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

特許第4265405号
(P4265405)

(45)発行日　平成21年5月20日(2009.5.20)　(24)登録日　平成21年2月27日(2009.2.27)

(51)Int.Cl.		F I	
C12N 7/00	(2006.01)	C12N 7/00	
C12N 15/09	(2006.01)	C12N 15/00	ZNAA
A61K 39/245	(2006.01)	A61K 39/245	
A61P 31/22	(2006.01)	A61P 31/22	

請求項の数 4　(全 24 頁)

(21)出願番号	特願2003-564191 (P2003-564191)
(86)(22)出願日	平成15年1月29日(2003.1.29)
(65)公表番号	特表2005-515775 (P2005-515775A)
(43)公表日	平成17年6月2日(2005.6.2)
(86)国際出願番号	PCT/US2003/001066
(87)国際公開番号	WO2003/064595
(87)国際公開日	平成15年8月7日(2003.8.7)
審査請求日	平成17年8月18日(2005.8.18)
(31)優先権主張番号	10/059,152
(32)優先日	平成14年1月31日(2002.1.31)
(33)優先権主張国	米国(US)

早期審査対象出願

(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一丁目６番２号
(74)代理人　100099759
弁理士　青木　篤
(74)代理人　100077517
弁理士　石田　敬
(74)代理人　100087871
弁理士　福本　積
(74)代理人　100087413
弁理士　古賀　哲次
(74)代理人　100082898
弁理士　西山　雅也

最終頁に続く

(54)【発明の名称】組換え七面鳥ヘルペスウィルス及びその利用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

配列番号１で示される配列のプロモーターの制御下でニューカッスル病ウィルスのFタンパク質遺伝子を有する組換え七面鳥ヘルペスウィルスにおいて、当該組換え七面鳥ヘルペスウイルスはHN遺伝子を含まず、前記プロモーター及びFタンパク質遺伝子が、主鎖ウィルスゲノム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に挿入されており、そして当該非翻訳領域が、前記ヘルペスウィルスゲノムのUL45とUL46との間に位置する領域である、ことを特徴とする組換え七面鳥ヘルペスウィルス。

【請求項２】

鳥類ヘルペスウィルス及びニューカッスル病ウィルスに対する防御免疫を鳥類宿主において誘発するための方法であって、請求項１に記載の組換え七面鳥ヘルペスウィルスを前記鳥類宿主に接種することを含んで成る方法。

【請求項３】

前記組換え七面鳥ヘルペスウィルスが、皮下経路により又はin ovoで前記鳥類宿主に投与される請求項２記載の防御免疫を付与する方法。

【請求項４】

請求項１に記載の組換え七面鳥ヘルペスウィルスを含んで成る家禽用ワクチン。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、改変された鶏β－アクチンプロモーターの制御下でニューカッスル病ウィルス（NDV）のFタンパク質（F遺伝子）のcDNAを含んで成る組換え七面鳥ヘルペスウィルス（rHVT）を提供する。

【背景技術】

【０００２】

ニューカッスル病は、家禽産業において最も恐ろしい伝染病の１つである。ニューカッスル病は、高い死亡率から無症候型までの範囲にわたる多くの形で存在する。株は、（１）強毒型（高いビルレンス）、（２）中等毒型（中位のビルレンス）、（３）長期潜伏型（低いビルレンス）及び（４）無症候型として分類される（Alexander, D.J. Diseases of Poultry 1997）。強毒型のNDVにより感染された鶏は数日で沈うつ状態になり嗜眠状態になり、そして死亡割合は数十％～50％以上である。生存する鳥類はしばしば、神経症状、例えば斜頸又は頭部捻転を呈する。その疾病が恐れられている理由の１つは、鶏が年齢に関係なくNDVに対して感受性であり、そして強毒NDVに感染した鶏はすべての年齢で劇症を呈する。

【０００３】

NDVは高い伝染性があるので、あらゆる鶏にその疾病の急激な発生の傾向がある。養鶏場は、さらなる感染を妨げるために十分に消毒しなければならない。中等毒型（中位のビルレンス）の株は、若い鳥における死亡が特徴である。長い潜伏性の病型（低いビルレンス）での株は、軽い呼吸感染が特徴で、それらの株の多くは若い鶏のためのワクチンとして使用される。無症候内臓型は通常、発症しない鶏の腸から単離される（Alexander, 1997）。ニューカッスル病は鶏及び七面鳥の両者に感染するが、しかしながら、七面鳥における臨床学的徴候は鶏における徴候よりも低い軽症である（Alexander, 1997）。

【０００４】

現在、生ワクチン及び不活性化ワクチンが、ニューカッスル病の予防のために利用できる。それらのワクチンは効果的であるが、しかし欠点を有する。不活性化ワクチンは、繁殖用雌鳥中にくり返し接種されるべきである。生ワクチンは主に、若い鶏のためである。しかしながら長期にわたる免疫は、高い移行抗体レベルを有する若い鶏には保証されない。生ワクチンのくり返し投与は時として、軽い呼吸器症状をひきおこすワクチン副作用のために、若い鶏の健康な成長に有害である。従って、効果的であり、副作用がなく、そして反復投与を必要としない新しいタイプのワクチンが、養鶏産業のために望まれている。

【０００５】

産業的要請に答えるために、Sakaguchiなど.（J. Virol. 74: 3217-3226, 2000; Vaccine 16: 472-479, 1998）は、ウィルスゲノムのUS10領域にNDV F遺伝子を有する組換えマレク病ウィルス血清型１を開発した。得られた組換えウィルスは、SPF鶏及び移行抗体陽性の市販鶏においてニューカッスル病に対する長期続く防御免疫を誘発した。

【０００６】

マレック病は、家禽産業に関するもう１つの重要な問題である。この疾病に対して、七面鳥ヘルペスウィルス（HVT）（Witter R.L. など., Am. J. Vet. Res. 1970, 31, 525-538） が、安全なワクチンとして最も広く使用されて来た。

【０００７】

現在まで、HVTをベースとしたニューカッスル病－マレック病二価ワクチンについていくつか報告されている。例えば、Morganなど.（Avian Dis. 37: 1032-1040, 1993; Vaccine 11: 349-358, 1993; Avian Dis. 36: 858-870, 1992）は、NDV F遺伝子を有する組換えHVTを構築し、そしてニューカッスル病ワクチンとしてそれらの組換え体の有効性を試験した。Macmillanら.,（Vaccine 14: 469-477, 1996）は、NDVのHN及びFタンパク質を発現する組換えHVTを構成し、そしてそれらの組換え体をそれらの有効性について試験した。両者ともに、ワクチン接種されたSPF鶏は、NDVに対して防御されたが、高い移行抗体レベルを有する市販鶏に対しては満足いくものではなかった。

【０００８】

Saitohなどは、HVTゲノム中にNDVのF及びHNタンパク質をコードするcDNAを挿入した（W

099/18215号）。挿入された遺伝子は、CMV又はRSVプロモーターの制御下に存在した。外来遺伝子挿入部位は、UL44と45との間又はUL45と46との間の新しく同定された遺伝子間領域であった。それらの組換え体は、SPF鶏及びNDV移行抗体を有する鶏においてNDV攻撃に対して良好な防御効果を付与した。しかしながら、それらの組換え体は、HN及びFの２種の挿入される遺伝子を発現した。

【０００９】

HNタンパク質は免疫された鶏に対して赤血球凝集阻止（HI）抗体を誘導するため、ワクチンで免疫された鶏とNDV感染鶏とを区別することは困難である。従って、ニューカッスル病に対して適切な防御免疫を誘導する、Fタンパク質遺伝子を発現する組換えウィルスがより所望のワクチンである。この目標は、NDVのF遺伝子のみを有するrHVTはMorganなどにより示されるように、鶏において所望する免疫性を誘導しないので、容易に達成できなかった。

【発明の開示】

【００１０】

本発明は、改変されたβ－アクチンプロモーター（Pecプロモーター）の制御下でのNDVのFタンパク質のcDNAの挿入により改変された組換え七面鳥ヘルペスウィルスを提供する。rHVTは、SPF鶏及び、NDVに対して高い移行抗体を有する市販鶏において、NDVに対して長期間持続する防御免疫を誘導した。

特に、本発明は、配列番号１で記載される配列のプロモーターの制御下でのNDV F遺伝子の挿入により修飾される組換え七面鳥ヘルペスウィルスを提供する。本発明はさらに、前記組換え七面鳥ヘルペスウィルスから主に成るニューカッスル病－マレック病二価ワクチンを提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１１】

本発明は、以下により詳細に記載される。

【化１】

配列番号１

5’-AGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTA
AATTGGCCCGCCGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGG
GACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCATTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTAC
GCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGATGCAGTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAG
GCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAG
TTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCT
TCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTCTAGAGG-3’

【００１２】

NDV F遺伝子：

NDV Fタンパク質をコードする限り、NDV株からのいずれの遺伝子でも本発明のために適切である。Sato, Miyodera, D26, Atami又はFuji及びTexas GB, B1又はLaSota株のF遺伝子が例である。野外分離株、又はいずれかのDNA配列が知られているF遺伝子でも良い。それらの中でも、D26からの遺伝子が好ましい例である。主鎖ウィルス中への追加の抗原遺伝子の組み込みは、本発明のために所望されない。

【００１３】

プロモーター：

本発明においては、NDV F遺伝子は、配列番号１で記載されるプロモーター（Pecプロモーターと称する）又はこれと相同性を有するプロモーターにより制御される。Pecプロモーター（審査請求されていない日本特許公開第2001－188号）は、鶏β－アクチンプロモ

ーターの所望する領域を切り縮めることによって、生成される。Pecに類似するプロモーターは、その活性がPecの活性にほぼ等しく、そしてその長さが120～850塩基対（bp）か又はより好ましくは、150～600pbであるプロモーターを意味する。

【００１４】

相同プロモーターは、β－アクチンプロモーターのヌクレオチドの置換、欠失又は付加により生成され得る。本発明に使用されるプロモーターは、天然に存在するか又は修飾されたエンハンサー配列を包含することができる。そのようなプロモーターの例は、配列番号２で記載されるCOAプロモーターである。

【００１５】

鳥類ヘルペスウィルス：

鶏に対して非病原性である限り、七面鳥のいずれのヘルペスウィルスでも本発明使用され得る。例えば、FC126（ATCC VR-584B），PB-THV1，H-2，YT-7，WTHV-1又はHPRS-26株が主鎖ウィルスのために適切である。それらの中で、FC126が、鶏におけるその安全な使用のために、本発明において使用されるのが好ましい。

【００１６】

遺伝子挿入部位：

ウィルス増殖のために重要でなく、そしてNDV F遺伝子挿入のために適切である、HVTのいくつかの非必須領域は知られている。例えば、UL43（WO89/01040号）、US2（WO93/25665号）、又はUL44とUL46との間のORF間領域（WO99/18215号）は、F遺伝子の挿入のために好ましい。それらの中で、UL44とUL46との間のORF間領域が最も好ましい。本発明に関しては、非必須領域は、後述の一般的方法により新しく同定され得る。第１に、適切な長さの鳥類ヘルペスウィルスDNAフラグメントがE.coliプラスミド中にクローン化され、そして制限酵素分析により物理的にマッピングされる。

【００１７】

次に、プロモーター及びマーカー遺伝子から成る遺伝子カセットがクローン化されたDNAフラグメントの適切な制限部位中に挿入され、相同プラスミドがもたらされる。後で記載されるように、得られる相同プラスミドによる相同組換えが挿入されたマーカー遺伝子を発現する組換えウィルスをもたらす場合、及びそれがインビトロ及びインビボで安定である場合、最初に選択されたDNAフラグメントがNDV－F cDNA挿入のために適切な非必須領域にちがいない。

【００１８】

rHVTの構築：

本発明に関しては、組換え鳥類ヘルペスウィルスを生成するいずれの既知方法も適用できる。典型的な例は次の通りである：

（１）まず、上記に記載されるように、鳥類ヘルペスウィルスの非必須領域を含む組換えプラスミドが構成される。次に、好ましくは、5’末端側にプロモーター、及び3’末端側にポリアデニル化シグナル、そして、NDV－F cDNAが、相同プラスミドを生成するために、前記非必須領域中に挿入される。

【００１９】

（２）得られたプラスミドが、親HVTが感染した鶏胚線維芽細胞（CEF）中にトランスフェクトされるか、又は感染性HVTゲノムDNAと共にCEF細胞中にトランスフェクトされる。

（３）トランスフェクトされたCEF細胞が培養プレート中に移され、そしてウィルスプラークが見えるようになるまでインキュベートされる。

（４）同定できるプラークは、組換えウィルス及び親野生型ウィルスを含む。組換えウィルスは、挿入された外来性遺伝子の発現をふるいにかけるいずれか既知の方法により野生型ウィルスから純化される。

【００２０】

ニューカッスル病－マレック病二価ワクチン：

Fタンパク質NDVの防御抗原であり、そして主鎖HVTはマレック病ワクチンであるので、本発明のF遺伝子を含むrHVTは、ニューカッスル及びマレック病に対する二価ワクチンと

して、又はニューカッスル病に対する一価ワクチンとして使用され得る。
本発明のrHVTから主に成るワクチンは、鶏細胞及び／又は培地成分を含んでも良い。薬理学的に有害でない限り、ワクチンはいずれかの成分、例えば保護剤を含んでいても良い。さらに、本発明のワクチンは、いずれかの組換え又は非組換えウィルス、例えばMDV血清型１又は血清型２ワクチン株との混合物として使用され得る。

【００２１】

いずれかの既知方法が、本発明の組換え二価ワクチンの調製に適用できる。例えば、rHVTは、増殖可能な培養細胞、例えばCEF細胞中に接種され、そして適切な力価まで増殖される。次に、細胞を培養プレート又はボトルからスクレーパー又はトリプシン処理により削りはがし、そして遠心分離にゆだねられる。次に、上清液から分離された細胞が、ジメチルスルオキシドを含む培養培地に懸濁され、そして液体窒素に保存される。rHVTが上清液に存在する場合、それらは集められ、そして凍結乾燥される。

【００２２】

二価組換えHVTワクチンが、マレック病ワクチンを接種する既知のいずれかの方法により鶏に投与される。例えば、本発明のワクチンは希釈され、$10-10^5$、又はより好ましくは10^2-10^4プラーク形成単位（PFU）/用量が得られ、そして注射器又は注射のためのいずれかの装置により、生後１日での鶏の首の背部皮下に接種されるか、又は発育鶏卵中に接種される。

本発明の鳥用二価ワクチンは、NDV攻撃に対して90％又はそれ以上の防御能、及び有意なレベルの抗－NDV移行抗体を有する市販鶏に対して少なくとも70％又はそれ以上の防御能を付与する。

【００２３】

本発明においては、NDV攻撃に対する防御は、例に記載されるように、攻撃試験における合計の試験された鳥に対する保護された鳥の割合により決定される。まず、NDV攻撃ウィルスの適切な用量が、ワクチン接種されていない鳥を攻撃することによって決定される。90％又はそれ以上のそれらの鳥（陰性対照群）は、臨床症状を示さなければならない。次に、ワクチン接種された鳥が、大腿部領域への筋肉内経路により、又は気管内、眼内又は眼窩下洞経路により、同じ用量の攻撃ウィルスにより攻撃される。攻撃された鳥が、ニューカッスル病、特に神経学的症状の開始について観察された。

【実施例】

【００２４】

例１：相同ベクターの構成：

プラスミド構成を、標準の分子生物学技法（Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. 1989）により実質的に行った。DNA制限フラグメントは、アガロースゲル上で電気泳動し、そしてQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, カタログ番号28704号)により精製した。

【００２５】

1-1：プロモーター活性の測定のために使用されるプラスミドの構成：

プラスミドpGIMICSpolyASfi (2773bp, WO97/18215号)を、PUC18のマルチクローニングサイト中にポリアデニル化シグナル及びSfiI部位を導入することによって作製した。次に、pGIMICSpolyASfiを、NheIにより消化し、そしてNheI及びXbaI消化によりPicageneエンハンサー２（5064bp, TOYO INK MFG CO., LTD.）から切り出した1721bpのフラグメントと連結した。得られたプラスミドをpLUC-Pro (4494bp)と命名した。

【００２６】

次に、β－アクチンプロモーターを含むDNAフラグメント（約1.5kb）を、鋳型として鶏細胞ゲノムDNAバンクを用いて、PCRにより調製した。プライマーは、PrBac1（配列番号：２，５’-CAGTGTCGCTGCAGCTCAGTGCATGCACGCTCATTGCCC-3’）とPrBac2（配列番号：３，５’-GCTCTAGAGTCGACAAGCTTCATGGCTGGCTGCGGAGGAACAGAGAAGGG-3’)であった。

得られたフラグメントを、PstI及びXbaIにより消化し、そしてPstI及びXbaIによりpLUC-Proを消化することによって作製された、4482bpのフラグメントを連結した。pLUC-bacと

命名されたその得られるプラスミドは、5986bpの長さであり、そしてβ－アクチンプロモーター領域を含んだ。

【００２７】

pLUC-Bac をBamHI及びBglIIにより消化し、そして得られる5958bpのフラグメントをセルフライゲーションし、pLUC-bac-Smaを作製した。pLUC-bac-Smaは、β－アクチンプロモーターの上流にPstI及びSmaI部位を有するので、PstI及びSmaIによる、pLUC-bac-Smaの切断、続くセルフライゲーションでは、β－アクチンプロモーターの5'領域を切りちぢめた第１プラスミドを作製した。同様に、SacI及びXbaIによるpLUC-bacの切断、続くセルフライゲーションは、β－アクチンプロモーターの3'領域を切りちぢめた第２プラスミドを作製した。

【００２８】

次に、得られる２種のプラスミドを線状化し、そしてKilo-Sequence Deletion kit (TAKARA SYUZO CO., LTD.)を用いて、ExoIII 処理にゆだねた。サンプリングを、１，２及び３分で行い、第１プラスミドから７種のサンプル及び第２プラスミドから22種のサンプルを得た。すべての29種のプラスミドは、約200～1500bpのプロモーター領域を含んだ。得られるフラグメントを末端平滑化し、そして標準方法によりセルフライゲーションし、環状プラスミドを生成した。

【００２９】

ルシフェラーゼ活性の測定は、PicaGene（TOYO INK MFG. CO., LTD）により行った。手短には、１μgの個々の29種のプラスミドを、Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories) を用いて、エレクトロポレーションによりCEF細胞中に導入した。次に、細胞を24時間、培養し、そして細胞融解緩衝液（Pica Ceneキットに包含される）を添加した。細胞を-80℃で１時間、凍結し、そして室温で融解し、細胞溶解を完結した。遠心分離の後、10μlの回収された上清液を、100μlのPicaGene基質液に添加し、そして１分後、蛍光の強度（単位：RLU）を、Lumino-Meter (Model 11253, Bio-Rad Laboratories)により測定した。Lumino-Meterを用いて、生成されたルシフェラーゼ、すなわちプロモーター活性のインジケーターの量を計算した（図１を参照のこと）。

【００３０】

図１に示されるように、5'－末端側に欠失を有するサンプルの中で、TATAAAボックスの上流で120bp以上の欠失を有するそれらのサンプルは、プロモーター活性の強い低下を示した。対照的に、プロモーター活性と3'－末端側の欠失の長さとの間に相関関係は存在しなかった。例えば、約100bpの欠失は、全長のβ－アクチンプロモーターの活性に比較して、プロモーター活性の1/5低下をもたらした。3’末端側のさらなる欠失（100bp以上）は、元の活性を再び得なかった。

【００３１】

1-2：コア配列プロモーター：

文献からの引例（引例12－19）は、β－アクチンプロモーターのすべての領域が必須でないことを示す。この情報に基づいて、273, 211, 175及び163bpのフラグメントを、pLUC-bacのβ－アクチンプロモーターを鋳型として、PCRにより得た。プライマーは、配列番号：４（5’-TATTTTGTGCAGCGAT-3’）と配列番号：５（5’-ACGTCTAGAAGGCAACGCAGCGACT-3’）、又は配列番号４と配列番号：６（5’-CTGTCTAGATAACGCGGTCAGTCAGA-3’）であった。得られたフラグメントcoa273, coa211, coa175及びcoa163は、コアー配列プロモーター（COAs）とした。

【００３２】

次に、それらの４種のCOAsを、PstI及びXbaIにより消化し、そして得られるフラグメントを、PstI及びXbaIによりpLUC-proから切除された4482bpのフラグメントと連結した。それらの４種のプラスミドのプロモーター活性を、例１－１に記載のようにして測定した。結果的に、pULC-COA273, pLUC-COA211, pULC-COA175及びpLUC-COA163の活性は、十分な長さのβ－アクチンプロモーターの活性のそれぞれ97%, 76%、96%及び34%であった。pULC-COA273に含まれるプロモーターを、それが最高のプロモーター活性を示したので、COA

プロモーターと命名した。

【００３３】

1-3：p45/46Sfiの構成（図２及び３）：

MDV血清１型のgC相同（gCh）遺伝子（Coussensなど., J. Virol. 62: 2373-2379, 1988）及びその隣接するBamHI-Bフラグメント（審査請求されていない日本特許公開番号116-292583号）の情報に基づいて、２種のORF UL45hとUL46hとの間にSfiI部位を有するDNAフラグメントを、PCRにより調製し、そしてPUC18中にクローン化した。最初に、HVT DNAを、Leeなど.（J. Gen. Virol., 51: 245-253, 1980)の方法に従って、HVT FC126株が感染したCEF細胞から調製した。

【００３４】

鋳型として、その得られたHVT DNAを用いて、PCRを２対のプライマーにより行った。第１対は配列番号：７（5’-CCCCGAATTCATGGAAGAAATTTCC-3’）と配列番号：８（5’-CGCGGGCCTTATTGGCCAAAACACACCTCTAACGGTTACT-3’）であった。第２対は配列番号：９（5’-GCGCGGCCAATAAGGCCAAAACACAGTAACCGTTAGAGGT-3’）と配列番号：10（5’-CCCCAAGCTTTCAAGTGATACTGCGTGA-3’）であった。得られる２種のPCR産物の混合物を鋳型として用いて、もう１つのPCRを配列番号７及び８により行い、２種のORF UL45hとUL46hとの間にSfiI部位を有するフラグメントを生成した。

次に、得られるフラグメントを、EcoRI及びHindIIIにより消化し、そしてEcoRI及びHindIIIにより消化されたpUC18に連結した。得られたプラスミドを、p45/46Sfiと命名した。

【００３５】

1-4：pUC18polyASfiの構築：

プラスミドpUC18polyASfiを、下記の２種のオリゴヌクレオチド（配列番号11及び12）のアニーリング、EcoRI及びHindIII により消化されたpUC18への続く連結により作製した。

【００３６】

【化２】

配列番号11：138bp

5’-AGCTTGCCAATAAGGCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGCGAGCTCGCTAGCGGGCCCGCATGCGGTACCGTCGACAATAAAGAACCGCTTTAAGAATAGTGTTTATTTTTGTGTTTATGGCCAATAAGGCCG-3’

配列番号12：138bp

5’-AATTCGGCCTTATTGGCCATAAACACAAAAATAAACACTATTCTTAAAGCGGTTCTTTATTGTCGACGGTACCGCATGCGGGCCCGCTAGCGAGCTCGCCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGCCTTATTGGC-3’

【００３７】

挿入されたフラグメントをBglIにより切り出し、そして粘着末端を、p45/46SfiのSfiI部位中に挿入されるよう設計した。さらに、マルチクローニング部位を、フラグメントの5’末端に付加し、その結果、プロモーター－外来性遺伝子カセットを挿入することが可能である。SalI部位から下流の43bpの配列は、MDV GA株のUL45hの下流に位置する配列に由来するポリアデニル化シグナルであった。

【００３８】

1-5：pBacの構築：

例1-1に記載されるβ－アクチンプロモーターを含む、約1.5kbのDNAフラグメントを、PstI及びSalIにより消化し、そしてPstI及びSalIにより消化されたpUC18polyASfiにより連結した。得られたプラスミドを、pBacと命名した。

【００３９】

1-6：pGICOAの構築：

pBacを鋳型として用いて、PCRを、下記プライマーPrBac3及びPrBac4により行った。

PrBac3（配列番号：13）：5-TTTCTGCAGTATTTTGTGCAGCGAT-3’；
PrBac4（配列番号：14)：5’-CTGTCTAGATAACGCGGTCAGTCAGA-3’。
PrBac3はPstI部位を有し、そしてPrBac4はXbaI部位を有する。PCR増幅されたフラグメントを、PstI及びXbaIにより切断し、約300bpのフラグメントを得た。次に、フラグメントを、PstI及びXbaIにより消化した。pUC18polyASfiに連結した。得られたプラスミドをpGICOAと命名した。

【００４０】

1-7：Pecプロモーターの構築：

プロモーター活性を増強するためにCMVエンハンサーを、COAプロモーターに付加した。CMVエンハンサーは２ヶ所のBgl部位を有するので、CMVエンハンサーからのBglIカセットは、pGICOAのSfiI部位中に容易に挿入できなかった。BglI部位を欠失するために、in vitro mutagenesisを、鋳型としてpBK-CMV（Stratagene)を用いて3対のプライマーによるPCRにより行った。前記プライマーは、PrCMV1（配列番号15)とPrCMV3（配列番号：17)、PrCMV4（配列番号：18）とPrCMV5（配列番号：19）、及びPrCMV6（配列番号：20）とPrCMV2（配列番号：16）であった。

【００４１】

鋳型として前記得られた３種の増幅されたフラグメントを用いて、二次PCRを、プライマーPrCMV1とPrCMV21により行った。PrCMV1はPstI部位を有し、そしてPrCMV2はEcoT22I部位を有するので、増幅されたフラグメントを、PstI及びEcoT22により消化し、約300bpのフラグメントを生成し、これを、pGICOAのPstI部位中にクローン化し、pGIPecを生成した。Pecプロモーターとして命名された、pGIPecに含まれるプロモーターは、CMVエンハンサーからの約275bpフラグメント、続いてβ－アクチンプロモーターからの273bpフラグメントから成った。Pecプロモーターは、例1-1に記載されるようにインビトロで評価される場合、COAプロモーターの活性よりも6.5倍高い増強されたプロモーター活性を示した。

【００４２】

PrCMV1（配列番号：15）：5’-GGG CTG CAG AGT TAT TAA TAG TAA TCA ATT-3’
PrCMV2（配列番号：16）：5’-GGG ATG CAT CCA TTT ACC GTC ATT GAC GTC-3’
PrCMV3（配列番号：17）：5’-GGG TCG TTG GGC GGT CAG CCG GCG G-3’
PrCMV4（配列番号：18）：5’-CTT ACG GTA AAT GGC CCG CCG GCT G-3’
PrCMV5（配列番号：19）：5’-TAC ACT TGA TGT ACT GCC AAT GGG C-3’
PrCMV6（配列番号：20）：5’-TAT TTA CGG TAA ACT GCC CAT TGG C-3’

【００４３】

1-8：NDV－Fベクターの構築：

鋳型としてXLIII 10H（Sato, H.など., Virus Research, 7241-7255, 1987）を用いて、PCRを下記プライマーPrF1及びPrF2により行った。
PrF1（配列番号：21）：5’-GCTCTAGAGGATCCGCATGGGCTCCAGATCTTCTACCAGGATCCC-3’
PrF2（配列番号：22）：5’-GCGAGCTCGGTCCATGACTGAAGACTGCTATTGG-3’
PrF1はXbaI及びBamHI部位を有する。PrF2はSacI部位を有する。
約1.9kbの長さの増幅されたフラグメントは、Virus Research, 7241-7255,1987に報告される遺伝子と同一であるF遺伝子の553個のアミノ酸をコードした。前記フラグメントを、XbaI及びKpnIにより消化し、そしてXbaI及びKpnIにより消化されたpGIPec中にクローン化した。得られたプラスミドを、pGIPecFと命名した。

【００４４】

1-9：相同ベクターp45/46PecFの構築：

相同プラスミドp45/46PecFの構築のために、Pecプロモーター、NDV F遺伝子及びSV40ポリアデニル化シグナル配列を、p45/46Sfiに挿入した。はじめに、Pecプロモーター及びNDV F遺伝子を、BglI及びKpnIによりpGIPecFから切除した。第２に、SV40ポリアデニル化シグナル配列を、PCRによりpBR－CMV（Stratagene）から増幅し、そしてBglI及びKpnIにより切断した。それらの２種のフラグメントを、SfiI部位中にクローン化し、SfiI部位の１つをつぶし、そして相同プラスミドp45/46pecFを得た。

【００４５】

例２．rHVT/NDVの構築及び純化：

HVT野生型FC126株（wt-HVT）のウィルスDNAを、Morganなど．(Avian Diseases, 34: 345-351, 1990) 記載のようにして調製した。CEF細胞に、前記調製されたwt-HVT DNA及びp45/46PecFをトランスフェクトした（例３－３を参照のこと）。得られた組換えウィルスを、抗－NDV－F抗体によるプラーク染色によりプラーク純化した。手短には、５μgの相同ベクターp45/46PecF及び25μgのwt-HVT DNAを、100μlのSaline G (0.14MのNaCl、0.5mMのKCl、1.1mMのNa_2HPO_4、1.5mMのNaH_2PO_4、0.5mMの$MgCl_2$、0.011％のグルコース)に溶解した。

【００４６】

次に、CEF細胞を、0.7mlのSalineGに懸濁し、そしてエレクトロポレーションにゆだねた。トランスフェクトされた細胞を、室温で10分間インキュベートし、そしてLeibovitz’s L-15（GIBCO BRL, カタログ番号41300-39号）及びＭｃCoy’s 5A培地（GIBCO BRL, カタログ番号21500-061号）（１：１）、及び４％仔ウシ血清（LM(+)培地）から成る培地5mlを含む60mmの皿に移した。F遺伝子の発現を、一次抗体として抗－NDV－Fモノクローナル抗体３-１G/5（Morrison, T.G., Proc. Natl. Acad. Sci. USA84: 1020-1024, 1987）を用いての抗原－抗体反応を用いて、個々の回の精製で純化をくり返すことで確かめた。前記純化方法を、得られたすべてのプラークが抗－NDV－F抗体により正に染色されるまで、くり返した。純化された組換えHVTを、rHVT/NDVと命名した。

【００４７】

例３：rHVT/NDVの安定性の確認：

3-1：サザンハイブリダイゼーション：

精製されたrHVT/NDVを２つの150mmの皿のCEF細胞上で増殖させ、集密製プラークを得た。細胞をスクレーパーにより皿から回収し、Falconチューブに移し、そして1,500rpmで５分間、遠心分離した。回収された細胞を、リン酸緩衝液（PBS）により洗浄し、1.2mlのPBS及び0.8mlの溶解緩衝液（PBS中、1.25％のTritonX-100、250mMの２-ME、及び50mMのEDTA）に懸濁し、そして30秒間のかくはんにより可溶化した。

【００４８】

次に、可溶化物を、室温で５分間、3,000rpmで遠心分離し、そして上清液をEppendorfチューブに移した。ウィルスを、15,000rpm, 22℃で20分間の遠心分離により集めた。次に、回収されたペレットを、4μlのヌクレアーゼ溶液（0.25mg/mlのDNaseI, 0.25mg/mlのRNaseI、150mMのNaCl）を加えた12.5mMのトリス－Cl（pH7.5）1mlに懸濁し、37℃で30分間インキュベートし、そしてSDS－プロテアーゼ溶液（500mMのEDTA、25μl；10％のSDS、125μl；水、87μl；10mg/mlのプロテアーゼK、12.5μl；２－メルカプトエタノール、0.5μl）と共に55℃で30分間インキュベートすることにより破壊した。

【００４９】

得られた混合物を、フェノール－クロロホルムにより２度、処理し、そして16μlの５MのNaClを水相に添加した。ウィルスDNAを、2.5倍量のエタノール（-20℃）を添加することにより沈殿せしめ、70％エタノールにより洗浄し、そして遠心分離した。空気乾燥の後、回収されたペレットを、50μlのTE緩衝液（10mMのトリス－Cl（pH8.0）、1mMのEDTA）に溶解した。

【００５０】

次に、TE緩衝液中、回収されたウィルスDNAを、XhoI、XbaI及びSfuIにより消化し、そして0.8％アガロース電気泳動に供した。単一ゲル上での電気泳動されたDNAフラグメントを、２種のナイロン膜（Molecular Cloning: A Laboratory Manual, third edition, 6.36, Sambrook, J., and Russeli, D.W. Cold Spring Harbor Laboratory）に同時に転写した。ベーキングによりDNAを固定化した後、その固定されたDNAを、PCR DIG Probe Synthesis Kit (ROCHE DIAGNOSTICS, カタログ番号1636090号)により調製された、DIG－ラベルされたプローブ、すなわち“Fプローブ”又は“IS45/46プローブ”によりハイブリダイズした。Fプローブは、プライマーとしてNDV-F-F（配列番号23）及びNDV-F-R（配列番号24

）及び鋳型としてp45/46PecFを用いて、PCRにより調製した。IS45/46プローブを、45/46-F（配列番号25）及び45/46－R（配列番号26）及びP45/46Sfiにより調製した。

【００５１】

NDV-F-F（配列番号：23）：5’-CTAGCAGTGGCAGTTGGGAAGAT-3’

NDV-F-R（配列番号：24）：5’-GTTAAGGCAGGGGAAGTGATTTGT-3’

45/46-F（配列番号：25）：5’-GGGGAAGTCTTCCGGTTAAGGGAC-3’

45/46-R（配列番号：26）：5’-GGTGCAATTCGTAAGACCGATGGG-3’

サザンブロットの結果は、3.6kbのフラグメントがFプローブにハイブリダイズし、そして3.6及び1.2kbのフラグメントがIS45/46プローブにハイブリダイズすることを示し、このことは、その得られるrHVT/NDVが予想されるゲノム構造を有したことを示す。

【００５２】

3-2：rHVT/NDVのインビトロ安定性：

rHVT/NDVを、CEF細胞において10回、継代培養し、そしてサザンブロット解析にゆだねた。結果は例３－１で得られた結果と同じであり、このことは、本発明のrHVT/NDVが10回の継代培養の後でさえ安定性であったことを示す。

【００５３】

3-3：rHVT/NDVのインビボ安定性：

3000PFUのrHVT/NDVを、SPF鶏及び抗－NDV移行抗体を有する商業用鶏の背部皮下に接種した。ワクチン接種の後、３，４，５及び６週で、末梢血を、ワクチン接種された鳥から集め、そしてウィルスを末梢血中のリンパ球から回収した。リンパ球の回収は次の通りに行われた。

【００５４】

0.5mlのヘパリン溶液（100U/ml）を含む2.5ml注射器を用いて、2mlの血液を、鶏から集め、そして15mlのFalcon遠心管中の5mlのFicoll-Paque (Amersham-Pharmacia)上に重層した。1800rpmでの20分間の遠心分離の後、末梢血リンパ球のバンドが、Ficoll－Paqueと血清成分層との間の境界で形成された。境界層をパスツールピペットにより集め、9cmの皿におけるCEF細胞に接種し、７日間、培養した。リンパ球からのウィルスの単離は、プラークが、第１の培養、続く継代培養の間、観察された場合、成功と考えられた。その結果は、表１に要約された。

【００５５】

【表１】

表１：ワクチン接種された鳥の末梢血液リンパ球からのrHVTの単離：

	rHVT/NDV		HVTFC126		ワクチン接種されていない
	MA+***	SPF****	MA+	SPF	MA+
3週**	2/2*	ND*****	2/2	1/1	ND
4週	3/3	2/2	1/3	2/2	0/2
5週	3/3	2/2	1/3	ND	0/2
6週	3/3	2/2	1/3	2/2	0/2

*: ウィルスが回収される鳥の数/試験された鳥の数

: 週令　　*：移行抗体陽性鶏

****：SPF鶏　　*****：実施せず

【００５６】

表１に示されるように、rHVT/NDV及び親HVT FC126株を、接種の後３～６週でのワクチン接種された鶏の末梢血液リンパ球から回収した。例2に記載のように抗－F抗体により染色される場合、すべての組換えプラークは、F遺伝子を発現することが示され、このこと

は、rHVT/NDVがインビボ継代培養の後、安定性であることを示唆する。

【００５７】

例４．rHVT/NDVによる挿入された遺伝子発現の確認：

4-1：免疫蛍光法：

rHVT/NDV感染された細胞を、組織培養チャンバースライドにおいて新鮮なCEF細胞と共に37℃でインキュベートし、そして得られるプラークを冷アセトンにより固定した。発現された抗原遺伝子産物を検出するために、鶏抗－NDV抗血清又はウサギ抗－F抗血清を、一次抗体としてPBS中、500倍希釈溶液で使用した。

【００５８】

固定された細胞を、100％湿度下室温で約１時間、前記一次抗体と共にインキュベートし、PBSにより３度、洗浄し、そして室温で約１時間、二次抗体と反応せしめた。蛍光物質（FITC）によりラベルされた、抗－鶏免疫グロブリン又は抗－ウサギIgG抗体を、二次抗体として使用した。PBSにより３度、洗浄した後、処理されたスライドを、蛍光顕微鏡により観察した。親株HVT FC-126により感染された細胞を対照として使用した。その結果は表２に要約された。

【００５９】

【表２】

表２：rHVT/NDVによる挿入されたF遺伝子の発現（蛍光の検出）：

ウィルス	一次抗体			
	ウサギ抗－F抗血清	鶏抗－NDV抗血清	抗－VP2モノクローナル抗体（R63）	PBS
rHVT/NDV	＋	＋	－	－
FC126	－	－	－	－
ナシ	－	－	－	－

＋：検出された、－：検出されなかった

【００６０】

4-2：ウェスターンブロット：

CEF細胞を、rHVT/NDVによりm.o.i.=0.1で感染し、72時間インキュベートし、そしてSDS－GEL荷電緩衝液に溶解した。同様に、親HVT FC126により感染された細胞又は感染されていない細胞をインキュベートし、そして溶解した。得られるサンプルを還元し、変性し、そしてSDS－PAGEにゆだねた。電気泳動されたタンパク質を、SDS－GELからPVDF膜（Immobilon-P, Millipore）に転写し、これを、PBS中、１％（w/v）脱脂粉乳において室温で１時間、ブロックした。

【００６１】

次に、処理された膜を、500倍希釈溶液中、抗－Fウサギ抗血清と室温で反応せしめ、PBSにより３度、洗浄し、ビオチニル化された抗－ウサギヤギ抗血清と共にインキュベートした。PBSにより３度、洗浄した後、膜をアビジン－アルカリホスファターゼ複合体と共に１時間インキュベートし、PBSにより３度、洗浄し、そしてBCIP－NBT（アルカリホスファターゼの基質）と反応せしめた。図４に示されるように、60kDaのタンパク質バンドを、rHVT/NDV感染された細胞を有するレーンにおいてのみ観察し、これは、Fタンパク質の予想されるサイズであった。

【００６２】

例５．SPF鶏におけるrHVT/NDVの効果：

例２で得られたrHVT/NDVを、ニューカッスル病のワクチンとして効果試験にゆだねた。

1,950PFU/100μl/鳥のrHVT/NDVを、15羽の生後１日のSPF鶏（LineM, Japan Biological Laboratories）の背部に20ゲージ注射器を用いて皮下接種した。ワクチン接種後、３週

間から、血清をワクチン接種された鳥から集めた、そして抗－NDV抗体力価を、市販のELISAキット（IDEXX、ニューカッスル病を診断するためのELISAキット）により測定した。

【００６３】

陽性対照群の鶏を、生後14日で、市販のNDV生ワクチンにより、その製造業者の推薦に従ってワクチン接種した。陰性対照群の鶏は、いずれのワクチンも投与されなかった。生後43日で（ワクチン接種の後42日）、すべての３種のグループの鶏を、10^3EID_{50}のNDV－TexasGB、すなわちアメリカ合衆国における標準攻撃株により、大腿部領域への筋肉内経路により攻撃した。攻撃された鶏を、死亡率を調べるために、又はニューカッスル病の発症を検出するために、毎日、観察した。

【００６４】

【表３】

表３：強毒NDVによるrHVT/NDV接種SPF鶏の攻撃試験：

ワクチン接種	用量 (PFU/鶏)	鶏の数	発症数/合計（%）		孵化時でのHI (ELISA)力価	攻撃時での ELISA力価
rHVT/NDV	1950	20	0/20	(0)	0	0.207±0.03
市販のNDV 生ワクチン	ラベルに基づいて	10	0/10	(0)		1.089±0.29
陽性対照	N/A	10	11/12	(92)		0.089±0.01
陰性対照	N/A	5	0/5	(0)		N/A

【００６５】

表３に示されるように、rHVT/NDVをワクチン接種された鶏は、いずれの臨床学的症状も示さず、そして攻撃時のELISA力価は有意に高められた。

【００６６】

例６．NDV移行抗体陽性鶏におけるrHVT/NDVの効果：

抗－NDV移行抗体陽性鶏に関するワクチンとしてのrHVT/NDVの効果を試験するために、市販鶏（Hy-line, Kanagawa Youkei Regoukai）の受精卵を購入し、そしてインキュベートした。1,950PFU/μlのrHVT/NDVを、20ゲージの1.5インチ注射器を用いて、18日胚に接種した。陽性対照群の鶏を、市販のNDV生ワクチンにより、その製造業者の推薦に従って、生後15日でワクチン接種した。陰性対照群の鶏は、いずれのワクチンも投与されなかった。生後43日で、すべての３種のグループの鶏を、10^3EID_{50}のNDV－TexasGB、すなわちアメリカ合衆国における標準攻撃株により、大腿部領域への筋肉内経路により攻撃した。攻撃された鶏を、死亡率を調べるために、又はニューカッスル病の発症を検出するために、毎日、観察した。

【００６７】

【表４】

表４：強毒NDVによるrHVT接種市販鶏の攻撃試験：

ワクチン接種	用量 (PFU/鶏)	鶏の数	発症数/合計（%）		孵化時でのHI (ELISA)力価	攻撃時での ELISA力価
rHVT/NDV	1950	10	0/20	(0)	N/A	0.471±0.108
市販のNDV 生ワクチン	ラベルに 基づいて	10	0/10	(0)	N/A	1.386±0.287
陽性対照	N/A	10	10/10	(100)	N/A	0.047±0.003
陰性対照	N/A	5	0/5	(0)	N/A	N/A

【００６８】

表４に示されるように、rHVT/NDVによりワクチン接種された鶏は、いずれの臨床学的症状も示さず、そして攻撃時でのELISA力価は有意に高められた。

【００６９】

例７．ELISA力価とワクチン効果との間の相関関係：

ELISA力価と防御との間の相互関係を、例５及び６に記載されるようにワクチン接種された鶏からの攻撃の日に集められた血清における抗－NDV力価を測定することによって評価した。抗体力価を、例５に記載される市販のELISAキットにより測定した。図５及び６は、それぞれ、生存した又は生存しなかったSPF及び市販鶏のELISA力価を示す。示されるように、0.15又はそれ以上の抗体力価（S/P値）を有するすべての鶏は、ビルレントNDV攻撃から耐過した。

【００７０】

例８．免疫持続期間：

例６に記載のようにrHVT/NDVによりワクチン接種された5羽の鶏を、攻撃を行わないで維持し、そして２週ごとに、集められた血清のNDV－ELISA力価を測定した。対照として、ワクチン接種されていない鶏を同じ方法にゆだねた。例７において得られたS/P値0.15を、防御を決定するための基準として使用した。結果は表５に示される。

【００７１】

【表５】

表５：rHVT/NDVにより付与される防御免疫持続期間：

グループ		週令											
		2	3	4	5	7	11	15	20	24	30	45	50
rHVT /NDV	抗体力価	0.85	0.50	0.31	0.21	0.36	0.84	0.91	0.88	1.21	0.90	1.04	1.12
	防御	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
ワクチン接種されていない対照	抗体力価	0.74	0.46	0.10	0.03	-0.03	0.02	0.05	0.02	0.02	0.00	0.01	0.02
	防御	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No

【００７２】

表５に示されるように、生後４週で、ワクチン接種されていない鶏のELISA力価は、基準値よりも低い値に低下し、これは防御が存在しないことを示唆する。生後50週までには

、力価はほぼゼロまで低下した。対照的に、ワクチン接種された鶏は、生後５週で最低の力価を示し、これは完全な防御を付与するのに十分に高かった。その後、前記値は、生後24週まで、徐々に上昇し続け、そして生後50週まで、同じで維持した。それらのデータは、本発明のrHVT/NDVがワクチン接種された移行抗体陽性の商業用鳥において長期続く防御免疫を誘導できることを示す。

【００７３】

例９．rHVT/NDVワクチン接種された鶏の末梢血液リンパ球からのrHVT/NDVの単離：

3000PFUのrHVT/NDVを、生後１日の抗NDV移行抗体陽性の市販鶏の背後に皮下接種した。鶏を30週間、維持し、そして２週ごとに、末梢血液をワクチン接種された鳥の羽の静脈から集めた。ウィルスを、例３に記載のようにして、末梢血液におけるリンパ球から回収した。ウィルスを、rHVT/NDVによりワクチン接種されたすべての鶏から回収し、そしてすべてのウィルスは、F遺伝子を発現することを示された。

【図面の簡単な説明】

【００７４】

【図１】図１は、欠失したβ－アクチンプロモーターの活性を示すグラフである。

【図２】図２は、相同プラスミドp45/46PecFの構築の間の中間体プラスミドpGIPecFの構築を示す図である。

【図３】図３は、相同プラスミドp45/46PecFの構築を示す図である。

【図４】図４は、NDV Fウサギ抗血清を用いての、rHVT/NDV、rHVT/NDV５継代、及びHVT親株のウエスタンブロット測定の結果を示す。

【図５】図５は、生き残った鳥及び生き残らなかった鳥（SFP鶏）からの血清のELISA力価を示すグラフである。

【図６】図６は、生き残った鳥及び生き残らなかった鳥（市販の鳥）からの血清のELISA力価を示すグラフである。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Zeon Corporation

<120> Recombinant herpesvirus of turkeys and use thereof

<130> NDV

<140>
<141>

<160> 26

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 555
<212> DNA
<213> Gallus gallus

<220>
<221> promoter
<222> (1)..(555)

<400> 1
gagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg 60
cgttacataa cttacggtaa attggcccgc cggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt 120
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca 180
atgggtggag tatttacggt aaactgccca ttggcagtac atcaagtgta tcatatgcca 240
agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt aaatggatgc agtattttgt gcagcgatgg 300
gggcgggggg gggggcgcg cgccaggcgg ggcggggcgg ggcgaggggc ggggcggggc 360
gaggcggaga ggtgcggcgg cagccaatca gagcggcgcg ctccgaaagt ttcctttcat 420
ggcgaggcgg cggcggcggc ggccctataa aaagcgaagc gcgcggcggg cgggagtcgc 480
tgcgcgctgc cttcgccccg tgccccgctc cgccgccgcc tcgcgccgcc cgccccggct 540
ctgactgacc gcgtc 555

<210> 2
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
primer DNA for PCR

<400> 2
cagtgtcgct gcagctcagt gcatgcacgc tcattgccc 39

<210> 3
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:synthetic

primer DNA for PCR

<400> 3
gctctagagt cgacaagctt catggctggc tgcggaggaa cagagaaggg 50

<210> 4
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:synthetic primer DNA for PCR

<400> 4
tattttgtgc agcgat 16

<210> 5
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:synthetic primer DNA for PCR

<400> 5
acgtctagaa ggcaacgcag cgact 25

<210> 6
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:synthetic primer DNA for PCR

<400> 6
ctgtctagat aacgcggtca gtcaga 26

<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:synthetic primer DNA for PCR

<400> 7
ccccgaattc atggaagaaa tttcc 25

<210> 8
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:synthetic primer DNA for PCR

<400> 8
cgcgggcctt attggccaaa acacacctct aacggttact 40

<210> 9
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:synthetic primer DNA for PCR

<400> 9
gcgcggccaa taaggccaaa acacagtaac cgttagaggt 40

<210> 10
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:synthetic primer DNA for PCR

<400> 10
ccccaagctt tcaagtgata ctgcgtga 28

<210> 11
<211> 138
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Modified synthetic oligonucleotide from pUC18

<400> 11
agcttgccaa taaggctgca ggtcgactct agaggatccc cgggcgagct cgctagcggg 60
cccgcatgcg gtaccgtcga caataaagaa ccgctttaag aatagtgttt atttttgtgt 120
ttatggccaa taaggccg 138

<210> 12
<211> 137

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Modified
synthetic oligonucleotide from pUC18 plasmid

<400> 12
aattcggcct tattggccat aaacacaaaa ataaacacta ttcttaaagc ggttctttat 60
tgtcgacggt accgcatgcg ggcccgctag cgagctcgcc cggggatcct ctagagtcga 120
cctgcagcct tattggc 137

<210> 13
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
primer DNA for PCR

<400> 13
tttctgcagt attttgtgca gcgat 25

<210> 14
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
primer DNA for PCR

<400> 14
ctgtctagat aacgcggtca gtcaga 26

<210> 15
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
primer DNA for PCR

<400> 15
gggctgcaga gttattaata gtaatcaatt 30

<210> 16
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic primer DNA for PCR

<400> 16
gggatgcatc catttaccgt cattgacgtc 30

<210> 17
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic primer DNA for PCR

<400> 17
gggtcgttgg gcggtcagcc ggcgg 25

<210> 18
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic primer DNA for PCR

<400> 18
cttacggtaa atggcccgcc ggctg 25

<210> 19
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic primer DNA for PCR

<400> 19
tacacttgat gtactgccaa gggc 24

<210> 20
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic primer DNA for PCR

<400> 20

tatttacggt aaactgccca ttggc 25

<210> 21
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic primer DNA for PCR

<400> 21
gctctagagg atccgcatgg gctccagatc ttctaccagg atccc 45

<210> 22
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic primer DNA for PCR

<400> 22
gcgagctcgg tccatgactg aagactgcta ttgg 34

<210> 23
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic primer DNA for PCR

<400> 23
ctagcagtgg cagttgggaa gat 23

<210> 24
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic primer DNA for PCR

<400> 24
gttaaggcag gggaagtgat ttgt 24

<210> 25
<211> 24

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic primer DNA for PCR

<400> 25
ggggaagtct tccggttaag ggac 24

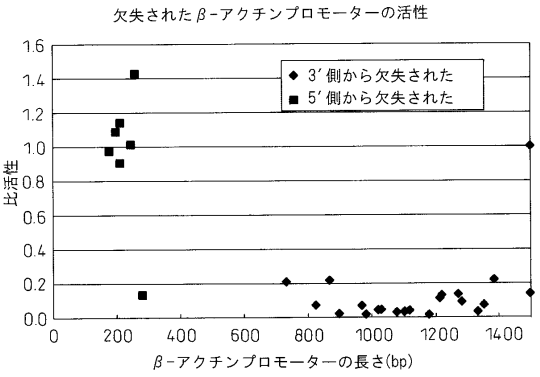
<210> 26
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic primer DNA for PCR

<400> 26
ggtgcaattc gtaagaccga tggg 24

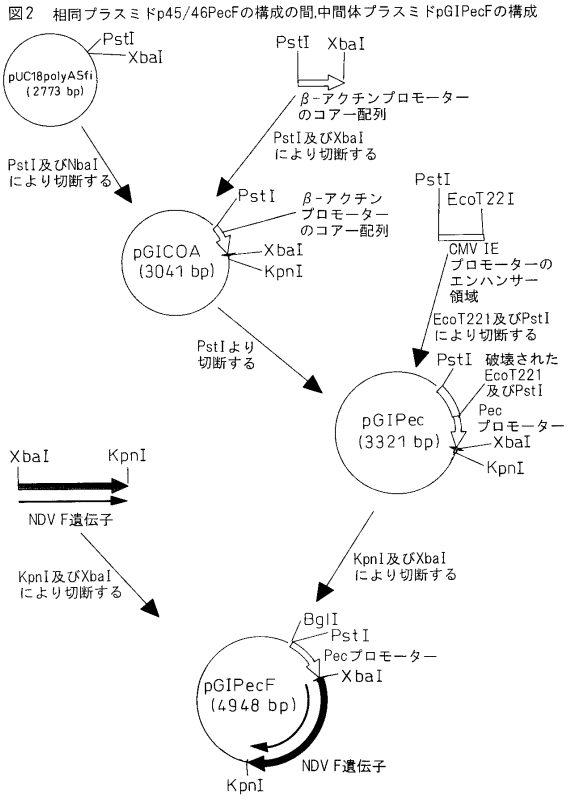
【図１】

図1



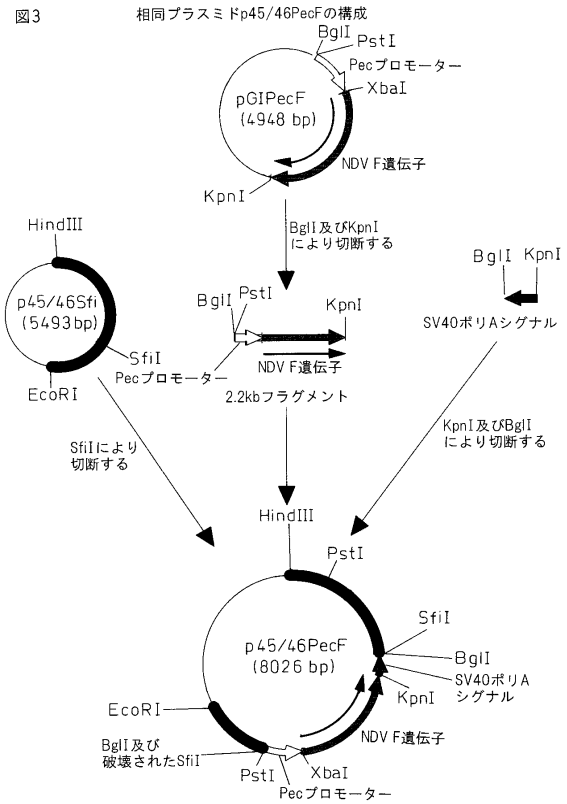
【図２】

図2 相同プラスミドp45/46PecFの構成の間,中間体プラスミドpGIPecFの構成



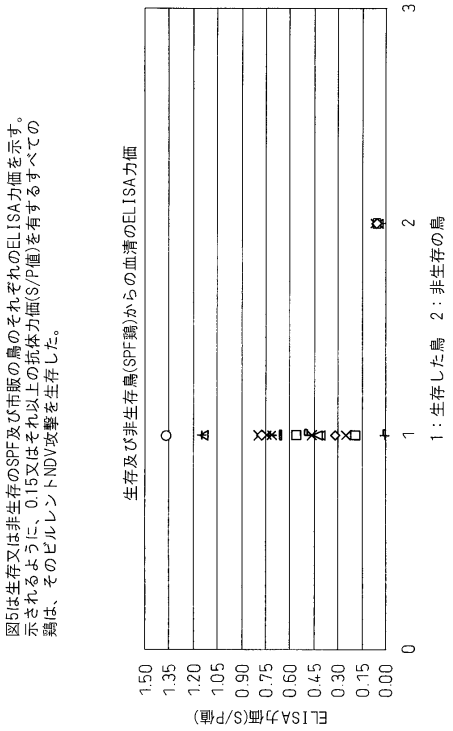
【図３】

図3



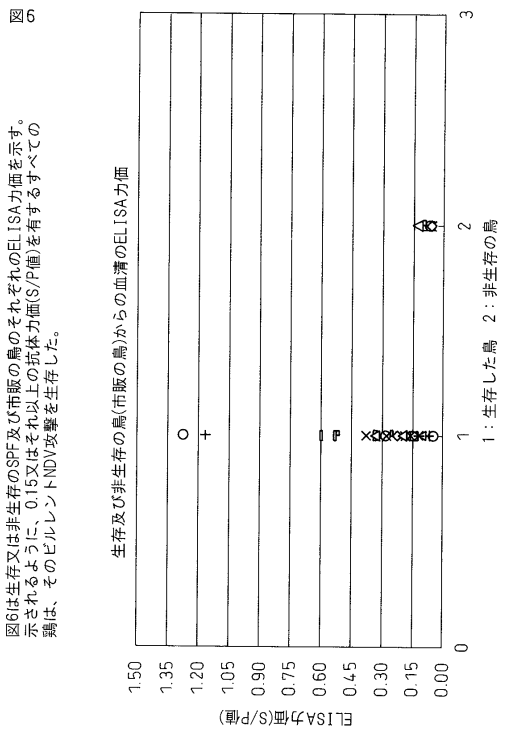
【図５】

図5



【図６】

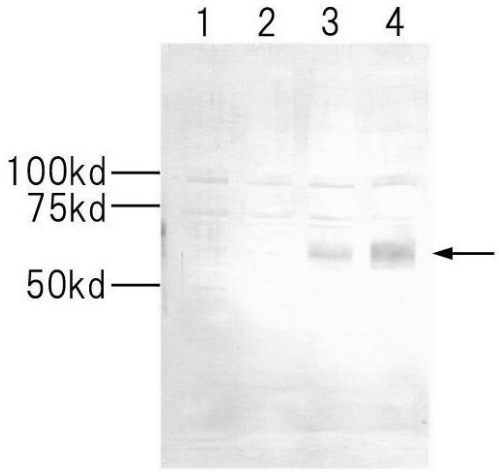
図6



【図４】

図４

rHVT/NDV、rHVT/NDV 継代 5 及び HVT 親株の NDV F
ウサギ抗血清を用いてのウェスターンブロットアッセイ。
レーン 1＝CEF 陰性対照；レーン 2＝HVT 親株；
レーン 3＝rHVT/NDV；レーン 4＝rHVT/NDV 継代 5。
矢印は 60kDa の分子量を有する F タンパク質を示す。



フロントページの続き

(72)発明者　ドーシー，クリスティー　エム
アメリカ合衆国，カンザス　６６２１５，レネクサ，ローズヒル　ロード　８９０６，シー／オー　バイオミューン　カンパニー
(72)発明者　斉藤　修治
神奈川県横浜市磯子区３丁目３５番１６号４０６
(72)発明者　奥田　尚志
東京都町田市忠生４丁目１１番２０号
(72)発明者　久保村　真由美
神奈川県川崎市中原区上小田中２丁目７番２５号７０１

審査官　六笠　紀子

(56)参考文献　特開２００１－０００１８８（ＪＰ，Ａ）
国際公開第９９／０１８２１５（WO，Ａ１）
Vaccine.，１９９３年，Vol.11，pp.349-358
Vaccine.，１９９８年，Vol.16，pp.472-479
Ｊ Virol.，２０００年，Vol.74，pp.3217-3226

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N 15/09
A61K 39/245
A61P 31/22
C12N 7/00
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CA(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)