

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-510684
(P2025-510684A)

(43)公表日 令和7年4月15日(2025.4.15)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	1/20 (2006.01)	C 1 2 N	1/20	A	4 B 0 6 5
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00	J	4 C 0 7 6
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04	1 7 1	4 C 0 8 5
A 6 1 K	9/12 (2006.01)	A 6 1 K	9/12		4 C 0 8 7
A 6 1 K	35/74 (2015.01)	A 6 1 K	35/74	A	
		審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全63頁)	
(21)出願番号	特願2024-555925(P2024-555925)		(71)出願人	522219098	
(86)(22)出願日	令和5年4月5日(2023.4.5)			ユニバーシティ オブ ジョージア リサ	
(85)翻訳文提出日	令和6年9月19日(2024.9.19)			ーチ ファンデーション, インコーポレ	
(86)国際出願番号	PCT/US2023/017527			ーテッド	
(87)国際公開番号	WO2023/196374			アメリカ合衆国 3 0 6 0 2 ジョージア	
(87)国際公開日	令和5年10月12日(2023.10.12)			州, アセンズ, テレル ホール 1 1 0 ,	
(31)優先権主張番号	63/327,851			エス. ジャクソン ストリート 2 1 0	
(32)優先日	令和4年4月6日(2022.4.6)		(74)代理人	110002572	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			弁理士法人平木国際特許事務所	
(31)優先権主張番号	63/404,226		(72)発明者	ファーガソン・ノエル, ナオラ エム.	
(32)優先日	令和4年9月7日(2022.9.7)			アメリカ合衆国 3 0 6 0 2 ジョージア	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			州, アセンズ, テレル ホール 1 1 0 ,	
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ		F ターム (参考)	4B065 AA37X CA45	
	最終頁に続く			4C076 AA24 BB15 BB16 BB21	
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 マイコプラズマ・ガリセプティカム生ワクチン

(57)【要約】

本発明は、キジ目のトリにおける毒性マイコプラズマ・ガリセプティカム感染予防のためのワクチンとして使用するための、特許指定P T A－1 2 7 1 6 8の下でA T C Cに寄託されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株K 6 0 6 7、特許指定P T A－1 2 7 2 8 2の下でA T C Cに寄託されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株K 4 1 1 0、並びにそれらの子孫及び派生物を提供する。また、キジ目のトリに対する投与のための組成物及び方法も提供される。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株であって、前記単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株が、特許指定 P T A - 1 2 7 1 6 8 の下で A T C C に寄託された K 6 0 6 7 マイコプラズマ・ガリセプティカム株、又はその子孫若しくは派生物を含むか、あるいは特許指定 P T A - 1 2 7 2 8 2 の下で A T C C に寄託された K 4 1 1 0 マイコプラズマ・ガリセプティカム株、並びにその子孫及び派生物を含む、単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株。

【請求項 2】

特許指定 P T A - 1 2 7 1 6 8 の下で A T C C に寄託された K 6 0 6 7 マイコプラズマ・ガリセプティカム株の本質的に生物学的に純粋な培養物。

10

【請求項 3】

特許指定 P T A - 1 2 7 2 8 2 の下で A T C C に寄託された K 4 1 1 0 マイコプラズマ・ガリセプティカム株の本質的に生物学的に純粋な培養物。

【請求項 4】

請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカムを含む、組成物。

【請求項 5】

水を含む、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

20

薬学的に許容される担体を含む、請求項 4 又は 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

アジュバントを含む、請求項 4 ～ 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記組成物が、鼻腔内、眼内、経口、粘膜、筋肉内、皮下、又は卵内投与のために製剤化される、請求項 4 ～ 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

前記組成物が、スプレーイング又はエアロゾル化のために製剤化される、請求項 4 ～ 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 10】

30

請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム、又は請求項 4 ～ 9 のいずれか一項に記載の組成物を含む、ワクチン。

【請求項 11】

前記ワクチンが、家禽におけるマイコプラズマ・ガリセプティカム感染によって誘発される臨床徴候のうちの 1 つ以上を低減する、請求項 10 に記載のワクチン。

【請求項 12】

前記ワクチンが、マイコプラズマ・ガリセプティカムによって誘発される疾患に対するキジ目のトリの感受性を低減する、請求項 10 又は 11 に記載のワクチン。

【請求項 13】

キジ目のトリのための生ワクチンであって、前記ワクチンが、前記トリを、マイコプラズマ・ガリセプティカムによって誘発される疾患から保護するのに十分な量の、特許寄託指定 P T A - 1 2 7 1 6 8 の下で A T C C に寄託された K 6 0 6 7 マイコプラズマ・ガリセプティカム株、又はその子孫若しくは派生物か、あるいは特許指定 P T A - 1 2 7 2 8 2 の下で A T C C に寄託された K 4 1 1 0 マイコプラズマ・ガリセプティカム株、並びにその子孫及び派生物と、薬学的に許容される担体と、を含む、生ワクチン。

40

【請求項 14】

前記単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム、組成物、又はワクチンが、凍結乾燥、フリーズドライ、冷凍されているか、又は発泡錠である、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム、請求項 4 ～ 9 のいずれか一項に記載の組成物、又は請求項 10 ～ 13 のいずれか一項に記載のワクチン。

50

【請求項 15】

請求項 1～3 のいずれか一項に記載の単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム、請求項 4～9 のいずれか一項に記載の組成物、又は請求項 10～13 のいずれか一項に記載のワクチンと、印刷された説明書と、を含むキットであって、前記キットの内容物が、包装材料内に含有されている、キット。

【請求項 16】

トリにおけるマイコプラズマ・ガリセプティカムに対する免疫応答を生成する方法であって、前記方法が、前記トリに、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム、請求項 4～9 のいずれか一項に記載の組成物、又は請求項 10～13 のいずれか一項に記載のワクチンを投与することを含む、方法。

10

【請求項 17】

マイコプラズマ・ガリセプティカムによって誘発される疾患に対するトリの感受性を低減するための方法であって、前記方法が、前記トリに、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム、請求項 4～9 のいずれか一項に記載の組成物、又は請求項 10～13 のいずれか一項に記載のワクチンを投与することを含む、方法。

【請求項 18】

トリをマイコプラズマ・ガリセプティカム感染に対して保護するための方法であって、前記方法が、前記トリに、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム、請求項 4～9 のいずれか一項に記載の組成物、又は請求項 10～13 のいずれか一項に記載のワクチンを投与することを含む、方法。

20

【請求項 19】

トリにおけるマイコプラズマ・ガリセプティカム感染によって誘発される 1 つ以上の臨床徴候を低減する方法であって、前記方法が、前記トリに、有効量の請求項 1～3 のいずれか一項に記載の単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム、請求項 4～9 のいずれか一項に記載の組成物、又は請求項 10～13 のいずれか一項に記載のワクチンを投与することを含む、方法。

【請求項 20】

投与が、鼻腔内、眼内、経口、粘膜、筋肉内、皮下、又は卵内である、請求項 16～19 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 21】

投与が、点眼によるか、エアロゾルによるか、又は飲料水による、請求項 16～19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

前記トリが、キジ目のトリを含む、請求項 16～21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

前記トリが、ニワトリ又はシチメンチョウを含む、請求項 16～22 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

継続出願データ

本出願は、2022 年 4 月 6 日に出願された米国仮特許出願第 63 / 327, 851 号、及び 2022 年 9 月 7 日に出願された米国仮特許出願第 63 / 404, 226 号の利益を主張するものであり、これらは各々参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

マイコプラズマ・ガリセプティカム (MG) は、ニワトリ及びシチメンチョウの感染性呼吸器病原体である。これは、家禽の最も病原性が大きく、また経済的に影響の大きいマイコプラズマ病原体である。枝肉の廃棄処分又は格下げ、飼料効率及び産卵効率の低減、

50

並びに投薬代の増大からの経済的損失は、MGを、世界中の商業家禽生産が直面している最も費用のかかる疾患問題の1つにしている要因である。自発的な監視プログラム、異なる抗生物質での治療、及びワクチン接種などの種々の対策が、マイコプラズマ・ガリセプティカム感染を制御し、家禽産業における経済的損失を減少させるために家禽産業において組み込まれているが、MGは依然として商業家禽産業に対する持続的な挑戦と考えられている。自発的な監視プログラムは効果的な場合があるが、長寿命の群れ（ブリーダー及び産卵鶏）の評価は、特にMGが広く流行しており風土病である地域における淘汰及び隔離の正当化を困難にしている。家禽における抗生物質の使用、特に予防的な飼料使用に対する法的制限の増加、並びにMG感染疾患を制御するために一般的に使用される抗生物質に対する耐性の報告の増加は、異なる抗生物質での治療の選択肢の適用性及び有効性を低下させる。したがって、ワクチン接種が、MG制御のためのなお一層魅力的な選択肢となっている。現在、MGに対して3つの市販の弱毒化生ワクチン（6／85、F株及びts-11）がある。これらの3つのワクチンは全て、安全性及び有効性に関して長所及び短所を有する。したがって、家禽におけるマイコプラズマ・ガリセプティカム感染の制御のための追加の弱毒化生ワクチンの必要性が存在する。

10

【発明の概要】

【0003】

本発明は、単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株を含み、単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株は、特許指定PTA-127168の下でATCCに寄託されたK6067マイコプラズマ・ガリセプティカム株、又はその子孫若しくは派生物である。いくつかの態様では、本発明は、単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株を含む組成物を含む。いくつかの態様では、組成物は、水を含み得る。いくつかの態様では、組成物は、薬学的に許容される担体を含み得る。いくつかの態様では、組成物は、アジュバントを含み得る。いくつかの態様では、組成物は、鼻腔内、眼内、経口、粘膜、筋肉内、皮下、又は卵内投与のために製剤化され得る。いくつかの態様では、組成物は、スプレーイング又はエアロゾル化のために製剤化され得る。

20

【0004】

本発明は、特許指定PTA-127168の下でATCCに寄託されたK6067マイコプラズマ・ガリセプティカム株の本質的に生物学的に純粋な培養物を含む。いくつかの態様では、本発明は、単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株を含む組成物を含む。いくつかの態様では、組成物は、水を含み得る。いくつかの態様では、組成物は、薬学的に許容される担体を含み得る。いくつかの態様では、組成物は、アジュバントを含み得る。いくつかの態様では、組成物は、鼻腔内、眼内、経口、粘膜、筋肉内、皮下、又は卵内投与のために製剤化され得る。いくつかの態様では、組成物は、スプレーイング又はエアロゾル化のために製剤化され得る。

30

【0005】

本発明は、本明細書に記載の特許指定PTA-127168の下でATCCに寄託された、単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株K6067、又はその子孫若しくは派生物、本明細書に記載の特許指定PTA-127168の下でATCCに寄託されたK6067マイコプラズマ・ガリセプティカム株の本質的に生物学的に純粋な培養物、あるいは本明細書に記載の組成物を含むワクチンを含む。いくつかの態様では、ワクチンは、家禽におけるマイコプラズマ・ガリセプティカム感染によって誘発される臨床徴候のうちの1つ以上を低減する。いくつかの態様では、ワクチンは、マイコプラズマ・ガリセプティカムによって誘発される疾患に対するキジ目のトリの感受性を低減する。

40

【0006】

本発明は、キジ目のトリのための生ワクチンであって、本明細書に記載されるように、トリをマイコプラズマ・ガリセプティカムによって誘発される疾患から保護するのに十分な量の、特許寄託指定PTA-127168の下でATCCに寄託されたK6067マイコプラズマ・ガリセプティカム株、又はその子孫若しくは派生物と、薬学的に許容される担体と、を含む、生ワクチンを含む。

50

【0007】

本発明は、単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株を含み、単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株は、特許指定PTA-127282の下でATCCに寄託されたK4110マイコプラズマ・ガリセプティカム株、又はその子孫若しくは派生物である。いくつかの態様では、本発明は、単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株を含む組成物を含む。いくつかの態様では、組成物は、水を含み得る。いくつかの態様では、組成物は、薬学的に許容される担体を含み得る。いくつかの態様では、組成物は、アジュバントを含み得る。いくつかの態様では、組成物は、鼻腔内、眼内、経口、粘膜、筋肉内、皮下、又は卵内投与のために製剤化され得る。いくつかの態様では、組成物は、スプレーイング又はエアロゾル化のために製剤化され得る。

10

【0008】

本発明は、特許指定PTA-127282の下でATCCに寄託されたK4110マイコプラズマ・ガリセプティカム株の本質的に生物学的に純粋な培養物を含む。いくつかの態様では、本発明は、単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株を含む組成物を含む。いくつかの態様では、組成物は、水を含み得る。いくつかの態様では、組成物は、薬学的に許容される担体を含み得る。いくつかの態様では、組成物は、アジュバントを含み得る。いくつかの態様では、組成物は、鼻腔内、眼内、経口、粘膜、筋肉内、皮下、又は卵内投与のために製剤化され得る。いくつかの態様では、組成物は、スプレーイング又はエアロゾル化のために製剤化され得る。

20

【0009】

本発明は、本明細書に記載の特許指定PTA-127282の下でATCCに寄託された、単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株K4110、又はその子孫若しくは派生物、本明細書に記載の特許指定PTA-127282の下でATCCに寄託されたK4110マイコプラズマ・ガリセプティカム株の本質的に生物学的に純粋な培養物、あるいは本明細書に記載の組成物を含むワクチンを含む。いくつかの態様では、ワクチンは、家禽におけるマイコプラズマ・ガリセプティカム感染によって誘発される臨床徴候のうちの1つ以上を低減する。いくつかの態様では、ワクチンは、マイコプラズマ・ガリセプティカムによって誘発される疾患に対するキジ目のトリの感受性を低減する。

30

【0010】

本発明は、キジ目のトリのための生ワクチンであって、本明細書に記載されるように、トリをマイコプラズマ・ガリセプティカムによって誘発される疾患から保護するのに十分な量の、特許寄託指定PTA-127282の下でATCCに寄託されたK4110マイコプラズマ・ガリセプティカム株、又はその子孫若しくは派生物と、薬学的に許容される担体と、を含む、生ワクチンを含む。

【0011】

いくつかの態様では、本明細書に記載の単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株、本明細書に記載の組成物、又は本明細書に記載のワクチンは、凍結乾燥、フリーズドライ、冷凍されているか、又は発泡錠であってもよい。

【0012】

本発明は、本明細書に記載の単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株、本明細書に記載の組成物、又は本明細書に記載のワクチンと、印刷された説明書とを含む、キットを含み、キットの内容物は、包装材料内に含有されている。

40

【0013】

本発明は、トリにおけるマイコプラズマ・ガリセプティカムに対する免疫応答を生成する方法を含み、方法は、本明細書に記載の単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株、本明細書に記載の組成物、又は本明細書に記載のワクチンを投与することを含む。いくつかの態様では、投与は、鼻腔内、眼内、経口、粘膜、筋肉内、皮下、又は卵内である。いくつかの態様では、投与は、点眼によるか、エアロゾルによるか、又は飲料水による。いくつかの態様では、トリは、キジ目のものである。いくつかの態様では、トリは、ニワトリ又はシチメンチョウである。

50

【0014】

本発明は、マイコプラズマ・ガリセプティカムによって誘発される疾患に対するトリの感受性を低減するための方法であって、トリに、本明細書に記載の単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株、本明細書に記載の組成物、又は本明細書に記載のワクチンを投与することを含む、方法を含む。いくつかの態様では、投与は、鼻腔内、眼内、経口、粘膜、筋肉内、皮下、又は卵内である。いくつかの態様では、投与は、点眼によるか、エアロゾルによるか、又は飲料水による。いくつかの態様では、トリは、キジ目のものである。いくつかの態様では、トリは、ニワトリ又はシチメンチョウである。

【0015】

本発明は、トリをマイコプラズマ・ガリセプティカム感染に対して保護するための方法であって、トリに、本明細書に記載の単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株、本明細書に記載の組成物、又は本明細書に記載のワクチンを投与することを含む、方法を含む。いくつかの態様では、投与は、鼻腔内、眼内、経口、粘膜、筋肉内、皮下、又は卵内である。いくつかの態様では、投与は、点眼によるか、エアロゾルによるか、又は飲料水による。いくつかの態様では、トリは、キジ目のものである。いくつかの態様では、トリは、ニワトリ又はシチメンチョウである。

【0016】

本発明は、トリにおけるマイコプラズマ・ガリセプティカム感染によって誘発される1つ以上の臨床徴候を低減する方法であって、トリに、有効量の本明細書に記載の単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株、本明細書に記載の組成物、又は本明細書に記載のワクチンを投与することを含む、方法を含む。いくつかの態様では、投与は、鼻腔内、眼内、経口、粘膜、筋肉内、皮下、又は卵内である。いくつかの態様では、投与は、点眼によるか、エアロゾルによるか、又は飲料水による。いくつかの態様では、トリは、キジ目のものである。いくつかの態様では、トリは、ニワトリ又はシチメンチョウである。

【0017】

本明細書で使用される場合、「単離された」とは、その元の環境（例えば、それが自然に存在する場合は自然環境）から除去された、したがって、「人の手によって」その自然な状態から変化させた材料を指す。

【0018】

「及び／又は」という用語は、列挙された要素のうちの1つ若しくは全て、又は列挙された要素の任意の2つ以上の組み合わせを意味する。

【0019】

「好ましい」及び「好ましくは」という単語は、ある特定の状況下である特定の利益をもたらし得る本発明の実施形態を指す。しかしながら、同じ又は他の状況下では、他の実施形態も好ましい場合がある。更に、1つ以上の好ましい実施形態の列挙は、他の実施形態が有用ではないことを意味するものではなく、また、他の実施形態を本発明の範囲から除外することを意図するものではない。

【0020】

「comprises（を含む）」という用語及びその変形は、これらの用語が本明細書及び特許請求の範囲に現われる場合に限定的な意味を有していない。

【0021】

特に明記されていない限り、「a」、「an」、「the」、及び「少なくとも1つ（at least one）」は、互換的に用いられ、1つ又は複数を意味する。

【0022】

また、本明細書において、終点による数値範囲の列挙は、その範囲内に含まれる全ての数値を含む（例えば、1～5は、1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5などを含む）。

【0023】

別個のステップを含む、本明細書に開示される任意の方法について、ステップは、任意の実現可能な順序で行われ得る。また、必要に応じて、2つ以上のステップの任意の組み

10

20

30

40

50

合わせを同時に行ってもよい。

【0024】

別途示されない限り、本明細書及び特許請求の範囲で使用される成分の量、分子量などを表す全ての数は、全ての例において「約」という用語によって修飾されているものとして理解されるべきである。したがって、別途示されない限り、明細書及び特許請求の範囲に記載の数値パラメータは、本発明によって得ることが求められる所望の特性に応じて変動し得る近似値である。少なくとも、かつ、等価物の見解を特許請求の範囲に限定しようとするものではなく、各数値パラメータは、少なくとも報告された有意な桁の数に照らし合わせて、かつ通常の四捨五入技法を適用することによって解釈されるべきである。

【0025】

本発明の広い範囲を記載する数値範囲及びパラメータは、近似値であるにもかかわらず、特定の例において記載される数値は、できる限り正確に報告される。しかしながら、全ての数値は、それらのそれぞれの試験測定値に見られる標準偏差から必然的に得られる範囲を本質的に含有する。

【0026】

本出願の全体にわたるいくつかの箇所で、例の列挙を通じて指針が提供され、それらの例は様々な組み合わせで使用することができる。いずれの場合も、列挙されるリストは代表的な群としてのみ機能するものであって、排他的なリストとして解釈されるべきではない。特定の例、材料、量、及び手順は、本明細書に記載の本発明の範囲及び趣旨に従って広義に解釈されるべきである。

【0027】

本明細書中の全ての見出しは、読者の便宜のためであり、そのように指定されていない限り、見出しに続くテキストの意味を制限するために使用されるべきではない。

【発明を実施するための形態】

【0028】

細菌マイコプラズマ・ガリセプティカムは、マイコプラズマ属のメンバーである。これは、ニワトリにおける慢性呼吸器疾患、並びにシチメンチョウ、ニワトリ、鴉、ピジョン、及びあらゆる年齢のスズメ目のトリにおける感染性副鼻腔炎の原因物質である。これは世界中で見られ、感染症は、感染性滑膜炎、鳥類マイコプラズマ症、感染性副鼻腔炎、又はマイコプラズマ関節炎と称され得る。マイコプラズマ・ガリセプティカムは、感染したブリーダーから子孫へといくつかの卵内で垂直に（経卵）、並びに感染性エアロゾルを介して、飼料、水、及び環境の汚染を通して、及び媒介物（靴、機器など）上でのヒトの動作を通して水平に伝播される。感染は産卵の低下を引き起こす可能性があるため、経済的に重要である（E l - G a z z a r , “ M y c o p l a s m a g a l l i s e p t i c u m I n f e c t i o n i n P o u l t r y , ” M e r k V e t e r i n a r y M a n u a l , 2 0 2 0 ）。

【0029】

本発明は、免疫原性であり、生製剤として投与されたときに安定している、マイコプラズマ・ガリセプティカム（MG）株K6067、並びにその子孫及び派生物を提供する。本発明はまた、免疫原性であり、生製剤として投与されたときに安定している、マイコプラズマ・ガリセプティカム（MG）株K4110、並びにその子孫及び派生物を提供する。本発明のマイコプラズマ・ガリセプティカムの製剤は、マイコプラズマ・ガリセプティカム感染を阻害するのに安全かつ有効であり、トリにおけるマイコプラズマ・ガリセプティカム感染の疾患の発生率及び重度を低減するのに有用であり得る。

【0030】

マイコプラズマ・ガリセプティカム株K6707は、American Type Culture Collection（ATCC（登録商標））、10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USAにPTA-127168として2021年11月24日に寄託された。この株は、特許手続の目的のための微生物の寄託の国際承認に関するブダペスト条約に従って寄託さ

10

20

30

40

50

れた。PTA-127168としてATCC（登録商標）に寄託されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株K6067は、本明細書において、マイコプラズマ・ガリセプティカム株6067、M.ガリセプティカム株6067、MG株K6067、K6067、MG株K6067 ATCC PTA-127168、K6067 ATCC PTA-127168、MG株K6067 PTA-127168、K6067 PTA-127168、及びATCC（登録商標）PTA-127168とも称される。

【0031】

マイコプラズマ・ガリセプティカム株K4110は、American Type Culture Collection（ATCC（登録商標））、10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USAにPTA-127282として2022年7月20日に寄託された。この株は、特許手続のための微生物の寄託の国際承認に関するブダペスト条約に従って寄託された。PTA-127282としてATCC（登録商標）に寄託されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株K4110は、本明細書において、マイコプラズマ・ガリセプティカム株4110、M.ガリセプティカム株4110、MG株K4110、K4110、MG株K4110 ATCC PTA-127282、K4110 ATCC PTA-127282、MG株K4110 PTA-127282、K4110 PTA-127282、及びATCC（登録商標）PTA-127282とも称される。

【0032】

本発明は、ATCC特許寄託指定PTA-127168の単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム（MG）株K6067を含む。本明細書で使用される場合、「単離された」とは、その元の環境（例えば、それが自然に存在する場合は自然環境）から除去され、したがって、「人の手によって」その自然な状態から変化させた材料を指す。また、ATCC特許寄託指定PTA-127168のマイコプラズマ・ガリセプティカム（MG）株K6067の生物学的に純粋な培養物も含まれる。

【0033】

本発明は、ATCC特許寄託指定PTA-127282の単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム（MG）株K4110を含む。また、ATCC特許寄託指定PTA-127282のマイコプラズマ・ガリセプティカム（MG）株K4110の生物学的に純粋な培養物も含まれる。

【0034】

また、同等又は類似の生物学的、血清学的、及び／又は遺伝的特徴を有する、PTA-127168としてATCC特許寄託指定で寄託されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株K6067の単離された子孫及び単離された派生物も本発明に含まれる。本明細書で使用される場合、血清学的、生物学的、及び遺伝的特徴は、本明細書に含まれる実施例のデータに記載された特徴のうちの1つ以上を含み得る。より具体的には、PTA-127168としてATCCに寄託されたK6067株の子孫又は派生物は、本発明に属する特に好ましい保護特性を保持し得る。PTA-127168としてATCCに寄託されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株K6067の子孫又は派生物は、例えば、トリにおけるインビトロ培養又は戻し継代を含むがこれらに限定されない、当該技術分野で既知のマイコプラズマ・ガリセプティカムを増殖させるための様々な方法のいずれかによって得られ得る。マイコプラズマ・ガリセプティカム株K6067 ATCC PTA-127168の派生物は、寄託されたMG K6067株の遺伝子改変バージョンを含み得る。このような操作には、MG株を変異誘発すること、又は代替タンパク質若しくは非機能タンパク質をコードする遺伝子若しくは遺伝子カセット、又は非コードヌクレオチド配列をMG生物に導入することが含まれるが、これらに限定されない。

【0035】

また、同等又は類似の生物学的、血清学的、及び／又は遺伝的特徴を有する、PTA-127282としてATCC特許寄託指定で寄託されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株K4110の単離された子孫及び単離された派生物も本発明に含まれる。本明細書で

使用される場合、血清学的、生物学的、及び遺伝的特徴は、本明細書に含まれる実施例のデータに記載された特徴のうちの1つ以上を含み得る。より具体的には、PTA-127282としてATCCに寄託されたK4110株の子孫又は派生物は、本発明に属する特に好ましい保護特性を保持し得る。PTA-127282としてATCCに寄託されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株K4110の子孫又は派生物は、例えば、トリのインビトロ培養又は戻し継代を含むがこれらに限定されない、当該技術分野で既知のマイコプラズマ・ガリセプティカムを増殖させるための様々な方法のいずれかによって得られ得る。マイコプラズマ・ガリセプティカム株K411 ATCC PTA-127282の派生物は、寄託されたMG K4110株の遺伝子改変バージョンを含み得る。このような操作には、MG株の変異誘発、又は代替タンパク質若しくは非機能タンパク質をコードする遺伝子若しくは遺伝子カセット、又は非コードヌクレオチド配列をMG生物に導入することが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0036】

本明細書に記載のマイコプラズマ・ガリセプティカム(MG)株K6067分離株、MG株K4110、並びにそれらの子孫及び派生物は、限定されないが、本明細書に含まれる実施例セクションに記載されるもののいずれかを含む、従来の方法によって増殖され得る。例えば、本発明のマイコプラズマ・ガリセプティカム株は、Freyの改変ブロス及び寒天(Ferguson-Noel and Kleven, "Mycoplasma species," In: Williams SM, Dufour-Zavala L, Jackwood MW, Lee MD, Lupiani B, Reed WM, Spackman E, Woolcock PR, editors. A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens. American Association of Avian Pathologists. p. 63-70; 2016)で培養され得る。

20

【0037】

MG株K6067、MG株K4110、並びにこれらの子孫及び派生物は、例えば、種特異的抗体を用いた直接免疫蛍光法、血清プレート凝集試験(SPA)試験、赤血球凝集抑制試験(HI)、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、及びリアルタイム定量PCR(qPCR)(Raviv and Kleven, 2009, Avian Dis; 53:103-107)、全ゲノム配列決定、及び16S-23S rRNA遺伝子間空間領域(IGSR)の標的DNA配列決定(Papazisi et al., 2003, Microbiology; 149:2307-16)及びmgc2シタデシン(Hnatow et al., 1998, Infect Immun; 66:3436-42)を含む多くの既知の技術のいずれかを使用して、他のマイコプラズマ種及び他のM.ガリセプティカム株から同定及び分化され得る。

30

【0038】

マイコプラズマ・ガリセプティカム(MG)株K6067、マイコプラズマ・ガリセプティカム(MG)株K4110、並びに本明細書に記載のそれらの子孫及び派生物は、ニワトリ及びシチメンチョウを含む家禽に弱毒化MG生ワクチンとして投与され得る。自発的な監視プログラム、ワクチン接種及び異なる抗生物質での治療などの種々の対策が、マイコプラズマ・ガリセプティカム(MG)感染を制御し、家禽産業における経済的損失を減少させるために家禽産業において組み込まれているが、MGは依然として商業家禽産業に対する持続的な挑戦と考えられている。自発的な監視プログラムは効果的な場合があるが、長寿命の群れ(ブリーダー及び産卵鶏)の評価は、特にMGが広く流行しており風土病である地域における淘汰及び隔離の正当化を困難にしている。更に、欧州及び米国では、家禽における抗生物質の使用(特に予防的な飼料使用)に対する法的制限の増加(Veterinary Feed Directive Journal. 80 number 106, 2015)、並びにMG感染を制御するために一般的に使用される抗生物質に対する耐性の報告の増加(de Jong et al., 2021, Avian P

40

50

athology: 50 (2): 161-173) は、この選択肢の適用性及び有効性を低下させる。これらの状況では、ワクチン接種が、MG 制御のためのなお一層魅力的な選択肢となっている。

【0039】

現在入手可能な免疫剤としては、細菌ワクチン、弱毒化生ワクチン、及び組換えワクチンが挙げられる。細菌は、感染性又は伝染性ではなく、毒性へ復帰することができないため、いくつかの利点があり (Sasipreeyajan et al., 1987, Avian Dis; 31: 776-81)、細菌は、産卵損失、卵巣退縮、及びMGの卵伝播を低減させることが示されている (Glisson and Kleven, 1985, Avian Dis; 29: 408-15)。しかしながら、細菌は、感染、気管及び気嚢病変に対して非常に限定的な保護を提供する (Talkington and Kleven, 1985, Avian Dis; 29: 998-1003)。筋肉内注射のための労働コスト及びトリの個々の取り扱いがストレスを引き起こす可能性があり、また局所的なワクチン反応のリスクもある。MG組換えワクチンについては、鶏痘ベクターMGワクチンが市販されているが、病原性MG株によって引き起こされる呼吸器病変に対する有効性は、細菌及び弱毒化生ワクチンよりも有意に低いことが報告されている (Ferguson-Noel et al., 2012, Avian Dis; 56: 272-275)。近年、TM-1タンパク質に基づくアデノウイルスベクターMGワクチンが開発されたが、有効性を調査するためには更なる研究が必要である (Dongchao Zhang et al., 2018, Avian Pathology; 42 (2): 213-222)。MG病原性及び免疫において異なる役割を果たすいくつかの遺伝子及び毒性因子 (Yu et al., 2019, Infection and Immunity; 87: e00248-19; Papazisi et al., 2002, Infect Immun; 70: 6839-45、及びIndikova et al., 2014, Vet Res; 45: 99) があり、適切に効果的かつ保護的なMGワクチンを生成するために1つの特定の遺伝子を選択することは困難であり得る。

【0040】

現在、MGに対して6/85、F株及びts-11として3つの市販の弱毒化生ワクチンがある。これらのワクチンは全て、安全性及び有効性に関して長所及び短所を有し、上記の理想的なMGワクチンは、免疫原性であると同時に無毒性であるが、依然として入手しやすく、曝露後の病原性MG株のコロニー形成を防止することができるべきである (Cummins and Kleven, 1986, Avian Dis; 30: 169-71)。6/85ワクチンは非常に安全である (Evans and Hafez, 1992, Avian Dis; 36: 197-201、Ley et al., 1997, Avian Dis; 41: 187-94、及びZaki et al., 2004, Avian Dis; 48: 642-6) が、しかしながら、ワクチンの有効性は高くなく、コロニー形成が弱いことが報告されている (Evans and Hafez, 1992, Avian Dis; 36: 197-201、及びKleven et al., 1998, Avian Dis; 42: 300-6)。加えて、不十分な血清学的応答が、血清学的アッセイでワクチン接種した群れの免疫状態を評価する際に問題を引き起こす可能性がある (Throne Steinlage et al., 2003, Avian Dis; 47: 499-505)。

【0041】

F株は、MG感染を制御するために家禽産業に導入された最初の生ワクチンであり (Yamamoto and Adler, 1958, J Infect Dis; 102: 143-52)、それは現在、市販されている最低の弱毒化MG生ワクチンである。シチメンチョウにおいて病原性であるという報告 (Lin and Kleven, 1982, Avian Dis; 26: 360-4)、ワクチン非接種のトリに伝染性であるという報告 (Kleven, 1981, Avian Dis; 25: 1005-18)、及びそれが群れの中で循環及び戻し継代するときの毒性の増加のリスク (Gharai beh

et al., 2011, Avian Dis; 55: 212-6) のために、F 株の使用は、いくつかの地域（ミネソタ、米国、イスラエル、及び日本など）では許可されていない。しかしながら、F 株は、病原性 MG 株の変位 (Kleven et al., 1990, Avian Dis; 34: 984-90)、並びに気嚢及び気管病変の低減 (Kleven, 1986, Avian Diseases; 30 No. 1: 169-171)、及び毒性 MG 卵伝播の減少 (Glisson and Kleven, 1984, Avian Dis; 28: 406-15) に非常に有効である。F 株と同様に (Kleven, 1998, Poult Sci; 77: 1146-9)、群れの生涯にわたってワクチン接種した気管において持続する他の MG 生ワクチンは、ts-11 である (Whithear et al., 1990, Aust Vet J; 67: 168-74)。このワクチンは、呼吸器病変 (Abdel-Motelib and Kleven, 1993, Avian Dis; 37: 981-7)、産卵損失 (Barbour et al., 2000, Poult Sci; 79: 1730-5)、及び卵巣退縮の予防に有効である (Whithear et al., 1990, IOM Lett; 1: 361-362)。ts-11 は、シチメンチョウにおいて安全に使用できるが、防御免疫を引き出すのに十分に良好に気管をコロニー形成することができない (Whithear et al., 1990, Aust Vet J; 67: 159-65、及び Wijesurendra et al., 2017, Avian Pathol; 1-10; 2017)。また、ts-11 の毒性への復帰もまた報告されている (Armour et al., 2015, Avian Pathol; 44: 296-304)。近年、ts-304, GapA+ts-11 ワクチンが開発された。ワクチンの持続性は依然として ts-11 に類似しており (Condello et al., 2020, Veterinary Microbiology; 251: 108883)、シチメンチョウにおける使用が安全かつ有効であると報告されている (Kanci et al., 2018, Vaccine; 36 (18): 2487-2493)。

10

20

30

40

50

【0042】

本発明は、本明細書に記載の M. ガリセプティカム分離株、並びにその子孫及び派生物の組成物及びワクチンを含む。好ましい実施形態では、M. ガリセプティカム分離株は、生である。いくつかの実施形態では、M. ガリセプティカム分離株は、不活性化又は死滅され得る。本発明の M. ガリセプティカム株、並びにその組成物及びワクチンは、様々な形態のいずれかで使用まで保存され得る。例えば、このような材料は、凍結乾燥又はフリーズドライされ得、使用のために再水和されてもよい。いくつかの実施形態では、M. ガリセプティカム株、又はその組成物若しくはワクチンは、冷凍され得る。

【0043】

いくつかの実施形態では、M. ガリセプティカム分離株、又はその組成物若しくはワクチンは、発泡テーブルとして製剤化され得る。このような発泡錠は、例えば、軽量のアルミニウムブリスター中に包装されてもよい。テーブルは、水中に溶解され、例えば、経口、経鼻、又はエアロゾルスプレーによって投与され、それによって液滴がトリの粘膜を介して入り得る。

【0044】

本発明の組成物及びワクチンは、例えば、水又は培地を含み得る。このような組成物及びワクチンは、1 つ以上の好適な薬学的に許容される担体、安定剤、防腐剤、希釈剤、及び／又は緩衝液を含み得る。好適な安定剤としては、例えば、SPGA、炭水化物（ソルビトール、マンニトール、デンプン、スクロース、デキストリン、若しくはグルコースなど）、又はタンパク質（アルブミン若しくはカゼインなど）が挙げられる。安定剤は、乾燥ワクチン調製物が凍結乾燥によって調製される場合に特に有利である。好適な防腐剤としては、例えば、チメロサル、メルチオレート、及びゲンタマイシンが挙げられる。希釈剤としては、限定されないが、水、水性緩衝液（緩衝食塩水など）、アルコール、及びポリオール（グリセロールなど）が挙げられる。

【0045】

本発明の組成物又はワクチンはまた、アジュバント活性を有する1つ以上の化合物も含み得る。この目的のための好適な化合物又は組成物としては、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、酸化アルミニウム、植物油、動物油、例えば、Bayol F（商標）若しくはMarcol 52（商標）などの鉱油に基づく水中油型若しくは油中水型エマルジョン、完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバント、又はビタミンEアセテートなどの植物油、及びサポニンが挙げられる。

【0046】

本発明の組成物又はワクチンは、家禽に感染する他の病原体に由来する1つ以上の免疫原を更に含む得る。このような免疫原は、例えば、マイコプラズマ・シノビエ（MS）、マレック病ウイルス（MDV）、感染性気管支炎ウイルス（IBV）、ニューカッスル病ウイルス（NDV）、産卵低下症候群（EDS）ウイルス、シチメンチョウ鼻気管炎ウイルス（TRTV）、ポックスウイルス、レオウイルス、ニワトリパルボウイルス、及びトリ腎炎ウイルス（限定されるものではないがANV-1及びANV-2を含む）に由来し得る。

【0047】

本発明の組成物及びワクチンは、実質的に純粋であり得る。本明細書で使用される場合、「実質的に純粋な」とは、通常、天然に存在する巨大分子又は他の生物学的実体を本質的に含まない材料を意味する。

【0048】

本発明の組成物及びワクチンは、限定されるものではないが、家禽、キジ目のトリ、及び外来トリ種を含む、マイコプラズマ・ガリセプティカム感染に感染しやすい様々な鳥類のいずれかのトリに投与され得る。キジ目のトリとしては、限定されるものではないが、ニワトリ、シチメンチョウ、ライチョウ、ウズラ、及びキジが挙げられる。本明細書で使用される場合、家禽としては、その卵を採集するか、又はそれらの肉及び／又は羽毛のために死滅させる目的で飼育される家畜化されたトリが挙げられる。これらは、最も典型的には、キジカモ上目（食用鳥）、特にキジ目（例えば、ニワトリ、ウズラ、シチメンチョウ、及びライチョウが挙げられる）並びに「水鳥」（例えば、アヒル、ガチョウ、及びハクチョウを含む）として一般的に既知のカモ科（ガンカモ目）のメンバーである。家禽としてはまた、その肉のために死滅される、ピジョン若しくはダブ、又は獵鳥とみなされるキジのような他のトリが挙げられ得る。ニワトリとしては、限定されるものではないが、メンドリ、オンドリ、ブロイラー、ロースター、産卵鶏、ブリーダー、種雌鶏の子孫、及び産卵鶏が挙げられる。本明細書で使用される場合、「感染しやすい」という用語は、感染しにくい個体又は群と比較したときの参照微生物に対する有害反応及び／又はマイコプラズマ・ガリセプティカム感染を示す1つ以上の病理学的状態の可能性又は現実性、例えば、活力低減又は成長障害を意味する。

【0049】

本発明の組成物及びワクチンは、例えば、限定されるものではないが、粘膜、鼻腔内、眼内、又は経口投与を含む獣医技術で既知の様々な経路のいずれかによる送達のために製剤化され得る。本発明の組成物及びワクチンは、呼吸粘膜に送達するために製剤化されてもよく、それが直ちに又は最終的にトリの呼吸粘膜と接触するように投与され得る。本発明の組成物又はワクチンは、経鼻、眼科的、点眼による、注射による、飲料水で、飼料で、卵内で、母系的に、呼吸吸入によるなどを含むがこれらに限定されない、家禽に接種する任意の好適な既知の方法によって投与され得る。注射によって投与される場合、免疫原性組成物又はワクチンは、非経口的に投与されてもよい。非経口投与には、例えば、静脈内、皮下、筋肉内、又は腹腔内注射による投与が挙げられる。

【0050】

組成物又はワクチンは、大量投与技術により、例えば、飲料水中にワクチンを入れることによるか、又はスプレーイング又はエアロゾル化により投与されてもよい。組成物は、個体又は群れに溶液をスプレーすることにより投与されてもよく、このようなエアロゾル送達は、小さな液体粒子に組み込まれた組成物の投与を含み得る。このようなスプレー型

粒子は、約10～約100ミクロンの範囲内の液滴サイズ、より好ましくは約<1～約50ミクロンの液滴サイズを有してもよい。小さな粒子の発生のために、従来のスプレー装置及びエアロゾル発生器、例えば、ナップザックスプレー、ハッチェリースプレー、及びアトミストスプレーのための市販のスプレー発生器を使用してもよい。飲料水を介した投与は、従来の装置を用いて実行することができ得る。

【0051】

本発明の組成物又はワクチンは、孵化の前又は後に家禽に投与され得る。卵内ワクチン接種は、例えば、約13日、約14日、約15日、約16日、約17日、約18日、約19日、約20日、又はそれらの任意の範囲で行われ得る。卵内送達の場合、産卵ストック又は繁殖ストックは、例えば約6～12週齢でワクチン接種され、約16～20週齢でブー

10

【0052】

家禽は、本明細書に記載の組成物又はワクチンを様々な年齢で受け得る。孵化後の送達では、材料は、約1～3日齢、孵化の約1週間後、孵化の約2週間後、孵化の約3週間後、孵化の約4週間後、孵化の約5週間後、孵化の約6週間後、又はそれらの任意の範囲を含むがこれらに限定されない、任意の好適な年齢で送達されてもよい。ニワトリは一度だけワクチン接種されてもよい。又は、2回の用量のワクチンを使用する場合、最初のワクチンは、例えば、ニワトリが3日齢～1週齢のとき、続いて更に1～10週間後である。

20

【0053】

ニワトリの生涯を通じて複数回用量の組成物を投与することができる。母子免疫がブロイラー子孫に防御を提供する主要源であるので、典型的には種鶏がワクチン接種されるが、所望によりブロイラー鶏にワクチン接種可能である。

【0054】

本発明の組成物及びワクチンは、指定された濃度のマイコプラズマ・ガリセプティカムを含むように調整され得る。生物は、色変化単位として測定され得る。本明細書において「ccu」とも称されるマイコプラズマ・ガリセプティカムの色変化単位は、例えば、Rodwell and Whitcomb (「In "Methods in Mycoplasmaology," Eds. Razin and Tully, 1993) に記載されるプロトコルを含む、確立された標準技法を使用して定量化することができる。例えば、組成物又はワクチンは、約50、約100、約 1×10^2 ccu/ml、約 2.5×10^2 ccu/ml、約 5×10^2 ccu/ml、約 1×10^3 ccu/ml、約 2.5×10^3 ccu/ml、約 5×10^3 ccu/ml、約 1×10^4 ccu/ml、約 2.5×10^4 ccu/ml、約 5×10^4 ccu/ml、約 1×10^5 ccu/ml、約 2.5×10^5 ccu/ml、約 5×10^5 ccu/ml、約 1×10^6 ccu/ml、約 2.5×10^6 ccu/ml、約 5×10^6 ccu/ml、約 1×10^7 ccu/ml、約 2.5×10^7 ccu/ml、約 5×10^7 ccu/ml、約 1×10^8 ccu/ml、約 2.5×10^8 ccu/ml、約 5×10^8 ccu/ml、約 1×10^9 ccu/ml、約 2.5×10^9 ccu/ml、又は約 5×10^9 ccu/mlの濃度を有してもよく、それらの任意の範囲（例えば、約 1×10^5 ccu/ml～約 1×10^6 ccu/ml）の濃度を使用してもよい。いくつかの用途では、有効量が、トリ1羽に対して1滴（トリごと片目当たり）投与され得る。1滴は、約0.05ml～0.1mlであり得る。

30

40

【0055】

本発明のマイコプラズマ・ガリセプティカム株は、トリに投与されて、マイコプラズマ

50

・ガリセプティカム感染に対する感受性を低減し得る。このような投与では、材料は、マイコプラズマ・ガリセプティカムを示す有意な臨床徴候又は病変をもたらさない。したがって、投与によってMS疾患を示す有意な臨床徴候又は病変をもたらさない、免疫学的材料を提供することが本発明の目的である。低毒性の免疫学的材料を提供することが、別の目的である。

【0056】

本発明は、家禽における抗MG免疫応答を生成する方法を含み、方法は、本明細書に記載のマイコプラズマ・ガリセプティカム株、組成物、又はワクチンを投与することを含む。いくつかの態様では、免疫は、体液性免疫及び／又は細胞性免疫を含む。体液性応答では、抗MS抗体は、例えば、血清プレート凝集試験（SPA）試験（例えば、市販の抗原（Charles River Laboratories International, Inc., Wilmington, MA）を使用して）、赤血球凝集抑制試験（HI）試験、及び酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）試験（例えば、市販のキット（IDEXX, Westbrook, Maine）を使用して）によって測定され得る。SPA及びHI試験手順は、Ferguson-Noel et al. (Ferguson-Noel, N., and S. H. Kleven *Mycoplasma species. In: A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens*, Sixth ed. S. M. Williams, L. Dufour-Zavala, M. W. Jackwood, M. D. Lee, B. Lupiani, W. M. Reed, E. Spackman and P. R. Woolcock, eds. American Association of Avian Pathologists. pp63-70. 2016) により詳細に記載される。いくつかの態様では、免疫は、粘膜免疫を含む。

【0057】

本発明は、家禽におけるMG感染を低減、阻害、又は予防する方法を含み、方法は、本明細書に記載の単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株、組成物、又はワクチンを投与することを含む。本明細書に記載の単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株、組成物、又はワクチンの投与は、感染性MGの疾患発現のうちの1つ以上を含む、更なるMG感染によるチャレンジの疾患発現のうちの1つ以上の低減、阻害、又は予防をもたらし得る。このような臨床徴候及び症状には、例えば、呼吸促迫、気管ラ音、呼吸困難、咳、くしゃみ、鼻汁、まぶたの腫れ、眼漏、視覚障害、結膜炎、眼の周りの起泡、眼窩下洞の腫れ、副鼻腔炎、カタル性副鼻腔炎、気管炎、気囊炎、肺炎、脚の問題、発育阻止、うつ状態、体重減少、食欲不振、低成長、孵化低減、雛の生存率低減、羽毛異常、低生産性、飼料効率の低減、体重増加の低減、産卵低下、処理時の廃棄処分、及び／又は死亡率の増加のうちの1つ以上が挙げられる。

【0058】

本発明はまた、本明細書に記載のマイコプラズマ・ガリセプティカム株K6067及び／又はその子孫若しくは派生物を含むキットを提供する。キットは、本発明のマイコプラズマ・ガリセプティカムで充填された1つ以上の容器を含んでもよい。マイコプラズマ・ガリセプティカム株K6067株は、凍結乾燥され得る。

【0059】

本発明はまた、本明細書に記載のマイコプラズマ・ガリセプティカム株K4110及び／又はその子孫若しくは派生物を含むキットを提供する。キットは、本発明のマイコプラズマ・ガリセプティカムで充填された1つ以上の容器を含んでもよい。マイコプラズマ・ガリセプティカム株K4110株は、凍結乾燥され得る。

【0060】

キットは、マイコプラズマ・ガリセプティカムの他の株又は家禽の他の病原体の追加の別個の容器を含んでもよい。加えて、キットは、緩衝液などの他の試薬を含み得、本発明を実施するために必要な溶液も含まれる。任意選択的にこのような容器（複数可）に関連

付けられるのは、通知又は印刷された説明書であり得る。本発明のキットは、「包装材料」を含み得る。本明細書で使用される場合、「包装材料」という用語は、キットの内容物を収容するために使用される1つ以上の物理的構造を指す。包装材料は、周知の方法によって、好ましくは無菌で汚染物質のない環境を提供するために構築される。包装材料は、固体マトリックス、又はガラス、プラスチック、紙、箔などの材料であり得る。したがって、例えば、パッケージは、c c u量のマイコプラズマ・ガリセプティカム株K 6 0 6 7又はマイコプラズマ・ガリセプティカム株K 4 1 1 0を含有するために使用されるガラス又はプラスチックバイアルであり得る。

【0061】

本発明の例示的な実施形態は、以下のものを含むが、それらに限定されない。

1. 単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株が、特許指定P T A-1 2 7 1 6 8の下でA T C Cに寄託されたK 6 0 6 7マイコプラズマ・ガリセプティカム株、又はその子孫若しくは派生物である、単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株。
2. 特許指定P T A-1 2 7 1 6 8の下でA T C Cに寄託されたK 6 0 6 7マイコプラズマ・ガリセプティカム株の本質的に生物学的に純粋な培養物。
3. 単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株が、特許指定P T A-1 2 7 2 8 2の下でA T C Cに寄託されたK 4 1 1 0マイコプラズマ・ガリセプティカム株、又はその子孫若しくは派生物である、単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム株。
4. 特許指定P T A-1 2 7 2 8 2の下でA T C Cに寄託されたK 4 1 1 0マイコプラズマ・ガリセプティカム株の本質的に生物学的に純粋な培養物。
5. 実施形態1～4のいずれか1つに記載の単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカムを含む、組成物。
6. 水を含む、実施形態5に記載の組成物。
7. 薬学的に許容される担体を含む、実施形態5に記載の組成物。
8. アジュバントを含む、実施形態5～7のいずれか1つに記載の組成物。
9. 組成物が、鼻腔内、眼内、経口、粘膜、筋肉内、皮下、又は卵内投与のために製剤化される、実施形態5～8のいずれか1つに記載の組成物。
10. 組成物が、スプレーイング又はエアロゾル化のために製剤化される、実施形態5～9のいずれか1つに記載の組成物。
11. 実施形態1～4のいずれか1つに記載の単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム、又は実施形態5～10のいずれか1つに記載の組成物を含む、ワクチン。
12. ワクチンが、家禽におけるマイコプラズマ・ガリセプティカム感染によって誘発される臨床徴候のうちの1つ以上を低減する、実施形態11に記載のワクチン。
13. ワクチンが、マイコプラズマ・ガリセプティカムによって誘発される疾患に対するキジ目のトリの感受性を低減する、実施形態11又は12に記載のワクチン。
14. キジ目のトリのための生ワクチンであって、ワクチンが、トリを、マイコプラズマ・ガリセプティカムによって誘発される疾患から保護するのに十分な量の、特許寄託指定P T A-1 2 7 1 6 8の下でA T C Cに寄託されたK 6 0 6 7マイコプラズマ・ガリセプティカム株、又はその子孫若しくは派生物と、薬学的に許容される担体と、を含む、生ワクチン。
15. キジ目のトリのための生ワクチンであって、トリを、マイコプラズマ・ガリセプティカムによって誘発される疾患から保護するのに十分な量の、特許寄託指定P T A-1 2 7 2 8 2の下でA T C Cに寄託されたK 4 1 1 0マイコプラズマ・ガリセプティカム株、又はその子孫若しくは派生物と、薬学的に許容される担体と、を含む、生ワクチン。
16. 単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム、組成物、又はワクチンが、凍結乾燥、フリーズドライ、冷凍されているか、又は発泡錠である、実施形態1～15のいずれか1つに記載の単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム、組成物、又はワクチン。
17. 実施形態1～16のいずれか1つに記載の単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム、組成物、又はワクチンと、印刷された説明書と、含むキットであって、キットの内容物が、包装材料内に含有されている、キット。

10

20

30

40

50

18. 実施形態1～16のいずれか1つに記載の単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム、組成物、又はワクチンを含む、発泡錠。

19. トリにおけるマイコプラズマ・ガリセプティカムに対する免疫応答を生成する方法であって、トリに、実施形態1～16のいずれか1つに記載の単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム、組成物、又はワクチンを投与することを含む、方法。

20. マイコプラズマ・ガリセプティカムによって誘発される疾病に対するトリの感受性を低減するための方法であって、トリに、実施形態1～16のいずれか1つに記載の単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム、組成物、又はワクチンを投与することを含む、方法。

21. トリをマイコプラズマ・ガリセプティカム感染に対して保護するための方法であって、トリに、実施形態1～16のいずれか1つに記載の単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム、組成物、又はワクチンを投与することを含む、方法。

22. トリにおけるマイコプラズマ・ガリセプティカム感染によって誘発される1つ以上の臨床徴候を低減する方法であって、トリに、有効量の実施形態1～16のいずれか1つに記載の単離されたマイコプラズマ・ガリセプティカム、組成物、又はワクチンを投与することを含む、方法。

23. 投与が、鼻腔内、眼内、経口、粘膜、筋肉内、皮下、又は卵内である、実施形態19～22のいずれか1つに記載の方法。

24. 投与が、点眼によるか、エアロゾルによるか、又は飲料水による、実施形態19～22のいずれか1つに記載の方法。

25. トリが、キジ目のトリを含む、実施形態19～24のいずれか1つに記載の方法。

26. トリが、ニワトリ又はシチメンチョウを含む、実施形態19～25のいずれか1つに記載の方法。

【0062】

本発明は、以下の実施例によって例示される。特定の実施例、材料、量、及び手順は、本明細書に記載の本発明の範囲及び趣旨に従って広義に解釈されるものと理解されるべきである。

【実施例】

【0063】

実施例1

ニワトリ及びシチメンチョウにおける生ワクチンとしてのマイコプラズマ・ガリセプティカム株の評価

10個のマイコプラズマ・ガリセプティカム(MG)分離株を、症例及びPoultry Diagnostic and Research Center(PDRC)における分離株リザーバからの標的配列決定結果の分析に基づいて選択した。分離株の安全性をシチメンチョウにおいて評価し、2つの分離株(K4110A及びK6067)を、剖検において臨床徴候又は肉眼的病変を示さない気管のコロニー形成の成功に基づいて選択した(治験1及び2)。治験3では、両方の分離株の安全性及び有効性をニワトリにおいて評価し、SPFニワトリを4週齢において点眼を介してワクチン接種し、R株を使用して、ワクチン接種の4週間後にエアロゾルを介してニワトリをチャレンジした。ワクチン候補を接種した両方の群は、陰性対照と比較して病変に有意な差を示さず、候補がニワトリにおいて安全であることを示した。また、ワクチン接種群は両方とも、チャレンジ後に有意に低い病変を有し、有効なワクチンがあることを示した。更なる調査を実施して、各候補に必要な最も保護的な投与経路及び用量を決定した。K6067及びK4110Aの両方に対する最低保護用量50%は、点眼投与経路を介した 10^4-10^5 c.c.u./mLであった(治験4及び5)。結論として、研究の結果によると、治験6では垂直伝播は検出されず、これらの初期研究が、これらがシチメンチョウ及びニワトリにおいて安全かつ有効であることを示すため、K6067及びK4110Aの両方は潜在的な生ワクチン候補を有する。

【0064】

材料及び方法

MG株及び分離株

10個のワクチン候補（表1）を、自然に弱毒化された（臨床徴候又は死亡率の症例なし）という表示、並びに迅速かつ一貫したインビトロ成長率を含む基準に基づいて、Poultry Diagnostic and Research Center (University of Georgia, Athens, GA) におけるMG培養物リポジトリから選択した。16S-23S rRNA遺伝子間空間領域 (IGSR) (Papazisi et al., 2003, Microbiology; 149: 2307-16) 及びmgc2シタデシン (Hnatow et al., 1998, Infect Immun; 66: 3436-42) 遺伝子の標的DNA配列決定結果をPDRC MG配列データベースと比較して、市販のワクチンに非常に類似した分離株を避けた (Ferguson et al., 2005, Microbiology; 151: 1883-1893)。配列の分析及び比較は、NCBI Blast (Johnson et al., 2008, Nucleic Acids Research; 36 (suppl 2): W5-W9) 及びMegAlign Software (Lasergene package, DNASTar, Inc., Madison, WI) を用いて実施した。インビトロ継代後の遺伝的安定性を評価し、公に入手可能又はPDRCのマイコプラズマ研究所の全ゲノムライブラリで入手可能なMGゲノム配列と全ゲノム配列を比較するために、候補の低（約10p）継代及び高（約50p）継代の両方で全ゲノム配列決定を行う。全ゲノム分析のために選択された分離株については、DNAをFreyの改変ブロス中で増殖させた後に抽出し、細胞を13,000xgで3分間遠心分離し、上清を捨て、細胞ペレットを200µlのリン酸緩衝食塩水 (pH=7) 中で再構成した。ゲノムDNAは、QIAGEN DNEASY (登録商標) Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Valencia, CA) 又はPromega WIZARD (登録商標) Genomic DNA精製キット (Promega, Madison, Wisconsin) を使用して、製造業者の推奨に従って抽出した。Illuminaベースの配列決定 (Illumina, San Diego, California) をNovogene (Sacramento, CA) において行った。分離株の包括的ゲノム分析 (新規アセンブリ及びアノテーションを含む) を、PATRIC (Wattam et al., 2017, Nucleic Acids Res; 45: D535-D542) で行った。分離株の全ゲノムを、PATRICのSimilar Genome Finder and Phylogenetic Tree Builderツールを使用して、確立されたワクチン及び実験室株と比較した。

【0065】

シチメンチョウにおける10個の候補の予備スクリーニング後、K4110A及びK6067を、ニワトリにおける安全性及び有効性（治験3）、各々の最も保護的かつ有効な用量及び投与経路（治験4及び5）、並びに各々の潜在的な垂直伝播（治験6）に関して更に評価した。MGの病原性株としてよく記載されるR株 (Rodriguez and Kleven, 1980, Avian Dis; 24: 800-7) を、陽性対照群として、ワクチン接種された、又はナイーブなトリをチャレンジするのに使用した。エアロゾル経路及び点眼経路は、トリに接種するために使用される2つの投与経路であり、前者では、市販のペイントスプレーヤ (PREVAL (登録商標) Sprayer Division, Precision Valve Corporation, Yonkers, NY) を使用して、1mLの活発に増殖する培養物をエアロゾル化し、後者では、100µlの活発に増殖する培養物を眼に投与した。

【0066】

血清学

血清を分析して体液性免疫系の刺激を確認し、抗MG抗体の存在を、市販の抗原 (Charles River Laboratories, North Franklin, CT) を使用した血清プレート凝集 (SPA)、A5969株及びニワトリの赤血球 (R

10

20

30

40

50

BC) から調製された抗原を使用した赤血球凝集抑制 (HI) 試験、及び市販のキット (IDEXX、Westbrook, ME; Biocheck、Scarborough, ME) を使用した酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) によって評価した。前述の手順 (Kleven SH, "Mycoplasmosis," In: Dufour-Zavala L, Swayne DE, Glisson JR, Pearson JE, Reed WM, Jackwood MW, Woolcock PR, editors. A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens, Fifth Edition. American Association of Avian Pathologists. p. 59-64; 2008) を使用して、SPA 及び HI 試験を実施し、スコア ≥ 1 は SPA で陽性とみなされ、HI では、 $1:20$ の力価が疑とみなされ、 $\geq 1:40$ の力価が陽性とみなされた。ELISA については、試料／陽性 (S/P) 比 ≥ 0.5 が陽性とみなされた。

10

【0067】

マイコプラズマの単離及び同定

綿スワブを気管、口蓋裂及び気囊から採取し、Frey の改変ブロス及び寒天中に接種した (Ferguson-Noel and Kleven, "Mycoplasma species," In: Williams SM, Dufour-Zavala L, Jackwood MW, Lee MD, Lupiani B, Reed WM, Spackman E, Woolcock PR, editors. A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens. American Association of Avian Pathologists. p. 63-70; 2016)。

20

【0068】

治験 1 及び 2 について、試料をまた、改変 PPLO ブロス及び寒天中に接種した (Ferguson-Noel and Kleven, "Mycoplasma species," In: Williams SM, Dufour-Zavala L, Jackwood MW, Lee MD, Lupiani B, Reed WM, Spackman E, Woolcock PR, editors. A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens. American Association of Avian Pathologists. p. 63-70; 2016) (マイコプラズマ種の存在についてトリをスクリーニングする場合接種前に)。全ての培養物を 37°C でインキュベートし、4 週間後にブロスチューブ又は寒天プレート中の増殖が認められなかった場合に、培養物はマイコプラズマで陰性とみなされた。直接免疫蛍光法を使用して、マイコプラズマ分離株を同定した (Talkington and Kleven, 1983, Avian Dis; 27: 422-9)。

30

【0069】

qPCR 及びコロニー形成率の計算

MG 及び MS、並びに MM 及び MI の特異的検出のためのリアルタイム定量 PCR (qPCR) 手順を、前述のプロトコル (Raviv and Kleven, 1983, Avian Dis; 53: 103-7、及び Callison et al., 2006, Avian Dis; 50: 537-44) を使用して実行した。qPCR を実施して、剖検で収集された気管試料中に存在する MG のゲノムコピー数を推定した。加えて、病原性チャレンジ株のコロニー形成を制御する際のこれらの 2 つのワクチン候補の有効性を評価するために、R 株、K4110A 及び K6067 に対して株特異的 qPCR を実施した。治験中に気管スワブを採取し、剖検では、個々のトリの上部気管部分を剖検で 10 ml の無菌 PBS 中に収集し、後で DNA 抽出した。ゲノム DNA を、製造者の推奨に従って、MAGMAX (商標) Express-96 Magnetic Particle

40

50

Processors (Thermo Fisher Scientific) 上で、MAG-BIND (登録商標) Blood及びTissue DNA HDQ 96キット (Omega Bio-tek, Inc., Norcross, GA) を使用して、200 μ l の喉頭洗浄及び気管スワブから抽出した。Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を使用してリアルタイムPCRを実施し、サイクル閾値 (Ct) ≤ 39 を陽性とみなした。アッセイを定量的にするために、標準DNA対照としてゲノム標的を含有するプラスミドを構築した。定量的ためのDNA対照及び標準曲線の構築に使用される手順は、他の場所で詳細に記載されている (Raviv et al., 2008, Vet Microbiol; 129:179-87)。

10

【0070】

病変の評価

Kleven (Kleven et al., 1972, Avian Dis; 16: 915-24、及びKleven et al., 1975, Avian Dis; 19: 126-35) によって記載されたスコア化システムを使用して、肉眼的気嚢病変を0~4の尺度でスコア化した。気管病変を、気管粘膜の幅を測定することによって顕微鏡的に評価した。気管の上方3分の1の部分 (喉頭から約1インチ遠位) を10%の中性ホルマリン中に固定した。気管粘膜の厚さは、気管の断面の組織学的スライド上の4つの等間隔点で測定した (Whithear, 1996, Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 15: 1527-1553)。その他の剖検所見も記録した。

20

【0071】

動物の飼育及び使用

これらの実験における動物手順は全て、Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Georgia, Athens, GAによって承認された。これらの研究における全てのトリに、飼料及び水を自由に提供し、二酸化炭素で安楽死させた。

【0072】

統計分析

一元配置ANOVAを用いて、ニワトリからの気嚢病変及びM. ガリセプティカム単離を分析した。平均気管粘膜厚さ、MG DNAゲノムコピー数log10、SPAスコア、S/P比、HI力価、受精率、及びメンドリ週産卵率を、テューキー・クレマーの高有意差検定 (Minitab 17 Statistical Software. [コンピューターソフトウェア]. State College, PA: Minitab, Inc. (www.minitab.com). 2010) を使用して分析した。p値 ≤ 0.05 を有意とみなした。

30

【0073】

実験の設計

治験1及び2 (シチメンチョウの安全性1及び2)

治験1及び2は、同じ実験の設計を有し、各治験において、5つの候補が含まれ、2つの治験にわたって合計10個のワクチン候補が評価された。これらの治験の各々について、42羽のシチメンチョウ家禽を、MG及びMSを含まないことが既知である供給源から1日齢で取得し、2つのアイソレーターに収容した。2週齢 (WOA) において、シチメンチョウに乱数を用いて (www.randomlists.com) 脚にバンドを付け、各々6羽の家禽の7つの治療群 (7つのアイソレーター) に無作為に割り当てた。処置群に分布する10羽のシチメンチョウを、培養物、気管試料の定量ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR)、及びその時点での血清中のマイコプラズマ抗体の存在についてスクリーニングした。3WOAにおいて、シチメンチョウをそのそれぞれの処置でエアロゾルを介して接種するか、又は未接種のままにした (陰性対照群) (表2及び3)。5WOAにおいて、全てのトリを剖検し、肉眼的気嚢病変スコア化、血清学、気管組織病理学、及び気管洗浄のMG特異的qPCRによって評価した。

40

50

【0074】

治験3（ニワトリの安全性及び有効性）

125日齢のSPF雛を、MG及びMSを有しないことが既知である供給源から取得し、松削りくずとともに1つのペン（1.5×3m²）に収容した。3WOAにおいて、雛を無作為に羽にバンドを付け、4つの処置群に割り当てた。15羽のニワトリ（処置群間に分布）を、培養物、気管試料のMG及びマイコプラズマ滑膜炎qPCR、並びに血清学によってマイコプラズマ種の存在についてスクリーニングした。4WOAにおいて、ニワトリにそれぞれの処置（B、C、D、K6067、K4110A又はR株）をエアロゾルを介して接種したか、又は以下の表4に詳述されるように、陰性対照群としてワクチン未接種のままにした。群B及びCの5羽のニワトリを接種せず、5WOAにおいてワクチン接種したトリと混合した。混合の19日後（8WOA）において、これらの10羽の接触トリを剖検し、評価した。ワクチン接種の4週間後において、各々群B、C及びDからの10羽のニワトリをエアロゾルを介してR株で直接チャレンジした。残りのワクチン接種されたトリをこれらのトリと混合し、10羽のナীবなトリを、ワクチン未接種のエアロゾルチャレンジ群（接触チャレンジ）と直接接触させた。10WOAにおいて、全てのトリを剖検し、肉眼的気嚢病変スコア化、血清学、気管組織病理学、並びに気管洗浄のMG qPCR、及び株特異的qPCRによって評価した。

10

【0075】

治験4（用量応答1）

84日齢のSPF雛を、MG及びMSを含まないことが既知である供給源から取得した。2WOAにおいて、雛の羽にバンドを付け、24個のアイソレーター中の12個の処置群に無作為に割り当てた（表5）。10羽の雛（処置群間に分布）を、培養物、気管試料のMG及びマイコプラズマ滑膜炎qPCR、並びに血清学によってマイコプラズマ種の存在についてスクリーニングした。3WOAにおいて、群C～Gのニワトリに、点眼を介してK6067をワクチン接種し、群H～Lのニワトリに、エアロゾルを介してK6067をワクチン接種した。表5に示されるように、群は、異なる用量のワクチン候補を受けた。群A及びBは、それぞれ陰性対照及びチャレンジのみの群としてワクチン未接種のままにした。ワクチン接種の1週間後に、培養物及びMG qPCRのために、全ての群から口蓋裂及び気管スワブを採取した。ワクチン接種の2週間後に、84羽全てのニワトリを採血し、MG血清学的検査、培養物、及びMG qPCRについてスワブした。ワクチン接種の4週間後及び7WOAにおいて、群B～Lのニワトリを、エアロゾルを介してR株でチャレンジした。9WOAにおいて、全てのトリを剖検し、肉眼的気嚢病変スコア化、血清学、口蓋裂及び気嚢培養、気管組織病理学、並びに気管洗浄のMG及び株特異的qPCRによって評価した。最低感染用量50（MID50）及び最低保護用量50（MPD50）を、サンプリング及び剖検の結果に基づいて計算した（Cottley et al., 2001, Current Protocols in Immunology; 42:19-11）。

20

30

【0076】

治験5（用量応答2）

79日齢のSPF雛を、MG及びMSを含まないことが既知である供給源から取得した。3WOAにおいて、雛の羽にバンドを付け、19個のアイソレーター中の7個の処置群に無作為に割り当てた（表6）。10羽の雛（処置群間に分布）を、培養物、気管試料のMG及びマイコプラズマ滑膜炎qPCR、並びに血清学によってマイコプラズマ種の存在についてスクリーニングした。3WOAにおいて、群C～Gのニワトリに、点眼を介して異なる用量のワクチン候補K4110Aをワクチン接種した。群A及びBは、それぞれ陰性対照及びチャレンジのみのグループとしてワクチン未接種のままにした。ワクチン接種の1週間後に、培養物及びMG qPCRのために、全ての群から口蓋裂及び気管スワブを採取した。ワクチン接種の2週間後に、79羽全てのニワトリを採血し、MG血清学的検査、培養、及びMG qPCRについてスワブした。ワクチン接種の4週間後及び7WOAにおいて、群B～Gのニワトリを、エアロゾルを介してR株でチャレンジした。9

40

50

WOA（チャレンジの2週間後）において、全てのトリを剖検し、肉眼的気嚢病変スコア化、血清学、口蓋裂及び気嚢培養、気管組織病理学、並びに気管洗浄のMG及び株特異的qPCRによって評価した。手順の実験の設計及び具体的な日付は表6に詳述する。

【0077】

最低感染用量50（MID50）及び最低保護用量50（MPD50）を、サンプリング及び剖検の結果に基づいて計算した（Cottey et al., 2001, Current Protocols in Immunology; 42:19-11）。

【0078】

治験6（垂直伝播）

144羽の4週齢のSPFニワトリ（131羽の雌及び18羽の雄）を取得し、松削りくずとともに4つのペン（1.5×3m²）に収容した。19WOAにおいて、ニワトリをコロニーハウスに移し、5つの群に無作為に割り当てた（表7）。16羽のニワトリ（処置群間に分布）を、23WOAにおいて、培養物、気管試料のMG及びマイコプラズマ滑膜炎qPCR、並びに血清学によってマイコプラズマ種の存在についてスクリーニングした。25WOAにおいて、ニワトリに点眼を介してそれぞれの処置（K6067、K4110A、F株、又はR株）を接種したか、又は陰性対照群として未接種のままにした。28WOAにおける接種の3週間後、MG qPCRを、陰性対照群、群Aの5羽のトリ、及び各群B～Eの10羽のトリから口蓋裂スワブに対して実施した。卵を、接種の1週間前（24WOA）から31WOAまで毎日収集し、インキュベーションを開始するまで4℃で維持した。月曜日を除く平日の産卵は土曜日に設定し、土曜日、日曜日、月曜日の産卵は月曜日に設定した。各セットの卵を、胚形成の7、9、11、13、及び15日（DOE）にキャンディングした。無精卵又は早期死胚（7DOE未満）を廃棄し、9、11、13、及び15DOEにおける任意の死胚卵の卵黄嚢をサンプリングし、培養のために改変Freyのプロスに接種した。残りの全ての胚形成卵を18DOEで培養のためにサンプリングした。

【0079】

加えて、HI及びELISA（IDEXX, Westbrook, Marine）アッセイを最後の卵セットの卵黄嚢試料に対して実施した（National Poultry Improvement Plan, “Procedures for preparing egg yolk samples for diagnostic tests,” National Poultry Improvement Plan Program Standards, 23-24; 2017）。卵黄についてNPPIPによって推奨される標準的な手順を使用して、試料を調製し、試験を実施した（National Poultry Improvement Plan, “Procedures for preparing egg yolk samples for diagnostic tests,” National Poultry Improvement Plan Program Standards, 23-24; 2017）。HI試験手順は、Ferguson-Noel et al.（Ferguson-Noel and Kleven, “Mycoplasma species,” In: Williams SM, Dufour-Zavala L, Jackwood MW, Lee MD, Lupiani B, Reed WM, Spackman E. Woolcock PR, editors. A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens. American Association of Avian Pathologists. p. 63-70; 2016）に記載された通りであった。産卵期間中の全ての群について、受精率及びメンドリ週生産率を含む産卵パラメータも記録した。16セットの卵について全ての群の受精率は、7DOE後の受精卵の数をインキュベートした卵の総数で割り、これに100を掛けて計算した（Lin and Kleven, 1982, Avian Dis; 26:487-95）。産卵数を21～31WOAから記録し、メンドリ週産卵率についても週当たりの産卵の総数をメ

10

20

30

40

50

ンドリの総数で割り、これに100を掛けて計算した。

【0080】

31WOAにおいて、全てのトリを剖検し、肉眼的気嚢病変スコア化、血清学、口蓋裂及び気嚢培養、気管組織病理学、並びに気管洗浄のMG qPCR卵管スワブによって評価した。

【0081】

結果

治験1（シチメンチョウの安全性1）

2WOAにおいて事前接種を試験した全てのトリは、MG、MM、及びMS抗体で陰性であり、また、qPCRによっても、MG、MS、MM、及びMIで陰性であった。また、全ての培養物は、その時点でマイコプラズマ種で陰性であった。MG抗体は、全ての接種群で検出され、治験1の血清学的結果を表8に要約する。最も弱い抗体応答は、分離株K6837を接種した群Eであった。気嚢病変が観察されなかった唯一の群は陰性対照群であったが、K6067（群B）及びK6837（群E）を接種した群は、陽性対照（群G）よりも有意に低い平均気嚢病変スコアを有した（ $P \leq 0.05$ ）。最も高い平均気管粘膜厚さ測定値は、群D及びFにおいてであった。陽性対照（R株、群G）よりも低い平均測定値を有する唯一の接種群に、K6067（群B）及びK6837（群E）を接種した。qPCR結果は、全ての接種群がMGに感染しており、群E（K6837接種）を除いて、MGが気管内で高レベルで複製されていたことを示した。群E（K6837を接種）及び群B（K6067を接種）からの2つの気嚢培養物を除いて、接種群からマイコプラズマを全ての培養物（気管及び気嚢）から回収した（表9）。治験中に死亡率はなかったが、観察された臨床徴候を表10に要約する。群B（K6067を接種）及び群E（K6837を接種）のトリにおいて、呼吸器臨床徴候は観察されなかった。

【0082】

治験2（シチメンチョウの安全性2）

3WOAにおいて事前接種を試験した10羽の全てのトリは、MG、MM、及びMS抗体で陰性であり、また、qPCRによっても、MG、MS、MI、及びMMで陰性であった。全ての培養物もマイコプラズマ種で陰性であった。MG抗体は、全ての接種群で検出され、最も弱い抗体応答は、K4110Aを接種した群Cにおいてであった（表11）。これは、平均気嚢病変スコアと一致していた。気嚢病変が観察されなかった唯一の群は、陰性対照群であった。しかしながら、K4110A（群C）及びK4179（群B）を接種した群は、陽性対照（群G）よりも低い平均気嚢病変スコアを有した。平均気嚢病変スコアの群B（3.5）と陽性対照（3.7）との間の差は有意ではなかった（ $P \leq 0.05$ ）。最も高い平均気管粘膜厚さ測定値は、群B及びFにおいてであった。陽性対照（群G）よりも低い平均測定値の接種群はなかった。qPCR結果は、全ての接種群がMGに感染し、MGが気管内で高レベルで複製されていたことを示した。これらの結果はまた、K4110A接種は有意な病変をもたらさなかったが（ $P \leq 0.05$ ）、トリが感染してMGを複製したことを示した。マイコプラズマは、気管及び気嚢の両方から、接種群の全ての培養物から回収された。これらの結果を表12に要約する。治験中に死亡率はなかったが、観察された臨床徴候を表13に要約する。群C（K4110Aを接種）及び群F（K6836Aを接種）トリにおいて、呼吸器臨床徴候は観察されなかった。

【0083】

治験3（ニワトリの安全性及び有効性）

2WOAにおいて事前接種を試験した15羽のトリは、MG及びMS抗体で陰性であり、また、qPCRによってもMG及びMSで陰性であった。また、全ての培養物は、マイコプラズマ種の事前接種で陰性であった。本治験では、ニワトリにおけるワクチン候補の安全性の評価（剖検1）、ワクチン候補の水平伝播の可能性の評価（剖検2）、及びチャレンジ後のワクチン候補の有効性の評価（剖検3）を目的として、3つの剖検を実施した。

【0084】

10

20

30

40

50

剖検 1（安全性）。MG 抗体は、全ての接種群で検出されたが、ワクチン候補を接種した群における抗体応答は、陽性対照（R 株）と比較して弱かった。群 B（K 6 0 6 7）及び C（K 4 1 1 0 A）の平均 SPA スコアは、群 D（R 株）のスコアより有意に低かった（ $P \leq 0.05$ ）。これらの血清学的結果の概要を表 1 4 に示す。陽性対照群を除く全ての群は、接種の 1 4 日後に気嚢病変を有せず、これらの差は統計的に有意であった（ $P \leq 0.05$ ）。群間の平均気管粘膜厚さに有意差はなかった（ $P \leq 0.0$ ）。しかし、陽性対照（R 株）は、接種の 1 4 日後における全ての接種されたトリの気管から数値的に高い MG が単離されたが、R 株群の 1 0 0 % からの MG 単離と比較して、ワクチン候補群の気嚢から MG は単離されなかった。qPCR 結果は、全ての分離株がそれらの群でトリをコロニー形成したが、K 6 0 6 7 及び R 株を接種した群と比較して、K 4 1 1 0 A では有意に低いゲノムコピー（MCN log 10）があったことを示した（ $P \leq 0.05$ ）。これらの結果の要約を表 1 5 に示す。

10

【0085】

剖検 2（接触への水平伝播）。混合の 1 9 日後に、ワクチン接種されたトリと直接接触させたトリには低レベルの感染があった（K 6 0 6 7 では 5 羽中 2 羽、K 4 1 1 0 A では 5 羽中 1 羽が気管からの単離によって検出された）。群間では、血清学的応答（表 1 6）、気嚢病変又は気管粘膜厚さ（表 1 7）に有意差はなかった。

【0086】

剖検 3（有効性－エアロゾル及び接触チャレンジ）。ワクチン候補を接種した群は、R 株のチャレンジの 1 4 日後に強い血清学的応答を示した（表 1 8 に示す）。表 1 9 から分かるように、ワクチン接種群はまた、チャレンジ後に有意に低い平均気嚢病変スコアを有した（ $P \leq 0.05$ ）。陰性対照と陽性対照との間であっても、気管測定値（表 2 1）に関して有意差はなかったが（ $P \leq 0.05$ ）、陽性対照は最も高い平均測定をもたらした。qPCR 結果を、表 2 0 に要約する。qPCR 結果は、K 6 0 6 7 群が、K 4 1 1 0 A 群と比較して、その気管において高い平均ゲノムコピー数 log 10 を有したことを示す。また、ワクチン接種群の気管において検出された MG の大部分が、両方のワクチン候補のチャレンジ株ではなくワクチン株であったことも明らかである。両方のワクチンが、ワクチン接種群における R 株特異的 qPCR について有意に低い MCN log 10 を有するチャレンジ株でコロニー形成を予防することができたように思われた（ $P \leq 0.05$ ）。接触チャレンジ群については、ワクチン非接種の接触トリへの R 株の一部の伝播があり、単離結果から、これらの接触トリの少なくとも 7 0 %（7 / 1 0）が R 株に感染していたが、チャレンジトリとの接触によって R 株に曝露されたワクチン接種トリのいずれもチャレンジ株に感染していなかったと推測することができる（R 株の qPCR 結果から）。

20

30

【0087】

治験 4（用量応答 1）

2 WOA において事前接種を試験した 1 0 羽の全てのトリは、MG 及び MS 抗体で陰性であり、また、qPCR によっても MG 及び MS で陰性であった。また、このとき、全ての培養物は、マイコプラズマ種でも陰性であった。4 WOA（ワクチン接種の 1 週間後）におけるサンプリングからの所見の概要を表 2 2 に示す。群 E、F 及び G の全ての培養物（それぞれ、点眼を介した用量 10^3 、 10^4 、及び 10^5 CCU / mL）は、マイコプラズマ種で陽性であった。他の群では、群 D（点眼を介した 10^2 CCU / mL）、J 及び K（エアロゾルを介した 10^5 及び 10^6 CCU / mL）の各々の 1 つの試料のみが陽性であった。qPCR 結果はまた、K 6 0 6 7 による群 E、F、及び G においてのみ、ある程度の MG コロニー形成を示した。

40

【0088】

6 WOA（ワクチン接種の 3 週間後）におけるサンプリング結果を表 2 3 及び 2 4 に示す。群 E、F、及び G の全ての培養物は、この場合もマイコプラズマで陽性であり、群 J 及び K から各々 1 つの試料、並びに群 D の 2 つの試料は陽性、残りは全て陰性であった。MG のコロニー形成はまた、気管スワブ上で qPCR を実施することによって評価され、群 D、E、F 及び G はある程度のコロニー形成を示し、群 F（点眼を介した 10^4 CCU

50

／mL)はコロニー形成率が100%であった。血清学の場合、血清プレート凝集(SPA)試験は、群D～G、J及びKにおけるいくつかの抗体応答を示したが、赤血球凝集抑制試験(HI)及び酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)試験により、群F及びGにおいては、ほとんど陽性でなかった。ワクチン接種の6週間後(R株によるチャレンジの2週間後)において、MG抗体は、全ての接種群(B～G)において検出された(表25及び26)。群E～G(これらは全て、初期サンプリングにおいて気管にK6067コロニー形成を示した)の平均SPAスコアは、群B(チャレンジのみの群)と比較して低かった。陰性対照群(群A)を除く全ての群は、毒性チャレンジの後にある程度のレベルの気嚢病変を有したが、群D、E、F、G、J、K及びLの平均気嚢病変スコアは、チャレンジのみの群(群B)よりも低かった。それらのうち、群E、F及びGの平均スコアは、他のワクチン接種群及びチャレンジ群と比較して有意に低かった($P \leq 0.05$)。群D、E、F、G、J及びKの平均気管粘膜厚さ測定値は、チャレンジのみの群と比較して低く、群E、F及びGにおいて差は有意であった($P \leq 0.05$)(表27)。

10

【0089】

表28に要約するqPCR結果は、全ての接種群が感染し、MGが気管内で複製していたことを示した。これらの群E、F及びG(点眼を介した最高用量のK6067をワクチン接種された)の平均コロニー形成率は、チャレンジのみの群(群B)を含む他の群よりも有意に低かった($P \leq 0.05$)。また、群D、J及びKの平均コロニー形成率は、群Bよりも低かった。株特異的qPCR結果は、群に対してMG qPCRと相関していた(表28)。マイコプラズマを、群Jの2羽のトリを除いて、R株チャレンジ後の接種群からの全ての口蓋裂培養物から回収した。気嚢培養物については、マイコプラズマを、エアロゾルを介してワクチン接種された全ての群の気嚢から回収した(群H～L)。点眼を介してワクチン接種した群で、群C、D及びGの全てのトリ、群Eの3羽のトリ、及び群Fの5羽のトリからマイコプラズマを単離した(表27)。K6067のMID50は、全ての用量及び両方の投与経路についてのワクチン接種の1週間及び3週間後のサンプリングのqPCR及び培養結果に基づいて計算した。qPCR結果ではMID50は計算できなかったが、点眼経路を介してワクチン接種された群の培養結果のMID50は、ワクチン接種の1週間後で $10^{3.8} \text{ CCU/mL}$ 、ワクチン接種の3週間後で $10^{3.53} \text{ CCU/mL}$ であった。エアロゾル経路を介してワクチン接種された群の培養結果からMID50を計算することはできなかった(表29)。

20

30

【0090】

加えて、K6067のMPD50は、剖検で記録された気嚢スコア及び気管厚さ測定値に基づいても計算された。エアロゾルを介してワクチン接種された群の気嚢スコア及び気管厚さ測定値のいずれでもMPD50を計算することはできなかったが、点眼を介してワクチン接種された群のMPD50は、気嚢スコアで 10^4 CCU/mL 、気管厚さ測定値で $10^{3.3} \text{ CCU/mL}$ であった(表30)。

【0091】

治験5(用量応答2)

2WOAにおいて事前接種を試験した10羽の全てのトリは、MG及びMS抗体で陰性であり、また、qPCRによってもMG及びMSで陰性であった。また、全ての培養物は、その時点でマイコプラズマ種で陰性であった。4WOA(ワクチン接種の1週間後)におけるサンプリングからの所見の概要を表31に示す。群Cからの13個の培養物のうち10個及び群D～Gからの全ての培養物は、マイコプラズマで陽性であった。qPCR結果はまた、K4110Aを接種した全ての群におけるある程度のレベルのMGコロニー形成を示し、群F及びG(最も高いワクチン用量を受けた群)は、陰性対照よりも有意に高い平均ゲノムコピー数($\text{MCN log } 10$)を有する($P < 0.05$)。

40

【0092】

6WOA(ワクチン接種の3週間後)におけるサンプリングからの結果を表32及び33に要約する。接種群の全ての培養物(群Cの2羽のトリを除く)は、マイコプラズマで陽性であった。ある程度のレベルのコロニー形成が全ての接種群において検出され、群E

50

、F及びGは、陰性対照よりも有意に高い平均ゲノムコピー数（ $MCN \log 10$ ）を有する（ $P < 0.05$ ）。血清学に関しては、HI及びELISA検査と比較して、SPA検査でより多くの陽性試料が見られた。群C（最低用量のワクチンを接種された）のSPAスコアは、他の接種群よりも有意に低かった（ $P < 0.05$ ）。群Cはまた、ELISA及びHI検査でも陽性結果を有しなかった。

【0093】

9WOA（ワクチン接種の6週間後及びR株でのチャレンジの2週間後）において、全ての接種群においてセロコンバージョンが観察された。群C～Gの平均SPAスコアは、群B（チャレンジのみの群）と比較して低かった。しかしながら、これらの群からのs/p比及びHI力価は全て、群Bよりも高かった（表34）。群A（陰性対照）及びFを除く全ての群は、いくつかの気嚢病変を有した。しかしながら、全てのワクチン接種群の平均気嚢病変スコアは、群B（チャレンジのみの対照）よりも有意に低かった（ $P < 0.05$ ）（表35）。全てのワクチン接種群の平均気管粘膜厚さ測定値は、チャレンジのみの群（群B）と比較して有意に低かった（ $P < 0.05$ ）。マイコプラズマは、全てのワクチン接種されたチャレンジ群の全ての口蓋裂培養物から、並びに群Dの2羽及び群Fの1羽を除いた全てのワクチン接種されたチャレンジの全てのトリの気嚢から単離された。

【0094】

MG qPCR及び株特異的qPCR結果を表36に要約する。気管内で検出されたR株平均ゲノムコピー数（ $MCN \log 10$ ）は、ワクチン接種群と比較して、チャレンジのみの群において有意に高かった（ $P < 0.05$ ）。K4110A特異的qPCRは、群C（最低ワクチン接種用量）のワクチン株の $MCN \log 10$ が他のワクチン接種群よりも有意に低いものの、ワクチン候補が全てのK4110Aワクチン接種群の気管をコロニー形成したことを示した。群Gを除いて、ワクチン接種群からの気嚢培養物においてK4110Aは検出されなかった（表36）。全ての用量についてワクチン接種の1～3週間後のqPCR及び培養結果に基づいて、K4110AのMID50を計算した（表37）。培養結果ではMID50は見られなかったが、点眼経路を介してワクチン接種された群のqPCR結果のMID50は、ワクチン接種の1週間後で $10^{5.3} \text{ CCU/mL}$ 、ワクチン接種の3週間後で $10^{5.2} \text{ CCU/mL}$ であった。

【0095】

K4110AのMPD50もまた、平均気嚢スコア剖検に基づいて計算され、 $10^{3.7} \text{ CCU/mL}$ であった。（表38）。ワクチン接種群の気管厚さ測定値のMPD50は計算できなかった。

【0096】

治験6（垂直伝播）

23WOAにおいて事前接種を試験した16羽の全てのトリは、MG及びMS抗体で陰性であり、また、qPCRによってもMG及びMSで陰性であった。また、全ての培養物は、その時点でマイコプラズマ種で陰性であった。

【0097】

合計4436個の卵を試験したが、いずれもマイコプラズマで陽性ではなかった。しかしながら、卵黄試料におけるHI及びELISAの結果は、抗体の胚への移行を示した（表39）。群C（K4110A）D（F株）及びE（R株）については、いくつかの陽性MG ELISA結果があったが、MG HIにおいては、群C群及びEのみが陽性であった。B群卵黄試料は、HI又はELISAのいずれによっても陽性ではなかった。16セットの卵の全ての群の受精率及びメンドリ週生産平均を表40に示す。群間で有意差はなかった（ $P < 0.05$ ）。

【0098】

剖検時の血清学的結果の概要を表41に示す。全ての接種群でMG抗体が検出された。群B（K6067）のHI力価及びELISAのS/P比は他の接種群よりも有意に低かったが（ $P < 0.05$ ）、接種群のSPAスコアで有意な差は認められなかった。

【0099】

10

20

30

40

50

2つのワクチン候補及びF株を接種した群における平均気嚢病変は、群E（R株）よりも有意に低かった（表42） $P < 0.05$ ）。最も高い平均気管粘膜厚さ測定値は、R株を接種した群Eにおいてであった。気管病変に関して、両方のワクチン候補（群B及びC）及びF株を接種した群（群D）は、陽性対照よりも有意に低い平均測定値を有した（群E～R株） $P < 0.05$ ）。気管洗浄試料のMG-qPCR結果は、全ての接種群がMGに感染しており、MGが気管内で複製していたことを示した。これらの結果は、両方のワクチン候補を接種した群の気管におけるMGコロニー形成率が、F株及びR株を接種した群よりも高かったことを示した。卵管スワブのいずれも、MG-qPCRで陽性ではなかった。マイコプラズマを、群Cからの1羽のトリ及び群Dからの別のトリを除く、全ての接種群の全ての口蓋裂培養物から回収した（表42）。両方の陰性試料は、qPCR及び気嚢培養において陽性であったトリからのものであった。全てのワクチン接種群における陽性の気嚢培養物の数は、群E（R株を接種）よりも有意に低かった。

10

【0100】

考察

ワクチン候補に対する我々の初期基準を満たした10個のMG分離株を、治験1及び2において最初にシチメンチョウに投与した。シチメンチョウから回収された分離株を選択し、並びにシチメンチョウで最初の安全性治験を実施するための理論的根拠は、一般に、シチメンチョウはニワトリと比較してMGに感染しやすく、重度に疾患の影響を受けやすいという事実に基づいていた。この研究の全体的な目標は、シチメンチョウ及びニワトリの両方で有効かつ安全である弱毒化MG生ワクチン候補を開発することであった。ある程度の自然弱毒化を有するワクチン候補は、毒性株よりも有望な候補であると考えられた。2つのシチメンチョウ治験からの結果（臨床徴候、気嚢及び気管病変）の分析は、これらの分離株が（ある程度）自然に弱毒化している証拠を示したため、更なる研究のためのK6067及びK4110Aの選択につながった。治験1（K6837）において、他の接種群と比較して最も弱い抗体応答及び低レベルの病変をもたらした別の分離株があった。しかしながら、この分離株の接種力価（ 10^6 CCU/mL）は、他の分離株の接種力価（ 10^8 CCU/mL）よりも比較的ずっと低く、qPCR結果に基づいて、この分離株はシチメンチョウ並びに他のMG分離株をコロニー形成しなかったようである。K6837は、堅牢なインビトロ増殖の最小要件を満たしたが、この治験のために選択された分離株の増殖が最も遅く、この分離株は、治験1からの結果が分離株の低力価（及び低コロニー形成率）又は低毒性に起因するかどうかを決定するために更なる研究を必要とする。

20

30

【0101】

治験1の結果は、K6067接種が有意な病変をもたらさなかったが、シチメンチョウは感染し、MGを複製した（保護免疫応答を生成するための要件）ことを示す。6/85が気管を不十分にコロニー形成していることが示されており、これはF株及びts-11と比較して説明され得る（16、29）。気嚢培養結果はまた、本治験では、K6067が他のMG分離株ほど侵襲的ではない可能性があることを示した。同様に、治験（シチメンチョウの安全性2）では、K4110Aはシチメンチョウに感染することができたが、重度の臨床徴候又は病変をもたらさなかった。残りの治験は全てニワトリで行われたが、この家禽種における有効性及び他のパラメータを調査するためには、シチメンチョウにおける更なる研究が必要である。

40

【0102】

治験3では、2つの選択された候補を、ニワトリにおける安全性（水平伝播の可能性を含む）及び有効性について評価した。この治験の最初の部分では、両方のワクチン候補がニワトリにおける安全性の要件を満たしていると判定され、分離株は呼吸器系をコロニー形成し、全身抗体応答を生成したが、エアロゾルによるK6067又はK4110Aの投与後に臨床徴候はなく、気嚢病変もなかった。この治験では、K6067は、K4110Aと比較して気管試料においてより高いレベルで存在したが、これは、投与されたK4110Aのわずかに低い用量（ 10^7 CCU/mL対 10^8 CCU/mL）に起因する可能性がある。安全性の別の態様－水平伝播のリスクを、ワクチン接種トリとナイーブとの接

50

触を混合することによって評価した。接触には感染のいくつかのエビデンスがあったが、トリは14日間のみ混合されたため、結論が出る前にワクチン候補の伝染性をより徹底的に調査する必要がある。ワクチン候補の有効性に関して、MG R株での毒性チャレンジに続くこの治験の結果は、両方の候補がニワトリにおいて保護免疫を誘発したことを示した。ワクチン接種されたトリは、エアロゾルでチャレンジされたトリに対するワクチン未接種の対照と比較して、有意に低い平均気嚢スコアを有した。

【0103】

この治験では、群間で気管粘膜測定値に有意差はなかったが、これは、エアロゾルチャレンジトリ及び接触チャレンジトリからの組み合わせデータに起因する可能性が高い。接触チャレンジトリは、ワクチン接種されていない対照群においても重度の病変を有しなかった。このチャレンジ方法は、一般に、高い病変スコアを有する強いチャレンジをもたらすとは予想されないが、qPCR結果は、ワクチン候補が、チャレンジ株に対する感染及びコロニー形成を予防（接触感染で）又は低減（直接エアロゾルチャレンジで）することができたことを示す。これらの予備結果を確認するためには、これらの候補の有効性の更なる調査（市販ワクチンとの直接比較を含む）を行う必要がある。しかしながら、治験4及び5の結果は、ワクチン候補が、点眼経路によって投与された場合に、市販のワクチンと同等の最低感染用量及び保護用量を有することを示す。点眼を介した 10^3 CCU/mLの範囲内の用量は、ワクチン接種の1週間後においてトリの100%（K6067について）及び77%（K4110Aについて）に感染するのに十分であった。この用量は、毒性チャレンジ後の気嚢及び気管病変に対するある程度の保護を提供するのに十分であった。F株の最小有効用量は、 $10^{5.5}$ CCU/mLで計算された（Lin and Kleven, 1984, Avian Dis; 28:273-7）。K6067のエアロゾル投与はあまり成功せず、治験における各群の少数のトリへのワクチンのエアロゾル投与での機器及び環境上の複雑さが、研究のこの部分に影響を及ぼした可能性が高い。より多くの調査（より多数のトリ）は、エアロゾルが効果的な投与経路であり得ることを示す可能性があるが、この治験の結果からは、点眼経路がK6067ワクチン接種に好ましいと思われる。同様のこれらの結果により、点眼が、F株に対する最も有効な投与経路であることが見出された（Leigh et al., 2018, Poultry Science; 97(9):3072-3075、及びEvans et al., 2015, Poultry Sci; 94:1849-52）。点眼ワクチン接種群について、より一貫した結果及び増加した免疫応答が血清学によって測定された。点眼経路で見られるより良好な結果は、ワクチンの個々の投与、及び群れにおける各トリのより一貫した体積及び用量を含む、いくつかの因子に起因し得る。投与応答2（K4110A）株では、気管試料だけでなく気嚢培養物でも株特異的PCRが行われ、R株ではゲノムコピー数が非常に高かったことに留意すべきであり、これは、R株がインビトロ培養に適応したことに起因する可能性が高い。

【0104】

シチメンチョウ及びニワトリの両方において、2つのワクチン候補は、検出可能かつ一貫した血清学的応答を誘発し、血清抗体レベルは、弱毒化MG生ワクチンの保護と相関するようには見えないが、広く利用可能で安価な血清学的試験を使用してワクチン接種を監視することが可能であることは有用である。

【0105】

垂直伝播は、マイコプラズマワクチンの安全性の主要な懸念となり得、F株ワクチン及びts-11ワクチンの両方は、卵を介して子孫に伝播するいくつかのリスクを有することが示されている（Armour et al., 2015, Avian Pathol; 44:296-304、及びEl Gazzar et al., 2011, Avian Dis; 55:569-74）。この研究では、いずれの候補でも垂直伝播は見られなかった。しかしながら、垂直伝播は、F株又はR株を接種した群でも検出されなかった。これらの結果は、治験におけるトリの数が比較的少ないこと、及び投与経路（点眼）が原因である可能性がある。この経路は、ワクチンの現場での適用の可能性をよりよく模倣

しているが、より重度のチャレンジ（エアロゾル）では、より高い伝播率が見られる可能性がある。結果は、ワクチン候補が高い垂直伝播率を有する可能性は低い、これらの結果を確認するためにトリの数と卵の数を増やすことを検討すべきであることを示している。卵黄試料中の移行抗体の移行の検出は、MGに対するいくつかの全身免疫応答を示した。MG感染における受動移行抗体の役割は、MGチャレンジに対する保護をほとんど提供しないため、有益ではないことが示されており（Lin and Kleven, 1984, Avian Dis; 28: 79-87）、毒性MGによって引き起こされる胚死亡率は、この抗体によってブロックされ（Levisohn et al., 1985, Avian Dis; 29: 188-97）、その結果、理想的ではない感染卵の孵化率の増加があり得る。

10

【0106】

結論として、両方の候補は、シチメンチョウ及びニワトリにおいて安全であり、毒性チャレンジ株でのコロニー形成を低減すること、及びニワトリにおける毒性MG株の病変及び影響を低減することに有効であった。点眼経路が有効な投与経路として確認され、感染用量及び保護用量は、他のMGワクチンに対応する。垂直伝播研究は、K6067及びK4110Aのいずれも高い伝播のリスクを有しないことを示した。これらの結果は有望であり、シチメンチョウにおける免疫期間、伝播性、及び有効性などのパラメータを評価する更なる研究は、これらのワクチンに関する更なる情報を提供するであろう。

【表1】

表1. 予備スクリーニングのために選択されたワクチン候補の履歴（治験1及び2）。

20

#	K#	単離の履歴	治験
1	K6837	シチメンチョウ、North Carolina、2017	治験1
2	K6813	シチメンチョウ、North Carolina、2017	治験1
3	K6694	51WOA ブロイラーブリーダー、Arkansas、2015	治験1
4	K6524	シチメンチョウブリーダー、Minnesota、2012	治験1
5	K6067	19WOA シチメンチョウ、Arkansas、2007	治験1
6	K6836A	シチメンチョウ、North Carolina 2017	治験2
7	K5792A	産卵鶏ブリーダー、Pennsylvania、2005	治験2
8	K5058E	シチメンチョウ、Virginia、2001	治験2
9	K4179	27WOA シチメンチョウブリーダー、Virginia、1996	治験2
10	K4110A	73WOA シチメンチョウ、North Carolina、1996	治験2

30

WOA=週齢

40

50

【表 2】

表 2. 治験 1 (シチメンチョウの安全性 1)。実験の設計。

群	アイソレータ ー当たりのト リの数	ワクチン接種 (スプレー)	継代レベル	培養の力価 (CCU/ml)
A	6	なし	N/A	N/A
B	6	あり/K6067	13P	8.0×10^8
C	6	あり/K6524	11P	4.2×10^8
D	6	あり/K6694	10P	3.9×10^8
E	6	あり/K6837	11P	3.1×10^6
F	6	あり/K6813	14P	1.8×10^8
G	6	R 株	12P	3.5×10^8

10

【表 3】

表 3. 治験 2 (シチメンチョウの安全性 2)。実験の設計。

群	アイソレータ ー当たりのト リの数	ワクチン接種 (スプレー)	継代レベル	培養の力価 (CCU/ml)
A	6	なし	N/A	N/A
B	6	あり/K4179	7P	8.0×10^8
C	6	あり/K4110A	10P	4.2×10^8
D	6	あり/K5058E	11P	3.9×10^8
E	6	あり/K5792A	12P	3.1×10^6
F	6	あり/K6836A	13P	1.8×10^8
G	6	R 株	12P	3.5×10^8

20

30

40

50

【表 4】

表 4. 治験 3（ニワトリの安全性及び有効性）。実験の設計。

群	群当たりの トリの数	ワクチン接種 (スプレー)	継代レベル	培養の力 価 (CCU/ml)
A	18	なし	N/A	N/A
B	38	あり/K6067	13P	4.2x10 ⁸
C	38	あり/K4110A	11P	2.3x10 ⁷
D	31	あり/R 株	13P	2.8x10 ⁸

注：接種後、群 B、C、及び D をチャレンジするために使用した R 株 13P の力価は、 2.45×10^9 CCU/ml であった。

10

20

30

40

50

【表 5】

表 5. 治験 4 (用量応答 1)。実験の設計。

群	群当たりの トリの数	ワクチン接種	チャレンジ	ワクチン接種 の用量及び経 路
A	7	なし	なし	N/A
B	7	なし	あり/R 12P	N/A
C	7	あり/K6067 18P	あり/R 12P	10^1 CCU/mL の 点眼
D	7	あり/K6067 18P	あり/R 12P	10^2 CCU/mL の 点眼
E	7	あり/K6067 18P	あり/R 12P	10^3 CCU/mL の 点眼
F	7	あり/K6067 18P	あり/R 12P	10^4 CCU/mL の 点眼
G	7	あり/K6067 18P	あり/R 12P	10^5 CCU/mL の 点眼
H	7	あり/K6067 18P	あり/R 12P	10^3 CCU/mL の エアロゾル
I	7	あり/K6067 18P	あり/R 12P	10^4 CCU/mL の エアロゾル
J	7	あり/K6067 18P	あり/R 12P	10^5 CCU/mL の エアロゾル
K	7	あり/K6067 18P	あり/R 12P	10^6 CCU/mL の エアロゾル
L	7	あり/K6067 18P	あり/R 12P	10^7 CCU/mL の エアロゾル

注：接種後、群 B～L をチャレンジするために使用した R 株 12P の力価は、 1.1×10^9 CCU/mL であった。

10

20

30

40

50

【表 6】

表 6. 治験 5（用量応答 2）。実験の設計。

群	群当たりの トリの数	ワクチン接 種	チャレンジ	ワクチン接 種の用量及 び経路
A	7	なし	なし	N/A
B	7	なし	あり/R 14P	N/A
C	13	あり/K4110A 14P	あり/R 14P	10 ³ CCU/mL の点眼
D	13	あり/K4110A 14P	あり/R 14P	10 ⁴ CCU/mL の点眼
E	13	あり/K4110A 14P	あり/R 14P	10 ⁵ CCU/mL の点眼
F	13	あり/K4110A 14P	あり/R 14P	10 ⁶ CCU/mL の点眼
G	13	あり/K4110A 14P	あり/R 14P	10 ⁷ CCU/mL の点眼

注：接種後、群 B～L をチャレンジするために使用した R 株 1 2 P の力価は、3. 5 × 1 0 ⁸ C C U / m l であった。

【表 7】

表 7. 治験 6（垂直伝播）。実験の設計。

群	群当たりの トリの数	ワクチン接 種 (スプレー)	継代レベル	培養の力 価 (CCU/ml)
A	16	なし	N/A	N/A
B	32	あり/K6067	18P	4.21x10 ⁸
C	32	あり/K4110A	14P	9.3x10 ⁸
D	32	あり/F 株	11P	1.77x10 ⁹
E	32	あり/R 株	14P	7.95x10 ⁸

10

20

30

40

50

【表 8】

表 8. 治験 1（シチメンチョウの安全性 1）。K 6 0 6 7、K 6 5 2 4、K 6 6 9 4、K 6 8 3 7、K 6 8 1 3、又は R 株接種の 2 週間後のシチメンチョウにおける M G 血清学的応答。^A

群	ワクチン/チャレンジ	SPA	HI	ELISA
A	なし	0/6 ^B (0.0) ^{Cc}	0/6(0.0) ^{Dd}	0/6(0.0) ^{Ea}
B	K6067	6/6(1.7)a	5/6(1.2)abc	3/6(0.6)c
C	K6524	6/6(2.2)a	2/6(0.4)cd	5/6(0.8)bc
D	K6694	6/6(2.0)a	6/6(1.5)ab	6/6(1.3)a
E	K6837	1/6(0.2)bc	3/6(0.7)bcd	0/6(0.1)a
F	K6813	6/6(1.2)ab	5/6(2.0)a	6/6(1.3)ab
G	R 株	6/6(2.2)a	6/6(1.8)a	6/6(1.2)ab

^A異なる小文字による特定の時点における列内の値は有意に異なる（ $P \leq 0.05$ ）

^B陽性試料の数／試験試料の数（SPA： ≥ 1 、HI： ≥ 20 、ELISA： ≥ 0.5 、気嚢スコア ≥ 1 ）

^C平均凝集グレード（0～4）

^D平均力価 $\log_{10}$

^E平均試料／陽性率

10

20

30

40

50

【表 9】

表 9. 治験 1 (シチメンチョウの安全性 1)。K 6 0 6 7、K 6 5 2 4、K 6 6 9 4、K 6 8 3 7、K 6 8 1 3、又は R 株接種の 2 週間後におけるシチメンチョウの病変スコア、気管粘膜の厚さ、ゲノムコピー数 $\log 10$ 及び気管及び気嚢からの MG 単離。^A

群	ワクチン/チャレンジ	気嚢病変スコア	気管粘膜厚さ	MG 単離		qPCR-MG
				気管	気嚢	
A	なし	0/6 ^B (0.0) ^C c	111.7±20.7 ^D c	0/6a	0/6a	0.0 ^E b
B	K6067	6/6(1.5)b	125.2±14.1c	6/6b	4/6b	2.5±0.2a
C	K6524	6/6(3.0)a	153.6±31.1bc	6/6b	6/6b	3.7±0.9a
D	K6694	6/6(3.2)a	215.5±56.9ab	6/6b	6/6b	3.4±0.7a
E	K6837	3/6(0.5)bc	105.1±27.4c	5/6b	0/6a	1.0±0.7b
F	K6813	6/6(3.2)a	226.5±39.6a	6/6b	6/6b	3.5±0.7a
G	R 株	6/6(3.7)a	148.0±47.6c	6/6b	6/6b	2.9±1.2a

^A異なる小文字による特定の時点における列内の値は有意に異なる ($P \leq 0.05$)

^B陽性試料の数/試験試料の数 (気嚢スコア ≥ 1)

^C平均スコア (巨視的スコア 0 ~ 4)

^D群の平均厚さ $\pm$ SD (μ m)

^E平均 (ゲノム) コピー数 $\log 10 \pm$ SD

10

20

30

【表 10】

表 10. 治験 1 (シチメンチョウの安全性 1)。K 6 0 6 7、K 6 5 2 4、K 6 6 9 4、K 6 8 3 7、K 6 8 1 3、又は R 株の接種の 2 週間後のシチメンチョウにおける臨床徴候。

群	ワクチン/チャレンジ	臨床画像
A	なし	呼吸器臨床徴候は観察されなかった
B	K6067	呼吸器臨床徴候は観察されなかった
C	K6524	ラ音及び咳
D	K6694	息切れ、ラ音、及び咳
E	K6837	呼吸器臨床徴候は観察されなかった
F	K6813	ラ音及び咳
G	R 株	弱いラ音

40

50

【表 1 1】

表 1 1. 治験 2 (シチメンチョウの安全性 2)。K 4 1 7 9、K 4 1 1 0 A、K 5 0 5 8 E、K 5 7 9 2 A、K 6 8 3 6 A、又は R 株接種の 2 週間後のシチメンチョウの MG 血清学的応答。^A

群	ワクチン/チャレンジ	SPA	HI	ELISA
A	なし	0/6 ^B (0.0) ^{Cc}	0/6(0.0) ^{Dc}	0/6(0.0) ^{Ec}
B	K4179	6/6(2.3)a	6/6(1.9)a	6/6(1.05)ab
C	K4110A	6/6(2.2)ab	6/6(1.8)a	2/6(0.48)bc
D	K5058E	6/6(1.3)ab	6/6(1.45)b	3/6(0.40)bc
E	K5792A	6/6(1.2)b	6/6(1.9)a	2/6(0.73)bc
F	K6836A	6/6(1.7)ab	6/6(1.8)a	6/6(1.59)a
G	R 株	6/6(1.8)ab	6/6(1.78)a	4/6(0.91)b

^A異なる小文字による特定の時点における列内の値は有意に異なる ($P \leq 0.05$)

^B陽性試料の数/試験試料の数 (SPA: ≥ 1 、HI: ≥ 20 、ELISA: ≥ 0.5 、気嚢スコア ≥ 1)

^C平均凝集グレード (0 ~ 4)。

^D平均力価 $10^{\log 10}$

^E平均試料/陽性率

10

20

30

40

50

【表 1 2】

表 1 2. 治験 2 (シチメンチョウの安全性 2)。K 4 1 7 9、K 4 1 1 0 A、K 5 0 5 8 E、K 5 7 9 2 A、K 6 8 3 6 A、又は R 株接種の 2 週間後のシチメンチョウからの病変スコア、気管粘膜厚さ、気管及び気囊からの MG 単離、及び q P C R。^A

群	ワクチン/チャレンジ	気囊病変スコア	気管粘膜厚さ	MG 単離		qPCR-MG
				気管	気囊	
A	なし	0/6 ^B (0.0) ^{Cc}	77.12±16.3 ^{Dc}	0/6a	0/6a	0.0 ^{Ec}
B	K4179	6/6(3.5)a	204.05±43.2a	6/6b	6/6b	3.3±0.7a
C	K4110A	6/6(2.0)b	152.52±37.5ab	6/6b	6/6b	1.8±0.6b
D	K5058E	6/6(3.8)a	172.57±22ab	6/6b	6/6b	3.4±0.37a
E	K5792A	6/6(3.7)a	133.49±27.8bc	6/6b	6/6b	1.9±1b
F	K6836A	6/6(3.7)a	200.59±39.4a	6/6b	6/6b	2.8±0.7ab
G	R 株	6/6(3.7)a	132.11±23.5bc	6/6b	6/6b	2.4±0.5ab

^A異なる小文字による特定の時点における列内の値は有意に異なる (P ≤ 0. 0 5)

^B陽性試料の数/試験試料の数 (気囊スコア ≥ 1)

^C平均スコア (巨視的スコア 0 ~ 4)

^D群の平均厚さ ± S D (μ m)

^E平均 (ゲノム) コピー数 1 o g 1 0 ± S D

10

20

【表 1 3】

表 1 3. 治験 2 (シチメンチョウの安全性 2)。K 4 1 7 9、K 4 1 1 0 A、K 5 0 5 8 E、K 5 7 9 2 A、K 6 8 3 6 A 又は R 株接種の 2 週間後のシチメンチョウにおける臨床徴候。

群	ワクチン/チャレンジ	臨床画像
A	なし	呼吸器臨床徴候は観察されなかった
B	K4179	ラ音
C	K4110A	呼吸器臨床徴候は観察されなかった
D	K5058E	息切れ、ラ音、及び咳
E	K5792A	息切れ、ラ音、及び咳
F	K6836A	呼吸器臨床徴候は観察されなかった
G	R 株	弱いラ音

30

40

50

【表 1 4】

表 1 4. 治験 3（ニワトリの安全性及び有効性）。K 6 0 6 7、K 4 1 1 0 A、又は R 株接種の 1 4 日後のニワトリの MG 血清学的応答（剖検 1）。^A

群	ワクチン/チャレンジ	SPA	HI	ELISA
A	なし	0/9 ^B (0.0) ^C c	0/9(0.0) ^D b	0/9(0.0) ^E b
B	K6067	10/10(1.8)b	1/10(0.1)b	1/10(0.1)ab
C	K4110A	10/10(1.5)b	3/10(0.3)ab	1/10(0.1)ab
D	R 株	11/11(2.6)a	7/11(0.9)a	4/11(1.3)a

10

^A異なる小文字による特定の時点における列内の値は有意に異なる（ $P \leq 0.05$ ）

^B陽性試料の数／試験試料の数（SPA： ≥ 1 、HI： ≥ 20 、ELISA： ≥ 0.5 、気嚢スコア ≥ 1 ）

^C平均凝集グレード（0～4）。

^D平均力価 $\log_{10}$

20

^E平均試料／陽性率

【表 1 5】

表 1 5. 治験 3（ニワトリの安全性及び有効性）。ワクチン候補又は R 株の接種の 1 4 日後のニワトリからの病変スコア、MG 単離及び qPCR-MG（剖検 1）。^A

群	ワクチン/チャレンジ	気嚢病変スコア	気管粘膜厚さ	MG 単離		qPCR-MG
				気管	気嚢	
A	なし	0/9 ^B (0.0) ^C b	74±20.5 ^D a	0/9a	0/9a	0.0 ^E b
B	K6067	0/10(0.0)b	88.8±32.1a	10/10b	0/10a	1.5±0.8a
C	K4110A	0/10(0.0)b	76.9±14.6a	10/10b	0/10a	0.5±0.5b
D	R 株	9/11(2.0)a	136.3±97.4a	11/11b	11/11b	1.9±0.7a

30

^A異なる小文字による特定の時点における列内の値は有意に異なる（ $P \leq 0.05$ ）

40

^B陽性試料の数／試験試料の数（気嚢スコア ≥ 1 ）

^C平均スコア（巨視的スコア 0～4）

^D群の平均厚さ±SD（ μm ）

^E平均（ゲノム）コピー数 $\log_{10} \pm \text{SD}$

50

【表 1 6】

表 1 6．治験 3（ニワトリの安全性及び有効性）。ワクチン接種群（群 B 及び C）との混合の 19 日後のニワトリの MG 血清学的応答（剖検 2）。^A

群	ワクチン/チャレンジ	SPA	HI	ELISA
B	K6067	1/5 ^B (0.2 ^C)a	0/5(0 ^D)a	0/5(0 ^E)a
C	K4110A	1/5(0.2)a	0/5(0)a	0/5(0)a

10

^A異なる小文字による特定の時点における列内の値は有意に異なる（ $P \leq 0.05$ ）

^B陽性試料の数／試験試料の数（SPA： ≥ 1 、HI： ≥ 20 、ELISA： ≥ 0.5 、気嚢スコア ≥ 1 ）

^C平均凝集グレード（0～4）。

^D平均力価 $\log 10$

^E平均試料／陽性率

20

【表 1 7】

表 1 7．治験 3（ニワトリの安全性及び有効性）。ワクチン接種群（群 B 及び C）との混合の 19 日後のニワトリからの病変スコア、MG 単離、及び qPCR-MG（剖検 2）。^A

群	ワクチン/チャレンジ	気嚢病変スコア	気管粘膜厚さ	MG 単離		qPCR-MG
				気管	気嚢	
B	K6067	0/5 ^B (0.0 ^C)a	70.9±14.4 ^D a	2/5a	0/5a	0.8±1.3 ^E a
C	K4110A	0/5(0.0)a	61±19.4a	1/5a	0/5a	0.1±0.2a

30

^A異なる小文字による特定の時点における列内の値は有意に異なる（ $P \leq 0.05$ ）

^B陽性試料の数／試験試料の数（気嚢スコア ≥ 1 、気管 MG 単離、気嚢 MG 単離）

^C平均スコア（巨視的スコア 0～4）

^D群の平均厚さ±SD（ μm ）

^E平均（ゲノム）コピー数 $\log 10 \pm \text{SD}$

40

50

【表 1 8】

表 1 8. 治験 3（ニワトリの安全性及び有効性）。ワクチン候補又は R 株での接種の 2 8 日後、及び R 株でのチャレンジの 1 4 日後のニワトリの MG 血清学的応答（剖検 3）。^A

群	ワクチン	チャレンジ	SPA	HI	ELISA
A	なし	なし	0/9 ^B (0.0) ^{Cb}	0/9(0.0) ^{Dc}	0/9(0.0) ^{Ec}
B-1	K6067	エアロゾル	10/10(3.4)a	9/10(1.4)ab	5/10(0.8)bc
B-2	K6067	接触	13/13(3.4)a	13/13(1.5)ab	11/13(0.7)bc
C-1	K4110A	エアロゾル	10/10(3.9)a	10/10(1.6)a	10/10(1.8)a
C-2	K4110A	接触	12/13(3.1)a	12/13(1.4)ab	12/13(0.7)bc
D-1	なし	エアロゾル	10/10(3.5)a	7/10(1.1)b	4/10(0.9)b
D-2	なし	接触	1/10(0.1)a	0/10(0)c	0/10(0)c

^A異なる小文字による特定の時点における列内の値は有意に異なる（ $P \leq 0.05$ ）

^B陽性試料の数／試験試料の数（SPA： ≥ 1 、HI： ≥ 20 、ELISA： ≥ 0.5 、気嚢スコア ≥ 1 ）

^C平均凝集グレード（0～4）。

^D平均力価 $10 \log 10$

^E平均試料／陽性率

10

20

30

40

50

【表 19】

表 19. 治験 3 (ニワトリの安全性及び有効性)。ワクチン候補又は R 株での接種の 28 日後、及び R 株でのチャレンジの 14 日後の病変スコア及び MG 単離結果 (剖検 3)。^A

群	ワクチン	チャレンジ	気嚢病変スコア	MG 単離	
				気管	気嚢
A	なし	なし	0/9 ^B (0.0) ^{Cb}	0/9c	0/9b
B-1	K6067	エアロゾル	1/10(0.1)b	10/10a	3/10ab
B-2	K6067	接触	0/13(0)b	13/13a	1/13b
C-1	K4110A	エアロゾル	3/10(0.3)b	10/10a	3/10ab
C-2	K4110A	接触	0/13(0)b	13/13a	2/13b
D-1	なし	エアロゾル	8/10(2.0)a	10/10a	7/10a
D-2	なし	接触	2/10(0.2)b	7/10b	2/10ab

^A異なる小文字による特定の時点における列内の値は有意に異なる ($P \leq 0.05$)

^B陽性試料の数/試験試料の数 (気嚢スコア ≥ 1 、MG 分離株試料の数/試験試料の数)

^C平均スコア (巨視的スコア 0 ~ 4)

10

20

30

40

50

【表 2 0】

表 2 0． 治験 3 （ニワトリの安全性及び有効性）。ワクチン候補でのワクチン接種の 2 8 日後、又は R 株及び R 株でのチャレンジの 1 4 日後のニワトリからの MG、R 株特異的、K 6 0 6 7 特異的、及び K 4 1 1 0 A 特異的 q P C R （剖検 3）。^A

群	ワクチン	チャレン ジ (R 株)	qPCR-MG	qPCR- K6067	qPCR- K4110A	qPCR- R
A	なし	なし	0.0 ^{Bb}	0.0a	0.0a	0.0bc
B-1	K6067	エアロゾ ル	2.6±0.3a	2.5±0.3b	N/A	0.2±0.4bc
B-2	K6067	接触	2.6±0.4a	2.4±0.4b	N/A	0.0c
C-1	K4110A	エアロゾ ル	2.2±0.9a	N/A	1.5±1.1b	0.9±0.9b
C-2	K4110A	接触	2.1±0.9a	N/A	2.0±1.0 b	0.0c
D-1	なし	エアロゾ ル	2.5±1.3a	0.0a	0.0a	2.8±1.3a
D-2	なし	接触	0.5±0.8b	0.0a	0.0a	0.4±1.0bc

^A異なる小文字による特定の時点における列内の値は有意に異なる（P ≤ 0. 0 5）

^B平均（ゲノム）コピー数 1 0 g 1 0 ± S D

10

20

30

40

50

【表 2 1】

表 2 1．治験 3（ニワトリの安全性及び有効性）。ワクチン候補又は R 株での接種の 2 8 日後、及び R 株でのチャレンジ、又は R 株チャレンジニワトリとの混合の 1 4 日後のニワトリの気管粘膜の厚さ（剖検 3）。^A

群	ワクチン/チャレンジ	気管粘膜厚さ
A	なし	82.31±14.64 ^{Ba}
B	K6067	80.43±11.86a
C	K4110A	85.53±17.73a
D	R 株	123.15±106.44a

^A異なる小文字による特定の時点における列内の値は有意に異なる（P ≤ 0. 0 5）

^B群の平均厚さ ± S D （μ m）

10

20

30

40

50

【表 2 2】

表 2 2. 治験 4 (用量応答 1)。K 6 0 6 7 での接種の 7 日後のニワトリからの MG 単離及び q P C R (1 回目のサンプリング)。^A

群	接種	MG 単離(口蓋裂)	qPCR-MG (気管)	
A	なし	0/7 ^{Bb}	0.0 ^{cb}	10
B	なし	0/7b	0.0b	
C	10 ¹ CCU/mL の点眼 K6067	0/7b	0.0b	
D	10 ² CCU/mL の点眼 K6067	1/7b	0.0b	
E	10 ³ CCU/mL の点眼 K6067	7/7a	0.16±0.42b	
F	10 ⁴ CCU/mL の点眼 K6067	7/7a	0.23±0.62ab	
G	10 ⁵ CCU/mL の点眼 K6067	7/7a	0.84±0.92a	
H	10 ³ CCU/mL のエアロゾル K6067	0/7b	0.0b	20
I	10 ⁴ CCU/mL のエアロゾル K6067	0/7b	0.0b	
J	10 ⁵ CCU/mL のエアロゾル K6067	1/7b	0.0b	
K	10 ⁶ CCU/mL のエアロゾル K6067	1/7b	0.0b	30
L	10 ⁷ CCU/mL のエアロゾル K6067	0/7b	0.0b	

^A異なる小文字による特定の時点における列内の値は有意に異なる (P ≤ 0. 0 5)

^B陽性試料の数／試験試料の数 (マイコプラズマ増殖の結果の変色)

^C平均 (ゲノム) コピー数 $\log_{10} \pm SD$

【表 2 3】

表 2 3. 治験 4 (用量応答 1)。K 6 0 6 7 での接種の 2 1 日後のニワトリの MG 血清学的応答 (2 回目のサンプリング)。^A

群	接種	SPA	HI	ELISA	
A	なし	0/7 ^B (0.0) ^C C	0/7(0.0) ^D a	0/7(0.0) ^E b	10
B	なし	0/7(0.0)c	0/7(0.0)a	0/7(0.0)b	
C	10 ¹ CCU/mL の点眼 K6067	0/7(0.0)c	0/7(0.0)a	0/7(0.0)b	
D	10 ² CCU/mL の点眼 K6067	2/7(0.5)bc	0/7(0.0)a	0/7(0.0)b	
E	10 ³ CCU/mL の点眼 K6067	6/7(1.1)ab	0/7(0.0)a	0/7(0.1)b	
F	10 ⁴ CCU/mL の点眼 K6067	6/7(1.0)ab	1/7(0.1)a	0/7(0.1)b	20
G	10 ⁵ CCU/mL の点眼 K6067	6/7(1.4)a	0/7(0.0)a	2/7(0.3)a	
H	10 ³ CCU/mL のエアロゾル K6067	0/7(0.0)c	0/7(0.0)a	0/7(0.0)b	
I	10 ⁴ CCU/mL のエアロゾル K6067	0/7(0.0)c	0/7(0.0)a	0/7(0.0)b	
J	10 ⁵ CCU/mL のエアロゾル K6067	1/7(0.1)c	0/7(0.0)a	0/7(0.0)b	
K	10 ⁶ CCU/mL のエアロゾル K6067	1/7(0.1)c	0/7(0.0)a	0/7(0.0)b	30
L	10 ⁷ CCU/mL のエアロゾル K6067	0/7(0.0)c	0/7(0.0)a	0/7(0.0)b	

^A異なる小文字による特定の時点における列内の値は有意に異なる ($P \leq 0.05$)

^B陽性試料の数/試験試料の数 (SPA: ≥ 1 、HI: ≥ 20 、ELISA: ≥ 0.5 、気嚢スコア ≥ 1)

^C平均凝集グレード (0~4)。

^D平均力価 $10 \log 10$

^E平均試料/陽性率

40

【表 2 4】

表 2 4. 治験 4 (用量応答 1)。K 6 0 6 7 での接種の 2 1 日後のニワトリからの M
G 単離及び q P C R (2 回目のサンプリング)。^A

群	接種	MG 単離(口蓋裂)	qPCR-MG (気管)	
A	なし	0/7 ^{Bb}	0.0 ^{Cc}	10
B	なし	0/7b	0.0c	
C	10 ¹ CCU/mL の点眼 K6067	0/7b	0.0c	
D	10 ² CCU/mL の点眼 K6067	2/7b	0.32±0.61bc	20
E	10 ³ CCU/mL の点眼 K6067	7/7a	0.45±0.59abc	
F	10 ⁴ CCU/mL の点眼 K6067	7/7a	1.00±0.58a	
G	10 ⁵ CCU/mL の点眼 K6067	7/7a	0.92±0.66ab	30
H	10 ³ CCU/mL のエアロゾ ル K6067	0/7b	0.0c	
I	10 ⁴ CCU/mL のエアロゾ ル K6067	0/7b	0.0c	
J	10 ⁵ CCU/mL のエアロゾ ル K6067	0/7b	0.0c	
K	10 ⁶ CCU/mL のエアロゾ ル K6067	1/7b	0.0c	
L	10 ⁷ CCU/mL のエアロゾ ル K6067	0/7b	0.0c	

^A異なる小文字による特定の時点における列内の値は有意に異なる (P ≤ 0. 0 5)

^B陽性試料の数/試験試料の数 (マイコプラズマ増殖の結果の変色)

^C平均 (ゲノム) コピー数 1 0 g 1 0 ± S D

40

【表 2 5】

表 2 5. 治験 4 (用量応答 1)。K 6 0 6 7 接種の 6 週間後、及び R 株でのチャレンジの 2 週間後のニワトリの MG 血清学的応答 (剖検)。^A

群	接種	SPA	HI	ELISA	
A	なし	0/7 ^B (0.0) ^{Cb}	0/7(0.0) ^{Dc}	0/7(0.0) ^{Ed}	10
B	R 株のみ	7/7(2.2)a	7/7(1.6)ab	7/7(1.7)abc	
C	10 ¹ CCU/mL の点眼 K6067+R 株	7/7(2.1)a	7/7(1.8)a	7/7(1.8)bcd	
D	10 ² CCU/mL の点眼 K6067+R 株	7/7(2.2)a	7/7(1.8)ab	7/7(1.9)abc	
E	10 ³ CCU/mL の点眼 K6067+R 株	7/7(2.0)a	7/7(1.8)a	7/7(2.3)abc	
F	10 ⁴ CCU/mL の点眼 K6067+R 株	7/7(1.7)a	7/7(1.9)a	7/7(2.7)ab	
G	10 ⁵ CCU/mL の点眼 K6067+R 株	7/7(1.8)a	7/7(1.5)ab	7/7(2.8)a	
H	10 ³ CCU/mL のエアロゾル	7/7(2.0)a	7/7(1.5)ab	6/7(1.4)abcd	20
	K6067+R 株				
I	10 ⁴ CCU/mL のエアロゾル	7/7(1.5)a	7/7(1.6)ab	7/7(1.3)abcd	
	K6067+R 株				
J	10 ⁵ CCU/mL のエアロゾル	4/7(1.2)a	5/7(1.2)b	4/7(0.8)cd	
	K6067+R 株				
K	10 ⁶ CCU/mL のエアロゾル	7/7(2.2)a	7/7(1.6)ab	7/7(1.2)bcd	
	K6067+R 株				
L	10 ⁷ CCU/mL のエアロゾル	7/7(2.0)a	7/7(1.9)a	7/7(1.3)abcd	30
	K6067+R 株				

^A異なる小文字による特定の時点における列内の値は有意に異なる (P ≤ 0.05)

^B陽性試料の数/試験試料の数 (SPA : ≥ 1、HI : ≥ 20、ELISA : ≥ 0.5、気嚢スコア ≥ 1)

^C平均凝集グレード (0 ~ 4)。

^D平均力価 log₁₀

^E平均試料/陽性率

40

【表 2 6】

表 2 6. 治験 4 (用量応答 1)。K 6 0 6 7 での接種 6 週間後、及び R 株でのチャレンジの 2 週間後の病変スコア及び MG 単離結果 (剖検)。^A

群	接種	気嚢病変スコア	気管粘膜厚さ	MG 単離	
				口蓋裂	気嚢
A	なし	0/7 ^B (0.0 ^C)d	92.4±18.5 ^D bc	0/7 ^E c	0/7c
B	R 株のみ	7/7(1.9)abd	236.5±101.2abc	7/7a	7/7a
C	10 ¹ CCU/mL の点眼 K6067+R 株	7/7(2.1)ab	296.1±152.1ab	7/7a	7/7a
D	10 ² CCU/mL の点眼 K6067+R 株	3/7(0.7)abcd	219.9±200.8abc	7/7a	7/7a
E	10 ³ CCU/mL の点眼 K6067+R 株	2/7(0.3)bcd	75.0±18.3bc	7/7a	3/7b
F	10 ⁴ CCU/mL の点眼 K6067+R 株	2/7(0.3)bcd	66.7±14.6c	7/7a	5/7ab
G	10 ⁵ CCU/mL の点眼 K6067+R 株	1/7(0.1)cd	80.0±20.2bc	7/7a	7/7a
H	10 ³ CCU/mL のエアロ ゾル K6067+R 株	6/7(2.4)a	248.7±137.5abc	7/7a	7/7a
I	10 ⁴ CCU/mL のエアロ ゾル K6067+R 株	7/7(1.5)a	257.0±151.6abc	7/7a	7/7a
J	10 ⁵ CCU/mL のエアロ ゾル K6067+R 株	7/7(2.0)abc	180.2±150.6abc	5/7b	7/7a
K	10 ⁶ CCU/mL のエアロ ゾル K6067+R 株	4/7(1.0)abcd	195.9±144.6abc	7/7a	7/7a
L	10 ⁷ CCU/mL のエアロ ゾル K6067+R 株	6/7(2.0)abc	405.5±163.5a	7/7a	7/7a

^A異なる小文字による特定の時点における列内の値は有意に異なる ($P \leq 0.05$)

^B陽性試料の数/試験試料の数 (気嚢スコア ≥ 1)

^C平均スコア (巨視的スコア 0 ~ 4)

^D群の平均厚さ $\pm$ SD (μ m)

^E陽性試料の数/試験試料の数 (培養物)

10

20

30

40

50

【表 2 7】

表 2 7. 治験 4 (用量応答 1)。K 6 0 6 7 での接種の 6 週間後、及び R 株でのチャレンジの 2 週間後の病変スコア及び MG 単離結果 (剖検)。^A

群	接種	気嚢病変スコア	気管粘膜厚さ	MG 単離	
				口蓋裂	気嚢
A	なし	0/7 ^B (0.0 ^C)d	92.4±18.5 ^D bc	0/7 ^E c	0/7c
B	R 株のみ	7/7(1.9)abd	236.5±101.2abc	7/7a	7/7a
C	10 ¹ CCU/mL の点眼 K6067+R 株	7/7(2.1)ab	296.1±152.1ab	7/7a	7/7a
D	10 ² CCU/mL の点眼 K6067+R 株	3/7(0.7)abcd	219.9±200.8abc	7/7a	7/7a
E	10 ³ CCU/mL の点眼 K6067+R 株	2/7(0.3)bcd	75.0±18.3bc	7/7a	3/7b
F	10 ⁴ CCU/mL の点眼 K6067+R 株	2/7(0.3)bcd	66.7±14.6c	7/7a	5/7ab
G	10 ⁵ CCU/mL の点眼 K6067+R 株	1/7(0.1)cd	80.0±20.2bc	7/7a	7/7a
H	10 ³ CCU/mL のエアロ ゾル K6067+R 株	6/7(2.4)a	248.7±137.5abc	7/7a	7/7a
I	10 ⁴ CCU/mL のエアロ ゾル K6067+R 株	7/7(1.5)a	257.0±151.6abc	7/7a	7/7a
J	10 ⁵ CCU/mL のエアロ ゾル K6067+R 株	7/7(2.0)abc	180.2±150.6abc	5/7b	7/7a
K	10 ⁶ CCU/mL のエアロ ゾル K6067+R 株	4/7(1.0)abcd	195.9±144.6abc	7/7a	7/7a
L	10 ⁷ CCU/mL のエアロ ゾル K6067+R 株	6/7(2.0)abc	405.5±163.5a	7/7a	7/7a

^A異なる小文字による特定の時点における列内の値は有意に異なる (P ≤ 0.05)

^B陽性試料の数/試験試料の数 (気嚢スコア ≥ 1)

^C平均スコア (巨視的スコア 0 ~ 4)

^D群の平均厚さ ± SD (μm)

^E陽性試料の数/試験試料の数 (培養物)

【表 2 8】

表 2 8. 治験 4 (用量応答 1)。ワクチン候補での接種の 6 週間後、及び R 株でのチャレンジの 2 週間後の MG、R 株特異的、及び K 6 0 6 7 特異的ゲノムコピー数 (剖検)。^A

群	接種	qPCR-MG	qPCR-R 株	qPCR-K6067
A	なし	0.0 ^{Bf}	0.0c	0.0a
B	R 株のみ	3.09±0.45ab	3.56±0.47a	0.0a
C	10 ¹ CCU/mL の点眼 K6067+R 株	3.15±0.62ab	3.41±0.73ab	0.0a
D	10 ² CCU/mL の点眼 K6067+R 株	2.59±1.33abcd	2.62±1.34ab	0.40±1.06a
E	10 ³ CCU/mL の点眼 K6067+R 株	0.66±0.65ef	0.06±0.16c	0.19±0.46a
F	10 ⁴ CCU/mL の点眼 K6067+R 株	1.26±0.86def	0.39±0.80c	0.79±0.96a
G	10 ⁵ CCU/mL の点眼 K6067+R 株	1.53±0.75cde	0.43±0.68c	0.85±0.87a
H	10 ³ CCU/mL のエアロゾル K6067+R 株	3.12±0.44ab	3.42±0.46ab	0.0a
I	10 ⁴ CCU/mL のエアロゾル K6067+R 株	3.31±0.92ab	3.44±0.68ab	0.0a
J	10 ⁵ CCU/mL のエアロゾル K6067+R 株	1.95±1.25bcde	2.11±1.54b	0.0a
K	10 ⁶ CCU/mL のエアロゾル K6067+R 株	2.73±0.66abc	3.06±0.81ab	0.24±0.63a
L	10 ⁷ CCU/mL のエアロゾル K6067+R 株	3.48±0.33a	3.90±0.24a	0.20±0.53a

^A異なる小文字による特定の時点における列内の値は有意に異なる (P ≤ 0.05)

^B平均 (ゲノム) コピー数 1.0 ± SD

10

20

30

40

50

【表 2 9】

表 2 9. 治験 4 (用量応答 1)。qPCR 及び 1 回目及び 2 回目のサンプリングのマイコプラズマ培養結果に基づく K 6 0 6 7 の最低感染用量 5 0 % (M I D 5 0)。

	パラメータ	タイミング	MID50	説明	
1	群 C~G ^A の qPCR 結果	1 回目のサンプリング ^B	N/A	50%以上で感染した群はなかった	10
2	群 H~L ^C の qPCR 結果	1 回目のサンプリング	N/A	50%以上で感染した群はなかった	
3	群 C~G のマイコプラズマ培養結果	1 回目のサンプリング	10 ^{3.8} CCU/mL	群 E 及び F は、それぞれ 38 及び 53%で保護された	
4	群 H~L のマイコプラズマ培養結果	1 回目のサンプリング	N/A	50%以上で感染した群はなかった	20
5	群 C~G の qPCR 結果	2 回目のサンプリング ^D	N/A	50%以上で感染した群はなかった	
6	群 H~L の qPCR 結果	2 回目のサンプリング	N/A	50%以上で感染した群はなかった	
7	群 C~G のマイコプラズマ培養結果	2 回目のサンプリング	10 ^{3.53} CCU/mL	群 E 及び F は、それぞれ 42%及び 57%感染した	30
8	群 H~L のマイコプラズマ培養結果	2 回目のサンプリング	N/A	50%以上で感染した群はなかった	

^A点眼接種群

^B 1 回目のサンプリングは、4 W O A における接種の 1 週間後に実施した。

^Cエアロゾル接種群

^D 2 回目のサンプリングは、接種の 3 週間後に 6 W O A で実施した。

【表 3 0】

表 3 0. 治験 4（用量応答 1）。剖検時の気嚢病変スコア及び気管厚さ測定値に基づく K 6 0 6 7 の最低保護用量 5 0 %（MPD 5 0）。

番号	パラメータ	MPD50	説明
1	群 C~G ^A の気嚢スコア	10 ⁴	群 F は、50%が累積的に保護された。
2	群 H~L ^B の気嚢スコア	N/A	50%以上で感染した群はなかった
3	群 C~G の気管厚さ測定値 ^C	10 ^{3.3} CCU/mL	群 E 及び F は、それぞれ 47 及び 60%で保護された
4	群 H~L の気管厚さ測定値	N/A	50%以上で感染した群はなかった

^A点眼接種群

^Bエアロゾル接種群

^C気管厚さの測定値を比較し、影響を受けている測定値と影響を受けていない測定値を考慮するために、群 A（陰性対照）の中で最も高い測定値である 1 1 8. 2 μ mを閾値として考慮した。

10

20

30

40

50

【表 3 1】

表 3 1. 治験 5（用量応答 2）。K 4 1 1 0 Aでの接種の 7 日後のニワトリからのM
G 単離及び q P C R（1 回目のサンプリング）。^A

群	接種	MG 単離(口蓋裂)	qPCR-MG (気管)
A	なし	0/7 ^{Bc}	0.0 ^{Cc}
B	なし	0/7 ^c	0.0 ^c
C	10 ³ CCU/mL の点眼 K4110A	10/13 ^b	0.18±0.65 ^c
D	10 ⁴ CCU/mL の点眼 K4110A	13/13 ^a	0.98±1.42 ^{bc}
E	10 ⁵ CCU/mL の点眼 K4110A	13/13 ^a	1.23±0.93 ^{abc}
F	10 ⁶ CCU/mL の点眼 K4110A	13/13 ^a	1.72±1.14 ^{ab}
G	10 ⁷ CCU/mL の点眼 K4110A	13/13 ^a	2.22±1.01 ^a

^A異なる小文字による特定の時点における列内の値は有意に異なる（P ≤ 0. 0 5）

^B陽性試料の数／試験試料の数（マイコプラズマ増殖の結果の変色）

^C平均（ゲノム）コピー数 1 o g 1 0 ± S D

10

20

30

40

50

【表 3 2】

表 3 2. 治験 5（用量応答 2）。K 4 1 1 0 Aでの接種の 2 1 日後のニワトリのMG 血清学的応答（2 回目のサンプリング）。^A

群	接種	SPA	HI	ELISA
A	なし	0/7 ^B (0.0) ^{Cb}	0/7(0.0) ^{Pb}	0/7(0.0) ^{Eab}
B	なし	0/7(0.0)b	0/7(0.0)b	0/7(0.0)ab
C	10 ³ CCU/mL の点眼 K4110A	4/13(0.3)b	0/13(0.0)b	0/13(0.0)b
D	10 ⁴ CCU/mL の点眼 K4110A	13/13(1.3)a	4/13(0.4)ab	0/13(0.0)b
E	10 ⁵ CCU/mL の点眼 K4110A	12/13(1.7)a	4/13(0.4)ab	2/13(0.1)ab
F	10 ⁶ CCU/mL の点眼 K4110A	13/13(1.4)a	2/13(0.2)b	0/13(0.0)ab
G	10 ⁷ CCU/mL の点眼 K4110A	13/13(1.5)a	10/13(1.1)a	2/13(0.2)a

^A異なる小文字による特定の時点における列内の値は有意に異なる（P ≤ 0. 0 5）

^B陽性試料の数／試験試料の数（S P A : ≥ 1、H I : ≥ 2 0、E L I S A : ≥ 0. 5、気嚢スコア ≥ 1）

^C平均凝集グレード（0 ～ 4）。

^D平均力価 l o g 1 0

^E平均試料／陽性率

10

20

30

40

50

【表 3 3】

表 3 3. 治験 5（用量応答 2）。K 4 1 1 0 Aでの接種の 2 1 日後のニワトリからの MG 単離及び q P C R（2 回目のサンプリング）。^A

群	接種	MG 単離(口蓋裂)	qPCR-MG (気管)
A	なし	0/7 ^{Bb}	0.0 ^{Cc}
B	なし	0/7b	0.0c
C	10 ³ CCU/mL の点眼	11/13a	0.53±0.92bc
	K4110A		
D	10 ⁴ CCU/mL の点眼	13/13a	0.77±1.31bc
	K4110A		
E	10 ⁵ CCU/mL の点眼	13/13a	1.62±1.18ab
	K4110A		
F	10 ⁶ CCU/mL の点眼	13/13a	1.33±1.00abc
	K4110A		
G	10 ⁷ CCU/mL の点眼	13/13a	2.13±0.81a
	K4110A		

^A異なる小文字による特定の時点における列内の値は有意に異なる（P ≤ 0. 0 5）

^B陽性試料の数／試験試料の数（マイコプラズマ増殖の結果の変色）

^C平均（ゲノム）コピー数 1 o g 1 0 ± S D

10

20

30

40

50

【表 3 4】

表 3 4. 治験 5 (用量応答 2)。K 4 1 1 0 A の接種の 6 週間後、及び R 株でのチャレンジ 2 週間後のニワトリの MG 血清学的応答 (剖検)。^A

群	接種	SPA	HI	ELISA
A	なし	0/7 ^B (0.0) ^{Cc}	0/7(0.0) ^{Dc}	0/7(0.0) ^{Ec}
B	R 株のみ	7/7(2.4)a	6/7(1.3)b	6/7(0.8)bc
C	10 ³ CCU/mL の点眼 K4110A+R 株	12/12(1.7)ab	12/12(1.8)a	12/12(1.7)a
D	10 ⁴ CCU/mL の点眼 K4110A+R 株	13/13(1.5)b	13/13(1.9)a	13/13(1.4)ab
E	10 ⁵ CCU/mL の点眼 K4110A+R 株	13/13(1.6)ab	13/13(1.9)a	13/13(1.5)ab
F	10 ⁶ CCU/mL の点眼 K4110A+R 株	13/13(1.7)ab	13/13(1.9)a	13/13(1.2)ab
G	10 ⁷ CCU/mL の点眼 K4110A+R 株	13/13(1.8)ab	13/13(2.0)a	13/13(1.7)a

^A異なる小文字による特定の時点における列内の値は有意に異なる ($P \leq 0.05$)

^B陽性試料の数/試験試料の数 (SPA : ≥ 1 、HI : ≥ 20 、ELISA : ≥ 0.5 、気嚢スコア ≥ 1)

^C平均凝集グレード (0 ~ 4)。

^D平均力価 $\log_{10}$

^E平均試料/陽性率

10

20

30

40

50

【表 3 5】

表 3 5. 治験 5（用量応答 2）。K 4 1 1 0 Aでの接種の 6 週間後、及び R 株でのチャレンジの 2 週間後の病変スコア、MG 分離、及び q P C R 結果（剖検）。^A

群	接種	気嚢病変スコア	気管粘膜厚さ	MG 単離	
				口蓋裂	気嚢
A	なし	0/7 ^B (0.0 ^C)c	71.1±11.2 ^D b	0/7 ^E a	0/7 ^E a
B	R 株のみ	6/7(2.0)a	224.1±196.7a	7/7b	7/7b
C	10 ³ CCU/mL の点眼 K4110A+R 株	8/12(0.8)b	76.4±17.9b	12/12b	12/12b
D	10 ⁴ CCU/mL の点眼 K4110A+R 株	3/13(0.2)bc	73.9±10.5b	13/13b	11/13b
E	10 ⁵ CCU/mL の点眼 K4110A+R 株	4/13(0.3)bc	66.8±15.7b	13/13b	13/13b
F	10 ⁶ CCU/mL の点眼 K4110A+R 株	0/13(0.0)c	68.9±19.8b	13/13b	12/13b
G	10 ⁷ CCU/mL の点眼 K4110A+R 株	3/13(0.2)bc	68.0±16.1b	13/13b	13/13b

^A異なる小文字による特定の時点における列内の値は有意に異なる（P ≤ 0. 0 5）

^B陽性試料の数／試験試料の数（気嚢スコア ≥ 1）

^C平均スコア（巨視的スコア 0 ～ 4）

^D群の平均厚さ ± S D （μ m）

^E陽性試料数／試験試料数（培養物）

10

20

30

40

50

【表 3 6】

表 3 6. 治験 5（用量応答 2）。K 4 1 1 0 Aでの接種の 6 週間後、及び R 株でのチャレンジの 2 週間後の、気管洗浄及び気嚢培養における MG、R 株特異的、及び K 4 1 1 0 A 特異的 q P C R 結果（剖検）。^A

		気管洗浄		気嚢培養		
群	接種	qPCR-MG	qPCR-R 株	qPCR-K4110A	qPCR-R 株	qPCR-K4110A
A	なし	0.0 ^{Bb}	0.0c	0.0c	0.0b	0.0a
B	R 株のみ	2.69±1.13a	2.56±1.01a	0.0c	1.16±1.98b	0.0a
C	10 ³ CCU/mL の 点眼 K4110A+R 株	2.27±0.86a	1.31±1.22b	0.89±0.88bc	3.98±0.59a	0.0a
D	10 ⁴ CCU/mL の 点眼 K4110A+R 株	2.31±0.63a	0.57±0.69bc	1.55±0.71ab	4.62±0.82a	0.0a
E	10 ⁵ CCU/mL の 点眼 K4110A+R 株	1.83±0.70a	0.53±0.44bc	1.30±0.88ab	4.26±0.52a	0.0a
F	10 ⁶ CCU/mL の 点眼 K4110A+R 株	2.1±1.4a	0.41±0.55c	1.43±0.74ab	4.63±0.74a	0.0a
G	10 ⁷ CCU/mL の 点眼 K4110A+R 株	2.07±0.57a	0.51±0.43bc	1.76±0.59a	4.32±0.63a	0.06±0.22a

^A異なる小文字による特定の時点における列内の値は有意に異なる（P ≤ 0. 0 5）

^B平均（ゲノム）コピー数 1 0 g 1 0 ± S D

【表 3 7】

表 3 7. 治験 5（用量応答 2）。qPCR 及び 1 回目及び 2 回目のサンプリングのマイコプラズマ培養結果に基づく K 4 1 1 0 A の最低感染用量 5 0 %（MID 5 0）。

番号	パラメータ	タイミング	MID50	説明
1	群 C~G ^A の qPCR 結果	1 回目のサンプリング ^B	10 ^{5.3} CCU/mL	群 E 及び F は、それぞれ 48% 及び 55% で感染した
2	群 C~G のマイコプラズマ培養結果	1 回目のサンプリング	N/A	いずれのグループも 50% 未満で感染していなかった
3	群 C~G の qPCR 結果	2 回目のサンプリング ^C	10 ^{5.2} CCU/mL	群 E 及び F は、それぞれ 48% 及び 57% で感染した
4	群 C~G のマイコプラズマ培養結果	2 回目のサンプリング	N/A	いずれのグループも 50% 未満で感染していなかった

^A点眼接種群

^B1 回目のサンプリングは、4 WOA における接種の 1 週間後に実施された。

^C2 回目のサンプリングは、6 WOA における接種の 3 週間後に実施された。

【表 3 8】

表 3 8. 治験 5（用量応答 2）。剖検時の気嚢スコア及び気管厚さ測定値に基づく K 4 1 1 0 A の最低保護用量 5 0 %（MPD 5 0）。

番号	パラメータ	MPD50	説明
1	群 C~G ^A の気嚢スコア	10 ^{3.7}	群 C 及び D の影響を受けなかった気嚢率は、それぞれ 33% 及び 56% であった。
2	群 C~G の気管厚さ測定値	N/A	50% 以下のレートにおいていずれの群も陽性 ^B ではなかった

^A点眼接種群

^B気管厚さの測定値を比較し、測定値を、影響を受けているもの及び影響を受けていないものとして考慮するために、群 A（陰性対照）の中で最も高い測定値である 9 1. 3 μ m を閾値として考慮した。

10

20

30

40

50

【表 3 9】

表 3 9. 治験 6（垂直伝播）。31WOAにおいて産卵された最後のセットの卵のM
G卵黄抗体、ワクチン候補、F株又はR株での接種の6週間後。^A

群	ワクチン/チャレンジ	HI	ELISA
A	なし	0/7 ^B (0.0) ^{Cb}	0/7 ^B (0.0) ^{Dc}
B	K6067	0/14(0.0)b	0/14(0.3)bc
C	K4110A	6/12(0.7)a	6/12(0.7)ab
D	F株	0/12(0.0)b	4/12(0.5)abc
E	R株	3/12(0.3)ab	9/12(0.9)a

^A異なる小文字による特定の時点における列内の値は有意に異なる（ $P \leq 0.05$ ）

^B陽性試料の数／試験試料の数（HI： ≥ 20 、ELISA： ≥ 0.5 ）

^C平均力価 $\log_{10}$

^D平均試料／陽性率

10

20

【表 4 0】

表 4 0. 治験 6（垂直伝播）。それぞれ24～31WOA及び21～31WOAからの
受精率及びメンドリ週産卵平均^A。

群	接種	受精率 ^B	メンドリ週産卵平均 ^C
A	陰性対照	83.7±9 ^D ab	89.4±9.1a
B	K6067	77.9±5.7b	88.2±9a
C	K4110A	84.0±4.2ab	84.5±4.8a
D	F株	85.3±5.1a	85.5±3.4a
E	R株	83.5±7.6ab	83.9±6.1a

^A異なる小文字による特定の時点における列内の値は有意に異なる（ $P \leq 0.05$ ）

^B7DOE後の受精卵の数／インキュベートした卵の総数×100

^C1週間に産卵した卵の数／メンドリの総数×100

^Dパーセンテージ±SD

30

40

50

【表 4 1】

表 4 1. 治験 6（垂直伝播）。接種の 6 週間後における 3 1 W O A のニワトリの MG 血清学的応答（剖検）。^A

群	接種	SPA	HI	ELISA
A	陰性対照	0/16 ^B (0 ^C)a	0/16(0 ^D)c	0/16(0 ^E)c
B	K6067	31/31(3)b	26/31(1.19)b	27/31(1.08)b
C	K4110A	32/32(3.1)b	31/32(1.73)a	31/32(2.02)a
D	F 株	31/31(2.8)b	31/31(1.64)a	31/31(1.89)a
E	R 株	31/31(3.3)b	31/31(1.87)a	31/31(2.27)a

^A異なる小文字による特定の時点における列内の値は有意に異なる（ $P \leq 0.05$ ）

^B陽性試料の数／試験試料の数（SPA： ≥ 1 、HI： ≥ 20 、ELISA： ≥ 0.5 、気嚢スコア ≥ 1 ）

^C平均凝集グレード（0～4）。

^D平均力価 $\log_{10}$

^E平均試料／陽性率

10

20

【表 4 2】

表 4 2. 治験 6（垂直伝播）。K 6 0 6 7、K 4 1 1 0 A、F 株又は R 株（剖検）での接種の 6 週間後におけるニワトリからの病変スコア、MG 単離及び qPCR。^A

群	ワクチ ン/チャ レンジ	気嚢病変 スコア	気管粘膜厚さ	MG 単離		qPCR-MG 気管	qPCR- MG 卵管
				口蓋裂	気嚢		
A	なし	2/16 ^B (0.1) ^C	61.83±17.03 ^D ab	0/16a	0/16b	0.0 ^E b	0.0 ^E a
B	K6067	2/31(0.1)	75.40±21.37b	31/31b	4/31b	2.54±1.02b	0.0a
C	K4110A	2/32(0.1)	107.9±90.94b	31/32b	8/32b	2.57±0.96ab	0.0a
D	F 株	4/31(0.1)	73.63±20.9b	30/31b	6/31b	1.89±1.02b	0.0a
E	R 株	10/31(0.6)	123.96±100.7a	31/31b	19/31a	2.2±1.3a	0.0a

^A異なる小文字による特定の時点における列内の値は有意に異なる（ $P \leq 0.05$ ）

^B陽性試料の数／試験試料の数（気嚢スコア ≥ 1 ）

^C平均スコア（巨視的スコア 0～4）

^D群の平均厚さ±SD（ μm ）

^E平均（ゲノム）コピー数 $\log_{10} \pm$

30

40

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2023/017527

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - INV. - C12N 1/20; A61K 39/02 (2023.01)

ADD.

CPC - INV. - C12N 1/205; A61K 39/0241 (2023.05)

ADD. - A61K 2039/552 (2023.05)

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)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2002/0187162 A1 (GEARY et al.) 12 December 2002 (12.12.2002) entire document	1-5, 13
A	US 2012/0021005 A1 (KLEVEN et al.) 26 January 2012 (26.01.2012) entire document	1-5, 13
A	US 2004/0009179 A1 (KLEVEN et al.) 15 January 2004 (15.01.2004) entire document	1-5, 13
A	US 2020/0121785 A1 (THE PIRBRIGHT INSTITUTE) 23 April 2020 (23.04.2020) entire document	1-5, 13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ 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

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 May 2023

Date of mailing of the international search report

JUN 27 2023

Name and mailing address of the ISA/

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Taina Matos

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2023/017527

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 6-12, 14-23
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,D
E,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,S
M,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,
AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,
ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,L
A,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,P
H,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,
UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

F ターム (参考)

BB22 BB24 BB25 BB38 CC06
4C085 AA03 BA48 CC07 DD86 GG03 GG04
4C087 AA01 AA02 BC82 MA13 MA55 MA56 MA57 MA58 MA59 NA05
ZB35