

豚ボルデテラ感染症不活化・パスツレラ・ムルトシダトキソイド混合(油性アジュバント加)ワクチン

ボルデテラ・ブロンキセプチカ（以下「Bb」という。）の培養菌液を不活化し、油性アジュバントを添加したもの及びパスツレラ・ムルトシダ（以下「Pm」という）の培養菌体より得た皮膚壊死毒素を部分精製した後不活化したものに油性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、10 日間観察する。

1.2.3 判定

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

1.3 安全試験

1.3.1 試験材料

1.3.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.3.1.2 試験動物

5 週齢の豚を用いる。

1.3.2 試験方法

試験動物 2 頭を試験群、1 頭を対照群とする。

注射材料 2 mL ずつを 4 週間隔で 2 回、試験群の筋肉内に注射し、対照群とともに 7 週間観察する。

1.3.3 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。また、試験群の注射反応は、無視しうる程度以下でなければならない。

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 試験動物

1.3 の試験に用いた動物を用いる。

1.4.1.1.2 Bb 凝集反応用抗原

Bb 凝集反応用抗原（付記 1）を用いる。

1.4.1.2 試験方法

1.3 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、凝集反応を行う。

各血清をリン酸緩衝食塩液（付記 2）で 5 倍に希釈し、更に 2 倍階段希釈した後、凝集反応用抗原を用いて試験管内凝集反応を行う。

1.4.1.3 判定

試験管内に凝集を認めた血清の最高希釈倍数を凝集価とする。

試験群では、いずれも凝集価 80 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、すべて 10 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 試験材料

1.4.2.1.1 試験動物

1.3 の試験に用いた動物を用いる。

1.4.2.1.2 酵素抗体反応（以下「ELISA」という。）用抗原

組換え皮膚壊死毒素蛋白質（以下「r ToxA」という。付記 3）を用いる。

1.4.2.2 試験方法

1.3 の試験最終日に試験群及び対照群から得られた各血清について、ELISA を行う。

試験群と対照群の血清を血清希釈液(付記 4)で 100 倍に希釈したもの、指示陽性血清

(付記 5) 及び指示陰性血清(付記 6) を rToxA 吸着プレート(付記 7) の 4 穴(偶数列 2 穴と奇数列 2 穴)に 50 μ L ずつ加える。37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた後、洗浄液(付記 8) で 3 回洗浄する。次に、各穴に酵素標識抗体液(付記 9) を 50 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 15 分間反応させた後、洗浄液で 3 回洗浄する。発色基質液(付記 10) を各穴に 50 μ L つ加え、遮光して 30 $^{\circ}$ C で 20 分間反応させた後、2 mol/L 硫酸水溶液を 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。

1.4.2.3 判定

試験群と対照群の血清、指示陽性血清及び指示陰性血清について、奇数列穴の吸光度値より偶数列の吸光度値を差し引いた値を算出し、平均したものを各血清の吸光度値とする。指示陽性血清の吸光度値が 0.8 ~ 1.3、指示陰性血清の吸光度値が 0.1 未満の場合、試験成立とし、次の式に基づいて試験群と対照群の血清の E 値を算出したとき、0.1 以上を陽性とする。

$$E \text{ 値} = S - N / P - N$$

S : 試験群と対照群の吸光度値

N : 指示陰性血清の吸光度値

P : 指示陽性血清の吸光度値

試験群の E 値は、すべて陽性でなければならない。この場合、対照群では、すべて 0.1 未満でなければならない。

付記 1 Bb 凝集反应用抗原

Bb 相菌のホルマリン死菌を適当と認められた希釈用液に 1 mL 中 1×10^{10} 個となるように浮遊させたもので、既知抗体価の陽性血清に対して所定の凝集価を示し、陰性血清に対して凝集しないことを確認したもの

付記 2 リン酸緩衝食塩液

1,000mL 中

塩化ナトリウム 6.8 g

無水リン酸水素二ナトリウム十二水和物 2.4 g

リン酸二水素カリウム 0.7 g

水 残 量

pH を 6.8 ~ 7.2 に調整して 121 で 15 分間高圧滅菌する。

付記 3 組換え皮膚壊死毒素蛋白質 (rToxA)

大腸菌 k-12 株由来 XL-1 Blue に *toxA* 遺伝子をクローン化したプラスミド pSN131 を形質転換して作出した rToxA 産生組換え大腸菌を培養する。培養菌液より集菌・洗浄して得た菌体を超音波処理、硫酸塩析の後、カラムクロマトグラフィーで精製して調製する。rToxA 液は、SDS ポリアクリルアミド電気泳動で分析したとき、約 140kDa の位置に特異的なバンドを認め、他にバンドを認めない。ELISA 抗原は、rToxA 液をホルマリンで不活化して使用する。

付記 4 血清希釈液

1,000mL 中

ゼラチン	10.0 g
------	--------

10 倍濃度リン酸緩衝食塩液	100 mL
----------------	--------

ポリソルベート 80	1 mL
------------	------

水	残 量
---	-----

ゼラチンを水に加温・溶解後、冷却し、これに 10 倍濃度リン酸緩衝食塩液及びポリソルベート 80 を添加する。

付記 5 指示陽性血清

不活化した精製 Pm 皮膚壊死毒素で免疫した豚の血清で、血清希釈液で ELISA での吸光度値が約 1.0 を示すように調整し、凍結したもの

ただし、免疫に用いる豚は、適当と認められた規格の豚を用いる。

付記 6 指示陰性血清

Pm 皮膚壊死毒素に対する抗体を保有しない豚の血清で、ELISA での吸光度値が 0.1 以下を示すもの

付記 7 rToxA 吸着プレート

rToxA を 0.05mol/L 炭酸重炭酸緩衝液(付記 11)により、蛋白質濃度が 1 μ g/mL

となるように希釈し、この抗原液をプレートの奇数列に、0.05mol/L 炭酸重炭酸緩衝液をプレートの偶数列にそれぞれ 50 μ L ずつ加え、4 で一夜固相化する。固相化したプレートを洗浄液で 1 回洗浄し、ブロッキング液（付記 12）を 50 μ L ずつ各穴に加え、常温で 60 分間反応させた後、プレートを洗浄液で 1 回洗浄したものの

付記 8 洗浄液

1,000mL 中	
塩化ナトリウム	8.5 g
ポリソルベート 80	0.5 mL
水	残 量

付記 9 酵素標識抗体液

1,000mL 中	
ペルオキシダーゼ標識プロテイン A (蛋白質濃度 2.0 mg/mL)	1 mL
10 倍濃度リン酸緩衝食塩液	100 mL
ポリソルベート 80	1 mL
水	残 量
使用直前に調製する。	

付記 10 発色基質液

1,000mL 中	
o-フェニレンジアミン二塩酸塩	0.40 g
過酸化水素(30)	0.2 mL
基質緩衝液（付記 13）	残 量
使用直前に調製する。	

付記 11 0.05mol/L 炭酸重炭酸緩衝液

1,000mL 中

炭酸水素ナトリウム	3.0 g
炭酸ナトリウム	1.5 g
水	残 量

pH を 9.6 に調整する。

付記 12 ブロッキング液

1,000mL 中

ゼラチン	10.0 g
水	残 量

ゼラチンを加温・溶解し、冷却後使用する。

付記 13 基質緩衝液

1,000mL 中

クエン酸	2.55 g
無水リン酸水素二ナトリウム	3.65 g
水	残 量

pH を 5.0 に調整する。