

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6201033号
(P6201033)

(45) 発行日 平成29年9月20日 (2017.9.20)

(24) 登録日 平成29年9月1日 (2017.9.1)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/12
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39
A 6 1 K 47/10 (2006.01)	A 6 1 K 47/10

請求項の数 12 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-505377 (P2016-505377)	(73) 特許権者	515266164
(86) (22) 出願日	平成26年2月3日 (2014.2.3)		オブティファーム カンパニー リミテッド
(65) 公表番号	特表2016-518118 (P2016-518118A)		ド
(43) 公表日	平成28年6月23日 (2016.6.23)		大韓民国 チュンチョンブクト 363-954
(86) 国際出願番号	PCT/KR2014/000897		チョンウォングン オソンウ オソンセンミョン6ロ 63
(87) 国際公開番号	W02014/148738	(74) 代理人	100100549
(87) 国際公開日	平成26年9月25日 (2014.9.25)		弁理士 川口 嘉之
審査請求日	平成27年11月24日 (2015.11.24)	(74) 代理人	100126505
(31) 優先権主張番号	10-2013-0029891		弁理士 佐貫 伸一
(32) 優先日	平成25年3月20日 (2013.3.20)	(74) 代理人	100131392
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		弁理士 丹羽 武司
微生物の受託番号	KCTC KCTC 12096BP	(74) 代理人	100151596
			弁理士 下田 俊明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規の韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルス(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus; PRRSV)(受託番号: KCTC 12096BP)。

【請求項2】

韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルス(受託番号: KCTC 12096BP)を有効成分として含むことを特徴とするワクチン組成物。

【請求項3】

前記ウイルスは、3回~120回の継代培養を通じて得られるウイルスであることを特徴とする請求項2に記載のワクチン組成物。

【請求項4】

前記ワクチン組成物は、アジュバント、賦形剤または担体をさらに含むことを特徴とする請求項2又は3に記載のワクチン組成物。

【請求項5】

前記ワクチン組成物は、保護剤をさらに含むことを特徴とする請求項2~4のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項6】

前記保護剤は、トレハロース(Trehalose)であることを特徴とする請求項5に記載のワクチン組成物。

10

20

【請求項 7】

請求項 2 ~ 6 のいずれか一項に記載のワクチン組成物を豚に投与する段階を含むことを特徴とする豚生殖器呼吸器症候群の予防方法。

【請求項 8】

前記ワクチン組成物を筋肉または鼻腔に接種することを特徴とする請求項 7 に記載の豚生殖器呼吸器症候群の予防方法。

【請求項 9】

前記ワクチン組成物は、 $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^7$ PFU/ml の韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルスを含むことを特徴とする請求項 7 又は 8 に記載の豚生殖器呼吸器症候群の予防方法。

10

【請求項 10】

韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルス(受託番号: KCTC 12096BP)またはその抗原を含むことを特徴とする韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルスの診断キット。

【請求項 11】

韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルス(受託番号: KCTC 12096BP)またはその抗原を利用した抗原 - 抗体反応を通じて感染されるまたは感染された細胞内で韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルス(受託番号: KCTC 12096BP)を検出することを特徴とする韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルスの検出方法。

【請求項 12】

前記抗原 - 抗体反応の分析は、組織免疫染色、放射能免疫分析法(RIA)、酵素免疫分析法(ELISA)、ウェスタンブロッティング(Western Blotting)、免疫沈降分析法(Immunoprecipitation Assay)、免疫拡散分析法(Immunodiffusion Assay)、補体結合分析法(Complement Fixation Assay)、FACS及びタンパク質チップ(protein chip)分析法からなる群より選択された1種以上の方法を利用して実行することを特徴とする請求項 11 に記載の韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルスの検出方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルス(porcine reproductive and respiratory syndrome virus; PRRSV)及びこれを利用したワクチン組成物、豚生殖器呼吸器症候群の予防方法に関する。

30

【背景技術】

【0002】

1987年アメリカの養豚地域を中心として原因不明の新しい豚疾病の発生が報告され始めた。繁殖障害と呼吸器感染が複合的に現われるこの疾病は、1988年と1989年の夏に爆発的に増加した。急に出現してアメリカ養豚業に莫大な被害を与えたこの疾病を、初期には豚ミステリー病と呼んだが、以後、原因ウイルスが分離されて臨床症状、病原性などに対する研究が進行されながら、繁殖障害と呼吸器感染が一緒に現われる臨床症状の特徴によって現在は国際的にPRRS(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome; 豚生殖器呼吸器症候群)と名付けている。

40

【0003】

韓国ではこの疾病と類似な症状の流行に関する報告はなかったが、1992年からこの疾病に対する研究を始めて、診断法を確立し、韓国内の養豚場に対する易学調査を実施して韓国内にも流入されたことを確認し、韓国内の感染農場で原因ウイルスを分離した。アジア地域では、韓国の外にも日本、台湾で発生の確認及び原因ウイルスの分離を報告した。

【0004】

発生報告の以後にも正確な原因が分からなくて養豚業界を一層混乱に落としたが、19

50

91年6月にオランダ中央獣医研究所のWensvoort博士が豚の肺胞大食細胞を利用して原因ウイルスを初めて分離した。このウイルスは、オランダ中央獣医研究所が位置した地名を取ってLelystadウイルスと命名され、以後、まもなくアメリカを含めた多くの国で原因ウイルスを分離した。性状と病原性などを調査した結果、その間アメリカとヨーロッパで繁殖障害と呼吸器感染を複合的に起こした新しい豚疾病がこのウイルスによることで判明された。

【0005】

ヨーロッパでは、Lelystadウイルス、アメリカでは、SIRSウイルスとよく呼ぶPRRSウイルスは、外膜を有し、直径45～80nmの小さい球形ウイルスとして、表面には小さい突起が出ている。遺伝子が入っている部位は、直径25～35nmで短鎖RNA遺伝子が位置している。外部環境にはあまり強くなって酸度5以下または7以上でウイルス感染力価が90%以上減少し、37℃で10～24時間、20℃では6日程度経過すれば、感染力価が10倍以上減少する。このウイルスに感染された場合、病気を起こす程度は非常に多様で、単純に血清検査によってのみ感染が分かる程度に、臨床症状及び経済的損失が全然ない場合から農場の生産に20%程度の損失を加える程度にひどい場合まである。

【0006】

病名からも分かるように、繁殖障害と呼吸器疾患が複合的に現われる。PRRSウイルス感染による繁殖障害の特徴は、主に妊娠107日から113日の間に集中された妊娠末期遺産または早産胎児分娩、死産及びミイラ子豚の発生、子豚の離乳前斃死率の急増、離乳後斃死率の増加、発情回帰の遅延などであり、この症状は、感染された母豚とその母豚から生まれた子豚に集中的に現われる。PRRSウイルス感染による繁殖障害は、大部分感染初期から6ヶ月程度が経過すれば、感染以前状態に回復することで知られている。PRRSウイルス感染による呼吸器疾患は、全日齢で現われ、特に哺乳子豚と離乳子豚で集中的に現われる。この場合、はやい腹式呼吸が観察され、眼瞼浮腫、結膜炎、くしゃみ、下痢などが観察され、短い期間の体温上昇がある場合もあり、珍しくは神経症状を示す場合もある。呼吸器疾患の特徴は、PRRSウイルス単独感染の場合よりは細菌性、ウイルス性病原体の2次感染及び複合感染が多く、その場合、病原性が一層増幅される。その他に、耳、腹部、外陰部などに青色斑点ができる場合もあって、イギリスでは青耳病(Blue ear disease)とも呼ばれている。

【0007】

以上の臨床症状は、急性でひどく進行される場合に明らかに観察することができ、準臨床型感染や慢性的に進行される場合には、明らかで特徴的な臨床症状をほとんど観察することができない。慢性的感染は、離乳子豚と育成肥肉段階で主に行われ、PRRSウイルスの攻撃を受けた呼吸器系に細菌及びウイルスが感染されて鼻炎と肺炎を起こす。結果的に、一日平均増大量が低下し、飼料要求率はさらに増加するようになり、離乳後の斃死率がPRRSウイルス感染前の平均斃死率より2倍ほど高くなる。PRRSウイルスによる呼吸器疾患を病んだ肺は、病理学的に特徴的な癩癩性肺炎所見を示す。

【0008】

PRRSウイルスは、現在、ヨーロッパで最初に分離されたLelystadウイルス(Wensvoort et al., 1991)と北アメリカで分離されたVR-2332[0004]ウイルス(Benfield et al., 1992)が、各々ヨーロッパ株(European strain)と北アメリカ株(North American strain)の原型(prototype)に分類されており、これらの間には塩基配列相同性が約55～70%程度で非常に低い(Gagnon and Dea, 1998; Kwang et al., 1994; Murtaugh et al., 1995)。PRRSウイルスは、現在、ウマ動脈炎ウイルス(equine arteritis virus; EAV)、乳酸脱水素酵素上昇ウイルス(lactate dehydrogenase-elevating virus; LDV)、サル出血熱ウイルス(simian hemorrhagic fever virus; SHFV)と共にニドウイルス目(order Nidovirales)

10

20

30

40

50

les)、アルテリウイルス科(family Arteriviridae)に属する(Cavanagh, 1997)。PRRSウイルスは、リン脂質を有した非常に小さいエンベローブウイルス(enveloped virus)であり、正多面体形態のヌクレオカプシド内に約15kb程度のプラス極性の一本鎖のRNAゲノムを有している(Collins et al., 1992)。ウイルスの自己複製に必要な酵素で構成された比構造タンパク質であるレプリカーゼ(replicase)をエンコードする遺伝子は、ゲノムRNAの5'-末端で約80%を占めて、ゲノムRNAから発現される互いに重畳される部位を有したORF1aとORF1bにより作られる。この中でORF1bは、ribosomal frameshiftメカニズムによって発現されると報告されたことがある(Brierley et al., 1989)。ウイルスの構造タンパク質は、ゲノムRNAの3'-末端で約20%を占めて、ORF2a、ORF2bからORF7の7個の遺伝子から発現される。ORF2、ORF3及びORF4は、各々GP2、GP3及びGPである糖化された膜タンパク質を生成し、ORF5は、PRRSウイルスの中和力に一番重要な役目をする糖タンパク質のGP5エンベローブタンパク質、ORF6は、M(matrix)、そして、ORF7は、N(nucleocapsid)を生成する(Meulenberg et al., 1995; Bastos et al., 2004)。これらは感染された細胞内でmonocistronic subgenomic mRNAの5'-末端から発現される(Meulenberg et al., 1993; Snyder et al., 1999)。PRRSウイルスの構造タンパク質だけではなく比構造タンパク質を含んだ大部分のタンパク質に対する機能及び分子生物学的特性に関する研究結果は、まだ些細な状態である。PRRSウイルスが豚に感染されると、臨床的な症状としてひどい繁殖障害と呼吸器障害が現われる。PRRSウイルスの北アメリカ株とヨーロッパ株は、疾病症状において明らかに差を証明することができないという事実にもかかわらず、それらは抗原的でも遺伝形的でも明らかな差を有している(Allende et al., 1999; Halbur et al., 1995; Wootton et al., 1998)。また、北アメリカ株とヨーロッパ株内でも分離株の間に差を示す。例えば、北アメリカ株に属する多くの分離株の間の塩基配列の変異は、RNA重合酵素またはRNA組換えの本質的なエラーに起因することができ、これらの遺伝学的変異は、ウイルスの病原性に重要な差を示すことができると報告されたことがある(Andreyev et al., 1997; Halbur et al., 1996; Ward et al., 1988)。

【0009】

しかし、今まで韓国型PRRSVを分離して韓国内の変異株に適合なワクチン及びこれを利用した韓国型PRRSVの予防法が実用化されなくて韓国型に一番適合なワクチンに関する研究が必要になっている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明者らは、韓国内の豚から豚生殖器呼吸器症候群ウイルス(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus; 以下、PRRSV)を分離して研究するうち、分離されたウイルスが新しい韓国型PRRSVであることを確認し、本発明を完成した。

【0011】

本発明の目的は、新しい韓国型PRRSV、これを利用したワクチン組成物及び豚生殖器呼吸器症候群の予防方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0012】

前記のような目的を達成するために本発明は、韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルス(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus; PRRSV)(受託番号: KCTC 12096BP)を提供する。

【0013】

また、本発明は、韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルス(受託番号：KCTC 12096BP)を有効成分として含むワクチン組成物を提供する。

【0014】

また、本発明は、前記ウイルスワクチン組成物を豚に投与する段階を含む豚生殖器呼吸器症候群の予防方法を提供する。

【0015】

また、本発明は、韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルス(受託番号：KCTC 12096BP)またはその抗原を含む韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルスの診断キットを提供する。

【0016】

また、本発明は、韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルス(受託番号：KCTC 12096BP)またはその抗原を利用した抗原-抗体反応を通じて感染されるまたは感染された細胞内で韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルス(受託番号：KCTC 12096BP)を検出することを特徴とする韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルスの検出方法を提供する。

【発明の効果】

【0017】

本発明による受託番号KCTC 12096BPの韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルスは、北アメリカ型及びヨーロッパ型と区別される韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルスとして、韓国型豚生殖器呼吸器症候群に特異的なワクチン組成物を生産して韓国型豚生殖器呼吸器症候群を予防するか韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルスの感染可否を特異的に診断することができる。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】無菌豚から分離された豚の肺大食細胞を示した図である(2×10^8 cells/ml)。

【図2】豚の肺大食細胞に豚生殖器呼吸器症候群ウイルス(以下、PRRSV)を接種した後、間接免疫蛍光染色法を通じてウイルスの感染可否を判断した結果を示した図である。

【図3】韓国型PRRSV(JW-PRRSV)のORF5の塩基配列分析結果を利用した系統分析図である。

【図4】分離された韓国型PRRSV(JW-PRRSV)の接種後(継代5、継代91)の抗体価を測定した結果を示した図である。

【図5】韓国型PRRSV(JW-PRRSV)の接種後(継代3、継代120)の血液内の抗体価を測定した結果を示した図である。

【図6】韓国型PRRSV(JW-PRRSV)の接種後(継代3、継代120)の個体の血液内白血球とリンパ球の数値を測定した結果を示した図である。

【図7】韓国型PRRSV(JW-PRRSV)の接種後(継代3、継代120)の個体の臨床症状を分析した結果を示した図である。

【図8】韓国型PRRSV(JW-PRRSV)の接種後(継代3、継代120)のウイルス排出を、PCRを通じて確認した結果を示した図である(Aグループ：MLV常用ワクチン接種群、Bグループ：継代3 JW-PRRSV接種群、Cグループ：継代120 JW-PRRSV接種群、Dグループ：陽性対照群、Eグループ：陰性対照群)。

【発明を実施するための形態】

【0019】

本発明は、韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルス(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus; PRRSV)(受託番号：KCTC 12096BP)を提供する。

【0020】

前記韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルス(以下；JW-PRRSV)(受託番号：KCTC 12096BP)は、野外農場から分離されたウイルスであり、サル腎臓細胞であるMARC-145細胞または豚から直接分離培養した豚肺大食細胞(Porcine al

10

20

30

40

50

veolar macrophage ; PAM)で増殖が可能であるが、これに限定されず、本ウイルスが増殖可能な細胞または培地で増殖することができる。

【0021】

また、本発明は、JW - PRRSV(受託番号：KCTC 12096BP)を有効成分として含むワクチン組成物を提供する。

【0022】

前記ワクチン組成物は、JW - PRRSVを3回～120回継代培養して得られるJW - PRRSVを含むことができ、継代培養の回数は本ウイルスの活性を維持することができるが、好ましくは、3回、5回、91回、120回の継代培養を通じて得られるJW - PRRSVを有効成分として含むことができる。

10

【0023】

本発明による韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルス(JW - PRRSV)は、抗体価形成、臨床症状の分析結果、常用ワクチンであるMLVワクチンと同一な程度のウイルス防御能を誘導することができるので、効果的に豚生殖器呼吸器症候群ウイルスに対する新しいワクチン候補物質になることができる。また、本発明の韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルス(JW - PRRSV)は、接種時に個体内で炎症反応を誘導しないで、注射部位の化膿壊死、発熱などの副作用がない安全性を示し、既存のPRRSVワクチンと比較してウイルス排出時間が短縮されることで、既存ワクチンの問題点を改善する効果があって新しい韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルスのワクチン用組成物で有用に利用されることができる。

20

【0024】

前記「ワクチン」は、抗原物質を含む獣医学用ワクチンとして、豚生殖器呼吸器症候群に対して特異的で能動または受動の免疫性を誘導するための目的で投与される。

【0025】

前記ワクチン組成物を構成するにおいて、有効成分であるJW - PRRSV(受託番号：KCTC 12096BP)の外にもワクチン組成物を構成するにおいて適切な一つ以上のアジュバントまたは賦形剤または担体を含むことができる。

【0026】

免疫反応を増進させる追加の成分は、よくアジュバントと呼ばれる構成物、例えば、水酸化アルミニウム、鉱油または他のオイルまたはワクチンに添加されるか、このような追加成分により各々の誘導後に身体で発生する補助分子、例えば、制限されるものではないが、インターフェロン、インターロイキンまたは成長因子であることができる。

30

【0027】

本発明で使用されるアジュバントは、注射した動物の免疫反応を増大させる物質を含む。多数の相異なっているアジュバントが当分野において知られている。本発明の明細書で使用されるアジュバントは、フロイント完全及び不完全アジュバント、ビタミンE、非イオン性ブロックポリマー、ムラミールジペプチド、Quil A、鉱油及び無鉱物油及びカーボポール(CarboPol)を含むことができる。好ましい一例で、本発明のワクチンは、油中水型乳剤アジュバントを含むことができる。

【0028】

ワクチンに適切な担体は、技術分野の当業者において公知であり、タンパク質、砂糖などを含むが、これに限定されるものではない。前記担体は、水溶液または非水溶液、懸濁液及びエマルジョンであることができる。非水溶液担体の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、食用油、例えば、オリーブオイル、及び注射可能な有機エステル、例えば、エチルオレートを挙げることができる。水溶液担体は、食塩水及び緩衝媒体を含んだ水、アルコール/水溶液、エマルジョンまたは懸濁液を含む。非経口担体は、塩化ナトリウム溶液、リンガーデキストロース、デキストロース及び塩化ナトリウム、乳酸処理リンガーまたは固定オイルを含む。静脈注射用担体は、例えば、リンガーデキストロースを基本とするもののような電解質補充剤、液体及び栄養補充剤などを含む。防腐剤及びその他添加剤、例えば、抗微生物製剤、抗酸化剤、キレート剤、不活性ガスなどのよ

40

50

うなものが追加で存在することができる。好ましい防腐剤は、ホルマリン、チメロサル、ネオマイシン、ポリミキシンB及びアンホテリシンBを含む。

【0029】

また、本発明によるワクチンは、一つ以上の適切な乳化剤、例えば、スパン(Span)またはツイン(Tween)を含むことができる。

【0030】

また、本発明のワクチン組成物は、保護剤を含むことができ、当業界において公知の保護剤を制限なしに使用することができる。好ましくは、ラクトース(Lactose; LPGA)またはトレハロース(Threhalose; TPGA)であることができ、より好ましくは、トレハロースを利用することができる。

10

【0031】

また、本発明は、JW-PRRSVを利用した豚生殖器呼吸器症候群の予防方法を提供し、これは、JW-PRRSVワクチン組成物を豚に投与して行われる。

【0032】

豚にワクチン組成物を投与する方法は、一般的なワクチン投与方法によって実行することができる、これに限定されるものではないが、臓内または非経口経路、経口、鼻腔内、静脈内、筋肉内、皮下、皮内または他の適切な経路を通じた投与を実行することができる。好ましくは、筋肉または鼻腔を通じて接種することができる。

【0033】

前記ワクチン組成物には、 $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^7$ PFU/mlの韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルスが含まれることが好ましい。

20

【0034】

また、本発明は、韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルス(受託番号:KCTC 12096BP)またはその抗原を含む韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルスの診断キットを提供する。

【0035】

前記診断キットは、当業界において通常的に使用される方法を利用して製造されること

【0036】

このような診断キットには、韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルス(受託番号:KCTC 12096BP)だけではなく免疫学的分析に使用される当分野において一般的に使用される道具、試薬などが含まれる。このような道具/試薬としては、適切な担体、検出可能な信号を生成することができる標識物質、溶解剤、洗浄剤、緩衝剤、安定化剤などが含まれるが、これに限定されない。標識物質が酵素の場合には、酵素活性を測定することができる気質及び反応停止剤を含むことができる。適した担体としては、これに限定されないが、可溶性担体、例えば、当分野において公知の生理学的に許容される緩衝液、例えば、PBS、不溶性担体、例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリアクリロニトリル、フッ素樹脂、架橋デキストラン、ポリサッカライド、ラテックスに金属をメッキした磁性微粒子のような高分子、その他紙、ガラス、金属、アガロース及びこれらの組み合わせであることができる。

30

40

【0037】

また、本発明は、韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルス(受託番号:KCTC 12096BP)またはその抗原を利用した抗原-抗体反応を通じて感染されるまたは感染された細胞内で韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルス(受託番号:KCTC 12096BP)を検出することを特徴とする韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルスの検出方法を提供する。

【0038】

抗原-抗体反応は、組織免疫染色、放射能免疫分析法(RIA)、酵素免疫分析法(ELISA)、ウェスタンブロッティング(Western Blotting)、免疫沈降分析法(Immunoprecipitation Assay)、免疫拡散分析法(Immunodiffusion Assay)、補体結合分析法(Complement Fixat

50

ion Assay)、FACS、タンパク質チップ(protein chip)などを利用して分析することができ、これに限定されない。

【実施例】

【0039】

以下、本発明を実施例によって詳しく説明する。しかし、下記実施例は本発明を例示することに過ぎず、本発明の内容が下記実施例によって限定されるものではない。

【0040】

実施例1．韓国型豚生殖器呼吸器症候群ウイルスの分離

1.1 肺大食細胞(porcine alveolar macrophage；以下、PAM)の分離

分離するウイルスを増殖させるためのPAM細胞の分離に使用する豚は、4～8週の無菌豚として、当社のSPF飼育環境で飼育した(Optifarm-Medipig)個体を使用した。豚を麻酔させた後、肺気管支を含む肺組織全体を傷がつかないように注意して分離した。肺気管支の内方へ挿入管を連結し、あらかじめ用意したリン酸緩衝溶液(pH7.2)を、気管支を通じて肺組織内方へ注入した。肺組織の膨脹が確認されると、挿入管を傾けて肺組織内のリン酸緩衝溶液を収集し、収集されたリン酸緩衝溶液を遠心分離して細胞を沈澱させて、あらかじめ用意した10%ウシ胎仔血清(fetal bovine serum)、非必須アミノ酸(nonessential amino acid)及びペニシリン/ストレプトマイシンが添加された培地に懸濁した。細胞懸濁液を培養容器に入れて、37℃、5%のCO₂濃度で培養した。1次分離した肺大食細胞は、総2×10⁸ cells/mlであり、-80℃に保管した。培養された豚肺大食細胞の模様を図1に示した。

【0041】

1.2 PRRSVの分離及びPRRSVのPAM感染の確認

本実験に使用されたウイルスは、JW農場飼育豚のうち病的症状を示す感染豚から分離した豚生殖器呼吸器症候群ウイルス(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome；以下、PRRSV)を使用した。感染疑い豚から血液、肺、リンパ、扁桃の組織を粉碎してリン酸緩衝溶液に懸濁し、PCR技法でウイルス陽性と判定されたサンプルからウイルス分離実験を進行した。

【0042】

前記実施例1.1で分離されたPAMをT-25フラスコに2×10⁶ cells/mlで株分けし、細胞付着を確認した後、PCRを通じて陽性と判定された試料の血液、肺、リンパ、扁桃などのサンプルを各々10～100μlで接種した。以後、細胞変性効果(Cytopathic effect；CPE)が現われると、収穫して-80℃に保管した。収穫されたウイルスをPAM細胞が存在するT-25フラスコに100μlずつ接種し、間接免疫蛍光染色法(immunofluorescence assay；IFA)でウイルスを確認し、ブラインド継代培養を持続的に進行した。より具体的には、PRRSVが感染されたことで確認された細胞を、4%パラホルムアルデヒド固定液を使用して5分間固定した後、緩衝溶液を使用して10分間3回洗浄した。以後、抗体の非特異結合を防止するために、2%BSA溶液で1時間の間処理した後、5分間3回洗浄した。1次抗体として、mouse anti-PRRSV Mab 4A5(JBT Cat#9041)を使用し、2次抗体としては、goat anti-mouse IgG FITC(Santacruz)を使用した。

【0043】

その結果を図2に示した。

【0044】

図2に示したように、分離されたPAMにウイルスを接種した後、96時間が経つと、PAM細胞内で蛍光を確認することができた。これを通じて、PAM細胞にPRRSVが効果的に感染されたことを確認した。

【0045】

1.3 プラーク分離方法を通じたウイルスクローンの分離

PAM細胞を 3×10^5 cells/ウェル濃度で6-ウェルプレートに接種後に12時間が経過した後、分離されたPRRSVをMOI = 1から始めて10倍に希釈し、各々のウェルに接種した。1時間の間培養した後、培地を除去し、ウイルスの感染が行われた細胞層上に0.5%アガロースと10%ウシ胎仔血清が入っているDMEM培地を覆って、37、5%のCO₂で培養した。約72時間が経過した後、プラークの形成を目視で確認し、各々のプラークを独立的に分離精製してPRRSVクローンを分離した。

【0046】

実施例2. PRRSV遺伝子分析を通じたJW-PRRSV(KCTC 12096BP)の分離

10

2.1 PRRSV遺伝子の増幅

分離されたPRRSVのORF5部分の遺伝子情報から系統分析してウイルスを分類した。PRRSV培養液150LからViral RNA Extraction kit (Intron, Korea)を利用して製造社の使い方によってPRRSVのゲノムRNAを抽出した。各々の遺伝子分節に相応するバイラルcDNAを合成するためにRT-PCRを進行した。抽出したRNA10μlに10pmol ORF5の逆方向プライマー2μlを入れて、80で3分間加熱した後また冷却し、RNA阻害剤(Promega, U.S.A)1μl、5x RT緩衝液(50mM Tris-HCl (pH 8.3)、75mM KCl、3mM MgCl₂、10mM DTT)、10mM dNTP (Promega, U.S.A)2μl、M-MLV逆転写酵素(Promega, U.S.A)1μlを入れて、37で1時間30分間増幅させた。合成されたcDNAを鋳型としてPCRを進行した。PCRは、premixチューブ(Intron)に滅菌蒸溜水16μl、cDNA2μl、プライマー1μlを入れて、94で5分、94で20秒の変性、60で30秒のアニール、72で45秒の伸張の過程で構成された一連の反応を一サイクルとして34回繰り返し実行し、最後に、72で5分間インキュベートした。実験に使用したプライマーは、ORF5遺伝子の塩基配列分析のために既に塩基配列が報告されたVR2332 (U.S. strain, Genbank accession number. U87382)を参考にし、正方向プライマー(CCA TTC TGT TGG CAA TTT GA)、逆方向プライマー(CAC CTT TAG GGC ATA TAT CAT)を使用した。

20

【0047】

2.2 分離されたPRRSVの系統分析

PCR産物を1%アガロースゲルに電気泳動した後、gel extraction kit (Macherey-Nagel, Germany)で純粋分離し、これらPCR産物をpGEM-TプラスミドベクターのlacZ遺伝子のマルチクローニング部位に連結し、E. coli DH5 competent cellを宿主細胞として各々の遺伝子をクローニングした。より具体的には、-70に保管中のE. coli DH5を氷でといた後、連結されたプラスミドDNAがあるチューブに50~70μl注入した。氷上で20分間放置した後、42で90秒間熱衝撃を加えて、更に氷上に3分間放置した。チューブにLB (Luria-Bertani)培地1mlを入れて、37の培養器で1時間の間培養した後、アンピシリン(300mg/ml)、X-gal、IPTGなどが含有されたLB寒天培地に均一に株分けし、37でひと晩の間培養した。培養後、白いコロニーを選択して塩基配列分析のためのプラスミドDNA抽出に使用した。選択された白いコロニーをアンピシリンが含有されたLBアガープレート5mlに1個ずつ入れて、37の培養器でひと晩の間培養した後、3000rpmで10分間遠心分離した。遠心分離した後、QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen, U.S.A.)を使用してプラスミドDNAを抽出した。精製されたプラスミドDNAの遺伝子情報をWorkbench Version 4 (CLC Bio, Aarhus, Denmark)ソフトウェアで分析して系統分析図を作って、ウイルス原種のヌクレオチド配列と継代培養した配列を比較して遺伝的変異を分析した。

40

【0048】

50

その結果を図3に示した。

【0049】

図3に示したように、分離したPRRSVは、北アメリカ型とは18%のヌクレオチドが相異なっている新しい韓国型PRRSVであることで確認した。新しい韓国型PRRSVは、JW-PRRSVと名付け、2011年12月2日にKCTC 12096BPで寄託した。

【0050】

実施例3. 韓国型PRRSV(以下; JW-PRRSV)を利用した開発ワクチンの免疫原性の確認(継代5、継代91)

3.1 JW-PRRSV接種後の臨床測定

新しく分離したJW-PRRSVをワクチンとして開発するために、継代5及び継代91のJW-PRRSVを豚に接種した後、その効果を観察した。より具体的には、PRRSV陰性であり、SPF(Specific-Pathogen-Free)の初乳未摂取(Colostrum-Derived)豚12匹を対象として、継代5JW-PRRSV、継代91JW-PRRSV、MLVワクチン(常用生ワクチン)、陰性対照区を含んで総4個のグループを構成して免疫原性を確認した(表1)。

【0051】

【表1】

表1

CD-pig 個体番号	内容
B09-011	継代5 JW-PRRSV 2ml 接種群
B09-012	
B09-013	
H10-002	継代91 JW-PRRSV 2ml 接種群
H10-004	
B09-014	
B09-008	MLVワクチン接種群
B09-009	
B09-010	
H10-005	陰性対照 (Negative control)
H10-006	
H10-007	

【0052】

各グループ別にウイルス 1×10^5 PFU/mlで2mlずつ接種し、接種した後、1日、3日、6日、10日、15日、21日、28日、35日目に体温/運動性/飼料摂取量などの臨床症状を観察した。接種後37日目に原腫毒JW野外ウイルスを 1×10^4 PFU/mlで攻撃接種し、上と同一な項目に対してモニタリングを実施した。より具体的には、体温及び運動性は、実験期間中で一日2回にわたって同一な時間に測定し、運動性は、個体観察を通じて0点~4点まで0.5点の間隔差で点数を付与する方式でモニタリングした(0点:運動性なし、1点:運動性弱い、2点:運動性普通、3点:運動性良好、4点:運動性非常に良好)。また、飼料摂取量は、体重による制限給餌を実施し、10分以内に全量摂取時に非常に良好(4点)で判断し、飼料を全量摂取する時間によって、0点~4点まで0.5点の間隔差で点数を付与した。前記のような方式の点数合算を通じて総合的な運動性と飼料摂取量を評価した。

【0053】

その結果を表2に示した。

【0054】

【表 2】

表 2

実験群	運動性	飼料摂取量
継代 5 JW-PRRSV 接種群	実験終了時まで飼料摂取及び運動性が良好な状態で管理される	
継代 9 1 JW-PRRSV 接種群	実験終了時まで飼料摂取及び運動性が良好な状態で管理される	
MLV 接種群	実験終了時まで飼料摂取及び運動性が良好な状態で管理される	
対照群	<p>攻撃接種当日：接種 10～15 分経過 H10-005 個体は嘔吐及び飼料摂取力が減少。H10-006 個体は運動性減少(接種後の飼料給与時に摂取意欲はないが、給与飼料は全量摂取)</p> <p>攻撃接種 1 日目：飼料摂取及び運動性良好。接種後 15 時間経過時の体温は、接種当日対比 1.6 度上昇。接種 24 時間経過時 0.96 度上昇。</p> <p>攻撃接種 2 日目：飼料摂取及び運動性良好</p>	

10

【0055】

表 2 に示したように、該当点数を解釈した結果、継代 5 JW-PRRSV、継代 9 1 JW-PRRSV 及び MLV 接種群は、実験終了時まで飼料摂取及び運動性がいずれも良好であった。したがって、継代 5 JW-PRRSV、継代 9 1 JW-PRRSV がいずれも市販される MLV ワクチンと同一な程度のウイルス防御能を誘導することを確認した。

20

【0056】

3.2 韓国型 PRRSV (JW-PRRSV) 接種後の抗体価の測定

JW-PRRSV のワクチン効果の評価のために、前記実施例 3.1 と同一な条件でウイルスを接種した後、抗体価の測定を実行した。接種後 37 日目に原腫毒 JW 野外ウイルスを 1×10^4 PFU/ml で攻撃接種し、実施例 3.1 と同一な項目に対してモニタリングを実施した。攻撃接種 14 日後、全個体に対して剖検を実施し、肺、リンパ、扁桃、脾臓、肝、脳、腎臓に対して定量 PCR を進行した。ワクチンウイルスが野外ウイルスに対する防御能を誘導するためには、一次で血清検査で抗体が陽性で判定される必要があり、またウイルス中和能力を有しなければならない。接種動物において抗体価が陽性に転換されたか否かを ELISA (Herd Check: PRRS 2XR ELISA kit (IDEXX laboratories, Westbrook, ME, USA)) 方法で測定した。PRRSV 抗体有無は、S/P 割合で示し、S/P 割合が 0.4 以上である時に陽性で判定した。

30

【0057】

その結果を表 3 及び図 4 に示した。

【0058】

【表 3】

表 3

個 体 区 分	P R R S S / P 割 合										
	0DPI 3/16	1DPI 3/17	3DPI 3/19	6DPI 3/22	10DPI 3/26	15DPI 3/31	21DPI 4/6	28DPI 4/13	35DPI 4/20	攻 撃 接 種 ⁷ 4/29	攻 撃 接 種 ⁴ 5/6
B09-011	-0.02	-0.01	-0.02	0.43	2.37	2.46	2.87	2.27	2.37	1.63	1.05
B09-012	-0.07	-0.09	-0.05	0.25	0.88	0.20	0.33	0.35	0.51	0.55	0.06
B09-013	-0.07	-0.09	-0.05	0.14	1.59	1.32	1.23	0.79	0.67	0.69	0.13
継代5 JW-PR RSV平 均	-0.05	-0.06	-0.04	0.27	1.62	1.33	1.48	1.14	1.18	0.96	0.41
H10-002	0.01	-0.03	0.00	0.00	0.05	0.27	2.34	2.82	2.29	2.17	1.86
H10-004	0.00	-0.02	-0.02	-0.07	0.09	0.66	0.99	1.72	2.16	2.27	0.62
B09-014	-0.01	-0.02	-0.01	-0.06	0.67	0.44	0.51	0.66	0.70	0.65	1.78
継代9 1JW-P RRSV 平均	0.00	-0.02	-0.01	-0.04	0.27	0.46	1.28	1.73	1.72	1.70	1.42
B09-008	0.02	-0.02	-0.04	-0.07	0.75	1.52	1.72	1.50	1.56	2.14	1.76
B09-009	-0.06	-0.09	-0.07	-0.09	1.02	1.34	1.52	1.39	1.35	2.04	1.59
B09-010	-0.04	-0.04	-0.06	-0.05	1.10	1.13	1.55	1.28	1.00	0.97	0.78
MLV 平均	-0.03	-0.05	-0.06	-0.07	0.96	1.33	1.60	1.39	1.30	1.72	1.38
H10-005	-0.02	-0.04	-0.02	-0.04	-0.08	-0.07	-0.08	-0.06	-0.03	0.43	1.43
H10-006	-0.03	-0.03	-0.04	-0.05	-0.06	-0.09	-0.03	-0.04	0.00	1.03	1.47
H10-007	-0.11	-0.09	-0.08	-0.07	-0.10	-0.07	-0.06	-0.05	-0.02	0.86	1.27
N/C 平均	-0.05	-0.05	-0.05	-0.05	-0.08	-0.08	-0.06	-0.05	-0.02	0.77	1.39

【 0 0 5 9 】

表 3 及び図 4 に示したように、接種後 10 日目から対照群を除いた継代 5 JW - P R R S V、継代 9 1 JW - P R R S V 及び M L V 接種群の実験群で抗体価の上昇が現われた。接種後 35 日目には、全ての実験群で抗体価が陽性に転換されたことを確認することができた。

【 0 0 6 0 】

3.3 JW - P R R S V によるウイルス力価の測定

JW - P R R S V のワクチン効果の評価のために、前記実施例 3.1 と同一な条件でウイルスを接種した後、血液及び剖検後の組織内の P R R S V 力価を測定した。接種後 37 日目に原腫毒 JW 野外ウイルスを 1×10^4 P F U / m l で攻撃接種し、実施例 3.1 と同一な項目に対してモニタリングを実施した。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 1 】

その結果を表 4 に示した。

【 0 0 6 2 】

【表 4】

表 4

接種 ウイ ルス	個体	NA ORF7 Log TCID50/ml									
		0DPI	1DPI	3DPI	6DPI	10DPI	15DPI	21DP	28DPI	35DPI	攻撃 接種 7DPI
P5	B09-011	N.D	2.627	2.812	3.265	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	B09-012	N.D	2.762	3.331	3.417	1.394	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	B09-013	N.D	2.414	3.166	2.338	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
P91	B09-014	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	H10-002	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	H10-004	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
MLV	B09-008	N.D	N.D	N.D	0.612	0.412	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	B09-009	N.D	N.D	N.D	0.677	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	B09-010	N.D	N.D	N.D	0.606	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
N/C	H10-005	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	2.794
	H10-006	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	3.213
	H10-007	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	3.22

10

20

30

【 0 0 6 3 】

表 4 に示したように、継代 5 JW - PRRSV 接種群では、10 日目まで血液内でウイルスが検出される個体があり、継代 9 1 JW - PRRSV 接種群では、接種後、攻撃接種後に全て血液内でウイルスが検出されなかった。常用生ワクチン MLV では、接種後 6 日目に多少のウイルスが検出されたが、攻撃接種後には検出されなかった。陰性対照群では、攻撃接種 7 日目に相当量のウイルスが血液内で検出された。

【 0 0 6 4 】

実施例 4 . 韓国型 PRRSV (JW - PRRSV) を利用した開発ワクチンの安全性及び免疫原性の確認 (継代 3 、 継代 1 2 0)

40

PRRSV が陰性であり、SPF (Specific - Pathogen - Free) である初乳未摂取 (Colostrum - Derived) の豚 2 0 匹を対象として、MLV ワクチン (常用生ワクチン ; G - A) 、継代 3 JW - PRRSV (G - B) 、継代 1 2 0 JW - PRRSV (G - C) 、陰性対照群 1 (攻撃接種に対する陰性対象群 ; G - D) 、陰性対照群 2 (全体実験対比陰性対照群 ; G - E) を含んで総 5 個のグループを構成した。各グループ別にウイルス 1×10^5 PFU/ml で 2 ml ずつ接種し、接種後 7 日、14 日、21 日、28 日、35 日目に体温/運動性/飼料摂取量などの臨床症状を観察し、各々採血して血液内のウイルス力価と抗体価を測定し、血球分析、臨床症状分析を進行した。そして、42 日目に原腫毒 JW 野外ウイルスを 1×10^4 PFU/ml で攻撃接種し、上と同一な項目

50

に対してモニタリングを実施した。ワクチンウイルスが野外ウイルスに対する防御能が生ずるためには、一次で血清検査で抗体が陽性で判定される必要があり、またウイルス中和能力を有しなければならない。接種動物において抗体価が陽性に転換されたか否かは、ELISA(HerdChek: PRRS 2XR ELISA kit (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA))方法で測定し、中和抗体価が誘導されたか否かは、VN(Virus neutralization)テストを利用して測定した。

【0065】

4.1 RT-PCR技法で血液内ウイルスの力価測定

PRRSVの量を測定するために、既に塩基配列が報告されたVR2332(US strain, Genbank accession number, U87382)を参考してプライマー(ORF7)を製作した(正方向プライマーATG ATG RGC TGG CAT TCT、逆方向プライマーACA CGG TCG CCC TAA TTG)。PRRSV培養液150 μ lからバイラルRNA Extraction kit(Intron, Korea)を利用してキット製造社の使い方によってPRRSVのゲノムRNA抽出し、各々の遺伝子分節に相応するバイラルcDNAを合成するためのRT-PCRを実行した。抽出したRNA10 μ lに10pmol ORF5の逆方向プライマー2 μ lを入れて、0 $^{\circ}$ で3分間加熱した後冷却し、RNA阻害剤(Promega, U.S.A)1 μ l、5 \times RT緩衝液(50mM Tris-HCl(pH8.3)、75mM KCl、3mM MgCl₂、10mM DTT)、10mM dNTP(Promega, U.S.A)2 μ l、M-MLV逆転写酵素(Promega, U.S.A)1 μ lを入れて、37 $^{\circ}$ で1時間30分間増幅させた。PCRは、合成されたcDNA 2 μ l、Sybr green dye 10 μ l(Bio-Rad Korea)、滅菌蒸溜水6 μ l、各1 μ lのプライマーを使用し、95 $^{\circ}$ で3分、変性段階96 $^{\circ}$ (20秒)、アニール段階60 $^{\circ}$ (20秒)、伸張段階72 $^{\circ}$ (30秒)で構成された一連の反応を1サイクルとして40回繰り返し実行し、55 $^{\circ}$ で1分、60 $^{\circ}$ で10秒の反応を71回繰り返し後終了した。RT-PCRは、連続希釈した量が分かっているDNAを標準でPCR反応をするので、基本に増幅が指数的に起きる領域で一定増幅産物量になるサイクル数(threshold cycle; Ct値)を横軸とし、初期DNA量を縦軸として、検量線を作成し、未知濃度飼料も同一条件下で反応してCt値を求めることで、目的DNA量を測定した。

【0066】

その結果を表5に示した。

【0067】

10

20

30

【表5】

表5

区分		免疫接種 (Immunization)						攻撃接種(challenge)						
		DPI -0	DPI -7	DPI -14	DPI -21	DPI -28	DPI -35	DPI -0	DPI -7	DPI -14	DPI -21	DPI -28	DPI -35	DPI -42
		NA ORF 7 JW(PRRS-NA TYPE)						NA ORF 7 JW(PRRS-NA TYPE)						
MVL 接種 (G-A)	A-1	N.D	1.3 13	-1. 74	-0. 173	-0. 273	-0. 161	-1. 681	0.2 7	-0. 633	-1. 285	N.D	N.D	N.D
	A-2	N.D	1.8 52	0.5 37	0.5 36	-0. 241	0.1 12	N.D	-0. 281	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	A-3	N.D	1.2 32	-1. 316	0.0 96	0.4 16	-0. 171	0.4 41	1.8 04	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	A-4	N.D	1.9 15	0.9 82	1.3 03	1.5 29	1.3 65	0.6 51	0.7 22	N.D	-0. 312	-0. 128	N.D	N.D
P-3 接種 (G-B)	B-1	N.D	3.7 95	2.4 59	0.0 95	0.0 16	-1. 713	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	B-2	N.D	3.7 47	3.4 12	2.1 71	0.7 62	-0. 665	N.D	N.D	N.D	-0. 761	-0. 774	-0. 774	N.D
	B-3	N.D	3.2 28	0.8 24	0.8 26	0.1 51	-0. 659	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	B-4	N.D	2.6 09	3.1 55	1.9 32	2.7 54	0.1 21	N.D	N.D	N.D	-0. 283	N.D	N.D	N.D
P-1 20 接種 (G-C)	C-1	N.D	-0. 318	0.9 75	0.1 10	N.D	-0. 168	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	C-2	N.D	-0. 779	-1. 033	-0. 901	-1. 174	-0. 039	N.D	-0. 11	N.D	0.0 77	-1. 456	N.D	N.D
	C-3	N.D	N.D	1.1 56	0.8 87	-1. 459	-0. 787	N.D	2.3 01	0.1 11	N.D	-0. 774	N.D	N.D
	C-4	N.D	0.0 25	N.D	0.5 50	-1. 064	-0. 443	N.D	0.1 83	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
P/C (G-D)	D-1	N.D	-0. 662	N.D	-0. 273	N.D	-2. 398	N.D	2.5 67	N.D	N.D	-1. 687	N.D	N.D
	D-2	N.D	-1. 356	N.D	N.D	-1. 004	-0. 82	N.D	2.0 32	2/22(火曜日)斃死				
	D-3	N.D	-1. 672	N.D	N.D	-1. 045	-2. 064	N.D	0.2 63	0.3 49	0.1 64	N.D	N.D	N.D
	D-4	N.D	-1. 173	-2. 88	N.D	N.D	-0. 881	N.D	0.9 48	0.6 19	0.3 45	N.D	N.D	N.D
N/C (G-E)	E-1	N.D	-0. 468	N.D	-0. 311	N.D	-0. 438	N.D	N.D	N.D	-1. 240	N.D	N.D	N.D
	E-2	N.D	-0. 192	N.D	-0. 278	-0. 337	-0. 341	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	E-3	N.D	-0. 376	N.D	N.D	-1. 215	-0. 07	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	E-4	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D

【0068】

表5に示したように、MLVワクチン(G-A)を接種したグループでは、接種後7日目に全ての個体でウイルスが検出され、35日まで持続する個体が存在した。継代5JW-PRRSV接種群(G-B)では、接種後7日目に全ての個体で高い力価のウイルスが検出された。以後持続的に28日目まで検出が確認され、35日目まで検出される個体も存在した。継代120JW-PRRSV(G-C)接種群では、接種後14日目に2個体でウイ

10

20

30

40

50

ルスが検出され、接種後21日目まで維持した後28日目から検出されなかった。このような結果を通じて、常用ワクチンであるMLVワクチン(G-A)より6倍程度低いウイルス力価を示し、血液内残存日も短いことがわかる。また、MLVワクチン(G-A)接種群は、全ての接種個体でウイルスが検出されたが、継代120JW-PRRSV(G-C)接種群では、2匹個体でのみウイルスが確認された。42日目に攻撃接種後、MLVワクチン(G-A)接種群では、接種後7日目に3匹個体で血液内ウイルス検出されて、継代5JW-PRRSV接種群(G-B)では、4個体の全てからウイルスが検出されなかった。これは相同攻撃接種に対する保護作用(homologous challenge protection)であると判断される(Report: Colloquium on Prospects for Development of an Effective PRRS Virus Vaccine, August 13, 2007 - D.L. Rock, PhD, University of Illinois)。継代120JW-PRRSV接種群(G-C)では、攻撃接種後7日目に2個体でウイルス検出が確認された。陰性対照群(G-D)では、攻撃接種7日目に2個体で相当量のウイルスが血液内で検出され、そのうち一個体は、接種後14日目に斃死した。この個体に対して剖検を進行し、肺、リンパ、扁桃、腎臓、気管支、肝に対してウイルス力価の測定を実施した。

10

【0069】

その結果を表6に示した。

【0070】

【表6】

20

表6 G-D個体-2に対する組織内のウイルス力価の測定

剖検血液	陰性(Log TCID ₅₀ /ml)
肺	2.767
肝	-0.171
腎臓	-0.366
気管支	0.681
リンパ節	0.107
扁桃	2.685

30

【0071】

表6に示したように、斃死した陰性対照群の肺と扁桃から相当量のウイルスが検出されたことを確認することができた。

【0072】

4.2 血液内抗体価の測定結果

各接種群別に採血したサンプルをELISA(HerdChek: PRRS 2XRE ELISA kit (IDEXX laboratories, Westbrook, ME, USA))方法で測定し、PRRSVに対する血液内抗体価を測定した。PRRSVの抗体形成有無は、S/P割合で示し、S/P割合が0.4以上の場合を陽性として判定した。

40

【0073】

その結果を表7及び図5に示した。

【0074】

【表7】

表7

区分		免疫接種 (Immunization)						攻撃接種 (challenge)						
		DPI-0	DPI-7	DPI-14	DPI-21	DPI-28	DPI-35	cha-0	cha-7	cha-14	cha-21	cha-28	cha-35	cha-42
M V L 接種 (G-A)	A-1	-0.18	-0.11	0.75	1.50	1.72	1.63	2.23	2.15	2.73	2.22	2.67	2.21	1.96
	A-2	-0.14	-0.17	0.81	1.50	1.91	1.70	2.66	2.55	2.84	2.63	2.93	2.39	2.08
	A-3	-0.17	-0.19	0.03	0.37	1.18	1.55	2.12	1.82	1.80	1.41	1.81	1.55	1.29
	A-4	-0.13	-0.12	0.24	0.38	1.14	1.03	1.38	1.29	1.34	1.31	1.55	1.44	1.15
	平均	-0.16	-0.15	0.40	0.94	1.49	1.48	2.10	1.95	2.18	1.89	2.24	1.90	1.52
P-3 接種 (G-B)	B-1	-0.17	0.01	0.75	1.39	1.69	1.68	2.47	2.30	2.61	2.46	2.86	2.31	2.38
	B-2	-0.11	0.80	1.30	1.85	2016	1.93	2.56	2.17	2.53	2.15	2.67	2.09	2.24
	B-3	-0.18	-0.04	0.45	0.78	0.85	1.03	2.13	2.12	2.46	2.16	2.55	1.96	2
	B-4	-0.23	-0.03	0.53	1.78	1.77	1.44	1.89	2.06	2.46	2.04	2.46	2.03	2.06
	平均	-0.17	0.19	0.76	1.45	1.62	1.52	2.26	2.16	2.52	2.20	2.64	2.10	2.17
P-120 接種 (G-C)	C-1	-0.22	-0.39	-0.31	-0.26	1.13	1.17	2.38	2.23	2.76	2.32	2.77	2.21	2.23
	C-2	-0.16	-0.13	0.12	0.51	1.06	1.00	2.02	1.87	2.04	1.94	2.37	2.12	2.06
	C-3	-0.14	-0.17	-0.03	0.43	1.01	0.87	1.66	1.66	2.18	2.11	2.51	2.19	2.11
	C-4	-0.20	-0.14	-0.04	0.07	1.19	1.12	1.63	1.60	2.15	1.91	2.4	2.18	2.2
	平均	-0.18	-0.21	-0.07	0.18	1.10	1.04	1.92	1.84	2.28	2.07	2.51	2.18	2.15
P/C (G-D)	D-1	-0.13	-0.17	-0.10	-0.17	-0.23	-0.11	-0.17	0.97	2.48	2.40	2.64	2.1	2.02
	D-2	-0.05	-0.02	-0.09	-0.07	-0.09	-0.11	-0.09	0.48	2/22(火曜日)斃死				
	D-3	-0.10	-0.07	-0.04	-0.15	-0.18	-0.13	-0.20	0.24	0.40	0.06	0.5	0.9	0.95
	D-4	--	-0.23	-0.22	-0.18	-0.18	-0.14	-0.10	0.07	0.12	0.19	0.12	0.34	0.74
	平均	-0.14	-0.12	-0.11	-0.14	-0.17	-0.12	-0.14	0.44	1.00	0.88	1.09	1.11	1.24
N/C (G-E)	E-1	-0.06	-0.11	-0.13	-0.10	-0.02	-0.09	-0.15	-0.07	-0.09	-0.04	-0.08	-0.06	-0.1
	E-2	-0.04	-0.05	-0.02	-0.05	0.16	0.35	-0.02	-0.02	0.01	-0.04	-0.06	-0.05	0
	E-3	-0.02	-0.05	0.01	-0.07	-0.07	-0.08	-0.10	-0.08	-0.01	-0.06	-0.08	-0.07	-0.03
	E-4	-0.03	-0.06	0.01	-0.04	-0.05	-0.10	-0.10	-0.06	0.00	-0.05	-0.04	-0.06	-0.02
	平均	-0.04	-0.07	-0.03	-0.07	0.01	0.02	-0.09	-0.06	-0.02	-0.05	-0.07	-0.06	-0.04

10

20

30

40

【0075】

表7及び図5に示したように、MLVワクチン(G-A)を接種したグループでは、接種後14日目から2匹個体で抗体価が陽性に転換され、28日目には、4匹個体が全て陽性に転換された。継代5 JW-PRRSV接種群(G-B)では、接種後7日目に1匹個体が陽性に転換され、14日目には、4匹個体が全て陽性に転換された。継代120 JW-PRRSV(G-C)接種群では、接種後21日目に2匹個体の陽性転換を始まり、28日目は、4匹個体が全て陽性に転換されたことを確認した。これを通じて、継代120 JW-PRRSV(G-C)接種群が安全であると共に抗体価を十分に誘導することができる候補物質であることを確認することができた。

【0076】

50

4.3 血球分析結果

自動血球計測機を使用して各接種群から収集した血液サンプルで血液内に存在する各種血液細胞の数値を測定した。

【0077】

その結果を図6に示した。

【0078】

図6に示したように、継代3 JW - PRRSV接種群(G - B)で白血球が多少増加したが、他の実験群では実験終了時まで白血球数値の変化が大きくないことを確認することができた(a)。また、血液内リンパ球の測定結果、ワクチン候補群の接種後にも4.3~13,600 cells/ μ lの正常リンパ球の数値を示した(b)。これは、本発明のワクチン候補物質が個体内で炎症を誘発しない安全な物質であることを示す結果である。

10

【0079】

4.4 臨床分析結果

ワクチンの攻撃接種後の豚で現われる臨床症状を観察した。体温及び運動性は、実験期間中で一日2回にわたって同一な時間に測定し、運動性は、個体観察を通じて0点~4点まで0.5点単位で点数を付与した(0点:運動性なし、1点:運動性弱い、2点:運動性普通、3点:運動性良好、4点運動性非常に良好)。飼料摂取量は、体重による制限給餌を実施し、10分以内に全量摂取時に非常に良好(4点)で判断し、飼料を全量摂取する時間によって0点~4点まで0.5点の間隔差で点数を付与した。

【0080】

その結果を表8及び図7に示した。

【0081】

20

【表 8】

表 8

区分	2/08(火)～2/15(火) DPI-0～7	2/16(水)～2/22 (火)	2/23(水)～3/1 (火)	3/2(水)～	
G-A (MLV)	JW P3 攻撃接種鼻腔、筋肉各2ML/匹の免疫接種後飼料摂取及び運動性の減少症状発生しない。	-飼料摂取及び運動性良好。	-飼料摂取及び運動性良好。 -左耳青色症で分離A-1番飼料摂取普通から良好に16日齢から好転。	-飼料摂取及び運動性良好。 -A-1番グループと隔離して別途管理中であり、飼料摂取及び運動性良い。	10
G-B (P-3)	-攻撃接種後飼料摂取及び運動性が免疫接種進行時と差がない。 -前/後肢の関節異常により運動性弱い。飼料摂取普通。	-飼料摂取及び運動性良好。 -B-4番攻撃接種の12日齢から漸次的に飼料摂取及び運動性を回復して良好になる。	-飼料摂取及び運動性良好。 -B-4番は16日から飼料摂取及び運動性正常に回復。	-飼料摂取及び運動性良好。	
G-C (P-120)	-1日齢：3番回飼料摂取及び運動性グループ内の子豚より少し減少。 -2日齢：飼料摂取及び運動性正常回復。	-飼料摂取及び運動性良好。 -C-3番攻撃接種の12日齢で運動性及び飼料摂取減少して14日齢で回復して行くが、現在同一グループより飼料摂取速度が多少遅い。	-飼料摂取及び運動性良好。 -C-3番の活動性飼料摂取は良好であるが、同一実験群に比べて摂取速度は遅い。	-飼料摂取及び運動性良好。	20
G-D (P/C)	-6日齢：2回飼料摂取及び運動性グループ内の子豚より少し減少。 -7日齢：飼料摂取及び運動性正常回復。	-10日齢：2回全身赤い斑点発生(滲出性表皮炎症状と類似) -13日齢：D-2番の午後管理時に急に状態が悪くなった。 -14日齢：D-2番斃死(剖検結果、検査結果資料を参照)	-飼料摂取及び運動性良好。	-飼料摂取及び運動性良好。	30
G-E (N/C)	-飼料摂取及び運動性良好。	-飼料摂取及び運動性良好。	-飼料摂取及び運動性良好。	-飼料摂取及び運動性良好。	40

【 0 0 8 2 】

表 8 及び図 7 に示したように、継代 3 JW - PRRSV 接種群 (G - B) は、全般的に運動性と飼料摂取量が多少弱いことで観察されたが、全般的に特異事項なしに飼料摂取及び運動性は良好であることで確認された。

【 0 0 8 3 】

実施例 5 . JW - PRRSV ワクチンの製造

5.1 継代方法及び保存

同定試験と免疫原性試験から確認された $10^{4.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 以上の PRRS 原腫毒ウイルス (120 継代株) を MARC - 145 細胞に接種し、 37°C で 4 ~ 5 日間培養した後採毒し、凍結乾燥するか -80°C で凍結保存した。腫毒は原腫毒と同一な方法で増殖

させた組織培養順化 PRRSV を採毒した後、凍結乾燥するか - 80 で凍結保存し、腫毒では 3 代以上継代しなかった。ウイルス力価は、 $10^{6.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 以上になるように製造した。

【0084】

5.2 バルク生産及びウイルス含量試験

細胞増殖用培地に MARC-145 または PAM 細胞を 850cm^2 の回転ボトルで培養した後、3 ~ 5 日間隔で継代培養した。 850cm^2 の回転ボトル培養細胞の断層が形成された時、細胞増殖用培地を除去し、製造用ウイルスを細胞が十分に覆うほどの量で接種した後、37 で 1 時間の間吸着させた。接種液を除去して細胞増殖用培地を添加し、37 で 4 ~ 5 日間回転培養した。遠心分離したウイルス培養液を 10 倍段階希釈して MARC-145 または PAM 細胞が培養された 96 ウェルプレートに接種し、37 で 7 日間培養しながら細胞変性効果 (CPE) を観察した。ウイルスも培養後、CPE が 80 ~ 90 % 以上出現した時、無菌的に収穫して - 80 に凍結保管した。

【0085】

5.3 試験ワクチンの製造

* 分離されたウイルスを抗原として保護剤を添加して試験ワクチンを製造した。滅菌リン酸緩衝液を加え、凍結乾燥器を利用して試験用ワクチン 3 種 (製造番号 ; 60 PRRS 01、60 PRRS 02、60 PRRS 03) を製造した。製造された試験用ワクチンの含量は、表 9、表 10、表 11 の通りである。

【0086】

【表 9】

表 9 60 PRRS 01

原料薬品	含量	バルク量
PRRS	$10^{6.5} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$	600 ml
TPGG		150 ml
Total		750 ml

【0087】

【表 10】

表 10 60 PRRS 02

原料薬品	含量	バルク量
PRRS	$10^{6.6} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$	620 ml
TPGG		156 ml
Total		776 ml

【0088】

【表 11】

表 11 60 PRRS 03

原料薬品	含量	バルク量
PRRS	$10^{6.4} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$	640 ml
TPGG		160 ml
Total		800 ml

【0089】

保護剤として既存に使用される LPGG (ラクトース) より TPGG (トレハロース) を使用することで、既存保護剤により生ワクチン製造時に発生できる汚染を最小化してワクチンの安全性を高めた。保護剤別のウイルス含量比較表は、表 12 に示した。

【0090】

【表 1 2】

表 1 2 L P G G 及び T P G G 保護剤別のウイルス含量比較表

原料薬品	含量	凍結乾燥後の含量
PRRS	$10^{6.5} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$	
TPGG		$10^{5.8} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$
LPGG		$10^{5.6} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$

【 0 0 9 1 】

5.4 試験ワクチンの安全性試験

前記実施例 5.3 で製造された試験ワクチンに対する安全性を試すために、特性、真空度、水素イオン濃度、含湿度、無菌試験、マイコプラズマ否定試験、迷入ウイルス試験、含量試験、力価試験を、製造当時、製造 3 ヶ月後、製造 6 ヶ月後にわたって実行した。安全性試験に対する結果を表 1 3 に示した。

【 0 0 9 2 】

【表 1 3】

表 1 3

区分	基準	試験基準								
		製造当時			3 ヶ月後			6 ヶ月後		
		01	02	03	01	02	03	01	02	03
特性試験	性状均一	適合	適合	適合	適合	適合	適合	適合	適合	適合
真空度試験	放電あり	適合	適合	適合	適合	適合	適合	適合	適合	適合
水素イオン濃度試験	6.0-8.0	7.15	7.05	7.20	7.13	7.10	7.17	7.14	7.17	7.15
含湿度試験	4%以下	2.60	2.62	2.70	2.61	2.60	2.63	2.62	2.63	2.62
無菌試験	菌増殖なし	適合	適合	適合	適合	適合	適合	適合	適合	適合
マイコプラズマ否定試験	PCR陰性	-	-	-	-	-	-	-	-	-
迷入ウイルス試験	CPE, 血球凝集認められない	適合	適合	適合	適合	適合	適合	適合	適合	適合
含量試験	PRRS 10 ^{5.0} /頭以上	5.8	5.7	5.7	5.7	5.6	5.6	5.6	5.6	5.5
力価試験	PRRS 4倍以上	32	45	45	45	45	45	32	45	32

【 0 0 9 3 】

表 1 3 に示したように、製造された試験ワクチンの 60 PRRS 01、60 PRRS 02、60 PRRS 03 は、いずれも製造当時、製造 3 ヶ月後、製造 6 ヶ月後にも全ての安全性実験項目において適合であることを確認することができた。したがって、本発明の新規した韓国型 PRRSV である JW-PRRSV を利用したワクチンは、安全性面においても適合なワクチンであることが分かる。

【 0 0 9 4 】

実施例 6 . 試験ワクチンの安全性確認

生ワクチンにおいて一番重要な安全を確認するために、実験動物であるマウス、モルモ

10

20

30

40

50

ットと目的動物である子豚に試験ワクチンを接種し、7日間または21日間の生存率を観察した。接種した試験ワクチンは、前記実施例5.3で製造された60 PRRS 01、60 PRRS 02、60 PRRS 03を使用し、製造当時、製造3ヶ月後、製造6ヶ月後の試験ワクチンを実験動物及び目的動物に接種し、生存率を各々確認した。

【0095】

6.1 マウスにおける試験ワクチンの安全性確認

体重15～20gのマウス8匹を公試し、各々試験ワクチン0.5ml(製造当時、製造後3ヶ月、製造後6ヶ月)を腹腔接種し、7日間観察した。

その結果を表14に示した。

【0096】

【表14】

表14

		品種	公試数	接種量	接種経路	生存数/ 接種数	結果 (生存率)
製造 当時		ICR	8匹	0.5ml	腹腔	8/8	100%
	60 PRRS 02	ICR	8匹	0.5ml	腹腔	8/8	100%
	60 PRRS 03	ICR	8匹	0.5ml	腹腔	8/8	100%
製造後 3ヶ月	60 PRRS 01	ICR	8匹	0.5ml	腹腔	8/8	100%
	60 PRRS 02	ICR	8匹	0.5ml	腹腔	8/8	100%
	60 PRRS 03	ICR	8匹	0.5ml	腹腔	8/8	100%
製造後 6ヶ月	60 PRRS 01	ICR	8匹	0.5ml	腹腔	8/8	100%
	60 PRRS 02	ICR	8匹	0.5ml	腹腔	8/8	100%
	60 PRRS 03	ICR	8匹	0.5ml	腹腔	8/8	100%

【0097】

表14に示したように、試験ワクチンをマウスに接種した際にすべての個体が生存したので、安全なワクチン候補群になることができることを確認した。

【0098】

6.2 モルモットにおける試験ワクチンの安全性確認

体重300～350gのモルモット4匹を公試し、2匹はモルモット筋肉または皮下に2頭分を、他の2匹は、腹腔に2頭分を接種(製造当時、製造後3ヶ月、製造後6ヶ月のワクチン)し、7日間観察した。

【0099】

その結果を表15に示した。

【0100】

10

20

30

【表 15】

表 15

	試験 ワクチン	品種	公試数	接種量	接種経路	観察 期間	結果
製造 当時	60 PRRS 01	Hartley	2匹	2頭分	筋肉	7日	異常なし
			2匹	2頭分	腹腔		
	60 PRRS 02	Hartley	2匹	2頭分	皮下	7日	異常なし
			2匹	2頭分	腹腔		
	60 PRRS 03	Hartley	2匹	2頭分	筋肉	7日	異常なし
			2匹	2頭分	腹腔		
製造後 3ヶ月	60 PRRS 01	Hartley	2匹	2頭分	筋肉	7日	異常なし
			2匹	2頭分	腹腔		
	60 PRRS 02	Hartley	2匹	2頭分	皮下	7日	異常なし
			2匹	2頭分	腹腔		
	60 PRRS 03	Hartley	2匹	2頭分	筋肉	7日	異常なし
			2匹	2頭分	腹腔		
製造後 6ヶ月	60 PRRS 01	Hartley	2匹	2頭分	筋肉	7日	異常なし
			2匹	2頭分	腹腔		
	60 PRRS 02	Hartley	2匹	2頭分	皮下	7日	異常なし
			2匹	2頭分	腹腔		
	60 PRRS 03	Hartley	2匹	2頭分	筋肉	7日	異常なし
			2匹	2頭分	腹腔		

10

20

30

【0101】

表 15 に示したように、全ての試験ワクチン接種群で 7 日間何の異常なしに生存を確認し、製造された試験ワクチンがモルモットにおいても安全なワクチンであることを確認した。

【0102】

6.3 子豚における試験ワクチンの安全性確認

目的動物である子豚に対して、試験ワクチン(製造当時、製造後 3 ヶ月、製造後 6 ヶ月のワクチン)の安全性を確認した。体重 8 ~ 10 kg (4 ~ 6 週齢)の PRRSV 抗体陰性である元気な豚 18 匹にワクチン 10 頭分を各々筋肉接種した後、21 日間観察した。

【0103】

その結果を表 16 に示した。

【0104】

40

【表 16】

表 16

試験ワクチン	公試数	接種量	接種経路	観察期間	結果	
製造当時	60 PRRS 01	2匹	10頭分	筋肉	21日	異常なし
	60 PRRS 02	2匹	10頭分	筋肉	21日	異常なし
	60 PRRS 03	2匹	10頭分	筋肉	21日	異常なし
製造後3ヶ月	60 PRRS 01	2匹	10頭分	筋肉	21日	異常なし
	60 PRRS 02	2匹	10頭分	筋肉	21日	異常なし
	60 PRRS 03	2匹	10頭分	筋肉	21日	異常なし
製造後6ヶ月	60 PRRS 01	2匹	10頭分	筋肉	21日	異常なし
	60 PRRS 02	2匹	10頭分	筋肉	21日	異常なし
	60 PRRS 03	2匹	10頭分	筋肉	21日	異常なし

10

【0105】

*表 16 に示したように、接種後 1 ~ 2 時間内に子豚で過敏反応が現われなかった。また、21日間観察する間、注射部位の化膿、壊死、発熱及び下痢などの副作用がなしに全て生存することを確認した。したがって、本発明の試験ワクチンは、豚の PRRSV のワクチンとして適切な安全性を有していることが分かる。

【0106】

実施例 7 . 試験ワクチンの SPF 豚に対する安全性確認

前記実施例 5 で製造された試験ワクチンを高い濃度で目的動物に感染させた時、血液と組織内のウイルス感染程度を確認し、目的動物内で連続継代接種をした時のウイルスの病原性が元々の野生型またはその以上の病原性に復帰するかどうかを確認した。SPF 状態の豚 2 匹に 1 次接種を始まり、弱毒化された 120 継代 JW - PRRSV 2×10^6 PFU/ml を筋肉と鼻腔に各々 2 ml 接種し、1 日目、3 日目、7 日目の血液、剖検後の肺、扁桃、リンパにおけるウイルス感染程度を確認した。接種個体の日齢と体重、ウイルス内訳と試験日程は、表 17 に示し、試験日程によるウイルス感染程度の確認結果は、表 18 に示した。

20

【0107】

【表 17】

表 17

区分	個体	日齢(日)	体重(kg)	接種ウイルス	試験日付
1次	100-2	145	23.4	P120 6.3 TCIO ₅₀ /ml	2010.9.1 ~ 2010.9.7
	100-4		26.6	P120 6.3 TCIO ₅₀ /ml	
2次	100-1	164	18.7	1次接種個体の可検物	2010.9.20 ~ 2010.9.27
	100-5		17.3	1次接種個体の可検物	
3次	H10-009	212	34.1	2次接種個体の可検物	2010.10.13 ~ 2010.10.21
	H10-011		38.2	2次接種個体の可検物	
4次	H10-013	227	36.5	3次接種個体の可検物	2010.10.27 ~ 2010.11.03
	H10-014		26.1	3次接種個体の可検物	
5次	104-3	127	19.8	4次接種個体の可検物	2010.11.25 ~ 2010.12.01
	104-4		16.7	4次接種個体の可検物	

30

40

【0108】

【表 18】

表 18

1次	個体	0日	1日	3日	7日 (剖検)	2次	個体	0日	1日	3日	7日 (剖検)	3次	個体	0日	1日	3日	7日 (剖検)
血液	個体 _w -2	N.D	N.D	N.D	-0.20	血液	個体-1	N.D	N.D	-0.99	N.D	血液	個体-1	N.D	N.D	N.D	N.D
	個体 _w -4	N.D	N.D	N.D	0.000		個体-5	N.D	N.D	-0.89	N.D		個体-2	N.D	N.D	N.D	N.D
リンパ	個体 _w -2	-	-	-	0.956	リンパ	個体-1	-	-	-	1.109	リンパ	個体-1	-	-	-	-0.27
	個体 _w -4	-	-	-	0.576		個体-5	-	-	-	0.96		個体-2	-	-	-	-
扁桃	個体 _w -2	-	-	-	0.607	扁桃	個体-1	-	-	-	0.964	扁桃	個体-1	-	-	-	0.316
	個体 _w -4	-	-	-	0.642		個体-5	-	-	-	1.128		個体-2	-	-	-	0.374
肺	個体 _w -2	-	-	-	0.509	肺	個体-1	-	-	-	0.84	肺	個体-1	-	-	-	N.D
	個体 _w -4	-	-	-	0.776		個体-5	-	-	-	0.72		個体-2	-	-	-	N.D

10

20

4次	個体	0日	1日	3日	7日 (剖検)	5次	個体	0日	1日	3日	7日 (剖検)
血液	個体-1	N.D	N.D	-2.25	N.D	血液	個体-1	N.D	N.D	N.D	-1.313
	個体-2	-2.326	-0.723	N.D	-1.295		個体-2	N.D	N.D	N.D	N.D
リンパ	個体-1	-	-	-	-0.034	リンパ	個体-1	-	-	-	-0.574
	個体-2	-	-	-	0.365		個体-2	-	-	-	-0.116
扁桃	個体-1	-	-	-	-0.098	扁桃	個体-1	-	-	-	0.115
	個体-2	-	-	-	-0.069		個体-2	-	-	-	0.068
肺	個体-1	-	-	-	-0.609	肺	個体-1	-	-	-	N.D
	個体-2	-	-	-	-0.542		個体-2	-	-	-	N.D

30

40

【0109】

表 18 に示したように、1 次～5 次までの目的動物において、逆継代培養後の血液と組織内でウイルス力価を測定した結果、5 次接種までの血液では、ウイルスが検出されなく、組織内で低いウイルス力価を示し、5 継代の間ウイルスの増幅や転移及び臨床症状は現われなかった(*N.D ; n o n d e t e c t i o n)。また、接種時から剖検時まで観察した結果、注射部位の化膿、壊死、発熱及び下痢などの副作用がなしに全て生存することを確認した。

【0110】

実施例 8 . ウイルス排出の確認

一般的に初めて生毒ワクチンを接種する場合には、ワクチンウイルスのウイルス排出(

50

s h e d d i n g)を普通3～5週まで観察することができる。ワクチンウイルスは、何の異常症状を誘発しないので、生毒ワクチンウイルスのウイルス排出の副作用が問題になる。本発明のワクチン候補物質のウイルス排出時間を確認し、既存の常用ワクチンとの比較を実行した。実験群は、MLVワクチン(A)接種群、5継代JW-PRRSV接種群(B)、120継代JW-PRRSV(C)接種群に分類し、ワクチン接種後に7日、12日、15日、19日、22日、26日、29日、33日、36日、攻撃接種後に0日、7日、14日、21日、28日、35日、42日の日程で各グループ別に個体の鼻腔サンプルを採取し、ウイルス特異的なプライマーを使用してPCRを実行し、各実験群別にウイルス排出程度を確認した。プライマー配列は、表19に示した配列を利用した。PCRは、既存の方法と同一に進行し、1%アガロースゲルで確認した。

10

【0111】

【表19】

表19

プライマー名	配列 (5' → 3')
Common EU&NAJ230_F	ATGGCCAGCCAGTCAATCA
Common EU&NAJ068_R	TCGCCCTAATTGAATAGGTGA

20

【0112】

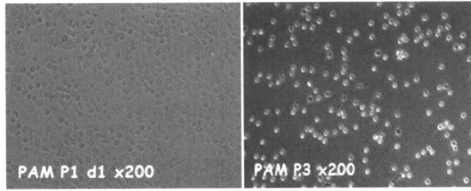
その結果を図8に示した。

【0113】

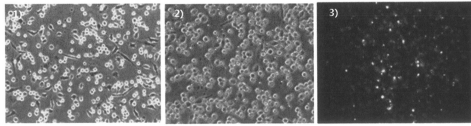
図8に示したように、MLVワクチン(G-A)を接種したグループでは、ワクチン接種後に12日までウイルスの排出が検出された。攻撃接種後には、28日までウイルスの排出が行われることを確認した。一方、120継代JW-PRRSV(G-C)接種群では、接種期間と野外ウイルス感染後の期間で全てウイルスの排出が確認されなかった。これは、既存に市販されるPRRSVに対するワクチンと比較して速いウイルス排出を示すことを意味する。長期間のウイルス排出は何回の複製過程を通すようになり、この過程で組換えを通じて再び毒性を回復して新しいウイルスが出現して更に病原性株に回帰可能性が高いので、本発明のワクチンは、速いウイルス排出により既存のPRRSVワクチンの問題点を改善することができることが期待される。

30

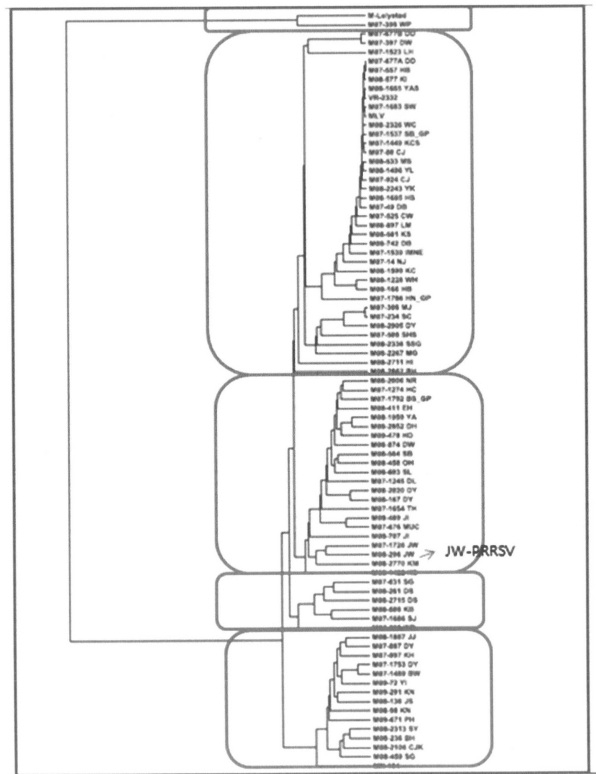
【 図 1 】



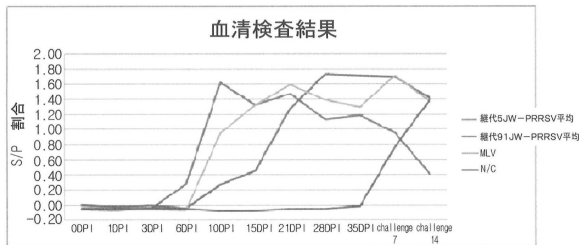
【 図 2 】



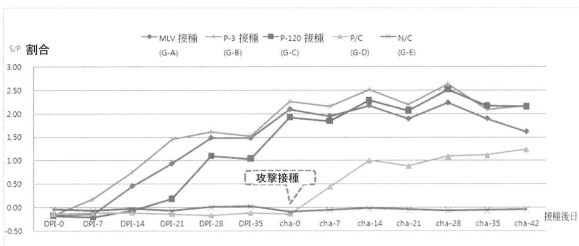
【 図 3 】



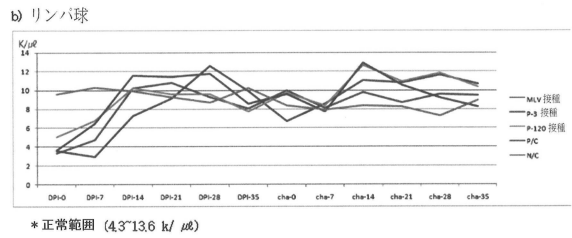
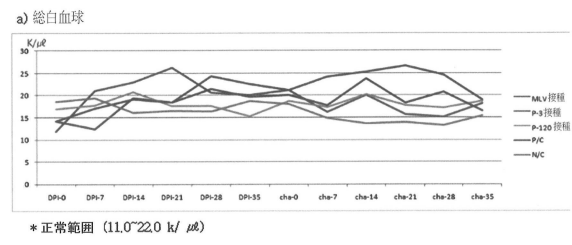
【 図 4 】



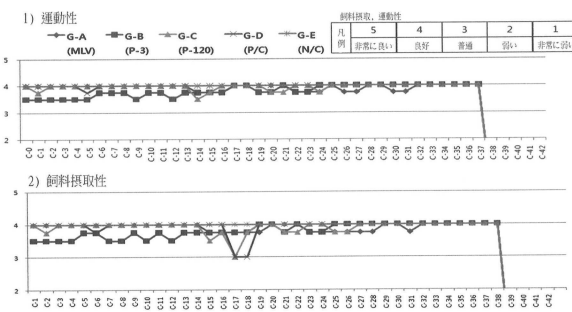
【 図 5 】



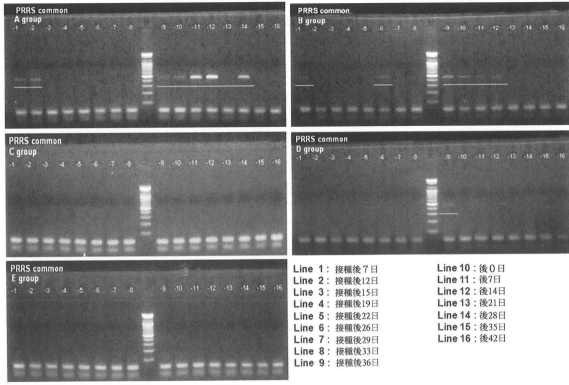
【 図 6 】



【 図 7 】



【 8 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 31/14 (2006.01)		A 6 1 P 31/14	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)		A 6 1 P 31/12	1 7 1
G 0 1 N 33/569 (2006.01)		G 0 1 N 33/569	L
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/534 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	Y
G 0 1 N 33/558 (2006.01)		G 0 1 N 33/534	
		G 0 1 N 33/558	

(72)発明者 キム, ヒュンイル

大韓民国 1 3 6 - 0 5 5 ソウル ソンブクグ アリラン口6キル 3 0

(72)発明者 シン, ソンホ

大韓民国 チュンチョンブクト 3 6 3 - 9 5 1 チョンウォングン オソンウ オソンセンミョ
ン5口 2 0 2 3 0 5 - 1 2 0 4

(72)発明者 ハン, ボンク

大韓民国 3 0 2 - 7 3 4 テジョン ソグ チョンサ口 2 8 1 2 1 3 - 6 0 3

審査官 福間 信子

(56)参考文献 韓国公開特許第10-2013-0010426(KR,A)

韓国公開特許第10-2011-0052183(KR,A)

Virology Journal 2011, 8:177

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 9 0

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

专利名称(译)	一种新的韩国猪生殖和呼吸综合症病毒		
公开(公告)号	JP6201033B2	公开(公告)日	2017-09-20
申请号	JP2016505377	申请日	2014-02-03
[标]申请(专利权)人(译)	致优制药有限公司		
申请(专利权)人(译)	乐观农场有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	乐观农场有限公司		
[标]发明人	キムヒュンイル シンソンホ ハンボンク		
发明人	キム,ヒュンイル シン,ソンホ ハン,ボンク		
IPC分类号	C12N7/00 C12N15/09 A61K39/12 A61K39/39 A61K47/10 A61P31/14 A61P31/12 G01N33/569 G01N33/53 G01N33/534 G01N33/558		
CPC分类号	C12N7/00 A61K39/12 A61K2039/525 A61K2039/54 A61K2039/543 C12N2770/10021 C12N2770/10034 G01N33/56983 G01N2333/08 G01N2469/20		
FI分类号	C12N7/00 C12N15/00.ZNA.A A61K39/12 A61K39/39 A61K47/10 A61P31/14 A61P31/12.171 G01N33/569.L G01N33/53.D G01N33/53.Y G01N33/534 G01N33/558		
代理人(译)	川口义行		
优先权	1020130029891 2013-03-20 KR		
其他公开文献	JP2016518118A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及韩国型猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 和使用其的疫苗组合物, 以及预防猪繁殖与呼吸综合症的方法。根据本发明的登记号为 KCTC 12096BP 的韩国型猪繁殖与呼吸综合征病毒是与欧洲毒株和北美毒株不同的韩国型猪繁殖与呼吸综合症病毒, 以及韩国型猪繁殖和特异性疫苗组合物。产生呼吸综合征病毒, 从而预防韩国型猪繁殖与呼吸综合症病毒或特异性诊断韩国型猪繁殖与呼吸综合症病毒感染。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6201033号 (P6201033)
(45) 発行日 平成29年9月20日(2017.9.20)		(24) 登録日 平成29年9月1日(2017.9.1)
(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/12	
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 K 47/10 (2006.01)	A 6 1 K 47/10	
請求項の数 12 (全 29 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2016-505377 (P2016-505377)	(73) 特許権者 515266164	
(86) (22) 出願日 平成26年2月3日(2014.2.3)	オプティファーム カンパニー リミテッ ド	
(65) 公表番号 特表2016-518118 (P2016-518118A)	大韓民国 チュンチョンブクト 363- 954 チョンウォングン オソンウ オ ソンセンミョンゴロ 63	
(43) 公表日 平成28年6月23日(2016.6.23)		
(86) 国際出願番号 PCT/KR2014/000897	(74) 代理人 100100549	
(87) 国際公開番号 W02014/148738	弁理士 川口 嘉之	
(87) 国際公開日 平成26年9月25日(2014.9.25)	100126505	
審査請求日 平成27年11月24日(2015.11.24)	弁理士 佐賀 伸一	
(31) 優先権主張番号 10-2013-0029891	100131392	
(32) 優先日 平成25年3月20日(2013.3.20)	弁理士 丹羽 武司	
(33) 優先権主張国 韓国 (KR)	100151596	
微生物の受託番号 KCTC KCTC 12096BP	弁理士 下田 俊明	
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 新規の韓国型豚生殖呼吸器症候群ウイルス		