

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5847713号

(P5847713)

(45) 発行日 平成28年1月27日 (2016. 1. 27)

(24) 登録日 平成27年12月4日 (2015. 12. 4)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 39/102 (2006. 01)	A 6 1 K 39/102
A 6 1 P 11/00 (2006. 01)	A 6 1 P 11/00
A 6 1 K 39/00 (2006. 01)	A 6 1 K 39/00 H
A 6 1 K 38/00 (2006. 01)	A 6 1 K 37/02

請求項の数 13 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2012-523330 (P2012-523330)	(73) 特許権者	510000976
(86) (22) 出願日	平成22年8月5日 (2010. 8. 5)		インターベット インターナショナル ベー. フェー.
(65) 公表番号	特表2013-501028 (P2013-501028A)		オランダ国、5 8 3 1・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・3 5
(43) 公表日	平成25年1月10日 (2013. 1. 10)	(74) 代理人	100146318
(86) 国際出願番号	PCT/EP2010/061387		弁理士 岩瀬 吉和
(87) 国際公開番号	W02011/015614	(74) 代理人	100114188
(87) 国際公開日	平成23年2月10日 (2011. 2. 10)		弁理士 小野 誠
審査請求日	平成25年2月22日 (2013. 2. 22)	(74) 代理人	100119253
(31) 優先権主張番号	09167342. 6		弁理士 金山 賢教
(32) 優先日	平成21年8月6日 (2009. 8. 6)	(74) 代理人	100124855
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 坪倉 道明
(31) 優先権主張番号	61/231, 820		
(32) 優先日	平成21年8月6日 (2009. 8. 6)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 豚胸膜肺炎に対するワクチン及び当該ワクチンの取得方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細菌培養から精製され、A p x I、A p x I I 及び A p x I I I から成る群より選択される 1 以上の毒素内リピート (repeats in toxin) と複合体を形成したりポ多糖を含む豚胸膜肺炎に対するワクチンであって、ポリミキシンを含み、リポ多糖により引き起こされる内毒素ショック症状を減少させ、更にアクチノバチルス・プルロニューモニアの 4 2 k D の外膜タンパク質を含むことを特徴とする前記ワクチン。

【請求項 2】

ワクチンが投与量当たり 2 0 0 0 I U 未満のポリミキシンを含むことを特徴とする請求項 1 記載のワクチン。

【請求項 3】

ワクチンが投与量当たり 1 0 0 0 I U 未満のポリミキシンを含むことを特徴とする請求項 2 記載のワクチン。

【請求項 4】

ワクチンが投与量当たり 5 0 0 I U 未満のポリミキシンを含むことを特徴とする請求項 3 記載のワクチン。

【請求項 5】

ポリミキシンがポリミキシン B であることを特徴とする請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載のワクチン。

【請求項 6】

リポ多糖がアクチノバチルス・プルロニューモニア由来であることを特徴とする請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載のワクチン。

【請求項 7】

リポ多糖を取得すること、当該リポ多糖を薬学的に許容可能な担体と混合すること及びポリミキシンの添加によって当該リポ多糖を無毒化することを含む豚胸膜肺炎に対するワクチンを取得する方法であって、該ワクチンが更にアクチノバチルス・プルロニューモニアの 42 kD の外膜タンパク質を含み、リポ多糖が A p x I、A p x I I 及び A p x I I I から成る群より選択される 1 以上の毒素内リピート (repeats in toxin) と複合体を形成していることを特徴とする前記方法。

【請求項 8】

ワクチン投与量当たり最大 2000 IU に達するようにポリミキシンを添加することを特徴とする請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

ワクチン投与量当たり最大 1000 IU に達するようにポリミキシンを添加することを特徴とする請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

ワクチンの投与量当たり最大 500 IU に達するようにポリミキシンを添加することを特徴とする請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

リポ多糖を担体と混合するときにポリミキシンを添加することを特徴とする請求項 7 乃至 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

対象動物への投与前にポリミキシンをワクチンに添加することを特徴とする豚胸膜肺炎に対するワクチンを投与する時の内毒素ショック症状を減少させるためのポリミキシンの使用であって、該ワクチンが更にアクチノバチルス・プルロニューモニアの 42 kD の外膜タンパク質及び A p x I、A p x I I 及び A p x I I I から成る群より選択される 1 以上の毒素内リピート (repeats in toxin) と複合体を形成しているリポ多糖を含むことを特徴とする前記使用。

【請求項 13】

請求項 1 乃至 6 のいずれかに記載のワクチンを投与することを含む、豚胸膜肺炎に対するリポ多糖を含有するワクチンを投与する時の内毒素ショック症状を減少させるための方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は養豚業に著しい経済的損失をもたらす世界中に広がった疾病、豚胸膜肺炎に対するワクチンに関する。豚胸膜肺炎の病原体は、パスツレラ科に属するグラム陰性細菌、アクチノバチルス・プルロニューモニア (*Actinobacillus pleuropneumoniae*: APP) である。この疾病は空気経路又は感染豚との直接接触によって伝染し、出血性、繊維素性及び壊死性の肺病変によって特徴づけられる。病像は最急性から慢性の範囲にわたり、無症候性の保菌豚は未感染の群れに持ち込まれると疾病を伝染し得る。荚膜多糖及びリポ多糖 (LPS) の O-側鎖成分に基づき、15 の血清型が特定されている。アクチノバチルス・プルロニューモニアに関する血清型別及び他の遺伝型分類法は、サーベイランス及び疫学調査に対し大いに貢献してきた。これらの手段は、病原性型の細菌の根絶に向けた制御プログラムにおける意志決定に対し重要な情報を提供する。北米では血清型 1、5 及び 7 が最も優勢であると報告されており、一方、血清型 2 及び 9 がヨーロッパでは最も一般的に単離され、オーストラリアの豚では血清型 15 が優勢な単離株である。

【0002】

A. プルロニューモニアについて特定された病原性因子には、LPS、荚膜多糖、A p x 毒素 I - I V (いわゆる毒素内リピート (repeats in toxin) 即ち R

10

20

30

40

50

TX毒素)、外膜タンパク質(OMP)及び種々の鉄獲得系が含まれる。しかし本細菌の病原性機構がはっきりしないために、各成分の感染過程に対する総体的な貢献は明らかでない。A. プルロニューモニアに対する現在のところ利用できるワクチンのほとんど全ては、任意に外膜画分を配合した不活化全菌体バクテリンか又はApx毒素とタンパク質のサブユニットの組み合わせである。いずれにせよ、好ましくは種々の血清型を越えて適切な防御を得るためには、リポ多糖(LPS)がワクチン中に存しなければならぬという見方が一般的となった(Julien Goure等、BMC Genomics誌、2009年、第10巻:88ページ(2009年2月24日発行);Dubreuil等、Animal Health Research Reviews誌、第1巻第2号;73-93ページ、2000年12月)。1980年代以降は、単独のリポ多糖に基づくワクチンが既に疾病の感染レベル又は疾病の病像を減少するうえで明白な効果を有し交差防御を誘導することが、より強固に認識されてきた(Fenwick等、the American Journal of Veterinary Research誌、第47巻、第9号、1986年9月;Rapp等、Canadian Veterinary Journal誌、1988年、第29巻、第7号、585-587ページ;Rioux等、Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases誌、第20巻第1号:63-74ページ、1997年1月)。

10

【0003】

リポ多糖のゆゆしき不利益は、内毒素の特性を有することであり、そのために例えば嗜眠、下痢、嘔吐、食欲不振又は死亡等の望まれない多くの副作用を伴う。それ故に直ちに、ワクチン中のLPS含量を低減又はLPSを無毒化する要求が生じる。しかし十分なAPPワクチンはLPSの存在に依存しており、従って一般に知られている通り、LPSの含有量を低下させるとワクチンの効力を本質的に減少させる。又、LPSの内毒素の性質を減少させしかも効果的なAPPワクチンを達成するために、種々の試みが成されてきた。Rioux等(上記)は、無毒化LPSのAPPに対するワクチンの効力への影響を研究し、(非無毒化)LPSにより免疫したマウスは防御されたが、一方、無毒化LPSに基づくワクチンはマウスを防御することができなかったと結論づけた(Riouxの刊行物71ページ、第三段落を参照)。この研究は豚で繰り返して行われた(Research in Veterinary Science、1998年、第65巻、165-167ページ)。市販のバクテリンワクチン(非無毒化LPSを含有)は、野生型APPの攻撃感染に対し良好な防御を示すことが明らかとなった。無毒化LPSに基づくワクチンは、はるかに効果が弱いと思われた(60%の豚が依然として肺病変を有した)。実際、このことは無毒化されるとLPSははるかに免疫原性が低下するという共通の理解と一致している。

20

30

【0004】

本発明の目的は、市販の利用可能なワクチンに匹敵する効力を有するが、しかしそれに伴う内毒素ショック症状が著しく軽減されたワクチン、特に有効量のワクチン投与後に豚に下痢、嘔吐及び呼吸促迫の兆候を全く、または殆ど示さない、豚胸膜肺炎に対するワクチンを提供することである。

40

【0005】

前述の目的を達成するために、リポ多糖を含むことに基づいてワクチンを考案した。ここで、リポ多糖に起因する内毒素ショック症状を減少させるために、ワクチンは付加的にポリミキシンを含む。驚いたことに、ポリミキシンによるLPSの無毒化は、LPSの免疫原性に著しい負の効果を与えず、従ってワクチンの効力にもそうであることが見出された。ポリミキシンを使用することによって、ワクチンの効力を十分なレベルに維持すると同時に、下痢、嘔吐及び呼吸促迫等の内毒素ショック症状が顕著に減少され得ると考えられる。特に、本ワクチンはポリミキシン無添加のワクチンと同等の効力さえ有し得ると考えられる。

【0006】

50

本発明における意味においてワクチンとは、宿主中の微生物又はその代謝過程（微生物体内か又は微生物によって誘導された過程）を妨害する抗体の誘導によって、微生物による感染又はその感染によって引き起こされる疾病若しくは障害の臨床症状を防止又は減少することを目標にする構成物である。ワクチンは、基本抗原として微生物のサブユニット（例えばLPS等）を含んでもよいし、又、弱毒化又は殺した全細胞の微生物菌体、又は例えば微生物の代謝物（分泌毒素等）を含んでもよい。ワクチンは、免疫学的に有効量の抗原（即ち野生型の微生物による攻撃感染の負の効果を少なくとも減少させるために標的動物の免疫系を十分に刺激することが可能な量）を含有し、典型的には水（しばしばリン酸緩衝食塩水）を含有する液体等の薬学的に許容可能な担体と組み合わせられ、また、ワクチンの使用目的又はワクチンに求められる性質に応じて免疫賦活剤（アジュバント）、安定剤、粘度調整剤又は他の成分を含有していてもよい。又、ワクチンが複数の野生型の微生物に対し防御するように、追加の他の微生物の抗原が存在してもよい。

10

【0007】

ポリミキシンは抗細菌特性を有する、バチルス・ポリミキサ（B. アエロスポラ）から単離又は人為的に生産することができる化合物であり、また、それから直接的に誘導可能な抗細菌特性を有する化合物である。B. ポリミキサによって産生されるポリミキシンは、長い疎水性尾部を有する1個の環状ペプチドからなる共通構造を有する。代表的なポリミキシン類は、ポリミキシンA（アエロスポリンとも称される）、ポリミキシンB（しばしばポリミキシンとも称される）、ポリミキシンE（コリスチンとも称される）ポリミキシンM（マッタシンとしても知られる）及びポリミキシンノナペプチドである。

20

【0008】

ポリミキシンは、グラム陰性菌を含有する免疫原性組成物中のリポ多糖を無毒化するために首尾よく使用することができることが既に記載されていることに留意する。例えば、Cooperstock等は、「Infection and Immunity」誌、1981年7月号、315-318ページにおいて、ポリミキシンBを使用することによって、数種類のグラム陰性菌（即ち、百日咳菌、大腸菌、インフルエンザ菌及び緑膿菌）の懸濁液の内毒素活性が著しく減少したことを開示している。しかしCooperstockは、「ポリミキシン処理された細菌の免疫原性が無傷のままかどうか明らかでない」こと、及び「免疫電気泳動系に前もって形成された抗体に結合するための数種類の...外膜成分の能力が、全細菌又は単離した膜の高濃度のポリミキシンB処理後に部分的に失われた」ことに明確に言及している。換言すれば、無毒化LPSの免疫原性には深い疑いをかけられており、少なくともこれらの特性の一部の消失が予知されていた。

30

【0009】

実際、Bannatyne等もまた、the Journal of Hygiene (Cambridge) 誌、1981年、第87巻、377-381ページにおいて、1ml当たり5000µgの濃度（ワクチンの投与量1回分当たり約42、000国際単位に等しい）のポリミキシン（ポリミキシンB硫酸塩）が、LPSの毒性効果を抑制することに成功したことを開示している。しかし彼はまた「しかしながら、このようなポリミキシン含有ワクチンには疑念が残る。最も重要なことは、内毒素含有量の減少が感染防御抗原の総量の減少を付随するかどうか、及び防御効力の低下と関連するかどうかである」と述べている。数年後、Larter等は（the American Journal of Diseases of Children誌、第138巻、1984年3月号）、百日咳ワクチンにおいて、百日咳ワクチンとポリミキシンを同時に接種された（投与1回分当たり150、000IU以上）動物の抗体力価がかなり低く、より緩徐に上昇するか又は全く存在しないことを実際に見出した。

40

【0010】

1980年代初期のこれらの研究結果が、その中でLPSが優位な役割を果たす有効なAPPワクチンに対し、何故ポリミキシンによる無毒化が安全でしかも有効なワクチンを得るために合理的な成功の見込みがあるとは信じられなかったのかを説明しているかもしれない。このことは、必須成分としてLPSを含むAPPワクチンでの現在のポリミキシン

50

ンの応用に至るまで、前述の知見以来25年以上が過ぎ去ったという事実によって強く支持される。

【0011】

一実施態様においてワクチンは、一以上の毒素内リピートと組み合わせて、細菌培養液（即ち、細胞小器官、核、細胞壁成分等の他の細胞成分と比較して濃縮されている）から精製されたりポ多糖を含む。バクテリンに基づくAPPワクチンは、複合体の形態のLPSとApxサブユニットの組合せに基づくワクチンよりも低い防御しか提供しないことが知られている。従って、一以上のApx毒素と複合体を形成した、細菌培養液から精製したLPSを含む当該組合せサブユニットワクチンが好ましい。LPSとこれら毒素との間の特異的結合が毒素の改良された免疫原性において主要な役割をはたすことは知られているが（Ramjeeet等、Molecular Biology誌、2008年、第70巻第1号、221-235ページ）、そのことが当該組合せサブユニットワクチンの改良された防御を説明しているかもしれない。驚いたことに、ポリミキシンを含む組合せサブユニットワクチンがポリミキシンを含まない組合せサブユニットワクチンと同等の防御を提供することより、その強いLPS結合特性にもかかわらずポリミキシンは、このLPS-毒素複合体にネガティブに干渉するようには思われないことが今や見出された。毒素内リピートは、例えばEP第453024号により知られたものであってもよい。又、他の毒素内リピートApxII又はApxIVのいかなるものも存在してもよい。これは防御すべきAPPの血清型に依存する。アクチノバチルス・プルロニューモニアの次に、Apx毒素（I及びII）がアクチノバチルス・スイスによっても産生されることが知られている。後者の毒素は、この実施態様に従ってワクチンに使用することもできる。好ましくはApxI、ApxII及びApxIIIの中の一以上の毒素がワクチンに含まれ、より好ましくはこれらのそれぞれが含まれる。

【0012】

一実施態様においてワクチンは投与1回分当たり2000IU未満のポリミキシンを含む。驚いたことに、内毒素症状の有効な減少は、2000IU/投与1回分程度の少量の使用によって達成することができることが見出された（例えば、投与1回分4mlに対しワクチン1ml当たりポリミキシンB硫酸塩約60μgを添加することによって達成することができる）。前掲の参考文献において、ワクチン接種時の有効量は、投与1回分当たりポリミキシン42,000~160,000IUの範囲にあり、それはほぼ保存料としてのポリミキシン使用のための範囲である（メルク獣医マニュアル第9版、2005年編をも参照、動物10kgに対し投与1回分当たり少なくとも50,000IUの投与量を推奨している）。出願人は、驚いたことにわずか一画分（5%未満）のみが内毒素ショック症状を減少するのに十分であるらしいことを見出した。ポリミキシンは一般的に無期限に安定ではないので、ワクチン中に存する量は添加された量未満、製剤1年後に測定すれば典型的には添加量の50乃至80%の間であるだろう。臨床症状を減少するために必要なだけの少量のポリミキシンが使用できることに留意する。例えば、ワクチン中のLPSに余り耐性のない豚の品種においては、投与1回分当たり約15~30IUの量は内毒素ショック症状を十分に減少するうえで有効であるかもしれない。このような低量での明白な効果は、実験的に確証されてきた。最少有効量は、豚の品種に依存するだけでなく、要求される臨床症状の減少、ワクチン中のLPS含量、ポリミキシンの種類等にも依存し得ることに留意する。一実施態様において、ワクチンは投与1回分当たり1000IU未満、又は500IU未満しか含まない。

【0013】

一実施態様において、リポ多糖はアクチノバチルス・プルロニューモニア由来である。実際のところ周知の通り、豚胸膜肺炎に対するワクチン中で有効であるために、ワクチン中のLPSがAPP菌から抽出される必要は無い。LPSは例えば大腸菌由来であってもよく、宿主細菌、動物細胞又は他の種類の宿主において組換えで発現されてもよい。しかし、発明者等はAPP由来のLPSが非常に良好なワクチン接種の結果を示すことを見出した。当該LPSはAPP菌から直接抽出してもよいし、また適切な宿主によって発現し

10

20

30

40

50

てもよい。

【0014】

一実施態様においてワクチンは、EP第453024号により知られた通り、アクチノバチルス・プルロニューモニアの42kDの外膜タンパク質を含む。

【0015】

また本発明は、リポ多糖を取得する方法、リポ多糖を薬学的に許容可能な担体と混合する方法及びポリミキシンを添加することによってリポ多糖を無毒化する方法を含む、豚胸膜肺炎に対するワクチンを取得するための方法に関する。無毒化(detoxifying)とは、少なくとも内毒素ショック症状、特に下痢、嘔吐及び呼吸促迫を減少するのに適した量のポリミキシンを添加することを意味する。好ましくは所期のワクチン投与量ごとに2000未満、又はさらに1000又は500IU未満のポリミキシンを使用する。一実施態様においてポリミキシンは、リポ多糖を担体と混合するときに添加する。

10

【0016】

本発明は、本発明によるワクチン投与を含む、リポ多糖を含有する豚胸膜肺炎に対するワクチンを投与した時の、内毒素ショック症状を減少するための方法にも関する。

【0017】

本発明を以下の実施例を用いて説明する。

【0018】

[実験計画]

第一の研究において、6週令の150頭の特定病原体フリー(SPF)豚を使用し、各50頭からなる3群に分けた。各群は、6週令時に投与4mlで筋肉内に一回接種した。群1は、ポリミキシン無添加の標準APPワクチン(Porcilis APP、Intervet International BV Boxmeer、オランダから入手可能)を接種した。本ワクチンは42kDの外膜タンパク質だけでなく25単位(1ml当たり)の毒素内リピートApxI、II及びIIIも含有する。LPSは約 $5 \sim 6 \times 10^5$ IU/mlの量で存在する。群2は、 $30 \mu\text{g/ml}$ の量(1ml当たり約250IU)のポリミキシンB(硫酸塩として)を添加した同じワクチンを接種した。群3は、同様に $30 \mu\text{g/ml}$ の量(1ml当たり約250IU)のポリミキシンE(硫酸塩として)を添加した同じ標準ワクチンを接種した。ポリミキシンは、ワクチン製剤の最終段階、即ち他の全ての抗原を担体Diluvac Forte(Intervet International BV Boxmeer、オランダから入手可能)と混合した直後に添加した。

20

30

【0019】

接種20時間前、接種直前及び接種2、4、7及び24時間後に直腸温を測定した。特定臨床症状(内毒素ショックの徴候)に関し、群ごとに全動物を接種30分及び1、2、4、7及び24時間後にモニターした。特に次の症状、活動低下、振戦、咳嗽、下痢、嘔吐、呼吸数増加、腹式呼吸、呼吸困難及び死亡に関し動物を点検した。接種後2～6日は日常点検だけを実施した。群2及び群3の温度と臨床症状を群1のこれらと比較した。

【0020】

第二の研究において、異なる二つのポリミキシン濃度を試験した。この研究は、3処理群にそれぞれ無作為に14頭割り当てた42頭の豚に関し実施した。群1はPorcilis APP(ポリミキシン無添加)を、群2はワクチン1ml当たりポリミキシンB $30 \mu\text{g}$ を添加した同じワクチンを、及び群3はワクチン1ml当たりポリミキシンB $60 \mu\text{g}$ を添加した同じワクチンを接種した。それ以外の実験設定は第一の研究と同様とした。

40

【0021】

第三の研究において、ポリミキシンBを含有するLPSに基づくAPPワクチンの効力を試験した。ポリミキシンBは、最良のLPS結合特性を有するポリミキシンとして一般に知られており、従ってポリミキシンBは理論的にはワクチンの効力に関して最も強い負の影響を与える。それゆえ、当該ポリミキシンと共に製剤化されたワクチンが有効であれ

50

ば、このことは他のポリミキシンを用いても少なくとも同等に有効なワクチンを取得することができることの証拠となる。本研究用のワクチンは、標準 *P o r c i l i s A P P* ワクチンに対しワクチン 1 m l 当たりポリミキシン B 3 0 μ g を添加することによって製剤した。6 及び 1 0 週令時に豚 1 4 頭をワクチン 2 m l で筋肉内接種し、結果として投与量としてポリミキシン約 5 0 0 I U を接種した。豚 7 頭にプラセボワクチン（4 0 m M トリス塩酸緩衝液）を接種した。OMP だけでなく R T X 毒素 A p x I、A p x I I 及び A p x I I I に対する抗体力価を 1 3 週目に定量した。2 回目の接種 3 週間後に、豚全頭をアクチノバチルス・プルロニューモニア血清型 2 によって攻撃感染した。

【0 0 2 2】

第四の研究において、発明者等はワクチンの安全性を試験した。この研究では、アクチノバチルス・プルロニューモニアの発酵バッチの後処理工程の間にポリミキシンを添加し、最終的にワクチン中で極めて低いポリミキシン含有量（約 2 ～ 4 μ / m l）に達する。本研究において、それぞれの培養液の発酵ブrossの上清 1 m l 当たりポリミキシン B 又はポリミキシン E 硫酸塩 3 0 μ g を添加することによってワクチンを調製し、その後毒素 A p x I、I I、I I を L P S と配合し、そしてこれらの上清から 4 2 k D の O M P を単離した。これらの単離したサブユニットを、ワクチン 1 m l 当たり毒素及び O M P 約 2 5 単位及び L P S 約 1×10^6 I U に達するように *D i l u v a c f o r t e* 中に製剤した。これらのワクチン中で、1 m l 当たりポリミキシン E 約 2 2 I U（2. 6 μ g / m l）及びポリミキシン B 約 3 5 I U（4. 2 μ / m l）のポリミキシン濃度が確認された。安全性を試験するために、6 週令の S P F 豚 1 0 頭からなる 2 群にそれぞれのワクチン 4 m l を接種した。臨床症状を第一の研究と同様に評価した。

【0 0 2 3】

[結果]

どのポリミキシン類にも直腸温に関する著しい効果はなかった。しかし、内毒素ショック症状に関して著しい効果があった。下記の表 1 に群ごとの症状の概略を示す。群 1 において、嘔吐（6 0 %）及び呼吸数増加（6 6 %）のように、典型的な臨床症状が動物の半数以上に観察された。この群では豚 2 頭（4 %）が内毒素ショックの結果として死亡した。対照的に、群 2 及び 3 においては非常に軽い症状だけが観察された。両群において豚の 2 %（動物 5 0 個体中の 1 個体）が嘔吐症状だった。さらに群 3 の豚の 2 % では、呼吸数増加が認められた。従って、ポリミキシンは A P P ワクチン中の L P S によって引き起こされる重篤な内毒素ショック症状を減少するために適していることが結論づけられた。

【0 0 2 4】

表 1. 種々の A P P ワクチン接種後の内毒素ショック症状

ワクチン	下痢	嘔吐	呼吸数増加	死亡
<i>P o r c i l i s A P P</i>	1 0 %	6 0 %	6 6 %	4 %
<i>P o r c i l i s A P P</i> + 3 0 μ g / m l ポリミキシン B	0 %	2 %	0 %	0 %
<i>P o r c i l i s A P P</i> + 3 0 μ g / m l ポリミキシン E	0 %	2 %	2 %	0 %

表 2 は第二の研究の結果を示す。群 1（標準ワクチン）において、嘔吐（5 4 %）及び呼吸数増加（1 5 %）のような典型的な臨床症状が観察された。群 2 及び 3 において、軽度の症状が観察されるか殆ど症状が観察されなかった。これらの結果に基づいて、ワクチン 1 m l 当たりわずか 6 0 μ g 又は 3 0 μ g / m l のポリミキシンの添加でも、L P S が重篤な内毒素ショック症状を誘発することを殆ど完全に阻止するために有効であることが

結論づけられる。

【0025】

表2．種々のAPPワクチン接種後の内毒素ショック症状

ワクチン	下痢	嘔吐	呼吸数増 加	死亡
P o r c i l i s A P P	1 5 %	5 4 %	1 5 %	0 %
P o r c i l i s A P P + 3 0 μ g / m l ポリミキシンB	0 %	0 %	8 %	0 %
P o r c i l i s A P P + 6 0 μ g / m l ポリミキシンB	0 %	0 %	0 %	0 %

10

第三の研究において、ポリミキシンBを含有するワクチンにより良好な効力の結果（ポリミキシンを除いては同様の薬剤処方を有する標準P o r c i l i s A P Pワクチンにより得られる結果と同等の結果）が得られた。結果を表3に要約する。対照群においては動物のほぼ60%が死亡したが、一方接種した群の動物は攻撃感染に対し全てが防御された。後者の群の力価は、ポリミキシン不含の標準P o r c i l i s A P Pワクチンにより得られる力価に匹敵した（「n. d.」は試験において不検出であることを意味する）。ポリミキシンBを含有するAPPワクチンによる非常に良好な結果、及び同ポリミキシンが一番強いLPS結合特性を有するという事実を考慮すれば、他のポリミキシンに関して少なくとも同等の効果を有するワクチンが取得可能であることが分かる。

20

【0026】

表3．ポリミキシンB含有ワクチンの平均効力結果

ワクチン	A p x I 力価	A p x I I 力価	A p x I I I 力 価	O M P 力 価	死亡
P o r c i l i s A P P + 3 0 μ g / m l ポリミキシンB	9 . 3	1 0 . 1	8 . 5	9 . 1	0 / 1 4
対照	n . d .	n . d .	n . d .	n . d .	4 / 7

30

第四の研究において、1ml当たり約20IUくらい少量のポリミキシンを含むワクチンによってさえ良好な安全性の結果が得られることが示された。平均データを表4に示す。遥かに高含量のポリミキシンが並存しても良好な効力の結果を得ることができることを考慮すれば（研究3を参照）、第四の研究のワクチンによって良好な効果の結果が同様に得られることは明らかである。

40

【0027】

表4．種々のAPPワクチン接種後の内毒素ショック症状

ワクチン	下痢	嘔吐	呼吸数増加	死亡
P o r c i l i s A P P	5 0 %	9 0 %	7 0 %	0 %
ポリミキシンB 4. 2 μ g / m l 含有P o r c i l i s A P P	0 %	1 0 %	1 0 %	0 %
ポリミキシンE 2. 6 μ g / m l 含有P o r c i l i s A P P	0 %	2 0 %	3 0 %	0 %

フロントページの続き

(74)代理人 100129713

弁理士 重森 一輝

(74)代理人 230105223

弁護士 城山 康文

(72)発明者 クラツセン, ヘンリカス・レオ・ベルナルダス・マリア

オランダ国、5831・アー・エヌ・ボツクスメル、ウイム・ドウ・コルベルストラート・35

審査官 深草 亜子

(56)参考文献 特開平05-262666 (JP, A)

特表2008-537749 (JP, A)

特表2003-506049 (JP, A)

COOPERSTOCK M, POLYMYXIN B INACTIVATION OF LIPOPOLYSACCHARIDE IN VACCINES OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA, INFECTION AND IMMUNITY, 米国, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, 1981年 7月 1日, V33 N1, P315-318

FROM A H L, POLYMYXIN B SULFATE MODIFICATION OF BACTERIAL ENDOTOXIN: EFFECTS ON THE DEVELOPMENT 以下備考, INFECTION AND IMMUNITY, 米国, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, 1979年 3月 1日, V23 N3, P660-664, OF ENDOTOXIN SHOCK IN DOGS

BANNATYNE R M, REDUCING THE ENDOTOXIC ACTIVITY OF PERTUSSIS VACCINE, JOURNAL OF HYGIENE, 1981年, V87 N3, P377-382

CARDOSO LUCIANA S, POLYMYXIN B AS INHIBITOR OF LPS CONTAMINATION OF SCHISTOSOMA MANSONI RECOMBINANT 以下備考, MICROBIAL CELL FACTORIES, NL, BIOMED CENTRAL, 2007年 1月 3日, V6 N1, P1, PROTEINS IN HUMAN CYTOKINE ANALYSIS

JIRAWATTANAPONG, EFFICACY OF A SUBUNIT VACCINE AGAINST ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE 以下備考, JOURNAL OF SWINE HEALTH AND PRODUCTION, 2008年 7月 1日, V16 N4, P193-199, IN AN ENDEMICALLY INFECTED SWINE HERD

DUBREUIL J DANIEL, ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE SURFACE POLYSACCHARIDES: THEIR ROLE IN DIAGNOSIS AND IMMUNOGENICITY, ANIMAL HEALTH RESEARCH REVIEWS, 英国, CABI PUBLISHING, 2000年12月 1日, V1 N2, P73-93

RAMJEET MAHENDRASINGH, MUTATION IN THE LPS OUTER CORE BIOSYNTHESIS GENE, GALU, AFFECTS LPS INTERACTION 以下備考, MOLECULAR MICROBIOLOGY, 英国, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING LTD, 2008年10月 1日, V70 N1, P221-235, WITH THE RTX TOXINS APXI AND APXII AND CYTOLYTIC ACTIVITY OF ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE

RIOUX STEPHANE, EVALUATION OF THE PROTECTIVE EFFICACY OF ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE 以下備考, RESEARCH IN VETERINARY SCIENCE, 英国, BRITISH VETERINARY ASSOCIATION, 1998年 9月 1日, V65 N2, P165-167, SEROTYPE 1 DETOXIFIED LIPOPOLYSACCHARIDES OR O-POLYSACCHARIDE-PROTEIN CONJUGATE IN PIGS

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 39/102