

豚ボルデテラ感染症精製・豚パスツレラ症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

平成 24 年 7 月 4 日（告示第 1622 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ボルデテラ・ブロンキセプチカの培養上清を濃縮し、部分精製したものと及び同規格に適合したパスツレラ・ムルトシダの培養上清を濃縮し、遠心して得られた上清を不活化したものを混合し、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 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

2.1.1.1 名称

ボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌 GCK-1 株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

ボルデー・ジャング培地上に隆起した小円形の集落を形成し、 β 溶血性を示す。また、K 抗原を有し、既知のボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌の免疫血清によって特異的に凝集される。

生後 7 日齢以内の豚に点鼻接種すると、豚萎縮性鼻炎を起こす。生菌又は超音波処理菌をモルモットの皮内に注射すると、注射部位に出血及び壊死を起こす。

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、ボルデー・ジャング培地（付記 1）又は適当と認められた平板培地で増殖させ、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、凍結して -70°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

マスターシード菌について、3.1.1.1 及び 3.1.1.2 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、ボルデー・ジャング培地又は適当と認められた平板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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2.1 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、ボルデー・ジャング培地又は適当と認められた平板培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して -70°C 以下又は凍結乾燥して 5°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、3.1.3.1 の試験を行う。

2.1.2 パスツレラ・ムルトシダ

2.1.2.1 名称

パスツレラ・ムルトシダ B-45 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

鶏血清加ハートインフュージョン寒天培地上に粘稠性のある円形の集落を形成する。

生菌を鼻粘膜に酢酸を前処理した約3週齢の豚に点鼻接種すると、豚萎縮性鼻炎を起こす。

生後7日以内の豚に点鼻接種すると、鼻甲介萎縮を起こす。

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、適当と認められた平板培地で増殖させ、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、凍結して -70°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

マスターシード菌について、3.1.1.1 及び 3.1.1.2 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で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結して -70°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2.1 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°C 以下又は凍結乾燥して 5°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、3.1.3.1 の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.2.2 パスツレラ・ムルトシダ

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

2.3.1.1 培養

平板培地で培養したプロダクションシード菌を液状培地に接種し、増菌培養したものを、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、3.2.1、3.2.2 及び 3.2.3 の試験を行う。

2.3.1.2 原液（部分精製）

培養菌液を遠心分離して得られた上清液を濃縮し、濃縮抗原液とする。濃縮抗原液からショ糖密度勾配により抗原画分を取り出し、ゲルろ過して抗原成分を採取し、適当と認められた保存剤を添加したものを原液とする。

原液について、3.4.1 の試験を行う。

2.3.2 パスツレラ・ムルトシダ

2.3.2.1 培養

平板培地で培養したプロダクションシード菌を液状培地に接種し、増菌培養したものを、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、3.2.1 及び 3.2.4 の試験を行う。

2.3.2.2 抗原液

培養菌液を遠心分離して得られた上清液を濃縮した後、更に遠心分離して得られた上清を抗原液とする。

抗原液について、3.3 の試験を行う。

2.3.2.3 不活化

抗原液にホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加えて不活化したものを原液とする。

原液について、3.4.2 の試験を行う。

2.4 最終バルク

ボルデテラ・ブロンキセプチカ原液とパスツレラ・ムルトシダ原液を混合し、適当と認められた希釈液で濃度調整した後、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 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、ボルデテラ・ブロンキセプチカ以外の菌の発育を認めてはならない。

3.1.1.2.2 パスツレラ・ムルトシダ

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、パスツレラ・ムルトシダ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

3.1.1.2.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.3 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

3.2.1.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

一般試験法の無菌試験法 1 を準用して試験するとき、ボルデテラ・ブロンキセプチカ以外の菌の発育を認めてはならない。

3.2.1.2 パスツレラ・ムルトシダ

一般試験法の無菌試験法 1 を準用して試験するとき、パスツレラ・ムルトシダ以外の菌の発育を認めてはならない。

3.2.2 総菌数試験

3.2.2.1 試験材料

3.2.2.1.1 試料

検体を生理食塩液で 10 倍希釈したものを試料とする。

3.2.2.1.2 グルタルアルデヒド固定赤血球液

牛赤血球をグルタルアルデヒドで固定後、リン酸緩衝食塩液（以下この項において「PBS」という。）で赤血球数が 1 mL 中 1×10^8 個となるように濃度を調整したものをを用いる。

3.2.2.2 試験方法

試料とグルタルアルデヒド固定赤血球液とを等量混合後、この混合液の塗抹標本を作成し、固定後ギムザ染色したものを鏡検する。数視野にわたって、少なくとも 500 個の赤血球を計測した際の菌数を測定し、赤血球数と菌数との比率を算出する。混合液 1 mL 中の赤血球数、赤血球数と菌数との比率及び検体の希釈倍率から総菌数を算出する。

3.2.2.3 判定

検体の総菌数は、1 mL 中 2×10^{10} 個以上でなければならない。

3.2.3 赤血球凝集（以下この項において「HA」という。）活性測定試験

3.2.3.1 試験材料

3.2.3.1.1 試料

検体 10mL を遠心分離して得た菌体を、10mL の生理食塩液に再浮遊させたものを試料とする。

3.2.3.1.2 2 vol % 牛赤血球浮遊液

健康な成牛からヘパリンで凝固阻止して採取した赤血球で、ボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌に強く凝集する性状を示す赤血球を、適当と認められた希釈用液に 2 vol % の割合で浮遊させたものをを用いる。

3.2.3.2 試験方法

試料の 25 μ L と 2 vol % 牛赤血球浮遊液 25 μ L をスライドグラス上で混合し、HA 反応を行う。

3.2.3.3 判定

牛赤血球を速やかに凝集しなければならない。

3.2.4 皮膚壊死毒素活性測定試験

3.2.4.1 試験材料

3.2.4.1.1 注射材料

検体を遠心して得た上清を生理食塩液で 2 倍階段希釈し、各段階の希釈液を注射材料とする。

3.2.4.1.2 試験動物

体重約 500g のモルモットを用いる。

3.2.4.2 試験方法

それぞれの注射材料 0.1mL を試験動物 1 匹ずつの背部皮内に注射し、2 日間観察する。

3.2.4.3 判定

直径 1 cm 以上の皮膚壊死像を認めた注射材料の最高希釈倍数を皮膚壊死毒素活性価とする。

検体の皮膚壊死毒素活性価は、32 倍以上でなければならない。

3.3 抗原液の試験

3.3.1 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。

3.3.2 皮膚壊死毒素活性測定試験

3.2.4 を準用して試験するとき、検体の皮膚壊死毒素活性価は、1,024 倍以上でなければならない。

3.4 原液の試験

3.4.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

3.4.1.1 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。

3.4.1.2 生菌否定試験

3.4.1.2.1 試験材料

3.4.1.2.1.1 試料

検体を試料とする。

3.4.1.2.1.2 培地

ボルデー・ジャング培地又は適当と認められた培地を用いる。

3.4.1.2.2 試験方法

検体 0.1mL ずつを培地 2 枚以上にそれぞれ塗抹接種し、37℃で 48 時間培養する。

3.4.1.2.3 判定

ボルデテラ・ブロンキセプチカの発育を認めてはならない。

3.4.1.3 HA 価測定試験

3.4.1.3.1 試験材料

3.4.1.3.1.1 試料

検体を生理食塩液で 2 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.4.1.3.2 試験方法

試料 0.5mL に 2 vol % 牛赤血球浮遊液 50 μ L を加えて振とう混合し、5 時間静置した後、判定する。

3.4.1.3.3 判定

赤血球の凝集を認めた試料の最高希釈倍数を HA 価とする。

検体の HA 価は、1,024 倍以上でなければならない。

3.4.1.4 皮膚壊死毒素活性否定試験

3.4.1.4.1 試験材料

3.4.1.4.1.1 注射材料

検体を HA 価が 1,024 倍となるように濃度を調整したものを注射材料とする。

3.4.1.4.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

3.4.1.4.2 試験方法

注射材料 0.1mL ずつを試験動物 3 匹の背部皮内に 4 点注射し、2 日間観察する。

3.4.1.4.3 判定

全ての試験動物の注射部位に壊死病変を認めてはならない。

3.4.1.5 たん白量測定試験

3.4.1.5.1 試験材料

3.4.1.5.1.1 試料

検体の HA 価が 1,024 倍となるように濃度を調整し、更に適当と認められた希釈用液で希釈したものを試料とする。

3.4.1.5.2 試験方法

試料 0.1mL の吸光度を Lowry 法又は適当と認められた方法により測定する。

3.4.1.5.3 判定

牛血清アルブミンを用いて作成した検量線より、試料のたん白量を算出する。

検体のたん白量は、1 mL 中 250 ~ 650 μ g の範囲でなければならない。

3.4.1.6 異種たん白混入否定試験

3.4.1.6.1 試験材料

3.4.1.6.1.1 試料

検体を HA 価が 512 倍となるように適当と認められた希釈用液で濃度を調整したものを試料とする。

3.4.1.6.2 試験方法

試料及び 1.2w/v % 寒天と抗牛全血清（ゲル内沈降反応で抗体価 32 倍以上）を用い、適当と認められた方法によりゲル内沈降反応を行う。

3.4.1.6.3 判定

試料と抗牛全血清との間に沈降線の形成を認めてはならない。

3.4.2 パスツレラ・ムルトシダ

3.4.2.1 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。

3.4.2.2 不活化試験

3.4.2.2.1 試験材料

3.5.2.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.4.2.2.1.2 試験動物

体重約 500g のモルモットを用いる。

3.4.2.2.2 試験方法

剃毛した試験動物 3 匹の背部皮内に、注射材料 0.1mL を 4 点注射し、7 日間観察する。

3.4.2.2.3 判定

全ての試験動物の注射部位に壊死病変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懸濁液でなければならず、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、0.1vol % 以下でなければならない。

3.5.5 安全試験

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

約 60 日齢の豚を用いる。

3.5.5.2 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 頭に注射材料 1 mL を、他の 1 頭に 3 mL をそれぞれ頸側部筋肉内に 3 週間隔で 2 回注射し、対照群と共に、第 2 回目注射後 3 週間まで観察する。

3.5.5.3 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を認めても 3 日以内に回復しなければならず、注射局所に腫脹又は硬結を認めても体表から 2 cm 以上隆起してはならない。

3.5.6 力価試験

3.5.6.1 豚ボルデテラ感染症力価試験

3.5.6.1.1 試験材料

3.5.6.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.6.1.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

3.5.6.1.1.3 HA 抗原

ボルデテラ・ブロンキセプチカ HA 抗原（付記 2）を用いる。

3.5.6.1.2 試験方法

試験動物の 10 匹を試験群、3 匹を対照群とする。

注射材料 0.1mL を 4 週間隔で 2 回、試験群の大腿部筋肉内に注射する。第 2 回目注射後 2 週目に試験群及び対照群から得られた各個体の血清を用いて、赤血球凝集抑制（以下この項において「HI」という。）試験を行う。

血清 1 容に RDE 3 容を加え、37℃で 18 時間感作した後、56℃で 30 分間加温して血清を非働化する。V 字型マイクロプレートを用いて血清 25 μ L を PBS で 2 倍階段希釈する。各希釈血清に 4 単位の HA 抗原 25 μ L を加えて振とうした後、20 分間静置する。更に 0.4vol % 牛赤血球浮遊液を 50 μ L ずつ加えて振とうした後、5 時間静置して赤血球凝集の有無を観察する。

3.5.6.1.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数を HI 抗体価とする。

試験群では、80 % 以上が HI 抗体価 32 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全て HI 抗体価 8 倍未満でなければならない。

3.5.6.2 豚パスツレラ症力価試験

3.5.6.2.1 試験材料

3.5.6.2.1.1 試験動物

3.5.6.1 の試験に用いた動物を用いる。

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

パスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素（以下この項において「PMT」という。）抗原（付記 3）を用いる。

3.5.6.2.2 試験方法

3.5.6.1 の試験最終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。試験群及び対照群の各血清、参照陽性血清（付記 4）及び参照陰性血清（付記 5）を希釈・洗浄液（付記 6）で 2 段階希釈したものを、PMT 抗原吸着プレート（付記 7）の各穴に 100 μ L ずつ加え、30℃で 1 時間感作する。希釈・洗浄液で洗浄した後、標識抗体（付記 8）を各穴に 100 μ L ずつ加え、30℃で 30 分間感作する。希釈・洗浄液で洗浄した後、基質液（付記 9）を各穴に 100 μ L ずつ加え、遮光して 30℃で 30 分間反応させる。停止液（付記 10）を各穴に 50 μ L ずつ加え、反応を停止させる。主波長 492nm 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。

3.5.6.2.3 判定

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

試験群では、抗 PMT 抗体価の幾何平均値が 32 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全て 8 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 2 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 ボルデー・ジャング培地

1,000mL 中

ボルデー・ジャング・アガーベース

30 g

グリセリン

10 g

水

残 量

加温溶解後、121 °Cで 15 分間高圧滅菌する。約 50 °Cに冷却した後、牛胎子血清を 10vol % となるように添加する。

付記 2 ボルデテラ・ブロンキセプチカ HA 抗原

牛赤血球に対する凝集活性を有するボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌をボルデー・ジャング培地に接種して 37 °Cで 20 時間培養し、発育した菌を PBS で 3 回遠心洗浄した後、50vol %グリセリン加 PBS に浮遊させ、HA 試験を行い、HA 価が 80 ~ 320 倍になるように濃度を調整したもの。

付記 3 PMT 抗原

パスツレラ・ムルトシダ B-45 株の培養上清を限外ろ過により濃縮した後、ハイドロキシアパタイトカラムで分画し、ホルマリンで不活化して得られた皮膚壊死毒素活性を持つ抗原であって、B-45 株培養上清免疫モルモット血清を用いてウェスタンブロッティングを行うと、150kDa 付近に単一のバンドを認め、たん白量を測定するとき、30 ~ 100 μ g/mL を示すもの。

付記 4 参照陽性血清

パスツレラ・ムルトシダ B-45 株の培養上清濃縮液をモルモットに免疫して得られた血清であって、抗 PMT 抗体価 32 ~ 128 倍を示すもの。

付記 5 参照陰性血清

健康なモルモットから採血した血清で、抗 PMT 抗体価 8 倍未満を示すもの。

付記 6 希釈・洗浄液

1,000mL 中

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
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 7 PMT 抗原吸着プレート

PMT 抗原を炭酸緩衝液（付記 11）でたん白量 0.005 ~ 0.01mg/mL に希釈し、ELISA 用プレート（U字型）の各穴に 100 μ L ずつ加え、4 °Cで 18 時間以上感作させた後、希釈・洗浄液で洗浄し、2 w/v %牛血清アルブミン溶液（付記 12）を各穴に 250 μ L ずつ加え、30 °Cで 1 時間感作した後、希釈・洗浄液で洗浄したもの。

付記 8 標識抗体

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・洗浄液で希釈したもの。

付記 9 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 13）100mL に溶解し、

遮光したものに、使用直前に過酸化水素(30)を 0.04mL 添加したもの。

付記 10 停止液

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

付記 11 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 に調整し、4 °C に保存する。1 週間以内に使用する。

付記 12 2 w/v % 牛血清アルブミン溶液

牛血清アルブミン 2 g を希釈・洗浄液 100mL で使用直前に溶解したもの。

付記 13 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。