

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2004/055045

発行日 平成18年4月20日 (2006. 4. 20)

(43) 国際公開日 平成16年7月1日 (2004. 7. 1)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/569 (2006. 01)	GO 1 N 33/569	F 4 H O 4 5
CO 7 K 14/255 (2006. 01)	CO 7 K 14/255	
GO 1 N 33/531 (2006. 01)	GO 1 N 33/531	A
	GO 1 N 33/531	B

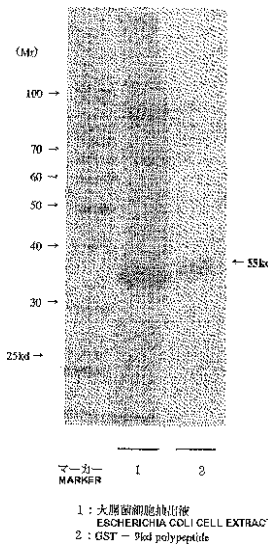
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 29 頁)

出願番号 特願2004-560569 (P2004-560569)	(71) 出願人 505201423
(21) 国際出願番号 PCT/JP2002/013148	株式会社シーエーエフラボラトリーズ
(22) 国際出願日 平成14年12月16日 (2002. 12. 16)	広島県深安郡神辺町道上1257番地の1
(81) 指定国 AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, 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, IE, IT, LU, MC, NL, PT, 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, B G, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, M Z, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW	(74) 代理人 100065721 弁理士 俣熊 弘稔
	(72) 発明者 大田 博昭 広島県神石郡神石町相渡236の1
	(72) 発明者 江川 智哉 広島県福山市春日町7丁目5番10-202号
	(72) 発明者 豊田 有樹子 広島県府中市広谷町1408-3
	Fターム(参考) 4H045 AA11 BA41 CA11 CA40 DA86 EA52 FA74

(54) 【発明の名称】 サルモネラ抗原処方物、それを使用した抗体検査キット及びサブユニットワクチン

(57) 【要約】

SEFl i C 9 k D aポリペプチド又はその複合物からなり、SE感染鶏及び現在市販のSE不活化ワクチン接種鶏とを血清学的に検査するための抗原処方物及びこれを含む検査キット、並びにこの抗原を含んだストレス反応性の低いSEサブユニットワクチンの提供。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

野外型サルモネラ感染動物とワクチン接種感染動物とを識別するマーカー抗原であって、サルモネラ種のべん毛抗原中に於けるフラジェリン 53 kDa 中の発現プロダクト 9 kDa ポリペプチド又はその複合物からなる抗原を含有することを特徴としたサルモネラ抗原処方物。

【請求項 2】

サルモネラ種がサルモネラ・エンテリティディスであることを特徴とした請求の範囲 1 記載のサルモネラ抗原処方物。

【請求項 3】

9 kDa ポリペプチドの複合物からなる抗原は、9 kDa ポリペプチドをグルタチオン-S-トランスフェラーゼと融合させた融合蛋白質であることを特徴とした請求の範囲 1 又は 2 記載のサルモネラ抗原処方物。

【請求項 4】

酵素抗体法により、血清試料、卵黄試料又は体液及び組織抽出液からなる流動体試料内のサルモネラに対する抗体を検出するためのキットであり、該抗体と免疫反応する抗原を支持体上に担持させた抗体検出用キットに於いて、種々のコントロール血清、血清希釈液、コンジュゲート希釈液及びオルトフェニレンジアミン希釈液を含み、支持体は請求の範囲 1 記載のサルモネラ抗原処方物が配されていることを特徴としたサルモネラ抗原処方物を使用した抗体検査キット。

【請求項 5】

支持体は、サルモネラ・エンテリティディスのべん毛抗原中に於ける 9 kDa ポリペプチド又はその複合物からなる抗原を含有するサルモネラ抗原処方物を配し、サルモネラ・エンテリティディス感染鶏とサルモネラ・エンテリティディス不活化ワクチン接種鶏とを血清学的に検査することを特徴とした請求の範囲 4 記載のサルモネラ抗原処方物を使用した抗体検査キット。

【請求項 6】

支持体は、フラジェリン 53 kDa 中の発現プロダクト 9 kDa ポリペプチドをグルタチオン-S-トランスフェラーゼと融合させた融合蛋白質を含有するサルモネラ抗原処方物が配されていることを特徴とした請求の範囲 4 又は 5 記載のサルモネラ抗原処方物を使用した抗体検査キット。

【請求項 7】

請求の範囲 1 記載の抗原を含んでなる、サルモネラ菌属の感染に対して動物を防御することを特徴としたサルモネラサブユニットワクチン。

【請求項 8】

請求の範囲 2 記載の抗原を含んでなる、サルモネラ・エンテリティディス感染に対して鶏を防御することを特徴としたサルモネラ・エンテリティディスサブユニットワクチン。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

この発明は、サルモネラ抗原処方物、及びこのサルモネラ抗原処方物を使用して野外型感染動物とワクチン接種動物とを識別するための検査用キット、並びにサブユニットワクチンに関するものである。

【背景技術】

サルモネラ属の細菌は人及び動物の両方に於いて病原性を示すことが知られている。とりわけ、サルモネラ・エンテリティディス (*Salmonella enteritidis* 以下 SE と云う) は、人の食中毒の原因菌の一つとして 1980 年代後半より注目されてきた。この SE は多くの研究により、養鶏場に於いて産生される殻付き卵を汚染していることが知られるようになり、養鶏場 (採卵場) に於ける SE 対策が重要視されている。

近年、養鶏場の SE 対策として一般的な衛生管理を向上させることの他に、採卵鶏の若

10

20

30

40

50

齡期にSE不活化ワクチンを接種することが試みられている。しかしながら、この場合、次のような問題点がある。

(1) SE不活化ワクチンを接種した場合、SE特異抗体は産生されるが、この産生されたSE特異抗体は野外型SEの自然感染と血清学的に区別することができない。

(2) 現在広く普及しているSE不活化ワクチンは、菌体を不活化した抗原、即ちSEの菌体をホルマリンにより死菌としたものを中心抗体として使用しているため、菌体内の毒素(Enterotoxin)を含んでおり、ワクチンを接種することにより様々な副反応(例えば鶏増体重を阻害する)を引き起こすことが知られている。また、不活化ワクチンの内、優れた免疫応答を誘導するものとして知られている油性アジュバントワクチンも、接種鶏にストレスを誘発するという欠点を持っている。

(3) 現在、養鶏場ではSE以外のサルモネラ菌属、例えばネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)、サルモネラ・インファンティスなどの汚染があり、ワクチネーションの回数を減らすためにも、サルモネラ菌属の多価ワクチンの開発が要望されているが、多くのサルモネラの菌体を混合することは必要以上のストレスを鶏に与えたり、必要な抗原量を安定的に確保するのが困難であるため、所望される菌体抗原を用いた多価ワクチンは製造上困難とされている。

本発明者らは既に、上記問題点(1)を解決するために、様々なSE表面抗原物質に対し、SE不活化ワクチン接種鶏とSE感染鶏との間に産生される抗体の種類に差があるかどうか調べ、SE表面抗原の1つであるべん毛抗原に対して、SE不活化ワクチン接種鶏と、SE感染鶏との間に差があることを明らかにしている。

SEの表面抗原としては、繊毛抗原として14kDa、17kDa及び23kDaのポリペプチドが知られ、夫々サブユニットワクチンの抗原として研究されているが、未だワクチンとして効果的な抗原であることの報告はなされていない。

一方、日本公開特許公報特開2001-186874号公報には、べん毛をサルモネラワクチンに関する適当な検出可能マーカー抗原とみなし、野生型形態に於いてはべん毛を保持するが、フラジェリン又はべん毛の抗原決定基の少なくとも一つに対する抗体を誘導する能力をもはや有さないサルモネラ属の細菌を利用するものとしたワクチンが記載されている。

他方、問題点(2)のアジュバントによる問題に対して、例えば日本公開特許公報特開2002-80396号公報には、親水性油性アジュバントを使用して水中油中水滴型エマルションとなしたワクチン製剤により解決しようとするのが記載されているが、SE不活化ワクチンは菌体を死滅させた抗原を大量に含んでいるため、問題点(3)に示すように、サルモネラ属全体の多価ワクチンを作成することは困難とされている。この解決策としては、SE菌体の中で有効な抗原のみを取り出し、サブユニットワクチンとして多価ワクチンを作成することが有用と考えられるが、これまでサブユニットワクチンとしての有効なSE抗原は報告されていない。

上記したように、ワクチン接種鶏と野外型感染鶏とを容易に識別でき、且つ被検体に対してストレスの少ないサブユニットSE不活化ワクチン或いはSE菌体を含む多価サブユニットSEワクチンの開発が強く望まれているが、未だ有効なものは確認されていない。本発明者らは、これに鑑みて鋭意研究を進めたところ、SEべん毛抗原の主体を成すFLIC(フラジェリン)である53kDaポリペプチド(SEFLIC)の中の一部9kDaポリペプチドが鶏に接種されたSE不活化ワクチンによる特異抗体を特異的に検出することを見出し、このSEFLIC9kDaポリペプチド又はその複合物を用いて、SE感染鶏及び現在市販のSE不活化ワクチン接種鶏を血清学的に検査するための抗原処方物及び検査キットを提供することを目的とする。

更には、SEのみならず、SEFLICと高い相同性を示すべん毛抗原を持つサルモネラ菌属、例えばサルモネラ・ダブリン(*Salmonella dublin*)の不顕性感染に於いて、上記SEの場合と同様に血清学的検査用の抗原処方物及び検査キットを提供する。

更には、SEFLIC9kDaポリペプチドがSE不活化ワクチンの抗原に於いて、

免疫組織学的に重要な役割を担っていることから、この抗原を含んだストレス反応の低い S E サブユニットワクチン或いはサルモネラサブユニットワクチンを提供する。

【発明の開示】

上記課題を解決するため、本発明では、野外型サルモネラ感染動物とワクチン接種感染動物とを識別するマーカー抗原にサルモネラ抗原処方物を使用するものとなし、該サルモネラ抗原処方物にサルモネラ種のべん毛抗原中に於けるフラジェリン 5 3 k D a 中の発現プロダクト 9 k D a ポリペプチド又はその複合物からなる抗原を含有させるものとする。これにより、サルモネラ菌に自然感染した動物とワクチン接種により感染した動物とを正確に識別することが可能となる。

また、この際、上記抗原処方物は、サルモネラ種をサルモネラ・エンテリティディスとなしてサルモネラ菌に感染した鶏を識別するものとなしたり、9 k D a ポリペプチドの複合物からなる抗原を、フラジェリン 5 3 k D a 中の発現プロダクト 9 k D a ポリペプチドをグルタチオン - S - トランスフェラーゼ（以下 G S T と云う）と融合させた融合蛋白質となして支持体上への定着を安定させるようになしたりする。

また、酵素抗体法により、血清試料、卵黄試料又は体液及び組織抽出液からなる流動体試料内のサルモネラに対する抗体を検出する検査キットに於いて、サルモネラに対する抗体と免疫反応する抗原に上記サルモネラ抗原処方物を使用するものとし、該サルモネラ抗原処方物を担持させた支持体と、該支持体と共に検査反応に使用する種々のコントロール血清、血清希釈液、コンジュゲート希釈液及びオルトフェニレンジアミン（以下 O P D と云う）希釈液とからなる抗体検査キットを作成するものとする。

また、上記 S E F l i C 9 k D a ポリペプチド又はその複合物を一部に含ませたサルモネラサブユニットワクチン或いは S E サブユニットワクチンを製造し、サルモネラ菌属の感染に対して鶏やその他の動物を防御するようにする。

【図面の簡単な説明】

図 1 は、本発明に係る試料のアガロースゲル電気泳動法による 7 3 3 ~ 1 0 0 8 b p 領域の P C R 像を示す。

図 2 は、本発明に係る G S T 9 k D a ポリペプチドの分子量の確認像を示す。

図 3 は、本実施例に於ける S E 不活化ワクチン A 及び E 接種鶏由来血清の W B 反応成績を示す。

図 4 は、本実施例に於ける S E 不活化ワクチン B 接種鶏由来血清の W B 反応成績を示す。

図 5 は、本実施例に於ける S E 不活化ワクチン C 及び D 接種鶏由来血清の W B 反応成績を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

本発明の抗原処方物に使用される S E f l i C 遺伝子は、S E のべん毛 F l i C を構成する主要な蛋白質であるフラジェリン（5 3 k D a ）をコードしており、1 5 1 8 塩基対で構成され、5 0 5 個のアミノ酸をコードしている。また、S E のアミノ酸配列と他のサルモネラの N 末端と C 末端のアミノ酸配列及び塩基配列を比較すると、かなり高いホモロジーが存在することが確認された。そこで、本発明では、S E フラジェリンの S E 特異的な領域の単離精製を遺伝子工学的に行い、S E F l i C 9 k D a ポリペプチド又はその複合物を以下のようにして生成した。

A . S E f l i C 遺伝子の単離と解析

1 . P C R 法による f l i C の増幅及びクローニング

既知の塩基配列を基に、P C R 用プライマー S E F 及びプライマー S E R を設計し、S E N o . 1 5 の菌体よりゲノム D N A を精製し、これをテンプレートとして P C R 法により増幅した。P C R の条件は、変性 9 4 ° C 、 3 0 秒間、アニーリング 6 0 ° C 、 3 0 秒間、増幅 7 2 ° C 、 9 0 秒間を 1 サイクルとして 3 0 サイクル繰り返した。また、増幅された D N A フラグメントはアガロースゲル電気泳動法（1 % アガロースゲル）により確認した（図 1 参照）。この増幅した P C R 断片（D N A ）中の不純な D N A を除去して精製するために、増幅した遺伝子を p C R 2 . 1 T ベクターにサブクローニングした後、大腸菌内

10

20

30

40

50

で複製し、クローニングを試みた。

2. fliC 遺伝子の塩基配列の決定

クローニング後、単離した4クローンの内1クローンをテンプレートとし、プライマー SEF、SER、SER3、SER4 を用い、塩基配列の決定を試みた。塩基配列の決定には、DNA オートシーケンサー ABI 310 (Applied Bio-logical Instrument) を用い、ダイターミネーター法により行った。サイクルシーケンス反応条件は変性96、10秒間、アニーリング50、5秒間、増幅72、4分間を1サイクルとして25サイクル繰り返した。

B. 融合蛋白質の発現及び精製

3. 発現クローンの作製

SE 特異的である fliC 遺伝子の塩基配列中735bpから1010bpの領域のクローニングを試みた。733bpから1008bpを増幅させる attB アダプタープライマーを attB1SEFepi 及び attB2SERepi を設計し、fliC 遺伝子の塩基配列を決定したクローンを鋳型にし、変性94、30秒間、アニーリング55、30秒間、増幅72、30秒間を1サイクルとして30サイクルの条件でPCRを行った。得られたDNAフラグメントを attP サイトを含むドナーベクター (pDONRTM) に接続した。その後、大腸菌 (DH5) に形質転換し、エントリークローンが構築されたことを確認し、このエントリークローンをデスティネーションベクター (pDESTTM15) に移し換え、大腸菌 (BL21-S1TM) に形質転換して、発現クローンを作製した (図2参照)。上記ベクター及び大腸菌は Invitrogen 社のものを使用した。

4. 融合蛋白質の大量発現

次に、融合蛋白質を大量に発現させ、精製することを試みた。

形質転換体のオーバーナイトカルチャーを1ml作製し、これをLB液体培地100mlに添加し、37でOD₆₀₀が0.5になるまで約6時間培養したあと、引き続き終濃度が0.3Mとなるように塩化ナトリウムを添加し、30で12時間培養した。

5. 融合蛋白質の精製

上記培養液を集菌し、プロテアーゼインヒビター (SIGMA製) を250µl加え、これに終濃度0.2%となるようにトライトンX-100を加え、エタノールバス及びブォーターバス (60) にて3回凍結融解を繰り返し、菌を破碎した。破碎した菌を遠心分離し (13,500rpm、10分、4)、その遠心上清をGSTrap FF 5mlカラム (Amersham Pharmacia Biotech製) に通し、融合蛋白質をカラム内の担体に結合させた後、10mM還元型グルタチオン (50mM Tris-HCl、pH8.0) 5mlで溶出した。溶出した融合蛋白質はPBSで透析し精製標品とした。

本発明に於ける検査キットは、酵素抗体法により、血清試料、卵黄試料又はその他の流動体試料内のサルモネラに対する抗体を検出するためのキットであり、上記サルモネラ抗原処方物でコーティングされた支持体の他に、種々のコントロール血清、血清希釈液、コンジュゲート希釈液及びOPD希釈液で構成される。コントロール血清としては、サルモネラ陽性及びサルモネラ陰性の非交差反応血清が使用される。とりわけサルモネラ抗体定量用に有利なのは、フィールドインフェクション又はワクチネーションにより免役されたサルモネラ陽性の動物から得られたコントロール血清である。

本発明に於けるサブユニットワクチンは、上記FliC9kDaポリペプチド抗原或いはその複合物からなる抗原性物質と医薬上許容される担体とから構成される。

以下、上記サルモネラ抗原処方物をELISA法に用いるものとして、各試薬、試料を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに特に制限されるものではなく、他の酵素抗体法に用いてもよい。

支持体 (以下ELISAプレートと云う) は、GST9kDaポリペプチド抗原をマイクロプレートにコーティングさせたものである。即ち、ELISAプレートは、上記の如く精製したGST9kDaポリペプチドを融解後、蛋白濃度で0.05µg/ウエルとな

10

20

30

40

50

るようコーティング緩衝液で希釈し、マイクロプレートウエルに2～5で1晩コーティングを行い、1%牛アルブミン-PBS（滅菌リン酸緩衝生理食塩水）を用いて室温で1時間ブロッキングを行い、その後ブロッキング液を除去してウエルを十分に乾燥させシールすることにより作製した。使用したコーティング緩衝液は、1000ml中に炭酸水素ナトリウム2.93g、炭酸ナトリウム1.59g、アジ化ナトリウム0.2gを含有し、pH9.4～9.6に調整されたものである。

この際、Fl i C 9 k D aポリペプチドをGSTと融合させた抗原処方物を使用することにより、該抗原処方物をマイクロプレート上にコーティングし易く、また作製されたELISAプレートも良好な安定性及び均一性並びに高感度のコーティングを得るものとなった。また、ELISAプレートは、検出精度を維持するために、使用時まで2～5の暗所にて保存することが好ましい。

サルモネラ陽性血清は、SE不活化ワクチン（レイヤーミュンSE）で免役した鶏より作製する。21～70日齢のSPF鶏にレイヤーミュンSEを1.0ドース皮下接種し、アイソレーターの中で飼育する。ワクチン接種4週間後に採血し、血清分離を行い、56で30分間非動化する。市販のひな白痢診断用抗原により凝集反応（PD-RPA）を行い、凝集価8倍を示す血清を500倍希釈する。このものは、使用時まで-40で保存するのが好ましいが、凍結乾燥させても良い。

サルモネラ陰性血清は、21～70日齢のSPF鶏より調整する。採血後、上記サルモネラ陽性血清と同様に血清分離及び非動化を行い、PD-RPAで陰性であることを確認してプールし、牛胎児血清を用いて10倍希釈する。このものを5ml容のバイアル瓶に100μlずつ分注して凍結乾燥する。また、使用時まで2～5の暗所に保存することが好ましい。

血清希釈液は、滅菌リン酸緩衝生理食塩水（以下PBSと云う）に牛胎児血清10ml、ポリソルベート20を1ml、アジ化ナトリウム0.02g、1%フェノールレッド0.3ml、ゲンタマイシン1mlを加えて1000mlに調整し、スターラーを用いて溶解し、濾過滅菌後、滅菌容器に小分けして2～5で保存する。

コンジュゲート希釈液は、PBSにポリソルベート20を2ml、牛胎児血清1ml、マラカイトグリーン0.05gを加えて1000mlに調整し、血清希釈液と同様にスターラーを用いて溶解し、濾過滅菌後、滅菌容器に小分けして2～5で保存する。

OPD希釈液は、蒸留水にクエン酸-水和物21.01g、無水リン酸-水素ナトリウム28.40g、30%過酸化水素水1mlを加えて1000mlに調整し、溶解後、2～5で保存する。

上記の如く調整した試薬を用いたELISA法による検査手順を以下に示す。この際、各試薬は使用する前に室温に戻しておく。

まず、検査用試料を準備する。

試料としては鶏の血清或いは卵黄を用いたりする。該試料を1mlシリンジで0.6mlをマイクロテストチューブに取り、等量の血清希釈液を加えてよく混合し、試料の1次希釈液を作製する（2倍希釈）。次いで、試料希釈用マイクロプレート（FALCON製の組織培養用マイクロテストプレート平底、低蒸発タイプ、96穴の蓋付きもの）にA段の1～8列を除いて、血清希釈液を250μl/ウエルずつ分注し、試料の1次希釈液を4μl/ウエルずつ分注して、20分間プレートミキサーで十分に攪拌して試料の2次希釈液を調整しておく（125倍希釈）。

1. 1次血清との反応（試料との反応）

上記希釈用マイクロプレートのA段の1～4列にサルモネラ陰性血清（500倍希釈）、5～8列にサルモネラ陽性血清（1000倍希釈）を分注する。一方、GST9kDaポリペプチド抗原を担持させたELISAプレートのA段1～8列を除いた全てのウエルに血清希釈液を75μlずつ分注し、上記試料の2次希釈液を25μlずつ加える（最終希釈が500倍となる）。更に、該ELISAプレートのA段1～4列にサルモネラ陰性血清、5～8列にサルモネラ陽性血清を夫々100μlずつ分注し、室温で30分間、抗原と反応させる。

10

20

30

40

50

2. 2次血清との反応(コンジュゲートとの反応)

1の反応が終了後、反応液を捨て、蒸留水でウエルを3回洗浄し、水分を除去した後、酵素で標識された抗ニワトリIgG(H+L)ウサギ血清をコンジュゲート希釈液で3000倍希釈となしたものを、全てのウエルに100μlずつ分注し、室温で30分間反応させる。

3. 基質との反応(発色)

2の反応が終了後、反応液を捨て、蒸留水でウエルを3回洗浄し、水分を除去した後、オルトフェニレンジアミンをOPD希釈液で適宜希釈したものを0.05mg/ウエルとなるように各ウエルに分注し、10分間室温で反応させる。

4. 反応の停止

3の反応が終了後、3規定硫酸を全てのウエルに100μlずつ分注し発色を停止させる。

5. 抗体価の決定

4の反応停止後、プレートリーダーで各試料の吸光度を(OD)を490nmで測定し、m-OD値(修正OD値)を次式により計算する。

$m-OD値 = (S - NC) / (PC - NC)$ (S:試料のOD値、PC:サルモネラ陽性血清のOD値、NC:サルモネラ陰性血清のOD値を示す)

以下、本発明を実施例により詳細に説明する。

【実施例1】

・マーカー検出系としての試み及びm-OD値における陽性基準の設定

SE不活化ワクチン接種群を3群とし、以下の通り試料を採取した。

(1) 81~93日齢で市販のSE不活化ワクチン(レイヤーミュンSE-NB)を接種した192日齢の鶏群より鶏卵18個、(2) 49~54日齢及び70~89日齢でレイヤーミュンSEを接種した420日齢の鶏群より鶏卵19個、(3) 57, 58日齢及び96~99日齢でレイヤーミュンSEを接種した690日齢の鶏群より鶏卵22個を採取した。従来SE抗体検出試験法として使用される市販のCAF-SEエリーザ(弊社製)及びひな白痢診断用抗原を用いた急速平板凝集反応(PD-RPA)を9kDaポリペプチドをコーティングした本発明のELISA法と共に行った。結果を表1~3に示す(表1:192日齢、表2:420日齢、表3:690日齢)。

(表1)

検体No.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ELISA	I ^{a)}	0.53	0.60	0.09	0.88	0.22	0.53	1.04	0.43	0.21	0.23
	II-9 ^{b)}	0.63	1.20	0.50	1.29	1.78	0.64	0.44	0.65	0.66	1.83
PD-RPA		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
検体No.		11	12	13	14	15	16	17	18		
ELISA	I	0.27	0.50	0.59	0.85	0.20	0.50	0.09	0.23		
	II-9	1.34	1.28	0.70	0.84	1.00	0.21	1.01	0.27		
PD-RPA		—	—	—	—	—	—	—	—		

a) 市販のSEエリーザ

b) GST-9kDa ポリペプチドをコーティングしたプレートを用いたエリーザ

c) ELISA I : 0.2以上、ELISA II-9 : 0.1以上が陽性を示す。

(表 2)

検体No.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ELISA	I	0.32	0.31	0.39	0.38	0.37	0.15	0.21	0.38	0.32	0.18
	II-9	0.39	0.35	1.46	1.36	0.33	0.40	0.24	0.72	1.74	0.15
PD-RPA		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
検体No.		11	12	13	14	15	16	17	18	19	
ELISA	I	0.13	0.19	0.34	0.27	0.22	0.48	0.32	0.34	0.19	
	II-9	0.15	0.26	0.58	0.29	0.39	1.28	0.33	0.31	0.37	
PD-RPA		—	—	—	—	—	—	—	—	—	

(表 3)

検体No.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ELISA	I	0.08	0.20	0.22	0.09	0.13	0.16	0.68	0.23	0.32	0.06
	II-9	0.02	0.33	0.22	0.06	0.10	0.10	0.09	0.13	0.09	0.01
PD-RPA		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

検体No.		11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
ELISA	I	0.46	0.17	0.32	0.18	0.40	0.10	0.19	0.27	0.30	0.41
	II-9	0.18	0.28	0.36	0.26	0.21	0.24	0.14	0.33	0.10	0.14
PD-RPA		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
検体No.		21	22								
ELISA	I	0.19	0.14								
	II-9	0.32	0.03								
PD-RPA		—	—								

(比較例 1)

約 1 年前に環境から S E が分離された農場より採取した 100 個の卵の卵黄について、実施例 1 と同様に抗体の検出を行った。結果を表 4 に示す。

検体No.		51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
ELISA	I	0.05	0.08	0.05	0.19	0.08	0.06	0.07	0.06	0.05	0.04
	II-9	0.04	0.01	0.01	0.04	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02	0.02
PD-RPA		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
検体No.		61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
ELISA	I	0.14	0.07	0.10	0.05	0.07	0.01	0.09	0.07	0.10	0.04
	II-9	0.02	0.03	0.02	0.02	0.04	0.02	0.02	0.05	0.06	0.03
PD-RPA		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
検体No.		71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
ELISA	I	0.06	0.10	0.27	0.14	0.05	0.04	0.10	0.06	0.06	0.05
	II-9	0.03	0.03	0.05	0.05	0.05	0.02	0.01	0.01	0.02	0.03
PD-RPA		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
検体No.		81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
ELISA	I	0.06	0.08	0.12	0.09	0.13	0.05	0.09	0.07	0.14	0.12
	II-9	0.04	0.03	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.03	0.03	0.05
PD-RPA		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
検体No.		91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
ELISA	I	0.02	0.06	0.07	0.12	0.11	0.09	0.08	0.04	0.06	0.11
	II-9	0.02	0.03	0.03	0.02	0.04	0.04	0.02	0.02	0.01	0.05
PD-RPA		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

* SE分離歴：約1年前にSEが分離された。これ以降は調べられていない。

ここに、上記したm - O D値における陽性基準は、SE不活化ワクチン接種群の中で650～720日齢の鶏群由来の卵黄を用いた試験に於いて50%以上の陽性率となること、且つSE汚染農場由来の卵黄及び購入したSPF鶏群由来の卵黄（SPAFAS社より購入した鶏卵より採取）を用いた試験に於いて全て陰性となることを条件とした。

・成績及び考察

CAF - SEエリーザを用いた卵黄中のSE特異抗体検出率は、日齢と共に低下することが明らかとなり、PD - RPA法では、192日齢鶏群由来の卵黄で1例の陽性が認められたのみであるが、本発明のELISAプレートに於いては、m - O D値で0.1以上を陽性とした場合、192日齢及び420日齢鶏群由来卵黄を用いた場合約95%の陽性率、690日齢鶏群由来卵黄でも陽性率は約70%であった。また、SE分離農場からの卵黄では、本発明のELISAプレートに於いてm - O D値0.1以上を示す検体は1例もなく、100検体の最大m - O D値は、0.07であった。また、表には示さなかったが、購入したSPF鶏群由来卵黄は、本発明のELISAプレートでは全て陰性であった。また、卵黄の代わりに血清を用いた場合もほぼ同様の結果が得られた。

以上により、本発明のELISAプレートは、マーカー検出としての使用を可能にするものと考察し、m - O D値0.1以上を陽性基準に設定される。

【実施例2】

・産卵中のSE投与鶏を用いた各種抗体検出法による抗体応答の経時的観察

過去5年間、SE分離歴のない農場の240日齢ハイライン系ホワイトレグホン20羽を用いて、SE投与試験を2回行った（各試験につき、投与群と非投与対照群を5羽ずつ設定し、同時に試験を行った）。感染鶏舎内へ鶏を導入する前に鶏舎内及び鶏群のプール盲腸便についてSE分離を行い、夫々陰性であることを確認した後、次の投与試験を行った。SE No. 15株を $3 \times 10^9 \sim 10^{10}$ CFU/羽となるように、2日開けて

2回経口投与し、接種3日後、1週間後、2週間後、4週間後、6週間後、8週間後、10週間後にクロアカスワブ、卵及び血液を採取してSE分離を行った。結果を表5～7に示す(表5：クロアカスワブ、表6：卵内容、表7：血液)。また、試験最終日に剖検を行い、盲腸内容、肝臓、脾臓及び輸卵管を採取してSE分離を行った。結果を表8に示す。また、採取した血液及び卵を用いて、CAF-SEエリーザ、本発明のELISAプレートでの反応性を調べると共に、ひな白痢診断用抗原を用いた急速平板凝集反応(PD-RPA)を行った。結果を表9～12に示す(表9：試験No.1における血液中の経時的な抗体検査成績、表10：試験No.1における卵黄中の抗体検査成績、表11：試験No.2における血液中の抗体検査成績、表12：試験No.2における卵黄中の抗体検査成績)。

10

尚、各検体からのSE分離は以下の方法により行った。

クロアカスワブ、血液及び卵は約10倍量のハーナテトラチオン酸塩基礎培地(HTB)に採取し、37℃で48時間培養後にそれをMLCBに画線塗抹し、48時間培養後にSE陽性を判定し、そこで得られたコロニーをトリプトソーヤ寒天培地に移植して24時間培養後、サルモネラ免疫血清O9群との反応を行い凝集性の有無を確認した。剖検時に無菌的に採取した輸卵管は、片方を結紮し形成中の卵を取り除いた後、もう一方からHTBを加え内容物をよくもんで取り出し、その洗浄液を試料とした。肝臓及び脾臓は夫々5gずつを無菌的に採取した後、約10倍量のHTBを加えてホモゲナイズしたものを試料とした。これらを37℃で48時間増菌培養した後MCLBに画線塗抹し、更に48時間後にSE陽性を判定した。そこで得られたコロニーをトリプトソーヤ寒天培地に移植して24時間培養後、サルモネラ免疫血清O9群との反応を行い凝集性の有無を確認した。

20

(表5) SE投与群におけるクロアカスワブからのSE分離成績

試験No.	検体No.	投与後経過日数或いは週数						
		3日	1週	2週	4週	6週	8週	10週
1	1	+ ^{a)}	- ^{b)}	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	+	+
	4	+	+	+	+	+	+	+
	5	-	+	-	-	-	-	+
2	11	+	+	+	+	+	-	-
	12	-	+	-	+	-	+	-
	13	+	+	+	+	+	+	+
	14	+	+	+	+	+	+	+
	15	+	+	-	-	-	-	-

a) + : SE分離陽性

b) - : SE分離陰性

(表 6) SE投与群における卵内容からのSE分離成績

試験 No.	検体 No.	投与後経過日数或いは週数						
		3日	1週	2週	4週	6週	8週	10週
1	1	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	—
	4	—	—	—	—	—	—	—
	5	—	—	—	—	—	—	—
2	11	—	—	—	—	—	—	—
	12	—	—	—	—	—	—	—
	13	—	—	—	—	—	—	—
	14	—	—	—	—	—	—	—
	15	—	—	—	—	—	—	—

(表 7) SE投与群における血液からのSE分離成績

試験 No.	検体 No.	投与後経過日数或いは週数						
		3日	1週	2週	4週	6週	8週	10週
1	1	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	—
	4	—	—	—	—	—	—	—
	5	—	—	—	—	—	—	—
2	11	—	—	—	—	—	—	—
	12	—	—	—	—	—	—	—
	13	—	—	—	—	—	—	—
	14	—	—	—	—	—	—	—
	15	—	—	—	—	—	—	—

(表 8) SE投与群における剖検時(投与10週後)の盲腸内容、輸卵管内容物、

肝臓及び脾臓からのSE分離成績

試験 No.	検体 No.	投与後経過日数或いは週数			
		盲腸内容	輸卵管内容物	肝臓	脾臓
1	1	—	—	—	—
	2	+	—	—	—
	3	—	—	—	—
	4	+	—	—	—
	5	—	—	—	—
2	11	—	—	—	—
	12	—	—	—	—
	13	+	—	—	—
	14	+	—	—	—
	15	—	—	—	—

(表9) 試験No.1における血液中の経時的な抗体検査成績

検体No.			SE投与群					非投与対照群					
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
投 予 後 経 過 日 数 あ る い は 週 数	0日	ELISA	I	0.02	0.00	0.04	0.05	0.00	0.01	0.03	0.04	0.04	0.04
			II-9	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01
		PD-MPA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3日	ELISA	I	0.05	0.03	0.05	0.05	0.06	0.02	0.03	0.03	0.04	0.03
			II-9	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
		PD-MPA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1週	ELISA	I	0.11	0.09	0.05	0.08	0.05	0.02	0.04	0.04	0.07	0.05
			II-9	0.02	0.01	0.01	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
		PD-MPA	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2週	ELISA	I	0.08	0.10	0.11	0.12	0.10	0.03	0.07	0.05	0.04	0.05
			II-9	0.01	0.02	0.01	0.04	0.03	0.02	0.02	0.01	0.01	0.02
		PD-MPA	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
	4週	ELISA	I	0.04	0.03	0.05	0.04	0.02	0.02	0.02	0.05	0.04	0.04
			II-9	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01
		PD-MPA	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
	6週	ELISA	I	0.05	0.02	0.04	0.05	0.03	0.02	0.05	0.07	0.03	0.04
			II-9	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01
		PD-MPA	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
	8週	ELISA	I	0.05	0.03	0.07	0.07	0.09	0.05	0.07	0.07	0.05	0.07
			II-9	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02
PD-MPA		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
10週	ELISA	I	0.05	0.04	0.08	0.10	0.06	0.06	0.05	0.07	0.09	0.07	
		II-9	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	
	PD-MPA	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-		

* ELISA I : 市販のSEエリザを用いたELISA反応におけるm-OD値

(0.2以上を陽性、0.2未満を陰性とする)

* ELISA II-9 : GST-9kDa ポリペプチドをコーティングしたプレートを用い

たELISA反応におけるm-OD値 (0.1以上を陽性、0.1未満を陰性とする)

* PBSで100倍に希釈した血清と、同様に100倍に希釈したひな白痢診断用菌液を混合し、52℃で2時間反応を行い、その後2～5℃に1晩静置後凝集像を観察し、陽性コントロールとして設定したSE不活化ワクチン接種4週後の血清と同様の凝集像を呈したものを陽性(+)と判定する。

(表 10) 試験No.1における卵黄中の抗体検査成績

検体No.			SE投与群					非投与対照群					
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
投 予 後 経 過 日 数 あ る い は 週 数	0日	ELISA	I	0.02	0.02	0.01	0.04	0.02	0.03	0.05	0.09	0.08	0.05
			II-9	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
	PD-MPA			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3日	ELISA	I	0.02	0.03	0.01	0.07	0.03	0.02	0.05	0.05	0.04	0.04
			II-9	0.01	0.00	0.00	0.02	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01
	PD-MPA			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1週	ELISA	I	0.01	0.04	0.01	0.06	0.00	0.01	0.05	0.06	0.08	0.04
			II-9	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00
	PD-MPA			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2週	ELISA	I	0.18	0.09	0.10	0.07	0.03	0.03	0.06	0.06	0.04	0.03
			II-9	0.01	0.00	0.00	0.04	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00
	PD-MPA			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	4週	ELISA	I	0.04	0.03	0.04	0.05	0.03	0.02	0.02	0.05	0.04	0.03
			II-9	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01
	PD-MPA			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	6週	ELISA	I	0.07	0.03	0.05	0.11	0.05	0.03	0.08	0.05	0.04	0.06
			II-9	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.02	0.00	0.01	0.01
	PD-MPA			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	8週	ELISA	I	0.04	0.05	0.03	0.05	0.04	0.01	0.07	0.06	0.07	0.06
			II-9	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01
PD-MPA			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
10週	ELISA	I	0.05	0.02	0.02	0.07	0.04	0.01	0.06	0.06	0.04	0.04	
		II-9	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	
PD-MPA			—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

* PD-MPA : PBSで10倍に希釈した卵黄と、同様に100に希釈したひな

白痢診断用菌液を混合し52℃で2時間反応を行い、その後2～5℃に1晩静置後凝集像を観察し、陽性コントロールとして設定したSE不活化ワクチン接種4週後の血清と同様の凝集像を呈したものを陽性(+)と判定する。

(表 1 2) 試験No.2における卵黄中の抗体検査成績

検体No.			SE投与群					非投与対照群					
			11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
投 予 後 経 過 日 数 あ る い は 週 数	0日	ELISA	I	0.03	0.04	0.06	0.08	0.07	0.04	0.05	0.02	0.14	0.03
			II-9	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.04
		PD-MPA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3日	ELISA	I	0.05	0.01	0.01	0.03	0.02	0.03	0.06	0.02	0.09	0.02
			II-9	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03
		PD-MPA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1週	ELISA	I	0.04	0.03	0.07	0.06	0.08	0.05	0.05	0.03	0.12	0.03
			II-9	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.03
		PD-MPA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2週	ELISA	I	0.20	0.08	0.18	0.06	0.19	0.02	0.03	0.03	0.09	0.03
			II-9	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
		PD-MPA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4週	ELISA	I	0.20	0.07	0.12	0.23	0.22	0.04	0.06	0.02	0.10	0.04
			II-9	0.02	0.02	0.03	0.03	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03
		PD-MPA	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	6週	ELISA	I	0.20	0.11	0.04	0.08	0.14	0.05	0.03	0.04	0.04	0.10
			II-9	0.02	0.01	0.02	0.02	0.04	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00
		PD-MPA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8週	ELISA	I	0.06	0.03	0.11	0.09	0.14	0.02	0.03	0.02	0.04	0.04
			II-9	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01
PD-MPA		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10週	ELISA	I	0.09	0.11	0.05	0.03	0.09	0.01	0.04	0.02	0.06	0.02	
		II-9	0.02	0.03	0.01	0.02	0.02	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
	PD-MPA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

・成績と考察

各試料からのSE分離を行った結果、クロアカスワブからは表5に示すとおり、試験No. 1及び2において接種群の全ての鶏より少なくとも1度はSE分離が認められたが、2週間後以降からSE分離が認められない個体が、試験No. 1では2羽、試験No. 2では1羽存在した。

卵内容物及び血液からは、表6及び7に示すとおり、何れの時期に於いてもSE分離は認められなかった。

盲腸内容、肝臓、脾臓及び輸卵管からは、表8に示すとおり、盲腸内容からのみ試験No. 1の5羽中2羽においてSE分離が認められた。尚、対照群に於いては全ての試料について陰性であった。

また、血液及び卵黄中の抗体を調べた結果、表9～12に示すとおり、CAF-SEエリザに於いては、2群の検体No. 13, 14及び15の血液が1, 2, 4週後の時点で陽性を示し、検体No. 11, 14及び15の卵黄が血液で陽性が見られたのよりもやや遅れて2, 4, 6週後の時点で陽性を示した。一方、本発明の9kDaポリペプチドをコーティングしたELISAプレートでは、全ての検体が陰性を示した。

以上より、SE投与産卵鶏に於いてもGST9kDaポリペプチドをコーティングしたELISAプレートの抗体検出法は、血清及び卵黄共に全てに陰性を示すことから、SE不活化ワクチン接種鶏とSE感染鶏の血清及び卵黄を用いた検査に於いてマーカー検出法に適していると判断される。

【実施例 3】

・市販されている S E 不活化ワクチン接種鶏由来血清を用いた試験

市販の S E 不活化ワクチンが 5 3 k D a ポリペプチドに対する抗体産生能を有しているかどうかについて検討した。

市販の S E 不活化ワクチン A を 2 6 日齢の S P F 鶏 5 羽に 0 . 5 m l / 羽接種、 B を 3 1 日齢の S P F 鶏 1 0 羽に 0 . 5 m l / 羽接種、 C を 3 3 日齢の S P F 鶏 5 羽に 0 . 5 m l / 羽接種、 D を 3 3 日齢の S P F 鶏 5 羽に 0 . 2 5 m l / 羽接種、 E を 3 3 日齢の S P F 鶏 4 羽に 0 . 2 5 m l / 羽接種し、夫々れ接種 4 週後に得られた血清を用いて、 C A F - S E エリーザ及び本発明の E L I S A プレートによる E L I S A 反応及び 5 3 k D a ポリペプチド並びに G S T 9 k D a ポリペプチドを抗原とした W e s t e r n B l o t t i n g (W B) 反応を行い、夫々れ抗原に対する抗体産生性を確認した。 W B 法では 2 種類のポリペプチドを用いて 1 0 % ポリアクリルアミドゲルを用いた S D S - P A G E を行った後、それをニトロセルロース膜に転写し、各試験血清 1 μ l と室温で 9 0 分間反応させた後に 2 次血清として抗ニワトリ I g G ウサギ血清を 2 0 0 0 倍希釈したものをを用いて室温で 9 0 分間反応させた。最後に基質として 4 - クロロ 1 - ナフトールを使用した。結果を表 1 3 に示す。

(表 1 3) 各種SE不活化ワクチン接種鶏由来血清を用いた抗体反応の成績

ワクチン名	検体 No.	ELISA値		PD-RPA	WB	
		I	II-9		53kDa	9kDa
SE不活化 ワクチンA	1	0.90	2.19	+	++++	+++
	2	0.29	2.07	-	++++	+++
	3	1.01	1.77	+	++++	+++
	4	1.06	1.94	+	++++	+++
	5	0.62	2.00	+	++++	+++
SE不活化 ワクチンB	6	1.22	2.13	+	++++	++
	7	1.00	1.88	+	++++	+++
	8	0.39	1.54	+	++++	++
	9	0.76	1.83	+	++++	++
	10	0.41	2.19	+	++++	++
	11	0.65	1.71	+	++++	+++
	12	0.29	1.42	+	++++	++
	13	1.36	1.12	+	++++	++
	14	1.12	1.94	+	++++	++
	15	0.34	1.49	+	++++	++
SE不活化 ワクチンC	16	0.32	2.31	+	++++	+++
	17	1.13	2.18	+	++++	+++
	18	0.14	2.31	+	++++	+++
	19	0.99	2.30	+	++++	+++
	20	0.97	2.30	+	++++	+++
SE不活化 ワクチンD	21	1.03	1.01	+	+	+
	22	0.98	0.16	+	+	+
	23	0.49	0.28	+	+	+
	24	0.99	0.44	+	+	±
	25	0.32	0.16	+	+++	+
SE不活化 ワクチンE	26	0.60	0.19	+	++	±
	27	0.26	0.12	+	+	±
	28	0.06	0.05	+	++	+
	29	0.40	0.12	+	++	+

* A及びBは用法用量通りに接種を行ったが、C～Dは用法用量で2回接種とされているところを1回のみとした。

* I : 市販のSEエリザを用いたELISA反応におけるm-OD値

(0.2以上を陽性、0.2未満を陰性とする)

* II-9: GST-9kDaポリペプチドをコーティングしたプレートを用いたELISA

反応におけるm-OD値 (0.1以上を陽性、0.1未満を陰性とする)

・成績と考察

ELISA法では、SE不活化ワクチンC、D、Eは用法用量で規定されている量の半量を接種したため、低い抗体価を示す鶏群もあったが、WB法に於いては53kDaポリペプチド及びGST9kDaポリペプチドを抗原とした両方の場合で全ての検体でバンドが認められたため(図3～5参照)、市販のSE不活化ワクチンは53kDaポリペプチド及び9kDaポリペプチドに対する抗体産生を誘導するものと考えられる。

以上より、SE不活化ワクチン接種鶏について、53kDa或いは9kDaポリペプチドをコーティングしたELISAプレートを用いた検出法(ELISA法)、及びこれら

抗原を用いたWB法によりSE感染鶏と区別することができた。

【実施例4】

・GST9kDaポリペプチドの細胞への接着性確認試験

SEfliCの一部である9kDaポリペプチドがSEのコロニー形成の最初のステップとなる上皮細胞への接着作用を持つかどうかの確認を行った。

GST9kDaポリペプチドをコーティングしたプレート、対照抗原として市販のSEエリーザプレート(CAF-SEエリーザ)、NDエリーザプレート及び1%牛アルブミンPBS液を0.1ml/ウエルずつ分注し、1時間室温に置いた後、液を捨てた状態のプレートに夫々 1.9×10^4 個/ウエルとなるようMEMで調整したHeLa細胞を分注して、37℃で1時間反応後、液を捨てMEMでウエルを洗浄し細胞の接着状態を観察した。

10

・成績と考察

HeLa細胞と各プレートとの反応は、牛アルブミンのみを分注したプレートでは接着(-)、市販のSEエリーザプレート(CAF-SEエリーザ)では(+)、GST9kDaポリペプチドをコーティングしたプレートでは(++)、市販のNDエリーザプレートでは(+++)となり、GST9kDaポリペプチドはHeLa細胞に接着する抗原であることがわかった。

よって、GST9kDaポリペプチドはSEfliCの中でも上皮細胞に接着することによりコロニー形成に重要な役割を果たす抗原であると考えられる。

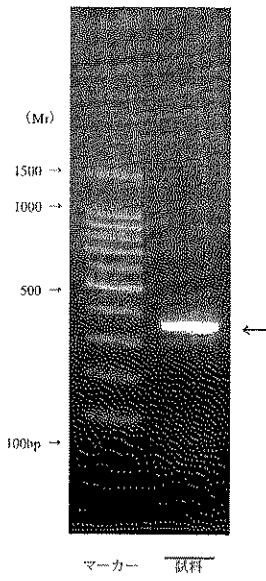
【産業上の利用可能性】

20

以上の如く構成した本発明により、SE不活化ワクチン接種鶏とSE感染鶏との間に血清学的なマーカーとなりうる違いを確認できることが明らかとなった。これにより、fliC9kDaのポリペプチド又はその複合物を用いて、SE不活化ワクチン接種鶏とSE感染鶏とを容易に識別することができるものとなる。また、fliC9kDaのポリペプチド又はその複合物がSE不活化ワクチンの抗原の中で免疫組織学的に重要な役割を担っていることから、この抗原をサブユニットワクチンとして多価ワクチンを製造することができる。更に、この抗原処方物はfliC9kDaポリペプチドからなるべん毛抗原を持つサルモネラ菌属全ての不顕性感染にとって有効であることから、SEに限らず他のサルモネラ菌属の検出にも適用できるものとなる。

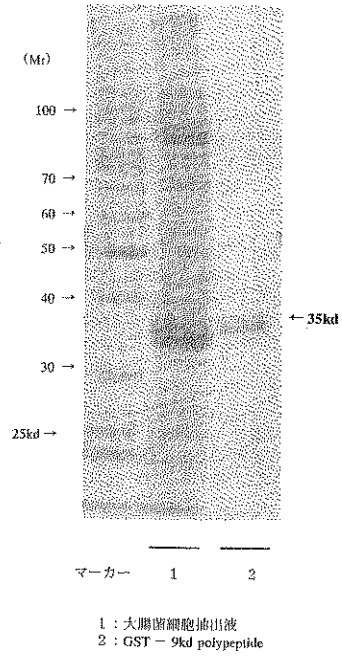
【 図 1 】

図 1



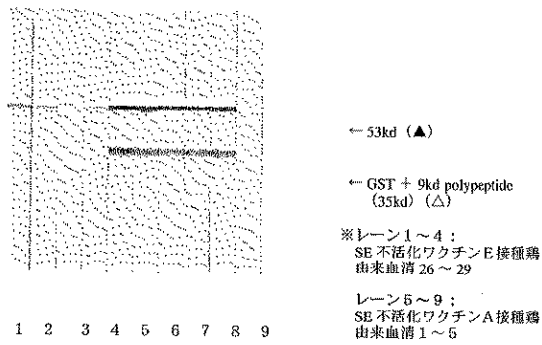
【 図 2 】

図 2



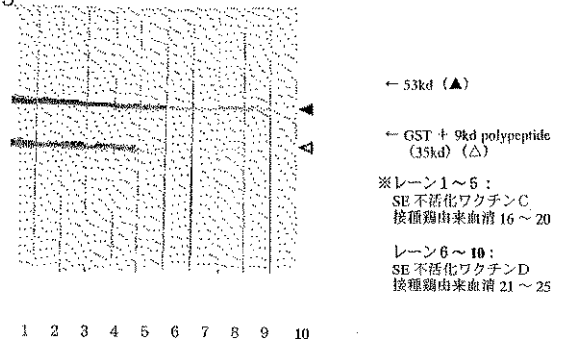
【 図 3 】

図 3



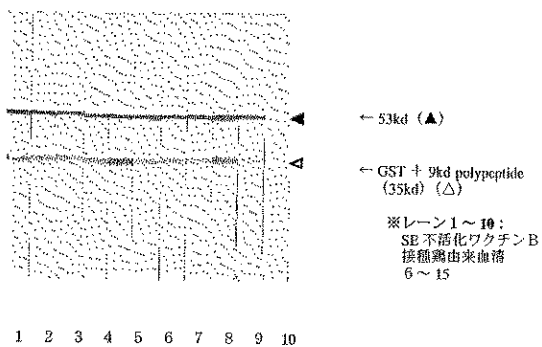
【 図 5 】

図 5



【 図 4 】

図 4



【手続補正書】

【提出日】平成16年10月25日(2004.10.25)

【手続補正001】

【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】

酵素抗体法により、血清試料、卵黄試料又は体液及び組織抽出液からなる流動体試料内のサルモネラに対する抗体を検出するためのキットであり、支持体上にサルモネラ種のべん毛抗原の主要抗原である53kDaポリペプチド中のSE9kDaポリペプチド又はその複合物からなる抗原を担持させた支持体と、種々のコントロール血清、血清希釈液、コンジュゲート希釈液及びオルトフェニレンジアミン希釈液とからなり、野外型感染鶏とワクチン接種鶏とを血清学的に検査するものとなしたことを特徴とするサルモネラ抗原処方物を使用した抗体検査キット。

10

【請求項2】

SE9kDaポリペプチド又はその複合物からなる抗原は、該9kDaポリペプチドをグルタチオン-S-トランスフェラーゼと融合させた融合蛋白質となしたことを特徴とする請求の範囲1に記載のサルモネラ抗原処方物を使用した抗体検査キット。

20

【請求項3】

サルモネラ種のべん毛抗原の主要抗原である53kDaポリペプチド中のSE9kDaポリペプチド又はその複合物からなる抗原を含んでなる、サルモネラ・エンテリティディスの感染に対して鶏を防御するものとなしたことを特徴とするサルモネラサブユニットワクチン。

【手続補正002】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0001

【補正方法】変更

【補正の内容】

30

【0001】

【技術分野】

この発明は、サルモネラ抗原処方物を使用して野外型感染鶏とワクチン接種鶏とを識別するための検査用キット、並びにサブユニットワクチンに関するものである。

【背景技術】

サルモネラ属の細菌は人及び動物の両方に於いて病原性を示すことが知られている。とりわけ、サルモネラ・エンテリティディス(*Salmonella enteritidis*以下SEと云う)は、人の食中毒の原因菌の一つとして1980年代後半より注目されてきた。このSEは多くの研究により、養鶏場に於いて産生される殻付き卵を汚染していることが知られるようになり、養鶏場(採卵場)に於けるSE対策が重要視されている。

40

近年、養鶏場のSE対策として一般的な衛生管理を向上させることの他に、採卵鶏の若齢期にSE不活化ワクチンを接種することが試みられている。しかしながら、この場合、次のような問題点がある。

(1) SE不活化ワクチンを接種した場合、SE特異抗体は産生されるが、この産生されたSE特異抗体は野外型SEの自然感染と血清学的に区別することができない。

(2) 現在広く普及しているSE不活化ワクチンは、菌体を不活化した抗原、即ちSEの菌体をホルマリンにより死菌としたものを中心抗体として使用しているため、菌体内の毒素(Enterotoxin)を含んでおり、ワクチンを接種することにより様々な副反応(例えば鶏増体重を阻害する)を引き起こすことが知られている。

50

【手続補正 0 0 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 0 3】

り出し、サブユニットワクチンとして多価ワクチンを作成することが有用と考えられるが、これまでサブユニットワクチンとしての有効な S E 抗原は報告されていない。

上記したように、ワクチン接種鶏と野外型感染鶏とを容易に識別でき、また鶏に対してストレスの少ない S E 不活化ワクチン或いは S E の有効な抗原を含む単価或いは多価サブユニットサルモネラワクチンの開発が強く望まれているが、何れについても未だ有効なものは確認されていない。本発明者らは、これに鑑みて鋭意研究を進めたところ、S E べん毛抗原の主体を成す F l i C (べん毛の主要抗原)である S E 5 3 k D a ポリペプチド (S E F l i C) の中の一部 9 k D a ポリペプチドが鶏に接種された S E 不活化ワクチンにより産生された抗体を特異的に検出できる抗原であることを見出し、この S E F l i C 9 k D a ポリペプチド又はその複合物を用いて、現在市販の S E 不活化ワクチン接種鶏を血清学的に検出するための抗原処方物を使用した検査キットを提供することを目的とする。

更には、S E 9 k D a ポリペプチドを鶏に接種した場合、鶏は S E に感染する免疫学的に防御能を誘導することから、この抗原を含んだストレス反応の低い S E サブユニットワクチン或いはサルモネラサブユニットワクチンを提供することを目的とする。

【発明の開示】

上記課題を解決するため、本発明では、酵素抗体法により、血清試料、卵黄試料又は体液及び組織抽出液からなる流動体試料内のサルモネラに対する抗体を検出する検査キットを、支持体上にサルモネラ種のべん毛抗原の主要抗原である 5 3 k D a ポリペプチド中の S E 9 k D a ポリペプチド又はその複合物からなる抗原を担持させた支持体と、種々のコントロール血清、血清希釈液、コンジュゲート希釈液及びオルトフェニレンジアミン (以下 O P D と云う) 希釈液とから構成し、該サルモネラ抗原処方物を使用した抗体検査キットを、野外型感染鶏とワクチン接種鶏

【手続補正 0 0 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 0 4】

とを血清学的に検査するために使用されるものとなしたことを特徴とする。これにより、サルモネラ菌に自然感染した野外型感染鶏と S E 不活化ワクチン接種により感染したワクチン接種鶏とを血清学的に正確に識別することが可能となる。

また、この際、上記 S E 9 k D a ポリペプチド又はその複合物からなる抗原は、該 9 k D a ポリペプチドをグルタチオン - S - トランスフェラーゼ (以下 G S T と云う) と融合させた融合蛋白質となして支持体上への定着を安定させるようになしたりする。

また、上記サルモネラ種のべん毛抗原の主要抗原である 5 3 k D a ポリペプチド中の S E 9 k D a ポリペプチド又はその複合物からなる抗原を含ませたサルモネラサブユニットワクチン或いは S E サブユニットワクチンを製造し、サルモネラ菌属の感染に対して鶏を防御するようにする。

【図面の簡単な説明】

図 1 は、本発明に係る試料のアガロースゲル電気泳動法による 7 3 3 ~ 1 0 0 8 b p 領域の P C R 像を示す。

図 2 は、本発明に係る G S T 9 k D a ポリペプチドの分子量の確認像を示す。

図 3 は、本実施例に於ける S E 不活化ワクチン A 及び E 接種鶏由来血清の W B 反応成績を示す。

10

20

30

40

50

【手続補正005】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0005

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0005】

図4は、本実施例に於けるSE不活化ワクチンB接種鶏由来血清のWB反応成績を示す。

図5は、本実施例に於けるSE不活化ワクチンC及びD接種鶏由来血清のWB反応成績を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

本発明の抗原処方物に使用されるSE f l i c 遺伝子は、SEのペム毛を構成する主要な蛋白質であるF l i c (5 3 k D a) をコードしており、1518塩基対で構成され、505個のアミノ酸より構成されている。また、SEのアミノ酸配列と他のサルモネラのN末端とC末端のアミノ酸配列及び塩基配列を比較すると、かなり高いホモロジーが存在することが確認された。そこで、本発明では、SE F l i c の特異的な領域(9kDaポリペプチド部分)の単離精製を遺伝子工学的に行い、SE 9 k D a ポリペプチド又はその複合物を以下のようにして精製した。

A. SE f l i c 遺伝子の単離と解析

1. PCR法によるf l i c の増幅及びクローニング

既知の塩基配列を基に、PCR用プライマーSE F 及びプライマーSE R を設計し、SE No. 15株の菌体よりゲノムDNAを精製し、これをテンプレートとしてPCR法により増幅した。PCRの条件は、変性94℃、30秒間、アニーリング60℃、30秒間、増幅72℃、90秒間を1サイクルとして30サイクル繰り返した。また、増幅されたDNAフラグメントはアガロースゲル電気泳動法(1%アガロースゲル)により確認した(図1参照)。この増幅したPCR断片(DNA)中の不純なDNAを除去して精製するために、増幅した遺伝子をpCR2.1Tベクターにサブクローニングした後、大腸菌内で複製し、クローニングを試みた。

2. f l i c 遺伝子の塩基配列の決定

クローニング後、単離した4クローンの内1クローンをテンプレートとし、プライマーSE F、SE R、SE R 3、SE R 4を用い、塩基配列の決定を試みた。塩

【手続補正006】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0007

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0007】

バス及びウォーターバス(60℃)にて3回凍結融解を繰り返し、菌を破碎した。破碎した菌を遠心分離し(13,500rpm、10分、4℃)、その遠心上清をGSTrap FF 5mlカラム(Amersham Pharmacia Biotech製)に通し、融合蛋白質をカラム内の担体に結合させた後、10mM還元型グルタチオン(50mM Tris・HCl、pH8.0)5mlで溶出した。溶出した融合蛋白質はPBSで透析し精製標品とした。

本発明に於ける検査キットは、酵素抗体法により、血清試料、卵黄試料又はその他の流動体試料内のサルモネラに対する抗体を検出するためのキットであり、上記サルモネラ抗原処方物でコーティングされた支持体の他に、種々のコントロール血清、血清希釈液、コンジュゲート希釈液及びOPD希釈液で構成される。コントロール血清としては、サルモネラ陽性及びサルモネラ陰性の鶏血清が使用される。とりわけサルモネラ抗体定量用に有利なのは、フィールドインフェクション又はワクチネーションにより免役されたサルモネラ陽性の鶏から得られたコントロール血清である。

10

20

30

40

50

本発明に於けるサブユニットワクチンは、上記SE9kDaポリペプチド抗原或いはその複合物からなる抗原性物質と医薬上許容される担体とから構成される。

以下、上記サルモネラ抗原処方物をELISA法に用いるものとして、各試薬、試料を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに特に制限されるものではなく、他の酵素抗体法に用いてもよい。

支持体（以下ELISAプレートと云う）は、GST9kDaポリペプチド抗原をマイクロプレートにコーティングさせたものである。即ち、ELISAプレートは、上記の如く精製したGST9kDaポリペプチドを融解後、蛋白濃度で0.05 μ g/ウエルとなるようコーティング緩衝液で希釈し、マイクロプレートウエルに2~5で1晩コーティングを行い、1%牛アルブミンPBS（滅菌リン酸緩衝生理食塩水）を用いて室温で1時間ブロッキングを行い、その後ブロッキング液を除去してウエルを十分に乾燥させシールすることにより作製した。使用したコーテ

10

【手続補正007】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0008】

リング緩衝液は、1000ml中に炭酸水素ナトリウム2.93g、炭酸ナトリウム1.59g、アジ化ナトリウム0.2gを含有し、pH9.4~9.6に調整されたものである。

20

この際、SE9kDaポリペプチドをGSTと融合させた抗原処方物を使用することにより、該抗原処方物が安定化すると共にマイクロプレート上にコーティングし易く、且つ作製されたELISAプレートも良好な安定性及び均一性並びに高感度のコーティングを得るものとなった。また、ELISAプレートは、検出精度を維持するために、使用時まで2~5の暗所にて保存することが好ましい。

サルモネラ陽性血清は、SE不活化ワクチン（レイヤーミューンSE）で免役した鶏より作製する。21~70日齢のSPF鶏にレイヤーミューンSEを1.0ドース皮下接種し、アイソレーターの中で飼育する。ワクチン接種4週間後に採血し、血清分離を行い、56で30分間非動化する。市販のひな白痢診断用抗原により凝集反応（PD-RPA）を行い、凝集価8倍を示す血清を500倍希釈する。このものは、使用時まで-40で保存するのが好ましいが、凍結乾燥させても良い。

30

サルモネラ陰性血清は、21~70日齢のSPF鶏より調整する。採血後、上記サルモネラ陽性血清と同様に血清分離及び非動化を行い、PD-RPAで陰性であることを確認してプールし、牛胎児血清を用いて10倍希釈する。このものを5ml容のバイアル瓶に100 μ lずつ分注して凍結乾燥する。また、使用時まで2~5の暗所に保存することが好ましい。

血清希釈液は、滅菌リン酸緩衝生理食塩水（以下PBSと云う）に牛胎児血清10ml、ポリソルベート20を1ml、アジ化ナトリウム0.02g、1%フェノールレッド0.3ml、ゲンタマイシン1mlを加えて1000mlに調整し、スターラーを用いて溶解し、濾過滅菌後、滅菌容器に小分けして2~5で保存する。

40

コンジュゲート希釈液は、PBSにポリソルベート20を2ml、牛胎児血清1ml、マラカイトグリーン0.05gを加えて1000mlに調整し、血清希釈液と同様にスターラーを用いて溶解し、濾過滅菌後、滅菌容器に小分けして2~5

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP02/13148
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C07K14/255, G01N33/53, G01N33/569, A61K39/00, 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) Int.Cl ⁷ C07K14/255, G01N33/53, G01N33/569, A61K39/00, A61K39/112, A61P31/04 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 practicable, search terms used) BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICST FILE (JOIS)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	van Asten AJ et al., Identification of the domain which determines the g, m serotype of the flagellin of Salmonella enteritidis., J.Bacteriol, 1995, Vol.177, No.6, pages 1610 to 1613	1-8
A	Solano C. et al., Enzyme-linked immunosorbent assay with a Salmonella enteritidis antigen for differentiating infected from vaccinated poultry., Vet.Res., 2000, Vol.31, No.5, pages 491 to 497	1-8
A	De Almeida ME et al., Antibody responses against flagellin in mice orally immunized with attenuated Salmonella vaccine strains., Arch Microbiol, 1999, Vol.172, No.2, pages 102 to 108	1-8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 "B" 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 14 March, 2003 (14.03.03)		Date of mailing of the international search report 01 April, 2003 (01.04.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13148

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01/40280 A2 (INOTEK CORP.), 07 June, 2001 (07.06.01), & AU 200147094 A	1-8
A	WO 89/10967 A1 (PRAXIS BIOLOG INC.), 16 November, 1989 (16.11.89), & FI 905441 A & DE 68922394 T & AU 3697989 A & AU 637049 B & NO 904806 A & DK 263390 A & EP 419513 A & JP 4-502402 A & AT 121782 T & US 6130082 A1 & NO 302031 B & JP 2793673 B2	1-8

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO2/13148	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int Cl ⁷ C07K14/255, G01N33/53, G01N33/569, A61K39/00, A61K39/112, A61P31/04			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int Cl ⁷ C07K14/255, G01N33/53, G01N33/569, A61K39/00, A61K39/112, A61P31/04			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X	van Asten AJ et al, Identification of the domain which determines the g,m serotype of the flagellin of <i>Salmonella enteritidis</i> ., J Bacteriol, 1995, Vol. 177, No. 6, p. 1610-1613	1-8	
A	Solano C et al, Enzyme-linked immunosorbent assay with a <i>Salmonella enteritidis</i> antigen for differentiating infected from vaccinated poultry., Vet Res, 2000, Vol. 31, No. 5, p. 491-497	1-8	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 14.03.03		国際調査報告の発送日 01.04.03	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JIP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 六笠 紀子	4B 9735 印
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO2/13148

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	De Almeida ME et al, Antibody responses against flagellin in mice orally immunized with attenuated <i>Salmonella</i> vaccine strains., Arch Microbiol, 1999, Vol. 172, No. 2, p. 102-108	1-8
A	WO 01/40280 A2 (INOTEK CORP) 2001.06.07 &AU 200147094 A	1-8
A	WO 89/10967 A1 (PRAXIS BIOLOG INC) 1989.11.16 &FI 905441 A &DE 68922394 T &AU 3697989 A &AU 637049 B &NO 904806 A &DK 263390 A &EP 419513 A &JP 4-502402 A &AT 121782 T &US 6130082 A1 &NO 302031 B &JP 2793673 B2	1-8

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	沙门氏菌抗原制剂，抗体检测试剂盒和使用其的亚单位疫苗		
公开(公告)号	JPWO2004055045A1	公开(公告)日	2006-04-20
申请号	JP2004560569	申请日	2002-12-16
[标]申请(专利权)人(译)	另类科技中心实验室°F		
申请(专利权)人(译)	有限公司另类科技中心实验室°F		
[标]发明人	大田博昭 江川智哉 豊田有樹子		
发明人	大田 博昭 江川 智哉 豊田 有樹子		
IPC分类号	G01N33/569 C07K14/255 G01N33/531 A61K39/00 A61P31/04		
CPC分类号	G01N33/56916 A61K39/00 C07K14/255 G01N2333/255		
FI分类号	G01N33/569.F C07K14/255 G01N33/531.A G01N33/531.B		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/BA41 4H045/CA11 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA52 4H045/FA74		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明旨在提供一种包含SE FliC 9kDa多肽或其复合物的抗原制剂，其用于血清学检测SE感染的家禽和接种了市售的SE减毒疫苗的家禽；包含该测试套件的测试套件；含有上述抗原并显示出低应激反应性的SE亚单位疫苗。