

牛クロストリジウム感染症5種混合（アジュバント加） トキシイド（シード）

平成23年10月4日（告示第1911号）新規追加
平成25年5月7日（告示第1495号）一部改正

1 定義

シードロット規格に適合した気腫疽菌、クロストリジウム・セプチカム、クロストリジウム・ノビイ、クロストリジウム・パーフリゲンシ及びクロストリジウム・ソルダーイーを培養して得た培養上清を無毒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トキシイドである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 気腫疽菌

2.1.1.1 名称

気腫疽菌沖縄F株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

対数増殖期の菌体は、周毛性の鞭毛を形成する。

2.1.1.3 マスターシード菌

2.1.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、適当と認められた培地で増殖させ、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

マスターシード菌について、3.1.1の試験を行う。

マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシード菌から小分製品までの最高継代数は、10代以内でなければならない。

2.1.1.4 ワーキングシード菌

2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、適当と認められた培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。

2.1.1.5 プロダクションシード菌

2.1.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、適当と認められた培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

2.1.2 クロストリジウム・セプチカム

2.1.2.1 名称

クロストリジウム・セプチカム No.44T 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

培養ろ液をマウスの静脈内に注射すると毒性を示す。

2.1.2.3 マスターシード菌

2.1.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、適当と認められた培地で増殖させ、保存用の容器に分注する。
分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

マスターシード菌について、3.1.1の試験を行う。

マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシード菌から小分製品までの最高継代数は、10代以内でなければならない。

2.1.2.4 ワーキングシード菌

2.1.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、適当と認められた培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。

2.1.2.5 プロダクションシード菌

2.1.2.5.1 増殖、継代及び保存

プロダクションシード菌は、適当と認められた培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

2.1.3 クロストリジウム・ノビイ

2.1.3.1 名称

クロストリジウム・ノビイ CN1025T 株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

培養液をマウスの静脈内に注射すると毒性を示す。

2.1.3.3 マスターシード菌

2.1.3.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、適当と認められた培地で増殖させ、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

マスターシード菌について、3.1.1の試験を行う。

マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシード菌から小分製品までの最高継代数は、10代以内でなければならない。

2.1.3.4 ワーキングシード菌

2.1.3.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、適当と認められた培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。

2.1.3.5 プロダクションシード菌

2.1.3.5.1 増殖、継代及び保存

プロダクションシード菌は、適当と認められた培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

2.1.4 クロストリジウム・パーフリゲンス

2.1.4.1 名称

クロストリジウム・パーフリゲンス PB6KT 株又はこれと同等と認められた株

2.1.4.2 性状

培養液をマウスの静脈内に注射すると毒性を示す。

2.1.4.3 マスターシード菌

2.1.4.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、適当と認められた培地で増殖させ、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

マスターシード菌について、3.1.1の試験を行う。

マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシード菌から小分製品までの最高継代数は、10代以内でなければならない。

2.1.4.4 ワーキングシード菌

2.1.4.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、適当と認められた培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。

2.1.4.5 プロダクションシード菌

2.1.4.5.1 増殖、継代及び保存

プロダクションシード菌は、適当と認められた培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

2.1.5 クロストリジウム・ソルデリー

2.1.5.1 名称

クロストリジウム・ソルデリー 3703T 株又はこれと同等と認められた株

2.1.5.2 性状

培養ろ液をマウスの静脈内に注射すると毒性を示す。

2.1.5.3 マスターシード菌

2.1.5.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、適当と認められた培地で増殖させ、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

マスターシード菌について、3.1.1の試験を行う。

マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシード菌から小分製品までの最高継代数は、10代以内でなければならない。

2.1.5.4 ワーキングシード菌

2.1.5.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、適当と認められた培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。

2.1.5.5 プロダクションシード菌

2.1.5.5.1 増殖、継代及び保存

プロダクションシード菌は、適当と認められた培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 気腫疽菌

2.2.1.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.2.2 クロストリジウム・セプチカム

2.2.2.1 培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

2.2.3 クロストリジウム・ノビイ

2.2.3.1 培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

2.2.4 クロストリジウム・パーフリンゲンス

2.2.4.1 培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

2.2.5 クロストリジウム・ソルデリー

2.2.5.1 培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 気腫疽菌原液

2.3.1.1 培養

プロダクションシード菌を培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2.1 の試験を行う。

2.3.1.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加え、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、3.3 の試験を行う。

2.3.1.3 原液

不活化菌液を遠心した上清又はこれを相当と認められた方法で濃縮したものを原液とする。

原液について、3.4 の試験を行う。

2.3.2 クロストリジウム・セプチカム原液

2.3.2.1 培養

プロダクションシード菌を培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2.1、3.2.2.1 及び 3.2.3.1 の試験を行う。

2.3.2.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加え、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、3.3 の試験を行う。

2.3.2.3 原液

不活化菌液を遠心した上清又はこれを相当と認められた方法で濃縮したものを原液とする。

原液について、3.4.1 及び 3.4.2 の試験を行う。

2.3.3 クロストリジウム・ノビイ原液

2.3.3.1 培養

プロダクションシード菌を培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2.1、3.2.2.1 及び 3.2.3.1 の試験を行う。

2.3.3.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加え、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、3.3 の試験を行う。

2.3.3.3 原液

不活化菌液を遠心した上清又はこれを相当と認められた方法で濃縮したものを原液とする。

原液について、3.4.1 及び 3.4.2 の試験を行う。

2.3.4 クロストリジウム・パーフリンゲンス原液

2.3.4.1 培養

プロダクションシード菌を培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2.1、3.2.2.2 及び 3.2.3.2 の試験を行う。

2.3.4.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加え、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、3.3 の試験を行う。

2.3.4.3 原液

不活化菌液を遠心した上清又はこれを適当と認められた方法で濃縮したものを原液とする。

原液について、3.4.1 及び 3.4.2 の試験を行う。

2.3.5 クロストリジウム・ソルデリー原液

2.3.5.1 培養

プロダクションシード菌を培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2.1、3.2.2.3 及び 3.2.3.1 の試験を行う。

2.3.5.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加え、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、3.3 の試験を行う。

2.3.5.3 原液

不活化菌液を遠心した上清又はこれを適当と認められた方法で濃縮したものを原液とする。

原液について、3.4.1 及び 3.4.2 の試験を行う。

2.4 最終バルク

気腫疽菌原液、クロストリジウム・セプチカム原液、クロストリジウム・ノビイ原液、クロストリジウム・パーフリンゲンス原液及びクロストリジウム・ソルデリー原液を混合し、濃度調整後、アジュバントを添加し、最終バルクとする。

2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。

小分製品について、3.5 の試験を行う。

3 試験法

3.1 製造用株の試験

3.1.1 マスターシード菌の試験

3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の 1.4.2.4.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 夾雑菌否定試験

3.1.1.2.1 試験材料

検体及び普通寒天斜面培地（付記 1）を用いる。

3.1.1.2.2 試験方法

検体 50 μ L ずつを普通寒天斜面培地 2 本に塗抹し、37 $^{\circ}$ C で好氣的に 48 時間培養する。

3.1.1.2.3 判定

いずれの斜面も菌の発育を認めてはならない。

3.1.2 ワーキングシード菌の試験

3.1.2.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.3 プロダクションシード菌の試験

3.1.3.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2 培養菌液の試験

3.2.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.2 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 毒力試験

3.2.2.1 クロストリジウム・セプチカム及びクロストリジウム・ノビイ

3.2.2.1.1 試験材料

3.2.2.1.1.1 試料

各検体を除菌ろ過して試料とする。

3.2.2.1.1.2 培養細胞

Vero 細胞又は適当と認められた培養細胞を培養し、単層となったものを用いる。

3.2.2.1.2 試験方法

細胞培養液（付記 2）で 2 倍階段希釈した試料を培養細胞に接種し、37 °C、5 vol % 炭酸ガス下でクロストリジウム・セプチカムでは 1 日間、クロストリジウム・ノビイでは 2 日間培養し、観察する。

3.2.2.1.3 判定

培養細胞の 50 % 以上に CPE を認めたものを陽性とし、陽性を示した試料の最高希釈倍数を毒力とする。検体の毒力は、1,600 倍以上でなければならない。

3.2.2.2 クロストリジウム・パーフリンゲンス

3.2.2.2.1 試験材料

3.2.2.2.1.1 試料

検体を除菌ろ過して試料とする。

3.2.2.2.1.2 卵黄液

鶏卵黄をホウ酸緩衝液（付記 3）で 10vol % の濃度に調整したものの遠心上清を用いる。

3.2.2.2.2 試験方法

ホウ酸緩衝液で 2 倍階段希釈した試料、参照毒素（付記 4）及びホウ酸緩衝液を加えたマイクロプレートの各穴に等量の卵黄液を加え、37 °C で 1 時間感作した後、波長 630nm で各穴の吸光度を測定する。

3.2.2.2.3 判定

希釈した試料及び参照毒素の穴の吸光度からホウ酸緩衝液の穴の吸光度を引く。参照毒素の値の 50 % 以上の値を示したものを陽性とし、陽性とした試料の最高希釈倍数を毒力とする。試料の毒力は、16 倍以上でなければならない。

3.2.2.3 クロストリジウム・ソルダーリー

3.2.2.3.1 試験材料

3.2.2.3.1.1 試料

検体を除菌ろ過して試料とする。

3.2.2.3.1.2 培養細胞

Vero 細胞又は適当と認められた培養細胞を培養し、単層となったものを用いる。

3.2.2.3.2 試験方法

細胞培養液で 2 倍階段希釈した試料に、抗クロストリジウム・ソルダーリー HT 血清（付記 5）又は抗クロストリジウム・ソルダーリー LT 血清（付記 6）を加えて 37 °C で 1 時間感作したものを、それぞれクロストリジウム・ソルダーリー LT 測定用試料、クロストリジウム・ソルダーリー HT 測定用試料とし、各測定用試料を培養細胞に接種し、37 °C、5 vol % 炭酸ガス下で 2 日間培養し、観察する。

3.2.2.3.3 判定

培養細胞の 50 % 以上に CPE を認めたものを陽性とし、陽性を示した試料の最高希釈倍数を毒力とする。クロストリジウム・ソルダーリー LT は 16,000 倍以上、クロストリジウム・ソルダーリー HT は 32 倍以上でなければならない。

3.2.3 毒素中和試験

3.2.3.1 クロストリジウム・セプチカム、クロストリジウム・ノビイ及びクロストリジウム・ソルダーリー

3.2.3.1.1 試験材料

3.2.3.1.1.1 試料

各検体を除菌ろ過して試料とする。

3.2.3.1.1.2 培養細胞

Vero 細胞又は適当と認められた培養細胞を培養し、単層となったものを用いる。

3.2.3.1.2 試験方法

クロストリジウム・セプチカムの試料に抗クロストリジウム・セプチカム α 毒素血清（付記7）を、クロストリジウム・ノビイの試料に抗クロストリジウム・ノビイ α 毒素血清（付記8）を、クロストリジウム・ソルダーリーの試料に抗クロストリジウム・ソルダーリー LT 血清及び抗クロストリジウム・ソルダーリー HT 血清を加えて 37℃で1時間感作したものを、それぞれ培養細胞に接種し、37℃、5 vol %炭酸ガス下でクロストリジウム・セプチカムでは1日間、クロストリジウム・ノビイ及びクロストリジウム・ソルダーリーでは2日間培養し、観察する。

3.2.3.1.3 判定

培養細胞に CPE を認めてはならない。

3.2.3.2 クロストリジウム・パーフリンゲンス

3.2.3.2.1 試験材料

3.2.3.2.1.1 試料

検体を除菌ろ過して、ホウ酸緩衝液で毒力が 16 倍になるように調製したものを試料とする。

3.2.3.2.1.2 卵黄液

鶏卵黄をホウ酸緩衝液で 10vol %の濃度に調整したものの遠心上清を用いる。

3.2.3.2.2 試験方法

試料に等量の抗クロストリジウム・パーフリンゲンス α 毒素血清（付記9）を加え 37℃で1時間感作したものを加えた穴及びホウ酸緩衝液のみを加えた穴に、等量の卵黄液を加え、37℃で1時間感作した後、波長 630nm で各穴の吸光度を測定する。

3.2.3.2.3 判定

感作試料を加えた穴の吸光度からホウ酸緩衝液のみを加えた穴の吸光度を差し引いた値は、0.20 未満でなければならない。

3.3 不活化菌液の試験

3.3.1 生菌否定試験

3.3.1.1 試験材料

検体及び液状チオグリコール酸培地を用いる。

3.3.1.2 試験方法

検体ごとに培地 4 本を用い、2 本には 1 mL ずつ、他の 2 本には 2 mL ずつ検体を接種し、37℃で 14 日間培養する。

3.3.1.3 判定

培地に菌の発育を認めてはならない。

3.4 原液の試験

3.4.1 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。

3.4.2 無毒化試験

3.4.2.1 試験材料

3.4.2.1.1 試験動物

4 週齢のマウスを用いる。

3.4.2.2 試験方法

試験動物 5 匹を 1 群として、各検体を 1 匹当たり 0.5mL ずつ皮下に注射し、7 日間観察する。

3.4.2.3 判定

試験期間中いずれの動物も毒素による中毒症状その他の異常を認めてはならない。

3.4.3 抗原量の定量試験

3.4.3.1 試験材料

3.4.3.1.1 試料

気腫疽菌の検体を洗浄液で 100 倍から 2 倍階段希釈したものを試料とする。

3.4.3.1.2 抗原捕捉用抗体

抗原捕捉用抗気腫疽菌鞭毛抗体（付記 10）を用いる。

3.4.3.2 試験方法

試料について酵素抗体反応（以下この項において「ELISA」という。）を行う。適当と認められたブロッキング液を気腫疽菌抗原定量用プレート（付記 11）の各穴に、300 μ L ずつ加え、2 ~ 5 $^{\circ}$ C で一夜反応させた後、洗浄液（付記 12）で 5 回洗浄する。試料又は参照抗原（付記 13）を各穴に 100 μ L ずつ加え、30 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させる。プレートを洗浄液で 5 回洗浄した後、洗浄液で希釈した抗気腫疽菌鞭毛抗体（付記 14）を各穴に 100 μ L ずつ加え、30 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させる。プレートを洗浄液で 5 回洗浄した後、洗浄液で希釈した酵素標識抗モルモット抗体（付記 15）を各穴に 100 μ L ずつ加え 30 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させる。プレートを洗浄液で 5 回洗浄した後、基質液（付記 16）を各穴に 100 μ L ずつ加え、遮光して 30 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させ、1 mol/L 硫酸溶液を各穴に 50 μ L ずつ加えて反応を停止させる。各穴の吸光度を主波長 492nm、副波長 630nm で測定し、ELISA 値とする。

3.4.3.3 判定

参照抗原の ELISA 値が 0.60 に最も近い希釈倍数を求め、そのたん白量を計算する。試料の ELISA 値が 0.60 に最も近い希釈倍数を求め、次式により検体中の抗原量を求める。

抗原量 (μ g/mL) = 試料の希釈倍数 \times 参照抗原のたん白量 (μ g/mL)

検体に含まれる抗原量は、400 μ g/mL 以上でなければならない。

3.5 小分製品の試験

3.5.1 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均質な懸濁液でなければならず、異物及び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。

3.5.2 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。

3.5.3 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。

3.5.4 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、ホルマリン含有量は、0.3vol % 以下でなければならない。

3.5.5 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 1.3mg 以下でなければならない。

3.5.6 毒性限度確認試験

一般試験法の毒性限度確認試験法 1 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、4 日目に行う。

3.5.7 力価試験

3.5.7.1 気腫疽力価試験

3.5.7.1.1 試験材料

3.5.7.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.7.1.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

3.5.7.1.1.3 反応用抗原

気腫疽菌酵素抗体反応用抗原（付記 17）を用いる。

3.5.7.1.2 試験方法

試験動物 8 匹を試験群、2 匹を対照群とする。

注射材料 0.4mL を 2 週間隔で 2 回、試験群の筋肉内に注射する。第 2 回注射後 10 日目に、試験群及び対照群から採血した血清をそれぞれプールしたものについて ELISA を行う。適当と認められたブロッキング液を気腫疽菌抗原吸着プレート（付記 18）の穴に 300 μ L ずつ加え、2～5℃ で一夜反応させた後、洗浄液で 5 回洗浄する。洗浄液で 5 倍希釈から 2 倍階段希釈した検体、参照陽性血清（付記 19）及び参照陰性血清（付記 20）に等量の酵素標識抗気腫疽菌鞭毛モノクローナル抗体（付記 21）を加え、よく混合した後、検体は 1 希釈当たり 4 穴以上、参照陽性血清及び参照陰性血清は 1 希釈当たり 2 穴以上に 100 μ L ずつ加え、30℃ で 1 時間反応させる。別にリン酸緩衝食塩液で 2 倍に希釈した酵素標識抗気腫疽菌鞭毛モノクローナル抗体を 100 μ L ずつ 6 穴以上に加え、標識抗体対照とする。プレートを 30℃ で 1 時間反応させた後、洗浄液で 5 回洗浄し、基質液を各穴に 100 μ L ずつ加え、遮光して 30℃ で 30 分間反応させ、1 mol/L 硫酸溶液を 50 μ L ずつ加えて反応を停止させる。各穴の吸光度を主波長 492nm 及び副波長 630nm で測定し、その平均値を ELISA 値とする。

3.5.7.1.3 判定

標識抗体対照の平均 ELISA 値の 1/2 以下の ELISA 値を示した最高希釈倍数を ELISA 抗体価とする。

試験群の ELISA 抗体価は、10 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、5 倍未満でなければならない。また、参照陽性血清の ELISA 抗体価は 20～80 倍、参照陰性血清の ELISA 抗体価は 5 倍未満でなければならない。標識抗体対照の ELISA 値は、0.80～1.40 でなければならない。

3.5.7.2 クロストリジウム・セプチカム感染症力価試験

3.5.7.2.1 試験材料

3.5.7.2.1.1 試験動物

3.5.7.1 の試験に用いた動物を用いる。

3.5.7.2.1.2 培養細胞

Vero 細胞を細胞培養液を用いて 2×10^5 個/mL の濃度に浮遊させ、細胞培養用プレートに 100 μ L ずつ加え、1 日間培養し、単層を形成させたもの（以下この項において「Vero 細胞培養プレート」という。）を用いる。

3.5.7.2.1.3 中和用毒素

クロストリジウム・セプチカム中和試験用毒素（付記 22）を用いる。

3.5.7.2.2 試験方法

3.5.7.1.2 で得られたプール血清を細胞培養液で 5 倍に希釈し、更に 2 倍階段希釈する。各段階の希釈液に 4 細胞毒性単位（付記 23）となるように細胞培養液で希釈したクロストリジウム・セプチカム中和試験用毒素を等量混合し、37℃ で 1 時間反応させる。その後、細胞培養液を除いた Vero 細胞培養プレートの各穴に 100 μ L ずつ加え、37℃ で 1 日間培養し、倒立顕微鏡で観察する。

3.5.7.2.3 判定

Vero 細胞培養プレート全穴中の 50 %以上の CPE を抑制した血清の最高希釈倍数を抗毒素価と

する。

試験群の抗毒素価は、10 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、5 倍未満でなければならない。

3.5.7.3 クロストリジウム・ノビイ感染症力価試験

3.5.7.3.1 試験材料

3.5.7.3.1.1 試験動物

3.5.7.1 の試験に用いた動物を用いる。

3.5.7.3.1.2 培養細胞

Vero 細胞培養プレートを用いる。

3.5.7.3.1.3 中和用毒素

クロストリジウム・ノビイ中和試験用毒素（付記 24）を用いる。

3.5.7.3.2 試験方法

クロストリジウム・ノビイ中和試験用毒素を用い、3.5.7.2.2 を準用して抗毒素価測定試験を行う。ただし、培養期間は、2 日間とする。

3.5.7.3.3 判定

Vero 細胞培養プレート全穴中の 50 %以上の CPE を抑制した血清の最高希釈倍数を、抗毒素価とする。

試験群の抗毒素価は、20 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、5 倍未満でなければならない。

3.5.7.4 クロストリジウム・パーフリンゲンス感染症力価試験

3.5.7.4.1 試験材料

3.5.7.4.1.1 試験動物

3.5.7.1 の試験に用いた動物を用いる。

3.5.7.4.1.2 ELISA 用抗原

クロストリジウム・パーフリンゲンス酵素抗体反応用抗原（付記 25）を用いる。

3.5.7.4.2 試験方法

3.5.7.1.2 で得られたプール血清について ELISA を行う。

ブロッキング液をクロストリジウム・パーフリンゲンス抗原吸着プレート（付記 26）の穴に 300 μ L ずつ加え、2～5℃で一夜反応させた後、洗浄液で 5 回洗浄する。試験群及び参照陽性血清を洗浄液で 100 倍から 2 倍階段希釈するとともに、対照群及び参照陰性血清を洗浄液で 100 倍希釈したものを、検体は 1 希釈当たり 4 穴以上、参照陽性血清及び参照陰性血清は 1 希釈当たり 2 穴以上に 100 μ L ずつ加え、30℃で 1 時間反応させる。その後、洗浄液で 5 回洗浄し、洗浄液で希釈した酵素標識抗モルモット抗体を各穴に 100 μ L ずつ加え、30℃で 30 分間反応させる。洗浄液で 5 回洗浄し、基質液を各穴に 100 μ L ずつ加え、遮光して 30℃で 30 分間反応させ、1 mol/L 硫酸溶液を各穴に 50 μ L ずつ加えて反応を停止させる。各穴の吸光度を主波長 492nm 及び副波長 630nm で測定し、その平均値を ELISA 値とする。

3.5.7.4.3 判定

ELISA 値が 0.40 以上を示した血清の最高希釈倍数を ELISA 抗体価とする。

試験群の ELISA 抗体価は、400 倍以上でなければならない。この場合、対照群のそれは、100 倍未満でなければならない。また、参照陽性血清の ELISA 抗体価は、400～1,600 倍でなければならない。参照陰性血清の ELISA 抗体価は、100 倍未満でなければならない。

3.5.7.5 クロストリジウム・ソルデリー感染症力価試験

3.5.7.5.1 試験材料

3.5.7.5.1.1 試験動物

3.5.7.1 の試験に用いた動物を用いる。

3.5.7.5.1.2 培養細胞

Vero 細胞培養プレートを用いる。

3.5.7.5.1.3 中和用毒素

クロストリジウム・ソルデリー中和試験用毒素 LT (以下この項において「LT」という。)(付記 27) 及びクロストリジウム・ソルデリー中和試験用毒素 HT (以下この項において「HT」という。)(付記 28) を用いる。

3.5.7.5.2 試験方法

LT 又は HT を用い、3.5.7.2.2 を準用して抗毒素価測定試験を行う。ただし、培養期間は、2 日間とする。

3.5.7.5.3 判定

Vero 細胞培養プレート全穴中の 50 %以上の CPE を抑制した血清の最高希釈倍数を、抗毒素価とする。

試験群の抗毒素価は、LT では 20 倍以上、HT では 10 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、LT 及び HT 共に 5 倍未満でなければならない。

4 貯蔵及び有効期間

有効期間は、製造後 1 年 9 か月間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その期間とする。

付記 1 普通寒天斜面培地

普通寒天培地を内径約 1.5cm、高さ約 16.5cm の試験管に 8 mL 分注し、全斜面培地にしたもの。

付記 2 細胞培養液

1,000mL 中	
トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
牛胎子血清	50 mL
イーグル MEM	残 量
pH を 7.0 ~ 7.4 に調整する。	

付記 3 ホウ酸緩衝液

1,000mL 中	
四ホウ酸ナトリウム十水和物	0.57 g
ホウ酸	2.1 g
塩化カルシウム二水和物	1.8 g
塩化ナトリウム	7.5 g
水	残 量
pH を 7.6 に調整する。	

付記 4 参照毒素

クロストリジウム・パーフリンゲンス培養上清から硫酸アンモニウム塩析及びイオン交換クロマトグラフィーにより精製したもので、1 μ mol/L の卵黄 L- α -ホスファチジルコリンを完全に溶解できる毒力のものを用いる。

付記 5 抗クロストリジウム・ソルデリー HT 血清

クロストリジウム・ソルデリー HT 産生株の培養上清からイオン交換クロマトグラフィー

により精製した HT を無毒化し、兎に免疫して得られた血清で、クロストリジウム・ソルデリー LT を中和しない。

付記 6 抗クロストリジウム・ソルデリー LT 血清

クロストリジウム・ソルデリー LT 産生株の培養上清からイオン交換クロマトグラフィーにより精製した LT を無毒化し、兎に免疫して得られた血清で、クロストリジウム・ソルデリー HT を中和しない。

付記 7 抗クロストリジウム・セプチカム α 毒素血清

クロストリジウム・セプチカムの培養上清からイオン交換及びゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した α 毒素を無毒化し、兎に免疫して得られた血清である。

付記 8 抗クロストリジウム・ノビイ α 毒素血清

クロストリジウム・ノビイの培養上清からイオン交換及び疎水クロマトグラフィーにより精製した α 毒素を無毒化し、兎に免疫して得られた血清である。

付記 9 抗クロストリジウム・パープリンゲンズ α 毒素血清

国際標準品又はこれと同等品

付記 10 抗原捕捉用抗気腫疽菌鞭毛抗体

適当と認められた方法により気腫疽菌の菌体表層から剥離させた鞭毛を密度勾配遠心法により精製したものを、兎に免疫して得られた血清から、IgG を硫酸アンモニウム塩析によって精製したもの。

付記 11 気腫疽菌抗原定量用プレート

抗原捕捉用抗気腫疽菌鞭毛抗体を、参照抗原のたん白量 $0.25 \sim 2 \mu \text{g/mL}$ で ELISA 値 0.60 を示すように炭酸緩衝液（付記 29）で希釈し、これを ELISA プレートに $100 \mu \text{L}$ ずつ加え、 30°C で 2 時間吸着させたもの。

付記 12 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
塩化カリウム	0.2 g
リン酸二水素カリウム	0.2 g
塩化ナトリウム	8.0 g
ポリソルベート 20	0.5 mL
水	残 量

付記 13 参照抗原

適当と認められた方法により気腫疽菌の菌体表層から剥離させた鞭毛を密度勾配遠心法により精製したもので、たん白量 $4 \mu \text{g/mL}$ から 2 倍階段希釈して用いる。

付記 14 抗気腫疽菌鞭毛抗体

抗原捕捉用抗気腫疽菌鞭毛抗体（付記 10）と同様にモルモットを用いて作製した IgG である。参照抗原のたん白量 $0.25 \sim 2 \mu \text{g/mL}$ で ELISA 値 0.60 を示すように調整する。

付記 15 酵素標識抗モルモット抗体

抗モルモット IgG をペルオキシダーゼで標識したものを。

付記 16 基質液

o-フェニレンジアミン二塩酸塩 10mg をリン酸クエン酸緩衝液（付記 30）25mL に溶解し、遮光する。使用直前に過酸化水素（30）を 10 μ L 添加して使用する。

付記 17 気腫疽菌酵素抗体反応用抗原

適当と認められた方法により気腫疽菌の菌体表層から剥離させた鞭毛を、密度勾配遠心法により精製したものを。

付記 18 気腫疽菌抗原吸着プレート

気腫疽菌酵素抗体反応用抗原を炭酸緩衝液で適当な濃度に希釈し、これを ELISA プレートに 100 μ L ずつ加え、30 $^{\circ}$ C で 2 時間吸着させたものを。

付記 19 参照陽性血清

気腫疽菌、クロストリジウム・セプチカム、クロストリジウム・パーフリンゲンス、クロストリジウム・ノビイ及びクロストリジウム・ソルダーリーを培養して得た培養上清を無毒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ものをモルモットに免疫して得られた血清で、気腫疽菌及びクロストリジウム・パーフリンゲンス ELISA 抗体価を測定したとき、気腫疽菌では 20 ~ 80 倍、パーフリンゲンスでは 400 ~ 1,600 倍を示すもの。

付記 20 参照陰性血清

非免疫モルモットの血清で、気腫疽菌及びクロストリジウム・パーフリンゲンス ELISA 抗体価を測定したとき、気腫疽菌では 5 倍未満、クロストリジウム・パーフリンゲンスでは 100 倍未満を示すもの。

付記 21 酵素標識抗気腫疽菌鞭毛モノクローナル抗体

気腫疽菌鞭毛に対するモノクローナル抗体を硫酸アンモニウム塩析で精製した後、ペルオキシダーゼで標識したもので、クロストリジウム・セプチカムには反応しないもの。参照陽性血清の気腫疽菌 ELISA 抗体価が 20 ~ 80 倍を示し、ELISA 値が 0.80 ~ 1.40 を示すように調整したものを。

付記 22 クロストリジウム・セプチカム中和試験用毒素

クロストリジウム・セプチカム製造用培地で増殖させたクロストリジウム・セプチカム培養菌液を、除菌ろ過したもの。

付記 23 細胞毒性単位

Vero 細胞培養プレート穴中の培養細胞の 50 % 以上に CPE を認めたものを陽性とし、陽性を示した試料の最高希釈倍数を 1 細胞毒性単位とする。

付記 24 クロストリジウム・ノビイ中和試験用毒素

クロストリジウム・ノビイ製造用培地で増殖させたクロストリジウム・ノビイ培養菌液を、除菌ろ過したもの。

付記 25 クロストリジウム・パーフリンゲンス酵素抗体反応用抗原

クロストリジウム・パーフリンゲンス製造用培地で増殖させたクロストリジウム・パーフリンゲンス培養菌液をろ過した後、硫酸アンモニウム塩析及びイオン交換クロマトグラフィーにより精製した α 毒素で、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析したとき、43kDa に主要バンドを認めるもの。

付記 26 クロストリジウム・パーフリンゲンス抗原吸着プレート

クロストリジウム・パーフリンゲンス酵素抗体反応用抗原を炭酸緩衝液で適当な濃度に希釈し、これを ELISA プレートに 100 μ L ずつ加え、30 $^{\circ}$ C で 2 時間吸着させたもの。

付記 27 クロストリジウム・ソルダーリー中和試験用毒素 LT

クロストリジウム・ソルダーリー製造用培地で増殖させたクロストリジウム・ソルダーリー培養菌液を除菌ろ過した後、限外ろ過により濃縮し、イオン交換クロマトグラフィーにより分離した毒素で、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析したとき、約 250kDa に主要バンドを認めるもの。

付記 28 クロストリジウム・ソルダーリー中和試験用毒素 HT

クロストリジウム・ソルダーリー製造用培地で増殖させたクロストリジウム・ソルダーリー培養菌液を除菌ろ過した後、限外ろ過により濃縮し、イオン交換クロマトグラフィーにより分離した毒素で、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析したとき、約 300kDa に主要バンドを認めるもの。

付記 29 炭酸緩衝液

1,000mL 中

無水炭酸ナトリウム

1.59 g

炭酸水素ナトリウム

2.93 g

水

残 量

pH を 9.6 に調整する。

付記 30 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