

# 豚丹毒（アジュバント加）不活化ワクチン（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豚丹毒菌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添加したワクチンである。

## 2 製法

### 2.1 製造用株

#### 2.1.1 名称

豚丹毒菌多摩96株（血清型2型）又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.2 性状

感受性豚に接種すると、豚丹毒を惹起する。

#### 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、平板培地（付記1）又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、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.1.4 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、平板培地又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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.1.5 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、平板培地又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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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 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

プロダクションシード菌を液状培地（付記2）又は適当と認められた培地に接種し、増量培養したものを、更に液状培地2（付記3）又は適当と認められた培地に接種し、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 原液の調製

培養菌液の pH を調整した後ホルマリンを加えて不活化したもの又は培養菌液にホルマリンを加えて不活化した後適当と認められた方法で濃縮し濃度調整し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

原液にアルミニウムゲルアジュバントを加えて混合したもの又はこれの pH 及び濃度調整したものを最終バルクとする。

この場合、適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 を準用して試験を実施するとき、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 液状培地培養法

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、豚丹毒菌以外の菌の発育を認めてはならない。

###### 3.1.1.2.2 普通寒天斜面培養法

###### 3.1.1.2.2.1 培地

普通寒天斜面培地を用いる。

###### 3.1.1.2.2.2 試験方法

検体 0.5mL ずつを普通寒天斜面培地 4 本に接種し、37 °C で 7 日間培養する。

###### 3.1.1.2.2.3 判定

豚丹毒菌以外の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 及び 3.2.3.1 の試験、又は 3.2.2 及び 3.2.3.2 の試験を行う。

##### 3.2.1 夾雑菌否定試験

###### 3.2.1.1 液状培地培養法

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

###### 3.2.1.2 普通寒天斜面培養法

3.1.1.2.2 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 染色試験

###### 3.2.2.1 試験方法

検体を適量スライド・ガラス上に塗抹し、乾燥させ、火焰固定し、グラム染色して標本作製する。ただし、標本は、菌体の観察に適当な分散を示すように作製する。

###### 3.2.2.2 判定

100 倍以上に拡大して鏡検するとき、豚丹毒菌以外の菌を認めてはならない。

### 3.2.3 生菌数試験

#### 3.2.3.1 生菌数試験 1

##### 3.2.3.1.1 試験材料

###### 3.2.3.1.1.1 試料

検体を普通ブイヨンで 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.2.3.1.1.2 培地

普通寒天培地を用いる。

##### 3.2.3.1.2 試験方法

試料 1 mL ずつをそれぞれ 2 枚のシャーレに分注し、平板混合希釈培養法により 37℃で 48 時間培養した後、生じた豚丹毒菌の集落数を数える。

##### 3.2.3.1.3 判定

各段階の希釈液ごとの集落数の平均値、希釈倍数及び培地への接種量から生菌数を算出する。

検体の生菌数は、1 mL 中  $1.5 \times 10^9$  個以上でなければならない。

#### 3.2.3.2 生菌数試験 2

##### 3.2.3.2.1 試験材料

検体を用いる。

##### 3.2.3.2.2 試験方法

検体 2 mL 以上を採り、検体中に含まれる豚丹毒菌の菌量として、波長 530nm での吸光度を測定する。

##### 3.2.3.2.3 判定

検体の吸光度値は、0.25 以上でなければならない。

### 3.3 原液の試験

3.3.1.1 及び 3.3.2 の試験、又は 3.3.1.2 の試験を行う。

#### 3.3.1 不活化試験

##### 3.3.1.1 不活化試験 1

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。

ただし、判定は、接種後 3 日目に行う。

##### 3.3.1.2 不活化試験 2

###### 3.3.1.2.1 試験材料

###### 3.3.1.2.1.1 試料

検体を接種材料とする。

###### 3.3.1.2.1.2 培地

血液寒天培地（付記 4）又は適当と認められた平板培地を用いる。

###### 3.3.1.2.2 試験方法

接種材料 1.0mL を血液寒天培地と混釈法にて混和し、又は接種材料 0.1mL を血液寒天培地に塗り広げ、35～39℃で 18～24 時間培養する。陽性対照として、豚丹毒菌製造用株の生菌培養液を同様の方法で試験する。

###### 3.3.1.2.3 判定

試料を接種した培地にはいかなる菌の発育も認めてはならず、豚丹毒菌製造用株の生菌培養液を接種した培地には豚丹毒菌の発育を認めなければならない。

#### 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

3.4.7 の試験を適用しないものについては、3.4.8 の試験を行う。

#### 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液体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

pH 測定試験を行う場合には、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 チメロサル定量試験

チメロサル添加製剤については、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。

#### 3.4.5 ホルマリン定量試験

ホルマリン添加製剤については、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、0.2vol %以下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、その含有量とする。

#### 3.4.6 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 2.5mg 以下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、その含有量とする。

#### 3.4.7 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性否定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。

#### 3.4.8 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、試験品の注射量は 0.3mL とし、注射後の体重測定は 4 日目とする。

#### 3.4.9 力価試験

3.4.9.1 又は 3.4.9.2 の試験を行う。

##### 3.4.9.1 2 回免疫による方法

###### 3.4.9.1.1 試験材料

###### 3.4.9.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 3.4.9.1.1.2 試験動物

5 週齢のマウスを用いる。

###### 3.4.9.1.1.3 攻撃用菌液

凍結乾燥した豚丹毒菌藤沢株又はこれと同等の毒力を有する株を液状培地に接種し、37 °C で 14 ~ 20 時間培養する。これを普通ブイヨンで 1 ml 中  $10^3$  個の菌量になるように希釈したものを攻撃用菌液とする。

###### 3.4.9.1.2 試験方法

試験動物 10 匹を試験群とし、10 匹を対照群とする。

注射材料 0.5mL ずつを 2 週間隔で 2 回、試験群の内股部皮下に注射する。第 2 回注射後 2 週目に、攻撃用菌液を試験群及び対照群の内股部皮下に 0.1mL ずつ注射して攻撃した後、7 日間観察する。

###### 3.4.9.1.3 判定

試験群においては、70 % 以上が耐過生存しなければならない。この場合、対照群においては、90 % 以上が死亡しなければならない。

##### 3.4.9.2 1 回免疫による方法

###### 3.4.9.2.1 試験材料

###### 3.4.9.2.1.1 注射材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で3倍に希釈したものを注射材料とする。

#### 3.4.9.2.1.2 試験動物

4週齢のマウスを用いる。

#### 3.4.9.2.1.3 攻撃用菌液

凍結乾燥した豚丹毒菌藤沢株又はこれと同等の毒力を有する株を攻撃菌用培地に接種し、37℃で14～20時間培養する。これを普通ブイヨンで1 mL中 $10^4$ 個の菌量になるように希釈したものを攻撃用菌液とする。

#### 3.4.9.2.2 試験方法

試験動物10匹を試験群とし、10匹を対照群とする。

注射材料0.1mLずつを試験群の内股部皮下に注射する。注射後10日目に、攻撃用菌液を試験群及び対照群の内股部皮下に0.1mLずつ注射して攻撃した後、10日間観察する。

#### 3.4.9.2.3 判定

試験群においては、70%以上が耐過生存しなければならない。この場合、対照群においては、90%以上が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3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 平板培地

1,000mL中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 30 g

プロテオーゼペプトン No.3 10 g

ポリソルベート 80 1 mL

寒天 10 g

水 残量

pHを7.4～7.8に調整して、121℃で15分間高圧滅菌する。

#### 付記2 液状培地

1,000mL中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 30 g

プロテオーゼペプトン No.3 10 g

ポリソルベート 80 1 mL

水 残量

pHを7.4～7.8に調整して、121℃で15分間高圧滅菌する。

#### 付記3 液状培地2

1,000mL中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 30 g

ポリソルベート 80 1 mL

水 残量

pHを8.0に調整して、121℃で15分間高圧滅菌する。冷却後、ろ過滅菌した牛血清を10～50mL添加する。

#### 付記4 血液寒天培地

1,000mL中

カゼイン製ペプトン	15 g
大豆製ペプトン	5 g
塩化ナトリウム	5 g
寒天	15 g
水	残 量

pHを7.1～7.5に調整して、121℃で15分間高圧滅菌する。約50℃に冷却した後、羊血液5 vol %となるように添加する。