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)

次の表により、改正前欄に掲げる規定の傍線を付した部分(以下「傍線部分」という。)でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分がある ものは、これを当該傍線部分のように改め、改正後欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正前欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これ を加え、改正前欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを削る。

ワクチン(シードロット製剤)の部

# 豚ボルデテラ感染症不活化・パスツレラ・ムルトシダトキソイド混合(油性アジュバント加)ワクチン(シード)

1 (略)

- 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・2.1.1.2 (略)
- 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 培地で増殖させ、連続した工程により作製し、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-70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下に保存する。<u>ただし、農</u> 林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

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、ボルデー・ジャング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-70℃以下又は凍結乾燥して5℃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

ワクチン(シードロット製剤)の部

# 豚ボルデテラ感染症不活化・パスツレラ・ムルトシダトキソイド混合(油性アジュバント加)ワクチン(シード)

- 1 (略)
- 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 2.1.1.2 (略)
- 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 培地で増殖させ、連続した工程により作製し、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-70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下に保存する。

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、ボルデー・ジャング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-70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

温度とする。

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、ボルデー・ジャング培地又は適当と認められた培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して-70 で以下又は 凍結乾燥して5 で以下で保存する。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。

プロダクションシード菌を保存する場合は、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 2.1.2.2 (略)
- 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、鶏血清加PPLO寒天培地(付記2)又は適当と認められた培地で増殖させ、連続した工程により作製し、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-70<sup>°</sup>C以下又は凍結乾燥して5 <sup>°</sup>C以下で保存する。<u>ただし、農</u> 林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

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、鶏血清加PPLO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-70<sup>°</sup>C以下又は凍結乾燥して5<sup>°</sup>C以下で保存する。<u>ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存</u>温度とする。

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、鶏血清加PPLO寒天培地又は適当と認められた培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して-70℃以下又は

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、ボルデー・ジャング培地又は適当と認められた培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して $\underline{-70以下 \mathbb{C}}$ 又は凍結乾燥して5 $\mathbb{C}$ 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は、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・2.1.2.2 (略)
- 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、鶏血清加PPLO寒天培地(付記2)又は適当と認められた培地で増殖させ、連続した工程により作製し、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-70℃以下又は凍結乾燥して5℃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、鶏血清加PPLO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-70<sup>°</sup>C以下又は凍結乾燥して5<sup>°</sup>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、鶏血清加PPLO寒天培地又は適当と認められた培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して-70℃以下又は

凍結乾燥して5℃以下で保存する。<u>ただし、農林水産大臣が特に認めた</u>場合には、その保存温度とする。

プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

- 2.2 (略)
- 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

ボルデー・ジャング培地又は適当と認められた培地で培養したワーキングシード菌又はプロダクションシード菌を、製造用培地1又は適当と認められた培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2.1.1及び3.2.2の試験を行う。

## 2.3.1.2 (略)

#### 2.3.1.3 濃度調整

PBS、又は適当と認められた保存剤を添加したPBSでボルデテラ・ブロンキセプチカ不活化菌液の濃度を調整したものを原液とする。原液について、3.6の試験を行う。

## 2.3.2 パスツレラ・ムルトシダトキソイド原液

# 2.3.2.1 培養

鶏血清加PPLO寒天培地又は適当と認められた培地で培養したワーキングシード菌又はプロダクションシード菌を、製造用培地2又は適当と認められた培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2.1.2及び3.2.3の試験を行う。

## 2.3.2.2 集菌及び破砕

培養菌液を遠心し、得られた沈殿菌を適量のリン酸緩衝液(付記6)に浮遊し、物理的処理により菌体を破砕したものをパスツレラ・ムルトシダ破砕菌液とする。

パスツレラ・ムルトシダ破砕菌液について、3.4の試験を行う。

#### 2.3.2.3 部分精製及び濃縮

パスツレラ・ムルトシダ破砕菌液からカラムクロマトグラフィーにより毒素活性部分を分取し、濃縮したものをパスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素液とする。

凍結乾燥して5℃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は、3.1.3の試験を行う。

- 2.2 (略)
- 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

ボルデー・ジャング培地又は適当と認められた培地で培養したワーキングシード菌又はプロダクションシード菌を、製造用培地1又は適当と認められた培地に接種し、培養したものをボルデテラ・ブロンキセプチカ培養菌液とする。

ボルデテラ・ブロンキセプチカ培養菌液について、3.2.1.1及び3.2.2の 試験を行う。

2.3.1.2 (略)

#### 2.3.1.3 濃度調整

PBS、又は適当と認められた保存剤を添加したPBSでボルデテラ・ブロンキセプチカ不活化菌液の濃度を調整したものをボルデテラ・ブロンキセプチカ原液とする。

ボルデテラ・ブロンキセプチカ原液について、3.6の試験を行う。

## 2.3.2 パスツレラ・ムルトシダトキソイド原液

# 2.3.2.1 培養

鶏血清加PPLO寒天培地又は適当と認められた培地で培養したワーキングシード菌又はプロダクションシード菌を、製造用培地2又は適当と認められた培地に接種し、培養したものをパスツレラ・ムルトシダ培養菌液とする。

<u>パスツレラ・ムルトシダ</u>培養菌液について、3.2.1.2及び3.2.3の試験を 行う。

## 2.3.2.2 集菌及び破砕

パスツレラ・ムルトシダ培養菌液を遠心し、得られた沈殿菌を適量のリン酸緩衝液(付記6)に浮遊し、物理的処理により菌体を破砕したものをパスツレラ・ムルトシダ破砕菌液とする。

パスツレラ・ムルトシダ破砕菌液について、3.4の試験を行う。

## 2.3.2.3 部分精製及び濃縮

破砕菌液からカラムクロマトグラフィーにより毒素活性部分を分取 し、濃縮したものをパスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素液とする。 パスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素液について、3.5の試験を行う。 パスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素液について、3.5の試験を行う。 2.3.2.4 不活化

パスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素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したものを原液とする。

原液について、3.6の試験を行う。

- 2.4 (略)
- 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、3.8の試験を行う。

- 3 試験法
- 3.1~3.4 (略)
- 3.5 パスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素液の試験
- 3.5.1 (略)
- 3.5.2 定量試験
- 3.5.2.1 試験材料
- 3.5.2.1.1 検体及び試料

毒素量測定試験には、検体をPBSで2倍階段希釈し、各段階の希釈液 を試料としたものを用いる。また、たん白量測定試験には、検体を用いる。

- 3.5.2.1.2 試験動物(略)
- 3.5.2.2 試験方法(略)
- 3.5.2.3 判定

検体  $1\,\mathrm{mL}$ 中の皮膚壊死毒素単位及びたん白量から、たん白 $\underline{\underline{1}}\,1\,\mu\,\mathrm{g}$ 当たりの皮膚壊死毒素単位を算出する。

検体中の皮膚壊死毒素は、たん白量  $1 \mu$  g当たり 30皮膚壊死毒素単位以上でなければならない。

- 3.6 3.7 (略)
- 3.8 小分製品の試験
- 3.8.1~ 3.8.4 (略)
- 3.8.5 安全試験
- 3.8.5.1 (略)
- 3.8.5.2 試験方法

試験動物の2頭を試験群、1頭を対照群とする。

2.3.2.4 不活化

パスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素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したものをパスツレラ・ムルトシダ原液とする。

パスツレラ・ムルトシダ原液について、3.6の試験を行う。

- 2.4 (略)
- 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 ~3.4 (略)
- 3.5 パスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素液の試験
- 3.5.1 (略)
- 3.5.2 定量試験
- 3.5.2.1 試験材料
- 3.5.2.1.1 検体及び試料

たん白量測定試験には、検体を用いる。また、毒素量測定試験には、 検体をPBSで2倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料としたものを用い る。

- 3.5.2.1.2 試験動物(略)
- 3.5.2.2 試験方法(略)
- 3.5.2.3 判定

検体  $1\,\mathrm{mL}$ 中の皮膚壊死毒素単位及びたん白量から、たん白  $1\,\mu\,\mathrm{g}$ 当たりの皮膚壊死毒素単位を算出する。

検体中の皮膚壊死毒素は、たん白量 1  $\mu$  g当たり30皮膚壊死毒素単位以上でなければならない。

- 3.6 · 3.7 (略)
- 3.8 小分製品の試験
- 3.8.1~ 3.8.4 (略)
- 3.8.5 安全試験
- 3.8.5.1 (略)
- 3.8.5.2 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2mLずつを1か月間隔で2回、試験群の筋肉内に注射し、対 照群と共に2回目注射後2週間観察する。

3.8.5.3 (略)

3.8.6 力価試験

3.8.6.1 (略)

3.8.6.2 豚パスツレラ症力価試験

3.8.6.2.1 試験材料

3.8.6.2.1.1 試験動物(略)

組換え無毒変異型皮膚壊死毒素たん白(以下この項において「mrPMT」 という。) (付記12) を用いる。

## 3.8.6.2.2 試験方法

3.8.5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、ELISAを行う。

試験群と対照群の血清を血清希釈液(付記13)で100倍に希釈したも の、指示陽性血清(付記14)及び指示陰性血清(付記15)をmrPMT吸着 プレート(付記16)の4穴(偶数列2穴と奇数列2穴)に50μLずつ加 える。37℃で30分間反応させた後、洗浄液(付記17)で3回洗浄する。 次に、各穴に酵素標識抗体液(付記18)を50 µ Lずつ加え、37℃で15 分間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。発色基質液(付記19)を各 穴に50 µ Lずつ加え、遮光して30℃で指示血清が所定の吸光度値となる ように感作させた後、2 mol/L硫酸水溶液を $50 \mu \text{ L}$ ずつ加えて反応を停止 させ、各穴の吸光度を主波長490~492nm、副波長630nmで測定する。

#### 3.8.6.2.3 判定

試験群と対照群の血清、指示陽性血清及び指示陰性血清について、奇 数列穴の吸光度値から偶数列穴の吸光度値を差し引いた値を算出し、平 均したものを各血清の吸光度値とする。

指示陽性血清の吸光度値が0.8~1.3、指示陰性血清の吸光度値が0.1未 満の場合、試験成立とし、次の式に基づいて試験群と対照群の血清のE 値を算出したとき、0.1以上を陽性とする。

E値= (S-N) / (P-N)

S:被検血清の吸光度値

N:指示陰性血清の吸光度値

P:指示陽性血清の吸光度値

試験群のE値は、全て陽性でなければならない。この場合において、

注射材料2mLを4週間隔で2回、試験群の筋肉内に注射し、対照群と 共に初回注射後44日間観察する。

3.8.5.3 (略)

3.8.6 力価試験

3.8.6.1 (略)

3.8.6.2 豚パスツレラ症力価試験

3.8.6.2.1 試験材料

3.8.6.2.1.1 試験動物

|3.8.6.2.1.2 酵素抗体反応 (以下この項において 「ELISA」という。) 用抗原 |3.8.6.2.1.2 酵素抗体反応 (以下この項において 「ELISA」という。) 用抗原 組換え皮膚壊死毒素たん白(以下この項において「rToxA」という。) (付記12) を用いる。

## 3.8.6.2.2 試験方法

3.8.5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、ELISAを行う。

試験群と対照群の血清を血清希釈液(付記13)で100倍に希釈したも の、参照陽性血清(付記14)及び参照陰性血清(付記15)をrToxA吸着 プレート(付記16)の4穴(偶数列2穴と奇数列2穴)に50μLずつ加 える。37℃で30分間反応させた後、洗浄液(付記17)で3回洗浄する。

次に、各穴に酵素標識抗体液(付記18)を50 µ Lずつ加え、37℃で15 分間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。発色基質液(付記19)を各 穴に50 µ Lずつ加え、遮光して30℃で20分間反応させた後、2 mol/L硫酸 水溶液を50 μ L ずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を主波長 492nm、副波長630nmで測定する。

## 3.8.6.2.3 判定

試験群と対照群の血清、参照陽性血清及び参照陰性血清について、奇 数列穴の吸光度値から偶数列穴の吸光度値を差し引いた値を算出し、平 均したものを各血清の吸光度値とする。

参照陽性血清の吸光度値が0.8~1.3、参照陰性血清の吸光度値が0.1未 満の場合、試験成立とし、次の式に基づいて試験群と対照群の血清のE 値を算出したとき、0.1以上を陽性とする。

E値= (S-N) / (P-N)

S:被検血清の吸光度値

N:参照陰性血清の吸光度値

P:参照陽性血清の吸光度値

試験群のE値は、全て陽性でなければならない。この場合において、

対照群では、全て0.1未満でなければならない。

4 (略)

付記1~付記11 (略)

## 付記12 mrPMT

組換え無毒変異型皮膚壊死毒素たん白 (mrPMT) を発現するパス ツレラ・ムルトシダ由来無毒変異型皮膚壊死毒素遺伝子を導入した 大腸菌株の培養液を集菌して得た菌体を超音波処理により破砕し、 硫安塩析法によりmrPMTを回収し、精製する。

精製したmrPMTは、SDSポリアクリルアミド電気泳動で分析したとき、約140kDaの位置に特異的なバンドを認める。精製したmrPMTをホルマリンで不活化し、リン酸緩衝液に透析したものをELISA抗原とする。

## 付記13 血清希釈液

1,000mL中

ゼラチン10 g10倍濃度PBS100 mLポリソルベート801 mL水残量

ゼラチンを水に加温・溶解後、冷却し、これに10倍濃度PBS及びポリソルベート80を添加する。

# 付記14 指示陽性血清

精製mrPMTで免疫した豚の血清であって、ELISAの吸光度値が約1.0を示すように調整したもの。

ただし、免疫に用いる豚は、適当と認められた規格の豚を用いる

## 付記15 指示陰性血清

健康な豚の血清で、ELISAの吸光度値が0.1未満を示すもの。

# 付記16 mrPMT吸着プレート

対照群では、全て0.1未満でなければならない。

4 (略)

付記1~付記11 (略)

## 付記12 rToxA

大腸菌K-12株由来のXL-1 Blue株を、ToxA遺伝子を挿入したpSN131プラスミドで形質転換してrToxA産生大腸菌を作出する。

この組換え大腸菌の培養液を集菌・洗浄して得た菌体を超音波処理及び硫安塩析した後、カラムクロマトグラフィーを用いて精製し、ホルマリンで不活化したものをrToxAとする。

rToxAは、不活化前の試料をSDSポリアクリルアミド電気泳動で分析したとき、約140KDaの位置に特異的なバンドを認め、他にバンドを認めない。

## 付記13 血清希釈液

1.000mL中

ゼラチン 10.0 g 10倍濃度PBS 100 mL ポリソルベート80 1 mL 水 残 量

ゼラチンを水に加温・溶解後、冷却し、これに10倍濃度PBS及びポリソルベート80を添加する。

# 付記14 参照陽性血清

不活化した精製パスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素で免疫した豚の血清であって、血清希釈によりELISAの吸光度値が約1.0を示すように濃度を調整し、凍結したもの。

ただし、免疫に用いる豚は、適当と認められた規格の豚を用いる

# 付記15 参照陰性血清

パスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素に対する抗体を保有しない 豚の血清であって、ELISAの吸光度が0.1以下を示すもの。

# 付記16 <u>rToxA</u>吸着プレート

ELISA抗原を指示陽性血清の吸光度が $0.8\sim1.3$ になるよう $0.05$ mol/L炭酸重炭酸緩衝液 (付記20) で希釈し、プレートの奇数列に分注し、 $0.05$ mol/L炭酸重炭酸緩衝液をプレートの偶数列にそれぞれ $50\mu$ Lずつ分注し、 $2\sim10$ ℃で1夜固相化する。固相化したプレートを洗浄液で洗浄し、ブロッキング液(付記21)を $50\mu$ Lずつ各穴に加えてブロッキング後、プレートを洗浄液で洗浄したもの。			$\frac{\vec{m}  1 \mu  g/mL  e  \Delta  s  5  c}{\sqrt{0.05  mol/L}  c}$ で $\frac{\vec{m}  1 \mu  g/mL  e  \Delta  s}{\sqrt{0.05  mol/L}  c}$ で $\frac{\vec{m}  a  b}{\sqrt{0.05  mol/L}}$ の $\frac{\vec{m}  a  b}{0.05  mol/$	ートの奇数列に それぞれ50μL ートを洗浄液で つ各穴に加え <u>、</u>
付記17	(略)		付記17 (略)	
付記18	酵素標識抗体液 1,000mL中 ペルオキシダーゼ標識プロテインA 10倍濃度PBS 100mL ポリソルベート80 水 使用直前に調製する。	1 mL 100 mL 1 mL 残 量	付記18 酵素標識抗体液 1,000mL中 ペルオキシダーゼ標識プロテインA <u>(たん白濃度2</u> mL 10倍濃度PBS 100mL ポリソルベート80	100 mL 1 mL
付記19	発色基質液 1,000mL中 o-フェニレンジアミン二塩酸塩 30%過酸化水素水 基質緩衝液(付記22) 使用直前に調製する。	0.4 0.2 mI 残 量		残 量 <u>0.40</u> g 0.2 mL 残 量
付記20	0.05mol/L炭酸重炭酸緩衝液 1,000mL中 炭酸水素ナトリウム 炭酸ナトリウム 水 pHを9.6に調整する。	_	使用直前に調製する。 付記20 0.05mol/L炭酸重炭酸緩衝液 1,000mL中 炭酸水素ナトリウム 炭酸ナトリウム 水	3.0 g 1.5 g 残 量
付記21	ブロッキング液 1,000mL中 ゼラチン 水 ゼラチンを加温・溶解し、冷却後使用する。	1 <u>0</u> 度 残 量	pHを9.6に調整する。 g 付記21 ブロッキング液 1,000mL中 ゼラチン 水	<u>10.0</u> g 残 量

付記22 (略)	ゼラチンを加温・溶解し、冷却後使用する。
	付記22 (略)