえば免疫測定法は、競合的または直接的な反応に基づくものである。さらに、プロトコルは固形担体を使用することができ、あるいは細胞の物質を使用することができる。抗体－抗原複合体の検出は、標識した抗体の使用を含んでよく、標識体は、たとえば酵素、蛍光性分子、化学発光性分子、放射活性分子または染料分子であってよい。

【００８４】

試料中のＮＤＶ抗体を検出するのに適した方法には、酵素結合免疫吸着検査法（ＥＬＩＳＡ）、免疫蛍光試験（ＩＦＴ）およびウエスタンブロット分析があり、ＥＬＩＳＡが好ましい。

【００８５】

代表的なＥＬＩＳＡでは、ポリスチレン製マイクロタイタープレートのウエルは、主要エピトープを含むＮＰの適切な断片でコーティングする。次に、コーティングされているプレートのウエルにニワトリの血清を充填し、一連の希釈液を作成する。培養後、関連のあるニワトリの抗ＮＰ血清の存在下あるいは不在下で、主要エピトープを対象とする抗体を、捕獲された抗ＮＰ抗体に結合する（試験血清中に存在する場合）、標識した（たとえばホースラディッシュペルオキシダーゼに結合した）検出用抗体によって決定する。ＮＰ断片に結合する、血清中に存在する関連のある抗体の量は、プレートを酵素基質と共に培養し、ミクロプレート自動読取装置の吸光度の値（ＯＤ）を読むことによって決定することができる。

【００８６】

診断法の代替的な実施形態では、ニワトリ血清中の特異的な抗体の存在を、（４４７～４５５）領域内に位置するエピトープと特異的に反応するモノクローナル抗体の存在下で、血清および適切な抗原を培養することによって調べる。

【００８７】

ＮＤＶ感染したニワトリとＮＤＶ（サブユニット）をワクチン接種したニワトリに関する、抗原としての全ＮＰ系の、抗体を検出することに基づくＥＬＩＳＡは、Ｍａｋｋａｙ他、（１９９９、上記）およびＥｒｒｉｎｇｔｏｎ他、（Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ５５、３５７－３６５、１９９５）によって記載されており、したがって関連のある抗原を使用するときは、本明細書に記載した原理を適用することができる。

【００８８】

本発明の他の実施形態では、前述の本発明による診断法を行うのに適した、診断試験用キットを提供する。

【００８９】

詳細には、通常存在する成分に加えて、キャリア分子に結合していることが好ましい（望むならば固相上にコーティングされている）、前に定義した適切なＮＰ断片、好ましくは１８量体（４４３～４６０）ペプチドを抗原反応物として含む、診断試験用キットを提供する。このような試験用キット中に通常存在する他の成分には、ビオチンまたはホースラディッシュペルオキシダーゼに結合した抗体、酵素基質、洗浄用緩衝液などがある。

【００９０】

実施例

実施例１．

核タンパク質（ＮＰ）上に主要エピトープが欠けている組み換えＮＤＶの作製

材料および方法

完全長であるＮＤＶのｃＤＮＡへの突然変異の導入

突然変異体ＮＤＶを作製するために、ｌｅｎｔｏｇｅｎｉｃ　ＮＤワクチン株、Ｃｌｏｎｅ３０の完全長のアンチゲノムＲＮＡを発現するプラスミドｐｆｌＮＤＶ（Ｒｏｍｅｒ－Ｏｂｅｒｄｏｒｆｅｒ他、Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．８０、２９８７－２９９５、１９９９）を使用して、突然変異を導入した。主要エピトープが位置する領域の内部欠失を、供給者の教示書（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）に従い、「急変部位特定変異導入キット」を使用して導入した。最初に、ＮＤＶゲノムのヌクレオチド７７～２２８９を含むＤＮＡ断片を、ＭｌｕｌでｐｆｌＮＤＶを消化し、Ｋｌｅｎｏｗを充填し、Ａｐａｌで処理することによって作製した。２．２ｋｂまでのＤＮＡ断片を、ＡｐａｌおよびＥｃｏＲＩで消化したｐＳＫＴ７Ｔベクターに連結させた。次いでＰＣＲ突然変異導入法を、以下のプライマーのセット（配列番号５～１０）を使用して前述の鋳型に行った：

ヌクレオチド１４５１～１４８６を欠失させるために、ＮＰアミノ酸４４４～４５５に対応する以下のプライマー

Ｐ１Ａ（５’－ＣＣＡＧＡＡＧＣＣＧＧＧＧＡＴＧＧＧ／ＡＡＴＡＧＣＡＴＧＡＧＧＧＡＧ－３’）および

Ｐ１Ｂ（５’－ＣＴＣＣＣＴＣＡＴＧＣＴＡＴＴ／ＣＣＣＡＴＣＣＣＣＧＧＣＴＴＣＴＧＧ－３’）

ヌクレオチド１４４８～１５０１を欠失させるために、ＮＰアミノ酸４４３～４６０に対応する以下のプライマー

Ｐ２Ａ（５’－ＣＣＡＧＡＡＧＣＣＧＧＧＧＡＴ／ＧＣＧＣＣＡＡＡＣＴＣＴＧＣＡＣＡＧＧ－３’）および

Ｐ２Ｂ（５’－ＣＣＴＧＴＧＣＡＧＡＧＴＴＴＧＧＣＧＣ／ＡＴＣＣＣＣＧＧＣＴＴＣＴＧＧ－３’）

ヌクレオチド１４４５～１５８８を欠失させるために、ＮＰアミノ酸４４２～４８９に対応する以下のプライマー

Ｐ３Ａ（５’－ＧＧＣＡＡＣＣＡＧＡＡＧＣＣＧＧＧ／ＴＧＡＴＧＧＡＣＡＡＡＡＣＣＣＡＧＣ－３’）

Ｐ３Ｂ（５’－ＧＣＴＧＧＧＴＴＴＴＧＴＣＣＡＴＣＡ／ＣＣＣＧＧＣＴＴＣＴＧＧＴＴＧＣＣ－３’）

【００９１】

突然変異を導入したクローンをＡａｔｌｌ／Ａｐａｌによって消化し、ｐｆｌＮＤＶの同

じ部位にクローン化した。導入された突然変異が存在することを、それぞれのクローンを配列決定することによって確認した。アミノ酸位置４４４～４５５、４４３～４６０、または４４２～４８９に対応するＮＰ遺伝子の欠失がある、生成した完全長のクローンを、それぞれＮＤＶ－Δ１２、ＮＤＶ－Δ１８、およびＮＤＶ－Δ４８と名付けた（図１）。

【００９２】

組み換えウイルスの回収

ファージＴ７ＲＮＡポリメラーゼを安定して発現する約１．５×10^6個のＢＳＲ－Ｔ７／５細胞を、直径３．２ｃｍの培養皿中で９０％の集合状態に一晩で増殖させた。哺乳動物トランスフェクション用キット（$CaPO_4$トランスフェクションプロトコル；Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）を使用して、５μｇのｐＣｉｔｅ－ＮＰ、２．５μｇのｐＣｉｔｅ－Ｐ、２．５μｇのｐＣｉｔｅ－Ｌ、および１０μｇの完全長クローンの１つを含むプラスミド混合物で、細胞をトランスフェクトした。トランスフェクションの３～５日後に、上澄みを採取し、生後９～１１日の胚を含むＳＰＦニワトリの卵の漿尿腔に接種した。培養の３～４日後に、漿尿液中のウイルスの存在を、ニワトリの赤血球を使用する、迅速なプレート上の赤血球凝集反応（ＨＡ）試験によって決定した。

【００９３】

結果

ＮＰ遺伝子上の主要エピトープを欠失させるため、あるいはＮＰのＣ末端部分の発現を遮断するために、記載した物質および方法で改変を行った。それぞれの改変した完全長ｃＤＮＡクローン、およびＮＤ　ＶＮＰ、ＰおよびＬタンパク質を発現している３つのサポートプラスミドを、ＢＳＲ－Ｔ７／５細胞にトランスフェクトした。培養の３～５日後に、上澄みを採取し、生後９～１１日の胚を含むＳＰＦニワトリの卵に接種した。培養の３～４日後に、漿尿液試料を採取し、ＨＡ試験を施した。非改変型ｐｆｌＮＤＶでトランスフェクトした細胞からの上澄みを接種した卵内で、ＨＡを検出した。驚くべきことに、さらに１回の卵の継代後にＨＡ試験を使用して、ＮＤＶ－Δ１８を検出した。次いでＮＤＶ－Δ１８を、胚含有ＳＰＦ卵において合計８回の継代で、順次に継代させた。それぞれの継代時に感染させた細胞からＲＮＡを単離し、ＲＴ－ＰＣＲを施した。すべての継代において、導入した欠失状態を保ち、組み換えウイルスの安定性が示された。ＮＤＶ－Δ１２およびＮＤＶ－Δ４８のトランスフェクションから得た上澄みを接種した胚含有卵の漿尿液では、３回の連続した卵の継代後でも、感染性ウイルスは検出されなかった。

【００９４】

実施例２．

ＮＤＶ－Δ１８は、マーカーワクチンとして使用することができる

材料および方法

ＮＤＶ－Δ１８を用いたニワトリの免疫処置、および血清の分析

３週齢の１５匹のＳＰＦのニワトリに、０．２ｍｌ当たり６．５$\log_{10}EID_{50}$の用量で眼－鼻経路によって、ＮＤＶ－Δ１８を用いて免疫性を与え、最初の免疫処置の５週間後に同じ用量を追加接種した。ワクチン接種の直前、最初の免疫処置の２、５および７週間後に、血清試料を回収した。次いで血清試料を、赤血球凝集反応阻害（ＨＩ）試験およびＥＬＩＳＡにより試験して、血清変換のレベルを決定した。

【００９５】

酵素結合免疫吸着検査法（ＥＬＩＳＡ）

核タンパク質のアミノ酸配列（４４３～４６０）を含む１８量体合成ペプチド（配列番号１）を合成し、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）に結合させた。簡潔には、合成ペプチド（２ｍｇ）を、リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）中に溶かした２０ｍＭのグルタルアルデヒドを架橋剤として使用して、ＢＳＡに結合させた（それぞれモル比４：１）。これと平行して、陰性対照の抗原を、ペプチドを加えずにＢＳＡ混合物を架橋させることによって作製した。周囲温度で一晩培養した後、グリシンを含む安定化緩衝液を反応混合物に加えることによって、架橋反応を停止させた。ＢＳＡ／ペプチド混合物を等分し、－２０℃で保存した。

【００９６】
マイクロタイタープレートを、２～８℃において一晩、コーティング緩衝液（炭酸緩衝液、ｐＨ９．６）中で、ＢＳＡに結合した合成ペプチド０．５μｇ、またはＢＳＡ単独でコーティングした。非結合抗原を、ＰＢＳＴ溶液（ＰＢＳ、Ｔｗｅｅｎ－２０）でウエルを４回洗浄することによって除去した。試験前に、ＩＢ－ＥＩＡ溶液（０．２Ｍ $Na_2HPO4-2H_2O$緩衝液、ｐＨ７．０、０．０５％ Ｔｗｅｅｎ－２０、０．５Ｍ ＮａＣｌ、０．１％ ＢＳＡ）に血清試料を５０倍希釈し、コーティングしたウエルに加えた。湿気のある雰囲気中において３７℃で１．５時間培養した後、ウエルをＰＢＳＴ溶液で洗浄し、ＩＢ－ＥＩＡ溶液に希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ結合ウサギ抗ニワトリ免疫グロブリン１００μｌと共に培養した。３７℃で４５分間培養した後、ウエルをＰＢＳＴ溶液で洗浄し、基質としてＴＭＢを加えることによって、抗原－抗体複合体を検出した。周囲温度で１５分間培養した後、２Ｍの硫酸５０μｌをそれぞれのウエルに加えることによって、反応を停止させた。光学濃度を４５０ｎｍで測定した。カットオフ値（ＣＯＶ）は、ＳＰＦニワトリからの陰性対照試料の平均Ｐ／Ｎ比を超える３標準偏差に設定した（この場合、Ｐはペプチドでコーティングしたウエルからの試料のＯＤ、ＮはＢＳＡでコーティングしたウエルからの試料のＯＤ）。

【００９７】
試験した血清パネルの完全なＮＤＶ特異的抗体応答を測定するために、マイクロタイタープレートを、スクロース勾配精製したＮＤＶ Ｃｌｏｎｅ３０抗原でコーティングした。簡潔には、４０ｍＭのリン酸緩衝液（ＰＢＳ、ｐＨ７．２）中において０．５％のＴｒｉｔｏｎ Ｘ－１００で処理したウイルス抗原（１．０μｇ／ｍｌ）で一晩、ウエルをコーティングした。ＰＢＳＴで洗浄することにより非結合抗原を除去した後、ＰＢＳ中において１０％ｖ／ｖドナーウマ血清でウエルをポストコーティングした。ポストコーティングした抗原のみを含むウエルを、陰性対照として使用した。試験した血清試料をＩＢ－ＥＩＡ溶液中で希釈し（１：１５０）、陽性および陰性対照ウエルの両方に加えた。ＥＬＩＳＡ手順の残りの培養ステップは、５％のドナーウマ血清を補った共役希釈溶液ＩＢ－ＥＩＡを除いて、前述のペプチド系ＥＬＩＳＡと同一であった。カットオフ値（ＣＯＶ）は、ＳＰＦニワトリからの陰性対照試料の平均Ｐ／Ｎ比を超える３標準偏差に設定した。

【００９８】
結果
組み換えＮＤＶ－Δ１８をワクチン接種した動物からの血清を第２、５および７週に回収し、ＨＩ試験およびＥＬＩＳＡを施した。図２に示したように、最初の免疫処置後２、５および７週間の平均ＨＩ力価はそれぞれ４．７、４．９および７．７であった。全ウイルス系ＥＬＩＳＡでは対応する高反応もあり、組み換えウイルスに対する相当な免疫応答の誘導が示された。対照的に、このＥＬＩＳＡでは、ペプチドでコーティングした血清は反応せず、ＮＤＶ－Δ１８を用いて免疫性したニワトリは、追加的な免疫処置の後でも、ＮＰタンパク質上の主要エピトープを対象とする抗体が完全に欠けていることが示された（第７週の血清）。従来の不活化または生ウイルスワクチンを接種した動物から得た血清を分析することによって、全ウイルスに対するＥＬＩＳＡの反応性が示された。さらに、試験したすべての血清は、ペプチド系ＥＬＩＳＡにおいて陽性であり（図２）、従来のＮＤワクチンを用いて免疫性した動物から回収した血清中の、ＮＰの主要エピトープを対象とする抗体が存在することが示された。したがって、このペプチド系ＥＬＩＳＡによって、組み換えＮＤＶ－Δ１８に対する抗体応答と、従来のＮＤ株の抗体応答を区別することができる。

【００９９】
実施例３．
単独あるいは他のベクターワクチンと組み合わせて投与する、卵内マーカーワクチンとしてのＮＤＶ－Δ１８
材料および方法
胚含有卵中のウイルス増殖

ウイルスの力価および胚の死亡率を決定するために、組み換えＮＤＶ－Δ１８ウイルスの一連の１０倍希釈液を作製し、生後９～１１日の胚を含有するＳＰＦニワトリの卵の、尿膜腔中に接種した。胚の死亡率について少なくとも７日間、これらの卵を毎日観察し、５０％の胚の致死用量（$ＥＬＤ_{50}$）を、ＲｅｅｄおよびＭｕｅｎｃｈ（Ａｍ．Ｊ．Ｈｙｇ．２７、４９３－４９７、１９３８）の方法を使用して決定した。培養４日後の他のセットの卵にも、迅速なプレート上のＨＡ試験を行い、５０％の胚感染用量（$ＥＩＤ_{50}$）として表される力価を、同じ方法を使用して計算した。

【０１００】

卵内ワクチン接種および抗原投与

生後１８日の胚を含有するＳＰＦニワトリの卵に、組み換えＮＤＶ－Δ１８ウイルスを単独で、あるいはＮＤＶＦタンパク質を発現するＨＶＴベクターと組み合わせて接種した（Ｍｏｒｇａｎ他、Ａｖｉａｎ　Ｄｉｓ．３７、１０３２－１０４０、１９９３）。２３Ｇ針を使用して、卵の平滑端、気嚢膜の真下にあけた穴を介して、０．１ｍｌのウイルス希釈液または陰性尿膜腔液を注射した。卵は、孵化するまでさらに培養した。孵化率を記録し、一般的な健康状態についてニワトリを毎日観察した。３週齢で、血液試料を採取し、ＮＤＶ赤血球凝集反応阻害（ＨＩ）試験およびＥＬＩＳＡで、ＮＤＶ抗体について血清を調べた。３週齢で、毒性のＮＤＶ　Ｈｅｒｔｓ株を筋肉内に投与することにより、すべての動物を抗原投与した。病気の臨床的徴候または斃死の発生について、１０日間の間ニワトリを毎日観察した。

【０１０１】

結果

ＮＤＶ－Δ１８は、ニワトリ胚の病原性を弱める。

【０１０２】

ＮＤＶ－Δ１８によって引き起こされる胚の死亡率を決定するために、３代目のＮＤＶ－Δ１８の一連の１０倍希釈液を、生後１１日の胚を含有するＳＰＦニワトリの卵に接種し（０．２ｍｌ／卵）、１週間培養した。驚くべきことに、７日間の培養期間中に特異的な胚の死亡率は検出されず、ＮＤＶ－Δ１８が胚について大幅に弱毒化されたことが示された（図３）。親ウイルス、組み換えＮＤＶ（ｒＮＤＶ）を接種したニワトリ胚は、接種後３日目、$４\log_{10}ＥＩＤ_{50}$／ｍｌより高い用量で既に死に始めた。ｒＮＤＶの５０％感染用量と５０％致死量の間の違いは、わずか$０．３\log_{10}$であった。対照的にこの違いは、ＮＤＶ－Δ１８については$８．０\log_{10}$にもおよび、これが大幅に弱毒化されたことが示された（図３）。

【０１０３】

ＮＤＶ－Δ１８は、有効な卵内／マーカーワクチンである。

【０１０４】

ＮＤＶ－Δ１８は、生後９～１１日の胚に施すと、ニワトリ胚について大幅に弱毒化され、したがって卵内（胚）ワクチン接種実験を行って、ＮＤＶ－Δ１８の安全性および効力を決定した（図１）。卵内ワクチン接種した卵から孵化したニワトリを、ＮＤＶの速現性Ｈｅｒｔｓ株で抗原投与した。ＮＤＶ－Δ１８が単独で与えられるか、ＮＤＶ－Ｆを発現するＨＶＴ組み換え体と組み合わせて与えられるかどうかに関係なく、ＮＤＶ－Δ１８を有する胚が高い抗体レベルに達し、致死的抗原投与に対する防御が１００％であったときに、ニワトリにワクチン接種した（表１）。対照のニワトリはすべて、抗原投与した３日以内に死んだ。これらのデータによってＮＤＶ－Δ１８は、生後１８日のＳＰＦニワトリ胚に投与すると、完全な防御を与えることができることが示される。

【０１０５】

ＮＤＶ－Δ１８を卵内ワクチン接種した動物を、感染した動物または従来のワクチンを接種した動物と血清学的に区別することができるかどうかを決定するために、３週齢で血液試料を回収し、実施例２に記載したようにＥＬＩＳＡを施した。予想通り、ＮＤＶ－Δ１８をワクチン接種した動物からの血清はすべて、ＮＰ遺伝子上の主要エピトープを含むペプチド系のＥＬＩＳＡに関しては反応しなかったが、これらの血清はすべて、全ウイルス

ＥＬＩＳＡ、およびＨＩ試験では反応した（図４）。このことは、ＮＤＶ－Δ１８の卵内投与が、ＮＤＶ－Δ１８をワクチン接種した動物と感染した動物を区別する可能性に影響を与えることはなかったことを示す。ＨＶＴ－ＮＤＶ／Ｆ、ＮＤＶ融合（Ｆ）タンパク質を発現するベクターワクチンと組み合わせてＮＤＶ－Δ１８を卵内投与したときに、ＮＰ遺伝子上の主要エピトープに対する応答が無いことも確認した（図４）。このことは、ＮＤＶ核タンパク質のエピトープ領域を発現しない他のベクターワクチンと、ＮＤＶ－Δ１８を組み合わせることができることを示す。

【０１０６】

【表１】

表１．胚形成の第１８日に卵内ワクチン接種したＳＰＦニワトリにおける、ＮＤＶ－Δ１８、またはＮＤＶ－Δ１８とＨＶＴ－ＮＤＶ／Ｆの安全性および効力

ウイルス	胚	用量[a]	孵化率、量／合計数	HI力価[b]	抗原投与後の生存率[c]
NDV-Δ18	SPF	3.2	25/30 (83%)	5.1 ± 1.2	20/20 (100%)
NDV-Δ18 + HVT-NDV/F	SPF	4.2 2.8	18/27 (67%)	4.6 ± 0.7	18/18 (100%)
対照	SPF	-	26/27 (96%)	0.0 ± 0.0	0/20 (0%)

[a]試料の逆力価測定後に計算したＮＤＶの卵１個あたりの$log_{10}EID_{50}$の用量、ＨＶＴ－ＮＤＶ／Ｆの卵１個あたりのｐｆｕ

[b]２週齢でのＮＤＶに対する赤血球凝集反応阻害（ＨＩ）力価（２ｌｏｇ）

[c]ニワトリ１匹当たり筋肉内に５．５$log_{10}ELD_{50}$の用量で、３週齢においてＮＤＶのＨｅｒｔｓ株で、ニワトリに抗原投与した。

【０１０７】

表１に示すように、高用量のＮＤＶ－Δ１８を使用したときは特に、ＳＰＦ動物の孵化率は低下した。母性由来抗体（ＭＤＡ）の存在がＮＤＶ－Δ１８の安全性を調節するかどうかを判定するために、商業用のニワトリにＮＤＶ－Δ１８を単独で、あるいはこれをＨＶＴ－ＮＤＶ／Ｆと組み合わせて卵内ワクチン接種した。胚を含有する商業用のニワトリの卵の孵化率は、ＮＤＶ－Δ１８単独の、あるいはこれをＨＶＴ－ＮＤＶ／Ｆと組み合わせた卵内投与によって影響を受けることはまったくなく（表２）、ＭＤＡを有する動物におけるＮＤＶ－Δ１８の安全性が実証された。

【０１０８】

【表２】

表２．胚形成の第１８日に卵内ワクチン接種した商業用のニワトリにおける、ＮＤＶ－Δ１８、またはＨＶＴ－ＮＤＶ／Ｆと組み合わせたＮＤＶ－Δ１８の安全性

ウイルス	胚	用量[a]	孵化率、量／合計数
NDV-Δ18	商業用のもの	4.2	29/30 (97%)
NDV-Δ18 + HVT-NDV/F	商業用のもの	4.2 2.8	30/30 (100%)
対照[b]	商業用のもの	-	27/30 (90%)

[a]試料の逆力価決定後に計算したＮＤＶの卵１個あたりの$log_{10}EID_{50}$の用量、ＨＶＴ－ＮＤＶ／Ｆの卵１個あたりのｐｆｕ

[b]孵化時のＮＤＶ特異的ＭＤＡの平均ＨＩ力価は、５．３±１．１であった。

【０１０９】

さらに、胚形成の第１８日または第１９日に、ＮＤＶ－Δ１８の投与後に孵化率を比較した。表３に示すように、胚形成の第１８日にワクチン接種した胚の７６％と比べて、胚形成の第１９日に卵内ワクチン接種したＳＰＦ胚の孵化率は１００％であった。

【０１１０】

【表３】

表３．胚形成の第１８日または第１９日にワクチン接種した、ＳＰＦニワトリにおけるＮＤＶ－Δ１８の安全性

ウイルス	胚の日齢	用量 log_{10} EID_{50}／卵	孵化率、量／合計数
NDV-Δ18	第18日	5.0	71% (15/21)
対照	第18日	0	100% (21/21)
NDV-Δ18	第19日	5.0	100% (22/22)
対照	第19日	0	96% (21/22)

【０１１１】

実施例４

有効な孵化後のマーカーワクチンとしてのＮＤＶ－Δ１８

材料および方法

孵化後のワクチンとしてのＮＤＶ－Δ１８の安全性および効力を判定するために、生後１日のＳＰＦニワトリに、雛１匹当たり６$log_{10}EID_{50}$の用量で点眼経路によりワクチン接種した。３週齢で、臨床的徴候についてニワトリを毎日観察し、血液試料を採取し、毒性のＮＤＶ　Ｈｅｒｔｓ株を筋肉内に投与することにより、すべての動物に抗原投与した。ＮＤＶの赤血球凝集反応阻害（ＨＩ）試験およびＥＬＩＳＡで、ＮＤＶ抗体について血清を調べた。抗原投与後の２週間の間に、病気の臨床的徴候または斃死の発生について、ニワトリを毎日観察した。

【０１１２】

結果

孵化後にＮＤＶ－Δ１８をワクチン接種したニワトリではＮＤＶに特異的な抗体が発生し、致死的な抗原投与に対する防御はこの投与量で９０％を超えた（表４）。対照のニワト

リはすべて、抗原投与の３日以内に死んだ。抗原投与前の観察期間中は、ワクチン接種関連の悪い徴候は検出されなかった。ＮＤＶ－Δ１８をワクチン接種した動物を、感染した動物または従来のワクチンを接種した動物と血清学的に区別することができるかどうかを決定するために、抗原投与の直前に血液試料を回収し、実施例２に記載したようにＥＬＩＳＡを施した。予想通り、すべての血清は全ウイルスＥＬＩＳＡ、およびＨＩ試験では反応したが、ＮＰ遺伝子上の主要エピトープを含むペプチド系ＥＬＩＳＡに関しては反応しなかった。まとめて考えると、これらのデータによって、ＮＤＶ－Δ１８は卵内ワクチン接種に適しているだけでなく、安全で有効な孵化後のマーカーワクチンであることも実証される。

【０１１３】

【表４】

表４．点眼経路によってワクチン接種した生後１日のＳＰＦニワトリにおける、ＮＤＶ－Δ１８の安全性および効力

ウイルス	用量[a]	HI力価[b]	抗原投与後の生存率[c]
NDV-Δ18	6.0	3.73	11/12 (91%)
対照	-	0.0	0/5 (0%)

[a]ニワトリ１匹当たりの$log_{10}EID_{50}$の用量

[b]３週齢でのＮＤＶに対する赤血球凝集反応阻害（ＨＩ）力価（２１ｏｇ）

[c]ニワトリ１匹当たり筋肉内に$6.0 log_{10}ELD_{50}$の用量で、３週齢においてＮＤＶのＨｅｒｔｓ株で、ニワトリに抗原投与した。

【０１１４】

実施例５

外来性エピトープを発現するマーカーワクチン

材料および方法

組み換えウイルスの構築および作製

組み換えＮＤＶによって外来性エピトープが発現される可能性を判定するために、マウスヘルペスウイルス（ＭＨＶ）のＳ２糖タンパク質の、充分に特徴付けられているＢ細胞エピトープ（Ｔａｌｂｏｔ他、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ、１３２、２５０－２６０、１９８４；Ｌｕｙｔｊｅｓ他、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６３、１４０８－１４１５、１９８９）を選択して、ＮＤＶのＮＰ主要エピトープを交換した。インフレーム置換によって、いずれか１６個のアミノ酸（ＮＰのアミノ酸４４４～４５９に対応する、ヌクレオチド位置１４５１～１４９９）、または１２個のアミノ酸（ＮＰのアミノ酸４４４～４５５に対応する、ヌクレオチド位置１４５１～１４８６）を、ＭＨＶのＳ２糖タンパク質上のエピトープを含む、アミノ酸１６個（ＭＨＶエピトープ－１）、またはアミノ酸１０個（ＭＨＶエピトープ－２）の２つの重複配列でそれぞれ置換した。

【０１１５】

ＭＨＶエピトープ－１の配列（受託番号ＮＣＢＩ　ＮＣ　００１８４６；完全なゲノムのヌクレオチド２６４６４～２６５１１；Ｓ２タンパク質のアミノ酸８４５～８６０）：

【０１１６】

【化１】

5′-AGT CCT CTA CTT GGA TGC ATA GGT TCA ACA TGT GCT GAA GAC GGC AAT-3′

Ser Pro Leu Leu Gly Cys Ile Gly Ser Thr Cys Ala Glu Asp Gly Asn

【０１１７】
ＭＨＶエピトープ－２の配列（受託番号ＮＣＢＩ　ＮＣ　００１８４６；完全なゲノムのヌクレオチド２６４７０～２６４９９；Ｓ２タンパク質のアミノ酸８４７～８５６）：
【０１１８】
【化２】

5′- CTA CTT GGA TGC ATA GGT TCA ACA TGT GCT-3′

Leu Leu Gly Cys Ile Gly Ser Thr Cys Ala

【０１１９】
ＰＣＲ突然変異を、適切なプライマーの対を使用して、実施例１に記載した２．２ｋｂのＭｌｕＩ／ＡｐａＩサブクローンに行った：
突然変異を導入したクローンをＡａｔＩＩ／ＡｐａＩによって消化し、ｐｆｌＮＤＶの同じ部位にクローン化した。導入された突然変異が存在することを、それぞれのクローンを配列決定することによって確認した。ＮＰアミノ酸４４４～４５９がＭＨＶエピトープ－１の配列に置換されており、ＮＰアミノ酸４４４～４５５がＭＨＶエピトープ－２の配列に置換されている、生成した完全長のクローンを、それぞれＮＤＶ－ＭＨＶ１およびＮＤＶ－ＭＨＶ２と名付けた。ウイルスのトランスフェクションおよび回収は、実施例１に記載したように行った。トランスフェクション後の３～５日目に、上澄みを採取し、生後９～１１日の胚を含むＳＰＦニワトリの卵の漿尿腔に接種した。培養の３～４日後に、漿尿腔液中のウイルスの存在を、ニワトリの赤血球を使用する、迅速なプレート上の赤血球凝集反応（ＨＡ）試験によって決定した。
【０１２０】
免疫蛍光性の分析
導入したＭＨＶエピトープの発現を判定するため、親組み換え体Ｃｌｏｎｅ３０、ＮＤＶ－Δ１８、ＮＤＶ－ＭＨＶ１およびＮＤＶ－ＭＨＶ２を用いて、ＢＳＲ－Ｔ７細胞を０．０１の感染多重度（ｍｏｉ）で感染させた。２４時間培養した後、感染させた細胞を室温で１時間、冷たいエタノール（９６％）で固定した。ＰＢＳで３回洗浄した後、Ｆタンパク質、ＮＰタンパク質の主要エピトープ、またはＭＨＶエピトープを対象とするモノクローナル抗体と共に細胞を培養した。細胞を洗浄し、抗マウス抗体と結合したＦＩＴＣで染色し、蛍光顕微鏡によって調べた。
【０１２１】
ＮＤＶ－ＭＨＶ１またはＮＤＶ－ＭＨＶ２を用いたニワトリの免疫処置、および血清の分析
３週齢のそれぞれ１０匹のＳＰＦのニワトリの２群に、０．２ｍｌ当たり６．０$\log_{10}$ＥＩＤ$_{50}$の用量で眼－鼻経路によって、ＮＤＶ－ＭＨＶ１またはＮＤＶ－ＭＨＶ２を用いて免疫し、最初の免疫処置の５週間後に同じ用量を追加接種した。ワクチン接種の直前、最初の免疫処置の２、５および７週間後に、血清試料を回収した。血清試料を赤血球凝集反応阻害（ＨＩ）試験およびＥＬＩＳＡにより試験して、血清変換のレベルを決定した。
【０１２２】
酵素結合免疫吸着検査法（ＥＬＩＳＡ）
ＮＤＶ－ＭＨＶ１およびＮＤＶ－ＭＨＶ２ウイルスで免疫性を与えたニワトリが、発現されるＭＨＶエピトープに対する特異的な抗体が発生させたかどうかを判定するために、ＥＬＩＳＡプレートを、スクロース勾配精製したＭＨＶ株Ａ５９抗原でコーティングした。４０ｍＭのリン酸緩衝液（ＰＢＳ、ｐＨ７．２）中において１％のＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００で処理したウイルス抗原で一晩、ウエルをコーティングした。非結合抗原の除去、ＥＬＩＳＡ手順の遮断および残りの培養ステップは、実施例２に記載した全ＮＤＶ系ＥＬＩＳＡと同一であった。ＮＰエピトープに対する応答が無いことを判定するために、ＮＰ主要エピトープを含む１８量体合成ペプチドを使用するＥＬＩＳＡを、実施例２に記載したように行った。同様に、完全なＮＤＶ特異的抗体応答を、実施例２に記載したように、ス

クロース勾配精製したＮＤＶ　Ｃｌｏｎｅ３０抗原でコーティングしたＥＬＩＳＡ用プレートにおいて測定した。

【０１２３】

マウスの免疫処置および抗原投与

ＮＤＶによって発現されるＭＨＶエピトープの防御能力を判定するために、４週齢のＢａｌｂ／ｃメスＭＨＶ血清陰性マウスの群を、免疫処置用および抗原投与実験用に使用した。それぞれ１０匹のマウスの２群に、マウス１匹当たり６．０$\log_{10}$ＥＩＤ$_{50}$の用量で、ＮＤＶ－ＭＨＶ１またはＮＤＶ－ＭＨＶ２を用いて免疫し、４週間後に同じ用量を追加接種した。免疫処置したマウスならびに同様の週齢の１０匹の対照マウスを、１０週齢時に（追加免疫処置の２週間後）、腹膜内経路によりマウス１匹当たり１０ＬＤ$_{50}$の用量で、野生型ＭＨＶ　Ａ５９株を用いて抗原投与した。抗原投与後の２週間の間に、ＭＨＶによる臨床的徴候または斃死について、ニワトリを観察した。

【０１２４】

結果

トランスフェクトした細胞からの上澄みを採取し、生後９～１１日の胚を含有するＳＰＦニワトリの卵に２回継代した。次いで尿膜腔液試料を採取し、ＨＡ試験を施した。ＮＤＶ－ＭＨＶ１およびＮＤＶ－ＭＨＶ２組み換え体でトランスフェクトした細胞からの上澄みを接種した卵中で、ＨＡを検出した。さらに、回収したウイルスを、胚含有卵においてさらに２回継代した。これらの組み換えウイルスの回収によって、ＮＰ主要エピトープはウイルス複製には必須ではないだけでなく、これを完全に外来性である配列またはエピトープで置換することもできることが示される。

【０１２５】

組み換えウイルスが新たに導入されたエピトープを発現するかどうかを判定するために、ＢＳＲ細胞を記載した材料および方法で感染させ、免疫蛍光性の分析を施した。融合タンパク質を対象とするモノクローナル抗体（Ｍａｂ）を使用すると、Ｆタンパク質の発現は、すべてのウイルスで区別できなかった。対照的に、ＮＰ主要エピトープを対象とするＭａｂは、親ウイルスＣｌｏｎｅ３０とのみ反応した。予想通り、ＭＨＶエピトープを対象とするＭａｂは、ＮＤＶ－ＭＨＶ１またはＮＤＶ－ＭＨＶ２で感染させた細胞とのみ反応し、ＮＰ遺伝子のオープンリーディングフレーム内で、エピトープがきちんと発現されることが示された。

【０１２６】

免疫処置直前（Ｔ＝０）および最初の免疫処置の７週間後（Ｔ＝７）に回収した血清に、次いでＨＩ試験および全ＮＤＶ　ＥＬＩＳＡを施した。図面中に示すように、ワクチン接種７週間後のすべてのニワトリのＨＩ力価は、６$\log_2$ＨＩ単位を超えており、全ＮＤＶ系のＥＬＩＳＡにおいて測定した反応値も、非常に高かった（図５～８）。興味深いことに、ＮＤＶ－ＭＨＶ１またはＮＤＶ－ＭＨＶ２で免疫された８０％～９０％のニワトリが、ＭＨＶ全ウイルス抗原系のＥＬＩＳＡにおいて陽性に反応し、組み換えＮＤＶによって発現されるＭＨＶエピトープに対する特異的な抗体を、ニワトリが産生することが示された（図９～１１）。対照的に、１８量体ペプチドでコーティングされた血清はＥＬＩＳＡにおいて反応せず、ＮＤＶ－ＭＨＶ１またはＮＤＶ－ＭＨＶ２で免疫されたニワトリは、ＮＰ上の主要エピトープを対象とする抗体が完全に欠けていることが示された。この性質により、陽性および陰性マーカーとしての診断試験におけるさらなる安全性が与えられ、組み換えウイルスが魅力的な二重性のマーカー候補になる。

【０１２７】

導入したエピトープの致死的な抗原投与に対する防御の能力をさらに示すために、組み換えウイルスを用いてマウスに免疫性を与え、最初の免疫処置の６週間後にそれらを抗原投与した。マウスはＮＤＶの本来の宿主ではないが、免疫されたマウスでは、致死的なＭＨＶの抗原投与に対する相当なレベルの防御が得られた（表５）。したがって、これらの組み換えウイルスは、マーカーワクチンとしてだけでなく、無関係な病原体に対して防御するための、外来性のエピトープを発現させるためのベクターとして魅力的である。

【０１２８】
【表５】

表５．

ウイルス	抗原投与後の生存率%
NDV-MHV1	70% (7/10)
NDV-MHV2	60% (6/10)
対照	20% (2/10)

【０１２９】
図面の説明
図１は、組み換えＮＤＶ構築体を示す図である。マイナス鎖ゲノムＲＮＡ中の、ＮＤＶ遺伝子配列の概略図である。ＮＰ遺伝子上の主要エピトープの周辺の配列（位置１４４２～１５０１、ＮＰアミノ酸４４１～４６０）は、陽性の意味で表す。破線は、ＮＤＶ－Δ１２およびＮＤＶ－Δ１８中の１２個または１８個のアミノ酸の欠失をそれぞれ示す。ＮＤＶ－Δ４８は、最後のアミノ酸の次の停止コドン（＊）のサインによって示される、Ｃ末端切断型ＮＰ（４８残基）を有している。
【０１３０】
図２は、１５匹のＳＰＦニワトリに、３週齢で眼－鼻経路によってＮＤＶ－Δ１８をワクチン接種し、５週齢でもう１度追加接種したことを示す図である。ワクチン接種直前（Ｄ１８　０Ｗ）、最初のワクチン接種の２週間（Ｄ１８　２Ｗ）、５週間（Ｄ１８　５Ｗ）、および７週間（Ｄ１８　７Ｗ）後に回収した血清試料に、物質および方法のセクションに記載したＥＬＩＳＡおよびＨＩ試験を施した。生の商業用ＮＤワクチン、Ｃｌｏｎｅ－３０に対する血清学的応答を、１週齢でワクチン接種し４週間後に採血した１９匹のＳＰＦニワトリと同様に評価した。ＮＥＷＣＡＶＡＣ群については、不活化商業用ワクチンを３週齢で２１匹のＳＰＦニワトリに接種し、免疫処置の３週間後に回収した血清試料に、同様の血清学的検査を行った。（Ｄ１８＝ＮＤＶ－Δ１８）。
【０１３１】
図３は、ＳＰＦニワトリ胚における、ｒＮＤＶおよびＮＤＶ－Δ１８の病原性を示す図である。生後１１日の胚を含有するＳＰＦニワトリの卵に、親ｒＮＤＶまたは突然変異体ＮＤＶ－Δ１８を接種し、７日間すなわち胚の死が起こるまで培養した。ＮＤＶ－Δ１８が、７日間の間に示した用量で胚の斃死を引き起こすことはなかったが、一方でｒＮＤＶは１ＥＩＤ５０／ｍｌという低い用量でも致死性であった（死亡率約１０％）。ｒＮＤＶを接種した胚は、高用量での接種後早くも３日間で死に始めた。
【０１３２】
図４は、ＮＤＶ－Δ１８を単独で、あるいはこれをＨＶＴ－ＮＤＶ／Ｆ、ＮＤＶ融合タンパク質を発現するベクターワクチンと組み合わせて卵内ワクチン接種したＳＰＦニワトリの血清学的応答を示す図である。動物には胚形成の第１８日にワクチン接種し、３週齢で回収した血清試料に、物質および方法のセクションに記載したようにＨＩ試験およびＥＬＩＳＡを行った（Ｄ１８＝ＮＤＶ－Δ１８）。
【０１３３】
図５～８は、ＮＤＶ－ＭＨＶ１またはＮＤＶ－ＭＨＶ２をワクチン接種したＳＰＦニワトリの血清学的応答を示す図である。免疫処置直前（Ｔ＝０）および最初の免疫処置の７週間後（Ｔ＝７）に回収した血清試料に、ＨＩ試験および全ＮＤＶ抗原系ＥＬＩＳＡを施した。
【０１３４】
図９～１１は、ＭＨＶエピトープに特異的な抗体を、ニワトリが産生することを示す図である。図５（ＮＤＶ－ＭＨＶ１およびＮＤＶ－ＭＨＶ２に関する）または図２（ＮＤＶ－Δ１８に関する）に記載したのと同じ血清に、全ＭＨＶ抗原系ＥＬＩＳＡを施した。

【図面の簡単な説明】
【図１】　組み換えＮＤＶ構築体を示し、マイナス鎖ゲノムＲＮＡ中の、ＮＤＶ遺伝子配列の概略図である。
【図２】　１５匹のＳＰＦニワトリに、３週齢で眼－鼻経路によってＮＤＶ－Δ１８をワクチン接種し、５週齢でもう１度追加接種した結果を示す図である。
【図３】　ＳＰＦニワトリ胚における、ｒＮＤＶおよびＮＤＶ－Δ１８の病原性を示す図である。
【図４】　ＮＤＶ－Δ１８を単独で、あるいはこれをＨＶＴ－ＮＤＶ／Ｆ、ＮＤＶ融合タンパク質を発現するベクターワクチンと組み合わせて卵内ワクチン接種したＳＰＦニワトリの血清学的応答を示す図である。
【図５】　ＮＤＶ－ＭＨＶ１をワクチン接種したＳＰＦニワトリの血清学的応答を示す図である。
【図６】　ＮＤＶ－ＭＨＶ１をワクチン接種したＳＰＦニワトリの血清学的応答を示す図である。
【図７】　ＮＤＶ－ＭＨＶ２をワクチン接種したＳＰＦニワトリの血清学的応答を示す図である。
【図８】　ＮＤＶ－ＭＨＶ２をワクチン接種したＳＰＦニワトリの血清学的応答を示す図である。
【図９】　ＭＨＶエピトープに特異的な抗体を、ニワトリが産生することを示す図である。
【図１０】　ＭＨＶエピトープに特異的な抗体を、ニワトリが産生することを示す図である。
【図１１】　ＮＤＶ－ｄ１８で免疫したニワトリの血清のＥＬＩＳＡ試験の結果を示す図である。
【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> AKZO Nobel N.V.

<120> A recombinant Newcastle disease virus nucleoprotein
mutant as a marker vaccine

<130> 2000583

<140>
<141>

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Newcastle disease virus

<220>
<223> 9-mer peptide/epitope

<400> 1
Phe Leu Asp Leu Met Arg Ala Val Ala
1 5

<210> 2
<211> 18
<212> PRT
<213> Newcastle disease virus

<220>
<223> 18-mer peptide

<400> 2
Gly Glu Thr Gln Phe Leu Asp Leu Met Arg Ala Val Ala Asn Ser Met
1 5 10 15

Arg Glu

<210> 3
<211> 1801
<212> DNA
<213> Newcastle disease virus

<220>
<221> CDS
<222> (122)..(1588)

<223> NP gene: nucleotides 56-1801; NP coding sequence:
nucleotides 122-1588

<400> 3

```
accaaacaga gaatccgtaa gttacgataa aaggcgaagg agcaattgaa gtcgcacggg 60

tagaaggtgt gaatctcgag tgcgagcccg aagcacaaac tcgagaaagc cttctgccaa 120

c atg tct tcc gta ttt gat gag tac gaa cag ctc ctc gcg gct cag act 169
  Met Ser Ser Val Phe Asp Glu Tyr Glu Gln Leu Leu Ala Ala Gln Thr
    1               5                  10                  15

cgc ccc aat gga gct cat gga ggg gga gaa aaa ggg agt acc tta aaa   217
Arg Pro Asn Gly Ala His Gly Gly Gly Glu Lys Gly Ser Thr Leu Lys
            20                  25                  30

gta gac gtc ccg gta ttc act ctt aac agt gat gac cca gaa gat aga   265
Val Asp Val Pro Val Phe Thr Leu Asn Ser Asp Asp Pro Glu Asp Arg
        35                  40                  45

tgg agc ttt gtg gta ttc tgc ctc cgg att gct gtt agc gaa gat gcc   313
Trp Ser Phe Val Val Phe Cys Leu Arg Ile Ala Val Ser Glu Asp Ala
    50                  55                  60

aac aaa cca ctc agg caa ggt gct ctc ata tct ctt tta tgc tcc cac   361
Asn Lys Pro Leu Arg Gln Gly Ala Leu Ile Ser Leu Leu Cys Ser His
65                  70                  75                  80

tca cag gta atg agg aac cat gtt gcc ctt gca ggg aaa cag aat gaa   409
Ser Gln Val Met Arg Asn His Val Ala Leu Ala Gly Lys Gln Asn Glu
                85                  90                  95

gcc aca ttg gcc gtg ctt gag att gat ggc ttt gcc aac ggc acg ccc   457
Ala Thr Leu Ala Val Leu Glu Ile Asp Gly Phe Ala Asn Gly Thr Pro
            100                 105                 110

cag ttc aac aat agg agt gga gtg tct gaa gag aga gca cag aga ttt   505
Gln Phe Asn Asn Arg Ser Gly Val Ser Glu Glu Arg Ala Gln Arg Phe
        115                 120                 125

gcg atg ata gca gga tct ctc cct cgg gca tgc agc aac gga acc ccg   553
Ala Met Ile Ala Gly Ser Leu Pro Arg Ala Cys Ser Asn Gly Thr Pro
    130                 135                 140

ttc gtc aca gcc ggg gcc gaa gat gat gca cca gaa gac atc acc gat   601
Phe Val Thr Ala Gly Ala Glu Asp Asp Ala Pro Glu Asp Ile Thr Asp
145                 150                 155                 160

acc ctg gag agg atc ctc tct atc cag gct caa gta tgg gtc aca gta   649
Thr Leu Glu Arg Ile Leu Ser Ile Gln Ala Gln Val Trp Val Thr Val
                165                 170                 175

gca aaa gcc atg act gcg tat gag act gca gat gag tcg gaa aca agg   697
Ala Lys Ala Met Thr Ala Tyr Glu Thr Ala Asp Glu Ser Glu Thr Arg
            180                 185                 190

cga atc aat aag tat atg cag caa ggc agg gtc caa aag aaa tac atc   745
Arg Ile Asn Lys Tyr Met Gln Gln Gly Arg Val Gln Lys Lys Tyr Ile
        195                 200                 205

ctc tac ccc gta tgc agg agc aca atc caa ctc acg atc aga cag tct   793
```

```
Leu Tyr Pro Val Cys Arg Ser Thr Ile Gln Leu Thr Ile Arg Gln Ser
    210                 215                 220

ctt gca gtc cgc atc ttt ttg gtt agc gag ctc aag aga ggc cgc aac   841
Leu Ala Val Arg Ile Phe Leu Val Ser Glu Leu Lys Arg Gly Arg Asn
225                 230                 235                 240

acg gca ggt ggt acc tct act tat tat aac ctg gta ggg gac gta gac   889
Thr Ala Gly Gly Thr Ser Thr Tyr Tyr Asn Leu Val Gly Asp Val Asp
                245                 250                 255

tca tac atc agg aat acc ggg ctt act gca ttc ttc ttg aca ctc aag   937
Ser Tyr Ile Arg Asn Thr Gly Leu Thr Ala Phe Phe Leu Thr Leu Lys
            260                 265                 270

tac gga atc aac acc aag aca tca gcc ctt gca ctt agt agc ctc tca   985
Tyr Gly Ile Asn Thr Lys Thr Ser Ala Leu Ala Leu Ser Ser Leu Ser
        275                 280                 285

ggc gac atc cag aag atg aag cag ctc atg cgt ttg tat cgg atg aaa  1033
Gly Asp Ile Gln Lys Met Lys Gln Leu Met Arg Leu Tyr Arg Met Lys
    290                 295                 300

gga gat aat gcg ccg tac atg aca tta ctt ggt gat agt gac cag atg  1081
Gly Asp Asn Ala Pro Tyr Met Thr Leu Leu Gly Asp Ser Asp Gln Met
305                 310                 315                 320

agc ttt gcg cct gcc gag tat gca caa ctt tac tcc ttt gcc atg ggt  1129
Ser Phe Ala Pro Ala Glu Tyr Ala Gln Leu Tyr Ser Phe Ala Met Gly
                325                 330                 335

atg gca tca gtc cta gat aaa ggt act ggg aaa tac caa ttt gcc agg  1177
Met Ala Ser Val Leu Asp Lys Gly Thr Gly Lys Tyr Gln Phe Ala Arg
            340                 345                 350

gac ttt atg agc aca tca ttc tgg aga ctt gga gta gag tac gct cag  1225
Asp Phe Met Ser Thr Ser Phe Trp Arg Leu Gly Val Glu Tyr Ala Gln
        355                 360                 365

gct cag gga agt agc att aac gag gat atg gct gcc gag cta aag cta  1273
Ala Gln Gly Ser Ser Ile Asn Glu Asp Met Ala Ala Glu Leu Lys Leu
    370                 375                 380

acc cca gca gca agg agg ggc ctg gca gct gct gcc caa cgg gtc tcc  1321
Thr Pro Ala Ala Arg Arg Gly Leu Ala Ala Ala Ala Gln Arg Val Ser
385                 390                 395                 400

gag gag acc agc agc ata gac atg cct act caa caa gtc gga gtc ctc  1369
Glu Glu Thr Ser Ser Ile Asp Met Pro Thr Gln Gln Val Gly Val Leu
                405                 410                 415

act ggg ctt agc gag ggg ggg tcc caa gct cta caa ggc gga tcg aat  1417
Thr Gly Leu Ser Glu Gly Gly Ser Gln Ala Leu Gln Gly Gly Ser Asn
            420                 425                 430

aga tcg caa ggg caa cca gaa gcc ggg gat ggg gag acc caa ttc ctg  1465

Arg Ser Gln Gly Gln Pro Glu Ala Gly Asp Gly Glu Thr Gln Phe Leu
        435                 440                 445

gat ctg atg aga gcg gta gca aat agc atg agg gag gcg cca aac tct  1513
```

```
Asp Leu Met Arg Ala Val Ala Asn Ser Met Arg Glu Ala Pro Asn Ser
    450                 455                 460

gca cag ggc act ccc caa tcg ggg cct ccc cca act cct ggg cca tcc  1561
Ala Gln Gly Thr Pro Gln Ser Gly Pro Pro Pro Thr Pro Gly Pro Ser
465                 470                 475                 480

caa gat aac gac acc gac tgg ggg tat tgatggacaa aacccagcct        1608
Gln Asp Asn Asp Thr Asp Trp Gly Tyr
                485

gcttccacaa aaacatccca atgccctcac ccgtagtcga cccctcgatt tgcggctcta
1668

tatgaccaca ccctcaaaca aacatccccc tctttcctcc ctccccctgc tgtacaactc
1728

cgcacgccct agataccaca ggcacaatgc ggctcactaa caatcaaaac agagccgagg
1788

gaattagaaa aaa
1801


<210> 4
<211> 489
<212> PRT
<213> Newcastle disease virus

<400> 4
Met Ser Ser Val Phe Asp Glu Tyr Glu Gln Leu Leu Ala Ala Gln Thr
  1               5                  10                  15

Arg Pro Asn Gly Ala His Gly Gly Gly Glu Lys Gly Ser Thr Leu Lys
             20                  25                  30

Val Asp Val Pro Val Phe Thr Leu Asn Ser Asp Asp Pro Glu Asp Arg
         35                  40                  45

Trp Ser Phe Val Val Phe Cys Leu Arg Ile Ala Val Ser Glu Asp Ala
     50                  55                  60

Asn Lys Pro Leu Arg Gln Gly Ala Leu Ile Ser Leu Leu Cys Ser His
 65                  70                  75                  80

Ser Gln Val Met Arg Asn His Val Ala Leu Ala Gly Lys Gln Asn Glu
                 85                  90                  95

Ala Thr Leu Ala Val Leu Glu Ile Asp Gly Phe Ala Asn Gly Thr Pro
            100                 105                 110

Gln Phe Asn Asn Arg Ser Gly Val Ser Glu Glu Arg Ala Gln Arg Phe
        115                 120                 125

Ala Met Ile Ala Gly Ser Leu Pro Arg Ala Cys Ser Asn Gly Thr Pro
    130                 135                 140

Phe Val Thr Ala Gly Ala Glu Asp Asp Ala Pro Glu Asp Ile Thr Asp
145                 150                 155                 160

Thr Leu Glu Arg Ile Leu Ser Ile Gln Ala Gln Val Trp Val Thr Val
```

```
                165                 170                 175

Ala Lys Ala Met Thr Ala Tyr Glu Thr Ala Asp Glu Ser Glu Thr Arg
            180                 185                 190


Arg Ile Asn Lys Tyr Met Gln Gln Gly Arg Val Gln Lys Lys Tyr Ile
        195                 200                 205

Leu Tyr Pro Val Cys Arg Ser Thr Ile Gln Leu Thr Ile Arg Gln Ser
    210                 215                 220

Leu Ala Val Arg Ile Phe Leu Val Ser Glu Leu Lys Arg Gly Arg Asn
225                 230                 235                 240

Thr Ala Gly Gly Thr Ser Thr Tyr Tyr Asn Leu Val Gly Asp Val Asp
                245                 250                 255

Ser Tyr Ile Arg Asn Thr Gly Leu Thr Ala Phe Phe Leu Thr Leu Lys
            260                 265                 270

Tyr Gly Ile Asn Thr Lys Thr Ser Ala Leu Ala Leu Ser Ser Leu Ser
        275                 280                 285

Gly Asp Ile Gln Lys Met Lys Gln Leu Met Arg Leu Tyr Arg Met Lys
    290                 295                 300

Gly Asp Asn Ala Pro Tyr Met Thr Leu Leu Gly Asp Ser Asp Gln Met
305                 310                 315                 320

Ser Phe Ala Pro Ala Glu Tyr Ala Gln Leu Tyr Ser Phe Ala Met Gly
                325                 330                 335

Met Ala Ser Val Leu Asp Lys Gly Thr Gly Lys Tyr Gln Phe Ala Arg
            340                 345                 350

Asp Phe Met Ser Thr Ser Phe Trp Arg Leu Gly Val Glu Tyr Ala Gln
        355                 360                 365

Ala Gln Gly Ser Ser Ile Asn Glu Asp Met Ala Ala Glu Leu Lys Leu
    370                 375                 380

Thr Pro Ala Ala Arg Arg Gly Leu Ala Ala Ala Ala Gln Arg Val Ser
385                 390                 395                 400

Glu Glu Thr Ser Ser Ile Asp Met Pro Thr Gln Gln Val Gly Val Leu
                405                 410                 415

Thr Gly Leu Ser Glu Gly Gly Ser Gln Ala Leu Gln Gly Gly Ser Asn
            420                 425                 430

Arg Ser Gln Gly Gln Pro Glu Ala Gly Asp Gly Glu Thr Gln Phe Leu
        435                 440                 445


Asp Leu Met Arg Ala Val Ala Asn Ser Met Arg Glu Ala Pro Asn Ser
    450                 455                 460

Ala Gln Gly Thr Pro Gln Ser Gly Pro Pro Pro Thr Pro Gly Pro Ser
465                 470                 475                 480
```

Gln Asp Asn Asp Thr Asp Trp Gly Tyr
485

<210> 5
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: NP primer P1A

<400> 5
ccagaagccg gggatgggaa tagcatgagg gag 33

<210> 6
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: NP primer P1B

<400> 6
ctccctcatg ctattcccat ccccggcttc tgg 33

<210> 7
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: NP primer P2A

<400> 7
ccagaagccg gggatgcgcc aaactctgca cagg 34

<210> 8
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: NP primer P2B

<400> 8
cctgtgcaga gtttggcgca tccccggctt ctgg 34

<210> 9
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: NP primer P3A

<400> 9
ggcaaccaga agccgggtga tggacaaaac ccagc 35

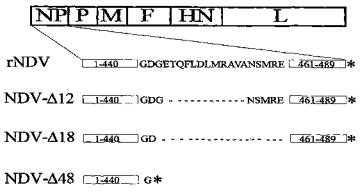
<210> 10
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: NP primer P3B

<400> 10
gctgggtttt gtccatcacc cggcttctgg ttgcc 35

【図１】

Figure 1



【図２】

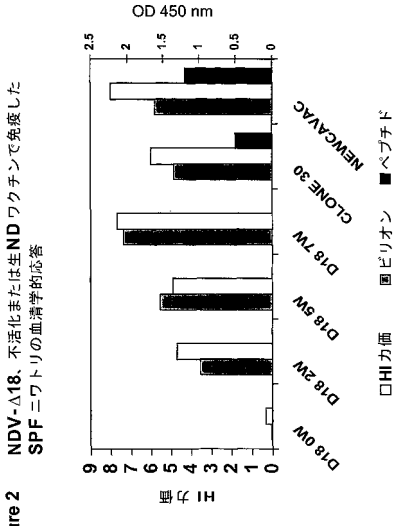


Figure 2 NDV-Δ18、不活化または生ND ワクチンで免疫した SPF ニワトリの血清学的応答

【図３】

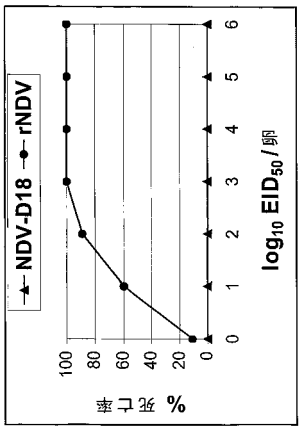


Figure 3 NDV-Δ18 の弱毒化

【図４】

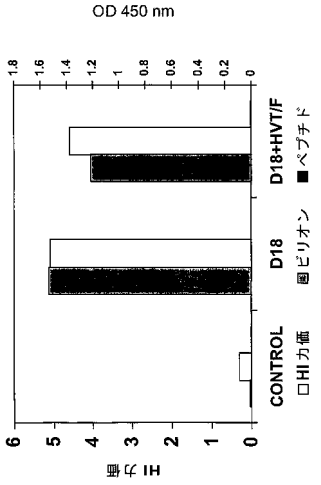


Figure 4 単独あるいは他のベクターワクチンと組み合わせた卵内の NDV-Δ18

【図５】

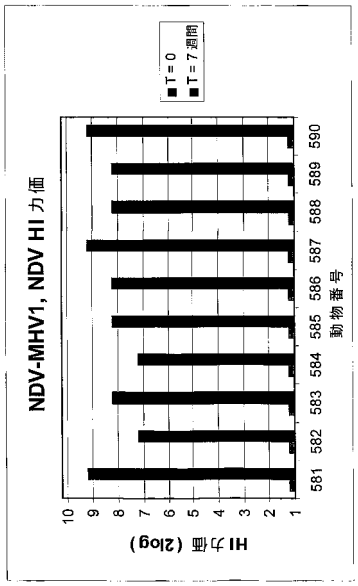


Figure 5 HI でのニワトリ血清の測定

【図６】

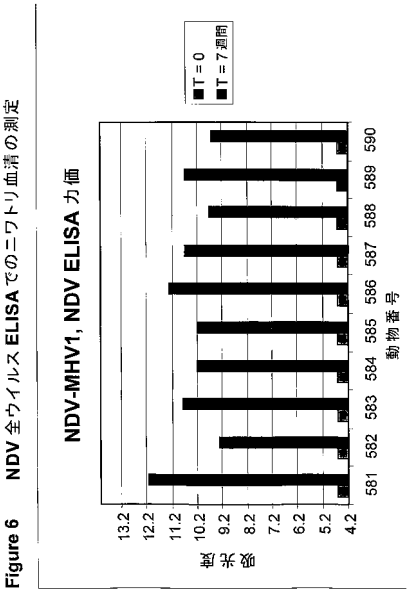


Figure 6 NDV 全ウイルス ELISA でのニワトリ血清の測定

【図７】

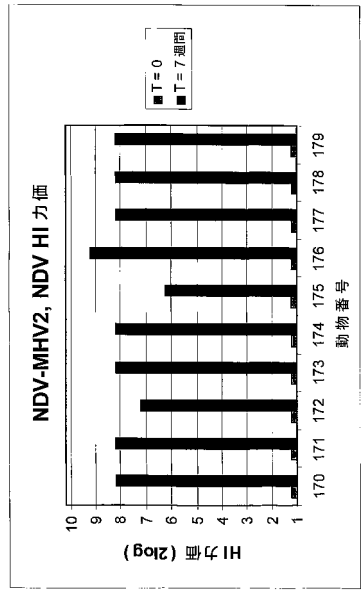


Figure 7 HI でのニワトリ血清の測定

【図８】

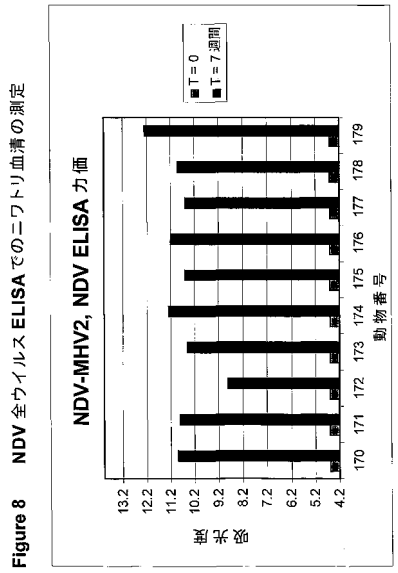


Figure 8 NDV 全ウイルス ELISA でのニワトリ血清の測定

【図９】

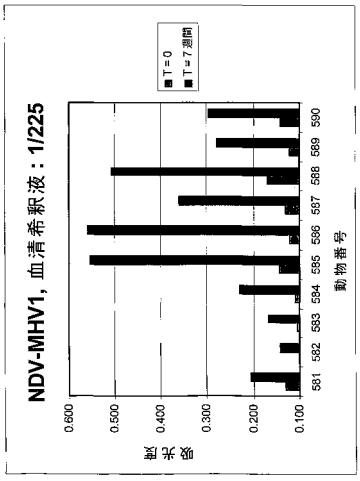


Figure 9 MHV の ELISA でのニワトリ血清の測定

【図１０】

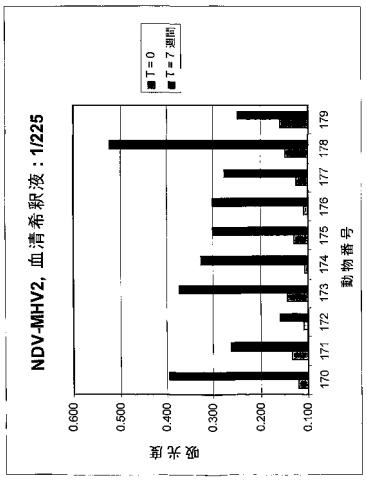


Figure 10 MHV の ELISA でのニワトリ血清の測定

【図１１】

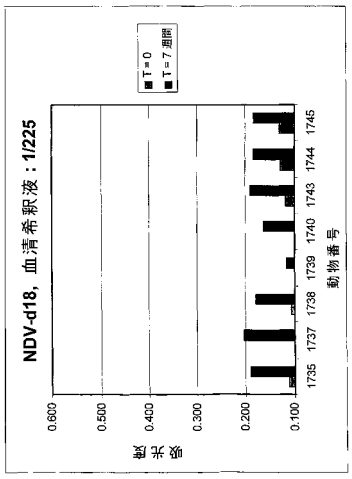


Figure 11 MHV の ELISA でのニワトリ血清の測定

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C12R 1/93 (2006.01) C12N 7/00
C12R 1:93

(74)代理人 100103920
弁理士 大崎 勝真
(74)代理人 100124855
弁理士 坪倉 道明
(72)発明者 メバシヨン，テシヨーメ
オランダ国、エヌ・エル－５８３１・エル・イエー・ボツクスメール、デ・リベス・２０
(72)発明者 コーレン，マルクス・ヨセフス・マリー
オランダ国、エヌ・エル－３９９２・エヌ・ペー・ハウテン、ヘレフトスフーフエ・６

審査官 松田 芳子

(56)参考文献 国際公開第９９／０６６０４５（WO，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N 15/09