

豚ボルデテラ感染症精製（アフィニティークロマトグラフ ィー部分精製）・豚パストレラ症混合（油性アジュバント 加）不活化ワクチン（シード）

平成 24 年 7 月 4 日（告示第 1622 号） 新規追加
平成 28 年 4 月 18 日（告示第 1020 号） 一部改正

1 定義

シードロット規格に適合したボルデテラ・ブロンキセプチカの培養ろ液を牛赤血球膜結合セルロースカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーで部分精製し、得られたシアル酸結合型赤血球凝集素を凍結乾燥したワクチン（以下この項において「乾燥ワクチン」という。）と、同規格に適合したパストレラ・ムルトシダの培養菌体を破碎し、遠心上清を不活化して油性アジュバントを添加したワクチン（以下この項において「液状不活化ワクチン」という。）を組み合わせたワクチンである。

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

2.1.1.1 名称

ボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌 A19・KS 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（付記 1）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 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、ボルデー・ジャング培地又は適当と認められた平板培地で増殖させ、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、凍結して -70 °C 以下又は凍結乾燥して 5 °C 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、ボルデー・ジャング培地又は適当と認められた培地で増殖させる。

ワーキング シード菌は、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。

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、ボルデー・ジャング培地又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、凍結して -70 °C 以下又は凍結乾燥して 5 °C 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 パスツレラ・ムルトシダ

2.1.2.1 名称

パスツレラ・ムルトシダD型 202·KS 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

培地上に半透明のスムースな集落を形成し、溶血性を示さない。莢膜を保有する。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、ペプシン消化羊血液加デキストロース・スターチ寒天培地（付記2）又は適當と認められた平板培地で継代する。

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、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して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、ペプシン消化羊血液加デキストロース・スターチ寒天培地又は適當と認められた平板培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

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 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、ペプシン消化羊血液加デキストロース・スターチ寒天培地又は適當と認められた平板培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して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 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

2.2.1.1 培地

製造に適當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

製造に適當と認められた培地を用いる。

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

平板培地で培養したプロダクションシード菌を液状培地に接種した後、更に液状培地で増菌培養したものを作成する。

培養菌液について、3.2.1 の試験を行う。

2.3.1.2 原液

培養菌液を遠心分離し、得られた上清液をろ過後、牛赤血球膜結合セルロースカラム（付記3）

を用いたアフィニティークロマトグラフィーで部分精製し、得られたシアル酸結合型赤血球凝集素を脱塩・濃縮した後、ろ過滅菌したものを原液とする。

原液について、3.3.1 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

平板培地で培養したプロダクションシード菌を液状培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2.2 の試験を行う。

2.3.2.2 原液

培養菌液を遠心分離し、得られた菌体をリン酸緩衝食塩液（以下この項において「PBS」という。）に浮遊して凍結融解する。物理的処理により菌体を破碎後遠心分離し、得られた遠心上清をろ過し、たん白量を測定する。ホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加えて不活化した後、PBS で濃度調整したものを原液とする。

原液について、3.3.2 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当と認められた安定剤を加えて混合し、最終バルクとする。

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当と認められた油性アジュバントを加えたものを最終バルクとする。

2.5 小分製品

2.5.1 乾燥ワクチン

ボルデテラ・ブロンキセプチカの最終バルクを小分容器に分注し、凍結乾燥し、小分製品とする。

小分製品について、3.4 の試験を行う。

2.5.2 液状不活化ワクチン

パスツレラ・ムルトシダの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 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 夾雜菌否定試験

3.1.1.2.1 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。

3.1.1.2.2 パスツレラ・ムルトシダ

一般試験法の無菌試験法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。

3.1.2 ワーキングシード菌の試験

3.1.2.1 夾雜菌否定試験

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 夾雜菌否定試験

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 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

3.2.1.1 夾雜菌否定試験

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。

3.2.1.2 赤血球凝集（以下この項において「HA」という。）価測定試験

3.2.1.2.1 試験材料

検体を遠心し、得られた上清を試料とする。

3.2.1.2.2 試験方法

96 穴U底又はV底プレートを用い、試料 $25 \mu L$ を PBS で 2 倍階段希釀する。各段階の希釀液に 0.5vol % グルタールアルデヒド固定牛赤血球浮遊液（付記4） $25 \mu L$ ずつを加え、37 °Cで 2 時間反応させ、更に 2 ~ 5 °Cで 1 夜静置した後、赤血球の凝集の有無を観察する。

3.2.1.2.3 判定

赤血球の凝集を認めた試料の最高希釀倍数を HA 価とする。

検体の遠心上清の HA 価は、8 倍以上でなければならない。

3.2.2 パスツレラ・ムルトシダ

3.2.2.1 夾雜菌否定試験

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。

3.3 原液の試験

3.3.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ原液

3.3.1.1 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。

3.3.1.2 生菌否定試験

3.3.1.2.1 試験材料

3.3.1.2.1.1 試料

検体を接種材料とする。

3.3.1.2.1.2 培地

ボルデー・ジャング培地又は適當と認められた培地を用いる。

3.3.1.2.2 試験方法

検体 $0.1mL$ ずつを平板培地 2 枚以上にそれぞれ塗抹接種し、37 °Cで 48 時間培養する。

3.3.1.2.3 判定

菌の発育を認めてはならない。

3.3.1.3 HA 価測定試験

3.3.1.3.1 試験材料

検体を用いる。

3.3.1.3.2 試験方法

3.2.1.2 を準用して試験を行う。

3.3.1.3.3 判定

検体の HA 価は、5 頭分及び 10 頭分の小分製品の原液では 128 倍以上、20 頭分の小分製品の原液では 256 倍以上でなければならない。

3.3.1.4 無毒化試験

3.3.1.4.1 試験材料

3.3.1.4.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.3.1.4.1.2 試験動物

体重約350gのモルモットを用いる。

3.3.1.4.2 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、7日間観察する。

3.3.1.4.3 判定

注射反応は、無視し得る程度以下でなければならず、試験動物は、全て生存しなければならない。

3.3.2 パスツレラ・ムルトシダ原液

3.3.2.1 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。

3.3.2.2 生菌否定試験

3.3.2.2.1 試験材料

3.3.2.2.1.1 試料

検体を接種材料とする。

3.3.2.2.1.2 培地

ペプシン消化羊血液添加デキストロース・スターチ培地又は適当と認められた培地を用いる。

3.3.2.2.2 試験方法

検体0.1mLずつを平板培地2枚以上にそれぞれ塗沫接種し、37℃で18時間培養する。

3.3.2.2.3 判定

菌の発育を認めてはならない。

3.3.2.3 無毒化試験

3.3.1.4を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.2.4 たん白量測定試験

3.3.2.4.1 試験材料

不活化前の遠心上清ろ過液を試料とする。

3.3.2.4.2 試験方法

Brandford色素結合法又は適当と認められた方法により、たん白量を測定する。

3.3.2.4.3 判定

試料1mL中のたん白量は、1.0mg以上でなければならない。

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、乾燥ワクチンは、固有の色調を有する乾燥物でなければならない。異物及び異臭を認めてはならない。液状不活化ワクチンは、固有の色調を有する懸濁液でなければならない。異物及び異臭を認めてはならない。乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンで溶解したものは、固有の色調を有する懸濁液でなければならない。異物及び異臭を認めてはならない。

また、小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.4.2 真空度試験

一般試験法の真空度試験法を準用して試験するとき、乾燥ワクチンは、これに適合しなければならない。

3.4.3 含湿度試験

一般試験法の含湿度試験法を準用して試験するとき、乾燥ワクチンは、これに適合しなければならない。

3.4.4 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、液状不活化ワクチンのpHは、固有の値を示さなければならない。

3.4.5 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、乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンで溶解したものは、これに適合しなければならない。

3.4.6 ホルマリン定量試験

適当と認められた方法で液状不活化ワクチン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、0.25vol %以下でなければならない。

3.4.7 チメロサール定量試験

一般試験法のチメロサール定量法を準用して試験するとき、液状不活化ワクチンは、これに適合しなければならない。

3.4.8 無毒化試験

3.4.8.1 試験材料

3.4.8.1.1 注射材料

乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンで溶解した試験品を注射材料とする。

3.4.8.1.2 試験動物

体重約350gのモルモットを用いる。

3.4.8.2 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、7日間観察する。

3.4.8.3 判定

注射反応は、無視し得る程度以下でなければならず、試験動物は、全て生存しなければならない。

3.4.9 安全試験

3.4.9.1 試験材料

3.4.9.1.1 注射材料

乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンで溶解した試験品を注射材料とする。

3.4.9.1.2 試験動物

体重10～30kgの豚を用いる。

3.4.9.2 試験方法

試験動物の2頭を試験群、1頭を対照群とする。

試験群の2頭に注射材料1mLをそれぞれ筋肉内に2週間隔で2回注射し、対照群と共に、第2回目注射後2週間まで観察する。

3.4.9.3 判定

観察期間中、試験動物に臨床的な異常を認めてはならない。注射により一過性の発熱を認めても3日以内に回復しなければならず、注射反応は、無視し得る程度以下でなければならない。

3.4.10 力価試験

3.4.10.1 豚ボルデテラ感染症力価試験

3.4.10.1.1 試験材料

3.4.10.1.1.1 試験動物

3.4.9の試験に用いた動物を用いる。

3.4.10.1.1.2 赤血球凝集抗原

ボルデテラ・ブロンキセプチカHA抗原（付記5）を用いる。

3.4.10.1.2 試験方法

3.4.9の試験終了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、マイクロタイマー法で赤血球凝集抑制（以下この項において「HI」という。）試験を行う。

血清1容に25w/v%カオリン加PBS2容及びPBS1容を加え、30分間処理した後、遠心上清を採取する（4倍希釈血清）。96穴V底プレートを用いて、4倍希釈血清25μLをPBSで2倍階段希釈する。各希釈血清に8単位の赤血球凝集抗原を25μLずつ加えて、4℃で1夜静置する。これに0.5vol%グルタールアルデヒド固定牛赤血球浮遊液（付記4）を50μLずつ加え、37℃で2

時間反応させ、更に4°Cで1夜静置した後、赤血球の凝集の有無を観察する。

3.4.10.1.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数をHI抗体価とする。

試験群のHI抗体価は、全て8倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全てHI抗体価4倍以下でなければならない。

3.4.10.2 豚パストレラ症力価試験

3.4.10.2.1 試験材料

3.4.10.2.1.1 注射材料

乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンで溶解した試験品を注射材料とする。

3.4.10.2.1.2 試験動物

約5週齢のマウスを用いる。

3.4.10.2.1.3 攻撃用菌液

パストレラ・ムルトシダ202・KS株又はこれと同等の毒力を有する株をペプシン消化羊血液加デキストロース・スターチ寒天培地に接種し、37°Cで18時間培養した後、10w/v%スキムミルクに集菌し、小分けして、-70°C以下に保存する。攻撃時に融解し、 $10^{7.6} \sim 10^{8.0}$ CFU/mLとなるように濃度を調整したものを攻撃用菌株とする。

3.4.10.2.2 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0.1mLずつを2週間隔で2回、試験群の腹腔内に注射する。2回目注射後2週目に攻撃用菌液0.1mLずつを試験群及び対照群の腹腔内に注射して攻撃した後、7日間観察する。

3.4.10.2.3 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、70%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、製造後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

1,000mL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

加温溶解した後、121°Cで15分間高圧滅菌する。

約50°Cに冷却した後、牛脱線維血液を5vol%となるように添加する。

付記2 ペプシン消化羊血液加デキストロース・スターチ寒天培地

1,000mL

プロテオース・ペプトン No.3	15 g
デキストロース	2 g
可溶性デンプン	10 g
塩化ナトリウム	3 g
リン酸水素二ナトリウム	3 g
ゼラチン	20 g
寒天	10 g
水	残量

加温溶解した後、121 ℃で 15 分間高压滅菌する。

約 50 ℃に冷却した後、ペプシン消化羊血液を 5 vol %となるように添加する。

付記3 牛赤血球膜結合セルロースカラム

牛赤血球を酢酸処理した後、超音波破碎して得られた破碎血球膜を臭化シアン-セルロースゲルに吸着させて調製し、カラムに充填したもの。

付記4 0.5 %グルタールアルデヒド固定牛赤血球

牛赤血球をグルタールアルデヒドで固定した後、10vol %赤血球液となるように濃度を調整したもので、使用時に、0.01w/v %ゼラチン加 PBS で 0.5vol %赤血球液となるように希釀する。

付記5 ボルデテラ・ブロンキセプチカ HA 抗原

牛赤血球に対して強い凝集活性を有するボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌の培養ろ液を、牛赤血球膜結合セルロースカラムを用いたアフィニティーコロマト法により精製し、得られた牛赤血球凝集素の赤血球凝集価が約 32 単位になるように濃度を調整したもの。