

マンヘミア・ヘモリチカ（1型）感染症不活化ワクチン(油性アジュバント加溶解用液)

平成 15 年 10 月 31 日（告示第 1792 号） 新規追加

マンヘミア・ヘモリチカ 1 型菌の培養菌液を不活化し、凍結乾燥したもので、使用時に油性アジュバントを含む溶解用液で溶解するワクチンである。

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 試料

試験品を溶解用液と等量の滅菌精製水で溶解したものを試料とする。

1.2.1.2 白血球浮遊液

白血球浮遊液（付記 1）を用いる。

1.2.2 試験方法

試料を RPMI-1640 培地（付記 2）で 2 倍階段希釈する。試料の原液及び各段階の希釈液 100 μ L を 96 穴マイクロプレートのそれぞれ 3 ウェルずつに移す。白血球浮遊液を 90 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間培養した後、200G で 12 分間遠心し、上清を捨てる。10vol%ホルマリン溶液（付記 3）を 100 μ L ずつ加え 30 分間静置し、細胞沈渣を固定する。各ウェルの内容液を除去後、1 w/v% クリスタルバイオレット溶液（付記 4）50 μ L を加え、5 分間染色する。流水で染色液を洗い流した後、各穴の底の紫色の細胞層の有無を観察する。

1.2.3 判定

細胞層が紫色に様に染まっていたとき、陰性と判定する。細胞層が完全に剥離あるいは濃く染まっていたとき、陽性と判定し、陽性を示した最高希釈倍数を毒素活性値とする。毒素活性値は 2 倍以下でなければならない。

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 2 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、試験品の注射量は 1 mL とし、体重測定は 5 日目に行うものとする。

1.4 力価試験

1.4.1 ロイコトキソイド力価試験

1.4.1.1 試験材料

1.4.1.1.1 試料

試験品を溶解溶液と等量の滅菌精製水で溶解したものを試料とする。

1.4.1.2 試験方法

希釈液（付記 5）で試料及び参照品（付記 6）の各 5 段階の 2 倍階段希釈液を作成し、その希釈液を抗体固相化プレート（付記 7）のウェルに 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させる。洗浄液（付記 8）で洗浄後、マンヘミア・ヘモリチカ ロイコトキソイドに対するマウスモノクロー

ナル抗体（付記 9）を各ウェルに 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させる。洗浄液で洗浄後、標識抗体 1（付記 10）を各ウェルに 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させる。洗浄液で洗浄後、基質液（付記 11）を各ウェルに 100 μ L ずつ加え、常温で反応させる。参照品の最低希釈倍率の希釈液を加えたウェルの吸光度を主波長 405nm、副波長 490nm で測定し、その値が 0.8 ～ 1.2 となったときにすべてのウェルの吸光度を測定する。

1.4.1.3 判定

参照品のロイコトキソイド量を 1.0 として、試料のロイコトキシンの相対量を統計学的計算方法（付記 12）により算出するとき、相対力価（付記 13）は 1.0 以上でなければならない。

1.4.2 莢膜抗原力価試験

1.4.2.1 試験材料

1.4.2.1.1 試料

試験品を溶解用液と等量の滅菌精製水で溶解したものを試料とする。

1.4.2.2 試験方法

希釈・洗浄液（付記 14）で試料及び参照品の各 5 段階の 2 倍階段希釈液を作成し、4 $^{\circ}$ C で一晩反応させる。希釈・洗浄液で洗浄後、ブロッキング液 1（付記 15）を各ウェルに 200 μ L ずつ加えて常温で 1 時間反応させる。希釈・洗浄液で洗浄後、マンヘミア・ヘモリチカ莢膜抗原に対するモノクローナル抗体（付記 16）を 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させる。洗浄液で洗浄後、標識抗体 2（付記 17）を各ウェルに 100 μ L ずつ分注し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させる。洗浄液で洗浄後、基質液を各ウェルに 100 μ L ずつ加え、常温で 1 時間反応させる。参照品の最低希釈倍率の希釈液を加えたウェルの吸光度を主波長 405nm、副波長 490nm で測定し、その値が 0.8 ～ 1.2 となったときにすべてのウェルの吸光度を測定する。

1.4.2.3 判定

参照品の莢膜抗原量を 1.0 として、試料中の莢膜抗原量の相対量を統計学的計算方法により算出するとき、相対力価は 1.0 以上でなければならない。

付記 1 白血球浮遊液

健康な牛から採取した血液から白血球を調製し、細胞数が 1×10^7 個/mL となるように RPMI-1640 培地で調整する。

付記 2 RPMI-1640 培地

1,000mL 中

RPMI-1640	10.39 g
-----------	---------

炭酸水素ナトリウム	2.0 g
-----------	-------

水	残量
---	----

付記 3 10vol%ホルマリン溶液

100mL 中

ホルムアルデヒド	10mL
----------	------

水	残量
---	----

200nm 以下のフィルターでろ過滅菌する。

付記 4 1 w/v%クリスタルバイオレット溶液

100mL 中

クリスタルバイオレット

1.0g

水

残量

付記 5 希釈液

1,000mL 中

牛血清アルブミン

20 g

0.38w/v %四ホウ酸ナトリウム溶液（付記 18）

残量

200nm 以下のフィルターでろ過滅菌する。

付記 6 参照品

動物医薬品検査所が適当と認めたもの

付記 7 抗体固相化プレート

希釈液 2 で適当な濃度に希釈したマンヘミア・ヘモリチカ ロイコトキシノイドに対する牛ポリクロナール抗体（付記 19）を 100 μ L ずつ 96 穴プレートに分注し、4 $^{\circ}$ C で 16 時間反応させる。上清を捨て、ブロッキング液 2（付記 20）を 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させる。反応後、希釈・洗浄液で 1 回洗浄したもの

付記 8 洗浄液

1,000mL 中

ポリソルベート 20

0.5 mL

希釈・洗浄液

残量

pH を 7.2 に調整する。

付記 9 マンヘミア・ヘモリチカ ロイコトキシノイドに対するマウスモノクローナル抗体

マンヘミア・ヘモリチカ ロイコトキシンを用いてイムノブロットを行った場合、分子量約 100kDa の単一バンドを認めるモノクロナール抗体で、中和能を有する。これを希釈・洗浄液で適当な希釈倍率に希釈したもの

付記 10 標識抗体 1

ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG(H+L)抗体を 50v/v%グリセリン溶液（付記 21）で溶解し、さらに希釈・洗浄液で希釈したもの

付記 11 基質液

A 液：0.6g の 2,2'-アジノ-ジ（3-エチルベンゾチアゾリンスルホネート）を 1,000mL のグリシン緩衝液で溶解したもの

B 液：0.02vol %過酸化水素水

A 液と B 液を使用時に等量混合したもの

付記 12 統計学的計算方法

動物医薬品検査所が適当と認めたもの

付記 13 相対力価

動物用不活化ワクチン又はトキソイドの力価試験において、酵素抗体反応による *in vitro* 抗原定量法を評価し、参照品との比較により試験品の有効抗原量を数値化するために考案された単位

付記 14 希釈・洗浄液

1,000mL 中

塩化ナトリウム	8.0 g
---------	-------

塩化カリウム	0.2 g
--------	-------

無水リン酸水素二ナトリウム	1.15 g
---------------	--------

リン酸二水素カリウム	0.2 g
------------	-------

水	残量
---	----

pH を 7.2 に調整し、200nm 以下のフィルターでろ過滅菌する。

付記 15 ブロッキング液 1

1,000mL 中

牛血清アルブミン	10 g
----------	------

希釈・洗浄液	残量
--------	----

200nm 以下のフィルターでろ過滅菌する。

付記 16 マンヘミア・ヘモリチカ 莢膜抗原に対するモノクローナル抗体

マンヘミア・ヘモリチカより精製した莢膜多糖体、ポリ多糖体及びロイコトキシンを用いて間接 ELISA を行った場合、莢膜多糖体にのみ特異的に反応するモノクローナル抗体で、ブロッキング液 1 で適当な希釈倍率に希釈したもの

付記 17 標識抗体 2

ペルオキシダーゼ標識したヤギ抗マウス IgM(μ)抗体を 50w/v%グリセリン溶液で適当な濃度になるように溶解したもの

付記 18 0.38w/v %四ホウ酸ナトリウム溶液

1,000mL 中

四ホウ酸ナトリウム	3.8 g
-----------	-------

水	残量
---	----

pH を 9.0 に調整し、20nm 以下のフィルターでろ過滅菌する。

付記 19 マンヘミア・ヘモリチカ ロイコトキシソイドに対する牛ポリクローナル抗体

マンヘミア・ヘモリチカ NADC615-8 株又は同等の抗原性を有する株の培養菌液を気管内投与し、2 週間後に得られた牛血清で、ロイコトキシンに対する中和抗体価が 128 ～ 256 倍になるように調整したもの

付記 20 ブロッキング液 2

1,000mL 中

牛血清アルブミン

20 g

希釈・洗浄液

残量

200nm 以下のフィルターでろ過滅菌する。

付記 21 50vol/%グリセリン溶液

滅菌精製水にグリセリンを等量混合したもの