

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6406703号
(P6406703)

(45) 発行日 平成30年10月17日(2018.10.17)

(24) 登録日 平成30年9月28日(2018.9.28)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/00	(2006.01)	C 1 2 N 1/00
C 1 2 N	7/08	(2006.01)	C 1 2 N 7/08
A 6 1 K	39/245	(2006.01)	A 6 1 K 39/245
A 6 1 P	31/22	(2006.01)	A 6 1 P 31/22
A O 1 K	61/13	(2017.01)	A O 1 K 61/13

請求項の数 8 (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2014-543029 (P2014-543029)
 (86) (22) 出願日 平成26年5月14日 (2014.5.14)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2014/062778
 (87) 国際公開番号 W02014/185439
 (87) 国際公開日 平成26年11月20日 (2014.11.20)
 審査請求日 平成29年5月1日 (2017.5.1)
 (31) 優先権主張番号 特願2013-103124 (P2013-103124)
 (32) 優先日 平成25年5月15日 (2013.5.15)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 501168814
 国立研究開発法人水産研究・教育機構
 神奈川県横浜市西区みなとみらい二丁目3
 番3号
 (74) 代理人 100080791
 弁理士 高島 一
 (74) 代理人 100125070
 弁理士 土井 京子
 (74) 代理人 100136629
 弁理士 鎌田 光宜
 (74) 代理人 100121212
 弁理士 田村 弥栄子
 (74) 代理人 100117743
 弁理士 村田 美由紀

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コイ科ヘルペスウイルス-2 (Cyprinid herpesvirus-2: CyHV-2)
 感染症用ワクチンおよびその製造方法、ならびにCyHV-2ウイルス製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下工程(a)~(c)を含む、コイ科ヘルペスウイルス-2 (Cyprinid herpesvirus-2: CyHV-2)の製造方法:

(a) コイ科魚類由来の培養細胞を含む細胞培養液に、CyHV-2を添加する工程;
 (b) CyHV-2添加後7日~14日間おきに、培養細胞を分散し、それまで使用していた細胞および培地を50%以上残存させつつ、該残存培地の1~2倍量の新たな培地を加えて継代する工程; および

(c) 継代後、細胞全体の50%以上の細胞が、培養容器の底面に対し接着性を失った際に、CyHV-2を回収する工程。

【請求項2】

以下工程(a)~(d)を含む、CyHV-2感染症に対するワクチンの製造方法:

(a) コイ科魚類由来の培養細胞を含む細胞培養液に、CyHV-2を添加する工程;
 (b) CyHV-2添加後7日~14日間おきに、培養細胞を分散し、それまで使用していた細胞および培地を50%以上残存させつつ、該残存培地の1~2倍量の新たな培地を加えて継代する工程;

(c) 継代後、細胞全体の50%以上の細胞が、培養容器の底面に対し接着性を失った際に、CyHV-2を回収する工程; および

(d) (c)で回収したCyHV-2を不活化する工程。

【請求項3】

不活化された、請求項 1 に記載の方法により製造される C y H V - 2 を含有する、C y H V - 2 感染症に対するワクチン。

【請求項 4】

C y H V - 2 がアルデヒドにより不活化されている、請求項 3 に記載のワクチン。

【請求項 5】

コイ科魚類に投与される、請求項 3 または 4 に記載のワクチン。

【請求項 6】

コイ科魚類がキングヨである、請求項 5 に記載のワクチン。

【請求項 7】

不活化された、請求項 1 に記載の方法により製造される C y H V - 2 の有効量を対象魚類へ投与することを含む、C y H V - 2 感染症の予防方法。

10

【請求項 8】

不活化された、請求項 1 に記載の方法により製造される C y H V - 2 の有効量を対象魚類へ投与すること、および当該対象魚類を飼育することを含む、該対象魚類の飼育方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、C y H V - 2 感染症用ワクチンおよびその製造方法、ならびに C y H V - 2 ウイルス製造方法に関する。

【背景技術】

20

【0002】

C y H V - 2 感染症は 1992 年に愛知県で初めて発症して以来、日本のキングヨ養殖場において多大な被害をもたらしている（愛知県庁ホームページ <http://www.pref.aichi.jp/000009518.html>）。さらに、当該感染症による被害は日本のみならず、世界中で発生しており、これまでにキングヨでは米国（非特許文献 1 および 2）、台湾（非特許文献 3）、オーストラリア（非特許文献 4）、ニュージーランド（非特許文献 5）、および英国（非特許文献 6）からの発生報告がなされ、ギベリオブナではハンガリー（非特許文献 7）、チェコ（非特許文献 8）、および中国（非特許文献 9）からの発生報告がなされている。

【0003】

30

C y H V - 2 は G F H N V (Goldfish hematopoietic necrosis virus) とも称されることがあり、感染した魚の造血組織に壊死を起こすことで知られる魚類ヘルペスウイルスの一種である。同じくコイ科の魚類に感染する C y H V - 1 および C y H V - 3 と遺伝学的に近い関係にある（非特許文献 14）。

【0004】

これまで、培養細胞を用いた安定的な C y H V - 2 ウイルスの増殖は困難であるとされてきた。ファットヘッドミノウ由来の F H M 細胞を用いた C y H V - 2 の増殖の報告（非特許文献 10）があるが、当該方法ではウイルスの継代は 4 回までしか行うことができない。また、コイのヒレ由来の K F - 1 細胞を用いた C y H V - 2 の増殖を行った報告（非特許文献 6 および 9）があるが、この方法においても C y H V - 2 の継続的な増殖には成功していない。キングヨのヒレ由来の G F F 細胞を用いて C y H V - 2 を継続して増殖できるとする報告（非特許文献 11）がなされたが、当該報告においては増殖方法が十分に開示されておらず、また、逆に G F F 細胞を用いて C y H V - 2 を増殖させることは困難であるとの報告（非特許文献 12）もあり、当該増殖方法が優れた方法であるかについては議論の余地がある。

40

【0005】

C y H V - 2 感染症は世界規模で多大な被害をもたらしているが、C y H V - 2 を継続的に増殖させることが困難であったこと等に起因して、本感染症に対するワクチン開発の報告はなされていない。C y H V - 2 と遺伝的に近い C y H V - 3 (K H V とも称される) はコイを宿主とし、世界中で大きな被害をもたらした（非特許文献 13）。C y H V -

50

3 感染症に対してはワクチンの開発が試みられたが、現在までに、C y H V - 3 感染症に対する安全で有効なワクチンは普及していない（非特許文献 1 4 および 1 5）。通常 C y H V - 3 感染症に対して腹腔内注射法による不活化ワクチンの投与は有効ではない（非特許文献 1 5）。C y H V - 3 については、不活化ワクチンが有効でないと考えられていたため、弱毒化した生ワクチンの開発が試みられている（非特許文献 1 4 および 1 5）。C y H V - 3 の不活化ワクチンについては、一般的に有効でないと考えられているが、不活化した C y H V - 3 をリポソームに封入し、コイに経口投与することにより C y H V - 3 感染症を一定の割合で防ぐことができたとする報告がある（非特許文献 1 6）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献 1】Groff JM, et al., J Vet Diagn Invest, Vol 10, pages 375-378, 1998

【非特許文献 2】Goodwin AE, et al., J Aquat Anim Health, Vol 18, pages 11-18, 2006

【非特許文献 3】Chang PH, et al., Fish Pathol, Vol 34, pages 209-210, 1999

【非特許文献 4】Stephens FJ, et al., Aust Vet J, Vol 82, pages 167-169, 2004

【非特許文献 5】Hine PM, et al., Surveillance, Vol 33, pages 3-5, 2006

【非特許文献 6】Jeffery KR, et al., J Fish Dis, Vol 30, pages 649-656, 2007

【非特許文献 7】Doszpoly A, et al., Magyar Allatorvosok Lapja, Vol 133, pages 174-181, 2011

【非特許文献 8】Danek T, et al., Dis Aquat Org, Vol 102, pages 87-95, 2012

【非特許文献 9】Wang L, et al., Bull Eur Assoc Fish Path, Vol 32, pages 164-173, 2012

【非特許文献 10】Jung SJ and Miyazaki T, J Fish Dis, Vol 18, pages 211-220, 1995

【非特許文献 11】Li X and Hukuda H, J Shanghai Fisheries Univ, Vol 12, pages 12-18, 2003

【非特許文献 12】Jeffery KR, et al., <http://www.cefas.co.uk/publications/posters/32952web.pdf>, 2006

【非特許文献 13】飯田貴次ら, ウイルス, 第55巻 第1号, pages 145-152, 2005

【非特許文献 14】Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2012, CHAPTER 2.3.6, pages 328-344

【非特許文献 15】Ilouze M, et al., Ecol Res, Vol 26, pages 885-892, 2011

【非特許文献 16】Yasumoto S, et al., Fish Pathol, Vol 41, pages 141-145, 2006

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の課題は、C y H V - 2 感染症に対するワクチンおよびその製造方法を提供し、世界中で大きな被害をもたらしている C y H V - 2 感染症による被害を防ぐことにある。また、ワクチン製造に有用である、C y H V - 2 ウイルスの継続的な増殖方法を提供することも本発明の課題である。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意研究を行い、C y H V - 2 を生体外で継続的に増殖可能な方法を開発した。当該増殖方法においては、培養細胞を使用し、少なくとも 1 2 回の継代培養が可能であることを確認している。

C y H V - 2 の近縁ウイルスである C y H V - 3 では不活化ワクチンは有効でないことが知られていることから、当初、本発明者は、C y H V - 2 不活化ワクチンについても効果を期待していなかった。しかしながら、予想に反し、本発明者は上記方法により増殖さ

10

20

30

40

50

せた CyHV - 2 を用いて不活化 CyHV - 2 ワクチンを作製し、キンギョに摂取させたところ、CyHV - 2 感染症に対する生存率は顕著に改善することが明らかとなった（生存率 0 % から 57 % に改善）。

本発明者は、以上の結果をもとに本発明を完成した。

【0009】

即ち、本発明は以下に関する。

[1] 不活化されたコイ科ヘルペスウイルス - 2 (Cyprinid herpesvirus - 2 : CyHV - 2) を含有する、CyHV - 2 感染症に対するワクチン。

[2] CyHV - 2 がアルデヒドにより不活化されている、[1] に記載のワクチン。

[3] コイ科魚類に投与される、[1] または [2] に記載のワクチン。

[4] コイ科魚類がキンギョである、[3] に記載のワクチン。

[5] 不活化された CyHV - 2 の有効量を対象魚類へ投与することを含む、CyHV - 2 感染症の予防方法。

[6] 不活化された CyHV - 2 の有効量を対象魚類へ投与すること、および当該対照魚類を飼育することを含む、該対象魚類の飼育方法。

[7] 以下工程 (a) ~ (c) を含む、CyHV - 2 ウイルスの製造方法：

(a) コイ科魚類由来の培養細胞を含む細胞培養液に、CyHV - 2 ウイルスを添加する工程；

(b) CyHV - 2 添加後 7 日 ~ 14 日間おきに、培養細胞を分散し、それまで使用していた細胞および培地を 50 % 以上残存させつつ、該残存培地の 1 ~ 2 倍量の新たな培地を加えて継代する工程；および

(c) 継代後、細胞全体の 50 % 以上の細胞が、培養容器の底面に対し接着性を失った際に、CyHV - 2 ウイルスを回収する工程。

[8] 以下工程 (a) ~ (d) を含む、CyHV - 2 感染症に対するワクチンの製造方法：

(a) コイ科魚類由来の培養細胞を含む細胞培養液に、CyHV - 2 ウイルスを添加する工程；

(b) CyHV - 2 添加後 7 日 ~ 14 日間おきに、培養細胞を分散し、それまで使用していた細胞および培地を 50 % 以上残存させつつ、該残存培地の 1 ~ 2 倍量の新たな培地を加えて継代する工程；

(c) 継代後、細胞全体の 50 % 以上の細胞が、培養容器の底面に対し接着性を失った際に、CyHV - 2 ウイルスを回収する工程；および

(d) (c) で回収した CyHV - 2 ウイルスを不活化する工程。

【発明の効果】

【0010】

本発明により、CyHV - 2 感染症に対する有効なワクチンが提供される。さらに、継続的に増殖可能な本発明の CyHV - 2 の製造方法を利用することで、CyHV - 2 感染症用ワクチンを効率的に製造することが可能となる。

本願発明のワクチンはリポソームを使用することなく、腹腔内投与により有効性が認められる。したがって、本願発明のワクチンはリポソームに封入する工程を要さない、非常に簡便に作製及び投与できる CyHV - 2 感染症に有効性のあるワクチンの作製方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図 1】 CyHV - 2 ワクチンの安全性試験の結果を示す図である。無処理、MEM の腹腔内投与 (IP - MEM)、および CyHV - 2 不活化ワクチン腹腔内投与 (IP - ワクチン) の各群につき、15 匹ずつのエドニシキを使用し、各処理後の累積死亡率 (%) を調べた結果を示す。

【図 2】 CyHV - 2 ワクチンの有効性試験の結果を示す図である。図 1 の安全性試験で生存したエドニシキ (無処理 ; 15 匹、IP - MEM ; 15 匹、IP - ワクチン ; 14 匹

10

20

30

40

50

) に対し、不活化処理をしていない CyHV - 2 を感染させ、その後の生存率を調べた結果を示す。

【図3】リウキンをを用いた、CyHV - 2 ワクチンの有効性試験の結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明は、不活化された CyHV - 2 を含有する、CyHV - 2 感染症に対するワクチンを提供する。

CyHV - 2 はヘルペスウイルス科に属するヘルペスウイルスの一種であり、その近縁ウイルスとして CyHV - 1 および CyHV - 3 が知られている。本発明のワクチンに使用され得る CyHV - 2 は、野生型の CyHV - 2 に加え、自然のまたは人工的な変異が導入された CyHV - 2 のバリエーションや亜型をも含み得る。CyHV - 2 としては、CyHV - 2 に感染した魚体から分離したウイルス、または培養細胞を使用して生体外で増殖したウイルスを用いてもよく、好ましくは培養細胞を使用して増殖したウイルスである。

【0013】

CyHV - 2 ウイルスを魚体から回収する場合は、CyHV - 2 の感染により発症又は死亡したコイ科に属する魚、例えば、キンギョ、フナ類等から切除又は摘出した器官から分離できる。かかる器官としては、例えば、脾臓、腎臓、鰓、肝臓、鱭、腸管、心臓等を用いることができる。これらのウイルス分離材料は、例えば、眼科用鋏で細切れにし、これに常用の塩類溶液や培地等、例えば、リン酸緩衝液 (PBS) や MEM 培地を添加してホモジナイザーで磨砕し、約 5 ~ 30 % (W/W) 組織乳剤を調製の後、低速遠心し、その上清又は沈渣組織の再浮遊液をウイルス分離材料としてワクチン製造に用いることができる。なお、かかる材料は膜濾過法により除菌できるし、抗生物質を添加できる。加えて、眼科用鋏で細切れにした組織片を細胞培養用フラスコに定着させ、その定着した組織片より伸張し増殖・分裂した株化細胞も同様にウイルス分離材料としてワクチン製造に用いることができる。

【0014】

CyHV - 2 を生体外で増殖・継代させるために使用し得る培養細胞は、CyHV - 2 が感染することができ、感染細胞内で CyHV - 2 ウイルスが複製可能であれば特に限定されないが、コイ科に属する魚類に由来する培養細胞が好ましい。例として、コイ科魚類由来の種々の初代あるいはその継代培養細胞、株化細胞等が挙げられる。株化細胞としては、GFF細胞、KF - 1細胞、FHM細胞、BF - 2細胞、CHSE - 214細胞、JSKG細胞、KRE - 3細胞、RTG - 2細胞、YTF細胞等の公知の細胞株を挙げることができる。また、独立行政法人水産総合研究センター増殖研究所玉城庁舎にて新たにキンギョのヒレから樹立された SRTF細胞も株化細胞の例として挙げられる。好ましい株化細胞は、GFF細胞、KF - 1細胞、FHM細胞、および SRTF細胞であり、特に好ましいのは GFF細胞、および SRTF細胞である。

【0015】

上記細胞の培養に使用し得る当業者に公知の培地等として、例えば、199培地、MEM (Eagle's Minimum Essential Medium) 培地、BME (Eagle's Basal Medium) 培地、Hanks液、Dulbeccoのリン酸緩衝液 (PBS) 等を使用できる。これらの組成と調製法は、ウイルス実験、細胞培養、組織培養等に関する常用テキスト、例えば、「組織培養の技術」(日本組織培養学会編、朝倉書店1982年発行)や市販製品カタログ等に詳述されている。また、かかる培地や塩類溶液は、添加剤を添加混合し修飾できる。添加剤としては、常用の物質、例えば、市販のヒト血清、ウシ胎児血清 FCS (Fetal Calf Serum)、抗生物質、炭酸水素ナトリウム溶液、塩化ナトリウム、非必須アミノ酸 [大日本住友製薬(株)製] 等から適宜選択し、適量使用できる。例えば、培地 1L 当たり添加混合するこれ等の最終濃度は、血清類は約 3 ~ 25 % (V/V)、炭酸水素ナトリウムは約 1 ~ 6 g、塩化ナトリウムは約 0.1 ~ 0.25 モル、また、非必須アミノ酸は製品カタログに

10

20

30

40

50

記載の標準量が望ましい。

【0016】

ウイルスの増殖・継代において使用できる培養細胞は、1種の細胞に限定されず、ウイルスの増殖・継代の途中でウイルス増殖の可否に基づき変更できる。即ち、1種以上の細胞を組み合わせて使用できる。ウイルスを回収するには、培養液を低速遠心した上清、感染細胞画分を採取し超音波処理した破壊細胞懸濁液、ドライアイスと有機溶媒で凍結融解したウイルスとその感染細胞の浮遊液、かかる浮遊液を低速遠心した上清、その沈渣細胞の再浮遊液等をワクチン原液として用いることができる。なお、かかるワクチン原液は、膜濾過法により除菌できるし、抗生物質も添加できる。

【0017】

また、上記の方法で回収したウイルスは、ショ糖密度勾配を用いる超遠心法により濃縮かつ精製できる。例えば、回収したウイルス液を約10万Gで90分間遠心し、ウイルスを含むその沈降物を適当な塩溶液、例えばトリス-塩化ナトリウム-EDTA緩衝液(TNE)溶液にて再懸濁させ、そのウイルス含有液をショ糖濃度10-60%(W/W)の密度勾配溶液上に重層し、超遠心につけ、ウイルス抗原を沈降させた後、その沈降物を回収し再浮遊液として精製ウイルス抗原を調製できる。この発明において採用できるショ糖濃度は約10~60%(W/W)の範囲にあり、遠心条件は約5万~15万Gで、約60~1000分である。

【0018】

培養細胞を使用して増殖したCyHV-2の好適な例としては、後述する本発明の製造方法により製造したCyHV-2を挙げる事ができる。

【0019】

本発明の一態様において、ワクチン用抗原として、完全ウイルス粒子であるビリオン、不完全ウイルス粒子、ビリオン構成成分とその翻訳後修飾体、感染防御抗原、中和反応のエピトープ等を使用できる。ビリオン構成成分とその翻訳後修飾体としては、例えば、CyHV-2由来のタンパク質、ペプチド、核酸、糖鎖、糖ペプチド、糖タンパク質、脂質、糖脂質、およびこれらの修飾体などであり得、投与対象における免疫応答を惹起することができ、所望の効果をえられるのであれば、ウイルス粒子のどの部分の構成成分であってもよい。当該構成成分は、CyHV-2ウイルスビリオンに由来する天然由来の成分であってもよく、もしくは人工的に合成されたものであってもよい。また、本発明のワクチンは、該構成成分の1つ、または2以上の組み合わせを含み得る。

【0020】

本発明のワクチンに含まれるCyHV-2は不活化ウイルスである。CyHV-2の近縁ウイルスであるCyHV-3については、不活化ウイルスワクチンは有効でないことが当業者に広く知られていたため、CyHV-2に関して不活化ワクチンは有効ではないことが予想された。しかしながら、意外にも、不活化CyHV-2が高いワクチン効果を示すことが本発明者により明らかとなった。

不活化ウイルスの種類としては、ウイルス粒子の構造が保持されたまま不活化された不活化全粒子ウイルス、ウイルス粒子を破壊して不活化された不活化スプリットウイルスを挙げる事ができる。不活化全粒子ウイルスは、-プロピオラクトン、フェノール、アルデヒド(ホルマリン、グルタルアルデヒド等)などの化学処理、紫外線照射、放射線照射、および加温処理などにより得ることができる。また、不活化スプリットウイルスは、エーテル等の化学処理などにより得ることができる。本発明において使用する不活化ウイルスは、抗原性の維持および高いワクチン効果の観点から、アルデヒドにより不活化されたCyHV-2の全粒子であることが望ましい。不活化の方法は、不活化処理の種類や使用する不活化剤により適宜設定することができ、CyHV-2感染症に対するワクチン効果が達成される限り特に限定されないが、一例として、不活化にホルマリンを使用する場合、魚体への安全性を考慮し添加量は最終濃度で0.1~0.3%程度(V/V)、不活化を行う際の温度は4~20℃、不活化処理を行う時間は、24~72時間が挙げられる。不活化により抗原性が損なわれる危険性がある場合には、不活化条件を緩和するための

10

20

30

40

50

創意工夫を要する。かかる緩和は、例えば、不活化剤の減量、中性アミノ酸や塩基性アミノ酸等の添加、不活化温度の低下、不活化時間の短縮等により達成できる。また、不活化工程で残存する遊離ホルムアルデヒドは、必要なら、等量の亜硫酸水素ナトリウムを添加してこれを中和するか、透析により除去できる。本発明では、十分な免疫原性を得るために、不活化全粒子ウイルスを用いることが好ましい。

【0021】

本発明のワクチンを調製するには、有効量の不活化CyHV-2を塩類溶液や培地等、例えば、培地MEMで希釈する。即ち、かかる希釈により、ワクチン中の不活化CyHV-2量が抗体産生に必要な量になるよう調整する。さらにその際、ワクチンの耐熱性を増強する安定化剤や、免疫原性を高める補助剤としてのアジュバントを添加混合できる。例えば、安定化剤として、糖類やアミノ酸類、また、アジュバントとして、鉱物油、植物油、ミョウバン、リン酸アルミニウム、ベントナイト、シリカ、ムラミルジペプチド誘導体、サイモシン、インターロイキン等を利用できる。次いで、適当な容積、例えば、約10~500ml容のバイアルに分注し、密栓・密封の後、ワクチンとして使用に供する。かかるワクチンは、液状のみならず、分注後に凍結乾燥を行うことにより、乾燥製剤として使用に供することができる。なお、調製したワクチン製剤は、使用に供する前に、その品質を保証するため、安全性と有効性に関する検定を行う必要がある。かかる検定は、この発明に係るワクチンと類似の既存製剤、例えば、薬事法（昭和35年法律第145号）に基づく「動物用生物学的製剤基準」に定める「日本脳炎不活化ワクチン」、「狂犬病組織培養不活化ワクチン」等の規程に準拠して行うことができる。

10

20

【0022】

また、本発明のワクチンの調製のためには、不活化CyHV-2をリポソームに封入してもよい。不活化CyHV-3では、リポソームに封入することによりワクチンとしての有効性を見出した報告（非特許文献16）があるため、不活化CyHV-2についても同様の態様によりワクチン効果が認められ得る。しかしながら、一態様において、本発明のワクチンに使用される不活化CyHV-2は、リポソームに封入されていない状態であっても所望の効果を発揮し得る。

【0023】

本発明のワクチンは、CyHV-2に感染する可能性がある任意の齢の魚類に対し使用できる。養魚保全の観点から、幼魚ないしは稚魚への使用が好ましいが成魚に対しても使用可能である。使用法として、例えば、腹腔内、皮下、又は筋肉内接種、浸漬法、経口投与、混餌投与等が可能である。リポソームに封入した不活化CyHV-3ワクチンでは、経口投与以外の投与方法による該ワクチンの有効性は確認されていないため、本発明の好ましい態様において、本発明のワクチンの投与方法は、腹腔内、皮下、又は筋肉内接種、浸漬法等である。使用量は投与対象となる魚の種類、大きさ、齢、投与方法などにより適宜設定する必要があり、例えば接種の場合、上記の抗原量を、1ドーズ約0.05~1.0ml使用が望ましく、浸漬による免疫には飼育水又は低張飼育水でワクチンを約10~100倍に希釈して用いることができる。ワクチンは、凍結しない冷温、例えば、約2~8の冷暗所で保存することができる。

30

【0024】

CyHV-2感染症に罹患した魚は、外観には特徴的な症状が現れないが、行動が不活発になり、水面や池の底で動かなくなる。また著しい貧血を起こすことが知られている。魚体内でのCyHV-2の感染は、鰭、鰓、心臓、腸管、脾臓、脳、腎臓などあらゆる器官で認められる。

40

【0025】

本発明のワクチンの投与対象は、CyHV-2に感染し、上記病態を示す可能性がある魚類である限り特に制限されないが、好ましい投与対象はコイ科魚類であり、より好ましい投与対象はキンギョ、フナ類であり、最も好ましい投与対象はキンギョである。

【0026】

本発明のワクチンの投与対象となり得るキンギョの例としては、ランチュウ、エドニシ

50

キ、サクラニシキ、トサキン、アズマニシキ、ジキンおよびリュウキン等の一般に高級品種と称されるキンギョが挙げられ、好ましくはエドニシキおよびリュウキンである。

【0027】

本発明のワクチンの効果の持続期間は、ワクチンの投与量、投与方法および投与回数など、ならびに投与対象となる魚類の種類、大きさおよび齢などにより異なり得るが、一態様において、本発明のワクチンの効果は、1回の投与で8週間以上持続し得る。

【0028】

本発明は、上記ワクチンを対象魚類へ投与することを含む、CyHV-2感染症の予防方法および対象魚類の飼育方法を提供する。

本発明の予防方法によれば、CyHV-2に感染していない対象魚類に対し、例えば、腹腔内、皮下、又は筋肉内接種、浸漬法、経口投与、混餌投与等により本発明のワクチンを投与することで、CyHV-2感染症に対する抵抗力を付与し、該感染症による病態発症を未然に防ぐことが可能である。また、本発明は、同様の方法により本発明のワクチンを投与することにより、CyHV-2感染症の発症を防ぎながら、または該感染症に罹った魚類を治癒しながら、該魚類を飼育する方法を提供する。当該予防方法および飼育方法における投与は、1または複数回行うことができ、十分な抵抗力を付与する観点から、複数回投与が好ましい。複数回投与では1の投与方法で行う、または複数の投与方法を組み合わせで行うことができる。投与方法としては、腹腔内、皮下、又は筋肉内接種、浸漬法、経口投与、混餌投与等が挙げられる。不活化CyHV-3ワクチンで有効性が確認されていない、腹腔内、皮下、又は筋肉内接種、浸漬法等による投与が特に好ましい。投与間隔は対象魚類の大きさ、種類、齢、飼育環境などにより適宜設定する必要があるが、一例として、キンギョに対し腹腔内投与によりワクチンを投与し、投与後6~12日後に再度ワクチンを投与する方法が挙げられる。対象魚類の齢は、成魚、幼魚、稚魚のいずれであってもよいが、養魚保全の観点から、幼魚または稚魚が好ましい。

【0029】

CyHV-2感染症に対するワクチンを製造・販売する上では、CyHV-2ウイルスを継続的に量産することが可能な方法が求められる。しかし、上述したように、過去の研究から、培養細胞を用いたCyHV-2の継続的な増殖が困難であることが当業者に周知である。従って、CyHV-2ワクチンの産業利用に対する限定要因を取り除く意味でも、培養細胞を用いた継続的なCyHV-2ウイルスの製造方法を開発することは有用である。

【0030】

一実施形態において、本発明はCyHV-2ウイルスの製造方法を提供する。該製造方法は以下の工程を含む：

(a) コイ科魚類由来の培養細胞を含む細胞培養液に、CyHV-2ウイルスを添加する工程；

(b) CyHV-2添加後7日~14日間おきに、培養細胞を分散し、それまで使用していた細胞および培地を50%以上残存させつつ、該残存培地の1~2倍量の新たな培地を加えて継代する工程；および

(c) 継代後、細胞全体の50%以上の細胞が、培養容器の底面に対し接着性を失った際に、CyHV-2ウイルスを回収する工程。

【0031】

本発明のCyHV-2ウイルスの製造方法で使用し得る、コイ科魚類由来の培養細胞は、CyHV-2が感染することができ、感染細胞内でCyHV-2ウイルスが複製可能であれば特に限定されないが、好ましくはGFF細胞、KF-1細胞、FHM細胞、SRTF細胞であり、GFF細胞およびSRTF細胞が最も好ましい。これら細胞の培養に際しては、上記の当業者に公知の培地、添加剤を使用し得る。

上記方法により培養しているコイ科魚類由来の培養細胞の培養液に対し、CyHV-2ウイルスを添加する。ウイルスの添加量はワクチン製造に必要な量のウイルスが得られる限り制限されないが、通常、TCID₅₀の対数値log(TCID₅₀/mL)に換算

10

20

30

40

50

して $10^2 \sim 10^4$ のウイルス液を、培地量の $1/10 \sim 1/20$ 添加する。ウイルス添加時の細胞は、培養容器の底面に接着した状態であっても良いし、定着前の培養液中に分散し、浮遊した状態であっても良い。好ましくは、ウイルス添加時の細胞は分散し、浮遊した状態である。

【0032】

当該製造方法では、CyHV-2ウイルス添加後、7日～14日間おきに細胞を分散して継代する工程を含む。該継代の際には、継代以前に使用していた培地を50%以上残存させ、該残存培地の1～2倍量の新たな培地を添加する。該残存培地には、継代以前に製造されたウイルスが含まれているため、ウイルスのタイターを上げるためには、培地の多くを残存させる当該工程は重要である。故に、例えば、継代以前の培地を50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、99%以上、または100%残存させる工程は、継代以前に産生されたウイルスの多くを残存させる結果をもたらすので、本発明のウイルスの製造方法で採用し得る。

10

【0033】

上記継代を行った後、顕微鏡下で細胞の状態を観察した際に、細胞全体の50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、最も好ましくは80%以上の細胞が培養容器の底面に対し接着性を失っている場合に、CyHV-2ウイルスを回収することができる。継代後7～14日が経過し、次の継代を行うか否かを判断する際に、前記培養容器の底面に接着性を失っている細胞の割合が50%未満であった場合は、上記方法によりさらなる継代を行うことを選択できる。該接着性を失っている細胞は、死細胞または生細胞であり得る。CyHV-2ウイルスの回収では、培地のみ、培養細胞のみ、または培地および培養細胞からウイルスを回収することができる。例えばウイルスは、培養液を低速遠心した上清、感染細胞画分を採取し超音波処理した破壊細胞懸濁液、ドライアイスと有機溶媒で凍結融解したウイルスとその感染細胞の浮遊液、かかる浮遊液を低速遠心した上清、その沈渣細胞の再浮遊液等から回収できる。

20

【0034】

本発明は、上記方法で製造したCyHV-2ウイルスを使用して、CyHV-2感染症に対するワクチンを製造する方法をさらに提供する。当該ワクチン製造方法では、上記方法により製造されたCyHV-2ウイルスを不活化する工程をさらに含む。該不活化は、所望のワクチン効果が得られるのであれば、いかなる方法によっても行い得るが、好ましい実施形態において、該不活化は、 β -プロピオラクトン、フェノール、アルデヒド（ホルマリン、グルタルアルデヒド等）などの化学処理、紫外線照射、放射線照射、および加熱処理などにより行うことができる。また、エーテル等の化学処理などにより、不活化スプリットウイルスとしてワクチンを製造することも可能である。不活化の方法は、不活化処理の種類や使用する不活化剤により適宜設定することができ、CyHV-2感染症に対するワクチン効果が達成される限り特に限定されないが、一例として、不活化にホルマリンを使用する場合、添加量は最終濃度で0.1～0.3%程度（V/V）、不活化を行う際の温度は4～20℃、不活化処理を行う時間は、24～72時間が挙げられる。不活化によりワクチンの抗原性が損なわれる場合には、不活化条件を緩和するための創意工夫を要する。かかる緩和は、例えば、不活化剤の減量、中性アミノ酸や塩基性アミノ酸等の添加、不活化温度の低下、不活化時間の短縮等により達成できる。また、不活化工程で残存する遊離ホルムアルデヒドは、必要なら、等量の亜硫酸水素ナトリウムを添加してこれを中和するか、透析により除去できる。

30

40

【実施例】

【0035】

以下の実施例は、単に本発明をより具体的に例示するためのものであって、本発明の範囲を制限するものではない。

【0036】

(実施例1) 培養細胞を用いたCyHV-2ウイルスの増殖

CyHV-2を増殖させるために、キンギョのヒレ由来の細胞であるGFF細胞(Li a

50

nd Hukuda 非特許文献 14) を元東京海洋大学教授の福田穎穂氏より入手し、使用した。該 G F F 細胞は、10% ウシ胎児血清 (Equitech Bio, Inc.) および抗生物質 (100 U / mL ペニシリンおよび 100 mg / mL ストレプトマイシン (和光純薬工業株式会社)) を添加した MEM 培地中で、25℃ で培養した。

増殖させる元となる CyHV-2 ウイルスは、元東京海洋大学教授の福田穎穂氏から入手した。0.25% トリプシン溶液 (Life technologies™) を使用して、培養中の G F F 細胞を培養フラスコから剥がし、新たな培地を加え、細胞を分散させた後、培養面積 25 cm² の培養フラスコに播種した。該播種した G F F 細胞に上記方法により得られた CyHV-2 (10² TCID₅₀ / mL) を 500 μL 添加し、培養器に静置した。

ウイルス添加から 7 日 ~ 14 日間後、上記と同様の方法で細胞を剥がし分散させた後、それまで使用していた培地をほとんど残存させつつ、既存の培地量の 1 ~ 2 倍量の新たな培地を加え、培養フラスコへ播種した。当該継代は 7 日 ~ 14 日間おきに行った。上記方法により少なくとも 12 回のウイルスの継代、増殖が可能であることを確認した。さらに、G F F 細胞だけでなく、独立行政法人水産総合研究センター増養殖研究所玉城庁舎にて新たにキングヨのヒレから樹立された S R T F 細胞でも同様に CyHV-2 ウイルスの継代が可能であることを確認した。

継代を行った後、毎日顕微鏡下で細胞を観察し、少なくとも 50%、好ましくは 80% 以上の細胞が培養フラスコに接着していなかった場合、細胞および培地を回収し、低速遠心し、その上清をウイルス液として得た。得られたウイルスのタイターは 10^{3.0} TCID₅₀ / mL であった。尚、継代後 7 ~ 14 日が経過したときに、培養フラスコに接着していない細胞の割合が 50% 未満であった場合は、さらなる継代を行った。

【0037】

(実施例 2) CyHV-2 感染症用ワクチンの作製

上記方法により得られた CyHV-2 ウイルス液 (ウイルス力価 10^{3.0} TCID₅₀ / mL に、ホルマリンを最終濃度 0.1% (V/V) となるように添加し、4℃ で 48 時間処理した。

【0038】

(実施例 3) CyHV-2 感染症用ワクチン投与による、CyHV-2 感染後の生存率の改善

まず初めに、上記ワクチンの安全性試験を行った (図 1)。投与対象のキングヨとして CyHV-2 フリーのエドニシキ (独立行政法人水産総合研究センター増養殖研究所玉城庁舎より入手) を使用した。無処理、MEM 腹腔内接種、および CyHV-2 ワクチン (10^{3.0} TCID₅₀ / mL) 腹腔内接種の各区のエドニシキを用意し (それぞれ 15 匹ずつ)、0.1 mL / 尾で腹腔内注射し、その 9 日後に再度同様に注射 (ブースター) した。その後、21 日間死亡の有無を観察したところ、注射針が内臓に刺さり死亡した 1 尾を除き、死亡した個体は認められなかった。従って、本発明の方法により製造されたワクチンの安全性が確認された。

次にワクチンの有効性試験を行った (図 2)。ワクチン作製に用いた同じロットウイルス液である CyHV-2 ウイルス (10^{3.0} TCID₅₀ / mL) を 1000 倍に希釈した液に、上記のワクチン安全性試験で使用したエドニシキを 1 時間浸漬し、CyHV-2 ウイルスを感染させた。その後、各区のエドニシキの死亡の有無を観察した。無処理および MEM 接種の区では、感染後 11 日以内に全てのエドニシキが死亡したのに対し、ワクチン接種をした区では 57% のエドニシキが生存した。Fisher の正確確立検定法により、これらの死亡率を比較した結果、ワクチン処理区とワクチン無処理区の間には p < 0.01% の危険率で有意差が示され、さらに、ワクチンの有効率 (RPS = { 1 - (ワクチン処理区の死亡率 / ワクチン無処理区の死亡率) } × 100) は 57% であった。以上の結果より、本発明のワクチンの有効性が証明された。

【0039】

(実施例 4) リュウキンを用いた、CyHV-2 感染症用ワクチン投与による、CyHV-2 感染後の生存率の改善 (図 3)

試験には増養殖研究所玉城庁舎にて生産したC y H V - 2フリーのリユウキン200尾を供した。供試魚を25尾ずつ8つの水槽に分け、それぞれワクチン区(i)または(ii)；ワクチン+ブースター区(i)または(ii)；無処理区(i)または(ii)；非感染区(i)または(ii)とした。ワクチン区(i)および(ii)、ならびにワクチン+ブースター区(i)および(ii)におけるリユウキンには、実施例1に記載の方法に準じて調製したC y H V - 2ウイルス(ウイルス力価 $10^3 \cdot 0$ TCID₅₀ mL⁻¹)を実施例2の方法に供して作製した、不活化C y H V - 2感染症用ワクチンを腹腔内注射し、免疫した。ワクチン+ブースター区(i)および(ii)には、最初の免疫時から4週間後に再度同じ方法で追加免疫(ブースター)した。初回のワクチン接種から8週間後に、ワクチン作製に用いたものと同じロットウイルス液であるC y H V - 2ウイルス($10^3 \cdot 0$ TCID₅₀ / mL)を1000倍に希釈した液にキンギョを1時間浸漬する方法により、ワクチン区(i)および(ii)、ワクチン+ブースター区(i)および(ii)、ならびに無処理区(i)および(ii)に対しウイルス攻撃試験を実施した。その後、34日間死亡を観察した。非感染区(i)および(ii)については、ワクチン接種およびウイルス攻撃を行わずに飼育し、34日間死亡を観察した。

10

無処理区では平均生存率が34%であったのに対し、ワクチン区及びワクチン+ブースター区ではそれぞれ平均72%及び76%の生存率であった。さらにワクチンの有効率(RPS; $= \{ 1 - (\text{ワクチン処理区の死亡率} / \text{ワクチン未処理区の死亡率}) \} \times 100$)はワクチン区で平均57.6%、ワクチン+ブースター区で平均63.6%であった。

これらのことから、C y H V - 2感染症用ワクチンがリユウキンに対しても有効であること、当該ワクチンの有効期間が8週間以上であることが確かめられた。さらに、ワクチン+ブースター区と無処理区の平均死亡率をt検定法により比較した結果、 $p < 0.05$ %の危険率でこれらの間に有意差が示され、追加免疫によりワクチン効果が向上することが証明された。

20

【産業上の利用可能性】

【0040】

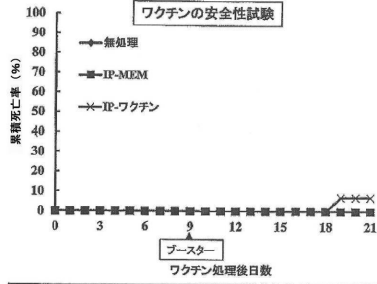
本発明のワクチンにより、多大な被害をもたらすC y H V - 2感染症による被害を防ぐことが可能である。また、本願発明は、C y H V - 2ウイルスの継続的な増殖方法も提供することで、ワクチンの量産を可能にする。

【0041】

本願は日本で出願された特願2013-103124(出願日:2013年5月15日)を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

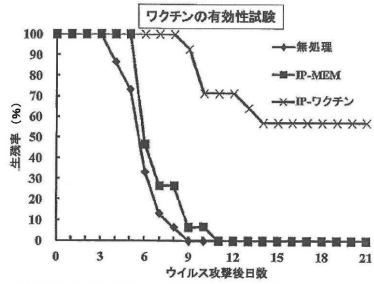
30

【 図 1 】



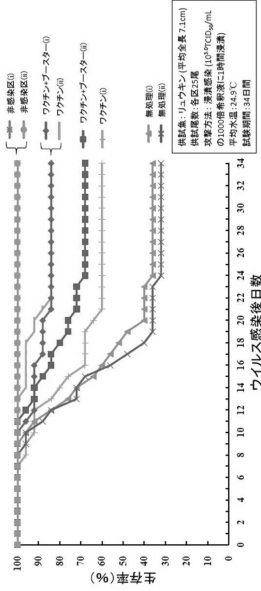
供試魚及び尾数：エドニシキ、各区15尾
 免疫原及び方法：GF細胞を用いて5代継代した、CyHV-2 ($10^{3.0}$ TCID₅₀/ml) の0.1%
 濃度でホルマリン処理した不活化ワクチンを1尾あたり0.1ml腹腔内接種

【 図 2 】



供試魚：ワクチンの安全性試験で生じたエドニシキ、各区15尾密たは14尾
 ウイルス攻撃方法：不活化精のウイルス液の1000倍希釈液に1時間浸漬

【 図 3 】



試験区	試験尾数	死亡率 (%)	平均死亡率 (%)	ワクチン有効率 (%)
ワクチン区(I)	25	40		
ワクチン区(II)	25	6		57.6
ワクチンブースター区(I)	25	16		28
ワクチンブースター区(II)	25	32		24
無処理区(I)	25	64		63.6
無処理区(II)	25	68		66
非感染区(I)	25	0		0
非感染区(II)	25	0		0

フロントページの続き

(74)代理人 100163658

弁理士 小池 順造

(74)代理人 100174296

弁理士 當麻 博文

(72)発明者 伊東 尚史

三重県度会郡玉城町昼田 2 2 4 - 1 独立行政法人水産総合研究センター 増養殖研究所内

審査官 吉田 佳代子

(56)参考文献 特開 2 0 0 7 - 2 2 3 9 1 3 (J P , A)

特表 2 0 0 6 - 5 1 2 0 7 8 (J P , A)

K.R.Jeffery et al. , Isolation of a cyprinid herpesvirus 2 from goldfish, *Carassius auratus*(L.), in the UK. , JOURNAL OF FISH DISEASES , 2 0 0 7 年 , VOL.30 , P.649-656
DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS , 2 0 1 3 年 9 月 3 日 , VOL.105 , P.193-202

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 / 0 0

A 0 1 K 6 1 / 1 3

A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4

A 6 1 P 3 1 / 2 2

C 1 2 N 7 / 0 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

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