

豚インフルエンザ・豚パストツレラ症・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 19 年 5 月 18 日（告示第 693 号） 新規追加

豚インフルエンザウイルスを発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液を不活化したもの、パストツレラ・ムルトシダ（以下「Pm」という。）の培養上清を濃縮し、遠心して得た上清を不活化したものと及びマイコプラズマ・ハイオニューモニエ（以下「Mhp」という。）の培養菌液を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。

1.2.2 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、無視し得る程度以下でなければならず、試験動物が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 0.2mL とし、注射後の体重測定は 6 日目とする。

1.4 力価試験

1.4.1 豚インフルエンザ力価試験

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

5 週齢のマウスを用いる。

1.4.1.1.3 赤血球凝集抗原

試験品に含まれるそれぞれのウイルス株と同一タイプのウイルスで調製した赤血球凝集抗原（付記 1）を用いる。

1.4.1.2 試験方法

試験動物 30 匹を試験群、10 匹を対照群とする。

注射材料の 0.2mL ずつを 2 週間隔で 2 回、試験群の脚部筋肉内に注射する。2 回目の注射後 2 週間目に得られた各個体の血清を群ごとに 5 匹分ずつプールし、試験群として 6 プール血清を得るとともに、及び対照群として 2 プール血清を得る。

得られた各プール血清について、赤血球凝集抑制試験を行う。

被検血清を RDE 及び鶏赤血球で処理する。これをリン酸緩衝食塩液で 2 倍階段希釈し、各希釈液 0.2mL に 0.2mL 中 8 単位の赤血球凝集抗原を等量ずつ加え、室温で 60 分間処理する。これに 0.5vol % 鶏赤血球浮遊液を 0.4mL ずつ加え、室温に 60 分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

1.4.1.3 判定

赤血球の凝集を抑制した血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。

試験群のプール血清の赤血球凝集抑制抗体価は、6 プール血清中 4 プール血清以上が 8 倍以上でなければならない。この場合、対照群のプール血清の赤血球凝集抑制抗体価は、4 倍未満でなければならない。

1.4.2 豚バスターラ症力価試験

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 酵素抗体反応（以下「ELISA」という。）用抗原

Pm 皮膚壊死毒素（以下「PMT」という。）抗原（付記 2）を用いる。

1.4.2.2 試験方法

1.4.1.2 の試験で得られた各プール血清について、ELISA を行う。

試験群及び対照群の各血清、PMT 参照陽性血清（付記 3）及び PMT 参照陰性血清（付記 4）を希釈・洗浄液（付記 5）で 4 倍希釈したものを 2 倍階段希釈し、各段階の希釈液を PMT 抗原吸着プレート（付記 6）の各ウェルに 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間感作する。希釈・洗浄液で洗浄した後、標識抗体（付記 7）を各ウェルに 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させる。希釈・洗浄液で洗浄した後、基質液（付記 8）を各ウェルに 100 μ L ずつ加え、遮光して 30 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させる。停止液（付記 9）を各ウェルに 50 μ L ずつ加え、反応を停止させる。主波長 492nm、副波長 630nm の 2 波長で吸光度を測定し、これらの差を ELISA 値とする。

1.4.2.3 判定

ELISA 値が 0.5 以上を示す血清の最高希釈倍数を抗 PMT 抗体価とする。

試験群のプール血清の抗 PMT 抗体価は、6 プール血清中 4 プール血清以上が PMT 参照陽性血清の示す抗 PMT 抗体価以上でなければならない。この場合、対照群のプール血清の抗 PMT 抗体価は、4 倍未満でなければならない。また、PMT 参照陽性血清の抗 PMT 抗体価は、8 ~ 32 倍を示さなければならない。PMT 参照陰性血清の抗 PMT 抗体価は、4 倍未満でなければならない。

1.4.3 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症力価試験

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 用抗原

Mhp-ELISA 抗原（付記 10）を用いる。

1.4.3.2 試験方法

1.4.1.2 の試験で得られた各プール血清について、ELISA を行う。

試験群及び対照群の各プール血清、Mhp 参照陽性血清(付記 11)及び Mhp 参照陰性血清(付記 12)を希釈・洗浄液で 100 倍希釈したものを、Mhp-ELISA 抗原吸着プレート(付記 13)のそれぞれ 6 ウェルに 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間感作する。希釈・洗浄液で洗浄した後、標識抗体を各ウェルに 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させる。希釈・洗浄液で洗浄した後、基質液を各ウェルに 100 μ L ずつ加え、遮光して 30 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させる。停止液を各ウェルに 50 μ L ずつ加えて反応を停止させる。主波長 492nm、副波長 630nm 2 波長で吸光度を測定し、これらの差を ELISA 値とする。

1.4.3.3 判定

それぞれ 6 穴の ELISA 値の平均を抗 Mhp 抗体価とする。

試験群のプール血清の抗 Mhp 抗体価は、6 プール血清中 4 プール血清が Mhp 参照陽性血清の示す抗 Mhp 抗体価以上の値を示さなければならない。この場合、対照群のプール血清の抗 Mhp 抗体価は、0.15 未満でなければならない。また、Mhp 参照陽性血清の抗 Mhp 抗体価は、0.45 以上を示さなければならない。Mhp 参照陰性血清の抗 Mhp 抗体価は、0.15 未満でなければならない。

2 中間製品の試験

2.1 不活化試験

2.1.1 試験材料

2.1.1.1 注射材料

不活化した 2 種類の豚インフルエンザウイルスの混合液を注射材料とする。

2.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の 10 ~ 12 日齢のものを用いる。

2.1.2 試験方法

注射材料 0.2mL ずつを 4 個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、36 ~ 37 $^{\circ}$ C で培養し、3 日間隔で尿膜腔液を 2 代まで継代する。2 代目の尿膜腔液に 0.5vol% の鶏の赤血球浮遊液を等量加え、室温で 60 分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

ただし、赤血球凝集を示す尿膜腔液があった場合には、その尿膜腔液を等量に混合して 3 代まで継代し、3 代目の尿膜腔液について同様の試験を繰り返した後、判定する。

2.1.3 判定

赤血球凝集を認めない場合には、活性ウイルス陰性と判定する。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

付記 1 赤血球凝集抗原

豚インフルエンザウイルス A 型 A/swine/京都/3/79 (H1N1) 株及び豚インフルエンザウイルス A 型 A/swine/和田山/5/69 (H3N2) 株を用いて、それぞれ調製した赤血球凝集抗原

付記2 PMT 抗原

パストツレラ・ムルトシダB-45株の培養上清を限外ろ過により濃縮した後、ハイドロキシアパタイトカラムで分画し、ホルマリンで不活化し、得られた皮膚壊死毒素活性を持つ抗原であって、B-45 株培養上清免疫モルモットの血清を用いてウェスタンブロッティングを行う場合に、150kDa 付近に単一のバンドを認め、そのたん白量を測定するとき、30 ~ 100 μ g/mL を示すもの

付記3 PMT 参照陽性血清

PmB-45 株の培養上清濃縮液をマウスに免疫して得られた血清であって、抗 PMT 抗体価 8 ~ 32 倍を示すものであり、凍結保存する。

付記4 PMT 参照陰性血清

健康なマウスから採血した血清であって、抗 PMT 抗体価 4 倍未満を示すものであり、凍結保存する。

付記5 希釈・洗浄液

1,000mL 中

リン酸水素二ナトリウム十二水和物	2.9 g
リン酸二水素カリウム	0.2 g
塩化ナトリウム	8.0 g
塩化カリウム	0.2 g
ポリソルベート 20	0.5 mL
水	残量

pHを 7.2 ~ 7.4 に調整する。

付記6 PMT 抗原吸着プレート

PMT 抗原を炭酸緩衝液（付記 14）でたん白濃度 0.005 ~ 0.01mg/mL に希釈し、ELISA 用プレート（U字型）の各ウェルに 100 μ L ずつ加え、4 で 18 時間以上感作させた後、希釈・洗浄液で洗浄し、2w/v % 牛血清アルブミン溶液（付記 15）を各ウェルに 250 μ L ずつ加え、37 で 1 時間感作させた後、希釈・洗浄液で洗浄したもの

付記7 標識抗体

西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体を希釈・洗浄液で希釈したもの

付記8 基質液

o-フェニレンジアミン二塩酸塩 40mg をリン酸クエン酸緩衝液（付記 16）100mL に溶解し、遮光したものに、使用直前に過酸化水素水を 0.04mL 添加したもの

付記9 停止液

濃硫酸 56.1mL を正確に量り、精製水 440mL 中に攪拌冷却しながら溶解し、更に水を加えて 500mL としたものの

付記10 Mhp-ELISA 抗原

MhpM-21 株の振とう培養菌液を遠心集菌し、TNF 液（付記 17）で菌体を洗浄した後、洗浄菌体をたん白濃度が 10mg/mL となるように調整したものの

付記11 Mhp 参照陽性血清

MhpM-21 株の不活化全菌体をマウスに免疫して得られた血清であって、抗 Mhp 抗体価 0.45 以上を示すものであり、凍結保存する。

付記12 Mhp 参照陰性血清

健康なマウスから採血した血清であって、抗 Mhp 抗体価 0.15 未満を示すものであり、凍結保存する

付記13 Mhp-ELISA 抗原吸着プレート

Mhp-ELISA 抗原を炭酸緩衝液で蛋白濃度が 0.05 ~ 0.1mg/mL となるように希釈し、ELISA 用プレート（U字型）の各ウェルに 100 μ L ずつ加え、4 で 18 時間以上感作させた後、希釈・洗浄液で洗浄し、2w/v %牛血清アルブミン溶液を各ウェルに 250 μ L ずつ加え、37 で 1 時間感作させた後、希釈・洗浄液で洗浄したものの

付記14 炭酸緩衝液

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 に調整し、4 に保存する。

付記15 2w/v %牛血清アルブミン溶液

牛血清アルブミン 2 g を希釈・洗浄液 100mL で使用直前に溶解したものの

付記16 リン酸クエン酸緩衝液

1,000mL 中

無水クエン酸 4.67 g

リン酸水素二ナトリウム十二水和物 19.95 g

水 残量

pH を 5.0 に調整する。

付記17 TNF 液

1,000mL 中

塩化ナトリウム	14.6 g
エデト酸ナトリウム	3.72 g
トリスヒドロキシメチルアミノメタン	3.94
水	残量