

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）不活化ワクチン（シード）

平成30年9月11日（告示第2046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である。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

PCV2ORF2 遺伝子組換え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

2.1.2 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 たん白抗原を発現する。

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、Sf細胞（付記1）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°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、Sf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 -70°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、Sf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 -70°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ウイルスを保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 培養細胞

Sf細胞を用いる。

2.2.2 培養液

製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた培養液を用いる。

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 -70°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。

2.2.4 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 -70°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 -70°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 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。ウイルス接種前の培養細胞に異常を認めてはならない。

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。

2.3.3 不活化

ウイルス培養液をろ過し、製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた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。

2.3.4 原液の調整

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。

2.4 最終バルク

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。

2.5 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、3.5 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 1.4.2.3.1.1 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、その試験法とする。

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、その試験法とする。

3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

豚コレラウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス、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、その試験法とする。

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。

3.2 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

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、その試験法とする。

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 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、その試験法とする。

3.2.1.5.2.2 個別ウイルス否定試験

豚コレラウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス、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、その試験法とする。

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 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

Sf 細胞を用いる。

3.4.2.2 試験方法

検体を 150 ~ 175cm² の培養細胞に接種し、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 抗原含有量試験

3.4.3.1 試験材料

検体、参照抗原 1（付記 2）、陰性対照（付記 3）及び陽性対照抗原 1（付記 4）、抗 PCV2ORF2 豚 IgG（付記 5）、抗 PCV2ORF2 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

3.4.3.2.2 試料の調製

検体、参照抗原 1、陰性対照及び陽性対照抗原 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。

3.4.3.2.1 反応

抗 PCV2ORF2 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液（付記 9）を 250 μ 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 μ 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 モノクローナル抗体を各穴に 100 μ 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（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 μ 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 μ 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 μ L ずつ各穴に分注し、反応を停止させる。

3.4.3.2.4 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 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、透明からやや混濁した無色から帯黄色、粘性のない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。

3.5.2 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。

3.5.3 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。

3.5.4 力価試験

3.5.4.1 試験材料

試験品、参照抗原 2（参照ワクチン）（付記 13）、陰性対照抗原、陽性対照抗原 2（付記 14）、抗 PCV2ORF2 豚 IgG、抗 PCV2ORF2 モノクローナル抗体及び酵素標識抗体を用いる。

3.5.4.2 試験方法

3.5.4.2.1 試料等の調製

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

3.5.4.2.2 反応

3.4.3.2.1 を準用して行う。

3.5.4.2.3 吸光度測定

波長 450nm で吸光度を測定する。

3.5.4.3 判定

参照抗原 2（参照ワクチン）の力価を 1.0 として、試験品の相対力価を統計学的計算方法により算出するとき、試験品の相対力価は、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、陰性対照の 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。

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 μ 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

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 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 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 14）で希釈して用いる。

付記 6 抗 PCV2ORF2 モノクローナル抗体

PCV2ORF2 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 6C4-2-4A3-5D10 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 ブロッキング液
洗浄・希釈液に脱脂粉乳を 5.0 w/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
A 液：テトラメチルベンチジン 0.4g を 26vol % *N,N*-ジメチルホルムアミド溶液 1,000mL で溶解したもの
B 液：クエン酸緩衝液に 0.02vol % 過酸化水素水を含む液
使用時に A 液と B 液を等量混合して用いる。

付記 12 統計学的計算方法
動物医薬品検査所が適当と認めたもの

付記 13 参照抗原 2 (参照ワクチン)
「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加) 不活化ワクチン」であって、動物医薬品検査所が適当と認めたもの。
参照抗原 1 に対する相対力価 4.45 の PCV2ORF2 抗原液を 52%、アジュバントを 20%及び生理食塩液を 28%含む。
更新する場合は、相対力価が 1.0 であり、元の参照抗原 2 と同等の免疫原性を確認したものとす。

付記 14 陽性対照抗原 2
参照抗原 1 に対する相対力価 4.45 の PCV2ORF2 抗原液を 80vol % 及びアジュバントを 20vol % 含むもの。
更新する場合は、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 15 吸着用緩衝液
1,000mL 中
炭酸水素ナトリウム 2.93 g
無水炭酸ナトリウム 1.59 g
水 残 量
pH を 9.5 ～ 9.7 に調整する。

豚サーコウイルス（2型・組換え型）感染症（酢酸トコフェロール・油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

平成30年9月11日（告示第2046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、酢酸トコフェロール及び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 名称

PCV2ORF2 遺伝子組換えオートグラフィア核多角体ウイルス（AcNPV）BacPCV2-Orf2；98-99株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

Sf21細胞（付記1）で増殖する。PCV2ORF2 特異的プライマーを用いて増幅したDNA断片の塩基配列は、核酸を供与した豚サーコウイルス2型と同じである。

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、Sf21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 -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、Sf21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 -70°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、Sf21細胞で増殖させる。

プロダクションシードウイルスは、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。

プロダクションシードウイルスを保存する場合には、3.1.3の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 培養細胞

Sf21細胞を用いる。

2.2.2 培養液

製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた培養液を用いる。

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、 -70°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。

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 -70°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 -70°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 プロダクションセルシードの培養

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

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 の細胞で培養し、ウイルスの増殖極期の培養液を超音波処理したものを不活化前原液とする。

不活化前原液について、3.3 の試験を行う。

2.3.3 不活化

不活化前原液に製剤ごと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、遠心した上清を原液とする。

原液について、3.4 の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液に適量のアジュバントを添加し、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、3.5 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 1.4.2.3.1.1 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、その試験方法とする。

3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

豚コレラウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス、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。

3.2 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、その試験方法とする。

3.2.1.5.2.2 個別ウイルス否定試験

豚コレラウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス、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 不活化前原液の試験

3.3.1 ウイルス含有量試験

3.3.1.1 試験材料

3.3.1.1.1 試料

検体を Sf9 細胞（付記 2）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.1.1.2 培養細胞

Sf9 細胞を用いる。

3.3.1.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 96 穴マイクロプレートの 4 穴以上に分注し、28℃で 5 日間培養する。培養後、96vol %冷エタノールで固定し、蛍光抗体法を用いて特異蛍光の有無を観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.3.1.3 判定

特異蛍光を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{7.0}TCID₅₀ 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。

3.4 原液の試験

3.4.1 不活化試験

3.4.1.1 試験材料

3.4.1.1.1 試料

検体を試料とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試料とする。

3.4.1.1.2 培養細胞

Sf9 細胞を用いる。

3.4.1.2 試験方法

試料をローラーボトルに単層を形成した培養細胞に 25mL ずつ接種し、28℃で 60 分間吸着した後、ウイルス増殖用培養液を加え、28℃で 3～4 日間培養後、接種した培養細胞を継代し、更に 28℃で 10～11 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、その試験方法とする。

3.4.1.3 判定

培養細胞に CPE を認めてはならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その判定方法とする。

3.4.2 抗原定量試験

3.4.2.1 試験材料

3.4.2.1.1 試料

検体を希釈液（付記 3）で 5,000 倍に希釈し、試料とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試料とする。

3.4.2.2 試験方法

モノクローナル抗体吸着プレート（付記 4）に希釈液を 100 μ L ずつ全穴に加える。試料、参照陽性抗原（付記 5）及び参照標準抗原（付記 6）各 200 μ L を希釈液で 1.5 倍階段希釈し、37℃で 60 分反応させる。一部、希釈液のみのブランク対照を設定する。反応後、洗浄液（付記 7）で洗浄し、ビオチン標識化 PCV2 特異的モノクローナル抗体（付記 8）100 μ L を各穴に加える。37℃で 60 分間反応後、洗浄液で洗浄し、ペルオキシダーゼ標識アビジン液（付記 9）100 μ L を各穴に加える。37℃で 45 分間反応後、洗浄液で洗浄し、基質液（付記 10）を各穴に 100 μ L ずつ加え、常温で反応させた後、2 mol/L 硫酸を各穴に 50 μ L ずつ加え、反応を停止させ、波長 450nm で吸光度を測定する。参照陽性抗原の吸光度から検量線を作成し、これから試料の抗原の単位を算出する。このとき、ブランク対照の平均吸光度は、0.05 以下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、その試験方法とする。

3.4.2.3 判定

試料中の ELISA 抗原価は、5,000 単位/mL 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、その抗原量とする。

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。

3.5 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、上層は、乳白色、不透明及び水様の懸濁液であり、底面に淡黄褐色の沈殿物を認める。攪拌後は、乳白色、不透明及び水様の懸濁液となる。また、異物及び異臭を認めてはならず、小分容器ごとの性状は均一でなければならない。

3.5.2 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。

3.5.3 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。

3.5.4 アジュバント定量試験

3.5.4.1 酢酸トコフェロール定量試験

日本薬局方のトコフェロール酢酸エステル定量法を準用して試験するとき、酢酸トコフェロールの含有量は、1 mL 中 11.8mg～13.2mg 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、その試験方法とする。

3.5.4.2 軽質流動パラフィン定量試験

試験品の全量を乾燥させた活性アルミナ約 50g を充てんしたガラスカラムに吸着させた後、約 250mL の n-ヘキサンを流す。n-ヘキサンを留去後、残留分の質量から軽質流動パラフィンの含有量

を求めるとき、軽質流動パラフィンの含有量は、1 mL 中 155mg ~ 191mg でなければならない。

3.5.5 毒性限度確認試験

一般試験法の毒性限度確認試験法 1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、試験品の注射量は 0.3mL とし、注射後の体重測定は 5 日目に行う。

3.5.6 力価試験

3.5.6.1 又は 3.5.6.2 のいずれかを実施する。

3.5.6.1 鶏を用いた試験

3.5.6.1.1 試験材料

3.5.6.1.1.1 注射材料

試験品 2 mL をプラセボ（付記 11）で 4 倍に希釈したものを注射材料とする。

3.5.6.1.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 3 ~ 4 週齢の鶏を用いる。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その規格の鶏を用いる。

3.5.6.1.2 試験方法

試験動物 10 羽を試験群、5 羽を対照群とする。注射材料 0.1mL を試験群の筋肉内に注射する。対照群にはプラセボを筋肉内注射する。注射時及び注射 28 日後に得られた各個体の血清について ELISA により抗体価を測定する。

抗原吸着プレート（付記 12）の 12 列目を除く各穴に希釈液を 100 μ L ずつ分注し、非働化した各被検血清を 50 μ L 加え、3 倍階段希釈する。希釈液で 5 倍に希釈した参照標準血清（付記 13）を 50 μ L 加え、3 倍階段希釈する。希釈液で 5 倍及び 16 倍に希釈した参照陽性血清（付記 14）及び参照陰性血清（付記 15）をそれぞれ 12 列目の 4 穴に 100 μ L 加える。11 列目の 2 穴をブランク対照とする。37 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させた後、洗浄液で洗浄し、ビオチン標識化 PCV2 特異モノクローナル抗体を各穴に 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させる。洗浄液で洗浄し、ペルオキシダーゼ標識アビジン液を各穴に 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 45 分間反応させる。洗浄液で洗浄し、基質液を各穴に 100 μ L ずつ加え、常温、暗所で反応させた後、2 mol/L 硫酸を各穴に 50 μ L ずつ加え、反応を停止させる。波長 450nm で吸光度を測定し、以下の式から被検血清及び参照標準血清の抗体価 (\log_2) を求める。

$$50\% \text{ 阻止吸光度} = (\text{参照陰性血清の吸光度の平均} - \text{参照陽性血清の吸光度の平均}) / 2$$

$$\text{カットオフ吸光度} = 50\% \text{ 阻止吸光度} + \text{参照陽性血清の吸光度の平均}$$

$$\text{各血清の抗体価} = \log_2 \{ \text{吸光度 A を示す各血清の希釈倍数} + (\text{カットオフ吸光度} - \text{吸光度 A} / \text{吸光度 B} - \text{吸光度 A}) \times (\text{吸光度 B を示す各血清の希釈倍数} - \text{吸光度 A を示す各血清の希釈倍数}) \}$$

吸光度 A 及び吸光度 B：被検血清及び参照標準血清におけるカットオフ吸光度を挟む 2 点（吸光度 A < 吸光度 B）の吸光度

3.5.6.1.3 判定

試験動物の注射 28 日後の抗体価の平均値は 4.5 \log_2 以上でなければならない。対照群の注射 28 日後の抗体価の平均値は 2.0 \log_2 以下でなければならない。この際、ブランク対照の平均吸光度は 1.000 以上、参照陽性血清の最小吸光度は 0.200 未満、参照陰性血清の最大吸光度は 1.000 以上でなければならない。参照標準血清の抗体価は 8.0 \log_2 ~ 10.0 \log_2 を示さなければならない。

3.5.6.2 モルモットを用いた試験

3.5.6.2.1 試験材料

3.5.6.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.6.2.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

3.5.6.2.2 試験方法

試験動物 10 匹を試験群、5 匹を対照群とする。注射材料 0.25mL ずつを試験群の筋肉内に注射し、注射 28 日後に得られた各個体の血清について 3.5.6.1.2 を準用した ELISA により抗体価を測定する。対照群は無接種とする。

3.5.6.2.3 判定

試験群の抗体価の平均値は $6.2 \log_2$ 以上でなければならない。対照群の抗体価の平均値は $2.0 \log_2$ 以下でなければならない。この際、ブランク対照の平均吸光度は 1.000 以上、参照陽性血清の最小吸光度は 0.200 未満、参照陰性血清の最大吸光度は 1.000 以上でなければならない。参照標準血清の抗体価は $8.0 \log_2 \sim 10.0 \log_2$ を示さなければならない。

付記 1 Sf21 細胞

Spodoptera frugiperda 卵巣由来細胞

付記 2 Sf9 細胞

Spodoptera frugiperda 卵巣由来細胞で Sf21 細胞のサブクローン

付記 3 希釈液

1,000mL 中

リン酸水素二ナトリウム二水和物 35.58 g

塩化ナトリウム 11.69 g

ポリソルベート 80 0.5 g

牛血清アルブミン (カオリン処理済み) 1.0 g

水 残量

pH を 7.0 に調整し、ろ過滅菌する。

付記 4 モノクローナル抗体吸着プレート

PCV2 特異的モノクローナル抗体 3/1B4 (付記 16) をモノクローナル抗体希釈液 (付記 17) で蛋白量として 100ng / mL になるように希釈し、96 穴マイクロプレートの各穴に 135 μ L ずつ分注し、2 ~ 8°C で 16 ~ 24 時間静置し、洗浄液 300 μ L で 4 回洗浄後、カゼイン緩衝液 (付記 18) を 200 μ L ずつ分注し、37°C で 1 ~ 2 時間静置したもの。

付記 5 参照陽性抗原

豚サーコウイルス (2 型・組換え型) 感染症 (酢酸トコフェロール・油性アジュバント加) 不活化ワクチン (以下、この項において「ワクチン」という。) と同じ方法で製造した PCV2 の ORF2 蛋白で、PCV2ORF2 抗原の含有量が ELISA 抗原価 5,000 単位/mL 以上のもの
ポリアクリルアミドゲル電気泳動した場合、約 28kDa に特異的なバンドを認め、また、3.3.2.2 を準用した ELISA により波長 450nm の吸光度を測定した場合、吸光度 1.000 以上を示すもの。

付記 6 参照標準抗原

ワクチンと同じ方法で製造した PCV2 の ORF2 蛋白で、PCV2ORF2 抗原の含有量が ELISA 抗原価 5,000 単位/mL と規定したもの。
ポリアクリルアミドゲル電気泳動した場合、約 28kDa に特異的なバンドを認め、また、3.3.2.2 を準用した ELISA により波長 450nm の吸光度を測定した場合、吸光度 1.000 以上を示すもの。

付記 7 洗浄液

1,000mL 中	
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
塩化ナトリウム	37.2 g
塩化カリウム	0.2 g
ポリソルベート 20	1.5 g
水	残量

pH を 7.0 に調整する。

付記 8 ビオチン標識化 PCV2 特異モノクローナル抗体

PCV2ORF2 に特異的モノクローナル抗体 5/6H12 をビオチンで標識したもので、希釈液で 1,200 倍に希釈して用いる。

付記 9 ペルオキシダーゼ標識アビジン液

ペルオキシダーゼで標識したアビジン液で、希釈液で希釈して用いる。

付記 10 基質液

UP 緩衝液、0.6w/v % TMB 溶液及び水を 1、0.185 及び 10 の割合で混合したもの

UP 緩衝液：テトラメチルベンジジン基質液（酢酸ナトリウム三水和物 13.6g を 80mL の水に溶解し、1.5mol/L のクエン酸一水和物で pH 5.5 に調整後、水を加えて 100mL としたもの）に尿素過酸化水素 140mg を加えたもの。

0.6w/v % TMB 溶液：テトラメチルベンジジン 6 g をジメチルスルホキシド 1,000mL で溶解したもの。

付記 11 プラセボ

ワクチンの成分のうち、主剤を基礎培地に置き換え、その他のアジュバント等の添加剤は、ワクチンと同一成分、同一分量に調製したもの。

付記 12 抗原吸着プレート

PCV2 特異的モノクローナル抗体 3/1B4 をモノクローナル抗体希釈液で蛋白量として 100ng / mL になるように希釈し、96 穴マイクロプレートの各穴に 135 μ L ずつ分注し、2 ~ 8 $^{\circ}$ C で 16 ~ 24 時間静置し、洗浄液 300 μ L で 4 回洗浄後、カゼイン緩衝液を 200 μ L ずつ分注し、37 $^{\circ}$ C で 1 ~ 2 時間静置し、洗浄液 300 μ L で 4 回洗浄する。さらに、PCV2ORF2 抗原（付記19）を希釈液で蛋白量として 4 μ g / mL になるように希釈し、100 μ L ずつ分注し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間静置し、洗浄液 300 μ L で 4 回洗浄したもの。

付記 13 参照標準血清

ワクチンで免疫した SPF 鶏群由来の血清で、PCV2ORF2 に対し抗体陽性のものを非働化したもので、3.4.7.1.2 を準用した ELISA（以下、この項において「力価試験の ELISA」という。）で測定したとき、抗体価 8.0 log₂ ~ 10.0 log₂ を示すもの。

付記 14 参照陽性血清

ワクチンで免疫した生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏から得た血清で、PCV2ORF2 に対し抗体陽性のものを非働化したもので、力価試験の ELISA で測定したとき、吸光度 0.200 未満を示すもの。

付記 15 参照陰性血清

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏から得た血清で、PCV2ORF2 に対し抗体陰性のものを非働化したもので、力価試験の ELISA で測定したとき、吸光度 1.000 以上を示すもの。

付記 16 PCV2 特異的モノクローナル抗体 3/1B4

PCV2ORF2 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培養細胞の培養上清をアフィニティークロマトグラフィーで精製し、1 mL 中蛋白量として 600 μ g になるように調整したもの。

付記 17 モノクローナル抗体希釈液

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

pH を 9.6 に調整し、ろ過滅菌する。

付記 18 カゼイン緩衝液

1,000mL 中	
トリス	4.84 g
スクロース	40.0 g
Triton X-100	0.5 g
カゼイン	2.0 g
水	残量

水約 400mL にトリスを加え、溶解し、pH を 7.3 ~ 7.5 に調整した後、残りの試薬を加え、水で 1,000mL とする。ろ過滅菌する。

付記 19 PCV2ORF2 抗原

ワクチンと同じ方法で製造した PCV2ORF2 蛋白抗原を不活化したもので、1 mL 中蛋白量として 200 μ g になるように調整したもの。ポリアクリルアミドゲル電気泳動した場合、約 28kDa に特異的なバンドを認めるもの。

犬レプトスピラ病（カニコーラ・イクテロヘモラジー）不活化ワクチン（シード）

平成 30 年 9 月 11 日 (告示第 2046 号)一部改正

1 定義

シードロット規格に適合したレプトスピラ・カニコーラ（以下この項において「L・カニコーラ」という。）及びレプトスピラ・イクテロヘモラジー（以下この項において「L・イクテロヘモラジー」という。）の培養浮遊菌液を不活化し、濃縮したものを混合したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 L・カニコーラ

2.1.1.1 名称

L・カニコーラ Ca-12-000 株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

モルモット又はハムスターの腹腔内に注射すると増殖する。

抗L・カニコーラ血清（付記1）に対して特異的に凝集する。

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、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。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。

2.1.1.4 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は、3.1.3の試験を行う。

2.1.2 L・イクテロヘモラジー

2.1.2.1 名称

L・イクテロヘモラジー 820K 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

モルモット又はハムスターの腹腔内に注射すると増殖する。

抗L・イクテロヘモラジー血清（付記2）に対して特異的に凝集する。

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、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。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 -70°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は、3.1.3の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 L・カニコーラ

2.2.1.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.2.2 L・イクテロヘモラジー

2.2.2.1 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 L・カニコーラ

2.3.1.1 培養

ワーキングシード菌又は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

適当と認められた方法で培養菌液を不活化したものを不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.3の試験を行う。

2.3.1.3 原液

適当と認められた方法で集菌し適当と認められた溶液に浮遊させたもの、又は適当と認められた方法で濃縮し適当と認められた溶液で洗浄したものを原液とする。

原液について、3.4の試験を行う。

2.3.2 L・イクテロヘモラジー

2.3.2.1 培養

ワーキングシード菌又は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

適当と認められた方法で培養菌液を不活化したものを不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.3 の試験を行う。

2.3.2.3 原液

適当と認められた方法で集菌し適当と認められた溶液に浮遊させたもの、又は適当と認められた方法で濃縮し適当と認められた溶液で洗浄したものを原液とする。

原液について、3.4 の試験を行う。

2.4 最終バルク

適当と認められた溶液で濃度調整した各原液を混合し、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、3.5 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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験法とする。

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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験法とする。

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。

3.2 培養菌液の試験

3.2.1 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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験法とする。

3.2.2 総菌数試験

光電比色計又は菌数計算法によって菌数を測定する。検体中の総菌数は、1 mL 中 10^5 個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、その菌数とする。また、原液において抗原量測定試験を実施するものについては、この試験を行わなくてもよい。

3.3 不活化菌液の試験

3.3.1 不活化試験

原液において不活化試験を実施するものについては、この試験を行わなくてもよい。

3.3.1.1 試験材料

3.3.1.1.1 試料

検体を試料とする。

3.3.1.1.2 培地

EMJH 培地（付記 3）又は適当と認められた培地を用いる。

3.3.1.1.2 試験方法

試料 1 mL を 100mL の培地に接種し、27～31℃で 14 日間培養し、更に 100mL の培地に継代し、

両方の培地を 27～31℃で 14 日間培養する。

3.3.1.3 判定

いずれの培地でもレプトスピラの発育を認めてはならない。

3.4 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

不活化菌液において不活化試験を実施するものについては、この試験を行わなくてもよい。

3.4.2.1 試験材料

3.4.2.1.1 試料

検体 5 mL を 100 倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、2～5℃で一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.4.2.1.2 培地

コルトフ培地（付記 4）又は適当と認められた培地を用いる。

3.4.2.2 試験方法

培地 20mL を入れた試験管 3 本に試料 0.5mL ずつを接種し、35～37℃で 6～8 日間培養し、各試験管から 1 白金耳を採取し、暗視野法で鏡検する。

3.4.2.3 判定

レプトスピラの増殖を認めてはならない。

3.4.3 抗原量測定試験

3.4.3.1 L・カニコーラ抗原量

3.4.3.1.1 試験材料

3.4.3.1.1.1 試料

検体を試料とする。

3.4.3.1.2 試験方法

酵素抗体反応（以下この項において「ELISA」という。）により、試料中の ELISA 抗原量を求める。96 穴 ELISA 用プレートを用い、通常、11 列を抗原の最大結合量の測定に、12 列をブランクの測定に用いる。

L・カニコーラ固相化プレート（付記 5）の A 行及び 11 列を除く全ての穴に 1 w/v % スキムミルク加 0.05 % ポリソルベート 20 加 PBS（付記 6。以下この項において「PBST-SM」という。）を 100 μ L ずつ加える。PBST-SM でそれぞれ至適濃度に希釈した L・カニコーラ参照抗原（付記 7）、試料及び L・カニコーラ内部標準（付記 8）を、A 行の 1 から 10 列までの 2 穴ずつに 200 μ L ずつ加えた後、H 行まで 100 μ L ずつ送り、2 倍階段希釈する。また、11 列の全ての穴には、PBST-SM で至適濃度に希釈した最大結合量測定用 L・カニコーラ参照抗原（付記 9）を 100 μ L ずつ加え、37℃で 1 時間反応させる。0.05 % ポリソルベート 20 加 PBS（付記 10。以下この項において「PBST」という。）で洗浄後、PBST-SM で希釈した L・カニコーラ検出用抗体（付記 11）を各穴に 100 μ L ずつ加え、37℃で 1 時間反応させ、PBST で洗浄する。基質液（付記 12）を各穴に 100 μ L ずつ加え、遮光して室温で 10 分間反応させ、2 mol/L 硫酸溶液を各穴に 50 μ L ずつ加えて反応を停止させる。各穴の吸光度を波長 450nm で測定し、適当と認められた計算方法により試料中の ELISA 抗原量を求める。

3.4.3.1.3 判定

試料 1 mL 中の抗原量は 30,000ELISA 単位以上でなければならない。この場合、内部標準で求められた抗原量は規定値を示さなければならない。試料の検量線の相関係数は 0.9 以上を示さなければならない。試料及び内部標準の検量線の傾きは参照抗原のそれに対して 0.8～1.25 の範囲にななければならない。また、試料の各希釈段階における吸光度の変動係数は 20 % 以下でなければならない。

3.4.3.2 L・イクテロヘモラジー抗原量

3.4.3.1 を準用して試験をするとき、試料 1 mL の抗原量は 3,000ELISA 単位以上でなければならない。ただし、試験には L・イクテロヘモラジー参照抗原（付記 13）、L・イクテロヘモラジー内部標準（付記 14）、L・イクテロヘモラジー固相化プレート（付記 15）、最大結合量測定用 L・イクテロヘモラジー参照抗原（付記 16）及び L・イクテロヘモラジー検出用抗体（付記 17）を用いる。

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 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。

3.5.3 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。

3.5.4 チメロサル定量試験

チメロサル添加製剤については、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。

3.5.5 フェノール定量試験

フェノール添加製剤については、一般試験法のフェノール定量法を準用して試験するとき、フェノールの含有量は、0.2 w/v %以下でなければならない。

3.5.6 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性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。

3.5.7 安全試験

3.5.7.1 試験材料

3.5.7.1.1 接種材料

試験品を注射材料とする。

3.5.7.1.2 試験動物

6 か月齢未満の犬を用いる。

3.5.7.2 試験方法

注射材料 5 頭分ずつを用法に従ってそれぞれ 2 頭の試験動物に注射し、10 日間観察する。

3.5.7.3 判定

観察期間中、異常を認めてはならない。

3.5.8 力価試験

3.5.8.1 試験材料

3.5.8.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.8.1.2 試験動物

体重約 300g のモルモット又は体重 60 ~ 100g のハムスターを用いる。

3.5.8.1.3 凝集反応用菌液

L・カニコーラ及び L・イクテロヘモラジーの生菌浮遊液を用いる。

3.5.8.2 試験方法

注射材料 1 mL ずつを 10 匹の試験動物に 7 日間隔で 2 回皮下注射する。2 回注射後 14 日目に得られた各個体の血清について、凝集反応用菌液を用いて、溶菌凝集反応を行う。

3.5.8.3 判定

それぞれの菌液に対し、80 %以上が 8 倍以上の凝集価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1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 抗L・カニコーラ血清

L・カニコーラの不活化菌で免疫した兔又は体重300～350gのモルモットの血清で、凝集抗体価40倍以上のもの。

付記2 抗L・イクテロヘモラジー血清

L・イクテロヘモラジーの不活化菌で免疫した兔又は体重300～350gのモルモットの血清で、凝集抗体価40倍以上のもの。

付記3 EMJH 培地

1,000mL 中

リン酸水素ナトリウム二水和物	0.94 g
リン酸水素カリウム	0.27 g
塩化ナトリウム	0.9 g
塩化アンモニウム	0.23 g
塩酸サイアミン	0.004 g
87vol %グリセリン	0.09 g
牛血清アルブミン	10.0 g
ピルビン酸ナトリウム	0.09 g
硫酸亜鉛	0.004 g
塩化カルシウム	0.01 g
塩化マグネシウム	0.01 g
硫酸鉄(Ⅱ)七水和物	0.05 g
硫酸銅(Ⅱ)五水和物	0.0003g
ポリソルベート 80	1.25 g
ビタミン B ₁₂	0.0002g
水	残 量

220nm以下のフィルターでろ過滅菌する。

付記4 コルトフ培地

1,000 mL 中

ペプトン	0.8 g
塩化ナトリウム	1.4 g
炭酸水素ナトリウム	0.02 g
塩化カリウム	0.04 g
リン酸二水素カリウム	0.18 g
無水リン酸水素二ナトリウム	1.76 g
水	残 量

100℃で40分間加熱し、冷却した後ろ過し、pHを7.0～7.2に調整し、121℃で15分間高圧滅菌する。冷却した後、新鮮兔血清を8～10vol%となるように加える。

付記5 L・カニコーラ固相化プレート

L・カニコーラの防御エピトープを認識するモノクローナル抗体を炭酸緩衝液(付記18)で

至適濃度に調整したものを 96 穴 ELISA 用マイクロプレートの各穴に 150 μ L ずつ加え、2 ~ 8 $^{\circ}$ C で 16 時間固相化し、反応終了後抗体液を捨て、PBST-SM を各穴に 200 μ L ずつ加え 37 $^{\circ}$ C で 1 時間感作し、PBST で洗浄したもの。

付記 6 1 w/v % スキムミルク加 0.05 % ポリソルベート 20 加 PBS (PBST-SM)
1,000mL 中
スキムミルク 10 g
PBST (付記 10) 1,000mL

付記 7 L・カニコーラ参照抗原
L・カニコーラ培養菌液を不活化し、1 mL 中に不活化前生菌数が 1×10^9 個を含むように調製したものを 1,000ELISA 単位を含む標準品として、ELISA 単位を測定したもの。- 15 $^{\circ}$ C 以下で保存する。

付記 8 L・カニコーラ内部標準
L・カニコーラ参照抗原と同じ製造方法で作製し、PBST-SM で所定の ELISA 単位を含むように希釈して使用する。- 15 $^{\circ}$ C 以下で保存する。

付記 9 最大結合量測定用 L・カニコーラ参照抗原
L・カニコーラ参照抗原を PBST-SM で至適濃度に希釈したもの。

付記 10 0.05 % ポリソルベート 20 加 PBS (PBST)
1,000mL 中
ポリソルベート 20 0.5mL
PBS 1,000 mL

付記 11 L・カニコーラ検出用抗体
L・カニコーラの防御エピトープを認識するモノクローナル抗体にペルオキシダーゼ標識を行ったもの。PBST-SM で希釈して使用する。- 15 $^{\circ}$ C 以下で保存する。

付記 12 基質液
A 液
10w/v % クエン酸溶液 3.2mL
酢酸ナトリウム三水和物 13.1 g
水 100 mL
B 液
テトラメチルベンチジン 2.36g
ジメチルスルホキシド 100 mL
使用時に A 液 : B 液 : 水を 1.5 : 0.2 : 13.3 の割合で混合する。あるいは適当な品質の市販品を用いてもよい。

付記 13 L・イクテロヘモラジー参照抗原
L・イクテロヘモラジー培養菌液を不活化し、1 mL 中に不活化前生菌数が 1×10^9 個を含むように調製したものを 1,000ELISA 単位を含む標準品として、ELISA 単位を測定したもの。- 15 $^{\circ}$ C 以下で保存する。

付記 14 L・イクテロヘモラジー内部標準

L・イクテロヘモラジー参照抗原と同じ製造方法で作製し、PBST-SM で所定の ELISA 単位を含むように希釈して使用する。－ 15 °C以下で保存する。

付記 15 L・イクテロヘモラジー固相化プレート

L・イクテロヘモラジーの防御エピトープを認識するモノクローナル抗体を炭酸緩衝液で至適濃度に調整したものを 96 穴 ELISA プレーットの各穴に 150 μ L ずつ加え、2～8 °Cで 16 時間固相化し、反応終了後抗体液を捨て、PBST-SM を各穴に 200 μ L ずつ加え 37 °Cで 1 時間感作し、PBST で洗浄したもの。

付記 16 最大結合量測定用 L・イクテロヘモラジー参照抗原

L・イクテロヘモラジー参照抗原を PBST-SM で至適濃度に希釈したもの。

付記 17 L・イクテロヘモラジー検出用抗体

L・イクテロヘモラジーの防御エピトープを認識するモノクローナル抗体にペルオキシダーゼ標識を行ったもの。PBST-SM で希釈して使用する。－ 15 °C以下で保存する。

付記 18 炭酸緩衝液

1,000mL 中

炭酸ナトリウム

1.59g

炭酸水素ナトリウム

2.93g

精製水

残量

pH を 9.6 に調整する。