

豚アクチノバシラス・プルロニューモニエ感染症（1型部分精製・無毒化毒素）・豚丹毒混合（酢酸トコフェロールアジュバント加）不活化ワクチン

平成23年11月15日(告示第2267号)新規追加

アクチノバシラス・プルロニューモニエ（以下この項において「App」という。）1型菌の培養菌液を不活化した後、部分精製して得た菌体外膜たん白（以下この項において「OMP」という。）に、App 2型菌及び5型菌、又は App 2型菌、7型菌及び10型菌を培養して得た App 毒素（Apx I、Apx II及びApx III）を無毒化した後、混合したものに、豚丹毒菌の培養菌液をアルカリ処理して可溶化した抗原液を不活化後したもの混合し、酢酸トコフェロー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 毒性限度確認試験

一般試験法の毒性限度確認試験法1により試験を行い、これに適合しなければならない。

1.3 力価試験

1.3.1 豚 App 感染症力価試験

1.3.1.1 試験材料

1.3.1.1.1 注射材料

試験品を生理食塩液で250倍及び5,000倍に希釈したものを注射材料とする。

1.3.1.1.2 試験動物

体重約1.5～2.0kgのダッチ種SPF兔を用いる。

1.3.1.1.3 酵素抗体反応（以下この項において「ELISA」という。）用抗原

Apx I抗原（付記1）、Apx II抗原（付記2）、Apx III抗原（付記3）及びOMP抗原（付記4）を用いる。

1.3.1.2 試験方法

試験動物10匹を試験群とし、5匹ずつの2群に分ける。

それぞれの注射材料1 mLずつを3週間隔で2回、各群の筋肉内に注射する。第1回目注射時（以下この項において「T0」という。）及び第2回目の注射後7日目（以下この項において「T4」という。）に両群から採血する。250倍に希釈した注射材料で免疫した兔から得られた各個体の血清についてはApx I抗原及びApx II抗原を、5,000倍に希釈した注射材料で免疫した兔から得られた各個体の血清についてはApx III抗原及びOMP抗原を用いて、ELISAを行う。

各試験群のT4血清及び参照陽性血清1（付記5）を希釈液（付記6）でそれぞれ50倍に希釈したもの、参照陽性血清2（付記7）を1,000倍に希釈したものを、あらかじめ希釈液100 µLを入れた抗原吸着プレート（付記8）に100 µLずつ加え、更に同希釈液で2倍段階希釈する。また、同様に各試験群のT0血清を希釈液で100倍に希釈したものを抗原吸着プレートに100 µLずつ加え、各兔の個体別陰性対照とし、希釈液のみの穴をバックグラウンドとする。37℃で1時間反応させた後、水で8回洗浄する。次に、標識抗体（付記9）を各穴に100 µLずつ加え、37℃で1時間反応させた後、水で8回洗浄する。基質液（付記10）を各穴に100 µLずつ加え、15分間反応させた後、2 mol/L 硫酸を各穴に50 µLずつ加えて反応を停止させ、波長450nmで各穴の

吸光度を測定する。

1.3.1.3 判定

同一個体の兎の T0 血清の吸光度に対して 1.5 倍以上の吸光度を示す T4 血清の最高希釈倍数を抗体価とし、100 倍以上を陽性とする。

各試験群の血清の 80 %以上がそれぞれの抗原に対して陽性でなければならない。この場合、バックグラウンドの吸光度は 0.1 未満でなければならない。また、T0 血清の吸光度は、Apx I、Apx II、Apx III 及び OMP 抗原を用いた ELISA において、Apx I 抗原を用いた場合にあつては 0.300 未満、Apx II 抗原を用いた場合にあつては 0.400 未満、Apx III 抗原を用いた場合にあつては 0.300 未満、OMP 抗原を用いた場合にあつては 0.350 未満でなければならない。また、参照陽性血清 1 のそれぞれの抗原に対する抗体価は、100 ~ 400 倍を示さなければならない。また、参照陽性血清 2 は、抗 Apx I 抗体価 8,000 ~ 32,000 倍、抗 Apx II 抗体価 16,000 ~ 64,000 倍、抗 Apx III 抗体価 8,000 ~ 32,000 倍及び抗 OMP 抗体価 8,000 ~ 64,000 倍を示さなければならない。

1.3.2 豚丹毒力価試験

1.3.2.1 試験材料

1.3.2.1.1 注射材料

試験品を生理食塩液で 2 倍希釈したものを注射材料とする。

1.3.2.1.2 試験動物

4 週齢のマウスを用いる。

1.3.2.1.3 攻撃用菌液

豚丹毒菌藤沢株又はこれと同等の毒力を有する株を攻撃菌用培地（付記 11）に接種し、37 °C で 18 ~ 22 時間培養する。これを 0.1mL 中約 100 致死量の菌量となるように調整したものを攻撃用菌液とする。

1.3.2.2 試験方法

試験動物 10 匹を試験群とし、10 匹を対照群とする。

注射材料 0.5mL ずつを試験群の皮下に注射する。注射後 3 週目に、攻撃用菌液を試験群及び対照群の皮下に 0.1mL ずつ注射して攻撃した後、7 日間観察する。

1.3.2.3 判定

試験群においては、80 %以上が耐過生存しなければならない。この場合、対照群においては、90 %以上が死亡しなければならない。

付記 1 Apx I 抗原

Apx I 毒素のみを産生する App 10 型菌の培養上清を無毒化した後濃縮し、ゲルろ過を行って精製したものであり、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた場合に、105kDa に特異なバンドを認めるもの。小分けし、凍結して - 20 °C で保存する。

付記 2 Apx II 抗原

Apx II 毒素のみを産生する App 7 型菌の培養上清を無毒化した後濃縮し、ゲルろ過を行って精製したものであり、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた場合に、105kDa に特異なバンドを認めるもの。小分けし、凍結して - 20 °C で保存する。

付記 3 Apx III 抗原

Apx III 毒素のみを産生する App 2 型菌の培養上清を無毒化した後濃縮し、ゲルろ過を行って精製したものであり、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた場合に、120kDa に特異なバンドを認めるもの。小分けし、凍結して - 20 °C で保存する。

付記4 OMP 抗原

App 2 型菌の培養菌液を不活化した後超音波処理し、その遠心上清をゲルろ過を行って精製したものであり、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた場合に、42kDa に特異なバンドを認めるもの。小分けし、凍結して -20°C で保存する。

付記5 参照陽性血清1

App の Apx I、Apx II、Apx III 及び OMP 抗原を兎に免疫して得られた抗血清であって、免疫開始時に採取した血清（以下この項において「RT0」という。）で、それぞれの抗原を用いて ELISA を行い、RT0 の吸光度（バックグラウンドの吸光度の4倍未満であり、かつ、0.2 以下のものに限る。）に対して 1.5 倍以上を示す血清の最高希釈倍数を抗体価としたとき、抗体価がそれぞれ 100 ~ 400 倍になるように濃度を調整したもの。小分けし、凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

付記6 希釈液

1,000mL 中

リン酸二水素ナトリウム二水和物	35.58 g
塩化ナトリウム	11.69 g
ポリソルベート 80	0.50 g
水	残 量

加温溶解した後、カオリン処理済みの牛血清アルブミン 1 g を加えて溶解し、pH を 7.0 に調整する。ろ過滅菌して保存する。

付記7 参照陽性血清2

App の Apx I、Apx II、Apx III 及び OMP 抗原を兎に免疫して得られた抗血清であって、それぞれの抗原を用いて ELISA を行い、バックグラウンドの吸光度の4倍以上を示す血清の最高希釈倍数を抗体価としたとき、抗体価がそれぞれ 8,000 ~ 32,000 倍、16,000 ~ 64,000 倍、8,000 ~ 32,000 倍及び 8,000 ~ 64,000 倍となるように濃度を調整したもの。小分けし、凍結して -20°C で保存する。

付記8 抗原吸着プレート

Apx I、Apx II、Apx III 及び OMP 抗原をそれぞれ 1 mL 中約 2.5, 0.38, 2.0 及び 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように炭酸緩衝液（付記12）で希釈し、プレートの穴に 0.1mL ずつ加える。

Apx I、Apx II 及び Apx III 抗原は 37°C で、OMP 抗原は $15 \sim 25^{\circ}\text{C}$ でそれぞれ 16 時間反応させた後、水でよく洗浄したもの。

付記9 標識抗体

ペルオキシダーゼ標識抗兎 IgG 抗体を希釈液で希釈したものであり、各参照陽性血清の抗体価が規定の値となるように濃度を調整して使用する。

付記10 基質液

A液：100mL 中

酢酸ナトリウム三水和物	13.6 g
水	残 量

クエン酸で pH を 5.5 に調整した後、尿素過酸化水素 140mg を溶解する。

B液：

テトラメチルベンジジン 6 g をジメチルスルホキシド 1,000mL に溶解したもの。
A液、B液及び水を 15 : 2 : 150 の割合で使用直前に混合して用いる。

付記 11 攻撃菌用培地

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 30 g

ポリソルベート 80 1 mL

水 残量

pH を 7.4 ~ 7.8 に調整して、121 °C で 15 分間高圧滅菌する。

付記 12 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。