豚丹毒（油性アジュバント加）不活化ワクチン

平成 21 年 3 月 26 日（告示第 420 号）　新規追加

1 定義

豚丹毒菌の培養菌体をアルカリ処理して抽出した抗原を不活化後、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

豚丹毒菌 Kyoto 株（血清型２型）又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

感受性豚に接種すると、豚丹毒を惹起する。

2.1.3 継代及び保存

原株及び種菌は、平板培地（付記１）及び液状培地（付記２）又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２代以内でなければならない。

原株及び種菌は、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

平板培地及び液状培地又は製造に適当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 培養

平板培地で培養した種菌を液状培地に接種して培養し、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 の試験を行う。

2.3.2 抗原抽出

培養菌液を遠心して得た菌を 0.01mol/L 水酸化ナトリウム溶液に再浮遊し、２～５℃で 1 夜攪拌後、遠心して採取した上清を抽出抗原液とする。

抽出抗原液について、3.2 の試験を行う。

2.3.3 原液

抽出抗原液にホルマリンを加えて不活化したものを原液とする。

原液について、3.3 の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液を適当と認められた希釈用液で濃度を調整し、これに適当と認められた油性アジュバントを添加したものを最終バルクとする。

この場合、適当と認められた保存剤を添加してもよい。

2.5 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

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。

3.1.2 生菌数試験

3.1.2.1 試験材料

3.1.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液を用いて10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.1.2.1.2 培地

試験用寒天培地（付記３）又は適当と認められた培地を用いる。

3.1.2.2 試験方法

試料 1.0mL あるいは 0.5mL ずつをそれぞれ２枚のシャーレに分注し、平板混釈培養法により 37℃で48時間培養後、生じた豚丹毒菌の集落数を数える。

3.1.2.3 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 5.0×10^8 個以上でなければならない。

3.2 抽出抗原液の試験

3.2.1 酵素抗体反応（以下「ELISA」という。）抗原価測定試験

3.2.1.1 試験材料

3.2.1.1.1 試料

検体を 220nm のメンブランフィルターで濾過滅菌したもの及び ELISA 抗原価測定用参照抗原（付記４）を、それぞれ炭酸緩衝液（付記５）で 10 倍希釈した後に２倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.1.1.2 測定用抗体

ELISA 抗原価測定用単クローン抗体（付記６）を用いる。

3.2.1.2 試験方法

試料 100 μ L ずつを ELISA 用プレート（U 底）の穴に入れ、２～５℃で一夜吸着させる。プレートを希釈・洗浄液（付記７）で洗浄し、２ w/v %牛血清アルブミン溶液（付記８）を各穴に 250 μ L ずつ加え、37 ℃ １時間感作する。プレートを洗浄後、ELISA 抗原価測定用単クローン抗体を各穴に 100 μ L ずつ加え、37 ℃ １時間感作する。プレートを洗浄後、標識抗体１（付記９）を各穴に 100 μ L ずつ加え、37 ℃ １時間感作する。プレートを洗浄後、基質液（付記 10）を各穴に 100 μ L ずつ加え、遮光して 30 ℃ 30 分間反応させる。停止液（付記 11）を各穴に 50 μ L ずつ加え、反応を停止させる。主波長 490nm と副波長 630nm の２波長で吸光度を測定し、これらの差を ELISA 値とする。

3.2.1.3 判定

ELISA 値が 0.4 以上を示す抗原の最高希釈倍数を ELISA 抗原価とする。

検体の ELISA 抗原価は、80 単位/mL 以上でなければならない。この場合、ELISA 抗原価測定用参照抗原の ELISA 抗原価は、80 ～ 160 単位/mL を示さなければならない。

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。

3.3.2 不活化試験

3.3.2.1 試験材料

3.3.2.1.1 接種材料

検体を接種材料とする。

3.3.2.2 試験方法

接種材料 0.1mL ずつを５枚の試験用寒天培地に塗沫し、37 ℃で 48 時間培養する。

3.3.2.3 判定

豚丹毒菌の発育を認めてはならない。

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、固有の色調を有する均質な液体でなければならず、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 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。

3.4.3 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、0.15 vol ％以下でなければならない。

3.4.4 安全試験

3.4.4.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.4.2 試験動物

約 30 日齢の豚を用いる。

3.4.4.3 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１頭には注射材料１ mL を、他の１頭には注射材料３ mL を頚部筋肉内に注射し、対照群とともに２週間観察する。

3.4.4.4 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。ただし、試験群に注射後一過性の発熱、元気・食欲の消失を認めても、３日以内に正常に回復しなければならない。

3.4.5 力価試験

3.4.5.1 試験材料

3.4.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.5.1.2 試験動物

体重約 350 g のモルモットを用いる。

3.4.5.1.3 ELISA 用抗原

豚丹毒抗体価測定用抗原（付記 12）を用いる。

3.4.5.2 試験方法

試験動物の８匹を試験群、２匹を対照群とする。

注射材料 0.2 mL ずつを３週間隔で２回、試験群の大腿部筋肉内に注射する。第２回注射後２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、参照陽性血清（付記 13）及び参照陰性血清（付記 14）を希釈・洗浄液で 100 倍より２倍階段希釈したものを、抗原吸着プレート（付記 15）の各穴に 100 μ L ずつ加え、37 ℃ 1 時間感作する。希釈・洗浄液で洗浄後、標識抗体２（付記 16）を各穴に 100 μ L ずつ加え、37 ℃ 1 時間感作する。洗浄後、基質液を各穴に 100 μ L ずつ加え、遮光して 30 ℃ 30 分間反応させる。停止液を各穴に 50 μ L ずつ加え、反応を停止させる。主波長 490nm と副波長 630nm の２波長で吸光度を測定し、これらの差を ELISA 値とする。

3.4.5.3 判定

ELISA 値が 0.5 以上を示す血清の最高希釈倍数を ELISA 抗体価とする。

試験群では、ELISA 抗体価の幾何平均値が 300 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、すべて 100 倍未満でなければならない。また、参照陽性血清は 400 ～ 800 倍、参照陰性血清

は 100 倍未満でなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、１年６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。

5 その他

5.1 添付文書記載事項

と畜場出荷前の所定の期間は使用しない旨

付記１　平板培地

1,000 mL 中

ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト寒天培地	40	g
ポリソルベート 80	1	mL
水	残	量

加温溶解後、121 ℃で 20 分間高圧滅菌する。約 50 ℃に冷却後、ろ過滅菌した馬血清 20mL を加える。

付記２　液状培地

1,000 mL 中

ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト液体培地	30	g
ポリソルベート 80	1	mL
水	残	量

121 ℃で 20 分間高圧滅菌する。冷却後、ろ過滅菌した馬血清 20mL を加える。

付記３　試験用寒天培地

1,000 mL 中

ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト寒天培地	40	g
ポリソルベート 80	1	mL
水	残	量

加温溶解後、121 ℃で 20 分間高圧滅菌する。

付記４　ELISA 抗原価測定用参照抗原

豚丹毒菌 Kyoto 株の菌体から作製した水酸化ナトリウム抽出抗原で、感染防御抗原である 67kDa 蛋白に対する単クローン抗体を用いてイムノブロッティングを行った場合、単一の反応バンドを認めるものであり、3.2.1 の試験により抗原価を測定するとき、ELISA 抗原価は 80 ～ 160 単位 /mL を示す。

付記５　炭酸緩衝液

1,000 mL 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。４℃で保存し、１週間以内に使用する。

付記６　ELISA 抗原価測定用単クローン抗体

豚丹毒菌 Kyoto 株水酸化ナトリウム抽出抗原中の感染防御抗原である 67kDa 蛋白に対する

精製単クローン抗体（サブクラス：IgG1）で、マウス受身感染防御能を有する。抗体産生ハイブリドーマを BALB/c 系マウスに腹腔内投与し、得られた腹水をプロテイン A カラムクロマトグラフ法で精製したもの。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた場合、非還元下で約 160kDa に 1 本、還元下で約 50kDa と 30kDa に各々 1 本ずつバンドが認められる。

付記 7　希釈・洗浄液

1,000 mL 中

リン酸水素二ナトリウム十二水和物	1.725	g
リン酸二水素カリウム	0.2	g
塩化ナトリウム	8.0	g
塩化カリウム	0.2	g
ポリソルベート 20	0.5	mL
水	残	量

pH を 7.2 ～ 7.4 に調整する。

付記 8　2 w/v %牛血清アルブミン溶液

牛血清アルブミン 2.0 g を希釈・洗浄液 100 mL で使用直前に溶解したもの

付記 9　標識抗体 1

西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体を希釈・洗浄液で至適濃度に希釈したもの

付記 10　基質液

オルトフェニレンジアミン二塩酸塩 40 mg をリン酸クエン酸緩衝液（付記 17）100 mL に溶解したものであり、遮光する。使用直前に過酸化水素水(30)を 40 μ L 添加する。

付記 11　停止液

濃硫酸 56.1mL を正確に量り、水 440mL 中に撹拌冷却しながら溶解し、更に水を加えて 500 mL としたもの

付記 12　豚丹毒抗体価測定用抗原

豚丹毒菌 Kyoto 株の菌体から作製した水酸化ナトリウム抽出抗原で、感染防御抗原である 67kDa 蛋白に対する単クローン抗体を用いてイムノブロッティングを行った場合、単一の反応バンドを認めるものであり、3.2.1 の試験により抗原価を測定するとき、ELISA 抗原価は 160 ～ 320 単位 /mL を示す。

付記 13　参照陽性血清

豚丹毒菌 Kyoto 株の菌体から作製した水酸化ナトリウム抽出抗原をモルモットに免疫して得られた血清で、ELISA 抗体価 400 ～ 800 倍を示すもの

付記 14　参照陰性血清

豚丹毒菌 Kyoto 株の菌体から作製した水酸化ナトリウム抽出抗原に対する抗体陰性のモルモット血清で、ELISA 抗体価 100 倍未満を示すもの

付記 15　抗原吸着プレート

豚丹毒抗体価測定用抗原を炭酸緩衝液で 100 倍に希釈し、ELISA 用プレート（U 字型）の各穴に 100 μL ずつ加え、２～５℃で一夜吸着させる。その後、希釈・洗浄液で洗浄し、２ w/v ％牛血清アルブミン溶液を各穴に 250 μL ずつ加え、37 ℃１時間感作し、更に希釈・洗浄液で洗浄したもの

付記 16　標識抗体２

西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗モルモット IgG 抗体を希釈・洗浄液で至適濃度に希釈したもの

付記 17　リン酸クエン酸緩衝液

1,000mL 中

無水クエン酸	4.67　g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	19.95　g
水	残　量

pH を 5.0 に調整する。