

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5362750号
(P5362750)

(45) 発行日 平成25年12月11日(2013.12.11)

(24) 登録日 平成25年9月13日(2013.9.13)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 14/01 (2006.01)

C O 7 K 14/01

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 C

C 1 2 N 7/00 (2006.01)

C 1 2 N 7/00

A 6 1 K 39/12 (2006.01)

A 6 1 K 39/12

請求項の数 21 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-4965 (P2011-4965)
 (22) 出願日 平成23年1月13日(2011.1.13)
 (62) 分割の表示 特願2007-254101 (P2007-254101)
 の分割
 原出願日 平成10年10月1日(1998.10.1)
 (65) 公開番号 特開2011-135875 (P2011-135875A)
 (43) 公開日 平成23年7月14日(2011.7.14)
 審査請求日 平成23年2月10日(2011.2.10)
 (31) 優先権主張番号 97/12382
 (32) 優先日 平成9年10月3日(1997.10.3)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)
 (31) 優先権主張番号 98/00873
 (32) 優先日 平成10年1月22日(1998.1.22)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(73) 特許権者 503365659
 メリアル エス アー エス
 フランス国 リヨン 69007、アヴニ
 ユ トニギャルニエ 29
 (73) 特許権者 500155350
 クィーンズ ユニバーシティ オブ ベル
 ファスト
 イギリス国 ビーティー4 3エスディ
 ベルファスト スターモント スターニー
 ロード (番地なし)
 (73) 特許権者 500155361
 ユニバーシティ オブ サスカチュワン
 カナダ国 エス7ダブリュー 5ビー4 サ
 スカチュワン サスカトーン キャンパ
 ス ドライブ 52

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プタサーコウウイルス、ワクチンおよび診断試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列 I D 番号 1、配列 I D 番号 2、配列 I D 番号 3、配列 I D 番号 4 および配列 I D 番号 6 の配列の中から選択される一つの配列に対して 96% 以上の相同性を有する配列を含むタイプ I I のプタサーコウウイルスの感染を診断する方法であって、

テストするブタの生理学的液体標本または組織標本とタイプ I I のプタサーコウウイルスに特異的な診断試薬とを合わせ、上記サンプル中のタイプ I I のプタサーコウウイルスの抗原、抗体または核酸の存在を明らかにする、ことを特徴とする方法。

【請求項 2】

診断試薬がタイプ I I のプタサーコウウイルスに特異的なプローブまたはプライマーを形成する少なくとも一つの D N A 配列を含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

診断試薬が配列 I D 番号 6 の D N A 配列を含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

診断試薬がタイプ I I のプタサーコウウイルスに特異的なプローブまたはプライマーを形成する少なくとも一つの D N A 配列を含む配列 I D 番号 6 の D N A 配列の一部を含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

ハイブリダイゼーションまたはポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) をベースにした方法である請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に方法。

10

20

【請求項 6】

診断試薬がタイプⅡのブタサーコウウイルスに特異的な抗原を含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

診断試薬が配列ⅡD 番号 6 の DNA 配列の一部によってコードされるタイプⅡのブタサーコウウイルスに特異的なエピトープまたはポリペプチドを含む請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

上記の抗原、エピトープまたはポリペプチドが、上記標本中のタイプⅡのブタサーコウウイルスに特異的な抗体を検出する請求項 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 9】

診断試薬がタイプⅡのブタサーコウウイルスに特異的な抗体を含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

タイプⅡのブタサーコウウイルスに特異的な抗体を含む診断試薬と、タイプⅡのブタサーコウウイルスに特異的な抗原を含む診断試薬とを使用する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

ウェスタンブロット法、免疫抗体法、ELISA および免疫クロマトグラフィーを使用する請求項 6 ～ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

間接法、競合法または置換法を使用する請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

配列ⅡD 番号 6 の DNA 配列によってコードされるポリペプチドから得られるタイプⅡのブタサーコウウイルス特異抗体の免疫調製物。

【請求項 14】

抗体がモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である請求項 13 に記載の免疫調製物。

【請求項 15】

抗体が標識化された抗体を含む請求項 13 または 14 に記載の免疫調製物。

【請求項 16】

抗体がペルオキシダーゼを用いて標識化されるか、コロイド性金を用いて標識化される請求項 15 に記載の免疫調製物。

【請求項 17】

タイプⅡのブタサーコウウイルスに特異的な抗体によって認識され且つタイプⅡのブタサーコウウイルスの感染を検出可能なタイプⅡブタサーコウウイルス特異抗原を含む抗原調製物。

【請求項 18】

タイプⅡブタサーコウウイルスに特異な抗体および／またはタイプⅡブタサーコウウイルス抗原の少なくとも一つを含むタイプⅡのブタサーコウウイルスの感染の有無をブタで診断するためのキット。

【請求項 19】

ウェスタンブロット法、免疫蛍光法、ELISA および免疫クロマトグラフィーを実施する手段を有する請求項 18 に記載のキット。

【請求項 20】

間接法、競合法または置換法を実施する手段を有する請求項 19 に記載のキット。

【請求項 21】

テストするブタの生理学的液体標本または組織標本中の、タイプⅡのブタサーコウウイルスの抗原またはこの抗原に対する抗体を検出することでタイプⅡのブタサーコウウイルスに特異的な抗原の存在をテストするブタサーコウウイルスの検出方法であって、

上記タイプⅡのブタサーコウウイルスが配列ⅡD 番号 1、配列ⅡD 番号 2、配列ⅡD 番号 3、配列ⅡD 番号 4 および配列ⅡD 番号 6 の配列の中から選択される一つの配列に対し

10

20

30

40

50

て96%以上の相同性を有する配列を含むことを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、PMWS症候群（ブタ多機能萎縮症候群:Porcine Multisystemic Wasting Syndrome）（離乳後多機能萎縮症候群:Post-weaning Multisystemic Wasting Syndromeともいわれる）の原因となる新規なブタサーコウイルス（PCV, Porcine Circovirus）株と、その検出試薬および検出方法と、ワクチン接種方法と、ワクチンと、これらワクチンおよび試薬の製造方法とに関するものである。

【背景技術】

10

【0002】

ブタサーコウイルス（PCV）はブタ腎臓細胞株PK/15中に無毒病原性汚染物質として最初に見い出された。このウイルスPCVはチキン貧血症ウイルス（CAV, Chicken Anaemia Virus）および嘴・羽症候群ウイルス（PBFDV, Pscittacine Beak and Feather Disease Virus）とともにサーコウイルス群（Circoviridae）に分類された。これらのウイルスはエンペロブのない小さなウイルス（15～24nm）で、その共通な特徴は1.76～2.31kbの環状一本鎖のDNAからなるゲノムを含む点にある。このゲノムは約30kDaのポリペプチドをコード化すると考えられていた（非特許文献1）が、最近の研究で、複雑な転写がわかってきた（非特許文献2）。さらに、上記3種類のサーコウイルス（circovirus）はそのヌクレオチド配列に有意な相同性はなく、また、共通の抗原決定基もない。

20

【0003】

PK/15細胞由来のPCVは病原性ではないと考えられる。この配列は「非特許文献3」が明らかにしている。PCV株が病原性で、PMWS症候群と関連があるかもしれないと考えられるようになったのはほんの最近のことである（非特許文献4、5）。Nayer達はブタPCVのDNAがPMWS症候群を示すことをPCR法を用いて見い出した。しかし、野生型PCV株は単離または精製されていない。

【0004】

カナダ、米国およびフランスで見られるPMWS症候群の臨床的な特徴は、体重を徐々に失い、頻呼吸症、呼吸困難および黄疸等を発症することである。病理的な面では、リンパ性または肉芽種性浸潤、リンパ節腫脹、まれには肝炎およびリンパ性または肉芽種性腎炎を発症する（非特許文献6～10）。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Todd et al., Arch Virol 1991, 117; 129-135

【非特許文献2】Meehan B. M. et al., 1997, 78; 221-227

【非特許文献3】"B. M. Meehan et al., J. Gen. Virol 1997 (78) 221-227"

【非特許文献4】Gupi P. S. Nayar et al., Can. Vet. J, Vol. 38, 1997: 385-387

【非特許文献5】Clark E. G., Proc. Am. Assoc. Swine Prac. 1997; 499-501

40

【非特許文献6】Clark E. G., Proc. Am. Assoc. Swine Prac. 1997; 499-501;

【非特許文献7】La Semaine Veterinaire 1996 (834)、

【非特許文献8】La Semaine Veterinaire No. 26;

【非特許文献9】La Semaine Veterinaire 1997 (857): 54;

【非特許文献10】Gupi P. S. Nayar et al., Can. Vet. J, Vol. 38, 1997: 385-387

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本出願人は、カナダ、米国（カリフォルニア）およびフランス（ブリタニー）の農場から得た肺または神経節の標本から5つの新規なPCV株（以下、本発明のサーコウイルス

50

(circovirus) という) を単離することに成功した。これらのウイルスは P M W S 症候群のブタの病変部に検出されるが、健康なブタには検出されない。

【 0 0 0 7 】

本出願人はさらに、これらの 4 種の株 (カナダおよび米国の株) と 2 種のフランスの株のゲノムの配列決定した。これらの株はヌクレオチドレベルで互いに非常に強い相同性 (9 6 % 以上) を示す、一方、P K / 1 5 株ははるかに弱い相同性 (約 7 6 %) しか示さない。従って、新規のタイプのブタサーコウイルス (circovirus) を代表するものと考えられ、P K / 1 5 に代表されるタイプ I (第 I 群) に対して、本発明の新規な株はタイプ I I (第 I I 群) とよぶことにする。

10

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 8 】

本発明の対象は単離または精製物の形をした上記定義の第 I I 群のブタサーコウイルス (circovirus) にある。

本発明はさらに、生理標本または組織標本、特に P M W S 症候群のブタの病変部の標本から実施例に記載した方法で単離可能なブタのサーコウイルス (circovirus)、特に I I 型サーコウイルスを提供する。

【 0 0 0 9 】

本発明の対象は E C A C C (European Collection of Cell Cultures, Centre for Applied Microbiology & Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, United Kingdom) に寄託された下記の 5 種の株の精製物にある：

20

1 9 9 7 年 1 0 月 2 日木曜日寄託：

寄託番号第 V 9 7 1 0 0 2 1 9 号 (以下、I m p . 1 0 0 8 P C V という)

寄託番号第 V 9 7 1 0 0 2 1 8 号 (以下、I m p . 1 0 1 0 P C V という)

寄託番号第 V 9 7 1 0 0 2 1 7 号 (以下、I m p . 9 9 9 P C V という)

1 9 9 8 年 1 月 1 6 日金曜日寄託：

寄託番号第 V 9 8 0 1 1 6 0 8 号 (以下、I m p . 1 0 1 1 - 4 8 2 8 5 という)

寄託番号第 V 9 8 0 1 1 6 0 9 号 (以下、I m p . 1 0 1 1 - 4 8 1 2 1 という)

【 0 0 1 0 】

30

本発明はさらに、病気のブタから単離したブタサーコウイルス (circovirus) および / または本発明株と有意な血清学的類似性を有するサーコウイルスおよび / または P K / 1 5 の P C V とハイブリダイゼーションが全く無く、厳密な条件下で本発明株とのクロスハイブリダイゼーションを有するサーコウイルスに関するものである。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 1 】

【図 1】I m p . 1 0 1 1 - 4 8 1 2 1 株のゲノムの D N A 配列

【図 2】図 1 の続き

【図 3】I m p . 1 0 1 1 - 4 8 2 8 5 株のゲノムの D N A 配列

【図 4】図 3 の続き

40

【図 5】I m p . 9 9 9 株のゲノムの D N A 配列

【図 6】図 5 の続き

【図 7】I m p . 1 0 1 0 株のゲノムの D N A 配列

【図 8】図 7 の続き

【図 9】PCV PK/15株の配列と図 1 ~ 8 の 4 つの配列との整列化

【図 1 0】図 9 の続き

【図 1 1】図 1 0 の続き

【図 1 2】図 1 1 の続き

【図 1 3】1 9 9 7 年 1 0 月 3 日のフランスの最初の出願における I m p . 9 9 9 株のゲノムの D N A 配列

50

【図 1 4】図 1 3 の続き

【図 1 5】PK/15株の配列と図 1 3、1 4 の配列との整列化

【図 1 6】図 1 5 の続き

【図 1 7】図 1 6 の続き

【図 1 8】図 1 7 の続き

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

ウイルス性株の増殖、特に全抗原（例えばウイルス）および／またはサブユニット（例えばポリペプチド）の製造は、PMWS症候群のブタの病変部の生理学標本または組織標本から単離されたウイルス株、特にブタ腎臓株細胞を汚染されていない細胞株（特にPCV、ペスチウイルス、ブタアデノウイルスおよびブタパルボウイルスに汚染されていないPK/15細胞）で増殖するのが有利である。

10

これらの単離株がPK/15細胞での培養で非常に生産的であり、ウイルスまたは抗原の製造、特に不活性化ワクチンの製造に有利であるということは驚くべきことであり、予想できなかったことである。

【0013】

従って、本発明の他の対象は本発明のサーコウイルス（circovirus）または病変部細胞、特にPMWS症候群のブタの細胞株の生理学標本または組織標本から単離される任意のブタサーコウイルスの少なくとも1つに感染された細胞をインビトロで培養した細胞株、特にPK/15細胞で継代した後に単離されるサーコウイルス（circovirus）の調製方法にある。

20

本発明のさらに別の対象は上記の培養抽出物または上澄み（必要に応じて一般的な方法でさらに精製されていてもよい）と、一般にインビトロの培養から得られる任意の抗原製剤にある。

本発明のさらに別の対象は免疫抗原性の有効成分と、少なくとも1つの上記定義の抗原を含むワクチンにある。

【0014】

本発明のさらに別の対象は、無毒化した生全ワクチンをベースとする免疫抗原性の有効成分またはこの有効成分を精製して得られるワクチンにある。この無毒化は通常の方法、例えば細胞での継代、好ましくはブタ細胞、特にPK/15細胞等の株細胞での継代（特に50～150、特に100回の継代）で行なわれる。これらのワクチンは一般に獣医学上許容される賦形剤または希釈液と、さらには必要に応じて添加される獣医学上許容される補助剤およびフリーズドライ安定剤とを含むことができる。

30

上記の抗原製剤およびワクチンは $10^3 \sim 10^6$ のTCID₅₀を有するのが好ましい。

【0015】

本発明のさらに別の対象は、不活化した本発明のサーコウイルス抗原をベースにした免疫抗原性有効成分またはワクチンにある。このワクチンは獣医学上許容される賦形剤または希釈液、さらには必要に応じて添加される獣医学上許容される補助剤を含むことができる。

【0016】

40

本発明のサーコウイルス（断片の形でもよい）は当業者に公知の方法で不活性化される。この不活性化は化学的方法、例えば抗原をホルムアルデヒド（ホルマリン）、パラフォルムアルデヒド、β-プロピオラクトン、エチレンイミンまたはその誘導体等の試薬で処理して行なうことができる。好ましい不活性化法は試薬、特にエチレンイミンまたはβ-プロピオラクトンで処理する方法である。

本発明の不活性化ワクチンにはアジュバンドを加え、当業者に公知の方法でエマルジョンの形、例えば油中水エマルジョンまたは水中油エマルジョン等の乳剤の形にするのが好ましい。一般的なアジュバンド化合物を有効成分に添加してアジュバンド処理することもできる。

【0017】

50

使用可能な補剤（アジュバンド）としては例えば水酸化アルミニウム、サポニン（例えば非特許文献 1 1 参照）、Avridine（商標登録）（非特許文献 1 2 参照）、DDA（ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド、非特許文献 1 3 参照）、ポリホスファゼン（非特許文献 1 4 参照）、さらには有機油、スクアラン（例えば S P T 乳剤、非特許文献 1 5 参照）、スクアレン（例えば M F 5 9、非特許文献 1 6 参照）をベースとする水中油乳剤または代謝可能な油をベースとする油中水乳剤（好ましくは特許文献 1、2 に記載の乳剤を挙げることができる。補剤の組み合わせ、例えば乳剤 Avr I D ine（商標登録）または DDA との組み合せた選択することもできる。

これらのワクチンは $10^6 \sim 10^8$ の T C I D 5 0 を有するのが好ましい。

【0018】

10

【非特許文献 1 1】Quillja saponin または Quil A ; "Vaccin Design, The Subunit and Adjuvant Approach, 1995, Michael F. Powell と Mark J. Newman 編、Plenum Press, New-York and London, p.210"

【非特許文献 1 2】Vaccine Design p. 148

【非特許文献 1 3】Vaccine Design p. 157

【非特許文献 1 4】Vaccine Design p. 204

【非特許文献 1 5】Vaccine Design p. 147

【非特許文献 1 6】Vaccine Design p. 183

【特許文献 1】国際特許第 WO-A-94-20071 号公報

【特許文献 2】米国特許第 5,422,109 号明細書

20

【0019】

生ワクチン補剤は不活性化ワクチン用のものから選択することができる。乳剤が好ましい。不活性化ワクチン用のものには特許文献 3 に記載のものも加えることができる。

【特許文献 3】国際特許第 WO-A-94-16681 号公報 凍結安定剤としては例えば S P G A（非特許文献 1 7）、ソルビトール、マンニトール、スターチ、スクロース、デキストランまたはグルコース等の炭水化物、アルブミンまたはカゼイン等のプロテイン、これらの化合物の誘導体またはアルカリ金属燐酸塩等の緩衝剤を挙げることができる。

【非特許文献 1 7】Bovarnik et al., J. Bacteriology 59, 509, 950

【0020】

本件出願人は配列 I D 番号 1 ~ 4（必要な場合にはさらに配列 I D 番号 6）で識別される 4 つの単離株のゲノムを得た。

30

本発明のさらに他の対象はこれらの配列の一部または全てを含む D N A 断片にある。本発明がこれと均等な配列すなわち上記配列の株の特徴または上記配列によりコードされるポリペプチドの機能を変更しない配列も含むものであるということは当然である。また、コードの欠失 (degenerescence) により変化した配列も含むということは理解できよう。

本発明はさらに、厳密な条件下で上記配列と混成可能であり、および / または、上記定義の第 I I 群に属する本発明株と高い相同性を有するという意味で均等な配列も含むものである。

【0021】

これらの配列およびその断片は適当なベクターを用いてインビトロまたはインビボでポリペプチドの発現に有利に用いることができる。

40

特に、これに使用可能な本発明の D N A 断片を形成する読み取り枠はタイプ I I のサーコウイルスのゲノム配列で同定されている。本発明は、少なくともこれらの読み取り枠（対応するアミノ酸配列）の一つを含む全てのポリペプチドに関するものである。特に、本発明は主として O R F 4、O R F 7、O R F 10 または O R F 13 で構成されるプロテインに関するものである。

インビトロのサブユニットを発現するための発現手段としては E. coli またはバキュロウイルス（特許文献 3）を用いるのが好ましい。

【特許文献 3】米国特許第 4,745,051 号明細書

【0022】

50

上記の単数または複数のコード配列またはその断片をバキュロウイルスゲノム（例えば *Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus AcNPV*）に組み込み、次いで、それを昆虫細胞、例えば *Spodoptera frugiperda* Sf9（寄託番号 ATCC CRL 1711）で増殖される。また、イースト（例えば酵母）またはほ乳類細胞（例えば CHO、BHK）等の真核細胞でサブユニットを製造することもできる。

【 0 0 2 3 】

本発明のさらに他の対象は、これらの発現手段によってインビトロで製造され、必要に応じて一般的な方法で精製されたポリペプチドにある。本発明のさらに他の対象は、このようにして得られた少なくとも 1 つのポリペプチドまたはその断片を獣医学上許容される賦形剤または希釈液（必要に応じて獣医学上許容される補助剤をさらに含むことができる）中に含むサブユニットワクチンにある。

10

【 0 0 2 4 】

組み換え生ワクチンの製造時にインビボ発現させるには単数または複数のコード化配列またはその断片を単数または複数のポリペプチドを発現できる条件下で適当な発現ベクターに挿入する。適切なベクターとしては好ましくはブタで増殖可能でブタに対しては非病原性の生ウイルスを当業者に周知の方法で使用することができる。特に、アウジェスキーク病ウイルス、ブタアデノウイルス等のブタヘルペスウイルス、ポックスウイルス、特にワクシニアウイルス、トリポックスウイルス、カナリアポックスウイルス、ブタポックスウイルス等を用いることができる（特許文献 4 ～ 7）。

【特許文献 4】国際特許第 WO-A-90-11092 号公報

20

【特許文献 5】国際特許第 WO-A-93-19813 号公報

【特許文献 6】国際特許第 WO-A-94-21797 号公報

【特許文献 7】国際特許第 WO-A-95-20660 号公報

【 0 0 2 5 】

従って、本発明の他の対象は、このようにして精製されたベクターと、組み換え生ワクチンまたはプラスミドワクチン（ポリヌクレオチドまたは DNA ワクチン）にある。これらのワクチンは獣医学上許容される賦形剤または希釈液を含むことができる。

本発明のワクチン（無毒化、不活性化、サブユニット、組み換えおよびプラスミド生ワクチン）は本発明の一つまたは複数（2、3 つ）のサーコウイルスから成る一つまたは複数の有効成分（抗原）を含むことができる。

30

【 0 0 2 6 】

本発明の上記各種ワクチンはブタの他の病原体に対するワクチンと組み合わせることができる。特に PMSW 症候群に関連する病原体に対するワクチンと組み合わせることができる。本発明のワクチン、特に不活性化ワクチンはブタの他の病原体に対応する他のワクチン価を含むことができる。これらのブタの他の病原体の中では好ましくは PRRS（Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome：ブタ生殖器官および呼吸器症候群）（特許文献 8 ～ 10 および非特許文献 18 を参照）および/または *Mycoplasma hyopneumonia*（特許文献 11 ～ 13 および非特許文献 19 を参照）を挙げることができる。他の重要なワクチン価の中ではアクチノバシラス胸膜肺炎菌、*E. coli*、ブタ萎縮鼻炎（porcine Atrophic Rhinitis）、仮性狂犬病（アウジェスキーク病）、ブタコレラ、ブタインフルエンザを挙げることができる。

40

【 0 0 2 7 】

【特許文献 8】国際特許第 WO-A-93-07898 号公報

【特許文献 9】国際特許第 WO-A-94-18311 号公報

【特許文献 10】フランス国特許第 2,709,966 号公報

【非特許文献 18】"C. Chareyre 他、IPVS Congress, Birmingham, England, 5-9 July 1998, p. 139 の議事録"

【特許文献 11】欧州特許第 597,852 号

【特許文献 12】第 550,477 号、

【特許文献 13】第 571,648 号

50

【非特許文献 1 9】"第 1 5 回 IPVS Congress の O. Martinon 達、p. 157, 284, 285 および G. Reynaud 達、p. 150"

【0 0 2 8】

本発明のさらに他の対象は、本発明のサーコウイルスに対してブタの免疫反応を誘発する方法、特にブタに有効なワクチン接種方法にある。

このワクチン接種方法では上記ワクチンを一回または複数回にわたってブタに投与する。同じワクチン接種プロトコルで複数種の前記ワクチンを組み合わせることも可能である。

このワクチンは大人のブタだけでなく、若いブタまたは妊娠中の雌に対して投与することができる。妊娠中の雌にワクチン接種することによって新生児に受動免疫（母親抗体：maternal antibody）を与えることができる。

10

【0 0 2 9】

本発明はさらに、本発明のブタサーコウイルスの存在を診断する方法を提供する。従って、本発明の他の対象は診断テストと下記試薬を用いたテスト方法にある。

互いに異なるサーコウイルスの配列が分かると共通の配列を定義でき、公知の全てのブタサーコウイルスを識別できる試薬を製造することができる。

当業者は特定の診断を実施するために対応する P K / 1 5 サークウイルスの配列とほとんどまたは全く相同性を示さない領域に対応する配列の断片を選択することができる。

【0 0 3 0】

配列を並べることによって当業者は所望の試薬を選択することができる。

20

第 1 の試薬は上記 D N A 配列およびその断片で構成され、それは周知のハイブリッド法または P C R（ポリメラーゼ鎖反応）法によってプローブまたはプライマーとして用いられる。

第 2 の試薬は上記ウイルスの配列によってコードされたポリペプチドまたはペクター（前記参照）を用いて発現されたまたは公知のペプチド合成法によって化学的に合成されたポリペプチドで構成される。

第 3 および第 4 の試薬はウイルス、ポリペプチドまたは断片、抽出物または D N A 配列でコードされたものから一般的な方法で製造可能なポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体からなる。

【0 0 3 1】

30

上記の第 2、第 3 および第 4 の試薬は本発明の対象である診断法で用いることができる。この診断法では検査するブタから得られた生理学的液体標本（血液、血漿、血清等）または組織標本（神経節、肝臓、肺、腎臓等）中に本発明のサーコウイルスに特有な抗原の存在を調べて抗原自体を検出するか、この抗原に対する抗体を検出する。

【0 0 3 2】

本発明の抗原および抗体は公知の任意の臨床診断法で用いることができるが、上記の抗原および抗体を獣医、ブリーダーまたは動物の飼い主が直接現場で使用可能な方法で用いるのが好ましい。臨床技術および現場技術を有する当業者は上記の抗原および/または抗体を試薬として用いることができる。

【0 0 3 3】

40

本発明で用いるのに好ましい診断法はウェスタンブロット法、免疫抗体法、E L I S A（酵素結合免疫測定法）および免疫クロマトグラフィーである。

免疫クロマトグラフィー法に関しては特に非特許文献 2 0 と特許文献 1 4 ~ 2 9 を参照することができる。

【0 0 3 4】

【非特許文献 2 0】"Robert F. Zulk et al., Clin. Chem. 31/7, 1144-1150 (1985) "

【特許文献 1 4】国際特許第 WO-A- 8 8 - 0 8 5 3 4 号公報

【特許文献 1 5】国際特許第 WO-A- 9 1 - 1 2 5 2 8 号公報

【特許文献 1 6】欧州特許第 2 9 1 , 1 7 6 号公報

【特許文献 1 7】欧州特許第 2 9 9 , 4 2 8 号公報

50

- 【特許文献 18】欧州特許第 291, 194 号公報
【特許文献 19】欧州特許第 284, 232 号公報
【特許文献 20】米国特許第 5, 120, 643 号明細書
【特許文献 21】米国特許第 5, 030, 558 号明細書
【特許文献 22】米国特許第 5, 266, 497 号明細書
【特許文献 23】米国特許第 4, 740, 468 号明細書
【特許文献 24】米国特許第 5, 266, 497 号明細書
【特許文献 25】米国特許第 4, 855, 240 号明細書
【特許文献 26】米国特許第 5, 451, 504 号明細書
【特許文献 27】米国特許第 5, 141, 850 号明細書
【特許文献 28】米国特許第 5, 232, 835 号明細書
【特許文献 29】米国特許第 5, 238, 652 号明細書
【0035】

10

標本中に特異な抗体は間接法、競合法または置換法によって検出するのが好ましい。そのためには抗原自体を診断試薬として用いるか、抗体の認識を保持する抗原断片を診断試薬として用いる。標識化はペルオキシダーゼを用いた標識化または特殊な標識化、好ましくはコロイド性金を用いた標識化が有利である。

標本中の抗原自体をこの抗原に特異な標識化した抗体を用いて検出することもできる。標識化は上記のものが有利である。

競合法または置換法または抗原自体の検出に用いられる抗原に特異な抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、これら抗体の断片、好ましくはFabまたはF(ab)₂断片である。

20

【0036】

本発明はさらに、上記抗体を生理学的液体標本または組織標本中の抗原の検出またはこれら標本または試験片中に存在する抗体の検出のための診断試薬として使用可能な本発明抗原に特有のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体の製造方法に関するものである。本発明はものにさらに、これらの抗体の免疫機能を有する断片、特にF(ab)およびF(ab)₂断片は本発明に含まれる。

抗体は一般的な方法で製造することができる。特に非特許文献 21 または非特許文献 22 を参照することができる。これらの内容は本件明細書の一部を成す。

30

特に、抗原またはその断片の少なくとも 1 つで免疫化されたネズミの脾臓細胞を適当な骨髓腫細胞と融合（この方法自体は公知）することができる。

【非特許文献 21】"Antibodies, A Laboratory Manual, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory, USA"

【非特許文献 22】"J. W. Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Inc.,"

【0037】

本発明の他の対象は上記抗原に特異なモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、特にネズミまたはウサギの抗体の純粋または部分的に純粋な製剤或いは粗原料からなる製剤にある。

40

本発明では上記の DNA 配列を基にした所望のエピトープ（ワクチン用エピトープまたは診断用エピトープ）を決めることができる。本発明のサーコウイルスのゲノムの DNA 配列から、エピトープを決めることができる。当業者は公知の方法、例えば適切なコンピュータプログラムまたはPEPSCANを用いてエピトープを求めることができる。このエピトープはプロテインの免疫優性領域であり、プロテインの表面に露出した領域である。このエピトープは抗体によって認識され、診断の分野において診断目的の抗体の調製または診断試薬として用いられる対応するペプチドの製造に用いられる。

少なくともエピトープは 8 ~ 9 個のアミノ酸を有するペプチドである。一般には最小でも 13 ~ 25 個のアミノ酸が好ましい。

【0038】

50

当業者は一つまたは複数の上記技術および利用可能なその他の技術を用いて診断用のペプチドまたは抗体で用いるエピトープを見付けることができる。

従って、本発明の他の対象はこの抗原および/またはこの抗原に特有なモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を含む診断キットにある。これらは特に、前記の診断技術による診断キットである。

【0039】

以下、下記の図を参照して本発明の実施例をさらに詳細に説明する。しかし、本発明が下記実施例に限定されるものではない。

配列IDリスト

配列ID番号1 = Imp. 1011-48121株のゲノムのDNA配列

配列ID番号2 = Imp. 1011-48285株のゲノムのDNA配列

配列ID番号3 = Imp. 999株のゲノムのDNA配列

配列ID番号4 = Imp. 1010株のゲノムのDNA配列

配列ID番号5 = PK/15株のゲノムのDNA配列

配列ID番号6 = 1997年10月3日のフランスの最初の出願における Imp. 999株のゲノムのDNA配列

【実施例】

【0040】

実施例1

ブタサーコウイルス(circovirus)株の培養および分離

組織標本はフランス、カナダおよび米国で子豚の肺およびリンパ節から集めた。これらの子豚は離乳後多機能萎縮症候群に典型的な臨床的徴候を示したものである。ウイルスを単離するため組織標本は死体解剖直後に - 70 で凍凍した。

ウイルス単離のために無菌の乳鉢と乳棒を用いて無菌の砂で組織を粉砕し、イール(Earl)塩(EMEM, BioWhittaker UK Ltd., Workingham, UK)、ペニシリン(100 IU/ml)およびストレプトマイシン(100 μm/ml)を含む最小培地(MEM-SA培地)中に約15%の組織標本を含む懸濁液を調製した。粉砕物をMEM-SAに溶解し、+4、3000gで30分間、遠心分離にかけて上澄みを回収した。

【0041】

細胞培地の接種前に、100 μlのクロロホルムを2mlの各上澄みに添加し、室温で10分間混合した。この混合物を超遠心分離管に移し、10分間3000gで遠心分離して上澄みを回収した。次いで、この上澄みをウイルス分離実験で種菌として用いた。

全てのウイルス単離研究はブタサーコウイルス(PCV)、ペスチウイルス、ブタアデノウイルスおよびブタパルヴォウイルスに感染していないことが分かっているPK/15細胞培地で実施した(非特許文献23)。

【非特許文献23】Allan G. et al., Pathogenesis of porcine circovirus experimental infections of colostrum-deprived piglets and examination of pig foetal material. Vet. Microbiol. 1995, 44, 49-64

【0042】

ブタサーコウイルスの単離は下記方法によって実施した：

PK/15細胞の単一層をトリプシン処理(トリプシン-versene混合物)によって集密的な培養から解離し、最終濃度が約400,000細胞/1mlであるペスチウイルス(=MEM-G培地)に感染していない15%のウシ胎児血清を含むMEM-SA培地に溶解した。次に、この細胞懸濁液の10mlの部分標本を2mlの前記接種材料の部分標本と混合し、最終混合物を2つの25cm²ファルコンフラスコに6mlの容積に分取した。+37で18時間、10%のCO₂を含む雰囲気下で培養した。

【0043】

培養後、半集密的な単一層を300mMのD-グルコサミン(Cat # G48175, Sigma-Aldrich株式会社, Poole, UK)で処理し(非特許文献24)、さらに37で48~72時間培養を続けた。この最終培養に続いて、2つのファルコンの1方を3回凍結/融解サイ

10

20

30

40

50

クルにかけた。残りのファルコンの P K / 1 5 細胞はトリプシン - versene 溶液で処理し、2 0 m l の M E M - G 培地中に再懸濁し、4 0 0 , 0 0 0 細胞 / m l 濃度で 7 5 c m² ファルコン中に接種した。新しく接種されたフラスコは凍結 / 融解サイクル後に得られた対応する可溶化液 5 m l を添加して「超感染」させた。

【非特許文献 2 4】Tischr l. et al., Arch. Virol., 1987 96 39-57

【 0 0 4 4 】

実施例 2

免疫抗体法または切片上ハイブリッド形成法によるブタサーコウイルスを検出するための細胞培地標本の調製

5 m l の容積の「超感染」した懸濁液を回収し、無菌で脱脂したカバーガラスを含む直径 5 5 m m のペトリ皿中に接種した。フラスコ中およびカバーガラス上で + 3 7 ° で培養し、実施例 1 に記載のグルコサミンで処理した。カバーガラス上での培養はグルコサミン処理後 2 4 ~ 4 8 時間で回収し、室温で 1 0 分間アセトンを用いて、または 4 時間緩衝剤処理した 1 0 % のホルムアルデヒドを用いて固定した。この固定後、全てのカバーガラスをシリカゲル上で - 7 0 ° で貯蔵してから、ハイブリッド形成の研究および細胞免疫の研究に使用した。

【 0 0 4 5 】

実施例 3

ハイブリッド形成法 (in situ) による P C V 配列の検出法

ハイブリッド形成法 (in situ) は病気のブタから集めた組織に対して実施し、ホルムアルデヒドで固定し、ウイルス単離 (実施例 2 参照) 用に接種した細胞培地の調整で用い、カバーガラスに固定した。

P K / 1 5 ブタサーコウイルス (P C V) および感染性ニワトリ貧血症ウイルス (C A V) に対応する完全なゲノムプローブを用いた。1 . 7 キロの塩基ペア (kbp) の挿入断片の形にクローン化された P C V ゲノムの複製型を含むプラスミド pPCVI (Meehan B. et al. Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circovirus, J. Gen. Virol. 1997, 78, 221-227) を P C V 固有 D N A 源として用いた。2 . 3 k b p の鳥サーコウイルス C A V の複製型を含む鳥プラスミド pCAAI を負対照として用いた。2 つのプラスミドのグリセロール源をアルカリ法 (非特許文献 2 5) によってプラスミドの製造および精製で用い、これらはプローブ調製用のテンプレートとして用いた。P C V および C A V の完全なゲノムを表すサーコウイルスプローブはメーカー推薦の方法で市販の非放射性ラベリングキット ("DIG DNA Labelling Kit", Boehringer Mannheim, Lewis, UK) を用いて上記精製プラスミド (各プローブに 1 μ g) およびヘキサヌクレオチドプライマーから製造した。

【非特許文献 2 5】Sambrook J. et al. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1988

【 0 0 4 6 】

ハイブリッド形成法 (in situ) で使用する前に、プローブをジゴキシジェニンで標識化し、容積 5 0 ~ 1 0 0 μ l の純水に溶解した。

パラフィンに包み、ホルムアルデヒドで固定した病気のブタの組織標本と、ホルムアルデヒドで固定した感染細胞培地の製剤を下記方法で P C V 核酸検出のために調製した：

5 μ m 厚の切片をパラフィンに包まれた組織塊から切り出し、濃度を次第に薄くしたアルコール溶液中で再水和した。ホルムアルデヒドで固定した組織切片および細胞培地を 1 5 分間および 5 分間それぞれ 5 m M の E D T A を含む 0 . 0 5 M の T r i s - H C L 緩衝剤 (p H 7 . 6) を用いた 0 . 5 % のプロテナーゼ K 溶液中で + 3 7 ° で培養した。次に、スライドガラスを加圧滅菌した蒸留水中の 1 % グリシン溶液中に 3 0 秒配置し、0 . 0 1 M の P B S 緩衝剤 (燐酸緩衝食塩水) (p H 7 . 2) で 2 度洗浄し、最後に無菌蒸留水で 5 分間洗浄した。スライドガラスを最後に外気で乾燥し、プローブと接触させた。

【 0 0 4 7 】

各組織 / プローブ製剤を清潔な脱脂カバーガラスで被覆し、+ 9 0 ° の炉内に 1 0 分間

10

20

30

40

50

配置した後、氷塊と1分間接触させ、最後に+37で18時間培養した。次に、調整物を2×クエン酸ナトリウム塩(SSC)緩衝剤(pH7.0)に短時間含浸した後、2×のSSC緩衝剤中で5分間、2回洗浄し、最後にPBS緩衝剤中で5分間、2回洗浄した。

洗浄後、調整物を0.1Mのマレイン酸、0.15MのNaCl(pH7.5)(マレイン緩衝剤)の溶液中に10分間含浸し、マレイン緩衝剤中の遮断試薬の1%溶液(Cat # 1096176, Boehringer Mannheim UK, Lewis, East Sussex, UK)中で+37で20分間培養した。

【0048】

次に、調整物を遮断緩衝剤で希釈された抗ジゴキシジェニンモノクローナル性抗体(Boehringer Mannheim)の1/250溶液中で+37で1時間培養し、PBS中で洗浄し、最後に抗ネズミ免疫グロブリン抗体を用いて+37で30分間培養した。調整物をPBSで洗浄し、内因性ペルオキシダーゼ作用を室温で20分間、PBS中の0.5%水酸化ペルオキシド溶液で処理して遮断した。調整物を再度PBS中で洗浄し、使用直前に調製した3-アミノ-9-ジエチルカルバゾル(AEC)基質(Cambridge Bioscience, Cambridge, UK)で処理した。

最後に水道水で洗浄した後、調整物をヘマトキシリンで逆染色し、水道水で"青色化"して固定液(GVA Mount, Cambridge Bioscience, Cambridge, UK)で顕微鏡のカバーガラスに固定した。対照実験には無関係な負プロブ(CAV)と正プロブ(PCV)を病気のブタおよび病気ではないブタから得られた標本で使うことが含まれる。

【0049】

実施例4

免疫抗体法によるPCVの検出法

アセトンを用いて固定した全ての細胞培地の最初のスクリーニングを貯蔵した大人のブタ血清の1/100希釈を用いた間接免疫抗体法(IIF)で実施した。この貯蔵血清は北アイルランドの25匹の大人の雌ブタからの血清を含み、PCV:ブタパルボウイルス、ブタアデノウイルスおよびPRRウイルスを含む広範囲のブタのウイルスに対する抗体を含むことで知られている。血清(PBSで希釈)を細胞培地と+37で1時間接触させた後、PBS中で2回洗浄してIIFを実施した。細胞培地をイソチオシアン酸フルオレセインに結合したPBSで1/80に希釈したウサギの抗ブタ免疫グロブリン抗体を用いて1時間染色し、PBSで洗浄し、グリセロール緩衝剤に固定し、紫外線下で顕微鏡観察した。

【0050】

実施例5

病気のブタの組織における切片上ハイブリッド形成結果

フランス、カナダおよびカリフォルニアの多機能性萎縮病変を有する子豚から集めた組織から調製したPCVゲノムプロブを用いた切片上ハイブリッド形成法から、研究された複数の病変部に病変部に関連するPCV核酸の存在が示された。これに対してPCVゲノムプロブを病気でないブタから集めた組織に用いた時またはCAVプロブを病気のブタの組織に用いた時には何の徴候も見られなかった。PCV核酸の存在はサイトプラズマおよびカリフォルニアの子豚の肺の病変部を浸潤する多数の単核細胞の核に認められた。PCV核酸の存在は肺細胞、気管支および細気管支の上皮細胞および細動脈、細静脈およびリンパ管の内皮細胞にも見られた。

【0051】

病気のフランスのブタではPCV核酸の存在は多数の濾胞性リンパ細胞のサイトプラズマおよびリンパ節の同様な毛細血管内の単核細胞に検出された。また、PCV核酸は一次的合胞体にも検出された。これらの検出結果から、カリフォルニアのブタの肺、フランスのブタの腸間膜リンパ節およびカナダのブタの器官の標本を新規なブタサーコウイルス株の単離用に選択した。

【0052】

10

20

30

40

50

実施例 6新規なブタサーコウイルス株の細胞培養結果と、免疫抗体法による検出

多機能性萎縮症候群の臨床的徴候を示すフランスの子豚（Imp. 1008株）、カリフォルニアの子豚（Imp. 999株）およびカナダの子豚（Imp. 1010株）から集めた標本を培養した細胞培地には細胞変性作用（CPE）は全く見られなかった。しかし、アセトンを用いて固定した後、貯蔵されたブタのポリクローン化した血清を用いて培養した細胞培地から得られた製剤を免疫標識化することによって、カリフォルニアの子豚（Imp. 999株）の肺、フランスの子豚（Imp. 1008株）の縦隔リンパ節およびカナダの子豚（Imp. 1010株）の器官を用いて培養した培地中の多数の細胞に核蛍光が現れた。

【0053】

10

実施例 7ブタサーコウイルスのゲノムDNAの抽出

ブタサーコウイルス（PCV）の新規な株の複製型を72～76時間の培養後に回収した感染したPK/15細胞培地（実施例1参照）（75cm²ファルコン10個）を用いて調製し、CAVの複製型のクローン化で記載したグルコサミンで処理した（非特許文献26）。この複製型の2本鎖DNAはHirt法（非特許文献27）の変形法で抽出した（非特許文献28に記載）。

【0054】

【非特許文献26】Todd, D. et al., Dot blot hybridization assay for chicken anaemia agent using a cloned DNA probe. J. Clin. Microbiol. 1991, 29, 933-939

20

【非特許文献27】Hirt B. Selective extraction of polyoma virus DNA from infected cell cultures, J. Mol. Biol. 1967, 36, 365-369

【非特許文献28】Molitor T. W. et al. Porcine parvovirus DNA: characterization of the genomic and replicative form DNA of two virus isolates, Virology, 1984, 137, 241-254

【0055】

実施例 8ブタサーコウイルス Imp.999株のゲノムの複製型の制限地図

Hirt法で抽出されたDNA（1～5μg）をメーカーの推薦する方法に従ってS1ヌクレアーゼ（Amersham）で処理し、各種制限酵素（Boehringer Mannheim UK, Lewis, East Sussex, UK）で消化し、消化物をTodd達が記載の方法（非特許文献29）で、臭化エチジウムの存在下、1.5%のアガロースゲル上で電気泳動で分離した。Imp.999株の培地から抽出したDNAは独特のEcoRI部位、2つのSacI部位を有し、PstI部位は全く持たない。従って、この制限プロフィールは、逆にPstI部位を有し、EcoRI部位を全く持たないPCVのPK/15株（非特許文献30）が示す制限プロフィールとは異なっている。

30

【非特許文献29】Purification and biochemical characterization of chicken anaemia agent. J. Gen. Virol. 1990, 71, 819-823

【非特許文献30】Meehan B. et al. Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circovirus, 1997, 78, 221-227

【0056】

40

実施例 9ブタサーコウイルス Imp.999株のゲノムのクローン化

制限酵素EcoRIを有するPCV Imp.999株の2本鎖複製型の消化で生じた約1.8kbの制限断片を市販のQiagen kit（QIAEXII Gel Extraction Kit, Cat # 20021, QIAGEN Ltd., Crawley, West Sussex, UK）を用いて1.5%アガロースゲル（実施例3参照）上で電気泳動で分離した。次に、このEcoRI-EcoRI制限断片を標準クローン化法（非特許文献31）によって予め同じ制限酵素を用いて消化し、脱リン酸したベクターpGEM-7（Promega, Medical Supply Company, Dublin, Ireland）と結合した。得られたプラスミドを標準的方法によってEscherichia coli JM109宿主株（Stratagene, La Jolla, USA）に変換した。同じく、PCV Imp.999株のEcoRI-EcoRI制限断片をベクターpBlueScript SK+（S

50

tratangene, La Jolla, USA) のEcoRI部位にクローン化した。各宿主株に対して得られたクローンの中から所望の大きさの断片を有する少なくとも2つのクローンを選択した。次に、得られたクローンを培養し、Imp.999株の完全なゲノムを含むプラスミドを標準的なプラスミド調製および精製法によって少容量(2 ml)または大容量(250 ml)に精製した。

【非特許文献31】Sambrook J. et al. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1988

【0057】

実施例10

PCV Imp.999株のゲノムDNAの配列(2本鎖複製型)

10

2つのEcoRI Imp.999のクローン配列(クローンpGEM-7/2およびpGEM-7/8)をメーカー推薦の方法で配列キット"AmpliTaQ DNA polymerase FS"(Cat # 402079 PE Applied Biosystems, Warrington, UK)および"Applied BioSystems AB1373A automatic sequencing apparatus"を用いてSangerのジデオキシヌクレオチド法で決定した。最初の配列反応はM13「前方」および「後方」自在プライマーを用いて実施した。続く配列反応は「DNA歩行」法によって実施した。その後の配列に必要なオリゴヌクレオチドはLife Technology(Lincoln Business Park, Paisley, UK)によって合成された。

【0058】

得られた配列は集め、MacDNASIS version 3.2のソフトウェア(Cat # 22020101, Applied gene, Durham, UK)を用いて分析した。各種の読み取り枠を"National Center for Biotechnology Information"(NCBI, Bethesda, MD, USA)サーバーで入手可能なBLAST algorithmを用いて解析した。

20

クローンpGEM-7/8(配列ID番号6)から最初に得られた完全な配列(EcoRI-EcoRI)は図13、14に表してある。この配列はEcoRI部位のGの後に任意に始まり、ヌクレオチドに関してはいくつか不安定な部分を有している。

次いで、この配列が最適化された。配列ID番号3(図9~14)はこの株の配列を全て表しており、EcoRI部位の始めすなわち最初のヌクレオチドとしてGから任意に始まる。

【0059】

同様の方法本発明の他の3つの分離株の配列を得た(配列ID番号1、2、4および図1~4および図7、8参照)。これら4つの株のゲノムの大きさは下記の通りである：

30

Imp. 1011-48121	1767個のヌクレオチド
Imp. 1011-48285	1767個のヌクレオチド
Imp. 999	1768個のヌクレオチド
Imp. 1010	1768個のヌクレオチド

【0060】

実施例11

PCV Imp.999株の配列の分析

Imp.999株から得られた配列をGenBankのデータベースに収容された配列との相同性テストで用いた結果、検出された有意な相同性はPK/15株の配列(寄託番号Y09921)(図9~12参照)と約76%の相同性であった。

40

データベース(NCBIサーバーのBLAST X algorithm)を用いた6つのフェーズでの配列の翻訳の相同性テストでは、アミノ酸レベルで、GenBank U49186配列でコードされるブラント(GenBank番号1841515)のサーコウイルスに類似のBBTBウイルスの理論的レプリカーゼに対応する読み取り枠と94%の相同性を示すということが分かった。

PCV Imp.999株から得られた配列と有意な相同性を示すものはデータベースに収容された他の配列にはなかった。

多機能萎縮症候群の臨床的徴候を示すカリフォルニアの子豚から得られた病変部を用いて培養されたImp.999株から得られた配列のには解析から、この単分離ウイルスが新規なブタサーコウイルス株であることが明らかになった。

50

【 0 0 6 1 】

実施例 1 2

配列の比較分析

新規な 4 つの P C V 株のヌクレオチド配列と P C V の P K / 1 5 株の配列 (図 9 ~ 1 2) とを整理比較した。新規な 4 つの株と公知の P K / 1 5 株とに関する相同性マトリクスを作成した。結果は下記の通りである :

1 : I m p . 1 0 1 1 - 4 8 1 2 1
 2 : I m p . 1 0 1 1 - 4 8 2 8 5
 3 : I m p . 9 9 9
 4 : I m p . 1 0 1 0
 5 : P K / 1 5

10

【 0 0 6 2 】

【表 1】

	1	2	3	4	5
1	1.0000	0.9977	0.9615	0.9621	0.7600
2		1.0000	0.9621	0.9632	0.7594
3			1.0000	0.9949	0.7560
4				1.0000	0.7566
5					1.0000

20

【 0 0 6 3 】

2 つのフランス株 I m p . 1011-48121 と I m p . 1011-48285 の相同性は 9 9 % 以上 (0 . 9 9 7 7) である。2 つの北米株 I m p . 999 と I m p . 1010 の相同性も 9 9 % 以上 (0 . 9 9 4 9) 以上である。フランス株と北米株との相同性はわずかに 9 6 % 以上である。

これら全ての株と P K / 1 5 株との相同性は 7 5 ~ 7 6 % の値に落ちる。

このことから、本発明の株は P K / 1 5 株に代表される種類とは異なる新規なブタサーコウウイルスの代表であると言える。P K / 1 5 がタイプ I を表すのに対し、P M W S 症候群を示すブタから単離されたこの新規な株をタイプ I I のブタサーコウウイルスとよぶことにする。このタイプ I I に属する株は実際には非常に離れた地理的領域から単離されたにもかかわらず、驚くべきヌクレオチド配列の相同性を示す。

30

【 0 0 6 4 】

実施例 1 3

新規な P C V 株のゲノムによってコードされるプロテインの分析

I m p . 1010 単離株のヌクレオチド配列は多機能性萎縮症候群に関する他のサーコウウイルス株を代表するものと考えられる。この配列を BLASTX algorithm (非特許文献 3 2) と、ソフトウェア MacVector 6.0 (Oxford Molecular Group, Oxford OX4 4GA, UK) のプログラムとを組み合わせを用いて詳細に分析した。この配列 (環状ゲノム) 上には 2 0 個のアミノ酸より大きいサイズの読み取り枠 (または O R F) が 1 3 個検出できた。この 1 3 個の O R F は下記の通りである :

40

【非特許文献 3 2】Altschl et al. J. Mol. Biol. 1990. 215. 403-410

【 0 0 6 5 】

【表 2】

名前	始め	終わり	鎖	ORFの大きさ (ヌクレオチド (nt))	プロテインの大きさ (アミノ酸 (aa))
ORF1	103	210	転写	108 nt	35 aa
ORF2	1180	1317	転写	138 nt	45 aa
ORF3	1363	1524	転写	162 nt	53 aa
ORF4	398	1342	転写	945 nt	314 aa
ORF5	900	1079	転写	180 nt	59 aa
ORF6	1254	1334	転写	81 nt	26 aa
ORF7	1018	704	非転写	315 nt	104 aa
ORF8	439	311	非転写	129 nt	42 aa
ORF9	190	101	非転写	90 nt	29 aa
ORF10	912	733	非転写	180 nt	59 aa
ORF11	645	565	非転写	81 nt	26 aa
ORF12	1100	1035	非転写	66 nt	21 aa
ORF13	314	1381	非転写	702 nt	213 aa

【0066】

各ORFの開始位置および終了位置は株1010のゲノムの図7、8に表された配列(配列ID番号4)を参照する。ORF1~13の端部は株999と同一である。これらは下記ORF3と13を除き、株1011-48121および1011-48285とも同一である:

ORF3 1432-1539、センス、108 nt、35 aa

ORF3 314-1377、アンチセンス、705 nt、234 aa

これら13のORFの中で4つがクローン化ウイルスPCV PK/15のゲノム上に位置する類似のORFと有意な相同性を有する。多機能性萎縮症候群に関連するサーコウイルス単離株全てのゲノム上に存在する読み取り枠をそれぞれ分析した。これら4つのORFは下記の通り:

【0067】

【表 3】

名前	始め	終わり	鎖	ORFの大きさ (nt)	プロテインの 大きさ (aa)	分子量
ORF4	398	1342	転写	945 nt	314 aa	37.7 kDa
ORF7	1018	704	非転写	315 nt	104 aa	11.8 kDa
ORF10	912	733	非転写	180 nt	59 aa	6.5 kDa
ORF13	314	1381	非転写	702 nt	233 aa	27.8 kDa

【0068】

各ORFの始めと終わりの位置は図7、8に表された配列(配列ID番号4)を参照する。ORFの大きさ(ヌクレオチド=nt)は終止コドンを含む。

PCV Imp. 1010とPCV PK-15の単離株のゲノム機構の比較からから、2つ

10

20

30

40

50

のウイルスのゲノムに保存された４つのORFが同定できた。下記の表は観察された同一性の程度を表す：

【 0 0 6 9 】

【表 4】

ORF Imp. 1010/ORF PVC PK-15	相同性 (%)
ORF4/ORF1	86%
ORF13/ORF2	66.4%
ORF7/ORF3	61.5% (重複レベルで (104 aa))
ORF10/ORF4	83% (重複レベルで (59 aa))

10

【 0 0 7 0 】

最大の相同性はORF 4 Imp. 1010とORF 1 PK - 15との間に見られた(86% 相同性)。このプロテインはおそらくウイルスのDNA複製に含まれ、ウイルスの複製に必須であるため、このことは予想されることである(非特許文献33)。

ORF 13 Imp. 1010とORF 2 PK - 15との間の配列同一性は余り強くない(66.4%の同一性)が、この2つのORFはそれぞれ、鳥サーコウイルスCAV(非特許文献34)の主構造プロテインのN-末端領域と同一な良く保存されたN-末端基本領域を有している。さらに、ORF 7 Imp. 1010とORF 3 PK - 15との間と、ORF 10 Imp. 1010とORF 4 PK - 15との間に大きな違いが見られた。PCV PK - 15のORF 3とORF 4と比較すると、それぞれにImp. 1010分離株のORF 7とORF 10のC-末端領域に欠失がある。最大の配列相同性はORF 7/ORF 3(重複部分の水準において61.5%の相同性)とORF 10/ORF 4(重複部分の水準において83%の相同性)のN-末端領域の水準において見られる。

20

【非特許文献33】Meehan et al., Gen. Virol. 1997,78; 221-227; Mankertz et al. J. Gen. Virol. 1998. 79. 381-384

【非特許文献34】Meehan et al., Arch. Virol. 1992, 124. 301-319

30

【 0 0 7 1 】

ブタサーコウイルスのゲノム構造はゲノムが極端に高密度であるため非常に複雑であるように見える。主構造プロテインはおそらくブタサーコウイルスゲノムの同じ鎖上に位置する複数の読み取り枠間のスプライシングに由来するものである。従って、上記の表に記載の全ての読み取り枠(ORF 1 ~ ORF 13)でタイプIIのブタサーコウイルスにコードされた抗原プロテインの全てまたは一部を表すことができ、これらは特有の病気および/またはワクチン接種に使用可能な抗原である。本発明はこれらのORFを少なくとも1つ含む全てのプロテインに関するものである。本発明は主としてORF 4、ORF 7、ORF 10またはORF 13で構成されるプロテインに関するものである。

【 0 0 7 2 】

40

実施例 14

新規な株からクローンされたPCVゲノムの感染特性

Imp. 999単離株の完全なゲノム(複製型)を含むプラスミドpGEM-7/8をMeehan B. 達に記載の方法によってPK/15細胞に形質移入した(非特許文献35)。未感染のPK/15細胞に形質移入した後の最初の継代に対して実施された免疫抗体法の分析(実施例4参照)から、クローンpGEM-7/8のプラスミドは感染性PCVウイルスを誘導することが示された。感染性PCVの遺伝物質を含むクローンが利用可能になったことによってウイルス性ゲノムに任意の有用な処置をして無毒化ワクチンまたは組み換えワクチンを製造し、或いは診断キット用抗原を製造することができ、変成PCVウイルス(ブタで無毒化または欠失)を製造することができるようになった。

50

【非特許文献 35】Characterization of viral DNAs from cells infected with chicken anemia agent: sequence analysis of the cloned replicative form and transfection capabilities of cloned genome fragments. Arch. Virol. 1992, 124. 301-319

【0073】

実施例 15

インビトロ培養による PCV 抗原の製造

感染していない PK / 15 細胞の培養およびウイルス処置を実施例 1 と同じ方法で実施した。感染細胞を 37 で 4 日間培養後、トリプシン処理し、回収し、命名した。次の継代は 1 ml につき 400,000 個の感染細胞を接種した。

【0074】

実施例 16

ウイルス性抗原の不活化

ウイルス培養の最後に、感染した細胞を回収し、超音波 (Branson Sonifier) またはロータースタータータイプのコロイドミル (UltraTurrax, IKA) を用いて溶解した。次に、懸濁液を 3700 g で 30 分間、遠心分離した。このウイルス懸濁液を +37 で 18 時間、0.1% エチレンイミンで、或いは、+28 で 24 時間、β-プロピオラクトンで不活化した。ウイルス価が不十分な場合にはウイルス懸濁液を 300 kDa のメンブレン (Millipore PTMK300) を用いた限外濾過で濃縮した。不活化ウイルス懸濁液は +5 で貯蔵した。

【0075】

実施例 17

有機油をベースにしたワクチン乳剤の製造

下記処方でワクチンを調製した：

不活化ブタサーコウイルス懸濁液 : 250 ml

Mondan I De (商標登録) ISA 70 (SEPPIC) : 750 ml

水相および油相は濾過によって別々に滅菌した。この乳剤はシルバーソン・タービン乳化機を用いて各成分を混合し、均質化して調製した。

一回のワクチン投与量は約 $10^{7.5}$ の TCID₅₀ を含む。皮膚経路の一回のワクチン投与容量は 0.5 ml、筋肉経路の投与量は 2 ml である。

【0076】

実施例 18

代謝可能な油ベースのワクチン乳剤の製造

下記処方でワクチンを調製した：

不活化ブタサーコウイルス懸濁液 : 200 ml

Dehymuls HRE 7 (Henkel) : 60 ml

Radia 7204 (Oleofina) : 740 ml

水相および油相は濾過によって別々に滅菌した。この乳剤はシルバーソン・タービン乳化機を用いて各成分を混合し、均質化して調製した。

一回のワクチン投与量は約 $10^{7.5}$ の TCID₅₀ を含む。皮膚経路の一回のワクチン投与容量は 0.5 ml、筋肉内経路の投与量は 2 ml である。

【0077】

実施例 19

過免疫血清 (PCV-T)、PK / 15 から調製されたモノクローナル抗体 F99 およびカナダ株から調製された過免疫血清 (PCV-C) で汚染されたアメリカおよびフランスの PCV ウイルス株および PK / 15 の間接免疫抗体法の結果

【0078】

10

20

30

40

【表 5】

ウイルス			
	PK/15	USA	フランス
PCV-T 抗血清	≥ 6400	200	800
PCV-C 抗血清	200	≥ 6.400	≥ 6.400
F99 1H4	≥ 10 000	<100	100
F99 4B10	≥ 10 000	<100	<100
F99 2B7	≥ 10 000	100	<100
F99 2E12	≥ 10 000	<100	<100
F99 1C9	≥ 10 000	<100	100
F99 2E1	≥ 10 000	<100	<100
F99 1H4	≥ 10 000	100	<100

10

* 間接的免疫抗体法で正の反応を示した血清またはモノクローナル抗体の最後の希釈液の逆数。

【図 1】

PCV Imp1011-48121 分離株の配列 (SEQ ID N°1)

```

1  AATTCAACCT TAACCTTTCT TATTCTGTAG TATTCAAAGG GCACAGAGCG
51  GGGGTTTGAG CCCCTCCTG GGGGAAGAAA GTCATTAATA TTGAATCTCA
101 TCATGTCCAC CGCCAGGAG GCGGTTCTGA CTGTGGTTGG CTTGACAGTA
151 TATCCGAAGG TCGCGGAGAG GCGGGTGTG AAGATGCCAT TTTCTCTCT
201 CCAGCGGTAA CGTGGCGGG GGTGGACGAG CCAGGGGCGG CGGCGGAGGA
251 TCTGGCCAAG ATGGCTGCGG GGGCGGTGTC TTCTCTCCG GTAACGCCTC
301 CTTGGATACG TCATATCTGA AAACGAAAGA AGTGCGGTGT AAGTATTACC
351 AGCGCACTTC GGCAGCGGCA GCACCTCGGC AGCACCTCAG CAGCAACATG
401 CCGAGCAAGA AGAATGGAGG AAGCGGACCC CAACCCGATA AAAGGTGGGT
451 GTTCACTCTG AATAATCCTT CGGAAGACGA GCGCAAGAAA ATACGGGATC
501 TTCCAATATC CCTATTTGAT TATTTTATTG TTGGCGAGGA GGGTAATGAG
551 GAAGGACGAA CACCTCACCT CCAGGGGTTC GCTAATTTTG TGAAGAAGCA
601 GACTTTTAAT AAAGTGAAGT GGTATTTGGG TGCCCGCTGC CACATCGAGA
651 AAGCGAAAGG AACAGATCAG CAGAATAAAG AATACTGCAG TAAAGAAGGC
701 AACTTACTGA TGGAGTGTGG AGCTCCTAGA TCTCAGGGAC AACGGAGTGA
751 CCTGTCTACT GCTGTGAGTA CCTTGTGGGA GAGCGGGAGT CTGGTGACCG
801 TTGCAGAGCA GCACCTGTGA ACCTTTGTCA GAAATTTCCG CGGGCTGGCT
851 GAACCTTTGA AAGTGAGCGG GAAAATGCAG AAGCGTGATT GGAAGACTTA
901 TGTACACGTC ATTGTGGGGC CACCTGGGTG TGGTAAAGC AAATGGGCTG
951 CTAATTTTGC AGACCCGAA ACCACATACT GGAACCACC TAGAACAAG
1001 TGGTGGGATG GTTACCATGG TGAAGAAGTG GTTGTATTG ATGACTTTTA
1051 TGGCTGGCTG CCCTGGGATG ATCTACTGAG ACTGTGTGAT CGATATCCAT
1101 TGAAGTGAAG GACTAAAGGT GGAAGTGTAC CTTTTTGGC CGCAGTATT
1151 CTGATTACCA GCAATCAGAC CCGTTGGGAA TGGTACTCCT CAACTGCTGT
1201 CCCAGCTGTA GAAGCTCTTT ATCGGAGGAT TACTTCCTTG GTATTTTGGG

```

【図 2】

```

1251 AGAATGCTAC AGAACAATCC ACGGAGGAAG GGGGCCAGTT CGTCACCCTT
1301 TCCCCCCCAT GCCCTGAATT TCCATATGAA ATAAATTACT GAGCTTTTTT
1351 TATCACTTCG TAATGGTTTT TATTATTCAT TAAGGGTTAA GTGGGGGGTC
1401 TTTAAGATTA AATTCTCTGA ATTGTACATA CATGGTTACA CGGATATTGT
1451 ATTCCTGGTC GTATATACTG TTTTCGAACG CAGTGCCGAG GCCTACGTGG
1501 TCACATTTC CAGCAGTTTG TAGTCTCAGC CACAGCTGGT TTCCTTTGTT
1551 GTTTGGTTGG AAGTAATCAA TAGTGAATC TAGGACAGGT TTGGGGGTAA
1601 AGTAGCGGGA GTGGTAGGAG AAGGGCTGGG TTATGGTATG GCGGGAGGAG
1651 TAGTTTACAT AGGGGTCATA GGTGAGGGCT GTGGCCTTTG TTACAAAGTT
1701 ATCATCTAGA ATAACAGCAC TGGAGCCCAT TCCCCTGTCA CCTGGGTGA
1751 TCGGGGAGCA GGSCCAG

```

【図 3】

PCV Imp1011-48285 分離株の配列 (SEQ ID N°2)

```
1 AATTCAACCT TAACCTTTCT TATTCTGTAG TATTCAAAGG GCACAGAGCG
51 GGGGTTTGAG CCCCTCTCGT GGGGAAGAAA GTCATTAAATA TTGAATCTCA
101 TCATGTCCAC CGCCAGGAG GCGGTTTGA CTGTGGTTCG CTTGACAGTA
151 TATCCGAAGG TCGGGGAGAG GCGGTTGTTG AAGATGCCAT TTTTCTTCT
201 CCAGCGGTAA CGGTGGCGGG GGTGGACGAG CCAGGGGCGG CGGCGGAGGA
251 TCTGGCCAAG ATGGCTGCGG GGGCGGTGTC TTCTTCTCG GTAACGCCTC
301 CTTGGATACG TCATATCTGA AAACGAAAGA AGTGGCGTGT AAGTATTACC
351 AGCGCACCTC GGCAGCGGCA GCACCTCGGC AGCACCTCAG CAGCAACATG
401 CCCAGCAAGA AGAATGGGAG AAGCGGACCC CAACCCCAT AAGGTGGGT
451 GTTCACTCTG AATAATCCTT CCGAAGACGA GCGCAAGAAA ATACGGGATC
501 TTCCAATATC CCTATTGTAT TATTTTATTG TTGGCGAGGA GGGTAATGAG
551 GAAGGACGAA CACCTCACCT CCAGGGGTTT GCTAATTTTG TGAAGAAGCA
601 GACTTTTAAAT AAAGTGAAGT GGTATTGGG TGCCCGCTGC CACATCGAGA
651 AAGCGAAAGG AACAGATCAG CAGAATAAAG AATACTGCAG TAAAGAAGGC
701 AACTTACTGA TGGAGTGTG AGCTCCTAGA TCTCAGGGAC AACGGAGTGA
751 CCTGTCTACT GCTGTAGTA CCTTGTGGA GAGCGGAGT CTGCTGACCG
801 TTGCAGAGCA GCACCTGTA ACGTTTGTC GAAATTTCCG CGGCTGSGCT
851 GAACTTTTGA AAGTGAGCGG GAAATGCAG AAGCGTGATT GGAAGACTAA
901 TGTACACGTC ATTGTGGGGC CACCTGGGTG TGGTAAAGC AAATGGGCTG
951 CTAATTTTGC AGACCCGGA ACCACATACT GGAAACCACC TAGAAACAAG
1001 TGGTGGGATG GTTACCATGG TGAAGAAGTG GTTGTTATTG ATGACTTTTA
1051 TGGCTGGCTG CCCTGGGATG ATCTACTGAG ACTGTGTGAT CGATATCCAT
1101 TGACTGTAGA GACTAAAGGT GGAAGTGTAC CTTTTTTGGC CGCAGTATT
1151 CTGATTACCA GCAATCAGAC CCCGTTGGAA TGGTACTCCT CAACTGCTGT
1201 CCCAGCTGTA GAAGCTCTTT ATCGGAGGAT TACTTCCTTG GTATTTTGGG
```

【図 5】

PCV Imp999 分離株の配列 (SEQ ID N°3)

```
1 AATTCAACCT TAACCTTTTT TATTCTGTAG TATTCAAAGG GTATAGAGAT
51 TTTGTGGTGC CCCCTCCCG GGGGAACAAA GTGTCATAA TTAATCTCA
101 TCATGTCCAC CGCCAGGAG GCGGTTCTGA CTGTGGTAGC CTTGACAGTA
151 TATCCGAAGG TCGGGGAGAG GCGGTTGTTG AAGATGCCAT TTTTCTTCT
201 CCACGGTAG CGGTGGCGGG GGTGGACGAG CCAGGGGCGG CGGCGGAGGA
251 TCTGGCCAAG ATGGCTGCGG GGGCGGTGTC TTCTTCTCG GTAACGCCTC
301 CTTGGATACG TCATAGCTGA AAACGAAAGA AGTGGCGTGT AAGTATTACC
351 AGCGCACCTC GGCAGCGGCA GCACCTCGGC AGCACCTCAG CAGCAACATG
401 CCCAGCAAGA AGAATGGGAG AAGCGGACCC CAACCATATA AAGGTGGGT
451 GTTCAAGCTG AATAATCCTT CCGAAGACGA GCGCAAGAAA ATACGGGAGC
501 TCCAATCTC CCTATTGTAT TATTTTATTG TTGGCGAGGA GGGTAATGAG
551 GAAGGACGAA CACCTCACCT CCAGGGGTTT GCTAATTTTG TGAAGAAGCA
601 AACTTTTAAT AAAGTGAAGT GGTATTGGG TGCCCGCTGC CACATCGAGA
651 AAGCCAAAGG AACTGATCAG CAGAATAAAG AATATTGCAG TAAAGAAGGC
701 AACTTACTTA TTGAATGTGG AGCTCCTCGA TCTCAAGGAC AACGGAGTGA
751 CCTGTCTACT GCTGTAGTA CCTTGTGGA GAGCGGAGT CTGCTGACCG
801 TTGCAGAGCA GCACCTGTA ACGTTTGTC GAAATTTCCG CGGCTGSGCT
851 GAACTTTTGA AAGTGAGCGG GAAATGCAG AAGCGTGATT GGAAGACCAA
901 TGTACACGTC ATTGTGGGGC CACCTGGGTG TGGTAAAGC AAATGGGCTG
951 CTAATTTTGC AGACCCGGA ACCACATACT GGAAACCACC TAGAAACAAG
1001 TGGTGGGATG GTTACCATGG TGAAGAAGTG GTTGTTATTG ATGACTTTTA
1051 TGGCTGGCTG CCGTGGGATG ATCTACTGAG ACTGTGTGAT CGATATCCAT
1101 TGACTGTAGA GACTAAAGGT GGAAGTGTAC CTTTTTTGGC CGCAGTATT
1151 CTGATTACCA GCAATCAGAC CCCGTTGGAA TGGTACTCCT CAACTGCTGT
1201 CCCAGCTGTA GAAGCTCTCT ATCGGAGGAT TACTTCCTTG GTATTTTGGG
```

【図 4】

```
1251 AGAATGCTAC AGAACAATCC ACGGAGGAAG GGGGCCAGTT CGTCACCCCT
1301 TCCCCCCCAT GCCCTGAATT TCCATATGAA ATAAATTACT GAGTCTTTTT
1351 TATCACTCG TAATGGTTTT TATTATTCAAT TAGGGTTAA GTGGGGGTC
1401 TTTAAGATTA AATTCTCTG ATTGTACATA CATGGTTACA CGGATATTGT
1451 ATTCTCTGTC GTATATACTG TTTTGAACG CAGTGCCGAG GCCTACGTGG
1501 TCTACATTTC CAGTAGTTTG TAGTCTCAGC CACAGCTGAT TTCTTTTGT
1551 GTTTGGTTGG AAGTAATCAA TAGTGAATC TAGGACAGGT TTGGGGGTAA
1601 AGTAGCGGGA GTGGTAGGAG AAGGGCTGGG TTATGGTATG CGGGGAGGAG
1651 TAGTTTACAT AGGGGTCATA GGTGAGGGCT GTGGCCTTTG TTACAAAGTT
1701 ATCATCTAGA ATAACAGCAC TGGAGCCCAT TCCCCTGTCA CCCTGGGTGA
1751 TCGGGGAGCA GGGCCAG
```

【図 6】

```
1251 AGAATGCTAC AGAACAATCC ACGGAGGAAG GGGGCCAGTT CGTCACCCCT
1301 TCCCCCCCAT GCCCTGAATT TCCATATGAA ATAAATTACT GAGTCTTTTT
1351 TATCACTCG TAATGGTTTT TATTATTCAAT TAGGGTTAA AGTGGGGGT
1401 CTTAAGATT AAATTCTCTG AATTGTACAT ACATGGTTAC ACGGATATTG
1451 TAGTCTGGT CGTATATACT GTTTTGAAC GCAGTGCCGA GGCCTACGTG
1501 GTCCAATTTC CTAGAGGTTT GTAGGCTCAG CCAAGCTGA TTCTTTTGT
1551 TATTTGGTTG GAAGTAATCA ATAGTGGAGT CAAGACAGG TTTGGGTGTG
1601 AAGTAACGGG AGTGGTAGGA GAAGGGTTGG GGGATTGTAT GCGGGAGGA
1651 GTAGTTTACA TATGGGTCAAT AGSTTAGGSC TGTGGCCTTT GTTACAAAGT
1701 TATCATCTAG AATAACAGCA GTGGAGCCCA CTCGCCATAC ACCCTGGGTG
1751 ATGGGGGAGC AGGGCCAG
```

【図 7】

PCV Imp1010 分離株の配列 (SEQ ID N°4)

```
1 AATTCAACCT TAACCTTTCT TATTCTGTAG TATTCAAAGG GTATAGAGAT
51 TTTGTTGGTC CCCCTCCCG GGGGAACAAA GTCTCAATT TTAATATCTCA
101 TCATGTCCAC CGCCAGGAG GCGGTGTGA CTGTGTGACG CTTGACAGTA
151 TATCCGAAGG TCGCGGAGAG GCGGGTGTG AAGATGCCAT TTTCTCTTCT
201 CCAACGGTAG CGGTGGCGGG GTTGACAGAG CCAGCGGGCG GCGCGGAGGA
251 TCTGGCCAAG ATGGCTGCGG GGCCTGTGTC TTCTTCTGCG GTAACGCTTC
301 CTTGGATACG TCATAGCTGA AAACGAAGA AGTCCGCTGT AAGTATTACC
351 AGCGCACTTC GGCAGCGGCA GCACCTCGCG AGCACCTCAG CAGCAACATG
401 CCCAGCAAGA AGAATGGAAG AAGCGGACCC CAACCAACATA AAAGTGGGT
451 GTTCACGCTG AATAATCCTT CCGAAGACGA GCGCAAGAAA ATACGGGAGC
501 TCCCAATCTC CCTATTTGAT TATTTTATTG TTGGCGAGGA GGTATATGAG
551 GAAGGACGAA CACCTCACCT CCAGGGGTTT GCTAATTTTG TGAAGAAGCA
601 AACTTTTAAT AAAGTGAAGT GGTATTTGGG TGCCCGCTGC CACATCGAGA
651 AAGCCAAAGG AACTGATCAG CAGAAATAAG AATATTGCAG TAAAGAAGSC
701 AACTTACTTA TTGAATGTGG AGCTCCTCGA TCTCAAGGAC AACGGAGTGA
751 CCTGTCTACT GCTGTGAGTA CTTGTGTGGA GAGCGGGAGT CTGGTGACCC
801 TTGCAGAGCA GCACCTCTTA ACGTTGTGCA GAAATTTCCG CGGGCTGGCT
851 GAACTTTIGA AAGTGAGCGG GAAATGCGAG AAGCGTGATT GGAAGACCAA
901 TGTACACGTC ATTGTGGGCG CACCTGGGTG TGTAAAGC AAATGGGCTG
951 CTAATTTTGC AGACCGGAA ACCACATACT GGAAACACCC TAGAACAAG
1001 TGCTGGGATG GTTACCATGG TGAAGAAGTG GTTGTATTG ATGACTTTTA
1051 TGCTGGGCTG CCGTGGGATG ATCTACTGAG ACTGTGTGAT CGATATCCAT
1101 TGACTGTAGA GACTAAAGGT GGAACGTGAC CTTTTTGGC CCGCAGTAAT
1151 CTGATTACCA GCAATCAGAC CCGTTGGA TGGTACTCCT CAATGCTGT
1201 CCCAGCTGTA GAAGCTCTCT ATCGAGGAT TACTTCCTTG GTATTTTGA
```

【図 9】

CLUSTAL W の配列の多重整列

```
PCVPK-15 AATTCAATTTAGCCTTTCTAATACGCTAGTATTGGAAGGTAGGGGTAGGGGTGGTG
IMP999-ECO AATTCAACCTTAACCTTTTATTCTCTGTAGTATTCAAAGGTATAGAGATTTTGTGGTC
IMP1010-ST AATTCAACCTTAACCTTTTATTCTCTGTAGTATTCAAAGGTATAGAGATTTTGTGGTC
IMP1011-48 AATTCAACCTTAACCTTTTATTCTCTGTAGTATTCAAAGGTATAGAGATTTTGTGGTC
IMP1011-48 AATTCAACCTTAACCTTTTATTCTCTGTAGTATTCAAAGGTATAGAGATTTTGTGGTC

PCVPK-15 CCGCTGAGGGGGGAGGAAGTGGCGATGTTGAATTTGAGGTAGTTAACAATCCAAGAT
IMP999-ECO CCGCTCCCGGGGGAACAAGTCTCAATATTAATCTCATATGTCACCGCCGAGAG
IMP1010-ST CCGCTCCCGGGGGAACAAGTCTCAATATTAATCTCATATGTCACCGCCGAGAG
IMP1011-48 CCGCTCCCGGGGGAACAAGTCTCAATATTAATCTCATATGTCACCGCCGAGAG
IMP1011-48 CCGCTCCCGGGGGAACAAGTCTCAATATTAATCTCATATGTCACCGCCGAGAG

PCVPK-15 GGC--TGCGAGTATCCTCCTTT-ATGGTGAAGTACAAATCTGTAGAAAGCGGGAATG
IMP999-ECO GGCCTCTGACTGTGTAGCTTGAACAGTATATCCGAAGGTGCGGAGAGCGGGTGTG
IMP1010-ST GGCCTGTGACTGTGTAGCTTGAACAGTATATCCGAAGGTGCGGAGAGCGGGTGTG
IMP1011-48 GGCCTGTGACTGTGTGTGCTTGAACAGTATATCCGAAGGTGCGGAGAGCGGGTGTG
IMP1011-48 GGCCTTTTGAAGTGTGTGCTTGAACAGTATATCCGAAGGTGCGGAGAGCGGGTGTG

PCVPK-15 AAGATACCCGTCTTTCGCGCATCTGTAAAGGTCTTGAAGCGGGGTGCGCAATAT
IMP999-ECO AAGATGCAATTTTCCCTTCTCCAAGGTGACGGTGGC-GGGGTGGA-CGAGCAAGGGC
IMP1010-ST AAGATGCAATTTTCCCTTCTCCAAGGTGACGGTGGC-GGGGTGGA-CGAGCAAGGGC
IMP1011-48 AAGATGCAATTTTCCCTTCTCCAAGGTGACGGTGGC-GGGGTGGA-CGAGCAAGGGC
IMP1011-48 AAGATGCAATTTTCCCTTCTCCAAGGTGACGGTGGC-GGGGTGGA-CGAGCAAGGGC

PCVPK-15 GGTCTTCTCCGAGGATTTTCCAGATGGCTGCGGGGGCGGTCTTCTTCTCGGTAA
IMP999-ECO GG----CGCGGAGATCTCGCAAGATGGCTGCGGGGGCGGTCTTCTTCTCGGTAA
IMP1010-ST GG----CGCGGAGATCTCGCAAGATGGCTGCGGGGGCGGTCTTCTTCTCGGTAA
IMP1011-48 GG----CGCGGAGATCTCGCAAGATGGCTGCGGGGGCGGTCTTCTTCTCGGTAA
IMP1011-48 GG----CGCGGAGATCTCGCAAGATGGCTGCGGGGGCGGTCTTCTTCTCGGTAA

PCVPK-15 CGCTCCTTGGCCACGTCATCCTATAAAAGTGAAGAAGTGGCTGCTGTAGTATTACCA
IMP999-ECO CGCTCCTTGGATACGTCATAGC-TGAAACGAAGAAGTGGCTGTA--AGTATTACCA
IMP1010-ST CGCTCCTTGGATACGTCATAGC-TGAAACGAAGAAGTGGCTGTA--AGTATTACCA
IMP1011-48 CGCTCCTTGGATACGTCATAGC-TGAAACGAAGAAGTGGCTGTA--AGTATTACCA
IMP1011-48 CGCTCCTTGGATACGTCATAGC-TGAAACGAAGAAGTGGCTGTA--AGTATTACCA

PCVPK-15 GCGCACTTCGCGAGCGGCGAGCACTCGGCGAGCG--TCAATG--AAATGCGAAGCAAGAA
IMP999-ECO GCGCACTTCGCGAGCGGCGAGCACTCGGCGAGCG--TCAATG--AAATGCGAAGCAAGAA
IMP1010-ST GCGCACTTCGCGAGCGGCGAGCACTCGGCGAGCG--TCAATG--AAATGCGAAGCAAGAA
IMP1011-48 GCGCACTTCGCGAGCGGCGAGCACTCGGCGAGCG--TCAATG--AAATGCGAAGCAAGAA
IMP1011-48 GCGCACTTCGCGAGCGGCGAGCACTCGGCGAGCG--TCAATG--AAATGCGAAGCAAGAA
```

【図 8】

```
1251 AGAATGCTAC AGAACAATCC ACGGAGGAAG GGGGCCAGTT CGTCACCCCTT
1301 TCCCCCCCCT GCCCTGAATT TCCATATGAA ATAAATTACT GAGTCTTTTTT
1351 TATCACTTCG TAATGGTTTT TATTATTCAT TTAGGGTTTA AGTGGGGGGT
1401 CTTTAAGATT AAATCTCTG AATTGTACAT ACATGGTTAC ACGGATATTG
1451 TAGTCTGGT CGTATTTACT GTTTTGAAC GCAGCGCGCA GGCCTACGTG
1501 GTCCACATT CCAGAGGTTT GTAGTCTCAG CCAAGCTGA TTCTTTTGT
1551 TATTGGTTG GAAGTAATCA ATAGTGSAGT CAAGAACAGG TTTGGGTGTG
1601 AAGTAACGG AGTGGTAGA GAAGGGTTG GGGATTGTAT GCGGGGAGGA
1651 GTAGTTTACA TATGGGTCA AGTTAGGCG TGTGGCCTTT GTTACAAAGT
1701 TATCATCTAG AATAACAGCA GTGGAGCCCA CTCCTCTATC ACCCTGGGTG
1751 ATGGGGGAGC AGGGCCAG
```

【図 10】

```
PCVPK-15 -----AAGCGGCCGCAACCCATAAGAGTGGGTGTACCCCTTAATAATCCTTC
IMP999-ECO GAATGAAGAAGCGGACCCCAACCAATAAAGGTGGGTGTCACGCTGAATAATCCTTC
IMP1010-ST GAATGAAGAAGCGGACCCCAACCAATAAAGGTGGGTGTCACGCTGAATAATCCTTC
IMP1011-48 GAATGAAGAAGCGGACCCCAACCCATAAAGGTGGGTGTCACGCTGAATAATCCTTC
IMP1011-48 GAATGAAGAAGCGGACCCCAACCCATAAAGGTGGGTGTCACGCTGAATAATCCTTC

PCVPK-15 CGAGGAGGAGAAAAACAATAACGGAGCTCCCAATCTCCCTTTTGAATTTTGTG
IMP999-ECO CGAAGACGAGCGCAAGAAATAACGGAGCTCCCAATCTCCCTATTGATTTTATG
IMP1010-ST CGAAGACGAGCGCAAGAAATAACGGAGCTCCCAATCTCCCTATTGATTTTATG
IMP1011-48 CGAAGACGAGCGCAAGAAATAACGGAGCTCCCAATCTCCCTATTGATTTTATG
IMP1011-48 CGAAGACGAGCGCAAGAAATAACGGAGCTCCCAATCTCCCTATTGATTTTATG

PCVPK-15 CGGAGAGGAGGTTTGAAGAGGGTAGAATCTCCACCTCCAGGGGTTTGCATTTTGC
IMP999-ECO TGGCGAGGAGGGTAATGAGGAAGGACGAACACTCCACCTCCAGGGGTTCCGTAATTTGT
IMP1010-ST TGGCGAGGAGGGTAATGAGGAAGGACGAACACTCCACCTCCAGGGGTTCCGTAATTTGT
IMP1011-48 TGGCGAGGAGGGTAATGAGGAAGGACGAACACTCCACCTCCAGGGGTTCCGTAATTTGT
IMP1011-48 TGGCGAGGAGGGTAATGAGGAAGGACGAACACTCCACCTCCAGGGGTTCCGTAATTTGT

PCVPK-15 TAAGAAGCAGACTTTTAACAAGGTGAAGTGTATTTTGGTGGCCGCTGCCATCGAGAA
IMP999-ECO GAAGAAGCAAACTTTTAATAAGTGAAGTGTATTTGGTGGCCGCTGCCATCGAGAA
IMP1010-ST GAAGAAGCAAACTTTTAATAAGTGAAGTGTATTTGGTGGCCGCTGCCATCGAGAA
IMP1011-48 GAAGAAGCAGACTTTTAATAAGTGAAGTGTATTTGGTGGCCGCTGCCATCGAGAA
IMP1011-48 GAAGAAGCAGACTTTTAATAAGTGAAGTGTATTTGGTGGCCGCTGCCATCGAGAA

PCVPK-15 AGCGAAAGAACCGGACGAGATAAAGAAATCTGCAGTAAAGAGGCGCAACTACTTAT
IMP999-ECO AGCGAAAGAACGATCAGCAGAAATAAGAAATCTGCAGTAAAGAGGCAACTACTTAT
IMP1010-ST AGCGAAAGAACGATCAGCAGAAATAAGAAATCTGCAGTAAAGAGGCAACTACTTAT
IMP1011-48 AGCGAAAGAACGATCAGCAGAAATAAGAAATCTGCAGTAAAGAGGCAACTACTTAT
IMP1011-48 AGCGAAAGAACGATCAGCAGAAATAAGAAATCTGCAGTAAAGAGGCAACTACTTAT

PCVPK-15 CGAGTGTGAGACTCCGCGGAACCGGGGAAGCGCAGCAGCTGTCTACTGCTGTAGTAC
IMP999-ECO TGAATGTGAGACTCCTCGATCTCAAGGACCAAGAGTGAAGTGTCTACTGCTGTAGTAC
IMP1010-ST TGAATGTGAGACTCCTCGATCTCAAGGACCAAGAGTGAAGTGTCTACTGCTGTAGTAC
IMP1011-48 GGAGTGTGAGACTCCTAGATCTCAGGACCAAGAGTGAAGTGTCTACTGCTGTAGTAC
IMP1011-48 GGAGTGTGAGACTCCTAGATCTCAGGACCAAGAGTGAAGTGTCTACTGCTGTAGTAC

PCVPK-15 CTTTGTGGAGAGCGGGCTCTTGTGACTGTAGCGGAGAGTCCCTGTAACTGTATGAG
IMP999-ECO CTTTGTGGAGAGCGGGAGTCTGTGACCGTTGCGAGAGCAGCACTGTAACTGTATGAG
IMP1010-ST CTTTGTGGAGAGCGGGAGTCTGTGACCGTTGCGAGAGCAGCACTGTAACTGTATGAG
IMP1011-48 CTTTGTGGAGAGCGGGAGTCTGTGACCGTTGCGAGAGCAGCACTGTAACTGTATGAG
IMP1011-48 CTTTGTGGAGAGCGGGAGTCTGTGACCGTTGCGAGAGCAGCACTGTAACTGTATGAG

PCVPK-15 AAATTTCCCGGGCTGTGCTGAATTTTGAAGTGAAGCGGGAAGATGCAGAGCTGATTG
IMP999-ECO AAATTTCCCGGGCTGTGCTGAATTTTGAAGTGAAGCGGGAAGATGCAGAGCTGATTG
IMP1010-ST AAATTTCCCGGGCTGTGCTGAATTTTGAAGTGAAGCGGGAAGATGCAGAGCTGATTG
IMP1011-48 AAATTTCCCGGGCTGTGCTGAATTTTGAAGTGAAGCGGGAAGATGCAGAGCTGATTG
IMP1011-48 AAATTTCCCGGGCTGTGCTGAATTTTGAAGTGAAGCGGGAAGATGCAGAGCTGATTG
```

【図 1 1】

PCVPK-15 GAAGACAGCTGTACACGTATAGTGGGCGCGCCGGTGTGGGAAGACCAATGGGCGCCG
IMP999-ECO GAAGACCAATGTACACGTATAGTGGGCGCACCTGGGTTGGTAAAGCAATGGGCTGC
IMP1010-ST GAAGACCAATGTACACGTATAGTGGGCGCACCTGGGTTGGTAAAGCAATGGGCTGC
IMP1011-48 GAAGACCAATGTACACGTATAGTGGGCGCACCTGGGTTGGTAAAGCAATGGGCTGC
IMP1011-48 *****
PCVPK-15 TAAATTTGCTGAGCTAGGAGACCACTAGGAAGCTAGTAAATAGTGGGATGG
IMP999-ECO TAAATTTGCGAGACCGGAACCACTACTGGAACCACTAGAAACAAGTGGTGGGATGG
IMP1010-ST TAAATTTGCGAGACCGGAACCACTACTGGAACCACTAGAAACAAGTGGTGGGATGG
IMP1011-48 TAAATTTGCGAGACCGGAACCACTACTGGAACCACTAGAAACAAGTGGTGGGATGG
IMP1011-48 TAAATTTGCGAGACCGGAACCACTACTGGAACCACTAGAAACAAGTGGTGGGATGG
IMP1011-48 *****
PCVPK-15 ATATCATGGAGAAGAGTGTGGTTGGTATGATTTTATGCTGGTACCTGGGATGA
IMP999-ECO TTACCATGGTGAAGAAGTGGTGTATTGATGACTTTTATGGCTGGCTGGCTGGGATGA
IMP1010-ST TTACCATGGTGAAGAAGTGGTGTATTGATGACTTTTATGGCTGGCTGGCTGGGATGA
IMP1011-48 TTACCATGGTGAAGAAGTGGTGTATTGATGACTTTTATGGCTGGCTGGCTGGGATGA
IMP1011-48 TTACCATGGTGAAGAAGTGGTGTATTGATGACTTTTATGGCTGGCTGGCTGGGATGA
IMP1011-48 *****
PCVPK-15 TCTACTGAGACTGTGTGACCGGTATCCATGACTGTAGAGACTAAAGGGGACTGTGTC
IMP999-ECO TCTACTGAGACTGTGTGATCGATATCCATGACTGTAGAGACTAAAGGGGACTGTGTC
IMP1010-ST TCTACTGAGACTGTGTGATCGATATCCATGACTGTAGAGACTAAAGGGGACTGTGTC
IMP1011-48 TCTACTGAGACTGTGTGATCGATATCCATGACTGTAGAGACTAAAGGGGACTGTGTC
IMP1011-48 *****
PCVPK-15 TTTTGTGGCCGAGTATTTGATTACCAAGCAATCAGGCCCGCCAGGAATGGTACTCCTC
IMP999-ECO TTTTGTGGCCGAGTATTTGATTACCAAGCAATCAGGCCCGCCAGGAATGGTACTCCTC
IMP1010-ST TTTTGTGGCCGAGTATTTGATTACCAAGCAATCAGGCCCGCCAGGAATGGTACTCCTC
IMP1011-48 TTTTGTGGCCGAGTATTTGATTACCAAGCAATCAGGCCCGCCAGGAATGGTACTCCTC
IMP1011-48 *****
PCVPK-15 AACTGCTGTCCAGCTGTAGAGCTCTCTATCGGAGGATTAATCTTGTCAATTTGGAA
IMP999-ECO AACTGCTGTCCAGCTGTAGAGCTCTCTATCGGAGGATTAATCTTGTCAATTTGGAA
IMP1010-ST AACTGCTGTCCAGCTGTAGAGCTCTCTATCGGAGGATTAATCTTGTCAATTTGGAA
IMP1011-48 AACTGCTGTCCAGCTGTAGAGCTCTCTATCGGAGGATTAATCTTGTCAATTTGGAA
IMP1011-48 *****
PCVPK-15 GACTGCTGAGAACCAATCCACGAGGTACCCGAAGCCGATTTGAAGAGTGGAGCCACC
IMP999-ECO GACTGCTGAGAACCAATCCACGAGGAGAA---GGGGCCAGTTCGTCACCCCTTCCCGCCC
IMP1010-ST GACTGCTGAGAACCAATCCACGAGGAGAA---GGGGCCAGTTCGTCACCCCTTCCCGCCC
IMP1011-48 GACTGCTGAGAACCAATCCACGAGGAGAA---GGGGCCAGTTCGTCACCCCTTCCCGCCC
IMP1011-48 *****
PCVPK-15 CTGTGCCCTTTTCCATATAAAATAAATTACTGAGTCTTTTGTATACATGTAATG
IMP999-ECO ATGCCCTGAATTTCCATATGAATAAATTACTGAGTCTTTT---TATCACTTCGTAATG
IMP1010-ST ATGCCCTGAATTTCCATATGAATAAATTACTGAGTCTTTT---TATCACTTCGTAATG
IMP1011-48 ATGCCCTGAATTTCCATATGAATAAATTACTGAGTCTTTT---TATCACTTCGTAATG
IMP1011-48 *****

【図 1 2】

PCVPK-15 GTTTTATT-TTTATTA---TTTA---GAGGGCTTTTAGGATMAATCTCTGAATTG
IMP999-ECO GTTTTATTATTCAATTAGGGTTTAAAGTGGGGCTTTTAAAGATTAAATCTCTGAATTG
IMP1010-ST GTTTTATTATTCAATTAGGGTTTAAAGTGGGGCTTTTAAAGATTAAATCTCTGAATTG
IMP1011-48 GTTTTATTATTCAATTAGGGTTTAAAGTGGGGCTTTTAAAGATTAAATCTCTGAATTG
IMP1011-48 *****
PCVPK-15 TACATAAATAGTCAGCTTACCACATAAATTTGGGCTGTGGCTGC-ATTTTGAAGCGCAT
IMP999-ECO TACATACATGGTTACACGGATATTGTAGTCTGG-TCGTATATACCTGTTTTCGAAGCGAG
IMP1010-ST TACATACATGGTTACACGGATATTGTAGTCTGG-TCGTATATACCTGTTTTCGAAGCGAG
IMP1011-48 TACATACATGGTTACACGGATATTGTATTCCTGG-TCGTATATACCTGTTTTCGAAGCGAG
IMP1011-48 TACATACATGGTTACACGGATATTGTATTCCTGG-TCGTATATACCTGTTTTCGAAGCGAG
IMP1011-48 *****
PCVPK-15 AGCCGAGGCTGTGTGCTGACATTTGTTGGGTAATTTAAATGGAGCCACAGCTGTTTC
IMP999-ECO TCCCGAGGCTACGTGTGCTGACATTTCTAGAGTTTGTAGGCTCAGCAAGCTGATTC
IMP1010-ST CCGCGAGGCTACGTGTGCTGACATTTCCAGAGTTTGTAGGCTCAGCAAGCTGATTC
IMP1011-48 TCCCGAGGCTACGTGTGCTGACATTTCCAGAGTTTGTAGGCTCAGCAAGCTGATTC
IMP1011-48 TCCCGAGGCTACGTGTGCTGACATTTCCAGAGTTTGTAGGCTCAGCAAGCTGATTC
IMP1011-48 *****
PCVPK-15 TTTTATTATTGGGTGAACCAATCAATTTTGGTCCAGCTCAGGTTTGGGGTGAAGT
IMP999-ECO TTTTGTATTGGTTGAAGTAATCAATAGTGGAGTCAAGAACAGGTTTGGGTGTGAAGT
IMP1010-ST TTTTGTATTGGTTGAAGTAATCAATAGTGGAGTCAAGAACAGGTTTGGGTGTGAAGT
IMP1011-48 TTTTGTATTGGTTGAAGTAATCAATAGTGGAGTCAAGAACAGGTTTGGGGTGAAGT
IMP1011-48 TTTTGTATTGGTTGAAGTAATCAATAGTGGAGTCAAGAACAGGTTTGGGGTGAAGT
IMP1011-48 *****
PCVPK-15 ACCTGGAGTGTAGTAAAGGCTGCTTATGTTGGTGGGAGGAGTAGTAAATATAGG
IMP999-ECO AACCGGAGTGTAGGAGAGGGTTGGGGATTTGATGGCGGAGGAGTAGTTACATATG
IMP1010-ST AACCGGAGTGTAGGAGAGGGTTGGGGATTTGATGGCGGAGGAGTAGTTACATATG
IMP1011-48 AGCGGAGTGTAGGAGAGGGCTGGGTTATGTTGGCGGAGGAGTAGTTACATATG
IMP1011-48 AGCGGAGTGTAGGAGAGGGCTGGGTTATGTTGGCGGAGGAGTAGTTACATATG
IMP1011-48 *****
PCVPK-15 GGTCAATAGCCCAAGTGTGTGGGAGGGGTTACAAAGTTGGCAATCAAGATTAACACAGTGG
IMP999-ECO GGTCAATAGTGTAGGGCTGTGGCTTTGTACAAAGTTATCATCTAGAAATAACAGCACTGG
IMP1010-ST GGTCAATAGTGTAGGGCTGTGGCTTTGTACAAAGTTATCATCTAGAAATAACAGCACTGG
IMP1011-48 GGTCAATAGTGTAGGGCTGTGGCTTTGTACAAAGTTATCATCTAGAAATAACAGCACTGG
IMP1011-48 GGTCAATAGTGTAGGGCTGTGGCTTTGTACAAAGTTATCATCTAGAAATAACAGCACTGG
IMP1011-48 *****
PCVPK-15 ACCCAACACCTCTTTGATTAGAGTGATGGGCTCTCGGGGTAA
IMP999-ECO AGCCCACTCCCTATCACCTGGGTGATGGGGAGCAGGGCCAG
IMP1010-ST AGCCCACTCCCTATCACCTGGGTGATGGGGAGCAGGGCCAG
IMP1011-48 AGCCCACTCCCTATCACCTGGGTGATGGGGAGCAGGGCCAG
IMP1011-48 *****

【図 1 3】

1 GAATTCAACC TTAACCTTTT TTATCTGTGA gTATTCAAG GGTATAAgA
51 TTTTGTGGT CCCCCCTCCC GGGGAACAA AGTCgTCAAT ATTAAATCTC
101 ATCATGTCCA CCGCCACAGA GGGCGTCTG ACTGTGTAg CTTGACAgT
151 ATATCCGAAG GTGCGGAGAG rGCGGGTGT GAAATGCCA TTTTTCCTTC
201 TCCAACGGTA GCGGTGCGG GGTGGAGmA nCCAgGGCG GCGCGGAGG
251 ATCTGGCCAA GATGCTGCG GGGCGGTGT CTTCTCTCG GGTAAAGCCT
301 CCTTGGATAC GTCAATAgCTG AAAACGAAG AAGTGCCTG TAaGTATTAC
351 CAGCGCACTT CCGCAGCGCG AGCACCTCG CAGCaCTCA GCAGCAACAT
401 GCCCAGCAAG AAGAATGGAA GAAGCGGACC CCAACACAT AAAAGTGGG
451 TGTTACAGCT GAATATCTCT TCCGAAGAC AGCCCAAGAA AATACGGAG
501 CTCcCAATCT CCCATTTTGA TTAATTTTATT GTTGGCGAG AGGgTWTGA
551 gGAAGAGcA ACACCTCACC TCCAGGGTTC CGCTAATTTT GTGAAGAAGC
601 aaACTTtTAA TAAAGTGAAG TGGTATTGG GTGCCCGTG CCACATCGAG
651 AARGCCaAG GAACGTATCA GCAGAAATAA GAATATTGCA GTAAAGaAGG
701 CAACTTACTT ATTGAATGTG GAGCTCCTCG ATCTCAAGGA CACGAGAGT
751 ACCTGTCTAC TGCTGTGAGT ACCTTGTGG AGAGCGGAG TCTGTGAGC
801 GTTGCAAGAG AGCACCTCTG AACGTTTGTG AGAAATTTCC GCGGGCTGCG
851 TGAACCTTTG AAAGTGAGCG GGAATAATGA GAAGCGTGAT TGGAGACCA
901 ATGTACAGCT CATTGTGGG CCACTGGGT GTGTAAAG CAAATGGCT
951 GCTAATTTTG CAGACCCGGA AACCACATAC TGGAAACCA CTAAGAACAA
1001 GTGGTGGGAT GGTATCCATG GTGAAGAAGT GGTGTATTAT GATGACTTTT
1051 ATGGCTGGCT GCCGTGGAT GATCTACTGA GACTGTGTGA TCGATATCCA
1101 TTGACTGTAG AGACTAAAGG TGAACCTGTA CNBNNNNNGG CCCGAGTAT
1151 TCTGATTACC AGCAATCAGA CCGGTtGGA ATGGTACTCC TCAACTGCTG
1201 TCCAGCTgt AGAAGCTCTC TATCGAGAGA EtACTTCTTT GGTATTTtGG
1251 AaGAATGCTA CAGAAACAT CACGGAGGAA GGGGCCAGT ThGTACACCT

【図 1 4】

1301 TTCCCCCA TGCCtGNAAT TTCCATaGA AATAAATTAC TGAGTCTTTT
1351 TTATCACTTC GTAATGGITT TTATTATtCA TTTAGGGITT AAGTGGGGG
1401 TCITTTAAGAT TAAATCTCT GAATTGTACA TACATGGTTA CACGATATT
1451 GTAGTCTCG TCGTATATAC TGTTTTCGAA CGCAGTCCG AGGCTACGT
1501 GGTCCACATT TCTAGAGTt tGTAGCCTCA gCCAAAGCtG ATTCTTTTG
1551 TTATTGTGTT GGAAGTAATC AATAGTGGAG TCAAGAACAG GTTTGGGTGT
1601 GAAGTAACG GAGTGGTAG AGAAGGGTTG GGGGATTGTA TGGCGGAGG
1651 AGTAGTTTAC ATATGGTCA TAGGTAGG CTGTGGCCTT TGTTACAAAG
1701 TTATCATeTA GAATAACAG AGTGGAGCCC ACTCCCTAT CACCTTGGGT
1751 GATGGGGGAG CAGGSCCA

【 図 1 6 】

8con.s = クローン pGEM-7/8 の配列
pcveco = PCV PK/15 株の配列

スコア Init1: 2517 Initn: 3774 Opt: 4010
1785 bp 重複で 75.8% 同一性

1769 1759 1749 1739 1729 1719
8con.s GAATTCCTGGCCCTGCTCCCCATCAACACCGGGTGATAGGGAGGTGGCGCTCCACTCGCTGT
pcveco GAATTTTACCCCAGAGACCCCATCACTCTAATCAAGAGGTGTTGGGTCCACTGTGTT
100 20 30 40 50 60

1709 1699 1689 1679 1669 1659
8con.s ATTCTAGATGATACTTTGTAAACAAGGCCACAGCCCTAACCTATGACCCATATGTAAG
pcveco ATCTTGGATGCCAATTGTGAACCCCTCCACCAACTTGGCCTATGACCCCTATATTAA
70 80 90 100 110 120

1649 1639 1629 1619 1609 1599
8con.s TACTCTCTCCCGCCATACAATCCCCAACCCCTCTCTCTACCCTCCCGTTACTTCAACCC
pcveco TACTCTCTCCCGCCACACCATGAAGGCAGCGCTTACTCTACACTCCAGGTACTTCAACCC
130 140 150 160 170 180

1589 1579 1569 1559 1549 1539
8con.s AAACCTGTTCTTGACTCCACTATTGATTACTTCCAACAAATAACAAGGAATCAGCTT
pcveco AAACCTGAGCTGGACCAACCAATTGATTGTTGCCACCAATAATAAAGAAACAGCTG
190 200 210 220 230 240

1529 1519 1509 1499 1489 1479
8con.s TGGCTGAGGCTACAAACCTCTAGAATGTGGACACAGTAGGCCTCGGCACCTCGGTTCGAA
pcveco TGGCTCCATTAAATACCCACACCAATGTGCGAGCACACAGGCTCGGCTATGCGCTCGA
250 260 270 280 290 300

1469 1459 1449 1439 1429 1419
8con.s AACAGTATATAC-GACCAAGACTACAAATACCGTGTAAACCTGATATGTACAATTACAGAG
pcveco AA-TGCAGCCACAGCCCAAAATATGTGGTAAGGCTGACTATTATGTACAATTACAGAG
310 320 330 340 350

1409 1399 1389 1379 1369 1359
8con.s ATTTAATCTTAAAGACCCCCACCTTAAACCTCAATGAATAATAAAACCATTCAGAG
pcveco ATTTATCTTAAAGACCCCTC---TAAA---TAAAT-AAAAATAAAACCATTCAGAG
360 370 380 390 400 410

1349 1339 1329 1319 1309 129
8con.s GAT---AAAAAGACTCAGTAATTTATTTTCATATGGAAATTCAGGGCATGGGGGGGAA
pcveco GATAACAACAAAGACTCAGTAATTTTATTTATGGAAAGGGCAACGGGTGGGTCA
420 430 440 450 460 470

【 図 1 8 】

125
 126
 127
 128
 129
 130
 131
 132
 133
 134
 135
 136
 137
 138
 139
 140
 141
 142
 143
 144
 145
 146
 147
 148
 149
 150
 151
 152
 153
 154
 155
 156
 157
 158
 159
 160
 161
 162
 163
 164
 165
 166
 167
 168
 169
 170
 171
 172
 173
 174
 175
 176
 177
 178
 179
 180
 181
 182
 183
 184
 185
 186
 187
 188
 189
 190
 191
 192
 193
 194
 195
 196
 197
 198
 199
 200
 201
 202
 203
 204
 205
 206
 207
 208
 209
 210
 211
 212
 213
 214
 215
 216
 217
 218
 219
 220
 221
 222
 223
 224
 225
 226
 227
 228
 229
 230
 231
 232
 233
 234
 235
 236
 237
 238
 239
 240
 241
 242
 243
 244
 245
 246
 247
 248
 249
 250
 251
 252
 253
 254
 255
 256
 257
 258
 259
 260
 261
 262
 263
 264
 265
 266
 267
 268
 269
 270
 271
 272
 273
 274
 275
 276
 277
 278
 279
 280
 281
 282
 283
 284
 285
 286
 287
 288
 289
 290
 291
 292
 293
 294
 295
 296
 297
 298
 299
 300
 301
 302
 303
 304
 305
 306
 307
 308
 309
 310
 311
 312
 313
 314
 315
 316
 317
 318
 319
 320
 321
 322
 323
 324
 325
 326
 327
 328
 329
 330
 331
 332
 333
 334
 335
 336
 337
 338
 339
 340
 341
 342
 343
 344
 345
 346
 347
 348
 349
 350
 351
 352
 353
 354
 355
 356
 357
 358
 359
 360
 361
 362
 363
 364
 365
 366
 367
 368
 369
 370
 371
 372
 373
 374
 375
 376
 377
 378
 379
 380
 381
 382
 383
 384
 385
 386
 387
 388
 389
 390
 391
 392
 393
 394
 395
 396
 397
 398
 399
 400
 401
 402
 403
 404
 405
 406
 407
 408
 409
 410
 411
 412
 413
 414
 415
 416
 417
 418
 419
 420
 421
 422
 423
 424
 425
 426
 427
 428
 429
 430
 431
 432
 433
 434
 435
 436
 437
 438
 439
 440
 441
 442
 443
 444
 445
 446
 447
 448
 449
 450
 451
 452
 453
 454
 455
 456
 457
 458
 459
 460
 461
 462
 463
 464
 465
 466
 467
 468
 469
 470
 471
 472
 473
 474
 475
 476
 477
 478
 479
 480
 481
 482
 483
 484
 485
 486
 487
 488
 489
 490
 491
 492
 493
 494
 495
 496
 497
 498
 499
 500
 501
 502
 503
 504
 505
 506
 507
 508
 509
 510
 511
 512
 513
 514
 515
 516
 517
 518
 519
 520
 521
 522
 523
 524
 525
 526
 527
 528
 529
 530
 531
 532
 533
 534
 535
 536
 537
 538
 539
 540
 541
 542
 543
 544
 545
 546
 547
 548
 549
 550
 551
 552
 553
 554
 555
 556
 557
 558
 559
 560
 561
 562
 563
 564
 565
 566
 567
 568
 569
 570
 571
 572
 573
 574
 575
 576
 577
 578
 579
 580
 581
 582
 583
 584
 585
 586
 587
 588
 589
 590
 591
 592
 593
 594
 595
 596
 597
 598
 599
 600
 601
 602
 603
 604
 605
 606
 607
 608
 609
 610
 611
 612
 613
 614
 615
 616
 617
 618
 619
 620
 621
 622
 623
 624
 625
 626
 627
 628
 629
 630
 631
 632
 633
 634
 635
 636

1289 1279 1269 1259 1249
Scon.s GGTGACNAACTGGCCCC---TTCCCTCGTGATTGTTCTGTAGCATTCTTCAAAAATAC
pcveco TGCTTCAAATCGGCCTTCGGTAGCTACTCGGTGGATTGTTCTCCAGCATGTTCCAANAATG

480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590
1239 1229 1219 1209 1199 1189 1179 1169 1159 1149 1139 1129
Scon.s CAAAGGAATAATCTCCGATAGAGAGCTTCTACAGTGGGACAGCAGTTGAGGAGTACCA
pcveco CAAAGTAGTAATCTCCGATAGAGAGCTTCTACAGTGGGACAGCAGTTGAGGAGTACCA

540 550 560 570 580 590
1179 1169 1159 1149 1139 1129
Scon.s TTCCAACGGGCTGATTGCTGGTAATCAGAATACTCGGGGCCNNNNNGTACAGTTCC
pcveco TTTCTGGGGGCTGATTGCTGGTAATCAAATACTCGGGGCCAAAAAGGAACAGTACC

600 610 620 630 640 650
1119 1109 1099 1089 1079 1069
Scon.s ACCTTTAGTCTCTACAGTCAATGGATATCGATCACACAGTCTCAGTAGATATCTCCACGG
pcveco CCCTTTAGTCTCTACAGTCAATGGATACGGTCAACACAGTCTCAGTAGATATCTCCACGG

660 670 680 690 700 710
1059 1049 1039 1029 1019 1009
Scon.s CAGCCAGGCATAAAAGTCATCAATAACAACACTCTTCTCACATGGTAACCATCCACCA
pcveco TAACCAGGCATAAAATCATCCAACAACAACACTCTTCTCCATGATATCCATCCACCA

720 730 740 750 760 770
999 989 979 969 959 949
Scon.s CTTGTTTCTAGTGTTTCCAGTAGTGTTTTCGGGCTCTGCAAAATAGACAGCCATT
pcveco CTTATTCTCTAGGCTTCCAGTAGTGTTTCCAGTGTGAGCAAAATACGGGCCACTG

780 790 800 810 820 830
939 929 919 909 899 889
Scon.s GCTTTTACCACACCCAGGTGGCCCCACAATGACGTGTACATTGCTCTCCATCAGCTT
pcveco GCTCTTCCACACCCGGCGGGCCACTATGACGTGTACAGCTGTCTCCATCAGCTG

840 850 860 870 880 890
879 869 859 849 839 829
Scon.s CTGCATTTCCCGCTCACTTTCAAAGTTCAGCCAGCCCGGGAAATTTCTGACAAAGT
pcveco CTGCATTTCCCGCTCACTTTCAAAGTTCAGCCAGCCCGGGAAATTTCTCACAATG

900 910 920 930 940 950
819 809 799 789 779 769
Scon.s TACAGGGTGCTGCTCTGCAACGGTCCACAGACTCCCGCTCTCTCAACAGGTACTCAGAG
pcveco TACAGGSAAGTCTCGGCTACGTCACCAAAGCCCCTCTCTCAAAAGGGTACTCAGAG

960 970 980 990 1000 1010

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 39/295 (2006.01)		A 6 1 K 39/295	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)		A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 35/76 (2006.01)		A 6 1 K 35/76	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)		A 6 1 P 31/12	1 7 1
A 6 1 P 37/04 (2006.01)		A 6 1 P 37/04	
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	N

(31)優先権主張番号 98/03707

(32)優先日 平成10年3月20日(1998.3.20)

(33)優先権主張国 フランス(FR)

微生物の受託番号 ECACC V97100219

微生物の受託番号 ECACC V97100218

微生物の受託番号 ECACC V97100217

微生物の受託番号 ECACC V98011608

微生物の受託番号 ECACC V98011609

(74)代理人 100092277

弁理士 越場 隆

(72)発明者 アラン, ゴードン

イギリス国 ビーティー5 7エーキュー ベルファスト キャビンヒル ガーデン 5 1

(72)発明者 ミーハン, ブライアン

イギリス国 ビーティー1 3エルエックス ベルファスト ラガンバンク ロード 2 セント
ジョンズ クローズ 2 6

(72)発明者 クラーク, エドワード

カナダ国 エス7ジェイ 2エル4 サスカチュワン サスカトーン マーフィークレセント
2 2

(72)発明者 エリス, ジョン

カナダ国 エス7エヌ 0エム3 サスカチュワン サスカトーン サーティーンズ ストリート
イースト 8 1 2

(72)発明者 ヘインズ, デボラ

カナダ国 エスエヌ7 0エム3 サスカチュワン サスカトーン サーティーンズ ストリート
イースト 8 1 2

(72)発明者 ハサード, ロリ

カナダ国 エス7ケイ 6ビー5 サスカチュワン サスカトーン ペロー レーン 4 4 3

(72)発明者 ハーディング, ジョン

カナダ国 エス0ケイ 2エイ0 サスカチュワン フンボルト ジュビリー ドライブ 4 3

(72)発明者 シャレイル, カトリーヌ エリザベス

フランス国 6 9 7 2 0 サン-ローラン ドゥ ミュール リュ フェルディナン ゴーチエ
4 2

(72)発明者 シャピュイ, ギーユ エミール

フランス国 6 9 0 0 6 リヨン リュ ローラン ヴィベール 3

(72)発明者 マクネイリー, フランシス

イギリス国 ビーティー5 4エヌエイチ ニュートウナーズ リスリーン プレース 4

審査官 濱田 光浩

- (56)参考文献 Nayar GP, Hamel A, Lin L. , Detection and characterization of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting disease, Can.Vet.J., (Jun.1997) 38, p.385-386 , 1997年 6月 , Vol.38, No.6 , p.385-386
Tischer I, Mielsch W, Wolff D, Vagt M, Griem W. , Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. Tischer I, Mielsch W, Wolff D, Vagt M , Arch.Virol., (1986) 91 , p.271-276 , 1986年 , Vol.91, No.3-4 , p.271-276

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 15/00

C07K 14/00

C12N 7/00

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDREAMIII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq

UniProt/GenSeq

SwissProt/GenSeq

PubMed

专利名称(译)	猪圆环病毒，疫苗和诊断试剂		
公开(公告)号	JP5362750B2	公开(公告)日	2013-12-11
申请号	JP2011004965	申请日	2011-01-13
[标]申请(专利权)人(译)	梅里亚有限公司 贝尔法斯特女王大学 萨斯喀彻温大学		
申请(专利权)人(译)	梅里亚ES ES啊 贝尔法斯特女王大学 萨斯喀彻温大学		
当前申请(专利权)人(译)	梅里亚ES ES啊 贝尔法斯特女王大学 萨斯喀彻温大学		
[标]发明人	アランゴードン ミーハンプライアン クラークエドワード エリスジョン ヘインズデボラ ハサードロリ ハーディングジョン シャレイルカトリーヌエリザベス シャピユイギーユエミール マクネイリーフランシス		
发明人	アラン, ゴードン ミーハン, プライアン クラーク, エドワード エリス, ジョン ヘインズ, デボラ ハサード, ロリ ハーディング, ジョン シャレイル, カトリーヌ エリザベス シャピユイ, ギーユ エミール マクネイリー, フランシス		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/01 C12P21/02 C12N7/00 A61K39/12 A61K39/295 A61K39/00 A61K35/76 A61P31/12 A61P37/04 G01N33/569 G01N33/53 A23C19/032 A61K38/00 A61K48/00 C07K16/08 C12N15/34 C12P21/08		
CPC分类号	A23C19/0321 A23C19/0323 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/12 A61K48/00 A61K2039/51 A61K2039/5252 A61K2039/552 A61K2039/55566 C07K14/005 C12N2710/10343 C12N2710/16743 C12N2710/24043 C12N2750/10021 C12N2750/10022 C12N2750/10034 C12N2750/10043 C12N2750/10064		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/01 C12P21/02.C C12N7/00 A61K39/12 A61K39/295 A61K39/00.H A61K35/76 A61P31/12.171 A61P37/04 G01N33/569.L G01N33/53.N A61K35/74.B A61K35/761 A61K48/00 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/34 C12N15/63.Z C12N7/01 C12Q1/6876.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA14 4B024/BA32 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/DA06 4B024/EA04 4B064/AG32 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC06 4B064/CC24 4B064/CE02 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA95X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BB25 4B065/BC03 4B065/BC07 4B065/BD45 4B065/CA45 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZB09 4C084/ZB33 4C084/ZC61 4C085/AA03 4C085/AA04 4C085/BA51 4C085/BB11 4C085/DD01 4C085		

/DD21 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB65 4C087/BC30
4C087/BC83 4C087/CA04 4C087/MA66 4C087/NA14 4C087/ZB09 4C087/ZB33 4C087/ZC61 4H045
/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA01 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50
4H045/FA74 4H045/GA01

审查员(译)	三罗·哈马达
优先权	1997012382 1997-10-03 FR 1998000873 1998-01-22 FR 1998003707 1998-03-20 FR
其他公开文献	JP2011135875A
外部链接	Espacenet

摘要(译)

要解决的问题：提供引起猪多系统衰竭综合征的新型猪圆环病毒（PCV）菌株，试剂和检测它们的方法。解决方案：从断奶后多系统衰竭综合征（PMWS）农场获得的肺和神经节样品中分离的新型PCV菌株，纯化的菌株制剂，减毒或灭活疫苗，重组活疫苗，质粒疫苗和亚单位疫苗，以及提供诊断试剂和诊断方法。还提供了用于产生体外表达载体的亚基的DNA片段，或作为在病毒上整合的质粒类型的体外表达载体中的序列的DNA片段。

	1	2	3	4	5
1	1.0000	0.9977	0.9615	0.9621	0.7600
2		1.0000	0.9621	0.9632	0.7594
3			1.0000	0.9949	0.7560
4				1.0000	0.7566
5					1.0000