

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８年９月１８日（告示第１４５７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℃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℃以下又は凍結乾燥して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。

２.１.１.５ 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、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°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°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°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、培養した細胞を個体別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の個体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体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 起原動物種同定試験

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 μ L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。

3.4.3.2.3 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。

3.7.4.1.2.3 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・ハイオニューモニー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100μLずつ加えて反応させた後、各穴に 1 mol/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。

3.7.6.1.3 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 酵素抗体反応用抗原

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 1 mol/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。

3.7.6.2.3 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℃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℃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100μLずつ加え、37℃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100μL ずつ加え、37℃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