

# パストツレラ・ムルトシダ（アジュバント加）トキシイド （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パストツレラ・ムルトシダを培養して得た皮膚壊死毒素を無毒化し、アルミニウムゲルアジュバントを添加したトキシイドである。

## 2 製法

### 2.1 製造用株

#### 2.1.1 名称

パストツレラ・ムルトシダ S70 株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.2 性状

血液寒天培地（付記1）及びデキストロース・スターチ寒天培地（付記2）によく発育し、蛍光色のムコイド型集落を形成する。溶血性は、示さない。生菌を初生豚の鼻腔内に頻回投与すると、鼻甲介骨の萎縮を起こす。また、本菌の細胞破碎抽出液を初生から6か月齢豚の筋肉内に注射すると鼻甲介骨の萎縮を起こす。

#### 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、デキストロース・スターチ寒天培地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、デキストロース・スターチ寒天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、デキストロース・スターチ寒天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

製造用培地（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

プロダクションシード菌を製造用培地又は適当と認められた培地に接種し、培養したものを更に製造用培地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 精製

培養菌液を遠心又は膜ろ過によって濃縮した後、菌体を破碎処理及び抽出処理して得られた粗毒素液を適当と認められた方法で精製したものを毒素液とする。

毒素液について、3.3 の試験を行う。

#### 2.3.3 無毒化

毒素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無毒化したものを無毒化原液とする。

無毒化原液について、3.4.1 の試験を行う。

#### 2.3.4 アジュバントの添加

無毒化原液に適量のアルミニウムゲルアジュバントを加え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

原液を混合し pH 調整を行い、適量のアルミニウムゲルアジュバントを加え、濃度調整をし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

###### 3.1.1.2.1 試験材料

検体及びデキストロース・スターチ寒天培地を用いる。

###### 3.1.1.2.2 試験方法

検体の 0.1mL ずつをデキストロース・スターチ寒天培地 8 枚に塗抹し、4 枚ずつを 22 °C 及び 31 °C で 7 日間培養する。

###### 3.1.1.2.3 判定

パストレラ・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 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。

#### 3.3 毒素液の試験

##### 3.3.1 毒素定量試験

###### 3.3.1.1 試験材料

#### 3.3.1.1.1 注射材料

検体を 15mmol/L リン酸緩衝食塩液（付記 4）で 32 倍及び 48 倍希釈からそれぞれ 2 倍階段希釈したものを注射材料とする。

#### 3.3.1.1.2 試験動物

体重約 350 g のモルモットを用いる。

#### 3.3.1.2 試験方法

試験動物 3 匹を用い、それぞれ毛刈した背部皮内に、注射材料をそれぞれ 0.1mL ずつ適当な間隔を空けて注射する。

#### 3.3.1.3 判定

注射 3 日目に壊死斑を測定し、直径 10mm 以上の皮膚壊死斑を示した最大希釈倍数の逆数を 10 倍したものを 1 mL 当たりの毒素量（モルモット単位）と定義したとき、1 mL 当たりの毒素量が 960 モルモット単位以上のものを適合とする。

### 3.4 原液の試験

#### 3.4.1 無毒化試験

##### 3.4.1.1 試験材料

##### 3.4.1.1.1 注射材料

検体及び 15mmol/L リン酸緩衝食塩液を注射材料とする。

##### 3.4.1.1.2 試験動物

5 週齢の雌マウスを用いる。

##### 3.4.1.2 試験方法

試験動物 10 匹を試験群、10 匹を対照群とする。試験群には注射材料 0.5mL、対照群には 15mmol/L リン酸緩衝食塩液 0.5mL を腹腔内に注射する。注射後 7 日間観察後、体重及び脾重量を測定し、各群の平均相対脾重量（脾重量／体重）を算出する。

##### 3.4.1.3 判定

試験群の平均相対脾重量は、対照群の平均相対脾重量の 90 %を下回ってはならない。

#### 3.4.2 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 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ず、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 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、固有な値でなければならない。

#### 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

一般試験法のホルマリン定量試験法を準用して試験するとき、ホルマリンの含有量は、0.4vol % 以下でなければならない。

#### 3.5.5 アルミニウム定量試験

一般試験法のアルミニウム定量試験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 1.4mg 以下でなければならない。

#### 3.5.6 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、体重測定は、4 日目に行うものとする。

#### 3.5.7 無毒化試験

### 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

体重約 350 g のモルモットを用いる。

### 3.5.7.2 試験方法

注射材料 0.1mL ずつを試験動物 2 匹の背部皮内に注射し、10 日間観察する。

### 3.5.7.3 判定

注射反応は、無視し得る程度以下でなければならず、試験動物は、全て生存しなければならない。

### 3.5.8 力価試験

#### 3.5.8.1 試験材料

##### 3.5.8.1.1 注射材料

水酸化アルミニウムゲル（付記 5）を添加した 9.3mmol/L リン酸緩衝食塩液（付記 6）で試験品を 9 倍に希釈したものを注射材料とする。

##### 3.5.8.1.2 試験動物

5 週齢の雌マウスを用いる。

##### 3.5.8.1.3 攻撃用毒素液

毒素液（付記 7）を用いる。

#### 3.5.8.2 試験方法

試験動物 10 匹以上を試験群とする。

注射材料 0.5mL を 2 週間間隔で 2 回、試験群の腹腔内に注射する。第 2 回注射 2 週間後に、毒素液を約 50LD<sub>50</sub>/0.5mL に調整し、その 0.5mL を試験群の腹腔内に注射して攻撃した後、7 日間観察する。

なお、試験群の攻撃時週齢と同週齢の無処置対照群 10 匹以上を 1 群として、その 3 群以上を用いて、攻撃毒素の LD<sub>50</sub> 値を測定する。

#### 3.5.8.3 判定

試験群では、80 %以上が生存耐過しなければならない。また、攻撃毒素の LD<sub>50</sub> 値は、25 ~ 100 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 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 血液寒天培地

1,000mL 中

ハートインフュージョン寒天

40 g

水

残 量

加温溶解後、121 °C で 15 分間高圧滅菌する。

約 50 °C に冷却後、羊脱線維血液を 5 vol % となるように添加する。

#### 付記 2 デキストロース・スターチ寒天培地

1,000mL 中

デキストロース・スターチ寒天

65 g

水

残 量

加温溶解後、121 °C で 15 分間高圧滅菌する。

付記3 製造用培地

1,000mL 中

ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 27.5g

酵母エキス 5 g

ブドウ糖 3 g

水 残量

加温溶解後、ろ過滅菌又は 121 °C で 15 分間高圧滅菌する。

付記4 15mmol/L リン酸緩衝食塩液 (pH6.6 ~ 7.0)

1,000mL 中

リン酸二水素カリウム 0.88 g

リン酸水素二ナトリウム十二水和物 3.10 g

塩化ナトリウム 7.3 g

水 残量

ろ過滅菌又は 121 °C で 15 分間高圧滅菌する。

付記5 水酸化アルミニウムゲル

水酸化アルミニウムをアルミニウム量換算として 5 ~ 11mg/mL 含むもの

付記6 9.3mmol/L リン酸緩衝食塩液 (pH7.0 ~ 7.5)

1,000mL 中

リン酸二水素ナトリウム二水和物 0.4 g

リン酸水素二ナトリウム十二水和物 2.4 g

塩化ナトリウム 7.4 g

水 残量

ろ過滅菌又は 121 °C で 15 分間高圧滅菌する。

付記7 毒素液

パスツレラ・ムルトシダ S70 株又はこれと同等の壊死毒素を産生する株を、ハートインフュージョン液体培地で 37 °C、18 時間振とう培養し、発育した菌体を遠心により集菌後、元の量の約 1/10 量のリン酸緩衝食塩液に浮遊させ、超音波処理によって菌体を破碎後、その遠心上清をろ過滅菌し、マウスに対する LD<sub>50</sub> 値が 50LD<sub>50</sub>/0.5mL 以上となるように調整したもの