

# ぶり $\alpha$ 溶血性レンサ球菌症（酵素処理）不活化ワクチン

平成 21 年 3 月 26 日（告示第 420 号） 新規追加

## 1 定義

ラクトコッカス・ガルビエの培養菌体を酵素処理し、不活化したワクチンである。

## 2.1 製法

### 2.1 製造用株

#### 2.1.1 名 称

ラクトコッカス・ガルビエ TE9501 株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.2 性状

かんぱち又はぶりに対して病原性を示す。ラクトコッカス・ガルビエ KG(一)型に一致する性状を示し、 $\alpha$ 溶血性レンサ球菌症に対する免疫原性を有する。

#### 2.1.3 継代及び保存

原株及び種菌は、継代に相当と認められた培地で継代する。

継代は、原株では 3 代以内、種菌では 5 代以内でなければならない。

原株及び種菌は、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。

## 2.2 製造用材料

### 2.2.1 培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

## 2.3 原液

### 2.3.1 培養

培地で培養した種菌を製造用培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.1 の試験を行う。

### 2.3.2 遠心

培養菌液を遠心集菌後、精製水に均一に浮遊したものを遠心菌液とする。

遠心菌液について、3.2 の試験を行う。

### 2.3.3 原液の調製

遠心菌液に相当と認められた酵素溶液を加え処理する。これにリン酸緩衝食塩液を加えた後、相当と認められた pH 調整液で pH を調整する。これにホルマリンを加え、不活化したものを原液とする。

原液について、3.3 の試験を行う。

## 2.4 最終バルク

原液を混合し、リン酸緩衝食塩液で濃度調整し、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、3.4 の試験を行う。

## 3 試験法

### 3.1 培養菌液の試験

#### 3.1.1 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法の 1 細菌否定試験を準用して試験するとき、ラクトコッカス・ガルビエ以外の菌の発育を認めてはならない。

#### 3.1.2 生菌数試験

### 3.1.2.1 試験材料

#### 3.1.2.1.1 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。

#### 3.1.2.1.2 培地

トッドヘヴィット寒天培地（付記 1）又は適当と認められた培地を用いる。

#### 3.1.2.2 試験方法

各試料 0.1mL ずつをそれぞれ 2 枚以上の培地平板に均等になるように接種して培地表面に拡散させ、25℃で 1 晩培養後、集落数を数える。

#### 3.1.2.3 判定

各段階の希釈液ごとの集落数から生菌数を算出する。

検体の生菌数は、1mL 中  $1 \times 10^{10}$ CFU 以上でなければならない。

### 3.2 遠心菌液の試験

#### 3.2.1 総菌数試験

##### 3.2.1.1 試験材料

###### 3.2.1.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で希釈したものを試料とする。

###### 3.2.1.2 試験方法

分光光度計を用い、波長 630nm における試料の吸光度を測定する。

###### 3.2.1.3 判定

回帰式、吸光度の測定値及び検体の希釈度から総菌数を算出する。

検体中の総菌数は、1mL 中  $8 \times 10^{10}$  個以上でなければならない。

### 3.3 原液の試験

#### 3.3.1 不活化試験

##### 3.3.1.1 試験材料

###### 3.3.1.1.1 接種材料

検体を接種材料とする。

###### 3.3.1.1.2 培地

トッドヘヴィット寒天培地又は適当と認められた培地を用いる。

###### 3.3.1.2 試験方法

接種材料 0.2mL ずつを 2 枚以上の培地平板に接種して培地表面に拡散させ、25℃で 7 日間培養後、集落の有無を観察する。

###### 3.3.1.3 判定

接種材料を接種したすべての培地に集落を認めてはならない。

#### 3.3.2 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。

### 3.4 小分製品の試験

#### 3.4.1 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。

#### 3.4.2 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。

#### 3.4.3 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。

#### 3.4.4 ホルマリン定量試験

遠心した上清について、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 0.3vol % 以下でなければならない。

### 3.4.5 安全試験

#### 3.4.5.1 試験材料

##### 3.4.5.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

##### 3.4.5.1.2 試験動物

水温 25℃、循環式で 7 日間以上飼育し、異常のないことを確認した体重 100g 以上のかんぱち又はぶり 30 尾以上を用いる。

#### 3.4.5.2 試験方法

試験動物は 24 時間以上餌止めした後、1 群 15 尾以上ずつの 2 群に分ける。1 群の試験動物に魚体重 1 kg 当たり 1 日量として接種材料 0.5mL を飼料中に混ぜて 5 日間経口投与し、試験群とする。他の 1 群は対照群とし、試験群と同様の方法で水を飼料中に混ぜて 5 日間投与する。その後、それぞれ飼育水温 25℃、循環式で 14 日間飼育し観察する。

#### 3.4.5.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に異常を認めてはならない。

### 3.4.6 力価試験

#### 3.4.6.1 試験材料

##### 3.4.6.1.1 試験動物

3.4.5 の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.4.6.1.2 攻撃用菌液

ラクトコッカス・ガルビエ強毒菌（付記 2）の培養菌液をリン酸緩衝食塩液で希釈し、対照群の死亡率が 80% と予測される希釈菌液を攻撃用菌液とする。

#### 3.4.6.2 試験方法

3.4.5 の試験最終日の前日から 24 時間餌止めした試験群及び対照群に、攻撃用菌液 0.1mL ずつを腹腔内に注射して攻撃した後、飼育水温 25℃で、14 日間観察して各群の生死を調べる。

#### 3.4.6.3 判定

試験群の生存率は、対照群のそれより有意に高い値を示さなければならない (Fisher の直接確率法、 $P < 0.05$ )。この場合、対照群は 60% 以上が死亡しなければならない。

### 4 貯法及び有効期間

有効期間は、3 年間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合は、その期間とする。

#### 付記 1 トッドヘヴィット寒天培地

1,000mL 中

心筋浸出液 3.1 g

ペプトン 20 g

ブドウ糖 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

炭酸ナトリウム 2.5 g

塩化ナトリウム 13 g

寒天 12 g

水 残量

水に各成分を加熱溶解し（溶解後 pH7.6 ~ 8.0 となる。）、121℃で 15 分間高压滅菌する。

#### 付記 2 ラクトコッカス・ガルビエ強毒菌

ラクトコッカス・ガルビエ KG9502 株又はこれと同等以上の毒力を有する株