

ひらめストレプトコッカス・パラウベリス（Ⅰ型・Ⅱ型） 感染症・ β 溶血性レンサ球菌症混合不活化ワクチン（シード）

令和4年8月15日（告示第1287号）新規追加

1 定義

シードロット規格に適合したストレプトコッカス・パラウベリスⅠ型菌及びⅡ型菌並びにストレプトコッカス・イニエの培養菌液を不活化後混合したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 ストレプトコッカス・パラウベリスⅠ型菌

2.1.1.1 名称

ストレプトコッカス・パラウベリスⅠ型菌M4Y株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

ストレプトコッカス・パラウベリスⅠ型菌に一致する生物学的性状を示し、ストレプトコッカス・パラウベリス感染症に対する免疫原性を有する。

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、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°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 -70°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°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 ストレプトコッカス・パラウベリスⅡ型菌

2.1.2.1 名称

ストレプトコッカス・パラウベリスⅡ型菌M5E株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

ストレプトコッカス・パラウベリスⅡ型菌に一致する生物学的性状を示し、ストレプトコッカス・パラウベリス感染症に対する免疫原性を有する。

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、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、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。

2.1.3 ストレプトコッカス・イニエ

2.1.3.1 名称

ストレプトコッカス・イニエF2K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・イニエ38－タイプに一致する生物学的性状を示し、ひらめのβ溶血性レンサ球菌症に対する免疫原性を有する。

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、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。

2.1.3.4 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－70℃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 製造用材料

2.2.1 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 ストレプトコッカス・パラウベリスⅠ型菌原液

2.3.1.1 培養

プロダクションシード菌を培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2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。

2.3.1.3 原液

不活化菌液を適当と認められた方法で集菌し、適当と認められた溶液で濃度調整したものを原液とする。必要に応じてpHを調整してもよい。

原液について、3.3の試験を行う。

2.3.2 ストレプトコッカス・パラウベリスⅡ型菌原液

2.3.2.1 培養

プロダクションシード菌を培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2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。

2.3.2.3 原液

不活化菌液を適当と認められた方法で集菌し、適当と認められた溶液で濃度調整したものを原液とする。必要に応じてpHを調整してもよい。

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・イニエ原液

2.3.3.1 培養

プロダクションシード菌を培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2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。

2.3.3.3 原液

不活化菌液を適当と認められた方法で集菌し、適当と認められた溶液で濃度調整したものを原液とする。必要に応じてpHを調整してもよい。

原液について、3.3の試験を行う。

2.4 最終バルク

それぞれの原液を混合して、適当と認められた溶液で濃度調整し、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 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を準用して試験を実施するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 夾雑菌否定試験

3.1.1.2.1 寒天培地法

3.1.1.2.1.1 試験材料

3.1.1.2.1.1.1 試料

検体を試料とする。

3.1.1.2.1.1.2 培地

トッド・ヘビット寒天培地（付記1）又は適当と認められた培地を用いる。

3.1.1.2.1.2 試験方法

それぞれの試料0.1mLずつを培地2枚以上に接種して培地表面に拡散させたものを、27℃で24～48時間培養する。

3.1.1.2.1.3 判定

ストレプトコッカス・パラウベリスⅠ型菌又はⅡ型菌の検体は、ストレプトコッカス・パラウベリス以外の菌の発育を認めてはならず、ストレプトコッカス・イニエの検体は、ストレプトコッカス・イニエ以外の菌の発育を認めてはならない。

3.1.1.2.2 無菌試験法

一般試験法の無菌試験法の真菌否定試験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 夾雑菌否定試験

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

トッド・ヘビット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

それぞれの試料0.1mLずつを培地 2 枚以上に接種して培地表面に拡散させたものを、27℃で24～48時間培養する。

3.2.1.3 判定

ストレプトコッカス・パラウベリスⅠ型菌又はⅡ型菌の検体は、ストレプトコッカス・パラウベリス以外の菌の発育を認めてはならず、ストレプトコッカス・イニエの検体は、ストレプトコッカス・イニエ以外の菌の発育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。

3.3.2 不活化試験

3.3.2.1 試験材料

3.3.2.1.1 試料

検体を試料とする。

3.3.2.1.2 培地

トッド・ヘビット寒天培地又は適当と認められた培地を用いる。

3.3.2.2 試験方法

試料0.1mLずつを培地 5 枚以上に接種して培地表面に拡散させたものを、27℃で 5 日間培養した後、集落の有無を観察する。

3.3.2.3 判定

接種したいずれの培地にも集落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

3.3.3.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液（以下この項において「PBS」という。）又は適当と認められた希釈用液で適度に希釈したものを試料とする。

3.3.3.2 試験方法

分光光度計を用い、試料の濁度を測定する。その数値をあらかじめ作成した標準検量線に挿入し、希釈倍率から検体の総菌数を算出する。

3.3.3.3 判定

各検体の総菌数は、ストレプトコッカス・パラウベリスⅠ型菌にあつては 1 mL中 2.28×10^{10} CFU以上、ストレプトコッカス・パラウベリスⅡ型菌にあつては 1 mL中 4.03×10^{10} CFU以上、ストレプトコッカス・イニエにあつては 1 mL中 2.94×10^{10} CFU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、その総菌数とする。

3.3.4 同定試験

3.3.4.1 試験材料

3.3.4.1.1 試料

検体 1 mLを遠心した沈殿を試料とする。

3.3.4.1.2 抗血清

ストレプトコッカス・パラウベリスⅠ型菌及びⅡ型菌には抗ストレプトコッカス・パラウベリスⅠ型血清（付記2。以下この項において「抗Ⅰ型血清」という。）及び抗ストレプトコッカス・パラウベリスⅡ型血清（付記3。以下この項において「抗Ⅱ型血清」という。）を、ストレプトコッカス・イニエには抗ストレプトコッカス・イニエ38－タイプ血清（付記4）及び抗ストレプトコッカス・イニエ38＋タイプ血清（付記5）を使用する。

3.3.4.2 試験方法

試料1白金耳ずつとそれぞれの抗血清をスライドグラス上で混合し、急速凝集反応を行う。

3.3.4.3 判定

ストレプトコッカス・パラウベリスⅠ型菌は、抗Ⅰ型血清では凝集し、抗Ⅱ型血清では凝集してはならない。ストレプトコッカス・パラウベリスⅡ型菌は、抗Ⅱ型血清では凝集し、抗Ⅰ型血清では凝集してはならない。ストレプトコッカス・イニエは、抗ストレプトコッカス・イニエ38－タイプ血清では凝集し、抗ストレプトコッカス・イニエ38＋タイプ血清では凝集してはならない。

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 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。

3.4.5 安全試験

3.4.5.1 試験材料

3.4.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.5.1.2 試験動物

水温20℃、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30～150gのひらめ40尾以上を用いる。

3.4.5.2 試験方法

試験動物は、24時間以上餌止めした後、1群20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PBSを注射する。その後、それぞれ水温20℃、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約1日かけて25℃に上昇させる。

3.4.5.3 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。

3.4.6 力価試験

3.4.6.1 ストレプトコッカス・パラウベリス感染症力価試験

3.4.6.1.1 試験材料

3.4.6.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.6.1.1.2 試験動物

水温20℃、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30～150gのひらめ160尾以上を用いる。

3.4.6.1.1.3 攻撃用菌液

ストレプトコッカス・パラウベリスⅠ型強毒菌（付記6）及びストレプトコッカス・パラウベリスⅡ型強毒菌（付記7）の液体培養菌液を、それぞれ対照群の死亡率が50%以上と予測される2段階に調整したものを攻撃用菌液とする。

3.4.6.1.2 試験方法

試験動物は、24時間以上餌止めした後、1群80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PBSを注射する。その後、それぞれ水温20℃、循環式で飼育し、注射後13日目に飼育水温を約1日かけて25℃に上昇させる。

注射後13日目から24時間以上餌止めした試験群及び対照群をそれぞれ20尾以上の4群ずつに分ける。各2群ずつにⅠ型菌の攻撃用菌液を、他の各2群ずつにⅡ型菌の攻撃用菌液を、それぞれ0.1mLずつを腹腔内に注射して攻撃する。攻撃後、飼育水温を2～4時間かけて27℃に上昇させ、21日間観察して各群の生死を調べる。

なお、この際、攻撃後4日目から48時間餌止めし、攻撃後5日目から観察期間終了時まで各水槽の溶存酸素量を約4～5 mg/Lとなるように調整する。

3.4.6.1.3 判定

それぞれの対照群の35%以上が死亡した攻撃用菌液のうち少なくとも1段階において、試験群の生残率は、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、 $P<0.05$ ）。

3.4.6.2 β溶血性レンサ球菌症力価試験

3.4.6.2.1 試験材料

3.4.6.2.1.1 試験動物

3.3.5の試験に用いた動物を用いる。

3.4.6.2.1.2 攻撃用菌液

ストレプトコッカス・イニエ強毒菌（付記8）の液体培養菌液をPBSで希釈し、対照群の死亡率が80%以上と予想される希釈菌液を攻撃用菌液とする。

3.4.6.2.2 試験方法

3.3.5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2～4時間かけて27℃に上昇させ、14日間飼育観察して各群の生死を調べる。

3.3.6.2.3 判定

次式により試験品の有効率を求めるとき、有効率は60%以上でなければならない。この場合、対照群は80%以上が死亡しなければならない。

$$\text{有効率 (\%)} = \{1 - (\text{試験群の死亡率} / \text{対照群の死亡率})\} \times 100$$

4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後3年5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 トッド・ヘビット寒天培地

1,000mL中

牛心臓浸出物	3.1 g
ネオペプトン	20.0 g
ブドウ糖	2.0 g
塩化ナトリウム	2.0 g
リン酸水素二ナトリウム	0.4 g
炭酸ナトリウム	2.5 g
寒天	15.0 g
水	残 量

加熱溶解した後、滅菌する。

付記2 抗ストレプトコッカス・パラウベリスⅠ型血清

ストレプトコッカス・パラウベリスⅠ型菌で免疫した兎の血清で、ストレプトコッカス・パラウベリスⅠ型菌のみに凝集するもの

付記3 抗ストレプトコッカス・パラウベリスⅡ型血清

ストレプトコッカス・パラウベリスⅡ型菌で免疫した兎の血清で、ストレプトコッカス・パラウベリスⅡ型菌のみに凝集するもの

付記4 抗ストレプトコッカス・イニエ38－タイプ血清

ストレプトコッカス・イニエ38－タイプで免疫した兎の血清で、ストレプトコッカス・イニエ38－タイプ及び38＋タイプの両方に凝集するもの

付記5 抗ストレプトコッカス・イニエ38＋タイプ血清

ストレプトコッカス・イニエ38＋タイプで免疫した兎の血清で、ストレプトコッカス・イニエ38＋タイプのみに凝集するもの

付記6 ストレプトコッカス・パラウベリスⅠ型強毒菌

ストレプトコッカス・パラウベリスM4Y株又はこれと同等以上の毒力を有する株

付記7 ストレプトコッカス・パラウベリスⅡ型強毒菌

ストレプトコッカス・パラウベリスM5E株又はこれと同等以上の毒力を有する株

付記8 ストレプトコッカス・イニエ強毒菌

ストレプトコッカス・イニエC1N株又はこれと同等以上の毒力を有する株