

# 豚増殖性腸炎生ワクチン（シード）

令和4年8月15日(告示第1287号)新規追加

## 1 定義

シードロット規格に適合したローソニア・イントラセルラリスを同規格に適合した株化細胞で増殖させて得た菌液を凍結乾燥したワクチンである。

## 2 製法

### 2.1 製造用株

#### 2.1.1 名称

ローソニア・イントラセルラリス B3903 株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.2 性状

豚に注射しても病原性を示さず、McCoy 細胞（付記1）で増殖する。

#### 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、McCoy 細胞又は適當と認められた培養細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して-35℃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、McCoy 細胞又は適當と認められた培養細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結して-35℃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、McCoy 細胞又は適當と認められた培養細胞で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して-35℃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 培養細胞

McCoy 細胞又は製造に適當と認められた培養細胞を用いる。

### 2.2.2 培養液

製造に適當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-35℃以下で保存する。

マスターセルシードについて、3.2.1 の試験を行う。

マスターセルシードは、ワクチンの製造又は試験以外の目的で継代しない。マスターセルシードからプロダクションセルシードまでの最高継代数は、20 代以内でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合は、その継代数以内とする。

#### 2.2.4 ワーキングセルシード

##### 2.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.2 の培養液で増殖及び継代する。

ワーキングセルシードは凍結して -35 ℃以下で保存する。

ワーキングセルシードについて、3.2.2 の試験を行う。

#### 2.2.5 プロダクションセルシード

##### 2.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.2 の培養液で増殖する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して -35 ℃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 ワーキングセルシード（プロダクションセルシード）の培養

1 回に処理し、培養した細胞を個体別培養細胞とみなす。菌接種前の培養細胞に異常を認めてはならない。

#### 2.3.2 菌の培養

ワーキングシード菌（プロダクションシード菌）を 2.3.1 の細胞で培養し、菌が感染した細胞の割合が 60 %以上に達したときに個体別培養細胞ごとに採取した培養液を原液とする。

原液について、3.3 の試験を行う。

3.3.2 の生菌数試験の結果、原液の生菌数が規定の濃度に達していないときは、適当と認められた方法により濃縮を行う。

#### 2.4 最終バルク

原液に適当と認められた安定剤、及び血清を含まない培養液を加えて濃度調整し、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て凍結乾燥し、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 1.4.2.2.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。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。

###### 3.1.1.2 灰雑菌否定試験

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 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 2.1 及び 2.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験法によるものとする。

###### 3.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験

#### 3.1.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス及びリンパ球性脈絡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3.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験法によるものとする。

#### 3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

豚熱ウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス、ロタウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2、3.2.3、3.2.4、3.2.5、3.2.7及び3.2.9を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験法によるものとする。

#### 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。

#### 3.1.1.6 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。

#### 3.1.1.7 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 灰雑菌否定試験

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。

##### 3.1.2.2 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 生菌数試験

###### 3.1.2.3.1 試料

検体を25ゲージ乳化用針付き注射器を用いて乳化した後、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。陽性対照品（付記3）を同様に希釈し、各段階の希釈液を陽性対照試料とする。

###### 3.1.2.3.2 培養細胞

McCoy細胞を96穴プレートに培養し、20～30%単層形成したものを用いる。

###### 3.1.2.3.3 試験方法

試料及び陽性対照試料の100 $\mu$ Lずつをそれぞれ6穴の培養細胞に接種する。80vol%窒素・10vol%炭酸ガス・10vol%水素の混合ガス下で、37℃で6日間培養後、培養液を除き、冷アセトントン・メタノール液（付記4）100 $\mu$ Lを加え2分間以上固定する。

固定プレートの各穴に50 $\mu$ Lのローソニア・イントラセルラリス特異モノクローナル抗体（付記5）を加え、5vol%炭酸ガス下、37℃で30分間反応させる。リン酸緩衝食塩液で洗浄後、各穴に蛍光標識抗マウスIgG抗体（付記6）50 $\mu$ Lずつを加え、5vol%炭酸ガス下、37℃で30分間反応させる。水で洗浄後、水分を除去し、各穴に50 $\mu$ Lのグリセロール液（付記7）を加え、蛍光顕微鏡下で観察する。

###### 3.1.2.3.4 判定

細胞内又は細胞膜上に付着した5個以上の典型的な蛍光を示す細胞が1個以上認められた穴を感染とみなし、TCID<sub>50</sub>を算出する。

この場合、陽性対照品は既知の生菌数±10<sup>0.5</sup>TCID<sub>50</sub>/mLの範囲内でなければならない。

#### 3.1.3 プロダクションシード菌の試験

##### 3.1.3.1 灰雑菌否定試験

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。

### 3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.1.3.3 生菌数試験

3.1.2.3 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

## 3.2 株化細胞の試験

### 3.2.1 マスターセルシードの試験

#### 3.2.1.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.1.2 起源動物種同定試験

シードロット規格の 2.1.4.2.1.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。。

#### 3.2.1.3 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.1.4 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.1.5 外来性ウイルス否定試験

##### 3.2.1.5.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.2、2.1 及び 2.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験法によるものとする。

##### 3.2.1.5.2 特定ウイルス否定試験

###### 3.2.1.5.2.1 特定ウイルス否定一般試験

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス及びリンパ球性脈絡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 3.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験法によるものとする。

###### 3.2.1.5.2.2 個別ウイルス否定試験

豚熱ウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス、ロタウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.2、3.2.3、3.2.4、3.2.5、3.2.7 及び 3.2.9 を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験法によるものとする。

#### 3.2.1.6 核学的（染色体）性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.1.6 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 原液の試験

### 3.3.1 夾雜菌否定試験

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。

### 3.3.2 生菌数試験

3.1.2.3 を準用して試験するとき、検体の生菌数は  $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub>/mL 以上でなければならない。また、陽性対照品の生菌数は既知の菌数の  $\pm 10^{0.5}$ TCID<sub>50</sub>/mL の範囲内でなければならない。

### 3.3.3 同定試験

3.3.2 の生菌数試験において、試料がローソニア・イントラセルラリス特異モノクローナル抗体に反応し、陰性対照に反応が認められない場合、ローソニア・イントラセルラリスと判定する。

## 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、固有の色調を有する乾燥物でなければならない。溶解したものは、固有の色調を有する懸濁液でなければならず、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。

### 3.4.2 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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験法とする。

### 3.4.4 夾雜菌否定試験

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。

### 3.4.5 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、その試験法とする。

### 3.4.6 生菌数試験

試験品を添付の溶解用液で溶解し、3.1.2.3 を準用して試験する。ただし、試料を接種する培養細胞は、単層形成率が 20～40 % となったものを用いる。試験の結果、試験品の生菌数は 1 頭当たり  $10^{4.9} \sim 10^{6.1}$ TCID<sub>50</sub> で、陽性対照品は既知の生菌数の  $\pm 10^{0.5}$ TCID<sub>50</sub>/mL の範囲内でなければならない。また、陰性対照にはローソニア イントラセルラリスの感染が認められてはならない。

### 3.4.7 同定試験

3.4.6 の生菌数試験において、試料がローソニア・イントラセルラリス特異モノクローナル抗体に反応し、陰性対照に反応しない場合、ローソニア・イントラセルラリスと判定する。

## 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 McCoy 細胞

マウス線維芽細胞由来の株化細胞

### 付記 2 増殖用培養液

1,000mL 中

ダルベッコ変法イーグル培地／ハム F12 (付記 8) 12 g

重炭酸ナトリウム 2.44 g

水 残量

ダルベッコ変法イーグル培地／ハム F12 を適量の水で溶解した後、重炭酸ナトリウムを加える。pH を 6.8～7.2 に調整後、水を加えて 1,000mL とし、ろ過滅菌する。その後、非働化

していない滅菌済みの新生子牛血清又は牛胎子血清 20～100mL を無菌的に加える。

付記3 陽性対照品

ローソニア・イントラセルラリス N343 株の培養菌液を凍結したもので、生菌数試験の精度の精度管理用として用いる。

付記4 冷アセトン・メタノール液

アセトン1容にメタノール2容を混合した液で、-30～-10℃で保存したもの

付記5 ローソニア・イントラセルラリス特異モノクローナル抗体

ローソニア・イントラセルラリスの 27kDa の外膜蛋白を特異的に認識するモノクローナル抗体

付記6 蛍光標識抗マウス IgG 抗体

ヤギ抗マウス免疫グロブリン血清から  $\gamma$ -グロブリンを調製し、これを蛍光色素で標識したもの

付記7 グリセロール液

グリセリン1容に水2容を混合した液で、室温で保存する。

付記8 ダルベッコ変法イーグル培地／ハム F12

適当と認められた品質の乾燥品