

# 豚アクチノバシラス・プルロニューモニエ（1・2・5型）感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

平成 22 年 7 月 12 日（告示第 1038 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アクチノバシラス・プルロニューモニエ 1 型菌、2 型菌及び 5 型菌の培養上清濃縮液を不活化した後、混合し、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 アクチノバシラス・プルロニューモニエ 1 型菌

##### 2.1.1.1 名称

アクチノバシラス・プルロニューモニエ 1 型菌 Y-1-1 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.1.2 性状

細胞毒素 Apx I 及び Apx II を産生する。感受性豚に接種すると、胸膜炎を惹起する。

##### 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、適当と認められた平板培地及び液状培地で増殖させ、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、適当と認められた平板培地及び液状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、適当と認められた平板培地及び液状培地で増殖する。

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。

#### 2.1.2 アクチノバシラス・プルロニューモニエ 2 型菌

##### 2.1.2.1 名称

アクチノバシラス・プルロニューモニエ 2 型菌 G-4-1 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.2.2 性状

細胞毒素 Apx II 及び Apx III を産生する。感受性豚に接種すると、胸膜炎を惹起する。

##### 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、適当と認められた平板培地及び液状培地で増殖させ、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、適当と認められた平板培地及び液状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、適当と認められた平板培地及び液状培地で増殖する。

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。

#### 2.1.3 アクチノバシラス・プルロニューモニエ5型菌

##### 2.1.3.1 名称

アクチノバシラス・プルロニューモニエ5型菌 E-3-1 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.3.2 性状

細胞毒素 Apx I 及び Apx II を産生する。感受性豚に接種すると、胸膜炎を惹起する。

##### 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、適当と認められた平板培地及び液状培地で増殖させ、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、適当と認められた平板培地及び液状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、適当と認められた平板培地及び液状培地で増殖する。

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

製造に適当と認められた平板培地及び液状培地を用いる。

## 2.3 アクチノバシラス・プルロニューモニエの各型菌原液

### 2.3.1 培養

平板培地で培養した各ワーキングシード菌又はプロダクションシード菌をそれぞれ別の液状培地に接種して培養し、更にそれぞれ液状培地に接種し、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 上清液の採取

培養菌液を遠心し、上清液を採取する。

上清液について、3.3 の試験を行う。

### 2.3.3 不活化

上清液を適当と認められた方法で濃縮し、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

原液を混合し、適当と認められた希釈用液で濃度を調整し、適当と認められた油性アジュバントを加え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、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を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 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

###### 3.2.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で 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

試験用培地（付記 1）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 0.5mL 又は 1 mL ずつを平板混釈培養法により培地 2 枚以上に接種し、37℃で 18 時間培養後、生じた集落数を数える。

###### 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  $5.0 \times 10^8$  個以上でなければならない。

### 3.3 上清液の試験

### 3.3.1 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。

## 3.4 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

検体及び平板培地（付記 2）を用いる。

#### 3.4.2.2 試験方法

検体 0.1mL ずつを 5 枚の培地表面に塗沫し、37℃で 24 時間培養した後、集落の有無を観察する。

#### 3.4.2.3 判定

アクチノバシラス・プルロニューモニエの発育を認めてはならない。

### 3.4.3 酵素抗体反応（以下「ELISA」という。）抗原価測定試験

#### 3.4.3.1 試験材料

##### 3.4.3.1.1 試料

検体を 220nm のメンブランフィルターでろ過滅菌したものを試料とする。

##### 3.4.3.1.2 ELISA 抗原価測定用参照抗原

ELISA 抗原価を測定する検体の血清型に対応する ELISA 抗原価測定用参照抗原（付記 3）を用いる。

##### 3.4.3.1.3 ELISA 抗原価測定用血清

ELISA 抗原価を測定する検体の血清型に対応する ELISA 抗原価測定用陽性血清（付記 4）及び ELISA 抗原価測定用陰性血清（付記 5）を用いる。

#### 3.4.3.2 試験方法

試料及び ELISA 抗原価測定用参照抗原を炭酸緩衝液（付記 6）で 100 倍に希釈後、それぞれ 2 倍階段希釈し、各段階の希釈液を ELISA 用プレート（U字型）の穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、2～5℃で一夜吸着させる。希釈・洗浄液（付記 7）で洗浄後、2 w/v %牛血清アルブミン溶液（付記 8）を各穴に 250  $\mu$  L ずつ加え、37℃で 1 時間反応させる。洗浄後、希釈・洗浄液で 100 倍に希釈した ELISA 抗原価測定用陽性血清及び ELISA 抗原価測定用陰性血清を穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、37℃で 1 時間反応させる。洗浄後、各穴に標識抗体（付記 9）を 100  $\mu$  L ずつ加え、37℃で 1 時間反応させる。洗浄後、各穴に基質液（付記 10）を 100  $\mu$  L ずつ加え、遮光して 30℃で 30 分間反応させた後、停止液（付記 11）を 50  $\mu$  L ずつ加えて反応を停止させる。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。

#### 3.4.3.3 判定

ELISA 値が 1.0 以上を示す抗原の最高希釈倍数を ELISA 抗原価とする。

各型菌の検体の ELISA 抗原価は、ELISA 抗原価測定用陽性血清に対して 800 倍以上でなければならない。ELISA 抗原価測定用陰性血清に対して 100 倍以下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、ELISA 抗原価測定用陽性血清に対して 800～1600 倍、ELISA 抗原価測定用陰性血清に対して 100 倍以下でなければならない。

### 3.4.4 リポポリサッカライド（以下「LPS」という。）含有量測定試験

#### 3.4.4.1 試験材料

##### 3.4.4.1.1 試料

検体を ELISA 抗原価が 800 倍となるように調製したものを試料とする。

#### 3.4.4.2 試験方法

ケトデオキシオクトネート（以下「KDO」という。）の測定により、検体中の LPS 含有量の測定を行う。

試料 0.1mL に 0.25mol/L 硫酸 0.1mL を加え、20 分間煮沸する。常温まで冷却し、0.1mol/L 過ヨウ素酸溶液 0.1mL を加え、55 °C で 10 分間反応させる。更に、4 w/v % 亜硝酸ナトリウム・塩酸液（付記 12）0.4mL と 0.6w/v % チオバルビツール酸溶液 1.6mL を加え、20 分間煮沸した後、直ちにブタノール・塩酸液（付記 13）2 mL を加え振盪する。1,720 G で 10 分間遠心し、発色したブタノール層を採取する。KDO 標準溶液についても同様に操作する。採取したブタノール層を分光光度計（波長 552nm 又は 508nm）を用いて吸光度値を測定する。

#### 3.4.4.3 判定

KDO 標準溶液の吸光度値から検量線を作成し、試料の吸光度値から LPS 含有量を算出する。

検体を ELISA 抗原価が 800 倍となるように調製した場合、その LPS 含有量は、1 mL 中 200  $\mu$ g 以下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。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 試験材料

###### 3.5.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 3.5.4.1.2 試験動物

約 30 日齢の豚を用いる。

###### 3.5.4.2 試験方法

試験動物の 3 頭を試験群、1 頭を対照群とする。

注射材料 1 mL ずつを試験群の頸側部筋肉内に注射し、対照群とともに 2 週間観察する。

###### 3.5.4.3 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。注射により一過性の発熱、元気・食欲の消失及び注射局所の小さな発赤を認めても、3 日以内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 補体結合反応（以下「CF」という。）用抗原

アクチノバシラス・プルロニューモニエ 1 型菌、2 型菌及び 5 型菌のそれぞれで調製した CF 用抗原（付記 14）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 週間間隔で 2 回、試験群の大腿部筋肉内に注射する。第 2 回目の注射後 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、CF を行う。

試験群と対照群の血清、参照陽性血清（付記 15）及び参照陰性血清（付記 16）をそれぞれゼラ

チン・ペロナール緩衝食塩液（付記 17、以下「GVB」という。）で4倍に希釈した後、GVBで2倍階段希釈する。各希釈液 25  $\mu$  L に CF 用抗原 25  $\mu$  L を加えた後、2 単位に調製した補体 50  $\mu$  L を加えて 4  $^{\circ}$ C で一夜処理する。3 vol % 羊血球浮遊液と 3 単位の溶血素とを等量混和後、37  $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた感作血球液 50  $\mu$  L を加え、37  $^{\circ}$ C で 30 分間反応させる。

#### 3.5.5.3 判定

50 % 溶血阻止を示す血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群では、それぞれの CF 用抗原に対する抗体価の幾何平均値は、32 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、いずれも 4 倍以下でなければならない。また、参照陽性血清のそれぞれの CF 用抗原に対する抗体価は 32 倍、参照陰性血清のそれぞれの CF 用抗原に対する抗体価は 4 倍以下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 試験用培地

1,000mL 中

カゼイン製ペプトン	15	g
ダイズ製ペプトン	5	g
塩化ナトリウム	5	g
寒天	12	g
水	残	量

加熱溶解後、pH を 7.1 ~ 7.5 に調整し、121  $^{\circ}$ C で 20 分間高圧滅菌する。

約 50  $^{\circ}$ C に冷却後、ろ過滅菌した 2 w/v %  $\beta$  - ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド〔還元型〕（以下「 $\beta$ -NAD」という。）を 2 mL 加える。

#### 付記 2 平板培地

1,000mL 中

鶏肉ブイヨン	100	mL
カザミノ酸	5	g
ダイズ製ペプトン	5	g
イーストエキストラクト	5	g
塩化ナトリウム	5	g
寒天	12	g
水	残	量

加熱溶解後、121  $^{\circ}$ C で 20 分間高圧滅菌する。約 50  $^{\circ}$ C に冷却した後、ろ過滅菌した 2 w/v %  $\beta$ -NAD を 2 mL 加える。

#### 付記 3 ELISA 抗原価測定用参照抗原

アクチノバシラス・プルロニューモニエ 1 型菌、2 型菌及び 5 型菌の各製造用株の培養上清濃縮液からそれぞれ調整した抗原で、アクチノバシラス・プルロニューモニエ 1 型菌、2 型菌及び 5 型菌の莢膜抗原に対する各モノクローナル抗体を用いてイムノプロットティングをするとき、それぞれの血清型に特異的な反応を認める。また、それぞれの抗原と Apx I、Apx II、Apx III に対する各モノクローナル抗体を用いてイムノプロットティングをするとき、1 型菌及び 5 型菌抗原にあつては、Apx I 及び Apx II に対するモノクローナル抗体に、2 型菌抗原にあつては、Apx II 及び Apx III に対するモノクローナル抗体に反応を認める。抗原とこれに対応

する血清型の ELISA 抗原価測定用陽性血清を用いて 3.4.3.2 の試験により ELISA 抗原価を測定するとき、各抗原の ELISA 抗原価は、800 倍～1,600 倍を示す。

付記 4 ELISA 抗原価測定用陽性血清

アクチノバシラス・プルロニューモニエ 1 型菌、2 型菌及び 5 型菌の各製造用株をそれぞれ SPF 豚に接種して得られた各血清型に対する抗血清であって、それぞれの ELISA 抗原価測定用陽性血清に対応する CF 抗原を用いて、3.5.5.2 の試験により CF 抗体価を測定するとき、各血清の CF 抗体価が 32 倍となるように調整する。小分けして凍結乾燥し、保存する。

付記 5 ELISA 抗原価測定用陰性血清

アクチノバシラス・プルロニューモニエに対する抗体陰性の豚から得られた血清であって、アクチノバシラス・プルロニューモニエ 1 型菌、2 型菌又は 5 型菌 CF 抗原を用いて、3.5.5.2 の試験により CF 抗体価を測定するとき、各血清型に対する CF 抗体価は 4 倍未満を示す。小分けして凍結乾燥し、保存する。

付記 6 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℃で保存し、1 週間以内に使用する。

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 1.725g  
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

西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗豚 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

o-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 18）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(30)を 40  $\mu$  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、さらに水を加えて 500mL としたもの

付記 12 4 w/v % 亜ヒ酸ナトリウム・塩酸液

亜ヒ酸ナトリウムを 4 w/v % の割合で 0.5mol/L 塩酸に溶解したもの

付記 13 ブタノール・塩酸液

ブタノールに濃塩酸を 5 vol % の割合で混合したもの

付記 14 CF 用抗原

アクチノバシラス・プルロニューモニエ 1 型菌 Shope 4074 株、2 型菌 S1536 株及び 5 型菌 K-17 株又はこれらの各型菌と同等の株を、それぞれ平板培地に接種し 37 °C で 20 時間培養する。これらの菌体をリン酸緩衝食塩液（付記 19）に浮遊し、McFaland 混濁管 No.4 の濃度にそれぞれ調整したもの又はこれらと同等のものであり、4 °C で保存し、使用時に GVB で 16 倍に希釈して使用する。

付記 15 参照陽性血清

アクチノバシラス・プルロニューモニエ 1 型菌、2 型菌及び 5 型菌の製造用株又はこれらの各型菌と同等の株をそれぞれモルモットに免疫して得られた抗血清で、それぞれの血清に対応する CF 抗原を用いて、3.5.5.2 の試験により抗体価を測定するとき、CF 抗体価が 32 倍となるように調整する。小分けして凍結し、保存する。

付記 16 参照陰性血清

アクチノバシラス・プルロニューモニエに対する抗体陰性のモルモットから得られた血清で、1 型菌、2 型菌又は 5 型菌 CF 抗原を用いて 3.5.5.2 の試験により抗体価を測定するとき、CF 抗体価が 4 倍以下を示す。小分けして凍結し、保存する。

付記 17 ゼラチン・ベロナール緩衝食塩液（GVB）

A 液 ベロナール緩衝食塩液

1,000mL 中

塩化ナトリウム 42.50 g

バルビタール 2.88 g

バルビタールナトリウム 1.88 g

水 残 量

加温溶解後、冷却して 1,000mL とする。

B 液 2 w/v % ゼラチン液

1,000mL 中

精製ゼラチン 20 g

水 残 量

加温溶解する。

使用時に、A 液 400mL、B 液 100mL、0.03mol/L 塩化カルシウム液 10mL、0.1mol/L 塩化マグネシウム液 10mL を混合し、水を加えて 2,000mL とする。

付記 18 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。

付記 19 リン酸緩衝食塩液

1,000mL 中

塩化ナトリウム 8.0 g

塩化カリウム 0.2 g

リン酸水素二ナトリウム十二水和物 2.9 g

リン酸二水素カリウム 0.2 g

水 残 量

pH を 6.9 ~ 7.1 に調製する。