

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3676449号  
(P3676449)

(45) 発行日 平成17年7月27日(2005.7.27)

(24) 登録日 平成17年5月13日(2005.5.13)

(51) Int.C1.<sup>7</sup>

F 1

**C12N 7/00**  
**A61K 39/12**  
**A61P 31/12**  
**A61P 37/04**  
**GO1N 33/53**

C12N 7/00  
A61K 39/12  
A61P 31/12 171  
A61P 37/04  
GO1N 33/53

D

請求項の数 11 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-270172  
(22) 出願日 平成7年10月18日(1995.10.18)  
(65) 公開番号 特開平8-228770  
(43) 公開日 平成8年9月10日(1996.9.10)  
審査請求日 平成14年8月23日(2002.8.23)  
(31) 優先権主張番号 9420956.6  
(32) 優先日 平成6年10月18日(1994.10.18)  
(33) 優先権主張国 英国(GB)  
(31) 優先権主張番号 9508704.5  
(32) 優先日 平成7年4月28日(1995.4.28)  
(33) 優先権主張国 英国(GB)  
(31) 優先権主張番号 9509425.6  
(32) 優先日 平成7年5月10日(1995.5.10)  
(33) 優先権主張国 英国(GB)

微生物の受託番号 ECACC V94090731

(73) 特許権者 394010986  
アクゾ・ノベル・エヌ・ペー  
オランダ国、6824・ペー・エム・アーネム、フエルペルウエヒ・76  
(74) 代理人 100062007  
弁理士 川口 義雄  
(74) 代理人 100080403  
弁理士 中村 至  
(74) 代理人 100094776  
弁理士 船山 武  
(72) 発明者 マリアン・エフ・マツクローリン  
イギリス国、ノーザン・アイルランド、6  
・ピー・エヌ、ベルファスト・ピー・ティー  
・5、チエリーバレー・パーク・35

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】魚類膵疾患ウイルス

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

14 の海水中に維持した降海期後タイセイヨウサケに  $10^{3\text{--}5}$  T C I D<sub>50</sub> の力値で腹腔内注射すると、該魚に膵疾患の症候を発生するウイルスであつて、

(a) 該ウイルスが、European Collection of Animal Cell Cultures(ECACC)に受託番号V94090731で受託されている株、または該受託されたウイルス株と類似の遺伝子型及び/または表現型特性を有する近縁株であり、且つ

(b) 該ウイルスが、回復期の抗魚類膵疾患ウイルス(FPDV)抗血清または該受託ウイルス株V94090731に対する抗血清と血清学的に反応するものである

10

## 【請求項2】

実質的に他のウイルスまたは微生物材料を含まない請求項1に記載のウイルス。

## 【請求項3】

請求項1または2に記載のウイルスを含む、魚類膵疾患に対抗するためのワクチン。

## 【請求項4】

弱毒化または不活化形態の請求項1または2に記載のウイルスを含む請求項3に記載のワクチン。

## 【請求項5】

請求項1または2に記載のウイルスに選択的に結合し得る抗体を含む魚類膵疾患用診断

20

試薬。

【請求項 6】

マーカー、発色団、蛍光団、重金属、酵素標識、または抗体標識を有する請求項 5 に記載の診断試薬。

【請求項 7】

固定化形態である請求項 5 または 6 に記載の診断試薬。

【請求項 8】

請求項 1 または 2 に記載のウイルスを単離する方法であって、臍疾患を患う魚を同定し、感染組織をチヌークサケ胚細胞と同時に培養し、同時培養した細胞をチヌークサケ胚細胞に継代し、ウイルス粒子を単離することからなる方法。 10

【請求項 9】

前記感染組織が臍または腎であり、チヌークサケ胚細胞との同時培養を 28 日間実施する請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

魚類臍疾患を診断する方法であって、

1) 検査試料を請求項 5 から 7 のいずれか一項に記載の診断試薬と接触させて試薬複合体を生成するステップ；

2) 任意の洗浄ステップ：及び

3) 前記試薬複合体の存在及び必要によっては濃度を測定し、該検査試料中のウイルスの存在または量を決定するステップ 20  
を含む方法。

【請求項 11】

前記検査試料が、血液試料、または当該魚が含まれていた水の試料である請求項 10 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

魚類臍疾患の原因物質である新規のウイルスを提供する。該ウイルスを使用し、該疾患のワクチン及び／または診断方法を提供し得る。 30

【0002】

【従来の技術】

臍疾患 (P D) はタイセイヨウサケ (*Salmon salar L.*) に感染する深刻な疾患である。該疾患は、臍外分泌組織の損失並びに纖維症、心筋及び骨格筋ミオパシーを含む臍臓の病変を惹起する。ニジマス、wild Atlantic salmon などの他のサケ亜目も P D に感染し得ると考えられている。

【0003】

P D の発生は、1984 年に Munro らによって Helgoland Meeresuntersuchungen 37 : 571 - 586 (1984) に初めて記載されたが、P D は早くも 1976 年には認識されていた。P D は、ノルウェー、アイルランド、フランス、スペイン及び米国西部を含む世界中の主要なサケ養殖国の全てで報告されている (Kent ら, Bull. Eur. Ass. Fish Path. 7 : 29 - 31 (1987); Poppe ら, Bull. Eur. Ass. Fish Path. 9 (4) : 83 - 85 (1989); 及び、Raynard ら, Proceedings of a European Commission Workshop, Scottish Office Aquaculture Report No 1, p 2 - 4 (1992) 参照)。 40

【0004】

P D は、塩水に入って 1 年目の魚に感染し、海洋ケージ内に維持された養殖魚内で急速に広がることが知られている。Ferguson ら (Journal of Fish Diseases 9 : 95 - 98 (1986)) は、感染魚はやせ細り、食欲が無く、不 50

活発であって、ケージの隅に群がる傾向があり、水平位置を維持できないと報告している。一次的な臍病変に加え、Fergusonら(前出)は、PDに感染した魚は重症の変性心筋症を示すと報告している。これらの知見はMurphyらによる後の研究(*Journal of Fish Diseases* 15: 401-408 (1992))で確認されており、彼らは、PD感染魚においては心筋及び骨格筋ミオパシーが一層悪化することを見い出した。

#### 【0005】

アイルランドでは1988~1992年の間に、海水初年度に当たる降海期サケについて報告された致死数のうちPDは15~20%を占める。生産損失の点でアイルランド工業に対する推定コストは現時点で約25百万ポンド/年であると考えられている。1994年時点でのノルウェー、スコットランド及びアイルランドの生産高は以下のようである。

10

#### 【0006】

国	サケ生産高(トン)	海洋に放出された降海期サケ数
ノルウェー	200,000	80百万
スコットランド	55,000	20百万
アイルランド	44,000	7百万

McVicarらは、PDは感染性物質によって惹起されると推定した。この仮説は、該疾患の感染性病因を示している種々の研究者による疫学的研究及び伝播実験の結果によって裏付けされている(McVicar, *Aquaculture* 67: 71-78 (1987); McVicar, *Bull. Eur. Ass. Fish Path.* 10: 84-87 (1990); Raynardsら, *Dis. Aquat. Org.* 15: 123-128 (1993); 及び、Murphyら(1992)前出 参照)。最近になって Houghton (1994) 18: 109-118は、PDを接種した後の魚は再感染に対して耐性となり、これは、PDが感染性物質によって惹起されるという説を裏付けるものであると報告している。しかしながら、多数の試みがなされたにも拘わらずこれまでに感染性物質は単離されていない(McVicar (1987) 前出; Munro 前出; 及び、Murphy 前出 参照)。

20

#### 【0007】

本発明は、PDの原因物質の単離を初めて報告するものである。該原因物質は大きさが65.5±4.3nmの球状ウイルスであることが見い出され、本明細書ではFPDVウイルスと称する。突起を除くと該ウイルスは直径46.8±2.5nmを有し、クロロホルム及びpHに感受性を示し、BUDRによる阻害に対して耐性を示し、電子顕微鏡によって形態を調査すると、トガウイルス群のメンバーとの類似性を有する。トガウイルスマリーは、アルファウイルス(27種)、ルビウイルス(1種)及びArteriviruses(1種)の3つの属からなり、淡水サケ幼魚及び海洋降海期後サケに接種すると、臍、心臓、及び骨格筋の形態的变化を伴なう臍疾患を生じる。

30

#### 【0008】

1つの態様において本発明は魚類臍疾患ウイルス(FPDV)を提供する。

40

#### 【0009】

FPDVはトガ様ウイルスであり、電子顕微鏡で測定すると64~66nmの粒径を有すると共に1.2g/mLの塩化セシウム中密度を有する、エンペロープを備えた球状粒子からなる。14の海水中に維持した降海期後タイセイヨウサケに10<sup>3.5</sup>TCD<sub>50</sub>で腹腔内注射すると、該魚に臍疾患の症候を発生し、即ち食欲不振となり、臍胞状細胞壊死、心臓壊死及び骨格筋ミオパシーを発症する。

#### 【0010】

FPDVとは、本発明者は、上記特性を有するウイルスを意味する。本発明は特定のFPDVウイルス株に制限されないが、本発明の実施態様は、単離された特定のFPDV株及びその近縁株に関して記載する。「近縁株」とは、本発明者らは、単離された株と類似の

50

遺伝子型及び／または表現型特性を有する任意の株を意味する。特にこの表現は、実質的に同じ機能的活性を保持する、若干変性された形態のウイルスを含む。即ち、例えば幾つかのアミノ酸またはヌクレオチドの追加、欠失または変更はウイルスの機能的活性に、あるとしても極めて僅かな影響しか与えない。

**【0011】**

特に、FPDVとは、本発明者らは、回復期の抗FPDV抗血清または受託FPDVサンプル（E C A C C No. V 9 4 0 9 0 7 3 1）に対する抗血清と血清学的に反応する魚ウイルスを意味する。とりわけ、FPDVは、間接蛍光抗体試験（I F A）において上記抗血清のいずれかと陽性反応を示す魚ウイルスである。

**【0012】**

望ましくは本発明のウイルスは、実質的に他のタイプのウイルスまたは微生物材料を含まない形態である。

**【0013】**

FPDVサンプルは、1994年9月7日付けでEuropean Collection of Animal Cell Cultures, Porton Down, Wiltshire, 英国（E C A C C）に受託番号V 9 4 0 9 0 7 3 1で受託されている。

**【0014】**

更に本発明は、FPDVから誘導されたポリペプチド（この用語はかかるポリペプチドの機能的均等物または部分を含む）を提供する。本明細書に使用される「ポリペプチド」なる用語は、分子の大きさに関して限定されず、個々の小ペプチド及び大タンパク質を含む。

**【0015】**

本発明のポリペプチドは任意の慣用方法によって製造し得る。例えばポリペプチドは、活性または弱毒化形態のFPDVをタンパク質分解処理するなどして、かかる形態のFPDVから回収することにより製造し得る。適当なタンパク質分解剤は当業者には公知であるが、例えばトリプシンまたはペプシンといった酵素、硫酸または塩酸といった化学試薬が挙げられる。洗剤を使用してウイルス調製物を可溶化し、活性であり得る全タンパク質を調製することもできる。或いは、本発明のポリペプチドは遺伝子操作技術によって製造することもできる。例えば、ヌクレオチド配列の適当なタンパク質コーディング部分を発現させ、必要なポリペプチドを生成することができる。必要とされる遺伝子操作技術は当業者には公知であるが、簡単に言えば、FPDV RNAゲノムの少なくとも適当な部分のcDNAコピーを作製する。cDNA生成に適したプライマーとしては、オリゴTプライマー、関連ウイルスのヌクレオチド情報から設計されたプライマー、またはランダムな配列で生成されたプライマーが挙げられる。次いでDNAを適当なベクター内に置き、必要によってはそれによってコードされるタンパク質を適合性宿主によって発現させることができる。任意のステップとして、適当な発現制御配列の挿入、組換えベクターのクローン増殖、及び要求される組換え構築物の選択が含まれる。

**【0016】**

遺伝子操作技術の一般参考文献として、Maniatisら, Molecular Cloning a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982が挙げられる。

**【0017】**

本発明のポリペプチドは、（その機能的均等物または部分を含む）FPDVの全てのポリペプチドを含み、ウイルス粒子の構造的または非構造的役割を有するポリペプチドを含む。FPDVの構造的ポリペプチドに関してはFPDVのコア及びエンベロープポリペプチドが挙げられる。本発明は更にFPDVの表面エピトープを含むポリペプチドを包含する。本発明は更に非グリコシル化及びグリコシル化形態のポリペプチドも包含する。

**【0018】**

更に本発明は、FPDVゲノムの少なくとも一部から誘導されるヌクレオチド配列を含む

10

30

40

50

遺伝子構築物を提供する。

【0019】

従って本発明は、少なくとも一部が、タンパク質コーディング領域を含み得るFPDVゲノムの少なくとも一部から誘導されるヌクレオチド配列に対応するヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを提供する。

【0020】

「から誘導される」なる表現は、RNAであろうとDNAであろうと、一本鎖であろうと二本鎖であろうと、FPDVのゲノムの少なくとも一部と同一のコピー及び相補的なコピーを含む。「から誘導される」なる表現は更に、発現されるポリペプチドのアミノ酸配列に（遺伝子コードの縮重による）影響を及ぼさない変更を含む配列、並びに、（発現されるポリペプチドの機能を含む）機能に実質的に不利な作用を惹起しないヌクレオチドの欠失、追加または置換によって修飾された配列を含む。10

【0021】

特に本発明の遺伝子構築物は、天然FPDVゲノム及びそのcDNA均等物を包含する。更に本発明の遺伝子構築物は、FPDVゲノムの少なくとも一部から誘導されるヌクレオチド配列を含む全ての組換え構築物を含む。かかる組換え構築物は、FPDVの特定のポリペプチドまたはポリペプチド群のみを発現するように設計することもできるし、非FPDV（外来）発現制御配列を含むこともできる。或いは、組換え構築物はFPDVの発現制御配列を含んでもよいし、必要によっては非FPDV（外来）タンパク質コーディング配列を含んでもよい。20

【0022】

特定の実施態様においては、本発明は、上記のごとき遺伝子構築物を含む（クローニングまたは発現ベクターのごとき）ベクターを含む。ベクターには、細菌及び酵母宿主細胞用の慣用クローニング及び発現プラスミド、並びに、真核細胞系中でのFPDVタンパク質の発現に有用となり得るワクシニアのごとき真核ウイルスベクターが含まれる。かかるベクターを使用して適当な宿主細胞を（クローニングまたは発現の目的で）形質転換し得、この形質転換細胞も本発明の別の態様を形成する。FPDV自体による形質転換に適した宿主細胞としては、チヌークサケ胚（CHSE-214）細胞、タイセイヨウサケ細胞系及びニジマス細胞系が挙げられる。しかしながら、生成されたベクターがFPDVから誘導されるヌクレオチド配列の一部のみからなる場合は、ベクターと適合性のある宿主細胞系を選択することがより適当となり得る。ウイルス性出血性敗血症ラブドウイルスの発現に首尾よく使用されているE. coli及びYersinia ruckeriのごとき原核性宿主細胞や、培養物中の酵母、藻類及び魚類、昆虫または哺乳動物細胞を含む真核宿主細胞を挙げることができる。バキュロウイルス発現系を使用する場合には昆虫細胞は特に有効であり得る。適当な宿主細胞は当業者には公知である。30

【0023】

特に本発明のベクターは、FPDVゲノムの遺伝子操作物をベースにして非FPDVポリペプチドのコーディング配列を含み、その非FPDVポリペプチドを発現し得る。

【0024】

遺伝子構築物、ベクター及び形質転換宿主細胞を使用してポリペプチド、特にFPDVポリペプチドを発現し得る。40

【0025】

非FPDVポリペプチドは例えれば、魚類疾患原因物質由来のポリペプチドであり得る。ベクターはワクチンとして有用であり得、ベクターに感染させた魚において非FPDVポリペプチドが発現すると、魚類疾患原因物質に対する免疫応答が誘起される。

【0026】

現場暴露及び実験的暴露の後、魚はPDに対する強力な免疫を獲得することが立証されている（Raynardら、Dis Aquat Org 15, 123-128 (1993) 参照）。FPDVの単離により、PDの素早い診断を助成すると共にこの重要な魚類疾患の病因及び流行のより完全な研究の支援となる抗原及び核酸検出系の開発が可能とな50

る。本発明の遺伝子構築物及びポリペプチドは、FPDVに対するワクチン及び／または診断材料を製造するのに有用となり得る。

#### 【0027】

更に本発明は、FPDVまたはFPDVから誘導されたポリペプチド（その機能的均等物及び部分を含む）を含む、PDに対するワクチンを提供する。特にFPDVはワクチンベクターとして使用し得る、即ちワクチン製造に特に有用な発現ベクターとして遺伝子操作し得る。

#### 【0028】

本発明ワクチンは例えば弱毒化または不活化形態のFPDV自体とし得る。不活化形態のFPDVは、FPDV試料を例えば50以上に加熱したり、クロロホルムで処理し、pHを調整したり、または任意の他の適当な手段によって製造し得る。弱毒化形態のFPDVは、多くの場合に異なる種の細胞培養物においてウイルスを長期間継代するか、または次第に高い温度で増殖させ、高温により適合する集団を選択することにより製造し得る。ブラークサイズによって変種株を選択するブラーク精製方法の開発は他のウイルスに使用されており、ここでも適当となり得る。或いはワクチンは、FPDVのポリペプチド、好ましくは魚（特にタイセイヨウサケ）において免疫原性であるポリペプチドを含み得、即ち該ポリペプチドは当該魚において免疫反応を誘発する。このようなポリペプチドは、任意の慣用手段、例えば遺伝子操作技術を使用して製造することができる。

#### 【0029】

他のトガウイルスに対するワクチンも当分野において公知であり、適当なワクチンを製造する方法を当業者は使用し得る。Roerigら, High Technology Route to Virus Vaccines, Driesman編, Bronson & Kennedy 1985, p142、及びLeongら, Annual Review of Fish Diseases (1993) pp225-240が挙げられる。

#### 【0030】

上述のごとく発現ベクターとしてFPDVを使用し、適当なFPDVワクチンまたは非FPDVワクチンを、セムリキ森林熱ウイルス(SFV)に類似の方法で製造し得る。SFVについて言えば、感染性RNAを転写し得る全長cDNAクローンが製造されており、且つSFVが分子生物学的に解明されていることから、RNA複製タンパク質をコードするcDNAをキャプシドタンパク質をコードするcDNAから容易に分離し得る。キャプシドタンパク質をコードするサブゲノムmRNAは感染細胞から単離することができる。この分離を使用し、RNA複製タンパク質のみをコードするRNAを包む正常ウイルスキヤプシドを含む「非複製」SFV粒子を製造することができる。かかる粒子は、個々のcDNAからin vitro転写によってそれぞれ合成された2種の異なるRNAを有する細胞を同時トランスフェクトすることにより製造される。転写物1はRNA複製の作用を担うタンパク質をコードし、転写物2はキャプシド及びエンベロープを構成するタンパク質をコードする。トランスフェクト細胞内で、両RNAが複製及び翻訳される。パッケージングシグナルを有することから、複製タンパク質をコードするRNAのみがキャプシドに封じ込められる。RNA複製能をコードするcDNA中に外来遺伝子を取り込むことで、SFVを極めて有効な発現系として使用し得るようになった。即ち、修飾転写物1でトランスフェクトされた細胞は外来タンパク質を発現する。SFVのベクターワクチンとしての潜在能力は、細胞が修飾転写物1及び転写物2で同時トランスフェクトされた時に実現される。この場合は、細胞に感染し防御免疫応答を誘起し得る外来タンパク質を効果的に産生する「非複製」SFV粒子が産生される結果となる。

#### 【0031】

必要によっては、上記ワクチンを幼若サケ、例えば淡水期のサケに投与することができる。ワクチンは、魚を含む水に直接添加することができる。或いは、魚（または魚サンプル）に直接接種することもできる。魚サンプルのみを接種する場合、ワクチン接種した魚に接触することにより、免疫が他の魚に賦与され得る。

10

20

30

40

50

**【0032】**

別の態様において本発明は、FPDVまたはその成分に選択的に結合し得る物質を含む、PDに対する診断試薬を提供する。

**【0033】**

前記物質の例としては、FPDV自体またはそのポリペプチドに選択的に結合し得る抗体または他のタンパク質、FPDV、そのオリゴ糖またはグリコシル化ポリペプチドに選択的に結合し得るレクチン、及びFPDVゲノムの少なくとも一部と相補的な配列を有するポリヌクレオチドが挙げられる。

**【0034】**

必要によっては本発明診断試薬は、放射性標識、発色団、蛍光団、重金属、酵素標識、抗体標識などのマーカーを含み得る。また必要によっては本発明の診断試薬は（例えばビーズ、ロッド、容器表面または膜上に）固定し、検査すべき試料を前記診断試薬と直接接触させることができる。10

**【0035】**

本発明の診断試薬中の前記物質として使用し得るFPDVに特異的な抗体は本発明の別の態様を形成する。必要であれば、該抗体はモノクローナル抗体とし得る。

**【0036】**

更に別の態様において本発明は、FPDVを単離する方法を提供する。該方法は、PDを患う魚、好ましくは（Munroら、前出によって定義される）急性期PDの魚を同定することを含む。感染組織（例えば臍または腎）をチヌークサケ胚（CHSE-214）細胞と一緒に適当な期間、例えば最高35日間、特に約28日間同時培養する。次いで、同時培養した細胞をCHSE細胞で継代である。20

**【0037】**

本発明は更に、PDを診断する方法であって、

- 1) 検査試料を本発明の診断試薬と接触させて試薬複合体を生成するステップ；
  - 2) 任意の洗浄ステップ；及び
  - 3) 試薬複合体の存在及び必要によっては濃度、即ち該試料中のFPDVの存在または量を測定するステップ
- を含む方法を提供する。

**【0038】**

本発明の診断方法は、FPDVを含む疑いのある任意の試料において実施し得る。例えば魚の組織試料（例えば腎、脾、心臓、臍、肝、腸、または血液）に該診断処理を実施し得る。一般には、血液試料を試験して、非致死的診断とするのが好ましい。魚を含むのに使用されていた水の試料に本発明診断試験を実施することもできる。30

**【0039】**

本発明は更に、FPDVを製造する方法及びFPDVから誘導されるポリペプチドを製造する方法も提供する。

**【0040】****【実施例】**

以下、非限定的な実施例を参照して本発明を更に説明する。40

**【0041】****実施例1****ウイルスの単離及び細胞培養****細胞培養**

ウイルス単離のため、チヌークサケ胚細胞系（CHSE-214, Nimsら, 1970）を全実験に使用した。使用した他の細胞は、epithelioma papulosum cyprini (EPC)、fathead minnow (FHM)、blue gill leponis macrochirus (BF2)、タイセイヨウサケ (AS)、ニジマス生殖腺 (RTG-2) 及びニジマス線維芽 (RTF) 細胞であった。細胞を、200 mM L-グルタミン、1% - 非必須アミノ酸、0.01 M Hepes、ペ50

ニシリン 100 IU / ml、ストレプトマイシン 100 µg / ml 及び 10% ウシ胎児血清 (FBS) Gibco, Scotland を補充した、アール塩及び炭酸水素ナトリウム 2.2 g / l を含むイーグル最少必須培地 (MEM) 中に維持した。細胞を 150 cm<sup>2</sup> フラスコまたは 24 ウェルプレート (Costar 3524) において 20°で増殖させた。

#### 【0042】

プレートを、密閉容器内で 3% CO<sub>2</sub> / 97% 空気雰囲気下でインキュベートした。ウイルス単離の間細胞を維持するため、抗生素質をペニシリン 500 IU ml<sup>-1</sup>、ストレプトマイシン硫酸塩 500 µg ml<sup>-1</sup>、アンホテリシン B 0.625 µg ml<sup>-1</sup> に増やし、FBS を 2% に減らした MEM からなる維持培地 (MEMM) を使用した。 10

#### 【0043】

##### 原ウイルス単離

アイルランド西海岸の養殖タイセイヨウサケにおいて臍疾患を発症した急性期の 20 匹の個々の魚から、腎、脾、心臓、肝、臍及び腸の試料を採取した。各魚から得た試料を別個に処理した。

#### 【0044】

##### 同時培養

同時培養によって単離するため、各腎の半分のアリコートを 2 ml シリンジに入れ、16 ゲージ皮下ニードルを通して 10 ml の維持培地 (MEMM) 中に押し込むことにより断片化した。得られた組織片の懸濁液を、24 時間前に調製しておいた単層の CHSE-214 細胞に接種した。1 ml の組織懸濁液を 24 ウェルプレートの各ウェルに接種し、15°で 28 日間または CHSE 細胞中に継代した場合は細胞変性効果 (CPE) が得られるまでインキュベートし、凍結及び溶解することなく、更に 28 日間インキュベートした。 20

#### 【0045】

##### 組織ホモジネート

各魚から得た腎の残りの部分と他の組織とをプールし、乳鉢及び乳棒を使用し、MEMM を用いて 10% ホモジネートを調製した。これらを 2500 g で 15 分間遠心し、上清 0.1 ml を、MEMM 中の最終希釈度 1 : 20、1 : 50 及び 1 : 100 で、CHSE-214 細胞を含む 24 ウェルプレート中に接種した。これらを 15° で最高 28 日間または CHSE 細胞中に継代した場合は CPE が見られるまでインキュベートし、15° で更に 28 日間インキュベートした。 30

#### 【0046】

##### CHSE-214 細胞中でのウイルス増殖曲線

CHSE-214 細胞中でのウイルス増殖を、24 ウェルプレート内の CHSE-214 細胞に FPDV 0.1 ml を、感染多度 (MOI) 1 TCID<sub>50</sub> / 細胞で接種し、ウイルスを 15° で 1 時間吸収させることにより測定した。接種材料を取り出し、細胞を MEMM で 3 回洗浄してから、1 ml MEMM で置き換えた。接種後 (PID) 0、2、4、6、8、10、12、14、21 及び 28 日目に、アッセイのため試料を以下のように取り出した。細胞外ウイルス試料に対しては、4 つのウェルのそれぞれから培地の半分を取り出し、プールし、800 × g で 5 分間遠心して細胞を除去した。上清は細胞外ウイルスを含んでいた。全ウイルス試料に対しては、残りの 0.5 ml の培地を、搔き取ることで取り出した付着細胞と合わせてプールし、一旦凍結及び溶解した。15° で 14 日間インキュベートした CHSE-214 細胞において滴定することにより、両試料のウイルス感染度をそれぞれ評価した。この一連の全ての試験の 50% 最終点を、Reed 及び Muench (1938) Am. J. of Hygiene 27: 493 - 497 の方法によって推算した。 40

#### 【0047】

##### 細胞培養物中でのウイルス増殖

本実験室において製造された epithelioma papilloma cypri 50

ni (EPC)、fathead minnow (FHM)、bluegill lepois macrochirus (BF2)、タイセイヨウサケ (AS) (Flow, Scotland)、ニジマス生殖腺 (RTG) 細胞及びニジマス線維芽細胞 (RTF) 系においてFPDVの細胞変性効果を調査した。培養物に、 $10^7 \text{ TCID}_{50} \text{ ml}^{-1}$  を含むウイルスプールの10倍希釀物を接種し、15でインキュベートし、CPEの出現を14日間にわたって調査した。CPEは全く認められず、CHSE-214細胞において培養液を滴定することにより培養物のウイルス増殖を検査した。全ての培養物を、同じ細胞内で15で14日間更に継代し、廃棄する前に、CHSE-214細胞中でのウイルス増殖を検査した。

## 【0048】

10

結果ウイルス単離

実験を行った20個の腎組織のうち2つからウイルスが単離された。これらは、CHSE-214細胞と一緒に28日間同時培養し、更にCHSE-214細胞系において継代させた。元の同時培養物にはCPEは見られなかった。しかしながら、継代すると、10日間インキュベートした後に、塞穴性及び空胞性で外観が不規則な小さな独立した細胞群が認められた。CHSE-214細胞中で更に4回継代すると、CPEの範囲が拡大された(図1参照)。 $10^{8.5} \text{ TCID}_{50} / \text{ml}$  のウイルス力価が常に得られた。感染細胞のはほとんどは単層に付着したままであった。どの培養物にもシンシチウムまたは封入体は認められなかった。接種組織ホモジネートのどちらもウイルスは単離されなかった。

20

## 【0049】

CHSE-214細胞における細胞変性作用の様相

継代初期には、小さな独立した細胞群は塞穴性及び空胞性であり、外観は不規則であった。これらは、単層の3/4が作用を受けるまで、3週間にわたって拡大した。感染細胞は培養プレートの表面から離れなかった。ウイルスが細胞に受け入れられると、CPEは早くも4日目に現れ、通常は14日目までに完全となった。

## 【0050】

種々の細胞培養物における増殖

CHSE-214細胞におけるウイルスの増殖を図2に示す。全ウイルスレベルは接種後6~8日目までに最高となり、細胞外ウイルスは接種後約11日にピークに達し、接種後14日目まで高いままであった。AS、BF2、FHM、EPCまたはRTG-2細胞系においてはCPEは認められず、これらの細胞中でのFPDVが増殖した形跡はなかった。しかしながら、RTF細胞系においてはCPEは認められたなかったものの、FPDV力価は、これらの細胞の第1及び第2継代において $10^6 \text{ TCID}_{50} \text{ ml}^{-1}$ に達した。

30

## 【0051】

実施例2クロロホルム感受性

0.05mlのクロロホルムを1mlのウイルスに添加することにより、クロロホルムに対する感受性を評価した。混合物を周囲温度で10分間振盪してから $400 \times g$ で5分間遠心し、クロロホルムを除去した。残った感染性ウイルスを、CHSE-214細胞中で滴定することにより検出した。対照は、クロロホルムの代わりに0.05mlのMEMMを1mlのウイルスに添加したものからなった。感染性膜壊死ウイルス (IPNV) 及びウイルス性出血性敗血症ウイルス (VHS) もまた、それぞれ陰性(非感受性)及び陽性(感受性)ウイルス対照として含めた。

40

## 【0052】

結果

単離体及びVHSウイルスの感染性は、クロロホルムに暴露したあと低下しており、必須脂質を含むエンベロープの存在が示された。

## 【0053】

## 【表1】

50

表1 クロロホルムに対するFPDVの感受性

ウイルス	ウイルス濃度 log TCID <sub>50</sub> /ml	
	対象	処理
FPDV	7.5	<1.0
IPNV	7.5	7.5
IHN	6.0	<1.0

10

## 【0054】

これに対して、IPNVの感染性は同様に処理しても影響を受けなかった。

## 【0055】

実施例3pH3.0における安定性

0.1mlのウイルスを、pH3.0に調整したMEM0.9mlに添加し、4に4時間維持し、15で14日間インキュベートしたCHSE-214細胞において滴定することで残留感染性ウイルスを検査することにより、pH3.0における安定性を評価した。対照としてpH7.2のMEM添加したFPDVを用いて実験を繰り返した。IPNVをpH3.0で安定なウイルス対照として含め、感染性造血系壊死ウイルス(IHN)をpH3.0感受性対照として使用した。

## 【0056】

結果

## 【0057】

## 【表2】

表2 pH3.0に対するFPDVの感受性

ウイルス	ウイルス濃度 log TCID <sub>50</sub> /ml	
	pH3.0	pH7.2
FPDV	<1.0	6.5
IPNV	7.5	7.5
IHN	<1.0	6.0

30

## 【0058】

単離体の感染性は、pH3.0に暴露したときに失われた。IPNVは影響を受けなかった。

40

## 【0059】

実施例4熱安定性

ウイルス懸濁液のアリコートを15、25、37、45、50、55または60で30分間加熱し、氷水に浸漬することにより急冷した。残っている感染性ウイルスの濃度を、15で14日間インキュベートしたCHSE-214細胞において滴定することにより評価した。

## 【0060】

結果

感染性は、4、15、25では影響を受けないが、37及び45では低下した。

50

で30分後には感染性ウイルスは検出されなかった。

#### 【0061】

##### 【表3】

表3 30分間種々の温度に維持したときのFPDVの安定性

15°Cで14日間インキュベートしたCHSE-214細胞中で残留ウイルス感染性を評価した。

温度(°C)	ウイルス濃度 log TCID <sub>50</sub> /ml	
4	7.5	10
15	7.5	
25	7.5	
37	6.5	
45	5.5	
50	—	

#### 【0062】

20

##### 実施例5

##### 血球凝集反応

ニワトリ、モルモット、ニジマス、及びタイセイヨウサケ赤血球を用いて血球凝集試験を実施した。U字形底面96ウェルプレートにおいて、リン酸緩衝塩類溶液(PBS) pH 7.2中の赤血球細胞の0.8%懸濁液0.1mlを、力価10<sup>7</sup>TCID<sub>50</sub>/mlのCHSE-214細胞において調製したFPDVプール0.1mlに添加し、4、15及び37でインキュベートした。1、3及び18時間後に検査を実施した。

#### 【0063】

##### 結果

どの温度でも、選択したどの赤血球でも、血球凝集は認められなかった。

30

#### 【0064】

##### 実施例6

##### 核酸阻害試験

ウイルスを、DNA阻害物質5'-ブロモ-2'-デオキシリジン(BUDR)の存在下で、チミジンがある場合とない場合とで増殖させることにより、ウイルスの核酸の種類を決定した。CHSE-214細胞を含む3つの24ウェルプレートの各々の1グループ4つのウェルに、10倍に希釈したウイルス0.1mlを接種し、15で1時間吸収させた。各プレートに1mlの、MEMMのみ、MEMMと1mM/mlのBUDR、またはMEMMと1mM/mlのBUDRと1mM/mlのチミジンを加えた。プレートを15で14日間インキュベートし、CPEについて検査した。BF2細胞中で増殖させた魚RNA(IPN)及びDNAウイルス(*lymphocystis*)を対照として含めた。

40

#### 【0065】

##### 結果

#### 【0066】

##### 【表4】

表4 1 mMの5-ブロモ-2'-デオキシウリジン(BUDR)の存在下でのCHSE-214細胞中のFPDVの複製

ウイルス	MEMM	MEMM+BUDR	MEMM+BUDR+THY
FPDV	7.0	7.25	7.0
IPNV	7.5	7.25	7.5
lymphocystis ウイルス	7.2	5.0	7.0
IHN	6.0	nd	nd

nd=実施せず。

#### 【0067】

単離体及びIPNVのウイルス力価は培地中のBUDRの存在に影響されなかったが、魚DNAウイルスは阻害された。このことから、単離体のゲノムはRNAからなることが判る。

#### 【0068】

##### 実施例7

##### 陰性比較EM試験

EM検査用のウイルス懸濁液は、FPDV感染細胞培地を、予め固定しないで使用したものと、グルタルアルデヒド(2%終濃度)を4で1時間かけて添加し、次いで100,000×gで4時間超遠心し、ペレットを数滴の蒸留水中に再懸濁させてから使用したものとからなった。カーボン被覆銅グリッドを1滴のウイルス懸濁液の上に載せ、10分間放置した。過剰な液体を排し、グリッドを2%ホスホタンゲステン酸(PTA)(pH7.2)で1分間染色し、それをHitachi H7000透過型EMにおいて倍率50,000倍で検査した。

#### 【0069】

##### 結果

EM検査前にグルタルアルデヒド中に固定しなかったウイルス調製物はほとんど破壊された粒子を含んでおり、固定前に無傷のビリオンを保存する必要があることが示された。

#### 【0070】

グルタルアルデヒド固定材料のEM検査から、65.5±4.3nmの円形粒子の存在が明らかとなった(図3)。これらは不規則な構造の内側コアを有し、その周囲をクラブ様の突起に見える外側フリンジが取り巻いていた。一部破壊された粒子も多く存在した。未固定調製物においては、完全な粒子は数個しか見られず、このことは、遊離ビリオンは脆弱であり、EM検査の準備中に容易に破壊されたことが判る。

#### 【0071】

##### 実施例8

##### ウイルスの増殖及び濃度

##### CHSE-214細胞におけるウイルスの増殖

24ウェルプレート内のCHSE-214細胞に0.1mlのFPDVを多重度1.0TCID<sub>50</sub>/細胞で接種し、15で1時間吸収させることにより、CHSE-214細胞中のウイルス増殖を測定した。次いでウイルスを取り出し、細胞をMEMMで2回洗浄してから、1mlのMEMMで置き換えた。接種後、0、7、11、14、21、28日目に、アッセイのため試料を以下のように取り出した。4つのウェルのそれぞれから培地

10

20

30

40

50

の半分を取り出し、プールし、 $800 \times g$ で5分間遠心して細胞を除去した。残りの $0.5 \text{ ml}$ の培地を、搔き取って取り出した付着細胞と合わせてプールし、一旦凍結及び溶解した。15で14日間インキュベートしたCHSE-214細胞において滴定することにより、両試料のウイルス感染度をそれぞれ評価した。

#### 【0072】

##### 塩化セシウム濃度勾配遠心

F PDVをCHSE-214細胞にMOI 1で接種した。細胞及び培地( $400 \text{ ml}$ )を接種後8日目に回収し、一旦 $-70^{\circ}\text{C}$ で凍結及び溶解してから、Beckman Ty p e 35アングルローターにおいて $10,000 \times g$ で30分間遠心し、細胞破片を除去した。上清を $100,000 \times g$ で4時間超遠心した。得られたペレットを全部で $2 \text{ ml}$ のPBS pH 7.2中に再懸濁させ、 $5 \text{ ml}$ の $1.3 \text{ g} / \text{ ml CsCl}$ 及び $4.5 \text{ ml}$ の $1.22 \text{ g} / \text{ ml CsCl}$ からなる不連続CsCl濃度勾配の上に重層した。これを $100,000 \times g$ , 4で19時間遠心した。20個のフラクションを回収し、15で14日間インキュベートしたCHSE-214細胞中で感染性を試験した。感染性ウイルスを含むフラクションの密度を屈折計を使用して測定した。

#### 【0073】

##### 結果

$1.08 \sim 1.26 \text{ g} / \text{ ml}$ の密度を有するCsCl濃度勾配由来のフラクション中で感染性が検出された。密度 $1.2 \text{ g} / \text{ ml}$ で最高の感染性が認められ、このフラクションは更に、EM調査によって評価すると最大数の完全ウイルス粒子を含んでいた。

#### 【0074】

##### 実施例9

##### 血清学的試験

感染性造血系ウイルス(IHN)、ウイルス性出血性敗血症ウイルス(VHS)、感染膜壊死ウイルス株Sp、Ab及びVR-299(IPNV)、ウマ動脈炎ウイルス(EAV)、ウシウイルス性下痢ウイルス(BVD)及び風疹ウイルスに対する過剰免疫ウサギ血清による中和についてF PDVを試験した。等量の $200 \text{ TCID}_{50} / 0.1 \text{ ml}$ のF PDVを、2倍に希釈した抗血清 $0.1 \text{ ml}$ に添加し、15で1時間インキュベートした。混合物を24ウェルプレート内の1ウェル当たり $0.1 \text{ ml}$ のCHSE-214細胞中に接種し、1時間吸収させ、 $1 \text{ ml}$ のMEMMを添加し、15で14日間インキュベートし、培養液のCPHの形跡を一日おきに顕微鏡で検査した。Reed及びMeunch, 1938, Amer. J. of Hygiene 27: 493-497の方法によつて力価を計算した。

#### 【0075】

##### 結果

F PDVは、IHN、VHSV、IPNV、EAV、BVDまたは風疹に対する抗血清によって中和されず、これらのウイルス群には関係ないことが判る。

#### 【0076】

##### 実施例10

##### 伝播実験

##### 1) 材料及び方法

##### a) 淡水魚

平均体重 $20 \text{ g} \pm 2.9 \text{ g}$ のタイセイヨウサケ幼魚を、10~12の一部再循環湧水を含む、直径 $1.2 \text{ m}$ の円筒形タンク内に維持した。魚を、順応させるために接種前2週間かかるタンク内に維持し、市販の餌を充足するまで与えた。10匹の魚から組織を採取し、感染性膜壊死ウイルス(IPNV)及び膜疾患の存在を検査した。接種前に、3-アミノ安息香酸エチルエステル(MS222)を用いて魚を麻酔した。

#### 【0077】

##### b) 海洋魚

平均体重 $87 \text{ g}$ の降海期後タイセイヨウサケを、12~15の流動系内の海水を含む2

× 1.5 m のタンク内に維持した。魚を、順応させるために接種前 2 週間維持し、10 匹の魚から得た組織試料を IPNV の存在について培養し、脾疾患の形跡を組織学的に検査した。

#### 【0078】

##### 2) 実験方法

###### 接種材料 1

ウイルスを CHSE - 214 細胞に感染多重度 1 T C I D<sub>50</sub> / 細胞で接種し、15 で 8 日間インキュベートした後に回収することにより、FPDV プールを調製した。一旦 -70 で凍結及び溶解することによって細胞を破壊し、10,000 × g で 30 分間遠心することにより細胞破片を除去した。得られたウイルスプール、力価 10<sup>7.0</sup> T C I D<sub>50</sub> / ml を 0.22 μ 多孔度 Millipore フィルターで濾過し、0.1 ml を 100 匹の魚の各々の腹腔内に接種した。50 匹のひれを切り取った未接種の魚を各タンクに接触魚として加えた。10

#### 【0079】

###### 接種材料 2

対照として、100 匹の魚にウイルス感染細胞と全く同様に調製した未感染 CHSE - 214 細胞由来の溶解物を接種し、更に 50 匹の接觸対照魚を加えた。

#### 【0080】

###### サンプリング

接種後 6 または 7、10、14 または 15、21、28、35、42 日目に、組織検査のため、10 匹の試験魚及び 10 匹の対照魚から心臓、脾、腎、肝、caeca / 脾、及び筋の試料を採取した。28 日目までに、ウイルス単離のために、心臓、脾、腎及び caeca / 脾の試料を同じ魚から採取した。接種後 14 または 15、21、28、35 及び 42 日目に 5 匹の接觸魚を取り出し、組織検査のために組織試料を採取した。14 または 15 及び 21 日目のみに、ウイルス単離用の試料を接觸魚から採取した。20

#### 【0081】

###### 組織分析

組織検査用試料を緩衝塩類溶液 pH 7.0 中の 10% ホルムアルデヒド中に固定し、パラフィンろう中に埋め込み、Reichert Ultracut Smicrotome において 5 μ 切片に切断した。これらをヘマトキシリソ及エオシンで染色した。30

#### 【0082】

###### ウイルス単離

組織を、乳鉢及び乳棒を使用して MEMM 中 10% ホモジネートとして調製し、2,500 × g で 15 分間遠心し、CHSE - 214 細胞を含む 24 ウェルプレートの 2 つのウェルの各々に、最終希釈度 1 : 20 及び 1 : 10 で接種し、15 で 28 日間インキュベートした。

#### 【0083】

陰性であると見なす前に、CPE を示さなかった試料を更に CHSE - 214 細胞中に継代した。

#### 【0084】

###### 結果

###### 淡水サケ幼魚の臨床的及び病理的病変

ウイルスを淡水サケ幼魚に接種すると、一部の幼魚で食餌が止まり、便放出が認められた。接種後 (p.i.) 6 ~ 10 日に急性脾胞状組織壊死が検出された。壊死の分布は限局性から拡散性までであった。14 ~ 21 日の間に、多くの魚が著しい胞状組織損失を示したが、生き残った胞状組織のポケットは特に数匹の魚のランゲルハンス島及び大きいほうの小葉内管の周囲に検出された。周辺胞状組織に若干の纖維症があった。脾病変を有する全ての魚で、p.i. 6 日目、同時多重限局性のミオサイト壊死及び変性が検出された。接種後 3 週目に、心臓は細胞過剰と見られ、ミオサイト核拡大を伴なうミオサイト及び心内膜下細胞の明らかな増殖があった。p.i. 21 日目から若干の骨格筋病変が検出され50

た。接触魚は2週間遅れて同様の病変を発症した。陰性対照においては組織病変は検出されなかった。

【0085】

海水伝播実験における臨床的及び病理的病変

7日目までに、FPDVを接種した魚は無食欲となり、タンク内の便放出物が増加した。7日目から、限局性から極度の拡散性の胞状細胞壊死と同時に多重限局性心筋壊死が一貫して認められた。15日目から骨格筋線維変性が検出され、赤色及び白色骨格筋線維の両方に影響が及ぼされた。これらの筋病変は、35及び42日目には頻度及び重症度が上昇した。21日目に認められた典型的な病変を図4～7に示す。全ての共住魚は2週間遅れて同様の病変を発症した。対照魚には臨床徵候または病変は検出されなかった。

10

【0086】

伝播実験におけるウイルスの単離

接種魚の全ての組織から接種後の種々の時点でウイルスが単離され（表5）、心臓組織は最も高い率を与えた。

【0087】

【表5】

表5 伝播実験－淡水魚

CHSE-214細胞中に接種し、15°Cで14日間インキュベートした10%組織ホモジネート由来のウイルス単離体

20

接種後の日数

組織	6	10	14	21	28
腎	+	+	+	+	-
脾	-	+	+	-	-
心臓	+	+	+	+	+
膵	-	-	+	+	+
肝	-	+	+	-	-
腸	-	+	+	+	+

30

【0088】

同じタンクの接触魚はウイルスで感染されたが、対照魚はウイルスを含まないことが判った。海水魚の結果を表6に与える。伝播実験のどの段階でもIPNウイルスは検出されなかった。

【0089】

【表6】

表6 感染実験におけるウイルス単離(海水魚)

魚種	陽性数/試験数				
	接種後の日数				
	7	10	15	21	28
接種対象	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
ウイルス接種	7/10	8/10	10/10	3/10	ND*
未接種(接触)	ND*	ND*	5/5	5/5	ND*

ND\*=実施せず。

## 【0090】

組織分析結果のまとめを表7及び8に示す。

## 【0091】

## 【表7】

表7 淡水魚におけるFPDVによる伝播実験の組織分析結果のまとめ

組織	感染後の日数				
	4	7	14	21	28
脾	—	+	+	+	+
		7/10	10/10	10/10	2/10
心臓	—	+	+	+	+
		7/10	10/10	9/10	2/10

20

30

## 【0092】

陰性対照においては病変は検出されなかった。

## 【0093】

## 【表8】

表8 海水魚におけるFPDVによる伝播実験の組織分析結果のまとめ

組織	感染後の日数				
	7	10	15	21	28
脾	+	+	+		
	9/10	10/10	10/10	10/10	9/10
心臓	+	+	+		
	6/10	10/10	10/10	10/10	6/10
筋	0	0	2/10	8/10	9/10

40

## 【0094】

陰性対照においては病変は検出されなかった。

50

**【0095】**実施例 1 1不活化魚類臍疾患ウイルス( FP DV )ワクチン実験方法実験の目的

アジュバントを添加した不活化 FP DV をサケ幼魚に接種すると、魚を生きた FP DV による攻撃から防御し得るかどうか試験する。

**【0096】**材料及び方法ワクチン製造に使用したウイルス

10

11回継代した FP DV を C H S E 細胞中で増殖させ、接種後 6 日目に回収し、1000 × g で 15 分間遠心した。得られた上清 600 ml を Amicon フィルターに通し、力値  $10^{7.5}$  T C I D<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup> の濃縮 FP DV 25 ml を生成した。

**【0097】**ウイルス不活化方法

A . 上記のごとく調製した FP DV 10 ml + 0.2% - プロピオラクトン ( B P L ) + 2 滴の NaOH ;

B . 上記のごとく調製した FP DV 10 ml + 0.1% ホルマリン ( 35 ~ 38 % ) ;

C . MEMM ( 維持培地 ) 。 20

**【0098】**

A、B 及び C のアリコートを +4 度で 24 時間維持してから、適当なアジュバントを添加した。アジュバントは、ウイルスを不活化してから添加し、ウイルス及び対照を受容し、最初の不活化から 8 日後に魚に接種した。

**【0099】**ワクチン接種方法

魚：平均体重 27 g のサケ幼魚を淡水流動系内にワクチン接種前 1 または 2 週間維持した（水温 10 ~ 14 ）。 30

**【0100】**

ワクチン接種前に、1 グループ当たり 5 匹の魚から血液及び組織試料を採取した。

30

**【0101】**

0.1 ml の A 及び B のごとく調製した不活化且つアジュバント添加 FP DV 並びにアジュバント対照グループ C ( MEMM + アジュバント ) を 1 グループ当たり 50 匹の魚の腹腔内 ( I / P ) に接種した。

**【0102】**サンプリング

FP DV で攻撃する 1 週間前に、各グループから 10 匹の魚を選択した。

**【0103】**

血液及び組織病理分析試料を採取し、臍疾患 ( PD ) の形跡を検査した。

**【0104】**

40

PD の形跡は組織分析によってもウイルス単離によっても認められなかった。

**【0105】**攻撃方法

9 回継代した生きた FP DV ( $10^{4.5}$  T C I D<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup>) 0.1 ml を 3 つの試験グループの各魚に、ワクチン接種後 28 日目に I / P 接種した。

**【0106】**

第 4 のグループ D をなす 50 匹のナイーブなワクチン接種していない魚に、同量の FP DV を I / P 接種し、陽性対照として作用させた。

**【0107】**

攻撃の 10 日及び 14 日後に、各グループの 5 匹の魚から試料を採取した。 50

## 【0108】

抗体試験のための血液試料、ウイルス単離のための腎及び心臓組織試料、及び組織分析のために幽門部 caeca、心臓及び筋試料を採取した。

## 【0109】

【表9】

ワクチン実験 1										
グループ /No	10日目			14日目			21日目			10 20 30
	組織分析		ウイルス	組織分析		ウイルス	組織分析		ウイルス	
	脾	心臓		脾	心臓		脾	心臓		
A1	+	+	+	+	+	ND				
A2	+	+		+	+					
A3	+	-		+	+					
A4	+	-		+	+					
A5	+	-		+	+					
B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B2	-	-		-	-		-	-		
B3	-	-		-	-		-	-		
B4	-	-		-	-					
B5	-	-		-	-					
C1	-	-	+	+	+	ND				
C2	+	+		+	+					
C3	+	-		+	+					
C4	+	+		-	-					
C5	+	+		+	+					
D1	+	+	+	+	+	+				
D2	+	+		+	+					
D3	+	+		+	+					
D4	+	+		+	+					
D5	+	+		+	+					

1+ = 病変またはウイルス存在

2- = 病変またはウイルス存在なし

3 ND = 実施せず

4 グループA = FPDV + 0.2%BPL + アジュバント

5 グループB = FPDV + 0.1%ホルマリン + アジュバント

6 グループC = 対照 MEMM + アジュバント

7 グループD = ワクチン未接種対照

## 【0110】

## 実施例12

## 細胞培養物中のFPDV抗原の検出のための間接蛍光抗体試験(IFA)

## 概要

該試験は、FPDV抗体を含む血清を、ウイルスに感染している疑いのあるCHSE細胞に添加することを含む。ウイルスが存在するならば、抗体は存在する抗原に結合する。次いでウサギにおいて産生された抗サケIgMを添加すると、それは結合抗体に付着する。この付着は、蛍光顕微鏡を使用すると緑色蛍光として見えるフルオレセインイソチオシアネート(FITC)に結合させた抗ウサギ血清を添加することにより検出し得る。

#### 【0111】

##### 材料

45,000個のCHSE-214細胞を1カバーガラス当たり0.5mlの増殖培地(MEM + 10%ウシ胎児血清)中に播種することにより、該細胞を24ウェルプレート(Costar)内で直径11mmカバーガラス上で増殖させた。培養物を、使用前に、3%CO<sub>2</sub>/空気混合物を含む密閉容器内で20で48時間インキュベートした。10

#### 【0112】

陽性血清 - FPDV感染サケの回復期血清を、リン酸緩衝塩類溶液(PBS)pH7.2で1/50に希釈したもの；

陰性対照血清 - PBSで1/50に希釈したFPDVに対する抗体を含まないサケ血清；ウサギ抗サケIgM - Soren Schierbeck & Co, Helsingør, Denmarkから市販のものをPBSで1/50に希釈したもの；

抗ウサギIg/FITC - Nordic Imm. Labs., Berks, Englandから市販のものをPBSで1/1000に希釈したもの。

#### 【0113】

##### 方法

FPDVを含む疑いのある材料を、1ml MEMM(維持培地)を含むウェル内のカバーガラスに添加し、3%CO<sub>2</sub>/空気混合物を含む密閉容器内で15で5日間インキュベートした。カバーガラスをPBSで2回洗浄し、アセトン中に5分間固定し、使用するまで+4で保存した。疑うべき試料を含まない陰性対照培養物と、FPDVを含む陽性対照培養物も同様に調製した。20

#### 【0114】

試験カバーガラスと対照カバーガラスとに50μLの陽性血清及び陰性血清を添加し、加湿した100mm<sup>2</sup>ペトリ皿内で35で30分間インキュベートした。PBSを添加して、試薬対照としてカバーガラスを分離した。全てのカバーガラスをPBSで6分間(2分間ずつ3回)濯ぎ、過剰なPBSをティッシュペーパーで吸い取った。50μLの抗サケIgMを全てのカバーガラスに添加し、35で30分間インキュベートした。PBSで6分間更に濯ぎ、50μLの抗ウサギ/FITCを全てのカバーガラスに添加し、それを35で30分間インキュベートした。PBSで6分間、最後の濯ぎを行い、カバーガラスを、Labophot 2蛍光顕微鏡において倍率40倍の対物レンズを用い、緩衝グリセロール塩類溶液pH9.2下で検査した。陰性対照においては蛍光が不在であるが、陽性対照と同様の緑色の蛍光は、培養物中にFPDVが存在することを示している。30

#### 【0115】

##### 実施例13

##### サケ血清中のFPDVに対する抗体を検出する間接蛍光抗体試験(IFAT)

##### 概要

該試験は、FPDV感染CHSE-214細胞にサケ血清を添加することを含む。FPDVに対する抗体が血清中に存在するならば、それはウイルス感染細胞に結合する。ウサギにおいて産生された抗サケIgMを調製物に添加し、結合抗体に付着させる。この付着は、蛍光顕微鏡下で緑色蛍光として見えるフルオレセインチオシアネート(FITC)に結合させた抗ウサギ血清を添加することにより認識される。

#### 【0116】

##### 材料

1ml当たり200,000個の細胞を含むCHSE-214細胞懸濁液にウイルスを多重度1で添加し、40μLを、12ウェルマルチスポットスライド(Hendley, E40

s sex) の各ウェルに播種することにより、FPDV 感染細胞を作製した。培養物を密閉容器内で 3% CO<sub>2</sub> / 空気雰囲気下に 20 度で 24 時間インキュベートした。次いでそれらを 15 度のインキュベーターに移して更に 3 日間インキュベートした後、リン酸緩衝塩類溶液 (PBS) pH 7.2 で 2 回灌ぎ、アセトンで 5 分間固定し、使用するまで +4 度保存した。ウイルスを含まない対照 CHSE-214 培養物も同様に作製した。

#### 【0117】

試験血清 - 抗体試験用サケ血清；

陽性対照血清 - 血清中和抗体試験 (SNT) によって中和抗体を有することが判っているサケ血清；

陰性対照血清 - SNT によると抗体を含まないサケ血清；

10

ウサギ抗サケ IgM - Soren Shierbeck & Co, Helsingor, デンマークから市販されているもの；

抗ウサギ Ig / FIFC - Nordic Imm. Labs. Berks, 英国から市販されているもの。

#### 【0118】

##### 方法

FPDV 陽性及び陰性マルチスポットウェルに、PBS pH 7.2 で 1/20 に希釈したサケ試験血清 30 μL を重層した。PBS で 1/20 に希釈した陽性及び陰性血清も別のウェルに入れた。各スライドの 2 つのウェルには対照として PBS を添加し、スライドを加湿した 100 mm<sup>2</sup> ペトリ皿内で 35 度 30 分間インキュベートした。PBS で灌いだ後 (2 分間ずつ 3 回の灌ぎ)、PBS で 1/50 に希釈した抗サケ IgM 30 μL を全てのウェルに加え、スライドを 35 度更に 30 分間インキュベートした。PBS で 6 分間灌いだ後、PBS で 1/100 に希釈した抗ウサギ IgM 30 μL を各ウェルに加え、スライドを 35 度 30 分間インキュベートした。最後の灌ぎを PBS で 6 分間を行い、40 倍対物レンズ及び Labophot 2 蛍光顕微鏡を使用し、スライドを緩衝グリセロール塩類溶液 pH 9.2 下に置いて蛍光の存在を検出した。試験血清及び陽性血清のウェルには明らかな緑色蛍光が認められたが、対照にはそれがないことから、かかる血清中の FPDV に対する抗体の存在が示された。同じ方法を使用して抗体滴定が実施される。

20

#### 【0119】

30

##### 実施例 14

##### ウイルス RNA : <sup>14</sup>C ウリジン

トリチウムよりは一般的に使用されないが、X 線フィルムを使用して検出可能であるが故にこの標識を選択した。

#### 【0120】

標識した細胞外ウイルスを高速でペレット化し、ホルムアルデヒド - ゲル電気泳動による分析のために抽出した。標識中 (2 ~ 5 日目) に Act D が存在した最初の実験では、ゲル上に標識は検出されなかった。

#### 【0121】

Act D で処理した感染細胞中に存在する RNA を試験した。NP40 溶解法によって抽出すると、分子量が小さいほど高い濃度で標識 RNA のスミア (smear) が認められた。明らかな候補ウイルス RNA は検出されなかった。

40

#### 【0122】

Act D の不在下で <sup>14</sup>C 及び <sup>3</sup>H - ウリジンで標識した大量の細胞外ウイルスをペレット化し、Gensys RNA 単離法によって抽出した。(感染細胞由来の) 標識リボソーム RNA の極めて優れた分解能を有するホルムアルデヒドゲルにおいて、高速ペレットウイルス RNA はスミアとして移動した。ほとんどの RNA は、移動度において tRNA またはそれより若干大きいものに対応する低い分子量であったが、スミアの大きさは 5000 nt (大きめの rRNA 種) より大きく広がった。このゲルを長時間露光すると、一方は大きさが 28S rRNA に相当し、他方は約 10 ~ 15 kb に対応する位置に、2

50

つの不鮮明なバンドの存在が示された。大きいほうの種は、トガウイルス / フラビウイルスで予想されるものと同様の移動度を有する。小さいほうの RNA は、本発明者らはトガウイルスによって產生されるサブゲノム RNA を検出したと説明することができる。

#### 【 0 1 2 3 】

##### 実施例 1 5

##### 魚類臍疾患ウイルス ( F P D V ) トランスフェクション結果

( a ) 感染 C H S E 細胞から抽出した RNA ( 細胞内 RNA ) 、及び ( b ) 組織培養物上清中に存在するウイルスから抽出した RNA ( 細胞外ウイルス RNA ) を用いたトランスフェクションはうまく実施された。

#### 【 0 1 2 4 】

10

##### R N A 調製

##### ( a ) 細胞内 R N A

75 cm<sup>2</sup> プラスチックフラスコ内の単層 C H S E 細胞を F P D V ( 典型的には 10<sup>4</sup> T C I D<sub>50</sub> ) に感染させた。これは、2 ml の M E M 培地中に含まれるウイルスを 1 時間吸収させ、次いで 17 ml の無血清培地を加えることにより実施した。感染後 7 日目に培地を取り出し、細胞をフラスコから搔き取って氷冷 P B S 中に入れた。1500 g で 5 分間遠心することにより作製した細胞ペレットを「 R N A アイソレーター」 ( G e n o s y s ) を使用して抽出した。通常通りに、1 ml の抽出試薬を用いて 2 つのフラスコから細胞を抽出した。

#### 【 0 1 2 5 】

20

##### ( b ) 細胞外ウイルス R N A

感染 C H S E 細胞由来の上清培地 ( 通常は容積 700 ~ 900 ml ) を A m i c o n 濾過及び Beckman 8 x 70 ml 固定アングルローターを使用して 35000 r p m で 4 時間超遠心して 5 または 6 倍に濃縮し、粗ウイルスペレットを生成すると、それは高力価のウイルス感染性を有することが判った。通常通りに、300 ~ 450 ml の上清から誘導された粗ウイルスペレットを 1 ml の「 R N A アイソレーター」試薬を用いて抽出した。

#### 【 0 1 2 6 】

30

##### トランスフェクション

R N A ペレットを、 - 20 °C の E t O H 中に保存した後、12000 g で 10 分間遠心し、20 μl の R N A a s e 非含有水中に溶解した。通常通りに、約 0.25 フラスコ単層に含まれる細胞から誘導した細胞内 RNA と、50 ~ 100 ml 上清から誘導した細胞外ウイルス RNA とを使用した。“ L i p o f e c t i o n ” ( G i b c o B R L ) 試薬を行い、製造業者推奨の方法を使用してトランスフェクションを実施した。簡単に述べるとこれには、 R N A 溶液を、 L i p o f e c t i o n を含む組織培地と混合し、24 ウェル C o s t a r プレート内で増殖させた半集密 C H S E 細胞を混合物 ( 100 μl / 1.5 cm 直径ウェル培養物 ) と一緒に 5 ~ 6 時間インキュベートしてから、試薬トランスフェクション混合物を維持培地と置き換えることが含まれる。培養物の C P E を毎日検査した。トランスフェクトした培養物を継代して 4 ~ 6 日後、ときおりウイルス C P E が認められた。継代処理は通常はトランスフェクションの 8 日後に実施される。

40

#### 【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 a は未感染 C H S E - 214 細胞 ( 倍率 750 倍 ) の写真を示し、 b は F P D V 感染後 8 日目の C H S E - 214 細胞 ( 倍率 750 倍 ) の写真を示す。

【 図 2 】 C H S E - 214 細胞における S P D V の増殖を示すグラフである。

【 図 3 】 グルタルアルデヒドで固定した F P D V 感染 C H S E - 214 細胞培養液の透過型電子顕微鏡写真である。ほとんどのウイルス粒子は表面突起を有するが、内部構造の詳細はほとんど不明である。 B a r = 100 nm 。

【 図 4 】 接種後 21 日目の、 F P D V により誘起された典型的な臍病変である臍胞状細胞の損失を示す写真である。 B a r = 50 μm 。

【 図 5 】 接種後 21 日目の臍病変と同時に起こった多重限局性心筋 ( c a r d i o m y o

50

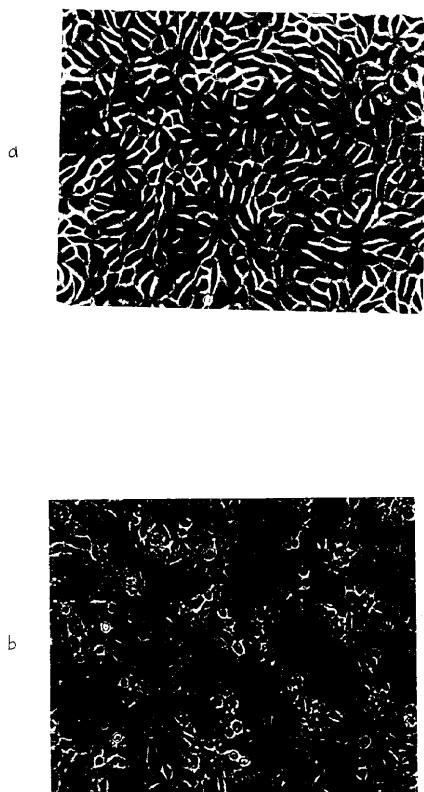
c y t i c ) 壊死を示す( )写真である。Bar = 20 μm。

【図6】接種後21日目の筋内膜結合組織の増加、筋線維鞘細胞の増殖、及び筋線維のヒアリン変性を示す、有酸素(赤色)骨格筋の変性を示す写真である。Bar = 50 μm。

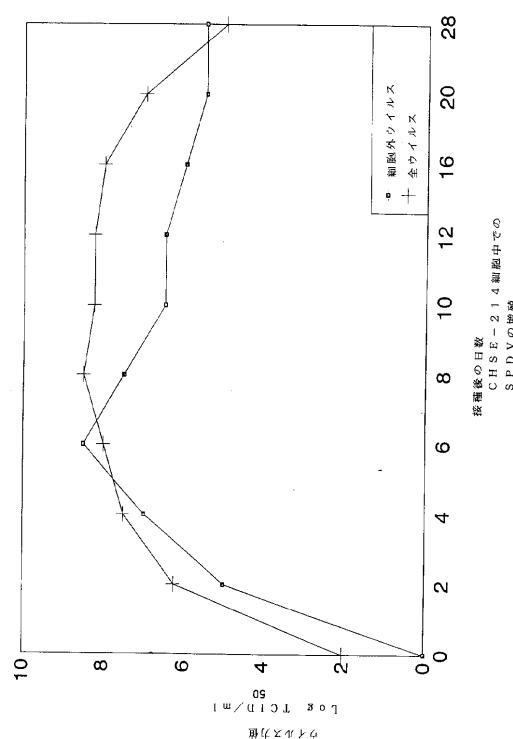
【図7】筋線維核及び筋含有物の食作用を示す無酸素(白色)骨格筋線維のヒアリン変性を示す写真である。Bar = 50 μm。

【図8】ウイルス単離体の写真である(倍率100,000倍)。

【図1】

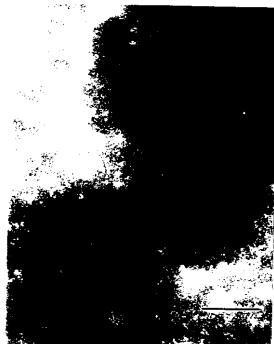


【図2】



【図3】

FIGURE 3



【図4】

FIGURE 4



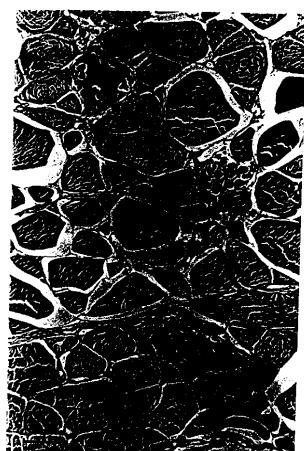
【図5】

FIGURE 5



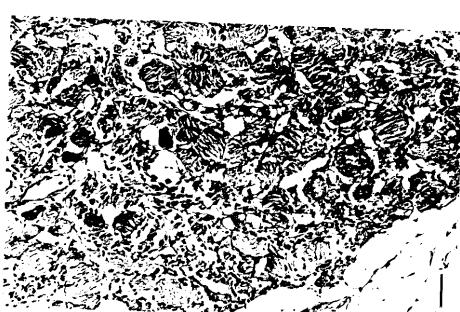
【図7】

FIGURE 7



【図6】

FIGURE 6



【図8】

FIGURE 8



---

フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	
G 01 N 33/531	G 01 N 33/531	A
G 01 N 33/569	G 01 N 33/569	L
// A 01 K 61/00	A 01 K 61/00	B

(72)発明者 ロバート・トーマス・ネルソン  
イギリス国、ノーザン・アイルランド、3・デイー・ユー、ベルファスト・ビー・ティー・4、ベルモント・パーク・37

審査官 森井 隆信

(58)調査した分野(Int.Cl.<sup>7</sup>, DB名)

C12N 7/00  
A61K 39/12  
A61P 31/12  
A61P 37/04  
G01N 33/53  
G01N 33/531  
G01N 33/569  
A01K 61/00  
CA(STN)  
BIOSIS/MEDLINE/WPI/DS(STN)