

豚サーコウイルス（2型）感染症不活化ワクチン（油性アジュバント加懸濁用液）

令和3年5月17日(告示第798号)新規追加

1 定義

豚サーコウイルス（2型）を培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化したもので、使用時に油性アジュバントを含む懸濁用液と混合して調製するワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

豚サーコウイルス（2型）（以下この項において「PCV2」という。）1010-25株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

PK15細胞で増殖する。PCV2に対する抗体を産生させる免疫原性を有する。

2.1.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、PK15細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。原液は、原株から7代以内に製造しなければならない。

原株及び種ウイルスは、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。

2.2 製造材料

2.2.1 培養細胞

PK15細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.1.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.3 原液

2.3.1 細胞の培養

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

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に培養液を採取し、必要に応じて、超音波処理による培養細胞の破碎、ろ過及び遠心分離を行ったものをウイルス浮遊液とする。

2.3.3 不活化

ウイルス浮遊液に適当と認められた不活化剤を加えて攪拌し、不活化した後に、適当と認められた中和剤を加えて中和したものを不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.1の試験を行う。

2.3.4 原液

不活化ウイルス液を濃縮したものを原液とする。

原液について、3.2の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液に適量の保存剤を添加し、適当と認められた溶液で濃度調整したものを最終バルクとする。

2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。

小分製品について、3.3の試験を行う。

3 試験法

3.1 不活化ウイルス液の試験

3.1.1 不活化試験

3.1.1.1 試験材料

3.1.1.1.1 試料

検体を試料とする。

3.1.1.1.2 培養細胞

PPK-3F細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.1.1.2 試験方法

試料及びPCV2参照ウイルス（付記1）6.6mL以上をそれぞれ300cm²以上の培養細胞に接種し、37°Cで1日培養後グルコサミン処理培地（付記2）を30mL加え、37°Cで15分間静置した後、上清を除去し、ウイルス継代培養液（付記3）を加え、3日間培養する。この培養細胞を凍結融解し、遠心して得た上清について、培養細胞300cm²当たり60mLを同様に接種、培養する。これを同様に凍結融解、遠心して得た上清を2倍及び5倍に希釈し、その0.1mLずつを培養細胞に加え、37°Cで4日間培養した細胞について、PCV2モノクローナル抗体（付記4）による蛍光抗体法を行う。

3.1.1.3 判定

試料を接種した培養細胞には特異蛍光抗原を認めてはならない。この際、PCV2参照ウイルスを接種した培養細胞には特異蛍光抗原を認めなければならない。

3.2 原液の試験

3.2.1 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。

3.2.2 抗原定量試験

3.2.2.1 試験材料

3.2.2.1.1 試料

検体を試料とする。

3.2.2.2 試験方法

固相化プレート（付記5）の各穴にELISA用緩衝液（付記6）で2倍階段希釈した参照抗原（付記7）及び試料を100μLずつ分注し、37°Cで3時間反応させた後、洗浄液（付記8）で洗浄する。各穴に抗原定量ELISA用標識抗体（付記9）を100μL加え、37°Cで1時間反応後、洗浄液で洗浄する。基質液（付記10）を100μLずつ加え、遮光して20°Cで30分間反応させる。0.5mol/L硫酸液を各穴に50μLずつ加え、反応を停止させる。主波長450nm、副波長630nmの2波長で吸光度（OD）を測定し、以下の計算式によりOD₅₀を算出し、OD₅₀を示す試料の希釈倍数を抗原量（ELISA単位）とする。

$$OD_{50} = (OD_{min} + OD_{max}) / 2$$

ODmin：参照抗原の最小OD

ODmax：参照抗原の最大OD

3.2.2.3 判定

参照抗原が所定の抗原量を示すとき、試料の抗原量は $10^{2.6}$ ELISA単位/mL以上でなければならない。

3.3 小分製品の試験

3.3.1 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一な液体でなければならない。懸濁用液と混和したものは、固有の色調を有する均一な乳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。

3.3.2 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。

3.3.3 チメロサル定量試験

一般試験法のチメロサル定量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。

3.3.4 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。

3.3.5 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。

3.3.6 力価試験

3.3.6.1 試験材料

3.3.6.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.3.6.1.2 試験動物

6～7週齢のマウスを用いる。

3.3.6.2 試験方法

試験動物10匹のそれぞれの頸部皮下に注射材料を0.2mLずつ注射し、注射21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。

DLE/SD緩衝液（付記11）で5倍に希釈した各被検血清及び参照陰性血清（付記12）を、DLE/SD緩衝液で2倍階段希釈する。参照陽性血清（付記13）はその抗体価に応じて希釈したものを同様に2倍階段希釈する。各希釈血清と抗原液（付記14）を等量混合し、4℃で一夜静置する。この抗原・抗体反応液100 μ Lずつを固相化プレート2（付記15）の各穴に加え、37℃で3時間反応させる。洗浄液で洗浄し、抗体価測定ELISA用標識抗体（付記16）を各穴に100 μ Lずつ加え、37℃で60分間反応させる。洗浄液で洗浄し、各穴に基質液を100 μ Lずつ加え、遮光して20℃で30分間反応させる。0.5mol/L硫酸液を各穴に50 μ Lずつ加え、反応を停止させる。主波長450nm、副波長630nmの2波長で吸光度（OD）を測定し、以下の計算式によりOD₅₀を示した血清の希釈倍数を抗体価とする。

$$OD_{50} = (OD_{min} + OD_{max}) / 2$$

ODmin：参照陽性血清の最低希釈倍数におけるODの平均

ODmax：320倍から2,560倍まで希釈した参照陰性血清のODの平均

$$\text{抗体価} (\log_{10}) = (OD_{50} - \text{定数}) / \text{傾き}$$

定数及び傾き：ODと血清希釈倍数の対数についてOD₅₀を挟む2点の回帰直線における定数及び傾き

3.3.6.3 判定

試験動物の抗体価の実数は幾何平均で72倍以上でなければならない。この際、参照陽性血清の抗体価は所定の値を示し、参照陰性血清のそれは20倍以下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 PCV2参照ウイルス

PCV2 1010株又はこれと同等と認められたウイルス株で、200TCID₅₀に調整したもの

付記2 グルコサミン処理培地

1,000mL中

d-グルコサミン 65 g

ハンクス199培地 残量

付記3 ウイルス継代培養液

1,000mL中

牛胎子血清 50 mL

ダルベッコ変法イーグルMEM (付記17) 残量

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記4 PCV2モノクローナル抗体

PCV2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。)を認識するモノクローナル抗体

付記5 固相化プレート

炭酸ナトリウム緩衝液 (付記18) で希釈した抗原定量ELISA用捕捉抗体 (付記19) を96穴ELISAプレートに分注し、固相化したもの

付記6 ELISA用緩衝液

1,000mL中

トリスヒドロキシメチルアミノメタン 2.43 g

塩化ナトリウム 8.77 g

牛血清アルブミン 10.0 g

ポリソルベート	0.5 mL
水	残 量

pHを7.4に調整する。

付記7 参照抗原

PK15細胞又は適当と認められた培養細胞で培養したPCV2を超音波処理し、遠心した後、 β -プロピオラクトンで不活化したもので、3.2.2 抗原定量試験で測定するとき、所定の抗原量を示すもの

付記8 洗浄液

1,000mL中	
塩化ナトリウム	8.77 g
トリスヒドロキシメチルアミノメタン	1.21 g
ポリソルベート	1 mL
水	残 量

pHを7.3～7.7に調整する。

付記9 抗原定量ELISA用標識抗体

ハイブリドーマPCV2 1903A8BCの産生するPCV2ORF2に特異的なモノクローナル抗体で、ELISA用緩衝液で希釈して用いる。

付記10 基質液

適当な品質の3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン溶液

付記11 DLE/SD緩衝液

1,000mL中	
トリスヒドロキシメチルアミノメタン	1.21 g
塩化ナトリウム	8.77 g
EDTA	3.72 g
ポリソルベート20	1 mL
水	残 量

pHを7.0に調整する。

付記12 参照陰性血清

マウスから得られた血清で、3.3.6.2を準用したELISAで測定したとき、抗体価が検出限界以下のもの

付記13 参照陽性血清

マウスをPCV2不活化ワクチンで2回免疫後35日目に得られた血清で、3.3.6.2を準用したELISAで測定したとき、所定の抗体価を示すもの

付記14 抗原液

PK15細胞で培養したPCV2を超音波処理し、遠心した後、 β -プロピオラクトンで不活化したもの

付記15 固相化プレート2

抗体価測定ELISA用捕捉抗体（付記19）を120 μ Lずつ96穴ELISAプレートに分注し、4 $^{\circ}$ Cで一夜静置する。洗浄液で3回洗浄し、ブロッキング液（付記20）を200 μ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで60分間反応させ、洗浄液で3回洗浄したもの

付記16 抗体価測定ELISA用標識抗体

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PCV2 1902B1BCを接種したヌードマウスの腹水を精製し、15w/v%サッカリン加リン酸緩衝食塩液で調整したもので、炭酸ナトリウム緩衝液で希釈して用いる。

付記17 ダルベッコ変法イーグルMEM

市販の適当な品質の液状製品、又は乾燥製品を記載に従って溶かし、滅菌したものをを用いる。

付記18 炭酸ナトリウム緩衝液

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に調整する。

付記19 抗原定量ELISA用捕捉抗体

ハイブリドーマPCV2 1902B1BCの産生するPCV2ORF2に特異的なモノクローナル抗体で、炭酸ナトリウム緩衝液で希釈して用いる。

付記20 ブロッキング液

リン酸緩衝食塩液に植物性ポリペプトンを1w/v%加えたもの

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

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。）とシードロット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たん白抗原を発現する。

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°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。

2.1.1.4 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°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。

2.1.1.5 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°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。

2.1.2 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、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°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、12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°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°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°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°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℃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、製剤ごとに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 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

培養菌液に相当と認められ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。不活化菌液について、3.6の試験を行う。

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、3.7の試験を行う。ただし、濃縮前に保存する場合は、保存前の原液について3.7.1及び3.7.3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、3.8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、3.8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。

3.1.4 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、その試験法とする。

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

3.1.4.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.6 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

3.1.4.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2 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、その試験法とする。

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 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

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

3.4.3.2.1 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 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

検体をスライドグラスにとり、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

検体をスライドグラスにとり、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 不活化菌液の試験

3.6.1 不活化試験

3.6.1.1 試験材料

3.6.1.1.1 試料

検体を適当と認められた方法で中和したものを試料とする。

3.6.1.2 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。

3.6.1.3 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 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、その試験法とする。

3.7.2 不活化試験

3.6.1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、検体を試料とする。

3.7.3 抗原定量試験

3.7.3.1 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。

3.7.3.2 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。

3.7.3.3 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 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。

3.7.3.4 判定

検体の抗原RPは、所定の値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（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 無菌試験

混合ワクチンについて、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。

3.8.4 安全試験

3.8.4.1 試験材料

3.8.4.1.1 注射材料

混合ワクチンを注射材料とする。

3.8.4.1.2 試験動物

3～5週齢の豚を用いる。

3.8.4.2 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。

3.8.4.3 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。

3.8.5 力価試験

3.8.5.1 豚サーコウイルス2型感染症力価試験

3.8.5.1.1 試験材料

3.8.5.1.1.1 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。

3.8.5.1.1.2 試験動物

6～7週齢のSPFのddY系雌マウスを用いる。

3.8.5.1.1.3 酵素抗体反応用抗原

固相化抗原1（付記21）を用いる。

3.8.5.1.2 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22）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23）の穴に100 μ 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 μ 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 μ Lずつ加えて反応させた後、各穴に1 mol/L塩酸を100 μ 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。

3.8.5.1.3 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。

3.8.5.2 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症力価試験

3.8.5.2.1 試験材料

3.8.5.2.1.1 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。

3.8.5.2.1.2 試験動物

6～7週齢のSPFのddY系雌マウスを用いる。

3.8.5.2.1.3 酵素抗体反応用抗原

固相化抗原2（付記24）を用いる。

3.8.5.2.2 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2（付記26）の穴に100 μ 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 μ 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 μ Lずつ加えて反応させた後、各穴に1 mol/L塩酸を100 μ 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。

3.8.5.2.3 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 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9mL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27）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

動物医薬品検査所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（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を示すように調整する。

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整する。

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28）で希釈した捕捉抗体2（付記29）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エタン	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21 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画分

付記22 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、3.8.5.1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23 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 μ 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 μ 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24 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25 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、3.8.5.2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26 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 μ 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 μ 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27 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28 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29 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

狂犬病組織培養不活化ワクチン（シード）

平成24年7月4日(告示第1622号)新規追加
令和2年6月30日(告示第1246号)一部改正
令和2年10月2日(告示第1865号)一部改正
令和3年5月17日(告示第798号)一部改正

1 定義

シードロット規格に適合した狂犬病培養細胞馴化ウイルスを同規格に適合した株化細胞で増殖させて得たウイルス液を精製し、不活化したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

狂犬病培養細胞馴化ウイルスRC・HL株

2.1.2 性状

3日齢以内の乳のみマウスの脳内に注射すると、発病して死亡させるが、3週齢以上のマウス、体重約300gのモルモット、体重約1.5kgの兔及び1.5か月齢の犬の脳内に注射しても、ほとんど病原性を示さない。

HmLu細胞で、CPEを伴って増殖する。

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、HmLu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。

2.1.4 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、HmLu細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結乾燥して5℃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、継代及び保存

プロダクションシードウイルスは、HmLu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℃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

HmLu細胞を用いる。

2.2.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

2.2.3 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 -100°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。浮遊培養を使う場合は、細胞数の増加で集団ダブリングタイムの約3倍で継代1代とみなす。

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 -100°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、継代及び保存

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 -100°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

単層培養法の場合は1回に処理し培養した細胞を、また、浮遊培養法の場合は最終ファーメンター培養細胞を、それぞれ個別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培養細胞に接種し、 $32\sim 34^{\circ}\text{C}$ で培養し、CPE又はGたん白産生量の極期に採取した培養液の遠心上清又はろ液をウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.3の試験を行う。

2.3.3 精製

ウイルス浮遊液をマクロゴール又は適当と認められた方法で精製濃縮し、精製ウイルス浮遊液とする。浮遊培養法の場合は、2.3.4の不活化操作を行った後、精製してもよい。

2.3.4 不活化

精製ウイルス浮遊液を β -プロピオラクトン又は適当と認められた方法で不活化し、不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.4の試験を行う。

2.3.5 原液の調整

不活化ウイルス液をリン酸緩衝食塩液で濃度調整し、原液とする。浮遊培養法の場合には、不活化ウイルス液又は不活化操作を行った精製ウイルス浮遊液に適当と認められた保存剤を加え、原液とする。

原液について、3.5の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液を混合し、浮遊培養法の場合にはリン酸緩衝食塩液で濃度調整し、最終バルクとする。この場合、適当と認められた保存剤を加えてもよい。

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、3.6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1.4.2.1.1.1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。

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

猫白血病ウイルス／猫肉腫ウイルス及びリンパ球性脈絡髄膜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3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

牛ウイルス性下痢ウイルス、犬パルボウイルス、猫汎白血球減少症ウイルス及び日本脳炎ウイルスについて、動生剤基準の一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、3.2.5、3.2.6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。

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。

3.1.2.3 効力及び免疫原性確認試験

3.1.2.3.1 モルモットでの試験

3.1.2.3.1.1 試験材料

3.1.2.3.1.1.1 試料

新旧の検体をリン酸緩衝食塩液でそれぞれ溶解し、1 mL中のウイルス含有量を約 $10^{7.0}$ TCID₅₀となるように濃度を調整する。それぞれにβ-プロピオラクトンを0.0125vol%になるように加えて、4℃で48時間感作し、ウイルスを不活化したものを試料とする。

3.1.2.3.1.1.2 試験動物

体重約400gのモルモットを用いる。

3.1.2.3.1.1.3 攻撃ウイルス

狂犬病ウイルスCVS株（付記1）を用いる。モルモット咬筋内注射法で、0.2mL中10LD₅₀のウイルスを含むように、2 vol%馬血清加生理食塩液を用いて濃度を調整し、攻撃ウイルスとする。

3.1.2.3.1.2 試験方法

新旧の試料を0.5mLずつ各試験動物10匹の内股部皮下に注射し、試験群とする。10匹を無処置対照群とする。注射後21日目に、3群のそれぞれに攻撃ウイルスを0.2mLずつ咬筋内注射し、14日間臨床観察する。

3.1.2.3.1.3 判定

発症しなかったものを耐過とみなし、耐過率を算出する。

両試験群の耐過率は、いずれも70%以上でなければならない。この場合、対照群の耐過率は、20%以下でなければならない。

3.1.2.3.2 犬での試験

3.1.2.3.2.1 試験材料

3.1.2.3.2.1.1 試料

3.1.2.3.1.1.1の試料を用いる。

3.1.2.3.2.1.2 試験動物

狂犬病ウイルスに対する抗体陰性の約4か月齢の犬を用いる。

3.1.2.3.2.2 試験方法

新旧の試料1 mLずつを各試験動物3頭の皮下に注射し、1か月後にそれぞれから採血し、中和抗体価を狂犬病培養細胞馴化ウイルスRC・HL株を用いて測定する。

3.1.2.3.2.3 判定

両試験群の中和抗体価は、それぞれ幾何平均値10倍以上でなければならない。

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。

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

猫白血病ウイルス／猫肉腫ウイルス及びリンパ球性脈絡髄膜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1.2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。

3.2.1.5.2.2 個別ウイルス否定試験

牛ウイルス性下痢ウイルス、犬パルボウイルス、猫汎白血球減少症ウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、動生剤基準の一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2、3.2.5、3.2.6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。

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 ウイルス浮遊液の試験

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

検体を細胞増殖用培養液（付記2）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.1.1.2 培養細胞

鶏胚初代細胞を用いる。

3.3.1.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4本（穴）以上の培養細胞に接種し、37°Cで2日間静置培養する。2日目に培養液をウイルス増殖用培養液1（付記3）に交換し、32°Cで8日間静置培養し、観察する。ただし、96穴マイクロプレートを用いる場合は、試料25 μ Lずつを10穴の培養細胞に接種した後、ウイルス増殖用培養液2（付記4）を0.2mLずつ加え、37°Cで10日間培養し、観察する。

3.3.1.3 判定

培養細胞にCPE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、単層培養法の場合には1mL中10^{7.5}TCID₅₀以上であり、浮遊培養法の場合には1mL中10^{7.0}TCID₅₀以上でなければならない。

3.4 不活化ウイルス液の試験

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 注射材料及び接種材料

検体を注射材料及び接種材料とする。

3.4.2.1.2 試験動物及び培養細胞

3日齢以内の乳のみマウス及び鶏胚初代細胞を用いる。

ただし、鶏胚初代細胞は、培養瓶に10mLずつ分注し、面積が約36cm²の単層となったものを用いる。

3.4.2.2 試験方法

注射材料0.02mLずつを試験動物10匹の脳内に注射し、14日間観察する。

接種材料2mLずつを培養細胞4本以上に接種し、37°Cで60分間吸着させた後、接種材料を除去し、ウイルス増殖用培養液1を10mLずつ加え、37°Cで10日間静置培養し、観察する。

3.4.2.3 判定

試験動物に狂犬病ウイルスによる症状を認めず、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。

3.5 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 力価試験

3.5.2.1 試験材料

検体、参照ワクチン（付記5）、抗体吸着プレート（付記6）及び酵素標識抗体（付記7）を用いる。

3.5.2.2 試験方法

検体6 mLにリン酸水素二ナトリウム十二水和物327.6mg、リン酸二水素カリウム38.6mgを加えて、よく振とう混和する。参照ワクチンは、動物医薬品検査所が指定した方法により溶解する。これらの検体及び参照ワクチンをそれぞれ30～60秒間超音波処理した後、約200Gで5分間遠心する。各遠心上清を、あらかじめ1 w/v%牛血清アルブミン加リン酸緩衝食塩液で前処理した450nmのメンブランフィルターでろ過し、そのろ液の4 mLについてゲルろ過（付記8）を行う。第1画分のピークを含む8 mLを採取し、抗原希釈用液（付記9）を用いて原液（高用量）、2倍希釈液（中用量）及び4倍希釈液（低用量）を作製する。各抗原液のそれぞれ100 μ Lを抗体吸着プレートの各2穴に加える。抗原希釈液を100 μ Lずつ2穴に加えたものを陰性対照穴とする。プレートを密閉し、37°Cで60分間反応させる。洗浄液（付記10）で5回洗浄した後、酵素標識抗体の100 μ Lずつを各穴に入れ、プレートを密閉し、遮光して37°Cで90分間反応させる。洗浄液で5回洗浄した後、基質・発色液（付記11）の100 μ Lずつを各穴に加え、プレートを遮光して常温で30分間反応させる。反応終了後直ちに、反応停止液（付記12）の50 μ Lずつを各穴に加え、主波長492nm及び副波長630nmでそれぞれ吸光度を測定する。検体及び参照ワクチンを加えた各穴の吸光度値から陰性対照穴の吸光度値を引いた値をそれぞれの抗原の吸光度値とする。ゲルろ過後の各抗原液について2回繰り返し測定を行った後、検体及び参照ワクチンの各吸光度値から相対力価の計算方法（付記13）により参照ワクチンに対する相対力価を算出する。

3.5.2.3 判定

検体の参照ワクチンに対する相対力価は、0.683以上でなければならない。

3.6 小分製品の試験

3.6.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、固有の色調を有する液体でなければならない、異物及び異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.6.2 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。

3.6.3 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。

3.6.4 チメロサル定量試験

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。

3.6.5 マクロゴール定量試験

一般試験法のマクロゴール定量法を準用して試験するとき、マクロゴールの含有量は、1 mL中0.5mg以下でなければならない。

3.6.6 たん白窒素定量試験

一般試験法のたん白窒素定量法を準用して試験するとき、たん白窒素の含有量は、1 mL中100 μ g以下でなければならない。

3.6.7 安全試験

3.6.7.1 試験材料

3.6.7.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.6.7.1.2 試験動物

体重5～10kgの犬及び体重約1kgの猫を用いる。

3.6.7.2 試験方法

注射材料5mLずつを2頭の犬に、2mLずつを2頭の猫に皮下注射し、10日間臨床観察する。

3.6.7.3 判定

観察期間中、試験動物に異常を認めてはならない。

3.6.8 力価試験

3.5.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、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 狂犬病ウイルスCVS株

狂犬病ウイルスCVS株を3週齢マウスの脳内に接種し、症状を示したマウスの脳を採取し、2vol%馬血清加生理食塩液を用いて乳剤としたもの。

ウイルス含有量は、体重約400gのモルモットの咬筋内注射法で測定するとき、0.2mL中 $10^{2.5}$ LD₅₀以上でなければならない。

付記2 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

牛胎子血清又は子牛血清 50 mL

イーグルMEM 残 量

pHを7.1～7.3に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記3 ウイルス増殖用培養液1

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

イーグルMEM 残 量

pHを7.4～7.6に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記4 ウイルス増殖用培養液2

1,000mL 中

ブドウ糖 5 g

L-グルタミン 0.4 g

牛胎子血清又は子牛血清 5～25 mL

イーグルMEM 残 量

pHを7.1～7.3に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記5 参照ワクチン

動物医薬品検査所が配布する参照狂犬病組織培養不活化ワクチンを動物医薬品検査所が指定した濃度となるように調整したもの。

付記6 抗体吸着プレート

狂犬病ウイルスのGたん白を認識するモノクローナル抗体を精製したものについて動物医薬品検査所が指定した濃度に調整した後、96穴プレートの各穴に100 μ Lずつ加えて密閉し、37 $^{\circ}$ Cで18時間吸着させたもの。

抗体吸着プレートはリン酸緩衝食塩液で4回洗浄した後使用する。

付記7 酵素標識抗体

狂犬病ウイルスのGたん白を認識するモノクローナル抗体を、ペルオキシダーゼで標識したものについて、下記の希釈用液で動物医薬品検査所が指定した濃度に調整したもの。

100mL中

牛血清アルブミン	0.3 g
ポリソルベート20	0.05 mL
リン酸緩衝食塩液	残 量

450nmメンブランフィルターでろ過する。

付記8 ゲルろ過

動物医薬品検査所が指定するカラムを用い、抗原希釈用液を移動相とし、流速毎分1 mLで液体クロマトグラフ法により画分を分取する。

検出波長は、280nmとする。

付記9 抗原希釈用液

1,000mL中

リン酸水素二ナトリウム十二水和物	54.66 g
リン酸二水素カリウム	6.44 g
水	残 量

pHを7.2に調整後、450nmメンブランフィルターでろ過する。

付記10 洗浄液

リン酸緩衝食塩液にポリソルベート20を0.05vol%となるように加えたもの。

付記11 基質・発色液

1,000mL中

クエン酸	21.0 g
無水リン酸水素二ナトリウム	28.4 g
水	残 量

溶解した液を450nmメンブランフィルターでろ過する。その液20mLに α -フェニレンジアミン二塩酸塩10mgを加えて溶解する。使用直前に過酸化水素(30)を5 μ L添加する。

付記12 反応停止液

水1,000mLに硫酸150mLを加えたもの。

付記13 相対力価の計算方法

1 Validity の検定

得られたそれぞれの吸光度値を1,000倍し、常用対数に変換後、参照ワクチン及び検体について各用量の合計値を求め、次式の計算を行う。ただし、参照ワクチンの低用量を S_1 、中用量を S_2 、高用量を S_3 とし、検体の低用量を T_1 、中用量を T_2 、高用量を T_3 とする。

$$\text{検体差SPa} = (S_1+S_2+S_3) - (T_1+T_2+T_3)$$

$$\text{直線性SPb} = (S_3-S_1) + (T_3-T_1)$$

$$\text{曲線性SPc} = [(S_1+S_3) - 2S_2] + [(T_1+T_3) - 2T_2]$$

$$\text{直線非平行性SPb}^\wedge = (S_3 - S_1) - (T_3 - T_1)$$

$$\text{曲線非平行性SPc}^\wedge = [(S_1+S_3) - 2S_2] - [(T_1+T_3) - 2T_2]$$

上記の式で求めたSPbが0.50以上、SPcの絶対値が0.86以下、SPb[^]の絶対値が0.49以下及びSPc[^]の絶対値が0.86以下である場合は、Validityの検定に適合する。

2 相対力価の計算

1のValidityの検定で適合と判定された場合は、次式により相対力価を求める。

$$M = - (4 \times \text{SPa} \times \log 2) \div (3 \times \text{SPb})$$

さらに、Mの真数（Mの逆対数 10^M ）を求めることにより、検体の参照ワクチンに対する相対力価を算出する。

$$P = 10^M$$

動物用生物学的製剤基準の一部を改正する件 新旧対照表

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

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を削る。

改正後	改正前																
<p>ワクチン（シードロット製剤）の部 狂犬病組織培養不活化ワクチン（シード）</p> <p>1～4（略） 付記1～6（略） 付記7 酵素標識抗体 狂犬病ウイルスのGたん白を認識するモノクローナル抗体を、ペルオキシダーゼで標識したものについて、下記の希釈用液で動物医薬品検査所が指定した濃度に調整したもの。</p> <table data-bbox="264 726 936 845"><tr><td>100mL中</td><td></td></tr><tr><td>牛血清アルブミン</td><td>0.3 g</td></tr><tr><td>ポリソルベート20</td><td>0.05mL</td></tr><tr><td>リン酸緩衝食塩液</td><td>残量</td></tr></table> <p>450nmメンブランフィルターでろ過する。</p> <p>（略）</p>	100mL中		牛血清アルブミン	0.3 g	ポリソルベート20	0.05mL	リン酸緩衝食塩液	残量	<p>ワクチン（シードロット製剤）の部 狂犬病組織培養不活化ワクチン（シード）</p> <p>1～4（略） 付記1～6（略） 付記7 酵素標識抗体 狂犬病ウイルスのGたん白を認識するモノクローナル抗体を、ペルオキシダーゼで標識し、凍結乾燥したものについて、下記の希釈用液で動物医薬品検査所が指定した濃度に調整したもの。</p> <table data-bbox="1225 726 1897 845"><tr><td>100mL中</td><td></td></tr><tr><td>牛血清アルブミン</td><td>0.3 g</td></tr><tr><td>ポリソルベート20</td><td>0.05mL</td></tr><tr><td>リン酸緩衝食塩液</td><td>残量</td></tr></table> <p>450nmメンブランフィルターでろ過する。</p> <p>（略）</p>	100mL中		牛血清アルブミン	0.3 g	ポリソルベート20	0.05mL	リン酸緩衝食塩液	残量
100mL中																	
牛血清アルブミン	0.3 g																
ポリソルベート20	0.05mL																
リン酸緩衝食塩液	残量																
100mL中																	
牛血清アルブミン	0.3 g																
ポリソルベート20	0.05mL																
リン酸緩衝食塩液	残量																