

豚パルボウイルス感染症・豚丹毒・豚レプトスピラ病（イクテロヘモラジー・カニコーラ・グリッポチフォーサ・ハージョ・ブラティスラーバ・ポモナ）混合（アジュバント・油性アジュバント加）不活化ワクチン

平成 23 年 5 月 11 日(告示第 940 号)一部改正

豚パルボウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化したものにアルミニウムゲルアジュバントを添加したもの、豚丹毒菌の培養菌液を不活化し、その遠心上清を濃縮したものにアルミニウムゲルアジュバントを添加したもの並びにレプトスピラ・インテロガンス血清型イクテロヘモラジー（以下この項において「レプトスピラ・イクテロヘモラジー」という。）、レプトスピラ・インテロガンス血清型カニコーラ（以下この項において「レプトスピラ・カニコーラ」という。）、レプトスピラ・インテロガンス血清型グリッポチフォーサ（以下この項において「レプトスピラ・グリッポチフォーサ」という。）、レプトスピラ・インテロガンス血清型ハージョ（以下この項において「レプトスピラ・ハージョ」という。）、レプトスピラ・インテロガンス血清型ブラティスラーバ（以下この項において「レプトスピラ・ブラティスラーバ」という。）及びレプトスピラ・インテロガンス血清型ポモナ（以下この項において「レプトスピラ・ポモナ」という。）の培養菌液をそれぞれ不活化したものを混合し、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 不活化試験

1.2.1 豚パルボウイルス不活化試験

1.2.1.1 試験材料

1.2.1.1.1 試料

試験品を 2,000G で 10 分間遠心し、その上清を -70 ℃で一夜凍結する。これを溶解した後、11,000G で、又は用法・用量として 1 回 2 mL 注射の試験品（以下「2 mL 試験品」という。）では 44,300G で 60 分間遠心し、その後、水相 5 mL、又は 2 mL 試験品では 2 mL を採取し、100 倍以上のリン酸緩衝食塩液を用い、4 ℃で一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

1.2.1.1.2 培養細胞

NLST-1 細胞を培養びんに培養し、単層となったものを用いる。

1.2.1.2 試験方法

試料の全量を 175cm² 以上の培養細胞に接種し、37 ℃で 60 分間静置吸着させた後、試料を抜き取り、リン酸緩衝食塩液で 3 回洗浄した後、ウイルス増殖用培養液（付記 1）を加え、37 ℃で 10 日間培養し、観察する。

観察最終日の培養上清を 96 穴丸底マイクロプレートの 4 穴以上に 50 μL ずつ採取し、これに等量のリン酸緩衝食塩液を加え、この混合液にリン酸緩衝食塩液で調整した 0.5vol % の鶏又はモルモット赤血球浮遊液を 50 μL ずつ加え、室温で 60 分間静置した後、赤血球凝集の有無を観察する。

1.2.1.3 判定

赤血球の凝集を認めない場合には、活性ウイルス陰性と判定する。

試料に活性ウイルスを認めてはならない。

1.2.2 レプトスピラ不活化試験

1.2.2.1 試験動物

1.4.3 の試験に用いた動物を用いる。

1.2.2.2 試験方法

1.4.3 の試験期間中観察する。

1.2.2.3 判定

観察期間中、いずれの試験動物にも発熱、黄疸、結膜充血、著しい体重減少その他の異常を認めなければならない。

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 2 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、試験品の注射量は 4 mL とし、体重測定は 5 日目に行う。2 mL 試験品では、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、体重測定は 4 日目に行う。

1.4 力価試験

1.4.1 豚パルボウイルス感染症力価試験

1.4.1.1 試験材料

試験品 25mL を水酸化ナトリウムで pH を 11.0 ~ 11.2 に調整した後、740G で 20 分間遠心し、その上清を試料とし、参照不活化抗原（付記 2）を同様に処理したものを対照とする。

1.4.1.2 試験方法

試料、陽性対照及び陰性対照を 96 穴丸底マイクロプレートを用いてリン酸緩衝食塩液で 2 倍階段希釈する。各段階の希釈液 50 μ L に力価試験用赤血球浮遊液（付記 3）を等量加え、4 °C で一夜反応させた後、赤血球凝集の有無を観察する。

1.4.1.3 判定

赤血球の凝集を認めた最高希釈倍数を赤血球凝集価とする。

試料の赤血球凝集価は、128 倍又は 2 mL 試験品では 320 倍以上でなければならず、対照の赤血球凝集価は、128 倍でなければならない。

1.4.2 豚丹毒力価試験

1.4.2.1 試験材料

1.4.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.4.2.1.2 試験動物

5 週齢（2 mL 試験品にあっては、4 週齢）のマウスを用いる。

1.4.2.1.3 攻撃用菌液

凍結乾燥した豚丹毒菌藤沢株又はこれと同等の毒力を有する株を攻撃菌用培地（付記 4）に接種し、37 °C で 14 ~ 20 時間培養する。これを普通ブイヨンで 10³ CFU/mL の菌量となるように希釈したものを攻撃用菌液とする。

1.4.2.2 試験方法

試験動物 10 匹を試験群、10 匹を対照群とする。

注射材料 0.5mL ずつを 2 週間隔で 2 回、試験群の内股部皮下に注射する。2 回目の注射をした後 2 週目に、攻撃用菌液を試験群及び対照群の内股部皮下に 0.1mL ずつ注射して攻撃した後、7 日間観察する。

2 mL 試験品では注射材料 0.5mL ずつを 1 回、試験群の内股部皮下に注射する。注射後 10 日目に、攻撃用菌液を試験群及び対照群の内股部皮下に 0.1mL ずつ注射して攻撃した後、7 日間観察する。

1.4.2.3 判定

試験群では、70 %以上が耐過生存しなければならず、2 mL 試験品では 80 %以上が耐過生存しなければならない。対照群では、いずれも、90 %以上が死亡しなければならない。

1.4.3 豚レプトスピラ病力価試験

1.4.3.1 試験材料

1.4.3.1.1 注射材料

試験品及び試験品をリン酸緩衝食塩液で 10 倍希釈したものを注射材料とする。

2 mL 試験品では、試験品を 5 vol % レシチン加軽質流動パラフィン（付記 5）で 2.5 倍希釈したもの及びこれを更にリン酸緩衝食塩液で 10 倍希釈したものを注射材料とする。

1.4.3.1.2 試験動物

体重 60 ~ 100g のハムスター及び体重約 300g のモルモットを用いる。

1.4.3.1.3 凝集反応用菌液

レプトスピラ凝集反応用菌液（付記 6）を用いる。

1.4.3.1.4 参照陽性血清

抗レプトスピラ・イクテロヘモラジー参照陽性血清（付記 7）、抗レプトスピラ・カニコーラ参照陽性血清（付記 8）、抗レプトスピラ・グリッポチフォーサ参照陽性血清（付記 9）、抗レプトスピラ・ハージョ参照陽性血清（付記 10）、抗レプトスピラ・プラティスラーバ参照陽性血清（付記 11）及び抗レプトスピラ・ポモナ参照陽性血清（付記 12）を用いる。

1.4.3.1.5 参照陰性血清

ハムスター参照陰性血清（付記 13）及びモルモット参照陰性血清（付記 14）を用いる。

1.4.3.2 試験方法

試験品 1 mL ずつを 10 匹のハムスターの内股部皮下に、試験品をリン酸緩衝食塩液で 10 倍に希釈したもの 1 mL ずつを 10 匹のモルモットの頸部皮下にそれぞれ 7 日間隔で 2 回注射する。2 mL 試験品では、試験品を 5 vol % レシチン加軽質流動パラフィンで 2.5 倍希釈したもの 1 mL ずつを 10 匹のハムスターの内股部皮下に、試験品を 5 vol % レシチン加軽質流動パラフィンで 2.5 倍希釈し、さらにリン酸緩衝食塩液で 10 倍に希釈したもの 1 mL ずつを 10 匹のモルモットの頸部皮下にそれぞれ 7 日間隔で 2 回注射する。2 回目の注射をした後 14 日目に得られたハムスターの各個体の血清について、レプトスピラ・イクテロヘモラジーに対する凝集価を、モルモットの各個体の血清について、レプトスピラ・カニコーラ、レプトスピラ・グリッポチフォーサ、レプトスピラ・ハージョ、レプトスピラ・プラティスラーバ及びレプトスピラ・ポモナに対する凝集価を、それぞれ各レプトスピラ凝集反応用菌液を用いて、マイクロプレート生菌凝集反応により測定する。

被検血清、参照陽性血清及び参照陰性血清を 56 °C で 30 分間処理する。これを 96 穴平底マイクロプレートを用いて、豚レプトスピラ病力価試験用 EMJH 基礎培地（付記 15）で 2 倍段階希釈し、各段階の希釈液 50 μ L に凝集反応用菌液を等量ずつ加え、30 °C で 2 ~ 4 時間処理する。

1.4.3.3 判定

プレートの各穴を暗視野顕微鏡で観察し、菌の凝集を認めた血清の最高希釈倍数を凝集価とする。凝集価が、レプトスピラ・イクテロヘモラジーの場合は 8 倍以上、レプトスピラ・カニコーラの場合は 16 倍以上、レプトスピラ・グリッポチフォーサの場合は 64 倍以上、レプトスピラ・ハージョの場合は 32 倍以上、レプトスピラ・プラティスラーバの場合は 128 倍以上、レプトスピラ・ポモナの場合は 16 倍以上のとき、凝集抗体陽性とする。ただし、2 mL 試験品では、レプトスピラ・イクテロヘモラジーに対する凝集価は、16 倍以上のとき、凝集抗体陽性とする。

試験動物の各血清型に対する凝集抗体陽性率は、いずれも 70 %以上でなければならない。

付記 1 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・プロス

2.95 g

牛胎子血清 20 mL
イーグルMEM 残量
炭酸水素ナトリウムで pH を 7.4 ~ 7.6 に調整する。
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 2 参照不活化抗原

豚パルボウイルス NADL-7 株又は適当と認められた株を用いて調製した不活化抗原で、力価試験用赤血球浮遊液を用いた赤血球凝集反応において、赤血球凝集価 128 倍を示すように調整したもの。小分けして -70 °C 以下で保存する。

付記 3 力価試験用赤血球浮遊液

非凝集性のモルモット赤血球を用いて、以下のとおり調製したもの

(1) 2 vol %赤血球浮遊液の調製

リン酸緩衝食塩液で 3 回遠心洗浄した後、沈渣をリン酸緩衝食塩液に再浮遊させ、2 vol %赤血球浮遊液を 25mL 調製する。

(2) 2 vol %赤血球浮遊液の標準化

2 vol %赤血球浮遊液を赤血球溶解緩衝液（付記 16）で 5 倍希釀したものについて、波長 540nm における吸光度を測定し、0.98 ~ 1.02 となるように下表のとおり調整したものを標準 2 vol %赤血球浮遊液とする。

吸光度	調整方法
0.98 ~ 1.02	調整不要
> 1.02	25 × 吸光度 - 25 上記で算出された量のリン酸緩衝食塩液 (mL) を加える。
< 0.98	(2.0 / 吸光度 - 2.0) × 1.2 上記で算出された量の赤血球 (mL) を加える。 又は、 25 × 吸光度 - 25 上記で算出された量のリン酸緩衝食塩液 (mL) を再遠心により除去する。

(3) 力価試験用赤血球浮遊液の調製

40mL の牛胎子血清加リン酸緩衝食塩液（付記 17）に、標準 2 vol %赤血球浮遊液を 10mL 加え、0.4vol %としたものを力価試験用赤血球浮遊液とする。

付記 4 攻撃菌用培地

1,000mL 中
トリプトース・ホスフェイト・ブロス 30 g
プロテオーゼペプトン 10 g
ポリソルベート 80 1 mL
水 残量
pH を 7.4 ~ 7.8 に調整して、121 °C で 15 分間高圧滅菌する。

付記 5 5 vol %レシチン加軽質流動パラフィン

1,000mL 中

レシチン加軽質流動パラフィン	50 mL
リン酸緩衝食塩液	950 mL
混合した後、ろ過滅菌する。	

付記 6 レプトスピラ凝集反応用菌液

レプトスピラ・イクテロヘモラジー NADL11403 株凍結保存菌液（付記 18）、レプトスピラ・カニコーラ C-51 株凍結保存菌液（付記 19）、レプトスピラ・グリッポチフォーサ MAL1540 株凍結保存菌液（付記 20）、レプトスピラ・ハージョ WHO 株凍結保存菌液（付記 21）、レプトスピラ・ブラティスラーバ JEZ 株凍結保存菌液（付記 22）及びレプトスピラ・ポモナ T262 株凍結保存菌液（付記 23）からそれぞれ調製したものを新鮮生菌浮遊液とする。

凍結保存菌液を速やかに融解し、豚レプトスピラ病力価試験用 EMJH 培地（付記 24）に接種し、30 ℃、40 回転/分で 4～8 日間振とう培養する。当該培養後、265G で 10 分間遠心した上清を採取し、波長 600 nm で透過率を測定する。豚レプトスピラ病力価試験用 EMJH 基礎培地で透過率 87～88 T %（約 2×10^8 個/mL）に調整したものを生菌浮遊液とする。

各凍結保存菌液（付記 18～23）は、いずれも病原性レプトスピラであるレプトスピラ・インテロガンスに分類される菌株の浮遊液であり、試験者の安全性を確保し、また、環境への漏出を防止するため、取扱いには注意すること。

付記 7 抗レプトスピラ・イクテロヘモラジー参照陽性血清

レプトスピラ・イクテロヘモラジー NADL11403 株をハムスターに免疫して得られた血清で、レプトスピラ・イクテロヘモラジー NADL11403 株に対して凝集価 16 倍を示すように調整したものであり、小分け後に凍結乾燥して保存する。

付記 8 抗レプトスピラ・カニコーラ参照陽性血清

レプトスピラ・カニコーラ C-51 株をモルモットに免疫して得られた血清で、レプトスピラ・カニコーラ C-51 株に対して凝集価 16 倍を示すように調整したものであり、小分け後に凍結乾燥して保存する。

付記 9 抗レプトスピラ・グリッポチフォーサ参照陽性血清

レプトスピラ・グリッポチフォーサ MAL1540 株をモルモットに免疫して得られた血清で、レプトスピラ・グリッポチフォーサ MAL1540 株に対して凝集価 32～64 倍を示すように調整したものであり、小分け後に凍結乾燥して保存する。

付記 10 抗レプトスピラ・ハージョ参照陽性血清

レプトスピラ・ハージョ WHO 株をモルモットに免疫して得られた血清で、レプトスピラ・ハージョ WHO 株に対して凝集価 16～32 倍を示すように調整したものであり、小分け後に凍結乾燥して保存する。

付記 11 抗レプトスピラ・ブラティスラーバ参照陽性血清

レプトスピラ・ブラティスラーバ JEZ 株をモルモットに免疫して得られた血清で、レプトスピラ・ブラティスラーバ JEZ 株に対して凝集価 64～128 倍を示すように調整したものであり、小分け後に凍結乾燥して保存する。

付記 12 抗レプトスピラ・ポモナ参照陽性血清

レプトスピラ・ポモナ T262 株をモルモットに免疫して得られた血清で、レプトスピラ・ポ

モナ T262 株に対して凝集価 16 倍を示すように調整したものであり、小分け後に凍結乾燥して保存する。

付記 13 ハムスター参照陰性血清

非免疫のハムスター血清で、レプトスピラ・イクテロヘモラジーに対して抗体陰性のものであり、小分け後に凍結乾燥して保存する。

付記 14 モルモット参照陰性血清

非免疫のモルモット血清で、レプトスピラ・カニコーラ、レプトスピラ・グリッポチフォーサ、レプトスピラ・ハージョ、レプトスピラ・ブラティスラバ及びレプトスピラ・ポモナのいずれに対しても抗体陰性のものであり、小分け後に凍結乾燥して保存する。

付記 15 豚レプトスピラ病力価試験用 EMJH 基礎培地

900 mL 中		
レプトスピラ・メディウムベース EMJH	2.3 g	
水	900 mL	
pH を 7.5 ± 0.2 に調整した後、121 °C で 15 分間高圧滅菌する。		

付記 16 赤血球溶解緩衝液

100mL 中		
NP-40	1.25 g	
水	残 量	
NP-40 を徐々に添加し、溶解する。		

付記 17 牛胎子血清加リン酸緩衝食塩液

40mL 中		
牛胎子血清	1.5 mL	
リン酸緩衝食塩液	38.5 mL	

牛胎子血清は、モルモットの赤血球を凝集しないことを確認したものを用いる。

付記 18 レプトスピラ・イクテロヘモラジー NADL11403 株凍結保存菌液

レプトスピラ・イクテロヘモラジー NADL11403 株を豚レプトスピラ病力価試験用 EMJH 培地で培養した培養菌液に、グリセリンを 10vol % 加えたものであり、1 mL ずつ小分けして-70 °C 以下で保存する。

付記 19 レプトスピラ・カニコーラ C-51 株凍結保存菌液

レプトスピラ・カニコーラ C-51 株を豚レプトスピラ病力価試験用 EMJH 培地で培養した培養菌液に、グリセリンを 10vol % 加えたものであり、1 mL ずつ小分けして-70 °C 以下で保存する。

付記 20 レプトスピラ・グリッポチフォーサ MAL1540 株凍結保存菌液

レプトスピラ・グリッポチフォーサ MAL1540 株を豚レプトスピラ病力価試験用 EMJH 培地で培養した培養菌液に、グリセリンを 10vol % 加えたものであり、1 mL ずつ小分けして-70 °C 以下で保存する。

付記 21 レプトスピラ・ハージョ WHO 株凍結保存菌液

レプトスピラ・ハージョ WHO 株を豚レプトスピラ病力価試験用 EMJH 培地で培養した培養菌液に、グリセリンを 10vol %加えたものであり、1 mL ずつ小分けして-70 ℃以下で保存する。

付記 22 レプトスピラ・ブラティスラーバ JEZ 株凍結保存菌液

レプトスピラ・ブラティスラーバ JEZ 株を豚レプトスピラ病力価試験用 EMJH 培地で培養した培養菌液に、グリセリンを 10vol %加えたものであり、1 mL ずつ小分けして-70 ℃以下で保存する。

付記 23 レプトスピラ・ポモナ T262 株凍結保存菌液

レプトスピラ・ポモナ T262 株を豚レプトスピラ病力価試験用 EMJH 培地で培養した培養菌液に、グリセリンを 10vol %加えたものであり、1 mL ずつ小分けして-70 ℃以下で保存する。

付記 24 豚レプトスピラ病力価試験用 EMJH 培地

1,000 mL 中

豚レプトスピラ病力価試験用 EMJH 基礎培地	900 mL
アルブミン添加溶液（付記 25）	100 mL

無菌的に混合する。

付記 25 アルブミン添加溶液

1,000 mL 中

アルブミン溶液（付記 26）	667 mL
硫酸鉄溶液（付記 27）	100 mL
塩化カルシウム-塩化マグネシウム溶液（付記 28）	10 mL
ビタミン B12 溶液（付記 29）	10 mL
ポリソルベート 80 溶液（付記 30）	62.5 mL
硫酸亜鉛溶液（付記 31）	10 mL
チアミン溶液（付記 32）	5 mL

各溶液を混合した後、水を加えて 1,000 mL とし、ろ過滅菌する。

付記 26 アルブミン溶液

牛アルブミン分画 V	100 g
------------	-------

水	667 mL
---	--------

4 ℃で攪拌し、完全に溶解する。

付記 27 硫酸鉄溶液

硫酸鉄七水和物	5 g
---------	-----

水	1,000 mL
---	----------

付記 28 塩化カルシウム-塩化マグネシウム溶液

塩化カルシウム二水和物	20 g
-------------	------

塩化マグネシウム六水和物	20 g
--------------	------

水	1,000 mL
---	----------

付記 29 ビタミン B12 溶液

ビタミン B12 (シアノコバラミン)	0.2 g
水	1,000 mL

付記 30 ポリソルベート 80 溶液

ポリソルベート 80	200 mL
水	800 mL

付記 31 硫酸亜鉛溶液

硫酸亜鉛七水和物	4 g
水	1,000 mL

付記 32 チアミン溶液

塩酸チアミン	10 g
水	1,000 mL