豚ボルデテラ感染症精製（油性アジュバント加）不活化ワクチン

平成 21 年 11 月 12 日（告示第 1569 号）　一部改正

1 定義

豚ボルデテラ・ブロンキセプチカの培養上清を濃縮し、部分精製後、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

ボルデテラ・ブロンキセプチカⅠ相菌 GCK-1 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 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。

2.1.3 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２代以内、種菌では３代以内でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その継代数以内とする。

原株及び種菌は、凍結してー 70 ℃以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 培地

製造に適当と認められた平板培地及び液状培地を用いる。

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、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 の試験を行う。

2.3.2 原液（部分精製）

培養菌液を遠心分離して得られた上清液を濃縮し、濃縮抗原液とする。濃縮抗原液からショ糖密度勾配により抗原画分を取り出し、ゲルろ過して抗原成分を採取し、原液とする。

原液について、3.2 の試験を行う。

2.3.3 最終バルク

原液を混合し、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保存剤を加え、適量の油性アジュバントを添加したものを最終バルクとする。

2.3.4 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、3.3 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、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。

3.1.2 総菌数試験

3.1.2.1 試験材料

3.1.2.1.1 試料

検体を生理食塩液で 10 倍希釈したものを試料とする。

3.1.2.2 試験方法

試料、1.5w/v ％クエン酸ナトリウム及び予め血球数を計測してあるマウス等の血液を適量混合後、この混合液の塗抹標本を作成し、固定後ギムザ染色したものを鏡検する。数視野にわたって、少なくとも 500 個の赤血球を計測した際の菌数を測定し、赤血球数と菌数との比率を算出する。混合液１ mL 中の赤血球数、赤血球数と菌数との比率及び検体の希釈倍率から総菌数を算出する。

3.1.2.3 判定

検体の総菌数は、１ mL 中２× 10^{10} 個以上でなければならない。

3.1.3 赤血球凝集（以下「HA」という。）活性測定試験

3.1.3.1 試験材料

3.1.3.1.1 試料

検体 10mL を遠心分離して得た菌体を、10mL の生理食塩液に再浮遊させたものを試料とする。

3.1.3.1.2 ２ vol ％牛赤血球浮遊液

健康な成牛からヘパリンで凝固阻止して採取した赤血球で、ボルデテラ・ブロンキセプチカⅠ相菌に強く凝集する性状を示す赤血球を、適当と認められた希釈用液に２ vol ％の割合で浮遊させたものを用いる。

3.1.3.2 試験方法

試料の 25 μ L と２ vol ％牛赤血球浮遊液 25 μ L をスライドグラス上で混合し、HA 反応を行う。

3.1.3.3 判定

牛赤血球を速やかに凝集しなければならない。

3.2 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。

3.2.2 生菌否定試験

3.2.2.1 試験材料

検体及びボルデー・ジャング培地又は適当と認められた平板培地を用いる。

3.2.2.2 試験方法

検体 0.1mL ずつを培地２枚以上にそれぞれ塗抹接種し、37 ℃で 48 時間培養する。

3.2.2.3 判定

ボルデテラ・ブロンキセプチカの発育を認めてはならない。

3.2.3 HA 価測定試験

3.2.3.1 試験材料

3.2.3.1.1 試料

検体を生理食塩液で２倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.3.2 試験方法

試料 0.5mL に２ vol ％牛赤血球浮遊液 50 μ L を加えて振盪混合し、５時間静置した後、判定する。

3.2.3.3 判定

赤血球の凝集を認めた試料の最高希釈倍数を HA 価とする。

検体の HA 価は、1,024 倍以上でなければならない。

3.2.4 皮膚壊死毒素活性否定試験
3.2.4.1 試験材料
3.2.4.1.1 注射材料
検体を HA 価が 1,024 倍となるように調製したものを注射材料とする。
3.2.4.1.2 試験動物
体重約 350g のモルモットを用いる。
3.2.4.2 試験方法
注射材料 0.1mL ずつを試験動物３匹の背部皮内に４点注射し、２日間観察する。
3.2.4.3 判定
すべての試験動物の注射部位に壊死病変を認めてはならない。
3.2.5 蛋白量測定試験
3.2.5.1 試験材料
3.2.5.1.1 試料
検体を HA 価が 1,024 倍となるように調整したものを試料とする。
3.2.5.2 試験方法
試料を適当と認められた希釈用液で希釈したもの 0.1mL の吸光度を Lowry 法又は適当と認められた方法により測定する。
3.2.5.3 判定
牛血清アルブミンを用いて作成した検量線より、試料の蛋白量を算出する。
試料の蛋白量は、１ mL 中 250 ～ 650 μ g の範囲でなければならない。
3.2.6 異種蛋白混入否定試験
3.2.6.1 試験材料
3.2.6.1.1 試料
検体を HA 価が 512 倍となるように適当と認められた希釈用液で調製したものを試料とする。
3.2.6.2 試験方法
試料及び 1.2w/v ％寒天と抗牛全血清（ゲル内沈降反応で抗体価 32 倍以上）を用い、適当と認められた方法によりゲル内沈降反応を行う。
3.2.6.3 判定
試料と抗牛全血清との間に沈降線の形成を認めてはならない。
3.3 小分製品の試験
3.3.1 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。
3.3.2 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。
3.3.3 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、0.06vol ％以下でなければならない。
3.3.4 毒性限度確認試験
一般試験法の毒性限度確認試験法 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、試験品の注射量は 0.3mL とし、体重測定は 7 日目に行うものとする。
3.3.5 力価試験
3.3.5.1 試験材料
3.3.5.1.1 注射材料
試験品を注射材料とする。

3.3.5.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

3.3.5.1.3 HA 抗原

ボルデテラ・ブロンキセプチカ HA 抗原（付記２）を用いる。

3.3.5.2 試験方法

試験動物の 10 匹を試験群、３匹を対照群とする。

注射材料 0.1mL を４週間隔で２回、試験群の大腿部筋肉内に注射する。第２回目注射後２週目に試験群及び対照群から得られた各個体の血清を用いて、赤血球凝集抑制（以下「HI」という。）試験を行う。

血清１容に RDE ３容を加え、37 ℃で 18 時間感作した後、56 ℃で 30 分間加温して血清を非働化する。V 字型マイクロプレートを用いて血清 25 μ L をリン酸緩衝食塩液（以下「PBS」という。）で２倍階段希釈する。各希釈血清に４単位の HA 抗原 25 μ L を加えて振盪混合後、20 分間静置する。更に、0.4vol ％牛赤血球浮遊液を 50 μ L ずつ加えて振盪混合後、５時間静置して赤血球凝集の有無を観察する。

3.3.5.3 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。

試験群では、80 ％以上が HI 抗体価 32 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、すべて８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 添付文書等記載事項

と畜場出荷前の所定の期間は使用しない旨

付記１　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

加温溶解後、121 ℃で 15 分間高圧滅菌する。

約 50 ℃に冷却後、牛胎子血清を 10vol ％となるように添加する。

付記２　ボルデテラ・ブロンキセプチカ HA 抗原

牛赤血球に対する凝集活性を有するボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌を、ボルデー・ジャング培地に接種して 37 ℃で 20 時間培養し、発育した菌を PBS で３回遠心洗浄した後、50vol ％グリセリン加 PBS に浮遊させ、HA 試験を行い、HA 価が 80 ～ 320 倍になるように調製したもの