

# 牛小型ピロプラズマ病スポロゾイト生ワクチン

タイレリア・サージャンタイをフタトゲチマダニで継代して得られたスポロゾイトを含有する生ワクチンである。

## 1 小分製品の試験

### 1.1 無菌試験

一般試験法のマイコプラズマ否定試験法及びサルモネラ否定試験法により試験を行い、これらに適合しなければならない。

### 1.2 生菌数限度試験

一般試験法の生菌数限度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。

### 1.3 迷入ウィルス否定試験

一般試験法の迷入ウィルス否定試験 1.1、2.4.1 及び 2.4.2 を準用して試験をするとき、適合しなければならない。

### 1.4 原虫含有量試験

#### 1.4.1 試験材料

試験品を遠心（4、約 1,500 G、30 分間）した沈渣を原虫浮遊液（付記 1）0.5mL に再浮遊させたものを試料とする。

#### 1.4.2 試験方法

試料 50  $\mu$ L をスライドグラスに直径約 6mm に塗抹し、ギムザ染色をした後、顕微鏡下で 20 視野のスポロゾイト数を数える。

#### 1.4.3 判定

1 視野当たりの平均スポロゾイト数をスポロゾイト塗抹直径及び顕微鏡視野直径より換算し、検体中のスポロゾイト含有量を算出する。試験品のスポロゾイト含有量は、1mL 中  $5 \times 10^2 \sim 2.5 \times 10^3$  個でなければならない。

### 1.5 安全試験

#### 1.5.1 試験材料

##### 1.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 1.5.1.2 試験動物

体重 100 ~ 200kg の牛を用いる。

#### 1.5.2 試験方法

注射材料 1 頭分を 1 頭の試験動物の頸側部皮下に注射し、8 週間観察する。また、注射後 7 及び 8 週目に採取した血液についてタイレリア・サージャンタイの寄生率を測定する。

#### 1.5.3 判定

観察期間中、一般状態及び眼瞼結膜の色調に異常を認めてはならない。また、タイレリア・サージャンタイの寄生率の上昇を認めてはならない。

ただし、貧血が認められた場合は、血液検査を行い赤血球 1,000 個当たりの寄生率が 8% 以下及び赤血球数が  $2.5 \times 10^6 / \mu$ L 以上であるときは適合とする。また、寄生率の上昇があった場合は、注射後 10 及び 12 週目の寄生率を測定し、上昇していないときは適合とする。

### 1.6 力価試験

#### 1.6.1 試験材料

##### 1.6.1.1 試験動物

1.5 の試験に用いた動物を用いる。

#### 1.6.2 試験方法

1.5 の試験終了後 5 日目に得られた血清について試験を行う。

ピロプラズマ抗原（付記 2）を抗原処理液（付記 3）と等量混合し、4℃ で 3 時間処理した後、抗原希釈液（付記 4）で希釈し、酵素抗体法（ELISA）用マイクロプレートに分注し、4℃ で約 16 時間固相化する。抗原を固相化したプレートを洗浄液（付記 5）で洗浄し、洗浄液をよく除いた後、血清希釈液（付記 6）で 100 倍に希釈した被検血清を添加し、37℃ で 1 時間処理する。洗浄液で洗浄し、洗浄液をよく除いた後、ペルオキシダーゼ標識抗牛 IgG 抗体（付記 7）を加え、37℃ で 1 時間処理する。洗浄液で洗浄し、酵素基質液（付記 8）を添加した後、37℃ で 1 時間処理する。処理後 1w/v% ラウリル硫酸ナトリウムを添加した後、すみやかに吸光度（OD<sub>405</sub>・OD<sub>492</sub>）を測定し、抗体価算出法（付記 9）により補正値を算出する。

なお、被検血清の代わりに血清希釈液を入れて同様の操作を加えたものをブランクとする。

### 1.6.3 判定

補正値は 0.2 以上でなければならない。

#### 付記 1 原虫浮遊液

600mL 中

A 液*	30 mL
B 液**	30 mL
牛血清アルブミンフラクション	6 g
ベンジルペニシリンカリウム	2,400 単位
硫酸ストレプトマイシン	2,400 μg (力価)
水	540 mL

pH を 7.0 ~ 7.4 に調整した後、孔径 220nm のメンブランフィルターでろ過滅菌する。

\* A 液

1,000mL 中

塩化ナトリウム	160 g
塩化カリウム	8 g
水	残 量

\*\* B 液

1,000mL 中

無水リン酸水素二ナトリウム	3.04 g
リン酸二水素ナトリウム二水和物	1.2 g
水	残 量

#### 付記 2 ピロプラズマ抗原

タイレリア・サージャンタイ感染ダニを吸血させることにより作出した感染牛の寄生赤血球数がピークに達したとき、凝固防止した血液を採取する。採取した血液をリン酸緩衝食塩液で冷却遠心（4℃、約 4,850G、35 分間）により 4 回洗浄した後、沈渣をリン酸緩衝食塩液で再浮遊し、20vol% 浮遊液を作製する。この 20vol% 浮遊液を窒素ガス破碎（1,000psi、1 分:70kg/cm<sup>2</sup>）した後、冷却遠心（4℃、約 4,850G、35 分間）により 3 回洗浄したものをピロプラズマ抗原とし、凍結保存する。

これを用いて 1.6.2 の試験をするとき、抗体価算出法による参照陽性血清（付記 10）の ELISA 値は 0.8 ~ 1.2、参照陰性血清（付記 11）の ELISA 値及び補正値はいずれも 0.2 未満となる希釈倍数を決定して使用する。

#### 付記 3 抗原処理液

1,000mL 中	
塩化ナトリウム	8 g
塩化カリウム	0.2 g
無水リン酸水素二ナトリウム	2.9 g
リン酸二水素カリウム	0.2 g
TritonX-100	40 g
水	残量

付記 4 抗原希釈液

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。

付記 5 洗浄液

1,000mL 中	
塩化ナトリウム	8 g
塩化カリウム	0.2 g
無水リン酸水素二ナトリウム	2.9 g
リン酸二水素カリウム	0.2 g
モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン (20E.O.)	0.2 g
水	残量

付記 6 血清希釈液

1,000mL 中	
塩化ナトリウム	8 g
塩化カリウム	0.2 g
無水リン酸水素二ナトリウム	2.9 g
リン酸二水素カリウム	0.2 g
モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン (20E.O.)	1.5 g
水	残量

付記 7 ペルオキシダーゼ標識抗牛 IgG 抗体

西洋ワサビペルオキシダーゼを抗牛 IgG 兔抗体に標識したもので 1.6.2 の試験をするとき、参照陽性血清の ELISA 値は 0.8 ~ 1.2、参照陰性血清の ELISA 値及び補正值はいずれも 0.2 未満となる希釈倍数を決定して使用する。 - 20 以下に保存する。

付記 8 酵素基質液

A 液	
200mL 中	
クエン酸ナトリウム	5.88 g
水	残量
B 液	
200mL 中	

クエン酸	4.2 g
水	残 量
C液	
1 mL 中	
過酸化水素水	0.2 mL
水	残 量

A液とB液を pH4.0 になるよう混合 (A液 : B液 = 1 : 1.3 ~ 1.6) したものを 0.1mol/L クエン酸溶液とする。0.1mol/L クエン酸溶液 40mL で、2,2' アジノ-ジ- [3-エチルベンツチアゾリンスルホン酸] を 20mg 溶解した後、C液 80 μL を加えたもの

#### 付記 9 抗体価算出法

次式により算出する。OD 値は、2 穴の平均値とする。

$$\text{OD 値} = \text{OD}_{405} - \text{OD}_{492}$$

$$\text{ELISA 値} = \text{O} - \text{B}$$

$$\text{補正值} = \text{S} / \text{P}$$

OD<sub>405</sub> : 405nm における吸光度

OD<sub>492</sub> : 492nm における吸光度

O : 測定した血清の OD 値

B : ブランクの OD 値

P : 参照陽性血清の ELISA 値

S : 被検血清の ELISA 値

#### 付記 10 参照陽性血清

タイレリア・サージャンタイ感染ダニを吸血させることにより作出した感染牛の発症極期に得られた血清を小分けして凍結乾燥したものであり、抗体価算出法による ELISA 値は 0.8 ~ 1.2 を示す。

#### 付記 11 参照陰性血清

血液塗抹の観察でタイレリア・サージャンタイ原虫陰性である健康な牛から得られた血清を小分けして凍結乾燥したものであり、抗体価算出法による ELISA 値はいずれも 0.2 未満を示す。