

動薬協会発 68 号  
平成24年3月15日

社団法人日本動物用医薬品協会  
会 員 各 位

社団法人 日本動物用医薬品協会  
理事長 岡本 雄平  
(公印省略)

動物用生物学的製剤基準の一部改正について

当協会の業務運営につきましては、日頃からご支援、ご協力を頂きお礼申し上げます。  
さて、標記のことについて、農林水産省消費・安全局長より通知がありましたのでお知らせします。



23消安第5180号  
平成24年3月13日

社団法人 日本動物用医薬品協会理事長 殿

農林水産省消費・安全局長



動物用生物学的製剤基準の一部改正等について

このことについて、別添写しのとおり各都道府県知事宛て通知したので、御了知願います。また、貴会会員に対する周知方よろしく願います。

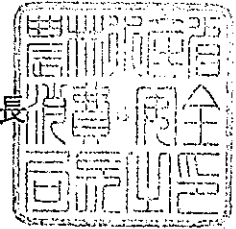




23消安第5180号  
平成24年3月13日

北海道知事 殿

農林水産省消費・安全局長



### 動物用生物学的製剤基準の一部改正等について

今般、「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）、「動物用生物学的製剤検定基準」（平成14年10月3日農林水産省告示第1568号）、「動物用医薬品の検定手数料並びに出願者の保存用品として抜き取らせるべき数量を定める等の件」（平成17年3月18日農林水産省告示第516号）、「薬事法第43条第1項の規定に基づき、農林水産大臣の指定する医薬品を定める等の件」（昭和36年2月1日農林省告示第66号）及び「農林水産大臣が指定する生物由来製品」（平成15年7月14日農林水産省告示第1034号）の一部が別紙1から別紙5までのとおり改正されましたので、貴庁に備え置いて縦覧願います。

これらの改正に伴い、「薬事法関係事務の取扱いについて」（平成12年3月31日付け12畜A第729号農林水産省畜産局長通知）の一部を別紙6のとおりに改正することとしましたので、御了知願います。

(別紙1)

○農林水産省告示第六百七十五号

薬事法(昭和三十五年法律第四百十五号)第八十三条第一項の規定により読み替えて適用される同法第四十二条第一項の規定に基づき、動物用生物学的製剤基準(平成十四年十月三日農林水産省告示第千五百六十七号)の一部を次のように改正し、公布の日から施行する。

平成二十四年三月十三日

農林水産大臣 鹿野 道彦

(「次のよう」は、省略し、その関係書類を農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課及び都道府県庁に備え置いて縦覧に供する。)

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部の牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢-粘膜病・牛パラインフルエンザ・牛RSウイルス感染症・牛アデノウイルス感染症混合生ワクチンの項の次に次のように加える。

## 牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢-粘膜病2価・牛パラインフルエンザ・牛RSウイルス感染症・牛アデノウイルス感染症混合ワクチン

### 1 定義

弱毒牛伝染性鼻気管炎ウイルス、弱毒牛パラインフルエンザ3型ウイルス、弱毒牛RSウイルス及び弱毒牛アデノウイルス（7型）を培養細胞でそれぞれ増殖させて得たウイルス液を混合し、凍結乾燥したワクチン（以下この項において「乾燥生ワクチン」という。）と牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス1型及び2型を培養細胞でそれぞれ増殖させて得たウイルス液を不活化し、混合したワクチン（以下この項において「液状不活化ワクチン」という。）とを組み合わせたワクチンである。

### 2 製法

#### 2.1 製造用株

##### 2.1.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス

###### 2.1.1.1 名称

弱毒牛伝染性鼻気管炎ウイルス No.758-43 株又はこれと同等と認められた株

###### 2.1.1.2 性状

牛の皮下、筋肉及び鼻腔内に接種しても病原性を示さず、妊娠牛に接種しても異常産を起こさない。

###### 2.1.1.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格 2.6.2 の豚精巢初代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、原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。原種ウイルスは、直接原株から連続した工程により製造し、その継代数は、3代以内でなければならない。種ウイルスは、原種ウイルスから2代以内に製造しなければならない。

原株及び原種ウイルスは、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

##### 2.1.2 牛パラインフルエンザ3型ウイルス

###### 2.1.2.1 名称

弱毒牛パラインフルエンザ3型ウイルス BN-CE 株又はこれと同等と認められた株

###### 2.1.2.2 性状

牛の鼻腔内又は筋肉内に接種しても病原性を示さず、妊娠牛に接種しても異常産を起こさない。

3日齢以内の乳のみマウスの脳内に接種しても、病原性を認めない。

###### 2.1.2.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞で継代する。

原株の継代は、原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。原種ウイルスは、直接原株から連続した工程により製造し、その継代数は、3代以内でなければならない。種ウイルスは、原種ウイルスから2代以内に製造しなければならない。

原株及び原種ウイルスは、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

### 2.1.3 牛RSウイルス

#### 2.1.3.1 名称

弱毒牛RSウイルス rs-52 株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.3.2 性状

牛に接種しても、病原性を示さない。

30℃におけるハムスター肺由来培養細胞から樹立された HAL 細胞での増殖性は、強毒ウイルスより 100 倍以上高い。

#### 2.1.3.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、HAL 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、原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。原種ウイルスは、直接原株から連続した工程により製造し、その継代数は、3 代以内でなければならない。種ウイルスは、原種ウイルスから 2 代以内に製造しなければならない。

原株及び原種ウイルスは、凍結して -70℃以下又は凍結乾燥して 5℃以下で保存する。種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

### 2.1.4 牛アデノウイルス (7 型)

#### 2.1.4.1 名称

弱毒牛アデノウイルス (7 型) TS-GT 株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.4.2 性状

牛に接種しても、病原性を示さない。

牛精巣継代細胞又はやぎ精巣継代細胞で CPE を伴って増殖する。

30℃における牛精巣継代細胞又はやぎ精巣継代細胞での増殖性は、強毒ウイルスよりも 100 倍以上高い。

#### 2.1.4.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、やぎ精巣継代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、原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。原種ウイルスは、直接原株から連続した工程により製造し、その継代数は、3 代以内でなければならない。種ウイルスは、原種ウイルスから 2 代以内に製造しなければならない。

原株及び原種ウイルスは、凍結して -70℃以下又は凍結乾燥して 5℃以下で保存する。種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

### 2.1.5 牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス 1 型

#### 2.1.5.1 名称

牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス 1 型 Nose/T 株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.5.2 性状

牛に接種すると、呼吸器症状、発熱、ウイルス血症及び白血球減少等の症状を示す。

牛精巣継代細胞及び MDBK 細胞で CPE を伴って増殖し、非細胞病原性株の感染した細胞に重感染させた場合、CPE が抑制される。

#### 2.1.5.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、牛精巣継代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、原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。原種ウイルスは、直接原株から連続した工程により製造し、その継代数は、3 代以内でなければならない。種ウイルスは、原種ウイルスから 2 代以内に製造しなければならない。

原株及び原種ウイルスは、凍結して -70℃以下又は凍結乾燥して 5℃以下で保存する。種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

### 2.1.6 牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス 2 型

#### 2.1.6.1 名称

牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス2型 KZ-cp/T 株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.6.2 性状

牛に接種すると、呼吸器症状、発熱、ウイルス血症及び白血球減少等の症状を示す。

牛精巢継代細胞及び MDBK 細胞で CPE を伴って増殖し、非細胞病原性株の感染した細胞に重感染させた場合、CPE が抑制される。

#### 2.1.6.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、牛精巢継代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、原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。原種ウイルスは、直接原株から連続した工程により製造し、その継代数は、3代以内でなければならない。種ウイルスは、原種ウイルスから2代以内に製造しなければならない。

原株及び原種ウイルスは、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

### 2.2 製造用材料

#### 2.2.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス

##### 2.2.1.1 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.6.2 の豚精巢初代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

##### 2.2.1.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

#### 2.2.2 牛パラインフルエンザ3型ウイルス

##### 2.2.2.1 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞を用いる。

##### 2.2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

#### 2.2.3 牛RSウイルス

##### 2.2.3.1 培養細胞

HAL 細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

##### 2.2.3.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

#### 2.2.4 牛アデノウイルス(7型)

##### 2.2.4.1 培養細胞

やぎ精巢初代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

##### 2.2.4.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

#### 2.2.5 牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス1型

##### 2.2.5.1 培養細胞

牛精巢継代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

##### 2.2.5.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

#### 2.2.6 牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス2型

##### 2.2.6.1 培養細胞

牛精巢継代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

##### 2.2.6.2 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 牛伝染性鼻気管炎ウイルス原液

#### 2.3.1.1 細胞の培養

1 回処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の培養細胞に、異常を認めてはならない。

個別培養細胞について、3.1 の試験を行う。

#### 2.3.1.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を混合し、原液とする。

原液について、3.4.1、3.4.2 及び 3.4.3.1 の試験を行う。

### 2.3.2 牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス原液

#### 2.3.2.1 細胞の培養

1 回処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の培養細胞に、異常を認めてはならない。

個別培養細胞について、3.1 の試験を行う。

#### 2.3.2.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を混合し、原液とする。

原液について、3.4.1、3.4.2 及び 3.4.3.2 の試験を行う。

### 2.3.3 牛RSウイルス原液

#### 2.3.3.1 細胞の培養

1 回処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の培養細胞に、異常を認めてはならない。

個別培養細胞について、3.1 の試験を行う。

#### 2.3.3.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を混合し、原液とする。

原液について、3.4.1、3.4.2 及び 3.4.3.3 の試験を行う。

### 2.3.4 牛アデノウイルス（7 型）原液

#### 2.3.4.1 細胞の培養

1 回処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の培養細胞に、異常を認めてはならない。

個別培養細胞について、3.1 の試験を行う。

#### 2.3.4.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を混合し、原液とする。

原液について、3.4.1、3.4.2 及び 3.4.3.4 の試験を行う。

### 2.3.5 牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス 1 型原液

#### 2.3.5.1 細胞の培養

1 回処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の培養細胞に、異常を認めてはならない。

個別培養細胞について、3.1 の試験を行う。

#### 2.3.5.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を混合し、ウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2 の試験を行う。



### 2.3.5.3 濃縮

ウイルス浮遊液を限外ろ過又は適当と認められた方法により濃縮し、濃縮ウイルス液とする。  
濃縮ウイルス液について、3.3の試験を行う。

### 2.3.5.4 不活化

濃縮ウイルス液を紫外線照射又は適当と認められた方法により不活化したものを原液とする。  
原液について、3.4.1及び3.4.4の試験を行う。

### 2.3.6 牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス2型原液

#### 2.3.6.1 細胞の培養

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

個別培養細胞について、3.1の試験を行う。

#### 2.3.6.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を混合し、ウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2の試験を行う。

#### 2.3.6.3 濃縮

ウイルス浮遊液を限外ろ過又は適当と認められた方法により濃縮し、濃縮ウイルス液とする。  
濃縮ウイルス液について、3.3の試験を行う。

#### 2.3.6.4 不活化

濃縮ウイルス液を紫外線照射又は適当と認められた方法により不活化したものを原液とする。  
原液について、3.4.1及び3.4.4の試験を行う。

### 2.4 乾燥生ワクチン混合原液

牛伝染性鼻気管炎ウイルス原液、牛パラインフルエンザ3型ウイルス原液、牛RSウイルス原液及び牛アデノウイルス(7型)原液を混合し、乾燥生ワクチン混合原液とする。

乾燥生ワクチン混合原液について、3.5の試験を行う。

### 2.5 最終バルク

#### 2.5.1 乾燥生ワクチン

乾燥生ワクチン混合原液に適当と認められた安定剤を加えて混合し、最終バルクとする。

#### 2.5.2 液状不活化ワクチン

牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス1型原液及び牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス2型原液を混合し、最終バルクとする。

### 2.6 小分製品

#### 2.6.1 乾燥生ワクチン

最終バルクを小分容器に分注し、凍結乾燥し、小分製品とする。

小分製品について、3.6の試験を行う。

#### 2.6.2 液状不活化ワクチン

最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。

小分製品について、3.6の試験を行う。

### 3 試験法

#### 3.1 培養細胞の試験

個別培養細胞の1%以上を対照培養細胞とし、これについて次の試験を行う。

豚精巢初代細胞の場合は、3.1.1、3.1.2、3.1.3及び3.1.4の試験を行う。

鶏胚初代細胞の場合は、3.1.5及び3.1.6の試験を行う。

HAL細胞及び牛精巢継代細胞の場合は、3.1.2及び3.1.5の試験を行う。

やぎ精巢継代細胞の場合は、3.1.2、3.1.3、3.1.7及び3.1.8の試験を行う。

### 3.1.1 培養観察

対照培養細胞を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で培養する。対照培養細胞をプールし、4本以上の培養瓶及びカバーグラスを入れた4枚以上のシャーレに継代し、7日間培養し、観察するとき、CPEを認めてはならない。

### 3.1.2 赤血球吸着試験

3.1.1、3.1.5 又は 3.1.7 の試験最終日に培養瓶の培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を2回洗浄した後、2群に分け、生理食塩液で濃度を調整した 0.1vol % のモルモット及びがちょうの赤血球浮遊液を重層し、60 分間静置した後、赤血球吸着の有無を観察するとき、培養細胞に赤血球吸着を認めてはならない。

### 3.1.3 封入体染色試験

3.1.1 又は 3.1.7 の試験最終日に培養カバーグラスをリン酸緩衝食塩液で洗浄し、固定した後、ギムザ染色し、封入体の有無を観察するとき、培養細胞に封入体を認めてはならない。

### 3.1.4 迷入ウイルス否定試験

3.1.1 の試験最終日に採取した培養液の 2 mL について、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 2.3.1.3 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.1.5 培養観察

対照培養細胞を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で培養し、観察するとき、CPEを認めてはならない。

### 3.1.6 赤血球吸着試験

3.1.5 の試験最終日に培養瓶の培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を2回洗浄した後、生理食塩液で濃度を調整した 0.1vol % の鶏の赤血球浮遊液を重層し、60 分間静置後、赤血球吸着の有無を観察するとき、培養細胞に赤血球の吸着を認めてはならない。

### 3.1.7 培養観察

対照培養細胞を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で3代まで継代培養する。3代目に継代するとき、対照培養細胞をプールし、4本以上の培養瓶及びカバーグラスを入れた4枚以上のシャーレに継代し、7日間培養し、観察するとき、CPEを認めてはならない。

### 3.1.8 迷入ウイルス否定試験

3.1.7 の試験最終日に採取した培養液の 2 mL について、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 2.4.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

## 3.2 ウイルス浮遊液の試験

### 3.2.1 ウイルス含有量試験

#### 3.2.1.1 牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス1型及び2型

##### 3.2.1.1.1 試験材料

##### 3.2.1.1.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記1）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.2.1.1.1.2 培養細胞

牛精巢継代細胞を小試験管で1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

##### 3.2.1.1.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を0.5mL ずつ加え、34～36℃で7日間回転培養し、観察する。

##### 3.2.1.1.3 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、1 mL 中 10<sup>7.5</sup>TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

## 3.3 濃縮ウイルス液の試験

### 3.3.1 ウイルス含有量試験

3.2.1.1 を準用して試験するとき、検体のウイルス含有量は、1 mL 中  $10^{8.5}$ TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

### 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。

#### 3.4.2 迷入ウイルス否定試験

牛伝染性鼻気管炎ウイルス原液について、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1、2.3.1、2.4.1、2.4.2 及び 2.7.2.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス原液、牛 R S ウイルス原液及び牛アデノウイルス (7 型) 原液について、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1、2.4.1、2.4.2 及び 2.7.2.1 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、中和用血清は、抗牛伝染性鼻気管炎ウイルス血清 (付記 2)、抗牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス血清 (付記 3)、抗牛 R S ウイルス血清 (付記 4) 及び抗牛アデノウイルス (7 型) 血清 (付記 5) を非働化したものを用いる。

#### 3.4.3 ウイルス含有量試験

##### 3.4.3.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス

###### 3.4.3.1.1 試験材料

###### 3.4.3.1.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.4.3.1.1.2 培養細胞

牛精巢継代細胞を小試験管に 1～3 日間培養し、単層となったものを用いる。

###### 3.4.3.1.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本以上の培養細胞に接種し、37℃で 60 分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を 0.5mL ずつ加え、34～36℃で 7 日間回転培養し、観察する。

###### 3.4.3.1.3 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、1 mL 中  $10^{5.7}$ TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

##### 3.4.3.2 牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス

###### 3.4.3.2.1 試験材料

###### 3.4.3.2.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.4.3.2.1.2 培養細胞

牛腎継代細胞を小試験管に 1～3 日間培養し、単層となったものを用いる。

###### 3.4.3.2.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本以上の培養細胞に接種し、37℃で 60 分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を 0.5mL ずつ加え、34～36℃で 7 日間回転培養し、観察する。

###### 3.4.3.2.3 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、1 mL 中  $10^{6.7}$ TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

##### 3.4.3.3 牛 R S ウイルス

###### 3.4.3.3.1 試験材料

###### 3.4.3.3.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.4.3.3.1.2 培養細胞

Vero 細胞を小試験管に 3～4 日間培養し、単層となったものを用いる。

#### 3.4.3.3.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を0.5mL ずつ加え、34℃で14日間回転培養し、観察する。

#### 3.4.3.3.3 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、1 mL 中 10<sup>6.7</sup>TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

#### 3.4.3.4 牛アデノウイルス（7型）

##### 3.4.3.4.1 試験材料

###### 3.4.3.4.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.4.3.4.1.2 培養細胞

牛精巢継代細胞を小試験管に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

###### 3.4.3.4.1.3 赤血球浮遊液

牛、羊又はやぎの赤血球をゼラチン・アルブミン加ペロナル緩衝食塩液（付記6）（以下この項において「希釈液」という。）に0.3vol %に浮遊したもので、赤血球凝集抗原が規定の赤血球凝集価を示すものを用いる。

##### 3.4.3.4.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を0.5mL ずつ加え、34～36℃で7日間回転培養する。培養終了後、培養細胞を4℃に冷却し、これに4℃に冷却した赤血球浮遊液 0.25mL を加え、4℃で1夜静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

##### 3.4.3.4.3 判定

赤血球凝集が認められ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、1 mL 中 10<sup>4.7</sup>TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

#### 3.4.4 不活化試験

##### 3.4.4.1 試験材料

###### 3.4.4.1.1 試料

検体を試料とする。

###### 3.4.4.1.2 培養細胞

牛精巢継代細胞を培養瓶に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

##### 3.4.4.2 試験方法

試料 2 mL を、1 mL につき 20cm<sup>2</sup> 以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着後、ウイルス増殖用培養液を加え、34～36℃で5日間培養し、CPEの有無を観察した後、細胞を10本の小試験管に継代し、5日間培養し、CPEの有無を観察する。培養液を除き、1 mL 中約 10<sup>5.0</sup>TCID<sub>50</sub> の牛ウイルス性下痢ウイルス-粘膜病1型 Nose 株を含むウイルス増殖用培養液 0.5mL ずつをそれぞれに加え、34～36℃で7日間回転培養し、CPEの有無を観察する。

##### 3.4.4.3 判定

観察期間中、牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス1型 Nose 株接種前の培養細胞にCPEを認めず、接種後の培養細胞にCPEを認めた場合、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 乾燥生ワクチン混合原液の試験

##### 3.5.1 迷入ウイルス否定試験

一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1 及び 2.8.1.1 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、中和用血清は、抗牛伝染性鼻気管炎ウイルス血清、抗牛パラインフルエンザ3型ウイル

ス血清、抗牛RSウイルス血清及び抗牛アデノウイルス（7型）血清を非働化したものを用いる。

### 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、乾燥生ワクチンは、固有の色調を有する乾燥物でなければならない。液状不活化ワクチンは、固有の色調を有する均質な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。乾燥生ワクチンを液状不活化ワクチンで溶解したものは、固有の色調を有する均質な液体でなければならない。異物及び異臭を認めてはならない。

また、小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

#### 3.6.2 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、液状不活化ワクチンのpHは、固有の値を示さなければならない。

#### 3.6.3 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、乾燥生ワクチンは、適合しなければならない。

#### 3.6.4 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、乾燥生ワクチンは、適合しなければならない。

#### 3.6.5 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。

#### 3.6.6 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、乾燥生ワクチンは、適合しなければならない。ただし、原液を含む中間工程でマイコプラズマ否定試験を実施する場合には、本試験の実施を省略することができる。

#### 3.6.7 迷入ウイルス否定試験

一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1、2.4.1 及び 2.4.2 を準用して試験するとき、乾燥生ワクチンは、適合しなければならない。

ただし、乾燥生ワクチンの溶解には液状不活化ワクチンと同量のリン酸緩衝食塩液を用い、中和用血清は、抗牛伝染性鼻気管炎ウイルス血清、抗牛パラインフルエンザ3型ウイルス血清、抗牛RSウイルス血清及び抗牛アデノウイルス（7型）血清を非働化したものを用いる。

#### 3.6.8 ウイルス含有量試験

##### 3.6.8.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス

乾燥生ワクチンを試験品とし、3.4.3.1 を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり  $10^{4.0}$ TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

ただし、試験品を液状不活化ワクチンと同量のウイルス増殖用培養液で溶解し、牛伝染性鼻気管炎ウイルス以外のウイルスを各抗血清を非働化したもので中和した後、ウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.6.8.2 牛パラインフルエンザ3型ウイルス

乾燥生ワクチンを試験品とし、3.4.3.2 を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり  $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

ただし、試験品を液状不活化ワクチンと同量のウイルス増殖用培養液で溶解し、牛パラインフルエンザ3型ウイルス以外のウイルスを各抗血清を非働化したもので中和した後、ウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.6.8.3 牛RSウイルス

乾燥生ワクチンを試験品とし、3.4.3.3 を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり  $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

ただし、試験品を液状不活化ワクチンと同量のウイルス増殖用培養液で溶解し、牛RSウイルス以外のウイルスを各抗血清を非働化したもので中和した後、ウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

#### 3.6.8.4 牛アデノウイルス（7型）

乾燥生ワクチンを試験品とし、3.4.3.4を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり $10^{3.0}$ TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

ただし、試験品を液状不活化ワクチンと同量のウイルス増殖用培養液で溶解し、牛アデノウイルス（7型）以外のウイルスを各抗血清を非働化したもので中和した後、ウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

#### 3.6.9 不活化試験

液状不活化ワクチンを試験品とし、3.4.4を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.6.10 異常毒性否定試験

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

#### 3.6.11 安全試験

##### 3.6.11.1 牛注射試験

###### 3.6.11.1.1 試験材料

###### 3.6.11.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 3.6.11.1.1.2 試験動物

体重100～200kgの牛を用いる。

###### 3.6.11.1.2 試験方法

注射材料1頭分を試験動物の筋肉内に注射し、14日間観察する。

###### 3.6.11.1.3 判定

観察期間中、軽い発熱（40.5℃以下）を認めても3日間以上継続せず、その他の異常を認めてはならない。

##### 3.6.11.2 乳のみマウス注射試験

###### 3.6.11.2.1 試験材料

###### 3.6.11.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 3.6.11.2.1.2 試験動物

3日齢以内の乳のみマウスを用いる。

###### 3.6.11.2.2 試験方法

注射材料0.01mLずつを10匹の試験動物の脳内に注射し、14日間観察する。

###### 3.6.11.2.3 判定

観察期間中、異常を認めてはならない。

事故のため試験動物が半数未満になった場合は、試験を反復する。

#### 3.6.12 力価試験

##### 3.6.12.1 牛伝染性鼻気管炎力価試験

###### 3.6.12.1.1 試験材料

###### 3.6.12.1.1.1 試験動物

3.6.11.1の試験に用いた動物を用いる。

###### 3.6.12.1.1.2 中和試験用ウイルス

牛腎又は牛精巢継代細胞で増殖させた強毒牛伝染性鼻気管炎ウイルスNo.758株を用いる。

###### 3.6.12.1.1.3 培養細胞

牛精巢継代細胞浮遊液を約27cm<sup>2</sup>のシャーレに5mLずつ分注し、1～3日間培養し、単層とな

ったものを用いる。

#### 3.6.12.1.2 試験方法

3.6.11.1 の試験終了後、14 日目に得られた血清について、中和試験を行う。

被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液で 2 倍階段希釈する。各希釈血清 0.5mL と 0.2mL 中約 100PFU の中和試験用ウイルス液 0.5mL とを混合し、37 °C で 60 分間処理する。この混合液 0.2mL ずつをそれぞれ 2 枚の培養細胞に接種し、37 °C で 60 分間吸着させた後、混合液を除き、第 1 次重層寒天培地（付記 7）5 mL を加え、37 °C、5 vol % 炭酸ガス下で 3 ~ 5 日間培養した後、第 2 次重層寒天培地（付記 8）3 mL を加え、更に 24 時間培養した後、ブラック数を算定する。

#### 3.6.12.1.3 判定

ブラック数がウイルス対照の 50 % 以下に減少した血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

試験動物の中和抗体価は、2 倍以上でなければならない。

#### 3.6.12.2 牛パラインフルエンザ力価試験

##### 3.6.12.2.1 試験材料

###### 3.6.12.2.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

###### 3.6.12.2.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

###### 3.6.12.2.1.3 赤血球凝集抗原

牛腎継代細胞で増殖させた強毒牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス BN<sub>I</sub>-1 株を用いる。

##### 3.6.12.2.2 試験方法

接種材料 0.2mL ずつを 5 匹の試験動物の鼻腔内に接種し、21 日目に得られた各個体の血清について赤血球凝集抑制試験を行う。

被検血清 0.2mL に 25w/v % カオリン加生理食塩液 0.6mL を加え、15 ~ 25 °C で 20 分間処理した後、1,700G で 20 分間遠心し、その上清を希釈液を用いて 2 倍階段希釈する。各希釈血清 0.2mL に 4 単位の赤血球凝集抗原 0.2mL を加え、37 °C で 60 分間処理した後、0.3vol % モルモット赤血球浮遊液 0.2mL を加え、4 °C で 1 夜静置し、観察する。

##### 3.6.12.2.3 判定

赤血球凝集を阻止した血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。

赤血球凝集抑制抗体価 8 倍以上を赤血球凝集抑制抗体陽性とする。

試験動物の赤血球凝集抑制抗体陽性率は、80 % 以上でなければならない。

#### 3.6.12.3 牛 R S ウイルス感染症力価試験

##### 3.6.12.3.1 試験材料

###### 3.6.12.3.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 3.6.12.3.1.2 試験動物

体重約 100g のハムスターを用いる。

###### 3.6.12.3.1.3 中和試験用ウイルス

牛腎継代細胞で増殖させた強毒牛 R S ウイルス NMK7 株を用いる。

###### 3.6.12.3.1.4 培養細胞

Vero 細胞を小試験管に 3 ~ 4 日間培養し、単層となったものを用いる。

##### 3.6.12.3.2 試験方法

注射材料 2 mL ずつを 5 匹の試験動物に 14 日間隔で 2 回腹腔内注射し、第 2 回目の注射後 14 日目に得られた各個体の血清について、中和試験を行う。

被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液で 2 倍階段希釈する。希釈血清 0.5mL と 0.1mL 中約 200TCID<sub>50</sub> の中和試験用ウイルス 0.5mL とを混合し、22 °C で 24 時間処理する。この混合液

0.1mL ずつを4本の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を0.5mL ずつ加え、34℃で10日間回転培養し、観察する。

#### 3.6.12.3.3 判定

培養細胞の2本以上にCPEの抑制を認めた血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

中和抗体価2倍以上を中和抗体陽性とする。

試験動物の中和抗体陽性率は、80%以上でなければならない。

#### 3.6.12.4 牛アデノウイルス感染症力価試験

##### 3.6.12.4.1 試験材料

###### 3.6.12.4.1.1 試験動物

3.6.11.1の試験に用いた動物を用いる。

###### 3.6.12.4.1.2 赤血球凝集抗原

牛精巢継代細胞で増殖させた強毒牛アデノウイルス(7型)袋井株を用いる。

###### 3.6.12.4.1.3 赤血球浮遊液

3.4.3.4.1.3の赤血球浮遊液を用いる。

##### 3.6.12.4.2 試験方法

3.6.11.1の試験終了後、14日目に得られた血清について、赤血球凝集抑制試験を行う。

被検血清を非働化した後、希釈液で5倍に希釈する。希釈血清に25w/v%カオリン加生理食塩液を等量加え、15～25℃で20分間処理した後、1,700Gで20分間遠心し、その上清を希釈液を用いて2倍階段希釈する。各希釈血清0.2mLに4単位の赤血球凝集抗原0.2mLを加え、4℃で1夜処理した後、4℃に冷却した赤血球浮遊液0.2mLを加え、4℃で1夜静置し、観察する。

###### 3.6.12.4.3 判定

赤血球凝集を阻止した血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。

試験動物の赤血球凝集抑制抗体価は、20倍以上でなければならない。

#### 3.6.12.5 牛ウイルス性下痢-粘膜病力価試験

##### 3.6.12.5.1 試験材料

###### 3.6.12.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 3.6.12.5.1.2 試験動物

4週齢のマウスを用いる。

###### 3.6.12.5.1.3 中和試験用ウイルス

牛精巢継代細胞で増殖させた牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス1型 Nose 株及び牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス2型 KZ-91-cp 株を用いる。

###### 3.6.12.5.1.4 培養細胞

牛精巢継代細胞を小試験管で1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

##### 3.6.12.5.2 試験方法

注射材料0.5mL ずつを25匹の試験動物に21日間隔で2回腹腔内注射し、第2回目の注射後14日目に得られた血清について、中和試験を行う。

マウス血清は、任意に5匹ずつプールし、5プールを用いる。

被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液で2倍階段希釈する。各希釈血清0.5mLと0.1mL中約200TCID<sub>50</sub>の中和試験用ウイルス液0.5mLとを混合し、37℃で60分間処理する。この混合液0.1mL ずつを、4本の培養細胞に接種し、37℃で60分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を0.5mL ずつ加え、37℃で7日間回転培養し、観察する。

###### 3.6.12.5.3 判定

培養細胞の2本以上にCPEの阻止を認めた血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

中和抗体価2倍以上を陽性とする。



ブール血清の中和抗体陽性率は、1型及び2型とも80%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、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 ウイルス増殖用培養液

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 20 ~ 100 mL

イーグル MEM 残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.2 ~ 7.6 に調整する。

牛胎子血清は、牛伝染性鼻気管炎ウイルス、牛パラインフルエンザ3型ウイルス、牛RSウイルス、牛アデノウイルス（7型）並びに牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス1型及び2型に対して抗体陰性のものを用いる。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

##### 付記2 抗牛伝染性鼻気管炎ウイルス血清

強毒牛伝染性鼻気管炎ウイルス No.758 株で免疫した兎の血清であって、検体又は試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの。

##### 付記3 抗牛パラインフルエンザ3型ウイルス血清

強毒牛パラインフルエンザ3型ウイルス BN<sub>1</sub>-1 株で免疫した兎の血清であって、検体又は試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの。

##### 付記4 抗牛RSウイルス血清

強毒牛RSウイルス NMK7 株で免疫した兎の血清であって、検体又は試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの。

##### 付記5 抗牛アデノウイルス（7型）血清

強毒牛アデノウイルス（7型）袋井株で免疫した兎の血清であって、検体又は試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの。

##### 付記6 ゼラチン・アルブミン加ペロナール緩衝食塩液

A液 ペロナール緩衝食塩液

1,000mL 中

塩化ナトリウム 8.5 g

バルビタール 0.575 g

バルビタールナトリウム 0.375 g

無水塩化カルシウム 0.028 g

塩化マグネシウム六水和物 0.168 g

水 残 量

B液 1 w/v %ゼラチン溶液

1,000mL 中

精製ゼラチン 1 g

水 残 量

使用時加温溶解する。

C液 5 w/v %牛血清アルブミン溶液

1,000mL 中

牛血清アルブミン

5 g

水

残 量

使用時に、A液 200mL にB液 0.2mL 及びC液 4 mL を加えて調製し、用いる。

付記7 第1次重層寒天培地

1,000mL 中

イーグルMEM

880 mL

トリプトース・ホスフェイト・ブロス

2.95 g

寒天

8 g

牛胎子血清

20 mL

水

残 量

牛胎子血清は、牛伝染性鼻気管炎ウイルスに対する中和抗体陰性のものを用いる。

付記8 第2次重層寒天培地

1,000mL 中

イーグルMEM

900 mL

トリプトース・ホスフェイト・ブロス

2.95 g

寒天

8 g

ニュートラルレッド

0.05 g

水

残 量

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部の豚アクチノバシラス・プルロニューモニエ（1・2・5型）感染症・豚丹毒混合（油性アジュバント加）不活化ワクチンの項の次に次のように加える。

## **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**

### 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

## 組換え大腸菌 ESN1113 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。Isopropylthiogalactoside (IPTG) 添加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  $-60^{\circ}\text{C}$  以下又は凍結乾燥して  $5^{\circ}\text{C}$  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

#### 組換え大腸菌 ESN1074 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 添加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  $-60^{\circ}\text{C}$  以下又は凍結乾燥して  $5^{\circ}\text{C}$  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

#### 組換え大腸菌 ESN1166 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 添加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  $-60^{\circ}\text{C}$  以下又は凍結乾燥して  $5^{\circ}\text{C}$  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  $-60^{\circ}\text{C}$  以下又は凍結乾燥して  $5^{\circ}\text{C}$  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 添加濃縮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相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、又は相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  $1.4 \times 10^8$  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  $3 \times 10^{10}$  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  $\mu$ 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  $\mu$ 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。

##### 3.3.1.3 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  $\text{cm}^2$  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  $\mu$  g/mL となるように希釈し、その 50  $\mu$  L に等量のサンプルバッファを加え、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

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。

### 3.5.3 たん白定量試験

#### 3.5.3.1 試験材料

検体を 20 ~ 200  $\mu$  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  $^{\circ}$ 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  $^{\circ}$ 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 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、2 型菌 SH-15 株又は適当と認められた株及び 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 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 %以上が死亡した最少の攻撃菌量において、試験群では、80 %以上が耐過生存しなければならぬ。

### 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  $\mu$  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（付記 16）で 3 回洗浄する。次に、各穴に標識抗体（付記 17）を 100  $\mu$  L ずつ加え、37℃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  $\mu$  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。

### 3.6.8.2.3 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。

#### 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分間高圧滅菌を行う。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分間高圧滅菌する。56  $^{\circ}$ Cに冷却した後、アンピシリンを最終力価250  $\mu$  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兔免疫血清

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 $10^6$ 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  $^{\circ}$ 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

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
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 °C 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 11 試験用培地 2

ハートインフュージョン培地を 121 °C 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 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 °C 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 °C 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 °C 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  $\mu$  L ずつ加え、4 °C 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  $\mu$  L ずつ加え、4 °C 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  $\mu$  g/mL になるように希釈し、各穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、4 °C 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 兎免疫血清

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兎の血清であって、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。

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部のニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎2価・産卵低下症候群－1976混合（油性アジュバント加）不活化ワクチンの項の2.1.2.1及び3.2.1.3中「D274株」を「249g株」に、3.4.5.1.1.2中「ニューカッスル病診断用赤血球凝集抗原」を「ニューカッスル病診断用赤血球凝集抗原」に改める。

ワクチン（シードロット製剤）の部のイバラキ病生ワクチン（シード）の項の前に次のように加える。

## アカバネ病生ワクチン（シード）

### 1 定義

シードロット規格に適合した弱毒アカバネ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

弱毒アカバネウイルス TS-C2 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.2 性状

妊娠牛に接種しても、異常産を起こさない。

##### 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-1 細胞又は相当と認められた細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 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-1 細胞又は相当と認められた細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 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 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、HmLu-1 細胞又は相当と認められた細胞で増殖させる。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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 株化細胞

HmLu-1 細胞又は製造に相当と認められた株化細胞を用いる。

#### 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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で

保存する。

マスターセルシードについて、3.2.1 の試験を行う。

マスターセルシードは、ワクチンの製造又は試験以外の目的で継代しない。マスターセルシードからプロダクションセルシードまでの最高継代数は、20 代以内でなければならない。

## 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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングセルシードについて、3.2.2 の試験を行う。

## 2.2.5 プロダクションセルシード

### 2.2.5.1 増殖及び保存

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、3.2.3 の試験を行う。

## 2.3 原液

### 2.3.1 プロダクションセルシードの培養

1 回に処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。ウイルス接種前のプロダクションセルシード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 2.3.1 の細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を混合し、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

原液に相当と認められた安定剤を加え、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、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

リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、牛RSウイルス及びブルータングウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法 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-粘膜病ウイルス、ロタウイルス、牛白血病ウイルス、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の 1.1、3.2.5、3.2.7、3.2.8 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。

#### 3.1.1.5 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法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

##### 3.1.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

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

#### 3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

##### 3.1.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

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

#### 3.2 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

リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、牛RSウイルス及びブルータングウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法 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-粘膜病ウイルス、ロタウイルス、牛白血病ウイルス、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の 1.2、3.2.5、3.2.7、3.2.8 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 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 ウイルス含有量試験

#### 3.3.2.1 試験材料

##### 3.3.2.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記）で10倍段階希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.3.2.1.2 培養細胞

HmLu-1細胞を小試験管1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

##### 3.3.2.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を0.5mLずつ加え、34～36℃で7日間回転培養し、観察する。

##### 3.3.2.3 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1 mL中10<sup>6.5</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

## 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 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 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、原液を含む中間工程でマイコプラズマ否定試験を実施する場合には、本試験の実施を省略することができる。

### 3.4.6 ウイルス含有量試験

3.3.2 を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり  $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

### 3.4.7 異常毒性否定試験

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

### 3.4.8 安全試験

#### 3.4.8.1 試験材料

##### 3.4.8.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.4.8.1.2 試験動物

体重 100 ~ 200kg の牛を用いる。

##### 3.4.8.2 試験方法

注射材料 1 頭分を 1 頭の試験動物の皮下に注射し、14 日間観察する。

##### 3.4.8.3 判定

観察期間中、軽い発熱 (40.5 °C 以下) を認めても 3 日間以上継続せず、その他の異常を認めてはならない。

### 3.4.9 力価試験

#### 3.4.9.1 試験材料

##### 3.4.9.1.1 試験動物

3.4.8 の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.4.9.1.2 中和試験用ウイルス

HmLu-1 細胞で増殖させたアカバネウイルス JaGAR39 株を用いる。

##### 3.4.9.1.3 培養細胞

HmLu-1 細胞を小試験管で 1 ~ 3 日間培養し、単層となったものを用いる。

##### 3.4.9.2 試験方法

3.4.8 の試験を終了した後、14 日目に得られた血清について中和試験を行う。

被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液で 2 倍段階希釈する。各希釈血清 0.5mL と 0.1mL 中に約 200TCID<sub>50</sub> の中和試験用ウイルス液 0.5mL とを混合し、37 °C で 60 分間処理する。この各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本の培養細胞に接種し、37 °C で 60 分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を 0.5mL ずつ加え、34 ~ 36 °C で 7 日間回転培養し、観察する。

##### 3.4.9.3 判定

培養細胞の 2 本以上に CPE の阻止を認めた血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

試験動物の中和抗体価は、2 倍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 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス

2.95 g

ブドウ糖	1.0 g
酵母エキス	0.5 g
牛血清	5 ~ 20 mL
イーグルMEM	残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.2 ~ 7.6 に調整する。

牛血清は、アカパネウイルスに対する中和抗体陰性のものを用いる。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

ワクチン（シードロット製剤）の部の牛流行熱・（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）の項の次に次のように加える。

## 牛流行熱・イバラキ病混合（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

### 1 定義

シードロット規格に適合した牛流行熱ウイルス及びイバラキウイルスをそれぞれ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不活化し、アルミニウムゲルアジュバントを添加した後混合したワクチンである。

### 2 製法

#### 2.1 製造用株

##### 2.1.1 牛流行熱ウイルス

###### 2.1.1.1 名称

牛流行熱ウイルス YHL 株又はこれと同等と認められた株

###### 2.1.1.2 性状

HmLu-1 細胞で CPE を伴って増殖する。

###### 2.1.1.3 マスターシードウイルス

###### 2.1.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、HmLu-1 細胞又は適当と認められた細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1.1 の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、5代以内でなければならない。

###### 2.1.1.4 ワーキングシードウイルス

###### 2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、HmLu-1 細胞又は適当と認められた細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2 の試験を行う。

###### 2.1.1.5 プロダクションシードウイルス

###### 2.1.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、HmLu-1 細胞又は適当と認められた細胞で増殖させる。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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ウイルスを保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

#### 2.1.2 イバラキウイルス

##### 2.1.2.1 名称

弱毒イバラキウイルス No.2 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.2.2 性状

牛腎継代細胞、鶏胚初代細胞、HmLu-1 細胞及び BHK-21(C-13)細胞で CPE を伴って増殖する。

##### 2.1.2.3 マスターシードウイルス

###### 2.1.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、鶏胚初代細胞又は適当と認められた細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1.2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。

#### 2.1.2.4 ワーキングシードウイルス

##### 2.1.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、HmLu-1細胞又は適当と認められた細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

#### 2.1.2.5 プロダクションシードウイルス

##### 2.1.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、HmLu-1細胞又は適当と認められた細胞で増殖させる。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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 牛流行熱ウイルス

#### 2.2.1.1 株化細胞

HmLu-1細胞又は製造に適当と認められた株化細胞を用いる。

#### 2.2.1.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

#### 2.2.1.3 マスターセルシード

##### 2.2.1.3.1 作製、保存及びプロダクションセルシードまでの最高継代数

マスターセルシードは、2.2.1.2の培養液で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターセルシードは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

マスターセルシードについて、3.3.1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。

#### 2.2.1.4 ワーキングセルシード

##### 2.2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.1.2の培養液で増殖及び継代する。

ワーキングセルシードは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングセルシードについて、3.3.2の試験を行う。

#### 2.2.1.5 プロダクションセルシード

##### 2.2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.1.2の培養液で増殖させる。

プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、3.3.3の試験を行う。

### 2.2.2 イバラキウイルス

### 2.2.2.1 初代細胞を用いる場合

#### 2.2.2.1.1 マスタープライマリーセルシードの増殖、継代及び保存に用いる初代細胞

SPF 動物規格の 2.6 に適合した鶏胚初代細胞又は製造に相当と認められた細胞を用いる。

#### 2.2.2.1.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

#### 2.2.2.1.3 マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）

##### 2.2.2.1.3.1 増殖、継代及び保存

マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）は、2.2.2.1.2 の培養液で増殖し、継代及び保存しない。

マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）について、3.2.1 の試験を行う。

### 2.2.2.2 株化細胞を用いる場合

#### 2.2.2.2.1 株化細胞

HmLu-1 細胞、BHK-21(C-13)細胞又は製造に相当と認められた株化細胞を用いる。

#### 2.2.2.2.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

#### 2.2.2.2.3 マスターセルシード

##### 2.2.2.2.3.1 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、2.2.2.2.2 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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

マスターセルシードについて、3.3.1 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。

#### 2.2.2.4 ワーキングセルシード

##### 2.2.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.2.2.2 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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングセルシードについて、3.3.2 の試験を行う。

#### 2.2.2.5 プロダクションセルシード

##### 2.2.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.2.2.2 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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、3.3.3 の試験を行う。

## 2.3 原液

### 2.3.1 牛流行熱ウイルス原液

#### 2.3.1.1 プロダクションセルシードの培養

1 回に処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。ウイルス接種前のプロダクションセルシードに異常を認めてはならない。

#### 2.3.1.2 ウイルスの培養

プロダクションセルシードウイルスを 2.3.1.1 の細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清をウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.4.1.1 の試験を行う。

#### 2.3.1.3 不活化

ウイルス浮遊液にホルマリンを 0.2vol % となるように加える方法又は適当と認められた方法によりウイルス浮遊液を不活化し、不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.5 の試験を行う。

#### 2.3.1.4 原液

不活化ウイルス液に適当と認められたアルミニウムゲルアジュバントを添加し、原液とする。

原液について、3.6 の試験を行う。

#### 2.3.2 イバラキウイルス原液

##### 2.3.2.1 プロダクションセルシードの培養

1 回に処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。ウイルス接種前のプロダクションセルシードに異常を認めてはならない。

##### 2.3.2.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを 2.3.2.1 の細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清をウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.4.1.2 の試験を行う。

##### 2.3.2.3 不活化

ウイルス浮遊液にホルマリンを 0.1vol % となるように加える方法又は適当と認められた方法によりウイルス浮遊液を不活化し、不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.5 の試験を行う。

##### 2.3.2.4 原液

不活化ウイルス液に適当と認められたアルミニウムゲルアジュバントを添加し、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

牛流行熱ウイルス原液及びイバラキウイルス原液を混合し、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、小分製品とする。

小分製品について、3.7 の試験を行う。

### 3 試験法

#### 3.1 製造用株の試験

##### 3.1.1 マスターシードウイルスの試験

###### 3.1.1.1 牛流行熱ウイルス

###### 3.1.1.1.1 同定試験

シードロット規格の 1.4.2.3.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.1.1.1.2 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。

###### 3.1.1.1.3 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。

###### 3.1.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

###### 3.1.1.1.4.1 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。

###### 3.1.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験

###### 3.1.1.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験

リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、牛 R,S ウイルス及びブルータングウイルスについて、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。



い。

#### 3.1.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス、ロタウイルス、牛白血病ウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.1、3.2.5、3.2.7、3.2.8 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。

#### 3.1.1.2 イバラキウイルス

##### 3.1.1.2.1 同定試験

シードロット規格の 1.4.2.3.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.1.2.2 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。

##### 3.1.1.2.3 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。

##### 3.1.1.2.4 外来性ウイルス否定試験

###### 3.1.1.2.4.1 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。

###### 3.1.1.2.4.2 特定ウイルス否定試験

###### 3.1.1.2.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験

牛RSウイルス、ブルータング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 1.1、3.1.1 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、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 3.1.2 の試験を実施しなくてもよい。

###### 3.1.1.2.4.2.2 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、牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス、ロタウイルス、牛白血病ウイルス、日本脳炎ウイルス、狂犬病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 1.1、3.2.1、3.2.2、3.2.5、3.2.7、3.2.8、3.2.9 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。

#### 3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

##### 3.1.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

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

#### 3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

##### 3.1.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

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

#### 3.2 初代細胞の試験

##### 3.2.1 マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）の試験

###### 3.2.1.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.2.4.2.1.1 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 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。

### 3.2.1.3 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 株化細胞の試験

### 3.3.1 マスターセルシードの試験

#### 3.3.1.1 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。

#### 3.3.1.2 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。

#### 3.3.1.3 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。

#### 3.3.1.4 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。

#### 3.3.1.5 外来性ウイルス否定試験

##### 3.3.1.5.1 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。

##### 3.3.1.5.2 特定ウイルス否定試験

###### 3.3.1.5.2.1 特定ウイルス否定一般試験

リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、牛RSウイルス及びブルータングウイルスについて、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。

###### 3.3.1.5.2.2 個別ウイルス否定試験

牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス、ロタウイルス、牛白血病ウイルス、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、3.2.5、3.2.7、3.2.8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。

#### 3.3.1.6 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。

### 3.3.2 ワーキングセルシードの試験

#### 3.3.2.1 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。

#### 3.3.2.2 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。

#### 3.3.2.3 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。

### 3.3.3 プロダクションセルシードの試験

#### 3.3.3.1 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。

#### 3.3.3.2 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、適合しなければならない。

#### 3.3.3.3 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。

## 3.4 ウイルス浮遊液の試験

### 3.4.1 ウイルス含有量試験

#### 3.4.1.1 牛流行熱ウイルス

##### 3.4.1.1.1 試験材料

#### 3.4.1.1.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

#### 3.4.1.1.1.2 培養細胞

HmLu-1細胞を小試験管に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

#### 3.4.1.1.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を0.5mLずつ加え、34℃で7日間回転培養し、観察する。

#### 3.4.1.1.3 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、1mL中10<sup>6.0</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

#### 3.4.1.2 イバラキウイルス

##### 3.4.1.2.1 試験材料

###### 3.4.1.2.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.4.1.2.1.2 培養細胞

HmLu-1細胞を小試験管に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

###### 3.4.1.2.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を0.5mLずつ加え、37℃で7日間回転培養し、観察する。

###### 3.4.1.2.3 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、1mL中10<sup>6.0</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

#### 3.5 不活化ウイルス液の試験

##### 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 不活化試験

###### 3.5.2.1 牛流行熱ウイルス

###### 3.5.2.1.1 試験材料

###### 3.5.2.1.1.1 試料

100倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、検体5mLを4℃で1夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

###### 3.5.2.1.1.2 培養細胞

HmLu-1細胞を培養瓶で1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

###### 3.5.2.1.2 試験方法

試料の全量を1mLにつき3cm<sup>2</sup>以上の培養細胞に接種し、34℃で60分間静置吸着させた後、試料を抜き取り、ウイルス増殖用培養液を加え、34℃で7日間培養し、観察する。

###### 3.5.2.1.3 判定

培養細胞にCPEを認めない場合、活性ウイルス陰性とする。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

###### 3.5.2.2 イバラキウイルス

###### 3.5.2.2.1 試験材料

###### 3.5.2.2.1.1 試料

100倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、検体5mLを4℃で1夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

###### 3.5.2.2.1.2 培養細胞

HmLu-1 細胞を培養瓶で1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

### 3.5.2.2.2 試験方法

試料の全量を1 mLにつき3 cm<sup>2</sup>以上の培養細胞に接種し、34℃で60分間静置吸着させた後、試料を抜き取り、ウイルス増殖用培養液を加え、34～36℃で5日間培養後、細胞を次代に継代する。継代後2日目に培養液を抜き取り、ウイルス増殖用培養液を加え、34～36℃で5日間培養後更に次代へ継代し、2代と同様の方法で培養し、観察する。

### 3.5.2.2.3 判定

培養細胞にCPEを認めない場合、活性ウイルス陰性とする。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

## 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。

## 3.7 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。

### 3.7.2 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 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、0.15vol%以下でなければならない。

### 3.7.5 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1 mg以下でなければならない。

### 3.7.6 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。

### 3.7.7 力価試験

#### 3.7.7.1 試験材料

##### 3.7.7.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.7.7.1.2 試験動物

体重約350gのモルモットを用いる。

##### 3.7.7.1.3 中和試験用ウイルス

###### 3.7.7.1.3.1 牛流行熱ウイルス

HmLu-1細胞で増殖させた牛流行熱ウイルスYHL株を用いる。

###### 3.7.7.1.3.2 イバラキウイルス

牛腎継代細胞で増殖させたイバラキウイルスNo.2株を用いる。

##### 3.7.7.1.4 培養細胞

HmLu-1細胞を小試験管に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

#### 3.7.7.2 試験方法

注射材料0.5mLずつを5匹の試験動物に3週間隔で2回筋肉内注射し、第2回目の注射後10日

目に得られた各個体の血清について、中和試験を行う。

被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液で2倍階段希釈する。各希釈血清 0.5mL と 0.1mL 中約 200TCID<sub>50</sub> の中和試験用ウイルス液 0.5mL とを等量混合し、牛流行熱ウイルスは 34℃で 60 分間、イバラキウイルスでは 37℃で 60 分間処理する。この各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本の培養細胞に接種し、37℃で 60 分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を 0.5mL ずつ加え、牛流行熱ウイルスは 34℃で、イバラキウイルスでは 37℃で 7 日間回転培養し、観察する。

#### 3.7.7.3 判定

培養細胞の 2 本以上に CPE の阻止を認めた血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

中和抗体価 2 倍以上を中和抗体陽性とする。

試験動物の中和抗体陽性率は、それぞれのウイルスに対して、80%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 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

グルタミン酸ナトリウム 4.0 g

ブドウ糖 1.0 g

酵母エキス 0.5 g

牛血清 20 mL

イーグル MEM 残量

炭酸水素ナトリウムで、pH を 7.2 ~ 7.6 に調整する。

牛血清は、牛流行熱ウイルス及びイバラキウイルスに対する中和抗体陰性のものを用いる。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

ワクチン（シードロット製剤）の部の豚伝染性胃腸炎濃縮生ワクチン（母豚用）（シード）の項の次に次のように加える。

## 豚繁殖・呼吸障害症候群生ワクチン（シード）

### 1 定義

シードロット規格に適合した弱毒豚繁殖・呼吸障害症候群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

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス JJ1882 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.2 性状

MA-104 細胞で CPE を伴って増殖し、感染価は、1 mL 当たり  $10^{6.0}$ TCID<sub>50</sub> 以上に達する。

##### 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、MA104 細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して  $-35^{\circ}\text{C}$  以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1 の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。

マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、5 代以内でなければならない。

##### 2.1.4 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、MA-104 細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して  $-35^{\circ}\text{C}$  以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2 の試験を行う。

##### 2.1.5 プロダクションシードウイルス

###### 2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、MA-104 細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖させる。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して  $-35^{\circ}\text{C}$  以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

### 2.2 製造用材料

#### 2.2.1 培養細胞

MA-104 細胞又は製造に適当と認められた株化細胞を用いる。

#### 2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

#### 2.2.3 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  $-70^{\circ}\text{C}$  以下で保存する。

マスターセルシードについて、3.2.1の試験を行う。

マスターセルシードは、ワクチンの製造又は試験以外の目的で継代しない。マスターセルシードからプロダクションセルシードまでの最高継代数は、20代以内でなければならない。

#### 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-70℃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の培養液で増殖させる。

プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して-70℃以下で保存する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、3.2.3の試験を行う。

### 2.3 原液

#### 2.3.1 プロダクションセルシードの培養

1回に処理し、培養した細胞を個別別培養細胞とみなす。ウイルス接種前のプロダクションセルシード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2.3.1の細胞で培養し、適当と認められた時期に個別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。

#### 2.4 最終バルク

原液に適当と認められた安定剤を加え、これ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、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

内在性レトロウイルス（C、Dタイプ粒子）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を準用して試験をするとき、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-粘膜病ウイルス、豚コレラウイルス、豚サーコウイルス、ロタウイルス、日

本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、3.2.3、3.2.4、3.2.5、3.2.7及び3.2.9を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 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法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

#### 3.1.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

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

### 3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

#### 3.1.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

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

### 3.2 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

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス及び内在性レトロウイルス（C、Dタイプ粒子）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を準用して試験をするとき、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-粘膜病ウイルス、豚コレラウイルス、豚サーコウイルス、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。

##### 3.2.1.6 核学的（染色体）性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.6.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。



### 3.2.1.7 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2.1.4.2.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.2.2 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2.1.4.2.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.3.2 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 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 ウイルス含有量試験

##### 3.3.2.1 試験材料

###### 3.3.2.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記1）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.3.2.1.2 細胞

MA-104細胞又は相当と認められた培養細胞を96穴プレートに培養し、単層となったものを用いる。

###### 3.3.2.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ6穴以上の培養細胞に接種し、37℃で8日間培養し観察する。

###### 3.3.2.3 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、1 mL中10<sup>6.0</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

### 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 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 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、原液を含む中間工程でマイコプラズマ否定試験を実施する場合には、本試験の実施を省略す

ることができる。

#### 3.4.6 ウイルス含有量試験

3.3.2 を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり  $10^{4.9} \sim 10^{6.7}$  TCID<sub>50</sub> の範囲内でなければならない。

#### 3.4.7 安全試験

##### 3.4.7.1 試験材料

###### 3.4.7.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 3.4.7.1.2 試験動物

3～4週齢の豚を用いる。

##### 3.4.7.2 試験方法

注射材料1頭分ずつを2頭の試験動物の頸部筋肉内に注射し、21日間観察する。

##### 3.4.7.3 判定

観察期間中、異常を認めてはならない。

#### 3.4.8 力価試験

##### 3.4.8.1 試験材料

###### 3.4.8.1.1 試験動物

3.4.7 の試験に用いた動物を用いる。

###### 3.4.8.1.2 感染細胞

MA-104 細胞を8チャンバースライドに37℃で培養し、単層を形成させたものに豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス JJ1882 株を1チャンバースライド当たり  $10^{3.5}$  TCID<sub>50</sub> 以上接種する。37℃で1～2日間培養した後、生理食塩液及び蒸留水で洗浄し、乾燥する。その後、冷アセトン・エタノール(1:1)液で固定した後乾燥させたものを感染細胞とし、8℃以下で密封保存する。

##### 3.4.8.2 試験方法

3.4.7 の試験終了後7日目に得られた各個体の血清について、蛍光抗体法を行う。

被検血清を生理食塩液で20倍希釈した後、更に2倍階段希釈する。感染細胞に各希釈液を加え、37℃で60分間処理した後、生理食塩液で洗浄し、抗豚IgG 蛍光標識抗体(付記2)を加え、37℃で60分間処理した後、生理食塩液で洗浄し、UV励起方式で観察する。

##### 3.4.8.3 判定

特異蛍光が認められた血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験動物の抗体価は、40倍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 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中

牛胎子血清

20～50 mL

イーグルMEM

残量

炭酸水素ナトリウムでpHを6.8～7.0に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

##### 付記2 抗豚IgG 蛍光標識抗体

抗豚IgG 血清からγグロブリンを調製し、これを蛍光色素で標識したもの。

ワクチン（シードロット製剤）の部の豚伝染性胃腸炎・豚流行性下痢混合混合生ワクチン（シード）の項の次に次のように加える。

## 日本脳炎・豚パルボウイルス感染症・豚ゲタウイルス感染症混合生ワクチン（シード）

### 1 定義

シードロット規格に適合した弱毒日本脳炎ウイルス、弱毒豚パルボウイルス及び弱毒ゲタウイルスを、それぞれ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混合し、凍結乾燥させたワクチンである。

### 2 製法

#### 2.1 製造用株

##### 2.1.1 日本脳炎ウイルス

###### 2.1.1.1 名称

弱毒日本脳炎ウイルスS株又はこれと同等と認められた株

###### 2.1.1.2 性状

1か月齢の豚に接種しても、ウイルス血症が出現しない。妊娠1か月前後の豚に接種しても、胎子に感染しない。コガタアカイエカに対する感染率が著しく低下している。乳のみマウスの脳内又は豚腎若しくは豚精巣初代細胞で増殖する。

##### 2.1.1.3 マスターシードウイルス

###### 2.1.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、HmLu-1細胞又は適当と認められた細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、5代以内でなければならない。

##### 2.1.1.4 ワーキングシードウイルス

###### 2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、HmLu-1細胞又は適当と認められた細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

##### 2.1.1.5 プロダクションシードウイルス

###### 2.1.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、HmLu-1細胞又は適当と認められた細胞で増殖させる。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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ウイルスを保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

#### 2.1.2 豚パルボウイルス

##### 2.1.2.1 名称

弱毒豚パルボウイルスHT/SK株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.2.2 性状

子豚に注射しても、临床上異常を認めず、ウイルス血症及びウイルス排出を認めない。また、妊

豚豚に注射しても、胎子・胎盤感染及び死亡を認めない。

豚腎由来細胞に接種したとき、32℃での増殖は、37℃での増殖を上回る。

### 2.1.2.3 マスターシードウイルス

#### 2.1.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、SK-H細胞又は適当と認められた細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して-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。

### 2.1.2.4 ワーキングシードウイルス

#### 2.1.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、SK-H細胞又は適当と認められた細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

### 2.1.2.5 プロダクションシードウイルス

#### 2.1.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、SK-H細胞又は適当と認められた細胞で増殖させる。

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ウイルスを保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

### 2.1.3 ゲタウイルス

#### 2.1.3.1 名称

弱毒ゲタウイルスKB/VT株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.3.2 性状

1か月齢の豚に注射しても、ウイルス血症を認めない。また、妊娠豚に注射しても、胎子に感染しない。乳のみマウスに脳内接種しても、病原性を示さない。

#### 2.1.3.3 マスターシードウイルス

##### 2.1.3.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、HAL細胞又は適当と認められた細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して-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。

#### 2.1.3.4 ワーキングシードウイルス

##### 2.1.3.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、HAL細胞又は適当と認められた細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

#### 2.1.3.5 プロダクションシードウイルス

##### 2.1.3.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、HAL細胞又は適当と認められた細胞で増殖させる。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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 日本脳炎ウイルス

#### 2.2.1.1 培養細胞

HmLu-1細胞又は製造に相当と認められた細胞を用いる。

#### 2.2.1.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

#### 2.2.1.3 マスターセルシード

##### 2.2.1.3.1 作製、保存及びプロダクションセルシードまでの最高継代数

マスターセルシードは、2.2.1.2の培養液で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターセルシードは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

マスターセルシードについて、3.2.1の試験を行う。

マスターセルシードは、ワクチンの製造又は試験以外の目的で継代しない。マスターセルシードからプロダクションセルシードまでの最高継代数は、20代以内でなければならない。

#### 2.2.1.4 ワーキングセルシード

##### 2.2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.1.2の培養液で増殖及び継代する。

ワーキングセルシードは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングセルシードについて、3.2.2の試験を行う。

#### 2.2.1.5 プロダクションセルシード

##### 2.2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.1.2の培養液で増殖させる。

プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、3.2.3の試験を行う。

## 2.2.2 豚パルボウイルス

### 2.2.2.1 培養細胞

SK-H細胞又は製造に相当と認められた細胞を用いる。

#### 2.2.2.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

#### 2.2.2.3 マスターセルシード

##### 2.2.2.3.1 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、2.2.2.2の培養液で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターセルシードは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

マスターセルシードについて、3.2.1の試験を行う。

マスターセルシードは、ワクチンの製造又は試験以外の目的で継代しない。マスターセルシードからプロダクションセルシードまでの最高継代数は、20代以内でなければならない。

#### 2.2.2.4 ワーキングセルシード

##### 2.2.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.2.2の培養液で増殖及び継代する。

ワーキングセルシードは、凍結して-70℃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。

#### 2.2.2.5 プロダクションセルシード

##### 2.2.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.2.2の培養液で増殖させる。

プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して-70℃以下で保存する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、3.2.3の試験を行う。

#### 2.2.3 ゲタウイルス

##### 2.2.3.1 培養細胞

HAL細胞又は製造に相当と認められた細胞を用いる。

##### 2.2.3.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

##### 2.2.3.3 マスターセルシード

###### 2.2.3.3.1 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、2.2.3.2の培養液で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

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

##### 2.2.3.4 ワーキングセルシード

###### 2.2.3.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.3.2の培養液で増殖及び継代する。

ワーキングセルシードは、凍結して-70℃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。

##### 2.2.3.5 プロダクションセルシード

###### 2.2.3.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.3.2の培養液で増殖させる。

プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して-70℃以下で保存する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、3.2.3の試験を行う。

#### 2.3 原液

##### 2.3.1 日本脳炎ウイルス

###### 2.3.1.1 プロダクションセルシードの培養

1回に処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。ウイルス接種前のプロダクションセルシードに異常を認めてはならない。

###### 2.3.1.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.1.1の細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を混合し、原液とする。

原液について、3.3.1、3.3.2.1及び3.3.3.1の試験を行う。

##### 2.3.2 豚パルボウイルス

###### 2.3.2.1 プロダクションセルシードの培養

1回に処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。ウイルス接種前のプロダクションセルシードに異常を認めてはならない。

### 2.3.2.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.2.1の細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を混合し、原液とする。

原液について3.3.1、3.3.2.2及び3.3.3.2の試験を行う。

### 2.3.3 ゲタウイルス

#### 2.3.3.1 プロダクションセルシードの培養

1回に処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。ウイルス接種前のプロダクションセルシードに異常を認めてはならない。

#### 2.3.3.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.3.1の細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を混合し、原液とする。

原液について3.3.1、3.3.2.3及び3.3.3.3の試験を行う。

### 2.4 最終バルク

日本脳炎ウイルス原液、豚パルボウイルス原液及びゲタウイルス原液を混合し、適当と認められた希釈液及び安定剤を加えて調製し、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、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1.4.2.1.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.1.2 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

ハムスター由来細胞を用いる場合には、豚繁殖・呼吸障害症候群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。

豚由来細胞を用いる場合には、豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1及び3.1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

日本脳炎ウイルスでは、豚コレラウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス、ロタウイルス及び狂犬病ウイルスについて、また、豚パルボウイルス及びゲタウイルスでは、豚コレラウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス、ロタウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、3.2.3、3.2.4、3.2.5、3.2.7及び3.2.9を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 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法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

## 3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

### 3.1.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

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

## 3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

### 3.1.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

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

## 3.2 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

ハムスター由来細胞を用いる場合には、豚繁殖・呼吸障害症候群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。

豚由来細胞を用いる場合には、豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2及び3.1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

豚コレラウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス、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。

#### 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 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 ウイルス含有量試験

#### 3.3.2.1 日本脳炎ウイルス

マウス接種試験又は培養細胞接種試験により行う。

##### 3.3.2.1.1 マウス接種試験

###### 3.3.2.1.1.1 試験材料

###### 3.3.2.1.1.1.1 試料

\* 検体をリン酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釈液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.3.2.1.1.1.2 試験動物

2日齢以内の乳のみマウスを用いる。

###### 3.3.2.1.1.2 試験方法

試料0.02mLずつを4匹以上の試験動物の脳内に注射し、14日間観察する。

###### 3.3.2.1.1.3 判定

脳炎症状を示して死亡したマウスを感染とみなし、LD<sub>50</sub>を算出する。

検体のウイルス含有量は、1mL中10<sup>7.0</sup>LD<sub>50</sub>以上でなければならない。

##### 3.3.2.1.2 培養細胞接種試験

###### 3.3.2.1.2.1 試験材料

###### 3.3.2.1.2.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記1）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.3.2.1.2.1.2 培養細胞

Vero細胞、ESK細胞又は適当と認められた細胞を小試験管で培養し、単層となったものを用いる。

###### 3.3.2.1.2.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37°Cで60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液0.5mLを加え、37°Cで7日間培養し、観察する。

###### 3.3.2.1.2.3 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、1 mL中 $10^{7.0}$ TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

### 3.3.2.2 豚パルボウイルス

#### 3.3.2.2.1 試験材料

##### 3.3.2.2.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.3.2.2.1.2 培養細胞

豚腎初代細胞、ESK細胞又は適当と認められた細胞を小試験管に培養し、単層となったものを用いる。

##### 3.3.2.2.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37°Cで60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液1 mLを加え、31~32°Cで10~14日間培養した後、リン酸緩衝食塩液（付記2）（以下この項において「PBS」という。）で濃度を調整した0.5vol%の被凝集性の鶏又はモルモットの赤血球浮遊液をそれぞれ0.4mLずつ加え、常温で60分間静置した後、赤血球凝集の有無を観察する。

##### 3.3.2.2.3 判定

赤血球の凝集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、1 mL中 $10^{6.0}$ TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

### 3.3.2.3 ゲタウイルス

#### 3.3.2.3.1 試験材料

##### 3.3.2.3.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.3.2.3.1.2 培養細胞

Vero細胞又は適当と認められた細胞を小試験管で培養し、単層となったものを用いる。

##### 3.3.2.3.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37°Cで60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液1 mLを加え、37°Cで7日間培養し、観察する。

##### 3.3.2.3.3 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、1 mL中 $10^{6.0}$ TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

### 3.3.3 マーカー試験

#### 3.3.3.1 日本脳炎ウイルス

##### 3.3.3.1.1 試験材料

##### 3.3.3.1.1.1 注射材料

検体及び対照として中山株薬検系を用い、それぞれのウイルスが1 mL中に $10^{7.0}$ TCID<sub>50</sub>又は $10^{7.0}$ LD<sub>50</sub>以上含まれるように調製したものを、注射材料とする。

##### 3.3.3.1.1.2 試験動物

3週齢のマウスを用いる。

##### 3.3.3.1.2 試験方法

注射材料0.3mLずつを10匹以上の試験動物の腹腔内に注射し、14日間観察する。

##### 3.3.3.1.3 判定

検体を注射したマウスの死亡率は、20%以下でなければならない。この場合、対照を注射したマウスの死亡率は、80%以上でなければならない。

### 3.3.3.2 豚パルボウイルス

#### 3.3.3.2.1 試験材料

##### 3.3.3.2.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.3.3.2.1.2 培養細胞

豚腎初代細胞、ESK細胞又は適当と認められた細胞を小試験管に培養し、単層となったものを用いる。

#### 3.3.3.2.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ8本以上の培養細胞に接種し、37°Cで60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液1mLを加え、2群に分け、32°C及び37°Cでそれぞれ10～14日間培養する。培養終了時に、PBSで濃度を調整した0.5vol%の被凝集性の鶏又はモルモットの赤血球浮遊液をそれぞれ0.4mLずつ加え、常温で60分間静置した後、赤血球凝集の有無を観察する。

#### 3.3.3.2.3 判定

検体のウイルス含有量は、32°Cで培養するとき、37°Cで培養する場合より100倍以上高くなければならない。

### 3.3.3.3 ゲタウイルス

#### 3.3.3.3.1 乳のみマウスに対する病原性マーカー

##### 3.3.3.3.1.1 試験材料

##### 3.3.3.3.1.1.1 注射材料

検体及び対照としてゲタウイルス2078株を用い、それぞれのウイルスが1mL中に約 $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub>以上含まれるように調製したものを、注射材料とする。

##### 3.3.3.3.1.1.2 試験動物

2～5日齢のマウスを用いる。

##### 3.3.3.3.1.2 試験方法

注射材料0.02mLずつを10匹以上の試験動物の脳内に注射し、14日間観察する。

##### 3.3.3.3.1.3 判定

検体を注射したマウスの死亡率は、20%以下でなければならない。この場合、対照を注射したマウスの死亡率は、80%以上でなければならない。

#### 3.3.3.3.2 ブラックマーカー

##### 3.3.3.3.2.1 試験材料

##### 3.3.3.3.2.1.1 試料

検体及び対照としてゲタウイルス2078株を用い、それぞれをウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.3.3.3.2.1.2 培養細胞

HAL細胞又は適当と認められた細胞をシャーレに培養し、単層になったものを用いる。

##### 3.3.3.3.2.2 試験方法

試料の0.4mLをそれぞれ2枚以上の培養細胞に接種し、37°Cで90分間静置吸着させた後、第1次重層寒天培地（付記3）を4mLずつ重層し、37°C、5vol%炭酸ガス下で3日間培養後、第2次重層寒天培地（付記4）を2mLずつ重層し、翌日ブラック数を計測するとともに、その形状を観察する。

##### 3.3.3.3.2.3 判定

培養4日後にブラック形状を観察するとき、検体のブラックはS（直径2mm以下）のブラックサイズでなければならない。対照の強毒ゲタウイルス2078株のブラックはL（直径4～5mm）又はM（直径2.5～3.5mm）のブラックサイズでなければならない。

### 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 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 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、原液を含む中間工程でマイコプラズマ否定試験を実施する場合には、本試験の実施を省略することができる。

#### 3.4.6 ウイルス含有量試験

##### 3.4.6.1 日本脳炎ウイルス

3.3.2.1を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり $10^{5.0}$ LD<sub>50</sub>又は $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

ただし、試験品中の日本脳炎ウイルス以外のウイルスを、各抗血清（付記5及び6）を非働化したもので中和したものを試料とする。

##### 3.4.6.2 豚パルボウイルス

3.3.2.2を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

ただし、試験品中の豚パルボウイルス以外のウイルスを、各抗血清（付記6及び7）を非働化したもので中和したものを試料とする。

##### 3.4.6.3 ゲタウイルス

3.3.2.3を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

ただし、試験品中のゲタウイルス以外のウイルスを、各抗血清（付記5及び7）を非働化したもので中和したものを試料とする。

#### 3.4.7 安全試験

##### 3.4.7.1 試験材料

###### 3.4.7.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 3.4.7.1.2 試験動物

約1か月齢の豚を用いる。

##### 3.4.7.2 試験方法

試験動物3頭を試験群、1頭を対照群とする。試験群に注射材料1頭分を用法に従ってそれぞれ注射し、対照群と共に21日間観察する。

##### 3.4.7.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に異常を認めてはならない。

#### 3.4.8 力価試験

##### 3.4.8.1 日本脳炎ウイルス

赤血球凝集抑制試験又は中和試験により行う。

#### 3.4.8.1.1 赤血球凝集抑制試験

##### 3.4.8.1.1.1 試験材料

###### 3.4.8.1.1.1.1 試験動物

3.4.7の試験に用いた動物を用いる。

###### 3.4.8.1.1.1.2 赤血球凝集抗原

日本脳炎ウイルス赤血球凝集抗原（付記8）を用いる。

###### 3.4.8.1.1.2 試験方法

3.4.7の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について、赤血球凝集抑制試験を行う。試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

被検血清に25w/v%カオリン液又はアセトンを加えて処理し、がちょう又は7日齢以内の鶏の赤血球で処理した後、非働化する。各処理血清を牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液（付記9）又は適当と認められた希釈液で2倍階段希釈する。各希釈血清に8単位の赤血球凝集抗原を加えて4℃で1夜処理した後、VAD液（付記10）で濃度を調整した0.33vol%のがちょう又は7日齢以内の鶏の赤血球浮遊液を加え、37℃で60分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

###### 3.4.8.1.1.3 判定

赤血球の凝集を抑制した血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。

試験群の赤血球凝集抑制抗体価は、20倍以上でなければならない。この場合、対照群では、10倍未満でなければならない。

#### 3.4.8.1.2 中和試験

##### 3.4.8.1.2.1 試験材料

###### 3.4.8.1.2.1.1 試験動物

3.4.7の試験に用いた動物を用いる。

###### 3.4.8.1.2.1.2 中和試験用ウイルス

日本脳炎ウイルス中山株葉検系、JaGAR-01株又は適当と認められた株を用いる。

###### 3.4.8.1.2.1.3 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格2.1.1に適合した鶏胚初代細胞をシャーレに培養し、単層となったものを用いる。

###### 3.4.8.1.2.2 試験方法

3.4.7の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について、中和試験を行う。試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液で5倍に希釈し、更に2倍階段希釈する。各希釈血清と0.4mL中約200PFUの中和試験用ウイルス液とを等量混合し、37℃で90分間処理する。各混合液0.4mLずつをそれぞれ4枚の培養細胞に接種し、37℃で60分間吸着させた後、混合液を除き、第1次重層寒天培地を加え、37℃で3日間培養する。その後、第2次重層寒天培地を重層し、37℃で1日間培養し、ブラック数を算出する。

###### 3.4.8.1.2.3 判定

ブラック数がウイルス対照の50%以下に減少した血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

試験群の中和抗体価は、20倍以上でなければならない。この場合、対照群では、10倍未満でなければならない。

#### 3.4.8.2 豚パルボウイルス

##### 3.4.8.2.1 試験材料

###### 3.4.8.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 3.4.8.2.1.2 試験動物

体重約350gのモルモットを用いる。

### 3.4.8.2.1.3 赤血球凝集抗原

豚パルボウイルス赤血球凝集抗原（付記11）を用いる。

### 3.4.8.2.2 試験方法

注射材料 5 mLずつを、5匹の試験動物の腹腔内に4週間隔で2回注射し、第2回目の注射後14日目に得られた各個体の血清について、赤血球凝集抑制試験を行う。

被検血清をPBSで5倍に希釈し、等量の25w/v%カオリン液を加え、常温で20分間処理する。遠心後の上清に鶏又はモルモットの赤血球を加え、常温で15分間処理し、再度遠心し、上清を採取する。これをPBSで2倍階段希釈し、各段階の希釈液に8単位の赤血球凝集抗原を等量加え、4℃で1夜処理する。これにPBSで濃度を調整した0.5vol%の被凝集性の鶏又はモルモットの赤血球浮遊液を加え、常温で60分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

### 3.4.8.2.3 判定

赤血球凝集を阻止した血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。

赤血球凝集抑制抗体価20倍以上を赤血球凝集抑制抗体陽性とする。

試験動物の赤血球凝集抑制抗体陽性率は、80%以上でなければならない。

### 3.4.8.3 ゲタウイルス

#### 3.4.8.3.1 試験材料

##### 3.4.8.3.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.4.8.3.1.2 試験動物

3.4.7の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.4.8.3.1.3 赤血球凝集抗原

ゲタウイルス赤血球凝集抗原（付記12）を用いる。

#### 3.4.8.3.2 試験方法

3.4.7の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について、赤血球凝集抑制試験を行う。試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

被検血清を25w/v%カオリン液又はアセトンを加えて処理し、がちょうの赤血球で処理した後、非働化する。各処理血清を牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釈液で2倍階段希釈する。各希釈血清に8単位の赤血球凝集抗原を加えて4℃で1夜処理した後、VAD液で濃度を調整した0.33vol%がちょう赤血球浮遊液を加え、37℃で60分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

#### 3.4.8.3.3 判定

赤血球の凝集を抑制した血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。

試験群の赤血球凝集抑制抗体価は、20倍以上でなければならない。この場合、対照群では、10倍未満でなければならない。

## 4 貯法及び有効期間

有効期間は、1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 ウイルス増殖用培養液

1,000mL中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス

2.95 g

牛血清

20~50 mL

又は牛血清アルブミン

1 g

イーグルMEM

残、量

炭酸水素ナトリウムでpHを7.0~7.4に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記2 リン酸緩衝食塩液

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

精製水 残量

1 mol/L塩酸でpHを6.8~7.2に調整する。

付記3 第1次重層寒天培地

1,000mL中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

牛血清 20~50 mL

寒天 10 g

イーグルMEM 残量

炭酸水素ナトリウムでpHを7.0~7.4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 第2次重層寒天培地

1,000mL中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

ニュートラルレッド 0.5 g

寒天 10 g

イーグルMEM 残量

炭酸水素ナトリウムでpHを7.0~7.4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 抗豚パルボウイルス血清

豚パルボウイルス90HS株又は適当と認められた株で免疫した兎又はモルモットの血清であって、検体又は試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの。

付記6 抗ゲタウイルス血清

ゲタウイルス2078株又は適当と認められた株で免疫した兎又はモルモットの血清であって、検体又は試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの。

付記7 抗日本脳炎ウイルス血清

日本脳炎ウイルス中山株薬検系又は適当と認められた株で免疫した兎又はモルモットの血清であって、検体又は試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの。

付記8 日本脳炎ウイルス赤血球凝集抗原

日本脳炎ウイルス中山株薬検系又は適当と認められた株を用いて調製した赤血球凝集抗原であって、赤血球凝集価が64倍以上のもの。

付記9 牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液

1,000mL中

塩化ナトリウム 10.52 g

ホウ酸 3.09 g

水酸化ナトリウム 0.96 g

精製水 残量

牛血清アルブミンを0.2w/v%となるように加えた後、水酸化ナトリウム液でpHを9.0に調整する。

付記10 VAD液

1,000mL中

塩化ナトリウム 8.77 g

リン酸水素二ナトリウム十二水和物 5.68 g

リン酸二水素ナトリウム二水和物 40.56 g

精製水 残量

牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液と等量混合して、pHを6.0に調整する。

付記11 豚パルボウイルス赤血球凝集抗原

豚パルボウイルス90HS株又は適当と認められた株を用いて調製した赤血球凝集抗原であって、赤血球凝集価が64倍以上のもの。

付記12 ゲタウイルス赤血球凝集抗原

ゲタウイルスHaruna株又は適当と認められた株を用いて調製した赤血球凝集抗原であって、赤血球凝集価が64倍以上のもの。



ワクチン（シードロット製剤）の部の鶏痘生ワクチン（シード）の項の次に次のように加える。

## 産卵低下症候群－1976（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

### 1 定義

シードロット規格に適合した産卵低下症候群－1976 ウイルスを同規格に適合した発育あひる卵、発育鶏卵又は培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化し、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

産卵低下症候群－1976 ウイルス BK-87 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.2 性状

7～11日齢の発育鶏卵又は9～15日齢の発育あひる卵の尿膜腔内に注射すると、増殖し、その尿膜腔液には、鶏赤血球凝集性を認める。

##### 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、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵、同規格の 1.3 に適合した発育あひる卵、同規格の 2.6 に適合した鶏胚肝初代細胞又は同規格の 2.6 に適合した鶏胚腎初代細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－40℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1 の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、5代以内でなければならない。

##### 2.1.4 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、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵、同規格の 1.3 に適合した発育あひる卵、同規格の 2.6 に適合した鶏胚肝初代細胞又は同規格の 2.6 に適合した鶏胚腎初代細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して－40℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2 の試験を行う。

##### 2.1.5 プロダクションシードウイルス

###### 2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵、同規格の 1.3 に適合した発育あひる卵、同規格の 2.6 に適合した鶏胚肝初代細胞又は同規格の 2.6 に適合した鶏胚腎初代細胞で増殖させる。

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－40℃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 初代細胞を用いる場合

##### 2.2.1.1 初代細胞

SPF 動物規格の 2.6 に適合した鶏胚肝初代細胞又は鶏胚腎初代細胞を用いる。

#### 2.2.1.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

#### 2.2.1.3 マスタープライマリーセルシード (プロダクションプライマリーセルシード)

##### 2.2.1.3.1 増殖、継代及び保存

マスタープライマリーセルシード (プロダクションプライマリーセルシード) は、2.2.2.2 の培養液で増殖し、継代及び保存しない。

マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルスを増殖、継代及び保存する場合のマスタープライマリーセルシード (プロダクションプライマリーセルシード) 又はプロダクションシードウイルスを増殖及び保存する場合のマスタープライマリーセルシード (プロダクションプライマリーセルシード) について、3.2 の試験を行う。

#### 2.2.2 発育卵を用いる場合

SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵又は同規格の 1.3 に適合した発育あひる卵を用いる。

マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルスを増殖、継代及び保存する場合の発育卵又はプロダクションシードウイルスを増殖及び保存する場合の発育卵について、3.3 の試験を行う。

#### 2.2.3 原液の製造に用いる発育卵

製造に相当と認められた発育卵を用いる。

### 2.3 原液

#### 2.3.1 発育卵の培養

1 回に処理する発育卵を個別発育卵とみなす。

個別発育卵について、3.4 の試験を行う。

#### 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 2.3.1 の発育卵で培養し、感染増殖させた尿膜腔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、3.5.1 又は 3.5.2 の試験を行う。

#### 2.3.3 不活化

ウイルス浮遊液を相当と認められた方法により不活化し、不活化ウイルス浮遊液とする。この場合、相当と認められた保存剤を添加してもよい。ただし、最終バルクの調製時に保存剤を添加してもよい。

不活化ウイルス浮遊液について、3.6 の試験を行う。

#### 2.3.4 アジュバントの添加

不活化ウイルス浮遊液を混合し、相当と認められた油性アジュバントを添加し、原液とする。ただし、最終バルクの調製時にアジュバントを添加してもよい。

原液について、3.7 の試験を行う。

### 2.4 最終バルク

原液を混合し、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、小分製品とする。

小分製品について、3.8 の試験を行う。

## 3 試験法

### 3.1 製造用株の試験

#### 3.1.1 マスターシードウイルスの試験

##### 3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の 1.4.2.3.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.1.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.1.1.3 マイコプラズマ否定試験

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

#### 3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

##### 3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.1、2.1 及び 2.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 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 1.1 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 1.1、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。

#### 3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

##### 3.1.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

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

#### 3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

##### 3.1.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

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

#### 3.2 マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）の試験

##### 3.2.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.2.4.2.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.2.2 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 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 発育卵の試験

##### 3.3.1 孵卵性状試験

シードロット規格の 3.2.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.4 個体別発育卵の試験

個体別発育卵の 1% 以上又は 30 個以上を対照発育卵とし、これについて次の試験を行う。

###### 3.4.1 培養観察

対照発育卵を、ウイルスを接種することなく、ウイルス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。

###### 3.4.2 鶏赤血球凝集試験

3.4.1 の試験最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol % 鶏赤血球浮遊液を等量加え、60 分間静置し、観察するとき、赤血球凝集を認めてはならない。

### 3.5 ウイルス浮遊液の試験

3.5.1 又は 3.5.2 のいずれかの試験を行う。

#### 3.5.1 ウイルス含有量試験

##### 3.5.1.1 試験材料

###### 3.5.1.1.1 試料

検体を適当と認められた希釈液で希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.5.1.1.2 培養細胞又は発育卵

適当と認められた培養細胞又は発育卵を用いる。

##### 3.5.1.2 試験方法

培養細胞を用いる場合は、各段階の試料 50  $\mu$  L と培養細胞浮遊液 100  $\mu$  L を 96 穴マイクロプレート 4 穴以上に分注・混合し、37  $^{\circ}$ C で 8 日間培養し、観察する。観察終了日に各穴の培養液を採取し、0.5vol % 鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集の有無を観察する。

発育卵を用いる場合は、試料 100  $\mu$  L ずつをそれぞれ 5 個以上の発育卵の尿膜腔内に注射し、37  $^{\circ}$ C で 7 日間培養し、観察する。試験最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol % 鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集の有無を観察する。

##### 3.5.1.3 判定

培養細胞を用いる場合は、CPE 又は培養液に赤血球凝集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、1 mL 中  $10^{7.3}$  TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

発育卵を用いる場合は、尿膜腔液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、EID<sub>50</sub> を算出する。ただし、24 時間以内に死亡したものは、除外する。検体のウイルス含有量は、1 mL 中  $10^{8.0}$  EID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

#### 3.5.2 赤血球凝集試験

##### 3.5.2.1 試験材料

###### 3.5.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.5.2.2 試験方法

マイクロタイター法で赤血球凝集試験を行う。試料に鶏赤血球浮遊液を加え、60 分間静置した後、赤血球凝集の有無を観察する。

##### 3.5.2.3 判定

赤血球凝集が観察された検体の最高希釈倍数を赤血球凝集単位とする。

検体の赤血球凝集単位は、640 倍以上でなければならない。

### 3.6 不活化ウイルス浮遊液の試験

#### 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 不活化試験

##### 3.6.2.1 試験材料

###### 3.6.2.1.1 注射材料

発育卵に接種する場合は、検体を注射材料とする。培養細胞を用いて接種する場合は、検体を滅菌した透析チューブに入れ、4  $^{\circ}$ C で 1,000 倍容量以上のリン酸緩衝食塩液中で 24 時間透析し不活化剤を除去するか、不活化剤を中和した後、これを無菌的に回収して注射材料とする。

###### 3.6.2.1.2 発育卵又は培養細胞

適当と認められた発育卵又は培養細胞を用いる。

##### 3.6.2.2 試験方法

発育卵を用いる場合は、注射材料を 10 個以上の発育卵の尿膜腔内に 100  $\mu$  L ずつ注射し、7 日間培養した後、尿膜腔液を採取し、更に 1 代以上継代し、7 日間培養し、胚を観察する。試験最終

日に、尿膜腔液を採取し、0.5vol %鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集の有無を観察する。

培養細胞を用いる場合は、接種材料の 100  $\mu$  L と鶏胚肝初代細胞 2.0mL を 6 穴プレートの 5 穴に分注、混合し、37  $^{\circ}$ C で 5 日間以上培養した後、1 代以上継代し 5 日間以上培養観察し、CPE の有無を観察する。試験最終日に各穴の培養液を 50  $\mu$  L ずつ採取し、鶏赤血球浮遊液を加え、60 分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

### 3.6.2.3 判定

胚については、正常に発育しなければならず、尿膜腔液に赤血球凝集を認めてはならない。

培養細胞については、CPE を認めず、培養液に赤血球凝集を認めてはならない。

## 3.7 原液の試験

### 3.7.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

## 3.8 小分製品の試験

### 3.8.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、固有の色調を有する均質な懸濁液で、静置すれば下底に水層の分離を生じる場合があるが、振とうすれば白色の均一な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。

### 3.8.2 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。

### 3.8.3 チメロサル定量試験

チメロサル添加製剤については、適当と認められた方法で試験品を処理したものを試料とし、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。

### 3.8.4 ホルマリン定量試験

ホルマリン添加製剤については、適当と認められた方法で試験品を処理したものを試料とし、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、0.2vol % 以下でなければならない。

### 3.8.5 安全試験

#### 3.8.5.1 試験材料

##### 3.8.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.8.5.1.2 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 4 ~ 10 週齢の鶏を用いる。

#### 3.8.5.2 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 羽分ずつを試験群の頸部皮下又は脚部筋肉内に注射し、対照群と共に 3 週間又は 4 週間観察する。

#### 3.8.5.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に臨床的な異常を認めてはならない。

### 3.8.6 力価試験

#### 3.8.6.1 試験材料

##### 3.8.6.1.1 試験動物

3.8.5 の試験で用いた鶏を用いる。

##### 3.8.6.1.2 赤血球凝集抗原

産卵低下症候群 - 1976 ウイルス赤血球凝集抗原 (付記) を用いる。

#### 3.8.6.2 試験方法

3.8.5 の試験最終日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赤血球凝集抑制試験

を行う。

血清1容に25w/v%カオリン液3容を加え、20分間処理した後、遠心した上清を採取する。これをリン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈し、各希釈血清25 $\mu$ Lに等量の4単位の産卵低下症候群-1976ウイルス赤血球凝集抗原を加えて混合し、30分間処理した後、0.5vol%の鶏赤血球浮遊液を50 $\mu$ Lずつ加えて振とう混合し、60分間静置した後に赤血球凝集の有無を観察する。

### 3.8.6.3. 判定

赤血球凝集が抑制された血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価（以下この項において「HI抗体価」という。）とする。

試験群の80%以上がHI抗体価32倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全てHI抗体価4倍以下でなければならない。

### 4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後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。

### 5 その他

#### 5.1 添付文書等記載事項

1 肉用鶏には使用しない旨

2 採卵鶏又は種鶏を産卵鶏として食鳥処理場へ出荷する前の所定の期間は使用しない旨

#### 付記 産卵低下症候群-1976赤血球凝集抗原

産卵低下症候群-1976ウイルス JPA-1株又は適当と認められた株を生ワクチン製造用材料の規格1.3に適合した発育あひる卵で増殖させて得た尿膜腔液又は生ワクチン製造用材料規格2.1.3に適合した鶏胚肝初代細胞で増殖させて得た培養上清に0.2vol%になるようにホルマリンを加えて不活化したもの。

ワクチン（シードロット製剤）の部の鶏伝染性喉頭気管炎生ワクチン（シード）の項を次のように改める。

## 鶏伝染性喉頭気管炎生ワクチン（シード）

### 1 定義

シードロット規格に適合した弱毒鶏伝染性喉頭気管炎ウイルスを同規格に適合した発育鶏卵又は初代細胞で増殖させて得たウイルス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

弱毒鶏伝染性喉頭気管炎ウイルス CE 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.2 性状

30 日齢の鶏に点鼻又は点眼接種すると、一過性の呼吸器症状及び結膜の充血を呈することがある。10 日齢の発育鶏卵の漿尿膜上に接種すると、特有のポックを形成する。

##### 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、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵又は同規格の 2.6 に適合した鶏胚初代細胞、鶏胚腎初代細胞若しくは鶏胚肝初代細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 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、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵又は同規格の 2.6 に適合した鶏胚初代細胞、鶏胚腎初代細胞若しくは鶏胚肝初代細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 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 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵又は同規格の 2.6 に適合した鶏胚初代細胞、鶏胚腎初代細胞若しくは鶏胚肝初代細胞で増殖させる。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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 発育鶏卵を用いる場合

SPF 動物規格の 1.1 に適合した 8～10 日齢のものを用いる。

マスターシードウイルス及びワーキングシードウイルスを増殖、継代及び保存する場合の発育鶏卵又はプロダクションシードウイルスを増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、3.2 の試験を行う。

## 2.2.2 初代細胞を用いる場合

### 2.2.2.1 初代細胞

SPF 動物規格の 2.6 に適合した鶏胚初代細胞又は鶏胚肝初代細胞を用いる。

### 2.2.2.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

### 2.2.2.3 マスタープライマリーセルシード (プロダクションプライマリーセルシード)

#### 2.2.2.3.1 増殖、継代及び保存

マスタープライマリーセルシード (プロダクションプライマリーセルシード) は、2.2.2.2 の培養液で増殖し、継代及び保存しない。

マスタープライマリーセルシード (プロダクションプライマリーセルシード) について、3.3 の試験を行う。

## 2.3 原液

### 2.3.1 発育鶏卵の培養

1 回に処理する発育鶏卵を個別発育鶏卵とみなす。

個別発育鶏卵について、3.4 の試験を行う。

### 2.3.2 マスタープライマリーセルシード (プロダクションプライマリーセルシード) の培養

1 回に処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。ウイルス接種前のマスタープライマリーセルシード (プロダクションプライマリーセルシード) に異常を認めてはならない。

個別培養細胞について、3.5 の試験を行う。

### 2.3.3 ウイルスの培養

#### 2.3.3.1 発育鶏卵を用いる場合

プロダクションシードウイルスを 2.3.1 の発育鶏卵で培養して、尿膜腔液を採取し、そのろ液、遠心上清又はこれを濃縮したものを原液とする。この場合、相当と認められた必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

原液について、3.6 の試験を行う。

#### 2.3.3.2 培養細胞を用いる場合

プロダクションシードウイルスを 2.3.2 の細胞で培養し、相当と認められた時期に個別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を原液とする。この場合、相当と認められた安定剤又は相当と認められた必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

原液について、3.6 の試験を行う。

## 2.4 最終バルク

原液を混合し、相当と認められた希釈液及び安定剤を加えて、最終バルクとする。この場合、相当と認められた必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

## 2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、凍結乾燥し、小分製品とする。

小分製品について、3.7 の試験を行う。

## 3 試験法

### 3.1 製造用株の試験

#### 3.1.1 マスターシードウイルスの試験

##### 3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の 1.4.2.1.1.1 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

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 1.1 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、細菌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 1.1、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法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

#### 3.1.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

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

### 3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

#### 3.1.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

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

### 3.2 発育鶏卵の試験

#### 3.2.1 孵卵性状試験

シードロット規格の 3.2.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.3 初代細胞の試験

#### 3.3.1 マスタープライマリーセルシード (プロダクションプライマリーセルシード) の試験

##### 3.3.1.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.2.4.2.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.3.1.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.3.1.3 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するとき、適合しなければならない。

### 3.4 個別発育鶏卵の試験

個別発育鶏卵の 1% 以上又は 30 個以上を対照発育鶏卵とし、これについて次の試験を行う。

#### 3.4.1 培養観察

対照発育鶏卵を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で培養し、観察するとき、鶏胚に異常を認めてはならない。

#### 3.4.2 鶏赤血球凝集試験

3.4.1 の試験最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol %の鶏赤血球浮遊液を等量加え、60 分間静置し、観察するとき、赤血球凝集を認めてはならない。

#### 3.5 個別培養細胞の試験

個別培養細胞の1%以上を対照培養細胞とし、これについて次の試験を行う。

##### 3.5.1 培養観察

対照培養細胞を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で培養し、観察するとき、CPE を認めてはならない。

##### 3.5.2 鶏赤血球凝集試験

3.5.1 の試験最終日に培養液を採取し、0.5vol %の鶏赤血球浮遊液を等量加え、60 分間静置し、観察するとき、赤血球凝集を認めてはならない。

#### 3.6 原液の試験

##### 3.6.1 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。

##### 3.6.2 ウイルス含有量試験

###### 3.6.2.1 試験材料

###### 3.6.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.6.2.1.2 発育鶏卵又は培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～11日齢の発育鶏卵又は小試験管に3～5日間培養し、単層となった同規格2.2.1の鶏腎初代細胞を用いる。

###### 3.6.2.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ5個以上の発育鶏卵の漿尿膜上に接種し、37℃で5日間培養し、観察する。あるいは、試料0.1mLずつそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液(付記)0.5mLずつを加え、37℃で7日間回転培養し、観察する。

###### 3.6.2.3 判定

漿尿膜に特有のポックを認めた場合又は培養細胞にCPEを認めた場合を感染とみなし、EID<sub>50</sub>又はTCID<sub>50</sub>を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10<sup>5.5</sup>EID<sub>50</sub>又は10<sup>6.5</sup>TCID<sub>50</sub>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。

##### 3.7.2 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。

##### 3.7.3 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。

##### 3.7.4 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。

##### 3.7.5 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。

### 3.7.6 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。

### 3.7.7 ウイルス含有量試験

3.6.2 を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1羽分当たり  $10^{3.5}$ EID<sub>50</sub> 又は  $10^{4.0}$ TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

### 3.7.8 マーカー試験

#### 3.7.8.1 試験材料

##### 3.7.8.1.1 試料

試験品を溶解用液で 0.1mL 当たり 1/100 羽分となるように濃度を調整したものを、試料とする。

##### 3.7.8.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の 11～12 日齢のものを用いる。

#### 3.7.8.2 試験方法

試料 0.1mL ずつを 5 個の発育鶏卵の漿尿膜上に接種し、37℃で 5 日間培養し、漿尿膜を観察する。

#### 3.7.8.3 判定

漿尿膜上に固有のポックの形成を認めなければならない。

### 3.7.9 安全試験

#### 3.7.9.1 試験材料

##### 3.7.9.1.1 接種材料

試験品を溶解用液を用いて 0.03mL 当たり 5 羽分となるように濃度を調整し、接種材料とする。

##### 3.7.9.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 4～5 週齢の鶏を用いる。

#### 3.7.9.2 試験方法

試験動物 10 羽を試験群、5 羽を対照群とする。

接種材料 0.03mL ずつを試験群に点眼接種し、対照群と共に 14 日間観察する。

試験開始時及び試験終了時に体重を測定する。

#### 3.7.9.3 判定

観察期間中、対照群においては、臨床的な異常を認めてはならず、試験群においては、一過性の呼吸器症状及び結膜の充血を呈することがあっても、その他の異常を認めてはならない。

### 3.7.10 力価試験

#### 3.7.10.1 試験材料

##### 3.7.10.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

##### 3.7.10.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 4～5 週齢の鶏を用いる。

##### 3.7.10.1.3 攻撃ウイルス

強毒鶏伝染性喉頭気管炎ウイルス NS-175 株を用いる。攻撃ウイルス量は、約 40 日齢の鶏の気管内に 0.1mL を接種した場合、接種鶏の 50%以上が発症する量の 100 倍量とする。

#### 3.7.10.2 試験方法

試験動物 10 羽を試験群、5 羽を対照群とする。

試験群に接種材料 1 羽分ずつ点眼接種する。14 日後に試験群及び対照群に攻撃ウイルス 0.1mL ずつを気管内に接種して攻撃し、10 日間観察する。

#### 3.7.10.3 判定

試験終了時、試験群は、60%以上異常なく耐過しなければならない。この場合、対照群は、80%以上発症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 1 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 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

牛血清 25 mL

イーグル MEM 残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.2 ～ 7.6 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

ワクチン（シードロット製剤）の部の鶏伝染性ファブリキウス嚢病生ワクチン（ひな用中等毒）（シード）の項の次に次のように加える。

## 鶏伝染性ファブリキウス嚢病（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

### 1 定義

シードロット規格に適合した伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスを同規格に適合した培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化し、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 名称

伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス I・Q 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.2 性状

鶏胚又はうずら胚細胞で 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、SPF 動物規格の 2.6 に適合した鶏胚初代細胞又は同規格の 2.7 に適合したうずら胚初代細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 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、SPF 動物規格の 2.6 に適合した鶏胚初代細胞又は同規格の 2.7 に適合したうずら胚初代細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 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 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、SPF 動物規格の 2.6 に適合した鶏胚初代細胞又は同規格の 2.7 に適合したうずら胚初代細胞で増殖させる。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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 初代細胞

SPF 動物規格の 2.6 に適合した鶏胚初代細胞、同規格の 2.7 に適合したうずら胚初代細胞又は製造に相当と認められた細胞を用いる。

#### 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 マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）

#### 2.2.3.1 増殖、継代及び保存

マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）は、2.2.2 の培養液で増殖し、継代及び保存しない。

マスタープライマリーセルシードについて、3.2 の試験を行う。

### 2.3 原液

#### 2.3.1 マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）の培養

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

個別培養細胞について、3.3 の試験を行う。

#### 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で培養し、ウイルスの増殖極期に個別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液、遠心上清又はこれらを濃縮したものをウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.4 の試験を行う。

#### 2.3.3 不活化

ウイルス浮遊液を適当と認められた方法により不活化し、不活化ウイルス浮遊液とする。

不活化ウイルス浮遊液について、3.5 の試験を行う。

#### 2.3.4 アジュバントの添加

不活化ウイルス浮遊液を混合し、アルミニウムゲルアジュバントを添加し、原液とする。

ただし、最終バルクの調製時にアジュバントを添加してもよい。

原液について、3.6 の試験を行う。

### 2.4 最終バルク

原液を混合し、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添加してもよい。

### 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、3.7 の試験を行う。

## 3 試験法

### 3.1 製造用株の試験

#### 3.1.1 マスターシードウイルスの試験

##### 3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の 1.4.2.3.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.1.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.1.3 マイコプラズマ否定試験

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

##### 3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

###### 3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.1、2.1 及び 2.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 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 1.1 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 1.1、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。

### 3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

#### 3.1.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

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

### 3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

#### 3.1.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

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

### 3.2 初代細胞の試験

#### 3.2.1 マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）の試験

##### 3.2.1.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.2.4.2.1.1 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 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。

##### 3.2.1.3. 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 個別培養細胞の試験

個別培養細胞の 1% 以上を対照培養細胞とし、これについて次の試験を行う。

#### 3.3.1 培養観察

対照培養細胞を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で培養し、観察するとき、CPE を認めてはならない。

#### 3.3.2 鶏赤血球凝集試験

3.3.1 の観察最終日に培養液を採取し、0.5vol % 鶏赤血球浮遊液を等量加え、60 分間静置し、観察するとき、赤血球凝集を認めてはならない。

### 3.4 ウイルス浮遊液の試験

#### 3.4.1 ウイルス含有量試験

##### 3.4.1.1 試験材料

###### 3.4.1.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記 1）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.4.1.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞で、単層となったものを用いる。

###### 3.4.1.1.3 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 枚の培養細胞に接種し、37℃で 60 分間静置吸着させる。第 1 次重層寒天培地（付記 2）を加え 3～4 日間培養した後、第 2 次重層寒天培地（付記 3）を重層し、観察する。

###### 3.4.1.1.4 判定

試料の各希釈段階の平均ブラック数からウイルス含有量を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中  $10^{7.0}$  PFU 以上でなければならない。

### 3.5 不活化ウイルス浮遊液の試験

### 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 不活化試験

#### 3.5.2.1 試験材料

##### 3.5.2.1.1 試料

100 倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、検体 5 mL を 4℃ で 1 夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

##### 3.5.2.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞で、単層となったものを用いる。

#### 3.5.2.2 試験方法

試料の全量を、1 mL につき 20cm<sup>2</sup> 以上の培養細胞に接種し、37℃ で 5 日間培養した後、その培養上清 5 mL を採取し、更に 1 代継代し、5 日間培養し、観察する。

#### 3.5.2.3 判定

培養細胞に CPE を認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

### 3.6 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。

### 3.7 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。

#### 3.7.2 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

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。

#### 3.7.5 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、ホルマリンの含有量は、0.2vol % 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 2.3mg 以下でなければならない。

#### 3.7.7 安全試験

##### 3.7.7.1 試験材料

###### 3.7.7.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 3.7.7.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 3～4 週齢の鶏を用いる。

##### 3.7.7.2 試験方法

試験動物 10 羽を試験群、3 羽を対照群とする。

注射材料 1 羽分ずつを試験群の筋肉内に注射し、対照群と共に 4 週間観察する。



### 3.7.7.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に臨床的な異常を認めてはならない。

### 3.7.8 力価試験

#### 3.7.8.1 試験材料

##### 3.7.8.1.1 試験動物

3.7.7 の試験に用いた鶏を用いる。

##### 3.7.8.1.2 中和試験用ウイルス

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞に接種し、培養した伝染性ファブリキウス囊病ウイルス I・Q 株又は適当と認められた株を用いる。

##### 3.7.8.1.3 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞をシャーレに培養し、単層となったものを用いる。

#### 3.7.8.2 試験方法

3.7.7 の試験最終日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中和試験を行う。

血清を非働化し、リン酸緩衝食塩液で 2 倍階段希釈する。各希釈血清と 0.1mL 中 100 ~ 200PFU を含む中和試験用ウイルス液をそれぞれ等量加えて混合し、37℃で 60 分間処理する。この各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ 2 枚の培養細胞に接種し、37℃で 60 分間静置吸着させた後、第 1 次重層寒天培地を加え、3~4 日間静置培養する。その後、第 2 次重層寒天培地を重層し、観察する。

#### 3.7.8.3 判定

ブラック数を 50% 減少させる血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

試験群の 70% 以上が中和抗体価 128 倍以上でなければならない。この場合、対照群は、全て 4 倍以下でなければならない。

### 4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後 2 年 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 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・プロス 2.95 g

牛血清 20 mL

イーグル MEM 残量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 7.4 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

#### 付記 2 第 1 次重層寒天培地

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・プロス 2.95 g

牛血清 20 mL

寒天 10 g

イーグル MEM 残量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 7.4 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 第 2 次重層寒天培地

第 1 次重層寒天培地に 0.5w/v % ニュートラルレッド液を 2 vol % となるように加えたもの。

ワクチン（シードロット製剤）の部のニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎混合生ワクチン（シード）の項の次に次のように加える。

## ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

### 1 定義

シードロット規格に適合したニューカッスル病ウイルス及び鶏伝染性気管支炎ウイルスを同規格に適合した発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液をそれぞれ不活化したものに油性アジュバントを添加し、混合したワクチンである。

### 2 製法

#### 2.1 製造用株

##### 2.1.1 ニューカッスル病ウイルス

###### 2.1.1.1 名称

ニューカッスル病ウイルス石井株又はこれと同等と認められた株

###### 2.1.1.2 性状

10 日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射すると、増殖し、その尿膜腔液には鶏赤血球凝集性を認める。

###### 2.1.1.3 マスターシードウイルス

###### 2.1.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1 の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、5 代以内でなければならない。

##### 2.1.1.4 ワーキングシードウイルス

###### 2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2 の試験を行う。

##### 2.1.1.5 プロダクションシードウイルス

###### 2.1.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖させる。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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ウイルスを保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

#### 2.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

##### 2.1.2.1 名称

鶏伝染性気管支炎ウイルスボーデット 42 株又は製造に相当と認められた株

##### 2.1.2.2 性状

10 日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射すると、鶏胚に特徴的な病変を伴って増殖する。

##### 2.1.2.3 マスターシードウイルス

#### 2.1.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.1.2.4 ワーキングシードウイルス

##### 2.1.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2 の試験を行う。

#### 2.1.2.5 プロダクションシードウイルス

##### 2.1.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖させる。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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 ニューカッスル病ウイルス

#### 2.2.1.1 発育鶏卵

##### 2.2.1.1.1 マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルス及びプロダクションシードウイルスの増殖、継代及び保存に用いる発育鶏卵

SPF 動物規格の 1.1 に適合した 8～14 日齢のものを用いる。

マスターシードウイルス及びワーキングシードウイルスを増殖、継代及び保存する場合の発育鶏卵又はプロダクションシードウイルスを増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、3.2 の試験を行う。

##### 2.2.1.1.2 原液の製造に用いる発育鶏卵

8～14 日齢のものを用いる。

### 2.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

#### 2.2.2.1 発育鶏卵

##### 2.2.2.1.1 マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルス及びプロダクションシードウイルスの増殖、継代及び保存に用いる発育鶏卵

SPF 動物規格の 1.1 に適合した 10～12 日齢のものを用いる。

マスターシードウイルス及びワーキングシードウイルスを増殖、継代及び保存する場合の発育鶏卵又はプロダクションシードウイルスを増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、3.2 の試験を行う。

##### 2.2.2.1.2 原液の製造に用いる発育鶏卵

10～12 日齢のものを用いる。

## 2.3 原液

### 2.3.1 ニューカッスル病ウイルス原液

#### 2.3.1.1 発育鶏卵の培養

1 回に処理する発育鶏卵を個別別発育鶏卵とみなす。

個別別発育鶏卵について、3.3 の試験を行う。

#### 2.3.1.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを 2.3.1.1 の発育鶏卵で培養し、感染増殖させた尿膜腔液のろ液

又は遠心上清をウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.4.1.1の試験を行う。

#### 2.3.1.3 不活化

ウイルス浮遊液を適当と認められた方法により不活化し、不活化ウイルス浮遊液とする。

不活化ウイルス浮遊液について、3.5.1及び3.5.2.1の試験を行う。

#### 2.3.1.4 アジュバントの添加

不活化ウイルス浮遊液又はこれを適当と認められた方法で濃縮したものに、適当と認められた油性アジュバントを添加し、原液とする。

ただし、最終バルクの調製時にアジュバントを添加してもよい。

原液について、3.6の試験を行う。

#### 2.3.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス原液

##### 2.3.2.1 発育鶏卵の培養

1回に処理する発育鶏卵を個別発育鶏卵とみなす。

個別発育鶏卵について、3.3の試験を行う。

##### 2.3.2.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.2.1の発育鶏卵で培養し、感染増殖させた尿膜腔液のろ液又は遠心上清をウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.4.1.2の試験を行う。

##### 2.3.2.3 不活化

ウイルス浮遊液を適当と認められた方法により不活化し、不活化ウイルス浮遊液とする。

不活化ウイルス浮遊液について、3.5.1及び3.5.2.2の試験を行う。

##### 2.3.2.4 アジュバントの添加

不活化ウイルス浮遊液又はこれを適当と認められた方法で濃縮したものに、適当と認められた油性アジュバントを添加し、原液とする。

ただし、最終バルクの調製時にアジュバントを添加してもよい。

原液について、3.6の試験を行う。

#### 2.4 最終バルク

ニューカッスル病ウイルス原液及び鶏伝染性気管支炎ウイルス原液を混合し、濃度調整したものを最終バルクとする。この場合、適当と認められた保存剤を添加してもよい。

#### 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 マスターシードウイルスの試験

###### 3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.1.1.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.1.1.3 マイコプラズマ否定試験

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

###### 3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

###### 3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、2.1及び2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 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 1.1 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 1.1、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。

### 3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

#### 3.1.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

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

### 3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

#### 3.1.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

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

### 3.2 発育鶏卵の試験

#### 3.2.1 孵卵性状試験

シードロット規格の 3.2.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.3 個体別発育鶏卵の試験

個体別発育鶏卵の 1% 以上又は 30 個以上を対照発育鶏卵とし、これについて次の試験を行う。

#### 3.3.1 培養観察

対照発育鶏卵を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で培養し、観察するとき、鶏胚に異常を認めてはならない。

#### 3.3.2 鶏赤血球凝集試験

3.3.1 の試験最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol % 鶏赤血球浮遊液を等量加え、60 分間静置し、観察するとき、赤血球凝集を認めてはならない。

### 3.4 ウイルス浮遊液の試験

#### 3.4.1 ウイルス含有量試験

##### 3.4.1.1 ニューカッスル病ウイルス

##### 3.4.1.1.1 試験材料

##### 3.4.1.1.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.4.1.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9～11 日齢のものを用いる。

##### 3.4.1.1.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 5 個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37 °C で 5 日間培養し、観察する。試験最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol % 鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

##### 3.4.1.1.3 判定

尿膜腔液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、EID<sub>50</sub> を算出する。ただし、24 時間以内に死亡したものは、除外する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中  $10^{2.5}$ EID<sub>50</sub> 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、そのウイルス含有量とする。

#### 3.4.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

##### 3.4.1.2.1 試験材料

###### 3.4.1.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.4.1.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9～10 日齢のものを用いる。

###### 3.4.1.2.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 5 個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で 7～8 日間培養し、観察する。試験最終日に鶏胚の変化を観察する。

###### 3.4.1.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全又はカーリング）を認めたものを感染とみなし、EID<sub>50</sub> を算出する。ただし、24 時間以内に死亡したものは、除外する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中  $10^{6.7}$ EID<sub>50</sub> 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、そのウイルス含有量とする。

#### 3.5 不活化ウイルス浮遊液の試験

##### 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 不活化試験

###### 3.5.2.1 ニューカッスル病ウイルス

###### 3.5.2.1.1 試験材料

###### 3.5.2.1.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

###### 3.5.2.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9～11 日齢のものを用いる。

###### 3.5.2.1.2 試験方法

注射材料 0.1mL ずつを 10 個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で 5 日間培養した後、尿膜腔液を採取し、更に 1 代継代し、37℃で 5 日間培養し、観察する。

試験最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol % 鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

###### 3.5.2.1.3 判定

鶏胚は、正常に発育しなければならず、尿膜腔液に赤血球凝集を認めてはならない。

###### 3.5.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

###### 3.5.2.2.1 試験材料

###### 3.5.2.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

###### 3.5.2.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9～10 日齢のものを用いる。

###### 3.5.2.2.2 試験方法

注射材料 0.1mL ずつを 10 個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で 5 日間培養した後、尿膜腔液を採取し、更に 1 代継代し、37℃で 5 日間培養し、観察する。

###### 3.5.2.2.3 判定

鶏胚は、正常に発育しなければならない。

#### 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。

### 3.7 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均質な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。

#### 3.7.2 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。

#### 3.7.3 チメロサル定量試験

チメロサル添加製剤については、適当と認められた方法で試験品を処理したものを試料とし、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。

#### 3.7.4 ホルマリン定量試験

ホルマリン添加製剤については、適当と認められた方法で試験品を処理したものを試料とし、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、0.1vol %以下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、そのホルマリン含有量とする。

#### 3.7.5 安全試験

##### 3.7.5.1 試験材料

###### 3.7.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 3.7.5.1.2 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 30 ～ 35 日齢の鶏を用いる。

##### 3.7.5.2 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 羽分ずつを試験群の脚部筋肉内に注射し、対照群と共に 4 週間観察する。

##### 3.7.5.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に臨床的な異常を認めてはならない。

#### 3.7.6 力価試験

##### 3.7.6.1 ニューカッスル病力価試験

###### 3.7.6.1.1 試験材料

###### 3.7.6.1.1.1 試験動物

3.7.5 の試験に用いた動物を用いる。

###### 3.7.6.1.1.2 赤血球凝集抗原

「ニューカッスル病診断用赤血球凝集抗原」を用いる。

###### 3.7.6.1.2 試験方法

3.7.5 の試験最終日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、ニューカッスル病ウイルス赤血球凝集抑制試験を行う。

###### 3.7.6.1.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価（以下この項において「HI 抗体価」という。）とする。

試験群の 80 % 以上が HI 抗体価 160 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全て HI 抗体価 5 倍以下でなければならない。

##### 3.7.6.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

###### 3.7.6.2.1 試験材料

###### 3.7.6.2.1.1 試験動物

3.7.5 の試験に用いた動物を用いる。

###### 3.7.6.2.1.2 中和試験用ウイルス

製造用株を用いる。ただし、そのウイルス量は、生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9～10 日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、ウイルス価を測定するとき、1 mL 中  $10^{5.0}$ EID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

#### 3.7.6.2.1.3 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9～10 日齢のものを用いる。

#### 3.7.6.2.2 試験方法

3.7.5 の試験最終日に、試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、ウイルス希釈法により中和試験を行う。血清は、それぞれ各群ごとに等量プールし、非働化する。

中和試験用ウイルスをリン酸緩衝食塩液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を 3 群に分け、第 1 群には試験群のプール血清を、第 2 群には対照群のプール血清を、第 3 群にはウイルス対照としてリン酸緩衝食塩液を、それぞれ等量加えて混合する。これらの混合液を 4℃で 18～24 時間又は 37℃で 60 分間処理する。処理した試料 0.1mL ずつを 5 個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で 7～8 日間培養し、観察する。試験最終日に鶏胚の変化を観察する。

#### 3.7.6.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全又はカーリング）を認めたものを感染したものとみなし、EID<sub>50</sub> を求め、中和指数を算出する。ただし、24 時間以内に死亡したものは、除外する。

試験群の中和指数は、対照群に対し 2.0 以上でなければならない。この場合、対照群の中和指数は、ウイルス対照に対し 1.0 以下でなければならない。

#### 4 貯法及び有効期間

有効期間は、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。

#### 5 その他

##### 5.1 添付文書等記載事項

1 肉用鶏には使用しない旨

2 採卵鶏又は種鶏を産鶏として食鳥処理場へ出荷する前の所定の期間は使用しない旨



ワクチン（シードロット製剤）の部のニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎 2 価混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）の項の次に次のように加える。

## ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎 2 価・産卵低下症候群-1976 混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

### 1 定義

シードロット規格に適合したニューカッスル病ウイルス及び血清型のそれぞれ異なる 2 種類の鶏伝染性気管支炎ウイルスを同規格に適合した発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液並びに産卵低下症候群-1976 ウイルスを同規格に適合した発育あひる卵で増殖させて得たウイルス液をそれぞれ不活化したものを混合し、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 ニューカッスル病ウイルス

###### 2.1.1.1 名称

弱毒ニューカッスル病ウイルス Clone30 株又はこれと同等と認められた株

###### 2.1.1.2 性状

10 日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射すると増殖し、その尿膜腔液には鶏赤血球凝集性を認める。

###### 2.1.1.3 マスターシードウイルス

###### 2.1.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1 の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、5 代以内でなければならない。

###### 2.1.1.4 ワーキングシードウイルス

###### 2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2 の試験を行う。

###### 2.1.1.5 プロダクションシードウイルス

###### 2.1.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖させる。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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ウイルスを保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

#### 2.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

##### 2.1.2.1 名称

鶏伝染性気管支炎ウイルス M41 株及び 249g 株、又は製造に相当と認められた 2 種類の株

##### 2.1.2.2 性状

10 日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射すると、鶏胚に特徴的な病変を伴って増殖する。

### 2.1.2.3 マスターシードウイルス

#### 2.1.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 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。

### 2.1.2.4 ワーキングシードウイルス

#### 2.1.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2 の試験を行う。

### 2.1.2.5 プロダクションシードウイルス

#### 2.1.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖させる。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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ウイルスを保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

### 2.1.3 産卵低下症候群— 1976 ウイルス

#### 2.1.3.1 名称

産卵低下症候群— 1976 ウイルス BC14 株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.3.2 性状

発育あひる卵の尿膜腔内に注射すると増殖し、その尿膜腔液には鶏赤血球凝集性を認める。

#### 2.1.3.3 マスターシードウイルス

##### 2.1.3.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、SPF 動物規格の 2.6 に適合した鶏胚肝初代細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 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。

##### 2.1.3.4 ワーキングシードウイルス

###### 2.1.3.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、SPF 動物規格の 2.6 に適合した鶏胚肝初代細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2 の試験を行う。

##### 2.1.3.5 プロダクションシードウイルス

###### 2.1.3.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、SPF 動物規格の 2.6 に適合した鶏胚肝初代細胞で増殖させる。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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 ニューカッスル病ウイルス

#### 2.2.1.1 発育鶏卵

##### 2.2.1.1.1 マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルス及びプロダクションシードウイルスの増殖、継代及び保存に用いる発育鶏卵

SPF 動物規格の 1.1 に適合した 10～12 日齢のものを用いる。

マスターシードウイルス及びワーキングシードウイルスを増殖、継代及び保存する場合の発育鶏卵又はプロダクションシードウイルスを増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、3.3 の試験を行う。

##### 2.2.1.1.2 原液の製造に用いる発育鶏卵

10～11 日齢のものを用いる。

### 2.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルスの各株

#### 2.2.2.1 発育鶏卵

##### 2.2.2.1.1 マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルス及びプロダクションシードウイルスの増殖、継代及び保存に用いる発育鶏卵

SPF 動物規格の 1.1 に適合した 10～12 日齢のものを用いる。

マスターシードウイルス及びワーキングシードウイルスを増殖、継代及び保存する場合の発育鶏卵又はプロダクションシードウイルスを増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、3.3 の試験を行う。

##### 2.2.2.1.2 原液の製造に用いる発育鶏卵

11～12 日齢のものを用いる。

### 2.2.3 産卵低下症候群-1976 ウイルス

#### 2.2.3.1 初代細胞

##### 2.2.3.1.1 マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルス及びプロダクションシードウイルスの増殖、継代及び保存に用いる初代細胞

SPF 動物規格の 2.6 に適合した鶏胚肝初代細胞を用いる。

##### 2.2.3.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

##### 2.2.3.3 マスタープライマリーセルシード (プロダクションプライマリーセルシード)

###### 2.2.3.3.1 増殖、継代及び保存

マスタープライマリーセルシード (プロダクションプライマリーセルシード) は、2.2.3.2 の培養液で増殖し、継代及び保存しない。

マスタープライマリーセルシード (プロダクションプライマリーセルシード) について、3.2 の試験を行う。

###### 2.2.3.4 原液の製造に用いる発育あひる卵

9～11 日齢のものを用いる。

## 2.3 原液

### 2.3.1 ニューカッスル病ウイルス原液

#### 2.3.1.1 発育鶏卵の培養

1 回に処理する発育鶏卵を個別発育鶏卵とみなす。

個別発育鶏卵について、3.4.1 の試験を行う。

#### 2.3.1.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを 2.3.1.1 の発育鶏卵で培養し、感染増殖させた尿膜腔液の遠心上清をウイルス浮遊液とする。

#### 2.3.1.3 不活化

ウイルス浮遊液を相当と認められた方法により不活化し、原液とする。

原液について、3.6.1、3.6.2.1 及び 3.6.3.1 の試験を行う。

## 2.3.2 鶏伝染性気管支炎ウイルスの各株原液

### 2.3.2.1 発育鶏卵の培養

1 回に処理する発育鶏卵を個別発育鶏卵とみなす。

個別発育鶏卵について、3.4.1 の試験を行う。

### 2.3.2.2 ウイルスの培養

各株のプロダクションシードウイルスを 2.3.2.1 の発育鶏卵で培養し、感染増殖させた尿膜腔液の遠心上清を各株のウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.5.1 の試験を行う。

### 2.3.2.3 不活化

各株のウイルス浮遊液を適当と認められた方法により不活化し、各株の原液とする。

原液について、3.6.1 及び 3.6.2.2 の試験を行う。

## 2.3.3 産卵低下症候群－1976 ウイルス原液

### 2.3.3.1 発育あひる卵の培養

1 回に処理する発育あひる卵を個別発育あひる卵とみなす。

個別発育あひる卵について、3.4.2 の試験を行う。

### 2.3.3.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを 2.3.3.1 の発育あひる卵で培養し、感染増殖させた尿膜腔液の遠心上清をウイルス浮遊液とする。

### 2.3.3.3 不活化

ウイルス浮遊液を適当と認められた方法により不活化し、原液とする。

原液について、3.6.1、3.6.2.3 及び 3.6.3.2 の試験を行う。

## 2.4 最終バルク

ニューカッスル病ウイルス原液、鶏伝染性気管支炎ウイルス各株の原液及び産卵低下症候群－1976 ウイルス原液を濃度調整して混合した後、適当と認められた油性アジュバントを添加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 マスターシードウイルスの試験

##### 3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の 1.4.2.3.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.1.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.1.3 マイコプラズマ否定試験

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

##### 3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

###### 3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.1、2.1 及び 2.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 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 1.1 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 1.1、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。

#### 3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

##### 3.1.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

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

#### 3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

##### 3.1.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

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

#### 3.2 初代細胞の試験

##### 3.2.1 マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）の試験

###### 3.2.1.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.2.4.2.1.1 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 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。

###### 3.2.1.3 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 発育鶏卵の試験

##### 3.3.1 孵卵性状試験

シードロット規格の 3.2.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.4 個別発育卵の試験

##### 3.4.1 個別発育鶏卵の試験

個別発育鶏卵の 1% 以上又は 30 個以上を対照発育鶏卵とし、これについて次の試験を行う。

###### 3.4.1.1 培養観察

対照発育鶏卵を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で培養し、観察するとき、鶏胚に異常を認めてはならない。

###### 3.4.1.2 鶏赤血球凝集試験

3.4.1.1 の試験最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol % 鶏赤血球浮遊液を等量加え、60 分間静置し、観察するとき、赤血球凝集を認めてはならない。

##### 3.4.2 個別発育あひる卵の試験

個別発育あひる卵の 1% 以上又は 30 個以上を対照発育あひる卵とし、これについて次の試験を行う。

###### 3.4.2.1 培養観察

対照発育あひる卵を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で培養し、観察するとき、あひる胚に異常を認めてはならない。

###### 3.4.2.2 鶏赤血球凝集試験

3.4.2.1 の試験最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol % 鶏赤血球浮遊液を等量加え、60 分間静置し、観察するとき、赤血球凝集を認めてはならない。

### 3.5 ウイルス浮遊液の試験

#### 3.5.1 ウイルス含有量試験

##### 3.5.1.1 鶏伝染性気管支炎ウイルス

###### 3.5.1.1.1 試験材料

###### 3.5.1.1.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.5.1.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した9～10日齢のものを用いる。

###### 3.5.1.1.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ5個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で7～8日間培養し、観察する。試験最終日に鶏胚の変化を観察する。

###### 3.5.1.1.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全又はカーリング）を認めたものを感染とみなし、EID<sub>50</sub>を算出する。ただし、24時間以内に死亡したものは、除外する。

検体のウイルス含有量は、M41株の場合にあっては1mL中10<sup>8.0</sup>EID<sub>50</sub>以上、249g株の場合にあっては1mL中10<sup>7.4</sup>EID<sub>50</sub>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、そのウイルス含有量とする。

### 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 不活化試験

##### 3.6.2.1 ニューカッスル病ウイルス

###### 3.6.2.1.1 試験材料

###### 3.6.2.1.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

###### 3.6.2.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した9～11日齢のものを用いる。

###### 3.6.2.1.2 試験方法

注射材料0.1mLずつを10個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で5日間培養した後、尿膜腔液を採取し、更に1代継代し、37℃で5日間培養し、観察する。

試験最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol%鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

###### 3.6.2.1.3 判定

鶏胚は、正常に発育しなければならない。尿膜腔液に赤血球凝集を認めてはならない。

##### 3.6.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

###### 3.6.2.2.1 試験材料

###### 3.6.2.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

###### 3.6.2.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した9～10日齢のものを用いる。

###### 3.6.2.2.2 試験方法

注射材料0.1mLずつを10個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で5日間培養した後、尿膜腔液を採取し、更に1代継代し、37℃で5日間培養し、観察する。

###### 3.6.2.2.3 判定

鶏胚は、正常に発育しなければならない。

#### 3.6.2.3 産卵低下症候群－1976ウイルス

### 3.6.2.3.1 試験材料

#### 3.6.2.3.1.1 試料

検体を重亜硫酸ナトリウムで中和したものを試料とする。

#### 3.6.2.3.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.3 に適合した鶏胚肝初代細胞であって、単層となったものを用いる。

#### 3.6.2.3.2 試験方法

試料の 2 mL を 150cm<sup>2</sup> 以上の培養細胞に接種し、37 °C で 5 日間培養した後、その培養上清を採取し、更に 1 代継代し、37 °C で 5 日間培養し、観察する。試験最終日に培養上清を採取し、0.5vol % 鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

#### 3.6.2.3.3 判定

培養細胞に CPE を認めず、かつ、1 代継代後の培養上清に赤血球凝集性を認めない場合には、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。

### 3.6.3 抗原定量試験

#### 3.6.3.1 ニューカッスル病ウイルス

##### 3.6.3.1.1 試験材料

###### 3.6.3.1.1.1 試料

検体を生理食塩液で 2 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.6.3.1.2 試験方法

各試料 50 μ L に 1 vol. % 鶏赤血球浮遊液を 25 μ L ずつ加えて振とう混合し、30 ~ 60 分間静置後、判定する。

##### 3.6.3.1.3 判定

赤血球が完全凝集を示す試料の最高希釈倍数を赤血球凝集単位（以下この項において「HA 単位」という。）とする。

検体の抗原量は、50 μ L 中 128 HA 単位以上でなければならない。

#### 3.6.3.2 産卵低下症候群 - 1976 ウイルス

##### 3.6.3.2.1 試験材料

###### 3.6.3.2.1.1 試料

検体を生理食塩液で 2 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.6.3.2.2 試験方法

各試料 50 μ L に 1 vol. % 鶏赤血球浮遊液を 25 μ L ずつ加えて振とう混合し、30 ~ 60 分間静置後、判定する。

##### 3.6.3.2.3 判定

赤血球凝集を示す試料の最高希釈倍数を HA 単位とする。

検体の抗原量は、50 μ L 中 4,096 HA 単位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。

#### 3.7.2 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。

#### 3.7.3 ホルマリン定量試験

適当と認められた方法で試験品を処理したものを試料とし、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、0.2vol % 以下でなければならない。

### 3.7.4 安全試験

#### 3.7.4.1 試験材料

##### 3.7.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.7.4.1.2 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 4 週齢の鶏を用いる。

#### 3.7.4.2 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 羽分ずつを試験群の頸部中央部皮下に注射し、対照群と共に 4 週間観察する。

#### 3.7.4.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に臨床的な異常を認めてはならない。

### 3.7.5 力価試験

#### 3.7.5.1 ニューカッスル病力価試験

##### 3.7.5.1.1 試験材料

##### 3.7.5.1.1.1 試験動物

3.7.4 の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.7.5.1.1.2 赤血球凝集抗原

「ニューカッスル病診断用赤血球凝集抗原」を用いる。

##### 3.7.5.1.2 試験方法

3.7.4 の試験最終日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、ニューカッスル病ウイルス赤血球凝集抑制試験を行う。

##### 3.7.5.1.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価（以下この項において「HI 抗体価」という。）とする。

試験群の 80 % 以上が HI 抗体価 80 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全て HI 抗体価 5 倍以下でなければならない。

#### 3.7.5.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

##### 3.7.5.2.1 試験材料

##### 3.7.5.2.1.1 試験動物

3.7.4 の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.7.5.2.1.2 中和試験用ウイルス

それぞれの製造用株を用いる。ただし、そのウイルス量は、生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9～10 日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、ウイルス価を測定するとき、1 mL 中  $10^{5.0}$  EID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

##### 3.7.5.2.1.3 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9～10 日齢のものを用いる。

##### 3.7.5.2.2 試験方法

3.7.4 の試験最終日に、試験群及び対照群から得られた血清について、ウイルス希釈法により中和試験を行う。血清は、それぞれ等量を各群ごとにプールし、非働化する。

それぞれの中和試験用ウイルスをリン酸緩衝食塩液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を 3 群に分け、第 1 群には試験群のプール血清を、第 2 群には対照群のプール血清を、第 3 群にはウイルス対照としてリン酸緩衝食塩液を、それぞれ等量加えて混合する。これらの混合液を 4℃で 18～24 時間又は 37℃で 60 分間処理する。処理した試料 0.1mL ずつを 5 個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で 7～8 日間培養し、観察する。試験最終日に鶏胚の変化を観察する。

##### 3.7.5.2.3 判定



鶏胚に死亡又は変性（發育不全又はカーリング）を認めたものを感染とみなし、EID<sub>50</sub>を求め、中和指数を算出する。ただし、24時間以内に死亡したものは、除外する。

試験群のそれぞれの株に対する中和指数は、対照群に対して 2.0 以上でなければならない。この場合、対照群の中和指数は、ウイルス対照に対し 1.0 以下でなければならない。

### 3.7.5.3 産卵低下症候群－1976 力価試験

#### 3.7.5.3.1 試験材料

##### 3.7.5.3.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.7.5.3.1.2 試験動物

3.7.4 の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.7.5.3.1.3 赤血球凝集抗原

産卵低下症候群－1976 ウイルス赤血球凝集抗原（付記1）を用いる。

#### 3.7.5.3.2 試験方法

3.7.4 の試験最終日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赤血球凝集抑制試験を行う。

血清1容に 25w/v %カオリン液（付記2）3容を加え、20分間処理した後、2,000rpm、10分間遠心した上清を採取する。これをリン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈し、各希釈血清 25 μL に等量の4単位の産卵低下症候群－1976 ウイルス赤血球凝集抗原を加えて混合し、30分間処理した後、0.5vol %の鶏赤血球浮遊液を 50 μL ずつ加えて振とう混合し、60分間静置した後に赤血球凝集の有無を観察する。

##### 3.7.5.3.3 判定

赤血球凝集が抑制された血清の最高希釈倍数を HI 抗体価とする。

試験群の 80 % 以上が HI 抗体価 32 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全て HI 抗体価 4 倍以下でなければならない。

### 4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後 3 年 6 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。

### 5 その他

#### 5.1 添付文書等記載事項

1 肉用鶏には使用しない旨

2 採卵鶏又は種鶏を産卵鶏として食鳥処理場へ出荷する前の所定の期間は使用しない旨

#### 付記1 産卵低下症候群－1976 ウイルス赤血球凝集抗原

産卵低下症候群－1976 ウイルス JPA-1 株又は同等と認められた株を生ワクチン製造用材料の規格 1.3 に適合した發育あひる卵で増殖させて得た尿膜腔液又は生ワクチン製造用材料の規格 2.1.3 に適合した鶏胚肝初代細胞で増殖させて得た培養上清に 0.2vol %になるようにホルマリンを加えて不活化したもの。

#### 付記2 25w/v %カオリン液

1,000mL 中

カオリン

250 g

リン酸緩衝食塩液

残量

115 °C、15 分間高压滅菌又は窒化ナトリウムを 0.01w/v % 添加した後、2 ~ 10 °C に保存する。

ワクチン（シードロット製剤）の部の鶏伝染性コリーザ（A・C型）（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）の項を次のように改める。

## 鶏伝染性コリーザ（A・C型）（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

### 1 定義

シードロット規格に適合したヘモフィルス・パラガリナルムA型菌及びC型菌の培養菌液をそれぞれ不活化したものを混合し、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 ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌

###### 2.1.1.1 名称

ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌 No.221 株又はこれと同等と認められた株

###### 2.1.1.2 性状

鶏及び発育鶏卵に対して病原性を示す。牛、馬、羊、鶏及びモルモットの赤血球を凝集する。

##### 2.1.2 ヘモフィルス・パラガリナルムC型菌

###### 2.1.2.1 名称

ヘモフィルス・パラガリナルムC型菌 H-18 株又はこれと同等と認められた株

###### 2.1.2.2 性状

鶏及び発育鶏卵に対して病原性を示す。

原株及び種菌は、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。

##### 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、生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の5～7日齢の発育鶏卵又は継代用培地（付記1）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。

##### 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、生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の5～7日齢の発育鶏卵又は継代用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。

##### 2.1.5 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、生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の5～7日齢の発育鶏卵又は継代用培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 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は、3.1.3の試験を行う。

## 2.2 製造用材料

### 2.2.1 発育鶏卵

#### 2.2.1.1 マスターシード菌、ワーキングシード菌及びプロダクションシード菌の増殖、継代及び保存に用いる発育鶏卵

SPF 動物規格の 1.1 に適合した 5～7 日齢のものを用いる。

マスターシード菌及びワーキングシード菌を増殖、継代及び保存する場合の発育鶏卵又はプロダクションシード菌を増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、3.2 の試験を行う。

### 2.2.2 培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

## 2.3 原液（ヘモフィルス・パラガリナルムの各型菌原液）

### 2.3.1 培養

プロダクションシード菌を製造用培地に接種し、培養したもの、又は更に製造用培地に接種し、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

培養菌液又はこれを遠心して得た菌を、相当と認められた希釈用液に浮遊させたものにホルマリンを添加し、又は相当と認められた方法により不活化したものを不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.3 の試験を行う。

### 2.3.3 アジュバントの添加

各型菌の不活化菌液又は各型菌の不活化菌液を混合したものに、相当と認められたアルミニウムゲルアジュバントを添加し、原液とする。

ただし、最終バルクの調製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

各型菌原液を混合し濃度調整したもの又は各型菌を混合した原液を濃度調整したものを最終バルクとする。この場合、相当と認められた保存剤を添加してもよい。

## 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、3.5 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

シードロットの規格 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 液状チオグリコール酸培地培養法

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。

###### 3.1.1.2.2 平板培地培養法

###### 3.1.1.2.2.1 培地

継代用培地又は相当と認められた平板培地を用いる。

###### 3.1.1.2.2.2 試験方法

検体 0.05mL ずつを平板培地 2 枚以上に接種し、37℃で 7 日間培養する。

###### 3.1.1.2.2.3 判定

ヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌又はヘモフィルス・パラガリナルム C 型菌以外の菌の発育を認めてはならない。

### 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

#### 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 発育鶏卵の試験

#### 3.2.1 孵卵性状試験

シードロット規格の3.2.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.3 培養菌液の試験

#### 3.3.1 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。

#### 3.3.2 生菌数試験

3.4.2 の総菌数試験を実施するものについては、本試験を実施しなくてもよい。

##### 3.3.2.1 試験材料

###### 3.3.2.1.1 試料

検体を普通ブイヨンで10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.3.2.1.2 培地

継代用培地を用いる。

##### 3.3.2.2 試験方法

各試料 0.1mL ずつをそれぞれ2枚以上の継代用培地に接種して培地表面に拡散させ、37℃、5 vol %炭酸ガス下で48時間培養後、集落数を数える。

##### 3.3.2.3 判定

各段階の希釈液ごとの集落数から生菌数を算出する。

検体の生菌数は、1 mL 中  $10^8$  個以上でなければならない。

### 3.4 不活化菌液の試験

#### 3.4.1 不活化試験

##### 3.4.1.1 試験材料

###### 3.4.1.1.1 接種材料

検体を接種材料とする。

###### 3.4.1.1.2 培地

継代用培地又は適当と認められた培地を用いる。

##### 3.4.1.2 試験方法

接種材料 0.1mL ずつを2枚以上の継代用培地に接種して培地表面に拡散させ、37℃、5 vol %炭酸ガス下で48時間培養後、集落の有無を観察する。

##### 3.4.1.3 判定

接種材料を接種した全ての培地上にヘモフィルス・パラガリナルムA型菌又はヘモフィルス・パラガリナルムC型菌の集落を認めてはならない。

#### 3.4.2 総菌数試験

3.3.2 の生菌数試験を実施するものについては、本試験を実施しなくてもよい。

##### 3.4.2.1 試験材料

###### 3.4.2.1.1 試料

検体又は検体をリン酸緩衝食塩液で至適濃度に希釈したものを試料とする。

##### 3.4.2.2 試験方法

試料の濁度を分光光度計で測定する。

### 3.4.2.3 判定

標準検量線、濁度の測定値及び検体の希釈度から総菌数を算出する。

検体中の総菌数は、1 mL 中  $10^8$  個以上でなければならない。

### 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。

### 3.6 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。

#### 3.6.2 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

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。

#### 3.6.5 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、ホルマリンの含有量は、0.2vol %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 1.0mg 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

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 4～5 週齢の鶏を用いる。

###### 3.6.7.2 試験方法

試験動物 10 羽を試験群、3 羽を対照群とする。

注射材料 1 羽分ずつを試験群の筋肉内に注射し、対照群と共に 3 週間観察し、試験最終日に注射部位を剖検する。

###### 3.6.7.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に臨床的な異常を認めてはならない。また、剖検したとき注射部位に著しい異常を認めてはならない。

#### 3.6.8 力価試験

##### 3.6.8.1 試験材料

###### 3.6.8.1.1 試験動物

3.6.7 の試験に用いた動物を用いる。

###### 3.6.8.1.2 赤血球凝集抗原

「鶏伝染性コリザ (A 型) 診断用赤血球凝集抗原」及び鶏伝染性コリザ (C 型) 赤血球凝集抗原 (付記 2) を用いる。

###### 3.6.8.2 試験方法

3.6.7 の試験最終日に試験動物から得られた各個体の血清について、鶏伝染性コリザ（A型）赤血球凝集抑制試験及び鶏伝染性コリザ（C型）赤血球凝集抑制試験を行う。

#### 3.6.8.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価（以下この項において「HI 抗体価」という。）とする。HI 抗体価 5 倍以上を陽性とする。

それぞれの赤血球凝集抑制反応において、試験群の 70 % 以上が陽性でなければならない。この場合、対照群では、全て陰性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 継代用培地

1,000mL 中

ペプトン	1 g
塩化ナトリウム	5 g
寒天	15 g
鶏肉水	残 量

pH を 7.0 ~ 7.4 に調整し、121 °C で 15 分間高圧滅菌する。

約 50 °C に冷却した後、鶏の非働化血清を 3 ~ 5 vol % となるように加える。

なお、適当と認められた V 因子を加えてもよい。

#### 付記 2 鶏伝染性コリザ（C型）赤血球凝集抗原

ヘモフィルス・パラガリナルム C 型菌を適当な方法で処理し、1 vol % 固定鶏赤血球を用いて反応を行うとき、赤血球凝集価が 80 倍以上のもの。

ワクチン（シードロット製剤）の部のマイコプラズマ・ガリセプチカム感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）の項の次に次のように加える。

## ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎・鶏伝染性コリーザ （A・C型菌処理）混合（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

### 1 定義

シードロット規格に適合したニューカッスル病ウイルス及び鶏伝染性気管支炎ウイルスを同規格に適合した発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液並びに同規格に適合したヘモフィルス・パラガリナルムA型菌及びC型菌の培養菌液を超音波処理し、それぞれ不活化したものを混合し、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 ニューカッスル病ウイルス

###### 2.1.1.1 名称

ニューカッスル病ウイルス石井株又はこれと同等と認められた株

###### 2.1.1.2 性状

10日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射すると、増殖し、その尿膜腔液には鶏赤血球凝集性を認める。

###### 2.1.1.3 マスターシードウイルス

###### 2.1.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、5代以内でなければならない。

###### 2.1.1.4 ワーキングシードウイルス

###### 2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

###### 2.1.1.5 プロダクションシードウイルス

###### 2.1.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させる。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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ウイルスを保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

###### 2.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

###### 2.1.2.1 名称

鶏伝染性気管支炎ウイルスボーデット42株又は製造に相当と認められた株

###### 2.1.2.2 性状

10日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射すると、鶏胚に特徴的な病変を伴って増殖する。

### 2.1.2.3 マスターシードウイルス

#### 2.1.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 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。

### 2.1.2.4 ワーキングシードウイルス

#### 2.1.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2 の試験を行う。

### 2.1.2.5 プロダクションシードウイルス

#### 2.1.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖させる。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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ウイルスを保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

### 2.1.3 ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌

#### 2.1.3.1 名称

ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌 No.221 株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.3.2 性状

鶏及び発育鶏卵に対して病原性を示す。牛、馬、羊、鶏及びモルモットの赤血球を凝集する。

#### 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、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖させ、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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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、3.1.4 の試験を行う。

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

#### 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、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵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、3.1.5 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、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 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は、3.1.6 の試験を行う。



## 2.1.4 ヘモフィルス・パラガリナルムC型菌

### 2.1.4.1 名称

ヘモフィルス・パラガリナルムC型菌 S1 株又はこれと同等と認められた株

### 2.1.4.2 性状

鶏及び発育鶏卵に対して病原性を示す。

### 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、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖させ、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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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、3.1.4 の試験を行う。

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

### 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、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵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、3.1.5 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、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 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は、3.1.6 の試験を行う。

## 2.2 製造用材料

### 2.2.1 ニューカッスル病ウイルス

#### 2.2.1.1 発育鶏卵

##### 2.2.1.1.1 マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルス及びプロダクションシードウイルスの増殖、継代及び保存に用いる発育鶏卵

SPF 動物規格の 1.1 に適合した 8～14 日齢のものを用いる。

マスターシードウイルス及びワーキングシードウイルスを増殖、継代及び保存する場合の発育鶏卵又はプロダクションシードウイルスを増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、3.2 の試験を行う。

##### 2.2.1.1.2 原液の製造に用いる発育鶏卵

8～14 日齢のものを用いる。

### 2.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

#### 2.2.2.1 発育鶏卵

##### 2.2.2.1.1 マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルス及びプロダクションシードウイルスの増殖、継代及び保存に用いる発育鶏卵

SPF 動物規格の 1.1 に適合した 10～12 日齢のものを用いる。

マスターシードウイルス及びワーキングシードウイルスを増殖、継代及び保存する場合の発育鶏卵又はプロダクションシードウイルスを増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、3.2 の試験を行う。

##### 2.2.2.1.2 原液の製造に用いる発育鶏卵

10～12 日齢のものを用いる。

### 2.2.3 ヘモフィルス・パラガリナルムの各型菌

### 2.2.3.1 発育鶏卵

#### 2.2.3.1.1 マスターシード菌、ワーキングシード菌及びプロダクションシード菌の増殖、継代及び保存に用いる発育鶏卵

SPF 動物規格の 1.1 に適合した 5～7 日齢のものを用いる。

マスターシード菌及びワーキングシード菌を増殖、継代及び保存する場合の発育鶏卵又はプロダクションシード菌を増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、3.2 の試験を行う。

#### 2.2.3.2 培地

##### 2.2.3.2.1 原液の製造に用いる培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

### 2.3 原液

#### 2.3.1 ニューカッスル病ウイルス原液

##### 2.3.1.1 発育鶏卵の培養

1 回に処理する発育鶏卵を個別発育鶏卵とみなす。

個別発育鶏卵について、3.3 の試験を行う。

##### 2.3.1.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを 2.3.1.1 の発育鶏卵で培養し、感染増殖させた尿膜腔液の遠心上清をウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.4.1.1 の試験を行う。

##### 2.3.1.3 不活化

ウイルス浮遊液を相当と認められた方法により不活化し、不活化ウイルス浮遊液とする。

不活化ウイルス浮遊液について、3.7.1 及び 3.7.2.1 の試験を行う。

##### 2.3.1.4 アジュバントの添加

不活化ウイルス浮遊液に相当と認められたアルミニウムゲルアジュバントを添加し、原液とする。ただし、最終バルクの調製時にアジュバントを添加してもよい。

原液について、3.9 の試験を行う。

#### 2.3.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス原液

##### 2.3.2.1 発育鶏卵の培養

1 回に処理する発育鶏卵を個別発育鶏卵とみなす。

個別発育鶏卵について、3.3 の試験を行う。

##### 2.3.2.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを 2.3.2.1 の発育鶏卵で培養し、感染増殖させた尿膜腔液の遠心上清をウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.4.1.2 の試験を行う。

##### 2.3.2.3 不活化

ウイルス浮遊液を相当と認められた方法により不活化し、不活化ウイルス浮遊液とする。

不活化ウイルス浮遊液について、3.7.1 及び 3.7.2.2 の試験を行う。

##### 2.3.2.4 アジュバントの添加

不活化ウイルス浮遊液に相当と認められたアルミニウムゲルアジュバントを添加し、原液とする。ただし、最終バルクの調製時にアジュバントを添加してもよい。

原液について、3.9 の試験を行う。

#### 2.3.3 ヘモフィルス・パラガリナルムの各型菌原液

##### 2.3.3.1 培養

プロダクションシード菌を製造用培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.5 の試験を行う。

##### 2.3.3.2 菌処理

培養菌液を超音波発生装置を用いて、所定の範囲の濁度となるように処理したものを超音波処理菌液とする。

超音波処理菌液について、3.6の試験を行う。

#### 2.3.3.3 不活化

超音波処理菌液にホルマリンを添加し、不活化したものを不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.8の試験を行う。

#### 2.3.3.4 アジュバントの添加

不活化菌液に相当と認められたアルミニウムゲルアジュバントを添加し、原液とする。ただし、最終バルクの調製時にアジュバントを添加してもよい。

原液について、3.9の試験を行う。

#### 2.4 最終バルク

ニューカッスル病ウイルス原液、鶏伝染性気管支炎ウイルス原液及びヘモフィルス・パラガリナラム各型菌原液を混合し、濃度調整したものを、最終バルクとする。

この場合、相当と認められた保存剤を添加してもよい。

#### 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、3.10の試験を行う。

### 3 試験法

#### 3.1 製造用株の試験

##### 3.1.1 マスターシードウイルスの試験

###### 3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.1.1.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.1.1.3 マイコプラズマ否定試験

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

###### 3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

###### 3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、2.1及び2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 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1.1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1.1、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。

##### 3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

###### 3.1.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

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

### 3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

#### 3.1.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

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

### 3.1.4 マスターシード菌の試験

#### 3.1.4.1 同定試験

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

#### 3.1.4.2 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.1.5 ワーキングシード菌の試験

#### 3.1.5.1 夾雑菌否定試験

3.1.4.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.1.6 プロダクションシード菌の試験

#### 3.1.6.1 夾雑菌否定試験

3.1.4.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.2 発育鶏卵の試験

#### 3.2.1 孵卵性状試験

シードロット規格の 3.2.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.3 個体別発育鶏卵の試験

個体別発育鶏卵の 1% 以上又は 30 個以上を対照発育鶏卵とし、これについて次の試験を行う。

#### 3.3.1 培養観察

対照発育鶏卵を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で培養し、観察するとき、鶏胚に異常を認めてはならない。

#### 3.3.2 鶏赤血球凝集試験

3.3.1 の試験最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol % 鶏赤血球浮遊液を等量加え、60 分間静置し、観察するとき、赤血球凝集を認めてはならない。

### 3.4 ウイルス浮遊液の試験

#### 3.4.1 ウイルス含有量試験

##### 3.4.1.1 ニューカッスル病ウイルス

##### 3.4.1.1.1 試験材料

##### 3.4.1.1.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.4.1.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9～11 日齢のものを用いる。

##### 3.4.1.1.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 5 個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で 5 日間培養し、観察する。試験最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol % 鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

##### 3.4.1.1.3 判定

尿膜腔液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、EID<sub>50</sub> を算出する。ただし、24 時間以内に死亡したものは、除外する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10<sup>5.5</sup>EID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

##### 3.4.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

##### 3.4.1.2.1 試験材料

##### 3.4.1.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

#### 3.4.1.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9～10 日齢のものを用いる。

#### 3.4.1.2.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 5 個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で 7～8 日間培養し、観察する。試験最終日に鶏胚の変化を観察する。

#### 3.4.1.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全又はカーリング）を認めたものを感染とみなし、EID<sub>50</sub>を算出する。ただし、24 時間以内に死亡したものは、除外する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10<sup>6.7</sup>EID<sub>50</sub>以上でなければならない。

### 3.5 培養菌液の試験

#### 3.5.1 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.5.2 生菌数試験

##### 3.5.2.1 試験材料

##### 3.5.2.1.1 試料

検体を普通ブイヨンで 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.5.2.1.2 培地

鶏血清加寒天培地（付記 1）を用いる。

##### 3.5.2.2 試験方法

各試料 0.1mL ずつをそれぞれ 2 枚以上の培地に接種して培地表面に拡散させ、37℃、5 vol % 炭酸ガス下で 48 時間培養後、集落数を数える。

##### 3.5.2.3 判定

各段階の希釈液ごとの集落数から生菌数を算出する。

検体の生菌数は、1 mL 中 10<sup>8</sup> 個以上でなければならない。

### 3.6 超音波処理菌液の試験

#### 3.6.1 濁度試験

##### 3.6.1.1 試験材料

##### 3.6.1.1.1 試料

検体を試料とする。

##### 3.6.1.2 試験方法

試料の濁度を、分光光度計で測定する。

超音波処理前後の試料の値を比較する。

##### 3.6.1.3 判定

超音波処理菌液の濁度は、所定の範囲の値を示さなければならない。

### 3.7 不活化ウイルス浮遊液の試験

#### 3.7.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.7.2 不活化試験

##### 3.7.2.1 ニューカッスル病ウイルス

##### 3.7.2.1.1 試験材料

##### 3.7.2.1.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

##### 3.7.2.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9～11 日齢のものを用いる。

#### 3.7.2.1.2 試験方法

注射材料 0.1mL ずつを 10 個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で 5 日間培養した後、尿膜腔液を採取し、更に 1 代継代し、37℃で 5 日間培養し、観察する。

試験最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol % 鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

#### 3.7.2.1.3 判定

鶏胚は、正常に発育しなければならず、尿膜腔液に赤血球凝集を認めてはならない。

#### 3.7.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

##### 3.7.2.2.1 試験材料

###### 3.7.2.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

###### 3.7.2.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9～10 日齢のものを用いる。

##### 3.7.2.2.2 試験方法

注射材料 0.1mL ずつを 10 個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で 5 日間培養した後、尿膜腔液を採取し、更に 1 代継代し、37℃で 5 日間培養し、観察する。

##### 3.7.2.2.3 判定

鶏胚は、正常に発育しなければならず、尿膜腔液に赤血球凝集を認めてはならない。

#### 3.8 不活化菌液の試験

##### 3.8.1 不活化試験

###### 3.8.1.1 試験材料

###### 3.8.1.1.1 接種材料

検体を接種材料とする。

###### 3.8.1.1.2 培地

鶏血清加寒天培地又は適当と認められた培地を用いる。

##### 3.8.1.2 試験方法

接種材料 0.1mL ずつを 2 枚以上の培地に接種して培地表面に拡散させ、37℃、5 vol % 炭酸ガス下で 48 時間培養した後、集落の有無を観察する。

##### 3.8.1.3 判定

接種材料を接種した全ての培地上にヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌又はヘモフィルス・パラガリナルム C 型菌の集落を認めてはならない。

#### 3.9 原液の試験

##### 3.9.1 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。

#### 3.10 小分製品の試験

##### 3.10.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、固有の色調を有する均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。

##### 3.10.2 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。

##### 3.10.3 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。

##### 3.10.4 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、ホルマリンの含有量は、0.2vol % 以下でなければならない。

##### 3.10.5 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 2.0mg 以下でなければならない。

### 3.10.6 安全試験

#### 3.10.6.1 試験材料

##### 3.10.6.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.10.6.1.2 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 4～5 週齢の鶏を用いる。

#### 3.10.6.2 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 羽分ずつを試験群の筋肉内に注射し、対照群と共に 3 週間観察し、試験最終日に注射部位を剖検する。

#### 3.10.6.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に臨床的な異常を認めてはならない。また、剖検したとき、注射部位に著しい異常を認めてはならない。

### 3.10.7 力価試験

#### 3.10.7.1 ニューカッスル病力価試験

##### 3.10.7.1.1 試験材料

##### 3.10.7.1.1.1 試験動物

3.10.6 の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.10.7.1.1.2 赤血球凝集抗原

「ニューカッスル病診断用赤血球凝集抗原」を用いる。

##### 3.10.7.1.2 試験方法

3.10.6 の試験の 2 週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、ニューカッスル病ウイルス赤血球凝集抑制試験を行う。

##### 3.10.7.1.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価（以下この項において「HI 抗体価」という。）とする。

試験群の 80 % 以上が HI 抗体価 10 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全て HI 抗体価 2 倍未満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、その抗体価とする。

#### 3.10.7.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

##### 3.10.7.2.1 試験材料

##### 3.10.7.2.1.1 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 4～5 週齢の鶏を用いる。

##### 3.10.7.2.1.2 中和試験用ウイルス

製造用株又は適当と認められた株を用いる。ただし、そのウイルス量は、生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9～10 日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、ウイルス価を測定するとき、1 mL 中  $10^{5.0}$  EID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

##### 3.10.7.2.1.3 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9～10 日齢のものを用いる。

##### 3.10.7.2.2 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 羽分ずつを試験群の筋肉内に 2 週間隔で 2 回注射する。2 回目注射後 2 週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、ウイルス希釈法により中和試験を行う。血清は、それぞれ

各群ごとに等量プールし、非働化する。

中和試験用ウイルスをリン酸緩衝食塩液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を 3 群に分け、第 1 群には試験群のプール血清を、第 2 群には対照群のプール血清を、第 3 群にはウイルス対照としてリン酸緩衝食塩液を、それぞれ等量加えて混合する。これらの混合液を 4℃で 18～24 時間又は 37℃で 60 分間処理する。処理した試料 0.1mL ずつを 5 個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で 7～8 日間培養し、観察する。試験最終日に鶏胚の変化を観察する。

#### 3.10.7.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全又はカーリング）を認めたものを感染とみなし、EID<sub>50</sub> を求め、中和指数を算出する。ただし、24 時間以内に死亡したものは、除外する。

試験群の中和指数は、対照群に対して 2.0 以上でなければならない。この場合、対照群の中和指数は、ウイルス対照に対し 1.0 以下でなければならない。

#### 3.10.7.3 鶏伝染性コリザ（A・C型）力価試験

##### 3.10.7.3.1 試験材料

###### 3.10.7.3.1.1 試験動物

3.10.6 の試験に用いた動物を用いる。

###### 3.10.7.3.1.2 赤血球凝集抗原

「鶏伝染性コリザ（A型）診断用赤血球凝集抗原」及び鶏伝染性コリザ（C型）赤血球凝集抗原（付記 2）を用いる。

##### 3.10.7.3.2 試験方法

3.10.6 の試験最終日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、鶏伝染性コリザ（A型）赤血球凝集抑制試験及び鶏伝染性コリザ（C型）赤血球凝集抑制試験を行う。

##### 3.10.7.3.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数を HI 抗体価とする。HI 抗体価 5 倍以上を陽性とする。

それぞれの赤血球凝集抑制試験において、試験群の 70%以上が陽性でなければならない。この場合、対照群では、全て陰性でなければならない。

#### 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 鶏血清加寒天培地

1,000mL 中

ペプトン 1 g

塩化ナトリウム 5 g

寒天 15 g

鶏肉水 残量

pH を 7.0～7.4 に調整し、121℃で 15 分間高圧滅菌する。

約 50℃に冷却後、鶏の非働化血清を 3～5 vol%となるように加える。

なお、適当と認められた V 因子を加えてもよい。

##### 付記 2 鶏伝染性コリザ（C型）赤血球凝集抗原

ヘモフィルス・パラガリナルム C 型菌を適当な方法で処理し、1 vol% 固定鶏赤血球を用いて反応を行うとき、赤血球凝集価が 80 倍以上のもの。



# ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎・鶏伝染性コリーザ (A・C型) 混合 (油性アジュバント加) 不活化ワクチン (シード)

## 1 定義

シードロット規格に適合したニューカッスル病ウイルス及び鶏伝染性気管支炎ウイルスを同規格に適合した発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液並びに同規格に適合したヘモフィルス・パラガリナラムA型菌及びC型菌の培養菌液をそれぞれ不活化したものに油性アジュバントを添加し、混合したワクチンである。

## 2 製法

### 2.1 製造用株

#### 2.1.1 ニューカッスル病ウイルス

##### 2.1.1.1 名称

ニューカッスル病ウイルス石井株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.1.2 性状

10日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射すると、増殖し、その尿膜腔液には、鶏赤血球凝集性を認める。

##### 2.1.1.3 マスターシードウイルス

###### 2.1.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、5代以内でなければならない。

##### 2.1.1.4 ワーキングシードウイルス

###### 2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

##### 2.1.1.5 プロダクションシードウイルス

###### 2.1.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させる。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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ウイルスを保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

### 2.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

#### 2.1.2.1 名称

鶏伝染性気管支炎ウイルスボーデット42株又は製造に相当と認められた株

#### 2.1.2.2 性状

10日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射すると、鶏胚に特徴的な病変を伴って増殖する。

#### 2.1.2.3 マスターシードウイルス

##### 2.1.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.1.2.4 ワーキングシードウイルス

##### 2.1.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2 の試験を行う。

#### 2.1.2.5 プロダクションシードウイルス

##### 2.1.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖させる。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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ウイルスを保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

#### 2.1.3 ヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌

##### 2.1.3.1 名称

ヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌 No.221 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.3.2 性状

鶏及び発育鶏卵に対して病原性を示す。牛、馬、羊、鶏及びモルモットの赤血球を凝集する。

##### 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、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖させ、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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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、3.1.4 の試験を行う。

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

##### 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、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵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、3.1.5 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、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 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は、3.1.6 の試験を行う。

#### 2.1.4 ヘモフィルス・パラガリナルム C 型菌

##### 2.1.4.1 名称

ヘモフィルス・パラガリナルムC型菌 S1 株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.4.2 性状

鶏及び発育鶏卵に対して病原性を示す。

#### 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、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖させ、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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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、3.1.4 の試験を行う。

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

#### 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、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵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、3.1.5 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、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 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は、3.1.6 の試験を行う。

## 2.2 製造用材料

### 2.2.1 ニューカッスル病ウイルス

#### 2.2.1.1 発育鶏卵

##### 2.2.1.1.1 マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルス及びプロダクションシードウイルスの増殖、継代及び保存に用いる発育鶏卵

SPF 動物規格の 1.1 に適合した 8～14 日齢のものを用いる。

マスターシードウイルス及びワーキングシードウイルスを増殖、継代及び保存する場合の発育鶏卵又はプロダクションシードウイルスを増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、3.2 の試験を行う。

##### 2.2.1.1.2 原液の製造に用いる発育鶏卵

8～14 日齢のものを用いる。

### 2.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

#### 2.2.2.1 発育鶏卵

##### 2.2.2.1.1 マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルス及びプロダクションシードウイルスの増殖、継代及び保存に用いる発育鶏卵

SPF 動物規格の 1.1 に適合した 10～12 日齢のものを用いる。

マスターシードウイルス及びワーキングシードウイルスを増殖、継代及び保存する場合の発育鶏卵又はプロダクションシードウイルスを増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、3.2 の試験を行う。

##### 2.2.2.1.2 原液の製造に用いる発育鶏卵

10～12 日齢のものを用いる。

### 2.2.3 ヘモフィルス・パラガリナルムの各型菌

#### 2.2.3.1 発育鶏卵

##### 2.2.3.1.1 マスターシード菌、ワーキングシード菌及びプロダクションシード菌の増殖、継代及び保存

に用いる発育鶏卵

SPF 動物規格の 1.1 に適合した 5～7 日齢のものを用いる。

マスターシード菌及びワーキングシード菌を増殖、継代及び保存する場合の発育鶏卵又はプロダクションシード菌を増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、3.2 の試験を行う。

#### 2.2.3.2 培地

##### 2.2.3.2.1 原液の製造に用いる培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

#### 2.3 原液

##### 2.3.1 ニューカッスル病ウイルス原液

###### 2.3.1.1 発育鶏卵の培養

1 回に処理する発育鶏卵を個別発育鶏卵とみなす。

個別発育鶏卵について、3.3 の試験を行う。

###### 2.3.1.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを 2.3.1.1 の発育鶏卵で培養し、感染増殖させた尿膜腔液のろ液又は遠心上清をウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.4.1.1 の試験を行う。

###### 2.3.1.3 不活化

ウイルス浮遊液を相当と認められた方法により不活化したもの、又はこれを相当と認められた方法で濃縮したものを不活化ウイルス浮遊液とする。

不活化ウイルス浮遊液について、3.6.1 及び 3.6.2.1 の試験を行う。

###### 2.3.1.4 アジュバントの添加

不活化ウイルス浮遊液に相当と認められた油性アジュバントを添加し、原液とする。

ただし、最終バルクの調製時にアジュバントを添加してもよい。

原液について、3.8 の試験を行う。

##### 2.3.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス原液

###### 2.3.2.1 発育鶏卵の培養

1 回に処理する発育鶏卵を個別発育鶏卵とみなす。

個別発育鶏卵について、3.3 の試験を行う。

###### 2.3.2.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを 2.3.2.1 の発育鶏卵で培養し、感染増殖させた尿膜腔液のろ液又は遠心上清をウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.4.1.2 の試験を行う。

###### 2.3.2.3 不活化

ウイルス浮遊液を相当と認められた方法により不活化したもの、又はこれを相当と認められた方法で濃縮したものを、不活化ウイルス浮遊液とする。

不活化ウイルス浮遊液について、3.6.1 及び 3.6.2.2 の試験を行う。

###### 2.3.2.4 アジュバントの添加

不活化ウイルス浮遊液に相当と認められた油性アジュバントを添加し、原液とする。

ただし、最終バルクの調製時にアジュバントを添加してもよい。

原液について、3.8 の試験を行う。

##### 2.3.3 ヘモフィルス・パラガリナルムの各型菌原液

###### 2.3.3.1 培養

プロダクションシード菌を製造用培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.5 の試験を行う。

###### 2.3.3.2 不活化

培養菌液又はこれを適当と認められた界面活性剤により処理した後、遠心して得た菌をリン酸緩衝食塩液に浮遊させたものにホルマリン又は適当と認められた不活化剤を添加し、不活化したものを不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.7の試験を行う。

#### 2.3.3.3 アジュバントの添加

不活化菌液又はこれを適当と認められた方法で濃縮した菌液に適当と認められた油性アジュバントを添加し、原液とする。

ただし、最終バルクの調製時にアジュバントを添加してもよい。

原液について、3.8の試験を行う。

### 2.4 最終バルク

ニューカッスル病ウイルス原液、鶏伝染性気管支炎ウイルス原液及びヘモフィルス・パラガリナラム各型菌原液を混合し、濃度調整したものを最終バルクとする。

この場合、適当と認められた保存剤を添加してもよい。

### 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、3.9の試験を行う。

## 3 試験法

### 3.1 製造用株の試験

#### 3.1.1 マスターシードウイルスの試験

##### 3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.1.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.1.3 マイコプラズマ否定試験

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

##### 3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

###### 3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、2.1及び2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 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1.1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1.1、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。

#### 3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

##### 3.1.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

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

#### 3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

### 3.1.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

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

### 3.1.4 マスターシード菌の試験

#### 3.1.4.1 同定試験

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

#### 3.1.4.2 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.1.5 ワーキングシード菌の試験

#### 3.1.5.1 夾雑菌否定試験

3.1.4.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.1.6 プロダクションシード菌の試験

#### 3.1.6.1 夾雑菌否定試験

3.1.4.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.2 発育鶏卵の試験

#### 3.2.1 孵卵性状試験

シードロット規格の 3.2.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.3 個体別発育鶏卵の試験

個体別発育鶏卵の 1 % 以上又は 30 個以上を対照発育鶏卵とし、これについて次の試験を行う。

#### 3.3.1 培養観察

対照発育鶏卵を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で培養し、観察するとき、鶏胚に異常を認めてはならない。

#### 3.3.2 鶏赤血球凝集試験

3.3.1 の試験最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol % 鶏赤血球浮遊液を等量加え、60 分間静置し、観察するとき、赤血球凝集を認めてはならない。

### 3.4 ウイルス浮遊液の試験

#### 3.4.1 ウイルス含有量試験

##### 3.4.1.1 ニューカッスル病ウイルス

###### 3.4.1.1.1 試験材料

###### 3.4.1.1.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.4.1.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9 ~ 11 日齢のものを用いる。

###### 3.4.1.1.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 5 個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37 °C で 5 日間培養し、観察する。試験最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol % 鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

###### 3.4.1.1.3 判定

尿膜腔液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、EID<sub>50</sub> を算出する。ただし、24 時間以内に死亡したものは、除外する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10<sup>5</sup>EID<sub>50</sub> 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、そのウイルス含有量とする。

##### 3.4.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

###### 3.4.1.2.1 試験材料

###### 3.4.1.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

#### 3.4.1.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した9～10日齢のものを用いる。

#### 3.4.1.2.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ5個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で7～8日間培養し、観察する。試験最終日に鶏胚の変化を観察する。

#### 3.4.1.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全又はカーリング）を認めたものを感染とみなし、EID<sub>50</sub>を算出する。ただし、24時間以内に死亡したものは、除外する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10<sup>6.7</sup>EID<sub>50</sub>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、そのウイルス含有量とする。

### 3.5 培養菌液の試験

#### 3.5.1 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.5.2 生菌数試験

3.7.2の総菌数試験を実施するものについては、この試験を行わなくてもよい。

#### 3.5.2.1 試験材料

##### 3.5.2.1.1 試料

検体を普通ブイヨンで10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.5.2.1.2 培地

鶏血清加寒天培地（付記1）又は適当と認められた培地を用いる。

#### 3.5.2.2 試験方法

各試料0.1mLずつをそれぞれ2枚以上の培地に接種して培地表面に拡散させ、37℃、5 vol %炭酸ガス下で48時間培養後、集落数を数える。

#### 3.5.2.3 判定

各段階の希釈液ごとの集落数から生菌数を算出する。

検体の生菌数は、1 mL中10<sup>9</sup>個以上でなければならない。

### 3.6 不活化ウイルス浮遊液の試験

#### 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 不活化試験

##### 3.6.2.1 ニューカッスル病ウイルス

##### 3.6.2.1.1 試験材料

##### 3.6.2.1.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

##### 3.6.2.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した9～11日齢のものを用いる。

##### 3.6.2.1.2 試験方法

注射材料0.1mLずつを10個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で5日間培養した後、尿膜腔液を採取し、更に1代継代し、37℃で5日間培養し、観察する。

試験最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol %鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

##### 3.6.2.1.3 判定

鶏胚は、正常に発育しなければならず、尿膜腔液に赤血球凝集を認めてはならない。

##### 3.6.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

##### 3.6.2.2.1 試験材料

#### 3.6.2.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

#### 3.6.2.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9～10 日齢のものを用いる。

#### 3.6.2.2.2 試験方法

注射材料 0.1mL ずつを 10 個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で 5 日間培養した後、尿膜腔液を採取し、更に 1 代継代し、37℃で 5 日間培養し、観察する。

#### 3.6.2.2.3 判定

鶏胚は、正常に発育しなければならない。

### 3.7 不活化菌液の試験

#### 3.7.1 不活化試験

##### 3.7.1.1 試験材料

##### 3.7.1.1.1 接種材料

検体を接種材料とする。

##### 3.7.1.1.2 培地

鶏血清加寒天培地又は適当と認められた培地を用いる。

##### 3.7.1.2 試験方法

接種材料 0.1mL ずつを 2 枚以上の培地に接種して培地表面に拡散させ、37℃、5 vol %炭酸ガス下で 48 時間培養後、集落の有無を観察する。

##### 3.7.1.3 判定

接種材料を接種した全ての培地上にヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌又はヘモフィルス・パラガリナルム C 型菌の集落を認めてはならない。

#### 3.7.2 総菌数試験

3.5.2 の生菌数試験を実施するものについては、この試験を行わなくてもよい。

##### 3.7.2.1 試験材料

##### 3.7.2.1.1 試料

検体又は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。

##### 3.7.2.2 試験方法

試料の吸光度を、分光光度計で測定する。

##### 3.7.2.3 判定

標準検量線、吸光度の測定値及び検体の希釈度から総菌数を算出する。

検体中の総菌数は、1 mL 中  $8 \times 10^9$  個以上でなければならない。

### 3.8 原液の試験

#### 3.8.1 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。

### 3.9 小分製品の試験

#### 3.9.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、固有の色調を有する均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。

#### 3.9.2 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。

#### 3.9.3 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。

#### 3.9.4 ホルマリン定量試験



ホルマリン添加製剤については、適当と認められた方法で試験品を処理したものを試料とし、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、0.1vol %以下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、そのホルマリン含有量とする。

### 3.9.5 安全試験

#### 3.9.5.1 試験材料

##### 3.9.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.9.5.1.2 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4～5週齢の鶏を用いる。

#### 3.9.5.2 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羽分ずつを試験群の頸部皮下又は脚部筋肉内に注射し、対照群と共に4週間観察し、試験最終日に注射部位を剖検する。

#### 3.9.5.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に臨床的な異常を認めてはならない。また、剖検したとき、注射部位に著しい異常を認めてはならない。

### 3.9.6 力価試験

#### 3.9.6.1 ニューカッスル病力価試験

##### 3.9.6.1.1 試験材料

##### 3.9.6.1.1.1 試験動物

3.9.5の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.9.6.1.1.2 赤血球凝集抗原

「ニューカッスル病診断用赤血球凝集抗原」を用いる。

##### 3.9.6.1.1.2 試験方法

3.9.5の試験最終日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、ニューカッスル病ウイルス赤血球凝集抑制試験を行う。

##### 3.9.6.1.1.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価（以下この項において「HI抗体価」という。）とする。

試験群の80%以上がHI抗体価160倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全てHI抗体価5倍以下でなければならない。

#### 3.9.6.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

##### 3.9.6.2.1 試験材料

##### 3.9.6.2.1.1 試験動物

3.9.5の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.9.6.2.1.2 中和試験用ウイルス

製造用株を用いる。ただし、そのウイルス量は、生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した9～10日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、ウイルス価を測定するとき、1 mL中 $10^{5.0}$ EID<sub>50</sub>以上でなければならない。

##### 3.9.6.2.1.3 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した9～10日齢のものを用いる。

##### 3.9.6.2.2 試験方法

3.9.5の試験最終日に、試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、ウイルス希釈法により中和試験を行う。血清は、それぞれ各群ごとに等量プールし、非働化する。

中和試験用ウイルスをリン酸緩衝食塩液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を3群に分け、第

1群には試験群のプール血清を、第2群には対照群のプール血清を、第3群にはウイルス対照としてリン酸緩衝食塩液を、それぞれ等量加えて混合する。これらの混合液を4℃で18～24時間又は37℃で60分間処理する。処理した試料0.1mLずつを5個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で7～8日間培養し、観察する。試験最終日に鶏胚の変化を観察する。

#### 3.9.6.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全又はカーリング）を認めたものを感染とみなし、EID<sub>50</sub>を求め、中和指数を算出する。ただし、24時間以内に死亡したものは、除外する。

試験群の中和指数は、対照群に対し2.0以上でなければならない。この場合、対照群の中和指数は、ウイルス対照に対し1.0以下でなければならない。

#### 3.9.6.3 鶏伝染性コリザ（A・C型）力価試験

##### 3.9.6.3.1 試験材料

##### 3.9.6.3.1.1 試験動物

3.9.5の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.9.6.3.1.2 赤血球凝集抗原

「鶏伝染性コリザ（A型）診断用赤血球凝集抗原」及び鶏伝染性コリザ（C型）赤血球凝集抗原（付記2）を用いる。

##### 3.9.6.3.2 試験方法

3.9.5の試験最終日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、鶏伝染性コリザ（A型）赤血球凝集抑制試験及び鶏伝染性コリザ（C型）赤血球凝集抑制試験を行う。

##### 3.9.6.3.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数をHI抗体価とする。HI抗体価5倍以上を陽性とする。

それぞれの赤血球凝集抑制試験において、試験群の70%以上が陽性でなければならない。この場合、対照群では、全て陰性でなければならない。

#### 4 貯法及び有効期間

有効期間は、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。

#### 5 その他

##### 5.1 添付文書等記載事項

1 肉用鶏には使用しない旨

2 採卵鶏又は種鶏を産鶏として食鳥処理場へ出荷する前の所定の期間は使用しない旨

#### 付記1 鶏血清加寒天培地

1,000mL 中

ペプトン

1 g

塩化ナトリウム

5 g

寒天

15 g

鶏肉水

残量

pHを7.0～7.4に調整し、121℃で15分間高圧滅菌する。

約50℃に冷却した後、鶏の非働化血清を3～5 vol%となるように加える。

なお、適当と認められたV因子を加えてもよい。

#### 付記2 鶏伝染性コリザ（C型）赤血球凝集抗原

ヘモフィルス・パラガリナルムC型菌を適当な方法で処理し、1 vol%固定鶏赤血球を用いて反応を行うとき、赤血球凝集価が80倍以上のもの。

ワクチン（シードロット製剤）の部のニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎2価・鶏伝染性コリーザ（A・C型）混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）の項の次に次のように加える。

## **ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎3価・鶏伝染性コリーザ（A・C型）混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）**

### 1 定義

シードロット規格に適合したニューカッスル病ウイルス及び3種類の鶏伝染性気管支炎ウイルスを同規格に適合した発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液並びに同規格に適合したヘモフィルス・パラガリナルムA型菌及びC型菌の培養菌液をそれぞれ不活化したものを混合し、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 ニューカッスル病ウイルス

###### 2.1.1.1 名称

ニューカッスル病ウイルス石井株又はこれと同等と認められた株

###### 2.1.1.2 性状

10日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射すると、増殖し、その尿膜腔液には鶏赤血球凝集性を認める。

###### 2.1.1.3 マスターシードウイルス

###### 2.1.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、5代以内でなければならない。

###### 2.1.1.4 ワーキングシードウイルス

###### 2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

###### 2.1.1.5 プロダクションシードウイルス

###### 2.1.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖する。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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ウイルスを保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

#### 2.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

##### 2.1.2.1 名称

鶏伝染性気管支炎ウイルス滋賀株、AO-27株及びGN-58株、又は製造に相当と認められた3種類の株

##### 2.1.2.2 性状

10日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射すると、鶏胚に特徴的な病変を伴って増殖する。

#### 2.1.2.3 マスターシードウイルス

##### 2.1.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.1.2.4 ワーキングシードウイルス

##### 2.1.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

#### 2.1.2.5 プロダクションシードウイルス

##### 2.1.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖する。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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ウイルスを保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

#### 2.1.3 ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌

##### 2.1.3.1 名称

ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌 No.221 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.3.2 性状

鶏及び発育鶏卵に対して病原性を示す。鶏赤血球を凝集する。

##### 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、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させ、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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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、3.1.4の試験を行う。

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

##### 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、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵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、3.1.5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、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖する。

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は、3.1.6の試験を行う。

## 2.1.4 ヘモフィルス・パラガリナルムC型菌

### 2.1.4.1 名称

ヘモフィルス・パラガリナルムC型菌 KA 株又はこれと同等と認められた株

### 2.1.4.2 性状

鶏及び発育鶏卵に対して病原性を示す。

### 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、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させ、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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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、3.1.4の試験を行う。

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

### 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、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵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、3.1.5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、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖する。

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は、3.1.6の試験を行う。

## 2.2 製造用材料

### 2.2.1 ニューカッスル病ウイルス

#### 2.2.1.1 発育鶏卵

##### 2.2.1.1.1 マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルス及びプロダクションシードウイルスの増殖、継代及び保存に用いる発育鶏卵

SPF動物規格の1.1に適合した9～11日齢のものを用いる。

マスターシードウイルス及びワーキングシードウイルスを増殖、継代及び保存する場合の発育鶏卵又はプロダクションシードウイルスを増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、3.2の試験を行う。

##### 2.2.1.1.2 原液の製造に用いる発育鶏卵

9～11日齢のものを用いる。

### 2.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルスの各株

#### 2.2.2.1 発育鶏卵

##### 2.2.2.1.1 マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルス及びプロダクションシードウイルスの増殖、継代及び保存に用いる発育鶏卵

SPF動物規格の1.1に適合した9～11日齢のものを用いる。

マスターシードウイルス及びワーキングシードウイルスを増殖、継代及び保存する場合の発育鶏卵又はプロダクションシードウイルスを増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、3.2の試験を行う。

##### 2.2.2.1.2 原液の製造に用いる発育鶏卵

9～11日齢のものを用いる。

## 2.2.3 ヘモフィルス・パラガリナルムの各型菌

### 2.2.3.1 発育鶏卵

#### 2.2.3.1.1 マスターシード菌、ワーキングシード菌及びプロダクションシード菌の増殖、継代及び保存に用いる発育鶏卵

SPF 動物規格の 1.1 に適合した 5～7 日齢のものを用いる。

マスターシード菌及びワーキングシード菌を増殖、継代及び保存する場合の発育鶏卵又はプロダクションシード菌を増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、3.2 の試験を行う。

### 2.2.3.2 培地

#### 2.2.3.2.1 原液の製造に用いる培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

## 2.3 原液

### 2.3.1 ニューカッスル病ウイルス原液

#### 2.3.1.1 発育鶏卵の培養

1 回に処理する発育鶏卵を個別発育鶏卵とみなす。

個別発育鶏卵について、3.3 の試験を行う。

#### 2.3.1.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを 2.3.1.1 の発育鶏卵で培養し、感染増殖させた尿膜腔液を相当と認められた方法で濃縮したものをウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.4.1.1 の試験を行う。

#### 2.3.1.3 不活化

ウイルス浮遊液にホルマリンを加えて不活化し、原液とする。

原液について、3.6.1 及び 3.6.2.1 の試験を行う。

### 2.3.2 鶏伝染性気管支炎ウイルスの各株原液

#### 2.3.2.1 発育鶏卵の培養

1 回に処理する発育鶏卵を個別発育鶏卵とみなす。

個別発育鶏卵について、3.3 の試験を行う。

#### 2.3.2.2 ウイルスの培養

各株のプロダクションシードウイルスを 2.3.2.1 の発育鶏卵で培養し、感染増殖させた尿膜腔液を相当と認められた方法で濃縮したものをウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.4.1.2 の試験を行う。

#### 2.3.2.3 不活化

ウイルス浮遊液にホルマリンを加えて不活化し、原液とする。

原液について、3.6.1 及び 3.6.2.2 の試験を行う。

### 2.3.3 ヘモフィルス・パラガリナルムの各型菌原液

#### 2.3.3.1 培養

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

培養菌液について、3.5 の試験を行う。

#### 2.3.3.2 不活化

培養菌液を相当と認められた方法で濃縮し、相当と認められた不活化剤を加えて不活化したものを原液とする。相当と認められた保存剤を添加してもよい。

原液について、3.6.1、3.6.2.3 及び 3.6.3 の試験を行う。

## 2.4 最終バルク

ニューカッスル病ウイルス原液、鶏伝染性気管支炎ウイルス各株原液及びヘモフィルス・パラガリナルム各型菌原液をそれぞれ濃度調整して混合し、相当と認められた油性アジュバントを添加し、

最終バルクとする。適当と認められた保存剤を添加してもよい。

## 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、3.7の試験を行う。

## 3 試験法

### 3.1 製造用株の試験

#### 3.1.1 マスターシードウイルスの試験

##### 3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.1.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.1.3 マイコプラズマ否定試験

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

##### 3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

###### 3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、2.1及び2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 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1.1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1.1、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。

### 3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

#### 3.1.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

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

### 3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

#### 3.1.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

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

### 3.1.4 マスターシード菌の試験

#### 3.1.4.1 同定試験

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

#### 3.1.4.2 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.1.5 ワーキングシード菌の試験

#### 3.1.5.1 夾雑菌否定試験

3.1.4.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.1.6 プロダクションシード菌の試験

#### 3.1.6.1 夾雑菌否定試験

3.1.4.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.2 発育鶏卵の試験

#### 3.2.1 孵卵性状試験

シードロット規格の 3.2.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.3 個体別発育鶏卵の試験

個体別発育鶏卵の 1% 以上又は 30 個以上を対照発育鶏卵とし、これについて次の試験を行う。

##### 3.3.1 培養観察

対照発育鶏卵を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で培養し、観察するとき、鶏胚に異常を認めてはならない。

##### 3.3.2 鶏赤血球凝集試験

3.3.1 の試験最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol % 鶏赤血球浮遊液を等量加え、60 分間静置し、観察するとき、赤血球凝集を認めてはならない。

#### 3.4 ウイルス浮遊液の試験

##### 3.4.1 ウイルス含有量試験

###### 3.4.1.1 ニューカッスル病ウイルス

###### 3.4.1.1.1 試験材料

###### 3.4.1.1.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.4.1.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9～11 日齢のものを用いる。

###### 3.4.1.1.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 5 個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃ で 5 日間培養し、観察する。試験最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol % 鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

###### 3.4.1.1.3 判定

尿膜腔液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、EID<sub>50</sub> を算出する。ただし、24 時間以内に死亡したものは、除外する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10<sup>8.7</sup>EID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

###### 3.4.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

###### 3.4.1.2.1 試験材料

###### 3.4.1.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.4.1.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9～10 日齢のものを用いる。

###### 3.4.1.2.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 5 個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃ で 7 日間培養し、観察する。試験最終日に鶏胚の変化を観察する。

###### 3.4.1.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全又はカーリング）を認めたものを感染とみなし、EID<sub>50</sub> を算出する。ただし、24 時間以内に死亡したものは、除外する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10<sup>7.7</sup>EID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

#### 3.5 培養菌液の試験

##### 3.5.1 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。



### 3.5.2 生菌数試験

3.6.3 の総菌数試験を実施するものについては、本試験を実施しなくてもよい。

#### 3.5.2.1 試験材料

##### 3.5.2.1.1 試料

検体を普通ブイヨンで10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.5.2.1.2 培地

鶏血清加寒天培地（付記1）又は適当と認められた培地を用いる。

#### 3.5.2.2 試験方法

各試料0.1mLずつをそれぞれ2枚以上の培地に接種して培地表面に拡散させ、37℃、5 vol %炭酸ガス下で48時間培養後、集落数を数える。

#### 3.5.2.3 判定

各段階の希釈液ごとの集落数から生菌数を算出する。

検体の生菌数は、1 mL中 $10^{6.0}$ 個以上でなければならない。

### 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 不活化試験

##### 3.6.2.1 ニューカッスル病ウイルス

###### 3.6.2.1.1 試験材料

###### 3.6.2.1.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

###### 3.6.2.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した9～11日齢のものを用いる。

###### 3.6.2.1.2 試験方法

注射材料0.1mLずつを10個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で5日間培養した後、尿膜腔液を採取し、更に1代継代し、37℃で5日間培養し、観察する。

試験最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol %鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

###### 3.6.2.1.3 判定

鶏胚は、正常に発育しなければならない。尿膜腔液に赤血球凝集を認めてはならない。

##### 3.6.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルスの各株

###### 3.6.2.2.1 試験材料

###### 3.6.2.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

###### 3.6.2.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した9～10日齢のものを用いる。

###### 3.6.2.2.2 試験方法

注射材料0.1mLずつをそれぞれ5個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で5日間培養した後、尿膜腔液を採取し、更に1代継代し、37℃で5日間培養し、観察する。

###### 3.6.2.2.3 判定

鶏胚は、正常に発育しなければならない。

##### 3.6.2.3 ヘモフィルス・パラガリナルムの各型菌

###### 3.6.2.3.1 試験材料

###### 3.6.2.3.1.1 接種材料

検体を接種材料とする。

###### 3.6.2.3.1.2 培地

鶏血清加寒天培地又は適当と認められた培地を用いる。

#### 3.6.2.3.2 試験方法

接種材料 0.1mL ずつを 2 枚以上の培地に接種して培地表面に拡散させ、37 °C、5 vol % 炭酸ガス下で 48 時間培養後、集落の有無を観察する。

#### 3.6.2.3.3 判定

接種材料を接種した全ての培地上にヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌又はヘモフィルス・パラガリナルム C 型菌の集落を認めてはならない。

#### 3.6.3 総菌数試験

3.5.2 の生菌数試験を実施するものについては、本試験を実施しなくてもよい。

#### 3.6.3.1 試験材料

##### 3.6.3.1.1 試料

検体又は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。

#### 3.6.3.2 試験方法

試料の濁度を分光光度計で測定する。

標準検量線、濁度の測定値及び検体の希釈度から総菌数を算出する。

#### 3.6.3.3 判定

検体の総菌数は、1 mL 中  $10^{9.0}$  個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。

##### 3.7.2 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。

##### 3.7.3 ホルマリン定量試験

適当と認められた方法で試験品を処理したものを試料とし、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、0.12vol % 以下でなければならない。

##### 3.7.4 安全試験

##### 3.7.4.1 試験材料

##### 3.7.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.7.4.1.2 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 30 ~ 35 日齢の鶏を用いる。

##### 3.7.4.2 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 羽分ずつを試験群の脚部筋肉内に注射し、対照群と共に 5 週間観察し、試験最終日に注射部位を剖検する。

##### 3.7.4.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に臨床的な異常を認めてはならない。また、剖検したとき、注射部位に著しい異常を認めてはならない。

##### 3.7.5 力価試験

##### 3.7.5.1 ニューカッスル病力価試験

##### 3.7.5.1.1 試験材料

##### 3.7.5.1.1.1 試験動物

3.7.4 の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.7.5.1.1.2 赤血球凝集抗原

「ニューカッスル病診断用赤血球凝集抗原」を用いる。

#### 3.7.5.1.2 試験方法

3.7.4 の試験最終日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、ニューカッスル病ウイルス赤血球凝集抑制試験を行う。

#### 3.7.5.1.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価（以下この項において「HI 抗体価」という。）とする。

試験群の 80 %以上が HI 抗体価 160 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全て HI 抗体価 5 倍以下でなければならない。

#### 3.7.5.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

##### 3.7.5.2.1 試験材料

##### 3.7.5.2.1.1 試験動物

3.7.4 の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.7.5.2.1.2 中和試験用ウイルス

製造用株又は適当と認められた株を用いる。

##### 3.7.5.2.1.3 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.2.1 に適合した鶏腎初代細胞を用いる。

#### 3.7.5.2.2 試験方法

3.7.4 の試験最終日に、試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、血清希釈法により中和試験を行う。血清は、それぞれ各群ごとに等量プールし、非働化する。

血清を細胞増殖用培養液（付記 2）で 20 倍に希釈した後、更に 5 倍階段希釈し、各段階の希釈液に 0.4mL 中 200PFU となるように濃度を調整した中和試験用ウイルス液を等量混合し、4℃で 18 ～ 24 時間又は 37℃で 60 分間処理する。処理した液 0.4mL ずつをそれぞれ 4 枚以上の鶏腎初代細胞を培養したシャーレに接種し、37℃、5 vol %炭酸ガス下で 60 分間吸着させ第 1 次重層寒天培地（付記 3）を重層し、2 日後、更に第 2 次重層寒天培地（付記 4）を重層し、24 ～ 48 時間培養し、ブラックの出現を観察する。

#### 3.7.5.2.3 判定

各希釈系列のブラック平均数から 50 %ブラック減少を示す血清希釈倍数を求め、中和抗体価を算出する。

試験群の中和抗体価は、100 倍以上でなければならない。この場合、対照群の中和抗体価は、20 倍以下でなければならない。

#### 3.7.5.3 鶏伝染性コリザ（A・C型）力価試験

##### 3.7.5.3.1 試験材料

##### 3.7.5.3.1.1 試験動物

3.7.4 の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.7.5.3.1.2 赤血球凝集抗原

「鶏伝染性コリザ（A型）診断用赤血球凝集抗原」及び鶏伝染性コリザ（C型）赤血球凝集抗原（付記 5）を用いる。

##### 3.7.5.3.2 試験方法

3.7.4 の試験最終日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、鶏伝染性コリザ（A型）赤血球凝集抑制試験及び鶏伝染性コリザ（C型）赤血球凝集抑制試験を行う。

##### 3.7.5.3.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数を HI 抗体価とする。HI 抗体価 5 倍以上を陽性とする。

それぞれの赤血球凝集抑制試験において、試験群の 70 %以上が陽性でなければならない。この

場合、対照群では、全て陰性でなければならない。

#### 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。

#### 5 その他

##### 5.1 添付文書等記載事項

1 肉用鶏には使用しない旨

2 採卵鶏又は種鶏を廃鶏として食鳥処理場へ出荷する前の所定の期間は使用しない旨

##### 付記1 鶏血清加寒天培地

1,000mL 中

ペプトン	1 g
塩化ナトリウム	5 g
寒天	15 g
鶏肉水	残量

pHを7.0～7.4に調整し、121℃で15分間高圧滅菌する。

約50℃に冷却後、鶏の非働化血清を3～5 vol%となるように加える。

なお、適当と認められたV因子を加えてもよい。

##### 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
牛血清	50.0 mL
イーグルMEM	残量

炭酸水素ナトリウムでpH6.8～7.2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 第1次重層寒天培地

1,000mL 中

酵母エキス	1.0 g
ラクトアルブミン	5.0 g
牛血清アルブミン	10.0 g
牛血清	20.0 mL
寒天	9.0 g
アール液	残量

炭酸水素ナトリウムでpH6.8～7.2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 第2次重層寒天培地

1,000mL 中

酵母エキス	1.0 g
ラクトアルブミン	5.0 g
ニュートラルレッド	120.0 mg
寒天	9.0 g
アール液	残量

炭酸水素ナトリウムでpH6.8～7.2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 鶏伝染性コリーザ（C型）赤血球凝集抗原

ヘモフィルス・パラガリナルムC型菌を適当な方法で処理し、1 vol %固定鶏赤血球を用いて反応を行うとき、赤血球凝集価が80倍以上のもの。

ワクチン（シードロット製剤）の部の猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症・猫汎白血球減少症混合生ワクチン（シード）の項の次に次のように加える。

## **猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症・猫汎白血球減少症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）**

### 1 定義

シードロット規格に適合した猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス、猫カリシウイルス及び猫汎白血球減少症ウイルスをそれぞれ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それぞれ不活化したものを混合し、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 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス

###### 2.1.1.1 名称

猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス FR-1 株又はこれと同等と認められた株

###### 2.1.1.2 性状

猫腎継代細胞に接種すると、CPE を伴って増殖する。

###### 2.1.1.3 マスターシードウイルス

###### 2.1.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、猫腎継代細胞又は適当と認められた細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1 の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、5代以内でなければならない。

###### 2.1.1.4 ワーキングシードウイルス

###### 2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、猫腎継代細胞又は適当と認められた細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2 の試験を行う。

###### 2.1.1.5 プロダクションシードウイルス

###### 2.1.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、猫腎継代細胞又は適当と認められた細胞で増殖させる。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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ウイルスを保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

#### 2.1.2 猫カリシウイルス

##### 2.1.2.1 名称

猫カリシウイルス FC-7 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.2.2 性状

猫腎継代細胞に接種すると、CPE を伴って増殖する。

##### 2.1.2.3 マスターシードウイルス

#### 2.1.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、猫腎継代細胞又は適当と認められた細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.1.2.4 ワーキングシードウイルス

##### 2.1.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、猫腎継代細胞又は適当と認められた細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

#### 2.1.2.5 プロダクションシードウイルス

##### 2.1.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、猫腎継代細胞又は適当と認められた細胞で増殖させる。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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ウイルスを保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

#### 2.1.3 猫汎白血球減少症ウイルス

##### 2.1.3.1 名称

猫汎白血球減少症ウイルス FP-5 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.3.2 性状

猫腎継代細胞に接種すると、核内封入体を伴って増殖し、その培養液は、豚の赤血球を凝集する。

##### 2.1.3.3 マスターシードウイルス

###### 2.1.3.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、猫腎継代細胞又は適当と認められた細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 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。

###### 2.1.3.4 ワーキングシードウイルス

###### 2.1.3.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、猫腎継代細胞又は適当と認められた細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

###### 2.1.3.5 プロダクションシードウイルス

###### 2.1.3.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、猫腎継代細胞又は適当と認められた細胞で増殖させる。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス

### 2.2.1.1 株化細胞

猫腎継代細胞又は製造に相当と認められた株化細胞を用いる。

### 2.2.1.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

### 2.2.1.3 マスターセルシード

#### 2.2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターセルシードは、2.2.1.2 の培養液で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターセルシードは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

マスターセルシードについて、3.2.1 の試験を行う。

マスターセルシードは、ワクチンの製造又は試験以外の目的で継代しない。マスターセルシードからプロダクションセルシードまでの最高継代数は、20 代以内でなければならない。

### 2.2.1.4 ワーキングセルシード

#### 2.2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.1.2 の培養液で増殖及び継代する。

ワーキングセルシードは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングセルシードについて、3.2.2 の試験を行う。

### 2.2.1.5 プロダクションセルシード

#### 2.2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.1.2 の培養液で増殖させる。

プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、3.2.3 の試験を行う。

## 2.2.2 猫カリシウイルス

### 2.2.2.1 株化細胞

猫腎継代細胞又は製造に相当と認められた株化細胞を用いる。

### 2.2.2.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

### 2.2.2.3 マスターセルシード

#### 2.2.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターセルシードは、2.2.2.2 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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

マスターセルシードについて、3.2.1 の試験を行う。

マスターセルシードは、ワクチンの製造又は試験以外の目的で継代しない。マスターセルシードからプロダクションセルシードまでの最高継代数は、20 代以内でなければならない。

### 2.2.2.4 ワーキングセルシード

#### 2.2.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.2.2 の培養液で増殖及び継代する。

ワーキングセルシードは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングセルシードについて、3.2.2 の試験を行う。

### 2.2.2.5 プロダクションセルシード

#### 2.2.2.5.1 増殖及び保存



プロダクションセルシードは、2.2.2.2の培養液で増殖させる。

プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して-70℃以下で保存する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、3.2.3の試験を行う。

## 2.2.3 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス

### 2.2.3.1 株化細胞

猫腎継代細胞又は製造に相当と認められた株化細胞を用いる。

### 2.2.3.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

### 2.2.3.3 マスターセルシード

#### 2.2.3.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターセルシードは、2.2.3.2の培養液で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

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

### 2.2.3.4 ワーキングセルシード

#### 2.2.3.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.3.2の培養液で増殖及び継代する。

ワーキングセルシードは、凍結して-70℃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。

### 2.2.3.5 プロダクションセルシード

#### 2.2.3.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.3.2の培養液で増殖させる。

プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して-70℃以下で保存する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、3.2.3の試験を行う。

## 2.3 原液

### 2.3.1 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス

#### 2.3.1.1 プロダクションセルシードの培養

1回に処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。ウイルス接種前のプロダクションセルシードに異常を認めてはならない。

#### 2.3.1.2 ウイルスの培養

プロダクションセルシードウイルスを2.3.1.1の細胞で培養し、相当と認められた時期に個別培養細胞ごとに感染細胞相又は培養液を採取する。

感染細胞相を採取した場合は、その遠心沈渣をウイルス感染細胞とする。

ウイルス感染細胞を採取した上清について、3.3.1及び3.3.2.1の試験を行う。

培養液を採取した場合は、培養液のろ液、遠心上清又はこれを濃縮したものをウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.3.1及び3.3.2.1の試験を行う。

#### 2.3.1.3 不活化

ウイルス感染細胞を可溶化処理し、遠心した上清又はウイルス浮遊液にホルマリンを加えてウイルスを不活化し、不活化ウイルス液とする。不活化後、不活化剤を中和することができる。また、不活化ウイルス液を濃縮してもよい。不活化ウイルス液又は不活化ウイルス濃縮液を原液とする。

原液について、3.4.1及び3.4.2.1の試験を行う。

## 2.3.2 猫カリシウイルス

### 2.3.2.1 プロダクションセルシードの培養

1 回に処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。ウイルス接種前のプロダクションセルシードに異常を認めてはならない。

### 2.3.2.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを 2.3.2.1 の細胞で培養し、適当と認められた時期に個別培養細胞ごとに採取した培養液又はその遠心上清をウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.3.1 及び 3.3.2.2 の試験を行う。

### 2.3.2.3 不活化

ウイルス浮遊液にホルマリンを加えてウイルスを不活化し、不活化ウイルス液とする。その後、不活化剤を中和してもよい。不活化ウイルス液を濃縮し、原液とする。

原液について、3.4.1 及び 3.4.2.2 の試験を行う。

## 2.3.3 猫汎白血球減少症ウイルス

### 2.3.3.1 プロダクションセルシードの培養

1 回に処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。ウイルス接種前のプロダクションセルシードに異常を認めてはならない。

### 2.3.3.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを 2.3.3.1 の細胞で培養し、適当と認められた時期に個別培養細胞ごとに採取した培養液又はその遠心上清をウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.3.1 及び 3.3.2.3 の試験を行う。

### 2.3.3.3 不活化

ウイルス浮遊液にホルマリンを加えてウイルスを不活化し、不活化ウイルス液とする。その後、不活化剤を中和してもよい。不活化ウイルス液を濃縮し、原液とする。

原液について、3.4.1 及び 3.4.2.3 の試験を行う。

## 2.4 原液の混合

猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス原液、猫カリシウイルス原液及び猫汎白血球減少症ウイルス原液を混合し、3 種混合原液とする。

## 2.5 最終バルク

原液に、油性アジュバント又はこれと同等と認められたアジュバントを加え、混合したものを最終バルクとする。

## 2.6 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 1.4.2.3.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.1.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.1.3 マイコプラズマ否定試験

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

##### 3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

###### 3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.1、2.1 及び 2.2 を準用して試験するとき、適合しな

ければならない。

#### 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-粘膜病ウイルス、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、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。

#### 3.1.3 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-粘膜病ウイルス、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、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 2.2.4.2.3.1 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 ウイルス感染細胞上清又はウイルス浮遊液の試験

### 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 ウイルス含有量試験

#### 3.3.2.1 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス含有量試験

##### 3.3.2.1.1 試験材料

###### 3.3.2.1.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記 1）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.3.2.1.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

###### 3.3.2.1.2 試験方法

試料の 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 60 分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で 7 日間回転又は静置培養し、観察する。

###### 3.3.2.1.3 判定

培養細胞に CPE が認められ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、1 mL 中 10<sup>7.0</sup> TCID<sub>50</sub> 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、そのウイルス含有量とする。

#### 3.3.2.2 猫カリシウイルス含有量試験

##### 3.3.2.2.1 試験材料

###### 3.3.2.2.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.3.2.2.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

###### 3.3.2.2.2 試験方法

試料の 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 60 分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で 7 日間回転又は静置培養し、観察する。

###### 3.3.2.2.3 判定

培養細胞に CPE が認められ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、1 mL 中 10<sup>8.0</sup> TCID<sub>50</sub> 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、そのウイルス含有量とする。

#### 3.3.2.3 猫汎白血球減少症ウイルス含有量試験

### 3.3.2.3.1 試験材料

#### 3.3.2.3.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

#### 3.3.2.3.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞浮遊液を小試験管に0.5mLずつ分注し、37°Cで約24時間培養し、細胞層を約50%形成させたもの又は猫腎継代細胞浮遊液を用いる。

#### 3.3.2.3.2 試験方法

試料の0.1mLずつをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37°Cで60分間吸着後、細胞増殖用培養液を加え、37°Cで静置培養する。

培養細胞が完全に単層を形成した後、1mLのウイルス増殖用培養液と交換し、37°Cで接種した後10日間回転培養し、1vol%豚赤血球浮遊液を0.2mL加え、4°Cで1夜静置し観察する。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。

#### 3.3.2.3.3 判定

赤血球の凝集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、1mL中10<sup>5.5</sup> TCID<sub>50</sub>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、そのウイルス含有量とする。

### 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。

#### 3.4.2 不活化試験

濃縮前の不活化ウイルス浮遊液について、本試験を実施してもよい。

##### 3.4.2.1 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス不活化試験

###### 3.4.2.1.1 試験材料

###### 3.4.2.1.1.1 試料

検体をトライトン除去処理(付記2)したもの又は検体2mL以上を100倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、2~5°Cで1夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

###### 3.4.2.1.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

###### 3.4.2.1.2 試験方法

試料を25cm<sup>2</sup>以上の培養細胞に接種し、37°Cで60分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を用いて細胞を2回洗浄した後、ウイルス増殖用培養液を加え、37°Cで10日間培養し、観察する。

###### 3.4.2.1.3 判定

培養細胞にCPEを認めないとき、活性ウイルス陰性と判定する。

試料に活性ウイルスを認めてはならない。

##### 3.4.2.2 猫カリシウイルス不活化試験

###### 3.4.2.2.1 試験材料

###### 3.4.2.2.1.1 試料

検体2mL以上を100倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、2~5°Cで1夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

###### 3.4.2.2.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

###### 3.4.2.2.2 試験方法

試料を25cm<sup>2</sup>以上の培養細胞に接種し、37°Cで60分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を用いて細胞を2回洗浄した後、ウイルス増殖用培養液を加え、37°Cで10日間培養し、観察する。

###### 3.4.2.2.3 判定

培養細胞に CPE を認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

試料に活性ウイルスを認めてはならない。

#### 3.4.2.3 猫汎白血球減少症ウイルス不活化試験

##### 3.4.2.3.1 試験材料

###### 3.4.2.3.1.1 試料

検体の 2 mL 以上を 100 倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、2～5℃で1夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

###### 3.4.2.3.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を細胞増殖用培養液（付記 3）で、 $3 \times 10^5$  個/mL に浮遊させたものを用いる。

##### 3.4.2.3.2 試験方法

試料の全量及び細胞増殖用培養液に浮遊させた猫腎継代細胞を同時に培養面積 25cm<sup>2</sup> 以上の培養瓶で 37℃で培養する。細胞が単層を形成した後、ウイルス増殖用培養液で液交換し、更に 10 日間観察する。観察最終日に培養瓶の培養液を採取し、これに等量のホウ酸緩衝食塩液（付記 4）を加える。さらに、この混合液と等量の VAD6.0 液（付記 5）で濃度を調整した 0.3～0.5vol % 豚赤血球浮遊液を加え、凝集の有無を調べる。

##### 3.4.2.3.3 判定

培養細胞に CPE を認めず、かつ、培養液に赤血球の凝集を認めないとき、活性ウイルス陰性と判定する。

試料に活性ウイルスを認めてはならない。

#### 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、固有の色調及び粘稠性をもつ均質な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 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。

##### 3.5.3 ホルマリン定量試験

試験品又は適当と認められた方法で試験品を処理したものを試料とし、一般試験法のホルマリン定量試験法を準用して試験するとき、ホルマリンの含有量は 0.2vol % 以下でなければならない。

##### 3.5.4 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、本試験を行うことができない場合は、3.5.5 の試験を行う。

##### 3.5.5 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。

##### 3.5.6 安全試験

###### 3.5.6.1 試験材料

###### 3.5.6.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 3.5.6.1.2 試験動物

体重約 1 kg の猫、6 か月齢未満の猫又はこれと同等の感受性を有する動物を用いる。

###### 3.5.6.2 試験方法

注射材料を 2 頭には 5 頭分ずつを頸部皮下に、2 頭には 2 頭分ずつを内股部筋肉内に注射し、10 日間観察する。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。

###### 3.5.6.3 判定

観察期間中、異常を認めてはならない。

### 3.5.7 力価試験

#### 3.5.7.1 猫ウイルス性鼻気管炎力価試験

##### 3.5.7.1.1 試験材料

###### 3.5.7.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 3.5.7.1.1.2 試験動物

体重約 100g のラットを用いる。

###### 3.5.7.1.1.3 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

###### 3.5.7.1.1.4 中和試験用ウイルス

適当と認められた猫ウイルス性鼻気管炎ウイルスを用いる。

##### 3.5.7.1.2 試験方法

試験動物 5 匹を試験群、2 匹を対照群とする。注射材料 1 頭分ずつを試験群の筋肉内に注射し、3 週後に試験群及び対照群から採血するか、又は 2 回目の注射を行い 7 日後に採血する。得られた各個体の血清について、中和試験を行う。

血清を非働化し、ウイルス増殖用培養液又は適当と認められた希釈液で 4 倍に希釈した後、更に 2 又は 4 倍階段希釈する。1 回注射の場合、各希釈血清と 0.05mL 中に約 60PFU を含む試験用ウイルスとを等量混合し、37℃で 60 分間処理し、2 回注射の場合、各希釈血清と 0.2mL 中に約 100PFU を含む中和試験用ウイルス液とを等量混合し、37℃で 60 分間処理する。別に中和試験用ウイルスとウイルス増殖用培養液とを等量混合し、希釈血清と同様に処理したものを、ウイルス対照とする。1 回注射の場合、各混合液 0.05mL ずつを、2 回注射の場合、各混合液 0.2mL ずつを 2 枚の培養細胞に接種し、37℃で 60 分間吸着した後、混合液を除き、第 1 次重層寒天培地（付記 6）を重層し、37℃、5 vol % 炭酸ガス下で 3～4 日間培養する。培養後、更に第 2 次重層寒天培地（付記 7）を重層し、37℃で 24 時間培養する。

##### 3.5.7.1.3 判定

ブラック数がウイルス対照の 50 % 以下に減少した血清の最高希釈倍数で中和抗体価を表す。

試験群の中和抗体価は、1 回注射の場合、全て 8 倍以上でなければならず、2 回注射の場合、幾何平均値で 16 倍以上でなければならない。いずれの場合も、対照群では、4 倍未満でなければならない。

#### 3.5.7.2 猫カリシウイルス感染症力価試験

##### 3.5.7.2.1 試験材料

###### 3.5.7.2.1.1 試験動物

3.5.7.1 の試験に用いた動物を用いる。

###### 3.5.7.2.1.2 中和試験用ウイルス

猫腎継代細胞で増殖させた猫カリシウイルスを用いる。

###### 3.5.7.2.1.3 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

##### 3.5.7.2.2 試験方法

3.5.7.1.2 で得られた各個体の血清について中和試験を実施する。

各個体の血清を非働化し、ウイルス増殖用培養液で 2 倍階段希釈する。各希釈血清と 0.1mL 中約 200TCID<sub>50</sub> を含む中和試験用ウイルス液とを等量混合し、37℃で 60 分間処理する。各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本（穴）の培養細胞に接種し、37℃で 60 分間静置した後、混合液を除き、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で 7 日間回転又は静置培養する。

##### 3.5.7.2.3 判定

CPE を阻止したものを陽性とし、中和抗体価を ED<sub>50</sub> で求める。

試験群の中和抗体価は、1回注射の場合5匹中4匹以上が32倍以上でなければならず、2回注射の場合幾何平均値で16倍以上でなければならない。いずれの場合も、対照群では、2倍未満でなければならない。

### 3.5.7.3 猫汎白血球減少症力価試験

#### 3.5.7.3.1 試験材料

##### 3.5.7.3.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.5.7.3.1.2 試験動物

体重約100gのラットを用いる。

##### 3.5.7.3.1.3 赤血球凝集抗原

猫汎白血球減少症ウイルス赤血球凝集抗原（付記8）を用いる。

#### 3.5.7.3.2 試験方法

試験動物5匹を試験群、2匹を対照群とする。注射材料の1頭分ずつを試験群の臀部筋肉内に注射し、3週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赤血球凝集抑制試験を行う。

被検血清を25w/v%カオリン液及び豚赤血球で処理した後、2倍段階希釈する。各希釈血清に8単位の赤血球凝集抗原を加え、常温で60分間処理し、0.3～0.5vol%豚赤血球浮遊液を加え、2～5℃で一夜静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

#### 3.5.7.3.3 判定

赤血球凝集の抑制された血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。

試験群の赤血球凝集抑制抗体価は、幾何平均値で128倍以上又は全て64倍以上でなければならない。この場合、対照群では、8倍未満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1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 ウイルス増殖用培養液

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

20 mL

イーグルMEM

残量

炭酸水素ナトリウムで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2 トライトン除去処理

##### (1) ビーズの洗浄

ビーズ30gにメタノール200mLを加え、常温で15分間攪拌洗浄後、ガラスろ過器上にビーズを集め、500mLのメタノールと精製水1,000mLで洗浄する。さらに、ビーズをカラムに入れ、2,000mLの精製水で長時間かけて洗浄する。洗浄したビーズは、水中に入れて2～5℃で保存する。

##### (2) 除去方法

0.01mol/Lリン酸カリウム液（pH7.2）で試料を2～5℃で一夜透析する。透析した試料2mLに洗浄したビーズ0.6gを加え2～5℃で120分間攪拌し、180G、10分間遠心して上清を得る。

#### 付記3 細胞増殖用培養液



1,000mL 中  
 トリプトース・ホスフェイト・プロス 2.95 g  
 牛胎子血清 50 ~ 100 mL  
 イーグル MEM 残 量  
 炭酸水素ナトリウムで 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 4 ホウ酸緩衝食塩液  
 1,000mL 中  
 塩化ナトリウム 10.52 g  
 ホウ酸 3.09 g  
 水酸化ナトリウム 0.96 g  
 水 残 量  
 水酸化ナトリウム液で pH を 9.0 に調整する。

付記 5 VAD6.0 液  
 1,000mL 中  
 塩化ナトリウム 8.77 g  
 無水リン酸水素二ナトリウム 5.68 g  
 リン酸二水素ナトリウム二水和物 40.56 g  
 水 残 量  
 ホウ酸緩衝食塩液と等量混合して pH を 6.0 に調整する。

付記 6 第 1 次重層寒天培地  
 1,000mL 中  
 寒天 7 g  
 トリプトース・ホスフェイト・プロス 2.95 g  
 牛胎子血清 20 mL  
 F12 培地 残 量  
 炭酸水素ナトリウムで 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 7 第 2 次重層寒天培地  
 第 1 次重層寒天培地に 0.5w/v % のニューラルレッドを 2 vol % となるように加えたもの。

付記 8 猫汎白血球減少症ウイルス赤血球凝集抗原  
 猫汎白血球減少症ウイルスを猫腎継代細胞で増殖させて得た培養液又はこれを不活化したものであって、赤血球凝集価 128 倍以上のもの。

(別紙2)

○農林水産省告示第六百七十六号

薬事法施行令(昭和三十六年政令第十一号)第八十三条の規定により読み替えて適用される同令第六十条の規定に基づき、動物用生物学的製剤検定基準(平成十四年十月三日農林水産省告示第千五百六十八号)の一部を次のように改正し、公布の日から施行する。

平成二十四年三月十三日

農林水産大臣 鹿野 道彦

(「次のよう」は、省略し、その関係書類を農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課及び都道府県庁に備え置いて縦覧に供する。)

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部の牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢－粘膜病 2 価  
・牛パラインフルエンザ・牛RSウイルス感染症・牛アデノウイルス感染症混合ワクチンの項を次の  
ように改める。

**牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢－粘膜病 2 価・牛  
パラインフルエンザ・牛RSウイルス感染症・牛アデノ  
ウイルス感染症混合ワクチン**

動生剤基準の牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢－粘膜病 2 価・牛パラインフルエンザ・牛RS  
ウイルス感染症・牛アデノウイルス感染症混合ワクチンの 3.6.5、3.6.7、3.6.8、3.6.9、3.6.10、3.6.11  
及び3.6.12.5 に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部の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）不活化ワクチンの項を次のように改める。

**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**

動生剤基準の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）不活化ワクチンの 3.6.3、3.6.7 及び 3.6.8 に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。

ワクチン（シードロット製剤）の部の日本脳炎生ワクチン（シード）の項の次に次のように加える。

## **日本脳炎・豚パルボウイルス感染症・豚ゲタウイルス感 染症混合生ワクチン（シード）**

動生剤基準の日本脳炎・豚パルボウイルス感染症・豚ゲタウイルス感染症混合生ワクチン（シード）の3.4.6.1に規定するところにより、試験を行うものとする。

ワクチン（シードロット製剤）の部のニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎混合生ワクチン（シード）の項の次に次のように加える。

## **ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）**

シードロット規格に適合したニューカッスル病ウイルス及び鶏伝染性気管支炎ウイルスを同規格に適合した発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液をそれぞれ不活化したものに油性アジュバントを添加し、混合したワクチンである。

### 1 小分製品の試験

#### 1.1 力価試験

##### 1.1.1 ニューカッスル病力価試験

###### 1.1.1.1 試験材料

###### 1.1.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 1.1.1.1.2 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4～5週齢の鶏を用いる。

###### 1.1.1.1.3 赤血球凝集抗原

「ニューカッスル病診断用赤血球凝集抗原」を用いる。

###### 1.1.1.2 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羽分ずつを試験群の脚部筋肉内に注射し、対照群と共に4週間観察する。

試験最終日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、ニューカッスル病ウイルス赤血球凝集抑制試験を行う。

###### 1.1.1.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価（以下この項において「HI抗体価」という。）とする。

試験群の80%以上がHI抗体価160倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全てHI抗体価5倍以下でなければならない。

ワクチン（シードロット製剤）の部のニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎 2 価混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）の次に次のように加える。

## **ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎 2 価・産卵低下症候群－1976 混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）**

シードロット規格に適合したニューカッスル病ウイルス及び 2 種類の鶏伝染性気管支炎ウイルスを同規格に適合した発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液並びに同規格に適合した産卵低下症候群－1976 ウイルスを同規格に適合した発育あひる卵で増殖させて得たウイルス液をそれぞれ不活化したものを混合し、油性アジュバントを添加したワクチンである。

### 1 小分製品の試験

#### 1.1 力価試験

##### 1.1.1 ニューカッスル病力価試験

###### 1.1.1.1 試験材料

###### 1.1.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 1.1.1.1.2 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 4 週齢の鶏を用いる。

###### 1.1.1.1.3 赤血球凝集抗原

「ニューカッスル病診断用赤血球凝集抗原」を用いる。

###### 1.1.1.2 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 羽分ずつを試験群の頸部中央部皮下に注射し、対照群と共に 4 週間観察する。

試験最終日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、ニューカッスル病ウイルス赤血球凝集抑制試験を行う。

###### 1.1.1.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価（以下この項において「HI 抗体価」という。）とする。

試験群の 80 % 以上が HI 抗体価 80 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全て HI 抗体価 5 倍以下でなければならない。

ワクチン（シードロット製剤）の部の鶏サルモネラ症（サルモネラ・インファンティス・サルモネラ・エンテリティディス・サルモネラ・ティフィムリウム）（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）の項の次に次のように加える。

## **ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎・鶏伝染性コリザ（A・C型菌処理）混合（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）**

シードロット規格に適合したニューカッスル病ウイルスを同規格に適合した発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液、同規格に適合した鶏伝染性気管支炎ウイルスを同規格に適合した発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液並びに同規格に適合したヘモフィルス・パラガリナルムA型菌及びC型菌の培養菌液を超音波処理し、それぞれ不活化したものを混合し、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。

### **1 小分製品の試験**

#### **1.1 力価試験**

##### **1.1.1 ニューカッスル病力価試験**

###### **1.1.1.1 試験材料**

###### **1.1.1.1.1 注射材料**

試験品を注射材料とする。

###### **1.1.1.1.2 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4～5週齢の鶏を用いる。

###### **1.1.1.1.3 赤血球凝集抗原**

「ニューカッスル病診断用赤血球凝集抗原」を用いる。

###### **1.1.1.2 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羽分ずつを試験群の頸部皮下又は脚部筋肉内に注射し、対照群と共に2週間観察する。

試験最終日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、ニューカッスル病ウイルス赤血球凝集抑制試験を行う。

###### **1.1.1.3 判定**

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価（以下この項において「HI抗体価」という。）とする。

試験群の80%以上がHI抗体価10倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全てHI抗体価2倍未満でなければならない。



# ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎・鶏伝染性コリーザ（A・C型）混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

シードロット規格に適合したニューカッスル病ウイルスを同規格に適合した発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液、同規格に適合した鶏伝染性気管支炎ウイルスを同規格に適合した発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液並びに同規格に適合したヘモフィルス・パラガリナルムA型菌及びC型菌の培養菌液をそれぞれ不活化したものに油性アジュバントを添加し、混合したワクチンである。

## 1 小分製品の試験

### 1.1 力価試験

#### 1.1.1 ニューカッスル病力価試験

##### 1.1.1.1 試験材料

###### 1.1.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 1.1.1.1.2 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4～5週齢の鶏を用いる。

###### 1.1.1.1.3 赤血球凝集抗原

「ニューカッスル病診断用赤血球凝集抗原」を用いる。

###### 1.1.1.2 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羽分ずつを試験群の頸部皮下又は脚部筋肉内に注射し、対照群と共に4週間観察する。

試験最終日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、ニューカッスル病ウイルス赤血球凝集抑制試験を行う。

###### 1.1.1.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価（以下この項において「HI抗体価」という。）とする。

試験群の80%以上がHI抗体価160倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全てHI抗体価5倍以下でなければならない。

ワクチン（シードロット製剤）の部のニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎2価・鶏伝染性コリーザ（A・C型）混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）の項の次に次のように加える。

## **ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎3価・鶏伝染性コリーザ（A・C型）混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）**

シードロット規格に適合したニューカッスル病ウイルスを同規格に適合した発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液、同規格に適合した3種類の鶏伝染性気管支炎ウイルスを同規格に適合した発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液並びに同規格に適合したヘモフィルス・パラガリナルムA型菌及びC型菌の培養菌液をそれぞれ不活化したものを混合し、油性アジュバントを添加したワクチンである。

### 1 小分製品の試験

#### 1.1 力価試験

##### 1.1.1 ニューカッスル病力価試験

###### 1.1.1.1 試験材料

###### 1.1.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 1.1.1.1.2 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 30～35 日齢の鶏を用いる。

###### 1.1.1.1.3 赤血球凝集抗原

「ニューカッスル病診断用赤血球凝集抗原」を用いる。

###### 1.1.1.2 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 羽分ずつを試験群の脚部筋肉内に注射し、対照群と共に 5 週間観察する。

試験最終日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、ニューカッスル病ウイルス赤血球凝集抑制試験を行う。

###### 1.1.1.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価（以下この項において「HI 抗体価」という。）とする。

試験群の 80 % 以上が HI 抗体価 160 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全て HI 抗体価 5 倍以下でなければならない。

診断液の部のオーエスキー病ウイルス糖たん白 g I 抗体識別用酵素抗体反応キット（抗原吸着・ペルオキシダーゼ標識抗体）の項を次のように改める。

## オーエスキー病ウイルス糖たん白 g I 抗体識別用酵素抗体反応キット（抗原吸着・ペルオキシダーゼ標識抗体）

オーエスキー病ウイルスを不活化した抗原をプレートに吸着させ、酵素抗体法によりオーエスキー病ウイルス糖たん白 gI 抗体を識別するためのキットである。

### 1 小分製品の試験

#### 1.1 吸光度試験

1.1.1 又は 1.1.2 の試験を行う。

##### 1.1.1 吸光度試験 1

###### 1.1.1.1 試験材料

###### 1.1.1.1.1 被検材料

指示陽性血清及び指示陰性血清を用いる。

###### 1.1.1.1.2 抗原

抗原吸着プレートを用いる。

###### 1.1.1.1.3 標識抗体

ペルオキシダーゼ標識抗オーエスキー病ウイルス糖たん白 gI モノクローナル抗体（以下この項において「標識抗体」という。）を用いる。

##### 1.1.1.2 試験方法

指示陽性血清を抗原吸着プレートの3穴に、指示陰性血清を抗原吸着プレートの2穴に、それぞれ 100  $\mu$  L ずつ入れる。プレートを密閉して常温で 60 分間反応させた後、濃縮洗浄液を水で 10 倍に希釈した洗浄液で 5 回洗浄する。標識抗体 100  $\mu$  L ずつを各穴に加え、常温で 20 分間反応させる。洗浄液を用いて 5 回洗浄した後、テトラメチルベンチジン原液をテトラメチルベンチジン希釈液で 2 倍に希釈した液の 100  $\mu$  L ずつを各穴に加え、常温で 15 分間反応させる。反応終了後直ちに、反応停止液を 50  $\mu$  L ずつに加え、650nm の波長で各穴の吸光度値を測定する。また、2 穴に水を 150  $\mu$  L ずつ入れたブランクについても、650nm の波長で各穴の吸光度値を測定する。

##### 1.1.1.3 判定

付記 1 により被検材料の平均吸光度値を算出する。

指示陰性血清の平均吸光度値は、全て 0.4 以上でなければならない。また、指示陰性血清の平均吸光度値から指示陽性血清の平均吸光度値を引いた値は、0.3 以上でなければならない。

##### 1.1.2 吸光度試験 2

###### 1.1.2.1 試験材料

###### 1.1.2.1.1 被検材料

指示陽性血清及び指示陰性血清を試料とする。

###### 1.1.2.1.2 抗原

抗原固相化プレートを用いる。

###### 1.1.2.1.3 標識抗体

標識抗体を用いる。

##### 1.1.2.2 試験方法

抗原固相化プレートのブランクを除く 4 穴にそれぞれ指示陽性血清及び指示陰性血清を 100  $\mu$  L、サンプル希釈液を 25  $\mu$  L 添加し、37℃で 120 分間反応させる（一次反応）。一次反応終了後、反応液を除去し、全ての穴を洗浄液で満たして 4 回洗浄する。ブランクを除く全ての穴に標識抗体

を 100  $\mu$  L ずつ添加し、37  $^{\circ}$ C で 30 分間反応させる（二次反応）。二次反応終了後、反応液を除去し、全ての穴を洗浄液で満たして 4 回洗浄する。基質溶液を 100  $\mu$  L ずつ全ての穴に添加し、暗所室温（21  $\pm$  5  $^{\circ}$ C）で 15 分間反応させる。反応終了後、反応停止液を 100  $\mu$  L ずつ全ての穴に添加し、反応を停止させる。反応停止後、波長 450nm でブランクを対照として吸光度値を測定する。

#### 1.1.2.3 判定

指示陽性血清及び指示陰性血清の平均吸光度値を算出する。指示陰性血清の平均吸光度値から指示陽性血清の平均吸光度値を引いた値は、0.600 より大きくなければならない。また、指示陰性血清の吸光度値は、0.700 以上でなければならない。

### 1.2 特異性試験

1.2.1 又は 1.2.2 の試験を行う。

#### 1.2.1 特異性試験 1

##### 1.2.1.1 試験材料

###### 1.2.1.1.1 被検材料

抗原吸着プレートを用いる。

###### 1.2.1.1.2 対照血清

抗豚コレラウイルス血清（付記 2）、抗糖たん白 gI 欠損オーエスキー病ウイルス血清（付記 3）、抗豚丹毒血清（付記 4）、参照陽性血清（付記 5）、参照陰性血清（付記 6）及び指示陰性血清を用いる。

###### 1.2.1.1.3 標識抗体

標識抗体を用いる。

##### 1.2.1.2 試験方法

被検血清希釈液で 2 倍に希釈したそれぞれの対照血清を抗原吸着プレートの各 2 穴に 100  $\mu$  L ずつ入れ、1.1.1.2 の試験方法を準用して試験を行う。

#### 1.2.1.3 判定

各対照血清の平均吸光度値から S/N 比（付記 7）を算出する。抗豚コレラウイルス血清、抗糖たん白 gI 欠損オーエスキー病ウイルス血清、抗豚丹毒血清及び参照陰性血清の S/N 比は 0.7 以上、参照陽性血清の S/N 比は 0.6 未満でなければならない。

### 1.2.2 特異性試験 2

##### 1.2.2.1 試験材料

###### 1.2.2.1.1 被検材料

抗原固相化プレートを用いる。

###### 1.2.2.1.2 対照血清

抗豚コレラウイルス血清、抗糖たん白 gE (gI) 欠損オーエスキー病ウイルス血清、抗豚丹毒血清、参照陽性血清及び参照陰性血清を用いる。

###### 1.2.2.1.3 標識抗体

標識抗体を用いる。

##### 1.2.2.2 試験方法

対照血清を 1.1.2.2 を準用して試験を行う。ただし、各試料は、それぞれ 4 穴を用いる。

#### 1.2.2.3 判定

対照血清の平均吸光度値を算出する。抗豚コレラウイルス血清、抗糖たん白 gE (gI) 欠損オーエスキー病ウイルス血清、抗豚丹毒血清及び参照陰性血清の平均吸光度値は 0.800 以上、参照陽性血清の平均吸光度値は 0.300 以下でなければならない。

### 1.3 力価試験

1.3.1 又は 1.3.2 の試験を行う。

#### 1.3.1 力価試験 1

### 1.3.1.1 試験材料

#### 1.3.1.1.1 被検材料

抗原吸着プレートを用いる。

#### 1.3.1.1.2 対照血清

指示陽性血清及び参照陰性血清を用いる。

#### 1.3.1.1.3 標識抗体

標識抗体を用いる。

### 1.3.1.2 試験方法

被検血清希釈液で2倍階段希釈した指示陽性血清及び希釈をしない参照陰性血清の各 100  $\mu$  L ずつを抗原吸着プレートのそれぞれ2穴以上に入れ、1.1.1.2を準用して試験を行う。

### 1.3.1.3 判定

参照陰性血清の平均吸光度値の60%以下を示す指示陽性血清の最高希釈倍数をgI力価とする。

指示陽性血清のgI力価は、32～128倍でなければならない。

### 1.3.2 力価試験 2

#### 1.3.2.1 試験材料

##### 1.3.2.1.1 被検材料

抗原固相化プレートを用いる。

##### 1.3.2.1.2 対照血清

参照陽性血清及び参照陰性血清を試料とする。

##### 1.3.2.1.3 標識抗体

標識抗体を用いる。

#### 1.3.2.2 試験方法

参照陽性血清をリン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈し、16倍、32倍、64倍及び128倍希釈したものを用い、参照陰性血清と共に1.1.2.2を準用して試験を行う。ただし、各試料は、それぞれ2穴を用いる。

#### 1.3.2.3 判定

対照血清の平均吸光度値を算出する。参照陰性血清の平均吸光度値の40%を超える直前の希釈倍率を力価としたとき、参照陽性血清の力価は、16～64倍でなければならない。

### 付記 1 平均吸光度値

平均吸光度値は、下記の計算式により算出する。

被検材料の吸光度値 = 被検材料の読取り値 - (各ブランクの読取り値の和 / ブランク穴数)

平均吸光度値 = 被検材料の各吸光度値の和 / 被検材料の穴数

### 付記 2 抗豚コレラウイルス血清

豚コレラウイルス GPE-株で免疫した豚の血清であって、中和抗体価 64 倍以上のもの。

ただし、免疫に用いる豚は、適当と認められた規格の豚を用いる。

### 付記 3 抗糖たん白 gI 欠損オーエスキー病ウイルス血清

糖たん白 gI を欠損したオーエスキー病ウイルスで免疫した豚の血清であって、中和抗体価 16 倍以上のもの。

ただし、免疫に用いる豚は、適当と認められた規格の豚を用いる。

### 付記 4 抗豚丹毒血清

アクリフラビン耐性弱毒豚丹毒菌小金井株 65-0.15 株で免疫した豚の血清であって、生菌発

育凝集価 64 倍以上のもの。

ただし、免疫に用いる豚は、適当と認められた規格の豚を用いる。

付記 5 参照陽性血清

オーエスキー病ウイルス山形 S81 株で免疫した豚の血清であって、中和抗体価が 32 倍以上のもの。

ただし、免疫に用いる豚は、適当と認められた規格の豚を用いる。

付記 6 参照陰性血清

オーエスキー病ウイルスに対する抗体を保有しない豚の血清

付記 7 S/N 比

S/N 比は、下記の計算式により算出する。

$S/N \text{ 比} = \text{被検血清の平均吸光度値} / \text{指示陰性血清の平均吸光度値}$

(別紙3)

○農林水産省告示第六百七十七号

薬事法施行令(昭和三十六年政令第十一号)第八十三条の規定により読み替えて適用される同令第五十八条及び動物用医薬品等取締規則(平成十六年農林水産省令第百七号)第百五十四条第一項の規定に基づき、平成十七年三月十八日農林水産省告示第五百十六号(動物用医薬品の検定手数料並びに試験品及び出願者の保存用品として抜き取らせるべき数量を定める等の件)の一部を次のように改正し、公布の日から施行する。

平成二十四年三月十三日

農林水産大臣 鹿野 道彦

表ワクチン(シードロット製剤を除く。)の部中

牛伝染性鼻気管炎・牛ウイン ルス性下痢—粘膜炎2価・ 牛パラインソフルエソザ・牛 RSウイルス感染症・牛ア	1,773,900	338,200	33	31	2
--	-----------	---------	----	----	---

を

デノウイルス感染症混合ワクチン									
「牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢—粘膜病2価・牛パライソフルエンザ・牛RSウイルス感染症・牛アデノウイルス感染症混合ワクチン	1,142,200	338,300			29	27	2		」

を

改めら。

表ワクチン（シールドロット製剤）の部中

「日本脳炎生ワクチン（シー ド）」	10,700	24,600			2	2	2		」
「日本脳炎生ワクチン（シー ド）」	10,700	24,600			2	2	2		」

を



フ)	日本脳炎・豚パルボウイルス感染症・豚ゲタウイルス感染症混合生ワクチン(シード)	10,700	67,700			2	2	2	2
									1

「	ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎混合生ワクチン(シード)	2,200	217,700			2	2	2	2
	ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎2価混合(油性アジュバント加) 不活化ワ	399,000	0				2		2

クチン (シート)						
鶏サルモネラ症 (サルモネラ・インフランテイス・サルモネラ・エンテリチイデイス・サルモネラ・チイフイムリウム) (油性アジユバント加) 不活化ワクチン (シート)	281,500	20,300			9	2
ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎 2価・鶏伝染性コリーザ (A・C型) 混合	355,900	0			2	2

を

(油性アジユバント加) 不 活化ワクチン (シード)									
┌ ニューカッスル病・鶏伝染 性気管支炎混合生ワクチン (シード)	2,200	217,700			2	2	2		2
ニューカッスル病・鶏伝染 性気管支炎混合 (油性アジ ユバント加) 不活化ワクチ ン (シード)	355,900	0				2			2
ニューカッスル病・鶏伝染 性気管支炎 2 価混合 (油性	399,000	0				2			2

アジユバント加) 不活化ワ クチン (シート)							
ニューカッスル病・鶏伝染 性気管支炎 2 価・産卵低下 症候群—1976混合 (油性ア ジユバント加) 不活化ワク チン (シート)	355,900	0			2	2	
鶏サルモネラ症 (サルモネ ラ・インフラアンチイス・サ ルモネラ・エンテリチイデ イス・サルモネラ・テイフ	281,500	20,300			9	2	

イムリウム) (油性アジユ バシト加) 不活化ワクチン (シード)					
ニューカッスル病・鶏伝染 性気管支炎・鶏伝染性コリ ーザ (A・C型菌処理) 混 合 (アジユバシト加) 不活 化ワクチン (シード)	269,600	0		2	2
ニューカッスル病・鶏伝染 性気管支炎・鶏伝染性コリ ーザ (A・C型) 混合 (油	355,900	0		2	2

性アジュバント加) 不活性化 ワクチン (シート)					
ニューカッスル病・鶏伝染 性気管支炎 2 価・鶏伝染性 コリーザ (A・C型) 混合 (油性アジュバント加) 不 活化ワクチン (シート)	355,900	0			2
ニューカッスル病・鶏伝染 性気管支炎 3 価・鶏伝染性 コリーザ (A・C型) 混合 (油性アジュバント加) 不	399,000	0			2

「消化ワケチン(シード)」

改める。

(別紙4)

○農林水産省告示第六百七十八号

薬事法(昭和三十五年法律第四百十五号)第八十三条第一項の規定により読み替えて適用される同法第四十三条第一項の規定に基づき、昭和三十六年二月一日農林省告示第六十六号(薬事法第四十三条第一項の規定に基づき、農林水産大臣の指定する医薬品を定める等の件)の一部を次のように改正し、公布の日から施行する。

平成二十四年三月十三日

農林水産大臣 鹿野 道彦

ただし書中「(63)まで」を「(69)まで」に改め、(106)を(112)とし、(64)から(105)までを六ずつ繰り下げ、(63)を(68)とし、(68)の次に次のように加える。

(69) 猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症・猫汎白血球減少症混合(油性アジュバント加)不活化ワクチン(シード)

ただし書中(62)を(67)とし、(46)から(61)までを五ずつ繰り下げ、(45)を(49)とし、(49)の次に次のように加える。



- (50) 鶏伝染性フアブリキウス嚢病 (アジュバント加) 不活化ワクチン (シード)  
ただし書中(44)を(48)とし、(39)から(43)までを四ずつ繰り下げ、(38)を(41)とし、(41)の次に次のように加える。
- (42) 産卵低下症候群 I 1976 (油性アジュバント加) 不活化ワクチン (シード)  
ただし書中(37)を(40)とし、(16)から(36)までを三ずつ繰り下げ、(15)を(17)とし、(17)の次に次のように加える。
- (18) 豚繁殖・呼吸障害症候群生ワクチン (シード)  
ただし書中(14)を(16)とし、(9)から(13)までを二ずつ繰り下げ、(8)を(9)とし、(9)の次に次のように加える。
- (10) 牛流行熱・イバラキ病混合 (アジュバント加) 不活化ワクチン (シード)  
ただし書中(7)を(8)とし、(6)を(7)とし、(5)の次に次のように加える。
- (6) アカバネ病生ワクチン (シード)

## 「薬事法関係事務の取扱いについて」(平成12年3月31日付け12畜A第729号農林水産省畜産局長通知)

(下線部分は改正部分)

改 正 後		現 行	
別表4 動物用医薬品の検定に関する標準処理期間			
製 剤	標準処理期間(日)	製 剤	標準処理期間(日)
(血清の部)		(血清の部)	
(略)	(略)	(略)	(略)
(ワクチン(シードロット製剤を除く。)の部)		(ワクチン(シードロット製剤を除く。)の部)	
(略)	(略)	(略)	(略)
牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢—粘膜炎2価・牛パラインフルエンザ・牛RSウイルス感染症・牛アデノウイルス感染症混合ワクチン	100	牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢—粘膜炎2価・牛パラインフルエンザ・牛RSウイルス感染症・牛アデノウイルス感染症混合ワクチン	120
(略)		(略)	
(ワクチン(シードロット製剤)の部)		(ワクチン(シードロット製剤)の部)	
(略)	(略)	(略)	(略)
日本脳炎生ワクチン(シード)	40	日本脳炎生ワクチン(シード)	40
日本脳炎・豚パルボウイルス感染症・豚ガタウイルス感染症混合生ワクチン(シード)	40		
(略)		(略)	
ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎混合生ワクチン(シード)	40	ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎混合生ワクチン(シード)	40
ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎混合(油性アジュバント加)不活化ワクチン(シード)	70		

70	<p>ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎2価混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）</p>	70	<p>ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎2価混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）</p>
70	<p>鶏サルモネラ症（サルモネラ・インフアンテンティス・サルモネラ・エンテリテイデイス・サルモネラ・ティフイムリウム）（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）</p>	70	<p>鶏サルモネラ症（サルモネラ・インフアンテンティス・サルモネラ・エンテリテイデイス・サルモネラ・ティフイムリウム）（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）</p>
60	<p>ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎・鶏伝染性コロリーザ（A・C型菌処理）混合（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）</p>	60	<p>ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎・鶏伝染性コロリーザ（A・C型菌処理）混合（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）</p>
70	<p>ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎・鶏伝染性コロリーザ（A・C型）混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）</p>	70	<p>ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎・鶏伝染性コロリーザ（A・C型）混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）</p>
70	<p>ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎2価・鶏伝染性コロリーザ（A・C型）混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）</p>	70	<p>ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎2価・鶏伝染性コロリーザ（A・C型）混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）</p>
80	<p>ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎3価・鶏伝染性コロリーザ（A・C型）混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）</p>	80	<p>ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎3価・鶏伝染性コロリーザ（A・C型）混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）</p>
(略)	(略)	(略)	(略)
(診断液の部)	(略)	(略)	(略)
(略)	(略)	(略)	(略)

(別紙5)

○農林水産省告示第六百七十九号

薬事法（昭和三十五年法律第四百十五号）第八十三条第一項の規定により読み替えて適用される同法第二条第九項の規定に基づき、農林水産大臣が指定する生物由来製品（平成十五年七月十四日農林水産省告示第千三十四号）の一部を次のように改正し、公布の日から施行する。

平成二十四年三月十三日

農林水産大臣 鹿野 道彦

第二号中(25)を(26)とし、(24)を(25)とし、(23)を(24)とし、(22)の次に次のように加える。

(23) 日本脳炎・豚パルボウイルス感染症・豚ゲタウイルス感染症混合生ワクチン（シード）