

鶏サルモネラ症（サルモネラ・エンテリティディス・サルモネラ・ティフィムリウム）（アジュバント加）不活化ワクチン

平成 20 年 10 月 28 日（告示 1564） 一部改正

サルモネラ・エンテリティディス（以下「SE」という。）及びサルモネラ・ティフィムリウム（以下「ST」という。）の培養菌液をそれぞれ不活化したもの、又は培養菌液をそれぞれ不活化し、濃縮したものを混合し、アルミニウムゲルアジュバントを添加したワクチンである。

1 小分製品の試験

1.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

1.2 安全試験

1.2.1 試験材料

1.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.2.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 5 週齢の鶏を用いる。

1.2.1.2 試験方法

試験動物の 10 羽以上を試験群、3 羽以上を対照群とする。

注射材料 1 羽分ずつを試験群の脚部筋肉内に注射し、対照群とともに 4 週間観察し、試験最終日に注射部位を剖検する。

1.2.1.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に臨床的な異常を認めてはならない。ただし、一過性の跛行が認められることがあるが、3 日以内に消失する。

また、剖検したとき、注射局所に著しい異常を認めてはならない。

1.3 力価試験

1.3.1.1 及び 1.3.2.1 の試験、又は 1.3.1.2 及び 1.3.2.2 の試験のいずれかを行う。

1.3.1 鶏サルモネラ症（SE）力価試験

1.3.1.1 SE 力価試験 1

1.3.1.1.1 試験材料

1.3.1.1.1.1 試験動物

1.2 の試験に使用した試験動物を用いる。

1.3.1.1.1.2 酵素抗体反応（以下「ELISA」という。）用抗原

SE 精製べん毛抗原 1（付記 1）を用いる。

1.3.1.1.2 試験方法

1.2 の試験の 2 週目に、試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、ELISA を行う。

試験群と対照群の血清、SE 参照陽性血清 1（付記 2）及び参照陰性血清 1（付記 3）を 5 w/v% スキムミルク加洗浄液（付記 4）で 100 倍に希釈したものを SE 抗原固相化プレート 1（付記 5）

のそれぞれ4穴に50 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で1時間反応させた後、洗浄液1（付記6）で洗浄する。各穴に酵素標識抗体1（付記7）を50 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で1時間反応させた後、洗浄液1で洗浄する。基質液1（付記8）を100 μ L ずつ加え、遮光して25 $^{\circ}$ C で30分間反応させた後、反応停止液1（付記9）を50 μ L ずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を主波長492nm、副波長630nmで測定する。

1.3.1.1.3 判定

4穴の吸光度の最高値と最低値を除いた2穴の値の平均値を吸光度値としたとき、試験群の70%以上が、試験群血清の吸光度値 / SE 参照陽性血清1の吸光度値 ≥ 1 でなければならない。この場合、対照群では、すべて SE 参照陽性血清1の吸光度値 / 対照群血清の吸光度値 ≥ 2 でなければならない。また、SE 参照陽性血清1は、吸光度値0.3 ~ 0.7の値を示さなければならず、参照陰性血清1は、吸光度値0.1以下を示さなければならない。

1.3.1.2 SE力価試験2

1.3.1.2.1 試験材料

1.3.1.2.1.1 試験動物

1.2の試験に使用した試験動物を用いる。ただし、試験群は10羽以上、対照群は5羽とする。

1.3.1.2.1.2 ELISA用抗原

SE べん毛抗原2（付記10）を用いる。

1.3.1.2.2 試験方法

1.2の試験最終日に、試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、ELISAを行う。

希釈用緩衝液（付記11）を用い、試験群の血清及びSE参照陽性血清2（付記12）を400倍に、対照群の血清及び参照陰性血清2（付記13）を50倍に希釈する。SE標準陽性血清（付記14）を希釈用緩衝液で100、200、400、800、1600、3200及び6400倍に希釈する。希釈した各血清をSE抗原固相化プレート2（付記15）のそれぞれ2穴に100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で1時間反応させた後、洗浄液2（付記16）で洗浄する。各穴に酵素標識抗体2（付記17）を100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で1時間反応させた後、洗浄液2で洗浄する。基質液2（付記18）を100 μ L ずつ加え、遮光して2.5分間反応させた後、反応停止液2（付記19）を50 μ L ずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を波長450nmで測定する。

1.3.1.2.3 判定

SE標準陽性血清の希釈列の吸光度より作成したSigmoid曲線から、試験群及び対照群の血清、並びにSE参照陽性血清2及び参照陰性血清2のELISA抗体価を算出する。

試験群の70%以上がELISA抗体価 $2^{8.9}$ 倍以上でなければならず、ELISA抗体価の幾何平均値は $2^{8.9}$ 倍以上でなければならない。この場合、対照群のELISA抗体価の幾何平均値は、 $2^{6.64}$ 倍未満でなければならない。また、SE参照陽性血清2は $2^{8.9}$ 倍以上、参照陰性血清2は $2^{6.64}$ 倍以下のELISA抗体価を示さなければならない。

1.3.2 鶏サルモネラ症（ST）力価試験

1.3.2.1 ST力価試験1

1.3.2.1.1 試験材料

1.3.2.1.1.1 試験動物

1.2の試験に使用した試験動物を用いる。

1.3.2.1.1.2 ELISA用抗原

ST 精製べん毛抗原 1 (付記 20) を用いる。

1.3.2.1.2 試験方法

1.2 の試験の 2 週目に、試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、ELISA を行う。

試験群と対照群の血清、ST 参照陽性血清 1 (付記 21) 及び参照陰性血清 1 を 5 w/v% スキムミルク加洗浄液で 100 倍に希釈したものを ST 抗原固相化プレート 1 (付記 22) のそれぞれ 4 穴に 50 μ L ずつ加え、37 で 1 時間反応させた後、洗浄液 1 で洗浄する。各穴に酵素標識抗体 1 を 50 μ L ずつ加え、37 で 1 時間反応させた後、洗浄液 1 で洗浄する。基質液 1 を 100 μ L ずつ加え、遮光して 25 で 30 分間反応させた後、反応停止液 1 を 50 μ L ずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を主波長 492nm、副波長 630nm で測定する。

1.3.2.1.3 判定

4 穴の吸光度の最高値と最低値を除いた 2 穴の値の平均値を吸光度値としたとき、試験群の 70% 以上が、試験群血清の吸光度値 / ST 参照陽性血清 1 の吸光度値 1 でなければならない。この場合、対照群では、すべて ST 参照陽性血清 1 の吸光度値 / 対照群血清の吸光度値 3 でなければならない。また、ST 参照陽性血清 1 は、吸光度値 0.3 ~ 0.7 の値を示さなければならず、参照陰性血清 1 は、吸光度値 0.1 以下を示さなければならない。

1.3.2.2 ST 力価試験 2

1.3.2.2.1 試験材料

1.3.2.2.1.1 試験動物

1.2 の試験に使用した試験動物を用いる。ただし、試験群は 10 羽以上、対照群は 5 羽とする。

1.3.2.2.1.2 ELISA 用抗原

ST べん毛抗原 2 (付記 23) を用いる。

1.3.2.2.2 試験方法

1.2 の試験最終日に、試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、ELISA を行う。

希釈用緩衝液を用い、試験群の血清及び ST 参照陽性血清 2 (付記 24) を 400 倍に、対照群の血清及び参照陰性血清 2 を 50 倍に希釈する。ST 標準陽性血清 (付記 25) を希釈用緩衝液で 100、200、400、800、1600、3200 及び 6400 倍に希釈する。希釈した各血清を ST 抗原固相化プレート 2 (付記 26) のそれぞれ 2 穴に 100 μ L ずつ加え、37 で 1 時間反応させた後、洗浄液 2 で洗浄する。各穴に酵素標識抗体 2 を 100 μ L ずつ加え、37 で 1 時間反応させた後、洗浄液 2 で洗浄する。基質液 2 を 100 μ L ずつ加え、遮光して 2.5 分間反応させた後、反応停止液 2 を 50 μ L ずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を波長 450nm で測定する。

1.3.2.2.3 判定

ST 標準陽性血清の希釈列の吸光度より作成した Sigmoid 曲線から、試験群及び対照群の血清、並びに ST 参照陽性血清 2 及び参照陰性血清 2 の ELISA 抗体価を算出する。

試験群の 65 % 以上が ELISA 抗体価 $2^{7.8}$ 倍以上でなければならない。ELISA 抗体価の幾何平均値は $2^{7.8}$ 倍以上でなければならない。この場合、対照群の ELISA 抗体価の幾何平均値は、 $2^{6.64}$ 倍未満でなければならない。また、ST 参照陽性血清 2 は $2^{7.8}$ 倍以上、参照陰性血清 2 は $2^{6.64}$ 倍以下の ELISA 抗体価を示さなければならない。

付記 1 SE 精製べん毛抗原 1

SE NT991 株の培養菌液から作製したべん毛抗原を、ゲルろ過及びイオン交換クロマトグラ

フィーにより精製し、リン酸緩衝食塩液で透析したもので、 -20 以下に保存する。本抗原を用いて 1.3.1.1.2 の試験により ELISA を実施するとき、SE 参照陽性血清 1 の吸光度値が 0.3 ~ 0.7、参照陰性血清 1 の吸光度値が 0.1 以下を示し、使用時の蛋白質量は 0.04 ~ 0.34 μ g/mL となるように炭酸緩衝液（付記 27）で調整する。

付記 2 SE 参照陽性血清 1

SE NT991 株で免疫した生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏の血清で、1.3.1.1.2 の試験により ELISA を実施するとき、吸光度値が 0.3 ~ 0.7 を示す。凍結して -20 以下で保存する。

付記 3 参照陰性血清 1

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏の血清で、1.3.1.1.2 及び 1.3.2.1.2 の試験により ELISA を実施するとき、いずれの試験においても吸光度値が 0.1 以下を示す。凍結して -20 以下で保存する。

付記 4 5 w/v% スキムミルク加洗浄液

洗浄液 1 にスキムミルクを 5 w/v% となるように加え、溶解したもの

付記 5 SE 抗原固相化プレート 1

SE 精製べん毛抗原 1 を炭酸緩衝液で希釈し、96 穴プレートの各穴に 50 μ L ずつ加え、37 で 1 時間反応させた後、洗浄液 1 で洗浄する。各穴に 5 w/v% スキムミルク加洗浄液を 200 μ L ずつ加え、37 で 1 時間反応させた後、洗浄液 1 で洗浄したものをを用いる。

付記 6 洗浄液 1

1,000mL 中

塩化ナトリウム 8.0 g

塩化カリウム 0.2 g

リン酸二水素カリウム 0.2 g

リン酸水素二ナトリウム十二水和物 2.89 g

ポリソルベート 20 0.5 mL

水 残量

pH を 7.2 ~ 7.4 に調整する。

付記 7 酵素標識抗体 1

ペルオキシダーゼ標識抗ニワトリ IgG (H+L) 抗体で、1.3.1.1.2 及び 1.3.2.1.2 の試験により ELISA を実施するとき、SE 参照陽性血清 1 及び ST 参照陽性血清 1 の吸光度値が 0.3 ~ 0.7 を示し、参照陰性血清 1 の吸光度値が 0.1 以下を示すように 5 w/v% スキムミルク加洗浄液で調整する。

付記 8 基質液 1

- フェニレンジアミン二塩酸塩 10mg をリン酸クエン酸緩衝液（付記 28）25mL に遮光して溶解し、使用直前に過酸化水素水を 10 μ L 添加する。

付記 9 反応停止液 1

1,000mL 中

硫酸	112.2 mL
水	残 量

付記 10 SE ベン毛抗原 2

SE P125/109 株の培養菌液から作製したもので、SDS-PAGE では分子量 40 ~ 50kd のバンドを認める。本抗原を用いて 1.3.1.2.2 の試験により ELISA を実施するとき、100 倍から 6400 倍まで 2 倍階段希釈した SE 標準陽性血清の吸光度が、1.3 100 倍希釈液吸光度 > 200 倍希釈液吸光度 > 400 倍希釈液吸光度 > 800 倍希釈液吸光度 > 1600 倍希釈液吸光度 > 3200 倍希釈液吸光度 > 6400 倍希釈液吸光度 0.05 を示す場合を 1 単位とし、抗原濃度を決定する。抗原濃度が 1 単位となるように調整した SE 抗原固相化プレート 2 を作製し、1.3.1.2.2 の試験により ELISA を実施するとき、SE 標準陽性血清は ELISA 抗体価 $2^{8.9 - 11.0}$ 倍を示し、ST 標準陽性血清は ELISA 抗体価 $2^{6.64}$ 倍以下を示す。

付記 11 希釈用緩衝液

1,000mL 中

塩化ナトリウム	8.0 g
塩化カリウム	0.2 g
リン酸二水素カリウム	0.2 g
無水リン酸水素二ナトリウム	1.15 g
水	残 量

pH を 7.4 ~ 7.6 に調整後、カゼイン 10.0 g を加えて溶解する。

付記 12 SE 参照陽性血清 2

SE P125/109 株の不活化抗原で免疫あるいは強毒株を接種した生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏の血清で、1.3.1.2.2 の試験により ELISA を実施するとき、ELISA 抗体価 $2^{8.8}$ 倍以上を示す。

付記 13 参照陰性血清 2

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏の血清で、1.3.1.2.2 及び 1.3.2.2.2 の試験により ELISA を実施するとき、いずれの試験においても ELISA 抗体価 $2^{6.64}$ 倍以下を示す。

付記 14 SE 標準陽性血清

SE P125/109 株の不活化抗原で免疫あるいは強毒株を接種した生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏の血清で、1.3.1.2.2 の試験により ELISA を実施するとき、100 倍から 6400 倍まで 2 倍階段希釈した SE 標準陽性血清の吸光度は、1.3 100 倍希釈液吸光度 > 200 倍希釈液吸

光度 > 400 倍希釈吸光度 > 800 倍希釈吸光度 > 1600 倍希釈吸光度 > 3200 倍希釈吸光度 > 6400 倍希釈吸光度 0.05 を示し、Sigmoid 曲線に当てはめた場合に相関係数 R^2 が 0.9 以上を示すように調整 (1000 単位 SE 陽性血清) したものの。また、1.3.1.2.2 及び 1.3.2.2.2 の試験により ELISA を実施するとき、1.3.1.2.2 の試験では ELISA 抗体価 $2^{8.9 \sim 11.0}$ 倍を示し、1.3.2.2.2 の試験では ELISA 抗体価 $2^{6.64}$ 倍以下を示す。

付記 15 SE 抗原固相化プレート 2

SE ペン毛抗原 2 を炭酸緩衝液で 1 単位となるように希釈し、96 穴平底プレートの各穴に 100 μ L ずつ加え、4 で一夜反応させた後、洗浄液 2 で洗浄したもの。

付記 16 洗浄液 2

1,000mL 中	
塩化ナトリウム	8.0 g
塩化カリウム	0.2 g
リン酸二水素カリウム	0.2 g
無水リン酸水素二ナトリウム	1.15 g
水	残量

pH を 7.4 ~ 7.6 に調整後、ポリソルベート 20 を 0.5mL 添加する。

付記 17 酵素標識抗体 2

ペルオキシダーゼ標識抗ニワトリ IgG ヤギ抗体で、1.3.1.2.2 及び 1.3.2.2.2 の試験により ELISA を実施するとき、1.3.1.2.2 の試験では SE 参照陽性血清 2 は ELISA 抗体価 $2^{8.9}$ 倍以上、1.3.2.2.2 の試験では ST 参照陽性血清 2 は ELISA 抗体価 $2^{7.8}$ 倍以上を示し、いずれの試験においても参照陰性血清は ELISA 抗体価 $2^{6.64}$ 倍以下を示すように、牛胎子血清を 5 vol % となるように添加した洗浄液 2 で調整する。

付記 18 基質液 2

TMB 溶液	0.2 mL
UP 緩衝液	1.5 mL
水	15.0 mL

TMB 溶液は、ジメチルスルホキシド 1,000mL に TMB (3,3', 5,5'-テトラメチルベンチジン) 6 g を溶かしたもの

UP 緩衝液は、尿素過酸化酵素 140mg を TMB 緩衝液 (酢酸ナトリウム 136g を約 500mL の水に溶かし、1.5mol/L クエン酸で pH5.3 ~ 5.7 に調整した後、水を加え、1,000mL としたもの) 100mL に溶かしたもの

付記 19 反応停止液 2

硫酸	110 mL
水	1,000 mL

付記 20 ST 精製べん毛抗原 1

ST A723 株の培養菌液から作製したべん毛抗原を、ゲルろ過及びイオン交換クロマトグラフィーにより精製し、リン酸緩衝食塩液で透析したもので、 -20 以下に保存する。本抗原を用いて 1.3.2.1.2 の試験により ELISA を実施するとき、ST 参照陽性血清 1 の吸光度値が $0.3 \sim 0.7$ 、参照陰性血清 1 の吸光度値が 0.1 以下を示し、使用時の蛋白質量は $0.07 \sim 0.36 \mu\text{g/mL}$ となるように炭酸緩衝液で調整する。

付記 21 ST 参照陽性血清 1

ST A723 株で免疫した生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏の血清で、1.3.2.1.2 の試験方法により ELISA を実施するとき、吸光度値が $0.3 \sim 0.7$ を示す。凍結して -20 以下で保存する。

付記 22 ST 抗原固相化プレート 1

ST 精製べん毛抗原 1 を炭酸緩衝液で希釈し、96 穴プレートの各穴に $50 \mu\text{L}$ ずつ加え、37 で 1 時間反応させた後、洗浄液 1 で洗浄する。各穴に $5 \text{ w/v}\%$ スキムミルク加洗浄液を $200 \mu\text{L}$ ずつ加え、37 で 1 時間反応させた後、洗浄液 1 で洗浄したものをを用いる。

付記 23 ST べん毛抗原 2

ST S7886/96 株の培養菌液から作製したもので、SDS-PAGE では分子量 $40 \sim 50\text{Kd}$ のバンドを認める。本抗原を用いて 1.3.2.2.2 の試験により ELISA を実施するとき、100 倍から 6400 倍まで 2 倍階段希釈した ST 標準陽性血清の吸光度が、 $1.3 \sim 100$ 倍希釈液吸光度 > 200 倍希釈液吸光度 > 400 倍希釈液吸光度 > 800 倍希釈液吸光度 > 1600 倍希釈液吸光度 > 3200 倍希釈液吸光度 > 6400 倍希釈液吸光度 > 0.05 を示す場合を 1 単位とし、抗原濃度を決定する。抗原濃度が 1 単位となるように調整した ST 抗原固相化プレート 2 を作製し、1.3.2.2.2 の試験により ELISA を実施するとき、ST 標準陽性血清は ELISA 抗体価 $2^{7.8 \sim 11.0}$ 倍を示し、SE 標準陽性血清は ELISA 抗体価 $2^{6.64}$ 倍以下を示す。

付記 24 ST 参照陽性血清 2

ST S7886/96 株の不活化抗原で免疫あるいは強毒株を接種した生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏の血清で、1.3.2.2.2 の試験により ELISA を実施するとき、ELISA 抗体価 $2^{7.8}$ 倍以上を示す。

付記 25 ST 標準陽性血清

ST S7886/96 株の不活化抗原で免疫あるいは強毒株を接種した生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏の血清で、1.3.2.2.2 の試験により ELISA を実施するとき、100 倍から 6400 倍まで 2 倍階段希釈した ST 標準陽性血清の吸光度は、 $1.3 \sim 100$ 倍希釈液吸光度 > 200 倍希釈液吸光度 > 400 倍希釈液吸光度 > 800 倍希釈液吸光度 > 1600 倍希釈液吸光度 > 3200 倍希釈液吸光度 > 6400 倍希釈液吸光度 > 0.05 を示し、Sigmoid 曲線に当てはめた場合に相関係数 R^2 が 0.9 以上を示すように調整（1000 単位 ST 陽性血清）したもの。また、1.3.1.2.2 及び 1.3.2.2.2 の試験によ

り ELISA を実施するとき、1.3.1.2.2 の試験では ELISA 抗体価 $2^{6.64}$ 倍以下を示し、1.3.2.2.2 の試験では ELISA 抗体価 $2^{7.8 - 11.0}$ 倍を示す。

付記 26 ST 抗原固相化プレート 2

ST ベン毛抗原 2 を炭酸緩衝液で 1 単位となるように希釈し、96 穴平底プレートの各穴に 100 μ L ずつ加え、4 で一夜反応させた後、洗浄液 2 で洗浄したもの。

付記 27 炭酸緩衝液

1,000mL 中

炭酸ナトリウム 1.59 g

炭酸水素ナトリウム 2.93 g

水 残量

pH を 9.6 に調整する。アジ化ナトリウム 0.2 g を添加する場合もある。

付記 28 リン酸クエン酸緩衝液

1,000mL 中

クエン酸 (無水) 4.67 g

リン酸水素二ナトリウム十二水和物 19.95 g

水 残量

pH を 5.0 に調整する。