

豚サーコウイルス（２型）感染症（１型－２型キメラ） （デキストリン誘導体アジュバント加）不活化ワクチン

平成29年11月 7 日（告示第1701号） 新規追加

令和元年 8 月26日（告示第723号） 一部改正

1 定義

組換えDNA技術を応用して製造された豚サーコウイルス 1 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「PCV1ORF2」という。）遺伝子を 2 型ウイルスのORF2に置換したウイルス（以下この項において「cPCV1-2」という。）を培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化し、デキストリン誘導体アジュバントを添加したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

1 型-2 型キメラ豚サーコウイルスcPCV1-2株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

1 型-2 型キメラ豚サーコウイルス特異的PCRにより同定される。豚サーコウイルス 2 型カプシドたん白を発現する。豚に接種してもウイルス血症を起こさない。

2.1.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、PK-15細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

原株の継代は、種ウイルスの製造又は原株の恒久的な維持以外の目的で行ってはならない。種ウイルスは直接原株から連続した工程により製造し、その継代数は 5 代以内でなければならない。

原株及び種ウイルスは、凍結して-50℃以下又は凍結乾燥して 7℃以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 培養細胞

PK-15細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.3 原液

2.3.1 細胞の培養

1 回に処理し、培養した細胞を個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

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの培養極期に培養液を採取しウイルス培養液とする。

ウイルス培養液について、3.1の試験を行う。

2.3.3 ウイルスの不活化

ウイルス培養液を濃縮し、適当と認められた不活化剤を加えて攪拌し不活化した後に、中和剤を加えて中和し、水素イオン濃度を調整したものを原液とする。

原液について、3.2の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液に、適量のアジュバント、保存剤及び溶剤を添加し、最終バルクとする。

2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。

小分製品について、3.3の試験を行う。

3 試験法

3.1 ウイルス培養液の試験

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

3.2 原液の試験

3.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験法によるものとする。

3.2.2 不活化試験

3.2.2.1 試験材料

3.2.2.1.1 試料

検体10mLを試料とする。

3.2.2.1.2 培養細胞

NLST-1細胞を150cm²培養フラスコで培養し、単層になったものを用いる。

3.2.2.2 試験方法

3.2.2.2.1 培養

培養細胞に試料10mLを接種する。cPCV1-2ウイルス浮遊液10mLを接種したものを陽性対照とし、非接種培養細胞を陰性対照とする。接種後、各フラスコを36±2℃で4～6日間培養する。接種後2日目に培地交換を行ってもよい。培養後拡張継代し、36±2℃で4～6日間培養する。拡張継代は5回行う。5代目の拡張継代時に48穴プレートに試験品、陽性対照、あるいは陰性対照ごとに6穴ずつ継代し、36±2℃、4～6 vol%炭酸ガス下で4～6日間培養する。

3.2.2.2.2 間接蛍光抗体反応

48穴プレートに培養した培養細胞をアセトンで固定後、リン酸緩衝食塩液A（付記1）で希釈した検出抗体（付記2）を各穴に加え、15～30℃で60～90分間感作させる。精製水で3回以上洗浄し、リン酸緩衝食塩液Aで希釈した二次抗体A（付記3）を各穴に加え、15～30℃で60～90分間感作させる。精製水で3回以上洗浄し、蛍光顕微鏡下で観察する。

3.2.2.3 判定

培養細胞に特異蛍光抗原を認めてはならない。

3.2.3 ウイルス抗原含有量試験

3.2.3.1 試験材料

参照ワクチン（付記4）、プラセボワクチン（付記5）及び検体をリン酸緩衝食塩液B（付記6）で希釈し、超音波処理後、検体処理液（付記7）をポリソルベート20の最終濃度が0.3vol%となるように添加したものをそれぞれ処理参照ワクチン、処理プラセボワクチン及び処理検体とする。

3.2.3.2 試験方法

3.2.3.2.1 固相化プレートの作製

捕獲抗体（付記8）を吸着用緩衝液（付記9）で希釈し、100μLずつ96穴ELISAプレートに分注し、2～7℃で16時間以上静置する。洗浄・希釈液（付記10）で洗浄し、ブロッキング液（付記11）を200μLずつ加え、37±2℃で60±5分間反応させる。このプレートを洗浄・希釈液で洗浄し、固相化プレートとする。

3.2.3.2.2 ELISA

処理参照ワクチン及び処理検体を洗浄・希釈液で階段希釈したものと処理プラセボワクチンを固相化プレートの各穴に100μLずつ移し、37±2℃で16±2時間振とうする。洗浄・希釈液で4回洗浄後、抗体希釈用緩衝液（付記12）で希釈した検出抗体を各穴に100μLずつ加え、37±2℃で60±5分間反応させる。洗浄・希釈液で洗浄後、2 vol%正常兔血清加希釈液（付記13）で希釈した二次抗体B（付記

14) を100 μ Lずつ分注し37 $\pm$ 2 $^{\circ}$ Cで60 $\pm$ 5分間反応させる。洗浄・希釈液で4回洗浄後、基質液（付記15）を各穴に100 μ Lずつ分注し、37 $\pm$ 2 $^{\circ}$ Cで20 $\pm$ 2分間反応させる。プラセボワクチンをブランクとして、主波長650nm、副波長490nmで吸光度を測定する。

3.2.3.3 判定

相対力価（Relative Potency。以下この項において「RP」という。）の計算法（付記16）により参照ワクチンに対するRPを算出する。

原液のRPは0.7以上でなければならない。

試験成立条件として、処理参照ワクチン及び処理プラセボワクチンの吸光度は、それぞれ1.4～2.0及び0.1以下でなければならない。

3.3 小分製品の試験

3.3.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、静置の状態では浮遊物又はその沈殿物が認められる場合があるが、混和後は乳桃色から乳白色の不透明な液体で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。

3.3.2 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、これに適合しなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験法によるものとする。

3.3.3 チメロサル定量試験

一般試験法のチメロサル定量法を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験法によるものとする。

3.3.4 安全試験

3.3.4.1 試験材料

3.3.4.1.1 注射材料

試験品を用いる。

3.3.4.1.2 試験動物

3～5週齢の豚を用いる。

3.3.4.2 試験方法

注射材料を試験動物2頭の頸部筋肉内に左右1用量ずつ計2用量を注射し、21日間観察する。

3.3.4.3 判定

観察期間中、注射数日後より認められる場合のある腫脹、硬結、一過性の体温の上昇を除き臨床的な異常が認められてはならない。また、腫脹及び硬結は観察期間中に無視しうる程度にならなければならない。

3.3.5 不活化試験

3.3.5.1 試験材料

3.3.5.1.1 試料

1,000mL以上の透析・吸着用液（付記17）を用い、検体12mLを2～7 $^{\circ}$ Cで24 $\pm$ 4時間透析したものを試料とする。

3.3.5.1.2 培養細胞

NLST-1細胞を増殖用培養液（付記18）に浮遊させ、150cm²培養フラスコで培養し、単層となったものを用いる。

3.3.5.2 試験方法

3.3.5.2.1 試料の接種及び継代

培養細胞に透析・吸着用液を10mL加えた後、試料10mLを接種し、吸着後、透析・吸着用液で洗浄する。増殖用培養液で36 $\pm$ 2 $^{\circ}$ Cで4～6日間又は培養細胞が単層形成するまで培養する。培養後、リン酸緩衝食塩液Aで洗浄した後、拡張継代し、36 $\pm$ 2 $^{\circ}$ Cで4～6日間又は培養細胞が単層形成するま

で培養する。拡張継代は4回行う。4回目の拡張継代時にチャンバースライドに継代し、 $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、 $4\sim 6\text{ vol\%}$ 炭酸ガス下で4～6日間培養する。

3.3.5.2.2 間接蛍光抗体反応

チャンバースライドに培養した培養細胞をアセトンで固定後、リン酸緩衝食塩液Aで希釈した検出抗体を各穴に加え、 $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ で30分間以上反応させる。リン酸緩衝食塩液Aで洗浄し、リン酸緩衝食塩液Aで希釈した二次抗体Aを各穴に加え、 $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ で30分間以上反応させる。リン酸緩衝食塩液Aで洗浄し、蛍光顕微鏡下で観察する。

3.3.5.3 判定

培養細胞に特異蛍光抗原を認めてはならない。

3.3.6 力価試験

3.2.3を準用して試験するとき、試験品のRPは1.0以上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3か月間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その期間とする。

付記1 リン酸緩衝食塩液A

1,000mL中	
塩化ナトリウム	8.5 g
無水リン酸水素二ナトリウム	0.22 g
無水リン酸二水素ナトリウム	1.19 g
水	残量
pHを7.1～7.5に調整する。	

付記2 検出抗体

cPCV1-2に対する中和活性のあるモノクローナル抗体

付記3 二次抗体A

マウスIgGで免疫した山羊の血清を精製し、フルオレセインイソチオシアネートで標識したものの。

付記4 参照ワクチン

豚サーコウイルス（2型）感染症（1型－2型キメラ）（デキストリン誘導体アジュバント加）不活化ワクチン（以下この項において「ワクチン」という。）で、動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

付記5 プラセボワクチン

ウイルスを接種しないでワクチンの製造方法で製造されたもの。

付記6 リン酸緩衝食塩液B

1,000mL中	
塩化ナトリウム	8.5 g
無水リン酸二水素ナトリウム	0.253 g
無水リン酸水素二ナトリウム	1.19 g
水	残量
pHを7.1～7.3に調整する。	

付記7 検体処理液

1,000mL中

ポリソルベート20

180mL

リン酸緩衝食塩液B（付記6）

残量

15～30℃で保存する。

付記8 捕獲抗体

豚サーコウイルス2型抗原で免疫して得た兔血清を、3.2.3ウイルス抗原含有量試験を準用して試験したとき、処理参照ワクチンの吸光度が1.4～2.0を示すように吸着用緩衝液（付記9）で希釈したもの。

付記9 吸着用緩衝液

1,000mL中

炭酸ナトリウム

1.59g

炭酸水素ナトリウム

2.93g

水

残量

pHを7.1～7.3に調整する。

付記10 洗浄・希釈液

リン酸緩衝食塩液にポリソルベート20を0.3vol%となるように加えたもの。

付記11 ブロッキング液

吸着用緩衝液に脱脂粉乳を1.15w/v%となるように加えたもの。

付記12 抗体希釈用緩衝液

洗浄・希釈液に脱脂粉乳を1.15w/v%となるように加えたもの。

付記13 2 vol%正常兔血清加希釈液

抗体希釈用緩衝液に兔正常血清を2 vol%となるように加えたもの。

付記14 二次抗体B

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15 基質液

A液：テトラメチルベンチジン0.4gを26vol%N,N-ジメチルホルムアミド1,000mLで溶解したもの。

B液：0.02w/v%過酸化水素溶液

使用時にA液とB液を等量混合して用いる。

付記16 RPの計算法

動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

付記17 透析・吸着用液

1,000mL中

ラクトアルブミン水解物	5.0g以下
Opti MEM（付記19）	残量

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記18 増殖用培養液

1,000mL中	
ラクトアルブミン水解物	5.0g以下
牛胎子血清	20～50mL
Opti MEM	残量

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記19 Opti MEM

添加血清を減じた最少必須培地で、市販の適当な品質のものを用いる。

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

平成24年３月13日（告示第 675号）新規追加
令和元年 8 月26日（告示第723号）一部改正

1 定義

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、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）を可溶化したもの及びマイコプラズマ・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 継代及び保存

原株及び種菌は、チョコレート寒天培地（付記１）又は適当と認められた寒天培地で継代する。

継代は、原株にあつては３代以内、種菌にあつては５代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して－60℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

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 継代及び保存

原株及び種菌は、チョコレート寒天培地又は適当と認められた寒天培地で継代する。

継代は、原株にあつては３代以内、種菌にあつては５代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して－60℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

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 継代及び保存

原株及び種菌は、チョコレート寒天培地又は適当と認められた寒天培地で継代する。

継代は、原株にあつては３代以内、種菌にあつては５代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して－60℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

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、App 41-1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「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 継代及び保存

原株及び種菌は、LB-Amp寒天培地（付記2）又は適当と認められた寒天培地で継代する。

継代は、原株にあつては3代以内、種菌にあつては5代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して-60℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

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 継代及び保存

原株及び種菌は、LB-Amp寒天培地又は適当と認められた寒天培地で継代する。

継代は、原株にあつては3代以内、種菌にあつては5代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して-60℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

2.1.6 rApx III 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apx III 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、rApx III 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 継代及び保存

原株及び種菌は、LB-Amp寒天培地又は適当と認められた寒天培地で継代する。

継代は、原株にあつては3代以内、種菌にあつては5代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して-60℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

2.1.7 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ

2.1.7.1 名称

マイコプラズマ・ハイオニューモニエMI-3株又はこれと同等と認められた株

2.1.7.2 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。

2.1.7.3 継代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた液状培地で継代する。

継代は、原株では3代以内、種菌では5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。

原株及び種菌は、凍結して-60℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 培地

2.2.1.1 App 1、2 及び 5 型菌

製造に相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

製造に相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 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ

製造に相当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 App 1、2 及び 5 型菌

2.3.1.1 培養

App各株の種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、3.1.1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相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、リン酸緩衝食塩液に均一に浮遊し、チメロサル又は相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、3.2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、チメロサル又は相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、3.5.1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種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、3.1.2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、3.3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約1/100量の相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、相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、3.4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約1/250量の滅菌蒸留水に浮遊する。

これに、相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、3.5.1、3.5.2及び3.5.3の試験を行う。

2.3.3 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ

2.3.3.1 培養

種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、3.1.3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、3.5.1及び3.5.4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整する。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、リン酸緩衝食塩液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、元の量と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 マイコプラズマ・ハイオニューモニエバルク

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整する。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、マイコプラズマ・ハイオニューモニエバルクとする。

2.4.4 最終バルク

rApxバルク、3株のAppバルク及びマイコプラズマ・ハイオニューモニエ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3.6の試験を行う。

3 試験法

3.1 培養菌液の試験

3.1.1 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。

3.1.2 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、大腸菌以外の発育を認めてはならない。

3.1.3 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ培養菌液の試験

3.1.3.1 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.3.2 同定試験

3.1.3.2.1 試験材料

検体又は検体をトリプトース・ホスフェイト・ブロスで 10^{-2} まで10倍階段希釈したものを試料とする。

3.1.3.2.2 試験方法

BHL寒天培地（付記3）及び抗マイコプラズマ・ハイオニューモニエ免疫血清（付記4）を染み込ませたる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5）を実施する。試料を接種した培地を37℃で14日間、微好氣的に培養する。

3.1.3.2.3 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。

3.1.3.3 総菌数試験

3.1.3.3.1 試験材料

検体を遠心し、得られた沈渣を適当量のリン酸緩衝食塩液（付記 6）に浮遊したものを試料とする。

3.1.3.3.2 試験方法

分光光度計を用い、試料の吸光度を測定する。

3.1.3.3.3 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 1.4×10^8 個以上でなければならない。

3.2 不活化菌液の試験

3.2.1 不活化試験

3.2.1.1 試験材料

検体及び製造に相当と認められた培地を用いる。

3.2.1.2 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。

3.2.1.3 判定

菌の発育を認めてはならない。

3.2.2 総菌数試験

3.2.2.1 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。

3.2.2.2 試験方法

試料の吸光度を分光光度計で測定する。

3.2.2.3 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 3×10^{10} 個以上でなければならない。

3.3 発現菌液の試験

3.3.1 発現たん白確認試験

3.3.1.1 試験材料

検体50 μ Lに等量のサンプルバッファー（付記 7）を加え、3 分間煮沸したものを試料とする。

3.3.1.2 試験方法

試料の10 μ 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。

3.3.1.3 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。

3.4 組換え大腸菌各株の破碎菌液の試験

3.4.1 破碎確認試験

3.4.1.1 試験材料

検体を用いる。

3.4.1.2 試験方法

検体0.01mLをスライド・ガラス上に 1 cm²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。

3.4.1.3 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。

3.5 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 同定試験

3.5.2.1 試験材料

検体を水によりたん白量 $300\mu\text{g/mL}$ となるように希釈し、その $50\mu\text{L}$ に等量のサンプルバッファーを加え、3分間煮沸したものを、試料とする。

3.5.2.2 試験方法

3.3.1.2を準用して試験する。

3.5.2.3 判定

rAp α I 及びrAp α II たん白の試料には分子量約105kDaの位置に、rAp α 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。

3.5.3 たん白定量試験

3.5.3.1 試験材料

検体を $20\sim 200\mu\text{g/mL}$ となるように2倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.5.3.2 試験方法

各試料をLowry法により測定し、検体1 mL中のたん白量を算出する。

3.5.3.3 判定

各検体のたん白量は、1 mL中10mg以上でなければならない。

3.5.4 不活化試験

3.5.4.1 試料

検体を用いる。

3.5.4.2 試験方法

BHL培地（付記8）に試料を接種し、 37°C 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°C で14日間微好氣的に培養して、マイコプラズマ・ハイオニューモニエの発育の有無を調べる。

3.5.4.3 判定

マイコプラズマ・ハイオニューモニエの発育を認めてはならない。

3.6 小分製品の試験

3.6.1 特性試験

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

3.6.2 pH測定試験

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

3.6.3 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.6.4 チメロサル定量試験

一般試験法のチメロサル定量法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.6.5 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。

3.6.6 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。

3.6.7 毒性限度確認試験

一般試験法の毒性限度確認試験法1により試験を行い、これに適合しなければならない。ただし、

体重測定は、4日目に行うものとする。

3.6.8 力価試験

3.6.8.1 豚App 感染症力価試験

3.6.8.1.1 試験材料

3.6.8.1.1.1 注射材料

試験品を希釈用液（付記9）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。

3.6.8.1.1.2 試験動物

約3週齢のマウスを用いる。

3.6.8.1.1.3 攻撃用菌液

凍結乾燥したApp 1型菌1H-7株又は適当と認められた株、App 2型菌SH-15株又は適当と認められた株及びApp 5型菌KN-1株又は適当と認められた株をそれぞれハートインフュージョン培地で溶解し、試験用培地1（付記10）に移植し、37℃で16時間増殖させ、集落を釣菌して試験用培地2（付記11）に移植し、37℃で3～6時間振とう培養したものを各攻撃用菌液とする。

3.6.8.1.2 試験方法

試験動物90匹以上を試験群、90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2週目に、試験群及び対照群をそれぞれ10匹ずつの3群計6群に分ける。1型菌株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。

また同様に、注射後2週目に、試験群及び対照群をそれぞれ10匹ずつの3群計6群に分ける。2型菌株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。

また同様に、注射後2週目に、試験群及び対照群をそれぞれ10匹ずつの3群計6群に分ける。5型菌株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。

3.6.8.1.3 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。

3.6.8.2 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症力価試験

3.6.8.2.1 試験材料

3.6.8.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.6.8.2.1.2 試験動物

6～7週齢のマウスを用いる。

3.6.8.2.1.3 二抗体サンドイッチ酵素抗体反応（以下この項において「二抗体サンドイッチELISA」という。）用抗原

ポリソルベート20抽出抗原（付記12）を用いる。

3.6.8.2.2 試験方法

試験動物の20匹を試験群、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13）を希釈液（付記14）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15）の穴に100 μ 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16）で3回洗浄する。次に、各穴に標識抗体（付記17）を100 μ 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18）を各穴に100 μ 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 μ 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。

3.6.8.2.3 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2年9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 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
水	残 量

加熱溶解した後、pHを7.4～7.6に調整し、121 $^{\circ}$ Cで15分間高压滅菌する。56 $^{\circ}$ Cに冷却した後、アンピシリンを最終力価250 μ g/mLとなるように添加する。

付記3 BHL寒天培地

BHL培地（付記8）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。約50 $^{\circ}$ C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4 抗マイコプラズマ・ハイオニューモニエ免疫血清

製造用株で兔を免疫して得た血清であって、少量に小分けして－20 $^{\circ}$ Cに保存したものである。約10⁶個の菌液を用いた発育阻止試験においては、約5mmの阻止帯を示す。

付記5 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、あらかじめ抗マイコプラズマ・ハイオニューモニエ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 $^{\circ}$ C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マイコプラズマ・ハイオニューモニエの集落の発育が阻止され、阻止帯が形成される。マイコプラズマ・ハイオニューモニエ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6 リン酸緩衝食塩液

1,000mL 中

塩化ナトリウム	8.0 g
---------	-------

リン酸水素二ナトリウム十二水和物	2.9 g
------------------	-------

リン酸二水素カリウム	0.2 g
------------	-------

塩化カリウム	0.2 g
--------	-------

水	残 量
---	-----

pH を6.8 ～ 7.2 に調整して、121 °Cで20 分間高圧滅菌又はろ過滅菌する。

付記7 サンプルバッファー

1,000 mL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	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

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
---------------	-------

2.5w/v% 酢酸タリウム水溶液	4 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°C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。

付記9 希釈用液

1,000mL 中

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
------------	---------

塩化ナトリウム	8.5 g
---------	-------

水	残 量
---	-----

pHを6.9～7.1に調整した後、121°Cで20分間高圧滅菌する。

付記10 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% β -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「 β -NAD」という。）液を 1 vol%の割合に加えたもの。

付記11 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 % β -NAD液を 1 vol%の割合に加えたもの。

付記12 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 1 mg/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13 参照陽性血清

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ 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。

付記14 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
------------	-------

無水リン酸一水素ナトリウム	1.15 g
---------------	--------

水	残 量
---	-----

121℃で15分間高圧滅菌する。

付記15 抗原吸着プレート

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ 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19）を炭酸緩衝液（付記20）で100倍に希釈した後、96穴マイクロプレートの各穴に100 μ Lずつ加え、4℃で18時間反応させる。その後、洗浄液で3回洗浄する。0.1w/v%ゼラチン液（付記21）を各穴に100 μ Lずつ加え、4℃で18時間反応させる。さらに、洗浄液で3回洗浄した後、ポリソルベート20抽出抗原を希釈液でたん白量12.5 μ g/mLになるように希釈し、各穴に100 μ Lずつ加え、4℃で18時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄したもの。

付記16 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17 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18 基質液

p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム100mgを基質緩衝液（付記22）100mLで溶解したもの。

付記19 兔免疫血清

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ 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、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20 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21 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22 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、5 mol/Lの塩酸でpHを9.8に調整し、全量を1,000mLとしたもの。

マンヘミア・ヘモリチカ（１型）感染症不活化ワクチン（油性アジュバント加溶解用液）（シード）

平成 25 年 1 月 22 日（告示第 257 号）新規追加
令和元年 8 月 26 日（告示第 723 号）一部改正

1 定義

シードロット規格に適合したマンヘミア・ヘモリチカ 1 型菌の培養菌液を不活化し、凍結乾燥したもので、使用時に油性アジュバントを含む溶解用液で溶解するワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

マンヘミア・ヘモリチカ 1 型 NL1009 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

ロイコトキシンを産生し、牛のマンヘミア性肺炎の発病を予防する免疫原性を有する。

2.1.3 マスターシード菌

2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、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、凍結乾燥して 2～7℃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 ワーキングシード菌

2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、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－30℃以下又は凍結乾燥して 2～7℃で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2 の試験を行う。

2.1.5 プロダクションシード菌

2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、適当と認められた培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して－30℃以下又は凍結乾燥して 2～7℃で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

2.2 製造材料

2.2.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 培養

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

培養菌液について、3.2 の試験を行う。

2.3.2 不活化

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たものを不活化菌液とする。
不活化菌液について、3.3 の試験を行う。

2.3.3 原液

不活化菌液を遠心分離し、上清液を原液とする。

2.4 最終バルク

原液にリン酸緩衝食塩液（付記 1）を添加し、濃度調整したものを最終バルクとする。

2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、凍結乾燥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 マスターシード菌の試験

3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の 1.4.2.4.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、マンヘミア・ヘモリチカ以外の菌の発育を認めてはならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.1.2 ワーキングシード菌の試験

3.1.2.1 夾雑菌否定試験

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

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 染色試験

3.2.1.1 試験材料

検体を用いる。

3.2.1.2 試験方法

検体をグラム染色して標本作製し、観察する。

3.2.1.3 判定

均一なグラム陰性球桿菌以外の菌を認めてはならない。

3.2.2 コロニー性状確認試験

3.2.2.1 試験材料

検体を用いる。

3.2.2.2 試験方法

検体を 5 vol % 羊血液トリプチケース・ダイズ・寒天培地（付記 2）に接種し、35 ～ 39 °C で 48 時間培養する。

3.2.2.3 判定

生育した集落は β 溶血環を示し、小さな灰色のコロニーでなければならない。

3.2.3 吸光度測定試験

3.2.3.1 試験材料

検体を用いる。

3.2.3.2 試験方法

検体を分光光度計を用いて波長 550 nm で吸光度を測定する。

3.2.3.3 判定

検体の吸光度値は、規定の値でなければならない。

3.3 不活化菌液の試験

3.3.1 不活化試験

3.3.1.1 試験材料

検体を用いる。

3.3.1.2 試験方法

検体を 100mL の液体培地に 1 mL、5 vol % 羊血液寒天培地に 0.2mL を接種し培養する。寒天培地については 33 ~ 37 °C で 48 時間以上培養後に菌の発育の有無を観察する。液体培地については 36 ~ 38 °C で培養後 7 日目に菌の発育の有無を観察した後、新しい 100mL の液体培地に 10mL、5 vol % 羊血液寒天培地に 0.2mL をそれぞれ継代し、寒天培地については継代後 3 ~ 7 日目に、液体培地については継代後 7 日目に菌の発育を観察する。

3.3.1.3 判定

菌の発育を認めてはならない。

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、帯黄白色の乾燥塊でなければならない、異物及び異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.4.2 真空度試験

一般試験法の真空度試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.3 含湿度試験

一般試験法の含湿度試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.4 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.5 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、ホルマリン含有量は、0.01vol % 以下でなければならない。ただし、乾燥ワクチンを溶解用液と等量の滅菌精製水で溶解したものを試料とする。

3.4.6 無毒化試験

3.4.6.1 試験材料

3.4.6.1.1 試料

試験品を溶解用液と等量の滅菌精製水で溶解したものを試料とする。

3.4.6.1.2 白血球浮遊液

白血球浮遊液（付記 3）を用いる。

3.4.6.2 試験方法

試料を RPMI-1640 培地（付記 4）で 2 倍階段希釈する。試料の原液及び各段階の希釈液 100 μ L を 96 穴マイクロプレートのそれぞれ 3 穴ずつに移す。白血球浮遊液を 90 μ L ずつ加え、37 °C で 1 時間培養した後、200G で 12 分間遠心し、上清を捨てる。10vol % ホルマリン溶液（付記 5）を 100 μ L ずつ加え 30 分間静置し、細胞沈渣を固定する。各穴の内容液を除去した後、1 w/v % クリスタルバイオレット溶液（付記 6）50 μ L を加え、5 分間染色する。流水で染色液を洗い流した後、各穴の底の紫色の細胞層の有無を観察する。

3.4.6.3 判定

細胞層が紫色に一様に染まっていたとき、陰性と判定する。細胞層が完全に剥離するか、濃く染まっていたとき、陽性と判定し、陽性を示した最高希釈倍数を毒素活性値とする。毒素活性値は、2 倍以下でなければならない。

3.4.7 毒性限度確認試験

一般試験法の毒性限度確認試験法 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、

試験品の注射量は 1 mL とし、体重測定は 5 日目に行うものとする。

3.4.8 力価試験

3.4.8.1 ロイコトキソイド力価試験

3.4.8.1.1 試験材料

3.4.8.1.1.1 試料

試験品を溶解用液と等量の滅菌精製水で溶解したものを試料とする。

3.4.8.1.2 試験方法

希釈液（付記 7）で試料及び参照品（付記 8）の階段希釈液を作製し、その希釈液を抗体固相化プレート（付記 9）の穴に 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させる。洗浄液（付記 10）で洗浄した後、マンヘミア・ヘモリチカロイコトキソイドに対するマウスモノクローナル抗体（付記 11）を各穴に 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させる。洗浄液で洗浄した後、標識抗体 1（付記 12）を各穴に 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させる。洗浄液で洗浄した後、基質液（付記 13）を各穴に 100 μ L ずつ加え、常温で反応させる。参照品の規定の希釈倍率の希釈液を加えた穴の吸光度を主波長 405nm、副波長 490nm で測定し、その値が参照品ごとに規定された値となったときに全ての穴の吸光度を測定する。

3.4.8.1.3 判定

参照品のロイコトキソイド量を 1.0 として、試料のロイコトキソイド量の相対量を統計学的計算方法（付記 14）により算出するとき、相対力価は、1.0 以上でなければならない。

3.4.8.2 莢膜抗原力価試験

3.4.8.2.1 試験材料

3.4.8.2.1.1 試料

試験品を溶解用液と等量の滅菌精製水で溶解したものを試料とする。

3.4.8.2.2 試験方法

希釈・洗浄液（付記 15）で試料及び参照品の階段希釈液を作製し、96 穴マイクロプレートの各穴に 100 μ L ずつ加えて 4 $^{\circ}$ C で 1 晩反応させる。希釈・洗浄液で洗浄した後、ブロッキング液 1（付記 16）を加え、常温で 1 時間反応させる。希釈・洗浄液で洗浄した後、マンヘミア・ヘモリチカ莢膜抗原に対するモノクローナル抗体（付記 17）を 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させる。洗浄液で洗浄した後、標識抗体 2（付記 18）を各穴に 100 μ L ずつ分注し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させる。洗浄液で洗浄した後、基質液を各穴に 100 μ L ずつ加え、常温で反応させる。参照品の規定の希釈倍率の希釈液を加えた穴の吸光度を主波長 405nm、副波長 490nm で測定し、その値が参照品ごとに規定された値となったときに全ての穴の吸光度を測定する。

3.4.8.2.3 判定

参照品の莢膜抗原量を 1.0 として、試料の莢膜抗原量の相対量を統計学的計算方法により算出するとき、相対力価は、1.0 以上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 リン酸緩衝食塩液

1,000 mL 中

塩化ナトリウム	9.0 g
リン酸水素二ナトリウム 12 水和物	6.77 g
リン酸二水素カリウム	2.58 g
水	残 量

pH を 7.2 に調整し、121 $^{\circ}$ C で 15 分間高圧滅菌する。

付記2 5 vol %羊血液トリブチケース・ダイズ・寒天培地
1,000 mL 中

カゼインのパンクレアチン消化物	15.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
ダイズのパパイン消化物	5.0 g
寒天	15.0 g
羊血液	50.0 g
精製水	残 量
完全に溶解し、高圧蒸気滅菌する。	

付記3 白血球浮遊液

健康な牛から採取した血液から白血球を調製し、細胞数が 1×10^7 個/mL となるように RPMI-1640 培地に浮遊させたもの。

付記4 RPMI-1640 培地

1,000 mL 中	
RPMI-1640	10.39 g
炭酸水素ナトリウム	2.0 g
水	残 量
pH を 7.4 に調整する。200nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。	

付記5 10vol %ホルマリン溶液

100mL 中	
ホルムアルデヒド	10 mL
水	残 量
200nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。	

付記6 1 w/v%クリスタルバイオレット溶液

100mL 中	
クリスタルバイオレット	1.0 g
水	残 量
200nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。	

付記7 希釈液

1,000mL 中	
牛血清アルブミン	20 g
0.38w/v%四ホウ酸ナトリウム溶液（付記19）	残 量
200nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。	

付記8 参照品

動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

付記9 抗体固相化プレート

0.38w/v %四ホウ酸ナトリウム溶液で適当な濃度に希釈したマンヘミア・ヘモリチカロイコトキソイドに対する牛ポリクローナル抗体（付記20）を 100 μ L ずつ 96 穴プレートに分注し、

4℃で 16 時間反応させる。内容液を捨て、ブロッキング液 2（付記 21）を加え、37℃で 30 分間反応させた後、希釈・洗浄液で 1 回洗浄したもの。

付記 10 洗浄液

1,000mL 中

ポリソルベート 20

0.5 mL

希釈・洗浄液

残 量

pH を 7.2 に調整する。

付記 11 マンヘミア・ヘモリチカロイコトキソイドに対するマウスモノクローナル抗体

マンヘミア・ヘモリチカロイコトキシンを用いてイムノブロットを行った場合、分子量約 100 kDa の単一のバンドを認めるモノクローナル抗体で、中和能を有する。これを希釈・洗浄液で適当な希釈倍率に希釈したもの

付記 12 標識抗体 1

ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG(H+L)抗体を 50vol %グリセリン溶液（付記 22）で溶解し、更に希釈・洗浄液で希釈したもの。

付記 13 基質液

A 液：0.3g の 2,2'-アジノ-ジ（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸）を 1,000mL のグリシン緩衝液で溶解したもの。

B 液：0.02vol%過酸化水素水

A 液と B 液を使用時に等量混合したもの。

付記 14 統計学的計算方法

動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

付記 15 希釈・洗浄液

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

水

残 量

pH を 7.2 に調整する。200nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。

付記 16 ブロッキング液 1

1,000mL 中

牛血清アルブミン

10 g

希釈・洗浄液

残 量

200nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。

付記 17 マンヘミア・ヘモリチカ 莢膜抗原に対するモノクローナル抗体

マンヘミア・ヘモリチカから精製した莢膜多糖体、リポ多糖体及びロイコトキシンを用いて間接 ELISA を行った場合、莢膜多糖体にのみ特異的に反応するモノクローナル抗体であって、プロ

ッキング液 1 で適当な希釈倍率に希釈したもの。

付記 18 標識抗体 2

ペルオキシダーゼ標識したヤギ抗マウス IgM (μ) 抗体を 50vol %グリセリン溶液で適当な濃度になるように溶解したもの。

付記 19 0.38w/v%四ホウ酸ナトリウム溶液

1,000mL 中

四ホウ酸ナトリウム

3.8 g

水

残 量

pH を 9.0 に調整する。200nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。

付記 20 マンヘミア・ヘモリチカ ロイコトキシノイドに対する牛ポリクローナル抗体

マンヘミア・ヘモリチカに対する牛ポリクローナル血清で、ロイコトキシノイドに対する反応の特異性が間接的に確認され、参照品に対する用量反応性等が証明されたもの。

付記 21 ブロッキング液 2

1,000mL 中

牛血清アルブミン

20 g

希釈・洗浄液

残 量

200nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。

付記 22 50vol %グリセリン溶液

滅菌精製水にグリセリンを等量混合したもの。

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

平成21年7月1日（告示第 861号）新規追加
平成22年4月22日（告示第 646号）一部改正
平成28年4月18日（告示第1020号）一部改正
令和元年8月26日（告示第723号）一部改正

1 定義

シードロット規格に適合したマイコプラズマ・ハイオニューモニエの培養菌液を不活化し、油性アジュバントを添加したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ NL1042株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ基準株に一致する生物学的性状を示す。

2.1.3 マスターシード菌

2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、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 -20°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する

マスターシード菌について、3.1.1の試験を行う。

マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシード菌から小分製品までの継代数は、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。

2.1.4 ワーキングシード菌

2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、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 -20°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。

2.1.5 プロダクションシード菌

2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、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 -20°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合について、3.1.3の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 培地

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 培養

ワーキングシード菌又はプロダクションシード菌を培地に接種して増菌・継代培養後、更に培地

に接種して培養したもの又はこれを適当と認められた方法で濃縮したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2の試験を行う。

2.3.2 不活化

培養菌液に適当と認められた不活化剤を加えて不活化したもの又はこれを適当と認められた方法で過剰の不活化剤を中和したものを不活化菌液とする。ただし、最終バルクの調整時に過剰の不活化剤を中和してもよい。

不活化菌液について、3.3の試験を行う。

2.3.3 アジュバントの添加

不活化菌液又は適当と認められた方法で濃縮した不活化菌液に適量のアジュバントを添加したものを原液とする。この場合、適当と認められた保存剤を添加してもよい。ただし、最終バルクの調整時にアジュバントを添加してもよい。

原液について、3.4の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液を混合し、濃度調整したものを最終バルクとする。

2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。

小分製品について、3.5の試験を行う。

3 試験法

3.1 製造用株の試験

3.1.1 マスターシード菌の試験

3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.4.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合は、その試験法とする。

3.1.2 ワーキングシード菌の試験

3.1.2.1 夾雑菌否定試験

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

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 染色試験

3.2.1.1 試験材料

検体を用いる。

3.2.1.2 試験方法

検体をスライドガラス上でグラム染色するか又はクリスタルバイオレットとヨウ化物で染色し、鏡検する。

3.2.1.3 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。

3.2.2 生菌数試験

3.2.2.1 試験材料

3.2.2.1.1 試料

検体を試料とする。

3.2.2.1.2 培地

適当と認められた液状培地を用いる。

3.2.2.2 試験方法

試料を培地でさらに10倍階段希釈し、36～38℃で14～17日間培養する。

3.2.2.3 判定

培養液を観察し、色調が変化したものをマイコプラズマ陽性とみなし、CCUを算出する。

検体の菌量は、1mL中 5×10^6 CCU以上でなければならない。

3.3 不活化菌液の試験

3.3.1 不活化試験

3.3.1.1 試験材料

3.3.1.1.1 試料

検体を試料とする。

3.3.1.1.2 培地

適当と認められた液状培地を用いる。

3.3.1.2 試験方法

試料を培地に接種し、37℃で7日間以上培養する。

3.3.1.3 判定

菌の発育を認めてはならない。

3.4 原液の試験

3.4.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.5 小分製品の試験

3.5.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、固有の色調を有する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。

3.5.2 pH測定試験

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

3.5.3 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.5.4 チメロサル定量試験

チメロサル添加製剤については、一般試験法のチメロサル定量法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.5.5 ホルマリン定量試験

ホルマリン添加製剤については、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、0.05vol %以下でなければならない。

3.5.6 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性否定試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

ただし、3.5.7の試験を行うときは、本試験は実施しない。

3.5.7 安全試験

3.5.7.1 試験材料

3.5.7.1.1 注射材料

試験品を用いる。

3.5.7.1.2 試験動物

3週齢の子豚を用いる。

3.5.7.2 試験方法

試験動物 2 頭に 1 回目は両頸部に 2 mL ずつ、2 回目は 14 日後に 2 mL を左後肢にそれぞれ筋肉内注射する。それぞれの接種後 14 日間、一般症状を観察する。試験期間中、1 回目接種の前日及び 3 日後、2 回目接種の当日及び 14 日後に体重を測定し、それぞれの接種の前日から 3 日後まで毎日直腸温を測定する。

3.5.7.3 判定

各項目について観察期間中に著しい異常を認めてはならない。

3.5.8 力価試験

3.5.8.1、3.5.8.2 又は 3.5.8.3 の試験を行う。

3.5.8.1 マウス試験法

3.5.8.1.1 試験材料

3.5.8.1.1.1 注射材料

試験品あるいは試験品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。

3.5.8.1.1.2 試験動物

6 ～ 7 週齢のマウスを用いる。

3.5.8.1.1.3 酵素抗体反応（以下「ELISA」という。）用抗原

ポリソルベート 20 抽出抗原 1（付記 1）を用いる。

3.5.8.1.2 試験方法

試験動物の 20 匹を試験群、5 匹を対照群とする。

注射材料 1.0 mL 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、ELISA を行う。

試験群と対照群の血清及び参照陽性血清 1（付記 2）を希釈液 1（付記 3）で 10 倍に希釈したものを、更に同希釈液で 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 1（付記 4）の穴に 100 μ L ずつ加え、希釈液のみの穴を血清対照とする。4℃ で 18 時間反応させた後、洗浄液 1（付記 5）で 3 回洗浄する。次に、各穴に標識抗体 1（付記 6）を 100 μ L ずつ加え、37℃ で 90 分間反応させた後、洗浄液 1 で 3 回洗浄する。その後、基質液 1（付記 7）を各穴に 100 μ L ずつ加え、37℃ 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 μ L ずつ加えて反応を停止させ、波長 405 nm で各穴の吸光度を測定する。

3.5.8.1.3 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、すべて 320 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 2,560 ～ 5,120 倍を示さなければならない。

3.5.8.2 ウサギ試験法

3.5.8.2.1 試験材料

3.5.8.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.8.2.1.2 試験動物

体重 1.6 ～ 3.2 kg のウサギを用いる。

3.5.8.2.1.3 ELISA 用抗原

ポリソルベート 20 抽出抗原 2（付記 8）を用いる。

3.5.8.2.2 試験方法

試験動物の 10 羽を試験群、3 羽を対照群とする。

注射材料 1.0 mL ずつを試験群の後肢筋肉内に注射する。注射後 6 週間目に試験群及び対照群から

得られた血清についてELISAを行う。

試験群と対照群の各ウサギ血清を等量混合した各プール血清、参照陽性血清 2（付記 9）及び参照陰性血清（付記10）を希釈液 2（付記11）で10倍に希釈したものを、更に同希釈液で 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 2（付記12）の 3 穴ずつに100 μ Lずつ加え、37℃で 1 時間反応させた後、洗浄液 2（付記13）で 3 回洗浄する。次に、各穴に標識抗体 2（付記14）を100 μ Lずつ加え、37℃で 1 時間反応させた後、洗浄液 2 で 3 回洗浄する。その後、基質液 2（付記15）を各穴に100 μ Lずつ加え、37℃で10分間反応させた後、0.5vol%フッ化水素酸溶液を各穴に100 μ 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。

3.5.8.2.3 判定

参照陰性血清の全穴の平均吸光度値の 2 倍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。また、参照陽性血清 2 及び試験群の血清の各希釈段階における吸光度値は、3 穴の平均値とする。

試験群では、参照陽性血清 2 の抗体価以上でなければならない。この場合、対照群では、すべて20倍以下でなければならない。また、参照陰性血清の平均吸光度値は0.05～0.11、参照陽性血清 2 の抗体価は40～160倍を示さなければならない。

3.5.8.3 相対力価試験法

3.5.8.3.1 試験材料

試験品及び参照品（付記16）を用いる。

3.5.8.3.2 試験方法

3.5.8.3.2.1 試料の調製

試験品を 2 回凍結融解したものを試料とする。この場合、凍結は、－65℃以下で24時間以上行う。

3.5.8.3.2.2 固相化プレートの作製

希釈した捕獲抗体（付記17）を96穴プレートの各穴に分注し、2～7℃で16～72時間静置する。プレートを洗浄した後、ブロッキング液（付記18）を各穴に加え、35～39℃で30～60分間反応させる。再度洗浄したものを固相化プレートとする。

3.5.8.3.2.3 反応

ELISAによりOD値を測定する。

試料及び参照品をブロッキング液で適当な濃度に希釈したもの、及びそれらを階段希釈したものを、固相化プレートの各穴に加え、21～25℃で60～75分間反応させる。洗浄した後、希釈した指示抗体（付記19）を各穴に加え、21～25℃で60～75分間反応させる。洗浄した後、基質液（付記20）を各穴に加え、21～25℃で反応させる。主波長405nm、副波長490nm又は492nmで最低希釈倍率の参照品の平均OD値を測定し、その値が1.5～2.2となった時点で反応終了とし、全ての穴のOD値を測定する。

3.5.8.3.3 判定

各穴のOD値を用いて、参照品中の抗原量を1.0として、試料の抗原量を相対力価（RP）の計算法（付記21）により算出するとき、試験品のRPは1.38以上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 3 か月間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その期間とする。

付記 1 ポリソルベート20抽出抗原 1

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）に蛋白濃度 1 mg/mL になるように懸濁後、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。遠心後の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、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とトリス緩衝液980mLを混合したもの。

付記2 参照陽性血清 1

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ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、抗体価が2,560～5,120倍となるように調整し、凍結又は凍結乾燥したもの。

付記3 希釈液 1

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
------------	-------

無水リン酸一水素ナトリウム	1.15 g
---------------	--------

水	残 量
---	-----

121℃で15分間高圧滅菌する。

付記4 抗原吸着プレート 1

マイコプラズマ・ハイオニューモニエJ株又はこれと同等の免疫原性を有する株に対するウサギ免疫血清（付記22）を炭酸緩衝液 1（付記23）で100倍に希釈後、96穴マイクロプレート各穴に100 μ Lずつ加え、4℃で18時間反応させる。その後、洗浄液 1 で3回洗浄する。0.1w/v%ゼラチン液（付記24）を各穴に100 μ Lずつ加え、4℃で18時間反応させる。さらに、洗浄液 1 で3回洗浄後、ポリソルベート20抽出抗原 1 を希釈液で蛋白量12.5 μ g/mLになるように希釈し、各穴に100 μ Lずつ加え、4℃で18時間反応させた後、洗浄液 1 で3回洗浄したもの。

付記5 洗浄液 1

ポリソルベート20 0.5mLと希釈液1,000mLを混合したもの。

付記6 標識抗体 1

アルカリフォ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7 基質液 1

p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム100mgを基質緩衝液（付記25）100mLで溶解したもの。

付記8 ポリソルベート20抽出抗原 2

製造用株又はこれと同等の抗原性を有する株の培養菌液を遠心集菌し、蛋白量として2 mg/mLとなるようにリン酸緩衝液 2（付記26）中に懸濁し、2 vol%ポリソルベート20溶液を等量加えて、37℃で90分間振とうしながら加温し、遠心後に採取し、適当な濃度に調製したもの。

付記9 参照陽性血清 2

豚での有効性が確認されている最少抗原量を含有するワクチン（ 3×10^8 CCU/dose）の1 mL

をウサギに免疫して得られた血清で、ELISA抗体価40～160倍となるように調製し、小分けして、凍結又は凍結乾燥したもの。

付記10 参照陰性血清

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ抗体陰性のウサギ血清でELISA抗体価20倍以下のものを小分けして、凍結又は凍結乾燥したもの。

付記11 希釈液 2

1,000mL中

塩化ナトリウム 9.0 g

トリスヒドロキシアミノメタン 1.21 g

牛血清アルブミン 10.0 g

ポリソルベート20 0.5 mL

水 残 量

pHを7.3～7.5に調整する。

付記12 抗原吸着プレート 2

ポリソルベート20抽出抗原 2 を炭酸緩衝液 2（付記27）で蛋白量として10 μ g/mLに調製した抗原液をマイクロプレートの各穴に100 μ Lずつ分注し、プレートをシールして室温で18～72時間感作したもの。

付記13 洗浄液 2

1,000mL中

塩化ナトリウム 9.0 g

ポリソルベート20 0.5 mL

水 残 量

pHを7.3～7.5に調整する。

付記14 標識抗体 2

ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG（H+L）を希釈液 2 で至適濃度に希釈したもの。

付記15 基質液 2

A液：0.6gの2,2'-アジノージ（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸）を1,000mLのグリシン緩衝液で溶解したもの。

B液：0.02vol%過酸化水素溶液

A液とB液を使用時に等量混合する。

付記16 参照品

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ製造用株若しくはこれと同等の免疫原性を有する株の培養菌液又はこれを濃縮したものを不活化し、油性アジュバントを添加したものであり、豚における攻撃試験において肺病変及び抗体価に基づいて有効性が確認されたものであって、動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

付記17 捕獲抗体

ハイブリドマクローンによって作製された抗p46マウスモノクローナル抗体。

付記18 ブロッキング液

溶液A	60 mL
牛胎子血清	0.3 mL

溶液A

溶液B	90 mL
Triton X-100	0.1 mL
Tween 20	10 mL

溶液B

カゼイン	1 g
リン酸緩衝食塩液	100 mL

リン酸緩衝食塩液

1,000mL中

塩化ナトリウム	8 g
無水リン酸水素二ナトリウム	1.15g
塩化カリウム	0.2 g
リン酸二水素カリウム	0.2 g
精製水	残 量

pH7.1～7.3に調整する。孔径0.2 μ m以下のフィルターでろ過滅菌する。

付記19 指示抗体

ホースラディッシュペルオキシダーゼで標識した抗p46マウスモノクローナル抗体。

付記20 基質液

2,2' -アジノビス (3 -エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) (ABTS) 液

付記21 相対力価 (RP) の計算法

動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

付記22 ウサギ免疫血清

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ J 株又はこれと同等の免疫原性を有する株で免疫したウサギの血清で、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23 炭酸緩衝液 1

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24 0.1w/v%ゼラチン液

ゼラチン1.0gを希釈液 2 1,000mLで溶解したもの。

付記25 基質緩衝液

塩化マグネシウム六水和物0.049g、ジエタノールアミン96mLを水に溶解後、5 mol/Lの塩酸でpHを9.8に調整し、全量を1,000mLとしたもの。

付記26 リン酸緩衝液 2

A液：リン酸二水素ナトリウム一水和物2.75gを水に溶解し、全量を1,000mLとする。

B液：無水リン酸一水素ナトリウム2.84gを水に溶解し、全量を1,000mLとする。

A液775mLとB液225mLを混合してpHを7.0に調整する。この液に、塩化ナトリウム14.6g、硫酸マグネシウム1.2gを加え、全量を1,000mLにする。

付記27 炭酸緩衝液 2

1,000mL中

炭酸ナトリウム	1.59 g
---------	--------

炭酸水素ナトリウム	2.93 g
-----------	--------

水	残 量
---	-----

pHを2 mol/L水酸化ナトリウム溶液で9.55～9.65に調整した後、水を加えて全量を1,000mLにする。

マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症凍結生ワクチン (シード)

平成24年7月4日(告示第1622号)新規追加
令和元年8月26日(告示第723号)一部改正

1 定義

シードロット規格に適合した弱毒マイコプラズマ・ガリセプチカムの培養菌液を凍結したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

マイコプラズマ・ガリセプチカムts-11株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

33℃でのマイコプラズマ用培地（付記1）における増殖は、39.5℃での増殖を上回り、その差は、100倍以上である。また、感受性鶏の腹腔内に接種しても、病原性を示さない。

2.1.3 マスターシード菌

2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、製造に相当と認められた培地で増殖させ、保存用の容器に分注する。分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－70℃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継代数は、10代以内でなければならない。

2.1.4 ワーキングシード菌

2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、製造に相当と認められた培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結して－70℃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。

2.1.5 プロダクションシード菌

2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、製造に相当と認められた培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して－70℃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は、3.1.3の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

プロダクションシード菌を培地に接種し、培養したものを原液とする。

原液について、3.2の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液を必要に応じ濃度調整したものを最終バルクとする。

2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、凍結し、小分製品とする。

小分製品について、3.3の試験を行う。

3 試験法

3.1 製造用株の試験

3.1.1 マスターシード菌の試験

3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.2.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.3 対象動物を用いた免疫原性試験

一般試験法の対象動物を用いた免疫原性試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.4 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。

3.1.1.5 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を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.2 ワーキングシード菌の試験

3.1.2.1 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.3 プロダクションシード菌の試験

3.1.3.1 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2 原液の試験

3.2.1 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.2 生菌数試験

3.2.2.1 試験材料

3.2.2.1.1 試料

原液を試料とする。

3.2.2.1.2 培地

マイコプラズマ用培地（付記1）又は適当と認められた培地を用いる。

3.2.2.2 試験方法

96穴の平底マイクロプレートの各穴に培地を225 μ Lずつ分注する。最初の列（縦列）の8穴にそれぞれ試料を25 μ Lずつ分注した後、10倍段階希釈し、 10^{-1} から 10^{-10} の希釈列を作製する。11及び12列は、無接種対照とする。1試験に2枚のプレートを用いる。プレートをシールし、33℃で2週間培養する。

3.2.2.3 判定

培地の色調変化を示した穴を有する行（横列）の希釈の高い方から連続した3つの希釈列又は連続した2つの希釈列と色調変化した穴が最初に全く認められなくなった希釈列の合計3希釈列のいずれかを用いて判定する。これら3希釈列の色調が変化した穴の数を用いて最確数表（付記2）から最確数を求め、3希釈列の最初の希釈倍数から1を引いた倍数を乗じて22.5 μ L当たりの色調変化単位（以下この項において「CCU」という。）を算出し、更に44.4を乗じて1 mL当たりのCCUを算出する。

検体の生菌数は、1 mL 当たり $10^{8.05}$ CCU以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に

認めた場合には、その生菌数とする。

3.3 小分製品の試験

3.3.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、融解したものは、固有の色調を有する半透明で均質な懸濁液でなければならない。異物及び異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.3.2 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.3 生菌数試験

試験品について3.2.2を準用して22.5 μ L当たりのCCUを算出し、更に1.33を乗じて1羽当たりのCCUを算出する。

試験品の生菌数は、1羽分当たり $5 \times 10^{6.05}$ ($10^{6.75}$) CCU以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その生菌数とする。

3.3.4 マーカー試験

3.3.3を準用して試験するとき、33℃培養の生菌数は、39.5℃培養の生菌数より100倍以上多くななければならない。

3.3.5 安全性試験

3.3.5.1 試験材料

3.3.5.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

3.3.5.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の3～4週齢の鶏を用いる。

3.2.5.2 試験方法

試験動物の10羽を試験群とし、5羽を対照群とする。

接種材料10羽分ずつを試験群10羽に点眼接種し、対照群と共に3週間観察する。試験最終日に剖検し、鼻腔、眼窩下洞、気管及び気囊の病変の有無を観察する。

試験開始時及び試験終了時に体重を測定する。

3.3.5.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群の動物に臨床的な異常を認めてはならない。また、剖検したとき、異常を認めてはならない。

3.3.6 力価試験

3.3.6.1 試験材料

3.3.6.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

3.3.6.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料規格1.1由来の3～4週齢の鶏を用いる。

3.3.6.1.3 凝集反応抗原

「マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症急速診断用菌液」を用いる。

3.3.6.2 試験方法

試験動物の10羽を試験群とし、3羽を対照群とする。

接種材料1羽分を試験群に点眼接種する。接種4週間後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、マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症急速凝集試験を行う。

3.3.6.3 判定

試験群の70%以上が凝集抗体陽性でなければならない。この場合、対照群では、全て凝集抗体陰性でなければならない。

4 貯法及び有効期間

－70℃以下に保管する。

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 マイコプラズマ用培地

1,000mL中

マイコプラズマ用基礎培地（PPLO培地）＊ 22.5 g

ブドウ糖＊ 1 g

塩酸システイン＊ 0.1 g

酢酸タリウム＊ 0.1 g

0.6w/v%フェノールレッド液 5 mL

豚血清 100 mL

新鮮イーストエキス 10 mL

0.2w/v%DNA液 10 mL

ベンジルペニシリンカリウム 5,000 単位

水 残 量

＊印の成分を加温溶解した後、121℃で15分間高圧滅菌する。これに、あらかじめろ過滅菌してある他の成分を無菌的に添加する。

付記2 最確数表

連続した3つの希釈列 に認められた培地色調 変化の穴の数	最確数 (MPN)	連続した3つの希釈列 に認められた培地色調 変化の穴の数	最確数 (MPN)
8 8 7	208	7 0 1	1.83
8 8 6	139	7 0 0	1.55
8 8 5	98.2	6 6 1	3.08
8 8 4	70.2	6 6 0	2.77
8 8 3	51.0	6 5 1	2.73
8 8 2	38.5	6 5 0	2.44
8 8 1	30.1	6 4 2	2.69
8 8 0	24.0	6 4 1	2.41
8 7 8	59.6	6 4 0	2.14
8 7 7	50.8	6 3 2	2.38
8 7 6	43.3	6 3 1	2.11
8 7 5	36.9	6 3 0	1.86
8 7 4	31.4	6 2 2	2.09
8 7 3	26.7	6 2 1	1.84
8 7 2	22.6	6 2 0	1.60

8 7 1	19.1	6 1 2	1.82
8 7 0	15.9	6 1 1	1.58
8 6 6	28.4	6 1 0	1.35
8 6 5	25.0	6 0 2	1.56
8 6 4	21.8	6 0 1	1.34
8 6 3	18.9	6 0 0	1.13
8 6 2	16.3	5 5 1	2.07
8 6 1	13.8	5 5 0	1.85
8 6 0	11.5	5 4 1	1.84
8 5 6	21.3	5 4 0	1.63
8 5 5	18.9	5 3 2	1.82
8 5 4	16.6	5 3 1	1.61
8 5 3	14.4	5 3 0	1.41
8 5 2	12.3	5 2 2	1.60
8 5 1	10.3	5 2 1	1.40
8 5 0	8.42	5 2 0	1.21
8 4 5	14.8	5 1 2	1.39
8 4 4	13.0	5 1 1	1.20
8 4 3	11.1	5 1 0	1.01
8 4 2	9.40	5 0 2	1.19
8 4 1	7.74	5 0 1	1.01
8 4 0	6.22	5 0 0	0.83
8 3 5	11.8	4 4 0	1.28
8 3 4	10.2	4 3 1	1.27
8 3 3	8.67	4 3 0	1.10
8 3 2	7.18	4 2 1	1.09
8 3 1	5.82	4 2 0	0.93
8 3 0	4.67	4 1 2	1.08
8 2 4	8.07	4 1 1	0.92
8 2 3	6.72	4 1 0	0.76
8 2 2	5.50	4 0 2	0.91
8 2 1	4.45	4 0 1	0.75
8 2 0	3.62	4 0 0	0.60
8 1 3	5.22	3 4 0	1.01
8 1 2	4.27	3 3 1	1.00
8 1 1	3.50	3 3 0	0.85

8 1 0	2.87	3 2 1	0.85
8 0 2	3.38	3 2 0	0.70
8 0 1	2.80	3 1 2	0.84
8 0 0	2.31	3 1 1	0.70
7 7 1	5.47	3 1 0	0.56
7 7 0	4.84	3 0 2	0.69
7 6 2	5.30	3 0 1	0.55
7 6 1	4.71	3 0 0	0.41
7 6 0	4.15	2 4 0	0.79
7 5 2	4.58	2 3 1	0.79
7 5 1	4.04	2 3 0	0.66
7 5 0	3.55	2 2 1	0.65
7 4 3	4.46	2 2 0	0.52
7 4 2	3.95	2 1 1	0.52
7 4 1	3.47	2 1 0	0.39
7 4 0	3.04	2 0 2	0.51
7 3 3	3.86	2 0 1	0.38
7 3 2	3.40	2 0 0	0.26
7 3 1	2.98	1 3 0	0.49
7 3 0	2.59	1 2 1	0.49
7 2 3	3.33	1 2 0	0.36
7 2 2	2.92	1 1 1	0.36
7 2 1	2.55	1 1 0	0.24
7 2 0	2.20	1 0 2	0.36
7 1 3	2.87	1 0 1	0.24
7 1 2	2.51	1 0 0	0.12
7 1 1	2.17	0 2 0	0.23
7 1 0	1.86	0 1 1	0.23
7 0 2	2.14	0 1 0	0.11
		0 0 1	0.11

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（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

令和元年 8 月 26 日（告示第 723 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「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と、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）とを混合し、アルミニウムゲルアジュバントを添加したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

マスターシード菌について、3.1.1の試験を行う。

マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシード菌から小分製品までの継代数は、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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。

2.1.2.5 プロダクションシード菌

2.1.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、適当と認められた培地で増殖する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して -60°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合について、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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

マスターシード菌について、3.1.1の試験を行う。

マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシード菌から小分製品までの継代数は、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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。

2.1.3.5 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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保

存する。

プロダクションシード菌を保存する場合について、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、App 41-1株染色体DNA由来*apx IA*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「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℃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℃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。

2.1.4.5 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℃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。

2.1.5 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 IIA*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℃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℃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。

2.1.5.5 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℃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。

2.1.6 rApxⅢ産生組換え大腸菌

2.1.6.1 名称

rApxⅢ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*apxⅢA*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℃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℃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。

2.1.6.5 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℃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。

2.2 製造用材料

2.2.1 培地

2.2.1.1 App 1、2及び5型菌

製造に相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

製造に相当と認められた寒天培地及び液状培地を用いる。

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相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、リン酸緩衝食塩液に均一に浮遊し、チメロサル又は相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、チメロサル又は相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約1/100量の相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。これに相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約1/250量の滅菌蒸留水に浮遊する。これに相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整する。これにホルマリン及びチメロサル又は相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蛋白濃度の調整をして混合した後、リン酸緩衝食塩液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、元の量と等量の

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 最終バルク

rApxバルク及び3株のApp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。

3.1.1.2 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。

3.1.1.3 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 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。

3.3 不活化菌液の試験

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 不活化試験

3.3.2.1 試験材料

検体及び製造に適当と認められた培地を用いる。

3.3.2.2 試験方法

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

3.3.2.3 判定

菌の発育を認めてはならない。

3.3.3 総菌数試験

3.3.3.1 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。

3.3.3.2 試験方法

試料の吸光度を分光光度計で測定する。

3.3.3.3 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 3×10^{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ー（付記3）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 μ 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くてはならない。

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 cm²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、ほぼすべ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たん白の原液を蒸留水又は2～4 mol/L尿素液によりたん白量300 μ g/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rApx 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

各rApxたん白の原液を20～200 μ g/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rAp_x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。

3.7 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。

3.7.2 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 3.6mg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 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 試験材料

3.7.8.1.1 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。

3.7.8.1.2 試験動物

約3週齢のマウスを用いる。

3.7.8.1.3 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を試験用培地 1 (付記 4) 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 5) に移植し、37℃で 3～6 時間振とう培養したものを各攻撃用菌液とする。

3.7.8.2 試験方法

試験動物70匹以上を試験群とし、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匹以上ずつの7群、計14群に分ける。1型菌攻撃用菌液及び2型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。

3.7.8.3 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。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後3年3か月間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その期

間とする。

付記 1 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

40g

水

残 量

加温溶解した後、121℃で15分間高圧滅菌を行う。約80℃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

10g

酵母エキス

5g

塩化ナトリウム

5g

水

残 量

加熱溶解した後、pHを7.4～7.6に調整し、121℃で15分間高圧滅菌する。56℃に冷却した後、アンピシリンを最終力価250 μ g/mLとなるように添加する。

付記 3 サンプルバッファー

1,000 mL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

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 4 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% β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（以下「 β -NAD」という。）液を 1 vol% の割合で加えたもの。

付記 5 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、冷却した後、ろ過滅菌した鶏非働化血清を 5 vol% 及び 0.1w/v% β -NAD液を 1 vol% の割合で加えたもの。

マイコプラズマ・シノビエ感染症凍結生ワクチン(シード)

平成25年 9 月26日(告示第2480号)新規追加
令和元年 8 月26日(告示第723号)一部改正

1 定義

シードロット規格に適合した弱毒マイコプラズマ・シノビエの培養菌液を凍結したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

マイコプラズマ・シノビエMS-H株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

33℃でのマイコプラズマ用培地(付記1)における増殖は、39.5℃での増殖を上回り、その差は100倍以上である。また、感受性鶏の腹腔内に接種しても病原性を示さない。

2.1.3 マスターシード菌

2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、製造に相当と認められた培地で増殖させ、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して-70℃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。

2.1.4 ワーキングシード菌

2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、製造に相当と認められた培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結して-70℃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。

2.1.5 プロダクションシード菌

2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、製造に相当と認められた培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して-70℃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は、3.1.3の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

プロダクションシード菌を培地に接種し、培養したものを原液とする。

原液について、3.2の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液を必要に応じ濃度調整したものを最終バルクとする。

2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、凍結し、小分製品とする。

小分製品について、3.3の試験を行う。

3 試験法

3.1 製造用株の試験

3.1.1 マスターシード菌の試験

3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.2.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.3 対象動物を用いた免疫原性試験

一般試験法の対象動物を用いた免疫原性試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.4 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。

3.1.1.5 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を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.2 ワーキングシード菌の試験

3.1.2.1 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.3 プロダクションシード菌の試験

3.1.3.1 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2 原液の試験

3.2.1 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.2 生菌数試験

3.2.2.1 試験材料

3.2.2.1.1 試料

検体を試料とする。

3.2.2.1.2 培地

マイコプラズマ用培地又は適当と認められた培地を用いる。

3.2.2.2 試験方法

96穴の平底マイクロプレートの各穴に培地を225 μ Lずつ分注する。最初の列（縦列）の8穴にそれぞれ試料を25 μ Lずつ分注後、10倍階段希釈し、 10^{-1} から 10^{-10} の希釈列を作製する。11及び12列は無接種対照とする。1試験に2枚のプレートを用いる。プレートをシールし、33℃で2週間培養する。

3.2.2.3 判定

培地の色調変化を示した穴を有する行（横列）の希釈の高い方から連続した3つの希釈列又は連続した2つの希釈列と色調変化した穴が最初に全く認められなくなった希釈列の合計3希釈列のいずれかを用いて判定する。これら3希釈列の色調が変化した穴の数をを用いて最確数表（付記2）から最確数を求め、3希釈列の最初の希釈倍数から1を引いた倍数を乗じて22.5 μ L当たりの色調変化単位（以下この項において「CCU」という。）を算出し、更に、それに44.4を乗じて1 mL当たりのCCUを算出する。

検体の生菌数は、1 mL 当たり $10^{8.0}$ CCU以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その生菌数とする。

3.3 小分製品の試験

3.3.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、融解したものは、固有の色調を有する半透明で均質な懸濁液でなければならない。異物及び異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.3.2 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.3 生菌数試験

試験品について3.2.2を準用して22.5 μ L当たりのCCUを算出し、更に1.33を乗じて1羽分当たりのCCUを算出する。

試験品の生菌数は、1羽分当たり $10^{6.4}$ CCU以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その生菌数とする。

3.3.4 マーカー試験

3.3.3を準用して試験するとき、33℃培養の生菌数は、39.5℃培養の生菌数より100倍以上多くななければならない。

3.3.5 安全性試験

3.3.5.1 試験材料

3.3.5.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

3.3.5.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した発育鶏卵由来の3～4週齢の鶏を用いる。

3.2.5.2 試験方法

試験動物の10羽を試験群とし、5羽を対照群とする。

接種材料10羽分ずつを試験群10羽に点眼接種し、対照群と共に3週間観察する。試験最終日に剖検し、鼻腔、眼窩下洞、気管、気囊及び関節（滑膜）の病変の有無を観察する。

試験開始時及び試験終了時に体重を測定する。

3.3.5.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群の動物に臨床的な異常を認めてはならない。また、剖検したとき、異常を認めてはならない。

3.3.6 力価試験

3.3.6.1 試験材料

3.3.6.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

3.3.6.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料規格1.1に適合した発育鶏卵由来の3～4週齢の鶏を用いる。

3.3.6.1.3 凝集反応抗原

「マイコプラズマ・シノビエ感染症急速診断用菌液」を用いる。

3.3.6.2 試験方法

試験動物の10羽を試験群とし、3羽を対照群とする。

接種材料1羽分を試験群に点眼接種する。接種6週間後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、マイコプラズマ・シノビエ感染症急速凝集反応を行う。

3.3.6.3 判定

試験群の70%以上が凝集抗体陽性でなければならない。この場合において、対照群では、全て凝集抗体陰性でなければならない。

4 貯法及び有効期間

凍結して、－70℃以下で保管する。

有効期間は、製造後 4 年間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合は、この限りでない。

付記 1 マイコプラズマ用培地

1,000mL中

マイコプラズマ用基礎培地（PPLO培地）＊ 22.5 g

ブドウ糖＊ 1 g

塩酸システイン＊ 0.1 g

酢酸タリウム＊ 0.1 g

0.6w/v%フェノールレッド液 5 mL

正常豚血清 100 mL

新鮮イーストエキス 10 mL

0.2w/v% DNA液 10 mL

1 w/v% β - NAD液 10 mL

ベンジルペニシリンカリウム 5,000 単位

水 残 量

＊印の成分を加温溶解した後、121℃で15分間高圧滅菌する。これに、あらかじめろ過滅菌してある他の成分を無菌的に添加する。

付記 2 最確数表

連続した3つの希釈列 に認められた培地色調 変化の穴の数	最確数 (MPN)	連続した3つの希釈列 に認められた培地色調 変化の穴の数	最確数 (MPN)
8 8 7	208	7 0 1	1.83
8 8 6	139	7 0 0	1.55
8 8 5	98.2	6 6 1	3.08
8 8 4	70.2	6 6 0	2.77
8 8 3	51.0	6 5 1	2.73
8 8 2	38.5	6 5 0	2.44
8 8 1	30.1	6 4 2	2.69
8 8 0	24.0	6 4 1	2.41
8 7 8	59.6	6 4 0	2.14
8 7 7	50.8	6 3 2	2.38
8 7 6	43.3	6 3 1	2.11
8 7 5	36.9	6 3 0	1.86
8 7 4	31.4	6 2 2	2.09
8 7 3	26.7	6 2 1	1.84
8 7 2	22.6	6 2 0	1.60

8 7 1	19.1	6 1 2	1.82
8 7 0	15.9	6 1 1	1.58
8 6 6	28.4	6 1 0	1.35
8 6 5	25.0	6 0 2	1.56
8 6 4	21.8	6 0 1	1.34
8 6 3	18.9	6 0 0	1.13
8 6 2	16.3	5 5 1	2.07
8 6 1	13.8	5 5 0	1.85
8 6 0	11.5	5 4 1	1.84
8 5 6	21.3	5 4 0	1.63
8 5 5	18.9	5 3 2	1.82
8 5 4	16.6	5 3 1	1.61
8 5 3	14.4	5 3 0	1.41
8 5 2	12.3	5 2 2	1.60
8 5 1	10.3	5 2 1	1.40
8 5 0	8.42	5 2 0	1.21
8 4 5	14.8	5 1 2	1.39
8 4 4	13.0	5 1 1	1.20
8 4 3	11.1	5 1 0	1.01
8 4 2	9.40	5 0 2	1.19
8 4 1	7.74	5 0 1	1.01
8 4 0	6.22	5 0 0	0.83
8 3 5	11.8	4 4 0	1.28
8 3 4	10.2	4 3 1	1.27
8 3 3	8.67	4 3 0	1.10
8 3 2	7.18	4 2 1	1.09
8 3 1	5.82	4 2 0	0.93
8 3 0	4.67	4 1 2	1.08
8 2 4	8.07	4 1 1	0.92
8 2 3	6.72	4 1 0	0.76
8 2 2	5.50	4 0 2	0.91
8 2 1	4.45	4 0 1	0.75
8 2 0	3.62	4 0 0	0.60
8 1 3	5.22	3 4 0	1.01
8 1 2	4.27	3 3 1	1.00
8 1 1	3.50	3 3 0	0.85

8 1 0	2.87	3 2 1	0.85
8 0 2	3.38	3 2 0	0.70
8 0 1	2.80	3 1 2	0.84
8 0 0	2.31	3 1 1	0.70
7 7 1	5.47	3 1 0	0.56
7 7 0	4.84	3 0 2	0.69
7 6 2	5.30	3 0 1	0.55
7 6 1	4.71	3 0 0	0.41
7 6 0	4.15	2 4 0	0.79
7 5 2	4.58	2 3 1	0.79
7 5 1	4.04	2 3 0	0.66
7 5 0	3.55	2 2 1	0.65
7 4 3	4.46	2 2 0	0.52
7 4 2	3.95	2 1 1	0.52
7 4 1	3.47	2 1 0	0.39
7 4 0	3.04	2 0 2	0.51
7 3 3	3.86	2 0 1	0.38
7 3 2	3.40	2 0 0	0.26
7 3 1	2.98	1 3 0	0.49
7 3 0	2.59	1 2 1	0.49
7 2 3	3.33	1 2 0	0.36
7 2 2	2.92	1 1 1	0.36
7 2 1	2.55	1 1 0	0.24
7 2 0	2.20	1 0 2	0.36
7 1 3	2.87	1 0 1	0.24
7 1 2	2.51	1 0 0	0.12
7 1 1	2.17	0 2 0	0.23
7 1 0	1.86	0 1 1	0.23
7 0 2	2.14	0 1 0	0.11
		0 0 1	0.11

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 723 号）新規追加

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、臨床症状を現せず、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°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°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°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、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。

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 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 $2.5 \times 10^4 \sim 2.5 \times 10^5$ 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。

3.4 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。試験開始翌日からは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 5×10^4 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。

(試験終了時の体重) - (攻撃日の体重)

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

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 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

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

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℃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、2～6℃又は凍結して－100℃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、2～6℃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。

2.1.2 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°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°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°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°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°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、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。

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

鶏脳脊髓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、鶏脳脊髓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髓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、鶏脳脊髓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 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

3.4 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。

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

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 $4 \times 10^5/0.3\text{mL}$ 、 $1 \times 10^5/0.3\text{mL}$ 及び $4 \times 10^5/0.3\text{mL}$ 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2 ソルビン酸加エタノール
100mL中
ソルビン酸
エタノール

10.0 g
殘 量

アイメリア・アセルブリナ株オーシスト：長径14.6~21.9 μ m、短径12.2~17.1 μ m、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 μ m、短径12.2～17.1 μ m、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。