

豚アクチノバシラス・プルロニューモニエ感染症（1型部分精製・無毒化毒素）（酢酸トコフェロールアジュバント加）不活化ワクチン

平成23年2月8日(告示第358号)一部改正

1 定義

アクチノバシラス・プルロニューモニエ（以下この項において「App」という。）1型菌の培養菌液を不活化した後、部分精製して得た菌体外膜たん白（以下この項において「OMP」という。）に、App 2型菌及び5型菌を培養して得たApp 毒素（Apx I、Apx II及びApx III）を無毒化したものを混合し、酢酸トコフェロー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 App 1型菌

2.1.1.1 名称

App 1-L-452 株(血清型1型)又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

細胞毒素 Apx I 及び Apx II を産生する。感受性豚に接種すると、胸膜炎を惹起する。

2.1.1.3 継代及び保存

原株及び種菌は、チョコレート寒天培地（付記1）又は適当と認められた寒天培地で継代する。

継代は、原株にあつては3代以内、種菌にあつては5代以内でなければならない。

原株は、凍結乾燥して5℃以下で保存する。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 App 2型菌

2.1.2.1 名称

App 1536 株(血清型2型)又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

細胞毒素 Apx II 及び Apx III を産生する。感受性豚に接種すると、胸膜炎を惹起する。

2.1.2.3 継代及び保存

原株及び種菌は、チョコレート寒天培地又は適当と認められた寒天培地で継代する。

継代は、原株にあつては3代以内、種菌にあつては5代以内でなければならない。

原株は、凍結乾燥して5℃以下で保存する。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。

2.1.3 App 5型菌

2.1.3.1 名称

App L20 株(血清型5型)又は適当と認められた株

2.1.3.2 性状

細胞毒素 Apx I 及び Apx II を産生する。感受性豚に接種すると、胸膜炎を惹起する。

2.1.3.3 継代及び保存

原株及び種菌は、チョコレート寒天培地又は適当と認められた寒天培地で継代する。

継代は、原株にあつては3代以内、種菌にあつては5代以内でなければならない。

原株は、凍結乾燥して5℃以下で保存する。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。

2.2 製造用材料

2.2.1 培地

App 1 型菌には、コロンビア寒天培地（付記 2）及び TPB 培地（付記 3）、又は製造に相当と認められた培地を用いる。

App 2 型菌及び 5 型菌には、コロンビア寒天培地及びコロンビア培地（付記 4）又は製造に相当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 OMP 抗原原液

2.3.1.1 培養

コロンビア寒天培地で培養した App 1 型種菌を TPB 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 の試験を行う。

2.3.1.2 不活化

培養菌液にクロクロゼールを加え、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、3.2 の試験を行う。

2.3.1.3 濃縮・精製

不活化菌液を限外ろ過により濃縮し、トリス塩酸緩衝液に浮遊する。これを超音波処理して菌体を破碎した後、遠心し、その上清に N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウムを加え混合する。さらに、超遠心によりペレットにし、これをトリス塩酸緩衝液に懸濁し、濃度調整したものを OMP 抗原原液とする。

OMP 抗原原液について、3.3.1 及び 3.3.2.1 の試験を行う。

2.3.2 Apx III / Apx II 抗原原液

2.3.2.1 培養

コロンビア寒天培地で培養した App 2 型種菌をコロンビア培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.1 の試験を行う。

2.3.2.2 不活化

培養菌液にクロクロゼールを加え、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、3.2 の試験を行う。

2.3.2.3 濃縮・精製

不活化菌液の遠心上清を、孔径 800nm のメンブタン・フィルターでろ過し、限外ろ過により濃縮し、トリス塩酸緩衝液で濃度調整したものを Apx III / Apx II 抗原原液とする。

Apx III / Apx II 抗原原液について、3.3.1 及び 3.3.2.2 の試験を行う。

2.3.3 Apx I / Apx II 抗原原液

2.3.3.1 培養

コロンビア寒天培地で培養した App 5 型種菌をコロンビア培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.1 の試験を行う。

2.3.3.2 不活化

培養菌液にクロクロゼールを加え、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、3.2 の試験を行う。

2.3.3.3 濃縮・精製

不活化菌液の遠心上清を、孔径 800nm のメンブタン・フィルターでろ過し、限外ろ過により濃縮し、トリス塩酸緩衝液で濃度調整したものを Apx I / Apx II 抗原原液とする。

Apx I / Apx II 抗原原液について、3.3.1 及び 3.3.2.2 の試験を行う。

2.4 最終バルク

OMP 抗原原液、Apx III / Apx II 抗原原液及び Apx I / Apx II 抗原原液を混合し、濃度調整したものに酢酸トコフェロールアジュバントを添加し、更にホルマリン又は適当と認められた保存剤を添加し、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、3.4 の試験を行う。

3 試験法

3.1 培養菌液の試験

3.1.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.1 試験材料

検体及びコロンビア寒天培地を用いる。

3.1.1.2 試験方法

検体の 0.1mL ずつを 2 枚の培地に接種し、37℃で 24 時間培養する。

3.1.1.3 判定

いずれの培地上にも App 以外の集落を認めてはならない。

3.2 不活化菌液の試験

3.2.1 不活化試験

3.2.1.1 試験材料

検体及びコロンビア寒天培地を用いる。

3.2.1.2 試験方法

検体の 0.1mL ずつを 2 枚の培地に接種し、37℃で 24 時間培養する。

3.2.1.3 判定

菌の発育を認めてはならない。

3.3 原液の試験

3.3.1 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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.3.2 抗原単位（付記 5）の測定

3.3.2.1 OMP 抗原

3.3.2.1.1 試験材料

検体及び OMP の参照抗原（付記 6）を用いる。

3.3.2.1.2 試験方法

検体及び参照抗原を、それぞれ、生理食塩液で希釈した後、その 2 容量と 3 倍濃度サンプル緩衝液（付記 7）の 1 容量と混和する。混和物を、12w/v % SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行う。泳動した後、ゲルをクマシー・ブリリアント・ブルーで染色し、次いで脱色する。脱色したゲルをガラス板に乗せ、ゲルの表面に脱色液を重層し、更にその上にガラス板を置く。ゲルをスキャナーでスキャンし、写真撮影してバンドの面積を計算する。検体中の OMP 抗原単位は、参照抗原の OMP 抗原量を基にして算出する。

3.3.2.1.3 判定

検体中の OMP 抗原単位は、250 単位/mL 以上でなければならない。

3.3.2.2 Apx I、Apx II 及び Apx III 抗原

3.3.2.2.1 試験材料

3.3.2.2.1.1 試料

検体をあらかじめ希釈液（付記 9）で希釈したものを試料とする。

3.3.2.2.1.2 酵素抗体反応（以下この項において「ELISA」という。）用モノクローナル抗体吸着プレート

Apx I 抗原単位の測定には Apx I に対するモノクローナル抗体吸着プレート（付記 8）、Apx II 抗原単位の測定には Apx II に対するモノクローナル抗体吸着プレート、Apx III 抗原単位の測定には Apx III に対するモノクローナル抗体吸着プレートを、それぞれ用いる。

3.3.2.2.1.3 参照抗原

Apx I 抗原単位の測定には Apx I の参照抗原、Apx II 抗原単位の測定には Apx II の参照抗原、Apx III 抗原単位の測定には Apx III の参照抗原を、それぞれ用いる。

3.3.2.2.1.4 標識抗体 1

Apx I 抗原単位の測定には Apx I に対する標識抗体 1（付記 10）、Apx II 抗原単位の測定には Apx II に対する標識抗体 1、Apx III 抗原単位の測定には Apx III に対する標識抗体 1 を、それぞれ用いる。

3.3.2.2.2 試験方法

Apx III / Apx II 抗原原液については Apx III 抗原単位及び Apx II 抗原単位を、Apx I / Apx II 抗原原液については Apx I 抗原単位及び Apx II 抗原単位を、ELISA により測定する。

ELISA 用モノクローナル抗体吸着プレートの A3 - A10 及び 11 列目を除いた全ての穴に希釈液を 100 μ L ずつ加える。A3 - A4、A5 - A6、A7 - A8 及び A9 - A10 には、試料 200 μ L を 2 穴ずつに加える。11 列目の全ての穴及び A1 - A2 には、参照抗原を 100 μ L ずつ入れる。1 - 10 列は、A 行から H 行に向かって 2 倍階段希釈し、H 行から 100 μ L ずつを除去する。フタをかぶせて、37 $^{\circ}$ C、1.5 時間加温した後、蒸留水で 3 回洗浄し、標識抗体 1 を各穴に 100 μ L ずつ加える。フタをかぶせて、37 $^{\circ}$ C、1 時間加温した後、蒸留水で 3 回洗浄し、基質液（付記 11）を各穴に 100 μ L ずつ加える。10 分間反応させた後、2 mol/L 硫酸を各穴に 50 μ L ずつ加え、反応を停止し、波長 450nm の吸光度を測定する。

1 - 2 列目の参照抗原の波長 450nm の吸光度から検量線を作成し、これから検体中の抗原単位を算出する。

3.3.2.2.3 判定

Apx III / Apx II 抗原原液中の Apx III 抗原単位及び Apx II 抗原単位はそれぞれ 250 単位/mL 以上及び 125 単位/mL 以上、Apx I / Apx II 抗原原液中の Apx I 抗原単位及び Apx II 抗原単位はそれぞれ 250 単位/mL 以上及び 125 単位/mL 以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その抗原単位とする。

3.4 小分製品の試験

3.4.1 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液体でなければならない、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。

3.4.2 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。

3.4.3 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。

3.4.4 ホルマリン定量試験

適当と認められた方法で試験品を処理したものを試料とし、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。

3.4.5 酢酸トコフェロール定量試験

日本薬局方の酢酸トコフェロールの定量法により試験するとき、酢酸トコフェロールの含有量は、80mg/mL 以下でなければならない。

3.4.6 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、注射量は 0.2mL とし、注射後の体重測定は、4 日目とする。

なお、3.4.7 の試験を実施するものについては、本試験を実施しなくてもよい。

3.4.7 安全試験

3.4.7.1 試験材料

3.4.7.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.7.1.2 試験動物

約 6 週齢の豚を用いる。

3.4.7.2 試験方法

注射材料の 2 mL ずつを 2 頭の試験動物の頸部筋肉内に注射し、14 日間観察する。

3.4.7.3 判定

注射後、試験動物に発熱（41 °C 以上）、行動緩慢、震え、まれに嘔吐等を認めても、これらの症状は 2 日以上継続してはならない。また、観察期間中、その他の臨床的な異常を認めてはならない。

3.4.8 力価試験

3.4.8.1 試験材料

3.4.8.1.1 注射材料

試験品を生理食塩液で 250 倍及び 5,000 倍に希釈したものを注射材料とする。

3.4.8.1.2 試験動物

体重約 1.5 ～ 2.0kg のダッチ種 SPF 兎を用いる。

3.4.8.1.3 ELISA 用抗原

Apx I 抗原（付記 12）、Apx II 抗原（付記 13）、Apx III 抗原（付記 14）及び OMP 抗原（付記 15）を用いる。

3.4.8.2 試験方法

試験動物 10 匹を試験群とし、5 匹ずつの 2 群に分ける。

それぞれの注射材料 1 mL ずつを 3 週間間隔で 2 回、各群の筋肉内に注射する。第 1 回目注射時（以下この項において「T0」という。）及び第 2 回目の注射後 7 日目（以下この項において「T4」という。）に両群から採血する。250 倍に希釈した注射材料で免疫した兎から得られた各個体の血清については Apx I 抗原及び Apx II 抗原を、5,000 倍に希釈した注射材料で免疫した兎から得られた各個体の血清については Apx III 抗原及び OMP 抗原を用いて、ELISA を行う。

各試験群の T4 血清及び参照陽性血清 1（付記 16）を希釈液でそれぞれ 50 倍に希釈したもの、及び参照陽性血清 2（付記 17）を 1,000 倍に希釈したものを、あらかじめ希釈液 100 μ L を入れた抗原吸着プレート（付記 18）に 100 μ L ずつ加え、更に同希釈液で 2 倍段階希釈する。また、同様に各試験群の T0 血清を希釈液で 100 倍に希釈したものを抗原吸着プレートに 100 μ L ずつ加え、各兎の個体別陰性対照とし、希釈液のみの穴をバックグラウンドとする。37 °C で 1 時間反応させた後、水で 8 回洗浄する。次に、標識抗体 2（付記 19）を各穴に 100 μ L ずつ加え、37 °C で 1 時間反応させた後、水で 8 回洗浄する。基質液を各穴に 100 μ L ずつ加え、15 分間反応させた後、2 mol/L 硫酸を各穴に 50 μ L ずつ加えて反応を停止させ、波長 450nm で各穴の吸光度を測定する。

3.4.8.3 判定

同一個体の兎の T0 血清の吸光度に対して 1.5 倍以上の吸光度を示す T4 血清の最高希釈倍数を抗体価とし、100 倍以上を陽性とする。

各試験群の血清の 80 % 以上が、それぞれの抗原に対して陽性でなければならない。この場合、

バックグラウンドの吸光度は 0.1 未満、T0 血清の吸光度はバックグラウンドの吸光度の 4 倍未満でなければならない。また、参照陽性血清 1 のそれぞれの抗原に対する抗体価は、100 ～ 400 倍を示さなければならない。参照陽性血清 2 は、抗 Apx I 抗体価 8,000 ～ 32,000 倍、抗 Apx II 抗体価 16,000 ～ 64,000 倍、抗 Apx III 抗体価 8,000 ～ 32,000 倍及び抗 OMP 抗体価 8,000 ～ 64,000 倍を示さなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、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 チョコレート寒天培地

1,000mL 中

コロンビア寒天培地	44.0	g
水		残 量

pH を 7.2 に調整して、高圧滅菌する。

約 80 °C に冷却後、馬脱線血を約 10vol% になるよう添加し、更にイソ・バイタル X を 10mL 加える。

付記 2 コロンビア寒天培地

1,000mL 中

トリプチケース・ペプトン	10.0	g
ペプトン	10.0	g
牛肉エキス	3.0	g
トウモロコシデンプン	1.0	g
塩化ナトリウム	5.0	g
寒天	15.0	g
水		残 量

pH を 7.2 に調整して、高圧滅菌する。

約 50 °C に冷却後、イソ・バイタル X を 10mL 及び 10w/v % β -NAD を 1 mL 添加する。

付記 3 TPB 培地

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	29.5	g
水		残 量

使用時に 10w/v % β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（以下この項において「 β -NAD」という。）を 1 mL 加える。

pH を 7.2 に調整して、ろ過滅菌する。

付記 4 コロンビア培地

1,000mL 中

L-システイン塩酸塩	0.1	g
デキストロース	2.5	g
塩化ナトリウム	5.0	g
硫酸マグネシウム七水和物	0.2	g
硫酸鉄七水和物	0.0036	g
トリス	3.03	g

牛肉エキス	3.0	g
トリプチケース・ペプトン	5.0	g
ペプトン	5.0	g
水		残 量

2型菌及び5型菌の培養の場合には、使用時に 10w/v % β -NAD を 1 mL 加える。また、5型菌の培養の場合には、1 mol/L 塩化カルシウム二水和物を 25mL 加える。pH を 7.2 に調整して、ろ過滅菌する。

付記 5 抗原単位

OMP 抗原及び Apx I 抗原、Apx II 抗原及び Apx III 抗原のたん白質量 1 μ g を、それぞれの抗原の 1 単位とする。

付記 6 参照抗原

OMP 抗原原液、Apx III/Apx II 抗原原液及び Apx I/Apx II 抗原原液の製法に準じて作製した抗原原液であって、OMP 抗原、Apx I 抗原、Apx II 抗原又は Apx III 抗原の含有量が明らかなもの。

付記 7 3 倍濃度サンプル緩衝液

0.15mol/L トリス塩酸、30vol% グリセロール、6 % w/v % SDS、15vol % 2-メルカプトエタノール、0.06w/v % プロモフェノール・ブルーを含み、pH6.8 に調整したもの。

付記 8 モノクローナル抗体吸着プレート

OMP、Apx I、Apx II 又は Apx III に特異的に反応するモノクローナル抗体を約 4 μ g/mL に調整し、その 100 μ L ずつ 96 穴の ELISA 用マイクロプレートの各穴に分注し、37 °C で約 16 時間静置し、吸着したもので、- 20 °C に保存し、6 か月以内に使用する。使用時には、融解後、液を捨て、流水で 3 回洗浄する。

付記 9 希釈液

1,000mL 中		
リン酸二水素ナトリウム二水和物	35.58	g
塩化ナトリウム	11.69	g
ポリソルベート 80	0.50	g
水		残 量

加温溶解した後、カオリン処理済みの牛血清アルブミン 1 g を加えて溶解し、pH を 7.0 に調整する。ろ過滅菌して保存する。

付記 10 標識抗体 1

OMP、Apx I、Apx II 又は Apx III に特異的に反応するモノクローナル抗体にペルオキシダーゼを標識したもの。

付記 11 基質液

A液：100mL 中		
酢酸ナトリウム	13.6	g
水		残 量

クエン酸で pH を 5.5 に調整した後、尿素過酸化水素 140mg を溶解する。

B液：

テトラメチルベンチジン 6 g をジメチルスルホキシド 1,000mL に溶解したもの
A液、B液及び水をそれぞれ 15：2：150 の割合で使用直前に混合して用いる。

付記 12 Apx I 抗原

Apx I 毒素のみを産生する App10 型菌の培養上清を無毒化した後濃縮し、ゲルろ過を行って精製したものであり、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた場合に、105kDa に特異なバンドを認める。小分けし、凍結して -20°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

付記 13 Apx II 抗原

Apx II 毒素のみを産生する App 7 型菌の培養上清を無毒化した後濃縮し、ゲルろ過を行って精製したものであり、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた場合に、105kDa に特異なバンドを認める。小分けし、凍結して -20°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

付記 14 Apx III 抗原

Apx III 毒素のみを産生する App 2 型菌の培養上清を無毒化した後濃縮し、ゲルろ過を行って精製したものであり、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた場合に、120kDa に特異なバンドを認める。小分けし、凍結して -20°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

付記 15 OMP 抗原

App 2 型菌の培養菌液を不活化後超音波処理し、その遠心上清をゲルろ過を行って精製したものであり、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた場合に、42kDa に特異なバンドを認める。小分けし、凍結して -20°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

付記 16 参照陽性血清 1

App の Apx I、Apx II、Apx III 及び OMP 抗原を兎に免疫して得られた抗血清であって、免疫開始時に採取した血清（以下この項において「RT0」という。RT0 吸光度は、バックグラウンドの吸光度の 4 倍未満でなければならない。）と、それぞれの抗原を用いて ELISA を行い、RT0 の吸光度に対して 1.5 倍以上を示す血清の最高希釈倍数を抗体価としたとき、抗体価がそれぞれ 100～400 倍になるように調整したものであり、小分けし、凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

付記 17 参照陽性血清 2

App の Apx I、Apx II、Apx III 及び OMP 抗原を兎に免疫して得られた抗血清であって、それぞれの抗原を用いて ELISA を行い、バックグラウンドの吸光度の 4 倍以上を示す血清の最高希釈倍数を抗体価としたとき、抗体価がそれぞれ 8,000～32,000 倍、16,000～64,000 倍、8,000～32,000 倍及び 8,000～64,000 倍となるように調整したものであり、小分けし、凍結して -20°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

付記 18 抗原吸着プレート

Apx I、Apx II、Apx III 及び OMP 抗原を、それぞれ 1 mL 中約 2.5, 0.38, 2.0 及び 0.03 $\mu\text{g/mL}$ になるように炭酸緩衝液（付記 20）で希釈し、プレートの穴に 0.1mL ずつ加える。

Apx I、Apx II 及び Apx III 抗原は 37°C で、OMP 抗原は $15\sim 25^{\circ}\text{C}$ でそれぞれ 16 時間反応させた後、水でよく洗浄したもの。

付記 19 標識抗体 2

ペルオキシダーゼ標識抗兔 IgG 抗体を希釈液で希釈したものであり、各参照陽性血清の抗体価が規定の値となるように調整して使用する。

付記 20 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 に調整する。