

鶏オルニソバクテリウム・ライノトラケアレ感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチン

平成 18 年 11 月 10 日制定（農水省告示 1533 号）

オルニソバクテリウム・ライノトラケアレの培養菌液を不活化し、油性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 安全試験

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

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 4 週齢の鶏を用いる。

1.2.2 試験方法

試験動物の 10 羽を試験群、5 羽を対照群とする。

注射材料 2 羽分ずつを、試験群の胸部筋肉内に注射する。対照群とともに 3 週間観察を行い、観察終了時に注射部位を剖検する。

1.2.3 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、剖検したとき、注射局所に著しい異常を認めてはならない。

1.3 力価試験

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

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 4 週齢の鶏を用いる。

1.3.1.3 酵素抗体反応（以下「ELISA」という。）用抗原

ELISA 用抗原（付記 1）を用いる。

1.3.2 試験方法

試験動物の 10 羽を試験群、5 羽を対照群とする。

注射材料 1 羽分ずつを、試験群の胸部筋肉内に注射する。注射後 3 週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。

2 枚の抗原吸着プレート（付記 2）の 11 列目を除くすべての列の穴に血清希釈液（付記 3）を 100 μ L 加える。一方の抗原吸着プレートの 1 ~ 10 列の A 行の穴に、あらかじめ血清希釈液で 32 倍

に希釈した試験群の各個体の血清を 100 μ L ずつ加え、A 行から H 行にかけて 2 倍階段希釈する。もう一方の抗原吸着プレートの 1 ~ 5 列の A 行の穴に、あらかじめ血清希釈液で 32 倍に希釈した対照群の各個体の血清を 100 μ L ずつ加え、A 行から H 行にかけて 2 倍階段希釈する。両プレートの 12 列の A 行目の穴にあらかじめ血清希釈液で 3,200 倍に希釈した参照陽性血清（付記 4）を 100 μ L 加え、A 行から H 行まで 2 倍階段希釈する。また、11 列目の各穴に血清希釈液であらかじめ 64 倍に希釈した参照陰性血清（付記 5）を 100 μ L 加える。両プレートを 37 °C で 1 時間反応後、洗浄用緩衝液（付記 6）で 7 回洗浄する。次に、各穴に標識抗体（付記 7）を 100 μ L ずつ加え、37 °C で 30 分間反応させた後、洗浄用緩衝液で 7 回洗浄する。各穴に基質液（付記 8）を 100 μ L ずつ加え、遮光して室温で 15 分間反応させる。さらに、すべての穴に 2mol/L 硫酸を 50 μ L ずつ加えて反応を停止させ、波長 450nm で吸光度を測定する。

1.3.3 判定

参照陰性血清の吸光度の平均値に 1.5 を乗じた値以上の吸光度値を示した血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群の抗体価の幾何平均値は $2^{10.6}$ 以上でなければならず、対照群の抗体価の幾何平均値は $2^{7.0}$ 以下でなければならない。ただし、試験成立条件として、1) 参照陰性血清の吸光度の平均値が 0.3 以下であること、2) 参照陽性血清の抗体価が 2^{17-19} であることを満たしていなければならない。

付記 1 ELISA 用抗原

20 倍希釈したときの波長 OD660nm での吸光度値が、0.15 ~ 0.3 となるように調整したオルニソバクテリウム・ライノトラケアレ B3263/91 株の菌液を 100 °C で 1 時間煮沸した後、遠心上清をろ過滅菌したもの

付記 2 抗原吸着プレート

ELISA 用抗原を固相化用緩衝液（付記 9）で参照陽性血清及び参照陰性血清が規格値を示すように希釈した後、100 μ L をプレートの全穴に分注し、37 °C で約 16 時間反応させる。その後、液を捨て、各穴にブロッキング緩衝液（付記 10）を 0.2mL ずつ加え、37 °C で 20 分間反応させた後、洗浄用緩衝液で 7 回洗浄したもの

付記 3 血清希釈液

1,000mL 中

リン酸水素二ナトリウム 2 水和物 35.58g

塩化ナトリウム 11.69g

ポリソルベート 80 0.5 g

牛血清アルブミン 1 g

精製水 残量

pH7.0 に調整後、ろ過滅菌する。

付記4 参照陽性血清

オルニソバクテリウム・ライノトラケアレ抗体陰性鶏をオルニソバクテリウム・ライノトラケアレ B3263/91 株又はこれと同等な免疫原性を有する株で免疫して得た血清であって、ELISA により抗体価を測定するとき、抗体価は $2^{17.0 - 19.0}$ であるもの

付記5 参照陰性血清

オルニソバクテリウム・ライノトラケアレ抗体陰性鶏から得た血清であって、ELISA を行うとき、平均吸光度値は 0.3 以下であるもの

付記6 洗浄用緩衝液

1,000mL 中

リン酸水素二ナトリウム二水和物 1.15g

リン酸二水素カリウム無水 0.2g

塩化カリウム 0.2g

塩化ナトリウム 37.2g

ポリソルベートン 20 1.5g

精製水 残量

pH7.2 に調整後、ろ過滅菌する。

付記7 標識抗体

ペルオキシダーゼ標識抗鶏 IgG 抗体を血清希釈液で希釈したものであって、参照陽性血清の抗体価が $2^{17 - 19}$ となるように調整したもの

付記8 基質液

UP 緩衝液 (付記 11) を 1.5、0.6w/v% TMB 溶液 (付記 12) を 0.2 及び水を 15 の割合で混合したもの

付記9 固相化用緩衝液

1,000mL 中

炭酸ナトリウム 1.59g

炭酸水素ナトリウム 2.93g

精製水 残量

pH9.6 に調整後、ろ過滅菌する。

付記10 ブロッキング緩衝液

1,000mL 中

リン酸二水素ナトリウム二水和物	1.43g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	12.09g
塩化ナトリウム	8.5 g
牛血清アルブミン	10 g
精製水	残量

pH7.2 に調整後、ろ過滅菌する。

付記 11 UP 緩衝液

尿素過酸化水素 140mg を、TMB 基質液 (付記 13) 100mL に溶解したものの

付記 12 0.6w/v% TMB 溶液

テトラメチルベンジジン (TMB) 6g をジメチルスルホキシド 1,000mL で溶解し、窒素で飽和状態にしたもの

付記 13 TMB 基質液

酢酸ナトリウム三水和物 13.6g を 80mL の水に溶解し、1.5mol/L クエン酸一水和物で pH5.5 に調整し、水を加えて 100mL とした後、ろ過滅菌したもの