

豚丹毒生ワクチン製造用原種菌

平成20年3月25日（告示第425号）一部改正

令和2年2月5日（告示第231号）一部改正

1 定義

アクリフラビン耐性弱毒豚丹毒菌小金井 65-0.15 株を液体培地で増殖させ、その培養液に安定剤を加え、凍結乾燥したもので、「豚丹毒生ワクチン」及び「豚熱・豚丹毒混合生ワクチン」の製造のための原種菌である。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

アクリフラビン耐性弱毒豚丹毒菌小金井 65-0.15 株

2.1.2 由来

原株は、豚丹毒菌小金井株をアクリフラビンを含む培地で長期間継代して得たアクリフラビン耐性の弱毒株である。

2.1.3 性状

原種菌は、0.02w/v %アクリフラビン加寒天培地で発育しなければならない。

豚丹毒抗体陰性豚の皮下に注射した場合、注射部位に限局した善感反応（小丘疹の形成）を呈するが、全身症状を認めてはならず、注射後3週目に豚丹毒菌の強毒株で攻撃した場合、耐過生存しなければならない。

4週齢のマウスの皮下に注射した場合、その90%以上が関節炎を呈するが、100%が耐過生存しなければならない。注射後10日目に豚丹毒菌の強毒株で攻撃した場合、耐過生存しなければならない。

2.1.4 継代及び保存

原株及び原種菌は、普通寒天培地で継代する。

原株の継代は、原種菌の製造又は原株の恒久的な維持以外の目的で行ってはならない。

原種菌は、直接原株から連続した工程により製造し、その継代数は、3代以内でなければならない。

原株及び原種菌は、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

2.2 製造用材料

普通ブイヨン培地又は適当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 培養

原株を培地で溶解した後、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 安定剤の添加

培養菌液に安定剤（付記1）又は適当と認められた安定剤を添加し、原液とする。

原液について、3.2の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液を混合し、最終バルクとする。

2.5 原種菌

最終バルクを50mL容量びんに20mLずつ分注し、凍結乾燥し、原種菌とする。

原種菌について、3.3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

3.1.1.1 液状チオグリコール酸培地培養法

一般試験法の無菌試験法 1 を準用して試験するとき、豚丹毒菌以外の菌の発育を認めてはならない。

3.1.1.2 普通寒天培地斜面培養法

3.1.1.2.1 試験材料

検体及び斜面の普通寒天培地を用いる。

3.1.1.2.2 試験方法

検体 0.5mL ずつを普通寒天培地 4 本の斜面部に接種し、2 本を 30 ～ 32℃で 10 日間、残りの 2 本を 22 ～ 25℃で 14 日間培養する。

3.1.1.2.3 判定

豚丹毒菌以外の菌の発育を認めてはならない。

3.2 原液の試験

3.2.1 夾雑菌否定試験

3.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.2 生菌数試験

3.2.2.1 試験材料

3.2.2.1.1 試料

検体を普通ブイヨン培地又は適当と認められた培地で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.2.1.2 培地

普通寒天培地又は適当と認められた培地を用いる。

3.2.2.2 試験方法

試料 1 mL ずつを平板混積培養法により培地 2 枚以上に接種し、37℃で 48 時間培養して生じた集落数を数える。

3.2.2.3 判定

各段階の希釈液ごとの集落数の平均値、希釈倍数及び培地への接種量から生菌数を算出する。

検体の生菌数は、1 mL 中 1.5×10^8 個以上でなければならない。

3.3 原種菌の試験

3.3.1 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乾燥物でなければならない。溶解したものは、固有の色調を有する液体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。

3.3.2 真空度試験

一般試験法の真空度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。

3.3.3 含湿度試験

一般試験法の含湿度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。

3.3.4 夾雑菌否定試験

検体を溶解用液 20mL で溶解した後、3.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.5 生菌数試験

検体を溶解用液 20mL で溶解した後、3.2.2 を準用して試験するとき、原種菌の生菌数は、1 mL 中 5×10^7 個以上でなければならない。

3.3.6 同定試験

3.3.6.1 試験材料

3.3.6.1.1 試料

検体を溶解用液 20mL で溶解したものを試料とする。

3.3.6.1.2 培地

0.02w/v %アクリフラビン加寒天培地を用いる。

3.3.6.2 試験方法

試料 0.1mL ずつを培地 2 枚以上に接種し、培地表面に拡散させ、37 °Cで 48 時間培養する。

3.3.6.3 判定

豚丹毒菌の発育が認められなければならない。

3.3.7 安全試験

3.3.7.1 試験材料

3.3.7.1.1 注射材料

検体を用いる。

3.3.7.1.2 試験動物

4 週齢のマウス及び 2 ～ 3 か月齢の豚丹毒菌に対する抗体陰性豚を用いる。

3.3.7.2 試験方法

3.3.7.2.1 マウス注射試験

マウス 10 匹を試験群、10 匹を対照群とする。

検体を溶解用液で生菌数が 1 mL 中 1×10^8 個となるように溶解したものを 0.1mL ずつ試験群の内股部皮下に注射し、対照群とともに 10 日間臨床観察する。

3.3.7.2.2 豚注射試験

豚 2 頭を試験群、2 頭を対照群とする。

検体を溶解用液 20mL で溶解したものを 10mL ずつ試験群の肩部皮下に注射し、溶解用液 10mL ずつを注射した対照群とともに 10 日間生死を観察する。

3.3.7.3 判定

3.3.7.3.1 マウス注射試験

すべての試験動物が生存しなければならない。

3.3.7.3.2 豚注射試験

試験群は、いずれも全身の異常が認められず、生存しなければならない。この場合、対照群は、いずれも生存しなければならない。

3.3.7.4 再試験

事故のため、マウスでは試験、対照両群のいずれかでも 9 匹未満となったとき、また、豚では試験、対照両群のいずれかで 2 頭未満となったときは、試験を反復しなければならない。

3.3.8 毒力試験

3.3.8.1 試験材料

3.3.7 の試験に用いたマウス及び豚を用いる。

3.3.8.2 試験方法

3.3.8.2.1 マウス注射試験

3.3.7 の試験の観察期間中、関節炎の発生の有無を検査する。

3.3.8.2.2 豚注射試験

3.3.7 の試験の観察期間中、注射局所の善感反応の発生の有無を検査する。

3.3.8.3 判定

3.3.8.3.1 マウス注射試験

試験群の 90%以上に関節炎が認められなければならない。この場合、対照群に関節炎が認められてはならない。

3.3.8.3.2 豚注射試験

試験群は、いずれも注射局所に善感反応が認められなければならない。この場合、対照群は、いずれも善感反応に類似する反応が認められてはならない。

3.3.8.4 再試験

対照群のマウスに関節炎の発生が認められたとき又は対照群の豚に善感反応が認められたときは、試験を反復しなくてはならない。

3.3.9 力価試験

3.3.9.1 試験材料

3.3.9.1.1 試料

検体を溶解用液で溶解したもの及び攻撃用豚丹毒菌藤沢株又は適当と認められた菌株を普通ブイヨン培地又は適当と認められた培地で培養した菌液を用いる。

3.3.9.1.2 試験動物

4週齢のマウス及び2～3か月齢の豚丹毒菌に対する抗体陰性豚を用いる。

3.3.9.2 試験方法

3.3.9.2.1 マウス注射試験

マウス 10匹を試験群、10匹を対照群とする。

検体を溶解用液で生菌数が1 mL中 10^4 個となるように希釈し、その0.1mLずつを試験群の左内股部皮下に注射し、注射後10日目に、藤沢株又は適当と認められた菌株の培養菌液を0.1mL中1,000致死量となるように希釈したものの0.1mLを両群の右内股部皮下に注射し、10日間臨床観察する。

3.3.9.2.2 豚注射試験

豚4頭を試験群、2頭を対照群とする。

検体を溶解用液で生菌数が1 mL中 10^6 個になるように希釈し、その1.0mLずつを試験群の肩部皮下に注射し、注射後3週目に、藤沢株又は適当と認められた菌株の培養菌液を0.1mL（生菌数1 mL中 10^8 個）ずつ両群の皮内に注射し、10日間臨床観察する。

3.3.9.3 判定

3.3.9.3.1 マウス注射試験

試験群は、すべて無症状で耐過生存しなければならない。この場合、対照群は、すべて死亡しなければならない。

3.3.9.3.2 豚注射試験

試験群は、いずれも攻撃局所に限定された局所反応（発赤）を呈することがあっても、全身反応を呈することなく耐過生存しなければならない。この場合、対照群は、いずれも定型的な豚丹毒の症状が認められなければならない。

4. 貯法及び有効期間

有効期間は、5年間とする。

付記1 安定剤

1 脱脂乳液

1,000 mL 中

脱脂粉乳

100 g

水

残量

加温溶解後、100メッシュでろ過したろ液を、110～115℃で20分間滅菌したもの

2 酵母エキス液

1,000 mL 中

酵母エキス

50 g

水

残量

加温溶解後、121 °Cで 15 分間滅菌したもの
使用時に 1 及び 2 を等量混合する。