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）不活化ワクチン（油性アジュバント加溶解用液）

平成 21 年 3 月 26 日（告示第 420 号）　新規追加

1 定義

豚ボルデテラ・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もので、使用時に油性アジュバントを含む溶解用液で溶解するワクチンである。

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 A19・KS 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）で継代する。

継代は、原株では３代以内、種菌では５代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結してー 70 ℃以下、又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 培地

ボルデー・ジャング培地及び製造に適当と認められた液状培地を用いる。

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、更に液状培地で増菌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

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２）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・濃縮後、ろ過滅菌したものを原液とする。

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。

2.3.4 小分製品

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、3.3 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 赤血球凝集（以下「HA」という。）価測定試験

3.1.2.1 試験材料

検体を遠心し、得られた上清を試料とする。

3.1.2.2 試験方法

96 穴 U 底プレートを用い、試料 25 μ L をリン酸緩衝食塩液で２倍階段希釈する。各段階の希釈液に 0.5vol ％グルタールアルデヒド固定牛赤血球（付記３）25 μ L ずつを加え、37 ℃で２時間反応させ、更に４℃で一夜静置した後、赤血球の凝集の有無を観察する。

3.1.2.3 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。

検体の遠心上清の HA 価は、８倍以上でなければならない。

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・ジャング培地を用いる。

3.2.2.2 試験方法

検体 0.05mL ずつを平板培地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

菌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

検体を用いる。

3.2.3.2 試験方法

3.1.2.2 を準用して試験を行う。

3.2.3.3 判定

検体の HA 価は、256 倍以上でなければならない。

3.2.4 無毒化試験

3.2.4.1 試験材料

3.2.4.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

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２匹の背部皮内に注射し、10 日間観察する。

3.2.4.3 判定

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

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乾燥物でなければならない。溶解したものは、固有の色調を有する均質な懸濁液でなければならず、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 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、適合しなければならない。

3.3.3 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、適合しなければならない。

3.3.4 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。

3.3.5 HA 価測定試験

3.3.5.1 試験材料

3.3.5.1.1 試料

乾燥ワクチンを溶解用液と等量のリン酸緩衝食塩液で溶解したものを試料とする。

3.3.5.2 試験方法

3.1.2.2 を準用して試験を行う。

3.3.5.3 判定

試験品の HA 価は、64 倍以上でなければならない。

3.3.6 安全試験

3.3.6.1 試験材料

3.3.6.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.3.6.1.2 試験動物

体重約 10 ～ 30kg の豚を用いる。

3.3.6.2 試験方法

試験動物の２頭を試験群、１頭を対照群とする。

注射材料１ mL ずつを２週間隔で２回、試験群の筋肉内に注射し、対照群とともに第１回目注射後４週間観察する。

3.3.6.3 判定

観察期間中、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、試験群の注射反応は、無視しうる程度以下でなければならない。

3.3.7 力価試験

3.3.7.1 試験材料

3.3.7.1.1 試験動物

3.3.6 の試験に用いた動物を用いる。

3.3.7.1.2 赤血球凝集抗原

赤血球凝集抗原（付記４）を用いる。

3.3.7.2 試験方法

3.3.6 の試験最終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、96 穴 V 底プレートを用いたマイクロタイター法での赤血球凝集抑制（以下「HI」という。）試験を行う。

血清１容に 25w/v ％カオリン－リン酸緩衝食塩液２容及びリン酸緩衝食塩液１容を加え、30 分間処理した後、遠心上清を採取し、４倍希釈血清とする。４倍希釈血清をリン酸緩衝食塩液で２倍階段希釈し、各希釈血清 25 μ L に８単位の赤血球凝集抗原を 25 μ L 加えて、４℃で一夜静置する。これに 0.5vol ％グルタールアデヒド固定牛赤血球浮遊液を 50 μ L ずつ加え、37 ℃で２時間反応させ、更に４℃で一夜静置した後、赤血球の凝集の有無を観察する。

3.3.7.3 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。

試験群は、すべて HI 抗体価８倍以上でなければならない。この場合、対照群では、すべて４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。

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　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、牛血液を 5 vol %となるように添加する。

付記２　牛赤血球膜結合セルロースカラム

牛赤血球を酢酸処理後、超音波破砕して得られた破砕血球膜を、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３　0.5vol %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後、10vol %赤血球液となるように調整したもので、使用時に、0.01w/v %ゼラチン加リン酸緩衝食塩液で 0.5vol %赤血球液となるように希釈する。

付記４　赤血球凝集抗原

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ク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 単位になるように調整したもの