

動薬協会発166号  
平成24年7月5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 福 井 邦 顯  
(公印省略)

動物用生物学的製剤基準の一部改正等について

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。



24消安第1146号  
平成24年7月4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。



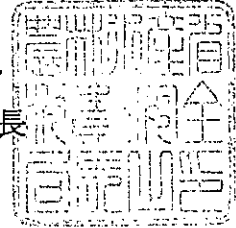


24消安第1146号

平成24年7月4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)

○農林水産省告示第千六百二十二号

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。

平成二十四年七月四日

農林水産大臣 郡司 彰

（「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。）の部の豚ボルデテラ感染症・豚パスツレラ症混合（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。

## 豚ボルデテラ感染症精製（アフィニティークロマトグラフィー部分精製）・豚パスツレラ症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン

### 1 定義

ボルデテラ・ブロンキセプチカの培養液を牛赤血球膜結合セルロースカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーで部分精製し、得られたシアル酸結合型赤血球凝集素を凍結乾燥したワクチン（以下この項において「乾燥ワクチン」という。）と、パスツレラ・ムルトシダの培養菌体を破碎し、遠心上清を不活化して油性アジュバントを添加したワクチン（以下この項において「液状不活化ワクチン」という。）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 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

###### 2.1.1.1 名称

ボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌 A19・KS 株又はこれと同等と認められた株

###### 2.1.1.2 性状

ボルデー・ジャング培地（付記1）上に隆起した小円形の集落を形成し、 $\beta$  溶血性を示す。また、K 抗原を有し、既知のボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌の免疫血清によって特異的に凝集される。

生後7日齢以内の豚に点鼻接種すると、豚萎縮性鼻炎を起こす。生菌又は超音波処理菌をモルモットの皮内に注射すると、注射部位に出血及び壊死を起こす。

###### 2.1.1.3 継代及び保存

原株及び種菌は、ボルデー・ジャング培地又は適当と認められた平板培地で継代する。

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。

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。

##### 2.1.2 パスツレラ・ムルトシダ

###### 2.1.2.1 名称

パスツレラ・ムルトシダ D 型 202・KS 株又はこれと同等と認められた株

###### 2.1.2.2 性状

培地上に半透明のスムーズな集落を形成し、溶血性を示さない。莢膜を保有する。培養菌体から調製した皮膚壊死毒素をモルモットの皮内に注射すると、注射部位に壊死を起こす。

###### 2.1.2.3 継代及び保存

原株及び種菌は、ペプシン消化羊血液加デキストロース・スターチ寒天培地（付記2）又は適当と認められた平板培地で継代する。

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。

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 $5^{\circ}\text{C}$ で保存する。

#### 2.2 製造用材料

##### 2.2.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

###### 2.2.1.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

##### 2.2.2 パスツレラ・ムルトシダ

#### 2.2.2.1 培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

### 2.3 原液

#### 2.3.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ原液

##### 2.3.1.1 培養

平板培地で培養した種菌を液状培地に接種した後、更に液状培地で増菌培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.1.1 の試験を行う。

##### 2.3.1.2 原液

培養菌液を遠心分離し、得られた上清液をろ過した後、牛赤血球膜結合セルロースカラム（付記 3）を用いたアフィニティークロマトグラフィーで部分精製し、得られたシアル酸結合型赤血球凝集素を脱塩・濃縮後、ろ過滅菌したものを原液とする。

原液について、3.2.1 の試験を行う。

#### 2.3.2 パスツレラ・ムルトシダ原液

##### 2.3.2.1 培養

平板培地で培養した種菌を液状培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.1.2 の試験を行う。

##### 2.3.2.2 原液

培養菌液を遠心分離し、得られた菌体をリン酸緩衝食塩液（以下この項において「PBS」という。）に浮遊して凍結融解する。物理的処理により菌体を破碎した後、遠心分離し、得られた遠心上清をろ過し、たん白量を測定する。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、PBS で濃度を調整したものを原液とする。

原液について、3.2.2 の試験を行う。

### 2.4 最終バルク

#### 2.4.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカバルク

ボルデテラ・ブロンキセプチカ原液に相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。

#### 2.4.2 パスツレラ・ムルトシダバルク

パスツレラ・ムルトシダ原液に相当と認められた油性アジュバントを加えたものを最終バルクとする。

### 2.5 小分製品

#### 2.5.1 乾燥ワクチン

ボルデテラ・ブロンキセプチカの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、3.3 の試験を行う。

#### 2.5.2 液状不活化ワクチン

パスツレラ・ムルトシダの最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。

小分製品について、3.3 の試験を行う。

## 3 試験法

### 3.1 培養菌液の試験

#### 3.1.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

##### 3.1.1.1 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、ボルデテラ・ブロンキセプチカ以外の菌の発育を認めてはならない。

##### 3.1.1.2 赤血球凝集（以下この項において「HA」という。）価測定試験

###### 3.1.1.2.1 試験材料

検体を遠心し、得られた上清を試料とする。

#### 3.1.1.2.2 試験方法

96 穴 U 底又は V 底プレートを用い、試料 25  $\mu$  L を PBS で 2 倍階段希釈する。各段階の希釈液に 0.5vol % グルタルアルデヒド固定牛赤血球浮遊液（付記 4）25  $\mu$  L ずつを加え、37  $^{\circ}$ C で 2 時間反応させ、更に 2 ~ 5  $^{\circ}$ C で 1 夜静置した後、赤血球の凝集の有無を観察する。

#### 3.1.1.2.3 判定

赤血球の凝集を認めた試料の最高希釈倍数を HA 価とする。

検体の遠心上清の HA 価は、8 倍以上でなければならない。

### 3.1.2 パスツレラ・ムルトシダ

#### 3.1.2.1 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、パスツレラ・ムルトシダ以外の菌の発育を認めてはならない。

### 3.2 原液の試験

#### 3.2.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ原液

##### 3.2.1.1 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。

##### 3.2.1.2 生菌否定試験

###### 3.2.1.2.1 試験材料

###### 3.2.1.2.1.1 試料

検体を接種材料とする。

###### 3.2.1.2.1.2 培地

ボルデー・ジャング培地又は適当と認められた培地を用いる。

##### 3.2.1.2.2 試験方法

検体 0.1mL ずつを平板培地 2 枚以上にそれぞれ塗抹接種し、37  $^{\circ}$ C で 48 時間培養する。

##### 3.2.1.2.3 判定

菌の発育を認めてはならない。

#### 3.2.1.3 HA 価測定試験

##### 3.2.1.3.1 試験材料

検体を用いる。

##### 3.2.1.3.2 試験方法

3.1.1.2 を準用して試験を行う。

##### 3.2.1.3.3 判定

検体の HA 価は、5 頭分及び 10 頭分の小分製品の原液では 128 倍以上、20 頭分の小分製品の原液では 256 倍以上でなければならない。

#### 3.2.1.4 無毒化試験

##### 3.2.1.4.1 試験材料

###### 3.2.1.4.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

###### 3.2.1.4.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

###### 3.2.1.4.2 試験方法

注射材料 0.1mL ずつを試験動物 2 匹の背部皮内に注射し、7 日間観察する。

###### 3.2.1.4.3 判定

注射反応は、無視し得る程度以下でなければならない。試験動物は、全て生存しなければならない。

#### 3.2.2 パスツレラ・ムルトシダ原液

### 3.2.2.1 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。

### 3.2.2.2 生菌否定試験

#### 3.2.2.2.1 試験材料

##### 3.2.2.2.1.1 試料

検体を接種材料とする。

##### 3.2.2.2.1.2 培地

ペプシン消化羊血液添加デキストロース・スターチ培地又は相当と認められた培地を用いる。

#### 3.2.2.2.2 試験方法

検体 0.1mL ずつを平板培地 2 枚以上にそれぞれ塗抹接種し、37℃で 18 時間培養する。

#### 3.2.2.2.3 判定

菌の発育を認めてはならない。

### 3.2.2.3 無毒化試験

3.2.1.4 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.2.2.4 たん白量測定試験

#### 3.2.2.4.1 試験材料

不活化前の遠心上清ろ過液を試料とする。

#### 3.2.2.4.2 試験方法

Brandford 色素結合法又は相当と認められた方法により、たん白量を測定する。

#### 3.2.2.4.3 判定

試料 1 mL 中のたん白量は、1.0mg 以上でなければならない。

## 3.3 小分製品の試験

### 3.3.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、乾燥ワクチンは、固有の色調を有する乾燥物でなければならない。異物及び異臭を認めてはならない。液状不活化ワクチンは、固有の色調を有する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。乾燥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。

また、小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

### 3.3.2 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、乾燥ワクチンは、これに適合しなければならない。

### 3.3.3 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、乾燥ワクチンは、これに適合しなければならない。

### 3.3.4 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。

### 3.3.5 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、乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンで溶解したものは、これに適合しなければならない。

### 3.3.6 ホルマリン定量試験

相当と認められた方法で液状不活化ワクチン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、0.25vol % 以下でなければならない。

### 3.3.7 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、液状不活化ワクチンは、これに適合しなければならない。

### 3.3.8 無毒化試験

#### 3.3.8.1 試験材料

##### 3.3.8.1.1 注射材料

乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンで溶解した試験品を注射材料とする。

##### 3.3.8.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

#### 3.3.8.2 試験方法

注射材料 0.1mL ずつを試験動物 2 匹の背部皮内に注射し、7 日間観察する。

#### 3.3.8.3 判定

注射反応は無視し得る程度以下でなければならない、試験動物は全て生存しなければならない。

### 3.3.9 安全試験

#### 3.3.9.1 試験材料

##### 3.3.9.1.1 注射材料

乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンで溶解した試験品を注射材料とする。

##### 3.3.9.1.2 試験動物

体重 10 ~ 30kg の豚を用いる。

#### 3.3.9.2 試験方法

試験動物の 2 頭を試験群、1 頭を対照群とする。

試験群の 2 頭に注射材料 1 mL ずつを筋肉内に 2 週間隔で 2 回注射し、対照群と共に、第 2 回目注射後 2 週間まで観察する。

#### 3.3.9.3 判定

観察期間中、試験動物に臨床的な異常を認めてはならない。注射により一過性の発熱を認めても 3 日以内に回復しなければならない、また、注射反応は無視し得る程度以下でなければならない。

### 3.3.10 力価試験

#### 3.3.10.1 豚ボルデテラ感染症力価試験

##### 3.3.10.1.1 試験材料

##### 3.3.10.1.1.1 試験動物

3.3.9 の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.3.10.1.1.2 赤血球凝集抗原

ボルデテラ・ブロンキセプチカ HA 抗原（付記 5）を用いる。

##### 3.3.10.1.2 試験方法

3.3.9 の試験終了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、マイクログタイター法で赤血球凝集抑制（以下この項において「HI」という。）試験を行う。

血清 1 容に 25w/v %カオリン加 PBS 2 容及び PBS 1 容を加え、30 分間処理した後、遠心上清を採取する（4 倍希釈血清）。96 穴 V 底プレートを用いて、4 倍希釈血清 25  $\mu$ L を PBS 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 25  $\mu$ L ずつ加えて、4  $^{\circ}$ C で 1 夜静置する。これに 0.5vol %グルタルアルデヒド固定牛赤血球浮遊液（付記 4）を 50  $\mu$ L ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で 2 時間反応させ、更に 4  $^{\circ}$ C で一夜静置した後、赤血球の凝集の有無を観察する。

##### 3.3.10.1.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数を HI 抗体価とする。

試験群の HI 抗体価は、全て 8 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全て 4 倍以下でなければならない。

#### 3.3.10.2 豚パスツレラ症力価試験

### 3.3.10.2.1 試験材料

#### 3.3.10.2.1.1 注射材料

乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンで溶解した試験品を注射材料とする。

#### 3.3.10.2.1.2 試験動物

約5週齢のマウスを用いる。

#### 3.3.10.2.1.3 攻撃用菌液

パスツレラ・ムルトシダ 202・KS 株又はこれと同等の毒力を有する株をペプシン消化羊血液添加デキストロース・スターチ培地に接種し、37℃で18時間培養した後、10w/v %スキムミルクに集菌し、小分けして、-70℃以下に保存する。攻撃時に融解し、 $10^{7.6} \sim 10^{8.0}$ CFU/mL となるように濃度を調整したものを攻撃用菌株とする。

#### 3.3.10.2.2 試験方法

試験動物の10匹を試験群とし、10匹を対照群とする。

注射材料 0.1mL ずつを2週間隔で2回、試験群の腹腔内に注射する。2回目注射後2週目に攻撃用菌液 0.1mL ずつを試験群及び対照群の腹腔内に注射して攻撃した後、7日間観察する。

#### 3.3.10.2.3 判定

試験群では、70%以上が耐過生存しなければならない。この場合、対照群では、70%以上が死亡しなければならない。

### 4 貯法及び有効期間

有効期間は、2年間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その期間とする。

### 5 その他

#### 5.1 添付文書記載事項

と畜場出荷前の所定の期間は使用しない旨

#### 付記1 ボルデー・ジャング培地

1,000mL 中

ボルデー・ジャング・アガーベース 30 g

グリセリン 10 g

水 残量

加温溶解後、121℃で15分間高圧滅菌する。

約50℃に冷却した後、牛脱線維血液を5 vol %となるように添加する。

#### 付記2 ペプシン消化羊血液加デキストロース・スターチ寒天培地

1,000mL 中

プロテオース・ペプトン No.3 15 g

デキストロース 2 g

可溶性デンプン 10 g

塩化ナトリウム 3 g

リン酸水素二ナトリウム 3 g

ゼラチン 20 g

寒天 10 g

水 残量

加温溶解後、121℃で15分間高圧滅菌する。

約50℃に冷却した後、ペプシン消化羊血液を5 vol %となるように添加する。

#### 付記3 牛赤血球膜結合セルロースカラム

牛赤血球を酢酸で処理した後、超音波破碎して得られた破碎血球膜を臭化シアン-セルロースゲルに吸着させて調製し、カラムに充填したもの。

付記4 0.5%グルタルアルデヒド固定牛赤血球

牛赤血球をグルタルアルデヒドで固定した後、10vol%赤血球液となるように濃度を調整したものであって、使用時に、0.01w/v%ゼラチン加PBSで0.5vol%赤血球液となるように希釈する。

付記5 ボルデテラ・ブロンキセプチカ HA 抗原

牛赤血球に対して強い凝集活性を有するボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌の培養液を、牛赤血球膜結合セルロースカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィー法により精製し、得られた牛赤血球凝集素の赤血球凝集価が約 32 単位になるように濃度を調整したもの。

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部の産卵低下症候群－1976（油性アジュバント加）不活化ワクチンの項を次のように改める。

## 産卵低下症候群－1976（油性アジュバント加）不活化ワクチン

### 1 定義

産卵低下症候群－1976 ウイルスを発育あひる卵、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 KE-80 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 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、製造に相当と認められた発育卵又は培養細胞で継代する。

継代は、原株では3代以内、種ウイルスでは2代以内でなければならない。

原株及び種ウイルスは、凍結して－40℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

#### 2.2 製造用材料

##### 2.2.1 発育卵

製造に相当と認められた発育卵を用いる。

##### 2.2.2 培養細胞

EB66細胞を用いる。

##### 2.2.3 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

#### 2.3 原液

##### 2.3.1 発育卵又は培養細胞の培養

###### 2.3.1.1 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、3.1の試験を行う。

###### 2.3.1.2 培養細胞の培養

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、3.2の試験を行う。

###### 2.3.2 ウイルスの培養

種ウイルスを発育卵で培養し、感染増殖させた尿膜腔液の遠心上清若しくはろ液、又は種ウイルスを培養細胞に接種して培養し、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、3.3.1又は3.3.2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たもの又はウイルス浮遊液を相当と認められた方法により濃縮し、不活化したものを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、3.4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たもの又は不活化ウイルス浮遊液を濃度調整したものに、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、3.5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、3.6の試験を行う。

### 3 試験法

#### 3.1 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。

##### 3.1.1 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。

##### 3.1.2 鶏赤血球凝集試験

3.1.1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。

#### 3.2 培養細胞の試験

個体別培養細胞の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。

##### 3.2.1 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。

ただし、対照培養細胞に添加するウイルス増殖用培養液は、牛血清を最終濃度3~5%となるように添加する。

##### 3.2.2 赤血球凝集試験

3.2.1の試験最終日に採取した培養液に、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。

#### 3.3 ウイルス浮遊液の試験

##### 3.3.1 ウイルス含有量試験

###### 3.3.1.1 試験材料

###### 3.3.1.1.1 試料

検体を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。

###### 3.3.1.1.2 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。

###### 3.3.1.2 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の4穴以上に分注し、混合した後、37 $^{\circ}$ Cで8日間培養し、観察する。試験最終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。

###### 3.3.1.3 判定

培養細胞を用いる場合は、培養細胞に CPE を認めたもの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<sup>7.5</sup>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<sup>8.0</sup>EID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

### 3.3.2 赤血球凝集試験

#### 3.3.2.1 試験材料

##### 3.3.2.1.1 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。

##### 3.3.2.2 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 0.5vol % 鶏赤血球浮遊液を加え、室温で 60 分間静置した後、赤血球凝集の有無を観察する。

##### 3.3.2.3 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。

### 3.4 不活化ウイルス浮遊液の試験

#### 3.4.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.4.2 不活化試験

##### 3.4.2.1 試験材料

##### 3.4.2.1.1 注射材料又は接種材料

発育卵に接種する場合は、検体を注射材料とする。

培養細胞に接種する場合は、検体を滅菌した透析チューブに入れ、4℃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、不活化剤を除去又は中和した後、これを無菌的に回収したものを接種材料とする。

##### 3.4.2.1.2 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。

##### 3.4.2.2 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 0.1mL ずつ注射し、37℃で 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、37℃で 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 0.1mL と鶏胚肝初代細胞 2.0mL を 6 穴プレートの 5 穴に分注し、混合し、37℃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 の出現を観察する。試験最終日に各穴の培養液を 50 μL ずつ採取し、0.5vol % 鶏赤血球浮遊液を等量加え、60 分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

##### 3.4.2.3 判定

発育卵を用いる場合は、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。

培養細胞を用いる場合は、培養細胞に CPE を認めず、培養液に赤血球凝集を認めてはならない。

### 3.5 原液の試験

#### 3.5.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.6 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、静置すれば下底に水層の分離を生ずる場合があるものの、振とうすれば白色の均一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ぬ。

### 3.6.2 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。

### 3.6.3 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。

### 3.6.4 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。

### 3.6.5 安全試験

#### 3.6.5.1 試験材料

##### 3.6.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.6.5.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 4～10 週齢の鶏を用いる。

#### 3.6.5.2 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。

#### 3.6.5.3 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。

### 3.6.6 力価試験

#### 3.6.6.1 試験材料

##### 3.6.6.1.1 試験動物

3.6.5 の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.6.6.1.2 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。

#### 3.6.6.2 試験方法

3.6.5 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、10 分間又は 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。

#### 3.6.6.3 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、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 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 の発育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 の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（シードロット製剤を除く。）の部のニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎 2 価・鶏伝染性ファブリキウス嚢病混合（油性アジュバント加）不活化ワクチンの項を次のように改める。

## ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎 2 価・鶏伝染性ファブリキウス嚢病混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン

### 1 定義

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発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液並びに鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスを培養細胞で増殖させたウイルス液をそれぞれ不活化し、油性アジュバントを添加したものを混合したワクチン、又はそれぞれのウイルス液を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 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の発育鶏卵で継代する。

継代は、原株では 3 代以内、種ウイルスでは 2 代以内でなければならない。

原株及び種ウイルスは、凍結して  $-70^{\circ}\text{C}$  以下又は凍結乾燥して  $5^{\circ}\text{C}$  以下で保存する。

##### 2.1.2 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練馬 E<sub>10</sub> 株及び TM-86EC 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接種すると、鶏胚に特徴的な病変を伴って増殖する。

###### 2.1.2.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の発育鶏卵で継代する。

継代は、原株では 3 代以内、種ウイルスでは 2 代以内でなければならない。

原株及び種ウイルスは、凍結して  $-70^{\circ}\text{C}$  以下又は凍結乾燥して  $5^{\circ}\text{C}$  以下で保存する。

##### 2.1.3 鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス

###### 2.1.3.1 名称

弱毒鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス K 株又はこれと同等と認められた株

###### 2.1.3.2 性状

鶏胚初代細胞又は Vero 細胞で CPE を伴って増殖する。

###### 2.1.3.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞又は同規格 1.1 の発育鶏卵で継代する。

継代は、原株では 3 代以内、種ウイルスでは 2 代以内でなければならない。

原株及び種ウイルスは、凍結して  $-70^{\circ}\text{C}$  以下又は凍結乾燥して  $5^{\circ}\text{C}$  以下で保存する。

## 2.2 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

製造に相当と認められた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

製造に相当と認められた日齢のものを用いる。

### 2.2.3 鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス

#### 2.2.3.1 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。

## 2.3 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、3.1.1 の試験を行う。

#### 2.3.1.2 ウイルスの培養

種ウイルスを発育鶏卵で培養し、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、3.2.1.1 の試験を行う。

#### 2.3.1.3 不活化

ウイルス浮遊液又はこれを濃縮したものにホルマリンを加えて不活化し、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、3.3.1、3.3.2.1 及び 3.3.3.1 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を濃度調整した後、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、3.4 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、3.1.1 の試験を行う。

#### 2.3.2.2 ウイルスの培養

各株の種ウイルスを発育鶏卵で培養し、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、3.2.1.2 の試験を行う。

#### 2.3.2.3 不活化

各ウイルス浮遊液又はこれらを濃縮したものにホルマリンを加えて不活化し、それぞれの株の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、3.3.1 及び 3.3.2.2 の試験を行う。

#### 2.3.2.4 アジュバントの添加

各株の不活化ウイルス浮遊液を濃度調整した後、相当と認められた油性アジュバントを添加し、それぞれの株の原液とする。

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。

### 2.3.3 鶏伝染性ファブリキウス囊病ウイルス原液

#### 2.3.3.1 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、3.1.2 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ウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2.1.3 の試験を行う。

#### 2.3.3.3 不活化

ウイルス浮遊液又はこれを濃縮したものにホルマリンを加えて不活化し、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、3.3.1、3.3.2.3 及び 3.3.3.2 の試験を行う。

#### 2.3.3.4 アジュバントの添加

不活化ウイルス浮遊液を濃度調整した後、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、3.4 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の各株原液及び鶏伝染性ファブリキウス囊病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、3.5 の試験を行う。

## 3 試験法

### 3.1 発育鶏卵又は培養細胞の試験

#### 3.1.1 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。

##### 3.1.1.1 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。

##### 3.1.1.2 鶏赤血球凝集試験

3.1.1.1 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。

#### 3.1.2 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。

##### 3.1.2.1 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。

##### 3.1.2.2 鶏赤血球凝集試験

3.1.2.1 の試験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。

### 3.2 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 ニューカッスル病ウイルス

3.3.3.1 の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。

#### 3.2.1.1.1 試験材料

##### 3.2.1.1.1.1 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。

##### 3.2.1.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の 9～11 日齢のものを用いる。

##### 3.2.1.1.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 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。

##### 3.2.1.1.3 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>9.0</sup>EID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

### 3.2.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

#### 3.2.1.2.1 試験材料

##### 3.2.1.2.1.1 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。

##### 3.2.1.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の 9～10 日齢のものを用いる。

##### 3.2.1.2.2 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 °C 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。

##### 3.2.1.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全、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、各株について定められた量以上でなければならない。

### 3.2.1.3 鶏伝染性ファブリキウス囊病ウイルス

3.3.3.2 の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。

#### 3.2.1.3.1 試験材料

##### 3.2.1.3.1.1 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。

##### 3.2.1.3.1.2 培養細胞

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

##### 3.2.1.3.2 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 °C で 60 分間静置吸着させる。第 1 次重層寒天培地（付記 1）を加え、37 °C で 3～4 日間培養した後、第 2 次重層寒天培地（付記 2）を重ねし、観察する。

##### 3.2.1.3.3 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<sup>8.0</sup>PFU 以上でなければならない。

### 3.3 不活化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 不活化試験

#### 3.3.2.1 ニューカッスル病ウイルス

##### 3.3.2.1.1 試験材料

###### 3.3.2.1.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

###### 3.3.2.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の 9～11 日齢のものを用いる。

##### 3.3.2.1.2 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。

##### 3.3.2.1.3 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。

#### 3.3.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

##### 3.3.2.2.1 試験材料

###### 3.3.2.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

###### 3.3.2.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の 9～10 日齢のものを用いる。

##### 3.3.2.2.2 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。

##### 3.3.2.2.3 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。

#### 3.3.2.3 鶏伝染性ファブリキウス囊病ウイルス

##### 3.3.2.3.1 試験材料

###### 3.3.2.3.1.1 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又は適当と認められた方法でホルマリンを中和したものを試料とする。

###### 3.3.2.3.1.2 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。

##### 3.3.2.3.2 試験方法

試料 5 mL を、1 mL につき 20cm<sup>2</sup> 以上の培養細胞に接種し、37℃で K 株では 5 日間、D78 株では 3～4 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、37℃で K 株では 5 日間、D78 株では 3～4 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。

### 3.3.3 抗原定量試験

#### 3.3.3.1 ニューカッスル病ウイルス

3.2.1.1 の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。

##### 3.3.3.1.1 試験材料

###### 3.3.3.1.1.1 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。

##### 3.3.3.1.2 試験方法

各試料 0.05mL に 1 vol % 鶏赤血球浮遊液を 0.025mL 加え、30 ~ 60 分間静置する。

#### 3.3.3.1.3 判定

赤血球の凝集を示す試料の最高希釈倍数を赤血球凝集（以下この項において「HA」という。）単位で示す。

抗原量は、0.05mL 中 128HA 単位以上でなければならない。

#### 3.3.3.2 鶏伝染性ファブリキウス囊病ウイルス

3.2.1.3 の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。

##### 3.3.3.2.1 試験材料

###### 3.3.3.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で 2 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.3.3.2.2 試験方法

試料及び参照抗原（付記 3）を R63 モノクローナル抗体（付記 4）で固相化した酵素抗体法（以下この項において「ELISA」という。）用プレート（付記 5）に添加し、37 °C で反応させた後、ビオチン標識 R63 抗体（付記 6）を添加し、37 °C で反応させる。その後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識アビジン（付記 7）を加え、37 °C で反応させた後、過酸化尿素を加えたテトラメチルベンチジンを加え、発色させる。2 mol/L 硫酸を加えて反応を停止させた後、波長 450nm で吸光度を測定する。

###### 3.3.3.2.3 判定

参照抗原及び試料の吸光度から試料の抗原量を計算するとき、R63-ELISA 単位は、1 mL 中 2,500EU 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。

##### 3.5 小分製品の試験

###### 3.5.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、固有の色調を有する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。

###### 3.5.2 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

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。

###### 3.5.4 安全試験

###### 3.5.4.1 試験材料

###### 3.5.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 3.5.4.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 4 ~ 7 週齢の鶏を用いる。

###### 3.5.4.2 試験方法

試験動物の 10 羽を試験群、3 羽を対照群とする。

注射材料の 1 羽分ずつを試験群の頸部皮下に注射し、対照群と共に 4 週間観察する。

###### 3.5.4.3 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。

###### 3.5.5 力価試験

###### 3.5.5.1 ニューカッスル病力価試験

### 3.5.5.1.1 試験材料

#### 3.5.5.1.1.1 試験動物

3.5.4 の試験に用いた試験動物を用いる。

#### 3.5.5.1.1.2 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。

#### 3.5.5.1.2 試験方法

3.5.4 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。

#### 3.5.5.1.3 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、対照群の全てが HI 抗体価 5 倍以下でなければならない。

### 3.5.5.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

#### 3.5.5.2.1 試験材料

##### 3.5.5.2.1.1 試験動物

3.5.4 の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.5.5.2.1.2 中和試験用ウイルス

それぞれの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 の 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。

##### 3.5.5.2.1.3 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の 9～10 日齢のものを用いる。

#### 3.5.5.2.2 試験方法

3.5.4 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、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。

#### 3.5.5.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全、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 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。

### 3.5.5.3 鶏伝染性ファブリキウス囊病力価試験

#### 3.5.5.3.1 試験材料

##### 3.5.5.3.1.1 試験動物

3.5.4 の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.5.5.3.1.2 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 の鶏胚初代細胞で培養した鶏伝染性ファブリキウス囊病ウイルス K 株又は適当と認められた株を用いる。

##### 3.5.5.3.1.3 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、単層になったものを用

いる。

### 3.5.5.3.2 試験方法

3.5.4 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、中和試験を行う。血清を非働化し、リン酸緩衝食塩液又はウイルス増殖用培養液（付記8）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、4℃で18～24時間又は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、37℃で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。

### 3.5.5.3.3 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、全て中和抗体価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、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 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 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は加えてもよい。

### 付記2 第2次重層寒天培地

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

### 付記3 参照抗原

Vero細胞で培養した鶏伝染性ファブリキウス囊病ウイルスD78株ウイルス液をホルマリンで不活化した後、抗原量を約10,000EU/mLに調整したもの。

### 付記4 R63モノクローナル抗体

鶏伝染性ファブリキウス囊病ウイルスの感染防御抗原であるVP2たん白を認識し、中和活性を有するモノクローナル抗体で、参照抗原が規定の抗原量を示すように固相化緩衝液で濃度を調整したもの。

### 付記5 ELISA用プレート

96穴平底マイクロプレート

### 付記6 ビオチン標識R63抗体

参照抗原が規定の抗原量を示すように IB・EIA 緩衝液（付記 9）で濃度を調整したもの。

付記 7 ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識アビジン

参照抗原が規定の抗原量を示すように IB・EIA 緩衝液で濃度を調整したもの。

付記 8 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 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。

付記 9 IB・EIA 緩衝液

1,000mL 中

リン酸二水素ナトリウム 2.31 g

リン酸水素二ナトリウム二水和物 24.06 g

塩化ナトリウム 29.22 g

カオリン処理 30g/dL 牛血清アルブミン 3.3 mL

ポリソルベート 20 0.5 g

水 残量

ろ過滅菌後、スキムミルク 2 g/dL 及び牛胎子血清 5 vol % を加える。

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部の鶏サルモネラ症（サルモネラ・エンテリティディス）（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。

## **鶏サルモネラ症（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**

### 1 定義

サルモネラ・エンテリティディス及びサルモネラ・ティフィムリウムのそれぞれの培養菌液を不活化し、油性アジュバントを添加したものを混合したワクチンである。

### 2 製法

#### 2.1 製造用株

##### 2.1.1 サルモネラ・エンテリティディス

###### 2.1.1.1 名称

サルモネラ・エンテリティディス E-926 株及び E-136 株、又はこれらと同等と認められた株

###### 2.1.1.2 性状

サルモネラ・エンテリティディス基準株に一致する生物学的性状及び血清学的性状を示す。

###### 2.1.1.3 継代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株では3代以内、種菌では2代以内でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その継代数以内とする。

原株及び種菌は、凍結して $-40^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

##### 2.1.2 サルモネラ・ティフィムリウム

###### 2.1.2.1 名称

サルモネラ・ティフィムリウム T-023 株又はこれと同等と認められた株

###### 2.1.2.2 性状

サルモネラ・ティフィムリウム基準株に一致する生物学的性状及び血清学的性状を示す。

###### 2.1.2.3 継代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株では3代以内、種菌では2代以内でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その継代数以内とする。

原株及び種菌は、凍結して $-40^{\circ}\text{C}$ 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

製造に適当と認められた培地を用いる。

#### 2.3 原液

##### 2.3.1 サルモネラ・エンテリティディス原液

###### 2.3.1.1 培養

種菌を培地に接種し、培養したものを更に培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.1の試験を行う。

###### 2.3.1.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加えて不活化したもの又はそれを濃縮したものを不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.2の試験を行う。

###### 2.3.1.3 アジュバントの添加

不活化菌液を必要に応じ濃度調整し、油性アジュバントを添加したものを原液とする。  
原液について、3.3 の試験を行う。

### 2.3.2 サルモネラ・ティフィムリウム原液

#### 2.3.2.1 培養

種菌を培地に接種し、培養したものを更に培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。  
培養菌液について、3.1 の試験を行う。

#### 2.3.2.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加えて不活化したもの又はそれを濃縮したものを不活化菌液とする。  
不活化菌液について、3.2 の試験を行う。

#### 2.3.2.3 アジュバントの添加

不活化菌液を必要に応じ濃度調整し、油性アジュバントを添加したものを原液とする。  
原液について、3.3 の試験を行う。

### 2.4 最終バルク

各原液を必要に応じ濃度調整し、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て、小分製品とする。  
小分製品について、3.4 の試験を行う。

## 3 試験法

### 3.1 培養菌液の試験

#### 3.1.1 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、夾雑菌の集落を認めてはならない。

#### 3.1.2 生菌数試験

##### 3.1.2.1 試験材料

###### 3.1.2.1.1 試料

検体を生理食塩水で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.1.2.1.2 培地

適当と認められた寒天培地を用いる。

###### 3.1.2.2 試験方法

各試料1 mL ずつを混釈法によりそれぞれ2枚以上の培地に接種し、37℃で24時間培養した後、集落数を数える。

###### 3.1.2.3 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、サルモネラ・エンテリティディスについては1 mL 中  $10^{8.7}$  個以上、サルモネラ・ティフィムリウムについては1 mL 中  $10^{8.4}$  個以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その生菌数とする。

### 3.2 不活化菌液の試験

#### 3.2.1 不活化試験

##### 3.2.1.1 試験材料

###### 3.2.1.1.1 試料

検体を試料とする。

###### 3.2.1.1.2 培地

適当と認められた液状培地及び適当と認められた寒天培地を用いる。

###### 3.2.1.2 試験方法

液状培地100mL に試料1 mL を接種し、37℃で24時間培養する。培養液0.1 mL ずつをそれぞれ2枚以上の寒天培地に接種して、37℃で24時間培養する。

### 3.2.1.3 判定

いずれの寒天培地上においても、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

#### 3.2.2.1.1 試料

検体又は検体を適当と認められたリン酸緩衝食塩液で希釈したものを試料とする。

#### 3.2.2.2 試験方法

分光光度計を用いて試料の吸光度を測定する。

### 3.2.2.3 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とき、検体中の総菌数は、サルモネラ・エンテリティディスについては1 mL 中  $10^{9.0}$  個以上、サルモネラ・ティフィウムについては1 mL 中  $10^{8.7}$  個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、その総菌数とする。

## 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。

## 3.4 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。

### 3.4.2 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。

### 3.4.3 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、0.2 vol %以下でなければならない。

### 3.4.4 安全試験

#### 3.4.4.1 試験材料

##### 3.4.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.4.4.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の5～7週齢の鶏を用いる。

#### 3.4.4.2 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頸部皮下に注射する。対照群と共に4週間観察を行い、試験最終日に注射部位を剖検する。

#### 3.4.4.3 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。

### 3.4.5 力価試験

#### 3.4.5.1 鶏サルモネラ症（サルモネラ・エンテリティディス）力価試験

##### 3.4.5.1.1 試験材料

###### 3.4.5.1.1.1 試験動物

3.4.4 の試験に使用した試験動物を用いる。

###### 3.4.5.1.1.2 凝集反応用抗原

「ひな白痢急速診断用菌液」を用いる。



#### 3.4.5.1.2 試験方法

3.4.4 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非働化された血清について、マイクロタイター法で凝集反応を行う。

生理食塩液で5倍に希釈した試験群及び対照群の血清、参照陽性血清（付記1）並びに参照陰性血清（付記2）を生理食塩液で2倍階段希釈し、各希釈血清に100倍に希釈した「ひな白痢急速診断用菌液」を等量加え、振とう混合後、37℃で2時間感作する。感作終了後、4℃で1夜静置し、凝集像を観察する。

#### 3.4.5.1.3 判定

完全凝集が認められた血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群の抗体価から、抗体価の幾何平均値を算出したとき、試験群は、100倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全て10倍以下でなければならない。また、参照陽性血清は、凝集抗体価160～320倍の値を示さなければならない、参照陰性血清は、10倍未満でなければならない。

#### 3.4.5.2 鶏サルモネラ症（サルモネラ・ティフィムリウム）力価試験

##### 3.4.5.2.1 試験材料

##### 3.4.5.2.1.1 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の5～7週齢の鶏を用いる。

##### 3.4.5.2.1.2 攻撃用菌液

サルモネラ・ティフィムリウムのリファンピシン耐性強毒株（付記3）をハートインフュージョン液体培地に接種して37℃で振とう培養する。これを $10^{8.7} \sim 9.7$  個/mLの菌量に濃度を調整したものを攻撃用菌液とする。

##### 3.4.5.2.2 試験方法

試験動物の10羽を試験群、10羽を対照群とする。

注射材料1羽分ずつを、試験群の頸部皮下に注射する。注射4週後に、攻撃用菌液を試験群及び対照群のそ嚢内に1mLずつ接種して攻撃する。攻撃後5日目に、試験群及び対照群から個体別に盲腸便約1gを採取し、これに9倍量のハーナテトラチオン酸塩加基礎培地を添加した後、よく混合したものを攻撃菌回収用試料とする。攻撃菌回収用試料をリン酸緩衝食塩液で10倍階段希釈し、 $10^0$ 、 $10^2$ 、 $10^4$ 及び $10^6$ 希釈のそれぞれ0.025mLを試験用培地（付記4）に接種し、37℃で24時間培養した後、発育した菌集落数を数え、盲腸便1g中の生菌数を算出する。

##### 3.4.5.2.3 判定

試験群の盲腸便中の生菌数は、対照群のそれより有意に低い値を示さなければならない（スチューデントt検定、 $P < 0.05$ ）。

#### 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 本剤を鶏に使用する場合は、事前に最寄りの家畜保健衛生所に相談の上、指示を受け、標識した無注射鶏を1%程度残す旨
- 2 本剤を投与した鶏は、ひな白痢の抗体検査で陽性を示す旨
- 3 肉用鶏には使用しない旨
- 4 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
- 5 本剤の投与と併せて、国が定めた鶏卵のサルモネラ総合対策指針に基づき、総合的な衛生管理対策を実施する旨

#### 付記1 参照陽性血清

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏をサルモネラ・エンテリティディスで免疫して得た血

清であって、「ひな白痢急速診断用菌液」を用いてマイクロタイター法で凝集反応を行ったとき、凝集抗体価 160 ~ 320 倍を示すものであり、小分けし、凍結して - 20 °C 以下で保存する。

付記 2 参照陰性血清

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏から得た血清で、「ひな白痢急速診断用菌液」を用いてマイクロタイター法で凝集反応を行ったとき、凝集抗体価 10 倍未満を示すものであり、小分けし、凍結して - 20 °C 以下で保存する。

付記 3 サルモネラ・ティフィムリウムのリファンピシン耐性強毒株

サルモネラ・ティフィムリウム T-023 株又はこれと同等以上の毒力を有するリファンピシン耐性強毒株

付記 4 試験用培地

DHL 寒天培地にリファンピシンを 100  $\mu$  g/mL となるように加えたもの。

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・鶏伝染性コリーザ（A・C型）・マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチンの項を次のように改める。

## 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・鶏伝染性コリーザ（A・C型）・マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン

### 1 定義

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発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液、産卵低下症候群－ 1976 ウイルスを発育あひる卵又は培養細胞で増殖させたウイルス液並びにヘモフィルス・パラガリナルム（A型及びC型菌）及びマイコプラズマ・ガリセプチカム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 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の発育鶏卵で継代する。

継代は、原株では 3 代以内、種ウイルスでは 2 代以内でなければならない。

原株及び種ウイルスは、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して 5℃以下で保存する。

##### 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練馬 E<sub>10</sub> 株及び TM-86EC 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接種すると、鶏胚に特徴的な病変を伴って増殖する。

###### 2.1.2.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の発育鶏卵で継代する。

継代は、原株では 3 代以内、種ウイルスでは 2 代以内でなければならない。

原株及び種ウイルスは、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して 5℃以下で保存する。

##### 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 KE-80 株又はこれと同等と認められた株

###### 2.1.3.2 性状

11 日齢の発育鶏卵又は 14 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。

### 2.1.3.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の発育鶏卵、同規格 1.3 の発育あひる卵又は EB66 細胞で継代する。

継代は、原株では 3 代以内、種ウイルスでは 2 代以内でなければならない。

原株及び種ウイルスは、凍結して $-40^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

### 2.1.4 ヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌

#### 2.1.4.1 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

#### 2.1.4.2 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。

#### 2.1.4.3 継代及び保存

原株及び種菌は、生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の 5～7 日齢の発育鶏卵で継代する。

継代は、原株では 3 代以内、種菌では 2 代以内でなければならない。

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。

### 2.1.5 ヘモフィルス・パラガリナルム C 型菌

#### 2.1.5.1 名称

ヘモフィルス・パラガリナルム C 型菌 53-47 株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.5.2 性状

鶏及び発育鶏卵に対して病原性を示す。

#### 2.1.5.3 継代及び保存

原株及び種菌は、生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の 5～7 日齢の発育鶏卵で継代する。

継代は、原株では 3 代以内、種菌では 2 代以内でなければならない。

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。

### 2.1.6 マイコプラズマ・ガリセプチカム

#### 2.1.6.1 名称

マイコプラズマ・ガリセプチカム 63-523 株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.6.2 性状

鶏に対して病原性を示す。

#### 2.1.6.3 継代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株では 3 代以内、種菌では 2 代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して $-40^{\circ}\text{C}$ 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 ニューカッスル病ウイルス

#### 2.2.1.1 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

#### 2.2.2.1 発育鶏卵

9～11 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 発育あひる卵

9～13 日齢のものを用いる。

#### 2.2.3.2 培養細胞

EB66 細胞を用いる。

#### 2.2.3.3 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

## 2.2.4 ヘモフィルス・パラガリナルムの各型菌

### 2.2.4.1 培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

## 2.2.5 マイコプラズマ・ガリセプチカム

### 2.2.5.1 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、3.1.1 の試験を行う。

#### 2.3.1.2 ウイルスの培養

種ウイルスを発育鶏卵で培養し、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、3.2.1.1 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で濃縮したものにホルマリンを加えて不活化し、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、3.4.1 及び 3.4.2.1 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をリン酸緩衝食塩液で濃度調整した後、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。

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、3.1.1 の試験を行う。

#### 2.3.2.2 ウイルスの培養

各株の種ウイルスを発育鶏卵で培養し、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、3.2.1.2 の試験を行う。

#### 2.3.2.3 不活化

各株のウイルス浮遊液を相当と認められた方法で濃縮したものにホルマリンを加えて不活化し、それぞれの株の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、3.4.1 及び 3.4.2.2 の試験を行う。

#### 2.3.2.4 アジュバントの添加

各株の不活化ウイルス浮遊液をリン酸緩衝食塩液で濃度調整した後、相当と認められた油性アジュバントを添加し、それぞれの株の原液とする。

原液について、3.6 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 発育あひる卵又は培養細胞の培養

##### 2.3.3.1.1 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、3.1.2 の試験を行う。

##### 2.3.3.1.2 培養細胞の培養

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、3.1.3 の試験を行う。

#### 2.3.3.2 ウイルスの培養

種ウイルスを発育あひる卵で培養し、感染増殖させた尿膜腔液を遠心若しくはろ過したもの、又は種ウイルスを培養細胞に接種して培養し、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若しく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、3.2.1.3 及び 3.2.2 の試験を行う。

#### 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で濃縮したものにホルマリンを加えて不活化し、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、3.4.1 及び 3.4.2.3 の試験を行う。

#### 2.3.3.4 アジュバントの添加

不活化ウイルス浮遊液をリン酸緩衝食塩液で濃度調整した後、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。

原液について、3.6 の試験を行う。

#### 2.3.4 ヘモフィルス・パラガリナルムの各型菌原液

##### 2.3.4.1 培養

種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、3.3.1 及び 3.3.2.1 の試験を行う。

##### 2.3.4.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加えて不活化した後、適当と認められた方法で濃縮したものを不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.5.1.1 及び 3.5.2.1 の試験を行う。

##### 2.3.4.3 アジュバントの添加

不活化菌液をリン酸緩衝食塩液で濃度調整した後、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。

原液について、3.6 の試験を行う。

#### 2.3.5 マイコプラズマ・ガリセプチカム

##### 2.3.5.1 培養

種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・継代し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.3.1 及び 3.3.2.2 の試験を行う。

##### 2.3.5.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加えて不活化した後、適当と認められた方法で濃縮したものを不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.5.1.2 及び 3.5.2.2 の試験を行う。

##### 2.3.5.3 アジュバントの添加

不活化菌液をリン酸緩衝食塩液で濃度調整した後、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。

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、鶏伝染性気管支炎ウイルスの各株原液、産卵低下症候群-1976 ウイルス原液、ヘモフィルス・パラガリナルム各型菌原液及びマイコプラズマ・ガリセプチカム原液を混合し、濃度調整したものを最終バルクとする。

## 2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。

小分製品について、3.7の試験を行う。

## 3 試験法

### 3.1 発育卵又は培養細胞の試験

#### 3.1.1 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。

##### 3.1.1.1 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。

##### 3.1.1.2 鶏赤血球凝集試験

3.1.1.1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。

#### 3.1.2 発育あひる卵の試験

個体別発育あひる卵の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。

##### 3.1.2.1 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。

##### 3.1.2.2 鶏赤血球凝集試験

3.1.2.1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。

#### 3.1.3 培養細胞の試験

個体別培養細胞の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。

##### 3.1.3.1 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。

ただし、対照培養細胞に加えるウイルス増殖用培養液は、牛血清を最終濃度3~5%となるように添加したものをを用いる。

##### 3.1.3.2 鶏赤血球凝集試験

3.1.3.1の試験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。

### 3.2 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 ニューカッスル病ウイルス

###### 3.2.1.1.1 試験材料

###### 3.2.1.1.1.1 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。

###### 3.2.1.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1の9~11日齢のものをを用いる。

###### 3.2.1.1.2 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。

###### 3.2.1.1.3 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  $10^{9.0}$ EID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

### 3.2.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

#### 3.2.1.2.1 試験材料

##### 3.2.1.2.1.1 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。

##### 3.2.1.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～10日齢のものを用いる。

#### 3.2.1.2.2 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日間観察する。試験最終日に鶏胚の変化を観察する。

#### 3.2.1.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全、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  $10^{7.0}$ EID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

### 3.2.1.3 産卵低下症候群－1976ウイルス

#### 3.2.1.3.1 試験材料

##### 3.2.1.3.1.1 試料

検体をイーグルMEMで10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.2.1.3.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格2.1.3の鶏胚肝初代細胞を用いる。

#### 3.2.1.3.2 試験方法

試料 50 μL と培養細胞浮遊液 100 μL を96穴マイクロプレート4穴以上に分注・混合し、37℃で8日間培養し、観察する。試験最終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。

#### 3.2.1.3.3 判定

培養細胞に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。

### 3.2.2 赤血球凝集試験

#### 3.2.2.1 試験材料

##### 3.2.2.1.1 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。

#### 3.2.2.2 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0.5vol %鶏赤血球浮遊液を等量加え、60分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

#### 3.2.2.3 判定

赤血球凝集が観察された試料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。

### 3.3 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

##### 3.3.2.1 ヘモフィルス・パラガリナルムの各型菌

##### 3.3.2.1.1 試験材料

##### 3.3.2.1.1.1 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。

#### 3.3.2.1.1.2 培地

鶏血清加寒天培地（付記1）を用いる。

#### 3.3.2.1.2 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。

#### 3.3.2.1.3 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、A型菌では1 mL 中  $10^{8.5}$  個以上、C型菌では1 mL 中  $10^{9.0}$  個以上でなければならない。

#### 3.3.2.2 マイコプラズマ・ガリセプチカム

##### 3.3.2.2.1 試験材料

###### 3.3.2.2.1.1 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。

###### 3.3.2.2.1.2 培地

変法シャノック寒天培地（付記2）を用いる。

##### 3.3.2.2.2 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℃で7日間培養した後、集落数を数える。

##### 3.3.2.2.3 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  $10^{7.8}$  個以上でなければならない。

#### 3.4 不活化ウイルス浮遊液の試験

##### 3.4.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.4.2 不活化試験

###### 3.4.2.1 ニューカッスル病ウイルス

###### 3.4.2.1.1 試験材料

###### 3.4.2.1.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

###### 3.4.2.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～11日齢のものを用いる。

###### 3.4.2.1.2 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。

###### 3.4.2.1.3 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。

###### 3.4.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

###### 3.4.2.2.1 試験材料

###### 3.4.2.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

###### 3.4.2.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～10日齢のものを用いる。

###### 3.4.2.2.2 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。

#### 3.4.2.2.3 判定

鶏胚は、正常に発育しなければならない。

#### 3.4.2.3 産卵低下症候群－ 1976 ウイルス

##### 3.4.2.3.1 試験材料

###### 3.4.2.3.1.1 注射材料又は接種材料

発育卵に接種する場合は、検体を注射材料とする。

培養細胞に接種する場合は、検体を滅菌した透析チューブに入れ、4℃で 1,000 倍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し、又は不活化剤を中和した後、これを無菌的に回収したものを接種材料とする。

###### 3.4.2.3.1.2 発育卵又は培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の 7～9 日齢の発育鶏卵、同規格 1.3 の 9～14 日齢の発育あひる卵又は同規格 2.1.3 の鶏胚肝初代細胞を用いる。

##### 3.4.2.3.2 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 0.1mL ずつ注射し、37℃で 7 日間培養した後、尿膜腔液を採取し、更に 1 代継代し、37℃で 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 0.1mL と鶏胚肝初代細胞浮遊液 2.0mL を 6 穴プレートの 5 穴に分注、混合し、37℃で 8 日間培養した後、更に 1 代継代し、37℃で 8 日間培養し、CPE 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、0.5vol % 鶏赤血球浮遊液を等量加え、60 分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

##### 3.4.2.3.3 判定

発育卵を用いる場合は、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。

培養細胞を用いる場合は、培養細胞に CPE を認めず、培養液に赤血球凝集を認めてはならない。

#### 3.5 不活化菌液の試験

##### 3.5.1 不活化試験

###### 3.5.1.1 ヘモフィルス・パラガリナルムの各型菌

###### 3.5.1.1.1 試験材料

###### 3.5.1.1.1.1 接種材料

検体を接種材料とする。

###### 3.5.1.1.1.2 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。

###### 3.5.1.1.2 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。

###### 3.5.1.1.3 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。

###### 3.5.1.2 マイコプラズマ・ガリセプチカム

###### 3.5.1.2.1 試験材料

###### 3.5.1.2.1.1 接種材料

検体を接種材料とする。

###### 3.5.1.2.1.2 培地

変法シャノック培地（付記3）及び変法シャノック寒天培地、又は適当と認められた培地を用いる。

#### 3.5.1.2.2 試験方法

変法シャノック培地 100mL に接種材料 1 mL を接種後、37℃で 14 日間培養する。培養後、3、7、10 及び 14 日目に培養液 0.1mL ずつを 2 枚以上の変法シャノック寒天培地に接種して培地表面に拡散させ、37℃で 7 日間培養後、集落の有無を観察する。

#### 3.5.1.2.3 判定

全ての培地上にマイコプラズマ・ガリセプチカムの集落を認めてはならない。

### 3.5.2 総菌数試験

#### 3.5.2.1 ヘモフィルス・パラガリナルムの各型菌

##### 3.5.2.1.1 試験材料

###### 3.5.2.1.1.1 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。

###### 3.5.2.1.2 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。

###### 3.5.2.1.3 判定

検体中の総菌数は、A型菌では 1 mL 中  $2.8 \times 10^9$  個以上、C型菌では 1 mL 中  $1.2 \times 10^{10}$  個以上でなければならない。

#### 3.5.2.2 マイコプラズマ・ガリセプチカム

##### 3.5.2.2.1 試験材料

###### 3.5.2.2.1.1 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。

###### 3.5.2.2.2 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。

###### 3.5.2.2.3 判定

検体中の総菌数は、1 mL 中  $10^{8.8}$  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。

### 3.7 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 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。

注射材料の 1 羽分ずつを試験群の頸部皮下に注射し、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。

###### 3.7.5.1.1.2 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。

###### 3.7.5.1.1.3 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 の 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 の 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 個以上の発育鶏卵に注射し、37℃で 7～8 日間培養し、観察する。

###### 3.7.5.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全、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。

##### 3.7.5.3 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 試験動物

3.7.4 の試験で用いた動物を用いる。

#### 3.7.5.3.1.2 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4）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5）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。

#### 3.7.5.3.3 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。

### 3.7.5.4 鶏伝染性コリ－ザ（A・C型）力価試験

#### 3.7.5.4.1 試験材料

##### 3.7.5.4.1.1 試験動物

3.7.4 の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.7.5.4.1.2 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）赤血球凝集抑制反应用抗原（付記6）を用いる。

#### 3.7.5.4.2 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。

#### 3.7.5.4.3 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。

### 3.7.5.5 マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症力価試験

#### 3.7.5.5.1 試験材料

##### 3.7.5.5.1.1 試験動物

3.7.4 の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.7.5.5.1.2 赤血球凝集抗原

マイコプラズマ・ガリセプチカム赤血球凝集抗原（付記7）を用いる。

#### 3.7.5.5.2 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、マイコプラズマ・ガリセプチカム赤血球凝集抑制試験を行う。

血清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単位のマイコプラズマ・ガリセプチカム赤血球凝集抗原を加えて混合し、15～20分間処理した後、0.25vol%の鶏赤血球浮遊液を50 $\mu$ Lずつ加えて振とう混合し、4℃で1夜又は室温で120分間処理した後、赤血球凝集の有無を観察する。

#### 3.7.5.5.3 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。

試験群の HI 抗体価の幾何平均値は、8 倍を超えなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その幾何平均値とする。この場合、対照群は、全て HI 抗体価 4 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、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

鶏肉水	300 mL
ペプトン	5 g
カザミノ酸	1 g
グルタミン酸ナトリウム	1 g
塩化ナトリウム	5 g
寒天	15 g
水	残量

pH を 7.0 ~ 7.4 に調整し、高圧滅菌する。冷却した後、鶏血清 25mL 及び  $\beta$ -ニコチンアミド・アデニン・ジヌクレオチド 0.005g を加える。

#### 付記 2 変法シャノック寒天培地

1,000mL 中

A

PPLO Broth w/o CV	16 g
寒天	9 g
水	750 mL

高圧滅菌又はろ過滅菌後、50 ~ 60 °C に冷却する。

B

非加熱馬血清	200 mL
25w/v % 新鮮イーストエキス	50 mL
50w/v % グルコース液	20 mL
ベンジルペニシリンカリウム	100 万単位

ろ過滅菌する。

A と B を混合する。

#### 付記 3 変法シャノック培地

1,000mL 中

A

PPLO Broth w/o CV	16 g
0.4w/v % フェノールレッド	0.4 mL
水	750 mL

高圧滅菌又はろ過滅菌する。

B

非加熱馬血清	200 mL
25w/v %新鮮イーストエキス	50 mL
50v/v %グルコース液	20 mL
ベンジルペニシリンカリウム	100 万単位

ろ過滅菌する。

AとBを混合し、1 mol/L 水酸化ナトリウム液でpHを7.6～8.0に調整する。

付記4 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 株又はこれと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 の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の規格 2.1.3 の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5 25w/v %カオリン液

100mL 中

カオリン

25 g

リン酸緩衝食塩液

残量

高圧滅菌又はアジ化ナトリウムを 0.01w/v%添加した後、2～10℃に保存する。

付記6 鶏伝染性コリーザ（C型）赤血球凝集抑制反作用抗原

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。

付記7 マイコプラズマ・ガリセプチカム赤血球凝集抗原

製造用株を培養し、ホルマリンを加えて不活化した菌液を遠心洗浄後、再浮遊し、これにグリセリンを等量加え、-20℃以下に保存したもの。

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）の項の次に次のように加える。

## アカバネ病・チュウザン病・アイノウイルス感染症混合（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アカバネウイルス、カสบウイルス及びアイノ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 アカバネウイルス

###### 2.1.1.1 名称

アカバネウイルス OBE-1 株又はこれと同等と認められた株

###### 2.1.1.2 性状

生後2日以内の乳のみマウスの脳内に接種すると、マウスは3日以内に死亡する。

牛腎初代培養細胞、豚腎初代培養細胞、HmLu-1 細胞、ESK 細胞及び Vero 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培養細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

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

##### 2.1.2.1 名称

カสบウイルス K-47 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.2.2 性状

子牛の脳内に接種すると、発熱、食欲不振、白血球減少、次いで神経症状を示す。



BHK-21 (C-13)細胞、HmLu-1細胞及びVero-T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、BHK-21 (C-13)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、BHK-21 (C-13)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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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、BHK-21 (C-13)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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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 アイノウイルス

##### 2.1.3.1 名称

アイノウイルス JaNAr28株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.3.2 性状

牛の静脈内に接種すると、ウイルス血症を認めるが、発熱などの臨床症状は認められない。

BHK-21 (C-13)細胞、HmLu-1細胞及びVero細胞でCPEを伴って増殖する。

##### 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、HmLu-1細胞、BHK-21 (C-13)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、HmLu-1細胞、BHK-21 (C-13)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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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、HmLu-1細胞、BHK-21 (C-13)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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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 アカバネウイルス

#### 2.2.1.1 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。

#### 2.2.1.2 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 カスバウイルス

### 2.2.2.1 株化細胞

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

#### 2.2.3 アイノウイルス

##### 2.2.3.1 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。

##### 2.2.3.2 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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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。

##### 2.2.3.4 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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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。

##### 2.2.3.5 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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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 アカバネウイルス原液

###### 2.3.1.1 プロダクションセルシードの培養

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

###### 2.3.1.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを 2.3.1.1 の細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個体別培養細胞ごとに採取した培養液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、3.3.1.1 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 0.1vol % となるように加える方法又はその他の相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、3.4.1 及び 3.4.2.1 の試験を行う。

#### 2.3.1.4 原液

不活化ウイルス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。

原液について、3.5 の試験を行う。

#### 2.3.2 カスパウイルス原液

##### 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。ウイルス接種前の培養細胞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、3.3.1.2 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その他の相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、3.4.1 及び 3.4.2.2 の試験を行う。

##### 2.3.2.4 原液

不活化ウイルス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。

原液について、3.5 の試験を行う。

#### 2.3.3 アイノウイルス原液

##### 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。ウイルス接種前の培養細胞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ウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.3.1.3 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 0.1vol % となるように加える方法又はその他の相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、3.4.1 及び 3.4.2.3 の試験を行う。

##### 2.3.3.4 原液

不活化ウイルス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。

原液について、3.5 の試験を行う。

#### 2.4 最終バルク

アカパネウイルス原液、カスパウイルス原液及びアイノ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、3.6 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

牛RSウイルス、ブルータングウイルス及びリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.1 及び 3.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

牛ウイルス性下痢-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。

### 3.1.2 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

牛RSウイルス、ブルータングウイルス及びリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.2 及び 3.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.2.1.5.2.2 個別ウイルス否定試験

牛ウイルス性下痢-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。

#### 3.2.1.6 核学的（染色体）性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.6.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.1.7 腫瘍形成性／腫瘍原性試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.7を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.2.2 ワーキングセルシードの試験

#### 3.2.2.1 培養性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.2.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.2.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.2.3 マイコプラズマ否定試験

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

### 3.2.3 プロダクションセルシードの試験

#### 3.2.3.1 培養性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.3.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.3.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.3.3 マイコプラズマ否定試験

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

### 3.3 ウイルス浮遊液の試験

#### 3.3.1 ウイルス含有量試験

##### 3.3.1.1 アカバネウイルス

###### 3.3.1.1.1 試験材料

###### 3.3.1.1.1.1 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。

###### 3.3.1.1.1.2 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。

###### 3.3.1.1.2 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、36℃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。

###### 3.3.1.1.3 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。

##### 3.3.1.2 カスバウイルス

###### 3.3.1.2.1 試験材料

###### 3.3.1.2.1.1 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。

###### 3.3.1.2.1.2 培養細胞

Vero-T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。

###### 3.3.1.2.2 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、36℃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。

###### 3.3.1.2.3 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>7.0</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

### 3.3.1.3 アイノウイルス

#### 3.3.1.3.1 試験材料

##### 3.3.1.3.1.1 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。

##### 3.3.1.3.1.2 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。

##### 3.3.1.3.2 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、36℃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。

##### 3.3.1.3.3 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、1mL中10<sup>6.0</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

### 3.4 不活化ウイルス液の試験

#### 3.4.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.4.2 不活化試験

##### 3.4.2.1 アカバネウイルス

##### 3.4.2.1.1 試験材料

##### 3.4.2.1.1.1 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。

##### 3.4.2.1.1.2 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。

##### 3.4.2.1.2 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、ウイルス増殖用培養液を加え、34～36℃で7日間培養し、観察する。

##### 3.4.2.1.3 判定

培養細胞にCPEを認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

##### 3.4.2.2 カスバウイルス

##### 3.4.2.2.1 試験材料

##### 3.4.2.2.1.1 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。

##### 3.4.2.2.1.2 培養細胞

Vero-T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。

##### 3.4.2.2.2 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、34～36℃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代目と同様の方法で培養し、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。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

##### 3.4.2.3 アイノウイルス

#### 3.4.2.3.1 試験材料

##### 3.4.2.3.1.1 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。

##### 3.4.2.3.1.2 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。

##### 3.4.2.3.2 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、ウイルス増殖用培養液を加え、34～36℃ で 7 日間培養し、観察する。

##### 3.4.2.3.3 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。

#### 3.5 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 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、0.1vol % 以下でなければならない。

##### 3.6.5 アルミニウム定量試験

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

##### 3.6.6 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。

##### 3.6.7 力価試験

###### 3.6.7.1 試験材料

###### 3.6.7.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 3.6.7.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

###### 3.6.7.1.3 中和試験用ウイルス

###### 3.6.7.1.3.1 アカバネウイルス

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

###### 3.6.7.1.3.2 カスバウイルス

BHK-21 (C-13) 細胞で増殖させたカスバウイルス K-47 株を用いる。

###### 3.6.7.1.3.3 アイノウイルス

BHK-21 (C-13) 細胞で増殖させたアイノウイルス JaNAr28 株を用いる。

###### 3.6.7.1.4 培養細胞



HmLu-1 細胞及び Vero-T 細胞を小試験管に 2～3 日間培養し、単層となったものを用いる。

#### 3.6.7.2 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、アカバネウイルス及びアイノウイルスは 37℃で 60 分間、カスバウイルスでは 90 分間処理する。この各混合液 0.1mL ずつをアカバネウイルス及びアイノウイルスは HmLu-1 細胞、カスバウイルスでは Vero-T 細胞のそれぞれ 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、アカバネウイルス及びアイノウイルスは 34～36℃、カスバウイルスは 37℃で、7 日間回転培養し、観察する。

#### 3.6.7.3 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。

アカバネウイルス及びアイノウイルスは中和抗体価 8 倍以上、カスバウイルスでは中和抗体価 32 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 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。

#### 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	5.0 g
ブドウ糖	1.0 g
酵母エキス	0.5 g
牛血清	10～20 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、アカバネウイルス、カスバウイルス及びアイノ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）の部の牛クロストリジウム感染症5種混合（アジュバント加）トキソイド（シード）の項の次に次のように加える。

## **牛ロタウイルス感染症3価・牛コロナウイルス感染症・牛大腸菌性下痢症（K99精製線毛抗原）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血清型のそれぞれ異なる3種類の牛ロタ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、シードロット規格に適合した牛コロナ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感染細胞の可溶化抗原及びシードロット規格に適合した大腸菌精製線毛抗原 K99 をそれぞれ不活化し、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 牛ロタウイルス

###### 2.1.1.1 名称

牛ロタウイルス Gunma 8701 株、Hyogo 9301 株及び Shimane 9501 株、又は製造に相当と認められた3種類の株

###### 2.1.1.2 性状

MA-104 細胞に接種すると、単層細胞の剥離を特徴とする CPE を伴って増殖し、その培養液は、モルモット赤血球を凝集する。

###### 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、MA-104 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。

###### 2.1.1.4 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、MA-104 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。

###### 2.1.1.5 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、MA-104 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。

###### 2.1.2 牛コロナウイルス

#### 2.1.2.1 名称

牛コロナウイルス No.66/H 株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.2.2 性状

生後3日以内の乳のみマウスの脳内に接種すると、神経症状を呈し死亡する。

牛腎継代細胞、HAL 細胞、HRT-18 細胞（ヒト直腸ガン由来株化細胞）及び BEK-1 細胞（牛胎子腎由来株化細胞）で合胞体形成を特徴とする CPE を伴って増殖する。

ラット、マウス、ハムスター及び鶏赤血球を凝集する。

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

#### 2.1.3 大腸菌

##### 2.1.3.1 名称

大腸菌 T-2 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.3.2 性状

ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト液状培地で培養すると耐熱性エンテロトキシンを産生する。

##### 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、適当と認められた液体培地（付記1）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、適当と認められた液体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、3.1.5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、適当と認められた液体培地で増殖させる。  
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、3.1.6の試験を行う。

#### 2.2 製造用材料

##### 2.2.1 牛ロタウイルス

###### 2.2.1.1 株化細胞

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。

###### 2.2.1.2 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、3.2.1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 牛コロナウイルス

###### 2.2.2.1 株化細胞

HAL細胞又は製造に適当と認められた株化細胞を用いる。

###### 2.2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

###### 2.2.2.3 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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.2.3 大腸菌

##### 2.2.3.1 培地

液体培地、寒天培地（付記 2）又は製造に相当と認められた培地を用いる。

#### 2.3 原液

##### 2.3.1 牛ロタウイルス各株

###### 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。ウイルス接種前の培養細胞に異常を認めてはならない。

###### 2.3.1.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを 2.3.1.1 の細胞で培養し、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、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、3.3.1 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 0.4vol % となるように加える方法又はその他相当と認められた方法により不活化し、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

不活化ウイルス液を混合し、原液とする。

原液について 3.10 の試験を行う。

##### 2.3.2 牛コロナウイルス

###### 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。ウイルス接種前の培養細胞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、相当と認められた時期に個別培養細胞ごとに感染細胞と培養液を採取し、遠心した沈渣をウイルス感染細胞、上清をウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.3.2 の試験を行う。

###### 2.3.2.3 可溶化

ウイルス感染細胞を可溶化処理した後、遠心した上清を可溶化抗原液とする。

可溶化抗原液について、3.6の試験を行う。

#### 2.3.2.4 不活化

可溶化抗原液から適当と認められた方法で可溶化剤を除去し、濃度調整したものにホルマリンを0.05vol %となるよう加える方法又はその他適当と認められた方法により不活化し、不活化可溶化抗原液とする。

不活化可溶化抗原液について、3.7の試験を行う。

#### 2.3.2.5 原液

不活化可溶化抗原液を混合し、原液とする。

原液について、3.10の試験を行う。

### 2.3.3 大腸菌

#### 2.3.3.1 培養

プロダクションシード菌を液体培地で培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.4の試験を行う。

#### 2.3.3.2 集菌

培養菌液を遠心し、その沈渣を線毛抽出用緩衝液（付記3）に浮遊し、濃厚菌液とする。

#### 2.3.3.3 線毛の精製

濃厚菌液から適当と認められる方法で加熱抽出したものの遠心上清を抽出線毛抗原液とする。抽出線毛抗原液から塩析法により抗原画分を採取し、リン酸緩衝食塩液に浮遊し、透析後濃度調整したものを精製線毛抗原液とする。

精製線毛抗原液について、3.8の試験を行う。

#### 2.3.3.4 不活化

精製線毛抗原液にホルマリンを0.1vol %となるよう加える方法又はその他適当と認められた方法により不活化し、不活化精製線毛抗原液とする。

不活化精製線毛抗原液について、3.9の試験を行う。

#### 2.3.3.5 原液

不活化精製線毛抗原液を混合し、原液とする。

原液について、3.10の試験を行う。

### 2.4 最終バルク

各原液を混合し、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、3.11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

げっ歯類由来細胞を用いる場合には、牛RSウイルス、ブルータング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。

サル由来細胞を用いる場合には、牛RSウイルス、ブルータング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 1.1 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

牛ロタウイルスについては、牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス、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、3.2.8 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。

牛コロナウイルスについては、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。

#### 3.1.2 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

###### 3.1.4.2.1 試験材料

検体及びBCP乳糖寒天培地（付記4）を用いる。

###### 3.1.4.2.2 試験方法

検体を滅菌整理食塩液で溶解したものを試料とし、シャーレに固めたBCP乳糖寒天培地に塗抹し、37℃で24時間培養する。

###### 3.1.4.2.3 判定

いずれの培地上にも大腸菌以外の集落を認めてはならない。

#### 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 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

げっ歯類由来細胞を用いる場合には、牛RSウイルス、ブルータング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。

サル由来細胞を用いる場合には、牛RSウイルス、ブルータング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。

#### 3.2.1.6 核学的（染色体）性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.1.6 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.1.7 腫瘍形成性/腫瘍原性試験

シードロット規格の 2.1.4.2.1.7 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.2.2 ワーキングセルシードの試験

#### 3.2.2.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.2.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.2.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.2.3 マイコプラズマ否定試験

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

### 3.2.3 プロダクションセルシードの試験

#### 3.2.3.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.3.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.3.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.3.3 マイコプラズマ否定試験

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



### 3.3 ウイルス浮遊液の試験

#### 3.3.1 ウイルス含有量試験

##### 3.3.1.1 牛ロタウイルス

###### 3.3.1.1.1 試験材料

###### 3.3.1.1.1.1 試料

検体をイーグル MEM で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.3.1.1.1.2 培養細胞

MA-104 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。

###### 3.3.1.1.2 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、牛ロタウイルス増殖用培養液（付記 5）を 1.0mL ずつ加え、37℃で 7 日間回転培養し、観察する。

###### 3.3.1.1.3 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>8</sup>TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

#### 3.3.2 赤血球凝集試験

##### 3.3.2.1 牛コロナウイルス

###### 3.3.2.1.1 試料

検体 0.4mL を 0.1w/v %牛血清アルブミン（以下この項において「BSA」という。）加里ン酸緩衝食塩液で 2 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.3.2.1.2 試験方法

試料 0.4mL に 1 vol % になるように濃度を調整したマウス赤血球浮遊液をそれぞれ 0.2mL ずつ加え、よく混和した後、常温で 1 ～ 2 時間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

###### 3.3.2.1.3 判定

赤血球の凝集を認めた試料の最高希釈倍数で赤血球凝集価を表す。

検体の赤血球凝集価は、64 倍以上でなければならない。

### 3.4 培養菌液の試験

#### 3.4.1 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。

#### 3.4.2 生菌数試験

##### 3.4.2.1 試験材料

試験用培地 I（付記 6）及び試験用培地 II（付記 7）を用いる。

##### 3.4.2.2 試験方法

検体を試験用培地 I を用いて、10 倍希釈系列にて 10<sup>8</sup> まで希釈し、10<sup>7</sup> 希釈液の 0.5mL と 10<sup>8</sup> 希釈液の 1.0mL とを、各々試験用培地 II の 20mL を用いて、直径 9 cm のシャーレに混釈して固める。各希釈ごとに 2 枚ずつ作製し、37℃で 18 時間培養した後、発育した集落数を数える。

##### 3.4.2.3 判定

検体の希釈倍数、接種液量及び発現した集落数から検体 1 mL 中の生菌数を計算するとき、3 × 10<sup>8</sup> 個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 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 2 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

MA-104 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。

#### 3.5.2.2 試験方法

試料の 0.1mL ずつを 10 本の小試験管の培養細胞に接種し、37℃で 60 分間静置吸着させた後、試料を抜き取り、イーグル MEM で 1 回細胞を洗浄した後、牛ロタウイルス増殖用培養液を 1.0mL ずつ加え、37℃で 7 日間回転培養する。培養細胞を凍結融解した後、その培養液を継代する。更に 1 代継代し、同様の方法で培養し観察する。

#### 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 可溶化抗原液の試験

#### 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 赤血球凝集試験

3.3.2 を準用して試験するとき、検体の赤血球凝集価は、14,120 倍以上でなければならない。

### 3.7 不活化可溶化抗原液の試験

#### 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。

#### 3.7.2 不活化試験

##### 3.7.2.1 試験材料

###### 3.7.2.1.1 試料

100 倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、検体 2 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。

###### 3.7.2.1.2 培養細胞

HAL 細胞を小試験管に 1～2 日間培養し、単層となったものを用いる。

###### 3.7.2.2 試験方法

試料の 0.1mL ずつを 10 本の小試験管の培養細胞に接種し、37℃で 60 分間吸着させた後、試料を抜き取り、イーグル MEM で 1 回細胞を洗浄した後、牛コロナウイルス増殖用培養液（付記 8）を 1.0mL ずつ加え、37℃で 7 日間回転培養し、観察する。

###### 3.7.2.3 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。

#### 3.7.3 赤血球凝集試験

3.3.2 を準用して試験するとき、検体の赤血球凝集価は、14,120 倍以上でなければならない。

### 3.8 精製線毛抗原液の試験

#### 3.8.1 抗原量の測定

##### 3.8.1.1 試験材料

###### 3.8.1.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で 10 倍に希釈し、試料とする。

###### 3.8.1.1.2 標準たん白溶液

参照 BSA 液（付記 9）を用いる。

###### 3.8.1.2 試験方法

試料と各濃度の標準たん白溶液を 100  $\mu$  L ずつ別々の試験管に入れる。全ての試験管に反応液 A (付記 10) を 1.0mL ずつ入れ、混和後常温で 20 分間感作する。さらに、反応液 B (付記 11) を 1.0mL ずつ入れ、30 分～2 時間感作したものについて、波長 550nm の吸光度を測定する。

### 3.8.1.3 判定

最小自乗法で Y を吸光度、X をたん白量とする回帰直線  $Y=aX+b$  を参照 BSA 液を用いて求める。試料の吸光度 Y を代入し、たん白量 X を求め、検体のたん白量としたとき、たん白量は 590  $\mu$  g/mL 以上でなければならない。

## 3.8.2 精製度確認試験

### 3.8.2.1 試験材料

#### 3.8.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で 100  $\mu$  g/mL になるように希釈し、試料とする。

#### 3.8.2.1.2 試験方法

抗原捕捉用抗 K99 線毛抗原モノクローナル抗体 (付記 12) を炭酸緩衝液 (付記 13) で希釈し、酵素抗体法 (以下この項において「ELISA」という。) 用マイクロプレート (付記 14) に 100  $\mu$  L ずつ加え、2～5℃で 1 夜静置しモノクローナル抗体を固相化する。このプレートを洗浄液 (付記 15) で 3 回洗浄し、抗体希釈液 (付記 16) を 250  $\mu$  L ずつ全穴に加え、37℃で 1 時間静置させた後、同様に 3 回洗浄する。次に、試料及び参照抗原 (付記 17) をそれぞれ 8 穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、37℃で 60 分間反応させ、洗浄液で 3 回洗浄する。その後、抗 K99 線毛抗原陽性血清 (付記 18) を全穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、37℃で 60 分間反応させ、3 回洗浄した後、酵素標識抗体 (付記 19) を全穴に 100  $\mu$  L ずつ加えて、37℃で 60 分間反応させ、3 回洗浄する。次に、基質溶液 (付記 20) を 100  $\mu$  L ずつ加え、遮光して 30℃で 30 分間反応させた後、1 mol/L 硫酸溶液を 50  $\mu$  L ずつ加えて反応を停止させる。各穴の吸光度を主波長 492nm、副波長 630nm で測定し、その差を ELISA 値とする。

#### 3.8.2.1.3 判定

参照抗原の平均 ELISA 値が 0.6～1.0 のとき、試料の平均 ELISA 値は、参照抗原の ELISA 値以上でなければならない。

## 3.8.3 エンドトキシン含量測定試験

### 3.8.3.1 試験材料

検体をリン酸緩衝食塩液で希釈し、試料とする。

### 3.8.3.2 試験方法

200  $\mu$  L の Et 反応液 (付記 21) を加えた試験管に、エンドトキシンフリー蒸留水 (ブランク)、エンドトキシン標準溶液 (付記 22) 又は試料 10  $\mu$  L をそれぞれ加え、混和する。直ちに 37℃で 30 分間反応させ、反応終了後氷水浴槽に移し、0.8mol/L 酢酸 0.4mL を加え反応を停止させる。波長 405nm の吸光度を測定する。

### 3.8.3.3 判定

検体のエンドトキシン濃度を以下の計算式を用いて算出するとき、8,820ng/mL 以下でなければならない。

$$C = Et \times \frac{\Delta E (Sa)}{\Delta E (St)} \times df$$

C: 検体のエンドトキシン濃度 (pg/mL)

Et: エンドトキシン標準液濃度 (pg/mL)

$\Delta E (Sa)$ : 試料の吸光度 - ブランクの吸光度

$\Delta E (St)$ : 標準溶液の吸光度 - ブランクの吸光度

df: 検体の希釈倍数

### 3.9 不活化精製線毛抗原液の試験

#### 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 原液の試験

#### 3.10.1 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。

### 3.11 小分製品の試験

#### 3.11.1 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。

#### 3.11.2 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。

#### 3.11.3 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。

#### 3.11.4 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、0.23vol %以下でなければならない。

#### 3.11.5 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。

#### 3.11.6 毒性限度確認試験

一般試験法の毒性限度確認試験法 1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、注射量は、0.2mL とする。

#### 3.11.7 力価試験

##### 3.11.7.1 牛ロタウイルス

##### 3.11.7.1.1 試験材料

##### 3.11.7.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.11.7.1.1.2 試験動物

約 4 週齢のマウスを用いる。

##### 3.11.7.1.1.3 中和試験用ウイルス

MA-104 細胞で増殖させた牛ロタウイルス Gunma 8701 株、Hyogo 9301 株及び Shimane 9501 株を用いる。

##### 3.11.7.1.1.4 培養細胞

MA-104 細胞を小試験管で 1～3 日間培養し、単層を形成させたものを用いる。

##### 3.11.7.1.2 試験方法

注射材料 0.5mL ずつを 20 匹の試験動物の腹腔内に 3 週間隔で 2 回注射し、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 4 匹分ずつプールし、5 プールを用いる。

被検血清を非働化した後、10 倍から 2 倍階段希釈する。各希釈血清 0.5mL と 0.1mL 中に約 200TCID<sub>50</sub> のウイルスを含む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。

この各混合液 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、接種した

混合液を除き、イーグル MEM で1回細胞を洗浄した後、牛ロタウイルス増殖用培養液を 1.0mL ずつ加え、37℃で7日間回転培養し、観察する。

#### 3.11.7.1.3 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 80 倍以上を中和抗体陽性とする。

プール血清の中和抗体陽性率は、それぞれのウイルスに対し 80 %以上でなければならない。

#### 3.11.7.2 牛コロナウイルス

##### 3.11.7.2.1 赤血球凝集抗原

牛コロナウイルス赤血球凝集抗原（付記 23）を用いる。

##### 3.11.7.2.2 試験方法

3.11.7.1.2 の血清について赤血球凝集抑制試験を行う。

被検血清 0.1mL に 0.1w/v % BSA 加リン酸緩衝食塩液 0.4mL 及び 25w/v % カオリン加生理食塩液（付記 24）0.5mL を加え、常温で 20 分間処理した後、1,700G で 10 分間遠心し、その上清 0.2mL を 0.1w/v % BSA 加リン酸緩衝食塩液で 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、常温で 60 分間処理した後、1.0vol % マウス赤血球浮遊液 0.2mL を加え、1 ～ 2 時間静置し、観察する。

##### 3.11.7.2.3 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 160 倍以上を赤血球凝集抑制抗体陽性とする。

プール血清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。

#### 3.11.7.3 大腸菌

##### 3.11.7.3.1 試験方法

3.11.7.1.2 の血清について ELISA を行う。

大腸菌 K99 ELISA 抗体価測定用抗原（付記 25）を炭酸緩衝液で希釈し、ELISA 用マイクロプレートに 100  $\mu$  L ずつ加え、2～5℃で1夜静置し抗原を固相化する。このプレートを洗浄液で3回洗浄し、抗体希釈液を1穴に 250  $\mu$  L ずつ全穴に加え、37℃で1時間静置させた後、同様に3回洗浄する。次に、抗体希釈液で 100 倍から 12,800 倍まで 2 倍階段希釈を行ったプール血清、参照陽性血清（付記 26）及び参照陰性血清（付記 27）をそれぞれ1列に 100  $\mu$  L ずつ加え、37℃で 60 分間反応させ、洗浄液で3回洗浄する。その後、抗体希釈液で希釈した酵素標識抗体を全穴に 100  $\mu$  L ずつ加えて 37℃で 60 分間反応させ、3回洗浄する。次に、基質溶液を 100  $\mu$  L ずつ加え、遮光して 30℃で 30 分間反応させた後、1 mol/L 硫酸溶液を 50  $\mu$  L ずつ加えて反応を停止させる。各穴の吸光度を主波長 492nm、副波長 630nm で測定し、その差を ELISA 値とする。

##### 3.11.7.3.2 判定

ELISA 値が 0.5 以上を示す血清の最高希釈倍数を抗体価とする。参照陽性血清が 800 倍から 3,200 倍、参照陰性血清が 100 倍未満の抗体価を示すとき、プール血清の ELISA 抗体価 1,600 倍以上を陽性とする。

プール血清の 80 %以上が ELISA 抗体陽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 液体培地

1,000mL 中

リン酸二水素カリウム

1.36 g

リン酸水素二ナトリウム十二水和物	20.3 g
カゼイン製ペプトン	10.0 g
ブドウ糖	1.0 g
酵母エキス	1.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
塩類溶液*	1.0 mL
水	残量

pH を 7.2 ~ 7.4 に調整し、118 °C で 20 分間高圧蒸気滅菌する。

\* 1,000mL 中

硫酸マグネシウム七水和物	10.0 g
塩化マンガン (II) 四水和物	1.0 g
塩化鉄 (III) 六水和物	0.135 g
塩化カルシウム二水和物	0.4 g
水	残量

#### 付記 2 寒天培地

1,000mL 中

リン酸二水素カリウム	1.36 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	20.3 g
カゼイン製ペプトン	10.0 g
酵母エキス	1.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
塩類溶液*	1.0 mL
寒天	12.0 g
水	残量

118 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌する。

\* 1,000mL 中

硫酸マグネシウム七水和物	10.0 g
塩化マンガン (II) 四水和物	1.0 g
塩化鉄 (III) 六水和物	0.135 g
塩化カルシウム二水和物	0.4 g
水	残量

#### 付記 3 線毛抽出用緩衝液

1,000mL 中

リン酸二水素カリウム	0.2 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	58.44 g
塩化ナトリウム	8.0 g
塩化カリウム	0.2 g
水	残量

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

#### 付記 4 BCP 乳糖寒天培地

1,000mL 中

バクトビーフ・イクストラクト	3.0 g
バクトペプトン	5.0 g
乳糖	10.0 g
寒天	10.0 g
ブロモクレゾールパープル	0.025 g
水	残 量

pH を 6.8 ~ 7.0 に調整して、121 °C 15 分間高圧滅菌する。

付記 5 牛ロタ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
トリプシン	1 mg
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 6 試験用培地 I

1,000mL 中

カゼイン製ペプトン	17.0 g
バクトソイトン	3.0 g
ブドウ糖	2.5 g
リン酸水素二カリウム	2.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
水	残 量

pH を 7.1 ~ 7.5 に調整し、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌する。

付記 7 試験用培地 II

1,000mL 中

カゼイン製ペプトン	15.0 g
バクトソイトン	5.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
寒天	12.0 g
水	残 量

pH を 7.1 ~ 7.5 に調整し、121 °C で 20 分間高圧蒸気滅菌する。

付記 8 牛コロナ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 7.2 ~ 7.6 に調整する。

牛胎子血清は、牛コロナ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。

付記 9 参照 BSA 液

BSA を水で 1 mg/mL となるように作製した後、下表に準じて調製したものを各濃度の参照 BSA 液とする。

BSA 濃度	量比	
	1 mg/mL BSA	PBS
0	0	1,000
25	25	975
50	50	950
100	100	900
200	200	800
400	400	600

付記 10 反応液 A

a 1,000mL 中

炭酸ナトリウム 20.0 g  
 水酸化ナトリウム 4.0 g  
 水 残量

b 100mL 中

硫酸銅六水和物 0.5 g  
 酒石酸カリウム 1.0 g  
 水 残量

使用直前に、a : b = 50 : 1 の割合で混合したものを反応液 A とする。

付記 11 反応液 B

フェノール試薬 2 mol/L を水で 2 倍に希釈する。

付記 12 抗原捕捉用抗 K99 線毛抗原モノクローナル抗体

1 性状

K99 抗原を発現している大腸菌を特異的に凝集する。K99 線毛抗原を発現している大腸菌から加熱処理及び硫酸アンモニウム塩析法により精製した線毛を抗原として、ウェスタンブロッティング法を行うと、約 17kDa の位置に特異的なバンドを認める。

2 作製方法

K99 抗原を保有する大腸菌 T-2 株 ( $10^9$  個/mL 以上を含有) をマウスに 3 週間隔で 2 回腹腔内に注射し、脾細胞を得る。その細胞とミエローマ細胞との融合細胞のうち、抗 K99 線毛抗原モノクローナル抗体を産生している細胞を、K99 精製線毛を抗原とした ELISA 法により選択後、クローニングを行う。抗体産生細胞の培養液を抗原捕捉用抗 K99 線毛抗原モノクローナル抗体とする。

3 規格

参照抗原、抗 K99 線毛抗原陽性血清を用いて 3.8.2 に準じた方法で ELISA を実施し、吸光度値が 0.6 ~ 1.0 になるように炭酸緩衝液で希釈して使用する。

付記 13 炭酸緩衝液

1,000mL 中

炭酸ナトリウム 1.59 g



炭酸水素ナトリウム	2.93 g
水	残量

pH を 9.6 に調整する。

付記 14 ELISA 用マイクロプレート  
U 字型 96 穴プレートを用いる。

付記 15 洗浄液

1,000mL 中	
塩化ナトリウム	8.00 g
塩化カリウム	0.20 g
リン酸二水素カリウム	0.20 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	2.90 g
ポリソルベート 20	0.50 mL
水	残量

付記 16 抗体希釈液  
BSA 2 g を洗浄液 100mL で使用直前に溶解したもの。

付記 17 参照抗原  
液体培地で増殖させた大腸菌 T-2 株から加熱処理及び硫酸アンモニウム塩析法により精製した K99 線毛抗原で、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析した場合、約 17kDa の単一なバンドを認める。リン酸緩衝食塩液で 1 mg/mL になるように濃度を調整した抗原液を注射材料とし、3.11.7.3 に準じた方法でマウスへの注射及び大腸菌 ELISA 抗体価の測定を行うと、ELISA 抗体価は 800 倍以上を示す。

抗原捕捉用抗 K99 線毛抗原モノクローナル抗体及び抗 K99 線毛抗原陽性血清を用いて 3.8.2 に準じた方法で ELISA を実施し、ELISA 値が 0.6 ~ 1.0 になるように濃度を調整して使用する。

付記 18 抗 K99 線毛抗原陽性血清  
液体培地で増殖させた大腸菌 T-2 株から加熱処理及び硫酸アンモニウム塩析法により精製した K99 線毛抗原を 1 mg/mL になるようにリン酸緩衝食塩液で濃度を調整し、その抗原とリン酸アルミニウムゲルを 85 : 15 の割合で混合する。その 0.5mL を体重約 350g のモルモットの皮下に 3 週間隔で 2 回注射し、その 2 週間後に得られた血清である。

抗原捕捉用抗 K99 線毛抗原モノクローナル抗体及び参照抗原を用いて 3.8.2 に準じた方法で ELISA を実施し、ELISA 値が 0.6 ~ 1.0 になるように濃度を調整して使用する。

付記 19 酵素標識抗体  
西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗モルモット IgG を用い、抗原捕捉用抗 K99 線毛抗原モノクローナル抗体及び参照抗原を用いて 3.8.2 に準じた方法で ELISA を実施し、抗 K99 線毛抗原陽性血清の吸光度値が 0.6 ~ 1.0 になるように濃度を調整して使用する。

付記 20 基質溶液  
オルトフェニレンジアミン二塩酸塩 13mg をリン酸クエン酸緩衝液\* 32.5mL に溶解し、遮光

する。使用直前に過酸化水素水を 13  $\mu$  L 添加する。

* 1,000mL 中	
無水クエン酸	4.67 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	19.95 g
水	残量

pH を 5.0 に調整する。

#### 付記 21 Et 反応液

カプトガニライセートと発色合成基質をバイアル瓶に分注し、乾燥させたもので、エンドトキシンフリー蒸留水 100  $\mu$  L 及び 0.2mol/L Tris-HCl \* 100  $\mu$  L を加えて使用する。

* 1,000mL 中	
トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン	10.60 g
トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン塩酸塩	17.76 g
水	残量

調製後の pH は、8.0 である。

#### 付記 22 エンドトキシン標準溶液

*E.coli* O111 : B4 由来のエンドトキシンで、そのエンドトキシン濃度は、100 ~ 300pg/mL の範囲である。

#### 付記 23 牛コロナウイルス赤血球凝集抗原

牛コロナウイルス No.66/H 株を HAL 細胞で増殖させて得た培養上清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、赤血球凝集価 64 倍以上のもの。

#### 付記 24 25w/v %カオリン加生理食塩液

1,000mL 中	
カオリン	250 g
塩化ナトリウム	8.75 g
水	残量

1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH を 7.2 ~ 7.4 に調整する。

#### 付記 25 大腸菌 K99 ELISA 抗体価測定用抗原

液体培地で増殖させた大腸菌 T-2 株から熱抽出、硫酸アンモニウム塩析及び陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製した K99 線毛抗原で、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析するとき、約 17kDa の単一なバンドを認めるもの。

#### 付記 26 参照陽性血清

液体培地で増殖させた大腸菌 T-2 株から加熱処理及び硫酸アンモニウム塩析法により精製した K99 線毛抗原を 118  $\mu$  g/mL になるようにリン酸緩衝食塩液で調整し、その抗原とリン酸アルミニウムゲルを 85 : 15 の割合で混合する。その 0.5mL を約 4 週齢のマウスの腹腔内に 3 週間隔で 2 回注射し、その 2 週間後に得られた血清である。

大腸菌 K99ELISA 抗体価測定用抗原を用いて 3.11.7.3 に準じた方法で ELISA を実施するとき、ELISA 抗体価は、800 倍から 3,200 倍までを示す。

付記 27 参照陰性血清

非免疫マウスの血清で、大腸菌 K99 ELISA 抗体価測定用抗原を用いて 3.11.7.3 に準じた方法で ELISA を実施するとき、ELISA 抗体価は、100 倍未満を示す。

# 馬ロタウイルス感染症（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馬ロタウイルス（A 群・G3 型）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不活化し、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

馬ロタウイルス Ho-5MA 株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.2 性状

MA-104 細胞でウイルス増殖用培養液に結晶トリプシンを添加することにより 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、MA-104 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、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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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、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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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 培養細胞

MA-104 細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

### 2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

### 2.2.3 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て、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。ウイルス接種前の培養細胞に異常を認めてはならない。

### 2.3.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.1の培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個別培養細胞ごとに培養液を採取し、遠心した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の試験を行う。

### 2.3.3 ウイルスの不活化

ウイルス浮遊液にホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加えて不活化したものを不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.4の試験を行う。

### 2.3.4 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、3.5の試験を行う。

## 2.4 最終バルク

原液を混合して、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 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

馬伝染性貧血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 1.1 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、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 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

##### 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 外来性ウイルス保定試験

###### 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

馬伝染性貧血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、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 及び 3.2.9 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.2.1.6 核学的（染色体）性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.1.6 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.2.1.7 腫瘍形成性/腫瘍原性試験

シードロット規格の 2.1.4.2.1.7 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.2.2 ワーキングセルシードの試験

#### 3.2.2.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.2.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.2.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.2.3 マイコプラズマ否定試験

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

### 3.2.3 プロダクションセルシードの試験

#### 3.2.3.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.3.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.3.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.3.3 マイコプラズマ否定試験

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

### 3.3 ウイルス浮遊液の試験

#### 3.3.1 ウイルス含有量試験

##### 3.3.2.1 試験材料

###### 3.3.2.1.1 試料

検体を希釈液（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 培養細胞

MA-104 細胞を 48 穴プレートで 2～3 日間培養し、単層となったものを用いる。

###### 3.3.2.1.3 試験方法

リン酸緩衝食塩液で 2 回洗浄した培養細胞に試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 穴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 2）を 0.4mL ずつ加え、37℃で 7 日間培養して観察する。

###### 3.3.2.1.4 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>7.0</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。

### 3.4 不活化ウイルス液の試験

#### 3.4.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.4.2 不活化試験

##### 3.4.2.1 試験材料

###### 3.4.2.1.1 試料

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

###### 3.4.2.1.2 培養細胞

MA-104 細胞を 2～3 日間培養し、単層となったものを用いる。

###### 3.4.2.1.3 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、37℃で 60 分間静置吸着させ、リン酸緩衝食塩液で 2 回洗浄した後、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で 7 日間培養し、観察する。

###### 3.4.2.1.4 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。

### 3.5 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 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、0.2vol %以下でなければならない。

#### 3.6.5 アルミニウム定量試験

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

#### 3.6.6 たん白窒素定量試験

一般試験法のたん白窒素定量法を準用して試験するとき、たん白窒素の含有量は、1 mL 中 100  $\mu$  g 以下でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その含有量とする。

#### 3.6.7 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。

#### 3.6.8 力価試験

##### 3.6.8.1 試験材料

###### 3.6.8.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 3.6.8.1.2 試験動物

体重 300 ~ 350g のモルモットを用いる。

###### 3.6.8.1.3 中和試験用ウイルス

MA-104 細胞で増殖させた馬ロタウイルス Ho-5MA 株を用いる。

###### 3.6.8.1.4 培養細胞

MA-104 細胞浮遊液を 6 穴プレートに 2 ~ 3 日間培養し、単層となったものを用いる。

##### 3.6.8.2 試験方法

注射材料の 0.5mL ずつを 3 週間隔で 2 回、5 匹の試験動物の筋肉内に注射し、第 2 回注射後 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。

各個体の血清を非働化した後、希釈液で 400 倍に希釈し、各希釈血清と 0.3mL 中に約 80PFU を含む中和試験用ウイルス液とを等量に混合し、37 °C で 60 分間処理する。各混合液 0.3mL ずつをそれぞれ 2 穴の培養細胞に接種し、37 °C で 90 分間吸着させる。その間、30 分ごとに接種材料を動かし細胞層表面に広げる。別に、中和試験用ウイルスと 400 倍に希釈した非働化正常モルモット血清とを等量混合し、希釈被検血清と同様に処理したもの（4 穴）をウイルス対照とする。それぞれの混合液を除き、リン酸緩衝食塩液で 2 回洗浄した後、第 1 次重層寒天培地（付記 3）を重層し、37 °C、5 vol % 炭酸ガス下で 4 ~ 5 日間培養する。その後、第 2 次重層寒天培地（付記 4）を重層し、更に 1 ~ 2 日間培養し、観察する。



### 3.6.8.3 判定

ウイルス対照と各被検血清の平均プラック数を比較するとき、ウイルス対照の平均プラック数を60%以上減少させた被検血清を中和抗体陽性と判定する。

中和抗体陽性率は、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。

#### 付記1 希釈液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス

2.95 g

イーグルMEM

残量

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 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

結晶トリプシン

1～2 mg

イーグルMEM

残量

炭酸水素ナトリウムでpHを7.4～7.8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

トリプトース・ホスフェイト・ブロス

2.95 g

アガロース

1.5 g

結晶トリプシン

2 mg

イーグルMEM

残量

炭酸水素ナトリウムでpHを7.4～7.8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

アガロース

7.5 g

結晶トリプシン

2 mg

0.5w/v%ニュートラルレッド

20 mL

イーグルMEM

残量

炭酸水素ナトリウムでpHを7.4～7.8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日本脳炎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不活化したワクチンである。

### 2 製法

#### 2.1 製造用株

##### 2.1.1 名称

日本脳炎ウイルス中山株薬検系又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.2 性状

豚腎初代細胞で増殖し、がちょう、鶏初生ひな及びはとの赤血球を凝集する。

##### 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、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 $-60^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、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、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 $-60^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、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、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 $-60^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

プロダクションシード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

Vero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培養細胞とみなす。ウイルス接種前の培養細胞に異常を認めてはならない。

#### 2.3.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを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、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、3.3の試験を行う。

#### 2.3.3 不活化

ウイルス浮遊液にホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加えて不活化し、不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.4の試験を行う。

#### 2.3.4 原液

不活化ウイルス液を混合し、原液とする。

原液について、3.5の試験を行う。

### 2.4 最終バルク

原液を混合し、適当と認められた希釈液で濃度調整し、最終バルクとする。

この場合、適当と認められた保存剤を加えてもよい。

### 2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。

小分製品について、3.6の試験を行う。

## 3 試験法

### 3.1 製造用株の試験

#### 3.1.1 マスターシードウイルスの試験

##### 3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.3.1.1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

サル由来細胞を用いる場合には、馬伝染性貧血ウイルス、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 1.1 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

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、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。

#### 3.1.2 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

馬伝染性貧血ウイルス、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2.1.4.2.1.6.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.2.1.7 腫瘍形成性／腫瘍原性試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.7を準用して試験するとき、適合しなければならない。

## 3.2.2 ワーキングセルシードの試験

### 3.2.2.1 培養性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.2.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.2.2.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.2.2.3 マイコプラズマ否定試験

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

## 3.2.3 プロダクションセルシードの試験

### 3.2.3.1 培養性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.3.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.2.3.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.2.3.3 マイコプラズマ否定試験

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

## 3.3 ウイルス浮遊液の試験

### 3.3.1 ウイルス含有量試験

マウス接種試験又は培養細胞接種試験により行う。

#### 3.3.1.1 マウス接種試験

##### 3.3.1.1.1 試験材料

##### 3.3.1.1.1.1 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。

##### 3.3.1.1.1.2 試験動物

約3週齢のマウスを用いる。

##### 3.3.1.1.2 試験方法

試料0.03mL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。

##### 3.3.1.1.3 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、1 mL中10<sup>7.5</sup>LD<sub>50</sub>以上でなければならない。

#### 3.3.1.2 培養細胞接種試験

##### 3.3.1.2.1 試験材料

##### 3.3.1.2.1.1 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。

##### 3.3.1.2.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格2.1.1の鶏胚初代細胞又は適当と認められた培養細胞を小試験管に培養し、単層となったものを用いる。

##### 3.3.1.2.2 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0.5mLを加え、37℃で7日間培養し、観察する。

##### 3.3.1.2.3 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<sup>7.5</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

### 3.4 不活化ウイルス液の試験

#### 3.4.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.4.2 不活化試験

##### 3.4.2.1 試験材料

###### 3.4.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

###### 3.4.2.1.2 試験動物

3週齢のマウスを用いる。

##### 3.4.2.2 試験方法

注射材料 0.03mL を 10 匹の試験動物の脳内に注射し、14 日間観察する。

##### 3.4.2.3 判定

脳炎症状を示して死亡した試験動物を認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

### 3.5 原液の試験

#### 3.5.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.6 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又は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 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。

#### 3.6.7 力価試験

##### 3.6.7.1 試験材料

###### 3.6.7.1.1 注射材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で 10 倍に希釈したものを注射材料とする。

###### 3.6.7.1.2 試験動物

2～3 週齢のマウスを用いる。

##### 3.6.7.2 攻撃ウイルス

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（付記 2）を用いる。

##### 3.6.7.3 試験方法

試験動物 30 匹を試験群、60 匹を対照群とする。

試験第 1 日目及び第 4 日目に、注射材料 0.1mL ずつを試験群の腹腔内に注射する。

試験第8日目に、試験群及び対照群のそれぞれ30匹に攻撃ウイルス0.2mLずつを腹腔内に注射する。更に対照群30匹を10匹ずつ3群に分け、各群に攻撃ウイルスを10倍、100倍及び1,000倍に希釈したものの0.2mLずつを腹腔内に注射する。試験群及び対照群について、14日間観察する。

#### 3.6.7.4 判定

脳炎症状を示して死亡した動物及び生存しているものの脳炎症状を示している動物を死亡したものとみなし、各群の死亡率及び攻撃ウイルスのLD<sub>50</sub>を算出する。

試験群の耐過率は、40%以上でなければならない。この場合、攻撃ウイルスを注射した対照群の死亡率は90%以上、攻撃ウイルスのウイルス量は0.2mL中10<sup>3</sup>LD<sub>50</sub>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、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

牛血清又はやぎ血清

0 ~ 50 mL

イーグルMEM

残量

炭酸水素ナトリウムでpHを7.0~7.6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 攻撃ウイルス

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生後3~4週齢のマウスの脳内に接種し、発症極期に採脳し、リン酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釈液で10倍乳剤とする。これを遠心した上清を攻撃ウイルスとする。

# 豚インフルエンザ（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豚インフルエンザ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 豚インフルエンザウイルスA型（H1N1）

##### 2.1.1.1 名称

豚インフルエンザウイルスA型 A/swine/京都/3/79（H1N1）株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.1.2 性状

発育鶏卵の尿膜腔内で増殖し、鶏赤血球を凝集させる。

##### 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 豚インフルエンザウイルスA型（H3N2）

##### 2.1.2.1 名称

豚インフルエンザウイルスA型 A/swine/和田山/5/69（H3N2）株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.2.2 性状

発育鶏卵の尿膜腔内で増殖し、鶏赤血球を凝集させる。

##### 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 発育鶏卵

##### 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並びに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。

##### 2.2.1.2 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 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 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、2.3.1の発育鶏卵で培養し、ウイルスの増殖極期に採取した感染尿膜腔液のろ液又は遠心上清を、各株のウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.4の試験を行う。

#### 2.3.3 不活化

ウイルス浮遊液にホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加えて不活化し、原液とする。

原液について、3.5の試験を行う。

### 2.4 最終バルク

各株の原液を混合し、適当と認められたアルミニウムゲルアジュバントを加えて、最終バルクとする。

この場合、適当と認められた保存剤を加えてもよい。

### 2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。

小分製品について、3.6の試験を行う。

## 3 試験法

### 3.1 製造用株の試験

### 3.1.1 マスターシードウイルスの試験

#### 3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の 1.4.2.3.1.1 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

豚繁殖・呼吸障害症候群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。

###### 3.1.1.4.2.2 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、豚コレラウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢一粘膜病ウイルス、ロタウイルス、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、3.2.3、3.2.4、3.2.5、3.2.7、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 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 の観察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。

#### 3.4 ウイルス浮遊液の試験

##### 3.4.1 赤血球凝集価測定試験

###### 3.4.1.1 試験材料

###### 3.4.1.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.4.1.2 試験方法

試料 0.4mL に、0.5vol %鶏赤血球浮遊液を 0.4mL 加え、常温で 60 分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

###### 3.4.1.3 判定

赤血球凝集を認めた検体の最高希釈倍数で赤血球凝集価を表す。

検体の赤血球凝集価は、320 倍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。

##### 3.5.2 不活化試験

###### 3.5.2.1 試験材料

###### 3.5.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

###### 3.5.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 10 ~ 12 日齢のものを用いる。

###### 3.5.2.2 試験方法

注射材料 0.2mL ずつを 4 個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、36 ~ 37 °C で培養し、3 日間隔で尿膜腔液を 2 代まで継代する。2 代目の尿膜腔液に 0.5vol %鶏赤血球浮遊液を等量加え、常温で 60 分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

ただし、赤血球凝集を示す尿膜腔液があった場合には、その尿膜腔液を等量に混合して 3 代まで継代し、3 代目の尿膜腔液について同様の試験を繰り返した後、判定する。

###### 3.5.2.3 判定

赤血球凝集を認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

##### 3.5.3 赤血球凝集価測定試験

3.3.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.6 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 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、0.04vol % 以下でなければならない。

##### 3.6.5 アルミニウム定量試験

一般試験法のアルミニウム定量法を準用して試験するとき、アルミニウムの含有量は、1 mL 中 0.95 ~ 1.30mg の範囲でなければならない。

### 3.6.6 安全試験

#### 3.6.6.1 試験材料

##### 3.6.6.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.6.6.1.2 試験動物

約 50 日齢の豚を用いる。

#### 3.6.6.2 試験方法

試験動物 3 頭を試験群、1 頭を対照群とする。試験群の 2 頭に注射材料 2 mL を、他の 1 頭に 6 mL を頸部皮下に注射し、3 週後に第 2 回注射を同量注射する。対照群と共に、試験群の第 2 回注射後 14 日間観察する。

#### 3.6.6.3 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。

### 3.6.7 力価試験

#### 3.6.7.1 試験材料

##### 3.6.7.1.1 注射材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で 10 倍に希釈したものを注射材料とする。

##### 3.6.7.1.2 試験動物

4 週齢のマウスを用いる。

##### 3.6.7.1.3 赤血球凝集抗原

試験品に含まれるそれぞれのウイルス株と同一タイプのウイルスから調製した赤血球凝集抗原(付記)を用いる。

#### 3.6.7.2 試験方法

注射材料 0.5mL ずつを試験動物 20 匹の腹腔内に注射した後、4 群に分け、14 日目に得られた血清を各群ごとにプールして、赤血球凝集抑制試験を行う。

被検血清を RDE 及び鶏赤血球処理、又は適当と認められた方法で処理する。これをリン酸緩衝食塩液で 2 倍階段希釈し、各希釈液 0.2mL に 0.2mL 中 8 単位の赤血球凝集抗原を等量ずつ加え、常温で 60 分間処理する。これに 0.5vol % 鶏赤血球浮遊液を 0.4mL ずつ加え、常温に 60 分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

#### 3.6.7.3 判定

赤血球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。

各群のプール血清の赤血球凝集抑制抗体価は、8 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 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 赤血球凝集抗原

豚インフルエンザウイルス A 型 A/swine/京都/3/79 (H1N1) 株及び A/swine/和田山/5/69 (H3N2) 株又はこれらと同等と認められたウイルス株を用いて、それぞれ調製した赤血球凝集抗原。

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。

## 豚パルボウイルス感染症生ワクチン（シード）

### 1 定義

シードロット規格に適合した弱毒豚パルボ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させたワクチンである。

### 2 製法

#### 2.1 製造用株

##### 2.1.1 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 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、妊娠豚に注射しても、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。

##### 2.1.3 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、豚腎株化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。

##### 2.1.4 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、豚腎株化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-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。

##### 2.1.5 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、豚腎株化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-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。

### 2.2 製造用材料

#### 2.2.1 培養細胞

豚腎株化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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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。ウイルス接種前の培養細胞に異常を認めてはならない。

### 2.3.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを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1.4.2.1.1.1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

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1及び3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.1.1.4.2 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 1.1、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

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 腫瘍形成試験／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 培養細胞

豚腎初代細胞、ESK細胞又は相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 試験方法

試料0.1mLずつを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1mLを加え、31～32℃で10～14日間培養した後、ペロナール緩衝食塩液（付記2）又はリン酸緩衝食塩液（以下この項において「PBS」という。）（付記3）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。

##### 3.3.2.3 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>5.7</sup>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 試験材料

##### 3.3.3.1.1 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。

##### 3.3.3.1.2 培養細胞

豚腎初代細胞、ESK細胞又は相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 試験方法

試料 0.1mL ずつを 8 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 1 mL を加え、2 群に分け、31～32℃及び 37℃でそれぞれ 10～14 日間培養する。培養終了時に、3.3.2.2 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。

### 3.3.3.3 判定

培養上清に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、32℃で培養するとき、37℃で培養する場合より 100 倍以上高くなければならない。

## 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<sup>5.0</sup>TCID<sub>50</sub> 以上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

約 1～2 か月齢の豚を用いる。

#### 3.4.7.2 試験方法

試験動物 2 頭を試験群、1 頭を対照群とする。注射材料 1 mL ずつを試験群の動物の皮下に注射し、対照群と共に同居飼育し、14 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 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

体重約 350g のモルモットを用いる。

### 3.4.8.1.3 赤血球凝集抗原

赤血球凝集抗原（付記4）を用いる。

### 3.4.8.2 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、2 回目の注射後 14 日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。

被検血清をペロナール緩衝食塩液又は 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。これをペロナール緩衝食塩液又は 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 3.3.2.2 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。

### 3.4.8.3 判定

赤血球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。

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。

### 4 貯法及び有効期間

有効期間は、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 ペロナール緩衝食塩液 (pH7.0)

1,000mL 中

バルビタール 0.575 g

バルビタールナトリウム 0.375 g

塩化ナトリウム 8.5 g

水 残量

#### 付記 3 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

水 残量

塩酸で pH を 6.8 ~ 7.2 に調整する。

#### 付記 4 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、赤血球凝集価が 64 倍以上のもの。

# 豚パルボウイルス感染症不活化ワクチン(シード)

## 1 定義

シードロット規格に適合した豚パルボウイルスを、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不活化したワクチンである。

## 2 製法

### 2.1 製造用株

#### 2.1.1 名称

豚パルボウイルス 90HS 株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.2 性状

豚腎初代又は継代細胞で増殖し、モルモット及び鶏の赤血球を凝集する。

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

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

豚腎株化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、特定の番号又は製造番号を付し、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の培養液で増殖する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して-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培養細胞とみなす。ウイルス接種前の培養細胞に異常を認めてはならない。

### 2.3.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.1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、3.3の試験を行う。

### 2.3.3 不活化

ウイルス浮遊液にホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加えて不活化し、不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.4の試験を行う。

### 2.3.4 原液

不活化ウイルス液を混合し、原液とする。

原液について、3.5の試験を行う。

## 2.4 最終バルク

原液を混合し、最終バルクとする。

この場合、適当と認められた保存剤を加えてもよい。

## 2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。

小分製品について、3.6の試験を行う。

## 3 試験法

### 3.1 製造用株の試験

#### 3.1.1 マスターシードウイルスの試験

##### 3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.3.1.1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

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

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.1 及び 3.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.1.4.2.2 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 1.1、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。

#### 3.1.2 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

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 ウイルス浮遊液の試験

#### 3.3.1 ウイルス含有量試験

##### 3.3.1.1 試験材料

###### 3.3.1.1.1 試料

検体を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。

###### 3.3.1.1.2 培養細胞

豚腎初代若しくは継代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。

###### 3.3.1.2 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 0.5mL を加え、37℃で 10 日間培養した後、ペロナル緩衝食塩液（付記 2）又はリン酸緩衝食塩液（以下この項において「PBS」という。）（付記 3）で濃度を調整した 0.5vol % の非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、室温で 60 分間静置した後、赤血球凝集の有無を観察する。

###### 3.3.1.3 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<sup>5.0</sup>TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

### 3.4 不活化ウイルス液の試験

#### 3.4.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.4.2 不活化試験

##### 3.4.2.1 試験材料

###### 3.4.2.1.1 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。

###### 3.4.2.1.2 培養細胞

豚腎初代又は継代細胞を培養瓶で培養し、単層となったものを用いる。

###### 3.4.2.2 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、37℃で 60 分間静置吸着させる。試

料を抜き取り、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で10日間培養した後、培養上清に3.3.1.2の赤血球浮遊液を等量加え、室温で60分間静置した後、赤血球凝集の有無を観察する。

#### 3.4.2.3 判定

赤血球の凝集を認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

### 3.5 原液の試験

#### 3.5.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.6 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 ホルマリン定量試験

ホルマリン添加剤については、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。

#### 3.6.5 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。

#### 3.6.6 力価試験

##### 3.6.6.1 試験材料

##### 3.6.6.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.6.6.1.2 試験動物

体重約300gのモルモットを用いる。

##### 3.6.6.1.3 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（付記4）を用いる。

##### 3.6.6.2 試験方法

注射材料2 mLずつを、5匹の試験動物の皮下に注射し、28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。

被検血清をペロナール緩衝食塩液又はPBSで5倍に希釈し、等量の25w/v%カオリン液を加え、室温で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、室温で15分間処理し、再度遠心し、上清を採取する。これをペロナール緩衝食塩液又は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3.3.1.2の赤血球浮遊液を加え、室温で60分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

##### 3.6.6.3 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80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。

## 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
牛血清アルブミン	1.1 g
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。

付記2 ベロナール緩衝食塩液 (pH7.0)

1,000mL 中

バルビタール	0.575 g
バルビタールナトリウム	0.375 g
塩化ナトリウム	8.5 g
水	残量

付記3 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
水	残量

塩酸でpHを6.8～7.2に調整する。

付記4 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つて、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）の部のマイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症（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。

## マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症（カルボキシビニルポリマーアジュバント加）不活化ワクチン（シード）

### 1 定義

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

### 2 製法

#### 2.1 製造用株

##### 2.1.1 名称

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ P-5722-3 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.2 性状

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ基準株に一致する生物学的性状を示す。

##### 2.1.3 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、適当と認められた液状培地で増殖させ、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-20^{\circ}\text{C}$ 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、適当と認められた液状培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結して $-20^{\circ}\text{C}$ 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、適当と認められた液状培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して $-20^{\circ}\text{C}$ 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 培地

製造に適当と認められた液状培地を用いる。

### 2.3 原液

#### 2.3.1 培養

プロダクションシード菌を培地に接種して増菌・継代培養後、更に培地に接種して培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2の試験を行う。

#### 2.3.2 不活化

培養菌液に適当と認められた不活化剤を加えて不活化した後に、適当と認められた方法で不活化剤を中和したものを原液とする。この場合、必要に応じて濃縮し、適当と認められた保存剤又は消

泡剤を添加してもよい。

原液について、3.3 の試験を行う。

## 2.4 最終バルク

原液を混合し、濃度調整したものに適量のアジュバントを加えたものを最終バルクとする。この場合、必要に応じて濃度調整し、適当と認められた保存剤等を添加してもよい。

## 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、3.4 の試験を行う。

## 3 試験法

### 3.1 製造用株の試験

#### 3.1.1 マスターシード菌の試験

##### 3.1.1.1 同定試験

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

##### 3.1.1.2 夾雑菌否定試験

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

#### 3.1.2 ワーキングシード菌の試験

##### 3.1.2.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.1.3 プロダクションシード菌の試験

##### 3.1.3.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.2 培養菌液の試験

#### 3.2.1 染色試験

##### 3.2.1.1 試験材料

検体を用いる。

##### 3.2.1.2 試験方法

検体 0.01mL 以上をスライドガラス上に塗抹し、乾燥・固定した後にグラム染色して標本を作成する。標本は、約 1,000 倍に拡大して 1 視野以上を鏡検する。

##### 3.2.1.3 判定

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ様菌(球状又は球桿状から短桿状の菌)以外の菌を検出してはならない。

#### 3.2.2 抗原量定量試験

##### 3.2.2.1 試験材料

##### 3.2.2.1.1 試料

検体 1.5mL を 12,000G 以上で 10 分間遠心し、上清を完全に除去した後、菌体を TNES 液 (付記 1) 0.12mL に再浮遊させたものを試料とする。

##### 3.2.2.2 試験方法

試料 0.01mL に適量の 0.04w/v % Hoechst 色素又はこれと同等の Hoechst 色素溶液を加えて混合し、蛍光量計で試料中の総 DNA 量 (ng) を測定した後、検体 1 mL 当たりの抗原量を DNA 量 (ng/mL) 又は *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA Cell equivalents (MHDCE) (付記 2) として以下の計算式により算出する。

検体 1 mL 中の MHDCE = DNA 量 (ng/mL)  $\times 1.25 \times 10^6$

##### 3.2.2.3 判定

検体 1 mL 中の抗原量は、所定の値でなければならない。

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

#### 3.3.2 抗原量定量試験

3.3.2.1 又は 3.3.2.2 の試験を行う。

##### 3.3.2.1 抗原量定量試験 1

3.2.2 を準用して試験するとき、検体 1 mL 中の抗原量は、所定の値でなければならない。

##### 3.3.2.2 抗原量定量試験 2

###### 3.3.2.2.1 試験材料

###### 3.3.2.2.1.1 試料

原液及び参照ワクチン 1 (付記 3) を凍結融解したものを試料とする。

###### 3.3.2.2.2 試験方法

捕捉抗体吸着プレート (付記 4) にブロッキング液 (付記 5) を 100  $\mu$ L ずつ加え、試料を各々 3 穴に 100  $\mu$ L ずつ加えてプレート上で 2 倍階段希釈する。また、陽性対照抗原 (付記 6) 及び陰性対照抗原 (付記 7) をいずれも凍結融解した後、プレートの 4 穴ずつに 100  $\mu$ L ずつ加え、プレート上で 2 倍希釈する。35 ~ 39  $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、洗浄液 (付記 8) で 3 回洗浄する。マウス抗マイコプラズマ・ハイオニューモニエモノクローナル抗体 (付記 9) をブランクを除く各穴に 100  $\mu$ L ずつ、ブランクにはブロッキング液を 100  $\mu$ L ずつ加え、35 ~ 39  $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、洗浄液で 3 回洗浄する。標識抗体 1 (付記 10) をブランクを除く各穴に 100  $\mu$ L ずつ、ブランクにはブロッキング液を 100  $\mu$ L ずつ加え、35 ~ 39  $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、洗浄液で 3 回洗浄する。基質液 1 (付記 11) を各穴に 100  $\mu$ L ずつ加え、10 分間反応させた後、各穴に 1 mol/L 塩酸を 100  $\mu$ L ずつ加えて反応を停止させ、波長 450nm で吸光度を測定する。

###### 3.3.2.2.3 判定

参照ワクチン 1 の抗原量を 1.0 とし、適当と認められた統計学的計算方法により原液中の抗原相対力価を算出するとき、相対力価は 1.25 以上でなければならない。また、陽性対照抗原の吸光度値は 0.542 ~ 1.578 を示さなければならない、陰性対照抗原の吸光度値は 0.081 以下でなければならない。

#### 3.3.3 不活化試験

3.3.3.1 又は 3.3.3.2 の試験を行う。

##### 3.3.3.1 不活化試験 1

###### 3.3.3.1.1 試験材料

###### 3.3.3.1.1.1 試料

検体を試料とする。

###### 3.3.3.1.1.2 培地

製造用培地を用いる。

###### 3.3.3.1.2 試験方法

試料 0.5mL を培地 4.5mL に接種し、これを更に培地で 10 倍階段希釈する。陰性対照は、培地のみとする。各段階の希釈液及び陰性対照を 35 ~ 37  $^{\circ}$ C で 14 日間培養した後、継代して同様に 7 日間培養する。

###### 3.3.3.1.3 判定

いずれの培養液にも、菌の発育による pH の低下を認めてはならない。

##### 3.3.3.2 不活化試験 2

###### 3.3.3.2.1 試験材料

###### 3.3.3.2.1.1 試料

検体を試料とする。

### 3.3.3.2.1.2 培地

フェノールレッドを含有する液状の製造用培地を用いる。

### 3.3.3.2.2 試験方法

試料 1mL を培地 10mL に接種し、35～39℃で7日間培養する。接種後7日目に継代し、更に35～39℃で7日間培養し、培地の色の変化を観察する。また、不活化前の培養液及び不活化前の培養液に試料を加えたものを陽性対照とし、培地のみを陰性対照として同様に培養する。なお、陽性対照については、接種7日目に培地の色が変化した場合には、継代培養を行わない。

### 3.3.3.2.3 判定

試料を接種した培養液及び陰性対照は、培地の色の変化を認めてはならず、陽性対照は、培地の色が黄変しなければならぬ。

## 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ぬ。

### 3.4.2 pH 測定試験

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

### 3.4.3 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ぬ。

### 3.4.4 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ぬ。

### 3.4.5 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が 0.125vol % 以下でなければならぬ。

### 3.4.6 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ぬ。ただし、注射量は、0.3mL とする。また、3.4.7 の試験を行うときは、本試験は実施しなくてもよい。

### 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

3～5週齢の豚を用いる。

##### 3.4.7.2 試験方法

注射材料 2頭分ずつを2頭の豚の頸部筋肉内に注射する。更に2週間後に1頭分ずつを反対側の頸部筋肉内に注射し、2週間臨床観察する。また、初回注射前及び観察期間終了時に体重を測定する。

##### 3.4.7.3 判定

観察終了時の体重は初回注射前の体重と同等以上でなければならぬ。また、観察期間中、試験動物に臨床的な異常を認めてはならない。

### 3.4.8 力価試験

3.4.8.1 又は 3.4.8.2 の試験を行う。

#### 3.4.8.1 力価試験 1

##### 3.4.8.1.1 試験材料

##### 3.4.8.1.1.1 注射材料

試験品及び参照ワクチン 2 (付記 12) を注射材料とする。

#### 3.4.8.1.1.2 試験動物

6～7 週齢の ICR 系雌マウスを用いる。

#### 3.4.8.1.1.3 酵素抗体反応 (以下この項において「ELISA」という。) 用抗原 固相化抗原 1 (付記 13) を用いる。

#### 3.4.8.1.2 試験方法

試験動物の 40 匹を試験群、10 匹を対照群とする。

試験群を 1 群 20 匹の 2 群に分け、1 群 (以下この項において「試験品群」という。) には試験品を、他の 1 群 (以下この項において「参照ワクチン群」という。) には参照ワクチン 2 をそれぞれ 0.2mL ずつ皮下に注射する。注射後 2 週目に、試験品群、参照ワクチン群及び対照群から得られた各個体の血清について、ELISA を行う。

試験品群、参照ワクチン群及び対照群の血清を希釈液 (付記 14) で 40 倍に希釈したものを抗原吸着プレート 1 (付記 15) の 2 穴ずつに 100  $\mu$  L ずつ加え、希釈液のみの穴を血清対照とする。また、指示陽性血清 (付記 16) を希釈液で 40 倍に希釈したものを抗原吸着プレート 1 の 4 穴に 100  $\mu$  L ずつ加える。1 時間反応させた後、希釈液で 3 回洗浄する。次に、各穴に標識抗体 2 (付記 17) を 100  $\mu$  L ずつ加え、30 分間反応させた後、希釈液で 4 回洗浄する。基質液 2 (付記 18) を各穴に 100  $\mu$  L ずつ加えて反応させ、主波長 405nm、副波長 450nm で吸光度を測定する。各被検血清の吸光度から血清対照の平均吸光度を引いた値を各被検血清の吸光度値として平均吸光度値を算出するとき、指示陽性血清の平均吸光度値が 0.85 ～ 1.05 となった時点を反応終了とし、全ての穴の吸光度を測定し、試験品群、参照ワクチン群及び対照群の平均吸光度値を算出する。

#### 3.4.8.1.3 判定

試験品群の血清の平均吸光度値は、参照ワクチン群の血清のそれと同値以上を示すか、試験品群の血清の平均吸光度値が参照ワクチン群の血清のそれを下回った場合には、両者に有意差があってはならない (片側 t 検定、 $P < 0.05$ )。この場合、参照ワクチン群と対照群の血清の平均吸光度値の差は、0.4 以上でなければならず、かつ、対照群の血清の平均吸光度値は、0.1 未満でなければならない。

#### 3.4.8.2 力価試験 2

##### 3.4.8.2.1 試験材料

##### 3.4.8.2.1.1 注射材料

試験品をワクチン注射液 (付記 19) で 90 倍に希釈した後、更に生理食塩液で 2 倍に希釈したものを注射材料とする。

##### 3.4.8.2.1.2 試験動物

6～7 週齢の SPF の ddY 系雌マウスを用いる。

##### 3.4.8.2.1.3 ELISA 用抗原

固相化抗原 2 (付記 20) を用いる。

##### 3.4.8.2.2 試験方法

試験動物の 20 匹を試験群、10 匹を対照群とする。

注射材料 0.1mL ずつを試験群の腹部皮下に注射する。注射後 3 週目に、試験品群及び対照群から得られた各個体の血清について、ELISA を行う。

試験品群と対照群の血清及び参照陽性血清 (付記 21) をブロッキング液で 10 倍に希釈したものを、更に同液で 2 倍階段希釈する。これらの血清希釈液を抗原吸着プレート 2 (付記 22) の穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、ブロッキング液のみの穴を血清対照とする。37  $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、洗浄液で 3 回洗浄する。次に、各穴に標識抗体 3 (付記 23) を 100  $\mu$  L ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、洗浄液で 3 回洗浄する。その後、基質液 1 を各穴に 100  $\mu$  L ずつ加えて 10 分間反応させた後、各穴に 1 mol/L 塩酸を 100  $\mu$  L ずつ加えて反応を停止させ、波長 450nm で吸光度を測定す

る。

#### 3.4.8.2.3 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 320 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全て 20 倍以下でなければならない。また、参照陽性血清は、抗体価 320 ~ 640 倍でなければならない。

#### 4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後 2 年 9 か月間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その期間とする。

#### 付記 1 TNES 液

以下の組成のもの又は動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

100mL 中

トリス	1.21 g
エデト酸ナトリウム	0.37 g
塩化ナトリウム	5.84 g
ドデシル硫酸ナトリウム	0.1 g
水	残量

pH を 7.4 に調整する。

#### 付記 2 MHDCE (*Mycoplasma hyopneumoniae* DNA cell equivalents)

*M. hyopneumoniae* 培養菌液から抽出した DNA の量を測定し、菌 1 個当たりの DNA 量である  $8 \times 10^{-7}$  ng で除して菌量を算出するもので、DNA 換算菌量を示す。この場合、1 ng の DNA 量は、菌  $1.25 \times 10^6$  個に相当する。

#### 付記 3 参照ワクチン 1

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ製造用株又はこれと同等の免疫原性を有する株の培養菌液を不活化し、カルボキシビニルポリマーアジュバントを添加したワクチンであり、豚における攻撃試験において有効性が確認されたものであって、動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

#### 付記 4 捕捉抗体吸着プレート

抗マイコプラズマ・ハイオニューモニエ抗体 (付記 24) をトリス緩衝食塩液 (付記 25) で適当と考えられる濃度に希釈し、96 穴 ELISA プレートに 100  $\mu$  L ずつ加える。なお、プレートの両端各 1 列は、ブランクとし、トリス緩衝食塩液を 100  $\mu$  L ずつ加える。35 ~ 39 °C で 1 時間反応させ、洗浄液で 3 回洗浄する。その後、ブロッキング液を各穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、2 ~ 8 °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 5 ブロッキング液

1,000mL 中

スキムミルク	50 g
洗浄液	残量

必要に応じ、200mm 以下のフィルターでろ過滅菌する。

#### 付記 6 陽性対照抗原

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ製造用株又はこれと同等の免疫原性を有する株の培養菌液を不活化し、カルボキシビニルポリマーアジュバントを添加し、3.3.2.2.2 の ELISA における吸光度値が適当な値となるように生理食塩液で濃度を調整したもの。

付記 7 陰性対照抗原

製造用培地にカルボキシビニルポリマーアジュバントを添加したもの。

付記 8 洗浄液

1,000mL 中

ポリソルベート 20

0.5 mL

トリス緩衝食塩液

残量

pH を 7.2 ~ 7.4 に調整する。

付記 9 マウス抗マイコプラズマ・ハイオニューモニエモノクローナル抗体

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ p44 抗原に対するマウス由来のモノクローナル抗体で、ブロッキング液で適当な希釈倍率に希釈したもの。

付記 10 標識抗体 1

ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体を標識抗体 1 希釈液 (付記 26) で至適濃度に希釈したもの。

付記 11 基質液 1

液中に 3,3', 5,5'テトラメチルベンチジン (TMB) 及び過酸化水素を含むもの。

付記 12 参照ワクチン 2

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ製造用株又はこれと同等の免疫原性を有する株の培養菌液を不活化し、カルボキシビニルポリマーアジュバントを添加したワクチンであり、1 mL 中に最小有効抗原量である約  $1 \times 10^9$  MHDCE が含有されるように濃度を調整する。動物医薬品検査所が適当と認めたものを参照ワクチンとして用いる。

付記 13 固相化抗原 1

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ製造用株又はこれと同等の免疫原性を有する株の培養菌液を遠心集菌し、TNE 液 (付記 27) で菌体を洗浄する。洗浄菌体をたん白質濃度が 200  $\mu$ g/mL となるように調整し、1 mL ずつ分注して凍結乾燥する。

付記 14 希釈液

1,000mL 中

塩化ナトリウム

8.5 g

無水リン酸二水素ナトリウム

0.22 g

無水リン酸水素二ナトリウム

1.19 g

ポリソルベート 20

0.5 mL

水

残量

pH を 7.2 ~ 7.4 に調整する。

付記 15 抗原吸着プレート 1



固相化抗原 1 本を 10mL の抗原溶解液 (付記 28) で溶解した後、96 穴 ELISA プレートの各穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、36 ~ 38  $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、2 ~ 7  $^{\circ}$ C で 18 時間反応させ、希釈液で 3 回洗浄したもの。

付記 16 指示陽性血清

参照ワクチン 2 で免疫したマウスの血清であって、3.4.8.1.2 の試験により希釈液で 40 倍に希釈した後の平均吸光度値が 0.85 ~ 1.00 となるように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 17 標識抗体 2

ペルオキシダーゼ標識抗マウス 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 2

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

B : 0.02vol % 過酸化水素溶液

A 液と B 液を使用時に等量混合する。

付記 19 ワクチン注射液

0.5w/v % カルボキシビニルポリマー液 (付記 29) を生理食塩液で 5 倍に希釈したもの。

付記 20 固相化抗原 2

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ製造用株又はこれと同等の免疫原性を有する株の培養菌液を遠心集菌し、菌体を洗浄した後、超音波処理をしてたん白質濃度が 173  $\mu$  g/mL となるように濃度を調整した抗原。凍結して -50  $^{\circ}$ C 以下で保存する。

付記 21 参照陽性血清

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ製造用株又はこれと同等の免疫原性を有する株の培養菌液を不活化し、カルボキシビニルポリマーアジュバントを添加したワクチンで免疫したマウスの血清であって、3.4.8.2.2 の試験により抗体価が 320 ~ 640 倍となるように濃度を調整したもの。凍結して -50  $^{\circ}$ C 以下で保存する。

付記 22 抗原吸着プレート 2

固相化抗原 2 をトリス緩衝食塩液で 25 倍に希釈し、96 穴 ELISA プレートの各穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、洗浄液で 3 回洗浄する。その後、ブロッキング液を各穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、洗浄液で 3 回洗浄したもの。

付記 23 標識抗体 3

ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体をブロッキング液で至適濃度に希釈したもの。

付記 24 抗マイコプラズマ・ハイオニューモニエ兔抗体

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ製造用株で免疫して得た兔血清を ProteinG アフィニティクロマトグラフィーで精製した抗体。

付記 25 トリス緩衝食塩液

1,000mL 中

トリスヒドロキシメチルアミノメタン	2.42 g
塩化ナトリウム	8.77 g
水	残量

pHを7.2～7.4に調整する。

付記 26 標識抗体 1 希釈液  
1,000mL 中

トリスヒドロキシメチルアミノメタン	2.42 g
塩化ナトリウム	8.77 g
スキムミルク	50 g
ポリソルベート 20	0.5 mL
豚血清	50 mL
水	残量

pHを7.2～7.4に調整する。必要に応じ、200nm以下のフィルターでろ過滅菌する。

付記 27 TNE 液  
1,000mL 中

トリスヒドロキシメチルアミノメタン	3.94 g
エデト酸ナトリウム	3.72 g
塩化ナトリウム	14.6 g
水	残量

付記 28 抗原溶解液  
1,000mL 中

塩化ナトリウム	8.5 g
グリシン	0.75 g
水	残量

pHを9.5～9.7に調整する。

付記 29 0.5w/v %カルボキシビニルポリマー液  
1,000mL 中

カルボキシビニルポリマー	5 g
水	残量

pHを7.2～7.5に調整して、121℃で30分間高圧滅菌する。

ワクチン（シードロット製剤）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（シード）の項の次に次のように加える。

## 豚ボルデテラ感染症精製（アフィニティークロマトグラフィー部分精製）・豚パスツレラ症混合（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ボルデテラ・ブロンキセプチカの培養ろ液を牛赤血球膜結合セルロースカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーで部分精製し、得られたシアル酸結合型赤血球凝集素を凍結乾燥したワクチン（以下この項において「乾燥ワクチン」という。）と、同規格に適合したパスツレラ・ムルトシダの培養菌体を破砕し、遠心上清を不活化して油性アジュバントを添加したワクチン（以下この項において「液状不活化ワクチン」という。）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 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

###### 2.1.1.1 名称

ボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌 A19・KS 株又はこれと同等と認められた株

###### 2.1.1.2 性状

ボルデー・ジャング培地（付記1）上に隆起した小円形の集落を形成し、β溶血性を示す。また、K抗原を有し、既知のボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌の免疫血清によって特異的に凝集される。

生後7日齢以内の豚に点鼻接種すると、豚萎縮性鼻炎を起こす。生菌又は超音波処理菌をモルモットの皮内に注射すると、注射部位に出血及び壊死を起こす。

##### 2.1.1.3 マスターシード菌

###### 2.1.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、ボルデー・ジャング培地又は適当と認められた平板培地で増殖させ、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

マスターシード菌について、3.1.1の試験を行う。

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

##### 2.1.1.4 ワーキングシード菌

###### 2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、ボルデー・ジャング培地又は適当と認められた培地で増殖させる。

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

ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。

##### 2.1.1.5 プロダクションシード菌

###### 2.1.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、ボルデー・ジャング培地又は適当と認められた培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

## 2.1.2 パスツレラ・ムルトシダ

### 2.1.2.1 名称

パスツレラ・ムルトシダD型 202・KS 株又はこれと同等と認められた株

### 2.1.2.2 性状

培地上に半透明のスムーズな集落を形成し、溶血性を示さない。莢膜を保有する。培養菌体から調製した皮膚壊死毒素をモルモットの皮内に注射すると、注射部位に壊死を起こす。

### 2.1.2.3 マスターシード菌

#### 2.1.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、ペプシン消化羊血液加デキストロース・スターチ寒天培地（付記2）又は適当と認められた平板培地で継代する。

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。

### 2.1.2.4 ワーキングシード菌

#### 2.1.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、ペプシン消化羊血液加デキストロース・スターチ寒天培地又は適当と認められた平板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。

### 2.1.2.5 プロダクションシード菌

#### 2.1.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、ペプシン消化羊血液加デキストロース・スターチ寒天培地又は適当と認められた平板培地で増殖させる。

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 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

#### 2.2.1.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

### 2.2.2 パスツレラ・ムルトシダ

#### 2.2.2.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

## 2.3 原液

### 2.3.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ原液

#### 2.3.1.1 培養

平板培地で培養したプロダクションシード菌を液状培地に接種した後、更に液状培地で増菌培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2.1の試験を行う。

#### 2.3.1.2 原液

培養菌液を遠心分離し、得られた上清液をろ過後、牛赤血球膜結合セルロースカラム（付記3）を用いたアフィニティークロマトグラフィーで部分精製し、得られたシアル酸結合型赤血球凝集素

を脱塩・濃縮した後、ろ過滅菌したものを原液とする。

原液について、3.3.1の試験を行う。

## 2.3.2 パスツレラ・ムルトシダ原液

### 2.3.2.1 培養

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

培養菌液について、3.2.2の試験を行う。

### 2.3.2.2 原液

培養菌液を遠心分離し、得られた菌体をリン酸緩衝食塩液（以下この項において「PBS」という。）に浮遊して凍結融解する。物理的処理により菌体を破碎後遠心分離し、得られた遠心上清をろ過し、たん白量を測定する。ホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加えて不活化した後、PBSで濃度調整したものを原液とする。

原液について、3.3.2の試験を行う。

## 2.4 最終バルク

### 2.4.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカバルク

ボルデテラ・ブロンキセプチカ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。

### 2.4.2 パスツレラ・ムルトシダバルク

パスツレラ・ムルトシダ原液に適当と認められた油性アジュバントを加えたものを最終バルクとする。

## 2.5 小分製品

### 2.5.1 乾燥ワクチン

ボルデテラ・ブロンキセプチカの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。

### 2.5.2 液状不活化ワクチン

パスツレラ・ムルトシダの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、3.4の試験を行う。

## 3 試験法

### 3.1 製造用株の試験

#### 3.1.1 マスターシード菌の試験

##### 3.1.1.1 同定試験

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

##### 3.1.1.2 夾雑菌否定試験

###### 3.1.1.2.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、ボルデテラ・ブロンキセプチカ以外の菌の発育を認めてはならない。

###### 3.1.1.2.2 パスツレラ・ムルトシダ

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、パスツレラ・ムルトシダ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 培養菌液の試験

### 3.2.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

#### 3.2.1.1 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。

#### 3.2.1.2 赤血球凝集（以下この項において「HA」という。）価測定試験

##### 3.2.1.2.1 試験材料

検体を遠心し、得られた上清を試料とする。

##### 3.2.1.2.2 試験方法

96穴U底又はV底プレートを用い、試料25 $\mu$ LをPBSで2倍階段希釈する。各段階の希釈液に0.5vol%グルタルアルデヒド固定牛赤血球浮遊液（付記4）25 $\mu$ Lずつを加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間反応させ、更に2～5 $^{\circ}$ Cで1夜静置した後、赤血球の凝集の有無を観察する。

##### 3.2.1.2.3 判定

赤血球の凝集を認めた試料の最高希釈倍数をHA価とする。

検体の遠心上清のHA価は、8倍以上でなければならない。

### 3.2.2 パスツレラ・ムルトシダ

#### 3.2.2.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

## 3.3 原液の試験

### 3.3.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ原液

#### 3.3.1.1 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。

#### 3.3.1.2 生菌否定試験

##### 3.3.1.2.1 試験材料

##### 3.3.1.2.1.1 試料

検体を接種材料とする。

##### 3.3.1.2.1.2 培地

ボルデー・ジャング培地又は適当と認められた培地を用いる。

##### 3.3.1.2.2 試験方法

検体0.1mLずつを平板培地2枚以上にそれぞれ塗抹接種し、37 $^{\circ}$ Cで48時間培養する。

##### 3.3.1.2.3 判定

菌の発育を認めてはならない。

#### 3.3.1.3 HA価測定試験

##### 3.3.1.3.1 試験材料

検体を用いる。

##### 3.3.1.3.2 試験方法

3.2.1.2を準用して試験を行う。

##### 3.3.1.3.3 判定

検体のHA価は、5頭分及び10頭分の小分製品の原液では128倍以上、20頭分の小分製品の原液では256倍以上でなければならない。

#### 3.3.1.4 無毒化試験

##### 3.3.1.4.1 試験材料

##### 3.3.1.4.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

##### 3.3.1.4.1.2 試験動物

体重約350gのモルモットを用いる。

#### 3.3.1.4.2 試験方法

注射材料 0.1mL ずつを試験動物 2 匹の背部皮内に注射し、7 日間観察する。

#### 3.3.1.4.3 判定

注射反応は、無視し得る程度以下でなければならず、試験動物は、全て生存しなければならない。

### 3.3.2 パスツレラ・ムルトシダ原液

#### 3.3.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.3.2.2 生菌否定試験

##### 3.3.2.2.1 試験材料

##### 3.3.2.2.1.1 試料

検体を接種材料とする。

##### 3.3.2.2.1.2 培地

ペプシン消化羊血液添加デキストロース・スターチ培地又は適当と認められた培地を用いる。

##### 3.3.2.2.2 試験方法

検体 0.1mL ずつを平板培地 2 枚以上にそれぞれ塗抹接種し、37℃で 18 時間培養する。

##### 3.3.2.2.3 判定

菌の発育を認めてはならない。

#### 3.3.2.3 無毒化試験

3.3.1.4 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.3.2.4 たん白量測定試験

##### 3.3.2.4.1 試験材料

不活化前の遠心上清ろ過液を試料とする。

##### 3.3.2.4.2 試験方法

Brandford 色素結合法又は適当と認められた方法により、たん白量を測定する。

##### 3.3.2.4.3 判定

試料 1 mL 中のたん白量は、1.0mg 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、乾燥ワクチンは、固有の色調を有する乾燥物でなければならず、異物及び異臭を認めてはならない。液状不活化ワクチンは、固有の色調を有する懸濁液でなければならず、異物及び異臭を認めてはならない。乾燥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。

また、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、乾燥ワクチンは、これに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、乾燥ワクチンは、これに適合しなければならない。

#### 3.4.4 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。

#### 3.4.5 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、乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンで溶解し

たものは、これに適合しなければならない。

#### 3.4.6 ホルマリン定量試験

適当と認められた方法で液状不活化ワクチン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、0.25vol %以下でなければならない。

#### 3.4.7 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、液状不活化ワクチンは、これに適合しなければならない。

#### 3.4.8 無毒化試験

##### 3.4.8.1 試験材料

###### 3.4.8.1.1 注射材料

乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンで溶解した試験品を注射材料とする。

###### 3.4.8.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

##### 3.4.8.2 試験方法

注射材料 0.1mL ずつを試験動物 2 匹の背部皮内に注射し、7 日間観察する。

##### 3.4.8.3 判定

注射反応は、無視し得る程度以下でなければならない。試験動物は、全て生存しなければならない。

#### 3.4.9 安全試験

##### 3.4.9.1 試験材料

###### 3.4.9.1.1 注射材料

乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンで溶解した試験品を注射材料とする。

###### 3.4.9.1.2 試験動物

体重 10 ~ 30kg の豚を用いる。

##### 3.4.9.2 試験方法

試験動物の 2 頭を試験群、1 頭を対照群とする。

試験群の 2 頭に注射材料 1 mL をそれぞれ筋肉内に 2 週間隔で 2 回注射し、対照群と共に、第 2 回目注射後 2 週間まで観察する。

##### 3.4.9.3 判定

観察期間中、試験動物に臨床的な異常を認めてはならない。注射により一過性の発熱を認めても 3 日以内に回復しなければならず、注射反応は、無視し得る程度以下でなければならない。

#### 3.4.10 力価試験

##### 3.4.10.1 豚ボルデテラ感染症力価試験

###### 3.4.10.1.1 試験材料

###### 3.4.10.1.1.1 試験動物

3.4.9 の試験に用いた動物を用いる。

###### 3.4.10.1.1.2 赤血球凝集抗原

ボルデテラ・ブロンキセプチカ HA 抗原 (付記 5) を用いる。

###### 3.4.10.1.2 試験方法

3.4.9 の試験終了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、マイクロタイター法で赤血球凝集抑制 (以下この項において「HI」という。) 試験を行う。

血清 1 容に 25w/v %カオリン加 PBS 2 容及び PBS 1 容を加え、30 分間処理した後、遠心上清を採取する (4 倍希釈血清)。96 穴 V 底プレートを用いて、4 倍希釈血清 25  $\mu$  L を PBS 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 25  $\mu$  L ずつ加えて、4  $^{\circ}$ C で 1 夜静置する。これに 0.5vol % グルタルアルデヒド固定牛赤血球浮遊液 (付記 4) を 50  $\mu$  L ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で 2 時間反応させ、更に 4  $^{\circ}$ C で 1 夜静置した後、赤血球の凝集の有無を観察する。



### 3.4.10.1.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数を HI 抗体価とする。

試験群の HI 抗体価は、全て 8 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。

### 3.4.10.2 豚パスツレラ症力価試験

#### 3.4.10.2.1 試験材料

##### 3.4.10.2.1.1 注射材料

乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンで溶解した試験品を注射材料とする。

##### 3.4.10.2.1.2 試験動物

約 5 週齢のマウスを用いる。

##### 3.4.10.2.1.3 攻撃用菌液

パスツレラ・ムルトシダ 202・KS 株又はこれと同等の毒力を有する株をペプシン消化羊血液加デキストロース・スターチ寒天培地に接種し、37 °C で 18 時間培養した後、10w/v % スキムミルクに集菌し、小分けして、- 70 °C 以下に保存する。攻撃時に融解し、 $10^{7.6} \sim 10^{8.0}$  CFU/mL となるように濃度を調整したものを攻撃用菌株とする。

##### 3.4.10.2.2 試験方法

試験動物の 10 匹を試験群、10 匹を対照群とする。

注射材料 0.1mL ずつを 2 週間隔で 2 回、試験群の腹腔内に注射する。2 回目注射後 2 週目に攻撃用菌液 0.1mL ずつを試験群及び対照群の腹腔内に注射して攻撃した後、7 日間観察する。

##### 3.4.10.2.3 判定

試験群では、70 % 以上が耐過生存しなければならない。この場合、対照群では、70 % 以上が死亡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 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。

### 5 その他

#### 5.1 添付文書記載事項

と畜場出荷前の所定の期間は使用しない旨

#### 付記 1 ボルデー・ジャング培地

1,000mL 中

ボルデー・ジャング・アガーベース 30 g

グリセリン 10 g

水 残量

加温溶解した後、121 °C で 15 分間高压滅菌する。

約 50 °C に冷却した後、牛脱線維血液を 5 vol % となるように添加する。

#### 付記 2 ペプシン消化羊血液加デキストロース・スターチ寒天培地

1,000mL

プロテオース・ペプトン No.3 15 g

デキストロース 2 g

可溶性デンプン 10 g

塩化ナトリウム 3 g

リン酸水素二ナトリウム 3 g

ゼラチン 20 g

寒天

10 g

水

残量

加温溶解した後、121℃で15分間高圧滅菌する。

約50℃に冷却した後、ペプシン消化羊血液を5 vol %となるように添加する。

付記3 牛赤血球膜結合セルロースカラム

牛赤血球を酢酸処理した後、超音波破碎して得られた破碎血球膜を臭化シアン-セルロースゲルに吸着させて調製し、カラムに充填したもの。

付記4 0.5%グルタルアルデヒド固定牛赤血球

牛赤血球をグルタルアルデヒドで固定した後、10vol %赤血球液となるように濃度を調整したもので、使用時に、0.01w/v %ゼラチン加PBSで0.5vol %赤血球液となるように希釈する。

付記5 ボルデテラ・ブロンキセプチカ HA 抗原

牛赤血球に対して強い凝集活性を有するボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌の培養ろ液を、牛赤血球膜結合セルロースカラムを用いたアフィニティークロマト法により精製し、得られた牛赤血球凝集素の赤血球凝集価が約32単位になるように濃度を調整したもの。

# 豚ボルデテラ感染症精製・豚パスツレラ症混合（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ボルデテラ・ブロンキセプチカの培養上清を濃縮し、部分精製したもの及び同規格に適合したパスツレラ・ムルトシダの培養上清を濃縮し、遠心して得られた上清を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 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

##### 2.1.1.1 名称

ボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌 GCK-1 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.1.2 性状

ボルデー・ジャング培地上に隆起した小円形の集落を形成し、 $\beta$  溶血性を示す。また、K 抗原を有し、既知のボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌の免疫血清によって特異的に凝集される。

生後 7 日齢以内の豚に点鼻接種すると、豚萎縮性鼻炎を起こす。生菌又は超音波処理菌をモルモットの皮内に注射すると、注射部位に出血及び壊死を起こす。

##### 2.1.1.3 マスターシード菌

###### 2.1.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、ボルデー・ジャング培地（付記 1）又は適当と認められた平板培地で増殖させ、保存用の容器に分注する。

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

マスターシード菌について、3.1.1.1 及び 3.1.1.2 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。

##### 2.1.1.4 ワーキングシード菌

###### 2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、ボルデー・ジャング培地又は適当と認められた平板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、3.1.2.1 の試験を行う。

##### 2.1.1.5 プロダクションシード菌

###### 2.1.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、ボルデー・ジャング培地又は適当と認められた平板培地で増殖させる。

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、3.1.3.1 の試験を行う。

#### 2.1.2 パスツレラ・ムルトシダ

##### 2.1.2.1 名称

パスツレラ・ムルトシダ B-45 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.2.2 性状

鶏血清加ハートインフュージョン寒天培地上に粘稠性のある円形の集落を形成する。

生菌を鼻粘膜に酢酸を前処理した約3週齢の豚に点鼻接種すると、豚萎縮性鼻炎を起こす。  
生後7日以内の豚に点鼻接種すると、鼻甲介萎縮を起こす。

#### 2.1.2.3 マスターシード菌

##### 2.1.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、適当と認められた平板培地で増殖させ、保存用の容器に分注する。

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

マスターシード菌について、3.1.1.1及び3.1.1.2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。

#### 2.1.2.4 ワーキングシード菌

##### 2.1.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、適当と認められた平板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、3.1.2.1の試験を行う。

#### 2.1.2.5 プロダクションシード菌

##### 2.1.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、適当と認められた平板培地で増殖させる。

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、3.1.3.1の試験を行う。

## 2.2 製造用材料

### 2.2.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

製造に適当と認められた培地を用いる。

### 2.2.2 パスツレラ・ムルトシダ

製造に適当と認められた培地を用いる。

## 2.3 原液

### 2.3.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

#### 2.3.1.1 培養

平板培地で培養したプロダクションシード菌を液状培地に接種し、増菌培養したものを、更に液状培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2.1、3.2.2及び3.2.3の試験を行う。

#### 2.3.1.2 原液（部分精製）

培養菌液を遠心分離して得られた上清液を濃縮し、濃縮抗原液とする。濃縮抗原液からショ糖密度勾配により抗原画分を取り出し、ゲルろ過して抗原成分を採取し、適当と認められた保存剤を添加したものを原液とする。

原液について、3.4.1の試験を行う。

### 2.3.2 パスツレラ・ムルトシダ

#### 2.3.2.1 培養

平板培地で培養したプロダクションシード菌を液状培地に接種し、増菌培養したものを、更に液状培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2.1及び3.2.4の試験を行う。

#### 2.3.2.2 抗原液

培養菌液を遠心分離して得られた上清液を濃縮した後、更に遠心分離して得られた上清を抗原液

とする。

抗原液について、3.3の試験を行う。

#### 2.3.2.3 不活化

抗原液にホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加えて不活化したものを原液とする。

原液について、3.4.2の試験を行う。

#### 2.4 最終バルク

ボルデテラ・ブロンキセプチカ原液とパスツレラ・ムルトシダ原液を混合し、適当と認められた希釈液で濃度調整した後、適当と認められた油性アジュバントを加えたものを最終バルクとする。

#### 2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。

小分製品について、3.5の試験を行う。

### 3 試験法

#### 3.1 製造用株の試験

##### 3.1.1 マスターシード菌の試験

###### 3.1.1.1 同定試験

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

###### 3.1.1.2 夾雑菌否定試験

###### 3.1.1.2.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、ボルデテラ・ブロンキセプチカ以外の菌の発育を認めてはならない。

###### 3.1.1.2.2 パスツレラ・ムルトシダ

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、パスツレラ・ムルトシダ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

3.1.1.2.1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 プロダクションシード菌の試験

###### 3.1.3.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2 培養菌液の試験

##### 3.2.1 夾雑菌否定試験

###### 3.2.1.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

一般試験法の無菌試験法1を準用して試験するとき、ボルデテラ・ブロンキセプチカ以外の菌の発育を認めてはならない。

###### 3.2.1.2 パスツレラ・ムルトシダ

一般試験法の無菌試験法1を準用して試験するとき、パスツレラ・ムルトシダ以外の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

###### 3.2.2.1.1 試料

検体を生理食塩液で10倍希釈したものを試料とする。

###### 3.2.2.1.2 グルタルアルデヒド固定赤血球液

牛赤血球をグルタルアルデヒドで固定後、リン酸緩衝食塩液（以下この項において「PBS」という。）で赤血球数が1 mL中 $1 \times 10^8$ 個となるように濃度を調整したものをを用いる。

### 3.2.2.2 試験方法

試料とグルタールアルデヒド固定赤血球液とを等量混合後、この混合液の塗抹標本を作成し、固定後ギムザ染色したものを鏡検する。数視野にわたって、少なくとも 500 個の赤血球を計測した際の菌数を測定し、赤血球数と菌数との比率を算出する。混合液 1 mL 中の赤血球数、赤血球数と菌数との比率及び検体の希釈倍率から総菌数を算出する。

### 3.2.2.3 判定

検体の総菌数は、1 mL 中  $2 \times 10^{10}$  個以上でなければならない。

### 3.2.3 赤血球凝集（以下この項において「HA」という。）活性測定試験

#### 3.2.3.1 試験材料

##### 3.2.3.1.1 試料

検体 10mL を遠心分離して得た菌体を、10mL の生理食塩液に再浮遊させたものを試料とする。

##### 3.2.3.1.2 2 vol % 牛赤血球浮遊液

健康な成牛からヘパリンで凝固阻止して採取した赤血球で、ボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌に強く凝集する性状を示す赤血球を、適当と認められた希釈用液に 2 vol % の割合で浮遊させたものを用いる。

#### 3.2.3.2 試験方法

試料の 25  $\mu$  L と 2 vol % 牛赤血球浮遊液 25  $\mu$  L をスライドグラス上で混合し、HA 反応を行う。

#### 3.2.3.3 判定

牛赤血球を速やかに凝集しなければならない。

### 3.2.4 皮膚壊死毒素活性測定試験

#### 3.2.4.1 試験材料

##### 3.2.4.1.1 注射材料

検体を遠心して得た上清を生理食塩液で 2 倍階段希釈し、各段階の希釈液を注射材料とする。

##### 3.2.4.1.2 試験動物

体重約 500g のモルモットを用いる。

#### 3.2.4.2 試験方法

それぞれの注射材料 0.1mL を試験動物 1 匹ずつの背部皮内に注射し、2 日間観察する。

#### 3.2.4.3 判定

直径 1 cm 以上の皮膚壊死像を認めた注射材料の最高希釈倍数を皮膚壊死毒素活性価とする。

検体の皮膚壊死毒素活性価は、32 倍以上でなければならない。

### 3.3 抗原液の試験

#### 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 皮膚壊死毒素活性測定試験

3.2.4 を準用して試験するとき、検体の皮膚壊死毒素活性価は、1,024 倍以上でなければならない。

### 3.4 原液の試験

#### 3.4.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

##### 3.4.1.1 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。

##### 3.4.1.2 生菌否定試験

###### 3.4.1.2.1 試験材料

###### 3.4.1.2.1.1 試料

検体を試料とする。

###### 3.4.1.2.1.2 培地

ボルデー・ジャング培地又は適当と認められた培地を用いる。

#### 3.4.1.2.2 試験方法

検体 0.1mL ずつを培地 2 枚以上にそれぞれ塗抹接種し、37℃で 48 時間培養する。

#### 3.4.1.2.3 判定

ボルデテラ・ブロンキセプチカの発育を認めてはならない。

#### 3.4.1.3 HA 価測定試験

##### 3.4.1.3.1 試験材料

###### 3.4.1.3.1.1 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。

##### 3.4.1.3.2 試験方法

試料 0.5mL に 2 vol % 牛赤血球浮遊液 50  $\mu$  L を加えて振とう混合し、5 時間静置した後、判定する。

##### 3.4.1.3.3 判定

赤血球の凝集を認めた試料の最高希釈倍数を HA 価とする。

検体の HA 価は、1,024 倍以上でなければならない。

#### 3.4.1.4 皮膚壊死毒素活性否定試験

##### 3.4.1.4.1 試験材料

###### 3.4.1.4.1.1 注射材料

検体を HA 価が 1,024 倍となるように濃度を調整したものを注射材料とする。

###### 3.4.1.4.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

##### 3.4.1.4.2 試験方法

注射材料 0.1mL ずつを試験動物 3 匹の背部皮内に 4 点注射し、2 日間観察する。

##### 3.4.1.4.3 判定

全ての試験動物の注射部位に壊死病変を認めてはならない。

#### 3.4.1.5 たん白量測定試験

##### 3.4.1.5.1 試験材料

###### 3.4.1.5.1.1 試料

検体の HA 価が 1,024 倍となるように濃度を調整し、更に適当と認められた希釈用液で希釈したものを試料とする。

##### 3.4.1.5.2 試験方法

試料 0.1mL の吸光度を Lowry 法又は適当と認められた方法により測定する。

##### 3.4.1.5.3 判定

牛血清アルブミンを用いて作成した検量線より、試料のたん白量を算出する。

検体のたん白量は、1 mL 中 250 ~ 650  $\mu$  g の範囲でなければならない。

#### 3.4.1.6 異種たん白混入否定試験

##### 3.4.1.6.1 試験材料

###### 3.4.1.6.1.1 試料

検体を HA 価が 5.12 倍となるように適当と認められた希釈用液で濃度を調整したものを試料とする。

##### 3.4.1.6.2 試験方法

試料及び 1.2w/v % 寒天と抗牛全血清（ゲル内沈降反応で抗体価 32 倍以上）を用い、適当と認められた方法によりゲル内沈降反応を行う。

##### 3.4.1.6.3 判定

試料と抗牛全血清との間に沈降線の形成を認めてはならない。

#### 3.4.2 パスツレラ・ムルトシダ

##### 3.4.2.1 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。

##### 3.4.2.2 不活化試験

###### 3.4.2.2.1 試験材料

###### 3.5.2.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

###### 3.4.2.2.1.2 試験動物

体重約 500g のモルモットを用いる。

###### 3.4.2.2.2 試験方法

剃毛した試験動物 3 匹の背部皮内に、注射材料 0.1mL を 4 点注射し、7 日間観察する。

###### 3.4.2.2.3 判定

全ての試験動物の注射部位に壊死病変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、固有の色調を有する懸濁液でなければならず、異物及び異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

##### 3.5.2 pH 測定試験

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

##### 3.5.3 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.5.4 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、0.1vol % 以下でなければならない。

##### 3.5.5 安全試験

###### 3.5.5.1 試験材料

###### 3.5.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 3.5.5.1.2 試験動物

約 60 日齢の豚を用いる。

###### 3.5.5.2 試験方法

試験動物の 2 頭を試験群、1 頭を対照群とする。

試験群の 1 頭に注射材料 1 mL を、他の 1 頭に 3 mL をそれぞれ頸側部筋肉内に 3 週間隔で 2 回注射し、対照群と共に、第 2 回目注射後 3 週間まで観察する。

###### 3.5.5.3 判定

観察期間中、試験動物に臨床的な異常を認めてはならない。注射により一過性の発熱を認めても 3 日以内に回復しなければならず、注射局所に腫脹又は硬結を認めても体表から 2 cm 以上隆起してはならない。

##### 3.5.6 力価試験

###### 3.5.6.1 豚ボルデテラ感染症力価試験

###### 3.5.6.1.1 試験材料

###### 3.5.6.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。



#### 3.5.6.1.1.2 試験動物

、体重約 350g のモルモットを用いる。

#### 3.5.6.1.1.3 HA 抗原

ボルデテラ・ブロンキセプチカ HA 抗原（付記 2）を用いる。

#### 3.5.6.1.2 試験方法

試験動物の 10 匹を試験群、3 匹を対照群とする。

注射材料 0.1mL を 4 週間隔で 2 回、試験群の大腿部筋肉内に注射する。第 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を用いて、赤血球凝集抑制（以下この項において「HI」という。）試験を行う。

血清 1 容に RDE 3 容を加え、37℃で 18 時間感作した後、56℃で 30 分間加温して血清を非働化する。V 字型マイクロプレートを用いて血清 25  $\mu$  L を PBS で 2 倍階段希釈する。各希釈血清に 4 単位の HA 抗原 25  $\mu$  L を加えて振とうした後、20 分間静置する。更に 0.4vol % 牛赤血球浮遊液を 50  $\mu$  L ずつ加えて振とうした後、5 時間静置して赤血球凝集の有無を観察する。

#### 3.5.6.1.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数を HI 抗体価とする。

試験群では、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 8 倍未満でなければならない。

#### 3.5.6.2 豚パスツレラ症力価試験

##### 3.5.6.2.1 試験材料

###### 3.5.6.2.1.1 試験動物

3.5.6.1 の試験に用いた動物を用いる。

###### 3.5.6.2.1.2 酵素抗体反応（以下この項において「ELISA」という。）用抗原

パスツレラ・ムルトシダ皮膚壊死毒素（以下この項において「PMT」という。）抗原（付記 3）を用いる。

##### 3.5.6.2.2 試験方法

3.5.6.1 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、ELISA を行う。試験群及び対照群の各血清、参照陽性血清（付記 4）及び参照陰性血清（付記 5）を希釈・洗浄液（付記 6）で 2 段階希釈したものを、PMT 抗原吸着プレート（付記 7）の各穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、30℃で 1 時間感作する。希釈・洗浄液で洗浄した後、標識抗体（付記 8）を各穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、30℃で 30 分間感作する。希釈・洗浄液で洗浄した後、基質液（付記 9）を各穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、遮光して 30℃で 30 分間反応させる。停止液（付記 10）を各穴に 50  $\mu$  L ずつ加え、反応を停止させる。主波長 492nm と副波長 630nm の 2 波長で吸光度を測定し、これらの差を ELISA 値とする。

##### 3.5.6.2.3 判定

ELISA 値が 0.5 以上を示す血清の最高希釈倍数を抗 PMT 抗体価とする。

試験群では、抗 PMT 抗体価の幾何平均値が 32 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全て 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 2 年 3 が月間とする。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 添付文書記載事項

と畜場出荷前の所定の期間は使用しない旨

付記 1. ボルデー・ジャング培地

1,000mL 中

ボルデー・ジャング・アガーベース	30 g
グリセリン	10 g
水	残量

加温溶解後、121℃で15分間高圧滅菌する。約50℃に冷却した後、牛胎子血清を10vol%となるように添加する。

#### 付記2 ボルデテラ・ブロンキセプチカ HA 抗原

牛赤血球に対する凝集活性を有するボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌をボルデー・ジャング培地に接種して37℃で20時間培養し、発育した菌をPBSで3回遠心洗浄した後、50vol%グリセリン加PBSに浮遊させ、HA試験を行い、HA価が80～320倍になるように濃度を調整したもの。

#### 付記3 PMT 抗原

パスツレラ・ムルトシダ B-45 株の培養上清を限外ろ過により濃縮した後、ハイドロキシアパタイトカラムで分画し、ホルマリンで不活化して得られた皮膚壊死毒素活性を持つ抗原であって、B-45 株培養上清免疫モルモット血清を用いてウェスタンブロッティングを行うと、150kDa付近に単一のバンドを認め、たん白量を測定するとき、30～100 μg/mLを示すもの。

#### 付記4 参照陽性血清

パスツレラ・ムルトシダ B-45 株の培養上清濃縮液をモルモットに免疫して得られた血清であって、抗PMT抗体価32～128倍を示すもの。

#### 付記5 参照陰性血清

健康なモルモットから採血した血清で、抗PMT抗体価8倍未満を示すもの。

#### 付記6 希釈・洗浄液

1,000mL 中

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
塩化ナトリウム	8.0 g
塩化カリウム	0.2 g
ポリソルベート 20	0.5 mL
水	残量

pHを7.2～7.4に調整する。

#### 付記7 PMT 抗原吸着プレート

PMT 抗原を炭酸緩衝液（付記11）でたん白量0.005～0.01mg/mLに希釈し、ELISA用プレート（U字型）の各穴に100 μLずつ加え、4℃で18時間以上感作させた後、希釈・洗浄液で洗浄し、2 w/v%牛血清アルブミン溶液（付記12）を各穴に250 μLずつ加え、30℃で1時間感作した後、希釈・洗浄液で洗浄したもの。

#### 付記8 標識抗体

西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗モルモット IgG 抗体を希釈・洗浄液で希釈したもの。

付記9 基質液

o-フェニレンジアミン二塩酸塩 40mg をリン酸クエン酸緩衝液 (付記 13) 100mL に溶解し、遮光したものに、使用直前に過酸化水素 (30) を 0.04mL 添加したもの。

付記10 停止液

濃硫酸 56.1mL を正確に量り、水 440mL 中に攪はん冷却しながら溶解し、更に水を加えて 500mL としたもの。

付記11 炭酸緩衝液

1,000mL 中

炭酸ナトリウム	1.59 g
炭酸水素ナトリウム	2.93 g
水	残 量

pH を 9.6 に調整し、4℃に保存する。1 週間以内に使用する。

付記12 2 w/v %牛血清アルブミン溶液

牛血清アルブミン 2 g を希釈・洗浄液 100mL で使用直前に溶解したもの。

付記13 リン酸クエン酸緩衝液

1,000mL 中

無水クエン酸	4.67 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	19.95 g
水	残 量

pH を 5.0 に調整する。

ワクチン（シードロット製剤）の部の豚ボルデテラ感染症・豚パスツレラ症（全菌体・部分精製トキソイド）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。

## 豚コレラ・豚丹毒混合生ワクチン（シード）

### 1 定義

シードロット規格に適合した弱毒豚コレラウイルスを同規格に適合したモルモット腎初代細胞で増殖させて得たウイルス液及び同規格に適合した弱毒豚丹毒菌培養菌液を混合し、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 豚コレラウイルス

###### 2.1.1.1 名称

弱毒豚コレラウイルス GPE-株

###### 2.1.1.2 性状

豚精巢初代細胞で増殖するが、END 現象を示さない（E マーカー）。また、30 °Cでのモルモット腎初代細胞における増殖は、40 °Cでの増殖を上回り（T マーカー）、強毒豚コレラウイルスの増殖を 100 倍以上上回る（G マーカー）。

###### 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 2.15 に適したモルモット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- 70 °C以下又は凍結乾燥して5°C以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、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 2.15 に適したモルモット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- 70 °C以下又は凍結乾燥して5°C以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、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 2.15 に適したモルモット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- 70 °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 豚丹毒菌

##### 2.1.2.1 名称

アクリフラビン耐性弱毒豚丹毒菌小金井 65 - 0.15 株

##### 2.1.2.2 性状

0.02w/v %アクリフラビン加寒天培地で発育する。

豚丹毒抗体陰性豚の皮下に注射した場合、注射部位に限局した善感反応（小丘疹の形成）を呈するが、全身症状を認めず、注射後3週目に豚丹毒菌の強毒株で攻撃した場合、耐過生存する。

4週齢のマウスの皮下に注射した場合、その90%以上が関節炎を呈するが、100%が耐過生存し、注射後10日目に豚丹毒菌の強毒株で攻撃した場合、耐過生存する。

#### 2.1.2.3 マスターシード菌

##### 2.1.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、普通ブイヨン又は適当と認められた培地で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシード菌は、保存安定剤（付記1）又は適当と認められた安定剤を添加し、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

マスターシード菌について、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。

#### 2.1.2.4 ワーキングシード菌

##### 2.1.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、普通ブイヨン又は適当と認められた培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、保存安定剤又は適当と認められた安定剤を添加し、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.5の試験を行う。

#### 2.1.2.5 プロダクションシード菌

##### 2.1.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、普通ブイヨン又は適当と認められた培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、保存安定剤又は適当と認められた安定剤を添加し、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.6の試験を行う。

## 2.2 製造用材料

### 2.2.1 豚コレラウイルス

#### 2.2.1.1 培養細胞

SPF動物規格の2.15に適合したモルモット腎初代細胞を用いる。

#### 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、2.2.1.2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の試験を行う。

### 2.2.2 豚丹毒菌

#### 2.2.2.1 培地

製造用培地（付記2）又は適当と認められた培地を用いる。

## 2.3 原液

### 2.3.1 豚コレラウイルス原液

#### 2.3.1.1 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。

個体別培養細胞について、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 の細胞に接種し、30℃で培養した後、ウイルスの増殖極期に個体別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を混合して豚コレラウイルス原液とする。

豚コレラウイルス原液について、3.4 の試験を行う。

#### 2.3.2 豚丹毒菌原液

##### 2.3.2.1 培養

プロダクションシード菌を培地で溶解した後、培地に接種し、培養したものを豚丹毒菌培養菌液とする。

豚丹毒菌培養菌液について、3.5 の試験を行う。

##### 2.3.2.2 原液の調製

培養菌液を遠心して菌体を採取し、適当と認められた安定剤に浮遊させた菌液を混合して豚丹毒菌原液とする。

豚丹毒菌原液について、3.6 の試験を行う。

#### 2.4 最終バルク

豚コレラウイルス原液に、適当と認められた希釈液を加えて濃度調整したもの1容と、豚丹毒菌原液に適当と認められた安定剤を加えて濃度調整したもの2容とを混合し、最終バルクとする。

希釈液及び安定剤は、ロットごとに調製しなければならない。

#### 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。

##### 2.5.1 サブロット

1つの最終バルクに由来し、同一条件で凍結乾燥した小分製品の1群をサブロットとする。

サブロットについて、3.7 の試験を行う。

##### 2.5.2 ロット

1つの原液に由来するサブロット群を1ロットとする。

ロットについて、3.8 の試験を行う。

### 3 試験法

#### 3.1 製造用株の試験

##### 3.1.1 豚コレラ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 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 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

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。

###### 3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

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の 1.1、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によって試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.1.1.6 対象動物を用いた安全性確認試験

一般試験法の対象動物を用いた安全性確認試験法によって試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.1.1.7 病原性復帰確認試験

一般試験法の病原性復帰確認試験法によって試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.1.1.8 マーカー試験

##### 3.1.1.8.1 E マーカー試験

##### 3.1.1.8.1.1 試験材料

##### 3.1.1.8.1.1.1 試料

検体を試料とする。

##### 3.1.1.8.1.1.2 培養細胞

豚精巣初代細胞浮遊液を用いる。

##### 3.1.1.8.1.1.3 ニューカッスル病ウイルス

TCND 株又は宮寺株を用いる。

##### 3.1.1.8.1.2 試験方法

試料の 0.1mL ずつを小試験管に 0.5mL ずつ分注した細胞 10 本以上に接種し、37℃で 4 日間静置培養し、単層形成が良好であることを確認する。培養液を除き、ニューカッスル病ウイルスを約  $10^{6.0}$  PFU 含む細胞増殖用培養液 1 (付記 3) を 0.5mL ずつを加え、37℃で 3 日間培養する。

##### 3.1.1.8.1.3 判定

培養細胞に CPE を認めてはならない。

##### 3.1.1.8.2 T 及び G マーカー試験

##### 3.1.1.8.2.1 試験材料

##### 3.1.1.8.2.1.1 試料

検体を細胞増殖用培養液 1 で希釈し、1 mL 中  $10^{3.0}$  TCID<sub>50</sub> を含むように濃度を調整したものを試料とする。

##### 3.1.1.8.2.1.2 培養細胞

モルモット腎初代細胞を小試験管に培養し、単層となったものを用いる。

##### 3.1.1.8.2.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 20 本以上の培養細胞に接種し、2 群に分け、30℃及び 40℃で 6～8 日間静置培養する。群ごとに培養液を採取し、混合し、そのウイルス含有量を 3.4.2 を準用して測定する。

##### 3.1.1.8.2.3 判定

30℃での増殖は、40℃での増殖を上回らなければならない (T マーカー)、30℃でのウイルス含有量は、1 mL 中  $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない (G マーカー)。

#### 3.1.1.9 力価試験

##### 3.1.1.9.1 試験材料

##### 3.1.1.9.1.1 注射材料

検体又は検体を細胞増殖用培養液 1 で 1 mL 当たり  $10^{3.0}$  TCID<sub>50</sub> のウイルス量に希釈したものを注射材料とする。

##### 3.1.1.9.1.2 試験動物

体重 20 ～ 40kg の豚を用いる。

#### 3.1.1.9.1.3 中和試験用ウイルス

弱毒豚コレラウイルス GPE<sup>-</sup> 株を用いる。

#### 3.1.1.9.1.4 培養細胞

CPK-NS 細胞を細胞数が 1 mL 中約  $5 \times 10^{50}$  となるように細胞増殖用培養液 2 (付記 4) に浮遊させたものを用いる。

#### 3.1.1.9.2 試験方法

豚 4 頭を試験群とし、1 頭を対照群とする。注射材料 1 mL ずつを試験群の皮下又は筋肉内に注射し、28 日目の血清について、中和試験を行う。

被検血清を非働化した後、細胞増殖用培養液 2 で 2 倍階段希釈し、各希釈血清と 0.025mL 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 °C で 60 分間処理する。この各混合液 0.05mL ずつをそれぞれ 96 穴組織培養用プレートの 4 穴ずつに分注し、CPK-NS 細胞浮遊液 0.1mL ずつを加え、37 °C で 7 日間培養し、観察する。

#### 3.1.1.9.3 判定

培養細胞 4 穴中 2 穴以上に CPE の阻止を認め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、全て 4 倍以上でなければならない。この場合、対照群は、抗体価 1 倍未満でなければならない。

### 3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

#### 3.1.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

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

### 3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

#### 3.1.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

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

### 3.1.4 豚丹毒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 1.4.2.2.1.1 を準用して試験を実施するとき、適合しなければならない。

#### 3.1.4.2 マーカー試験

##### 3.1.4.2.1 試験材料

検体及び 0.02w/v % アクリフラビン加寒天培地を用いる。

##### 3.1.4.2.2 試験方法

検体 0.1mL を 0.02w/v % アクリフラビン加寒天培地 2 枚以上に接種し、培地表面に拡散させ、37 °C で 48 時間培養し、観察する。

##### 3.1.4.2.3 判定

豚丹毒菌の発育が認められなければならない。

#### 3.1.4.3 夾雑菌否定試験

##### 3.1.4.3.1 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、豚丹毒菌以外の菌の発育を認めてはならない。

##### 3.1.4.3.2 普通寒天培地斜面培養法

###### 3.1.4.3.2.1 培地

斜面の普通寒天培地を用いる。

###### 3.1.4.3.2.2 試験方法



検体 0.5mL ずつを普通寒天培地 4 本の斜面部に接種し、2 本を 30 ~ 32 °C で 10 日間、残りの 2 本を 22 ~ 25 °C で 14 日間培養し、観察する。

#### 3.1.4.3.2.3 判定

豚丹毒菌以外の菌の発育を認めてはならない。

#### 3.1.4.4 生菌数試験

##### 3.1.4.4.1 試験材料

###### 3.1.4.4.1.1 試料

検体を普通ブイヨン又は適当と認められた培地で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.1.4.4.1.2 培地

普通寒天培地又は適当と認められた培地を用いる。

##### 3.1.4.4.2 試験方法

試料 1 mL ずつを平板混濁培養法により培地 2 枚以上に接種し、37 °C で 48 時間培養した後、生じた豚丹毒菌の集落数を数える。

##### 3.1.4.4.3 判定

各段階の希釈液ごとの集落数の平均値、希釈倍数及び培地への接種量から生菌数を算出する。

検体の生菌数は、1 mL 中  $5 \times 10^7$  個以上でなければならない。

#### 3.1.4.5 対象動物を用いた免疫原性試験

##### 3.1.4.5.1 試験材料

###### 3.1.4.5.1.1 検体

マスターシード菌及びそれを 10 代継代したものを検体とする。ただし、試験のために充分量のマスターシード菌が利用できない場合は、最も継代数の少ないワーキングシード菌を検体とする。

###### 3.1.4.5.1.2 試験動物

品種及び系統 (SPF 等) が明らかで健康な、豚丹毒菌に対する抗体陰性の 2 ~ 3 か月齢の豚 8 頭以上を用いる。

##### 3.1.4.5.2 試験方法

試験動物を、試験群 2 群 (1 群 3 頭以上) 及び対照群 (2 頭以上) 1 群に分ける。

試験群には、各々の検体を生菌数が 1 mL 中  $10^6$  個となるように濃度を調整したものを 1.0mL ずつ、肩部皮下に注射する。

注射後 3 週目に、豚丹毒菌藤沢株又は適当と認められた菌株の培養菌液を 0.1mL (生菌数 1 mL 中  $10^8$  個) ずつ各群の皮内に注射し、10 日間臨床観察する。

##### 3.1.4.5.3 判定

試験群は、いずれも、攻撃局所に限定された局所反応 (発赤) を呈することがあっても、全身反応を呈することなく耐過生存しなければならない。この場合、対照群は、いずれも定型的な豚丹毒の症状が認められなければならない。

#### 3.1.4.6 対象動物を用いた安全性確認試験

##### 3.1.4.6.1 試験材料

###### 3.1.4.6.1.1 検体

マスターシード菌を検体とする。ただし、試験のために充分な量のマスターシード菌が利用できない場合は、最も継代数の少ないワーキングシード菌を検体とする。

###### 3.1.4.6.1.2 試験動物

品種及び系統 (SPF 等) が明らかで健康な、豚丹毒菌に対する抗体陰性の 2 ~ 3 か月齢の豚 4 頭以上を用いる。

##### 3.1.4.6.2 試験方法

試験動物を 2 頭以上ずつの試験群及び対照群に分ける。

試験群には、検体を生菌数が1 mL中 $5 \times 10^7$ 個以上となるように濃度を調整したものを10mLずつ肩部皮下に注射する。対照群は、非投与とする。

投与後21日間、臨床症状を観察する。

#### 3.1.4.6.3 判定

試験群は、いずれも注射局所に善感反応が認められなければならないが、全身の異常を認めてはならず、生存しなければならない。対照群は、いずれも善感反応に類似する反応が認められてはならず、生存しなければならない。

#### 3.1.4.7 マウスを用いた安全性確認試験

##### 3.1.4.7.1 試験材料

###### 3.1.4.7.1.1 検体

マスターシード菌を検体とする。ただし、試験のために十分な量のマスターシード菌が利用できない場合は、最も継代数の少ないワーキングシード菌を検体とする。

###### 3.1.4.7.1.2 試験動物

4週齢のマウスを用いる。

###### 3.1.4.7.2 試験方法

マウス10匹を試験群、10匹を対照群とする。

検体を生菌数が1 mL中 $1 \times 10^8$ 個となるように濃度を調整したものを0.1mLずつ試験群の内股部皮下に注射し、対照群と共に10日間臨床観察する。

###### 3.1.4.7.3 判定

試験群は、いずれも生存しなければならないが、90%以上に関節炎が認められなければならない。対照群は、いずれも生存しなければならないが、関節炎が認められてはならない。

#### 3.1.4.8 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。

#### 3.1.4.9 力価試験（マウス注射試験）

##### 3.1.4.9.1 試験材料

###### 3.1.4.9.1.1 検体

マスターシード菌を検体とする。ただし、試験のために十分な量のマスターシード菌が利用できない場合は、最も継代数の少ないワーキングシード菌を検体とする。

###### 3.1.4.9.1.2 試験動物

4週齢のマウスを用いる。

###### 3.1.4.9.2 試験方法

試験動物の10匹を試験群、10匹を対照群とする。

検体を生菌数が1 mL中 $10^4$ 個となるように調整したものを0.1mLずつ、試験群の左内股部皮下に注射する。注射後10日目に、藤沢株又は適当と認められた菌株の培養菌液を0.1mL中1,000致死量となるように希釈したものを0.1mLを両群の右内股部皮下に注射し、10日間臨床観察する。

###### 3.1.4.9.3 判定

試験群は、全て無症状で耐過生存しなければならない。この場合、対照群は、全て死亡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

3.1.4.3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、普通寒天培地斜面培養法の培養は、37℃で7日間とする。

#### 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

3.1.4.3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、普通寒天培地斜面培養法の

培養は、37℃で7日間とする。

## 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2.1.4.2.1.1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 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。

### 3.3.2 赤血球吸着試験

3.3.1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、3群に分け、0.1vol%のモルモット、がちょう及び7日齢以内の鶏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。

### 3.3.3 封入体染色試験

3.3.1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。

### 3.3.4 迷入ウイルス否定試験

3.3.1の試験最終日に採取した培養液を試料として、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法2.3.1.1、2.3.1.2、2.3.1.3、2.3.2及び2.7.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

## 3.4 豚コレラウイルス原液の試験

### 3.4.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.4.2 ウイルス含有量試験

#### 3.4.2.1 試験材料

##### 3.4.2.1.1 試料

検体を細胞増殖用培養液1で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.4.2.1.2 培養細胞

豚精巢初代又は豚腎継代細胞浮遊液を用いる。

#### 3.4.2.2 試験方法

96穴組織培養用プレートを用いる。試料0.1mLずつをそれぞれ1列10穴に分注する。各列の2穴には細胞増殖用培養液1を0.1mLずつ分注し、対照細胞とする。各穴に細胞増殖用培養液1で濃度を調整した細胞浮遊液を0.1mLずつ分注する。37℃で5～7日間静置培養した後、培養液を除き、洗浄液(付記5)で2回洗浄した後、固定する。

固定プレートの各穴に抗体希釈液(付記6)で至適濃度に希釈した抗豚コレラウイルスモノクローナル抗体(付記7)0.05mLずつを分注し、37℃で60分間反応させる。

洗浄液で4回洗浄後、抗体希釈液で至適濃度に希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリン0.05mLずつを各穴に分注し、37℃で40～60分間反応させる。

洗浄液で4回洗浄後、基質液(付記8)0.1mLを各穴に分注し、常温で10～30分間反応させた後、2.5mol/L硫酸0.05mLずつを各穴に加えて反応を停止させ、各穴の吸光度値を492/630nmの波

長でそれぞれ測定する。

#### 3.4.2.3 判定

対照細胞の平均吸光度値の2倍以上の吸光度値を示す穴を豚コレラウイルス感染細胞とみなし、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。

#### 3.4.3 マーカー試験

3.1.1.8を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.5 豚丹毒菌培養菌液の試験

##### 3.5.1 夾雑菌否定試験

3.1.4.3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、普通寒天培地斜面培養法の培養は、37℃で7日間とする。

#### 3.6 豚丹毒菌原液の試験

##### 3.6.1 夾雑菌否定試験

3.1.4.3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、普通寒天培地斜面法の培養は、37℃で7日間とする。

##### 3.6.2 生菌数試験

3.1.4.4を準用して試験するとき、検体の生菌数は、1 mL中1×10<sup>9</sup>個以上でなければならない。

#### 3.7 サブロットの試験

##### 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液体でなければならない。異物及び異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

##### 3.7.2 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 夾雑菌否定試験

3.1.4.3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、普通寒天培地斜面法の培養は、37℃で7日間とする。

##### 3.7.5 豚コレラウイルス含有量試験

3.4.2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<sup>3.0</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

ただし、試料は、遠心した上清を用いる。

##### 3.7.6 生菌数試験

3.1.4.4を準用して試験するとき、試験品の生菌数は、1頭分当たり1×10<sup>8</sup>個以上でなければならない。

#### 3.8 ロットの試験

##### 3.8.1 マイコプラズマ否定試験

試料は、各サブロットから2本ずつを用い、それぞれ等量ずつ混合したものを用いて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。

##### 3.8.2 豚丹毒マーカー試験

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。

##### 3.8.3 安全試験

### 3.8.3.1 豚注射試験

#### 3.8.3.1.1 試験材料

##### 3.8.3.1.1.1 注射材料

各サブロットから同数の試験品を採取し、溶解用液 20mL 中に 100 頭分のワクチンが含まれるように溶解し、混合し、注射材料とする。

##### 3.8.3.1.1.2 試験動物

体重 20 ~ 40kg の豚を用いる。

##### 3.8.3.1.2 試験方法

注射材料 20mL ずつを 4 頭の試験動物の皮下に注射し、14 日間観察する。ワクチン注射時、試験動物の体重 1 kg 当たり、50,000 単位のペニシリンを筋肉内に注射する。

##### 3.8.3.1.3 判定

観察期間中、試験動物に異常を認めてはならない。

### 3.8.3.2 マウス注射試験

#### 3.8.3.2.1 試験材料

##### 3.8.3.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.8.3.2.1.2 試験動物

4 週齢のマウスを用いる。

##### 3.8.3.2.2 試験方法

試験動物 10 匹を試験群、5 匹を対照群とする。

注射材料 0.1mL ずつを試験群の内股部皮下に注射し、対照群と共に 10 日間生死を観察する。

##### 3.8.3.2.3 判定

全ての試験動物が生存しなければならない。

### 3.8.4 毒力試験

#### 3.8.4.1 試験動物

3.8.3.2 の試験に用いた動物を用いる。

#### 3.8.4.2 試験方法

3.8.3.2 の試験の観察期間中、関節炎の発生の有無を検査する。

#### 3.8.4.3 判定

試験群の 80 % 以上に関節炎が認められなければならない。この場合、対照群は、いずれも関節炎が認められてはならない。

### 4 貯法及び有効期間

有効期間は、1 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。

#### 付記 1 保存安定剤

##### 1 脱脂乳液 1,000 mL 中

脱脂粉乳 100 g

水 残量

加温溶解した後、100 メッシュでろ過したる液を、110 ~ 115 °C で 20 分間滅菌したものの。

##### 2 酵母エキス液 1,000 mL 中

酵母エキス 50 g

水 残量

加温溶解後、121 °C で 15 分間滅菌したもの。

使用時に1及び2を等量混合する。

付記2 製造用培地

1,000mL 中

ペプトン

20.0 g

塩化ナトリウム

5.0 g

ポリソルベート 80

1.0 mL

肉水

残 量

pH を 7.8 ~ 8.0 に調整し、121 °C で 15 分間高圧滅菌する。

付記3 細胞増殖用培養液 1

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・プロス

2.95 g

又はラクトアルブミン水解物

5 g

牛又はやぎ血清

50 ~ 100 mL

イーグル MEM 又はアール液

残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 6.8 ~ 7.2 に調整する。

牛又はやぎ血清は、牛ウイルス性下痢-粘膜病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。

付記4 細胞増殖用培養液 2

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・プロス

2.95 g

バクトペプトン

5 g

N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸

2.13 g

イーグル MEM

残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 6.8 ~ 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 洗浄液

A液とB液を混合したもの

A液 800mL 中

塩化ナトリウム

8.0 g

塩化カリウム

0.2 g

無水リン酸水素二ナトリウム

1.15 g

リン酸二水素カリウム

0.2 g

水

残 量

B液 200mL 中

無水塩化カルシウム

0.1 g

塩化マグネシウム六水和物

0.1 g

水

残 量

付記6 抗体希釈液

ハンクス液又は洗浄液に牛血清アルブミン・フラクションVを0.5 ~ 1.0w/v%となるように

溶解したもの。

付記7 抗豚コレラウイルスモノクローナル抗体  
動物医薬品検査所が配布するもの

付記8 基質液

0.2mol/L リン酸－0.1mol/L クエン酸緩衝液 (pH5.0) 50mL に *o*-フェニレンジアミン二塩  
酸塩 25mg 及び過酸化水素 (30) 0.01mL を加えたもの。  
用時調製する。

ワクチン（シードロット製剤）の部のトリニューモウイルス感染症生ワクチン（シード）の項の次に次のように加える。

## トリレオウイルス感染症（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トリレオウイルスを同規格に適合した初代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

トリレオウイルス 58-132E50 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.2 性状

8日齢の発育鶏卵の卵黄嚢内に注射すると、増殖し、胚を死亡させる。鶏胚初代細胞で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。

##### 2.1.4 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。

##### 2.1.5 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 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適当と認められた細胞を用いる。

#### 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（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。

## 2.3 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。ウイルス接種前の個別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 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

ウイルス浮遊液を濃縮した後ホルマリンを加えて不活化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、3.5 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。

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 個体別培養細胞の試験

個体別培養細胞の 1% 以上又は 500mL 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 の試験最終日に培養液を採取し、0.5vol % 鶏赤血球浮遊液を加え、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

検体はトリプシン処理（付記 1）した後、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。

###### 3.4.1.1.2 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、単層になったものを用いる。

###### 3.4.1.1.3 試験方法

各段階の試料 0.1mL をそれぞれ 2 枚の培養細胞に接種し、37℃ で 90 分間吸着させた後、第 1 次重層寒天培地（付記 2）を重層し、37℃、5 vol % 炭酸ガス下で 3 日間培養する。その後、第 2 次重層寒天培地（付記 3）を重層し、更に 18 ~ 24 時間培養し、ブラック数を測定する。

###### 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の含有量を算出する。

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 注射材料

検体を、100 倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、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 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 由来の5～7週齢の鶏を用いる。

##### 3.7.4.2 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頸部皮下に注射し、対照群と共に4週間観察する。

##### 3.7.4.3 判定

試験期間中、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 試験材料

###### 3.7.5.1.1 試験動物

3.7.4 で用いた鶏を用いる。

###### 3.7.5.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.2.1 の鶏腎初代細胞を用いる。

###### 3.7.5.1.3 中和試験用ウイルス

生ワクチン製造用材料の規格 2.2.1 の鶏腎初代細胞で、ウイルス増殖用培養液（付記 4）を用いて 37℃で 72 時間培養後トリプシン処理したものをを用いる。

### 3.7.5.2 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、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 中に約 100PFU を含む中和試験用ウイルス液とを等量混合し、4℃で 18～24 時間又は 37℃で 60 分間処理する。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 90 分間静置吸着させる。別に、中和試験用ウイルス液とリン酸緩衝食塩液とを等量混合し、希釈血清と同様に処理したものをウイルス対照とする。第 1 次重層寒天培地を重層し、37℃で 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、37℃で更に 24 時間静置培養し、観察する。

### 3.7.5.3 判定

プラック数を 90% 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 80% 以上が中和抗体価 320 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全て 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、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 トリプシン処理

ウイルス材料にトリプシン液を最終濃度 0.01w/v % となるように加えた後、よく混和し、37℃で 30 分間処理する。

## 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・ブロス 2.95 g

寒天 10 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 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。

## 付記 4 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

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る。

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

## 鶏伝染性気管支炎生ワクチン（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

弱毒鶏伝染性気管支炎ウイルス 4-91 株又は製造に相当と認められた株

##### 2.1.2 性状

4日齢の鶏に  $10^{3.0}$  EID<sub>50</sub> を点鼻又は点眼接種すると、一過性の軽い呼吸器症状を示すことがある。8～10日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射すると、増殖し、鶏胚を2～7日後に死亡させ、又は鶏胚の発育不全若しくはカーリングを起こす。

##### 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

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並びに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。

### 2.3 原液

#### 2.3.1 発育鶏卵の培養

1 回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 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。

原液に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 3.4 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調製し、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て凍結乾燥し、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 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 に規定する試験を適用する製剤については、本試験を実施しなくてよい。

###### 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 に規定する試験を適用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 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 原液の試験

#### 3.4.1 生菌数限度試験

一般試験法の生菌数限度試験法又は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 ウイルス含有量試験

##### 3.4.2.1 試験材料

###### 3.4.2.1.1 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。

###### 3.4.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～10日齢のものを用いる。

##### 3.4.2.2 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。

##### 3.4.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性(発育不全、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、1mL中10<sup>6.8</sup>EID<sub>50</sub>以上でなければならない。

### 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、固有の色調を有する乾燥塊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。

#### 3.5.2 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。

#### 3.5.3 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。

#### 3.5.4 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。

#### 3.5.5 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。

#### 3.5.6 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。

#### 3.5.7 ウイルス含有量試験

3.4.2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>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。

#### 3.5.8 安全試験

##### 3.5.8.1 試験材料

##### 3.5.8.1.1 接種材料

試験品をリン酸緩衝食塩液を用いてウイルスが0.03mL当たり10羽分含まれるように調整し、接種材料とする。

##### 3.5.8.1.2 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日齢の鶏を用いる。

##### 3.5.8.2 試験方法

試験動物の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3週間観察する。

試験開始時及び試験終了時に体重を測定する。

##### 3.5.8.3 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。

#### 3.5.9 力価試験

##### 3.5.9.1 試験材料

##### 3.5.9.1.1 接種材料

試験品をリン酸緩衝食塩液又は適当と認められた溶解用液を用いてウイルスが0.03mL当たり1羽分含まれるように濃度を調整し、接種材料とする。

##### 3.5.9.1.2 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日齢の鶏を用いる。

##### 3.5.9.1.3 中和試験用ウイルス

製造用株を用いる。ただし、ウイルス量は、ウイルスを感染させた尿膜腔液を、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、1mL中 $10^{5.0}$  EID<sub>50</sub>以上でなければならない。

##### 3.5.9.1.4 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。

##### 3.5.9.2 試験方法

試験動物の10羽を試験群、3羽を対照群とする。試験群に、接種材料0.03mLずつを点眼接種し、対照群と共に3～4週間観察する。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。

試験終了時、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。各群の血清は、それぞれ等量をプールし、非働化する。

中和試験用ウイルスを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



した後、各段階の希釈液ごとに5個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に0.1mLずつ注射し、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。

#### 3.5.9.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全、カーリング）を認めたものを感染とみなし、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、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。

ワクチン（シードロット製剤）の部のマレック病（マレック病ウイルス1型）凍結生ワクチン（シード）の項の次に次のように加える。

## マレック病（マレック病ウイルス1型・七面鳥ヘルペスウイルス）凍結生ワクチン（シード）

### 1 定義

シードロット規格に適合した弱毒マレック病ウイルス（1型）及び七面鳥ヘルペスウイルスをそれぞれ同規格に適合した初代細胞で増殖させて得た感染細胞浮遊液を混合し、凍結したワクチンである。

### 2 製法

#### 2.1 製造用株

##### 2.1.1 マレック病ウイルス1型

###### 2.1.1.1 名称

弱毒マレック病ウイルス CVI988 株又はこれと同等と認められた株

###### 2.1.1.2 性状

1日齢の鶏の皮下、筋肉内又は腹腔内に注射しても病原性を示さない。鶏、うずら又はあひるの發育卵の胚初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、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、同規格の2.8に適合したあひる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 $-100^{\circ}\text{C}$ 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2.6に適合した鶏胚初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 $-100^{\circ}\text{C}$ 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2.6に適合した鶏胚初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 $-100^{\circ}\text{C}$ 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 七面鳥ヘルペスウイルス

##### 2.1.2.1 名称

七面鳥ヘルペスウイルス FC126 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.2.2 性状

1日齢の鶏の皮下、筋肉内又は腹腔内に注射しても病原性を示さない。鶏、うずら又はあひるの発育卵の胚初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、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、同規格の2.8に適合したあひる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 $-100^{\circ}\text{C}$ 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、同規格の2.8に適合したあひる胚初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 $-100^{\circ}\text{C}$ 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、同規格の2.8に適合したあひる胚初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 $-100^{\circ}\text{C}$ 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 マレック病ウイルス1型

#### 2.2.1.1 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、同規格の2.8に適合したあひる胚初代細胞又は製造に適当と認められた初代細胞を用いる。

#### 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、2.2.1.2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の試験を行う。

### 2.2.2 七面鳥ヘルペスウイルス

#### 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、同規格の2.7に適合したうずら胚初代細胞、同規格の2.8に適合したあひる胚初代細胞又は製造に適当と認められた初代細胞を用いる。

#### 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、3.2 の試験を行う。

## 2.3 原液

### 2.3.1 マレック病ウイルス1型原液

#### 2.3.1.1 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。ウイルス接種前の個別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。

#### 2.3.1.2 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 の細胞又は細胞浮遊液に接種して培養し、ウイルスの増殖極期の感染細胞を個別培養細胞ごとに採取して遠心し、混合して原液とする。原液に相当と認められた安定剤を加えてもよい。

原液について、3.4 の試験を行う。

### 2.3.2 七面鳥ヘルペスウイルス原液

#### 2.3.2.1 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。ウイルス接種前の個別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。

#### 2.3.2.2 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 の細胞又は細胞浮遊液に接種して培養し、ウイルスの増殖極期の感染細胞を個別培養細胞ごとに採取して遠心し、混合して原液とする。原液に相当と認められた安定剤を加えてもよい。

原液について、3.4 の試験を行う。

## 2.4 最終バルク

マレック病ウイルス1型原液及び七面鳥ヘルペスウイルス原液を混合し、相当と認められた希釈液で濃度調整し、相当と認められた凍害防止剤を加え、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、凍結して小分製品とする。

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 に規定する試験を実施する製剤については、本試験を実施しなくてよい。

##### 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。

#### 3.1.1.5 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 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 個体別培養細胞の試験

個体別培養細胞の 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 迷入ウイルス否定試験

3.3.1 の試験最終日に、対照培養細胞のそれぞれの容器から細胞及び培養液を採り、混合したものを試料とし、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 2.1、2.2.1 及び 2.2.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.3.3 鶏注射試験

#### 3.3.3.1 試験材料

##### 3.3.3.1.1 注射材料

3.3.1 の試験最終日に対照培養細胞のそれぞれの容器から細胞及び培養液を採り、混合したものを注射材料とする。

##### 3.3.3.1.2 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 1～4 日齢の鶏を用いる。

#### 3.3.3.2 試験方法

注射材料 0.2mL ずつを 10 羽の鶏の皮下に注射し、5 週間観察する。  
観察最終日に剖検する。

#### 3.3.3.3 判定

観察期間中、試験動物に臨床的な異常を認めてはならない。また、剖検したときに、異常を認めてはならない。

### 3.4 原液の試験

#### 3.4.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.4.2 マイコプラズマ否定試験

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

#### 3.4.3 ウイルス含有量試験

##### 3.4.3.1 試験材料

##### 3.4.3.1.1 試料

検体を細胞維持用培養液（付記 1）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.4.3.1.2 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又は 2 代継代細胞を 25 cm<sup>2</sup> 以上のシャーレに培養し、単層となったものを用いる。

##### 3.4.3.2 試験方法

試料 0.2mL ずつをそれぞれ 4 枚以上の培養細胞に接種し、37℃で 60 分間静置吸着させた後、細胞維持用培養液を加え、37℃で 4～7 日間培養し、観察する。

##### 3.4.3.3 判定

シャーレ当たり平均 20 個以上検出された試料の希釈倍数及びその平均ブラック数又は平均フォーカス数からウイルスの含有量を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中それぞれ 10<sup>6</sup>PFU 又は 10<sup>6</sup>FFU 以上でなければならない。

### 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、固有の色調を有する凍結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。

#### 3.5.2 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 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。

#### 3.5.4 ウイルス含有量試験

3.4.3 を準用し、両ウイルス株の CPE の形態学的相違による鑑別法で、それぞれのプラック数又はフォーカス数を測定するとき、試験品のウイルス含有量は、1羽分当たり両ウイルス株ともに  $10^{3.0}$ PFU 又は  $10^{3.0}$ FFU 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。

また、CPE の形態学的相違による鑑別法で十分に測定できないときは、モノクローナル抗体を用いた免疫染色法により測定する。

### 3.5.5 安全試験

#### 3.5.5.1 試験材料

##### 3.5.5.1.1 注射材料

試験品を溶解用液を用いて 1 注射量当たり 100 羽分のウイルス量が含まれるように濃度を調整し、注射材料とする。

##### 3.5.5.1.2 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 1～4 日齢の鶏を用いる。

#### 3.5.5.2 試験方法

試験動物の 10 羽を試験群、5 羽を対照群とする。

注射材料の 1 注射量ずつを試験群の皮下に注射し、対照群と共に 5 週間観察する。

試験開始時及び試験終了時に体重を測定し、剖検する。

#### 3.5.5.3 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、異常を認めてはならない。

### 3.5.6 力価試験

#### 3.5.6.1 試験材料

##### 3.5.6.1.1 注射材料

試験品を溶解用液で 1 注射量当たり 1 羽分のウイルスが含まれるように濃度を調整し、注射材料とする。

##### 3.5.6.1.2 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 1～4 日齢の鶏を用いる。

#### 3.5.6.2 試験方法

試験動物の 10 羽を試験群、3 羽を対照群とする。

注射材料の 1 注射量ずつを試験群の皮下に注射し、対照群と共に 5 週間観察する。

観察最終日に得られた各個体の血清について、両ウイルス株に対する蛍光抗体反応を行う。

血清をリン酸緩衝食塩液で 20 倍とし、更に 2 倍階段希釈する。感染細胞（付記 3）に、各希釈液を加え、37℃で 45～60 分間処理した後、リン酸緩衝食塩液で 3 回洗浄し、風乾した後、4 単位の抗鶏 IgG 蛍光標識抗体（付記 4）を加え、37℃で 45～60 分間処理した後、リン酸緩衝食塩液で 3 回洗浄し、蛍光顕微鏡で観察する。

#### 3.5.6.3 判定

特異蛍光が認められる血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群の 80%以上が両ウイルス株に対してそれぞれ抗体価 40 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全て 20 倍以下でなければならない。

### 4 貯法及び有効期間

－100℃以下で保存する。

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

#### 付記 1 細胞維持用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス

2.95 g

牛血清

適量

イーグル MEM 又は F10 培地

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 抗マレック病ウイルス血清

弱毒マレック病ウイルス（血清型 1 型）CVI988 株又はこれと同等と認められた株、及び七面鳥ヘルペスウイルス FC126 株又はこれと同等と認められた株で免疫した生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏の血清であって、試験品中のウイルスを完全に中和する力価を有するもの。

#### 付記3 感染細胞

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 37 °C、5 vol % 炭酸ガス下で培養し、カバーグラスに単層を形成させたものにマレック病ウイルス CVI988 株又はこれと同等と認められた株、及び七面鳥ヘルペスウイルス FC126 株又はこれと同等と認められた株をそれぞれ接種し、2 ~ 4 日間培養したもので、特異抗原を有するもの。

#### 付記4 抗鶏 IgG 蛍光標識抗体

抗鶏 IgG 血清から  $\gamma$ -グロブリンを調製し、これを蛍光色素で標識したもので、8 単位以上を含むもの。



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）の項を次のように改める。

## 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）

### 1 定義

シードロット規格に適合した弱毒ニューカッスル病ウイルス及び弱毒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混合し、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 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 B<sub>1</sub> 株又はこれと同等と認められた株

###### 2.1.1.2 性状

8 週齢の鶏に  $10^{6.0}$ EID<sub>50</sub> を点眼接種し、又は総排泄腔に擦入しても病原性を示さない。

10 日齢の発育鶏卵に 1 EID<sub>50</sub> を注射すると増殖し、鶏胚を約 5 日で死亡させる。

###### 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℃以下又は凍結乾燥して 5℃以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1 の試験を行う。

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

###### 2.1.1.4 ワーキングシードウイルス

###### 2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、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℃以下又は凍結乾燥して 5℃以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2 の試験を行う。

###### 2.1.1.5 プロダクションシードウイルス

###### 2.1.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、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℃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。

##### 2.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

###### 2.1.2.1 名称

弱毒鶏伝染性気管支炎ウイルス H120 株又は製造に相当と認められた株

###### 2.1.2.2 性状

4 日齢の鶏に  $10^{3.0}$ EID<sub>50</sub> を点鼻又は点眼接種すると、一過性の軽い呼吸器症状を示すことがある。

8～10 日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射すると、増殖し、鶏胚を 2～7 日後に死亡させ、又は鶏胚の発育不全若しくはカーリングを起こす。

###### 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

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並びに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 鶏伝染性気管支炎ウイルス

##### 2.2.2.1 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並びに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。

## 2.3 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。

原液に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 3.4.1 及び 3.4.2.1 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。

個体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。

原液に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3.4.1及び3.4.2.2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及び鶏伝染性気管支炎ウイルス原液を混合し、相当と認められた希釈液及び安定剤を加えて調製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て凍結乾燥し、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。

###### 3.1.1.5 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 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%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。

#### 3.4 原液の試験

##### 3.4.1 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。

##### 3.4.2 ウイルス含有量試験

###### 3.4.2.1 ニューカッスル病ウイルス

###### 3.4.2.1.1 試験材料

###### 3.4.2.1.1.1 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。

###### 3.4.2.1.1.2 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。

###### 3.4.2.1.2 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。

###### 3.4.2.1.3 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>を算定する。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、1mL中10<sup>8.5</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。

###### 3.4.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

###### 3.4.2.2.1 試験材料

###### 3.4.2.2.1.1 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。

###### 3.4.2.2.1.2 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。

###### 3.4.2.2.2 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。

#### 3.4.2.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全、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>6.8</sup>EID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

### 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又は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。

#### 3.5.2 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。

#### 3.5.3 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。

#### 3.5.4 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。

#### 3.5.5 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。

#### 3.5.6 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。

#### 3.5.7 ウイルス含有量試験

##### 3.5.7.1 ニューカッスル病ウイルス

試験品の鶏伝染性気管支炎ウイルスを、抗鶏伝染性気管支炎ウイルス血清（付記1）を非働化したもので中和したものを試料とし、3.4.2.1を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1羽分当たり 10<sup>5.4</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。

##### 3.5.7.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

試験品のニューカッスル病ウイルスを、抗ニューカッスル病ウイルス血清（付記2）を非働化したもので中和したものを試料とし、3.4.2.2を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1羽分当たり 10<sup>3.0</sup>EID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

#### 3.5.8 マーカー試験

##### 3.5.8.1 試験材料

###### 3.5.8.1.1 試料

試験品の鶏伝染性気管支炎ウイルスを、抗鶏伝染性気管支炎ウイルス血清を非働化したもので中和し、リン酸緩衝食塩液を用いてニューカッスル病ウイルスが 0.5mL 当たり 1羽分及び 1/10 羽分含まれるように濃度を調整したものを試料とする。

###### 3.5.8.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9～10 日齢の発育鶏卵の胚から得た細胞を細胞増殖用培養液（付記3）で浮遊し、約 20cm<sup>2</sup> 以上のシャーレに分注し、培養し、単層となったものを用いる。

###### 3.5.8.2 試験方法

試料 0.5mL をそれぞれ2枚以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置した後、重層寒天培地（付記4）を重層し、37℃で4日間培養し、ブラック形成能を試験する。

###### 3.5.8.3 判定

培養4日後に細胞を観察するとき、ブラックの形成を認めてはならない。

### 3.5.9 安全試験

#### 3.5.9.1 試験材料

##### 3.5.9.1.1 接種材料

試験品を、リン酸緩衝食塩液を用いてウイルスが0.03mL当たり10羽分含まれるように濃度を調整し、接種材料とする。

##### 3.5.9.1.2 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日齢の鶏を用いる。

#### 3.5.9.2 試験方法

試験動物の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3週間観察する。

試験開始時及び試験終了時に体重を測定する。

#### 3.5.9.3 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。

### 3.5.10 力価試験

#### 3.5.10.1 ニューカッスル病力価試験

##### 3.5.10.1.1 試験材料

##### 3.5.10.1.1.1 接種材料

試験品をリン酸緩衝食塩液又は適当と認められた溶解用液を用いてウイルスが0.03mL当たり1羽分含まれるように濃度を調整し、接種材料とする。

##### 3.5.10.1.1.2 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。

##### 3.5.10.1.1.3 攻撃ウイルス

強毒ニューカッスル病ウイルス佐藤株で感染させた尿膜腔液であり、約40日齢の鶏の筋肉内に注射し、そのウイルス量を測定するとき、1mL中 $10^{6.0}$ 致死量以上を有するものを用いる。

使用時、リン酸緩衝食塩液を用いて、1mL中 $10^{4.0}$ 致死量となるように濃度を調整する。

##### 3.5.10.1.2 試験方法

試験動物の10羽を試験群、5羽を対照群とする。

試験群に接種材料0.03mLずつを点鼻接種する。2週後に、試験群及び対照群の全てに攻撃ウイルス1mLを筋肉内に注射して攻撃し、2週間観察する。

##### 3.5.10.1.3 判定

試験終了時、試験群は、80%以上が異常なく耐過しなければならない。この場合、対照群は、100%発病して死亡しなければならない。

#### 3.5.10.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

##### 3.5.10.2.1 試験材料

##### 3.5.10.2.1.1 接種材料

試験品をリン酸緩衝食塩液又は適当と認められた溶解用液を用いてウイルスが0.03mL当たり1羽分含まれるように濃度を調整し、接種材料とする。

##### 3.5.10.2.1.2 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日齢の鶏を用いる。

##### 3.5.10.2.1.3 中和試験用ウイルス

製造用株を用いる。ただし、ウイルス量は、ウイルスを感染させた尿膜腔液を、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、1mL中 $10^{5.0}$ EID<sub>50</sub>以上でなければならない。

#### 3.5.10.2.1.4 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。

#### 3.5.10.2.2 試験方法

試験動物の10羽を試験群、3羽を対照群とする。

試験群に、接種材料0.03mLを点眼接種し、対照群と共に3～4週間観察する。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。

試験終了時、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。各群の血清は、それぞれ等量をプールし、非働化する。

中和試験用ウイルスを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水を、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分間処理した後、各段階の希釈液ごとに5個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に0.1mLずつ注射し、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。

#### 3.5.10.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全、カーリング）を認めたものを感染とみなし、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、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 抗鶏伝染性気管支炎ウイルス血清

製造用株で免疫した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鶏又は哺乳動物の血清であって、試験品中のウイルスを完全に中和する力価を有するもの。

#### 付記2 抗ニューカッスル病ウイルス血清

製造用株で免疫した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鶏又は哺乳動物の血清であって、試験品中のウイルスを完全に中和する力価を有するもの。

#### 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・ブロス 2.95 g

牛血清 50 mL

イーグルMEM 残量

炭酸水素ナトリウムでpHを6.8～7.2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 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 10 mL

ニュートラルレッド 50 mg

寒天 9 g

イーグルMEM 残量

炭酸水素ナトリウムでpHを6.8～7.2に調整する。

、必要最少量の抗生物質を加えてもよい。



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）の項に次に次のように加える。

## マレック病（マレック病ウイルス 2 型・七面鳥ヘルペスウイルス）・鶏痘混合生ワクチン（シード）

### 1 定義

シードロット規格に適合した弱毒マレック病ウイルス（2 型）及び七面鳥ヘルペスウイルスをそれぞれ同規格に適合した培養細胞で増殖させて得た感染細胞浮遊液を混合し、凍結したマレック病 2 価ワクチンとシードロット規格に適合した弱毒鶏痘ウイルスを同規格に適合した培養細胞又は発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液を凍結乾燥した鶏痘ワクチンを組み合わせたものである。

### 2 製法

#### 2.1 製造用株

##### 2.1.1 マレック病ウイルス 2 型

###### 2.1.1.1 名称

弱毒マレック病ウイルス SB-1 株又はこれと同等と認められた株

###### 2.1.1.2 性状

1 日齢の鶏の皮下、筋肉内又は腹腔内に注射しても、病原性を示さない。鶏胚初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、SPF 動物規格の 2.6 に適合した鶏胚初代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 $-100^{\circ}\text{C}$ 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 2.6 に適合した鶏胚初代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 $-100^{\circ}\text{C}$ 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 2.6 に適合した鶏胚初代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 $-100^{\circ}\text{C}$ 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 七面鳥ヘルペスウイルス

##### 2.1.2.1 名称

七面鳥ヘルペスウイルス FC126 株又はこれと同等と認められた株

### 2.1.2.2 性状

1日齢の鶏の皮下、筋肉内又は腹腔内に注射しても、病原性を示さない。鶏、うずら又はあひるの発育卵の胚初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、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、同規格の2.8に適合したあひる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 $-100^{\circ}\text{C}$ 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、同規格の2.8に適合したあひる胚初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 $-100^{\circ}\text{C}$ 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、同規格の2.8に適合したあひる胚初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 $-100^{\circ}\text{C}$ 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について、3.1.3の試験を行う。

## 2.1.3 鶏痘ウイルス

### 2.1.3.1 名称

弱毒鶏痘ウイルス TL株又はこれと同等と認められた株

### 2.1.3.2 性状

鶏の翼膜に穿刺し、又は外股部の毛のうに擦入すると、5～7日で善感発痘する。

12日齢発育鶏卵の漿尿膜上に接種すると増殖し、特徴的なポックを形成する。

### 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、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵又はSPF動物規格の2.6に適合した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 1.1 に適合した発育鶏卵又は SPF 動物規格の 2.6 に適合した鶏胚初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、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵又は SPF 動物規格の 2.6 に適合した鶏胚初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 マレック病ウイルス 2 型

#### 2.2.1.1 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製造に適当と認められた初代細胞を用いる。

#### 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、2.2.1.2 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 の試験を行う。

### 2.2.2 七面鳥ヘルペスウイルス

#### 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、同規格の 2.7 に適合したうずら胚初代細胞、同規格の 2.8 に適合したあひる胚初代細胞又は製造に適当と認められた初代細胞を用いる。

#### 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。

#### 2.2.2.3 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、3.2 の試験を行う。

### 2.2.3 鶏痘ウイルス

#### 2.2.3.1 培養細胞又は発育鶏卵

##### 2.2.3.1.1 培養細胞

###### 2.2.3.1.1.1 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製造に適当と認められた初代細胞を用いる。

###### 2.2.3.1.1.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

###### 2.2.3.1.1.3 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)

###### 2.2.3.1.1.3.1 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、2.2.3.1.1.2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の試験を行う。

#### 2.2.3.1.2 発育鶏卵

SPF 動物規格の 1.1 に適合した 9～13 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並びに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。

### 2.3 原液

#### 2.3.1 マレック病ウイルス 2 型原液

##### 2.3.1.1 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。ウイルス接種前の個別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、3.4.1 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 の細胞に接種して培養し、ウイルスの増殖極期の感染細胞を個別培養細胞ごとに採取して遠心し、混合して原液とする。原液に相当と認められた安定剤を加えてもよい。

原液について、3.6.1 の試験を行う。

#### 2.3.2 七面鳥ヘルペスウイルス原液

##### 2.3.2.1 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。ウイルス接種前の個別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、3.4.1 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 の細胞に接種して培養し、ウイルスの増殖極期の感染細胞を個別培養細胞ごとに採取して遠心し、混合して原液とする。原液に相当と認められた安定剤を加えてもよい。

原液について、3.6.1 の試験を行う。

#### 2.3.3 鶏痘ウイルス原液

##### 2.3.3.1 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、3.4.2 の試験を行う。

##### 2.3.3.2 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、3.5 の試験を行う。

##### 2.3.3.3 ウイルスの培養

###### 2.3.3.3.1 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 2.3.3.1 の細胞に接種して培養し、ウイルスの増殖極期の感染細胞を個別培養細胞ごとに採取して、凍結融解した後混合し、その遠心上清を原液とする。原液に相当と認められた安定剤を加えてもよい。

原液について、3.6.2 の試験を行う。

###### 2.3.3.3.2 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 2.3.3.2 の発育鶏卵で培養し、漿尿膜を採取して乳剤とし、そのろ液又は遠心上清を原液とする。

この場合、適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、3.6.2 の試験を行う。

## 2.4 最終バルク

### 2.4.1 マレック病ウイルス 2 型及び七面鳥ヘルペスウイルス

マレック病ウイルス 2 型原液及び七面鳥ヘルペスウイルス原液を混合し、適当と認められた希釈液で濃度調整し、適当と認められた凍害防止剤を加え、最終バルクとする。

この場合、適当と認められた必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

### 2.4.2 鶏痘ウイルス

鶏痘ウイルス原液を混合し、適当と認められた安定剤を加え、最終バルクとする。この場合、適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

### 2.5.1 マレック病 2 価ワクチン

2.4.1 の最終バルクを小分容器に分注し、凍結し、小分製品とする。

小分製品について、3.7 の試験を行う。

### 2.5.2 鶏痘ワクチン

2.4.2 の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 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。

なお、鶏痘ウイルスのマスターシードウイルスについては、検体を孔径 0.2  $\mu$ m のフィルターを用いて 3 回ろ過処理したものを試料としてもよい。

###### 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。

なお、鶏痘ウイルスのマスターシードウイルスについては、検体を孔径 0.2  $\mu$ m のフィルターを用いて 3 回ろ過処理したものを試料としてもよい。

###### 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。

なお、鶏痘ウイルスのマスターシードウイルスについては、検体を孔径0.2 μmのフィルターを用いて3回ろ過処理したものを試料としてもよい。

#### 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 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 個体別培養細胞の試験

#### 3.4.1 マレック病ウイルス培養細胞の試験

個体別培養細胞の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。

##### 3.4.1.1 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し、観察するとき、CPEを認めてはならない。

##### 3.4.1.2 迷入ウイルス否定試験

3.4.1.1の試験最終日に対照培養細胞のそれぞれの容器から細胞及び培養液を採り、混合したものを試料とし、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法2.1、2.2.1及び2.2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.4.1.3 鶏注射試験

###### 3.4.1.3.1 試験材料

###### 3.4.1.3.1.1 注射材料

3.4.1.1 の試験最終日に対照培養細胞のそれぞれの容器から細胞及び培養液を採り、混合したものを注射材料とする。

#### 3.4.1.3.1.2 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 1～4 日齢の鶏を用いる。

#### 3.4.1.3.2 試験方法

注射材料 0.2mL ずつを 10 羽の鶏の皮下に注射し、5 週間観察する。

観察最終日に剖検する。

#### 3.4.1.3.3 判定

観察期間中、試験動物に臨床的な異常を認めてはならない。また、剖検したときに異常を認めてはならない。

### 3.4.2 鶏痘ウイルス培養細胞の試験

#### 3.4.2.1 培養細胞の試験

個体別培養細胞の 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。

##### 3.4.2.1.1 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し、観察するとき、CPE を認めてはならない。

##### 3.4.2.1.2 鶏赤血球凝集試験

3.4.2.1.1 の試験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。

### 3.5 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。

#### 3.5.1 培養観察

対照発育鶏卵に、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。

#### 3.5.2 鶏赤血球凝集試験

3.5.1 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。

### 3.6 原液の試験

#### 3.6.1 マレック病ウイルス原液の試験

##### 3.6.1.1 ウイルス含有量試験

##### 3.6.1.1.1 試験材料

##### 3.6.1.1.1.1 試料

検体を細胞維持用培養液（付記 1）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.6.1.1.1.2 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又は 2 代継代細胞を 25cm<sup>2</sup> 以上のシャーレに培養し、単層となったものを用いる。

##### 3.6.1.1.2 試験方法

試料 0.2mL ずつをそれぞれ 4 枚以上の培養細胞に接種し、37℃で 60 分間静置吸着させた後、細胞維持用培養液を加え、37℃で 4～7 日間培養し、観察する。

##### 3.6.1.1.3 判定

シャーレ当たり平均 20 個以上検出された試料の希釈倍数及びその平均ブラック数又は平均フォーカス数からウイルスの含有量を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中それぞれ 10<sup>6.0</sup>PFU 又は 10<sup>6.0</sup>FFU 以上でなければならない。

#### 3.6.2 鶏痘ウイルス原液の試験

##### 3.6.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.6.2.2 ウイルス含有量試験

#### 3.6.2.2.1 発育鶏卵を用いる試験

##### 3.6.2.2.1.1 試験材料

###### 3.6.2.2.1.1.1 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 11 ～ 13 日齢のものを用いる。

###### 3.6.2.2.1.1.2 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。

###### 3.6.2.2.1.2 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漿尿膜上に接種し、37℃で 5 日間培養し、観察する。

試験最終日に漿尿膜を検査してポック発現の有無を観察する。

###### 3.6.2.2.1.3 判定

漿尿膜にポックの出現し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>6.0</sup>EID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

#### 3.6.2.2.2 培養細胞を用いる試験

##### 3.6.2.2.2.1 試験材料

###### 3.6.2.2.2.1.1 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培養したものを用いる。

###### 3.6.2.2.2.1.2 試料

検体を細胞維持用培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.6.2.2.2.2 試験方法

試料 0.1mL ずつを 5 枚以上の培養細胞に接種し、37℃で 60 分吸着させた後、細胞維持用培養液を加え、37℃で 5 日間培養し、観察する。

###### 3.6.2.2.2.3 判定

培養細胞に CPE を認めた場合を感染とみなし、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>5.8</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、マレック病 2 価ワクチンにあっては固有の色調を有する凍結物でなければならない、鶏痘ワクチンにあっては固有の色調を有する乾燥物でなければならない。

両ワクチンを溶解し、混合したものは、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。

また、小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

#### 3.7.2 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、鶏痘ワクチンは、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、鶏痘ワクチンは、適合しなければならない。

#### 3.7.4 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。ただし、マレック病 2 価ワクチン及び鶏痘ワクチンのそれぞれ 1 本を 50mL の溶解用液（付記 2）に溶解したものを小分容器ごとの試料とする。

#### 3.7.5 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、マレック病2価ワクチン及び鶏痘ワクチンのそれぞれ1本を50mLの溶解用液に溶解したものを小分容器ごとの試料とする。

### 3.7.6 ウイルス含有量試験

#### 3.7.6.1 マレック病ウイルス

マレック病2価ワクチンを細胞維持用培養液で10倍階段希釈し、各階段の希釈液を試料とする。

3.6.1.1を準用し、両ウイルス株のCPEの形態学的相違による鑑別法でそれぞれのプラック数又はフォーカス数を測定するとき、試験品のウイルス含有量は、1羽分当たり両ウイルス株共に $10^{3.0}$ PFU又は $10^{3.0}$ FFU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。

また、CPEの形態学的相違による鑑別法で十分に測定できないときは、モノクローナル抗体を用いた免疫染色法により測定する。

#### 3.7.6.2 鶏痘ウイルス

3.6.2.2を準用して試験するとき、鶏痘ワクチンのウイルス含有量は、1羽分当たり $10^{2.0} \sim 10^{4.0}$ EID<sub>50</sub>又は $10^{1.5} \sim 10^{2.5}$ TCID<sub>50</sub>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

マレック病2価ワクチン及び鶏痘ワクチンを溶解用液で0.2mL中10羽分となるように濃度を調整したものを注射材料とする。

##### 3.7.7.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した発育鶏卵由来の1～4日齢の鶏を用いる。

#### 3.7.7.2 試験方法

試験動物の10羽を試験群、5羽を対照群とする。

注射材料0.2mLずつを試験群の皮下に注射し、対照群と共に5週間臨床観察を行い、観察終了時に体重を測定し、剖検する。

#### 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。また、剖検したときに異常を認めてはならない。

### 3.7.8 マレック病力価試験

#### 3.7.8.1 試験材料

##### 3.7.8.1.1 注射材料

マレック病2価ワクチン及び鶏痘ワクチンを溶解用液で0.2mL中1羽分となるように濃度を調整したものを注射材料とする。

##### 3.7.8.1.2 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1～4日齢の鶏を用いる。

#### 3.7.8.2 試験方法

試験動物の10羽を試験群、3羽を対照群とする。

注射材料の1羽分ずつを試験群の皮下に注射し、対照群と共に3週間観察する。

観察最終日に得られた各個体の血清について、蛍光抗体法により両ウイルス株に対する抗体価を測定する。

血清をリン酸緩衝食塩液で20倍に希釈し、更に2倍階段希釈する。感染細胞(付記4)に各希釈液を加え、37℃で45～60分間処理した後、リン酸緩衝食塩液で3回洗浄し、風乾した後、4単位の抗鶏IgG蛍光標識抗体(付記5)を加え、37℃で45～60分間処理した後、リン酸緩衝食塩液で3回洗浄し、UV励起法で観察する。

### 3.7.8.3 判定

特異蛍光が認められる血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

抗体価は、試験群の 80 %以上が両ウイルス株に対してそれぞれ 40 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全て 20 倍以下でなければならない。

### 3.7.9 鶏痘発痘試験

#### 3.7.9.1 試験材料

##### 3.7.9.1.1 接種材料

マレック病 2 価ワクチン及び鶏痘ワクチンを溶解用液で 0.01mL 中 1 羽分となるように濃度を調整したものを接種材料とする。

##### 3.7.9.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した発育鶏卵由来の 1～4 日齢の鶏を用いる。

#### 3.7.9.2 試験方法

試験動物の 10 羽の翼膜に接種材料の 0.01mL ずつをそれぞれ穿刺接種し、3 週間観察する。

#### 3.7.9.3 判定

接種後 5～7 日で善感発痘し、痘疱は、21 日以内に完全に消退しなければならない。

### 4 貯法及び有効期間

マレック病 2 価ワクチンは -140℃以下の液体窒素容器内で、鶏痘ワクチンは 2～5℃で保存する。

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

#### 付記 1 細胞維持用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

牛血清 適量

イーグルMEM又は F10 培地 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 溶解用液

1,000mL 中

塩化ナトリウム 8.0 g

無水リン酸水素二ナトリウム 1.2 g

リン酸二水素カリウム 0.19 g

フェノールレッド 0.025 g

水 残量

#### 付記 3 抗マレック病ウイルス血清

マレック病ウイルス SB-1 株又はこれと同等と認められた株、及び七面鳥ヘルペスウイルス FC126 株又はこれと同等と認められた株で免疫した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鶏の血清であって、試験品中のウイルスを完全に中和する力価を有するもの。

#### 付記 4 感染細胞

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 37℃、5 vol %炭酸ガス下で培養し、カバーグラスに単層を形成させたものにマレック病ウイルス SB-1 株又はこれと同等と認められた株、及び七面鳥ヘルペスウイルス FC126 株又はこれと同等と認められた株をそれぞれ接種

し、2～4日間培養したもので、特異抗原を有するもの。

付記5 抗鶏IgG 蛍光標識抗体

抗鶏IgG血清から $\gamma$ -グロブリンを調製し、これを蛍光色素で標識したもので、8単位以上を含むもの。

# ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎・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培養細胞又は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

ニューカッスル病ウイルス Ulster 2C 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℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1の試験を行う。

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

#### 2.1.1.4 ワーキングシードウイルス

##### 2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、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℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

#### 2.1.1.5 プロダクションシードウイルス

##### 2.1.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、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℃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。

#### 2.1.2 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 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 McFerran 127 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.3.2 性状

あひる胚初代細胞で CPE を伴って増殖する。

##### 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、SPF 動物規格の 2.6 に適合した鶏胚肝初代細胞又は同規格の 2.8 に適合したあひる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。

##### 2.1.3.4 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又は同規格の 2.8 に適合したあひる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。

##### 2.1.3.5 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又は同規格の 2.8 に適合したあひる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 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並びに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

10～12 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 9～12 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並びに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

9～12 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 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又は同規格の 2.8 に適合したあひる胚初代細胞を用いる。

SPF 動物規格の 2.8 に適合したあひる胚初代細胞は、原液の製造にも用いる。

#### 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、3.3.1 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

13～15 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、3.4.1 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、3.6.1.1 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不活化剤を加えて不活化した後、適当と認められた方法で濃縮し、原液とする。

原液について、3.7.1 及び 3.7.2.1 の試験を行う。ただし、3.7.2.1 の試験は、ウイルス浮遊液の濃縮前に行ってもよい。

## 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、3.4.1 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若しくは遠心上清又は感染増殖させた尿膜腔液を適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、3.6.1.2 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不活化剤を加えて不活化したもの又はこれを適当と認められた方法で濃縮したものを原液とする。

原液について、3.7.1 及び 3.7.2.2 の試験を行う。ただし、3.7.2.2 の試験は、不活化したウイルス浮遊液の濃縮前に行ってもよい。

## 2.3.3 産卵低下症候群— 1976 ウイルス原液

### 2.3.3.1 発育あひる卵又は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

#### 2.3.3.1.1 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。

#### 2.3.3.1.2 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。

### 2.3.3.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを 2.3.3.1.1 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、又はプロダクションシードウイルスを 2.3.3.1.2 のあひる胚初代細胞に接種して培養し採取したろ液若しく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、3.6.1.3 の試験を行う。

### 2.3.3.3 不活化

ウイルス浮遊液を適当と認められた不活化剤を加えて不活化したもの又はこれを適当と認められた方法で濃縮したものを原液とする。

原液について、3.7.1 及び 3.7.2.3 の試験を行う。ただし、3.7.2.3 の試験は、ウイルス浮遊液の濃縮前に行ってもよい。

## 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。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、3.8 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 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 個体別発育卵の試験



### 3.4.1 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。

#### 3.4.1.1 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 個体別発育あひる卵の試験

個体別発育あひる卵の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 個体別培養細胞の試験

個体別培養細胞の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の培養終了時に採取した培養液に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。

### 3.6 ウイルス浮遊液の試験

#### 3.6.1 ウイルス含有量試験

##### 3.6.1.1 ニューカッスル病ウイルス

##### 3.6.1.1.1 試験材料

##### 3.6.1.1.1.1 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。

##### 3.6.1.1.1.2 発育鶏卵

生ワタ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。

##### 3.6.1.1.2 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。

##### 3.6.1.1.3 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、1mL中10<sup>8.0</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。

##### 3.6.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

##### 3.6.1.2.1 試験材料

##### 3.6.1.2.1.1 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。

#### 3.6.1.2.1.2 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。

#### 3.6.1.2.2 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。

#### 3.6.1.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全、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>6.0</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。

#### 3.6.1.3 産卵低下症候群—1976 ウイルス

##### 3.6.1.3.1 試験材料

###### 3.6.1.3.1.1 試料 1

検体を細胞維持用培養液（付記 1）で 10 倍に希釈した後、4 倍階段希釈した各段階の希釈液を試料 1 とする。

###### 3.6.1.3.1.2 試料 2

検体をトリプトース・ホスフェイト・ブロス溶液で 10 倍階段希釈した各段階の希釈液を試料 2 とする。

###### 3.6.1.3.1.3 培養細胞

96 穴マイクロプレートに培養したあひる胚初代細胞を用いる。

###### 3.6.1.3.1.4 発育あひる卵

13～15 日齢の産卵低下症候群—1976 ウイルス抗体陰性の発育あひる卵を用いる。

##### 3.6.1.3.2 試験方法

次のいずれかの方法によりウイルス含有量を測定する。

###### 3.6.1.3.2.1 培養細胞接種試験

試料 1 の 0.1mL ずつをそれぞれ 4 穴以上の培養細胞に接種し、37℃で 7 日間培養して、CPE 形成の有無を観察する。

###### 3.6.1.3.2.2 発育あひる卵接種試験

試料 2 の 0.1mL ずつをそれぞれ 5 個以上の発育あひる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。

###### 3.6.1.3.3 判定

培養細胞接種試験にあつては CPE が認められる最高希釈倍数から TCID<sub>50</sub> を、発育あひる卵接種試験にあつては赤血球凝集性を示した最高希釈倍数から EID<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> 以上又は 1 mL 中 10<sup>8.5</sup>EID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

#### 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。

##### 3.7.2 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。

### 3.7.2.3 産卵低下症候群－1976 ウイルス

#### 3.7.2.3.1 試験材料

##### 3.7.2.3.1.1 試料

検体を試料とする。

##### 3.7.2.3.1.2 培養細胞

あひる胚初代細胞を用いる。

##### 3.7.2.3.1.3 発育あひる卵

13～15 日齢のものを用いる。

#### 3.7.2.3.2 試験方法

次のいずれかの方法により試験する。

##### 3.7.2.3.2.1 あひる胚初代細胞接種試験

試料にホルマリンを中和するための L-システインを加え、その 5 mL につき 850cm<sup>2</sup> 以上の培養細胞に接種し、38.5℃で 6 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、38.5℃で 7 日間培養する。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性を調べる。

##### 3.7.2.3.2.2 発育あひる卵接種試験

試料 0.2mL ずつを 10 個以上の発育あひる卵の尿膜腔内に注射し、37℃で 7 日間培養した後、尿膜腔液を採取し、更に 1 代継代し、37℃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性の有無を観察する。

#### 3.7.2.3.3 判定

あひる胚初代細胞接種試験については、培養細胞に CPE を認めず、かつ、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。

発育あひる卵接種試験については、胚が正常に発育し、かつ、尿膜腔液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。

## 3.8 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 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。

### 3.8.4 チメロサル定量試験

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。

### 3.8.5 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4～5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脚部筋肉内又は頸背部皮下に注射し、対照群と共に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 ニューカッスル病力価試験

##### 3.8.6.1.1 試験材料

##### 3.8.6.1.1.1 試験動物

3.8.5の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.8.6.1.1.2 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。

##### 3.8.6.1.2 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、ニューカッスル病ウイルス赤血球凝集抑制試験を行う。

##### 3.8.6.1.3 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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、そのHI抗体価とする。

#### 3.8.6.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

##### 3.8.6.2.1 試験材料

##### 3.8.6.2.1.1 試験動物

3.8.5の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.8.6.2.1.2 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。

#### 3.8.6.2.1.3 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。

#### 3.8.6.2.2 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。

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。

#### 3.8.6.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全、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。

#### 3.8.6.3 産卵低下症候群－1976 力価試験

##### 3.8.6.3.1 試験材料

##### 3.8.6.3.1.1 試験動物

3.8.5 の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.8.6.3.1.2 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2）を用いる。

##### 3.8.6.3.2 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、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25μL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50μLずつ加えて振とう混合し、60分間静置した後、赤血球凝集の有無を観察する。

##### 3.8.6.3.3 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、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 細胞維持用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス

2.95～3.0 g

牛血清

0 ~ 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 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。

# ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎 2 価・鶏伝染性ファブリキウス嚢病混合（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同規格の鶏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たウイルス液をそれぞれ不活化し、油性アジュバントを添加したものを混合したワクチン又はそれぞれのウイルス液を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練馬 E<sub>10</sub> 株及び TM-86EC 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 鶏伝染性ファブリキウス囊病ウイルス

#### 2.1.3.1 名称

弱毒鶏伝染性ファブリキウス囊病ウイルス K 株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.3.2 性状

鶏胚初代細胞又は Vero 細胞で CPE を伴って増殖する。

#### 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、SPF 動物規格の 2.6 に適合した鶏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。

#### 2.1.3.4 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 に適合した製造に相当と認められた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並びに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

製造に相当と認められた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 に適合した製造に相当と認められた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並びに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

製造に相当と認められた日齢のものを用いる。

### 2.2.3 鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス

#### 2.2.3.1 初代細胞

SPF 動物規格の 2.6 に適合した鶏胚初代細胞を用いる。

#### 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、3.3 の試験を行う。

## 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 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、3.6.1.1 の試験を行う。

#### 2.3.1.3 不活化

ウイルス浮遊液又はこれを濃縮したものにホルマリンを加えて不活化し、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、3.7.2.1 及び 3.7.3.1 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を濃度調整後、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、3.6.1.2の試験を行う。

### 2.3.2.3 不活化

各ウイルス浮遊液又はこれらを濃縮したものにホルマリンを加えて不活化し、それぞれの株の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

各株の不活化ウイルス浮遊液を濃度調整した後、適当と認められた油性アジュバントを添加し、それぞれの株の原液とする。

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 鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス原液

### 2.3.3.1 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。ウイルス接種前の個別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、3.5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、3.6.1.3の試験を行う。

### 2.3.3.3 不活化

ウイルス浮遊液又はこれを濃縮したものにホルマリンを加えて不活化し、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、3.7.2.3及び3.7.3.2の試験を行う。

### 2.3.3.4 アジュバントの添加

不活化ウイルス浮遊液を濃度調整後、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の各株原液及び鶏伝染性ファブリキウス嚢病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、3.9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。

### 3.2 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。

#### 3.4.1 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 %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

静置培養の場合は個別培養細胞の1 %以上を、ファーメンター培養の場合は個別培養細胞の1 vol %以上又は500mL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 %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 ウイルス浮遊液の試験

##### 3.6.1 ウイルス含有量試験

###### 3.6.1.1 ニューカッスル病ウイルス

3.7.3.1 の試験を実施するものについては、本試験を行わなくてもよい。

###### 3.6.1.1.1 試験材料

###### 3.6.1.1.1.1 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。

###### 3.6.1.1.1.2 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。

###### 3.6.1.1.2 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。

###### 3.6.1.1.3 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>9.0</sup>EID<sub>50</sub>以上でなければならない。

###### 3.6.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

###### 3.6.1.2.1 試験材料

###### 3.6.1.2.1.1 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。

###### 3.6.1.2.1.2 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。

###### 3.6.1.2.2 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。

###### 3.6.1.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性(発育不全、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、各株について定められた量以上でなければならない。

###### 3.6.1.3 鶏伝染性ファブリキウス囊病ウイルス

3.7.3.2 の試験を実施するものについては、本試験を行わなくてもよい。

###### 3.6.1.3.1 試験材料

#### 3.6.1.3.1.1 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。

#### 3.6.1.3.1.2 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、単層になったものを用いる。

#### 3.6.1.3.2 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1）を加え、37℃で3～4日間培養後、第2次重層寒天培地（付記2）を重層し、観察する。

#### 3.6.1.3.3 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  $10^{8.0}$  PFU 以上でなければならない。

### 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ない、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ない。

##### 3.7.2.3 鶏伝染性ファブリキウス囊病ウイルス

###### 3.7.2.3.1 試験材料

###### 3.7.2.3.1.1 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又は適当と認められた方法でホルマリンを中和したものを試料とする。

###### 3.7.2.3.1.2 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であって、単層となったものを用いる。

#### 3.7.2.3.2 試験方法

試料 5 mL を、1 mL につき 20cm<sup>2</sup> 以上の培養細胞に接種し、37℃でK株では5日間、D78株では3～4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、37℃でK株では5日間、D78株では3～4日間培養し、観察する。

#### 3.7.2.3.3 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。

### 3.7.3 抗原定量試験

#### 3.7.3.1 ニューカッスル病ウイルス

3.6.1.1 の試験を実施するものについては、本試験を行わなくてもよい。

##### 3.7.3.1.1 試験材料

###### 3.7.3.1.1.1 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。

###### 3.7.3.1.2 試験方法

各試料 0.05mL に 1 vol % 鶏赤血球浮遊液を 0.025mL 加え、30～60分間静置する。

###### 3.7.3.1.3 判定

赤血球の凝集を示す試料の最高希釈倍数を赤血球凝集（以下この項において「HA」という。）単位で示す。

抗原量は、0.05mL 中 128HA 単位以上でなければならない。

#### 3.7.3.2 鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス

3.6.1.3 の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。

##### 3.7.3.2.1 試験材料

###### 3.7.3.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.7.3.2.2 試験方法

試料及び参照抗原（付記3）をR63モノクローナル抗体（付記4）で固相化した酵素抗体法（以下この項において「ELISA」という。）用プレート（付記5）に添加し、37℃で反応させた後、ビオチン標識R63抗体（付記6）を添加し、37℃で反応させる。その後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識アビジン（付記7）を加え、37℃で反応させた後、過酸化尿素を加えたテトラメチルベンチジンを加え、発色させる。2 mol/L 硫酸を加えて反応を停止後、波長 450nm で吸光度を測定する。

###### 3.7.3.2.3 判定

参照抗原及び試料の吸光度から試料の抗原量を計算するとき、R63-ELISA 単位は、1 mL 中 2,500EU 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 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。

### 3.9.4 安全試験

#### 3.9.4.1 試験材料

##### 3.9.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.9.4.1.2 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4～7週齢の鶏を用いる。

#### 3.9.4.2 試験方法

試験動物の10羽を試験群、3羽を対照群とする。

注射材料の1羽分ずつを試験群の頸部皮下に注射し、対照群と共に4週間観察する。

#### 3.9.4.3 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。

### 3.9.5 力価試験

#### 3.9.5.1 ニューカッスル病力価試験

##### 3.9.5.1.1 試験材料

##### 3.9.5.1.1.1 試験動物

3.9.4の試験に用いた試験動物を用いる。

##### 3.9.5.1.1.2 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。

##### 3.9.5.1.2 試験方法

3.9.4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。

##### 3.9.5.1.3 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、対照群の全てがHI抗体価5倍以下でなければならない。

#### 3.9.5.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

##### 3.9.5.2.1 試験材料

##### 3.9.5.2.1.1 試験動物

3.9.4の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.9.5.2.1.2 中和試験用ウイルス

それぞれの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 の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。

##### 3.9.5.2.1.3 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。

##### 3.9.5.2.2 試験方法

3.9.4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、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。

#### 3.9.5.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全、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。

#### 3.9.5.3 鶏伝染性ファブリキウス囊病力価試験

##### 3.9.5.3.1 試験材料

###### 3.9.5.3.1.1 試験動物

3.9.4の試験に用いた動物を用いる。

###### 3.9.5.3.1.2 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に適合した鶏胚初代細胞で培養した鶏伝染性ファブリキウス囊病ウイルスK株又は適当と認められた株を用いる。

###### 3.9.5.3.1.3 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、単層になったものを用いる。

##### 3.9.5.3.2 試験方法

3.9.4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、中和試験を行う。血清を非働化し、リン酸緩衝食塩液又はウイルス増殖用培養液（付記8）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、4℃で18～24時間又は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、37℃で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。

##### 3.9.5.3.3 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、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 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は加えてもよい。

##### 付記2 第2次重層寒天培地



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

付記3 参照抗原

Vero 細胞で培養した鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス D78 株ウイルス液をホルマリンで不活化した後、抗原量を約 10,000EU/mL に調整したもの。

付記4 R63 モノクローナル抗体

鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスの感染防御抗原である VP2 たん白を認識し、中和活性を有するモノクローナル抗体であって、参照抗原が規定の抗原量を示すように固相化緩衝液で濃度を調整したもの。

付記5 ELISA 用プレート

96 穴平底であるマイクロプレート。

付記6 ビオチン標識 R63 抗体

参照抗原が規定の抗原量を示すように IB・EIA 緩衝液（付記9）で調整したもの。

付記7 ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識アビジン

参照抗原が規定の抗原量を示すように IB・EIA 緩衝液で調整したもの。

付記8 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 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。

付記9 IB・EIA 緩衝液

1,000mL 中

リン酸二水素ナトリウム 2.31 g

リン酸水素二ナトリウム二水和物 24.06 g

塩化ナトリウム 29.22 g

カオリン処理 30g/dL 牛血清アルブミン 3.3 mL

ポリソルベート 20 0.5 g

水 残量

ろ過滅菌後、スキムミルク 2 g/dL 及び牛胎子血清 5 vol% を加える。

# ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎・産卵低下症候群 -1976・トリニューモウイルス感染症混合（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産卵低下症候群-1976ウイルス及びトリニューモ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 Ulster 2C 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 Mass41 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 V127 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.3.2 性状

あひる胚初代細胞で CPE を伴って増殖する。

##### 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、SPF 動物規格の 2.8 に適合したあひる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。

##### 2.1.3.4 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 2.8 に適合したあひる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。

##### 2.1.3.5 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 2.8 に適合したあひる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。

#### 2.1.4 トリニューモウイルス

##### 2.1.4.1 名称

トリニューモウイルス VCO3 株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.4.2 性状

Vero 細胞及び鶏胚初代細胞に CPE を伴って増殖する。

#### 2.1.4.3 マスターシードウイルス

##### 2.1.4.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、シードロット規格に適合した Vero 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、シードロット規格に適合した Vero 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、シードロット規格に適合した Vero 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 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並びに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

#### 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並びに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 産卵低下症候群 - 1976 ウイルス

#### 2.2.3.1 初代細胞

SPF 動物規格の 2.8 に適合したあひる胚初代細胞を用いる。

## 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、3.3 の試験を行う。

## 2.2.4 トリニューモウイルス

### 2.2.4.1 株化細胞

Vero 細胞又は製造に相当と認められた細胞を用いる。

### 2.2.4.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

### 2.2.4.3 マスターセルシード

#### 2.2.4.3.1 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 2.2.4.2 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、3.4.1 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。

### 2.2.4.4 ワーキングセルシード

#### 2.2.4.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.4.2 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、3.4.2 の試験を行う。

### 2.2.4.5 プロダクションセルシード

#### 2.2.4.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.4.2 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、3.4.3 の試験を行う。

## 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、3.5 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、3.7.1 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不活化剤を加えて不活化した後、相当と認められた方法で濃縮し、原液とする。

原液について、3.8.1 及び 3.8.2.1 の試験を行う。ただし、3.8.2.1 の試験は、ウイルス浮遊液の濃

縮前に行ってもよい。

## 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、3.5 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、3.7.1.2 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不活化剤を加えて不活化した後、適当と認められた方法で濃縮し、原液とする。

原液について、3.8.1 及び 3.8.2.2 の試験を行う。ただし、3.8.2.2 の試験は、ウイルス浮遊液の濃縮前に行ってもよい。

## 2.3.3 産卵低下症候群－1976 ウイルス原液

### 2.3.3.1 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、3.6 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、3.7.1.3 の試験を行う。

### 2.3.3.3 不活化

ウイルス浮遊液を適当と認められた不活化剤を加えて不活化した後、適当と認められた方法で濃縮し、原液とする。

原液について、3.8.1 及び 3.8.2.3 の試験を行う。ただし、3.8.2.3 の試験は、ウイルス浮遊液の濃縮前に行ってもよい。

## 2.3.4 トリニューモウイルス原液

### 2.3.4.1 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。

### 2.3.4.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを 2.3.4.1 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細胞及び培養液をホモジナイズ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、3.7.1.4 の試験を行う。

### 2.3.4.3 不活化

ウイルス浮遊液を適当と認められた不活化剤を加えて不活化した後、適当と認められた方法で濃縮し、原液とする。

原液について、3.8.1 及び 3.8.2.4 の試験を行う。ただし、3.8.2.4 の試験は、ウイルス浮遊液の濃縮前に行ってもよい。

## 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、産卵低下症候群－1976 ウイルス原液及びトリニューモ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。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

発育鶏卵及びあひる胚初代細胞を用いて培養する場合には、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。

Vero細胞を用いて培養する場合には、鶏脳脊髄炎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1.1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。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。

###### 3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

発育鶏卵及びあひる胚初代細胞を用いて培養する場合には、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。

Vero細胞を用いて培養する場合には、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、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、3.2.9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 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 株化細胞の試験

### 3.4.1 マスターセルシードの試験

#### 3.4.1.1 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。

#### 3.4.1.2 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。

#### 3.4.1.3 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。

#### 3.4.1.4 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。

#### 3.4.1.5 外来性ウイルス否定試験

##### 3.4.1.5.1 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。

##### 3.4.1.5.2 特定ウイルス否定試験

###### 3.4.1.5.2.1 特定ウイルス否定一般試験

鶏脳脊髄炎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、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 3.4.1.5.2.2 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の 3.1.2 を実施しなくてもよい。

###### 3.4.1.5.2.2 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、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 1.2、3.2.1、3.2.2、3.2.5、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 3.4.1.5.2.1 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。

#### 3.4.1.6 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。

#### 3.4.1.7 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。



### 3.4.2 ワーキングセルシードの試験

#### 3.4.2.1 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。

#### 3.4.2.2 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。

#### 3.4.2.3 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。

### 3.4.3 プロダクションセルシードの試験

#### 3.4.3.1 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。

#### 3.4.3.2 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。

#### 3.4.3.3 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。

### 3.5 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。

#### 3.5.1 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。

#### 3.5.2 鶏赤血球凝集試験

3.5.1 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。

### 3.6 個体別培養細胞の試験

個体別培養細胞の 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。

#### 3.6.1 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。

#### 3.6.2 鶏赤血球凝集試験

3.6.1 の培養終了時に採取した培養液に 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。

### 3.7 ウイルス浮遊液の試験

#### 3.7.1 ウイルス含有量試験

##### 3.7.1.1 ニューカッスル病ウイルス

##### 3.7.1.1.1 試験材料

##### 3.7.1.1.1.1 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。

##### 3.7.1.1.1.2 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。

##### 3.7.1.1.2 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。

##### 3.7.1.1.3 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>8.0</sup>EID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

### 3.7.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

#### 3.7.1.2.1 試験材料

##### 3.7.1.2.1.1 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。

##### 3.7.1.2.1.2 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。

##### 3.7.1.2.2 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。

##### 3.7.1.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全、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>6.0</sup>EID<sub>50</sub>以上でなければならない。

### 3.7.1.3 産卵低下症候群－1976ウイルス

#### 3.7.1.3.1 試験材料

##### 3.7.1.3.1.1 試料

検体を細胞維持用培養液（付記1）で10倍に希釈した後、4倍階段希釈した各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.7.1.3.1.2 培養細胞

96穴マイクロプレートに培養し単層となった生ワクチン製造用材料の規格2.4.1に適合したあひる胚初代細胞を用いる。

##### 3.7.1.3.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4穴以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間培養し、観察する。

##### 3.7.1.3.3 判定

培養細胞にCPEが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。

### 3.7.1.4 トリニューモウイルス

#### 3.7.1.4.1 試験材料

##### 3.7.1.4.1.1 試料

検体を細胞維持用培養液で10倍に希釈した後、4倍階段希釈した各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.7.1.4.1.2 培養細胞

96穴マイクロプレートに培養し単層となったVero細胞を用いる。

##### 3.7.1.4.2 試験方法

試料0.2mLずつをそれぞれ4穴以上の培養細胞に接種し、38℃で9日間培養し、観察する。

##### 3.7.1.4.3 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>5.0</sup>TCID<sub>50</sub>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。

#### 3.8.2 不活化試験

##### 3.8.2.1 ニューカッスル病ウイルス

##### 3.8.2.1.1 試験材料

##### 3.8.2.1.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

#### 3.8.2.1.1.2 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。

#### 3.8.2.1.2 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。

#### 3.8.2.1.3 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。

#### 3.8.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

##### 3.8.2.2.1 試験材料

###### 3.8.2.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

###### 3.8.2.2.1.2 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。

##### 3.8.2.2.2 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。

##### 3.8.2.2.3 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。

#### 3.8.2.3 産卵低下症候群 - 1976 ウイルス

##### 3.8.2.3.1 試験材料

###### 3.8.2.3.1.1 試料

検体の不活化剤を中和したものを試料とする。

###### 3.8.2.3.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.4.1 に適合したあひる胚初代細胞を用いる。

##### 3.8.2.3.2 試験方法

試料 5 mL につき 850cm<sup>2</sup> 以上の培養細胞に接種し、38.5℃で 6 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、38.5℃で 7 日間培養する。試験最終日に培養上清を採取し、鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

##### 3.8.2.3.3 判定

培養細胞に CPE を認めず、培養上清に赤血球凝集を認めない場合、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。

#### 3.8.2.4 トリニューモウイルス

##### 3.8.2.4.1 試験材料

###### 3.8.2.4.1.1 試料

検体の不活化剤を中和したものを試料とする。

###### 3.8.2.4.1.2 培養細胞

ローラーボトルに培養した Vero 細胞を用いる。

##### 3.8.2.4.2 試験方法

試料 5 mL につき 850cm<sup>2</sup> 以上の培養細胞に接種し、38℃で 6 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、38℃で 7 日間培養する。

##### 3.8.2.4.3 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。

### 3.9 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 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。

#### 3.9.4 チメロサル定量試験

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。

#### 3.9.5 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 30 ~ 35 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脚部筋肉内に注射し、対照群と共に 4 週間観察する。

##### 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。

#### 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。

###### 3.9.6.1.2 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。

###### 3.9.6.1.3 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 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 日齢の発育鶏卵を用いる。

###### 3.9.6.2.1.3 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、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。

#### 3.9.6.3 産卵低下症候群 - 1976 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

産卵低下症候群 - 1976 ウイルス赤血球凝集抗原（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、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 3）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  $\mu$  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。

##### 3.9.6.3.3 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。

#### 3.9.6.4 トリニューモウイルス力価試験

##### 3.9.6.4.1 試験材料

##### 3.9.6.4.1.1 試験動物

3.9.5 の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.9.6.4.2 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、ELISA キット（付記 4）を用いて酵素抗体反応試験を行う。

被検血清を洗浄用緩衝液（付記 5）を用いて 2 倍に希釈し、固相化プレート（付記 6）の 2 穴以上にそれぞれの希釈血清を 1 穴当たり 100  $\mu$  L、また、参照陽性血清（付記 7）及び参照陰性血清

(付記 8) を 2 穴に 1 穴当たり 100  $\mu$  L 加え、常温で 30 分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で 3 回洗浄し、水切りを行った後、マウス抗トリニューモウイルスペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体 (付記 9) を 100  $\mu$  L 加え、常温で 30 分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で 3 回洗浄し、水切りを行った後、基質液 (付記 10) を 100  $\mu$  L 加え、常温で 10 分間反応させる。反応終了後、反応停止液 (付記 11) を 50  $\mu$  L 加えて反応を停止させ、波長 450nm で吸光度値を測定する。

#### 3.9.6.4.3 判定

血清の平均吸光度から、以下に示す式により PI 値を算出する。

参照陽性血清吸光度値 : OD<sub>PR</sub>

参照陰性血清吸光度値 : OD<sub>NR</sub>

被検血清吸光度値 : OD<sub>S</sub>

ブランク吸光度値 : BN

$$OD_p = [(OD_s \text{ 又は } OD_{PR} - BN) / (OD_{NR} - BN)] \times 100$$

$$PI = 100 - OD_p$$

参照陰性血清の吸光度値 OD<sub>NR</sub> は 0.600 以上でなければならず、参照陽性血清の OD<sub>p</sub> 値が 60 以下であるとき、試験群の PI 値の平均は 60 以上でなければならず、対照群の PI 値は全て 15 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 1 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 細胞維持用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 ~ 3.0 g

牛血清 0 ~ 30 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 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 株又はこれと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 3 25w/v %カオリン液

100mL 中

カオリン 25 g

リン酸緩衝食塩液 残量

115 °C で 15 分間高圧滅菌又はアジ化ナトリウムを 0.01w/v % 添加した後、10 °C 以下に保存する。

#### 付記4 ELISA キット

適当と認められる ELISA キットで、洗浄用緩衝液、固相化プレート、参照陽性血清、参照陰性血清、マウス抗トリニューモウイルスペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体、基質液及び反応停止液で構成されるものであり、バリデーション用陽性血清（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1週齢鶏にトリニューモウイルスを  $10^{4.0}$ TCID<sub>50</sub>/羽で免疫し、免疫後4週目に採血し、プールして得たもの）及びバリデーション用陰性血清（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5～15週齢鶏の血清でトリニューモウイルス抗体陰性のもの。）を用いて酵素抗体反応試験を実施したとき、バリデーション用陽性血清のPI値は65以上80以下を示し、バリデーション用陰性血清のPI値は5以下を示す。

#### 付記5 洗浄用緩衝液

PBS-Tween 錠剤又は濃縮液を水に溶解し、以下の最終濃度のもの。  
0.14 mol/L 塩化ナトリウム液  
0.003 mol/L 塩化カリウム液  
0.01 mol/L リン酸緩衝液  
0.05 % ポリソルベート 20 液  
pH を 7.4 に調整する。

#### 付記6 固相化プレート

酵素抗体反应用プレートにトリニューモウイルス VCO3 株抗原（付記 12）を固相化し、乾燥したもので、2～5℃に保存する。

#### 付記7 参照陽性血清

0.05w/v % チメロサル含有抗トリニューモウイルス血清で、その OD<sub>492</sub> 値が 60 以下のもの。

#### 付記8 参照陰性血清

0.05w/v % チメロサル含有陰性血清で、その吸光度が 0.600 以上のもの。

#### 付記9 マウス抗トリニューモウイルスペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体

トリニューモウイルス株をマウスに免疫して作成したハイブリドーマから、VCO3 抗原のスクリーニングを行って得たモノクローナル抗体で、アフィニティーカラムクロマトグラフィーにより精製し、ホースラディッシュペルオキシダーゼで標識し、凍結乾燥したもので、洗浄用緩衝液に溶解して用いる。溶解後は、-20℃で保存する。

#### 付記10 基質液

液中に 3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン及び過酸化水素を含むもの。

#### 付記11 反応停止液

2mol/L 硫酸液

#### 付記12 トリニューモウイルス VCO3 抗原

トリニューモウイルス VCO3 株を Vero 細胞に接種して 37℃で培養し、完全な CPE が観察された後、ウイルス浮遊液及び細胞を凍結融解し、3,500rpm で 30 分間遠心し、その遠心上清を更に 19,000rpm で 15～20 時間超遠心して得た沈殿に少量のリン酸緩衝食塩液を加えてガラ

スホモジナイザーでホモジナイズして懸濁したものに、最終濃度 0.1 % となるように Triton X 100 を加え、37 °C で 30 分間処理した後、超音波処理したもの。



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生ワクチン（シード）の項の次に次のように加える。

## マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症凍結生ワクチン （シード）

### 1 定義

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

### 2 製法

#### 2.1 製造用株

##### 2.1.1 名称

マイコプラズマ・ガリセプチカム ts-11 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.2 性状

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

##### 2.1.3 マスターシード菌

###### 2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、製造に相当と認められた培地で増殖させ、保存用の容器に分注する。分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

マスターシード菌について、3.1.1の試験を行う。

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

##### 2.1.4 ワーキングシード菌

###### 2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、製造に相当と認められた培地で増殖及び継代する。

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

ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。

##### 2.1.5 プロダクションシード菌

###### 2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、製造に相当と認められた培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

### 2.2 製造用材料

#### 2.2.1 培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

### 2.3 原液

プロダクションシード菌を培地に接種し、培養したものを原液とする。

原液について、3.2の試験を行う。

### 2.4 最終バルク

原液を必要に応じ濃度調整したものを最終バルクとする。

### 2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、凍結し、小分製品とする。  
小分製品について、3.3の試験を行う。

### 3 試験法

#### 3.1 製造用株の試験

##### 3.1.1 マスターシード菌の試験

###### 3.1.1.1 同定試験

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

###### 3.1.1.2 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.1.1.3 対象動物を用いた免疫原性試験

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

###### 3.1.1.4 対象動物を用いた安全性確認試験

一般試験法の対象動物を用いた安全性確認試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.1.1.5 病原性復帰確認試験

一般試験法の病原性復帰確認試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.2 ワーキングシード菌の試験

###### 3.1.2.1 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.1.3 プロダクションシード菌の試験

###### 3.1.3.1 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2 原液の試験

##### 3.2.1 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.2.2 生菌数試験

###### 3.2.2.1 試験材料

###### 3.2.2.1.1 試料

原液を試料とする。

###### 3.2.2.1.2 培地

マイコプラズマ用培地（付記1）又は適当と認められた培地を用いる。

###### 3.2.2.2 試験方法

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

###### 3.2.2.3 判定

培地の色調変化を示した穴を有する行（横列）の希釈の高い方から連続した3つの希釈列又は連続した2つの希釈列と色調変化した穴が最初に全く認められなくなった希釈列の合計3希釈列のいずれかを用いて判定する。これら3希釈列の色調が変化した穴の数を用いて最確数表（付記2）から最確数を求め、3希釈列の最初の希釈倍数を乗じて25  $\mu$ L当たりの色調変化単位（以下この項において「CCU」という。）を算出し、更に40を乗じて1 mL当たりのCCUを算出する。

検体の生菌数は、1 mL当たり $10^0$ CCU以上でなければならない。

#### 3.3 小分製品の試験

### 3.3.1 特性試験

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

### 3.3.2 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.3.3 生菌数試験

試験品について 3.2.2 を準用して試験するとき、1羽分当たり  $5 \times 10^7$  ( $10^{7.7}$ ) CCU 以上でなければならない。ただし、25  $\mu$ L 当たりの CCU を算出し、更に 1.2 を乗じて 1羽当たりの CCU を算出する。

### 3.3.4 マーカー試験

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

### 3.3.5 安全性試験

#### 3.3.5.1 試験材料

##### 3.3.5.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

##### 3.3.5.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 3～4 週齢の鶏を用いる。

#### 3.2.5.2 試験方法

試験動物の 10 羽を試験群とし、5 羽を対照群とする。

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

試験開始時及び試験終了時に体重を測定する。

#### 3.3.5.3 判定

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

### 3.3.6 力価試験

#### 3.3.6.1 試験材料

##### 3.3.6.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

##### 3.3.6.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料規格 1.1 由来の 3～4 週齢の鶏を用いる。

##### 3.3.6.1.3 凝集反応抗原

「マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症急速診断用菌液」を用いる。

#### 3.3.6.2 試験方法

試験動物の 10 羽を試験群とし、3 羽を対照群とする。

接種材料 1 羽分を試験群に点眼接種する。接種 4 週間後に試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症急速凝集試験を行う。

#### 3.3.6.3 判定

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

## 4 貯法及び有効期間

－70  $^{\circ}$ C 以下に保管する。

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

る。

付記1 マイコプラズマ用培地

1,000mL 中

マイコプラズマ用基礎培地 (PPLO 培地) *	22.5 g
ブドウ糖*	1 g
塩酸システイン*	0.1 g
酢酸タリウム*	0.1 g
0.6w/v%フェノールレッド液	5 mL
豚血清	100 mL
新鮮イーストエキス	10 mL
0.2w/v%DNA 液	10 mL
ベンジルペニシリンカリウム	5,000 単位
水	残量

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

付記2 最確数表

連続した3つの希釈列 に認められた培地色調 変化の穴の数	最確数 (MPN)	連続した3つの希釈列 に認められた培地色調 変化の穴の数	最確数 (MPN)
8 8 7	208	7 0 1	1.83
8 8 6	139	7 0 0	1.55
8 8 5	98.2	6 6 1	3.08
8 8 4	70.2	6 6 0	2.77
8 8 3	51.0	6 5 1	2.73
8 8 2	38.5	6 5 0	2.44
8 8 1	30.1	6 4 2	2.69
8 8 0	24.0	6 4 1	2.41
8 7 8	59.6	6 4 0	2.14
8 7 7	50.8	6 3 2	2.38
8 7 6	43.3	6 3 1	2.11
8 7 5	36.9	6 3 0	1.86
8 7 4	31.4	6 2 2	2.09
8 7 3	26.7	6 2 1	1.84
8 7 2	22.6	6 2 0	1.60
8 7 1	19.1	6 1 2	1.82
8 7 0	15.9	6 1 1	1.58

8 6 6	28.4	6 1 0	1.35
8 6 5	25.0	6 0 2	1.56
8 6 4	21.8	6 0 1	1.34
8 6 3	18.9	6 0 0	1.13
8 6 2	16.3	5 5 1	2.07
8 6 1	13.8	5 5 0	1.85
8 6 0	11.5	5 4 1	1.84
8 5 6	21.3	5 4 0	1.63
8 5 5	18.9	5 3 2	1.82
8 5 4	16.6	5 3 1	1.61
8 5 3	14.4	5 3 0	1.41
8 5 2	12.3	5 2 2	1.60
8 5 1	10.3	5 2 1	1.40
8 5 0	8.42	5 2 0	1.21
8 4 5	14.8	5 1 2	1.39
8 4 4	13.0	5 1 1	1.20
8 4 3	11.1	5 1 0	1.01
8 4 2	9.40	5 0 2	1.19
8 4 1	7.74	5 0 1	1.01
8 4 0	6.22	5 0 0	0.83
8 3 5	11.8	4 4 0	1.28
8 3 4	10.2	4 3 1	1.27
8 3 3	8.67	4 3 0	1.10
8 3 2	7.18	4 2 1	1.09
8 3 1	5.82	4 2 0	0.93
8 3 0	4.67	4 1 2	1.08
8 2 4	8.07	4 1 1	0.92
8 2 3	6.72	4 1 0	0.76
8 2 2	5.50	4 0 2	0.91
8 2 1	4.45	4 0 1	0.75
8 2 0	3.62	4 0 0	0.60
8 1 3	5.22	3 4 0	1.01
8 1 2	4.27	3 3 1	1.00
8 1 1	3.50	3 3 0	0.85
8 1 0	2.87	3 2 1	0.85
8 0 2	3.38	3 2 0	0.70

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

ワクチン（シードロット製剤）の一部マイコプラズマ・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）の項を次のように改める。

## 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）

### 1 定義

シードロット規格に適合したマイコプラズマ・ガリセプチカムの培養菌液を不活化し、油性アジュバントを添加したワクチンである。

### 2 製法

#### 2.1 製造用株

##### 2.1.1 名称

マイコプラズマ・ガリセプチカム 63-523 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.2 性状

鶏に対して病原性を示す。

##### 2.1.3 マスターシード菌

###### 2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

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

分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-40^{\circ}\text{C}$ 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、適当と認められた培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結して $-40^{\circ}\text{C}$ 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、適当と認められた培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して $-40^{\circ}\text{C}$ 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 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

### 2.3 原液

#### 2.3.1 培養

プロダクションシード菌を製造用培地に接種して増菌・継代培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2 の試験を行う。

#### 2.3.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加えて不活化した後、適当と認められた希釈用液で遠心洗浄し、適量の希釈用液に再浮遊させたもの、又は培養菌液にホルマリンを加えて不活化した後、適当と認められ

た方法で濃縮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

不活化菌液を適当と認められた希釈用液で濃度調整し、油性アジュバントを添加したものを原液とする。この場合、適当と認められた保存剤を添加してもよい。

ただし、アジュバントは、最終バルクの調製時に添加してもよい。

原液について、3.4の試験を行う。

### 2.4 最終バルク

原液を混合し、濃度調整し、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て、小分製品とする。

小分製品について、3.5の試験を行う。

## 3 試験法

### 3.1 製造用株の試験

#### 3.1.1 マスターシード菌の試験

##### 3.1.1.1 同定試験

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

##### 3.1.1.2 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.1.2 ワーキングシード菌の試験

##### 3.1.2.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.1.3 プロダクションシード菌の試験

##### 3.1.3.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.2 培養菌液の試験

#### 3.2.1 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。

#### 3.2.2 生菌数試験

適当と認められた方法で試験するとき、適合しなければならない。

3.3.2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 不活化菌液の試験

#### 3.3.1 不活化試験

適当と認められた方法で試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.3.2 総菌数試験

適当と認められた方法で試験するとき、適合しなければならない。

3.2.2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。また、原液の調製時に本試験を行ってもよい。

### 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。

### 3.5 小分製品の試験

#### 3.5.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、固有の色調を有する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。

### 3.5.2 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 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。

### 3.5.4 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、0.25vol %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、その含有量とする。

### 3.5.5 安全試験

#### 3.5.5.1 試験材料

##### 3.5.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.5.5.1.2 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4～7週齢の鶏を用いる。

#### 3.5.5.2 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週間観察する。

#### 3.5.5.3 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。

### 3.5.6 力価試験

#### 3.5.6.1 試験材料

##### 3.5.6.1.1 試験動物

3.5.5の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.5.6.1.2 赤血球凝集抗原

マイコプラズマ・ガリセプチカム赤血球凝集抗原（付記）を用いる。

#### 3.5.6.2 試験方法

3.5.5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単位のマイコプラズマ・ガリセプチカム赤血球凝集抗原を加えて混合し、15～20分間処理した後、0.25vol%の鶏赤血球浮遊液を50 $\mu$ Lずつ加えて振とう混合し、4 $^{\circ}$ Cで1夜又は室温で120分処理した後、赤血球凝集の有無を観察する。

#### 3.5.6.3 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HI抗体価の幾何平均値は、40倍を超えなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その幾何平均値とする。この場合、対照群は全てHI抗体価4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 マイコプラズマ・ガリセプチカム赤血球凝集抗原

：製造用株を培養し、ホルマリンを加えて不活化した菌液を遠心洗浄後、再浮遊し、これにグリセリンを等量加え、 $-20^{\circ}\text{C}$ 以下に保存したもの。

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・鶏伝染性コリザ（A・C型）液状混合（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滋賀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又は鶏腎初代細胞に接種すると、鶏胚に特徴的な病変又は鶏腎初代細胞に特有な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、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 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並びに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並びに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並びに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、3.4.1.1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、3.6.1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、3.8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。

#### 2.3.2.2 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、3.4.1.2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、3.6.1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、3.8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

発育鶏卵の卵黄嚢又は培地で培養した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遠心して得た菌をリン酸緩衝食塩液に浮遊させ、適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、3.7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。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>8.0</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、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>7.0</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、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）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時間培養した後、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 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。

### 3.7 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 時間培養した後、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、本試験を実施しなくてもよい。

##### 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。

###### 3.7.2.3 判定

検体の総菌数は、1 mL 中  $10^8$  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 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。

#### 3.9.3 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。

#### 3.9.4 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。

### 3.9.5 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。

### 3.9.5 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。

### 3.9.6 安全試験

#### 3.9.6.1 試験材料

##### 3.9.6.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.9.6.1.2 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。

#### 3.9.6.2 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脚部筋肉内に注射し、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。

#### 3.9.6.3 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、剖検した時に注射部位に著しい異常を認めてはならない。

### 3.9.7 力価試験

#### 3.9.7.1 ニューカッスル病力価試験

##### 3.9.7.1.1 試験材料

##### 3.9.7.1.1.1 試験動物

3.9.6 の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.9.7.1.1.2 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。

##### 3.9.7.1.2 試験方法

3.9.6 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。

##### 3.9.7.1.3 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。

#### 3.9.7.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

##### 3.9.7.2.1 試験材料

##### 3.9.7.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.9.7.2.1.2 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。

##### 3.9.7.2.1.3 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。

#### 3.9.7.2.1.4 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。

#### 3.9.7.2.2 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脚部筋肉内に 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。

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）を加え、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、プラックの出現を観察する。

#### 3.9.7.2.3 判定

各希釈系列のプラック平均数から 50 %プ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。

#### 3.9.7.3 鶏伝染性コリザ（A・C型）力価試験

##### 3.9.7.3.1 試験材料

##### 3.9.7.3.1.1 試験動物

3.9.6 の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.9.7.3.1.2 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 5）を用いる。

##### 3.9.7.3.2 試験方法

3.9.6 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。

##### 3.9.7.3.3 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 分間高压滅菌する。

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 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 mL

イーグルMEM

残量

炭酸水素ナトリウムで pH を 6.8 ~ 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 mL

寒天

9 g

アール液

残量

炭酸水素ナトリウムで pH を 6.8 ~ 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 mg

寒天

9 g

アール液

残量

炭酸水素ナトリウムで pH を 6.8 ~ 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。

# 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（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石田株及び宮崎株、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 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 G-1 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並びに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 10～13 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並びに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

10～13 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並びに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、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又はこれを相当と認められた方法でホルマリンを中和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、3.8 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それぞれ 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、3.4.1.2 の試験を行う。

###### 2.3.2.3 不活化

各株の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、各株の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

各株ごとの不活化ウイルス浮遊液又はこれを相当と認められた方法でホルマリンを中和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、各株の原液とする。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

培養菌液又はこれを適当と認められた界面活性剤で処理した後、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ホルマリンを中和したもの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。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各株の原液、ヘモフィルス・パラガリナリウムA型菌原液及びヘモフィルス・パラガリナリウムC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

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.1.6 プロダクションシード菌の試験

#### 3.1.6.1 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

## 3.2 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>8.6</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、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、1mL中10<sup>6.6</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

3.7.2の総菌数試験を実施するものについては、本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）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時間培養した後、集落数を数える。

##### 3.5.2.3 判定

各段階の希釈ごとの集落数から、生菌数を算出する。

検体の生菌数は、1mL中10<sup>8</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

製造用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 時間培養した後、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、本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 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。

#### 3.9.3 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。

### 3.9.4 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。

### 3.9.5 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。ただし、ホルマリンを適当と認められた方法で中和した製剤については、本試験を行わなくてもよい。

### 3.9.6 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 2.0mg 以下でなければならない。

### 3.9.7 安全試験

#### 3.9.7.1 試験材料

##### 3.9.7.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.9.7.1.2 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。

#### 3.9.7.2 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 3 週間観察し、試験最終日に注射部位を剖検する。

#### 3.9.7.3 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。

### 3.9.8 力価試験

#### 3.9.8.1 ニューカッスル病力価試験

##### 3.9.8.1.1 試験材料

##### 3.9.8.1.1.1 試験動物

3.9.7 の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.9.8.1.1.2 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。

##### 3.9.8.1.2 試験方法

3.9.7 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、ニューカッスル病ウイルス赤血球凝集抑制試験を行う。

##### 3.9.8.1.3 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 5 倍未満でなければならない。

#### 3.9.8.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

##### 3.9.8.2.1 試験材料

##### 3.9.8.2.1.1 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。

##### 3.9.8.2.1.2 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<sup>5.0</sup>EID<sub>50</sub>以上でなければならない。

#### 3.9.8.2.1.3 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。

#### 3.9.8.2.2 試験方法

試験動物の 10 羽を試験群、3 羽を対照群とする。

注射材料 1 羽分ずつを試験群の脚部筋肉内に 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。

#### 3.9.8.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全、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 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。

#### 3.9.8.3 鶏伝染性コリザ（A・C 型）力価試験

##### 3.9.8.3.1 試験材料

##### 3.9.8.3.1.1 試験動物

3.9.7 の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.9.8.3.1.2 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。

##### 3.9.8.3.2 試験方法

3.9.7 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、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。

##### 3.9.8.3.3 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は、その期間とする。

#### 付記 1 鶏血清加寒天培地

1,000 mL 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 分間高压滅菌する。

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 鶏伝染性コリーザ（C型）赤血球凝集抗原

ヘモフィルス・パラガリナラム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・鶏伝染性コリーザ（A・C型）・マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症混合（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型及びC型菌）及びマイコプラズマ・ガリセプチカム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滋賀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。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 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。

## 2.1.5 マイコプラズマ・ガリセプチカム

### 2.1.5.1 名称

マイコプラズマ・ガリセプチカム TK 株又はこれと同等と認められた株

### 2.1.5.2 性状

鶏に対して病原性を示す。

### 2.1.5.3 マスターシード菌

#### 2.1.5.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、適当と認められた培地で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

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

### 2.1.5.4 ワーキングシード菌

#### 2.1.5.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、適当と認められた培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.1.5.5 プロダクションシード菌

##### 2.1.5.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、適当と認められた培地で増殖させる。

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

###### 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並びに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並びに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

製造に適当と認められた培地を用いる。

##### 2.2.4 マイコプラズマ・ガリセプチカム

###### 2.2.4.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

#### 2.3 原液

##### 2.3.1 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。

- 個体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及び鶏胚乳剤の遠心上清を適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体別発育鶏卵とみなす。  
個体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及び鶏胚乳剤の遠心上清を適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、3.5.1及び3.5.2.1の試験を行う。
- 2.3.3.2 不活化  
培養菌液を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チメロサルを加えて不活化し、原液とする。  
原液について、3.6.1及び3.6.2.3の試験を行う。
- 2.3.4 マイコプラズマ・ガリセプチカム原液
- 2.3.4.1 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・継代し、培養したものを培養菌液とする。  
培養菌液について、3.5.1及び3.5.2.2の試験を行う。
- 2.3.4.2 不活化  
培養菌液を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チメロサルを加えて不活化し、原液とする。  
原液について、3.6.1及び3.6.2.4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、ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌原液、ヘモフィルス・パラガリナルムC型菌原液及びマイコプラズマ・ガリセプチカム原液をそれぞれ濃度調整して混合し、適当と認められた油性アジュバント及び保存剤を添加し、最終バルクとする。
- 2.5 小分製品  
最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。  
小分製品について、3.7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

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.6 プロダクションシード菌の試験

###### 3.1.6.1 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2 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、1mL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、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、1mL中10<sup>7.3</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 ヘモフィルス・パラガリナルムの各型菌

###### 3.5.2.1.1 試験材料

###### 3.5.2.1.1.1 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。

#### 3.5.2.1.1.2 培地

試験用培地（付記1）を用いる。

#### 3.5.2.1.2 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時間培養した後、集落数を数える。

#### 3.5.2.1.3 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  $1 \times 10^9$  個以上でなければならない。

#### 3.5.2.2 マイコプラズマ・ガリセプチカム

##### 3.5.2.2.1 試験材料

###### 3.5.2.2.1.1 試料

検体を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。

###### 3.5.2.2.1.2 培地

適当と認められた寒天培地を用いる。

##### 3.5.2.2.2 試験方法

各試料 0.1mL ずつをそれぞれ2枚以上のシャーレに接種した後、培地を加えて混濁培養し、37℃、5 vol % 炭酸ガス下で14日間培養した後、集落数を数える。

##### 3.5.2.2.3 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  $1 \times 10^8$  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10個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。試験最終日に鶏胚の変化を観察する。

#### 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

試験用培地を用いる。

##### 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℃、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。

##### 3.6.2.3.3 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。

#### 3.6.2.4 マイコプラズマ・ガリセプチカム

##### 3.6.2.4.1 試験材料

###### 3.6.2.4.1.1 接種材料

検体を接種材料とする。

###### 3.6.2.4.1.2 培地

適当と認められた寒天平板培地を用いる。

##### 3.6.2.4.2 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10日間培養する。

##### 3.6.2.4.3 判定

接種材料を接種した全ての培地上にマイコプラズマ・ガリセプチカムの集落を認めてはならない。

#### 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 チメロサル定量試験

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

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、0.06vol %以下でなければならない。

##### 3.7.5 安全試験

###### 3.7.5.1 試験材料

###### 3.7.5.1.1 注射材料

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。

### 3.7.5.3 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。

## 3.7.6 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

適当と認められた株を用いる。

##### 3.7.6.2.1.3 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。

#### 3.7.6.2.2 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、血清希釈法により中和試験を行う。各群ごとに血清をそれぞれ等量プールし、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℃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。

#### 3.7.6.2.3 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。

### 3.7.6.3 鶏伝染性コリーザ（A・C 型）力価試験

### 3.7.6.3.1 試験材料

#### 3.7.6.3.1.1 試験動物

3.7.5 の試験に用いた動物を用いる。

#### 3.7.6.3.1.2 赤血球凝集抗原

「鶏伝染性コリーザ（A型）診断用赤血球凝集抗原」及び鶏伝染性コリーザ（C型）赤血球凝集抗原（付記5）を用いる。

#### 3.7.6.3.2 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、鶏伝染性コリーザ（A型）赤血球凝集抑制試験及び鶏伝染性コリーザ（C型）赤血球凝集抑制試験を行う。

#### 3.7.6.3.3 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。

### 3.7.6.4 マイコプラズマ・ガリセプチカム力価試験

#### 3.7.6.4.1 試験材料

##### 3.7.6.4.1.1 試験動物

3.7.5 の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.7.6.4.1.2 赤血球凝集抗原

マイコプラズマ・ガリセプチカム赤血球凝集抗原（付記6）を用いる。

#### 3.7.6.4.2 試験方法

3.7.5 の注射後 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、マイコプラズマ・ガリセプチカム赤血球凝集抑制試験を行う。

血清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 単位のマイコプラズマ・ガリセプチカム赤血球凝集抗原を加えて混合し、15 ~ 20 分間処理した後、0.25vol % の鶏赤血球浮遊液を 50  $\mu$  L ずつ加えて振とう混合し、4  $^{\circ}$ C で 1 夜処理した後、赤血球凝集の有無を観察する。

#### 3.7.6.4.3 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。

試験群の HI 抗体価の幾何平均値は、37 倍を超えなければならない。この場合、対照群では、HI 抗体価 4 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、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 試験用培地

1,000 mL 中

ペプトン

1 g

塩化ナトリウム

5 g

イーストエキストラクト

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 % になるように加える。  
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

1,000 mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
牛血清	50 mL
イーグル MEM	残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 6.8 ~ 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

1,000 mL 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 mL
寒天	9.0 g
アール液	残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 6.8 ~ 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

1,000 mL 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 mg
寒天	9.0 g
アール液	残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 6.8 ~ 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。

付記 6 マイコプラズマ・ガリセプチカム赤血球凝集抗原

製造用株を培養し、ホルマリンを加えて不活化した菌液を遠心洗浄した後、再浮遊し、これにグリセリンを等量加え、- 20 °C 以下に保存したもの。

ワクチン（シードロット製剤）の部の犬パルボウイルス感染症生ワクチン（シード）の項の次に次のように加える。

## 狂犬病組織培養不活化ワクチン（シード）

### 1 定義

シードロット規格に適合した狂犬病培養細胞馴化ウイルスを同規格に適合した株化細胞で増殖させて得たウイルス液を精製し、不活化したワクチンである。

### 2 製法

#### 2.1 製造用株

##### 2.1.1 名称

狂犬病培養細胞馴化ウイルス RC・HL 株

##### 2.1.2 性状

3日齢以内の乳のみマウスの脳内に注射すると、発病して死亡させるが、3週齢以上のマウス、体重約300gのモルモット、体重約1.5kgの兔及び1.5か月齢の犬の脳内に注射しても、ほとんど病原性を示さない。

HmLu細胞で、CPEを伴って増殖する。

##### 2.1.3 マスターシードウイルス

###### 2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、HmLu細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

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

マスターシードウイルスについて、3.1.1の試験を行う。

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

##### 2.1.4 ワーキングシードウイルス

###### 2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、HmLu細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

##### 2.1.5 プロダクションシードウイルス

###### 2.1.5.1 増殖、継代及び保存

プロダクションシードウイルスは、HmLu細胞で増殖させる。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して-70℃以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

### 2.2 製造用材料

#### 2.2.1 培養細胞

HmLu細胞を用いる。

#### 2.2.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

#### 2.2.3 マスターセルシード

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

マスターセルシードは、2.2.2の培養液で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターセルシードは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して-100℃以下で保存する。

マスターセルシードについて、3.2.1の試験を行う。

マスターセルシードは、ワクチンの製造又は試験以外の目的で継代しない。マスターセルシードからプロダクションセルシードまでの最高継代数は、20代以内でなければならない。浮遊培養を使う場合は、細胞数の増加で集団ダブリングタイムの約3倍で継代1代とみなす。

## 2.2.4 ワーキングセルシード

### 2.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.2の培養液で増殖及び継代する。

ワーキングセルシードは、凍結して-100℃以下で保存する。

ワーキングセルシードについて、3.2.2の試験を行う。

## 2.2.5 プロダクションセルシード

### 2.2.5.1 増殖、継代及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.2の培養液で増殖させる。

プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して-100℃以下で保存する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、3.2.3の試験を行う。

## 2.3 原液

### 2.3.1 プロダクションセルシードの培養

単層培養法の場合は1回に処理し培養した細胞を、また、浮遊培養法の場合は最終フェーメンター培養細胞を、それぞれ個別別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の培養細胞に異常を認めてはならない。

### 2.3.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを培養細胞に接種し、32～34℃で培養し、CPE又はGたん白産生量の極期に採取した培養液の遠心上清又はろ液をウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.3の試験を行う。

### 2.3.3 精製

ウイルス浮遊液をマクロゴール又は適当と認められた方法で精製濃縮し、精製ウイルス浮遊液とする。浮遊培養法の場合は、2.3.4の不活化操作を行った後、精製する。

### 2.3.4 不活化

精製ウイルス浮遊液をβ-プロピオラクトン又は適当と認められた方法で不活化し、不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.4の試験を行う。

### 2.3.5 原液の調整

不活化ウイルス液をリン酸緩衝食塩液で濃度調整し、原液とする。浮遊培養法の場合には、精製ウイルス浮遊液に適当と認められた保存剤を加え、原液とし、最終バルクで濃度調整を行う。

原液について、3.5の試験を行う。

## 2.4 最終バルク

原液を混合し、浮遊培養法の場合にはリン酸緩衝食塩液で濃度調整し、最終バルクとする。この場合、適当と認められた保存剤を加えてもよい。

## 2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。

小分製品について、3.6の試験を行う。

## 3 試験法

### 3.1 製造用株の試験

#### 3.1.1 マスターシードウイルスの試験

### 3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の 1.4.2.1.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.1.1.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.1.1.3 マイコプラズマ否定試験

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

### 3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

#### 3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

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

#### 3.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験

##### 3.1.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験

猫白血病ウイルス/猫肉腫ウイルス及びリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.1 及び 3.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

牛ウイルス性下痢-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及び日本脳炎ウイルスについて、動生剤基準の一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.1、3.2.5、3.2.6 及び 3.2.9 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

#### 3.1.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

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

#### 3.1.2.3 効力及び免疫原性確認試験

##### 3.1.2.3.1 モルモットでの試験

###### 3.1.2.3.1.1 試験材料

###### 3.1.2.3.1.1.1 試料

新旧の検体をリン酸緩衝食塩液でそれぞれ溶解し、1 mL 中のウイルス含有量を約  $10^{7.0}$ TCID<sub>50</sub> となるように濃度を調整する。それぞれにβ-プロピオラクトンを 0.0125 vol % になるように加えて、4℃で 48 時間感作し、ウイルスを不活化したものを試料とする。

###### 3.1.2.3.1.1.2 試験動物

体重約 400g のモルモットを用いる。

###### 3.1.2.3.1.1.3 攻撃ウイルス

狂犬病ウイルス CVS 株 (付記 1) を用いる。モルモット咬筋内注射法で、0.2mL 中 10LD<sub>50</sub> のウイルスを含むように、2 vol % 馬血清加生理食塩液を用いて濃度を調整し、攻撃ウイルスとする。

###### 3.1.2.3.1.2 試験方法

新旧の試料を 0.5mL ずつ各試験動物 10 匹の内股部皮下に注射し、試験群とする。10 匹を無処置対照群とする。注射後 21 日目に、3 群のそれぞれに攻撃ウイルスを 0.2mL ずつ咬筋内注射し、14 日間臨床観察する。

###### 3.1.2.3.1.3 判定

発症しなかったものを耐過とみなし、耐過率を算出する。

両試験群の耐過率は、いずれも 70 % 以上でなければならない。この場合、対照群の耐過率は、20 % 以下でなければならない。

##### 3.1.2.3.2 犬での試験

###### 3.1.2.3.2.1 試験材料

#### 3.1.2.3.2.1.1 試料

3.1.2.3.1.1.1 の試料を用いる。

#### 3.1.2.3.2.1.2 試験動物

狂犬病ウイルスに対する抗体陰性の約4か月齢の犬を用いる。

#### 3.1.2.3.2.2 試験方法

新旧の試料1 mL ずつを各試験動物3頭の皮下に注射し、1か月後にそれぞれから採血し、中和抗体価を狂犬病培養細胞馴化ウイルス RC・HL 株を用いて測定する。

#### 3.1.2.3.2.3 判定

両試験群の中和抗体価は、それぞれ幾何平均値10倍以上でなければならない。

### 3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

#### 3.1.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

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

### 3.2 株化細胞の試験

#### 3.2.1 マスターセルシードの試験

##### 3.2.1.1 培養性状試験

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

##### 3.2.1.2 起源動物種同定試験

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

##### 3.2.1.3 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.2.1.4 マイコプラズマ否定試験

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

##### 3.2.1.5 外来性ウイルス否定試験

###### 3.2.1.5.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2、2.1及び2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.2.1.5.2 特定ウイルス否定試験

###### 3.2.1.5.2.1 特定ウイルス否定一般試験

猫白血病ウイルス/猫肉腫ウイルス及びリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2及び3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.2.1.5.2.2 個別ウイルス否定試験

牛ウイルス性下痢-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、動生剤基準の一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2、3.2.5、3.2.6及び3.2.9を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.2.1.6 核学的(染色体)性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.6を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.2.1.7 腫瘍形成性/腫瘍原性試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.7を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.2 ワーキングセルシードの試験

##### 3.2.2.1 培養性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.2.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.2.2.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。



### 3.2.2.3 マイコプラズマ否定試験

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

## 3.2.3 プロダクションセルシードの試験

### 3.2.3.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.3.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.2.3.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.2.3.3 マイコプラズマ否定試験

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

## 3.3 ウイルス浮遊液の試験

### 3.3.1 ウイルス含有量試験

#### 3.3.1.1 試験材料

##### 3.3.1.1.1 試料

検体を細胞増殖用培養液（付記 2）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.3.1.1.2 培養細胞

鶏胚初代細胞を用いる。

##### 3.3.1.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本（穴）以上の培養細胞に接種し、37℃で 2 日間静置培養する。

2 日目に培養液をウイルス増殖用培養液 1（付記 3）に交換し、32℃で 8 日間静置培養し、観察する。ただし、96 穴マイクロプレートを用いる場合は、試料 25  $\mu$ L ずつを 10 穴の培養細胞に接種した後、ウイルス増殖用培養液 2（付記 4）を 0.2mL ずつ加え、37℃で 10 日間培養し、観察する。

##### 3.3.1.3 判定

培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub> を算出する。

検体のウイルス含有量は、単層培養法の場合には 1 mL 中 10<sup>7.5</sup>TCID<sub>50</sub> 以上であり、浮遊培養法の場合には 1 mL 中 10<sup>7.0</sup>TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

## 3.4 不活化ウイルス液の試験

### 3.4.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.4.2 不活化試験

#### 3.4.2.1 試験材料

##### 3.4.2.1.1 注射材料及び接種材料

検体を注射材料及び接種材料とする。

##### 3.4.2.1.2 試験動物及び培養細胞

3 日齢以内の乳のみマウス及び鶏胚初代細胞を用いる。

ただし、鶏胚初代細胞は、培養瓶に 10mL ずつ分注し、面積が約 36cm<sup>2</sup> の単層となったものを用いる。

##### 3.4.2.2 試験方法

注射材料 0.02mL ずつを試験動物 10 匹の脳内に注射し、14 日間観察する。

接種材料 2 mL ずつを培養細胞 4 本以上に接種し、37℃で 60 分間吸着させた後、接種材料を除去し、ウイルス増殖用培養液 1 を 10mL ずつ加え、37℃で 10 日間静置培養し、観察する。

##### 3.4.2.3 判定

試験動物に狂犬病ウイルスによる症状を認めず、培養細胞に CPE を認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

### 3.5 原液の試験

#### 3.5.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.5.2 たん白窒素定量試験

一般試験法のたん白窒素定量法を準用して試験するとき、たん白窒素の含有量は、1 mL 中 100  $\mu$ g 以下でなければならない。

#### 3.5.3 力価試験

##### 3.5.3.1 試験材料

検体、参照ワクチン（付記 5）、抗体吸着プレート（付記 6）及び酵素標識抗体（付記 7）を用いる。

##### 3.5.3.2 試験方法

検体 6 mL にリン酸水素二ナトリウム十二水和物 327.6mg、リン酸二水素カリウム 38.6mg を加えて、よく振とう混和する。参照ワクチンは、動物医薬品検査所が指定した方法により溶解する。これらの検体及び参照ワクチンをそれぞれ 30 ~ 60 秒間超音波処理した後、約 200G で 5 分間遠心する。各遠心上清を、あらかじめ 1 w/v % 牛血清アルブミン加リン酸緩衝食塩液で前処理した 450nm のメンブランフィルターでろ過し、そのろ液の 4 mL についてゲルろ過（付記 8）を行う。第 1 画分のピークを含む 8 mL を採取し、抗原希釈用液（付記 9）を用いて原液（高用量）、2 倍希釈液（中用量）及び 4 倍希釈液（低用量）を作製する。各抗原液のそれぞれ 100  $\mu$  L を抗体吸着プレートの各 2 穴に加える。抗原希釈液を 100  $\mu$  L ずつ 2 穴に加えたものを陰性対照穴とする。プレートを密閉し、37℃で 60 分間反応させる。洗浄液（付記 10）で 5 回洗浄した後、酵素標識抗体の 100  $\mu$  L ずつを各穴に入れ、プレートを密閉し、遮光して 37℃で 90 分間反応させる。洗浄液で 5 回洗浄した後、基質・発色液（付記 11）の 100  $\mu$  L ずつを各穴に加え、プレートを遮光して常温で 30 分間反応させる。反応終了後直ちに、反応停止液（付記 12）の 50  $\mu$  L ずつを各穴に加え、主波長 492nm 及び副波長 630nm でそれぞれ吸光度を測定する。検体及び参照ワクチンを加えた各穴の吸光度値から陰性対照穴の吸光度値を引いた値をそれぞれの抗原の吸光度値とする。ゲルろ過後の各抗原液について 2 回繰り返し測定を行った後、検体及び参照ワクチンの各吸光度値から相対力価の計算方法（付記 13）により参照ワクチンに対する相対力価を算出する。

##### 3.5.3.3 判定

検体の参照ワクチンに対する相対力価は、0.683 以上でなければならない。

### 3.6 小分製品の試験

#### 3.6.1 特性試験

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

#### 3.6.2 pH 測定試験

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

#### 3.6.3 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.6.4 チメロサル定量試験

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

#### 3.6.5 マクロゴール定量試験

一般試験法のマクロゴール定量法を準用して試験するとき、マクロゴールの含有量は、1 mL 中 0.5mg 以下でなければならない。

#### 3.6.6 たん白窒素定量試験

一般試験法のたん白窒素定量法を準用して試験するとき、たん白窒素の含有量は、1 mL 中 100

μg 以下でなければならない。

### 3.6.7 安全試験

#### 3.6.7.1 試験材料

##### 3.6.7.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.6.7.1.2 試験動物

体重 5 ~ 10kg の犬及び体重約 1 kg の猫を用いる。

#### 3.6.7.2 試験方法

注射材料 5 mL ずつを 2 頭の犬に、2 mL ずつを 2 頭の猫に皮下注射し、10 日間臨床観察する。

#### 3.6.7.3 判定

観察期間中、試験動物に異常を認めてはならない。

### 3.6.8 力価試験

3.5.3 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

## 4 貯法及び有効期間

有効期間は、2 年間とする。

### 付記 1 狂犬病ウイルス CVS 株

狂犬病ウイルス CVS 株を 3 週齢マウスの脳内に接種し、症状を示したマウスの脳を採取し、2 vol % 馬血清加生理食塩液を用いて乳剤としたもの。

ウイルス含有量は、体重約 400g のモルモットの咬筋内注射法で測定するとき、0.2mL 中  $10^{2.5}$  LD<sub>50</sub> 以上でなければならない。

### 付記 2 細胞増殖用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス

2.95 g

牛胎子血清又は子牛血清

50 mL

イーグル MEM

残量

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 3 ウイルス増殖用培養液 1

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス

2.95 g

イーグル MEM

残量

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 4 ウイルス増殖用培養液 2

1,000mL 中

ブドウ糖

5 g

L-グルタミン

0.4 g

牛胎子血清又は子牛血清

5 ~ 25 mL

イーグル MEM

残量

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 5 参照ワクチン

動物医薬品検査所が配布する参照狂犬病組織培養不活化ワクチンを動物医薬品検査所が指定した濃度となるように調整したもの。

付記 6 抗体吸着プレート

狂犬病ウイルスのGたん白を認識するモノクローナル抗体を精製したものについて動物医薬品検査所が指定した濃度に調整した後、96 穴プレートの各穴に 100  $\mu$  L ずつ加えて密閉し、37  $^{\circ}$ C で 18 時間吸着させたもの。

抗体吸着プレートはリン酸緩衝食塩液で 4 回洗浄した後使用する。

付記 7 酵素標識抗体

狂犬病ウイルスのGたん白を認識するモノクローナル抗体を、ペルオキシダーゼで標識し、凍結乾燥したものについて、下記の希釈用液で動物医薬品検査所が指定した濃度に調整したもの。

100mL 中

牛血清アルブミン 0.3 g

ポリソルベート 20 0.05 mL

リン酸緩衝食塩液 残量

450nm メンブランフィルターでろ過する。

付記 8 ゲルろ過

動物医薬品検査所が指定するカラムを用い、抗原希釈用液を移動相とし、流速毎分 1 mL で液体クロマトグラフ法により画分を分取する。

検出波長は、280nm とする。

付記 9 抗原希釈用液

1,000mL 中

リン酸水素二ナトリウム十二水和物 54.66 g

リン酸二水素カリウム 6.44 g

水 残量

pH を 7.2 に調整後、450nm メンブランフィルターでろ過する。

付記 10 洗浄液

リン酸緩衝食塩液にポリソルベート 20 を 0.05vol % となるように加えたもの。

付記 11 基質・発色液

1,000mL 中

クエン酸 21.0 g

無水リン酸水素二ナトリウム 28.4 g

水 残量

溶解した液を 450nm メンブランフィルターでろ過する。その液 20mL に  $\alpha$ -フェニレンジアミン二塩酸塩 10mg を加えて溶解する。使用直前に過酸化水素 (30) を 5  $\mu$  L 添加する。

付記 12 反応停止液

水 1,000mL に硫酸 150mL を加えたもの。

### 付記 13 相対力価の計算方法

#### 1 Validity の検定

得られたそれぞれの吸光度値を 1,000 倍し、常用対数に変換後、参照ワクチン及び検体について各用量の合計値を求め、次式の計算を行う。ただし、参照ワクチンの低用量を  $S_1$ 、中用量を  $S_2$ 、高用量を  $S_3$  とし、検体の低用量を  $T_1$ 、中用量を  $T_2$ 、高用量を  $T_3$  とする。

$$\text{検体差 SPa} = (S_1 + S_2 + S_3) - (T_1 + T_2 + T_3)$$

$$\text{直線性 SPb} = (S_3 - S_1) + (T_3 - T_1)$$

$$\text{曲線性 SPc} = [(S_1 + S_3) - 2S_2] + [(T_1 + T_3) - 2T_2]$$

$$\text{直線非平行性 SPb}^{\wedge} = (S_3 - S_1) - (T_3 - T_1)$$

$$\text{曲線非平行性 SPc}^{\wedge} = [(S_1 + S_3) - 2S_2] - [(T_1 + T_3) - 2T_2]$$

上記の式で求めた SPb が 0.50 以上、SPc の絶対値が 0.86 以下、SPb<sup>^</sup> の絶対値が 0.49 以下及び SPc<sup>^</sup> の絶対値が 0.86 以下である場合は、Validity の検定に適合する。

#### 2 相対力価の計算

1 の Validity の検定で適合と判定された場合は、次式により相対力価を求める。

$$M = - (4 \times \text{SPa} \times \log 2) \div (3 \times \text{SPb})$$

さらに、M の真数 (M の逆対数  $10^M$ ) を求めることにより、検体の参照ワクチンに対する相対力価を算出する。

$$P = 10^M$$

ワクチン（シードロット製剤）の部のジステンパー・犬アデノウイルス（2型）感染症・犬パライ  
ンフルエンザ・犬パルボウイルス感染症・犬コロナウイルス感染症・犬レプトスピラ病混合ワクチン  
（シード）の項の次に次のように加える。

## **ジステンパー・犬アデノウイルス（2型）感染症・犬パ ラインフルエンザ・犬パルボウイルス感染症・犬コロナウイ ルス感染症・犬レプトスピラ病（カニコーラ、コペンハー ゲニー、ヘブドマディス）混合ワクチン（シード）**

### 1 定義

シードロット規格に適合した弱毒ジステンパーウイルス、弱毒犬アデノウイルス（2型）、弱毒  
犬パラインフルエンザウイルス、弱毒犬パルボウイルス及び弱毒犬コロナウイルスを同規格に適合  
した株化細胞又は初代細胞で増殖させて得たウイルス液の混合液を凍結乾燥したワクチン（以下こ  
の項において「混合生ワクチン」という。）と、シードロット規格に適合したレプトスピラ・カニ  
コーラ（以下この項において「L・カニコーラ」という。）、レプトスピラ・コペンハーゲニー（以  
下この項において「L・コペンハーゲニー」という。）及びレプトスピラ・ヘブドマディス（以下こ  
の項において「L・ヘブドマディス」という。）の培養菌液を不活化・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 ジステンパーウイルス

###### 2.1.1.1 名称

弱毒ジステンパーウイルス DFB-HC 株又はこれと同等と認められた株

###### 2.1.1.2 性状

犬に注射しても、病原性を示さない。発育鶏卵の漿尿膜上又は感受性のある培養細胞に接種する  
と、ポック又は 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、SPF 動物規格 2.6 に適合した鶏腎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 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 2.6 に適合した鶏腎初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、SPF 動物規格 2.6 に適合した鶏腎初代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。

## 2.1.2 犬アデノウイルス (2型)

### 2.1.2.1 名称

弱毒犬アデノウイルス (2型) OD-N/SL 株又はこれと同等と認められた株

### 2.1.2.2 性状

犬に注射しても、病原性を示さない。感受性のある培養細胞に接種すると、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、犬腎株化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。

### 2.1.2.4 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、犬腎株化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。

### 2.1.2.5 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、犬腎株化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。

## 2.1.3 犬パラインフルエンザウイルス

### 2.1.3.1 名称

弱毒犬パラインフルエンザウイルス DL-E 株又はこれと同等と認められた株

### 2.1.3.2 性状

犬に注射しても、病原性を示さない。感受性のある培養細胞に接種すると増殖し、細胞はモルモットの赤血球を吸着する。

### 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、SPF 動物規格 2.6 に適合した鶏胚初代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。

#### 2.1.3.4 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2.6に適合した鶏胚初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℃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、SPF動物規格2.6に適合した鶏胚初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℃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。

#### 2.1.4 犬パルボウイルス

##### 2.1.4.1 名称

弱毒犬パルボウイルス 29-F/LT株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.4.2 性状

犬に注射しても、病原性を示さない。犬及び猫由来細胞で核内封入体を伴って増殖し、その培養ウイルス液は、豚及び猿の赤血球を凝集する。

##### 2.1.4.3 マスターシードウイルス

###### 2.1.4.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、猫腎株化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。

#### 2.1.4.4 ワーキングシードウイルス

##### 2.1.4.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、猫腎株化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。

#### 2.1.4.5 プロダクションシードウイルス

##### 2.1.4.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、猫腎株化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。

#### 2.1.5 犬コロナウイルス

##### 2.1.5.1 名称

弱毒犬コロナウイルス 5821-B株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.5.2 性状

犬に注射しても、病原性を示さない。感受性のある培養細胞に接種すると、CPEを伴って増殖す



る。

### 2.1.5.3 マスターシードウイルス

#### 2.1.5.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、猫腎株化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。

### 2.1.5.4 ワーキングシードウイルス

#### 2.1.5.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、猫腎株化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。

### 2.1.5.5 プロダクションシードウイルス

#### 2.1.5.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、猫腎株化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。

### 2.1.6 L・カニコーラ

#### 2.1.6.1 名称

L・カニコーラ フント ユートレヒトIV株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.6.2 性状

モルモット及びハムスターの腹腔内に注射すると、増殖する。

抗L・カニコーラ血清（付記1）に対して特異的に凝集する。

#### 2.1.6.3 マスターシード菌

##### 2.1.6.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

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

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

#### 2.1.6.4 ワーキングシード菌

##### 2.1.6.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、適当と認められた培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.1.6.5 プロダクションシード菌

##### 2.1.6.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、適当と認められた培地で増殖させる。

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

## 2.1.7 L・コペンハーゲニー

### 2.1.7.1 名称

L・コペンハーゲニー 芝浦株又はこれと同等と認められた株

### 2.1.7.2 性状

モルモット及びハムスターの腹腔内に注射すると、増殖する。

抗L・コペンハーゲニー血清（付記2）に対して特異的に凝集する。

### 2.1.7.3 マスターシード菌

#### 2.1.7.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

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

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

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。

### 2.1.7.4 ワーキングシード菌

#### 2.1.7.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、適当と認められた培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結して-70℃以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.5の試験を行う。

### 2.1.7.5 プロダクションシード菌

#### 2.1.7.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、適当と認められた培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して-70℃以下で保存する。

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。

## 2.1.8 L・ヘブドマディス

### 2.1.8.1 名称

L・ヘブドマディス 秋疫B株又はこれと同等と認められた株

### 2.1.8.2 性状

モルモット及びハムスターの腹腔内に注射すると、増殖する。

抗L・ヘブドマディス血清（付記3）に対して特異的に凝集する。

### 2.1.8.3 マスターシード菌

#### 2.1.8.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

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

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

### 2.1.8.4 ワーキングシード菌

#### 2.1.8.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、適当と認められた培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結して-70℃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。

### 2.1.8.5 プロダクションシード菌

#### 2.1.8.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、適当と認められた培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して-70℃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 ジステンパーウイルス

#### 2.2.1.1 初代細胞

SPF動物規格2.6に適合した鶏腎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。

### 2.2.1.3 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、2.2.1.2の培養液で増殖させ、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 犬アデノウイルス（2型）

#### 2.2.2.1 株化細胞

犬腎株化細胞又は製造に適当と認められた株化細胞を用いる。

#### 2.2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

#### 2.2.2.3 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℃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、3.3.2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、3.3.3の試験を行う。

### 2.2.3 犬パラインフルエンザウイルス

#### 2.2.3.1 初代細胞

SPF動物規格2.6に適合した鶏胚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。

#### 2.2.3.2 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 の培養液で増殖させ、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。

### 2.2.4 犬パルボウイルス

#### 2.2.4.1 株化細胞

猫腎株化細胞又は製造に相当と認められた株化細胞を用いる。

#### 2.2.4.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

#### 2.2.4.3 マスターセルシード

##### 2.2.4.3.1 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、2.2.4.2 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。

#### 2.2.4.4 ワーキングセルシード

##### 2.2.4.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.4.2 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。

##### 2.2.4.5 プロダクションセルシード

###### 2.2.4.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.4.2 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。

### 2.2.5 犬コロナウイルス

#### 2.2.5.1 株化細胞

猫腎株化細胞又は製造に相当と認められた株化細胞を用いる。

#### 2.2.5.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

#### 2.2.5.3 マスターセルシード

##### 2.2.5.3.1 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、2.2.5.2 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。

#### 2.2.5.4 ワーキングセルシード

##### 2.2.5.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.5.2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、3.3.2の試験を行う。

#### 2.2.5.5 プロダクションセルシード

##### 2.2.5.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.5.2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、3.3.3の試験を行う。

#### 2.2.6 L・カニコーラ

##### 2.2.6.1 培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

#### 2.2.7 L・コペンハーゲニー

##### 2.2.7.1 培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

#### 2.2.8 L・ヘブドマディス

##### 2.2.8.1 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 ジステンパーウイルス原液

###### 2.3.1.1 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。

個別別培養細胞について、3.4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の細胞で培養し、相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を添加してもよい。

原液について、3.6.1及び3.6.2.1の試験を行う。

##### 2.3.2 犬アデノウイルス（2型）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別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の培養細胞に異常を認めてはならない。

###### 2.3.2.2 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、相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を添加してもよい。

原液について、3.6.1及び3.6.2.2の試験を行う。

##### 2.3.3 犬パラインフルエンザウイルス原液

###### 2.3.3.1 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。ウイルス接種前の培養細胞に異常を認めてはならない。

個別別培養細胞について、3.4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のろ液又は遠心上清を原液とする。この場合、適当と認められた安定剤を添加してもよい。

原液について、3.6.1及び3.6.2.3の試験を行う。

### 2.3.4 犬パルボウイルス原液

#### 2.3.4.1 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。ウイルス接種前の培養細胞に異常を認めてはならない。

#### 2.3.4.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.4.1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のろ液又は遠心上清を原液とする。この場合、適当と認められた安定剤を添加してもよい。

原液について、3.6.1及び3.6.2.4の試験を行う。

### 2.3.5 犬コロナウイルス原液

#### 2.3.5.1 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。

#### 2.3.5.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.5.1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のろ液又は遠心上清を原液とする。この場合、適当と認められた安定剤を添加してもよい。

原液について、3.6.1及び3.6.2.5の試験を行う。

### 2.3.6 L・カニコーラ原液

#### 2.3.6.1 培養

プロダクションシード菌を培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.5の試験を行う。

#### 2.3.6.2 不活化

適当と認められた方法で培養菌液を不活化し、遠心して集菌し、適当と認められた溶液に浮遊させたものを原液とする。

原液について、3.6.3の試験を行う。

### 2.3.7 L・コペンハーゲン原液

#### 2.3.7.1 培養

プロダクションシード菌を培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.5の試験を行う。

#### 2.3.7.2 不活化

適当と認められた方法で培養菌液を不活化し、遠心して集菌し、適当と認められた溶液に浮遊させたものを原液とする。

原液について、3.6.3の試験を行う。

### 2.3.8 L・ヘブドマディス原液

#### 2.3.8.1 培養

プロダクションシード菌を培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.5の試験を行う。

#### 2.3.8.2 不活化

適当と認められた方法で培養菌液を不活化し、遠心して集菌し、適当と認められた溶液に浮遊させたものを原液とする。

原液について、3.6.3 の試験を行う。

## 2.4 最終バルク

### 2.4.1 混合生ワクチン

ジステンパーウイルス原液、犬アデノウイルス（2型）原液、犬パラインフルエンザウイルス原液、犬パルボウイルス原液及び犬コロナウイルス原液を混合し、最終バルクとする。この場合、適当と認められた安定剤を添加してもよい。

### 2.4.2 液状不活化ワクチン

適当と認められた溶液で濃度調整したL・カニコーラ原液、L・コペンハーゲン原液及びL・ヘブドマディス原液を混合し、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

### 2.5.1 混合生ワクチン

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、3.7 の試験を行う。

### 2.5.2 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、3.7 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

猫由来細胞を用いる場合には、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。

鶏由来細胞を用いる場合には、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3.1.1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、鶏脳脊髄炎ウイルスについて3.1.1.4.2.2に規定する試験を適用する製剤については、本試験を実施しなくてよい。

###### 3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

猫由来細胞又は犬由来細胞を用いる場合には、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。

鶏由来細胞を用いる場合は鶏白血病ウイルス、細網内皮症ウイルス、牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス、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、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、3.2.6、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に規定する試験を適用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。

### 3.1.4 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

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.1.6 プロダクションシード菌の試験

#### 3.1.6.1 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.2 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2.1.4.2.1.1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 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

猫由来細胞を用いる場合には、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。

###### 3.3.1.5.2.2 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、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。

#### 3.3.1.6 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。

#### 3.3.1.7 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。

### 3.3.2 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 個体別培養細胞の試験

個体別培養細胞のそれぞれ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。

#### 3.4.1 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

日間以上培養し、観察するとき、CPE を認めてはならない。

#### 3.4.2 赤血球吸着試験

3.4.1 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0.1vol %モルモット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。

#### 3.4.3 封入体染色試験

3.4.1 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。

#### 3.4.4 赤血球凝集試験

3.4.1 の試験最終日に培養液について、1.0vol %豚赤血球浮遊液を等量加えて、4℃で18時間静置した後、赤血球凝集の有無を観察し、HA を認めてはならない。

#### 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 総菌数試験

菌数計算盤を用いて菌数を計算するとき、総菌数は、1 mL 中  $1 \times 10^9$  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 ウイルス含有量試験

###### 3.6.2.1 ジステンパーウイルス含有量試験

###### 3.6.2.1.1 試験材料

###### 3.6.2.1.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記4）又は適当と認められた培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.6.2.1.1.2 培養細胞

Vero 細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

###### 3.6.2.1.2 試験方法

試料0.1mL ずつを4本以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間回転培養し、観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験法によるものとする。

###### 3.6.2.1.3 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  $10^{4.5}$ 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。

###### 3.6.2.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験

###### 3.6.2.2.1 試験材料

###### 3.6.2.2.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液又は適当と認められた培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.6.2.2.1.2 培養細胞

豚腎培養細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

###### 3.6.2.2.2 試験方法

試料0.1mL ずつを4本以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間回転培養し、観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験法によるものとする。

### 3.6.2.2.3 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。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。

### 3.6.2.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

#### 3.6.2.3.1 試験材料

##### 3.6.2.3.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液又は適当と認められた培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.6.2.3.1.2 培養細胞

Vero 細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

#### 3.6.2.3.2 試験方法

試料 0.1mL ずつを 4 本以上の培養細胞に接種し、30 °C で 7 日間回転培養し、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。

#### 3.6.2.3.3 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<sup>6.5</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、そのウイルス含有量とする。

### 3.6.2.4 犬パルボウイルス含有量試験

#### 3.6.2.4.1 試験材料

##### 3.6.2.4.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液又は適当と認められた培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.6.2.4.1.2 培養細胞

猫腎株化細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

#### 3.6.2.4.2 試験方法

試料 0.1mL ずつを 4 本以上の培養細胞に接種し、32 °C で 24 時間静置培養した後、ウイルス増殖用培養液と交換し、更に 32 °C で 6 日間回転培養する。培養した後、培養液を採取し、これに等量の牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液（付記 5）を加え、更にこの混合液と等量の VAD6.0 液（付記 6）で濃度を調整した 0.3 ~ 0.5vol % 豚赤血球浮遊液を加え、2 ~ 5 °C で静置した後観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験法によるものとする。

#### 3.6.2.4.3 判定

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<sup>6.5</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。

### 3.6.2.5 犬コロナウイルス含有量試験

#### 3.6.2.5.1 試験材料

##### 3.6.2.5.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液又は適当と認められた培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.6.2.5.1.2 培養細胞

猫腎株化細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

#### 3.6.2.5.2 試験方法

試料 0.1mL ずつを 4 本以上の培養細胞に接種し、37 °C で 7 日間回転培養し、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。

### 3.6.2.5.3 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>5.0</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。

### 3.6.3 不活化試験

#### 3.6.3.1 試験材料

##### 3.6.3.1.1 試料

検体 5 mL 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。

##### 3.6.3.1.2 培地

適当と認められた培地を用いる。

#### 3.6.3.2 試験方法

培地 20mL を入れた試験管 3 本に試料 0.5mL ずつを接種し、35～37℃で6～8日間培養し、各試験管から1白金耳を採取し、暗視野法で鏡検する。

#### 3.6.3.3 判定

レプトスピラの増殖を認めてはならない。

### 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、混合ワクチンは、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。混合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液体でなければならない。異物及び異臭を認めてはならない。

また、小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

#### 3.7.2 pH 測定試験

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。

#### 3.7.3 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、混合生ワクチンは、適合しなければならない。

#### 3.7.4 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、混合生ワクチンは、適合しなければならない。

#### 3.7.5 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。

#### 3.7.6 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、混合生ワクチンは、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。

#### 3.7.7 ウイルス含有量試験

##### 3.7.7.1 ジステンパーウイルス含有量試験

##### 3.7.7.1.1 試験材料

##### 3.7.7.1.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の滅菌水で溶解する。試験品中のジステンパーウイ

ルス以外のウイルスの各抗血清（付記8から11まで）を非働化したもので中和したもの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。

#### 3.7.7.1.1.2 培養細胞

Vero細胞を用いる。

#### 3.7.7.1.2 試験方法

試料0.1mLずつを4本（穴）以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間チューブ法による回転培養又はプレート法による静置培養を行い、観察する。

#### 3.7.7.1.3 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。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たりチューブ法で10<sup>3.5</sup>TCID<sub>50</sub>以上、プレート法で10<sup>2.1</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

### 3.7.7.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験

#### 3.7.7.2.1 試験材料

##### 3.7.7.2.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の滅菌水で溶解する。試験品中の犬アデノウイルス（2型）以外のウイルスの各抗血清（付記7及び9から11まで）を非働化したもので中和したもの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。

##### 3.7.7.2.1.2 培養細胞

豚腎培養細胞又は犬腎株化細胞を用いる。

#### 3.7.7.2.2 試験方法

試料0.1mLずつを4本（穴）以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間チューブ法による回転培養又はプレート法による静置培養を行い、観察する。

#### 3.7.7.2.3 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。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たりチューブ法で10<sup>5.5</sup>TCID<sub>50</sub>以上、プレート法で10<sup>2.3</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

### 3.7.7.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

#### 3.7.7.3.1 試験材料

##### 3.7.7.3.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の滅菌水で溶解する。試験品中の犬パラインフルエンザウイルス以外のウイルスの各抗血清（付記7、8、10及び11）を非働化したもので中和したもの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。

##### 3.7.7.3.1.2 培養細胞

Vero細胞を用いる。

#### 3.7.7.3.2 試験方法

試料0.1mLずつを4本（穴）以上の培養細胞に接種し、30℃で7日間チューブ法による回転培養又はプレート法による静置培養を行い、観察する。

#### 3.7.7.3.3 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。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たりチューブ法で10<sup>5.5</sup>TCID<sub>50</sub>以上、プレート法で10<sup>3.7</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

### 3.7.7.4 犬パルボウイルス含有量試験

#### 3.7.7.4.1 試験材料

##### 3.7.7.4.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の滅菌水で溶解する。試験品中の犬パルボウイルス

以外のウイルスの各抗血清（付記7から9まで及び11）を非働化したもので中和したもの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。

#### 3.7.7.4.1.2 培養細胞

猫腎株化細胞を用いる。

#### 3.7.7.4.2 試験方法

試料0.1mLずつを4本（穴）以上の培養試験管に接種し、32℃で24時間静置培養した後、ウイルス増殖用培養液と交換し、32℃で6日間チューブ法による回転培養又はプレート法による静置培養する。培養した後、培養液を採取し、これに等量の牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液を加え、更にこの混合液と等量のVAD6.0液で濃度を調整した0.3～0.5vol%豚赤血球浮遊液を加え、2～5℃で静置後、観察する。

#### 3.7.7.4.3 判定

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。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たりチューブ法で10<sup>5.5</sup>TCID<sub>50</sub>以上、プレート法で10<sup>5.1</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

#### 3.7.7.5 犬コロナウイルス含有量試験

##### 3.7.7.5.1 試験材料

##### 3.7.7.5.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の滅菌水で溶解する。試験品中の犬コロナウイルス以外のウイルスの各抗血清（付記7から10まで）を非働化したもので中和したもの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。

##### 3.7.7.5.1.2 培養細胞

猫腎株化細胞を用いる。

##### 3.7.7.5.2 試験方法

試料0.1mLずつを4本（穴）以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間チューブ法による回転培養又はプレート法による静置培養を行い、観察する。

##### 3.7.7.5.3 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。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たりチューブ法で10<sup>4.0</sup>TCID<sub>50</sub>以上、プレート法で10<sup>2.2</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

#### 3.7.8 チメロサル定量試験

チメロサルを添加した液状不活化ワクチンについて、一般試験法のチメロサル定量試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.7.9 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。

#### 3.7.10 安全試験

##### 3.7.10.1 試験材料

##### 3.7.10.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.7.10.1.2 試験動物

6か月齢未満の犬を用いる。

##### 3.7.10.2 試験方法

試験動物3頭を試験群、2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8週間観察する。

##### 3.7.10.3 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。

### 3.7.11 力価試験

#### 3.7.11.1 ジステンパー力価試験

##### 3.7.11.1.1 試験材料

###### 3.7.11.1.1.1 試験動物

3.7.10 に用いた犬を用いる。

###### 3.7.11.1.1.2 中和試験用ウイルス

犬ジステンパーウイルス DFE-HC 株又は適当と認められたジステンパーウイルス株を用いる。

###### 3.7.11.1.1.3 培養細胞

適当と認められた培養細胞を用いる。

##### 3.7.11.1.2 試験方法

3.7.10 の初回注射後 4 週目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。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

各プール血清を非働化し、1 vol% 牛胎子血清加リン酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釈液で 5 倍階段希釈する。各希釈血清と 0.1mL 中約 200TCID<sub>50</sub> の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、2～5℃で 1 夜又は 37℃で 60 分間処理する。この各混合液 0.1mL ずつを 4 本以上の培養細胞に接種し、37℃で 7 日間回転培養し、観察する。

###### 3.7.11.1.3 判定

細胞を観察し、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、40 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。

#### 3.7.11.2 犬アデノウイルス（2型）感染症力価試験

##### 3.7.11.2.1 試験材料

###### 3.7.11.2.1.1 試験動物

3.7.10 に用いた犬を用いる。

###### 3.7.11.2.1.2 中和試験用ウイルス

犬アデノウイルス（2型）OD-N 株又は適当と認められた犬アデノウイルス（2型）株を用いる。

###### 3.7.11.2.1.3 培養細胞

犬腎株化細胞を用いる。

##### 3.7.11.2.2 試験方法

3.7.10 の初回注射後 4 週目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。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

各プール血清を非働化し、1 vol % 牛胎子血清加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 中約 200TCID<sub>50</sub> の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、35～37℃で 60 分間処理する。この各混合液 0.1mL ずつを 4 本以上の培養細胞に接種し、37℃で 7 日間回転培養し、観察する。

###### 3.7.11.2.3 判定

培養細胞の 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、50 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。

#### 3.7.11.3 犬パラインフルエンザ力価試験

##### 3.7.11.3.1 試験材料

###### 3.7.11.3.1.1 試験動物

3.7.10 に用いた犬を用いる。

###### 3.7.11.3.1.2 中和試験用ウイルス

犬パラインフルエンザウイルス DL-1 株又は適当と認められた犬パラインフルエンザウイルス株

を用いる。

#### 3.7.11.3.1.3 培養細胞

Vero 細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

#### 3.7.11.3.2 試験方法

3.7.10 の初回注射後 4 週目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。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールのする。

各プール血清を非働化し、1 vol % 牛胎子血清加リン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。各希釈血清と 0.1mL 中約 200TCID<sub>50</sub> の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、適当な温度で 60 分間処理する。この各混合液 0.1mL ずつを 4 本以上の培養細胞に接種し、37℃で 7 日間回転培養し、観察する。

#### 3.7.11.3.3 判定

培養細胞の 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、10 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。

#### 3.7.11.4 犬パルボウイルス感染症力価試験

##### 3.7.11.4.1 試験材料

##### 3.7.11.4.1.1 試験動物

3.7.10 に用いた犬を用いる。

##### 3.7.11.4.1.2 中和試験用ウイルス

犬パルボウイルス CP-49 株又は適当と認められた犬パルボウイルス株を用いる。

##### 3.7.11.4.1.3 培養細胞

猫腎株化細胞を用いる。

##### 3.7.11.4.2 試験方法

3.7.10 の初回注射後 4 週目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。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールのする。

各プール血清を非働化し、1 vol % 牛胎子血清加リン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。各希釈血清と 0.1mL 中約 200TCID<sub>50</sub> の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、35～37℃で 60 分間処理する。この各混合液 0.1mL ずつを 4 本以上の培養試験管に接種し、37℃で 24 時間静置培養した後、ウイルス増殖用培養液で液交換し、更に 37℃で 6 日間回転培養する。培養最終日に、培養液を採取し、これに等量の牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液を加え、更にこの混合液と等量の VAD6.0 液で濃度を調整した 0.3～0.5vol % 豚赤血球浮遊液を加え、2～5℃で静置後、観察する。

##### 3.7.11.4.3 判定

赤血球凝集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、200 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、4 倍未満でなければならない。

#### 3.7.11.5 犬コロナウイルス感染症力価試験

##### 3.7.11.5.1 試験材料

##### 3.7.11.5.1.1 試験動物

3.7.10 に用いた犬を用いる。

##### 3.7.11.5.1.2 中和試験用ウイルス

犬コロナウイルス 5821-B 株又は適当と認められた犬コロナウイルス株を用いる。

##### 3.7.11.5.1.3 培養細胞

猫腎株化細胞を用いる。

##### 3.7.11.5.2 試験方法



3.7.10 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。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

各プール血清を非働化し、1 vol % 牛胎子血清加リン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。各希釈血清と0.1mL 中約200TCID<sub>50</sub>の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、適当な温度で60分間処理する。この各混合液0.1mL ずつを4本以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間回転培養し、観察する。

#### 3.7.11.5.3 判定

培養細胞の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、8倍以上でなければならない。この場合、対照群では、4倍未満でなければならない。

#### 3.7.11.6 犬レプトスピラ病力価試験

##### 3.7.11.6.1 試験材料

##### 3.7.11.6.1.1 注射材料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンで溶解した試験品を注射材料とする。

##### 3.7.11.6.1.2 試験動物

体重約300gのモルモット又は体重60～100gのハムスターを用いる。

##### 3.7.11.6.1.3 凝集反应用菌液

L・カニコーラ、L・コペンハーゲニー及びL・ヘブドマディスの生菌浮遊液を用いる。

##### 3.7.11.6.2 試験方法

注射材料1mL ずつを10匹の試験動物に7日間隔で2回皮下注射する。2回目注射後14日目に得られた各個体の血清について、凝集反应用菌液を用いて溶菌凝集反応を行う。

##### 3.7.11.6.3 判定

L・カニコーラの菌液及びL・コペンハーゲニーの菌液に対して80%以上が8倍以上の凝集価を示し、L・ヘブドマディスの菌液に対して10倍以上の凝集価を示さなければならない。

#### 4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後2年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 抗L・カニコーラ血清

L・カニコーラの不活化菌で免疫した体重300～350gのモルモットの血清であって、凝集抗体価40倍以上のもの。

#### 付記2 抗L・コペンハーゲニー血清

L・コペンハーゲニーの不活化菌で免疫した体重300～350gのモルモットの血清であって、凝集抗体価40倍以上のもの。

#### 付記3 抗L・ヘブドマディス血清

L・ヘブドマディスの不活化菌で免疫した体重300～350gのモルモットの血清であって、凝集抗体価40倍以上のもの。

#### 付記4 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

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 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	7.01 g
ホウ酸	3.09 g
水酸化ナトリウム	0.96 g
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 6 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
リン酸水素二ナトリウム二水和物	40.56 g
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 7 抗ジステンパーウイルス血清

ジステンパーウイルスで免疫した兎、モルモット又はフェレットの血清であって、ワクチン中のジステンパーウイルスを完全に中和できるもの。

付記 8 抗犬アデノウイルス (2型) 血清

犬アデノウイルス (2型) で免疫した兎又はモルモットの血清であって、ワクチン中の犬アデノウイルス (2型) を完全に中和できるもの。

付記 9 抗犬パラインフルエンザウイルス血清

犬パラインフルエンザウイルスで免疫した兎又はモルモットの血清であって、ワクチン中の犬パラインフルエンザウイルスを完全に中和できるもの。

付記 10 抗犬パルボウイルス血清

犬パルボウイルスで免疫した兎又はモルモットの血清であって、ワクチン中の犬パルボウイルスを完全に中和できるもの。

付記 11 抗犬コロナウイルス血清

犬コロナウイルスで免疫した兎の血清であって、ワクチン中の犬コロナウイルスを完全に中和できるもの。

(別紙2)

○農林水産省告示第千六百二十三号

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。

平成二十四年七月四日

農林水産大臣 郡司 彰

「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。）の部の馬ウイルス性動脈炎不活化ワクチン（アジュバント加溶解用液）の項の次に次のように加える。

## 馬鼻肺炎生ワクチン

糖たん白 gE 遺伝子を欠損した弱毒馬ヘルペスウイルス 1 型を培養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。

### 1 小分製品の試験

#### 1.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

#### 1.2.1 迷入ウイルス否定試験

##### 1.2.1.1 馬由来細胞接種試験

##### 1.2.1.1.1 細胞観察

##### 1.2.1.1.1.1 試験法

ED 細胞（付記 1）を用いる。

一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1 を準用して調整した試料 1 mL につき 20cm<sup>2</sup> 以上の培養細胞に接種し、37℃で 60 分間吸着した後、ウイルス増殖用培養液（付記 2）を加えて 37℃で 7 日間培養する。CPE の有無を観察した後、次代へ継代し、37℃で 7 日間培養して CPE の有無を観察する。

ただし、中和用抗血清は、抗馬ヘルペスウイルス 1 型血清（付記 3）を非働化したものを用いる。

##### 1.2.1.1.1.2 判定

観察期間中、培養細胞に CPE を認めてはならない。

##### 1.2.1.1.2 赤血球吸着試験

##### 1.2.1.1.2.1 試験法

1.2.1.1.1 の観察最終日に細胞表面をリン酸緩衝食塩液で 2 回洗浄後、培養細胞を 2 群に分け、モルモット及びがちょうの 0.1vol % 赤血球浮遊液をそれぞれの群に重層し、室温で 60 分間静置後、赤血球吸着の有無を観察する。

##### 1.2.1.1.2.2 判定

培養細胞に赤血球吸着を認めてはならない。

##### 1.2.1.1.3 馬伝染性貧血ウイルス否定試験

##### 1.2.1.1.3.1 試験方法

1.2.1.1.1 の試料接種後 7 日目の細胞を次代へ継代し、37℃で 7 日間培養する。培養 7 日目に培養細胞をリン酸緩衝食塩液で洗浄した後、抗馬伝染性貧血ウイルス馬血清（付記 4）による蛍光抗体法を行い、観察する。

##### 1.2.1.1.3.2 判定

培養細胞に特異蛍光抗原を認めてはならない。

### 1.3 ウイルス含有量試験

#### 1.3.1 試料

試験品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。

#### 1.3.2 培養細胞

BEK-1 細胞（付記 5）を 96 穴プレートに培養して単層となったものを用いる。

#### 1.3.3 試験方法

試料 25 μL ずつをそれぞれ 4 穴の培養細胞に接種し、37℃で 60 分間吸着した後、ウイルス増

殖用培養液を 75  $\mu$  L 加え、37  $^{\circ}$ C で 5 ~ 7 日間培養し、観察する。

#### 1.3.4 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。

試験品のウイルス含有量は、1 mL 中 10<sup>4.5</sup>TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

#### 1.4 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性否定試験法により試験するとき、これに適合しなければならない。

#### 1.5 力価試験

##### 1.5.1 試験材料

##### 1.5.1.1 注射材料

試験品並びにそれをリン酸緩衝食塩液で 5 倍及び 25 倍に希釈したものを注射材料とする。

##### 1.5.1.2 試験動物

約 6 週齢のハムスターを用いる。

##### 1.5.1.3 攻撃ウイルス

ハムスターに馴化させた攻撃用馬鼻肺炎ウイルス KyD 株 (付記 6) を用いる。

##### 1.5.1.4 試験方法

試験動物 12 匹を試験群、4 匹を対照群とする。注射材料 1 mL ずつをそれぞれ 4 匹の試験群の腹腔内に注射する。注射後 21 日目に攻撃ウイルス 1 mL ずつを試験群及び対照群の腹腔内に注射し、7 日間観察する。

##### 1.5.1.5 判定

試験群の生残動物数から試験品の ED<sub>50</sub> を算出する。

試験品の ED<sub>50</sub> は、16ED<sub>50</sub>/mL 以上でなければならない。この場合、対照群は、全て死亡しなければならない。

#### 付記 1 ED 細胞

健康な妊娠馬から摘出された胎子の皮膚をトリプシン (1:250) を 0.25w/v % 含むリン酸緩衝食塩液で消化して調整した細胞を、細胞増殖用培養液に浮遊し、培養瓶に分注し、37  $^{\circ}$ C で 4 ~ 5 日間静置培養して細胞層を形成させた後、次代に継代培養する方法で作出された継代 35 代以内のものである。

#### 付記 2 ウイルス増殖用培養液

1,000 mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス

2.95 g

牛胎子血清又はやぎ血清

5 ~ 10 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。

#### 付記 3 抗馬ヘルペスウイルス 1 型血清

馬ヘルペスウイルス 1 型  $\Delta$  gE-NIBS 株で免役した兔血清であって、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 抗馬伝染性貧血ウイルス馬血清

健康馬に馬伝染性貧血ウイルスを実験感染させて作製した馬血清であって、蛍光抗体法により測定した力価が 16 倍以上のもの。

付記5 BEK-1細胞

健康な牛胎子腎由来の株化細胞

付記6 攻撃用馬鼻肺炎ウイルス KyD 株

馬鼻肺炎ウイルス KyD 株をハムスターの腹腔内に注射し、感染極期に肝臓を採取し、リン酸緩衝食塩液で 10w/v % 乳剤に調整する。攻撃には、 $10^{4.0}$ LD<sub>50</sub> を用いる。

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部のマイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチンの項の次に次のように加える。

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

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又はこれを濃縮したものに、アルミニウムゲルアジュバント及び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 無菌試験

一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

#### 1.2 毒性限度確認試験

一般試験法の毒性限度確認試験法 1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、注射量は 0.4mL とし、体重測定は 4 日目に行うものとする。

#### 1.3 力価試験

##### 1.3.1 試験材料

###### 1.3.1.1 注射材料

試験品及び参照ワクチン（付記 1）を、試験品から培養菌体を除いた組成の溶液又はこれと同等の溶液で希釈したものを注射材料とする。

###### 1.3.1.2 試験動物

6～7 週齢の ddY 系マウスを用いる。

###### 1.3.1.3 酵素抗体反応（以下この項において「ELISA」という。）用抗原

ポリソルベート 20 抽出抗原（付記 2）を用いる。

#### 1.3.2 試験方法

試験動物の 40 匹を試験群、5 匹を対照群とする。

試験群を 1 群 20 匹の 2 群に分け、1 群（以下この項において「試験品群」という。）には試験品を、他の 1 群（以下この項において「参照ワクチン群」という。）には参照ワクチンをそれぞれ 0.2mL ずつ腹腔内に注射する。注射後 4 週後に、試験品群、参照ワクチン群及び対照群から得られた各個体の血清について、ELISA を行う。

試験品群、参照ワクチン群及び対照群の血清を希釈液（付記 3）で 200 倍に希釈したものを抗原吸着プレート（付記 4）の 2 穴ずつに 100  $\mu$ L ずつ加え、希釈液のみの穴をブランクとする。また、参照陽性血清（付記 5）を希釈液で 200 倍に希釈したものを抗原吸着プレートの 4 穴に 100  $\mu$ L ずつ加える。4℃で 18 時間反応させた後、洗浄液（付記 6）で 3 回洗浄する。次に、各穴に標識抗体（付記 7）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。基質液（付記 8）を各穴に 100  $\mu$ L ずつ加え、37℃で 30 分間反応させた後、3 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を各穴に 50  $\mu$ 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。

#### 1.3.3 判定

各被検血清の吸光度からブランクの平均吸光度を引いた値を各被検血清の吸光度値として平均吸光度値を算出する。

試験品群の血清の平均吸光度値は、参照ワクチン群の血清の平均吸光度値と同値以上を示さなければならない。また、参照ワクチン群と対照群の血清の平均吸光度値の差は 0.7 以上、対照群の血清の平均吸光度値は 0.35 未満、参照陽性血清の平均吸光度値は 0.8～1.8 でなければならない。

### 付記 1 参照ワクチン

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

付記2 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培養菌液を遠心集菌し、希釈液に懸濁後、4℃で24時間攪拌して菌体を洗浄する。洗浄菌体をトリス緩衝液(1)にたん白濃度1 mg/mLになるように懸濁後、2 vol %ポリソルベート 20 加トリス緩衝液(2)を等量加え、37℃で30分間振とうしながら加温する。遠心後の上清にジエチルエーテルを等量加えて振とう後、エーテル層を完全に除去したものに希釈液を加え、適当と認められるたん白濃度に調整したもの。

(1) トリス緩衝液

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

(2) 2 vol %ポリソルベート 20 加トリス緩衝液

ポリソルベート 20 20mL とトリス緩衝液 980mL を混合したもの。

付記3 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
リン酸水素二ナトリウム	1.15 g
水	残量

付記4 抗原吸着プレート

製造用株又はこれと同等の抗原性を有する株で免疫した兔免疫血清(付記9)を炭酸緩衝液(付記10)で100倍に希釈したものを、96穴マイクロプレートに100  $\mu$ Lずつ加え、4℃で18時間反応させ、洗浄液で3回洗浄する。さらに、0.1w/v %ゼラチン液(付記11)を各穴に100  $\mu$ Lずつ加え、4℃で18時間反応させ、洗浄液で3回洗浄する。これに、ポリソルベート 20 抽出抗原を100  $\mu$ Lずつ加え、4℃で18時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄したもの。

付記5 参照陽性血清

製造用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、希釈液で200倍に希釈してELISAを行うとき、平均吸光度値が0.8~1.8となるように濃度を調整したもの。

付記6 洗浄液

ポリソルベート 20 0.5mL と希釈液 1,000mL を混合したもの。

付記7 標識抗体

アルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG 抗体を希釈液で希釈したもの。

付記8 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12) 100mL に溶解したもの。



付記9 兎免疫血清

製造用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、マイコプラズマ・ハイオニューモニエと特異的に反応するもの。

付記10 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、pH9.6 に調整する。

付記11 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12 基質緩衝液

1,000mL 中

塩化マグネシウム・六水和物

0.049 g

ジエタノールアミン

96 mL

水

残量

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。）の部の豚ボルデテラ感染症精製（アフィニティークロマトグラフィー部分精製）・豚パスツレラ症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチンの項を次のように改める。

**豚ボルデテラ感染症精製（アフィニティークロマトグラフィー部分精製）・豚パスツレラ症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン**

動生剤基準の豚ボルデテラ感染症精製（アフィニティークロマトグラフィー部分精製）・豚パスツレラ症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチンの 3.3.5、3.3.9 及び 3.3.10 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。）の部の鶏サルモネラ症（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）不活化ワクチンの項を次のように改める。

### **鶏サルモネラ症（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**

動生剤基準の鶏サルモネラ症（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）不活化ワクチンの3.4.2、3.4.4及び3.4.5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。）の部のぶりピブリオ病不活化ワクチンの項の次に次のように加える。

## ひらめストレプトコッカス・パラウベリス（Ⅰ型・Ⅱ型） 感染症・β溶血性レンサ球菌症混合不活化ワクチン

ストレプトコッカス・パラウベリスⅠ型菌及びⅡ型菌並びにストレプトコッカス・イニエの培養菌液を不活化後混合したワクチンである。

### 1 小分製品の試験

#### 1.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

#### 1.2 安全試験

##### 1.2.1 試験材料

###### 1.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 1.2.1.2 試験動物

水温 20℃、循環式で7日間以上飼育し、異常のないことを確認した体重 30～150g のひらめ 40尾以上を用いる。

###### 1.2.2 試験方法

試験動物は24時間以上餌止めした後、1群20尾以上ずつの2群に分ける。1群の試験動物に注射材料 0.1mL を腹腔内に注射し、試験群とする。他の1群は対照群とし、試験群と同様の方法でリン酸緩衝食塩液を注射する。その後、それぞれ水温 20℃、循環式で飼育し、14日間観察する。ただし、安全試験最終日の前日から水温を約1日かけて25℃に上昇させる。

###### 1.2.3 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。

### 1.3 力価試験

#### 1.3.1 ストレプトコッカス・パラウベリス感染症力価試験

##### 1.3.1.1 試験材料

###### 1.3.1.1.1 試験動物

水温 20℃、循環式で7日間以上飼育し、異常のないことを確認した体重 30～150g のひらめ 160尾以上を用いる。

###### 1.3.1.1.2 攻撃用菌液

ストレプトコッカス・パラウベリスⅠ型強毒菌（付記1）及びⅡ型強毒菌（付記2）の液体培養菌液を、それぞれ対照群の死亡率が35%以上と予測される2段階の濃度に調整したものを攻撃用菌液とする。

###### 1.3.1.2 試験方法

試験動物は24時間以上餌止めした後、1群80尾以上ずつの2群に分ける。1群の試験動物に注射材料 0.1mL を腹腔内に注射し、試験群とする。他の1群は対照群とし、試験群と同様の方法でリン酸緩衝食塩液を注射する。その後、それぞれ水温 20℃、循環式で飼育し、13日目に水温を約1日かけて25℃に上昇させる。飼育13日目から24時間以上餌止めした試験群及び対照群をそれぞれ20尾以上の4群ずつに分ける。各2群ずつの腹腔内にⅠ型菌の攻撃用菌液を、他の各2群ずつの腹腔内にⅡ型菌の攻撃用菌液を、それぞれ0.1mL ずつ注射して攻撃する。攻撃後、飼育水温を2～4時間かけて27℃に上昇させ、21日間飼育観察して各群の生死を調べる。なお、この際、攻撃後4日目から48時間以上餌止めするとともに、攻撃5日目から観察期間終了時まで各水槽の溶

存酸素量を約 4～5 mg/L となるように調整する。

#### 1.3.1.3 判定

それぞれの攻撃菌により、それぞれの対照群の 35 %以上が死亡した攻撃菌液のうち少なくとも 1 段階において、試験群の生残率は、対照群の生残率より有意に高い値を示さなければならない (Fisher の直接確率計算法、 $P < 0.05$ )。

#### 1.3.2 $\beta$ 溶血性レンサ球菌症力価試験

##### 1.3.2.1 試験材料

###### 1.3.2.1.1 試験動物

1.2 の試験に用いた動物を用いる。

###### 1.3.2.1.2 攻撃用菌液

ストレプトコッカス・イニエ強毒菌 (付記 3) の液体培養菌液をリン酸緩衝食塩液で希釈し、対照群の死亡率が 80 %以上と予測される希釈菌液を攻撃用菌液とする。

##### 1.3.2.2 試験方法

1.2 の試験最終日の前日から 24 時間以上餌止めした試験群及び対照群それぞれ 20 尾以上の腹腔内に、攻撃用菌液を 0.1mL ずつ注射して攻撃した後、飼育水温 25 °C を 2～4 時間かけて 27 °C に上昇させ、14 日間飼育観察して各群の生死を調べる。

##### 1.3.2.3 判定

次式により試験品の有効率を求めるとき、有効率は 60 %以上でなければならない。この場合、対照群は、80 %以上が死亡しなければならない。

$$\text{有効率 (\%)} = \{1 - (\text{試験群の死亡率} / \text{対照群の死亡率})\} \times 100$$

付記 1 ストレプトコッカス・パラウベリス I 型強毒菌

ストレプトコッカス・パラウベリス M4Y 株又はこれと同等以上の毒力を有する株

付記 2 ストレプトコッカス・パラウベリス II 型強毒菌

ストレプトコッカス・パラウベリス M5E 株又はこれと同等以上の毒力を有する株

付記 3 ストレプトコッカス・イニエ強毒菌

ストレプトコッカス・イニエ C1N 株又はこれと同等以上の毒力を有する株

ワクチン（シードロット製剤を除く。）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・猫白血病・猫クラミジア感染症混合（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。

## 猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症 2 価・猫汎白血球減少症・猫白血病（猫白血病ウイルス由来防御抗原たん白遺伝子導入カナリア痘ウイルス）・猫クラミジア感染症混合ワクチン

弱毒猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス、弱毒猫汎白血球減少症ウイルス及び弱毒猫クラミドフィラ・フェリスをそれぞれ培養細胞で増殖させて得たウイルス液と 2 種類の猫カリシウイルスをそれぞれ培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化したものを混合し、凍結乾燥したもの（以下この項において「混合ワクチン」という。）と、猫白血病ウイルスの *env* たん白、*gag* たん白及び *pol* たん白をコードする遺伝子の一部を組み込んだ弱毒カナリア痘ウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液（以下この項において「液状ワクチン」という。）を組み合わせたワクチンである。

### 1 小分製品の試験

#### 1.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

#### 1.2 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 2.6.1 を準用して試験するとき、これらに適合しなければならない。

ただし、試料作製には中和用抗血清として抗猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス血清（付記 1）及び抗猫汎白血球減少症ウイルス血清（付記 2）をそれぞれ非働化したもの並びに抗生物質混合液（付記 3）を用いる。

#### 1.3 ウイルス含有量試験

##### 1.3.1 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス含有量試験

###### 1.3.1.1 試料

混合ワクチンを液状ワクチンと同量のリン酸緩衝食塩液で溶解したもの（以下この項において「溶解ワクチン」という。）を抗猫汎白血球減少症ウイルス血清を非働化したもの及び抗生物質混合液を加えて 37℃ 1 時間反応させたものをウイルス増殖用培養液（付記 4）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 1.3.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

###### 1.3.1.3 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本（穴）以上の培養細胞に接種し、37℃で 60 分吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で 7 日間培養し、観察する。

###### 1.3.1.4 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。

試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たり 10<sup>4.9</sup>TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

##### 1.3.2 猫汎白血球減少症ウイルス含有量試験

###### 1.3.2.1 試料

溶解ワクチンを抗猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス血清を非働化したもの及び抗生物質混合液を加えて 37℃で 1 時間反応させたもの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。

#### 1.3.2.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

#### 1.3.2.3 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ培養細胞浮遊液を分注した 4 本（穴）以上に接種し、37℃で 24 時間培養した後、ウイルス増殖用培養液と交換し、更に 37℃で 6 日間培養する。培養後、培養液を採取し、これに等量の牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液（付記 5）を加え、更にこの混合液と等量の VAD6.0 液（付記 6）により濃度を調整した 0.3 ～ 0.5 % 豚血球浮遊液を加え、2 ～ 5℃で静置した後、観察する。

#### 1.3.2.4 判定

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。

試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たり 10<sup>3.5</sup>TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

### 1.3.3 猫白血病ウイルス由来防御抗原たん白発現遺伝子導入カナリア痘ウイルス含有量試験

#### 1.3.3.1 試験材料

##### 1.3.3.1.1 試料

液状ワクチン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。

##### 1.3.3.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の発育鶏卵由来鶏胚細胞を用いる。

#### 1.3.3.2 試験方法

試料の 0.1mL ずつを 96 穴プレートの 5 穴以上の鶏胚細胞浮遊液に接種し、37℃で 7 日間培養する。

#### 1.3.3.3 判定

特徴的な CPE を認めたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub> を算出する。

試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たり 10<sup>7.2</sup>TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

### 1.4 クラミドフィラ・フェリス生菌数試験

#### 1.4.1 試験材料

##### 1.4.1.1 試料

混合ワクチンを液状ワクチンと同量の生理食塩液で溶解したものを生理食塩液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 1.4.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の発育鶏卵の 6 日齢のものを用いる。

#### 1.4.2 試験方法

試料の 0.2mL ずつをそれぞれ 10 個の発育鶏卵の卵黄嚢内に接種し、37℃で 11 日間培養し、観察する。

#### 1.4.3 判定

鶏胚が死亡したものを感染とみなし、EID<sub>50</sub> を算出する。ただし、4 日目までに死亡したものは、除外する。

試験品の生菌数は、1 頭分当たり 10<sup>3.0</sup>EID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

### 1.5 猫白血病ウイルス由来防御抗原たん白発現遺伝子導入カナリア痘ウイルス同定試験

#### 1.5.1 試験材料

##### 1.5.1.1 試料

液状ワクチンを牛胎子血清無添加の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。

##### 1.5.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の発育鶏卵由来鶏胚細胞を用いる。

### 1.5.2 試験方法

試料の 0.1mL ずつを 96 穴プレート の 2 穴の鶏胚細胞に接種し、37℃で 3 日間培養する。アセトン固定した後、これにリン酸緩衝食塩液で希釈した FITC 標識抗カナリア痘ウイルスモノクローナル抗体（付記 7）及びローダミン標識抗猫白血病ウイルス gp70 たん白モノクローナル抗体（付記 8）の混合液を 0.08mL 加え、37℃で 30 分間静置する。蒸留水で洗浄後、490nm 及び 550nm 励起フィルターを用いて蛍光顕微鏡で特異蛍光を観察する。

### 1.5.3 判定

カナリア痘ウイルス及び猫白血病ウイルス gp70 たん白に対する特異蛍光が認められなければならない。

### 1.6 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性否定試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、モルモットの観察期間は、14 日間とする。

### 1.7 猫カリシウイルス感染症力価試験

#### 1.7.1 試験材料

##### 1.7.1.1 試料

混合ワクチンを液状ワクチンと同量の注射用水で溶解したものを試料とする。

#### 1.7.2 試験方法

96 穴 ELISA 用プレート各穴に捕捉用抗猫カリシウイルス抗体（付記 9）を 120  $\mu$  L ずつ加え、5℃で 1 夜静置後、TNE 緩衝液（付記 10）300  $\mu$  L で 1 回洗浄して固相化プレートとする。

固相化プレートの各穴に ELISA 用緩衝液（付記 11）を 100  $\mu$  L ずつ加える。最初の列の 2 穴ずつに試料及び猫カリシウイルス抗原定量 ELISA 参照品（以下この項において「参照品」という。）

（付記 12）を 100  $\mu$  L ずつ加えて 2 倍階段希釈し、37℃で 3 時間反応させる。TNE 緩衝液 300  $\mu$  L で 1 回洗浄した後、猫カリシウイルス抗原定量 ELISA 用モノクローナル抗体（付記 13）を 100  $\mu$  L ずつ各穴に加え、37℃で 1 時間静置する。TNE 緩衝液 300  $\mu$  L で 3 回洗浄した後、全穴に基質液（付記 14）を 100  $\mu$  L ずつ加え、遮光して 20℃で 30 分間反応させる。反応停止液（付記 15）を 50  $\mu$  L ずつ加え、主波長 450nm 及び補正波長 630nm の 2 波長で吸光度（OD）を測定する。

以下の計算式により OD<sub>50</sub> を算出し、OD<sub>50</sub> を示す検体の希釈倍数を抗原量として ELISA 単位（log<sub>10</sub>）で表す。

$$OD_{50} = (OD_{max} + OD_{min}) / 2$$

OD<sub>max</sub>: 参照品の最大 OD の平均

OD<sub>min</sub>: 参照品の最小 OD の平均

$$\text{抗原量 (log 2)} = (OD_{50} - \text{定数}) / \text{傾き}$$

定数及び傾き：OD と抗原希釈倍数の対数について OD<sub>50</sub> を挟む 2 点の回帰直線の定数及び傾き

上記の計算式で算出した抗原量（log 2）の値を ELISA 単位（log<sub>10</sub>）に換算する。

#### 1.7.3 判定

参照品が所定の抗原量を示すとき、試験品の抗原量は、2.0log<sub>10</sub>ELISA 単位以上でなければならない。

#### 付記 1 抗猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス血清

猫ウイルス性鼻気管炎ウイルスで免疫した血清であって、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 2 抗猫汎白血球減少症ウイルス血清

猫汎白血球減少症ウイルスで免疫した血清であって、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 抗生物質混合液

1mL 中

結晶ペニシリンGカリウム

100万単位

硫酸カナマイシン

1g 力価

硫酸ストレプトマイシン

1g 力価

付記4 ウイルス増殖用培養液

1000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス

2.95 g

牛胎子血清

0 ~ 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。

必要最小限の抗生物質を加えてもよい。

付記5 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

7.01 g

ホウ酸

3.09 g

水酸化ナトリウム

0.96 g

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6 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塩

40.56 g

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7 FITC 標識抗カナリア痘ウイルスモノクローナル抗体

FITC 標識抗カナリア痘ウイルスモノクローナル抗体をリン酸緩衝食塩液で濃度を調整して使用する。

付記8 ローダミン標識抗猫白血病ウイルス gp70 たん白モノクローナル抗体

ローダミン標識抗白血病ウイルス gp70 たん白モノクローナル抗体をリン酸緩衝食塩液で濃度を調整して使用する。

付記9 捕捉用抗猫カリシウイルス抗体

猫を猫カリシウイルス G1 株で免疫して得た血清であって、炭酸ナトリウム緩衝液(付記16)で至適濃度に希釈して使用する。-20℃で保存し、凍結融解は避ける。

付記 10 U-TNE 緩衝液

1,000mL 中

塩化ナトリウム 8.77 g

トリス 1.21 g

ポリソルベート 20 1 mL

精製水 残量

pH を 7.5 ± 0.2 に調整する。

付記 11 ELISA 用緩衝液

1,000mL 中

トリス 2.42 g

塩化ナトリウム 8.77 g

牛血清アルブミン 10 g

ポリソルベート 20 0.5 mL

pH を 7.2 に調整する。

付記 12 猫カリシウイルス抗原定量 ELISA 参照品

猫カリシウイルス G1 株又は 431 株を含有する濃縮精製抗原、又は凍結乾燥ワクチン (G1 株及び 431 株) を注射用水で溶解したものであって、抗原量が明らかなもの。

本 ELISA で抗原量を測定するとき、所定の抗原量を示さなければならない。

付記 13 猫カリシウイルス抗原定量 ELISA 用モノクローナル抗体

ペルオキシダーゼ標識抗猫カリシウイルス p66 モノクローナル抗体

付記 14 基質液

本 ELISA に適当なテトラメチルベンジジン溶液

付記 15 反応停止液

0.5 mol/L 硫酸液

付記 16 炭酸ナトリウム緩衝液

1,000mL 中

炭酸ナトリウム 1.59 g

炭酸水素ナトリウム 2.93 g

水 残量

pH を 9.6 に調整する。

アジ化ナトリウム 0.2g を加えてもよい。

ワクチン（シードロット製剤）の部の炭疽生ワクチン（シード）の項の前に次のように加える。

## 牛コロナウイルス感染症（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

動生剤基準のシードロット規格に適合した牛コロナ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濃縮した後、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。

### 1 小分製品の試験

#### 1.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

#### 1.2 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性否定試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

#### 1.3 力価試験

##### 1.3.1 試験材料

###### 1.3.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 1.3.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

###### 1.3.1.3 赤血球凝集（HA）抗原

HmLu-1 細胞で増殖させた牛コロナウイルス No.66/HL 株であって、赤血球凝集価が 64 倍以上のものを用いる。

##### 1.3.2 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 7 日目に得られた各個体の血清について赤血球凝集抑制（以下この項において「HI」という。）試験を行う。

非働化した被検血清 0.2mL に 25w/v %カオリン加生理食塩液（付記 1）0.8mL を加え、常温で 20 分間処理した後、1,700G、10 分間遠心し、その上清に 0.1w/v %牛血清アルブミン加里ン酸緩衝食塩液（付記 2）で濃度を調整した 1 vol %マウス赤血球浮遊液を等量加え、よく混合した後、常温で 20 分間処理し、1,700G、10 分間遠心し、その上清を試料とする。

試料 0.2mL を 0.1w/v %牛血清アルブミン加里ン酸緩衝食塩液 0.2mL で 2 倍階段希釈し、各希釈液に 4 単位の HA 抗原を 0.2mL 加え、37°C で 60 分間処理する。それに 0.1w/v %牛血清アルブミン加里ン酸緩衝食塩液に浮遊させた 1 vol %マウス赤血球浮遊液を 0.2mL 加え、常温で 1 ~ 2 時間静置し、観察する。

##### 1.3.3 判定

赤血球の凝集を阻止した血清の最高希釈倍数を HI 抗体価とする。

HI 抗体価 160 倍以上を HI 抗体陽性とする。

試験動物の HI 抗体陽性率は、80 % 以上でなければならない。

### 2 中間製品の試験

#### 2.1 不活化試験

##### 2.1.1 試験材料

###### 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 5 mL を 4°C で 1 夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

### 2.1.1.2 培養細胞

HmLu-1 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。

### 2.1.2 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、37℃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（付記3）を加え、37℃で7日間培養し、観察する。

### 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判定する。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

#### 付記1 25w/v %カオリン加生理食塩液

1,000mL 中

カオリン

250 g

塩化ナトリウム

8.75 g

水

残量

水酸化ナトリウム溶液でpHを7.2～7.4に調整する。

#### 付記2 0.1w/v %牛血清アルブミン加リン酸緩衝食塩液

A液 5 w/v %牛血清アルブミン溶液

100mL 中

牛血清アルブミン

5.0 g

水

残量

使用時に、リン酸緩衝食塩液 196 mL にA液 4 mL を加えて調製する。

#### 付記3 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

グルタミン酸ナトリウム

5.0 g

イースト・イクストラクト

0.5 g

牛胎子血清

10～20 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。

牛胎子血清は、牛コロナウイルスに対する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。

## **日本脳炎不活化ワクチン (シード)**

動生剤基準の日本脳炎不活化ワクチン (シード) の 3.6.7 に規定するところにより、試験を行うものとする。

# 豚サーコウイルス(2型)感染症不活化ワクチン(油性アジュバント加懸濁用液)(シード)

動生剤基準のシードロット規格に適合した豚サーコウイルス(2型)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たもので、使用時に油性アジュバントを含む懸濁用液と混和して調製するワクチンである。

## 1 小分製品の試験

### 1.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

### 1.2 不活化試験

#### 1.2.1 試験材料

##### 1.2.1.1 試料

試験品を試料とする。

##### 1.2.1.2 培養細胞

PPK-3F細胞を用いる。

##### 1.2.2 試験方法

細胞増殖用培養液(付記1)で適当な濃度に調整した培養細胞浮遊液30mLに試料1.5mLを接種し、37℃で1日培養後グルコサミン処理培地(付記2)を7~8mL加え、37℃で15分間静置した後、上清を除去し、ウイルス増殖用培養液(付記3)を加えて処理し、3日間培養する。培養細胞を2~3回凍結融解し、遠心して得た上清15mLを細胞浮遊液に同様に接種、培養、処理した後、ろ過した液を新たな細胞浮遊液に等量加え、37℃で4日間培養した細胞について豚サーコウイルス(2型)(以下この項において「PCV2」という。)モノクローナル抗体(付記4)による蛍光抗体法を行う。

##### 1.2.3 判定

培養細胞に特異蛍光抗原を認めてはならない。

### 1.3 異常毒性否定試験

動生剤基準の一般試験法の異常毒性否定試験を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 1.4 力価試験

#### 1.4.1 試験材料

##### 1.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 1.4.1.2 試験動物

6~7週齢のマウスを用いる。

##### 1.4.2 試験方法

試験動物10匹のそれぞれの頸部皮下に注射材料を0.2mLずつ注射し、注射21日後に得られた各個体の血清についてELISAにより抗体価を測定する。

希釈用96穴プレートにDLE/SD緩衝液(付記5)を各穴に80μLずつ分注し、DLE/SD緩衝液で5倍に希釈した各被検血清、参照陽性血清(付記6)及び参照陰性血清(付記7)をそれぞれ80μL加え、2倍階段希釈する。抗原液(付記8)を各穴に等量加え、4℃で1夜静置して処理する。この抗原・抗体反応液を100μLずつ固相化プレート(付記9)の各穴に加え、37℃で3時間感作し、洗浄液(付記10)300μLで洗浄した後、抗体価測定ELISA用標識抗体(付記11)を各穴に100μLずつ加え、37℃で60分間反応させる。洗浄液300μLで3回洗浄し、各穴に基質液(付記12)を100μLずつ加え、遮光して20℃で30分間反応させる。0.5mol/L硫酸液を各穴に50μLずつ加え、反応を停止させる。主波長450nm、副波長630nmの2波長で吸光度(OD)を測定し、以下の計算式に

より OD<sub>50</sub> を示した血清の希釈倍率を抗体価とする。

$$OD_{50} = (OD_{min} + OD_{max}) / 2$$

OD<sub>min</sub> : 参照陽性血清の最低希釈倍数における OD の平均

OD<sub>max</sub> : 320 倍から 2,560 倍まで希釈した参照陰性血清の OD の平均

$$\text{抗体価 (log}_{10}\text{)} = (OD_{50} - \text{定数}) / \text{傾き}$$

定数及び傾き : OD と血清希釈倍数の対数について OD<sub>50</sub> を挟む 2 点の回帰直線における定数及び傾き

#### 1.4.3 判定

試験動物の抗体価の実数は幾何平均で 72 倍以上でなければならない。この際、参照陽性血清の抗体価は所定の値を示し、参照陰性血清のそれは 20 倍以下でなければならない

#### 付記 1 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 100 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 グルコサミン処理培地

1,000mL 中

d-グルコサミン 65 g

ハンクス 199 培地 残量

#### 付記 3 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 4 PCV2 モノクローナル抗体

PCV2 オープンリーディングフレーム 2 (以下この項において「PCV2 ORF2」という。) を認識するモノクローナル抗体

#### 付記 5 DLE/SD 緩衝液

1,000mL 中

トリス 1.21 g

塩化ナトリウム 8.77 g

EDTA 3.72 g

ポリソルベート 20 1 mL

水 残量

pH を 7.0 に調整する。

付記 6 参照陽性血清

標準陽性血清（付記 13）と同様の方法で作成した血清であって、標準血清を用いて 1.4.2 を準用した ELISA（以下この項において「力価試験の ELISA」という。）で測定したとき、2 倍階段希釈の 3 段階目から 5 段階目までに OD<sub>50</sub> を示すように DLE/SD 緩衝液で希釈して用いる。

付記 7 参照陰性血清

SPF マウスから得られた血清であって、力価試験の ELISA で測定したとき抗体価が 20 (1.30 log<sub>10</sub>) 倍以下のもの。

付記 8 抗原液

PK15 細胞で培養した PCV2 1010-25 株を超音波処理し、遠心した後、β-プロピオラクトンで不活化したもので、標準陽性血清を用いて力価試験の ELISA で測定したとき、標準血清が所定の抗体価を示すように DLE/SD 緩衝液で希釈して用いる。

付記 9 固相化プレート

抗体価測定 ELISA 用捕捉抗体（付記 14）を 120 μL ずつ 96 穴 ELISA プレートに分注し、4℃ で 1 夜静置する。洗浄液で 3 回洗浄し、ブロッキング液（付記 15）を 200 μL ずつ加え、37℃ で 60 分間反応させ、洗浄液で 3 回洗浄したもの。

付記 10 洗浄液

1,000mL 中

トリス

1.21 g

塩化ナトリウム

8.77 g

ポリソルベート 20

1 mL

水

残 量

pH を 7.3 ~ 7.7 に調整する。

付記 11 抗体価測定 ELISA 用標識抗体

PCV2ORF2 に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ PCV2 1902B1BC を接種したヌードマウスの腹水を精製し、ホースラディッシュペルオキシダーゼで標識した後、15 w/v % サッカリン加里ン酸緩衝食塩液で濃度を調整したものであって、標準陽性血清を用いて力価試験の ELISA で測定したとき、標準陽性血清が所定の抗体価を示すように DLE/SD 緩衝液で希釈して用いる。

付記 12 基質液

適当な規格のテトラメチルペンチジン溶液

付記 13 標準陽性血清

マウスを PCV2 感染症不活化ワクチン（油性アジュバント加懸濁用液）で 2 回免疫後 35 日目に得られたプール血清であって、力価試験の ELISA で測定したとき、抗体価 4,000 ~ 10,000 倍を示すもの。

付記 14 抗体価測定 ELISA 用捕捉抗体

PCV2ORF2 に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ PCV2 1903A8BC を接種したヌードマウスの腹水を精製し、15w/v % サッカリン加里ン酸緩衝食塩液で濃度を調整した



もので、標準陽性血清を用いて力価試験の ELISA で測定したとき、標準陽性血清が所定の抗体価を示すように炭酸ナトリウム緩衝液（付記 16）で希釈して用いる。

付記 15 ブロッキング液

リン酸緩衝食塩液に植物性ポリペプトンを 1 w/v % 加えたもの。

付記 16 炭酸ナトリウム緩衝液

1,000mL 中

塩化ナトリウム

1.59 g

炭酸水素ナトリウム

2.93 g

アジ化ナトリウム

0.2 g

水

残量

pH を 9.6 に調整する。

# 豚パルボウイルス感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

動生剤基準のシードロット規格に適合した豚パルボ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、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 無菌試験

一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

### 1.2 不活化試験

#### 1.2.1 試験材料

##### 1.2.1.1 試料

試験品 10mL に等量のクロロホルムを加え、よく混和した後、遠心分離した水層の 5 mL を 100 倍量以上のリン酸緩衝食塩液で 4℃ で 1 夜透析したものを試料とする。

##### 1.2.1.2 培養細胞

PK-15 細胞を培養瓶で培養し、単層となったものを用いる。

#### 1.2.2 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、37℃ で 60 分間静置吸着させる。試料を抜き取り、ウイルス増殖用培養液（付記 1）を加え、37℃ で 10 日間培養した後、培養上清にペロナール緩衝食塩液（以下この項において「VBS<sup>-</sup>」という。）（付記 2）で濃度を調整した 0.5vol % の非凝集性の鶏又はモルモットの赤血球浮遊液を等量加え、室温で 60 分間静置した後、赤血球凝集の有無を観察する。

#### 1.2.3 判定

赤血球の凝集を認めない場合、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。

## 1.3 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、注射量は、0.4mL とする。

## 1.4 力価試験

### 1.4.1 試験材料

#### 1.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

#### 1.4.1.2 試験動物

体重約 300g のモルモットを用いる。

#### 1.4.1.3 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（付記 3）を用いる。

#### 1.4.2 試験方法

注射材料 2 mL ずつを、5 匹の試験動物の皮下に注射し、28 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 VBS<sup>-</sup> で 5 倍に希釈し、等量の 25w/v % カオリン液を加え、室温で 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、室温で 15 分間処理し、再度遠心し、上清を採取する。これを VBS<sup>-</sup> 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 VBS<sup>-</sup> で濃度を調整した 0.5vol % の非凝集性の鶏又はモルモットの赤血球浮遊液を加え、室温で 60 分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

### 1.4.3 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の幾何平均は、80 倍以上でなければならない。

#### 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

牛胎子血清又は牛血清アルブミン

20mL 又は 1.1 g

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。

#### 付記 2 ベロナール緩衝食塩液 (pH7.2)

1,000mL 中

バルビタール

0.575 g

バルビタールナトリウム

0.375 g

塩化ナトリウム

8.5 g

水

残 量

#### 付記 3 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つて、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）の部の豚大腸菌性下痢症不活化・クロストリジウム・パーフリンゲンストキソイド混合（アジュバント加）ワクチン（シード）の項の次に次のように加える。

## 豚ボルデテラ感染症・豚パスツレラ症（粗精製トキソイド）・マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症混合（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

動生剤基準のシードロット規格に適合したボルデテラ・ブロンキセプチカ（以下この項において「Bb」という。）の菌体破碎上清濃縮液、同規格に適合したパスツレラ・ムルトシダ（以下この項において「Pm」という。）の粗精製濃縮液及び同規格に適合したマイコプラズマ・ハイオニューモニエ（以下この項において「Mhp」という。）の培養菌液の培養濃縮粗ろ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。

### 1 小分製品の試験

#### 1.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

#### 1.2 無毒化試験

##### 1.2.1 試験材料

###### 1.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 1.2.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

###### 1.2.1.3 試験方法

注射材料 0.1mL ずつを試験動物 2 匹の背部皮内に注射し、10 日間観察する。

###### 1.2.1.4 判定

注射反応は無視し得る程度以下でなければならず、試験動物は全て生存しなければならない。

#### 1.3 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、注射量は 0.3mL とし、体重測定は 3 日目に行うものとする。

#### 1.4 力価試験

##### 1.4.1 Bb 感染症力価試験

###### 1.4.1.1 試験材料

###### 1.4.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 1.4.1.1.2 試験動物

6～7 週齢の ddY 系 SPF マウスを用いる。

###### 1.4.1.1.3 酵素抗体反応（以下この項において「ELISA」という。）用 Bb 抗原

Bb 精製抗原（付記 1）を用いる。

###### 1.4.1.2 試験方法

試験動物 10 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 週目に試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、ELISA を行う。

試験群及び対照群の各血清及び Bb 参照陽性血清（付記 2）を希釈液（付記 3）で 40～10,240 倍まで 2 倍階段希釈したものを Bb 精製抗原吸着プレート（付記 4）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 5）で 10 回洗浄する。次

に各穴に標識抗体（付記6）を100  $\mu$  Lずつ加え、37℃で2時間反応させた後、洗浄液で10回洗浄する。基質液（付記7）を各穴に100  $\mu$  Lずつ加え、37℃で30分間反応させた後、3 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を各穴に50  $\mu$  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。

#### 1.4.1.3 判定

対照の各穴の測定値の平均値に0.5を加えた値以上の測定値を示した血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群では、70%以上が抗体価320倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全て抗体価80倍以下でなければならない。また、Bb参照陽性血清は、抗体価320～640倍を示さなければならない。

#### 1.4.2 Pm 症力価試験

##### 1.4.2.1 試験材料

###### 1.4.2.1.1 試験動物

1.4.1の試験に用いた動物を用いる。

###### 1.4.2.1.2 ELISA用Pm抗原

Pm精製抗原（付記8）を用いる。

##### 1.4.2.2 試験方法

1.4.1の試験において試験群及び対照群から得られた各個体の血清を用いて、ELISAを行う。

試験群及び対照群の各血清及びPm参照陽性血清（付記9）を希釈液で40倍～10,240倍まで2倍階段希釈したものをPm精製抗原吸着プレート（付記10）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、洗浄液で10回洗浄する。次に各穴に標識抗体を100  $\mu$  Lずつ加え、37℃で2時間反応させた後、洗浄液で10回洗浄する。基質液を各穴に100  $\mu$  Lずつ加え、37℃で30分間反応させた後、3 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を各穴に50  $\mu$  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。

#### 1.4.2.3 判定

対照の各穴の測定値の平均値に0.5を加えた値以上の測定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1,280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、Pm参照陽性血清は、抗体価640～1,280倍を示さなければならない。

#### 1.4.3 Mhp 感染症力価試験

##### 1.4.3.1 試験材料

###### 1.4.3.1.1 試験動物

1.4.1の試験に用いた動物を用いる。

###### 1.4.3.1.2 ELISA用Mhp抗原

ポリソルベート20抽出抗原（付記11）を用いる。

##### 1.4.3.2 試験方法

1.4.1の試験において試験群及び対照群から得られた各個体の血清を用いて、ELISAを行う。

試験群及び対照群の各血清及びMhp参照陽性血清（付記12）を希釈液で40倍～10,240倍まで2倍階段希釈したものをMhp抗原吸着プレート（付記13）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、洗浄液で10回洗浄する。次に各穴に標識抗体を100  $\mu$  Lずつ加え、37℃で90分間反応させた後、洗浄液で10回洗浄する。基質液を各穴に100  $\mu$  Lずつ加え、37℃で30分間反応させた後、3 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を各穴に50  $\mu$  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。

#### 1.4.3.3 判定

対照の各穴の測定値の平均値に 0.5 を加えた値以上の測定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、Mhp 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 Bb 精製抗原

Bb 製造用株又はこれと同等の抗原性を有する株を培養し、菌体破碎後、ハイドロキシアパタイトカラムで精製した皮膚壊死毒素であって、SDS ポリアクリルアミド電気泳動で分析したとき、分画の主成分は、分子量約 140 ~ 160kDa を示し、モルモットの皮内に注射すると貧血斑を示す。

#### 付記 2 Bb 参照陽性血清

Bb 製造用株又はこれと同等の抗原性を示す株を培養し、菌体破碎後、ハイドロキシアパタイトカラムで精製した皮膚壊死毒素で免疫したマウスの血清であって、ELISA 抗体価が 320 ~ 640 倍となるように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

#### 付記 3 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
リン酸水素二ナトリウム	1.15 g
水	残量

#### 付記 4 Bb 精製抗原吸着プレート

Bb 精製抗原を炭酸緩衝液（付記 14）で 40 倍に希釈し、96 穴マイクロプレートに 100  $\mu$  L ずつ加え、4℃で 18 時間反応後、洗浄液で 10 回洗浄し、さらにゼラチン液（付記 15）を各穴に 150  $\mu$  L ずつ加え、37℃2 時間反応後、洗浄液で 10 回洗浄したもの。

#### 付記 5 洗浄液

ポリソルベート 20 0.5mL と希釈液 1,000mL を混合したもの。

#### 付記 6 標識抗体

アルカリフォスファターゼ標識マウス IgG 抗体を希釈液で希釈したもの。

#### 付記 7 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 16）100mL に溶解したもの。

#### 付記 8 Pm 精製抗原

Pm 製造用株又はこれと同等の抗原性を有する株を培養し、菌体破碎後、ハイドロキシアパタイトカラムで精製した皮膚壊死毒素であって、SDS ポリアクリルアミド電気泳動で分析したとき、分画の主成分は、分子量約 125 ~ 145kDa を示し、モルモットの皮内に注射すると壊死斑を示す。

付記9 Pm 参照陽性血清

Pm 製造用株又はこれと同等の抗原性を有する株を培養し、菌体破碎後、ハイドロキシアパタイトカラムで精製した皮膚壊死毒素で免疫したマウスの血清であって、ELISA 抗体価が 640 ~ 1,280 倍になるように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記10 Pm 精製抗原吸着プレート

Pm 精製抗原を炭酸緩衝液で 40 倍に希釈し、96 穴マイクロプレートに 100  $\mu$  L ずつ加え、4°C で 18 時間反応させた後、洗浄液で 10 回洗浄する。さらに、ゼラチン液を各穴に 150  $\mu$  L ずつ加え、37°C で 2 時間反応させた後、洗浄液で 10 回洗浄したもの。

付記11 ポリソルベート 20 抽出抗原

Mhp 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、希釈液に懸濁した後、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。遠心後の上清にジエチルエーテルを等量加えて振とう後、エーテル層を完全に除去したもの。

(1) トリス緩衝液

トリスヒドロキシメチルアミノメタン 3.03g 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12 Mhp 参照陽性血清

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

付記13 Mhp 抗原吸着プレート

Mhp J 株又はこれと同等の抗原性を有する株で免疫した免疫血清 (付記 17) を炭酸緩衝液で 100 倍に希釈したものを、96 穴マイクロプレートに 100  $\mu$  L ずつ加え、4°C で 18 時間反応させ、洗浄液で 10 回洗浄する。さらに、ゼラチン液を各穴に 150  $\mu$  L ずつ加え、4°C で 18 時間反応させ、洗浄液で 10 回洗浄する。これに、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たものを 100  $\mu$  L ずつ加え、4°C で 18 時間反応させた後、洗浄液で 10 回洗浄したもの。

付記14 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、pH9.6 に調整する。

付記15 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16 基質緩衝液

1,000mL 中

塩化マグネシウム・六水和物

0.049 g

ジエタノールアミン

96 mL

水

残量

pHを9.8に調整し、全量を1,000mLにする。

付記 17 兎免疫血清

Mhp J株又はこれと同等の免疫原性を有する株で免疫した兎の血清であつて、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。



## 豚コレラ・豚丹毒混合生ワクチン（シード）

動生剤基準の豚コレラ・豚丹毒混合生ワクチン（シード）の 3.7.5 に規定するところにより試験を行うものとする。

# 豚インフルエンザ・豚パストツレラ症・マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症混合（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

動生剤基準のシードロット規格に適合した豚インフルエンザ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不活化したもの、パストツレラ・ムルトシダ（以下この項において「Pm」という。）の培養上清を濃縮し、遠心して得た上清を不活化したもの及び同規格に適合したマイコプラズマ・ハイオニューモニエ（以下この項において「Mhp」という。）の培養菌液を不活化したものを混合し、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 無菌試験

一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

### 1.2 無毒化試験

#### 1.2.1 試験材料

##### 1.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 1.2.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

##### 1.2.2 試験方法

注射材料 0.1mL ずつを試験動物 2 匹の背部皮内に注射し、10 日間観察する。

##### 1.2.3 判定

注射反応は無視し得る程度以下でなければならず、試験動物は全て生存しなければならない。

### 1.3 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、注射量は 0.2mL とし、注射後の体重測定は 6 日目とする。

### 1.4 力価試験

#### 1.4.1 豚インフルエンザ力価試験

##### 1.4.1.1 試験材料

##### 1.4.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 1.4.1.1.2 試験動物

5 週齢のマウスを用いる。

##### 1.4.1.1.3 赤血球凝集抗原

試験品に含まれるそれぞれのウイルス株と同一タイプのウイルスで調製した赤血球凝集抗原（付記 1）を用いる。

##### 1.4.1.2 試験方法

試験動物 30 匹を試験群、10 匹を対照群とする。

注射材料の 0.2mL ずつを 2 週間隔で 2 回、試験群の脚部筋肉内に注射する。2 回目の注射後 2 週目に得られた各個体の血清を群ごとに 5 匹分ずつプールし、試験群として 6 プール血清を得ると共に、対照群として 2 プール血清を得る。

得られた各プール血清について、赤血球凝集抑制試験を行う。

被検血清を RDE 及び鶏赤血球で処理する。これをリン酸緩衝食塩液で 2 倍階段希釈し、各希釈液 0.2mL に 0.2mL 中 8 単位の赤血球凝集抗原を等量加え、室温で 60 分間処理する。これに 0.5vol % 鶏赤血球浮遊液を 0.4mL ずつ加え、室温に 60 分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

#### 1.4.1.3 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。

試験群のプール血清の赤血球凝集抑制抗体価は、6 プール血清中 4 プール血清以上が 8 倍以上でなければならない。この場合、対照群のプール血清の赤血球凝集抑制抗体価は、4 倍未満でなければならない。

#### 1.4.2 豚パスツレラ症力価試験

##### 1.4.2.1 試験材料

###### 1.4.2.1.1 試験動物

1.4.1 の試験に用いた動物を用いる。

###### 1.4.2.1.2 酵素抗体反応（以下この項において「ELISA」という。）用抗原

Pm 皮膚壊死毒素（以下この項において「PMT」という。）抗原（付記 2）を用いる。

##### 1.4.2.2 試験方法

1.4.1.2 の試験で得られた各プール血清について、ELISA を行う。

試験群及び対照群の各血清、PMT 参照陽性血清（付記 3）及び PMT 参照陰性血清（付記 4）を希釈・洗浄液（付記 5）で 4 倍希釈したものを 2 倍階段希釈し、各段階の希釈液を PMT 抗原吸着プレート（付記 6）の各穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で 1 時間感作する。希釈・洗浄液で洗浄した後、標識抗体（付記 7）を各穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で 30 分間反応させる。希釈・洗浄液で洗浄した後、基質液（付記 8）を各穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、遮光して 30  $^{\circ}$ C で 30 分間反応させる。停止液（付記 9）を各穴に 50  $\mu$  L ずつ加え、反応を停止させる。主波長 492nm、副波長 630nm の 2 波長で吸光度を測定し、これらの差を ELISA 値とする。

#### 1.4.2.3 判定

ELISA 値が 0.5 以上を示す血清の最高希釈倍数を抗 PMT 抗体価とする。

試験群のプール血清の抗 PMT 抗体価は、6 プール血清中 4 プール血清以上が PMT 参照陽性血清の示す抗 PMT 抗体価以上でなければならない。この場合、対照群のプール血清の抗 PMT 抗体価は、4 倍未満でなければならない。また、PMT 参照陽性血清の抗 PMT 抗体価は、8 ~ 32 倍を示さなければならず、PMT 参照陰性血清の抗 PMT 抗体価は、4 倍未満でなければならない。

#### 1.4.3 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症力価試験

##### 1.4.3.1 試験材料

###### 1.4.3.1.1 試験動物

1.4.1 の試験に用いた動物を用いる。

###### 1.4.3.1.2 ELISA 用抗原

Mhp-ELISA 抗原（付記 10）を用いる。

##### 1.4.3.2 試験方法

1.4.1.2 の試験で得られた各プール血清について、ELISA を行う。

試験群及び対照群の各プール血清、Mhp 参照陽性血清（付記 11）及び Mhp 参照陰性血清（付記 12）を希釈・洗浄液で 100 倍希釈したものを、Mhp-ELISA 抗原吸着プレート（付記 13）のそれぞれ 6 穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で 1 時間感作する。希釈・洗浄液で洗浄した後、標識抗体を各穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、37  $^{\circ}$ C で 30 分間反応させる。希釈・洗浄液で洗浄した後、基質液を各穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、遮光して 30  $^{\circ}$ C で 30 分間反応させる。停止液を各穴に 50  $\mu$  L ずつ加えて反応を停止させる。主波長 492nm、副波長 630nm 2 波長で吸光度を測定し、これらの差を ELISA 値とする。

#### 1.4.3.3 判定

それぞれ 6 穴の ELISA 値の平均を抗 Mhp 抗体価とする。

試験群のプール血清の抗 Mhp 抗体価は、6 プール血清中 4 プール血清が Mhp 参照陽性血清の示す抗 Mhp 抗体価以上の値を示さなければならない。この場合、対照群のプール血清の抗 Mhp 抗体価は、0.15 未満でなければならない。また、Mhp 参照陽性血清の抗 Mhp 抗体価は、0.45 以上を示

さなければならず、Mhp 参照陰性血清の抗 Mhp 抗体価は、0.15 未満でなければならない。

## 2 中間製品の試験

### 2.1 不活化試験

#### 2.1.1 試験材料

##### 2.1.1.1 注射材料

不活化した 2 種類の豚インフルエンザウイルスの混合液を注射材料とする。

##### 2.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の 10 ~ 12 日齢のものを用いる。

#### 2.1.2 試験方法

注射材料 0.2mL ずつを 4 個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、36 ~ 37 °C で培養し、3 日間隔で尿膜腔液を 2 代まで継代する。2 代目の尿膜腔液に 0.5vol % の鶏の赤血球浮遊液を等量加え、室温で 60 分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

ただし、赤血球凝集を示す尿膜腔液があった場合には、その尿膜腔液を等量に混合して 3 代まで継代し、3 代目の尿膜腔液について同様の試験を繰り返した後、判定する。

#### 2.1.3 判定

赤血球凝集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。

## 付記 1 赤血球凝集抗原

豚インフルエンザウイルス A 型 A/swine/京都/3/79 (H1N1) 株及び豚インフルエンザウイルス A 型 A/swine/和田山/5/69 (H3N2) 株を用いて、それぞれ調製した赤血球凝集抗原

## 付記 2 PMT 抗原

パスツレラ・ムルトシダ B-45 株の培養上清を限外ろ過により濃縮した後、ハイドロキシアパタイトカラムで分画し、ホルマリンで不活化し、得られた皮膚壊死毒素活性を持つ抗原であって、B-45 株培養上清免疫モルモットの血清を用いてウェスタンブロッティングを行う場合に、150kDa 付近に単一のバンドを認め、そのたん白量を測定するとき、30 ~ 100  $\mu$  g/mL を示すもの。

## 付記 3 PMT 参照陽性血清

PmB-45 株の培養上清濃縮液をマウスに免疫して得られた血清であって、抗 PMT 抗体価 8 ~ 32 倍を示すものであり、凍結保存する。

## 付記 4 PMT 参照陰性血清

健康なマウスから採血した血清であって、抗 PMT 抗体価 4 倍未満を示すものであり、凍結保存する。

## 付記 5 希釈・洗浄液

1,000mL 中

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

塩化ナトリウム

8.0 g

塩化カリウム

0.2 g

ポリソルベート 20

0.5 mL

水

残量

pH を 7.2 ~ 7.4 に調整する。

付記 6 PMT 抗原吸着プレート

PMT 抗原を炭酸緩衝液 (付記 14) でたん白濃度 0.005 ~ 0.01mg/mL に希釈し、ELISA 用プレート (U字型) の各穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、4°C で 18 時間以上感作させた後、希釈・洗浄液で洗浄し、2 w/v % 牛血清アルブミン溶液 (付記 15) を各穴に 250  $\mu$  L ずつ加え、37°C で 1 時間感作させた後、希釈・洗浄液で洗浄したもの。

付記 7 標識抗体

西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体を希釈・洗浄液で希釈したもの。

付記 8 基質液

o-フェニレンジアミン二塩酸塩 40mg をリン酸クエン酸緩衝液 (付記 16) 100mL に溶解し、遮光したものに、使用直前に過酸化水素水を 0.04mL 添加したもの。

付記 9 停止液

濃硫酸 56.1mL を正確に量り、精製水 440mL 中に攪拌冷却しながら溶解し、更に水を加えて 500mL としたもの。

付記 10 Mhp-ELISA 抗原

MhpM-21 株の振とう培養菌液を遠心集菌し、TNF 液 (付記 17) で菌体を洗浄した後、洗浄菌体をたん白濃度が 10mg/mL となるように濃度を調整したもの。

付記 11 Mhp 参照陽性血清

MhpM-21 株の不活化全菌体をマウスに免疫して得られた血清であって、抗 Mhp 抗体価 0.45 以上を示すものであり、凍結保存する。

付記 12 Mhp 参照陰性血清

健康なマウスから採血した血清であって、抗 Mhp 抗体価 0.15 未満を示すものであり、凍結保存する。

付記 13 Mhp-ELISA 抗原吸着プレート

Mhp-ELISA 抗原を炭酸緩衝液でたん白濃度が 0.05 ~ 0.1mg/mL となるように希釈し、ELISA 用プレート (U字型) の各穴に 100  $\mu$  L ずつ加え、4°C で 18 時間以上感作させた後、希釈・洗浄液で洗浄し、2 w/v % 牛血清アルブミン溶液を各穴に 250  $\mu$  L ずつ加え、37°C で 1 時間感作させた後、希釈・洗浄液で洗浄したもの。

付記 14 炭酸緩衝液

1,000mL 中

炭酸ナトリウム

1.59 g

炭酸水素ナトリウム

2.93 g

水

残量

pH を 9.6 に調整し、4°C に保存する。

付記 15 2 w/v % 牛血清アルブミン溶液

牛血清アルブミン 2 g を希釈・洗浄液 100mL で使用直前に溶解したもの。

付記 16 リン酸クエン酸緩衝液

1,000mL 中

無水クエン酸

4.67 g

リン酸水素二ナトリウム十二水和物

19.95 g

水

残 量

pH を 5.0 に調整する。

付記 17 TNF 液

1,000mL 中

塩化ナトリウム

14.6 g

エデト酸ナトリウム

3.72 g

トリスヒドロキシメチルアミノメタン

3.94 g

水

残 量

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・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）

動生剤基準の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産卵低下症候群－1976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 4～5 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又は頸背部皮下に注射し、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 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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その HI 抗体価とする。

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 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) 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・鶏伝染性フ ァブリキウス囊病混合(油性アジュバント加) 不活化ワ クチン(シード)

動生剤基準の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  
同規格に適合した鶏伝染性フアブリキウス囊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  
たウイルス液をそれぞれ不活化し、油性アジュバントを添加したものを混合したワクチン又はそれぞ  
れのウイルス液を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 4～7 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。



# ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎・産卵低下症候群 —1976・トリニューモウイルス感染症混合（油性アジュ バント加）不活化ワクチン（シード）

動生剤基準の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、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 ウイルス及びトリニューモ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 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。

## マイコプラズマ・シノピエ感染症凍結生ワクチン（シード）

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

### 1 小分製品の試験

#### 1.1 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

#### 1.2 生菌数試験

##### 1.2.1 試験材料

###### 1.2.1.1 培地

試験用培地（付記1）を用いる。

##### 1.2.2 試験方法

96 穴の平底マイクロプレートの各穴に培地を 225  $\mu$  L ずつ分注する。最初の列（縦列）の 8 穴にそれぞれ試験品を 25  $\mu$  L ずつ分注した後、10 倍階段希釈し、 $10^{-1}$  から  $10^{-10}$  の希釈列を作成する。11 及び 12 列は無接種対照とする。プレートをシールし、33  $^{\circ}$ C で 2 週間培養する。

##### 1.2.3 判定

培地の色調変化を示した穴を有する行（横列）の希釈の高い方から連続した 3 つの希釈列又は連続した 2 つの希釈列と色調変化した穴が最初に全く認められなくなった希釈列の合計 3 希釈列のいずれかを用いて判定する。これら 3 希釈列の色調が変化した穴の数を用いて最確数表（付記2）から最確数を求め、3 希釈列の最初の希釈倍数を乗じて 25  $\mu$  L 当たりの色調変化単位（以下この項において「CCU」という。）を算出し、さらに、それに 1.2 を乗じて生菌数を算出する。試験品の生菌数は、1 羽分当り  $10^{7.35}$  CCU 以上でなければならない。

#### 1.3 マーカー試験

1.2 を準用して試験するとき、33  $^{\circ}$ C 培養の生菌数は、39.5  $^{\circ}$ C 培養の生菌数より 100 倍以上多くななければならない。ただし、マイクロプレート 4 枚を用い、2 枚は 33  $^{\circ}$ C で、残りの 2 枚は 39.5  $^{\circ}$ C で培養する。

#### 1.4 安全試験

##### 1.4.1 試験材料

###### 1.4.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

###### 1.4.1.2 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。

##### 1.4.2 試験方法

試験動物の 10 羽を試験群、5 羽を対照群とする。

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

##### 1.4.3 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、剖検で異常を認めてはならない。

#### 1.5 力価試験

1.5.1 試験材料

1.5.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

1.5.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 3～4 週齢の鶏を用いる。

1.5.2 試験方法

試験動物の 10 羽を試験群、3 羽を対照群とする。

接種材料 1 羽分を試験群に点眼接種する。接種 6 週間後に試験群及び対照群から得られた各個体の血清について「マイコプラズマ・シノビエ感染症急速診断用菌液」を用いて凝集反応を行う。

1.5.3 判定

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

付記 1 試験用培地

1,000mL 中

マイコプラズマ用基礎培地 (PPLO 培地) *	22.5 g
塩酸システイン*	0.1 g
酢酸タリウム*	0.1 g
ブドウ糖*	1 g
0.6w/v % フェノールレッド液	5 mL
正常豚血清	100 mL
新鮮イーストエキス	10 mL
0.2w/v % DNA 液	10 mL
1 w/v % $\beta$ - NAD 液	10 mL
ベンジルペニシリンカリウム	5,000 単位
水	残量

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

付記 2 最確数表

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

8 7 4	31.4	6 2 2	2.09
8 7 3	26.7	6 2 1	1.84
8 7 2	22.6	6 2 0	1.60
8 7 1	19.1	6 1 2	1.82
8 7 0	15.9	6 1 1	1.58
8 6 6	28.4	6 1 0	1.35
8 6 5	25.0	6 0 2	1.56
8 6 4	21.8	6 0 1	1.34
8 6 3	18.9	6 0 0	1.13
8 6 2	16.3	5 5 1	2.07
8 6 1	13.8	5 5 0	1.85
8 6 0	11.5	5 4 1	1.84
8 5 6	21.3	5 4 0	1.63
8 5 5	18.9	5 3 2	1.82
8 5 4	16.6	5 3 1	1.61
8 5 3	14.4	5 3 0	1.41
8 5 2	12.3	5 2 2	1.60
8 5 1	10.30	5 2 1	1.40
8 5 0	8.42	5 2 0	1.21
8 4 5	14.8	5 1 2	1.39
8 4 4	13.0	5 1 1	1.20
8 4 3	11.1	5 1 0	1.01
8 4 2	9.40	5 0 2	1.19
8 4 1	7.74	5 0 1	1.01
8 4 0	6.22	5 0 0	0.83
8 3 5	11.8	4 4 0	1.28
8 3 4	10.2	4 3 1	1.27
8 3 3	8.67	4 3 0	1.10
8 3 2	7.18	4 2 1	1.09
8 3 1	5.82	4 2 0	0.93
8 3 0	4.67	4 1 2	1.08
8 2 4	8.07	4 1 1	0.92
8 2 3	6.72	4 1 0	0.76
8 2 2	5.50	4 0 2	0.91
8 2 1	4.45	4 0 1	0.75
8 2 0	3.62	4 0 0	0.60
8 1 3	5.22	3 4 0	1.01
8 1 2	4.27	3 3 1	1.00
8 1 1	3.50	3 3 0	0.85
8 1 0	2.87	3 2 1	0.85
8 0 2	3.38	3 2 0	0.70
8 0 1	2.80	3 1 2	0.84
8 0 0	2.31	3 1 1	0.70
7 7 1	5.47	3 1 0	0.56
7 7 0	4.84	3 0 2	0.69

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

# 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）液状混合（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

動生剤基準の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。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。

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

動生剤基準の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 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。

### 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 3 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 5 倍未満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 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）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）・マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）**

動生剤基準の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、同規格に適合したヘモフィルス・パラガリナルム（A型及びC型菌）の培養菌液及び同規格に適合したマイコプラズマ・ガリセプチカム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。



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）・マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症混合（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。

### **狂犬病組織培養不活化ワクチン（シード）**

動生剤基準の狂犬病組織培養不活化ワクチン（シード）の 3.6.8 に規定するところにより、試験を行うものとする。

# 猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症 2 価・ 猫汎白血球減少症混合ワクチン (シード)

動生剤基準のシードロット規格に適合した弱毒猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス及び同規格に適合した猫汎白血球減少症ウイルスをそれぞれ培養細胞で増殖させて得たウイルス液並びに同規格に適合した 2 種類の猫カリシウイルスをそれぞれ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たものを混合し、凍結乾燥したワクチンである。

## 1 小分製品の試験

### 1.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

### 1.2 ウイルス含有量試験

#### 1.2.1 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス含有量試験

##### 1.2.1.1 試験材料

###### 1.2.1.1.1 試料

試験品中の猫汎白血球減少症ウイルスを抗猫汎白血球減少症ウイルス血清 (付記 1) を非働化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液 (付記 2) で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 1.2.1.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

###### 1.2.1.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本 (穴) 以上の培養細胞に接種し、37℃で 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 日間培養し、観察する。

###### 1.2.1.3 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。

試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たり 10<sup>4.9</sup>TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

#### 1.2.2 猫汎白血球減少症ウイルス含有量試験

##### 1.2.2.1 試験材料

###### 1.2.2.1.1 試料

試験品中の猫ウイルス性鼻気管炎ウイルスを、抗猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス血清 (付記 3) を非働化したもので中和したもの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。

###### 1.2.2.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

###### 1.2.2.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ培養細胞浮遊液を分注した 4 本 (穴) 以上に接種し、37℃で 24 時間培養した後、ウイルス増殖用培養液と交換し、更に 37℃で 6 日間培養する。培養後、培養液を採取し、これに等量の牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液 (付記 4) を加え、更にこの混合液と VAD6.0 液 (付記 5) により濃度を調整した 0.3 ~ 0.5vol % 豚赤血球浮遊液を等量加え、2 ~ 5℃で静置した後、観察する。

###### 1.2.2.3 判定

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。

試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たり 10<sup>3.5</sup>TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

### 1.3 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性否定試験により試験を行い、これに適合しなければならない。

#### 1.4 力価試験

##### 1.4.1 猫カリシウイルス感染症力価試験

###### 1.4.1.1 試験材料

###### 1.4.1.1.1 試料

試験品を試料とする。

###### 1.4.1.2 試験方法

96 穴 ELISA 用マイクロプレート各穴に捕捉用抗猫カリシウイルス抗体（付記 6）を 120  $\mu$  L ずつ加え、5  $^{\circ}$ C で 1 夜静置後、TNE 緩衝液（付記 7）300  $\mu$  L で 1 回洗浄して固相化プレートとする。

固相化プレートの各穴に ELISA 用緩衝液（付記 8）を 100  $\mu$  L ずつ加える。最初の列の 2 穴ずつに試料及び猫カリシウイルス抗原量定量 ELISA 参照品（付記 9）を 100  $\mu$  L ずつ加えて 2 倍階段希釈し、37  $^{\circ}$ C で 3 時間反応させる。TNE 緩衝液 300  $\mu$  L で 1 回洗浄した後、猫カリシウイルス抗原定量 ELISA 用標識モノクローナル抗体（付記 10）を 100  $\mu$  L ずつ各穴に加え、37  $^{\circ}$ C で 1 時間静置する。TNE 緩衝液 300  $\mu$  L で 3 回洗浄した後、全穴に基質液（付記 11）を 100  $\mu$  L ずつ加え、遮光して 20  $^{\circ}$ C で 30 分間反応させる。反応停止液（付記 12）を 50  $\mu$  L ずつ加え、主波長 450nm 及び補正波長 630nm の 2 波長で吸光度（OD）を測定する。

以下の計算式により OD<sub>50</sub> を算出し、OD<sub>50</sub> を示す検体の希釈倍数を抗原量として ELISA 単位（log<sub>10</sub>）で表す。

$$OD_{50} = (OD_{max} + OD_{min}) / 2$$

OD<sub>max</sub> : 参照品の最大 OD の平均

OD<sub>min</sub> : 参照品の最低 OD の平均

$$\text{抗原量 (log 2)} = (OD_{50} - \text{定数}) / \text{傾き}$$

定数及び傾き : OD と抗原希釈倍数の対数について OD<sub>50</sub> を挟む 2 点の回帰直線の定数及び傾き

上記の計算式で算出した抗原量（log 2）の値を ELISA 単位（log<sub>10</sub>）に換算する。

###### 1.4.1.3 判定

参照品が所定の抗原量を示すとき、試験品の抗原量は、2.0log<sub>10</sub>ELISA 単位以上でなければならない。

#### 付記 1 抗猫汎白血球減少症ウイルス血清

猫汎白血球減少症ウイルスで免疫した兔又はモルモットの血清であって、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 2 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 0 ~ 20 mL

イーグル培養液 (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 3 抗猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス血清

猫ウイルス性鼻気管炎ウイルスで免疫した兔又はモルモットの血清であって、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 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	7.01 g
ホウ酸	3.09 g
水酸化ナトリウム	0.96 g
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
リン酸水素二ナトリウム二水和物	40.56 g
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6 捕捉用抗猫カリシウイルス抗体

猫を猫カリシウイルス G1 株で免疫して得た血清であって、炭酸ナトリウム緩衝液 (付記 13) で至適濃度に希釈して使用する。- 20 °C に保存し、凍結融解は避ける。

付記7 TNE 緩衝液

1,000mL 中

塩化ナトリウム	8.77 g
トリス	1.21 g
ポリソルベート 20	1 mL
チメロサル	0.02 g
水	残量

pH を 7.5 ± 0.2 に調整する。

付記8 ELISA 用緩衝液

1,000mL 中

トリス	2.42 g
塩化ナトリウム	8.77 g
牛血清アルブミン	10.0 g
ポリソルベート 20	0.5 mL
水	残量

pH を 7.2 に調整する。

付記9 猫カリシウイルス抗原定量 ELISA 参照品

猫カリシウイルス G1 株又は 431 株を含有する濃縮精製抗原、又は凍結乾燥ワクチン (G1 株及び 431 株) を注射用水で溶解したもので、抗原量が明らかなもの。

本 ELISA で抗原量を測定するとき、所定の抗原量を示さなければならない。

付記10 猫カリシウイルス抗原定量 ELISA 用標識モノクローナル抗体

ペルオキシダーゼ標識抗猫カリシウイルス p66 モノクローナル抗体を用いる。ハイブリドーマ H3-2 1012 E2E を接種したマウスの腹水を精製し、ペルオキシダーゼで標識したもので、ELISA 用緩衝液で希釈して使用する。-20℃に保存し、凍結融解は避ける。

付記 11 基質液

本 ELISA に適当なテトラメチルベンジジン溶液を用いる。

付記 12 反応停止液

1 mol/L 硫酸液

(別紙3)

○農林水産省告示第千六百二十四号

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。

平成二十四年七月四日

農林水産大臣 郡司 彰

表ワクチン(シードロット製剤を除く。)の部中

「馬ウイルス性動脈炎不活化 ワクチン(アジュバント加 溶解用液)	248,100	20,300	22	2
「馬ウイルス性動脈炎不活化	248,100	20,300	22	2

ワクチン（アジュバント加 溶解用液）									
馬鼻肺炎生ワクチン	342,100	51,200	25	15			2		
「マイコプラズマ・ハイオニ ューモニエ感染症（油性ア ジュバント加）不活化ワク チン	263,700	20,300		10	10		2		
「マイコプラズマ・ハイオニ ューモニエ感染症（油性ア ジュバント加）不活化ワク チン	263,700	20,300		10	10		2		

に

を

に

マイコプラズマ・ハイオニ ューモニエ感染症（アジュ バント・油性アジュバント 加）不活化ワクチン	286,100	20,300			10	2	
「ぶりびブリオ病不活化ワク チン	339,400	20,300			9	2	セ
「ぶりびブリオ病不活化ワク チン	339,400	20,300			9	2	
ひらめストレプトコッカス ・パラウベリス（I型・II 型）感染症・β溶血性レン サ球菌症混合不活化ワクチ	834,600	20,300			9	2	セ



ン						」
「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・猫白血病 ・猫クラミジア感染症混合 (油性アジュバント加) 不 活化ワクチン	705,000	20,300	45		5	」
「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・猫白血病 ・猫クラミジア感染症混合 (油性アジュバント加) 不 活化ワクチン	705,000	20,300	45		5	」

を

猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症2価 ・猫汎白血球減少症・猫白血病（猫白血病ウイルス由来防御抗原たん白遺伝子導入カナリア痘ウイルス） 猫クラミジア感染症混合ワクチン	421,600	241,200	36			2	2
--	---------	---------	----	--	--	---	---

改める。

株式会社（インテグレーション）の報告

「炭疽生ワクチン（シード）」	2,200	22,200		2		2	2
「牛コロナウイルス感染症（	352,800	20,300		16	13	2	

アジュバント加) 不活化ワクチン (シード)										
炭疽生ワクチン (シード)	2,200	22,200		2				2		
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		
日本脳炎不活化ワクチン (シード)	128,700	0		4	4			2		
豚サーコウイルス (2型)	357,500	20,300		13	12			2		

に

を

に

感染症不活化ワクチン（油性アジュバント加懸濁用液）（シード）						
豚パルボウイルス感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）	276,300	20,300		12	12	2
豚大腸菌性下痢症不活化・クロストリジウム・パーフリンゲンストキソイド混合（アジュバント加）ワクチン（シード）	585,000	20,300		14	14	2
豚大腸菌性下痢症不活化・	585,000	20,300		14	14	2

社

クロストリジウム・パーフリンゲンストキソイド混合 (アジュバント加) ワクチン (シード)						
豚ボルデテラ感染症・豚パスツレラ症 (粗精製トキソイド) ・マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症混合 (アジュバント加) 不活化ワクチン (シード)	390,100	20,300	11	10	2	
豚コレラ・豚丹毒混合生ワ	80,200	0		2	2	

24

クチン (シード)					
豚インフルエンザ・豚パスト ツレラ症・マイコプラズマ ・ハイオニューモニエ感染 症混合 (アジュバント加) 不活化ワクチン (シード)	382,900	20,300		15	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 クチン (シード)	399,000	0		2	2
ニューカッスル病・鶏伝染	355,900	0		2	2

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）						
鶏サルモネラ症（サルモネ ラ・インフアンティス・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）	281,500	20,300			9	2
「ニューカッスル病・鶏伝染	399,000	0			2	2

丸

」

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)					
ニューカッスル病・鶏伝染 性気管支炎・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)	355,900	0		2	2
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	355,900	0		2	2



ジュバント加) 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 2 価・鶏伝染性ファブリキウス嚢病混合 (油性アジュバント加) 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・産卵低下症候群-1976・トリニューモウイルス感染症混合 (油性ア

355,900

0

2

2

355,900

0

2

2

2

ジュバント加) 不活化ワクチン (シード)					
鶏サルモネラ症 (サルモネラ・インフアンティス・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)	281,500	20,300		9	2
マイコプラズマ・シノビエ感染症凍結生ワクチン (シ	428,200	37,400		10	2

ード)						
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）液状混合（アジュバント加）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）	355,900	0			2	2
「ニューカッスル病・鶏伝染	355,900	0			2	2

」

を

」

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）						
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 （アジュバント加）不活化 ワクチン（シード）	312,800	0			2	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	399,000	0			2	2

に

(油性アジュバント加) 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 2 価・鶏伝染性 コリーザ (A・C型) ・マ イコプラズマ・ガリセプチ カム感染症混合 (油性アジ ュバント加) 不活化ワクチ ン (シード)	355,900	0			2	2	㌵
「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	399,000	0			2	2	」

(油性アジュバント加) 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・鶏伝染性コリ ーザ(A・C型)・マイコ プラズマ・ガリセプチカム 感染症混合(油性アジュバ ント加)不活化ワクチン(シ ード)	399,000	0		2	2
ニューカッスル病・鶏伝染 性気管支炎2価・鶏伝染性	355,900	0		2	2

コリーザ (A・C型) ・マ イコプラズマ・ガリセプチ カム感染症混合 (油性アジ ュバント加) 不活化ワクチ ン (シード)						
狂犬病組織培養不活化ワク チン (シード)	125, 200	0	12	2	5mL未満 の場合 5 5mL以上2 0mL未満 の場合 2	
猫ウイルス性鼻気管炎・猫	271, 200	20, 300	32		5	

カリシウイルス感染症 2 価  
・猫汎白血球減少症混合ワ  
クチン (シード)

改めぬ。



(別紙4)

○農林水産省告示第千六百二十五号

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。

平成二十四年七月四日

農林水産大臣 郡司 彰

ただし書中「(69)まで」を「(83)まで」に改め、(112)を(126)とし、(68)から(111)までを十四ずつ繰り下げ、(67)を(80)とし、(80)の次に次のように加える。

(81) ジステンパー・犬アデノウイルス(2型)感染症・犬パラインフルエンザ・犬パルボウイルス感染症  
・犬コロナウイルス感染症・犬レプトスピラ病(カニコローラ・コペンハーゲン)・ヘブドマデイス)混合ワクチン(シード)

- ただし書中(66)を(79)とし、(60)から(65)までを十三ずつ繰り下げ、(59)を(71)とし、(71)の次に次のように加える。
- (72) マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症凍結生ワクチン(シード)
- ただし書中(58)を(70)とし、(57)を(69)とし、(56)を(68)とし、(55)を(66)とし、(66)の次に次のように加える。
- (67) マレック病(マレック病ウイルス2型・七面鳥ヘルペスウイルス)・鶏痘混合生ワクチン(シード)
- ただし書中(54)を(64)とし、(64)の次に次のように加える。
- (65) マレック病(マレック病ウイルス1型・七面鳥ヘルペスウイルス)凍結生ワクチン(シード)
- ただし書中(53)を(63)とし、(44)から(52)までを十ずつ繰り下げ、(43)を(52)とし、(52)の次に次のように加える。
- (53) トリレオウイルス感染症(油性アジュバント加)不活化ワクチン(シード)
- ただし書中(42)を(51)とし、(37)から(41)までを九ずつ繰り下げ、(36)を(43)とし、(43)の次に次のように加える。
- (44) 豚ボルデテラ感染症精製(アフィニティークロマトグラフィー部分精製)・豚パスツレラ症混合(油性アジュバント加)不活化ワクチン(シード)
- (45) 豚ボルデテラ感染症精製・豚パスツレラ症混合(油性アジュバント加)不活化ワクチン(シード)
- ただし書中(35)を(42)とし、(34)を(40)とし、(40)の次に次のように加える。

- (41) マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症（カルボキシビニルポリマーアジュバント加）不活化ワクチン（シード）
- ただし書中(33)を(39)とし、(18)から(32)までを六ずつ繰り下げ、(17)を(21)とし、(21)の次に次のように加える。
- (22) 豚パルボウイルス感染症生ワクチン（シード）
- (23) 豚パルボウイルス感染症不活化ワクチン（シード）
- ただし書中(16)を(20)とし、(15)を(19)とし、(14)を(18)とし、(13)を(14)とし、(14)の次に次のように加える。
- (15) 牛ロタウイルス感染症3価・牛コロナウイルス感染症・牛大腸菌性下痢症（K99精製線毛抗原）混合（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）
- (16) 馬ロタウイルス感染症（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）
- (17) 豚インフルエンザ（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）
- ただし書中(12)を(13)とし、(8)から(11)までを一ずつ繰り下げ、(7)の次に次のように加える。
- (8) アカバネ病・チュウザン病・アイノウイルス感染症混合（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

(別紙5)

○農林水産省告示第千六百二十六号

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。

平成二十四年七月四日

農林水産大臣 郡司 彰

第二号中(26)を(27)とし、(25)を(26)とし、(24)の次に次のように加える。

(25) 豚コレラ・豚丹毒混合生ワクチン（シード）

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		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)
馬ウイルス性動脈炎不活化ワクチン(アジュバント加溶解用液)	70	馬ウイルス性動脈炎不活化ワクチン(アジュバント加溶解用液)	70
<u>馬鼻肺炎生ワクチン</u>	<u>70</u>		
(略)	(略)	(略)	(略)
マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症(油性アジュバント加)不活化ワクチン	90	マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症(油性アジュバント加)不活化ワクチン	90
<u>マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症(アジュバント・油性アジュバント加)不活化ワクチン</u>	<u>70</u>		
(略)	(略)	(略)	(略)
ぶりビブリオ病不活化ワクチン	120	ぶりビブリオ病不活化ワクチン	120
<u>ひらめストレプトコッカス・パラウベリス(I型・II型)感染症・β溶血性レンサ球菌症混合不活化ワクチン</u>	<u>120</u>		
(略)	(略)	(略)	(略)

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・猫白血病・猫クラミジア感染症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン	70	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・猫白血病・猫クラミジア感染症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン	70
猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症2価・猫汎白血球減少症・猫白血病（猫白血病ウイルス由来防御抗原たん白遺伝子導入カナリア痘ウイルス）・猫クラミジア感染症混合ワクチン	50		
(略)	(略)	(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)	
牛コロナウイルス感染症（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）	70		
炭疽生ワクチン（シード）	30	炭疽生ワクチン（シード）	30
(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
日本脳炎不活化ワクチン（シード）	60		
豚サーコウイルス（2型）感染症不活化ワクチン（油性アジュバント加懸濁用液）（シード）	70		
豚パルボウイルス感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）	70		
(略)	(略)	(略)	(略)
豚大腸菌性下痢症不活化・クロストリジウム・パーフリンゲンストキソイド混合（アジュバント加）ワクチン（シード）	80	豚大腸菌性下痢症不活化・クロストリジウム・パーフリンゲンストキソイド混合（アジュバント加）ワクチン（シード）	80
豚ボルデテラ感染症・豚パスツレラ症（粗精製トキソイド）・マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症混合（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）	70		

<u>豚コレラ・豚丹毒混合生ワクチン (シード)</u>	40		
<u>豚インフルエンザ・豚パスツレラ症・マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症混合 (アジュバント加) 不活化ワクチン (シード)</u>	70		
(略)	(略)	(略)	(略)
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)	70	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)	70
<u>ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎・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)</u>	70		
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)	70	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)	70
<u>ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎 2 価・鶏伝染性ファブリキウス囊病混合 (油性アジュバント加) 不活化ワクチン (シード)</u>	70		
<u>ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎・産卵低下症候群-1976・トリニューモウイルス感染症混合 (油性アジュバント加) 不活化ワクチン (シード)</u>	70		
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)	70	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)	70
<u>マイコプラズマ・シノビエ感染症凍結生ワクチン (シード)</u>	90		
<u>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) 液状混合 (アジュバント加) 不活化ワクチン (シード)</u>	60		
(略)	(略)	(略)	(略)

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)	70
<u>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 (アジュバント加) 不活化ワクチン (シード)</u>	70
(略)	(略)
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)	80
<u>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) ・マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症混 合 (油性アジュバント加) 不活化ワクチン (シード)</u>	70
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) ・マイコプラズマ・ガリセプチカム感染 症混合 (油性アジュバント加) 不活化ワクチン (シード)	70
<u>狂犬病組織培養不活化ワクチン (シード)</u>	40
<u>猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症 2 価・猫 汎白血球減少症混合ワクチン (シード)</u>	50
(略)	(略)
(診断液の部)	
(略)	(略)

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)	70
(略)	(略)
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)	80
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) ・マイコプラズマ・ガリセプチカム感染 症混合 (油性アジュバント加) 不活化ワクチン (シード)	70
(略)	(略)
(診断液の部)	
(略)	(略)