

牛ヒストフィルス・ソムニ（ヘモフィルス・ソムナス）感染症 （アジュバント加）不活化ワクチン

平成19年1月15日 一部改正 告示第36号

1 定義

ヒストフィルス・ソムニの培養菌液を不活化し、アルミニウムゲルアジュバントを加えたワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

ヒストフィルス・ソムニ M-1Br 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

牛の髄腔内に注射すると、発症して死亡する。

2.1.3 継代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた培地で継代する。

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。

原株及び種菌は、液体窒素で凍結保存又は凍結乾燥して5 以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 培地

製造に適当と認められた液体培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 培養

種菌を液体培地で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 不活化

培養菌液にホルマリンを加えて不活化したものを不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.2 の試験を行う。

2.3.3 原液

不活化菌液を遠心し、リン酸緩衝食塩液で再浮遊させ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

原液を混合し、アルミニウムゲルアジュバントを加え、最終バルクとする。

この場合には、適当と認められた保存剤を加えてもよい。

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を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.2 生菌数試験

3.1.2.1 試験材料

検体及び液体培地及びこれと同等の発育の得られる寒天培地を用いる。

3.1.2.2 試験方法

検体を液体培地を用いて、10 倍階段希釈系列にて 10^{-7} まで希釈し、 10^{-6} 希釈液の 0.5 mL と 10^{-7} 希釈液の 1.0 mL とを、それぞれ寒天培地の 20mL を用いて、直径 9 cm のシャーレに混釈して固める。各希釈ごとに 2 枚ずつ作製し、 36°C の炭酸ガスの下で 48 時間培養した後、発育をしたコロニー数を計測する。

3.1.2.3 判定

試料の希釈倍数、接種液量及び発現したコロニー数から検体 1 mL 中の生菌数を計算するとき、 5×10^8 個以上でなければならない。

3.2 不活化菌液の試験

3.2.1 試験材料

検体及び液体培地又はこれと同等の発育の得られる培地

3.2.1.2 試験方法

液体培地を 20 mL ずつ分注した試験管 10 本に、検体を 0.5 mL ずつ接種し、 37°C で 48 時間培養した後、観察する。

3.2.1.3 判定

いずれの試験管も菌の発育による混濁を認めてはならない。

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。

3.4 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懸濁液でなければならない。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 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、pH は、固有の値を示さなければならない。

3.4.3 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。

3.4.4 ホルマリン定量試験

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、0.05vol% 以下でなければならない。

3.4.5 アルミニウム定量試験

一般試験法のアルミニウム定量試験法を準用して試験するとき、アルミニウムの含有量は、1 mL 中 1.3mg 以下でなければならない。

3.4.6 フェノール定量試験

一般試験法のフェノール定量法を準用して試験するとき、フェノールの含有量は、0.1vol% 以下でなければならない。

3.4.7 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、注射量は 0.2mL とし、注射後 4 日目の体重を測定する。

3.4.8 力価試験

3.4.8.1 試験材料

3.4.8.1.1 注射材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で 10 倍に希釈したものを注射材料とする。

3.4.8.1.2 試験動物

体重約 300g のモルモットを用いる。

3.4.8.1.3 酵素抗体反作用抗原

ヒストフィルス・ソムニ酵素抗体反作用抗原（付記 1。以下「OMC 抗原」という。）を用いる。

3.4.8.2 試験方法

試験動物 8 匹を試験群、2 匹を対照群とする。注射材料 0.2mL ずつを 2 週間隔で 2 回、試験群の筋肉内に注射する。2 回目の注射をした後 7 日目に両群から得られた各個体の血清について酵素抗体反応（以下「ELISA」という。）を行う。

試験群と対照群の血清、参照陽性血清（付記 2）及び参照陰性血清（付記 3）をポリソルベート 20 添加リン酸緩衝食塩液（付記 4。以下「ポリソルベート PBS」という。）で 100 倍に希釈したものを抗原吸着プレート（付記 5）の穴に 100 μ L ずつ加え、30 分で 1 時間反応させた後、ポリソルベート PBS でよく洗浄する。各穴にペルオキシダーゼ標識抗モルモット IgG 液（付記 6）を 100 μ L ずつ加え、30 分で 1 時間反応させ、ポリソルベート PBS でよく洗浄する。その後、基質液（付記 6）を各穴に 100 μ L ずつ加え、遮光して 30 分で 30 分間反応させ、1 mol/L 硫酸溶液を各穴に 50 μ L ずつ加えて反応を停止させる。各穴の吸光度を主波長 492nm 及び副波長 630nm で測定する。

3.4.8.3 判定

主波長と副波長の測定値の差の平均値を吸光度値とする。参照陽性血清の吸光度を OD_p、参照陰性血清の吸光度を OD_n、試験群の血清の吸光度を OD_v、対照群の血清の吸光度を OD_c とし、吸光度比を算出するとき、試験群の血清の 70 % 以上が $OD_v / OD_p > 1$ でなければならず、かつ、対照群血清は、2 例とも $OD_c / OD_n = 2$ でなければならない。この場合には、各測定値 OD_p、OD_n、OD_v 及び OD_c の値は、血清非添加対照の値を差し引いたものとし、OD_p 及び OD_n は、それぞれ所定の値を示さなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、1 年間とする。ただし、特に承認されたものは、その期間とする。

付記 1 ヒストフィルス・ソムニ酵素抗体反作用抗原

培養したヒストフィルス・ソムニ M-1Br 株を集菌し、洗浄した後、生理食塩液に浮遊し、さらにこれを低温下で攪拌し、遠心分離した後、上清を採取し、ろ過したもの。参照ヘモフィルス・ソムナス ELISA 抗原（付記 8）に対する本抗原の吸光度比を参照陽性血清を ELISA で測定して算出するとき、 1.0 ± 0.3 でなければならない。

付記 2 参照陽性血清

ヒストフィルス・ソムニの全菌体を抗原として、体重約 400g のモルモットに注射して得られた凝集抗体価 40 倍以上を示す抗血清で、56 30 分間非働化し、OMC 抗原を用いて ELISA で測定するとき、吸光度値は 0.5 以上を示す。小分けして凍結乾燥し、保存する。

付記 3 参照陰性血清

無処置のモルモット血清で、56 30 分間非働化し、OMC 抗原を用いて ELISA で測定するとき、吸光度値は 0.18 以下を示す。小分けして凍結乾燥し、保存する。

付記 4 ポリソルベート 20 添加リン酸緩衝食塩液

1,000mL 中

塩化ナトリウム	8.0 g
塩化カリウム	0.2 g
リン酸二水素カリウム	0.2 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	2.9 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 5 抗原吸着プレート

OMC 抗原を炭酸緩衝液（付記 9）で希釈し、プレートの穴に 0.1mL ずつ加え、30 で 2 時間反応させ、その後、ポリソルベート PBS でよく洗浄し、さらに 0.05w/v% オバアルブミン液（付記 10）を各穴に 0.3mL 加え、4 で 18 時間反応させた後、ポリソルベート PBS でよく洗浄したもの

付記 6 ペルオキシダーゼ標識抗モルモット IgG 液

参照陽性血清の吸光度値を測定すると、吸光度値が 0.5 以上を、参照陰性血清は 0.18 以下を示すように調整して使用する。

付記 7 基質液

オルトフェニレンジアミン 40 mg を、リン酸クエン酸緩衝液（付記 11）100 mL に溶解し、遮光するとともに、使用直前に過酸化水素（30）を 0.04mL 添加する。

付記 8 参照ヒストフィルス・ソムニ ELISA 抗原

培養したヒストフィルス・ソムニ M-1Br 株を集菌し、洗浄した後、生理食塩液に浮遊し、さらにこれを低温下で攪拌し、遠心分離した後、上清を採取し、ろ過したものであり、小分けして 4 で保存する。

本抗原の吸光度値を参照陽性血清を用いて ELISA で測定して算出するとき、0.5 以上でなければならない。

付記 9 炭酸緩衝液

1,000mL 中

無水炭酸ナトリウム	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 10 0.05w/v% オバアルブミン液

オバアルブミン 0.05g をポリソルベート PBS100mL に溶解したもの

付記 11 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。