

豚丹毒（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

平成 21 年 7 月 1 日（告示第 861 号） 新規追加
平成 28 年 4 月 18 日（告示第 1020 号） 一部改正

1 定義

シードロット規格に適合した豚丹毒菌の培養菌体をアルカリ処理して抽出した抗原を不活化後、油性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 Kyoto 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）及び液状培地（付記 2）又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 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、平板培地及び液状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。

2.1.5 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する。

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について、3.1.3 の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 培地

平板培地及び液状培地又は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

平板培地で培養したワーキングシード菌又はプロダクションシード菌を液状培地に接種して培養し、更に液状培地に接種し、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 抗原抽出

培養菌液を遠心して得た菌を 0.01mol/L 水酸化ナトリウム溶液に再浮遊し、2～5℃で1夜攪拌後、遠心して採取した上清を抽出抗原液とする。

抽出抗原液について、3.3 の試験を行う。

2.3.3 原液

抽出抗原液にホルマリンを加えて不活化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

原液を適当と認められた希釈用液で濃度を調整し、これに適当と認められた油性アジュバントを添加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、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

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。

3.1.2 ワーキングシード菌の試験

3.1.2.1 夾雑菌否定試験

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。

3.1.3 プロダクションシードの試験

3.1.3.1 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、豚丹毒菌以外の菌の発育を認めてはならない。

3.2 培養菌液の試験

3.2.1 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、豚丹毒菌以外の菌の発育を認めてはならない。

3.2.2 生菌数試験

3.2.2.1 試験材料

3.2.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液を用いて 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.2.1.2 培地

試験用寒天培地（付記 3）又は適当と認められた培地を用いる。

3.2.2.2 試験方法

試料 1.0mL 又は 0.5mL ずつをそれぞれ 2 枚のシャーレに分注し、平板混濁培養法により 37℃で 48 時間培養後、生じた豚丹毒菌の集落数を数える。

3.2.2.3 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 5.0×10^8 個以上でなければならない。

3.3 抽出抗原液の試験

3.3.1 酵素抗体反応（以下「ELISA」という。）抗原価測定試験

3.3.1.1 試験材料

3.3.1.1.1 試料

検体を 220nm のメンブランフィルターで濾過滅菌したもの及び ELISA 抗原価測定用参照抗原（付記 4）を、それぞれ炭酸緩衝液（付記 5）で 10 倍希釈した後に 2 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.1.1.2 測定用抗体

ELISA 抗原価測定用単クローン抗体（付記 6）を用いる。

3.3.1.2 試験方法

試料 100 μ L ずつを ELISA 用プレート（U底）の穴に入れ、2～5℃で一夜吸着させる。プレートを希釈・洗浄液（付記 7）で洗浄し、2 w/v %牛血清アルブミン溶液（付記 8）を各穴に 250 μ L ずつ加え、37℃1時間感作する。プレートを洗浄後、ELISA 抗原価測定用単クローン抗体を各穴に 100 μ L ずつ加え、37℃1時間感作する。プレートを洗浄後、標識抗体 1（付記 9）を各穴に 100 μ L ずつ加え、37℃1時間感作する。プレートを洗浄後、基質液（付記 10）を各穴に 100 μ L ずつ加え、遮光して 30℃30分間反応させる。停止液（付記 11）を各穴に 50 μ L ずつ加え、反応を停止させる。主波長 490nm と副波長 630nm の 2 波長で吸光度を測定し、これらの差を ELISA 値とする。

3.3.1.3 判定

ELISA 値が 0.4 以上を示す抗原の最高希釈倍数を ELISA 抗原価とする。

検体の ELISA 抗原価は、80 単位/mL 以上でなければならない。この場合、ELISA 抗原価測定用参照抗原の ELISA 抗原価は、80～160 単位/mL を示さなければならない。

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 不活化試験

3.4.2.1 試験材料

3.4.2.1.1 接種材料

検体を接種材料とする。

3.4.2.2 試験方法

接種材料 0.1mL ずつを 5 枚の試験用寒天培地に塗抹し、37℃で 48 時間培養する。

3.4.2.3 判定

豚丹毒菌の発育を認めてはならない。

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。

3.5.2 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。

3.5.3 ホルマリン定量試験

適当と認められた方法で試験品を処理したものを試料とし、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、0.15vol %以下でなければならない。

3.5.4 安全試験

3.5.4.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.4.2 試験動物

約 30 日齢の豚を用いる。

3.5.4.3 試験方法

試験動物の 2 頭を試験群、1 頭を対照群とする。

試験群の 1 頭には注射材料 1 mL を、他の 1 頭には注射材料 3 mL を頸部筋肉内に注射し、対照群とともに 2 週間観察する。

3.5.4.4 判定

観察期間中、試験動物に臨床的な異常を認めてはならない。ただし、試験群に注射後一過性の発熱、元気・食欲の消失を認めても、3 日以内に正常に回復しなければならない。

3.5.5 力価試験

3.5.5.1 試験材料

3.5.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.5.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

3.5.5.1.3 ELISA 用抗原

豚丹毒抗体価測定用抗原（付記 12）を用いる。

3.5.5.2 試験方法

試験動物の 8 匹を試験群、2 匹を対照群とする。

注射材料 0.2mL ずつを 3 週間隔で 2 回、試験群の大腿部筋肉内に注射する。第 2 回注射後 2 週目に、試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、ELISA を行う。

試験群及び対照群の各血清、参照陽性血清（付記 13）及び参照陰性血清（付記 14）を希釈・洗浄液で 100 倍より 2 倍階段希釈したものを、抗原吸着プレート（付記 15）の各穴に 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C 1 時間感作する。希釈・洗浄液で洗浄後、標識抗体 2（付記 16）を各穴に 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C 1 時間感作する。洗浄後、基質液を各穴に 100 μ L ずつ加え、遮光して 30 $^{\circ}$ C 30 分間反応させる。停止液を各穴に 50 μ L ずつ加え、反応を停止させる。主波長 490nm と副波長 630nm の 2 波長で吸光度を測定し、これらの差を ELISA 値とする。

3.5.5.3 判定

ELISA 値が 0.5 以上を示す血清の最高希釈倍数を ELISA 抗体価とする。

試験群では、ELISA 抗体価の幾何平均値が 300 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、すべて 100 倍未満でなければならない。また、参照陽性血清は 400 ~ 800 倍、参照陰性血清は 100 倍未満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 1 年 9 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

ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト寒天培地 40 g

ポリソルベート 80 1 mL

水 残量

加温溶解後、121 $^{\circ}$ C で 20 分間高压滅菌する。約 50 $^{\circ}$ C に冷却後、ろ過滅菌した馬血清を 20mL 加える。

付記 2 液状培地

1,000mL 中

ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト液体培地	30	g
ポリソルベート 80	1	mL
水		残 量

121 °Cで 20 分間高压滅菌する。冷却後、ろ過滅菌した馬血清を 20mL 加える。

付記 3 試験用寒天培地

1,000mL 中

ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト寒天培地	40	g
ポリソルベート 80	1	mL
水		残 量

加温溶解後、121 °Cで 20 分間高压滅菌する。

付記 4 ELISA 抗原価測定用参照抗原

豚丹毒菌 Kyoto 株の菌体から作製した水酸化ナトリウム抽出抗原で、感染防御抗原である 67kDa 蛋白に対する単クローン抗体を用いてイムノブロットィングを行った場合、単一の反応バンドを認めるものであり、3.3.1 の試験により抗原価を測定するとき、ELISA 抗原価は 80 ~ 160 単位/mL を示す。

付記 5 炭酸緩衝液

1,000mL 中

炭酸ナトリウム	1.59	g
炭酸水素ナトリウム	2.93	g
水		残 量

pH を 9.6 に調整する。4 °Cで保存し、1 週間以内に使用する。

付記 6 ELISA 抗原価測定用単クローン抗体

豚丹毒菌 Kyoto 株水酸化ナトリウム抽出抗原中の感染防御抗原である 67kDa 蛋白に対する精製単クローン抗体（サブクラス：IgG1）で、マウス受身感染防御能を有する。抗体産生ハイブリドーマを BALB/c 系マウスに腹腔内投与し、得られた腹水をプロテイン A カラムクロマトグラフ法で精製したもの。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた場合、非還元下で約 160kDa に 1 本、還元下で約 50kDa と 30kDa に各々 1 本ずつバンドが認められる。

付記 7 希釈・洗浄液

1,000mL 中

リン酸水素二ナトリウム十二水和物	1.725	g
リン酸二水素カリウム	0.2	g
塩化ナトリウム	8.0	g
塩化カリウム	0.2	g
ポリソルベート 20	0.5	mL
水		残 量

pH を 7.2 ~ 7.4 に調整する。

付記 8 2 w/v %牛血清アルブミン溶液

牛血清アルブミン 2.0g を希釈・洗浄液 100mL で使用直前に溶解したもの

付記 9 標識抗体 1

西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体を希釈・洗浄液で至適濃度に希釈したもの

付記 10 基質液

オルトフェニレンジアミン二塩酸塩 40mg をリン酸クエン酸緩衝液（付記 17）100mL に溶解したものであり、遮光する。使用直前に過酸化水素水(30)を 40 μ L 添加する。

付記 11 停止液

濃硫酸 56.1mL を正確に量り、水 440mL 中に攪拌冷却しながら溶解し、更に水を加えて 500mL としたもの

付記 12 豚丹毒抗体価測定用抗原

豚丹毒菌 Kyoto 株の菌体から作製した水酸化ナトリウム抽出抗原で、感染防御抗原である 67kDa 蛋白に対する単クローン抗体を用いてイムノブロットィングを行った場合、単一の反応バンドを認めるものであり、3.3.1 の試験により抗原価を測定するとき、ELISA 抗原価は 160 ~ 320 単位/mL を示す。

付記 13 参照陽性血清

豚丹毒菌 Kyoto 株の菌体から作製した水酸化ナトリウム抽出抗原をモルモットに免疫して得られた血清で、ELISA 抗体価 400 ~ 800 倍を示すもの

付記 14 参照陰性血清

豚丹毒菌 Kyoto 株の菌体から作製した水酸化ナトリウム抽出抗原に対する抗体陰性のモルモット血清で、ELISA 抗体価 100 倍未満を示すもの

付記 15 抗原吸着プレート

豚丹毒抗体価測定用抗原を炭酸緩衝液で 100 倍に希釈し、ELISA 用プレート（U字型）の各穴に 100 μ L ずつ加え、2 ~ 5 $^{\circ}$ C で一夜吸着させる。その後、希釈・洗浄液で洗浄し、2 w/v % 牛血清アルブミン溶液を各穴に 250 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C 1 時間感作し、更に希釈・洗浄液で洗浄したもの

付記 16 標識抗体 2

西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗モルモット IgG 抗体を希釈・洗浄液で至適濃度に希釈したもの

付記 17 リン酸クエン酸緩衝液

1,000mL 中

無水クエン酸 4.67 g

リン酸水素二ナトリウム十二水和物 19.95 g

水 残量

pH を 5.0 に調整する。