

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3587065号
(P3587065)

(45) 発行日 平成16年11月10日(2004.11.10)

(24) 登録日 平成16年8月20日(2004.8.20)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 N 15/09
A 6 1 K 39/245
A 6 1 K 39/255
C 1 2 N 7/00
G O 1 N 33/531

C 1 2 N 15/00 Z N A A
A 6 1 K 39/245
A 6 1 K 39/255
C 1 2 N 7/00
G O 1 N 33/531

A

請求項の数 3 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-282906
(22) 出願日 平成10年10月5日(1998.10.5)
(65) 公開番号 特開平11-192093
(43) 公開日 平成11年7月21日(1999.7.21)
審査請求日 平成13年3月29日(2001.3.29)
(31) 優先権主張番号 特願平9-271445
(32) 優先日 平成9年10月3日(1997.10.3)
(33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 000229117
日本ゼオン株式会社
東京都千代田区丸の内2丁目6番1号
(74) 代理人 100091096
弁理士 平木 祐輔
(74) 代理人 100096183
弁理士 石井 貞次
(72) 発明者 齋藤 修治
神奈川県川崎市川崎区夜光1-2-1 日
本ゼオン株式会社内
(72) 発明者 奥田 尚志
神奈川県川崎市川崎区夜光1-2-1 日
本ゼオン株式会社内

審査官 阪野 誠司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 鳥類感染型ヘルペス属ウイルスの組み換え体、およびこれを利用した組み換えワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

七面鳥ヘルペスウイルスまたはマレック病ウイルスの(1)UL44とUL45の間および(2)UL45とUL46の間からなる群から選ばれる非翻訳領域の少なくとも1箇所の挿入部位に、少なくとも1つの外来遺伝子が挿入された、鳥類感染型組み換えヘルペス属ウイルス。

【請求項2】

前記外来遺伝子が、鳥類の感染症の病原体に由来する遺伝子である請求項1に記載の組み換えウイルス。

【請求項3】

請求項1又は2に記載された組み換えウイルスを有効成分とする鶏用ワクチン。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、七面鳥ヘルペスウイルス(以下、HVTということがある)のゲノムまたはマレック病ウイルス(以下、MDVということがある)のゲノムの非必須領域に外来遺伝子を組み込んだ組み換えHVTおよびMDV、及びこれを利用したワクチンに関する。

【0002】

【従来技術】

従来、遺伝子組み換え手法を使ったウイルスベクターワクチンは、ポックスウイルス属を

ベクターとしたワクチン (Ogawa R.ら、Vaccine, 8: 486 - 490 (1990))、アデノウイルスをベクターとしたワクチン (Hsu, K. H.ら、Vaccine, 12: 607 - 612 (1994))、バキュロウイルスをベクターとしたワクチンのほか、ヘルペスウイルス属をベクターとしたワクチン (Shin, M.-F.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 5867 - 5870 (1984)) が知られている。中でもヘルペスウイルス属の遺伝子組み換えベクターワクチンは近年盛んに研究されている。

【0003】

外来抗原遺伝子を発現させるウイルスベクターとして用いるウイルスは、ヒトヘルペスウイルス (HSV) やオーエスキー病ウイルス (PRV) (Van Zijl M., 10
ら、J. Virol., 65: 2761 - 2765 (1991))、七面鳥ヘルペスウイルス (HVT) (Morgan R. W.ら、Avian Dis., 36: 858 - 870 (1992))、マレック病ウイルス (MDV) などが知られている。これらの中でも HVT ウイルスおよびワクチン株 MDV は接種対象動物となる家禽での安全性が高く、ワクチン特性も良好であることから、鳥類に対するベクターウイルスとして注目されている。

【0004】

また、HVT および MDV の感染様式として、感染細胞から他の細胞にウイルスが感染する際、ウイルスが感染細胞から一旦血中に放出されてから他の細胞に感染するというポックスウイルスのような感染様式をとらず、隣り合う細胞へ、細胞間 - 細胞間で感染が成立 20
する。このため、血流中に存在する HVT または MDV 特異的抗体の影響を受けにくい。

【0005】

従来、親鳥からの移行抗体 (Maternal antibody) の存在によって、ウイルス生ワクチンの効果が減弱され、十分な効果を発揮できないという問題があった。近年、鶏へのワクチン接種法の一つとして、発生途中の鶏卵内にワクチンを接種する方法も開発され、HVT または MDV のワクチンとしての有用性も認められている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、組み換え HVT もしくは MDV でこれまで知られている遺伝子組み換え領域は、TK 領域 (Ross L.ら、16th International Herpes 30
virus Workshop (1991))、US10 領域 (Sakaguchi M.ら、Vaccine, 12: 953 - 957 (1994))、US2 領域 (Sondermeijer, P. J.ら、Vaccine, 11: 349 - 358 (1993)) などの HVT の生存に非必須と考えられる遺伝子の中に外来抗原遺伝子を組み込むという報告ばかりであった。このような非必須領域への組み込みは、外来遺伝子を、非必須とはいえ本来 HVT で発現すべき遺伝子、すなわち抗原決定基となる遺伝子の代わりに発現させるため、HVT もしくは MDV の抗原性を減弱させる可能性がある。そればかりでなく、挿入部分のオープン・リーディング・フレーム (ORF) の転写及び翻訳に関係した遺伝子機構 (エンハンサー、プロモーター、ターミネーターなど) が、挿入遺伝子の発現に対して悪影響を及ぼす可能性を否定できない。 40

【0007】

事実、多くのウイルスで、非必須と考えられるタンパク質をコードする遺伝子領域を欠失させたり、その部分に外来遺伝子を組み込んだりした場合に、ウイルスの形状が変化したり抗原性が低下したりすることが報告されている。さらに、弱毒ワクチンの調整方法としても、外来遺伝子を組込む方法が用いられているケースがある。

【0008】

また、TK 領域に外来遺伝子を挿入して発現させたときに、発現遺伝子の抗原性が低下するという報告もある (Ross L.ら、J. Gen. Virol., 74: 371 - 377 (1993))。さらに、特定の ORF 内に挿入できる抗原遺伝子の長さが限られてしまうため、多くの抗原遺伝子を挿入できないなど、ワクチンとして多くの問題点 50

がある。

【 0 0 0 9 】

本発明者らは、かかる問題点を解決すべく鋭意研究を進めた結果、何種類もの外来抗原遺伝子を挿入でき、かつ安定的に抗原タンパク質を発現できるHVTまたはMDVの遺伝子挿入領域、つまりここでいうHVTまたはMDVの非翻訳領域を見だし、その部分に種々の外来抗原遺伝子を挿入できること、そしてこれらの外来抗原遺伝子が挿入された組み換えHVTまたはMDVを作製し、これらの組み換えウイルスを宿主に感染させることにより、宿主側に十分なワクチン効果を付与する事を見だし、本発明を完成するに至ったのである。

【 0 0 1 0 】

【課題を解決するための手段】

本発明の発明者らは、上記の課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、鳥類感染型ヘルペス属ウイルスに属するウイルスの非翻訳領域中の特定の部位に外来遺伝子を挿入した組み換えウイルスを作製し、この組み換えウイルスをワクチンとして使用できることを見出し、本発明を完成したものである。

【 0 0 1 1 】

すなわち、本発明は、ゲノム中の非翻訳領域である遺伝子領域に外来遺伝子が挿入された、鳥類感染型組み換えヘルペス属ウイルスである。ここで、上記ウイルスは、七面鳥ヘルペスウイルス(HVT)またはマレック病ウイルス(MDV)であることを特徴とする。

【 0 0 1 2 】

また、本発明は、ヒト単純ヘルペスウイルスの各オープン・リーディング・フレームに相当する七面鳥ヘルペスウイルスまたはマレック病ウイルスのオープン・リーディング・フレームの間に存在する非翻訳領域中にあり、かつ、(1) UL44とUL45の間、(2) UL45とUL46の間、(3) UL41とUL42の間、(4) UL40とUL41の間、(5) gB遺伝子の下流領域、(6) UL53とUL54の間、および(7) UL36とUL37の間からなる群から選ばれる少なくとも1箇所の挿入部位に、少なくとも1つの外来遺伝子が挿入されている組み換えウイルスであることを特徴とする。

【 0 0 1 3 】

さらに、上記外来遺伝子は、鳥類の感染症の病原体に由来する遺伝子であり、ウイルス、細菌、真菌、および原虫からなる群から選ばれる病原体由来の抗原遺伝子であることを特徴とする。さらにまた、上記外来遺伝子は、ニューカッスル病ウイルス(NDV)、ガンボ口病ウイルス(IBDV)、伝染性喉頭気管炎ウイルス(ILTV)、伝染性気管支炎ウイルス(IBV)、マイコプラズマ(MG)、およびコクシジウムからなる群から選ばれる病原体由来の遺伝子であることを特徴とする。

本発明はまた、上記の組み換えウイルスを有効成分とする鶏用ワクチンである。

【 0 0 1 4 】

【発明の実施の形態】

以下に、本発明を詳述する。

(本発明で使用するウイルス)

本発明で使用するウイルスは、鳥類に感染するウイルスのうち、ヘルペスウイルス属に属するもの(鳥類感染型ヘルペス属ウイルス)であることが好ましい。これは、ヘルペスウイルス属に属するウイルスが、潜伏感染(latent infection)や持続感染(persistent infection)の状態に感染動物の体内に永続的に生存し続けるという性質を有するためである。

【 0 0 1 5 】

鳥類感染型ヘルペス属ウイルスのなかでも、特に、七面鶏ヘルペスウイルス(HVT)またはマレック病ウイルス(MDV)であることが好ましい。上記のウイルスは感染期間が長いために長期にわたってワクチン効果を感染した鳥類に付与できる可能性があり、ワクチンとしての有効性が期待されることによる。

10

20

30

40

50

【0016】

(HVTまたはMDV)

本発明において使用するHVTまたはMDVは、天然に得られたり、ATCCなどから有償または無償で入手できるものなどであればよく、特に限定されるものではない。

【0017】

HVTの好ましい例としては、ガンマヘルペスウイルス亜科に属し、生来非病原性であり、かつ非腫瘍性のウイルスで家禽用のワクチンとして用いられているものが挙げられる。具体的には、FC126(ATCC VR-584B)、PB-THV1、H-2、YT-7、WTHV-1、HPRS-26などが挙げられ、例えば、FC126株を好適に使用することができる。また、MDVとしては、具体的には、CVI988やSB1などを挙げる事ができる。

10

【0018】

本発明の組み換えウイルスを作製するためには、まず、上記のウイルスを適当な宿主細胞中で増殖させ、ゲノムDNAを得る。そして、このゲノムDNA中の非翻訳領域を確認し、その領域に、後述する外来遺伝子を挿入する。

ウイルスを増殖させるための宿主および増殖条件は、増殖させようとするウイルスに応じて適宜選択する。例えば、HVTを増殖させる場合には、宿主細胞としてCEF、発育鶏卵、鶏腎細胞などを用いる。Eagle's MEM、ライボピツル-15/マッコイ5A(1:1混合)培地などの中で、37前後にて、3~4日間培養する。

【0019】

以上のように培養した細胞から定法に従ってDNAを抽出する。すなわち、単層培養した細胞をはがし、遠心上清をとり、リシスバッファーでタンパク質を変性除去した後に、フェノールとエタノールでDNAを抽出する。

このようにして得たウイルスDNAの非翻訳領域を後述のように確認する。

20

【0020】

非翻訳領域とは、ORFを有さず、翻訳によって発現されるタンパク質のアミノ酸配列を規定していない塩基およびORFが転写、翻訳、タンパク質発現のいずれにも関与していない塩基領域をいう。この領域に含まれている塩基配列は、その領域がORFを含むこととならない限り、塩基の置換、欠失、付加されたものであってもよい。

【0021】

(外来遺伝子挿入領域)

外来遺伝子を挿入する領域を、外来遺伝子挿入領域といい、外来遺伝子を挿入する部位を外来遺伝子挿入部位という。

外来遺伝子挿入領域は、以下のようにして得ることができる。HVTまたはMDVの場合を例にとって説明する。

30

【0022】

これらのウイルスの非翻訳領域を、以下のようにして得る。まず、全塩基配列が解明されているヒト単純ヘルペスウイルスI型(HSV-1)や、HVTと相同性の高い塩基配列を持つMDV-1など相互で配列が確定されている領域などから、非翻訳領域と推定される配列の前後の配列を選択する。

40

【0023】

ついで、これらの配列をもとにDNAプライマーを合成し、HVTまたはMDVのDNAを鋳型として所定の条件でポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)を行い、特定の遺伝子を増幅することによって得られる。

【0024】

この増幅された遺伝子にORFがないことをDNA配列分析で確認し、ORFの転写および翻訳に関係した遺伝子機構(エンハンサー、プロモーター、ターミネーターなどを含む機構)なども存在しない位置を確認して、外来遺伝子挿入領域を決定する。

【0025】

この領域がウイルスの増殖に非必須であり、外来遺伝子を導入できることを明らかにする

50

ために、この領域に、特異的な配列を付加し、もしくは欠失させ、または置換を行い、CEF（鶏胚繊維芽細胞）に感染させ、このような変化を生じさせた前後における感染性および増殖性の変化を調べる。

【0026】

上記のような特定の配列の付加、欠失、置換などは、*in vitro*突然変異（*in vitro mutagenesis*）、PCR、部位特異的突然変異（*site-directed mutagenesis*）、および特公平6-16709号公報に記載された部位特定変異法など、一般的な手法を用いて行うことができる。

【0027】

また、CEFに対しては、*m.o.i.* 1で感染させ、37℃で3～4時間インキュベートして増殖させ、ウイルスの増殖性、細胞の形態、プラークの形態、細胞の不活化を観察する。

【0028】

この結果、塩基の変更前の株と細胞やプラークの形態に差がなく、また、ウイルスの増殖性も5回の繰り返し実験の平均で塩基の変更前の株との差が±20%以内であることを確認し、同部位を外来遺伝子の挿入が可能な領域（外来遺伝子挿入可能領域）と判断する。この際、外来遺伝子挿入領域は、非翻訳領域を含めて外来遺伝子挿入部位の前後10bp以上あればよく、好ましくは100bp以上、より好ましくは500bp以上あればよい。

【0029】

外来遺伝子挿入部位は非翻訳領域内であれば特に限定されるものではないが、具体例としては、(1) UL44とUL45との間およびUL45とUL46との間、(2) UL41とUL42、(3) UL40とUL41との間、(4) gB遺伝子の下流領域、(5) UL53とUL54との間、(6) UL36とUL37との間、などが挙げられる。これらは、第16回国際ヘルペスウイルスワークショップ（1991年07月7～12日に米国カリフォルニア州パシフィックグローブで開催された）の予稿集中に、HSV-1について掲載されている。

【0030】

これらの中でも、好ましいものとして、HSV-1だけでなく、MDVでも相同性がORFにおいて確認されている(1)および(4)を挙げることができ、より好ましくはORF間の非翻訳領域が推定できる(1)を挙げることができる。

【0031】

（外来遺伝子含有プラスミドの構築）

外来遺伝子をHVTもしくはMDVの非翻訳領域に挿入するには、非翻訳領域を含んだ配列をプラスミドにクローニングしておく必要があるが、このプラスミドも特に限定されるものではない。

例えば、pBR322、pBR325、pBR327、pBR328、pUC18、pUC19、pUC7、pUC8、およびpUC9などのプラスミド、ラムダファージ、M13ファージなどのようなファージ、pHC79などのコスミドを例示することができる。

【0032】

これらのプラスミドに、上記のようにして得た非翻訳領域を常法によって組み込む。このように組み込まれた非翻訳領域へ外来遺伝子を挿入するためには、上記のようなプラスミドなどにクローニングした非翻訳領域の特定の部分に変異を加えて新たな制限酵素切断部分を作り出し、そこに外来遺伝子を挿入する。

【0033】

変異を加える方法は定法に従えばよく、*in vitro mutagenesis*やPCRなど当業者において通常用いられる方法を使用することができる。すなわち、PCR法では、PCRプライマーに1～2塩基の欠失、置換、付加などの変異を生じさせ、このプライマーを使用することにより変異を生じさせることができる。

【0034】

10

20

30

40

50

ここで挿入する外来遺伝子とは、本来その領域には含まれていない自己由来の遺伝子、非自己由来の遺伝子の双方を含み、鳥類感染型ヘルペス属ウイルスの抗原遺伝子であることが望ましい。

【0035】

このような遺伝子としては、例えば、鳥類の感染症の病原体に由来する遺伝子を挙げることができる。鳥類の感染症を引き起こす病原体としては、ウイルス、細菌、真菌、原虫などを挙げることができ、これらの病原体が有する抗原遺伝子、すなわち、抗原決定基をコードする遺伝子を好適に使用することができる。

【0036】

このような病原体としては、具体的には、鶏の一生を通じて問題となるニューキャッスル病ウイルス（NDV）、ガンボロ病ウイルス（IBDV）、中難以降で問題となる伝染性喉頭気管炎ウイルス（ILTV）、伝染性気管支炎ウイルス（IBV）、マイコプラズマ（MG）、およびコクシジウムなどを挙げることができる。

【0037】

特に、中和抗原遺伝子または感染防御抗原と考えられる抗原の遺伝子が同定されている疾病では、これらの遺伝子をHVTやMDVなどの鳥類感染型ヘルペス属ウイルスに組み込むことによって、組み換えウイルスが感染した鶏の体内で抗原として発現させることが可能となることによる。また、これによって、効果的なワクチンとして使用することが可能になる。

【0038】

具体的に、HVTまたはMDVなどの鳥類感染型ヘルペス属ウイルスに遺伝子を組み込んで組み換えウイルスを作製し、これらのウイルスに感染した鳥類の体内で発現されるタンパク質は、構造タンパク質、非構造タンパク質のいずれであってもよく、DNA配列のわかっているタンパク質であれば特に限定されない。

【0039】

例えば、NDVでは、HNタンパク質、Fタンパク質、NPタンパク質が、また、IBVでは、Mタンパク質、Nタンパク質、スパイクタンパク質が挙げられる。IBDVでは、VP1～VP5の全タンパク質、ILTVはヘルペスウイルスであることから、HSV-1やMDV、HVTと相同性のあるタンパク質（特にgBタンパク質やUL32相当タンパク質など）、マイコプラズマではアドヘシンタンパク質、HMW関連タンパク質、40Kタンパク質、66Kタンパク質、67Kタンパク質など（国際公開公報WO94/23019号に配列が記載）などが挙げられる。

【0040】

したがって、これらのタンパク質をコードしている遺伝子を組み込むことが好ましい。このような外来遺伝子を、異種抗原遺伝子という。

【0041】

また、異種抗原遺伝子をHVTまたはMDVで発現させるためには、異種抗原遺伝子の上流域にプロモーター配列を組込む必要がある。使用するプロモーターは、合成プロモーター、天然プロモーターのいずれであってもよく、HVTまたはMDVが感染した細胞内で保有する転写の系でプロモーターとして有効に機能し得るものであれば特に限定されない。

【0042】

このようなプロモーターとしては、HVTまたはMDVが保有している固有のプロモーターは無論のこと、HVTもしくはMDV以外のウイルス由来のプロモーターやDNA、または真核生物もしくは原核生物由来のものや合成プロモーターであっても上記要件を満たす限り、本発明において使用することができる。

【0043】

具体的には、ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモーター（Ross L. J., Gen. Virol., 74:371-377 (1993)）、HVTおよびMDVのgBタンパク質プロモーター（前出）、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）のI

10

20

30

40

50

Eプロモーター (Alting-Mees M. A., *Nucleic Acid Res.*, 17:9494 (1989))、SV40プロモーター (Gunning P., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84:4831-4835 (1987))、ヒトおよび鶏のアクチンプロモーター (前出、および Kost A. T., *Nucleic Acid Res.*, 11:8287-8301 (1983))、 γ -グロビンプロモーター (Spitzner J. R., *Nucleic Acid Res.*, 18:1-11 (1990))、ラウス肉腫ウイルス (RSV) のLTRプロモーター (Fiek A. B., *Nucleic Acid Res.*, 20:1785 (1992))などが挙げられる。その他、HVTまたはMDVの構造タンパク質や必須遺伝子のプロモーターを利用することができる。

10

【0044】

上述した非翻訳領域に、特定のプロモーターの支配下において外来抗原遺伝子が発現するような形でこれらを組み込み、プラスミドを構築する。このようにして構築されたプラスミドは、HVTおよびMDVゲノムの特定領域と組み換えを起こして組み換えウイルスを作ることができる。

【0045】

(組み換えウイルスの作製)

鳥類感染型ヘルペス属ウイルスのゲノムの非翻訳領域内への上記のような外来遺伝子の挿入は、定法に従って行えばよい。HVTの場合を例にとって説明する。

【0046】

20

まず、上記のようにして得たHVT非翻訳領域内に外来抗原遺伝子が挿入されたプラスミドを、HVT感染細胞に、エレクトポレーションや、リン酸カルシウム法、リポフェクションを用いた方法や遺伝子銃などで導入する。導入効率の高さから、エレクトポレーションやリポフェクションを用いた方法を採用することが好ましい。導入するプラスミドの量を、0.1~1000 μ gの範囲とすると、このようなプラスミドを導入した細胞内における、HVT-DNAとプラスミドの相同領域との間での組み換えウイルスの発生率が高くなる。

【0047】

このようにして誕生した組み換えHVTのみを選択するためには、プラスミドの非翻訳領域に1または複数の外来遺伝子を組み込み、そのうちの少なくとも1つを特定の基質を発色させる酵素遺伝子としておくとよい。このような酵素遺伝子の例としては、例えば、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子が挙げられる。

30

【0048】

β -ガラクトシダーゼ遺伝子を含む組み換えHVTは、ブルオガルなどの基質の添加により特定の色を呈するため、非組み換えウイルスと明確に区別できる。したがって、このような遺伝子を組み込んだウイルスに感染させた細胞を、特定の基質を添加した培地中で培養することにより、発色したウイルス感染細胞を選択することができる。この操作を繰り返すことによって、組み換えウイルスを純化することができる。

【0049】

(生ワクチン)

40

本発明の生ワクチンの調製方法は特に限定されないが、たとえば次の方法によって調製することができる。

【0050】

本発明の組み換えウイルスの感染細胞を当該ウイルスが生育できる細胞(以下、宿主細胞という)に感染させ、増殖させた後、細胞をスクレーパーまたはトリプシンではがし、遠心分離によって感染細胞と上清とに分離する。

【0051】

宿主細胞としては、トリ由来の細胞が好ましく、CEF(ニワトリ胚繊維芽細胞)、鶏腎細胞などを好適に使用することができる。

得られた感染細胞は、10%のジメチルスルフォキシド(DMSO)を含む培養用培地に

50

懸濁し、液体窒素存在下で凍結保存する。ワクチンとして使用するときは100倍量のリン酸緩衝液にこの凍結保存品を溶かして使用する。

【0052】

液体窒素下で上記感染細胞を保存するための安定剤やその他の成分は、ウイルス感染細胞が安定的に生存でき、かつレシピエントにとって薬理的に問題のない成分であれば特に限定されない。

本発明の生ワクチンの家禽への投与方法は特に限定されないが、皮下に注射により接種する方法が一般的に用いられており、現行のHVTワクチンと同じである。接種量も従来ワクチンと同様でよい。

【0053】

本ワクチンはヘルペス属ウイルス感染症用ワクチンとしてだけでなく、非翻訳領域に挿入した抗原遺伝子によって、それらの遺伝子が由来する病原体によって惹起される疾病のワクチンとして使用することができる。本発明のワクチンは、有用な組み換えHVT多価ワクチンとして使用することができる。

【0054】

【実施例】

以下に実施例を用いて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。

【0055】

(実施例1) HVT-DNAの調製

HVT-DNAの調製は、基本的にLeeらの方法(J. of Virol., 7: 289-294 (1971))に準じて行った。

【0056】

まず16cm培養皿で、ライボピッツ/マッコイ5A(1:1)混合培地中37で4日間培養したHVT(FC-126株)感染細胞(5×10^7 個)をスクレーパーで剥がし、低速(2,000rpm、5分)で遠心分離した。遠心上清をすて、沈殿した感染細胞の10倍量にあたるリシスバッファー(0.15M NaCl、0.1M EDTA、1% SDS、100µg/mlのProteinase K)を加えた。

【0057】

37で一昼夜保温した後、等量のフェノールを加えてタンパク質を変成させ、この操作を2回繰り返してHVT-DNAを抽出した。抽出したDNAはエタノール沈殿によって回収した。

【0058】

(実施例2) pNZ45/46Sfiの構築

MDV-1型のgCh(Coussensら, J. Gen. Virol., 62: 2373-2379(1981))遺伝子とそれに隣接するBamHI-BフラグメントのEcoRI-BamHI断片(特開平6-292583号公報)の情報をもとにして、ORFの間にSfiI部位を導入できるように合成DNA(プライマー1~4)を設計した。

ここで、上記のCoussensらの文献ではUL44および45が記載されており、特開平6-292583号公報にはUL46が記載されている。

【0059】

このプライマーを用いて以下のようにPCRを行い、pUC18にクローニングした。HVT-FC126株感染CEFより、実施例1の方法でDNAを取得し、このDNA100ngをテンプレートとして用いた。また、プライマー1(配列番号1)とプライマー2(配列番号2)からなるプライマーセットA(それぞれ50pmol)およびプライマー3(配列番号3)とプライマー4(配列番号4)とからなるプライマーセットB(それぞれ50pmol)とを用いて、通常の方法でPCRを行った。30サイクルで反応を停止させ、それぞれ約10µgの増幅産物を得た。

【0060】

10

20

30

40

50

これら2つのPCR産物を混合したもの（混合比1：1、それぞれ100ngを混合したもの）をテンプレートとして、プライマー1とプライマー4とを用いて、45 1分、60 2分、73 3分を1サイクルとして30サイクルPCRを行うことにより、UL45hおよびUL46hのORFの間にSfiI部位を導入した。

【0061】

得られた増幅産物をEcoRIとHindIIIで切断し、その断片をpUC18のEcoRI-HindIII部位にT4リガーゼ（宝酒造社製）4ユニットを用いて16 で、30分間インキュベートして挿入し、pNZ45/46Sfiを構築した。

【0062】

（実施例3）pNZ44/45fiの構築

実施例2と同様に、HVT-FC126株感染CEFより取得したDNA（100ng）をテンプレートとして、プライマー1およびプライマー5（配列番号5）からなるプライマーセットC（それぞれ50pmol）およびプライマー6（配列番号6）とプライマー4からなるプライマーセットD（それぞれ50pmol）とを用いて、実施例2と同様にしてPCRを行った。それぞれ約10μgの増幅産物が得られた。

【0063】

これら2つのPCR産物を混合したもの（混合比1：1、それぞれ100ngを混合したもの）をテンプレートとして、プライマー1（50pmol）とプライマー4（50pmol）とを用いて実施例2と同様にしてPCRを行うことにより、UL44h（MDV1のHSV-1に対応するgChまたはgA）およびUL45hのORFの間にSfiI部位

を導入した。この産物をEcoRIとHindIIIとで切断し、得られた断片をpUC18のEcoRI-HindIII部位に実施例2と同様にして挿入し、pNZ44/45Sfiを構築した。

【0064】

（実施例4）pGIMCSpolyASfiの構築

（1）ドナープラスミドpGTPsの構築

pUC18のHindIII-PstI部位に、合成DNA（5'-AGCTGCCCCGCCCGCAAGCTTGCA-3'（配列番号7））を挿入し、その後DNAポリメラーゼでこの部分を二本鎖とした。次いで、得られたプラスミドのSalI-KpnI部位に合成DNA（5'-TCGACATTTTATGTAC-3'（配列番号8））を挿入し、同様にDNAポリメラーゼで二本鎖とした。さらに、ここで得られたプラスミドのSacI-EcoRI部位に、2本の合成DNA（5'-AATTCGGCCGGGGGGCCAGCT-3'（配列番号9））および（5'-GGCCCCCCCGGCCG-3'（配列番号10））をアニールさせたものを挿入し、最後にこのプラスミドのHindIII-SacI部位にプラスミドpNZ1729R（Yanagida et al., J. Virol., 66:1402-1408（1992））をHindIIIとSalIとで消化して得られた約140bpのDNA断片を挿入して、プラスミドpGTPsを構築した。

【0065】

（2）pGIMCSpolyASfiの構築

pUC18をDraIで切断し、XhoIリンカー（宝酒造社製）を実施例2と同様にして挿入し、XhoIサイトを導入したpUC18Xを構築した。

このpUC18XをHindIIIとPstIで切断し、合成DNA1（配列番号11）と合成DNA2（配列番号12）とをアニールした断片を作製した。これをT4ライゲース（宝酒造社製）を用いて上記のXhoIサイトに挿入し、pU18XGを構築した。

【0066】

このpU18XGのKpnI-EcoRI部位に、ポリA付加シグナルおよびSfiIサイトを導入するために、合成DNA3（配列番号13）と合成DNA4（配列番号14）とをアニールした断片をT4ライゲースによって挿入し、pUCpolyASfiを構築

10

20

30

40

50

した。

【0067】

このpUCpolyASfiのKpnI - BamHIサイトに、実施例4(1)に記載のpGTPsのKpnI - BamHI断片36bpを挿入し、pMCSpolyASfiを構築した。

このpMCSpolyASfiのHindIII - PstIサイトに合成DNA5(配列番号15)を実施例2と同様にして挿入し、pGIMCSpolyASfiを構築した。

【0068】

(実施例5)pRSVおよびpCMVの構築

pBK - RSV (STRATAGENE社製)からNsiIとNheIとを用いて二重消化して切り出したRSVプロモーターを含む約600bpのNsiI - NheI断片を、実施例3で得られたpGIMCSpolyASfiのPstI - XbaI部位に実施例2と同様にして導入し、pRSVを構築した。

10

【0069】

同様に、pBK - CMV (STRATAGENE社製)のCMVプロモーターを含むNsiI - NheI断片を切出し、実施例3で得られたpGIMCSpolyASfiのPstI - XbaI部位に実施例2と同様にして導入して、pCMVを構築した。

【0070】

(実施例6)pCMV - HN (BglI^r) の構築

(1)pCMVのCMVプロモーターからのBglI部位の欠失

pCMVのCMVプロモーター内には、BglI部位が3箇所存在するため、BglI部位を欠失させるために、以下のようにPCRを行って変異を導入した。変異は次の方法によって行った。

20

【0071】

実施例5で構築したpCMV(100ng)をテンプレートにして、プライマー7(配列番号12)とプライマー8(配列番号15)からなるプライマーセットE、M13P7プライマー(東洋紡績株式会社製)とプライマー9(配列番号13)からなるプライマーセットFとを用いて、実施例2と同様の条件でPCRを行った。それぞれ約10μgの増幅産物を得た。

【0072】

上記2つのプライマーセットを用いて得た増幅産物100ngを混合比1:1で混合し、その混合物をテンプレートとして、今度は、M13P7プライマーとプライマー8とを用いて実施例2と同様にPCRを行い、PCR産物(1)を約10μg得た。

30

【0073】

同様にpCMV(100ng)をテンプレートにして、プライマー10(配列番号14)とプライマー11(配列番号17)とのセットF、およびプライマー12(配列番号16)とM13P8プライマー(東洋紡績株式会社)とで、実施例2と同様にしてPCRを行った。

【0074】

同様に、これら2つのプライマーセットの産物それぞれ100ngを1:1で混合した混合物をテンプレートとして、今度は、プライマー10とM13P8プライマーのプライマーでPCRを行い、PCR産物(2)を約10μg得た。

40

さらに、PCR産物(1)と、PCR産物(2)とを混合し、M13P7プライマーとM13P8プライマーとを用いて実施例2と同じようにPCRを行うことにより、BglI部位を欠失したCMVプロモーターを得ることができた。

【0075】

(2)pUCCMVの構築

また、pUC19のPstI - XbaI部位に、pBK - CMV (STRATAGENE社)のCMVプロモーターを含む約600bpのNsiI - NheI断片を実施例2のようにして挿入して、pUCCMVを構築した。

50

【0076】

(3) pNZ87の構築

(3-1) 7.5Kプロモーターに -ガラクトシダーゼ遺伝子が連結されたプラスミド (pNZ76)の作製

10 μ gのpMA001 (Shirakawaら、Gene, 28:127-(1984))をBamHIで消化後、フェノール:クロロホルム(1:1)で抽出し、エタノール沈殿により、 -ガラクトシダーゼ遺伝子(約3.3kbp)を回収した。

【0077】

一方、0.3 μ gのpUC19をBamHIで消化後、フェノール:クロロホルムで抽出し、エタノール沈殿により回収し、上記で調製した -ガラクトシダーゼ遺伝子とライゲーションし、ハイブリッドプラスミドpNZ66を作製した。

10

【0078】

40 μ gのpUWP-1 (ワクチニアウイルスWR株の7.5KダルトンのペプチドをコードするDNAのプロモーターを含むプラスミド)をHpaIとEcoRIとで消化し、1.5%低融点アガロース電気泳動(70V、6時間)により、7.5Kプロモーターを含む約0.26kbpの断片を分離し、フェノール:クロロホルム(1:1)で抽出し、エタノール沈殿によりDNAを回収した。このDNA断片の接着末端をDNAポリメラーゼにより平滑末端とした。

【0079】

0.3 μ gのpNZ66をHincIIで消化し、フェノール:クロロホルムで抽出し、エタノール沈殿により断片を回収し、上記の約0.26kbpの7.5Kプロモーター遺伝子をライゲーションし、得られたハイブリッドプラスミドをpNZ76と命名した。

20

【0080】

(3-2) ハイブリッドファージmp10-HN180からプロモーターおよびその支配下にNDVのHN遺伝子DNAを連結したハイブリッドプラスミドpNZ87の作製
pNZ76をBamHIで消化し、0.8%アガロースゲルより、 -ガラクトシダーゼ遺伝子を含まない約2.9kbpの断片を回収した。

【0081】

一方、ハイブリッドファージmp10-HN180をBglIIとBamHIとで消化後、0.8%アガロースゲルより約1.8kbpのHN遺伝子のDNA断片を回収した。両者をリガーゼにより連結し、得られたプラスミドでコンピテントな大腸菌TG-1株を形質転換し、常法に従ってプラスミドを抽出し、HN遺伝子を含むハイブリッドプラスミドを検出し、これをpNZ-87と命名した。

30

【0082】

(4) pNZ87CMVの構築

次に、(3)で構築したpNZ87から、NDVのHN遺伝子を含む約1.8kbpのBamHI-SacI断片を切り出した。この断片をpUCCMVのBamHI-SacI部位に実施例2と同様にして挿入して、pNZ87CMVを構築した。

このpNZ87CMVのCMVプロモーター領域にはBglI部位が含まれるので、CMVプロモーター領域を含むHindIII-BamHI断片を(2)でPCRにより構築したBglI部位を欠失したCMVプロモーターのHindIII-BamHI断片と実施例2に記載したようにして入れ替えて、pCMV-HN(BglI⁻)を構築した。

40

【0083】

(実施例7) pRSV-Fの構築

(1) pUCRSV-pAの構築

pUC19のPstI-XbaI部位に、pBK-RSV(STRATAGENE社)のRSVプロモーターを含む約600bpのNsiI-NheI断片を実施例2に記載したようにして挿入し、pUCRSVを構築した。

【0084】

これとは別に、pBK-RSV(STRATAGENE社、100ng)をテンプレート

50

として、プライマー 13 (配列番号 18) とプライマー 14 (配列番号 19) のプライマー (それぞれ 50 pmol) とを用いて、実施例 2 と同様にして PCR を行うことによって、pBK-RSV に含まれる SV40 プロモーターの pA 付加シグナルを持つ断片を複製した。

この PCR で増幅した断片を SacI と EcoRI とで二重消化して、pUCRSV の SacI - EcoRI 部位に実施例 2 に記載のようにして挿入することにより、pUCRSV - pA を構築した。

【0085】

(2) pNZ98 の構築

NDV の F 遺伝子および HN 遺伝子を含むプラスミド XLI II - 10H (Virus Research, 7:241-255 (1987)) を使用した。 10

4 μg のプラスミド XLI II - 10H を XbaI で消化し、生じた付着末端を DNA ポリメラーゼで平滑末端とし、フェノール - クロロホルム (1:1) で抽出し、エタノール沈殿により回収した。回収した DNA を BamHI で消化し、0.8% アガロースゲルで電気泳動して、約 2.1 kbp の F 遺伝子を完全に含む断片を回収した。

【0086】

一方、上記のようにして複製した pNZ76 を BamHI と SmaI で二重消化し、lacZ 遺伝子部分を除いた約 3.0 kbp の BamHI - SmaI 断片を回収した。回収したこの断片と、約 2.1 kbp の F 遺伝子を完全に含む断片とをリガーゼによって連結し、コンピテントな大腸菌 TG1 株を形質転換した。 20

【0087】

50 μg/mL のアンピシリンを含む LB 寒天培地上で生育してきたコロニーから、上記と同様の操作によってプラスミドを調製した。制限酵素 (BamHI と SmaI) でこのプラスミドを切断し、目的のクローンを確認し、pNZ98' と命名した。この pNZ98' には、F 遺伝子全長の他、HN 遺伝子の 5' - 末端約 300 bp が含まれる。この部分を除去するために、pNZ98' を SmaI と KpnI とで二重消化し、約 4,150 bp の SmaI - KpnI 断片を 0.8% アガロースゲル電気泳動により回収した。また、pNZ98' を SmaI と AvaII とで同様に二重消化し、約 650 bp の SmaI - AvaII を 1.5% アガロースゲル電気泳動により回収した。

【0088】

これら 2 つの断片を混合し、DNA ポリメラーゼによって付着末端を平滑末端とした後にコンピテントな大腸菌 TG1 を形質転換し、形質転換体を得た。50 μg/mL のアンピシリンを含む LB 寒天培地上でこの形質転換体を生育させ、形成されたコロニーより上述のようにしてプラスミドを得た。このプラスミドを SmaI で再び消化し、切断されたものを選択してプラスミド pNZ98 を得た。 30

【0089】

(3) 上記 (2) で構築した pNZ98 から、NDV の F 遺伝子を含む約 1.8 kbp の BamHI - SacI 断片を切り出し、pUCRSV - pA の BamHI - SacI 部位に実施例 2 に記載したようにして挿入し、pNZ98RSV3' を構築した。

また、pNZ98 を PstI で切断したのち、BamHI にて部分消化を行い、125 bp の断片を回収した。 40

【0090】

この回収した断片と pNZ98RSV3' に含まれる PstI - BamHI 断片 75 bp と交換して、pNZ98RSVpA を構築した。

実施例 5 で構築した pRSV の MluI - SacI 切断 2,892 bp 断片と、pNZ98RSVpA の NDV の F 遺伝子を含む MluI - SacI 切断 2,262 bp 断片をライゲーションすることによって、pRSV - F を構築した。

【0091】

(実施例 8) pCMV - VP2S (Okayama) の構築

(1) pCMV / MCS の構築

実施例6で構築したpCMV-HN(BglI⁺)のBamHI-KpnI部位に、pBluescript SK+のBamHI-KpnI断片62bpを実施例2に記載したように挿入し、pCMV/MCSを構築した。

【0092】

(2) pCMV/MCS pAの構築

これとは別に、実施例7と同様に、pBK-RSV(STRATAGENE社)をテンプレートとして、プライマー15(配列番号20)とプライマー16(配列番号21)とを用いて、実施例2と同様にPCRを行い、SV40のpA付加シグナルを持つ断片を作製した。

このPCRで増幅した断片をApaIとKpnIとで二重消化して、pCMV/MCSのApaI-KpnI部位に実施例2に記載したように挿入することにより、pCMV/MCS pAを構築した。

10

【0093】

(3) pCMV-VP2Sの構築

さらに、IBDV野分株岡山株より、常法によりRNAを抽出し、リバーストランスクリプターゼとcDNA合成キット(宝酒造製)とを用いてcDNAを作製した。

このcDNAをテンプレートとして、VP2に相当する領域を特開昭62-503006号公報に記載された遺伝子配列を元にして、プライマー17(配列番号22)とプライマー18(配列番号23)とを設計した。

【0094】

これら2つのプライマーを用いて実施例2と同様にPCRを行うことによってIBDVのVP2に相当する領域を取得した。

20

これとは別に、pCMV/MCS pAをHindIIIで部分消化し、ついでSalIで部分消化して3,687塩基対の断片を得た。上記のPCRによって取得したIBDVの断片をHindIIIとSalIとで二重消化し、これを3,687塩基対の断片に実施例2に記載したようにして挿入し、pCMV-VP2S(Okayama)を構築した。

【0095】

(実施例9) pUC18Xlacの構築

lacZのBamHI-SmaI断片(Yanagidaら、J. Virol., 66:1402-1408(1992))を、実施例4で構築したpU18XGのBamHI-SmaI部位に実施例2に記載したようにして挿入し、pUC18Xlacを構築した。

30

【0096】

(実施例10) pNZ45/46RSVlacおよびpNZ44/45RSVlacの構築

(1) pNZ45/46RSVlacの構築

実施例2で構築したpNZ45/46SfiのSfiI部位に、実施例5で構築したRSVプロモーターを含むpRSVのBglI断片を実施例2に記載したように挿入して、pNZ45/46RSVを構築した。

このpNZ45/46RSVのSfiI部位に、実施例9で構築したlacZを含むpUC18XlacのBglI断片を実施例2に記載したように挿入して、pNZ45/46RSVlacを構築した。

40

【0097】

(2) pNZ44/45RSVlacの構築

同様に、実施例3で構築したpNZ44/45SfiのSfiI部位に、実施例5で構築したRSVプロモーターを含むpRSVのBglI断片を挿入して、pNZ45/46RSVを構築した。このpNZ44/45RSVのSfiI部位に、実施例9で構築したlacZを含むpUC18XlacのBglI断片を実施例2に記載したように挿入して、pNZ44/45RSVlacを構築した。

【0098】

50

(実施例11) pNZ45/46VP2SおよびpNZ44/45VP2Sの構築

(1) pNZ45/46VP2S

実施例10で構築したpNZ45/46RSVlacのSfiI部位に、実施例8で構築したIBDVのVP2遺伝子を含むpCMV-VP2S(Okayama)のBglI断片を実施例2に記載したように挿入して、pNZ45/46VP2Sを構築した。

【0099】

(2) pNZ44/45VP2S

同様に、実施例10で構築したpNZ44/45RSVlacのSfiI部位に、実施例8で構築したIBDVのVP2遺伝子を含むpCMV-VP2S(Okayama)のBglI断片を実施例2に記載したように挿入して、pNZ44/45VP2Sを構築した

10

【0100】

(実施例12) pNZ45/46HNFおよびpNZ44/45HNFの構築

(1) pNZ45/46HNFの構築

実施例10で構築したpNZ45/46RSVlacのSfiI部位に、実施例6で構築したNDVのHN遺伝子を含むpCMV-HN(BglI⁻)のBglI断片を実施例2に記載したようにして挿入し、pNZ45/46HNを構築した。さらにpNZ45/46HNのSfiI部位に、実施例7で構築したNDVのF遺伝子を含むpRSV-FのBglI断片を挿入して、pNZ45/46HNFを構築した。

【0101】

(2) pNZ44/45HNFの構築

同様に、実施例10で構築したpNZ44/45RSVlacのSfiI部位に、実施例6で構築したNDVのHN遺伝子を含むpCMV-HN(BglI⁻)のBglI断片を挿入して、pNZ44/45HNを構築した。さらにpNZ44/45HNのSfiI部位に、実施例7で構築したNDVのF遺伝子を含むpRSV-FのBglI断片を挿入して、pNZ44/45HNFを構築した。

20

【0102】

(実施例13) pNZ45/46HNF-VP2SおよびpNZ44/45VP2S-HNFの構築

(1) pNZ45/46HNF-VP2Sの構築

実施例12で構築したpNZ45/46HNFのSfiI部位に、実施例8で構築したIBDVのVP2遺伝子を含むpCMV-VP2S(Okayama)のBglI断片を挿入して、pNZ45/46HNF-VP2Sを構築した。

30

【0103】

(2) pNZ44/45VP2S-HNFの構築

実施例11で構築したpNZ44/45VP2SのSfiI部位に、実施例6で構築したNDVのHN遺伝子を含むpCMV-HN(BglI⁻)のBglI断片を挿入して、pNZ44/45VP2S-HNFを構築した。さらにpNZ44/45VP2S-HNFのSfiI部位に、実施例7で構築したNDVのF遺伝子を含むpRSV-FのBglI断片を挿入して、pNZ44/45VP2S-HNFを構築した。

40

【0104】

(実施例14) 組み換えHVTの純化

トリプシンではがした単層のCEFを、SalineG(0.14M塩化ナトリウム、0.5mM塩化カリウム、1.1mMリン酸一水素二ナトリウム、1.5mMリン酸二水素一ナトリウム、0.5mM塩化マグネシウム・6水和物、0.011%グルコース)に懸濁し、細胞懸濁液を調製した。このた細胞懸濁液(2×10^7 個)に、実施例11、12および13で作製した組み換え用プラスミドpNZ44/45VP2S、pNZ44/45HNF、pNZ45/46VP2S、pNZ45/46HNF、pNZ44/45VP2S-HNF、pNZ45/46HNF-VP2Sをそれぞれ40μgと、実施例1で調製したHVTのDNAを100μgずつ混合した。

50

【0105】

この溶液を室温にて10分間放置した後、室温にてジーンパルサー（Bio-Rad社製）を用いて、 3.0 kV cm^{-1} 、 0.4 msec 、 25 の条件下でエレクトロポレーションした。

プラスミド及びHVTのDNAを導入した細胞を、その後9cm径の培養用ディッシュ（Falcon社製）にまき、 37 にてHVT特有のプラークが形成されるまで約4日～5日間培養した。

【0106】

プラークが形成された細胞を1%トリプシンではがし、同様にトリプシンではがしたCEF（ 2×10^7 個）の細胞と混合し、培養用96ウェル平底マルチプレート（Falcon社製）10枚に限界希釈した。これらのプレートを、 37 で各ウェルにHVT特有のプラークが形成されるまで、さらに、約4日～5日間培養した。ついで、各プレートの半数のウェルにガラクトシダーゼの発色基質であるブルオガル（Blugal: Gibco社製） $100 \mu\text{g/ml}$ 及び0.8%寒天を含むCEF培養用培地を $100 \mu\text{l}$ /wellずつ加え、 37 において約4時間インキュベートした。

【0107】

その後、各ウェルの青プラーク数を数え、最も青プラーク数の多かったプレートを選択し、任意の20ウェルに1%トリプシンを加えて組み換えHVT感染細胞を含むCEFをそれぞれ回収し、 1×10^6 個の細胞と混合し、それぞれに培養用96ウェル平底マルチプレートに播いた。

培養用96ウェル平底マルチプレートから培養用96ウェル平底マルチプレートに一回継代する行程を一回のスクリーニングとしては、全ウェルが青プラークになるまで繰り返し、ブルオガルを加えたときに全プラークが青変するまで繰り返し、ウイルスを純化した。通常は、ほぼ5～10回のスクリーニングで純化できる。

【0108】

9cm径の培養用ディッシュ上で感染細胞を増殖させたのち、16cm径の培養用ディッシュで感染細胞をさらに増殖させ、組み換えHVTの力価を測定したところ、組み換えHVTの力価は $1 \sim 6 \times 10^5 \text{ TCID}_{50}$ であった。

各組み換え用プラスミドから作製された組み換えHVTを以下の表1ように呼ぶこととした。

【0109】

【表1】

表 1

組み換え用プラスミドの名称	組み換えHVTの名称
pNZ44/45VP2S	HF002
pNZ45/46VP2S	HF003
pNZ44/45HNF	HF004
pNZ45/46HNF	HF005
pNZ44/45HNF-VP2S	HF006
pNZ45/46HNF-VP2S	HF007

【0110】

（実施例15） サザンハイブリダイゼーション

実施例14で調製した組み換えウイルスDNA（HF003, HF004）を実施例1のHVT-DNA抽出方法と同じ方法で抽出した。

得られた組み換えウイルスDNA（HF003, HF004）、その組み換え用プラスミド（pNZ45/46VP2S、pNZ44/45HNF）、及び親株ウイルスDNAを、BamHIで消化し、これらを0.8%アガロース電気泳動に供し、サザンプロットハイブリダイゼーションとオートラジオグラフィーで分析した。

【0111】

使用したプローブは、pNZ45/46VP2SまたはpNZ44/45HNFをEco

10

20

30

40

50

R Iで消化した断片をマルチプライムラベリングシステム（アマシャム社製）で、³²P 標識したプローブDNAである。

その結果、プローブDNAと相同な配列が組み換えHVTにも存在することが判明した。

【0112】

（実施例16） 組み換えHVT感染細胞での外来抗原の発現確認（蛍光抗体法）
組織培養用チャンバースライド上で、上記組み換えHVT感染細胞をCEFとともに37でブランクが出現するまで培養し、冷アセトンで固定した。

【0113】

発現した抗原を検出するために、一次抗体抗体として以下のものを用いた。 - ガラクトシダーゼの検出には、抗ガラクトシダーゼウサギ抗血清（ポリクローナル抗体：O r g a n o n T e k n i c a N . V . 社製）、NDV-HNタンパク質及びFタンパク質の検出には、NDVワクチン免疫鶏血清を、それぞれ500倍にPBSで希釈して用いた。IBDV-VP2タンパク質の検出には、抗VP-2モノクローナル抗体GK-5（Y a m a g u c h i T . , e t a l . , A v i a n D i s . , 40:501-509（1996））をPBSで100倍に希釈して用いた。

10

【0114】

標識抗体としては、FITC標識抗ニワトリIgG抗体、FITC標識抗マウスIgG抗体、FITC標識抗ウサギIgG抗体（いずれもハーランセララボ社製）を、それぞれ使用時にPBSで100倍に希釈した。

上記の抗体を含む各溶液を冷アセトンで固定したチャンバースライド上の細胞と接触させ、室温100%湿度で約一時間放置し、PBSで三回洗浄した。この後、FITC結合抗鶏イムノグロブリンまたは抗マウスIgGの希釈液とともに、約一時間、室温にて反応させた。その後、PBSで三回洗浄し、蛍光励起波長光（493.5nm）下で顕微鏡観察して反応性を調べた。

20

【0115】

対照ウイルスとしてHVT親株FC-126を感染させ、この親株ウイルスを感染させた細胞を対照細胞として使用した。結果を表2に示した。

【0116】

【表2】

表2 一次抗体に対する反応性

30

感染ウイルス	抗HN Mab	抗F Mab	抗VP2 Mab	抗β-gal
HF002	-	-	+	+
HF003	-	-	+	+
HF004	+	+	-	+
HF005	+	+	-	+
HF006	+	+	+	+
HF007	+	+	+	+
FC126	-	-	-	-
非感染細胞	-	-	-	-

表中、Mabはモノクローナル抗体を表わす。 +:反応, -:反応せず

【0117】

NDV抗原遺伝子を組み込んだ組み換えHVTは抗NDVモノクローナル抗体と反応し、IBDV-VP2遺伝子を組み込んだ組み換えHVTは抗VP2モノクローナル抗体と反応した。

40

この結果から、各組み換えHVTは、挿入した遺伝子がコードするタンパク質を発現していることが確認された。

【0118】

（実施例17） 鶏ワクチンのNDVに対する効果実験（SPF鶏）
実施例14で得られた組み換えHVTのワクチンの効果を判定するためにワクチン効果実験を実施した。

各群10羽の試験用SPF鶏（Line M、日本生物科学研究所）に、表2に示す組み

50

換えHVTを接種した。陽性対照群にはNDVの市販の生ワクチンを接種し、陰性対照群は未接種とした。

【0119】

試験用SPF鶏が孵化したときに、各組み換えHVTを、鶏の背部皮下に 10^4 TCID₅₀となるように26Gの注射針をつかって接種した。陽性対照群に使用した市販のNDV生ワクチン(日本生物科学研究所)は、4日齢の雛に用法通り点眼接種した。

接種4週後に、各群の鶏に強毒NDVウイルス(Sato株)を 10^4 PFUとなるように右大腿部にチャレンジした。チャレンジ後約2週間までの鶏の生死及びNDVの発症の有無を観察し、生存率を指標として効果を判定した。

【0120】

NDVウイルスをチャレンジする前に各鶏から採血を行い、各鶏の血清中のNDVに対する赤血球凝集抑制抗体の検出を行った。測定は市販されているNDV赤血球凝集素(日本生物科学研究所)の使用説明書に従った。結果は表3に示した。

【0121】

【表3】

表3 組み換えHVTのNDV攻撃試験結果(その1)

接種ウイルス	生存鶏数/試験鶏数	生存率(%)
HF004	10/10	100
HF005	10/10	100
HF006	10/10	100
HF007	10/10	100
FC126	0/10	0
NDV市販ワクチン	10/10	100
非接種	0/10	0

【0122】

組み換えHVTを接種した鶏では、NDVのチャレンジに対して100%感染防御がなされた。HI抗体価はFC126接種鶏群と非接種鶏群で2倍以下という低い値であったのに対して、他の群では全鶏128倍から1024倍であった。

以上の結果から、各組み換えHVTによってNDVに対する感染防御能が接種鶏に付与されていることが明らかとなった。

【0123】

(実施例18) 鶏ワクチンのIBDVに対する効果実験(SPF鶏)

実施例14で得られた組み換えHVTのワクチン効果を判定するために、ワクチン効果実験を実施した。

各群10羽の試験用SPF鶏(Line M、日本生物科学研究所)に、HF003、および親株ウイルスであるFPVをそれぞれ接種した。陽性対照群にはIBDVの市販のワクチンを接種し、陰性対照群は非接種とした。

【0124】

試験用SPF鶏が孵化したときに、各組み換えHVTを、鶏の背部皮下に 10^4 TCID₅₀となるように26Gの注射針をつかって接種した。陽性対照群に使用した市販のNDV生ワクチン(北里研究所)は、16日齢の雛に用法通り点眼接種した。

【0125】

生ワクチン接種17日後に、各群の鶏に強毒IBDVウイルス(Okayama株)を $1.5 \times 10^3 \sim 8$ EID₅₀となるように経口でチャレンジした。チャレンジ後約3日での鶏の生死を観察した。その後生存した鶏を屠殺し、IBDVの発症の有無をファブリキウス嚢の病変形成状態を指標として効果を判定した。ファブリキウス嚢の病変形成状態は、出血(A)、嚢内チーズ様浸出物形成(B)、黄色病変(C)、ゼリー様浸出物形成(D)の4点で判定した。各病変スコアは、病変を形成した鶏羽数で表わし、スコア合計で接種ワクチンの効果を判定した。

結果を表4に示した。

【0126】

【表4】

表4 組み換えHVTのIBDV攻撃試験結果

接種ウイルス	生存鶏数	発症鶏	A	B	C	D	病変スコア
HF003	10/10	6/10	2/6	1/6	3/6	0/6	6
FPV	9/10	9/10	7/9	6/9	8/9	6/6	27
市販ワクチン	10/10	3/10	1/3	0/3	2/3	0/3	3
非接種	10/10	3/10	7/10	9/10	8/10	5/10	29

【0127】

組み換えHVTを接種した鶏では、IBDVのチャレンジに対して市販のワクチンとほぼ同等の感染防御能を示した。 10

この結果から、組み換えHVTの接種によってIBDVに対する感染防御能が付与されていることが示された。

【0128】

(実施例19) 鶏ワクチン効果実験(移行抗体保有鶏)

実施例14で得られた組み換えHVTが移行抗体を保有している鶏に対してもワクチン効果を発揮するかどうかについて、市販鶏に接種して調べた。

使用した鶏は、市販されている白色レグホン(Dekalb鶏、神奈川養鶏連合会)から生まれた初生雛である。HF004とHF006を実施例17と同様に背部皮下接種した。このとき同じロットの雛20羽から、心臓採血によって血液を採取し、血清を得た。移行抗体が完全になくなる8週後に実施例17と同様にNDVによるチャレンジを行い、生存率の有無で感染防御能を評価した。結果を表5に示した。 20

【0129】

【表5】

表5 組み換えHVTのNDV攻撃試験結果(その2)

接種ウイルス	生存鶏数/試験鶏数	生存率(%)	HI抗体価
HF004	19/20	95	16
HF006	18/20	90	15.5
FC126	0/20	0	<2
NDV市販ワクチン	14/19	74	8
非接種	0/20	0	<2

30

【0130】

なお、初生齢のHI抗体価は97であった(20羽の平均値)。

この結果から明らかなように、組み換えHVTを接種した群ではNDVのチャレンジに対してほぼ完璧なワクチン効果が示された。また、チャレンジ時のHI抗体価もFC126接種群(<2)や非接種群(<2)と比較して明らかに高い値を示した(16および15.5)。

【0131】

また、HF004とHF006の間ではHI抗体価に有意な差もなく、挿入抗原の多少に関わらず、鶏に対して有意な免疫効果を与えることが示された。 40

これらの結果から明らかなように、本明細書で示した組み換えHVTは、すべて挿入抗原遺伝子が由来する疾病の効果的なワクチンになった。そればかりでなく、移行抗体の影響を受けない。

【0132】

また、挿入抗原の多少に関わらず効果を発揮したことから、多価組み換えHVTワクチンとしての有用性が示された。

【0133】

【発明の効果】

本発明によれば、七面鳥ヘルペスウイルスゲノム中の非翻訳領域である遺伝子領域に外来遺伝子が挿入された組み換え七面鳥ヘルペスウイルスおよび当該組み換え七面鳥ヘルペス 50

ウイルスを含有するワクチンが提供される。

【 0 1 3 4 】

【 配列表 】

SEQUENCE LISTING

<110> NIPPON ZEON CO., LTD.

<120> Recombinant of Aves infectious Herpesviridae virus, and
recombinant vaccine using thereof 10

<130> P98-0561

<150> JP 97/271445

<151> 1997-10-03

20

<160> 23

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 1

ccccgaattc atggaagaaa ttcc

25

40

<210> 2

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 2

cgcgggcctt atggcctaaa acacacctct aacggttact

40

10

<210> 3

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 3

gcgcgcccaa taaggcctaaa acacagtaac cgttagaggt

40

20

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 4

30

40

ccccaagctt tcaagtgata ctgctgta

28

<210> 5

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 5

gcgcggccaa taaggccaac atcgggacgt acatcat

37

<210> 6

20

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

30

<400> 6

gcgcggcctt attggcctta aataccgctg ttggagtaaa

40

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 7

agctgcccc cggcaagct tgca 24

<210> 8

10

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

20

<400> 8

tcgacatttt tatgtac 17

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 9

aattcggccg gggggccag ct 22

40

<210> 10

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

10

<400> 10

ggcccccccg gccg

14

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 11

agcttgccaa taaggctgca

20

30

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

40

⟨400⟩ 12		
atggcccgcc ggctgaccgc	20	
⟨210⟩ 13		
⟨211⟩ 20		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		10
⟨220⟩		
⟨223⟩ Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA		
⟨400⟩ 13		
gcggtcagcc ggccggccat	20	
		20
⟨210⟩ 14		
⟨211⟩ 22		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		
⟨220⟩		
⟨223⟩ Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA		30
⟨400⟩ 14		
ggtaaactgc agacttggca gt	22	
⟨210⟩ 15		
⟨211⟩ 22		
⟨212⟩ DNA		40
⟨213⟩ Artificial Sequence		

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 15

actgcccaagt ctgcagttta cc 22

10

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

20

<400> 16

atggcccgcc atgcattatg cc 22

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

30

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 17

ggcataatgc atggcgggcc at 22

40

⟨210⟩ 18		
⟨211⟩ 21		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		
⟨220⟩		
⟨223⟩ Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA		10
⟨400⟩ 18		
cgggagctct aattgtttgt g	21	
⟨210⟩ 19		
⟨211⟩ 20		
⟨212⟩ DNA		20
⟨213⟩ Artificial Sequence		
⟨220⟩		
⟨223⟩ Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA		
⟨400⟩ 19		
cgggaattcg ctacaattt	20	30
⟨210⟩ 20		
⟨211⟩ 21		
⟨212⟩ DNA		
⟨213⟩ Artificial Sequence		
⟨220⟩		40
⟨223⟩ Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA		

<400> 20

cgggggccct aattgtttgt g

21

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 21

cgggggtaccg cttacaattt

20

20

<210> 22

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 22

gcaagcttgc gatgacgaac ctgc

24

<210> 23

<211> 25

40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 23

gcgtcgactc acctccttag ggccc

25

10

【 0 1 3 5 】

【 配列表フリーテキスト 】

配列番号 1 ~ 2 3 : 合成 DNA

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷		F I	
G 0 1 N 33/569		G 0 1 N 33/569	J
// C 0 7 K 14/03		C 0 7 K 14/03	
C 0 7 K 14/055		C 0 7 K 14/055	
(C 1 2 N 7/00		C 1 2 N 7/00	
C 1 2 R 1:92)		C 1 2 R 1:92	

(56)参考文献 特開平09-020682(JP,A)
 特開平07-255488(JP,A)
 Avian Diseases, 1992年, 36, 858-70
 第45回 日本ウイルス学会総会発表要旨, 1997年 9月, p.131, 1d22
 Avian Diseases, 1993年, 37, 1032-40
 Virology, 1996年, 211, 481-90
 Journal of General Virology, 1993年, 74, 371-7
 Journal of General Virology, 1998年, 79, 1997-2001
 Current Research on Marek's Disease, 1996年, 408-13
 Vaccine, 1998年, 16 (5), 472-9
 Avian Diseases, 1996年, 40, 770-7
 Vaccine, 1996年, 14 (6), 469-77
 Avian Pathology, 1998年, 27, 565-73
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985年, 82, 694-8
 Journal of Virology, 1994年, 68 (12), 8239-53

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

C12N 15/00-90
 A61K 39/245-255
 C12N 1/00-7/08
 PubMed
 EUROPAT(QUESTEL)
 JICSTファイル(JOIS)
 BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)