

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3945885号
(P3945885)

(45) 発行日 平成19年7月18日(2007.7.18)

(24) 登録日 平成19年4月20日(2007.4.20)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 A
A 6 1 K 9/107 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 C
A 6 1 K 9/12 (2006.01)	A 6 1 K 9/107
A 6 1 K 9/19 (2006.01)	A 6 1 K 9/12
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 9/19

請求項の数 10 外国語出願 (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-365483
 (22) 出願日 平成9年12月2日(1997.12.2)
 (65) 公開番号 特開平10-179144
 (43) 公開日 平成10年7月7日(1998.7.7)
 審査請求日 平成16年7月14日(2004.7.14)
 (31) 優先権主張番号 96203441.9
 (32) 優先日 平成8年12月5日(1996.12.5)
 (33) 優先権主張国 オランダ(NL)

微生物の受託番号 CNCM I-1787

(73) 特許権者 506196247
 インターベツト・インターナショナル・ペー・ペー
 オランダ国、5831・アー・エヌ・ボツクスメール、ウイム・ドウ・コルベルストラート・35
 (74) 代理人 100062007
 弁理士 川口 義雄
 (74) 代理人 100114188
 弁理士 小野 誠
 (74) 代理人 100140523
 弁理士 渡邊 千尋
 (74) 代理人 100119253
 弁理士 金山 賢教

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非毒性 *Mycoplasma synoviae* とそのワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

CNCM I-1787として寄託された菌株MS1であることを特徴とする、生きた弱毒化マイコプラズマ・シノビアエ(*Mycoplasma synoviae*)。

【請求項2】

請求項1に記載の生きた弱毒化 *Mycoplasma synoviae*を含む、微生物学的培養物。

【請求項3】

請求項1に記載の弱毒化 *Mycoplasma synoviae*を含むことを特徴とする、家禽を *Mycoplasma synoviae*感染から保護するための生ワクチン。

【請求項4】

さらに、家禽に対して病原性である微生物またはウイルスに由来する他の抗原を少なくとも1種含むことを特徴とする、請求項3に記載のワクチン。

【請求項5】

微生物またはウイルスが、伝染性気管支炎ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、伝染性ファブリキウス嚢病(ガンボ口病)、ニワトリ貧血因子、トリレオウイルス、ニワトリポックスウイルス、トリ脳脊髄炎ウイルス、シチメンチョウ鼻気管炎ウイルス、マイコプラズマ・ガリセプチクム、ヘモフィルス・パラガリナルム(コリーザ)、パスツレラ・マルトサイダ(家禽コレラ)、オルニトバクテリウム・リノトラケアル(*Ornithobacterium rhinotracheale*)および大腸菌から成る群から選択されることを特徴とする、請求項4に記載のワクチン。

【請求項6】

ワクチンが噴霧ワクチン接種に適する担体を含むことを特徴とする、請求項3～5に記載の生ワクチン。

【請求項7】

ワクチンがアジュバントを含むことを特徴とする、請求項3～6に記載の生ワクチン。

【請求項8】

ワクチンが凍結乾燥形態であることを特徴とする、請求項3～7に記載の生ワクチン。

【請求項9】

請求項1に記載の *Mycoplasma synoviae* を薬学的に許容され得る担体と混合することを含むことを特徴とする、請求項3～8に記載の生ワクチンの製造法。

10

【請求項10】

請求項1に記載の *Mycoplasma synoviae* 菌株の、家禽を *Mycoplasma synoviae* 感染から保護するための生ワクチンの製造における使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野および従来技術】

マイコプラズマ・シノビアエ (*Mycoplasma synoviae*) は、家禽に対する伝染性が強いマイコプラズマである。*Mycoplasma synoviae* 感染は、非常に多くの養鶏業者にとって重大な問題である。この感染はシチメンチョウの群れでもしばしば認められる。

【0002】

Mycoplasma synoviae によって引き起こされる病気により、体重は減少し、産卵数が低下する。ニワトリおよびシチメンチョウの罹患率はいずれも通常5～15%である。ニワトリの死亡率は通常低いが、シチメンチョウの場合は群れ同士の踏みつけや共食いのため、かなり高いと考えられる。

20

【0003】

伝染性滑膜炎は、最初、1950～1960年に米国の養鶏場において、主に4～12週齢の成長期のニワトリが大規模に罹患しているのが見られた。そのときに初めてこの病気が知られ、マイコプラズマと関連付けられた(Olsonら、Poult. Sci. 33: 1075 (1954) および Olsonら、Am. J. Vet. Res. 17: 747-754 (1956))。

【0004】

この病気は、気道を介して伝染する。自然感染は、ニワトリでは1週齢のニワトリから見られ、シチメンチョウでは通常は10～24週齢のシチメンチョウで見られる。*Mycoplasma synoviae* 感染は、無症状の上気道感染として生じると考えられるが、重い気嚢炎まで進行し得る。他のケースでは、*Mycoplasma synoviae* が全身に及び、ニワトリおよびシチメンチョウの急性～慢性の伝染病である伝染性滑膜炎を生じる。この病気は、滲出性滑膜炎、腱鞘炎または滑液嚢炎を生じる関節および腱鞘の滑膜の感染を特徴とする。特に問題となるのは、ほとんど全てのニワトリ生産国において一般的に実施されている、ニューカッスル病または伝染性気管支炎(または家禽の他の呼吸器系病原体)に対するワクチンを接種する際に、*M. synoviae* 感染した動物に対してもワクチン接種がなされることである。これらの*M. synoviae* 感染した動物では、ND-およびIBV-ワクチン接種により、しばしば呼吸器感染および肺包嚢感染が生じる(Klevenら、; Avian Dis. 16:915-924 (1972), Springerら; Infect. Immun. 10:578-589 (1974))。 *M. synoviae* 感染が、滑膜感染としても呼吸器感染としても、家禽産業に大きな経済的損害を引き起こすことは明らかである。従って、*M. synoviae* に対して有効なワクチンがあれば、かなり高く評価されるであろう。

30

40

【0005】

今まで当業界では、不活化 *Mycoplasma synoviae* ワクチンのみが使用されている。米国特許 No. 3,917,819は、マイコプラズマ感染に対する不活化ワクチンを開示している。しかし、これらのワクチンは、十分な免疫応答を引き出すのに比較的大量の抗原物質が必要であるため、高価である。さらに、不活化ワクチンは全て、例えば点眼または非経口投与に

50

よって手動で適用されなければならない、個々の動物を個別に取り扱う必要がある。これは、非常に労力の要するワクチン接種法である。弱毒化生ワクチンは、不活化ワクチンに比していくつかの利点があるので、より望ましい。第一に、生ワクチンは、自己複製するので、抗原物質をあまり含まなくてよい。さらに、生ワクチンは、自然感染を厳密に模倣するので、より良好な保護を付与する。Mycoplasma synoviae 生ワクチンのベースとして、生きた弱毒化Mycoplasma synoviae 菌株が必要である。特定の生きた弱毒化菌株が1種のみ記載されている(Nonomura ら、Avian Dis. 26:763-775 (1982)) が、この菌株をベースとした弱毒化生ワクチンは市販されていない。Nonomuraによる生きた弱毒化菌株、ならびに野生菌株には、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)を含む培地で増殖させなければならないという欠点がある。これは、高価な成分であり、さらに、加熱による滅菌ができないので、培地の調製がより複雑になる。従って、NAD-非依存性ということが、かなり有利な特徴となる。

10

【0006】

NADの代わりにニコチンアミド(NIC)に適合させた菌株が、DaMassa (DaMassa, A. J.および Adler H.E.; Avian Diseases 19:544-555 (1975))によって記載されている。しかし、これらの菌株は、元の毒力を有しており、弱毒化生ワクチンのベースとしては適切でないという欠点がある。

【0007】

さらに、Nonomuraが記載した生きた弱毒化菌株は、不活化ワクチンと同様に、各動物の外鼻孔への点鼻により投与しなければならないという欠点を有する。前述したように、これは非常に労力を要するワクチン接種法である。

20

【0008】

従って、噴霧投与しても有効であり且つNADを含まない培地での増殖が可能な生きた弱毒化菌株が、非常に望まれている。

【0009】**【発明が解決しようとする課題】**

本発明の目的は、そのようなNAD-非依存性の生きた弱毒化Mycoplasma synoviae 菌株を提供することである。本発明の別の目的は、そのような菌株をベースとするワクチンを提供することである。

【0010】**【課題を解決するための手段】**

これらの目的は、フランスのthe Collection Nationale de Cultures de Microorganismes of the Institut Pasteur (25, Rue du Docteur Rous, 75724 Paris CEDEX 15)に No 1-1787として寄託されている菌株MS1の生きた弱毒化Mycoplasma synoviae を提供する本発明によって達成される。

30

【0011】**【発明の実施の形態】**

NAD-依存性菌株に由来するこの菌株を、NADを含まないマイコプラズマ増殖培地で増殖するように適合させた。

【0012】

本発明に係る菌株MS1は、Adler の改変培地(H.E. Adler, R. Yamamotoおよび S. Bankowski, (1954) Am. J. Ver. Res. 15:463-465)で増殖させることができる。改変は、Bacto PPLO培養ブロスプロテアーゼペプトン(Difco)で置き換え、ウマ血清をブタ血漿で置き換え、ニコチンアミドを0.01%の最終濃度まで添加することから成る。

40

【0013】

本発明はまた、本発明に係る菌株の生きた弱毒化Mycoplasma synoviae を含む微生物学的培養物にも関する。そのような微生物学的培養物は、上記した培地を調製し、この培地に、寄託した2、3個のマイコプラズマ菌株を接種することにより、容易に得ることができる。また、当技術分野で公知の他の適する培地も、本発明に係る菌株の増殖に使用できることは明らかである。また、本発明の菌株はNAD-非依存性であるが、所望により、培

50

地にNADを添加することも可能である。

【0014】

本発明はまた、本発明に係る生きた弱毒化Mycoplasma synoviae を含むという独特な特徴を有する、家禽をMycoplasma synoviae 感染から保護するための生ワクチンも提供する。本発明に係るワクチンは、動物に1日齢から接種することができる。マイコプラズマの別の種類である M. gallisepticum に対するワクチン接種は6週齢で行われ、従って、本発明に係る M. synoviaeワクチンと効果的に組み合わせることができる。従って、本発明に係るワクチンは、6週齢で効果的に接種することができる。

【0015】

別の態様では、本発明に係るワクチンが、家禽に対するウイルスまたは微生物病原体に由来する他の抗原を少なくとも1種含む。そのような混合ワクチンは、1回のワクチン接種で多数の病原体に対する免疫感作が得られるという利点を有する。

10

【0016】

抗原は、免疫系において応答を引き出すことができる、タンパク質、糖タンパク質、多糖類、リポ多糖類もしくは他の抗原またはそれらの組み合わせであってもよい。また、生きた弱毒化または不活化生物全体を抗原物質として使用することもできる。

【0017】

特に、他の家禽病原体は、伝染性気管支炎ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、伝染性ファブリキウス嚢病(ガンボ口病)、ニワトリ貧血因子(Chicken Anaemia agent)、トリレオウイルス、ニワトリポックスウイルス、トリ脳脊髄炎ウイルス、シチメンチョウ鼻気管炎ウイルス、マイコプラズマ・ガリセプチウム(Mycoplasma gallisepticum)、ヘモフィルス・パラガリナルム(Haemophilus paragallinarum)(コリーザ)、パストツレラ・マルトサイダ(Pasteurella multocida)(家禽コレラ)、オルニトバクテリウム・リノトラケアル(Ornithobacterium rhinotracheale)および大腸菌から成る群から選択される。

20

【0018】

ワクチンは、公知の生ワクチンの投与方法で接種できる。例えば、眼内、鼻腔内、気管内または経口投与できる。非経口投与も可能である。感染は気道を介して伝播されるので、気道によるワクチン接種は、自然の感染経路を厳密に模倣するものである。菌株MS1のMycoplasma synoviae をベースとする生ワクチンの利点は、噴霧によるワクチン接種が可能なことである。噴霧によるワクチン接種は、気道によるワクチン接種を行う際の最も簡単な投与方法であり、ワクチン接種したい複数の動物にワクチン菌株を単に噴霧するだけで、多数の動物を同時にワクチン接種することができる。噴霧によるワクチン接種の最も簡単な方法は、生ワクチンのネブライザーによる噴霧である。そのようなネブライザーにより、生ワクチンを含む細小滴が形成される。ワクチン接種したい動物がこれらのワクチン小滴を吸入すると、小滴は気道に浸透し、従って、自然感染を有利に模倣する。家禽のワクチン接種に通常使用される種類のネブライザーが使用される。この方法はまた、時間を要する、ワクチン接種したい動物を個別に取り扱うことを必要としないので、非常に有効な方法である。従って、より好ましい形態では、本発明に係るワクチンは、噴霧によるワクチン接種に適する担体を含む。そのような担体は、水のように単純なものでもよく、または、例えば生理学的塩溶液または培地であってもよい。1m³の隔離された小屋での噴霧に非常に適するMycoplasma synoviae の量は、10⁶~10¹¹ Colour Changing単位(CCU)である。

30

40

【0019】

所望により、アジュバント活性を有する化合物1種以上をワクチンに添加することができる。アジュバントは、免疫系の非特異的的刺激剤である。それらは、侵略してくる病原体に対する宿主の免疫応答を高める。従って、さらにより好ましい形態では、本発明に係るワクチンはアジュバントを含む。当技術分野で公知のアジュバントの例としては、フロイントの完全および不完全アジュバント、ビタミンE、非イオン性ブロックポリマー、ムラミルジペプチド、ISCOM(免疫刺激複合体;例えば、欧州特許EP 109942を参照)、サポニン、鉱物油、植物油およびCarbopol(ホモポリマー)が挙げられる。粘膜投与に特

50

に適するアジュバントとしては、例えば、大腸菌易熱性トキシン (L T) またはコレラトキシン (C T) が挙げられる。他の適するアジュバントとしては、例えば、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、油性エマルジョン (例えば、Bayol F^(R)) または Marcol 52^(R))、サポニンまたはビタミン E 溶解物が挙げられる。

【 0 0 2 0 】

本発明に係る生ワクチンは、菌株 M S 1 の *Mycoplasma synoviae* を薬学的に許容され得る担体と混合することにより調製できる。ワクチンは、しばしば、例えば、分解しがちなポリペプチドを分解から保護し、ワクチンの寿命を高め、または凍結乾燥効率を改善するために、さらに安定剤と混合する。有用な安定剤としては、S P G A (Bovarnik ら; J. Bacteriology 59: 509 (1950)) ; 炭水化物、例えば、ソルビトール、マンニトール、トレハロース、澱粉、ショ糖、デキストランまたはグルコース; アルブミンもしくはカゼインまたはそれらの分解産物などのタンパク質; およびアルカリ金属リン酸塩などの緩衝剤が挙げられる。化合物を添加することによりワクチンを安定化するための他の方法も本発明に含まれることは言うまでもない。

10

【 0 0 2 1 】

本発明に係るワクチンは、生ワクチンを保存するための当技術分野で公知の方法を使用して保存することができる。保存は、例えば、氷点下の温度で行うことができる。

【 0 0 2 2 】

凍結乾燥も、生ワクチンの保存に適する公知の方法である。凍結乾燥は、非凍結乾燥ストックの保存に必要な温度よりもかなり高い温度でワクチンを保存できるようにワクチンを安定化するという利点がある。

20

【 0 0 2 3 】

本発明に係る生ワクチンは、非常に効率的に凍結乾燥することができ、凍結乾燥の前に上記したような安定剤と組み合わせるときは特にそうである。従って、最も好ましい態様の生ワクチンは凍結乾燥形態である。凍結乾燥ワクチンをすぐに使用できるようにするためには、凍結乾燥ワクチンに水を加えるだけで十分である。

【 0 0 2 4 】

さらに、アンピシリンまたはテトラサイクリンなどの抗生物質をワクチンに添加することもできる。

【 0 0 2 5 】

さらに、本発明は、*Mycoplasma synoviae* 生ワクチンの製造法を提供する。そのような方法は、本発明に係る *Mycoplasma synoviae* を薬学的に許容され得る担体と混合することを含む。薬学的に許容され得る担体としては、健康に害を及ぼさない担体が挙げられ、さらに、健康に対するマイナスの影響がワクチン接種の有益な効果により相殺される担体が挙げられる。薬学的に許容され得る担体としては、例えば、生理学的塩溶液が挙げられる。

30

【 0 0 2 6 】

さらに、本発明は、本発明に係る *Mycoplasma synoviae* の、家禽を *Mycoplasma synoviae* 感染から保護するための生ワクチンの製造における使用に関する。

【 0 0 2 7 】

【実施例】

実施例 1 : ワクチンバッチの製造

1 0⁷CCU の凍結乾燥した M S 1 を含む 1 アンプルを使用して、Adler の改変培地 (上記参照) 2 0 ml に接種した。3 7 °C で一夜インキュベートした後、1 : 1 0 および 1 : 1 0 0 の継代培養物を 1 0 0 ml の培地において調製し、3 7 °C で一夜インキュベートした。次いで、1 : 1 0 および 1 : 1 0 0 の継代培養物を混合し、噴霧ワクチンとして使用した。

40

【 0 0 2 8 】

実施例 2 : 安全試験およびワクチン攻撃試験

菌株 M S 1 の安全性を試験するために、ニワトリに対してワクチン接種を次のように実験的に行った。

【 0 0 2 9 】

50

ニワトリに、塗料噴霧器を使用してワクチンを噴霧した。噴霧器には、上記したワクチン 100 mlを入れた。1 m³の隔離された小屋に対して、約100 mlのワクチンを噴霧した。ニワトリ1羽に対しては、約10 mlのワクチンを噴霧した。

【0030】

実験動物

35羽のSPF産卵鶏 (Intervet) および35羽のHyline brown産卵鶏 (Interbroed) を隔離した小屋に入れた。それらの動物を毎日観察した。

【0031】

実験計画

6群のニワトリを使用した。

【0032】

【表1】

群	種類 (羽)	MS1ワクチン接種	F10 攻撃
A	SPF (10)	—	—
B	SPF (15)	+	+
C	SPF (10)	—	+
D	Hyline brown (10)	—	—
E	Hyline brown (15)	+	+
F	Hyline brown (10)	—	+

【0033】

6週齢のとき、BおよびE群の動物に、実施例1のMS1培養物を噴霧によりワクチン接種した。10日後、A、B、DおよびE群の5羽のニワトリを検死して、MS1の安全性を評価した。

【0034】

攻撃試験

B、C、EおよびF群のニワトリに9週齢で毒性F10菌株を投与し、10日後に全動物の検死を行った。それらの動物には、M. synoviae 投与の3日前にニューカッスル病菌株を初期投与した。M. synoviae 菌株F10は、S.H. Kleven 博士 (ジョージア大学、Athens GA) から入手し、Freyの培地 (Freyら、Am. J. Vet. Res. 29:2163-2171 (1963)) で培養した。1アンプルのF10 (26-10-1995 P2, 1 ml, -70 で凍結保存) を使用して10 mlの培地に接種した。37 で48時間インキュベートした後、1:10、1:100および1:1000の継代培養物を100 mlの培地で調製し、37 で一夜インキュベートした。攻撃培養物を、1:10および1:100継代培養物を混合することにより調製し、塗料噴霧器によって投与した (隔離小屋毎に100 ml)。攻撃混合物のCCU数を測定した。

【0035】

AおよびD群の動物には、NDウイルスを投与した後、3日後にFreyの培地50 mlを噴霧した。

【0036】

血清学的試験

ワクチン接種の1週間前、攻撃時および検死時に血清サンプルを採取した。それらのサンプルを、M. synoviae 抗原 Nobilis (Intervet, バッチ MSG508) によるM. synoviae 凝集抗体に対して試験した。

【0037】

10

20

30

40

50

CCU測定

M. synoviae 培養物中の生きた生物の数を、1 mlの培地において順次10倍希釈物を調製することにより滴定し、次いで、37℃で10日間インキュベートして測定した。培地中で指示薬の色が変化した最高希釈物を使用して、CCU/mlを計算した。

【0038】

死後の検査

検死の際に、ニワトリの気管炎および滑膜炎の兆候について調べ、気嚢炎を、公知の方法(Klevenら、Avian Dis. 16:915-924 (1972))に従って採点した：

0：病変がない

1：気嚢膜がわずかに曇っている

2：チーズ様滲出液の小さい集まりがある、肥大した膜

3：1個の気嚢にチーズ様滲出液の大きい集まりがある、肥大した膜

4：3と同様であるが、チーズ様滲出液の大きい集まりが2個以上の気嚢に見られる。

【0039】

気管、気嚢および踵関節スワブをM. synoviae に対して培養した。M. synoviae の再単離を、PCRによって確認した(Lauerma ら、Avian Dis. 37:829-834 (1993))。

【0040】

結果MS1の安全性

ワクチン接種の7日前に、全動物のM. synoviae に対する抗体を調べたが、陽性は認められなかった。6週齢のとき、BおよびE群のニワトリに、 10^9 CCU/mlを含むMS1培養物を噴霧によりワクチン接種した。ワクチン接種後に、臨床上の異常は認められなかった。ワクチン接種から10日目に、BおよびE群の5匹の動物、ならびにAおよびD群のワクチン接種していない5匹の対照動物の検死を行った。気管炎、気嚢炎(得点=0)、滑膜炎または他の異常の兆候は認められなかった。E群の全15羽のニワトリおよびB群の15羽のうちの13羽は、血清平板凝集により測定されるように、ワクチン接種から10日後にM. synoviae に対する抗体を生じた(表1)。

【0041】

MS1の効力

攻撃時(すなわち、ワクチン接種から21日後)ワクチン接種したニワトリの抗体レベルは高かった(表1)。B、C、EおよびF群のニワトリの攻撃に対しては、 10^8 CCU/mlを含むF10培養物を使用した。表2に示すように、ワクチン接種したニワトリ(BおよびE群)では気嚢炎の得点は、攻撃対照群のニワトリよりもかなり低かった。気管炎は、A群の2羽およびC群の2羽のニワトリで認められた。脾臓の腫れは、A群の2羽、B群の1羽、C群の7羽、D群の1羽およびF群の5羽で認められた。E群のニワトリは、脾臓の腫れを示さなかった。C群の2羽およびF群の1羽は、肺炎に罹った。

【0042】

M. synoviae は、攻撃した全群のニワトリの気管および気嚢から再単離できた(表3)。ワクチンまたは攻撃菌株の再単離に差異はなかった。にもかかわらず、C群の1羽およびF群の3羽における陽性の培養物と比較して、ワクチン接種したニワトリの踵関節からは、M. synoviae が単離されなかった。マイコプラズマ属の他の種も単離されなかった。

【0043】

【表2】

10

20

30

40

表1： 血清平板凝集結果。BおよびE群は6週齢（ $t=0$ ）でMS1をワクチン接種した群であり、CおよびF群はワクチン接種していない対照群であった。B、C、DおよびE群は $t=21$ でF10を投与し、 $t=31$ dで検死した。血清は、*M. synoviae* 抗原 Nobilis により試験した。（最大凝集得点：+++）

B群	t=-7d	t=10d	t=21d	t=31d	C群	t=21d	t=31d
	-	+++	++++	++++		-	+++

10

E群	t=-7d	t=10d	t=21d	t=31d	F群	t=21d	t=31d
	-	++++	++++	++++		-	+++

【0044】

【表3】

20

表2： F10 攻撃から10日後の気嚢炎の得点^a。

A, D： ワクチン接種も攻撃もしなかった；

B, E： ワクチン接種して攻撃した；

C, F： ワクチン接種しないで攻撃した。

ニトリ	SPF			Hyline-brown		
	A(対照)	B(ワクチン接種)	C(攻撃)	D(対照)	E(ワクチン接種)	F(攻撃)
1	1	1	3	1	1	3
2	0	1	3	0	0	3
3	1	4	3	0	1	1
4	1	1	2	0	1	1
5	0	1	2	1	1	3
6		2	2		3	3
7		1	4		1	3
8		1	3		0	3
9		1	4		1	1
10		0				3
平均	0.6	1.3 ^b	2.9	0.4	1.0 ^b	2.4

^a： 最大得点：4^b： ワクチン摂取していない攻撃対照群（Kruskal-Wallis 試験）とは有意に（ $p < 0.01$ ）異なる

【0045】

【表4】

表3： M.synoviae 再単離の割合

	SPF			Hyline-brown		
	A	B	C	D	E	F
気管	nd ^a	8/10	9/9	0/5	7/9	10/10
気嚢	nd	5/10	4/9	0/5	3/9	9/10
腫関節	nd	0/10	1/9	0/5	0/9	3/10

^a： nd：単離しなかった

【0046】

実施例 3 : 投与量に应答するワクチン効力

広い範囲の用量にわたってワクチンの効力を試験するために、次の実験を行った。

【0047】

実験計画

4群のニワトリを使用した。

【0048】

【表5】

群	羽	ワクチン接種	F10 攻撃
A	10	MS1(1:100)	+
B	9	MS1(1:10,000)	+
C	10	—	+
D	5	—	—

10

【0049】

6週齢のときに、AおよびB群のニワトリにMS1ワクチンを噴霧により接種した。ワクチン接種から3週間後、A、BおよびC群のニワトリに、上記したようにNDウイルスを初期投与した後、毒性F10菌株を投与した。全ニワトリを、攻撃から10日後に検死した。

20

【0050】

実験動物

34羽のSPF産卵鶏(Intervet)を隔離した小屋に入れた。それらの動物を毎日観察した。B群の1羽およびC群の1羽は、攻撃前に死亡した。

【0051】

ワクチン接種

菌株MS1の培養物を凍結乾燥してワクチンを調製した。ワクチンの噴霧接種前に、凍結乾燥したワクチンの1バイアルの内容物を100mlのリン酸緩衝塩類溶液(1:100に希釈したワクチン)に再懸濁した。このワクチンから、1:100希釈物を、リン酸緩衝塩類溶液(1:10,000に希釈したワクチン)を用いて調製した。ニワトリに対して、微小噴霧によってワクチン接種した(隔離した小屋毎に100mlのワクチン希釈物)。最終ワクチン希釈物中のMS1濃度を、CCU数によって測定した。

30

【0052】

結果

ニワトリに、 10^6 CCU/ml(A群)および 10^3 CCU/ml(B群)を含むワクチンを接種した。ワクチン接種から3週間後、ワクチン接種したニワトリおよびワクチン接種していない対照ニワトリに、 10^7 CCU/mlを含むM. synoviae F10培養物を投与した。検死すると、ワクチン接種した両群で気嚢炎が予防されていることが認められた(表4)

40

【0053】

【表6】

表4：F10 攻撃から 10 日後の気嚢炎の得点

A： 10^6 CCU/ml でワクチン接種； B： 10^3 CCU/ml でワクチン接種；
 C：ワクチン接種しないで攻撃した； D：ワクチン接種も攻撃もしていない

ニワトリ	群			
	A(1:100 ワクチン接種)	A(1:10,000 ワクチン接種)	C(攻撃)	D(対照)
1	2	0	3	0
2	1	2	1	0
3	2	3	3	0
4	2	1	2	0
5	2	2	2	0
6	1	2	3	
7	0	1	2	
8	1	2	3	
9	1		2	
10	1			
平均	1.3 ^a	1.6 ^b	2.3	0

^a：ワクチン接種していない攻撃対照群とは有意に ($p < 0.01$) 異なる

^b： $p = 0.10$

【0054】

結論

本発明に係る N A D - 非依存性菌株は、ワクチンを噴霧接種した後の 6 週齢のニワトリで無発病性であった。これは、 10^9 CCU/ml を含む培養物によるワクチン接種から 10 日後の検死において、臨床上的異常が何ら見られなかったことで実証される。他方、9 週齢のときに毒性 F 10 菌株の培養物 10^8 CCU/ml を投与すると、攻撃の 10 日後には、ワクチン接種しなかったニワトリで重い気嚢炎が生じた。

【0055】

F 10 菌株による攻撃に対する保護は、S P F および市販の Hyline brown ニワトリの両方で、非常に広い用量範囲にわたって認められた。気嚢炎の得点は減少し、ワクチン接種したニワトリの関節からは *M. synoviae* は単離されなかった。巨脾腫を示したニワトリの数も、ワクチン接種していない攻撃対照ニワトリの方が多かった。従って、本発明に係る *Mycoplasma synoviae* 菌株をベースとするワクチンは安全であり、かつ有効であると結論付けることができる。

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 R 1/35 (2006.01) A 6 1 K 39/00 J
C 1 2 N 1/20 A
C 1 2 R 1:35

(74)代理人 100103920

弁理士 大崎 勝真

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 マーテン・ヘンドリック・ウイトフリート

オランダ国、5 8 0 7 ・ ベー ・ ウエー ・ オーストラム ・ エヌ ・ エル、バイテンホーフ ・ 3 6

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 特開平01 - 131123 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 1/20

A61K 9/107

A61K 9/12

A61K 9/19

A61K 39/00

PubMed

JSTPlus(JDream2)