

豚ボルデテラ感染症・豚パストツレラ症（全菌体・部分精製トキソイド）混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

平成22年7月12日（告示第1038号） 新規追加
平成28年4月18日（告示第1020号） 一部改正
平成29年1月19日（告示第89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・ブロンキセプチカの培養菌液を不活化したもの、同規格に適合したパストツレラ・ムルトシダの培養菌体を不活化したもの及び同規格に適合したパストツレラ・ムルトシダの培養菌体より得た皮膚壊死毒素を部分精製した後不活化し、アルミニウムゲルで内毒素を吸着したものを混合し、油性アジュバントを添加したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

2.1.1.1 名称

ボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌2-9 NADL株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

ボルデー・ジャング培地（付記1）上に隆起した小円形の集落を形成し、 β 溶血性を示す。また、K抗原を有し、既知のボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌の免疫血清によって特異的に凝集される。

生後7日齢以内の豚に点鼻接種すると豚萎縮性鼻炎を起こす。生菌又は超音波処理菌をモルモットの皮内に注射すると、注射部位に出血及び壊死を起こす。

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、ボルデー・ジャング培地又は適当と認められた平板培地で増殖させ、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、凍結乾燥して7℃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、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-30℃以下又は、凍結乾燥して7℃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、適当と認められた培地で増殖する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して-30℃以下又は凍結乾燥して7℃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について、3.1.3の試験を行う。

2.1.2 パスツレラ・ムルトシダ

2.1.2.1 名称

パスツレラ・ムルトシダD型8株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

鶏血清加ハートインフュージョン寒天培地上に粘稠性のある円形の集落を形成する。

生菌を鼻粘膜に酢酸を前処理した約3週齢の豚に点鼻接種すると、豚萎縮性鼻炎を起こす。培養菌体から調製した皮膚壊死毒素をモルモットの皮内に注射すると、注射部位に壊死を起こし、また、豚の筋肉内に注射すると豚萎縮性鼻炎を起こす。

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、適当と認められた培地で増殖させ、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、凍結乾燥して7℃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、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-30℃以下又は凍結乾燥して7℃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、適当と認められた培地で増殖する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して-30℃以下又は凍結乾燥して7℃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について、3.1.3の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 培地

2.2.1.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.2.1.2 パスツレラ・ムルトシダ

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ原液

2.3.1.1 培養

液状培地で培養したプロダクションシード菌を液状培地に接種し、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の試験を行う。

2.3.1.2 不活化

培養菌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不活化後、遠心して得られた菌体を適当と認められた緩衝液に再浮遊させ、濃縮したものを原液とする。

2.3.2 パスツレラ・ムルトシダ菌体原液

2.3.2.1 培養

液状培地で培養したプロダクションシード菌を液状培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2.2の試験を行う。

2.3.2.2 不活化

培養菌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不活化後、遠心して得られた菌体を適当と認められた緩衝液に再浮遊させ、濃縮する。これに、適当と認められたアルミニウムゲル及び保存剤を加えたものを原液とする。

原液について、3.3.1の試験を行う。

2.3.3 パスツレラ・ムルトシダトキソイド原液

2.3.3.1 培養

2.3.2.1に準じて培養したものを、培養菌液とする。

培養菌液について、3.2.3の試験を行う。

2.3.3.2 無毒化

培養菌液を物理的処理により菌体を破碎した後、遠心して得られた上清を0.45 μ m及び0.2 μ mフィルターでろ過する。これに適当と認められた保存剤及び乳化剤を添加し、適当と認められた方法により濃縮する。この濃縮液に5 mol/L水酸化ナトリウム液を添加してpHを10.5 \pm 0.2に調整後、1～6時間静置し、40vol%プロピオン酸溶液を添加してpHを7.0 \pm 0.4に再調整する。このpH感作を繰り返して完全に無毒化した後、適当と認められたアルミニウムゲルを添加したものを原液とする。

原液について、3.3.2の試験を行う。

2.4 最終バルク

ボルデテラ・ブロンキセプチカ原液、パスツレラ・ムルトシダ菌体原液及びパスツレラ・ムルトシダトキソイド原液を混合した後、適当と認められた油性アジュバント及び緩衝液を添加して濃度調整したものを最終バルクとする。この場合、適当と認められた保存剤を添加してもよい。

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 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

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 ワーキングシード菌の試験

3.1.2.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.2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

3.1.1.2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 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

3.2.1.1 染色試験

3.2.1.1.1 試験材料

検体を用いる。

3.2.1.1.2 試験方法

検体0.01mLをスライドガラス上の1 cm²の区画に塗抹し、乾燥させた後に火焰固定し、グラム染色して標本を作製する。標本を顕微鏡下で約1,000倍に拡大し、30視野以上を観察する。

3.2.1.1.3 判定

均一なグラム陰性球桿菌以外の菌を認めてはならない。

3.2.1.2 コロニー性状確認試験

3.2.1.2.1 試験材料

検体を用いる。

3.2.1.2.2 試験方法

検体をボルデー・ジャング培地に接種し、 $37 \pm 2^\circ\text{C}$ で48時間培養する。

3.2.1.2.3 判定

生育した集落のうち、90%以上が β 溶血環を示し、白色不透明の隆起した光沢のあるコロニーでなければならない。

3.2.1.3 吸光度測定試験

3.2.1.3.1 試験材料

検体を用いる。

3.2.1.3.2 試験方法

検体を分光光度計を用いて波長625nmで吸光度を測定する。

3.2.1.3.3 判定

検体の吸光度値は、2.5以上でなければならない。

3.2.2 パスツレラ・ムルトシダ菌体

3.2.2.1 染色試験

3.2.1.1を準用して試験するとき、均一なグラム陰性短桿菌以外の菌を認めてはならない。

3.2.2.2 吸光度測定試験

3.2.1.3を準用して試験するとき、検体の吸光度値は5.0以上でなければならない。ただし、測定波長は650nmを用いる。

3.2.3 パスツレラ・ムルトシダトキソイド

3.2.3.1 染色試験

3.2.1.1を準用して試験するとき、均一なグラム陰性短桿菌以外の菌を認めてはならない。

3.2.3.2 吸光度測定試験

3.2.1.3を準用して試験するとき、検体の吸光度値は5.0以上でなければならない。ただし、測定波長は650nmを用いる。

3.3 原液の試験

3.3.1 パスツレラ・ムルトシダ菌体

3.3.1.1 無毒化試験

3.3.1.1.1 試験材料

3.3.1.1.1.1 注射材料

検体を用いる。

3.3.1.1.1.2 試験動物

体重16~24gのNon-Swiss Outbred、Non-Swiss Albino、CF-1又は適当と認められたマウスを用いる。

3.3.1.1.2 試験方法

試験動物の5匹を試験群、5匹を対照群とする。

検体0.5 mLずつを試験群に皮下注射し、対照群とともに24時間観察する。

3.3.1.1.3 判定

観察期間中、試験動物に死亡を認めてはならない。

3.3.1.2 遊離エンドトキシン定量試験

3.3.1.2.1 試験材料

3.3.1.2.1.1 試料

検体を14,000Gで5分間遠心し、その上清を0.2 μ mのフィルターでろ過したものを試料とする。

3.3.1.2.2 試験方法

適当と認められたカイネティック-比色法により、試料の吸光度を測定し、大腸菌エンドトキシン（付記2）の標準曲線より検体中のエンドトキシン量を算出する。

3.3.1.2.3 判定

検体のエンドトキシン量は、1 mL当たり25 μ g以下でなければならない。

3.3.2 パスツレラ・ムルトシダトキシノイド

3.3.2.1 無毒化試験

3.3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.2.2 遊離エンドトキシン定量試験

3.3.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.2.3 壊死毒素定量試験

3.3.2.3.1 試験材料

3.3.2.3.1.1 試料

検体に最終濃度12vol%となるように水酸化アルミニウムゲルを加えて調整したものを試料とする。

3.3.2.3.2 試験方法

試料、壊死毒素参照品（付記3）及び壊死毒素陽性対照（付記4）の100 μ Lをそれぞれ抗壊死毒素ヤギ抗体（付記5）100 μ Lと混合し、37 \pm 2 $^{\circ}$ Cで120~130分間反応させた後、700Gで20分間遠心し、その上清を採取する。各上清を精製壊死毒素固相化プレート（付記6）の各穴に50 μ L加えて37 \pm 2 $^{\circ}$ Cで60~75分間反応させる。プレートを洗浄液（付記7）及びリン酸緩衝食塩液（付記8）で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗体-1（付記9）50 μ Lを各穴に加えて37 \pm 2 $^{\circ}$ Cで60~75分間反応させる。プレートを洗浄液及びリン酸緩衝食塩液で洗浄後、基質液（付記10）100 μ Lを各穴に加えて15~20分間反応させ、主波長405nm及び副波長490nm（あるいは492nm）で各穴の吸光度を測定する。壊死毒素参照品の希釈系列の吸光度測定値から求められる参照曲線より、検体中の壊死毒素量を算出する。

3.3.2.3.3 判定

検体中の壊死毒素量は、1 mL当たり200 相対単位（付記11）以上でなければならない。

また、壊死毒素参照品の希釈系列の吸光度測定値から求められる参照曲線の相関係数（r）は0.98以上であり、壊死毒素陽性対照は1 mL当たり200相対単位以上でなければならない。

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 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 無毒化試験

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

体重約350gのモルモットを用いる。

3.4.4.2 試験方法

注射材料0.1mLずつを試験動物2匹の背部皮内に注射し、10日間観察する。

3.4.4.3 判定

注射反応は、無視しうる程度以下でなければならず、試験動物がすべて生存しなければならない。

3.4.5 チメロサル定量試験

チメロサル添加製剤については、適当と認められた方法で試験品を処理したものを試料とし、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。

3.4.6 ホルマリン定量試験

ホルマリン添加製剤については、適当と認められた方法で試験品を処理したものを試料とし、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、0.01vol%以下でなければならない。

3.4.7 安全試験

3.4.7.1 試験材料

3.4.7.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.7.1.2 試験動物

約4週齢の豚を用いる。

3.4.7.2 試験方法

試験動物の2頭を試験群、1頭を対照群とする。

注射材料の1頭分を4週間隔で2回試験群の筋肉内に注射し、対照群とともに第1回目注射後6週間観察する。

3.4.7.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群の動物に臨床的な異常を認めてはならない。

3.4.8 力価試験

3.4.8.1 豚ボルデテラ感染症力価試験

3.4.8.1.1 試験材料

3.4.8.1.1.1 試験動物

3.4.7の試験に用いた動物を用いる。

3.4.8.1.1.2 凝集反应用抗原

ボルデテラ・ブロンキセプチカ凝集反应用抗原（付記12）を用いる。

3.4.8.1.2 試験方法

3.4.7の試験最終日に試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、凝集反応を行う。

血清をリン酸緩衝食塩液で5倍に希釈し、さらに2倍階段希釈した後、ボルデテラ・ブロンキセプチカ凝集反应用抗原を用いて試験管内凝集反応を行う。

3.4.8.1.3 判定

試験管内に凝集を認めた血清の最高希釈倍数を凝集価とする。

試験群では、いずれも凝集価40倍以上でなければならない。この場合、対照群では、凝集価10倍以下でなければならない。

3.4.8.2 豚パスツレラ症力価試験

3.4.8.2.1 試験材料

3.4.8.2.1.1 試験動物

3.4.7の試験に用いた動物を用いる。

3.4.8.2.2 試験方法

3.4.7の試験最終日に試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、酵素抗体反応（以下「ELISA」という。）を行う。

試験群の血清及び参照陽性血清－1（付記13）を希釈・ブロッキング液（付記14）で20倍より2倍階段希釈したもの、参照陽性血清－2（付記15）を希釈・ブロッキング液で800倍より2倍階段希釈したもの、及び参照陰性血清（付記16）を希釈・ブロッキング液で20倍希釈したものを抗原吸着プレート（付記17）の各穴に100 μ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで60分間反応させる。洗浄液でプレートを洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗体－2（付記18）を各穴に100 μ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで60分間反応させる。プレートを洗浄後、基質液を各穴に100 μ Lずつ加えて反応させる。主波長405nm、副波長490nmで、800倍希釈した参照陽性血清－2の吸光度値を測定し、その値が0.8～1.2となった時点で反応終了とし、すべての穴の吸光度を測定する。

3.4.8.2.3 判定

得られた血清の各穴の吸光度値から、参照陰性血清の各穴の平均吸光度値＋3 \times 参照陰性血清の各穴の吸光度値の標準偏差を引いた値が0以上を示す血清の最高希釈倍数を抗毒素抗体価とする。試験群では、いずれも抗毒素抗体価160倍以上でなければならない。この場合、対照群では、抗毒素抗体価20倍以下でなければならない。

この場合、参照陽性血清－1の抗毒素抗体価は160～320倍、参照陽性血清－2の抗毒素抗体価は3,200～12,800倍及び参照陰性血清の抗毒素抗体価は20倍以下を示さなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後2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。

5 その他

5.1 添付文書等記載事項

と畜場出荷前の所定の期間は使用しない旨

付記1 ボルデー・ジャング培地

1,000 mL中

ボルデー・ジャング・アガーベース 30 g

グリセリン 10 g

水 残量

加温溶解後、121 $^{\circ}$ Cで15分間高压滅菌する。

約50 $^{\circ}$ Cに冷却後、必要に応じて馬脱線維素血液または羊脱線維素血液を5～20vol%となるように添加する。

付記2 大腸菌エンドトキシン

1 mL当たり50EUの大腸菌O55 : B5由来エンドトキシンを発熱性物質を含まない水で8倍階段希釈したもの。

付記3 壊死毒素参照品

パスツレラ・ムルトシダD型8株又はこれと同等の壊死毒素を産生する株の菌体超音波処理後の遠心上清を、濃縮及びイオン交換クロマトグラフィーを用いた精製の後、pH感作により無毒化し、ろ過滅菌したものを1 mL当たり40相対単位となるように調製後、小分けして凍結乾燥し、2～7 $^{\circ}$ Cで保存したもの。

付記4 壊死毒素陽性対照

2.3.3に従って製造されたパスツレラ・ムルトシダトキソイド原液を3.3.2.3の試験を準用して試験するとき、1 mL当たり200相対単位以上となるように調製後、小分けして-65℃以下で保存したものの。

付記5 抗壊死毒素ヤギ抗体

ヤギ由来のパスツレラ・ムルトシダ壊死毒素に対する抗体をブロッキング液（付記19）で至適濃度に希釈したもの。

付記6 精製壊死毒素固相化プレート

0.05mol/L炭酸塩緩衝液（付記20）に溶解した精製皮膚壊死毒素（付記21）の100 μ Lずつを、96穴平底プレートの各穴に加えて37 \pm 2℃で90～120分間反応させ、リン酸緩衝食塩液で洗浄後、ブロッキング液300 μ Lずつを加え、37 \pm 2℃で10～20分間反応させた後、リン酸緩衝食塩液で洗浄したもの。

付記7 洗浄液

1,000mL中

塩化ナトリウム	8.0 g
塩化カリウム	0.2 g
無水リン酸水素二ナトリウム	1.15 g
リン酸水素二カリウム	0.2 g
ポリソルベート20	0.5 mL
水	残 量

pHを7.2に調整する。

付記8 リン酸緩衝食塩液

1,000mL中

塩化ナトリウム	6.8 g
無水リン酸水素二ナトリウム	1.2 g
リン酸二水素カリウム	0.7 g
水	残 量

pHを6.8～7.2に調整し、121℃で15分間高圧滅菌する。

付記9 ペルオキシダーゼ標識抗体-1

ペルオキシダーゼ標識抗ヤギIgGを、ブロッキング液で至適濃度に希釈したもの。

付記10 基質液

A液： 0.6gの2,2'-アジノ-ジ (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) を1,000mLのグリシン緩衝液で溶解したもの。

B液： 0.02vol%過酸化水素溶液

A液とB液を使用時に等量混合する。

付記11 相対単位

壊死毒素参照品の希釈系列の吸光度測定値から求められる参照曲線より算出される相対値

を示す単位

付記12 ボルデテラ・ブロンキセプチカ凝集反応用抗原

ボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌のホルマリン死菌を適当と認められた希釈用液に 1 mL 中 1×10^{10} 個となるように浮遊させたもので、既知抗体価の陽性血清に対して所定の凝集価を示し、陰性血清に対して凝集しないことを確認したものの。

付記13 参照陽性血清-1

無毒化したパスツレラ・ムルトシダ壊死毒素で免疫した豚の血清で、3.4.8.2.2の試験を準用して試験するとき、抗毒素抗体価160~320倍を示すように調製し、凍結乾燥したもの。

付記14 希釈・ブロッキング液

1,000 mL中

塩化ナトリウム	8.0	g
塩化カリウム	0.2	g
無水リン酸水素二ナトリウム	1.15	g
リン酸水素二カリウム	0.2	g
ポリソルベート20	0.5	mL
カゼイン	1	g
水		残量

pHを7.2に調整する。

付記15 参照陽性血清-2

無毒化したパスツレラ・ムルトシダ壊死毒素で免疫した豚の血清で、3.4.8.2.2の試験を準用して試験するとき、抗毒素抗体価3,200~12,800倍を示すように調製し、凍結乾燥したもの。

付記16 参照陰性血清

パスツレラ・ムルトシダ壊死毒素に対する抗毒素抗体を保有しない豚の血清で、3.4.8.2.2の試験を準用して試験するとき、抗毒素抗体価20倍以下を示し、凍結乾燥したもの。

付記17 抗原吸着プレート

0.01mol/Lホウ酸緩衝液（付記22）で0.5 μ g/mLに希釈した抗壊死毒素マウスモノクローナル抗体（付記23）を96穴平底プレートの各穴に100 μ Lずつ加え、4 $^{\circ}$ Cで16時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄し、希釈・ブロッキング液を200 μ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで60分間反応させる。反応後、洗浄液で3回洗浄し、希釈・ブロッキング液で400倍希釈した豚ELISA抗体価測定試験用パスツレラ・ムルトシダ壊死毒素（付記24）を100 μ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで60分間反応させた後、洗浄液で3回洗浄したもの。

付記18 ペルオキシダーゼ標識抗体-2

ペルオキシダーゼ標識抗ブタIgGを希釈・ブロッキング液で至適濃度に希釈したもの。

付記19 ブロッキング液

100 mL中

スキムミルク	10	g
--------	----	---

洗淨液 残 量

付記20 0.05mol/L炭酸塩緩衝液

1,000mL中

炭酸ナトリウム 1.59 g

炭酸水素ナトリウム 2.93 g

水 残 量

付記21 精製皮膚壊死毒素

パスツレラ・ムルトシダD型8株又はこれと同等の壊死毒素を産生する株の菌体超音波処理後の遠心上清をゲル浸透クロマトグラフィー及びイオン交換クロマトグラフィーを用いて精製後、皮膚壊死毒素画分を小分けして凍結乾燥し、2～7℃で保存したもの。

付記22 0.01 mol/Lホウ酸緩衝液

1,000 mL中

四ホウ酸ナトリウム十水和物 3.8 g

水 残 量

pHを9.0に調整する。

付記23 抗壊死毒素マウスモノクローナル抗体

パスツレラ・ムルトシダ壊死毒素を用いてイムノブロッティングを行った場合、分子量約143kDaの単一のバンドを認めるマウスモノクローナル抗体P3F51又はこれと同等と認められたもの。

付記24 豚ELISA抗体価測定試験用パスツレラ・ムルトシダ壊死毒素

パスツレラ・ムルトシダD型8株又はこれと同等の壊死毒素を産生する株の菌体超音波処理後の遠心上清をろ過滅菌して、モルモット皮内試験で320～640倍の壊死毒素活性を示すように豚ELISA抗体価測定試験用抗原として調製したもの。