

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-501237
(P2006-501237A)

(43) 公表日 平成18年1月12日(2006.1.12)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	G
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	J
A 6 1 K 39/155 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	Z
A 6 1 K 39/245 (2006.01)	A 6 1 K 39/12	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-530459 (P2004-530459)	(71) 出願人 397067152 ファイザー・プロダクツ・インク アメリカ合衆国コネチカット州グロトン市 イースタン・ポイント・ロード
(86) (22) 出願日 平成15年8月14日 (2003. 8. 14)	
(85) 翻訳文提出日 平成17年4月18日 (2005. 4. 18)	
(86) 国際出願番号 PCT/IB2003/003633	
(87) 国際公開番号 W02004/017990	(74) 代理人 100099759 弁理士 青木 篤
(87) 国際公開日 平成16年3月4日 (2004. 3. 4)	(74) 代理人 100077517 弁理士 石田 敬
(31) 優先権主張番号 60/405, 969	(74) 代理人 100087871 弁理士 福本 積
(32) 優先日 平成14年8月26日 (2002. 8. 26)	(74) 代理人 100087413 弁理士 古賀 哲次
(33) 優先権主張国 米国 (US)	(74) 代理人 100108903 弁理士 中村 和広

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 家畜の呼吸系と生殖系の感染症に対するワクチン

(57) 【要約】

本発明は、混合ワクチンと、ウシ・ウイルス性下痢症ウイルス (BVDV) 1型と2型、ウシ・ヘルペス・ウイルス1型 (BHV-1)、ウシ呼吸器多核体ウイルス (BRSV)、パラインフルエンザ・ウイルス (PI₃)、カンピロバクター・フィタス、レプトスピラ・カニコーラ、レプトスピラ・グリッポティフォーサ、レプトスピラ・ボルグペテルセニイ・ハージョ-プラジトゥノ、レプトスピラ・イクテロヘモルハジア、レプトスピラ・ボルグペテルセニイ・ハージョ-ボピス、レプトスピラ・インターロガンズ・ポモナの感染によって起こる動物の疾患または異常を治療または予防するため、上記動物に、有効な量の混合ワクチンを投与するステップを含む方法とに関する。混合ワクチンとしては、細胞の全体または一部が不活化または修飾された生の調製物が可能である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の：

- 修飾した生きたウシ・ヘルペス・ウイルス（BHV-1）；
- 修飾した生きたパラインフルエンザ・ウイルス3型（PI₃）；
- 修飾した生きたウシ呼吸器多核体ウイルス（BRSV）；
- アジュバント；
- 少なくとも1種類の抗原；および
- 獣医学的に許容される基剤、

を含む免疫原性組成物。

10

【請求項2】

前記抗原が不活化されている、請求項1に記載の免疫原性組成物。

【請求項3】

前記アジュバントが、サポニン；サポニン含有水中油型エマルジョン；および/または
クイルA、アンフィジェン(登録商標)およびコレステロールを含む、請求項1に記載の免疫
原性組成物。

【請求項4】

前記抗原が、ウシ・ウイルス性下痢症ウイルス1型（BVDV-1）、ウシ・ウイルス性下痢
症ウイルス2型（BVDV-2）、レプトスピラ・カニコーラ、レプトスピラ・グリッポティフ
ォーサ、レプトスピラ・ボルグペテルセニイ・ハージョ-プラジトゥノ、レプトスピラ・
イクテロヘモルハジア、レプトスピラ・インターロガンズ・ポモナ、レプトスピラ・ボル
グペテルセニイ・ハージョ-ボビス、カンピロバクター・フィタスから成る群から選択さ
れる少なくとも1種類の抗原を含む、請求項1に記載の免疫原性組成物。

20

【請求項5】

上記ウシ・ウイルス性下痢症ウイルス1型（BVDV-1）が細胞変性または非細胞変性であ
り；上記ウシ・ウイルス性下痢症ウイルス2型（BVDV-2）が細胞変性または非細胞変性で
ある、請求項4に記載の免疫原性組成物。

【請求項6】

以下の：

- (a) ウシ・ヘルペス・ウイルス1型；
- (b) ウシ・ウイルス性下痢症ウイルス1型；
- (c) ウシ・ウイルス性下痢症ウイルス2型；
- (d) パラインフルエンザ・ウイルス3型（PI₃）；
- (e) ウシ呼吸器多核体ウイルス（BRSV）；
- (f) カンピロバクター・フィタス；または

30

(g) レプトスピラ・カニコーラ、レプトスピラ・グリッポティフォーサ、レプトス
ピラ・ボルグペテルセニイ・ハージョ-プラジトゥノ、レプトスピラ・イクテロヘモルハ
ジア、レプトスピラ・インターロガンズ・ポモナ、レプトスピラ・ボルグペテルセニイ・
ハージョ-ボビス、レプトスピラ・ブラチスラバ、ネオスポラ・カニナム、トリコモナス
・フィタス、マイコプラズマ・ボビス、ヘモフィルス・ソムナス、マンハイミア・ヘモリ
ティカ、およびパスツレラ・ムルトシダから成る群から選択される抗原、

40

の少なくとも1つに対する免疫応答を対象となる動物に誘導する方法であって、免疫学的
に有効な量の請求項1に記載の組成物と、獣医学的に許容される基剤を投与するステップ
を含む前記方法。

【請求項7】

以下の：

- 修飾した生きたウシ・ヘルペス・ウイルス（BHV-1）；
- 修飾した生きたパラインフルエンザ・ウイルス3型（PI₃）；
- 修飾した生きたウシ呼吸器多核体ウイルス（BRSV）；
- アジュバント；

50

少なくとも1種類の抗原；および
獣医学的に許容される基剤、
を含むワクチン組成物。

【請求項 8】

動物におけるBHV-1から成る群から選択されるウイルスによって起こる流産の予防方法であって、治療に有効な量の請求項7に記載のワクチン組成物を上記動物に投与するステップを含む前記方法。

【請求項 9】

前記動物が、乳牛、子牛、未経産雌牛、去勢した雄牛、去勢していない雄牛のいずれかである、請求項8に記載の方法。

10

【請求項 10】

BVDV1型もしくは2型、BHV-1、PI₃、BRSVから成る群から選択されるウイルスの感染によって起こる動物の疾患または異常の治療または予防方法であって、治療に有効な量の請求項7に記載のワクチン組成物を上記動物に投与するステップを含む前記方法。

【請求項 11】

レプトスピラ・カニコラ、レプトスピラ・グリッポティフォーサ、レプトスピラ・ボルグペテルセニイ・ハージョ・プラジトゥノ、レプトスピラ・イクテロヘモルハジア、レプトスピラ・インターロガンズ・ポモナ、レプトスピラ・ボルグペテルセニイ・ハージョ・ボビス、レプトスピラ・ブラチスラバ、カンピロバクター・フィタス、ネオスポラ・カニナム、トリコモナス・フィタス、マイコプラズマ・ボビス、ヘモフィルス・ソムナス、マンハイミア・ヘモリティカ、およびパスツレラ・ムルトシダから成る群から選択される抗原の感染によって起こる動物の疾患または異常の治療または予防方法であって、治療に有効な量の請求項7に記載のワクチン組成物を上記動物に投与するステップを含む前記方法。

20

【請求項 12】

対象となる動物の持続的な胎仔感染の予防方法であって、有効な量の請求項7に記載のワクチン組成物を上記動物に投与するステップを含む前記方法。

【請求項 13】

以下の：

- 修飾した生きたウシ・ヘルペス・ウイルス (BHV-1)；
- 修飾した生きたパラインフルエンザ・ウイルス3型 (PI₃)；
- 修飾した生きたウシ呼吸器多核体ウイルス (BRSV)；
- 細胞変性BVD-2；
- BVD-1；

30

アジュバント；ならびに

レプトスピラ・カニコラ、レプトスピラ・グリッポティフォーサ、レプトスピラ・ボルグペテルセニイ・ハージョ・プラジトゥノ、レプトスピラ・イクテロヘモルハジアと、レプトスピラ・インターロガンズ・ポモナ、レプトスピラ・ボルグペテルセニイ・ハージョ・ボビス、レプトスピラ・ブラチスラバ、およびカンピロバクター・フィタスから成る群から選択される少なくとも1種類の抗原；そして

40

獣医学的に許容される基剤、
を含むワクチン組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、混合ワクチンと、ウシ・ウイルス性下痢症ウイルス (Bovine Viral Diarrhea Virus) (BVDV) 1型と2型、ウシ・ヘルペス・ウイルス1型 (Bovine Herpes Virus Type -1) (BHV-1)、ウシ呼吸器多核体ウイルス (Bovine Respiratory Syncytial Virus) (BRSV)、パラインフルエンザ・ウイルス (Parainfluenza Virus) (PI₃)、カンピロバクター・フィタス (Campylobacter fetus)、レプトスピラ・カニコラ (Leptospira cani

50

cola)、レプトスピラ・グリッポティフォーサ (*Leptospira grippotyphosa*)、レプトスピラ・ボルグペテルセニイ・ハージョ-ブラジトゥノ (*Leptospira borgpetersenii hardjo-prajitno*)、レプトスピラ・イクテロヘモルハジア (*Leptospira icterohaemorrhagiae*)、レプトスピラ・ボルグペテルセニイ・ハージョ-ボビス (*Leptospira borgpetersenii harjo-bovia*)、及びレプトスピラ・インターロガンズ・ポモナ (*Leptospira interrogans pomona*) の感染によって起こる動物の疾患または異常を治療または予防するため、その動物に有効な量の混合ワクチンを投与する操作を含む方法とに関する。混合ワクチンとしては、細胞の全体または一部が不活化または修飾された生の調製物が可能である。

【背景技術】

【0002】

ウシ呼吸疾患 (BRD) 複合体に関係する5つのウイルス媒体、すなわちウシ・ヘルペス・ウイルス1型 (BHV-1) (感染性ウシ鼻気管炎ウイルス (IBR) としても知られる)、ウシ・ウイルス性下痢症ウイルス (BVDV) 1型と2型、ウシ呼吸器多核体ウイルス (BRV)、ラインフルエンザ・ウイルス (PI₃) は呼吸系と生殖系の感染症を引き起こすため、世界中の乳牛-子牛と乳業にとって経済的に重要である。BRDは、急性呼吸疾患や流産など、さまざまな臨床症候群を引き起こす。BRDになったときの呼吸形態は、呼吸管粘膜の炎症、膨潤、出血、壊死を特徴としており、高熱、食欲不振、鬱状態、鼻からの分泌物、呼吸困難、鼻口部の炎症を伴うことがある。IBRウイルスやBVDVウイルスによる流産は、妊娠期間中のどの時期にでも起こる可能性があるが、主に妊娠中の後半期に起こり、他の臨床的な徴候のないことがしばしばある (Ellis他、JAVMA、第208巻、393-400ページ、1996年；Ellsworth他、1994年、「第74回動物の疾患に関する研究者の会議」のプロシーディング、34ページ)。

【0003】

ウシ・ヘルペス・ウイルス1型 (BHV-1) は、ヘルペスウイルス亜属のメンバーであり、家畜にさまざまな臨床形態の疾患 (呼吸器感染症、生殖器感染症、結膜炎、脳炎、流産) を引き起こす。BHV-1による感染症を制御するため、これまでは弱毒化したウイルスを含む生ワクチン (Gerber, J.D.他、Am. J. Vet. Res., 第39巻、753-760ページ、1978年；Mitchell, D., Can. Vet. Jour., 第15巻、148-151ページ、1974年)、不活化したウイルスを含むワクチン (Frerichs, G.N.他、Vet. Rec., 第111巻、116-122ページ、1982年)、ウイルスのサブユニット (例えばBHV-1の3つある重要な糖タンパク質 (gI, gII, gIVと名づけられている) のうちの1つ) を含むワクチン (Babiuk, L.A.他、Virology, 第159巻、57-66ページ、1987年；van Drunen, S.他、Vaccine, 第11巻、25-35ページ、1993年) が使用されてきた。さらに、(従来技術においてBHV-1 gIVと名づけられた) BHV-1のgIV糖タンパク質の組み換え切断体は、BHV-1に対して粘膜免疫を誘導する能力を有することが明らかになっている (van Drunen, S.他、Vaccine, 第12巻、1295-1302ページ、1994年)。しかし従来技術によるBHV-1ワクチンを妊娠した家畜に使用するのは、その家畜が血清反応陽性であるか血清反応陰性であるかに関係なく禁忌であり、子牛に授乳している乳牛で使用するのも禁忌である。

【0004】

BVDV1型と2型は、さまざまな臨床的症候群に関係する。多くの研究により、このウイルスが原発性呼吸疾患を引き起こすこと；持続感染している (PI) ウシは、周囲の影響を受けやすい子牛の主要な感染源であること；BVDVは白血球細胞のリザーバを感染させ、免疫系の深刻かつ広範な欠陥を引き起こすことが明らかになった。Ellis他、JAVMA、第208巻、393-400ページ、1996年；Baum他、『概説集：食用動物の飼育における感染性疾患』、トレントン、ニュージャージー州、獣医学学習システム、113-121ページ、1993年；Meyling他、Agric. Pestivirus Infect. Rumin., 225-231ページ、1987年。流産または乾性壊疽は、妊娠した家畜が特に第1トリメスターの時期に感染したときに起こる可能性がある。Bolin他、Am. J. Vet. Res., 第52巻、1033-1037ページ、1989年。粘膜疾患は、ウシ・ウイルス性下痢 (BVD) の別の症状であって死に至ることがしばしばあるが、この粘膜疾患は、胎仔が初期に非傷害性BVDVバイオタイプに感染してウイルスに対する免疫寛容が進

10

20

30

40

50

展し、持続感染している (PI) 子牛が誕生し、その結果として細胞変性BVDVバイオタイプに重複感染したことの結果である。Bolin他、Am. J. Vet. Res.、第52巻、1033-1037ページ、1989年。BVDV2型は、主として乳牛における中心的な出血性BVDV単離物であることが確認された後、米国のほとんどの地域でBVDVに関係した流産と呼吸器疾患の両方から単離される優勢な株になった。Van Oirschot他、Vet. Micro.、第64巻、169-183ページ、1999年。

【0005】

BVDVは、ペスチウイルス属とフラビウイルス科に分類される。BVDVは、ヒツジのボーダー病と古典的なトンコレラを引き起こすウイルスと密接な関係がある。感染した家畜は、高熱、下痢、咳、消化管粘膜の潰瘍を特徴とする“粘膜疾患”の症状を示す (Olafson他、Cornell Vet.、第36巻、205-213ページ、1946年；Ramsey他、North Am. Vet.、第34巻、629-633ページ、1953年)。BVDウイルスは、妊娠した家畜の胎盤を通過することができ、PI状態の子牛を誕生させる可能性がある (Malmquist、J. Am. Vet. Med. Assoc.、第152巻、763-768ページ、1968年；Ross他、J. Am. Vet. Med. Assoc.、第188巻、618-619ページ、1986年)。このような子牛はそのウイルスに対して免疫寛容になっており、一生を通じてウイルス血症の状態が続く。このような子牛は、粘膜疾患の発生源となり (Liess他、Dtsch. Tieraerztl. Wschr.、第81巻、481-487ページ、1974年)、肺炎や腸疾患などの疾患を引き起こす微生物に非常に感染しやすい傾向がある (Barber他、Vet. Rec.、第17巻、459-464ページ、1985年)。

【0006】

培養細胞におけるBVDVウイルスの増殖に関する研究により、BVDVウイルスは2つのウイルス・バイオタイプに分類されている。すなわち、感染した細胞に細胞傷害効果を誘導する (cp) ウイルスと、感染した細胞に細胞傷害効果を誘導しない (ncp) ウイルスである (Lee他、Am. J. Vet. Res.、第18巻、952-953ページ；Gillespie他、Cornell Vet.、第50巻、73-79ページ、1960年)。cp変異体は、ncpウイルスに以前に感染したPI動物から生じる可能性がある (Howard他、Vet. Microbiol.、第13巻、361-369ページ、1987年；Corapi他、J. Virol.、第62巻、2823-2827ページ、1988年)。BVDVウイルスの5'非翻訳領域 (NTR) の遺伝的多様性とビリオンの表面にある糖タンパク質E2の抗原性の違いに基づき、2つの主要な遺伝子型が提案された。1型と2型である。BVDV1型は、古典的または伝統的なウイルス株であり、免疫のある動物に通常は軽い下痢だけを引き起こすのに対し、BVDV2型は毒性の大きなエマージング・ウイルスであり、血小板減少症、出血、急性の致命的疾患を引き起こす可能性がある (Corapi他、J. Virol.、第63巻、3934-3943ページ；Bolin他、Am. J. Vet. Res.、第53巻、2157-2163ページ；Pellerin他、Virology、第203巻、260-268ページ、1994年；Ridpath他、Virology、第205巻、66-74ページ、1994年；Carman他、J. Vet. Diagn. Invest.、第10巻、27-35ページ、1998年)。BVDVウイルスの1型と2型は、一群のモノクローナル抗体 (Mabs) と、動物の体内に生成させたウイルス特異的抗血清を用いた交差中和により、はっきりと異なる抗原性を有することがわかる (Corapi他、Am. J. Vet. Res.、第51巻、1388-1394ページ、1990年)。どちらの遺伝子型のウイルスも、2つのバイオタイプ的一方、すなわちcpウイルスまたはncpウイルスとして存在することができる。

【0007】

BVDウイルスに感染した動物の研究から、BVDウイルスが動物においてB細胞とT細胞の両方の応答を誘導することが示唆される (Donis他、Virology、第158巻、168-173ページ、1987年；Larsson他、Vet. Microbiol.、第31巻、317-325ページ、1992年；Howard他、Vet. Immunol. Immunopathol.、第32巻、303-314ページ、1992年；Lambot他、J. Gen. Virol.、第78巻、1041-1047ページ、1997年；Beer他、Vet. Microbiology、第58巻、9-22ページ、1997年)。

【0008】

化学的に不活性なBVDウイルス単離物を用いて多数のBVDVワクチンが開発されている (Fernelius他、Am. J. Vet. Res.、第33巻、1421-1431ページ、1972年；Kolar他、Am. J. V

10

20

30

40

50

et. Res., 第33巻、1415-1420ページ、1972年；McClurkin他、Arch. Virol., 第58巻、119ページ、1978年）。不活化したウイルスを用いたワクチンだと、一次免疫を実現するのに複数回の投与が必要である。BVDVワクチンは、BVDV1型の感染だけに対する保護効果がある（Beer他、Vet. Microbiology, 第77巻、195-208ページ、2000年）。不活化BVDVワクチンは免疫期間が短くて交差タイプの保護には不十分であるため、これまで胎仔の保護は実現していない（Bolin, Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract., 第11巻、615-625ページ、1995年）。

【0009】

それに対して修飾した生ウイルス（MLV）ワクチンは、保護レベルがより高い。現在のところ、認可されているBVDV MLVワクチンは、ウシまたはブタの細胞内で継代培養して得られる弱毒化したウイルスを用いて製造される（Coggins他、Cornell Vet., 第51巻、539-、1961年；Phillips他、Am. J. Vet. Res., 第36巻、135-、1975年）か、あるいは温度感受性表現型を示す化学的に修飾したウイルスを用いて製造される（Lobmann他、Am. J. Vet. Res., 第45巻、2498-、1984年；Am. J. Vet. Res., 第47巻、557-561ページ、1986年）。MLVワクチンを1回投与するだけで免疫化には十分であり、ワクチンを投与した家畜で免疫期間が数年にわたって続く可能性がある。しかしこのワクチンはBVDV1型ウイルス株を用いて開発されたため、保護効果は1型ウイルスに対してだけである。さらに、入手できるBVDVワクチンは、妊娠した家畜や、子牛に授乳している妊娠中の乳牛には適応でない。

10

【0010】

一般にPI₃ウイルスは、単独で作用するときには軽度の疾患しか引き起こさない。しかしこのウイルスは、より病原性の強い生物（例えばIBRウイルス、BRV、BVDV）による呼吸管の二次感染を起こす傾向があるため、古典的な船舶熱候群が起こる。家畜に呼吸器疾患を引き起こすことが知られているさまざまなウイルスのうちでPI₃ウイルスが最も一般的なものである。Ellis他、JAVMA、第208巻、393-400ページ、1996年。

20

【0011】

BRVは下部呼吸管を好み、感染の重症度は、主に、カギとなるウイルス・タンパク質に対する免疫系の応答によって決まる。Bolin他、Am. J. Vet. Res., 第51巻、703ページ、1990年。病気になった家畜は、一般に、非特異的な症状として、例えば鼻および目からの分泌物、軽度でしばしば二相性の発熱、乾いた空咳といった症状を示す。より重症の家畜では、激しい咳、口を開けた苦しそうな呼吸、口の周辺の泡状になった唾液が見られ、飲食できないことがある。Ellis他、JAVMA、第208巻、393-400ページ、1996年。

30

【0012】

レプトスピラ属のスピロヘータによって起こるレプトスピラ症は、経済的に重要な、家畜の人獣共通伝染性感染症である。レプトスピラ・ボルグペテルセニイの血清型ハージョ（L.ハージョ）とL.インターロガンスの血清型ポモナ（L.ポモナ）は、世界中の家畜のレプトスピラ症で最も一般的に見られる2つの血清型である。米国の家畜に関するある調査によると、29%がL.ハージョに血清反応し、23%がL.ポモナに血清反応した。レプトスピラは粘膜または皮膚の傷口から体内に侵入し、血液を通じて体中に広がる。レプトスピラは腎臓と生殖管に向かう傾向があり、目の硝子体液や中枢神経系には少ない。最も一般的な感染手段は、感染した尿、乳、胎盤液との直接的または間接的な接触であるが、性交や卵巣を経由した感染も知られている。家畜がレプトスピラに感染すると、急性の発熱、乳汁分泌欠如、流産が起こったり、未熟で弱い感染した子牛が誕生したりすることがあり、しかも交配が失敗したり妊娠率が低くなったりする可能性がある。感染は抗生物質で治療できるが、授乳または妊娠していない家畜では感染が明らかでないことがある。そのような家畜では腎臓の急性または慢性の感染が起こり、毒性を持った生物を含む尿が放出される。すると今度は、他の動物やその動物の世話をしている人が感染する可能性がある。レプトスピラに対する免疫は血清型特異的である。ワクチンが長年にわたって使われているにもかかわらず、そのほとんどは、弱くて短期間の免疫しか誘導しない。

40

【発明の開示】

50

【0013】

したがって、妊娠している乳牛、授乳している乳牛、子牛にとって安全で、ミルクと肉の市場でのニーズに合致する、多彩な抗原から保護するための混合ワクチンを開発する必要がある。本発明により、動物における呼吸疾患と生殖疾患の主要な感染原因を治療・予防するためのワクチンが提供される。さらに本発明により、動物における疾患または異常を治療または予防するための免疫原性組成物と方法が提供される。

【0014】

本発明により、BVDV1型、BVDV2型、BHV-1、PI₃、BRSV、カンピロバクター・フィタス、レプトスピラ・カニコーラ、レプトスピラ・グリッポティフォーサ、レプトスピラ・ボルグペテルセニイ・ハージョ-プラジトゥノ、レプトスピラ・イクテロヘモルハジア、レプトスピラ・ボルグペテルセニイ・ハージョ-ボビス、レプトスピラ・インターロガンズ・ポモナのうちの少なくとも1つに感染することによって起こる動物の疾患または異常を治療または予防する方法であって、有効な量の混合ワクチンをその動物に投与する操作を含む方法が提供される。

10

【0015】

本発明により、ウシ、特に乳牛を呼吸器感染症と生殖器感染症から保護する方法が提供される。本発明により、動物（例えば妊娠した乳牛）を、IBRによって起こる流産や、BVDV1型と2型によって起こる持続性胎仔感染から保護する方法が提供される。さらに本発明により、動物（例えば乳を出している乳牛や子牛に授乳している妊娠中の乳牛）を、BVDV1型と2型によって起こる持続感染から保護する方法も提供される。したがって本発明により、繁殖年齢の動物、妊娠している動物、乳を出している動物を保護する方法が提供される。

20

【0016】

本発明で使用する混合ワクチンとしては、細胞の全体または一部の調製物（例えば修飾した生調製物）が可能である。本発明に従って投与する混合ワクチンは、追加成分として、例えばアジュバントや、オプションとなる第2またはそれ以上の抗原を含むことができる。第2の抗原の選択は、ウシ・ヘルペス・ウイルス1型（BHV-1）、ウシ・ウイルス性下痢症ウイルス（BVDV1型または2型）、ウシ呼吸器多核体ウイルス（BRSV）、パラインフルエンザ・ウイルス（PI₃）、レプトスピラ・カニコーラ、レプトスピラ・グリッポティフォーサ、レプトスピラ・ボルグペテルセニイ・ハージョ-プラジトゥノ、レプトスピラ・イクテロヘモルハジア、レプトスピラ・インターロガンズ・ポモナ、レプトスピラ・ボルグペテルセニイ・ハージョ-ボビス、レプトスピラ・ブラチスラバ（*Leptospira bratislava*）、カンピロバクター・フィタス（*Campylobacter Fetus*）、ネオスポラ・カニナム（*Neospora canonum*）、トリコモナス・フィタス（*Trichomonus fetus*）、マイコプラズマ・ボビス（*Mycoplasma bovis*）、ヘモフィルス・ソムナス（*Haemophilus somnus*）、マンハイミア・ヘモリティカ（*Mannheimia haemolytica*）、パストレラ・ムルトシダ（*Pasturella multocida*）の中から行なうが、選択肢がこれだけに限られることはない。

30

発明の詳細な説明

【0017】

本発明により、IBR、BVDV、PI₃、BRSV、カンピロバクター・フィタス、レプトスピラのうちの少なくとも1つに感染することによって起こる動物の疾患または異常を治療または予防する方法であって、有効な量の混合ワクチンをその動物に投与する操作を含む方法が提供される。

40

【0018】

いくつかの実施態様では、本発明の方法で使用するワクチンは、修飾した生ワクチンと薬理的に許容される基剤を含んでいるか、あるいは修飾した生ワクチンとアジュバントを含んでいる。

【0019】

開示内容を明確にするため、本発明の詳細な説明をサブセクションに分け、その中で本発明のいくつかの特徴、実施態様、応用を記述または説明する。

50

【0020】

定義と略号

この明細書で疾患または異常に関して用いる“治療または予防”という用語は、毒性を持つBVDVウイルスの1型または2型；IBR；PI₃；BRSV；カンピロバクテリア；レプトスピラといった抗原のうちの少なくとも1つに感染するリスクを減らす、またはなくすこと、感染症の症状を改善または緩和すること、感染症からの回復を促進することを意味する。治療と考えられるのは、ウイルスまたは細菌の量が減った場合、肺感染が減った場合、直腸温が下がった場合、餌の摂取および/または成長の増大がある場合のうちの少なくとも1つが見られるときである。また、胎仔の感染が減った場合や、例えばレプトスピラの血清型ハージョやポモナに感染したことによる尿の放出が減った場合も、治療と考えられる。

10

【0021】

本発明の方法は、例えば、IBRによって起こる流産、BVDV1型と2型によって起こる感染の予防または低減、直腸温の低下に効果がある。したがって本発明により、IBRからの胎仔の保護、BVDV1型と2型によって起こる感染からの胎仔の保護、家畜ヘルペスと家畜ペストウイルスからの胎仔の保護が実現すると考えられる。本発明により、BVDV1型と2型によって起こる持続性胎仔感染（例えば持続性BVDV感染）に対する保護も実現すると考えられる。“持続性胎仔感染”は、胎仔の初期成長期（例えば妊娠後45-125日の間）に感染が起こったことでBVDVに対して免疫寛容になった動物が誕生し、その動物の体内で何ヶ月または何年にもわたって活性なBVDVの複製と増殖が高いレベルで続くため、その動物が群の中で持続的なBVDV供給源となることを意味する。持続感染した動物は、細胞変性ウイルス・

20

【0022】

“混合ワクチン”という用語は、2種類以上の抗原（例えば修飾した生抗原および/または不活化した抗原）の二価または多価の組み合わせを意味する。本発明によれば、混合ワクチンに含めることができるのは、修飾した生の感染性IBR、PI₃、BRSV、不活化したBVDV1型と2型、1つ以上の抗原（例えばレプトスピラ・カニコーラ、レプトスピラ・グリッポティフォーサ、レプトスピラ・ボルグペテルセニイ・ハージョ-プラジトゥノ、レプトスピラ・イクテロヘモルハジア、レプトスピラ・インターロガンズ・ポモナ、レプトスピラ・ボルグペテルセニイ・ハージョ-ボビス、レプトスピラ・ブラチスラバ、カンピロバクター・フィタス、ネオスポラ・カニナム、トリコモナス・フィタス、マイコプラズマ・ボビス、ヘモフィルス・ソムナス、マンハイミア・ヘモリティカ、パスツレラ・ムルトシダなど）、獣医学的に許容される基剤、アジュバントである。好ましい一実施態様では、修飾した生IBR成分は、温度感受性IBRである。別の好ましい一実施態様では、BVDV2型成分は、細胞変性（cpBVD-2の53637株：ATCC第PTA-4859）であり、BVDV1型成分は、細胞変性5960（cpBVD-1の5960株：国立動物疾患センター、米国農業省、エイムズ、アイオワ州）である。本発明では、非細胞変性のBVDV1型株と2型株も考える。さらに別の好ましい一実施態様では、修飾した生きた抗原は、乾燥状態、凍結乾燥状態、ガラス化状態のいずれかの状態にされている。

30

【0023】

本発明によれば、混合ワクチンに含まれるのは、不活化したBVDV1型と2型、1つ以上の抗原（例えばレプトスピラ・カニコーラ、レプトスピラ・グリッポティフォーサ、レプトスピラ・ボルグペテルセニイ・ハージョ-プラジトゥノ、レプトスピラ・イクテロヘモルハジア、レプトスピラ・インターロガンズ・ポモナ、レプトスピラ・ボルグペテルセニイ・ハージョ-ボビス、レプトスピラ・ブラチスラバ、カンピロバクター・フィタス、ネオスポラ・カニナム、トリコモナス・フィタス、マイコプラズマ・ボビス、ヘモフィルス・ソムナス、マンハイミア・ヘモリティカ、パスツレラ・ムルトシダなど）、獣医学的に許容される基剤、アジュバントである。この明細書で用いる“混合ワクチン”という用語は、少なくとも1つの修飾した生抗原と、少なくとも1つの第2の抗原と、感染のリスクを防止または低減する、および/または感染の症状を改善するアジュバントとを含む多成分組成物も意味する。好ましい一実施態様では、第2の抗原は不活化されている。好ましい一

40

50

実施態様では、混合ワクチンの供給源は、プレグシュア（登録商標）5（ファイザー社）、プレグシュア（登録商標）5-L5（ファイザー社）、プレグシュア（登録商標）5-VL5（ファイザー社）である。混合ワクチンの特に好ましい供給源は、プレグシュア（登録商標）5-VL5である。

【0024】

病原菌に対する混合ワクチン組成物の保護効果は、通常は、対象に免疫応答（細胞免疫応答と体液性免疫応答の一方または両方）を誘導することによって実現される。一般に、BVDV、IBR、PI₃のうち少なくとも1つの感染がなくなる、あるいは少なくなること、症状が改善すること、感染した対象からのウイルス除去が促進されることは、混合ワクチン組成物の保護効果を示している。本発明のワクチン組成物は、BVDウイルス1型と2型の一方または両方によって起こる感染のほか、BHV-1（IBR）によって起こる流産や、PI₃またはBVDVによって起こる呼吸器感染症に対する保護効果を有する。

10

【0025】

IBR、BVDV、PI₃、BRSV、カンピロバクター・フィタス、レプトスピラのうち少なくとも1つに感染することによって起こる疾患または異常を混合ワクチンの投与によって治療または予防する本発明の方法も、この明細書では予防接種法と呼ぶ。

【0026】

本発明の方法で用いることのできる“混合ワクチン”という用語には、例えば、全体または一部を不活化したカンピロバクター・フィタスおよび/またはレプトスピラの細胞調製物、不活化したBVDV1型と2型、1つ以上の修飾した生の抗原（例えばBHV-1、PI₃、BRSVのうち少なくとも1つ）、のうちの少なくとも1つが含まれる。

20

【0027】

一実施態様では、本発明のワクチン組成物は、上記のBVDVウイルスとして、cpBVD-2の53537株（ATCC PTA-4859）；cpBVD-1の5960株（cpBVD-1の5960株：国立動物疾患センター、米国農業省、エームズ、アイオワ州）；IBR ts突然変異株RBL 106（国立獣医学研究センター、ブリュッセル、ベルギー）；PI₃ ts突然変異株RBL 103（RIT、リクサンザール、ベルギー）；BRSVの375株（獣医学研究センター、エームズ、アイオワ州）のうち1つ以上を有効な量含んでいることが好ましい。精製したBVDVウイルスをワクチン組成物に直接使用すること、あるいはBVDVウイルスを試験管内で化学的不活化または継代培養することによってさらに弱毒化することができるが、後者が好ましい。一般にワクチンは、プラークまたはコロニーを形成する約 1×10^3 ~ 約 1×10^{10} 個のウイルス単位と、獣医学的に許容される基剤と、アジュバントとを、0.5 ~ 5ml（好ましくは約2ml）の体積の中に含んでいる。保護効果を与えるのに有効なワクチン組成物に含まれるウイルスの正確な量は、獣医学の当業者が決めることができる。ワクチン組成物で使用するのに適した獣医学的に許容される基剤は、後出のものの中から自由に選ぶことができる。

30

【0028】

典型的な投与経路は筋肉内注射または皮下注射であり、約0.1 ~ 約5mlのワクチンを注射することになる。本発明のワクチン組成物は、追加の活性成分として、例えばBVDVに対するワクチン組成物も含むことができる。そのような追加活性成分としては、例えばWO 95/12682、WO 99/55366、米国特許第6,060,457号、第6,015,795号、第6,001,613号、第5,593,873号に記載されているものがある。

40

【0029】

ワクチン接種は、1回または複数回の接種によって実現することができる。望むのであれば、接種した動物から血清を回収し、BVDウイルスに対する抗体が存在しているかどうかを検査することができる。

【0030】

本発明の別の実施態様では、ワクチン組成物を用いてBVDV感染症を治療する。したがって本発明により、BVDウイルス1型と2型の一方または両方によって対象となる動物に起こる感染症を、本発明のBVDウイルスを治療に有効な量投与することによって治療する方法が提供される。別の実施態様では、本発明のワクチン組成物は、家畜群の出生率を向

50

上させることと、家畜からその家畜の世話をする人に疾患が移るリスクを減らすことに役立つ。

【0031】

“対象となる動物”という表現には、BVDV、BHV、PI₃、BRSV、レプトスピラに感染するあらゆる動物（例えばウシ、ヒツジ、ブタ）が含まれる。

本発明の方法を実施する際には、本発明のワクチン組成物を、好ましくは筋肉内経路または皮下経路を通じて家畜に投与する。しかし他の投与経路も利用することができる。例えば、経口、鼻腔内（例えばエーロゾルまたはそれ以外の針なし投与法）、リンパ節内、皮膚内、腹腔内、直腸、膣のいずれかの経路、あるいはこれら経路の組み合わせを利用することができる。追加投与が必要となる可能性がある。また、投与計画を調節して最適な免疫が得られるようにすることができる。

10

【0032】

“免疫原性”とは、BVDウイルスが、動物にBVDウイルス1型と2型の一方または両方に対する免疫応答を引き起こすことのできる能力を意味する。免疫応答としては、細胞変性T細胞が中心となって起こる細胞性免疫応答、あるいは、B細胞を活性化して抗体を産生させるヘルパーT細胞が中心となって起こる体液性免疫応答が可能である。

【0033】

本発明によれば、ウイルスは、化学的不活化によって、あるいは細胞培養物の中で継代培養することによって弱毒化した後、免疫原性組成物で使用することが好ましい。弱毒化法は、当業者にはよく知られている。

20

【0034】

本発明の免疫原性組成物に含まれる好ましいウイルスは、BVDV cp53637（ATCC第PTA-4859号）である。本発明の免疫原性組成物に含まれる別の好ましいウイルスは、BVDV 5960である。本発明の免疫原性組成物に含まれるさらに別の好ましいウイルスは、IBR株ts突然変異株RBL 106である。本発明の免疫原性組成物に含まれる別の好ましいウイルスは、PI₃ ts突然変異株RBL 103である。本発明の免疫原性組成物に含まれるさらに別の好ましいウイルスは、BRSVの375株である。

【0035】

本発明の免疫原性組成物は、追加の活性成分として、例えばBVDVに対する他の免疫原性組成物も含むことができる。そのような追加活性成分として、例えば同時係属中の出願であるシリアル番号第08/107,908号、WO 95/12682、WO 99/55366、米国特許第6,060,457号、第6,015,795号、第6,001,613号、第5,593,873号に記載されているものが挙げられる。

30

【0036】

さらに、本発明の免疫原ワクチン組成物は、1種類以上の獣医学的に許容される基剤を含むことができる。この明細書では、“獣医学的に許容される基剤”に、あらゆる溶媒、分散媒体、コーティング、アジュバント、安定剤、希釈剤、保存剤、抗菌剤、抗真菌剤、等張剤、吸収遅延剤などが含まれる。希釈剤としては、水、生理食塩水、デキストロース、エタノール、グリセロールなどが挙げられる。等張剤としては、塩化ナトリウム、デキストロース、マンニトール、ソルビトール、ラクトースなどが特に挙げられる。安定剤としては、アルブミンが特に挙げられる。アジュバントとしては、RIBIアジュバント系（リビ社）、ミョウバン、水酸化アルミニウム・ゲル、コレステロール、水中油エマルジョン、油中水エマルジョンなどがあり、具体的には、フロイントの完全アジュバントと不完全アジュバント、ブロック・コポリマー（CytRx社、アトランタ、ジョージア州）、SAF-M（カイロン社、エメリーヴィル、カリフォルニア州）、アンフィジェン（登録商標）アジュバント、サポニン、クイルA、QS-21（ケンブリッジ・バイオテック社、ケンブリッジ、マサチューセッツ州）、GPI-0100（ガレニカ・ファーマシューティカルズ社、バーミンガム、アラバマ州）、他のサポニン分画、モノホスホリル脂質A、アブリジン脂質-アミン・アジュバント、大腸菌からの熱不安定性内毒素（組み換えによるもの、あるいはそれ以外のもの）、コレラ毒素、ムラミル・ジペプチドなどが特に挙げられる。免疫原性組成物はさらに、他の免疫調節剤として、例えばインターロイキン、インターフェロン、他のサイト

40

50

カインのうちの1つ以上を含むことができる。免疫原性組成物は、ゲンタマイシンとメルチオレートも含むことができる。本発明の状況で役に立つアジュバントと添加物の量ならびに濃度は当業者が容易に決定できるとはいえ、本発明では、約50 μ g~約2000 μ gのアジュバントと、好ましくは約500 μ g/2mlの用量のワクチン組成物とを含む組成物を考える。本発明の別の好ましい一実施態様では、約1 μ g/ml~約60 μ g/ml(好ましくは約30 μ g/ml未満)の抗生物質を含むワクチン組成物を考える。

【0037】

本発明の免疫原性組成物は、投与経路に合わせてさまざまな形態にすることができる。例えば免疫原性組成物を、注射に適した滅菌水溶液または滅菌分散液の形態にすること、あるいは凍結乾燥技術を利用して凍結乾燥した形態にすることができる。凍結乾燥免疫原性組成物は、一般に約4に維持し、アジュバントとともに、あるいはアジュバントなしで安定化溶液(例えば生理食塩水および/またはヘブス)の中に再構成することができる。

10

【0038】

本発明の免疫原性組成物を対象となる動物に投与すると、BVDウイルス1型と2型の一方または両方に対する免疫応答を誘導することができる。したがって本発明の別の一実施態様によれば、対象となる動物に本発明による上記の免疫原性組成物を有効な量投与することによってBVD2型ウイルスまたはBVD1型ウイルスと2型ウイルスの組み合わせに対する免疫応答を促進する方法が提供される。“対象となる動物”という表現には、BVDVに感染するあらゆる動物(例えばウシ、ヒツジ、ブタ)が含まれる。

20

【0039】

本発明の方法によれば、対象となる動物に投与することが好ましい免疫原性組成物として、BVDV cp53637ウイルスおよび/またはBVDV cp5960ウイルスがある。BVDVウイルス(このBVDVウイルスは、化学的不活化または培養物中での継代培養によって弱毒化することが好ましい)を含む免疫原性組成物は、筋肉内または皮下という経路を通じて家畜に投与するが、他の投与経路を利用することもできる。例えば、経口、鼻腔内、リンパ節内、皮膚内、腹腔内、直腸、膈のいずれかに投与することや、これら経路の組み合わせが挙げられる。

【0040】

免疫化プロトコルは、従来技術でよく知られている手続きを利用して最適化することができる。動物に1回投与すること、あるいは2~10週間の間隔で2回以上接種することが可能である。動物の年齢に応じ、免疫原性組成物またはワクチン組成物を再投与することができる。例えば本発明では、BVDV1型と2型によって起こる感染から胎仔を保護するため、生後6ヶ月になる前の健康な家畜にワクチン接種を行ない、生後6ヶ月の時点でワクチンの再接種を行なうことを考える。本発明の別の実施態様では、交配の約5週間前に家畜にワクチンを接種し、交配の約2週間前に再度ワクチンを接種することを考える。半年ごとに混合ワクチンを1回再接種して胎仔がBVDVに感染しないようにすることも考えられる。

30

【0041】

家畜に誘導される免疫応答の程度と性質は、さまざまな方法で評価することができる。例えば接種した動物から血清を回収し、BVDVウイルスに対して特異的な抗体の存在を、例えば一般的なウイルス中和アッセイによって調べるとよい。

40

【0042】

この明細書では、“家畜”という用語はウシを意味するが、その中には、去勢した雄牛、去勢していない雄牛、乳牛、子牛が含まれる。この明細書で用いる家畜は、妊娠しているウシと授乳しているウシを意味する。本発明の方法は、ヒトでない動物(好ましくは授乳している乳牛、妊娠している乳牛とその胎仔)に適用することが好ましい。

【0043】

“治療に有効な量”または“有効な量”という表現は、混合ワクチンを投与する動物に免疫応答を誘導するのに十分な混合ワクチンの量を意味する。免疫応答には、細胞免疫および/または体液性免疫の誘導が含まれるが、それだけには限られない。治療に有効なワ

50

クチンの量は、用いる具体的なウイルスが何であるか、および/または家畜の状態、および/または感染の程度によって異なっており、獣医が決定することができる。

【0044】

(細胞の一部または全体を)不活化し修飾した生ワクチン

本発明の方法で使用する不活化し修飾した生ワクチンは、従来技術で知られているさまざまな方法を利用して調製することができる。

BVDV単離物は、例えば感染した乳牛の子宮から公知の方法を利用して直接得ることができる。

【0045】

BVDV単離物は、公知のさまざまな方法を利用して不活化することができる。例えば、米
10 国特許第5,565,205号に記載されているように細菌単離物を両性エチレンイミン(BEI)で
処理する方法や、ホルマリン、グルタルアルデヒド、熱、光照射、BPL、または公知の他
の不活化剤を利用して不活化する方法がある。

【0046】

ワクチン生成物は、不活化したウイルス単離物に加え、一般的に使用されている1種類
以上のアジュバントも適量を含むことができる。適切なアジュバントとしては、無機ゲル
(例えば水酸化アルミニウム);界面活性物質(例えばリゾレクチン);グリコシド(例
例えばクイルAやGPI-0100などのサポニン誘導体);プルロニック・ポリオール;ポリアニ
オン;非イオン性ブロック・ポリマー(例えばプルロニックF-127(B.A.S.F.社、米国)
);ペプチド;鉱油(例えばモンタニドISA-50(セピック社、パリ、フランス));カル
20 ボポール、アンフィジェン、アンフィジェン・マークII(ハイドロニクス社、米国)、アル
ヒドロゲル、油性エマルジョン(例えば鉱油(バイヨールF/アルラセルAなど)と水の
エマルジョン、または植物油と水と乳化剤(レシチンなど)のエマルジョン);ミョウバ
ン;ウシのサイトカイン;コレステロール;アジュバントの組み合わせなどが挙げられる
。好ましい一実施態様では、サポニンを含む水中油エマルジョンを一般に微流体化する。

【0047】

本発明のワクチンと方法で使用するのが特に好ましいBVDV1型の供給源は、BVDV5960株
(国立動物疾患センター(NADC)、USDA、エイムズ、アイオワ州から入手)を含むプレグ
シュア(登録商標)(ファイザー社)である。本発明のワクチンと方法で使用するのが特
30 くに好ましいBVDV2型の供給源は、BVDV53637株(ATCC PTA-4859、グウェルフ大学、グウェ
ルフ、オンタリオ州から入手)を含むプレグシュア(登録商標)(ファイザー社)である
。

【0048】

5960株と53637株は、BEIを用いて不活化し、市販のアジュバント(好ましくはクイルA-
コレステロール-アンフィジェン(ハイドロニクス社、米国))をアジュバントとして用
いることが好ましい。本発明による免疫原ワクチン組成物の好ましい用量は約2.0mlであ
る。保存剤が本発明の方法と組成物に含まれていてもよい。本発明で考慮する保存剤とし
ては、ゲンタマイシンとメルチオレートが挙げられる。基剤も添加することができる。基
40 剤は、PBSであることが好ましい。例えば有毒な株を培養物の中で継代培養して弱毒化す
ることによって修飾した生ワクチンを調製する方法は公知である。

【0049】

不活化したBVDV単離物は、以下に示す細菌やウイルスと組み合わせることもできる:ウ
シ・ヘルペス・ウイルス1型(BHV-1)、ウシ呼吸器多核体ウイルス(BRSV)、パラインフ
ルエンザ・ウイルス(PI₃)、カンピロバクター・フィタス、レプトスピラ・カニコラ
、レプトスピラ・グリッポティフォーサ、レプトスピラ・ボルグペテルセニイ・ハージョ
-ブラジトゥノ、レプトスピラ・イクテロヘモルハジア、レプトスピラ・ボルグペテルセ
50 ニイ・ハージョ-ボビス、レプトスピラ・インターロガンズ・ポモナなどである。

【0050】

投与量と投与形態

本発明によれば、家畜(例えば妊娠している乳牛や、子牛に授乳している妊娠中の乳牛

10

20

30

40

50

）に投与する混合ワクチンの有効な量により、ウシ・ウイルス性下痢症ウイルス（1型と2型）に伴う疾患と胎仔の感染に対する効果的な免疫が提供される。一実施態様では、混合ワクチンを約3～4週間の間隔を空けて子牛に2回投与する。例えば動物の年齢が約1ヶ月～約3ヶ月のときに第1回目の投与を行なう。第2回目の投与は、混合ワクチンを最初に投与してから約1～約4週間後に行なう。

【0051】

好ましい一実施態様では、動物を交配させる約5週間前に最初の投与を行なう。2回目の投与は、交配の約2週間前に行なう。その後のワクチン投与は、毎年行なうことが好ましい。別の好ましい一実施態様では、約6ヶ月未満の年齢のときにワクチンを接種した動物は、年齢が6ヶ月を過ぎた後に再度ワクチンを接種する必要がある。その後のワクチンの投与は、毎年行なうことが好ましい。

10

【0052】

混合ワクチンの有効な量は、ワクチンの成分と投与スケジュールによって異なる。一般に、不活化したウシ・ウイルス性下痢症ウイルス調製物をワクチンに使用する場合には、単位用量のBVDV（1型と2型）当たり約 10^3 ～約 10^{10} 個（好ましくは約 10^5 ～約 10^8 個）のコロニー形成単位を含むワクチンの量が、約3～4週間の期間に動物に2回投与する場合に効果的である。効果的な免疫を提供する混合ワクチンは、約3～4週間の期間に動物に2回投与する場合に、単位用量のBVDV（1型と2型）当たり約 10^5 ～ 10^8 （好ましくは 10^6 ）個のコロニー形成単位を含んでいる。第1回目の投与は、動物を交配させる約5週間前に行なう。2回目の投与は、交配の約2週間前に行なう。その後のワクチンの投与は、毎年行なうことが好ましい。約6ヶ月未満の年齢のときにワクチンを接種した動物は、年齢が6ヶ月を過ぎた後に再度ワクチンを接種する必要がある。その後のワクチンの投与は、毎年行なうことが好ましい。

20

【0053】

本発明によれば、好ましい製品であるプレグシュア（登録商標）5（ファイザー社）を投与する場合、プレグシュア（登録商標）5は2回投与することが好ましく、それぞれの回に約0.5ml～約5.0mlの量を投与する。投与量は約1.5ml～約2.5mlであることが好ましく、約2mlであることがさらに好ましい。好ましい製品であるプレグシュア（登録商標）5-L5またはプレグシュア（登録商標）5-VL5を投与する場合には、プレグシュア（登録商標）5-L5またはプレグシュア（登録商標）5-VL5は2回投与することが好ましく、それぞれの回に約0.5ml～約10.0mlの量を投与する。投与量は約3ml～約7mlであることが好ましく、約5mlであることがさらに好ましい。第1回目の投与は、動物を交配させる約5週間前に行なう。2回目の投与は、交配の約2週間前に行なう。その後のワクチンの投与は、毎年行なうことが好ましい。約6ヶ月未満の年齢のときにワクチンを接種した動物は、年齢が6ヶ月を過ぎた後に再度ワクチンを接種する必要がある。その後のワクチンの投与は、毎年行なうことが好ましい。

30

【0054】

本発明によれば、投与は、公知の経路を通じて行なうことができる。例えば、経口、鼻腔内、局所、経皮、非経口（例えば静脈内、腹腔内、皮膚内、皮下、筋肉内）などの経路がある。好ましい投与経路は、皮下投与または筋肉内投与である。

40

【0055】

本発明では、最初に1回だけ投与した後、毎年のように再接種することも考える。このようにすると、感染に対する免疫の発生および/または維持を目的として毎年行なう再接種の前に子牛に追加投与を行なう必要がなくなる。

【0056】

本発明に従って投与する混合ワクチンは、追加成分としてアジュバントなどを含むことができる。そのようなアジュバントとしては、例えば、無機ゲル（例えば水酸化アルミニウム）；界面活性物質（例えばコレステロール、リゾレシチン）；グリコシド（例えばクイルA、QS-21、GPI-0100などのサポニン誘導体）；プルロニック・ポリオール；ポリアニオン；非イオン性ブロック・ポリマー（例えばプルロニックF-127）；ペプチド；鉱油（

50

例えばモンタニドISA-50)、カルボポール、アンフィジェン、アルヒドロゲル、油性エマルジョン(例えば鉱油(バイオールF/アルラセルAなど)と水のエマルジョン、または植物油と水と乳化剤(レシチンなど)のエマルジョン);ミョウバン;ウシのサイトカイン;コレステロール;アジュバントの組み合わせなどが挙げられる。

【0057】

本発明によれば、家畜に有効な量の混合ワクチンを年齢が約3ヶ月のときに投与すると、呼吸器感染症と生殖器疾患に対して効果的な免疫が得られ、流産が少なくなる。

本発明により、BVDV(1型と2型)によって起こる感染、IBR、BVDV(1型と2型)、PI₃、BRSVが原因の呼吸器疾患、カンピロバクター症、レプトスピラ症に対する免疫を家畜(例えば乳牛、子牛、交配前の未経産雌牛など)に与える方法であって、BVD(1型と2型)、IBR、PI₃、BRSV、レプトスピラ・カニコーラ、レプトスピラ・グリッポティフォーサ、レプトスピラ・ボルグペテルセニイ・ハージョ-プラジトゥノ、レプトスピラ・イクテロヘモルハジア、レプトスピラ・インターロガンズ・ポモナ、レプトスピラ・ボルグペテルセニイ・ハージョ-ボビス、レプトスピラ・ブラチスラバ、カンピロバクター・フィタスによって起こる感染に対する免疫をその家畜に与えるため、混合ワクチンを少なくとも1回、好ましくは2回、その家畜に投与する操作を含む方法も提供される。

【0058】

好ましい一実施態様では、ワクチンを皮下投与する。別の好ましい一実施態様では、ワクチンを筋肉内投与する。さらに、ワクチンの用量には、約2ml~約7ml(好ましくは約5ml)が含まれており、単位用量のウイルスにつき約 10^3 ~約 10^{10} 個のコロニー形成単位が1mlに含まれている。別の好ましい一実施態様では、ワクチンは約2mlを含んでおり、単位用量のウイルスにつき約 10^3 ~約 10^{10} 個のコロニー形成単位が1mlに含まれている。混合ワクチンは、動物に2回投与することが望ましい。1回は、年齢が約1ヶ月~約3ヶ月のとき、もう1回はその約1~4週間後である。本発明では、1回分の用量を半年ごとに再接種し、交配前に再接種することも考える。

【0059】

本発明により、ウシの胎子を胎子感染および持続性胎子感染から保護する方法であって、BVD(1型と2型)、IBR、PI₃、BRSV、レプトスピラ・カニコーラ、レプトスピラ・グリッポティフォーサ、レプトスピラ・ボルグペテルセニイ・ハージョ-プラジトゥノ、レプトスピラ・イクテロヘモルハジア、レプトスピラ・インターロガンズ・ポモナ、レプトスピラ・ボルグペテルセニイ・ハージョ-ボビス、レプトスピラ・ブラチスラバ、カンピロバクター・フィタスによって起こる感染に対する免疫を胎子に与えるため、動物に少なくとも1回、好ましくは2回混合ワクチンを投与する操作を含む方法も提供される。混合ワクチンは2回投与することが望ましい。1回目は交配の約5週間前、もう1回は交配の約2週間前に投与する。

【0060】

本発明では、有効な量の混合ワクチンを動物(好ましくは家畜)に投与し、異常(例えば持続性胎子感染、生殖異常(例えばこのような動物の流産))を治療または予防することも考える。

本発明のいくつかの実施態様を以下の実施例によって説明するが、本発明がこれら実施例に限定されることはない。

【実施例】

【0061】

実施例1

材料と方法

動物 - 交配に適したBVDV血清陰性(すなわち血清中和[SN]力価が $<1:2$)の56頭の乳牛を複数の供給源から取得し、研究期間中、研究用隔離施設で保管した。それぞれのウシは、それぞれの耳に1つずつ付けたタグによって特定した。ウシが耳のタグを紛失した場合には、新しいタグを取り付けた。研究を始める前に、レプトスピラ症、カンピロバクター症(ピブリオ症)、クロストリジウムの感染に対する市販のワクチンをテスト用の

ウシに接種した。テスト用のウシを担当獣医の監督下に置いた。獣医は、臨床面からウシを毎日観察した。

【0062】

テスト用ワクチン - テスト用ワクチンは、感染性ウシ鼻気管炎（IBR）-パラインフルエンザ3（PI₃）-呼吸器多核体ウイルス（RSV）に対する修飾した多価の生ワクチンを乾燥させた形態のものであり、不活化した液体BVDVワクチンとアジュバントを用いて再び水和化する（ファイザー社、ニューヨーク、ニューヨーク州）。BVDV成分は、免疫化のための最少量のBVDV1型および2型と、滅菌アジュバントを含んでいた。BVDV免疫化抗原の効力は、ワクチン調製物で使用したバルク流体について8回行なった滴定の幾何平均力価（GMT）を計算することによって明らかにした。再水和化後、2mlのIBR-PI₃-BRSV-BVDVワクチン

10

【0063】

攻撃接種（challenge）ウイルス - 非細胞変性BVDV2型野生単離体（94B-5359株、ワイオミング大学、ワイオミング州獣医学研究所のHana Van Campen博士から入手）を攻撃接種剤として用いた。どのようなウイルスであるかは、SNアッセイと逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）によって確認した。RT-PCR分析の結果は、p125タンパク質と5'非翻訳領域に関してはBVDV2型ヌクレオチド配列が陽性であり、gp53とp80タンパク質に関してはBVDV1型の保存された配列が陰性であった。攻撃接種の直前と直後に行なった2回の滴定により、攻撃接種ウイルスの効力を示すGMTが $10^{3.2}$ TCID₅₀/mlであることが明らかになった。攻撃接種のための接種材料は、鼻腔内に4mlの用量を分割して与えた（1つの外鼻孔に2mlずつ）。

20

【0064】

血清学的アッセイ - ウシ細胞培養物におけるウイルス一定・血清減少アッセイにより、BVDV1型と2型に関する血清中和力価を測定した。血清の系列希釈物を、50-300TCID₅₀の細胞変性BVDV1型5960株、あるいはほぼ同量の細胞変性BVDV2型125c株と混合した。

【0065】

ウイルスの単離 - ウシ細胞培養物の中で、乳牛の末梢血、羊水、胎仔血液、胎仔組織からBVDVを攻撃接種後（PC）に単離することを試みた。BVDVに対して陽性の細胞培養物を、ヤギの抗BVDVポリクローナル抗体を用いた間接的な免疫蛍光により調べた。以前に報告されている免疫組織化学的方法を利用して胎仔組織からBVDVを単離することも試みた（Haines, D.M., Clark, E.G., Dubovi, E.J., Vet. Pathol., 第29巻、27-32ページ、1992年）。乳牛からの全血を頸静脈から5~10mlのサンプルとして採取し、ヘパリンを入れた試験管に入れ、ウイルスの単離に用いる軟層細胞を調製した。局所麻酔下で左脇腹を開いて子宮から吸引することにより、3~5mlの羊水サンプルを回収した。

30

【0066】

帝王切開または自然流産の後、目、脾臓、胸腺、脳の3つの切片（脳幹/中脳、大脳、小脳）をそれぞれの胎仔から無菌状態で回収した。均質化した胎仔組織からの上清を用いて細胞培養物の中でウイルスを単離することを試みた。免疫組織化学的評価を行なうため、胎仔組織をパラフィン中に埋包し、抗BVDVモノクローナル抗体を含む1:800と1:600の腹水希釈物を用いてテストを2回行なった。

40

【0067】

生物測定データの分析 - 攻撃接種後に保護されたことを証明するため、雌親と胎仔でのBVDV2型の感染事象が統計的に有意に減少したことを、接種群（T2とT3）とプラセボ対照群（T1）で比較して明らかにする必要がある。フィッシャーの正確検定を利用し、（1）攻撃接種直後14日間の乳牛のウイルス血症、（2）羊水からのBVDV単離物、（3）自然流産または帝王切開した胎仔組織と胎仔血からのBVDV単離物、（4）BVDVが陽性である胎仔組織の免疫組織化学という事象を比較した。繰り返して測定した結果に対して混合線形モデルを用いることにより、血清中和力価を分析した。分散の分析から得られる最小自乗平均を利用し、幾何平均力価（GMT）を計算した。そのとき、攻撃接種を行なわなかつ

50

た乳牛のSNデータは除外した。確率の値としてP 0.05を利用し、統計的有意さを明らかにした。

【0068】

胎仔の保護に関する研究 - テストした56頭の乳牛をランダムに3つのテスト群に割り当てた。それは、表1に示したIMプラセボ群(T1)、IMワクチン接種群(T2)、SCワクチン接種群(T3)である。ワクチンまたはプラセボを0日目と21日目に乳牛に接種した。どの場合にも、0日目の接種は首の左側に行ない、21日目の接種は首の右側に行なった。

【0069】

1日目から14日間にわたり、乳牛に酢酸メレンゲストロールを上に乗せた餌を与えた。32日目、発情期に合わせてすべての乳牛にIMプロスタグランジンを注射した(ルタライズ、ファルマシア&アップジョン社、カラマズー、ミシガン州)。BVDVが陰性であることを確認した精子を用い、発情期を示した乳牛に人工授精を行なった。100日目、すなわち妊娠後約65日のとき、乳牛の妊娠状態を直腸触診によって調べた。105日目、妊娠が確認された23頭の乳牛を各テスト群からランダムに選択し(対照7頭、IMワクチン接種8頭、SCワクチン接種8頭)、近くの隔離施設(中西部獣医学施設、オークランド、ネブラスカ州)に入れて混じり合わせた。119日目、23頭のテスト用乳牛に有毒なBVDVを鼻腔内接種した。BVDVの単離と血清学的アッセイを目的として、血液サンプルを攻撃接種の日と攻撃接種後の8つの日、すなわち119日目、121日目、123日目、125日目、127日目、129日目、133日目、140日目、147日目(PC0日目、2日目、4日目、6日目、8日目、10日目、14日目、21日目、28日目)に回収した。

【0070】

147日目(攻撃接種後28日目)に左脇腹を切開し、羊水をそれぞれの乳牛から抽出した。297日目、すなわち子牛誕生予定日の約7~14日前、テスト用乳牛をネブラスカ大学の獣医学・生体臨床医学サービス学部(リンカーン、ネブラスカ州)に属する施設に送って帝王切開した。手術の直前に血液サンプルをそれぞれの乳牛から回収してSNアッセイを行なった。(300~301日目の)帝王切開後、血液サンプルをそれぞれの胎仔から回収した。次に胎仔を安楽死させ、BVDVを単離するために組織を無菌状態で回収した。

【0071】

自然流産が起こったいくつかのケースでは、流産が検出されたときとその2週間後に血液サンプルを雌親から採取した。対となるその血液サンプルに対して血清学的テストを行ない(ネブラスカ大学獣医学診断センター、リンカーン、ネブラスカ州)、流産した胎仔からのBVDVの単離(ファイザー中央研究所、リンカーン、ネブラスカ州)と胎仔組織の組織病理学的評価(サスカトゥーン獣医学生体診断、サスカトゥーン、SK、カナダ)を行なった。

【0072】

結果

ワクチンを2回投与した間の期間または投与直後に好ましくない事象は観察されなかった。

乳牛はすべて、接種前(0日目)にはBVDV1型と2型に関して血清反応が陰性であった。これは、テスト用乳牛が研究開始時にはBVDVに対して免疫学的にナイーブであることを示している。BVDV1型に関するGMT値を表2に示してある。ワクチンを2回投与した後、接種した16頭の乳牛のうちの15頭がセロコンバージョンを起こした。乳牛61(T3群)は、BVDV1型のSN力価が、0日目に<1:2、21日目に1:19、33日目と119日目に<1:2であった。BVDV2型に対するGMT値を表3に示してある。接種したすべての乳牛(乳牛61も含む)は、2回目の接種後にセロコンバージョンを起こした。(乳牛61は、BVDV2型のSN力価が、0日目に<2、21日目に1:19、33日目に<1:2,048、119日目に1:431であった。)交配のとき(32日目~41日目)、接種した乳牛は(乳牛61を除き)、BVDV1型のSN力価が1:64~1:13,777の範囲であった。接種した乳牛は、交配時にBVDV2型のSN力価が1:64~1:6,889の範囲であった。ワクチン接種後のIM群(T2)とSC群(T3)でのGMT値の違いは、攻撃接種前の2回の時期にも攻撃接種後にも統計的に有意ではなかった。プラセボ群(T1)のすべての乳牛

は、攻撃接種のとき（119日目）までBVDV1型と2型の両方に対して血清反応が陰性に留まった。これは、この研究が偶発的な曝露によって無効にならなかったことを示している。プラセボのすべての乳牛は、攻撃接種に血清反応した。これは、それぞれの乳牛で生存できる攻撃接種が起こったことを示している。プラセボ群は、BVDV1型に関し、既往性応答が起こったどちらのワクチン群よりもPC-GMTが有意に小さかった（表2、147日目）。プラセボの乳牛は、BVDV2型に関しても、どちらのワクチン群よりもPC-GMTが小さかったが、差は、IM接種群（T2）と比べたときだけ統計的に有意であった。

【0073】

3つのテスト群で23頭の乳牛が妊娠していることが確認されたため、攻撃接種を行ない、羊水穿刺を行なった（表1）。羊水穿刺（147日目）と帝王切開（300～301日目）の間に7頭の乳牛が流産した。4頭はT2群からの乳牛であり、3頭はT3群からの乳牛である。さらに、交配した3頭の乳牛（1頭はT1プラセボ群からの乳牛、2頭はT3群からの乳牛）が妊娠していないことが、帝王切開のときにわかった。これら3頭の乳牛に関しては、100日目（交配後65日目）に直腸触診によって妊娠していることを確認した。これは、その後に出産されない流産または胎子の再吸収が起こったことを意味する。妊娠しなかったこれら3頭の乳牛からの胎子組織は評価に使用できなかったため、これらの乳牛は研究から除外した。259日目、プラセボ群（T1）の乳牛67が死んだため、その胎子を取り出してBVDVを単離した。したがって研究の終了時に、攻撃接種を受けた23頭の乳牛のうちの12頭に対して帝王切開を行なった。帝王切開により得られた12頭の胎子と流産した7頭の胎子に加え、死んだ乳牛からの胎子（合計20頭）をBVDVの単離に関して評価した。

【0074】

T2群からの乳牛38は、156日目に胎子を流産した（妊娠123日目、攻撃接種後37日目）。対となる血清サンプルは評価しなかったが、この乳牛38は、攻撃接種後の末梢血と羊水からのBVDVの単離に関して陰性であった。胎子は著しく自己分解していた。胎子の組織病理学的評価と細菌学的評価により、絨毛膜と絨毛膜下の結合組織が化膿性炎症になっていることが明らかになった。ブドウ球菌（スタフィロコッカス・ヒクス）を肺、肝臓、胸膜液から単離した。BVDVの単離と免疫組織化学に関して陰性の結果が得られた。これは、胎子が攻撃接種によって感染しなかったことを示している。

【0075】

T3群からの3頭の乳牛（番号21、27、40）は、158日目または159日目に流産した（妊娠125～127日目、攻撃接種後39日目または40日目）。流産を観察していなかったため、回収した胎子がどの乳牛からのものであるかを特定できなかった。そこで未知の胎子1、2、3と名づけた。未知の胎子1はミイラ化しており、組織学的に典型的なネオスポラ症の病変があった。未知の胎子2は自己分解しており、化膿して壊死した多病巣性の胎盤炎と、炎症性滲出液に混じった多数の球菌が存在していた。スタフィロコッカス・ヒクスを肺、腎臓、肝臓、胃の内容物、胎盤組織から単離した。未知の胎子3は浸軟して自己分解していた。ブドウ球菌属を肺、肝臓、腎臓、胃の内容物から単離した。3頭の未知の胎子からのすべての組織で、BVDVの単離と免疫組織化学に関して陰性の結果が得られた。3頭の雌親はすべて、攻撃接種後の末梢血からのBVDVの単離に関して陰性であった。乳牛21と40は、同様に羊水からのBVDVの単離に関して陰性であったが、乳牛27は、羊水サンプルがBVDVの単離に関して陽性であった。雌親からの対となる血清サンプルは評価しなかった。

【0076】

T2群からの乳牛45は、160日目に胎子を流産した（妊娠128日目、攻撃接種後40日目）。胎子が広範に自己分解していることが明らかであった。ブドウ球菌属を肺、肝臓、腎臓、胃の内容物、胎盤から単離した。多病巣性の血栓症と化膿性脈管炎を伴った胎盤炎が存在していた。胸膜液に関する血清学的アッセイの結果は、IBR、ウシ・ウイルス性下痢症（BVD）、レプトスピラ症に関して陰性であった。すべての胎子組織でBVDVの単離と免疫組織化学に関して陰性の結果が得られた。

【0077】

T2群からの乳牛66は、195日目に胎子を流産した（妊娠160日目、攻撃接種後76日目）。

胎盤の粘膜固有層の顕著な化膿性炎症が胎仔の表面から広がっていることが観察された。胃の内容物と胎盤からの大腸菌とプロテウス属 (*Proteus vulgaris*) を培養した。対となる血清サンプルと胸膜液の血清学的結果は、IBR、BVD、レプトスピラ症が病因であることを示していなかった。すべての胎仔組織でBVDVの単離と免疫組織化学に関して陰性の結果が得られた。

【0078】

T2群からの乳牛31は、295日目に胎仔を流産した（妊娠262日目、攻撃接種後176日目）。組織病理学的検査により、散在性壊死化膿性胎盤炎、絨毛膜上皮の壊死、強度の好中球性炎症が起こっていることが明らかになった。炎症の病巣からのグラム陰性球杆菌を培養した。対となる血清サンプルと胸膜液の血清学的結果は、IBR、BVD、レプトスピラ症が病因であることを示していなかった。すべての胎仔組織でBVDVの単離と免疫組織化学に関して陰性の結果が得られた。

10

【0079】

攻撃接種後にT1プラセボ群の乳牛67から採取した末梢血サンプルと羊水において、陽性のBVDV単離物が得られた。すべての胎仔組織でBVDVの単離と免疫組織化学に関して陽性の結果が得られた。この乳牛からのすべての胎仔は、BVDVの単離と免疫組織化学に関して陽性であった。

【0080】

帝王切開によって得られた12頭の胎仔から回収した血液サンプルに関し、BVDV1型と2型に対するSN力価を調べた。プラセボの5頭の乳牛と接種した7頭の乳牛を帝王切開して得たどの胎仔も、BVDV1型と2型に関して血清反応は陽性でなかった。

20

【0081】

攻撃接種後のウイルス単離結果を表4に示してある。T1プラセボ群の7頭の乳牛はすべて、BVDVウイルス血症になっていた。これは血清学的結果を裏付けるものであり、接種していないそれぞれの乳牛で生き延びる攻撃接種が起こったことを示している。接種したT2群とT3群の合計16頭からの血液サンプルは、攻撃接種後の8つのサンプルのそれぞれにおいて、BVDVウイルス血症に関して陰性であった。接種したT2群とT3群におけるPCウイルス血症と対照におけるPCウイルス血症の差は、統計的に有意であった（ $P = 0.0001$ ）。

【0082】

接種した12頭のうちの2頭（12.5%）からの羊水はBVDVが陽性であったのに対し、T1プラセボ群の乳牛では7頭のうちの7頭が陽性であった。これは統計的な有意差である（ $P = 0.0001$ ）。接種したT3群の乳牛27と60からの羊水サンプルは陽性であった。乳牛27からの胎仔は、ウイルスの単離と免疫組織化学的方法によるとBVDVが陰性であった。

30

【0083】

接種した14頭のうちの1頭（T3群の乳牛60）（7.1%）からの胎仔組織は、BVDVの単離に関して陽性であった。これをT1プラセボ群からの胎仔6頭中の6頭（100%）でBVDVが単離されたことと比較すると、統計的有意差がある（ $P = 0.0001$ ）。BVDVの単離結果は、それぞれの胎仔から評価した胎仔組織に関し、すべて陽性かすべて陰性のいずれかであった。

【0084】

免疫組織化学の結果は、接種したT2群とT3群合わせて14頭のうちの1頭（T3群の乳牛60）（7.1%）からの胎仔組織においてBVDVが陽性であった。T1プラセボ群からの胎仔6頭中の6頭（100%）に由来するすべての胎仔組織が、BVDV-免疫組織化学に関して陽性であった。これは、接種群と比べて有意に大きな値である（ $P = 0.0001$ ）。BVDV-免疫組織化学の結果は、それぞれの胎仔から評価した胎仔組織に関し、すべて陽性かすべて陰性のいずれかであった。

40

【0085】

表5に、BVDVの単離結果が陽性であった接種した2頭の乳牛に関するウイルス単離源と攻撃接種前のSN力価を示してある。血清学的データは、接種したT3群の乳牛27と60の両方が、接種に免疫応答したことを示している。乳牛27は、攻撃接種時のBVDV2型のSN力価がT3群のGMTよりも小さかったが、差は有意でなかった。

50

【0086】

筋肉内と皮下へのワクチン接種により、接種した14頭の乳牛のうちの13頭からの胎仔組織でBVDVの単離結果が陰性になったため、胎仔のBVDV-2感染に関して全体として92.9%で効果が得られた(表4)。これは、BVDV-1を用いた胎仔攻撃接種に対する同じワクチンでの以前のテストにおける88.9%という保護効果(接種した18頭中の16頭がBVDVの単離に関して陰性であった)に匹敵していた(実施例2を参照のこと)。どちらの研究でも、接種していないプラセボの乳牛で100%の胎仔感染が起こった。これは、接種した乳牛が激しい免疫の攻撃接種を受けたことを示している。

【0087】

接種した2頭の乳牛(乳牛27と60)の羊水から攻撃接種ウイルスを単離した(表5)。その結果、どちらの乳牛も、攻撃接種後8回の時期のいずれでもウイルス血症に関して陰性であったにもかかわらず、BVDVの感染に関して陽性であると考えられた。特異性と感度が大きいウイルス単離法と免疫組織化学的方法では、乳牛27の流産した胎仔でBVDVを検出することはできなかった。そのためBVDV陰性として報告する必要があった。雌親の体内でBVDV感染プロセスによってこの胎仔が流産することはあり得た。

10

【0088】

結果を確認するため、2つの方法を利用して乳牛とその胎仔における保護を評価した(乳牛では、ウイルス血症と、羊水からのウイルス単離、胎仔では、免疫組織化学と、組織培養物中でのウイルスの単離)。最も控えめな結果を利用し、保護率を決定した。したがって接種した乳牛での保護率は、ウイルス血症に関して陰性である100%ではなく、羊水からのウイルス単離に関して陰性である乳牛の割合の87.5%(14/16)であるとした。BVDVによる攻撃接種を行なう免疫研究に関し、接種していない対照で胎仔の感染が100%になった攻撃接種に対して接種した場合に胎仔が100%保護されたケースは報告されていない。妊娠した乳牛で評価することが一般的でない修飾した生ウイルス(MLV)ワクチンでも、1回の研究における胎仔のBVDV-1感染に対する保護率は83%を超えなかった。(Cortese, V.S., Grooms, D.L., Ellis, J.他、Am. J. Vet. Res., 第59巻、1409-1413ページ、1998年。)

20

【0089】

【表 1】

表1ーウシ・ウイルス性下痢症ウイルス (BVDV) 2型を胎仔に攻撃接種した研究におけるテスト群と乳牛の妊娠状態

群	処理	予防接種した乳牛の数 (0, 21日目)	攻撃接種した乳牛の数 (119日目)	妊娠の終了				BVDVの単離 について評価した胎仔 の数 (1+2+4)
				(1) 雌親の死 ^a	(2) 流産 ^b	(3) 妊娠失敗 ^c	(4) 帝王切開	
T1	プラセボ(IM)	18	7	1	0	1	5	6
T2	ワクチン(IM)	18	8	0	4	0	4	8
T3	ワクチン(SC)	20	8	0	3	2	3	8

IM=筋肉内接種；SC=皮下接種

^a雌親の死がT1の乳牛67で起こった(259日目)。

^b流産が、T2の乳牛38(156日目)、乳牛45(160日目)、乳牛66(195日目)、乳牛31(295日目)と、T3の乳牛21、27、40(158日目または159日目)で起こった。

^c妊娠に失敗したすべての乳牛は、100日目(交配後約65日目)に妊娠が確認されていた。

表2-BVDV2型を攻撃接種した乳牛におけるウシ・ウイルス性下痢症ウイルス (BVDV) 1型の血清反応

処理群	選択したテスト時期におけるBVDV1型の血清中和 (SN) 幾何平均力価の逆数						
	帝王切開の日 に血清反応が 陽性であった 数 ^a	ワクチン接種 (0日目)	ワクチン接種 (21日目)	交配 (32-41日目)	攻撃接種 (119日目)	羊水穿刺 (147日目)	帝王切開 (300-301日目)
T1 (n=7)	0/7	<2	<2	<2	<2	65.7	833.6 (n=6) ^d
T2 (n=8)	8/8	<2	13.7 ^b	2,383.1 ^c	480.7 ^e	1,919.2 ^e	762.7 (n=4) ^e
T3 (n=8)	7/8 (87.5%)	<2	18.2 ^c	1,116.6 ^c	570.4 ^e	1,448.3 ^e	691.7 (n=5) ^f
T2&T3 (n=16)	15/16 (93.8%)	<2	15.8 ^c	1,631.3 ^c	523.6 ^e	1,667.2 ^e	726.3 (n=9)

^a SN力価の逆数 ≥ 8 。

^b プラセボ群 (T1) に対する統計的有意差、 $P \leq 0.0002$ 。

^c プラセボ群 (T1) に対する統計的有意差、 $P \leq 0.0001$ 。

^d 乳牛67が259日目に死んだ。

^e 流産が、乳牛38 (156日目)、乳牛45 (160日目)、乳牛66 (195日目)、乳牛31 (295日目) で起こった；これらの乳牛からは300~301日目に血液を回収しなかった。

^f 流産が、乳牛21、27、40 (158日目または159日目) で起こった；これらの乳牛からは300~301日目に血液を回収しなかった。

【表 3】

表3—BVDV2型を攻撃接種した乳牛におけるウシ・ウイルス性下痢症ウイルス (BVDV) 2型の血清反応

処理群 (数)	選択したテスト時期におけるBVDV2型の血清中和 (SN) 幾何平均力価の逆数						
	交配の日に血清反応が陽性であった数 ^a	ワクチン接種 (0日目)	ワクチン接種 (21日目)	交配 (32-41日目)	攻撃接種 (119日目)	羊水穿刺 (147日目)	帝王切開 (300-301日目)
T1 (n=7)	0/7	<2	<2	<2	<2	402.6	2,823.8 (n=6) ^g
T2 (n=8)	8/8	<2	7.0 ^b	1,217.7 ^d	285.2 ^d	2,598.6 ^e	922.2 ^b (n=4) ^h
T3 (n=8)	8/8	<2	12.8 ^c	1,837.6 ^d	261.7 ^d	1,217.5	621.3 (n=5) ⁱ
T2&T3 (n=16)	16/16	<2	9.5 ^c	1,495.9 ^d	273.2 ^d	1,778.7 ^f	756.9 ^b (n=9)

^a SN力価の逆数 ≥ 8 。

^b プラセボ群 (T1) に対する統計的有意差、 $P \leq 0.0064$ 。

^c プラセボ群 (T1) に対する統計的有意差、 $P \leq 0.0005$ 。

^d プラセボ群 (T1) に対する統計的有意差、 $P \leq 0.0001$ 。

^e プラセボ群 (T1) に対する統計的有意差、 $P \leq 0.0128$ 。

^f プラセボ群 (T1) に対する統計的有意差、 $P \leq 0.023$ 。

^g 乳牛67が259日目に死んだ。

^h 流産が、乳牛38 (156日目)、乳牛45 (160日目)、乳牛66 (195日目)、乳牛31 (295日目) で起こった；これらの乳牛からは300~301日目に血液を回収しなかった。

ⁱ 流産が、乳牛21、27、40 (158日目または159日目) で起こった；これらの乳牛からは300~301日目に血液を回収しなかった。

表4-1 攻撃接種後の乳牛と胎仔でのウシ・ウイルス性下痢症ウイルス (BVDV) の単離結果のまとめ

処理群	攻撃接種後のウイルス単離法と事象数			
	乳牛におけるウイルス血症 ^a	羊水からのウイルス単離	胎仔組織からのウイルス単離 ^b	胎仔組織の免疫組織化学 ^b
T1プラセボ(IM)	7/7(100%)	7/7(100%)	6/6(100%) ^c	6/6(100%) ^c
T2ワクチン(IM)	0/8(0%) ^d	0/8(0%) ^d	0/8(0%) ^d	0/8(0%) ^d
T3ワクチン(SC)	0/8(0%) ^d	2/8(25%) ^d	1/6(16.7%) ^{c, d}	1/6(16.7%) ^{c, d}
T2&T3	0/16(0%) ^d	2/16(12.5%) ^d	1/14(7.1%) ^d	1/14(7.1%) ^d

^a 119日目(攻撃接種)～147日目(羊水穿刺)の間に9回にわたって回収したサンプルをもとにした軟膜細胞調製物からウイルスの単離を試みた。血液サンプルがBVDVに関して陽性である場合は乳牛をウイルス血症であると見なした。

^b 流産または帝王切開の後に胎仔組織を回収した。どの組織であれ、BVDVに関して陽性のときに胎仔をBVDVに関して陽性であると見なした。

^c T1の1頭の乳牛とT3の2頭の乳牛をこの研究から除外した。というのも、これらの乳牛は帝王切開時に妊娠しておらず、流産も観察されなかったからである。

^d プラセボ群(T1)に対する統計的有意差、 $P \leq 0.0001$ 。

【表 5】

表5ーワクチンを接種した乳牛またはその胎仔からウシ・ウイルス性下痢症ウイルス (BVDV) が単離された場合の雌親の血清中和 (SN) 力価と攻撃接種の結果

テスト群	乳牛の番号	ウイルスの単離源	攻撃接種時のBVDV血清型とSN力価の逆数		
			妊娠の終了	BVDV1	BVDV2
T3	27	AF	流産	512	91
T3	60	AF, FT, IHC	帝王切開	181	152
T3	GMT群	N/A	N/A	570	262

AF=羊水 ; FT=胎仔組織 ; IHC=胎仔組織の免疫組織化学 ; GMT=力価の幾何平均 ; N/A適用不能

10

20

30

40

【 0 0 9 4 】

実施例 2

材料と方法

動物

生殖年齢になった健康でBVDV血清反応陰性(すなわち血清中和 [SN] 力価が

50

<1:2>の59頭の乳牛と未経産雌牛を複数の供給源から取得し、研究期間中、ネブラスカにある研究用施設に隔離した。それぞれのウシは、それぞれの耳に1つずつ付けたタグによって特定した。ウシが耳のタグを紛失した場合には、新しいタグを取り付けた。研究を始める前に、レプトスピラ症、カンピロバクター症（ピブリオ症）、クロストリジウムの感染に対する市販のワクチンをテスト用のウシに接種した。テスト用のウシを担当獣医の監督下に置いた。獣医は、臨床面からウシを毎日観察した。

【0095】

テスト用ワクチン - テスト用ワクチンは、感染性ウシ鼻気管炎（IBR）-パラインフルエンザ3（PI₃）-呼吸器多核体ウイルス（RSV）に対する修飾した多価の生ワクチンを乾燥させた形態のものであり、不活化した液体BVDVワクチン（キャトルマスター/プレグシユア5、ファイザー社、ニューヨーク、ニューヨーク州）を用いて再び水和化する。このBVDV成分を滅菌アジュバントと混合した。BVDV免疫化抗原の効力は、ワクチン調製物で使用したバルク流体について8回行なった滴定の幾何平均力価（GMT）を計算することによって明らかにした。再水和化後、2mlのIBR-PI₃-BRSV-BVDVワクチンを筋肉内（IM）注射または皮下（SC）注射により投与した。乾燥させたIBR-PI₃-RSVワクチンを滅菌水で再構成したものをプラセボとして利用した。

10

【0096】

攻撃接種ウイルス - 非細胞変性BVDV1型野生単離体（816317株、コーネル大学、ニューヨーク州獣医学カレッジのE.J. Dubovi博士から入手）を攻撃接種剤として用いた。どのようなウイルスであるかは、SNアッセイと逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）によって確認した。RT-PCR分析の結果は、gp53およびp80タンパク質と5'非翻訳領域に関してはBVDV1型ヌクレオチド配列が陽性であり、p125タンパク質に関してはBVDV2型の配列が陰性であった。攻撃接種の直前と直後に行なった2回の滴定により、攻撃接種・ウイルスの効力を示すGMTが $10^{4.3}$ TCID₅₀/mlであることが明らかになった。攻撃接種のための接種は、鼻腔内に4mlの用量を分割して与えた（1つの外鼻孔に2mlずつ）。

20

【0097】

血清学的アッセイ - ウシ細胞培養物におけるウイルス一定・血清減少アッセイにより、BVDV1型と2型に関する血清中和力価を測定した。血清の系列希釈物を、50-300TCID₅₀の細胞変性BVDV1型5960株、あるいはほぼ同量の細胞変性BVDV2型125c株と混合した。

【0098】

ウイルスの単離 - ウシ細胞培養物の中で、乳牛の末梢血、羊水、胎仔組織からBVDVを攻撃接種後に単離することを試みた。BVDVに対して陽性の細胞培養物を、ヤギの抗BVDVポリクローナル抗体を用いた間接的な免疫蛍光により調べた。以前に報告されている免疫組織化学的方法を利用して胎仔組織からBVDVを単離することも試みた（Haines, D.M., Clark, E.G., Dubovi, E.J., Vet. Pathol., 第29巻、27~32ページ、1992年）。乳牛からの全血を頸静脈から5~10mlのサンプルとして採取し、ヘパリンを入れた試験管に入れ、ウイルスの単離に用いる軟層細胞を調製した。局所麻酔下で左脇腹を切開して子宮から吸引することにより、3~5mlの羊水サンプルを回収した。帝王切開または自然流産の後、目、脳の3つの切片、脾臓、胸腺をそれぞれの胎仔から無菌状態で回収した。均質化した胎仔組織からの上清を用いて細胞培養物の中でウイルスを単離することを試みた。免疫組織化学的評価を行なうため、胎仔組織をパラフィン中に埋包し、抗BVDVモノクローナル抗体を含む1:800と1:600の腹水希釈物を用いてテストを2回行なった。

30

40

【0099】

生物測定データの分析 - 攻撃接種後に保護されたことを証明するため、雌親と胎仔でのBVDV2型の感染事象が統計的に有意に減少したことを、接種群（T2とT3）とプラセボ対照群（T1）で比較して明らかにする必要がある。フィッシャーの正確検定を利用し、乳牛のウイルス血症、羊水からのBVDV単離物、胎仔組織、胎仔組織の免疫組織化学という事象を比較した。繰り返し測定した結果に対して混合線形モデルを用いることにより、血清中和力価を分析した。分散の分析から得られる最小自乗平均を利用し、幾何平均力価（GMT）を計算した。そのとき、攻撃接種を行なわなかった乳牛のSNデータは除外した。

50

確率の値としてP 0.05を利用し、統計的有意さを明らかにした。

【0100】

胎仔の保護に関する研究 - テストした59頭の乳牛をランダムに3つのテスト群に割り当てた。それは、表6に示したIMプラセボ群(T1)、IM接種群(T2)、SC接種群(T3)である。ワクチンまたはプラセボを0日目と21日目に乳牛に接種した。どの場合にも、0日目の接種は首の左側に行ない、21日目の接種は首の右側に行なった。

【0101】

32日目、発情期に合わせてすべての乳牛にプロスタグランジンを筋肉内注射した(ルタライズ、ファルマシア&アップジョン社、カラマズー、ミシガン州)。BVDVが陰性であることを確認した精子を用い、発情期を示した乳牛に人工授精を行なった。96日目、すなわち妊娠後約60日目のとき、乳牛の妊娠状態を直腸触診によって調べた。103日目、妊娠が確認された30頭の乳牛を各テスト群からランダムに選択し、近くの隔離施設(中西部獣医学施設、オークランド、ネブラスカ州)に入れて混じり合わせた。117日目、30頭のテスト用乳牛に有毒なBVDVを鼻腔内接種した。BVDVの単離を目的として、血液サンプルを攻撃接種の日と攻撃接種後の8つの日、すなわち 119日目、121日目、123日目、125日目、127日目、131日目、138日目、145日目に回収した。

【0102】

145日目(攻撃接種後28日目)に左脇腹を切開し、羊水をそれぞれの乳牛から抽出した。295日目、すなわち子牛誕生予定日の約7~14日前、テスト用乳牛をネブラスカ大学の獣医学・生体臨床医学サービス学部に属する施設に送って帝王切開した。手術の直前に血液サンプルをそれぞれの乳牛から回収してSNアッセイを行なった。(298~300日目の)帝王切開後、血液サンプルをそれぞれの胎仔から回収した。次に胎仔を安楽死させ、BVDVを単離するために組織を無菌状態で回収した。

【0103】

自然流産が起こったケースでは、流産が検出されたときとその2週間後に血液サンプルを雌親から採取した。対となるその血液サンプルに対して血清学的テストを行ない(ネブラスカ大学獣医学診断センター、リンカーン、ネブラスカ州)、流産した胎仔からのBVDVの単離(ファイザー中央研究所、リンカーン、ネブラスカ州)と胎仔組織の組織病理学的評価(サスカトゥーン獣医学生体診断、サスカトゥーン、SK、カナダ)を行なった。

【0104】

結果

胎仔保護テストで用いた30頭の乳牛の個々のSN値は、0日目にはBVDV1型と2型に関して陰性であった。これは、テスト用乳牛が研究開始時にはBVDVに対して免疫学的にナイーブであることを示している。GMT値(表7と表8)は、IMワクチン接種(T2群)とSCワクチン接種(T3群)の両方で、2回接種した後に血清反応が誘導されたことを示している。T2群とT3群のすべての乳牛は、2回目のワクチンを投与した後にBVDV1型とBVDV2型に対してセロコンバージョンを起こした(SN力価 1:8)。交配のとき(34日目~37日目)、BVDV1型のSN力価は1:27~1:2,900の範囲であり、BVDV2型のSN力価は1:609~1:13,777の範囲であった。ワクチン接種後、SC群でのGMT値は、攻撃接種前のそれぞれの時期におけるIM群での値よりもわずかに大きかった。しかし差は統計的に有意ではなかった。攻撃接種後28日目(145日目)、BVDV1型のGMT値(表7)は、IM接種(T2)群よりもSC接種(T3)群のほうが有利であることに統計的な有意差を示した。

【0105】

プラセボ群(T1)のすべての乳牛は、攻撃接種のとき(117日目)までBVDV1型と2型の両方に対して血清反応が陰性に留まった。これは、この研究が偶発的な曝露によって無効にならなかったことを示している。プラセボの乳牛は、攻撃接種に血清反応したが、145日目のBVDV1型と2型に対するGMT応答では、既往性応答が起こったどちらのワクチン群よりもPC-GMTが有意に小さかった(表7と表8)。

【0106】

羊水穿刺(145日目)と帝王切開(298~300日目)の間に2頭の乳牛が流産した。1頭はT

10

20

30

40

50

1群からの乳牛であり、もう1頭はT3群からの乳牛である。さらに、交配した4頭の乳牛（2頭はT1プラセボ群からの乳牛、1頭はT2群、1頭はT3群からの乳牛）が妊娠していないことが、帝王切開のときにわかった。これら4頭の乳牛に関しては、96日目（交配後60日目）に直腸触診によって妊娠していることを確認した。これは、その後に検出されない流産または胎仔の再吸収が起こったことを意味する。妊娠しなかったこれら4頭の乳牛からの胎仔組織は評価に使えなかったため、これらの乳牛は研究から除外した。したがって研究の終了時に、攻撃接種を受けた30頭の乳牛のうち24頭に対して帝王切開を行なった。帝王切開により得られた胎仔と流産した胎仔の合計26頭をBVDVの単離に関して評価した（表6）。

【0107】

T1プラセボ群からの乳牛1317は、238日目に胎仔を流産した（妊娠201日目、攻撃接種後121日目）。胎仔の組織病理学的評価と細菌学的評価によって肺炎と絨毛膜上皮の壊死が明らかになり、胃と胎盤からコリネバクテリウム属が単離された。乳牛からの対となる血清サンプルは、IBR、BVD、レプトスピラ症が病因であることを示していなかった。攻撃接種後6日目、8日目、10日目に回収した乳牛の末梢血、羊水、胎仔の脳、目、胸腺に関する細胞培養物において、BVDVの単離に関して陽性の結果が得られたが、胎仔の脾臓では陰性であった。胎仔の脳、目、胸腺、脾臓は、BVDVに関して免疫組織化学的に陽性であった。この場合のウイルス単離と血清学的証拠から、BVDVに感染した胎仔は、攻撃接種の結果としてウイルス血症になった雌親が流産したことが示唆される。

【0108】

T3ワクチン群からの乳牛1331は、249日目に胎仔を流産した（妊娠212日目、攻撃接種後132日目）。組織病理学的検査により、散在性化膿性肺炎になっていることが明らかになった。胃の内容物と肺に関する培養物が腸内細菌によって厚く覆われた。乳牛からの対となる血清サンプルは、IBR、BVD、レプトスピラ症が病因であることを示していなかった。攻撃接種後に9回回収した乳牛の末梢血、羊水、胎仔の脳、目、脾臓、胸腺に関する細胞培養物からBVDVを単離する試みは、すべて陰性であった。胎仔組織に関する免疫組織化学の結果は陰性であった。しかしプールした胎仔組織は、細胞培養物でのBVDV単離に関して陽性であった。この矛盾する結果は、胎仔組織が、BVD攻撃接種・ウイルスが播かれている牧場との接触によって汚染されたか、BVDVを以前に単離した検死施設における媒介物によって汚染された可能性があることを示唆している。雌親の体内に攻撃接種後のウイルス血症がなく、陽性へのセロコンバージョン状態がなく、特定の胎仔器官でBVDVの単離が陰性であると、攻撃接種の結果としてこの胎仔がBVDVに感染することはなかったという結論が支持されることになる。帝王切開によって生まれたそれぞれの胎仔から回収した血液サンプルに関し、BVDV1型と2型に対するSM力価を調べた。T1プラセボ群からの帝王切開による7頭の胎仔のどれも、BVDV1型と2型に関して血清反応は陽性でなかった。T2接種群とT3接種群からの帝王切開による17頭の胎仔のうち5頭は、BVDV1型に対する血清反応が陽性であった。4頭の胎仔は1型に対するSM力価が1:2~1:4であり、T2群の乳牛1421からの胎仔は、1型に対するSM力価が1:181であり、2型に対するSM力価が1:512であった。

【0109】

攻撃接種後にウイルスを単離した結果を表9に示してある。T1プラセボ群からの10頭の乳牛のうち9頭は、BVDVウイルス血症になった。これは、生存できる攻撃接種が起こったことを示している。T2接種群とT3接種群の20頭のうち19頭からの血液サンプルは、攻撃接種後の8つのサンプルそれぞれにおいて、BVDVウイルス血症に関して陰性であった。T2接種群の乳牛1421は、攻撃接種後6日目の123日目にBVDVに関して陽性であり、上記のように血清反応が陽性だがウイルス単離に関しては陰性の胎仔を産んだ。T2接種群とT3接種群における攻撃接種後のBVDVウイルス血症が5%というのは、対照における90%と比べて有意に少なかった（ $P = 0.0001$ ）。

【0110】

接種群の18頭のうち2頭（11.1%）、すなわちT2の乳牛1301と1335からの胎仔組織は、BVDVの単離に関して陽性であった。これをT1プラセボ群の乳牛からの胎仔8頭のうち8

10

20

30

40

50

頭（100%）でBVDVが単離されたことと比べると、統計的な有意差がある（ $P = 0.0001$ ）。BVDVの単離結果は、T1群の乳牛1317を除き、評価した他のすべての胎仔組織でBVDV陽性またはBVDV陰性のどちらかであった。乳牛1317に関しては、4つの胎仔組織サンプルのうち3つで陽性であった。

【0111】

接種群20頭のうちの2頭（10.0%）からの羊水は、BVDVに関して陽性であった。それに対してT1プラセボ群の乳牛では、10頭のうちの10頭で陽性の結果であり、統計的な有意差がある（ $P = 0.0001$ ）。T2接種群の乳牛1301と1335からの羊水サンプルが陽性であった。

【0112】

免疫組織化学の結果は、接種群の18頭のうちの2頭（11.1%）、すなわちT2の乳牛1301と1335からの胎仔組織に関してBVDV陽性であった。接種したこれら乳牛からの胎仔組織はすべて、陽性であった。これは、細胞培養法を利用して羊水と胎仔組織からウイルスを単離しようと試みたときの同じ2頭のウシに関するBVDV単離結果に対応していた。T1プラセボ群の乳牛8頭のうちの8頭からの胎仔組織はすべて陽性であり、接種群の乳牛での頻度と比べて統計的に有意に多い（ $P = 0.0001$ ）。

10

【0113】

BVDVの単離結果が陽性であった接種した3頭の乳牛に関する攻撃接種前の血清状態を表10に示してある。BVDVが陽性の胎仔を産んだ乳牛1301および1335と、ウイルス血症であった乳牛1421はすべて、ワクチン接種に免疫応答した。

【0114】

接種した乳牛からの胎仔18頭のうちの16頭（88.9%）は、接種していない対照で胎仔を100%感染させた攻撃接種に対して抵抗力があった。鼻腔内攻撃接種により、感染の天然経路を真似ただけでなく、野外で曝露するときに予想されるよりもはるかに多い量で攻撃接種を行なった。攻撃接種の効力は、実験的にBVDV1型ウイルス血症と胎仔の感染を確実に実現できることが以前の研究でわかっているレベルも超えていた。「ウシ・ウイルス性下痢症ウイルスに関する国際シンポジウム、50年の回顧」のプロシーディング（イサカ、ニューヨーク州、1996年）の110～112ページに記載されているFicken, M.、Jeevaraerathnam, S.、Wan Welch, S.K.らの「選択した単離物によるBVDV胎仔感染」。持続感染と免疫寛容な胎仔の感染と関係するパイオタイプであるという理由で、非細胞変性攻撃接種株を用いた。『最新の動物治療法4、食肉動物実践編』、フィラデルフィア、ペンシルヴェニア州、W.B. Saunders、1999年の286～291ページに記載されているCortese, V.S.の「ウシ・ウイルス性下痢症ウイルスと粘膜疾患」。

20

30

【0115】

血清学的データにより、IMとSCの両方の投与経路でワクチンの抗原性が確認された。接種したすべての乳牛は、両方のタイプのBVDVに対してセロコンバージョンした。攻撃接種に対する顕著な既往性応答（表7と表8）により、GMT力価の値が6ヶ月後に研究を終えるときまで維持された。ウイルスの単離に関して陽性であることと関係している接種した3頭の乳牛も、接種後にセロコンバージョンした（表10）。血清反応陽性の乳牛1301と1355を帝王切開して生まれた子牛は、BVDVに関して陽性であった。血清反応が陽性の乳牛またはその胎仔からのウイルス単離結果は、体液性抗体が保護と関係しているものの、それが唯一の決定要因ではないことを示唆している。細胞メカニズムまたは粘膜メカニズムも関与している可能性がある。

40

【0116】

【表 6】

表6-ウシ・ウイルス性下痢症ウイルス (BVDV) 1型を胎仔に攻撃接種した研究におけるテスト群と乳牛の妊娠状態

処理群	接種した乳牛の数 (0.21日目)	攻撃接種を行なった乳牛の数 (119日目)	妊娠の終了				BVDVの単離に 関して評価し た胎仔の数 (1+2+4)
			(1) 雌親の死	(2) 流産 ^o	(3) 妊娠失敗 ^o	(4) 帝王切開	
T1	18	7	1	0	1	5	6
T2	18	8	0	4	0	4	8
T3	20	8	0	3	2	3	6

IM=筋肉内接種；SC=皮下接種

^o流産が、238日目 (T1の乳牛) と249日目 (T3の乳牛) で起こった。

^b妊娠に失敗したすべての乳牛は、96日目 (交配後約60日目) に妊娠が確認されていた。

【表7】

表7—BVDV1型を攻撃接種した乳牛におけるウシ・ウイルス性下痢症ウイルス (BVDV) 1型の血清反応

処理群	選択したテスト時期におけるBVDV1型の血清中和 (SN) 幾何平均力価の逆数						
	帝王切開の日 に血清反応が 陽性であった 数 ^a	ワクチン接種 (0日目)	ワクチン接種 (21日目)	交配 (34-37日目)	攻撃接種 (117日目)	羊水穿刺 (145日目)	帝王切開 (298-300日目)
T1 (n=10)	0/10	<2	<2	<2	<2	118.0	808.2 (n=9) ^d
T2 (n=10)	10/10	<2	5.5 ^b	414.1 ^b	177.4 ^b	10,380.1 ^b	2,233.2 ^b (n=10)
T3 (n=10)	10/10	<2	7.3 ^b	630.2 ^b	281.2 ^b	20,169.2 ^{b,c}	3,804.6 ^b (n=9) ^e
T2&T3 (n=20)	20/20	<2	6.3 ^b	510.8 ^b	223.3 ^b	14,469.2 ^b	2,914.9 ^b (n=19)

^a SN力価の逆数 ≥ 8 。

^b プラセボ群 (T1) に対する統計的有意差、 $P \leq 0.003$ 。

^c IMワクチン群 (T2) に対する統計的有意差、 $P \leq 0.0446$ 。

^d 1頭の乳牛が238日目に流産した。

^e 1頭の乳牛が249日目に流産した。

【表 8】

表8—BVDV1型を攻撃接種した乳牛におけるウシ・ウイルス性下痢症ウイルス (BVDV) 2型の血清学的応答

処理群	選択したテスト時期におけるBVDV1型の血清中和 (SN) 幾何平均力価の逆数						
	帝王切開の日 に血清反応が 陽性であった 数 ^a	ワクチン接種 (0日目)	ワクチン接種 (21日目)	交配 (34-37日目)	攻撃接種 (117日目)	羊水穿刺 (145日目)	帝王切開 (298-300日目)
T1 (n=10)	0/10	<1.4	<1.4	<1.4	<1.4	48.5	604.9 (n=9) ^d
T2 (n=10)	10/10	<1.4	7.6 ^b	1,782.9 ^b	174.8 ^b	3,756.0 ^b	1,634.9 ^b (n=10)
T3 (n=10)	10/10	<1.4	17.7 ^{b,c}	2,749.6 ^b	309.7 ^b	4,240.4 ^b	1,879.9 ^b (n=9) ^e
T2&T3 (n=20)	20/20	<1.4	11.6 ^b	2,214.1 ^b	232.7 ^b	3,990.9 ^b	1,753.1 ^b (n=19)

^a SN力価の逆数 ≥ 8 。

^b プラセボ群 (T1) に対する統計的有意差、 $P \leq 0.02$ 。

^c IMワクチン群 (T2) に対する統計的有意差、 $P \leq 0.0415$ 。

^d 1頭の乳牛が238日目に流産した。

^e 1頭の乳牛が249日目に流産した。

【表 9】

表9ー攻撃接種後の乳牛と胎仔でのウシ・ウイルス性下痢症ウイルス (BVDV) の単離結果のまとめ

処理群	攻撃接種後のウイルス単離法と事象数			
	乳牛におけるウイルス血症 ^a	羊水からのウイルス単離 ^b	胎仔組織からのウイルス単離 ^b	胎仔組織の免疫組織化学 ^b
T1プラセボ(IM)	9/10 (90%)	10/10 (100%) ^c	8/8 (100%) ^c	8/8 (100%) ^c
T2ワクチン(IM)	1/10 (10%) ^d	2/10 (20%) ^d	2/9 (22.2%) ^{c, d}	2/9 (22.2%) ^{c, d}
T3ワクチン(SC)	0/10 (0%) ^d	0/10 (0%) ^d	0/9 (0%) ^d	0/9 (0%) ^{c, d}
T2&T3	1/20 (5%) ^d	2/20 (10%) ^d	2/18 (11.1%) ^d	2/18 (11.1%) ^d

^a 攻撃接種の日 (117日目) ~145日目間に9回にわたって回収したサンプルもとにした軟膜細胞調製物からウイルスの単離を試みた。血液サンプルがBVDVに関して陽性である場合に乳牛をウイルス血症であるときに見なした。

^b 流産または帝王切開の後に胎仔組織を回収した。どの組織であれBVDVに関して陽性のときに胎仔をBVDVに関して陽性であると見なした。

^c T1の2頭の乳牛とT2の1頭の乳牛とT3の1頭の乳牛をこの研究から除外した。というのも、これらの乳牛は帝王切開時に妊娠しておらず、流産も観察されなかったからである。

^d プラセボ群 (T1) に対する統計的有意差、 $P \leq 0.008$ 。

【表 1 0】

表10-ワクチンを接種した乳牛またはその胎仔からウシ・ウイルス性下痢症ウイルス (BVDV) が単離された場合の雌親の血清中和 (SN) カ価と攻撃接種の結果

テスト群	乳牛の番号	ウイルス単離源	攻撃接種時のBVDV血清型とSNカ価の逆数	
			BVDV1	BVDV2
T2	1301	FT, AF, IHC	128	181
T2	1335	FT, AF, IHC	109	91
T2	1421	CV	64 ^a	27 ^a
T2	群のGMT	N/A	177.4	174.8

FT=胎仔組織；AF=羊水；IHC=胎仔組織の免疫組織化学；CV=乳牛のウイルス血症；N/A適用不能；GMT=カ価の幾何平均

10

20

30

40

【 0 1 2 1】

実施例 3

- 1) クイルAを含む2.5%アンフィジェン/コレステロール(それぞれ250mcg/ml)と、2
- 2) アンフィジェン/AIゲルという2つのアジュバント製剤から調製したレプトスピラ・ハ

50

ー ジョ / レプトスピラ・ポモナ混合ワクチン2mlを、16頭の家畜からなる2つのグループに3週間の間隔で2回皮下接種した。このワクチンは死んだレプトスピラで構成されており、レプトスピラから培養液を除去することで遊離した内毒素が少なくなっている。体温、注射部位の反応、全体的な健康所見を、2回の注射後に記録した。全身性の悪い効果は見られず、局所反応は最小限であったため、臨床的に許容可能であると判断した。対照として、別の16頭に生理食塩水を注射した。接種してから4週間後、 5×10^6 個のレプトスピラを用いて家畜の目と膈に3日連続で攻撃接種を行なった。それぞれの処理群の半分にはハー ジョを用い、半分にはポモナを用いて攻撃接種を行なった。ポモナを用いた対照のうちの2頭はある理由により研究から除いたため、その群には6頭が残った。尿を毎週回収し、腎臓サンプルを剖検によって回収し、攻撃接種の8週間後に、培養物、PCR、蛍光抗体顕微鏡法 (FA) によって評価した。

10

【0122】

レプトスピラ・ハー ジョを用いた攻撃接種の後、生き延びた生物が、接種していない対照のすべて (8/8) で尿培養物および / または腎臓培養物に検出された。それに対して接種したどの動物でも、陽性の培養物は得られなかった (0/16)。レプトスピラ・ポモナを用いた攻撃接種の後、接種していない対照の67% (4/6) が尿 / 腎臓培養物のレベルで感染していたが、接種したどの動物でも腎臓培養物または尿培養物が陽性になることはなかった (0/16)。

【0123】

レプトスピラ症は汚染された尿を通じて移るため、放尿を防いだり少なくしたりする能力が、ワクチンの効力に関する有効な指標である。どちらのワクチン組成物も、尿によるレプトスピラの放散を対照と比較して統計的に有意な程度に低下させた。データは、いずれかのアジュバントを用いて調製した二価のレプトスピラ・ハー ジョ / レプトスピラ・ポモナ・ワクチンを接種することの実質的な利点を示している。これは、ホルマリンで殺した組み合わせバクテリンを接種することにより、家畜がレプトスピラの感染から保護されることを示している。

20

【0124】

実施例 4

材料と方法

動物 - BVDVとレプトスピラに関して血清反応陰性 (すなわちBVDV血清中和 [SN] 力価が $<1:2$ であり、レプトスピラの血清型ハー ジョとポモナの [MAT] 力価が $<1:20$) である年齢が約7ヶ月の36頭の子牛を複数の供給源から取得し、研究期間中、ネブラスカの研究用隔離施設で保管した。それぞれの子牛は、それぞれの耳に1つずつ付けたタグによって特定した。子牛が耳のタグを紛失した場合には、新しいタグを取り付けた。研究を始める前に、クロストリジウム症とウシ呼吸器疾患に対する薬をテスト用のウシに接種した (BVDウイルスは除く)。テスト用の子牛を担当獣医の監督下に置いた。獣医は、臨床面からウシを毎日観察した。

30

【0125】

テスト用ワクチン - テスト用ワクチンは、ホルマリンで不活化したレプトスピラ・ハー ジョ-ボビスとレプトスピラ・ポモナの一方または両方と、不活化したBVD1型と2型のウイルスを含む液体ワクチンであった。BVDV成分は、滅菌アジュバントと混合した。BVDV免疫化抗原の効力は、ワクチン調製物で使用したバルク流体について8回行なった滴定の幾何平均力価 (GMT) を計算することによって明らかにした。レプトスピラ免疫化抗原の効力は、ハムスター致死率モデルの手続きに従って決定した。実験用テスト・ワクチンに含まれるアジュバントは、クイルAを含む2.5% (v/v) アンフィジェン / コレステロール (それぞれ250mcg/ml) だけ、あるいはそれに2% (v/v) 水酸化アルミニウムを加えたものと ; クイルAを含む2.5% (v/v) アンフィジェン / ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド (DDA) (それぞれ100mcg/ml) だけ、あるいは2% (v/v) 水酸化アルミニウムを加えたもの、のいずれかを含んでいた。実験用テスト・ワクチンは、皮下 (SC) 注射により5mlを投与した。一価レプトスピラ・ハー ジョ-ボビス・バクテリンを、製造者の指示に従っ

40

50

て陽性の対照として用いた。生理食塩水を含むプラセボ・ワクチンを陰性の対照として用いた。

【0126】

攻撃接種細菌 - レプトスピラ・ボルグベテルセニイの血清型ハージョ・タイプであるハージョ-ボビス株203（国立動物疾患センター、エイムズ、アイオワ州）を攻撃接種剤として利用した。レプトスピラ・ハージョ-ボビスという攻撃接種材料は、実験的にレプトスピラ・ハージョ-ボビスを感染させた家畜の尿から単離した初代継代培養生物として調製した。この攻撃接種材料を1日に1回、3日連続で投与した。攻撃接種を行なう日ごとに、レプトスピラ・ハージョ-ボビスを1mlに約 2.5×10^6 個含む合計2mlの攻撃接種材料を別々の3つの解剖学的部位に投与した。攻撃接種経路は、両方の目の結膜嚢（それぞれ1/2 ml）と膣（1ml）への滴注にした。

【0127】

血清学的アッセイ - ウシ細胞培養物におけるウイルス一定・血清減少アッセイにより、BVDV1型と2型に関する血清中和力価を測定した。血清の系列希釈物を、50-300TCID₅₀の細胞変性BVDV1型5960株、あるいはほぼ同量の細胞変性BVDV2型125c株と混合した。レプトスピラ・ハージョ-ボビスとレプトスピラ・ポモナに関する血清顕微鏡的凝集力価（MAT）は、設備の整った獣医学診断センター（コーネル大学、獣医学カレッジ、診断研究室）で標準的な方法を利用して測定した。

【0128】

レプトスピラの単離 - 尿サンプルと腎臓組織ホモジェネート（左右の腎臓をプールしたもの）にレプトスピラが存在しているかどうかを調べた。尿と腎臓の培養物にレプトスピラが存在しているかどうかを、標準的な手続きを利用して週に1回、8週間にわたって調べた。標準的なやり方でレプトスピラ蛍光抗体（FA）法を設備の整った獣医学診断センター（コーネル大学、獣医学カレッジ、診断研究室）で実施した。

【0129】

生物測定データの分析 - 攻撃接種後に保護されたことを証明するため、レプトスピラの感染事象が統計的に有意に減少したことを、接種した群（表11）（T02、T03、T04、T05）とプラセボ対照群（T1）で比較して明らかにする必要がある。腎臓移植と放尿に関するデータを処理法と時期に関してまとめた。それぞれの処理につき、腎臓でレプトスピラが検出された子牛の割合を比較した。それぞれの処理につき、尿でレプトスピラが検出された子牛の割合を比較した。フィッシャーの正確検定を利用してこのような分析を行なった。一般的な線形混合モデルを利用し、レプトスピラが尿に放出される期間も比較した。確率の値として $P = 0.05$ を利用し、統計的有意さを明らかにした。

【0130】

レプトスピラからの保護に関する研究 - 表11に示したように、テストした36頭の子牛をランダムに6つのテスト群に割り当てた。0日目と21日目に、T01～T05に割り当てたそれぞれの子牛に、適切な実験用テスト・ワクチンまたはプラセボ・ワクチン5mlを1回皮下投与した。0日目と28日目に、T06に割り当てたそれぞれの子牛に、陽性の対照となるワクチン2mlを1回皮下投与した。57～59日目に、すべての子牛に対し、すでに概略を説明したレプトスピラ・ハージョ-ボビス203株を用いて攻撃接種を行なった。

【0131】

0日目、21日目、35日目、56日目、84日目、111日目に血液サンプルをそれぞれの子牛から回収し、BVDV1型と2型の力価を測定した。

-1日目、56日目、70日目、77日目、84日目、91日目、98日目、105日目に尿サンプル（約45ml）をそれぞれの子牛から回収し、すでに説明したようにしてレプトスピラを単離した。

112日目と113日目に子牛を安楽死させ、腎臓にレプトスピラが存在しているかどうかをすでに説明したようにして調べた。

【0132】

結果

GMT値（表12）から、BVDV-レプトスピラ混合ワクチンを受けたすべての子牛（T02、T03、T04、T05）において、ワクチンを2回投与した後に血清反応が誘導されたことがわかる。T02、T03、T04、T05の群に属するすべての子牛は、2回目のワクチンを投与した後にBVDV1型に対してセロコンバージョンした（SN力価 1：8）。T02、T04、T05の群に属するすべての子牛は、2回目のワクチンを投与した後にBVDV2型にセロコンバージョンした（SN力価 1：8）。プラセボ群（T01）または一価のレプトスピラ・ハージョ-ボビス・ワクチンを受けた群のすべての子牛は、BVDV1型と2型の両方に対して血清反応が陰性のままであった。これは、この研究が偶発的な曝露によって無効にならなかったことを示している。全体として、BVDVの血清学的データは、不活化したBVDV1型および2型と、不活化したレプトスピラ・ハージョ-ボビスおよびレプトスピラ・ポモナとを4通りの異なるアジュバントの中に含む混合ワクチンが、家畜のBVDV疾患に対する保護応答を誘導できることを初めて示している。というのも、ウシBVDV SN力価が 1：8であるというのは、BVDV疾患から保護されていることを示す、ということが従来から知られているからである。

10

【0133】

尿と腎臓におけるレプトスピラの結果（表13）から、BVDV-レプトスピラ混合ワクチンを受けたすべての子牛（T02、T03、T04、T05）が、テストした8つの時期のすべての尿培養物（CX）について陰性であり、剖検時（112日目または113日目）に採取した腎臓の培養物について陰性であったことがわかる（表13、8列）。一価レプトスピラ・ワクチンを受けた子牛（T06、陽性の対照）は、レプトスピラの感染から同様に保護された。逆に、プラセボ・ワクチンを受けた子牛（T01、陰性の対照）は、尿培養物（表13、2列）と腎臓培養物（表13、8列）での結果に基づくと感染していた。これは、攻撃接種に対するワクチンの研究が有効であったことを示している。全体として、レプトスピラ・ハージョ-ボビス単離のデータは、不活化したBVDV1型および2型と、不活化したレプトスピラ・ハージョ-ボビスおよびレプトスピラ・ポモナとを4通りの異なるアジュバントの中に含む混合ワクチンが、家畜のBVDV疾患に対する保護応答を誘導できることを初めて示している。

20

【0134】

【表 1 1】

表11-BVDC-レプトスピラ混合ワクチンにおける子牛テスト群

処理	ワクチン	乳牛の数	投与量	投与経路	1頭への投与回数	投与の間隔
T01	生理食塩水のプラセボ	6	5mL	SC	2	3週間
T02	QACの中にレプトスピラ・ハルディオボビス・レプトスピラ・ポモナ-BVDC-1- BVDC-2	6	5mL	SC	2	3週間
T03	QAC/A10Hの中にレプトスピラ・ハルディオボビス・レプトスピラ・ポモナ-BVDC-1- BVDC-2	6	5mL	SC	2	3週間
T04	DDAの中にレプトスピラ・ハルディオボビス・レプトスピラ・ポモナ-BVDC-1- BVDC-2	6	5mL	SC	2	3週間
T05	DDA/A10Hの中にレプトスピラ・ハルディオボビス・レプトスピラ・ポモナ-BVDC-1- BVDC-2	6	5mL	SC	2	3週間
T06	一価のレプトスピラ・ハルディオボビス	6	2mL	SC	2	4週間

10

20

30

40

【表 1 2】

表12-35日目におけるBVDc1型と2型血清中和幾何平均力価の逆数と範囲（#-#）

処理	35 日目における血清ウイルス中和幾何平均力価の逆数と範囲（#-#）	
	BVDウイルス1型	BVDウイルス2型
T01	<2 (<2-<2)	<2 (<2-<2)
T02	1084.9 (609-2435)	20.8 (16-54)
T03	148.0 (<2-1218)	5.8 (<2-19)
T04	1877.9 (1024-2896)	34.0 (19-91)
T05	1084.6 (152-3444)	36.1 (10-91)
T06	<2 (<2-<2)	<2 (<2-<2)

【表 1 3】

表13-レプトスピラ・ハルディオボリスによる攻撃接種に対するBVDV-レプトスピラ混合ワクチンの効果に関する結果

処理	尿中でレプトスピラが陽性だったことのある子牛の割合				レプトスピラが陽性の尿になる日数の最小自乗平均				腎臓でレプトスピラが陽性だったことのある子牛の割合			
	CX	FA	PCR	PCR	CX	FA	PCR	PCR	CX	FA	FA	PCR
T01 n=6	100 ^a	83.3 ^a	83.3 ^a	83.3 ^a	50.9 ^a	29.1 ^a	37.1 ^a	37.1 ^a	83.3 ^a	0 ^a	0 ^a	16.7 ^a
T02 n=6	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a
T03 n=6	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	50.0 ^a	0 ^a	0 ^a
T04 n=6	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a
T05 n=6	0 ^b	16.7 ^{a b}	16.7 ^{a b}	16.7 ^{a b}	0 ^b	0.3 ^b	0.4 ^b	0.4 ^b	0 ^b	16.7 ^a	16.7 ^a	0 ^a
T06 n=6	0 ^b	0 ^b	33.3 ^{a b}	33.3 ^{a b}	0 ^b	0 ^b	1.6 ^b	1.6 ^b	0 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a

1つの列内で上付き添字が異なる数値は有意差があった (P<0.05)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internationa	Application No
	PCT/IB 03/03633

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K39/295 A61K39/12 A61K39/155 A61K39/02 A61K39/265		
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) IPC 7 A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TALENS L T ET AL: "EFFICACY OF VIRAL COMPONENTS OF A NONABORTIGENIC COMBINATION VACCINE FOR PREVENTION OF RESPIRATORY AND REPRODUCTIVE SYSTEM DISEASES IN CATTLE" JOURNAL OF THE AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, XX, XX, vol. 194, no. 9, 1 May 1989 (1989-05-01), pages 1273-1280, XP000568596 ISSN: 0003-1488	1, 2, 4-12
Y	the whole document ---	3, 13 -/--
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document 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	Date of mailing of the international search report	
18 November 2003	03/12/2003	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Brouns, G	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Interna .pplication No
 PCT/IB 03/03633

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CORTESE V S ET AL: "BVD VIRUS TRANSMISSION FOLLOWING ATTENUATED VACCINES TO BVDV SERONEGATIVE CATTLE" LARGE ANIMAL PRACTICE, VETERINARY PRACTICE PUBL., IRVINE, CA, US, vol. 18, no. 5, September 1997 (1997-09), pages 18-20, 22-24, XP001037197 ISSN: 1092-7603	1,2,4-12
Y	page 19, column 1; tables 1-3 ---	3,13
X	ANONYMOUS: "Invest early in CattleMaster 4 vaccine to get the highest rate of return" INTERNET ARTICLE, 'Online!' 14 August 2002 (2002-08-14), pages 1-2, XP002261912 Retrieved from the Internet: <URL:http://www.pfizer.com/ah/livestock/beef/11_beef.html> 'retrieved on 2003-11-18!' the whole document ---	1,2,4,5,7
X	FULTON R W ET AL: "Antibody responses by cattle after vaccination with commercial viral vaccines containing bovine herpesvirus-1, bovine viral diarrhea virus, parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus immunogens and subsequent revaccination at day 140" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 13, no. 8, 1 June 1995 (1995-06-01), pages 725-733, XP004057520 ISSN: 0264-410X tables 1-6 ---	1,2,4-10,12
X	US 3 634 587 A (AMENT ROLAND W ET AL) 11 January 1972 (1972-01-11) table XII ---	11
Y	FULTON R W ET AL: "Bovine viral diarrhea virus types 1 and 2 antibody response in calves receiving modified live virus or inactivated vaccines" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 19, no. 2-3, 15 September 2000 (2000-09-15), pages 264-274, XP004228836 ISSN: 0264-410X tables 1,4,5 page 269 -----	13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
with mention of patent family members

International application No
PCT/IB 03/03633

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 3634587	A	11-01-1972 CA 950827 A1	09-07-1974

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 15/06	(2006.01)	A 6 1 K 39/155	
A 6 1 P 31/12	(2006.01)	A 6 1 K 39/245	
A 6 1 P 37/02	(2006.01)	A 6 1 P 15/06	
		A 6 1 P 31/12	1 7 1
		A 6 1 P 37/02	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72) 発明者 ドミノスキー, ポール ジョセフ

アメリカ合衆国, コネチカット 0 6 3 4 0, グロトン, イースタン ポイント ロード, ファイ
ザー グローバル リサーチ アンド ディベロップメント

Fターム(参考) 4C085 AA03 BA07 BA48 BA51 BA78 BA99 CC07 CC08 EE03 EE06
FF12 FF14 FF17