

ロイコチトゾーン症（油性アジュバント加）ワクチン（組換え型）

平成23年 5月 11日(告示第 939号)一部改正
令和 2年 6月 30日(告示第1246号)一部改正

1 定義

組換え大腸菌で産生されるロイコチトゾーン・カウレリー第2代シズント（以下「2GS」という。）由来 R7 抗原に油性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 名称

大腸菌 TB1/pMAL-cRI-R7 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

2GS 構造蛋白質の一部である R7 抗原を発現する。

2.1.3 継代及び保存

原株及び種菌は、継代用培地（付記1）又は液状培地（付記2）で継代する。

継代は、原株及び種菌とも3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 以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 培地

液状培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 培養

種菌を液状培地で培養したものに発現誘導剤（付記3）を添加し、更に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 抗原の抽出

培養菌液を遠心し、その沈渣をリン酸緩衝食塩液（付記4）に浮遊する。これにリゾチーム溶液（付記5）及びデオキシコール酸を添加し、抽出処理したものの遠心上清をろ過し、抽出抗原液とする。

抽出抗原液について、3.2の試験を行う。

2.3.3 不活化

抽出抗原液にホルマリンを添加し、不活化抗原液とする。

不活化抗原液について、3.3の試験を行う。

2.3.4 アジュバントの添加

不活化抗原液の抗原価をリン酸緩衝食塩液で調整し、油性アジュバントを添加し、原液とする。

原液について、3.4の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液を混合し、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 培養菌液の試験

3.1.1 菌濃度確認試験

3.1.1.1 試験材料

検体を用いる。

3.1.1.2 試験方法

検体の吸光度を波長 600nm で測定する。

3.1.1.3 判定

検体の吸光度値は、0.8 以上でなければならない。

3.2 抽出抗原液の試験

3.2.1 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 不活化抗原液の試験

3.3.1 不活化試験

3.3.1.1 試験材料

検体をリン酸緩衝食塩液を用いて透析し、ホルマリンを除去したものを試料とする。

3.3.1.2 試験方法

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。

3.3.2 R7 抗原の定量試験

3.3.2.1 試験材料

検体及び参照陽性抗原（付記 6）をそれぞれ酵素抗体反応（以下「ELISA」という。）用希釈液（付記 7）で 10,000 倍に希釈後、2 倍階段希釈により 1,280,000 倍まで希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.2.2 試験方法

抗 2GS 膜抗原モノクローナル抗体（付記 8）を、炭酸緩衝液（付記 9）で至適濃度となるように希釈し、96 穴マイクロプレートの全穴に 100 μ L ずつ加え、4℃で 14 ~ 18 時間反応後、洗浄液（付記 10）で 3 回洗浄する。各穴にブロッキング液（付記 11）を 200 μ L ずつ加え、37℃で 1 時間反応後、洗浄液で 3 回洗浄する。1 試料当たり 4 穴に、及びブランクとして ELISA 用希釈液を 1 穴に、それぞれ 100 μ L ずつ加え、37℃で 1 時間反応させる。洗浄液で 3 回洗浄後、ELISA 用希釈液で至適濃度に希釈したペルオキシダーゼ標識抗 2GS 膜抗原モノクローナル抗体（付記 12）を 100 μ L ずつ加え、37℃で 1 時間反応させる。洗浄液で 5 回洗浄後、基質液（付記 13）を 100 μ L ずつ加え、37℃で 15 分間反応後、停止液（付記 14）を 50 μ L ずつ加えて反応を停止させ、波長 492nm で各穴の吸光度を測定する。

3.3.2.3 判定

試料の吸光度値は、それぞれの吸光度値からブランクの吸光度値を引いた値とする。4 穴の平均吸光度値が 0.081 以上を示す試料の最高希釈倍数を R7 抗原価とする。

参照陽性抗原が所定の R7 抗原価を示すとき、検体の R7 抗原価は、1 mL 中 800,000 単位以上でなければならない。

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。

3.5 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。

3.5.2 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 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、0.002vol %以下でなければならない。

3.5.4 安全試験

3.5.4.1 試験材料

3.5.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.4.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の5週齢の鶏を用いる。

3.5.4.2 試験方法

試験動物 10羽を試験群、3羽を対照群とする。

注射材料 0.25mL ずつを試験群の脚部筋肉内に注射し、対照群とともに4週間観察し、観察期間最終日に注射部位を剖検する。

3.5.4.3 判定

観察期間中、試験群の注射局所の軽度の腫脹以外に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、剖検したとき、注射局所に著しい異常を認めてはならない。

3.5.5 力価試験

3.5.5.1 試験材料

3.5.5.1.1 試験動物

3.5.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.5.5.2 試験方法

3.5.4 の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について ELISA を行う。

抗原固相化プレート（付記 15）を洗浄液で3回洗浄後、各穴にブロッキング液を 200 μ L ずつ加え、37℃で1時間反応後、洗浄液で3回洗浄する。試験群の血清を ELISA 用希釈液で 100 倍希釈し、及び参照陽性血清（付記 16）を ELISA 用希釈液 2 mL で溶解したものを、それぞれ2倍階段希釈により 12,800 倍まで希釈したもの、並びに対照群の血清及び参照陰性血清（付記 17）を 100 倍希釈したものを、試験群及び対照群の血清並びに参照陽性血清は1試料当たり2穴に、参照陰性血清は4穴に、及びブランクとして ELISA 用希釈液を1穴にそれぞれ100 μ L ずつ加え、37℃で1時間反応させる。洗浄液で4回洗浄後、各穴にペルオキシダーゼ標識抗鶏 IgG 液（付記18）を 100 μ L ずつ加え、37℃で1時間反応させる。洗浄液で5回洗浄後、基質液を各穴に 100 μ L ずつ加え、37℃で15分間反応後、停止液を全穴に 50 μ L ずつ加えて反応を停止させ、波長 492nm で各穴の吸光度を測定する。

3.5.5.3 判定

吸光度値は、それぞれの吸光度値からブランクの吸光度値を引いた値とする。

試験群及び対照群の血清並びに参照陽性血清は2穴の、参照陰性血清は4穴の、それぞれの平均吸光度値が 0.078 以上を示す検体の最高希釈倍数を 2GS 抗体価とする。

参照陰性血清の 2GS 抗体価が 100 倍以下であり、参照陽性血清が所定の 2GS 抗体価を示すとき、試験群の 80 % 以上で 2GS 抗体価が 6,400 倍以上でなければならない。この場合、すべての対照群の 2GS 抗体価は 100 倍以下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 継代用培地

1,000 mL 中

カゼン製ペプトン	10	g
粉末酵母エキス	5	g
塩化ナトリウム	10	g
寒天	15	g
水		残量

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

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 2 液状培地

1,000mL 中

カゼイン製ペプトン	10	g
粉末酵母エキス	5	g
塩化ナトリウム	10	g
水		残量

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

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 3 発現誘導剤

100 mL 中

イソプロピル-β-D(-)-チオガラクトピラノシド	2.38	g
水		残量

ろ過滅菌する。

付記 4 リン酸緩衝食塩液

1,000 mL 中

塩化ナトリウム	8.00	g
リン酸二水素ナトリウム二水和物	0.20	g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	1.83	g
水		残量

付記 5 リゾチーム溶液

100mL 中

卵白リゾチーム	1	g
水		残量

付記 6 参照陽性抗原

R7 抗原液を凍結保存したもので、3.3.2 の方法で測定するとき、R7 抗原価が 1 mL 中 1,600,000 単位のもの

付記 7 ELISA 用希釈液

ブロッキング液を洗浄液で 10 倍に希釈したもの

付記 8 抗 2GS 膜抗原モノクローナル抗体

2GS 膜抗原認識単クローン抗体を用いて得られた精製マウス腹水を、リン酸緩衝食塩液で濃度調整したもの

付記 9 炭酸緩衝液

A液

700 mL 中

炭酸水素ナトリウム 2.93 g

水 残量

B液

300 mL 中

炭酸ナトリウム 1.59 g

水 残量

A液に pH 9.6 になるまで B液を加え、ろ過滅菌したもの

付記 10 洗浄液

リン酸緩衝食塩液にポリソルベート 20 を 0.05vol % となるように加えたもの

付記 11 ブロッキング液

100 mL 中

牛血清アルブミン 3 g

洗浄液 100 mL

ろ過滅菌する。

付記 12 ペルオキシダーゼ標識抗 2GS 膜抗原モノクローナル抗体

抗 2GS 膜抗原モノクローナル抗体をペルオキシダーゼで標識して、至適濃度に調整したものの

付記 13 基質液

A液：リン酸水素二ナトリウム、無水 8.5 g

水 300 mL

B液：クエン酸 6.3 g

水 300 mL

使用時に、A液とB液とを 51.4 : 48.6 の割合に混合し、その 100mL にオルトフェニレンジアミン二塩酸塩を 0.1w/v %、また、過酸化水素水を 0.03vol % となるように加えたもの

付記 14 停止液

1,000 mL 中

硫酸 138.9 mL

水 残量

付記 15 抗原固相化プレート

炭酸緩衝液で至適濃度になるように希釈した固相用抗原（付記 19）を 96 穴プレートの全穴に 100 μ L ずつ分注し、4°C で 14 ~ 18 時間吸着したもの

付記 16 参照陰性血清

ロイコトゾーン・カウレリー原虫に未感染、かつ、ロイコトゾーン症ワクチン未注射の鶏血清で、3.5.5.の方法で測定するとき、2GS 抗体価が 100 倍以下のもの

付記 17 参照陽性血清

ロイコトゾーン症ワクチン接種鶏由来の血清を 100 倍に希釈したもので、3.5.5 の方法で測定するとき、2GS 抗体価が 6,400 倍のもの

付記 18 ペルオキシダーゼ標識抗鶏 IgG 液

ペルオキシダーゼ標識抗鶏 IgG を、ELISA 用希釈液で至適濃度に希釈したもの

付記 19 固相用抗原

2GS 抗原をリン酸緩衝食塩液で至適濃度に調整したもの