

豚ボルデテラ感染症・豚パスツレラ症（粗精製トキソイド） ・マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症混合（アジュバント加）不活化ワクチン

平成 17 年 6 月 30 日（告示第 1161 号） 新規追加

ボルデテラ・ブロンキセプチカ（以下「Bb」という。）の菌体破碎上清濃縮液、パスツレラ・ムルトシダ（以下「Pm」という。）の粗精製濃縮液及びマイコプラズマ・ハイオニューモニエ（以下「Mhp」という。）の培養菌液の培養濃縮粗ろ液をそれぞれ不活化したものを混合し、アルミニウムゲ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 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。

1.2.1.3 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。

1.2.1.4 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、すべ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、注射量は0.3mL とし、体重測定は 3 日目に行うものとする。

1.4 力価試験

1.4.1 Bb 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

6 ~ 7 週齢の ddY 系 SPF マウスを用いる。

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 Bb 抗原

Bb 精製抗原（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1.0mL ずつを試験群の腹腔内に注射する。注射後 4 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。

試験群及び対照群の各血清及び Bb 参照陽性血清（付記 2）を希釈液（付記 3）で40 ~ 10,240倍まで 2 倍階段希釈したものを Bb 精製抗原吸着プレート（付記 4）に100 μ L ずつ加え、希釈液のみの穴を血清対照とする。4 で18時間反応させた後、洗浄液（付記 5）で10回洗浄する。次に各穴に標識抗体（付記 6）を100 μ L ずつ加え、37 で 2 時間反応させた後、洗浄液で10回洗浄する。

基質液（付記7）を各穴に100 μ L ずつ加え、37 °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各穴に50 μ 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

対照の各穴の測定値の平均値 + 0.5以上の測定値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320倍以上でなければならない。この場合、対照群では、すべて80倍以下でなければならない。また、Bb 参照陽性血清は、抗体価320 ~ 640倍を示さなければならない。

1.4.2 Pm 症力価試験

1.4.2.1 試験材料

1.4.2.1.1 試験動物

1.4.1の試験に用いた動物を用いる。

1.4.2.1.2 ELISA 用 Pm 抗原

Pm 精製抗原（付記8）を用いる。

1.4.2.2 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及び Pm 参照陽性血清（付記9）を希釈液で40倍 ~ 10,240倍まで2倍階段希釈したものを Pm 精製抗原吸着プレート（付記10）に100 μ L ずつ加え、希釈液のみの穴を血清対照とする。4 °C で18時間反応させた後、洗浄液で10回洗浄する。次に各穴に標識抗体を100 μ L ずつ加え、37 °C で2時間反応させた後、洗浄液で10回洗浄する。基質液を各穴に100 μ L ずつ加え、37 °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各穴に50 μ 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。

1.4.2.3 判定

対照の各穴の測定値の平均値 + 0.5以上の測定値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1,280倍以上でなければならない。この場合、対照群では、すべて320倍以下でなければならない。また、Pm 参照陽性血清は、抗体価640 ~ 1,280倍を示さなければならない。

1.4.3 Mhp 感染症力価試験

1.4.3.1 試験材料

1.4.3.1.1 試験動物

1.4.1の試験に用いた動物を用いる。

1.4.3.1.2 ELISA 用 Mhp 抗原

ポリソルベート20抽出抗原（付記11）を用いる。

1.4.3.2 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及び Mhp 参照陽性血清（付記12）を希釈液で40倍 ~ 10,240倍まで2倍階段希釈したものを Mhp 抗原吸着プレート（付記13）に100 μ L ずつ加え、希釈液のみの穴を血清対照とする。4 °C で18時間反応させた後、洗浄液で10回洗浄する。次に各穴に標識抗体を100 μ L ずつ加え、37 °C で90分間反応させた後、洗浄液で10回洗浄する。基質液を各穴に100 μ L ずつ加え、37 °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各穴に50 μ 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。

1.4.3.3 判定

対照の各穴の測定値の平均値 + 0.5以上の測定値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2,560倍以上でなければならない。この場合、対照群では、すべて320倍以下でなければならない。また、Mhp 参照陽性血清は、抗体価2,560 ~ 5,120倍を示さなければならない。

付記 1 Bb 精製抗原

Bb 製造用株又はこれと同等の抗原性を有する株を培養し、菌体破碎後、ハイドロキシアパタイトカラムで精製した皮膚壊死毒素であり、SDS ポリアクリルアミド電気泳動で分析したとき、分画の主成分は、分子量約140～160kDaを示し、モルモットの皮内に注射すると貧血斑を示す。

付記 2 Bb 参照陽性血清

Bb 製造用株又はこれと同等の抗原性を示す株を培養し、菌体破碎後、ハイドロキシアパタイトカラムで精製した皮膚壊死毒素で免疫したマウスの血清であり、ELISA 抗体価が320～640倍となるよう調整し、凍結乾燥したもの

付記 3 希釈液

1,000mL 中

塩化ナトリウム 8.0 g

塩化カリウム 0.2 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 1.15 g

水 残量

付記 4 Bb 精製抗原吸着プレート

Bb 精製抗原を炭酸緩衝液（付記14）で40倍に希釈し、96穴マイクロプレートに100 μ L ずつ加え、4 で18時間反応後、洗浄液で10回洗浄し、さらにゼラチン液（付記15）を各穴に150 μ L ずつ加え、37 2時間反応後、洗浄液で10回洗浄したもの

付記 5 洗浄液

ポリソルベート20 0.5mL と希釈液1,000mL を混合したもの

付記 6 標識抗体

アルカリフォスファターゼ標識マウス IgG 抗体を希釈液で希釈したもの

付記 7 基質液

p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム100mg を基質緩衝液（付記16）100mL に溶解したもの

付記 8 Pm 精製抗原

Pm 製造用株又はこれと同等の抗原性を有する株を培養し、菌体破碎後、ハイドロキシアパタイトカラムで精製した皮膚壊死毒素であり、SDS ポリアクリルアミド電気泳動で分析したとき、分画の主成分は、分子量約125～145kDaを示し、モルモットの皮内に注射すると壊死斑を示す。

付記 9 Pm 参照陽性血清

Pm 製造用株又はこれと同等の抗原性を有する株を培養し、菌体破碎後、ハイドロキシアパタイトカラムで精製した皮膚壊死毒素で免疫したマウスの血清であり、ELISA 抗体価が640～1,280倍になるように調整し、凍結乾燥したもの

付記10 Pm 精製抗原吸着プレート

Pm 精製抗原を炭酸緩衝液で40倍に希釈し、96穴マイクロプレートに100 μ L ずつ加え、4 で18時間反応させた後、洗浄液で10回洗浄し、さらにゼラチン液を各穴に150 μ L ずつ加え、37 2時間反応後、洗浄液で10回洗浄したもの

付記11 ポリソルベート20抽出抗原

Mhp 製造用株又はこれと同等の抗原性を有する株の振盪培養菌液を遠心集菌し、希釈液に懸濁後、4 で24時間攪拌して菌体を洗浄する。洗浄菌体をトリス緩衝液(1)に蛋白濃度1 mg/mL になるように懸濁後、2 vol %ポリソルベート20加トリス緩衝液(2)を等量加え、37 で30分間振盪しながら加温する。遠心後の上清にジエチルエーテルを等量加えて振盪後、エーテル層を完全に除去したもの

(1) トリス緩衝液

トリスヒドロキシメチルアミノメタン3.03g、塩化ナトリウム14.61g を水に溶解し、全量を1,000mL としたもの

(2) 2 vol %ポリソルベート20加トリス緩衝液

ポリソルベート20 20mL とトリス緩衝液980mL を混合したもの

付記12 Mhp 参照陽性血清

Mhp J 株又はこれと同等の免疫原性を有する株で免疫したマウスの血清であり、ELISA 抗体価が2,560~5,120倍となるように調整し、凍結乾燥したもの

付記13 Mhp 抗原吸着プレート

Mhp J 株又はこれと同等の抗原性を有する株で免疫した兔免疫血清(付記17)を炭酸緩衝液で100倍に希釈したものを、96穴マイクロプレートに100 μ L ずつ加え、4 で18時間反応させ、洗浄液で10回洗浄する。さらに、ゼラチン液を各穴に150 μ L ずつ加え、4 で18時間反応させ、洗浄液で10回洗浄する。これに、ポリソルベート20抽出抗原を希釈液で蛋白量12.5 μ g/mL になるように希釈したものを100 μ L ずつ加え、4 で18時間反応させた後、洗浄液で10回洗浄したもの

付記14 炭酸緩衝液

A液: 炭酸ナトリウム5.3g を水に溶解し、全量を1,000mL とする。

B液: 炭酸水素ナトリウム4.2g を水に溶解し、全量を1,000mL とする。

A液とB液を混合し、pH9.6に調整する。

付記15 ゼラチン液

ゼラチン1.0g を希釈液1,000mL で溶解したもの

付記16 基質緩衝液

1,000mL 中

塩化マグネシウム・六水和物

0.049 g

ジエタノールアミン

96 mL

水

残量

pH を9.8に調整し、全量を1,000mL としたもの

付記17 兔免疫血清

Mhp J株又はこれと同等の免疫原性を有する株で免疫した兎の血清であり、発育阻止試験において直径3 mm以上の阻止帯を示すもの