

パストツレラ・ムルトシダ（アジュバント加）トキシイド

1 定義

パストツレラ・ムルトシダを培養して得た皮膚壊死毒素を無毒化し、アルミニウムゲルアジュバントを添加したトキシイドである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

パストツレラ・ムルトシダ S70 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

血液寒天培地（付記 1）及びデキストロース・スターチ寒天培地（付記 2）によく発育し、蛍光色のムコイド型集落を形成する。溶血性は示さない。生菌を初生豚の鼻腔内に頻回投与すると、鼻甲介骨の萎縮を起こす。また、本菌の細胞破碎抽出液を初生から 6 か月齢豚の筋肉内に注射すると鼻甲介骨の萎縮を起こす。

2.1.3 継代及び保存

原株及び種菌は、血液寒天培地で継代する。

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、凍結して - 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

液状培地（付記 3）又は製造に相当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 培養

種菌を液状培地に接種し、培養したものを更に製造用培地に接種し、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 精製

培養菌液を濃縮後、菌体を破碎処理して抽出処理した粗毒素液を精製したものを毒素液とする。

毒素液について、3.2 の試験を行う。

2.3.3 無毒化

毒素液にホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加えて無毒化したものを無毒化原液とする。
無毒化原液について、3.3.1の試験を行う。

2.3.4 アジュバントの添加

無毒化原液に適量のアルミニウムゲルアジュバントを添加し、原液とする。ただし、アジュバントは、最終バルクの調製時に添加してもよい。

原液について、3.3.2の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液を混合し、濃度調整をし、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、3.4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

3.1.1.1 試験材料

検体及びデキストロース・スターチ寒天培地を用いる。

3.1.1.2 試験方法

検体の0.1mLずつをデキストロース・スターチ寒天培地8枚に塗抹し、4枚ずつを22℃及び31℃で7日間培養する。

3.1.1.3 判定

パスツレラ・ムルトシダ以外の菌の発育を認めてはならない。

3.2 毒素液の試験

3.2.1 毒素定量試験

3.2.1.1 試験材料

3.2.1.1.1 注射材料

検体を15mmol/Lリン酸緩衝食塩液(付記4)で32倍及び48倍希釈からそれぞれ2倍階段希釈したものを注射材料とする。

3.2.1.1.2 試験動物

体重約350gのモルモットを用いる。

3.2.1.2 試験方法

試験動物 3 匹を用い、それぞれ毛刈した背部皮内に、注射材料をそれぞれ 0.1mL ずつ適当な間隔をあけて注射する。

3.2.1.3 判定

注射 3 日目に壊死斑を測定し、直径 10mm 以上の皮膚壊死斑を示した最大希釈倍数の逆数を 10 倍したものを、1 mL 当たりの毒素量（モルモット単位）と定義したとき、1 mL 当たりの毒素量が 960 モルモット単位以上のものを適合とする。

3.3 原液の試験

3.3.1 無毒化試験

3.3.1.1 試験材料

3.3.1.1.1 注射材料

検体及び 15mmol/L リン酸緩衝食塩液を注射材料とする。

3.3.1.1.2 試験動物

5 週齢の雌マウスを用いる。

3.3.1.2 試験方法

試験動物 10 匹を試験群、10 匹を対照群とする。試験群には注射材料 0.5mL、対照群には 15mmol/L リン酸緩衝食塩液 0.5mL を腹腔内に注射する。注射後 7 日間観察後、体重並びに脾重量を測定し、各群の平均相対脾重量（脾重量 / 体重）を算出する。

3.3.1.3 判定

試験群の平均相対脾重量は、対照群の平均相対脾重量の 90 % を下回ってはならない。

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。

3.4 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 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、固有な値でなければならない。

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試験法を準用して試験するとき、ホルマリンの含有量は、0.4vol % 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 1.4mg 以下でなければならない。

3.4.6 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、体重測定は 4 日目に行うものとする。

3.4.7 無毒化試験

3.4.7.1 試験材料

3.4.7.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.7.1.2 試験動物

体重約 350 g のモルモットを用いる。

3.4.7.2 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。

3.4.7.3 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。

3.4.8 力価試験

3.4.8.1 試験材料

3.4.8.1.1 注射材料

水酸化アルミニウムゲル（付記 5）を添加した 9.3mmol/L リン酸緩衝食塩液（付記 6）で、試験品を 9 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

5 週齢の雌マウスを用いる。

3.4.8.1.3 攻撃用毒素液

毒素液（付記 7）を用いる。

3.4.8.2 試験方法

試験動物 10 匹以上を試験群とする。

注射材料 0.5mL を 2 週間間隔で 2 回、試験群の腹腔内に注射する。第 2 回注射 2 週間後に、毒素

液を約 50LD₅₀/0.5mL に調整し、その 0.5mL を試験群の腹腔内に注射して攻撃した後、7日間観察する。

なお、試験群の攻撃時週齢と同週齢の無処置対照群 10 匹以上を 1 群として、その 3 群以上を用いて、攻撃毒素の LD₅₀ 値を測定する。

3.4.8.3 判定

試験群では、80 %以上が生存耐過しなければならない。また、攻撃毒素の LD₅₀ 値は、25 ~ 100 でなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、3年間とする。ただし、特に承認されたものは、その期間とする。

付記 1 血液寒天培地

1,000mL 中

ハートインフュージョン寒天 40 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、羊脱線維血液を 5 vol %となるように添加する。

付記 2 デキストロース・スターチ寒天培地

1,000mL 中

デキストロース・スターチ寒天 65 g

水 残量

加温溶解後、121 で 15 分間高圧滅菌する。

付記 3 液状培地

1,000mL 中

ハートインフュージョン培地 25 g

酵母エキス 5 g

ブドウ糖 3 g

水 残量

加温溶解後、ろ過滅菌又は 121 で 15 分間高圧滅菌する。

付記4 15mmol/L リン酸緩衝食塩液
1,000mL 中

リン酸二水素カリウム	0.88 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	3.10 g
塩化ナトリウム	7.3 g
水	残量

pH を 6.6 ~ 7.0 に調整して、ろ過滅菌又は 121 で 15 分間高圧滅菌する。

付記5 水酸化アルミニウムゲル

水酸化アルミニウムをアルミニウム量換算として 5 ~ 11mg/mL 含むもの

付記6 9.3mmol/L リン酸緩衝食塩液
1,000mL 中

リン酸二水素ナトリウム二水和物	0.40 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	2.40 g
塩化ナトリウム	7.4 g
水	残量

pH を 7.0 ~ 7.5 に調整して、ろ過滅菌又は 121 で 15 分間高圧滅菌する。

付記7 毒素液

パスツレラ・ムルトシダ S70 株又はこれと同等の壊死毒素を産生する株を、ハートインフュージョン液体培地で 37 、18 時間振とう培養し、発育した菌体を遠心により集菌後、元の量の約 1/10 量のリン酸緩衝食塩液に浮遊させ、超音波処理によって菌体を破碎後、その遠心上清をろ過滅菌し、マウスに対する LD₅₀ 値が 50LD₅₀/0.5mL 以上となるように調整したもの