

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013年9月26日(26.09.2013)



(10) 国際公開番号
WO 2013/140919 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 39/02 (2006.01) *A61K 39/12* (2006.01)
A61K 39/102 (2006.01) *A61K 39/17* (2006.01)
A61K 39/108 (2006.01) *A61P 31/00* (2006.01)
A61K 39/112 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/054038
- (22) 国際出願日: 2013年2月19日(19.02.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-065162 2012年3月22日(22.03.2012) JP
- (71) 出願人: 一般財団法人化学及血清療法研究所
(THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH
INSTITUTE) [JP/JP]; 〒8608568 熊本県熊本市北区
大窪一丁目6番1号 Kumamoto (JP).
- (72) 発明者: 坂元 隆一 (SAKAMOTO, Ryuichi); 〒
8691298 熊本県菊池市旭志川辺1314番地1
一般財団法人化学及血清療法研究所菊池研究所
内 Kumamoto (JP). 坂口 正士 (SAKAGUCHI, Mas-
ashi); 〒8691298 熊本県菊池市旭志川辺1314
番地1 一般財団法人化学及血清療法研究所菊
池研究所内 Kumamoto (JP).

- (74) 代理人: 鮫島 睦, 外 (SAMEJIMA, Mutsumi et al.);
〒5300017 大阪府大阪市北区角田町8番1号梅
田阪急ビルオフィスタワー青山特許事務所
Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH,
PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシ
ア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ
(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,
GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT,
NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: LPS VACCINE

(54) 発明の名称: LPSワクチン

[図1]	AA	ラクトン	BB	LPS量 EL/mL	フェノール 抽出	ラクトン投与後週数						DD	積分値 (2-10 W)	EE
						2	3	4	6	8	10			
FF	3種混合全菌体ワクチン			54,000	—	0.4	1.1	0.7	0.4	0.1	0		2.7	
				54,000		0.5	0.7	0.5	0.2	0	0		1.9	
GG	3価LPSワクチン			54,000	KK有	0	0.3	0.2	0	0	0		0.5	
				5,400		0.1	0.3	0.2	0.2	0	0		0.8	
HH	10種混合 LPSワクチン			7,200	—	0.4	0.9	0.7	0.2	0.1	0		2.3	
				7,200		0	0.4	0.4	0	0	0		0.8	
II	Oilvax 7			—	—	0	0	0	0.2	0	0		0.2	
JJ	ワクチン未投与			—	—	0	0	0	0	0	0		0	

AA Vaccines
BB Amount of LPS
CC Phenol extraction
DD Number of weeks elapsed after administration of vaccine
EE Integrated values
FF Three-mixed whole cell vaccine
GG Trivalent LPS vaccine
HH Ten-mixed LPS vaccine
II Oilvax 7
JJ Unvaccinated
KK Yes

(57) Abstract: Provided are: a vaccine composition for birds, which contains a structure containing an O-antigen originated from a gram-negative bacterium (wherein a whole cell is not included within the scope of the structure) as an active ingredient; and a method for producing the vaccine composition. In the present invention, a structure containing an O-antigen originated from a gram-negative bacterium (e.g., a lipopolysaccharide) is used as an antigen for the vaccine. Therefore, the occurrence of a vaccination reaction can be reduced and the amount of an injection solution can also be reduced compared with those in conventional whole cell vaccines, and a multi-mixed vaccine can be prepared.

(57) 要約: グラム陰性菌に由来するO抗原を含む構造物(ただし、全菌体を含まない)を有効成分とする鳥類用のワクチン組成物、及びその製造方法を提供する。本発明は、グラム陰性菌に由来するO抗原を含む構造物(例えば、リポ多糖)をワクチンの抗原とすることで、従来の菌体ワクチンと比較して接種反応の軽減及び注射液量の少量化が達成され、ワクチンの多混化を可能ならしめる。

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称 : L P S ワクチン

技術分野

[0001] 本発明はサルモネラ菌や大腸菌などのグラム陰性菌が起因する感染症を予防する為に有用な新規ワクチンを提供する。詳細には、本発明は、グラム陰性菌に由来するO抗原を含む構造物（例えば、リポ多糖）を防御抗原とし、この抗原を用いて非ヒト動物、特に鳥類を免疫化する方法に関する。

背景技術

[0002] 細菌はグラム染色法を行った場合に細胞壁の組成の違いによって染色性が異なり、その染色性の違いを指標にして、グラム陰性菌とグラム陽性菌の大きな二つのグループに分けられる。グラム陰性菌の場合、その細胞壁は外膜とその内側にあるペプチドグリカンの層からなっている。外膜の構成成分は、リン脂質、リポ多糖(Lipopolysaccharide ; LPS)、リポ蛋白、及び蛋白質であり、外膜の単位膜構造はリン脂質とリポ多糖で構成されている。膜の外葉にはリポ多糖が、内葉にはリン脂質がある。リポ多糖は、リピドA (Lipid A) と呼ばれる高分子の脂質とそれに結合した多糖の部分からなる。リピドAの部分は外膜の外葉をつくっており、多糖の部分は、外膜より外部に伸びている。最外部とリピドAに近い部分とでは糖の種類が異なり、外部をO側鎖多糖(O抗原)、内側の部分をコア多糖という。O抗原をつくる糖は、主に6炭糖、及び5炭糖で、3〜5種類のこれらの糖からなる基本構造が繰返し現れる。コア多糖部分にはこれらの糖のほかに8炭糖であるケトデオキシオクトン酸や7炭糖であるヘプトースなど、細菌独特の糖が存在している。リピドAは細菌独特の脂質で、2分子のグルコサミンが β -1,6結合した糖にリン酸と脂肪酸が結合したものであり、コア多糖部分とは糖の6'の位置で結合している。

[0003] グラム陰性菌に属する細菌としては非常に多くの種類が含まれ、腸内細菌科に含まれるようなサルモネラ属や大腸菌属、パスツレラ科に属するヘモフィルス属もグラム陰性菌に含まれる。

[0004] サルモネラ属 (Salmonella) は中等大桿菌で周毛性鞭毛を有する細菌であり、O抗原の種類によって群に分けられ、さらにH抗原の種類によって細分化されており、2000種類を超す血清型が存在する。サルモネラ属の宿主域はきわめて広く、ヒトをはじめ、各種の哺乳動物及び鳥類が感染または保有していることが知られている。サルモネラ属が鶏に感染した場合、幼雛において敗血性疾病を引き起こすことがある。ただし、成鶏の場合、保菌鶏においても無症状であることから淘汰の対象とはならず、その結果、サルモネラ汚染鶏由来の鶏肉や鶏卵が流通し、そこから派生する食品を介してヒトに食中毒を惹起する。

[0005] サルモネラによる食中毒は、汚染された食品を摂取してから12～48時間の潜伏期を経て発症する。潜伏期間は、摂取菌量、患者の健康状態及び年齢によって左右される。症状としては主として急性胃腸炎であり、下痢、腹痛、嘔吐及び発熱などを主徴とする。従って、鶏用サルモネラワクチンは鶏疾病をコントロールするのではなく、公衆衛生上使用される重要なワクチンである。

[0006] 従来のサルモネラ属に対するワクチンとして、不活化させたサルモネラ属の菌体を含む全菌体ワクチンが存在するが、全菌体ワクチンは抗原性を付与する以外の部分も含まれることから、副作用を惹起し得る。多数羽飼育される鶏においてはワクチネーションの省力化の観点から一回の注射で多くの疾病を予防できる多価ワクチンへの要望が強い。同時に多価ワクチンは注射回数の削減に繋がることから鶏のストレス軽減にも寄与する。しかしながら、多価ワクチンはこのような利便性を有する一方、特にサルモネラ菌のような菌類を含む場合には投与部位の接種反応が生じやすい。

[0007] このような状況下、サルモネラに対するコンポーネントワクチンの研究が行われており、その一つとしてリポ多糖 (O抗原) の応用についても検討がなされている。例えば、サルモネラ・ティフィムリウム (Salmonella Typhimurium) 由来のO抗原をキャリアー蛋白質に結合させた結合体をマウスに投与して有効性を確認した報告がある (非特許文献1)。また、サルモネラ・ティ

フィ (*Salmonella Typhi*) 由来のリポ多糖をマウスに投与して有効性を確認した報告がある (特許文献 1)。また、サルモネラ属以外でもバークホルデリア・タイランデンシス (*Burkholderia thailandensis*) またはバークホルデリア・シュードマレイ (*Burkholderia pseudomallei*) 由来のリポ多糖をマウスに投与して有効性を確認した報告がある (特許文献 2、非特許文献 2)。

[0008] しかしながら、リポ多糖は臨床的には敗血症に伴うショック、汎発性血管内凝固症候群 (DIC)、さらに多臓器障害 (MOF) といった極めて致死性の高い諸疾患を引き起こすこと、ごく微量であっても発熱等の原因となることから、生体に投与する医薬品等においてはリポ多糖の混入を避けるべく細心の注意が払われている (非特許文献 3)。実際にリポ多糖をマウスに投与した場合、72 時間以内に 90% 以上のマウスが死亡することが報告されている (特許文献 3)。このような状況下、リポ多糖そのものをワクチン抗原として使用するという発想は一般的には生じ得ない。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献 1 : W02004/052394 号公報

特許文献 2 : W02010/082020 号公報

特許文献 3 : 特開 2001-26602

非特許文献

[0010] 非特許文献 1 : Infect. Immun, 60, pp4679-4686, 1992

非特許文献 2 : Vaccine, 28, pp7551-7555, 2010

非特許文献 3 : Bull. Natl. Inst. Health Sci., 126, pp19-33 2008

非特許文献 4 : AVIAN DISEASES, 53, pp281-286, 2009

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明は、サルモネラ菌や大腸菌などのグラム陰性菌に対するワクチンに

において、多価ワクチンや混合ワクチンの製造を可能とし、接種反応の軽減を図ることを目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] 上記の課題に対して本発明者らは鋭意検討を行った結果、グラム陰性菌に由来するO抗原を含む構造物（例えば、リポ多糖）を有効成分とするワクチンを鳥類へ投与した場合、予想に反して投与部位での腫脹が抑えられることを見出した。すなわち、グラム陰性菌（例えば、サルモネラ属）の培養液に含まれる菌体からO抗原を含む構造物を遊離させた後（例えば、超音波処理やフェノール処理により）、前記構造物が吸着するカラムなどを用いて前記構造物を回収する。そして、必要に応じて乳化させる工程を経て、前記構造物を有効成分とするワクチン組成物へ組成を調製する。こうして得られたワクチン組成物を鳥類（例えば、ニワトリ）へ免疫すると、特筆すべき副反応を示すことなく前記グラム陰性菌に対して免疫付与できることを見出し、本願発明を完成させるに至った。

[0013] 本発明は、以下に示す通りである。

[1] グラム陰性菌に由来するO抗原を含む構造物（ただし、全菌体を含まない）を有効成分とする鳥類用のワクチン組成物。

[2] O抗原を含む構造物が、リポ多糖である、前記[1]に記載のワクチン組成物。

[3] グラム陰性菌が、腸内細菌科、又はパスツレラ科の細菌である、前記[1]又は[2]に記載のワクチン組成物。

[4] 腸内細菌科の細菌が、サルモネラ属、又は大腸菌属の細菌である、前記[3]に記載のワクチン組成物。

[5] サルモネラ属の細菌が、O4群、O7群及びO9群からなる群より選択される1種類以上のサルモネラ属の細菌である、前記[4]に記載のワクチン組成物。

[6] サルモネラ属の細菌が、サルモネラ・エンテリティディス、サルモネラ・ティフィムリウム、及びサルモネラ・インファンティスからなる群より

選択される１種類以上の細菌である、前記〔４〕又は〔５〕に記載のワクチン組成物。

〔７〕グラム陰性菌に由来するＯ抗原を含む構造物が、サルモネラ・エンテリティディス、サルモネラ・ティフィムリウム、及びサルモネラ・インファントリスに由来するＯ抗原を含む構造物の混合物である、前記〔４〕又は〔５〕に記載のワクチン組成物。

〔８〕大腸菌属の細菌が、Ｏ７８のＯ抗原を持つ大腸菌属の細菌である、前記〔４〕に記載のワクチン組成物。

〔９〕パスツレラ科の細菌が、ヘモフィルス属の細菌である、前記〔３〕に記載のワクチン組成物、

〔１０〕ヘモフィルス属の細菌が、ヘモフィルス・パラガリナルムである、前記〔９〕に記載のワクチン組成物。

〔１１〕Ｏ抗原を含む構造物が、ワクチン組成物中に少なくとも各5,400EU/mlで含まれるＯ抗原を含む構造物である、前記〔１〕から〔１０〕のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

〔１２〕ニューカッスル病ウイルス、鶏伝染性気管支炎ウイルス、マイコプラズマ・ガリセプチカム、産卵低下症候群ウイルス、及びヘモフィルス・パラガリナルムからなる群より選択される１種類以上の病原体に由来する抗原をさらに含有する前記〔１〕から〔１１〕のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

〔１３〕グラム陰性菌に由来するＯ抗原を含む構造物を有効成分とする鳥類用のワクチン組成物の製造方法であって、下記の（１）から（４）の工程を含む前記製造方法；

（１）グラム陰性菌を培養する工程（培養工程）、

（２）前記培養後の溶液に含まれる菌体から前記構造物を遊離する工程（遊離工程）、

（３）前記遊離後の溶液から前記構造物を回収する工程（回収工程）、
で

(4) 前記回収後の溶液を調製してワクチン組成物を得る工程（調製工程）。

[14] 前記構造物を遊離する工程が、超音波処理する工程、又はフェノール処理する工程である、前記[13]に記載の製造方法。

[15] 菌体を不活化する工程（不活化工程）、及び／又は乳化する工程（乳化工程）をさらに含む、前記[13]又は[14]に記載の製造方法。

[16] 前記不活化工程が前記培養工程の後であり、前記乳化工程が前記回収工程の後である、前記[15]に記載の製造方法。

[17] 前記構造物の量を測定する工程（測定工程）をさらに含む、前記[13]から[16]のいずれか一項に記載の製造方法。

[18] 前記測定工程が前記回収工程の後である、前記[17]に記載の製造方法。

[19] リピドAを除去する工程（リピドA除去工程）をさらに含む、前記[13]から[18]のいずれか一項に記載の製造方法。

[20] 前記リピドA除去工程が前記回収工程の後である、前記[19]に記載の製造方法。

発明の効果

[0014] ワクチン組成物の有効成分としてグラム陰性菌に由来するO抗原を含む構造物（例えばリポ多糖）を用いることによって、投与部位での腫脹を従来の菌体ワクチンより軽減することが可能となる。また、コンポーネント化することにより、注射液量を増やすことなく更なる多混化が可能となる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]図1は、サルモネラ・エンテリティディス、サルモネラ・インファンティス、及びサルモネラ・ティフィムリウム由来のリポ多糖を混合したワクチン（3価LPSワクチン）、又は3価LPSワクチンに他の抗原を添加したワクチン（10種混合LPSワクチン）について、投与部位の腫脹スコアを示す。

[図2]図2は、3価LPSワクチンについて、サルモネラ・ティフィムリウムで攻撃試験を行った際の排泄菌数を示した図である。図中、*は対照群との有意

差 ($p < 0.05$) を示す。

[図3] 図3は、3価LPSワクチンについて、サルモネラ・エンテリティディスで攻撃試験を行った際の排泄菌数を示した図である。図中、*は対照群との有意差 ($p < 0.05$) を示す。

[図4] 図4は、3価LPSワクチンについて、サルモネラ・インファンティスで攻撃試験を行った際の排泄菌数を示した図である。図中、*は対照群との有意差 ($p < 0.05$) を示す。

[図5] 図5は、10種混合LPSワクチンについて、サルモネラ・エンテリティディスで攻撃試験を行った際の排泄菌数を示した図である。図中、*は対照群との有意差 ($p < 0.05$) を示す。

[図6] 図6は、10種混合LPSワクチンについて、サルモネラ・インファンティスで攻撃試験を行った際の排泄菌数を示した図である。図中、*は対照群との有意差 ($p < 0.05$) を示す。

発明を実施するための形態

[0016] 1. ワクチン組成物

本発明の第一の実施形態はグラム陰性菌に由来するO抗原を含む構造物を有効成分とする鳥類用のワクチン組成物である。

[0017] 本発明では、サルモネラ・ティフィムリウム、サルモネラ・インファンティス、又はサルモネラ・エンテリティディスに由来するO抗原を含む構造物（具体的にはリポ多糖）を有効成分とするワクチン組成物において、それぞれの菌体を用いた攻撃に対する排菌軽減効果が確認されている。それは、複数種類のグラム陰性菌に由来する前記構造物を混合した場合であっても、それぞれの前記構造物に対する抗原性が保持されているためと考えられる。また、上記の3価ワクチンに前記構造物とは異なる抗原を混合した10種混合ワクチンにおいて、前記構造物を提供した菌体に対する抗原性が保持されている。それは、混合ワクチンに前記構造物以外の抗原を含ませた場合であっても、前記構造物に対する抗原性が保持されているためと考えられる。

[0018] 上述より、本発明のワクチン組成物は、

(A) 一種類のグラム陰性菌に由来する前記構造物を有効成分とするワクチン組成物（以下、単価ワクチンと称する場合もある）、

(B) 複数種類のグラム陰性菌に由来する前記構造物を有効成分とするワクチン組成物（以下、多価ワクチンと称する場合もある）、及び

(C) 単価ワクチンや多価ワクチンに前記構造物とは異なる抗原を含ませたワクチン組成物（以下、混合ワクチンと称する場合もある）

を含む。

[0019] (1) 菌体

本発明のワクチン組成物は0抗原を含む構造物を有効成分として含む。そのため、本発明のワクチン組成物は前記構造物を有するグラム陰性菌に広く適用可能である。例えば、本発明のグラム陰性菌には、通性嫌気性グラム陰性桿菌 (Gram-negative facultatively anaerobic rod)、アナプラズマ科 (Anaplasmataceae)、アーコバクター属 (Arcobacter)、バルトネラ科 (Bartonellaceae)、ブラキスピラ属 (Brachyspira)、ブフネラ属 (Buchnera)、カンピロバクター属 (Campylobacter)、クラミジア目 (Chlamydiales)、クロロフレクサス属 (Chloroflexus)、グラム陰性好気性菌 (Gram-negative aerobic bacteria)、グラム陰性嫌気性菌 (Gram-negative anaerobic bacteria)、グラム陰性酸素産生光合成細菌 (Gram-negative oxygenic photosynthetic bacteria)、ヘリコバクター属 (Helicobacter)、ローソニア細菌 (Lawsonia bacteria)、メチロサイナス (Methylosinus)、オセアノスピリルム科 (Oceanospirillaceae)、オルニソバクテリウム属 (Ornithobacterium)、ピスキリケッチア科 (Piscirickettsiaceae)、ロドバクター属 (Rhodobacter)、ロドミクロビウム属 (Rhodomicrobium)、ロドブラム属 (Rhodovulum)、リケッチア科 (Rickettsiaceae)、ロゼオバクター属 (Roseobacter)、スピリルム科 (Spirillaceae)、及びテネリクテス門 (Tenericutes) が含まれる。好ましくは通性嫌気性グラム陰性桿菌である。

[0020] 通性嫌気性グラム陰性桿菌は、腸内細菌科 (Enterobacteriaceae)、パストレラ科 (Pasteurellaceae)、アクチノバチルス属 (Actinobacillus)、エ

ロモナス科 (Aeromonadaceae)、アゾアルカス属 (Azoarcus)、キャプノサイトファーガ属 (Capnocytophaga)、カルジオバクテリウム科 (Cardiobacteriaceae)、クロモバクテリウム属 (Chromobacterium)、エイケネラ属 (Eikenella)、ガードネラ属 (Gardnerella)、モリテーラ属 (Moritella)、ラーネラ属 (Rahnella)、シュワネラ属 (Shewanella)、ストレプトバチルス属 (Streptobacillus)、ビブリオ科 (Vibrionaceae)、及びザイモモナス属 (Zymomonas) が含まれる。好ましくは腸内細菌科、及びパストツレラ科である。

[0021] 腸内細菌科は、サルモネラ属 (Salmonella)、大腸菌属 (Escherichia)、カリマトバクテリウム属 (Calymmatobacterium)、シトロバクター属 (Citrobacter)、エドワージエラ属 (Edwardsiella)、エンテロバクター属 (Enterobacter)、エルウィニア属 (Erwinia)、ハフニア属 (Hafnia)、クレブシエラ属 (Klebsiella)、クライベラ属 (Kluyvera)、モルガネラ属 (Morganella)、パンテア属 (Pantoea)、ペクトバクテリウム属 (Pectobacterium)、フォトラブダス属 (Photobacterium)、プレジオモナス属 (Plesiomonas)、プロテウス属 (Proteus)、プロビデンシア属 (Providencia)、セラチア属 (Serratia)、赤痢菌属 (Shigella)、ウィグルスウォーチア属 (Wigglesworthia)、ゼノラブダス属 (Xenorhabdus)、及びエルシニア属 (Yersinia) が含まれる。好ましくはサルモネラ属、及び大腸菌属である。

[0022] サルモネラ属は、主要なO抗原の種類で群に分けられ、さらにH抗原の種類によって細分化される。表1及び表2のように、O2群 (A)、O4群 (B)、O7群 (C1、C4)、O8群 (C2、C3)、O9群 (D1)、及びO3/O10群 (E1、E2、E3) が挙げられる (カッコ内は旧呼称)。

[0023]

[表1]

O血清型	血清型	O抗原： () は欠けている場合もある
O2 (A)	サルモネラ・パラチフスA菌 (<i>Salmonella Paratyphi A</i>)	1、2、12
O4 (B)	サルモネラ・パラチフスB菌 (<i>Salmonella Paratyphi B</i>)	1、4、 (5) 、12
	サルモネラ・スタンレー (<i>Salmonella Stanley</i>)	1、4、 (5) 、12、27
	サルモネラ・デルビー (<i>Salmonella Derby</i>)	1、4、 (5) 、12
	サルモネラ・アゴナ (<i>Salmonella Agona</i>)	1、4、12
	サルモネラ・ティフィムリウム (<i>Salmonella Typhimurium</i>)	1、4、 (5) 、12
	サルモネラ・ハイデルベルグ (<i>Salmonella Heidelberg</i>)	1、4、 (5) 、12
O7 (C1、C4)	サルモネラ・パラチフスC菌 (<i>Salmonella Paratyphi C</i>)	6、7、 (Vi)
	サルモネラ・コレレスイス (<i>Salmonella Choleraesuis</i>)	6、7
	サルモネラ・ブラエンデラップ (<i>Salmonella Braenderup</i>)	6、7、14
	サルモネラ・モンテビデオ (<i>Salmonella Montevideo</i>)	6、7、14
	サルモネラ・トンプソン (<i>Salmonella Thompson</i>)	6、7、14
	サルモネラ・ウィルヒョー (<i>Salmonella Virchow</i>)	6、7
	サルモネラ・インファンティス (<i>Salmonella Infantis</i>)	6、7、14
	サルモネラ・バレーリー (<i>Salmonella Bareilly</i>)	6、7、14
	サルモネラ・テネシー (<i>Salmonella Tennessee</i>)	6、7、14

[0024]

[表2]

O血清型	血清型	O抗原：() は欠けている場合もある
O8 (C2、C3)	サルモネラ・ナラシノ (<i>Salmonella</i> Narashino)	6、8
	サルモネラ・ニューポート (<i>Salmonella</i> Newport)	6、8、20
	サルモネラ・リッティフィムルド (<i>Salmonella</i> Lichfield)	6、8
O9 (D1)	サルモネラ・センダイ (<i>Salmonella</i> Sendai)	1、9、12
	サルモネラ・ティフィ (<i>Salmonella</i> Typhi)	9、12、(Vi)
	サルモネラ・エンテリティディス (<i>Salmonella</i> Enteritidis)	1、9、12
	サルモネラ・パナマ (<i>Salmonella</i> Panama)	1、9、12
	サルモネラ・エンテリカ亜種サラマエ (<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>salamae</i>)	1、9、12
	サルモネラ・ガリナラム (<i>Salmonella</i> Gallinarum)	1、9、12
O3/O10 (E1、E2、E3)	サルモネラ・アナタム (<i>Salmonella</i> Anatum)	3、10、(15)、(15、34)
	サルモネラ・メレアグリジス (<i>Salmonella</i> Meleagridis)	3、10、(15)、(15、34)
	サルモネラ・ロンドン (<i>Salmonella</i> London)	3、10、(15)
	サルモネラ・ギブ (<i>Salmonella</i> Give)	3、10、(15)、(15、34)
	サルモネラ・ウェルトゥフレーデン (<i>Salmonella</i> Weltevreden)	3、10、(15)

[0025] 本発明では、サルモネラ・ティフィムリウム (04群)、サルモネラ・インファンティス (07群)、及びサルモネラ・エンテリティディス (09群) に由来するO抗原を含む構造部を有効成分とする3価ワクチンにおいて、当該菌を用いた攻撃に対する排菌軽減効果が見出されている。それは、本発明の製造方法で得られた前記構造物は、O抗原の種類を問わず、その抗原性を保持させているためと考えられる。そのため、本発明のワクチン組成物は、04群、07群、及び09群に属するサルモネラ属を問わず、サルモネラ属全般に適用可能であると考えられる。

[0026] そして、非特許文献4で、サルモネラ・ティフィムリウム、サルモネラ・インファンティス、及びサルモネラ・エンテリティディスの菌体を含むワク

チンを免疫した鳥類において、上記のワクチン株のみならず、サルモネラ・ティフィムリウムと同じO抗原群（O4群）のサルモネラ・ハイデルベルグ（*Salmonella Heidelberg*）に対しても排菌軽減効果が見られた。それゆえ、前記ワクチンはワクチン株のO抗原と相同性のあるO抗原を持つ異なる血清型の菌体にも効果があると考えられる。つまり、サルモネラワクチンの場合にはワクチン株と相同性のあるO抗原を持つ菌体（ワクチン株と同じO抗原群の菌体）に対しても効果があると考えられる。そのため、本発明のワクチン組成物をサルモネラ属に適用した場合には、O4群、O7群、及びO9群に属する他のサルモネラ属の細菌にも適用可能である。

[0027] すなわち、本発明のワクチン組成物には、

(A) サルモネラ属に由来するO抗原を含む構造物を有効成分とする単価ワクチン、

(B) サルモネラ属より選択される2種類以上のサルモネラ属に由来するO抗原を含む構造物を有効成分とする多価ワクチン、

(C) O4群、O7群、又はO9群のサルモネラ属に由来するO抗原を含む構造物を有効成分とする単価ワクチン、

(D) O4群、O7群、及びO9群からなる群より選択される2種類以上のサルモネラ属に由来するO抗原をそれぞれ含む多価ワクチン、

(E) 前記単価ワクチン又は多価ワクチンに前記構造物とは異なる抗原を含ませた混合ワクチン

が含まれる。

[0028] サルモネラ属、O4群、O7群、又はO9群に含まれるサルモネラ属の一例としては、表1や表2の菌体が含まれる。好ましくは、サルモネラ属は、O4群、O7群、及びO9群に属するサルモネラ属である。また、好ましくは、O4群はサルモネラ・ティフィムリウム、O7群はサルモネラ・インファンティス、O9群はサルモネラ・エンテリティディスである。

[0029] 大腸菌属は、O抗原、K抗原、及びH抗原の3種類の抗原の組合せによって分類される。O抗原には約160種類、K抗原には約100種類、H抗原には56種類の型

が知られている。大腸菌では一定の型の菌が下痢や胃腸炎を起こし、食中毒の原因となる。このような菌は、一般的には毒素原性大腸菌、細胞侵入性大腸菌、腸管出血性大腸菌、腸管病原性大腸菌、凝集付着性大腸菌、及び均一付着性大腸菌に区別される。毒素原性大腸菌に属する群としては、018、026、044、055、086、0111、0112、0114、0119、0125、0126、0127、0128a、及び0142が含まれる。毒素原性大腸菌には、04、06、07、08、09、015、018、020、025、027、063、077、078、080、085、0114、0115、0126、0128a、0139、0148、0153、0159、0167、0168、及び0169が含まれる。腸管侵襲性大腸菌には、028c、029、0112a、0124、0136、0143、0144、0152、0164、及び0167が含まれる。腸管出血性大腸菌には、01018、026、091、0111、0113、0114、0115、0117、0119、0121、0128、0145、及び0157が含まれる。好ましくは、078である。

[0030] パスツレラ科は、ヘモフィルス属、マンヘミア属、及びパスツレラ属が含まれる。好ましくはヘモフィルス属である。

[0031] ヘモフィルス属は、ヘモフィルス・パラガリナルム (*Haemophilus paragalinarum*)、軟性下痢菌、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*)、パラインフルエンザ菌 (*Haemophilus parainfluenzae*)、ヘモフィルス・パラフロフィルス (*Haemophilus paraphrophilus*)、ヘモフィルス・パラスイス (*Haemophilus parasuis*)、及びヘモフィルス・ソムナス (*Haemophilus somnus*) が含まれる。好ましくはヘモフィルス・パラガリナルムである。

[0032] (2) 0抗原を含む構造物

本発明のワクチン組成物は、0抗原を含む構造物を有効成分として含む。0抗原が抗原性の主体と考えられるため、0抗原を含む構造物は、0抗原を含んでいれば如何なる構造物であっても構わない。ただし、前記構造物は全菌体を含まない構造物である。例えば、リポ多糖、及びリポ多糖からリピドAの部分を除いた構造物（例えば、0抗原、0抗原とコア多糖からなる構造物）が含まれる。製剤化の簡便性を考えて、リピドAを除去する工程を用いないのであれば、好ましくはリポ多糖を有効成分としたものを用いる。本発明のワク

チン組成物は副作用が問題とされないが、さらに安全性を高めるべく、好ましくはリポ多糖からリピドAの部分を除去した構造物を有効成分とする。

[0033] (3) 単価ワクチン

本発明のワクチン組成物は、一種類のグラム陰性菌に由来する前記構造物を有効成分とするワクチン組成物（単価ワクチン）を含む。

[0034] 単価ワクチンの場合、グラム陰性菌は前記のグラム陰性菌に属する菌体から適宜選択されうる。グラム陰性菌は、腸内細菌科、又はパスツレラ科が好ましい。腸内細菌科は、サルモネラ属、又は大腸菌属が好ましい。サルモネラ属は、04群、07群、又は09群に属するサルモネラ属が好ましい。04群に属するサルモネラ属はサルモネラ・ティフィムリウム、07群に属するサルモネラ属はサルモネラ・インファンティス、09群に属するサルモネラ属はサルモネラ・エンテリティディスが好ましい。大腸菌属は078の0抗原を持つ大腸菌属が好ましい。パスツレラ科はヘモフィルス属、とりわけ、ヘモフィルス・パラガリナルムが好ましい。

[0035] すなわち、本発明の単価ワクチンとしては、

- (A) 1種類のグラム陰性菌に由来する0抗原を有効成分とするワクチン組成物、
- (B) 1種類の腸内細菌科に由来する0抗原を有効成分とするワクチン組成物、
- (C) 1種類のパスツレラ科に由来する0抗原を有効成分とするワクチン組成物、
- (D) 1種類のサルモネラ属に由来する0抗原を有効成分とするワクチン組成物、
- (E) 1種類の大腸菌属に由来する0抗原を有効成分とするワクチン組成物、
- (F) 1種類の04群に属するサルモネラ属に由来する0抗原を有効成分とするワクチン組成物、
- (G) 1種類の07群に属するサルモネラ属に由来する0抗原を有効成分とするワクチン組成物、
- (H) 1種類の09群に属するサルモネラ属に由来する0抗原を有効成分とするワ

クチン組成物、

(I) サルモネラ・ティフィムリウムに由来する0抗原を有効成分とするワクチン組成物、

(J) サルモネラ・インファンティスに由来する0抗原を有効成分とするワクチン組成物、

(K) サルモネラ・エンテリティディスに由来する0抗原を有効成分とするワクチン組成物、

(L) 1種類の078の0抗原を持つ大腸菌属に由来する0抗原を有効成分とするワクチン組成物、

(M) 1種類のヘモフィルス属に由来する0抗原を有効成分とするワクチン組成物、及び

(N) ヘモフィルス・パラガリナルムに由来する0抗原を有効成分とするワクチン組成物

が含まれる。

[0036] (4) 多価ワクチン

本発明のワクチン組成物は、複数種類のグラム陰性菌に由来する前記構造物を有効成分とするワクチン組成物（多価ワクチン）を含む。

[0037] 多価ワクチンの場合、0抗原を含む構造物が由来とするグラム陰性菌の種類は、好ましくは2種類以上、3種類以上、4種類以上、又は5種類以上である。好ましくは2種類（2価ワクチン）、3種類（3価ワクチン）、4種類（4価ワクチン）、又は5種類（5価ワクチン）である。

[0038] サルモネラ属を対象とした3価ワクチンの場合、サルモネラ・ティフィムリウム、サルモネラ・インファンティス、及びサルモネラ・エンテリティディスに由来する前記構造物を含むことが好ましい。

[0039] グラム陰性菌は、前記のグラム陰性菌に属する菌体から適宜選択されうる。グラム陰性菌は、腸内細菌科、又はパストレラ科が好ましい。腸内細菌科は、サルモネラ属、又は大腸菌属が好ましい。サルモネラ属は、04群、07群、又は09群に属するサルモネラ属が好ましい。04群に属するサルモネラ属は

サルモネラ・ティフィムリウム、07群に属するサルモネラ属はサルモネラ・インファンティス、09群に属するサルモネラ属はサルモネラ・エンテリティディスが好ましい。大腸菌属は078の0抗原を持つ大腸菌属が好ましい。パストツレラ科はヘモフィルス属、とりわけ、ヘモフィルス・パラガリナルムが好ましい。

[0040] すなわち、本発明の多価ワクチン組成物は、

(A) 2種類以上のグラム陰性菌に由来する0抗原を有効成分とするワクチン組成物、

(B) 2種類以上の腸内細菌科に由来する0抗原を有効成分とするワクチン組成物、

(C) 2種類以上のパストツレラ科に由来する0抗原を有効成分とするワクチン組成物、

(D) 2種類以上のサルモネラ属に由来する0抗原を有効成分とするワクチン組成物、

(E) 2種類以上の大腸菌属に由来する0抗原を有効成分とするワクチン組成物、

(F) 04群、及び07群に属するサルモネラ属に由来する0抗原を有効成分とするワクチン組成物、

(G) 04群、及び09群に属するサルモネラ属に由来する0抗原を有効成分とするワクチン組成物、

(H) 07群、及び09群に属するサルモネラ属に由来する0抗原を有効成分とするワクチン組成物、

(I) 04群、07群、及び09群に属するサルモネラ属に由来する0抗原を有効成分とするワクチン組成物、

(J) サルモネラ・ティフィムリウム、及びサルモネラ・インファンティスに由来する0抗原を有効成分とするワクチン組成物、

(K) サルモネラ・ティフィムリウム、及びサルモネラ・エンテリティディスに由来する0抗原を有効成分とするワクチン組成物、

(L) サルモネラ・インファンティス、及びサルモネラ・エンテリティディスに由来するO抗原を有効成分とするワクチン組成物、

(M) サルモネラ・ティフィムリウム、サルモネラ・インファンティス、及びサルモネラ・エンテリティディスに由来するO抗原を有効成分とするワクチン組成物、

(N) 2種類以上のO78のO抗原を持つ大腸菌属に由来するO抗原を有効成分とするワクチン組成物、

(O) 2種類以上のヘモフィルス属に由来するO抗原を有効成分とするワクチン組成物、

が含まれる。

[0041] (5) 混合ワクチン

本発明のワクチン組成物は、単価ワクチンや多価ワクチンに前記構造物とは異なる抗原を含むワクチン組成物（混合ワクチン）を含む。

[0042] そうした抗原としては、弱毒化病原体、不活化病原体、蛋白質、ペプチド、核酸、及びウイルス様粒子が含まれる。本発明の単価ワクチンや多価ワクチンは、他のウイルス（例えば、伝染性気管支炎ウイルス（infectious bronchitis virus）、伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス（infectious bursal disease virus）、鶏脳脊髄炎ウイルス（avian encephalomyelitis virus）、産卵低下症候群ウイルス（Egg drop syndrome virus）、ニューカッスル病ウイルス（Newcastle disease virus）、トリレオウイルス（Avian reovirus）、鳥インフルエンザウイルス（avian influenza virus）、マレック病ウイルス（Marek's disease virus）、伝染性喉頭気管炎ウイルス（infectious laryngotracheitis virus）、トリニューモウイルス（avian pneumovirus）、及び鶏痘ウイルス（fowlpox virus））、細菌（例えば、マイコプラズマ・ガリセプチカム（*Mycoplasma gallisepticum*）、マイコプラズマ・シノビエ（*Mycoplasma synoviae*）、クロストリジウム・セプチカム（*Clostridium septicum*）、クロストリジウム・パーフリングENS（*Clostridium perfringens*）、カンピロバクター・ジェジュニ（*Campylobacter jejuni*）、及びカンピ

ロバクター・フェタス (*Campylobacter fetus*)) 及び原虫 (例えば、ロイコチトゾーム・カウレリー (*Leucocytozoon caulleryi*)、アイメリア・テネラ (*Eimeria tenella*)、アイメリア・マキシマ (*Eimeria maxima*)、及びアイメリア・ネカトリックス (*Eimeria necatrix*)) に対するワクチンよりなる群から選択される少なくとも1種類のワクチンと組み合わせることにより混合ワクチンとして使用することもできる。

[0043] (6) 有効成分の濃度と比率

本発明のワクチン組成物は、0抗原を含む構造物を有効成分とする。ワクチン組成物に含まれる前記構造物の濃度は、エンドトキシンユニット (endotoxin unit=EU) を指標にして定められる。EUを測定する方法は下記の2- (6) 測定工程に準じて行われる。ワクチン組成物に含まれる前記構造物の濃度は、多価ワクチンの場合には、前記構造物の種類毎に異なっても良く、同一であっても構わない。前記構造物の好ましい濃度としては、少なくとも各5,400 EU/mLである。さらに好ましくは少なくとも各54,000 EU/mLである。

[0044] 多価ワクチンの場合、前記構造物が含まれる比率 (EU比) は、等比であっても、異なる比率であっても構わない。サルモネラ・ティフィムリウム、サルモネラ・インファンティス、又はサルモネラ・エンテリティディスに由来する前記構造物を有効成分とする3価ワクチンの場合、前記構造物の比率はサルモネラ・ティフィムリウム：サルモネラ・インファンティス：サルモネラ・エンテリティディス=1：1：1であることが好ましい。

[0045] (7) 投与対象

本発明は、実施例1で3価ワクチンをニワトリに免疫した場合に排菌軽減効果が確認された。そのため、本発明のワクチン組成物は鳥類に使用することができる。鳥類は商用又は非商用目的で飼育されている鳥類が含まれる。鳥類の一例としては、キジ目 (例えば、ニワトリ、ウズラ類、及びシチメンチョウ)、カモ目 (例えば、アヒル、及びガチョウ)、チドリ目 (例えば、カモメ、ミフウズラ、及びチドリ)、ハト目 (例えば、ハト)、ダチョウ目 (例えば、ダチョウ)、スズメ目 (例えば、カラス、フィンチ、スズメ、スタ

ーリング、及びツバメ）、オウム目（例えば、オウム）、タカ目（例えば、イーグル、及びタカ）、フクロウ目（例えば、フクロウ）、ペンギン目（例えば、ペンギン）、及びオウム目（例えば、インコ、及びオウム）が含まれる。好ましくはニワトリである。

[0046] (8) 投与経路

本発明のワクチン組成物は、投与部位での腫脹がワクチンとして許容されるレベルに抑えられていたため、本発明のワクチン組成物の投与経路としては様々な経路が想定され、例えば、脚部、胸部、頸部、経口、直腸、経皮、腸内投与、筋内、皮下、髄内注入、鞘内、直接脳室内、静脈内、腹腔内、鼻腔内及び眼内注入が含まれる。また、脚部はワクチン組成物を投与する際に簡便な投与経路である。そのため、好ましい投与経路は脚部である。

[0047] (9) 担体

本発明のワクチン組成物は、医薬として許容されうる担体を含んでいてもよい。前記医薬として許容されうる担体としては、ワクチンの製造に通常用いられる担体を限定なく使用することができる。具体的には、食塩水、緩衝食塩水、デキストロース、水、グリセロール、等張水性緩衝液及びそれらの組み合わせが挙げられる。また、これに乳化剤、保存剤（例、チメロサル）、等張化剤、pH調整剤、不活化剤（例、ホルマリン）、及びアジュバントなどが適宜配合される。アジュバントとして好ましくはオイルアジュバントである。

[0048] (10) キャリアー蛋白質

0抗原を含む構造物は、投与時の免疫応答を増強する等の目的で必要に応じてキャリアー蛋白質に結合させても構わない。そうしたキャリアー蛋白質としては、ジフテリアトキソイド（DT）、破傷風トキソイド（TT）、コレラ毒素（CT）、及びCRM197が含まれる。キャリアー蛋白質に結合させる方法は、リンカー（例えば、SPDPやADH）を介しても、直接結合させても構わない。結合方法の一例としては、臭化シアンを用いて、SPDP又はADHを介してキャリアー蛋白質（DT/TT/CT）に結合させる方法が開示されている（非特許文献1）。

[0049] 2. ワクチン組成物の製造方法

本発明の第二の実施形態は、グラム陰性菌に由来するO抗原を含む構造物を有効成分とする鳥類用のワクチン組成物の製造方法である。

[0050] 本発明の製造方法は、グラム陰性菌を培養する工程（培養工程）、前記培養後の溶液に含まれる菌体から前記構造物を遊離する工程（遊離工程）、前記遊離後の溶液から前記構造物を回収する工程（回収工程）、及び前記回収後の溶液を調製してワクチン組成物を得る工程（調製工程）を含む。さらに、前記工程に加えて、菌体を不活化する工程（不活化工程）、及び／又は乳化する工程（乳化工程）を含んでいても構わない。前記不活化工程は前記培養工程の後、前記乳化工程は前記回収工程の後であることが好ましい。また、回収工程の後に前記構造物の量を測定する工程（測定工程）があることが好ましい。前記構造物がリピドAを含まない構造物である場合はリピドAを除去する工程（リピドA除去工程）があることが好ましい。リピドA除去工程は、前記回収工程の後であることが好ましい。

[0051] 各工程を下記で説明するが、必要に応じて、各工程は下記の順番でなくとも構わず、特定の工程を入れなくても構わず、また、特定の工程を重複して行っても構わない。例えば、オイルアジュバントを使用しない場合は乳化工程を用いずとも構わない。不活化工程と遊離工程を同時に行っても構わない（例えば、両工程とも超音波処理やホルマリン処理する）。

[0052] (1) 培養工程

前記培養工程は、グラム陰性菌の種類に応じて培地の種類や増殖条件（時間、温度、酸素濃度、炭酸ガス濃度、pH、及び塩濃度）を適宜変更して構わない。サルモネラ属の場合は、TPB培地で35～43℃（好ましくは37℃）で8～24時間（好ましくは16時間）培養する。大腸菌属の場合は、LB培地で30～43℃（好ましくは37℃）で8～24時間（好ましくは16時間）培養する。

[0053] (2) 不活化工程

前記不活化工程は、グラム陰性菌の種類に応じて適宜変更して構わない。例えば、物理的処理（例えば、X線照射、熱処理、又は超音波処理）、又は化

学的処理（ホルマリン処理、水銀処理、アルコール処理、又は塩素処理）などの操作により行うことができる。それらの処理は単独でも組み合わせても構わない。好ましくはホルマリン処理である。

[0054] (3) 遊離工程

前記遊離工程は、前記構造物の抗原性が保持されていれば如何なる方法でも構わず、グラム陰性菌や前記構造物の性質に応じて、処理方法や処理条件を適宜選択して構わない。例えば、超音波処理、フェノール処理、機械的処理、凍結融解処理、加圧減圧処理、浸透圧処理、細胞壁分解処理（例えば非特許文献1や非特許文献2のリゾチーム処理）、及び界面活性剤処理が含まれる。それらの処理は単独でも組み合わせても構わない。好ましくは細胞壁分解処理、超音波処理、又はフェノール処理である。

[0055] 超音波処理は、前記構造物の抗原性が保持されていれば如何なる条件であっても構わず、例えば25℃以下（好ましくは氷水中）で5～30分間（好ましくは15分間）処理する。超音波処理後の溶液は、不純物を除去するために遠心分離を行っても構わない。

[0056] フェノール処理は、前記構造物の抗原性が保持されていれば如何なる条件であっても構わず、例えば45～100%（好ましくは100%）フェノールで、4～80℃（好ましくは68℃）、5～30分間（好ましくは15分間）処理する。処理中は一定時間毎に容器を攪拌しても構わない。反応後の溶液は、不純物を除去するために遠心分離を行っても構わない。フェノール処理後の溶液は、適当なバッファー（例えばPBS）で透析しても構わない。

[0057] 非特許文献1や非特許文献2のように遊離工程後に核酸分解処理（DNase処理やRNase処理）、又は蛋白質分解処理（プロテアーゼ処理）を行っても構わない。また、エタノール分画によって核酸を除去しても構わない。酢酸処理により蛋白質の除去及びリピドAの脂肪酸側鎖除去をしても構わない。

[0058] (4) 回収工程

前記回収工程は、前記構造物の性質に応じて、適宜変更して構わない。例えば、リポ多糖は多くのリン酸基を持っていることから全体としてマイナス

チャージとなり、プラス荷電の物質に吸着され易い特性を持っている。そのため、前記構造物はこのような性質を利用したアフィニティークロマトグラフィーやプラス荷電修飾膜等による吸着方法により回収しても構わない。例えば、プラス荷電物質として、ポリミキシンB、ヒスチジン、ヒスタミン、リジン、アミノ化ーポリ（γ-メチルーL-グルタミン酸）ビーズ、及びアンモニウム基導入プラス荷電修飾膜が考えられる。

[0059] また、前記構造物は、リピドAが疎水性であることを利用して回収しても構わない。疎水性の物質としては、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリスチレン、及びP T E E膜がある。また、前記構造物の回収方法としては、リポ多糖に結合する物質を利用した方法も考えられる。そうした物質としては、抗LPS抗体、カプトガニ抗LPS因子、BPI (bactericidal permeability increasing) 蛋白質、CAP18 (cationic antibacterial protein of 18 kDa) 、及びLBP (LPS-Binding-Protein) がある。これらを結合させた担体によるクロマトグラフィーを用いることができる。

[0060] 前記構造物を回収する方法は、市販の製品を使用することにより達成される。例えば、ET-clean（登録商標、チッソ社）を用いることができる。また、非特許文献1のように超遠心分離で回収しても構わない。

[0061] (5) リピドA除去工程

0抗原を含む構造物は、リピドAを含む構造（例えば、リポ多糖）であっても良く、リピドAを含まない構造物（例えば、0抗原、0抗原とコア多糖）であっても構わない。リピドAを含まない構造物の場合にはリピドAを除去する工程を組み込むことが好ましい。

[0062] リピドAを除去する工程の一例としては、酸を添加した熱処理工程が挙げられる。上記の工程の例は、1%酢酸で100℃、90分処理する方法が例示される（非特許文献1）。この工程に、除去されたリピドAを分離する工程が組み合わされる。リピドAを分離する工程の一例としては、超遠心分離が挙げられる（非特許文献1）。

[0063] (6) 測定工程

リポ多糖の測定方法としては次の方法が例示される。蒸留水で希釈した前記構造物の溶液とCSE-Lセットの標準品（大腸菌0113：H10由来エンドトキシン）をマイクロプレートへ添加する。エンドスピーシーES-50Mセット（生化学バイオビジネス株式会社）のLAL試薬を添加する。プレートにフタを被せ、37℃で30分間反応させる。トキシカラーシステムDIAセット（生化学バイオビジネス株式会社）内の亜硝酸ナトリウム・塩酸溶液混合液、スルファミン酸アンモニウム溶液、及びN-(1-ナフチル)エチレンジアミン二塩酸塩・N-メチル-2-ピロリドン溶液混合液をそれぞれ添加し、マイクロプレートを十分振とうさせる。545nm・630nmの二波長で吸光度を測定（日本モレキュラーデバイス社、VersaMax）し、エンドトキシンを定量する。

[0064] (7) 乳化工程

乳化する工程は、前記構造物を含有する溶液、オイル、及び乳化剤を混合する工程である。乳化剤としては単独の乳化剤であっても良く、複数種類の乳化剤を組み合わせても構わない。乳化剤としては、Tween 80（登録商標）、Tween 60（登録商標）、Brij 721（登録商標）、Eumulgin B2（登録商標）、Arlacel 165 FL（登録商標）、Tefose 1500（登録商標）、Glucamate SSE20（登録商標）、Surfhope C-1216（登録商標）、Surfhope C-1811（登録商標）、Surfhope SE Pharma D-1816（登録商標）、Surfhope SE Pharma D-1616（登録商標）、Span 60（登録商標）、Olepal isostearique（登録商標）、Glucate SS（登録商標）、及びSurfhope C-1205（登録商標）が挙げられる。好ましくは、モノオレイン酸ソルビタンである。オイルとしては、植物油、鉱油、動物油、合成油及びシリコン油が挙げられる。好ましくは、軽質流動パラフィンである。

[0065] (8) 調製工程

調製工程は、多価ワクチンの場合に、上記の工程から得られた、特定の菌体に由来する前記構造物を含む組成物を混合する工程である。例えば、サルモネラ・ティフィムリウム、サルモネラ・インファンティス、及びサルモネラ・エンテリティディスに由来する前記構造物を有効成分とする3価ワクチン

の場合、サルモネラ・ティフィムリウムに由来する前記構造物を含む組成物、サルモネラ・インファンティスに由来する前記構造物を含む組成物、及びサルモネラ・エンテリティディスに由来する前記構造物を含む組成物を混合する工程である。

[0066] 得られたワクチンは、単独で鳥類用サルモネラワクチンとして使用してもよく、他のウイルス（例えば、伝染性気管支炎ウイルス（infectious bronchitis virus）、伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス（infectious bursal disease virus）、鶏脳脊髄炎ウイルス（avian encephalomyelitis virus）、産卵低下症候群ウイルス（Egg drop syndrome virus）、ニューカッスル病ウイルス（Newcastle disease virus）、トリレオウイルス（Avian reovirus）、鳥インフルエンザウイルス（avian influenza virus）、マレック病ウイルス（Marek's disease virus）、伝染性喉頭気管炎ウイルス（infectious laryngotracheitis virus）、トリニューモウイルス（avian pneumovirus）、及び鶏痘ウイルス（fowlpox virus））、細菌（例えば、マイコプラズマ・ガリセプチカム（*Mycoplasma gallisepticum*）、マイコプラズマ・シノビエ（*Mycoplasma synoviae*）、クロストリジウム・セプチカム（*Clostridium septicum*）、クロストリジウム・パーフリンゲンス（*Clostridium perfringens*）、カンピロバクター・ジェジュニ（*Campylobacter jejuni*）、及びカンピロバクター・フェタス（*Campylobacter fetus*））及び原虫（例えば、ロイコチトゾーム・カウレリー（*Leucocytozoon caulleryi*）、アイメリア・テネラ（*Eimeria tenella*）、アイメリア・マキシマ（*Eimeria maxima*）、及びアイメリア・ネカトリックス（*Eimeria necatrix*））に対するワクチンよりなる群から選択される少なくとも1種類のワクチンと組み合わせることにより混合ワクチンとして使用することもできる。

[0067] 多価ワクチンや混合ワクチンの場合に、前記構造物を含む各組成物を混合する比率（EU比）は等比でもよく、特定の組成物の比率を増減させても構わない。

以下、実施例に従って更に詳述するが、本発明は、何らこれらの実施例に

限定されるものではない。

実施例 1

[0068] (1) 抗原の調製

1) 培養工程

サルモネラ・エンテリティディス (Salmonella Enteritidis、以下SEと称する)、サルモネラ・インファンティス (Salmonella Infantis、以下SIと称する)、及びサルモネラ・ティフィムリウム (Salmonella Typhimurium、以下STと称する) をそれぞれ50mLのLB培地 (培地1,000mL中、塩化ナトリウム10 g、Bact Tryptone 10 g、Bact Yeast Extract 5 gを含む) で培養した (37℃、16~24時間、 $4 \times 10^8 \sim 4 \times 10^9$ CFU/mL)。

[0069] 2) 不活性化工程

0.4%ホルマリンとなるように各培養液にホルマリンを添加し、37℃で16時間処理して菌体を不活化した。

[0070] 3) 遊離工程

不活化菌体を超音波破碎、又はフェノール処理してリポ多糖を遊離させた。

[0071] 菌体の超音波破碎 (ブランソン社、ソニファイヤー 350) は、氷水中で15分を行った。その後、遠心分離 (トミー精工、10,000×g、15分) し、上清を回収工程に使用した。

[0072] 菌体のフェノール処理は、前記のホルマリン不活化後の菌液20mLを等量の飽和フェノール溶液と混合し、68℃で15分加温して行った。その際、3分毎に攪拌した。その後、4℃で1日静置後に遠心分離 (トミー精工、10,000×g、15分) を行った。更に不純物を除去するために上清を遠心分離 (トミー精工、10,000×g、15分) した。その後、上清をPBSで3日間透析し、回収工程に使用した。

[0073] 4) 回収工程

各上清をET-clean Lカラム (チッソ社、カタログ番号20015) に30mL添加した。0.15MのNaClを含むリン酸バッファー溶液で洗浄 (溶液1,000mL中、NaCl

8.76g) 後、2MのNaClを含むリン酸バッファー溶液でリポ多糖を溶出させた（溶液1,000mL中、NaCl 117.54g）。

[0074] (2) エンドトキシン定量

蒸留水で希釈した各抗原液とCSE-Lセットの標準品（大腸菌0113：H10由来エンドトキシン）をマイクロプレートへ添加した。エンドスピーシーES-50Mセット（生化学バイオビジネス株式会社）のLAL試薬を添加した。プレートにフタを被せ、37℃で30分間反応させた。トキシカラーシステムDIAセット（生化学バイオビジネス株式会社）内の亜硝酸ナトリウム・塩酸溶液混合液、スルファミン酸アンモニウム溶液、及びN-(1-ナフチル)エチレンジアミン二塩酸塩・N-メチル-2-ピロリドン溶液混合液をそれぞれ添加し、マイクロプレートを十分振とうさせた。545nm・630nmの二波長で吸光度を測定（日本モレキュラーデバイス社、VersaMax）し、エンドトキシシンの定量を行った。

[0075] (3) 乳化及び調製工程

各抗原液3.6mLをオイルアジュバント14.4mL（軽質流動パラフィン、モノオレイン酸ソルビタン、及びポリソルベート80を混合したもの）と混合・乳化した。各ワクチンを等量混合し、3種類のリポ多糖を混合したサルモネラワクチンとした（3価LPSワクチン）。前記ワクチンとして、SE、ST、又はSI由来のリポ多糖を各54,000EU/mL含むワクチン、各5,400EU/mL含むワクチン、及び各540EU/mL含むワクチンを調製した。

[0076] (4) 免疫試験

5週齢のSPF鶏に各ワクチンを0.5mLずつ下腿部筋肉内へ投与した。比較対照として、SE、ST、及びSIの不活化全菌体を含む3種混合全菌体ワクチンを使用した。3種混合全菌体ワクチンは、各菌株を培養・不活化後にリポ多糖量がそれぞれ54,000EU/mLとなるようにPBSで希釈後、オイルアジュバントと混合・乳化して調製した。また、ワクチン未投与群を用意した。投与部位を10週後まで観察し、安全性を評価した。免疫4週後にサルモネラ菌SE（ 9.1×10^9 CFU/羽）、SI（ 2.3×10^9 CFU/羽）、又はST（ 1.2×10^9 CFU/羽）を用いて経口接種により攻撃し、有効性を確認した。有効性は攻撃1、4、7、10、及び14日後に糞

便を回収し、そこに含まれる菌数を下記の方法で測定した。

[0077] (5) 菌数測定

回収した糞便を20%乳剤となるようHTT培地で希釈し、DHL寒天プレートに50 μ L塗布し培養した(37°C、16~24時間)。翌日、出てきたコロニー数をカウントし、盲腸便菌数(CFU/g)を算出した。この直接培養でコロニーが得られなかった検体については一日増菌培養を行い、コロニーの有無により菌数を決定した(ここでコロニーが出た検体は、菌数50CFU/gとなる)。また、一日増菌培養でもコロニーが得られなかった検体については遅延二次培養を行い、コロニーの有無により菌数を決定した(コロニーが出た検体は菌数10CFU/gとし、コロニーが全く出なかった検体は菌数0CFU/gとした)。

[0078] (6) 脚部浮腫の評価方法

安全性は投与部位を10週間観察し、脚部の腫脹スコアを用いて評価した。腫脹スコアは投与部位の軽度の腫脹(下腿部の一部の腫脹)をスコア1、中度の腫脹(下腿部全体の腫脹)をスコア2、重度の腫脹(下腿部全体の腫脹に加えて、触診により水腫が確認されるもの)をスコア3とした。スコア基準は目視及び触診により判定した。

[0079] (7) 結果

脚部腫脹の観察結果を図1、STで攻撃した結果を図2、SEで攻撃した結果を図3、SIで攻撃した結果を図4にそれぞれ示した。図1に示すように、3種混合全菌体ワクチンと比較して3価LPSワクチンでは脚部腫脹の軽減が確認された。またフェノール抽出工程を加えて蛋白等の夾雑物をさらに除去した3価LPSワクチンではさらに脚部腫脹が軽減された。有効性については、図2、図3及び図4に示すように3価LPSワクチン投与群ではST、SE及びSI全ての攻撃試験においてワクチン未投与群に対して有意な排菌軽減効果が認められ、3価LPSワクチンの有効性を確認された。フェノール抽出した3価LPSワクチン投与群についても排菌軽減効果が認められ、サルモネラワクチン抗原としてO抗原を含む構造物(具体的にはリポ多糖)が有用であることが確認された。

実施例 2

[0080] (1) 抗原の調製

実施例1で作製したSE、ST、又はSI由来のリポ多糖を各54,000EU/mL含むワクチンについて、オイルバックス7（登録商標、一般財団法人化学及血清療法研究所製；伝染性気管支炎ウイルス練馬株、TM株、マイコプラズマ・ガリセプチカム、産卵低下症候群ウイルス、及び伝染性コリーザA及びC（組換え抗原）を含む）を混合した。混合後の組成は、SE、ST、又はSI由来のリポ多糖は各7,200EU/mL、ニューカッスル病ウイルス $10^{8.4} \text{EID}_{50}/\text{mL}$ 以上、伝染性気管支炎ウイルス練馬株 $10^{6.4} \text{EID}_{50}/\text{mL}$ 以上、TM株 $10^{6.4} \text{EID}_{50}/\text{mL}$ 以上、マイコプラズマ・ガリセプチカム $10^{7.4} \text{EID}_{50}/\text{mL}$ 以上、産卵低下症候群ウイルス $10^{6.7} \text{EID}_{50}/\text{mL}$ 以上、伝染性コリーザA及びC抗原（組換え抗原） $2.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上となり、これを10種混合LPSワクチンとした。

[0081] (2) 免疫試験

5週齢のSPF鶏に前記の10種混合LPSワクチンを0.5mLずつ下腿部筋肉内へ投与した。比較対照として、オイルバックス7、又は3価LPSワクチン（SE、ST、及びSIのリポ多糖を各5,400EU/mL）を投与した群、及びワクチン未投与群を用意した。脚部の腫脹を10週後まで観察し、安全性を評価した。免疫4週後にサルモネラ菌SE（ $9.1 \times 10^9 \text{CFU}/\text{羽}$ ）、又はSI（ $2.3 \times 10^9 \text{CFU}/\text{羽}$ ）を用いて経口接種により攻撃し、有効性を確認した。有効性は攻撃1、4、7、10、及び14日後に糞便を回収し、そこに含まれる菌数を実施例1の菌数測定方法で測定した。また、脚部腫脹の程度を実施例1の方法で評価した。

[0082] (3) 結果

脚部腫脹の観察結果を図1、SEで攻撃した結果を図5、SIで攻撃した結果を図6にそれぞれ示した。図1に示すように10種混合LPSワクチンでは、フェノール抽出工程を加えて精製したリポ多糖抗原において腫脹の軽減が確認された。免疫10週後まで投与部位を観察した結果、フェノール未処理リポ多糖を含む10種混合LPSワクチン群においても起立困難を引き起こすような野外で問題となる腫脹（スコア3）は認められず、10種混合LPSワクチンの安全性が確認された。有効性については、SE又はSIを用いた攻撃試験において3価LPS

ワクチンと同等の排菌軽減効果が認められ、10種混合LPSワクチンとしての有効性が確認された。

産業上の利用可能性

[0083] グラム陰性菌に由来するO抗原を含む構造物（例えばリポ多糖）を有効成分とするワクチンは、投与部位の副反応を軽減することが可能となる。また、複数種類のグラム陰性菌に由来する前記構造物を混合することにより、注射液量を増やすことなく更なる多価ワクチンや混合ワクチンの製造が可能となる。

請求の範囲

- [請求項1] グラム陰性菌に由来するO抗原を含む構造物（ただし、全菌体を含まない）を有効成分とする鳥類用のワクチン組成物。
- [請求項2] O抗原を含む構造物が、リポ多糖である、請求項1に記載のワクチン組成物。
- [請求項3] グラム陰性菌が、腸内細菌科、又はパスツレラ科の細菌である、請求項1又は請求項2に記載のワクチン組成物。
- [請求項4] 腸内細菌科の細菌が、サルモネラ属、又は大腸菌属の細菌である、請求項3に記載のワクチン組成物。
- [請求項5] サルモネラ属の細菌が、O4群、O7群及びO9群からなる群より選択される1種類以上のサルモネラ属の細菌である、請求項4に記載のワクチン組成物。
- [請求項6] サルモネラ属の細菌が、サルモネラ・エンテリティディス、サルモネラ・ティフィムリウム、及びサルモネラ・インファンティスからなる群より選択される1種類以上の細菌である、請求項4又は請求項5に記載のワクチン組成物。
- [請求項7] グラム陰性菌に由来するO抗原を含む構造物が、サルモネラ・エンテリティディス、サルモネラ・ティフィムリウム、及びサルモネラ・インファンティスに由来するO抗原を含む構造物の混合物である、請求項4又は請求項5に記載のワクチン組成物。
- [請求項8] 大腸菌属の細菌が、O78のO抗原を持つ大腸菌属の細菌である、請求項4に記載のワクチン組成物。
- [請求項9] パスツレラ科の細菌が、ヘモフィルス属の細菌である、請求項3に記載のワクチン組成物、
- [請求項10] ヘモフィルス属の細菌が、ヘモフィルス・パラガリナルムである、請求項9に記載のワクチン組成物。
- [請求項11] O抗原を含む構造物が、ワクチン組成物中に少なくとも各5,400EU/mlで含まれるO抗原を含む構造物である、請求項1から請求項10の

いずれか一項に記載のワクチン組成物。

[請求項12] ニューカッスル病ウイルス、鶏伝染性気管支炎ウイルス、マイコプラズマ・ガリセプチカム、産卵低下症候群ウイルス、及びヘモフィルス・パラガリナルムからなる群より選択される１種類以上の病原体に由来する抗原をさらに含有する請求項１から請求項１１のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

[請求項13] グラム陰性菌に由来するO抗原を含む構造物を有効成分とする鳥類用のワクチン組成物の製造方法であって、下記の（１）から（４）の工程を含む前記製造方法；

（１）グラム陰性菌を培養する工程（培養工程）、

（２）前記培養後の溶液に含まれる菌体から前記構造物を遊離する工程（遊離工程）、

（３）前記遊離後の溶液から前記構造物を回収する工程（回収工程）

、ついで

（４）前記回収後の溶液を調製してワクチン組成物を得る工程（調製工程）。

[請求項14] 前記構造物を遊離する工程が、超音波処理する工程、又はフェノール処理する工程である、請求項１３に記載の製造方法。

[請求項15] 菌体を不活化する工程（不活化工程）、及び／又は乳化する工程（乳化工程）をさらに含む、請求項１３又は請求項１４に記載の製造方法。

[請求項16] 前記不活化工程が前記培養工程の後であり、前記乳化工程が前記回収工程の後である、請求項１５に記載の製造方法。

[請求項17] 前記構造物の量を測定する工程（測定工程）をさらに含む、請求項１３から請求項１６のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項18] 前記測定工程が前記回収工程の後である、請求項１７に記載の製造方法。

[請求項19] リピドAを除去する工程（リピドA除去工程）をさらに含む、請求項

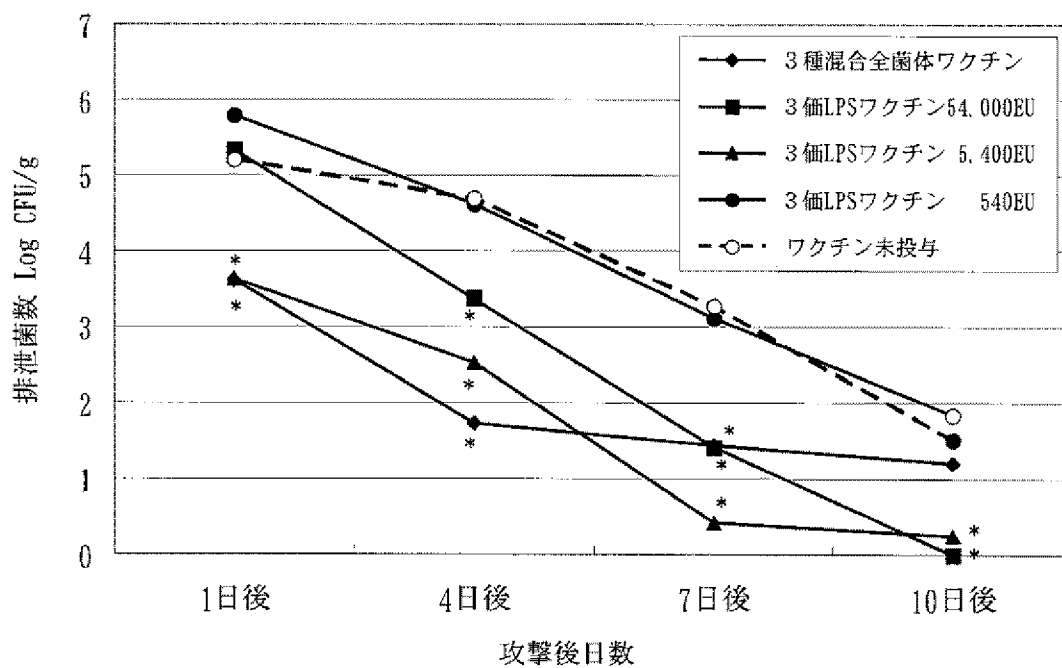
1 3 から請求項 1 8 のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項20] 前記リピドA除去工程が前記回収工程の後である、請求項 1 9 に記載の製造方法。

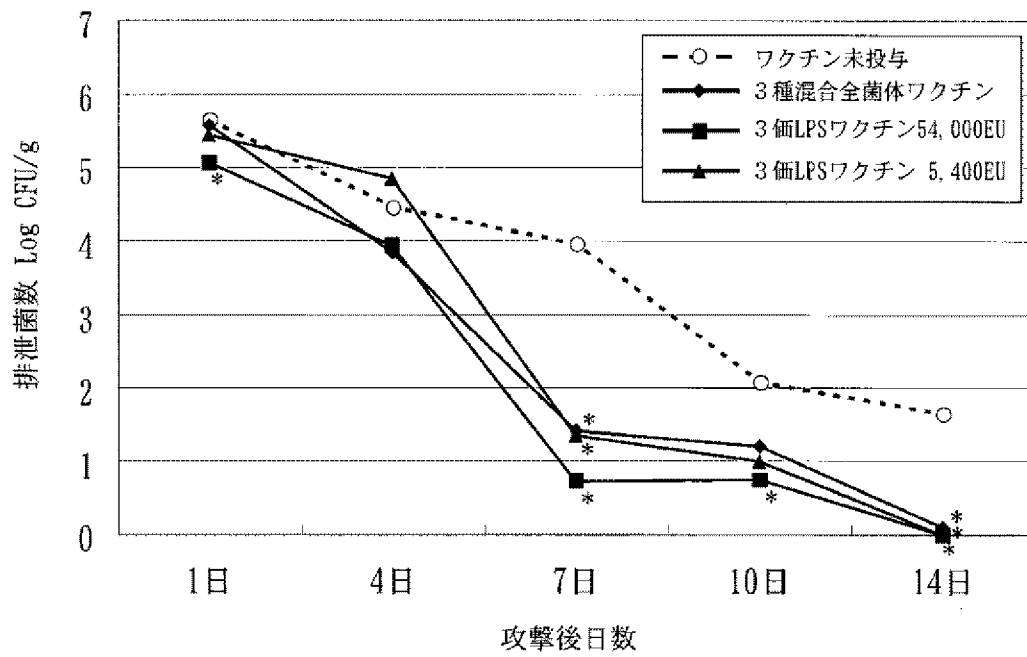
[図1]

ワクチン	LPS量 EU/mL	フェノール 抽出	ワクチン投与後週数						積算値 (2-10 W)
			2	3	4	6	8	10	
3種混合全菌体ワクチン	54,000	—	0.4	1.1	0.7	0.4	0.1	0	2.7
	54,000	—	0.5	0.7	0.5	0.2	0	0	1.9
3価LPSワクチン	54,000	有	0	0.3	0.2	0	0	0	0.5
	5,400	—	0.1	0.3	0.2	0.2	0	0	0.8
10種混合 LPSワクチン	7,200	—	0.4	0.9	0.7	0.2	0.1	0	2.3
	7,200	有	0	0.4	0.4	0	0	0	0.8
オイルパックス 7	—	—	0	0	0	0.2	0	0	0.2
ワクチン未投与	—	—	0	0	0	0	0	0	0

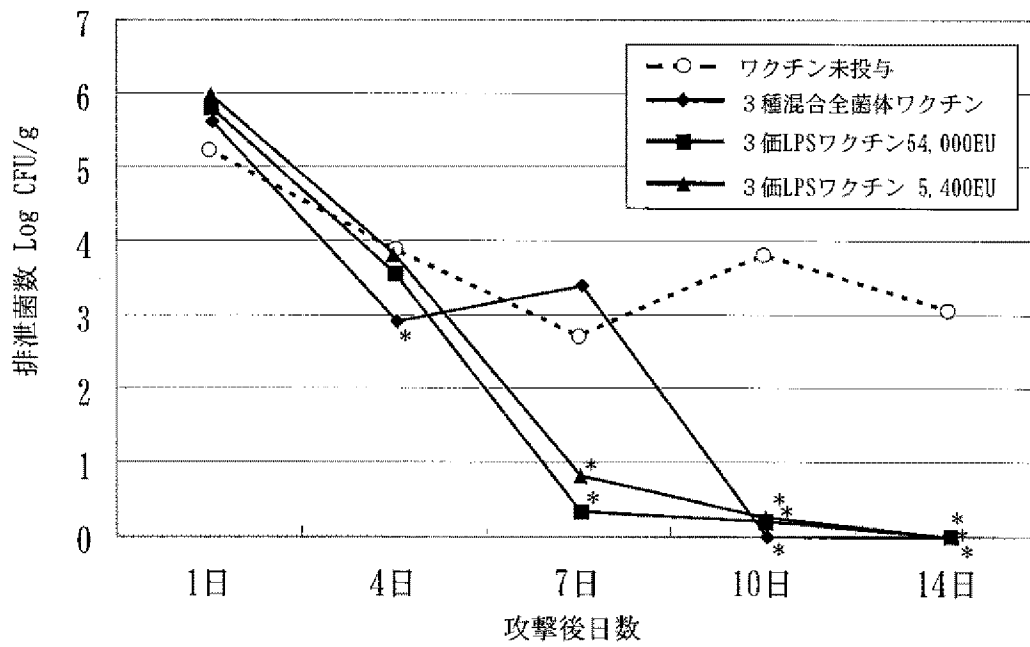
[図2]



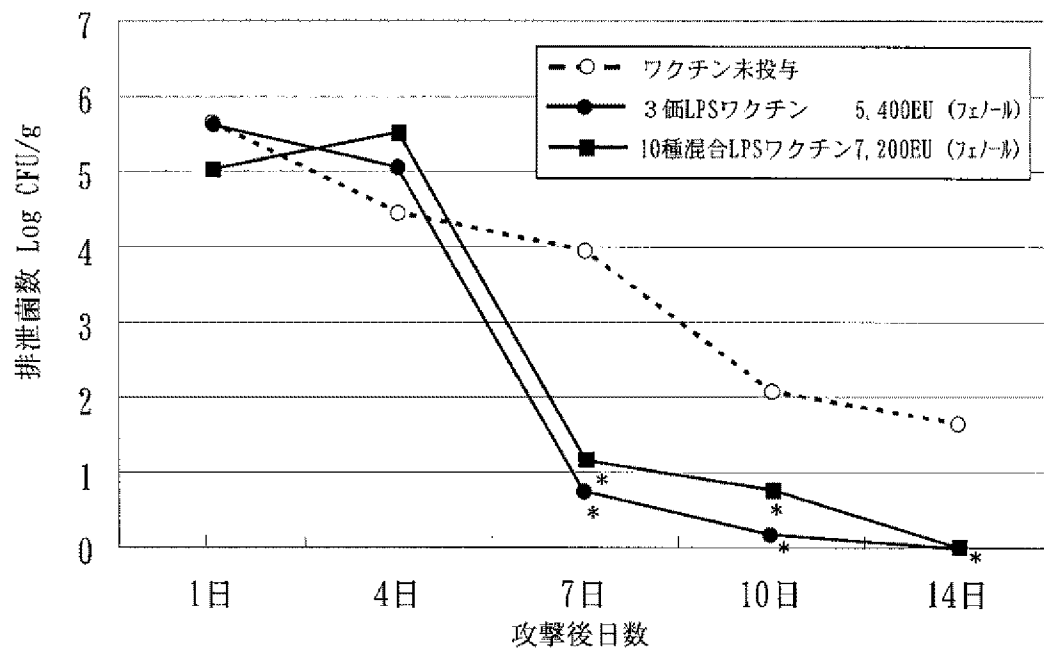
[図3]



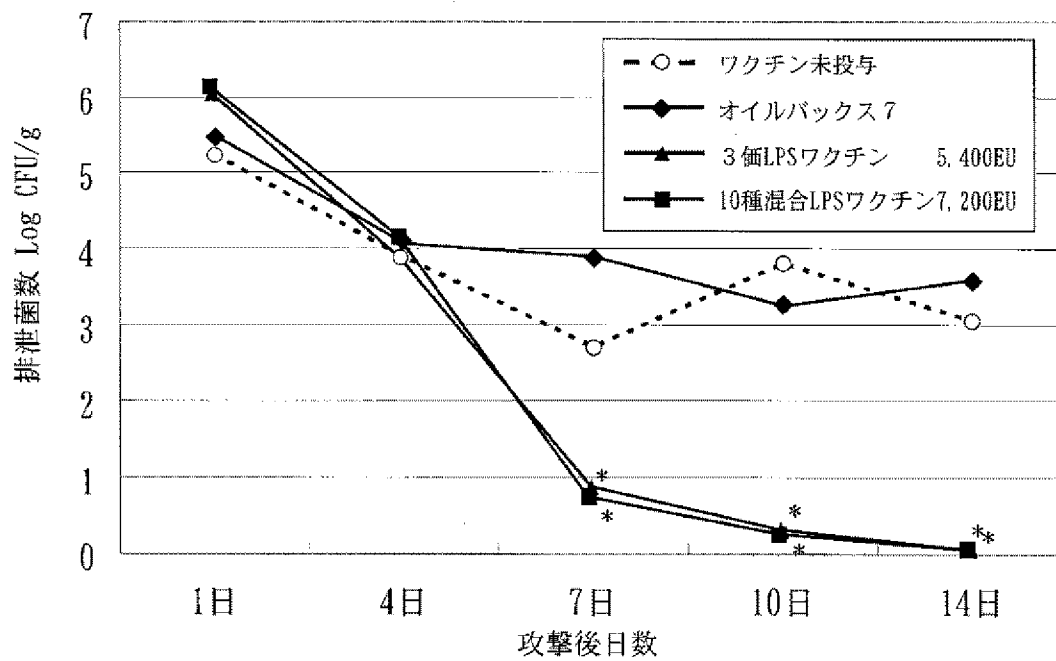
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/054038

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K39/02(2006.01)i, A61K39/102(2006.01)i, A61K39/108(2006.01)i,
A61K39/112(2006.01)i, A61K39/12(2006.01)i, A61K39/17(2006.01)i, A61P31/00
(2006.01)i

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)

A61K39/02, A61K39/102, A61K39/108, A61K39/112, A61K39/12, A61K39/17,
A61P31/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

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

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TIWARI, R.P. et al., "Immunobiology of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-derived immunoconjugates vaccinate mice against Salmonella typhimurium", Microbiol. Immunol., 1998, vol.42, no.1, pp.1-5, entire text, particularly, abstract, page 1, right column, line 5 to page 2, left column, line 3, page 4, right column, lines 41 to 50, page 4, left column, lines 5 to 11, table 4	1-20
Y	DEGUSHI, K. et al., "Efficacy of a novel trivalent inactivated vaccine against the shedding Salmonella in a chicken challenge model", AVIAN DISEASES, 2009, vol.53, pp.281-286, entire text, particularly, summary, page 282, left column 'Vaccine'	1-20



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

"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

15 April, 2013 (15.04.13)

Date of mailing of the international search report

23 April, 2013 (23.04.13)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/054038

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	REBERS, P.A. et al., "The effect of formalin-killing of Pasteurella multocida on the antigenicity and extractability of its lipopolysaccharide", Carbohydrate Research, 1984, vol.133, pp.83-94, entire text, particularly, abstract	1-20

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. A61K39/02(2006.01)i, A61K39/102(2006.01)i, A61K39/108(2006.01)i, A61K39/112(2006.01)i, A61K39/12(2006.01)i, A61K39/17(2006.01)i, A61P31/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. A61K39/02, A61K39/102, A61K39/108, A61K39/112, A61K39/12, A61K39/17, A61P31/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
 日本国公開実用新案公報 1 9 7 1 - 2 0 1 3 年
 日本国実用新案登録公報 1 9 9 6 - 2 0 1 3 年
 日本国登録実用新案公報 1 9 9 4 - 2 0 1 3 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	TIWARI, R. P. et al., "Immunobiology of lipopolysaccharide(LPS) and LPS-derived immunoconjugates vaccinate mice against Salmonella typhimurium", Microbiol. Immunol., 1998, vol.42, no.1, pp.1-5 全文、特に、A b s t r a c t、第1頁右欄第5行—第2頁左欄第3行、第4頁右欄第41—50行、第4頁左欄第5—11行、表4	1-20

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 5 . 0 4 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

2 3 . 0 4 . 2 0 1 3

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

小堀 麻子

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

4 C

5 2 7 7

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	DEGUSHI, K. et al., “Efficacy of a novel trivalent inactivated vaccine against the shedding Salmonella in a chicken challenge model”, AVIAN DISEASES, 2009, vol.53, pp.281-286 全文、特に、Summary、第282頁左「Vaccine」欄	1-20
Y	REBERS, P. A. et al., “The effect of formalin-killing of Pasteurella multocida on the antigenicity and extractability of its lipopolysaccharide”, Carbohydrate Research, 1984, vol.133, pp.83-94 全文、特に、Abstract	1-20