

(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2009-531029

(P2009-531029A)

(43) 公表日 平成21年9月3日(2009.9.3)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|---------------------------------|--------------------|-------------|
| C 1 2 N 1/21 (2006.01) | C 1 2 N 1/21 Z N A | 4 B 0 2 4 |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 A | 4 B 0 6 5 |
| A 6 1 K 39/108 (2006.01) | A 6 1 K 39/108 | 4 C 0 8 5 |
| A 6 1 K 39/112 (2006.01) | A 6 1 K 39/112 | |
| A 6 1 P 31/04 (2006.01) | A 6 1 P 31/04 | |

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 53 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-500672 (P2009-500672)
 (86) (22) 出願日 平成18年3月20日 (2006.3.20)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年10月30日 (2008.10.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/BE2006/000020
 (87) 国際公開番号 W02007/112518
 (87) 国際公開日 平成19年10月11日 (2007.10.11)

(71) 出願人 502320611
 ヴリジェ ユニヴェルシテ ブリュッセル
 ベルギー, ペー1050 ブリュッセル
 , プレインラーン 2
 (74) 代理人 100103816
 弁理士 風早 信昭
 (74) 代理人 100120927
 弁理士 浅野 典子
 (72) 発明者 デ グレヴェ, ヘンリ マルセル ジョ
 ゼフ
 ベルギー, ペー1060 シントーギリ
 ス, ジェフ ラムビュックスラーン 1
 1

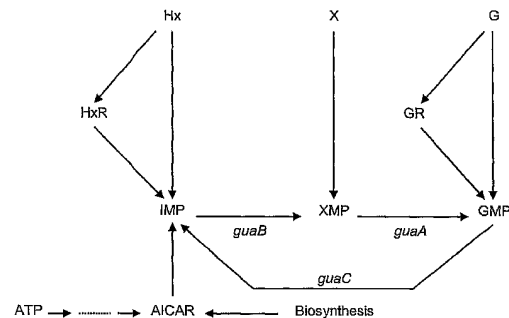
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 弱毒化サルモネラ生ワクチン

(57) 【要約】

本発明は、サルモネラ・エンテリカおよび/または(病原性)大腸菌のような、獣医学的動物種に感染する細菌の二重弱毒化変異体株および三重弱毒化変異体株に関する。本発明の変異体株は、少なくとも1つの第1の遺伝子改変および少なくとも1つの第2の遺伝子改変を含有し、前記第1の改変は1つまたはそれより多い運動性遺伝子において、そして前記第2の改変は宿主における細菌の生存または増殖に関与する1つまたはそれより多い遺伝子においてである。本発明は、獣医学的動物種においてとりわけサルモネラ症および/または大腸菌病原体による感染を防御するための、このような変異体株に基づく弱毒化生ワクチンにさらに関する。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

獣医学的動物種に感染する細菌の弱毒化変異体株であって、前記変異体は少なくとも 1 つの第 1 の遺伝子改変および少なくとも 1 つの第 2 の遺伝子改変を含有し、前記第 1 の遺伝子改変は 1 つまたはそれより多い運動性遺伝子において、そして前記第 2 の遺伝子改変は宿主における細菌の生存または増殖に關与する 1 つまたはそれより多い遺伝子においてである、弱毒化変異体株。

【請求項 2】

獣医学的動物種は家禽である、請求項 1 に記載の変異体株。

【請求項 3】

サルモネラ・エンテリカ株または大腸菌株である、請求項 1 または 2 に記載の変異体株。

10

【請求項 4】

運動性遺伝子は、フラジェリンをコードする遺伝子である、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の変異体株。

【請求項 5】

f l i C および / または f l j B もしくは f l j B A 遺伝子に変異を有する、請求項 4 に記載の変異体株。

【請求項 6】

0 . 4 % 寒天を含有する L B 培地で遊走できない、請求項 4 または 5 に記載の変異体株。

20

【請求項 7】

生存に關与する遺伝子は、ハウスキーピング遺伝子または毒性遺伝子である、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の変異体株。

【請求項 8】

不活化されるハウスキーピング遺伝子は、g u a B 遺伝子である、請求項 7 に記載の変異体株。

【請求項 9】

変異体株は、g u a B 遺伝子機能を損なう欠失変異を含有する、請求項 8 に記載の変異体株。

30

【請求項 10】

新規グアニンヌクレオチドを形成することができない、請求項 8 または 9 に記載の変異体株。

【請求項 11】

前記変異体株は、外来抗原をコードし、かつ発現する、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の変異体株。

【請求項 12】

弱毒化腸炎菌株または弱毒化ネズミチフス菌株である、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の変異体株。

【請求項 13】

遺伝子改変は、親株腸炎菌ファージ 4 型株 7 6 S a 8 8 に導入される、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載の変異体株。

40

【請求項 14】

弱毒化腸炎菌株 S M 7 3 は、寄託番号 L M G P - 2 1 6 4 2 を有する、請求項 13 に記載の変異体株。

【請求項 15】

遺伝子改変は、親株ネズミチフス菌 1 4 9 1 S 9 6 に導入される、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載の変異体株。

【請求項 16】

弱毒化ネズミチフス菌株 S M 8 9 は、寄託番号 L M G P - 2 1 6 4 3 を有する、請求

50

項 15 に記載の変異体株。

【請求項 17】

g u a B 遺伝子における遺伝子改変および f l i C 遺伝子における遺伝子改変を含む、請求項 1 ~ 16 のいずれかに記載の変異体株。

【請求項 18】

g u a B 遺伝子における遺伝子改変および f l j B A 遺伝子における遺伝子改変を含む、請求項 1 ~ 17 のいずれかに記載の変異体株。

【請求項 19】

g u a B 遺伝子における遺伝子改変、f l i C 遺伝子における遺伝子改変、および f l j B A 遺伝子における遺伝子改変を含む、請求項 1 ~ 18 のいずれかに記載の変異体株。

10

【請求項 20】

改変は前記遺伝子における 1 つまたはそれより多いヌクレオチドの挿入、欠失および / または置換からなる群より選択される、請求項 1 ~ 19 のいずれかに記載の変異体株。

【請求項 21】

医薬的に有効な量、または免疫量の請求項 1 ~ 20 のいずれかに記載の変異体株 ; および医薬的に許容される担体または希釈剤を含む、細菌感染に対して獣医学的動物種を免疫するためのワクチン。

【請求項 22】

前記変異体株は、外来抗原をコードしかつ発現する、請求項 21 に記載のワクチン。

【請求項 23】

前記変異体株は、真核細胞において外来遺伝子をコードし、かつ発現するプラスミドを含む、請求項 21 または 22 に記載のワクチン。

20

【請求項 24】

免疫量の請求項 1 ~ 20 のいずれかに記載の変異体株および / または請求項 21 ~ 23 のいずれかに記載のワクチンを、それを必要とする獣医学的動物種に投与する工程を含む、細菌感染に対して獣医学的動物種を免疫する方法。

【請求項 25】

獣医学的動物種は家禽である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

変異体株はサルモネラ・エンテリカまたは大腸菌である、請求項 24 または 25 に記載の方法。

30

【請求項 27】

変異体株および / またはワクチンは、経口、経鼻または非経口経路により投与される、請求項 24 ~ 26 のいずれかに記載の方法。

【請求項 28】

獣医学的動物種、好ましくは家禽における感染の防御および / または処置のためのワクチンの調製のための、請求項 1 ~ 20 のいずれかに記載の変異体株の使用。

【請求項 29】

ワクチン接種された動物と野生型株に感染した動物との間の血清学的識別のための方法であって、ワクチン接種された動物は、フラジェリン遺伝子が不活化されている変異体株で免疫されており、前記方法は :

40

フラジェリンに対して産生刺激された抗体の存在に関して動物を分析する工程 ; および前記抗体の存在または不存在に基づいて、感染した動物をワクチン接種された動物から識別する工程

を含む、方法。

【請求項 30】

前記抗体は、野生型株によって感染された動物によって作成されるが、請求項 4 ~ 20 のいずれかに記載の変異体株のようなフラジェリン遺伝子が不活化されている変異体株でワクチン接種されている動物によっては作成されない、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

50

前記抗体の存在は野生型株の存在、従って感染の指標である、請求項 29 または 30 に記載の方法。

【請求項 32】

サルモネラに感染した動物は、請求項 21 ~ 23 のいずれかに記載の弱毒化生ワクチンで免疫されている動物から識別される、請求項 29 ~ 31 のいずれかに記載の方法。

【請求項 33】

動物は、F l i C に対して産生刺激された抗体に関して分析される、請求項 29 ~ 32 のいずれかに記載の方法。

【請求項 34】

動物は獣医学的動物種であり、好ましくは家禽、さらに好ましくはニワトリである、請求項 29 ~ 32 のいずれかに記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、弱毒化細菌変異体、とりわけ弱毒化サルモネラ・エンテリカ変異体、およびこれを含む弱毒化生ワクチンに関する。本発明の二重、三重、多重変異体により、ワクチン接種された動物と、野生型フィールドサルモネラ・エンテリカのような野生型フィールドに暴露されている（ワクチン接種されていない）動物との間で血清学的な識別が有利に可能になる。

【背景技術】

20

【0002】

サルモネラは、腸内細菌科に属するグラム陰性、通性嫌気性、運動性、非ラクトース発酵性桿菌である。サルモネラは、通常、汚染された食品の摂取によりヒトに伝染し、そしてサルモネラ症を引き起こす。大腸菌は腸内細菌科の別のメンバーである。

【0003】

サルモネラは、ウシ、ニワトリ、シチメンチョウ、ヒツジ、ブタ、イヌ、ネコ、ウマ、ロバ、アザラシ、トカゲおよびヘビを含む多くの動物種から単離されている。

【0004】

重要なサルモネラ病原体の 95% がサルモネラ・エンテリカに属し、サルモネラ・エンテリカ血清型ティフィムリウム（ネズミチフス菌）およびサルモネラ・エンテリカ血清型エンテリティディス（腸炎菌）が最も一般的な形態である。

30

【0005】

サルモネラ感染は、全世界的に深刻な医学的および獣医学的問題であり、そして食品産業における不安材料である。汚染された食品は容易には同定することができない。

【0006】

致死的なヒト感染の可能性および畜産業の相当な経済的損失を回避するために、サルモネラ症の制御は重要である。

【0007】

天然のサルモネラの偏在的な存在により、感染した動物の検出および根絶のみによる疾患の制御は困難になっている。

40

【0008】

競合的排除およびワクチン接種の原理に基づくいくつかの制御計画は、例えば家禽の感染を制御するために試験されている。

【0009】

牧場動物のワクチン接種はしばしば、例えばサルモネラにより引き起こされる人畜共通感染症を防御するための最も有効な方法として考えられる。

【0010】

全細胞死菌ワクチンおよびサブユニットワクチンを用いる動物およびヒトにおけるサルモネラ感染の防御において変動する結果が得られる。一般に不活化ワクチンはサルモネラ症に対してあまり良好な保護を提供しない。

50

【0011】

弱毒化サルモネラ生ワクチンは：(i)抗体応答に加えて細胞媒介の免疫を誘起するその能力；(ii)針汚染の危険性のない経口送達；(iii)単回用量の投与の後の有効性；(iv)複数の粘膜部位での免疫応答の誘起；(v)低い生産コスト；および(vi)組換え抗原の免疫系への送達のための担体としてのその使用の可能性；のおかげで不活化調製物よりも潜在的に優れている。

【0012】

以下の弱毒化変異体株は処置された動物における保護免疫応答を誘起するためのその有効性に関して試験されている：(1)aro遺伝子に変異を担持する株(Aldertonら、Avian diseases 35:435-442(1991)；SchiemannおよびMontgomery、Veterinary Microbiology 27:295-308(1991))、(2)cya(アデニレートシクラーゼ)および/またはcrp(サイクリックAMP受容体)遺伝子において欠失を担持する株(米国特許第5389368号；米国特許第5855879号；米国特許第5855880号；HassanおよびCurtiss、Avian Diseases 41:783-791(1997)；Porterら、Avian Diseases 37:265-273(1993))ならびに(3)チフス菌のguaBAオペロンの遺伝子に変異を担持する株(Wangら、Infection and Immunity 69:4734-4741(2001)；WO99/58146号および米国特許第6190669号)。

10

20

【0013】

今までのところ、cyaおよびcrp遺伝子に欠失を担持するワクチン株Megan(登録商標)Vac1のみが少なくともある程度有効性を有している。この株は完全な保護を提供しない(<http://www.meganhealth.com/meganvac.html>)。

【0014】

McFarlandおよびStocker(Microbial pathogenesis 3:129-141(1987))はBALB/cマウスにおけるネズミチフス菌およびサルモネラ・ダブリンのguaAおよびguaB Tn10挿入変異体の毒性に関して報告している。これらの著者は、高投薬量(2.5×10^7 CFU)で、栄養要求性株の増幅の結果である動物の有意な致死性を報告している。

30

【0015】

またチフス菌のguaBA変異体は腸チフス熱に対する無事な保護のための適当な候補ではないことが判明した。それはマウスにおいて有意な残留毒性を示した(Wangら(2001))。

【0016】

従って、改善された弱毒化サルモネラ生ワクチン株および細菌感染した一般的な獣医学的動物種の改善された弱毒化生ワクチン株が依然必要とされている。

【0017】

ワクチン接種された動物は、しばしば病原体の異なる抗原に対して抗体を生成する。問題は、そのようなワクチン接種された動物がもはやサルモネラフィールド株のような野生型フィールド株と接触している動物から識別できず、そしてそれに感染する可能性があるという点である。

40

【0018】

従って、かかる識別を可能にする、弱毒化サルモネラ生ワクチン株のような改善された弱毒化生株もまた必要とされている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

本発明の目的は、二重または三重変異を有する弱毒化サルモネラ・エンテリカ株を提供

50

することである。

【0020】

本発明の別の目的は、サルモネラ症に対する弱毒化生ワクチンおよびそれに基づいた処置の方法を提供することである。

【0021】

本発明のさらに別の目的は、生ベクターとして、および外来抗原を発現するDNA媒介ワクチンとして有用である弱毒化サルモネラ株を提供することである。従って、かかる株は、多価ワクチンを含むワクチンの開発に非常に適切である。

【0022】

本発明のさらに別の目的は、本発明のサルモネラ・エンテリカ欠失変異体を得る方法を提供することである。

10

【0023】

さらに、本発明のさらなる目的は、ワクチン接種された動物と、ワクチン接種されていない依然感染の可能性のある動物との間の血清学的識別を可能にする弱毒化サルモネラ株を提供することである。

【0024】

さらに、本発明のさらなる目的は、一般的な獣医学的動物種、特に家禽に感染する細菌の弱毒化株を調製するための同一材料および方法を提供することである。

【0025】

一般的な目標は食品の安全性および動物の健康を改善することである。

20

【課題を解決するための手段】

【0026】

g u a B 遺伝子に欠失変異を有するいくつかの g u a B 栄養要求性サルモネラ・エンテリカ変異体は残留毒性を示した。運動性に関与する1つまたはそれより多い遺伝子におけるさらなる改変（好ましくは欠失）は、株の免疫原性能力に影響を及ぼすことなく残存する毒性を低下させることが見出された。

【0027】

したがって本発明の第1の態様は、獣医学的動物種に感染する細菌の弱毒化変異体株、とりわけ弱毒化サルモネラ・エンテリカ変異体株に関し、該変異体株は少なくとも1つの第1の遺伝子改変および少なくとも1つの第2の遺伝子改変を含有し、該第1の改変は1つまたはそれより多い（少なくとも1つの）運動性遺伝子において、そして該第2の改変は宿主における細菌または病原体（例えばサルモネラ・エンテリカ）の生存または増殖に関与する1つまたはそれより多い（少なくとも1つの）遺伝子においてである。「獣医学的動物種に感染する細菌」なる用語は、本発明の文脈ではとりわけ獣医学的動物種に対して病原性である細菌を指し、そしてそれを前記の遺伝子改変により弱毒化することができる。獣医学的動物種に感染する細菌はグラム陰性細菌であってよい。好ましくはサルモネラ、パストレラ、大腸菌等のような家禽に関するグラム陰性細菌である。最も好ましくはサルモネラ・エンテリカおよび（病原性）大腸菌である。「に対して病原性である」とは、細菌が弱毒化されていない場合、獣医学的動物種において感染性疾患を引き起こすことができることを意味する。

30

40

【0028】

本発明の遺伝子改変は、有利にヌル機能を導く、換言すれば遺伝子機能を損なうかまたはそれに影響を及ぼす。本文脈での改変はまた「欠陥改変」とも称される。その改変は問題の遺伝子を不活化すると考えられる。有利には、該不活化は少なくとも変異体株が弱毒化生ワクチンにおける使用に適切である程度までの弱毒化を招く。

【0029】

遺伝子改変は、該遺伝子における1つまたはそれより多いヌクレオチドの挿入、欠失および/または置換であってよい。かかる改変により、本発明による変異体株は、運動性遺伝子機能および病原体の生存または増殖に必要な遺伝子機能に影響を受け、そして影響を受けた遺伝子のヌル機能（機能的遺伝子生成物が形成されない）に至る。

50

【0030】

挿入変異体は、復帰することがあり、それにより株の病原性を復活させることがあるので、欠失変異体が好ましい。

【0031】

第1の改変は、1つまたはそれより多い(1、2、3、...)運動性遺伝子においてである。運動性に関与する遺伝子の例は、フラジェリンをコードする遺伝子である。本発明の変異体はf l i Cおよび/またはf l j Bもしくはf l j B A遺伝子の各々(f l i C ; f l j B ; f l j B A ; f l i C および f l j B ; f l i C および F l j B A ; . . .)に(欠陥)改変を有し得る。有利には、フラジェリンをコードする全ての遺伝子が欠失している変異体は、0.4%寒天を含有するLB培地で遊走できず、そしてそれにより野生型運動性株から容易に識別することができる。

10

【0032】

第2の遺伝子改変は、その宿主における病原体の生存または増殖に関与する1つまたはそれより多い(1、2、3、...)遺伝子においてである。かかる遺伝子はハウスキーピング遺伝子または毒性遺伝子であってよい。遺伝子機能が影響を受けた場合に弱毒化株に至り得るハウスキーピング遺伝子の例は、酵素IMPデヒドロゲナーゼをコードするg u a B遺伝子である。かかる変異体は新規グアニンヌクレオチドを形成することができない。g u a B A オペロンにおける欠陥改変もまた可能であり、有利には適切なIMPデヒドロゲナーゼ活性をコードするかまたは制御する(複数の)遺伝子のヌル機能を導く。

【0033】

有利には、本発明の弱毒化変異体株は免疫原性である。

20

【0034】

本発明は、とりわけ弱毒化腸炎菌およびネズミチフス菌株を提供することを目的とする。

【0035】

好ましくは、本発明の遺伝子改変は親株腸炎菌ファージ4型株76Sa88または親株ネズミチフス菌1491S96に導入される。76Sa88株は獣医農薬研究センター(Groeselemborg 99、B-1180、ウッケル、ベルギー)から入手したシチメンチョウからの臨床分離株であり、バクテリオファージラムダレッドリコンビナーゼ系をコードする温度感受性複製プラスミドpKD46を宿す。1491S96株はニワトリからの臨床分離株である。

30

【0036】

本発明により得られた弱毒化腸炎菌株の1つは、寄託番号LMG P-21642を有する腸炎菌株SM73である。別の例は、寄託番号LMG P-21643を有する弱毒化ネズミチフス菌株SM89である。

【0037】

本発明の好ましい変異体は、g u a B 遺伝子における遺伝子改変およびf l i C 遺伝子における遺伝子改変を担持するかまたは含む。

【0038】

本発明の別の好ましい変異体は、g u a B 遺伝子における遺伝子改変およびf l j B A 遺伝子における遺伝子改変を担持するかまたは含む。

40

【0039】

本発明のさらに別の好ましい変異体は、g u a B 遺伝子における遺伝子改変、f l i C 遺伝子における遺伝子改変、およびf l j B A 遺伝子における遺伝子改変を担持するかまたは含む。

【0040】

本発明の弱毒化株は弱毒化生ワクチンにおける使用に非常に適切である。本発明の変異体株は、外来抗原をコードし、かつ発現し得る。

【0041】

本発明の別の態様は：

50

医薬的に有効な量、または免疫量の本発明による弱毒化変異体株；および
医薬的に許容される担体または希釈剤；

を含む、細菌感染に対して獣医学的動物種を免疫するためのワクチンに関する。

とりわけ本発明はサルモネラ・エンテリカおよび/または大腸菌の弱毒化変異体株を含むワクチンに関する。

【0042】

一般に約 10^2 cfuから約 10^{10} cfu、好ましくは約 10^5 cfuから約 10^{10} cfuが投与される（医薬的に有効な量、または免疫量の例）。免疫用量は投与経路により異なる。当業者は、非経口的に投与されるワクチンのための有効用量が、飲料水等を介して投与される類似のワクチンよりも少なくともよいことを見出すことができる。

10

【0043】

本発明の弱毒化株およびこれを含む医薬組成物またはワクチンは、獣医学的動物種、家畜、およびさらに特に家禽のような動物を免疫するために非常に適切である。例えば本発明の弱毒化サルモネラ株、およびこれを含む医薬組成物またはワクチンは獣医学的動物種、およびとりわけニワトリのような家禽をサルモネラ症および恐らくその他の疾患（例えば多価ワクチンの場合）に対して免疫するのに非常に適切である。本発明の弱毒化株は、問題の動物/獣医学的動物種を問題の病原体（獣医学的動物種に感染する細菌）による攻撃に対して保護するために特に適している。

【0044】

したがって本発明のさらなる態様は動物、好ましくは獣医学的動物種、さらに好ましくはニワトリのような家禽を、獣医学的動物種に感染する細菌により引き起こされる疾患に対して免疫する方法に関し、該方法は：免疫量の本発明の弱毒化変異体株および/またはこれを含むワクチンを、それを必要とする動物または獣医学的動物種に投与し、それにより次いで動物または獣医学的動物種において保護免疫応答を惹起する工程を含む。本発明は、とりわけサルモネラ症または病原性大腸菌による感染に対して獣医学的動物種を免疫する方法に関する。

20

【0045】

サルモネラ症に対して免疫される獣医学的動物種の例：ニワトリ、シチメンチョウ、アヒル、ウズラ、ホロホロチョウ、ブタ、ヒツジ、子牛、畜牛等のような家禽、小型または大型家畜。好ましくは経口、経鼻または非経口経路により、免疫量がこれらの動物に投与される。

30

【0046】

本発明のさらなる態様は、医薬品としての使用のための（例えばワクチンにおける使用のための）本発明の変異体株に関する。本発明のさらに別の態様は、サルモネラ症のような病原体（獣医学的動物種に感染する細菌）により引き起こされる疾患の防御（および/または処置）のための、ワクチンのような医薬品の調製のための本発明の弱毒化変異体株の使用に関する。処置される動物または獣医学的動物種の例および推奨される用量は前記で提示されている。

【0047】

本発明のさらに別の態様は、ワクチン接種された動物と天然に感染している、すなわち野生型株に接触し、そして感染している動物とを識別するための血清学的マーカーとしての本発明の変異体、とりわけフラジェリン変異体の使用に関する。

40

【0048】

本発明は、例えばワクチン接種された動物と野生型株に感染した動物との間の血清学的識別のための方法に関し、ワクチン接種された動物は、フラジェリン遺伝子が不活化されている変異体株で免疫されており、該方法は：

フラジェリンに対して産生刺激された抗体の存在に関して動物を分析する工程；および該抗体の存在または不存在に基づいて、感染した動物をワクチン接種された動物から識別する工程；

を含む。

50

【0049】

本発明の方法は有利にはインビトロの方法である。有利には、サルモネラに感染した動物はこのように本発明による弱毒化生ワクチンで免疫されている動物から識別される。

【0050】

家禽のような家畜およびとりわけニワトリは、フラジェリン遺伝子生成物、およびとりわけFl i C遺伝子生成物に対して抗体を作成することが知られている。従って、問題の抗体は、野生型株に感染した動物（かかる抗体を作成する）で検出されるが、（複数の）フラジェリン遺伝子が不活化されている変異体株でワクチン接種されている動物においては検出されない。後者は例えばFl i Cおよび/またはFl j Bに対する抗体を作成しない。

10

【0051】

該抗体の存在は、野生型株の存在、従って感染のための指標である。従って、本発明の方法は有利には、（複数の）フラジェリン遺伝子が不活化されている変異体株でワクチン接種された動物におけるサルモネラ感染の検出または診断を可能にする。かかる変異体株は本明細書にて前記された本発明の株の1つであってよい。

【0052】

従って、fl i Cのようなフラジェリン遺伝子の不活化により、（ワクチン接種された）動物における野生型サルモネラ・エンテリカのような野生型株の存在の診断のための、例えばFl i Cタンパク質の検出に基づく血清学的試験の使用が可能になる。本発明の方法では、動物をFl i Cに対する抗体について分析するのが好ましい。

20

【0053】

本発明の方法はとりわけ家禽、さらに好ましくはニワトリに適用可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0054】

驚くべきことに、フラジェリン変異（フラジェリンをコードする遺伝子における欠陥改変；鞭毛変異とも称される）および栄養要求性変異の組み合わせは、高免疫原性の弱毒化サルモネラ・エンテリカ株を導くことができる。本発明による変異体株は、（複数の）運動性遺伝子における1つ（少なくとも1つ）の改変およびその宿主における病原体の生存または増殖に関与する（複数の）遺伝子における1つ（少なくとも1つ）の改変を担持するかまたは含む。

30

【0055】

生存または増殖に関与する遺伝子はハウスキーピング遺伝子および/または毒性遺伝子であってよい。かかるハウスキーピング遺伝子および毒性遺伝子の例を（Mastroeniら、The Veterinary Journal 161:132-164（2000）、参照により本明細書に組み込まれる）にて見出すことができる。ハウスキーピング遺伝子の好ましい例はgua B遺伝子であり、さらにaro、pur、dap、pab、sip C、pho P、pho Q、pag C、cyaおよび/またはcrp遺伝子における改変もまた想定され得る。

【0056】

「遺伝子」なる用語は、本明細書にて使用される際には、コード配列ならびにプロモーターおよび終止シグナルのようなその調節配列を指す。

40

【0057】

遺伝子機能が損なわれる欠失により、かかる不活化を得ることができる。当業者にはかかる変異体を得る方法が知られており、そして簡単な試験により遺伝子機能が損なわれているかどうかを見分けることができる。例えば、機能的gua B遺伝子生成物を発現できない変異体株は、最小A培地に（例えば0.3 mMの）グアニン、キサントシン、グアノシンまたはキサントシンが補充されなければこの培地では成長できない。

【0058】

別の簡単な試験により、フラジェリン遺伝子機能のような運動性遺伝子機能が損なわれているかどうかを見分けることができる。これらの変異体は0.4%寒天を含有するLB

50

培地で遊走しない。

【0059】

問題の遺伝子における改変は、好ましくは少なくとも生ワクチンにおける使用に適切である程度までの変異体株の弱毒化に至るはずである。

【0060】

以下の実施例により、1つ(少なくとも1つ; 1つまたはそれより多い)の運動性遺伝子(fliC、fliJ Bおよび/またはfliJ B A)における追加的な変異は、gua B 欠失変異体の残留病原性を有利に緩和し、そして致死用量の野生型サルモネラ・エンテリカによる抗原投与に対する免疫動物の保護を改善したことが示される。

【0061】

サルモネラ属の全てのメンバーの鞭毛フィラメントは単一のタンパク質、フラジェリンタンパク質の多量体である(van Astenら、Journal of Bacteriology 177:1610-1613(1995))。

【0062】

FliCはフラジェリンの1相フィラメントサブユニットである(Ciacchi-Woolwineら、Infection and Immunity 66:1127-1134(1998))。

【0063】

ネズミチフス菌は、染色体の異なる部位に位置しかつ相変異を示す2つのフラジェリン遺伝子(fliCおよびfliJ B)を有する。fliJ Bのプロモーターは、部位特異的組換えにより逆位になり得る染色体フラグメントの部分を形成する。配向に依存してfliJ BがfliJ Aと一緒に発現され、後者はfliC遺伝子の抑制物質をコードするか; またはfliCが発現に至るかのはいずれかである。腸内細菌科の別のメンバーである大腸菌もまた、各々サルモネラ・エンテリカのfliCおよびfliJ B遺伝子と相同性を共有する2つのフラジェリン遺伝子を保有し得る(Tominaga、Genes Genet. Syst. 79:1-8(2004))。

【0064】

腸炎菌におけるfliC遺伝子(主要な鞭毛タンパク質をコードする)の不活化は、近交系マウスBALB/c系に投与されるワクチンの安全性および有効性の双方を増大させた。この系は全身性サルモネラ症に対して感受性が非常に高い。

【0065】

したがって文献での多くの指摘にかかわらず、これによりとりわけフラジェリンがBALB/cマウスにおいてサルモネラに対する保護免疫応答の誘導に必須の抗原ではないことが判明する。

【0066】

腸炎菌フラジェリンは、ニワトリにおいて免疫原性であり、そしてH:g,m抗原決定基を担持する(van Astenら(1995); Wyantら、Infection and Immunity 67:1338-1346(1999); Ogushiら、The Journal of Biological Chemistry 276:30521-30526(2001))。

【0067】

グラム陰性細菌の種々の種の鞭毛(例えば腸炎菌およびチフス菌の鞭毛)は、単球を活性化して炎症誘発性サイトカイン(例えば腫瘍壊死因子アルファ)を生成し、そしてインターロイキン-1受容体関連キナーゼ(IRAK)の活性化を媒介するということが証明されている。

【0068】

従って、グラム陰性細菌に対する自然免疫応答においてグラム陰性フラジェリンは、重要でありかつ以前には認識されていない役割を果たすと考えられる。FliCは、胃腸管の感染の経過中にとりわけ重要であり得る(Ciacchi-Woolwineら(1998); Wyantら(1999); Moorsら、Infection and Im

10

20

30

40

50

munity 69:4424-4429(2001)。

【0069】

文献では、鞭毛が家禽および/またはヒトにおける毒性に寄与する程度に関して非常に曖昧である。

【0070】

Van Astenらにより(FEMS Microbiol Lett. 185:175-9(2000))、腸炎菌のフラジェリン遺伝子の不活化はCaco-2細胞(ヒト結腸癌細胞系)への浸潤を強く低下させる(50倍)が、細菌付着はほとんど影響を受けなかったことが示されている。該報告はインビトロ結果に限定されている。

【0071】

一方、ParkerおよびGuard-Petterにより(FEMS Microbiology Letters 204:287-291(2001))、ニワトリの経口抗原投与時に、fliC::Tn10変異体が野生型と同等に毒性であったことが見出された。これは、経口抗原投与後にフラジェリンの存在が少なくとも中程度のレベルの浸潤を達成するのに必要ではなかったことを示している。皮下適用した場合、鞭毛変異体は野生型株と比較して有意に弱毒化された。

【0072】

従って、先行技術では例えば本発明によるサルモネラ・エンテリカ二重(または三重)変異体を構築することから離れることを教示する多くの示唆がある。1つまたはそれより多い運動性遺伝子の不活化は、例えばguaB欠失変異体の残存毒性を低減させるのを助けるが、他の利点は同様に存在する。

【0073】

例えばfliC遺伝子の不活化は有利には、(ワクチン接種された)動物における野生型サルモネラ・エンテリカ、例えば腸炎菌の存在の診断のための、fliCタンパク質に対して指向する抗体の検出に基づいた血清学的試験の使用を可能にする。免疫検出は、ELISAにより、RIA技術および/または任意の他の公知の免疫学的試験もしくは形式により可能である。

【0074】

IDEX Laboratoriesは、腸炎菌のfliCフラジェリンのH抗原決定基(H:g,m鞭毛エピトープ)に対する抗体を確実に検出する市販の試験を有する(Flock Check(登録商標)腸炎菌抗体試験キット)。

【0075】

前記により、宿主における病原体の生存または増殖に関与する遺伝子および運動性に関与する(複数の)遺伝子における(欠陥)遺伝子改変を担う、本発明の二重および/または三重サルモネラ・エンテリカ変異体は、当分野である弱毒化サルモネラ・エンテリカ株よりも有利であることが実証される。

【0076】

本発明の変異体株は、生ベクターおよび/またはDNA媒介ワクチンとしての弱毒化生ワクチンにおける使用に非常に適切である。「ワクチン」なる用語は予防用および治療用ワクチンを含むと意図される。好ましくは、ワクチンは予防用である。

【0077】

「生ベクター」ワクチンは、「担体ワクチン」および「生抗原送達系」とも称され、ワクチン学の刺激かつ多目的な分野を含む(Levineら、Microecol. Ther. 19:23-32(1990))。この研究法では、ウイルス性または細菌性生ワクチンは、それが別の微生物の保護性外来抗原を発現し、そしてこれらの抗原を免疫系に送達し、それにより保護免疫応答を刺激するように改変されている。公表されている細菌性生ベクターには、とりわけ弱毒化サルモネラが含まれる。

【0078】

本発明の目的は、生ワクチン、おそらく多価生ワクチンで使用するための弱毒化変異体株を提供することである。「多価ワクチン」または「マルチバレント」とはとりわけ多く

10

20

30

40

50

の異なる疾患原因生物に由来する抗原決定基を含むワクチンを意味する。

【 0 0 7 9 】

したがって本発明の目的の 1 つは：
 医薬的に有効な量、または免疫量の本発明の弱毒化変異体株；および
 医薬的に許容される担体または希釈剤；
 を含む例えばサルモネラ症に対するワクチンを提供することである。

【 0 0 8 0 】

本発明の別の目的は：
 医薬的に有効な量、または免疫量の本発明の弱毒化変異体株であって、該変異体が外来抗
 原をコードし、そして発現する変異体株；および
 医薬的に許容される担体または希釈剤；
 を含む生ベクターワクチンを提供することである。

10

【 0 0 8 1 】

生ベクターで用いられる特定の外来抗原は本発明にとって重要ではない。

【 0 0 8 2 】

本発明のなお別の目的は：
 医薬的に有効な量、または免疫量の本発明の弱毒化変異体株であって、該変異体が真核細
 胞において外来抗原をコードし、そして発現するプラスミドを含有する変異体株；および
 医薬的に許容される担体または希釈剤；
 を含む DNA 媒介ワクチンを提供することである。

20

【 0 0 8 3 】

DNA 媒介ワクチンの構築および使用に関する詳細は米国特許第 5 8 7 7 1 5 9 号（参
 照によりその全てが本明細書に組み込まれる）に見出すことができる。また、DNA 媒介
 ワクチンに用いられる特定の外来抗原は本発明にとって重要ではない。

【 0 0 8 4 】

病原体において（生ベクターワクチンで真核細胞性プロモーターを用いて）または病原
 体により浸潤された細胞において（DNA 媒介ワクチンで真核細胞性プロモーターを用い
 て）外来抗原を発現するかどうかの決定は、動物実験もしくは臨床試験においてその特定
 の抗原に関するどのワクチン構築物により最良の免疫応答が得られるか、および / または
 抗原のグリコシル化がその保護免疫原性に必須であるかどうか、および / または抗原の正
 確な三次元立体構造が発現の 1 つの形態で他の形態よりも良好に達成されるかどうかに基づ
 き得る（米国特許第 5 7 8 3 1 9 6 号）。

30

【 0 0 8 5 】

「医薬的に有効な量」とは、問題の疾患、例えばサルモネラ症を克服（防御および / ま
 たは処置）するための通常よりもさらに多い量を意味する。「免疫量」とは本明細書にて
 使用される際には実際に、医薬組成物 / ワクチンを投与される動物において（保護）免疫
 応答を誘起することができる量を意味する。惹起される免疫応答は体液性、粘膜性、局所
 および / または細胞性免疫応答であってよい。当分野において公知のように、必要量は年
 齢、性別、体重および多くの他の因子に依存し得る。

【 0 0 8 6 】

特定の医薬的に許容される担体または希釈剤は本発明にとっては重要ではなく、そして
 当分野で慣用技術である。希釈剤の例には：スクロースを含有するクエン酸緩衝剤（pH
 7 . 0）、重炭酸塩緩衝剤（pH 7 . 0）単独またはアスコルビン酸、ラクトースおよび
 場合によってはアスパルテムを含有する重炭酸塩緩衝剤（pH 7 . 0）のような胃で胃
 酸に対して緩衝するための緩衝剤が挙げられる。担体の例には：例えば脱脂粉乳に見出さ
 れるようなタンパク質；糖；例えばスクロース；またはポリビニルピロリドンが挙げられ
 る。

40

【 0 0 8 7 】

本発明による欠失変異体は、標準的な相同組換えにより創成され、それにより第 1 工程
 で問題の（複数の）遺伝子全体または遺伝子の少なくとも部分が抵抗性遺伝子および F R

50

T 部位をフランキングすることにより置き換えられる。

【0088】

好ましくは、第2工程では、該抵抗性遺伝子は2つのFRT部位の間の組換えにより除去される。DatsenkoおよびWanner(2000)に従って、1つのFRT部位ならびにプライミング部位P1およびP2は組換えの分子メカニズムにより残存し、抗生物質抵抗性遺伝子を除去する(例えば図4参照)。

【0089】

以下の実施例および実施形態において添付の図面を参照して本発明をさらに詳細に記載する。特定の実施形態および実施例は特許請求されるように本発明の範囲がいかなるようにも限定されないと意図される。本明細書にて示されたサルモネラ・エンテリカに関する実施例の原理は、獣医学的動物種に感染する他の(グラム陰性)細菌、さらにとりわけパスツレラ、(病原性)大腸菌等のような家禽に関する他の(グラム陰性)細菌に同等に十分に適用可能である。

10

【0090】

図面の簡単な記述

図1は、グアノシンーリン酸の生合成経路の図式的概観を示す。AICAR: 5'-ホスホリボシル-4-カルボキサミド-5-アミノイミダゾール; ATP: アデノシン三リン酸; G: グアニン; GMP: グアノシンーリン酸; GR: グアノシン; Hx: ヒポキサントシン; HxR: ヒポキサントシンリボシド(イノシン); IMP: イノシンーリン酸; X: キサンチン、XMP: キサントシンーリン酸; guaA: GMPシンテターゼ、guaB: IMPデヒドロゲナーゼ; guaC: GMPリダクターゼ。

20

【0091】

図2は、腸炎菌ゲノムのコンティグ1294を表す(配列番号: 19)。guaB遺伝子のATG開始コドンおよびTGA終止コドンは太字である。NはA、C、TまたはGであってよい。

【0092】

図3は、pUC18にクローン化された腸炎菌のguaBフラグメントの配列を表す(配列番号: 20)。使用されたプライマーを水平矢印により示す。プライマーGuaB6-GuaB7で作成されたフラグメントをpUC18にクローン化した。guaB遺伝子のATG開始およびTGA終止コドンならびにCCCGGG SmaI制限部位を太字で示す。

30

【0093】

図4は、プライマーGuaB10を用いて得られたguaB欠失を含む、腸炎菌PCRフラグメントのヌクレオチド配列を表す(配列番号: 21)。変異体SM20の全ゲノムDNAを用いてプライマーGuaB6-GuaB7でPCRフラグメントを増幅した。残存するFRT部位を太字イタリックで、そしてP1およびP2プライマーを矢印により示す(DatsenkoおよびWanner、PNAS 97: 6640-6645(2000))。guaB遺伝子のATG開始およびTGA終止コドンを太字で示す。

【0094】

図5は、ネズミチフス菌LT2のguaB遺伝子、完全ゲノムのセクション220の117を示す(配列番号: 22)。guaB遺伝子のATG開始およびTGA終止コドンを太字で示す。

40

【0095】

図6は、プライマーFlc1およびFlc2を用いて変異体SM73およびSM89の全DNAで、プライマーFlc1-Flc2で増幅されたPCRフラグメントを配列決定した後に得られたヌクレオチド配列を示す(配列番号: 23)。残存するFRT部位を太字イタリックで、ATG開始およびTAA停止コドンを太字で、そしてP1およびP2を矢印で示す。

【0096】

図7は、プライマーFljBA6を用いてネズミチフス菌変異体SM48の全DNAで

50

、プライマー F1jBA6 - F1jBA5 で増幅された PCR フラグメントを配列決定した後、得られたヌクレオチド配列を示す (配列番号: 24)。残存する FRT 部位を太字で、P1 および P2 を矢印で示す。

【0097】

図 8 - 11 は、SM69、SM73、SM86 および SM89 の各々に関する寄託受領を表す。

【実施例】

【0098】

実施例 1: guaB 遺伝子に影響を及ぼす栄養要求性変異

挿入変異誘発により野生型腸炎菌の栄養要求性挿入変異体を得られた。0.3 M グアニン、キサンチン、グアノシンまたはキサントシンを補充した場合のみ、変異体株は最小 A 培地で成長できた。

【0099】

これらのデータにより、株の栄養要求性変異は、酵素 IMP デヒドロゲナーゼをコードする guaB 遺伝子に影響を及ぼすことが強く示唆される (EC 1.1.1.205)。図 1 で示されるように、この酵素はイノシン - 5' - リン酸 (IMP) をキサントシン - リン酸 (XMP) に変換する。

【0100】

挿入変異体は復帰することがあり、それにより株の病原性を復活させることがある。これは弱毒化生ワクチンにおけるその適用性を限定し得る。その態様では欠失変異体が好ましい。したがって腸炎菌およびネズミチフス菌の guaB 欠失変異体が創成され、そして試験された。双方の血清型の guaB 遺伝子を図 2 および 5 に示す。

【0101】

実施例 2: guaB 欠失変異体

guaB 欠失変異体の構築

以前に公開された大腸菌 K12 のゲノムにおいて欠失変異体を作成する方法 (Datzenko および Wanner、PNAS 97: 6640 - 6645 (2000)) をこの目的のために適用した。この方法はバクテリオファージ レッドリコンビナーゼ系により媒介される、PCR により作成された直鎖状 DNA フラグメントの相同組換えに頼り、guaB 配列が抗生物質抵抗性遺伝子により置換される。この抵抗性遺伝子は FRT 部位により取り囲まれ、そして FLP リコンビナーゼにより媒介される部位特異的組換えによりゲノムから切除できる。

【0102】

重複 PCR (Hōら、Gene 77: 51 - 59 (1989)) を guaB コード配列の 861 塩基対の内部セグメントの欠失のために適用した。原理は 2 つのプライマーセット、GuaB3 - GuaB4 (guaB 遺伝子の 5' 末端をフランキングする) および GuaB5 - GuaB2 (guaB 遺伝子の 3' 末端をフランキングする) の使用に頼る。双方のセットは、部分的に相補的であり、そしてそれに SmaI 制限部位を付加したプライマー (GuaB4 および GuaB5) を含有する。得られた相補的配列のアニーリングおよび鎖伸長の後、外向きプライマー GuaB6 および GuaB7 での PCR により、GuaB コード配列の 861 塩基対内部セグメントを置き換える 6 塩基対 SmaI 部位を有するフラグメントを作成した。この guaB フラグメントをベクター pUC18 にクローン化した (図 3 参照)。

【0103】

プライマー P1 および P2 (Datzenko および Wanner (2000)) ならびにプラスミド pKD3 DNA を鋳型として使用して、クロラムフェニコール抵抗性遺伝子 (cat) をそのフランキング FRT 配列と共に増幅した。この PCR フラグメントを、クローン化された guaB フラグメントの SmaI 部位にライゲートした。ネステッドプライマー (GuaB6 - GuaB7) を使用して望ましいフラグメントを作成した。バクテリオファージラムダレッドリコンビナーゼ系をコードする温度感受性複製プラス

10

20

30

40

50

ミド p K D 4 6 を宿す腸炎菌 7 6 S a 8 8 に、得られた P C R フラグメントをエレクトロポレーションした。最小 A 培地および 0 . 3 m M グアニンを補充した最小 A 培地でクロラムフェニコール抵抗性形質転換体を試験した。以下のプライマーの組み合わせ：G u a B 6 - G u a B 7、G u a B 6 - P 2、G u a B 7 - P 1 および P 1 - P 2 を使用する P C R により g u a B : : c a t F R T 変異体を確認した。

【 0 1 0 4 】

腸炎菌 g u a B : : c a t F R T 変異体 (S M 1 2) を、F L P リコンビナーゼをコードする温度感受性複製プラスミド p C P 2 0 でエレクトロポレーションして、c a t 遺伝子を除去した。得られた株腸炎菌 g u a B を S M 2 0 と称した。変異体 S M 2 0 の全ゲノム DNA およびプライマーの組み合わせ G u a B 6 - G u a B 7 を使用して、欠失が位置する P C R フラグメントが得られた。プライマー G u a B 1 0 を使用してこのフラグメントの配列決定により g u a B 変異を確認した (図 4 参照) 。

10

【 0 1 0 5 】

前記した全てのプライマーの配列を表 1 に示す。

【 0 1 0 6 】

レッドリコンビナーゼ系の発現により引き起こされる、可能な追加的な変異体の存在を回避するために、同質遺伝子株を構築した。

【 0 1 0 7 】

変異体 S M 1 2 の g u a B : : c a t F R T 変異を S M 1 2 のバクテリオファージ P 2 2 H T i n t - (D a v i s , R . W . , B o t s t e i n D . および R o t h , J . R . , A d v a n c e d B a c t e r i a l G e n e t i c s , A m a n u a l f o r g e n e t i c e n g i n e e r i n g , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y , コールドスプリングハーバー、ニューヨーク州) ライゼートで野生型腸炎菌 7 6 S a 8 8 に形質導入した。プラスミド p C P 2 0 を使用して c a t 遺伝子を除去した。得られた株腸炎菌 g u a B は S M 6 9 と称され、寄託番号 L M G P - 2 1 6 4 1 を有した。

20

【 0 1 0 8 】

同一の手順および同一のプライマーを使用してネズミチフス菌株 1 4 9 1 S 9 6 の g u a B 変異体を構築した。得られた株を S M 1 9 と称した。S M 8 6 (寄託番号 L M G P - 2 1 6 4 6 を有する) は、S M 9 のバクテリオファージ P 2 2 H T i n t - ライゼートを使用する g u a B : : c a t F R T のネズミチフス菌株 1 4 9 1 S 9 6 への形質導入の後、および c a t 遺伝子の切除の後に得られた同質遺伝子株である。

30

【 0 1 0 9 】

g u a B 変異体 S M 1 9、S M 2 0、S M 6 9 および S M 8 6 はバクテリオファージ P 2 2 H T i n t - に感受性がある。これによりインタクトなりポ多糖類 (L P S) の存在が判明する。

【 0 1 1 0 】

マウスにおける腸炎菌 g u a B 欠失変異体 S M 2 0 を用いる毒性および保護試験

独立した 2 つの実験で 6 - 8 週齢雌 B A L B / c マウスの経口感染によりマウスにおける変異体 S M 2 0 の毒性を試験した (P a t t e r y ら、M o l . M i c r o b i o l . 3 3 (4) : 7 9 1 - 8 0 5 (1 9 9 9)) 。これらを前記したように実施した。野生型株腸炎菌 7 6 S a 8 8 を陽性対照として平行して試験した。腸炎菌 7 6 S a 8 8 a r o A 変異体 S M 5 0 をワクチン対照として実験に含めた。この変異体は完全 a r o A コード配列の正確な欠失を担持し、そして D a t s e n k o および W a n n e r (2 0 0 0) の方法により構築された。

40

【 0 1 1 1 】

完全なデータを表 2 および 3 に示す。これらの結果により、マウスにおいて g u a B 変異体 S M 2 0 が強く弱毒化されるが、この高用量で投与された場合に依然いくらかの残留病原性を示すことが実証される。高用量の対応する病原性野生型腸炎菌株 7 6 S a 8 8 による感染に対して、この変異体での経口免疫が保護免疫を誘起する。その保護は腸炎菌

50

aroA 変異体 SM50 により付与される保護と少なくとも同等である。

【0112】

マウスにおける同質遺伝子 guaB 欠失変異体 SM69 および SM86 での毒性および保護試験

マウスにおける変異体 SM69 および SM86 の毒性を 6 - 8 週齢雌 BALB/c マウスの経口感染により試験した。これらを前記したように実施した。野生型株腸炎菌 76 Sa88 およびネズミチフス菌 1491S96 を陽性対照として平行して試験した。

【0113】

完全なデータを表 6、7 および 10 - 13 に示す。これらの結果により、マウスにおいて guaB 変異体 SM69 および SM86 が強く弱毒化されるが、この高用量で投与された場合に、なお依然いくらかの残留病原性を示すことが実証される。高用量の対応する病原性野生株による感染に対して、変異体での経口免疫が保護免疫を誘起する。

10

【0114】

実施例 3：腸炎菌およびネズミチフス菌のフラジェリン変異体

次いで運動性遺伝子（例えばフラジェリン遺伝子）における追加的な（さらなる）改変がさらに SM20 のような guaB 遺伝子における欠失変異を担持する単一の変異体において残存する残留病原性を低下させることができるかどうかを試験した。

【0115】

フラジェリンをコードする 1 個の遺伝子 fl i C のみ含有する腸炎菌株を予備実験で使用した。腸炎菌の guaB および fl i C 遺伝子が不活化されている二重変異体を構築した。ネズミチフス菌に関して、二重（ guaB fl i C ; guaB fl j B A ）および三重（ guaB fl i C fl j B A ）変異体を構築した。

20

【0116】

fl i C 変異体（SM24、SM30）の構築

鋳型プラスミド pKD3（catFRT）または pKD4（kanFRT）で Fl i C P1 - Fl i C P2 プライマー組み合わせを使用する PCR により、FRT 部位およびプライミング部位 P1 および P2 と一緒に抗生物質抵抗性遺伝子を含有する組換えフラグメントを増幅し、そして伸長物は fl i C コード配列の始端 50（1 - 50）および終端（1468 - 1518）50 ヌクレオチドに相同である。この領域ではネズミチフス菌 1491S96 および腸炎菌 76 Sa88 はプライマーと各々 100% および 98% の配列同一性を示す。配列番号：22 と比較してプライマー Fl i C P1 は 37 位置で追加的な G を含有する。したがって fl i C 変異体アレルは 16 個のアミノ酸ペプチドをコードし、その最初の 12 個のアミノ酸は Fl i C のアミノ末端に相当する。fl i C コード配列（1 - 1518）の 1416 塩基対（51 - 1467）の内部セグメントが置換される。

30

【0117】

ラムダリコンビナーゼ系をコードする得られた PCR 生成物（1 μg）を予め 0.2% アラビノースで誘起されたネズミチフス菌 1491S96（pKD46）および腸炎菌 76 Sa88（pKD46）にエレクトロポレーションした。

【0118】

プライマー Fl i C 1 および Fl i C 2 ならびに変異体株および野生型株の全 DNA を使用する PCR により、抗生物質抵抗性候補置換変異体を確認した。およそ同一の大きさを有する PCR フラグメント間を認識するために制限分析を実施した。Fl i C 1 - Fl i C 2 で増幅された野生型ネズミチフス菌 PCR フラグメントの制限のために酵素 EcoRV を使用した。2 つのフラグメント（470 塩基対および 1021 塩基対）が得られた。fl i C 置換変異体に関して増幅されたフラグメントは EcoRV 制限部位を含有しない。腸炎菌の場合、酵素 ApoI を使用した。この酵素は腸炎菌の野生型 fl i C フラグメントを 2 片（345 塩基対および 1147 塩基対）に切断する。fl i C 置換変異体に関して得られたフラグメントは ApoI 制限部位を含有しない。

40

【0119】

0.4% 寒天を含む LB 培地で変異体の運動性を試験した（Miller（1992）

50

、A short course in bacterial genetics, a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria、Cold Spring Harbor Laboratory Press、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク州)。野生型ネズミチフス菌および野生型腸炎菌はこの培地で遊走する。ネズミチフス菌 *fliC* 置換変異体は、変異体に *fliJ* B 遺伝子が依然存在するので遊走する。腸炎菌 *fliC* 置換変異体はもはや遊走しない。これらの結果を顕微鏡観察により確認した。

【0120】

様々な変異体のエレクトロコンピテントセルを調製し、そしてエレクトロポレーションによりプラスミド pCP20 (ネズミチフス菌 3730 から抽出、R. Curtis, I. Kelly, S. M. Kelly, P. A. Gulig, C. R. Gentry-Weeks および J. E. Galan、「経口投与ワクチンとして使用するための他の病原体由来の毒性抗原を発現する毒性サルモネラ」、J. Roth (編)、Virulence Mechanisms、American Society for Microbiology、ワシントン DC (1988)、311 頁) で形質転換して抗生物質抵抗性を除去した。形質転換体を 43 でインキュベートした。これにより温度感受性 pCP20 プラスミドが排除され、そして抗生物質抵抗性遺伝子が排除されるはずである。ネズミチフス菌および腸炎菌 *fliC::catFRT* 変異体における抗生物質抵抗性の喪失を確認した。

【0121】

プライマー組み合わせ *fliC1/fliC2* を使用する PCR により、クロラムフェニコール抵抗性置換変異体に由来する欠失変異体を確認した。ネズミチフス菌 *fliC* および腸炎菌 *fliC* の双方に関して 185 塩基対のフラグメントを増幅した。

【0122】

プライマー *fliC3* を使用して増幅されたフラグメントを配列決定することにより欠失を確認した。

【0123】

0.4% 寒天を含有する LB 培地で得られた変異体を試験した：野生型ネズミチフス菌および野生型腸炎菌はこの培地で遊走し、またネズミチフス菌 *fliC* も遊走する (*fliJ* B 鞭毛遺伝子は依然存在する)。腸炎菌 *fliC* は予想されたように遊走しない。

【0124】

fliJ B A 変異体 (SM48) の構築

ネズミチフス菌は第 2 のフラジェリン遺伝子、*fliJ* B を含有する。この遺伝子は *fliJ* A と一緒に発現され、*fliC* の抑制物質をコードする。この場合、*fliJ* A および *fliJ* B の双方を欠失した。*fliJ* B は 1520 塩基対長であり、そしてタンパク質フラジェリンをコードする。*fliJ* A は 539 塩基対長であり、そして *fliC* の抑制物質をコードする。欠失されたフラグメントの全長 (*fliJ* B) : 2127 塩基対。

【0125】

fliJ B A 遺伝子の配列との 51ヌクレオチド相同性ならびに抗生物質抵抗性遺伝子および FRT 部位をフランキングする鑄型プラスミドの配列との相同性を示すプライマーを設計した。プライマー *fliJ* B A P1 は *fliJ* B の開始コドンから出発して 51 塩基対下流までの配列 (1 - 51) と相同性を示し、そしてプライマー *fliJ* B A P2 は *fliJ* A の開始コドンから出発して 51 塩基対下流までの配列 (2076 - 2127) と相同性を示す。プライマー *fliJ* B A P1 および *fliJ* B A P2 はその 3' 末端で FRT 部位を有する抵抗性遺伝子をフランキングする鑄型プラスミドのプライミング部位 P1 および P2 部位との相同性を示す。

【0126】

プライマー *fliJ* B A P1 および *fliJ* B A P2 (表 1 の配列) ならびに鑄型 DNA pKD3 (*catFRT*) または pKD4 (*kanFRT*) を使用する PCR により望ま

10

20

30

40

50

しい長さのフラグメントを増幅した。

【0127】

pKD46またはpKD20で形質転換されたネズミチフス菌にPCR生成物1μgをエレクトロポレーションした。選択されたカナマイシンおよびクロラムフェニコール抵抗性形質転換体をPCRにより確認した。

【0128】

0.4%寒天を含有するLB培地で変異体を試験した。野生型ネズミチフス菌、ネズミチフス菌 fljBA::kanFRTおよびネズミチフス菌 fljBA::catFRTは遊走する(fliCは依然存在する)。3つの株の運動性を顕微鏡観察により確認した。

10

【0129】

様々な変異体のエレクトロコンピテントセルをpCP20プラスミド(ネズミチフス菌LT2制限変異体3730に由来する)でエレクトロポレーションして抗生物質抵抗性遺伝子を除去した。28で2時間インキュベートした後、カルベニシリンを含むLB培地に培養物をプレーティングした。LB上43で形質転換体をインキュベートした後、それをプラスミドおよび抗生物質抵抗性遺伝子の喪失に関して試験した。フラグメントのPCRおよび配列決定の手段により欠失変異体を確認した。

【0130】

プライマー組み合わせFljBA6/FljBA5(表1の配列)を使用するPCRにより、野生型ネズミチフス菌に関して2112塩基対のフラグメント、およびネズミチフス菌 fljBA変異体SM48に関して185塩基対のフラグメントを増幅した。

20

【0131】

プライマーFljBA6-FljBA5(図7)を使用して得られたPCRフラグメントに関してプライマーFljBA6を使用して配列決定することにより、変異体SM48における欠失を確認した。

【0132】

ネズミチフス菌1491S96 fljBA fliC二重変異体(SM23)の構築
ネズミチフス菌 fljBA::kanFRT(pKD46)株を使用して二重変異体を構築した。28の温度でエレクトロコンピテントセルを調製した(温度感受性プラスミドpKD46)。エレクトロコンピテントセルを組換えfliCフラグメントでエレクトロポレーションし、ここでfliC遺伝子はクロラムフェニコール抵抗性遺伝子で置換されている(先行の実施例を参照)。候補変異体をスクリーニングおよび確認するために、fliC変異体の構築に使用された手順は以下のとおりであった。望ましい遺伝子型:ネズミチフス菌 fljBA::kanFRT fliC::catFRT。抗生物質抵抗性遺伝子を排除するための、以前に記載されたプロトコールは以下のとおりであった。ネズミチフス菌 fljBA fliC(SM23)における欠失をPCRにより確認した。

30

【0133】

二重変異体ネズミチフス菌 fljBA fliC(SM23)は予想されたように0.4%寒天を含むLB培地で運動しなかった。株の非運動性を顕微鏡観察により確認した。

40

【0134】

栄養要求性および鞭毛変異の組み合わせ

P22-形質導入(Davis, R.W., Botstein D.およびRoth, J.R.(1980)、Advanced Bacterial Genetics, A manual for genetic engineering. Cold Spring Harbor Laboratory, コールドスプリングハーバー、ニューヨーク州)を使用して変異を組み合わせた。置換変異体のP22-ライゼートを使用して組み合わされた欠失変異体を構築した。PCRにより形質導入を確認した(以前の確認と同一のプロトコールおよびプライマーを使用した)。抗生物質抵抗性遺伝子の排除のために

50

、pCP20ヘルパープラスミドを使用する以前に記載されたプロトコルを使用した。PCRにより欠失を確認した。この方式で構築された変異体は：ネズミチフス菌 *fliC guaB* (SM32)、ネズミチフス菌 *fljBA guaB* (SM35)、ネズミチフス菌 *fliC fljBA guaB* (SM27) および腸炎菌 *fliC guaB* (SM21) である。

【0135】

同質遺伝子欠失変異体の構築

欠失変異体の構築のための Datsenko および Wanner (2000) により記載された方法を専ら使用して、追加的な未知の変異体 (それは株の弱毒化に及ぼす影響を有し得る) が候補ワクチン株に存在する可能性を排除するために、同質遺伝子欠失変異体を構築した。P22ファージ形質導入により、変異を野生型バックグラウンドに形質導入した (Davis, R. W., Botstein D. および Roth, J. R. (1980), *Advanced Bacterial Genetics, A manual for genetic engineering*. Cold Spring Harbor Laboratory, コールドスプリングハーバー、ニューヨーク州)。抗生物質抵抗性置換変異体をドナー株として使用した。抗生物質抵抗性遺伝子の排除および欠失の確認のために、以前の実験と同一のプロトコルを使用した。

10

【0136】

構築された変異体：腸炎菌 *guaB* (SM69、寄託番号 LMG P-21641 を有する)；腸炎菌 *fliC* (SM71)；ネズミチフス菌 *guaB* (SM86、寄託番号 LMG P-21646 を有する)；ネズミチフス菌 *fliC* (SM91)；ネズミチフス菌 *fljBA* (SM90)、腸炎菌 *guaB fliC* (SM73、寄託番号 LMG P-21642 を有する)；ネズミチフス菌 *guaB fliC* (SM104)；ネズミチフス菌 *guaB fljBA* (SM87)；ネズミチフス菌 *fljBA fliC* (SM83)；ネズミチフス菌 *guaB fljBA fliC* (SM89、寄託番号 LMG P-21643 を有する)。

20

【0137】

実施例 4：腸炎菌ワクチン株での毒性および保護実験

腸炎菌ワクチン株の毒性に及ぼす *fliC* 遺伝子の不活化の影響

腸炎菌ワクチン株の免疫原性に及ぼす *fliC* 遺伝子の不活化の影響を研究するために、2つの独立した毒性および保護試験を7週齢雌BALB/cマウスにおいてSM20 (*guaB*) およびSM21 (*guaB fliC*) の双方の変異体を用いて実施した (表4および5)。

30

【0138】

毒性分析のために、野生型株のLD₅₀のおよそ10⁵倍に相当する約10⁸CFUの用量でマウスを経口感染した (Patteryら、*Molecular Microbiology* 33:791-805 (1999))。マウスを21日間観察した。野生型腸炎菌株76Sa88を接種された全てのマウスは感染後9日以内に死亡したが、非感染対照マウスは21日間の観察期間中健常なままであった。最初の実験では、腸炎菌 *guaB* 変異体SM20に感染したマウスは典型的な病徴 (活動性低下、毛並みの乱れおよび背の曲がり) を示し、そして10匹中1匹が死亡した。第2の実験では、SM20で病徴は観察されなかった。腸炎菌 *guaB fliC* 変異体SM21は双方の実験で無症候性であった。

40

【0139】

保護を付与するための変異体SM20およびSM21の有効性：保護試験

野生型腸炎菌株76Sa88の約10⁵LD₅₀ (LD₅₀ = 10³CFU) での経口抗原投与による初期免疫の3週後に、保護を付与するための変異体SM20およびSM21の有効性を試験した。マウスを21日間観察した。全ての非免疫マウスは抗原投与後死亡した。第2の実験では、SM20でワクチン接種された3匹のマウスのうち1匹が死亡した。全ての他のワクチン接種されたマウスは病徴を観察されずに抗原投与を生き延びた

50

。これらのデータにより、双方の変異体が弱毒化され、そして対応する野生型株での抗原投与に対して保護を付与することが示される。

【0140】

候補ワクチン株の弱毒化に寄与し得る付加的な未知の変異が存在しないことを確かめるために、P22形質導入により、選択可能な抵抗性遺伝子を含む変異を野生型バックグラウンドに移入した(Davis, R.W., Botstein D. および Roth, J.R. (1980), *Advanced Bacterial Genetics, A manual for genetic engineering*, Cold Spring Harbor Laboratory, コールドスプリングハーバー、ニューヨーク州)。

10

【0141】

腸炎菌の毒性に及ぼすfliC遺伝子の不活化の影響：同質遺伝子株での毒性および保護試験

PCRによる確認および先に記載されたような表現型特徴付けの後、BALB/cマウスでの毒性および保護試験を同質遺伝子株SM69(guaB)、SM71(fliC)およびSM73(guaB fliC)を用いて繰り返した。この毒性分析では、腸炎菌の毒性に及ぼすfliC遺伝子の不活化の影響を研究するためにfliC変異体を含めた。毒性および抗原投与実験のために前記したものと類似の条件を使用した。形質導入体SM69およびSM73に関して得られたデータ(表6および7)により、先の実験で成された観察を確認した。

20

【0142】

双方のguaB欠失変異体間の比較により、腸炎菌guaB fliC二重変異体SM73が、野生型株の高用量での抗原投与に対して、腸炎菌guaB単一変異体SM69よりもさらに弱毒化され、そしてより良好な保護を付与することが示される。腸炎菌fliC変異体SM71で実施された毒性分析により、この変異体が、適用された条件下で野生型株と同程度の毒性を残存することが示された。

【0143】

免疫学的応答および抗体生成

第1の実験での初期免疫の54日後、マウスの尾動脈から血液試料を収集した。腸炎菌LPS(Sigma)をコーティングに用いる酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)により、抗リポ多糖類(LPS)IgG力価を決定した。SM20およびSM21で免疫したマウスの血清間の比較により、双方の場合で抗LPS血清IgG応答が引き出され、そして力価に有意差は測定されないことが示された。第2および第3の用量での経口免疫により、初期免疫後66および95日に血清中の抗LPS IgGレベルは増強されなかった(データは示していない)。

30

【0144】

実施例5：ネズミチフス菌形質導入体での毒性および保護実験

7週齢雌BALB/cマウスにおいて形質導入体を用いて毒性および保護実験を実施した。およそ 10^8 細胞でマウスを経口により接種した。マウスを21日間毎日観察した。この期間の後、マウスを野生型病原性株 10^8 細胞で抗原投与し、そしてマウスを21日間観察した。

40

【0145】

病徴および生存率を表10-13に記す。単一および二重鞭毛変異体は経口投与された場合、高度に毒性のままであり、全マウスが死亡した。guaB変異体を接種されたマウスは穏やかな病徴を示した(マウスは闘争的であり、2匹のみが生存した)。組み合わされたguaB fljBA、guaB fliCおよびguaB fliC fljBA変異体は高度に弱毒化された。ワクチン接種後21日間の観察期間中に病徴は観察されなかった。これらの変異体は高用量の野生型株での抗原投与後に良好な保護を付与した。抗原投与後にマウスの活動性低下のみが観察され得る。

【0146】

50

またこれらの結果により、BALB/cマウスに投与された場合、鞭毛変異は株の免疫原性に影響を及ぼさないことも示された。鞭毛変異はワクチン株と野生型株との間の識別のための血清学的マーカーとして有用であり得る。栄養要求性変異と(複数の)鞭毛変異との組み合わせにより、マウスにおける変異体の毒性の低下および対応する野生型株に対する保護に関して最良の結果が得られる。

【0147】

ネズミチフス菌 *g u a B f l i C f l j B A* 三重欠失変異体ならびにネズミチフス菌二重欠失変異体 *g u a B f l j B A* および *g u a B f l i C* の弱毒化は同程度であった。

【0148】

実施例6：腸炎菌ワクチン株の安全性評価

気管内または経口経管経路により1日齢で接種されたニワトリにおけるSM69安全性評価

この研究の目的は、1日齢のニワトリにおける腸炎菌 *g u a B* 変異体株SM69マスターシードの安全性を評価することであった。安全性の決定のための一次的なパラメータとして死亡率を用いた。

【0149】

1日齢のニワトリの脚にバンドを付け、そして4つの処置群の各々に無作為に配した(第1群: SM69-IT、第2群: SM69-OG、第3群: PBS-ITおよび第4群: PBS-OG)。マスターシード接種の後、第1および第2群からのトリを1つの隔離飼育器に、そして第3および第4群のトリを別の隔離飼育器に配した。

【0150】

第1および第2群のニワトリに各々気管内(IT)経路または経口経管(OG)経路により、SM69マスターシードを、トリあたりの実際の力価 1.3×10^8 CFU/0.2 ml で接種した。第3および第4群のニワトリに各々気管内経路または経口経管経路により、トリあたり0.2 ml のPBS(リン酸緩衝生理食塩水)を投与した。

【0151】

SM69またはPBSの接種の後、ニワトリ死亡率を接種後38日まで毎日観察した。表8に全4群に関する死亡率の結果をまとめる。第1群では接種中に接種外傷のために1羽のトリが死亡した。接種後(DPI)2日に2羽のトリが死亡した。3日目から13日目までに3羽のトリが死亡した(各々3、5および13 DPI)。従って、第1群では全部で6羽のトリが死亡した。第2群では全部で2羽のトリが死亡した。1羽は接種外傷のために死亡し、そして1羽は接種後5日に死亡した。PBS処置群では気管内経路でも経口経管経路でも死亡したトリはなかった。

【0152】

この研究により、腸炎菌 *g u a B* 変異体株SM69は1日齢のトリあたり 1.3×10^8 CFU で気管内経路または経口経管経路により投与された場合に安全ではないことが示される。

【0153】

気管内経路または経口経管経路により2週齢で接種されたニワトリにおけるSM69の安全性評価

次いで腸炎菌 *g u a B* 変異体株SM69の安全性を2週齢SPFニワトリにおいて気管内経路または経口経管経路により評価した。安全性の決定のために死亡率を一次基準として、および体重を二次基準として用いた。

【0154】

2週齢のトリの脚にバンドを付け、そして4つの処置群の各々に無作為に配した: SM69-IT、SM69-OG、Poultvac ST-ITおよびPBS-IT。第1群の10羽のトリに気管内経路によりSM69を接種し; 第2群の10羽のトリに経口経管経路によりSM69を接種し; 第3群の10羽のトリに気管内経路によりネズミチフス菌 *A r o A* ワクチン(Poultvac(登録商標)ST)を接種し; そして第4群の5羽のト

10

20

30

40

50

りに気管内経路によりP B Sを接種した。

【0155】

第1および第2群のニワトリに各々気管内経路または経口経管経路により、S M 6 9 マスターシードをトリあたりの実際の力価 2.3×10^8 CFU / 0.2 ml で接種した。第3群のニワトリに気管内経路により、P o u l v a c (登録商標) S T をトリあたり 2.2×10^8 CFU / 0.2 ml で投与した。第4群のニワトリに気管内経路によりトリあたり0.2 ml のP B Sを投与した。

【0156】

接種後、処置第1および第2群からのトリを1つの隔離飼育器に、そして第3および第4群のトリを別の隔離飼育器に配した。

【0157】

接種に続いて、接種後21日まで死亡率を毎日観察した。全てのトリの体重もまた研究期間(21日間)の最後に記録した。P o u l v a c (登録商標) S T およびP B S を気管内手順の対照として使用した。

【0158】

21日の観察期間中にS M 6 9 気管内処置群(第1群)の1羽のトリが卵黄嚢感染から死亡した。死亡率はS M 6 9 に関連せず、それはS M 6 9 株が気管内経路および経口経管経路により、試験された力価、トリあたり 2.3×10^8 CFU で安全であることを示している。予想されたように、トリあたり 2.2×10^8 CFU の力価でP o u l v a c (登録商標) S T 処置されたトリ、またはP B S 処置されたトリのいずれでも死亡は観察されず、それはこの研究が正当であったことを示している(表9)。

【0159】

従属変数として体重、および独立変数として含まれた処置を用いる分散(ANOVA)モデルの分析で体重を群間で比較した。多重比較のためにチューキー検定を使用して群比較を行った。有意性のレベルを $p < 0.05$ に設定した、対照ニワトリ(P B S 対照群)は健常のままであり、そして研究の間中臨床病徴または死亡はなかったため、研究は正当であると考えられた。

【0160】

気管内接種または経口経管接種によるS M 6 9、P o u l v a c (登録商標) S T またはP B S を投与されたニワトリにおける最終体重に有意差はなかった(表9)。1日齢の各群のトリのベースラインは確立されなかったが、トリは無作為に4つの処置群の各々に配されたので、4群間の初期体重に有意差があったとは考えられなかった。

【0161】

本実験から、S M 6 9 は気管内経路または経口経管経路のいずれかにより、2週齢でトリあたり 2.3×10^8 CFU の試験された力価で投与された場合、安全であると結論づけることができる。

【0162】

気管内経路または経口経管経路により1日齢で接種されたニワトリにおけるS M 7 3 の安全性評価

腸炎菌欠失変異体株S M 7 3 (g u a B f l i C) の安全性を気管内経路および経口経管経路により評価した。安全性の決定のために、死亡率を一次基準として、および体重を二次基準として用いた。

【0163】

全てのトリの脚にバンドを付け、そしてこの研究に含められたトリの4群の1つに無作為に割り当てた(第1群: S M 7 3 - I T、第2群: S M 7 3 - O G、第3群: P o u l v a c S T - I T および第4群: P B S - I T)。第1群の10羽のトリに気管内経路によりS M 7 3 を接種し; 第2群の10羽のトリに経口経管によりS M 7 3 を接種し; 第3群の10羽のトリに気管内経路によりネズミチフス菌A r o A ワクチン(P o u l v a c (登録商標) S T) を接種し; そして第4群の5羽のトリに気管内経路によりP B S を接種した。全部で4つの隔離飼育器(各群に1個)を使用し、そこでニワトリを研究期

10

20

30

40

50

間中飼育した。

【0164】

1日齢のニワトリに接種した。第1および第2群のニワトリに各々気管内経路または経口経管経路により、SM73マスターシードをトリあたりの実際の力価 2.5×10^7 CFU/0.2 mlで接種した。第3群のニワトリに気管内経路により、Poulvac (登録商標) STをトリあたり 2.1×10^7 CFU/0.2 mlで投与した。第4群のニワトリに気管内経路によりトリあたり0.2 mlのPBSを投与した。

【0165】

SM69に関して前記で記載したように死亡率を観察し、そして体重を記録した。Poulvac (登録商標) STおよびPBSを再度気管内手順の対照として使用した。

10

【0166】

21日の観察期間中に、いずれのトリでも死亡は全く観察されなかった。PBS-IT、Poulvac ST-ITおよびSM73-OG接種されたトリの最終体重にはさらに差異はなかった。SM73-IT群の平均体重はSM73-OG群と比較して有意に低かった ($p = 0.0009$) が、これはほぼ確実に実験誤差による。

【0167】

本実験から、SM73は1日齢で気管内経路または経口経管経路により、トリあたり 2.5×10^7 CFUの試験された力価で投与された場合、安全であると結論づけることができる。

【0168】

以下の微生物に関してBCCM/LMGカルチャーコレクション、(Laboratorium voor Microbiologie, K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000、アントワープ(ベルギー))でブダペスト条約に従って寄託を行っている: 寄託番号LMG P-21641の下で腸炎菌SM69 (寄託日: 2002年8月9日); 寄託番号LMG P-21642の下で腸炎菌SM73 (寄託日: 2002年8月9日)、寄託番号LMG P-21646の下でネズミチフス菌SM86 (寄託日: 2002年8月28日) および寄託番号LMG P-21643の下でネズミチフス菌SM89 (寄託日: 2002年8月9日)。寄託はProf. J.-P. Hernalsteens (旧住所: Vrije Universiteit Brussel, Laboratorium Genetische Virologie, Paardenstraat 65, B-1640 Sint-Genesius-Rhode、現住所: Vrije Universiteit Brussel, Onderzoeksgroep Genetische Virologie, Pleinlaan 2, B-1050ブリュッセル、ベルギー) の名で行われた。

20

30

【0169】

表 1 : プライマー配列

| 配列番号 | プライマー | 配列 |
|------|---------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | GuaB2 | 5' CGTTCAGCG CAACAGGCG TTGT 3' |
| 2 | GuaB3 | 5' GGCTGGGATT GCGGAGTAG TA 3' |
| 3 | GuaB4 | 5' GGTGATCCCG GCGTCAAC GTCAGGGCTT CTTTA 3' |
| 4 | GuaB5 | 5' TTGACGCCCG GGATCACCAG AGAGTCCCG AACTA 3' |
| 5 | GuaB6 | 5' GCAACAATC CTGCTGGTA 3' |
| 6 | GuaB7 | 5' AGACCGAGGA TCACTTTATC 3' |
| 7 | GuaB10 | 5' AGGAAGTTG AGAGGATAA 3' |
| 8 | P1 | 5' GTGTAGGCTG GAGCTGCTTC 3' |
| 9 | P2 | 5' CATATGAATA TCCTCCTTAG 3' |
| 10 | FliCP1 | 5' ATGGCACAG TCATTAATAC AAACAGCCTG TCGCTGGTTG ACCAGAATA ATGTGTAGGC TGGAGCTGCT TC 3' |
| 11 | FliCP2 | 5' CGCATTACG CAGTAAAGAG AGGACGTTTT GCGGAACCTG GTTMCCTGC GCCACATATG AATATCCTCC TTAG 3' |
| 12 | FliC1 | 5' ATGGCACAG TCATTAATAC AAACAG 3' |
| 13 | FliC2 | 5' CGCATTACG CAGTAAAGAG AGGAC 3' |
| 14 | FliC3 | 5' TATCGGCAAT CTGGAGGCAA 3' |
| 15 | FljBAP1 | 5' ATGGCACAG TAATCAACAC TAACAGTCTG TCGCTGCTGA CCCAGAATAA CTGTGTAGGC TGGAGCTGCT TC 3' |
| 16 | FljBAP2 | 5' TTATTCAGCG TAGTCCGAAG ACGTGATCCT GCTCACCCAG TCAACACATAA CCATATGAAT ATCCTCCTTA G 3' |
| 17 | FljBA5 | 5' CAGCGTAGC CGAAGACGTG ATC 3' |
| 18 | FljBA6 | 5' AACTAACAG TCTGTGCTG CT 3' |

10

20

30

40

表 2 : BALB/cマウスにおける腸炎菌 Δ g u a B 変異体 SM20 の毒性試験

| 感染株 | マウスの状態 | | 生存 | 死亡の日 | マウスの状態 |
|------------------------------------|-------------------|--|-------|---------------|-----------------------|
| | 用量 | | | | |
| 第 1 実験 | | | | | |
| 陰性対照 : ミルク | / | | 11/11 | / | 病徴なし |
| 陽性対照 : 腸炎菌 76Sa88 | 2.1×10^8 | | 0/5 | 7, 7, 8, 8, 9 | |
| ワクチン対照 : 腸炎菌 Δ a r o A SM50 | 2.5×10^8 | | 10/10 | / | 病徴なし |
| 腸炎菌 Δ g u a B SM20 | 5.1×10^8 | | 9/10 | 13 | 感染後 7 日目と 14 日目との間で病徴 |
| 第 2 実験 | | | | | |
| 陰性対照 : ミルク | / | | 4/4 | / | 病徴なし |
| 陽性対照 : 腸炎菌 76Sa88 | 1.4×10^8 | | 0/3 | 8, 9, 9 | |
| ワクチン対照 : 腸炎菌 Δ a r o A SM50 | 2.1×10^8 | | 3/3 | / | 病徴なし |
| 腸炎菌 Δ g u a B SM20 | 1.9×10^8 | | 3/3 | / | 病徴なし |

表3：腸炎菌 g u a B 変異体 S M 2 0 でワクチン接種されたマウスの抗原投与

| ワクチン接種 | | 抗原投与 | | 生存 | 死亡の日 | マウスの状態 |
|-------------------------------------|-------------------|-----------------|-------------------|-----|------------------|-----------------------------------|
| 株 | 用量 | 株 | 用量 | | | |
| 第 1 実験 | | | | | | |
| 陰性対照：ミルク | / | 陰性対照：ミルク | / | 6/6 | / | 病徴なし |
| 陰性対照：ミルク | / | 腸炎菌 7 6 S a 8 8 | 1.5×10^8 | 0/5 | 7, 8, 8, 8, 9 | 抗原投与後 5 日目に病徴が始まる |
| ワクチン対照：腸炎菌 Δ a r o A S M 5 0 | 2.5×10^8 | 腸炎菌 7 6 S a 8 8 | 1.5×10^8 | 3/5 | 9, 13 | 抗原投与後 7 日目と 1 4 日目との間で病徴 |
| 腸炎菌 Δ g u a B S M 2 0 | 5.1×10^8 | 腸炎菌 7 6 S a 8 8 | 1.5×10^8 | 5/5 | / | マウスは抗原投与後 1 1 日目と 1 4 日目との間で活動性低下 |

10

20

30

40

表 3 続き:

| ワクチン接種 | | 抗原投与 | | 生存 | 死亡の日 | マウスの状態 |
|------------------------------|-------------------|------------|-------------------|-----|------|-------------------------|
| 株 | 用量 | 株 | 用量 | | | |
| 第2実験 | | | | | | |
| 陰性対照：ミルク | / | 陰性対照：ミルク | / | 2/2 | / | 病徴なし |
| 陰性対照：ミルク | / | 腸炎菌 76Sa88 | 1.5×10^8 | 0/2 | 9,18 | |
| ワクチン対照： 腸炎菌 ΔaroA SM50 | 2.1×10^6 | 腸炎菌 76Sa88 | 1.5×10^8 | 1/3 | 9,21 | 抗原投与後7日目と21日目との 間で病徴 |
| 腸炎菌 ΔguaB SM20 | 1.9×10^8 | 腸炎菌 76Sa88 | 1.5×10^8 | 2/3 | 10 | 感染後9日目に病徴が始まる |

10

20

30

40

表4: BALB/cマウスにおける腸炎菌変異体SM20およびSM21の毒性試験

| 感染株 | 生存 | | 死亡の日 | マウスの状態 |
|---------------------|-------|---------------------|---------------|---------------------------|
| | 生存 | 用量 | | |
| 第1実験 | | | | |
| 陰性対照: 感染なし | 11/11 | / | | 無症候性 |
| 陽性対照: 腸炎菌76Sa88 | 0/5 | 2.1x10 ⁶ | 7,7,8, 8,9 | 5日目から重度の症状 |
| 腸炎菌ΔguaB SM20 | 9/10 | 5.1x10 ⁸ | 13 | 7日目から17日まで軽度から 重度までの症状 |
| 腸炎菌ΔguaB ΔfliC SM21 | 10/10 | 4.3x10 ⁸ | / | 無症候性 |
| 第2実験 | | | | |
| 陰性対照: 感染なし | 4/4 | / | / | 無症候性 |
| 陽性対照: 腸炎菌76Sa88 | 0/3 | 1.4x10 ⁹ | 8,9,9 | 6日目から重度の症状 |
| 腸炎菌ΔguaB SM20 | 3/3 | 1.9x10 ⁸ | / | 無症候性 |
| 腸炎菌ΔguaB ΔfliC SM21 | 3/3 | 3.2x10 ⁸ | / | 無症候性 |

表5：腸炎菌変異体SM20およびSM21でワクチン接種されたマウスの抗原投与

| ワクチン接種 | | 抗原投与 | | 生存 | 死亡の日 | マウスの状態 |
|-----------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----|------------------|------------|
| 株 | 用量 | 株 | 用量 | | | |
| 第1実験 | | | | | | |
| 陰性対照：ミルク | / | 腸炎菌野生型株 76Sa88 | 1.6×10^8 | 0/5 | 7, 8, 8, 8, 9 | 6日目から重度の症状 |
| 腸炎菌野生型株 76Sa88 | 2.1×10^8 | 腸炎菌野生型株 76Sa88 | 1.6×10^8 | / | / | / |
| 腸炎菌 Δ g u a B SM20 | 5.1×10^8 | 腸炎菌野生型株 76Sa88 | 1.6×10^8 | 4/4 | / | 無症候性 |
| 腸炎菌 Δ g u a B Δ f l i C SM21 | 4.3×10^8 | 腸炎菌野生型株 76Sa88 | 1.6×10^8 | 5/5 | / | 無症候性 |

10

20

30

40

表5: 続き

| ワクチン接種 株 | 抗原投与 | | 生存 | 死亡の日 | マウスの状態 |
|------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-----|-------|-----------------|
| | 用量 | 株 | | | |
| 第2実験 | | | | | |
| 陰性対照: ミルク | / | 腸炎菌野生型株 76Sa88 | 0/2 | 9, 18 | 6日目から重度の症状 |
| 腸炎菌野生型株 76Sa88 | 1.4×10^8 | 腸炎菌野生型株 76Sa88 | / | / | / |
| 腸炎菌 Δ g u a B SM20 | 1.9×10^8 | 腸炎菌野生型株 76Sa88 | 2/3 | 10 | 重度の症状の一例を除いて無症状 |
| 腸炎菌 Δ g u a B Δ f i c S M 2 1 | 3.2×10^8 | 腸炎菌野生型株 76Sa88 | 3/3 | / | 無症候性 |

10

20

30

40

表6：BALB/cマウスにおける腸炎菌変異体SM71、SM73およびSM69の毒性試験

| 感染株 | マウスの状態 | | 死亡の日 | 生存 | 用量 |
|--------------------------|-------------------|---------|------|-------------------|----|
| | マウスの状態 | 死亡の日 | | | |
| 陰性対照：感染なし | 無症候性 | / | 4/4 | / | |
| 陽性対照：腸炎菌76Sa88 | 5日目から重度の症状 | 7, 8, 9 | 0/3 | 3.7×10^8 | |
| 腸炎菌Δfl i c SM71 | 4日目から重度の症状 | 6, 8, 8 | 0/3 | 1.4×10^8 | |
| 腸炎菌Δg u a B SM69 | 11日目から18日目まで軽度の症状 | / | 5/5 | 7.6×10^8 | |
| 腸炎菌Δg u a B Δfl i c SM73 | 11日目から13日目まで活動性低下 | / | 5/5 | 1.2×10^8 | |

10

20

30

40

表 7: 腸炎菌変異体 SM71、SM73 および SM69 でワクチン接種されたマウスの抗原投与

| ワクチン接種 | | 抗原投与 | | 生存 | 死亡の日 | マウスの状態 |
|-------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----|---------------|------------|
| 株 | 用量 | 株 | 用量 | | | |
| 陰性対照: ミルク | / | 腸炎菌野生型株 76Sa88 | 3.1×10^8 | 0/4 | 8, 8, 8, 9 | 5日目から重度の症状 |
| 腸炎菌野生型株 76Sa88 | 3.7×10^8 | 腸炎菌野生型株 76Sa88 | 3.1×10^8 | / | / | / |
| 腸炎菌 Δ fllic SM71 | 1.4×10^8 | 腸炎菌野生型株 76Sa88 | 3.1×10^8 | / | / | / |
| 腸炎菌 Δ guaaB SM69 | 7.6×10^8 | 腸炎菌野生型株 76Sa88 | 3.1×10^8 | 2/5 | 8, 8, 19 | 5日目から重度の症状 |
| 腸炎菌 Δ guaaB Δ fllic SM73 | 1.2×10^8 | | | 5/5 | / | 無症候性 |

表 8 : 1日齡ニワトリにおけるサルモネラ変異体SM69の安全性評価

| 感染株 | 群 | N | 力価 | 経路 | 生存 | 死亡の日 (DPI) |
|-----------|------------|----|---------------------------------|------|--------|----------------|
| 腸炎菌SM69 | 1: SM69-IT | 10 | 1.3×10^8 CFU/0.2 ml | 気管内 | 4/10* | 0, 2, 3, 5, 13 |
| 腸炎菌SM69 | 2: SM69-OG | 10 | 1.3×10^8 CFU/0.2 ml | 経口経管 | 8/10** | 0, 5 |
| 陰性対照: PBS | 3: PBS-IT | 10 | PBS - 0.2 ml | 気管内 | 10/10 | - |
| 陰性対照: PBS | 4: PBS-OG | 10 | PBS - 0.2 ml | 経口経管 | 10/10 | - |

IT 気管内

OG 経口経管

DPI 接種後の日数

* 第1群では、各々、接種中に1羽のトリが死亡し、3、5および13DPIで1羽のトリが死亡し、そして2DPIで2羽のトリが死亡した。

** 第2群では、接種中に1羽のトリが死亡し、そしてDPI5日に1羽のトリが死亡した。

表9：2週齢ニワトリにおけるサルモネラ変異体SM69の安全性評価

| 感染株 | 群 | N | 力価 | 経路 | 生存 | 死亡の日 (DPI) | 平均体重 (kg) | 体重標準 偏差 |
|-------------------------------|---------------|----|---------------------------------|----|-------|---------------|--------------|------------|
| 腸炎菌 SM69 | 1: SM69-IT | 10 | 2.3×10^8 CFU/0.2 ml | IT | 9/10* | 13 | 0.429 | 0.064 |
| 腸炎菌 SM69 | 2: SM69-OG | 10 | 2.3×10^8 CFU/0.2 ml | OG | 10/10 | - | 0.420 | 0.044 |
| ワクチン対照: Poulvac (登録商標) ST* | 3: Poulvac-IT | 10 | 2.2×10^6 CFU/0.2 ml | IT | 10/10 | - | 0.423 | 0.046 |
| 陰性対照: PBS | 4: PBS-IT | 5 | PBS - 0.2 mL | OG | 5/5 | - | 0.388 | 0.019 |

IT 気管内

OG 経口経管

DPI 接種後の日数

* 卵黄嚢感染による死亡

** ネズミチフス菌に対するネズミチフス菌AroA-生ワクチン

表 10: BALB/cマウスにおけるネズミチフス菌変異株での毒性実験。
ネズミチフス菌株 1491S96 およそ 10^8 細胞で経口接種

| 感染株 | 生存 (死亡の日) | マウスの状態 |
|--------------------------------------------------|----------------------------|------------------|
| 株 (ネズミチフス菌 1491S96) | | |
| 野生型 SM2 | 0/3 (9, 9, 10) | 4日目から病徴 |
| Δ fliC SM91 | 0/5 (9, 10, 11, 15, 15) | 5日目から病徴 |
| Δ fliJBA SM90 | 0/5 (8, 10, 10, 11, 34) | 7日目から重度の病徴 |
| Δ fliJBA Δ fliC SM83 | 0/5 (8, 9, 12, 14, 15) | 7日目から重度の病徴 |
| Δ guaB SM85 | 2/5* (2, 2, 2) | 9日目から抗原投与まで軽度の病徴 |
| Δ guaB Δ fliJBA SM87 | 5/5 | 症状なし |
| Δ guaB Δ fliC Δ fliJBA SM89 | 5/5 | 症状なし |
| 対照 (感染なし) | 4/4 | 症状なし |

* 闘争後に死亡

表11: BALB/cマウスにおけるネズミチフス菌変異株での抗原投与実験。
 ネズミチフス菌株1491S96および108細胞で経口ワクチン接種

| ワクチン接種 | 抗原投与 | 用量 (CFU) | 生存 (死亡の日) | マウスの状態 |
|--------------------------------|---------------------------|-----------------------|-----------|----------------------------------------------------|
| 株 (ネズミチフス菌1491S96) | 株 (ネズミチフス菌 1491S96) | 1.3 x 10 ⁷ | 2/2 | 14日目まで軽度の症状、 その後1匹のマウスが明確な症状 を示し、他は再び健康であった。 |
| <i>ΔguaB</i> SM86 | ネズミチフス菌 1491S96 | 1.3 x 10 ⁷ | 5/5 | 8日目と10日目との間で 活動性低下 |
| <i>ΔguaB ΔfljBA</i> SM87 | ネズミチフス菌 1491S96 | 1.3 x 10 ⁷ | 5/5 | 8日目と10日目との間で 活動性低下 |
| <i>ΔguaB ΔfliC ΔfljBA</i> SM89 | ネズミチフス菌 1491S96 | 1.3 x 10 ⁷ | 5/5 | 8日目と10日目との間で 活動性低下 |
| 対照 (感染なし) | ネズミチフス菌 1491S96 | 1.3 x 10 ⁷ | 0/4 | 6日目から重度の病徴 |

表 12 : BALB/c マウスにおけるネズミチフス菌 1491S96 変異株での毒性実験

| 感染株 | 用量 | 生存 (死亡の日) | マウスの状態 |
|--------------------------------------------------|-------------------|---------------------|--------------------|
| 株 (ネズミチフス菌 1491S96) | | | |
| 野生型 SM2 | 0.8×10^8 | 1/4 (11, 13, 14) | 6 日から病徴 |
| Δ guaB SM86 | 0.8×10^8 | 5/5 | 13 日および 14 日目に弱い症状 |
| Δ guaB Δ fliC SM91 | 2.5×10^6 | 5/5 | 症状なし |
| Δ guaB Δ fliJBA SM87 | 1.5×10^8 | 5/5 | 症状なし |
| Δ guaB Δ fliC Δ fliJBA SM89 | 1.7×10^8 | 5/5 | 症状なし |
| 対照 (感染なし) | - | 5/5 | 症状なし |

表13: BALB/cマウスにおけるネズミチフス菌1491S96変異株での保護実験

| ワクチン接種 | 抗原投与 | 用量 | 用量 | 生存 (死亡の日) | マウスの状態 |
|---------------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|------------------------------------|
| 株 (ネズミチフス菌 1491S96) | 株 (ネズミチフス菌1491S96) | | | | |
| ΔguaB SM86 | ネズミチフス菌 1491S96 | 0.8×10^8 | 2.7×10^8 | 5/5 | 6日目から16日目まで 活動性低下 |
| ΔguaB ΔfliC SM91 | ネズミチフス菌 1491S96 | 2.5×10^8 | 2.7×10^8 | 5/5 | 7日目から活動性低下; 8日目から14日目まで 弱い症状 |
| ΔguaB ΔfliJBA SM87 | ネズミチフス菌 1491S96 | 1.5×10^8 | 2.7×10^8 | 3/5 (10,28) | 6日目と16日目との間 で弱い症状 |
| ΔguaB ΔfliC-ΔfliJBA SM89 | ネズミチフス菌 1491S96 | 1.7×10^8 | 2.7×10^8 | 4/5 (19) | 8日目と16日目との間 で活動性低下 |
| 対照 (感染なし) | ネズミチフス菌 1491S96 | - | 2.7×10^8 | 0/5 (8,9,10,11,16) | 6日目から重度の病徴 |

10

20

30

40

【 図面の簡単な説明】

【 0170】

50

- 【図 1】グアノシンーリン酸の生合成経路の図式的概観を示す。
- 【図 2】腸炎菌ゲノムのコンティグ 1 2 9 4 を表す (配列番号: 1 9)。
- 【図 3】pUC 1 8 にクローン化された腸炎菌の *g u a B* フラグメントの配列を表す (配列番号: 2 0)。
- 【図 4】プライマー *G u a B 1 0* を用いて得られた *g u a B* 欠失を含む、腸炎菌 PCR フラグメントのヌクレオチド配列を表す (配列番号: 2 1)。
- 【図 5】ネズミチフス菌 LT 2 の *g u a B* 遺伝子、完全ゲノムのセクション 2 2 0 の 1 1 7 を示す (配列番号: 2 2)。*g u a B* 遺伝子の A T G 開始および T G A 終止コドンに太字を示す。
- 【図 6】プライマー *F l i C 1* および *F l i C 2* を用いて変異体 S M 7 3 および S M 8 9 の全 DNA で、プライマー *F l i C 1 - F l i C 2* で増幅された PCR フラグメントを配列決定した後に得られたヌクレオチド配列を示す (配列番号: 2 3)。
- 【図 7】プライマー *F l j B A 6* を用いてネズミチフス菌変異体 S M 4 8 の全 DNA で、プライマー *F l j B A 6 - F l j B A 5* で増幅された PCR フラグメントを配列決定した後に得られたヌクレオチド配列を示す (配列番号: 2 4)。
- 【図 8 - 1】S M 6 9 に関する寄託受領を表す。
- 【図 8 - 2】S M 6 9 に関する寄託受領を表す。
- 【図 8 - 3】S M 6 9 に関する寄託受領を表す。
- 【図 8 - 4】S M 6 9 に関する寄託受領を表す。
- 【図 9 - 1】S M 7 3 に関する寄託受領を表す。
- 【図 9 - 2】S M 7 3 に関する寄託受領を表す。
- 【図 9 - 3】S M 7 3 に関する寄託受領を表す。
- 【図 9 - 4】S M 7 3 に関する寄託受領を表す。
- 【図 10 - 1】S M 8 9 に関する寄託受領を表す。
- 【図 10 - 2】S M 8 9 に関する寄託受領を表す。
- 【図 10 - 3】S M 8 9 に関する寄託受領を表す。
- 【図 10 - 4】S M 8 9 に関する寄託受領を表す。
- 【図 11 - 1】S M 8 6 に関する寄託受領を表す。
- 【図 11 - 2】S M 8 6 に関する寄託受領を表す。
- 【図 11 - 3】S M 8 6 に関する寄託受領を表す。
- 【図 11 - 4】S M 8 6 に関する寄託受領を表す。
- 【配列表フリーテキスト】
- 【0 1 7 1】
- 配列番号 1 は、*G u a B 2* プライマーの配列である。
- 配列番号 2 は、*G u a B 3* プライマーの配列である。
- 配列番号 3 は、*G u a B 4* プライマーの配列である。
- 配列番号 4 は、*G u a B 5* プライマーの配列である。
- 配列番号 5 は、*G u a B 6* プライマーの配列である。
- 配列番号 6 は、*G u a B 7* プライマーの配列である。
- 配列番号 7 は、*G u a B 1 0* プライマーの配列である。
- 配列番号 8 は、*P 1* プライマーの配列である。
- 配列番号 9 は、*P 2* プライマーの配列である。
- 配列番号 10 は、*F l i C P 1* プライマーの配列である。
- 配列番号 11 は、*F l i C P 2* プライマーの配列である。
- 配列番号 12 は、*F l i C 1* プライマーの配列である。
- 配列番号 13 は、*F l i C 2* プライマーの配列である。
- 配列番号 14 は、*F l i C 3* プライマーの配列である。
- 配列番号 15 は、*F l j B A P 1* プライマーの配列である。
- 配列番号 16 は、*F l j B A P 2* プライマーの配列である。
- 配列番号 17 は、*F l j B A 5* プライマーの配列である。

配列番号 18 は、F l j B A 6 プライマーの配列である。

配列番号 20 は、p U C 18 にクローン化された腸炎菌の g u a B フラグメントの配列である。

配列番号 21 は、プライマー G u a B 10 を用いて得られた g u a B 欠失を含む、腸炎菌 P C R フラグメントのヌクレオチド配列である。

配列番号 23 は、プライマー F l i C 1 および F l i C 2 を用いて変異体 S M 7 3 および S M 8 9 の全 D N A で、プライマー F l i C 1 - F l i C 2 で増幅された P C R フラグメントを配列決定した後に得られたヌクレオチド配列である。

配列番号 24 は、プライマー F l j B A 6 を用いてネズミチフス菌変異体 S M 4 8 の全 D N A で、プライマー F l j B A 6 - F l j B A 5 で増幅された P C R フラグメントを配列決定した後に得られたヌクレオチド配列である。

10

【 図 1 】

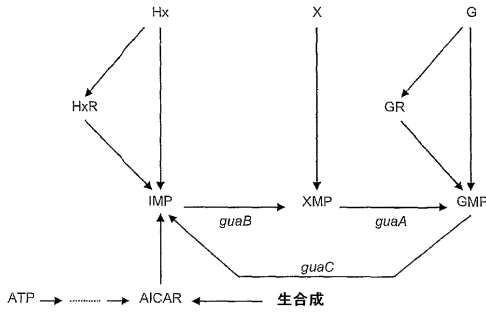


Fig. 1

【 図 2 】

```

CTGATCGAACCAAGCCTTCGGCCTGCAGTTTGGCTTTTTCAGCTGCTCATATTTCTGCTGCAG - 60
CAAGCCTTCGCCCCGGGGCTGCATATTTTCGGCGATGATTTGATATTCGCGCGCGGGCTC - 120
GTACAGCGTATATGTTGGCGGTACAGCACCTGCTGCCCGTGTGCGGGCGGAACGTCAC - 180
CCGGCGATTTGCTGTTACGGAACTTCGACAGCGCACCTGAGCGGTAFCGCTTTTGGCGGT - 240
AAAGTACCAGTGGCCCGACGCGAGCTGCGTGAATTTAGAAATCTCGCCGCTGATCCATAC - 300
CTGTCCCATCTCCTGTTCTAACAGCAGACGAAACCGTCTGGTTTAAAGCGGGCTTACGTTAAA - 360
AATTGAGGAAGTTTGGAGGATACATGTGAGCGGGATCAAATTTCTAATCAGCAGGTTTA - 420
TTCAATCGATAGTAACTGCTCACGGGGATCGCAAGCACTAATTTGCAAAAAAATGTAGA - 480
TGCAACCGATTAAGTCTGTATAAATGCGCGGGAATATTTATTAACCTCCAGCGAGAT - 540
ATTGCCCATGCTACGTTATGCTAAGAAAGCTCTGACGTTTGAACGACGCTCTCTTGTCTCC - 600
CGTCACTCCACCGTTTTCGCGAATACTGCCGATCTCAGCACGCAAGTTGACGAAACTAT - 660
TGTCTGAATATCTTATGCTTTTCGCGCGATGGAACCCGTGACGGAAGCGCGCTGGC - 720
AATTGCCCTGGCCAGGAAGCGGCAATGGTTTATCCACAAAAACAATGCTTATTTGAGCG - 780
CCAGCGGAAAGATTCGCGCGGTGAAGAAACACAGATCCGCGTGTAGTACCCGACCGCA - 840
GACCGTCTGCAACCAACAGCTTGTGTAAGTGAAGACCTGACCCGACCTAACGTTTT - 900
TGCGGCTATCCGCGGTACTGTAAGTAAAGACGCTGCGGTTCTCTCACCGGTCGTA - 960
CGTCCGCTTTTGTGATGACCTGAAACAGCGGTTGATGTTCTAATGACGCGAAGAGCG - 1020
TCTGTTGACCGTTTGTGAAAGCGAAGCGCCGTAAGTCTGCTGCAAAATGCAAGAAA - 1080
ACCGTGAAGAAAGCGTGTGTTGATGATAACTCCATCTGCTTGGCTGATTAACCGT - 1140
AAAAGATTTCCAGAAAGCGGAACTGTAACCAAACTCCGTTAAGAGTATGACGCGCGTGT - 1200
ACGTTCCGCGCGCGGCTGCGCGTCAAGCGCGGCAACAGAAAGCGCGTTGACGCGCTGT - 1260
GGCGGCGGCGTTGACGCTACTGCTGATCGACTCTCTCACGGTCACTTGAAGCGTGT - 1320
GCACCGTATCCGTTGAGACGCTGCTAATATCTCTGACTTGAATCATCGGCGGAACTG - 1380
TGCGAGCGGCGCAGCGCTCGCGCACTGGCGAAGCCGCTTGAACCGGTTGAAAGTGGG - 1440
TATCGCGCGGTTTCCATCTGTACGACTCGGATCGGACTGCTGTTGGCGTTCCDCAAGAT - 1500
CACCGCTGTTTTCGACCGGTGAAAGCGCTGGAAGCGCACCGGATTCGCGTTATCGTGA - 1560
CGGCGGATCCGTTCTCGNNNACTCGCAAGCGCTCCCGCGAGCGCGAGCGCGGT - 1620
AATGTTGGGTTCTATGCTGGCGGTAACGAAAGATCNCGCGCGAATCGAACTCTACCA - 1680
GGGCGCTTCTTCAAACTTATGCGGATGCGGTTCTCTGCGCGGATGCTCCAAAGGTTTC - 1740
CTCCGACCGTTACTTCCAGAGCGCAACCGCGCGCAAACTGGTSCCGGAAGGTTATCGA - 1800
AGGCGCGTACGCTATAAAGTTCGCTGAAAGAGATCAATTCACCGAGATGCGCGCGCT - 1860
GGGCTCTGTTGGCGTGAACCGTTGCTCACTGACGAACTGCTACTAAAGCGGA - 1920
GTTTGTGCTATCGCGGTTGCGGTTATCCAGAAAGCGCTTCCGACGTTGACCACTAC - 1980
CAAAGATCCCGACTACCGCTGCGGCTCTGATTTTCTGCGCGGACCTTGGCTGCG - 2040
GCGATTTTAAATGCTTCACTTGCCTCGAATAAGCGTCAATGACGAAACATTC - 2100
TAAAGATCGCATCTCACTGACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG - 2160
CGTGGTGAAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG - 2220
TCGTCATTCACCAAGCGGCAATTTCTTCCCGCGCGGAAAGCACCAACCGCAAG - 2280
AAAACAGCGCGCGCGCGCGAGTATGCTTTGAAAGCAGCGCTGCGGATTTTGGCGTTG - 2340
CTATGTTATCGACCATCGGATGTCAGCTTGGCGGTCATGTAGAGGTTCTAATGAGCG - 2400
TGAATTTGGTTATCCGAGGTGAAAGTGTGACCGCAAGCGCGCTGCTGCGGTTATGGA - 2460
AGATTTCCCTGACCGGACGCGCAACCGCTGCTGGAAGCTGTTGATGACGCGCGGATTA - 2520
AGTGAAGCGGATTCCTCGACTTCTGACCGCTGCGGACGACCGGAGACTGCGGTTGCG - 2580
CATATGCGCAAGGAAAGAAAGCGTCTTACCGCGTACAGTTCCACCGCGAAGTACTCA - 2640
CACCGCGCGGTTATGCGCATGCTGGAGCGTTTGTGACCGGATTTCTCGAGTTGTAAGC - 2700
GTTTGTGACCGCGCGGAAAGATCATCGATGACCGCGCTGCGCGGCTTCCGCGAGGTTAG - 2760
CGACGATAAAGTATCTCGGCTCTCGCGCGCGGATTTCTCGCTACCGCGCACTGCT - 2820
GCTGACCGCGGATCGTAAAGATCTGACCTGTTTTCGTCGACACGACGCTGTTGCG - 2880
CCTGAACGAGCGCGAGCGTGA -2933 (配列番号: 19)

```

Fig. 2

【 8 - 2 】

BELGIAN COORDINATED COLLECTIONS OF MICROORGANISMS - BCCM LMG-COLLECTION Page 2 of Form BCCM/LMG/BP/4/...02-132 Receipt in the case of an original deposit

KOPIE

ii. Scientific description and/or proposed taxonomic designation
The microorganism identified under I above was accompanied by:
(mark with a cross the applicable box(es)):
[] a scientific description
[] a proposed taxonomic designation
III. Receipt and acceptance
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on (date of original deposit) :
August 9, 2002
IV. International Depositary Authority
Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)
Laboratorium voor Microbiologie - Bacteriënverzameling (LMG)
Universiteit Gent
K.L. Ledeganckstraat 35
B-9000 Gent, Belgium
Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):

[Handwritten signature]

Dr. D. Janssens, curator IDA

Date : September 5, 2002

【 8 - 3 】

BELGIAN COORDINATED COLLECTIONS OF MICROORGANISMS - BCCM LMG-COLLECTION Page 1 of Form BCCM/LMG/BP/9/...02-132 Viability statement

KOPIE

Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure

Viability statement issued pursuant to Rule 10.2 by the International Depositary Authority BCCM/LMG identified on the following page

International Form BCCM/LMG/BP/9/...02-132...

To: Party to whom the viability statement is issued:

Name : Prof. J.-P. Hernalsteens

Address : Vrije Universiteit Brussel
Laboratorium Genetische Virologie
Paardenstraat 65
B-1640 Sint-Genesius-Rode

I. Depositor:

I.1 Name : Prof. J.-P. Hernalsteens

I.2 Address : Vrije Universiteit Brussel
Laboratorium Genetische Virologie
Paardenstraat 65
B-1640 Sint-Genesius-Rode

II. Identification of the microorganism

II.1 Accession number given by the International Depositary Authority:

LMG P-21641

II.2 Date of the original deposit (or where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date) :

August 9, 2002

III. Viability statement.

The viability of the microorganism identified under II above was tested on

August 9, 2002

(Give data. In the cases referred to in Rule 10.2(a)(i) and (ii), refer to the most recent viability test).

On that date, the said microorganism was: (mark the applicable box with a cross)

[x] viable
[] no longer viable

【 8 - 4 】

BELGIAN COORDINATED COLLECTIONS OF MICROORGANISMS - BCCM LMG-COLLECTION Page 2 of Form BCCM/LMG/BP/9/...02-132 Viability statement

KOPIE

IV. Conditions under which the viability test has been performed:
(Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative).

[Empty box for conditions]

V. International Depositary Authority

Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)
Laboratorium voor Microbiologie - Bacteriënverzameling (LMG)
Universiteit Gent
K.L. Ledeganckstraat 35
B-9000 Gent, Belgium

Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s) :

[Handwritten signature]

Dr. D. Janssens, curator IDA

Date : September 5, 2002

Fig. 8

【 9 - 1 】

BELGIAN COORDINATED COLLECTIONS OF MICROORGANISMS - BCCM LMG-COLLECTION Page 1 of Form BCCM/LMG/BP/4/...02-133 Receipt in the case of an original deposit

KOPIE

Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure

Receipt in the case of an original deposit issued pursuant to Rule 7.1 by the International Depositary Authority BCCM/LMG identified at the bottom of next page

International Form BCCM/LMG/BP/4/...02-133...

To: Name of the depositor : Prof. J.-P. Hernalsteens

Address : Vrije Universiteit Brussel
Laboratorium Genetische Virologie
Paardenstraat 65
B-1640 Sint-Genesius-Rode

I. Identification of the microorganism:

I.1 Identification reference given by the depositor:

SH73

I.2 Accession number given by the International Depositary Authority:

LMG P-21642

【 9 - 2 】

BELGIAN COORDINATED COLLECTIONS OF MICROORGANISMS - BCCM LMG-COLLECTION Page 2 of Form BCCM/LMG/BP/9/02-133 Receipt in the case of an original deposit

KOPIE

II. Scientific description and/or proposed taxonomic designation

The microorganism identified under I above was accompanied by:

(mark with a cross the applicable box(es)):

- ☑ a scientific description
☑ a proposed taxonomic designation

III. Receipt and acceptance

This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on (date of original deposit)

August 9, 2002

IV. International Depositary Authority

Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) Laboratorium voor Microbiologie - Bacteriënverzameling (LMG) Universiteit Gent K.L. Ledeganckstraat 35 B-9000 Gent, Belgium

Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):

[Handwritten signature]

Dr. D. Janssens, curator IDA

Date : September 5, 2002

【 9 - 3 】

BELGIAN COORDINATED COLLECTIONS OF MICROORGANISMS - BCCM LMG-COLLECTION Page 1 of Form BCCM/LMG/BP/9/02-133 Viability statement

KOPIE

Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure

Viability statement issued pursuant to Rule 10.2 by the International Depositary Authority BCCM/LMG identified on the following page

International Form BCCM/LMG/BP/9/02-133

To: Party to whom the viability statement is issued:

Name : Prof. J.-P. Hernalsteens

Address : Vrije Universiteit Brussel Laboratorium Genetische Virologie Paardenstraat 65 B-1640 Sint-Genesius-Rode

I. Depositor:

I.1 Name : Prof. J.-P. Hernalsteens

I.2 Address : Vrije Universiteit Brussel Laboratorium Genetische Virologie Paardenstraat 65 B-1640 Sint-Genesius-Rode

II. Identification of the microorganism

II.1 Accession number given by the International Depositary Authority:

IMG P-21642

II.2 Date of the original deposit (or where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date)

August 9, 2002

III. Viability statement.

The viability of the microorganism identified under II above was tested on

August 9, 2002

(Give date. In the cases referred to in Rule 10.2(a)(i) and (ii), refer to the most recent viability test).

On that date, the said microorganism was: (mark the applicable box with a cross)

- ☑ viable
☐ no longer viable

【 9 - 4 】

BELGIAN COORDINATED COLLECTIONS OF MICROORGANISMS - BCCM LMG-COLLECTION Page 2 of Form BCCM/LMG/BP/9/02-133 Viability statement

KOPIE

IV. Conditions under which the viability test has been performed:

(Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative).

[Large empty box for conditions]

V. International Depositary Authority

Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) Laboratorium voor Microbiologie - Bacteriënverzameling (LMG) Universiteit Gent K.L. Ledeganckstraat 35 B-9000 Gent, Belgium

Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):

[Handwritten signature]

Dr. D. Janssens, curator IDA

Date : September 5, 2002

Fig. 9

【 10 - 1 】

BELGIAN COORDINATED COLLECTIONS OF MICROORGANISMS - BCCM LMG-COLLECTION Page 1 of Form BCCM/LMG/BP/4/02-134 Receipt in the case of an original deposit

KOPIE

Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure

Receipt in the case of an original deposit issued pursuant to Rule 7.1 by the International Depositary Authority BCCM/LMG identified at the bottom of next page

International Form BCCM/LMG/BP/4/02-134

To: Name of the depositor : Prof. J.-P. Hernalsteens

Address : Vrije Universiteit Brussel Laboratorium Genetische Virologie Paardenstraat 65 B-1640 Sint-Genesius-Rode

I. Identification of the microorganism:

I.1 Identification reference given by the depositor:

SMB9

I.2 Accession number given by the International Depositary Authority:

IMG P-21643

【 ☒ 1 0 - 2 】

BELGIAN COORDINATED COLLECTIONS OF MICROORGANISMS - BCCM
LMG-COLLECTION
Page 2 of Form BCCM/LMG/BP/4/.....02-134 Receipt in the case of an original deposit

KOPIE

II. Scientific description and/or proposed taxonomic designation

The microorganism identified under I above was accompanied by:

(mark with a cross the applicable box(es):

- a scientific description
- a proposed taxonomic designation

III. Receipt and acceptance

This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on (date of original deposit):

August 9, 2002

IV. International Depository Authority

Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)
Laboratorium voor Microbiologie - Bacteriënverzameling (LMG)
Universiteit Gent
K.L. Ledeganckstraat 35
B-9000 Gent, Belgium

Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s):

Dr. D. Janssens, curator IDA

Date : September 5, 2002

【 ☒ 1 0 - 3 】

BELGIAN COORDINATED COLLECTIONS OF MICROORGANISMS - BCCM
LMG-COLLECTION
Page 1 of Form BCCM/LMG/BP/9/.....02-134 Viability statement

KOPIE

Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure

Viability statement issued pursuant to Rule 10.2 by the International Depository Authority BCCM/LMG identified on the following page

International Form BCCM/LMG/BP/9/.....02-134...

To: Party to whom the viability statement is issued:

Name : Prof. J.-P. Hernalsteens

Address : Vrije Universiteit Brussel
Laboratorium Genetische Virologie
Paardenstraat 65
B-1640 Sint-Genesius-Rode

I. Depositor:

I.1 Name : Prof. J.-P. Hernalsteens

I.2 Address : Vrije Universiteit Brussel
Laboratorium Genetische Virologie
Paardenstraat 65
B-1640 Sint-Genesius-Rode

II. Identification of the microorganism

II.1 Accession number given by the International Depository Authority:

LMG P-21643

II.2 Date of the original deposit (or where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date):

August 9, 2002

III. Viability statement.

The viability of the microorganism identified under II above was tested on

August 9, 2002

(Give date. In the cases referred to in Rule 10.2(a)(i) and (ii), refer to the most recent viability test).

On that date, the said microorganism was: (mark the applicable box with a cross)

- viable
- no longer viable

【 ☒ 1 0 - 4 】

BELGIAN COORDINATED COLLECTIONS OF MICROORGANISMS - BCCM
LMG-COLLECTION
Page 2 of Form BCCM/LMG/BP/9/.....02-134 Viability statement

KOPIE

IV. Conditions under which the viability test has been performed:

(Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative).

V. International Depository Authority

Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)
Laboratorium voor Microbiologie - Bacteriënverzameling (LMG)
Universiteit Gent
K.L. Ledeganckstraat 35
B-9000 Gent, Belgium

Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s):

Dr. D. Janssens, curator IDA

Date : September 5, 2002

【 ☒ 1 1 - 1 】

BELGIAN COORDINATED COLLECTIONS OF MICROORGANISMS - BCCM
LMG-COLLECTION
Page 1 of Form BCCM/LMG/BP/4/.....02-135 Receipt in the case of an original deposit

KOPIE

Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure

Receipt in the case of an original deposit issued pursuant to Rule 7.1 by the International Depository Authority BCCM/LMG identified at the bottom of next page

International Form BCCM/LMG/BP/4/.....02-135...

To: Name of the depositor : Prof. J.-P. Hernalsteens

Address : Vrije Universiteit Brussel
Laboratorium Genetische Virologie
Paardenstraat 65
B-1640 Sint-Genesius-Rode

I. Identification of the microorganism:

I.1 Identification reference given by the depositor:

SM66

I.2 Accession number given by the International Depository Authority:

LMG P-21646

Fig. 10

【 ☒ 1 1 - 2 】

BELGIAN COORDINATED COLLECTIONS OF MICROORGANISMS - BCCM LMG-COLLECTION
Page 2 of Form BCCM/LMG/BP/9/.....02-135. Receipt in the case of an original deposit

KOPIE

II. Scientific description and/or proposed taxonomic designation

The microorganism identified under I above was accompanied by :

(mark with a cross the applicable box(es)):

- a scientific description
- a proposed taxonomic designation

III. Receipt and acceptance

This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on (date of original deposit) :

August 28, 2002

IV. International Depository Authority

Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)
Laboratorium voor Microbiologie - Bacteriënverzameling (LMG)
Universiteit Gent
K.L. Ledeganckstraat 35
B-9000 Gent, Belgium

Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s) :

Dr. D. Janssens, curator IDA

Date : September 5, 2002

【 ☒ 1 1 - 3 】

BELGIAN COORDINATED COLLECTIONS OF MICROORGANISMS - BCCM LMG-COLLECTION
Page 1 of Form BCCM/LMG/BP/9/.....02-135 Viability statement

KOPIE

Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure

Viability statement issued pursuant to Rule 10.2 by the International Depository Authority BCCM/LMG identified on the following page

International Form BCCM/LMG/BP/9/.....02-135

To: Party to whom the viability statement is issued:

Name : Prof. J.-P. Hernalsteens
Address : Vrije Universiteit Brussel
Laboratorium Genetische Virologie
Paardenstraat 65
B-1640 Sint-Genesius-Rode

I. Depositor:

I.1 Name : Prof. J.-P. Hernalsteens
I.2 Address : Vrije Universiteit Brussel
Laboratorium Genetische Virologie
Paardenstraat 65
B-1640 Sint-Genesius-Rode

II. Identification of the microorganism

II.1 Accession number given by the International Depository Authority:

LMC P-21546

II.2 Date of the original deposit (or where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date) :

August 28, 2002

III. Viability statement.

The viability of the microorganism identified under II above was tested on

August 28, 2002

(Give date. In the cases referred to in Rule 10.2(a)(i) and (ii), refer to the most recent viability test).

On that date, the said microorganism was: (mark the applicable box with a cross)

- viable
- no longer viable

【 ☒ 1 1 - 4 】

BELGIAN COORDINATED COLLECTIONS OF MICROORGANISMS - BCCM LMG-COLLECTION
Page 2 of Form BCCM/LMG/BP/9/.....02-135 Viability statement

KOPIE

IV. Conditions under which the viability test has been performed:

(Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative).

V. International Depository Authority

Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)
Laboratorium voor Microbiologie - Bacteriënverzameling (LMG)
Universiteit Gent
K.L. Ledeganckstraat 35
B-9000 Gent, Belgium

Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s) :

Dr. D. Janssens, curator IDA

Date : September 5, 2002

Fig. 11

【配列表】

2009531029000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成21年2月20日(2009.2.20)

【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】

獣医学的動物種に感染する細菌の弱毒化変異体株であって、前記変異体は少なくとも1つの第1の遺伝子改変および少なくとも1つの第2の遺伝子改変を含有し、前記第1の遺伝子改変は1つまたはそれより多い運動性遺伝子において行われ、そして前記第2の遺伝子改変は宿主における細菌の生存または増殖に關与する1つまたはそれより多い遺伝子において行われる、弱毒化変異体株。

【請求項2】

獣医学的動物種は家禽である、請求項1に記載の変異体株。

【請求項3】

サルモネラ・エンテリカ株または大腸菌株である、請求項1または2に記載の変異体株。

【請求項4】

運動性遺伝子は、フラジェリンをコードする遺伝子である、請求項1～3のいずれかに記載の変異体株。

【請求項5】

f1iCおよび/またはf1jBもしくはf1jBA遺伝子に変異を有する、請求項4に記載の変異体株。

【請求項6】

0.4%寒天を含有するLB培地で遊走できない、請求項4または5に記載の変異体株。

【請求項7】

生存に關与する遺伝子は、ハウスキーピング遺伝子または毒性遺伝子である、請求項1～6のいずれかに記載の変異体株。

【請求項8】

不活化されるハウスキーピング遺伝子は、guaB遺伝子である、請求項7に記載の変異体株。

【請求項9】

変異体株は、guaB遺伝子機能を損なう欠失変異を含有する、請求項8に記載の変異体株。

【請求項10】

新規グアニンヌクレオチドを形成することができない、請求項8または9に記載の変異体株。

【請求項11】

前記変異体株は、外来抗原をコードし、かつ発現する、請求項1～10のいずれかに記載の変異体株。

【請求項12】

弱毒化腸炎菌株または弱毒化ネズミチフス菌株である、請求項1～11のいずれかに記載の変異体株。

【請求項13】

遺伝子改変は、親株腸炎菌ファージ4型株76Sa88に導入される、請求項1～12

のいずれかに記載の変異体株。

【請求項 14】

弱毒化腸炎菌株 S M 7 3 は、寄託番号 L M G P - 2 1 6 4 2 を有する、請求項 13 に記載の変異体株。

【請求項 15】

遺伝子改変は、親株ネズミチフス菌 1 4 9 1 S 9 6 に導入される、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載の変異体株。

【請求項 16】

弱毒化ネズミチフス菌株 S M 8 9 は、寄託番号 L M G P - 2 1 6 4 3 を有する、請求項 15 に記載の変異体株。

【請求項 17】

g u a B 遺伝子における遺伝子改変および f l i C 遺伝子における遺伝子改変を含む、請求項 1 ~ 16 のいずれかに記載の変異体株。

【請求項 18】

g u a B 遺伝子における遺伝子改変および f l j B A 遺伝子における遺伝子改変を含む、請求項 1 ~ 17 のいずれかに記載の変異体株。

【請求項 19】

g u a B 遺伝子における遺伝子改変、f l i C 遺伝子における遺伝子改変、および f l j B A 遺伝子における遺伝子改変を含む、請求項 1 ~ 18 のいずれかに記載の変異体株。

【請求項 20】

改変は前記遺伝子における 1 つまたはそれより多いヌクレオチドの挿入、欠失および / または置換からなる群より選択される、請求項 1 ~ 19 のいずれかに記載の変異体株。

【請求項 21】

医薬的に有効な量、または免疫量の請求項 1 ~ 20 のいずれかに記載の変異体株 ; および医薬的に許容される担体または希釈剤を含む、細菌感染に対して獣医学的動物種を免疫するためのワクチン。

【請求項 22】

前記変異体株は、外来抗原をコードしかつ発現する、請求項 21 に記載のワクチン。

【請求項 23】

前記変異体株は、真核細胞において外来遺伝子をコードし、かつ発現するプラスミドを含む、請求項 21 または 22 に記載のワクチン。

【請求項 24】

免疫量の請求項 1 ~ 20 のいずれかに記載の変異体株および / または請求項 21 ~ 23 のいずれかに記載のワクチンを、それを必要とする獣医学的動物種に投与する工程を含む、細菌感染に対して獣医学的動物種を免疫する方法。

【請求項 25】

獣医学的動物種は家禽である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

変異体株はサルモネラ・エンテリカまたは大腸菌である、請求項 24 または 25 に記載の方法。

【請求項 27】

変異体株および / またはワクチンは、経口、経鼻または非経口経路により投与される、請求項 24 ~ 26 のいずれかに記載の方法。

【請求項 28】

獣医学的動物種、好ましくは家禽における感染の防御および / または処置のためのワクチンの調製のための、請求項 1 ~ 20 のいずれかに記載の変異体株の使用。

【請求項 29】

ワクチン接種された動物と野生型株に感染した動物との間の血清学的識別のための方法であって、ワクチン接種された動物は、フラジェリン遺伝子が不活化されている変異体株で免疫されており、前記方法は :

フラジェリンに対して産生刺激された抗体の存在に関して動物を分析する工程；および前記抗体の存在または不存在に基づいて、感染した動物をワクチン接種された動物から識別する工程を含む、方法。

【請求項 30】

前記抗体は、野生型株によって感染された動物によって作成されるが、請求項 4 ~ 20 のいずれかに記載の変異体株のようなフラジェリン遺伝子が不活化されている変異体株でワクチン接種されている動物によっては作成されない、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記抗体の存在は野生型株の存在、従って感染の指標である、請求項 29 または 30 に記載の方法。

【請求項 32】

サルモネラに感染した動物は、請求項 21 ~ 23 のいずれかに記載の弱毒化生ワクチンで免疫されている動物から識別される、請求項 29 ~ 31 のいずれかに記載の方法。

【請求項 33】

動物は、F l i C に対して産生刺激された抗体に関して分析される、請求項 29 ~ 32 のいずれかに記載の方法。

【請求項 34】

動物は獣医学的動物種であり、好ましくは家禽、さらに好ましくはニワトリである、請求項 29 ~ 32 のいずれかに記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/BE2006/000020

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| INV. C12N1/20 | G01N33/53 | A61K39/108 A61K39/112 A61P31/04 |
| 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) C12N G01N A61K A61P | | |
| 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) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, SCISEARCH, WPI Data, PAJ | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | KODAMA CHIE ET AL: "Salmonella flagellin is not a dominant protective antigen in oral immunization with attenuated live vaccine strains" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 72, no. 4, April 2004 (2004-04), pages 2449-2451, XP002408910 ISSN: 0019-9567 page 2450 ----- -/- | 1-7,12, 13,15, 20,21 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family 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 23 November 2006 | | Date of mailing of the international search report 13/12/2006 |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentian 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 apo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Domingues, Helena |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/BE2006/000020

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | <p>MATSUI HIDENORI ET AL: "Oral immunization with ATP-dependent protease-deficient mutants protects mice against subsequent oral challenge with virulent Salmonella enterica serovar Typhimurium." INFECTION AND IMMUNITY, vol. 71, no. 1, January 2003 (2003-01), pages 30-39, XP002408911 ISSN: 0019-9567 page 31</p> | 1-7, 12, 13, 15, 20, 21 |
| X | <p>MANN B J ET AL: "Protection in a gerbil model of amebiasis by oral immunization with Salmonella expressing the galactose/N-acetyl d-galactosamine inhibitable lectin of Entamoeba histolytica" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 15, no. 6-7, April 1997 (1997-04), pages 659-663, XP004064528 ISSN: 0264-410X page 659</p> | 1-7, 11-13, 15, 20-23 |
| X | <p>US 2004/120962 A1 (CURTISS ROY [US] ET AL) 24 June 2004 (2004-06-24)</p> <p>page 6; table 1 examples 3, 4</p> | 1-7, 11-13, 15, 20-23 |
| Y | <p>CURTISS R ET AL: "NONRECOMBINANT AND RECOMBINANT AVIRULENT SALMONELLA VACCINES FOR POULTRY" VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY, AMSTERDAM, NL, vol. 54, no. 1/4, November 1996 (1996-11), pages 365-372, XP000876519 ISSN: 0165-2427 the whole document</p> | 1-34 |
| Y | <p>BARBEZANGE CYRIL ET AL: "Some safety aspects of Salmonella vaccines for poultry: In vivo study of the genetic stability of three Salmonella typhimurium live vaccines" FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, vol. 192, no. 1, 1 November 2000 (2000-11-01), pages 101-106, XP002408912 ISSN: 0378-1097 the whole document</p> | 1-34 |
| | -/- | |

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/BE2006/000020

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y | MCFARLAND W C ET AL: "EFFECT OF DIFFERENT PURINE AUXOTROPHIC MUTATIONS ON MOUSE-VIRULENCE OF A VI-POSITIVE STRAIN OF SALMONELLA-DUBLIN AND OF TWO STRAINS OF SALMONELLA-TYPHIMURIUM" MICROBIAL PATHOGENESIS, ACADEMIC PRESS LIMITED, NEW YORK, NY, US, vol. 3, no. 2, 1987, pages 129-142, XP002376858 ISSN: 0882-4010 table 1 page 135, paragraph 1; table 2 page 138, paragraph 3 | 1-34 |

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/BE2006/000020

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|----------------------------------------|------------------|-------------------------|------------------|
| US 2004120962 | A1 | NONE | |

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53 (2006.01) G 0 1 N 33/53 N

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, 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, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 アドリアエンセン, コニー テレジア

ベルギー, ベ - 9 0 0 0 ゲント, レイエカーイ 3 3

(72)発明者 ヘルナルステーンズ, ジャン - ピエール エルネスト クレメント

ベルギー, ベ - 1 1 5 0 シント - ピエテルス ウォルウェ, フランソア デスメットラート
 1 5 6

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA02 CA20 DA05 DA06 EA03 EA04 FA20
 4B065 AA26X AA26Y AA46X AA46Y AB01 AC20 BA01 BA14 CA45
 4C085 AA03 BA21 BA24 CC07 DD62 EE01 GG08 GG10

| | | | |
|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译) | 减毒沙门氏菌活疫苗 | | |
| 公开(公告)号 | JP2009531029A | 公开(公告)日 | 2009-09-03 |
| 申请号 | JP2009500672 | 申请日 | 2006-03-20 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 布鲁塞尔自由大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | Vrije Universiteit Brussel | | |
| [标]发明人 | デグレヴェンリマルセルジョゼフ アドリアエンセンコニーテレジア ヘルナルステーンズジャンピエールエルネストクレメント | | |
| 发明人 | デグレヴェ, ヘンリ マルセル ジョゼフ アドリアエンセン, コニー テレジア ヘルナルステーンズ, ジャン-ピエール エルネスト クレメント | | |
| IPC分类号 | C12N1/21 C12N15/09 A61K39/108 A61K39/112 A61P31/04 G01N33/53 | | |
| CPC分类号 | A61K39/0258 A61K39/0275 A61K2039/522 A61K2039/552 A61P31/04 G01N33/56916 Y02A50/474 Y02A50/482 | | |
| FI分类号 | C12N1/21.ZNA C12N15/00.A A61K39/108 A61K39/112 A61P31/04 G01N33/53.N | | |
| F-TERM分类号 | 4B024/AA01 4B024/CA02 4B024/CA20 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/FA20 4B065/AA26X 4B065/AA26Y 4B065/AA46X 4B065/AA46Y 4B065/AB01 4B065/AC20 4B065/BA01 4B065/BA14 4B065/CA45 4C085/AA03 4C085/BA21 4C085/BA24 4C085/CC07 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG08 4C085/GG10 | | |
| 代理人(译) | Kazehaya信明 浅野纪子 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明涉及感染兽医动物物种如肠沙门氏菌和/或(致病性)大肠杆菌的细菌的双减毒和三减毒突变菌株。本发明的突变株包含至少一个第一遗传修饰和至少一个第二遗传修饰,所述一个或多个运动基因中的所述第一修饰和所述第二个是在一个或多个基因中参与细菌存活或宿主生长的。本发明进一步涉及基于此类突变株的减毒活疫苗,特别是用于保护沙门氏菌病和/或被兽医动物物种中的大肠杆菌病原体感染。[选型图]图1

