

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成16年12月9日(2004.12.9)

【公表番号】特表2000-512844(P2000-512844A)

【公表日】平成12年10月3日(2000.10.3)

【出願番号】特願平10-502456

【国際特許分類第7版】

C 1 2 N 15/09

A 6 1 K 31/00

A 6 1 K 39/17

A 6 1 K 39/215

A 6 1 K 39/255

A 6 1 K 39/295

C 1 2 N 7/00

//(C 1 2 N 15/09

C 1 2 R 1:91 )

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 31/00 6 3 1 J

A 6 1 K 39/17

A 6 1 K 39/215

A 6 1 K 39/255

A 6 1 K 39/295

C 1 2 N 7/00

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 R 1:91

【誤訳訂正書】

【提出日】平成16年4月8日(2004.4.8)

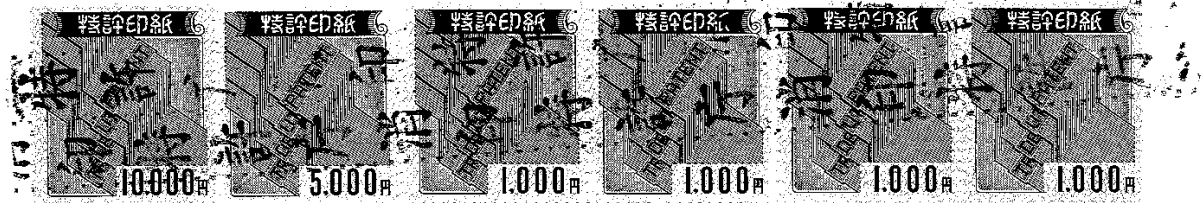
【誤訳訂正1】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】補正の内容のとおり

【訂正方法】変更

【訂正の内容】



適 (19,000円)

# 誤訳訂正書

平成16年4月8日



特許庁長官殿

## 1. 事件の表示

平成10年特許願第502456号

## 2. 特許出願人

住所 フランス国 69002 リヨン リュブルジュラ 17

名称 メリアル

## 3. 代理人

住所 〒102-0094 東京都千代田区紀尾井町 3-32

紀尾井町ヒルズ3階

電話 (03) 5211-5401

氏名 (9227) 弁理士 越場 隆



## 4. 訂正により増加する請求項の数 なし

## 5. 訂正の対象 明細書全文

## 6. 訂正の内容 別紙の通り

## 7. 訂正の理由等

1) 翻訳文の提出時に用語「heterologous」および「homologue」を「非相同」および「相同」と誤訳したので、正しい訳語である「異種」および「同種」に訂正する。訂正箇所が多い(22カ所)ため全文訂正明細書を提出する。

2) この機会に明細書の記載を日本の国内法の形式とし(図面の簡単な説明の項を文末に移動し、「発明の分野」等のタイトルを付け)、また、不明瞭な記載も補正した(補正箇所には下線を付した)。

(別紙)

## 明細書

### 1. 発明の名称

ベクターとして鳥類の感染性喉頭気管炎ウイルスを用いた鳥類用組換え生ワクチン

### 2. 特許請求の範囲

1. 特異的な ILTV 株において配列番号 N0.5 のヌクレオチド 1624～3606 の間で定義される挿入部位に挿入された少なくとも 1 つの異種塩基配列を含み且つ発現する ILTV ウイルスをベクターとして有する鳥類用組換え生ワクチン。

2. 塩基配列が単純な挿入によって挿入されるか、挿入部位の完全または部分的欠失の後に挿入される請求項 1 に記載の組換え生ワクチン。

3. 塩基配列が配列番号 N0.5 のヌクレオチド 1713～2897 の間に出現する ORF B に挿入される請求項 1 または 2 に記載の組換え生ワクチン。

4. 塩基配列が配列番号 N0.5 のヌクレオチド 2898～3606 の間に規定された遺伝子間領域に挿入される請求項 1 または 2 に記載の組換え生ワクチン。

5. 挿入される塩基配列を発現するために、ベクターが強い真核生物プロモータを有する請求項 1～4 のいずれか一項に記載の組換え生ワクチン。

6. 強いプロモータが CMV 前初期プロモータ、好ましくはネズミまたはヒトの CMV 前初期プロモータ、ラウス肉腫ウイルス (RSV) LTR プロモータ、SV40 ウイルス初期プロモータからなる群の中から選択される請求項 5 に記載の組換え生ワクチン。

7. 異なる真核生物のプロモータの制御下で挿入部位に挿入される塩基配列を少なくとも2つ含む請求項1～6のいずれか一項に記載の組換え生ワクチン。

8. 真核生物のプロモータが由来の異なる動物のCMV前初期プロモータである請求項7に記載の組換え生ワクチン。

9. CMV前初期プロモータと、制御下に他の塩基配列を有する他のプロモータと組み合わされた第1の塩基配列を有し、これら2つのプロモータの5'末端が隣接するように配置される請求項7に記載の組換え生ワクチン。

10. 鳥類の病原物質の抗原ポリペプチドをコード化する塩基配列を有し、この配列が挿入部位に挿入される請求項1～9のいずれか一項に記載の組換え生ワクチン。

11. ニューカッスル病ウイルス (NDV)、感染性滑液囊炎ウイルス (IBDV)、マレック病ウイルス (MDV)、感染性気管支炎ウイルス (IBV)、ニワトリの貧血症ウイルス (CAV)、ニワトリの肺炎ウイルスより成る群の中から選択される鳥類の病原物質の抗原をコード化する塩基配列を有する請求項10に記載の組換え生ワクチン。

12. NDVウイルスのFおよびHNポリペプチドをコード化する塩基配列から選択される、塩基配列を有する請求項11に記載の組換え生ワクチン。

13. MDVウイルスのポリペプチドgB, gD, gH+gLをコード化する塩基配列から選択される、塩基配列を有する請求項11に記載の組換え生ワクチン。

14. IBDV VP2 抗原、S 抗原、または IBV ウイルスの S、M および N の部

位、CAV VP1 および CAV VP2 抗原、ニワトリの肺炎ウイルス G および F 抗原に対応する配列より成る群の中から選択される塩基配列を少なくとも 1 つ有する請求項 11 に記載の組換え生ワクチン。

15. 免疫調節性ポリペプチドをコード化する塩基配列を有し、この配列が挿入部位に挿入される請求項 1 ～14 に記載の組換え生ワクチン。

16. この塩基配列がサイトカインをコード化する群の中から選択される請求項 15 に記載の組換え生ワクチン。

17. プロモータと、IRES によって対で分離された 2 つまたはそれ以上の遺伝子と、ポリアデニレーションシグナルとを連続して含む発現カセットを、挿入部位に挿入された状態で有する請求項 1 ～16 のいずれか一項に記載の組換え生ワクチン。

18. 異なる配列が挿入された請求項 1 ～17 のいずれか一項に記載の組換え生ワクチンを少なくとも 2 種含む混合物または混合用の多価ワクチン製剤。

19. 配列番号 N0.5 の 1 ～3841 の位置によって規定された配列の完全または部分的な配列を有する DNA 断片。

20. 配列番号 N0.5 のヌクレオチド 1624 ～3606 の間で定義される挿入部位に挿入された異種塩基配列を少なくとも 1 つ有する ILTV ウイルス。

### 3. 発明の詳細な説明

#### 発明の分野

本発明は感染性喉頭気管炎ウイルス (layngotrachéite infectieuse, ILTV) をベースとした鳥類用の組換え生ワクチンに関するものである。こ

の生ワクチンはワクチンを接種した動物が病原物質から効果的に保護される免疫を獲得するような条件で鳥類の病原物質の抗原ポリペプチドをコードし且つ発現する少なくとも1つの異種塩基配列を遺伝子組み換えによって挿入したものである。

### 従来の技術

感染性喉頭気管炎ウイルス (ILTV) は、ニワトリ (L.E. Hanson および T.J. Bagust, Diseases of Poultry 9th edn 1991. pp 485-495. Ames, Iowa State University Press) の主な呼吸症状 (感染性喉頭気管炎または ILT) を引き起こす  $\alpha$  ヘルプスウイルス (B. Roizman, Arch. Virol. 1992. 123. 425-449) である。この条件に対して現在入手可能なワクチンは、飲料水およびエアロゾル (L.E. Hanson and T.J. Bagust, Diseases of Poultry 9th Edition 1991. pp485-495. Ames, Iowa State University Press) によって鼻腔内、結膜および総排出腔経路を含む各種経路によって投与することができる弱毒化株を有する。

ILTV ウイルスの分子生物学的研究によって、ウイルスゲノム (M.A. Johnson et al., Arch. Virol. 1991. 119. 181-198) を特徴付けし且ついくつかのウイルス遺伝子 (A.M. Griffin, J. Gen. Virol. 1989. 70. 3085-3089) を同定することができる。これらのウイルス遺伝子は下記をコード化する遺伝子を含む：チミジンキナーゼ (UL23) (A.M. Griffin, and M.E.G. Boursnell, J. Gen. Virol. 1990. 71. 841-850; C.L. Keeler et al., Avian Dis. 1991. 35. 920-929) と、糖蛋白質 gB (UL27) (A.M. Griffin, J. Gen. Virol. 1991. 72. 393-398; K. Kongsuwan et al., Virology 1991. 184. 404-410; D.J. Poulsen et al., Virus Genes 1991. 5. 335-347) と、糖蛋白質 gC (UL44) (D.H. Kingsley et al., Virology 1994. 203. 336-343) と、キャプシド蛋白質 p40 (UL26) (A.M. Griffin, Nucl. Acids Res. 1990. 18. 3664) と、単純ヘルプス (HSV-1) の ICP4 蛋白質と同種の蛋白質 (M.A. Johnson et al., Virus Research 1995. 35. 193-204) と、蛋白質 ICP27 (UL54) と同種の蛋白質と、HSV-1 の糖蛋白質 gK (UL53) およびDNAヘリカーゼ (UL52)

(M. A. Johnson et al., Arch Virol 1995. 140. 623-634) と、リボヌクレオチド還元酵素 (A. M. Griffin, J. Gen. Virol. 1989. 70. 3085-3089, WO-A-90/02802 号) と、ゲノム独特の短配列 (Us) に存在する遺伝子 (M. A. Johnson et al., D N A Sequence- The Journal of Sequencing and Mapping 1995. Vol. 5. pp 191-194; K. Kongsuwan et al., Arch Virol 1995. 140. 27-39; K. Kongsuwan et al., Virus Research 1993. 29. 125-140; K. Kongsuwan et al., Virus Gene 1993. 7. 297-303; WO-A-92/03554 号、WO-A-95/08622 号)。

#### 発明が解決しようとする課題

本発明の目的は、ワクチンを接種した宿主の免疫を良好な安全性を維持しながら複製且つ誘導することができる、異種遺伝子を発現する組換え ILTV ウイルスをベースとする鳥類のワクチンを開発することにある。

本発明の他の目的は、さらに感染性喉頭気管炎 (ILT) に対して特に効果的であるワクチンを提供することにある。

本発明の他の目的は、粘膜経路、例えばエアロゾル経路または飲料水による大量の予防接種で 사용할 ことができる、粘膜レベルでウイルスを複製することによって粘膜および全身の免疫を誘導することができるワクチンを提供することにある。このような粘膜の免疫は呼吸器疾患並びに病原物質が粘膜経路で侵入する他の疾患と戦うのに特に効果的である。

本発明の他の目的は、動物の子にも成体にも使用することができるワクチンを提供することにある。

特殊な目的は、動物の子、例えば生後 1 日のヒナへの粘膜経路による大量の予防接種で使用する ことができるワクチンを提供することにある。

本発明の他の目的は、親株と同じ大きな効力を有し且つ異種遺伝子を挿入・発現することさえできる抗 ILT ワクチンを提供することにある。

本発明者は、ILTV ウイルスの研究中に、本発明者は異種遺伝子を挿入するための部位として完全に適したゲノム領域を発見した。これによって、ILTV ベクターをベースとする組換え生ワクチンを開発することができた。この ILTV ベクターには、ニューカッスル病ウイルス (NDV) の鳥類の免疫

原、特に HN および F 蛋白質、および／またはマレック病ウイルス (MDV) の糖蛋白質 gB、および／または感染性滑液囊炎ウイルス (IBDV) の VP2 蛋白質、および／または、感染性気管支炎ウイルス (IBV) の S および M 蛋白質をコード化する少なくとも 1 つの配列が挿入されている。NDV、MDV および IBV 蛋白質をコード化する配列を組み込んだワクチンは動物をニューカッスル病、マレック病、感染性滑液囊炎、感染性気管支炎からそれぞれ十分に守ることができる。

#### 課題を解決するための手段

本発明の対象は、特異的 ILTV 株において配列番号 NO. 5 のヌクレオチド 1624～3606 の間で定義される挿入部位に挿入された、特に鳥類の病原物質の抗原ポリペプチドをコード化且つ発現する少なくとも 1 つの異種塩基配列を含む ILTV ウイルスをベクターとして有する鳥類用組換え生ワクチンにある。

#### 発明を実施するための最良の形態

異種配列とは、挿入部位に由来しない配列、すなわち ILTV ウイルス由来の配列およびこのウイルスの他のゲノム領域に由来の配列の両者を意味する。

挿入領域への挿入とは、特に単純に行う挿入または完全または部分的に欠失させて行う挿入を意味する。

この挿入領域には配列番号 NO. 5 のヌクレオチド 1713～2897 の間に出現するオープンリーディングフレーム (ORF B) および、ORF B～ORF C の遺伝子間領域 (ヌクレオチド 2898～3606) が決定されている。従って、両者を ORF B または遺伝子間領域に挿入し、これら 2 つの領域をオーバーラップすることができる。1 つまたは複数の発現カセットを挿入することができ、それぞれ発現すべき少なくとも 1 つの配列を有する。

挿入される配列を発現するために、強い真核生物プロモータ、例えば CMV 前初期プロモータ (IE)、ラウス肉腫ウイルス (RSV) LTR プロモータおよび



SV40 ウイルス初期プロモータを使用するのが好ましい。

CMV 前初期プロモータ (IE) とは、例に挙げた断片およびそれと同じプロモータ活性を保持するサブ断片を意味する。

CMV IE プロモータはヒトのプロモータ (HCMV IE) またはネズミのプロモータ (MCMV IE) あるいは由来の異なる CMV IE プロモータ、例えばサル、ラット、モルモットまたはブタ由来のプロモータにすることができる。

ILTV ベクターに挿入され、発現される塩基配列は鳥類の病原物質の抗原ポリペプチドすなわち本発明の提供する好適な条件のもとで発現された時に、予防接種をした動物が病原物質から効果的に防御されるような免疫を獲得できるようなポリペプチドをコード化する任意の配列にすることができる。従って、所定の病気の対象となる抗原をコード化する塩基配列を本発明の条件下で挿入することができる。

ILTV ベクターに挿入される塩基配列は免疫調節性ポリペプチド、特にサイトカインをコード化することもできる。

驚くべきことに、本発明の組換え体は卵の状態での予防接種や生後 1 日目のヒナの予防接種、さらに大きなヒナや成鳥の予防接種で使うことができる。各種投与経路：非経口経路、または口鼻などの粘膜経路（飲料水、エアロゾル）、結膜（点眼）または総排出腔経路を用いることができる。粘膜による大量の予防接種（飲料水、エアロゾル）が可能な経路が好ましい。

本発明は、病原物質の自然な侵入経路の遮断によって呼吸症状および全身症状の両者に対して防御するのに特に有用であることがわかった。

本発明は特に NDV ウイルスの抗原蛋白質、特に HN 糖蛋白質または F 糖蛋白質を適切にコード化する塩基配列の挿入に使用することができる。これによって得られる組換え生ワクチンは感染性喉頭気管炎に対する防御に加えてニューカッスル病に対して完全に防御できる。

ニューカッスル病に対する組換えワクチンは 1 回の投与量当たり 10～104PFU の濃度で与えるのが好ましい。

本発明の他の好ましいケースは、他の鳥類の病原物質の抗原をコード化

する塩基配列、特に下記のを挿入したものであるが、下記に限定されるものではない：マレック病のウイルスの抗原をコード化する塩基配列、特に gB、gD および gH+gL 遺伝子（PCT 特許公開第 90/02803 号）、感染性滑液囊炎ウイルスの抗原をコード化する塩基配列、特に VP2 遺伝子、感染性気管支炎ウイルス（IBV）の抗原をコード化する塩基配列、特に S および M 遺伝子（M. Binns et al., J. Gen. Virol. 1985. 66. 719-726; M. Boursnell et al., Virus Research 1984. 1. 303-313）、ニワトリの貧血症ウイルス（CAV）の抗原をコード化する塩基配列、特に VP1(52 kDa)+VP2(24 kDa)（N. H. M. Noteborn et al., J. Virol. 1991. 65. 3131-3139）、ILTV ウイルスの抗原をコード化する塩基配列、特に gB(A. M. Griffin, J. Gen. Virol. 1991. 72. 393-398) または gD(M. A. Johnson et al., DNA Sequence- The Journal of Sequencing and Mapping 1995. Vol. 5. pp 191-194. Harwood Academic Publishers GmbH)、または gp60(K. K. Kongsuwan et al., Virus Genes 1993. 7. 297-303) に関してコードする遺伝子、感染性「頭部腫大症候群」ウイルス（またはニワトリの肺炎ウイルスまたは七面鳥の鼻気管炎ウイルス（TRTV）；肺炎）の抗原をコード化する塩基配列、特に融合糖蛋白質 F（Q. Yu et al., J. Gen. Virol. 1991. 72. 75-81）、または付着糖蛋白質 G（R. Ling et al., J. Gen. Virol. 1992. 73. 1709-1715; K. Juhasz and J. Easton. J. Gen. Virol. 1994. 75. 2873-2880）。投与量はニューカッスルワクチンで確認されたものと同じにするのが好ましい。

本発明の枠内では、同じ ILTV ウイルス、特にこの部位に 2 種以上の異種配列を挿入することは当然可能である。特に、同じ ILTV ウイルスにこの同じウイルスまたは異なるウイルスに由来の配列を挿入することができ、さらに ILTV および他の鳥類のウイルスの配列が挿入されている。同じ ILTV ウイルスと免疫調節物質、特にサイトカインをコード化する配列とを連結することもできる。

例えば、CMV IE プロモータを別のプロモータにこれらの末端 5' が隣接する（転写が反対方向に起こる）ように連結し、2 つの塩基配列は一方は CMV IE のプロモータの制御下に挿入し、もう一方は該プロモータに連結された

プロモータの制御下に挿入できるようにする。この構成は CNV IE プロモータ、特にそのエンハンサー部分によって連結されたプロモータによって誘導される転写が活性化されるという点で特筆すべきものである。連結されるプロモータは特に ILTV ウイルスあるいは MDV または HVT ウイルスの遺伝子のプロモータにすることができる。

本発明の典型的なケースは、NDV HN をコード化する塩基配列を含み且つ NDV F または他の鳥類疾患の抗原、特に上記のものをコード化する塩基配列を含み、遺伝子の一方は CMV IE プロモータの制御下にあり、もう一方は連結されるプロモータの制御下にあるワクチンである。

由来の異なる 2 種の CMV IE プロモータをこれらの末端 5' が隣接するように並べることも可能である。

当然、異種配列およびこれらの連結されるプロモータは挿入部位に、標準的に直列に、すなわち転写と同じ方向に従って挿入することができる。

挿入部位に挿入される複数の異種遺伝子は特に下記のウイルスから得られた「IRES」(内部リボソーム侵入部位)とよばれる配列の挿入によっても発現することができる：ピコルナウイルス、例えばブタの小囊病ウイルス (SVDV; B.-F. Chen et al., J. Virology, 1993, 67, 2142-2148)、脳心筋炎ウイルス (EMCV; R. J. Kaufman et al., Nucleic Acids Research, 1991, 19, 4485-4490)、手足口病ウイルス (FMDV; N. Luz and E. Beck, J. Virology, 1991, 65, 6486-6494)、または他に由来のウイルス。これら 3 つの論文の内容は参考として本明細書の一部を成す。従って、2 つの遺伝子を発現するためのカセットはプロモータ-遺伝子 1-IRES-遺伝子 2-ポリアデニレーションシグナルの最小構造を有する。本発明の組換え生ワクチンは従ってプロモータと、IRES によって対で分離された 2 つまたはそれ以上の遺伝子と、ポリアデニレーションシグナルとを連続して含む発現カセットを、挿入部位に挿入された状態で有する。

本発明の部位への挿入に加えて、ゲノム内の他の部位で 1 つまたは複数の他の挿入、1 つまたは複数の変異、または 1 つまたは複数の欠失を行うことができる。すなわち、親株が毒性である場合は、チミジンキナーゼ遺

伝子、リボヌクレオチド還元酵素遺伝子、gE 遺伝子などの毒性に関与する遺伝子を例えば（欠失、挿入または変異によって）不活性化することができる。いかなる場合でも、本発明に記載の部位以外の部位に挿入することによって他の遺伝子を発現することができる。

本発明の対象はさらに、主な ILTV 免疫原をコード化する遺伝子、好ましくは gB（A.M.Griffin, J.Gen.Vrol. 1991.72.393-398）または gD(M.A.Johnson et al., DNASequence- The Journal of Sequencing and Mapping 1995.Vol.5.pp 191-194. Harwood Academic Publishers GmbH)、または gp60(K.K.Kongsuwan et al.,Virus Genes 1993. 7.297-303)に関してコードする遺伝子、外来プロモータ、特に上記の強いプロモータの上流に挿入した、組換え ILTV ウイルスを有する、ILT に対するワクチンにある。これによって、1つまたは複数のこれら遺伝子の発現のレベルを上げることができ、従ってワクチンの ILT に対する有効性が増大する。当然、この構成と、挿入部位への異種配列の挿入を有する上記の構成とを組合せることができる。

本発明の対象はさらに、異なる病原体に由来する異なる配列を挿入された上記定義の組換え生ワクチンと他のワクチン、特に他の鳥類用組換え生ワクチンとを含む混合物または混合用の多価ワクチン製剤にある。

本発明の対象はさらに、上記説明から明らかなように、本発明のワクチンの調製方法にある。

本発明は、さらに、上記定義の組換え生ワクチンまたは多価ワクチン製剤を投与する鳥類の予防接種法に関するものである。本発明は特に卵の状態での予防接種、生後1日またはそれ以上のヒナおよび成鳥の予防接種を行うための方法を対象にする。ワクチンの各種投与経路（上記参照）を用いることができ、粘膜による大量の予防接種（エアロゾル、飲料水）が可能な経路が好ましく、ワクチンの投与量は動物1個体当たり  $10^1 \sim 10^4$  で選択するのが好ましい。

本発明の対象はさらに、上記の挿入部位に挿入された、少なくとも1つの上記の異種塩基配列を有する ILTV ウイルスにある。

本発明の対象はさらに、配列番号 NO. 5 のヌクレオチド 1～3841 の完全または部分的な配列から成る DNA 断片にある。

以下、図を参照して非限定的な実施例を挙げて本発明をより詳細に説明する。

配列リスト：

|           |   |
|-----------|---|
| 配列 NO. 1  | オリゴヌクレオチド EL207                               |
| 配列 NO. 2  | オリゴヌクレオチド EL208                               |
| 配列 NO. 3  | オリゴヌクレオチド LP018                               |
| 配列 NO. 4  | オリゴヌクレオチド LP020                               |
| 配列 NO. 5  | 配列決定された SalI-BamHI 断片の配列<br>(3841 bp; 図 2 参照) |
| 配列 NO. 6  | オリゴヌクレオチド MB088                               |
| 配列 NO. 7  | オリゴヌクレオチド MB089                               |
| 配列 NO. 8  | オリゴヌクレオチド MB090                               |
| 配列 NO. 9  | オリゴヌクレオチド MB091                               |
| 配列 NO. 10 | オリゴヌクレオチド MB092                               |
| 配列 NO. 11 | オリゴヌクレオチド MB093                               |
| 配列 NO. 12 | オリゴヌクレオチド MB070                               |
| 配列 NO. 13 | オリゴヌクレオチド MB071                               |
| 配列 NO. 14 | NDV HN 遺伝子の配列 (図 14 参照)                       |
| 配列 NO. 15 | オリゴヌクレオチド EL071                               |
| 配列 NO. 16 | オリゴヌクレオチド EL073                               |
| 配列 NO. 17 | オリゴヌクレオチド EL074                               |
| 配列 NO. 18 | オリゴヌクレオチド EL075                               |
| 配列 NO. 19 | オリゴヌクレオチド EL076                               |
| 配列 NO. 20 | オリゴヌクレオチド EL077                               |
| 配列 NO. 21 | オリゴヌクレオチド CD001                               |
| 配列 NO. 22 | オリゴヌクレオチド CD002                               |

配列 NO. 23 オリゴヌクレオチド CD003

配列 NO. 24 オリゴヌクレオチド CD004

### 実施例

全てのプラスミドの作製はサムブルック (Sambrook) 達の Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor New York. 1989) に記載の分子生物学の標準的手法で行った。本発明で使用した全ての制限酵素断片はジェネクリーン (Geneclean) キット (BIO 101 Inc. La Jolla, CA) を用いて単離した。

親ウイルスとして使用したウイルスは J. R. Andreasen 達の (Avian Diseases. 1990. 34. 646-656) に記載のワクチンの株または Select laboratories 10026 Main Street P.O. Box 6 Berlin, Maryland 21811, USA で得られた T-20 12-8-66 株よりなる群の中から選択することができる。さらに、毒性の株、例えば N-71851 株 (ATCC VR-783) または USDA の 83-2 株を使用することもでき、これらは公知の方法、例えば WO-A-95/08622 号に記載の方法によって弱毒化することができる。

### 実施例 1

#### ILTV ウイルスの培養

ILTV ウイルスはニワトリの腎臓の初代細胞 (CKC) 上で培養する。この細胞は  $75\text{ cm}^2$  の培養フラスコ ( $2 \times 10^5$  細胞/ $\text{cm}^2$ ) 内に 3% の牛胎児血清 (FCS) を添加した MEM 培地で 1 日または 2 日培養し、その後接種する。

接種日には、1000 投与量の凍結乾燥したワクチンを入れたフラスコを、1% の FCS を添加した MEM 培地 10ml に再懸濁する；次いで、この溶液約 0.5ml を CKC 培地に沈着させる。翌日、この培地が変化し、翌々日、細胞変性効果 (CPE) が汎化したとき、培養フラスコを  $-70^\circ\text{C}$  で凍結させる。

ILTV ウイルスの培養は不死化したニワトリの肝細胞、特に LMH 系統 (W. M. Schnitzlein et al, Avian Diseases. 1994. 38. 211-217) で行うこと

もできる。

## 実施例 2

### ILTV のゲノム DNA の調製

2 回の凍結／融解サイクルの後、ILTV 培養物 (75 cm<sup>2</sup> の 2 つのフラスコ) を回収し、低速 (20 ロータ、Beckman JA 21 遠心分離機で 5000 回転／分) で 5 分間遠心分離して大きな細胞片を除去する。次いで、上澄みを超遠心分離する (TLA100.3 ロータ、Beckman TL 100 遠心分離機で 100,000 回転／分で 1 時間)。このペレットを 1.6 ml の TEN-SDS (10mM Tris pH 8.0; 1mM EDTA; 0.5M NaCl; 0.5% の硫酸ドデシルナトリウム) に取り、35  $\mu$  l の 20 mg / ml プロテイナーゼ K 溶液を添加する。この溶液を 37°C の水浴で 3 ～ 4 時間インキュベートし、次いで DNA をフェノール／クロロホルムを用いて 3 回、クロロホルムを用いて 1 回抽出し、これを -20°C でエタノール沈殿させる。遠心分離後、ペレットを 70% エタノールを用いて洗浄し、乾燥させて 200  $\mu$  l の TE (10mM Tris pH 8.0; 1mM EDTA) に再懸濁する。次いでヌクレイン酸濃度を分光光度計 (OD360) で測定する。この DNA 溶液はポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 試験に対して直接鋳型の役目をすることができる。また、組換えウイルスを得るためのトランスフェクション試験に用いることもできる。

## 実施例 3

### 組換え ILTV ウイルスの単離および精製

挿入部位の 2 つのフランキンギン領域の間に挿入されたポリペプチドを発現するためのカセットよりなるドナープラスミドを制限酵素で処理し、プラスミドを直線化することができ、これをフェノール／クロロホルム混合物を用いて抽出し、無水エタノール溶液沈殿させ、滅菌水に取る。24 時間培養した初代 CKC 細胞を 0.2 ～ 1  $\mu$  g の直鎖状ドナープラスミド + 2 ～ 5  $\mu$  g の ILTV のウイルス DNA を 300  $\mu$  l の OptiMEM 培地 (ギブコ BRL カタログ番号 041-01985H) に入れたものと、100  $\mu$  g の LipofectAMINE を 300

$\mu$  l の培地に希釈したものとの混合物（混合物の最終量は  $600 \mu$  l）を用いて感染させた。この  $600 \mu$  l を  $3 \text{ ml}$ （最終量）の培地に希釈して  $5 \times 10^6$  CKC 上に播く。混合物を細胞に接触させた状態で 5 時間保ち、その後取り除いて  $5 \text{ ml}$  の培養培地で置き換える。その後細胞を  $37^\circ\text{C}$  で 3～8 日間培養し、細胞変性効果が見られたとき、 $-70^\circ\text{C}$  で細胞を凍結する。融解後、必要に応じてさらに超音波処理し、このウイルス群を限定的な希釈でマイクロプレート（96 ウェル）にクローニングし、同種組換えウイルス群を単離する。このプレートを 1～3 日間培養し、上澄みを空の 96 ウェルプレートに回収し、この上澄みを含むプレートを  $4^\circ\text{C}$  または  $-70^\circ\text{C}$  に置く。

次いで、他のプレートに残っている細胞を 95% のアセトン中で  $-20^\circ\text{C}$  で 20～30 分間、または室温で 5 分間固定する。発現されたポリペプチドに直接対するモノクロナル抗体を用いて間接蛍光抗体（IIF）反応を行い、このポリペプチドを発現するプラークを調べる。再び同じ方法で（96-ウェルプレートにおける限定的な希釈で）、 $4^\circ\text{C}$  または  $-70^\circ\text{C}$  に置かれたプレートのウェルで、IIF によって陽性プラークを有するウェルに対応するウェル内に存在する上澄みからクローニングを行う。一般に、連続 4 回の単離サイクル（限定的な希釈、上澄みの回収、IIF による細胞のモニタリング、上澄みからの限定的な希釈等）を行うことによって子孫全てが特異的な蛍光を示す組換えウイルスを得ることができる。この組換えウイルスのゲノム DNA について適当なオリゴヌクレオチドおよび DNA プロブを用いた標準的な PCR およびサザンブロット法によって分子レベルでの特徴付けを行う。

組換えウイルスの単離は挿入された発現カセットに特異的なプロブとのハイブリダイゼーションによって行うこともできる。そのために、トランスフェクション後に回収されたウイルス群を希釈して CKC 細胞（ペトリ皿で培養）上に沈着させて単離したプラークを得る。 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間接触させた後、感染培地を取り除いて 1% のアガロースを含む  $5 \text{ ml}$  の MEM 培地で置き換え、 $42^\circ\text{C}$  で灌流状態を維持する。アガロースが凝固したとき、皿を  $37^\circ\text{C}$  で 48～72 時間  $\text{CO}_2$  インキュベータ内で、プラークが現れるまで



インキュベートする。その後アガロース層を除去し、ウイルスプラークを培養物用のペトリ皿と同じ径を有する無菌のニトロセルロース膜上に移す。この膜自体は他のニトロセルロース膜上に移し、第1番目のトランスファーの逆「コピー」を得る。後者のコピー上に移されたプラークを当業者に周知の標準的な方法に従って発現カセットのジゴキシゲニン標識DNA断片（DNAラベリングキット、ベーリンガーマンハイム、カタログ番号1175033）とハイブリダイズする。ハイブリダイゼーション後、洗浄し、現れた基質と接触させ、このニトロセルロース膜をオートラジオグラフィーのフィルムと接触状態に置く。この膜上の陽性ハイブリダイゼーションのイメージはプラークが発現カセットを挿入した組換え ILTV ウイルスを含むことを示している。この陽性プラークに対応するプラークを第1のニトロセルロース膜から無菌状態で切断し、0.5mlのMEM培地を入れたエッペンドルフ管に入れ、超音波処理し、この膜からビリオンを放出する。エッペンドルフ管に入れた培地をMEM培地に希釈し、こうして得られた希釈溶液はCKC細胞の新しい培養物を感染する役目をする。

#### 実施例 4

##### ILTV のゲノム領域の増幅

オリゴヌクレオチド EL207 (配列 NO. 1) および EL208 (配列 NO. 2) はポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による第1の増幅のためのプライマーの役目をする。

EL207 (配列 NO. 1) : 5' AAGTATACTCGAAACTAGCGCAGTACTCTG 3'

EL208 (配列 NO. 2) : 5' AGATGCGATACCATTTTTACTGCCATTTGG 3'

非特異的な増幅を制限するために、1回目のPCRはオリゴヌクレオチド EL207 および EL208 と、PCRバッファーと、dNTP と、ILTV DNA と、Taq ポリメラーゼと、抗 Taq 抗体 (TaqStart™ Antibody, Clontech Lab., Palo Alto, CA, USA) との存在下で行った。35回のサイクル (94℃で30秒、60℃で30秒、72℃で8分) を行った。反応生成物の一定分量を電

気泳動ゲル上に置き、約 7 k b の増幅した DNA 帯を検出することができた。

2 回目の PCR をオリゴヌクレオチド LP018 (配列 NO. 3) (配列 NO. 5 の 2677~2696 の位置) および LP020 (配列 NO. 4) を用いて行い、1190bp の断片を増幅することができた。

LP018 (配列 NO. 3) : 5' TCGTGTCTCTGCTATCACTG 3'

LP020 (配列 NO. 4) : 5' AGCTCTCCATGGATCTAGCG 3'

## 実施例 5

### ILTV のゲノム領域のクローニングおよび特徴付け

1 回目の遺伝子増幅反応の生成物をフェノール/クロロホルム抽出によって精製し、次いで制限酵素 EcoRI と SacI で 37℃ で 2 時間処理した。次いで管を 65℃ で 20 分間加熱して制限酵素を不活性化した。この処理で得られる断片を EcoRI と SacI で処理したプラスミド pBlueScriptII SK+ (pBS SK+; Stratagene) に導入し (14℃ で一晩)、E. coli DH5α バクテリアの形質転換およびアンピシリンを添加した培地の皿での培養後に得られたクローンを分析し、3 つの異なるプラスミド内に存在する寸法の異なる 3 つの EcoRI- SacI 挿入断片、すなわち約 0.6kb の断片 (プラスミド pLP001) と、2.8kb の断片 (プラスミド pLP002) と、1.8kb の断片 (プラスミド pLP003) を同定することができた。

2 回目の PCR 反応の増幅生成物を前回と同様に精製し、酵素 EcoRI と BamHI で処理し、予め EcoRI と BamHI で処理したプラスミド pBS SK+ にクローニングしてクローン pLP011 を得た。

pLP002 に存在する挿入断片の部分的な配列 (図 1 の SalI 部位の右側) および pLP003 と pLP011 に存在する挿入断片の完全な配列によって 2 個の完全なオープンリーディングフレーム (ORFs) (ORF A および ORF B) および他の ORF (ORF C) の N-末端部を同定することができた。このクローン化ゲノム領域および配列決定された領域の制限地図、並びにクローン pLP001、

pLP002、pLP003 および pLP011 の挿入断片のこの地図上での位置は図 1 に示されている。3841pb の配列（配列 N05）は図 2 に示されている。ORFs A、B および C の位置およびアミノ酸配列も図 1 および図 2 にそれぞれ示されている。

ORF A（配列 N05 の位置 1624）の STOP コドンと、ORF C（配列 N05 の位置 3606）の ATG コドンとの間の配列であって、特に ORF B を有し、その後に ORFs B と C との間の遺伝子間領域が続くものはポリペプチドを発現するためのカセットを ILTV ゲノムに挿入するのに使用することができる。この配列は挿入部位とよばれる。この挿入の実施は ORF B（実施例 6 参照）または遺伝子間領域（実施例 7 参照）における欠失を伴っても伴わなくてもよく、この欠失は ORF B を完全または部分的に且つ遺伝子間領域を完全または部分的にカバーすることもできる（実施例 8 参照）。

#### 実施例 6

##### ORF B に挿入するためのドナープラスミド pMB035 の作製

プラスミド pLP003（4665bp）を酵素 EcoRI と XhoI で処理し、この処理したプラスミドを dNTP の存在下で DNA ポリメラーゼ（クレノウ断片）で処理し、ブラントエンドを作り、E. coli バクテリアの連結および形質転換後、クローン pMB034（4636 bp）を得た。このクローニング段階によってプラスミド pLP003 の EcoRI と XhoI との間のクローニング部位を欠失することができた。

次いで、プラスミド pMB034 を酵素 HindIII と SphI で処理し、4.0kpb 断片を溶離し、予めハイブリダイズしたオリゴヌクレオチド MB088（配列 NO. 6）および MB089（配列 NO. 7）に導入する。このようにして、E. coli バクテリアの形質転換後、プラスミド pMB035（3990 bp）を得た（図 3 の pMB035 の製造模式図参照）。

MB088（配列 NO. 6）： 5' AGCTGAATTCAAGCTTCCCGGGGTCGACATG 3'

MB089（配列 NO. 7）： 5' TCGACCCCGGGAAGCTTGAATTC 3'

従って、プラスミド pMB035 は：(1) ORF B の 5' における同種配列、(2) 独特な EcoRI、SmaI、HindIII および SalI 部位を含む、挿入された塩基配列、(3) ORF B の 3' における同種配列を含んでいる。このプラスミドは従って 2 つのフランキング領域 (1) と (3) の間に配置された (2) に見られる独特な部位に発現カセットを導入することができる。得られた組換え ILTV ウイルスは ORF B (HindIII と SphI 部位との間；欠失した ORF B のアミノ酸 56～279) で欠失している。

#### 実施例 7

##### ORFs B と C との間の遺伝子間領域に挿入するためのドナープラスミド pMB039 の作製

プラスミド pLP011 (3883bp) を酵素 EcoRI と HindIII で処理し、プラスミド pLP003 (4665 bp) を酵素 EcoRI と HindIII で処理して得られた 1021bp の制限断片に導入する。こうして得られたプラスミド (pMB036) の寸法は 4892bp である。このプラスミド pMB036 を酵素 HindIII と ApaI で処理し、この処理したプラスミドを dNTP の存在下で DNA ポリメラーゼ (クレノウ断片) で処理し、ブラントエンドを作り、E. coli バクテリアの連結および形質転換後、クローン pMB037 (4862 bp) を得た。このクローニング段階によってプラスミド pMB036 の HindIII と ApaI との間のクローニング部位を欠失することができた。

このプラスミド pMB037 を酵素 NotI と BamHI で処理し、処理したプラスミドを dNTP の存在下で DNA ポリメラーゼ (クレノウ断片) で処理し、ブラントエンドを作り、E. coli バクテリアの連結および形質転換後、クローン pMB038 を得た。このクローニング段階によってプラスミド pMB037 の NotI と BamHI との間のクローニング部位を欠失することができた。

このプラスミド pMB038 を酵素 BglIII と EcoRI で処理し、4.5kbp 断片を溶離し、予めハイブリダイズしたオリゴヌクレオチド pMB090 (配列 NO. 8) および pMB091 (配列 NO. 9) に導入する。このようにして、E. coli バクテリアの形質転換後、プラスミド pMB039 (bp) を得た (図 4 の pMB039 の製造模

式図参照)。

pMB090 (配列 NO. 8) : 5' GATCGTCGACCCCGGGAAGCTTG 3'

pMB091 (配列 NO. 9) : 5' AATTCAAGCTTCCCGGGGTCGAC 3'

従って、プラスミド pMB039 は：(1) ORF B の 5' における同種配列、(2) 独特な EcoRI、SmaI、HindIII および SalI 部位を含む、挿入された塩基配列、(3) ORFs B と C との間の遺伝子間領域の 3' における同種配列を含んでいる。このプラスミドは従って 2 つのフランキング領域 (1) と (3) の間に配置された (2) に見られる独特な部位に発現カセットを導入することができる。得られた組換え ILTV ウイルスは ORFs B と C との間の遺伝子間領域 (EcoRI と BglIII 部位との間) で 344 bp が欠失している。

#### 実施例 8

##### ORF B をオーバーラップするゲノム領域および ORFs B と C との間の遺伝子間領域に挿入するためのドナープラスミド pMB042 の作製

プラスミド pLP011 (3883 bp) を酵素 BamHI と EcoRI で処理して得られた 940bp の断片と、プラスミド pLP003 (4665 bp) を酵素 EcoRI と SacI で処理して得られた 1754bp の断片とを酵素 BamHI と SacI で処理したプラスミド pBS SK+に導入する。こうして得られたプラスミド (pMB040) の寸法は 5623bp である。プラスミド pMB039 を酵素 BamHI と XhoI で処理し、この処理したプラスミドを dNTP の存在下で DNA ポリメラーゼ (クレノウ断片) で処理し、プラントエンドを作り、E. coli バクテリアの連結および形質転換後、クローン pMB041 (5576 bp) を得た。このクローニング段階によってプラスミド pMB040 の BamHI と XhoI との間のクローニング部位を欠失することができた。

このプラスミド pMB041 を酵素 HindIII と BglIII で処理し、4.2kpb 断片を溶離し、予めハイブリダイズしたオリゴヌクレオチド MB092 (配列 NO. 10) および MB093 (配列 NO. 11) に導入する。このようにして、E. coli バクテリ

アの形質転換後、プラスミド pMB042(4234bp)を得た (図 5 の pMB042 の製造模式図参照)。

MB092(配列 NO. 10) : 5' AGCTGAATTCAAGCTTCCCGGGGTCGAC 3'

MB093(配列 NO. 11) : 5' GATCGTCGACCCCGGGAAGCTTGAATTC 3'

従って、プラスミド pMB042 は : (1) ORF B の 5' における同種配列、(2) 独特な EcoRI、SmaI、HindIII および SalI 部位を含む、挿入された塩基配列、(3) ORFs B と C との間の遺伝子間領域の 3' における同種配列を含んでいる。このプラスミドは従って 2 つのフランキング領域 (1) と (3) の間に配置された (2) に見られる独特な部位に発現カセットを導入することができる。得られた組換え ILTV ウイルスは ORF B の C 末端部 (ORF B の 339 C 末端アミノ酸) と ORFs B と C との間の遺伝子間領域の 5' 部 (図 1 に示す HindIII と BglII 部位との間) とをカバーする 1366 bp が欠失している。

#### 実施例 9

IBDV VP2 遺伝子を発現するカセットを HCMV-IE プロモータの制御下で ORF B 部位に挿入するためのドナープラスミド pMB043 の作製と vILTV 1 の単離

#### 9.1 感染性滑液囊炎ウイルス (IBDV) の VP2 遺伝子のクローニングおよび HCMV-IE プロモータの制御下での VP2 発現カセットの作製

BamHI-HindIII カセット状の IBDV VP2 遺伝子を含むプラスミド pEL004 (図 6 参照 ; = フランス国特許第 92/13109 号に記載のプラスミド pGH004 に等しい) を、BamHI と XbaI とで処理して 1104 bp の BamHI-XbaI 断片 (切り出された VP2 遺伝子) を単離した。この断片を予め XbaI および BamHI で処理したベクター pBS SK+ にクローニングして 4052 bp のプラスミド pEL022 (図 6) を得た。このベクター pBS SK+ を EcoRV と XbaI で処理し、次いでそれをつないで pBS-SK\* (変性されたもの) を得た。プラスミド

pEL004 を、KpnI と HindIII で処理して、完全な IBDV VP2 遺伝子を含む 1387 bp の KpnI-HindIII 断片を単離した。この断片を予め KpnI と HindIII で処理したベクター pBS-SK\* にクローニングして 4292 bp のプラスミド pEL023 (図 6) を得た。プラスミド pEL022 を BamHI および NotI で処理して 1122 bp の BamHI-NotI 断片 (断片 A) を単離した。このプラスミド pEL023 を BamHI と NotI で処理して 333 bp の BamHI-NotI 断片 (断片 B) を単離した。断片 A と断片 B とを予め NotI で処理してアルカリホスファターゼで処理したプラスミド pBS-SK+ に導入して 4369 bp のプラスミド pEL024 (図 6) を得た。

プラスミド pEL024 を NotI で処理して 1445 bp の NotI-NotI 断片を単離した。この断片を予め NotI で処理したプラスミド pCMV $\beta$  (クロンテックカタログ番号 6177-1、図 7) に導入して 5095 bp のプラスミド pEL026 (図 7) を得た。

プラスミド pEL026 を EcoRI、SalI および XmnI で処理して 2428 bp の EcoRI-SalI 断片を単離した。この断片を予め EcoRI と SalI で処理したベクター pBS SK+ に導入して 5379 bp のプラスミド pEL027 (図 7) を得た。

## 9.2 ドナープラスミド pMB043 の作製

プラスミド pEL027 を EcoRI、SalI および XmnI で処理して 2428 bp の EcoRI-SalI 断片を単離した。この断片を予め EcoRI と SalI で処理したプラスミド pMB035 (実施例 6、図 3 参照) に導入して 6414 bp のプラスミド pMB043 (図 8) を得た。

## 9.3 組換え vILTV1 ウイルスの単離と精製

実施例 3 の方法で、予め酵素 KpnI を用いて直線化したプラスミド pMB036 の DNA と、そのウイルス DNA との同時形質転換 (cotransfection) を行って vILTV1 ウイルスの単離・精製をした。この組換え体は一部欠失した ILTV ウイルスの ORF B (実施例 5、実施例 6 参照) 内に HCMV-IE/IBDV VP2 カセットを含んでいる。

## 実施例 10

IBDV VP2 遺伝子を発現するカセットを MCMV IE プロモータの制御下で ORF B 部位に挿入するためのドナープラスミド pMB044 の作製と vILTV 2 の単離

### 10.1 MCMV(マウスのサイトメガロウイルス)即時初期 (IE) プロモータの制御下で IBDV VP2 遺伝子を発現するカセットを含む pEL070 の作製

プラスミド pCMV  $\beta$  (クロンテックカタログ番号 6177-1、図 9) を SalI と SmaI で処理して lacZ 遺伝子並びに SV40 ウイルスの後期遺伝子のポリアデニレーションシグナルを含む 3679 bp の SalI-SmaI 断片を単離した。この断片を予め SalI と EcoRV とで処理したベクター pBS SK+ に挿入して 6625 bp のプラスミド pCD002 (図 9) を得た。このプラスミドは lacZ レポータ遺伝子を含むが、この遺伝子の上流に位置するプロモータはない。

MCMV ウイルスの Smith 株は米国タイプカルチャーコレクション (Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA) から入手した (ATCC No. VR-194)。このウイルスを Balb/C マウスの胎児細胞上で培養し、このウイルスのウイルス DNA をエベリング達 (Ebeling A. et al., J. Virol. 1983. 47. 421-433) の方法で調製した。このウイルスのゲノム DNA を PstI で処理して 2285 bp の PstI-PstI 断片を単離した。この断片を予め PstI で処理してアルカリホスファターゼで処理したベクター pBS SK+ にクローニングしてプラスミド pCD004 (図 9) を得た。プラスミド pCD004 を HpaI と PstI で処理して 1389bp の HpaI-PstI 断片を得た。この断片はネズミのサイトメガロウイルスの即時初期遺伝子のプロモータ/アクチベータ領域を含む (ネズミのサイトメガロウイルス=MCMV) (Dorsch-Hasler K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 1985. 82. 8325-8329、WO-A-87/03905 号)。この断片を予め PstI と SmaI とで処理したプラスミド pCD002 にクローニングして 8007 bp のプラスミド pCD009 (図 9) を得た。

下記 2 つのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを行って 2 本鎖のオリゴヌクレオチドを作製した：



MB070 (配列 NO. 12)

5' CGAATTCAGTAGTGTGTGTCTGCAGGCGGCCGCGTGTGTGTCGACGGTAC 3'

MB071 (配列 NO. 13)

5' CGTCGACACACACGCGGCCGCTGCAGACACACACTAGTGAATTCGAGCT 3'

この2本鎖オリゴヌクレオチドを予め KpnI と SacI とで処理したベクターpBS-SK+に導入してプラスミド pEL067 を得た(図 10)。プラスミド pCD009 を PstI と SpeI で処理して 1396 bp の PstI-SpeI 断片を単離した。この断片を予め PstI と SpeI とで処理したプラスミド pEL067 に導入して 4297 bp のプラスミド pEL068 (図 10) を得た。プラスミド pEL024 (実施例 9、段落 9.1、図 6 参照、) を HindIII および NotI で処理して 1390 bp の HindIII-NotI 断片(断片 A)を単離した。プラスミド pEL027 (実施例 9、段落 9.1、図 7 参照、) を HindIII および SalI で処理して 235 bp の HindIII-SalI 断片(断片 B)を単離した。断片 A と B を同時に予め NotI と SalI で処理したプラスミド pEL068 に導入して 5908 bp のプラスミド pEL070 (図 10) を得た。このプラスミドは従って、MCMV IE プロモータと、VP2 遺伝子と、SV40 ポリ A シグナルとよりなる発現カセットを含んでいる。

#### 10.2 ドナープラスミド pMB044 の作製

プラスミド pEL070 を EcoRI、SalI および XmnI で処理して 3035 bp の EcoRI-SalI 断片を単離した。この断片を予め EcoRI と SalI で処理したプラスミド pMB035 (実施例 6、図 3 参照) に導入して 7009 bp のプラスミド pMB044 (図 11) を得た。このプラスミドによって ILTV ウイルスの一部欠失した ORF B に MCMV-IE/IBDV-VP2 発現カセットを挿入することが可能となる。

#### 10.3 組換え vILTV2 ウイルスの単離と精製

実施例 3 の方法で、予め酵素 BssHII を用いて直線化したプラスミド pMB044 の DNA と、そのウイルス DNA との同時形質転換を行って vILTV2

ウイルスの単離・精製をした。この組換え体は ILTV ウイルスの一部欠失した ORF B（実施例 5、実施例 6 参照）内に MCMV-IE/IBDV VP2 カセットを含んでいる。

#### 実施例 11

IBDV VP2 遺伝子を発現するカセットを MCMV IE プロモータの制御下で ORFs B と C との間の遺伝子間部位に挿入するためのドナープラスミド pMB045 の作製と vILTV 3 の単離

プラスミド pEL070(実施例 10、図 10 参照)を EcoRI、SalI および XmnI で処理して 3035 bp の EcoRI-SalI 断片を単離した。この断片を予め EcoRI と SalI で処理したプラスミド pMB039（実施例 7、図 4 参照）に導入して 7540 bp のプラスミド pMB045（図 12）を得た。このプラスミドによって ILTV ウイルスの ORFs B と C との間の一部欠失した遺伝子間領域に MCMV-IE/IBDV-VP2 発現カセットを挿入することが可能となる。

実施例 3 の方法で、予め酵素 BssHII を用いて直線化したプラスミド pMB045 の DNA と、そのウイルス DNA との同時形質転換を行って vILTV3 ウイルスの単離・精製をした。この組換え体は ILTV ウイルスの ORFs B と C との間の一部欠失した遺伝子間領域（実施例 5、実施例 7 参照）内に挿入された HCMV-IE/IBDV VP2 カセットを含んでいる。

#### 実施例 12

IBDV VP2 遺伝子を発現するカセットを MCMV IE プロモータの制御下で、ORF B をオーバーラップするゲノム領域および ORFs B と C との間の遺伝子間部位に挿入するためのドナープラスミド pMB046 の作製と ILTV 4 の単離

プラスミド pEL070(実施例 10、図 10 参照)を EcoRI、SalI および XmnI で処理して 3035 bp の EcoRI-SalI 断片を単離した。この断片を予め EcoRI と SalI で処理したプラスミド pMB042（実施例 8、図 5 参照）に導入して 7253 bp のプラスミド pMB046（図 13）を得た。このプラスミドによって ILTV ウイルスの ORF B をオーバーラップするゲノム領域および ORFs B と

Cとの間の遺伝子間ゲノム領域に MCMV-IE/IBDV-VP2 発現カセットを挿入することが可能となる。

実施例 3 の方法で、予め酵素 BssHII を用いて直線化したプラスミド pMB046 の DNA と、そのウイルス DNA との同時形質転換を行って vILTV4 ウイルスの単離・精製をした。この組換え体は ILTV ウイルスの ORF B をオーバーラップするゲノム領域および ORFs B と C との間の遺伝子間ゲノム領域（実施例 5、実施例 8 参照）内に挿入された MCMV-IE/IBDV VP2 カセットを含んでいる。

### 実施例 13

#### NDV HN 遺伝子を発現するカセットを ORF B に挿入するためのドナープラスミド pMB047 の作製と vILTV 5 の単離

##### 13.1 ニューカッスル病ウイルス (NDV) HN 遺伝子のクローニング

テイラー達の方法 (Taylor J. et al., J. Virol. 1990. 64. 1441-1450) に従ってニューカッスル病ウイルス (NDV) テキサス株のゲノムに対して相補的な DNA ライブラリーを作製した。融合遺伝子 (F) の末端、赤血球凝集素ノイラミニダーゼ (HN) 遺伝子の全体およびポリメラーゼ用の遺伝子の開始点を含む pBR322 クローンを pHN01 として同定した。このクローン内に存在する NDV HN 遺伝子の配列を図 14 (配列 NO. 14) に示す。プラスミド pHN01 を SphI および XbaI で処理して 2520 bp の SphI-XbaI 断片を単離した。この断片を予め SpaI と XbaI で処理したベクター pUC19 に導入して 5192 bp のプラスミド pHN02 を得た。プラスミド pHN02 を ClaI と PstI で処理して 700 bp の ClaI-PstI 断片 (断片 A) を単離した。下記のオリゴヌクレオチドと鋳型 pHN02 を用いて 270 bp の PCR 断片を作製した：

EL071 (配列 NO. 15)

5' CAGACCAAGCTTCTTAAATCCC 3'

EL073 (配列 NO. 16)

5' GTATTCGGGACAATGC 3'

この断片を HindIII と PstI で処理して 220 bp の HindIII-PstI 断片 (断片 B) を単離した。断片 A と断片 B を同時に予め ClaI と HindIII で処理したベクター pBS-SK+ に導入して 3872 bp のプラスミド pEL028 (図 15) を得た。プラスミド pHN02 を BspHI と ClaI で処理して 425 bp の BspHI-ClaI 断片 (断片 C) を単離した。下記のオリゴヌクレオチドと鋳型 pHN02 を用いて 465 bp の PCR 断片を作製した：

EL074 (配列 NO. 17)

5' GTGACATCACTAGCGTCATCC 3'

EL075 (配列 NO. 18)

5' CCGCATCATCAGCGGCCGCGATCGGTCATGGACAGT 3'

この断片を BspHI と NotI で処理して 390 bp の BspHI-NotI 断片 (断片 D) を単離した。断片 C と断片 D を同時に予め ClaI と NotI で処理したベクター pBS-SK+ に導入して 3727 bp のプラスミド pEL029bis (図 15) を得た。プラスミド pEL028 を ClaI と SacII で処理して 960 bp の ClaI-SacII 断片 (断片 E) を単離した。プラスミド pEL029bis を ClaI と NotI で処理して 820 bp の ClaI-NotI 断片 (断片 F) を単離した。断片 E と断片 F を同時に予め NotI と SacII で処理したベクター pBS-SK+ に導入して 4745 bp のプラスミド pEL030 (図 15) を得た。

### 13.2 ORF B 内に NDV HN を発現するカセットを含むプラスミド pMB047 の作製

プラスミド pEL030 を NotI で処理して 1780 bp の NotI-NotI 断片 (NDV HN 遺伝子の全体) を単離した。この断片を、IBDV VP2 の蛋白質をコード化する遺伝子を含む 1405 bp の NotI-NotI 断片の代わりに、プラスミド pMB044 (実施例 10、図 11 参照) の NotI 部位に挿入した。このクローニングによって 7385 bp のプラスミド pMB047 (図 16) を単離することができた。このプラスミドによって ILTV ウイルスの一部欠失した ORF B に MCMV-IE/NDV-

HN 発現カセットを挿入することが可能となる。

### 13.3 vILTV5 組換えウイルスの単離と精製

実施例 3 の方法で、予め酵素 BssHII を用いて直線化したプラスミド pMB047 の DNA と、そのウイルス DNA との同時形質転換を行って vILTV5 ウイルスの単離・精製をした。この組換え体は ILTV ウイルスの一部欠失した ORF B（実施例 5、実施例 6 参照）内に MCMV-IE/NDV-HN カセットを含んでいる。

### 実施例 14

#### NDV ウイルス HN 遺伝子を発現する他の組換え ILTV ウイルスの単離

実施例 13（段落 13.2、13.3）と同様な方法で、NotI 部位によってフランキングされた HN 遺伝子（pEL030 から単離、図 15）をプラスミド pMB045（図 12）および pMB046（図 13）内で VP2 遺伝子の代わりに用いることができ、ORFs B と C との間の遺伝子間部位内または ORF B および ORFs B と C との間の遺伝子間部位にオーバーラップして NDV HN を発現するカセットを有する組換えウイルスの単離を可能にするプラスミドを得る。

### 実施例 15

#### NDV F 遺伝子を発現するカセットを ORF B に挿入するためのドナープラスミド pMB048 の作製と vILTV 6 の単離

### 15.1 ニューカッスル病ウイルス（NDV）F 遺伝子のクローニング

ニューカッスル病ウイルスのゲノム（実施例 13、段落 13.1）に対して相補的な DNA ライブラリーで得られた、融合（F）遺伝子全体を含むクローンを pNDV81 とよぶ。このプラスミドは既に記載しており、このクローン内に存在する NDV F 遺伝子の配列は開示されている（Taylor J. et al., J. Virol. 1990. 64. 1441-1450）。プラスミド pNDV81 を NarI および PstI で処理して 1870 bp の NarI-PstI 断片（断片 A）を単離した。下記のオリゴ

ヌクレオチドと鋳型 pNDV81 を用いて 160 bp の P C R 断片を作製した：

EL076 (配列 NO. 19) : TGACCCTGTCTGGGATGA 3'

EL077 (配列 NO. 20)

5' GGATCCCGGTCGACACATTGCGGCCGCAAGATGGGC 3'

この断片を PstI と SalI で処理して 130 bp の PstI-SalI 断片 (断片 B) を単離した。断片 A と断片 B を同時に予め ClaI と SalI で処理したベクター pBS-SK+ に導入して 4846 bp のプラスミド pEL033 (図 17) を得た。

#### 15.2 ORF B 内に NDV F を発現するカセットを含むプラスミド pMB048 の作製

プラスミド pEL033 を NotI で処理して 1935 bp の NotI-NotI 断片 (F 遺伝子全体) を単離した。この断片を、IBDV VP2 の蛋白質をコード化する遺伝子を含む 1405 bp の NotI-NotI 断片の代わりに、プラスミド pMB044 (実施例 10、図 11) の NotI 部位に挿入した。このクローニングによって 7538 bp のプラスミド pMB048 (図 18) を単離することができた。このプラスミドによって ILTV ウイルスの一部欠失した ORF B に MCMV-IE/NDV-F 発現カセットを挿入することが可能となる。

#### 15.3 vILTV6 組換えウイルスの単離と精製

実施例 3 の方法で、予め酵素 BssHII を用いて直線化したプラスミド pMB048 の DNA と、そのウイルス DNA との同時形質転換を行って vILTV6 ウイルスの単離・精製をした。この組換え体は ILTV ウイルスの一部欠失した ORF B (実施例 5、実施例 6 参照) 内に MCMV-IE/NDV-F カセットを含んでいる。

#### 実施例 16

NDV HN および F 遺伝子を発現する二重カセットを ORF B 部位に挿入するた

### めのドナープラスミドの作製と組換え ILTV ウイルスの単離

2つの遺伝子、例えば NDV ウイルスの HN および F 遺伝子を発現する二重カセットを作製することができる。この構造は図 19 に概念的に示されている。この構造では、2つのプロモータの末端 5' は隣接しており、2つの遺伝子の転写が反対方向に起こるようになっている。2つのプロモータのうちの一方が CMV IE プロモータで、他方のプロモータ（組み合わせて使用されるプロモータとよぶ）がウイルス（特にヘルプスウイルス）または他に由来の、真核細胞内で活性である任意のプロモータであるのが好ましい。この構造では、組み合わせて使用されるプロモータは CMV IE プロモータのアクチベーション領域によって活性化される。この二重発現カセットは上記の3つのドナープラスミド（それぞれ図 3、図 4、図 5 に示された実施例 6、7、8 に記載の pMB035、pMB039、pMB042）の1つに挿入することができる。組換えウイルスの単離は上記と同じ方法（実施例 3 参照）で行う。

### 実施例 17

#### MDV gB 遺伝子を発現するカセットを ORF B に挿入するためのドナープラスミド pMB049 の作製と vILTV 7 の単離

##### 17.1 マレック病ウイルス gB 遺伝子のクローニング

MDV gB 遺伝子を含む MDV ウイルス RB1B 株のゲノム DNA の 3.9 kbp の EcoRI-SalI 断片〔この配列はロス（Ross.N）達が開示している（J. Gen. Virol. 1989. 70. 1789-1804）〕を予め EcoRI と-SalI で処理したベクター pUC13 に導入して 6543 bp のプラスミド pCD007（図 20）を得た。このプラスミドを SacI および XbaI で処理して 2260 bp の SacI-XbaI 断片（gB 遺伝子の中央部位＝断片 A）を単離した。下記のオリゴヌクレオチドと鋳型 pCD007 を用いて 222 bp の PCR 断片を作製した：

CD001 （配列 NO. 21）：

5' GACTGGTACCGCGGCCGCATGCACTTTTTAGGCGGAATTG 3'

CD002 (配列 NO. 22) 5' TTCGGGACATTTTCGCGG 3'

この断片を KpnI と XbaI で処理して 190 bp の KpnI-XbaI 断片 (gB 遺伝子の 5' 末端=断片 B) を単離した。下記のオリゴヌクレオチドと鋳型 pCD007 を用いて 195 bp の P.C.R 断片を作製した:

CD003 (配列 NO. 23): 5' TATATGGCGTTAGTCTCC 3'

CD004 (配列 NO. 24)

5' TTGCGAGCTCGCGGCCGCTTATTACACAGCATCATCTTCTG 3'

この断片を SacI と SacII で処理して 162 bp の SacI-SacII 断片 (gB 遺伝子の 3' 末端=断片 C) を単離した。断片 A、B および C を同時に予め KpnI と SacI で処理したベクター pBS-SK+ に導入して 5485 bp のプラスミド pCD011 (図 20) を得た。

#### 17.2 ORF B 内に MDV gB 遺伝子を発現するカセットを含むプラスミド pMB049 の作製

プラスミド pCD011 を NotI で処理して 2608 bp の NotI-NotI 断片 (MDV gB 遺伝子全体) を単離した。この断片を、IBDV VP2 の蛋白質をコード化する遺伝子を含む 1405 bp の NotI-NotI 断片の代わりに、プラスミド pMB044 (実施例 10、図 11) の NotI 部位に挿入した。このクローニングによって 8213 bp のプラスミド pMB049 (図 21) を単離することができた。このプラスミドによって ILTV ウイルスの一部欠失した ORF B に MCMV-IE/ MDV-gB 発現カセットを挿入することが可能となる。

#### 17.3 組換え vILTV7 ウイルスの単離と精製

実施例 3 の方法で、予め酵素 BssHII を用いて直線化したプラスミド pMB049 の DNA と、そのウイルス DNA との同時形質転換を行って vILTV7 ウイルスの単離・精製をした。この組換え体は ILTV ウイルスの一部欠失し



た ORF B（実施例 5、実施例 6 参照）内に MCMV-IE/MDV-gB カセットを含んでいる。

#### 実施例 18

IBV 遺伝子（1 つまたは複数）を発現するカセットを ORF B に挿入するためのドナープラスミドの作製と ILTV 組換えウイルスの単離

上記の 3 箇所の部位（実施例 6、7 および 8）への単一のカセットの挿入（実施例 9、10、11、12、13、14、15 および 17）または二重カセットの挿入（実施例 18）に関する上記の戦略と同様な戦略に従って、膜（M）またはスパイク（S）の蛋白質、または鳥類の感染性気管支炎ウイルス（IBV）のヌクレオカプシド（N）を高レベルで発現する組換え ILTV ウイルスを調製することができる。特に、二重発現カセットは CMV IE プロモータの制御下で S 遺伝子を用いて、且つ組み合せて使用されるプロモータの制御下で M 遺伝子を用いて調製した。

#### 実施例 19

他の鳥類の病原物質または免疫調節性ペプチドの遺伝子（1 つまたは複数）を発現するカセットを 3 箇所の上記の部位に挿入するためのドナープラスミドの作製と ILTV 組換えウイルスの単離

上記の 3 箇所の部位（実施例 6、7 および 8）への単一のカセットの挿入（実施例 9、10、11、12、13、14、15 および 17）または二重カセットの挿入（実施例 18）に関する上記の戦略と同様な戦略に従って、CAV の免疫源（特に、VP1 および VP2 をコード化する遺伝子が発現するための二重カセット）、ニワトリの肺炎ウイルスまたは他の鳥類の病原物質、あるいは免疫調節性ペプチド、特にサイトカインを高レベルで発現する組換え ILTV ウイルスを調製することができる。

#### 実施例 20

ワクチンの製造

本発明に従って得られた組換えウイルスは孵化鶏卵で製造する。回収したウイルス溶液を凍結乾燥安定剤に希釈し、1000 ワクチン投与量の割合でバイアルに分配して最後に凍結乾燥する。

#### 4. 図面の簡単な説明

図 1 : 制限地図、クローン化断片の位置および ORFs の位置

図 2 : 3841 bp の配列および ORFs A, B および C の翻訳

図 3 : プラスミド pMB 035 の製造模式図

図 4 : プラスミド pMB 039 の製造模式図

図 5 : プラスミド pMB 042 の製造模式図

図 6 : プラスミド pEL 024 の製造模式図

図 7 : プラスミド pEL 027 の製造模式図

図 8 : プラスミド pMB 043 の図

図 9 : プラスミド pCD 009 の製造模式図

図 10 : プラスミド pEL 070 の製造模式図

図 11 : プラスミド pMB 044 の図

図 12 : プラスミド pMB 045 の図

図 13 : プラスミド pMB 046 の図

図 14 : NDV HN 遺伝子の配列

図 15 : プラスミド pEL 030 の製造模式図

図 16 : プラスミド pMB 047 の図

図 17 : プラスミド pEL 033 の図

図 18 : プラスミド pMB 048 の図

図 19 : 二重発現カセットの図

図 20 : プラスミド pCD 011 の図

図 21 : プラスミド pMB 049 の図