

鶏サルモネラ症（サルモネラ・インファンティス・サルモネラ・エンテリティディス・サルモネラ・ティフィムリウム）（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

平成 23 年 7 月 15 日(告示第 1349 号)新規追加
平成 30 年 4 月 27 日(告示第 969 号)一部改正

シードロット規格に適合したサルモネラ・インファンティス（以下この項において「SI」という。）、サルモネラ・エンテリティディス（以下この項において「SE」という。）及びサルモネラ・ティフィムリウム（以下この項において「ST」という。）のそれぞれの培養菌液を不活化し、濃縮したものに油性アジュバントを添加し、混合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 力価試験

1.2.1 鶏サルモネラ症（SI）力価試験

1.2.1.1 試験材料

1.2.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.2.1.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 5～7 週齢の鶏を用いる。

1.2.1.1.3 酵素抗体反応（以下この項において「ELISA」という。）用抗原

組換え SI べん毛抗原（付記 1）を用いる。

1.2.1.2 試験方法

試験動物の 10 羽を試験群、3 羽を対照群とする。

注射材料 1 羽分ずつを、試験群の背側部皮下に注射する。注射後 4 週目に両群から得られた各個体の血清について、ELISA を行う。

試験群及び対照群の各血清、SI 参照陽性血清（付記 2）及び参考陰性血清（付記 3）を希釀・洗浄液（付記 4）で 400 倍希釀し、それぞれ組換え SI べん毛抗原吸着プレート（付記 5）4 穴に $100 \mu L$ ずつ加える。各プレートに、希釀・洗浄液のみの穴を 3 穴設け、ブランク穴とする。37 °C で 1 時間反応させた後、希釀・洗浄液で洗浄する。各穴に酵素標識抗体（付記 6）を $100 \mu L$ ずつ加え、37 °C で 1 時間反応させた後、希釀・洗浄液で洗浄する。基質液（付記 7）を $100 \mu L$ ずつ加え、遮光して室温で 15 分間反応させた後、反応停止液（付記 8）を $50 \mu L$ ずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を波長 492nm で測定する。

1.2.1.3 判定

各穴の吸光度からブランク穴の平均吸光度を引いた値を各穴の吸光度値とする。それぞれの血

清の 4 穴の吸光度値を比較し、最高値と最低値を除いた 2 穴の平均吸光度値を、それぞれの血清の吸光度値とし、試験群及び対照群の各血清の吸光度値を SI 参照陽性血清の吸光度値で割った値を、それぞれの血清の ELISA 抗体価とする。

試験群の ELISA 抗体価の平均値は、0.25 以上でなければならず、対照群の ELISA 抗体価は、いずれも 0.1 以下でなければならない。また、SI 参照陽性血清の吸光度値は、0.8 ~ 1.2 を示さなければならず、参考陰性血清の吸光度値は、0.1 以下でなければならない。

1.2.2 鶏サルモネラ症 (SE) 力価試験

1.2.2.1 試験材料

1.2.2.1.1 試験動物

1.2.1 の試験に使用した試験動物を用いる。

1.2.2.1.2 ELISA 用抗原

SE 精製べん毛抗原（付記 9）を用いる。

1.2.2.2 試験方法

注射後 4 週目に、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。

試験群及び対照群の各血清、SE 参照陽性血清（付記 10）及び参考陰性血清を希釀・洗浄液で 800 倍希釀し、それぞれ SE 精製べん毛抗原吸着プレート（付記 11）4 穴に $100 \mu L$ ずつ加える。各プレートに、希釀・洗浄液のみの穴を 3 穴設け、ブランク穴とする。37 °C で 1 時間反応させた後、希釀・洗浄液で洗浄する。各穴に酵素標識抗体を $100 \mu L$ ずつ加え、37 °C で 1 時間反応させた後、希釀・洗浄液で洗浄する。基質液を $100 \mu L$ ずつ加え、遮光して室温で 15 分間反応させた後、反応停止液を $50 \mu L$ ずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を波長 492nm で測定する。

1.2.2.3 判定

各穴の吸光度からブランク穴の平均吸光度を引いた値を各穴の吸光度値とする。それぞれの血清の 4 穴の吸光度値を比較し、最高値と最低値を除いた 2 穴の平均吸光度値を、それぞれの血清の吸光度値とし、試験群及び対照群の各血清の吸光度値を SE 参照陽性血清の吸光度値で割った値を、それぞれの血清の ELISA 抗体価とする。

試験群の ELISA 抗体価の平均値は、0.25 以上でなければならず、対照群の ELISA 抗体価は、いずれも 0.1 以下でなければならない。また、SE 参照陽性血清の吸光度値は、0.8 ~ 1.2 を示さなければならず、参考陰性血清の吸光度値は、0.1 以下でなければならない。

1.2.3 鶏サルモネラ症 (ST) 力価試験

1.2.3.1 試験材料

1.2.3.1.1 試験動物

1.2.1 の試験に使用した試験動物を用いる。

1.2.3.1.2 ELISA 用抗原

組換え ST べん毛抗原（付記 12）を用いる。

1.2.3.2 試験方法

注射後 4 週目に、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。

試験群及び対照群の各血清、ST 参照陽性血清（付記 13）及び参考陰性血清を希釀・洗浄液で 400 倍希釀し、それぞれ組換え ST べん毛抗原吸着プレート（付記 14）4 穴に $100 \mu L$ ずつ加える。各プレートに、希釀・洗浄液のみの穴を 3 穴設け、ブランク穴とする。37 °C で 1 時間反応させた

後、希釈・洗浄液で洗浄する。各穴に酵素標識抗体を $100 \mu \text{L}$ ずつ加え、 37°C で 1 時間反応させた後、希釈・洗浄液で洗浄する。基質液を $100 \mu \text{L}$ ずつ加え、遮光して室温で 15 分間反応させた後、反応停止液を $50 \mu \text{L}$ ずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を波長 492nm で測定する。

1.2.3.3 判定

各穴の吸光度からブランク穴の平均吸光度を引いた値を各穴の吸光度値とする。それぞれの血清の 4 穴の吸光度値を比較し、最高値と最低値を除いた 2 穴の平均吸光度値を、それぞれの血清の吸光度値とし、試験群及び対照群の各血清の吸光度値を ST 参照陽性血清の吸光度値で割った値を、それぞれの血清の ELISA 抗体価とする。

試験群の ELISA 抗体価の平均値は、0.2 以上でなければならず、対照群の ELISA 抗体価は、いずれも 0.1 以下でなければならない。また、ST 参照陽性血清の吸光度値は、0.8 ~ 1.2 を示さなければならず、参考陰性血清の吸光度値は、0.1 以下でなければならない。

付記 1 組換え SI べん毛抗原

SI I-178 株の fliC 遺伝子の一部を挿入したプラスミドで形質転換した大腸菌を超音波で破碎し、べん毛抗原をアフィニティークロマトグラフィーにより精製した後、リン酸緩衝食塩液（付記 15）で透析したもので、 -80°C 以下で保存する。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析したとき、35 ~ 40KDa の位置にバンドを認める。1.3.1.2 の試験により ELISA を行うとき、SI 参照陽性血清の吸光度値が 0.8 ~ 1.2、参考陰性血清の吸光度値が 0.1 以下を示し、使用時の蛋白質量が $0.01 \sim 0.06 \mu \text{g}/\text{穴}$ になるように炭酸緩衝液（付記 16）で調整する。

付記 2 SI 参照陽性血清

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏を SI I-178 株で免疫して得た血清で、1.2.1.2 の試験により ELISA を行うとき、吸光度値が 0.8 ~ 1.2 を示し、1.2.2.2 の試験により ELISA を行うとき、吸光度値が 0.25 以下を示し、1.2.3.2 の試験により ELISA を行うとき、吸光度値が 0.2 以下を示す。凍結して -20°C 以下で保存する。

付記 3 参照陰性血清

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏の血清で、1.2.1.2、1.2.2.2 及び 1.2.3.2 の試験により ELISA を行うとき、いずれの試験においても吸光度値が 0.1 以下を示す。凍結して -20°C 以下で保存する。

付記 4 希釈・洗浄液

1,000mL 中	
塩化ナトリウム	8.0 g
塩化カリウム	0.2 g
リン酸水素二ナトリウム	1.15 g
リン酸二水素カリウム	0.3 g
水	残 量

pH を 7.2 に調整後、ポリソルベート 20 を 0.5mL 添加する。

付記5 組換えSIべん毛抗原吸着プレート

組換えSIべん毛抗原を炭酸緩衝液で希釈し、96穴プレートの各穴に100 μ Lずつ加え、37°Cで1時間反応させた後、希釈・洗浄液で洗浄し、次に、各穴に1w/v%スキムミルク加希釈・洗浄液（付記17）を200 μ Lずつ加え、37°Cで1時間反応させた後、希釈・洗浄液で洗浄したもの

付記6 酵素標識抗体

ペルオキシダーゼ標識抗鶏IgG（H+L）抗体で、1.2.1.2、1.2.2.2及び1.2.3.2の試験によりELISAを行うとき、SI参考陽性血清、SE参考陽性血清及びST参考陽性血清の吸光度値が0.8～1.2を示し、参考陰性血清の吸光度値が0.1以下を示すように、希釈・洗浄液又は1w/v%スキムミルク加希釈・洗浄液で調整したもの

付記7 基質液

σ-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18）10mLに遮光して溶解し、使用直前に過酸化水素水10 μ Lを添加したもの

付記8 反応停止液

1,000mL中	
シュウ酸二水和物	28.02 g
水	残量

付記9 SE精製べん毛抗原

SE E-926株の培養菌液に塩酸を加えた後、硫酸アンモニウムで沈殿させたべん毛抗原をリン酸緩衝食塩液で透析したもので、-80°C以下で保存する。1.2.2.2の試験によりELISAを行うとき、SE参考陽性血清の吸光度値が0.8～1.2、参考陰性血清の吸光度値が0.1以下を示し、使用時の蛋白質量が0.01～0.2 μ g/穴になるように炭酸緩衝液で調整する。

付記10 SE参考陽性血清

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の鶏をSE E-926株で免疫して得た血清で、1.2.1.2の試験によりELISAを行うとき、吸光度値が0.25以下を示し、1.2.2.2の試験によりELISAを行うとき、吸光度値が0.8～1.2を示し、1.2.3.2の試験によりELISAを行うとき、吸光度値が0.2以下を示す。凍結して-20°C以下で保存する。

付記11 SE精製べん毛抗原吸着プレート

SE精製べん毛抗原を炭酸緩衝液で希釈し、96穴プレートの各穴に100 μ Lずつ加え、37°Cで1時間反応させた後、希釈・洗浄液で洗浄し、次に、各穴に1w/v%スキムミルク加希釈・洗浄液を200 μ Lずつ加え、37°Cで1時間反応させた後、希釈・洗浄液で洗浄したもの

付記12 組換えSTべん毛抗原

ST T-023 株の fliC 遺伝子の一部を挿入したプラスミドで形質転換した大腸菌を超音波で破碎し、べん毛抗原をアフィニティークロマトグラフィーにより精製した後、リン酸緩衝食塩液で透析したもので、-80 ℃以下で保存する。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析したとき、35 ~ 40KDa の位置にバンドを認める。1.2.3.2 の試験により ELISA を行うとき、ST 参照陽性血清の吸光度値が 0.8 ~ 1.2、参照陰性血清の吸光度値が 0.1 以下を示し、使用時の蛋白質量が 0.01 ~ 0.06 μg/穴になるように炭酸緩衝液で調整する。

付記 13 ST 参照陽性血清

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏を ST T-023 株で免疫して得た血清で、1.2.1.2 及び 1.2.2.2 の試験により ELISA を行うとき、いずれも吸光度値が 0.25 以下を示し、1.2.3.2 の試験により ELISA を行うとき、吸光度値が 0.8 ~ 1.2 を示す。凍結して -20 ℃以下で保存する。

付記 14 組換え ST べん毛抗原吸着プレート

組換え ST べん毛抗原を炭酸緩衝液で希釈し、96 穴プレートの各穴に 100 μL ずつ加え、37 ℃で 1 時間反応させた後、希釈・洗浄液で洗浄し、次に、各穴に 1 w/v%スキムミルク加希釈・洗浄液を 200 μL ずつ加え、37 ℃で 1 時間反応させた後、希釈・洗浄液で洗浄したもの

付記 15 リン酸緩衝食塩液

1,000mL 中	
塩化ナトリウム	8.0 g
塩化カリウム	0.2 g
リン酸水素二ナトリウム	1.15 g
リン酸二水素カリウム	0.2 g
水	残 量

リン酸二水素カリウムで pH を 6.8 ~ 7.4 に調整する。

付記 16 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。

付記 17 1 w/v%スキムミルク加希釈・洗浄液

希釈・洗浄液にスキムミルクを 1 w/v%となるように加え、溶解したもの

付記 18 リン酸クエン酸緩衝液

1,000mL 中	
クエン酸一水和物	10.3 g
リン酸水素二ナトリウム	14.5 g

水

残量

pH を 5.0 に調整する。