

# 豚ストレプトコッカス・スイス（2型）感染症（酢酸トコフェロールアジュバント加）不活化ワクチン（シード）

平成27年9月24日（告示第2146号）新規追加

## 1 定義

シードロット規格に適合したストレプトコッカス・スイス2型菌の培養菌液を不活化し、酢酸トコフェロー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

ストレプトコッカス・スイス P1/7 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、髄膜炎及び関節炎を惹起する。

#### 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、血液寒天基礎培地 No. 2（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、血液寒天基礎培地 No. 2 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、血液寒天基礎培地 No. 2 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

0.1w/v %システイン加トッドヘヴィット液体培地（付記2）及び0.1w/v %システイン加1w/v %グルコース加トッドヘヴィット液体培地（付記3）、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

0.1w/v %システイン加トッドヘヴィット液体培地で培養したプロダクションシード菌を0.1w/v %システイン加1w/v %グルコース加トッドヘヴィット液体培地に接種し、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 原液

不活化菌液を遠心して得た菌をリン酸緩衝食塩液に浮遊し、濃度調整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

原液に酢酸トコフェロールアジュバントを添加し、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、ストレプトコッカス・スイス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

#### 3.2.2.1 夾雑菌否定試験

##### 3.2.2.1.1 試験材料

検体及びトッドヘヴィット寒天培地（付記4）を用いる。

##### 3.2.2.1.2 試験方法

検体の 0.1mL ずつを 2 枚の培地に接種し、37℃で 24 時間培養する。

##### 3.2.2.1.3 判定

いずれの培地上にもストレプトコッカス・スイス以外の集落を認めてはならない。

### 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

検体及びトッドヘヴィット寒天培地を用いる。

##### 3.3.1.2 試験方法

検体の 0.1mL を培地に接種し、37℃で 48 時間培養する。

##### 3.3.1.3 判定

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。

### 3.5 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。

#### 3.5.2 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 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 0.014vol %以下でなければならない。

#### 3.5.5 酢酸トコフェロール定量試験

日本薬局方のトコフェロール酢酸エステル定量法により試験するとき、酢酸トコフェロールの含有量は、70～80mg/mL でなければならない。

#### 3.5.6 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をするとき、適合しなければならない。

#### 3.5.7 力価試験

##### 3.5.7.1 試験材料

##### 3.5.7.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.5.7.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の4週齢の鶏で、3週齢時のストレプトコッカス・スイス2型菌に対する抗体価が20倍以下のものを用いる。

##### 3.5.7.1.3 酵素抗体反応（以下この項において「ELISA」という。）用抗原

ELISA 用抗原（付記5）を用いる。

##### 3.5.7.2 試験方法

試験動物の10羽を試験群、10羽を対照群とする。

注射材料 0.5mL ずつを、試験群の脚部筋肉内に4週間隔で2回注射し、第2回目の注射後14日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。

抗原吸着プレート（付記6）の各穴に血清希釈液（付記7）を100 $\mu$ Lずつ加える。H行を除く各行の1列目に、あらかじめ血清希釈液で10倍に希釈した各個体の血清を100 $\mu$ Lずつ加え、1列目から11列目まで2倍階段希釈し、最後の列から100 $\mu$ Lを除去する。H行の1列目には、あらかじめ血清希釈液で10倍に希釈した参照陽性血清（付記8）を100 $\mu$ L加え、1列目から11列目まで2倍階段希釈し、最後の列から100 $\mu$ Lを除去する。また、各行の12列目はブランクとする。37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた後、水で3回洗浄する。次に、各穴に標識抗体（付記9）を100 $\mu$ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた後、水で3回洗浄する。各穴に基質液（付記10）を100 $\mu$ Lずつ加え、遮光して室温で15分間反応させる。各穴に2 mol/L 硫酸を50 $\mu$ Lずつ加えて反応を停止させ、波長450nmで吸光度を測定する。

##### 3.5.7.3 判定

参照陽性血清のH行の6列目（640倍）の吸光度以上の値を示した血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群の抗体価の幾何平均値は、588倍以上でなければならない。この場合、対照群の抗体価の幾何平均値は、120倍以下でなければならない。この場合、対照群の抗体価の幾何平均値は、120倍以下でなければならない。参照陽性血清のH行の6列目（640倍）の吸光度は、ブランクの平均吸光度の2倍以上を示さなければならない。

### 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 血液寒天基礎培地 No. 2

1,000mL 中

トリプトン 15.0 g

肝消化物末 2.5 g

酵母エキス 5.0 g

塩化ナトリウム 5.0 g

寒天 12.0 g

水 残 量

pH を 7.4 に調整し、高圧蒸気滅菌する。

付記 2 0.1w/v %システイン加トッドヘヴィット液体培地

トッドヘヴィット液体培地（付記 11）に 220nm のメンブランフィルターでろ過した L-システインを 0.1w/v %で加えたもの

付記 3 0.1w/v %システイン加 1 w/v %グルコース加トッドヘヴィット液体培地

0.1w/v %システイン加トッドヘヴィット液体培地に高圧滅菌した D-グルコースを 1 w/v %で加えたもの

付記 4 トッドヘヴィット寒天培地

トッドヘヴィット液体培地に寒天を 1.5w/v %で加えたもの

付記 5 ELISA 用抗原

ストレプトコッカス・スイスの製造用株の濃縮菌液を超音波処理した後、遠心分離し、たん白濃度を 4.8mg/mL に調整したもの

付記 6 抗原吸着プレート

ELISA 用抗原を抗原希釈液（付記 12）で 1,000 倍希釈し、96 穴プレートの各穴に 100  $\mu$  L ずつ分注し、4°C の暗所で 16 時間静置する。その後、液を捨て、各穴にブロッキング液（付記 13）を 200  $\mu$  L ずつ加え、室温で 1 時間以上静置した後、水で 3 回洗浄したもの

付記 7 血清希釈液

1,000mL 中

リン酸水素二ナトリウム二水和物 35.58 g

塩化ナトリウム 11.69 g

ポリソルベート 80 0.50 g

水 残 量

加温溶解した後、カオリン処理 30w/v %牛血清アルブミンを 3.3mL 加えて溶解し、pH を 7.0 に調整する。ろ過滅菌して保存する。

付記 8 参照陽性血清

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏をストレプトコッカス・スイス 2 型菌で免疫して得た血清であって、ELISA により抗体価を測定するとき、抗体価が 640 倍を示すもの

付記9 標識抗体

ペルオキシダーゼ標識抗鶏 IgG 抗体を参照陽性血清の抗体価が 640 倍を示すように血清希釈液で希釈して調整したもの

付記10 基質液

UP 緩衝液 (付記 14) ・ 0.6w/v % TMB 液 (付記 15) ・ 水を 1.5 : 0.2 : 15 の割合で混合したもの

付記11 トッドヘヴィット液体培地

1,000mL 中

ラブ・レムコ粉末	10.0 g
トリプトン	20.0 g
ブドウ糖	2.0 g
炭酸水素ナトリウム	2.0 g
塩化ナトリウム	2.0 g
リン酸水素二ナトリウム	0.4 g
水	残量

pH を 7.2 に調整し、高圧蒸気滅菌する。

付記12 抗原希釈液

1,000mL 中

リン酸二水素ナトリウム二水和物	1.43 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	12.10 g
塩化ナトリウム	8.50 g
水	残量

pH を 7.2 に調整した後、121 °C で 15 分間高圧滅菌する。

付記13 ブロッキング液

牛血清アルブミンを 1 w/v % になるように抗原希釈液で溶解したもの

付記14 UP 緩衝液

尿素過酸化水素 140mg を TMB 基質液 (付記 16) 100mL に溶解したもの

付記15 0.6w/v % TMB 液

テトラメチルベンジジン (TMB) 6 g をジメチルスルホキシド 1,000mL に溶解したもの

付記16 TMB 基質液

酢酸ナトリウム三水和物 13.6g を 80mL の水に溶解し、1.5mol/L のクエン酸一水和物で pH を 5.5 に調整し、水を加え 100mL とした後、ろ過滅菌したもの