

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5688373号
(P5688373)

(45) 発行日 平成27年3月25日 (2015. 3. 25)

(24) 登録日 平成27年1月30日 (2015.1.30)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	7/00	(2006.01)	C 1 2 N 7/00 Z N A
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 N	15/873	(2010.01)	C 1 2 N 15/00 K
A 6 1 K	39/12	(2006.01)	A 6 1 K 39/12
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P 31/12

請求項の数 5 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-534306 (P2011-534306)
 (86) (22) 出願日 平成22年9月30日 (2010. 9. 30)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2010/067083
 (87) 国際公開番号 W02011/040527
 (87) 国際公開日 平成23年4月7日 (2011. 4. 7)
 審査請求日 平成25年9月13日 (2013. 9. 13)
 (31) 優先権主張番号 特願2009-227757 (P2009-227757)
 (32) 優先日 平成21年9月30日 (2009. 9. 30)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(出願人による申告) 平成20年度、農林水産省「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発」委託事業、産業技術強化法第19条の適用を受ける特許出願

(73) 特許権者 504300088
 国立大学法人帯広畜産大学
 北海道帯広市稲田町西2線11番地
 (73) 特許権者 501203344
 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
 茨城県つくば市観音台3-1-1
 (74) 代理人 110000109
 特許業務法人特許事務所サイクス
 (72) 発明者 小川 晴子
 北海道帯広市稲田町西2線11番地 国立
 大学法人帯広畜産大学 動物・食品衛生研
 究センター内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 α-ガラクトースエピトープを発現するトランスジェニック鳥類、ウイルス及びワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項10】

1, 3 - ガラクトース転移酵素 (1, 3 - G T) 遺伝子を発現し得る状態で含むレンチウイルスベクターを鶏 2 . 5 日胚に注入して得られたトランスジェニック操作胚を培養し孵化させることを含む方法で、 - ガラクトースエピトープ (G a l 1 - 3 G a l 1 - 4 G l c N A c - R : 以下 - G a l) を発現し得るトランスジェニック鶏を得ること、

トランスジェニック鶏が産んだ卵にウイルスを接種し、ウイルスを接種した卵を育成し、育成した卵から - G a l を発現するウイルスを得ることを含む、 - G a l 発現ウイルスの作製方法。

【請求項11】

前記ウイルスがインフルエンザウイルス、天然痘ウイルス、麻疹ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、風疹ウイルス、エイズウイルス、ニューカッスル病ウイルス、またはマレック病ウイルスである請求項10に記載の - G a l 発現ウイルスの作製方法。

【請求項12】

請求項10または11に記載の方法で、 - G a l を発現するウイルスを作製し、得られたウイルスからワクチンを作製する、ワクチンの作製方法。

【請求項13】

1, 3 - G T 遺伝子がマウス、ブタまたはウシ由来である、請求項10に記載の作製方法。

【請求項14】

トランスジェニック鶏の産んだ卵が受精卵または発育鶏卵である請求項10に記載の作製方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

本出願は、2009年9月30日出願の日本特願2009-227757号の優先権を主張し、その全記載は、ここに特に開示として援用される。

【技術分野】

【0002】

本発明は、 α -ガラクトースエピトープ(Gal 1-3Gal 1-4GlcNAc-R:以下 α -Galと略記することがある)を発現し得るトランスジェニック鳥類、このトランスジェニック鳥類から得られる生体試料、例えば、卵にウイルスを接種して得られる α -Galを発現するウイルス、及びこのウイルスを含有するワクチンに関する。

【背景技術】

【0003】

高病原性鳥インフルエンザおよび新型インフルエンザの世界的な発生拡大が続く中、今後、家禽のみならず人における流行の危険性も指摘されている。そのため、これまで以上にインフルエンザの予防と制御への取り組みが求められている。インフルエンザ予防には発育鶏卵で作製されるワクチンが有効とされる。現在のヒト用のインフルエンザワクチンには副作用のおそれのある免疫増強剤が含まれていないが、今後、新型インフルエンザが発生した場合は、ワクチンが緊急的に用いられる事が想定されているため、安全にワクチン効果を増強する手法の開発は重要な課題である。さらに、少量でも効果の高いワクチンを提供することで、より多くの人にワクチンを接種できる技術の確保が必要とされる。

【0004】

α -ガラクトースエピトープ(α -Gal)はABO式血液型抗原に構造が類似した糖抗原であり、1,3-ガラクトース転移酵素(以下1,3-GTと略記することがある)が作用して細胞表面に発現する。 α -Galは大部分の哺乳動物に発現するが、人と鳥類では1,3-GT遺伝子が機能していないために α -Galの発現が無い。そのため、人と鳥類では α -Galを外來抗原として認識し、 α -Galに対する自然抗体(抗Gal抗体)を保有する(非特許文献1)。 α -Galと抗 α -Gal抗体の反応は、豚から人等の異種間の臓器移植等における超急性拒絶反応の原因である。本発明者のひとりである小川は、異種移植における α -Galと抗 α -Gal抗体の制御技術に取り組むとともに、この反応を利用したガンワクチンの抗原性増強に関する研究に携わり、その有効性を確認した(非特許文献2)。

【0005】

上記 α -Galを用いた抗原性増強方法をインフルエンザに応用し、 α -Galを発現させたインフルエンザウイルスを作製することが出来れば、人や鳥類ではウイルスに抗 α -Gal抗体が結合し、これが抗原提示細胞のFc受容体に結合する結果、抗原提示が効果的に行われ、ウイルスに対する免疫応答が増強される(オプソニン作用)可能性がある事は、Galiliらが報告している(非特許文献3)。エイズウイルスについての実験についてもGaliliらは報告している(非特許文献4)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開2002-176880号公報

【特許文献2】WO2004/061081

【特許文献3】特開2009-82032号公報

【特許文献4】特開2006-271266号公報

【非特許文献】

【0007】

10

20

30

40

50

【非特許文献1】Galili U and Avila JL. -Gal and Anti-Gal. 1999. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, N.Y.

【非特許文献2】Deriy L, Ogawa H, Gao GP, Galili U. In vivo targeting of vaccinating tumor cells to antigen-presenting cells by a gene therapy method with adenovirus containing the 1,3galactosyltransferase gene. Cancer Gene Ther. 2005; 12: 528-539.

【非特許文献3】Abdel-Motal UM, Guay HM, Wigglesworth K, Welsh RM, Galili U. Immunogenicity of influenza virus vaccine is increased by anti-gal-mediated targeting to antigen-presenting cells. J. Virol. 2007; 81: 9131-9141.

【非特許文献4】Abdel-Motal U, Wang S, Lu S, Wigglesworth K, Galili U. Increased immunogenicity of human immunodeficiency virus gp120 engineered to express Galα1-3Galβ1-4GlcNAc-R epitopes. J. Virol. 2006; 80:6943-6951.

【非特許文献5】Eto M, Mase M. Isolation of the Newcastle disease virus and the H9N2 influenza A virus from chicken imported from China. J. Jpn. Vet. Med. Assoc. 2003; 56: 333-339.

【非特許文献6】WHO. WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. 2002. WHO, Geneva, Switzerland.

【非特許文献7】Killington RA, Stokes A, Hierholzer JC. Virus purification. pp: 71-89. In: Virology Methods Manual. Mahy BWJ, Kangro HO (Ed). 1996. Academic Press Limited, London.

【非特許文献8】McGrew MJ, Sherman A, Ellard FM, Lillico U, Gilhooly HJ, Kingman AJ, Mitrophanous KA, Sang H. Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. EMBO reports. 2004; 5: 728-733.

【非特許文献9】Chapman SC, Lawson A, Macarthur WC, Wiese RJ, Loechel RH, Burgos-Trinidad M, Wakefield JK, Ramabhadran R, Mauch TJ, Schoenwolf GC. Ubiquitous GFP expression in transgenic chickens using a lentiviral vector. Development. 2005; 132: 935-940.

【非特許文献10】Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick. J. Morphol. 1951; 88: 49-92.

【0008】

非特許文献1～10の全記載は、ここに特に開示として援用される。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

ウイルスに -Galを発現させる方法としては、in vitroにおける酵素反応が用いられてきている(非特許文献3、4)。しかし、この方法は、反応に用いる酵素を必要とする事、酵素反応時間を必要とする事、酵素反応液の除去を必要とする事などの点から、同方法によってワクチン用の大量の -Gal発現ウイルスを準備する事は困難であると考えられる。

【0010】

そこで、本発明の目的は、酵素を用いることなく、ウイルスにおいて -Galを発現させる手段を提供すること、この手段を用いて -Galを発現させたウイルスを作製すること、得られたウイルスからワクチンを作製することにある。特に本発明は、ウイルスに対する免疫応答が増強されたウイルスを用いることで、効果(抗原性)の高いワクチン、特にインフルエンザウイルスワクチンを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、天然には -Galを発現しない鳥類に 1,3-ガラクトース転移酵素遺伝子を発現し得る状態で導入し、得られたトランスジェニック鳥類から、卵等の生体試料を得、この生体試料にウイルス感染させることで、 -Gal(-ガラクトースエピトープ)を発現するウイルスを作製できること、さらには、この -Galを発現するウイルスを用いる

10

20

30

40

50

ことで、従来の α -Gal を発現しないウイルスを用いたワクチンに比べて、ウイルスに対する免疫応答が増強されたワクチンが得られることを見出して、本発明を完成させた。

【 0 0 1 2 】

本発明は以下のとおりである。

[1]

α -ガラクトースエピトープ (Gal 1-3Gal 1-4GlcNAc-R ; 以下 α -Gal) を発現し得るトランスジェニック鳥類。

[2]

鳥類がニワトリである [1] に記載のトランスジェニック鳥類。

[3]

G0 または後代である、[1] または [2] に記載のトランスジェニック鳥類。

[4]

1, 3-ガラクトース転移酵素 (1, 3-GT) 遺伝子を発現し得る状態で含む、1, 3-GT 遺伝子導入用ベクターを鳥類に導入して、[1] ~ [3] のいずれかに記載のトランスジェニック鳥類を得る、トランスジェニック鳥類の作製方法。

[5]

1, 3-GT 遺伝子導入用ベクターがレンチウイルスベクターである [4] に記載のトランスジェニック鳥類の作製方法。

[6]

1, 3-GT 遺伝子がマウス、ブタまたはウシ由来である、[4] または [5] に記載のトランスジェニック鳥類の作製方法。

[7]

[1] ~ [3] のいずれかに記載のトランスジェニック鳥類から得られる生体試料。

[8]

生体試料がトランスジェニック鳥類の産んだ卵である [7] に記載の生体試料。

[9]

トランスジェニック鳥類の産んだ卵が受精卵または発育鳥類卵である [8] に記載の生体試料。

[10]

[7] ~ [9] のいずれかに記載の生体試料にウイルスを接種し、ウイルスを接種した生体試料を育成し、育成した生体試料から α -Gal を発現するウイルスを得ることを含む、 α -Gal 発現ウイルスの作製方法。

[11]

前記ウイルスがインフルエンザウイルス、天然痘ウイルス、麻疹ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、風疹ウイルス、エイズウイルス、ニューカッスル病ウイルス、またはマレック病ウイルスである [10] に記載の α -Gal 発現ウイルスの作製方法。

[12]

[10] または [11] に記載の方法で、 α -Gal を発現するウイルスを作製し、得られたウイルスからワクチンを作製する、ワクチンの作製方法。

【 0 0 1 3 】

トランスジェニック鳥類については既にいくつかの報告例がある (例えば、特許文献 1 ~ 3)。しかし、1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子を発現し得る状態で導入したトランスジェニック鳥類は知られていない。さらに、この 1, 3-ガラクトース転移酵素遺伝子を発現し得る状態で導入したトランスジェニック鳥類を用いた α -Gal を発現するウイルスの作製、およびこの α -Gal を発現するウイルスを用いた、ウイルスに対する免疫応答が増強されたワクチンについても、報告はない。

【発明の効果】

【 0 0 1 4 】

本発明によれば、 α -Gal を発現し得る鳥類を提供することができる。

10

20

30

40

50

【0015】

さらに本発明によれば、 α -Galに対する自然抗体を保有する人と鳥類においては外来抗原として認識される α -Galを発現するウイルスを提供することができる。

【0016】

加えて本発明によれば、 α -Galを発現するウイルスを用いることで、従来の α -Galを発現しないウイルスを用いたワクチンに比べて、 α -Galに対する自然抗体を保有する人と鳥類においては、ウイルスに対する免疫応答が増強されたワクチンを提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】ウイルス表面に糖タンパクを保有するウイルスを、 α -ガラクトース転移酵素を保有し、 α -Galを発現させた細胞系に接種すると、細胞内においてインフルエンザウイルスの複製と α -Galの付加が行われ、 α -Gal発現ウイルスを増殖させる事ができることの概略説明図である。

【図2】PCR法により1,3-GT遺伝子検出して、1,3-GTトランスジェニックニワトリ(G1)を検索した結果を示す。後代ID429に1,3-GT遺伝子配列が検出された。

【図3】1,3-GT遺伝子トランスジェニックニワトリ(G1)血球のレクチン染色の結果を示す。

【図4】1,3-GT遺伝子トランスジェニックニワトリ(G1)精子のレクチン染色の結果を示す。

【図5 - 1】実施例2で得られた1,3-GT遺伝子トランスジェニックニワトリ(G1)ID4964、実施例3で得られたID4964由来の1,3-GT遺伝子トランスジェニックニワトリ(G2)及び無処置ニワトリ(コントロール)の血球における α -Gal発現のフローサイトメーターによる解析結果を示す。(グラフ内の括弧内の数字は α -Galを発現する赤血球の割合を示す)

【図5 - 2】実施例3で得られたID4964由来の1,3-GT遺伝子トランスジェニックニワトリ(G2)の血球における α -Gal発現のフローサイトメーターによる解析結果を示す。(グラフ内の括弧内の数字は α -Galを発現する赤血球の割合を示す)

【図5 - 3】実施例3で得られたID4964由来の1,3-GT遺伝子トランスジェニックニワトリ(G2)の血球における α -Gal発現のフローサイトメーターによる解析結果を示す。(グラフ内の括弧内の数字は α -Galを発現する赤血球の割合を示す)

【図5 - 4】実施例3で得られたID4964由来の1,3-GT遺伝子トランスジェニックニワトリ(G2)の血球における α -Gal発現のフローサイトメーターによる解析結果を示す。(グラフ内の括弧内の数字は α -Galを発現する赤血球の割合を示す)

【図5 - 5】実施例3で得られたID4964由来の1,3-GT遺伝子トランスジェニックニワトリ(G2)の血球における α -Gal発現のフローサイトメーターによる解析結果を示す。(グラフ内の括弧内の数字は α -Galを発現する赤血球の割合を示す)

【図6】実施例4で得られた、1,3-GT遺伝子トランスジェニックニワトリ胚(G2)で増殖させたH9N2亜型インフルエンザウイルスをウエスタンブロッティング法にて α -Gal発現の確認(GS-IB₄を用いたWestern blottingによる解析)した結果を示す。4964E-2, 3, 4から得られたウイルスに α -Gal発現が確認された。

【発明を実施するための形態】

【0018】

[トランスジェニック鳥類]

本発明は、 α -ガラクトースエピトープ(Gal 1-3Gal 1-4GlcNAc-R: 以下 α -Gal)を発現し得るトランスジェニック鳥類に関する。

【0019】

α -ガラクトースエピトープ(α -Gal)は、Gal 1-3Gal 1-4GlcNAc-Rで示される糖鎖であり、N-アセチルラクタミンを発現する糖タンパク(Gal 1-4GlcNAc-R、Rはタンパクを表す)に1,3-ガラクトース転移酵素を作用させて、基質としてのガラクトースをN-アセチルラクタミンのガラクトース基に1-3結合させることで、生成される糖鎖である。

10

20

30

40

50

【0020】

本発明において、トランスジェニック鳥類を得るために用いる、鳥類への 1,3-GT遺伝子の導入方法は、個体全身の細胞に導入遺伝子が組み込まれ、目的とする -Galタンパクを発現する方法であれば特に限定されない。具体的には、1,3-ガラクトース転移酵素(1,3-GT)遺伝子を発現し得る状態で含む、1,3-GT遺伝子導入用ベクターを用いて鳥類に1,3-GT遺伝子を導入することで、このトランスジェニック鳥類を作製できる。

【0021】

1,3-GT遺伝子は、マウス由来、ブタ由来及びウシ由来のもの等が知られており、Gen Bankから遺伝子配列情報を入手することができる[マウス: GenBank accession number M8 5153; J. Biol. Chem. 267, 5534-5541 (1992)(配列番号1), ブタ: GenBank accession number L36535; Xenotransplantation 1, 81-88, 1994(配列番号2), ウシ: GenBank accession number J04989; J. Biol. Chem. 264, 14290-14297, 1989(配列番号3)].

【0022】

本発明のベクターを用いて遺伝子導入をする鳥類とは、分類学的分類 鳥綱「Aves」の生物のいずれもの種、亜種または品種を指すことを意図する(限定されるものではないが、ニワトリ、シチメンチョウ、アヒル、ガチョウ、ウズラ、キジ、オウム、フィンチ、タカ、カラス、ダチョウ、エミュー、およびヒクイドリのような生物など)。前記用語は、セキショクヤケイ(Gallus gallus)またはニワトリ(例えば、ホワイトレグホン(White Leghorn)、ブラウンレグホン(Brown Leghorn)、パールロック(Barred-Rock)、サセックス(Sussex)、ニューハンプシャー(New Hampshire)、ロードアイランド(Rhode Island)、オーストラロップ(Australorp)、ミノルカ(Minorca)、アムロックス(Amrox)、カリフォルニアグレイ(California Gray)、イタリアンパーティッジカラード(Italian Partidge-colored))の様々な系統、ならびに一般に繁殖されるシチメンチョウ、キジ、ウズラ、アヒル、ダチョウ、および他の家禽の系統を包含する。なかでもニワトリやウズラは入手が容易であり産卵種としても多産であり、長年の飼育経験により安全性が認められている点で特に好ましい。

【0023】

本発明では、1,3-GT遺伝子導入用ベクターとしては、例えば、1,3-GT遺伝子をコードするレンチウイルスベクターを用いることができる。レンチウイルスとしては、安全性の観点から複製能欠損型のヒト免疫不全ウイルス(HIV)を用いることができる。

【0024】

レンチウイルスベクターは、1,3-ガラクトース転移酵素(1,3-GT)を発現させるために必要な発現調節配列(プロモータ)を含むものであり、特に限定はされないが、全身のいずれの細胞においても導入遺伝子が発現するものが望ましい。従って、EF-1 プロモータのかわりに、CAGプロモータ、PGKプロモータ等も利用可能である。

【0025】

SINベクターコンストラクトに、例えば、ブタの1,3-GT遺伝子配列を組み込んだプラスミドを作製し、パッケージングコンストラクト(HIV-1のgag, polのみをコード)およびエンベロープ&Revコンストラクトと共にウイルス産生細胞(ヒト胎児腎細胞株293T)へ導入し、組換えウイルスを産生させる。この場合、導入遺伝子を発現させるために必要な発現調節配列(プロモータ)は、特に限定はされないが、前述のように、全身のいずれの細胞においても導入遺伝子が発現するものが望ましい。

【0026】

複製能欠損型のレンチウイルスベクターを用いるトランスジェニック鳥類の作製は、McCrewら(非特許文献8)やChapmanら(非特許文献9)により報告されている。これらの文献では、レンチウイルスを孵卵0日目の胚盤葉へ導入する方法が採られているが、後述の実施例においては、卵殻鋭端部に直径1~1.5cmの穴を開け、ウイルス力価 10^8 - 10^9 /mlの組換えウイルス粒子の1 μ lを鶏2.5日胚の後背動脈中へ注入することによりトランスジェニック操作胚を作製した。操作胚は、穴を開けた部分をラップまたはテープで塞ぎ、孵卵器で培養することにより孵化させることができる。尚、レンチウイルスの0日胚投

10

20

30

40

50

与法は、遺伝子導入ニワトリが得られる技術として報告されている。しかし、0日胚投与では投与ウイルスが卵黄中に拡散してしまうと考えられ、それに対し、2.5日胚の血管中への投与法はウイルスが血液循環に乗り、胚全体の細胞に感染する機会が増えると考えられることから、上記のように2.5日胚への投与法を採用した。

【0027】

孵化したトランスジェニック操作鳥類(本明細書ではG0と称する)では、個体構成細胞に不均一に導入遺伝子を有している。G0が性成熟に達した後、体を構成する全ての細胞に均一に1,3-GT遺伝子が組み込まれているトランスジェニックニワトリを得るため、他鳥類と交配することにより後代をとる。交配に用いる鳥類は限定されることはなく、同種の鳥類でも他種の鳥類でも良い。また、トランスジェニック鳥類でも非トランスジェニック鳥類でも用いることが可能である。

10

【0028】

後代の一部の細胞からDNAを抽出し、1,3-GT遺伝子の存在をPCR法により確認する。後代のうち1,3-GT遺伝子が検出されたトランスジェニック鳥類を本明細書ではG1と称する。このようにして作製したG1のうち、-Galを発現する個体を選抜し、ワクチン生産に供することができる。G1個体における-Galの検出は、-Gal抗原特異的レクチン(*Griffonia simplicifolia* 1 isolectin B₄; GS-IB₄)を用いた細胞染色等の方法を用いることができる。G1が得られれば、複数のG1の中から所望の-Gal発現量、発現形式の好ましい個体を選抜し、他鳥類と交配させることにより1,3-GT遺伝子が組み込まれたトランスジェニック鳥類を得ることが出来るようになる。この後代トランスジェニック鳥類をG2、さら

20

【0029】

[-Gal発現ウイルスの作製方法]

本発明は、-Gal(-ガラクトースエピトープ)を発現するウイルス(-Gal発現ウイルス)の作製方法を包含する。

【0030】

-Gal発現ウイルスの作製は、上記本発明のトランスジェニック鳥類に由来する生体試料にウイルスを接種し、接種したウイルスに感染した鳥類由来生体試料から-Gal発現ウイルスを得る。

30

【0031】

鳥類由来生体試料とは、例えば、上記本発明のトランスジェニック鳥類の産んだ卵であることができ、鳥類の産んだ卵は、例えば、受精卵または発育鳥類卵であることができる。

【0032】

接種に用いるウイルスは、ウイルス表面に糖タンパクを保有するウイルスであれば、特に制限はない。機構の説明は図1を用いて後述するが、ウイルス表面に糖タンパクを保有するウイルスを、1,3-ガラクトース転移酵素を保有する鳥類由来生体試料に接種すると、この生体試料中の細胞において-Gal発現ウイルスを増殖させる事ができる。

40

【0033】

ウイルス表面に糖タンパクを保有するウイルスとしては、例えば、インフルエンザウイルス、天然痘ウイルス、麻疹ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、風疹ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、マレック病ウイルス等であることができる。尚、エイズウイルス(レトロウイルス)については、エンベロープ上に糖タンパクがあり、手法は本発明と異なるが、-Galを発現する方法をGaliliが報告している(非特許文献4)。さらに、インフルエンザウイルスとしては、例えば、ヒトインフルエンザウイルスのAソ連型(H1N1亜型)ウイルスやA香港型(H3N2亜型)ウイルス、高病原性トリインフルエンザウイルスのH5N1亜型ウイルス、低病原性トリインフルエンザウイルスのH9N2亜型ウイルス等を挙げることができる。

50

【0034】

発育鳥類卵等へのウイルスの接種は常法に従うが、例えば発育鶏卵を用いたインフルエンザウイルスの接種は、WHOの方法(非特許文献6参照)に準じて行うことができる。具体的には、発育鶏卵を10~11日間培養し、 α -Galを発現していない元のウイルス液を尿膜腔へ接種して33~37℃で3~4日間培養することで、発育鶏卵へのウイルス接種を行うことができる。

【0035】

α -Gal発現ウイルスは、上記本発明のウイルスに感染した鳥類由来生体試料を用いて作製することができる。より具体的には、ウイルス感染した鳥類由来生体試料を育成して、育成した鳥類由来生体試料から α -Galを発現するウイルスを得る。 α -Galを発現するウイルスとは、ウイルスの表面に α -Galを有するものであり、ウイルスの表面に存在する α -Galは、 α -Galに対する自然抗体を保有する人や鳥類では外来抗原として認識される。

10

【0036】

ウイルスに感染した鳥類由来生体試料を用いての α -Gal発現ウイルスの作製は、例えば、以下のように実施することができる。 α -Gal発現鳥類由来生体試料に接種したウイルスは、鳥類由来生体試料の細胞内で複製される過程で α -Galを発現するウイルスとなって細胞外へ放出される。そのため、 α -Gal発現ウイルスは鳥類由来生体試料中に含まれる。鳥類由来生体試料が発育鳥類卵の場合、卵へウイルスを接種し3~4日間培養した後に、4℃で一晩置き、胚の血流を止めて、 α -Gal発現ウイルスが豊富に含まれる漿尿液(尿液)を回収する。

20

【0037】

尚、上記 α -Galを発現し得る鳥類由来生体試料の細胞にウイルスを感染させることによって、ウイルスの表面に α -Galを有する α -Gal発現ウイルスを作製できる。この点を、図1を用いて具体的に説明する。一般に、ウイルス(図中の左上)が接種された細胞内では、ウイルス粒子の構成タンパクが合成されるが、それが「糖タンパク」である場合には、細胞が保有する糖転移酵素によって合成された「糖」がタンパクに付加される。そのため、 α -ガラクトース転移酵素が機能する細胞内で合成された糖タンパクには α -Galが付加され得る事になる。従って、本発明のように、ウイルス表面に糖タンパクを保有するウイルス(インフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、エイズウイルス等)を α -Gal発現細胞(α -ガラクトース転移酵素を保有)に接種すると、 α -Gal発現ウイルスを増殖させる事ができる。

30

【0038】

本発明の作製方法で得た α -Gal発現ウイルスは、 α -Galを発現しない同タイプのウイルスと比較して、 α -Galに対する自然抗体を保有する人や鳥類においては、ウイルスに対する免疫応答が増強されたものになる。所謂、オプソニン作用を示す。これは、 α -Gal発現ウイルスの場合、人や鳥類ではウイルスに抗 α -Gal抗体が結合し、これが抗原提示細胞のFc受容体に結合する結果、抗原提示が効果的に行われるためと考えられる。

【0039】

[ワクチンの作製方法]

本発明は、上記本発明の作製方法で得た α -Gal発現ウイルスを用いて、ワクチンを作製する方法を包含する。

40

【0040】

上述のように、 α -Gal発現ウイルスは、 α -Gal発現ウイルスが豊富に含まれる漿尿液として回収される。この漿尿液は、そのままワクチンの作製に用いることもできるが、常法により精製することもできる。精製方法としては、例えば、非特許文献7に記載の方法に従いスクロース液を用いた超遠心により行う方法を挙げることができる。

【0041】

本発明の作製方法で得られるウイルスは、例えば、不活性化されたウイルスであることができる。また、ワクチンに含有されるウイルスは、ウイルスのサブユニットであることもできる。さらに、ワクチンに含有されるウイルスは、弱毒化ウイルスであることもでき

50

る。

【0042】

ウイルスの不活性化は、ウイルスの不活性化処理方法として公知の方法を用いて適宜行うことができる。不活性化処理としては、例えば、精製ウイルスをホルマリン、紫外線またはβ-プロピオラクトンにより不活化する方法を挙げることができる。

【0043】

ウイルスのサブユニット(成分)は、公知の方法を用いて適宜作製することができる。例えば、ウイルス液と1% Tween 20を9:1の割合で混和して30分間放置した後、等量のエーテルを加えて激しく混和し、それを遠心して得られた水相画分を上述と同様の方法で不活化することで、サブユニットワクチンを得ることができる。

10

【0044】

弱毒化ウイルスは、遺伝子変異などの公知の方法によって病原性を低減させることで得ることができる。但し、インフルエンザウイルスのような変異を起こしやすいウイルスについては、弱毒化ワクチンの使用は懸念が多いため、一般には、弱毒化ウイルスではなく、不活性化ウイルスを用いたワクチンやサブユニットワクチンが用いられる。

【0045】

本発明の作製方法で得られるワクチンは、上記ウイルスを単独で含む場合と、アジュバントをさらに含有する場合がある。アジュバントとしては、例えば、ゴマ油、菜種油等の植物油、軽質流動パラフィン等の鉱物オイル、水酸化アルミニウムゲル、リン酸アルミニウムゲル等を挙げることできる。

20

【0046】

本発明の作製方法で得られるワクチンの投与経路としては、点眼、点鼻、筋肉内、又は皮下が挙げられる。また、不活化ワクチンとして投与する場合には筋肉内、腹腔内又は皮下への投与が好ましい。

【0047】

本発明の作製方法で得られるワクチンは、前記ウイルスに感染するヒトや鳥類の予防および/または治療のための処置に用いられる。

【実施例】

【0048】

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明する。

30

【0049】

試験方法

以下の実施例で用いた試験方法について記載する。

(1) Griffonia simplicifolia lectin I-Isolectin B₄(GS-IB₄)を用いたフローサイトメトリー

細胞上に発現するβ-Galをfluorescein isothiocyanate (FITC) 標識GS-IB₄(Vector Laboratories Inc.)を用いて4℃で30分間染色した後に洗浄し、FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences)にて解析した。

【0050】

(2) Western blotting法

40

ウイルスに発現するβ-Galを調べるためのWestern blottingは以下のように行った。ウイルスのタンパクを2-mercaptoethanolの存在下でSodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)により分離した後、polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad)に転写し、1%Alkali-soluble Casein (Novagen)を用いてブロッキングを行った。その後、HRP標識GS-IB₄(Sigma-Aldrich)と室温で1時間反応させ、反応後のPVDF membraneをECL Western blotting analysis system (Amersham Biosciences)によって発光させ、LAS-3000 (FujiFilm)を用いて解析した。

【0051】

実施例1

1,3-ガラクトース転移酵素(1,3-GT)遺伝子導入用ベクター作製法

50

レンチウイルスベクターの作製に必要なSINベクターコンストラクト、ウイルスベクターのエンベロープとなるVSV-G遺伝子とrev遺伝子が挿入されたコンストラクトおよびgag-pol遺伝子を組み込んだパッケージングコンストラクトは、理化学研究所から購入した。SINベクターコンストラクトのEF-1 プロモーターの下流にプタの 1,3-ガラクトース転移酵素(1,3-GT)遺伝子を連結したプラスミドを構築した。VSV-G遺伝子とrev遺伝子が挿入されたコンストラクト(10 µg)、パッケージングコンストラクト(10 µg)および構築したSINベクタープラスミド(17 µg)を共にリン酸カルシウム法を用いて、あらかじめ直径10cmのPoly-L-Lysine処理したシャーレ上でサブコンフルエント状態まで培養していた293T細胞へ組み込み、37 °C、3% CO₂インキュベーターで16時間培養した。培養上清を除去した後、新しいDMEM培地10 mlと置換し、37 °C、10% CO₂インキュベーターで48時間培養することによりレンチウイルスベクターを産生させた。ウイルスを含む培養液を回収し、0.45 µm フィルターを通じして浮遊細胞を除去した後、超遠心機を用いて50000g、2時間遠心することによりレンチウイルスを濃縮した。上清を除去した後、10 µlのHBSS溶液に溶解することにより遺伝子導入用の 1,3-GT遺伝子のレンチウイルスベクターを作製した。

【0052】

実施例2

-Galを発現するトランスジェニックニワトリ(G1) 作製法

トランスジェニックニワトリの作製法は、特許文献4に記載の方法に基づいて実施した。詳細は以下の通りである。

【0053】

白色レグホン種のニワトリ受精卵を孵卵器において2.5日培養し、Hamburger およびHamilton(非特許文献10)によるニワトリ胚の発生段階14から16に達したところで卵殻の鋭端側を開窓した。卵黄上に位置する胚の血管中(注¹)に、高ウイルス力価(注²)の 1,3-GT遺伝子配列が組み込まれたレンチウイルスベクター 1 µlを注入した。遺伝子導入操作胚は、開窓部分をラップで閉じた後に、孵卵器中で18日間培養し、孵化させた。孵化したトランスジェニック操作ニワトリ(G0)を飼養して性成熟に達した後、G0に対して異性の非トランスジェニックニワトリ(白色レグホン種)と人工授精による交配試験を行った。この交配試験の結果得られた後代の細胞からDNAを採取し、PCR法を用いて 1,3-GT遺伝子が組み込まれた個体(G1)を選別した。PCRは、TaKaRa ExTaq Hot Start Version (タカラバイオ)を用いた。1,3-GT遺伝子検出のためのPCRに用いるプライマーの配列は、GT-F(caccatgaatgt caaaggaagagtgg)(配列番号4)およびGT-R2(tcagatgttattttctaacc aaat)(配列番号5)である。テンプレートDNA 100ng、10×Ex Taq Buffer 2 µl、dNTP mixture 1.6 µl、GT-F primer (10pmol) 0.4 µl、GT-R2 primer(10pmol) 0.4 µl、TaKaRa Ex Taq HS 0.1 µlおよび超純水を加えた総量20 µlを0.2ml PCR用チューブ内で混合した。PCR条件は、94 °C 1分のプレヒートの後、94 °C 30秒、55 °C 30秒および72 °C 20秒を54回サイクル行い、最後に72 °C 5分の伸長反応を行った。1,3-GT遺伝子検出のためのPCRの結果を図2に示す。表1に示すように、11羽のG0の交配試験の結果、7羽の 1,3-GT遺伝子配列が組み込まれたトランスジェニックニワトリ(G1)が得られた。

【0054】

【表 1】

GT 遺伝子トランスジェニック操作鶏(G0)

ID	性別	後代産子数	GT 遺伝子導入鶏数(%)	α -Gal 発現産子数 (%)
0001	雄	393	0 (0.0)	0 (0.0)
0002	雄	319	1 (0.3)	0 (0.0)
0003	雄	47	0 (0.0)	0 (0.0)
0004	雄	110	0 (0.0)	0 (0.0)
0005	雄	399	0 (0.0)	0 (0.0)
0006	雌	150	1 (0.7)	0 (0.0)
0007	雌	108	0 (0.0)	0 (0.0)
0008	雌	193	0 (0.0)	0 (0.0)
0009	雌	124	1 (0.8)	1 (0.8)
0010	雌	150	1 (0.7)	1 (0.7)
0011	雌	121	3 (2.5)	1 (0.8)
合計		2114	7 (0.3)	3 (0.1)

10

20

【 0 0 5 5 】

1,3-GT遺伝子が組み込まれたG1のうち、その個体より採取した血球がレクチン(Griffonia simplicifolia lectin I-Isolectin B₄(GS-IB₄)と混合することにより血球凝集反応を示し、同レクチンを利用した染色法により血球細胞が染色された個体を α -Galを発現するトランスジェニックニワトリ(G1)として選別した(図3参照)。図3において、ID 293は、

1,3-GT遺伝子が導入され血球表面に α -Galを発現しているため、レクチンの作用により血球が凝集し、蛍光染色されている。この方法により、6羽の 1,3-GT遺伝子トランスジェニックニワトリ(ID 293(雄), ID333(雄), ID429(雌), ID466(雄), ID475(雌), ID4964(雌))を解析した結果、3羽(ID293, ID475, ID4964)が血球に α -Galを発現していた。

30

また、性成熟に達した雄のG1であるID293, ID333およびID466の精子に対して同レクチンを利用した染色法により染色した結果、ID293およびID466の精子はレクチン染色されており、 α -Galが発現していることが示された(図4参照)。ID333の精子はレクチン染色されなかった。以上の結果を総合すると、ID293, ID466, ID475, ID4964において α -Galが発現していることが示された。

【 0 0 5 6 】

(注1)上記方法では、主として後背動脈へ注入しているが、血管なら何処でも注入可能。

40

(注2)ウイルス力価が 1.0×10^9 /mlまたは 1.7×10^9 /mlのベクターを利用。表 1 においてID004, ID0005が、力価 1.0×10^9 /mlのウイルス、その他は力価 1.7×10^9 /mlのウイルスを注入して作製した。

【 0 0 5 7 】

実施例3

 α -Galを発現するトランスジェニックニワトリ(G2) 作製法

1. 実施例1で得られた血球または精子に α -Galを発現するトランスジェニックニワトリ(G1)4羽中3羽(ID293(雄), ID466(雄), ID4964(雌))が性成熟に達した。この3羽について遺伝子導入操作を行っていない非トランスジェニックニワトリ(白色レグホン種)との交配試験を行った。孵化した産子については採取した血液よりDNAを抽出し、実施例2と同様のPC

50

R法により 1,3-GT遺伝子が組込まれている第二世代のトランスジェニックニワトリ(G2)を検索した。1,3-GT遺伝子が組込まれたことが確認された個体については、実施例2と同様のレクチンを利用した血球凝集反応を利用して血球に α -Gal を発現するトランスジェニックニワトリ(G2)を検索した。その結果、表2に示すとおり 1,3-GT遺伝子が組込まれたトランスジェニックニワトリ(G2)は、ID4964から44羽得られた。ID293およびID466からは受精卵が得られなかった。レクチンを用いた血球凝集反応の結果、ID4964から得られた44羽のG2中43羽(97.7%)が血球に α -Gal を発現すると判定した。

【0058】

ID293およびID466については、1,3-GT遺伝子トランスジェニック操作雌ニワトリ(G0) (ID0006, ID0007およびID0008)との交配を行った。その結果、表3に示すとおり 1,3-GT 10
遺伝子が組込まれた第二世代のトランスジェニックニワトリ(G2)は、ID293から21羽、ID466から18羽得られた。レクチンによる血球の凝集試験の結果、ID293から得られたG2の21羽は全て血球において α -Gal を発現するトランスジェニックニワトリであると判定された。一方、ID466から得られた 1,3-GT遺伝子が組込まれたトランスジェニックニワトリ(G2)は全て血球における α -Gal の発現は認められなかった。なお、ID333は非トランスジェニックニワトリとの交配試験を行った結果、32羽の1,3-GT遺伝子が組込まれたトランスジェニックニワトリ(G2)が得られたが、いずれも血球に α -Gal が発現していないと判定された。

【0059】

1,3-GT遺伝子トランスジェニックニワトリ(G1)と非トランスジェニックニワトリの交配 20
試験による第2世代(G2)の生産

【表2】

α 1,3-GT遺伝子トランスジェニックニワトリ(G1)と
非トランスジェニックニワトリの交配試験による第2世代(G2)の生産

ID	性別	血球での α -Gal 発現	人工授精 処理産卵数	孵化産子数	GT 遺伝子組込 産子 (G2) (%)	α -Gal 発現 産子数 (%)
293	雄	+	304	0	0 (0.0)	0 (0.0)
333	雄	-	287	122	32 (26.2)	0 (0.0)
466	雄	-	168	0	0 (0.0)	0 (0.0)
4964	雌	+	121	86	44 (51.2)	43 (97.7)

【0060】

1,3-GT遺伝子トランスジェニック雄ニワトリ(G1)と 1,3-GT遺伝子トランスジェニック
操作雌ニワトリ(G0)の交配試験による第2世代(G2)の生産

【表3】

α 1,3-GT遺伝子トランスジェニック雄ニワトリ(G1)と
 α 1,3-GT遺伝子トランスジェニック操作雌ニワトリ(G0)の
交配試験による第2世代(G2)の生産

ID	性別	血球での α -Gal 発現	人工授精 処理産卵数	孵化産子数	GT 遺伝子組込 産子 (G2) (%)	α -Gal 発現 産子数 (%)
293	雄	+	40	33	21 (61.8)	21 (100.0)
466	雄	-	38	23	18 (66.7)	0 (0.0)

【0061】

2. ID4964から得られた第2世代の 1,3-GT遺伝子トランスジェニックニワトリ(G2)の 50

うち、性成熟に達した28個体の赤血球について α -Galを発現しているかを、フローサイトメトリーにより解析した。結果を図5に示す。解析した96.6%の 1,3-GT遺伝子トランスジェニックニワトリ(G2)が α -Gal発現を発現していた。導入遺伝子の発現が抑制されるサイレンシングの発生は、本実施例では非常に低かった。

【0062】

上記結果から、 α -Galを発現するトランスジェニックニワトリ(G1)から第2世代の α -Gal発現ニワトリ(G2)が多数生産出来る可能性があることが明らかとなった。その結果、 α -Gal発現ニワトリ由来の受精卵を産業的に利用できる基盤が作られた。

【0063】

実施例4

α -Galを発現するインフルエンザウイルス作製法

1. 実施例3において、 α -Gal発現トランスジェニック雌ニワトリ(ID 4964)(G1)と非遺伝子導入雄との交配で得られた受精卵(G2)のうち5個を孵卵してウイルス感染実験に用いた。受精卵(G2)は、人工的に37℃～39℃、湿度60%で30分毎に90°転卵させる方法により培養することにより胚発生を開始し、発育鶏卵とした。10～11日齢に達した発育鶏卵4964E1～E5の漿尿膜腔内へH9N2ウイルスを接種し、その3～4日後に各卵から漿尿液を回収した。得られた漿尿液について赤血球凝集(HA)試験を行ったところ、いずれの漿尿液も2048～4096倍のHA力価を示し、同ウイルスを接種した正常卵におけるHA力価と同等であった(表4)。

【0064】

【表4】

**GT-T_g鶏胚(G2)における H9N2
亜型 インフルエンザウイルスの増殖性**

鶏胚	HA力価 ¹⁾
Normal	2048
4964E-1	2048
4964E-2	2048
4964E-3	2048
4964E-4	4096
4964E-5	4096

4964E-1～5と正常鶏胚で増殖したH9N2

ウイルスは同じウイルス力価を示した

¹⁾ 鶏胚漿尿液中のウイルスのHA力価

【0065】

2. G2卵から採取した漿尿液より超遠心法を用いてウイルスを精製した。得られたウイルスをウエスタンブロッティング法にて解析した。結果を図6に示す。4964E-2, E-3, E-4から得られたウイルスには α -Galが発現することが明らかになった。 α -Galが発現するウイルスは、ワクチンの生産に供与できる。ワクチンの生産は常法により実施できる。

【0066】

上記結果から以下のことが言える。

1. α -Gal発現の発育鶏卵から産生されるインフルエンザウイルスの増殖性は正常卵のものと同様であるという知見により、 α -Gal発現発育鶏卵を用いた α -Gal発現ワクチンの大量生産化が期待出来る。

2. α -Gal発現発育鶏卵から作製された α -Gal発現ワクチンは、抗 α -Gal抗体を保有する人や家禽等にとって、従来のワクチンよりも効果が増強されたインフルエンザワクチンとなることが期待される。

10

20

30

40

50

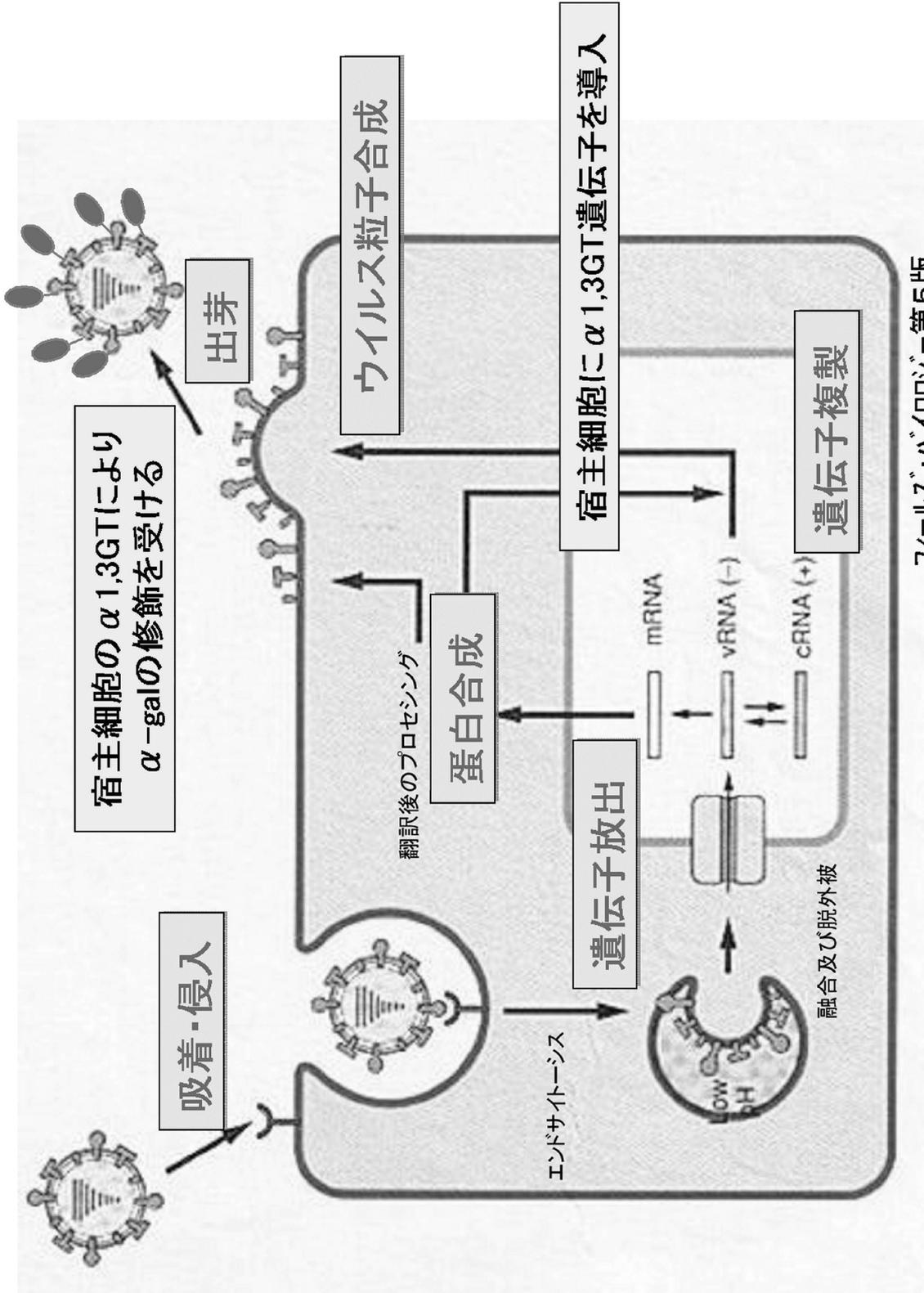
3. -Gal発現ワクチンはインフルエンザのみならず、鶏胚を用いて作製するその他のワクチンにも応用可能であると考えられる。

【産業上の利用可能性】

【0067】

本発明は、ワクチン製造に関する分野に有用である。

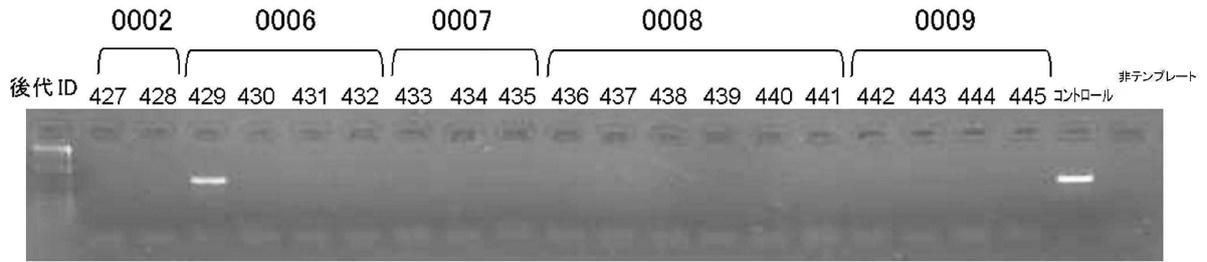
【 図 1 】



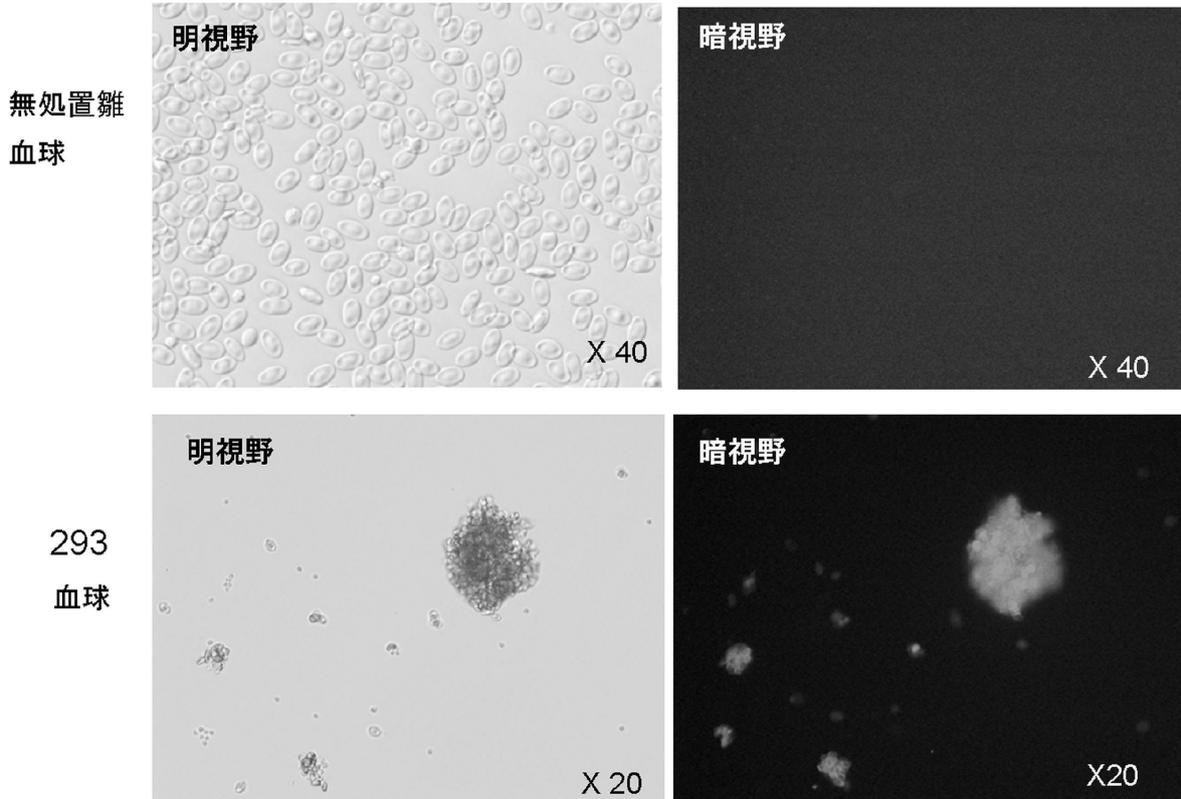
ウイルス・バイロジ-第5版
(Fields Virology 5th Ed)

【 図 2 】

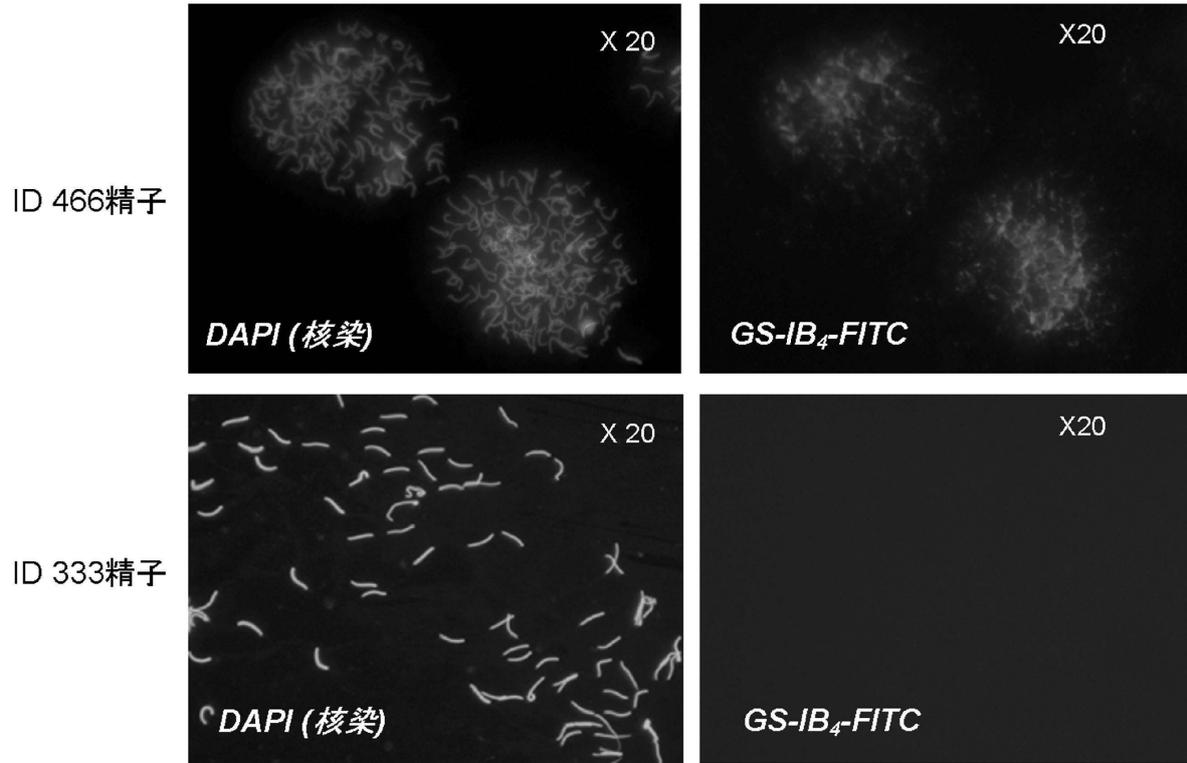
トランスジェニック操作ニワトリ ID



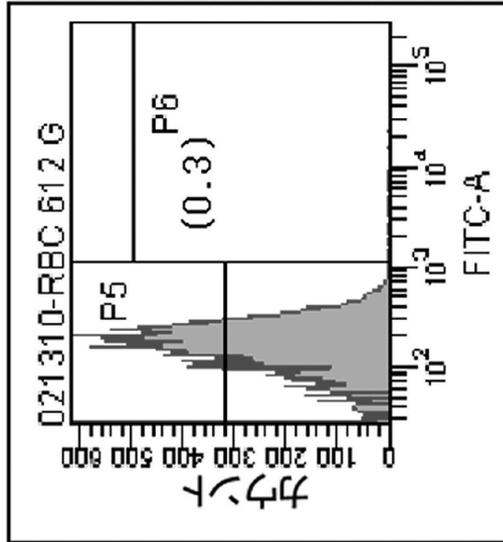
【 図 3 】



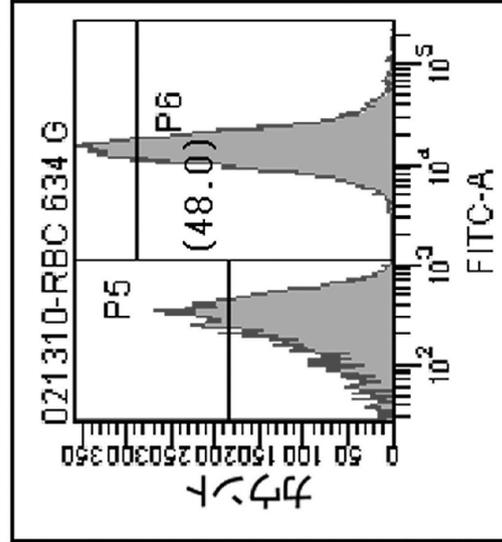
【 図 4 】



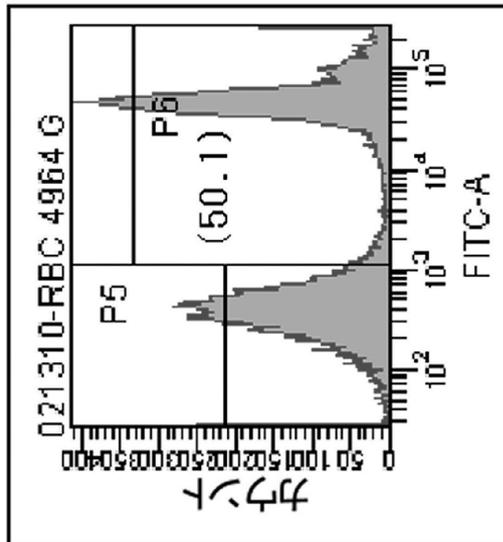
【 図 5 - 1 】



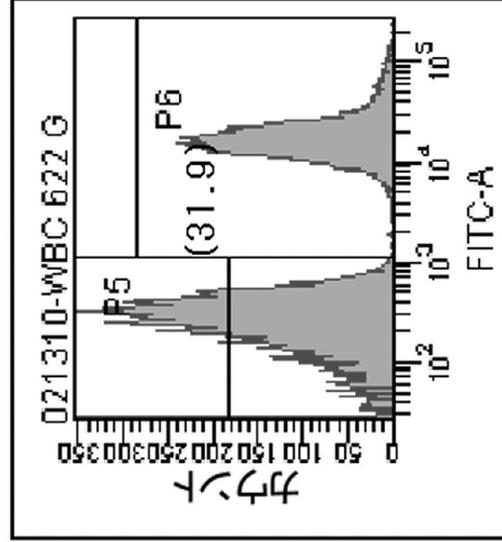
ID612 (G2)



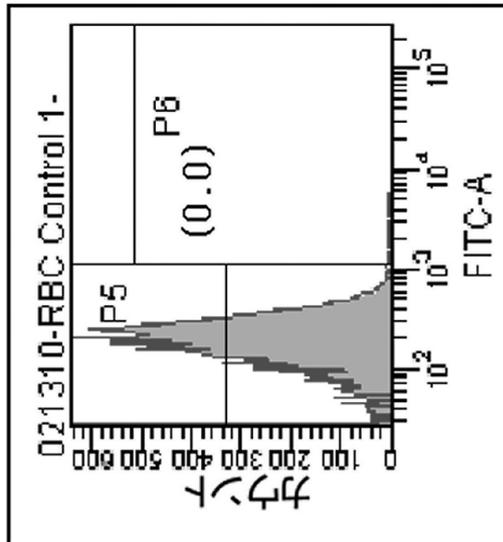
ID634 (G2)



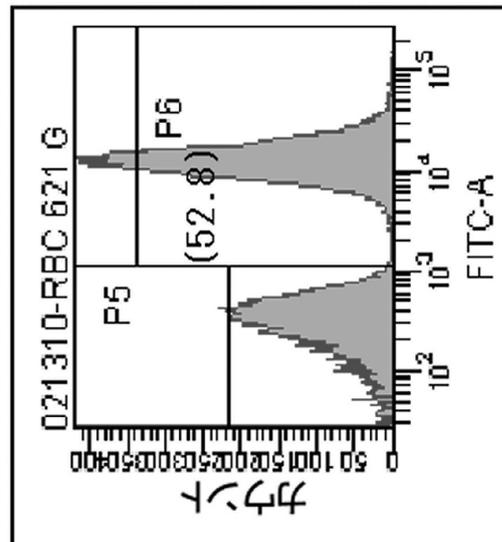
ID4964 (G1)



ID622 (G2)

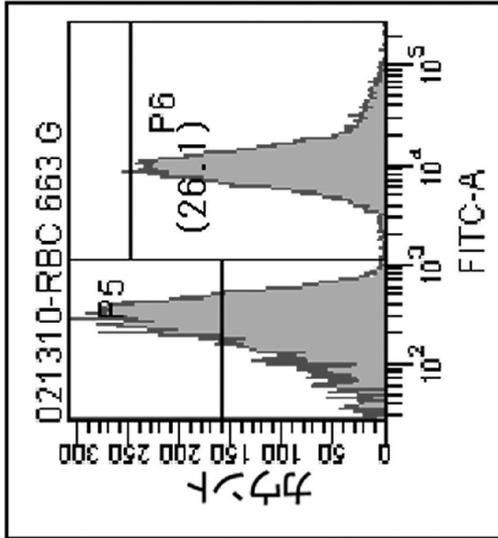


コントロール

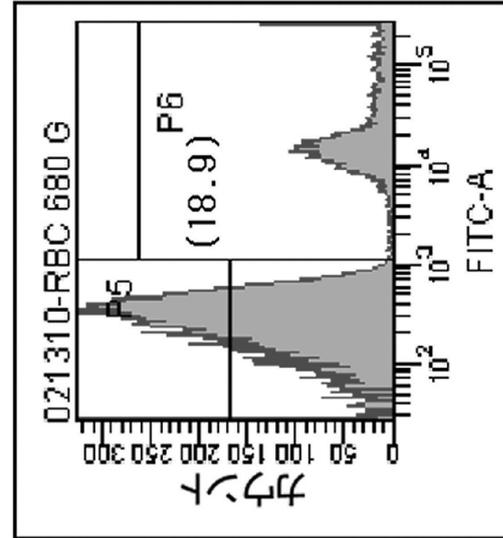


ID621 (G2)

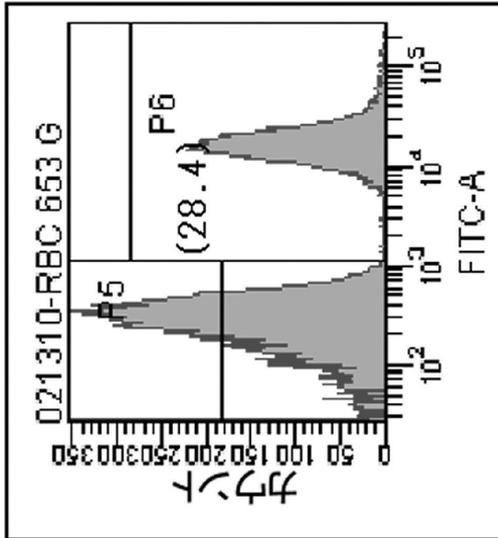
【 図 5 - 2 】



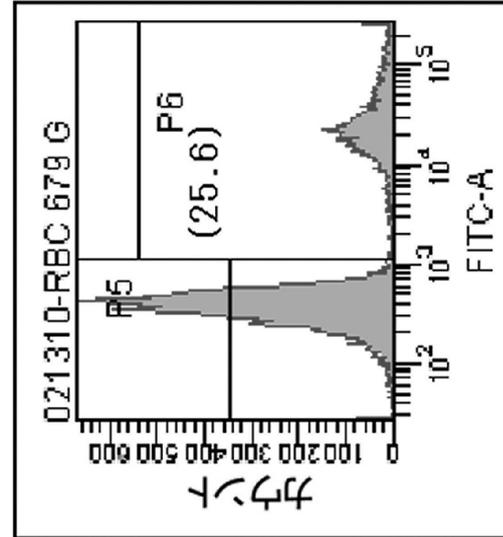
ID663 (G2)



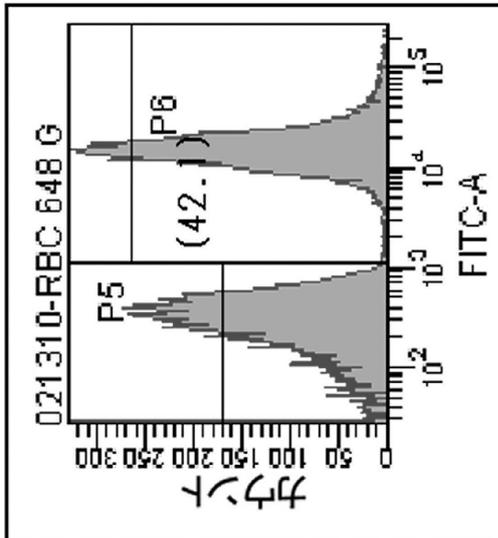
ID680 (G2)



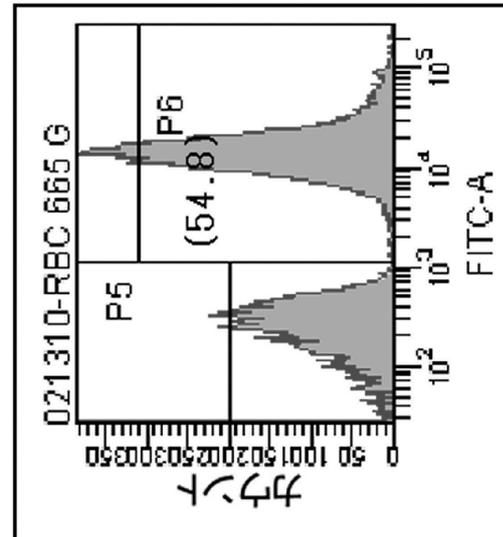
ID653 (G2)



ID679 (G2)

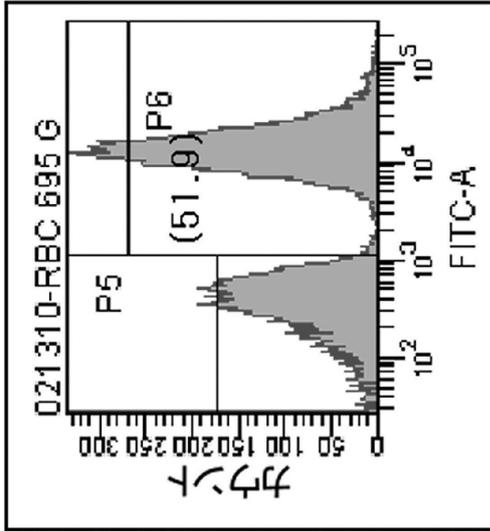


ID648 (G2)

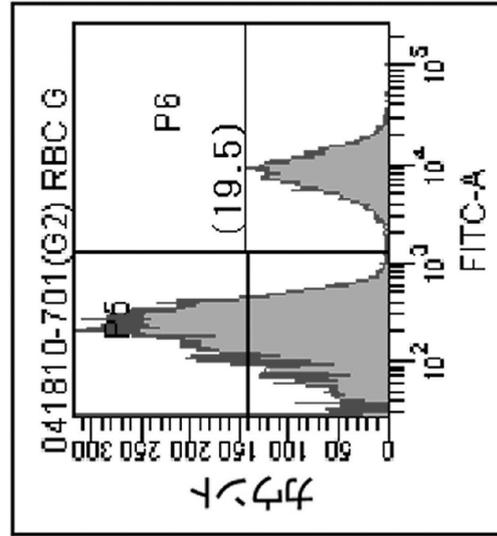


ID665 (G2)

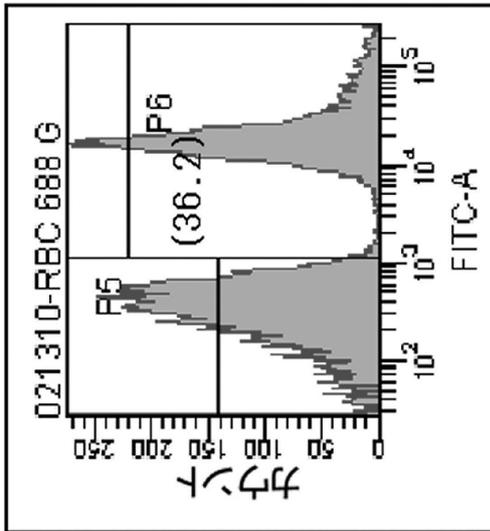
【 図 5 - 3 】



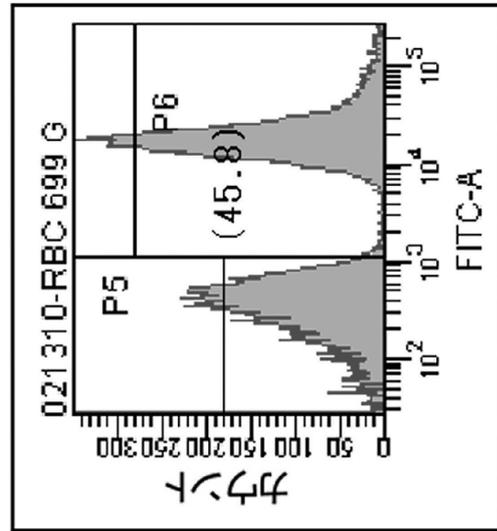
ID695 (G2)



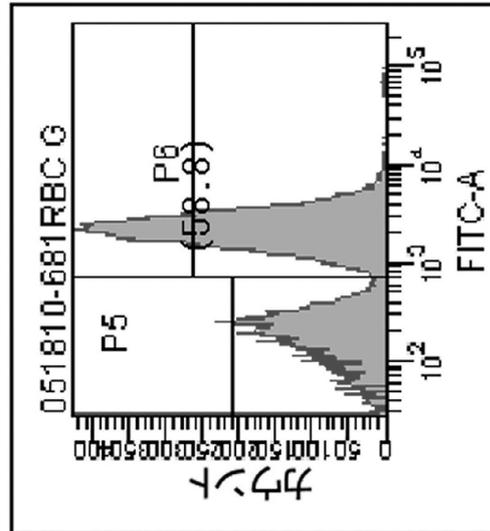
ID701 (G2)



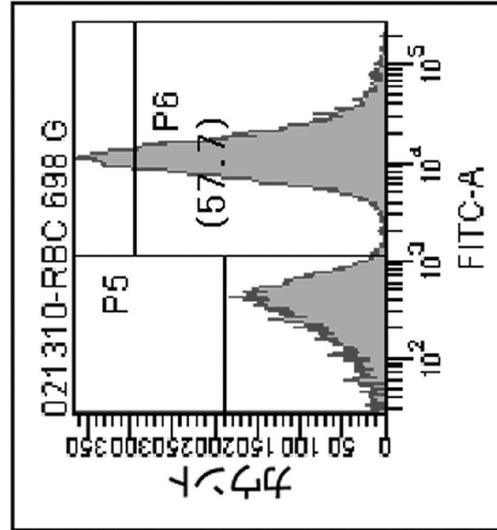
ID688 (G2)



ID699 (G2)

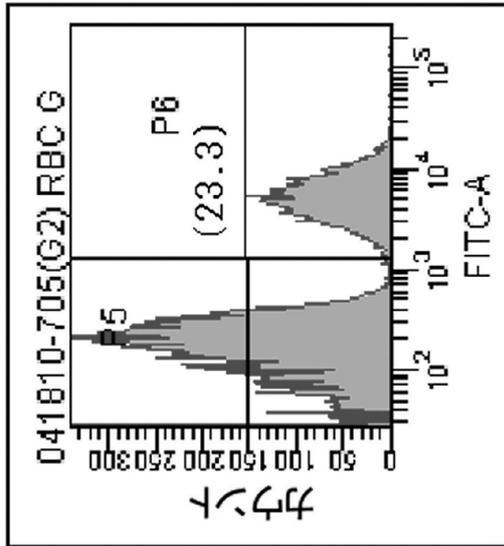


ID681 (G2)

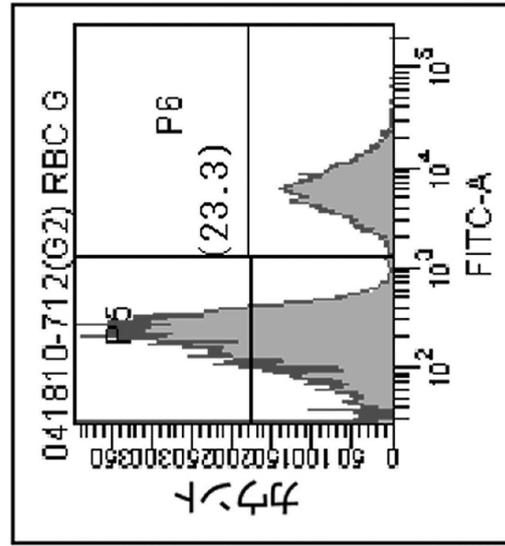


ID698 (G2)

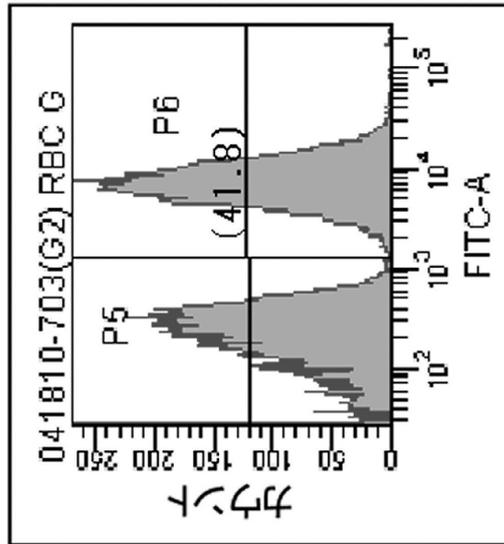
【 図 5 - 4 】



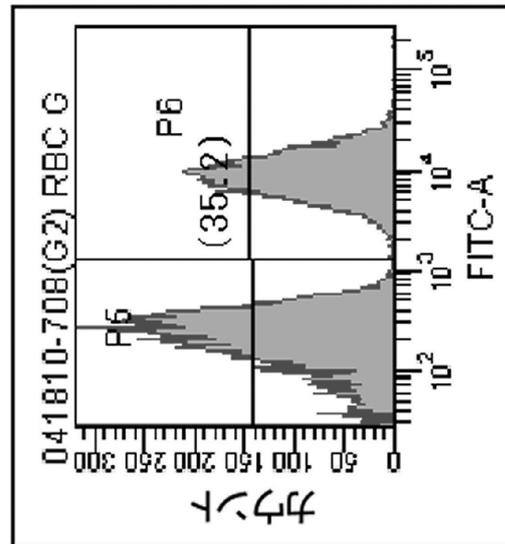
ID705 (G2)



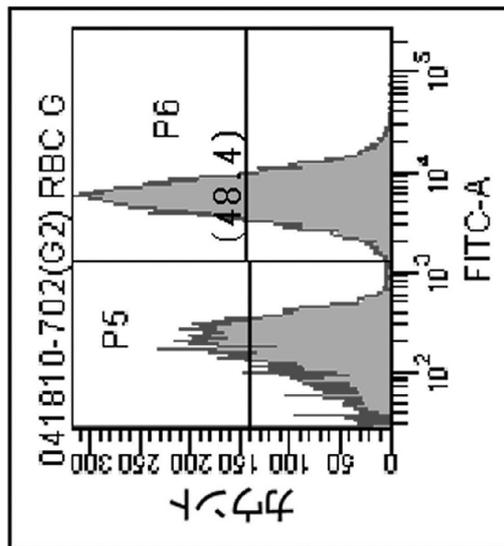
ID712 (G2)



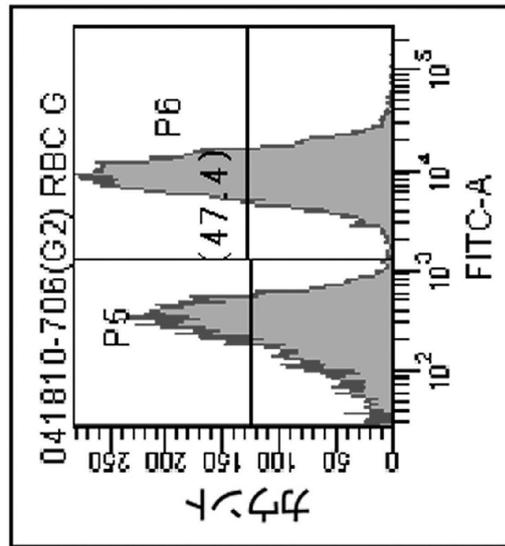
ID703 (G2)



ID708 (G2)

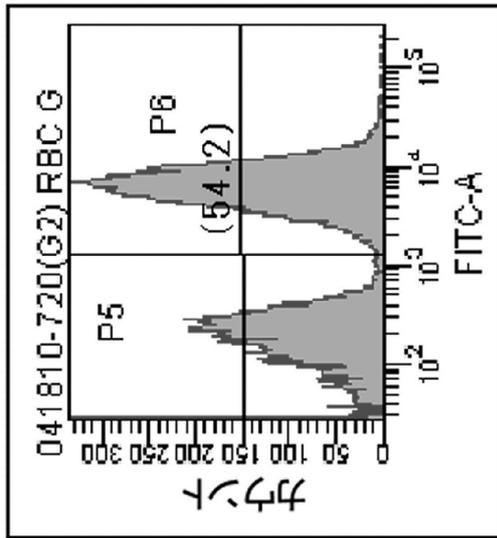


ID702 (G2)

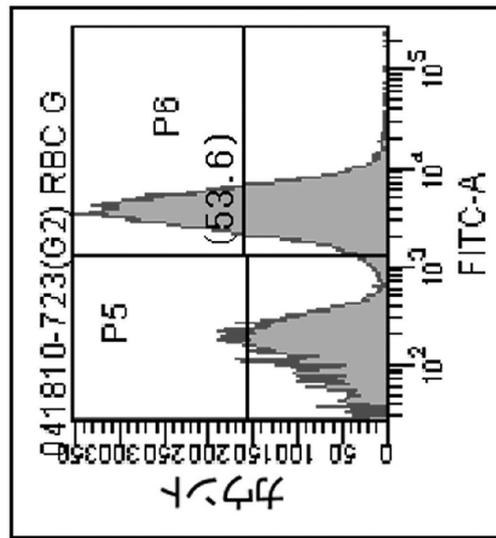


ID706 (G2)

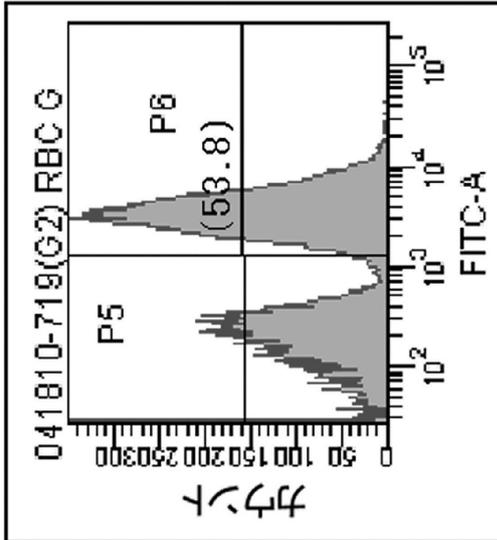
【 図 5 - 5 】



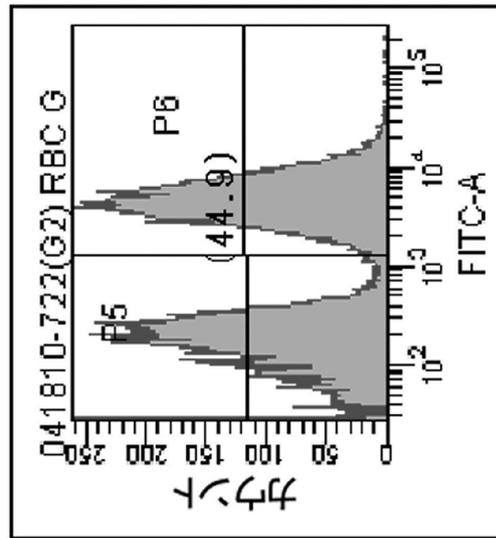
ID720 (G2)



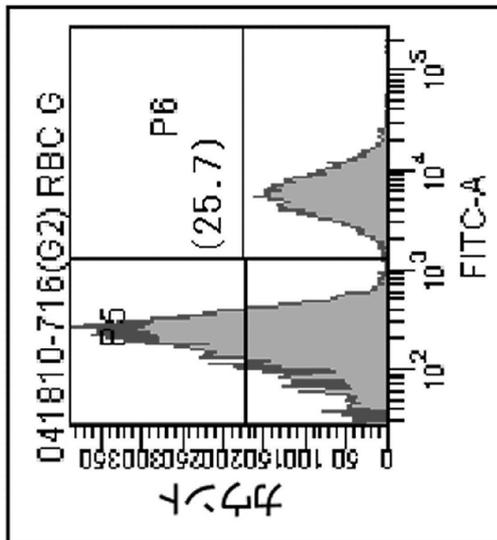
ID723 (G2)



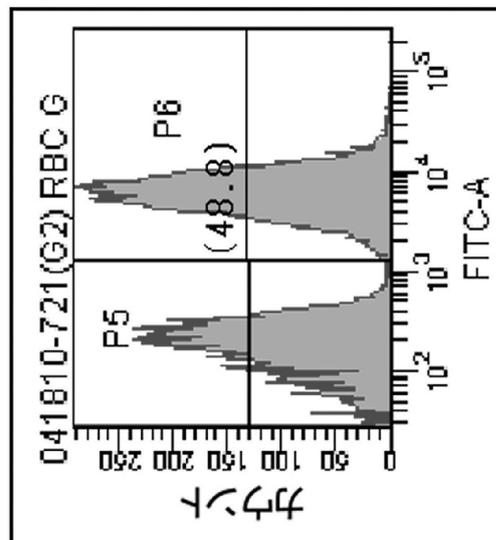
ID719 (G2)



ID722 (G2)

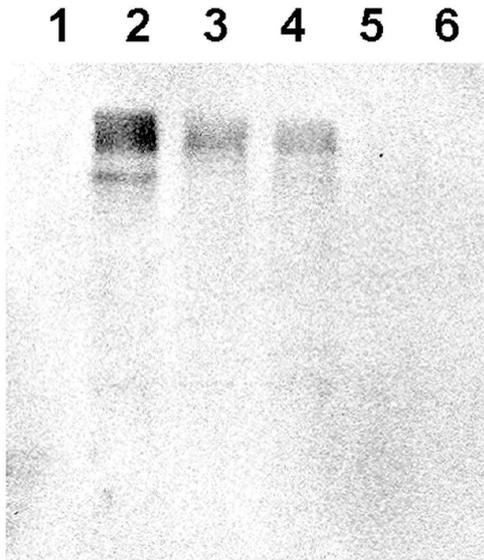


ID716 (G2)



ID721 (G2)

【図6】



1. 4964E-1 由来ウイルス
2. 4964E-2 由来ウイルス
3. 4964E-3 由来ウイルス
4. 4964E-4 由来ウイルス
5. 4964E-5 由来ウイルス
6. 正常鶏胚由来ウイルス

【配列表】

0005688373000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 31/16	(2006.01)	A 6 1 P 31/16
A 6 1 P 31/18	(2006.01)	A 6 1 P 31/18
A 6 1 K 39/145	(2006.01)	A 6 1 K 39/145
A 6 1 K 39/255	(2006.01)	A 6 1 K 39/255
A 6 1 K 39/17	(2006.01)	A 6 1 K 39/17
A 6 1 K 39/285	(2006.01)	A 6 1 K 39/285
A 6 1 K 39/165	(2006.01)	A 6 1 K 39/165
A 6 1 K 39/20	(2006.01)	A 6 1 K 39/20
A 6 1 K 39/21	(2006.01)	A 6 1 K 39/21
A 0 1 K 67/027	(2006.01)	A 0 1 K 67/027

(72)発明者 田上 貴寛
茨城県つくば市池の台2 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所内

審査官 渡邊 潤也

(56)参考文献 米国特許出願公開第2009/0123494 (US, A1)
国際公開第2005/007827 (WO, A2)
欧州特許出願公開第1939281 (EP, A1)
国際公開第95/003399 (WO, A2)
J Virol., 2007年, Vol.81, p.9131-9141
Blood, 2002年, Vol.99, p.2477-2482
EMBO Rep., 2004年, Vol.5, p.728-733

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 1 5 / 0 0
C 1 2 N 7 / 0 0
C 1 2 N 1 5 / 8 7 3
A 0 1 K 6 7 / 0 2 7
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)