

マンヘミア・ヘモリチカ（1型）感染症不活化ワクチン（油性アジュバント加溶解用液）（シード）

平成 25 年 1 月 22 日（告示第 257 号）新規追加
令和元年 8 月 26 日（告示第 723 号）一部改正

1 定義

シードロット規格に適合したマンヘミア・ヘモリチカ 1 型菌の培養菌液を不活化し、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

マンヘミア・ヘモリチカ 1 型 NL1009 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

ロイコトキシンを産生し、牛のマンヘミア性肺炎の発病を予防する免疫原性を有する。

2.1.3 マスターシード菌

2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、適当と認められた培地で増殖させ、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結乾燥して 2～7℃で保存する。

マスターシード菌について、3.1.1 の試験を行う。

マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシード菌から小分製品までの最高継代数は、10 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。

2.1.4 ワーキングシード菌

2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、適当と認められた培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結して -30℃以下又は凍結乾燥して 2～7℃で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2 の試験を行う。

2.1.5 プロダクションシード菌

2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、適当と認められた培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して -30℃以下又は凍結乾燥して 2～7℃で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

2.2 製造材料

2.2.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 培養

培地で培養したプロダクションシード菌を培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2 の試験を行う。

2.3.2 不活化

培養菌液にホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加えたものを不活化菌液とする。
不活化菌液について、3.3 の試験を行う。

2.3.3 原液

不活化菌液を遠心分離し、上清液を原液とする。

2.4 最終バルク

原液にリン酸緩衝食塩液（付記1）を添加し、濃度調整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、凍結乾燥して小分製品とする。

小分製品について、3.4 の試験を行う。

3 試験法

3.1 製造用株の試験

3.1.1 マスターシード菌の試験

3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の 1.4.2.4.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 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、マンヘミア・ヘモリチカ以外の菌の発育を認めてはならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.1.2 ワーキングシード菌の試験

3.1.2.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.3 プロダクションシード菌の試験

3.1.3.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2 培養菌液の試験

3.2.1 染色試験

3.2.1.1 試験材料

検体を用いる。

3.2.1.2 試験方法

検体をグラム染色して標本を作製し、観察する。

3.2.1.3 判定

均一なグラム陰性球桿菌以外の菌を認めてはならない。

3.2.2 コロニー性状確認試験

3.2.2.1 試験材料

検体を用いる。

3.2.2.2 試験方法

検体を 5 vol % 羊血液トリプチケース・ダイズ・寒天培地（付記2）に接種し、35 ~ 39 °C で 48 時間培養する。

3.2.2.3 判定

生育した集落はβ溶血環を示し、小さな灰色のコロニーでなければならない。

3.2.3 吸光度測定試験

3.2.3.1 試験材料

検体を用いる。

3.2.3.2 試験方法

検体を分光光度計を用いて波長 550 nm で吸光度を測定する。

3.2.3.3 判定

検体の吸光度値は、規定の値でなければならない。

3.3 不活化菌液の試験

3.3.1 不活化試験

3.3.1.1 試験材料

検体を用いる。

3.3.1.2 試験方法

検体を 100mL の液体培地に 1 mL、5 vol % 羊血液寒天培地に 0.2mL を接種し培養する。寒天培地については 33 ~ 37 °C で 48 時間以上培養後に菌の発育の有無を観察する。液体培地については 36 ~ 38 °C で培養後 7 日目に菌の発育の有無を観察した後、新しい 100mL の液体培地に 10mL、5 vol % 羊血液寒天培地に 0.2mL をそれぞれ継代し、寒天培地については継代後 3 ~ 7 日目に、液体培地については継代後 7 日目に菌の発育を観察する。

3.3.1.3 判定

菌の発育を認めてはならない。

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、帯黄白色の乾燥塊でなければならない、異物及び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 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。

3.4.3 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。

3.4.4 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。

3.4.5 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、ホルマリン含有量は、0.01vol % 以下でなければならない。ただし、乾燥ワクチンを溶解用液と等量の滅菌精製水で溶解したものを試料とする。

3.4.6 無毒化試験

3.4.6.1 試験材料

3.4.6.1.1 試料

試験品を溶解用液と等量の滅菌精製水で溶解したものを試料とする。

3.4.6.1.2 白血球浮遊液

白血球浮遊液（付記 3）を用いる。

3.4.6.2 試験方法

試料を RPMI-1640 培地（付記 4）で 2 倍階段希釈する。試料の原液及び各段階の希釈液 100 μ L を 96 穴マイクロプレートのそれぞれ 3 穴ずつに移す。白血球浮遊液を 90 μ L ずつ加え、37 °C で 1 時間培養した後、200G で 12 分間遠心し、上清を捨てる。10vol % ホルマリン溶液（付記 5）を 100 μ L ずつ加え 30 分間静置し、細胞沈渣を固定する。各穴の内容液を除去した後、1 w/v % クリスタルバイオレット溶液（付記 6）50 μ L を加え、5 分間染色する。流水で染色液を洗い流した後、各穴の底の紫色の細胞層の有無を観察する。

3.4.6.3 判定

細胞層が紫色に一様に染まっていたとき、陰性と判定する。細胞層が完全に剥離するか、濃く染まっていたとき、陽性と判定し、陽性を示した最高希釈倍数を毒素活性値とする。毒素活性値は、2 倍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 2 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1 mLとし、体重測定は5日目に行うものとする。

3.4.8 力価試験

3.4.8.1 ロイコトキソイド力価試験

3.4.8.1.1 試験材料

3.4.8.1.1.1 試料

試験品を溶解用液と等量の滅菌精製水で溶解したものを試料とする。

3.4.8.1.2 試験方法

希釈液（付記7）で試料及び参照品（付記8）の階段希釈液を作製し、その希釈液を抗体固相化プレート（付記9）の穴に100 μ Lずつ加え、37℃で60分間反応させる。洗浄液（付記10）で洗浄した後、マンヘミア・ヘモリチカロイコトキソイドに対するマウスモノクローナル抗体（付記11）を各穴に100 μ Lずつ加え、37℃で60分間反応させる。洗浄液で洗浄した後、標識抗体1（付記12）を各穴に100 μ Lずつ加え、37℃で60分間反応させる。洗浄液で洗浄した後、基質液（付記13）を各穴に100 μ Lずつ加え、常温で反応させる。参照品の規定の希釈倍率の希釈液を加えた穴の吸光度を主波長405nm、副波長490nmで測定し、その値が参照品ごとに規定された値となったときに全ての穴の吸光度を測定する。

3.4.8.1.3 判定

参照品のロイコトキソイド量を1.0として、試料のロイコトキソイド量の相対量を統計学的計算方法（付記14）により算出するとき、相対力価は、1.0以上でなければならない。

3.4.8.2 莢膜抗原力価試験

3.4.8.2.1 試験材料

3.4.8.2.1.1 試料

試験品を溶解用液と等量の滅菌精製水で溶解したものを試料とする。

3.4.8.2.2 試験方法

希釈・洗浄液（付記15）で試料及び参照品の階段希釈液を作製し、96穴マイクロプレートの各穴に100 μ Lずつ加えて4℃で1晩反応させる。希釈・洗浄液で洗浄した後、ブロッキング液1（付記16）を加え、常温で1時間反応させる。希釈・洗浄液で洗浄した後、マンヘミア・ヘモリチカ莢膜抗原に対するモノクローナル抗体（付記17）を100 μ Lずつ加え、37℃で1時間反応させる。洗浄液で洗浄した後、標識抗体2（付記18）を各穴に100 μ Lずつ分注し、37℃で1時間反応させる。洗浄液で洗浄した後、基質液を各穴に100 μ Lずつ加え、常温で反応させる。参照品の規定の希釈倍率の希釈液を加えた穴の吸光度を主波長405nm、副波長490nmで測定し、その値が参照品ごとに規定された値となったときに全ての穴の吸光度を測定する。

3.4.8.2.3 判定

参照品の莢膜抗原量を1.0として、試料の莢膜抗原量の相対量を統計学的計算方法により算出するとき、相対力価は、1.0以上でなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後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。

付記1 リン酸緩衝食塩液

1,000 mL 中

塩化ナトリウム 9.0 g

リン酸水素二ナトリウム 12水和物 6.77 g

リン酸二水素カリウム 2.58 g

水 残量

pHを7.2に調整し、121℃で15分間高圧滅菌する。

- 付記2 5 vol %羊血液トリブチケース・ダイズ・寒天培地
1,000 mL 中
- | | |
|-----------------|--------|
| カゼインのパンクレアチン消化物 | 15.0 g |
| 塩化ナトリウム | 5.0 g |
| ダイズのパパイン消化物 | 5.0 g |
| 寒天 | 15.0 g |
| 羊血液 | 50.0 g |
| 精製水 | 残 量 |
- 完全に溶解し、高圧蒸気滅菌する。
- 付記3 白血球浮遊液
健康な牛から採取した血液から白血球を調製し、細胞数が 1×10^7 個/mL となるように RPMI-1640 培地に浮遊させたもの。
- 付記4 RPMI-1640 培地
1,000 mL 中
- | | |
|-----------|---------|
| RPMI-1640 | 10.39 g |
| 炭酸水素ナトリウム | 2.0 g |
| 水 | 残 量 |
- pH を 7.4 に調整する。200nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。
- 付記5 10vol %ホルマリン溶液
100mL 中
- | | |
|----------|-------|
| ホルムアルデヒド | 10 mL |
| 水 | 残 量 |
- 200nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。
- 付記6 1 w/v%クリスタルバイオレット溶液
100mL 中
- | | |
|-------------|-------|
| クリスタルバイオレット | 1.0 g |
| 水 | 残 量 |
- 200nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。
- 付記7 希釈液
1,000mL 中
- | | |
|-----------------------------|------|
| 牛血清アルブミン | 20 g |
| 0.38w/v%四ホウ酸ナトリウム溶液 (付記 19) | 残 量 |
- 200nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。
- 付記8 参照品
動物医薬品検査所が適当と認めたもの。
- 付記9 抗体固相化プレート
0.38w/v %四ホウ酸ナトリウム溶液で適当な濃度に希釈したマンヘミア・ヘモリチカロイコトキソイドに対する牛ポリクローナル抗体 (付記 20) を 100 μ L ずつ 96 穴プレートに分注し、

4℃で16時間反応させる。内容液を捨て、ブロッキング液2（付記21）を加え、37℃で30分間反応させた後、希釈・洗浄液で1回洗浄したもの。

付記10 洗浄液

1,000mL 中

ポリソルベート 20

0.5 mL

希釈・洗浄液

残 量

pHを7.2に調整する。

付記11 マンヘミア・ヘモリチカロイコトキソイドに対するマウスモノクローナル抗体

マンヘミア・ヘモリチカロイコトキシンを用いてイムノブロットを行った場合、分子量約100 kDaの単一のバンドを認めるモノクローナル抗体で、中和能を有する。これを希釈・洗浄液で適当な希釈倍率に希釈したもの

付記12 標識抗体1

ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG(H+L)抗体を50vol %グリセリン溶液（付記22）で溶解し、更に希釈・洗浄液で希釈したもの。

付記13 基質液

A液：0.3gの2,2'-アジノ-ジ(3-エチルベンゾチアズリン-6-スルホン酸)を1,000mLのグリシン緩衝液で溶解したもの。

B液：0.02vol%過酸化水素水

A液とB液を使用時に等量混合したもの。

付記14 統計学的計算方法

動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

付記15 希釈・洗浄液

1,000mL 中

塩化ナトリウム

8.0 g

塩化カリウム

0.2 g

無水リン酸水素二ナトリウム

1.15 g

リン酸二水素カリウム

0.2 g

水

残 量

pHを7.2に調整する。200nm以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。

付記16 ブロッキング液1

1,000mL 中

牛血清アルブミン

10 g

希釈・洗浄液

残 量

200nm以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。

付記17 マンヘミア・ヘモリチカ 莢膜抗原に対するモノクローナル抗体

マンヘミア・ヘモリチカから精製した莢膜多糖体、リポ多糖体及びロイコキシンを用いて間接ELISAを行った場合、莢膜多糖体にのみ特異的に反応するモノクローナル抗体であって、プロ

ッキング液 1 で適当な希釈倍率に希釈したもの。

付記 18 標識抗体 2

ペルオキシダーゼ標識したヤギ抗マウス IgM (μ) 抗体を 50vol %グリセリン溶液で適当な濃度になるように溶解したもの。

付記 19 0.38w/v%四ホウ酸ナトリウム溶液

1,000mL 中

四ホウ酸ナトリウム

3.8 g

水

残 量

pH を 9.0 に調整する。200nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。

付記 20 マンヘミア・ヘモリチカ ロイコトキソイドに対する牛ポリクローナル抗体

マンヘミア・ヘモリチカに対する牛ポリクローナル血清で、ロイコトキソイドに対する反応の特異性が間接的に確認され、参照品に対する用量反応性等が証明されたもの。

付記 21 ブロッキング液 2

1,000mL 中

牛血清アルブミン

20 g

希釈・洗浄液

残 量

200nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。

付記 22 50vol %グリセリン溶液

滅菌精製水にグリセリンを等量混合したもの。