

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-528882

(P2006-528882A)

(43) 公表日 平成18年12月28日(2006. 12. 28)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/20 (2006. 01)	C 1 2 N 1/20 A	4 B 0 6 5
A 6 1 K 39/02 (2006. 01)	A 6 1 K 39/02	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/39 (2006. 01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 P 31/04 (2006. 01)	A 6 1 P 31/04 1 7 1	
A 6 1 P 1/00 (2006. 01)	A 6 1 P 1/00 1 7 1	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-521125 (P2006-521125)	(71) 出願人	503345374
(86) (22) 出願日	平成16年7月15日 (2004. 7. 15)		ペーリンガー インゲルハイム フェトメ
(85) 翻訳文提出日	平成18年1月24日 (2006. 1. 24)		ディカ インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/022704		アメリカ合衆国 ミズーリ州 6 4 5 0 6
(87) 国際公開番号	W02005/011731		- 2 0 0 2 セント ジョセフ ノース
(87) 国際公開日	平成17年2月10日 (2005. 2. 10)		ベルト ハイウェイ 2 6 2 1
(31) 優先権主張番号	60/490, 001	(74) 代理人	100082005
(32) 優先日	平成15年7月25日 (2003. 7. 25)		弁理士 熊倉 禎男
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100084009
			弁理士 小川 信夫
		(74) 代理人	100084663
			弁理士 稲田 篤
		(74) 代理人	100093300
			弁理士 浅井 賢治
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 欧州起源のローソニア・イントラセルラリス並びにそのワクチン、診断薬及び使用方法

(57) 【要約】

本発明は、ローソニア・イントラセルラリスワクチン並びにL. イントラセルラリス感染に対する予防及び診断方法に関する。本発明の製品及び方法は、部分的に、L. イントラセルラリスの大規模供給品の改良された培養方法の結果として達成でき、欧州起源のL. イントラセルラリスの新規アイソレートと、ワクチン製品として弱毒化欧州アイソレートを含有する凍結乾燥品の製造方法とを含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ローソニア・イントラセルラリスの毒性アイソレートであって、前記毒性アイソレートが、ローソニア・イントラセルラリス寄託アイソレートATCC番号PTA-4927であるか又は寄託アイソレートATCC番号PTA-4927のすべての同定特徴を有するローソニア・イントラセルラリスである、毒性アイソレート。

【請求項 2】

ローソニア・イントラセルラリスの無毒性アイソレートであって、前記無毒性アイソレートが、ローソニア・イントラセルラリス寄託アイソレートATCC番号PTA-4926であるか又は寄託アイソレートATCC番号PTA-4926のすべての同定特徴を有するローソニア・イントラセルラリスである、無毒性アイソレート。

【請求項 3】

医薬的に有効な量のローソニア・イントラセルラリスの不活化毒性アイソレートと、医薬的に許容しうる担体とを含んでなる動物の免疫化用ワクチンであって、前記毒性アイソレートが請求項 1 又は 2 記載の毒性アイソレートである、前記ワクチン。

【請求項 4】

前記ローソニア・イントラセルラリスの無毒性アイソレートの医薬的に有効な量が、約 10^3 TCID₅₀ ~ 約 10^6 TCID₅₀ / 用量である、請求項 3 記載のワクチン。

【請求項 5】

請求項 2 記載のローソニア・イントラセルラリスの無毒性アイソレートと、以下の病原：サルモネラ spp.、エリシペロトリックス spp.、ヘモフィルス spp.、マイコプラズマ spp.、レプトスピラ spp.、クロストリジウム spp.、ストレプトコッカス spp.、ブラキスピラ spp.、サーコウイルス、ブタ生殖器及び呼吸器症候群（PRRS）ウイルス、ブタインフルエンザウイルス（SIV）、伝播性胃腸炎（TGE）ウイルス、パルボウイルス、及び大腸菌；の少なくとも 1 種由来の抗原物質と、医薬的に許容しうる担体とを含んでなる動物の免疫化用ワクチン。

【請求項 6】

請求項 2 記載のローソニア・イントラセルラリスの無毒性アイソレートと、ブタコレラ菌、エリシペロトリックス spp.、伝播性胃腸炎（TGE）ウイルス、大腸菌、クロストリジウム spp.、及びブラキスピラ spp. 由来の抗原物質と、医薬的に許容しうる担体とを含んでなる動物の免疫化用ワクチン。

【請求項 7】

請求項 2 記載のローソニア・イントラセルラリスの無毒性アイソレートと、ブタコレラ菌及びエリシペロトリックス spp. 由来の抗原物質と、医薬的に許容しうる担体とを含んでなる動物の免疫化用ワクチン。

【請求項 8】

請求項 2 記載のローソニア・イントラセルラリスの無毒性アイソレートと、以下の病原：クロストリジウム spp.、ウマインフルエンザウイルス（EIV）、ウマヘルペスウイルス（EHV）、アルファウイルス、及び西ナイルウイルス；の少なくとも 1 種由来の抗原物質と、医薬的に許容しうる担体とを含んでなる動物の免疫化用ワクチン：。

【請求項 9】

病原性ローソニア・イントラセルラリスの免疫原性抗原に反応するように動物の免疫系を刺激する方法であって、前記動物に、請求項 2 記載のローソニア・イントラセルラリスの無毒性アイソレートを含有する免疫原性組成物を投与することを含む方法。

【請求項 10】

ブタ増殖性腸疾患に対して動物を免疫化する方法であって、医薬的に有効な量の請求項 2 記載のローソニア・イントラセルラリスの無毒性アイソレートを投与することを含み、前記ローソニア・イントラセルラリスの無毒性アイソレートの医薬的に有効な量が、約 10^3 TCID₅₀ ~ 約 10^6 TCID₅₀ / 用量である、前記方法。

【請求項 11】

動物内でローソニア・イントラセルラリス細菌に対する免疫反応を誘発するためのワクチンの製造方法であって、以下の工程：（a）請求項1又は2記載のローソニア・イントラセルラリスアイソレートを、約10%未満の酸素濃度で懸濁状態である培養細胞中でインキュベートして前記細胞を培養する工程；及び（b）前記培養細菌を医薬的に許容しうる担体と混合する工程；

を含む、前記方法。

【請求項12】

前記培養細菌を殺して、不活化ローソニア・イントラセルラリスを含有するワクチンを調製する工程をさらに含む、請求項11記載の方法。

【請求項13】

前記細菌を弱毒化アイソレートを生成するために十分な時間培養する工程をさらに含む、請求項11記載の方法。

【請求項14】

ローソニア・イントラセルラリスの培養方法であって、以下の工程：

（a）請求項1記載のローソニア・イントラセルラリスの毒性アイソレートを含む接種材料で培養細胞を感染させる工程；

（b）前記感染細胞を、約10%未満の酸素濃度で、前記ローソニア・イントラセルラリスの生成を増やすために十分な時間、前記細胞の攪拌によって前記感染細胞を懸濁状態に維持しながらインキュベートする工程；及び

（c）前記ローソニア・イントラセルラリスの少なくとも一部を収集する工程；

を含む、前記方法。

【請求項15】

前記酸素濃度が、約0%～約8%の範囲である、請求項14記載の方法。

【請求項16】

前記酸素濃度が、約0%～約3%の範囲である、請求項15記載の方法。

【請求項17】

前記インキュベーションを約6%～約10%の範囲の二酸化炭素下で行う、請求項14記載の方法。

【請求項18】

前記培養細胞が、HEp-2、McCoy、及びIEC-18細胞から成る群より選択される、請求項14記載の方法。

【請求項19】

前記IEC-18細胞をマイクロキャリア上で培養する、請求項18記載の方法。

【請求項20】

前記感染細胞を工程（c）に従って約2～約10日間インキュベートする、請求項14記載の方法。

【請求項21】

前記細菌を弱毒化アイソレートを生成するために十分な時間培養する工程（d）をさらに含む、請求項14記載の方法。

【請求項22】

前記細菌を工程（d）に従って約150日～約250日間培養する、請求項21記載の方法。

【請求項23】

前記弱毒化アイソレートを凍結乾燥する工程（e）をさらに含む、請求項22記載の方法。

【請求項24】

前記凍結乾燥工程が、第1乾燥工程と第2乾燥工程を含む、請求項23記載の方法。

【請求項25】

請求項23記載の方法で製造される凍結乾燥弱毒化アイソレート。

【請求項26】

非ヒト動物対象内でローソニア・イントラセルラリスに対する抗体を検出するためのア

10

20

30

40

50

ッセイを行うことを含むブタ増殖性腸疾患の診断方法であって、以下の工程：

(a) 前記対象由来の試料を、請求項1又は2記載のローソニア・イントラセルラリスアイソレートと接触させて抗原-抗体複合体を形成する工程；及び

(b) 前記複合体の形成を検出する工程；

を含み、このとき、前記複合体の存在はブタ増殖性腸疾患の診断とポジティブに関係している、前記方法。

【請求項27】

前記アッセイが、ラジオイムノアッセイ、エンザイム-リンクドイムノソルベントアッセイ、蛍光イムノアッセイ、及び免疫電気泳動アッセイから成る群より選択される、請求項26記載の方法。

10

【請求項28】

非ヒト動物内でローソニア・イントラセルラリスに対する抗体を生じさせる方法であって、以下の工程：

(a) 請求項1又は2記載のローソニア・イントラセルラリスアイソレートを、免疫反応を誘発するために有効な量で非ヒト動物に投与する工程；及び

(b) 前記ローソニア・イントラセルラリスに対する抗体を含有する抗血清又は血漿を収集する工程；

を含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

20

【0001】

〔関連出願〕

この出願は、2003年1月25日提出の米国仮出願第60/490,001号の利益を主張し、該出願の開示は、参照によってその全体が本明細書に取り込まれる。

【0002】

〔背景〕

本発明は、ローソニア・イントラセルラリス(*Lawsonia intracellularis*)ワクチン及びL. イントラセルラリス感染に対する予防方法及びL. イントラセルラリス感染の診断方法に関する。本発明の製品及び方法は、部分的に、L. イントラセルラリスの大規模供給品の改良された培養方法の結果として達成でき、欧州起源のL. イントラセルラリスの新規アイソレートと、ワクチン製品として弱毒化欧州アイソレートを含有する凍結乾燥品の製造方法とを含む。

30

ブタの増殖性腸疾患(“PPE”)の原因物質であるL. イントラセルラリスは、事実上、ウサギ、フェレット、ハムスター、キツネ、ウマ、及びダチョウやエミューのような多様な他の動物を含むすべての動物に作用する。L. イントラセルラリスは、欧州のみならず米国のブタ群の損失の特に大きな原因である。

PPEの一貫した特徴は、腸患部の腸細胞内に細胞質内の非-膜結合型湾曲桿菌が出現することである。PPEに関連する細菌は“カンピロバクター様生物”と呼ばれている。S. McOristら, *Vet. Pathol.*, Vol. 26, 260-264 (1989)。その後、この原因細菌は新規な分類学上の属と種として同定され、通俗的に回腸共生生物(Ileal symbiont) (IS) イントラセルラリスと呼ばれている。C. Gebhartら, *Int'l. J. of Systemic Bacteriology*, Vol. 43, No. 3, 533-538 (1993)。さらに最近、これら新規細菌に分類学名ローソニア(*Lawsonia*) (L.) イントラセルラリスが与えられた。S. McOristら, *Int'l. J. of Systemic Bacteriology*, Vol. 45, No. 4, 820-825 (1995)。本明細書でさらに同定かつ記述する場合、これら3つの名称を相互交換可能に用いて同生物を表す。

40

【0003】

L. イントラセルラリスは、通常は無細胞培地で普通の細菌学的方法によっては培養できず、成長には付着性上皮細胞が必要であると考えられている真正細胞内細菌である。S. McOristら, *Infection and Immunity*, Vol. 61, No. 19, 4286-4292 (1993)及びG. Lawsonら, *J. of Clinical Microbiology*, Vol. 31, No. 5, 1136-1142 (1993)は、通常の組

50

組織培養フラスコ内でのIEC-18ラットの腸上皮細胞単層を用いたL. イントラセルラリスの培養について論じている。さらに、H. Stills, Infection and Immunity, Vol. 59, No. 9, 3227-3236 (1991)は、通常の組織培養フラスコ内で、腸407ヒト胚腸細胞単層とGPC-16モルモット結腸腺癌細胞単層を用いることについて論じている。

最近、L. イントラセルラリスワクチンが米国で使うために承認され、このワクチンは米国特許第5,714,375号及び第5,885,823号（両特許は参照によってその全体が本明細書に取り込まれる）で記載かつ請求されているL. イントラセルラリスアイソレートに基づいている。上記ワクチンは、Boehringer Ingelheim Vetmedaca, Inc., 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri, 64506-2002によって商標名ENTERISOL(登録商標)Ileitisで販売されている。

10

【0004】

〔発明の概要〕

本発明の1つの目的は、欧州起源のアイソレートを用いた改良されたL. イントラセルラリスワクチンを提供することである。

本発明の別の目的は、L. イントラセルラリスの大規模かつ改良された生産技術に基づいたL. イントラセルラリスの改良された培養方法を提供することである。

これらの目的及び他の目的を達成するため、かつ本明細書で具体化かつ広範に述べるような本発明の目的に従い、本発明は、欧州由来の新規に単離されたL. イントラセルラリス、該アイソレートを弱毒化する方法、及びその弱毒化したアイソレートを提供する。本発明は、弱毒化アイソレートを含んでなるワクチンをも提供する。本発明は、投与時に再構成するため凍結乾燥形態で弱毒化アイソレートを含むワクチンの製造方法及びその凍結乾燥品をも提供する。

20

一態様では、欧州由来の新規に単離されたL. イントラセルラリス、すなわちアイソレートDK 15540が、寄託アイソレートATCCアクセッション番号PTA-4927である。別の態様では、アイソレートDK 15540から誘導された弱毒化アイソレートがアイソレートB3903と命されている（ATCCアクセッション番号PTA-4926）。

【0005】

〔詳細な説明〕

本明細書では、用語“L. イントラセルラリス”は、C. Gebhartら, Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Vol. 43, No. 3, 533-538 (1993)及びS. McOristら, Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Vol. 45, No. 4, 820-825 (1995)（それぞれ参照によってその全体が本明細書に取り込まれる）で詳述されている細胞内の湾曲グラム陰性菌を意味し、限定するものではないが、ブダベスト条約下、2003年1月9日、米国菌培養収集所(American Type Culture Collection)、10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209によって寄託され、かつATCCアクセッション番号PTA-4927が割り当てられた名称DK 15540アイソレート；本技術で知識が与えられ、かつ本明細書で教示が与えられている世界中のPPE感染したブタ又は他の動物から得られる原因細菌；及び上記細菌のいずれかの変種又は変異体（自然又は人工的に得られる）が挙げられる。

30

【0006】

本明細書では、用語“弱毒化アイソレート”は、宿主動物に投与するとき免疫原性を維持しながら無毒性を達成するために本明細書で教示する培養及び継代技術に従って調製されるいずれのL. イントラセルラリスアイソレートをも意味し、限定するものではないが、ブダベスト条約下、2003年1月9日、米国菌培養収集所、10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209によって寄託され、かつATCCアクセッション番号PTA-4926が割り当てられた名称B-3903の弱毒化アイソレートが挙げられる。

40

本発明の弱毒化アイソレートは、鳥、魚、並びにヤギ、ブタ、ウマ、及び霊長類のような哺乳類を含む動物用の抗菌ワクチンで免疫原として使用することができる。かかるワクチンは、当業者に既知の技術によって、かつ本明細書に包含される教示を考慮して調製することができる。該ワクチンは、医薬的に許容しうる担体中に免疫学的に有効な量の弱毒化アイソレートを含む。本ワクチンは、1又はそれ以上の用量で投与することができる。

50

免疫学的に有効な量は、過度の実験を行うことなく、本明細書に包含される教示を考慮して技術的に既知の手段で決定される。無毒性細菌の量は、無毒性でありながら病気の疑いのある動物内で免疫反応を刺激するために十分でなければならない。これは、関与する特定の動物、細菌、及び病気によって決まる。疑いのある動物に投与すべく推奨される用量は、好ましくは約 3.0TCID_{50} (組織培養感染量50%終点)/用量～約 6.0TCID_{50} /用量、さらに好ましくは約 4.0TCID_{50} /用量～約 5.0TCID_{50} /用量である。好ましい態様では、ワクチンのタイターは、組織培養感染量50%終点希釈アッセイ(TCID_{50})で決定する場合約 4.9TCID_{50} /用量である。担体は当業者に知られており、安定剤及び希釈剤が挙げられる。このようなワクチンは、適切なアジュバントをも含む。本発明のワクチンを例えば別のワクチンの希釈剤として他のワクチンと併用しうる。ワクチン製剤は、例えば、貯蔵目的のため又は引き続き液体ワクチンに製剤化するため凍結乾燥することによって乾燥させてもよい。

【0007】

従って、本発明は、動物宿主内における毒性の野生型L. イントラセルラリス細菌に対する免疫反応を該細菌から宿主を保護する目的のために誘発する方法をも含む。本方法は、疫学的に有効な量の本発明の弱毒化細菌又は死細菌を宿主に投与すること、好ましくは、本発明のワクチンを宿主に投与することを含む。

本明細書では、用語“大規模培養”は、約2.0～3.0リットルより大きいレベルのL. イントラセルラリスの培養を意味し、100リットル以上の規模の生産が挙げられる。本明細書では、“培養”は、L. イントラセルラリスの成長、再生及び／又は増殖を促進するプロセスを意味する。

L. イントラセルラリスは、技術的に公知の方法で、好ましくは米国特許第5,714,375号及び第5,885,823号に従って培養することができる。例えば、まずL. イントラセルラリス細菌を含む接種材料を培養細胞に接種して培養細胞をL. イントラセルラリス細菌で感染させる。本発明の実施では、多数の細胞系を使用でき、限定するものではないが、IEC-18(ATCC 1589)ーラット腸上皮細胞、HEp-2(ATCC 23)ーヒト類表皮癌細胞、McCoy's(ATCC 1696)ーマウス(非特異的)細胞、BGMK(Biowhittaker #71-176)ーバッファローミドリザル腎臓細胞及びブタ腸上皮細胞が挙げられる。好ましい培養細胞はHEp-2、McCoy's又はIEC-18細胞である。

培養細胞を使用する場合、接種前、細胞は単層の形態でよい。単層を形成するため、細胞を通常のフラスコに接種してよい。各フラスコには、通常、増殖培地と混合して25、75、150、850 cm^2 のフラスコ又はローラーボトル当たり約 1×10^5 細胞～約 10×10^5 細胞を接種する。増殖培地は、窒素源、選択した培養細胞に必要な成長因子、及びグルコース又はラクトースのような炭素源を含む、細胞培養用のいずれの培地でもよい。好ましい培地は、1～5%のウシ血清アルブミンを有するHam's F12で強化したDMEMであるが、他の市販されている培地を用いて良い結果を得ることができる。

培養細胞を一定の増殖状態に維持することによって、L. イントラセルラリスの培養は成功する。従って、培養細胞単層は、接種時点で少なくとも約20%～約50%のコンフルエンスでなければならない。好ましくは、細胞は接種時点で約30%～約40%のコンフルエンス、最も好ましくは約30%のコンフルエンスであるべきである。

或いは、後述するように、接種する前に懸濁液内で細胞を増殖させることができる。好ましくは、まず付着タイプシステム、例えばローラーボトルシステムで単層形態で100%のコンフルエンスに増殖させてから3～3000リットルに移して懸濁液内で増殖させる。或いは、3～3000リットル容器(バイオリアクター、発酵槽、スピナーフラスコ等)内でこのシステムで接種前に増殖させるために適したパラメーターを用いて細胞を懸濁液内で所望の細胞密度、例えば 2×10^5 細胞/mlに増殖させることができる。

【0008】

接種材料は、感染ブタ又は他の動物から得たL. イントラセルラリスの純粋培養菌でよい。接種材料はATCCアクセッション番号PTA-4927から得たL. イントラセルラリスの純粋培養菌が好ましい。

接種材料は、PPEで感染させたブタ又は他の動物の回腸の粘膜を小片にすることで調製

10

20

30

40

50

した腸ホモジネートでよい。腸ホモジネートを調製するとき、培養用に選択される回腸部分は、腸の肉眼で見えるほどの肥厚のある重度の傷害を示すべきである。細菌の脆い性質のため、試料は、好ましくは壊死後できる限り早く-70℃で貯蔵すべきである。好ましくは、バンコマイシン、アンホテリシンB又はごく少数の名を挙げるとゲンタマイシン及びネオマイシンといったアミノグルコシド群の抗生物質のメンバーのようなL. イントラセルラリスが耐性である抗生物質を接種材料に加えてL. イントラセルラリスを増殖させながら細菌が汚染するのを抑制する。接種材料が純粋培養菌又は腸ホモジネートのいずれであれ、本明細書の教示を考慮して技術的に既知の種々の方法で培養細胞の接種を達成することができる。

次に、低い溶解 O_2 濃度下で、細菌及び／又は接種培養細胞をインキュベートする。10 %より高い溶解酸素濃度では、L. イントラセルラリスの増殖は最適より少なく、この範囲外で最終的に増殖が停止する。好ましくは、約0 %～約10 %の範囲の溶解酸素濃度で細菌及び／又は接種培養細胞をインキュベートする。さらに好ましくは、約0 %～約8 %の範囲の酸素濃度、最も好ましくは約0 %～約3.0 %の酸素濃度で細菌及び／又は細胞をインキュベートする。

二酸化炭素の適切な濃度もL. イントラセルラリスの適切な増殖に重要である。0 %より高く4 %未満の二酸化炭素濃度では、最適でない増殖が起こり、この範囲外の二酸化炭素濃度で最終的に増殖が停止する。好ましくは、二酸化炭素濃度は約6 %～約10 %の範囲であり、約8.8 %の二酸化炭素濃度が最も好ましい。

また、好ましくは約4 %～約10 %の範囲の水素濃度で細胞をインキュベートする。最も好ましくは、約0～約8.0 %の O_2 、約8.8 %の CO_2 、及び約4 %の H_2 で細胞をインキュベートする。窒素は、この生物の増殖のための窒素(96 %)と水素(4 %)又は窒素(80 %)、二酸化炭素(10 %)及び水素(10 %)を含む混合気体の“バランス”として使用する。好ましくは、約80 %～96 %の範囲の窒素濃度で細胞をインキュベートする。従って、最も好ましくは、約0～8.0 %の O_2 、約8.8 %の CO_2 、約4 %の H_2 及び約96 %の N_2 で細胞をインキュベートする。

【0009】

適切な水素濃度、酸素濃度及び二酸化炭素濃度を含み、かつインキュベーションの間細胞を懸濁させることができるデュアルガスインキュベーター又は他のガスチャンバー内で接種細胞をインキュベートすることができる。チャンバーは接種細胞を懸濁状態で維持する手段と、適切な気体濃度を供給かつ維持するためのガスモニター及び供給源とを含むべきである。インキュベーション温度は30℃～約45℃の範囲でなければならず、さらに好ましくは約36℃～約38℃の範囲である。最も好ましくは、温度は約37℃である。培養及び弱毒化に必要な設備は、本明細書の教示を考慮して当業者が容易に入手することができる。本発明を実施するために好適な設備の一例は、懸濁状態で細胞を維持するためのスピナーフラスコを併用するデュアルガスインキュベーター、例えば、モデル480(Lab-Line, Melrose Park, IL)である。現在好ましい設備は、少なくとも約2リットルの培地を含有し、かつ適切な濃度のガスを吹き込んで、又は機械的攪拌の他の手段によって培養細胞を懸濁状態で維持し、継続的に培地中の溶解 O_2 レベルをモニターできる発酵槽、バイオリアクター、攪拌プレート又は回転式シェーカーである。New Brunswick, Braun及び他の会社は、この目的に好適な発酵槽及びバイオリアクターを製造している。

【0010】

インキュベーションの間、接種細胞を懸濁状態で維持することによって、それぞれ個々の細胞の増殖培地と水素、酸素及び二酸化炭素の適切な混合物への露出を高めることで、細胞、ひいてはL. イントラセルラリスの最大増殖が達成される。種々の技術的に公知の方法で培養細胞を攪拌して懸濁状態を維持することができ、その方法として、例えば、培養フラスコ、ローラーボトル、メンブラン培養、バイオバッグ、WAVETMバイオリアクターシステム、発酵槽及びスピナーフラスコが挙げられる。デュアルガスインキュベーター又は同様の装置内、スピナーフラスコ中で細胞をインキュベートすることによって、インキュベーションの間細胞を懸濁状態に保つことができる。本明細書では、用語“スピナーフ

ラスコ”は、培養物を攪拌して培養物に含まれる細胞を懸濁状態に保つためのパドル、プロペラ又は他の手段を利用するフラスコ又は他の容器を意味する。

好ましい態様では、接種細胞がコンフルエンスに達するまで接種細胞をインキュベートしてから、増殖培地を含有するスピナーフラスコに該細胞を入れ、フラスコを回転させながらデュアルガスインキュベーター内で細胞をインキュベートする。好ましくは、接種細胞を小片にし、又はトリプシン処理してスピナーフラスコ中に通す。これは、細胞スクレーパーを用いて細胞を引き離すような技術的に公知の種々の方法で達成することができる。細胞をスピナーフラスコ中に導入したら、典型的に、マグネチックスターラープレート上でスピナーフラスコのパドルを約5～約500rpmの範囲で回転させて感染細胞を懸濁状態に維持する。

10

次に、培養したL. イントラセルラリスの一部を新鮮な培養に継代してL. イントラセルラリス細菌の生成を増やす。ここで、用語“継代”又はその変形は、培養したL. イントラセルラリスの一部を新鮮な培養細胞に移してこの新鮮な細胞を該細菌で感染させるプロセスを意味する。本明細書では、用語“新鮮”は、まだL. イントラセルラリスで感染されていない細胞を意味する。好ましくは、該細胞は、平均して約1日齢を超えない。

懸濁培養中のL. イントラセルラリスの継代は、元の培養物の一部を除去し、これを新鮮な培養細胞を含有する新しいフラスコに加えることで達成することができる。元の培養物が多数の細菌/ml、例えば、約 10^4 細菌/mlを有する場合、感染フラスコから新鮮細胞を含有する新しいフラスコに約1～10%（体積-対-体積）の培養物を加えることが好ましい。50～100%の細胞が感染されている場合にこれを行うことが好ましい。50%未満の細胞しか感染されていない場合、培養物を1：2に分けて新しいフラスコに入れ、新鮮な組織培養細胞と培地を添加して体積をスケールアップすることで継代を行うことが好ましい。どちらの場合も、先行技術におけるような単層培養物の継代とは対照的に、細胞溶解及び他の工程が必要ない。

20

【0011】

間接的蛍光抗体（IFA）染色、TCID₅₀又は別の同様の方法で決定されるように、培養細胞の十分な増殖とその後のL. イントラセルラリスによる感染後、培養したL. イントラセルラリス細菌の少なくとも一部を収集する。典型的に、約60%以上の細胞感染力のときに収集を行うが、当業者は、60%未満の細胞感染力で収集を行えることを知っている。収集工程は、本明細書の教示を考慮して、当業者に周知の種々の技術で懸濁液から細菌を分離することによって達成しうる。好ましくは、すべて又は一部の懸濁液の内容物を遠心分離して、培養細胞をペレットにし、結果の細胞ペレットを再懸濁させ、かつ感染細胞を溶解させることによってL. イントラセルラリス細菌を収集する。典型的に、内容物の少なくとも一部を約3000xgで約20分間遠心分離して細胞及び細菌をペレットにする。次に、ペレットを例えばスクロース-ホスフェート-グルタメート（SPG）溶液に再懸濁させ、25ゲージ針を約20回通過させて細胞を溶解させる。さらなる精製が望ましい場合、試料を約145xgで約5分間遠心分離して細胞核と細胞デブリを除去することができる。次いで上清を約3000xgで約20分間遠心分離して生じたペレットを適切な希釈剤、例えばウシ血清アルブミンを有するSPG（凍結乾燥、凍結、又は接種剤として使用するのに好適な収集細菌を調製するため）又は増殖培地（新鮮な細胞に継代するためにさらに好適な収集細菌を調製するため）に再懸濁させる。

30

40

【0012】

既に述べたように、組織細胞を活発に成長し続けさせることで大規模生産に有効なL. イントラセルラリスの増殖が高まる。培養物がコンフルエントになると、単層では、細胞分割の速度が実質的に低減する。単層組織培養でL. イントラセルラリスを育てるための試みは成功に限界があり、スケールアップは不可能だった。しかし、懸濁培養を用いると、細胞を活発に増殖させ続けることを大いに促進し、連続的な培養拡大とスケールアップを可能にする。発酵槽と上述したように約0～3%の溶解O₂を用いると、 10^8 細菌/mlまでまたそれより多くの増殖が可能である。

IEC-18細胞を用いる場合、ゼラチン、アガロース、コラーゲン、アクリルアミド又はシ

50

リカビード、例えばCultisphere-G多孔性マイクロキャリア(HyClone Laboratories, Logan Utah)を増殖培地と共に添加することが好ましい。しかし、本明細書で使用方法によればHEp-2細胞及び他の細胞はマイクロキャリアを要しない。

培養維持目的のため、HEp-2培養では、毎週、好ましくは培養物の25%~50%を除去して新鮮な培地と交換する。マイクロキャリア又はビードを有する細胞培養では、毎週1~2回、好ましくは培養物の25%~50%を除去して新鮮な培地と交換する。スケールアップ目的では、さらに25%~50%の培地、又はマイクロキャリアを有する培地を培養物に加えることができる。

培養細胞が感染される速度によって、新鮮な細胞の継代は通常約2~約7日毎に行う。2~7日以内に培養細胞が少なくとも70%感染されると仮定すると、好ましくは約5~7日毎に継代を行う。 10

本発明は、欧州起源のL. イントラセルラリスの新規アイソレートに対するワクチン及びワクチンの製造方法をも提供する。好ましくは、長期間(例えば、6~8カ月)感染細胞を懸濁状態で維持した後、培養したL. イントラセルラリスの少なくとも一部を収集し、弱毒化の可能性をモニターする。このようなモニタリングは、好ましくは弱毒化アイソレートを選択するための宿主動物又は動物モデル誘発(challenge)によって行う。本明細書で教示する方法のワクチンで該弱毒化アイソレートを使用する。

【0013】

本発明は、迅速な培養拡張、100~1000倍の収率の増加、及び欧州起源のL. イントラセルラリス生成のコスト低減を可能にする。結果として、生成されたL. イントラセルラリス細菌の豊富な供給量がワクチン製造目的のためにたやすく弱毒化される。懸濁液状態でL. イントラセルラリスを増殖させる方法は、この目的で利用できる細菌の入手し易さ、速さ、及び数を大いに高める。細胞及び起こる細胞分割が多いほど、ワクチン開発に有利な突然変異が起こるレベルが高い。従って、懸濁状態の増殖は、環境的に調節されている遺伝子とその発現産物によって制御される重要な免疫原の発現を増やす。 20

その結果の弱毒化アイソレートは、組織培養単層中で培養できるが、好ましくは懸濁培養で培養する。弱毒化の他の手段として、例えば、N-メチルニトロソグアニジン及び技術的に公知の他のものを用いる化学的弱毒化が挙げられる。複数継代によって或いは化学的手段によっても弱毒化L. イントラセルラリスが生成し、ワクチン調製用を選択する。好ましい態様では、結果の弱毒化アイソレートはATCCアクセッション番号PTA-4926である。 30

上述したように遠心分離又はマイクロろ過でワクチン抗原を収集することができる。次に、宿主動物種における用量滴定で決定される、最適な宿主動物の免疫反応に基づいて定義されるレベルで抗原を標準化する。技術的に公知の方法、例えば、0.3%ホルマリン又は他の不活性化剤を用いて細菌を不活性化して死菌ワクチンを調製することができる。次に、水酸化アルミニウム又は鉱油のような適切なアジュバントに該抗原を組み込んで免疫反応を高める。次に、この抗原を用いて筋肉内又は皮下注射でワクチン接種し、約3~4週齢のブタの場合、必要に応じて追加誘発量をワクチン接種する。

好ましくは、細菌を連続的に継代して誘発して、弱毒化した無毒性の生培養菌を選択する。宿主動物内で弱毒化の徴候について培養菌を試験する。前述したように培養菌を収集かつ凍結乾燥する。例えば、ブタは経口で $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 細菌でワクチン接種する。ワクチン接種後約28日に、低継代(腸ホモジネートからの最初の単離を越えて30未満のインビトロ継代)のL. イントラセルラリスの毒性培養菌から得た約 1×10^7 生物でブタを経口接種する。感染動物は誘発21日後に壊死し、肉眼で見える傷害のみならず顕微鏡で見えるほどの傷害について小腸を観察する。PCR、間接蛍光抗体(IFA)又は免疫組織化学(IHC)も行うべきである。 40

【0014】

約8%の対照動物が肉眼で見える傷害と顕微鏡で見えるほどの傷害を示し、PCR、IFA又はIHC試験法を用いて腸の粘膜細胞内のL. イントラセルラリスの存在についてポジティブ試験を行う。組織学的観察で決定した場合、ワクチン接種した動物は正常な粘膜表面を有し、ワクチン接種3~4週間後のPCR試験ではネガティブである。 50

一般に、弱毒化免疫原性L. イントラセルラリスアイソレートは約150日～約250日の連続培養後に生成され、この間に培養を約50～100回継代する。しかし、当業者は、これらの数字を変えて他の弱毒化培養物を生産することができる。

本発明のワクチン製品は凍結乾燥させることができる。収集後、技術的に公知の種々の方法でアイソレートを濃縮し、安定剤、例えばスクロースゼラチン安定剤と混合することができる。次いで、ワクチン製品を凍結かつ乾燥（凍結乾燥）に供することができる。一般に、凍結工程は、約 $-45^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ に傾斜する工程と約150分～約480分間保持する工程を含む。乾燥工程は、第1及び第2乾燥工程を含みうる。例えば、第1乾燥工程は以下の工程を含みうる：（a）約 -30°C ～約 -5°C への傾斜工程と約120分～約1000分の保持工程、及び任意に（b）約 -5°C ～約 5°C への傾斜工程と約150分～約2000分の保持工程。第2工程は、一般的に約 $27^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ への傾斜工程と約330分～約1120分の保持工程を含む。当業者は、条件、例えば開始体積によってこれら範囲を調整することができる。

次に、免疫学的に有効な量の弱毒化L. イントラセルラリスを医薬的に許容しうる担体中に含むワクチンを調製する。好ましい態様では、ワクチンは、医薬的に許容しうる担体中にATCCアクセッション番号PTA-4926を含む。この混ぜ合わせた免疫原と担体は水溶液、エマルジョン又は懸濁液でよい。免疫学的に有効な量は、本明細書の教示を考慮すれば、過度の実験を行うことなく技術的に公知の手段で決定される。一般に、免疫原の量は、精製細菌を用いる場合、 $5 \sim 5000\text{mg}$ 、かつ $10^{2.0} \sim 10^{9.0} \text{TCID}_{50}$ 、好ましくは $10^{3.0} \sim 10^{6.0} \text{TCID}_{50}$ 、さらに好ましくは $10^{4.0} \sim 10^{5.0} \text{TCID}_{50}$ である。

【0015】

本発明は、ATCCアクセッション番号PTA-4926と命名された弱毒化L. イントラセルラリスアイソレートと、少なくとも1種の他の病原由来の抗原物質と、医薬的に許容しうる担体とを含む組合せワクチンをも包含する。前記病原としては、限定するものではないが、サルモネラ(*Salmonella*) spp.（例えば、ブタコレラ菌(*Salmonella choleraesuis*)、ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)）、エリシペロトリックス(*Erysipelothrix*) spp.（例えば、ブタ丹毒菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)）、ヘモフィルス(*Haemophilus*) spp.（例えば、ブタパラインフルエンザ菌(*Haemophilus parasuis*)）、マイコプラズマ spp.（例えば、*Mycoplasma hyopneumoniae*）、レプトスピラ(*Leptospira*) spp.、クロストリジウム(*Clostridium*) spp.（例えば、ウェルシュ菌(*Clostridium perfringens*)、クロストリジウムディフィシレ(*Clostridium difficile*)）、ストレプトコッカス spp.（例えば、ブタ連鎖球菌(*Streptococcus suis*)）、ブラキスピラ(*Brachyspira*) spp.（例えば、ブラキスピラ・ヒオディセンテリエ(*Brachyspira hyodysenteriae*)）、ボルデテラ(*Bordetella*)（例えば、気管支敗血症菌(*Bordetella bronchiseptica*)）、パストレラ(*Pasteurella*) spp.（例えば、パストレラ・ムルトシダ(*Pasteurella multocida*)）、サーコウイルス(*circovirus*)（例えば、ブタサーコウイルス2型）、ブタ生殖器及び呼吸器症候群(*porine reproductive and respiratory syndrome*) (PRRS) ウイルス、ブタインフルエンザウイルス(SIV)、大腸ウイルス（例えば、伝播性胃腸炎(TGE)ウイルス、ブタ呼吸器コロナウイルス）、パルボウイルス、又は大腸菌が挙げられる。

【0016】

一態様では、組合せワクチンは、ATCCアクセッション番号PTA-4926と命名された弱毒化L. イントラセルラリスアイソレートと、ブタコレラ菌、エリシペロトリックス spp.、クロストリジウム spp.、ブラキスピラ spp.、伝播性胃腸炎(TGE)ウイルス、及び大腸菌由来の抗原物質と、医薬的に許容しうる担体とを含む。クロストリジウム spp. 由来の抗原物質として、限定するものではないが、ウェルシュ菌及びクロストリジウムディフィシレが挙げられる。エリシペロトリックス spp. 由来の抗原物質として、限定するものではないが、ブタ丹毒菌が挙げられる。

別の態様では、組合せワクチンは、ATCCアクセッション番号PTA-4926と命名された弱毒化L. イントラセルラリスアイソレートと、ブタコレラ菌及びエリシペロトリックス spp. 由来の抗原物質と、医薬的に許容しうる担体とを含む。別の態様では、組合せワクチンは、ATCCアクセッション番号PTA-4926と命名された弱毒化L. イントラセルラリスアイソレ

10

20

30

40

50

ートと、ブタコレラ菌及びブタ丹毒菌由来の抗原物質と、医薬的に許容しうる担体とを含む。

別の態様では、組合せワクチンは、ATCCアクセッション番号PTA-4926と命名された弱毒化L. イントラセルラリスアイソレートと、少なくとも1種の他の病原（限定するものではないが、クロストリジウム spp.（例えば、破傷風菌）、ウマインフルエンザウイルス(EIV)(例えば、EIV-1、EIV-2)、ウマヘルペスウイルス(EHV)(例えば、EHV-1、EHV-2、EHV-3、EHV-4、EHV-5、EHV-6、EHV-7)、アルファウイルス(例えば、東部脳炎ウイルス、西部脳炎ウイルス、ベネズエラ脳脊髄炎ウイルス)、又は西ナイルウイルスが挙げられる)と、医薬的に許容しうる担体とを含む。

【0017】

本発明のワクチンは、一般的に、疑いのある動物、好ましくはブタに1又は複数用量で投与される。生ワクチン又は死菌ワクチンを1回又は2週間間隔で2回投与することができる。弱毒化した生ワクチンでは、1回投与が好ましい。弱毒化生アイソレートの好ましい投与経路は筋肉内、経口又は鼻腔内であるが、死菌ワクチンでは筋肉内及び皮下注射経路が最も好ましい。

原因となる細菌を培養するために必要な時間によってPPEの効果的な診断も邪魔されている。本発明の結果として、今や、PPEの疑いのあるブタ及び他の動物から採取した生体試料中のL. イントラセルラリスの存在の迅速かつ正確なアッセイを促進する診断ツールの開発が可能である。

ELISA又は免疫蛍光抗体試験（“IFA”）のような他のイムノアッセイで欧州起源のL. イントラセルラリス細菌、又は該細菌由来の成分を抗原として用いて該細菌に感染している疑いのある動物の血清及び他の体液中のL. イントラセルラリスに対する抗体を検出することができる。現在好ましいイムノアッセイは下記実施例で述べるようなIFAである。或いは、本発明の細菌をウェスタンブロットアッセイで使用することができる。

【0018】

本発明の好ましいELISA手順は以下のとおりである。

1. コーティング緩衝液に希釈した0.1ml/ウェルの抗原を添加する。4℃で18時間インキュベートする。
2. PBSで3回洗浄する。
3. プレートの各ウェルに0.25mlのブロッキング緩衝液を添加する。37℃で1～2時間インキュベートする。
4. 洗浄緩衝液で3回洗浄する。
5. ブロッキング緩衝液に血清を希釈し、プレートの第1ウェルに0.1ml添加する。プレートをまたがる連続的な1：2希釈物を作る。37℃で1時間インキュベートする。
6. 洗浄緩衝液で3～5回洗浄する。
7. ブロッキング緩衝液に抱合体を希釈し、プレートのウェルに0.1ml添加し、37℃で1時間インキュベートする。
8. 洗浄緩衝液で3～5回洗浄する。
9. 基質を添加する。
10. 分光光度計で光の吸収を測定する。
11. 抗原を添加しないウェルをブランクとして使用する。
12. 各試験で正及び負の対照ブタ血清も使用すべきである。

【0019】

好ましいウェスタンブロット手順は以下のとおりである。

1. 抗原を12% SDS-PAGE上に流し、ニトロセルロース膜に移す。
2. 膜を2時間ブロッキング緩衝液に入れる。
3. ブロッキング緩衝液を除去し、PBSで1分間洗い流す。
4. ブロッキング緩衝液に血清を希釈し、膜に添加する。室温で2時間インキュベートする。
5. 洗浄緩衝液で3回洗浄する（各洗浄5分間）。

6. 抱合体をブロッキング緩衝液に希釈し、膜に添加する。室温で1時間インキュベートする。
7. 洗浄緩衝液で3回洗浄する。
8. 10分間又は強いバンドが現れるまで基質を添加する。
9. PBSで洗い流す。
10. 空気乾燥させ、暗所で貯蔵する。

【0020】

本発明の欧州起源のL. イントラセルラリス細菌、又は該細菌由来の成分を用いて診断、予防、又は治療用途の抗血清又は抗体を調製することもできる。技術的に公知の方法及び本明細書で述べる方法により、本発明の欧州起源のL. イントラセルラリス細菌、又は該細菌由来の成分を非ヒト動物に免疫反応を誘発するのに有効な量で投与して、L. イン

10

トラセルラリス細菌、又は該細菌由来の成分に対する抗体を含有する抗血清若しくは血漿を収集することができる。

以下の実施例で本発明をさらに説明するが、この実施例は説明目的だけのために提供したものであり、限定と解釈すべきでない。実際、当業者には、本発明の他の変形が容易に分かるだろう。

本明細書のすべての刊行物及び特許文献は、参照によってその全体が本明細書に取り込まれる。

【0021】

〔実施例1〕

20

L. イントラセルラリスワクチンの製造

〔ブタ増殖性腸疾患(PPE)の欧州ブタの腸由来のL. イントラセルラリスの単離及び弱毒化〕

L. イントラセルラリス毒性アイソレートDK 15540(本明細書ではDK 15540、DK-15540及び15540を相互交換可能に使用する)は、急性ブタ出血性腸疾患に感染しているデンマークブタの回腸ホモジネートからミネソタ大学で単離された。このアイソレートは、ブダペスト条約下、米国菌培養収集所(ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209によって2003年1月9日に寄託され、アクセッション番号PTA-4927が割り当てられている。単離プロセスは、回腸由来の粘膜を小片にし、ホモジネートし、30分間トリプシン処理し、かつ組織グライNDERを通す工程を含む。次に、回腸ホモジネートを5.0、1.0、及び0.65 μm から成る一連のフィルターを通した。ホモジネートを、10% ウシ胎児血清(FBS)を有するスクロースホスフェートグルタメート緩衝液に希釈した。一定分量(6 $\times$ 1ml)のホモジネートを調製し、-70°C未満で貯蔵した。ホモジネートを接種材料として用いてT-75cm² フラスコのMcCoy細胞を感染させた。McCoy細胞感染についてMcCoy細胞単層を小片にし、塩化カリウム処理で細胞を溶かし、かつその濃縮細胞ペレットを、L. イントラセルラリスに特異的なモノクローナル抗体を用いてIFAで染色した顕微鏡スライドガラス上に置くことによって培養物を毎日モニターした。固着剤依存性細胞培養で11回継代後、継代11から得た接種材料を、McCoy細胞を含有する250mlのスピナーフラスコに移し、収穫まで懸濁状態で育てた。L. イントラセルラリスのデンマークアイソレート(ATCCアクセッション番号PTA-4927)を80週間McCoy細胞中で連続的なインビトロ継代で弱毒化し、モノクローナル抗体でアイデンティティーについて試験した。この弱毒化アイソレートをB3903(B3903、B 3903及びB-3903は本明細書では相互交換可能に使用される)と命名した。アイソレートB3903はブダペスト条約下、米国菌培養収集所, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209によって2003年1月9日に寄託され、アクセッション番号PTA-4926が割り当てられている。

30

40

【0022】

〔培養〕

〔同定〕

特徴的な成長要求、PCR反応、及びモノクローナル抗体反応を用いてL. イントラセルラリスマスター種及びワーキング種物質を同定した。

50

〔純度〕

L. イントラセルラリスのマスター種及びワーキング種の純度は、培養物をモノクローナル抗体染色、細菌やウイルスの通常の外来性因子試験及び無菌性マイコプラズマ試験によって決定した。

〔毒性〕

L. イントラセルラリスのマスター種は、下記実施例 2 でさらに説明するように、毒性 L. イントラセルラリスの暴露後の疑いのあるブタで観察される臨床徴候及び肉眼で見える傷害を生じさせるようなマスター種及び逆継代接種材料の能力の欠如によって示されるように毒性でなかった。

〔継代培養の範囲〕

L. イントラセルラリスの生成から最後に収集される物質はマスター種から 11 継代を超えなかった。

〔培地組成〕

EU McCoy マスター細胞ストック (MCS) は、ハムの強化 F12 (Ham's Fortified F12) を有するダルベッコの変性イーグル培地 (DMEM/F12) 及び 1 ~ 10% (v/v) の新生ウシ血清 (NBS) 又は胎児ウシ血清 (FBS) (細胞増殖及び維持培地) で増殖かつ維持した。

マスター種及びワーキング種は、1 ~ 10% (v/v) の NBS 又は FBS 及び 5 ~ 15% (v/v) グリセロールを有する DMEM/F12 (マスター種及びワーキング種貯蔵培地) 中で貯蔵した。

最終収集産物はスクロースゼラチン安定剤 (SGS) (最終産物貯蔵培地) 内で貯蔵した。

〔繁殖〕

上述した細胞増殖及び維持培地を用いて EU McCoy MCS 内で L. イントラセルラリスのマスター種及びワーキング種を繁殖させ、約 -35°C 以下で貯蔵した。

〔組織源〕

L. イントラセルラリス種及び生成生物を McCoy マスター細胞ストック内で増殖させた (ATCC アクセッション番号 CRL 1696、バッチ番号 F-10422)。マスター細胞ストックを継代 X で 3894 MMCSS と同定した。マスター細胞ストックをさらに 6 回継代し、EU McCoy MCS X+0 と同定した。EU McCoy MCS 継代 X+0 を -70°C ± 5 °C 以下で貯蔵した。EU McCoy MCS 細胞株継代培養内で 40th 継代を経て生産ワクチンを製造した。

〔培養容器〕

25 ~ 150 cm² の表面積を有する組織培養フラスコ内、Costar 細胞キューブ内、850 cm² ~ 2, 2250 cm² のローラーボトル内、40 L 容量までのスピナーフラスコ内、及び 3 L ~ 500 L の容量を有するバイオリアクター内で EU McCoy MCS を繁殖させた。

L. イントラセルラリスの種培養は 250 ~ 40,000 ml のスピナーフラスコ内、850 cm² ~ 2, 250 cm² ローラーボトル内、25 ~ 150 cm² の表面積を有する組織培養フラスコ内、又は 3 L ~ 500 L の容量を有するバイオリアクター内で増殖させた。

L. イントラセルラリスの生産培養は 6 L ~ 40 L のスピナーフラスコ内又は 3 L ~ 500 L の容量を有するバイオリアクター内で増殖させた。

【0023】

〔播種又は接種用懸濁液の調製方法〕

〔播種培養〕

凍結した又は新鮮な L. イントラセルラリスマスター種又は拡張ワーキング種を室温 (25 °C ± 3 °C) 又は 37 °C ± 2 °C で解凍した。予め McCoy 細胞を 50,000 ~ 500,000 細胞 / ml の細胞密度で播いたバイオリアクター、スピナーフラスコ又はボトルを 1 ~ 10% (v/v) の濃度又は 0.08 ~ 1.0 の MOI に L. イントラセルラリスで感染させた。86% N₂、4 % H₂ 及び 10% CO₂ の気体混合物で覆うことによって酸素濃度を低減下で感染培養をインキュベートした。37 °C ± 2 °C、pH 6.7 ~ 7.3 で培養物を連続的に攪拌しながら (10 ~ 100 rpm) 3 ~ 10 日間インキュベートして、細胞が懸濁状態のままで十分な混合を維持した。

〔生産培養〕

凍結した又は新鮮な L. イントラセルラリスマスター種又は拡張ワーキング種を室温 (25 °C ± 3 °C) 又は 37 °C ± 2 °C で解凍した。予め McCoy 細胞を 50,000 ~ 500,000 細胞 / ml の細胞密

10

20

30

40

50

度で播いたバイオリアクター又はスピナーフラスコ(容量 3 L～500 L)を 1～10% (v/v)の濃度又は 0.08～1.0の MOI に L. イントラセルラリスで感染させた。96% N₂、4% H₂の気体混合物で覆い或いは該気体混合物を吹き込むことによって酸素濃度低減下で感染培養をインキュベートした。37℃±2℃、pH6.7～7.3で培養を連続的に攪拌しながら(10～100rpm) 3～8日間インキュベートして、細胞が懸濁状態のままで十分な混合を維持した。

〔種培養と生産培養の接種法〕

〔種培養〕

10% (v/v)までのマスター種を、増殖培地中で 0～7日の McCoy細胞を播いたバイオリアクター、スピナーフラスコ又はボトルに接種した (MOI=0.08～1.0)。

〔生産培養〕

10% (v/v)までの生産種を、3 L～500 L 容量の容器中、適切な McCoy細胞密度で 0～7日の McCoy細胞を播いた適切な体積の増殖培地に接種した (MOI=0.08～1.0)。

〔微生物のインキュベーション〕

低酸素雰囲気下で 3～10日間 37℃±2℃で培養物を攪拌しながらインキュベートして懸濁液を維持した。さらなる培地及び／又は McCoy細胞を添加して増殖プロセスを継続することができる。

インキュベーションの間、多量の増殖の証拠又はコンタミネーションの徴候について肉眼で培養物を観察した。

【0024】

収集：

〔培養物の取扱い及び調製〕

間接蛍光抗体 (IFA) 染色によって細菌の十分な増殖の徴候を調べた。培養物は、典型的に 60～100%の細胞感染力を示す用意ができていた。感染率は、少なくとも 3つの領域 (各領域は表面積の少なくとも 80%を満たすのに十分な McCoy細胞を含有する) の観察によって決定した。約 50%の細胞が細菌で満たされている場合に感染したとみなす。

収集培養の力価は、特異的モノクローナル抗体 (抗-L. イントラセルラリスモノクローナル抗体 VPM 53 Lot 31599又は均等物；抗-マウス IgG-フルオレッセイン抱合体 (FITC) (ICN 番号 55499)) を用いて 37℃±2℃でインキュベーション後 6日に固定かつ染色した McCoy細胞上の試料の滴定によって調べた。

コンタミネーションのいずれの明白な徴候についても培養物を目視検査した。接種後 3～10日に収集を行った。

〔収集法及び特定化〕

生産培養バイオリアクター、スピナーフラスコ及びボトル中の細胞と液状物の一部又はすべてを無菌の受容器に収集した。各生産培養バイオリアクター、スピナーフラスコ及びボトルから別個に収集し、或いはいくつかの容器の中身を SGS を添加してプールし、1℃～7℃以下で貯蔵した。収集した生産培養物は、TCID₅₀による力価と IFA 染色による同定用にサンプリングした。生産培養物は IFA 染色で少なくとも 4.9TCID₅₀/ml を示し、顕微鏡観察でいずれのコンタミネーションの痕跡も無かった。

【0025】

ワクチン製品の調製：

〔濃縮法〕

種々の方法、例えば、デカンテーション後の上清で培養物を安定させることによって、メンブランろ過 (0.22 μm 以下)、漕流、又は遠心分離によってワクチン製品を濃縮することができる。

〔スクロースゼラチン安定剤 (SGS)〕

SGS パッチサイズの約 25%の最終総体積でゼラチンを脱イオン水又は注射用水と混合して 121℃で 120分間オートクレーブ内で加水分解することによって加水分解ゼラチン溶液を調製する。

次に、この加水分解ゼラチン溶液 (40.0g/L) を SGS パッチサイズの約 75%の最終総体積で脱イオン水又は注射用水と混合した。水酸化カリウム (AR) (0.548g/L)、L-グルタミン酸 (1

10

20

30

40

50

.440g/L)、リン酸二カリウム (AR) (2.508g/L)、リン酸二水素カリウム (AR) (1.030g/L)、及びスクロース (AR) (150.00g/L)を加え、溶液を完全に混合した。安定剤のpHを塩酸又は水酸化ナトリウム溶液で6.8～7.0に調整した。脱イオン水又は注射用水を加えて所望最終体積のSGSにした。この完成安定剤を完全に混合し、全溶液を0.1ミクロンフィルターに通する過で滅菌した。

【0026】

シリアルを作るためのユニットの構築例を表1に示す。

表 1

L. イントラセルラリス	200,000～300,000ml
スクロースゼラチン安定剤 (SGS)	100,000ml (25% v/v)
DMEM/F12 (加えて産物を標準化しうる)	0～150,000ml
総体積	400,000ml

10

平均シリアルの体積は50 L～500 Lだった。

【0027】

〔凍結乾燥〕

10用量サイクル(6.0ml充填)では表2、50/100用量サイクル(10.0ml充填)では表3に概要を示す手順に従ってワクチン製品を凍結乾燥した。

20

表 2

工程	℃	速度 (分)	保持 (分)	圧力 (mT)
予備冷却*	5°	Na	Na	Atm
凍結	-47° ± 3°	できるだけ速く	150	Atm
1° 乾燥、1st	-15° ± 2°	120	120	100～150
1° 乾燥、2nd	0° ± 2°	120	180	100～150
2° 乾燥、1st	32° ± 2°	240	180	60～80
2° 乾燥、2nd	26° ± 2°	240	できるだけ速く	60～80

30

総時間：1352分(22.5時間)

* 凍結乾燥器の装填の間 5℃ ± 2℃ に棚を予備冷却する。

【0028】

表 3

工程	℃	速度 (分)	保持 (分)	圧力 (mT)
予備冷却*	5°	N/A	N/A	Atm
凍結	-48° ± 3°	60	90	Atm
1° 乾燥	-15° ± 2°	60	1500	100～150
2° 乾燥	26° ± 2°	60	600	60～80

40

総時間：2370分(39.5時間)

* 凍結乾燥器の装填の間 5℃ ± 2℃ に棚を予備冷却する。

【0029】

〔実施例2〕

〔L. イントラセルラリスワクチンの安全性〕

目的：

50

この研究の目的は2つあった。この研究の第1の目的は、6と1/2週齢のブタでL. イントラセルラリスの3つの異なる低継代アイソレート（2つは米国起源で1つは欧州起源）によって引き起こされる疾患の発生率を観察して比較することだった。第2の目的は、6と1/2週齢のブタにおけるL. イントラセルラリスの2つの高継代アイソレート（両方とも欧州起源）の安全性を観察することだった。

〔材料と方法〕

〔試験物質〕

1. L. イントラセルラリス低継代米国アイソレート N343
2. L. イントラセルラリス低継代米国アイソレート N101494
3. L. イントラセルラリス低継代欧州アイソレート DK 15540 p20 10
4. L. イントラセルラリス高継代欧州アイソレート DK 15540 p60
5. L. イントラセルラリス高継代欧州アイソレート DK 15540 p80（マスター種名 B3903）。

〔試験物質の調製〕

低継代アイソレートは、McCoy細胞懸濁液で単離後10～20週間継続して増殖させた。高継代アイソレートは、McCoy細胞懸濁液で単離後60～80週間継続して増殖させた。すべての培養物を10,000RPMで15分間遠心分離によって収集した。ローソニアを含有するMcCoy細胞培養ペレットを、10%FBSを有するスクロース-ホスフェート-グルタメート (SPG) 溶液に再懸濁させた。

〔試験物質の貯蔵〕

収集した培養物は誘発(challenge)の日まで-70℃で貯蔵した。同一のアイソレートであるが種々の収集日付の誘発用培養物を解凍し、プラスチックのワクチンボトルと一緒に入れ、標識し、かつ誘発の時まで4℃又は氷上で貯蔵した。

【0030】

〔試験物質のアッセイ〕

プールしたすべての誘発用アイソレートについて誘発の時（日0）にTCID₅₀を行った。平均タイター(n=3)(TCID₅₀/ml)は下表4のとおりだった。

表 4

試験物質	平均タイター (TCID ₅₀ /ml)
L. イントラセルラリス N343	6.4
L. イントラセルラリス N101494	6.1
L. イントラセルラリス DK 15540 p20	6.2
L. イントラセルラリス DK 15540 p60	6.87
L. イントラセルラリス DK 15540 p80	7.4

【0031】

〔研究設計〕

この研究は5つの実験群と1つの対照群から成る。研究の日0に、1群（10匹のブタ、6と1/2週齢）は、1回の10ml又は等価な胃内(IG)用量のL. イントラセルラリス低継代米国アイソレート N343を受けた。2群（10匹のブタ、6と1/2週齢）は、1回の10ml又は等価なIG用量のL. イントラセルラリス低継代米国アイソレート N101494を受けた。3群（10匹のブタ、6と1/2週齢）は、1回の10ml又は等価なIG用量のL. イントラセルラリス低継代欧州アイソレート DK15540 p20を受けた。4群（10匹のブタ、6と1/2週齢）は、1回の10ml又は等価なIG用量のL. イントラセルラリス低継代欧州アイソレート DK15540 60週を受けた。5群（20匹のブタ、6と1/2週齢）は、1回の10ml又は等価なIG用量のL. イントラセルラリス低継代欧州アイソレート DK15540 p80を受けた。“真正対照”と命名した6群（10匹のブタ、6と1/2週齢）は処理を受けなかった。

適切な試験動物の研究の開始から誘発の日まで毎日健康観察を行った。1～4の尺度で 50

誘発の日(日0)から研究の終了(日21)まで毎日臨床的な健康(挙動、食欲、身体状態、被毛状態、及び糞便の堅さ)を決めた。誘発の日(日0)から研究終了日(日21)まで毎日の平均増量(ADWG)を計算した。糞便によるL. イントラセルラリスの排出を日0、7、14、及び21に評価した。研究中に死亡した1匹(1群)の動物を肉眼で見える傷害と顕微鏡で見えるほどの傷害について調べた。組織学及びPCR解析で確認してPPEに附随する傷害によるものと決定し;この動物は置き換えなかった。糞便中のローソニア含量の定量分析は、回腸と結腸に関するL. イントラセルラリスについての組織学的評価と共にPCRによって評価した。研究の日0、7、14、及び21に血清を収集した。

10

【0032】

結果:

20

〔研究結果の要約〕

表 5

群	処理	ブタ の数	タイター (TCID ₅₀ / ml)	血清 学	糞便 排出	PCR	FA	組織 学	肉眼 傷害	ADWG	臨床 スコ ア
1	N343	9	7.4	19%	11%	0%	11%	44%	1	0.61	5.23
2	N101494	10	7.1	10%	10%	10%	30%	30%	1.2	0.8	5.15
3	DK15540p20	10	7.2	18%	13%	30%	10%	20%	1.2	0.86	5.01
4	DK15540p60	10	7.87	5%	0%	0%	0%	10%	1	0.9	5
5	DK15540p80	20	8.4	0%	0%	0%	0%	0%	1	1.05	5
6	真正対照	10	0	0%	0%	0%	0%	0%	1.05	0.91	5

30

【0033】

〔一般的観察〕

誘発まで毎日健康を観察した。研究持続期間の誘発後毎日動物の臨床状態を評価した。以下のことを観察した:挙動、食欲、身体状態、被毛状態及び糞便の堅さ。これら動物の臨床状態は、病気の重症度を反映する数値ポイントシステムに基づいて評価した。各パラメーターについてスコアは1~4の範囲である。正常な健康状況の動物にスコア1を与え、重度の臨床徴候を示す動物にスコア3を与え、死亡した動物にスコア4を与えた。真正対照、DK15540p60、及びDK15540p80の毎日の平均スコアは5.0だった。低継代物質についての毎日の平均スコアは、N343(5.23)、N101494(5.15)、及びDK15540p20(5.01)だった。これら結果についての統計解析は、Kruskal-Wallis Rank Sum Testを用いて処理群と対照群との間に差異を示さなかった。

40

〔毎日の平均増量(ADWG)〕

誘発の時(日0)から研究の終了(日21)まで毎日の平均増量を計算した。真正対照群の1日当たりの平均増量は408g(0.9ポンド)だった。低継代処理群の平均増量は、272g(0.6ポンド)(N343)、363g(0.8ポンド)(N101494)、及び390g(0.86ポンド)(DK15540 p20)/日だけだった。高継代処理群は、誘発を受けなかった真正対照群と比べて1日当たりの平均

50

増量は同じかそれ以上であり、それぞれ408 g (0.9ポンド)/日(DK15540p60)及び476 g (1.0ポンド)/日(DK15540p80)だった。毎日の平均増量の平均的な相異は、本研究の日21における高継代処理群(DK15540p60及びp80)と真正対照群に比し、N343処理群では有意に低かった。(ピアソン χ -二乗 $p < 0.05$)。

【0034】

〔抗体陽転〕

IFATアッセイで抗-ローソニア抗体の存在について試験することによってブタにおけるローソニア暴露に対する抗体陽転を測定した。日0には、N343処理群だけが2/10匹のブタで検出できる抗体陽転が認められた。日7では、2/9匹のブタ(N343)及び1/10匹のブタ(DK15540p20)がローソニア抗体についてIFAポジティブが観察された。日14では、N343処理群で2/9匹のブタがIFAポジティブであり、DK15540p20及びDK15540p60でそれぞれ1/10匹のブタがIFAポジティブだった。日21では、1/10匹のブタ(N343)、4/10匹のブタ(N101494)及び6/10匹のブタ(DK15540p20)がIFAポジティブであるが、高継代処理群(DK15540p60及びDK15540p80)は検出できる抗体陽転を示さない。ローソニア暴露に対する抗体陽転は、本研究の日21で米国と欧州の両アイソレートの低継代L. イントラセルラリスを受ける処理群で増えた。

〔糞便排出〕

糞便のPCR試験により、日14にL. イントラセルラリスの排出が始まることが分かり、この日に、試験した低継代動物N343で4/9匹、N101494で4/10匹、及びDK15540p20で5/10匹がポジティブだった。両高継代処理群と真正対照群は日14ではPCRネガティブだった。日21に、DK15540p20処理群は1匹の動物がPCRポジティブであるが、他のすべての群及び対照群はPCRネガティブだった。研究全体でPCRにより高継代アイソレート群(DK15540p60及びDK15540p80)では排出の証拠が観察されなかった。糞便中にローソニアの活発な排出を示すPCRポジティブ動物は、日14で高継代アイソレート群と真正対照群より低継代アイソレート群(N343、N101494、及びDK15540p20)で有意に多かった(ピアソン χ -二乗 $p < 0.05$)。

〔日21におけるPCR：回腸及び結腸〕

検死後(日21)に回腸及び結腸の粘膜小片のPCR試験を行った。L. イントラセルラリスコロニー形成についてPCRポジティブである試料はN101494中に(2/10結腸)及びDK15540p20低継代アイソレート群中に(2/10回腸、及び4/10結腸)あった。すべての他の処理群と対照群は本研究の日21の組織中でPCRネガティブだった。結果は、DK15540p20のブタの回腸及び結腸が、他の処理群及び対照群に比べて有意に多くL. イントラセルラリスとコロニー形成したことを示した。

〔組織学〕

検死のとき(日21)に末端の回腸及び結腸の部分を収集し、組織学解析用の緩衝ホルマリンに入れた。4/9匹のブタ(N343)、3/10匹のブタ(N101494)、2/10匹のブタ(DK15540p60)及び1/20匹のブタ(DK15540p80)の、ヘマトキシリンとエオシン(H&E)及びウォーシン-スターリー銀試薬で染色した組織で細胞内細菌及び陰窩肥厚化の存在を観察した。傷害発生は、1/9匹のブタ(N343)、3/10匹のブタ(N101494)、及び1/10匹のブタ(DK15540p60)で、ローソニア・イントラセルラリスに対するモノクローナル抗体を用いる蛍光抗体染色によって確認した。FAは、すべての処理群と対照群の結腸でローソニアによって生じる傷害を検出できなかった。FA結果は、N101494処理群のブタの回腸で、全処理群と対照群に比べて有意な傷害発生を示した。H&E/銀染色は、N343処理群で全処理群及び対照群に比べてPPEに附随する有意な傷害発生を示した。(ピアソン χ -二乗 $p < 0.05$)。

【0035】

〔肉眼スコア〕

検死の時(日21)にPPEに附随する傷害について回腸と結腸のスコアをつけた。正常な状況(傷害の発生なし)の組織にスコア1を与え、軽い肥厚化を示す傷害にスコア2を与え、中程度の肥厚化にスコア3、重度の肥厚化にスコア4を与えた。真正対照は、1.05の平均臨床スコアを有し、N343(1.0)、N101494(1.2)、DK15540p20(1.2)、DK15540p60及びp80(1.0)だった。平均肉眼傷害スコアは、複数比較用ANOVA試験を用いて対照と処理群の間に

統計的な差異が無いことを示した。

結論：

集めたデータに基づき、この研究は、TCID₅₀が 1×10^7 細菌/用量より高い低継代用量のN343、N101494、及びDK15540を投与したブタは、これら動物内でPPEの発症率を高めることを示した。同齢のブタに 1×10^7 より高いTCID₅₀で高継代アイソレート(DK15540p60及びDK15540p80)を与えた場合、安全であることが判り、PPEに附随するコロニー形成及び傷害発生の減少を示す。この結論は、回腸粘膜についてのPCR、組織病理学、及び組織部のFA染色に基づく。

PCRで決定される糞便中L. イントラセルラリスの排出の減少は、低継代アイソレートに比べて高継代アイソレートで明白だった。全処理群と対照群について計算した毎日の平均増量は、低継代アイソレートを与えた特にN343処理群の動物に比し、高継代アイソレート及び真正対照を与えた群ではっきりと均一な毎日の増量を実証することによってこの結論を支持する。この考察は、低継代物質を与えた動物の増量の減少を示し、高継代物質を与えた動物の、誘発を受けない動物と適合し、かつ同様の増殖性能を支持する。真正対照に比し、高継代アイソレートは、増量に対し、また臨床スコアに基づく全体的な健康に対して負の影響を示さなかった。

【0036】

〔実施例3〕

〔効力及び最小保護タイター〕

目的：

この研究の目的は、経口水薬で3週齢のブタに投与するアイソレートB3903(凍結乾燥)(DK15540、継代80)(“B3903(凍結乾燥)ワクチン”及び“B3903ワクチン”は本明細書では相互交換可能に使用される)を含むワクチンの最小保護タイターを決定することと、ブタにおけるブタ増殖性腸疾患の原因物質であるL. イントラセルラリスの低継代L. イントラセルラリスによる毒性の異種純粋培養誘発に対する効力を実証することだった。

〔材料と方法〕

試験物質：L. イントラセルラリスの弱毒化生培養物、アイソレートB3903

〔B3903(凍結乾燥)ワクチンの調製〕

McCoy細胞懸濁液に単離後80週間継続してDK15540アイソレートを増殖させた。15分間10,000RPMで遠心分離して全培養物を収集した。ローソニアを含有するMcCoy細胞培養ペレットを10%FBSを有するスクロース-ホスフェート-グルタメート(SPG)溶液に再懸濁させた。上記実施例1で述べたように乾燥を行った。凍結乾燥製品は、適量の水を加えて2.0mlにして注射用に再構成される。

〔B3903(凍結乾燥)ワクチンの貯蔵〕

ワクチンは、使用の直前まで2℃～8℃で貯蔵した。再構成後、ワクチンは投与まで氷上で貯蔵した。

〔B3903(凍結乾燥)ワクチンの用量〕

1. 高用量(処理群1)： 1×2 mL(6.0logs/用量)、本研究の日0に直接経口水薬で
2. 中用量(処理群2)： 1×2 mL(4.9logs/用量)、本研究の日0に直接経口水薬で
3. 低用量(処理群3)： 1×2 mL(3.8logs/用量)、本研究の日0に直接経口水薬で

試験物質：プラシーボ

5%NBSで強化したDMEM/F12増殖培地に懸濁した非感染McCoy組織培養細胞から成るプラシーボを、本研究の日0に処理群4(誘発対照)と処理群5(負対照)に与えた。この物質は、処理群4では直接経口水薬で子ブタに投与し、試験動物1匹当たり 1×2 mLのプラシーボを与えた。

〔試験物質：L. イントラセルラリスN101494毒性誘発物質〕

L. イントラセルラリスN101494は、インディアナ州の農場の12週齢ブタの腸から得た(米国特許第5,714,375号)。

〔L. イントラセルラリスN101494毒性誘発物質の処方〕

L. イントラセルラリス誘発物質は、感染した腸組織から最初に単離した後、30回以下

の継代をMcCoy細胞懸濁液で継続して増殖させた。(1L)SF 1421に加え、SF 1422及びSF 1423と同定された活性培養物(2×3L)をMcCoy細胞懸濁液内で7日間増殖させて15～30%のMcCoy細胞感染にした。誘発の日(日21)に、15分間10,000PRMで遠心分離して活性培養物を収集し、細胞ペレットをSPG安定剤と共に総体積350mlに再懸濁させた。収集した活性培養物は、種々の継代(単離後24～27継代)の低継代N101494の300mLの凍結した10倍～20倍濃縮した誘発ストックと共にプールした。

〔L. イントラセルラリスN101494毒性誘発物質の貯蔵〕

誘発の準備の整った最終製剤は、接種まで2℃～8℃又は氷上で貯蔵した。

〔ワクチン接種前／後及び誘発物質タイター〕

TCID₅₀アッセイの結果は、ワクチン接種及び誘発の間、1用量当たり各試験動物に投与した生L. イントラセルラリスの量を確認した。B3903ワクチンについて滴定前と滴定後の平均タイター(n=5)及び誘発物質(L. イントラセルラリスN101494)は、下表6のとおりだった。

10

【0037】

表 6

20

群	処理 (logs/用量)	平均logs/用量(2ml) ワクチン接種前 (TCID ₅₀ /ml)	平均logs/用量(2ml) ワクチン接種後 (TCID ₅₀ /ml)	総平均 logs/用量
1	B3903ワクチン 高用量	6.07	5.89	6.0
2	B3903ワクチン 中用量	4.94	4.84	4.9
3	B3903ワクチン 低用量	3.9	3.5	3.8
4	誘発 対照	7.85	7.57	7.71

30

【0038】

〔研究設計〕

65匹の健康なL. イントラセルラリスネガティブな3週齢の離乳した子ブタをランダムに5つの処理群に分け、研究の間中別個に収容した。日0に、処理群1(15匹のブタ)は2mL用量(6.0logs/用量)のB3903ワクチンを直接経口水薬で受けた。処理群2(15匹のブタ)は、4.9logs/用量で滴定した1×2mL用量のB3903ワクチンを直接経口水薬で受けた。処理群3(15匹のブタ)は、3.8logs/用量で滴定した1×2mL用量のB3903ワクチンを直接経口水薬で受けた。

40

処理群4と処理群5(10匹のブタ/群)は、1×2mL用量のプラシーボを直接経口水薬で受けた。

本研究の日21(ワクチン接種後3週間)に、処理群1～4の試験ブタは、1×10mL用量の毒性低継代純粋培養L. イントラセルラリス異種アイソレートN101494を胃管栄養によって受けた。

本研究の日42(誘発後3週間)に、全処理群(1～5)を安楽死させ、PPEの肉眼で見える傷害分析と顕微鏡で見える傷害分析について検死した。

【0039】

各試験動物の研究の開始から誘発の日まで毎日健康観察を行った。誘発の日(日21)から

50

研究の終了(日42)まで毎日臨床的な健康(下痢、挙動、及び身体状態)のスコアをつけた。ワクチン接種の日(日0)、誘発の日(日21)及び研究終了の日(日42)に秤量し、各処理群の毎日の平均増量を計算した。本研究の日0、7、14、21、28、35、及び42に、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって糞便スワブ(f-PCR)を試験することでL. イントラセルラリスの糞便による排出を評価した。研究の最後(日42)に安楽死させた全動物を肉眼で見える傷害と顕微鏡で見える傷害について調べた。本研究の日42における回腸、結腸、扁桃腺、及び腸間膜リンパ節内のL. イントラセルラリスの組織病理学評価と共にPCR(t-PCR)によって組織内の細菌含量の定量分析値を求めた。本研究の日0、7、14、21、28、35、及び42に血清を収集した。間接蛍光抗体試験(IFAT)を用いて血清を検査して試験動物内の抗-ローソニア抗体を検出した。ワクチン接種後と誘発後の毎日の平均増量、臨床スコア、抗体陽転率(IFAT)、コロニー形成(t-PCR)、糞便排出(f-PCR)、肉眼で見える傷害、及び免疫組織化学(IHC)による顕微鏡で見える傷害発生のデータ分析によって処理群の比較を行った。

10

【0040】

結果：

20

〔研究結果の要約〕

表 7

処 理 群	ブタ/ 群	処理群ID (logs/用量)	平均肉眼 傷害スコア (回腸)	平均肉眼 傷害スコア (結腸)	平均顕微鏡 傷害スコア (回腸)	平均顕微鏡 傷害スコア (結腸)
1	15	B3903ワクチン 高用量(6.0)	1.5ab	1.2a	0.2ab	0.1a
2	15	B3903ワクチン 中用量(4.9)	1.2ab	1.0a	0.4ab	0.0a
3	15	B3903ワクチン 低用量(3.8)	2.5b	1.5a	1.0b	0.3a
4	10	誘発 対照	3.6c	2.2b	2.4c	1.5b
5	10	真正対照	1.0a	1.0a	0.0a	0.0a

30

* 同様の文字は有意な差異がないことを示す ($p < 0.05$)

【0041】

40

各処理群の最終試験結果は、群1、2及び3のワクチン接種したブタに比し、用量とは無関係に(高、中、及び低)、非ワクチン接種ブタ、誘発対照ブタ(群4)において回腸と結腸の有意な肉眼で見える傷害発生と顕微鏡で見える傷害発生を明かにした($p < 0.05$)。ワクチン-低用量結腸の平均肉眼傷害スコアは誘発対照と有意な差異がなかった。ワクチン-低用量群(群3)は、ワクチンを受け、かつ研究の間中ワクチン接種、プラシーボ、又は誘発を受けなかった真正対照群に比べて有意な傷害の発生(肉眼及び顕微鏡)を有する唯一の処理群である。

【0042】

〔臨床スコア〕

誘発の日(日21)から検死の日(日42)まで毎日各動物について臨床スコアを記録した。臨

50

床スコアを計算して、処理群間のL. イントラセルラリスの毒性誘発を受けることによる病気の重症度と持続期間を反映する毎日の平均臨床スコアを得た。各処理群の平均臨床スコアを下表 8 にまとめた。

表 8

処理群	群識別	平均臨床スコア
1	B3903ワクチン－高用量	3.1a
2	B3903ワクチン－中用量	3.0a
3	B3903ワクチン－低用量	3.0a
4	誘発対照	3.0a
5	真正対照	3.0a

10

* 同様の文字は、誘発の日から検死の日の平均臨床スコアに有意な差異がないことを示す ($p < 0.05$)。

【0043】

1-ウェイANOVAを用いて、平均臨床スコアを受ける処理群に関してデータを精査することによって臨床スコアの統計解析を行った。非-ワクチン接種、誘発対照及び真正対照の間には高用量、中用量、又は低用量ワクチン群に比べて有意な差異の証拠はなかった。

20

〔毎日の平均増量〕

ワクチン投与の時(日0)から誘発物質投与の日(日21)まで、研究の終了の日(日21)まで毎日の平均増量を計算した。ワクチン-高用量～非-ワクチン、誘発対照処理群の増量差(1bs=ポンド)の統計解析は、誘発物質投与の時から検死の時までの有意な差異の証拠を明らかにした($p < 0.05$)。重量データを下表 9 にまとめた。

表 9

処理群	処理群識別	平均初期重量 (kg(1bs.))	ADWG (日0～21) (kg(1bs.))	ADWG (日21～42) (kg(1bs.))	総ADWG (kg(1bs.)) (ワクチン接種～検死)
1	B3903ワクチン 高用量	8.07a (17.8a)	0.43a (0.94a)	0.739a (1.63a)	0.585a (1.29a)
2	B3903ワクチン 中用量	8.02a (17.7a)	0.45a (1.00a)	0.726a (1.60a)	0.590a (1.30a)
3	B3903ワクチン 低用量	8.16a (18.0a)	0.43a (0.94a)	0.671ab (1.48a)	0.549a (1.21a)
4	誘発 対照	8.02a (17.7a)	0.44a (0.96a)	0.658b (1.45a)	0.549a (1.21a)
5	真正対照	8.02a (17.7a)	0.43a (0.94a)	0.739ab (1.63a)	0.581a (1.28a)

30

40

* 同様の文字は、ワクチン接種の日から誘発の日のADWG及び誘発の日から検死の日のADWGに処理群間で有意な差異がないことを示す ($p < 0.05$)。

【0044】

〔抗体陽転(IFAT)〕

各処理群のすべての試験動物から毎週血清試料を収集し、本研究の日0、7、14、21、28、35、及び42における抗-ローソニアIgG抗体の存在について調べた。この研究では、すべてのアッセイで正と負のIFAT対照試料は100%正確だった。日0～21(ワクチン接種後3週間)では、各処理群のすべての試験動物がIFAネガティブだった。本研究の日28(誘発後

50

1 週間)には、ワクチン-高用量処理群の1/15(6.7%)の試験動物がIFAポジティブであり、試験した他の全動物はIFAネガティブだった。本研究の日35(誘発後2週間)には、ワクチン-高用量処理群と中用量処理群の4/15(26.7%)のブタ及び非-ワクチン、誘発対照処理群の1/10(10%)のブタがローソニア抗体についてIFAポジティブだった。本研究の日42(誘発後3週間)には、誘発対照処理群の8/10(80%)のブタ、ワクチン-中用量処理群の6/15(40%)のブタ、ワクチン-低用量処理群の5/15(33.3%)のブタ、及び高用量処理群の3/15(20%)のブタがIFAポジティブだった。真正対照群は研究終了時(日42)にIFAネガティブだった。

抗体陽転データを χ^2 -二乗統計を用いて解析した。真正対照処理群で得られた結果については、研究全体を通じて各試験動物で100%ネガティブ反応が見られたので計算しなかった。ワクチン又はプラシーボを受ける処理群では、正確なp-値の推定と共に χ^2 -二乗統計を用いてIFAT結果を比較した(モンテ-カルロ)。毒性純粋培養誘発を受ける誘発群から得たポジティブIFAT結果は、本研究の日42(誘発後3週間)でワクチン-高用量及びワクチン-低用量を受ける結果より有意に高かった ($p < 0.05$)。

【0045】

〔L. イントラセルラリスの糞便排出(PCR)〕

各処理群のすべての試験動物から毎週糞便スワブを収集し、本研究の日0、7、14、21、28、35、及び42にPCRでL. イントラセルラリスの存在について調べた。この研究で行った各アッセイでは、ポジティブ及びネガティブDNA抽出及びPCR反応対照は100%正確だった。日0(ワクチン接種)から日21(誘発)では、L. イントラセルラリスについて各処理群のすべての試験動物が糞便PCRネガティブだった。真正対照群のブタは、本研究の間中その糞便中のL. イントラセルラリスについて糞便PCRネガティブのままだった。誘発接種後、各週で種々の処理群でL. イントラセルラリスの糞便排出(糞便PCRポジティブ)が明かだった。これら結果を下表10にまとめた。

【0046】

表10

処理群	群識別	日28 (誘発後 1週間)	日35 (誘発後 2週間)	日42 (誘発後 3週間)
1	B3903ワクチン 高用量	0/15(0%)a	2/15(13.3%)a	0/15(0%)a
2	B3903ワクチン 中用量	6/15(40%)ab	5/15(33.3%)a	0/15(0%)a
3	B3903ワクチン 低用量	4/15(26.7%)ab	8/15(53.3%)ab	2/15(13.3%)ab
4	誘発 対照	4/10(40%)b	7/10(70%)b	4/10(40%)b
5	真正対照	0/10(0%)	0/10(0%)	0/10(0%)

* 同様の文字は、誘発を受ける処理群間で有意な差異がないことを示す ($p < 0.05$)。

【0047】

正確なp-値の推定と共に χ^2 -二乗統計を用いる統計解析(モンテ-カルロ)は、各ワクチン処理群のポジティブ反応を非-ワクチン、誘発対照群だけと比較した。真正対照群の結果は、本研究の間中各ブタはL. イントラセルラリスに対して100%糞便PCRネガティブだったので、群比較から取り除いた。日28(誘発後1週間)には、高用量のワクチンを受けたブタは、非-ワクチン接種、誘発ブタよりL. イントラセルラリスの排出が有意に少なかった ($p = 0.017$)。日35(誘発後2週間)には、高用量のワクチンを受けたブタ ($p = 0.0024$)と

中用量のワクチンを受けたブタ ($p = 0.041$) は、非-ワクチン接種、誘発ブタよりその糞便中の L. イントラセルラリスの排出が有意に少なかった。日 42 (研究終了) では、この場合もやはり、高用量と中用量のワクチンを受けたブタは、非-ワクチン接種、誘発ブタよりその糞便中の L. イントラセルラリスの排出が有意に少なかった ($p = 0.017$)。低用量群のブタは、誘発後のどの日でも誘発対照より PCR ポジティブが有意には低くなかった。

【0048】

〔L. イントラセルラリス組織コロニー形成 (PCR)〕

末端回腸、結腸、扁桃腺、及び腸間膜リンパ節の組織部分のポリメラーゼ連鎖反応試験を検死後行った (本研究の日 42)。ワクチン-高用量群では、1/15 (6.7%) のブタが扁桃腺内で L. イントラセルラリスコロニー形成について PCR ポジティブであり、すべての他の処理群は PCR ネガティブだった。回腸炎 PCR 試験は非-ワクチン接種、誘発対照の 3/10 (30%) のブタが腸間膜リンパ組織の L. イントラセルラリスコロニー形成に対してポジティブであることを明らかにしたが、他のすべての処理群は PCR ネガティブだった。末端回腸の粘膜小片の回腸炎 PCR 試験は、誘発対照の 4/10 (40%) のブタ、ワクチン-低用量群の 4/15 (26.7%) のブタ、ワクチン-中用量群の 2/15 (13.3%) のブタ、及びワクチン-高用量群の 1/15 (6.7%) のブタが L. イントラセルラリスコロニー形成に対して PCR ポジティブであることを明らかにした。結腸の回腸炎 PCR 試験は、誘発対照の 3/10 (30%) のブタ、ワクチン-低用量群の 5/15 (33.3%)、ワクチン-中用量群の 1/15 (6.7%) のブタ、及びワクチン-低用量群の 2/15 (13.3%) のブタが L. イントラセルラリスコロニー形成に対して PCR ポジティブであることを明らかにした。真正対照群の組織では L. イントラセルラリスコロニー形成の証拠は見られなかった。

回腸炎 PCR ポジティブの結果の統計解析を、その正確な p -値のモンテ-カルロ近似と共に χ^2 -二乗統計を用いて処理群間で比較した。腸間膜リンパ節 PCR 結果は、非ワクチン接種対照、誘発対照及びワクチン処理を受けるすべての処理群間で有意な差異の証拠を示した ($p = 0.054$)。本研究の日 42 における回腸、結腸、又は扁桃腺内での L. イントラセルラリスコロニー形成の処理群間には統計的意義がないことが明かだった。

〔組織学 (IHC/H&E)〕

検死のとき (日 21) に扁桃腺、腸間膜リンパ節、末端回腸、及び結腸の長さ 2 ~ 4 cm の部分を収集し、組織学解析用の 10% 緩衝ホルマリンに入れた。検死時のすべての処理群の扁桃腺部分の IHC 染色ではローソニア・イントラセルラリスは検出されなかった。検死で採取したすべての組織試料での IHC では真正対照群は L. イントラセルラリスに対してネガティブだった。PPE に附随する L. イントラセルラリスの存在及び顕微鏡で見えるほどの傷害は、それぞれ非-ワクチン接種、誘発対照の 9/10 (90%) のブタ、ワクチン-低用量群の 6/15 (40%) のブタ、ワクチン-中用量群の 3/15 (20%) のブタ、及びワクチン-高用量群の 1/15 (6.7%) のブタの回腸内で見られた。顕微鏡で見えるほどの傷害は、誘発対照群の 8/10 (80%) のブタ、ワクチン-低用量群の 3/15 (20%) のブタ、及びワクチン-高用量群の 1/15 (6.7%) のブタの結腸内で明白だった。中用量を受けるワクチン群は、結腸内で L. イントラセルラリスに対して IHC ネガティブだった。腸間膜リンパ節の染色部分は、L. イントラセルラリスを有する誘発対照内で 1/10 (10%) のブタだけを生成した。処理群間の回腸と結腸の部分でのポジティブ IHC 結果は、H&E 方法論で示される顕著な陰窩肥厚化の存在によく関連した。

【0049】

1-ウェイ ANOVA 及び Kruskal-Wallis Rank Sum 試験後、誘発群と真正対照群との間の p -値の各ワクチン投与群に対する特有の対比を用いて、定量的 IHC データの統計解析を行った。本研究の日 42 における投与とは無関係にワクチン接種したブタに比べて誘発対照群の回腸と結腸内の L. イントラセルラリスによる有意な傷害発生の証拠を明らかにする ($p < 0.001$)。真正対照群に比べて高用量又は中用量のワクチンを受けるワクチン接種動物の回腸と結腸の平均的な IHC 傷害スコアで統計的有意さは明白でなかった ($p > 0.05$)。低用量のワクチンを受けるブタは、真正対照群に比較して回腸内の L. イントラセルラリスによる有意に高い平均顕微鏡傷害スコアを有した。

【0050】

10

20

30

40

50

〔肉眼スコア〕

検死の時(日21)にPPEに附随する傷害について各動物の回腸と結腸のスコアをつけた。真正対照の試験ブタ由来の組織は正常であり、傷害を含まず、かつ平均傷害スコア1.1(回腸)及び1.0(結腸)を受けた。非-ワクチン接種、誘発対照群の試験動物の組織は、処理群間で回腸(3.6)と結腸(2.0)について最高の平均肉眼傷害スコアを受けた。ワクチン-低用量群の試験ブタは、2.5(回腸)及び1.5(結腸)という平均肉眼傷害スコアを受けた。ワクチン-中用量試験ブタは、1.5(回腸)及び1.0(結腸)という平均肉眼傷害スコアを受けた。

1-ウェイANOVAを用いて処理群間の平均肉眼傷害スコアの統計解析を行った。平均肉眼傷害スコアは、それぞれ非-ワクチン接種、誘発対照群と、ワクチン-中用量群及び高用量群の回腸間の有意な差異の証拠を示した ($p < 0.001$)。有意な差異の証拠は、ワクチン-低用量群に比べて誘発対照の平均肉眼回腸スコア間で観察された ($p < 0.01$)。結腸の平均肉眼傷害スコアは、それぞれワクチン-中用量及び高用量群に比べて誘発対照群で有意に高かった ($p < 0.05$)。さらに、ワクチン-低用量群の回腸内で真正対照群に比べて有意な肉眼傷害発生が観察された ($p < 0.001$)。真正対照処理群に比べてワクチン-中用量群及び高用量群で平均肉眼傷害スコア(回腸及び結腸)の統計的有意の証拠がないことが明白だった。

【0051】

〔結論〕

この研究は、1用量当たり最小4.9logsの生L. イントラセルラリスを含有するB3903(凍結乾燥)ワクチンの経口2 mL用量を与えると、PPEに対する3週齢ブタの保護が達成されることを実証した。同様ではないにしても、誘発3週間前に6.0logs/用量を受けるワクチン-高用量処理群ではわずかに良い保護が明かだった。低用量ワクチン群(3.8logs/用量)は、高用量又は中用量の実験ワクチンを受ける試験動物に比し、毒性純粋培養異種誘発に対して十分な保護を示さなかった。ワクチン-低用量群と非ワクチン接種、誘発対照の間では、回腸及び結腸内の顕微鏡的傷害の重症度 ($p < 0.001$) と回腸の肉眼で見える傷害の平均スコア ($p < 0.01$) に関して統計的差異が明白だった。しかし、ワクチン又は誘発を受けない真正対照群に比し、この群の回腸(顕微鏡的傷害)及び結腸(肉眼で見える傷害)で有意なPPE傷害が観察された。

【0052】

要するに、この研究から得られたデータは以下のことを実証した：(1) 3週齢ブタに対するB3903(凍結乾燥)ワクチンの単回経口投与の最小保護タイターは4.9logs/用量である；(2) B3903(凍結乾燥)ワクチンは、毒性の低継代純粋培養L. イントラセルラリス異種アイソレートN101494に対して有効である；及び(3) B3903(凍結乾燥)ワクチンは、非-ワクチン接種ブタに比べてワクチン接種ブタにおいて肉眼で見える傷害と顕微鏡で見えるほどの傷害の低減、組織コロニー形成の低減、及びL. イントラセルラリスの糞便排出の低減を助ける。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K39/02 C12N1/20		Int. Patent Application No. PCT/US2004/022704
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K C12N G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 885 823 A (KNITTEL JEFFREY P ET AL) 23 March 1999 (1999-03-23) cited in the application abstract column 2, lines 18-58 column 3, lines 44-58 column 4, lines 2-10 column 4, lines 57-67 column 5, lines 1-8 column 6, line 62 - column 7, line 6 column 7, lines 20-33 column 8, line 29 - line 35 column 8, line 57 - column 9, line 1 column 17, lines 30-44 claims 1-17 ----- -/--	1-28
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 October 2004		Date of mailing of the international search report 03/11/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Noë, V

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. nat. Application No.
PCT/US2004/022704

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 714 375 A (KNITTEL JEFFREY P ET AL) 3 February 1998 (1998-02-03) cited in the application column 1, line 60 - column 2, line 51 column 3, lines 13-23 column 3, line 66 - column 4, line 17 column 6, lines 4-8 column 6, lines 26-34 column 7, line 38 - line 42 column 8, lines 1-17 example 5	1,2,9, 11, 13-15, 17-22, 26,27
A	KROLL J J ET AL: "Efficacy of an avirulent <i>Lawsonia intracellularis</i> vaccine in swine" ABSTRACTS OF THE GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, vol. 101, 2001, page 747, XP008006344 & 101ST GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY; ORLANDO, FL, USA; MAY 20-24, 2001 ISSN: 1060-2011 abstract	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national application No.
PCT/US2004/022704

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 9,10 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/JP2004/022704

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5885823 A	23-03-1999	US 5714375 A	03-02-1998
		AU 717045 B2	16-03-2000
		AU 6262796 A	24-12-1996
		BG 64292 B1	31-08-2004
		BG 102130 A	30-09-1998
		BR 9608338 A	05-01-1999
		CA 2222643 A1	12-12-1996
		CN 1167146 A	10-12-1997
		CZ 9703899 A3	15-07-1998
		DE 843818 T1	28-11-2002
		EP 1403643 A1	31-03-2004
		EP 0843818 A1	27-05-1998
		ES 2173055 T1	16-10-2002
		HU 9900884 A2	28-07-1999
		ID 17131 A	04-12-1997
		JP 11507225 T	29-06-1999
		NZ 319994 A	28-01-2000
		PL 325872 A1	17-08-1998
		RO 118885 B1	30-12-2003
		WO 9639629 A1	12-12-1996
US 5714375 A	03-02-1998	AU 717045 B2	16-03-2000
		AU 6262796 A	24-12-1996
		BG 64292 B1	31-08-2004
		BG 102130 A	30-09-1998
		BR 9608338 A	05-01-1999
		CA 2222643 A1	12-12-1996
		CZ 9703899 A3	15-07-1998
		DE 843818 T1	28-11-2002
		EP 1403643 A1	31-03-2004
		EP 0843818 A1	27-05-1998
		ES 2173055 T1	16-10-2002
		HU 9900884 A2	28-07-1999
		JP 11507225 T	29-06-1999
		NZ 319994 A	28-01-2000
		PL 325872 A1	17-08-1998
		RO 118885 B1	30-12-2003
		WO 9639629 A1	12-12-1996
		US 5885823 A	23-03-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	N
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	G O 1 N 33/569	F

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

(74)代理人 100114007

弁理士 平山 孝二

(72)発明者 ルーフ マイケル ビー

アメリカ合衆国 アイオワ州 5 0 0 1 6 エイムズ テュペロ サークル 3 2 2 2

(72)発明者 クロール ジェレミー ジェイ

アメリカ合衆国 アイオワ州 5 0 3 2 3 アーバンデイル メイプル ドライヴ 1 4 2 1 7

(72)発明者 ニッテル ジェフリー ピー

アメリカ合衆国 フロリダ州 3 2 9 3 4 メルボルン フィローデンドロン コート 4 4 0 0

F ターム(参考) 4B065 AA01X AC20 BA14 BB23 BC06 BC07 BC41 BD11 CA43 CA45

4C085 AA03 AA05 AA06 BA07 CC07 DD86 EE01 FF19 GG01

专利名称(译)	欧洲起源的劳森氏菌 (Lawsonia intracellularis) 及其疫苗 , 诊断剂和使用方法		
公开(公告)号	JP2006528882A	公开(公告)日	2006-12-28
申请号	JP2006521125	申请日	2004-07-15
[标]申请(专利权)人(译)	贝林格尔.英格海姆维特梅迪卡有限公司		
申请(专利权)人(译)	勃林格殷格翰胎儿本草公司		
[标]发明人	ルーフマイケルビー クロールジェレミージェイ ニッテルジェフリーピー		
发明人	ルーフ マイケル ビー クロール ジェレミー ジェイ ニッテル ジェフリー ピー		
IPC分类号	C12N1/20 A61K39/02 A61K39/39 A61P31/04 A61P1/00 G01N33/53 G01N33/569 C07K16/12 C12N1/21		
CPC分类号	A61K39/105 A61K2039/505 A61K2039/521 A61K2039/522 A61P1/00 C07K16/1203 G01N2333/195 Y10S424/825		
FI分类号	C12N1/20.A A61K39/02 A61K39/39 A61P31/04.171 A61P1/00.171 G01N33/53.N G01N33/569.F		
F-TERM分类号	4B065/AA01X 4B065/AC20 4B065/BA14 4B065/BB23 4B065/BC06 4B065/BC07 4B065/BC41 4B065/BD11 4B065/CA43 4B065/CA45 4C085/AA03 4C085/AA05 4C085/AA06 4C085/BA07 4C085/CC07 4C085/DD86 4C085/EE01 4C085/FF19 4C085/GG01		
代理人(译)	小川伸男		
优先权	60/490001 2003-07-25 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及胞内劳森菌疫苗和用于保护和诊断胞内劳森氏菌感染的方法。本发明的产品和方法部分地可以通过改进的培养大规模细胞内劳森氏菌供应的方法获得，包括欧洲来源的细胞内劳森氏菌的新分离物和制备冻干产品的方法。含有减毒的欧洲分离物作为疫苗产品。

表 2

工程	℃	速度 (分)	保持 (分)	圧力 (mT)
予備冷却*	5°	Na	Na	Atm
凍結	-47° ± 3°	できるだけ速く	150	Atm
1° 乾燥、1st	-15° ± 2°	120	120	100~150
1° 乾燥、2nd	0° ± 2°	120	180	100~150
2° 乾燥、1st	32° ± 2°	240	180	60~80
2° 乾燥、2nd	26° ± 2°	240	できるだけ速く	60~80