

豚アクチノバシラス・プルロニューモニエ（1・2・5型、組換え型毒素）感染症（アジュバント加）不活化ワクチン

平成 19 年 5 月 18 日（告示第 692 号） 新規追加

1 定義

アクチノバシラス・プルロニューモニエ（以下「App」という。）1 型菌、2 型菌及び 5 型菌の培養菌液を不活化したものと、組換え大腸菌で産生される無毒変異型 App 毒素（rApx₁、rApx₂ 及び rApx₅）とを混合し、アルミニウムゲル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 App 1 型菌

2.1.1.1 名称

App 41-1 株(血清型 1 型)又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

細胞毒素 Apx₁ 及び Apx₂ を産生する。感受性豚の気管内に接種すると、胸膜肺炎を惹起する。

2.1.1.3 継代及び保存

原株及び種菌は、チョコレート寒天培地(付記 1)又は適当と認められた寒天培地で継代する。

継代は、原株にあつては 3 代以内、種菌にあつては 5 代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して - 60℃ 以下又は凍結乾燥して 5℃ 以下で保存する。

2.1.2 App 2 型菌

2.1.2.1 名称

App SHP-1 株(血清型 2 型)又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

細胞毒素 Apx₂ 及び Apx₃ を産生する。感受性豚の気管内に接種すると、胸膜肺炎を惹起する。

2.1.2.3 継代及び保存

原株及び種菌は、チョコレート寒天培地又は適当と認められた寒天培地で継代する。

継代は、原株にあつては 3 代以内、種菌にあつては 5 代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して - 60℃ 以下又は凍結乾燥して 5℃ 以下で保存する。

2.1.3 App 5 型菌

2.1.3.1 名称

App Ng-2 株(血清型 5 型)又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

細胞毒素 Apx₅ 及び Apx₆ を産生する。感受性豚の気管内に接種すると、胸膜肺炎を惹起する。

2.1.3.3 継代及び保存

原株及び種菌は、チョコレート寒天培地又は適当と認められた寒天培地で継代する。

継代は、原株にあつては 3 代以内、種菌にあつては 5 代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して - 60℃ 以下又は凍結乾燥して 5℃ 以下で保存する。

2.1.4 rApx₁ 産生組換え大腸菌

2.1.4.1 名称

組換え大腸菌 ESN1113 株

2.1.4.2 性状

アンピシリン及びテトラサイクリン耐性を示し、App 41-1 株染色体 DNA 由来 apx₁ A 遺伝子を挿入したプラスミド pSN110 を有する。Isopropylthiogalactoside 添加培地(以下「IPTG 添加培地」と

いう。)により発育させると、rApx たん白を産生することが SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により確認される。

2.1.4.3 継代及び保存

原株及び種菌は、LB-Amp 寒天培地（付記 2）又は適当と認められた寒天培地で継代する。

継代は、原株にあつては 3 代以内、種菌にあつては 5 代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して - 60 以下又は凍結乾燥して 5 以下で保存する。

2.1.5 rApx 産生組換え大腸菌

2.1.5.1 名称

組換え大腸菌 ESN1074 株

2.1.5.2 性状

アンピシリン及びテトラサイクリン耐性を示し、App Ng-2 株染色体 DNA 由来 apx A 遺伝子を挿入したプラスミド pSN63 を有する。IPTG 添加培地により発育させると、rApx たん白を産生することが SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により確認される。

2.1.5.3 継代及び保存

原株及び種菌は、LB-Amp 寒天培地又は適当と認められた寒天培地で継代する。

継代は、原株にあつては 3 代以内、種菌にあつては 5 代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して - 60 以下又は凍結乾燥して 5 以下で保存する。

2.1.6 rApx 産生組換え大腸菌

2.1.6.1 名称

組換え大腸菌 ESN1166 株

2.1.6.2 性状

アンピシリン及びテトラサイクリン耐性を示し、App SHP-1 株染色体 DNA 由来 apx A 遺伝子を挿入したプラスミド pSN148 を有する。IPTG 添加培地により発育させると、rApx たん白を産生することが SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により確認される。

2.1.6.3 継代及び保存

原株及び種菌は、LB-Amp 寒天培地又は適当と認められた寒天培地で継代する。

継代は、原株にあつては 3 代以内、種菌にあつては 5 代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して - 60 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

2.2.1.1 App 1、2 及び 5 型菌

製造に適当と認められた寒天培地及び液状培地を用いる。

2.2.1.2 組換え大腸菌

製造に適当と認められた寒天培地及び液状培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 App 1、2 及び 5 型菌

2.3.1.1 培養

App 各株の種菌をそれぞれ寒天培地に接種し、培養したものを液状培地に接種し、培養する。これを更に液状培地に接種し、培養したものを各株の培養菌液とする。

培養菌液について、3.1.1 の試験を行う。

2.3.1.2 不活化及び集菌

各株の培養菌液をホルマリン又は適当と認められた不活化剤で不活化した後、遠心して得られた菌体を、リン酸緩衝食塩液に均一に浮遊し、チメロサル又は適当と認められた保存剤を添加したものを、各株の不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.2 の試験を行う。

2.3.1.3 濃度調整

各株の不活化菌液を総菌数が規定量となるようにリン酸緩衝食塩液で希釈し、チメロサル又は適当と認められた保存剤を添加したものを、各株の原液とする

原液について、3.5.1 の試験を行う。

2.3.2 rApx 、 及び たん白

2.3.2.1 培養

組換え大腸菌各株の種菌をそれぞれ寒天培地に接種し、培養したものを液状培地に接種し、培養する。これを更に液状培地に接種し、培養したものを、各株の培養菌液とする。

培養菌液について、3.1.2 の試験を行う。

2.3.2.2 発現培養

各株の培養菌液に IPTG 添加濃縮液状培地を加えて培養した菌液を、各株の発現菌液とする。

発現菌液について、3.3 の試験を行う。

2.3.2.3 集菌及び破碎

各株の発現菌液を遠心し、菌体を発現菌液量の約 1/100 量の適当と認められた緩衝液に浮遊し、これにリゾチームを添加し、攪拌する。これに適当と認められた緩衝液を加え、高圧細胞破碎装置により処理を行ったものを、各株の破碎菌液とする。

破碎菌液について、3.4 の試験を行う。

2.3.2.4 rApx たん白の回収と可溶化

各株の破碎菌液を遠心し、各 rApx たん白を発現菌液量の約 1/250 量の滅菌蒸留水に浮遊する。これに適当と認められた可溶化剤を加えて可溶化し、遠心する。得られた上清を、各 rApx たん白の原液とする。

原液について、3.5 の試験を行う。

2.4 最終バルク

2.4.1 App バルク

App 各株の原液をリン酸緩衝食塩液及び水酸化アルミニウムゲルで総菌数が規定濃度になるように希釈して調整する。これにホルマリン及びチメロサル又は適当と認められた保存剤を添加したものを、各株の App バルクとする。

2.4.2 rApx バルク

rApx 、 及び たん白の各原液をそれぞれ蛋白濃度の調整をして混合した後、リン酸緩衝食塩液及び水酸化アルミニウムゲルを加えて感作し、各 rApx たん白を水酸化アルミニウムゲルに吸着させる。遠心により rApx たん白の吸着した水酸化アルミニウムゲルを回収し、元の量と等量のリン酸緩衝食塩液に再浮遊する。これに、ホルマリン及びチメロサル又は適当と認められた保存剤を添加したものを、rApx バルクとする。

2.4.3 最終バルク

rApx バルク及び 3 株の App バルクを混合したものを、最終バルクとする。

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 3.6 の試験を行う。

3 試験法

3.1 培養菌液の試験

3.1.1 App 菌株の夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法 1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.2 組換え大腸菌株の夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法 1 を準用して試験するとき、大腸菌以外の発育を認めてはならない。

3.2 不活化菌液の試験

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 不活化試験

3.2.2.1 試験材料

検体及び製造に相当と認められた培地を用いる。

3.2.2.2 試験方法

検体 0.5mL ずつを 20mL の培地 2 本以上に接種し、37℃ で 2 日間培養する。

3.2.2.3 判定

菌の発育を認めてはならない。

3.2.3 総菌数試験

3.2.3.1 試験材料

検体をリン酸緩衝食塩液で適度に希釈したものを、試料とする。

3.2.3.2 試験方法

試料の吸光度を分光光度計で測定する。

3.2.3.3 判定

標準検量曲線、吸光度の測定値及び検体の希釈倍率から総菌数を算出する。

検体中の総菌数は、1 mL 中 3×10^{10} 個以上でなければならない。

3.3 発現菌液の試験

3.3.1 発現たん白確認試験

3.3.1.1 試験材料

検体 50 μ L に等量のサンプルバッファー（付記 3）を加え、3 分間煮沸したものを試料とする。

3.3.1.2 試験方法

試料の 10 μ L を 10w/v % SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後、クマシー・ブルー染色により泳動像を観察する。

3.3.1.3 判定

ESN1113 株及び ESN1074 株の検体には分子量約 105kDa の位置に、ESN1166 株の検体には分子量約 120kDa の位置に明瞭なバンドを認めなくてはならない。

3.4 組換え大腸菌各株の破碎菌液の試験

3.4.1 破碎確認試験

3.4.1.1 試験材料

検体を用いる。

3.4.1.2 試験方法

検体 0.01mL をスライド・ガラス上に 1 cm² の区画に塗抹し、乾燥させ、火炎固定し、ギムザ染色又はグラム染色する。

3.4.1.3 判定

鏡検により、ほぼすべての菌体の破碎像が観察されなければならない。

3.5 原液の試験

3.5.1 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。

3.5.2 同定試験

3.5.2.1 試験材料

検体を水によりたん白量 300 μ g/mL となるように希釈し、その 50 μ L に等量のサンプルバッファーを加え、3 分間煮沸したものを、試料とする。

3.5.2.2 試験方法

3.3.1.2 を準用して試験する。

3.5.2.3 判定

rApx 及び rApx たん白の試料には分子量約 105kDa の位置に、rApx たん白の試料には約 120kDa の位置に明瞭なバンドを認めなければならない。

3.5.3 たん白定量試験

3.5.3.1 試験材料

検体を 20 ~ 200 μ g/mL となるように 2 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.5.3.2 試験方法

各試料を Lowry 法により測定し、検体 1 mL 中のたん白量を算出する。

3.5.3.3 判定

各検体のたん白量は、1 mL 中 10mg 以上でなければならない。

3.6 小分製品の試験

3.6.1 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。

3.6.2 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。

3.6.3 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。

3.6.4 チメロサル定量試験

一般試験法のチメロサル定量法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.6.5 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、0.25vol % 以下でなければならない。

3.6.6 アルミニウム定量試験

一般試験法のアルミニウム定量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 3.6mg 以下でなければならない。

3.6.7 毒性限度確認試験

一般試験法の毒性限度確認試験 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、注射後の体重測定は 4 日目とする。

3.6.8 力価試験

3.6.8.1 試験材料

3.6.8.1.1 注射材料

試験品をリン酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釈液で 20 倍に希釈したものを注射材料とする。

3.6.8.1.2 試験動物

約 3 週齢のマウスを用いる。

3.6.8.1.3 攻撃用菌液

凍結乾燥した App 1 型菌 1H-7 株又は適当と認められた株、App 2 型菌 SH-15 株又は適当と認められた株及び App 5 型菌 KN-1 株又は適当と認められた株をそれぞれハートインフュージョン培地で溶解し、試験用培地 1 (付記 4) に接種し、37 °C で 16 時間培養する。集落を釣菌して試験用培地 2 (付記 5) に接種し、37 °C で 6 時間振盪培養したものを各攻撃用菌液とする。

3.6.8.2 試験方法

試験動物 90 匹以上を試験群とし、90 匹以上を対照群とする。

注射材料 0.5mL ずつを試験群の腹腔内に注射する。注射後 2 週間目に、試験群及び対照群をそ

れぞれ 10 匹ずつの 3 群計 6 群に分ける。1 型菌株攻撃用菌液をハートインフュージョン培地で 3 段階に希釈し、更にこれらの希釈菌液を 10w/v % ムチン液で 10 倍に希釈したものを、試験群及び対照群にそれぞれ 0.5mL ずつ腹腔内に注射して攻撃した後、7 日間臨床観察する。

また、同様に、注射後 2 週間目に、試験群及び対照群をそれぞれ 10 匹ずつの 3 群計 6 群に分ける。2 型菌株攻撃用菌液をハートインフュージョン培地で 3 段階に希釈し、更にこれらの希釈菌液を 10w/v% ムチン液で 10 倍に希釈したものを、試験群及び対照群にそれぞれ 0.5mL ずつ腹腔内に注射して攻撃した後、7 日間臨床観察する。

また、同様に、注射後 2 週間目に、試験群及び対照群をそれぞれ 10 匹ずつの 3 群計 6 群に分ける。5 型菌株攻撃用菌液をハートインフュージョン培地で 3 段階に希釈し、更にこれらの希釈菌液を 10w/v% ムチン液で 10 倍に希釈したものを、試験群及び対照群にそれぞれ 0.5mL ずつ腹腔内に注射して攻撃した後、7 日間臨床観察する。

3.6.8.3 判定

各攻撃菌株の対照群の 80 % 以上が死亡した最少の攻撃菌量において、試験群では 80 % 以上が耐過生存しなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、3 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。

付記 1 チョコレート寒天培地

1,000mL 中

ハートインフュージョン寒天

40g

水

残量

加温溶解した後、121 度で 15 分間高圧滅菌を行う。約 80 度に冷却した後、馬脱線維血を 10vol% となるように添加する。

付記 2 LB-Amp 寒天培地

1,000mL 中

カゼインペプトン

10 g

酵母エキス

5 g

塩化ナトリウム

5 g

水

残量

加熱溶解した後、pH を 7.4 ~ 7.6 に調整し、121 度で 15 分間高圧滅菌する。56 度に冷却した後、アンピシリンを最終力価 250 μ g/mL となるように添加する。

付記 3 サンプルバッファー

1,000 mL 中

0.25mol/L トリス塩酸緩衝液、pH 6.8

500 mL

20w/v % ラウリル硫酸ナトリウム

260 mL

グリセリン

200 mL

ジチオスレイトール

1.54 g

ブロムフェノールブルー

1.00 g

水

残量

付記 4 試験用培地 1

ハートインフュージョン寒天培地を 121 度で 15 分間高圧滅菌し、冷却した後、ろ過滅菌した

鶏非働化血清を 5 vol % 及び 0.1w/v % -ニチンアミドアデニンジヌクレオチド (以下「
-NAD」という。) 液を 1 vol % の割合で加えたもの

付記 5 試験用培地 2

ハートインフュージョン培地を 121 で 15 分間高圧滅菌し、冷却した後、ろ過滅菌した鶏非働化血清を 5 vol % 及び 0.1w/v % -NAD 液を 1 vol % の割合で加えたもの