

# 豚アクチノバシラス・プルロニューモニエ（１・２・５型、組換え型毒素）感染症・マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症混合（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

令和２年10月２日(告示第1865号)新規追加

## 1 定義

シードロット規格に適合したアクチノバシラス・プルロニューモニエ（以下この項において「App」という。）１型菌、２型菌及び５型菌の培養菌液を不活化したもの、同規格に適合した組換え大腸菌で産生される無毒変異型App毒素（rApx I、rApx II 及びrApx III）を可溶化したもの並びに同規格に適合したマイコプラズマ・ハイオニューモニエ（以下この項において「Mhp」という。）の培養菌液を不活化したものにそれぞれアルミニウムゲルアジュバントを添加し、これらを混合したワクチンである。

## 2 製法

### 2.1 製造用株

#### 2.1.1 App 1 型菌

##### 2.1.1.1 名称

App 41-1株（血清型１型）又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.1.2 性状

細胞毒素Apx I 及びApx II を産生する。感受性豚の気管内に接種すると、胸膜肺炎を惹起する。

##### 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、チョコレート寒天培地（付記１）又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－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－60℃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する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して－60℃以下又は凍結乾燥して５℃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について、3.1.3の試験を行う。

#### 2.1.2 App 2 型菌

#### 2.1.2.1 名称

App SHP-1株（血清型 2 型）又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.2.2 性状

細胞毒素Apx II 及びApx IIIを産生する。感受性豚の気管内に接種すると、胸膜肺炎を惹起する。

#### 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、チョコレート寒天培地又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－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－60℃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する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して－60℃以下又は凍結乾燥して 5℃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について、3.1.3の試験を行う。

#### 2.1.3 App 5 型菌

##### 2.1.3.1 名称

App Ng-2株（血清型 5 型）又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.3.2 性状

細胞毒素Apx I 及びApx IIを産生する。感受性豚の気管内に接種すると、胸膜肺炎を惹起する。

#### 2.1.3.3 マスターシード菌

##### 2.1.3.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、チョコレート寒天培地又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－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。

#### 2.1.3.4 ワーキングシード菌

##### 2.1.3.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、適当と認められた培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結して－60℃以下又は凍結乾燥して 5℃以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。

#### 2.1.3.5 プロダクションシード菌

##### 2.1.3.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、適当と認められた培地で増殖する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、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。

プロダクションシード菌を保存する場合について、3.1.3の試験を行う。

#### 2.1.4 rApx I 産生組換え大腸菌

##### 2.1.4.1 名称

rApx I 産生組換え大腸菌ESN1113株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.4.2 性状

アンピシリン及びテトラサイクリン耐性を示し、App41-1株染色体DNA由来*apx I A*遺伝子を挿入したプラスミドpSN110を有する。イソプロピルチオガラクトシド（以下この項において「IPTG」という。）を添加した培地により発育させると、rApx I たん白を産生することがSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により確認される。

##### 2.1.4.3 マスターシード菌

###### 2.1.4.3.1 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、LB-Amp寒天培地（付記2）又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 $-60^{\circ}\text{C}$ 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。

##### 2.1.4.4 ワーキングシード菌

###### 2.1.4.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、LB-Amp寒天培地又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 $-60^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。

##### 2.1.4.5 プロダクションシード菌

###### 2.1.4.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、LB-Amp寒天培地又は適当と認められた培地で増殖する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、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。

プロダクションシード菌を保存する場合について、3.1.3の試験を行う。

#### 2.1.5 rApx II 産生組換え大腸菌

##### 2.1.5.1 名称

rApx II 産生組換え大腸菌ESN1074株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.5.2 性状

アンピシリン及びテトラサイクリン耐性を示し、App Ng-2株染色体DNA由来*apx II A*遺伝子を挿入したプラスミドpSN63を有する。IPTGを添加した培地により発育させると、rApx II たん白を産生することがSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により確認される。

##### 2.1.5.3 マスターシード菌

###### 2.1.5.3.1 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、LB-Amp寒天培地又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 $-60^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.1.5.4 ワーキングシード菌

##### 2.1.5.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、LB-Amp寒天培地又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 $-60^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。

#### 2.1.5.5 プロダクションシード菌

##### 2.1.5.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、LB-Amp寒天培地又は適当と認められた培地で増殖する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、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。

プロダクションシード菌を保存する場合について、3.1.3の試験を行う。

#### 2.1.6 rApxⅢ産生組換え大腸菌

##### 2.1.6.1 名称

rApx Ⅲ産生組換え大腸菌ESN1166株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.6.2 性状

アンピシリン及びテトラサイクリン耐性を示し、App SHP-1株染色体DNA由来*apxⅢ A*遺伝子を挿入したプラスミドpSN148を有する。IPTGを添加した培地により発育させると、rApxⅢたん白を産生することがSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により確認される。

##### 2.1.6.3 マスターシード菌

###### 2.1.6.3.1 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、LB-Amp寒天培地又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 $-60^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.1.6.4 ワーキングシード菌

##### 2.1.6.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、LB-Amp寒天培地又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 $-60^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。

#### 2.1.6.5 プロダクションシード菌

##### 2.1.6.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、LB-Amp寒天培地又は適当と認められた培地で増殖する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、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。

プロダクションシード菌を保存する場合について、3.1.3の試験を行う。

## 2.1.7 Mhp

### 2.1.7.1 名称

Mhp MI-3株又はこれと同等と認められた株

### 2.1.7.2 性状

Mhp基準株に一致する生物学的性状を示す。

### 2.1.7.3 マスターシード菌

#### 2.1.7.3.1 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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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。

### 2.1.7.4 ワーキングシード菌

#### 2.1.7.4.1 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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。

### 2.1.7.5 プロダクションシード菌

#### 2.1.7.5.1 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する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 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菌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 培地

#### 2.2.1.1 App 1、2 及び 5 型菌

製造に適当と認められた寒天培地及び液状培地を用いる。

#### 2.2.1.2 組換え大腸菌

製造に適当と認められた寒天培地及び液状培地を用いる。

#### 2.2.1.3 Mhp

製造に適当と認められた液状培地を用いる。

## 2.3 原液

### 2.3.1 App 1、2 及び 5 型菌

#### 2.3.1.1 培養

App各株のプロダクションシード菌をそれぞれ寒天培地に接種し、培養したものを液状培地に接種し、培養する。これを更に液状培地に接種し、培養したものを各株の培養菌液とする。

培養菌液について、3.2.1の試験を行う。

#### 2.3.1.2 不活化及び集菌

各株の培養菌液をホルマリン又は適当と認められた不活化剤で不活化した後、遠心して得られた菌体を、リン酸緩衝食塩液（付記3）に均一に浮遊し、チメロサル又は適当と認められた保存剤を添加したものを、各株の不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.3の試験を行う。

### 2.3.1.3 濃度調整

各株の不活化菌液を総菌数が規定量となるようにリン酸緩衝食塩液で希釈し、チメロサル又は適当と認められた保存剤を添加したものを、各株の原液とする。

原液について、3.6.1の試験を行う。

### 2.3.2 rApx I、II及びIIIたん白

#### 2.3.2.1 培養

組換え大腸菌各株のプロダクションシード菌をそれぞれ寒天培地に接種し、培養したものを液状培地に接種し、培養する。これを更に液状培地に接種し、培養したものを、各株の培養菌液とする。

培養菌液について、3.2.2の試験を行う。

#### 2.3.2.2 発現培養

各株の培養菌液にIPTGを添加した液状培地を加えて培養した菌液を、各株の発現菌液とする。

発現菌液について、3.4の試験を行う。

#### 2.3.2.3 集菌及び破碎

各株の発現菌液を遠心し、菌体を発現菌液量の1/25～1/100量の適当と認められた緩衝液に浮遊し、これにリゾチームを添加し、攪拌する。これに適当と認められた緩衝液を加え、高圧細胞破碎装置により処理を行ったものを、各株の破碎菌液とする。

破碎菌液について、3.5の試験を行う。

#### 2.3.2.4 rApxたん白の回収と可溶化

各株の破碎菌液を遠心し、各rApxたん白を発現菌液量の1/100～1/250量の滅菌蒸留水に浮遊する。

これに、適当と認められた可溶化剤を加えて可溶化し、遠心する。得られた上清を、各rApxたん白の原液とする。

原液について、3.6.1、3.6.2及び3.6.3の試験を行う。

### 2.3.3 Mhp

#### 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増菌・継代培養後、更に培地に接種して培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2.3の試験を行う。

#### 2.3.3.2 原液の調製

培養菌液にホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加えて不活化した後、水酸化アルミニウムゲルを加えて菌体を吸着させる。菌体吸着水酸化アルミニウムゲルを回収してリン酸緩衝食塩液に懸濁し、ホルマリン及びチメロサル又は適当と認められた保存剤を添加したものを原液とする。

原液について、3.6.1、3.6.4及び3.6.5の試験を行う。

### 2.4 最終バルク

#### 2.4.1 Appバルク

App各株の原液をリン酸緩衝食塩液及び水酸化アルミニウムゲルで総菌数が規定濃度になるように希釈して調製する。これにホルマリン及びチメロサル又は適当と認められた保存剤を添加したものを、各株のAppバルクとする。

#### 2.4.2 rApxバルク

rApx I、II及びIIIたん白の各原液をそれぞれたん白濃度を調整して混合した後、適当と認められた溶媒及び水酸化アルミニウムゲルを加えて感作し、各rApxたん白を水酸化アルミニウムゲルに吸着させる。遠心によりrApxたん白の吸着した水酸化アルミニウムゲルを回収し、元の量の1/2量～等量のリン酸緩衝食塩液に再浮遊する。これに、ホルマリン及びチメロサル又は適当と認められた保存剤を添加したものを、rApxバルクとする。

#### 2.4.3 Mhpバルク

原液をリン酸緩衝食塩液及び水酸化アルミニウムゲルで総菌数が規定濃度になるように希釈して

調製する。これに、ホルマリン及びチメロサル又は適当と認められた保存剤を添加したものを、Mhpバルクとする。

#### 2.4.4 最終バルク

Appバルク、rApxバルク及びMhpバルクを混合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3.7の試験を行う。

### 3 試験法

#### 3.1 製造用株の試験

##### 3.1.1 マスターシード菌の試験

##### 3.1.1.1 同定試験

##### 3.1.1.1.1 App菌株の同定試験

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。

##### 3.1.1.1.2 組換え大腸菌株の同定試験

シードロット規格の1.4.2.5.2.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.1.1.3 Mhpの同定試験

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

##### 3.1.1.2.1 App菌株の夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.1.2.2 組換え大腸菌株の夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法1を準用して試験するとき、組換え大腸菌以外の発育を認めてはならない。

##### 3.1.1.2.3 Mhp菌株の夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.1.3 組換え遺伝子等安定性確認試験

##### 3.1.1.3.1 組換え大腸菌株の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をするとき、適合しなければならない。

##### 3.1.2 ワーキングシード菌の試験

##### 3.1.2.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.3 プロダクションシード菌の試験

貯蔵するものについて次の試験を行う。

##### 3.1.3.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2 培養菌液の試験

##### 3.2.1 App菌株の夾雑菌否定試験

3.1.1.2.1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 組換え大腸菌株の夾雑菌否定試験

3.1.1.2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.2.3 Mhp培養菌液の試験

##### 3.2.3.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.2.3を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.2.3.2 同定試験

以下の試験方法で試験するとき、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。

#### 3.2.3.2.1 試験材料

検体をトリプトース・ホスフェイト・ブロスで10倍階段希釈したものを試料とする。

#### 3.2.3.2.2 試験方法

BHL寒天培地（付記4）及び抗Mhp兔免疫血清（付記5）を染み込ませたろ紙ディスクを用い、試料についてマイコプラズマ発育阻止試験（付記6）を実施する。

#### 3.2.3.2.3 判定

試料のいずれかにおいて、ろ紙ディスクの周辺に明瞭な発育阻止帯を認めなければならない。

### 3.2.3.3 総菌数試験

#### 3.2.3.3.1 試験材料

検体を遠心し、得られた沈渣を適量のリン酸緩衝食塩液に浮遊したものを試料とする。

#### 3.2.3.3.2 試験方法

分光光度計を用い、試料の吸光度を測定する。

#### 3.2.3.3.3 判定

標準検量線及び吸光度値から総菌数を算出するとき、検体中の総菌数は、1 mL 中  $1.4 \times 10^8$  個以上でなければならない。

### 3.3 App菌株の不活化菌液の試験

#### 3.3.1 不活化試験

##### 3.3.1.1 試験材料

検体及び製造に相当と認められた液体培地を用いる。

##### 3.3.1.2 試験方法

検体0.5mLずつを20mLの培地2本以上に接種し、37℃で2日間培養する。

##### 3.3.1.3 判定

菌の発育を認めてはならない。

#### 3.3.2 総菌数試験

##### 3.3.2.1 試験材料

検体をリン酸緩衝食塩液で適度に希釈したものを、試料とする。

##### 3.3.2.2 試験方法

試料の吸光度を分光光度計で測定する。

##### 3.3.2.3 判定

標準検量曲線、吸光度の測定値及び検体の希釈倍率から総菌数を算出する。

検体中の総菌数は、1 mL 中  $3 \times 10^{10}$  個以上でなければならない。

### 3.4 発現菌液の試験

#### 3.4.1 発現たん白確認試験

##### 3.4.1.1 試験材料

大腸菌各株の発現菌液に等量のサンプルバッファ（付記7）を加えて煮沸したものを試料とする。

##### 3.4.1.2 試験方法

試料の10  $\mu$  Lを10w/v% SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後、クマシー・ブルー染色により泳動像を観察する。

##### 3.4.1.3 判定

ESN1113株及びESN1074株の検体には分子量約105kDaの位置に、ESN1166株の検体には分子量約120kDaの位置に明瞭なバンドを認めなければならない。

### 3.5 破碎菌液の試験

### 3.5.1 破碎確認試験

#### 3.5.1.1 試験材料

破碎菌液を試料とする。

#### 3.5.1.2 試験方法

検体0.01mLをスライド・ガラス上に1 cm<sup>2</sup>の区画に塗抹し、乾燥させ、火炎固定し、ギムザ染色又はグラム染色する。

#### 3.5.1.3 判定

鏡検により、ほぼ全ての菌体の破碎像が観察されなければならない。

### 3.6 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。

#### 3.6.2 同定試験

##### 3.6.2.1 試験材料

各rApxたん白の原液を水又は2～4 mol/L尿素液によりたん白量300 μg/mLとなるように希釈したものを、試料とする。

##### 3.6.2.2 試験方法

3.4.1.2を準用して試験する。

##### 3.6.2.3 判定

rApx I 及び II たん白の試料には分子量約105kDaの位置に、rApx III たん白の試料には約120kDaの位置に、明瞭なバンドを認めなければならない。

#### 3.6.3 たん白定量試験

##### 3.6.3.1 試験材料

検体を20～200 μg/mLとなるように2倍階段希釈したものを試料とする。

##### 3.6.3.2 試験方法

Lowry法により吸光度を測定し、原液1 mL中のたん白量を算出する。

##### 3.6.3.3 判定

各rApxたん白の原液のたん白量は、1 mL中4 mg以上でなければならない。

#### 3.6.4 不活化試験

##### 3.6.4.1 試料

検体を用いる。

##### 3.6.4.2 試験方法

BHL培地（付記8）に試料を接種し、37℃で14日間培養する。培養中に培地の黄変が認められたときは、BHL寒天培地に塗抹し、37℃で14日間微好氣的に培養して、Mhpの発育の有無を調べる。

##### 3.6.4.3 判定

Mhpの発育を認めてはならない。

#### 3.6.5 アルミニウム定量試験

一般試験法のアルミニウム定量法を準用して試験するとき、アルミニウムの含有量は、1 mL中36mg以下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

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ず、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。

#### 3.7.2 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。

#### 3.7.3 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。

#### 3.7.4 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。

#### 3.7.5 ホルマリン定量試験

一般試験法のホルマリン定量法を準用して試験するとき、ホルマリンの含有量は、0.25vol%以下でなければならない。

#### 3.7.6 アルミニウム定量試験

一般試験法のアルミニウム定量法を準用して試験するとき、アルミニウムの含有量は1 mL中3.3mg以下でなければならない。

#### 3.7.7 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、注射後の体重測定は、4日目とする。

#### 3.7.8 力価試験

##### 3.7.8.1 App感染症力価試験

##### 3.7.8.1.1 試験材料

##### 3.7.8.1.1.1 注射材料

試験品をリン酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釈液で20倍に希釈したものを注射材料とする。

##### 3.7.8.1.1.2 試験動物

約3週齢のマウスを用いる。

##### 3.7.8.1.1.3 攻撃用菌液

App 1 型菌AH-1株又は適当と認められた株、App 2 型菌SHP-1株又は適当と認められた株及びApp 5 型菌Ng-2株又は適当と認められた株をそれぞれ試験用培地1（付記9）に移植し、37℃で16時間培養する。集落を釣菌して試験用培地2（付記10）に移植し、37℃で4～8時間振とう培養したものを各攻撃用菌液とする。

##### 3.7.8.1.2 試験方法

試験動物70匹以上を試験群、70匹以上を対照群とする。

注射材料0.5mLずつを試験群の腹腔内に注射する。

注射後14日目に、試験群及び対照群をそれぞれ10匹ずつの7群、計14群に分ける。1型菌攻撃用菌液及び2型菌攻撃用菌液をハートインフュージョン培地で2段階、5型菌攻撃用菌液をハートインフュージョン培地で3段階に希釈し、更にこれらの希釈菌液を10w/v%ムチン液で10倍に希釈したものを、試験群及び対照群にそれぞれ0.5mLずつ腹腔内に注射して攻撃した後、7日間臨床観察する。

##### 3.7.8.1.3 判定

各攻撃菌株の対照群の80%以上が死亡した攻撃菌量において、試験群では80%以上が耐過生存しなければならない。

##### 3.7.8.2 Mhp感染症力価試験

##### 3.7.8.2.1 試験材料

##### 3.7.8.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.7.8.2.1.2 試験動物

6～7週齢のマウスを用いる。

##### 3.7.8.2.2 試験方法

試験動物の20匹を試験群とし、5匹を対照群とする。

注射材料1.0mLずつを試験群の腹腔内に注射する。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、二抗体サンドイッチELISAを行う。

試験群及び対照群の血清並びに参照陽性血清（付記11）を希釈液（付記12）で10倍に希釈したも

のを、更に希釈液で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（付記13）の穴に100 $\mu$ Lずつ加え、希釈液のみの穴を血清対照とする。4 $^{\circ}$ Cで18時間反応させた後、洗浄液（付記14）で3回洗浄する。次に各穴に標識抗体（付記15）を100 $\mu$ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで90分間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。その後、基質液（付記16）を各穴に100 $\mu$ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた後、3 mol/L水酸化ナトリウム溶液を各穴に50 $\mu$ Lずつ加えて反応を停止させ、波長405nmで各穴の吸光度を測定する。

#### 3.7.8.2.3 判定

血清対照の各穴の吸光度値の平均値+0.5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2,560倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全て抗体価320倍以下でなければならない。また、参照陽性血清は、抗体価2,560～5,120倍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3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 チョコレート寒天培地

1,000mL 中

ハートインフュージョン寒天

40 g

水

残 量

加温溶解した後、121 $^{\circ}$ Cで15分間高压滅菌を行う。約80 $^{\circ}$ Cに冷却した後、馬脱線維血を10vol%となるように添加する。

##### 付記2 LB-Amp寒天培地

1,000mL中

カゼインペプトン

10 g

酵母エキス

5 g

塩化ナトリウム

5 g

寒天

15 g

水

残 量

加温溶解した後、pHを7.4～7.6に調整し、121 $^{\circ}$ Cで15分間高压滅菌する。寒天が固まらない程度に冷却した後、アンピシリンを最終力価250 $\mu$ g/mLとなるように添加する。

##### 付記3 リン酸緩衝食塩液

1,000mL 中

塩化ナトリウム

8.5 g

リン酸水素二ナトリウム十二水和物

2.435 g

リン酸二水素カリウム

0.435 g

水

残 量

pH を6.8 ～7.2 に調整して、121 $^{\circ}$ Cで20分間高压滅菌又はろ過滅菌する。

##### 付記4 BHL寒天培地

BHL培地1,000mL分の基礎培地に精製寒天4.0gを加え、加温溶解した後、115 $^{\circ}$ Cで15分間滅菌する。寒天が固まらない程度に冷却し、あらかじめろ過滅菌された付記8と同様の添加物を混合し、直径90mmのシャーレに分注する。

付記5 抗Mhp兔免疫血清

製造用株で兎を免疫して得た血清であって、少量に小分けして-20℃に保存したものである。  
1 mL当たり約10<sup>6</sup>個の菌液を用いた発育阻止試験においては、約5 mmの阻止帯を示す。

付記6 マイコプラズマ発育阻止試験

寒天平板の一端に試料を約0.05mL滴下し、培地を傾けて試料を他端に向け流下させる。表面が乾燥した後、あらかじめ抗Mhp兔免疫血清を浸み込ませて乾燥させたろ紙ディスクを流線の中央に置き、37℃で14日間、微好氣的に培養する。培養後観察すると、ディスクから拡散した抗血清によりその周辺におけるMhpの集落の発育が阻止され、阻止帯が形成される。Mhp以外のマイコプラズマに対しては、発育阻止は起こらない。

付記7 サンプルバッファー

|                             |        |
|-----------------------------|--------|
| 1,000mL中                    |        |
| 0.25mol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 6.8) | 500 mL |
| 20w/v% ラウリル硫酸ナトリウム溶液        | 260 mL |
| グリセリン                       | 200 mL |
| ジチオスレイトール                   | 1.54 g |
| ブロムフェノールブルー                 | 1.00 g |
| 水                           | 残 量    |

付記8 BHL培地

|               |        |
|---------------|--------|
| 1,000mL中      |        |
| 基礎培地          |        |
| ブルセラブロス       | 5.8 g  |
| ハンクス液粉末       | 4.9 g  |
| ラクトアルブミン水解物   | 2.0 g  |
| 水             | 750 mL |
| 添加物           |        |
| 非働化豚血清        | 200 mL |
| 5 w/v% 酵母エキス液 | 50 mL  |
| クロキサシリンナトリウム  | 100 mg |
| 又は            |        |
| アンピシリンナトリウム   | 250 mg |

基礎培地を加温溶解した後、115℃で15分間滅菌する。冷却した後、あらかじめろ過滅菌された添加物を混合し、pHを7.5～7.7に調整する。なお、添加物として2.5w/v%酢酸タリウム水溶液を4 mL加えてもよい。

付記9 試験用培地1

ハートインフュージョン寒天培地を121℃で15分間高圧滅菌し、冷却した後、ろ過滅菌した鶏非働化血清を5 vol%及び0.1w/v%  $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（以下この項において「 $\beta$ -NAD」という。）液を1 vol%の割合に加えたもの。

付記10 試験用培地2

ハートインフュージョン培地を121℃で15分間高圧滅菌し、冷却後、ろ過滅菌した鶏非働化血

清を 5 vol %及び0.1w/v %  $\beta$ -NAD液を 1 vol%の割合に加えたもの。

付記11 参照陽性血清

Mhp J 株又はこれと同等の免疫原性を有する株で免疫したマウスの血清であって、二抗体サンドイッチELISA抗体価が2,560～5,120倍となるように濃度を調整し、凍結又は凍結乾燥したものの。

付記12 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

リン酸二水素カリウム 0.2 g

無水リン酸水素二ナトリウム 1.15 g

水 残 量

121℃で15分間高圧滅菌する。

付記13 抗原吸着プレート

Mhp J 株又はこれと同等の免疫原性を有する株に対する兔免疫血清（付記17）を炭酸緩衝液（付記18）で適当な濃度に希釈した後、96穴マイクロプレートの各穴に100  $\mu$  Lずつ加え、4℃で18時間反応させる。その後、洗浄液で洗浄する。0.1w/v%ゼラチン液（付記19）を各穴に100  $\mu$  Lずつ加え、4℃で18時間反応させる。さらに、洗浄液で洗浄した後、ポリソルベート20抽出抗原（付記20）を希釈液でたん白量12.5  $\mu$  g/mLになるように希釈し、各穴に100  $\mu$  Lずつ加え、4℃で18時間反応させた後、洗浄液で洗浄したもの。

付記14 洗浄液

ポリソルベート20 0.5mL及び希釈液1,000mLを混合したもの。

付記15 標識抗体

アルカリホスファターゼ標識抗マウスIgG抗体を希釈液で至適濃度に希釈したもの。

付記16 基質液

p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム六水和物100mgを基質緩衝液（付記21）100mLで溶解したもの。

付記17 兔免疫血清

Mhp J 株又はこれと同等の免疫原性を有する株で免疫した兔の血清であって、マイコプラズマ発育阻止試験において直径 3 mm以上の阻止帯を示すもの。

付記18 炭酸緩衝液

A液：炭酸ナトリウム5.3gを水に溶解し、全量を1,000mLとする。

B液：炭酸水素ナトリウム4.2gを水に溶解し、全量を1,000mLとする。

A液とB液を混合し、pHを9.6に調整する。

付記19 0.1w/v%ゼラチン液

ゼラチン1.0gを希釈液1,000mLで溶解したもの。

#### 付記20 ポリソルベート20抽出抗原

製造用株又はこれと同等の抗原性を有する株の振とう培養菌液を遠心集菌し、希釈液に懸濁後、4℃で24時間攪拌して菌体を洗浄する。洗浄菌体をトリス緩衝液（1）にたん白濃度1mg/mLになるように懸濁した後、2 vol%ポリソルベート20加トリス緩衝液（2）を等量加え、37℃で30分間振とうしながら加温する。遠心上清にジエチルエーテルを等量加えて振とう後、エーテル層を完全に除去したもの。

##### （1）トリス緩衝液

トリスヒドロキシメチルアミノメタン3.03g及び塩化ナトリウム14.61gを水に溶解し、全量を1,000mLとしたもの。

##### （2）2 vol%ポリソルベート20加トリス緩衝液

ポリソルベート20 20mL及びトリス緩衝液980mLを混合したもの。

#### 付記21 基質緩衝液

塩化マグネシウム六水和物0.049g及びジエタノールアミン96mLを水に溶解した後、pHを9.8に調整し、全量を1,000mLとしたもの。

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）

（下線の部分は改正部分）

| 改正後                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 改正前                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>ワクチン（シードロット製剤）の部</p> <p><b>鶏コクシジウム感染症（ネカトリックス）生ワクチン（シード）</b></p> <p>1・2 (略)</p> <p>3 試験法</p> <p>3.1 製造用株の試験</p> <p>3.1.1 マスターシードコクシジウム</p> <p>3.1.1.1 同定試験</p> <p><u>適当な形態学的性状試験法、ポリメラーゼ連鎖反応（以下この項において「PCR」という。）法、酵素電気泳動法その他の承認された試験法によってそのコクシジウム同定のための試験を実施するとき、適合しなければならない。</u></p> <p>3.1.1.2～3.1.1.7 (略)</p> <p>3.1.2・3.1.3 (略)</p> <p>3.2 (略)</p> <p>3.3 原液の試験</p> <p><u>3.3.1～3.3.3の試験を行う。ただし、シードロット規格4.1のただし書の規定により、鶏貧血ウイルスについて、原液において迷入を否定する場合には、3.3.1～3.3.4の試験を行う。</u></p> <p>3.3.1～3.3.3 (略)</p> <p>3.3.4 鶏貧血ウイルス否定試験</p> <p>3.3.4.1 試験材料</p> <p>3.3.4.1.1 試料</p> <p><u>10mLの検体を適当と認められた方法で処理し、リン酸緩衝食塩液で2倍に希釈したものを試料とする。</u></p> <p>3.3.4.1.2 培養細胞</p> <p><u>MDCC-MSB1細胞浮遊液を用いる。</u></p> <p>3.3.4.2 試験方法</p> <p><u>試料0.1mLにつき約<math>2 \times 10^5</math>個/mLに調整した5 mLの培養細胞に接種し、40℃、5 vol%炭酸ガス下で培養する。この細胞を3～5日ごとに7代目まで継代し、各代の細胞について観察する。</u></p> <p>3.3.4.3 判定</p> <p><u>各代の細胞について、細胞の消失又は激減、CPEが認められなかった場合を</u></p> | <p>ワクチン（シードロット製剤）の部</p> <p><b>鶏コクシジウム感染症（ネカトリックス）生ワクチン（シード）</b></p> <p>1・2 (略)</p> <p>3 試験法</p> <p>3.1 製造用株の試験</p> <p>3.1.1 マスターシードコクシジウム</p> <p>3.1.1.1 同定試験</p> <p><u>適当な形態学的性状試験法、PCR検査法、酵素電気泳動法その他の承認された試験法によってそのコクシジウム同定のための試験を実施するとき、適合しなければならない。</u></p> <p>3.1.1.2～3.1.1.7 (略)</p> <p>3.1.2・3.1.3 (略)</p> <p>3.2 (略)</p> <p>3.3 原液の試験</p> <p>(新設)</p> <p>3.3.1～3.3.3 (略)</p> <p>(新設)</p> |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><u>適合とする。細胞の消失又は激減、CPEが認められた場合には、その培養上清について鶏貧血ウイルス特異的PCR（付記3）を行い、特異的PCR産物を認めない場合は適合とする。</u></p> <p>3.4 小分製品の試験</p> <p>3.4.1 特性試験</p> <p>一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、固有の色調で少量の沈殿を認めるが、振とうすると固有の色調の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。</p> <p>3.4.2～3.4.8 （略）</p> <p>4 （略）</p> <p>付記1・2 （略）</p> <p>付記3 <u>鶏貧血ウイルス特異的PCR</u></p> <p><u>鶏貧血ウイルスのカプシドたん白VP-1をコードする遺伝子領域を特異的に検出するPCR法である。</u></p> | <p>3.4 小分製品の試験</p> <p>3.4.1 特性試験</p> <p>一般試験法の特性試験を準用して試験するとき、固有の色調で少量の沈殿を認めるが、振とうすると固有の色調の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。</p> <p>3.4.2～3.4.8 （略）</p> <p>4 （略）</p> <p>付記1・2 （略）</p> <p>（新設）</p> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

# 鶏コクシジウム感染症（ネカトリックス）生ワクチン （シード）

令和元年 8 月 26 日 （告示第 723 号）新規追加  
令和 2 年 10 月 2 日 （告示第 1865 号）一部改正

## 1 定義

シードロット規格に適合した弱毒アイメリア・ネカトリックスを鶏腸管内で増殖させて得たオーシストを調製した生ワクチンである。

## 2 製法

### 2.1 製造用株

#### 2.1.1 名称

アイメリア・ネカトリックス Nn-P125 株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.2 性状

主要な増殖部位は、鶏の小腸及び盲腸である。

平飼いの条件においてオーシストを飼料中に混合して若齢鶏に経口投与したとき、臨床症状を発生せず、発育に悪影響を与えない。

#### 2.1.3 マスターシードコクシジウム

##### 2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードコクシジウムは、シードロット規格の 4 に適合した鶏で増殖させ、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コクシジウムは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して  $-100^{\circ}\text{C}$  以下で保存する。

マスターシードコクシジウムについて、3.1.1 の試験を行う。

マスターシードコクシジウムは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードコクシジウム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 ワーキングシードコクシジウム

##### 2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードコクシジウムは、シードロット規格の 4 に適合した鶏で増殖及び継代する。

ワーキングシードコクシジウムは、 $2\sim 6^{\circ}\text{C}$  又は凍結して  $-100^{\circ}\text{C}$  以下で保存する。

ワーキングシードコクシジウムについて、3.1.2 の試験を行う。

#### 2.1.5 プロダクションシードコクシジウム

##### 2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードコクシジウムは、シードロット規格の 4 に適合した鶏で増殖する。

プロダクションシードコクシジウムを保存する場合は、 $2\sim 6^{\circ}\text{C}$  又は凍結して  $-100^{\circ}\text{C}$  以下で保存する。

プロダクションシードコクシジウム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 鶏

シードロット規格の 4 に適合した鶏を用いる。

マスターシードコクシジウム及びワーキングシードコクシジウムを増殖、継代及び保存する場合の鶏並びにプロダクションシードコクシジウムを増殖及び保存する場合の鶏について、3.2 の試験を行う。

## 2.3 原液

### 2.3.1 製造用コクシジウム及び原液の調製

プロダクションシードコクシジウムを鶏に経口投与し、一定期間糞便を採取する。糞便を洗剤液

で増量してろ過した後、遠心して得た沈渣を飽和食塩液に混合し、遠心して上清を採取する。これを洗浄してオーシストを収集した後、2 w/v%重クロム酸カリウム溶液（付記1）に混合し加温して孢子形成させ、孢子形成オーシスト液とする。この孢子形成オーシスト液に含まれる孢子形成オーシストを適当と認められた方法により除菌及び洗浄し、さらに精製した後、ソルビン酸加エタノール（付記2）を添加した滅菌アルセバー液を加えオーシスト数を調整し、原液とする。

原液について、3.3の試験を行う。

## 2.4 最終バルク

原液に滅菌アルセバー液及びソルビン酸加エタノールを加えてよく混合し、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、密栓して小分製品とする。

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 マスターシードコクシジウム

##### 3.1.1.1 同定試験

適当な形態学的性状試験法、ポリメラーゼ連鎖反応（以下この項において「PCR」という。）法、酵素電気泳動法その他の承認された試験法によってそのコクシジウム同定のための試験を実施するとき、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をするとき、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をするとき、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1.3、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1.3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1.3、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によって試験するとき、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によって試験するとき、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によって試験するとき、適合しなければならない。

### 3.1.2 ワーキングシードコクシジウム

#### 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をするとき、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をするとき、適合しなければならない。

#### 3.1.3 プロダクションシードコクシジウム

貯蔵するものについて次の試験を行う。

##### 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をするとき、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をするとき、適合しなければならない。

#### 3.2 鶏の試験

##### 3.2.1 発育試験

対照鶏を、ワクチンシードを接種することなく、ワクチンシードの作製時と同じ条件で飼育し、観察するとき、異常を認めてはならない。

#### 3.3 原液の試験

3.3.1～3.3.3の試験を行う。ただし、シードロット規格4.1のただし書の規定により、鶏貧血ウイルスについて、原液において迷入を否定する場合には、3.3.1～3.3.4の試験を行う。

##### 3.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.3.2 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。

##### 3.3.3 オーシスト含有量試験

###### 3.3.3.1 試験材料

検体又は検体を水で希釈したものを試料とする。

###### 3.3.3.2 試験方法

試料に含まれる孢子形成オーシスト数を顕微鏡下で計数する。

###### 3.3.3.3 判定

検体 1 mL中に $2.5 \times 10^4$ ～ $2.5 \times 10^5$ 個の孢子形成オーシストが含まれていなければならない。

##### 3.3.4 鶏貧血ウイルス否定試験

###### 3.3.4.1 試験材料

###### 3.3.4.1.1 試料

10mLの検体を適当と認められた方法で処理し、リン酸緩衝食塩液で2倍に希釈したものを試料とする。

###### 3.3.4.1.2 培養細胞

MDCC-MSB1細胞浮遊液を用いる。

###### 3.3.4.2 試験方法

試料0.1mLにつき約 $2 \times 10^5$ 個/mLに調整した5 mLの培養細胞に接種し、40℃、5 vol%炭酸ガス下で培養する。この細胞を3～5日ごとに7代目まで継代し、各代の細胞について観察する。

###### 3.3.4.3 判定

各代の細胞について、細胞の消失又は激減、CPEが認められなかった場合を適合とする。細胞の消失又は激減、CPEが認められた場合には、その培養上清について鶏貧血ウイルス特異的PCR（付記3）を行い、特異的PCR産物を認めない場合は適合とする。

#### 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、固有の色調で少量の沈殿を認めるが、振とうすると固有の色調の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。

#### 3.4.2 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。

#### 3.4.3 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。

#### 3.4.4 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。

#### 3.4.5 オーシスト含有量試験

3.3.3を準用して試験するとき、試験品 1 mL中に $2.5 \times 10^3 \sim 2.5 \times 10^4$ 個の孢子形成オーシストが含まれていなければならない。

#### 3.4.6 迷入ウイルス否定試験

試験品を適当と認められた方法で処理したものを試料とする。

一般試験法の迷入ウイルス否定試験法2.1、2.2.1及び2.2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.4.7 安全試験

##### 3.4.7.1 試験材料

##### 3.4.7.1.1 投与材料

試験品を投与材料とする。

##### 3.4.7.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の6日齢鶏を用いる。

##### 3.4.7.2 試験方法

試験動物の15羽ずつを試験群及び対照群とする。

試験群には投与材料150羽分を75gの実験動物幼雛用飼料に混合して経口投与し、対照群には75gの実験動物用幼雛用飼料のみを与える。試験開始翌日から両群とも不断給餌し、共に4週間観察する。

試験開始時及び試験終了時に体重を測定し、下式により個体別に増体率を算出した後、群ごとに平均増体率を算出する。

なお、試験動物は、試験開始の前夜から約半日間断餌した後使用する。

(試験終了時の体重) - (試験開始時の体重)

$$\text{増体率 (\%)} = \frac{\text{(試験終了時の体重)} - \text{(試験開始時の体重)}}{\text{(試験開始時の体重)}} \times 100$$

##### 3.4.7.3 判定

試験期間中、試験群及び対照群に臨床的異常を認めてはならず、試験群の平均増体率は、対照群のその80%以上でなければならない。

#### 3.4.8 力価試験

##### 3.4.8.1 試験材料

##### 3.4.8.1.1 投与材料

試験品を投与材料とする。

##### 3.4.8.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の6日齢鶏を用いる。

##### 3.4.8.1.3 攻撃オーシスト

強毒アイメリア・ネカトリックス株を用いる。

攻撃オーシスト量は、1羽当たり $5 \times 10^4$ 個とする。

##### 3.4.8.2 試験方法

試験動物の10羽を試験群、20羽を対照群とする。

試験群には投与材料の10羽分を50gの実験動物幼雛用飼料に混合して経口投与し、対照群には100gの実験動物用幼雛用飼料のみを与える。試験開始翌日からは両群とも不断給餌し、4週間後に両群の10羽ずつに攻撃オーシストを経口投与して攻撃する。対照群の残り10羽は非攻撃対照群とする。攻撃後臨床観察を行い、試験群と攻撃対照群の死亡数を算出する。また、攻撃日及び攻撃後8日目に試験動物の体重を測定し、下式により個体別に増体率を算出した後、各群ごとに平均増体率を算出する。

$$\text{増体率 (\%)} = \frac{(\text{試験終了時の体重}) - (\text{攻撃日の体重})}{(\text{攻撃日の体重})} \times 100$$

#### 3.4.8.3 判定

Fisherの直接確率計算法により有意水準5%で試験群の死亡数が攻撃対照群のそれより有意に少ない場合には、適合とする。

両群間の死亡数に有意差が認められない場合には、平均増体率により評価する。

試験群の平均増体率は、攻撃対照群のそれを上回らなければならない。この場合、攻撃対照群における平均増体率は非攻撃対照群のそれよりも有意に低くなければならない（t検定、有意水準5%）。

#### 4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後12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 2 w/v%重クロム酸カリウム溶液

重クロム酸カリウム2gに水を加えて100mLとしたもの。

##### 付記2 ソルビン酸加エタノール

100mL中

|       |        |
|-------|--------|
| ソルビン酸 | 10.0 g |
| エタノール | 残 量    |

##### 付記3 鶏貧血ウイルス特異的PCR

鶏貧血ウイルスのカプシドたん白VP-1をコードする遺伝子領域を特異的に検出するPCR法である。

| 改正後                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 改正前                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>ワクチン（シードロット製剤）の部</p> <p><b>鶏コクシジウム感染症（アセルブリナ・テネラ・マキシマ）混合生ワクチン（シード）</b></p> <p>1・2 (略)</p> <p>3 試験法</p> <p>3.1 製造用株の試験</p> <p>3.1.1 マスターシードコクシジウム</p> <p>3.1.1.1 同定試験</p> <p><u>適当な形態学的性状試験法、ポリメラーゼ連鎖反応（以下この項において「PCR」という。）法、酵素電気泳動法その他の承認された試験法によってそのコクシジウム同定のための試験を実施するとき、適合しなければならない。</u></p> <p>3.1.1.2～3.1.1.7 (略)</p> <p>3.1.2・3.1.3 (略)</p> <p>3.2 (略)</p> <p>3.3 原液の試験</p> <p><u>3.3.1～3.3.3の試験を行う。ただし、シードロット規格4.1のただし書の規定により、鶏貧血ウイルスについて、原液において迷入を否定する場合には、3.3.1～3.3.4の試験を行う。</u></p> <p>3.3.1～3.3.3 (略)</p> <p>3.3.4 鶏貧血ウイルス否定試験</p> <p>3.3.4.1 試験材料</p> <p>3.3.4.1.1 試料</p> <p><u>10mLの検体を適当と認められた方法で処理し、リン酸緩衝食塩液で2倍に希釈したものを試料とする。</u></p> <p>3.3.4.1.2 培養細胞</p> <p><u>MDCC-MSB1細胞浮遊液を用いる。</u></p> <p>3.3.4.2 試験方法</p> <p><u>試料0.1mLにつき約<math>2 \times 10^5</math>個/mLに調整した5 mLの培養細胞に接種し、40℃、5 vol%炭酸ガス下で培養する。この細胞を3～5日ごとに7代目まで継代し、各代の細胞について観察する。</u></p> <p>3.3.4.3 判定</p> <p><u>各代の細胞について、細胞の消失又は激減、CPEが認められなかった場合を</u></p> | <p>ワクチン（シードロット製剤）の部</p> <p><b>鶏コクシジウム感染症（アセルブリナ・テネラ・マキシマ）混合生ワクチン（シード）</b></p> <p>1・2 (略)</p> <p>3 試験法</p> <p>3.1 製造用株の試験</p> <p>3.1.1 マスターシードコクシジウム</p> <p>3.1.1.1 同定試験</p> <p><u>適当な形態学的性状試験法、PCR検査法、酵素電気泳動法その他の承認された試験法によってそのコクシジウム同定のための試験を実施するとき、適合しなければならない。</u></p> <p>3.1.1.2～3.1.1.7 (略)</p> <p>3.1.2・3.1.3 (略)</p> <p>3.2 (略)</p> <p>3.3 原液の試験</p> <p>(新設)</p> <p>3.3.1～3.3.3 (略)</p> <p>(新設)</p> |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><u>適合とする。細胞の消失又は激減、CPEが認められた場合には、その培養上清について鶏貧血ウイルス特異的PCR（付記4）を行い、特異的PCR産物を認めない場合は適合とする。</u></p> <p>3.4.1～3.4.8（略）</p> <p>3.4.9 力価試験</p> <p>3.4.9.1 試験材料</p> <p>3.4.9.1.1・3.4.9.1.2（略）</p> <p>3.4.9.1.3 攻撃オーシスト</p> <p>強毒のアイメリア・アセルブリナ株、アイメリア・テネラ株及びアイメリア・マキシマ株を用いる。</p> <p>攻撃オーシスト量は、それぞれ1羽当たり <math>4 \times 10^5</math>、<math>1 \times 10^5</math>及び <math>4 \times 10^5</math>とする。</p> <p>3.4.9.2・3.4.9.3（略）</p> <p>4（略）</p> <p>付記1～3（略）</p> <p><u>付記4 鶏貧血ウイルス特異的PCR</u></p> <p><u>鶏貧血ウイルスのカプシドたん白VP-1をコードする遺伝子領域を特異的に検出するPCR法である。</u></p> | <p>3.4.1～3.4.8（略）</p> <p>3.4.9 力価試験</p> <p>3.4.9.1 試験材料</p> <p>3.4.9.1.1・3.4.9.1.2（略）</p> <p>3.4.9.1.3 攻撃オーシスト</p> <p>強毒のアイメリア・アセルブリナ株、アイメリア・テネラ株及びアイメリア・マキシマ株を用いる。</p> <p>攻撃オーシスト量は、それぞれ1羽当たり <math>4 \times 10^5</math>/<u>0.3mL</u>、<math>1 \times 10^5</math>/<u>0.3mL</u>及び <math>4 \times 10^5</math>/<u>0.3mL</u>とする。</p> <p>3.4.9.2・3.4.9.3（略）</p> <p>4（略）</p> <p>付記1～3（略）</p> <p>（新設）</p> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

# 鶏コクシジウム感染症（アセルブリナ・テネラ・マキシマ） 混合生ワクチン（シード）

令和元年 8 月 26 日（告示第 723 号）新規追加  
令和 2 年 10 月 2 日（告示第 1865 号）一部改正

## 1 定義

シードロット規格に適合した弱毒アイメリア・アセルブリナ、弱毒アイメリア・テネラ及び弱毒アイメリア・マキシマをそれぞれ鶏腸管内で増殖させて得たオーシストを混合したワクチンである。

## 2 製法

### 2.1 製造用株

#### 2.1.1 アイメリア・アセルブリナ株

##### 2.1.1.1 名称

アイメリア・アセルブリナ Na-P75 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.1.2 性状

主要な増殖部位は、鶏の十二指腸及び空腸の粘膜上皮細胞である。平飼い条件においてオーシストを飼料中に混合して 5 日齢の鶏に経口投与したとき、臨床症状を発現せず、発育に悪影響を与えない。

##### 2.1.1.3 マスターシードコクシジウム

###### 2.1.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードコクシジウムは、シードロット規格の 4 に適合した鶏で増殖させ、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コクシジウムは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して  $-100^{\circ}\text{C}$  以下で保存する。

マスターシードコクシジウムについて、3.1.1 の試験を行う。

マスターシードコクシジウムは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードコクシジウムから小分製品までの最高継代数は、10 代以内でなければならない。

##### 2.1.1.4 ワーキングシードコクシジウム

###### 2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードコクシジウムは、シードロット規格の 4 に適合した鶏で増殖及び継代する。

ワーキングシードコクシジウムは、 $2\sim 6^{\circ}\text{C}$  又は凍結して  $-100^{\circ}\text{C}$  以下で保存する。

ワーキングシードコクシジウムについて、3.1.2 の試験を行う。

##### 2.1.1.5 プロダクションシードコクシジウム

###### 2.1.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードコクシジウムは、シードロット規格の 4 に適合した鶏で増殖する。

プロダクションシードコクシジウムを保存する場合は、 $2\sim 6^{\circ}\text{C}$  又は凍結して  $-100^{\circ}\text{C}$  以下で保存する。

プロダクションシードコクシジウムを保存する場合について、3.1.3 の試験を行う。

#### 2.1.2 アイメリア・テネラ株

##### 2.1.2.1 名称

アイメリア・テネラ Nt-P110 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.2.2 性状

主要な増殖部位は、鶏の盲腸粘膜上皮及び固有層の細胞である。平飼い条件においてオーシスト

を飼料中に混合して5日齢の鶏に経口投与したとき、臨床症状を発現せず、発育に悪影響を与えない。

#### 2.1.2.3 マスターシードコクシジウム

##### 2.1.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードコクシジウムは、シードロット規格の4に適合した鶏で増殖させ、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コクシジウムは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-100^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

マスターシードコクシジウムについて、3.1.1の試験を行う。

マスターシードコクシジウムは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードコクシジウムから小分製品までの最高継代数は、10代以内でなければならない。

#### 2.1.2.4 ワーキングシードコクシジウム

##### 2.1.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードコクシジウムは、シードロット規格の4に適合した鶏で増殖及び継代する。

ワーキングシードコクシジウムは、 $2\sim 6^{\circ}\text{C}$ 又は凍結して $-100^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングシードコクシジウムについて、3.1.2の試験を行う。

#### 2.1.2.5 プロダクションシードコクシジウム

##### 2.1.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードコクシジウムは、シードロット規格の4に適合した鶏で増殖する。

プロダクションシードコクシジウムを保存する場合は、 $2\sim 6^{\circ}\text{C}$ 又は凍結して $-100^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

プロダクションシードコクシジウムを保存する場合について、3.1.3の試験を行う。

#### 2.1.3 アイメリア・マキシマ株

##### 2.1.3.1 名称

アイメリア・マキシマNm-P102 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.3.2 性状

主要な増殖部位は、鶏の十二指腸、空腸及び回腸の粘膜上皮細胞である。平飼い条件においてオーシストを飼料中に混合して5日齢の鶏に経口投与したとき、臨床症状を発現せず、発育に悪影響を与えない。

#### 2.1.3.3 マスターシードコクシジウム

##### 2.1.3.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードコクシジウムは、シードロット規格の4に適合した鶏で増殖させ、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コクシジウムは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-100^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

マスターシードコクシジウムについて、3.1.1の試験を行う。

マスターシードコクシジウムは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードコクシジウムから小分製品までの最高継代数は、10代以内でなければならない。

#### 2.1.3.4 ワーキングシードコクシジウム

##### 2.1.3.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードコクシジウムは、シードロット規格の4に適合した鶏で増殖及び継代する。

ワーキングシードコクシジウムは、 $2\sim 6^{\circ}\text{C}$ 又は凍結して $-100^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングシードコクシジウムについて、3.1.2の試験を行う。

#### 2.1.3.5 プロダクションシードコクシジウム

##### 2.1.3.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードコクシジウムは、シードロット規格の4に適合した鶏で増殖する。

プロダクションシードコクシジウムを保存する場合は、2～6℃又は凍結して-100℃以下で保存する。

プロダクションシードコクシジウム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 鶏

シードロット規格の4に適合した鶏を用いる。

マスターシードコクシジウム及びワーキングシードコクシジウムを増殖、継代及び保存する場合の鶏並びにプロダクションシードコクシジウムを増殖及び保存する場合の鶏について、3.2の試験を行う。

## 2.3 原液

### 2.3.1 アイメリア・アセルブリナ株原液

#### 2.3.1.1 製造用コクシジウム及び原液の調製

プロダクションシードコクシジウムを鶏に経口投与し、一定期間糞便を採取する。糞便を洗剤液で増量してろ過した後、遠心して得た沈渣を飽和食塩液に混合し、遠心して上清を採取する。これを洗浄してオーシストを収集した後、2 w/v%重クロム酸カリウム溶液（付記1）に混合し加温して孢子形成させ、孢子形成オーシスト液とする。この孢子形成オーシスト液に含まれる孢子形成オーシストを適当と認められた方法により除菌及び洗浄し、さらに精製した後、ソルビン酸加エタノール（付記2）を添加したリン酸緩衝食塩液に混合し、オーシスト数を調整してアイメリア・アセルブリナ株原液とする。

アイメリア・アセルブリナ株原液について、3.3の試験を行う。

### 2.3.2 アイメリア・テネラ株原液

#### 2.3.2.1 製造用コクシジウム及び原液の調製

プロダクションシードコクシジウムを鶏に経口投与し、一定期間糞便を採取する。糞便を洗剤液で増量してろ過した後、遠心して得た沈渣を飽和食塩液に混合し、遠心して上清を採取する。これを洗浄してオーシストを収集した後、2 w/v%重クロム酸カリウム溶液に混合し加温して孢子形成させ、孢子形成オーシスト液とする。この孢子形成オーシスト液に含まれる孢子形成オーシストを適当と認められた方法により除菌及び洗浄し、さらに精製した後、ソルビン酸加エタノールを添加したリン酸緩衝食塩液に混合し、オーシスト数を調整してアイメリア・テネラ株原液とする。

アイメリア・テネラ株原液について、3.3の試験を行う。

### 2.3.3 アイメリア・マキシマ株原液

#### 2.3.3.1 製造用コクシジウム及び原液の調製

プロダクションシードコクシジウムを鶏に経口投与し、一定期間糞便を採取する。糞便を洗剤液で増量してろ過した後、遠心して得た沈渣を飽和食塩液に混合し、遠心して上清を採取する。これを洗浄してオーシストを収集した後、2 w/v%重クロム酸カリウム溶液に混合し加温して孢子形成させ、孢子形成オーシスト液とする。この孢子形成オーシスト液に含まれる孢子形成オーシストを適当と認められた方法により除菌及び洗浄し、さらに精製した後、ソルビン酸加エタノールを添加したリン酸緩衝食塩液に混合し、オーシスト数を調整してアイメリア・マキシマ株原液とする。

アイメリア・マキシマ株原液について、3.3の試験を行う。

## 2.4 最終バルク

各株の原液を混合し、リン酸緩衝食塩液及びソルビン酸加エタノールを加えて各オーシスト数を調整し、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、密栓して小分製品とする。

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 マスターシードコクシジウム

##### 3.1.1.1 同定試験

適当な形態学的性状試験法、ポリメラーゼ連鎖反応（以下この項において「PCR」という。）法、酵素電気泳動法その他の承認された試験法によってそのコクシジウム同定のための試験を実施するとき、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をするとき、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をするとき、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1.3、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1.3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1.3、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によって試験するとき、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によって試験するとき、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によって試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.1.2 ワーキングシードコクシジウム

##### 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をするとき、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をするとき、適合しなければならない。

#### 3.1.3 プロダクションシードコクシジウム

貯蔵するものについて次の試験を行う。

##### 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をするとき、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をするとき、適合しなければならない。

### 3.2 鶏の試験

#### 3.2.1 発育試験

対照鶏を、ワクチンシードを接種することなく、ワクチンシードの作製時と同じ条件で飼育し、

観察するとき、異常を認めてはならない。

### 3.3 原液の試験

3.3.1～3.3.3の試験を行う。ただし、シードロット規格4.1のただし書の規定により、鶏貧血ウイルスについて、原液において迷入を否定する場合には、3.3.1～3.3.4の試験を行う。

#### 3.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.3.2 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。

#### 3.3.3 オーシスト含有量試験

##### 3.3.3.1 試験材料

検体又は検体を水で希釈したものを試料とする。

##### 3.3.3.2 試験方法

試料に含まれる孢子形成オーシスト数を顕微鏡下でオーシストの鑑別点（付記3）に準じて計数する。

##### 3.3.3.3 判定

検体 1 mL中に次の数の孢子形成オーシストが含まれていなければならない。

アイメリア・アセルブリナ株  $1.5 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^7$  個

アイメリア・テネラ株  $6 \times 10^5 \sim 6 \times 10^6$  個

アイメリア・マキシマ株  $3 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$  個

#### 3.3.4 鶏貧血ウイルス否定試験

##### 3.3.4.1 試験材料

###### 3.3.4.1.1 試料

10mLの検体を適当と認められた方法で処理し、リン酸緩衝食塩液で2倍に希釈したものを試料とする。

###### 3.3.4.1.2 培養細胞

MDCC-MSB1細胞浮遊液を用いる。

##### 3.3.4.2 試験方法

試料0.1mLにつき約  $2 \times 10^5$  個/mLに調整した 5 mLの培養細胞に接種し、40℃、5 vol%炭酸ガス下で培養する。この細胞を3～5日ごとに7代目まで継代し、各代の細胞について観察する。

##### 3.3.4.3 判定

各代の細胞について、細胞の消失又は激減、CPEが認められなかった場合を適合とする。細胞の消失又は激減、CPEが認められた場合には、その培養上清について鶏貧血ウイルス特異的PCR（付記4）を行い、特異的PCR産物を認めない場合は適合とする。

### 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、固有の色調で少量の沈殿を認めるが、振とうすると固有の色調の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。

#### 3.4.2 pH 測定試験

一般試験法のpH測定試験法を準用して試験するとき、pHは、固有の値を示さなければならない。

#### 3.4.3 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。

#### 3.4.4 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。

#### 3.4.5 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。

#### 3.4.6 オーシスト含有量試験

3.3.3を準用して試験するとき、試験品 1 mL中に孢子形成オーシストは総数で  $8 \times 10^4 \sim 8 \times 10^5$  個、そのうち長径  $25 \mu\text{m}$  以上の孢子形成オーシストは  $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$  個含まれていなければならない。

#### 3.4.7 迷入ウイルス否定試験

試験品を適当と認められた方法で処理したものを試料とする。

一般試験法の迷入ウイルス否定試験法2.1、2.2.1及び2.2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.4.8 安全試験

##### 3.4.8.1 試験材料

##### 3.4.8.1.1 投与材料

試験品を投与材料とする。

##### 3.4.8.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の5日齢の鶏を用いる。

##### 3.4.8.2 試験方法

試験動物の15羽ずつを試験群及び対照群とする。

試験群には投与材料の150羽分を75gの実験動物幼雛用飼料に混合して経口投与し、対照群には75gの実験動物幼雛用飼料のみを投与する。試験開始翌日からは両群とも不断給餌し、共に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し、下式により個体別に増体率を算出した後、群ごとに平均増体率を算出する。

なお、試験動物は試験開始の前夜から約半日間断餌した後使用する。

(試験終了時の体重) - (試験開始時の体重)

$$\text{増体率(\%)} = \frac{\text{試験終了時の体重} - \text{試験開始時の体重}}{\text{試験開始時の体重}} \times 100$$

##### 3.4.8.3 判定

試験期間中、試験群及び対照群に臨床的異常を認めてはならず、試験群の平均増体率は、対照群のその80%以上でなければならない。

#### 3.4.9 力価試験

##### 3.4.9.1 試験材料

##### 3.4.9.1.1 投与材料

試験品を投与材料とする。

##### 3.4.9.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の5日齢の鶏を用いる。

##### 3.4.9.1.3 攻撃オーシスト

強毒のアイメリア・アセルブリナ株、アイメリア・テネラ株及びアイメリア・マキシマ株を用いる。

攻撃オーシスト量は、それぞれ1羽当たり  $4 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5$  及び  $4 \times 10^5$  とする。

##### 3.4.9.2 試験方法

試験動物の30羽を試験群、40羽を対照群とする。

試験群には投与材料の30羽分を150gの実験動物幼雛用飼料に混合して経口投与し、対照群には200gの実験動物幼雛用飼料のみを与える。試験開始翌日からは両群とも不断給餌し、3週間後に両群の10羽ずつにそれぞれの攻撃オーシストを経口投与して攻撃する。対照群の残り10羽は非攻撃対照群とする。

攻撃後臨床観察を行い、試験群と攻撃対照群の各攻撃株に対する死亡数を算出する。また、攻撃日及びアイメリア・アセルブリナ株攻撃群では攻撃後6日目、アイメリア・テネラ株及びアイメリ

ア・マキシマ株攻撃群では攻撃後 7 日目に体重を測定する。下式により個体別に増体率を算出した後、各群ごとに平均増体率を算出する。

$$\text{増体率(\%)} = \frac{(\text{試験終了日の体重}) - (\text{攻撃日の体重})}{(\text{攻撃日の体重})} \times 100$$

#### 3.4.9.3 判定

各攻撃株についてFisherの直接確率計算法により有意水準 5 %で試験群の死亡数が攻撃対照群のそれより有意に少ない場合には、適合とする。

両群間の死亡数に有意差が認められない場合には、平均増体率により評価する。

各攻撃株について試験群の平均増体率は、攻撃対照群のそれを上回らなければならない。この場合、各攻撃株の攻撃対照群における平均増体率は非攻撃対照群のそれよりも有意に低くなければならない (t 検定、有意水準 5 %)。

#### 4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後 1 年 5 か月間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その期間とする。

##### 付記 1 2 w/v%重クロム酸カリウム溶液

重クロム酸カリウム 2 g に水を加えて 100mL としたもの。

##### 付記 2 ソルビン酸加エタノール

100mL 中

ソルビン酸

10.0 g

エタノール

残 量

##### 付記 3 オーシストの鑑別点

アイメリア・アセルブリナ株オーシスト：長径 14.6～21.9 μm、短径 12.2～17.1 μm、無色、オーシスト壁は薄く、卵形から楕円形を示す。

アイメリア・テネラ株オーシスト：長径 19.5～24.4 μm、短径 12.2～17.1 μm、無色、オーシスト壁は比較的厚く卵円形から卵形を示す。

アイメリア・マキシマ株オーシスト：長径 24.4～34.2 μm、短径 19.5～29.3 μm、やや茶褐色味を呈し、オーシスト壁は厚く、卵円形～卵形を示す。

##### 付記 4 鶏貧血ウイルス特異的PCR

鶏貧血ウイルスのカプシドたん白VP-1をコードする遺伝子領域を特異的に検出するPCR法である。

| 改正後                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 改正前                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>ワクチン（シードロット製剤）の部</p> <p><b>狂犬病組織培養不活化ワクチン（シード）</b></p> <p>1（略）<br/>2 製法<br/>2.1・2.2（略）<br/>2.3 原液<br/>2.3.1・2.3.2（略）<br/>2.3.3 精製<br/>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、<u>精製してもよい。</u></p> <p>2.3.4（略）<br/>2.3.5 原液の調整<br/>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、<u>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。</u><br/>原液について、3.5の試験を行う。</p> <p>2.4・2.5（略）<br/>3 試験法<br/>3.1～3.4（略）<br/>3.5 原液の試験<br/>3.5.1（略）<br/><u>（削る）</u></p> <p><u>3.5.2（略）</u><br/><u>3.5.2.1～3.5.2.3（略）</u><br/>3.6 小分製品の試験<br/>3.6.1～3.6.7（略）<br/>3.6.8 力価試験<br/>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。</p> <p>4 貯法及び有効期間</p> | <p>ワクチン（シードロット製剤）の部</p> <p><b>狂犬病組織培養不活化ワクチン（シード）</b></p> <p>1（略）<br/>2 製法<br/>2.1・2.2（略）<br/>2.3 原液<br/>2.3.1・2.3.2（略）<br/>2.3.3 精製<br/>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、<u>精製する。</u></p> <p>2.3.4（略）<br/>2.3.5 原液の調整<br/>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、<u>精製ウイルス浮遊液に適当と認められた保存剤を加え、原液とし、最終バルクで濃度調整を行う。</u><br/>原液について、3.5の試験を行う。</p> <p>2.4・2.5（略）<br/>3 試験法<br/>3.1～3.4（略）<br/>3.5 原液の試験<br/>3.5.1（略）<br/><u>3.5.2 たん白窒素定量試験</u><br/><u>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 μg以下でなければならない。</u></p> <p><u>3.5.3（略）</u><br/><u>3.5.3.1～3.5.3.3（略）</u><br/>3.6 小分製品の試験<br/>3.6.1～3.6.7（略）<br/>3.6.8 力価試験<br/>3.5.3を準用して試験するとき、適合しなければならない。</p> <p>4 貯法及び有効期間</p> |

|                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                          |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>有効期間は、2年間とする。<u>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。</u></p>                                                                                                | <p>有効期間は、2年間とする。</p>                                                                                                                                                     |
| <p>付記1 (略)</p>                                                                                                                                          | <p>付記1 (略)</p>                                                                                                                                                           |
| <p>付記2 細胞増殖用培養液<br/>1,000mL 中<br/>トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g<br/>牛胎子血清又は子牛血清 50 mL<br/>イーグルMEM 残 量<br/>pHを7.1～7.3に調整する。<br/>必要最少量の抗生物質を加えてもよい。</p>        | <p>付記2 細胞増殖用培養液<br/>1,000mL 中<br/>トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g<br/>牛胎子血清又は子牛血清 50 mL<br/>イーグルMEM 残 量<br/><u>炭酸水素ナトリウム</u>でpHを7.1～7.3に調整する。<br/>必要最少量の抗生物質を加えてもよい。</p>        |
| <p>付記3 ウイルス増殖用培養液1<br/>1,000mL 中<br/>トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g<br/>イーグルMEM 残 量<br/>pHを7.4～7.6に調整する。<br/>必要最少量の抗生物質を加えてもよい。</p>                           | <p>付記3 ウイルス増殖用培養液1<br/>1,000mL 中<br/>トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g<br/>イーグルMEM 残 量<br/><u>炭酸水素ナトリウム</u>でpHを7.4～7.6に調整する。<br/>必要最少量の抗生物質を加えてもよい。</p>                           |
| <p>付記4 ウイルス増殖用培養液2<br/>1,000mL 中<br/>ブドウ糖 5 g<br/>L-グルタミン 0.4 g<br/>牛胎子血清又は子牛血清 5～25 mL<br/>イーグルMEM 残 量<br/>pHを7.1～7.3に調整する。<br/>必要最少量の抗生物質を加えてもよい。</p> | <p>付記4 ウイルス増殖用培養液2<br/>1,000mL 中<br/>ブドウ糖 5 g<br/>L-グルタミン 0.4 g<br/>牛胎子血清又は子牛血清 5～25 mL<br/>イーグルMEM 残 量<br/><u>炭酸水素ナトリウム</u>でpHを7.1～7.3に調整する。<br/>必要最少量の抗生物質を加えてもよい。</p> |
| <p>(略)</p>                                                                                                                                              | <p>(略)</p>                                                                                                                                                               |

# 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10月2日(告示第1865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の兎及び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℃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℃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℃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、それぞれ個体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、32～34℃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 $10^{7.0}$ TCID<sub>50</sub>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10LD<sub>50</sub>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1mL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℃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℃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25μL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℃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、TCID<sub>50</sub>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<sup>7.5</sup>TCID<sub>50</sub>以上であり、浮遊培養法の場合には1mL中10<sup>7.0</sup>TCID<sub>50</sub>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36cm<sup>2</sup>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℃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℃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  $\mu$  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  $\mu$  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℃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  $\mu$  Lずつを各穴に入れ、プレートを密閉し、遮光して37℃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  $\mu$  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  $\mu$  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ず、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  $\mu$  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 1 kgの猫を用いる。

#### 3.6.7.2 試験方法

注射材料 5 mLずつを 2 頭の犬に、 2 mL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、2 vol%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 $10^{2.5}$ LD<sub>50</sub>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 $\mu$ Lずつ加えて密閉し、37℃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、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。

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o-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 $\mu$ 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<sup>^</sup>の絶対値が0.49以下及びSPc<sup>^</sup>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）

（下線の部分は改正部分）

| 改正後                                                                                                                                                                                                                                                                        | 改正前                                                                                                                                                                              |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <div>規格</div> <div>シードロット規格</div> <div>1 ～ 3 （略）</div> <div>4 鶏</div> <div>4.1 鶏</div> <div>シードロット製剤の製造に使用するための鶏は、生ワクチン製造用材料 1.1 に準じた SPF 鶏群由来のものでなければならない。<u>ただし、生ワクチン製造用材料の表 1 に掲げる病原体のうち、鶏貧血ウイルスについては、原液を含む製剤の製造の中間工程において迷入が否定される場合は、この限りではない。</u></div> <div>(略)</div> | <div>規格</div> <div>シードロット規格</div> <div>1 ～ 3 （略）</div> <div>4 鶏</div> <div>4.1 鶏</div> <div>シードロット製剤の製造に使用するための鶏は、生ワクチン製造用材料 1.1 に準じた SPF 鶏群由来のものでなければならない。</div> <div>(略)</div> |

# シードロット規格

平成28年 9 月30日（告示第1889 号）一部改正

令和 2 年10 月 2 日（告示第1865号）一部改正

## 1 ワクチンシード

### 1.1 継代数の範囲

マスターシードより製品までの継代数の範囲はウイルスでは5代以内、細菌では10代以内、コクシジウムでは10代以内とする。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。

### 1.2 作製方法

承認された作製方法に従い、均一性及び安定性を確保し汚染を防ぐために、一連の操作で行う。

マスターシードウイルスは、外来性ウイルス否定試験において抗血清で十分中和可能なウイルス濃度で小分けする。

### 1.3 保存

承認された条件下で保存する。

### 1.4 シードの由来並びに規格及び検査方法

#### 1.4.1 由来に関する記録

##### 1.4.1.1 起源

分離方法、分離場所、分離時期、由来動物及び由来動物から分離されたウイルス、細菌等の分離株の性状について記録すること。

また、分与を受けた（又は購入した）ものである場合には、分与元（又は購入先）及び分与（又は購入）時期についても記録する。

遺伝子組換え技術を利用して作製した場合には、遺伝子組換え微生物の特性（宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報、供与核酸に関する情報、ベクターに関する情報、遺伝子組換え微生物の調整方法、遺伝子組換え微生物の識別の方法、宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違等）について記録する。

##### 1.4.1.2 継代歴

分離後の継代について、用いた動物、培養細胞、培地類、クローニング及び弱毒化の方法等について記録すること。また、分与を受けたものである場合には、分与以前及びそれ以降の継代等の過程について記録する。

#### 1.4.2 規格及び検査方法

##### 1.4.2.1 生ウイルスワクチン

###### 1.4.2.1.1 マスターシードウイルス

###### 1.4.2.1.1.1 同定試験

1.4.2.1.1.1.1又は1.4.2.1.1.1.2の試験法を用いる。

###### 1.4.2.1.1.1.1 蛍光抗体試験

検体を接種した培養細胞及び無接種の培養細胞について蛍光標識抗体で細胞を染色し、検体を接種した細胞ではそのウイルスに特徴的な蛍光が認められ、無接種細胞では認められてはならない。

###### 1.4.2.1.1.1.2 血清中和試験

検体を適当な培養細胞を用いて増殖させるとき、ウイルスに特有な細胞変性等を示さなければならず、その増殖は、特異抗血清によって中和されなければならない。

###### 1.4.2.1.1.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験をするとき、適合しなければならない。

###### 1.4.2.1.1.3 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をするとき、適合しなければならない。

#### 1.4.2.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

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

#### 1.4.2.1.1.5 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によって試験をするとき、適合しなければならない。

#### 1.4.2.1.1.6 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によって試験をするとき、適合しなければならない。

#### 1.4.2.1.1.7 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によって試験をするとき、適合しなければならない。

#### 1.4.2.1.1.8 組換え遺伝子等安定性確認試験

当該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をするとき、適合しなければならない。

#### 1.4.2.1.2 ワーキングシードウイルス

##### 1.4.2.1.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験をするとき、適合しなければならない。

##### 1.4.2.1.2.2 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をするとき、適合しなければならない。

#### 1.4.2.1.3 プロダクションシードウイルス

貯蔵するものについて次の試験を行う。

##### 1.4.2.1.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験をするとき、適合しなければならない。

##### 1.4.2.1.3.2 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をするとき、適合しなければならない。

#### 1.4.2.2 生菌ワクチン

##### 1.4.2.2.1 マスターシード菌

###### 1.4.2.2.1.1 同定試験

適当な形態学的性状試験法、生化学的性状試験法その他の承認された試験法によって菌種同定のための試験を実施するとき、適合しなければならない。

###### 1.4.2.2.1.2 夾雑菌否定試験

ワクチン（シードロット製剤）の部で規定された試験方法によって試験をするとき、適合しなければならない。試験方法がワクチン（シードロット製剤）の部で規定されていない場合は、承認された試験方法に準じる。

###### 1.4.2.2.1.3 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によって試験をするとき、適合しなければならない。

###### 1.4.2.2.1.4 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によって試験をするとき、適合しなければならない。

###### 1.4.2.2.1.5 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によって試験をするとき、適合しなければならない。

###### 1.4.2.2.1.6 組換え遺伝子等安定性確認試験

当該マスターシード菌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をするとき、適合しなければならない。

##### 1.4.2.2.2 ワーキングシード菌

###### 1.4.2.2.2.1 夾雑菌否定試験

ワクチン（シードロット製剤）の部で規定された試験方法によって試験するとき、適合しなければならない。試験方法がワクチン（シードロット製剤）の部で規定されていない場合は、承認された試験方法に準じる。

#### 1.4.2.2.3 プロダクションシード菌

貯蔵するものについて次の試験を行う。

##### 1.4.2.2.3.1 夾雑菌否定試験

ワクチン（シードロット製剤）の部で規定された試験方法によって試験するとき、適合しなければならない。試験方法がワクチン（シードロット製剤）の部で規定されていない場合は、承認された試験方法に準じる。

#### 1.4.2.3 不活化ウイルスワクチン

##### 1.4.2.3.1 マスターシードウイルス

###### 1.4.2.3.1.1 同定試験

1.4.2.3.1.1.1 又は1.4.2.3.1.1.2の試験法を用いる。

###### 1.4.2.3.1.1.1 蛍光抗体試験

検体を接種した培養細胞及び無接種の培養細胞について蛍光標識抗体で細胞を染色するとき、検体を接種した細胞ではそのウイルスに特徴的な蛍光が認められ、無接種細胞では認められてはならない。

###### 1.4.2.3.1.1.2 血清中和試験

検体を適当な培養細胞を用いて増殖させるとき、ウイルスに特有な細胞変性等を示さなければならない。その増殖は、特異抗血清によって中和されなければならない。

###### 1.4.2.3.1.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験をするとき、適合しなければならない。

###### 1.4.2.3.1.3 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をするとき、適合しなければならない。

###### 1.4.2.3.1.4 外来性ウイルス否定試験

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

###### 1.4.2.3.1.5 組換え遺伝子等安定性確認試験

当該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をするとき、適合しなければならない。

##### 1.4.2.3.2 ワーキングシードウイルス

###### 1.4.2.3.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験をするとき、適合しなければならない。

###### 1.4.2.3.2.2 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をするとき、適合しなければならない。

#### 1.4.2.3.3 プロダクションシードウイルス

貯蔵するものについて次の試験を行う。

##### 1.4.2.3.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験をするとき、適合しなければならない。

##### 1.4.2.3.3.2 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をするとき、適合しなければならない。

#### 1.4.2.4 不活化細菌ワクチン

##### 1.4.2.4.1 マスターシード菌

###### 1.4.2.4.1.1 同定試験

適当な形態学的性状試験法、生化学的性状試験法その他の承認された試験法によって菌種同定のための試験を実施するとき、適合しなければならない。

#### 1.4.2.4.1.2 夾雑菌否定試験

ワクチン（シードロット製剤）の部で規定された試験方法によって試験するとき、適合しなければならない。試験方法がワクチン（シードロット製剤）の部で規定されていない場合は、承認された試験方法に準じる。

#### 1.4.2.4.1.3 組換え遺伝子等安定性確認試験

当該マスターシード菌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をするとき、適合しなければならない。

#### 1.4.2.4.2 ワーキングシード菌

##### 1.4.2.4.2.1 夾雑菌否定試験

ワクチン（シードロット製剤）の部で規定された試験方法によって試験するとき、適合しなければならない。試験方法がワクチン（シードロット製剤）の部で規定されていない場合は、承認された試験方法に準じる。

#### 1.4.2.4.3 プロダクションシード菌

貯蔵するものについて次の試験を行う。

##### 1.4.2.4.3.1 夾雑菌否定試験

ワクチン（シードロット製剤）の部で規定された試験方法によって試験するとき、適合しなければならない。試験方法がワクチン（シードロット製剤）の部で規定されていない場合は、承認された試験方法に準じる。

#### 1.4.2.5 遺伝子組換えたん白ワクチン

##### 1.4.2.5.1 遺伝子組換えウイルスによる発現系

###### 1.4.2.5.1.1 マスターシードウイルス

###### 1.4.2.5.1.1.1 同定試験

1.4.2.1.1.1を準用して試験をするとき、適合しなければならない。

###### 1.4.2.5.1.1.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験をするとき、適合しなければならない。

###### 1.4.2.5.1.1.3 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をするとき、適合しなければならない。

###### 1.4.2.5.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

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

###### 1.4.2.5.1.1.5 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をするとき、適合しなければならない。

###### 1.4.2.5.1.2 ワーキングシードウイルス

###### 1.4.2.5.1.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験をするとき、適合しなければならない。

###### 1.4.2.5.1.2.2 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をするとき、適合しなければならない。

###### 1.4.2.5.1.3 プロダクションシードウイルス

貯蔵するものについて次の試験を行う。

###### 1.4.2.5.1.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験をするとき、適合しなければならない。

###### 1.4.2.5.1.3.2 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をするとき、適合しなければならない。

##### 1.4.2.5.2 遺伝子組換え細菌による発現系

###### 1.4.2.5.2.1 マスターシード菌

#### 1.4.2.5.2.1.1 同定試験

適当な形態学的性状試験法、生化学的性状試験法その他の承認された試験法によって菌種同定のための試験を実施するとき、適合しなければならない。

#### 1.4.2.5.2.1.2 夾雑菌否定試験

ワクチン（シードロット製剤）の部で規定された試験方法によって試験するとき、適合しなければならない。試験方法がワクチン（シードロット製剤）の部で規定されていない場合は、承認された試験方法に準じる。

#### 1.4.2.5.2.1.3 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をするとき、適合しなければならない。

#### 1.4.2.5.2.2 ワーキングシード菌

##### 1.4.2.5.2.2.1 夾雑菌否定試験

ワクチン（シードロット製剤）の部で規定された試験方法によって試験するとき、適合しなければならない。試験方法がワクチン（シードロット製剤）の部で規定されていない場合は、承認された試験方法に準じる。

##### 1.4.2.5.2.3 プロダクションシード菌

貯蔵するものについて次の試験を行う。

##### 1.4.2.5.2.3.1 夾雑菌否定試験

ワクチン（シードロット製剤）の部で規定された試験方法によって試験するとき、適合しなければならない。試験方法がワクチン（シードロット製剤）の部で規定されていない場合は、承認された試験方法に準じる。

#### 1.4.2.6 生コクシジウムワクチン

##### 1.4.2.6.1 マスターシードコクシジウム

##### 1.4.2.6.1.1 同定試験

適当な形態学的性状試験法、PCR検査法、酵素電気泳動法その他の承認された試験法によってそのコクシジウム同定のための試験を実施するとき、適合しなければならない。

##### 1.4.2.6.1.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験をするとき、適合しなければならない。

##### 1.4.2.6.1.3 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をするとき、適合しなければならない。

##### 1.4.2.6.1.4 外来性ウイルス否定試験

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

##### 1.4.2.6.1.5 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によって試験するとき、適合しなければならない。

##### 1.4.2.6.1.6 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によって試験するとき、適合しなければならない。

##### 1.4.2.6.1.7 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によって試験するとき、適合しなければならない。

##### 1.4.2.6.2 ワーキングシードコクシジウム

##### 1.4.2.6.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験をするとき、適合しなければならない。

##### 1.4.2.6.2.2 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をするとき、適合しなければならない。

##### 1.4.2.6.3 プロダクションシードコクシジウム

貯蔵するものについて次の試験を行う。

#### 1.4.2.6.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験をするとき、適合しなければならない。

#### 1.4.2.6.3.2 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をするとき、適合しなければならない。

### 2 セルシード

#### 2.1 株化細胞

##### 2.1.1 継代数の範囲

マスターセルシードよりプロダクションセルシードまで20代以内とする。

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。ただし、製造用細胞としての適性を保証する試験成績によって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 作製方法

承認された作製方法に従い、一連の工程を経て1回で作製された細胞浮遊液は均質性の確保及び汚染の防止に配慮し、連続する操作により分注されなければならない。

##### 2.1.3 保存

承認された条件下で保存する。

##### 2.1.4 セルシードの由来並びに規格及び検査方法

###### 2.1.4.1 由来に関する記録

###### 2.1.4.1.1 起源

起源となった動物及び臓器名、樹立の経緯（継代、クローニング、樹立者、時期）について可能な範囲で記録する。

###### 2.1.4.1.2 継代歴

樹立後及び分与受け（又は購入）後の継代歴、クローニング等について記録する。

###### 2.1.4.1.3 培養液

継代、増殖、保存用培養液について記録する。

###### 2.1.4.2 規格及び検査方法

###### 2.1.4.2.1 マスターセルシード

###### 2.1.4.2.1.1 培養性状試験

顕微鏡下における所見、増殖率、酸の産生、形態的特徴、その他株化細胞として正常と判定されるための特徴について観察するとき、適合しなければならない。

###### 2.1.4.2.1.2 起源動物種同定試験

蛍光抗体法で試験するとき、2.1.4.1.1 起源の項で記録された「起源となった動物」の種と一致しなければならない。

###### 2.1.4.2.1.3 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験をするとき、適合しなければならない。

###### 2.1.4.2.1.4 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をするとき、適合しなければならない。

###### 2.1.4.2.1.5 外来性ウイルス否定試験

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

###### 2.1.4.2.1.6 核学的（染色体）性状試験

次のいずれかの試験法によって試験するとき、適合しなければならない。

###### 2.1.4.2.1.6.1 マスターセルシード及びその最高継代数の細胞の試験

マスターセルシード及びその最高継代数の細胞のそれぞれについて、次の試験を行う。

細胞分裂している50個以上の細胞について染色体を検査するとき、最高継代数の細胞におけるモ

ダル数（最頻染色体数）はマスターセルシードにおけるその $\pm 15\%$ 以内でなければならない。また、マスターセルシードに存在するすべての指標染色体は最高継代数の細胞においても認められなければならない。

#### 2.1.4.2.1.6.2 継代培養細胞の試験

マスターセルシードを継代培養し、シードロット製剤の製造に使用する継代数又はそれ以上継代された4検体以上の細胞について2.1.4.2.1.6.2.1、2.1.4.2.1.6.2.2、2.1.4.2.1.6.2.3、2.1.4.2.1.6.2.4及び2.1.4.2.1.6.2.5の試験をするとき、4検体すべてにおいてマスターセルシードと差が認められないとき、適合とする。

##### 2.1.4.2.1.6.2.1 多倍数性の試験

4検体で計300個以上の細胞について多倍数性を試験する。

##### 2.1.4.2.1.6.2.2 異数性の試験

4検体で計100個以上の細胞について異数性を試験する。

##### 2.1.4.2.1.6.2.3 形態異常の試験

4検体で計100個以上の細胞について染色体の形態異常を試験する。

##### 2.1.4.2.1.6.2.4 染色体の切断の試験

4検体で計100個以上の細胞について染色体の切断の有無を試験する。

##### 2.1.4.2.1.6.2.5 核型分析の試験

4検体のうち、いずれか1検体中の1細胞について核型分析の試験をする。

#### 2.1.4.2.1.7 腫瘍形成性／腫瘍原性試験

当該株化細胞が製造用細胞として用いられたシードロット製剤の対象動物種に対して悪性腫瘍を誘発することが疑われる知見のある場合には、マスターセルシードを継代培養し、シードロット製剤の製造に使用する継代数、又はそれ以上継代された4検体以上の細胞について、次の試験法によって試験するとき、適合しなければならない。

試験には、細胞性免疫能の欠損したマウス（nu/nu）又は免疫抑制したマウスあるいはハムスターを用いる。動物5匹以上に1匹当たり、 $2 \times 10^6$ 個以上の細胞を皮下に注射して、28日間観察する。この間、いずれの動物も腫瘍の形成を認めてはならない。また、対照として造腫瘍性の認められるHeLa細胞を同様の動物5匹以上に1匹当たり、 $2 \times 10^6$ 個以上注射して、28日間観察するとき、80%以上の動物に造腫瘍性を認めなければならない。

#### 2.1.4.2.2 ワーキングセルシード

##### 2.1.4.2.2.1 培養性状試験

顕微鏡下における所見、増殖率、酸の産生、形態的特徴、その他株化細胞として正常と判定されるための特徴について観察するとき、適合しなければならない。

##### 2.1.4.2.2.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験をするとき、適合しなければならない。

##### 2.1.4.2.2.3 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をするとき、適合しなければならない。

#### 2.1.4.2.3 プロダクションセルシード

貯蔵するものについて次の試験を行う。

##### 2.1.4.2.3.1 培養性状試験

顕微鏡下における所見、増殖率、酸の産生、形態的特徴、その他株化細胞として正常と判定されるための特徴について観察するとき、適合しなければならない。

##### 2.1.4.2.3.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験をするとき、適合しなければならない。

##### 2.1.4.2.3.3 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をするとき、適合しなければならない。

## 2.2 初代細胞

### 2.2.1 使用の条件

シードロット製剤の製造には、株化細胞を使用する。ただし、2.2.4規格及び検査方法に適合する初代細胞であれば、その限りでない。

### 2.2.2 継代数の範囲

動物体内より採取された細胞からプロダクションプライマリーセルシードまでの継代は10代以内とする。ただし、製造用細胞としての適性を保証する試験成績によって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。

### 2.2.3 保存

承認された条件下で保存する。

### 2.2.4 規格及び検査方法

#### 2.2.4.1 初代細胞が採取される動物

SPF動物規格に適合しなければならない。

#### 2.2.4.2 初代細胞の規格及び検査方法

##### 2.2.4.2.1 マスタープライマリーセルシード

###### 2.2.4.2.1.1 培養性状試験

顕微鏡下における所見、増殖率、酸の産生、形態的特徴、その他初代細胞として正常と判定されるための特徴について観察するとき、適合しなければならない。

###### 2.2.4.2.1.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験をするとき、適合しなければならない。

###### 2.2.4.2.1.3 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をするとき、適合しなければならない。

##### 2.2.4.2.2 ワーキングプライマリーセルシード

###### 2.2.4.2.2.1 培養性状試験

顕微鏡下における所見、増殖率、酸の産生、形態的特徴、その他初代細胞として正常と判定されるための特徴について観察するとき、適合しなければならない。

###### 2.2.4.2.2.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験をするとき、適合しなければならない。

###### 2.2.4.2.2.3 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をするとき、適合しなければならない。

##### 2.2.4.2.3 プロダクションプライマリーセルシード

貯蔵するものについて次の試験を行う。

###### 2.2.4.2.3.1 培養性状試験

ワクチン（シードロット製剤）の部に規定される製造用細胞の培養観察を準用して行うとき、適合しなければならない。試験方法がワクチン（シードロット製剤）の部で規定されていない場合は、承認された試験方法に準じる。

###### 2.2.4.2.3.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験をするとき、適合しなければならない。

###### 2.2.4.2.3.3 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をするとき、適合しなければならない。

## 3 発育卵

### 3.1 発育卵が採取される動物

SPF動物規格に適合しなければならない。

### 3.2 発育卵の規格及び検査方法

#### 3.2.1 孵卵性状試験

対照発育卵を、ワクチンシードを接種することなく、ワクチンシードの培養と同じ条件で培養し、観察するとき、胚に異常を認めてはならない。

#### 4 鶏

##### 4.1 鶏

シードロット製剤の製造に使用するための鶏は、生ワクチン製造用材料1.1に準じたSPF鶏群由来のものでなければならない。ただし、生ワクチン製造用材料の表1に掲げる病原体のうち、鶏貧血ウイルスについては、原液を含む製剤の製造の中間工程において迷入が否定される場合は、この限りではない。

##### 4.2 鶏の規格及び検査方法

###### 4.2.1 発育試験

対照鶏を、ワクチンシードを接種することなく、ワクチンシードの作製時と同じ条件で飼育し、観察するとき、異常を認めてはならない。

#### 5 その他の材料

培地、消化液その他各シードを製造又は維持するために必要な材料については、微生物や異物が迷入していないものを使用する。