

豚インフルエンザ・豚丹毒混合（油性アジュバント加） 不活化ワクチン

令和3年11月22日(告示第1991号)新規追加

1 定義

豚インフルエンザウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化後凍結乾燥したもの（以下この項において「乾燥ワクチン」という。）と、豚丹毒菌の培養菌液を不活化し、その遠心上清を濃縮したものに油性アジュバントを添加したもの（以下この項において「液状ワクチン」という。）とを組み合わせたものである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 豚インフルエンザウイルス株

2.1.1.1 名称

2.1.1.1.1 豚インフルエンザウイルス A 型 (H1N1) 株

豚インフルエンザウイルス A 型 A/swine/Iowa/08/00 (H1N1) 株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.1.2 豚インフルエンザウイルス A 型 (H3N2) 株

豚インフルエンザウイルス A 型 A/swine/Iowa/06/00 (H3N2) 株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

犬腎継代細胞に接種すると CPE を示して増殖する。また、発育鶏卵の尿膜腔内で増殖し、鶏、モルモット、イヌ、ラット、ガチョウ及びヒト（O 型）の赤血球を凝集する。

2.1.1.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、犬腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

原株の継代は、種ウイルス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。種ウイルスは、直接原株から連続した工程により製造し、その継代数は5代以内でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その継代数以内とする。

原株は凍結して -60°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下、種ウイルスは凍結して -30°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

2.1.2 豚丹毒菌株

2.1.2.1 名称

豚丹毒菌 CN3342 株（血清型 2 型）又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

感受性豚に接種すると、豚丹毒を惹起する。

2.1.2.3 継代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた培地で継代する。

原株の継代は、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。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8代以内でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その継代数以内とする。

原株は凍結して -60°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下、種菌は凍結して -30°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

2.2 製造用材料

2.2.1 豚インフルエンザウイルス

2.2.1.1 培養細胞

犬腎継代細胞又は製造に相当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.1.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

2.2.2 豚丹毒菌

2.2.2.1 培地

製造に相当と認められた液状培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 豚インフルエンザウイルス原液

2.3.1.1 細胞の培養

1 回に処理し、培養した細胞を個体別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の培養細胞に異常を認めてはならない。

2.3.1.2 ウイルスの培養

各株の種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に培養液を採取し、各株のウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.1 の試験を行う。

2.3.1.3 不活化

各ウイルス浮遊液に相当と認められた不活化剤を加えて攪拌し、不活化した後に、相当と認められた中和剤を加えて中和したものを各株の不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.2 の試験を行う。

2.3.1.4 原液

各株の不活化ウイルス液を最終バルクを調製するのに十分な濃度になるよう、必要により濃縮したものを各株の原液とする。

2.3.2 豚丹毒菌原液

2.3.2.1 培養

種菌を液状培地に接種し、培養したものを液状培地に接種し、培養する。更にそれを液状培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。このとき、2次培養の工程を省略してもよい。

培養菌液について、3.3 の試験を行う。

2.3.2.2 不活化

培養菌液に相当と認められた不活化剤を加えて攪拌し、不活化したものを不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.4 の試験を行う。

2.3.2.3 原液

不活化菌液の遠心上清を最終バルクを調製するのに十分な濃度になるよう濃縮し、相当と認められた安定剤を加えたものを原液とする。

2.4 最終バルク

2.4.1 乾燥ワクチン

各株の原液を混合後、濃度を調整し、最終バルクとする。

このとき、相当と認められた安定剤及び保存剤を添加してもよい。

2.4.2 液状ワクチン

原液を濃度調整し、相当と認められた油性アジュバントを添加したものを最終バルクとする。

このとき、相当と認められた保存剤を添加してもよい。

2.5 小分製品

2.5.1 乾燥ワクチン

最終バルクを小分容器に分注し、凍結乾燥し、小分製品とする。

小分製品について、3.5 の試験を行う。

2.5.2 液状ワクチン

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 ウイルス浮遊液の試験

3.1.1 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。

3.1.2 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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。

3.1.3 赤血球凝集価測定試験

3.1.3.1 試験材料

3.1.3.1.1 試料

検体を適当と認められた希釈液で階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.1.3.2 試験方法

試料に鶏赤血球浮遊液を加えて混合、反応させた後、赤血球凝集の有無を観察する。

3.1.3.3 判定

赤血球凝集を認めた最高希釈倍数を赤血球凝集価とする。

検体 0.05mL 当たりの赤血球凝集価は、16 倍以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その赤血球凝集価とする。

3.2 不活化ウイルス液の試験

3.2.1 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。

3.2.2 不活化試験

3.2.2.1 試験材料

3.2.2.1.1 試料

検体を試料とする。

3.2.2.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.2.2.2 試験方法

検体 10mL 以上を 150cm² 以上の培養細胞に接種し、34 ~ 38 °C で 14 ~ 16 日間培養する。ただし、当該培養期間中に、接種後の培養細胞について凍結融解したものを継代用試料として 2 代以上継代を行う。

3.2.2.3 判定

試験期間中に CPE を認めず、試験終了時に蛍光抗体法により、各型のウイルスに特異的な蛍光を認めてはならない。

3.3 培養菌液の試験

3.3.1 染色試験

顕微鏡を用いた形態学的観察及びグラム染色によって試験するとき、豚丹毒菌以外の菌の性状を認めてはならない。

3.3.2 吸光度測定試験

波長 625 nm で吸光度を測定するとき、その値は 4.0 以上でなければならない。

3.4 不活化菌液の試験

3.4.1 不活化試験

3.4.1.1 試験材料

3.4.1.1.1 試料

検体を接種材料とする。

3.4.1.1.2 培地

液状チオグリコール酸培地（付記1）及び羊血液加寒天培地（付記2）又は適当と認められる培地を用いる。

3.4.1.2 試験方法

接種材料を、液状チオグリコール酸培地及び羊血液加寒天培地にそれぞれ接種し、33～37℃で液状チオグリコール酸培地は7～8日間、羊血液加寒天培地は3～7日間培養する。7～8日間培養後の液状チオグリコール酸培地から、それぞれ液状チオグリコール酸培地及び羊血液加寒天培地に継代し、33～37℃で液状チオグリコール酸培地は7～8日間、羊血液加寒天培地は3～7日間培養する。

3.4.1.3 判定

試料を接種した培地にはいかなる菌の発育も認めてはならない。

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、乾燥ワクチンは、固有の色調を有する乾燥物でなければならない。また、液状ワクチンは、固有の色調を有する懸濁液でなければならない。異物及び異臭を認めてはならない。乾燥ワクチンを液状ワクチンで溶解したもの（以下この項において「混合ワクチン」という。）は、固有の色調を有する懸濁液でなければならない。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

混合ワクチンについて、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 真空度試験

乾燥ワクチンについて、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。

3.5.4 含湿度試験

乾燥ワクチンについて、一般試験法の含湿度試験法を準用して試験するとき、固有の値以下でなければならない。

3.5.5 無菌試験

混合ワクチンについて、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。

3.5.6 不活化試験

3.5.6.1 試験材料

3.5.6.1.1 注射材料

乾燥ワクチンを 100mL のリン酸緩衝食塩液で溶解したものを注射材料とする。

3.5.6.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の 10～12 日齢のものを用いる。

3.5.6.2 試験方法

注射材料 0.2mL ずつを 4 個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、36～37℃で培養し、3 日間隔で尿膜腔液を 2 代まで継代する。2 代目の尿膜腔液に 0.5vol% の鶏の赤血球浮遊液を等量加え、室温で 60 分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

ただし、赤血球凝集を示す尿膜腔液があった場合には、その尿膜腔液を等量混合して 3 代まで継代し、3 代目の尿膜腔液について同様の試験を繰り返した後、判定する。

3.5.6.3 判定

赤血球凝集を認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

試験品に活性ウイルスを認めてはならない。

3.5.7 チメロサル定量試験

液状ワクチンについて、一般試験法のチメロサル定量法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.5.8 ホルマリン定量試験

液状ワクチンについて、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、0.015vol %以下でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その含有量以下とする。

3.5.9 毒性限度確認試験

混合ワクチンについて、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。

3.5.10 力価試験

3.5.10.1 豚インフルエンザ力価試験

3.5.10.1.1 試験材料

3.5.10.1.1.1 注射材料

混合ワクチンをリン酸緩衝食塩液で 10 倍に希釈したものを注射材料とする。

3.5.10.1.1.2 試験動物

4 週齢のマウスを用いる。

3.5.10.1.1.3 赤血球凝集抗原

混合ワクチンに含まれる各ウイルス株と同一亜型のウイルスで調製した赤血球凝集抗原（付記 3）を用いる。

3.5.10.1.2 試験方法

注射材料 0.5mL ずつを試験動物 20 匹の腹腔内に注射した後、4 群に分け、14 日目に得られた血清を各群ごとにプールして、赤血球凝集抑制試験を行う。

被検血清を RDE 及び鶏赤血球処理又は適当と認められた方法で処理する。これをリン酸緩衝食塩液で 2 倍階段希釈し、各希釈液 0.2mL に 0.2mL 中 8 単位の赤血球凝集抗原を等量ずつ加え、室温で 60 分間処理する。これに 0.5vol%の鶏の赤血球浮遊液を 0.4mL ずつ加え、室温に 60 分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

3.5.10.1.3 判定

赤血球凝集を抑制した血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。

各群のプール血清の赤血球凝集抑制抗体価は、H1N1 亜型で 16 倍以上、H3N2 亜型で 32 倍以上でなければならない。

3.5.10.2 豚丹毒力価試験

3.5.10.2.1 試験材料

3.5.10.2.1.1 注射材料

混合ワクチンを注射材料とする。

3.5.10.2.1.2 試験動物

5 週齢のマウスを用いる。

3.5.10.2.1.3 攻撃用菌株

豚丹毒菌藤沢株又はこれと同等の毒力を有する株を攻撃菌用培地（付記 4）に接種し、37 °Cで 14 ～ 20 時間培養する。これを普通ブイヨンで 1 mL 中 10³ 個の菌量となるように希釈したものを攻撃用菌液とする。

3.5.10.2.2 試験方法

試験動物の 10 匹を試験群、10 匹を対照群とする。

注射材料 0.5mL ずつを 2 週間間隔で 2 回、試験群の内股部皮下に注射する。第 2 回目注射後 2 週目に、攻撃用菌液を試験群及び対照群の内股部皮下に 0.1mL ずつ注射して攻撃した後、7 日間

観察する。

3.5.10.2.3 判定

試験群では、80%以上が耐過生存しなければならない。この場合、対照群では90%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、製造後1年11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 液状チオグリコール酸培地

1,000mL 中

カゼイン製ペプトン	15.0 g
酵母エキス	5.0 g
デキストロース	5.5 g
塩化ナトリウム	2.5 g
L-シスチン	0.5 g
チオグリコール酸ナトリウム	0.5 g
寒天	0.75 g
レサズリン	1.0mg
水	残量

1分間加熱して溶解後、121℃で15分間高圧滅菌する。

付記2 羊血液加寒天培地

1,000mL 中

カゼイン製ペプトン	14.5 g
大豆パepsin消化ペプトン	5.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
寒天	14.0 g
発育因子	1.5 g
水	残量

1分間加熱して溶解後、121℃で15分間高圧滅菌する。45～50℃に冷却後、羊脱線維血液を50mL添加して十分に混和する。

付記3 赤血球凝集抗原

豚インフルエンザウイルス A 型 A/swine/Iowa/08/00 (H1N1) 株及び A/swine/Iowa/06/00 (H3N2) 株又はこれらと同等と認められたウイルス株を用いて、それぞれ調製した赤血球凝集抗原

付記4 攻撃菌用培地

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	30 g
プロテオーゼペプトン	10 g
ポリソルベート 80	1 mL
水	残量

pHを7.4～7.8に調整して、121℃で15分間高圧滅菌する。