(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3723205号
(P3723205)
(45)発行日　平成17年12月7日(2005.12.7)　(24)登録日　平成17年9月22日(2005.9.22)

(51)Int.Cl.[7]	F I		
A61K 39/245	A61K	39/245	AFE
A61K 39/12	A61K	39/12	
A61K 39/39	A61K	39/39	
G01N 33/569	G01N	33/569	J

請求項の数 7　(全 46 頁)

(21)出願番号	特願平5-512703
(86)(22)出願日	平成5年1月15日(1993.1.15)
(65)公表番号	特表平7-506565
(43)公表日	平成7年7月20日(1995.7.20)
(86)国際出願番号	PCT/US1993/000450
(87)国際公開番号	WO1993/014195
(87)国際公開日	平成5年7月22日(1993.7.22)
審査請求日	平成12年1月17日(2000.1.17)
審判番号	不服2003-15536(P2003-15536/J1)
審判請求日	平成15年8月11日(2003.8.11)
(31)優先権主張番号	822,530
(32)優先日	平成4年1月17日(1992.1.17)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　500349339
ワイエス・ホールディングス・コーポレーション
Ｗｙｅｔｈ　Ｈｏｌｄｉｎｇｓ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ
アメリカ合衆国、ニュージャージー州　０７９４０、マディソン、ジラルダ・ファームス　５
(74)代理人　100058479
弁理士　鈴江　武彦
(74)代理人　100084618
弁理士　村松　貞男
(74)代理人　100092196
弁理士　橋本　良郎

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アジュバントとしてのアセマンナンを含有するワクチン

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

非ヒト動物において甲介骨障害（turbinate lesions）を予防する方法であって、該非ヒト動物にアセマンナンを投与し、その後、Pasteurella multocida、Bordetella bronchiseptica、およびErysipelothrix rhusiopathiaeの混合物から成る効果的に免疫する量の細菌性抗原を単位投与量当たり含むワクチンを投与することを具備した方法。

【請求項２】

請求項１に記載の方法であって、前記アセマンナンを新生児に相当する時期に（neonatally）投与する方法。

【請求項３】

請求項２項に記載の方法であって、前記アセマンナンをブタに投与する方法。

【請求項４】

請求項３に記載の方法であって、前記アセマンナンを３回の投薬ユニットで投与する方法。

【請求項５】

請求項４に記載の方法であって、前記ワクチンを２回の投薬ユニットで投与する方法。

【請求項６】

請求項４に記載の方法であって、前記アセマンナンを５mg投与量で投与する方法。

【請求項７】

請求項１に記載の方法であって、前記アセマンナンを非経口的に投与する方法。

【発明の詳細な説明】
〔本発明の背景〕
ウイルス性疾患の蔓延を制御する１つのアプローチとしては、生きたウイルスを改変し、ワクチンとして投与することがある。アジュバントをウイルスに適用し、ワクチンの免疫原性を高め、これによってその防御能力を増加する。
マレク病は、家禽産業において重要である。マレク病ウイルスでの感染は、致命的なリンパ球増殖性障害を起こし、白血症による廃棄を含む主な生産因子（但し、これだけに制限されない。）に有意な損失を引き起こす。ひな当たりの死亡率、供給の変化（feed conversion）、全コストを含んだ生産性の他の指針は、病気の過酷な発生によっても影響を受けうる。病気のコントロールは、生きたウイルスを改変したワクチン、主として、七面鳥の改変された生きたヘルペスウイルスワクチン（マレク病ウイルスセロタイプIII）を用いて試されてきた。七面鳥のヘルペスウイルス（ＨＶＴ）でワクチン接種することは、マレク病を防止するのに非常に効果があると考えられているが、若干の損失が、フィールドへのウイルス攻撃による低レベルの廃棄、免疫抑制、及び非常に感染力の高いマレク病（ｖｖＭＤ）のウイルス攻撃による明確な症状に見い出され続ける。非常に感染力の高いマレク病の制御は、二価のマレク病ウイルスセロタイプII及びIIIワクチンで試みられている。しかし、これらのワクチンの使用は、鳥の特定の種でリンパ球性白血病の増加を伴う（Baconら、1989）。
改善された防御能力を有するアジュバントを含有するワクチンは、現在存在しているマレク病ワクチンが使用されているにもかかわらず起こり続けている損失を除去する助けになるり、従って家禽産業において非常に価値がある。
アロエバルバデンシス（Aroe barbadensis）植物（アロエベラ（Aaroe vera））の葉は、アセマンナン（acemannan）として知られるβ－（１，４）結合したアセチル化マンナン（約１００万ｋＤａの水溶性ポリマー）を大量に含有している。アセマンナンの製造は、米国特許第４，７３５，９３５（８月５日、１９８８年）、４，８５１，２２４（７月２５日、１９８９年）、４，９１７，８９０（８月１７日、１９９０年）、４、９５７、９０７（９月１８日、１９９０年）、４，９５９，２１４（９月２５日、１９９０年）、及び４，９６６，８９２（１０月３０日、１９９０年）に開示されている。ワクチンの防御能力を改善するためにアジュバントとしてアセマンナンを使用することは、以前には開示されていない。
本発明は、アセマンナンをアジュバントとして含有する七面鳥のヘルペスウイルスワクチン、アセマンナンアジュバントを含有する改変された生きたウイルスワクチン、及び複合炭水化物アジュバントを含有する改変された生きたウイルスワクチンを提供する。また、本発明は、細菌性抗原及びアセマンナンアジュバントを含有した細菌ワクチンを提供する。
〔発明の概要〕
本発明は、七面鳥のヘルペスウイルスワクチンであって、投与量当たり、効果的に免疫する量の七面鳥の改変された生きたヘルペスウイルス、該七面鳥のヘルペスウイルスの免疫原性を高めるのに効果的な量のアセマンナン、及び適切な担体を含有するワクチンを提供する。本発明はまた、投与量当たり、効果的に免疫する量の改変された生きたウイルス、該改変された生きたウイルスの免疫原性を高めるのに効果的な量のアセマンナン、及び適切な担体を含有するワクチンを提供する。本発明は、更に投与量当たり、改変された生きたウイルス、該改変された生きたウイルスの免疫原性を高めるのに効果的な量の複合炭水化物、及び適切な担体を含有するワクチンを提供する。マレク病に対してひなを免疫化する方法、及びウイルス性疾患に対して動物を免疫する方法も本発明によって提供される。
本発明は、投与量当たり、効果的に免疫する量の細菌性抗原、該細菌性抗原の免疫原性を高めるのに効果的な量のアセマンナン、及び適切な担体を含有する細菌性ワクチンを提供する。更に、本発明の細菌性ワクチンを、適切な年齢で動物に投与することを具備した細菌性疾患に対して動物を免疫する方法を提供する。本発明は、更に、細菌性疾患に対して動物を免疫する方法であって、適切な担体中の細菌性抗原、及び適切な担体中の細菌性抗

原の免疫原性を高めるのに効果的な量のアセマンナンを動物に投与することを具備した方法を提供する。

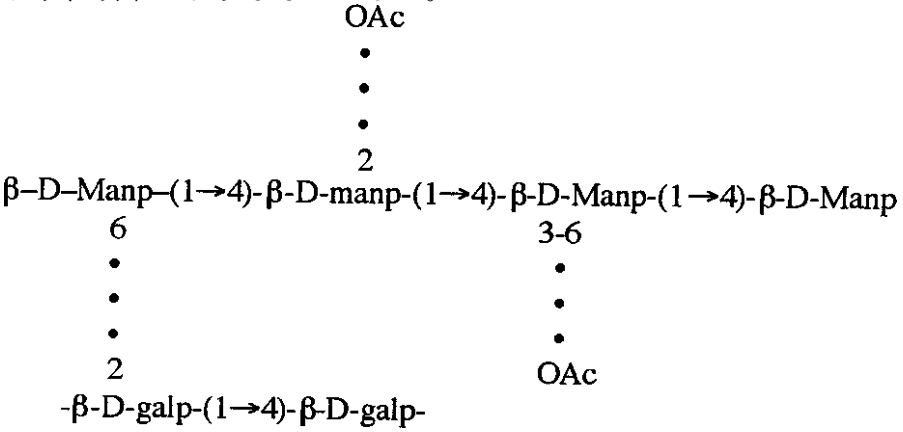
〔本発明の詳細な説明〕

本発明は、七面鳥のヘルペスウイルスワクチンであって、投与量当たり、免疫化するのに効果的な量の七面鳥の改変された生きたヘルペスウイルス（ＨＶＴ）、該七面鳥のヘルペスウイルスの免疫原性を高めるのに効果的な量のアセマンナン、及び適切な担体を含有するものを提供する。本発明の目的において、七面鳥の改変された生きたヘルペスウイルスの「効果的に免疫する量」とは、家禽を免疫するのに効果的な、七面鳥の改変された生きたヘルペスウイルスの任意の量である。本発明の実施において、七面鳥の改変された生きたヘルペスウイルスの「効果的に免疫する量」は、望ましくは約１０００プラーク形成単位よりも多い量である。好ましくは、七面鳥の改変された生きたヘルペスウイルスを効果的に免疫する量は、約３０００プラーク形成単位よりも多い量である。

七面鳥のヘルペスウイルスが、細胞共生ウイルスであることは周知である。従って、本発明のＨＶＴワクチンは、七面鳥感染細胞のヘルペスウイルスのうち、効果的に免疫する量の改変された生きたヘルペスウイルスを含有しうる。望ましくは、効果的に免疫する量の七面鳥の改変された生きたヘルペスウイルスは、約２０，０００ＨＶＴ感染細胞に存在する量である。典型的には、七面鳥感染細胞のヘルペスウイルスは、種々の段階で細胞を維持するのに適切な細胞培養培地に懸濁される。

本発明の目的として、「七面鳥の改変された生きたウイルス」は、七面鳥のヘルペスウイルスを任意に無毒化、若しくは減毒化したものでありうる。これは、例えば無毒化した七面鳥のヘルペスウイルス系ＦＣ１２６（アメリカンタイプカルチャーコレクション（ＡＴＣＣアクセッションNo.ＶＲ５８４Ｂ）より入手可能である。）の様なウイルスでワクチン接種された動物において免疫応答を誘導しうるものである。

上述したように、本発明の七面鳥のヘルペスウイルスワクチンはアセマンナンを含有する。米国特許第４，８５１，２２４に開示されているように、アセマンナンは、多分散性の多糖化合物であり、１００，０００ダルトンよりも大きい分子量を有するアセマンナンポリマーを少なくとも７３％含んでいるものである。米国特許第４，９５７，９０７には、アセマンナンが、β（１→４）結合したマンノシルユニットからなること、及びアセチル基が、酸素原子を介してポリマーに結合され、該アセチル化の度合いが、ほぼ０．８アセチル基／モノマーであること（これは、Hestrinのアルカリ性ヒドロキサメート法によって決定された（J. Bio. Chem. 180:240（1949））が開示されている。更に、中性糖結合分析が開示されており、該分析により、おそらくα（２→６）結合を介してＤ－ガラクトピラノース残基が、ほぼ７０個の糖ごとに１個の割合でポリマーに結合されていることが示される。このガラクトースに対するマンノースの比が２０：１であることは、ガラクトースユニットもお互いに、主にβ（１→４）グリコシド結合で結合していることを示している。アセマンナンポリマーの化学構造は、米国特許第４，９５７，９０７に開示されており、以下のようなものである。



アセマンナンは、アロエバルバデンシス（Aloe barbadensis）植物の葉から抽出されうる。しかし、ここで使用される「アセマンナン」の語は、この抽出物だけでなく、化学合成

又は組織培養生産を含んだ任意の方法によって誘導されるアセマンナンも包含する。
本発明の実施において、「効果的な量の」アセマンナンとは、典型的には、約５０マイクログラムよりも多い量、望ましくは約５０マイクログラムから約１０００マイクログラムの量である。より望ましくは、アセマンナンの効果的な量は、約５０マイクログラムから約１５０マイクログラムの量である。現在の本発明の好ましい態様において、アセマンナンの効果的な量は、約１００マイクログラムの量である。
本発明の実施に従ったワクチンに対する適切な担体は、当業者に周知の多数の何れの水性バッファーであっても良い。現在、好ましい水性バッファーは、例えば以下の例で開示されるホスフェートバッファーのようなホスフェートバッファーである。
本発明はまた、マレク病に対してひなを免疫する方法であって、本発明の七面鳥のヘルペスウイルスワクチンの投与量を１日齢のひなに投与することを具備した方法を提供する。現在のところ、ワクチンは皮下注射若しくは筋肉内注射で投与されることが好ましい。
本発明は、更に、投与量当たり、効果的に免疫する量の改変された生きたウイルス、該改変された生きたウイルスの免疫原性を高めるのに効果的な量のアセマンナン、及び適切な担体を含有するワクチンを提供する。本発明の目的として、改変された生きたウイルスの「効果的に免疫する量」は、動物を免疫するのに効果的な改変された生きたウイルスの任意の量である。改変された生きたウイルスを効果的に免疫する量を決定する方法は、当業者に周知であり、過度の実験をすることなく容易に決定しうる。本発明の実施において、改変された生きたウイルスの効果的な量は、典型的には、１，０００プラーク形成単位よりも多い量である。本発明の目的において、「改変された生きたウイルス」は、無毒化、若しくは減毒化された任意のウイルスであって、該ウイルスでワクチン接種されたどうぶつに免疫応答を誘導しうるものでありうる。
本発明の一態様において、改変された生きたウイルスは、改変された生きた鳥類ウイルスである。適切な鳥類ウイルスには、改変された生きたマレク病ウイルス、例えば七面鳥のヘルペスウイルス系ＦＣ１２６；又はマレク病ウイルスセロタイプＩ（例えば、３０１－Ｂ１系）が含まれる。適切なウイルスには、改変された生きたのニューカッスル病ウイルス、例えばニューカッスル病ウイルス系Ｂ１Ｂ１又はLaSota系も含まれる。適切な鳥類ウイルスには、更に改変された生きた感染性嚢胞性疾患ウイルス（Bursal diserse virus）、例えば感染性の嚢胞性疾患ウイルスＬｕｋｅｒｔ系（Bursine ２）又は２５１２系が含まれる。適切な鳥類ウイルスには、更に、改変された生きた感染性の気管支炎ウイルス、例えば感染性の気管支炎ウイルスのＭａｓｓ．，Ｃｏｎｎ．，又はＡｒｋ．系がある。適切な鳥類ウイルスには、更に、改変された生きた鳥類レオウイルス、例えば鳥類レオウイルス系（Avian Reovirus strain）１１３３が含まれる。
本発明の他の態様において、改変された生きたウイルスは、改変された生きた豚のウイルス、例えば改変された生きた仮性狂犬病ウイルス、コロナウイルス、又はパルボウイルスでありうる。
本発明の他の態様において、改変された生きたウイルスは、改変された生きた猫のウイルス、例えば、改変された生きた猫白血病ウイルス、猫Ｔ－細胞白血病ウイルス、又は猫免疫不全ウイルスでありうる。
本発明の他の態様では、改変された生きたウイルスは、改変された生きた犬ウイルス、例えば、改変された生きた犬コロナウイルス、パルボウイルス又はジステンパーウイルスでありうる。
上述したように、本発明のワクチンは、「アセマンナン」を含有する。アセマンナンは、アロエバルバデンシス（Aloe barbadensis）植物の葉から抽出されうる。しかし、ここで使用される「アセマンナン」の語は、この抽出物だけでなく、化学合成又は組織培養生産を含んだ任意の方法によって誘導されるアセマンナンも包含する。このようなワクチンでは、効果的な量のアセマンナンは典型的には、約５０マイクログラムよりも多い量、望ましくは約５０マイクログラムから約１，０００マイクログラムの量である。
本発明は、第二の改変された生きたウイルスを更に含有するこのようなワクチンを提供する。第一の改変された生きたウイルス及び第二の改変された生きたウイルスは、改善され

た生きた鳥類ウイルスでありうる。本発明の１つの態様では、第一の改変された生きた鳥類ウイルスは、改変された七面鳥のヘルペスウイルスであり、第二の改変された生きた鳥類ウイルスは、改変された生きたマレク病ウイルスセロタイプＩ、マレク病ウイルスセロタイプII、ニューカッスル病ウイルス、感染性気管支炎ウイルス、感染性嚢胞性疾患ウイルス又は鳥類レオウイルスでありうる。本発明の他の態様では、第一の改変された生きた鳥類ウイルスは、改変された生きたマレク病ウイルスセロタイプＩであり、第二の改変された生きた鳥類ウイルスは、改変された生きたマレク病ウイルスセトタイプII、ニューカッスル病ウイルス、感染性気管支炎ウイルス、感染性嚢胞性疾患ウイルス又は鳥類レオウイルスでありうる。本発明の他の態様では、第一の改変された生きた鳥類ウイルスは、改変された生きたニューカッスル病ウイルスであり、第二の改変された生きた鳥類ウイルスは、感染性気管支炎ウイルス、感染性嚢胞性疾患ウイルス又は鳥類レオウイルスでありうる。本発明の他の態様では、第一の改変された生きた鳥類ウイルスは、改変された生きた感染性気管支炎ウイルスであり、第二の改変された生きた鳥類ウイルスは、感染性嚢胞性疾患ウイルス又は鳥類レオウイルスでありうる。本発明の他の態様では、第一の改変された生きた鳥類ウイルスは、感染性嚢胞性疾患ウイルスであり、第二の改変された生きた鳥類ウイルスは、鳥類レオウイルスでありうる。

第一の改変された生きたウイルス及び第二の改変された生きたウイルスは改変された生きた豚ウイルス、改変された生きた猫ウイルス又は改変された生きた犬ウイルスでもありうる。

本発明は、更に第三の改変された生きたウイルスを更に含有するこのようなワクチンを更に提供する。

本発明は、ウイルス性疾患に対して、動物を免疫する方法であって、該動物に本発明のワクチンの投与量を投与することを具備した方法を提供する。該動物は、１日齢の家禽、例えば１日齢の鶏、七面鳥、アヒル又はうずらでありうる。該動物はまた、豚でありうる。該動物は、更に猫でありうる。該動物は、更に犬でありうる。動物にワクチンを投与するのに適切な年齢、及び必要であれば、ブースターワクチンを投与するための間隔は、当業者に周知であるか、又は過度の実験をせずに容易に決定しうる。該ワクチンは、経口的、点眼によって、皮下注射によって、又は筋肉内注射によって投与されうる。

本発明は、投与量当たり、効果的に免疫する量の改変された生きたウイルス、該改変された生きたウイルスの免疫原性を高めるのに効果的な量の複合炭水化物、及び適切な担体を含有するワクチンを提供する。本発明の目的において、改変された生きたウイルスの「効果的に免疫する量」は、動物を、免疫するのに効果的な改変された生きたウイルスの任意の量である。改変された生きたウイルスを効果的に免疫する量を決定するための方法は、当業者に周知であるか、又は決まりきった実験で容易に決定することができる。本発明の実施において、改変された生きたウイルスを効果的に免疫する量は、典型的には、１，０００プラーク形成単位よりも多い量である。該改変された生きたウイルスは、ウイルスが接種された動物で、免疫応答を誘導しうる任意の無毒化、若しくは減毒化したものである。本発明の１つの態様では、該改変された生きたウイルスは、改変された生きた鳥類ウイルス、例えば七面鳥の改変された生きたヘルペスウイルスである。

先に述べたように、本発明のワクチンは、複合炭水化物を含有する。複合炭水化物の「効果的な量」を決定するための方法は、当業者に周知であるか、又は決まりきった実験で容易に決定することができる。典型的には、複合炭水化物の効果的な量は、約５０マイクログラムより多い量、望ましくは約５０マイクログラムから約１，０００マイクログラムの量である。本発明の１つの態様では、複合炭水化物は、マンナン、例えばβ－（１→４）結合したマンナンでありうる。好ましくは、該β－（１→４）結合したマンナンはアセマンナンである。本発明の他の態様では、該複合炭水化物はグルカン、例えばβ－（１→３）結合したグルカンでありうる。本発明の実施に有効なβ－（１→３）結合したグルカンは、レンチナン（lentinan）でありうる。グルカンはグルコース単位からなるポリマーでできた多糖化合物である。本発明の他の態様では、該複合炭水化物はレバン、例えばβ－（２→６）－結合したビーン（lvean）である。本発明の実施に有用なβ－（２→６）－

結合したレバンは、アエロバクテルレバニカム（Aerobacter levanicum）からのレバンである。
本発明はまた、ウイルス性疾患に対して動物を免疫する方法であって、投与量の本発明のワクチンを動物に投与することを具備した方法を提供する。該動物は家禽、例えば鶏、七面鳥、アヒル又はうずらでありうる。
本発明は、更に、投与量当たり、効果的に免疫する量の細菌性抗原、該細菌性抗原の免疫原性を高めるのに効果的な量のアセマンナン、及び適切な担体を含有する細菌性ワクチンを提供する。本発明の目的において、細菌性抗原を「効果的に免疫する量」は、動物を免疫するのに効果的な細菌性抗原の任意の量である。ここで用いられる「細菌性抗原」という語は、細菌性サブユニット、改変された生きた細菌又は不活性化された細菌が包含される。
ここで用いられる「細菌性サブユニット」という語には、１以上の細菌性抗原決定基が包含される。本発明の実施では、細菌性サブユニットを効果的に免疫する量は、典型的には、約１０マイクログラムより多い量であり、望ましくは、約１０マイクログラムから１０，０００マイクログラムの量である。更に望ましくは、細菌性サブユニットを効果的に免疫する量は、約１０マイクログラムから１，０００マイクログラムである。
ここで使用される「改変された生きた細菌」という用語は、無毒化若しくは減毒化された細菌を包含するが、これらに制限されない。本発明の実施において、該改変された生きた細菌を効果的に免疫する量は、典型的には、約10^7コロニー形成単位（ｃｆｕｓ）よりも多い量であり、望ましくは約10^7ｃｆｕｓから約10^{12}ｃｆｕｓの量である。より望ましくは、該改変された生きた細菌を効果的に免疫する量は、約10^7ｃｆｕｓから約10^{10}ｃｆｕｓの量である。
ここで用いられる「不活性化された細菌」の語は、クローニングを開始する能力を失った不活性な細菌を意味する。この能力の消失は、細菌内で起こる化学基の修復不可能な変換又は化学結合の開裂のような化学的な出来事の結果である。これらの出来事を十分な回数経験した細菌が不活性化される。細菌を不活性化する方法、例えば光照射若しくは熱処理は、同業者に周知であるか、又は過度の実験をすることなく容易に決定される。本発明の実施において、該不活性化された細菌を効果的に免疫する量は、典型的には、約10^7コロニー形成単位（ｃｆｕｓ）よりも多い量であり、望ましくは約10^7ｃｆｕｓから約10^{12}ｃｆｕｓの量である。より望ましくは、該不活性化された細菌を効果的に免疫する量は、約10^7ｃｆｕｓから約10^{10}ｃｆｕｓの量である。
本発明の１つの態様において、細菌性抗原は、豚細菌性抗原、例えばPasteurella multocida, Bordetella bronchiseptica, Erysipelothrix rhusiopathias, Actinobacillus pleuropneumoniae, Mycoplasma hypopneumoniae, Haemophilus parasuis, Streptococcus suis又はEsherichia colli抗原である。本発明の他の態様では、該細菌性抗原は、反芻動物の細菌性抗原、例えばPasteurella haemolytica, Haemophillus somnus, Listeria monocytogenes又はMycobacterium paratuberculosis抗原である。ここで使用される「反芻動物」という語は、ウシ、羊、及びヤギを包含するが、これらに限定されない。本発明の他の態様では、該細菌性抗原は、ウマの細菌性抗原、例えばBorrelia burgdorferi, Sterptococcus equi又はClostridium tetani抗原である。
上述したように、本発明の細菌性ワクチンは、アセマンナンを含有する。アセマンナンは、アロエバルバデンシス（Aloe barbadensis）植物の葉から抽出されうる。しかし、ここで使用される「アセマンナン」の語は、この抽出物だけでなく、化学合成又は組織培養生産を含んだ任意の方法によって誘導されるアセマンナンも包含する。本発明の実施では、効果的な量のアセマンナンは典型的には、約１００マイクログラムよりも多い量、望ましくは約１００マイクログラムから約１，０００マイクログラムの量である。より望ましくは、効果的な量のアセマンナンは、約３００マイクログラムから約７００マイクログラムである。更に望ましくは、効果的な量のアセマンナンは約５００マイクログラムである。
細菌性ワクチンの適切な担体は、同業者に周知である。細菌性ワクチンの適切な担体は、多数の食塩水溶液のなかの任意の１つである。現在のところ、アジュバント活性を有する

水溶性の化合物、例えば水酸化アルミニウム、並びに少量の防腐剤及び着色剤を含有した食塩水が好ましい。
本発明は、細菌性患者に対して動物を免疫する方法であって、本発明の細菌性ワクチンの投与量を動物に投与することを具備した方法を提供する。本発明の実施において、該動物はブタ、ウシ、ヒツジ、ヤギ又はウマでありうる。細菌性ワクチンを動物に投与するための適切な年齢、及び必要であれば、ブースター投与量を投与する間隔は、当業者に周知であるか、又は決まりきった実験で容易に決定しうる。細菌性ワクチンは、皮下若しくは筋肉内注射によって投与されうる。
本発明はまた、細菌性疾患に対して動物を免疫する方法であって、適切な担体中の、効果的に免疫する量の細菌性抗原、及び適切な担体中の、細菌性抗原の免疫原性を高めるのに有効な量のアセマンナンを動物に投与することを具備した方法を提供する。
本発明の実施において、効果的な量のアセマンナンは、すでになされた投与の後、間隔をおいて動物に再投与されうる。アセマンナンの投与の間の適切な間隔は、当業者に周知であり、過度の実験をせずに容易に決定しうる。
細菌性抗原に対する適切な担体は、当業者に周知である。現在のところ、好ましい担体は、食塩水溶液、例えば水溶性アジュバント化合物、並びに少量の防腐剤及び着色剤を含有する食塩水である。アセマンナンに対する適切な担体は、当業者に周知である。現在のところ、上記の食塩水、及びホスフェートバッファー、例えば以下の例で説明するホスフェートバッファーが好ましい。
本発明は以下の例によってよりよく理解されるであろう。しかし、当業者は、詳述された独特の例が、以後の請求の範囲でより完全に説明される本発明を例示するのみであることを容易に認識することができるだろう。
実施例
例１
七面鳥のヘルペスウイルスワクチンの調製
七面鳥のヘルペスウイルス（ＨＶＴ）を、アヒル胎児の繊維芽細胞の１２継代物として、アメリカンタイプカルチャーコレクション（ＡＴＣＣ）、12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852から得た。七面鳥のＦＣ＃１２６ヘルペスウイルス（現在のところ、ＡＴＣＣアクセッションNo.ＶＲ５８４Ｂとして入手可能である。）は、マレク病ワクチンを調製するのに使用しうる系統である。ワクチンには、１００％ＨＶＴ及び安定化剤を含有した細胞培養物質が含まれる。
各々のマスターシード（Master Seed）（”Ｘ”）ウイルスを、丸い細胞、屈折した細胞、若しくは破壊された細胞を含有した鶏の胎児繊維芽細胞の特徴的な細胞変性効果（ＣＰＥ）によって同定した。マスターシード（”Ｘ”）は、寒天ゲル分散試験、又はフルオレセインに接合した七面鳥の抗ヘルペスウイルス血清を用いた感染細胞の特徴的な直接反応によって特異的に同定された。
該七面鳥のヘルペスウイルスは無毒性である。
マスターシードウイルス（”Ｘ”）の調製に使用されたＣＥＦ細胞の各々のバッチを、９Ｃ．Ｆ．Ｒ．１１３．２６（ａ）（２）、１１３．２６（ａ）（３）、１１３．３０及び１１３．１５（ｃ）に従って試験した。該マスターシードを、９Ｃ．Ｆ．Ｒ．１１３．３００及び１１３．３３０、並びに特に、１１３．２７、１１３．２８、１１３．３１、１１３．３４及び１１３．３７に従って試験した。該マスターシードは９Ｃ．Ｆ．Ｒ．１１３．３３０に従った試験で安全であった。
該マスターシード（”Ｘ”）は、種々の七面鳥ヘルペスウイルス（ＨＶＴ）に感染した鶏胎児性繊維芽細胞（ＣＥＦ）の懸濁液である。該懸濁液を凍結し、－１００℃、又は液体窒素の蒸気層若しくは液体窒素中においてより低温でアンプル中に保存した。
該マスタシードは第１６継代であり、”Ｘ”継代のように表した。該シードの継代範囲は、細胞培養で第１６から１９代である。ワクチンウイルスの範囲は、第１７から２０代である。以下は、シードの継代の系統的なスケジュールである。

シード継代の系統的スケジュール

受領先		アメリカンカルチャーコレクション、１２３０１ パークローンドライブ、 ロックビル、ＭＤ　２０８５７
受領先	第１１継代 生産シード	（ＦＣ＃１２６系）
マスターシード（”Ｘ”）	第１６継代	
（”Ｘ”＋１”）	第１７継代	
（”Ｘ”＋２”）	第１８継代	
（”Ｘ”＋３”）	第１９継代 生産シード	
（”Ｘ”＋４”）	第２０継代	ワクチンウイルス

圧熱滅菌によって無菌にされなかった動物由来の全培地成分を、９Ｃ．Ｆ．Ｒ．１１３．５３に従って、特に不純物を試験した。細胞培養のための培養培地は、シードと生産培地の両方の増殖に対して同一である。増殖培地は、Ｅａｒｌｅの塩及びＬ－グルタミンを有するＥａｇｌｅの最小培地（Eagle's Minimum Essential Medium）である。

増殖培地は、５％のトリプシンホスフェートブロス及び１％から５％の胎児仔牛血清を付加させた。該血清は、５６℃で３０分熱処理された。該血清は商業的な生産者から無菌で得られ、９Ｃ．Ｆ．Ｒ．１１３．５３の要求に合致していた。該血清は、濾過によって、ガンマー線照射によって、又はβ－プロピオラクトンで処理することによって無菌にされうる。β－プロピオラクトンで無菌にされた血清は、９Ｃ．Ｆ．Ｒ．１１３．２６に従って細菌及び菌類に対して、９Ｃ．Ｆ．Ｒ．１１３．２８に従ってマイコプラズマに対して、更に９Ｃ．Ｆ．Ｒ．１１３．５３（ｃ）に従って外来ウイルスに対して試験された。ガンマ線照射された血清は、９Ｃ．Ｆ．Ｒ．１１３．２６に従って細菌及び菌類に対して、９Ｃ．Ｆ．Ｒ．１１３．２８に従ってマイコプラズマに対して、更に９Ｃ．Ｆ．Ｒ．１１３．５３に従って外来ウイルスに対して、ガンマ線照射の前に試験され、これらを含まないことが見いだされた。血清は、ＪＲＨ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，１３８０４　ｗｅｓｔ　１０７ｔｈ　Ｓｔｒｅｅｔ，Ｌｅｎｅｘａ，Ｋａｎｓａｓ　６６２１５，又はＭａｔｒｉｘ　Ｃｏｍｐａｎｙ，４４００　Ｃｈａｖｅｎｅｌｌｅ　Ｒｏａｄ，Ｄｏｂｕｑｕｅ，Ｉｏｗａ　５２００１－９６７３から入手しうる。

この血清は、生物学的増殖系における栄養補足剤として使用され得、生産者から受け取った後１年以下の間７℃若しくはより低温で保存された。

細胞培養に使用されたひな胎芽は９から１０日齢あった。該胎芽を、特別な病原体を含まない（ＳＰＦ）群から確保された卵から取った。生きたウイルスワクチンを生産するための鶏の卵を、以下の因子（agent）に対して特に試験し、以下の因子を含まない群から確保した。該因子は、鳥類アデノウイルス（ＡＡＶ）；鳥類脳脊髄炎ウイルス（ＡＥＶ）；鳥類白血症ウイルス（ＡＬＶ）又は鶏肉腫抗体Ａ及びＢ（ＲＳＶ－RAV_1及びＲＳＶ－RAV_2）；鶏痘ウイルス（ＦＰＶ）；感染性気管支炎ウイルス（ＩＢＶ）、コネチカットタイプ；感染性気管支炎ウイルス、マサチューセッツタイプ；感染性咽頭気管炎ウイルス（ＩＬＶ）；ニューカッスル病ウイルス（ＮＤＶ）；Mycoplasma gallisepticum（MG）;Salmonella pullorum－チフス様；鳥類インフルエンザウイルス－タイプＡ；レオウイルス；及び感染性嚢包性疾患ウイルス（ＩＢＤＶ）である。

１００パーセントの鳥を１２から２０週齢の間に採血した。血液サンプルを、鳥類脳脊髄炎ウイルス（ＡＥＶ）以外の上記疾患に対して試験した。ＡＥＶ試験は、該集団が卵を生める状態になった後であるが、卵がワクチン製造に使用される前に試験当たり５０の胎芽を用いて行われた。
モニターリングは、ほぼ一ヶ月の間隔で該集団のちょうど５％程を試験することによって達成された。試験は、以下の研究所で行われた。：Solvay Animal Health Inc., Charles City, Iowa;SPAFAS, Inc., Norwich, Conneticut;ISA Laboratories, Ithaca, New York;HY-Vac Laboratory Eggs Company, Gowrie, Iowa;State Laboratory of Minnesota, Minneapolis, Minnesota;State Laboratory of Ohio, Columbus, Ohio;及びLasher Associates, Inc., Millsboro, Delaware。
細胞懸濁液を、９から１２日の胚を含有するGallus gallusのＳＰＦ卵、リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）無菌のトリプシン、及び最小培地（ＭＥＭ）若しくは以下の手順に従ったメディア＃１９９増殖培地を用いて調製した。培地＃１９９は、当業者に容易に利用しうる標準増殖培地である。
卵はアルコール－ヨウ素溶液で殺菌された。乾燥する場合には、該卵を薄層のフローフード下に置き、殻を無菌の鉗子で砕いた。胎芽をこれらの膜から無菌で除去し、無菌のペトリ皿に貯めた。頭を、改良した無菌の外科用のはさみで除去した。胴及び頭を貯め、無菌の容器に振り分け、次いで抗生物質を全く含まないＰＢＳで洗浄した。次に洗浄した胎芽を、ＰＢＳで最後の洗浄をするためにトリプシン化したフラスコに移した。最後の洗浄をした後、抗生物質を含む０．４％以下のトリプシンＰＢＳ溶液をフラスコに加えた。この懸濁液を磁気撹拌機で撹拌し、更に細胞を分散した。
該細胞を、胎芽の胴からは１００分間以内の累積周期で、また胎芽の頭からは４０分以内の累積周期で抽出した。これらの抽出物から得た細胞を、５％以下の胎児ウシ血清（ＦＢＳ）を含有する１リットルの遠心管中において２５０×ｇ以上で１０分間遠心した。上清をデカントし、最大で細胞対培地の比がほぼ１：５である増殖培地に細胞を懸濁した。得られた懸濁物を一般的な容器に貯め、磁気撹拌機で撹拌した。完全に混合した後、細胞数を測定した。ＰＢＳ中において胎芽の胴及び頭を最初に洗浄した後、表示したサンプルを集め、９Ｃ．Ｆ．Ｒ．１１３．３０及び９Ｃ．Ｆ．Ｒ．１１３．５１に従って試験した。
ＣＥＦ細胞を、ワクチンの生産において、又はウイルスをアッセイするための試験系において、ウイルスの増殖を補助するために使用した。
細胞を、１ml当たり約０．５から５．０×10^6細胞の最終濃度で、上記増殖培地に分散した。該細胞を無菌のローラーボトル（ボトル当たり８５mlから５００mlの培地）に移植し、３７℃±２℃で２０から７２時間培養した。４８時間より長く保持する場合は、細胞に新鮮な培地を供給した。汚染されたボトルは、非典型的な単層、若しくは非典型的なｐＨを有しており、廃棄された。
細胞培養は、約２，０００mlから９，０００mlのサイズのローラーボトルで増殖された。該ボトルは、軟質ガラス、タイプＩのボロシリケートガラス、又は、無菌の市販のプラスチックボトルの何れかである。ガラスボトルは、１３２℃±２℃以上で最低５分間、１２１℃±２℃以上で最低１５分間蒸気殺菌をするか、１６０℃±２℃以上で最低１時間乾燥加熱殺菌する。該ボトルを、殺菌後２週間以内に使用するか又は再殺菌した。該ボトルをゴムで被覆したスクリューキャップ又はゴム栓で密封した。栓及び／又はスクリューキャップは殺菌された。
マスターシード（”Ｘ”）は、七面鳥の生存しうるヘルペスウイルス（ＨＶＴ）に感染した細胞としてアンプル中で－１００℃若しくは液体窒素の蒸気層においてより低温で保存するか、又は液体窒素中で保存した。
播種若しくは接種のための細胞懸濁物の調製には、まずストックしたシード培養物を液体窒素から取り出し、迅速に解凍することが必要になる。シード培養物を、解凍されたアンプルから無菌状態で取り出し、ローターボトル中の鶏胎芽繊維芽細胞（ＣＥＦ）単層物に接種するために、５００プラーク形成単位（ｐｆｕ’ｓ）以上に希釈した。
引き続きシードを、０．０５％から０．２５％トリプシンを用いてローターボトルから細

胞を除去することによって採取した。トリプシン溶液は以下のようにして調製した。

トリプシン１：２５０、Ｔ．Ｃ．グレード	250.0ｸﾞﾗﾑ
リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）	
十分な品質（ｑ．ｓ．）	10,000.0ml

トリプシンを少量の温リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）でスラリーにした。温ＰＢＳを２５％の最終容積まで加えた。この溶液を泡立たないように穏和な速度で撹拌した。残りの容積を追加のＰＢＳで補い、この溶液をよく混合した。

溶液No.２：

トリプシン１：２５０、（１０×）市販品として調製された溶液--β－プロピオラクトン処理（ＢＰＬ－処理）されたもの	2,000.0ml
塩化ナトリウム、Ｕ．Ｓ．Ｐ．	320.0ｸﾞﾗﾑ
塩化カリウム、Ｕ．Ｓ．Ｐ．	16.0ｸﾞﾗﾑ
デキストロース水和物	80.0ｸﾞﾗﾑ
重炭酸ナトリウム	28.0ｸﾞﾗﾑ
エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）	20.0ｸﾞﾗﾑ
脱イオン化スーパーＱH_2O	
十分な品質（ｑ．ｓ．）	10,000.0ml

乾燥した各々の成分を脱イオン化水で別々に混合し、暖めた。次に、この溶液を合わせトリプシンとエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）溶液を加えた。この溶液を、よく混合されるまで穏和な速度で撹拌した。

トリプシン溶液１及び２を無菌の０．２ミクロンのフィルターを通して最終的に濾過することによって滅菌した。この無菌溶液を濾過し、ボトル当たり２５mlから５００mlの割合で無菌のタイプＩボロシリケートガラスに分配した。このボトルをゴムで被覆したスクリューキャップで密封した。この方法で無菌にされた溶液は、９Ｃ．Ｆ．Ｒ．１１３．２６に従って細菌及び菌類に対して、９Ｃ．Ｆ．Ｒ．１１３．２８に従ってマイコプラズマに対して、９Ｃ．Ｆ．Ｒ．１１３．３７に従って鶏胎芽接種によって病原体に対して試験された。トリプシン粉末の各ロットは９Ｃ．Ｆ．Ｒ．１１３．５３（ｄ）に従ってブタパルボウイルスに対して試験された。トリプシン溶液はまた、β－プロピオラクトンを用いて滅菌された。処理される物質の容積の４倍のサイズの、スクリューキャップで蓋をしたエルレンマイヤーフラスコを使用した。塩溶液、例えば、ダルベッコの平衡塩類溶液（Mg^{++}及びCa^{++}を含まない）で２．５％のトリプシンを含有するものを調製した。β－プロピオラクトンを、プロピペッター及び保護膜を用いる保護フード下で激しく振盪しながらこの溶液に加え、氷冷した蒸留水で１０％の濃度に希釈した。この希釈されたＢＰＬを、処理される冷トリプシンの１mlから９９mlの割合でトリプシンに加え、最終濃度を０．１％ＢＰＬにした。このＢＰＬ－トリプシンを、ウォーク－イン式の冷凍庫で一晩ゆっくり撹拌し、失活物（inactivant）上にウイルスを保持しうる泡立ちを防ぐためにときどきチェックした。処理した材料は、１０倍に希釈し、すぐに使用するために０．２５％のトリプシン溶液を調製するか、該濃縮物を濾過し、後に希釈及び使用するために凍結して保存した。β－プロピオラクトンで滅菌した溶液は、９Ｃ．Ｆ．Ｒ．１１３．２６に従って細菌及び菌類に対して、９Ｃ．Ｆ．Ｒ．１１３．２８に従ってマイコプラズマに対して、９

Ｃ．Ｆ．Ｒ．１１３．３７に従って鶏胎芽接種によって病原体に対して試験された。この方法で滅菌された溶液は、９Ｃ．Ｆ．Ｒ．若しくは生産者によって示されているプロトコルに従って、ブタパルボウイルスに対して試験された。

溶液No.３は、商業的に製造されたトリプシン１：２５０（１０×）溶液であり、これは、Gibco Laboratories, 3175 Staley Road, Grand Island, New York 14072から得ることができる。トリプシンは、９Ｃ．Ｆ．Ｒ．１１３．５３の要求にあっている。溶液No.４は、商業的に製造された１：２５０－エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）（１０×）で処理され、ガンマ線照射された溶液であり、Sigma Chemical Company, Post Office Box 14508, St. Louis, Missouri 63178から得ることができる。ガンマ線照射されたトリプシン溶液は、Ｕ．Ｓ．Ｐ．ＸＸＩに従って細菌及び菌類に対して、Ｂａｒｉｌｅ法でマイコプラズマに対して、更に９Ｃ．Ｆ．Ｒ．１１３．５３に従ってブタパルボウイルスに対して試験された。溶液No.５は、商業的に製造されたトリプシン１：２５０（１０×）ＢＰＬ処理された溶液であり、JRH Biosciences, 13804 West 107th Street, Lenexa. Kansas 66215から入手可能である。

トリプシン濃縮物（溶液１、３及びNo.４）を、無菌のリン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）で適切な濃度に希釈し、細胞培養物を分散するために使用した。トリプシン濃縮物（溶液No.２）を、スーパーＱH_2Oで適切な濃度に希釈し、細胞培養物を分散するために使用した。トリプシン濃縮物（溶液No.５）を溶液No.２の調製に使用した。種々のトリプシン濃縮物を－２０℃又はそれより低温で１２カ月以内の期間保存した。

胎児性仔牛血清を採集した細胞に加え、遠心する前にトリプシンを不活性化した。採集した細胞を１０から２０分遠心した。上清をデカントし、該細胞を、ＰＢＳに対する充填細胞の容積：容積比で１：４０から１：８０の範囲で再懸濁した。リン酸緩衝食塩水に４％の胎児性仔牛血清及び抗生物質を追加した。

シードウイルス懸濁物を、ＣＥＦ単層上にローラーボトル当たり２から３mlの割合で無菌状態で接種した。シードウイルスの容積を感染細胞を継代することによって１：５から１：３０の範囲に拡大した。接種された単層物に、利用できる場合には以下のようにして追加の１次ＣＥＦを追加した。１次ＣＥＦ細胞を上述のようにして調製した。次いでこの１次ＣＥＦ細胞を、利用した細胞の数に依存してボトル当たり０．５から５．０×10^8細胞の割合で、七面鳥のヘルペスウイルス（ＨＶＴ）を接種したローラーボトルに濃縮物として加え、この細胞濃縮物を１８から２４時間の後接種時に加えた。この細胞濃縮物を９Ｃ．Ｆ．Ｒ．１１３．３０に従ってSalmonellaに対して、及び９Ｃ．Ｆ．Ｒ．１１３．５１に従って外来因子（Adventitious agent）に対して試験した。

七面鳥のヘルペスウイルスに感染したＣＥＦ単層物は、３７℃±２℃で２４から７２時間培養した。採集の前に、経験及び観測によって決定される特徴的な細胞変性効果が、８０％以上の細胞に表れていなければならない。特徴的な細胞変性効果を示さない全ての容器、及び細菌で汚染されたか若しくは非典型的な細胞単層を有するものは廃棄された。

ボトルはランダムに選択され、特徴的なＣＰＥ及び不純物の形跡を顕微鏡的に検査した。接種の時から採集までに経過した最小と最大の時間は、２４時間から７２時間である。収穫は４８時間の後接種でなされることが好ましい。

細胞懸濁液を遠心した後、上清培養液を捨て、細胞を、０．０５％から０．２５％のトリプシンでガラス表面から引きはがした。次に、細胞をローターボトルから１リットルの遠心容器に貯めた。胎児性仔ウシ血清をこの細胞に加えトリプシンを不活性化した。貯めた細胞を２５０×ｇ以上で、５から１５分以上遠心した。上清のトリプシン溶液を捨てた後、充填細胞を、無菌の最小培地若しくはＥａｒｌｅの平衡塩類溶液（ＢＳＳ）及び１５％の胎児性仔ウシ血清を含有する培地＃１９９に再懸濁した。この懸濁物の容積は、ワクチンの採集容積の４０から８０％である。特徴的なＣＰＥを示し、及び異常細胞、ｐＨ、濁り、におい及びモールドのような汚染の何れの指標も含まない単層物が採集されるべきである。ワクチン生産に使用されなかった全ての材料はVeterinary Services Memorandum No.800.56に従って処理された。

ＨＶＴ－感染細胞は、以下の媒体中で凍結を制御することによって種々の状態に維持され

た。

成分	１０リットル当たり
１.最小培地若しくは１０％グルタミンを有し、EarleのＢＳＳを有する培地＃１９９	7,400から7,480mℓ
２．トリプトースホスフェートブロス（Broth）（ＴＢＰ）	500mℓ
３．$NaHCO_3$(10%)、試薬グレード(reagent grade)	20から100mℓ
４．胎児性仔ウシ血清	1,500mℓ
５．ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）	500mℓ

培地＃１９９は当分野の実務家にとって容易に利用できる標準培地である。この培地は、使用のために７２時間以内に調製される。ジメチルスルホキシドは、１２１±３℃で１５分間滅菌された。

生成物は、まず細胞懸濁液の細胞を、１ml当たり1×10^7細胞以上の最終濃度に調節することによって標準化した。この濃度は、血球計算板又は電気粒子計測器の様な標準の細胞計測法によって測定された。細胞の生存力は、生体染色、例えばトリパンブルー若しくはエリトロシンＢを用いることによって評価した。

系列（serial）は懸濁された細胞を無菌の綿毛を含まないガーゼ、又は無菌のステンレス鋼スクリーンを通して集めた。細胞懸濁物を機械的に撹拌しながら、凍結した培地の混合物をゆっくり加え、先に述べた細胞濃度のバッチにした。この細胞懸濁物をいつでも冷凍温度で保存した。２０，０００mlのバッチを基にして、系列を集めた例は以下のようであった。

１）ＨＶＴ感染細胞	2×10^{11}
２）最小培地(Earle's)若しくはＬ－グルタミンを有する培地＃１９９	14,800から14,960mℓ
３）トリプトースホスフェートブロス（Broth）	1,000mℓ
４）$NaHCO_3$ 10%、試薬グレード(reagent grade)	40から200mℓ
５）胎児性仔ウシ血清	3,000mℓ
６）ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）	1,000mℓ
全容積	20,000mℓ±3%

平均系列容積は、約２０，０００mlである。系列の最大容積は４０，０００mlである。

充填の容積は、５００から３，０００の投与量アンプル当たり２．０±０．２mlであり、５００の投与量アンプル当たり１．０±０．１mlである。ワクチンは、２mlのタイプＩボロシリケートガラスアンプルに分配され、前もって記録し、滅菌した。アセマンナンアジュバントを、２０mlのゴム又はブチルストッパーを用いて２０から５０mlのタイプＩボロシリケートボトルに分配した。

希釈物を製造し、試験し、Veterinary Services Memorandum No.800.74に従って販売した。１リットルのバッチの希釈物は以下の組成を有する。

ＮＺアミン	14.00g
蔗糖（食品グレード）	50.00g
$K_2HPO_4.3H_2O$（リン酸カリウム　二塩基性）	1.48g
フェノールレッド、Ａ．Ｃ．Ｓ．	0.01g
脱イオン化水	1,000.00mℓ

上に示した成分を小容積の脱イオン化水に撹拌しながら分散した。該成分が溶液状態になり、ｐＨをＮａＯＨ又はＨＣｌで７．１から７．３に調製した後、この混合物を脱イオン化水で最終容積に希釈した。希釈物の平均バッチサイズは、１，０００，０００mlから２，４００，０００mlであり、最大のバッチは３，０００，０００mlであった。防腐剤は全く希釈物に加えなかった。

一定の撹拌下でワクチンを、無菌のガラスアンプルに無菌の状態で詰め、該アンプルを炎で密封し、保存するための小胞（canes）に置いた。充填と密封は自動充填機でなされ、この操作は１０℃±５℃で行われた。ワクチンのアンプルを、制御された冷却チャンバー中で１分当たり約１℃の一定速度で冷却することによって凍結した。アンプルを、約－１００℃又は液体窒素の蒸気層若しくは液体窒素中でより低温で保存した。

最終容器中のワクチンの各々の供給量には、２０，０００以上の細胞が含有され、これは上記のように計測した。ワクチンの容器は、出荷及び保存の間液体窒素中に保持され、一方、アジュバントは出荷及び保存の間室温に維持された。

細胞の各々のバッチを、９ＣＦＲ１１３．３０に従ってSalmonellaに対して、更に９ＣＦＲ１１３．５１に従って外来因子に対して試験した。最終容器のワクチンサンプル及びアジュバントを、９ＣＦＲ１１３．２８に従ってマイコプラズマに対して、９ＣＦＲ１１３．２７に従って細菌及び菌類に対して、９ＣＦＲ１１３．３４に従って血球凝集性ウイルスに対して、及び９ＣＦＲ１１３．３７に従って外来因子に対して試験した。バルク及び最終容器のワクチンサンプルを、９ＣＦＲ１１３．３１に従って鳥類リンパ球様白血病に対して試験した。

最終容器のサンプルは、９ＣＦＲ１１３４．３３０に従って安全性について試験した。

ワクチンを９Ｃ．Ｆ．Ｒ．１１３．３３０に従って、また当業者に一般的に知られた方法によって力価測定した。マスターシード（”Ｘ”）を１９８６年1月１７日に製造し、マスターシードから第４継代（”Ｘ＋４”）の試験を１９８６年７月１０日に完了した。ワクチンをこの第４継代物から製造した。出荷時のワクチンの力価は、１羽の投与量当たり３，０００プラーク形成単位（ｐｆｕ’ｓ）以上であるべきである。

アジュバントの湿気は９ＣＦＲ１１３．２９に従って測定し、５％を越えるべきではない。

ワクチンを２mlのアンプルに詰め、１小胞（cane）当たり５つのアンプル、１パッケージ当たり１小包を詰めた。アジュバントは、２０若しくは５０mlのボトルに詰め、１パッケージ当たり５ボトルを詰めた。アセマンナン（キャリシン（Ｃａｒｒｉｓｙｎ）（登録商標））はCarrington Laboratories, Irbing, Texasから供給された。１００マイクログラムのアセマンナンに各々のワクチンの投与量及び希釈剤を追加した。アセマンナンを無菌の粉末として分配するか、無菌の栓をしたバイアル中で凍結乾燥した。供給されたアセマンナンは、同定、ポリマンノアセテート分率、アントラキノンの濃度、及び分子量について「バルクキャリシンの分析証明書（Bulk Carrisyn Certificate of Analysis）」に対するCarrington Laboratoriesの仕様書に合っていた。アセマンナンは、ワクチン接種の前に希釈剤（上記参照）で再構成された。ワクチン及びアジュバントの再構成サンプルを品質を保証するために凍結した後に集めた。

ワクチンの期限の満了日は、９ＣＦＲ１１４．１３に従った有効性試験の開始日から２２カ月を越えるべきではない。

ワクチンは、マレク病を防ぐために日齢のひなのワクチン接種に使用されうる。２０mgの

アセマンナンを２００mlの上記希釈剤に懸濁し、２mlの解凍したワクチンをこれに加え、１，０００羽の投与量のワクチンを生産した。１回に０．２ml投与量のワクチンを１羽当たりに投与しうる。ワクチンは、経皮的若しくは筋肉内的に投与された。
これらの研究に使用された鳥は、すべて母方の抗体に陰性の特異的な病原体のない（ＳＰＦ）レグホンであった。鳥を１日齢でワクチン接種し、試験の期間中、各々の鳥に対して最低２００cm^2の床面積を有するようにして、分離した陰圧のホースホールタイプ（Horsfall-type）プレキシガラス培養容器に収容し、餌を与え、任意に給水した。

例２

ワクチン接種後１、２、３若しくは４日に投与されたマレク病ウイルスＲＢ１Ｂのウイルス攻撃（Challenge）に対するＨＶＴ／アセマンナン接種ひなの応答

使用される七面鳥ヘルペスウイルスのワクチンを０．２ml投与量当たり３５００ｐｆｕ’ｓの理論投与量で上記のリン酸バッファー中に希釈した。アセマンナンをCarrington Laboratories, Irving TXからガンマ線照射した無菌の粉末として入手した。アセマンナンを０．２ml投与量レベル当たり１００ugで、ウイルスの添加前にリン酸バッファー希釈剤と混合した。対照の希釈剤は、他に何も加えないリン酸バッファーである。
マレク病ウイルスＲＢ１Ｂウイルス攻撃用のウイルスは、鳥１羽当たり７００ｐｆｕ’ｓの理論量で、腹腔内注射で投与された。ＲＢ１Ｂ、即ち典型的な非常に毒性のマレク病のウイルス攻撃は、East Lansing Regional Poultry Research LaboratoryのDr. Witterから得、１次ひな腎細胞培養で増殖させた。
鳥を、以下のような３０のグループに分け、独立したアイソレーターに収容した。各グループは、ワクチン接種後、１、２、３及び４日にＨＶＴで攻撃されたもの；ワクチン接種後、１、２、３及び４日にＨＶＴ及びアセマンナンで攻撃されたもの；ワクチン接種後、１、２、３及び４日にリン酸バッファー希釈剤中のアセマンナンで攻撃されたもの；及びワクチン接種せず、他のグループのワクチン接種後、１、２、３及び４日に希釈剤対照物で攻撃したものである。
処理後、適切な日に、ワクチン接種を受けたものに７５０プラーク形成単位のＲＢ１Ｂを皮下注射し、羽根に連続番号をふった単色の帯を縛り付けた。最後のウイルス攻撃を行った後、各々のウイルス攻撃期間及びワクチン接種したグループからの鳥を全部ランダムに混ぜ、一定のバックグラウンドのウイルス攻撃を維持するためにアイソレーター中に置いた。
ウイルス攻撃後の鳥の外傷の徴を観測し、死亡した場合には記録した（posted）。全グループを４８日の試験期間の残こりの間に観測し、更にｖｖＤＭ（非常に毒性のマレク病ウイルス攻撃（very virulent Marek's Disease Challenge））に対する病徴的な外傷を記録し及び試験した。ｖｖＤＭによる幣死率、及びｖｖＤＭによる外傷をもった鳥を合計し、治療の防御指針を決定するためにワクチン接種しなかった鳥との全発病率の関係を考察した。マレク病の免疫は、各々のグループの成績が対照の感染力レベルと比較された防御指針として示されている。防御指針＝（陽性な対照％）－（陽性のワクチン接種されたもの％）／（陽性な対照％））×１００
表１（以下参照）に与えられた結果は、この早い齢で鳥に投与されたウイルス攻撃が過酷であり、ワクチン接種されていないもの全てが、１００％影響されることを示している。このデータはまた、ＨＶＴへのアセマンナンの添加がワクチンに十分効果的であり、ワクチン接種後２、３及び４日でのウイルス攻撃グループが、ＨＶＴ単独のグループよりも十分によい成績であることを示している。表２（以下参照）の結果は、鳥がウイルス攻撃された日に関係なく、ＨＶＴ／アセマンナン処置した鳥が全体的によりよい成績であることを示している。

表１

日齢でワクチン接種されたひなのウイルス攻撃日の影響

グループ	ウイルス攻撃の日	グループ中の番号	非特異的な幣死率	腫瘍を伴った死亡	腫瘍	Ｐ．Ｉ．＊
NonVac	１日目	１０	0	5	5	0.00
Acm	１日目	２０	4	6	7	18.75
HVT	１日目	２０	5	9	5	6.67
HVT/Acm	１日目	２０	3	8	6	17.65
NonVac	２日目	１０	0	7	3	0.00
Acm	２日目	２０	6	5	5	28.57
HVT	２日目	２０	3	5	7	29.41
HVT/Acm	２日目	２０	5	2	3	66.67
NonVac	３日目	１０	2	6	2	0.00
Acm	３日目	２０	5	4	6	33.33
HVT	３日目	２０	1	3	3	68.43
HVT/Acm	３日目	２０	0	1	2	85.00
NonVac	４日目	１０	1	4	5	0.00
Acm	４日目	２０	3	6	5	35.29
HVT	４日目	２０	4	3	2	68.75
HVT/Acm	４日目	２０	2	0	1	94.44

＊　Ｐ．Ｉ．＝防御指針；ワクチン接種されず、ウイルス攻撃された鳥の％、ワクチン接種されウイルス攻撃された鳥の％より少ない、ワクチン接種されずウイルス攻撃された鳥の％によって分けられた。NonVac＝ワクチン接種されていない；Acm＝アセマンナン。非特異的幣死率は観測されうる外傷を全く有さず死亡した鳥をいう。

表２

ウイルス攻撃の日付に関係のない蓄積防御データ

グループ	グループ中の番号	非特異的な幣死率	腫瘍を伴った死亡	腫瘍	Ｐ．Ｉ．*
NonVac	４０	３	２２	１５	０
Acm	８０	１８	２１	２３	２９．０
HVT	８０	１３	２０	１７	４４．８
HVT/Acm	８０	１０	１１	１２	６８．６

＊　Ｐ．Ｉ．＝防御指針；ワクチン接種されず、ウイルス攻撃された鳥の％、ワクチン接種されウイルス攻撃された鳥の％より少ない、ワクチン接種されずウイルス攻撃された鳥の％によって分けられた。NonVac＝ワクチン接種されていない；Acm＝アセマンナン。非特異的幣死率は観測されうる外傷を全く有さず死亡した鳥をいう。

これらのデータは、鳥１羽の投与量レベル当たり３，５００ｐｆｕ及び１００μｇで、ＨＶＴワクチンへアセマンナンを添加することによって、ワクチン接種後の２、３及び４日でウイルス攻撃されたひなに対して防御が十分に改善されたことを示唆している。

更に興味のあることは、種々のワクチン接種グループ間に非特異的幣死率に差があることである。ワクチン接種グループ間で顕著な差は生じなかったが、ワクチン接種したものとワクチン接種しなかったものの間の非特異的幣死率のパーセンテージに明らかな差があった。実験計画は、著しい腫瘍の減少を観測することによってワクチンを評価するために必要である。これは、ワクチン接種したものに対して明らかな腫瘍の発達を部分的に防御することでありうるが、この特別なワクチンではウイルス攻撃が他の方法に影響される。そのような場合は、データの再検討によって、ＨＶＴ／アセマンナングループの幣死率が低いことが示され、アセマンナンの明かなアジュバント効果が同じであるか若しくは増加したままであることが示唆される。

例３

ＨＶＴワクチン接種後の初期の悪性のウイルス攻撃に関するアセマンナンの影響

日齢の鳥をグループに分け、ゼロ、２５０若しくは１０００ｐｆｕｓの改変された生きたＨＶＴ及びゼロ若しくは１００マイクログラム（μｇ）のアセマンナン（以下の表３参照）を投与した。

ウイルス攻撃用のウイルスはマレク病ウイルスのＲＢ１Ｂ又はＪＭＶであった。ＲＢ１Ｂ、即ち典型的な非常に悪性のマレク病のウイルス攻撃物は、East Lansing Regional Poultry Research LaboratoryのDr. Witterから得、ウイルス攻撃されるウイルスの投与量当たり４００ｐｆｕ’ｓを含有する０．２mlの腹腔内投与量で投与された。ウイルス攻撃は、ワクチン接種後５若しくは２１日であった。鳥を麻痺の徴候でモニターし、幣死率を感染の後４８から６０日の間評価した。観測の終了時点で、全ての鳥を安楽死させ、必要事項を記入し（posted）、顕著な腫瘍の発達の徴候、特に心臓、肝臓、腎臓、脾臓、及び睾丸若しくは卵巣での徴候を記録した。ＪＭＶ移植可能腫瘍は、Dr. Sevoian, University of Massachusettsから入手し、試験動物のワクチン接種と同時にドナーである日齢のひなに腹腔内注射した。感染の後５日目に、ＪＭＶのひなを安楽死させ、肝臓と脾臓を集め、

無菌のＲＰＭＩ中で細かく切り刻み、次いでＴｅｎｂｒｏｃｋ[R]組織ホモジナイザー中で細かく砕いた。次に、得られたホモジネートを新鮮なＲＰＭＩに３：１で希釈し、０．２mlをひなに腹腔内注射した。該ひなを、幣死率が記録されている間の２１日間観察した。表３に示されたデータから、ＨＶＴワクチンにアセマンナンを加えると、ワクチンの保護能力が改善されることが示唆された。これは、アセマンナンを投与したグループは全て、アセマンナンを含有していないワクチンを投与された対応するグループが有しているよりも、疾患の影響を受けた鳥の数のパーセンテージが低く、高い防御指針を示していることに基づいている。防御指針は、各々の実験グループの成績を対照の感染性レベルと比較した。

表３

七面鳥の改変された生きたヘルペスウイルス及びアセマンナン及び非常に悪性のマレク病ウイルス攻撃を用いた１日齢の鶏のワクチン接種

Ａ．実験計画

グループ	ＰＦＵｓ	Ａｃｍの量（μｇ）	ウイルス攻撃(日にち)	鳥の数
１	０	０	ＲＢ１Ｂ（５）	１４
２	250	０	ＲＢ１Ｂ（５）	１５
３	250	100	ＲＢ１Ｂ（５）	１５
４	1000	０	ＲＢ１Ｂ（５）	１５
５	1000	100	ＲＢ１Ｂ（５）	１５
６	０	０	ＲＢ１Ｂ（２１）	２０
７	250	０	ＲＢ１Ｂ（２１）	２０
８	250	100	ＲＢ１Ｂ（２１）	２０
９	1000	０	ＲＢ１Ｂ（２１）	２０
１０	1000	100	ＲＢ１Ｂ（２１）	２０

Ｂ．結果

グループ	死亡数	腫瘍を有していた数	影響を受けた％	Ｐ．Ｉ．＊
１	０	１２	８６	０
２	０	６	４０	５３
３	０	３	２０	７７
４	０	６	４０	５３
５	０	５	３３	６２
６	４	１７	８５	０
７	０	１０	５０	４１
８	２	６	４０	５３
９	０	１０	５０	４１
１０	０	８	４０	５３

＊　Ｐ．Ｉ．＝防御指針；ワクチン接種されず、ウイルス攻撃された鳥の％、ワクチン接種されウイルス攻撃された鳥の％より少ない、ワクチン接種されずウイルス攻撃された鳥の％によって分けられた。Ａｃｍ＝アセマンナン。

例４

ＨＶＴワクチン接種後の早期の悪性ワクチン攻撃に関するアセマンナンの影響

日齢の鳥をグループに分け、ゼロ、６２５、１２５０若しくは３７５０ｐｆｕｓの改変された生きたＨＶＴウイルス及びゼロ若しくは１００マイクログラムのアセマンナン（以下の表４を参照）を投与した。ワクチン攻撃は、例３（上記参照）で示したように、ワクチン接種後５日目にマレク病ウイルスのＲＢ１Ｂ系で行った。
表４に示されたデータから、ＨＶＴワクチンにアセマンナンを加えると、ワクチンの保護能力が改善されることが示唆された。アセマンナンを含有するワクチンを投与したグループは全て、アセマンナンを含有するワクチンを投与しなかった対応するグループよりも、鳥の死亡数が少なくなり、疾患に影響される鳥の数のパーセンテージが低くなり、保護指数が高くなった。

表４

七面鳥の改変された生きたヘルペスウイルス及びアセマンナン及び非常に悪性のマレク病ウイルス攻撃を用いた１日齢の鶏のワクチン接種

Ａ．実験計画

グループ	ＰＦＵｓ	Ａｃｍの量（μｇ）	ウイルス攻撃(日にち)	鳥の数
1	0	0	ＲＢ１Ｂ（５）	３０
2	625	0	ＲＢ１Ｂ（５）	２９
3	625	100	ＲＢ１Ｂ（５）	３０
4	1250	0	ＲＢ１Ｂ（５）	３０
5	1250	100	ＲＢ１Ｂ（５）	３４
6	3750	0	ＲＢ１Ｂ（５）	３０
7	3750	100	ＲＢ１Ｂ（５）	３５

Ｂ．結果

グループ	死亡数	腫瘍を有していた数	影響を受けた％	Ｐ．Ｉ．＊
1	２２	6	９０	0
2	8	１０	６２	３３
3	1	8	３０	６９
4	5	１０	５０	４６
5	4	9	３８	５９
6	3	１１	４７	４９
7	1	5	１７	８２

＊　Ｐ．Ｉ．＝防御指針；ワクチン接種されず、ウイルス攻撃された鳥の％、ワクチン接種されウイルス攻撃された鳥の％より少ない、ワクチン接種されずウイルス攻撃された鳥の％によって分けられた。Ａｃｍ＝アセマンナン。

例５

ＨＶＴワクチン接種後の早期の悪性ワクチン攻撃に関するアセマンナンの影響

日齢の鳥をグループに分け、ゼロ、３３０若しくは１０００ｐｆｕｓの改変された生きたＨＶＴウイルス及びゼロ、１、１００若しくは１０００マイクログラムのアセマンナン（以下の表５を参照）を投与した。ワクチン攻撃は、例３（上記参照）で示したように、ワクチン接種後５日目に行った。

表４に示されたデータから、ＨＶＴワクチンにアセマンナンを加えると、ワクチンの保護能力が改善されることが示唆された。アセマンナンを投与したグループは、アセマンナンを含有するワクチンを投与しなかった対応するグループよりも、死亡数が少なくなり、疾患に影響される鳥の数のパーセンテージが低くなり、保護指数が高くなった。

表5

七面鳥の改変された生きたヘルペスウイルス及びアセマンナン及び非常に悪性のマレク病ウイルス攻撃を用いた1日齢の鶏のワクチン接種

A．実験計画

グループ	PFUs	Acmの量 (μg)	ウイルス攻撃(日にち)	鳥の数
1	0	0	RB1B (5)	21
2	330	0	RB1B (5)	21
3	330	1	RB1B (5)	21
4	330	100	RB1B (5)	21
5	330	1000	RB1B (5)	21
6	1000	0	RB1B (5)	21
7	1000	1	RB1B (5)	21
8	1000	100	RB1B (5)	20
9	1000	1000	RB1B (5)	20

B．結果

グループ	死亡数	腫瘍を有していた数	影響を受けた %	P．I．*
1	16	4	95	0
2	6	7	62	34[a]
3	5	7	57	40
4	4	4	38	60[b]
5	3	5	38	60[b]
6	4	1	24	75
7	4	3	33	65
8	1	2	15	84
9	1	4	24	73

* P．I．＝防御指針；ワクチン接種されず、ウイルス攻撃された鳥の%、ワクチン接種されウイルス攻撃された鳥の%より少ない、ワクチン接種されずウイルス攻撃された鳥の%によって分けられた。a，b＝Fisherの精密試験（Fisher's Exact test）によって評価されたワクチン接種グループ間の十分な差を示す。Acm＝アセマンナン。

例6

ＨＶＴワクチン接種後の早期の悪性ワクチン攻撃に関するアセマンナンの影響

日齢の鳥をグループに分け、ゼ若しくは３６０ｐｆｕｓの改変された生きたＨＶＴウイルス及びゼロ若しくは１００マイクログラムのアセマンナン（以下の表６を参照）を投与した。ワクチン攻撃は、例３（上記参照）で示したように、ワクチン接種後５日目に行った。

表６に示されたデータから、ＨＶＴワクチンにアセマンナンを加えると、ワクチンの保護能力が改善されることが示唆された。アセマンナンを含有するワクチン投与したグループは、アセマンナンを含有するワクチンを投与しなかった対応するグループよりも、死亡数が少なくなり、疾患に影響される鳥の数のパーセンテージが低くなり、保護指数が高くなった。

表６

七面鳥の改変された生きたヘルペスウイルス及びアセマンナン及び非常に悪性のマレク病ウイルス攻撃を用いた１日齢の鶏のワクチン接種

Ａ．実験計画

グループ	ＰＦＵｓ	Ａｃｍの量（μｇ）	ウイルス攻撃(日にち)	鳥の数
1	0	0	ＪＭＶ（５）	２０
2	360	0	ＪＭＶ（５）	２０
3	360	0	ＪＭＶ（５）	２０
4	360	0	ＪＭＶ（５）	２０
5	360	100	ＪＭＶ（５）	２０

Ｂ．結果

グループ	死亡数	影響を受けた%	.Ｐ．Ｉ．*
1	１９	９５	0
2	１１	５５	４２[a]
3	１０	５０	４７
4	１０	５０	４７
5	５	２５	７４[b]

＊　Ｐ．Ｉ．＝防御指針；ワクチン接種されず、ウイルス攻撃された鳥の%、ワクチン接種されウイルス攻撃された鳥の%より少ない、ワクチン接種されずウイルス攻撃された鳥の%によって分けられた。a，b＝Ｆｉｓｈｅｒの精密試験（Ｆｉｓｈｅｒ’ｓ　Ｅｘａｃｔ　ｔｅｓｔ）によって評価されたワクチン接種グループ間の十分な差を示す。Ａｃｍ＝アセマンナン。

例７

表７（以下参照）には、例３から６に示されたデータがまとめられている。種々の試験で

得られた結果をバッチ処理し、共通のワクチン攻撃／ワクチングループを対にした。これらの対は、Wilcoxonの対応対符号ランク試験（Wilcoxonmatched-pairs signed-rank test）によって有意性を評価した。全ての対は、メンバーがアセマンナン含有ワクチンを投与されたグループでは、鳥が、アセマンナン含有ワクチンを投与されなかったグループに属する鳥に比べてマレク病のウイルス攻撃に対して改善された応答をすることを示した。

表７

Ｗｉｌｃｏｘｏｎの対応対符号ランク試験

（Ｗｉｌｃｏｘｏｎ ｍａｔｃｈｅｄ-ｐａｉｒｓ ｓｉｇｎｅｄ-ｒａｎｋ ｔｅｓｔ）；

ＨＯ：鳥１羽当たり１００マイクログラム若しくは１ミリグラムの投与量でのアセマンナンの投与は、ワクチン投与量及びワクチン攻撃から独立に考察された場合に、ＨＶＴの成績を改善した。

対	Ｎｏ	Ｙｅｓ	ｄ	ｄのランク	符号
１	３３	６９	３６	１１	＋
２	４６	５９	１３	６	＋
３	４９	８２	３３	１０	＋
４	３４	６０	２６	７．５／８．５	＋
５	３４	６０	２６	７．５／８．５	＋
６	７５	７３	０		－
７	７５	８４	９	１．５／２．５	＋
８	５３	７７	２４	６／７	＋
９	５３	６２	９	１．５／２．５	＋
１０	４１	５３	１２	３．５／４．５	＋
１１	４１	５３	１２	３．５／４．５	＋
１２	４２	７４	３２	９	＋

Ｎ＝１１／１２

Ｘ　Ｎ／対＝４１

サンプルサイズ＝４９３

Ｐ＞＝両側検定に対して０．０１

Ｐ＞＝片側検定に対して０．０５

このデータは、ＨＶＴワクチンにアセマンナンを加えると、宿主の鳥の能力に正に影響し、引き続きのワクチン攻撃に応答しうることを示唆している。これは、ＨＶＴワクチン接種プロトコルが低いプラーク形成単位数又は早期のワクチン攻撃によって侵襲される場合に特に有意である。

例８

ニューカッスル病ウイルス及び感染性気管支炎ウイルスワクチンの製造

ニューカッスル病ウイルス（ＮＤＶ）系Ｂ１Ｂ１、即ちマスターシードから第５継代（“Ｘ＋５”）のひな胎芽性継代物（ＣＥＰ）７、Intervetから得られる感染性気管支炎ウイ

ルス（ＩＢＶ）マサチューセッツ（Mass.）、及び七面鳥のヘルペスウイルスＦＣ１２６（ＭＤＶａｃ）を、ＮＤＶ及びＩＢＶワクチン接種におけるアセマンナンの効果を試験する実験に使用した。

スプレーワクチンの調製を以下のようにして行った。

ＮＤＶ　Ｂ１Ｂ１、　　ＩＢＶ　Ｍａｓｓ．系

ＣＥＰ７（Ｘ＋５）

１：１５８０に希釈された　　１：６３００に希釈され３０mℓに再構成したもの

３０mℓに再構成したもの

３６mℓ　＋　３６mℓ

７２mℓの全容積

８６．４mℓの全容積に十分な量

収量　2.0 $\log_{10}$ EID_{50} IBV/0.3mℓ投与量

4.2 $\log_{10}$ EID_{50} NDV/0.3mℓ投与量

エアロゾルスプレーによって投与した。

例９

ニューカッスル病ウイルス及び感染性気管支炎ウイルスでのウイルス攻撃

National Veterinary Services Laboratory（NVSL）Ames, Iowaから入手したニューカッスル病ウイルス系ＧＢ　テキサスｐ２２及び感染性気管支炎ウイルス系Ｍ４１をワクチン接種した鳥及びワクチン接種しない鳥を、ウイルス攻撃するために使用した。

例１０

生きた日齢ワクチンとして投与されるニューカッスル病ウイルス及び感染性気管支炎ウイルスにおけるアセマンナンの効果

グループ	処置	＃ｂｄｓ
1	ワクチン接種しないもの	５０
2	ＭＤＶａｃ／ＮＤＶ＋ＩＢＶ	５０
3	ＡＣＭ／ＮＤＶ＋ＩＢＶ	５０
4	ＭＤＶａｃ＋ＡＣＭ／ＮＤＶ＋ＩＢＶ	５０

グループ２に対して、ＭＤＶａｃを、２００mlの上記ホスフェートバッファー希釈剤に１つのアンプルの細胞を希釈することによって調製された０．２ml容積の皮下投与量として投与した。グループ３に対しては、粉末化したアセマンナン（ＡＣＭ）を無菌のバッファーに懸濁し、これによって０．２mlの皮下注射剤１００μｇ／鳥投与量で得た。マレク病ワクチンとアセマンナンの両方を投与するグループ４では、マレク病のワクチン成分を２×の濃度に懸濁し、無菌のバッファーの２×アセマンナン懸濁液と１：１で混合した。０．２mlが皮下投与される場合、これは、理論的にグループ３と同じアセマンナン投与量／鳥と、グループ２と同じＭＤＶａｃ投与量／鳥をプラスしたものになる。ＮＤＶ及びＩＢＶは、スプレー塗布でグループに投与され、これによって、鳥に、２．０$\log_{10}$$EID_{50}$ＩＢＶと、４．２$\log_{10}$$TCID_{50}$ＮＤＶをプラスしたものの理論投与量が投与された。全ワクチン接種は日齢で行われ、次いで鳥を、ウイルス攻撃されるまでグループに分離して収容した。

ワクチン接種後２１日に悪性のＮＤＶ若しくはＩＢＶウイルス攻撃系で鳥をウイルス攻撃した。処置グループ当たりトータルで１０羽の鳥を４つのプレキシガラスのアイソレーターの各々に置き、アイソレーターの内の２つをＮＤＶでウイルス攻撃し、２つをＩＢＶでウイルス攻撃した。これにより、$4 log_{10}$ＴＣＩＤ$_{50}$／鳥のＮＤＶ　ＧＢテキサスの理論投与量で処置グループ当たり２０羽の鳥が筋肉内的にウイルス攻撃され、Ｍ４１の$4 log_{10}$ＥＩＤ$_{50}$／鳥の理論投与量で処置グループ当たり２０羽の鳥が眼内的にウイルス攻撃されたことになる。各々の処置グループの内、１０羽の鳥はウイルス攻撃する前にワクチン接種をしなかった。ＮＤＶウイルス攻撃の結果をウイルス攻撃後４０日間の幣死率として記録した。ＩＢＶウイルス攻撃は、９Ｃ．Ｆ．Ｒ．１１３．１６２（ｃ）（３）に開示されたように、ウイルスの再分離によって評価した。

ＮＤＶウイルス攻撃の結果を表８に示した。グループ４が最も高いパーセントの防御を示し、次にグループ３が続いた。ワクチン接種されない対照は有意に冒され、ワクチン攻撃後の１４日間の評価期間に鳥が生き延びることはなかった。

ＩＢＶワクチン攻撃の結果も表８に与えられている。再度アセマンナン処置されたグループは、アセマンナン処置されなかった鳥に比べて僅かに高いパーセンテージの防御を示した。ワクチン接種されなかった対照は、有意に（１００％）冒された。

表８

ＮＤＶ及びＩＢＶウイルス攻撃の結果

	ＮＤＶウイルス攻撃		ＩＢＶウイルス攻撃	
	死亡数／#		死亡数／#	
グループ	Chall.	防御％	Chall.	防御％
(1)ワクチン接種せず	２０／２０	０	２０／２０	０
(2)MDV/NDV+IBV	７／２０	６５	４／２０	８０
(3)ACM/NDV+IBV	３／２０	８５	０／２０	１００
(4)MDV+ACM/NDV+IBV	２／２０	９０	３／２０	８５

Chall.=ウイルス攻撃された数。ACM＝アセマンナン；MDV＝MDVac（マレク病ワクチン）

例１１

生きた日齢ワクチンとして投与されるニューカッスル病ウイルス及び感染性気管支炎ウイルスにおけるアセマンナンの効果

約４２０日齢のひなを以下のグループに分配した（Ａｃｍ＝アセマンナン）。

グループ	処置	＃ｂｄｓ
１	ＭＤＶａｃ	１４０
２	ＭＤＶａｃ／ＮＤＶ＋ＩＢＶ	１４０
３	ＭＤＶａｃ＋ＡＣＭ／ＮＤＶ＋ＩＢＶ	１４０

皮下投与は、例１０（上記参照）で開示された同様の成分投与量より成る。鳥に識別の目的で帯を結び、グループ１をアイソレーションに置いた。残りの２つのグループをそれぞれ１５羽ごとの８つのレプリケート（replicate）及び２０羽の１つのレプリケートに分配した。ＮＤＶ＋ＩＢＶのスプレーワクチン接種のために、各々のグループから１のレプリケートを、スプレーチャンバーに置き、例１０で開示したのと同様に、１羽当たりの成分投与量を用いてワクチン投与した。ワクチン接種後２１日目まで鳥をグループに再度隔離し、分離した。各々のグループからの２０羽の鳥のレプリケートから、血清の収集のた

めに血を取った。各々のグループの残りのレプリケートの内、上述のように４つをＮＤＶＧＢ　テキサスでウイルス攻撃し、４つをＩＢＶ　Ｍ４１でウイルス攻撃した。各々のウイルス攻撃が完了したときに、３つのもとのワクチン接種グループの各々の１つのレプリケートが、４つのアイソレーターの各々に現れるように鳥を配分し、上述したように各々の作用薬に対するウイルス攻撃を評価した。

ＮＤＶウイルス攻撃の結果は、表９中のレプリケートによって、及び表１０（以下参照）中のグループ全体によって表される。４つのレプリケートの内３つでアセマンナン処置したグループ（グループ３）が、未処理のグループ（グループ２）よりも高いパーセンテージの制御を示した。第４のレプリケートでは、２つが等しかった。アセマンナン処理したグループのグループ全体の防御率は、未処理のグループよりも２０％高かった。ワクチン接種されなかった対照の鳥（グループ１）は全て１４日間の観察期間中に死亡した。

ＩＢＶウイルス攻撃の結果もまた、表９及び１０に与えられている。４つのレプリケートのうち２つのみを試験した。１組のレプリケートに対して、アセマンナン処置したグループはその未処理の片方よりも能力が優れていたが、他の組のレプリケートではそうではなかった。試験された２７のワクチン接種されない対照の鳥のうち、わずか１羽のみが冒されなかった。

表９

レプリケートによって表されたＮＤＶ及びＩＢＶウイルス攻撃の結果

グループ	ＮＤＶウイルス攻撃 死亡数／# Chall.	防御％	ＩＢＶウイルス攻撃 死亡数／# Chall.	防御％
レプリケート１				
(1)MDV	１５／１５	0	１３／１４	7
(2)MDV/NDV+IBV	4／１５	７３	3／１３	７７
(3)MDV+ACM/NDV+IBV	0／１５	１００	3／１３	８０
レプリケート２				
(1)MDV	１５／１５	0	１３／１３	0
(2)MDV/NDV+IBV	5／１５	６７	3／１５	８０
(3)MDV+ACM/NDV+IBV	1／１５	９３	4／１４	７１
レプリケート３				
(1)MDV	１５／１５	0	n．t．	n．t．
(2)MDV/NDV+IBV	1／１５	９３	n．t．	n．t．
(3)MDV+ACM/NDV+IBV	1／１５	９３	n．t．	n．t．
レプリケート４				
(1)MDV	１５／１５	0	n．t．	n．t．
(2)MDV/NDV+IBV	4／１５	７３	n．t．	n．t．
(3)MDV+ACM/NDV+IBV	3／１５	８０	n．t．	n．t．

n.t.＝試験せず。ACM＝アセマンナン；MDV＝MDVac（マレク病ワクチン）

表１０

グループ全体によって表されたＮＤＶ及び

ＩＢＶウイルス攻撃の結果

Ａ．ＮＤＶウイルス攻撃

グループ	死亡数／# Chall.	防御%
(1)MDV	６０／６０	0
(2)MDV/NDV+IBV	１４／６０	７７
(3)MDV+ACM/ NDV+IBV	５／６０	９２

Ｂ．ＩＢＶウイルス攻撃

グループ	死亡数／# Chall.	防御%
(1)MDV	２６／２７	4
(2)MDV/NDV+IBV	６／２８	７９
(3)MDV+ACM/ NDV+IBV	７／２９	７６

Chall.=ウイルス攻撃された数。ACM＝アセマンナン；MDV＝MDVac(マレク病ワクチン)

血清学的結果は表１１（以下参照）に与えられている。ＮＤＶに対しては、試験されたアセマンナン処置した鳥の５７％が、４より大きいＥＬＩＳＡプロフィールのランクを有しており、一方、ワクチン接種処理されないものでは、その数の半分（２３．５％）のみが、４より大きいＥＬＩＳＡプロフィールのランクを有していた。ＩＢＶに対しては、非常に小さな血清学的応答がそれぞれのグループで見られた。

表１１

ＮＤＶ及びＩＢＶの血清学的結果

	ＮDV ＥＬＩＳＡ		ＩＢＶ ＥＬＩＳＡ	
グループ	平均ＮＤＶ ﾌﾟﾛﾌｨｰﾙ	ﾌﾟﾛﾌｨｰﾙ>4の 鳥の数(%)	平均ＩＢＶ ﾌﾟﾛﾌｨｰﾙ.	ﾌﾟﾛﾌｨｰﾙ>4の 鳥の数(%)
(1)MDV	0	0 (0)	0	0 (0)
(2)MDV/ NDV+IBV	1.88	4/17(23.5)	0.88	2/17(11.7)
(3)MDV+ACM /NDV+IBV	3.71	8/14(57.1)	0.93	1/14(7.1)

Ａｃｍ＝アセマンナン

例１２

ＮＤＶワクチン接種を含む両組の実験から得られるＮＤＶウイルス攻撃の結果は、アセマンナン処置したグループにおいて防御が増加していることを示している。この増加が観測されないのは、例１１のレプリケート４のみであり、この場合は、両ワクチン接種された

グループは等しい防御を示した。スプレーキャビネットを使用した場合には、ワクチン接種の効果に関して本来的に可変性が存在する。この理由として考えられることは、我々が、分離した際に各々のレプリケートグループをワクチン接種し、その結果各々のアセマンナン処置した比較物と処置しなかった比較物が、ＮＤＶ／ＩＢＶワクチンに同様に曝されたことである。我々がレプリケートで見た傾向は、ワクチン接種がより効果的になる（グループ３参照）につれて、アセマンナン処置したグループと処置しなかったグループとの間の差がより小さくなることである。

ＩＢＶウイルス攻撃の結果は可変性である。例１０において、アセマンナン処置したグループにおいて防御が増加したようであるが、これは例１１の場合は増加しなかった。これは、ウイルスの再分離によってウイルス攻撃の防御を評価することが、斃死率によるよりも本来的により可変性があるということでありうる。

例１１におけるＥＬＩＳＡの血清学的結果は、鳥をアセマンナンで処置した場合に、スプレーワクチンのＮＤＶフラクションに応答する抗体が増加し、可能性として、防御の増加が観測されたことに寄与していることを示唆している。ＩＢＶに対するＥＬＩＳＡの結果は、一般に非常に低く何れにも使用し得ない。

日齢でのアセマンナンを用いた処置で導き出されることは、スプレー投与された組合せワクチンのＮＤＶ　Ｂ１Ｂ１成分に対する血清学的及び防御的応答が、アセマンナンで処置されなかった対照グループに比較して増加しているということである。

日齢でのアセマンナンを用いた処置は、スプレー投与されたワクチンのＩＢＶ　Ｍａｓｓ．成分によって誘導される血清学的及び防御的応答に関して、僅かな効果しか有しないか、全く効果がなかった。

例１３

アセマンナンの添加を行うか、又は行わない条件で、日齢ＳＰＦ鶏におけるBursine２及び細胞関連ＨＶＴワクチンの妨害試験

感染性嚢包性疾患ウイルスワクチンの調製

ホスフェートバッファー希釈剤（上述したもの）中の感染性嚢包性疾患ウイルス（ＩＢＤＶ）Bursine２（放出力価（release titer）：鳥１羽の投与量当たり$10^{4.7}$ＴＣＩＤ$_{50}$）及び七面鳥のヘルペスウイルスＦＣ１２６（放出力価：鳥１羽の投与量当たり９，４１５プラーク形成単位）を使用した。Bursine２は、Phil Lukert, University of Georgiaから入手した。

再懸濁したＨＶＴワクチンを力価測定の前に２時間冷凍温度に保持した。プラーク形成単位の力価測定を２次胎芽繊維芽細胞（ＣＥＦ）単層で行った。感染性嚢包性疾患ウイルスを一次ＣＥＦで力価測定した。

ワクチン接種用の保存物を以下のようにして調製した。

ストックＡ．　ＨＶＴのバイアル１個を解凍し、１００ミリリットル（ml）のホスフェートバッファに希釈した。

ストックＢ．　Bursine２系のバイアル１個をホスフェートバッファを用いて５０mlに再構成した。

ストックＣ．　１mlのアセマンナン溶液当たり２．０ミリグラムが、アセマンナン粉末を再水和するためのホスフェートバッファーを用いて調製された。

ストックＤ．　２５mlのストックＢと２５mlのリン酸バッファーとをプラスした。

ストックＥ．　２５mlのストックＢ及び２５mlのストックＣ。

１日齢のＳＰＦレグホンのひなに、以下に示したようなストック溶液の組合せで頚部の首筋に皮下的にワクチン接種した。ワクチン接種は全て０．２mlの容積であった。

ワクチン接種グループ１．ＨＶＴのみ

注射の前に２０mlのストックＡを２０mlの追加のホスフェートバッファーと混合し、次に０．２ml投与量を２０羽のひなに投与した。

ワクチングループ２．Bursine２及びＨＶＴ

２０mlのストックＡを２０mlのストックＤと混合し、次に０．２ml投与量を４０羽のひなに投与した。

ワクチングループ３．Bursine２のみ
２０mlのストックＤを、０．２mlの投与量で２０羽のひなのグループに注射する前に追加の２０mlホスフェートバッファーと混合した。
ワクチングループ４．Burinse２－アセマンナン
２０mlのストックＥを追加の２０mlホスフェートバッファーと混合し、次いで０．２mlの投与量で２０羽のひなに投与した。
ワクチングループ５．Bursine２－ＨＶＴ－アセマンナン
２０mlのストックＡと２０mlのストックＥを混合し、次に４０羽のひなに投与した。
これらの試験で使用された鳥は、１日齢でワクチン接種されたＳＰＦホワイトレグホンであった。同じ孵化で得られた４０羽のひなを、ウイルス攻撃の対照としてプレキシガラス分離ユニットに収容した。
嚢包性疾患のウイルス攻撃用ウイルスを、National Veterinary Services Laboratory, Ames, Iowaから入手した。該ウイルスをトリプトースホスフェートブロスに１：５で希釈し、$10^{1.4}EID_{50}$の鳥点眼用供給物（dose）を得た。マレク病ウイルス攻撃用ウイルスはＲＢ１Ｂ／１７Ｔ５５系（ＣＰ１，ＴＣＰ３，ＣＰ１，ＴＣＰ４継代）であった。これらの材料は、０．２ミリリットル当たり２．８×$10^{4.0}$プラーク形成単位（ｐｆｕｓ）の力価を有していた。該ウイルスを、鳥１羽のウイルス攻撃用の投与量当たり１０００ｐｆｕｓを含有するようにホスフェートバッファーに希釈した。
ワクチン接種の後５日目に、２０羽の対照、ワクチングループ１、並びにワクチングループ２及び５から各々得た２０羽の鳥を、マレク病ウイルスのＲＢ１Ｂ１分離物を用いて腹腔内的（ＩＰ）にウイルス攻撃した。ワクチン接種後１４日目に１０羽の鳥が、血清中和（ＳＮ）力価をＩＢＤＶベータ法で測定するためにワクチングループ２、３、４、５及びウイルス攻撃しなかった対照から採血された。グループ２、３、４、５及び対照から得た各々２０羽の鶏を引き続きＮＶＳＬ　ＩＢＤＶウイルスで点眼によってウイルス攻撃した。ＩＢＤＶでウイルス攻撃された鳥を１１日後に殺し、重さを量り、これらの嚢包を除去し、臨床的な嚢包の萎縮の値として体重に対する嚢包の重さの割合を求めるために重さを量った。試験の４８日目までに死んだＭＤＶウイルス攻撃された鳥は、全て検死を行い、臨床的障害を記録した。生き残ったものは、４８日目に殺し、障害を記録した。
ＩＢＤＶに対する循環抗体力価をＳＮ試験で評価した。
マレク病免疫を防御指針（ＰＩ）として記録し、各々のグループの成績を対照の感染性レベルと比較した。防御指針＝（（（陽性の対照％）－（陽性のワクチン接種体％））／（陽性の対照））×１００。
嚢包性疾患の防御は、嚢包の萎縮を基にして免疫された鳥のパーセンテージとして記録した。これは、嚢包性指針（bursal index）（ＢＩ＝（嚢包の重量／体重）×１００）を用いて判断された。２．５よりも大きいか又は等しい値で防御されたものとした。
マレク病に対する死亡後（post mortem）の臨床的障害の評価結果を、防御指針として表１２（以下参照）に示した。対照グループ（これをゼロのＰＩと定義した。）は臨床的障害に対して９４％陽性であった。ＨＶＴ、ＨＶＴプラスBursine２、又はＨＶＴ－Bursine２－アセマンナン混合物を投与された鳥は、それぞれ８３、８９、９５パーセント臨床的障害を受けなかった。これらの指標は８２、８８、９５の防御指針に補外された。

表１２

マレク病防御指針

処置	防御指針
ＣＡ　ＨＶＴ	８２
ＣＡ　ＨＶＴ－Ｂｕｒｓｉｎｅ２	８８
ＣＡ　ＨＶＴ－Ｂｕｒｓｉｎｅ－アセマンナン	９５
対照	0

ＣＡ＝細胞関連（ｃｅｌｌ ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ）

嚢包性疾患の結果は、括弧で示された各々のグループにおいて臨床的に免疫された鳥のパーセンテージで、体重に対する嚢包の比として表１３に示されている。試験された各々のワクチンに対して、アセマンナンを添加すると防御の数値の増加があった。Bursine２のみを投与された鳥は、鳥１羽の投与量当たり１００マイクログラムのアセマンナンを添加すると１００パーセントの免疫に比較して８５％防御された。Bursine２－ＨＶＴの組み合わせで、アセマンナンを添加したグループは、７９％の臨床的防御の有利さに対して１００パーセントを保持した。

表１３

嚢包性疾患の嚢包対体重比

処置	B/BW比±S.D.	ﾊﾟｰｾﾝﾄ免疫
Bursine2	3.9±1.5	85
Bursine2-ｱｾﾏﾝﾅﾝ	4.9±1.6	100
Bursine2-HVT	4.0±1.6	79
B2-HVT-ｱｾﾏﾝﾅﾝ	5.0±1.5	100
対照	1.1±0.3	0

B/BW＝嚢包／体重比、B2＝Bursine2

嚢包性指針（嚢包対体重比）の平均値±各々のワクチン接種グループの平均の一標準偏差（one standard diviation）は、Bursine２、Bursine２-アセマンナン、Bursine２－ＨＶＴ、及びBursine２－ＨＶＴ－アセマンナンに対してそれぞれ３．９±１．５、４．９±１．６、４．０±１．６及び５．０±１．５であった。独立のサンプルの個々の嚢包対体重比（以下の表１４参照）のStudentのＴ－検定分析は、Bursine２のみに相当するグループには有為な差がないことを表しているが、Bursine２－ＨＶＴの比較は、アセマンナングループが９５パーセントの信頼性レベルで有意性においてよりよいことを示している。

表１４

個々の嚢包対体重比

Bursine 2	Bursine 2+ アセマンナン	Bursine 2[a]+ HVT	B-2+HVT[a]+ アセマンナン	C
1.7	5.1	1.7	7.0	1.3
5.1	4.3	4.5	7.4	1.4
3.1	5.2	1.4	5.6	0.7
2.9	5.5	2.2	6.0	1.6
3.1	4.3	5.5	8.2	0.5
3.1	4.0	3.5	7.3	1.2
1.2	5.0	3.2	4.5	1.0
3.0	3.9	5.3	4.3	1.3
4.5	4.0	4.6	4.6	0.8
4.7	4.8	5.6	4.7	1.4
2.0	3.6	5.1	3.2	1.1
5.3	8.4	2.9	4.5	0.6
3.6	6.2	5.0	5.2	1.4
4.7	9.0	5.2	3.3	1.1
6.9	3.5	6.5	3.3	1.3
5.7	2.9	2.8	3.7	1.3
2.7	4.4	3.8	4.4	1.0
4.1		6.1	4.3	1.2
4.3		1.7	4.1	1.0
6.3			5.3	
平均±ＳＤ				
3.9±	4.9±	4.0±	5.0±	1.1±
1.5	1.6	1.6	1.5	0.3

a　これらのグループは有意に差があった。Ｔ＝2.075998。Ｃ＝対照。

血清学的な結果は、表１５（以下参照）に示されている。ＳＮ力価は臨床的障害からの防御と何れの相互関係パターンにも従わなかった。嚢包性ＳＮ力価は、Bursine２－ＨＶＴ－アセマンナンで最も大きく（６９のＧＭＴ）、アセマンナンを用いない組み合わせを投与された鳥で最も低かった（３０のＧＭＴ）。１価のＩＢＤＶを投与された鶏では、アセマンナンを用いないグループは、添加をした場合の３５に比べて５６のＧＭＴを有していた。対照は全て

≥ 2

であった。

表１５

嚢包性血清学

処置	ＳＮ[b]
Bursine 2	56
Bursine 2-ACM	35
Bursine 2-HVT	30
Bursine 2-HVT-ACM	69
対照	≤2

ａ＝算術平均プローフィールランク

ｂ＝幾何平均中和力価

Bursine２及び細胞関連ＨＶＴワクチンが全フィールド投与量で投与された場合、免疫の妨害は、Bursine２及び細胞関連ＨＶＴワクチン間で全く観測されなかった。

一価のBursHine 2ワクチン及びＨＶＴとの組み合わせへのアセマンナンの添加は、アセマンナンを含有する一価の処置に対して、及び組み合わせワクチンにおけるＨＶＴに対して有利な数知的効果を生じる。組み合わせのBursine２は、アセマンナンを用いない場合よりもアセマンナンを用いた方が（９５パーセントの信頼性で）より有意性においてよかった。

例１５

アセマンナンを使用若しくは使用しない場合の子豚のワクチン接種／細菌攻撃試験

１７０匹の乳のみの１週齢子豚をJensen Brothers Inc., Thronton, IAから購入した。これらは全て、小割り板で３部屋に仕切ったフロアーパンに、１パン当たり２０匹の子豚を含むように収容した。

１６～２２グラムの１２０匹のＣＦ１の白色マウスをHarlan Sprague Dawleyから購入した。マウスは、ボックス当たり８匹のマウスのグループで収容した。

グループ当たり１０匹の動物がいるが、試験を完了するのに多数の豚が必要であるので、各々の５匹の豚のレプリケートセットを生まれてから、１週間別にして選択した。レプリケートの内、豚をワクチン接種又は対照グループとしてランダムに割り当てた。ワクチンをアセマンナンに５mg／投与量で混合するか、又は混合しなかった。更にアセマンナンを、１日齢の時に選択された１０匹の豚のグループに関して、ワクチン接種前の免疫刺激剤として評価した。異なったワクチン及び対照グループを表１にリストした。豚を１週齢でワクチン接種し、再度３週齢でワクチン接種した。最初のワクチン接種は、肩と耳の間の首の部分に、０．２ml投与量の細菌ワクチンとして筋肉内的に行われた。２回目のワクチン接種は反対側の首に同様に行われた。

表１６

実験グループ及びワクチン組成物[a]

ワクチングループ	PMD[b]濃度	アセマンナン[c]
PMD-1	8.7	不使用
PMD-2	9.0	不使用
PMD-3	9.5	不使用
3-種+D-1[d]	8.7	不使用
3-種+D-2	9.0	不使用
3-種+D-3	9.5	不使用
PMD-1A	8.7	5mg
PMD-2A	9.0	5mg
PMD-3A	9.5	5mg
3-種+D-1A	8.7	5mg
3-種+D-2A	9.0	5mg
3-種+D-3A	9.5	5mg

3-種+D+Tox[e]	9.0	不使用
3-種	不使用	不使用
新生児アセマンナン[f]	不使用	5mg, 3X
(3-種+D-2)	9.0	不使用
ワクチン接種されず細菌攻撃したもの[g]	不使用	不使用
ワクチン接種されず細菌攻撃されなかったもの[h]	不使用	不使用

---

a 細菌ワクチンはすべて以下の成分を含有している。
a．水酸化アルミニウム（アルハイドロゲル（Alhydrogel)'８５'）
０．７５％（Al_2O_3として）
b．ホルムアルデヒド ０．２％
残り
c．食塩水 Q．S．０．２mℓ投与量まで

b PMD＝パスツレラムルトシダ（Pasteurella multocida），ﾀｲﾌﾟD。リストされた価は投与量当たりLog_{10}の濃度（ＣＦＵ）である。

c アセマンナンは、アロエベラ（Aloe vera）植物から抽出されたアセチル化マンノースポリマーである。これを乾燥した粉末として、投与量当たり５mgの最終量で補充及び添加した。

d 既にリストした成分に加えて３－種（3-Way）の細菌ワクチンも含まれる。
a．Bordetellla bronchiseptica３．０×10^9ＣＦＵ／投与量
b．Erysipelothrix rhusiopathiae１．０mℓ／投与量（rhusiopathiaeは未精製培養に関して１３．１の濃度因子を有していた。）
c．Pasteurella multocida、タイプA ３．０×10^9ＣＦＵ／投与量

e PMD－２のブロスに存在する量のトキソイドを与えるために、(標準製剤中に既に存在する任意のトキソイド活性に加えて）PMD培

養の、不活性化され、濃縮されたブロス上清（supernate）を加えた。

f 一腹の１０匹の豚に、１、３、及び５日齢でアセマンナンの食塩水懸濁物（５mgs／投与量－１ml）を与えた。３－種＋２－Ｄ細菌ワクチンを１及び３週齢で、レプリケート２の他の豚に対するように与えた。

g ワクチン接種されなかったものは、他の豚のように血を取られたが、他の注射はされなかった。細菌攻撃された豚をワクチン接種され、細菌攻撃された豚と混合した。

h ワクチン接種されず、細菌攻撃されなかった豚は、他の豚の細菌攻撃後に、他の豚から分離しておいた。模擬細菌攻撃は全くされなかった。

２回目のワクチン接種後１週間に、豚を、１：１０のPromAce:Vetalar［ケタミン（Ketamine）］混合物、約１．０ml／１０　１ｂ体重で鎮静させた。豚が静かになったとき、２ml／鼻孔量の細菌攻撃用懸濁液を鼻孔内挿管法で投与した。豚を、鎮静から回復するまで断続的に観察した。

２００mlのＸ＋６継代のP. multocidaタイプＤ（ＰＭＤ）、Ｐ１６８３－Ｔ３系を、１０リットルのDifcoBitek Fermentationブロス（BT）に接種した。培養物を１．４５の光学密度（OD_{660nm}）（これは４．３×10^9ＣＦＵ／mlを含有する。）まで発酵させた。該培養物を、２０．０mlのホルムアルデヒドを加え、３７℃で１時間撹拌し、次いで４℃で５日間撹拌して不活性化した。不活性化された培養物を、Amicon DC-10の１００，０００ダルトン（分子量）を除去する中空繊維フィルターで５．３倍に濃縮した。細菌ワクチンの成分を表１６（上記参照）に与えた。要するに、アセマンナンを用いない多成分ワクチンでは、ＰＭＤ濃縮物を５、１０、及び３０×10^8ＣＦＵ／投与量で変化させたが、他の成分は一定に保った。同じ濃度のＰＭＤを、単成分「参照（reference）」ワクチンに使用した。加えて、同様のワクチングループを５mg／投与量でアセマンナンを用いて調製した。

チオグリコレート及びトリプチックソイ（tryptic soy）の両方のブロス中において、不活性化を考慮する前１４日間２５℃及び３７℃で、１mlの１４の細菌ワクチンの各々を培養することによって不活性化を評価した。

細菌ワクチンの安全性を、８匹のマウスに０．５mlの与えられた細菌ワクチン製剤を皮下的に接種することによって評価した。マウスを、注射に起因する逆効果に対して評価した。

Ｘ継代のＰＭＤ系Ｐ１６８３－Ｔ３を、７５．０mlのＢＴブロスを含有する２つのフラスコに接種した。培養物を、１分当たり１２５周期で振盪しながら４．５時間３７℃で培養した。１．６５のOD_{660nm}で、培養物をＢＴブロスに１：４で希釈し、使用するまで凍らせるように冷却した。生存していた細胞数によって、細菌攻撃物が、２つのレプリケートに対して４．５×10^9及び５．６×10^9ＣＦＵを含有することが示された。

前面の静脈から以下の時に子豚の血液を取った：これは、１回目のワクチン接種時（Ｖ１）、２回目のワクチン接種時（Ｖ２）、細菌攻撃時（Ｃ＋０）、検死時（Ｃ＋２１）である。全ての場合に、血液は、任意の細菌ワクチン、鎮静剤、細菌攻撃剤（challenge）、又は安楽死のための溶液が投与される前に採取された。血液サンプルを、４℃で２０分間２５０Ｃ×ｇで遠心した。血清を集め、５６℃で３０分間熱で不活性化し、試験するまで－２０℃で保存した。

酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）を全ての血清サンプルで行い、細菌ワクチンの抗原成分に対する抗体応答を評価し、成分間の妨害を検出する手助けとした。

豚をワクチン接種の逆効果に対して、及び引き続きの細菌攻撃に起因する臨床症状に対し

て観測した。ワクチン接種グループ及び檻当たりの豚が多数いるので、与えられた豚の特別な徴候は記録されなかった。３週間の観測期間に死んだ豚を検死し、死の特徴を評価した。細菌攻撃に起因しない原因で死亡した豚は、更なる評価から除外した。生き残った豚を、細菌攻撃後三週間で、過剰投与量のナトリウムペンタバルビトールで安楽死させ検死した。

検死の時に、肺の障害及びワクチン接種部位の反応を記録し、点数化（scored）した。鼻づらを鼻孔から眼窩まで除去し、ラベルし、後に第二小臼歯と同じ高さで、二分の一インチの切片に帯鋸でひいた。切片をミリメートルスケールに並んで写真に撮り、引き続き５×７インチのカラー写真をネガからプリントした。

点数システムは、全て表１７（以下参照）に与えられている。甲介骨の萎縮の激しさを、５×７のプリントから形態測定的に評価した。形態測定プロトコルは、Collinsら（豚の萎縮性鼻炎の診断のための外耳の萎縮の指針としての甲介骨の周辺の長さの比（Turbinate Perimeter ratio as an indicator of conchal atrophy for diagnosis of atrophic rhinitis in pigs.）Am. J. Vet. Res., 50（3）, 1989:421-424）によって開示されているものである。処置グループの平均の甲介骨領域の比（ＴＡＲ）及び甲介骨周辺の長さの平均（ＴＰＲ）の有為な差を分析の変化によって分析した。

表１７

評価系

Ａ．肺点数システム：全葉（lobe）を評価した（４ｐｔｓ／全葉；全部で２４ｐｔｓ）

１．　葉の部分的優集群（＋１）

２．　葉の全優集群　（＋１）

３．　膿瘍　（＋１）

４．　繊維性肋膜炎　（＋１）

Ｂ．ワクチン接種部位の反応：（２つの部位）

１．　軽い繊維性の筋と関係のないもの－０ポイント

２．　小さなもの（＜１cm）－１ポイント

３．　１cm×３cmまで－２ポイント

４．　＞１cm×３cm－３ポイント

５．　膿を伴う膿瘍－４ポイント

調製された細菌ワクチンは、安全性に関する９Ｃ．Ｆ．Ｒ．ガイダンスに従ってマウスを接種することによって示されるような安全性であった。アセマンナンを含有した細菌ワクチンは微生物の混合培養物で汚染された。しかしこのワクチンは、ワクチン系に関して不活性であるようである。

表１８及び１９（以下参照）に、異なったグループに対する細菌攻撃の臨床的及び全病理学的結果をまとめた。肺の障害は全グループで穏和であった。同様に、死亡率は低かった。ワクチン接種部位の反応は一般的に穏やかであるが、最も激しい反応は最も大きなバイオマスを用いたワクチンで起こる傾向があった。これらのうち、アセマンナンが存在する場合でも、障害は最も激しかった。アセマンナンを含有するワクチンでの注射から得られる幾つかの膿瘍は、直径で５から１０cmであった。

表１８

Pasteurella multocida、タイプＤによるワクチン接種及び細菌攻撃で得られた斃死率及び検死による全障害

ワクチングループ[a]	肺点数[b]	ワクチン接種反応[c]	斃死率[d]
PND-1	0.00	0.44/0.00	1/9
PMD-2	0.00	0.00/0.22	0/10
PMD-3	1.20	0.70/0.80	0/10
3-種+D-1	0.50	1.20/1.00	0/10
3-種+D-2	0.00	0.56/1.33	1/10
3-種+D-3	0.00	1.75/2.00	2/10
3-種+D+Tox	0.22	0.22/1.00	1/10
3-種	2.67	1.00/1.11	1/10
ワクチン接種せず細菌攻撃されたもの	0.56	---/---	2/11
ワクチン接種せず細菌攻撃されなかったもの	0.11	---/---	1/10

a　ワクチングループは表１６に示してある。２つのレプリケートグループが組み合わされた。アセマンナングループは表１９(以下参照)にある。

b　肺障害の評価方法は、表１７にある。最大点数は２４．０である。価は、グループの豚の数の平均である。

c　ワクチン反応の評価方法は、表１７に示してある。最大数値は部位当たり４．０である。価は１回目／２回目のワクチン接種部位の平均である。

d　比は、グループの数について、細菌攻撃後に死んだ数を表す。

表１９

Pasteurella multocida、タイプＤによるワクチン接種及び細菌攻撃で得られた斃死率及び検死率による全障害；アセマンナンが投与量当たり５mgワクチン中に存在した。

ワクチングループ[a]	肺点数[b]	ワクチン接種反応[c]	斃死率[d]
PND-1A	0.00	0.13/0.00	0/10
PMD-2A	1.30	0.30/0.20	2/10
PMD-3A	1.33	0.22/0.89	1/10
3-種+D-1A	1.22	0.33/0.11	1/10
3-種+D-2A	0.40	1.40/0.40	0/10
3-種+D-3A	1.63	2.38/2.63	2/10
新生児アセマンナン[e] 3-種+D-2	0.00	1.44/1.67	1/10
Non-Vacc. 細菌攻撃されたもの	0.56	---/---	2/11
Non-Vacc. 細菌攻撃されなかったもの	0.11	---/---	1/10

a　ワクチングループは表１６に示してある。２つのレプリケートグループが組み合わされた。Non-Vacc.＝ワクチン接種されず。

b　肺障害の評価方法は、表１７にある。最大点数は部位当たり２４．０である。価は、グループの豚の数の平均である。

c　ワクチン反応の評価方法は、表１７に示してある。最大数値は部位当たり４．０である。価は１回目／２回目のワクチン接種部位の平均である。

d　比は、グループの数について、細菌攻撃後に死んだ数を表す。

e　１、３、及び５日齢の時に、豚にアセマンナン懸濁液（１mℓ当たり５mg）の注射をした。７及び２１日齢の時に豚に３－種＋Ｄ－２（この時点では追加のアセマンナンは与えない。）でワクチン接種した。

平均甲介骨周辺長さ（ＴＰＲ）及び甲介骨領域比（ＴＡＲ）を表２０及び２１（以下参照）に示した。ワクチン接種されず、細菌攻撃されなかった豚のＴＰＲは、１－試行Ｔ試験（one-tailed T-test）で新生児アセマンナングループ（Ｐ＝０．１）以外の他のグループより有意に
（Ｐ≧０．０５）
大きかった。３つのワクチン（グループＰＭＤ－１、ＰＭＤ－２、及び３－種＋Ｄ－２）は、生きた、毒素原性ＰＭＤでの細菌攻撃に対して有意な防御を与えた。ＰＭＤ－２Ａ及び３－種＋Ｄ－２Ａの両方も有意な防御を示したが、これらの生成物中にアセマンナンが存在してもＴＰＲに関して何れの追加の利益も与えていないようであることに注意しなければならない。ワクチン接種されず、細菌攻撃されない豚のＴＡＲは他の全てのグループよりも有意に大きかった。ＰＭＤ－１及びＰＭＤ－１Ａワクチンのみが、ＰＭＤ細菌攻撃に対するＴＡＲで説明したような有意な防御を示した。再度のアセマンナンの添加はＴＡＲに関して利益があるようには思われない。

表２０

組み合わせレプリケートにおける甲介骨障害の形態測定的評価

ワクチングループ[a]	豚の数[b]	ＴＡＲ 平均＋(S.D.)	ＴＰＲ 平均＋(S.D.)
PND-1	9	0.426 (0.083)[c]	1.096 (0.268)[c]
PMD-2	9	0.396 (0.107)	1.109 (0.201)[c]
PMD-3	9	0.319 (0.094)	0.857 (0.292)
3-種+D-1	10	0.403 (0.108)	1.004 (0.292)
3-種+D-2	9	0.409 (0.109)	1.056 (0.245)[c]
3-種+D-3	8	0.359 (0.072)	0.903 (0.232)
3-種+D+Tox	9	0.379 (0.087)	0.951 (0.177)
3-種	9	0.367 (0.084)	1.000 (0.183)
ワクチン接種せず細菌攻撃されたもの	9	0.347 (0.099)	0.856 (0.282)
ワクチン接種せず細菌攻撃されなかったもの		0.555 (0.100)[d]	1.369 (0.167)[d]

価は、第２臼歯からの鼻づら部分の５×７写真で得られる甲介骨及び鼻腔のデジタル化されたトレースによって評価された、甲介骨領域（ＴＡＲ）及び甲介骨周辺長さ（ＴＰＲ）比の平均＋（標準偏差）である。

a　ワクチングループは表１に示されているようなものである。２つのレプリケートグループを組み合わせた。

b　細菌攻撃後３週間生き残った豚の数。

c　これらの価は、ワクチン接種されず、細菌攻撃された豚に対する同じ列の価より有意によかった（Ｐ≦０．０５；１試行Ｔ試験）。

d　これらの価は、同じ列の他の何れの価よりも有意によかった。

表２１

アセマンナンを含有するワクチンでワクチン接種された豚の組み合わせレプリケートにおける甲骸骨障害の形態測定的評価

ワクチングループ[a]	豚の数[b]	TAR 平均＋／－(S.D.)	TPR 平均＋／－(S.D.)
PND-1A	8	0.412 (0.038)[c]	1.075 (0.141)[c]
PMD-2A	10	0.346 (0.107)	1.011 (0.301)
PMD-3A	9	0.254 (0.033)	0.727 (0.126)
3-種+D-1A	9	0.394 (0.074)	1.002 (0.281)
3-種+D-2A	10	0.410 (0.099)	1.112 (0.233)
3-種+D-3A	8	0.270 (0.070)	0.566 (0.288)
新生児アセマンナン 3-種+D-2	9	0.413 (0.095)	1.204 (0.215)[cd]
ワクチン接種せず細菌攻撃されたもの	9	0.347 (0.099)	0.856 (0.282)
ワクチン接種せず細菌攻撃されなかったもの	9	0.555 (0.100)[e]	1.369 (0.167)[e]

価は、第２臼歯からの鼻づら部分の５×７写真で得られる甲介骨及び鼻腔のデジタル化されたトレースによって評価された、甲介骨領域（ＴＡＲ）及び甲介骨周辺長さ（ＴＰＲ）比の平均＋（標準偏差）である。

a ワクチングループは表１６に示されているようなものである。２つのレプリケートグループを組み合わせた。アセマンナンは、存在する場合には、投与量当たり５mgの濃度であった。新生児アセマンナングループに、１、３、及び５日齢で、５mgを懸濁液として与え、次いで３－種－Ｄ－２ワクチンを用い７及び２１日齢でワクチン接種した。

b 細菌攻撃後３０週間生き残った豚の数。

c これらの価は、ワクチン接種されず、細菌攻撃された豚に対する同じ列の価より有意によかった（Ｐ≦０．０５；１試行Ｔ試験）。

d これらの価は、ワクチン接種されず、細菌攻撃されなかったグループの価と有意な差がなかった。

e これらの価は、同じ列の注”ｄ”で記載されたものを除き、他の何れの価よりも有意によかった。

細菌ワクチン－トキソイドの全フラクションに関する細菌ワクチンの全組み合わせにおいて、微生物成分の各々に対するＩｇＧ抗体応答を検出するためにＥＬＩＳＡ試験を行った。データを表２２（以下参照）に示した。このデータは、細菌ワクチン中のＰＭＤ応答に関して、B. Bronchiseptica、P. multocida、及びE. rhusiopathiae成分によって妨害されないことを示している。１価のＰＭＤワクチンはより低い２回の投与量で、萎縮性鼻炎に対して有意な防御を示すが、これらの２つのワクチンに対する抗体応答は、ＰＭＤ－１

ワクチンの場合に細菌攻撃をした後でも弱い。細菌ワクチンの３つの組み合わせの抗体応答は、表２２（以下参照）に記載された他の何れのワクチンよりも一貫して高かった。

表２２

Pasteurella multocida、タイプＤ（ＰＭＤ）を含有する細菌ワクチンでワクチン接種された豚におけるＰＭＤに対する血清学的応答

ワクチングループ[a]	Ｖ１	Ｖ２	Ｃ＋０	Ｃ＋２１
PND-1	0.892	0.727	0.751	0.701
PMD-2	0.969	0.806	0.744	0.920
PMD-3	0.818	0.758	0.696	1.088
3-種+D-1	0.977	0.717	1.305	1.143
3-種+D-2	0.845	0.721	1.039	1.022
3-種+D-3	0.669	0.819	1.029	1.117
3-種+D+Tox	1.072	0.762	0.934	0.927
3-種	0.906	0.776	0.894	1.010
ワクチン接種せず細菌攻撃されたもの	0.835	0.612	0.697	1.025
ワクチン接種せず細菌攻撃されなかったもの	0.800	0.614	0.791	0.914

比較は、ＰＭＤを用いない細菌ワクチン及びワクチン接種されなかった豚からの血清に対して行い、他の微生物成分及びＰＭＤ間の妨害を評価した。血清を、１回目のワクチン接種の時（Ｖ１）、第２回目のワクチン接種の時（Ｖ２）及び検死の時（Ｃ＋２１）に採取した。試験ウェルにコートされた、細胞を全て超音波で分解したＰＭＤ抗原でＥＬＩＳＡ試験することによって応答を測定した。

a　ワクチングループは表１６にリストされているものである。２つのレプリケートグループを組み合わせた。

表２３（以下参照）に示されるように、細菌ワクチンの組み合わせで２つのより高濃度のＰＭＤにおいてＰＭＡを用いたＰＭＤによる妨害があった。しかし、これは、３－種＋Ｄ－２と同じＰＭＤの濃度を有する３－種＋Ｄ＋Ｔｏｘワクチンにおいて、ＰＭＡ応答が、３－種ワクチンに対する応答と同じであるから、例外的であるだろう。Bordetella及びErysipelothrixの応答は、全てのワクチンで良好であり、妨害はないようであった。

表２３

Pasteurella multocida、タイプA（PMA）Brodetella bronchiseptica（ＢＢ）、及びErysipelothrix Rhusiopathiae（E. ＲＨＵ）の成分を含有する細菌ワクチンを接種した豚のこれらの微生物に対する血清学的応答（ＩＧＧ）

ワクチングループ[a]	Ｖ１	Ｖ２	Ｃ＋０	Ｃ＋２１
PND-1				
PMA	0.675	0.669	1.245	1.277
BB	0.982	0.650	1.353	1.684
E. rhu	1.012	0.847	1.317	1.270
3-種+D-1				
PMA	0.581	0.650	1.171	1.067
BB	0.899	0.626	1.282	1.766
E. rhu	0.887	0.883	1.262	1.274
3-種+D-2				
PMA	0.556	0.756	0.665	1.123
BB	0.667	0.730	1.362	1.686
E. rhu	0.860	0.774	1.327	1.317
3-種+D-3				
PMA	0.439	0.668	0.634	1.194
BB	0.723	0.785	1.576	1.794
E. rhu	0.991	0.651	1.255	1.218
3-種+D+Tox				
PMA	0.675	0.758	1.179	0.904
BB	1.042	0.900	1.608	1.726
E. rhu	0.726	0.793	1.138	1.015
3-種				
PMA	0.775	0.664	0.957	1.589
BB	0.992	0.883	1.702	1.962
E. rhu	1.211	0.890	1.112	1.040

ワクチン接種せず細菌攻撃されなかったもの				
PMA	0.460	0.546	0.759	1.253
BB	0.921	0.637	0.778	0.668
E. rhu	0.860	0.547	0.396	0.217

ＰＭＤを用いた細菌ワクチン、及びワクチン接種されなかった豚からの血清とを比較し、これらの他の微生物成分を用いたＰＭＤによる妨害を評価した。血清を、１回目のワクチン接種の時（Ｖ１）、第２回目のワクチン接種の時（Ｖ２）及び検死の時（Ｃ＋２１）に採取した。試験ウェルにコートされた、細胞を全て超音波で分解した適切な抗原でＥＬＩＳＡ試験することによって応答を測定した。

a ワクチングループは表１にリストされているものである。２つのレプリケートグループを組み合わせた。

例１６

アセマンナンを使用若しくは使用しない子豚のワクチン接種／細菌攻撃試験

試験されたＰＭＤの最小防御投与量は、萎縮性鼻炎の障害の減少によって決定された５×１０^{8}ＣＦＵであった。ＴＡＲ及びＴＰＲの両方の価は、この結果を支持している。１×１０^{9}の投与量もＴＰＲで示されるように防御的であった。ワクチン接種又は細菌攻撃の直接の効果は、肺障害には全くなかった。これらの観測によって、関連の細菌ワクチンにおいて５×１０^{8}ＣＦＵ、及び組み合わせにおいて１×１０^{9}ＣＦＵの投与量が支持される。

Brodetella、Erysipelothrix、及びタイプＡPasteurellaによるPasteurellaタイプＤとの妨害は、ＰＭＤに対する血清学的応答に反映される。しかし、５×１０^{8}ＰＭＤを用いた細菌ワクチンの組み合わせにおいてＴＰＲ又はＴＡＲに対する０．０５レベルでの有為さが失われており、これは、穏和な程度の妨害があることを示唆している。ＰＭＤの高投与量（３×１０^{9}ＣＦＵ）では、明らかに防御応答を阻害している。これは、我々が以前に同じように見た現象である。高投与量での妨害の原因はよくわからないが、この結果から、製品系（Production serials）に過剰のＰＭＤ（１×１０^{9}ＣＦＵよりも多い量）を加えるには注意が必要である。細菌ワクチンにアセマンナンを添加することは、防御応答を誘導するにのには必要でない。実際に、ワクチン接種部位の反応に対するアセマンナンのこのバッチの明確な寄与は、その使用に対して禁忌を示すのに十分であった。

使用されるアセマンナンの利益は、１、３、及び５日齢で３回の投与量が与えられ、次いで７及び２１日齢で細菌ワクチンの組み合わせをワクチン接種されたグループで生じると思われる。そのグループは、引き続きのＰＭＤ細菌攻撃に対して保護されており、その程度は、ＴＰＲが、ワクチン接種されずに細菌攻撃された豚に関して有意に改良されるばかりでなく、ＴＰＲが細菌攻撃されなかった対照グループのＴＰＲと有意な差がない唯一のグループであった。この観測によって、非特異的な刺激、及びプライミングがアセマンナンによって新生児に誘導されることが示唆される。

細菌ワクチン－トキソイドは、すべてマウスの安全性試験に合格したが、幾つかのものは低レベルの不純物を含んでいることが見いだされた。アセマンナンは、無菌化されない粉末として細菌ワクチン－トキソイドに添加され、これらの製品に見いだされる不純物に強く寄与する。全ての製品のホルマリン濃度は０．１５から０．１７％の間（これは許容しうる限度内にある。）であることが見いだされた。アセマンナンが最終生成物に含まれうる場合は、プロトコールにより長い不活性化時間を必要とする。

一般に、臨床的な徴候の評価並びに肺障害及び鼻の障害の主観的な評価は、ＰＭＤでのワクチン接種による防御を測定するための有用な基準にはならない。ＰＭＤ感染の主要な障害は、萎縮性鼻炎である。従って、肺障害がこの試験の疾患の主要な構成要素に寄与しな

いことは、驚くにはあたらない。萎縮性鼻炎の激しさに対して鼻づら（Snouts）を点数化することは、主観的であり、不連続なデータを与える。鼻づらの障害を評価する場合に形態測定を適用することは、この試験でなされたような母数的な統計方法によって有用に分析されうる客観的なデータを与える。

ディスカッション

上記の例で示されたデータは、ワクチンへのアセマンナンの添加が、ウイルスの免疫原性を高めることを示唆している。これが起こるメカニズムは、まだ明確ではないが、１つの提唱しうるモデルは、マクロファージに関連する。マクロファージは全て、マンノースレセプターを表面に有しており、表面がマンノースに富んでいる細菌や菌類に対して該レセプターが非特異的な応答を補助することは公知である（Largentら1984年）。マクロファージは、ワクチン接種を受けた宿主中のウイルスの転写及び複製に役割を演じていると信じられている。ワクチンへのアセマンナンの添加は、休息状態のマクロファージを活性化した状態に変換する手助けをし、これによって、ウイルスのより効果的な加工及び輸送が可能となる。これによって、ワクチン接種後、特に初期の場合、又は別の激しいウイルス攻撃（virus Challenge）の場合に、ウイルス攻撃により効き目のある応答をするようになるだろう。

上記のデータは、Brodetella、Erysipelothri）、及びPasteurellaタイプＡを組み合わせた細菌ワクチンが、疾患を防御するのに効果があることを示唆している。このデータから、更に、非経口的に与えられるアセマンナンが、引き続き投与されたワクチンの効き目が促進されることが示唆される。

参照文献

１．Bacon, L. D. et al. Augmentation of retrovirus-induced lymphoide leukosis by Marek's Disease in White Leghorn Chickens. J. Virol 63:504-512（1989）.

２．Lagent, B. L. et al. Carbohydrate-Specific adhesion of alveolar macrophages to mannose-derived surfaces. J. Biol. Chem. 259:1764-1769（1984）.

フロントページの続き

(74)代理人 100095441
弁理士 白根 俊郎
(72)発明者 ノードグレン、ロバート・エム
アメリカ合衆国、ミネソタ州 ５５０４４、レイクビル、ワンハンドレッド セブンティーサード・ストリート・ウエスト ７９８５

合議体
審判長 森田 ひとみ
審判官 亀田 宏之
審判官 横尾 俊一

(56)参考文献 特表平３－５０１６２４（ＪＰ，Ａ）
特開昭６３－２７４３７（ＪＰ，Ａ）
特開昭６２－２１２３２６（ＪＰ，Ａ）
特開平１－２７２５２９（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.[7]，ＤＢ名)
A61K39/245
A61K39/12
A61K39/39
C12N7/01
C12N15/00
G01N33/569