

# 豚ボルデテラ感染症・豚パスツレラ症混合（アジュバント加）不活化ワクチン

## 1 定義

ボルデテラ・ブロンキセプチカ及びパスツレラ・ムルトシダ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。

## 2 製法

### 2.1 製造用株

#### 2.1.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

##### 2.1.1.1 名称

ボルデテラ・ブロンキセプチカ 相菌 77-14,540 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.1.2 性状

15 %牛血液加ボルデー・ジャング培地（付記 1）上に隆起した小円形の集落を形成し、溶血性を示す。既知のボルデテラ・ブロンキセプチカ 相菌の免疫血清によって特異的に凝集される。易熱性壊死毒素を産生し、子豚の鼻腔内に接種すると鼻甲介萎縮を起こす。

##### 2.1.1.3 継代及び保存

原株及び種菌は、15 %牛血液加ボルデー・ジャング培地又は適当と認められた平板培地で継代する。

継代は、原株及び種菌ともに 2 代以内でなければならない。ただし、特に承認されたものは、その継代数以内とする。

原株及び種菌は、凍結して - 70 以下又は凍結乾燥して 5 以下で保存する。

#### 2.1.2 パスツレラ・ムルトシダ

##### 2.1.2.1 名称

パスツレラ・ムルトシダ D 型 B-3669 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.2.2 性状

ハートインフュジョン寒天培地（付記 2）上に集落を形成し、透過光線により蛍光色を呈する。易熱性壊死毒素を産生し、子豚の鼻腔内に接種すると鼻甲介萎縮を起こす。

##### 2.1.2.3 継代及び保存

原株及び種菌はコロソビア血液寒天培地（付記 3）又は適当と認められた平板培地で継代

する。

継代は、原株及び種菌ともに2代以内でなければならない。ただし、特に承認されたものは、その継代数以内とする。

原株及び種菌は、凍結して - 70 以下又は凍結乾燥して5 で保存する。

## 2.2 製造用材料

### 2.2.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

ボルデテラ・ブロンキセプチカ用培地(付記4)又は製造に相当と認められた液状培地を用いる。

### 2.2.2 パスツレラ・ムルトシダ

パスツレラ・ムルトシダ用培地(付記5)又は製造に相当と認められた液状培地を用いる。

## 2.3 原液

### 2.3.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

#### 2.3.1.1 培養

液状培地で培養した種菌を液状培地に接種し、培養したものを更に液状培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.1.1の試験を行う。

#### 2.3.1.2 不活化

培養菌液にホルマリン又は相当と認められた不活化剤を加えて不活化したものを不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.2.1の試験を行う。

#### 2.3.1.3 濃縮

不活化菌液を限外濾過により濃縮を行い、残留ホルマリンを不活性化したのち、原液とする。

### 2.3.2 パスツレラ・ムルトシダ

#### 2.3.2.1 培養

液状培地で培養した種菌を液状培地に接種し、培養したものを更に液状培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.1.2の試験を行う。

#### 2.3.2.2 不活化

培養菌液にホルマリン又は相当と認められた不活化剤を加えて不活化したものを不活化菌

液とする。

不活化菌液について、3.2.2 の試験を行う。

#### 2.3.2.3 濃縮

不活化菌液を限外濾過により濃縮を行い、残留ホルマリンを不活性化したのち、原液とする。

#### 2.4 最終バルク

ボルデテラ・ブロンキセプチカとパスツレラ・ムルトシダの原液を混合し、アジュバントを加えたものを最終バルクとする。この場合、適当と認められた保存剤及び安定剤を加えてもよい。

#### 2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注して、小分製品とする。

小分製品について、3.3 の試験を行う。

### 3 試験法

#### 3.1 培養菌液の試験

##### 3.1.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

###### 3.1.1.1 濁度試験

###### 3.1.1.1.1 試料

検体を試料とする。

###### 3.1.1.1.2 試験方法

試料の濁度を分光光度計で測定する。

菌を非接種の培地を対照とする。

###### 3.1.1.1.3 判定

培養菌液の濁度は所定の値を示さなければならない。

##### 3.1.1.2 毒素値試験

###### 3.1.1.2.1 試料

検体を超音波処理し、適度に希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.1.1.2.2 試験方法

試料を牛鼻腔介骨細胞（付記6）に接種し、24 時間及び 48 時間後に細胞変性効果(CPE)を観察する。

###### 3.1.1.2.3 判定

明らかな CPE を示した最大希釈倍数を毒素値とするとき、検体の毒素値は、0.1mL 中 320 倍以上でなければならない。

### 3.1.1.3 溶血性試験

検体をボルデー・ジャング培地に塗抹し、37℃ で 48 時間培養するとき、90 % 以上のコロニーが溶血環を示さなければならない。

### 3.1.2 パスツレラ・ムルトシダ

#### 3.1.2.1 濁度試験

##### 3.1.2.1.1 試料

検体を試料とする。

##### 3.1.2.1.2 試験方法

試料の濁度を分光光度計で測定する。

菌を非接種の培地を対照とする。

##### 3.1.2.1.3 判定

培養菌液の濁度は所定の値を示さなければならない。

#### 3.1.2.2 毒素値試験

##### 3.1.2.2.1 試料

検体を超音波処理し、適度に希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.1.2.2.2 試験方法

試料を牛鼻腔介骨細胞に接種し、24 時間及び 48 時間後に細胞変性効果(CPE)を観察する。

##### 3.1.2.2.3 判定

明らかな CPE を示した最大希釈倍数を毒素値とするとき、検体の毒素値は、0.1mL 中 1600 倍以上でなければならない。

### 3.2 不活化菌液の試験

#### 3.2.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

##### 3.2.1.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.2 パスツレラ・ムルトシダ

##### 3.2.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.3 小分製品の試験

### 3.3.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、固有の色調を有する懸濁液でなければならず、異物又は異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

### 3.3.2 pH 測定試験

一般試験法の pH 測定試験法を準用して試験するとき、pH は、固有の値を示さなければならない。

### 3.3.3 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.3.4 ホルマリン定量試験

一般試験法のホルマリン定量法を準用して試験するとき、ホルマリンの含有量は、0.2vol% 以下でなければならない。

### 3.3.5 アルミニウム定量試験

一般試験法のアルミニウム定量法を準用して試験するとき、アルミニウムの含有量は、1 mL 中 0.9 ~ 1.6mg でなければならない。

### 3.3.6 毒性限度確認試験

一般試験法の毒性限度確認試験法 を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、注射後の体重測定は5日目に測定する。

### 3.3.7 無毒化試験

#### 3.3.7.1 試験材料

##### 3.3.7.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.3.7.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

##### 3.3.7.1.3 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。

##### 3.3.7.1.4 判定

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

### 3.3.8 力価試験

### 3.3.8.1 豚ボルデテラ感染症力価試験

#### 3.3.8.1.1 試験材料

##### 3.3.8.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.3.8.1.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

##### 3.3.8.1.1.3 酵素抗体反応(以下「ELISA」という)用抗原

ボルデテラ・ブロンキセプチカトキシン(付記 7)を用いる。

#### 3.3.8.1.2 試験方法

試験動物 10 匹を試験群、2 匹を対照群とする。

注射材料 0.5 mL ずつを 2 週間間隔で 2 回、試験群の皮下に注射する。第 2 回目の注射後 2 週間後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。

試験群と対照群の各血清、ボルデテラ・ブロンキセプチカ参照陽性血清(付記 8)及び参照陰性血清(付記 9)を希釈液(付記 10)で 8 倍 ~ 4,096 倍まで希釈したものをボルデテラ・ブロンキセプチカトキシン抗原吸着プレート(付記 11)に 100  $\mu$  L ずつ加え、希釈液のみの穴を血清対照とする。37  $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた後、洗浄液(付記 12)で 5 回洗浄する。次に各穴に標識抗体(付記 13)を 100  $\mu$  L ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた後、洗浄液で 5 回洗浄する。発色基質(付記 14)を各穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、遮光して、30  $^{\circ}$ 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 50  $\mu$  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。

##### 3.3.8.1.3 判定

各被検血清の測定値から血清対照の測定値を差し引いた吸光度値が 0.2 以上を陽性とし、陽性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、80 %以上が抗体価 32 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、すべて 8 倍未満でなければならない。また、ボルデテラ・ブロンキセプチカ参照陽性血清は、抗体価 256 ~ 1,024 倍を示さなければならない、参照陰性血清は 8 倍未満でなければならない。

### 3.3.8.2 豚パスツレラ症力価試験

#### 3.3.8.2.1 試験材料

##### 3.3.8.2.1.1 試験動物

3.3.8.1 の試験に用いた動物を用いる。

### 3.3.8.2.1.2 ELISA 用抗原

パスツレラ・ムルトシダトキシン(付記 15)を用いる。

### 3.3.8.2.2 試験方法

3.3.8.1 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、パスツレラ・ムルトシダ参照陽性血清(付記 16)及び参照陰性血清を、希釈液で 2 倍 ~ 1,024 倍まで希釈したものをパスツレラ・ムルトシダトキシン抗原吸着プレート(付記 17)に 100  $\mu$  L ずつ加え、希釈液のみの穴を血清対照とする。37  $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた後、洗浄液で 5 回洗浄する。次に、各穴に標識抗体を 100  $\mu$  L ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた後、洗浄液で 5 回洗浄する。発色基質を各穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、遮光して、30  $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、3 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を 50  $\mu$  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。

### 3.3.8.2.3 判定

各被検血清の測定値から血清対照の測定値を差し引いた吸光度値が 0.1 以上を陽性とし、陽性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 8 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、すべて 8 倍未満でなければならない。また、パスツレラ・ムルトシダ参照陽性血清は、抗体価 64 ~ 256 倍を示さなければならない、参照陰性血清は、8 倍未満でなければならない。

## 4 貯法及び有効期間

有効期間は、2 年 3 か月間とする。ただし、特に承認されたものは、その期間とする。

### 付記 1 15%牛血液加ボルデー・ジャング培地

1,000mL 中

|          |       |
|----------|-------|
| ジャガイモエキス | 4.5 g |
| 塩化ナトリウム  | 5.5 g |
| 寒天       | 20 g  |
| グリセリン    | 10 mL |
| 水        | 残 量   |

水 990mL にグリセリン 10mL を加えて溶解し、次に他の成分を加えて加熱溶解後、pH を 6.6 ~ 7.0 に調整し、121  $^{\circ}$ C で 15 分間高圧滅菌する。

約 50 に冷却後、牛血液を 15vol% となるように添加する。

付記 2 ハートインフュージョン寒天培地

1,000mL 中

|           |       |
|-----------|-------|
| ウシ心臓浸出液   | 500 g |
| カゼイン製ペプトン | 10 g  |
| 塩化ナトリウム   | 5 g   |
| 寒天        | 15 g  |
| 水         | 残 量   |

pH を 7.2 ~ 7.6 に調整し、121 で 15 分間高圧滅菌する。

付記 3 コロンビア血液寒天培地

1,000mL 中

|               |      |
|---------------|------|
| ポリペプトン        | 10 g |
| バイオセートペプトン    | 10 g |
| 心筋 - スイ消化ペプトン | 3 g  |
| 塩化ナトリウム       | 5 g  |
| トウモロコシデンブ     | 1 g  |
| 寒天            | 15 g |
| 水             | 残 量  |

pH を 7.1 ~ 7.5 に調整し、121 で 15 分間高圧滅菌する。

約 50 に冷却後、馬血液又は綿羊血液を 5 ~ 10vol% となるように添加する。

付記 4 ボルデテラ・ブロンキセプチカ用培地

1,000mL 中

|            |        |
|------------|--------|
| トリプトース     | 20.5 g |
| 塩化ナトリウム    | 3.8 g  |
| 消泡剤 (10 %) | 0.1 mL |
| 水          | 残 量    |

pH を 7.4 ~ 7.6 に調整し、121 で 15 分間高圧滅菌する。



1,000mL当たり滅菌した 50% デキストロース溶液を 20mL 加える。

#### 付記5 パスツレラ・ムルトシダ用培地

1,000mL 中

|               |        |
|---------------|--------|
| トリプトース        | 15.4 g |
| 塩化ナトリウム       | 12.3 g |
| 無水リン酸水素二ナトリウム | 6.8 g  |
| 無水リン酸二水素カリウム  | 2.6 g  |
| 消泡剤 (10%)     | 0.1 mL |
| 水             | 残 量    |

pH を 7.4 ~ 7.6 に調整し、121 で 15 分間高圧滅菌する。

1,000mL当たり滅菌した 15% イースト溶液を 134mL 及び滅菌した 50% デキストロース溶液を 1.67mL 加える。

#### 付記6 牛鼻腔介骨細胞

新生子牛に由来する牛鼻甲介骨細胞を 6 ~ 9 日間培養し、単層を形成させた後、得られた細胞を 96 穴プレートの各穴に 100  $\mu$  L ずつ接種し、37 で 24 時間培養したもの

#### 付記7 ボルデテラ・ブロンキセプチカトキシン

ボルデテラ・ブロンキセプチカ 77-14,540 株 相菌又はこれと同等の壊死毒素を産生する株を 1% デキストロース加トリプトース液体培地で、37 で 48 時間培養する。培養菌液の超音波処理により得られた粗毒素をクロマトカラムで精製したものであり、SDS ポリアクリルアミド電気泳動にかけた場合、140 ~ 160kDa に特異バンドを認め、モルモットの皮内に注射すると貧血斑を示す。

#### 付記8 ボルデテラ・ブロンキセプチカ参照陽性血清

ボルデテラ・ブロンキセプチカ 77-14,540 株 相菌から抽出したトキシンを 2 vol% ホルマリンで不活化し、硫酸アルミニウムカリウムと混合し、モルモットに注射して得た血清で、ボルデテラ・ブロンキセプチカトキシンに対する抗体価が 256 ~ 1,024 倍とな

るように調整したものであり、小分けして、凍結保存する。

#### 付記 9 参照陰性血清

健康なモルモット血清で、ボルデテラ・ブロンキセプチカトキシン及びパスツレラ・ムルトシダトキシン(付記 15)に対する抗体価がいずれも 8 倍未満であり、小分けして、凍結保存する。

#### 付記 10 希釈液

1,000mL 中

|                    |       |
|--------------------|-------|
| 塩化ナトリウム            | 8.0 g |
| リン酸二水素カリウム         | 0.2 g |
| 無水リン酸水素二ナトリウム十二水和物 | 2.9 g |
| 塩化カリウム             | 0.2 g |
| アジ化ナトリウム           | 0.2 g |
| 馬血清                | 30 mL |
| 水                  | 残 量   |

pH を 7.4 に調整する。

#### 付記 11 ボルデテラ・ブロンキセプチカトキシン抗原吸着プレート

ボルデテラ・ブロンキセプチカトキシンを用いて、ボルデテラ・ブロンキセプチカ参照陽性血清及び参照陰性血清の抗体価を測定するとき、各血清が規格値を示すように、炭酸緩衝液(付記 18)で希釈したボルデテラ・ブロンキセプチカトキシンを、プレートの各穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、プレートを 37 で 30 分間静置後、4 で一夜反応させ、プレートを常温で 30 分間静置し、洗浄液で 1 回洗浄し、各穴に希釈液 150  $\mu$  L ずつ加え、37 で 30 分間静置後、洗浄液で 5 回洗浄したもの

#### 付記 12 洗浄液

1,000mL 中

|            |       |
|------------|-------|
| 塩化ナトリウム    | 8.0 g |
| リン酸二水素カリウム | 0.2 g |

|                    |        |
|--------------------|--------|
| 無水リン酸水素二ナトリウム十二水和物 | 2.9 g  |
| 塩化カリウム             | 0.2 g  |
| ポリソルベート 20         | 0.5 mL |
| アジ化ナトリウム           | 0.2 g  |
| 水                  | 残 量    |

pH を 7.4 に調整する。

#### 付記 13 標識抗体

ウサギで作成したアルカリフォスファターゼ標識抗モルモット IgG 血清を用いる。標識抗体はボルデテラ・ブロンキセプチカトキシン及びパスツレラ・ムルトシダトキシンを用いて各陽性血清及び陰性血清の抗体価を測定するとき、各血清が規定の抗体価を示すように、希釈液で濃度を調整して使用する。

#### 付記 14 発色基質

*p*-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム六水和物 100mg を基質緩衝液(付記 19)100mL に溶解したものであり、使用直前に調整する。

#### 付記 15 パスツレラ・ムルトシダトキシン

パスツレラ・ムルトシダ B-3669 株又はこれと同等の壊死毒素を産生する株を 2 vol% イーストエキストラクト加トリプトース液体培地で、37℃ で 24 時間培養する。培養菌液の超音波処理により得られた粗毒素をクロマトカラムで精製したものであり、SDS ポリアクリルアミド電気泳動にかけた場合、125 ~ 145kDa に特異バンドを認め、モルモットの皮内に注射すると壊死斑を示す。

#### 付記 16 パスツレラ・ムルトシダ参照陽性血清

パスツレラ・ムルトシダ B-3669 株から抽出したトキシンを 0.2vol%ホルマリンで不活化し、硫酸アルミニウムカリウムと混合し、モルモットに注射して得た血清で、パスツレラ・ムルトシダトキシンに対する抗体価が 64 ~ 256 倍となるように調整し、凍結したものである。

付記 17 パスツレラ・ムルトシダトキシン抗原吸着プレート

パスツレラ・ムルトシダトキシンを用いて、パスツレラ・ムルトシダ参照陽性血清及び参照陰性血清の抗体価を測定するとき、各血清が規格値を示すように、炭酸緩衝液で希釈したパスツレラ・ムルトシダトキシンを、プレートの各穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、プレートを 37 で 30 分間静置後、4 で一夜反応させ、プレートを室温で 30 分間静置し、洗浄液で 1 回洗浄し、各穴に希釈液 150  $\mu$  L ずつ加え、37 で 30 分間静置後、洗浄液で 5 回洗浄したもの。

付記 18 炭酸緩衝液

1,000m L 中

|                   |       |
|-------------------|-------|
| 1 mol/L 炭酸水素ナトリウム | 70 mL |
| 1 mol/L 炭酸ナトリウム   | 30 mL |
| 水                 | 残 量   |

pH を 9.6 に調整する。

付記 19 基質緩衝液

1,000m L 中

|           |         |
|-----------|---------|
| ジエタノールアミン | 97.0 mL |
| 水         | 500 mL  |
| 塩化マグネシウム  | 0.1 g   |
| アジ化ナトリウム  | 0.2 g   |
| 水         | 残 量     |

pH を 10.2 に調整する。冷所で遮光して保存する。