

# ローソニア・イントラセルラリス感染症生ワクチン（シード）

令和 年 月 日(告示第 号)新規追加

## 1 定義

シードロット規格に適合したローソニア・イントラセルラリスを同規格に適合した株化細胞で増殖させて得た菌液を凍結乾燥したワクチンである。

## 2 製法

### 2.1 製造用株

#### 2.1.1 名称

ローソニア・イントラセルラリス B3903 株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.2 性状

豚に注射しても病原性を示さず、McCoy 細胞(付記1)で増殖する。

#### 2.1.3 マスターシード菌

##### 2.1.3.1 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、McCoy 細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖させ、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 $-35^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.1.4 ワーキングシード菌

##### 2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、McCoy 細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結して $-35^{\circ}\text{C}$ 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 プロダクションシード菌

##### 2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、McCoy 細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して $-35^{\circ}\text{C}$ 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。

## 2.2 製造用材料

### 2.2.1 培養細胞

McCoy 細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

### 2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

### 2.2.3 マスターセルシード

#### 2.2.3.1 作製、保存及びプロダクションセルシードまでの最高継代数

マスターセルシードは、2.2.2 の培養液で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターセルシードは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-35^{\circ}\text{C}$ 以下で

保存する。

マスターセルシードについて、3.2.1の試験を行う。

マスターセルシードは、ワクチンの製造又は試験以外の目的で継代しない。マスターセルシードからプロダクションセルシードまでの最高継代数は、20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、その継代数とする。

## 2.2.4 ワーキングセルシード

### 2.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.2の培養液で増殖及び継代する。

ワーキングセルシードは凍結して $-35^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングセルシードについて、3.2.2の試験を行う。

## 2.2.5 プロダクションセルシード

### 2.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.2の培養液で増殖させる。

プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して $-35^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、3.2.3の試験を行う。

## 2.3 原液

### 2.3.1 ワーキングセルシード(プロダクションセルシード)の培養

1回に処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。菌接種前の培養細胞に異常を認めてはならない。

### 2.3.2 菌の培養

ワーキングシード菌(プロダクションシード菌)を2.3.1の細胞で培養し、菌が感染した細胞の割合が60%以上に達したときに個別培養細胞ごとに採取した培養液を原液とする。

原液について、3.3の試験を行う。

3.3.2の生菌数試験の結果、原液の生菌数が規定の濃度に達していないときは、適当と認められた方法により濃縮を行う。

## 2.4 最終バルク

原液に適当と認められた安定剤、及び血清を含まない培養液を加えて濃度調整し、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て凍結乾燥し、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1.4.2.2.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法によるものとする。

##### 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。

### 3.1.1.3 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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。

### 3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

#### 3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 2.1 及び 2.2 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、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法によるものとする。

#### 3.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験

##### 3.1.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス及び馬伝染性貧血ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 3.1 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、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法によるものとする。

##### 3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

豚熱ウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス、ロタウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.2、3.2.3、3.2.4、3.2.5、3.2.7 及び 3.2.9 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、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法によるものとする。

### 3.1.1.5 対象動物を用いた免疫原性試験

一般試験法の対象動物を用いた免疫原性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。

### 3.1.1.6 対象動物を用いた安全性確認試験

一般試験法の対象動物を用いた安全性確認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。

### 3.1.1.7 病原性復帰確認試験

一般試験法の病原性復帰確認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

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。

### 3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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。

### 3.1.2.3 生菌数試験

#### 3.1.2.3.1 試料

検体を 25 ゲージ乳化用針付き注射器を用いて乳化した後、増殖用培養液(付記 2)で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。陽性対照品(付記 3)を同様に希釈し、各段階の希釈液を陽性対照試料とする。

#### 3.1.2.3.2 培養細胞

McCoy 細胞を 96 穴プレートに培養し、20~30%単層形成したものを用いる。

#### 3.1.2.3.3 試験方法

試料及び陽性対照試料の 100 $\mu$ L ずつをそれぞれ 6 穴の培養細胞に接種する。80vol%窒素・10vol%炭酸ガス・10vol%水素の混合ガス下で、37 $^{\circ}$ Cで 6 日間培養後、培養液を除き、冷アセトン・メタノール液(付記 4)100 $\mu$ L を加え 2 分間以上固定する。

固定プレートの各穴に 50 $\mu$ L のローソニア・イントラセルラリス特異モノクローナル抗体(付記 5)を加え、5 vol%炭酸ガス下、37 $^{\circ}$ Cで 30 分間反応させる。リン酸緩衝食塩液で洗浄後、各穴に

蛍光標識抗マウス IgG 抗体(付記6) 50 $\mu$ L ずつを加え、5 vol%炭酸ガス下、37 $^{\circ}$ Cで 30 分間反応させる。水で洗浄後、水分を除去し、各穴に 50 $\mu$ L のグリセロール液(付記7)を加え、蛍光顕微鏡下で観察する。

#### 3.1.2.3.4 判定

細胞内又は細胞膜上に付着した 5 個以上の典型的な蛍光を示す細胞が 1 個以上認められた穴を感染とみなし、TCID<sub>50</sub>を算出する。

この場合、陽性対照品は既知の生菌数 $\pm 10^{0.5}$ TCID<sub>50</sub>/mL の範囲内でなければならない。

#### 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

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。

##### 3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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。

##### 3.1.3.3 生菌数試験

3.1.2.3 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2 株化細胞の試験

##### 3.2.1 マスターセルシードの試験

###### 3.2.1.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.2.1.2 起源動物種同定試験

シードロット規格の 2.1.4.2.1.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.2.1.3 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。

###### 3.2.1.4 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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。

###### 3.2.1.5 外来性ウイルス否定試験

###### 3.2.1.5.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.2、2.1 及び 2.2 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、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法によるものとする。

###### 3.2.1.5.2 特定ウイルス否定試験

###### 3.2.1.5.2.1 特定ウイルス否定一般試験

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス及び馬伝染性貧血ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 3.1 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、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法によるものとする。

###### 3.2.1.5.2.2 個別ウイルス否定試験

豚熱ウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス、ロタウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.2、3.2.3、3.2.4、3.2.5、3.2.7 及び 3.2.9 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、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法によるものとする。

###### 3.2.1.6 核学的(染色体)性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.1.6 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.2.1.7 腫瘍形成性/腫瘍原性試験

シードロット規格の 2.1.4.2.1.7 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.2.2 ワーキングセルシードの試験

#### 3.2.2.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.2.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.2.2 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。

#### 3.2.2.3 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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。

### 3.2.3 プロダクションセルシードの試験

#### 3.2.3.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.3.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.3.2 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。

#### 3.2.3.3 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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 原液の試験

#### 3.3.1 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。

#### 3.3.2 生菌数試験

3.1.2.3 を準用して試験するとき、検体の生菌数は  $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub>/mL 以上でなければならない。また、陽性対照品の生菌数は既知の菌数の $\pm 10^{0.5}$ TCID<sub>50</sub>/mL の範囲内でなければならない。

#### 3.3.3 同定試験

3.3.2 の生菌数試験において、試料がローソニア・イントラセルラリス特異モノクローナル抗体に反応し、陰性対照に反応が認められない場合、ローソニア・イントラセルラリスと判定する。

### 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乾燥物でなければならない。溶解したものは、固有の色調を有する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 真空度試験

一般試験法の真空度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 含湿度試験

一般試験法の含湿度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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法によるものとする。

#### 3.4.4 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。

#### 3.4.5 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法によるものとする。

#### 3.4.6 生菌数試験

試験品を添付の溶解用液で溶解し、3.1.2.3 を準用して試験する。ただし、試料を接種する培養細胞は、単層形成率が 20~40% となったものを用いる。試験の結果、試験品の生菌数は 1 頭当たり  $10^{4.9}$ ~ $10^{6.1}$ TCID<sub>50</sub> で、陽性対照品は既知の生菌数の $\pm 10^{0.5}$ TCID<sub>50</sub>/mL の範囲内でなければならない。

また、陰性対照にはローソニア・イントラセルラリスの感染が認められてはならない。

#### 3.4.7 同定試験

3.4.6 の生菌数試験において、試料がローソニア・イントラセルラリス特異モノクローナル抗体に反応し、陰性対照に反応しない場合、ローソニア・イントラセルラリスと判定する。

#### 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。

##### 付記1 McCoy細胞

マウス線維芽細胞由来の株化細胞

##### 付記2 増殖用培養液

1,000mL中

ダルベッコ変法イーグル培地／ハムF12(付記8) 12 g

重炭酸ナトリウム 2.44 g

水 残量

ダルベッコ変法イーグル培地／ハムF12を適量の水で溶解した後、重炭酸ナトリウムを加える。pHを6.8～7.2に調整後、水を加えて1,000mLとし、ろ過滅菌する。その後、非働化していない滅菌済みの新生子牛血清又は牛胎子血清20～100mLを無菌的に加える。

##### 付記3 陽性対照品

ローソニア・イントラセルラリスN343株の培養菌液を凍結したもので、生菌数試験の精度の精度管理用として用いる。

##### 付記4 冷アセトン・メタノール液

アセトン1容にメタノール2容を混合した液で、 $-30\sim-10^{\circ}\text{C}$ で保存したもの

##### 付記5 ローソニア・イントラセルラリス特異モノクローナル抗体

ローソニア・イントラセルラリスの27kDaの外膜蛋白を特異的に認識するモノクローナル抗体

##### 付記6 蛍光標識抗マウスIgG抗体

ヤギ抗マウス免疫グロブリン血清から $\gamma$ -グロブリンを調製し、これを蛍光色素で標識したもの

##### 付記7 グリセロール液

グリセリン1容に水2容を混合した液で、室温で保存する。

##### 付記8 ダルベッコ変法イーグル培地／ハムF12

適当と認められた品質の乾燥品

# 豚サーコウイルス（2型・組換え型）感染症・マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症混合（カルボキシビニルポリマーアジュバント加）不活化ワクチン（シード）

令和3年5月17日（告示第798号）新規追加  
令和7年3月14日（告示第414号）一部改正  
令和 年 月 日（告示第 号）一部改正

## 1 定義

シードロット規格に適合した組換え豚サーコウイルス2型オープンリーディングフレーム2（以下この項において「PCV2ORF2」という。）遺伝子挿入バキュロウイルスを同規格に適合した培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化し、カルボキシビニルポリマーアジュバントを添加したワクチン（以下この項において「PCV2ワクチン」という。）と同規格に適合したマイコプラズマ・ハイオニューモニエの培養菌液を不活化し、カルボキシビニルポリマーアジュバントを添加したワクチン（以下この項において「Mhpワクチン」という。）を使用時に混合するワクチンである。

## 2 製法

### 2.1 製造用株

#### 2.1.1 PCV2ORF2遺伝子挿入バキュロウイルス

##### 2.1.1.1 名称

PCV2ORF2遺伝子挿入オートグラフィア核多角体ウイルス（AcNPV）N120-058W株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.1.2 性状

バキュロウイルスに感受性のある培養細胞でCPEを伴って増殖する。PCV2ORF2抗原を発現する。

##### 2.1.1.3 マスターシードウイルス

###### 2.1.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、Sf細胞（付記1）又は適当と認められた培養細胞で増殖させ、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ウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-60^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。

マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、5代以内でなければならない。

##### 2.1.1.4 ワーキングシードウイルス

###### 2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、Sf細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して $-35^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

##### 2.1.1.5 プロダクションシードウイルス

###### 2.1.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、Sf細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖させる。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して $-35^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

## 2.1.2 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ

### 2.1.2.1 名称

マイコプラズマ・ハイオニューモニエJ株B-3745又はこれと同等と認められた株

### 2.1.2.2 性状

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ基準株に一致する生物学的性状を示す。

### 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、適当と認められた液状培地で増殖させ、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 $-40^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

マスターシード菌について、3.1.4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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その継代数とする。

### 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、適当と認められた液状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 $-40^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.5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、適当と認められた液状培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して $-40^{\circ}\text{C}$ 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、3.1.6の試験を行う。

## 2.2 製造用材料

### 2.2.1 PCV2ORF2遺伝子挿入バキュロウイルス

#### 2.2.1.1 培養細胞

Sf細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

#### 2.2.1.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

#### 2.2.1.3 マスターセルシード

##### 2.2.1.3.1 作製、保存及びプロダクションセルシードまでの最高継代数

マスターセルシードは、2.2.1.2の培養液で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターセルシードは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

マスターセルシードについて、3.2.1の試験を行う。

マスターセルシードは、ワクチンの製造又は試験以外の目的で継代しない。

マスターセルシードからプロダクションセルシードまでの最高継代数は、20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、その継代数とする。

#### 2.2.1.4 ワーキングセルシード

##### 2.2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.1.2の培養液で増殖及び継代する。ワーキングセルシードは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングセルシードについて、3.2.2の試験を行う。

#### 2.2.1.5 プロダクションセルシード

##### 2.2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.1.2の培養液で増殖させる。

プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。プロダクションセルシードを保存する場合は、3.2.3の試験を行う。

#### 2.2.2 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ

##### 2.2.2.1 培地

製造に相当と認められた液状培地を用いる。

#### 2.3 原液

##### 2.3.1 PCV2ORF2遺伝子挿入バキュロウイルス原液

###### 2.3.1.1 プロダクションセルシードの培養

1回に処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の個別培養細胞に異常を認めてはならない。

###### 2.3.1.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.1.1の細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個別培養細胞ごとに採取した培養液をウイルス培養液とする。

ウイルス培養液について、3.3の試験を行う。

###### 2.3.1.3 不活化

ウイルス培養液をろ過し、農林水産大臣が相当と認めた不活化剤を加えて攪拌し不活化した後、中和剤を加えて中和し、必要に応じて濃縮したものを原液とする。

原液について、3.4の試験を行う。

###### 2.3.1.4 原液の調製

原液を混合し、混合原液とする場合がある。混合原液について、3.4.2の試験を行う。

##### 2.3.2 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ原液

###### 2.3.2.1 培養

プロダクションシード菌を培地に接種して培養し、更に培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.5の試験を行う。

###### 2.3.2.2 不活化

培養菌液に農林水産大臣が相当と認めた不活化剤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

相当と認められた方法で不活化剤を中和し、必要に応じて濃縮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 最終バルク

##### 2.4.1 PCV2ORF2遺伝子挿入バキュロウイルスバルク

原液又は混合原液に、必要に応じて生理食塩液及び適量のアジュバントを添加し、最終バルクとする。

##### 2.4.2 マイコプラズマ・ハイオニューモニエバルク

原液に適量のアジュバントを添加し、必要に応じて生理食塩液を添加して最終バルクとする。

## 2.5 小分製品

### 2.5.1 PCV2ワクチン

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。

### 2.5.2 Mhpワクチン

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 マスターシードウイルスの試験

##### 3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.1.2 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。

##### 3.1.1.3 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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。

##### 3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

###### 3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、2.1及び2.2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、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法によるものとする。

###### 3.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験

###### 3.1.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1及び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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法によるものとする。

###### 3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

豚熱ウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス、ロタウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、3.2.3、3.2.4、3.2.5、3.2.7及び3.2.9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、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法によるものとする。

##### 3.1.1.5 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 ワーキングシードウイルスの試験

##### 3.1.2.1 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。

##### 3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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。

#### 3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

##### 3.1.3.1 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。

##### 3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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。

#### 3.1.4 マスターシード菌の試験

#### 3.1.4.1 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。

#### 3.1.4.2 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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法によるものとする。

#### 3.1.5 ワーキングシード菌の試験

##### 3.1.5.1 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。

#### 3.1.6 プロダクションシード菌の試験

##### 3.1.6.1 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。

#### 3.2 株化細胞の試験

##### 3.2.1 マスターセルシードの試験

###### 3.2.1.1 培養性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.2.1.2 起源動物種同定試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.2.1.3 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。

###### 3.2.1.4 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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。

###### 3.2.1.5 外来性ウイルス否定試験

###### 3.2.1.5.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2、2.1及び2.2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、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法によるものとする。

###### 3.2.1.5.2 特定ウイルス否定試験

###### 3.2.1.5.2.1 特定ウイルス否定一般試験

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2及び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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法によるものとする。

###### 3.2.1.5.2.2 個別ウイルス否定試験

豚熱ウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス、ロタウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2、3.2.3、3.2.4、3.2.5、3.2.7及び3.2.9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、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法によるものとする。

###### 3.2.1.6 核学的（染色体）性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.6.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.2.1.7 腫瘍形成性/腫瘍原性試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.7を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.2.2 ワーキングセルシードの試験

###### 3.2.2.1 培養性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.2.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.2.2.2 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。

### 3.2.2.3 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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。

## 3.2.3 プロダクションセルシードの試験

### 3.2.3.1 培養性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.3.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.2.3.2 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。

### 3.2.3.3 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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 ウイルス培養液の試験

### 3.3.1 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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 PCV2ORF2遺伝子挿入バキュロウイルス原液の試験

### 3.4.1 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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法によるものとする。

### 3.4.2 不活化試験

#### 3.4.2.1 試験材料

##### 3.4.2.1.1 試料

検体を試料とする。

##### 3.4.2.1.2 培養細胞

Sf細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

##### 3.4.2.2 試験方法

検体を培養細胞に接種し、25～29℃で7日間培養し、次代に継代する。2代目の細胞を25～29℃で7日間培養する。

##### 3.4.2.3 判定

培養細胞にCPEを認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。検体に活性ウイルスを認めてはならない。

### 3.4.3 抗原定量試験

#### 3.4.3.1 試験材料

検体、参照抗原1（付記2）、陰性対照抗原（付記3）、陽性対照抗原1（付記4）、抗PCV2ORF2抗原豚IgG（付記5）、抗PCV2ORF2抗原モノクローナル抗体（付記6）及び酵素標識抗体（付記7）を用いる。

#### 3.4.3.2 試験方法

##### 3.4.3.2.1 試料の調製

検体、参照抗原1、陰性対照抗原及び陽性対照抗原1を洗浄・希釈液（付記8）でそれぞれ30倍から3倍階段希釈した各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.4.3.2.2 反応

抗PCV2ORF2抗原豚IgGを固相したプレートを用いる。固相プレートにブロッキング緩衝液（付記9）を250μLずつ加え、35～39℃で約60分間反応させた後、洗浄・希釈液で洗浄する。各試料100μLずつをプレートの3穴に加え、35～39℃で約60分間反応させる。反応後、プレートを洗浄液で洗浄する。洗浄・希釈液で300倍に希釈した抗PCV2ORF2抗原モノクローナル抗体を各穴に100μLずつ分注し、35～39℃で約60分間反応させる。反応後、各穴を洗浄・希釈液で洗浄する。1 vol% 兔血清加希釈用緩衝液（付記10）で5,000～20,000倍に希釈した酵素標識抗体を各

穴に100 $\mu$ Lずつ分注し、35～39 $^{\circ}$ Cで約45分間反応させる。反応後、各穴を洗浄・希釈液で洗浄する。基質液（付記11）を100 $\mu$ Lずつ各穴に分注し、室温で反応させる。その後、1 mol/L塩酸溶液を100 $\mu$ Lずつ各穴に分注し、反応を停止させる。

#### 3.4.3.2.3 吸光度測定

波長450nmで吸光度を測定する。

#### 3.4.3.3 判定

参照抗原1の力価を1.0として、検体の相対力価を統計学的計算方法（付記12）により算出する。このとき、検体の相対力価は、1.0以上でなければならない。また、陽性対照抗原1の270倍希釈液の平均吸光度は0.838以上であり、陰性対照抗原の30倍希釈液の平均吸光度は0.2以下でなければならない。

### 3.5 培養菌液の試験

#### 3.5.1 暗視野顕微鏡下観察試験

##### 3.5.1.1 試験材料

検体を用いる。

##### 3.5.1.2 試験方法

検体をスライドガラスにとり、暗視野顕微鏡下で鏡検する。

##### 3.5.1.3 判定

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ様菌（球状又は球桿状から短桿状の菌）以外の菌を検出してはならない。

#### 3.5.2 染色試験

##### 3.5.2.1 試験材料

検体を用いる。

##### 3.5.2.2 試験方法

検体をスライドガラスにとり、グラム染色し、鏡検する。

##### 3.5.2.3 判定

グラム陰性のマイコプラズマ・ハイオニューモニエ様菌（球状又は球桿状から短桿状の菌）以外の菌を検出してはならない。

#### 3.5.3 DNA含有量試験

##### 3.5.3.1 試験材料

検体を用いる。

##### 3.5.3.2 試験方法

検体を適当と認められた方法で処理した後、蛍光分光光度計を用いてDNA量を測定する。

##### 3.5.3.3 判定

検体のDNA含有量は、所定の値以上でなければならない。

### 3.6 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ原液の試験

#### 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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法によるものとする。

#### 3.6.2 不活化試験

##### 3.6.2.1 試験材料

###### 3.6.2.1.1 試料

検体を試料とする。

##### 3.6.2.2 試験方法

不活化前の培養液を陽性対照試料とする。培地に試料又は陽性対照試料を接種し、陽性対照試

料を接種した培地のうち、適当と認められた数の培地に試料を追加で接種する。以上の培地を適当と認められた方法で培養し、培地の色調を観察する。

### 3.6.2.3 判定

試料を接種した培地に色調の変化を認めてはならない。また、陽性試料を接種した培地並びに試料及び陽性対照試料を接種した培地には、赤色から黄色への色調の変化を認めなければならない。

## 3.6.3 抗原定量試験

### 3.6.3.1 試験材料

検体、参照品（付記13）、陽性対照（付記14）、陰性対照（付記15）及び抗体固相化プレート（付記16）を用いる。

#### 3.6.3.1.1 試料

検体、参照品、陽性対照及び陰性対照を $-80\sim-60^{\circ}\text{C}$ で凍結処理した後、 $35\sim39^{\circ}\text{C}$ の恒温槽で融解したものを試料とする。

#### 3.6.3.2 試験方法

抗体固相化プレートを洗浄液（付記17）で洗浄し、 $100\mu\text{L}$ のブロッキング液（付記18）を全ての穴に加える。

試料の $100\mu\text{L}$ ずつを該当するプレートの各穴に加え、ピペッティングにより混和した後、最後の列から混合液を $100\mu\text{L}$ ずつ除去し、プレートを $35\sim39^{\circ}\text{C}$ で約1時間反応させる。

プレートを洗浄液で洗浄し、ブランクとなる各穴に $100\mu\text{L}$ のブロッキング液を加える。その他各穴に $100\mu\text{L}$ のモノクローナル抗体（付記19）を加え、 $35\sim39^{\circ}\text{C}$ で約1時間反応させる。

プレートを洗浄液で洗浄し、ブランクの各穴には標識抗体希釈液（付記20）を、その他の各穴には酵素標識抗体をそれぞれ $100\mu\text{L}$ 加え、 $35\sim39^{\circ}\text{C}$ で約1時間反応させる。反応終了後、プレートを洗浄液で洗浄し、全ての穴に $100\mu\text{L}$ の基質液を加えて常温で10分間反応させる。反応終了後、全ての穴に $100\mu\text{L}$ の $1\text{ mol/L}$ 塩酸を加えて反応を停止させ、波長 $450\text{nm}$ で吸光度を測定する。得られた吸光度について、解析ソフトを用い、参照品に対する検体の相対力価を算出する。

#### 3.6.3.3 判定

検体の相対力価は、 $1.25$ 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

PCV2ワクチンとMhpワクチンを等量混合したもの（以下この項において「混合ワクチン」という。）について、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。

また、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

混合ワクチンについて、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

PCV2ワクチン及びMhpワクチンそれぞれについて、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 抗原定量試験

#### 3.7.4.1 豚サーコウイルス2型感染症抗原定量試験

##### 3.7.4.1.1 試験材料

PCV2ワクチン、参照抗原2（付記21）、陰性対照抗原、陽性対照抗原2（付記22）、抗PCV2ORF2抗原豚IgG、抗PCV2ORF2抗原モノクローナル抗体及び酵素標識抗体を用いる。

### 3.7.4.1.2 試験方法

#### 3.7.4.1.2.1 試料の調製

PCV2ワクチン、参照抗原 2、陰性対照抗原及び陽性対照抗原 2 を洗浄・希釈液でそれぞれ 30倍から 3 倍階段希釈した各段階の希釈液を試料とする。

#### 3.7.4.1.2.2 反応

抗PCV2ORF2抗原豚IgGを固相したプレートを用いる。固相プレートにブロッキング緩衝液を250 $\mu$ Lずつ加え、35~39 $^{\circ}$ Cで約60分間反応させた後、洗浄・希釈液で洗浄する。各試料 100 $\mu$ Lずつをプレートの3穴に加え、35~39 $^{\circ}$ Cで約60分間反応させる。反応後、プレートを洗浄液で洗浄する。洗浄・希釈液で300倍に希釈した抗PCV2ORF2抗原モノクローナル抗体を各穴に100 $\mu$ Lずつ分注し、35~39 $^{\circ}$ Cで約60分間反応させる。反応後、各穴を洗浄・希釈液で洗浄する。1 vol% 兔血清加希釈用緩衝液で5,000~20,000倍に希釈した酵素標識抗体を各穴に100 $\mu$ Lずつ分注し、35~39 $^{\circ}$ Cで約45分間反応させる。反応後、各穴を洗浄・希釈液で洗浄する。基質液を100 $\mu$ Lずつ各穴に分注し、室温で反応させる。その後、1 mol/L塩酸溶液を100 $\mu$ Lずつ各穴に分注し、反応を停止させる。

#### 3.7.4.1.2.3 吸光度測定

波長450nmで吸光度を測定する。

#### 3.7.4.1.3 判定

参照抗原 2 の力価を1.0として、PCV2ワクチンの相対力価を統計学的計算方法により算出する。このとき、PCV2ワクチンの相対力価は、1.0~3.75でなければならない。また、陽性対照抗原 2 の480倍希釈液の平均吸光度は0.988~2.500であり、陰性対照抗原の30倍希釈液の平均吸光度は0.124以下でなければならない。

### 3.7.4.2 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症抗原定量試験

Mhpワクチンについて3.6.3を準用して試験するとき、Mhpワクチンの相対力価は1.0~ 4.6でなければならない。

### 3.7.5 安全試験

#### 3.7.5.1 試験材料

##### 3.7.5.1.1 注射材料

混合ワクチンを注射材料とする。

##### 3.7.5.1.2 試験動物

3~5 週齢の豚を用いる。

##### 3.7.5.2 試験方法

注射材料 2 頭分ずつを 2 頭の試験動物の頸部筋肉内に注射し、21日間観察する。

##### 3.7.5.3 判定

観察期間中、試験動物に臨床的な異常を認めてはならない。

### 3.7.6 力価試験

#### 3.7.6.1 豚サーコウイルス 2 型感染症力価試験

小分製品において、豚サーコウイルス 2 型感染症抗原定量試験を実施する場合には、本試験の実施を省略することができる。

##### 3.7.6.1.1 試験材料

###### 3.7.6.1.1.1 注射材料

混合ワクチンを適当と認められた希釈液で希釈したものを注射材料とする。

###### 3.7.6.1.1.2 試験動物

6~7 週齢のSPFのddY系雌マウスを用いる。

###### 3.7.6.1.1.3 酵素抗体反応用抗原

固相化抗原 1（付記23）を用いる。

#### 3.7.6.1.2 試験方法

試験動物の20匹を試験群、10匹を対照群とする。

注射材料0.2mLずつを試験群の腹部皮下に注射する。注射後4週間目に、試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、酵素抗体反応を行う。

試験群及び対照群の血清並びに参照陽性血清 1（付記24）をブロッキング液で10倍に希釈したものを、更に同液で2倍階段希釈する。これらの血清希釈液を抗原吸着プレート 1（付記25）の穴に100 $\mu$ Lずつ加え、ブロッキング液のみの穴を血清対照とする。37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。次に、ブロッキング液で至適濃度に希釈した酵素標識抗体を各穴に100 $\mu$ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで60分間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。その後、基質液を各穴に100 $\mu$ Lずつ加えて反応させた後、各穴に1 mol/L塩酸を100 $\mu$ Lずつ加えて反応を停止させ、波長450nmで吸光度を測定する。

#### 3.7.6.1.3 判定

血清対照の各穴の吸光度値の平均値に0.5を加えた値以上の吸光度値を示した血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群では、70%以上が抗体価640倍以上でなければならない。この場合において、対照群では、全て抗体価20倍以下でなければならない。また、参照陽性血清 1は、抗体価640～1280倍でなければならない。

#### 3.7.6.2 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症力価試験

小分製品において、マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症抗原定量試験を実施する場合には、本試験の実施を省略することができる。

##### 3.7.6.2.1 試験材料

###### 3.7.6.2.1.1 注射材料

混合ワクチンをワクチン希釈液で90倍に希釈した後、更に生理食塩液で2倍に希釈したものを注射材料とする。

###### 3.7.6.2.1.2 試験動物

6～7週齢のSPFのddY系雌マウスを用いる。

###### 3.7.6.2.1.3 酵素抗体反应用抗原

固相化抗原 2（付記26）を用いる。

##### 3.7.6.2.2 試験方法

試験動物の20匹を試験群、10匹を対照群とする。

注射材料0.2mLずつを試験群の腹部皮下に注射する。注射後3週間目に、試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、酵素抗体反応を行う。

試験群及び対照群の血清並びに参照陽性血清 2（付記27）をブロッキング液で10倍に希釈したものを、更に同液で2倍階段希釈する。これらの血清希釈液を抗原吸着プレート 2（付記28）の穴に100 $\mu$ Lずつ加え、ブロッキング液のみの穴を血清対照とする。37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。次に、ブロッキング液で至適濃度に希釈した酵素標識抗体を各穴に100 $\mu$ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。その後、基質液を各穴に100 $\mu$ Lずつ加えて反応させた後、各穴に1 mol/L塩酸を100 $\mu$ Lずつ加えて反応を停止させ、波長450nmで吸光度を測定する。

#### 3.7.6.2.3 判定

血清対照の各穴の吸光度値の平均値に0.5を加えた値以上の吸光度値を示した血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群では、70%以上が抗体価320倍以上でなければならない。この場合において、対照群

では、全て抗体価20倍以下でなければならない。また、参照陽性血清2は、抗体価320～640倍でなければならない。

#### 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 Sf細胞

*Spodoptera frugiperda* 卵巣由来細胞

##### 付記2 参照抗原1

ワクチンの製造方法で製造されたもので、PCV2ORF2抗原として約8 µg/mL含むもの。

更新する場合には、元の参照抗原1に対する相対力価を求めておき、原液の相対力価測定時には元の参照抗原1と同等の抗原量となるよう調製する。

##### 付記3 陰性対照抗原

Sf細胞培養液にワクチンのアジュバントを20vol%含むもの

##### 付記4 陽性対照抗原1

ワクチンの製造方法で製造されたもので、参照抗原1に対する相対力価4.45のPCV2ORF2抗原液31mLに対して生理食塩液9 mLを加えたもの。

更新する場合には、元の陽性対照抗原1との相対力価が統計的に同等になるよう調製する。

##### 付記5 抗PCV2ORF2抗原豚IgG

ワクチンで免疫したCDCD（帝王切開由来初乳未摂取）豚血清から精製した抗PCV2ORF2抗原豚IgGであって、間接蛍光抗体価が1,500倍以上のもの。吸着用緩衝液（付記29）で希釈して用いる。

##### 付記6 抗PCV2ORF2抗原モノクローナル抗体

PCV2ORF2抗原に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞の培養上清

##### 付記7 酵素標識抗体

ペルオキシダーゼ標識した抗マウスIgG（H+L）山羊血清

##### 付記8 洗浄・希釈液

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

リン酸二水素カリウム 0.2 g

ポリソルベート20 0.5 mL

水 残量

pHを7.2～7.4に調整する。

- 付記9 ブロッキング緩衝液  
洗浄・希釈液にスキムミルクを5.0w/v%になるように加えたもの
- 付記10 1 vol% 兔血清加希釈用緩衝液  
洗浄・希釈液に兔正常血清を1 vol%になるように加えたもの
- 付記11 基質液  
3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンを含むペルオキシダーゼ基質液
- 付記12 統計学的計算方法  
農林水産大臣が適当と認めたもの
- 付記13 参照品  
マイコプラズマ・ハイオニューモニエ不活化抗原と同じ製造方法により製造されたワクチンで、豚での攻撃試験により有効性が確認されたもので相対力価が約1.0のもの。参照品が更新される際には、同じ製造方法により製造され、相対力価が1.0になるように調製した後、豚での攻撃試験で現行参照品と同等の有効性が担保されなければならない。
- 付記14 陽性対照  
マイコプラズマ・ハイオニューモニエ不活化抗原と同じ方法により製造されたワクチンで、抗原定量試験における吸光度は0.542～1.578のもの。陽性対照を更新する場合は、マイコプラズマ・ハイオニューモニエ不活化抗原と同じ方法により製造し、抗原定量試験における吸光度が0.542～1.578を示すように調製する。
- 付記15 陰性対照  
マイコプラズマ・ハイオニューモニエ不活化抗原の製造用培地にアジュバントを加えて調製されたもので、抗原定量試験における吸光度は0.081以下を示す。陰性対照を更新する場合は、元の陰性対照と同じ方法により製造し、抗原定量試験における吸光度が0.081以下を示すように調製する。
- 付記16 抗体固相化プレート  
96穴平底プレートにトリス緩衝食塩液（付記30）で希釈した捕捉抗体2（付記31）を加えて35～39℃で約1時間静置した後、洗浄液で洗浄後、ブロッキング液を加えて2～8℃で16～24時間静置したもの
- 付記17 洗浄液  
0.5mLのポリソルベート20をトリス緩衝食塩液に加えて1,000mLとする。
- 付記18 ブロッキング液  
50gのスキムミルクに洗浄液を加えて1,000mLとする。
- 付記19 モノクローナル抗体  
マイコプラズマ・ハイオニューモニエp44抗原に対するマウス由来のモノクローナル抗体

付記20 標識抗体希釈液

1,000mL中

トリスヒドロキシメチルアミノメタン	2.42	g
塩化ナトリウム	8.766	g
スキムミルク	50.0	g
ポリソルベート20	0.5	mL
豚血清	50.0	mL
注射用水		残量

pHを7.2~7.4に調整する。

トリスヒドロキシアミノメタンと塩化ナトリウムを適量の注射用水に溶かし、pHを7.2~7.4に調整する。残りの原料を加え、分散させた後、注射用水を加えて1,000mLとする。

付記21 参照抗原 2

ワクチンの製造方法で製造された、参照陽性抗原 1 に対する相対力価4.45のPCV2ORF2抗原52容に、ワクチンのアジュバントを20容及び生理食塩液を28容加えたもの。

更新する場合には、元の参照抗原 2 に対する相対力価が1.0となり、豚への免疫原性が、元の参照抗原 2 のそれと同等となるよう調製する。

付記22 陽性対照抗原 2

ワクチンの製造方法で製造された、参照抗原 1 に対する相対力価4.45のPCV2ORF2抗原液 8 容にワクチンのアジュバントを 2 容加えたもの。

更新する場合には、元の陽性対照抗原 2 との相対力価が統計的に同等になるよう調製する。

付記23 固相化抗原 1

適当と認められたクロマトグラフィーによって精製したPCV2ORF2抗原画分

付記24 参照陽性血清 1

混合ワクチンで免疫したddY系マウスの血清であって、3.7.6.1の試験により抗体価が640~1280倍となるように濃度を調整したもの

付記25 抗原吸着プレート 1

固相化抗原 1 をトリス緩衝食塩液で希釈し、96穴ELISAプレートの各穴に100μLずつ加え、37°Cで1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。その後、ブロッキング液を各穴に100μLずつ加え、37°Cで1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄したもの

付記26 固相化抗原 2

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ製造用株又はこれと同等の免疫原性を有する株の培養菌液を遠心集菌し、菌体を洗浄した後、超音波処理をして調製した抗原

付記27 参照陽性血清 2

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ製造用株又はこれと同等の免疫原性を有する株の培養菌液を不活化した抗原で免疫したマウスの血清であって、3.7.6.2の試験により抗体価が320~640倍となるように濃度を調整したもの

付記28 抗原吸着プレート 2

固相化抗原 2 をトリス緩衝食塩液で希釈し、96穴ELISAプレートの各穴に100 $\mu$ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。その後、ブロッキング液を各穴に100 $\mu$ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた後、洗浄液で洗浄したもの

付記29 吸着用緩衝液

1,000mL中

炭酸水素ナトリウム 2.93 g

炭酸ナトリウム 1.59 g

水 残 量

pHを9.5~9.7に調整する。

付記30 トリス緩衝食塩液

1,000mL中

トリスヒドロキシメチルアミノメタン 2.42 g

塩化ナトリウム 8.77 g

水 残 量

pHを7.2~7.4に調整する。

付記31 捕捉抗体 2

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ不活化抗原の製造用株で免疫したウサギ血清をアフィニティークロマトグラフィーで精製したポリクローナル抗体

# 豚サーコウイルス（2型・組換え型）感染症（カルボキシビニルポリマーアジュバント加）・豚繁殖・呼吸障害症候群・マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症（カルボキシビニルポリマーアジュバント加）混合ワクチン（シード）

令和 年 月 日（告示第 号）新規追加

## 1 定義

シードロット規格に適合した組換え豚サーコウイルス2型オープンリーディングフレーム2（以下この項において「PCV2ORF2」という。）遺伝子挿入バキュロウイルスを同規格に適合した培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化し、カルボキシビニルポリマーアジュバントを添加したワクチン（以下この項において「PCV2ワクチン」という。）、同規格に適合した弱毒豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスを同規格に適合した培養細胞で増殖させて得たウイルス液を凍結乾燥したワクチン（以下この項において「PRRSワクチン」という。）及び同規格に適合したマイコプラズマ・ハイオニューモニエの培養菌液を不活化し、カルボキシビニルポリマーアジュバントを添加したワクチン（以下この項において「Mhpワクチン」という。）を使用時に混合するワクチンである。

## 2 製法

### 2.1 製造用株

#### 2.1.1 PCV2ORF2遺伝子挿入バキュロウイルス

##### 2.1.1.1 名称

PCV2ORF2遺伝子挿入オートグラフィア核多角体ウイルス（AcNPV）N120-058W株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.1.2 性状

バキュロウイルスに感受性のある培養細胞でCPEを伴って増殖する。PCV2ORF2抗原を発現する。

##### 2.1.1.3 マスターシードウイルス

###### 2.1.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、Sf細胞（付記1）又は適当と認められた培養細胞で増殖させ、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ウイルスは、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。

マスターシードウイルスについて、3.1.1の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。

マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、5代以内でなければならない。

#### 2.1.1.4 ワーキングシードウイルス

##### 2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、Sf細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して $-35^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

#### 2.1.1.5 プロダクションシードウイルス

##### 2.1.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、Sf細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖させる。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して $-35^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

#### 2.1.2 豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス

##### 2.1.2.1 名称

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスJJ1882株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.2.2 性状

豚に注射しても病原性又は臨床的な異常を示さず、MA-104細胞又は豚肺胞マクロファージでCPEを伴って増殖する。

##### 2.1.2.3 マスターシードウイルス

###### 2.1.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、MA-104細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖させ、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ウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-60^{\circ}\text{C}$ 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。

マスターシードウイルスについて、3.1.1の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。

マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、5代以内でなければならない。

##### 2.1.2.4 ワーキングシードウイルス

###### 2.1.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、MA-104細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して $-60^{\circ}\text{C}$ 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。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

## 2.1.2.5 プロダクションシードウイルス

### 2.1.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、MA-104細胞又は相当と認められた培養細胞で増殖させる。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して $-60^{\circ}\text{C}$ 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ウイルスを保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

## 2.1.3 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ

### 2.1.3.1 名称

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ J株B-3745又はこれと同等と認められた株

### 2.1.3.2 性状

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ基準株に一致する生物学的性状を示す。

### 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、相当と認められた液状培地で増殖させ、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 $-40^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

マスターシード菌について、3.1.4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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その継代数とする。

### 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、相当と認められた液状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 $-40^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.5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、相当と認められた液状培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して $-40^{\circ}\text{C}$ 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、3.1.6の試験を行う。

## 2.2 製造用材料

### 2.2.1 PCV2ORF2遺伝子挿入バキュロウイルス

#### 2.2.1.1 培養細胞

Sf細胞又は相当と認められた培養細胞を用いる。

#### 2.2.1.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

#### 2.2.1.3 マスターセルシード

##### 2.2.1.3.1 作製、保存及びプロダクションセルシードまでの最高継代数

マスターセルシードは、2.2.1.2の培養液で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターセルシードは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

マスターセルシードについて、3.2.1の試験を行う。

マスターセルシードは、ワクチンの製造又は試験以外の目的で継代しない。

マスターセルシードからプロダクションセルシードまでの最高継代数は、20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、その継代数とする。

#### 2.2.1.4 ワーキングセルシード

##### 2.2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.1.2の培養液で増殖及び継代する。

ワーキングセルシードは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングセルシードについて、3.2.2の試験を行う。

#### 2.2.1.5 プロダクションセルシード

##### 2.2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.1.2の培養液で増殖させる。

プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、3.2.3 の試験を行う。

## 2.2.2 豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス

### 2.2.2.1 培養細胞

MA-104細胞又は製造に相当と認められた株化細胞を用いる。

### 2.2.2.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

### 2.2.2.3 マスターセルシード

#### 2.2.2.3.1 作製、保存及びプロダクションセルシードまでの最高継代数

マスターセルシードは、2.2.2.2の培養液で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターセルシードは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 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。

マスターセルシードについて、3.2.1の試験を行う。

マスターセルシードは、ワクチンの製造又は試験以外の目的で継代しない。

マスターセルシードからプロダクションセルシードまでの最高継代数は、20代以内でなければならない。

### 2.2.2.4 ワーキングセルシード

#### 2.2.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.2.2の培養液で増殖及び継代する。

ワーキングセルシードは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 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。

ワーキングセルシードについて、3.2.2の試験を行う。

#### 2.2.2.5 プロダクションセルシード

##### 2.2.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.2.2の培養液で増殖させる。

プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 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。

プロダクションセルシードを保存する場合は、3.2.3の試験を行う。

#### 2.2.3 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ

##### 2.2.3.1 培地

製造に相当と認められた液状培地を用いる。

#### 2.3 原液

##### 2.3.1 PCV2ORF2遺伝子挿入バキュロウイルス原液

###### 2.3.1.1 プロダクションセルシードの培養

1回に処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の個別培養細胞に異常を認めてはならない。

###### 2.3.1.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.1.1の細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個別培養細胞ごとに採取した培養液をウイルス培養液とする。

ウイルス培養液について、3.3の試験を行う。

###### 2.3.1.3 不活化

ウイルス培養液をろ過し、農林水産大臣が相当と認めたと不活化剤を加えて攪拌し不活化した後に、中和剤を加えて中和し、必要に応じて濃縮したものを原液とする。

原液について、3.4の試験を行う。

###### 2.3.1.4 原液の調製

原液を混合し、混合原液とする場合がある。

混合原液について、3.4.2の試験を行う。

##### 2.3.2 豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス原液

###### 2.3.2.1 プロダクションセルシードの培養

1回に処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の個別培養細胞に異常を認めてはならない。

###### 2.3.2.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.2.1の細胞で培養し、相当と認められた時期に個別培養細胞ごとに採取し、必要に応じてろ過及び濃縮した培養液を原液とする。

原液について、3.5の試験を行う。

### 2.3.3 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ原液

#### 2.3.3.1 培養

プロダクションシード菌を培地に接種して培養し、更に培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.6の試験を行う。

#### 2.3.3.2 不活化

培養菌液に農林水産大臣が適当と認めた不活化剤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

適当と認められた方法で不活化剤を中和し、必要に応じて濃縮したものを原液とする。  
原液について、3.7の試験を行う。

## 2.4 最終バルク

### 2.4.1 PCV2ORF2遺伝子挿入バキュロウイルスバルク

原液又は混合原液に、必要に応じて生理食塩液及び適量のアジュバントを添加し、最終バルクとする。

### 2.4.2 豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスバルク

原液に、必要に応じて、適当と認められた安定剤、希釈液及び保存剤を加え、これを最終バルクとする。

### 2.4.3 マイコプラズマ・ハイオニューモニエバルク

原液に適量のアジュバントを添加し、必要に応じて生理食塩液を添加して最終バルクとする。

## 2.5 小分製品

### 2.5.1 PCV2ワクチン

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。

### 2.5.2 PRRSワクチン

最終バルクを小分容器に分注し、凍結乾燥し、小分製品とする。

小分製品について、3.8の試験を行う。

### 2.5.3 Mhpワクチン

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 製造用株の試験

#### 3.1.1 マスターシードウイルスの試験

##### 3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.1.1.2 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。

### 3.1.1.3 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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。

### 3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

#### 3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、2.1及び2.2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、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法によるものとする。

#### 3.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験

##### 3.1.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験

Sf細胞を用いる場合には、豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスについて、サル由来細胞を用いる場合には、内在性レトロウイルス（C、Dタイプ粒子）について、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1及び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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法によるものとする。

##### 3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

豚熱ウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス、ロタウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、3.2.3、3.2.4、3.2.5、3.2.7及び3.2.9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、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法によるものとする。

### 3.1.1.5 対象動物を用いた免疫原性試験

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスについて、一般試験法の対象動物を用いた免疫原性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。

### 3.1.1.6 対象動物を用いた安全性確認試験

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスについて、一般試験法の対象動物を用いた安全性確認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。

### 3.1.1.7 病原性復帰確認試験

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスについて、一般試験法の病原性復帰確認試験を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.1.1.8 組換え遺伝子等安定性確認試験

マスターシードウイルスが遺伝子組換え技術を利用して作製されたものである場合には、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 ワーキングシードウイルスの試験

### 3.1.2.1 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。

### 3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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。

### 3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

#### 3.1.3.1 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。

#### 3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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。

### 3.1.4 マスターシード菌の試験

#### 3.1.4.1 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。

#### 3.1.4.2 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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法によるものとする。

### 3.1.5 ワーキングシード菌の試験

#### 3.1.5.1 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。

### 3.1.6 プロダクションシード菌の試験

#### 3.1.6.1 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。

### 3.2 株化細胞の試験

#### 3.2.1 マスターセルシードの試験

##### 3.2.1.1 培養性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.2.1.2 起源動物種同定試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.2.1.3 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。

##### 3.2.1.4 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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。

##### 3.2.1.5 外来性ウイルス否定試験

###### 3.2.1.5.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2、2.1及び2.2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、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法によるものとする。

### 3.2.1.5.2 特定ウイルス否定試験

#### 3.2.1.5.2.1 特定ウイルス否定一般試験

Sf由来細胞を用いる場合には、豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスについて、サル由来細胞を用いる場合には、内在性レトロウイルス（C、Dタイプ粒子）について、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2及び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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法によるものとする。

#### 3.2.1.5.2.2 個別ウイルス否定試験

豚熱ウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス、ロタウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2、3.2.3、3.2.4、3.2.5、3.2.7及び3.2.9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、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法によるものとする。

### 3.2.1.6 核学的（染色体）性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.6を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.2.1.7 腫瘍形成性/腫瘍原性試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.7を準用して試験するとき、適合しなければならない。

## 3.2.2 ワーキングセルシードの試験

### 3.2.2.1 培養性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.2.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.2.2.2 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。

### 3.2.2.3 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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。

## 3.2.3 プロダクションセルシードの試験

### 3.2.3.1 培養性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.3.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.2.3.2 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。

### 3.2.3.3 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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 PCV2ORF2遺伝子挿入バキュロウイルス培養液の試験

### 3.3.1 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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 PCV2ORF2遺伝子挿入バキュロウイルス原液の試験

### 3.4.1 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。

### 3.4.2 不活化試験

#### 3.4.2.1 試験材料

##### 3.4.2.1.1 試料

検体を試料とする。

##### 3.4.2.1.2 培養細胞

SI細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

#### 3.4.2.2 試験方法

検体を培養細胞に接種し、25～29℃で7日間培養し、次代に継代する。2代目の細胞を25～29℃で7日間培養する。

#### 3.4.2.3 判定

培養細胞にCPEを認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。検体に活性ウイルスを認めてはならない。

### 3.4.3 抗原定量試験

#### 3.4.3.1 試験材料

検体、参照抗原1（付記2）、陰性対照抗原（付記3）、陽性対照抗原1（付記4）、抗PCV2ORF2抗原豚IgG（付記5）、抗PCV2ORF2抗原モノクローナル抗体（付記6）及び酵素標識抗体（付記7）を用いる。

#### 3.4.3.2 試験方法

##### 3.4.3.2.1 試料の調製

検体、参照抗原1、陰性対照抗原及び陽性対照抗原1を洗浄・希釈液（付記8）でそれぞれ30倍から3倍階段希釈した各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.4.3.2.2 反応

抗PCV2ORF2抗原豚IgGを固相したプレートを用いる。固相プレートにブロッキング緩衝液（付記9）を250μLずつ加え、35～39℃で約60分間反応させた後、洗浄・希釈液で洗浄する。各試料100μLずつをプレートの3穴に加え、35～39℃で約60分間反応させる。反応後、プレートを洗浄液で洗浄する。洗浄・希釈液で300倍に希釈した抗PCV2ORF2抗原モノクローナル抗体を各穴に100μLずつ分注し、35～39℃で約60分間反応させる。反応後、各穴を洗浄・希釈液で洗浄する。1 vol% 兔血清加希釈用緩衝液（付記10）で5,000～20,000倍に希釈した酵素標識抗体を各穴に100μLずつ分注し、35～39℃で約45分間反応させる。反応後、各穴を洗浄・希釈液で洗浄する。基質液（付記11）を100μLずつ各穴に分注し、室温で反応させる。その後、1 mol/L塩酸溶液を100μLずつ各穴に分注し、反応を停止させる。

##### 3.4.3.2.3 吸光度測定

波長450nmで吸光度を測定する。

##### 3.4.3.3 判定

参照抗原1の力価を1.0として、検体の相対力価を統計学的計算方法（付記12）により

算出する。このとき、検体の相対力価は、1.0以上でなければならない。また、陽性対照抗原1の270倍希釈液の平均吸光度は0.838以上であり、陰性対照抗原の30倍希釈液の平均吸光度は0.2以下でなければならない。

### 3.5 豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス原液の試験

#### 3.5.1 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。

#### 3.5.2 ウイルス含有量試験

##### 3.5.2.1 試験材料

###### 3.5.2.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記13）又は適当と認められた培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.5.2.1.2 細胞

MA-104細胞又は適当と認められた培養細胞を96穴プレートに培養し、単層となったものを用いる。

##### 3.5.2.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ6穴以上の培養細胞に接種し、37℃で8日間培養し観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法によるものとする。

##### 3.5.2.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub>を算出する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その判定方法とする。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10<sup>6.0</sup>TCID<sub>50</sub>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、そのウイルス含有量とする。

### 3.6 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ培養菌液の試験

#### 3.6.1 暗視野顕微鏡下観察試験

##### 3.6.1.1 試験材料

検体を用いる。

##### 3.6.1.2 試験方法

検体をスライドグラスにとり、暗視野顕微鏡下で鏡検する。

##### 3.6.1.3 判定

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ様菌（球状又は球桿状から短桿状の菌）以外の菌を検出してはならない。

#### 3.6.2 染色試験

##### 3.6.2.1 試験材料

検体を用いる。

##### 3.6.2.2 試験方法

検体をスライドガラスにとり、グラム染色し、鏡検する。

##### 3.6.2.3 判定

グラム陰性のマイコプラズマ・ハイオニューモニエ様菌（球状又は球桿状から短桿状の菌）以外の菌を検出してはならない。

### 3.6.3 DNA含有量試験

#### 3.6.3.1 試験材料

検体を用いる。

#### 3.6.3.2 試験方法

検体を適当と認められた方法で処理した後、蛍光分光光度計を用いてDNA量を測定する。

#### 3.6.3.3 判定

検体のDNA含有量は、所定の値以上でなければならない。

### 3.7 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ原液の試験

#### 3.7.1 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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法によるものとする。

#### 3.7.2 不活化試験

##### 3.7.2.1 試験材料

###### 3.7.2.1.1 試料

検体を試料とする。

##### 3.7.2.2 試験方法

不活化前の培養液を陽性対照試料とし、培地に試料、陽性対照試料並びに試料及び陽性対照試料を接種して、適当と認められた方法で培養し、培地の色調を観察する。

##### 3.7.2.3 判定

試料を接種した培地に色調の変化を認めてはならない。また、陽性試料を接種した培地並びに試料及び陽性対照試料を接種した培地には、赤色から黄色への色調の変化を認めなければならない。

#### 3.7.3 抗原定量試験

##### 3.7.3.1 試験材料

検体、参照品（付記14）、陽性対照（付記15）、陰性対照（付記16）及び抗体固相化プレート（付記17）を用いる。

###### 3.7.3.1.1 試料

検体、参照品、陽性対照及び陰性対照を $-80\sim-60^{\circ}\text{C}$ で凍結処理した後、 $35\sim39^{\circ}\text{C}$ の恒温槽で融解したものを試料とする。

##### 3.7.3.2 試験方法

抗体固相化プレートを洗浄液（付記18）で洗浄し、 $100\mu\text{L}$ のブロッキング液（付記19）を全ての穴に加える。

試料の $100\mu\text{L}$ ずつを該当するプレートの各穴に加え、ピペッティングにより混和した後、最後の列から混合液を $100\mu\text{L}$ ずつ除去し、プレートを $35\sim39^{\circ}\text{C}$ で約1時間反応させ

る。

プレートを洗浄液で洗浄し、ブランクとなる各穴に100  $\mu$ Lのプロッキング液を加える。その他各穴に100  $\mu$ Lのモノクローナル抗体（付記20）を加え、35～39°Cで約1時間反応させる。

プレートを洗浄液で洗浄し、ブランクの各穴には標識抗体希釈液（付記21）を、その他の各穴には酵素標識抗体をそれぞれ100  $\mu$ L加え、35～39°Cで約1時間反応させる。反応終了後、プレートを洗浄液で洗浄し、全ての穴に100  $\mu$ Lの基質液を加えて常温で10分間反応させる。反応終了後、全ての穴に100  $\mu$ Lの1 mol/L塩酸を加えて反応を停止させ、波長450nmで吸光度を測定する。得られた吸光度について、解析ソフトを用い、参照品に対する検体の抗原RPを算出する。

### 3.7.3.3 判定

検体の抗原RP値は、1.25以上でなければならない。

## 3.8 小分製品の試験

### 3.8.1 特性試験

PCV2ワクチンとMhpワクチンを等量混合したものでPRRSワクチンを溶解したもの（以下この項において「混合ワクチン」という。）について、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。

また、小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

### 3.8.2 pH測定試験

混合ワクチンについて、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。

### 3.8.3 真空度試験

PRRSワクチンについて、一般試験法の真空度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。

### 3.8.4 含湿度試験

PRRSワクチンについて、一般試験法の含湿度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。

### 3.8.5 無菌試験

PCV2ワクチン、PRRSワクチン及びMhpワクチンそれぞれについて、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。

### 3.8.6 豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス含有量試験

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスについて、3.5.2を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり $10^{4.9}$ ～ $10^{6.7}$ TCID<sub>50</sub>の範囲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、そのウイルス含有量とする。

### 3.8.7 抗原定量試験

#### 3.8.7.1 豚サーコウイルス2型感染症抗原定量試験

#### 3.8.7.1.1 試験材料

PCV2ワクチン、参照抗原 2（付記22）、陰性対照抗原、陽性対照抗原 2（付記23）、抗PCV2ORF2抗原豚IgG、抗PCV2ORF2抗原モノクローナル抗体及び酵素標識抗体を用いる。

#### 3.8.7.1.2 試験方法

##### 3.8.7.1.2.1 試料の調製

PCV2ワクチン、参照抗原 2、陰性対照抗原及び陽性対照抗原 2 を洗浄・希釈液でそれぞれ30倍から 3 倍階段希釈した各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.8.7.1.2.2 反応

抗PCV2ORF2抗原豚IgGを固相したプレートを用いる。固相プレートにブロッキング緩衝液を250  $\mu$ Lずつ加え、35～39°Cで約60分間反応させた後、洗浄・希釈液で洗浄する。各試料100  $\mu$ Lずつをプレートの 3 穴に加え、35～39°Cで約60分間反応させる。反応後、プレートを洗浄液で洗浄する。洗浄・希釈液で300倍に希釈した抗PCV2ORF2抗原モノクローナル抗体を各穴に100  $\mu$ Lずつ分注し、35～39°Cで約60分間反応させる。反応後、各穴を洗浄・希釈液で洗浄する。1 vol% 兎血清加希釈用緩衝液で5,000～20,000倍に希釈した酵素標識抗体を各穴に100  $\mu$ Lずつ分注し、35～39°Cで約45分間反応させる。反応後、各穴を洗浄・希釈液で洗浄する。基質液を100  $\mu$ Lずつ各穴に分注し、室温で反応させる。その後、1 mol/L塩酸溶液を100  $\mu$ Lずつ各穴に分注し、反応を停止させる。

##### 3.8.7.1.2.3 吸光度測定

波長450nmで吸光度を測定する。

##### 3.8.7.1.3 判定

参照抗原 2 の力価を1.0として、PCV2ワクチンの相対力価を統計学的計算方法により算出する。このとき、PCV2ワクチンの相対力価は、1.0～3.75でなければならない。また、陽性対照抗原 2 の480倍希釈液の平均吸光度は0.988～2.500であり、陰性対照抗原の30倍希釈液の平均吸光度は0.124以下でなければならない。

#### 3.8.7.2 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症抗原定量試験

Mhpワクチンについて3.7.3を準用して試験するとき、Mhpワクチンの抗原RP値は1.0～4.6でなければならない。

#### 3.8.8 安全試験

##### 3.8.8.1 試験材料

###### 3.8.8.1.1 注射材料

混合ワクチンを注射材料とする。

###### 3.8.8.1.2 試験動物

3～5週齢の豚を用いる。

##### 3.8.8.2 試験方法

注射材料 1 頭分ずつを 2 頭の試験動物の筋肉内に注射し、21日間観察する。

##### 3.8.8.3 判定

観察期間中、試験動物に臨床的な異常を認めてはならない。

### 3.8.9 力価試験

#### 3.8.9.1 豚サーコウイルス 2 型感染症力価試験

小分製品において、豚サーコウイルス 2 型感染症抗原定量試験を実施する場合には、本試験の実施を省略することができる。

##### 3.8.9.1.1 試験材料

###### 3.8.9.1.1.1 注射材料

混合ワクチンを適当と認められた希釈液で希釈したものを注射材料とする。

###### 3.8.9.1.1.2 試験動物

6～7 週齢のSPFのddY系雌マウスを用いる。

###### 3.8.9.1.1.3 酵素抗体反応用抗原

固相化抗原 1（付記24）を用いる。

##### 3.8.9.1.2 試験方法

試験動物の20匹を試験群、10匹を対照群とする。

注射材料0.2mLずつを試験群の腹部皮下に注射する。注射後4週間目に、試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、酵素抗体反応を行う。

試験群及び対照群の血清並びに参照陽性血清 1（付記25）をブロッキング液で10倍に希釈したものを、更に同液で2倍階段希釈する。これらの血清希釈液を抗原吸着プレート 1（付記26）の穴に100  $\mu$ Lずつ加え、ブロッキング液のみの穴を血清対照とする。37°Cで1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。次に、ブロッキング液で至適濃度に希釈した酵素標識抗体を各穴に100  $\mu$ Lずつ加え、37°Cで60分間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。その後、基質液を各穴に100  $\mu$ Lずつ加えて反応させた後、各穴に1 mol/L塩酸を100  $\mu$ Lずつ加えて反応を停止させ、波長450nmで吸光度を測定する。

##### 3.8.9.1.3 判定

血清対照の各穴の吸光度値の平均値に0.5を加えた値以上の吸光度値を示した血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群では、70%以上が抗体価640倍以上でなければならない。この場合において、対照群では、全て抗体価20倍以下でなければならない。また、参照陽性血清 1 は、抗体価640～1280倍でなければならない。

#### 3.8.9.2 豚繁殖・呼吸障害症候群力価試験

小分製品において、豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス含有量試験を実施する場合には、本試験の実施を省略することができる。

##### 3.8.9.2.1 試験材料

###### 3.8.9.2.1.1 試験動物

3.8.8の試験に用いた動物を用いる。

###### 3.8.9.2.1.2 感染細胞

MA-104細胞を8チャンバースライドに37°Cで培養し、単層を形成させたものに豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスJJ1882株を1チャンバー当たり $10^{3.5}$ TCID<sub>50</sub>以上接種する。37°Cで

1～2日間培養した後、生理食塩液及び蒸留水で洗浄し、乾燥する。その後、冷アセトン・エタノール（1：1）液で固定後乾燥させたものを感染細胞とし、8℃以下で密封保存する。

#### 3.8.9.2.2 試験方法

3.8.8の試験終了後7日目に得られた各個体の血清について、蛍光抗体法を行う。

被検血清を生理食塩液で20倍希釈した後、更に2倍階段希釈する。感染細胞に各希釈液を加え、37℃で60分間処理した後、生理食塩液で洗浄し、抗豚IgG蛍光標識抗体（付記27）を加え、37℃で60分間処理した後、生理食塩液で洗浄し、UV励起方式で観察する。

#### 3.8.9.2.3 判定

特異蛍光が認められた血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験動物の抗体価は、40倍以上でなければならない。

#### 3.8.9.3 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症力価試験

小分製品において、マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症抗原定量試験を実施する場合には、本試験の実施を省略することができる。

#### 3.8.9.3.1 試験材料

##### 3.8.9.3.1.1 注射材料

混合ワクチンをワクチン希釈液で90倍に希釈した後、更に生理食塩液で2倍に希釈したものを注射材料とする。

##### 3.8.9.3.1.2 試験動物

6～7週齢のSPFのddY系雌マウスを用いる。

##### 3.8.9.3.1.3 酵素抗体反应用抗原

固相化抗原2（付記28）を用いる。

#### 3.8.9.3.2 試験方法

試験動物の20匹を試験群、10匹を対照群とする。

注射材料0.2mLずつを試験群の腹部皮下に注射する。注射後3週間目に、試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、酵素抗体反応を行う。

試験群及び対照群の血清並びに参照陽性血清2（付記29）をブロッキング液で10倍に希釈したものを、更に同液で2倍階段希釈する。これらの血清希釈液を抗原吸着プレート2（付記30）の穴に100μLずつ加え、ブロッキング液のみの穴を血清対照とする。37℃で1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。次に、ブロッキング液で至適濃度に希釈した酵素標識抗体を各穴に100μLずつ加え、37℃で1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。その後、基質液を各穴に100μLずつ加えて反応させた後、各穴に1mol/L塩酸を100μLずつ加えて反応を停止させ、波長450nmで吸光度を測定する。

#### 3.8.9.3.3 判定

血清対照の各穴の吸光度値の平均値に0.5を加えた値以上の吸光度値を示した血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群では、70%以上が抗体価320倍以上でなければならない。この場合において、対

照群では、全て抗体価20倍以下でなければならない。また、参照陽性血清 2 は、抗体価320～640倍でなければならない。

#### 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 Sf細胞

*Spodoptera frugiperda* 卵巣由来細胞

##### 付記 2 参照抗原 1

ワクチンの製造方法で製造されたもので、PCV2ORF2抗原として約 8  $\mu$ g/mL含むもの。

更新する場合には、元の参照抗原 1 に対する相対力価を求めておき、原液の相対力価測定時には元の参照抗原 1 と同等の抗原量となるよう調製する。

##### 付記 3 陰性対照抗原

Sf細胞培養液にワクチンのアジュバントを20vol%含むもの

##### 付記 4 陽性対照抗原 1

ワクチンの製造方法で製造されたもので、参照抗原 1 に対する相対力価4.45のPCV2ORF2抗原液31mLに対して生理食塩液 9 mLを加えたもの。

更新する場合には、元の陽性対照抗原 1 との相対力価が統計的に同等になるよう調製する。

##### 付記 5 抗PCV2ORF2抗原豚IgG

ワクチンで免疫したCDCD（帝王切開由来初乳未摂取）豚血清から精製した抗PCV2ORF2抗原豚IgGであって、間接蛍光抗体価が1,500倍以上のもの。

吸着用緩衝液（付記31）で希釈して用いる。

##### 付記 6 抗PCV2ORF2抗原モノクローナル抗体

PCV2ORF2抗原に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞の培養上清

##### 付記 7 酵素標識抗体

ペルオキシダーゼ標識した抗マウスIgG（H+L）山羊血清

##### 付記 8 洗浄・希釈液

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
リン酸二水素カリウム	0.2 g
ポリソルベート20	0.5 mL
水	残 量

pHを7.2～7.4に調整する。

付記9 ブロッキング緩衝液

洗浄・希釈液にスキムミルクを5.0w/v%になるように加えたもの

付記10 1 vol% 兔血清加希釈用緩衝液

洗浄・希釈液に兔正常血清を1 vol%になるように加えたもの

付記11 基質液

3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンを含むペルオキシダーゼ基質液

付記12 統計学的計算方法

農林水産大臣が適当と認めたもの

付記13 ウイルス増殖用培養液

1,000mL中

牛胎子血清	20～50 mL
イーグルMEM	残 量

pHを6.8～7.0に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記14 参照品

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ不活化抗原と同じ製造方法により製造されたワクチンで、豚での攻撃試験により有効性が確認されたもので相対力価 (RP) が約1.0のもの。参照品が更新される際には、同じ製造方法により製造され、RPが1.0になるように調製した後、豚での攻撃試験で現行参照品と同等の有効性が担保されなければならない。

付記15 陽性対照

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ不活化抗原と同じ方法により製造されたワ

クチンで、抗原定量試験における吸光度は0.542～1.578のもの。陽性対照を更新する場合は、マイコプラズマ・ハイオニューモニエ不活化抗原と同じ方法により製造し、抗原定量試験における吸光度が0.542～1.578を示すように調製する。

#### 付記16 陰性対照

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ不活化抗原の製造用培地にアジュバントを加えて調製されたもので、抗原定量試験における吸光度は0.081以下を示す。陰性対照を更新する場合は、元の陰性対照と同じ方法により製造し、抗原定量試験における吸光度が0.081以下を示すように調製する。

#### 付記17 抗体固相化プレート

96穴平底プレートにトリス緩衝食塩液（付記32）で希釈した捕捉抗体2（付記33）を加えて35～39℃で約1時間静置した後、洗浄液で洗浄後、ブロッキング液を加えて2～8℃で16～24時間静置したもの

#### 付記18 洗浄液

0.5mLのポリソルベート20をトリス緩衝食塩液に加えて1,000mLとする。

#### 付記19 ブロッキング液

50gのスキムミルクに洗浄液を加えて1,000mLとしたもの

#### 付記20 モノクローナル抗体

マイコプラズマ・ハイオニューモニエp44抗原に対するマウス由来のモノクローナル抗体

#### 付記21 標識抗体希釈液

1,000mL中

トリスヒドロキシメチルアミノメタン	2.42	g
塩化ナトリウム	8.766	g
スキムミルク	50.0	g
ポリソルベート20	0.5	mL
豚血清	50.0	mL
注射用水		残量

トリスヒドロキシアミノメタンと塩化ナトリウムを適量の注射用水に溶かし、pHを7.2～7.4に調整する。残りの原料を加え、分散させた後、注射用水を加えて1,000mLとする。

付記22 参照抗原 2

ワクチンの製造方法で製造された、参照陽性抗原 1 に対する相対力価4.45のPCV2ORF2抗原52容に、ワクチンのアジュバントを20容及び生理食塩液を28容加えたもの。

更新する場合には、元の参照抗原 2 に対する相対力価が1.0となり、豚への免疫原性が、元の参照抗原 2 のそれと同等となるよう調製する。

付記23 陽性対照抗原 2

ワクチンの製造方法で製造された、参照抗原 1 に対する相対力価4.45のPCV2ORF2抗原液 8 容にワクチンのアジュバントを 2 容加えたもの。

更新する場合には、元の陽性対照抗原 2 との相対力価が統計的に同等になるよう調製する。

付記24 固相化抗原 1

適当と認められたクロマトグラフィーによって精製したPCV2ORF2抗原画分

付記25 参照陽性血清 1

混合ワクチンで免疫したddY系マウスの血清であって、3.8.9.1の試験により抗体価が640～1280倍となるように濃度を調整したもの

付記26 抗原吸着プレート 1

固相化抗原 1 をトリス緩衝食塩液で希釈し、96穴ELISAプレートの各穴に100  $\mu$  Lずつ加え、37°Cで1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。その後、ブロッキング液を各穴に100  $\mu$  Lずつ加え、37°Cで1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄したもの

付記27 抗豚IgG蛍光標識抗体

抗豚IgG血清から $\gamma$ -グロブリンを調製し、これを蛍光色素で標識したもの

付記28 固相化抗原 2

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ製造用株又はこれと同等の免疫原性を有する株の培養菌液を遠心集菌し、菌体を洗浄した後、超音波処理をして調製した抗原

付記29 参照陽性血清 2

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ製造用株又はこれと同等の免疫原性を有する株の培養菌液を不活化した抗原で免疫したマウスの血清であって、3.8.9.3の試験により抗体価が320～640倍となるように濃度を調整したもの

付記30 抗原吸着プレート 2

固相化抗原 2 をトリス緩衝食塩液で希釈し、96穴ELISAプレートの各穴に100  $\mu$ L ずつ加え、37°Cで1時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。その後、ブロッキング液を各穴に100  $\mu$ L ずつ加え、37°Cで1時間反応させた後、洗浄液で洗浄したもの

付記31 吸着用緩衝液

1,000mL中

炭酸水素ナトリウム 2.93 g

炭酸ナトリウム 1.59 g

水 残 量

pHを9.5~9.7に調整する。

付記32 トリス緩衝食塩液

1,000mL中

トリスヒドロキシメチルアミノメタン 2.42 g

塩化ナトリウム 8.77 g

水 残 量

pHを7.2~7.4に調整する。

付記33 捕捉抗体 2

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ不活化抗原の製造用株で免疫したウサギ血清をアフィニティークロマトグラフィーで精製したポリクローナル抗体

# ニューカッスル病生ワクチン（シード）

平成22年7月12日（告示第1038号）新規追加  
平成29年10月11日（告示第1539号）一部改正  
令和2年12月11日（告示第2406号）一部改正  
令和 年 月 日（告示第 号）一部改正

## 1 定義

シードロット規格に適合した弱毒ニューカッスル病ウイルスを同規格に適合した発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液を凍結乾燥したワクチンである。

## 2 製法

### 2.1 製造用株

#### 2.1.1 名称

弱毒ニューカッスル病ウイルス B 1 株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.2 性状

8 週齢の鶏に $10^{6.0}$ EID<sub>50</sub>を点眼接種し、又は総排泄腔に擦入しても病原性を示さない。  
10日齢の発育鶏卵に1 EID<sub>50</sub>を注射すると増殖し、半数以上の鶏胚を約5日で死亡させる。

#### 2.1.3 マスターシードウイルス

##### 2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させ、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ウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、5代以内でなければならない。

#### 2.1.4 ワーキングシードウイルス

##### 2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

#### 2.1.5 プロダクションシードウイルス

##### 2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させ

る。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

プロダクションシードウイルス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 発育鶏卵

SPF動物規格の1.1に適合した9～11日齢のものを用いる。

マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルスを増殖、継代及び保存する場合の発育鶏卵、プロダクションシードウイルスを増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、3.2の試験を行う。

## 2.3 原液

### 2.3.1 発育鶏卵の培養

1回に処理する発育鶏卵を個別発育鶏卵とみなす。

個別発育鶏卵について、3.3の試験を行う。

### 2.3.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.1の発育鶏卵で培養して、尿膜腔液を採取し、そのろ液、遠心上清又はこれを濃縮したものを原液とする。

原液に相当と認められた必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

原液について、3.4の試験を行う。

## 2.4 最終バルク

原液を混合し、相当と認められた希釈液及び安定剤を加えて調製し、最終バルクとする。この場合、相当と認められた必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

小分製品が錠剤である製剤については、原液を混合して凍結乾燥し、相当と認められた賦形剤及び滑沢剤を加えて調製し、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て凍結乾燥し、小分製品とする。

小分製品が錠剤である製剤については、最終バルクを錠剤に成型し、小分製品とする。

小分製品について、3.5の試験を行う。

## 3 試験法

### 3.1 製造用株の試験

#### 3.1.1 マスターシードウイルスの試験

##### 3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.1.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.1.2 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。

##### 3.1.1.3 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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。

#### 3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

##### 3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、2.1及び2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験

###### 3.1.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験

鶏脳脊髄炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1及び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。ただし、鶏脳脊髄炎ウイルスについて3.1.1.4.2.2に規定する試験を実施する製剤については、本試験を実施しなくてもよい。

###### 3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

鶏白血病ウイルス、細網内皮症ウイルス及び鶏脳脊髄炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、3.2.1、3.2.2及び3.2.10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、鶏脳脊髄炎ウイルスについて3.1.1.4.2.1に規定する試験を実施する製剤については、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の3.2.10の試験を実施しなくてもよい。

#### 3.1.1.5 対象動物を用いた免疫原性試験

一般試験法の対象動物を用いた免疫原性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。

#### 3.1.1.6 対象動物を用いた安全性確認試験

一般試験法の対象動物を用いた安全性確認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。

#### 3.1.1.7 病原性復帰確認試験

一般試験法の病原性復帰確認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。

#### 3.1.1.8 マーカー試験

小分試験において、マーカー試験を実施する場合には、本試験の実施を省略することができる。

##### 3.1.1.8.1 試験材料

###### 3.1.1.8.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液を用いてウイルス含有量が0.5mL当たり小分製品における1羽分及び1/10羽分と同量含まれるように調整したものを試料とする。

###### 3.1.1.8.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～10日齢の発育鶏卵の胚から得た細胞を細胞増殖用培養液（付記1）で浮遊し、約20cm<sup>2</sup>以上のシャーレに分注し、培養し、単層となったものを用いる。

#### 3.1.1.8.2 試験方法

試料0.5mLをそれぞれ2枚以上の培養細胞に接種し、37°Cで60分間静置した後、重層寒天培地（付記2）を重層し、37°Cで4日間培養し、プラック形成の有無を観察する。

#### 3.1.1.8.3 判定

細胞にプラックの形成を認めてはならない。

### 3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

#### 3.1.2.1 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。

#### 3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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。

### 3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

#### 3.1.3.1 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。

#### 3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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。

### 3.2 発育鶏卵の試験

#### 3.2.1 孵卵性状試験

シードロット規格の3.2.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.3 個体別発育鶏卵の試験

個体別発育鶏卵の1%以上又は30個以上を対照発育鶏卵とし、これについて次の試験を行う。

#### 3.3.1 培養観察

対照発育鶏卵を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で培養し、観察するとき、鶏胚に異常を認めてはならない。

#### 3.3.2 鶏赤血球凝集試験

3.3.1の試験最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol%鶏赤血球浮遊液を等量加え、60分間静置し、観察するとき、赤血球凝集を認めてはならない。

### 3.4 原液の試験

#### 3.4.1 生菌数限度試験

一般試験法の生菌数限度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。

#### 3.4.2 ウイルス含有量試験

##### 3.4.2.1 試験材料

###### 3.4.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.4.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～11日齢のものを用いる。

#### 3.4.2.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ5個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37°Cで5日間培養し、観察する。試験最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol%鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

#### 3.4.2.3 判定

尿膜腔液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、EID<sub>50</sub>を算出する。ただし、24時間以内に死亡したものは除外する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10<sup>8.8</sup>EID<sub>50</sub>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、そのウイルス含有量とする。

### 3.5 小分製品の試験

#### 3.5.1 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乾燥物でなければならない。完全に溶解したものは、固有の色調を有する液体又は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。

#### 3.5.2 真空度試験

一般試験法の真空度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。

#### 3.5.3 含湿度試験

一般試験法の含湿度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。

#### 3.5.4 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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。

#### 3.5.5 サルモネラ否定試験

一般試験法のサルモネラ否定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。

#### 3.5.6 生菌数限度試験

一般試験法の生菌数限度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。

#### 3.5.7 ウイルス含有量試験

3.4.2を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1羽分当たり10<sup>5.5</sup>EID<sub>50</sub>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、そのウイルス含有量とする。

#### 3.5.8 マーカー試験

3.1.1.8を準用して試験するとき、適合しなければならない。マスターシードウイルスにおいて、マーカー試験を実施する場合には、本試験の実施を省略することができる。

#### 3.5.9 安全試験

### 3.5.9.1 試験材料

#### 3.5.9.1.1 接種材料

試験品をリン酸緩衝食塩液を用いてウイルス含有量が0.03mL当たり10羽分含まれるように調製し、接種材料とする。

#### 3.5.9.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の4日齢の鶏を用いる。

### 3.5.9.2 試験方法

試験動物10羽を試験群、5羽を対照群とする。

接種材料0.03mLずつを試験群に点眼接種し、対照群とともに3週間観察する。

試験開始時及び試験終了時に体重を測定する。

### 3.5.9.3 判定

観察期間中、対照群においては、臨床的な異常を認めてはならず、試験群においては、一過性の呼吸器症状及び結膜の充血を呈することがあっても、その他の異常を認めてはならない。

### 3.5.10 力価試験

#### 3.5.10.1 試験材料

##### 3.5.10.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

##### 3.5.10.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の4～5週齢の鶏を用いる。

##### 3.5.10.1.3 攻撃ウイルス

強毒ニューカッスル病ウイルス佐藤株で感染させた尿膜腔液であり、約40日齢の鶏の筋肉内に注射し、そのウイルス量を測定するとき、1 mL中 $10^{6.0}$ 致死量以上を有するものを用いる。

使用時、リン酸緩衝食塩液を用いて、1 mL中 $10^{4.0}$ 致死量となるように調製する。

#### 3.5.10.2 試験方法

試験動物10羽を試験群、5羽を対照群とする。

試験群に接種材料1羽分ずつを点鼻接種し、2週間後に試験群及び対照群の全てに攻撃ウイルス1 mLを筋肉内に注射して攻撃し、2週間観察する。

#### 3.5.10.3 判定

試験終了時、試験群は、80%以上が異常なく耐過しなければならない。この場合、対照群は、100%発病して死亡しなければならない。

### 4 貯法及び有効期間

有効期間は、1年6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 細胞増殖用培養液

1,000mL中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
牛血清	30～50 mL
イーグルMEM	残量

pH6.8～7.2に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記2 重層寒天培地

1,000mL中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
牛血清	10 mL
ニュートラルレッド	50 mg
寒天	9 g
イーグルMEM	残量

pH6.8～7.2に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。