

牛クロストリジウム感染症3種混合（アジュバント加）トキソイド（シード）

平成23年2月8日(告示第358号)新規追加

1 定義

シードロット規格に適合した気腫疽菌、クロストリジウム・セプチカム及びクロストリジウム・ノビイを培養して得た培養上清を無毒化したものを混合し、アルミニウムゲルアジュバントを添加したトキソイドである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 気腫疽菌

2.1.1.1 名称

気腫疽菌沖縄-1株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

対数増殖期の菌体は、周毛性の鞭毛を形成する。

2.1.1.3 マスターシード菌

2.1.1.3.1 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、連続した工程により作製し、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5℃以下で保存する。

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。

2.1.1.4 ワーキングシード菌

2.1.1.4.1 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、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。

2.1.1.5 プロダクションシード菌

2.1.1.5.1 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、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

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。

2.1.2 クロストリジウム・セプチカム

2.1.2.1 名称

クロストリジウム・セプチカム No.44-1 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

培養ろ液をマウスの静脈内に接種すると毒性を示す。

2.1.2.3 マスターシード菌

2.1.2.3.1 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、連続した工程により作製し、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5℃以下で保存する。

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。

2.1.2.4 ワーキングシード菌

2.1.2.4.1 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、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。

2.1.2.5 プロダクションシード菌

2.1.2.5.1 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、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

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。

2.1.3 クロストリジウム・ノビイ

2.1.3.1 名称

クロストリジウム・ノビイ CN1025-1 株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

培養液をマウスの静脈内に接種すると毒性を示す。

2.1.3.3 マスターシード菌

2.1.3.3.1 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、連続した工程により作製し、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5℃以下で保存する。

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。

2.1.3.4 ワーキングシード菌

2.1.3.4.1 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、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。

2.1.3.5 プロダクションシード菌

2.1.3.5.1 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、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

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 製造用材料

2.2.1 気腫疽菌

2.2.1.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.2.2 クロストリジウム・セプチカム

2.2.2.1 培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

2.2.3 クロストリジウム・ノビイ

2.2.3.1 培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 気腫疽菌原液

2.3.1.1 培養

プロダクションシード菌を培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2.1 及び 3.2.2 の試験を行う。

2.3.1.2 不活化

培養菌液をろ過したものにホルマリンを加え、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、3.3 の試験を行う。

2.3.1.3 原液

不活化菌液を遠心した上清、又はこれを相当と認められた方法で濃縮したものを原液とする。

原液について 3.4 の試験を行う。

2.3.2 クロストリジウム・セプチカム原液

2.3.2.1 培養

プロダクションシード菌を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。

2.3.2.2 不活化

培養菌液をろ過したものにホルマリンを加え、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、3.3 の試験を行う。

2.3.2.3 原液

不活化菌液を遠心した上清、又はこれを相当と認められた方法で濃縮したものを原液とする。

原液について、3.4 の試験を行う。

2.3.3 クロストリジウム・ノビイ原液

2.3.3.1 培養

プロダクションシード菌を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。

2.3.3.2 不活化

培養菌液をろ過したものにホルマリンを加え、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、3.3 の試験を行う。

2.3.3.3 原液

不活化菌液を遠心した上清、又はこれを相当と認められた方法で濃縮したものを原液とする。

原液について、3.4 の試験を行う。

2.4 最終バルク

気腫疽菌原液、クロストリジウム・セプチカム原液及びクロストリジウム・ノビイ原液を混合し、濃度調整後アジュバントを添加し、最終バルクとする。この場合、相当と認められた保存剤を添加してもよい。

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、3.5 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

3.1.1.2.1 試験材料

検体及び普通寒天斜面培地（付記 4）を用いる。

3.1.1.2.2 試験方法

検体 0.05mL ずつを普通寒天斜面培地 2 本に塗抹し、37℃で好氣的に 48 時間培養する。

3.1.1.2.3 判定

いずれの斜面も菌の発育を認めてはならない。

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 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。

3.2.2 生菌数試験

3.2.2.1 試験材料

検体及び製造用培地

3.2.2.2 試験方法

検体を、製造用培地の上清を用いて 10 倍階段希釈列にて 10^7 まで希釈し、 10^5 、 10^6 及び 10^7 の各希釈液の 1 mL ずつを 10mL の培地 5 本にそれぞれ接種し、36℃で 48 時間培養後、培地の混濁を観察する。

3.2.2.3 判定

検体の希釈倍数と菌の増殖した培地の本数から最確数表を用いて換算するとき、それぞれの検体 1 mL 中の生菌数は、 3.5×10^6 個以上でなければならない。

3.2.3 毒素価試験

3.2.3.1 試験材料

3.2.3.1.1 試料

クロストリジウム・セプチカム及びクロストリジウム・ノビイのそれぞれの検体を除菌ろ過して試料とする。

3.2.3.1.2 試験動物

約 4 週齢のマウスを用いる。

3.2.3.2 試験方法

試料を、滅菌生理食塩液で 10 倍階段希釈系列にて 10^3 まで希釈し、 10^2 及び 10^3 の各希釈液についてそれぞれ 10 匹のマウスに 0.5mL ずつ静脈内に接種し、5 日間生死を観察する。

3.2.3.3 判定

クロストリジウム・セプチカムでは 10^2 希釈液接種マウスが全例死亡し、クロストリジウム・ノビイでは 10^3 希釈液接種マウスが全例死亡しなければならない。

3.3 不活化菌液の試験

3.3.1 生菌否定試験

3.3.1.1 試験材料

検体及び製造用培地を用いる。

3.3.1.2 試験方法

それぞれの検体の 1.0mL ずつを 20mL の製造用培地 2 本に接種し、37 °C で 7 日間培養する。

3.3.1.3 判定

いずれの培地も菌の発育を認めてはならない。

3.4 原液の試験

3.4.1 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。

3.4.2 抗原価試験

検体、参照陽性血清（付記 5）及び参照抗原（付記 6）を用いる。

3.4.2.1 試験方法

ゲル内沈降反応（付記 7）により試験を行う。

3.4.2.2 判定

各検体は、参照陽性血清に対して明瞭な沈降線を生じ、その力価は、4 単位以上でなければならない。

3.5 小分製品の試験

3.5.1 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。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.5.2 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。

3.5.3 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。

3.5.4 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、その含有量は、0.1vol % 以下でなければならない。

3.5.5 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、0.4vol % 以下でなければならない。

3.5.6 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 1.3mg 以下でなければならない。

3.5.7 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、体重測定は、4 日目に行うものとする。

3.5.8 力価試験

3.5.8.1 試験材料

3.5.8.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.8.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

3.5.8.1.3 攻撃用芽胞液

攻撃菌 3 種類（付記 8）の芽胞液を滅菌生理食塩液で希釈し、6 w/v % 塩化カルシウム液を等量加えて、それぞれ 10 ~ 100MLD となるように調整したものをを用いる。

3.5.8.2 試験方法

モルモット 30 頭を用い、試験群 15 頭及び対照群 15 頭とする。試験群には注射材料を 2 週間隔で 2 回、0.4mL ずつ筋肉内に注射し、2 回注射後 10 日目に試験群及び対照群各 5 頭を一組として 3 組に区分し、各攻撃菌液をそれぞれ筋肉内に 0.5mL ずつ接種して 7 日間観察する。

3.5.8.3 判定

試験群では、いずれの菌で攻撃した場合も 80 %以上が生存しなければならない。この場合、対照群では、全て死亡しなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後 1 年 3 か月間とする。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 レイフソン鞭毛染色液

| | |
|------------|-------|
| 100mL 中 | |
| 塩化ナトリウム | 0.5 g |
| タンニン酸 | 1.0 g |
| パラロザニリン酢酸塩 | 0.9 g |
| パラロザニリン塩酸塩 | 0.9 g |
| 水 | 残 量 |

付記 2 抗気腫疽菌鞭毛モノクローナル抗体

気腫疽菌の鞭毛に対するモノクローナル抗体を硫酸アンモニウム塩析で精製したもの

付記 3 封入剤

| | |
|--------------------------|-------|
| 100mL 中 | |
| 0.5mol/L 炭酸緩衝液 (pH9.5) * | 10 mL |
| グリセリン | 90 mL |

| | |
|-------------|---------|
| * 1,000mL 中 | |
| 炭酸ナトリウム | 13.78 g |
| 炭酸水素ナトリウム | 31.08 g |
| 水 | 残 量 |

付記 4 普通寒天斜面培地

普通寒天培地を内径約 1.5cm、高さ約 16.5cm の試験管に 8 mL 分注し、全斜面培地にしたもの

付記 5 参照陽性血清

気腫疽菌の参照陽性血清は、気腫疽菌抗原を兔に注射して得られた抗血清で、間接血球凝集反応により抗体価が 256 倍を示す。

クロストリジウム・セプチカム及びクロストリジウム・ノビイの参照陽性血清は、それぞれ動物医薬品検査所が適当と認めたもので、1 mL 当たりクロストリジウム・セプチカムは 10 国際単位、クロストリジウム・ノビイは 50 国際単位になるように、リン酸緩衝食塩液で調整したもの

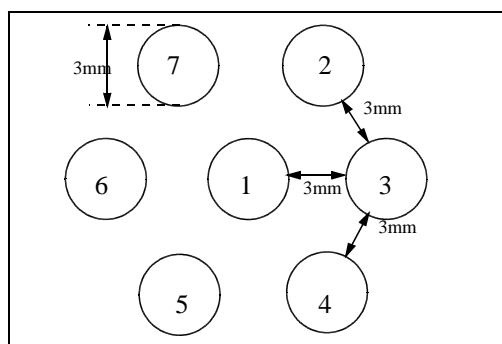
付記 6 参照抗原

気腫疽菌、クロストリジウム・セプチカム及びクロストリジウム・ノビイの各原液をリン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈し、希釈液とそれぞれの参照陽性血清を用いてゲル内沈降反応を実施し、沈降線の認められる限界希釈倍数を抗原価1単位として、その4単位を含む濃度に調整したもの

付記7 ゲル内沈降反応

100mL の生理食塩液に寒天末 0.8g と 10w/v %アジ化ナトリウム溶液 1mL を加え、溶解させた後、スライドガラス上に注加し凝固させた後、下図のように穴を空けた厚さ 3 mm の寒天板を用いる。

図の番号のように、各穴に参照陽性血清、参照抗原の各希釈液及び検体の各希釈液をそれぞれ 35 μ L ずつ満たして 37 $^{\circ}$ C で 72 時間反応させ沈降線形成の有無を観察する。



- 1 参照陽性血清
- 2 参照抗原 1/2 希釈液
- 3 参照抗原 1/4 希釈液
- 4 参照抗原 1/8 希釈液
- 5 検体 1/2 希釈液
- 6 検体 1/4 希釈液
- 7 検体 1/8 希釈液

付記8 攻撃菌

気腫疽菌、クロストリジウム・セプチカム及びクロストリジウム・ノビイの製造用株をそれぞれ製造用培地で培養し、芽胞を形成させた後、ろ過したもので、この芽胞液を塩化カルシウムと共にモルモットに接種した場合、気腫疽菌は 10^4 MLD、クロストリジウム・セプチカムは 10^6 MLD、クロストリジウム・ノビイは 10^2 MLD の致死性を示す。