

動物用生物学的製剤基準の一部を改正する件 新旧対照表

○動物用生物学的製剤基準（平成14年10月3日農林水産省告示第1567号）（抄）

改正後	改正前
<p>ワクチン（シードロット製剤）の部</p> <p>豚アクチノバシラス・プルロニューモニエ（1・2・5型）感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）</p> <p>（略）</p> <p><u>豚アクチノバシラス・プルロニューモニエ（1・2・5型、組換え型毒素）感染症（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）</u></p> <p>1 定義 シードロット規格に適合したアクチノバシラス・プルロニューモニエ（以下「App」という。）1型菌、2型菌及び5型菌の培養菌液を不活化したものと、同規格に適合した組換え大腸菌で產生される無毒変異型App毒素（rApx I、rApx II 及びrApxIII）とを混合し、アルミニウムゲルアジュバントを添加したワクチンである。</p> <p>2 製法 2.1 製造用株 2.1.1 App 1型菌 2.1.1.1 名称 App 41-1株(血清型1型)又はこれと同等と認められた株 2.1.1.2 性状 細胞毒素Apx I 及びApx IIを產生する。感受性豚の気管内に接種すると、胸膜肺炎を惹起する。 2.1.1.3 マスターしード菌 2.1.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数 マスターしード菌は、チョコレート寒天培地(付記1)又は適當と認められた培地で増殖させ、保存用の容器に分注する。 分注したマスターしード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して-60℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。</p>	<p>ワクチン（シードロット製剤）の部</p> <p>豚アクチノバシラス・プルロニューモニエ（1・2・5型）感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）</p> <p>（略）</p> <p>（新設）</p>

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継代数は、10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は、その継代数以内とする。

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-60°C以下又は凍結乾燥して5°C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-60°C以下又は凍結乾燥して5°C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 App 2型菌

2.1.2.1 名称

App SHP-1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

細胞毒素Apx II及びApx IIIを産生する。感受性豚の気管内に接種すると、胸膜肺炎を惹起する。

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、チョコレート寒天培地又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、凍結して-60°C以下又は凍結乾燥して5°C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継代数は、10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。

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-60°C以下又は凍結乾燥して5°C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-60°C以下又は凍結乾燥して5°C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。

2.1.3 App 5型菌

2.1.3.1 名称

App Ng-2株(血清型5型)又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

細胞毒素Apx I 及びApx IIを產生する。感受性豚の気管内に接種すると、胸膜肺炎を惹起する。

2.1.3.3 マスターシード菌

2.1.3.3.1 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、チョコレート寒天培地又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、凍結して-60°C以下又は凍結乾燥して5°C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継代数は、10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。

2.1.3.4 ワーキングシード菌

2.1.3.4.1 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-60°C以下又は凍結乾燥して5°C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。

2.1.3.5 プロダクションシード菌

2.1.3.5.1 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-60°C以下又は凍結乾燥して5°C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。

2.1.4 rApx I 產生組換え大腸菌

2.1.4.1 名称

rApx I 產生組換え大腸菌ESN1113株又はこれと同等と認められた株

2.1.4.2 性状

アンピシリン及びテトラサイクリン耐性を示し、App 41-1株染色体DNA由来 $apx\ I\ A$ 遺伝子を挿入したプラスミドpSN110を有する。イソプロピオチルガラクトシド(以下「IPTG」という。)を添加した培地により発育させると、rApx Iたん白を產生することがSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により確

認される。

2.1.4.3 マスターシード菌

2.1.4.3.1 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、LB-Amp寒天培地（付記2）又は適當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、凍結して-60°C以下又は凍結乾燥して5°C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継代数は、10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。

2.1.4.4 ワーキングシード菌

2.1.4.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、LB-Amp寒天培地又は適當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-60°C以下又は凍結乾燥して5°C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。

2.1.4.5 プロダクションシード菌

2.1.4.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、LB-Amp寒天培地又は適當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-60°C以下又は凍結乾燥して5°C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。

2.1.5 rApx II 產生組換え大腸菌

2.1.5.1 名称

rApx II 產生組換え大腸菌ESN1074株又はこれと同等と認められた株

2.1.5.2 性状

アンピシリン及びテトラサイクリン耐性を示し、App Ng-2株染色体DNA由來 $apx\text{ II}A$ 遺伝子を挿入したプラスミドpSN63を有する。IPTGを添加した培地により発育させると、rApx IIたん白を產生することがSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により確認される。

2.1.5.3 マスターシード菌

2.1.5.3.1 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、LB-Amp寒天培地又は適當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、凍結して-60°C以下又は凍結乾燥して5°C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継代数は、10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。

2.1.5.4 ワーキングシード菌

2.1.5.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、LB-Amp寒天培地又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-60°C以下又は凍結乾燥して5°C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。

2.1.5.5 プロダクションシード菌

2.1.5.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、LB-Amp寒天培地又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-60°C以下又は凍結乾燥して5°C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。

2.1.6 rApxIII産生組換え大腸菌

2.1.6.1 名称

rApxIII産生組換え大腸菌ESN1166株又はこれと同等と認められた株

2.1.6.2 性状

アンピシリン及びテトラサイクリン耐性を示し、App SHP-1株染色体DNA由来 $apx IIIA$ 遺伝子を挿入したプラスミドpSN148を有する。IPTGを添加した培地により発育させると、rApxIIIたん白を産生することがSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により確認される。

2.1.6.3 マスターシード菌

2.1.6.3.1 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、LB-Amp寒天培地又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、凍結して-60°C以下又は凍結乾燥して5°C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継代数は、10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。

2.1.6.4 ワーキングシード菌

2.1.6.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、LB-Amp寒天培地又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-60°C以下又は凍結乾燥して5°C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。

2.1.6.5 プロダクションシード菌

2.1.6.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、LB-Amp寒天培地又は適當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-60°C以下又は凍結乾燥して5°C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 App 1、2 及び 5 型菌

製造に適當と認められた寒天培地及び液状培地を用いる。

2.2.1.2 組換え大腸菌

製造に適當と認められた寒天培地及び液状培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 App 1、2 及び 5 型菌

2.3.1.1 培養

App各株のプロダクションシード菌をそれぞれ寒天培地に接種し、培養したものを液状培地に接種し、培養する。これを更に液状培地に接種し、培養したものを各株の培養菌液とする。

培養菌液について、3.2の試験を行う。

2.3.1.2 不活化及び集菌

各株の培養菌液をホルマリン又は適當と認められた不活化剤で不活化した後、遠心して得られた菌体を、リン酸緩衝食塩液に均一に浮遊し、チメロサール又は適當と認められた保存剤を添加したものを、各株の不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.3の試験を行う。

2.3.1.3 濃度調整

各株の不活化菌液を総菌数が規定量となるようにリン酸緩衝食塩液で希釈し、チメロサール又は適當と認められた保存剤を添加したものを、各株の原液とする

原液について、3.6.1の試験を行う。

2.3.2 rApx I、II 及び III たん白

2.3.2.1 培養

組換え大腸菌各株のプロダクションシード菌をそれぞれ寒天培地に接種し、培養したものを液状培地に接種し、培養する。これを更に液状培地に接種し、培養したものを、各株の培養菌液とする。

培養菌液について、3.2の試験を行う。

2.3.2.2 発現培養

各株の培養菌液にIPTGを添加した液状培地を加えて培養した菌液を、各株の発現菌液とする。

発現菌液について、3.4の試験を行う。

2.3.2.3 集菌及び破碎

各株の発現菌液を遠心し、菌体を発現菌液量の約1/100量の適當と認められた緩衝液に浮遊し、これにリゾチームを添加し、攪拌する。これに適當と認められた緩衝液を加え、高圧細胞破碎装置により処理を行ったものを、各株の破碎菌液とする。

破碎菌液について、3.5の試験を行う。

2.3.2.4 rApxたん白の回収と可溶化

各株の破碎菌液を遠心し、各rApxたん白を発現菌液量の約1/250量の滅菌蒸留水に浮遊する。これに適當と認められた可溶化剤を加えて可溶化し、遠心する。得られた上清を、各rApxたん白の原液とする。

原液について、3.6の試験を行う。

2.4 最終バルク

2.4.1 Appバルク

App各株の原液をリン酸緩衝食塩液及び水酸化アルミニウムゲルで総菌数が規定濃度になるように希釗して調整する。これにホルマリン及びチメロサーク又は適當と認められた保存剤を添加したものを、各株のAppバルクとする。

2.4.2 rApxバルク

rApx I、II及びIIIたん白の各原液をそれぞれ蛋白濃度の調整をして混合した後、リン酸緩衝食塩液及び水酸化アルミニウムゲルを加えて感作し、各rApxたん白を水酸化アルミニウムゲルに吸着させる。遠心によりrApxたん白の吸着した水酸化アルミニウムゲルを回収し、元の量と等量のリン酸緩衝食塩液に再浮遊する。これに、ホルマリン及びチメロサーク又は適當と認められた保存剤を添加したものを、rApxバルクとする。

2.4.3 最終バルク

rApxバルク及び3株のAppバルクを混合したものを、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3.7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

3.1.1.1.1 App菌株の同定試験

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。

3.1.1.1.2 組換え大腸菌株の同定試験

シードロット規格の1.4.2.5.2.1.1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 夾雜菌否定試験

3.1.1.2.1 App菌株の夾雜菌否定試験

一般試験法の無菌試験法1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2.2 組換え大腸菌株の夾雜菌否定試験

一般試験法の無菌試験法1を準用して試験するとき、組換え大腸菌以外の発育を認めてはならない。

3.1.1.3 組換え遺伝子等安定性確認試験

3.1.1.3.1 組換え大腸菌株の組換え遺伝子等安定性確認試験

一般試験法の組換え遺伝子等安定性確認試験法を準用して試験をするとき、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 夾雜菌否定試験

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

貯蔵するものについて次の試験を行う。

3.1.3.1 夾雜菌否定試験

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 夾雜菌否定試験

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。

3.3 不活化菌液の試験

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。

3.3.2 不活化試験

3.3.2.1 試験材料

検体及び製造に適当と認められた培地を用いる。

3.3.2.2 試験方法

検体0.5mLずつを20mLの培地2本以上にそれぞれ接種し、37℃で2日間培養する。

3.3.2.3 判定

菌の発育を認めてはならない。

3.3.3 総菌数試験

3.3.3.1 試験材料

検体をリン酸緩衝食塩液で適度に希釀したものを、試料とする。

3.3.3.2 試験方法

試料の吸光度を分光光度計で測定する。

3.3.3.3 判定

標準検量曲線、吸光度の測定値及び検体の希釈倍率から総菌数を算出する。
検体中の総菌数は、1mL中 3×10^{10} 個以上でなければならない。

3.4 発現菌液の試験

3.4.1 発現たん白確認試験

3.4.1.1 試験材料

大腸菌各株の発現菌液に等量のサンプルバッファー（付記3）を加えて煮沸したものを試料とする。

3.4.1.2 試験方法

試料の $10 \mu\text{L}$ を 10w/v\% SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後、クマシー・ブルー染色により泳動像を観察する。

3.4.1.3 判定

ESN1113株及びESN1074株の検体には分子量約105kDaの位置に、ESN1166株の検体には分子量約120kDaの位置に明瞭なバンドを認めなくてはならない。

3.5 破碎菌液の試験

3.5.1 破碎確認試験

3.5.1.1 試験材料

破碎菌液を試料とする。

3.5.1.2 試験方法

検体 0.01mL をスライド・グラス上に 1cm^2 の区画に塗抹し、乾燥させ、火炎固定し、ギムザ染色又はグラム染色する。

3.5.1.3 判定

鏡検により、ほぼすべての菌体の破碎像が観察されなければならない。

3.6 原液の試験

3.6.1 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。

3.6.2 同定試験

3.6.2.1 試験材料

各rApxたん白の原液を蒸留水又は $2 \sim 4\text{ mol/L}$ 尿素液によりたん白量 $300 \mu\text{g/mL}$ となるように希釈したものを、試料とする。

3.6.2.2 試験方法

3.4.1.2を準用して試験する。

3.6.2.3 判定

rApx I 及びrApx II たん白の試料には分子量約105kDaの位置に、rApx III たん白の試料には約120kDaの位置に明瞭なバンドを認めなければならない。

3.6.3 たん白定量試験

3.6.3.1 試験材料

各rApxたん白の原液を $20 \sim 200 \mu\text{g/mL}$ となるように2倍階段希釈したものを試料とする。

3.6.3.2 試験方法

Lowry法により測定し、原液1mL中のたん白量を算出する。

3.6.3.3 判定

各rApxたん白の原液のたん白量は、1mL中4mg以上でなければならない。

3.7 小分製品の試験

3.7.1 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液体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。

3.7.2 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。

3.7.3 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。

3.7.4 チメロサール定量試験

一般試験法のチメロサー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。

3.7.5 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、0.25vol%以下でなければならない。

3.7.6 アルミニウム定量試験

一般試験法のアルミニウム定量法を準用して試験するとき、アルミニウムの含有量は1mL中3.6mg以下でなければならない。

3.7.7 毒性限度確認試験

一般試験法の毒性限度確認試験1を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、注射後の体重測定は4日目とする。

3.7.8 力価試験

3.7.8.1 試験材料

3.7.8.1.1 注射材料

試験品をリン酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釀液で20倍に希釀したものを作成する。

3.7.8.1.2 試験動物

約3週齢のマウスを用いる。

3.7.8.1.3 攻撃用菌液

App 1型菌AH-1株又は適当と認められた株、App 2型菌SHP-1株又は適当と認められた株及びApp 5型菌Ng-2株又は適当と認められた株をそれぞれを試験用培地1(付記4)に移植し、37℃で16時間培養する。集落を釣菌して試験用培地2(付記5)に移植し、37℃で3~6時間振とう培養したものを各攻撃用菌液とする。

3.7.8.2 試験方法

試験動物70匹以上を試験群とし、70匹以上を対照群とする。

注射材料0.5mLずつを試験群の腹腔内に注射する。

注射後14日目に、試験群及び対照群をそれぞれ10匹以上ずつの7群、計14群に分ける。1型菌攻撃用菌液及び2型攻撃用菌液をハートインフュージョン培地で2段階、5型菌攻撃用菌液をハートインフュージョン培地で3段階に希釈し、更にこれらの希釈菌液を10w/v%ムチン液で10倍に希釈したものを、試験群及び対照群にそれぞれ0.5mLずつ腹腔内に注射して攻撃した後、7日間臨床観察する。

3.7.8.3 判定

各攻撃菌株の対照群の80%以上が死亡した攻撃菌量において、試験群では80%以上が耐過生存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3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 チョコレート寒天培地

1,000mL中	
ハートインフュージョン寒天	40g
水	残量
加温溶解した後、121℃で15分間高压滅菌を行う。約80℃に冷却した後、馬脱線維血を10vol%となるように添加する。	

付記2 LB-Amp寒天培地

1,000mL中	
カゼインペプトン	10g
酵母エキス	5g
塩化ナトリウム	5g
水	残量
加熱溶解した後、pHを7.4～7.6に調整し、121℃で15分間高压滅菌する。	
56℃に冷却した後、アンピシリンを最終力値250μg/mLとなるように添加する。	

付記3 サンプルバッファー

1,000 mL中	
0.25mol/Lトリス塩酸緩衝液、pH 6.8	500 mL
20w/v%ラウリル硫酸ナトリウム	260 mL
グリセリン	200 mL
ジチオスレイトール	1.54 g
プロムフェノールブルー	1.00 g
水	残量

付記4 試験用培地1

ハートインフュージョン寒天培地を121℃で15分間高压滅菌し、冷却した後、ろ過滅菌した鶏非働化血清を5 vol%及び0.1w/v% β -ニコチンアミドアデニジヌクレオチド（以下「 β -NAD」という。）液を1 vol%の割合で加えたもの。

付記5 試験用培地2

ハートインフュージョン培地を121℃で15分間高压滅菌し、冷却した後、ろ過滅菌した鶏非働化血清を5 vol%及び0.1w/v% β -NAD液を1 vol%の割合で加えたもの。