

# 豚ボルデテラ感染症・豚パストツレラ症・豚丹毒混合（アジュバント加）不活化ワクチン

平成 23 年 5 月 11 日 (告示第 940 号) 一部改正

ボルデテラ・ブロンキセプチカ（以下この項において「Bb」という。）、パストツレラ・ムルトシダ（以下この項において「Pm」という。）及び豚丹毒菌の各々の培養菌液を不活化し、アルミニウムゲルアジュバントを添加したものを混合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 無毒化試験

#### 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

体重約 350g のモルモットを用いる。

##### 1.2.2 試験方法

注射材料 0.1mL ずつを試験動物 2 匹の背部皮内に注射し、14 日間観察する。

##### 1.2.3 判定

注射反応は、無視し得る程度以下でなければならず、試験動物は、全て生存しなければならない。

### 1.3 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。ただし、試験品の注射材料は 0.2mL とし、体重測定は 4 日目に行うものとする。

### 1.4 力価試験

#### 1.4.1 豚ボルデテラ感染症力価試験

##### 1.4.1.1 試験材料

##### 1.4.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 1.4.1.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

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

Bb トキシン（付記 1）を用いる。

##### 1.4.1.2 試験方法

試験動物 10 匹を試験群、5 匹を対照群とする。

注射材料 0.5mL ずつを 4 週間隔で 2 回、試験群の皮下に注射する。第 2 回目の注射後 2 週間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。

試験群と対照群の各血清、Bb トキシン参照陽性血清（付記 2）及び参照陰性血清（付記 3）を希釈液（付記 4）で 8 倍～ 8,192 倍まで希釈したものを Bb トキシン抗原吸着プレート（付記 5）に 100  $\mu$ L ずつ加え、希釈液のみの穴を血清対照とする。37  $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた後、洗浄液（付記 6）で 5 回洗浄する。次に各穴に標識抗体（付記 7）を 100  $\mu$ L ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた後、洗浄液で 5 回洗浄する。発色基質（付記 8）を各穴に 100  $\mu$ L ずつ加え、遮光して、30  $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた後、3 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を 50  $\mu$ L ずつ加えて反応を停止させ、波長 405nm で各穴の吸

光度を測定する。

#### 1.4.1.3 判定

各被検血清の測定値から血清対照の測定値を差し引いた吸光度値が 0.2 以上を陽性とし、陽性を示した血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群では、70 %以上が抗体価 256 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全て 16 倍以下でなければならない。また、Bb トキシン参照陽性血清は、抗体価 256 ~ 1,024 倍を示さなければならない、参照陰性血清は、16 倍以下でなければならない。

#### 1.4.2 豚パスツレラ症力価試験

##### 1.4.2.1 Pm トキシン抗体価測定試験

###### 1.4.2.1.1 試験材料

###### 1.4.2.1.1.1 試験動物

1.4.1 の試験に用いた動物を用いる。

###### 1.4.2.1.1.2 ELISA 用抗原

Pm トキシン（付記 9）を用いる。

###### 1.4.2.1.2 試験方法

1.4.1 の試験において試験群及び対照群から得られた各個体の血清を用いて、ELISA を行う。

試験群及び対照群の各血清、Pm トキシン参照陽性血清（付記 10）並びに参照陰性血清を、希釈液で 8 倍～8,192 倍まで希釈したものを Pm トキシン抗原吸着プレート（付記 11）に 100  $\mu$ L ずつ加え、希釈液のみの穴を血清対照とする。37  $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた後、洗浄液で 5 回洗浄する。次に、各穴に標識抗体を 100  $\mu$ L ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた後、洗浄液で 5 回洗浄する。発色基質を各穴に 100  $\mu$ L ずつ加え、遮光して 30  $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた後、3 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を 50  $\mu$ L ずつ加えて反応を停止させ、波長 405nm で各穴の吸光度を測定する。

###### 1.4.2.1.3 判定

各被検血清の測定値から血清対照の測定値を差し引いた吸光度値が 0.1 以上を陽性とし、陽性を示した血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群では、70 %以上が抗体価 512 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全て 16 倍以下でなければならない。また、Pm トキシン参照陽性血清は、抗体価 512 ~ 2,048 倍を示さなければならない、参照陰性血清は、16 倍以下でなければならない。

##### 1.4.2.2 PmA 型莢膜抗体価測定試験

###### 1.4.2.2.1 試験材料

###### 1.4.2.2.1.1 試験動物

1.4.1 の試験に用いた動物を用いる

###### 1.4.2.2.1.2 ELISA 用抗原

PmA 型莢膜抗原（付記 12）を用いる。

###### 1.4.2.2.2 試験方法

1.4.1 の試験において試験群及び対照群から得られた各個体の血清を用いて、ELISA を行う。

試験群及び対照群の各血清、Pm A 型莢膜抗原参照陽性血清（付記 13）並びに参照陰性血清を、希釈液で 8 ~ 8,192 倍まで希釈したものを Pm A 型莢膜抗原吸着プレート（付記 14）に 100  $\mu$ L ずつ加え、希釈液のみの穴を血清対照とする。37  $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた後、洗浄液で 5 回洗浄する。次に、各穴に標識抗体を 100  $\mu$ L ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた後、洗浄液で 5 回洗浄する。発色基質を各穴に 100  $\mu$ L ずつ加え、遮光して 30  $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた後、3 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を 50  $\mu$ L ずつ加えて反応を停止させ、波長 405nm で各穴の吸光度を測定する。

###### 1.4.2.2.3 判定

各被検血清の測定値から血清対照の測定値を差し引いた吸光度値が 0.1 以上を陽性とし、陽性を示した血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群では、70 %以上が抗体価 512 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、すべて16 倍以下でなければならない。また、Pm A型莢膜抗原参照陽性血清は、抗体価 512 ~ 2,048 倍を示さなければならない、参照陰性血清は、16倍以下でなければならない。

#### 1.4.3 豚丹毒力価試験

##### 1.4.3.1 試験材料

###### 1.4.3.1.1 注射材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で3倍に希釈したものを注射材料とする。

###### 1.4.3.1.2 試験動物

4週齢のマウスを用いる。

###### 1.4.3.1.3 攻撃菌液

凍結乾燥した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15）に接種し、37℃で14～20時間培養する。これを普通ブイヨンで $10^4$  CFU/mLの菌量となるように希釈したものを攻撃用菌液とする。

##### 1.4.3.2 試験方法

試験動物10匹を試験群、10匹を対照群とする。

注射材料 0.1mL ずつを試験群の内股部皮下に注射する。注射後10日目に、攻撃用菌液を試験群及び対照群の内股部皮下に0.1mL ずつ注射して攻撃した後、10日間観察する。

##### 1.4.3.3 判定

試験群では、70 %以上が耐過生存しなければならない。この場合、対照群では、90 %以上が死亡しなければならない。

#### 付記1 Bb トキシン

Bb S798 株又はこれと同等の壊死毒素を産生する株を動物医薬品検査所が適当と認めた培地で、37℃で16時間培養後、培養菌液の超音波処理により得られた粗毒素をクロマトカラムで精製したものであり、SDS ポリアクリルアミド電気泳動にかけた場合、140～160kDa に特異バンドを認め、毒素活性を有するもの

#### 付記2 Bb トキシン参照陽性血清

Bb S798 株又はこれと同等の壊死毒素を産生する株から抽出した Bb トキシンをホルマリンで不活化し、アジュバントと混合し、モルモットに注射して得られた血清で、Bb トキシンに対する抗体価が256～1,024倍となるように調整し、小分けして、凍結保存したもの

#### 付記3 参照陰性血清

健康なモルモット血清で、Bb トキシン、Pm トキシン及び Pm A型莢膜抗原に対する抗体価がいずれも16倍以下を示すもので、小分けして、凍結保存したもの

#### 付記4 希釈液

1,000mL 中

塩化ナトリウム	8.0 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	2.9 g
塩化カリウム	0.2 g
アジ化ナトリウム	0.2 g
馬血清	30 mL
水	残量

pH を 7.4 に調整する。

#### 付記 5 Bb トキシン抗原吸着プレート

Bb トキシンを用いて、Bb トキシン参照陽性血清及び参照陰性血清の抗体価を測定するとき、各血清が規格値を示すように、炭酸緩衝液（付記 16）で希釈した Bb トキシンを、プレートの各穴に 100  $\mu$ L ずつ加え、プレートを 4  $^{\circ}$ C で一夜反応させた後、洗浄液で 1 回洗浄し、更に各穴に希釈液 150  $\mu$ L ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で 30 分間静置後、洗浄液で 5 回洗浄したもの

#### 付記 6 洗浄液

1,000ml 中

塩化ナトリウム	8.0	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	2.9	g
塩化カリウム	0.2	g
ポリソルベート 20	0.5	mL
アジ化ナトリウム	0.2	g
水	残	量

pH を 7.4 に調整する。

#### 付記 7 標識抗体

アルカリフォスファターゼ標識抗モルモット IgG 抗体を希釈液で至適濃度に希釈したもの

#### 付記 8 発色基質

*p*-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム六水和物 100mg を使用直前に基質緩衝液（付記 17）100mL に溶解したもの

#### 付記 9 Pm トキシン

Pm82 株又はこれと同等の壊死毒素を産生する株を動物医薬品検査所が適当と認めた培地で、37  $^{\circ}$ C で 16 時間培養後、培養菌液の超音波処理により得られた粗毒素をクロマトカラムで精製したものであり、SDS ポリアクリルアミド電気泳動にかけた場合、125 ~ 145kDa に特異バンドを認め、毒素活性を有するもの

#### 付記 10 Pm トキシン参照陽性血清

Pm82 株又はこれと同等の壊死毒素を産生する株から抽出したトキシンをホルマリンで不活化し、アジュバントと混合し、モルモットに注射して得られた血清で、Pm トキシンに対する抗体価が 512 ~ 2,048 倍となるように調整し、小分けして、凍結保存したもの

#### 付記 11 Pm トキシン抗原吸着プレート

Pm トキシンを用いて、Pm トキシン参照陽性血清及び参照陰性血清の抗体価を測定するとき、各血清が規格値を示すように、炭酸緩衝液で希釈した Pm トキシンを、プレートの各穴に 100  $\mu$ L ずつ加え、4  $^{\circ}$ C で一夜反応させた後、洗浄液で 1 回洗浄し、さらに各穴に希釈液 150  $\mu$ L ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で 30 分間静置後、洗浄液で 5 回洗浄したもの

#### 付記 12 Pm A型莢膜抗原

Pm86 株又はこれと同等の莢膜抗原を有する株を動物医薬品検査所が適当と認めた培地で 37  $^{\circ}$ C

で 18 時間培養した後、培養菌液の加熱処理により得られた莢膜抗原であり、SDS ポリアクリルアミド電気泳動にかけてクマシーブリリアントブルー染色した場合、バンドを認めず、過ヨウ素酸シッフ染色した場合、スミア像を示すもの

付記 13 Pm A型莢膜抗原参照陽性血清

Pm86 株又はこれと同等の莢膜抗原を有する株から抽出したPmA型莢膜抗原をアジュバントと混合し、モルモットに注射して得られた血清で、Pm A型莢膜抗原に対する抗体価が 512 ~ 2,048 となるように調整し、小分けして、冷凍保存したもの

付記 14 Pm A型莢膜抗原吸着プレート

Pm A型莢膜抗原を用いて、Pm A型莢膜抗原参照陽性血清及び参照陰性血清の抗体価を測定するとき、各血清が規格値を示すように炭酸緩衝液で希釈したPmA型莢膜抗原を、プレートの各穴に 100 $\mu$ L ずつ加え、プレートを 4 $^{\circ}$ C で一夜反応させた後、洗浄液で 1 回洗浄し、更に各穴に希釈液を 150 $\mu$ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分間静置後、洗浄液で 5 回洗浄したもの

付記 15 攻撃菌用培地

1,000mL 中	
トリプトース・ホスフェイト・ブロス	30.0 g
プロテオーゼペプトン	10.0 g
ポリソルベート 80	1.0 mL
水	残 量

pH を 7.4 ~ 7.8 に調整して、121 $^{\circ}$ C で 15 分間高圧滅菌する。

付記 16 炭酸緩衝液

1,000mL 中	
炭酸水素ナトリウム	2.93 g
炭酸ナトリウム	1.59 g
水	残 量

pH を 9.6 に調整する。

付記 17 基質緩衝液

1,000mL 中	
ジエタノールアミン	97.0 mL
塩化マグネシウム	0.1 g
アジ化ナトリウム	0.2 g
水	残 量

pH を 10.2 に調整する。冷所で遮光して保存する。