

ぶりビブリオ病・ α 溶血性レンサ球菌症・ストレプトコッカス・ジスガラクチエ感染症混合不活化ワクチン

令和2年4月16日（告示第816号）新規追加

1 定義

ビブリオ・アングイラルムJ-O-3型、ラクトコッカス・ガルビエ及びストレプトコッカス・ジスガラクチエ・サブスピーシーズ・ジスガラクチエの培養菌液をそれぞれ不活化したものを混合したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 ビブリオ・アングイラルム

2.1.1.1 名称

ビブリオ・アングイラルムKT-5株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

ビブリオ・アングイラルムJ-O-3型に一致する性状を示し、J-O-3型ビブリオ病に対する免疫原性を有する。

2.1.1.3 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。

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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

2.1.2 ラクトコッカス・ガルビエ

2.1.2.1 名称

ラクトコッカス・ガルビエKS-7M株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

ラクトコッカス・ガルビエKG（-）型に一致する性状を示し、 α 溶血性レンサ球菌症に対する免疫原性を有する。

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。

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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

2.1.3 ストレプトコッカス・ジスガラクチエ・サブスピーシーズ・ジスガラクチエ

2.1.3.1 名称

ストレプトコッカス・ジスガラクチエ・サブスピーシーズ・ジスガラクチエSD3M株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

ストレプトコッカス・ジスガラクチエに一致する性状を示し、ストレプトコッカス・ジスガラクチエ感染症に対する免疫原性を有する。

2.1.3.3 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。

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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 ビブリオ・アングイラルム

2.2.1.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.2.2 ラクトコッカス・ガルビエ

2.2.2.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.2.3 ストレプトコッカス・ジスガラクチエ・サブスピーシーズ・ジスガラクチエ

2.2.3.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 ビブリオ・アングイラルム

2.3.1.1 培養

種菌を培地に接種し、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。

2.3.1.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加えて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、3.2の試験を行う。

2.3.1.3 原液

不活化菌液を適当と認められた方法で濃縮し、濃度調整したものを原液とする。

原液について、3.3の試験を行う。

2.3.2 ラクトコッカス・ガルビエ

2.3.2.1 培養

種菌を培地に接種し、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。

2.3.2.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加えて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、3.2の試験を行う。

2.3.2.3 原液

不活化菌液を適当と認められた方法で濃縮し、濃度調整したものを原液とする。

原液について、3.3の試験を行う。

2.3.3 ストレプトコッカス・ジスガラクチエ・サブスピーシーズ・ジスガラクチエ

2.3.3.1 培養

種菌を培地に接種し、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。

2.3.3.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加えて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、3.2の試験を行う。

2.3.3.3 原液

不活化菌液を適当と認められた方法で濃縮し、濃度調整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

それぞれの原液を、適当と認められた希釈用液に混合して濃度調整し、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

3.1.1.1 試験材料

3.1.1.1.1 試料

検体を試料とする。

3.1.1.1.2 培地

それぞれの製造用培地に寒天を加えた斜面寒天培地を用いる。

3.1.1.2 試験方法

それぞれの試料0.2mLずつを培地10本ずつに接種し、そのうち5本についてはそれぞれの培養温度で7日間培養し、残り5本については36～38℃で7日間培養し、観察する。

3.1.1.3 判定

ビブリオ・アングイラルムの検体は、ビブリオ・アングイラルム以外の菌の発育を認めてはならず、ラクトコッカス・ガルビエの検体は、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ず、ストレプトコッカス・ジスガラクチエ・サブスピーシーズ・ジスガラクチエの検体は、ストレプトコッカス・ジスガラクチエ・サブスピーシーズ・ジスガラクチ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又は適当と認められた希釈用液で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

ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト液体培地に寒天を添加した寒天培地(付記1。以下「SCDb寒天培地」という。)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5枚以上の培地に接種して培地表面に拡散させたものを、適当と認められた温度及び時間で培養した後、生じた集落数を数える。

3.1.2.3 判定

各試料ごとの集落数から生菌数を算出する。各検体の生菌数は、ビブリオ・アングイラルム

にあつては1 mL中 10^9 個以上、ラクトコッカス・ガルビエにあつては1 mL中 10^9 個以上、ストレプトコッカス・ジスガラクチエ・サブスピーシーズ・ジスガラクチエにあつては1 mL中 10^8 個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、その生菌数とする。

3.2 不活化菌液の試験

3.2.1 不活化試験

3.2.1.1 試験材料

3.2.1.1.1 試料

検体を試料とする。

3.2.1.1.2 培地

SCDb寒天培地又は適当と認められた培地を用いる。

3.2.1.2 試験方法

試料0.1mLずつを培地5枚以上に接種し、適当と認められた温度で5～7日間培養した後、集落の有無を観察する。

3.2.1.3 判定

接種した全ての培地に集落を認めてはならない。

3.3 原液の試験

3.3.1 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 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ず、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。

3.4.2 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。

3.4.3 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、0.3vol%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、その含有量とする。

3.4.4 安全試験

3.4.4.1 試験材料

3.4.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.4.1.2 試験動物

水温23℃、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20～100gのかんぱち50尾以上を用いる。

3.4.4.2 試験方法

試験動物は、24時間以上餌止めした後、1群25尾以上ずつの2群に分ける。1群の試験動物に、注射材料0.1mLを腹腔内に注射し、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滅菌精製水を注射する。その後、それぞれ水温23℃、循環式で飼育し、14日間観察する。ただし、安全試験最終日の前日から飼育水温を25℃に上昇させる。

3.4.4.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に臨床的な異常を認めてはならない。

3.4.5 力価試験

3.4.5.1 ビブリオ病力価試験

3.4.5.1.1 試験材料

3.4.5.1.1.1 試験動物

3.4.4の試験に用いた動物を用いる。

3.4.5.1.2 試験方法

3.4.4の試験最終日に試験群及び対照群のそれぞれ10尾ずつを取り上げて採血し、45℃で20分間非働化した血清について、マイクロタイター法で凝集試験を行う。

試験群及び対照群の血清、参照陽性血清（付記2）並びに参照陰性血清（付記3）をリン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈し、各希釈血清に凝集反応用抗原（付記4）を等量加えて、25℃で2時間反応させ、更に4℃で一夜静置した後、管底の凝集の有無を観察する。

3.4.5.1.3 判定

凝集を認めた血清の最高希釈倍数を凝集抗体価とする。

試験群の血清の抗体価の幾何平均値は16倍以上でなければならない。対照群では、抗体価の幾何平均値は4倍以下でなければならない。また、参照血清は、所定の抗体価を示さなければならない。

3.4.5.2 α溶血性レンサ球菌症力価試験

3.4.5.2.1 試験材料

3.4.5.2.1.1 試験動物

3.4.4の試験に用いた動物を用いる。

3.4.5.2.1.2 攻撃用菌液

ラクトコッカス・ガルビエ強毒菌（付記5）の液体培養菌液をリン酸緩衝食塩液で希釈したものを攻撃用菌液とする。

3.4.5.2.2 試験方法

3.4.4の試験最終日の前日から24時間以上餌止めした試験群及び対照群それぞれ15尾以上に、攻撃用菌液0.1mLずつを腹腔内に注射して攻撃した後、飼育水温を25℃から29℃に上昇させ、14日間観察して各群の生死を調べる。

3.4.5.2.3 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の直接確率計算法、 $P < 0.05$ ）。この場合、対照群では60%以上が死亡しなければならない。

3.4.5.3 ストレプトコッカス・ジスガラクチエ感染症力価試験

3.4.5.3.1 試験材料

3.4.5.3.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.5.3.1.2 試験動物

水温23℃、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20～100gのかんばち180尾以上を用いる。

3.4.5.3.1.3 攻撃用菌液

ストレプトコッカス・ジスガラクチエ・サブスピーシーズ・ジスガラクチエ強毒菌（付記6）

の液体培養菌液をソイビーン・カゼイン・ダイジェスト液体培地（付記7）で希釈し、対照群の死亡率が50～90%と予測される希釈とその前後の希釈の3段階の希釈菌液を攻撃用菌液とする。

3.4.5.3.2 試験方法

試験動物は、24時間以上餌止めした後、1群90尾以上ずつの2群に分ける。1群の試験動物に、注射材料0.1mLずつを腹腔内に注射し、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滅菌精製水を注射する。その後、それぞれ水温23℃、循環式で飼育し、注射後13日から飼育水温を25℃に上昇させる。

試験最終日の前日から24時間以上餌止めした試験群及び対照群それぞれ30尾以上の3群に分け、攻撃用菌液0.1mLずつを腹腔内に注射して攻撃した後、飼育水温を25℃から29℃に上昇させ、14日間観察して各群の生死を調べる。

3.4.5.3.3 判定

3段階の攻撃用菌液の希釈段階のうち、少なくとも1段階において、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の直接確率計算法、 $P < 0.05$ ）。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、1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 SCDb寒天培地

ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト液体培地に寒天を1.5w/v%で加えたもの。

付記2 参照陽性血清

ビブリオ・アングイラルムJ-O-3型の死菌をぶりに注射して得た血清であって、3.4.5.1を準用して試験を行うとき、凝集抗体価が128～512倍となるように濃度を調整したもの。

付記3 参照陰性血清

健康なぶりの血清であって、3.4.5.1を準用して試験を行うとき、凝集抗体価が2倍未満のもの。

付記4 凝集反応用抗原

ビブリオ・アングイラルムJ-O-3型の加熱死菌をリン酸緩衝食塩液でMcFarland混濁管No 1～3の濃度になるように浮遊させたものであって、既知抗体価の陽性血清に対し所定の凝集抗体価を示すことを確認したもの。

付記5 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

付記6 ストレプトコッカス・ジスガラクチエ・サブスピーシーズ・ジスガラクチエ強毒菌

ストレプトコッカス・ジスガラクチエ・サブスピーシーズ・ジスガラクチエ04K01株又はこれと同等以上の毒力を有する株

付記7 ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト液体培地

ポリペプトン	17.0g
大豆製ペプトン	3.0g
ブドウ糖	2.5g
塩化ナトリウム	5.0g
リン酸水素二カリウム	2.5g
水	1,000mL

pHを7.1～7.5に調整し、121℃で15分間高圧滅菌する。