

豚ボルデテラ感染症不活化・パストツレラ・ムルトシダトキソイド・豚丹毒不活化混合（アジュバント加）ワクチン

平成 21 年 3 月 26 日（告示第 420 号） 新規追加

1 定義

ボルデテラ・ブロンキセプチカの培養菌液を不活化し、アルミニウムゲルアジュバントを添加したもの、パストツレラ・ムルトシダの培養菌体より得た皮膚壊死毒素を部分精製した後不活化し、アルミニウムゲルアジュバントを添加したものと及び豚丹毒菌の培養菌液を不活化し、アルミニウムゲルアジュバントを添加したものを混合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・ブロンキセプチカ菌株

2.1.1.1 名称

ボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌 N-40 株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

ボルデー・ジャング培地上に隆起した小円形の集落を形成し、 β 溶血性を示す。また、K 抗原を有し、既知のボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌の免疫血清によって特異的に凝集される。

生後 7 日齢以内の豚に点鼻接種すると、豚萎縮性鼻炎を起こす。生菌又は超音波処理菌をモルモットの皮内に注射すると、注射部位に出血及び壊死を起こす。

2.1.1.3 継代及び保存

原株及び種菌は、ボルデー・ジャング培地（付記 1）又は適当と認められた平板培地で継代する。

継代は、原株では 3 代以内、種菌では 5 代以内でなければならない。

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

2.1.2 パストツレラ・ムルトシダ菌株

2.1.2.1 名称

パストツレラ・ムルトシダ G-7 株（莢膜抗原型 D）又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

鶏血清加ハートインフュージョン寒天培地上に粘稠性のある円形の集落を形成する。

生菌を鼻粘膜に酢酸を前処理した約 3 週齢の豚に点鼻接種すると、豚萎縮性鼻炎を起こす。培養菌体から調製した皮膚壊死毒素をモルモットの皮内に注射すると、注射部位に壊死を起こし、また、豚の筋肉内に注射すると豚萎縮性鼻炎を起こす。

2.1.2.3 継代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株では 3 代以内、種菌では 5 代以内でなければならない。

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

2.1.3 豚丹毒菌株

2.1.3.1 名称

豚丹毒菌多摩 96 株（血清型 2 型）又はこれと同等と認められた株

2.1.3.3 性状

感受性豚に接種すると、豚丹毒を惹起する。

2.1.3.4 継代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株では3代以内、種菌では4代以内でなければならない。

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。

2.2 製造用材料

2.2.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

2.2.1.1 培地

ボルデー・ジャング培地又は製造に相当と認められた培地を用いる。

2.2.2 パスツレラ・ムルトシダ

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 豚丹毒菌

2.2.3.1 培地

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・ブロンキセプチカ原液

2.3.1.1 培養

種菌を平板培地に接種し、増菌培養したものを、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、3.1.1.1 及び 3.1.2 の試験を行う。

2.3.1.2 不活化及び遠心

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後、遠心して得られた菌体を適量のリン酸緩衝食塩液（付記2。以下「PBS」という。）に浮遊させ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 濃度調整

PBS で不活化菌液の濃度を調整したものを原液とする。

原液について、3.5.1 の試験を行う。

2.3.2 パスツレラ・ムルトシダ原液

2.3.2.1 培養

種菌を平板培地に接種し、増菌培養したものを、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、3.1.1.2 及び 3.1.3.1 の試験を行う。

2.3.2.2 集菌及び破碎

培養菌液を遠心し、得られた菌体を適量のリン酸緩衝液（付記3）に浮遊し、物理的処理により菌体を破碎したものを破碎菌液とする。

破碎菌液について、3.3 の試験を行う。

2.3.2.3 部分精製及び濃縮

破碎菌液をカラムクロマトグラフィーにより分画し、毒素活性部分を採取、濃縮したものを皮膚壊死毒素液とする。

皮膚壊死毒素液について、3.4 の試験を行う。

2.3.2.4 不活化

皮膚壊死毒素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原液とする。

原液について、3.5.1 の試験を行う。

2.3.3 豚丹毒菌原液

2.3.3.1 培養

種菌を液状培地に接種し、増菌培養したものを、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、3.1.1.3 及び 3.1.3.2 の試験を行う。

2.3.3.2 原液の調製

培養菌液にホルマリンを加えて不活化後、遠心して得られた菌体を適量の PBS に浮遊させたものを原液とする。

原液について、3.5 の試験を行う。

2.4 最終バルク

2.4.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカバルク

ボルデテラ・ブロンキセプチカ原液に適量の PBS 及びアルミニウムゲルアジュバントを加えて濃度調整したものをボルデテラ・ブロンキセプチカバルクとする。この場合、適当と認められた保存剤を添加してもよい。

2.4.2 パスツレラ・ムルトシダバルク

パスツレラ・ムルトシダ原液に適量の PBS 及びアルミニウムゲルアジュバントを加えて濃度調整したものをパスツレラ・ムルトシダバルクとする。この場合、適当と認められた保存剤を添加してもよい。

2.4.3 豚丹毒菌バルク

豚丹毒菌原液に適量の PBS 及びアルミニウムゲルアジュバントを加えて濃度調整したものを豚丹毒菌バルクとする。この場合、適当と認められた保存剤を加えてもよい。

2.4.4 最終バルク

ボルデテラ・ブロンキセプチカバルク、パスツレラ・ムルトシダバルク及び豚丹毒菌バルクを混合したものを最終バルクとする。

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、3.6 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 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

一般試験法の無菌試験法 1 を準用して試験するとき、ボルデテラ・ブロンキセプチカ以外の菌の発育を認めてはならない。

3.1.1.2 パスツレラ・ムルトシダ

一般試験法の無菌試験法 1 を準用して試験するとき、パスツレラ・ムルトシダ以外の菌の発育を認めてはならない。

3.1.1.3 豚丹毒菌

3.1.1.3.1 液状チオグリコール酸培地培養法

一般試験法の無菌試験法 1 を準用して試験するとき、豚丹毒菌以外の菌の発育を認めてはならない。

3.1.1.3.2 普通寒天培地斜面培養法

3.1.1.3.2.1 培地

普通寒天斜面培地を用いる。

3.1.1.3.2.2 試験方法

検体 0.5mL ずつを普通寒天斜面培地の 4 本に接種し、37℃で 7 日間培養し、観察する。

3.1.1.3.2.3 判定

豚丹毒菌以外の菌の発育を認めてはならない。

3.1.2 型別試験

3.1.2.1 試験材料

3.1.2.1.1 試料

検体、ボルデテラ・ブロンキセプチカの K 因子血清（付記 4）及び O 因子血清（付記 5）を用いる。

3.1.2.2 試験方法

検体の約 0.03mL ずつとそれぞれの因子血清約 0.03mL とをスライドグラス上で混合し、急速凝集反応を行う。

3.1.2.3 判定

検体は、K 因子血清では速やかに凝集しなければならず、O 因子血清では難凝集性を示さなければならない。

3.1.3 生菌数試験

3.1.3.1 パスツレラ・ムルトシダ

3.1.3.1.1 試験材料

3.1.3.1.1.1 試料

検体をソイビーン・カゼイン・ダイジェスト・ブロス（付記 6）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.1.3.1.1.2 培地

CHI 寒天培地（付記 7）を用いる。

3.1.3.1.2 試験方法

各試料 0.1mL ずつをそれぞれ 2 枚以上の平板培地に接種して培地表面に拡散させ、37℃で 24 時間培養後、集落数を数える。

3.1.3.1.3 判定

各段階の希釈液ごとの集落数の平均値、希釈倍数及び培地への接種量から生菌数を算出する。

検体の生菌数は、1 mL 中 5×10^9 個以上でなければならない。

3.1.3.2 豚丹毒菌

3.1.3.2.1 試験材料

3.1.3.2.1.1 試料

検体を普通ブイヨンで 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.1.3.2.1.2 培地

普通寒天培地を用いる。

3.1.3.2.2 試験方法

試料 1 mL ずつをそれぞれ 2 枚のシャーレに分注し、平板混積培養法により 37℃で 48 時間培養後、生じた豚丹毒菌の集落数を数える。

3.1.3.2.3 判定

各段階の希釈液ごとの集落数の平均値、希釈倍数及び培地への接種量から生菌数を算出する。

検体の生菌数は、1 mL 中 1.5×10^9 個以上でなければならない。

3.2 ボルデテラ・ブロンキセプチカ不活化菌液の試験

3.2.1 不活化試験

一般試験法の無菌試験法 1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.2 総菌数試験

3.2.2.1 試験材料

3.2.2.1.1 試料

検体を PBS で適度に希釈したものを試料とする。

3.2.2.2 試験方法

分光光度計を用い、試料の吸光度を測定する。

3.2.2.3 判定

標準検量線、吸光度の測定値及び検体の希釈度から総菌数を算出するとき、検体の総菌数は、1 mL 中 2×10^{11} 個以上でなければならない。

3.3 パスツレラ・ムルトシダ破碎菌液の試験

3.3.1 毒素量測定試験

3.3.1.1 試験材料

3.3.1.1.1 試料

ろ過した検体を PBS で 2 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.1.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

3.3.1.2 試験方法

試料 0.2mL ずつを試験動物の背部皮内に適当な間隔をあけて注射する。試験動物 1 匹当たり 8 希釈の試料の注射を限度とする。

3.3.1.3 判定

注射 2 日目に壊死斑を測定し、直径 5 mm 以上の壊死斑を形成させる最高希釈を 1 皮膚壊死毒素単位とし、その希釈倍数を検体 0.2mL 中の皮膚壊死毒素単位とする。

検体の皮膚壊死毒素単位は、1 mL 中 640 以上でなければならない。

3.4 パスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素液の試験

3.4.1 同定試験

3.4.1.1 試験材料

3.4.1.1.1 試料

検体 50 μ L に等量のサンプルバッファー（付記 8）を加え、3 分間煮沸したものを試料とする。

3.4.1.2 試験方法

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による。試料 10 μ L を 10w/v % アクリルアミドゲル（付記 9）のウェルに接種し、泳動後、クマシー・ブルーで染色して泳動像を観察する。

3.4.1.3 判定

検体は、分子量約 140kDa の位置に主要なバンドを認めなければならない。

3.4.2 皮膚壊死毒素定量試験

3.4.2.1 試験材料

3.4.2.1.1 検体及び試料

たん白量測定試験には、検体を用いる。また、毒素量測定試験には、検体を PBS で 2 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料としたものを用いる。

3.4.2.1.2 試験動物

毒素量測定試験には、体重約 350g のモルモットを用いる。

3.4.2.2 試験方法

3.4.2.2.1 毒素量測定試験

3.3.1.2 を準用して試験を行い、検体 1 mL 中の皮膚壊死毒素単位を測定する。

3.4.2.2.2 たん白量測定試験

Lowry 法により検体 1 mL 中のたん白量を測定する。

3.4.2.3 判定

検体 1 mL 中の皮膚壊死毒素単位及びたん白量より、たん白量 1 μ g 当たりの皮膚壊死毒素単位を算出する。

検体中の皮膚壊死毒素は、たん白量 1 μ g 当たり 30 皮膚壊死毒素単位以上でなければならない。

3.5 原液の試験

3.5.1 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。

3.5.2 不活化試験

一般試験法の無菌試験法 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、判定は接種後 3 日目に行う。

3.6 小分製品の試験

3.6.1 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。

3.6.2 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。

3.6.3 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。

3.6.4 無毒化試験

3.6.4.1 試験材料

3.6.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.6.4.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

3.6.4.2 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。

3.6.4.3 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。

3.6.5 チメロサル定量試験

チメロサル添加製剤については、一般試験法のチメロサル定量法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.6.6 ホルマリン定量試験

ホルマリン添加製剤については、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、0.25vol % 以下でなければならない。

3.6.7 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 2.4mg 以下でなければならない。

3.6.8 安全試験

3.6.8.1 試験材料

3.6.8.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.6.8.1.2 試験動物

約 5 週齢の豚を用いる。

3.6.8.2 試験方法

試験動物の 2 頭を試験群、1 頭を対照群とする。

注射材料 1 mL ずつを 3 週間隔で 2 回、試験群の筋肉内に注射し、対照群とともに第 1 回目注射後 5 週間観察する。

3.6.8.3 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、試験群の注射反応は無視しうる程度以下でなければならない。

3.6.9 力価試験

3.6.9.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ感染症力価試験

3.6.9.1.1 試験材料

3.6.9.1.1.1 試験動物

3.6.8 の試験に用いた動物を用いる。

3.6.9.1.1.2 凝集反应用抗原

ボルデテラ・ブロンキセプチカ凝集反应用抗原（付記 10）を用いる。

3.6.9.1.2 試験方法

3.6.8 の試験最終日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、凝集試験を行う。

血清を凝集反应用リン酸緩衝食塩液（付記 11）で 5 倍に希釈し、更に 2 倍階段希釈した後、ボルデテラ・ブロンキセプチカ凝集反应用抗原を用いて試験管内凝集反応を行う。

3.6.9.1.3 判定

試験管内に凝集を認めた血清の最高希釈倍数を凝集抗体価とする。

試験群では、いずれも凝集抗体価 40 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、10 倍以下でなければならない。

3.6.9.2 パスツレラ・ムルトシダ感染症力価試験

3.6.9.2.1 試験材料

3.6.9.2.1.1 試験動物

3.6.8 の試験に用いた動物を用いる。

3.6.9.2.1.2 酵素抗体反応（以下「ELISA」という。）用抗原

組換え皮膚壊死毒素たん白（付記 12。以下「rToxA」という。）を用いる。

3.6.9.2.2 試験方法

3.6.8 の試験最終日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。

試験群と対照群の血清を血清希釈液（付記 13）で 100 倍に希釈したもの、指示陽性血清（付記 14）及び指示陰性血清（付記 15）を rToxA 吸着プレート（付記 16）の 4 穴（偶数列 2 穴と奇数列 2 穴）に 50 μ L ずつ加える。37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた後、洗浄液（付記 17）で 3 回洗浄する。次に、各穴に酵素標識抗体液（付記 18）を 50 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 15 分間反応させた後、洗浄液で 3 回洗浄する。発色基質液（付記 19）を各穴に 50 μ L ずつ加え、遮光して 30 $^{\circ}$ C で 20 分間反応させた後、2 mol/L 硫酸水溶液を 50 μ L ずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を主波長 492nm、副波長 630nm で測定する。

3.6.9.2.3 判定

試験群と対照群の血清、指示陽性血清及び指示陰性血清について、奇数列穴の吸光度より偶数列穴の吸光度を差し引いた値を算出し、平均したものを各血清の吸光度値とする。指示陽性血清の吸光度値が 0.8 ~ 1.3、指示陰性血清の吸光度値が 0.1 未満の場合、試験成立とし、次式に基づいて試験群と対照群の血清の E 値を算出したとき、0.1 以上を陽性とする。

$$E \text{ 値} = (S - N) / (P - N)$$

S : 被験血清の吸光度値

N : 指示陰性血清の吸光度値

P : 指示陽性血清の吸光度値

試験群の E 値は、すべて陽性でなければならない。この場合、対照群では、すべて 0.1 未満でなければならない。

3.6.9.3 豚丹毒力価試験

3.6.9.3.1 試験材料

3.6.9.3.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.6.9.3.1.2 試験動物

5週齢のマウスを用いる。

3.6.9.3.1.3 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 20）に接種し、37℃で14～20時間培養する。これを普通ブイヨンで 10^3 個/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。

3.6.9.3.2 試験方法

試験動物の10匹を試験群、10匹を対照群とする。

注射材料 0.5mL ずつを14日間隔で2回、試験群の内股部皮下に注射する。第2回目注射後14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。

3.6.9.3.3 判定

試験群では、70%以上が耐過生存しなければならない。この場合、対照群では、90%以上が死亡しなければならない。

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、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 ボルデー・ジャング培地

1,000 mL 中

ボルデー・ジャング・アガーベース 30 g

グリセリン 10 g

水 残量

加温溶解後、pHを6.6～7.0に調整し、121℃で15分間高圧滅菌する。約50℃に冷却後、必要に応じて馬又は羊血液を5～20vol%となるように添加する。

付記 2 リン酸緩衝食塩液（PBS）

1,000mL 中

塩化ナトリウム 8.5 g

リン酸水素二ナトリウム十二水和物 2.435 g

リン酸二水素カリウム 0.435 g

水 残量

pHを6.9～7.1に調整後、121℃で20分間高圧滅菌、又はろ過滅菌する。

チメロサル又は適当と認められた保存剤を添加してもよい。

付記 3 リン酸緩衝液

1,000mL 中

リン酸水素二ナトリウム十二水和物 2.256 g

リン酸二水素ナトリウム二水和物 2.137 g

水 残量

pHを6.4～6.6に調整後、121℃で20分間高圧滅菌、又はろ過滅菌する。

付記 4 K因子血清

ボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌に対する兔免疫血清で、I 相菌に対する凝集価を 80 倍以上に、III 相菌に対する凝集価を 10 倍以下に調整したもの

付記 5 O 因子血清

ボルデテラ・ブロンキセプチカ III 相菌に対する兔免疫血清で、III 相菌に対する凝集価を 80 倍以上に、I 相菌に対する凝集価を 10 倍以下に調整したもの

付記 6 ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト・ブロス
1,000mL 中

ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト・ブロス	30 g
水	残 量

加温溶解後、pH を 7.0 ~ 7.4 に調製し、沈殿をろ過により除去した後、121 °C で 15 分間高圧滅菌する。

付記 7 CHI 寒天培地

1,000mL 中

ハートインフュージョン・ブロス	25 g
寒天	10 g
水	残 量

加温溶解後、121 °C で 15 分間高圧滅菌する。約 50 °C に冷却後、鶏血清を 5 vol% となるように添加する。

付記 8 サンプルバッファー

50 mL 中

0.25mol/L トリス塩酸緩衝液、pH 6.8	25 mL
20w/v % ラウリル硫酸ナトリウム (SDS)	13 mL
グリセリン	10 mL
ジチオスレイトール	0.77 g
ブロムフェノールブルー	0.05 g
水	残 量

付記 9 10w/v % アクリルアミドゲル

濃縮ゲル 5 mL 中

0.25mol/L トリス塩酸緩衝液、pH 6.8	1.3 mL
30w/v % アクリルアミド / 0.8w/v % ビス	0.9 mL
20w/v % SDS	0.05 mL
水	残 量

使用直前に下記の試薬を加えてゲルを重合させる。

10w/v % 過硫酸アンモニウム	0.025 mL
N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED)	0.01 mL

分離ゲル 10mL 中

1.5mol/L トリス塩酸緩衝液、pH 8.8	2.5 mL
30w/v % アクリルアミド / 0.8w/v % ビス	3.3 mL
20w/v % SDS	0.1 mL

水	残 量
使用直前に下記の試薬を加えてゲルを重合させる。	
10w/v %過硫酸アンモニウム	0.1 mL
TEMED	0.01 mL

付記 10 ボルデテラ・ブロンキセプチカ凝集反応用抗原

ボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌のホルマリン不活化菌を適当と認められた希釈用液に 1 mL 中 1×10^{10} 個となるように浮遊させたもので、抗体価が既知の陽性血清に対して所定の凝集価を示し、陰性血清に対して凝集しないことを確認したもの

付記 11 凝集反応用リン酸緩衝食塩液

1,000mL 中	
塩化ナトリウム	6.8 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	2.4 g
リン酸二水素カリウム	0.7 g
水	残 量

pH を 6.8 ~ 7.2 に調整後、121 °C で 20 分間高圧滅菌、あるいはろ過滅菌する。

付記 12 組換え皮膚壊死毒素たん白 (r ToxA)

大腸菌 K-12 株由来 XL-1 Blue に、toxA 遺伝子をクローン化したプラスミド pSN131 を形質転換して作出した rToxA 産生組換え大腸菌を培養する。

培養菌液より集菌・洗浄して得た菌体を、超音波処理、硫酸塩析の後、カラムクロマトグラフィー精製及び濃縮により調製する。

rToxA 液は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析したとき、分子量約 140KDa の位置に特異的なバンドを認め、他にバンドを認めない。ELISA 抗原は、rToxA 液をホルマリンで不活化して使用する。

付記 13 血清希釈液

1,000mL 中	
ゼラチン	10.0 g
塩化ナトリウム	6.8 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	3.02 g
リン酸二水素カリウム	0.7 g
ポリソルベート 80	1 mL
水	残 量

ゼラチンを水に加温・溶解後、冷却し、これに他の成分を加えて溶解する。

付記 14 指示陽性血清

不活化した精製パスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素で免疫した豚の血清で、血清希釈液により、ELISA の吸光度値が 0.8 ~ 1.3 を示すように調整し、凍結したもの

ただし、免疫に用いる豚は、適当と認められた規格の豚を用いる。

付記 15 指示陰性血清

パスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素に対する抗体を保有しない豚の血清で、ELISA の吸光度値が 0.1 未満を示すもの

付記 16 rToxA 吸着プレート

rToxA を 0.05mol/L 炭酸重炭酸緩衝液（付記 21）によりたん白濃度が $1 \mu\text{g/mL}$ となるように希釈し、この抗原液を ELISA 用プレートの奇数列の穴に、0.05mol/L 炭酸重炭酸緩衝液をプレートの偶数列の穴にそれぞれ $50 \mu\text{L}$ ずつ加え、 4°C で一夜固相化した後に洗浄液で 1 回洗浄し、次に、ブロッキング液（付記 22）を $50 \mu\text{L}$ ずつ各穴に加え、60 分間反応させた後、洗浄液で 1 回洗浄したもの

付記 17 洗浄液

1,000mL 中	
塩化ナトリウム	8.5 g
ポリソルベート 80	0.5 mL
水	残 量

付記 18 酵素標識抗体液

1,000mL 中	
ペルオキシダーゼ結合プロテイン A (蛋白濃度 2.0mg/mL)	1 mL
塩化ナトリウム	6.8 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	3.02 g
リン酸二水素カリウム	0.7 g
ポリソルベート 80	1 mL
水	残 量

使用時直前に調製する。

付記 19 発色基質液

1,000mL 中	
o-フェニレンジアミン二塩酸塩	0.40 g
過酸化水素 (30)	0.2 mL
基質緩衝液（付記 23）	残 量

使用直前に調製する。

付記 20 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 に調整後、 121°C で 15 分間高圧滅菌する。

付記 21 0.05mol/L 炭酸重炭酸緩衝液

1,000mL 中	
炭酸水素ナトリウム	3.0 g
炭酸ナトリウム	1.5 g
水	残 量

pH を 9.6 に調製する。

付記 22 ブロッキング液

1,000mL 中

ゼラチン

10.0 g

水

残 量

ゼラチンを加温・溶解し、冷却後使用する。

付記 23 基質緩衝液

1,000mL 中

クエン酸

2.55 g

無水リン酸水素二ナトリウム

3.65 g

水

残 量

pH を 5.0 に調整する。