

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02005/054451

発行日 平成19年6月28日(2007.6.28)

(43) 国際公開日 平成17年6月16日(2005.6.16)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 39/285 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/285	4 B O 6 5
<b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 4
<b>A 6 1 K 39/02 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/02	4 C O 8 5
<b>A 6 1 K 39/002 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/002	4 C O 8 7
	審査請求 有 予備審査請求 未請求	(全 23 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2005-511272 (P2005-511272)	(71) 出願人 800000024
(21) 国際出願番号 PCT/JP2003/015632	北海道ティー・エル・オー株式会社
(22) 国際出願日 平成15年12月5日(2003.12.5)	北海道札幌市北区北8条西5丁目 北海道
(81) 指定国 AP (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, A Z, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, M G, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW	大学事務局内
	(74) 代理人 100091096
	弁理士 平木 祐輔
	(74) 代理人 100096183
	弁理士 石井 貞次
	(74) 代理人 100118773
	弁理士 藤田 節
	(74) 代理人 100111741
	弁理士 田中 夏夫
	(72) 発明者 志田 壽利
	北海道札幌市北区北16条西4丁目21-368 カルム北大前1001
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高度安全性痘瘡ワクチンウイルスおよびワクシニアウイルスベクター

## (57) 【要約】

リバージョン（先祖帰り）を起こしにくいワクチン株を作出し、より安全性の高い痘瘡ワクチンを提供することを目的とする。本ワクチンウイルスは、ワクシニアウイルス株 LC 16m8 株または LC 16m0 株の B5R 遺伝子の一部または全部を欠失しており、正常な機能を有する B5R 遺伝子産物を産生しない。本ワクチンウイルスは、痘瘡ワクチンとして、また外来遺伝子を発現し得るベクターとして使用可能である。そして、復帰突然変異により正常機能を有する B5R 遺伝子産物を産生しない痘瘡ワクチンおよびワクシニアウイルスベクターを提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ワクシニアウイルス株 LC16 株、LC16m8 株または LC16mO 株の B5R 遺伝子の一部または全部が欠失しており、正常な機能を有する B5R 遺伝子産物を産生しないワクシニアウイルスからなる痘瘡ワクチンであって、正常な機能を有する B5R 遺伝子産物の産生を引き起こす復帰突然変異を起こしにくい痘瘡ワクチンウイルス。

## 【請求項 2】

B5R 遺伝子を完全に欠失している、請求項 1 に記載の痘瘡ワクチンウイルス。

## 【請求項 3】

B5R 遺伝子の一部が欠失し、正常な機能を有する B5R 遺伝子発現産物が産生されない、請求項 1 または 2 に記載の痘瘡ワクチンウイルス。 10

## 【請求項 4】

RK13 細胞に感染させたときのプラークサイズおよびウサギに投与したときの皮下増殖性が LC16m8 株と同等である請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の痘瘡ワクチンウイルス。

## 【請求項 5】

B5R 遺伝子の一部が欠失し、該 B5R 遺伝子の上流にプロモーターが連結され、B5R 遺伝子の一部が発現するが、該発現産物は B5R 遺伝子発現産物の正常な機能を失っている、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の痘瘡ワクチンウイルス。

## 【請求項 6】

B5R 遺伝子の膜貫通ドメインが欠失している、請求項 3 から 5 のいずれか 1 項に記載の痘瘡ワクチンウイルス。 20

## 【請求項 7】

プロモーターが PSFJ1-10、PSFJ2-16 または他のボックスウイルス用高発現プロモーターである、請求項 5 または 6 に記載の痘瘡ワクチンウイルス。

## 【請求項 8】

B5R 遺伝子のうち膜貫通ドメインの全部または一部が欠失しているワクシニアウイルスよりなる痘瘡ワクチンウイルス。

## 【請求項 9】

B5R 遺伝子の上流にプロモーターが連結し、B5R 遺伝子の一部が発現するが、該発現産物は B5R 遺伝子発現産物の正常な機能を失っている、請求項 8 に記載の痘瘡ワクチンウイルス。 30

## 【請求項 10】

プロモーターが PSFJ1-10、PSFJ2-16 または他のボックスウイルス用高発現プロモーターである、請求項 8 または 9 に記載の痘瘡ワクチンウイルス。

## 【請求項 11】

請求項 1 から 10 のいずれか 1 項に記載の痘瘡ワクチンウイルスを含む痘瘡ワクチン医薬組成物。

## 【請求項 12】

ワクシニアウイルス株 LC16 株、LC16m8 株または LC16mO 株の B5R 遺伝子の一部または全部が欠失しており、正常な機能を有する B5R 遺伝子産物を産生しないワクシニアウイルスベクターであって、正常な機能を有する B5R 遺伝子産物の産生を引き起こす復帰突然変異を起こしにくいワクシニアウイルスベクター。 40

## 【請求項 13】

B5R 遺伝子を完全に欠失している、請求項 12 に記載のワクシニアウイルスベクター。

## 【請求項 14】

B5R 遺伝子の一部が欠失し、正常な機能を有する B5R 遺伝子発現産物が産生されない、請求項 12 または 13 に記載のワクシニアウイルスベクター。

## 【請求項 15】

ウサギ腎臓細胞に感染させたときのプラークサイズおよびウサギに投与したときの皮下増 50

殖性が LC 16 m 8 株と同等である請求項 1 2 から 1 4 のいずれか 1 項に記載のワクシニアウイルスベクター。

【請求項 1 6】

B 5 R 遺伝子の一部が欠失し、該 B 5 R 遺伝子の上流にプロモーターが連結され、B 5 R 遺伝子の一部が発現するが、該発現産物は B 5 R 遺伝子発現産物の正常な機能を失っている、請求項 1 2 から 1 5 のいずれか 1 項に記載のワクシニアウイルスベクター。

【請求項 1 7】

B 5 R 遺伝子の膜貫通ドメインが欠失している、請求項 1 2 から 1 6 のいずれか 1 項に記載のワクシニアウイルスベクター。

【請求項 1 8】

プロモーターが P S F J 1 - 1 0、P S F J 2 - 1 6 または他のポックスウイルス用高発現プロモーターである、請求項 1 6 または 1 7 のワクシニアウイルスベクター。

【請求項 1 9】

B 5 R 遺伝子のうち膜貫通ドメインの全部または一部が欠失しているワクシニアウイルスベクター。

【請求項 2 0】

B 5 R 遺伝子の上流にプロモーターが連結し、B 5 R 遺伝子の一部が発現するが、該発現産物は B 5 R 遺伝子発現産物の正常な機能を失っている、請求項 1 9 記載のワクシニアウイルスベクター。

【請求項 2 1】

プロモーターが P S F J 1 - 1 0、P S F J 2 - 1 6 または他のポックスウイルス用高発現プロモーターである、請求項 1 9 または 2 0 に記載のワクシニアウイルスベクター。

【請求項 2 2】

外来遺伝子を含む請求項 1 2 から 2 1 のいずれか 1 項に記載のワクシニアウイルスベクター。

【請求項 2 3】

外来遺伝子がウイルス、細菌、原虫または癌の抗原である請求項 2 2 記載のワクシニアウイルスベクター。

【請求項 2 4】

請求項 2 3 記載のワクシニアウイルスベクターを含む、ウイルス、細菌、原虫または癌用ワクチンウイルス医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

本発明は、新規なワクシニアウイルスおよびウイルスベクターに関するものである。具体的には、リバージョン（復帰突然変異または先祖帰り）を起こしやすい弱毒痘瘡ワクシニアウイルス LC 16 m 8 株およびその親株 LC 16 m 0 株から、リバージョンに関わる遺伝子を除去することによりリバージョンを起こしにくくした、遺伝的に安定でより安全なワクシニアウイルスおよびワクシニアウイルスベクターに関するものである。

【背景技術】

痘瘡ワクチンはかつて全世界で使用され、天然痘の撲滅に貢献した。しかし、当時のワクチン株はいずれも、1) 種痘後脳炎のような重篤な副作用を引き起こすこと、2) ワクチンの生産はウイルスを牛の皮膚に接種し、できた膿瘍から取り出すという原始的な手法によっており、無菌性を保証することが容易ではない、という問題点を持っていた。千葉県血清研究所の橋爪らはこのような問題点を解決するために、当時世界中で用いられていた痘苗株の中で比較的副作用が少ないとされていた L i s t e r 株を初代ウサギ腎臓細胞 (P R K) に 3 0 で継代培養し、その中から、4 0 . 8 以上では増殖しない温度感受性株として LC 16 株を樹立した。LC 16 株はサルの中樞神経系に対する病原性が、親株の L i s t e r 株や当時ワクチンに使用されていた他の株に比べ大きく減弱していたが、ウサギの皮膚での増殖性はむしろ亢進していることが判明した。そこでさらに P R K での継代を重ね、より小さなポックを形成する LC 16 m 0 株（以下 m 0 株と称することも

10

20

30

40

50

ある)を選択した。mO株は約1000人に接種された。しかしmO株でも皮膚での反応がまだ強かったために、mO株からさらにポックサイズが小さい株としてLC16m8株(以下m8株と称することもある)が樹立された(橋爪 壮、臨床とウイルス Vol. 3 No. 3 昭和50年7月1日)。m8株は、1974年から1975年にかけて10万人の子供に接種されたが、重篤な副反応は報告されなかったことから、従来のワクチン株と比較して高い安全性が証明され、正式なワクチン株として厚生省から認可された。mO株と比較すると、m8株は皮膚増殖能が弱いにもかかわらず抗体誘導能は親株のLister株とほぼ同程度であり、また安全性では明らかに優れていた。この株はウサギ腎臓の初代培養細胞を用いた無菌的な組織培養によって製造できる点も大きな改善点であった。しかし、m8株を用いた応用研究と平成13年度の千葉県血清研究所における実製造の経験から、m8株の培養過程でラージプラークを形成するリバータント(復帰突然変異体)が出現することが明らかになった。リバータントはプラーク純化したm8からも出現することから、リバータントウイルスの出現はm8株の避けがたい性質であり、リバータントの性状はmO株に酷似し、皮膚での増殖能が昂進していることから、リバータントの混入はワクチンの安全性に懸念を生じかねないことが判明した。

また、ワクシニアウイルスは、広い宿主域と高い発現効率を有しているという理由で、他の外来遺伝子を導入し、ベクターとして用いられていた(特表平11-509091)。前述のLC16mO株やLC16m8株もその高い安全性から、ベクターとしての使用について検討されていた。

しかし、上述のようにLC16mO株は皮膚増殖性の面で問題があり、LC16m8株はリバータントの出現という問題があったので、痘瘡ワクチン株あるいはベクターウイルスとしてより安全性の高いウイルス株を作出する必要性があった。

#### 【発明の開示】

本発明は、リバージョン(先祖帰り)を起こしにくいワクチン株を作出し、より安全性の高い痘瘡ワクチンを提供することを目的とする。更にそのウイルスを利用して外来遺伝子を安全に発現するためのベクターウイルスを提供することを目的とする。

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究の結果、リバージョンに関わる遺伝子がウイルスの宿主城やプラークサイズに関わるB5R遺伝子であることを突き止めた。つまり、m8株ではB5R遺伝子がorf内での1塩基欠失によるフレームシフトでorfの大部分が失われることにより失活しているが、リバータントでは新たに別の箇所に塩基の挿入が起こることによってorfが復元されていることを明らかにした(図1および2)。RVのB5R遺伝子の塩基配列を配列番号1に、B5R遺伝子産物のアミノ酸配列を配列番号2に示す。mO株ではB5R遺伝子のorfは完全である。そこで、まずmO株のB5R遺伝子をクローニングし、m8株に相同組換えによって導入し、完全なB5R遺伝子を持つ組換えウイルス(RVV)を作製した(m8B5R)。このRVVのスクリーニングはラージプラークを選択し、さらにB5R遺伝子をシーケンスすることによって行った。次に、プロモーター領域を含むB5R遺伝子全体を完全に欠失させたコンストラクトを作製し(B5R、図6)、相同組換えによってm8B5RとmO株にB5R遺伝子の欠失を導入したRVV(それぞれm8B5R(以下m8と称することもある)、mOB5R(以下mOと称することもある))を作出した。さらに、B5R遺伝子の膜貫通領域を取り除き、高発現プロモーターPSFJ1-10につないだコンストラクトを作成し(proB5RdTM、図6)、同様にm8B5RとmO株に導入した(それぞれm8proB5RdTM(以下m8dTMと称することもある)、mOproB5RdTM(以下mOdTMと称することもある))を作出した。RVVのスクリーニングは小さなプラークを選択し、さらにゲノムのシーケンスを確認することによった。

B5R遺伝子の欠失を導入した2種類のRVV(m8B5R、mOB5R)と、B5R遺伝子の機能を欠失させて高発現させた2種類のRVV(m8proB5RdTM、mOproB5RdTM)の遺伝的安定性をm8株と比較するため、製造と同じ培養温度(30)及び34でこれらのウイルスを初代ウサギ腎細胞に7代継代し、更にリバータントを選択的に増幅して検出を容易にするためVerO細胞に34で2代継代してラ

10

20

30

40

50

ージブランクの比率を測定した。対照として再クローニングしたm8株(m8rc)を用いた(図8)。その結果、m8rcでは30継代で8.7%、34継代では60.3%のウイルスがラージブランクを形成したのに対し、これら4種類のRVVではいずれの温度においてもラージブランクが検出されなかった。m8rcから出現したラージブランクを形成するクローンのB5R遺伝子を調べたところ全てで挿入変異によるorfの回復が認められた。

以上の結果から、m8 B5R、mO B5R、m8pro B5R dTMおよびmOpro B5R dTMはm8株に比べ遺伝的な安定性が高いことが証明された。

すなわち、本発明は以下のとおりである。

- [1] ワクシニアウイルス株LC16株、LC16m8株またはLC16mO株のB5R 10  
遺伝子の一部または全部が欠失しており、正常な機能を有するB5R遺伝子産物を産生しないワクシニアウイルスからなる痘瘡ワクチンであって、正常な機能を有するB5R遺伝子産物の産生を引き起こす復帰突然変異を起こしにくい痘瘡ワクチンウイルス、
- [2] B5R遺伝子を完全に欠失している、[1]の痘瘡ワクチンウイルス、
- [3] B5R遺伝子の一部が欠失し、正常な機能を有するB5R遺伝子発現産物が産生されない、[1]または[2]の痘瘡ワクチンウイルス、
- [4] RK13細胞に感染させたときのブランクサイズおよびウサギに投与したときの皮下増殖性がLC16m8株と同等である[1]から[3]のいずれかの痘瘡ワクチンウイルス、
- [5] B5R遺伝子の一部が欠失し、該B5R遺伝子の上流にプロモーターを連結させ 20  
、B5R遺伝子の一部が発現するが、該発現産物はB5R遺伝子発現産物の正常な機能を失っている、[1]から[4]のいずれかの痘瘡ワクチンウイルス、
- [6] B5R遺伝子の膜貫通ドメインが欠失している、[3]から[5]のいずれかの痘瘡ワクチンウイルス、
- [7] プロモーターがPSFJ1-10、PSFJ2-16または他のボックスウイルス用高発現プロモーターである、[5]または[6]の痘瘡ワクチンウイルス、
- [8] B5R遺伝子のうち膜貫通ドメインの全部または一部が欠失しているワクシニアウイルスよりなる痘瘡ワクチンウイルス、
- [9] B5R遺伝子の上流にプロモーターが連結し、B5R遺伝子の一部が発現するが 30  
、該発現産物はB5R遺伝子発現産物の正常な機能を失っている、[8]の痘瘡ワクチンウイルス、
- [10] プロモーターがPSFJ1-10、PSFJ2-16または他のボックスウイルス用高発現プロモーターである、[8]または[9]の痘瘡ワクチンウイルス、
- [11] [1]から[10]のいずれかの痘瘡ワクチンウイルスを含む痘瘡ワクチン医薬組成物、
- [12] ワクシニアウイルス株LC16株、LC16m8株またはLC16mO株のB5R 40  
遺伝子の一部または全部が欠失しており、正常な機能を有するB5R遺伝子産物を産生しないワクシニアウイルスベクターであって、正常な機能を有するB5R遺伝子産物の産生を引き起こす復帰突然変異を起こしにくいワクシニアウイルスベクター、
- [13] B5R遺伝子を完全に欠失している、[12]のワクシニアウイルスベクター 40  
、
- [14] B5R遺伝子の一部が欠失し、正常な機能を有するB5R遺伝子発現産物が産生されない、[12]または[13]に記載のワクシニアウイルスベクター、
- [15] ウサギ腎臓細胞に感染させたときのブランクサイズおよびウサギに投与したときの皮下増殖性がLC16m8株と同等である[12]から[14]のいずれかのワクシニアウイルスベクター、
- [16] B5R遺伝子の一部が欠失し、該B5R遺伝子の上流にプロモーターを連結させ、B5R遺伝子の一部が発現するが、該発現産物はB5R遺伝子発現産物の正常な機能を失っている、[12]から[15]のいずれかのワクシニアウイルスベクター、
- [17] B5R遺伝子の膜貫通ドメインが欠失している、[12]から[16]のいずれ 50

れかのワクシニアウイルスベクター、

[ 1 8 ] プロモーターが P S F J 1 - 1 0、P S F J 2 - 1 6 または他のボックスウイルス用高発現プロモーターである、[ 1 6 ] または [ 1 7 ] のワクシニアウイルスベクター、

[ 1 9 ] B 5 R 遺伝子のうち膜貫通ドメインの全部または一部が欠失しているワクシニアウイルスベクター、

[ 2 0 ] B 5 R 遺伝子の上流にプロモーターが連結し、B 5 R 遺伝子の一部が発現するが、該発現産物は B 5 R 遺伝子発現産物の正常な機能を失っている、[ 1 9 ] のワクシニアウイルスベクター、

[ 2 1 ] プロモーターが P S F J 1 - 1 0、P S F J 2 - 1 6 または他のボックスウイルス用高発現プロモーターである、[ 1 9 ] または [ 2 0 ] のワクシニアウイルスベクター、

[ 2 2 ] 外来遺伝子を含む [ 1 2 ] から [ 2 1 ] のいずれかのワクシニアウイルスベクター、

[ 2 3 ] 外来遺伝子がウイルス、細菌、原虫または癌の抗原である [ 2 2 ] のワクシニアウイルスベクター、ならびに

[ 2 4 ] [ 2 3 ] のワクシニアウイルスベクターを含む、ウイルス、細菌、原虫または癌用ワクチンウイルス医薬組成物。

#### 【図面の簡単な説明】

図 1 は、L C 1 6 m 0 株、L C 1 6 m 8 株および L C 1 6 m 8 株のリバートントの B 5 R 遺伝子の塩基配列を示す図である。 20

図 2 は、L C 1 6 m 0 株、L C 1 6 m 8 株および L C 1 6 m 8 株のリバートントの B 5 R 遺伝子産物のアミノ酸配列を示す図である。

図 3 は、L i s t e r 株から L C 1 6 m 8 への継代を示す図である。

図 4 は、L i s t e r 株、L C 1 6 m 0 株および L C 1 6 m 8 株の特徴を示す図である。

図 5 は、L C 1 6 m 8 株、L C 1 6 m 8 株のリバートントである L P C ( L a r g e P l a q u e C l o n e ) および L C 1 6 m 0 株のプラークサイズを示す図である。

図 6 は、B 5 R 遺伝子を欠失したウイルスの構築方法の概念図である。

図 7 は、改良型ウイルスを感染させた R K 1 3 細胞画分の B 5 R タンパク質発現をウエスタンブロットで確認した結果を示す写真である。 30

図 8 は、改良型ウイルスの細胞継代培養によるリバートントの出現頻度を示す図である。

図 9 は、改良型ウイルスのウサギにおける皮膚増殖性を示す図である。

図 1 0 A は、ウイルスを投与した S C I D マウスの体重減少を示す図である。

図 1 0 B は、ウイルスを投与した S C I D マウスの体重減少を示す図である。

図 1 1 は、ウイルスを投与した S C I D マウスにおける R E D 5 0 の経時的変化を示す図である。

図 1 2 は、強毒ワクシニアウイルスで攻撃した B A L B / c マウスの体重減少を示す図である。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

本発明のワクシニアウイルスは、ワクシニアウイルス、例えば、L C 1 6 株、L C 1 6 m 0 株または L C 1 6 m 8 株の B 5 R 遺伝子の総てまたは一部を欠失させることにより作出することができる。B 5 R 遺伝子は、エンベロープに存在するタンパク質をコードしており、B 5 R 遺伝子産物は、ウイルスの感染に関与している。B 5 R 遺伝子が存在すると、皮膚増殖性が大きく、ヒトに投与した場合、自己接種等の副作用を引き起こすという問題があった。L C 1 6 m 8 株は、B 5 R 遺伝子中の一塩基のフレームシフト変異により、B 5 R 遺伝子産物が産生されず、皮膚増殖性は弱くなっていたが、復帰突然変異により正常な機能を有する B 5 R 遺伝子産物が産生されるようになり(リバージョン)、病原性が復活するおそれがあった。 40

本発明のワクシニアウイルスでは、B 5 R 遺伝子の総てまたは一部が欠失しているため、m 0 B 5 R 株においては、親株の L C 1 6 m 0 株の元来有していた病原性が低下し、 50

m 8 B 5 Rにおいては、親株の L C 1 6 m 8 株の復帰突然変異によりリバータントが生じることがない。

本発明における B 5 R 遺伝子の欠失は、B 5 R 遺伝子が発現しないかあるいは発現してもその発現タンパク質が B 5 R 遺伝子産物の正常な機能を保持していないような欠失である。本欠失は、ウイルスの点突然変異により形質が復帰するようなものではなく、一旦失われた B 5 R 遺伝子産物の正常な機能が復帰することのない欠失である。例えば、L C 1 6 m 8 株は、突然変異により B 5 R 遺伝子の塩基の一つが欠失しフレームシフトを起こし、B 5 R 遺伝子の O R F がずれ、正常な B 5 R が発現しなくなっている。しかし、一塩基欠失部分の近傍の点突然変異により塩基一つが挿入されることにより B 5 R 遺伝子の O R F が元に戻り、正常な機能を有する B 5 R が発現するようになり、先祖帰りを起こす。本発明の欠失はこのような点突然変異により先祖帰りを起こしうる欠失を含まない。B 5 R 遺伝子は、S C R 1 から S C R 4 までの短コンセンサス領域 ( S h o r t c o n s e n s u s r e g i o n ) および膜貫通ドメイン ( T M : T r a n s m e m b r a n e D o m a i n ) からなり、膜貫通ドメインが B 5 R 遺伝子産物の機能に重要な働きをする。従って、B 5 R 遺伝子の欠失は、膜貫通ドメインの欠失でもよい。また、膜貫通ドメインだけではなく、S C R 1 から S C R 4 の一部が欠失していてもよい。この場合、欠失は各領域をコードする D N A の総ての欠失でも、あるいは各領域をコードする D N A の一部が欠失することにより、正常な機能を有する B 5 R 遺伝子産物が産生されなくなるような欠失でもよい。好適には、B 5 R 遺伝子の欠失は、B 5 R 遺伝子総ての欠失または膜貫通ドメイン総ての欠失である。また、B 5 R 遺伝子のプロモーターをも欠失させるのが望ましい。このような欠失は、公知の相同組換え法により行うことができる。

相同組換えとは、細胞内で 2 つの D N A 分子が同じ塩基配列介して相互に組換えを起こす現象で、ワクシニアウイルスのような巨大なゲノム D N A を持つウイルスの組換えにしばしば用いられる方法である。まず、標的とするワクシニアウイルス遺伝子部位の配列を中央で分断する形で、プロモーターと外来遺伝子を連結したプラスミド ( これをトランスファーベクターという ) を構築し、これを、ワクシニアウイルスを感染させた細胞に導入してやると、ウイルス複製の過程で裸になったウイルス D N A とトランスファーベクター上の同じ配列部分との間に入れ換えが起こり、挟み込まれたプロモーターと外来遺伝子がウイルスゲノム中に組み込まれる。例えばトランスファーベクターとして、ワクシニアウイルスの B 4 R 遺伝子から B 6 R 遺伝子の領域をプラスミドにクローニングし、B 4 R 遺伝子と B 6 R 遺伝子の間に位置する B 5 R 遺伝子の全領域を欠失させたプラスミド) または B 5 R 遺伝子の一部を欠失させたプラスミドを作製して、これをワクシニアウイルス感染細胞に導入する。細胞としては、B S C - 1 細胞、H T K - 1 4 3 細胞、H e p 2 細胞、M D C K 細胞、V e r o 細胞、H e L a 細胞、C V 1 細胞、C O S 細胞、R K 1 3 細胞、B H K - 2 1 細胞、初代ウサギ腎臓細胞等ワクシニアウイルスが感染しうる細胞を用い得る。また、ベクターの細胞への導入は、リン酸カルシウム法、カチオニックリポゾーム法、エレクトロポレーション法等の公知の方法で行えばよい。組換え体を同定しやすくするため、相同組換えにより分断され機能を失う導入部位の遺伝子には選択マーカーとなり得る遺伝子 ( 例えば B 5 R 遺伝子、H A 遺伝子および T K 遺伝子等 ) を用いることが多い。ワクシニアウイルス遺伝子の塩基配列情報を基にトランスファーベクターを設計・作製し、該トランスファーベクターを用いて破壊しようとする遺伝子を相同組換えすればよい。トランスファーベクターは、D . M . G l o v e r 他編、加藤郁之進 監訳 D N A クローニング 4 - 哺乳類のシステム - ( 第 2 版 ) T a K a R a 等に記載の方法に従って作製することができる。相同組換えを起こした相同組換え体の選別方法としては、選択した標的遺伝子によって、ブランクサイズ ( B 5 R 遺伝子の場合 )、ブランクの赤血球吸着の有無 ( H A 遺伝子 )、B u d R 薬剤耐性 ( T K 遺伝子 ) 等の選択方法を用いればよい。あるいは、P C R 法でもサザンブロッティング法のいずれの方法をも用いることができる。

B 5 R 遺伝子産物は感染細胞表面およびウイルスのエンベロープに存在し、隣接の細胞、あるいは宿主体内の他の部位にウイルスが感染・伝播するとき、感染効率を高める働きをし、ウイルスのブランクサイズおよび宿主域にも関与している。例えば、B 5 R 遺伝

10

20

30

40

50

子を欠失させると、R K 1 3 細胞等の動物細胞に感染させた場合のプラークサイズが小さくなり、孵化鶏卵の漿尿膜上におけるポックサイズも小さくなる。また、V e r o 細胞中のウイルス増殖性は著しく低下する。さらに、ウサギに皮内投与したときの皮膚増殖能は低下し、皮膚病原性が低下する。従って、B 5 R タンパク質の機能が欠失しているかどうかは、R K 1 3 細胞に感染させたときに形成されるプラークサイズ、ポックサイズ、V e r o 細胞でのウイルス増殖性、ウサギにおける皮膚病原性等を指標に判断することができる。また、ワクシニアウイルスの遺伝子配列を調べてもよい。本発明のワクシニアウイルスは、B 5 R 遺伝子機能を有する L i s t e r 株や L C 1 6 m 0 株と比較して、動物細胞に感染させた場合のプラークサイズが小さくなり、ポックサイズが小さくなり、V e r o 細胞でのウイルス増殖性、皮膚病原性等も低下しており、L C 1 6 m 8 株と比較して、動物細胞に感染させた場合のプラークサイズ、ポックサイズが同等であり、ウサギ腎臓細胞でのウイルス増殖性、V e r o 細胞でのウイルス増殖性、皮下病原性等も同等である。L C 1 6 m 0 株と L C 1 6 m 8 株をウサギ腎細胞に感染させた場合のプラークサイズを図 5 に、L C 1 6 m 0 株と L C 1 6 m 8 株（リクローニングされた L C 1 6 m 8 株）のウサギにおける皮膚増殖性を図 9 に示す。さらに、B 5 R 遺伝子を欠失させると、動物に接種した場合の病原性も低下する。例えば、S C I D マウスにウイルスを腹腔内接種し、経時的に体重を測定した場合、正常な機能を有する B 5 R 遺伝子産物を産生するウイルス株では、 $10^5$  P F U のウイルスを接種後 2 週間程度で発痘が認められ、体重が減少し始めるが、正常な機能を有する B 5 R 遺伝子産物を産生しないウイルス株では、 $10^7$  P F U のウイルスを接種しても発痘は認められず、体重の減少も認められない。また、動物に接種した場合の病原性を R E D 5 0（半数の個体に発痘を起こし得るウイルス量）を指標に調べた場合、正常な機能を有する B 5 R 遺伝子産物を産生するウイルス株では正常な機能を有する B 5 R 遺伝子産物を産生しないウイルス株に対して 2 l o g 以上高い値を示す。図 1 0 A、図 1 0 B および図 1 1 に S C I D マウスに対する病原性を示す。本発明における正常な機能を有する B 5 R 遺伝子産物とは、野生型 B 5 R 遺伝子がコードする遺伝子産物が有する機能と同一の機能を有する遺伝子産物であり、上記の性質を有する。

また、B 5 R 遺伝子を完全に欠失したウイルス株でも、感染防御能は B 5 R 遺伝子を有するウイルス株に比べ遜色ないという結果は得られているが（図 1 2）、B 5 R 遺伝子産物は、対痘瘡ワクチンの感染防御抗原として重要であるという報告もあるため、痘瘡ワクチンとして用いる場合は B 5 R 遺伝子産物の一部が産生されていたほうが望ましい可能性もある。従って、本発明のワクシニアウイルスにおいて、B 5 R 遺伝子とその発現産物の抗原性を維持したまま正常な機能が失われた形で発現されてもよい。このためには、B 5 R 遺伝子のうちの一部、例えば S C R 1 から 4 の一部または全部のみが発現されるようにウイルスを設計すればよい。また、よりワクチンの抗原性を高めるためにこれらの領域がより多量に発現されるように設計してもよい。このためには、一部欠失させた B 5 R 遺伝子の 5' 側に高発現プロモーターを機能し得る形で連結させればよい。用いるプロモーターとして、例えば P S F J 1 - 1 0、P S F J 2 - 1 6 や p 7 . 5 K プロモーター、p 1 1 K プロモーター、T 7 . 1 0 プロモーター、C P X プロモーター、H F プロモーター、H 6 プロモーター、T 7 ハイブリッドプロモーターなどの他のポックスウイルス用高発現プロモーター等が挙げられる。

本発明において、B 5 R 遺伝子を完全に欠失した L C 1 6 m 0 株、L C 1 6 m 8 株をそれぞれ、m 0 B 5 R、m 8 B 5 R と称し、それぞれ、m 0、m 8 と称することがあり、B 5 R 遺伝子のなかの膜貫通ドメインを欠失し、5' 側にプロモーターを連結させ高発現性とした L C 1 6 m 0 株、L C 1 6 m 8 株をそれぞれ、m 0 p r o B 5 R d T M、m 8 p r o B 5 R d T M と称し、それぞれ m 0 d T M、m 8 d T M と称することがある。

L C 1 6 m 0 株は、L i s t e r 株から L C 1 6 株を経て作出された株であり、L C 1 6 m 8 株は、さらに L C 1 6 m 0 株から作出された株である（蛋白質 核酸 酵素 V o l . 4 8 N o . 1 2 ( 2 0 0 3 ) , p . 1 6 9 3 - 1 7 0 0）。L i s t e r 株から L C 1 6 m 8 株の単離は、図 2 に示すような工程で行われ、L C 1 6 m 0 株および L C 1 6 m 8 株は、千葉県衛生研究所、から入手することができる。

10

20

30

40

50



本発明の B 5 R 遺伝子を欠失した L C 1 6 m O 株および L C 1 6 m 8 株は、リバージョンを起こすことなく安全な痘瘡ウイルスワクチンとして用いることができる。

また、本発明は、上記の B 5 R 遺伝子を欠失した L C 1 6 株、L C 1 6 m O 株および L C 1 6 m 8 株からなるワクシニアウイルスベクターを包含する。

該ベクターには、所望の外来遺伝子を導入することができる。上記の相同組換えの手法を用いることにより、理論的にはワクシニアウイルスゲノムのどの部位にも外来遺伝子を導入することができる。相同組換えは上述の方法で行えばよい。例えば、導入したい部位の DNA 配列中に導入すべき外来遺伝子を連結したプラスミド(トランスファーベクター)を作製し、これを、ワクシニアウイルスを感染させた細胞の中に導入すればよい。トランスファーベクターとして、例えば p S F J 1 - 1 0、p S F J 2 - 1 6、p M M 4、p G S 2 0、p S C 1 1、p M J 6 0 1、p 2 0 0 1、p B C B 0 1 - 3、0 6、p T K g p t - F 1 - 3 s、p T M 1、p T M 3、p P R 3 4、3 5、p g p t - A T A 1 8 - 2、p H E S 1 - 3 等を用いることができる。外来遺伝子の導入領域は、ワクシニアウイルスの生活環に必須でない遺伝子中であり、例えば赤血球凝集素(HA)遺伝子、チミジンキナーゼ(TK)遺伝子、Fフラグメント等が挙げられる。また、上記の B 5 R 遺伝子領域中(B 4 R 遺伝子と B 6 R 遺伝子の間)に導入してもよい。導入する部分の遺伝子は、それが欠失することによりウイルスの形質に変化し組換え体の選択が容易になるものが望ましい。例えば、HA 遺伝子の場合では HA 遺伝子中に外来遺伝子が導入された組換え体では、HA 遺伝子が導入された外来遺伝子によって分断され、機能を失う。そのためプラークはニワトリの赤血球を吸着しなくなるため白く見えるようになるので、組換え体を容易に選別することができる。また、TK 遺伝子中に外来遺伝子が導入された組換え体では、TK 遺伝子の機能が失われ、5-プロモデオキシウリジン(BudR)が致死的に作用しないので、BudR により選別することができる。また、B 5 R 遺伝子中に外来遺伝子を導入した場合は、組換え体のプラークが小さくなるのでプラークのサイズで選別することができる。ワクシニアウイルスを感染させる細胞としては、Vero 細胞、HeLa 細胞、CV1 細胞、COS 細胞、RK13 細胞、BHK-21 細胞、初代ウサギ腎細胞、BSC-1 細胞、HTK-143 細胞、Hep2 細胞、MDCk 細胞等、ワクシニアウイルスが感染しうる細胞を用い得る。

また、外来遺伝子を導入する際、外来遺伝子の upstream に適当なプロモーターを機能し得る形で連結させるのが望ましい。プロモーターは、限定はないが、上述の P S F J 1 - 1 0 や、P S F J 2 - 1 6、p 7 . 5 K プロモーター、p 1 1 K プロモーター、T 7 . 1 0 プロモーター、C P X プロモーター、H F プロモーター、H 6 プロモーター、T 7 ハイブリッドプロモーター等を用いることができる。本発明のワクシニアウイルスベクターに外来遺伝子を導入する方法は、組換えワクシニアウイルスベクターを構築する公知の方法により行うことができ、例えば別冊 実験医学 ザ・プロトコールシリーズ 遺伝子導入 & 発現解析実験法 斎藤泉他編集、羊土社(1997年9月1日発行)、あるいは、D . M . G l o v e r 他編、加藤郁之進 監訳 DNA クローニング 4 - 哺乳類のシステム - (第 2 版) T a K a R a、E M B O J o u r n a l (1987年 6 巻 p . 3 3 7 9 - 3 3 8 4 等の記載に従えばよい。

このようにして、外来遺伝子を導入したワクシニアウイルスベクターを用いて該外来遺伝子を製造することができる。この際、外来遺伝子を導入したワクシニアウイルスベクターを適当な宿主細胞に感染させて該宿主細胞を培養すればよい。宿主細胞としては、上述の種々の動物細胞を用いることができる。培養は、動物細胞の公知の培養条件に従えばよい。

さらに、外来遺伝子としてウイルス、細菌、原虫および癌等の抗原をコードする遺伝子を導入することにより、外来遺伝子を導入したワクシニアウイルスベクターを種々のウイルス、細菌、原虫および癌に対するワクチンとして用いることができる。例えば、ヒト免疫不全ウイルス、肝炎ウイルス、ヘルペスウイルス、ミコプラズマ、マラリア原虫、重症急性呼吸器症候群(SARS=サーズ)ウイルス等の感染防御抗原(中和抗原)、あるいは癌抗原をコードする遺伝子を導入すればよい。本発明は、これらの抗原を導入したワ

クシニアウイルスベクターも包含する。

さらに、本発明は、本発明の B 5 R 遺伝子が欠失したワクシニアウイルスを含む痘瘡ワクチン医薬組成物、本発明の B 5 R 遺伝子が欠失したワクシニアウイルスの痘瘡ワクチンとしての使用およびワクシニアウイルスを被験体に投与し、天然痘の感染を防御する方法を包含する。

本発明のワクチン医薬組成物の投与方法、投与量等は、既にワクチンとして用いられている公知のワクシニアウイルスワクチンと同様である。本発明のワクチン医薬組成物は、医薬的に有効量の本発明のワクシニアウイルスワクチンを有効成分として含んでおり、無菌の水性又は非水性の溶液、懸濁液、又はエマルションの形態であってもよい。さらに、塩、緩衝剤、アジュバント等の医薬的に許容できる希釈剤、助剤、担体等を含んでいてもよい。本発明のワクチン医薬組成物の投与は種々の非経口経路、例えば、皮下経路、静脈内経路、皮内経路、筋肉内経路、腹腔内経路、鼻内経路、経皮経路によればよいが、この中でも皮内投与が好ましい。医薬的な有効投与量は、所望の生物学的効果、この場合にはウイルス抗原に対する細胞性免疫応答又は体液性免疫応答の少なくとも一つを得るのに充分である量である。有効投与量は被験体の年齢、性別、健康、及び体重等により適宜決定することができる。例えば、限定されないが、ヒト成人に対して、投与当たり約  $10^2 \sim 10^{10}$  ポック形成単位 (PFU) 又はプラーク形成単位 (PFU)、好ましくは  $10^5 \sim 10^6$  ポック形成単位 (PFU) 又はプラーク形成単位 (PFU) である。

さらに、本発明は、B 5 R 遺伝子が欠失しており外来遺伝子を導入したワクシニアウイルスベクターであって、導入した外来遺伝子がウイルス、細菌、原虫および癌の抗原をコードする、ワクシニアウイルスのワクチン医薬組成物、および該ワクチンの使用および該ベクターを被験体に投与し、ウイルス、細菌、原虫および癌等の感染を防御あるいは治療する方法を包含する。該ワクチン医薬組成物の投与方法、投与量とは上述の痘瘡ワクチン医薬組成物に準ずればよい。

次に、本発明を実施例により具体的に説明する。

実施例 1 B 5 R 遺伝子欠失ミュータントおよび一部欠失 B 5 R 高発現組換え体の構築

B 5 R 遺伝子欠失用トランスファーベクター (p B 4 R + B 6 R) の構築

B 4 R の T A クローニング

m 8 株の精製ゲノム DNA を鋳型として、2つのプライマー (G A T G C T G T T G T G C T G T G T T T G C (配列番号 3) と G T T A A C A C T G T C G A G C A C T A A A A G G (配列番号 4)) によって B 4 R 遺伝子を増幅し、併せて orf の 3' 側に H p a I 部位を導入した。これを T A ベクター (p C R I I) にクローニングした (p B 4 R + H p a I)。p B 4 R + H p a I の塩基配列を確認した後、これを鋳型に 2つのプライマー (G A T G C T G T T G T G C T G T G T T T G C (配列番号 5) と T T G T G T G G A A T T G T G A G C G G A (配列番号 6)) によって B 4 R 遺伝子全領域と T A ベクターのマルチクローニング部位を増幅した。この PCR 産物を精製後、T 4 DNA ポリメラーゼで両端を平滑化した (B 4 R + H p a I フラグメント)。

B 6 R の T A クローニング

m 8 株の精製ゲノム DNA を鋳型として、2つのプライマー (G T T A A C G T T C C A T A A A T T G C T A C C G (配列番号 7) と G T G T G A C C T C T G C G T T G A A T A G (配列番号 8)) によって B 6 R 遺伝子を増幅し、併せて orf の 5' 側に H p a I 部位を導入した。これを T A ベクターにクローニングした (p B 6 R + H p a I)。

B 4 R と B 6 R の連結

p B 6 R + H p a I の塩基配列を確認した後、H p a I で消化し、B A P で脱リン酸化した。次に、B 4 R + H p a I フラグメントと混合しライゲーションした。この混合物を鋳型にして、プライマー p s / h r - s 1 (T C G G A A G C A G T C G C A A N C A A C (配列番号 9)) と p s / h r - a s 1 (A T A C C A T C G T C G T T A A A A G C G C (配列番号 10)) によって、連結した B 4 R 遺伝子と B 6 R 遺伝子の一部領域を増幅した。この PCR 産物を T A ベクターにクローニングし、塩基配列を確認した (p B 4 R + B 6 R)。

10

20

30

40

50

一部欠失 B 5 R 高発現組換え体用トランスファーベクター ( p B 4 R + B 6 R p r o B 5 R d T M ) の構築

m O 株の精製ゲノム DNA を鋳型として、2 つのプライマー ( A T G A A A A C G A T T T C C G T T G T T A C G ( 配列番号 1 1 ) と T C A A T G A T A A G T T G C T T C T A A C G A ( 配列番号 1 2 ) ) によって B 5 R 遺伝子の e c t o d o m a i n 領域 ( S C R 1 から S C R 4 までの領域 ) のみを増幅し、これを T A ベクターにクローニングした ( p B 5 R d T M ) 。 p B 5 R d T M の塩基配列を確認した後、制限酵素 P s t I で切断した後、T 4 DNA ポリメラーゼで平滑化し、さらに S a c I で切断して B 5 R d T M フラグメントを切り出した。これを S m a I と S a c I で消化したトランスファーベクター p S F J 1 - 1 0 に連結した ( p S F J d T M ) 。次に p S F J d T M を H p a I と S a c I で消化して、プロモーター + B 5 R d T M のフラグメント ( p r o B 5 R d T M ) を切り出した。これを、H p a I と S a c I で消化した p B 4 R + B 6 R に連結した ( p B 4 R + B 6 R p r o B 5 R d T M ) 。

組換えウイルスの作成

3 5 m m ディッシュに 8 0 % コンフルエントに培養された R K 1 3 細胞または P R K 細胞にワクシニアウイルス ( m 8 B 5 R の場合は m 8 株、m 8 と m 8 p r o B 5 R d T M の場合は m 8 B 5 R 、m O と m O p r o B 5 R d T M の場合は m O 株 ) を m o i = 0 . 0 2 で感染させ、室温で 1 時間吸着後、L i p o f e c t A M I N E P L U S ( I n v i t r o g e n ) と混合したトランスファーベクタープラスミド DNA ( m 8 B 5 R の場合は p B 5 R 、m 8 と m O の場合は p B 4 R + B 6 R 、m 8 p r o B 5 R d T M と m O p r o B 5 R d T M の場合は p B 4 R + B 6 R p r o B 5 R d T M ) をマニュアルに従って細胞に添加して取り込ませ、3 4 にて 2 日間培養した。細胞を凍結融解後、ソニケーションし、ほぼコンフルエントになった R K 1 3 細胞に適当に希釈して接種し、0 . 8 % メチルセルロースを含む E a g l e M E M , 5 % F C S 培地を加え、3 4 で 2 から 3 日間培養した。ニュートラルレッドを最終濃度 0 . 0 1 % になるように加え、3 4 で 3 時間細胞を染色した後、培地を除き、フェノールレッドを含まない E a g l e M E M 培地で 2 度細胞面を洗い、m 8 B 5 R の場合はラージプラークを、m 8 、m 8 p r o B 5 R d T M 、m O および m O p r o B 5 R d T M の場合はスモールプラークをチップの先で掻き取り、E a g l e M E M 培地に浮遊させた。採取したプラークの浮遊液をソニケーション後、その 2 0 0 μ L を 1 5 , 0 0 0 r p m 、3 0 分間遠心し、沈査に 5 0 μ L の滅菌蒸留水または 1 0 m M T r i s - H C l ( p H 7 . 5 ) を添加した。3 0 秒間ソニケーション後、9 5 で 1 0 分間加熱してゲノム DNA を抽出し、P C R によるスクリーニングに供した。m 8 と m O の場合は p s / h r - s 1 と p s / h r - a s 1 によって、m 8 p r o B 5 R d T M と m O p r o B 5 R d T M の場合は p s / h r - s 1 と B 5 R 7 9 3 a s ( G A T C C G A A G A A T G A T A T C C C ) ( 配列番号 1 3 ) によって P C R を行い、所定の大きさの P C R プロダクトが検出されたクローンについて、P C R プロダクトの塩基配列をダイレクトシーケンスにより確認した。塩基配列に問題が無いクローンを選択し、R K 1 3 細胞にてさらに 2 から 3 回プラーク純化した。全てのウイルスは R K 1 3 細胞にて大量培養した後、3 5 ( W / V ) % シュークローサクッションを用いた超遠心によって精製濃縮し、R K 1 3 細胞にてウイルス力価を測定し、実験に供した。

。 図 6 に B 5 R 遺伝子を欠失したウイルスの構築図を示す。

実施例 2 B 5 R 遺伝子欠失ミュータントおよび一部欠失 B 5 R 高発現組換え体における B 5 R タンパク質の発現の確認

4 種類の改良型ウイルス ( m 8 、m O 、m 8 p r o B 5 R d T M 、m O p r o B 5 R d T M ) を、R K 1 3 細胞に m o i = 1 0 で感染させ、感染後 1 日の感染細胞画分の B 5 R タンパク質発現をウエスタンブロットで確認した ( 図 7 a ) 。ウエスタンブロットの一次抗体には抗 B 5 R ラットモノクローナル抗体 ( S C R 2 領域を認識 ) を使い、E C L W e s t e r n B l o t t i n g D e t e c t i o n S y s t e m ( A m e r s h a m B i o s c i e n c e s K . K . ) で特異的なバンドを検出した。

m8B5R (m8株に野生型B5R遺伝子を導入したもの)とmO株では同じ分子量のB5Rタンパク質のバンドが確認され、高発現タイプの改良型ウイルス(m8proB5RdTM、mOproB5RdTM)では、短いB5R産物の発現が確認された。m8rc (リクローニングしたm8株)、m8 およびmO では、B5R遺伝子産物は検出されなかった(図7a)。

さらに、培養上清中に分泌されたB5R蛋白質を検出するため、上記と同じ培養条件で、m8proB5RdTM、mOproB5RdTM、m8B5R、mO、LC16、Wyeath株を感染させ、培養した培養上清を12.5%TCAで濃縮し、ウエスタンブロットで確認した(図7b)。1次抗体には抗B5Rウサギポリクローナル抗体を用い、ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences K.K.)で検出した。細胞画分は全体の1/40量、培養上清は1/10量をアプライした。

TMドメインを欠くB5R蛋白質を発現するm8proB5RdTMとmOproB5RdTMでは細胞画分に比して大量のB5R蛋白質が培養上清画分に検出されたのに対し、他のウイルス株では分子量の小さい(約35Kd)B5R蛋白質が細胞画分と同程度の量検出された。

#### 実施例3 リバートアント出現頻度の確認

4種類の改良型ウイルス(m8、mO、m8proB5RdTM、mOproB5RdTM)を製造用細胞であるPRKにmoi=1.0で7代まで、それぞれ30と34で継代培養した後、34でvero細胞に2代継代培養し、リバートアントの出現の有無を、RV含有量を測定して確認した。リバートアント含有量は、RK13細胞でのウイルス力価に対するvero細胞によるウイルス力価の比として計算した。対照としてリクローニングしたm8株(m8rc)を用いた。図8にリバートアントの出現頻度を示す。

4種類の改良型ウイルスではPRK細胞に7代継代してもさらにその後にvero細胞でリバートアントを選択的に増幅させてもリバートアントは出現せず、リバージョンが起こりにくいウイルスであることが証明された。

一方、リクローニングされたm8株(m8rc)からはリバートアントが検出され、vero細胞でリバートアントを選択的に増幅すると、m8rcではPRK細胞1代培養ですでにリバートアントが出現しており、m8株では容易にリバージョンが起こることが判明した。

#### 実施例4 改良型ウイルスのウサギにおける皮膚増殖性

改良型ウイルス(m8、mO、m8proB5RdTM、mOproB5RdTM)について、ウサギ皮膚接種試験で、ErD50(Erythema Dose 50、接種部位の50%に1cm以上の発赤を起しうるウイルス量)を測定し、皮膚での増殖性を評価した。対照として、mO株、m8rcおよびm8株に野生型B5R遺伝子を導入したm8B5Rを用いた。

3.5kg以上の日本白色種の背中の中毛を刈り、硫化バリウムで完全に除毛した翌日、10倍階段希釈したウイルスを0.1mLずつ皮内接種した。1羽当り2系列、うち1系列は肩から尻へ、もう1系列は逆方向に、高ドーズから低ドーズへと接種した。1サンプル当り2羽(4箇所/ドーズ)用いた。接種後毎日、7日間、接種部位の発赤径を計測し、10mmを超える発赤を陽性として極期の反応を基にErD50をthe Reed and Muench methodによって算出した。図9にウサギにおける皮膚増殖性を示す。

B5R遺伝子が活性を持つウイルス(m8B5R、mO株)は皮膚での増殖力が強くErD50値が低い(1.00, 2.25)のに対し、B5R遺伝子を欠いたウイルス(m8rc, m8, mO)では皮膚増殖能が低下してErD50値が高くなる(5.83, 5.50, 6.00)ことが示され、B5R遺伝子が皮膚増殖性に直接拘わっていることが裏付けられた。TM領域を欠失したB5Rを発現する組換え体(m8proB5RdTM, mOproB5RdTM)においても、野生型B5Rを発現する対照ウイルス(m8B5R, mO)に比べて高いErD50値(4.75, 5.00)を示し、m8rc,

10

20

30

40

50

m8、mOと同程度に皮膚増殖性が大きく減弱していることが示された。

#### 実施例5 SCIDマウスにおける感染実験

1群4匹の6週令BALB/cSCIDマウス(雌)に、m8、mO、m8dTM、およびmOdTM株をそれぞれ $10^7$ から $10^9$ PFU/doseで腹腔内接種し、接種後5週まで体重減少と発症の有無を観察した。対照として、PBS接種群とほ乳類細胞では一段増殖しかできないMVA株を $10^7$ から $10^9$ PFU/dose、リクローニングしたm8株(m8rc)を $10^7$ から $10^9$ PFU/dose、mO株およびm8株にmO株のB5R遺伝子を組み込んだm8B5Rを $10^4$ から $10^6$ PFU/dose、現在アメリカで使用されているワクチン株Wyeth株を $10^3$ から $10^5$ PFU/dose、を接種して同様の観察を行った(図10A、図10Bおよび図11)。

10

図10Aおよび図10Bはマウスの体重減少を示している。m8、mO、m8dTM、およびmOdTM株接種群のうち $10^8$ PFU/dose接種群では若干の体重減少を示しているが、 $10^7$ PFU/dose接種群ではPBS接種群、MVA接種群と同様に全く体重減少を認めず、発症もしなかった。一方、B5R遺伝子の活性を持つmO株、m8B5R株、Wyeth株接種群では $10^5$ PFU/dose接種群でも接種後2週間で発症が始まり、それに伴い体重が減少始まった。特にmO株接種群では、いずれのdoseにおいても接種後4週までにほとんどの個体が死亡した。

体重減少以外に、ウイルス株のSCIDマウスに対する病原性の指標として、半数の個体に発症を起こしうるウイルス量として、Rash Expression Dose 50 (RED50)という値を設定した。図11は、その経時的变化を表したものである。その結果、B5R遺伝子の機能を欠損した5株(m8、mO、m8dTM、mOdTM、m8rc)はいずれもほぼ同じ値を示し、B5R活性を持つ3株(mO、m8B5R、Wyeth)より2log以上高い値を示した。また発症が始まる時期にも数日間の開きがあった。これらの5株では、通常人体に投与される接種量の10倍から100倍に当たる $10^7$ PFU/doseを接種した群では、全く発症を認めず、体重減少も見られず、これらの株の高い安全性が証明された。

20

#### 実施例6 BALB/cマウスにおける感染防御実験

m8、mO株について、天然痘ワクチンとしての効果を評価するために、BALB/cマウスでの感染防御実験を行った。1群8匹の6週令BALB/cマウス(雌)の筋肉内にそれぞれのウイルスを $10^4$ から $10^6$ PFU/dose接種し、接種後4週目に致死量( $10^6$ PFU/dose)のワクシニアウイルス強毒株Western Reserve (WR)株を経鼻感染させ、攻撃後の体重減少を測定した(図12)。対照として、アメリカの現行ワクチン株Wyethとm8rc、MVAを用いた。

30

m8、mO株ではいずれのdoseにおいてもWyeth株同様、攻撃後4日目に一過性の体重減少を認めたものの、完全に耐過し、死亡する個体もいなかった。一方MVA株接種群では $10^4$ 、 $10^5$ PFU接種群では顕著な体重減少が見られ、 $10^6$ PFU接種群でも若干の体重減少が認められた。 $10^4$ PFU接種群では2匹が死亡した。これらの結果からm8株、mO株はいずれも現行の天然痘ワクチンと遜色ない免疫原性を備えることが確認された。

#### 【産業上の利用可能性】

40

本発明により、皮膚増殖性のような病原性が減じられ、かつリバージョンを起こしにくい、より安全性の高い痘瘡ワクチンウイルスを提供することが可能となった。これにより痘瘡ワクチンの製造工程管理をより確実に行うことが可能となり、ワクチン製造において大きなメリットがある。また、品質の安定した安全な痘瘡ワクチンの供給は国の危機管理においても重要である。さらに、ワクシニアウイルスは痘瘡ワクチンとしての用途以外に、組み換え生ワクチンや発現ベクター系としての利用法が実用化されつつあり、新興再興感染症に対するワクチンや診断薬等の開発にも重要なツールになりうることから、応用面からもm8株の改良は意義が大きい。

本明細書に引用されたすべての刊行物は、その内容の全体を本明細書に取り込むものとする。また、添付の請求の範囲に記載される技術思想および発明の範囲を逸脱しない範囲

50

内で本発明の種々の変形および変更が可能であることは当業者には容易に理解されるであらう。本発明はこのような変形および変更をも包含することを意図している。

【 図 1 】

```

[GENETYX-MAC: Multiple Alignment]
BSR/md.txt      801  GTCTGTGACAGATAAATGGAAATACGAAATCCATCGAAGAAATGCGACAGTTTCTGATATGCTCTGAAATATGATAAGCC-A-TT-ATAGG 897
BSR/m8R1.txt    801  .....C.....- 897
BSR/m8R2.txt    801  .....A.....- 897
BSR/m8R3.txt    801  .....T.....- 897
BSR/md.txt      801  ***** ** **** 896

BSR/md.txt      898  AAGTGAATCCAGCATGACACTAGTTGCAACGCGAACAATAATTTGGTTGGAGAAATAATGCAAAATCTCTTGGATGATGACTGTTAGGTG 997
BSR/m8R1.txt    898  ..... 997
BSR/m8R2.txt    898  ..... 997
BSR/m8R3.txt    898  ..... 997
BSR/md.txt      899  ***** 996

```

図 1

【 図 2 】

```

BSR/md.aa      1  MKTISVTLLOLPAVYVSTCTPTMNAKLTSLETSRDKKQKFTTQDGYHSLDPNVAICDKYKPKMCTISDYVELYDKPLVEMSTMLLS 100
BSR/m8R1.aa    1  .....IIG..... 100
BSR/m8R2.aa    1  .....IIG..... 100
BSR/m8R3.aa    1  .....FIQ..... 100
***** 100

BSR/md.aa      101  ONGETYFRCEENAGTSDNDYTCRMEGDFLELHSSGDPKPKYSPREMTNCDYGVYVIGASYICTAKSINNYTPSCKKGMPSLNSGLISST 200
BSR/m8R1.aa    101  ..... 200
BSR/m8R2.aa    101  ..... 200
BSR/m8R3.aa    101  ..... 200
***** 200

BSR/md.aa      201  FSIIGVYHLSCKSGFTLIGSPSTGIDKKNPILPTQNSNIEKPTVDGPRDETDLSKSKWQVYDELESLEATYHIIVALTIMGIFLISVIVLV 300
BSR/m8R1.aa    201  ..... 300
BSR/m8R2.aa    201  ..... 300
BSR/m8R3.aa    201  ..... 300
***** 300

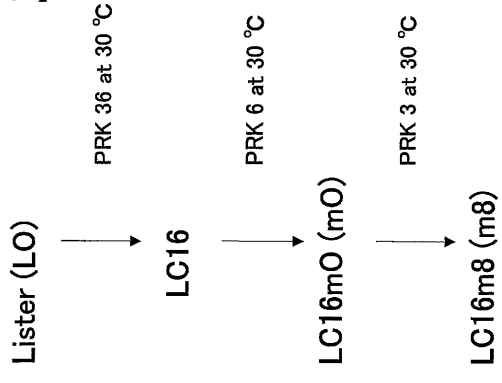
BSR/md.aa      301  CSDCKNDQYKFKLLP 317
BSR/m8R1.aa    301  ..... 317
BSR/m8R2.aa    301  ..... 317
BSR/m8R3.aa    301  ..... 317
***** 317

```

図 2

図 3

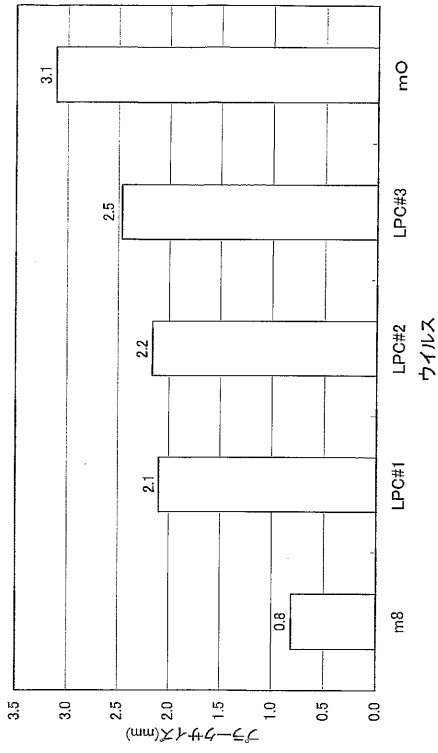
【 図 3 】



【 図 5 】

図 5

リバータントウイルスのブレードサイズ



【 図 4 】

図 4

	Lister	LC16m0	LC16m8
ts	弱	強	強
ポックサイズ	大	中	小
神経毒性	中	非常に低	非常に低
皮膚増殖性	中	中	弱
抗体産生	中	強	中

【 図 6 】

図 6

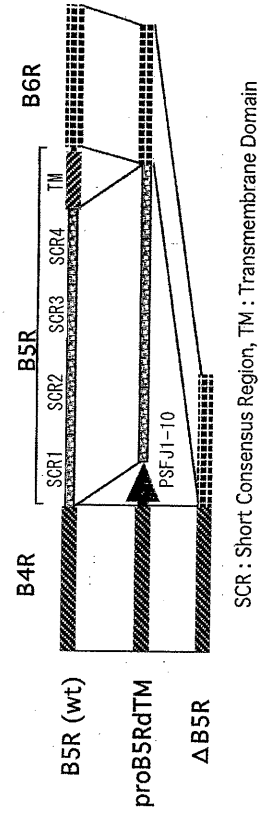
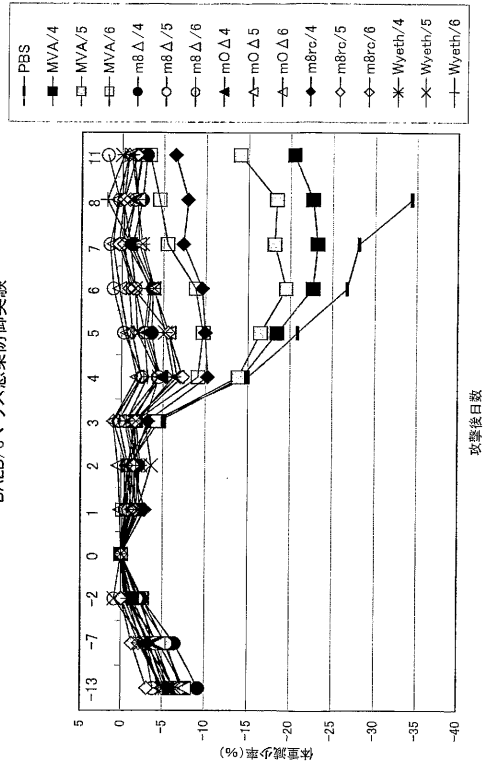






図 1 2

BALB/cマウス感染防御実験



【 図 1 2 】

図 1 0 B

SCIDマウスにおける病原性(体重減少)2

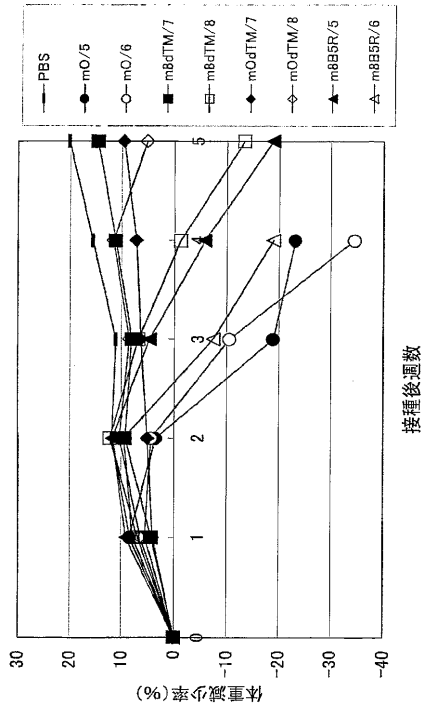
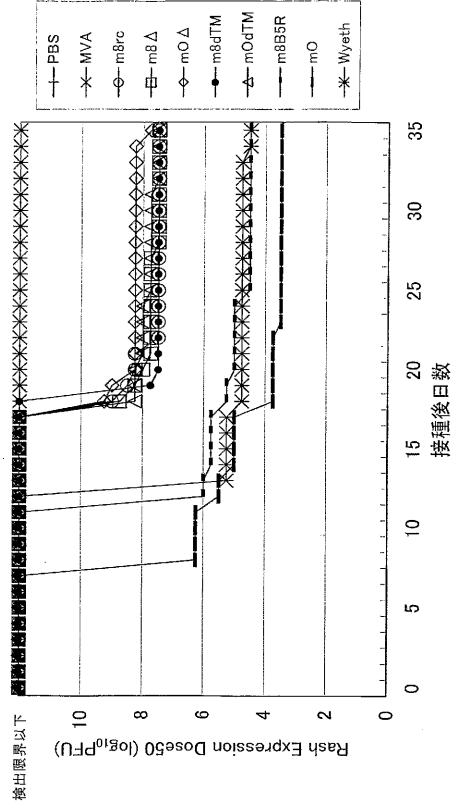


図 1 1

SCIDマウスに対する病原性 (RED50)



【 図 1 1 】

【配列表】

2005054451000001.xml

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15632

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl <sup>7</sup> C12N7/01, C12N15/863, A61K39/285		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Masanobu SUGIMOTO et al., "Kokusan Ten'mento Vaccine no Aratana Yakuwari", Protein, Nucleic acid and Enzyme, September, 2003, Vol.48, No.12, pages 1693 to 1701	1-24
Y	WO 90/12101 A (LYNXVALE LTD.), 18 October, 1990 (18.10.90), Especially, Claims 1, 2 & AU 9053509 A & EP 465539 A & JP 4-504357 A	1-5, 7, 11-16, 18, 22-24
Y	Mathew E. et al., The extracellular domain of vaccinia virus protein B5R affects plaque phenotype, extracellular enveloped virus release, and intracellular actin tail formation., J.Virol., 1998, Vol.72, No.3, p. 2429-38	1-5, 7, 11-16, 18, 22-24
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"
"E"	earlier document but published on or after the international filing date	"X"
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 02 March, 2004 (02.03.04)		Date of mailing of the international search report 16 March, 2004 (16.03.04)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15632

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Herrera E. et al., Functional analysis of vaccinia virus B5R protein: essential role in virus envelopment is independent of a large protein of the extracellular domain., J.Virol., 1998, Vol.72, No.1, pages 294 to 302	1-5,7,11-16, 18,22-24
Y	Wolffe EJ. et al., Deletion of the vaccinia virus B5R gene encoding a 42-kilodalton membrane glycoprotein inhibits extracellular virus envelope formation and dissemination., J.Virol., 1993 Vol.67, No.8, p.4732-41	1-5,7,11-16, 18,22-24
Y	Mathew EC. et al., A mutational analysis of the vaccinia virus B5R protein., J.Gen.Virol., 2001, Vol.82, Pt 5., p.1199-213	1-24
Y	Lorenzo MM. et al., Functional analysis of vaccinia virus B5R protein: role of the cytoplasmic tail., Virology., 1998, Vol.252, No.2, p.450-7	1-24

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO3/15632	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int Cl <sup>7</sup> C12N7/01, C12N15/863, A61K39/285			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するとき、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
Y	杉本正信他, 国産天然痘ワクチンの新たな役割, 蛋白質 核酸 酵素, 9月. 2003, Vol. 48, No. 12, p. 1693-1701	1-24	
Y	WO 90/12101 A (LYNXVALE LTD) 1990. 10. 18, especially claim 1, 2 &AU 9053509 A &EP 465539 A &JP 4-504357 A	1-5, 7, 11-16, 18, 22-24	
Y	Mathew E et al, The extracellular domain of vaccinia virus protein B5R affects plaque phenotype, extracellular enveloped virus release, and intracellular actin tail formation., J Virol., 1998, Vol. 72, No. 3, p. 2429-38	1-5, 7, 11-16, 18, 22-24	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 02. 03. 2004		国際調査報告の発送日 16. 3. 2004	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 六笠 紀子	4B 9735
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO3/15632
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Herrera E et al, Functional analysis of vaccinia virus B5R protein: essential role in virus envelopment is independent of a large portion of the extracellular domain., J Virol., 1998, Vol. 72, No. 1, p. 294-302	1-5, 7, 11-16, 18, 22-24
Y	Wolffe EJ et al, Deletion of the vaccinia virus B5R gene encoding a 42-kilodalton membrane glycoprotein inhibits extracellular virus envelope formation and dissemination., J Virol., 1993, Vol. 67, No. 8, p. 4732-41	1-5, 7, 11-16, 18, 22-24
Y	Mathew EC et al, A mutational analysis of the vaccinia virus B5R protein., J Gen Virol., 2001, Vol. 82, Pt 5., p. 1199-213	1-24
Y	Lorenzo MM et al, Functional analysis of vaccinia virus B5R protein: role of the cytoplasmic tail., Virology., 1998, Vol. 252, No. 2, p. 450-7	1-24

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
<b>A 6 1 K 39/12 (2006.01)</b>		A 6 1 K 39/12		
<b>A 6 1 K 39/00 (2006.01)</b>		A 6 1 K 39/00	H	
<b>A 6 1 P 31/04 (2006.01)</b>		A 6 1 P 31/04		
<b>A 6 1 P 31/12 (2006.01)</b>		A 6 1 P 31/12		
<b>A 6 1 P 33/00 (2006.01)</b>		A 6 1 P 33/00		
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>		A 6 1 P 35/00		
<b>A 6 1 K 35/76 (2006.01)</b>		A 6 1 K 35/76		
<b>C 1 2 N 7/00 (2006.01)</b>		C 1 2 N 7/00		

(72)発明者 木所 稔

東京都武蔵村山市学園2 - 3 6 - 1 むさしの住宅1 2 棟2 0 1 号

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA32 CA04 DA02 EA02 FA02 GA11 HA12  
 4B065 AA90X AA95Y AB01 AC20 BA01 CA45  
 4C084 AA13 ZB26 ZB33 ZB35 ZB38  
 4C085 AA03 BA86 BB01 CC07 CC08 DD62 EE01  
 4C087 AA01 BC83 CA12 ZB26 ZB33 ZB35 ZB38

(注) この公表は、国際事務局(W I P O)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第1 8 4条の1 0第1項(実用新案法第4 8条の1 3第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。