

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3722794号
(P3722794)

(45) 発行日 平成17年11月30日(2005.11.30)

(24) 登録日 平成17年9月22日(2005.9.22)

(51) Int.CI.⁷

F 1

C 12 N 7/00
A 61 K 35/16
A 61 K 35/42
A 61 K 39/12
A 61 K 39/395

C 12 N 7/00
A 61 K 35/16
A 61 K 35/42
A 61 K 39/12
A 61 K 39/395

S

請求項の数 11 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-310716 (P2002-310716)
(22) 出願日 平成14年10月25日 (2002.10.25)
(62) 分割の表示 特願平5-504485の分割
原出願日 平成4年8月17日 (1992.8.17)
(65) 公開番号 特開2003-252791 (P2003-252791A)
(43) 公開日 平成15年9月10日 (2003.9.10)
審査請求日 平成14年11月22日 (2002.11.22)
(31) 優先権主張番号 749,839
(32) 優先日 平成3年8月26日 (1991.8.26)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 760,713
(32) 優先日 平成3年9月16日 (1991.9.16)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 860,444
(32) 優先日 平成4年3月30日 (1992.3.30)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 502370993
ボーリンガー・インゲライム・ヴェトメディカ・インコーポレーテッド
アメリカ合衆国 64506 ミズーリ、
セント・ジョセフ、ノース・ベルト・ハイウェイ 2621
(73) 特許権者 502371004
サウス・ダコタ・ステイト・ユニバーシティ
アメリカ合衆国 57007 サウス・ダコタ、ブルッキンズ、アドミニストレーション・ビルディング

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 SIRSワクチンおよびSIRS診断方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

単離されたブタ不育呼吸器不全症候群ウイルスであって、ATCC取得番号 VR-2332として寄託されたウイルス。

【請求項2】

請求項1に記載の単離されたウイルスに感染したサル腎細胞を含む細胞培養物。

【請求項3】

サル腎細胞がMA-104細胞あるいはその派生物である、請求項2に記載の細胞培養物。

【請求項4】

次の成分を含むブタ不育呼吸器不全症候群ウイルスに対する中和抗血清の誘導に使用するための組成物； 10

(a) 薬学的担体、および

(b) 不活性化された、単離されたATCC取得番号 VR-2332として寄託されたブタ不育呼吸器不全症候群ウイルス。

【請求項5】

請求項4に記載の組成物を非ヒト哺乳動物に投与する工程を含む、ブタ不育呼吸器不全症候群ウイルスに対する中和抗血清の誘導方法。

【請求項6】

請求項4に記載の組成物をブタに投与する工程を含む、ブタ不育呼吸器不全症候群ウイルスに対する中和抗血清の誘導方法。

【請求項 7】

次の成分を含むブタ不育呼吸器不全症候群ウイルスのポリクローナル抗体の誘導に使用するための免疫原組成物；

(a) 薬学的担体、および

(b) 单離されたブタ不育呼吸器不全症候群ウイルスの不活性化型または弱毒化型を含む抗原成分であって、該单離されたウイルスがATCC取得番号VR-2332として寄託されたウイルスである抗原成分。

【請求項 8】

免疫原組成物が单離されたブタ不育呼吸器不全症候群ウイルスの不活性型を含む、請求項 7に記載の免疫原組成物。 10

【請求項 9】

免疫原組成物が单離されたブタ不育呼吸器不全症候群ウイルスの弱毒化型を含み、かつ該单離されたウイルスの弱毒化型がブタに対してブタ不育呼吸器不全症候群を引き起こさない、請求項 7に記載の免疫原組成物。

【請求項 10】

請求項 7から請求項 9のいずれかに記載の組成物を非ヒト哺乳動物に投与する工程を含む、ブタ不育呼吸器不全症候群ウイルスのポリクローナル抗血清の誘導方法。

【請求項 11】

請求項 7から請求項 9のいずれかに記載の組成物をブタに投与する工程を含む、ブタ不育呼吸器不全症候群ウイルスのポリクローナル抗血清の誘導方法。 20

【発明の詳細な説明】**【0001】****【従来の技術】**

1987年以降、養豚産業は未知の病気で、しばしば「ブタミステリー病」(M S D、最近は「ブタ不育呼吸器不全症候群」(S I R S)と呼ばれている)と呼ばれる壊滅的伝染病の被害にあっている。これは、研究者らが病原を同定できなかったためである。M S Dは、北アメリカおよび欧州の全域にわたって何十万ものブタに被害を与えてきた。ブタ1頭がM S Dに感染すると、3乃至7日以内に群れ全体にM S Dが感染する場合もある。1987年から1991年にかけて、養豚産業はM S Dが原因で何百万ドルもの利益を損失してしまった。最近の調査から、M S Dによって棚卸した雌ブタあたり 250ドルから 500ドルの財務上の損失が生じたと推定されている。 30

【0002】

M S Dは、ブタに複数の症状をもたらす。ブタの飼育群におけるM S Dの最初の徴候は、一般に、食欲不振および軽度の発熱である。さらに、この群のブタの特に、耳、乳頭、鼻ならびに頸および肩の前頭部の皮膚に青みがかった変色が見られることがある。感染した皮膚の損傷は、非回復性になることがある。ただし、M S Dの最も壊滅的な症状は、ブタの飼育群に生じる生殖不全である。M S Dによって、雌ブタは仔ブタを死産したり、呼吸困難の標準より小さい虚弱な仔ブタを産んだり、離乳前に死亡する仔ブタを産んだりする。M S D起因のその他の生殖性の徴候には、早産、受胎率の低下、複数の雌ブタにおける周期不全および同腹の仔ブタ総数の減少などがある。生殖不全によるブタの損失数は、年間のブタ生産量の約10乃至15%であると推定されている。 40

【0003】

このため、研究は、M S Dの病原を単離する方向に向けられてきた。この結果、多くの潜在的細菌病原体が単離されている。ただし、潜在的細菌病原体の型は、養豚場によってさまざまであった。ウイルス調査には、蛍光抗体試験、電子顕微鏡検査、血清学的方法などがある。これらの方によって、M S Dの病原を追求することはできなかった。その結果、ブタの集団治療に使用することができるワクチンの開発に成功した者はいない。

【0004】**【発明が解決しようとする課題】**

したがって、本発明の目的は、ブタの飼育群に投与した場合に、飼育集団中のM S Dの発 50

現を低減することができる血清含有ワクチンを提供することにある。本発明の別の目的は、ブタ母集団をそのワクチンで治療し、そのブタ母集団からM S Dを根絶する方法を提供することにある。また、本発明の別の目的は、M S D診断方法を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】

上記のおよび別の目的は、ブタにおけるM S Dの予防および治療するための血清含有ワクチンならびにその診断方法に向けられた本発明によって達成することができる。

【0006】

【発明の実施の形態】

本発明のワクチンは、ブタにM S Dを感染させる病原菌由来である。病原菌は、M S Dに感染したブタの調整組織接種材料から得られ、肺組織から得られることが好ましい。病原菌は、ブタ感染組織の接種材料に感染したサル細胞系などの*in vitro*ほ乳類細胞培養生成物であることが好ましい。この接種材料は、大きさが約1.0ミクロン以下の生物学的粒子であることが好ましく、0.5ミクロン以下であることが好ましく0.2ミクロン以下であることが最も好ましい。接種材料は、一般的な抗体で中和することも好ましい。

10

【0007】

本発明に従って、ノトバイオートの仔ブタおよび妊娠ブタに鼻腔内接種した場合、S I R S影響下群の仔ブタから得られた組織ホモジネートは、S I R Sの呼吸性生殖性形態を複製した。ノトバイオートの仔ブタに、未濾過接種材料または濾過接種材料(0.45、0.22または $0.1\mu m$)で同様に接種したところ食欲不振に陥り、S I R S影響下の群れに見られる病変に類似した顕微鏡的肺病変を発現した。同様の接種材料は、S I R S影響下群に見られる生殖的効果と同一の効果も引き起こした。ウイルス因子を組織ホモジネートから検出した。このウイルス因子によって、仔ブタおよび妊娠豚のS I R S類似の疾患が生じる。ウイルス因子は、現在まで分類されていない。ただし、ウイルス因子は、選好性非血球凝集外被RNAウイルスである。S I R Sを引き起こすウイルス因子は、1991年07月18日、メリーランド州ロックビル所在のアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)、登録番号ATCC VR-2332で寄託されている。

20

【0008】

感染したブタの治療に用いる血清は、ほ乳類抗体をM S D病変まで輸送する。これは、上述の病原菌で前処理した(ブタであるか否かを問わず)ほ乳類血漿から得られる。

30

【0009】

選択的に、血清をハイブリドーマ法によって生成したM S Dに対するモノクロナール抗体から調合する。

【0010】

M S D診断方法は、M S Dに対する免疫特異抗体の使用に基づく。本方法は、肺生検試料の濾過ホモジネートまたは生検試料もしくは他の組織から得た同様の(生検またはホモジネート)試料と免疫特異抗体とを結合させる必要があり、この結合で形成された接合体には既知の検出技術を利用する。接合体の定着または沈殿と、E L I S A、R I A、サザンプロット法、ノーザンプロット法、ウエスタンプロット法などの検出技術を用いることによって、M S Dを診断できる。

40

【0011】

本発明によれば、M S Dに対して抗体を使用する治療方法および診断方法には、上述の選好性非血球凝集外被RNAウイルスに対するモノクロナール抗体(IgGやIgM)が必要である。模範的な抗体には、SDOW12とSDOW17があり、各々登録番号HB 10996とHB 10997で1992年3月27日付けてアメリカン・タイプ・カルチャーに寄託されている。

【0012】

発明の詳細な説明

ブタミステリー病(M S D)の決定は困難であった。しかし、本発明によって、M S Dを引き起こす病原菌を単離し成長させることができた。本文中に使用するように「病原菌」は、ブタに対して不育症候群および呼吸器症候群を生じさせることができるウイルスを言

50

う。さらに詳述すると、病原菌は、ブタに対して不育と呼吸器疾患とを生じさせる能力がある選好性非血球凝集外被RNAウイルスおよびその動物病理学的突然変異体である。病原菌の単離は大発見である。この発見によって、ワクチンの生産、感染したブタを治療するための抗体血清の生産および診断方法の確立が可能になる。

【0013】

ワクチンは、不活性のまたは弱毒化したMSD病原菌から成り、MSDの特性的損傷を示すブタ感染肺組織またはその他のブタ組織調整の接種材料由来である。病原菌の機能的誘導体として、サブユニットワクチン、ベクターワクチン、組換体ワクチン、合成ペプチドワクチンなども、考えられる。MSDワクチンの開発には、複数のステップを踏む方法を利用する。初めに、MSD病原菌を感染ブタ組織、好ましくは肺組織から分離および単離することによって接種材料として得る。次に、MSD病原菌を既知のワクチン学的技法を使用して処理し、抗MSDワクチンを生成する。

【0014】

MSD病原菌は、MSDによって呼吸が急速なブタの肺組織から接種材料として単離することが好ましい（胎児組織などのその他の組織を使用してウイルスを回収することもできる）。このようなブタを殺処分し、肺組織を摘出する。次に、摘出その肺組織を、肺胞腔中にマクロファージ、変性細胞およびデブリの存在によって生じる肥大した肺胞間について調べる。これらの特性は、MSD病原菌の存在を示すものである。この種の損傷を示す別のブタ組織を使用して、MSD病原菌を単離することもできる。

【0015】

続いて、（生理的塩類溶液、リンガー溶液、ハンクス均衡塩類溶液、最小必須培地などの）薬学的に耐用し得る水溶液で、肺組織またはその他のブタ組織を均質化して、組織がホモジネートの容量に対して10%の重量から成るようにする。ホモジネートを、細孔直径が0.05乃至10ミクロンまでの、好ましくは0.45、0.2および0.1ミクロンの一連の濾過器にかけて、MSD病原菌を含む濾過ホモジネートを生成する。結果的に、濾過ホモジネートは、約1.0ミクロン以下の、好ましくは0.2-0.1ミクロンの大きさの生物学的粒子を含む。ホモジネートをさらにフロイント不完全アジュバンドに混合して、抗体産生をほ乳類への注射時に刺激することができる。この混合物をブタのMSD発現用接種材料またはMSD病原菌のさらに進んだ研究用の接種材料として使用することもできる。

【0016】

病原菌を含む濾過ホモジネートを得た後に、ホルマリンやアセトアルデヒドなどを含むアルデヒド試薬、クレゾールやフェノールなどを含む反応性酸性アルコール、安息香酸やベンゼンスルホン酸などの酸、ベータ-プロピオンラクトンやカプロラクトンなどのラクトン、カルボニルジイミダゾールなどの活性ラクタム、カルボジイミド、カルボニルジヘテロ芳香族化合物などの標準的化学的不活性化剤を含む濾過ホモジネートを処理することによって、病原菌を不活性化または死滅させることができる。紫外線照射や線などによる照射を使用して病原菌を不活性化または死滅させることもできる。選択的には、この病原菌をブタ以外のほ乳動物または鳥の起点由来の細胞培養で反復成長させることによって弱毒化し、病原菌が毒性を有して繁殖する能力を失わせることができる。細胞培養による弱毒化技術に関する詳細は、以下に述べる。

【0017】

死滅または弱毒化した病原菌を、免疫応答刺激用稀釀アジュバント溶液を添加することによって、適切な力価まで稀釀する。力価測定は、ELISA、RIA、IFAなどの免疫学的試験または以下に述べる酵素基質検出試験において、MSD抗体を測定することによって、達成することができる。

【0018】

病原菌の精製形態を生成するには、上述の濾過ホモジネートを一連の*in vitro*細胞試料に接種することもできる。腎臓、肝臓、心臓などのほ乳類の器官細胞と、脳細胞細胞、肺細胞、脾細胞、精巣細胞、鼻甲介、自血球細胞および赤血球細胞ならびにリンパ節とによる細胞試料のほか、昆虫胚試料および鳥胚試料を使用することができる。これらの細胞試料

10

20

30

40

50

に適切な培地には、ウシ胎児血清およびウシ胎児寒天、浸出物物寒天、脳・心臓浸出物の肉汁および寒天などほ乳類支持細胞成長因子などを含む。ほ乳類細胞は、サル腎細胞であることが好ましく、アフリカ産ミドリザル腎胚細胞--サル腎細胞系(MA-104)--であることが最も好ましい。

【0019】

濾過ホモジネートを細胞試料に接種し、培養を増殖させた後、培養細胞から成る個体凝集を細胞含有の無菌培地に収集し再導入する。この系列の最終培養由来の培養液は、毒性病原菌の精製形態を提供する。また、一連の反復収集物を形成した後、培養を育成し、培養液を収集しその液を異なる細胞種を培養するための接種材料として使用することができる。この方法では、病原菌を弱毒化して、異種培養由来の培養液によって弱毒化病原菌の精製形態を提供する。

10

【0020】

ポリクローナル抗体血清を、ほ乳類の免役応答を引き起こす抗原物質として病原菌を使用することによって生成することができる。培養液または上述の方法で調整した接種材料を、ウマ、ヤギ、マウス、ウサギなどのブタ以外のほ乳動物に対して刺激アジュバントを投与することができる。抗原刺激を反復した後、血液採取した動物の血清に一般に認められる上述の疾患に特異的な抗体に対して固着した抗体を使用して、血清の一部を取り出して抗原精製をすることができる。さらに、生理的塩類溶液と分子量約10,000のタンパク様化合物の収集物とを含む糖ゲルカラムなどによるクロマトグラフィーによって半精製した血清を処理し、治療に用いる精製ポリクローナル血清を生成する。

20

【0021】

モノクロナール抗体血清をハイブリドーマ技術によって生成することができる。MSD含有細胞培養ライゼートまたは上述の勾配-精製MSDでマウス、ブタ、ラット、ウサギまたはその他の適切な種を免疫化した後、動物の脾臓を摘出し完全な細胞試料に変換することができる。KohlerおよびMilsteinの方法(Kohlerら、*Nature*, 256, 459-97(1975))に従って、脾臓細胞試料由来の免疫細胞を骨髄腫細胞と融合させて、ハイブリドーマを生成することができる。このハイブリドーマを培養し、病原菌を輸送する培養液または接種材料に対して培養液を試験することによって、MSD病原菌に対するモノクロナール抗体を産生するハイブリドーマ培養を単離することができる。このハイブリドーマをホスト種の腹膜に導入することによって、ハイブリドーマを腹膜で増殖させることができる。腹水を収集することによって、病原菌に対するモノクロナール抗体を含む体液を生成することができる。ハイブリドーマ細胞培養由来の細胞培養上澄みを使用することもできる。モノクロナール抗体をマウス誘導ハイブリッド細胞系によって生成することができる。この場合の抗体は、IgG型またはIgM型の免疫グロブリンである。SIRSの病原菌に対する模範的モノクロナール抗体は、SDOW12とSDOW17である。本明細書の別の箇所で述べる使用方法の他に、本発明によるモノクロナール抗体を、診断用組成物および治療用組成物ならびに、受動免疫方法や抗イディオタイプワクチン調整方法などの診断方法および治療方法を利用することができる。

30

【0022】

本発明のワクチンは、ブタ母集団に見られるMSD感染を予防し治癒することができる。*in vivo*において、効果的に予防および抗感染用に使用するために、ワクチンには死滅病原菌または弱毒化病原菌を含んでおり、単独でまたはブタと適合する薬学的担体と組み合わせて投与することができる。このワクチンは、経口、非経口、経鼻腔または経静脈的に誘導することができる。ワクチン容量決定に関連する因子には、年齢、体重および感染したブタの母体抗体レベルなどが含まれる。投与量は、1mlあたりの50%組織培養感染価で $10^3 - 10^7$ であり、容量で1ml乃至5mlで投与することが好ましい。ワクチン投与は、約14-28日間で投与して、ブタがMSD感染に対して確実に免疫を発現させることが望ましい。

40

【0023】

MSDワクチンは、様々な異なる投与形態で投与することができる。死滅または弱毒化させたMSD病原菌を含む水性培地は、錠剤やカプセルなどの形態をしたラクトース、デン

50

ブン、炭酸カルシウム、クエン酸ナトリウムなどの薬学的に耐用し得る不活性賦形剤および緩衝剤で乾燥させて組み合わせることができる。これらの組み合わせは、粉末状にしたり、水溶液に懸濁したりして、この粉末および水溶液またはそのいずれかを動物用飼料や動物用飲料水に添加しても良い。これらのM S Dワクチン粉末または溶液をさまざまな既知の薬剤によって、適当な甘味や風味を与えて、ブタが経口でワクチンを摂取するように促進しても良い。

【0024】

非経口投与を行なうには、死滅または弱毒化させたM S D病原菌を食塩水、水、プロピレングリコール、などの当業者らには良く知られている薬学的に耐用し得る担体と組み合わせができる。この形態では、ワクチンを非経口的、経鼻腔的および経口的手段で、
10 獣医学関係の当業者には良く知られる方法によって投与することができる。M S Dワクチンは注射器によって静脈投与することもできる。この場合、食塩水などの薬学的に耐用し得る水性担体と組み合わせる。M S Dワクチンの非経口的および静脈的製剤形態は、乳化剤および懸濁剤またはそのいずれか一方であるが、薬学的に耐用し得る稀釀剤を併用し、M S Dワクチンの誘導および投与量を制御することもできる。

【0025】

M S D診断方法は、上述のポリクローナル抗体血清またはモノクローナル抗体血清を用いて実行することができる。抗体血清または生検組織ホモジネートをポリスチレン表面またはタンパク質を固定する別のポリマー表面に接触させることによって固定することができる。さらに、抗体血清および抗体ホモジネートの残りを添加し、培養し、非固定材料を洗浄などによって除去する。抗体血清用の標識種 - 特異抗体を加えて、標識の存在および量を測定する。標識測定は、検定する組織にM S Dが存在することを示す。この方法の一般的な態様には、酵素結合免疫吸着検定方法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、免疫蛍光検定(IFA)、ノーザンプロット免疫検定、サザンプロット免疫検定、ウエスタンプロット免疫検定などがある。
20

【0026】

【実施例】

以下の例は、本発明の特異的態様をさらに説明するものである。ただし、以下の例は、上述の開示において十分に特徴づけられた本発明の範囲を限定するものではない。

【0027】

例 1
M S D病原菌は、接種材料の処理後、ノトバイオートブタに接種して、M S D病原菌に病原性が残存するかどうかを測定し、物理化学的特性(大きさ、脂質溶剤に対する感受性およびプロテアーゼ感受性)を測定することによって特徴付けることができる。
30

【0028】

A. 材料

ノトバイオートブタ。ノトバイオートブタに対する誘導方法および維持方法はBenifieldら、Am. J. Vet. Res., 49, 330 - 36 (1988) およびCollinsら、Am. J. Vet. Res., 50, 824 - 35 (1989) に記載されている。雌ブタをM S Dを含む生殖上の問題がない群れから得ることができる。死産およびミイラ化した胎児またはそのいずれか一方を伴う同腹子は使用してはならない。
40

【0029】

M S D接種材料(MN90-SD76-GP2、本文ではMNSD90 76LまたはMSND90 76-Pを言う)。気管、肺、鼻甲介、扁桃、肝臓、脳、脾臓をM S Dに自然感染したミネソタ州の1群中養育中のブタから得ることができる(Collins et al., Minnesota Swine Conference for Veterinarians, Abstract, 254 - 55 (1990))。これらの組織ホモジネート(MN 89 - 35477)を、抗体を用いずにハンクの塩類溶液で調整し、0.5mlを経鼻腔によりNebulizerガラス(Ted Pella Co., Redding, CA)を使用して、日齢3日のノトバイオートブタに接種することができる。接種した仔ブタは、自然感染のブタに観察されるのと同様の臨床的徵候および電子顕微鏡的損傷を発現する場合がある。これらのノトバイオートブタから得た肺
50

、肝臓、腎臓、脾臓および脳を、初回接種後8日後収集し、プールして別のホモジネートを調整することができる。その後、第2回目に得られたホモジネートを、ノトバイオート豚にもう一度接種することができる。また、MSDは肺組織から理想的に増殖させることができるので、肺組織を分離ホモジネートとして調整できる場合以外は、同様組織を収集し均質化しても良い。肺ホモジネートは、ノトバイオートブタの初回接種材料(MN 89-35477)の第2の連続継代に相当する(Collinsら、71st Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Disease, Abstract No. 2 (1990))。2種の濾液を0.20μmフィルター(Gelman Sciences, Ann Arbor, MI)および0.10μmフィルター(Millipore Corp., Bedford, MA)を用いて調整することができる。これらの濾液を区分して、-70で保管することができる。すべての濾液は、細菌を有さず、ウイルスは、逆染色調整法を使用しても直接電子顕微鏡検査では観察されないことが望ましい。

【0030】

対照接種材料。擬似感染ノトバイオートブタ2例から調整した肺組織ホモジネートを対照ブタの接種材料として使用することができる。この対照接種材料をMSD接種材料に関して述べたように、0.20および0.10μmの濾液として調整することができる。

【0031】

剖検方法および組織病理学。Collinsら、71st Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Disease, Abstract No. 2 (1990)で先述したように、初回接種7日後、ブタを安樂死させる。組織を収集し、中性緩衝ホルマリンで固定し、Collinsら、An. J. Vet. Res., 50, 827-35 (1989)で述べたように光学的顕微鏡試験で処理することができる。標本を、鼻甲介、扁桃、気管、脳、胸線、肺(根尖葉、噴門側葉、隔膜側葉)、心臓、腎臓、脾臓、肝臓、胃、十二指腸、空腸、回腸、上行結腸、下行結腸、血液、隔膜リンパ結節から収集することができる。これらの組織を処理し、光学顕微鏡を使用して、リンパ単核脳炎、間質性肺炎、リンパプラスマ細胞性鼻炎、タンパク单核心筋炎または門脈性肝炎が存在するか否かを測定する。病変は、MSD接種群から得た自然感染ブタに常時認められる(Collinsら、Minnesota Swine Conference for Veterinarians, Abstract, 254-55 (1990))。糞含有物を収集し、先述のRitchieらによる、Arch. Gesante. Virus-forcshe, 23, 292-98 (1968)のように、ウイルス粒子を試験しても良い。血液を免疫検定および免疫組織用に収集し、例3に述べるように細菌用に培養することができる。

【0032】

B. 病原菌の単離

SIRS感染群中の感染仔ブタから得た肺組織および脳・脾・肝・腎結合組織を個々に均質化した。10%の組織ホモジネートを用いた。個々のホモジネートを1ml当たり約100μgでゲンタマイシンを含む最小必須培養液(MEM)と混合した。両試料を約25分間約4000×gで遠心分離にかけた。上澄みを抽出して、0.45ミクロンのフィルターに通した。組織ホモジネートおよび肺ホモジネートを混合させ、この混合材料を使用してさまざまな組織培養細胞系を感染させた。

【0033】

1. in vitro試験。75cm²プラスチックボトルを使用して2つの実験を行なった。試験番号1では、混合材料を以下に記載した細胞系各々の完全細胞シーツを含むボトル2本に接種した。さらに、各細胞系を含む1ボトルに約2.5mgのトリプシンを添加した。残りの条件はすべて、細胞系を含む各ボトルに関して同一であった。血清は、培地に添加しなかった。接種材料は1mlだった。すべてのボトルを約34℃で7日間保管した。結果は、7日目の最後に記録した。凍結し解凍した後、試料を同細胞系における第2の継代用に取り出す。残りの材料は、凍結し約-60℃で保管した。

【0034】

試験番号2においては、混合材料を、試験番号1で使用したものと同様の細胞を含む1ボトルに接種した。ただし、細胞シーツは、接種時には20-40%しか融合していないかった。培地は約10%のウシ胎児血清を含んでいた。さらに、接種材料は1mlであり、培養を約7日間約34℃で培養した。試験番号1および試験番号2の結果を以下にまとめた。

10

20

30

40

50

使用細胞系	試験番号 1	試験番号 2	
ウシ鼻甲介 (BT)	-	-	
ネコ腎臓 (CRFK)	-	-	
サル (Vero) 腎臓	-	-	
サル (Vero) 肺	-	-	
イヌ腎臓 (MDCK)	-	-	
ブタ (PK2a) 腎臓	-	-	
ミンク肺	-	-	
ケナガイタチ肺	-	-	
ウシ肺	-	-	10
水牛肺	-	-	
ウシ腎臓 (MDBK)	-	-	
ブタ精巣 (ST)	-	-	
サル腎臓 (MA-104)	-	+	
ヒト直腸腫瘍 (HRT-18)	-	NT	
ヒト肺	NT	-	

+ = CPE効果

- = CPE効果なし

NT = 未試験

【 0 0 3 5 】

細胞変性効果は、評価した細胞系を問わず試験番号 1においては認められなかった。ただし、試験番号 2においては、MA-104細胞の小凝集が肥大し、ボトルの縁周辺の単層で「ウイーク・ホール」を形成し始めた。液体をボトルから分離し、MA - 104細胞（これも 20-40% の細胞シーツである）を含む新たなボトルに継代した後、もう一度継代した。細胞変性効果は、継代を重ねる度に大きくなつた。上述の方法を、完全細胞シーツを使用して、MA-104細胞系に対して繰り返した。その後の試験は、ウイルス剤は、37℃でも繁殖することを示した。血清の存在は、ウイルス剤の初回単離に役立てられる。MA-104細胞系におけるウイルス剤のその後の継代によって、血清を含まない CPE を生じさせることができる。さらに、より際立った P E 効果を MA-104 細胞系用の増殖培地に血清を用いることで認めることができる。

20

【 0 0 3 6 】

ウイルス剤を MA-104 細胞系で 8 回継代したところ、3 日間後の 5 回目以降の継代では、CPE は良好だった。得られた力値は対数で約 5-1/2 であった ($10^{5.5}$)。ウイルス剤は、さらにサル細胞系でも増殖することができる。

30

【 0 0 3 7 】

2. in vivo 試験。別の継代収集物を使用して日齢 3 日のノトバイオート仔ブタに接種した。両仔ブタとも経鼻腔で、一方は 1ml であり、もう一方は 2ml で暴露した。仔ブタを 7 日間観察し、安楽死させた。

【 0 0 3 8 】

組織試料を病理組織学的試験用とウイルス剤の回収用に収集した。病理組織学的報告からは、感染仔ブタの肺病変は、SIRS にかかったことが判明している仔ブタ由来の肺組織病変と一致することが確認された。組織試料は前述のように処理され、ウシ胎児血清を含む MA-104 細胞系を 20-40% 含む単層と 100% 含む単層上で培養した。ウイルス剤を再び回収した。

40

【 0 0 3 9 】

別の継代収集物を雌ブタに接種し、疾患の繁殖効果を複製し確認することができることが証明するために使用した。経産雌ブタ 2 例に、妊娠 93 日目に経鼻腔で接種を行なつた。この雌ブタは、それぞれ妊娠 112 日目および 114 日に 50% 死産で同腹子の仔ブタを出産した（死産 / 生産比は、8/13 と 6/14）。死産仔ブタ 7 例は、一部ミイラ化しており、生産仔ブタは弱く、強健に育成することはできなかつた。このウイルス剤を死産仔ブタの組織から

50

回収した。

【0040】

ウイルス剤をSIRSとわかっている3群から回収した。ATCC VR-2332剤に対する抗体力価は、これらの同じ群で確認された。

【0041】

臨床的徴候に違い、すなわち、ヨーロッパ産のブタにおける耳、尾、乳房の皮膚チアノーゼが若干あるが、北アメリカにおける疾患およびヨーロッパにおける疾患は、同一のウイルスすなわちATCC寄託のVR-2332によって例証されるように選好性非血球凝集外皮RNAウイルスによって引き起こされるというのが、一般の意見である。

【0042】

10

例1A - その他の病原菌特性

A. 材料および方法

1. 細胞。ネコ科Crandellの腎臓(CRFK)およびサル腎臓(MA-104)の細胞を適切な細胞培養フラスコ内で37℃で育成した。CRFK細胞およびMA-104細胞は、(JRH Biosciences, Lenexa, KSより入手可能な)10%の線照射ウシ胎児血清(FBS)と1%のペニシリントレプトマイシンと2.5μg/mlのアムホテリシンBとを補足した(Gibco Laboratories, Grand Island, NYより入手可能な)イーグル最小必須培地(MEM)で増殖させた。MA-104細胞を10%のFBSと50μg/mlのゲンタマイシンで補足同様の培地で増殖させた。FBSおよび細胞は、先述のMayerら、Vet. Microbiol., 16, 303-314 (1988)、Smithiesら、Proc. Annu. Meet. U.S. Animal Health Assoc., 73, 539-550 (1969)およびVickersら、J. Vet. Diagn. Invest., 2, 300-302 (1990)による方法で、ウシウイルス性下痢性ウイルスがないことが確認された。

20

【0043】

2. VR-2332単離体ソース(SIRSウイルス)。本例のSIRSウイルスのソースおよび単離体は、以下記載の通りである。この試験に使用したウイルスは、105乃至10⁶TCID₅₀/mlの力価のMA-104細胞を5乃至7回継代したものに乗せた。

【0044】

30

ノトバイオートブタ。閉鎖子宮切開で得たノトバイオートブタを、先述のMiniatas O.P.ら、Can. J. Comp. Med., 42, 428-437 (1978)のようにフレキンブルフィルムアイソレータで覆わせたステンレス鋼タブに保管した。このアイソレータは、周囲温度30℃で保管され、ブタに1日3回商用ミルク代用品を推奨量摂取させた。実験接種前および剖検時に、糞スワップを収集し、好気雰囲気および嫌気雰囲気中で、ヒツジ血液寒天、tergital-sepen寒天、ブリリアントグリーン寒天上に接種した。剖検時に収集した糞も、上述のRichieら、Arch. Gesante. Virus-Forscheに述べられたように、陰性造影電子顕微鏡検査によって、ウイルスに対する試験を行なった。

30

【0045】

接種材料ソース。West Central Minnesotaの分娩から仕上げまでの160頭の雌ブタの1群が典型的なMSD症候を有するMSDを発症した。生存雌ブタ、生存新生仔ブタおよび死産ブタ胎児をMinnesota Veterinary Diagnostic Laboratoryに提供し、全身培検、組織病理学的調査および規定の微生物調査を含む試験を行なった。接種材料を臨床的疾患新生仔ブタ由来の複数の組織を用いて実験するために調整した。さらに詳しく述べると、感染した群れから動物間で流行中に日齢7乃至10日の生存仔ブタおよび死亡仔ブタを各2例ずつ剖検し、試料を診断試験用に収集した。生存仔ブタは、剖検前に安樂死用液を静注し安樂死させた。各ブタからブールした脳、肺および扁桃から成る10%ホモジネート(MN89-35477)を、100IUペニシリントレプトマイシンと100μg/mlストレプトマイシンと5μg/mlアムホテリシンBとを含むハンクスの平衡塩類溶液(HBSS)を使用して調整した。

40

【0046】

実験的媒介。一連のノトバイオートブタ14例に、日齢3日目にブールした組織ホモジネートで抗原刺激を行なった。各仔ブタは、経鼻腔で、ブタの外鼻孔前に置いたNebulizerガラスに取り付けたゴムバルブを使用して、抗原刺激を受けた。最初、ノトバイオート仔

50

ブタ 2 例に濾過していない接種材料をそれぞれ 0.5ml 接種し、疾患の臨床的徵候を監視し、暴露後 7 日後に感電（PE）させて安樂死させた。

前述のノトバイオート仔ブタからプールした肺の 10% ホモジネート（MNSD-1）を、1 例に 0.5ml の未濾過ホモジネートを投与し、別の 1 例に 0.45 μm 濾液を投与し、残り 1 例には 0.22 μm の濾液を投与したノトバイオート仔ブタ 3 例各々を 0.5ml のホモジネートで暴露して、盲目的継代を行なった。仔ブタは、PE によって 8 日後安樂死させ、組織を組織学的試験用、その後のノトバイオートブタ継代用およびウイルス単離用に収集した。

【 0 0 4 7 】

MNSD-1 濾液 0.45 μm を接種した仔ブタの肺（MNSD9076-L）と脳、肝臓および腎臓（MNSD90 76-P）の複合材料とから成る 25% の懸濁液を、カナマイシン、ストレプトマイシン、パンコマイシンをそれぞれ 0.5 mg/ml 含むリン酸緩衝塩類溶液を使用して調整した。ノトバイオート仔ブタ 6 例に肺ホモジネート MNSD90 76-L を、4 例に 0.45 μm の濾液を、2 例に 0.1 μm の濾液を投与した。未感染対照ノトバイオート仔ブタ 3 例については、1 例に HBSS に含有の未感染コブタ組織ホモジネート 0.45 μm を接種し、残り 2 例には HBSS のみを接種した。

【 0 0 4 8 】

ウイルス単離。 組織ホモジネート（MNSD90 76-L および MNSD90 76-P）を 20 分間 4 度で 1 500 g で遠心分離した。上澄みを 10 μg/ml のゲンタマイシンを含む最小必須培地（MEM）で稀釀し、Vortexミキサーを使用して完全に混合し、30 分間 4 度で 4500g で再び遠心分離にかけた。上澄みを収集し 0.45 μm フィルターで濾過した。肺ホモジネートおよび組織プールホモジネートから得た濾液を混合し、連続的継代細胞系 MA-104 に接種した。ウイルス単離を 10% ウシ胎児血清（FBS）含有の 50 ml MEM（pH7.5）を含む MA-104 細胞の 20-40% 密集单層を伴う 75cm² フラスコで行なった。細胞培養は、7 日間 34 度で保持した。細胞変性効果（CPE）が 7 日以内に観察されない場合は、培養を凍結し、融解し、MA-104 細胞に接種し、上述のように培養した。

【 0 0 4 9 】

ウイルス滴定。 ウイルス滴定を 96 ウェル型平底マイクロタイタ板で行なった。ウイルスの 10 回連続稀釀液を 2% FBS を含む MEM で調整した。3 日後、細胞育成培地をマイクロタイタ板から排除し、200 μl のウイルス稀釀液を 5 つのウェル各々に入れて、プレートを 5% CO₂ 霧囲気中 37 度で培養した。3 日後、CPE がないウェル中の培地を 2% FBS (pH7.5) で補足した MEM と取換えて、最終判定を培養 5 日目に行なった。力価は、Reedらの Am. J. Hyg., 27, 493-497 (1938) の方法によって算出された。

【 0 0 5 0 】

3. その他のウイルス。 Department of Microbiology, University of South Dakota School of Medicine, Vermillion, SD の Roger Koment 博士から得た弱毒化ポリオウイルスを MA-104 細胞上で 108 TCID₅₀/ml の力価まで増殖し、National Veterinary Services Laboratory, Ames, IA より得られた仮性狂犬病ウイルスのショープ菌株を CRFK 細胞上で成長させて、力価 10⁵ - 7 TCID₅₀/ml になるまで育成した。これらのウイルスを、試験において RNA および DNA のウイルス対照として使用し、SIRS ウィルスの VR2332 分離体の核酸型を決定した。

【 0 0 5 1 】

4. VR-2332 単離体に対する抗血清の調整。 5 回目の継代の SIRS ウィルスの VR 2332 単離体（力価 10⁶ TCID₅₀/ml）を 0.25% ホルマリンで不活性化し、フロイントの不完全アジュバントで 1 対 1 に混合し、ウサギにこの懸濁液 2 ml を 2 週間間隔で 6 週間皮下注射した。最後の注入 2 週間後に調整した抗血清は、1 対 512 の中和力価を有した。

【 0 0 5 2 】

5. ウィルス中和化試験（VNT）。 MA-104 細胞を VNT 用の平底の 96 ウェル型マイクロタイタ板に接種した。血清（100 μl）それぞれの 2 回連続稀釀液を MEM 稀釀液で調整し、100-300 TCID₅₀/100 μl を含む同容量（100 μl）単離体 VR-2332 と混合した。各混合液を 37 度 1 時間培養し、200 μl の血清ウイルス混合物それぞれを 3 重ウェルに添加する

10

20

20

30

30

40

50

。マイクロタイタ板をさらに3日間37℃で培養し、細胞変性効果(CPE)について光学的顕微鏡で調査し、終点力価は、CPEを中和化した最高の血清稀釀液の逆数として表わされた。

以下のポリクローナル抗血清は、別段の記載がない場合、VR-2332単離体に関して記載されたように調整し、VNTに使用した。換言すれば、伝染性胃腸炎のミラー株、ブタロタウイルスセロタイプ4(Gottfried)、ブタロタウイルスセロタイプ5(OSU)、ブタレオウイルスセロタイプ1、National Veterinary Services Laboratory, Ames, IAより入手可能なブタエンテロウイルスセロタイプ1乃至8、アメリカン・タイプ・カルチャーRockville, MDより入手可能なブタパルボウイルスに対するモノクロナール抗体、Department of clinical and Population Sciences, University of Minnesota St. Paul MNのW. Christtanson博士より入手可能な脳心筋炎ウイルス、National Veterinary Services Laboratory, Ames IAより入手可能な仮性狂犬病ウイルス、東部脳炎ウイルス、西部脳炎ウイルスおよびベネズエラ脳炎ウイルス、Nayerらの Vet. Microbiol., 16, 303-314(1988)に記載のBVDVに対するD89モノクロナール抗体、National Veterinary Services Laboratory, Ames, IAより入手可能なウマ動脈炎ウイルス、風疹ならびにDepartment of Microbiology, University of South Dakota School of Medicine Vermillion, SDのW. Cafruny博士より入手可能な乳酸脱水酵素である。

【0053】

6. 直接電子顕微鏡法(DEM)。セシウムクロライド勾配画分を、Benfieldらの J. Clin. Microbiol., 16, 186-190(1982)、Horzinek, Non-arthropod-borne Togaviruses" (Acad. Press, London, 1981)、Richieらの Arch. Gesante. Virus-forshe. に先述したように、ウイルス粒子に対してDEMによって試験し、75kV電圧で電子顕微鏡(Hitachi HU12A, 日立、東京、日本)で検査した。

【0054】

7. 免疫電子顕微鏡(IEM)。免疫-金標識化を、ヤギの抗ウサギIgG金コロイド粒子(5nm)を使用して行なった。簡潔に述べれば、ウイルスを4℃で30分間、40,000×gで濃縮した。ペレットを50μlの再懸濁で、25μlをパラフィルム1枚の上に置いた。コロジオン炭素被覆グリッドをウイルス滴に15分間浮かべて、25μlのウサギ抗SIRS血清に2分間置いた。グリッドを0.1%のウシ血清アルブミン(BSA)-トリス緩衝液を2回交換して各5分間洗浄し、金標識化抗ウサギ-IgG1滴に15分間浮かべた。各2分間ずつBSA-トリス緩衝液で6回洗浄し、2回上流水で洗浄した後、ネガティブ染色し、上述のようにDEMに対して試験した。

【0055】

8. 血液凝集反応(HAT)。ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヒト「O」型、カモおよびニワトリの赤血球を血液凝集させるVR-2332単離体能力を標準的方法を使用して測定した。VR-2332単離体の第5乃至第7継代の2回稀釀液をU底マイクロタイタ板のリン酸緩衝塩類溶液(pH7.2-7.4)で調整した。上述の標本それぞれから洗浄赤血球の1%懸濁液を等容量、ウイルス稀釀液に添加して、4℃、22℃または37℃で培養し、(ウイルス非含有の)赤血球対照をウェルの底のボタンに沈殿した1-2時間後に判定した。

【0056】

9. 免疫蛍光検査(ImF)。単離体 VR-2332感染および非感染のMA-104細胞の間接または直接ImF染色を、VNTで試験したポリクロナール抗体またはモノクロナール抗体を使用して行なった。National Veterinary Services Laboratory, Ames, IA(A型、H1N1)から入手可能なブタインフルエンザおよびNational Veterinary Services Laboratory, Ames, IAも使用した。先述のBenfieldらの J. Clin. Microbiol. に記載されているように、細胞単層のスクラップを無菌接種ループImF染色を用いた72時間PIで除去する。陽性対照スライドを雌ブタ由来の回復期抗血清またはSIRSウイルスのVR-2332単離体に対するモノクロナール抗体(本文では、SDOW12またはSDOW17)の何れかで染色する。

【0057】

10

20

30

40

50

10. VR - 2332の大きさ評価のための濾過試験。 凈化 - 感染細胞培養上澄みを $0.45\mu m$ (Shleicher and Scnelli, Keene, NH)、 $0.20\mu m$ (Millipore Products Div., Bedford MA) および $0.05\mu m$ (Millipore Products Div., Bedford, MA) の各フィルターで濾過した。濾過の前後の感染力値をマイクロタイマー検定およびCottrial, Manual of Standardized Methodes for Veterinary Microbiology, pp.81-82 (Cornell Univ. Press, Ithaca, NY, 1978) で先述した方法を使用して測定した。感染力値において、100倍の減少は有意と見なされた。

【0058】

11. VR-2332単離体の勾配精製。

浄化培養上澄みから得たSIRSウイルスのVR - 2332単離体をTNC緩衝液 (10mMトリス、100mMNaClおよび2mMCaCl、pH 7.8) 中の2mlの20、30、40、50および65%ショ糖 (wt/vol) を含む非連続ショ糖勾配を介して、 $200,000 \times g$ 、4 16時間で遠心分離 (Beckman SW 41 Ti rotor) によって濃縮した。培養上澄みも1,1,2-トリクロロトリフルオロエタン (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) で抽出し、1時間4 、 $100,00 \times g$ で超遠心分離にかけて、ショ糖勾配に関して述べたように、セシウムクロライド密度勾配 ($1.20g/ml$) で精製した。何れかの勾配から得た画分を上部から収集し、屈折計を使用して屈折率を測定し、選択画分を上述のウイルス滴定用ハンクの均衡塩類溶液で稀釀した。

【0059】

12. クロロホルムおよびフルオロカーボン培養。

等量のSIRSウイルス (VR - 2332) およびクロロホルムを周囲室温で30分間定期的に混合し、 $500 \times g$ 、4 で15分間遠心分離した。同様に、等量の1,1,2-トリクロロトリフルオロエタンおよびSIRSウイルスを5分間渦状攪拌し、クロロホルム処理ウイルスに関して述べたように遠心分離した。遠心分離後、各処理試料の水性相を収集し、稀釀し、マイクロタイマー検定を使用して、残りのウイルス感染力を測定した。非処理ウイルスと比較し、処理ウイルスの力値が100倍減少していることは有意であると見なされた。

【0060】

13. VR - 2332単離体に対するDNAウイルス阻害剤の効果。 5-ブロモ-2-デオキシウリジン (BUDR) およびマイトマイシンの配合物は、DNAウイルス複製阻害座として知られているが、レトロウイルス科を除き、RNAウイルスを阻害することはない (Eastern rook, Virology, 19, 509 - 520) およびReichら、Proc. Natl. Acad. Sci., 47, 1212-1 217 (1961))。仮性狂犬病およびポリオウイルスを本実験では既知のDNAウイルス対照およびポリオウイルス対照として使用した。細胞 (CRFKまたはMA-104) を96ウェル型ミクロタイマー板に接種し、複製のウェルを仮性狂犬病ウイルス、ポリオウイルスまたはSIRSウイルス各々の $100\mu l$ の10倍稀釀液で接種した。37 の1時間吸収期後、未吸収ウイルスを含む培地を取り出し、MEM (未処理ウイルス対照)、40もしくは $150\mu g/ml$ のBUDRで補足したMEMまたは2、10もしくは $20\mu g/ml$ のマイトマイシンCを含むMEMと取換えた。マイクロタイマー板をさらに4日間37 で培養し、CPEに対して光学的顕微鏡法で調査をして、ウイルスカ価を上述のCottrialの文献 (1978) による方法で計測した。非処理対照と比較したウイルス感染力値の1000倍の減少は、有意であると見なされた。

【0061】

14. SIRSウイルスの温度安定性。 MEM中の2mlのアリコートを4度または水槽中で37度および56 で少なくとも5日間培養した。3つの異なる温度で各管から得たアリコートを15、30、60および120分目に収集し、12乃至120時間までは12時間間隔で収集した。ウイルス試料をMEMで10倍稀釀し、ウイルスカ価は上述のようになつた。

【0062】

B. 結果。

1. MA-104細胞に対するVR - 2332単離体の細胞変性効果。 CPEは小型の細胞球状凝集として発現し、この凝集は未感染单層残物上方に上昇すると考えられた (図1B)。球状凝集数は増加し、細胞の多くは核凝縮を起こし、2乃至4日PI以内に单層から剥離した。5乃至6日PIまでに、CPEは100%の单層において明らかとなつた。感染力値は、ウイ

10

20

30

40

50

ルスの連続継代 5 度目および 7 度目には、各々 10^5 乃至 10^7 TCID₅₀ / 1ml と同様であった。未接種の MA-104 細胞では、CPE は観察されなかった（図 1 A）。

蛍光は非接種 MA-104 細胞では観察されなかった。図 2 B は強烈な拡散蛍光が（SIRS の VR-2332 単離体に対して調整した）ブタ回復期血清、ウサギ抗血清またはモノクローナル抗体のいずれかで染色した接種 MA-104 紡錐の細胞質に認められることを示す。

【0063】

2. SIRS ウィルス（VR-2332 単離体）の感染力に対する脂質溶剤の効果。クロロホルムによるウィルスの前処理は、感染力を相殺した（ 10^5 から 10^1 TCID₅₀ / 1ml まで減少）。従って、フルオロカーボン処理には有意な効果はなかった。

【0064】

3. 血球凝集。ウィルスは、培養温度とは無関係に異なる 11 種から得られた赤血球を凝集させなかった。

【0065】

4. 濾過による SIRS ウィルスの大きさ評価。ウィルス力価は、0.45、0.20 および $0.10 \mu\text{m}$ フィルターによる濾過後も変化しなかった。ただし、感染力価葉、 $0.05 \mu\text{m}$ (50nm) による継代後には、 10^5 - 10^2 TCID₅₀ / 1ml まで 1000 倍減少した。

【0066】

5. SIRS ウィルス複製に対する DNA 阻害剤の効果。仮性狂犬病 DNA ウィルスだけは、BUDR またはマイトイシン C によって感染力が減少した。ポリオウイルス（RNA）対照および VR-2332 単離体の複製は、影響を受けず、SIRS ウィルスのゲノムが恐らく RNA であることが示された（表 1 および 2）。

【0067】

6. ウィルス精製。ウィルス帶はショ糖勾配では検出されなかった。ウィルス力価のピーク (10^4 TCID₅₀ / ml) は、 1.18 - $1.23\text{g}/\text{ml}$ の浮遊密度を有する画分から発見された。このピークウィルス懸濁液の感染力価 (10^7 TCID₅₀ / ml) の 1000 分の 1 以下であった。セシウムクロライド勾配によって、単一の僅かなタンパク光帶が 1.18 - $1.19\text{g}/\text{ml}$ の浮遊密度で生じた。ピークウィルス感染力は、 1.3×10^6 TCID₅₀ / 1ml であるが、これはショ糖勾配から得られるピーク感染力寄りも 130 倍高く、この可視帶に一致した（図 3）。

【0068】

7. 精製 SIRS ウィルス粒子の DEM。相似形態であるが主に球状ビリオンが CsCl 画分中の DEM によって認められた (1.18 - $1.19\text{g}/\text{ml}$)。ビリオンは、直径 48 - 80nm (平均 25 粒子 = 62nm) であり、薄膜または外皮に囲まれた完全な電子半透明または中空（電子密集中心）粒子から成っていた（図 4 A）。[長さ約 5nm の短い突起を有する直径 40 - 45nm のイソサヘドラルヌクレオチドカピドが観察された。] これらの粒子は、直径 25 - 35nm の核を含んでいた（図 4 B）。ウサギ高度免疫抗血清と金標識化抗 - ウサギ IgG を 1 次および 2 次抗体として使用した場合には、ビリオンを免疫 - 金標識化した（図 4 B）。VR-2332 単離体に対するウサギ高度免疫血清の非存在下では、ビリオンを金標識化しなかった。

【0069】

8. 他のウィルスから得た抗血清に対する SIRS ウィルスの抗原関係。既知のブタウイルスときまざまなトガウイルスは、感染 MA-104 細胞中の SIRS ウィルス抗原と中和化したり、反応したりしなかった。回復期のブタ抗血清および高度免疫ウサギ血清は、各々 $1:256$ と $1:512$ の中和化抗体力を有していた。

【0070】

9. SIRS ウィルスの感染力に対する温度効果。MA-104 細胞に対するウィルス感染力は、12 時間 37 の培養後 50% 減少し、37 の 48 時間培養および 56 の 45 分間培養後完全に不活性化した（図 5）。感染力は（データを示さないが）4 の 1 か月培養または 4 か月の -70 培養後は変化しなかった。SIRS ウィルスに感染しハンクスの均衡塩類溶液で均質化したノトバイオートブタから回収した肺組織は、少なくとも 18 か月間ブタに対する感染力を維持する。結果は、VR-2332 単離体は選好性非血球凝集外皮 RNA ウィルスで

10

20

30

40

50

あり、未知の属の非節足動物偏狭性トガウイルスに仮説的に分類することができる。

【0071】

SIRSウイルスのRNAゲノムの存在葉、DNAおよびあるRNAウイルス系統群の複製を阻害しその他のRNAウイルスの複製を阻害しないことが知られる5-プロモ-2-デオキシンウリジンおよびマイトマイシンCの存在下で継続的に複製するこのウイルスの能力によって確認された(Easterbrook, 上述(1962)、Reichら、上述(1961))。RNAウイルスとしてのSIRウイルスの暫定的な著者らの分類は、このウイルスがImFによって検出されるウイルスの存在によって示される細胞の細胞質で複製する観察結果に一致する。

【0072】

SIRSウイルスのVR-2332単離体は熱に不安定であるが、4および-70では比較的長期間安定である。37でのこのウイルスの熱不安定性は、ウイルスの増殖に対しては実用的であり、このことから37以下の温度での増殖によってウイルスの収率が高くなることが示唆される。短期間のウイルス単離体に対する診断試料の保存には、冷蔵で十分であり、それ以外の場合には、試料を数ヶ月以上冷凍することができる。

【0073】

例2

例1における実験から測定されたように、MSD病原菌を含む接種材料の最も純粋な形態を使用してMSD病原菌を妊娠ブタに伝達し、病徵の複数形態を複製することができる。

【0074】

考察。 最近、(当分野においてMSDの顕著な臨床的徴候である)一過性食欲不振および早期分娩は、ノトバイオートブタに呼吸器系疾患による病変を生じさせる同一のMSD接種材料を接種した雌ブタ2例中2例に生じた。また、29例中15例(52%)のブタは死産で、残り14例は衰弱し、十分に乳飲することができなかった。肉眼的病変または顕微鏡的病変は、死産ブタには観察されなかつたが、微生物剤を検出する胎盤処理および単離処理が現在進歩している。従って、以下の試験はMSDの複数形態が経鼻腔で雌ブタに伝達されうるか否かと、胎児生存度の干渉は胎児ではなく母系組織の複製から生じるのか否かを述べた実験である。

【0075】

例1の実験から、どのように接種材料を処理(フィルターの大きさ、組織培養の抽出およびプロテアーゼ診断またはそのいずれか一方)するかに関する情報が提供され、接種材料(すなわちウイルス剤)に対するMSD因子の最も純粋な形態が提供される。MSD因子には若いブタに対する呼吸器形態とブタ成体の複数形態とがあるので、症候群の後者の形態を複製し、さらに病原菌がMSDの理論上の原因であることを証明しなければならない。

【0076】

MSD病原菌を接種したブタに流産を実験的に誘導することは可能であるので、妊娠93日のブタを実験動物として使用する。雌ブタは、生殖上の問題がなく、MSDにかかっていない商用群から購入すれば良い。この群の完全な免疫学的記録をコンピュータ処理すると、妊娠期間、同腹子の大きさ、死産児数の平均を比較研究に利用することができる。3例の雌ブタから成るグループそれに妊娠93日目に0.20μlの濾液(陽性対照)、病原性であるが、例1の結果によって示される修飾接種材料、接種材料の0.20μmの濾液(陰性対照)または例1の実験結果より示されるように修飾した対照接種材料の何れかを経鼻腔で接種することができる。各グループのブタを個別隔離室に収容し、出産までの間毎日調査を行なう。温度および(食欲不振や、咳、クシャミ、浅息呼吸、呼吸数の増加などの呼吸器系統の問題など)臨症的徴候を毎日記録する。ブタのサンプリングは、血清学上分娩前後の血液試料に限定される。実際の分娩日を記録し、死産児、ミイラ化した胎児、生産「衰弱」ブタおよび生産「正常ブタ」を決定する。胎児に例1に述べたように肉眼的病変および顕微鏡的病変について調べ、例3で述べるように、胎児組織を微生物学的方法で処理する。胎児血清によってガンマグロブリンおよびPPVならびにEMCVの存在について調査することもできる(Joeら、In Proceedings of the Mystery Swine Disease Comi

10

20

30

40

50

ttee Meeting, 62-66 (1990)、Kimら、J. Vet. Diagn. Invest., 1, 101-4 (1990)。生産したブタを1週間観察し、罹患率および死亡率を記録し、ブタを安樂死させた後、胎児について述べたように、光学顕微鏡検査および微生物学的検査用に組織を収集した。

【0077】

M S D 接種材料から成る0.2μmの濾液および修飾した濾液は、ブタに対して病原性があり、食欲不振や、時には微熱、各同腹子の多数が死産か衰弱している早期分娩を誘導する。これは、接種材料がM S D 因子を含む証拠である。対照接種材料を接種した雌ブタは、予定日近くに分娩したが、この群の利用可能な疫学的データベースから分かるように、元の群の標準範囲内の同腹子を出産している。死産ブタの病変は認められず、生存衰弱ブタにおいては生後1週間以内の致死率が高いことがわかった。

10

【0078】

例 3

M S D 接種材料で接種し、接種後さまざまな時期に安樂死させたノトバイオート仔ブタから収集した組織試料を使用して、M S D の病原菌を単離同定し、病変の連続的発達を測定し、M S D 因子が免疫抑制的であることを確認する。

【0079】

凍結組織および接種細胞培養に対する免疫蛍光検査法。 凍結組織および細胞スクラップに対する免疫蛍光検査をBenfieldら、J. Clin. Microbiol., 16, 186-190 (1982) およびBenfieldら、Am. J. Ver. Res., 49, 330-36 (1988) に先述したような方法で実行する。凍結組織および細胞スクラップを PPV、EMCV(頭字語については例4参照)およびM S D 因子についてスクリーニングを行なった。PPVおよびEMCVに対する接合体は、South Dakota Animal Disease Research and Diagnostic Laboratoryで入手できる。ノトバイオートブタにおける高度免疫血清をM S D 接種材料の最も純粋な形態から調整する。ブタ2例を経鼻腔接種し、初回接種2週間後および4週間後にフロインドの不完全アジュバント中の接種材料を皮下経由で追加抗原刺激する。血清を最後の追加抗原刺激2週間後にこのブタから収集する。対照血清も、対照接種材料とM S D 接種材料に関して述べた同一の免疫化プロトコルを用いてノトバイオートブタ2例について調整する。これらの血清を一次抗体として使用し、フルオレセインイソシオチアン酸塩で接合したヤギまたはウサギの抗ブタ免疫グロブリンを二次抗体として使用し、凍結組織片および細胞培養中のM S D 抗原を検出することができる。

20

【0080】

血清学的検査。 対照ブタまたは接種ブタから収集した血清について、PPVおよびSIV(血球凝集阻害)、レプトスピラ(微細凝集)、ならびにEMCV(ウイルス中和化)に対する抗体が存在するか否かを検査する(頭字語については例4参照)。以前の結果は、他の一般的の微生物学的因子に対する血清学的検査には陰性であったことが示されている(Collinsら、71st Meeting of the Conference of Research Workers in Animal Disease, Abstract No.2 (1990))。

30

【0081】

免疫学的検査。 組織および血液をM S D 接種ブタおよび対照ブタから収集し、免疫学的状態を測定する。ブタ白血球をPescovitzら、J. immuno1., 134, 37-44 (1985)によつて示されるように、Histopaque 1077にかけて、単回不連続勾配浮遊法によって末梢血から単離する。リンパ結節、脾臓および胸腺から得た細胞を、生成細胞懸濁液の組織および収集物を適度にミンスすることによって、単細胞に分解する(Hurleyら、Cancer Res., 47, 3729-35 (1987))。

40

【0082】

ブタ白血球表現型をアメリカン・タイプ・カルチャーコレクションおよびJoan Lunney(USDA Beltsville, MD)経由で入手できるモノクローナルパネルを使用して決定することができる。これらには、T細胞、pCD2(MSA4; Hammerbergら、Ver. Immunol. Immunopathol., 11, 107-21 (1986)、ヘルパー/クラスII MHC依存T細胞、pCD4(74-12-; Lunneyら、Ver. Immunol. Immunopathol., 17, 135-144 (1987))細胞傷害性-サプレッサー

50

/ クラス I MHC 依存 T 細胞、pCD 8 (74-2-11; I bid) 、マクロファージおよび顆粒細胞 (74-22-15A: I bid) 、ヒト D R w と等価のブタ MHC クラス II 抗原 (MSA3; Hammerberg ら、Vet. Immunol. Immunopathol., 11, 107-21 (1986) ならびに D Q w (TH21A) およびその他 VRMD、Pullman、WA; Davis ら、Hybridoma Technology in Agriculture and Veterinary Research. Rowman and Allanheld, 121-50 (1984)) などがある。ブタ免疫グロブリンに対するイソタイプ - 特異モノクローナル抗体も利用可能であり (Paul ら、J. Vet. Res., 50, 471-79 (1989)) 、末梢血、リンパ結節およびパイエル板から得た白血球を間接蛍光染色するために 2 度に分けて最小飽和濃度で使用することができる (Vet. Immunol. Immunopathol., 25, 177-93 (1990)) 。 2 色検査を実行するためには、ビオチン (Pierce kit #21333) 抗体で標識化した後、rPE-標識化アビジンで細胞を染色すれば良い。細胞をフローサイトメトリーまたは 2 色解析蛍光顕微鏡 (PTI FSCAN システム) で解析する。フローサイトメトリー時の 488nm レーザー光線での相互検出または二重蛍光顕微鏡法の使用を容易に行なうことができる。細胞性蛍光強度および陽性細胞の百分率も測定する。

【 0 0 8 3 】

コンカナバリン A、アメリカヤマゴボウマイトジエン (PWM) および植物性血球凝集素 (PHA) を用いるレクチン有糸分裂法などの *in vitro* 機能検査法を Hammerberg ら、Am. J. Vet. Res., 50, 868-74 (1989) に記載のように実行する。リゾチームに対する抗原特異 *in vitro* T 細胞反応を、それらの技術実行後にモデル化することができる。B 細胞増殖検査を大腸菌およびネズミチフス菌 LPS または抗免疫グロブリンによって、Symons ら、Int. Archs. Allergy Appl. Immun., 54, 67-77 (1977) において報告されているように行なうことができる。PWM を用いて誘導される *in vitro* 抗体生成は、Hammerberg ら、Am. J. Vet. Res., 50, 668-74 (1989) に述べられているように達成され定量される。大腸菌 LPS に対する 48 時間暴露後の I 1-1 のマクロファージ生成をマウス胸腺細胞検査で測定することができる (Mizel, Immunological Rev., 63, 51-72 (1982)) 。 PHA- 刺激リンパ球による I 1-2 の生成を、Stott ら、Vet. Immunol. Immunopathol., 13, 31-38 (1986) に記載のように測定することができる。イソタイプ - 特異抗リゾチーム ELISA をブタ免疫グロブリンイソタイプに対するモノクローナル抗体を用いて行なうことができる (Paul ら、Am. J. Vet. Res., 50, 471-79 (1989)) 。

【 0 0 8 4 】

in vivo 抗体生成を評価するためには、M S D 感染の仔ブタ 3 例および対照接種材料接種 3 例に対し、ヒツジ赤血球の 2 % 懸濁液およびウシ血清アルブミンの 10 μg/ml 溶液を別々の部位に、初回接種 5 、 7 、 10 、 14 および 24 日後に注入すれば良い。初回接種 24 日後にブタを安樂死させて、例 1 に述べたように組織病理学用に収集し、血液を収集し、抗体検査をする。全抗体濃度および各抗原に対する特異 IgG および IgM 反応を抗原特異放射免疫拡散法または EIISA で測定する。抗原 - 特異ブラーク検査を脾細胞に対して実行し、感染ブタおよび対照ブタの B 細胞クローンの頻度を評価する (Kappler, J. Immunol., 112, 1271-85 (1974)) 。

【 0 0 8 5 】

例 4

目的。 本実験の目的は、M S D 単離体に対するノトバイオートブタの高度免疫抗血清を調整し、診断試薬として使用して、M S D の抗原特性を特徴化することにある。

【 0 0 8 6 】

背景。 ミネソタ大学協力のサウスダコタ州立大学におけるノトバイオートブタの先行研究により、現場症例 MN-8935477 より得たプール組織ホモジネートがノトバイオートブタの肺病変を誘導したことが示された。これらのブタ由来のプール組織ホモジネートは、その後、日齢 3 日のノトバイオートブタの臨床的疾患および呼吸器系統病変の特性を生じさせるために使用されている (Collins ら、71st Meeting of Research Workers in American Diseases., Abstract No.2 (1990)) および Collins ら、 Minnesota Swine Conference for Veterinarians , Abstract , 245-55 (1990)) 。 肺ホモジネートおよび組織ホモジネートをノトバイオートブタ (90 × 75) の初回接種材料の第 2 継代から調整し、第 2 の接種材

10

20

20

30

40

50

料を生成した。第2の接種材料を接種材料および抗原として、この実験の高度免疫血清を生成するために使用することができる。

【0087】

目的を達成するための方法。

ノトバイオートブタ。ノトバイオートブタを先述のBenefieldら、Am. J. Vet. Res., 49, 330-36 (1988) およびCollinsら、Am. J. Res., 50 827-835 (1989) に記載のように誘導し維持することができる。

【0088】

高度免疫血清接種。高度免疫血清を上述のようにノトバイオートブタ1例に初回接種することによって調整することができる。その後、ブタには1mlの第の接種材料および1mlのフロイントの不完全アジュバントを含む追加抗原を初回接種14および21日後に投与する (HarlowおよびLanne, 1988)。このブタは、最終接種後14日以後に安樂死させが望ましい。血清を回収し、適切なアリコートに調整し、-20°で凍結することが望ましい。

10

【0089】

血清学的検査。大半の診断研究所で一般に行なうように、高度免疫血清についてブタ共通の病原体に対する抗体があるか試験をする。この血清をヘモフィルス、ブルセラ、レプトスピラ(6血液型亜型)、仮性狂犬病ウイルス(PRV)、パルボウイルス(PPV)、脳心筋炎ウイルス(EMC)およびブタインフルエンザウイルス(SI)に対する抗体について検査することができる。

【0090】

20

結果。抗血清調整用のブタは、ブタ #4B(実験番号 90x238)であった。このブタは1990年11月1日に接種し、1990年11月29日殺処分するまで毎日臨床的徴候について観察した。臨床的徴候は、表1にまとめた。残念ながら、ブタの連続変性条件は、1990年11月13日の僅か1回の追加免疫後に安樂死させることであった。初回追加免疫16日後の1990年11月29日にブタを安樂死させた。

【0091】

血清学的結果は、16,384の力値を有するPPV以外の上述の因子はすべて陰性だった(表2参照)。このブタの滴定前の血清は処理しなかった。

【0092】

30

肺、心臓、脳、腎臓、結腸、小腸、鼻甲介、脾臓、胃および気管をブタ剖検時に収集した。これらの試料を評価し、ブタ由来の肺がMSDの現場症例を伴って典型的にみられるその重篤な肺炎に関する病変を有することがわかった。

【0093】

この実験結果は、病原菌は、MSDの自然症例に典型的に見られる臨床的疾患および病変を誘導するので、病原菌が第2の接種材料に存在するとする初期の試験を確証するものである。

【0094】

【表1】

日付 接種仔ブタの観察 (90x238)

10/29 外科処置

11/1 午後 5時、Nebulizerを用いて上述の接種材料
0.5mlを経鼻腔でブタに接種する。

11/2 観察せず。

10

11/3 当ブタは、対照のブタの2倍量のポウル入りミルクを飲んだ。ブタが十分に食べているのか、病原菌が食欲不振の原因であるかどうかは確信できない。糞は正常。

11/4 多少動きが鈍くなったかもしれないが、機敏で健康である。ミルクを1/2残した。糞は柔らかく茶色である。

20

11/5 午前 9時：健康、機敏、ミルクの大半を飲む。
糞はムコイド様、茶色。

午後 4時：健康、機敏、ミルクの大半を飲む。糞はムコイド様、茶色。

30

11/6 午前 9時：健康、機敏、ミルクの1/2を残す。
糞はムコイド様、茶色。

午後 6時：健康、機敏、ミルクの1/2を残す。糞は下痢、茶黄色(2)。

40

11/7 年前 9時：健康、機敏、ミルクの大半を飲む。
糞は、薄茶色、ムコイド様（2）。

午後 3時：健康、機敏、ミルクの大半を
飲む。糞は薄茶色、ムコイド様。

11/8 午後 2時：機敏だが、対照ほどミルクを飲まな
ず、対照よりも緩慢、糞は黄色。 10

11/9 午前 8時：機敏、対照ほど活発にミルクを飲ま
ない。糞は糊状。

午後 5時：午前 8時と同様。

11/10 年後 6時：機敏、強健、鼻を飼料皿に活発に擦
りつける。糞は茶色で緩い。対照のようには食
べない。 20

11/11 午後6時：機敏、強健、飼料皿に活発に鼻をこ
すりつける。糞は糊状。対照ほどは食べない。
ミルクは飼料皿に残る。対照は午後6時30分ま
でに食べ終わる。 30

11/12 午前9時：機敏だが対照ほどは活発でない。5
分後に対照は食べ終わったが、このブタはボウ
ルの少なくとも2/3のミルクを残していた。鼻
を若干擦りつけた。 40

11/13 年後4時：ネプライザおよび試料IFA (1ml)

を用いて90x751gおよびプールを接種する。機敏だが：対照ほど活発ではなく、飼料皿にミルクの1/2を残す。対照は残さずにミルクを飲んだ。鼻を擦ることはない。糞は糊状。

11/15 午後7時：機敏だが対照ほど活発ではなく、まだゆっくりと食べている。毛皮は荒い。対照と同様に体重は増えている。
10

11/16- さほど変化はない。機敏だが、じっとして活動
11/24 は鈍くなっている。

午後1時（11/24）：呼吸は速く、毛皮は荒い
ように思われる。対照のような体重増加は見られない。
20

11/29 安楽死させる。H.I.用に血液を収集する。扁桃を含み、組織病理学用に通常回数収集する。血液をリンパ球有糸分裂誘発検査用に収集する。
肉眼的病変は認められない。鼻甲介移植片の培養開始。
30

【0095】

【表2】

接種ブタの抗体試験

- 1. ブタインフルエンザ - 陰性
- 2. ブタ脳心筋炎 - 陰性
- 3. ブタAPP - 陰性
- 4. ブタPRV - 陰性
- 5. ブタPPV - 陰性
- 6. ブタブルセラ - 陰性
- 7. ブタレプトスピラ - 陰性
- 8. ブタEPI - 陰性

【0096】

例4A モノクローナル抗体調整

マウス免疫化。ハイブリドーマ融合の8日前、BALB/C AnNマウスにフロイントの完全アジュバント（CFA）に抗原を含む1:1の懸濁液をIP接種した。使用する抗原の量は、抗原の免疫原性および毒性によって異なる。1マウス当たり、最大0.3mlのCFAを使用する。融合1週間前は、塩類溶液に含めた抗原でマウスをIP免疫する。融合2日前は、マウスIVを塩類溶液に含めた抗原を接種する。

【0097】

10

20

30

40

50

骨髓腫細胞。 10%のウシ胎児血清を含むダルベッコの調整イーグル培地上で、マウス骨髓腫細胞（P3.NS-1-Ag4-1 (ATCC TIB 18)）を維持する。約 10^7 - 10^8 個の細胞を、模範的なマウスの1脾臓から得られたB細胞に融合する。ハイブリドーマ融合直前に、50mlの遠心分離管に対数期培養から骨髓腫細胞を収集し、5分間の $200 \times g$ 遠心分離によってペレット細胞を収集する。上澄みを抽出し、細胞を2度無血清DMEMで洗浄し、上述のように遠心分離にかける。（ 10^7 - 10^8 個の細胞を含む）ペレットを1mlの無血清DMEMで再懸濁する。

【0098】

脾臓リンパ球の単離。 頸部脱臼によってマウスを安楽死させ、7分間70%のエタノールに浸漬する。無菌処理によって脾臓を摘出し、5mlの低温無血清DMEMを含む無菌ペトリ皿に移す。メスを使用し、長軸に沿って脾臓を切れ目を入れ、脾臓の縦方向にそって徐々に解体して、脾細胞を培地に放出する。ピペットを使用して遊離細胞および培地を15mlの遠心分離管に移すが、脾臓ケーシングは残す。管の組織デブリを5分間放置し、単細胞懸濁液を新たな管に移す。細胞を5分間 $200 \times g$ で遠心分離し、上澄みを捨て、ペレットを低温無血清DMEMで洗浄する。細胞を1mlの無血清DMEMで再懸濁し、融合するまで氷上で保管する。

【0099】

融合。 脾細胞を骨髓腫細胞を含む遠心分離管に添加し、5分間 $500 \times g$ 遠心分離する。上澄みをすべて除去し、管の側面を軽く叩くことによって細胞ペレットを解す。すべての試薬および細胞を37℃に維持し、1ml 150%のポリエチレングリコール溶液（PEG 4000, Gibco, Grand Island, NY）を滴状で穏やかに混ぜながら1分間かけて添加する。37℃で1分間混合物を放置する。1mlの中温無血清DMEMを穏やかに混ぜながら滴状に1分間かけて添加する。最後20mlの無血清DMEMを4分間滴状添加して、すぐに $200 \times g$ で5分間細胞を遠心分離にかける。上澄みを除去し、20%のウシ胎児血清、0.2単位/mlのインシュリン、0.5mMのピルビン酸ナトリウム、1mMのオキザロ酢酸、2mMのL-グルタミン、非必須アミノ酸および10%のNCTC-109リンパ球培地を含む47mlのDMEMで細胞を再懸濁する。1ml容量の細胞再懸濁を24-ウェル型平底組織培養板2枚のウェルに添加する。骨髓腫細胞の対照ウェルを含ませ、板を37℃および10%CO₂ (SDMEM)で培養する。

【0100】

1晩培養した後、各ウェルから0.5mlの培地を細胞層を動搖させずに取り出す。 1×10^{-4} Mのヒポキサンチン、 4×10^{-7} Mのアミノブテリンおよび 1.6×10^{-5} Mのチミジン（HAT）を、各ウェルに添加し、37℃および10%CO₂で培養を続ける。2-3週間毎に3回、1mlの使用培地を1mlの新鮮なDMEM+HATを継続して取り替える。有意なクローン増殖が見られた場合、ELISA、間接FAまたはその他の適切な検定システムで特異抗体がウェルに存在するか否かを検査する。

【0101】

クローニング。 特異抗体に対して陽性試験を行なう一次ウェルを、サブクローニングして直ちに安定した細胞系を得て、その他のクローンによる過剰増殖を避けることが望ましい。選択した一次ウェル細胞を再懸濁して、トリパンブルー染色法および血球計数器で細胞数を計測する。細胞を稀釈し、SEMEM+HT中約2細胞/mlの最終濃度を得る。非接種マウスから得た標準脾細胞を100ml培地当たり50μlの濃縮細胞を添加することによって支持細胞層として用いる。

【0102】

250μlの細胞懸濁液を96-ウェル型板の各ウェルに添加し、37℃ 10%CO₂で培養する。クローンは、2-3週間後には肉眼視できることが望ましく、单クローンを含むウェルから得た上澄みは、有意な増殖が認められた場合に検査する。特異抗体に対する陽性試験を行なうウェルでクローニング処理を繰り返す。選択クローンを組織培養フラスコに徐々に拡大し、さらに特徴化し凍結保存する。

【0103】

腹水生成。 ハイブリドーマ細胞接種の2週間前、BALB/c AnNマウスに0.5mlのプリスターのIP投与で初回抗原刺激を行なう。ハイブリドーマ細胞を収集し、ハンクスの均衡塩類

10

20

30

40

50

溶液で1回洗浄する。HBSSで細胞を再懸濁し、初回抗原刺激を受けたマウスに $10^4\text{-}10^6$ の生存可能細胞を接種する。腹水生成が明らかである場合（通常は、接種1-2週間後）、鼠径部に16G 1-1/2"ニードルを腹側挿入して抽出する。ニードルのハブを遠心分離管上で固定し、腹水を管に排出する。腹水液を $200\times g$ で遠心分離し、0.2nmのフィルターで濾過し、凍結保管する。

【0104】

例4 - SIRSモノクローナル抗体
(SDOW12およびSDOW17)

SIRSウイルスに対するモノクローナル抗体SDOW12 (ATCC No. HB 10996) およびSDOW17 (ATCC No. HB 10997) を上述の標準モノクローナル抗体生成プロトコルを用いて調整した。マウス免疫化に使用した抗原をBoehringer Ingelheim Animal Health (BIAH) から得たMA-104で育成した6回継代のSIRSウイルス (VR-2332) であった。各免疫化には、マウスに力価 $10^6\text{ TCID}_{50}/100\mu l$ を含む0.3mlの勾配生成ウイルスを接種した。

【0105】

間接蛍光抗体 (IFA) 検査を用いて、ハイブリドーマ一次ウェルおよびクローンウェル中の特異抗体を検出した。96-ウェル型組織培養板におけるアセトン固定ウイルス感染および非感染の細胞単層をIFAに用いた。これらのハイブリドーマ由来の細胞培養上澄みおよび腹水液によって、SIRS感染細胞中に明るい顆粒細胞質蛍光が生じた。

【0106】

これらのモノクローナル抗体の予備的特性化には、免疫グロブリンイソタイプやSIRSウイルスタンパク質の放射性免疫沈殿解析などがある。モノクローナル抗体SDOW12およびSDOW17は、IgG₁イソタイプである。両抗体は、15kDのウイルスタンパク質に放射性免疫沈殿解析時に結合した。

【0107】

例5

3つの予備試験について説明する。ノトバイオートブタ試験は、現場材料を使用して、ノトバイオートブタにおける症候群の呼吸器系成分に感染し、それを誘発することができるることを示すために意図された。一般的の離乳ブタを使用する第2の試験は、ノトバイオートブタに見られる呼吸器疾患が一般的のブタに再生されうるか否かを判定するために意図された。最後に、妊娠ブタ試験は、症候群の再生不全成分を実験的に複製できるか否かを判定するために意図された。

【0108】

材料および方法

現場症例。 例1Aの接種材料ソースを参照。

ノトバイオートブタ試験。 子宮摘出誘導のノトバイオート仔ブタ6例に日齢3日目に現場接種材料（きまざなまな組織を含む10%ホモジネート）を接種した。濾過（0.22μm）および非濾過の接種材料を使用した。対照仔ブタ2例には培地のみ接種した。臨床的徵候を毎日監視し高度免疫血清生成に保持するブタ1例を除いて、接種後8日目に安樂死させた。ウイルス単離および組織学的検査に用いる組織を剖検時に血清とともに収集し、血清をレプトスピラ、クラミジア、エペリスロゾーン、アウジエスキーブタウイルス、ブタパルボウイルス、脳心筋炎ウイルス、血球凝集性脳炎ウイルス、ブタインフルエンザウイルス、ウシRSウイルス、犬ジステンパーウイルス、ウシ性下痢ウイルスおよびブタコレラに対する抗体について、血清のスクリーニングを行なった。初回接種材料は、ノトバイオート仔ブタを連続的に3回継代するために初代細胞系に接種した。さらに、直接免疫電子顕微鏡検査を行なった。

【0109】

通常飼育ブタ試験。 MSD病歴のない農場から入手した通常飼育の日齢28日の離乳ブタ3例に、感染ノトバイオート仔ブタ由来の10%肺ホモジネートを経鼻腔接種した。陰性ノトバイオートブタからの肺ホモジネートを対照用の接種材料として用いた。仔ブタの臨床的徵候について毎日監視し、接種8日後に剖検した。血清／組織を上述の方法で処理し

10

20

30

40

50

た。

【0110】

妊娠ブタ試験。 M S D のない農場から得た過去の出産日がわかっている経産雌ブタ 8 例を本試験に使用した。予定分娩日の 3 週間前、雌ブタ 6 例に感染ノトバイオート肺ホモジネートを経鼻腔で接種し、2 例には陰性肺ホモジネートを接種した。毎日、臨床的徴候を監視した。雌ブタには自然分娩させ、可能であれば、分娩に立ち会い、生産ブタから乳飲前の血清を収集した。雌ブタおよび生産ブタを分娩後間もなく安樂死させ、組織病理学用およびウイルス単離用に収集した。血清または胸部液も収集した。

【0111】

結果

10

現場試験。 肉眼的病変は剖検時には見られなかった。養生ブタの顕微鏡的試験から、壊死性間質性肺炎およびリンパ球单核脳炎があきらかになった。胎児には病変がなかったが、雌ブタには軽度の脳炎があった。顕微鏡的試験では決定的な結果は出なかった。

【0112】

ノトバイオート試験。 接種後、仔ブタの食欲は減退し、毛皮が荒くなった。対照動物は正常を維持した。顕微鏡的病変が濾過または非濾過の材料を接種した当該のブタに認められた。病変は現場症例に類似し、壊死性間質性肺炎（6/6 [仔ブタ 6 例中 6 例]）、リンパ球形質細胞性鼻炎（4/6）、リンパ球单核脳炎（2/6）および心筋炎（1/6）を含んでいた。病因学的因素は、接種前後の血清学的検査によつても接種材料 / 組織試験によつても同定されなかつた。

20

【0113】

通常飼育離乳ブタ試験。 臨床的には、当該のブタが接種 2 日後に鈍くなり食欲不振となつた。これらのブタは、温度を十分に提供しててさえも、身震いをしているように感じられた。1 例の体温は、接種 6 日後に上昇していた（41.5）。間質性肺炎、脳炎および心筋炎は、当該のブタには認められたが、対照には認められなかつた。

【0114】

妊娠ブタ試験。 臨床的には、2 例に限つては、が接種後 3 または 5 日後、若干の体温上昇があつた（1.5）。ただし、食欲減退は、4/6 の雌ブタについて接種 4 または 5 日後に認められた。3 例は最大 7 日早く分娩し、3 例は予定通り分娩した。感染雌ブタの胎児の 50% 以上が死産であったが、対照は正常な同腹子を産んだ。実験室的所見は、決定的ではなく、特異因子は同定されず、病変は現在まで認められていない。

30

【0115】

原因的微生物は同定されなかつたが、所見から M S D は、（1 農場からの現場組織を使用して）実験的にノトバイオートブタおよび通常飼育ブタに伝達され得ることが示唆された。M S D に対する呼吸器系形態および生殖的形態は、再生された。当該因子は、伝染性で 0.22 μm において濾過性があると思われるほか、外見上選好性である。

【0116】

考察

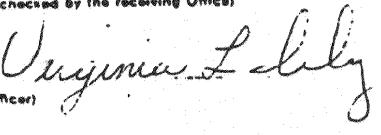
米国だけではなく世界中で M S D は重要で新種の疾患である。調整した環境において疾患を研究するには、ノトバイオートブタには、M S D の臨床的徴候を経験している農場から得た組織ホモジネートを用いて日齢 3 日目に経鼻腔接種した。壊死性間質性肺炎を含む現場症例に類似しているが、リンパ球形質細胞性鼻炎、リンパ球单核脳炎または心筋炎にはあまり類似性が少ない顕微鏡的病変は、実験動物には見られたが対照には見られなかつた。ノトバイオートブタから得た肺ホモジネートを使用した場合、通常飼育の生後 4 週目の離乳ブタは同様の病変を引き起こした。経産の妊娠ブタにも分娩日の 3 週間前にノトバイオートの肺ホモジネートを接種した。臨床的には、これらの雌ブタはある期間食欲不振になり、最大 7 日間前までに分娩した。50% 以上の胎児は死産または初期の段階でミイラ化しているかのいずれかだった。これらの所見は、病滅菌に関する病気を単離し、実験的に現場組織を用いてノトバイオートブタに伝達させることができ、ノトバイオートのブタから通常飼育のブタまたは妊娠ブタに伝達させることができる。本研究は、疾患の呼吸器的

40

50

形態および生殖的形態のモデルを提供するので、M S D の発生病理および診断方法をさらに調査することができる。

International Application No: PCT/ /

MICROORGANISMS	
Optional Sheet in connection with the microorganism referred to on page _____, line _____ of the description.	
A. IDENTIFICATION OF DEPOSIT:	
Further deposits are identified on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/> (antibody) SDOW 12	
Name of depositary institution <input type="checkbox"/>	
AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION	
Address of depositary institution (including postal code and country) <input type="checkbox"/>	
12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852 United States of America	
Date of deposit <input type="checkbox"/>	Accession Number <input type="checkbox"/>
27 March 1992	HB 10996
B. ADDITIONAL INDICATIONS: (Leave blank if not applicable). This information is continued on a separate attached sheet <input type="checkbox"/>	
C. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE: (If the indications are not for all designated States)	
D. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS: (Leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later. (Specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	
<input checked="" type="checkbox"/> This sheet was received with the international application when filed (to be checked by the receiving Office)  (Authorized Officer)	
<input type="checkbox"/> The date of receipt (from the applicant) by the International Bureau is _____ 1985 (January 1985)	
WO8 (Authorized Officer)	

10

20

30

40

International Application No: PCT/ /

MICROORGANISMS

Optional Sheet in connection with the microorganism referred to on page _____, line _____ of the description.

A. IDENTIFICATION OF DEPOSIT¹Further deposits are identified on an additional sheet (antibody) SDOW 17Name of depository institution²

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION

Address of depository institution (including postal code and country)³12301 Parklawn Drive
Rockville, Maryland 20852
United States of America

10

Date of deposit⁴

27 March 1992

Accession Number⁵

HB 10997

B. ADDITIONAL INDICATIONS⁶ (Leave blank if not applicable). This information is continued on a separate attached sheet

20

C. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE⁷ (If the indications are not for all designated States)**D. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS⁸** (Leave blank if not applicable)The indications listed below will be submitted to the International Bureau later⁹ (Specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")

30

E. This sheet was received with the international application when filed (to be checked by the receiving Office)

(Authorized Officer)

Virginia L. Shly The date of receipt (from the applicant) by the International Bureau¹⁰

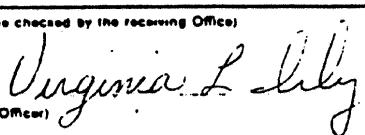
wos

(Authorized Officer)

40

(January 1985)

International Application No: PCT/ /

MICROORGANISMS	
Optional Sheet in connection with the microorganism referred to on page _____, line _____ of the description.	
A. IDENTIFICATION OF DEPOSIT:	
<input checked="" type="checkbox"/> Further deposits are identified on an additional sheet. (SIRS virus) BIAH-001	
Name of depositary institution *	
AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION	
Address of depositary institution (including postal code and country) *	
12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852 United States of America	
Date of deposit *	Accession Number *
18 July 1991	VR 2332
B. ADDITIONAL INDICATIONS: (Leave blank if not applicable). This information is continued on a separate attached sheet. []	
[Large empty box]	
C. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE: (If the indications are not for all designated States)	
[Large empty box]	
D. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS: (Leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later. (Specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit")	
[Large empty box]	
E. [X]: This sheet was received with the international application when filed (to be checked by the receiving Office)	
 (Authorized Officer)	
<input checked="" type="checkbox"/> The date of receipt (from the applicant) by the International Bureau is	
[Large empty box]	
wss (Authorized Officer)	

【図面の簡単な説明】

- 【図1】 図1は、SIRSウイルスVR-2332によって観察される細胞変性効果を示す。図1Aは、非感染未染色細胞単層である。図1Bは、小型顆粒状成熟変性細胞に感染した単層であり、該SIRSウイルスの6回目の継代を伴う接種3日後に観察された。
- 【図2】 図2は、SIRSウイルス感染MA-104細胞の直接免疫蛍光染色を示す。図2Aは、非感染細胞単層である。図2Bは、強度で、しばしば接種後3日後観察される顆粒

10

20

30

40

(January 1985)

50

状細胞質蛍光を有する感染細胞である。

【図3】 図3は、CsCl密度勾配にかけて精製したSIRSウイルスの密度勾配プロファイルである。ウイルスの感染力は1.18-1.19g/mlで最大になる。

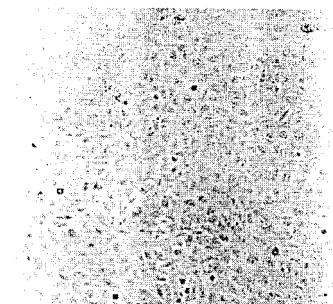
【図4】 図4は、密度1.18-1.19g/mlのCsCl勾配画分に観察されるウイルス粒子の電子顕微鏡写真を示す。図4 Aは、これら4粒子が直径60-65nmの球形であることを示す。2粒子は、「中空」であり、高電子密度核であることを示し(矢印)、残り2粒子は完全である。棒線の長さは100nmである。図4 Bは、ウサギ高度免疫血清および金粒子で標識化した抗ウサギIgGを用いたSIRSウイルスの免疫-金電子顕微鏡検査の結果を示す。このビリオン内に直径約25-30nmの核粒子が存在することに注目されたい。棒線の長さは、50nmである。

【図5】 図5は、SIRSウイルスの4(黒三角)、37(黒丸)、56(白丸)における温度安定性を示す。

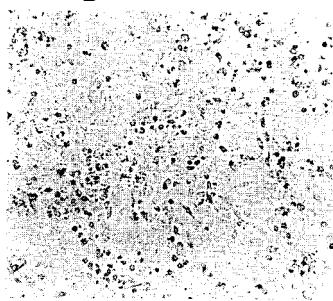
10

【図1】

A



B



【図2】

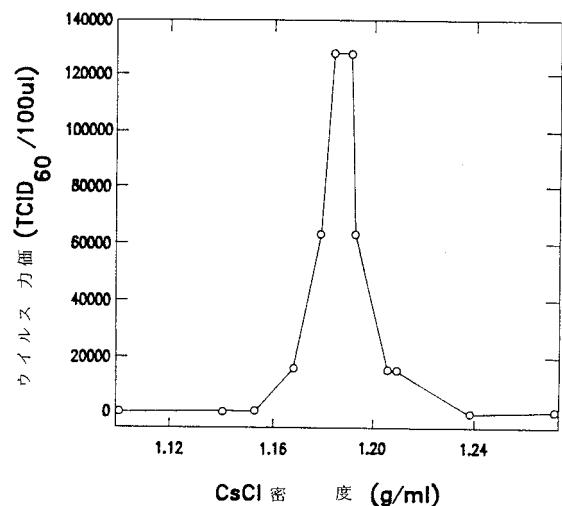
A



B



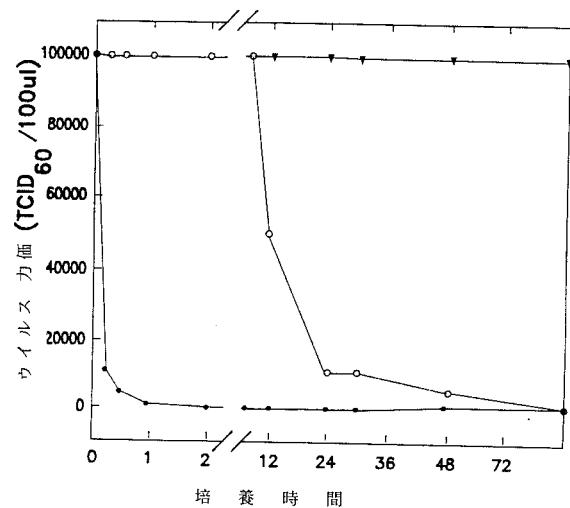
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I
A 6 1 P 1/00	A 6 1 P 1/00 1 7 1
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 11/00
A 6 1 P 37/04	A 6 1 P 37/04
C 0 7 K 16/08	C 0 7 K 16/08
C 1 2 N 5/06	C 1 2 N 7/04
C 1 2 N 7/04	C 1 2 P 21/08
C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 5/00 E

微生物の受託番号 ATCC VR-2332

早期審査対象出願

(73)特許権者 593142743

リージェンツ・オブ・ザ・ユニバーシティ・オブ・ミネソタ
Regents of the University of Minnesota
アメリカ合衆国 55455 ミネソタ州ミネアポリス、チャーチ・ストリート・サウス・イースト 1
00 番 モリル・ホール

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志

(72)発明者 コリンズ、ジェームズ・エドワード

アメリカ合衆国 55110 ミネソタ、ホワイト・ベア・レイク、リヴェリア・ドライブ・サウス 2658

(72)発明者 ベンフィールド、デイヴィド・アレン

アメリカ合衆国 57006 サウス・ダコタ、ブルッキングス、ツウェルフス・ストリート・サウス 1509

(72)発明者 クラデック、ダニー・ダブリュ

アメリカ合衆国 64505 ミズーリ、セント・ジョセフ、エヴァーグリーン・テラス 19

(72)発明者 ハリス、ルイス・エル

アメリカ合衆国 64505 ミズーリ、セント・ジョセフ、タングルウッド・ドライブ 402

(72)発明者 ゴーシカ、デイヴィド・イー

アメリカ合衆国 64506 ミズーリ、セント・ジョセフ、エレファント・トレインル 2408

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献 特開平7-138186 (JP, A)

Veterinary Quarterly, 1991年, Vol. 13, No. 3, p. 121 - 130

Veterinary Quarterly, 1991年, Vol. 13, No. 3, p. 131 - 136

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

C12N 7/00

C07K 16/08

C12N 15/00-15/90

BIOSIS/WPI(DIALOG)

专利名称(译)	SIRS疫苗和SIRS诊断方法		
公开(公告)号	JP3722794B2	公开(公告)日	2005-11-30
申请号	JP2002310716	申请日	2002-10-25
[标]申请(专利权)人(译)	勃林格英格豪斯公司 南达科他州立大学 明尼苏达大学		
申请(专利权)人(译)	勃林格Ingereimu-Vetomedika公司 南达科他州立大学 明尼苏达大学校董会		
当前申请(专利权)人(译)	勃林格Ingereimu-Vetomedika公司 南达科他州立大学 明尼苏达大学校董会		
[标]发明人	コリンズ・ジェームズ・エドワード ベンフィールド・デイヴィッド・アレン クラデック・ダニーダ・ブリュ ハリス・ルイス・エル ゴーシカ・デイヴィド・イー		
发明人	コリンズ、ジェームズ・エドワード ベンフィールド、デイヴィド・アレン クラデック、ダニー・ダブリュ ハリス、ルイス・エル ゴーシカ、デイヴィド・イー		
IPC分类号	G01N33/569 A61K35/16 A61K35/42 A61K38/00 A61K39/12 A61K39/23 A61K39/395 A61P1/00 A61P11/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P37/04 C07K16/08 C07K16/10 C12N5/06 C12N5/10 C12N7/00 C12N7/02 C12N7/04 C12N7/08 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/12 A61K2039/552 A61P1/00 A61P11/00 C07K16/10 C12N7/00 C12N2720/00011 C12N2720/00034 C12N2770/10011 C12N2770/10021 C12N2770/10034 Y10S435/975		
FI分类号	C12N7/00 A61K35/16 A61K35/42 A61K39/12 A61K39/395.S A61P1/00.171 A61P11/00 A61P37/04 C07K16/08 C12N7/04 C12P21/08 C12N5/00.E A61K35/74.A A61K39/23 C07K16/10 C12N5/00.202.J C12N5/078 C12N7/02 G01N33/569.L G01N33/577.B		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/DA04 4B065/AA95X 4B065/BA14 4B065/BA16 4B065/CA45 4C085/AA03 4C085/AA14 4C085/BA75 4C085/CC08 4C085/CC23 4C085/DD01 4C085/EE01 4C087/AA01 4C087/BB35 4C087/BB55 4C087/BC83 4C087/DA15 4C087/NA01 4C087/ZA59 4C087/ZA66 4C087/ZB09 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA01 4H045/DA76 4H045/EA31 4H045/FA72		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	07/749839 1991-08-26 US 07/760713 1991-09-16 US 07/860444 1992-03-30 US		
其他公开文献	JP2003252791A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

(经修改) 要解决的问题：提供SIRS疫苗和SIRS诊断方法。解决方案：用于治疗猪神秘疾病的疫苗和血清 (MSD , 最近称为“猪不满意呼吸功能不全综合征”SIRS) , 生产疫苗的方法 , 诊断MSD的方法 , 可以模拟MSD的病毒制剂 , 以及用于诊断和治疗MSD的病毒制剂的抗体。血清含有对MSD治疗有效的哺乳动物抗体。

Official Sheet in connection with this microorganism deposit is on back	
A. IDENTIFICATION OF DEPOSIT: Further details are furnished on an addendum sheet <input checked="" type="checkbox"/> (antibody) SDOW 12	
Name of depositary institution: AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION	
Address of depositary institution (including street and city): 12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852 United States of America	
Date of deposit: 27 March 1992	Accession Number: HB 10996
B. ADDITIONAL INDICATIONS: (Leave blank if not applicable. This information is contained on a separate sheet on back.)	
C. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE: (If the indications are not for all concerned States)	
D. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS: (Leave blank if not applicable) The indication listed below will be submitted to the International Bureau later. (Specify the general nature of the indications etc.) Accession Number of Deposit:	
E. <input checked="" type="checkbox"/> This sheet was received with the International application when filed or as checked by the receiving Office <i>Virginia L. Liley</i> (Authorized Officer)	