(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2005-538343
(P2005-538343A)
(43)公表日　平成17年12月15日(2005.12.15)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
G01N 33/569	G01N 33/569	ZNAG	4B024
A61K 39/145	A61K 39/145		4C085
A61K 39/295	A61K 39/295		
A61P 31/16	A61P 31/16		
G01N 33/573	G01N 33/573	A	

審査請求 有　予備審査請求 有　（全 42 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2003-583471 (P2003-583471)
(86)(22)出願日　平成14年4月12日 (2002.4.12)
(85)翻訳文提出日　平成16年11月29日 (2004.11.29)
(86)国際出願番号　PCT/IT2002/000231
(87)国際公開番号　WO2003/086453
(87)国際公開日　平成15年10月23日 (2003.10.23)
(81)指定国　AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(71)出願人　504379017
イラリア・カプア
イタリア・１－３５０２７・ノヴェンタ・パドヴァナ・ヴィア・ティツィアーノ・ヴェチェリオ・１
(71)出願人　305039079
ステファノ・マランゴン
イタリア・１－３０１７４・メストレ・ヴィアル・ガリバルディ・７６
(71)出願人　305039091
ジョヴァンニ・カトリ
イタリア・１－３５１００・パドヴァ・ヴィア・アマティ・１
(74)代理人　100064908
弁理士　志賀　正武

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ノイラミニダーゼをコードする精製サブフラグメント、組み換えノイラミニダーゼ、及び動物予防におけるその使用

(57)【要約】
逆転写酵素ＲＴ－ＰＣＲを使用するポリメラーゼベースの増幅法によって得ることが可能な、流行性のサブタイプ（ＨｘＮｙ）を有するトリインフルエンザウイルスのゲノムから由来するノイラミニダーゼタンパク質ＮＡｙをコードするＲＮＡ配列の精製サブフラグメント。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
逆転写酵素ＲＴ－ＰＣＲを使用するポリメラーゼベースの増幅法によって得ることが可能な、流行性のサブタイプ（ＨｘＮｙ）を有するトリインフルエンザウイルスのゲノムから由来するノイラミニダーゼタンパク質ＮＡｙをコードするＲＮＡ配列の精製サブフラグメント。
【請求項２】
前記ノイラミニダーゼタンパク質ＮＡｙがＮＡ１によって表され、前記逆転写酵素ＲＴ-ＰＣＲが前記配列から由来するｃＤＮＡを重合し、前記ｃＤＮＡが以下の二つのポリヌクレオチド配列：正のプライマー5'- GCG CGC GGC CGC CAG GAG TTT AAA ATG AAT CCA AAT C -3'、及び負のプライマー5'- GCG CGC GGC CGC CTA CTT GTC AAT GGT GAA TGG C -3'に結合している、請求項１に記載の精製サブフラグメント。
【請求項３】
約1.4ｋｂの長さを有する、請求項１に記載の精製サブフラグメント。
【請求項４】
請求項１から３のいずれか一項に記載のサブフラグメントを含むプラスミド。
【請求項５】
特に流行性のサブタイプ（ＨｘＮｙ）を有するトリインフルエンザによって誘導される抗ＮＡｙ抗体の検出のための試験に対する抗原マーカーとしての使用のための、ノイラミニダーゼタンパク質ＮＡｙの発現方法であって、前記タンパク質をコードするｃＤＮＡのバキュロウイルスベクターにおける発現工程を含む方法。
【請求項６】
大腸菌細胞における前記バキュロウイルスベクターのクローニング工程；
前記バキュロウイルスベクターによる、昆虫細胞、特にTrichoplusia niの感染工程
を含む、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記バキュロウイルスベクターにおける発現工程が、発現システムBac-to-Bac(登録商標)において生じる、請求項５に記載の方法。
【請求項８】
前記発現されるノイラミニダーゼタンパク質ＮＡｙが請求項１または２に記載のサブフラグメントから由来できる、請求項５に記載の方法。
【請求項９】
前記サブフラグメントが、制限酵素ＮｏｔＩで切断され、前記制限酵素ＮｏｔＩで切断されたドナープラスミドpFast-Bacに結合され、コンピテントな大腸菌ＤＨ５αコンピテントセルにクローン化される、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
前記方法から由来し、前記バキュロウイルスプラスミドを含む大腸菌ＤＨ１０Ｂａｃ細胞がpFast-Bacでトランスフォームされ、前記プラスミドが前記細胞から単離され、Trichoplusia ni昆虫細胞のトランスフェクションのために使用される、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
請求項１または２に記載のサブフラグメントのバキュロウイルスベクターにおける発現により得ることが可能な組換え抗原。
【請求項１２】
前記組換えバキュロウイルスを人工的に取り込んでいる細胞性キャリアーを含む、請求項１１に記載の組換え抗原。
【請求項１３】
大腸菌細菌においてクローン化された前記組換えバキュロウイルスで感染された、昆虫細胞キャリアー、特にTrichoplusia niを含む、請求項１１に記載の組換え抗原。
【請求項１４】

前記サブフラグメントが請求項５から１０のいずれか一項に記載の発現方法によって発現できる、請求項１１から１３のいずれか一項に記載の組換え抗原。
【請求項１５】
前記抗原が前記サブフラグメントから得られた精製タンパク質からなる、請求項１１に記載の組換え抗原。
【請求項１６】
特異的な流行性株（ＨｘＮｙ）を有するトリインフルエンザウイルスによって誘導される抗ＮＡｙ抗体の検出のための試験における使用のための、ノイラミニダーゼタンパク質ＮＡｙをコードする少なくとも一つのゲノム配列を有する組換え抗原。
【請求項１７】
前記検出試験が、少なくとも一部が、同じサブタイプのウイルスヘモアグルチニンＨａｘ及び異なるサブタイプのノイラミニダーゼＮＡｙによって特徴付けられる異種ワクチンによるワクチン化を受けている動物の群から選択される動物の生物学的な流体に対して実施される、請求項１６に記載の組換え抗原。
【請求項１８】
前記ゲノム配列が請求項１または２に記載のサブフラグメントのバキュロウイルスにおける発現によって得ることができる、請求項１６または１７に記載の組換え抗原。
【請求項１９】
ノイラミニダーゼタンパク質ＮＡｙをコードする前記ゲノム配列が請求項５から１０のいずれか一項記載の発現方法によって発現できる、請求項１６または１７に記載の組換え抗原。
【請求項２０】
特異的な流行性株（ＨｘＮｙ）でのトリインフルエンザウイルス感染に対する陽性を検出するための診断方法であって、
－　ノイラミニダーゼタンパク質（ＮＡｙ）をコードする少なくとも一つのゲノム配列を有する抗原を準備する工程；
－　試験される動物の生物学的な流体の標本を前記抗原と接触させる工程；
－　陽性の検出試験によって抗原－抗体反応を明らかにする工程
を含む方法。
【請求項２１】
陽性の検出のための前記試験が免疫蛍光試験または免疫ペルオキシダーゼ試験である、請求項２０に記載の診断方法。
【請求項２２】
陽性の検出のための前記試験がＥＬＩＳＡ試験である、請求項２０に記載の診断方法。
【請求項２３】
陽性の検出のための前記試験が吸着された前記抗原を有する不活性な支持体によって、フィールドで実施されるように適応された発色試験である、請求項２０に記載の診断方法。
【請求項２４】
特異的な流行性株ＨｘＮｙでのトリインフルエンザウイルス感染に対するワクチン化方法であって、
－　同じサブタイプのウイルスヘモアグルチニンＨａｘ及び異なるサブタイプのノイラミニダーゼＮａｚによって特徴づけされる異種ワクチンを準備する工程；
－　感染の危険のある集団から選択される少なくとも一つの群の動物に前記ワクチンを投与する工程；
－　ノイラミニダーゼタンパク質（ＮＡｙ）をコードする少なくとも一つのゲノム配列を有する抗原を準備する工程；前記動物集団に含まれる動物の身体から生物学的な流体を採取する工程；陽性の検出試験によって抗原－抗体反応を明らかにする工程；によって、前記トリインフルエンザのウイルス感染に対する陽性を検出する工程
を含む方法。

【請求項２５】
前記検出工程が請求項２０から２３のいずれか一項に記載の診断方法によって得られる、請求項２４に記載のワクチン化方法。
【請求項２６】
前記抗原が請求項１１から１５のいずれか一項によって得られる、請求項２４に記載のワクチン化方法。
【請求項２７】
前記ワクチンが天然のウイルスを不活性化することによって得られる天然のワクチンである、請求項２４に記載のワクチン化方法。
【請求項２８】
流行性サブタイプ（ＨｘＮｙ）でのトリインフルエンザウイルス感染に対する陽性を、動物集団に対して検出するための試験用の診断キットであって、
－　不活性な材料の固体の支持体；
－　特異的なトリインフルエンザウイルス株（ＨｘＮｙ）のものと比較して実質的に変性されていない状態で、ノイラミニダーゼタンパク質ＮＡｙをコードする少なくとも一つのゲノム配列を有する抗原であって、前記固体の支持体に会合している抗原；
－　動物の生物学的な流体に含まれる抗ＮＡｙ抗体の存在下で、感染に対する陽性を発色的に明らかにするように適合された試薬
を含む診断キット。
【請求項２９】
前記生物学的な流体が感染の危険のある動物の集団から由来し、その少なくとも一つの群は同じサブタイプのウイルスヘモアグルチニンＨａｘと異なるサブタイプのノイラミニダーゼＮａｚによって特徴づけされる異種ワクチンで処理されており、いずれの場合でも感染個体の他の個体からの識別を確立する、請求項２８に記載の診断キット。
【請求項３０】
前記抗原が請求項１１から１５のいずれか一項によって得られる、請求項２８に記載の診断キット。
【請求項３１】
前記支持体がラテックススフェア、プラスチック支持体を含む群から選択される、請求項２８に記載の診断キット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、高い及び低い病原性のインフルエンザの流行が広がることを制御及び防止するために採用できる、動物予防作用の分野に関する。
【０００２】
より詳細には、本発明の主題は、特に異種ウイルス株で調製されているワクチン化によって免疫化されている非感染動物由来のインフルエンザ疾患を集約している動物の効果的な識別による、トリインフルエンザの流行を制御するための鳥類飼育の分野で有利に使用されるようにデザインされる。その結果本発明は、異種ウイルス株でワクチン化されている動物の集団において、ウイルス感染の進化をモニターすることを可能にする。
【０００３】
この目的のため、本発明の課題は、ウイルス起源のノイラミニダーゼＮＡｙタンパク質、特にＮＡ１サブタイプをコードするゲノム配列を有する精製サブフラグメント；そのようなゲノム配列によってコードされ、感染マーカーとしてインフルエンザ感染の過程で生産される抗体を認識するために使用できる組換え抗原；前記組換え抗原の発現方法；特異的なインフルエンザ感染ＨｘＮｙの抗ＮＡ抗体の検出方法、特にワクチン化した動物からの感染動物の識別方法；ワクチン化した動物のから感染個体の識別で、インフルエンザの流行の発達をしっかりとした制御下に維持することを特に企図したワクチン化方法；並びにそのような検出及び識別を可能にする容易に使用できるツールとして使用できる診断キ

ットである。
【背景技術】
【０００４】
トリインフルエンザ（ＡＩ）が鳥類で非常に感染性の疾患であり、鳥類飼育者にかなりの経済的損害を引き起こし得ることは周知である。
【０００５】
その結果、鳥類飼育の分野では、並びに免疫学的に規格化された生物内では、高度に病原性の形態（ＨＰＡＩ）であれ、軽度に病原性の形態（ＬＰＡＩ）であれ、トリインフルエンザの流行を制御し防止するための有効な予防上のストラテジーを開発する必要性が強く理解されている。
【０００６】
より詳細には、インフルエンザウイルスは、ウイルスが保有する抗原群によって、各種のＡ、Ｂ、Ｃ類型に分類可能であることが知られている。Ａ、Ｂ、Ｃ型のインフルエンザウイルスは、ウイルスキャップシド（ＮＰ）及びマトリックス（Ｍ）タンパク質で見出せる抗原の差異に基づいて、互いに識別可能である。特に、Ａ型インフルエンザウイルスは、ヘモアグルチニン（ＨＡ）及びノイラミニダーゼ（ＮＡ）分子の抗原差に基づいて、サブタイプにさらに分類できる。現在では、ＮＡ１からＮＡ９と示されている９のサブタイプのノイラミニダーゼタンパク質と、ＨＡ１からＨＡ１５と示されている１５の異なるサブタイプの血清ヘモアグルチニンＨＡタンパク質が知られており、通常それぞれＨ１からＨ１５と示される１５の関連するウイルスサブタイプが知られている。鳥類では、いずれかのＨＡ及びＮＡサブタイプを有するウイルスが単離できる。
【０００７】
ＨＡは、約５６０アミノ酸を含み、全ウイルスタンパク質の２５％を占めるウイルス表面グリコプロテインである。それは主に、宿主細胞へのウイルス粒子の付着と、感染の初段階における宿主細胞への浸透に関与している。ウイルスタンパク質の中でヘモアグルチニンは、翻訳後再整列に最も重要なものである。その合成が完成した後、当該分子は宿主細胞のエキソサイトーシス経路に入り、その過程でＨＡはホールディングし、トリマーにアセンブルし、グリコシル化を受ける。最後にそれは二つのサブユニットＨ１及びＨ２に切断される；この切断は、分子の活性化、及びビリオンによる感染能力の獲得に重要な工程である。
【０００８】
実際に、塩基性アミノ酸残基に関する切断部位の各種の組成が、全くではないがほとんど局在しない感染症状を生ずるＡＩウイルスの能力に翻訳され、またはその逆も然りであり、多くの鳥類飼育種に対する致死的な結末を有する普遍化した感染が生ずる。それ故、この事実が、インフルエンザに生物親和性を与え、宿主特異性を与え、並びにウイルスの病原性を与えることが提案されている。ウイルスの病原性に関して言えば、複数の塩基部位のＨＡを有する株では、Ｈ０分子を切断するプロテアーゼが見出され、かくしていくつかの細胞タイプにおける活性形態Ｈ１及びＨ２では、感染性ウイルス粒子の甚大な生産を有する複数の感染サイクルを生じ、短期間で全ての地域に感染の普遍化を引き起こす（ＨＰＡＩ株）。その結果感染は、非常に高い普遍性で、急性から超急性の過程を有することが分かるであろう。
【０００９】
ノイラミニダーゼ（ＮＡ）は、インフルエンザＡウイルスの第二の膜グリコプロテインである。それは、４１３アミノペプチドをコードする１４１３ヌクレオチドの長さの遺伝子(ウイルスＲＮＡのセグメント６)によってコードされている。このタンパク質は、少なくとも２の重要な機能を有する：シアル酸分子の間での切断によるウイルスヘモアグルチニンに対する細胞レセプターの破壊、及びヘモアグルチニン自身の破壊である。この態様では、新たに形成されたウイルス粒子が細胞膜に沿って蓄積することを防止し、並びに粘膜上に存在する粘膜を通じたウイルスの移動を促進することによる、ウイルス子孫の放出を容易にすることであろうと推定されている。さらにＮＡは、抗原性のバリエーションに

関与する重要な抗原決定基を占める。

【００１０】

インフルエンザウイルスによって感染されている宿主は、この抗原に対して生じる顕著な抗体応答を生ずるが、ヘモアグルチニンで生じているものとは異なり、これらの抗体は主に中和抗体ではなく、それら自身によって、新たな感染から宿主を保護することができないであろう。

【００１１】

上述の流行病の制御のストラテジーが、インフルエンザウイルスによって引き起こされる感染が生じた後のその検出におそらく基づくことは明らかである。それゆえ前記ストラテジーの範囲では、「場当たり的な」ワクチンのセットアップの可能性に対するウイルス株の同定、インフルエンザ感染の前及び最中の動物集団の免疫の度合いの定量、並びに流行の間のインフルエンザ感染を信頼できるように診断する可能性が特に重要である。

【００１２】

トリインフルエンザの重篤な流行現象の存在下にある、メキシコ及びパキスタンのような特定の国々で広く使用されている周知の制御ツールは、いまだワクチン化によって代表されている。

【００１３】

この方法は主に、ワクチン化動物の身体における免疫応答を誘導する、ワクチンに含まれている特定の内部または膜のウイルスタンパク質の能力を利用している。そのような応答は、対応する病理学的なインフルエンザの状態に関与する特定のウイルス株に対する抗体の生産を通じて表されている。

【００１４】

主に、インフルエンザ感染の予防のためのワクチンのセットアップを目的とする研究は、ほとんどヘモアグルチニンＨＡタンパク質の使用に絞られている。実際にこの後者は、宿主細胞内へのインフルエンザウイルスの吸着及び浸透に関与することにより、中和抗体の主な標的である。

【００１５】

ワクチンは従来型と操作型が存在することが周知である。

【００１６】

とりわけ第一のものは、天然の感染の結果として生産されたものと同一である生産抗体を、免疫化された被験者において刺激する、天然の、適切に不活性化された流行(フィールドの)ウイルスから調製される。それに対して、操作型である第二のものは、遺伝学的な操作法を通じて、研究室において複数の過程で誘導されたウイルスミューテーションを通じて得られたものであることが周知である。

【００１７】

ワクチン政策の応用の主要な問題点は、ワクチン化被験者(フィールドのウイルスと接触していない)と感染被験者の間の識別である。

【００１８】

トリインフルエンザの特定の場合では、これはOffice International des Epizotes (OIE)のリストＡに含まれており、このリストは非常に流行する動物の疾患を含み、血清のモニタリング及び撲滅計画を妨げる可能性を避けるため、それに対するワクチン化は欧州連合（ＥＵ）の各国において禁止されている(いずれの種類のワクチンも)。

【００１９】

従来のワクチンの使用を利用するトリインフルエンザの制御政策は、現在では多くの国で、その使用が莫大な流行人口の例学的な場合のみ許可されているように、実施においていくつかの制限が示されている。

【００２０】

実際、そのような既知のワクチン化法の主たる制限は、動物の集団内で生き残ったワクチン化ウイルス株の進化の可能性に対する有効な制御を実施する不十分な可能性に帰結し得る。実際問題として、ワクチン化は、健全性と臨床上の症状を防止する一方で、「健康

なキャリア」の疾患を要するするものではない。その結果、引き続き感染しているワクチン化被験者は、感染を含み根絶する標的とは反対に、感染の更なる拡散の供給源を表し得る。それ故、ワクチン化キャンペーンの範囲で、ワクチン化されているため血清陽性である被験者を、フィールドのウイルスと接触しているため血清陽性である被験者から識別可能であるように、流行病的な信頼性を知見することについて基本的な重要性が存在するものと解される。

【００２１】

同じ態様で、トリインフルエンザ制御政策内での操作型ワクチンの利用は、いくつかのハードルが存在している。

【００２２】

そのようなワクチンは、インフルエンザウイするの各種のサブタイプと関連する疾患と、さらに増大した有効性で闘うために考慮されている。それらは、適切なベクターによって運搬される特異的ウイルスタンパク質をコード可能であるゲノム配列を含むより洗練された組換えワクチンの生産のための方法を供与する進歩した遺伝学的操作法で開発される。

【００２３】

この種類のワクチンは、例えばＨ５及びＨ７ウイルスサブタイプに対する保護的免疫応答を生ずるために、鶏痘ウイルスに挿入され発現されるヘモアグルチニン抗原ＨＡ５またはＨＡ７の発現を提供する。

【００２４】

特定の状態における間接的な予防を通じて感染を制御することの問題点は、かくして避けられないものである。特に、サブタイプＨ５またはＨ７のインフルエンザウイルスによって引き起こされる感染は、1700万以上の鳥類が死んだ1984年のペンシルバニア、並びにより最近のメキシコ、パキスタン、及び北イタリア（1400万の鳥類が死滅）のように、世界の各地でかなりのニワトリ及び七面鳥飼育農場に対する壊滅的な影響で、最も重篤な高度に病原性のトリインフルエンザの発生に関与している。

【００２５】

遺伝学的に修飾された生存ウイルスから得られたワクチンは、環境への影響の観点から潜在的に危険であるため、欧州連合内では登録が困難である。

【００２６】

実際、動物集団に対する生存する遺伝学的に修飾されたウイルスの使用は、環境内へのウイルスの分散を引き起こし、そのような遺伝学的に変性された生物は、遺伝学的な観点から、制御不能な態様で高等生物または微生物と相互作用するであろう。

【００２７】

動物の流行性の疾患のより高い制御を可能にするために、「マーカーワクチン」の概念について近年その路が見出されており、それは特異的なタンパク質の存在、不存在、または突然変異を有する一方で、フィールドのウイルスに対する十分な交差保護能力を維持していることを特徴する操作型ワクチンである。

【００２８】

しかしながら現存するマーカーワクチンの利用は、現在のワクチン法に関する上述のものと同じ制限を示す。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【００２９】

この状況での結果、本発明の主たる目的は、インフルエンザウイルスを集約している動物を容易に認識し、ワクチン化の結果として血清陽性である個体から識別することを可能にするストラテジーを提供することにより、特に鳥類飼育の分野において、高い及び低い病原性のインフルエンザの流行の制御のための以前に知られている予防法と関連する制限及び欠点を解消することである。

【００３０】

本発明の特定の目的は、請求項１に記載の精製核酸フラグメント(サブフラグメント)を提供することである。

【００３１】

本発明の更なる目的は、マーカー抗原としてノイラミニダーゼタンパク質Ｎａｙの発現方法を提供することである。

【００３２】

本発明の更なる目的は、前記サブフラグメントの発現を通じて得ることができる組換え抗原を提供することである。

【００３３】

本発明の更なる目的は、前記組換え抗原に基づき、ワクチン化動物から感染動物を識別することが可能な診断試験を提供することである。

【００３４】

本発明のまた更なる目的は、トリインフルエンザによって引き起こされる感染に対する鳥類飼育動物のワクチン化方法を提供することである。

【００３５】

前記目的による、本発明の技術的特徴は、添付された特許請求の範囲の内容から明らかに見出すことができ、その利点は、添付された以下の図面を参考にして提供される、本発明の好ましいが排他的ではない実施態様に引き続き、以下の詳細な記載から明らかであろう。

【００３６】

図１は、Ｈ７Ｎ１陽性血清で実施された間接的免疫蛍光試験の結果を示す顕微鏡写真である。

【００３７】

図２は、Ｈ７Ｎ３陽性血清で実施された間接的免疫蛍光試験の結果を示す顕微鏡写真である。

【発明を実施するための最良の形態】

【００３８】

以下では本発明は、サブタイプＨ７Ｎ１を有するウイルス株によって引き起こされるＡ型トリインフルエンザの場合を特に参考にして詳細に記載されている。しかしながら、本発明は、いずれかのＨｘＮｙウイルス株[式中ｘ及びｙはそれぞれＨ及びＮのいずれかのサブタイプを示す]から由来する高い及び低い病原性のインフルエンザの流行の拡散を制御及び防止するためのストラテジーの発達のためにも採用できる。

【００３９】

本発明のアイデアは特に、ＨＡに関する限り考慮されるものと同じサブタイプであるが、ＮＡのサブタイプに関しては考慮されるものと異種であるインフルエンザ株を含む、容易に生産できて確立された有効性を有する低コストのワクチンである、不活性化された従来のワクチンを使用することである。

【００４０】

そのような選択は、ヘモアグルチニンのＨａｘタンパク質が抗体の生産に関与している知見、及びその結果いずれかのＨｘウイルスが保護抗体の合成を刺激できる一方で、異種ノイラミニダーゼが天然のマーカーとして機能するという知見に基づいている。

【００４１】

この態様では、動物をワクチン化し、同じヘモアグルチニンのサブタイプに属するインフルエンザウイルスによって引き起こされる感染に対しては保護できる一方で、特異的な抗ＮＡ抗体を測定することにより、ワクチン化動物を感染動物から識別可能である。

【００４２】

試験下にある特定の場合を参考にして、臨床上の保護が、同種のヘモアグルチニンを有するウイルス株からセットアップされているワクチンを通じて担保されるが、同種のノイラミニダーゼでは担保されないことが強調されるであろう。特定の場合、実験的試験は、ワクチンの構成成分としてウイルス株Ｈ７Ｎ３の使用で実施されている一方で、フィール

ドの(またはチャレンジ)ウイルスは、Ｈ７Ｎ１の抗原構成を示す。それ故、同種群のＨ７は臨床上の保護を提供する一方で、感染動物の検出は、それがタンパク質Ｎ１に対する抗体を生産するのに対し、ワクチン化動物は、感染されていなければ、Ｎ１ではなく異種ノイラミニダーゼＮ３に対する抗体を形成するという事実に基づく。

【００４３】

これを実施するために、一方では前記特異的な抗体抗ＮＡ(この場合Ｎ１)を検出する測定である診断方法を提供することが必要であり、他方ではトリインフルエンザの特定の株に対する満足な交差保護能力を維持する一方で、異なるノイラミニダーゼにより前記ウイルスから識別可能である天然のワクチンを準備することが必要である。

【００４４】

前記方法の調製は次いで、Ｎａｙタンパク質によって、または特定のトリインフルエンザウイルス株ＨｘＮｙのものと比較して、必須に非変性状態でノイラミニダーゼタンパク質Ｎａｙをコードするゲノム配列を含むベクターによって、表すことができる抗原をセットアップすることを必要とする。

【００４５】

トリインフルエンザＨ７Ｎ１の場合、本発明に係る抗原は、ウイルス株Ａ/ｔｙ/Ｉｔａｌｙ/４４２６/Ｖ００/Ｈ７Ｎ１ ＬＰＡＩからウイルスＲＮＡをまず抽出し、次いでノイラミニダーゼタンパク質ＮＡ１をコードするウイルスＲＮＡセグメントを増幅することによって調製される。

【００４６】

ＲＮＡサンプルは、温度安定性ポリメラーゼに対して必要とされるテンプレートを提供できるように、最初にｃＤＮＡに変換される。

【００４７】

それ故ＲＮＡセグメントは、逆転写酵素ＲＴにより最初に逆転写される。

【００４８】

この後第Ｖ工程を開始し、ＤＮＡ分子として興味ある配列の増幅下で、記載されたサイクルのＰＣＲ反応が引き続く。初期のＲＮＡテンプレートの量及び純度が、ＲＴ-ＰＣＲの成功を決定する因子である。

【００４９】

次いでＰＣＲは、特異的なｃＤＮＡ配列を、唯一この配列のみ増幅することを可能にする。それ故、本発明によれば、ノイラミニダーゼタンパク質ＮＡ１のｃＤＮＡ-ポリメラーゼのために、正のプライマー5'- GCG CGC GGC CGC CAG GAG TTT AAA ATG AAT CCA AAT C -3'(配列番号1)、及び負のプライマー5'- GCG CGC GGC CGC CTA CTT GTC AAT GGT GAA TGG C -3'(配列番号2)からなる、増幅される領域の境界配列を表す過剰な二つのオリゴヌクレオチドの存在下で、ｃＤＮＡを変性した後にアニールを引き起こさせる。そのようなプライマーの配列では、制限酵素ＮｏｔＩによって認識される特異的長さが挿入されている。前記プライマーで得られるであろう増幅産物を次いで、酵素ＮｏｔＩによって切断でき、かくして以下に記載される遺伝子のクローニング方法が可能となる。

【００５０】

モル過剰のオリゴヌクレオチドのために、ｃＤＮＡ鎖は、互いによりはむしろ、ほとんど排他的に二つのオリゴヌクレオチドとアニールするであろう。次いで第一の反応の産物は、新たな鎖の合成のためのテンプレートとして機能するであろう。増幅した二本鎖が、二つのオリゴヌクレオチドとよりはむしろ、互いにアニールする程度に多くなるまで、全サイクルを再び繰り返す。過剰な数の増幅サイクルの後、この飽和に到達する。実際、かくしてオリジナルのフラグメントは、数百万倍に増幅されるであろう。

【００５１】

前記ＲＮＡゲノム配列から由来するｃＤＮＡの増幅は、実験下の場合、好ましくは約1.4ｋｂの長さを有する精製サブフラグメント（ＲＴ-ＰＣＲによって得られた増幅産物）を有するようにもたらす。

【００５２】

この時点で、かくして得られた遺伝子のｃＤＮＡをゲル精製し、増幅の同一性を確認するためにシークエンスする。

【００５３】

ＮＡをコードする遺伝子のクローニング、及び組換えＮＡの生産は、診断方法における、特に以下に示されるような血清試験における使用のための、比較的大量の抗原を得ることを可能にする。

【００５４】

そのような抗原は、タンパク質Ｎ１によって表される場合では、興味ある単一のタンパク質のみを明らかに含み、交差反応の出現を引き起こすであろう他のウイルスタンパク質、特にＨＡタンパク質と組み合わせる可能性の問題を避ける。

【００５５】

さらに、前述の通り、この組換えタンパク質は、オリジナルのペプチドに対して特異的な特徴を有する抗原の可能性をほとんど変化することなく維持することが必要であり、前記特徴は、アミノ酸配列、分子の三次元構造、及び非常に重要なことにはグリコシル化によって必須に与えられる。

【００５６】

本発明の更なる特徴によれば、前記特徴を維持するタンパク質を得るための最も適切な発現システムは、発現ベクターとしてバキュロウイルス、即ち節足動物（昆虫類及び甲殻類）のみで複製可能なＤＮＡウイルスを使用して、昆虫細胞における真核生物システムであることが分かった。

【００５７】

これらのウイルスは、他の無脊椎動物、または植物または哺乳動物のような高等生物に関する証拠はないため、その安全性は十分に認識されており、これらの発現システムで抗原を生産するための研究室は、特別な安全基準を適用する必要がなく、これは実際的且つ経済的な観点の両者からさらに有利である。

【００５８】

それ故増幅された後、前記のｃＤＮＡサブフラグメントは有利には、以下に要約されるバキュロウイルスベクター発現法において、Bac-to-Bac(登録商標)(Invitrogen, LifeTechnologies)を使用して発現される。

【００５９】

ｃＤＮＡはＮｏｔＩで切断され、ＮｏｔＩ切断pFast-Bacドナープラスミドにライゲートされ、大腸菌ＤＨ５αコンピテントセルでクローン化される。正確な挿入物を含む大腸菌コロニーを選択し、組換えpFast-Bacをその後抽出する。バキュロウイルスシャトルベクター（バクミド）を含む大腸菌ＤＨ10Bac細胞を、pFast-Bacでトランスフォームし、組換えバクミドを単離し、Trichoplusia ni昆虫細胞(HighFive(登録商標)細胞、Invitrogen, LifeTechnologies)のトランスフェクションのために使用する。

【００６０】

組換えバキュロウイルス粒子を７２時間後に細胞カルチャーから回収し、プラークアッセイにより滴定する。興味ある遺伝子の発現を、ウエスタンブロットにより確認する。

【００６１】

それ故かくして得られた組換え抗原は、バキュロウイルスによって運搬され、昆虫細胞において発現されたゲノム配列の組換えグリコプロテインノイラミニダーゼＮＡ１によって表される。

【００６２】

以下に記載されるように、流行性株Ｈ７Ｎ１でのトリインフルエンザウイルス感染のための陽性の検出のための診断方法内で有利に使用されるように適応される。

【００６３】

本発明の更なる特徴によれば、抗原調製工程が完成した後、識別工程は、診断下のワクチン化動物の身体から得た生物学的な流体を採取するための工程、引き続き前記生物学的な流体と組換え抗原を接触させて、被験者が感染している場合に陽性を検出するために試

験による、抗原-抗体反応の検出工程を含む。

【００６４】

検出試験は有利には、間接的免疫蛍光、または免疫ペルオキシダーゼ、または間接的若しくは競合的なＥＬＩＳＡ試験、または沈降試験、またはいずれかの他の迅速な試験からなることができる。

【００６５】

迅速な試験として、各種の性質(通常酵素的またはさもなければ発色試験)の検出システムが、抗原-抗体反応の証拠を提供する試験を意味する。

【００６６】

そのような試験は通常、フィールドで使用可能であるような方法を構成し、いずれかの特別な装置を必要としない。

【００６７】

さらに本発明の目的は、以下に記載される例示的な場合を参照して、ウイルス株Ｈ７Ｎ１によるものであるトリインフルエンザに対するワクチン化方法である。

【００６８】

そのような方法は、天然のワクチン(即ち不活性化天然ウイルスから由来するワクチン)の調製のための初期の方法を含み、同一のサブタイプのウイルスヘモアグルチニンＨＡ７と、異なるサブタイプのノイラミニダーゼＮＡ３によって特徴づけされるため、前記ワクチンは異種である。

【００６９】

この種のワクチンは、免疫化作用を生じる一方で、それらから異なるノイラミニダーゼを識別する特異的なフィールドのウイルスに対して満足な交差保護能力を示すはずであることが必須である。

【００７０】

本発明の場合では、ウイルスＨ７Ｎ１に対する異種Ｈ７Ｎ３ワクチンの有効な交差保護作用を驚くべきことに観察した。

【実施例】

【００７１】

以下では、交差保護研究の驚くべき結果が記載され、ここでは不活性化異種株Ａ/ｃｋ/Ｐａｋｉｎｓｔａｎ/９５ Ｈ７Ｎ３を含むワクチンで免疫化された鳥類が、ＨＰＡＩ Ａ/ｔｙ/Ｉｔａｌｙ/４５８０/Ｖ９９ Ｈ７Ｎ１で感染された。

【００７２】

より詳細に言うと、単離された非常に病原性のフィールドウイルスＨＰＡＩ Ａ/ｔｙ/Ｉｔａｌｙ/４５８０/Ｖ９９(Ｈ７Ｎ１)をチャレンジウイルスとして使用し、0.05mlの眼滴の結膜点滴により、$10^{7.5}$ EID_{50}の投与量で投与した。使用されたワクチンは、0.3ml/投与量のＡ/ｃｋ/Ｐａｋｉｎｓｔａｎ/９５(Ｈ７Ｎ３)（Merialにより製造されたFluvac(登録商標)としての市販品）を含む不活性化オイルエマルションワクチンであった。

【００７３】

50の白色レグホンＳＰＦチキンを、チャレンジ実験のために使用し、5の実験群にランダムに分割した。それらを孵化し、別々に育て、水を与え、自由にえさを与えた。4及び5群のものを除く全ての鳥類を、6週齢でチャレンジした。

【００７４】

1群：6週齢でチャレンジした10の非ワクチン化コントロール鳥類；

【００７５】

2群：2及び4週齢で0.3mlのFluvac(登録商標)でs/cでワクチン化した13の鳥類；

【００７６】

3群：3週齢で0.3mlのFluvac(登録商標)でs/cでワクチン化した13の鳥類；

【００７７】

4群：11の非ワクチン化のチャレンジしないコントロール；

【００７８】

5群：チャレンジ後2時間で2群と共に配置した、5の非ワクチン化「標識」鳥類。標識鳥類の実験群を単離箱に入れ、ワクチン化鳥類からのウイルスの伝播を評価した。

【００７９】

ワクチン投与、及びチャレンジに引き続き、実験の継続時間を通じて臨床上の兆候と死亡率について鳥類を毎日観察した。チャレンジの前に、4のヘマグルチニンユニット（CEC, 1992）を使用するヘマグルチニン阻害試験によって、H7に対する抗体の検出のために全ての鳥類について羽の静脈から採血した。

【００８０】

シェディングのレベルの評価するため、2、4、7、10及び14日目で鳥類から生物学的物質を拭い取り、それを記載されたように（CEC, 1992）制限希釈（10^{-1}から10^{-7}）でウイルス単離物について加工した。

【００８１】

チャレンジウイルスによる標的器官の発色形成を調べるために、2及び3群から得た二つの臨床的に健康な鳥類をチャレンジ後2及び4日目で犠牲にし検体した。次いでその器官を選択し（脳、小脳、肝臓、脾臓、心臓、気管、肺、すい臓、腎臓、副腎、十二指腸、扁桃腺、及びFabricius嚢）、次いで記載されたように抗原検出のため組織病理学的及び免疫組織化学的（IHC)）観察のため加工した。胸の筋肉及び腿の筋肉のサンプルもこれらの鳥類から回収し、従来のウイルス単離法(CEC, 1992)によりワクチン化した健康な鳥類の筋肉中のウイルスの存在につき評価した。

【００８２】

同様な器官サンプルを、チャレンジ後に死んだ全ての鳥類から回収し、標的器官におけるウイルスの分布を評価した。さらに、プールした器官と肺、小腸と腎臓サンプル、及び胸と腿の筋肉から得られた標本を、実験の継続時間の間で死んだ全ての鳥類からウイルス単離（CEC, 1992）のために加工した。

【００８３】

血清サンプルをチャレンジ後2及び6週で生存している鳥類から回収し、ＨＩ試験によりＨ７の力価を評価した（CEC, 1992）。

【００８４】

チャレンジの前に実験鳥類で実施されたＨＩ試験の結果は、表１に提示されている。予測されるように、二度ワクチン化された鳥類は、一度ワクチン化されたものと比較して高い血清学的力価を示した。2及び3群では、それぞれ2/13及び5/13の鳥類が1：16より低い力価を有し、それは陽性のためのカットオフ限界と考慮された。4群に属する全ての鳥類（ワクチン化なし、チャレンジなし）は、ＨＩアッセイにおいて陰性の結果を示した。

【００８５】

4群に属する全ての鳥類が、疾患の臨床上の兆候を示さなかった。

【００８６】

全ての非ワクチン化チャレンジ鳥類(1群)は、感染後4日以内でＨＰＡＩの典型的な症状と病変を示した。プールした肺と器官から、及び全てのこれらの鳥類の小腸から、及び8/10の鳥類から改修された胸と腿の筋肉の両者のサンプルから、単離によってウイルスを回収した。チャレンジした非ワクチン化鳥類から回収された10/10の排出腔の拭き取り及び8/10の気管の拭き取りは、ml当たり10^{2}から10^{4}のEID_{50}の範囲の力価で感染後2日でのウイルス単離により陽性であった。2群の一匹の鳥類及び3群の一匹の鳥類は、それぞれチャレンジ後4及び6日で死亡した。これらの鳥類はそれぞれ、チャレンジの前に＜1：2及び1：4の血清学的力価を示した。2群の「in vivo」シェディングを評価するために単離箱に導入されている標識鳥類は、感染後8日目に死に始めた。実験の終了後2ヶ月まで行き続けた一匹の標識鳥類を除いて、全ての標識鳥類が13日目までに死亡した。この鳥類が臨床上の兆候を示すまで時間はかからず、Ｈ７への血清変換はなかった。

【００８７】

全ての死んだまたは犠牲にした鳥類から回収された器官、組織、及び排出腔と気管の拭き取りで実施されたウイルス学的調査の結果が表2及び3に提示されている。

【００８８】
データを調べると、ウイルスシェディングは、ml当たり10^4 EID_{50}の最大値でイノキュレーション後7日目までで、3群(一度ワクチン化した)から回収されたサンプルにおけるウイルス単離によって検出された。感染後4日目でチャレンジに引き続き死んだ血清陰性の鳥類を除いて、2群のいずれの鳥類からもウイルスは回収されなかった。
【００８９】
チャレンジ後2及び4日目で犠牲にされた臨床上健康なワクチン化鳥類から回収された筋肉サンプルのいずれからも、ウイルスは回収されなかった。
【００９０】
非ワクチン化鳥類に関する全てのコントロールは、トリインフルエンザに典型的な死後の組織病理学的な病変を示した。さらに、1及び5群（非ワクチン化コントロール及びin vivoシェディングのための標識）に属する鳥類の脳、小脳、肝臓、脾臓、心臓、気管、肺、すい臓、腎臓、副腎、十二指腸、扁桃腺、及びFabricius嚢において、ウイルス抗原が検出された。
【００９１】
最も強いＩＨＣ陽性を示した器官は、脳、腎臓、心臓、及びすい臓であった。
【００９２】
2及び3群に属する犠牲にされたワクチン化鳥類のいずれにおいても、ウイルス抗原は検出されなかった。対照的に、チャレンジ後4及び6日目で死んだ二匹の鳥類においては、ウイルス抗原が検出された。しかしながらこれらの鳥類では、ＩＨＣにおいて穏やか陽性のみが観察され、ウイルスの分布は、脳、心臓、腎臓、及びすい臓にいくつかの焦点で制限された。
【００９３】
チャレンジを生き抜いたワクチン化鳥類における血清学的調査の結果が表2に提示されている。幾何学的な平均ＨＩ力価（ＧＭＴ）は、二度ワクチン化された鳥類よりも一度ワクチン化された鳥類において有意に高かった。これはおそらく、チャレンジの前に低いＨＩ力価を有する鳥類（3群）において、チャレンジウイルスの高い度合いの複製の効果を表すであろう。
【００９４】
異種Ｈ７Ｎ３ワクチンは、使用されたワクチン化スキームのそれぞれにおいて93%の臨床上の保護レベルを誘導し、ＨＰＡＩ Ｈ７Ｎ１株Ａ/ｔｙ/Ｉｔａｌｙ/４５８０/Ｖ９９でのチャレンジの際に、ＳＰＦ(特異的病原体フリー)の鳥類におけるウイルス感染を予防した。さらに、シェディング感染した鳥類の数は、非ワクチン化コントロールと比較した場合、ワクチン化鳥類群において減少することが分かった。
【００９５】
この調査の結果は、鳥類におけるトリインフルエンザに対するワクチン化のトピックにアプローチする場合に頻繁に称する必須の事項の二つ、特にシェディングの減少と筋肉内の感染性ウイルスの存在に関する実験データを提供する。我々の経験は、非ワクチン化コントロールよりも低い度合いではあるがシェディングが生じ、特に二度ワクチン化した鳥類において、従来のウイルス学的方法によってはウイルスは検出されないが、ＳＰＦ標識の導入によって検出されるように、シェディングのレベルは低いことを確認した。臨床上健康なワクチン化鳥類におけるＩＨＣのいずれかの陽性の不存在は、ウイルス感染が確立しておらず、おそらく観察されたシェディングが、小腸及び気管における制限されたウイルス複製の結果であることを示唆している。同様に、臨床上健康なワクチン化鳥類の胸または腿の筋肉から単離されたウイルスは存在せず、これは前述の報告されたウイルス感染の不在を維持している。
【００９６】
トリインフルエンザに対するワクチン化政策に焦点を絞る主な目的は、臨床上の兆候及びウイルス感染から鳥類を保護することであり、環境に流出したウイルスの量を減少することである。

【００９７】
かくして完全に交差保護の結果が、使用されたワクチン化スキームの両者で異種ワクチンＨ７Ｎ３によって誘導された驚くべき保護を明らかに証明し、93%の保護指数を達成することが観察できる。
【００９８】
本発明の目的であるワクチン化ストラテジーは、血清学的陽性がワクチン化によってのみ誘導されたものか、フィールドのウイルスでの超感染が存在するのかを識別する可能性をも提供する。そのような識別は、フィールドウイルスのノイラミニダーゼタンパク質ＮＡ１を含むような前述の方法によって、抗原の調製及びその診断目的での使用を含む前述の診断方法により実施される。
【００９９】
この時点で、前記検出方法によれば、引き続きチャレンジにより、陽性の検出のための試験によって抗原-抗体反応を通じて陽性である可能性を指摘できるように、組換え抗原でそれをチャレンジすることによって、生物学的な流体は血清陽性の動物の個体の身体から採取される。
【０１００】
試験される生物学的な流体は例えば、少なくともワクチン化動物群の群を含む感染の危険のある動物集団から採取される。
【０１０１】
しかしながら有利には、基本として、全動物集団のワクチン化のために提供されるものが存在するであろう。
【０１０２】
より詳細に言うと、間接的免疫蛍光試験が検出試験として使用される場合、そのような試験は以下でｉＩＦＡと称されるが、抗原は好ましくは以下に特定されるように調製される。
【０１０３】
HighFive(登録商標)細胞を、チェンバースライド(250μl/ウェルの接種)または96穴ミクロウェルプレート(50μl/ウェルの接種)に、10%胎児ウシ血清及び1%抗生物質溶液を補ったTC-100培養培地で0.9-1×10^6細胞/mlの濃度で接種し、28℃で1時間インキュベートし、次いで2の感染の複数性（ＭＯＩ）で組換えバクミドで感染した。組換えＮ１タンパク質を発現する感染細胞を、28℃で48時間のインキュベーションの後アセトンで固定し、+4℃で4週間まで貯蔵した。
【０１０４】
試験される血清サンプルを-20℃で貯蔵し、ＰＢＳ、ｐＨ7.4で1：250に事前希釈した。50μlの事前希釈試験及びコントロール血清を二重のウェルに分散し、37℃で45分間インキュベートし、200μlのＰＢＳ中で5分間3回洗浄し、二次抗体としてＦＩＴＣ(フルオレセインイソチオシアナート）接合抗チキンＩｇＧイムノグロブリン、及びエバンスブルー(作業希釈1：500、ストック溶液0.5%)と37℃で45分インキュベートし、インキュベーション後、200μlのＰＢＳで5分間3回洗浄した。ウェルをカルボナートバッファー、ｐＨ9.6中の25μlグリセロールで積層し、カバースリップを同じバッファーでチェンバースライドに乗せ、ＵＶ顕微鏡下で読み取った。
【０１０５】
以下のコントロールを、各プレート/バッチのチェンバースライドで含んだ：実験的に感染したＳＰＦチキン（ＨＩ力価1：128）から得たＨ７Ｎ１陽性血清；実験的に感染した七面鳥（ＨＩ力価1：16）から得たＨ７Ｎ１陽性血清；ＳＰＦチキンから得た陰性血清；市販の七面鳥から得た陰性血清；Ｈ７Ｎ３ワクチン化ＳＰＦチキン（ＨＩ力価1：1024）から得たＨ７Ｎ３陽性血清；Ｈ７Ｎ３ワクチン化七面鳥（ＨＩ力価1：128）から得たＨ７Ｎ３陽性血清。全てのコントロール血清は、単離して孵化して飼育されたＳＰＦまたは市販の鳥類から得られた。
【０１０６】

合計で608の七面鳥のフィールドの血清を、試験を確認するために使用した。これらの中で107は天然で感染したＨ７Ｎ１動物であり（ＨＩ力価≧1：16）、140はＨ７陰性動物から得られ、そして361はＨ７Ｎ３ワクチン化鳥類から得られた（力価≧1：16）。ＨＩの結果とｉＦＡとの間の一致を統計学的分析(カッパ値)によって評価し、かくして相対的感度と特異性の測定が可能であった。

【０１０７】

コントロール血清で観察される蛍光に基づいて、サンプルを以下のように評価付けした：陽性サンプル＝細胞変性効果（ＣＰＥ）の焦点に対応する50-80%の単一層に制限された蛍光、蛍光は明るく、主に細胞膜の近接部に位置する(図1)；陰性サンプル＝蛍光の不存在、または全ての細胞区画に存在し、単一層の100%に存在する偽の黄色-緑色のバックグランド(図2)；疑わしいサンプル＝大多数の細胞の細胞膜上の粒状または青白い蛍光。

【０１０８】

試験の評価付けの結果は表4に存在している。実施された統計学的分析は0.93のカッパ値を示し、それは「ほぼ完全な一致」を示す。試験の相対的感度及び特異性は、それぞれ98.1%及び95.7%として計算された（$CI_{95\%}$＝92.4；99.1）

【０１０９】

Ｎ１-Ｎ３識別ｉＦＡ試験の開発と評価付けは、この試験がＨＩ試験とほぼ完全に一致して考慮できることを示す。相対的感度及び特異性のレベルは、Ｎ３ワクチン化鳥類からＮ１感染鳥類を識別する満足以上のものと考慮できる。

【０１１０】

前記記載のものとは異なって、前記検出方法は、特に間接的ＥＬＩＳＡ、競合的ＥＬＩＳＡ、免疫ペルオキシダーゼ、沈降試験、または他の迅速な試験のような比較的軽作業の検出試験の使用のために提供できる。

【０１１１】

間接的ＥＬＩＳＡの場合、組換えバキュロウイルス(またはいずれかの精製したそれから由来するタンパク質)である抗原を、カーボナート-バイカーボナートバッファー、ｐＨ9.6-9.8で4℃で一晩96穴ウェルプレートで吸着させる。次いで試験血清を連続的に所定の希釈でプレート中に分散し、37℃または室温で1から3時間インキュベートする。適切なバッファーでの洗浄後、抗種酵素接合体を分散し、次いでそれをインキュベートし、その後以前に記載されたように洗浄する。その後基質を加え、それは存在する場合ペルオキシダーゼの存在の証拠を提供することができるであろう。

【０１１２】

抗原と抗体の間の対応は、二次抗種抗体に結合した酵素複合体の活性のための発色反応において明らかである。

【０１１３】

この試験では、陽性サンプルは発色し、陰性サンプルは反対に無色であろう。

【０１１４】

競合的ＥＬＩＳＡの場合、組換えバキュロウイルス(またはいずれかの精製したそれから由来するタンパク質)である抗原を、カーボナート-バイカーボナートバッファー、ｐＨ9.6-9.8で4℃で一晩96穴ウェルプレートで吸着させる。抗原特異的であることを条件に、モノクローナルまたはポリクローナル血清を使用する。試験血清をプレートに分散し、インキュベーション工程と同時にまたはその後に適切な血清を所定の希釈で加える。適切なバッファーでの洗浄後、抗種酵素接合体を分散し、この場合それは適切な血清の酵素の証拠を提供するためのものであり、その後記載されたようにプレートをインキュベートして洗浄する。その後基質を加え、それは存在する場合ペルオキシダーゼの存在の証拠を提供することができるであろう。

【０１１５】

抗原と抗体の間の対応は、二次抗種抗体に結合した酵素複合体の活性のための発色反応において明らかである。

【０１１６】

この試験では、陽性サンプルは無色であり、陰性サンプルは反対に発色するであろう。

【０１１７】

免疫ペルオキシダーゼ試験は免疫蛍光試験と同様であり、二次抗体がフルオレセインの代わりにペルオキシダーゼに接合されている点で異なる；それゆえ読み取りは光学顕微鏡下で実施される。

【０１１８】

この場合では組換えバキュロウイルスで感染された細胞基質を固定し、その後適切に希釈された試験血清を各ウェルに分散させる。プレートを３７℃または室温で１から３時間インキュベートする。正しいバッファーで洗浄した後、抗種酵素接合体(ペルオキシダーゼ)を分散し、次いでそれをインキュベートし、その後以前に記載されたように洗浄する。その後基質を加え、それは抗原と抗体の間の相補性が存在することを条件に、ペルオキシダーゼの存在(存在すれば)を検出することを可能にする。

【０１１９】

陽性は感染細胞の特異的発色により明らかにされ、それは光学顕微鏡で視覚化できる。

【０１２０】

免疫沈降試験は、不活性支持体における、二つの可溶性成分、この場合試験血清と組換えノイラミニダーゼ含有抗原から肉眼で観察できる不溶性複合体の形成に基づく。

【０１２１】

迅速な試験の場合、各種の性質、通常酵素ベースのものの発色検出システムが、抗原-抗体反応の証拠を提供する。そのような試験は一般的に、フィールド上で使用可能であり、いずれかの特別な装置を必要としないような態様で構成される。

【０１２２】

この場合、一滴の試験サンプル(血清）を、抗原が吸着している不活性材料の支持体に加える。数分後、一滴の検出システムプラス基質を加える。不活性基質上の一つまたはいくつかの区切られた発色の染色により、陽性が示される。

【０１２３】

さらに有利には、本発明の更なる目的は、ワクチン化動物集団で発生した後の、感染の検出のための診断キットである。それは必須に、不活性材料の固体の支持体、動物の陽性をチェックするためのものに対応する特異的なトリインフルエンザウイルス株ＨｘＮｙのものと比較して、必須に非変性である状態のノイラミニダーゼタンパク質Ｎａｙをコードするサブフラグメントの発現から生ずる組換え抗原を含む。

【０１２４】

抗原は例えば、ラテックススフェアの固体の支持体上に吸着により固定化され、またはＥＬＩＳＡ試験で特に提供されるプラスチックの固体の支持体上に吸着される。

【０１２５】

動物の個体から抽出され、支持体の上部に添加された生物学的な流体に含まれる抗Ｎａｙ抗体の存在下で、ウイルス感染に対する陽性を発色的に際立たせるために適用される試薬の使用をも提供する。

【０１２６】

抗原生産は有利には、タンパク質ＮＡ１を参考にして詳細に以前に記載された実施例に従って実施できる。

【０１２７】

試験される生物学的な流体が例えば、同じサブタイプのウイルスヘモアグルチニンＨａｘと異なるサブタイプのノイラミニダーゼＮａｚ(ここでｚはｙとは異なるいずれかのノイラミニダーゼである)によって評価付けされる異種ワクチンでワクチン化されている動物集団の個体から採取される。かくしてセットアップされたキットは、いずれの場合でも、感染個体と他の血清陽性の個体の間の識別を確立することを可能にし、よってワクチン化による偽の陽性の結果の存在を防止する。

【０１２８】

本発明は、同じ群のヘモアグルチニンと異種ノイラミニダーゼを有する不活性化ワクチ

ンの使用が、一方で良好な臨床上の保護を得ることを可能にし、他方で感染被験者からワクチン化被験者の識別の可能性を提供するため、トリインフルエンザを制御するために驚くべき有効な解決策を与えるものである。

【０１２９】

それ故、そのようなストラテジーは、試験下でのここに開示された例示的な場合を超えて、各種のサブタイプによって引き起こされる感染の制御に適用でき、それによって公的な健康機関及び獣医が、感染した鳥類とワクチン化鳥類の間の識別による実際に感染された鳥類群を同定することを可能にし、それがウイルス疾患を撲滅する目的のいずれかの制御ストラテジーについての基礎を与えるものである。

【０１３０】

本発明で開示された制御ストラテジーは、このストラテジーが、ある時点で唯一のサブタイプが循環していることを条件に、世界中の全てのＨＰＡＩ及びＬＰＡＩ感染の両者の制御に適用できるであろうことを示唆している。

【０１３１】

【表１】

表１：ワクチン化に対する鳥類の血清学的応答

チャレンジの前の力価*

群	＜1:16	≧1:16	≧1:32	≧1:64	≧1:128	≧1:256	≧1:512	GMTlog$_0$
2 (二度ﾜｸﾁﾝ化)	2/13	11/13	10/13	7/13	4/13	2/13	1/13	45
3 (一度ﾜｸﾁﾝ化)	5/13	8/13	5/13	3/13	2/13	1/13	0/13	19

* 力価を有するＮ^0／ワクチン化のｎ^0

【０１３２】

【表２】

表２：Ａ/ｃｋ/Ｐａｋｉｓｔａｎ/９５（Ｈ７Ｎ３）ウイルスを含む不活性化ワクチンで免疫化され、Ａ/ｔｙ/Ｉｔａｌｙ/４５８０/Ｖ９９（Ｈ７Ｎ１）ウイルスでチャレンジされたワクチン化鳥類の血清学的応答及びウイルス単離試験

	GMT^log_{10}		ウイルス単離*					
群	２週 p.c.	６週 p.c.	小腸	肺＋気管支	腎臓	胸筋	腿筋	臨床上の兆候
２（二度ﾜｸﾁﾝ化）	108	75	1˙/5	1˙/5	1˙/5	1˙/5	1˙/5	1˙/13
３（一度ﾜｸﾁﾝ化）	152	210	0/5	1˙/5	1˙/5	0/5	0/5	1˙/13
コントロール	-	-	10/10	10/10	10/10	8/10	8/10	10/10

^ チャレンジ後のＨＩ試験における幾何学的平均力価

* 陽性チキンの数／分析チキンの数

˙ ＡＩの死亡

【０１３３】

【表３】

表３：Ａ/ｃｋ/Ｐａｋｉｓｔａｎ/９５（Ｈ７Ｎ３）ウイルスを含む不活性化ワクチンで免疫化され、Ａ/ｔｙ/Ｉｔａｌｙ/４５８０/Ｖ９９（Ｈ７Ｎ１）ウイルスでチャレンジされたコントロールとワクチン化鳥類の排出腔と気管の拭き取りから得られたウイルス単離アッセイの結果

	ウイルスの回収									
	気管の拭き取り					排出腔の拭き取り				
群	2日 p.c.	4日 p.c.	7日 p.c.	10日 p.c.	14日 p.c.	2日 p.c.	4日 p.c.	7日 p.c.	10日 p.c.	14日 p.c.
2 (二度ﾜｸﾁﾝ化)	1˙/13[a]	0/10	0/8	0/8	0/8	1˙/13	0/10	0/8	0/8	0/8
3 (一度ﾜｸﾁﾝ化)	1/13	3˙˙/11	0/8	0/8	0/8	1/13	2/11	2/8	0/8	0/8
コントロール	7/8	-	-	-	-	8/8	-	-	-	-

[a] 陽性チキンの数／分析チキンの数
˙ ＡＩの後の死亡
˙˙ ＡＩの死亡した一匹の鳥類を含む

【０１３４】
【表４】

表４：フィールドの血清に対するｉＩＦＡＴ評価付けの結果。
試験された七面鳥血清サンプルの総数：６０８

		iIFAT 陽性	iIFAT 陰性
H7N1 で天然で感染した動物から得た血清の数(HI 力価≧ 1:16)*	107	105	2
H7 陰性動物から得た血清の数	140	6	134
H7N3 ワクチン化動物から得た血清の数	361	18	342

【図１】

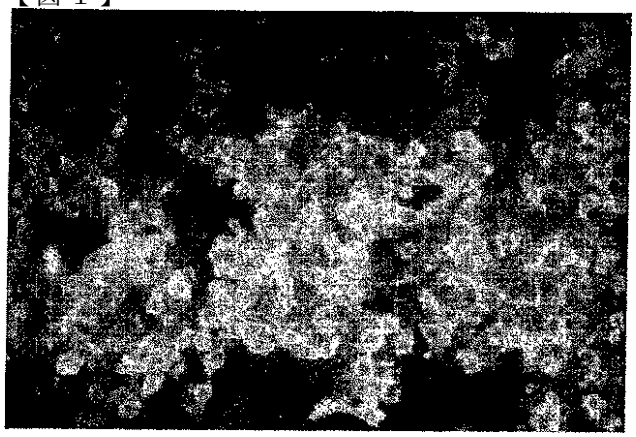


Fig. 1

【図２】



Fig. 2

【配列表】
2005538343000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成16年6月24日(2004.6.24)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
特異的な流行性株（ＨｘＮｙ）のトリインフルエンザウイルスでの感染を検出するための診断方法であって、
－　ノイラミニダーゼタンパク質（ＮＡｙ）のアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む組換え抗原を準備する工程；
－　試験される動物から得た生物学的な流体の標本と前記抗原を接触させる工程；
－　陽性検出試験によって抗原がそれに結合した抗ノイラミニダーゼ抗体を有するかを測定する工程；
を含む方法。
【請求項２】
前記抗原が流行性サブタイプ（ＨｘＮｙ）を有するトリインフルエンザウイルスのゲノムから由来するヌクレオチド配列によってコードされている、請求項１に記載の診断方法。
【請求項３】
前記抗原がバキュロウイルスベクターを使用する昆虫細胞における発現によって得るこ

とができる、請求項１または２に記載の診断方法。
【請求項４】
感染動物とワクチン化動物の間の識別が可能である、請求項１から３のいずれか一項に記載の診断方法。
【請求項５】
前記生物学的な流体の標本がトリインフルエンザに対してワクチン化されている動物から得たものである、請求項１から４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
前記検出試験が、少なくともそのいくらかが、同じサブタイプのウイルスヘマグルチニンＨａｘ及び異なるサブタイプのノイラミニダーゼＮａｙによって特徴づけされる異種ワクチンによるワクチン化を受けている動物の集団から得た生物学的な流体の標本に対して実施される、請求項１から５のいずれか一項に記載の診断方法。
【請求項７】
陽性の検出のための前記試験が免疫蛍光試験または免疫ペルオキシダーゼ試験である、請求項１から６のいずれか一項に記載の診断方法。
【請求項８】
陽性の検出のための前記試験がＥＬＩＳＡ試験である、請求項１から６のいずれか一項に記載の診断方法。
【請求項９】
陽性の検出のための前記試験が前記抗原が吸着している不活性な支持体によってフィールドで実施されるように適応した発色試験である、請求項１から６のいずれか一項に記載の診断方法。
【請求項１０】
特異的な流行性株ＨｘＮｙでのトリインフルエンザウイルス感染に対して動物をワクチン化する方法であって、
－　同じサブタイプのウイルスヘマグルチニンＨａｘ及び異なるサブタイプのノイラミニダーゼＮａｚによって特徴づけされる異種ワクチンを準備する工程；
－　感染の危険のある集団から選択される少なくとも一つの群の動物に前記ワクチンを投与する工程；
－　請求項１から９のいずれか一項に記載の診断方法を使用して、動物がウイルスに感染しているかを測定する工程
を含む方法。
【請求項１１】
前記ワクチンが天然のウイルスを不活性化することによって得られる天然のワクチンである、請求項１０に記載のワクチン化方法。
【請求項１２】
流行性サブタイプ（ＨｘＮｙ）を有するトリインフルエンザウイルスでの感染を検出するための診断キットであって、
－　不活性な材料の固体の支持体；
－　特異的なトリインフルエンザウイルス株（ＨｘＮｙ）のものと比較して実質的に変性されていない状態で、ノイラミニダーゼタンパク質ＮＡｙのアミノ酸配列またはそのフラグメントを含む組換え抗原であって、前記固体の支持体に会合している抗原；
－　動物の生物学的な流体に含まれる抗ＮＡｙ抗体の存在下で、感染に対する陽性を発色的に明らかにするように適合された試薬
を含む診断キット。
【請求項１３】
感染動物とワクチン化動物の間の識別が可能である、請求項１２に記載の診断キット。
【請求項１４】
前記支持体がラテックススフェア、プラスチック支持体を含む群から選択される、請求項１２または１３に記載の診断キット。

【手続補正書】
【提出日】平成17年6月2日(2005.6.2)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、高い及び低い病原性のインフルエンザの流行が広がることを制御及び防止するために採用できる、動物予防作用の分野に関する。
【０００２】
より詳細には、本発明の主題は、特に異種ウイルス株で調製されているワクチン化によって免疫化されている非感染動物由来のインフルエンザ疾患を集約している動物の効果的な識別による、トリインフルエンザの流行を制御するための鳥類飼育の分野で有利に使用されるようにデザインされる。その結果本発明は、異種ウイルス株でワクチン化されている動物の集団において、ウイルス感染の進化をモニターすることを可能にする。
【０００３】
この目的のため、本発明の課題は、ウイルス起源のノイラミニダーゼＮＡｙタンパク質、特にＮＡ１サブタイプをコードするゲノム配列を有する精製サブフラグメント；そのようなゲノム配列によってコードされ、感染マーカーとしてインフルエンザ感染の過程で生産される抗体を認識するために使用できる組換え抗原；前記組換え抗原の発現方法；特異的なインフルエンザ感染ＨｘＮｙの抗ＮＡ抗体の検出方法、特にワクチン化した動物からの感染動物の識別方法；ワクチン化した動物のから感染個体の識別で、インフルエンザの流行の発達をしっかりとした制御下に維持することを特に企図したワクチン化方法；並びにそのような検出及び識別を可能にする容易に使用できるツールとして使用できる診断キットである。
【背景技術】
【０００４】
トリインフルエンザ（ＡＩ）が鳥類で非常に感染性の疾患であり、鳥類飼育者にかなりの経済的損害を引き起こし得ることは周知である。
【０００５】
その結果、鳥類飼育の分野では、並びに免疫学的に規格化された生物内では、高度に病原性の形態（ＨＰＡＩ）であれ、軽度に病原性の形態（ＬＰＡＩ）であれ、トリインフルエンザの流行を制御し防止するための有効な予防上のストラテジーを開発する必要性が強く理解されている。
【０００６】
より詳細には、インフルエンザウイルスは、ウイルスが保有する抗原群によって、各種のＡ、Ｂ、Ｃ類型に分類可能であることが知られている。Ａ、Ｂ、Ｃ型のインフルエンザウイルスは、ウイルスキャップシド（ＮＰ）及びマトリックス（Ｍ）タンパク質で見出せる抗原の差異に基づいて、互いに識別可能である。特に、Ａ型インフルエンザウイルスは、ヘモアグルチニン（ＨＡ）及びノイラミニダーゼ（ＮＡ）分子の抗原差に基づいて、サブタイプにさらに分類できる。現在では、ＮＡ１からＮＡ９と示されている９のサブタイプのノイラミニダーゼタンパク質と、ＨＡ１からＨＡ１５と示されている１５の異なるサブタイプの血清ヘモアグルチニンＨＡタンパク質が知られており、通常それぞれＨ１からＨ１５と示される１５の関連するウイルスサブタイプが知られている。鳥類では、いずれかのＨＡ及びＮＡサブタイプを有するウイルスが単離できる。
【０００７】
ＨＡは、約５６０アミノ酸を含み、全ウイルスタンパク質の２５％を占めるウイルス表

面グリコプロテインである。それは主に、宿主細胞へのウイルス粒子の付着と、感染の初段階における宿主細胞への浸透に関与している。ウイルスタンパク質の中でヘモアグルチニンは、翻訳後再整列に最も重要なものである。その合成が完成した後、当該分子は宿主細胞のエキソサイトーシス経路に入り、その過程でＨＡはホールディングし、トリマーにアセンブルし、グリコシル化を受ける。最後にそれは二つのサブユニットＨ１及びＨ２に切断される；この切断は、分子の活性化、及びビリオンによる感染能力の獲得に重要な工程である。

【０００８】

実際に、塩基性アミノ酸残基に関する切断部位の各種の組成が、全くではないがほとんど局在しない感染症状を生ずるＡＩウイルスの能力に翻訳され、またはその逆も然りであり、多くの鳥類飼育種に対する致死的な結末を有する普遍化した感染が生ずる。それ故、この事実が、インフルエンザに生物親和性を与え、宿主特異性を与え、並びにウイルスの病原性を与えることが提案されている。ウイルスの病原性に関して言えば、複数の塩基部位のＨＡを有する株では、Ｈ０分子を切断するプロテアーゼが見出され、かくしていくつかの細胞タイプにおける活性形態Ｈ１及びＨ２では、感染性ウイルス粒子の甚大な生産を有する複数の感染サイクルを生じ、短期間で全ての地域に感染の普遍化を引き起こす（ＨＰＡＩ株）。その結果感染は、非常に高い普遍性で、急性から超急性の過程を有することが分かるであろう。

【０００９】

ノイラミニダーゼ（ＮＡ）は、インフルエンザＡウイルスの第二の膜グリコプロテインである。それは、４１３アミノペプチドをコードする１４１３ヌクレオチドの長さの遺伝子(ウイルスＲＮＡのセグメント６)によってコードされている。このタンパク質は、少なくとも２の重要な機能を有する：シアル酸分子の間での切断によるウイルスヘモアグルチニンに対する細胞レセプターの破壊、及びヘモアグルチニン自身の破壊である。この態様では、新たに形成されたウイルス粒子が細胞膜に沿って蓄積することを防止し、並びに粘膜上に存在する粘膜を通じたウイルスの移動を促進することによる、ウイルス子孫の放出を容易にすることであろうと推定されている。さらにＮＡは、抗原性のバリエーションに関与する重要な抗原決定基を占める。

【００１０】

インフルエンザウイルスによって感染されている宿主は、この抗原に対して生じる顕著な抗体応答を生ずるが、ヘモアグルチニンで生じているものとは異なり、これらの抗体は主に中和抗体ではなく、それら自身によって、新たな感染から宿主を保護することができないであろう。

【００１１】

上述の流行病の制御のストラテジーが、インフルエンザウイルスによって引き起こされる感染が生じた後のその検出におそらく基づくことは明らかである。それゆえ前記ストラテジーの範囲では、「場当たり的な」ワクチンのセットアップの可能性に対するウイルス株の同定、インフルエンザ感染の前及び最中の動物集団の免疫の度合いの定量、並びに流行の間のインフルエンザ感染を信頼できるように診断する可能性が特に重要である。

【００１２】

トリインフルエンザの重篤な流行現象の存在下にある、メキシコ及びパキスタンのような特定の国々で広く使用されている周知の制御ツールは、いまだワクチン化によって代表されている。

【００１３】

この方法は主に、ワクチン化動物の身体における免疫応答を誘導する、ワクチンに含まれている特定の内部または膜のウイルスタンパク質の能力を利用している。そのような応答は、対応する病理学的なインフルエンザの状態に関与する特定のウイルス株に対する抗体の生産を通じて表されている。

【００１４】

主に、インフルエンザ感染の予防のためのワクチンのセットアップを目的とする研究は

、ほとんどヘモアグルチニンＨＡタンパク質の使用に絞られている。実際にこの後者は、宿主細胞内へのインフルエンザウイルスの吸着及び浸透に関与することにより、中和抗体の主な標的である。

【００１５】

ワクチンは従来型と操作型が存在することが周知である。

【００１６】

とりわけ第一のものは、天然の感染の結果として生産されたものと同一である生産抗体を、免疫化された被験者において刺激する、天然の、適切に不活性化された流行(フィールドの)ウイルスから調製される。それに対して、操作型である第二のものは、遺伝学的な操作法を通じて、研究室において複数の過程で誘導されたウイルスミューテーションを通じて得られたものであることが周知である。

【００１７】

ワクチン政策の応用の主要な問題点は、ワクチン化被験者(フィールドのウイルスと接触していない)と感染被験者の間の識別である。

【００１８】

トリインフルエンザの特定の場合では、これはOffice International des Epizotes (OIE)のリストＡに含まれており、このリストは非常に流行する動物の疾患を含み、血清のモニタリング及び撲滅計画を妨げる可能性を避けるため、それに対するワクチン化は欧州連合（ＥＵ）の各国において禁止されている(いずれの種類のワクチンも)。

【００１９】

従来のワクチンの使用を利用するトリインフルエンザの制御政策は、現在では多くの国で、その使用が莫大な流行人口の例学的な場合のみ許可されているように、実施においていくつかの制限が示されている。

【００２０】

実際、そのような既知のワクチン化法の主たる制限は、動物の集団内で生き残ったワクチン化ウイルス株の進化の可能性に対する有効な制御を実施する不十分な可能性に帰結し得る。実際問題として、ワクチン化は、健全性と臨床上の症状を防止する一方で、「健康なキャリア」の疾患を要するするものではない。その結果、引き続き感染しているワクチン化被験者は、感染を含み根絶する標的とは反対に、感染の更なる拡散の供給源を表し得る。それ故、ワクチン化キャンペーンの範囲で、ワクチン化されているため血清陽性である被験者を、フィールドのウイルスと接触しているため血清陽性である被験者から識別可能であるように、流行病的な信頼性を知見することについて基本的な重要性が存在するものと解される。

【００２１】

同じ態様で、トリインフルエンザ制御政策内での操作型ワクチンの利用は、いくつかのハードルが存在している。

【００２２】

そのようなワクチンは、インフルエンザウイするの各種のサブタイプと関連する疾患と、さらに増大した有効性で闘うために考慮されている。それらは、適切なベクターによって運搬される特異的ウイルスタンパク質をコード可能であるゲノム配列を含むより洗練された組換えワクチンの生産のための方法を供与する進歩した遺伝学的操作法で開発される。

【００２３】

この種類のワクチンは、例えばＨ５及びＨ７ウイルスサブタイプに対する保護的免疫応答を生ずるために、鶏痘ウイルスに挿入され発現されるヘモアグルチニン抗原ＨＡ５またはＨＡ７の発現を提供する。

【００２４】

特定の状態における間接的な予防を通じて感染を制御することの問題点は、かくして避けられないものである。特に、サブタイプＨ５またはＨ７のインフルエンザウイルスによって引き起こされる感染は、1700万以上の鳥類が死んだ1984年のペンシルバニア、並びに

より最近のメキシコ、パキスタン、及び北イタリア（1400万の鳥類が死滅）のように、世界の各地でかなりのニワトリ及び七面鳥飼育農場に対する壊滅的な影響で、最も重篤な高度に病原性のトリインフルエンザの発生に関与している。

【００２５】

遺伝学的に修飾された生存ウイルスから得られたワクチンは、環境への影響の観点から潜在的に危険であるため、欧州連合内では登録が困難である。

【００２６】

実際、動物集団に対する生存する遺伝学的に修飾されたウイルスの使用は、環境内へのウイルスの分散を引き起こし、そのような遺伝学的に変性された生物は、遺伝学的な観点から、制御不能な態様で高等生物または微生物と相互作用するであろう。

【００２７】

動物の流行性の疾患のより高い制御を可能にするために、「マーカーワクチン」の概念について近年その路が見出されており、それは特異的なタンパク質の存在、不存在、または突然変異を有する一方で、フィールドのウイルスに対する十分な交差保護能力を維持していることを特徴する操作型ワクチンである。

【００２８】

しかしながら現存するマーカーワクチンの利用は、現在のワクチン法に関する上述のものと同じ制限を示す。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【００２９】

この状況での結果、本発明の主たる目的は、インフルエンザウイルスを集約している動物を容易に認識し、ワクチン化の結果として血清陽性である個体から識別することを可能にするストラテジーを提供することにより、特に鳥類飼育の分野において、高い及び低い病原性のインフルエンザの流行の制御のための以前に知られている予防法と関連する制限及び欠点を解消することである。

【００３０】

本発明の特定の目的は、請求項１に記載の精製核酸フラグメント(サブフラグメント)を提供することである。

【００３１】

本発明の更なる目的は、マーカー抗原としてノイラミニダーゼタンパク質Ｎａｙの発現方法を提供することである。

【００３２】

本発明の更なる目的は、前記サブフラグメントの発現を通じて得ることができる組換え抗原を提供することである。

【００３３】

本発明の更なる目的は、前記組換え抗原に基づき、ワクチン化動物から感染動物を識別することが可能な診断試験を提供することである。

【００３４】

本発明のまた更なる目的は、トリインフルエンザによって引き起こされる感染に対する鳥類飼育動物のワクチン化方法を提供することである。

【００３５】

前記目的による、本発明の技術的特徴は、添付された特許請求の範囲の内容から明らかに見出すことができ、その利点は、添付された以下の図面を参考にして提供される、本発明の好ましいが排他的ではない実施態様に引き続き、以下の詳細な記載から明らかであろう。

【００３６】

図１は、Ｈ７Ｎ１陽性血清で実施された間接的免疫蛍光試験の結果を示す顕微鏡写真である。

【００３７】

図２は、Ｈ７Ｎ３陽性血清で実施された間接的免疫蛍光試験の結果を示す顕微鏡写真である。

【発明を実施するための最良の形態】

【００３８】

以下では本発明は、サブタイプＨ７Ｎ１を有するウイルス株によって引き起こされるＡ型トリインフルエンザの場合を特に参考にして詳細に記載されている。しかしながら、本発明は、いずれかのＨｘＮｙウイルス株[式中ｘ及びｙはそれぞれＨ及びＮのいずれかのサブタイプを示す]から由来する高い及び低い病原性のインフルエンザの流行の拡散を制御及び防止するためのストラテジーの発達のためにも採用できる。

【００３９】

本発明のアイデアは特に、ＨＡに関する限り考慮されるものと同じサブタイプであるが、ＮＡのサブタイプに関しては考慮されるものと異種であるインフルエンザ株を含む、容易に生産できて確立された有効性を有する低コストのワクチンである、不活性化された従来のワクチンを使用することである。

【００４０】

そのような選択は、ヘモアグルチニンのＨａｘタンパク質が抗体の生産に関与している知見、及びその結果いずれかのＨｘウイルスが保護抗体の合成を刺激できる一方で、異種ノイラミニダーゼが天然のマーカーとして機能するという知見に基づいている。

【００４１】

この態様では、動物をワクチン化し、同じヘモアグルチニンのサブタイプに属するインフルエンザウイルスによって引き起こされる感染に対しては保護できる一方で、特異的な抗ＮＡ抗体を測定することにより、ワクチン化動物を感染動物から識別可能である。

【００４２】

試験下にある特定の場合を参考にして、臨床上の保護が、同種のヘモアグルチニンを有するウイルス株からセットアップされているワクチンを通じて担保されるが、同種のノイラミニダーゼでは担保されないことが強調されるであろう。特定の場合、実験的試験は、ワクチンの構成成分としてウイルス株Ｈ７Ｎ３の使用で実施されている一方で、フィールドの(またはチャレンジ)ウイルスは、Ｈ７Ｎ１の抗原構成を示す。それ故、同種群のＨ７は臨床上の保護を提供する一方で、感染動物の検出は、それがタンパク質Ｎ１に対する抗体を生産するのに対し、ワクチン化動物は、感染されていなければ、Ｎ１ではなく異種ノイラミニダーゼＮ３に対する抗体を形成するという事実に基づく。

【００４３】

これを実施するために、一方では前記特異的な抗体抗ＮＡ(この場合Ｎ１)を検出する測定である診断方法を提供することが必要であり、他方ではトリインフルエンザの特定の株に対する満足な交差保護能力を維持する一方で、異なるノイラミニダーゼにより前記ウイルスから識別可能である天然のワクチンを準備することが必要である。

【００４４】

前記方法の調製は次いで、Ｎａｙタンパク質によって、または特定のトリインフルエンザウイルス株ＨｘＮｙのものと比較して、必須に非変性状態でノイラミニダーゼタンパク質Ｎａｙをコードするゲノム配列を含むベクターによって、表すことができる抗原をセットアップすることを必要とする。

【００４５】

トリインフルエンザＨ７Ｎ１の場合、本発明に係る抗原は、ウイルス株Ａ/ｔｙ/Ｉｔａｌｙ/４４２６/Ｖ００/Ｈ７Ｎ１ ＬＰＡＩからウイルスＲＮＡをまず抽出し、次いでノイラミニダーゼタンパク質ＮＡ１をコードするウイルスＲＮＡセグメントを増幅することによって調製される。

【００４６】

ＲＮＡサンプルは、温度安定性ポリメラーゼに対して必要とされるテンプレートを提供できるように、最初にｃＤＮＡに変換される。

【００４７】

それ故ＲＮＡセグメントは、逆転写酵素ＲＴにより最初に逆転写される。

【００４８】

この後第Ｖ工程を開始し、ＤＮＡ分子として興味ある配列の増幅下で、記載されたサイクルのＰＣＲ反応が引き続く。初期のＲＮＡテンプレートの量及び純度が、ＲＴ-ＰＣＲの成功を決定する因子である。

【００４９】

次いでＰＣＲは、特異的なｃＤＮＡ配列を、唯一この配列のみ増幅することを可能にする。それ故、本発明によれば、ノイラミニダーゼタンパク質ＮＡ１のｃＤＮＡ-ポリメラーゼのために、正のプライマー5'- GCG CGC GGC CGC CAG GAG TTT AAA ATG AAT CCA AAT C -3'(配列番号1)、及び負のプライマー5'- GCG CGC GGC CGC CTA CTT GTC AAT GGT GAA TGG C -3'(配列番号2)からなる、増幅される領域の境界配列を表す過剰な二つのオリゴヌクレオチドの存在下で、ｃＤＮＡを変性した後にアニールを引き起こさせる。そのようなプライマーの配列では、制限酵素ＮｏｔＩによって認識される特異的長さが挿入されている。前記プライマーで得られるであろう増幅産物を次いで、酵素ＮｏｔＩによって切断でき、かくして以下に記載される遺伝子のクローニング方法が可能となる。

【００５０】

モル過剰のオリゴヌクレオチドのために、ｃＤＮＡ鎖は、互いによりはむしろ、ほとんど排他的に二つのオリゴヌクレオチドとアニールするであろう。次いで第一の反応の産物は、新たな鎖の合成のためのテンプレートとして機能するであろう。増幅した二本鎖が、二つのオリゴヌクレオチドとよりはむしろ、互いにアニールする程度に多くなるまで、全サイクルを再び繰り返す。過剰な数の増幅サイクルの後、この飽和に到達する。実際、かくしてオリジナルのフラグメントは、数百万倍に増幅されるであろう。

【００５１】

前記ＲＮＡゲノム配列から由来するｃＤＮＡの増幅は、実験下の場合、好ましくは約1.4ｋｂの長さを有する精製サブフラグメント（ＲＴ-ＰＣＲによって得られた増幅産物）を有するようにもたらす。

【００５２】

この時点で、かくして得られた遺伝子のｃＤＮＡをゲル精製し、増幅の同一性を確認するためにシークエンスする。

【００５３】

ＮＡをコードする遺伝子のクローニング、及び組換えＮＡの生産は、診断方法における、特に以下に示されるような血清試験における使用のための、比較的大量の抗原を得ることを可能にする。

【００５４】

そのような抗原は、タンパク質Ｎ１によって表される場合では、興味ある単一のタンパク質のみを明らかに含み、交差反応の出現を引き起こすであろう他のウイルスタンパク質、特にＨＡタンパク質と組み合わせる可能性の問題を避ける。

【００５５】

さらに、前述の通り、この組換えタンパク質は、オリジナルのペプチドに対して特異的な特徴を有する抗原の可能性をほとんど変化することなく維持することが必要であり、前記特徴は、アミノ酸配列、分子の三次元構造、及び非常に重要なことにはグリコシル化によって必須に与えられる。

【００５６】

本発明の更なる特徴によれば、前記特徴を維持するタンパク質を得るための最も適切な発現システムは、発現ベクターとしてバキュロウイルス、即ち節足動物（昆虫類及び甲殻類）のみで複製可能なＤＮＡウイルスを使用して、昆虫細胞における真核生物システムであることが分かった。

【００５７】

これらのウイルスは、他の無脊椎動物、または植物または哺乳動物のような高等生物に関する証拠はないため、その安全性は十分に認識されており、これらの発現システムで抗

原を生産するための研究室は、特別な安全基準を適用する必要がなく、これは実際的且つ経済的な観点の両者からさらに有利である。

【００５８】

それ故増幅された後、前記のｃＤＮＡサブフラグメントは有利には、以下に要約されるバキュロウイルスベクター発現法において、Bac-to-Bac(登録商標)(Invitrogen, LifeTechnologies)を使用して発現される。

【００５９】

ｃＤＮＡはＮｏｔＩで切断され、ＮｏｔＩ切断pFast-Bacドナープラスミドにライゲートされ、大腸菌ＤＨ５αコンピテントセルでクローン化される。正確な挿入物を含む大腸菌コロニーを選択し、組換えpFast-Bacをその後抽出する。バキュロウイルスシャトルベクター（バクミド）を含む大腸菌ＤＨ10Bac細胞を、pFast-Bacでトランスフォームし、組換えバクミドを単離し、Trichoplusia ni昆虫細胞(HighFive(登録商標)細胞、Invitrogen, LifeTechnologies)のトランスフェクションのために使用する。

【００６０】

組換えバキュロウイルス粒子を７２時間後に細胞カルチャーから回収し、プラークアッセイにより滴定する。興味ある遺伝子の発現を、ウエスタンブロットにより確認する。

【００６１】

それ故かくして得られた組換え抗原は、バキュロウイルスによって運搬され、昆虫細胞において発現されたゲノム配列の組換えグリコプロテインノイラミニダーゼＮＡ１によって表される。

【００６２】

以下に記載されるように、流行性株Ｈ７Ｎ１でのトリインフルエンザウイルス感染のための陽性の検出のための診断方法内で有利に使用されるように適応される。

【００６３】

本発明の更なる特徴によれば、抗原調製工程が完成した後、識別工程は、診断下のワクチン化動物の身体から得た生物学的な流体を採取するための工程、引き続き前記生物学的な流体と組換え抗原を接触させて、被験者が感染している場合に陽性を検出するために試験による、抗原-抗体反応の検出工程を含む。

【００６４】

検出試験は有利には、間接的免疫蛍光、または免疫ペルオキシダーゼ、または間接的若しくは競合的なＥＬＩＳＡ試験、または沈降試験、またはいずれかの他の迅速な試験からなることができる。

【００６５】

迅速な試験として、各種の性質(通常酵素的またはさもなければ発色試験)の検出システムが、抗原-抗体反応の証拠を提供する試験を意味する。

【００６６】

そのような試験は通常、フィールドで使用可能であるような方法を構成し、いずれかの特別な装置を必要としない。

【００６７】

さらに本発明の目的は、以下に記載される例示的な場合を参照して、ウイルス株Ｈ７Ｎ１によるものであるトリインフルエンザに対するワクチン化方法である。

【００６８】

そのような方法は、天然のワクチン(即ち不活性化天然ウイルスから由来するワクチン)の調製のための初期の方法を含み、同一のサブタイプのウイルスヘモアグルチニンＨＡ７と、異なるサブタイプのノイラミニダーゼＮＡ３によって特徴づけされるため、前記ワクチンは異種である。

【００６９】

この種のワクチンは、免疫化作用を生じる一方で、それらから異なるノイラミニダーゼを識別する特異的なフィールドのウイルスに対して満足な交差保護能力を示すはずであることが必須である。

【００７０】
本発明の場合では、ウイルスＨ７Ｎ１に対する異種Ｈ７Ｎ３ワクチンの有効な交差保護作用を驚くべきことに観察した。
【実施例】
【００７１】
以下では、交差保護研究の驚くべき結果が記載され、ここでは不活性化異種株Ａ/ｃｋ/Ｐａｋｉｎｓｔａｎ/９５ Ｈ７Ｎ３を含むワクチンで免疫化された鳥類が、ＨＰＡＩ Ａ/ｔｙ/Ｉｔａｌｙ/４５８０/Ｖ９９ Ｈ７Ｎ１で感染された。
【００７２】
より詳細に言うと、単離された非常に病原性のフィールドウイルスＨＰＡＩ Ａ/ｔｙ/Ｉｔａｌｙ/４５８０/Ｖ９９(Ｈ７Ｎ１)をチャレンジウイルスとして使用し、0.05mlの眼滴の結膜点滴により、$10^{7.5}$ EID_{50}の投与量で投与した。使用されたワクチンは、0.3ml/投与量のＡ/ｃｋ/Ｐａｋｉｎｓｔａｎ/９５(Ｈ７Ｎ３)（Merialにより製造されたFluvac(登録商標)としての市販品）を含む不活性化オイルエマルションワクチンであった。
【００７３】
50の白色レグホンＳＰＦチキンを、チャレンジ実験のために使用し、5の実験群にランダムに分割した。それらを孵化し、別々に育て、水を与え、自由にえさを与えた。4及び5群のものを除く全ての鳥類を、6週齢でチャレンジした。
【００７４】
1群：6週齢でチャレンジした10の非ワクチン化コントロール鳥類；
【００７５】
2群：2及び4週齢で0.3mlのFluvac(登録商標)でs/cでワクチン化した13の鳥類；
【００７６】
3群：3週齢で0.3mlのFluvac(登録商標)でs/cでワクチン化した13の鳥類；
【００７７】
4群：11の非ワクチン化のチャレンジしないコントロール；
【００７８】
5群：チャレンジ後2時間で2群と共に配置した、5の非ワクチン化「標識」鳥類。標識鳥類の実験群を単離箱に入れ、ワクチン化鳥類からのウイルスの伝播を評価した。
【００７９】
ワクチン投与、及びチャレンジに引き続き、実験の継続時間を通じて臨床上の兆候と死亡率について鳥類を毎日観察した。チャレンジの前に、4のヘマグルチニンユニット（CEC, 1992）を使用するヘマグルチニン阻害試験によって、H7に対する抗体の検出のために全ての鳥類について羽の静脈から採血した。
【００８０】
シェディングのレベルの評価するため、2、4、7、10及び14日目で鳥類から生物学的物質を拭い取り、それを記載されたように（CEC, 1992）制限希釈（10^{-1}から10^{-7}）でウイルス単離物について加工した。
【００８１】
チャレンジウイルスによる標的器官の発色形成を調べるために、2及び3群から得た二つの臨床的に健康な鳥類をチャレンジ後2及び4日目で犠牲にし検体した。次いでその器官を選択し（脳、小脳、肝臓、脾臓、心臓、気管、肺、すい臓、腎臓、副腎、十二指腸、扁桃腺、及びFabricius嚢）、次いで記載されたように抗原検出のため組織病理学的及び免疫組織化学的（IHC)）観察のため加工した。胸の筋肉及び腿の筋肉のサンプルもこれらの鳥類から回収し、従来のウイルス単離法(CEC, 1992)によりワクチン化した健康な鳥類の筋肉中のウイルスの存在につき評価した。
【００８２】
同様な器官サンプルを、チャレンジ後に死んだ全ての鳥類から回収し、標的器官におけるウイルスの分布を評価した。さらに、プールした器官と肺、小腸と腎臓サンプル、及び胸と腿の筋肉から得られた標本を、実験の継続時間の間で死んだ全ての鳥類からウイルス

単離（CEC, 1992）のために加工した。

【００８３】

血清サンプルをチャレンジ後2及び6週で生存している鳥類から回収し、ＨＩ試験によりＨ７の力価を評価した（CEC, 1992）。

【００８４】

チャレンジの前に実験鳥類で実施されたＨＩ試験の結果は、表１に提示されている。予測されるように、二度ワクチン化された鳥類は、一度ワクチン化されたものと比較して高い血清学的力価を示した。2及び3群では、それぞれ2/13及び5/13の鳥類が1：16より低い力価を有し、それは陽性のためのカットオフ限界と考慮された。4群に属する全ての鳥類（ワクチン化なし、チャレンジなし）は、ＨＩアッセイにおいて陰性の結果を示した。

【００８５】

4群に属する全ての鳥類が、疾患の臨床上の兆候を示さなかった。

【００８６】

全ての非ワクチン化チャレンジ鳥類(1群)は、感染後4日以内でＨＰＡＩの典型的な症状と病変を示した。プールした肺と器官から、及び全てのこれらの鳥類の小腸から、及び8/10の鳥類から改修された胸と腿の筋肉の両者のサンプルから、単離によってウイルスを回収した。チャレンジした非ワクチン化鳥類から回収された10/10の排出腔の拭き取り及び8/10の気管の拭き取りは、ml当たり10^2から10^4のEID_{50}の範囲の力価で感染後2日でのウイルス単離により陽性であった。2群の一匹の鳥類及び3群の一匹の鳥類は、それぞれチャレンジ後4及び6日で死亡した。これらの鳥類はそれぞれ、チャレンジの前に＜1：2及び1：4の血清学的力価を示した。2群の「in vivo」シェディングを評価するために単離箱に導入されている標識鳥類は、感染後8日目に死に始めた。実験の終了後2ヶ月まで行き続けた一匹の標識鳥類を除いて、全ての標識鳥類が13日目までに死亡した。この鳥類が臨床上の兆候を示すまで時間はかからず、Ｈ７への血清変換はなかった。

【００８７】

全ての死んだまたは犠牲にした鳥類から回収された器官、組織、及び排出腔と気管の拭き取りで実施されたウイルス学的調査の結果が表2及び3に提示されている。

【００８８】

データを調べると、ウイルスシェディングは、ml当たり10^4 EID_{50}の最大値でイノキュレーション後7日目までで、3群(一度ワクチン化した)から回収されたサンプルにおけるウイルス単離によって検出された。感染後4日目でチャレンジに引き続き死んだ血清陰性の鳥類を除いて、2群のいずれの鳥類からもウイルスは回収されなかった。

【００８９】

チャレンジ後2及び4日目で犠牲にされた臨床上健康なワクチン化鳥類から回収された筋肉サンプルのいずれからも、ウイルスは回収されなかった。

【００９０】

非ワクチン化鳥類に関する全てのコントロールは、トリインフルエンザに典型的な死後の組織病理学的な病変を示した。さらに、1及び5群（非ワクチン化コントロール及びin vivoシェディングのための標識）に属する鳥類の脳、小脳、肝臓、脾臓、心臓、気管、肺、すい臓、腎臓、副腎、十二指腸、扁桃腺、及びFabricius嚢において、ウイルス抗原が検出された。

【００９１】

最も強いＩＨＣ陽性を示した器官は、脳、腎臓、心臓、及びすい臓であった。

【００９２】

2及び3群に属する犠牲にされたワクチン化鳥類のいずれにおいても、ウイルス抗原は検出されなかった。対照的に、チャレンジ後4及び6日目で死んだ二匹の鳥類においては、ウイルス抗原が検出された。しかしながらこれらの鳥類では、ＩＨＣにおいて穏やか陽性のみが観察され、ウイルスの分布は、脳、心臓、腎臓、及びすい臓にいくつかの焦点で制限された。

【００９３】

チャレンジを生き抜いたワクチン化鳥類における血清学的調査の結果が表2に提示されている。幾何学的な平均ＨＩ力価（ＧＭＴ）は、二度ワクチン化された鳥類よりも一度ワクチン化された鳥類において有意に高かった。これはおそらく、チャレンジの前に低いＨＩ力価を有する鳥類（3群）において、チャレンジウイルスの高い度合いの複製の効果を表すであろう。

【００９４】

異種Ｈ７Ｎ３ワクチンは、使用されたワクチン化スキームのそれぞれにおいて93％の臨床上の保護レベルを誘導し、ＨＰＡＩ Ｈ７Ｎ１株Ａ/ｔｙ/Ｉｔａｌｙ/４５８０/Ｖ９９でのチャレンジの際に、ＳＰＦ(特異的病原体フリー)の鳥類におけるウイルス感染を予防した。さらに、シェディング感染した鳥類の数は、非ワクチン化コントロールと比較した場合、ワクチン化鳥類群において減少することが分かった。

【００９５】

この調査の結果は、鳥類におけるトリインフルエンザに対するワクチン化のトピックにアプローチする場合に頻繁に称する必須の事項の二つ、特にシェディングの減少と筋肉内の感染性ウイルスの存在に関する実験データを提供する。我々の経験は、非ワクチン化コントロールよりも低い度合いではあるがシェディングが生じ、特に二度ワクチン化した鳥類において、従来のウイルス学的方法によってはウイルスは検出されないが、ＳＰＦ標識の導入によって検出されるように、シェディングのレベルは低いことを確認した。臨床上健康なワクチン化鳥類におけるＩＨＣのいずれかの陽性の不存在は、ウイルス感染が確立しておらず、おそらく観察されたシェディングが、小腸及び気管における制限されたウイルス複製の結果であることを示唆している。同様に、臨床上健康なワクチン化鳥類の胸または腿の筋肉から単離されたウイルスは存在せず、これは前述の報告されたウイルス感染の不在を維持している。

【００９６】

トリインフルエンザに対するワクチン化政策に焦点を絞る主な目的は、臨床上の兆候及びウイルス感染から鳥類を保護することであり、環境に流出したウイルスの量を減少することである。

【００９７】

かくして完全に交差保護の結果が、使用されたワクチン化スキームの両者で異種ワクチンＨ７Ｎ３によって誘導された驚くべき保護を明らかに証明し、93％の保護指数を達成することが観察できる。

【００９８】

本発明の目的であるワクチン化ストラテジーは、血清学的陽性がワクチン化によってのみ誘導されたものか、フィールドのウイルスでの超感染が存在するのかを識別する可能性をも提供する。そのような識別は、フィールドウイルスのノイラミニダーゼタンパク質ＮＡ１を含むような前述の方法によって、抗原の調製及びその診断目的での使用を含む前述の診断方法により実施される。

【００９９】

この時点で、前記検出方法によれば、引き続きチャレンジにより、陽性の検出のための試験によって抗原-抗体反応を通じて陽性である可能性を指摘できるように、組換え抗原でそれをチャレンジすることによって、生物学的な流体は血清陽性の動物の個体の身体から採取される。

【０１００】

試験される生物学的な流体は例えば、少なくともワクチン化動物群の群を含む感染の危険のある動物集団から採取される。

【０１０１】

しかしながら有利には、基本として、全動物集団のワクチン化のために提供されるものが存在するであろう。

【０１０２】

より詳細に言うと、間接的免疫蛍光試験が検出試験として使用される場合、そのような

試験は以下でｉＩＦＡと称されるが、抗原は好ましくは以下に特定されるように調製される。

【０１０３】

HighFive(登録商標)細胞を、チェンバースライド(250μl/ウェルの接種)または96穴ミクロウェルプレート(50μl/ウェルの接種)に、10%胎児ウシ血清及び1%抗生物質溶液を補ったTC-100培養培地で0.9-1×10^6細胞/mlの濃度で接種し、28℃で1時間インキュベートし、次いで2の感染の複数性（ＭＯＩ）で組換えバクミドで感染した。組換えＮ１タンパク質を発現する感染細胞を、28℃で48時間のインキュベーションの後アセトンで固定し、+4℃で4週間まで貯蔵した。

【０１０４】

試験される血清サンプルを-20℃で貯蔵し、ＰＢＳ、ｐＨ7.4で1：250に事前希釈した。50μlの事前希釈試験及びコントロール血清を二重のウェルに分散し、37℃で45分間インキュベートし、200μlのＰＢＳ中で5分間3回洗浄し、二次抗体としてＦＩＴＣ(フルオレセインイソチオシアナート）接合抗チキンＩｇＧイムノグロブリン、及びエバンスブルー(作業希釈1：500、ストック溶液0.5%)と37℃で45分インキュベートし、インキュベーション後、200μlのＰＢＳで5分間3回洗浄した。ウェルをカルボナートバッファー、ｐＨ9.6中の25μlグリセロールで積層し、カバースリップを同じバッファーでチェンバースライドに乗せ、ＵＶ顕微鏡下で読み取った。

【０１０５】

以下のコントロールを、各プレート/バッチのチェンバースライドで含んだ：実験的に感染したＳＰＦチキン（ＨＩ力価1：128）から得たＨ７Ｎ１陽性血清；実験的に感染した七面鳥（ＨＩ力価1：16）から得たＨ７Ｎ１陽性血清；ＳＰＦチキンから得た陰性血清；市販の七面鳥から得た陰性血清；Ｈ７Ｎ３ワクチン化ＳＰＦチキン（ＨＩ力価1：1024）から得たＨ７Ｎ３陽性血清；Ｈ７Ｎ３ワクチン化七面鳥（ＨＩ力価1：128）から得たＨ７Ｎ３陽性血清。全てのコントロール血清は、単離して孵化して飼育されたＳＰＦまたは市販の鳥類から得られた。

【０１０６】

合計で608の七面鳥のフィールドの血清を、試験を確認するために使用した。これらの中で107は天然で感染したＨ７Ｎ１動物であり（ＨＩ力価≧1：16）、140はＨ７陰性動物から得られ、そして361はＨ７Ｎ３ワクチン化鳥類から得られた（力価≧1：16）。ＨＩの結果とｉＩＦＡとの間の一致を統計学的分析(カッパ値)によって評価し、かくして相対的感度と特異性の測定が可能であった。

【０１０７】

コントロール血清で観察される蛍光に基づいて、サンプルを以下のように評価付けした：陽性サンプル＝細胞変性効果（ＣＰＥ）の焦点に対応する50-80%の単一層に制限された蛍光、蛍光は明るく、主に細胞膜の近接部に位置する(図1)；陰性サンプル＝蛍光の不存在、または全ての細胞区画に存在し、単一層の100%に存在する偽の黄色-緑色のバックグランド(図2)；疑わしいサンプル＝大多数の細胞の細胞膜上の粒状または青白い蛍光。

【０１０８】

試験の評価付けの結果は表4に存在している。実施された統計学的分析は0.93のカッパ値を示し、それは「ほぼ完全な一致」を示す。試験の相対的感度及び特異性は、それぞれ98.1%及び95.7%として計算された（$CI_{95\%}$＝92.4；99.1）

【０１０９】

Ｎ１-Ｎ３識別ｉＩＦＡ試験の開発と評価付けは、この試験がＨＩ試験とほぼ完全に一致して考慮できることを示す。相対的感度及び特異性のレベルは、Ｎ３ワクチン化鳥類からＮ１感染鳥類を識別する満足以上のものと考慮できる。

【０１１０】

前記記載のものとは異なって、前記検出方法は、特に間接的ＥＬＩＳＡ、競合的ＥＬＩＳＡ、免疫ペルオキシダーゼ、沈降試験、または他の迅速な試験のような比較的軽作業の検出試験の使用のために提供できる。

【０１１１】
間接的ＥＬＩＳＡの場合、組換えバキュロウイルス(またはいずれかの精製したそれから由来するタンパク質)である抗原を、カーボナート-バイカーボナートバッファー、ｐＨ9.6-9.8で4℃で一晩96穴ウェルプレートで吸着させる。次いで試験血清を連続的に所定の希釈でプレート中に分散し、37℃または室温で1から3時間インキュベートする。適切なバッファーでの洗浄後、抗種酵素接合体を分散し、次いでそれをインキュベートし、その後以前に記載されたように洗浄する。その後基質を加え、それは存在する場合ペルオキシダーゼの存在の証拠を提供することができるであろう。
【０１１２】
抗原と抗体の間の対応は、二次抗種抗体に結合した酵素複合体の活性のための発色反応において明らかである。
【０１１３】
この試験では、陽性サンプルは発色し、陰性サンプルは反対に無色であろう。
【０１１４】
競合的ＥＬＩＳＡの場合、組換えバキュロウイルス(またはいずれかの精製したそれから由来するタンパク質)である抗原を、カーボナート-バイカーボナートバッファー、ｐＨ9.6-9.8で4℃で一晩96穴ウェルプレートで吸着させる。抗原特異的であることを条件に、モノクローナルまたはポリクローナル血清を使用する。試験血清をプレートに分散し、インキュベーション工程と同時にまたはその後に適切な血清を所定の希釈で加える。適切なバッファーでの洗浄後、抗種酵素接合体を分散し、この場合それは適切な血清の酵素の証拠を提供するためのものであり、その後記載されたようにプレートをインキュベートして洗浄する。その後基質を加え、それは存在する場合ペルオキシダーゼの存在の証拠を提供することができるであろう。
【０１１５】
抗原と抗体の間の対応は、二次抗種抗体に結合した酵素複合体の活性のための発色反応において明らかである。
【０１１６】
この試験では、陽性サンプルは無色であり、陰性サンプルは反対に発色するであろう。
【０１１７】
免疫ペルオキシダーゼ試験は免疫蛍光試験と同様であり、二次抗体がフルオレセインの代わりにペルオキシダーゼに接合されている点で異なる；それゆえ読み取りは光学顕微鏡下で実施される。
【０１１８】
この場合では組換えバキュロウイルスで感染された細胞基質を固定し、その後適切に希釈された試験血清を各ウェルに分散させる。プレートを３７℃または室温で１から３時間インキュベートする。正しいバッファーで洗浄した後、抗種酵素接合体(ペルオキシダーゼ)を分散し、次いでそれをインキュベートし、その後以前に記載されたように洗浄する。その後基質を加え、それは抗原と抗体の間の相補性が存在することを条件に、ペルオキシダーゼの存在(存在すれば)を検出することを可能にする。
【０１１９】
陽性は感染細胞の特異的発色により明らかにされ、それは光学顕微鏡で視覚化できる。
【０１２０】
免疫沈降試験は、不活性支持体における、二つの可溶性成分、この場合試験血清と組換えノイラミニダーゼ含有抗原から肉眼で観察できる不溶性複合体の形成に基づく。
【０１２１】
迅速な試験の場合、各種の性質、通常酵素ベースのものの発色検出システムが、抗原-抗体反応の証拠を提供する。そのような試験は一般的に、フィールド上で使用可能であり、いずれかの特別な装置を必要としないような態様で構成される。
【０１２２】
この場合、一滴の試験サンプル(血清）を、抗原が吸着している不活性材料の支持体に

加える。数分後、一滴の検出システムプラス基質を加える。不活性基質上の一つまたはいくつかの区切られた発色の染色により、陽性が示される。

【０１２３】

さらに有利には、本発明の更なる目的は、ワクチン化動物集団で発生した後の、感染の検出のための診断キットである。それは必須に、不活性材料の固体の支持体、動物の陽性をチェックするためのものに対応する特異的なトリインフルエンザウイルス株ＨｘＮｙのものと比較して、必須に非変性である状態のノイラミニダーゼタンパク質Ｎａｙをコードするサブフラグメントの発現から生ずる組換え抗原を含む。

【０１２４】

抗原は例えば、ラテックススフェアの固体の支持体上に吸着により固定化され、またはＥＬＩＳＡ試験で特に提供されるプラスチックの固体の支持体上に吸着される。

【０１２５】

動物の個体から抽出され、支持体の上部に添加された生物学的な流体に含まれる抗Ｎａｙ抗体の存在下で、ウイルス感染に対する陽性を発色的に際立たせるために適用される試薬の使用をも提供する。

【０１２６】

抗原生産は有利には、タンパク質ＮＡ１を参考にして詳細に以前に記載された実施例に従って実施できる。

【０１２７】

試験される生物学的な流体が例えば、同じサブタイプのウイルスヘモアグルチニンＨａｘと異なるサブタイプのノイラミニダーゼＮａｚ(ここでｚはｙとは異なるいずれかのノイラミニダーゼである)によって評価付けされる異種ワクチンでワクチン化されている動物集団の個体から採取される。かくしてセットアップされたキットは、いずれの場合でも、感染個体と他の血清陽性の個体の間の識別を確立することを可能にし、よってワクチン化による偽の陽性の結果の存在を防止する。

【０１２８】

本発明は、同じ群のヘモアグルチニンと異種ノイラミニダーゼを有する不活性化ワクチンの使用が、一方で良好な臨床上の保護を得ることを可能にし、他方で感染被験者からワクチン化被験者の識別の可能性を提供するため、トリインフルエンザを制御するために驚くべき有効な解決策を与えるものである。

【０１２９】

それ故、そのようなストラテジーは、試験下でのここに開示された例示的な場合を超えて、各種のサブタイプによって引き起こされる感染の制御に適用でき、それによって公的な健康機関及び獣医が、感染した鳥類とワクチン化鳥類の間の識別による実際に感染された鳥類群を同定することを可能にし、それがウイルス疾患を撲滅する目的のいずれかの制御ストラテジーについての基礎を与えるものである。

【０１３０】

本発明で開示された制御ストラテジーは、このストラテジーが、ある時点で唯一のサブタイプが循環していることを条件に、世界中の全てのＨＰＡＩ及びＬＰＡＩ感染の両者の制御に適用できるであろうことを示唆している。

【０１３１】

【表１】

表１：ワクチン化に対する鳥類の血清学的応答

チャレンジの前の力価*

群	＜1:16	≧1:16	≧1:32	≧1:64	≧1:128	≧1:256	≧1:512	GMT$\log_{10}$
2 (二度ﾜｸﾁﾝ化)	2/13	11/13	10/13	7/13	4/13	2/13	1/13	45
3 (一度ﾜｸﾁﾝ化)	5/13	8/13	5/13	3/13	2/13	1/13	0/13	19

* 力価を有するＮ^0／ワクチン化のｎ^0

【０１３２】
【表２】

表２：Ａ/ｃｋ/Ｐａｋｉｓｔａｎ/９５（Ｈ７Ｎ３）ウイルスを含む不活性化ワクチンで免疫化され、Ａ/ｔｙ/Ｉｔａｌｙ/４５８０/Ｖ９９（Ｈ７Ｎ１）ウイルスでチャレンジされたワクチン化鳥類の血清学的応答及びウイルス単離試験

	GMT^$\log_{10}$		ウイルス単離*					
群	２週 p.c.	６週 p.c.	小腸	肺＋気管支	腎臓	胸筋	腿筋	臨床上の兆候
2 (二度ﾜｸﾁﾝ化)	108	75	1˙/5	1˙/5	1˙/5	1˙/5	1˙/5	1˙/13
3 (一度ﾜｸﾁﾝ化)	152	210	0/5	1˙/5	1˙/5	0/5	0/5	1˙/13
コントロール	-	-	10/10	10/10	10/10	8/10	8/10	10/10

^ チャレンジ後のＨＩ試験における幾何学的平均力価
* 陽性チキンの数／分析チキンの数
˙ ＡＩの死亡

【０１３３】
【表３】

表３：A/ck/Pakistan/95（H7N3）ウイルスを含む不活性化ワクチンで免疫化され、A/ty/Italy/4580/V99（H7N1）ウイルスでチャレンジされたコントロールとワクチン化鳥類の排出腔と気管の拭き取りから得られたウイルス単離アッセイの結果

	ウイルスの回収									
	気管の拭き取り					排出腔の拭き取り				
群	2日 p.c.	4日 p.c.	7日 p.c.	10日 p.c.	14日 p.c.	2日 p.c.	4日 p.c.	7日 p.c.	10日 p.c.	14日 p.c.
2 (二度ﾜｸﾁﾝ化)	1˙/13*	0/10	0/8	0/8	0/8	1˙/13	0/10	0/8	0/8	0/8
3 (一度ﾜｸﾁﾝ化)	1/13	3˙˙/11	0/8	0/8	0/8	1/13	2/11	2/8	0/8	0/8
コントロール	7/8	-	-	-	-	8/8	-	-	-	-

* 陽性チキンの数／分析チキンの数
˙ ＡＩの後の死亡
˙˙ ＡＩの死亡した一匹の鳥類を含む

【０１３４】
【表４】

表４：フィールドの血清に対するｉＩＦＡＴ評価付けの結果。
試験された七面鳥血清サンプルの総数：６０８

		iIFAT陽性	iIFAT陰性
H7N1 で天然で感染した動物から得た血清の数(HI 力価≧ 1:16)*	107	105	2
H7 陰性動物から得た血清の数	140	6	134
H7N3 ワクチン化動物から得た血清の数	361	18	342

【図面の簡単な説明】
【０１３５】
【図１】コントロール血清で観察される蛍光に基づいて、サンプルを以下のように評価付けした：陽性サンプル＝細胞変性効果（ＣＰＥ）の焦点に対応する50-80%の単一層に制限された蛍光、蛍光は明るく、主に細胞膜の近接部に位置する(図1)疑わしいサンプル＝大多数の細胞の細胞膜上の粒状または青白い蛍光。
【図２】コントロール血清で観察される蛍光に基づいて、サンプルを以下のように評価付けした：陰性サンプル＝蛍光の不存在、または全ての細胞区画に存在し、単一層の100%

に存在する偽の黄色-緑色のバックグランド(図2)；疑わしいサンプル＝大多数の細胞の細胞膜上の粒状または青白い蛍光。

【配列表】
SEQUENCE LISTING

<110> Ilaria Capua
<110> Stefano Marangon
<110> Giovanni Cattoli
<120> Purified subfragment codifying for neuroaminidase, recombinant neuroaminidase and its use in zooprophylaxis

<130> F15365A1

<140> JP 2003-583471
<141> 2002-04-12

<160> 2

<170> SeqWin99

<210> 1
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 1
gcgcgcggcc gccaggagtt taaaatgaat ccaaatc 37

<210> 2
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 2
gcgcgcggcc gcctacttgt caatggtgaa tggc 34

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/IT 02/00231

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K39/295 G01N33/569 A61K39/145

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
BIOSIS, EPO-Internal, MEDLINE, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! 15 December 1999 (1999-12-15) LEE M S ET AL: "Influenza A virus (A/chicken/Taiwan/7-5/99 (H6N1)) segment 6 neuraminidase gene, complete cds" retrieved from EMBL Database accession no. AF208598 XP002229091 the whole document ---	1
X	US 6 221 362 B1 (RIVIERE MICHEL ET AL) 24 April 2001 (2001-04-24) column 13, line 9 - line 28; figure 26 --- -/--	3,4

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

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

"E" earlier document but published on or after the international filing date

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 January 2003	17/02/2003

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Turri, M

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/IT 02/00231

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOHANSSON B E: "Immunization with influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase produced in recombinant baculovirus results in a balanced and broadened immune response superior to conventional vaccine" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 17, no. 15-16, 9 April 1999 (1999-04-09), pages 2073-2080, XP004165058 ISSN: 0264-410X	5-23,28
Y	the whole document See especially pages 2074-2075, "Methods"	17, 24-27, 29-31
Y	CAPUA LDARIA ET AL: "Strategies for the control of avian influenza in Italy." THE VETERINARY RECORD. ENGLAND 16 FEB 2002, vol. 150, no. 7, 16 February 2002 (2002-02-16), page 223 XP009004791 ISSN: 0042-4900 the whole document See especially the second paragraph of the article	17, 24-27, 29-31
A	PRICE P M ET AL: "COMPLEMENTATION OF RECOMBINANT BACULOVIRUSES BY COINFECTION WITH WILD-TYPE VIRUS FACILITATES PRODUCTION IN INSECT LARVAE OF ANTIGENIC PROTEINS OF HEPATITIS B VIRUS AND INFLUENZA VIRUS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 86, no. 5, 1 March 1989 (1989-03-01), pages 1453-1456, XP000008241 ISSN: 0027-8424 the whole document	
A	JOHANSSON B E ET AL: "Immunogenicity of influenza A virus N2 neuraminidase produced in insect larvae by baculovirus recombinants" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 13, no. 9, 1 June 1995 (1995-06-01), pages 841-845, XP004057540 ISSN: 0264-410X	

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/IT 02/00231

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SUAREZ D L ET AL: "Immunology of avian influenza virus: A review." DEVELOPMENTAL & COMPARATIVE IMMUNOLOGY, vol. 24, no. 2-3, March 2000 (2000-03), pages 269-283, XP002229027 ISSN: 0145-305X	
A	SWAYNE D E ET AL: "Highly pathogenic avian influenza." REVUE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, vol. 19, no. 2, August 2000 (2000-08), pages 463-482, XP001122269 ISSN: 0253-1933	
A	SUAREZ DAVID L: "Evolution of avian influenza viruses." VETERINARY MICROBIOLOGY, vol. 74, no. 1-2, 22 May 2000 (2000-05-22), pages 15-27, XP002229029 ISSN: 0378-1135	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/IT 02/00231

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6221362 B1	24-04-2001	FR 2751225 A1	23-01-1998
		AU 735184 B2	05-07-2001
		AU 3773697 A	10-02-1998
		BR 9710495 A	17-08-1999
		CN 1225685 A	11-08-1999
		EP 0914442 A1	12-05-1999
		WO 9803659 A1	29-01-1998
		JP 2001503019 T	06-03-2001
		NZ 333779 A	28-07-2000
		US 2002037292 A1	28-03-2002

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
// Ｃ１２Ｎ 15/09	Ｃ１２Ｎ 15/00	Ａ	

(74)代理人 100089037
弁理士 渡邊 隆
(74)代理人 100101465
弁理士 青山 正和
(74)代理人 100108453
弁理士 村山 靖彦
(74)代理人 100110364
弁理士 実広 信哉
(72)発明者 イラリア・カプア
イタリア・Ｉ－３５０２７・ノヴェンタ・パドヴァナ・ヴィア・ティツィアーノ・ヴェチェリオ・１
(72)発明者 ステファノ・マランゴン
イタリア・Ｉ－３０１７４・メストレ・ヴィアル・ガリバルディ・７６
(72)発明者 ジョヴァンニ・カトリ
イタリア・Ｉ－３５１００・パドヴァ・ヴィア・アマティ・１

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA32 CA01 DA02 EA02 HA11
4C085 AA03 AA04 BA55 CC08 DD61