

ボルデテラ・ブロンキセプチカ・パスツレラ・ムルトシダ混合（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
平成27年9月24日（告示第2146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（以下この項において「Bb」という。）及びパスツレラ・ムルトシダ（以下この項において「Pm」という。）をそれぞれ培養して得た皮膚壊死毒素を無毒化した後、混合し、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 Bb

2.1.1.1 名称

Bb S611 株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

グラム陰性の短桿菌であり、I相菌である。ボルデ・ジャング培地（付記1）によく発育し、溶血環をもった真珠様の光沢を有するドーム状の集落を形成する。生菌を3日齢豚の鼻内に投与すると、鼻甲介骨の萎縮を起こす。

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・ジャング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°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・ジャング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°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・ジャング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°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の試験を行う。

2.1.2 Pm

2.1.2.1 名称

Pm S70 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

血液寒天培地（付記2）及びデキストロース・スターチ寒天培地（付記3）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、鼻甲介の萎縮を起こす。

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、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°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、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°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、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°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の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 Bb

2.2.1.1 培地

製造用培地1（付記4）又は製造に適当と認められた培地を用いる。

2.2.2 Pm

2.2.2.1 培地

製造用培地2（付記5）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 Bb

2.3.1.1 培養

プロダクションシード菌を製造用培地1又は製造に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1又は製造に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、3.2.1.1の試験を行う。

2.3.1.2 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、3.3.1.1の試験を行う。

2.3.1.3 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、適当と認められた緩衝液

で希釈又は透析したものを原液とする。

原液について、3.4.1 及び 3.4.2.1 の試験を行う。

2.3.2 Pm

2.3.2.1 培養

プロダクションシード菌を製造用培地 2 又は製造に相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 2 又は製造に相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、3.2.1.2 の試験を行う。

2.3.2.2 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を相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、3.3.1.2 の試験を行う。

2.3.2.3 無毒化

毒素液にホルマリン又は相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、3.4.2.2 の試験を行う。

2.3.2.4 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、3.4.1 の試験を行う。

2.4 最終バルク

各原液を混合し 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 Bb

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、Bb 以外の菌の発育を認めてはならない。

3.1.1.2.2 Pm

3.1.1.2.2.1 試験材料

3.1.1.2.2.1.1 試料

検体を接種材料とする。

3.1.1.2.2.1.2 培地

デキストロース・スターチ寒天培地を用いる。

3.1.1.2.2.2 試験方法

接種材料の 0.1mL ずつを培地 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。

3.1.1.2.2.3 判定

Pm 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

3.1.2.1.1 Bb

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。

3.1.2.1.2 Pm

3.1.1.2.2 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

3.1.3.1.1 Bb

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。

3.1.3.1.2 Pm

3.1.1.2.2 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 Bb

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。

3.2.1.2 Pm

3.1.1.2.2 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 Bb

3.3.1.1.1 試験材料

3.3.1.1.1.1 試料

検体に内標準物質（付記 6）及び SDS 液（付記 7）を 1/20 量ずつ加え、超音波処理したものを試料とする。

3.3.1.1.1.2 標準たん白質

牛血清アルブミンを適当と認められた高速液体クロマトグラフ法用緩衝液で希釈し、内標準物質及び水を 1/20 量ずつ加えたものを標準たん白質とする。標準たん白質は、検量線の作成に用いる。

3.3.1.1.2 試験方法

試料及び標準たん白質を適当と認められた高速液体クロマトグラフ法で測定し、検量線及び適当と認められた計算方法により、検体中の皮膚壊死毒素量（MND/mL）を算出する。

3.3.1.2 Pm

3.3.1.2.1 試験材料

3.3.1.2.1.1 注射材料

検体を 15mmol/L リン酸緩衝食塩液（付記 8）で 2 倍階段希釈し、各段階の希釈液を注射材料とする。

3.3.1.2.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

3.3.1.2.2 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、注射材料の 0.1mL ずつをそれぞれ適当な間隔を空けて注射し、注射後 3 日目に皮膚壊死斑の直径を測定する。

3.3.1.2.3 判定

直径 10mm 以上の皮膚壊死斑を示した検体の最高希釈倍数を 10 倍したもので、1 mL 当たりの毒素量（モルモット単位）を表す。

検体中の 1 mL 当たりの毒素量は、960 モルモット単位以上でなければならない。

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 無毒化試験

3.4.2.1 Bb

3.4.2.1.1 試験材料

3.4.2.1.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.4.2.1.1.2 試験動物

体重約 350 g のモルモットを用いる。

3.4.2.1.2 試験方法

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

3.4.2.1.3 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。

3.4.2.2 Pm

3.4.2.2.1 試験材料

3.4.2.2.1.1 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。

3.4.2.2.1.2 試験動物

5 週齢の雌マウスを用いる。

3.4.2.2.2 試験方法

試験動物 10 匹を試験群とし、10 匹を対照群とする。試験群にあつては検体 0.5mL を、対照群にあつては 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 日間観察した後、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。

3.4.2.2.3 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 % 以上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

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、0.4vol % 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 2.4mg 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、注射後の体重測定は、4 日目とする。

3.5.7 力価試験

3.5.7.1 Bb 感染症力価試験

3.5.7.1.1 試験材料

3.5.7.1.1.1 注射材料

水酸化アルミニウムゲル（付記 9）を添加した 9.3mmol/L リン酸緩衝食塩液（付記 10）で、試験品を 9 倍に希釈したものを注射材料とする。

3.5.7.1.1.2 試験動物

5 週齢の雌マウスを用いる。

3.5.7.1.1.3 攻撃用毒素

Bb 皮膚壊死毒素（付記 11）を用いる。

3.5.7.1.2 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 ずつを 2 週間間隔で 2 回、試験群の腹腔内に注射する。第 2 回目注射 2 週間後、Bb 皮膚壊死毒素を約 50LD₅₀/0.5mL 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、別に、試験群マウスの攻撃時週齢と同週齢の無処置マウス 10 匹以上を 1 群として、その 3 群以上を用いて、攻撃に用いた毒素の LD₅₀ 値を測定する。

3.5.7.1.3 判定

試験群においては、70 %以上が耐過生存しなければならない。この場合、攻撃に用いた毒素の LD₅₀ 値は、25 ~ 150 でなければならない。

3.5.7.2 Pm 感染症力価試験

3.5.7.2.1 試験材料

3.5.7.2.1.1 注射材料

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

3.5.7.2.1.2 試験動物

5 週齢の雌マウスを用いる。

3.5.7.2.1.3 攻撃用毒素

Pm 皮膚壊死毒素（付記 12）を用いる。

3.5.7.2.2 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 ずつを 2 週間間隔で 2 回、試験群の腹腔内に注射する。第 2 回目注射 2 週間後、Pm 皮膚壊死毒素を約 50LD₅₀/0.5mL 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、別に、試験群マウスの攻撃時週齢と同週齢の無処置マウス 10 匹以上を 1 群として、その 3 群以上を用いて、攻撃に用いた毒素の LD₅₀ 値を測定する。

3.5.7.2.3 判定

試験群においては、80 %以上が耐過生存しなければならない。また、攻撃用に用いた毒素の LD₅₀ 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 ボルデ・ジャング培地

1,000mL 中

ボルデ・ジャング・アガー・ベース 30 g

グリセリン 10 g

水 残量

加熱溶解した後、121 °C で 15 分間高圧滅菌する。約 50 °C に冷却した後、羊脱線維血液を 15vol% となるように添加する。

付記2 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

加熱溶解後、121 °Cで 15 分間高圧滅菌する。約 50 °Cに冷却した後、羊脱線維血液を 5 vol %となるように添加する。

付記3 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

加熱溶解した後、121 °Cで 15 分間高圧滅菌する。

付記4 製造用培地 1

1,000mL 中

カザミノ酸	5.0 g
ペプトン	5.0 g
でんぷん	1.5 g
酵母エキス	1.0 g
リン酸二水素カリウム	0.5 g
塩化ナトリウム	2.5 g
水	残量

溶解した後、pH を 6.8 ~ 7.6 に調整して、121 °Cで 15 分間高圧滅菌又はろ過滅菌する。

付記5 製造用培地 2

1,000mL 中

ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地	27.5 g
酵母エキス	5 g
ブドウ糖	3 g
水	残量

溶解した後、121 °Cで 15 分間高圧滅菌又はろ過滅菌する。

付記6 内標準物質

適当と認められた高速液体クロマトグラフ法用緩衝液に L-チロシンを 1 mL 中 0.1mg となるように添加したもの

付記7 SDS 液

適当と認められた高速液体クロマトグラフ法用緩衝液にドデシル硫酸ナトリウムを 1 mL 中 20mg となるように添加したもの

付記8 15mmol/L リン酸緩衝食塩液

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
pH を 6.6 ～ 7.0 に調整して、121 °C で 15 分間高圧滅菌又はろ過滅菌する。

付記 9 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 10 9.3mmol/L リン酸緩衝食塩液
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

pH を 7.0 ～ 7.5 に調整して、121 °C で 15 分間高圧滅菌又はろ過滅菌する。

付記 11 Bb 皮膚壊死毒素

Bb S611 株又はこれと同等の壊死毒素を産生する株を、製造用培地 1 又は製造に相当と認められた培地で 37 °C、15 ～ 24 時間培養し、発育した菌体を相当と認められたリン酸緩衝食塩液に集菌・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 LD₅₀ 値が 50LD₅₀/0.5mL 以上となるように調整したもの

付記 12 Pm 皮膚壊死毒素

Pm 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、相当と認められたリン酸緩衝食塩液に元の量の約 1/10 量となるように浮遊させ、超音波処理によって菌体を破碎した後、その遠心上清をろ過滅菌し、マウスに対する LD₅₀ 値が 50LD₅₀/0.5mL 以上となるように調整したもの