

動薬協会発 196号

平成24年8月15日

社団法人日本動物用医薬品協会
会 員 各 位

社団法人 日本動物用医薬品協会
理事長 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1961号
平成24年8月10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1961号
平成24年8月10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）及び「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）の一部が別紙1から別紙4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5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)

○農林水産省告示第二千四号

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。

平成二十四年八月十日

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。）の部の牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢—粘膜病2価・牛パラインフルエンザ・牛RSウイルス感染症混合（アジュバント加）不活化ワクチンの項を次のように改める。

牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢—粘膜病2価・牛パラインフルエンザ・牛RSウイルス感染症混合（アジュバント加）不活化ワクチン

1 定義

牛伝染性鼻気管炎ウイルス、牛ウイルス性下痢—粘膜病ウイルス（1型）、牛ウイルス性下痢—粘膜病ウイルス（2型）、牛パラインフルエンザ3型ウイルス及び牛RSウイルスを培養細胞でそれぞれ増殖させて得たウイルス液を不活化したものを混合し、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 牛伝染性鼻気管炎ウイルス

2.1.1.1 名称

牛伝染性鼻気管炎ウイルス マッカチャー株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

牛に接種すると、発熱、鼻汁漏出を伴って鼻気管炎を発症する。

牛腎由来株化（以下この項において「MDBK」という。）細胞でCPEを伴って増殖する。

2.1.1.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、牛腎及び牛精巢継代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

2.1.2 牛ウイルス性下痢—粘膜病ウイルス（1型）

2.1.2.1 名称

牛ウイルス性下痢—粘膜病ウイルス（1型）シンガー株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

牛に接種すると、発熱、鼻汁漏出等の呼吸器症状、下痢及び軟便等の消化器症状、白血球減少等を示す。

MDBK細胞でCPE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、牛腎及び牛精巢継代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

2.1.3 牛ウイルス性下痢—粘膜病ウイルス（2型）

2.1.3.1 名称

牛ウイルス性下痢—粘膜病ウイルス（2型）5912株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

牛に接種すると、発熱、鼻汁漏出等の呼吸器症状、下痢及び軟便等の消化器症状、白血球減少等を示す。

MDBK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、牛腎及び牛精巢継代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。
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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

2.1.4 牛パラインフルエンザ3型ウイルス

2.1.4.1 名称

牛パラインフルエンザ3型ウイルス ライシंगाー SF-4 株又はこれと同等と認められた株

2.1.4.2 性状

牛に接種すると、発熱、鼻汁漏出を伴って牛のパラインフルエンザを発症する。

MDBK 細胞で CPE を伴って増殖する。

2.1.4.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、牛腎及び牛精巢継代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

2.1.5 牛RSウイルス

2.1.5.1 名称

牛RSウイルス ダイヤモンド株又はこれと同等と認められた株

2.1.5.2 性状

MDBK 細胞で CPE を伴って増殖する。

2.1.5.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、牛腎及び牛精巢継代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス

2.2.1.1 培養細胞

MDBK 細胞又は製造に適当と認められた細胞を用いる。

2.2.1.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.2 牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス (1型)

2.2.2.1 培養細胞

MDBK 細胞又は製造に適当と認められた細胞を用いる。

2.2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.3 牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス (2型)

2.2.3.1 培養細胞

MDBK 細胞又は製造に適当と認められた細胞を用いる。

2.2.3.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.4 牛パラインフルエンザ3型ウイルス

2.2.4.1 培養細胞

MDBK 細胞又は製造に適当と認められた細胞を用いる。

2.2.4.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.5 牛RSウイルス

2.2.5.1 培養細胞

MDBK 細胞又は製造に相当と認められた細胞を用いる。

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。

2.3 原液

2.3.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス

2.3.1.1 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。ウイルス接種前の細胞に異常を認めてはならない。

個別培養細胞について、3.1 の試験を行う。

2.3.1.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に回収したウイルス液をウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について 3.2 の試験を行う。

2.3.1.3 不活化

ウイルス浮遊液を相当と認められた方法により処理して不活化し、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 の試験を行う。

2.3.1.4 原液

不活化ウイルス浮遊液を混合し、原液とする。

原液について、3.4 の試験を行う。

2.3.2 牛ウイルス性下痢—粘膜病ウイルス（1型）

2.3.2.1 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。ウイルス接種前の細胞に異常を認めてはならない。

個別培養細胞について、3.1 の試験を行う。

2.3.2.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に回収したウイルス液をウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2 の試験を行う。

2.3.2.3 不活化

ウイルス浮遊液を相当と認められた方法により処理して不活化し、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 の試験を行う。

2.3.2.4 原液

不活化ウイルス浮遊液を混合し、原液とする。

原液について、3.4 の試験を行う。

2.3.3 牛ウイルス性下痢—粘膜病ウイルス（2型）

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。ウイルス接種前の細胞に異常を認めてはならない。

個別培養細胞について、3.1 の試験を行う。

2.3.3.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に回収したウイルス液をウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2 の試験を行う。

2.3.3.3 不活化

ウイルス浮遊液を相当と認められた方法により処理して不活化し、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 の試験を行う。

2.3.3.4 原液

不活化ウイルス浮遊液を濃縮した後、混合し、原液とする。

原液について、3.4 の試験を行う。

2.3.4 牛パラインフルエンザウイルス

2.3.4.1 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。ウイルス接種前の細胞に異常を認めてはならない。

個別培養細胞について、3.1 の試験を行う。

2.3.4.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に回収したウイルス液をウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2 の試験を行う。

2.3.4.3 不活化

ウイルス浮遊液を適当と認められた方法により処理して不活化し、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 の試験を行う。

2.3.4.4 原液

不活化ウイルス浮遊液を混合し、原液とする。

原液について、3.4 の試験を行う。

2.3.5 牛RSウイルス

2.3.5.1 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。ウイルス接種前の細胞に異常を認めてはならない。

個別培養細胞について、3.1 の試験を行う。

2.3.5.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に回収したウイルス液をウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2 の試験を行う。

2.3.5.3 不活化

ウイルス浮遊液を適当と認められた方法により処理して不活化し、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 の試験を行う。

2.3.5.4 原液

不活化ウイルス浮遊液を混合し、原液とする。

原液について、3.4 の試験を行う。

2.4 最終バルク

牛伝染性鼻気管炎ウイルス原液、牛ウイルス性下痢—粘膜病ウイルス（1型）原液、牛ウイルス性下痢—粘膜病ウイルス（2型）原液、牛パラインフルエンザ3型ウイルス原液及び牛RSウイルス原液を混合し、適当と認められたアジュバント、安定剤及び保存剤を添加した後、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、3.5 の試験を行う。

3 試験法

3.1 培養細胞の試験

個別培養細胞の1%以上を対照培養細胞とし、これについて次の試験を行う。

3.1.1 培養観察

対照培養細胞を、ウイルスを接種することなく、ウイルス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 赤血球吸着試験

3.1.1 の観察最終日に培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を2回洗浄した後、2群に分け、生理食塩液で濃度を調整した0.1vol %のモルモット及びがちょうの赤血球浮遊液を重層し、60分間静置後、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。

3.2 ウイルス浮遊液の試験

3.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.2 ウイルス含有量試験

3.3.3 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。

3.2.2.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス（1型）、牛ウイルス性下痢ウイルス（2型）及び牛パラインフルエンザ3型ウイルス

3.2.2.1.1 試験材料

3.2.2.1.1.1 試料

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

3.2.2.1.1.2 培養細胞

MDBK細胞を24穴プラスチックプレートに1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

3.2.2.1.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ5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。

3.2.2.1.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中牛伝染性鼻気管炎ウイルスでは10^{8.0}TCID₅₀以上、牛ウイルス性下痢ウイルス（1型）では10^{7.0}TCID₅₀以上、牛ウイルス性下痢ウイルス（2型）では10^{5.7}TCID₅₀以上、牛パラインフルエンザ3型ウイルスでは10^{8.1}TCID₅₀以上でなければならない。

3.2.2.2 牛RSウイルス

3.2.2.2.1 試験材料

3.2.2.2.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.2.2.1.2 培養細胞

Vero細胞を24穴プラスチックプレートに1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

3.2.2.2.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ5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。

3.2.2.2.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10^{5.7}TCID₅₀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 牛伝染性鼻気管炎ウイルス

3.3.2.1.1 試験材料

検体を試料とする。

3.3.2.1.2 培養細胞

MDBK 細胞を 1～3 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

試料 1 mL につき 3 cm² 以上の培養細胞に接種し、37 °C で 90 分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を加え、37 °C で 7 日間培養し、観察する。

3.3.2.1.4 判定

培養細胞に CPE を認めないとき、活性ウイルス陰性とする。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

3.3.2.2 牛ウイルス性下痢—粘膜病ウイルス（1 型）

3.3.2.2.1 試験材料

検体を試料とする。

3.3.2.2.2 培養細胞

MDBK 細胞を 1～3 日間培養し、単層となったものを用いる。

3.3.2.2.3 試験方法

試料 1 mL につき 3 cm² 以上の培養細胞に接種し、37 °C で 90 分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を加え、37 °C で 7 日間培養し、観察する。

3.3.2.2.4 判定

培養細胞に CPE を認めないとき、活性ウイルス陰性とする。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

3.3.2.3 牛ウイルス性下痢—粘膜病ウイルス（2 型）

3.3.2.3.1 試験材料

検体を試料とする。

3.3.2.3.2 培養細胞

MDBK 細胞を 1～3 日間培養し、単層となったものを用いる。

3.3.2.3.3 試験方法

試料 1 mL につき 3 cm² 以上の培養細胞に接種し、37 °C で 90 分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を加え、37 °C で 7 日間培養し、観察する。

3.3.2.3.4 判定

培養細胞に CPE を認めないとき、活性ウイルス陰性とする。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

3.3.2.4 牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス

3.3.2.4.1 試験材料

検体を試料とする。

3.3.2.4.2 培養細胞

MDBK 細胞を 1～3 日間培養し、単層となったものを用いる。

3.3.2.4.3 試験方法

試料 1 mL につき 3 cm² 以上の培養細胞に接種し、37 °C で 90 分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を加え、37 °C で 7 日間培養し、観察する。

3.3.2.4.4 判定

培養細胞に CPE を認めないとき、活性ウイルス陰性とする。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

3.3.2.5 牛 R S ウイルス

以下の試験方法又は適当と認められた試験方法を用いる。

3.3.2.5.1 試験材料

検体を試料とする。

3.3.2.5.2 培養細胞

MDBK 細胞を 1～3 日間培養し、単層となったものを用いる。

3.3.2.5.3 試験方法

試料 1 mL につき 3 cm² 以上の培養細胞に接種し、37 °C で 90 分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を加え、37 °C で 7 日間培養し、観察する。

3.3.2.5.4 判定

培養細胞に CPE を認めないとき、活性ウイルス陰性とする。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

3.3.3 抗原定量試験

酵素免疫測定法により参照品（付記 2）に対する相対抗原量を算出するため、以下の試験方法又は適当と認められた試験方法を用いる。3.2.2 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。

3.3.3.1 試験材料

3.3.3.1.1 試料

検体に小分製品と同じ組成となるように希釈液（付記 3）及びアジュバントを加えたものを試料とする。

3.3.3.1.2 抗体感作プレート

抗牛伝染性鼻気管炎ウイルス牛血清、抗牛ウイルス性下痢—粘膜病ウイルス（1 型）牛血清、抗牛ウイルス性下痢—粘膜病ウイルス（2 型）牛血清、抗牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス牛血清及び抗牛 R S ウイルス牛血清（付記 4）を用時調製した 0.05mol/L 炭酸緩衝液（pH9.7）でそれぞれ希釈し、96 穴の抗体吸着プレートに 100 μ L ずつ分注する。これを 2～7 °C で 1 昼夜静置した後、0.3vol % ポリソルベート 20-リン酸緩衝液で 4 回洗浄する。1.15w/v % 脱脂粉乳加 0.05mol/L 炭酸緩衝液を 1 穴当り 200 μ L ずつ加え、37 °C で 60 分間静置する。この処理済み抗体吸着プレートを 0.3vol % ポリソルベート 20-リン酸緩衝液で 4 回洗浄し、抗体感作プレートとする。

3.3.3.2 試験方法

試料及び参照品を 0.01mol/L-リン酸緩衝液にて 2 倍に希釈し、この液 3 mL に 0.5mL の 20w/v % NZ アミン-リン酸緩衝液を加える。これを氷水中で 6 ± 2 W で 1 分間超音波処理した後、2.86w/v % NZ アミン加 0.3vol % ポリソルベート 20-リン酸緩衝液で 5 倍に希釈する。試料及び参照品を必要に応じて希釈液で希釈した後、2.86w/v % NZ アミン加ポリソルベート 20-リン酸緩衝液で 1.75 倍（牛 R S ウイルスの場合には 2 倍）階段希釈する（希釈範囲は、牛ウイルス性下痢—粘膜病ウイルス（2 型）及び牛 R S ウイルスの場合には 7 段階、その他は 11 段階とする。）。各希釈試料は、100 μ L をそれぞれ 2 穴ずつの抗体感作プレートに添加し、37 °C で 1 昼夜静置した後、0.3vol % ポリソルベート 20-リン酸緩衝液を用いて 4 回洗浄する。洗浄プレートに対象ウイルスのモノクローナル抗体の希釈液を 100 μ L ずつ加え、37 °C で 60 分間静置感作する。感作プレートは、0.3vol % ポリソルベート 20-リン酸緩衝液で 4 回洗浄した後、2 % 牛胎子血清-2.86w/v % NZ アミン加 0.3vol % ポリソルベート 20-リン酸緩衝液で希釈したビオチン標識—抗マウス IgG ヤギ抗体（H + L）液を 100 μ L ずつ加え、37 °C で 60 分間静置した後、更に 0.3vol % ポリソルベート 20-リン酸緩衝液にて 4 回洗浄する。ストレプトアビジン—ペルオキシダーゼ標識抗体を 100 μ L ずつ添加し、37 °C で 30 分間静置した後、0.3vol % ポリソルベート 20-リン酸緩衝液で 4 回洗浄する。洗浄した後、牛伝染性鼻気管炎ウイルス及び牛 R S ウイルスでは基質 1（付記 5）を、牛ウイルス性下痢—粘膜病ウイルス（1 型）、牛ウイルス性下痢—粘膜病ウイルス（2 型）及び牛パラインフルエンザ 3 型ウイルスでは基質 2（付記 6）を用い、全ての穴に 100 μ L ずつ添加し、基質 1 では 37 °C、基質 2 では常温で 30 分間暗所に静置して発色させる。発色後、基質 1 では主波長 405nm、補正波長 490nm、また、基質 2 では主波長 650nm、補正波長 490nm で吸光度を測定する。

3.3.3.3 判定

参照品の抗原量を 1.0 として試料中の相対抗原量を統計学的計算方法（付記 7）により算出するとき、試料中の各抗原の参照品に対する相対力価は 1.0 以上でなければならない。この際、参照品及び試料とも希釈と吸光度間の相関係数は 0.95 以上を示し、参照品の積分値は希釈液のその 4 倍以上であり、かつ、試料を 3 段階まで希釈した穴の吸光度は参照品のその 85 % 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 pH 測定試験

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

3.5.3 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.5.4 チメロサル定量試験

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

3.5.5 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。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。

3.5.6 毒性限度確認試験

一般試験法の毒性限度確認試験法 2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、本試験における注射液量は 1 頭当たり 1 mL とし、注射後 3 日目の体重が注射前の体重と同等以上であることを、等分散を仮定した母平均の差の t 検定（対応のない場合、両側検定、有意水準 5 %）により確認する。

3.5.7 力価試験

3.5.7.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス、牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス及び牛 R S ウイルス

3.5.7.1.1 試験材料

3.5.7.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.7.1.1.2 試験動物

体重約 300g のモルモットを用いる。

3.5.7.1.1.3 中和試験用ウイルス

3.5.7.1.1.3.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス

牛伝染性鼻気管炎ウイルス マッカチャー株又は適当と認められた株を用いる。

3.5.7.1.1.3.2 牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス

牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス ライシンガー SF-4 株又は適当と認められた株を用いる。

3.5.7.1.1.3.3 牛 R S ウイルス

牛 R S ウイルス ダイヤモンド株又は適当と認められた株を用いる。

3.5.7.1.1.4 培養細胞

3.5.7.1.1.4.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス

MDBK 細胞浮遊液を用いる。

3.5.7.1.1.4.2 牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス

Vero 細胞浮遊液を用いる。

3.5.7.1.1.4.3 牛RSウイルス

96 穴マイクロプレートで単層となった Vero 細胞を用いる。

3.5.7.1.2 試験方法

注射材料 3 mL ずつを 5 匹の試験動物に 2 週間隔で 2 回注射する。注射方法は、2 か所の筋肉内にそれぞれ 1 mL ずつ注射し、1 か所の皮下に 1 mL を注射する。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。

3.5.7.1.2.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス

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。各希釈血清と 200TCID₅₀/25 μL に濃度を調整した中和試験用ウイルスを等量混和し、37 °C で 18 時間中和処理する。この混合液 25 μL ずつを 96 穴プラスチックプレートの 4 穴に接種し、更に MDBK 細胞浮遊液を 0.1mL ずつ加え、37 °C、5 vol % 炭酸ガス下で 7 日間培養し、観察する。

3.5.7.1.2.2 牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス

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。各希釈血清と 200TCID₅₀/25 μL に濃度を調整した中和用ウイルスを等量混和し、37 °C で 60 分間中和処理する。この混合液 25 μL ずつを 96 穴プラスチックプレートの 4 穴に接種し、更に Vero 細胞浮遊液を 0.1mL ずつ加え、37 °C、5 vol % 炭酸ガス下で 7 日間培養し、観察する。

3.5.7.1.2.3 牛RSウイルス

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。各希釈血清と 200TCID₅₀/25 μL に濃度を調整した中和試験用ウイルスを等量混和し、37 °C、5 vol % 炭酸ガス下で 60 分間中和処理する。Vero 細胞の培養液を除き、混合液 25 μL ずつを 4 穴に加え、37 °C、5 vol % 炭酸ガス下で 60 分間吸着する。吸着後にウイルス増殖用培養液を 0.1mL ずつ加え、34 °C 5 vol % 炭酸ガス下で 7 日間培養し、観察する。

3.5.7.1.3 判定

培養細胞の 2 穴以上に 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。

3.5.7.1.3.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス

中和抗体価 128 倍以上を陽性とするとき、試験動物の中和抗体陽性率は、80 % 以上でなければならない。

3.5.7.1.3.2 牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス

中和抗体価 4 倍以上を陽性とするとき、試験動物の中和抗体陽性率は、80 % 以上でなければならない。

3.5.7.1.3.3 牛RSウイルス

中和抗体価 2 倍以上を陽性とするとき、試験動物の中和抗体陽性率は、80 % 以上でなければならない。

3.5.7.2 牛ウイルス性下痢—粘膜病ウイルス 1 型及び 2 型

3.5.7.2.1 試験材料

3.5.7.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.7.2.1.2 試験動物

体重約 100g のラットを用いる。

3.5.7.2.1.3 中和試験用ウイルス

3.5.7.2.1.3.1 牛ウイルス性下痢—粘膜病ウイルス (1 型)

牛ウイルス性下痢—粘膜病ウイルス (1 型) シンガー株又は適当と認められた株を用いる。

3.5.7.2.1.3.2 牛ウイルス性下痢—粘膜病ウイルス (2 型)

牛ウイルス性下痢—粘膜病ウイルス（2型）5912株又は適当と認められた株を用いる。

3.5.7.2.1.4 培養細胞

MDBK 細胞浮遊液を用いる。

3.5.7.2.2 試験方法

注射材料を5匹の試験動物の両後肢大腿部筋肉内にそれぞれ各1 mLずつ注射する。注射後21日に得られた血清について中和試験を行う。

被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液で2倍階段希釈する。各希釈血清と200TCID₅₀/25 μLに濃度を調整した中和試験用ウイルスを等量混和し、37℃で60分間中和処理する。この混合液25 μLずつを96穴プラスチックプレートの4穴に接種し、更にMDBK細胞浮遊液を0.1mLずつ加え、37℃、5 vol %炭酸ガス下で7日間培養し、観察する。

3.5.7.2.3 判定

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

中和抗体価2倍以上を陽性とするとき、試験動物の中和抗体陽性率は、それぞれの株に対して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、2年間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その期間とする。

付記1 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

牛血清 10 ~ 20 mL

イーグルMEM 残量

炭酸水素ナトリウムを用いてpHを7.2~7.6に調整する。

牛血清は、牛伝染性鼻気管炎ウイルス、牛ウイルス性下痢—粘膜病ウイルス（1型）、牛ウイルス性下痢—粘膜病ウイルス（2型）、牛パラインフルエンザ3型ウイルス及び牛RS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2 参照品

ワクチン製造方法で製造されたウイルス浮遊液を不活化したものにアジュバントを小分製品と同一の割合で混合したもので、動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

付記3 希釈液

ウイルスの培養と同じ工程でウイルスを接種せずに製造用細胞を培養した後のウイルス増殖用培養液とアジュバントを小分製品と同一割合で混合したもの。

付記4 抗牛伝染性鼻気管炎ウイルス牛血清、抗牛ウイルス性下痢—粘膜病ウイルス（1型）牛血清、抗牛ウイルス性下痢—粘膜病ウイルス（2型）牛血清、抗牛パラインフルエンザ3型ウイルス牛血清及び抗牛RSウイルス牛血清

各抗血清は、各ウイルスの精製、不活化抗原にフロイントの不完全アジュバントを加え、牛の皮内に注射して得られる。それぞれの抗血清を検体として間接蛍光抗体法により試験するとき、目的のウイルスの感染細胞に特異蛍光が認められ、対照細胞には特異蛍光を認めない。

付記5 基質1

適当と認められた2,2'-アジノビス（3-エチルベンチアゾリン-6-スルホン酸溶液（ABTS）

付記6 基質2

適当と認められた (3,3', 5,5') テトラメチルベンチジン溶液 (TMB)

付記7 統計学的計算方法

動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

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）の項の次に次のように加える。

破傷風（アジュバント加）トキソイド（シード）

1 定義

シードロット規格に適合した破傷風菌を培養して得た破傷風毒素を無毒化し、アルミニウムゲルアジュバントを添加したトキソイドである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

破傷風菌 Harvard A/47 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

培養ろ液をマウス又はモルモットの皮下に注射するとき、特異な破傷風症状を呈して死亡する。

2.1.3 マスターシード菌

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、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

マスターシード菌について、3.1.1の試験を行う。

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

2.1.4 ワーキングシード菌

2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、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、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培地に接種して培養し、これを更に培地に接種して培養したものを培養菌液とする。

2.3.2 毒素液

培養菌液を除菌ろ過し、毒素液とする。

2.3.3 トキソイド化及び精製

毒素液にホルマリンを加えてトキソイド化する。トキソイド化の前又は後に適当と認められた方法で精製する。このトキソイドを含む液をトキソイド液とする。

トキソイド液について、3.2の試験を行う。

2.3.4 アジュバントの添加

トキソイド液を必要な濃度に希釈し、適当と認められたアジュバントを加える。この場合、適当と認められた保存剤を加える。また、適当と認められた安定剤を加えてもよい。これを原液とする。原液について、3.3 の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液を生理食塩液等で希釈し、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、3.4 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 を準用して試験を実施するとき、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 トキソイド液の試験

3.2.1 無菌試験

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 無毒化試験

3.2.2.1 試験材料

3.2.2.1.1 試料

検体を 1/60mol/L リン酸緩衝食塩液で希釈し、最終バルクの 3 倍濃厚なトキソイド液を作る。また、最終バルクと同等な濃度のトキソイド液を作り、37℃で 20 日間静置して試料とする。

3.2.2.1.2 試験動物

体重 300 ~ 400g のモルモットを用いる。

3.2.2.2 試験方法

試験動物 4 匹以上を 1 群として、それぞれの試料を 1 匹当たり 5 mL ずつ皮下注射し、21 日間観察する。

3.2.2.3 判定

観察期間中、いずれの動物も毒素による中毒症状その他の異常を認めてはならない。

3.3 原液の試験

3.3.1 無菌試験

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。

3.3.2 力価試験

3.3.2.1 試験材料

3.3.2.1.1 注射材料

検体、標準沈降破傷風トキソイド（以下この項において「標準品」という。）（付記）及び適当と認められた攻撃用毒素を用いる。

3.3.2.1.2 試験動物

体重 300 ~ 400g のモルモット又は約 5 週齢のマウスを用いる。

3.3.2.1.3 攻撃用毒素

適当と認められた攻撃用毒素を用いる。攻撃用毒素の LD₅₀ 値は、1 群 3 匹以上のモルモット又はマウスのそれぞれ 3 群以上を用いて測定するとき、モルモットでは 25 ~ 100、マウスでは 50 ~ 200 でなければならない。

3.3.2.2 試験方法

検体及び標準品をそれぞれ生理食塩液で対数的等間隔に階段希釈する。検体及び標準品の各希釈液を、1 群 10 匹以上のモルモット又はマウスに、1 匹当たりモルモットでは 2 mL を、マウスでは 0.5 mL をそれぞれ外股部皮下に注射する。4 ~ 6 週後に、ゼラチン加 1/60mol/L リン酸緩衝食塩液で希釈した毒素を、モルモットの場合は約 50LD₅₀/mL ずつ、マウスの場合は約 100LD₅₀/0.5mL ずつをそれぞれ外股部皮下に注射して 7 日間観察する。

3.3.2.3 判定

試験の成績を統計学的に処理して比較するとき、検体の力価は、40 国際単位以上でなければならない。

3.4 小分製品の試験

3.4.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、固有の色調を有する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。

3.4.2 pH 測定試験

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

3.4.3 無菌試験

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。

3.4.4 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ない。

3.4.5 ホルマリン定量試験

一般試験法のホルマリン定量法を準用して試験するとき、ホルマリンの含有量は、0.03vol% 以下でなければならない。

3.4.6 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 0.5mg 以下でなければならない。

3.4.7 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 20 μg 以下でなければならない。

3.4.8 異常毒性否定試験

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

3.4.9 力価試験

3.3.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

4 貯法及び有効期間

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

付記 標準沈降破傷風トキソイド

動物医薬品検査所から配布される標準品

ワクチン（シードロット製剤）の部の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（K 99 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）の項の次に次のように加える。

馬鼻肺炎（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鼻肺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濃縮した後、不活化してアルミニウムゲルアジュバントを添加したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

馬鼻肺炎ウイルス HH-1 BKS 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

馬に接種すると、軽度の発熱を示すが、呼吸器症状は示さない。

牛腎細胞、馬腎細胞及び豚腎細胞で CPE を伴って増殖し、馬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、EFD-C₁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、EFD-C₁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、EFD-C₁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

EFD-C₁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°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°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°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採取した培養液のろ液、遠心上清又はこれを濃縮したものをウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.3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 アジュバントの添加

不活化ウイルス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、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。

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法

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法

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

3.3.1.1 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

MDBK 細胞を小試験管又は 48 穴プレートに 1～2 日間培養し、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 本又は 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を 0.5mL ずつ加え、37℃で 7 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、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{8.0}TCID₅₀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液を用い、2～5℃で 1 夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.4.2.1.2 培養細胞

MDBK 細胞を 1～3 日間培養し、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 cm² 以上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、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。

3.4.2.3 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 1.0mg 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 400 μ 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

試験品をリン酸緩衝食塩液で 250、500、1,000 及び 2,000 倍に希釈したものを注射材料とする。

3.6.8.1.2 試験動物

約 6 週齢のハムスターを用いる。

3.6.8.1.3 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 2) を用いる。

3.6.8.2 試験方法

試験動物 16 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。

3.6.8.3 判定

試験群の生残動物数から試験品の ED₅₀ を算出する。

試験品の ED₅₀ は、500 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全て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 1 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 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

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。

牛血清 10mL は、やぎ血清 20mL をもって代えることができる。

付記2 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、 $10^{4.0}$ LD₅₀ を用いる。

ワクチン（シードロット製剤）の部の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）の項の次に次のように加える。

日本脳炎・ゲタウイルス感染症混合不活化ワクチン（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及びゲタウイルスをそれぞれ同規格に適合した株化細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化し、混合したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 日本脳炎ウイルス

2.1.1.1 名称

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

2.1.1.2 性状

マウスの脳内に注射すると、死亡する。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。

2.1.1.3 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、MPK-III aC1 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°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、MPK-III aC1 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°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、MPK-III aC1 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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

2.1.2 ゲタウイルス

2.1.2.1 名称

ゲタウイルス MI-110 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

馬の皮下、筋肉内又は鼻腔内に接種すると、発熱及び浮腫等の症状を示す。

馬、牛、豚及びサル由来の培養細胞で CPE を伴って増殖し、がちょう赤血球を凝集する。

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、Vero 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°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。

2.1.2.4 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、Vero 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°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。

2.1.2.5 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、Vero 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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 日本脳炎ウイルス

2.2.1.1 培養細胞

MPK-III aC1 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て、凍結して -70°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°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°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 ゲタウイルス

2.2.2.1 培養細胞

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細胞

Vero 細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.2.1.2 原液の製造に用いる細胞

EFD-C₁ 細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.2.2 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て、凍結して- 70 °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 °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 °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 日本脳炎ウイルス原液

2.3.1.1 プロダクションセルシードの培養

1 回に処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の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。

2.3.1.3 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。

2.3.1.4 原液の調製

不活化ウイルス液を混合し、日本脳炎ウイルス原液とする。

原液について、3.5 の試験を行う。

2.3.2 ゲタウイルス原液

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を濃縮したものを浮遊液とする。

浮遊液について、3.3 の試験を行う。

2.3.2.3 不活化

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。

2.3.2.4 原液の調製

不活化ウイルス液を混合し、ゲタウイルス原液とする。

原液について、3.5 の試験を行う。

2.4 最終バルク

日本脳炎ウイルス原液とゲタ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 1.4.2.1.1.1 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法

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

豚由来細胞を用いる場合には馬伝染性貧血ウイルス及び豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスについて、サル由来細胞を用いる場合には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、馬由来細胞を用いる場合には馬伝染性貧血ウイルスについて、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

豚由来細胞を用いる場合には、豚コレラウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス、ロタウイルス及び狂犬病ウイルスについて、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。

サル由来細胞又は馬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、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法

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

豚由来細胞を用いる場合には馬伝染性貧血ウイルス及び豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスについて、サル由来細胞を用いる場合には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、馬由来細胞を用いる場合には馬伝染性貧血ウイルスについて、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

豚由来細胞を用いる場合には、豚コレラウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス、ロタウイルス及び狂犬病ウイルスについて、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。

サル由来細胞又は馬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、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

3.3.1.1 日本脳炎ウイルス

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 1）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.1.1.1.2 培養細胞

初代ハムスター腎細胞又は適当と認められた培養細胞を小試験管又は 48 穴のマイクロプレートに培養し、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 本又は 4 穴以上の培養細胞に接種し、37 °C で 60 分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液 0.5mL を加え、37 °C で 7 日間培養し、観察する。

3.3.1.1.3 判定

培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{7.5}TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.3.1.2 ゲタウイルス

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 細胞を小試験管又は 48 穴のマイクロプレートに 1 ~ 2 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 本又は 4 穴以上の培養細胞に接種し、37 °C で 60 分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を 0.5mL ずつ加え、37 °C 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、TCID₅₀ を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{7.5}TCID₅₀ 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 日本脳炎ウイルス

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 試験動物

3週齢のマウスを用いる。

3.4.2.1.2 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。

3.4.2.1.3 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。

3.4.2.2 ゲタウイルス

3.4.2.2.1 試験材料

3.4.2.2.1.1 試料

検体 5 mL を、100 倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用いて 2～5℃ で 1 夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.4.2.2.1.2 培養細胞

Vero T 細胞を培養瓶に 2～3 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 5 mL を 1 mL につき 3 cm² 以上の Vero T 細胞に接種し、37℃ で 90 分間吸着させた後、試料を抜き取り、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃ で 10 日間培養し、観察する。

観察最終日に培養液を小試験管 4 本以上に 0.5mL ずつ採取し、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 2）を加え、この混合液に、VAD6.2 液（付記 3）で洗浄調整した 0.33vol % のがちょう赤血球浮遊液を 1.0mL 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。

3.4.2.2.3 判定

培養細胞に CPE を認めず、培養液にがちょう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、0.1vol % 以下でなければならない。

3.6.5 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、たん白窒素含有量は、1 mL 中 200 μg 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 日本脳炎力価試験

3.6.7.1.1 試験材料

3.6.7.1.1.1 注射材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で4倍に希釈したものを注射材料とする。

3.6.7.1.1.2 試験動物

2～3週齢のマウスを用いる。

3.6.7.1.2 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4）を用いる。

3.6.7.1.3 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。さらに、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倍に希釈したものを0.2mLずつ腹腔内に注射する。試験群及び対照群について、14日間観察する。

3.6.7.1.4 判定

脳炎症状を示して死亡した動物数から各群の死亡率及び攻撃ウイルスのLD₅₀を算出する。この場合、生存しているものの脳炎症状を示している動物は、死亡した動物とみなして計算する。

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%以上であり、かつ、攻撃ウイルスのウイルス量は、0.2mL中10³LD₅₀以下でなければならない。

3.6.7.2 ゲタウイルス感染症力価試験

3.6.7.2.1 試験材料

3.6.7.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.6.7.2.1.2 試験動物

約6週齢のハムスターを用いる。

3.6.7.2.1.3 培養細胞

Vero T細胞を小試験管又は48穴のマイクロプレートに培養し、単層となったものを用いる。

3.6.7.2.1.4 中和試験用ウイルス

Vero細胞で増殖させたゲタウイルスAMM-2021株を用いる。

3.6.7.2.2 試験方法

試験動物10匹を試験群、2匹を対照群とする。注射材料1mLずつを試験群の皮下に注射し、注射後21日目に得られた各個体の血清について中和試験を行う。

試験群及び対照群の血清は、それぞれ2匹ずつ等量混合し、非働化する。非働化血清をウイルス増殖用培養液で2倍階段希釈する。各希釈血清と0.1mL中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、37℃で60分間処理する。各混合液0.1mLずつを、それぞれ4本又は4穴の培養細胞に接種し、37℃で90分間静置した後、ウイルス増殖用培養液を0.5mLずつ加え、37℃で7日間培養し、観察する。

3.6.7.2.3 判定

培養試験管又はマイクロプレートの2本又は2穴以上に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。抗体価2倍以上を中和抗体陽性と判定する。

試験群の血清の80%以上が中和抗体陽性でなければならない。この場合、対照群では、2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 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

牛又はやぎ血清 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。

牛又はやぎ血清は、日本脳炎ウイルス及びゲタウイルスに対する中和抗体陰性のもので、56℃で30分間非働化したものを用いる。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記2 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

牛血清アルブミン 4.0 g

ゼラチン 0.01 g

精製水 残量

牛血清アルブミンを最終濃度が 0.4w/v % に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3 VAD6.2 液

1,000mL 中

塩化ナトリウム 20.45 g

リン酸水素二ナトリウム十二水和物 20.06 g

リン酸二水素ナトリウム二水和物 22.47 g

精製水 残量

牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液と等量混合して pH6.2 に調整する。

付記4 攻撃ウイルス

日本脳炎ウイルス中山株葉検系又は適当と認められた株を生後3~4週齢のマウスに脳内接種し、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し、原液又は必要に応じて希釈した原液を攻撃に用いる。

ワクチン（シードロット製剤）の部の鶏痘生ワクチン（シード）の項を次のように改める。

鶏痘生ワクチン（シード）

1 定義

シードロット規格に適合した弱毒鶏痘ウイルス又は弱毒鳩痘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調製した液状ワクチン又は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

弱毒鶏痘ウイルス#946 株、弱毒鳩痘ウイルス中野株又はこれらと同等と認められた株

2.1.2 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 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°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。

2.1.4 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°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。

2.1.5 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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

プロダクションシード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9～13日齢のものを用いる。

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

2.3 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

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、漿尿膜を採取して乳剤とし、その液又は遠心上清を原液とする。

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。

2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、乾燥製剤の場合は凍結乾燥し、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。この場合、検体を孔径 0.2 μ 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。この場合、検体を孔径 0.2 μ 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。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。この場合、検体を孔径 0.2 μ 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。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 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に適合した11～13日齢の発育鶏卵を用いる。

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。

3.4.2.3 判定

漿尿膜にポックが出現したものを感染とみなし、EID₅₀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、液状製剤の場合には1mL中10^{5.0}EID₅₀以上、乾燥製剤の場合には1mL中10^{6.0}EID₅₀以上でなければならない。

3.5 小分製品の試験

次の試験を行う。ただし、液状製剤の場合には、3.5.2及び3.5.3の試験を行わない。

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、乾燥製剤にあつては、固有の色調を有する乾燥物でなければならない。液状製剤又は乾燥製剤を溶解したものは、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 チメロサル定量試験

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

3.5.8 フェノール定量試験

フェノー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、フェノールの含有量は、0.5w/v %以下でなければならない。

3.5.9 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 $10^{3.0}$ EID₅₀ 以上でなければならない。

3.5.10 安全及び発痘試験

3.5.10.1 試験材料

3.5.10.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

3.5.10.1.2 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鶏を用いる。

ただし、塗擦用試験品では 60 日齢、初生ひな以上用の穿刺用試験品では 4 日齢、中ひな以上用の穿刺用試験品では 60 日齢の鶏とする。

3.5.10.2 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 1 羽分ずつを試験群に用法に従って接種し、対照群と共に 21 日間観察する。

試験開始時及び試験終了時に体重を測定する。

3.5.10.3 判定

塗擦用試験群は、接種後 5～7 日で善感発痘し、痘疱は、14 日以内に完全に消退しなければならない。

穿刺用試験群は、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。

いずれの試験群の場合も、観察期間中、痘疱の転移や重度の痂皮の形成を認めてはならない。

対照群においては、試験動物に臨床的な異常を認めてはならず、試験群においては、試験動物に発痘以外の臨床的な異常を認めてはならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後 1 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。

ワクチン（シードロット製剤）の部のマレック病（七面鳥ヘルペスウイルス）生ワクチン（シード）の項を次のように改める。

マレック病（七面鳥ヘルペスウイルス）生ワクチン（シード）

1 定義

シードロット規格に適合した七面鳥ヘルペス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感染細胞浮遊液を凍結又は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

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 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。

2.1.3 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、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°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、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°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。

2.1.5 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、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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 初代細胞

SPF 動物規格の 2.6 に適合した鶏胚初代細胞、同規格の 2.7 に適合したうずら胚初代細胞、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 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

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

2.2.3.1 増殖、継代及び保存

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

マスタープライマリーセルシード（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

原液を混合し、相当と認められた希釈液で濃度調整し、凍結製剤の場合には相当と認められた凍害防止剤を加え、乾燥製剤の場合には相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、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、凍結製剤の場合には凍結して、乾燥製剤の場合には凍結乾燥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 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 培養細胞の試験

静置培養の場合には個体別培養細胞の 1% 以上を、ファーメンター培養の場合には個体別培養細胞の 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。

3.3.1 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の 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、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 25cm² 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 中凍結製剤の場合には 10^{6.0}PFU 又は 10^{6.0}FFU 以上、乾燥製剤の場合には 2 × 10^{6.0}PFU 又は 2 × 10^{6.0}FFU 以上でなければならない。

3.5 小分製品の試験

次の試験を行う。ただし、液状製剤の場合には、3.5.2 及び 3.5.3 の試験を行わない。

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又は乾燥物でなければならない。溶解したものは、固有の色調を有する均質な懸濁液でなければならない。異物及び異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.5.2 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 無菌試験

一般試験法の無菌試験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 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。

3.5.6 ウイルス含有量試験

3.4.3 を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1羽分当たり凍結製剤の場合には $10^{3.0}$ PFU 又は $10^{3.0}$ FFU 以上、乾燥製剤の場合には $2 \times 10^{3.0}$ PFU 又は $2 \times 10^{3.0}$ FFU 以上でなければならない。

3.5.7 安全試験

3.5.7.1 試験材料

3.5.7.1.1 注射材料

試験品を溶解用液を用いて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。

3.5.7.1.2 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。

3.5.7.2 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。

3.5.7.3 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、異常を認めてはならない。

3.5.8 力価試験

3.5.8.1 試験材料

3.5.8.1.1 注射材料

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

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1～4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、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2）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、風乾後、4単位の抗鶏IgG 蛍光標識抗体（付記3）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。

3.5.8.3 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。

試験群の80%以上が抗体価40倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全て抗体価20倍以下でなければならない。

4 貯法及び有効期間

凍結ワクチンは、-100℃以下で保存する。

有効期間は、製造後1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 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 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 3 抗鶏 IgG 蛍光標識抗体

抗鶏 IgG 血清から γ -グロブリンを調製し、これを蛍光色素で標識したもので、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）の項を次のように改める。

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）

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）を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

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

2.1.2 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。

2.1.3 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、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°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、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°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。

2.1.5 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、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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 初代細胞

SPF動物規格の2.6に適合した鶏胚初代細胞、同規格の2.7に適合したうずら胚初代細胞、同規

格の 2.8 に適合したあひる胚初代細胞又は製造に相当と認められた初代細胞を用いる。

2.2.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

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

2.2.3.1 増殖、継代及び保存

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

マスタープライマリーセルシード（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

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 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 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の 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、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 25cm² 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 10^{6.0}PFU 又は 10^{6.0}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 ウイルス含有量試験

3.4.3 を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1 羽分当たり 10^{3.0}PFU 又は 10^{3.0}FFU 以上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

試験品を溶解用液を用いて 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 2）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、風乾後、4 単位の抗鶏 IgG 蛍光標識抗体（付記 3）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、全て抗体価 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 1 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 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 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 JM 株又はこれと同等と認められた株を接種し、2～4 日間培養したもので、特異抗原を有するもの。

付記3 抗鶏 IgG 蛍光標識抗体

抗鶏 IgG 血清から γ -グロブリンを調製し、これを蛍光色素で標識したもので、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）凍結生ワクチン（シード）の項を次のように改める。

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）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（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°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°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2.6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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

プロダクションシード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°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°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。

2.1.2.5 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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

プロダクションシード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 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、3.3 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 2 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 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 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 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。

3.3.3 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の 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、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 25cm² 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^{6.0}PFU 又は 10^{6.0}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、それぞれのブ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 $10^{2.0}$ 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 羽分となるように濃度を調整したものを注射材料とする。

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 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、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 2）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、風乾後、4 単位の抗鶏 IgG 蛍光標識抗体（付記 3）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、全て抗体価 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 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 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 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 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3 抗鶏 IgG 蛍光標識抗体

抗鶏 IgG 血清から γ -グロブリンを調製し、これを蛍光色素で標識したもので、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・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・鶏サルモネラ症（サルモネラ・エンテリティディス）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に適合したサルモネラ・エンテリティディス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 Lasota 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 -60°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

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

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

プロダクションシード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 Holland 52株及びM-41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 -60°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

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

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

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

2.1.3 サルモネラ・エンテリティディス

2.1.3.1 名称

サルモネラ・エンテリティディス 037-90 株、038-90 株及び 039-90 株又は相当と認められた株

2.1.3.2 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を示す。

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、相当と認められた培地で継代させ、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して -60°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

マスターシード菌について、3.1.4 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、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 -60°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.5 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、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 -60°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.6 の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 ニューカッスル病ウイルス

2.2.1.1 発育鶏卵

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

SPF 動物規格の 1.1 に適合した 9～11 日齢のものを用いる。

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

2.2.1.1.2 原液の製造に用いる発育鶏卵

9～11 日齢のものを用いる。

2.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

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

2.2.2.1.2 原液の製造に用いる発育鶏卵

9～11 日齢のものを用いる。

2.2.3 サルモネラ・エンテリティディス

2.2.3.1 培地

製造に相当と認められた液状培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 ニューカッスル病ウイルス原液

2.3.1.1 発育鶏卵の培養

1 回に処理する発育鶏卵を個別発育鶏卵とみなす。

個別発育鶏卵について、3.3 の試験を行う。

2.3.1.2 ウイルスの培養

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

ウイルス浮遊液について、3.4.1.1 の試験を行う。

2.3.1.3 不活化

ウイルス浮遊液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、3.6.1 及び 3.6.2.1 の試験を行う。

2.3.1.4 濃縮

限外ろ過法により不活化ウイルス浮遊液を濃縮し、原液とする。

2.3.2 鶏伝染性気管支炎ウイルスの各株原液

2.3.2.1 発育鶏卵の培養

1 回に処理する発育鶏卵を個別発育鶏卵とみなす。

個別発育鶏卵について、3.3 の試験を行う。

2.3.2.2 ウイルスの培養

各株のプロダクションシードウイルスを 2.3.2.1 の発育鶏卵で培養し、感染増殖させた尿膜腔液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、3.4.1.2 の試験を行う。

2.3.2.3 不活化

各ウイルス浮遊液をホルマリンで不活化し、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、3.6.1 及び 3.6.2.2 の試験を行う。

2.3.2.4 濃縮

限外ろ過法により不活化ウイルス浮遊液を濃縮し、原液とする。

2.3.3 サルモネラ・エンテリティディス

2.3.3.1 培養

培養した各種菌のワーキングシード菌又はプロダクションシード菌をそれぞれ培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

各培養菌液について 3.5 の試験を行う。

2.3.3.2 不活化

各培養菌液にホルマリンを加え不活化したものを不活化菌液とする。

各不活化菌液について、3.7 の試験を行う。

2.3.3.3 濃縮

限外ろ過法及び遠心法により不活化菌液の濃縮を行い、原液とする。

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サルモネラ・エンテリティディ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及び保存剤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、3.8 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。

3.1.4 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、サルモネラ・エンテリティディス以外の菌の発育を認めてはならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験法とする。

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 個別発育鶏卵の試験

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

3.3.1 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、EID₅₀ を算出する。ただし、24 時間以内に死亡したものは、除外する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 $10^{8.0}$ EID₅₀ 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、EID₅₀ 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 $10^{7.0}$ EID₅₀ 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

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。

3.5.2 生菌数試験

3.5.2.1 試験材料

3.5.2.1.1 試料

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

3.5.2.1.2 培地

適当と認められた寒天培地を用いる。

3.5.2.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 2 枚の寒天培地に塗布し、37℃で 18 時間培養した後、生じたサルモネラ・エンテリティディスの集落数を数える。

3.5.2.3 判定

各段階の希釈液ごとの集落数の平均値、希釈倍率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 10^9 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 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。

3.7 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 試料

検体を試料とする。

3.7.1.1.2 培地

適当と認められた寒天培地を用いる。

3.7.1.2 試験方法

試料を培地に接種して培養する。

3.7.1.3 判定

試料を接種した培地では、いかなる菌の発育も認めてはならない。

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 チメロサル定量試験

チメロサル添加製剤については、適当と認められた方法で試験品を処理したものを試料とし、一般試験法のチメロサル定量法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.8.4 ホルマリン定量試験

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、固有の値以下でなければならない。

3.8.5 安全試験

3.8.5.1 試験材料

3.8.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.8.5.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した発育鶏卵由来の 3～5 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。

注射材料の 1 羽分ずつを試験群の肩部皮下に注射し、対照群と共に 4 週間観察し、試験最終日に注射部位を剖検する。

3.8.5.3 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。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。

3.8.6 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 80 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。

3.8.6.2 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

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した発育鶏卵由来の 3～5 週齢の鶏を用いる。

3.8.6.2.1.2 中和試験用ウイルス

それぞれの製造用株を用いる。ただし、そのウイルス量は、生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9～10 日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、ウイルス価を測定するとき、1 mL 中 $10^{5.0}$ EID₅₀ 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

試験動物の 10 羽を注射群、3 羽を対照群とする。

注射材料の 1 羽分ずつを試験群の肩部皮下に 4 週間隔で 2 回注射し、第 2 回目の注射後 6 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。

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、EID₅₀ 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。

3.8.6.3 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

3.8.6.3.1 抗原含有量試験

3.8.6.3.1.1 試験材料

試験品及び参照抗原（付記1）、参照陽性血清（付記2）及び参照陰性血清（付記3）を用いる。

3.8.6.3.2 試験方法

3.8.6.3.2.1 試験品及び参照抗原の前処理

3.8.6.3.2.1.1 試験品の前処理

試験品 2 mL を 30 °C で 10 分間加温した後、2 w/v % n - オクチル - β - D - グルコピラノサイド添加リン酸緩衝食塩液（以下この項において「OG-PBS」という。）（付記4）0.1mL、クロロホルム 6 mL、10w/v % 塩化ナトリウム水溶液 3.9mL を加え、よく攪拌した後、数分間静置する。上層 2 mL を分取し、遠心分離後、上清を完全に除去し、沈渣を 0.5mL の炭酸緩衝液（付記5）に再浮遊させたものを試験品抗原試料とする。

3.8.6.3.2.1.2 参照抗原の前処理

参照抗原 1 バイアルをリン酸緩衝食塩液（以下この項において「PBS」という。）（付記6）で溶解した後、同液で1回遠心洗浄し、沈渣を 10mL の PBS に再浮遊させてよく攪拌する。この液 0.5mL を分取し、OG-PBS 0.1mL を加えてよく攪拌した後、1時間静置する。遠心分離後、上清を完全に除去し、沈渣を 0.5mL の炭酸緩衝液に再浮遊させたものを参照抗原試料とする。

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

試験品抗原試料及び参照抗原試料を炭酸緩衝液で 50 倍に希釈したものを、あらかじめ炭酸緩衝液 100 μ L を入れた ELISA 用プレートに 100 μ L ずつ加え、更に同希釈液で 2 倍階段希釈する。4 °C で 18 時間反応させた後、洗浄液（付記7）で洗浄する。次に 1 w/v % 牛血清アルブミン液（付記8）を各穴に 100 μ L ずつ加え、1 時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。さらに、参照陽性血清及び参照陰性血清を血清希釈液（付記9）で 1,000 倍に希釈し、30 °C で 10 分間加温したものを各抗原の希釈系列に 100 μ L ずつ加える。30 分間反応させた後、洗浄液で 4 回洗浄する。30 °C で 10 分間加温した標識抗体（付記10）を各穴に 100 μ L ずつ加え、30 分間反応させた後、洗浄液で 4 回洗浄する。基質液（付記11）を 30 °C で 10 分間加温した基質希釈液（付記12）で 10 倍に希釈し、各穴に 100 μ L ずつ加え、10 ~ 15 分間反応させた後、反応停止液（付記13）を各穴に 100 μ L ずつ加えて反応を停止させ、波長 492nm で各穴の吸光度を測定する。

3.8.6.3.3 判定

試験品抗原試料の 800 倍希釈列における参照陽性血清に対する平均吸光度値を S、参照抗原試料の 800 倍希釈列における参照陽性血清に対する平均吸光度値を R、試験品抗原試料の 800 倍希釈列における参照陰性血清に対する吸光度値を N1、参照抗原試料の 800 倍希釈列における参照陰性血清に対する吸光度値を N2 とし、S/R 比を $(S-N1)/(R-N2)$ により求めるとき、1.0 以上でなければならない。また、R は 0.5 ~ 0.9 未満、N1 及び N2 は 0.2 以下、参照抗原試料の 3,200 倍希釈列における参照陽性血清に対する平均吸光度値は 0.5 未満でなければならない。

3.8.7 抗原性確認試験

3.8.7.1 試験材料

3.8.7.1.1 試験動物

3.8.5 の試験に用いた動物を用いる。

3.8.7.1.2 凝集反应用抗原

「ひな白痢急速診断用菌液」を用いる。

3.8.7.2 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を非働化し、凝集反应用抗原を用いて急速平板凝集反応を行う。

凝集反应用抗原 1 滴（約 0.03mL）と血清 1 滴（約 0.03mL）を反应用ガラス板上でよく混和し、凝集の有無を観察する。

3.8.7.3 判定

凝集反応用抗原と血清を混和した後、1分間以内に凝集したものを陽性、1分間以内に凝集しないものを陰性とする。

試験群は、90%以上が陽性でなければならない。この場合、対照群では、全て陰性でなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後2年間とする。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

付記1 参照抗原

サルモネラ・エンテリティディス 037-90 株、038-90 株及び 039-90 株のホルマリン不活化菌浮遊液を等量ずつ混合し、安定剤と水を加える。本液 1.75mL を分取して前処理を行い抗原試料を調製した後、更に 800 倍希釈した液について、参照陽性血清を用いた ELISA を行ったとき、基質液の反応時間 10 分で吸光度値が 0.5 となるように濃度を調整したものであり、1 バイアル当たり 1.75mL ずつ小分けして、凍結乾燥し、保存する。

付記2 参照陽性血清

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り、「ひな白痢急速診断用菌液」を用いて急速平板凝集反応を行ったとき、抗体価 8 ~ 16 倍を示す。小分けして、凍結乾燥し、保存する。

付記3 参照陰性血清

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鶏から得た血清であり、「ひな白痢急速診断用菌液」を用いて急速平板凝集反応を行ったとき、陽性反応を示さない。小分けして、凍結乾燥し、保存する。

付記4 2 w/v % n - オクチル - β - D - グルコピラノサイド添加リン酸緩衝食塩液

1,000mL 中

n - オクチル - β - D - グルコピラノサイド 20 g

塩化ナトリウム 8.0 g

塩化カリウム 0.2 g

リン酸二水素カリウム 0.2 g

無水リン酸水素二ナトリウム 1.15 g

水 残量

pH を 7.4 ~ 7.6 に調整する。

付記5 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
	アジ化ナトリウム	0.2 g
	水	残 量
	pH を 9.6 に調整する。	
付記 6	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
	リン酸二水素カリウム	0.2 g
	無水リン酸水素二ナトリウム	2.9 g
	水	残 量
	pH を 7.4 ~ 7.6 に調整する。	
付記 7	洗浄液	
	ポリソルベート 20 0.5mL をリン酸緩衝食塩液 1,000mL に溶解したもの。	
付記 8	1 w/v % 牛血清アルブミン液	
	牛血清アルブミン 1.0 g を使用直前に洗浄液 100mL に溶解したもの。	
付記 9	血清希釈液	
	1,000mL 中	
	牛胎子血清	10 mL
	ポリソルベート 20	1 mL
	リン酸緩衝食塩液	残 量
付記 10	標識抗体	
	ペルオキシダーゼ標識抗鶏 IgG 抗体を標識抗体希釈液 (付記 14) で希釈したもの。	
付記 11	基質液	
	1,000mL 中	
	o-フェニレンジアミン	5 g
	クエン酸一水和物	21 g
	無水リン酸水素二ナトリウム	28.4 g
	水	残 量
	溶解後、速やかに小分けして、-70 °C 以下に保存する。	
付記 12	基質希釈液	
	1,000mL 中	
	クエン酸一水和物	21.01 g
	無水リン酸水素二ナトリウム	28.40 g
	過酸化水素 (30 %)	1 mL
	水	残 量
付記 13	反応停止液	

1,000mL 中
硫酸
水

84 mL
残 量

付記 14 標識抗体希釈液
1,000mL 中
牛胎子血清
ポリソルベート 20
リン酸緩衝食塩液

1 mL
2 mL
残 量

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混合生ワクチン（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 DFE-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動物規格の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℃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℃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 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°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。

2.1.2.4 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°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。

2.1.2.5 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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

プロダクションシード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°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。

2.1.3.4 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°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。

2.1.3.5 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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

プロダクションシード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、豚及びサルの上皮細胞を凝集する。

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°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。

2.1.4.4 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°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。

2.1.4.5 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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

プロダクションシード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°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。

2.1.5.4 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°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。

2.1.5.5 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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

プロダクションシード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 ジステンパーウイルス

2.2.1.1 培養細胞

SPF動物規格の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°C 以下で保存する。

マスターセルシードについて、3.3.1の試験を行う。

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

2.2.2.4 ワーキングセルシード

2.2.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.2.2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°C 以下で保存する。

ワーキングセルシードについて、3.3.2の試験を行う。

2.2.2.5 プロダクションセルシード

2.2.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.2.2 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°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。

2.2.3 犬パラインフルエンザウイルス

2.2.3.1 培養細胞

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

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°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°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°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°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°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。

2.2.5.5 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°C 以下で保存する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、3.3.3 の試験を行う。

2.3 原液

2.3.1 ジステンパーウイルス原液

2.3.1.1 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、3.4 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、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、3.5.1 及び 3.5.2.1 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培養細胞とみなす。ウイルス接種前のプロダクションセルシードに異常を認めてはならない。

2.3.2.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを 2.3.2.1 の細胞で培養し、適当と認められた時期に個別培養細胞ごとに採取した培養液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、3.5.1 及び 3.5.2.2 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 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、3.4 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培養細胞

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、3.5.1 及び 3.5.2.3 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、3.5.1 及び 3.5.2.4 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、3.5.1 及び 3.5.2.5 の試験を行う。

2.4 最終バルク

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。

2.5 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、3.6 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

猫由来細胞を用いる場合には、猫白血病ウイルス及び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 3.1.2 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

犬又は猫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、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 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、猫白血病ウイルス及び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 個別培養細胞の試験

個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

胞に赤血球の吸着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 ウイルス含有量試験

3.5.2.1 ジステンパーウイルス含有量試験

3.5.2.1.1 試験材料

3.5.2.1.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記1）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。

3.5.2.1.1.2 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。

3.5.2.1.2 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。

3.5.2.1.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1mL中10^{4.5}TCID₅₀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。

3.5.2.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験

3.5.2.2.1 試験材料

3.5.2.2.1.1 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。

3.5.2.2.1.2 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。

3.5.2.2.2 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、その試験法とする。

3.5.2.2.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1mL中10^{6.5}TCID₅₀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。

3.5.2.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

3.5.2.3.1 試験材料

3.5.2.3.1.1 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。

3.5.2.3.1.2 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。

3.5.2.3.2 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℃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。

3.5.2.3.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1mL中10^{6.5}TCID₅₀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。

3.5.2.4 犬パルボウイルス含有量試験

3.5.2.4.1 試験材料

3.5.2.4.1.1 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。

3.5.2.4.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.5.2.4.2 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℃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℃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2）を加え、更にこの混合液と等量のVAD6.0液（付記3）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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験法とする。

3.5.2.4.3 判定

培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1mL中10^{6.5}TCID₅₀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。

3.5.2.5 犬コロナウイルス含有量試験

3.5.2.5.1 試験材料

3.5.2.5.1.1 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。

3.5.2.5.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.5.2.5.2 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℃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。

3.5.2.5.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1mL中10^{5.0}TCID₅₀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 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。

3.6.2 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。

3.6.3 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。

3.6.4 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。

3.6.5 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。

3.6.6 ウイルス含有量試験

3.6.6.1 ジステンパーウイルス含有量試験

3.6.6.1.1 試験材料

3.6.6.1.1.1 試料

各抗血清（付記5から8までの血清）を非働化したもので試験品中のジステンパーウイルス以外のウイルスを中和する。これをウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.6.6.1.1.2 培養細胞

Vero細胞を用いる。

3.6.6.1.2 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で培養し、観察する。

3.6.6.1.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID₅₀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は10^{3.5}TCID₅₀以上、プレート法では10^{2.1}TCID₅₀以上でなければならない。

3.6.6.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験

3.6.6.2.1 試験材料

3.6.6.2.1.1 試料

各抗血清（付記4及び6から8までの血清）を非働化したもので試験品中の犬アデノウイルス（2型）以外のウイルスを中和する。これをウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.6.6.2.1.2 培養細胞

豚腎培養細胞又は犬腎株化細胞を用いる。

3.6.6.2.2 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で培養し、観察する。

3.6.6.2.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID₅₀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は10^{5.5}TCID₅₀以上、プレート法では10^{2.3}TCID₅₀以上でなければならない。

3.6.6.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

3.6.6.3.1 試験材料

3.6.6.3.1.1 試料

各抗血清（付記4、5、7及び8の血清）を非働化したもので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を中和する。これをウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.6.6.3.1.2 培養細胞

Vero細胞を用いる。

3.6.6.3.2 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で培養し、観察する。

3.6.6.3.3 判定

培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ 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は 10^{5.5}TCID₅₀ 以上、プレート法では 10^{3.7}TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.6.6.4 犬パルボウイルス含有量試験

3.6.6.4.1 試験材料

3.6.6.4.1.1 試料

各抗血清（付記 4 から 6 まで及び 8 の血清）を非働化したもので試験品中の犬パルボウイルス以外のウイルスを中和する。これをウイルス増殖用培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.6.6.4.1.2 培養細胞

猫腎株化細胞を用いる。

3.6.6.4.2 試験方法

試料の 0.1mL ずつを 4 本（穴）以上の培養細胞に接種し、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で培養する。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。

3.6.6.4.3 判定

培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ 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は 10^{5.5}TCID₅₀ 以上、プレート法では 10^{3.1}TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.6.6.5 犬コロナウイルス含有量試験

3.6.6.5.1 試験材料

3.6.6.5.1.1 試料

各抗血清（付記 4 から 7 までの血清）を非働化したもので試験品中の犬コロナウイルス以外のウイルスを中和する。これをウイルス増殖用培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.6.6.5.1.2 培養細胞

猫腎株化細胞を用いる。

3.6.6.5.2 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で培養し、観察する。

3.6.6.5.3 判定

培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ 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は 10^{4.0}TCID₅₀ 以上、プレート法では 10^{2.2}TCID₅₀ 以上でなければならない。

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試験するとき、適合しなければならない。

3.6.8 安全試験

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

6 か月齢未満の犬を用いる。

3.6.8.2 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。

3.6.8.3 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。

3.6.9 力価試験

3.6.9.1 ジステンパー力価試験

3.6.9.1.1 試験材料

3.6.9.1.1.1 試験動物

3.6.8 の試験に用いた犬を用いる。

3.6.9.1.1.2 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。

3.6.9.1.1.3 培養細胞

適当と認められた培養細胞を用いる。

3.6.9.1.2 試験方法

3.6.8 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。

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 200TCID₅₀ 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。

3.6.9.1.3 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 ED₅₀ 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。

3.6.9.2 犬アデノウイルス（2 型）感染症力価試験

3.6.9.2.1 試験材料

3.6.9.2.1.1 試験動物

3.6.8 の試験に用いた犬を用いる。

3.6.9.2.1.2 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。

3.6.9.2.1.3 培養細胞

犬腎株化細胞を用いる。

3.6.9.2.2 試験方法

3.6.8 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。

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 200TCID₅₀ 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。

3.6.9.2.3 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 ED₅₀ 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。

3.6.9.3 犬パラインフルエンザ力価試験

3.6.9.3.1 試験材料

3.6.9.3.1.1 試験動物

3.6.8 の試験に用いた犬を用いる。

3.6.9.3.1.2 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。

3.6.9.3.1.3 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。

3.6.9.3.2 試験方法

3.6.8 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 2 倍階段希釈する。各希釈血清と 0.1mL 中約 200TCID₅₀ 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。

3.6.9.3.3 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 ED₅₀ 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。

3.6.9.4 犬パルボウイルス感染症力価試験

3.6.9.4.1 試験材料

3.6.9.4.1.1 試験動物

3.6.8 の試験に用いた犬を用いる。

3.6.9.4.1.2 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。

3.6.9.4.1.3 培養細胞

猫腎株化細胞を用いる。

3.6.9.4.2 試験方法

3.6.8 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 2 倍階段希釈する。各希釈血清と 0.1mL 中約 200TCID₅₀ 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 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。

3.6.9.4.3 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 ED₅₀ 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。

3.6.9.5 犬コロナウイルス感染症力価試験

3.6.9.5.1 試験材料

3.6.9.5.1.1 試験動物

3.6.8 の試験に用いた犬を用いる。

3.6.9.5.1.2 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。

3.6.9.5.1.3 培養細胞

猫腎株化細胞を用いる。

3.6.9.5.2 試験方法

3.6.8 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200TCID₅₀ の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、37℃で60分間処理する。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。

3.6.9.5.3 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ED₅₀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。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後2年3か月間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その期間とする。

付記1 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・プロス 2.95 g

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 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3 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4 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兔、モルモット又はフェレットの血清であって、試験品中

のジステンパーウイルスを完全に中和できるもの。

付記5 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、試験品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6 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、試験品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7 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、試験品中の犬パルボウイルスを完全に中和できるもの。

付記8 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、試験品中の犬コロナウイルスを完全に中和できるもの。

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及び弱毒犬パルボ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 DFE-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 動物規格の 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°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 2.6 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°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 2.6 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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

プロダクションシード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°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。

2.1.2.4 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°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。

2.1.2.5 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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

プロダクションシード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 -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。

2.1.3.4 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°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。

2.1.3.5 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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

プロダクションシード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°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。

2.1.4.4 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°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。

2.1.4.5 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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

2.1.5 L・カニコーラ

2.1.5.1 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

2.1.5.2 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・カニコラ血清（付記1）に対して特異的に凝集する。

2.1.5.3 マスターシード菌

2.1.5.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、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°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°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°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。

2.1.6 L・コペンハーゲニー

2.1.6.1 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

2.1.6.2 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・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。

2.1.6.3 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°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°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°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・ヘブドマディス

2.1.7.1 名称

L・ヘブドマデイス 秋疫 B 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・ヘブドマデイス血清（付記 3）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 °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。

2.1.7.4 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 °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。

2.1.7.5 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 °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 ジステンパーウイルス

2.2.1.1 培養細胞

SPF 動物規格の 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 °C 以下で保存する。

マスターセルシードについて、3.3.1の試験を行う。

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

2.2.2.4 ワーキングセルシード

2.2.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.2.2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 培養細胞

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

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℃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大継代数は、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℃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℃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 L・カニコーラ

2.2.5.1 培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

2.2.6 L・コペンハーゲニー

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・ヘブドマディス

2.2.7.1 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 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、3.4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培養細胞とみなす。ウイルス接種前のプロダクションセルシードに異常を認めてはならない。

2.3.2.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.2.1の細胞で培養し、相当と認められた時期に個別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を原液とする。この場合、相当と認められた安定剤を添加してもよい。

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 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、3.4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、相当と認められた時期に個別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を原液とする。この場合、相当と認められた安定剤を添加してもよい。

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 L・カニコーラ原液

2.3.5.1 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。

2.3.5.2 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。

2.3.6 L・コペンハーゲニー原液

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・ヘブドマデイス原液

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。

2.4 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及び犬パルボ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・コペンハーゲニー原液及び L・ヘブドマデイス原液を混合し、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、猫白血病ウイルス及び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 3.1.2 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

犬又は猫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、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。

3.1.4 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2.2.4.2.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.3 マイコプラズマ否定試験

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

3.3 株化細胞の試験

3.3.1 マスターセルシードの試験

3.3.1.1 培養性状試験

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

3.3.1.2 起源動物種同定試験

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

3.3.1.3 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.1.4 マイコプラズマ否定試験

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

3.3.1.5 外来性ウイルス否定試験

3.3.1.5.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2、2.1及び2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.1.5.2 特定ウイルス否定試験

3.3.1.5.2.1 特定ウイルス否定一般試験

猫由来細胞を用いる場合には、猫白血病ウイルス及び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 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、培養細胞に赤血球の吸着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 1×10^9 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。

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、TCID₅₀ を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{4.5}TCID₅₀ 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、TCID₅₀ を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{6.5}TCID₅₀ 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℃で 7 日間回転培養し、観察する。

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、TCID₅₀ を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{6.5}TCID₅₀ 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。

3.6.2.4 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℃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℃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 0.3～0.5vol %

豚赤血球浮遊液を加え、2～5℃で静置後観察する。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、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10^{6.5}TCID₅₀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20 mLを入れた試験管3本に試料0.5 mL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。また、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。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精製水で溶解する。各抗血清（付記7から9

まで)を非働化したもので試験品中のジステンパーウイルス以外のウイルスを中和する。これをウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.7.7.1.1.2 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で培養し、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、TCID₅₀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は10^{3.5}TCID₅₀以上、プレート法では10^{2.1}TCID₅₀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精製水で溶解する。各抗血清(付記6、8及び9)を非働化したもので試験品中の犬アデノウイルス(2型)以外のウイルスを中和する。これをウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.7.7.2.1.2 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で培養し、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、TCID₅₀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は10^{5.5}TCID₅₀以上、プレート法では10^{2.3}TCID₅₀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精製水で溶解する。各抗血清(付記6、7及び9)を非働化したもので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を中和する。これをウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.7.7.3.1.2 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し、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、TCID₅₀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は10^{5.5}TCID₅₀以上、プレート法では10^{3.7}TCID₅₀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精製水で溶解する。各抗血清(付記6から8

まで)を非働化したもので試験品中の犬パルボウイルス以外のウイルスを中和する。これをウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.7.7.4.1.2 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で培養する。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℃で静置した後、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、TCID₅₀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は10^{5.5}TCID₅₀以上、プレート法では10^{5.1}TCID₅₀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4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の試験に用いた犬を用いる。

3.7.11.1.1.2 中和試験用ウイルス

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5倍階段希釈する。各希釈血清と0.1mL中約200TCID₅₀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ED₅₀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の試験に用いた犬を用いる。

3.7.11.2.1.2 中和試験用ウイルス

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200TCID₅₀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ED₅₀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の試験に用いた犬を用いる。

3.7.11.3.1.2 中和試験用ウイルス

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200TCID₅₀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ED₅₀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 の試験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200TCID₅₀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、さらに、この混合液と等量のVAD6.0液(付記10)で濃度を調整した0.3～0.5vol%豚赤血球浮遊液を添加し、2～5℃で静置した後、赤血球凝集の有無を観察する。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。

3.7.11.4.3 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ED₅₀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 犬レプトスピラ病力価試験

3.7.11.5.1 試験材料

3.7.11.5.1.1 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。

3.7.11.5.1.2 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。

3.7.11.5.1.3 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・ヘブドマデイスの生菌浮遊液を用いる。

3.7.11.5.2 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、凝集反應用菌液を用いて、溶菌凝集反応を行う。

3.7.11.5.3 判定

L・カニコーラ及びL・コペンハーゲニーの菌液に対しては80%以上が8倍以上の凝集価を、L・ヘブドマデイスに対しては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液で免疫した兎又は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液で免疫した兎又は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・ヘブドマデイス血清

L・ヘブドマデイスの不活化菌液で免疫した兎又は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

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 7.0 ~ 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 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、試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの。

付記 7 抗犬アデノウイルス (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、試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの。

付記 8 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、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 9 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、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 10 VAD6.0 液

1,000mL 中

塩化ナトリウム 8.77 g

無水リン酸水素二ナトリウム 5.68 g

リン酸二水素ナトリウム二水和物 40.56 g

水 残 量

ホウ酸緩衝食塩液と等量混合して pH を 6.0 に調整する。

(別紙2)

○農林水産省告示第二千五号

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。

平成二十四年八月十日

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は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。）の部の豚インフルエンザ（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。

豚インフルエンザ不活化ワクチン（油性アジュバント加溶解用液）

豚インフルエンザウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化した後凍結乾燥したもの（以下この項において「乾燥ワクチン」という。）で、使用時に油性アジュバントを含む溶解用液で溶解するワクチンである。

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 注射材料

乾燥ワクチンを溶解用液と同量のリン酸緩衝食塩液で溶解したものを注射材料とする。

1.2.1.2 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。

1.2.2 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℃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。

1.2.3 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。

試験品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。

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。

1.4.1.2 試験動物

4 週齢のマウスを用いる。

1.4.1.3 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亜型のウイルスで調製した赤血球凝集抗原（付記）を用いる。

1.4.2 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加え、室温で 60 分間処理する。これに 0.5vol % の鶏の赤血球浮遊液を 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。

1.4.3 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、H1N1 亜型及び H3N2 亜型で8倍以上でなければならない。

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/Iowa/08/00 (H1N1) 株及び A/swine/Iowa/06/00 (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、それぞれ調製したもの。

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（アジュバント・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（カルボキシビニルポリマーアジュバント・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又はこれを濃縮したものを不活化し、カルボキシビニルポリマー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を準用して試験するとき、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 0.2mL 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）を注射材料とする。

1.3.1.2 試験動物

6～7 週齢の ICR 系雌マウスを用いる。

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

固相化抗原（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 ずつ皮下に注射する。注射後 2 週間目に、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 3）で 100 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 μ 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 100 倍に希釈したものを抗原吸着プレートの 4 穴に 100 μ L ずつ加える。37℃で 30 分間反応させた後、洗浄液（付記 6）で 4 回洗浄する。次に、各穴に標識抗体（付記 7）を 100 μ L ずつ加え、37℃で 30 分間反応させた後、洗浄液で 4 回洗浄する。基質液（付記 8）を各穴に 100 μ L ずつ加え、37℃で 20 分間遮光して反応させた後、1 w/v % ドデシル硫酸ナトリウム溶液を各穴に 100 μ L ずつ加えて反応を停止させ、波長 405nm で各穴の吸光度を測定する。

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。ただし、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平均吸光度値を下回った場合であっても、両者に有意差がない場合は、適合とする（片側 t 検定、 $P \geq 0.05$ ）。

また、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、参照陽性血清の平均吸光度値

は 0.5 ~ 1.0 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又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、カルボキシビニルポリマー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 固相化抗原

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遠心集菌し、TNE 液 (付記 9) で菌体を洗浄する。洗浄菌体をたん白質濃度が $200 \mu\text{g/mL}$ となるように濃度を調整したもの。凍結して -20°C 以下又は凍結乾燥して 10°C 以下で保存する。

付記 3 希釈液

1,000mL 中

トリス緩衝食塩液 (付記 10)

100 mL

牛血清アルブミン

1.0 g

ポリソルベート 20

0.5 mL

豚血清 (付記 11)

20 mL

水

残 量

用時調製する。

付記 4 抗原吸着プレート

固相化抗原を炭酸緩衝液 (付記 12) でたん白量が $10 \mu\text{g/mL}$ となるように濃度を調整したものを 96 穴マイクロプレートの各穴に $100 \mu\text{L}$ ずつ加え、 37°C で 1 時間反応させた後、 $2\sim 7^\circ\text{C}$ で 18 時間反応させ、洗浄液で 4 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の培養菌液又はこれを濃縮したものを不活化し、カルボキシビニルポリマー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免疫したマウスの血清であって、希釈液で 100 倍に希釈して ELISA を行うとき、平均吸光度値が 0.5 ~ 1.0 となるように濃度を調整したもの。凍結して -20°C 以下又は凍結乾燥して 10°C 以下で保存する。

付記 6 洗浄液

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

0.253 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

3.0 mL

水

残 量

pH を 7.1 ~ 7.3 に調整する。

付記 7 標識抗体

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 8 基質液

A 液 : 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 0.3g/L グリシン加クエン酸緩衝液で溶解したもの。

B 液 : 0.02w/v % 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 9 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 10 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	60.55 g
塩化ナトリウム	87.66 g
無水エデト酸ナトリウム	3.72 g
水	残量

pH を 7.3 ~ 7.5 に調整する。

付記 11 豚血清

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ補体結合反応の抗体価が 64 倍以下の豚血清。

付記 12 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 ~ 9.8 に調整する。

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部の豚インフルエンザ・豚丹毒混合（油性アジュバント加）不活化ワクチンの項の次に次のように加える。

豚サーコウイルス（2型・組換え型）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・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

組換え DNA 技術を応用して製造された豚サーコウイルス 2 型オープンリーディングフレーム 2（以下この項において「PCV2ORF2」という。）遺伝子を挿入したバキュロウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化し、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（以下この項において「PCV2 ワクチン」という。）とマイコプラズマ・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（以下この項において「Mhp 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

PCV2 ワクチンと Mhp ワクチンそれぞれを試験品として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

PCV2 ワクチンと Mhp ワクチンそれぞれを注射材料とする。

1.2.1.2 試験動物

3～5 週齢の豚を用いる。

1.2.2 試験方法

注射材料 2 頭分ずつを 2 頭の試験動物の左右の頸部筋肉内にそれぞれ注射し、21 日間観察する。

1.2.3 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。

1.3 力価試験

1.3.1 豚サーコウイルス 2 型感染症力価試験

1.3.1.1 試験材料

PCV2 ワクチン、参照ワクチン（付記 1）、陰性対照（付記 2）、陽性対照（付記 3）、抗 PCV2ORF2 豚 IgG（付記 4）、抗 PCV2ORF2 モノクローナル抗体（付記 5）及び酵素標識抗体（付記 6）を用いる。

1.3.1.2 試験方法

1.3.1.2.1 酵素抗体反応（以下この項において「ELISA」という。）用固相化プレートの作製

抗 PCV2ORF2 豚 IgG を吸着用緩衝液（付記 7）で 5,000～6,000 倍に希釈したものを 100 μ L ずつ 96 穴 ELISA プレートに分注し、35～39 $^{\circ}$ C で 1 夜静置する。洗浄・希釈液（付記 8）で 3 回洗浄し、ブロッキング液（付記 9）を 250 μ L ずつ加え、35～39 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させる。この固相化プレートを洗浄・希釈液で 3 回洗浄し、固相化プレートとする。

1.3.1.2.2 試料等の調整

PCV2 ワクチン、参照ワクチン、陰性対照及び陽性対照を洗浄・希釈液でそれぞれ 30 倍から 2 倍階段希釈した各段階の希釈液を試料とする。

1.3.1.2.3 反応

各試料 100 μ L ずつを固相化プレートの3穴に加え、35～39℃で60分間反応させる。反応後、各穴を洗浄・希釈液で3回洗浄する。洗浄・希釈液で300倍に希釈した抗PCV2ORF2モノクローナル抗体を各穴に100 μ L ずつ分注し、35～39℃で60分間反応させる。反応後、各穴を洗浄・希釈液で3回洗浄する。1 vol %ウサギ血清加希釈用緩衝液（付記10）で5,000～20,000倍に希釈した酵素標識抗体を各穴に100 μ L ずつ分注し、35～39℃で45分間反応させる。反応後、洗浄・希釈液で3回洗浄する。基質液（付記11）を100 μ L ずつ各穴に分注し、室温で15分間反応させる。その後、1 mol/L塩酸溶液を100 μ L ずつ各穴に分注し、反応を停止させる。

1.3.1.2.4 吸光度測定

波長450nmで吸光度を測定する。

1.3.1.3 判定

参照ワクチンの力価を1.0として、PCV2ワクチンの相対力価を統計学的計算方法（付記12）により算出するとき、PCV2ワクチンの相対力価は、1.0～3.75でなければならない。この際、陽性対照の480倍希釈液の平均吸光度は0.998～2.500でなければならない。陰性対照の30倍希釈液の平均吸光度は0.124以下でなければならない。

1.3.2 マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症力価試験

1.3.2.1 試験材料

1.3.2.1.1 注射材料

Mhpワクチンをワクチン希釈液（付記13）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。

1.3.2.1.2 試験動物

6～7週齢のSPFのddY系雌マウスを用いる。

1.3.2.1.3 ELISA用抗原

固相化抗原（付記14）を用いる。

1.3.2.2 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週間目に、試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、ELISAを行う。

試験群及び対照群の血清並びに参照陽性血清（付記15）をブロッキング液（付記16）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（付記17）の穴に100 μ 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℃で1時間反応させた後、洗浄液（付記18）で3回洗浄する。次に、ブロッキング液で至適濃度に希釈した酵素標識抗体を各穴に100 μ L ずつ加え、37℃で1時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄する。その後、基質液を各穴に100 μ 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 μ 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。

1.3.2.3 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、全て抗体価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。

付記1 参照ワクチン

PCV2ワクチンであって、動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

付記 2 陰性対照

Spodoptera frugiperda 細胞培養液に PCV2 ワクチンのアジュバントを 20vol %含むもの。

付記 3 陽性対照

PCV2 ワクチンの製造方法で製造されたもので、PCV2ORF2 抗原液を 80vol %及びアジュバントを 20vol %含むもの。

付記 4 抗 PCV2ORF2 豚 IgG

PCV2 ワクチンで免疫した CDCD (帝王切開由来初乳未摂取) 豚血清から精製した抗 PCV2ORF2 豚 IgG であって、間接蛍光抗体価が 1,500 倍以上のもの。

付記 5 抗 PCV2ORF2 モノクローナル抗体

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細胞 6C4-2-4A3-5D10 の培養上清

付記 6 酵素標識抗体

ペルオキシダーゼ標識した抗マウス IgG (H+L) 山羊血清

付記 7 吸着用緩衝液

1,000mL 中

炭酸水素ナトリウム

2.93 g

炭酸ナトリウム

1.59 g

水

残量

pH を 9.5 ~ 9.7 に調整する。

付記 8 洗浄・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

リン酸水素二ナトリウム、無水

1.15 g

リン酸二水素カリウム

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 9 ブロッキング液

洗浄・希釈液に脱脂粉乳を 5.0w/v %になるように加えたもの。

付記 10 1 vol % ウサギ血清加希釈用緩衝液

洗浄・希釈液にウサギ正常血清を 1 vol %になるように加えたもの。

付記 11 基質液

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

B 液: クエン酸緩衝液に 0.02vol %過酸化水素水を含む液

使用時に A 液と B 液を等量混合して用いる。

付記 12 統計学的計算方法

動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

付記 13 ワクチン希釈液

0.5w/v %カルボキシビニルポリマー液 (付記 19) を生理食塩液で 5 倍に希釈したもの。

付記 14 固相化抗原

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約 173 μ g/mL となるように調製した抗原。

付記 15 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、1.3.2 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 16 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、200nm 以下のフィルターでろ過滅菌する。

付記 17 抗原吸着プレート

マイコプラズマ固相化抗原をトリス緩衝食塩液 (付記 20) で 25 倍に希釈し、96 穴 ELISA プレートの各穴に 100 μ 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 μ 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 18 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 19 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 $^{\circ}$ C で 30 分間高圧滅菌する。

付記 20 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
塩化ナトリウム
水
pHを7.2～7.4に調整する。

2.42 g

8.77 g

残量

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の次に次のように加える。

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

サルモネラ・インファンティス（以下この項において「SI」という。）、サルモネラ・エンテリティディス（以下この項において「SE」という。）及びサルモネラ・ティフィムリウム（以下この項において「ST」という。）のそれぞれの培養菌液を不活化し、濃縮したものを混合し、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 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

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。

1.2.2 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頸背部中央皮下に注射する。対照群と共に 4 週間観察を行い、観察終了時に注射部位を剖検する。

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。また、剖検したとき、注射局所に著しい異常を認めてはならない。

1.3 力価試験

1.3.1 鶏サルモネラ症 (SI) 力価試験

1.3.1.1 試験材料

1.3.1.1.1 試験動物

1.2 の試験に使用した試験動物を用いる。

1.3.1.1.2 凝集反应用抗原

SI 凝集反应用抗原（付記 1）を用いる。

1.3.1.2 試験方法

1.2 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、56℃で 30 分間非働化した後、マイクロタイター法で凝集反応を行う。

試験群の血清、SI 参照陽性血清（付記 2）、SE 参照陽性血清（付記 3）及び ST 参照陽性血清（付記 4）を 25w/v %カオリン加里ン酸緩衝食塩液（付記 5）と等量混合し、37℃で 1 時間反応させた後、9,500G で 5 分間遠心して採取した上清、未処理の対照群の血清及び未処理の参照陰性血清（付記 6）を試料とする。各々の試料を生理食塩液で 5 倍に希釈した後、更に生理食塩水で 2 倍階段希釈し、各希釈血清に SI 凝集反应用抗原を等量加え、振とう混合後、37℃で 2 時間感作する。感作終了後、4℃で 1 夜静置した後、凝集像を観察する。

1.3.1.3 判定

完全凝集の認められた血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群の血清の抗体価の幾何平均値は、100 倍以上でなければならない。この場合、対照群の抗体価は、いずれも 5 倍未満でなければならない。また、SI 参照陽性血清の抗体価は 640 ~ 1,280 倍、SE 参照陽性血清及び ST 参照陽性血清の抗体価はいずれも 10 倍以下で、参照陰性血清の抗体価は 5 倍未満でなければならない。

1.3.2 鶏サルモネラ症 (SE) 力価試験

1.3.2.1 試験材料

1.3.2.1.1 試験動物

1.2 の試験に使用した試験動物を用いる。

1.3.2.1.2 凝集反应用抗原

「ひな白痢急速診断用菌液」を用いる。

1.3.2.2 試験方法

1.2 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、56 °C で 30 分間非働化した後、マイクロタイター法で凝集反応を行う。

試験群の血清、対照群の血清、SI 参照陽性血清、SE 参照陽性血清、ST 参照陽性血清及び参照陰性血清を生理食塩液で 5 倍に希釈した後、更に生理食塩水で 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 °C で 2 時間感作する。感作終了後、4 °C で 1 夜静置した後、凝集像を観察する。

1.3.2.3 判定

完全凝集の認められた血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群の血清の抗体価の幾何平均値は、100 倍以上でなければならない。この場合、対照群の抗体価は、いずれも 5 倍未満でなければならない。また、SE 参照陽性血清の抗体価は 640 ~ 1,280 倍、ST 参照陽性血清の抗体価は 160 倍以下で、SI 参照陽性血清及び参照陰性血清の抗体価はいずれも 5 倍未満でなければならない。

1.3.3 鶏サルモネラ症 (ST) 力価試験

1.3.3.1 試験材料

1.3.3.1.1 試験動物

1.2 の試験に使用した試験動物を用いる。

1.3.3.1.2 凝集反应用抗原

ST 凝集反应用抗原 (付記 7) を用いる。

1.3.3.2 試験方法

1.2 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、1.3.1.2 と同様の方法で凝集反応を行う。ただし、凝集反应用抗原には ST 凝集反应用抗原を用いる。

1.3.3.3 判定

完全凝集の認められた血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群の血清の抗体価の幾何平均値は、100 倍以上でなければならない。この場合、対照群の抗体価は、いずれも 5 倍未満でなければならない。また、ST 参照陽性血清の抗体価は 640 ~ 1,280 倍、SE 参照陽性血清の抗体価は 160 倍以下、SI 参照陽性血清の抗体価は 10 倍未満で、参照陰性血清の抗体価は 5 倍未満でなければならない。

付記 1 SI 凝集反应用抗原

SI KUVZ-0005 株又はこれと同等の抗原性を有する株のホルマリン不活化菌液を 100 °C で 15 分間加熱処理し、0.2vol %ホルマリン加里ン酸緩衝食塩液に浮遊させたもので、波長 650nm の吸光度値が 0.15 程度になるように生理食塩液で希釈して 1.3.1.2 の凝集反応試験を行うとき、

SI、SE 及び ST 参照陽性血清並びに参照陰性血清の凝集抗体価が所定の値を示すことを確認したものの。

付記 2 SI 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 SI KUVZ-0005 株又はこれと同等の抗原性を有する株で免疫して得た血清を非働化したものであって、1.3.1.2 の試験により凝集反応試験を行うとき抗体価は 640 ~ 1,280 倍を示し、1.3.2.2 の試験により凝集反応試験を行うとき抗体価は 5 倍未満を示し、1.3.3.2 の試験により凝集反応試験を行うとき抗体価は 10 倍未満を示す。凍結して -20 °C 以下又は凍結乾燥して 10 °C 以下で保存する。

付記 3 SE 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 SE KUVZ-0792 株又はこれと同等の抗原性を有する株で免疫して得た血清を非働化したものであって、1.3.1.2 の試験により凝集反応試験を行うとき抗体価は 10 倍以下を示し、1.3.2.2 の試験により凝集反応試験を行うとき抗体価は 640 ~ 1,280 倍を示し、1.3.3.2 の試験により凝集反応試験を行うとき抗体価は 160 倍以下を示す。凍結して -20 °C 以下又は凍結乾燥して 10 °C 以下で保存する。

付記 4 ST 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 ST KUVZ-0301 株又はこれと同等の抗原性を有する株で免疫して得た血清を非働化したものであって、1.3.1.2 の試験により凝集反応試験を行うとき抗体価は 10 倍以下を示し、1.3.2.2 の試験により凝集反応試験を行うとき抗体価は 160 倍以下を示し、1.3.3.2 の試験により凝集反応試験を行うとき抗体価は 640 ~ 1,280 倍を示す。凍結して -20 °C 以下又は凍結乾燥して 10 °C 以下で保存する。

付記 5 25w/v %カオリン加リン酸緩衝食塩液

1,000mL 中

カオリン

250.0 g

リン酸緩衝食塩液

残 量

付記 6 参照陰性血清

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏の血清を非働化したものであって、1.3.1.2、1.3.2.2 及び 1.3.3.2 の試験により凝集反応試験を行うとき、抗体価がいずれも 5 倍未満を示すもの。凍結して -20 °C 以下又は凍結乾燥して 10 °C 以下で保存する。

付記 7 ST 凝集反应用抗原

ST KUVZ-0301 株又はこれと同等の抗原性を有する株のホルマリン不活化菌液を 100 °C で 15 分間加熱処理し、0.2vol %ホルマリン加リン酸緩衝食塩液に浮遊させたもので、波長 650nm の吸光度値が 0.15 程度になるように生理食塩液で希釈して 1.3.3.2 の凝集反応試験を行うとき、SI 参照陽性血清、SE 参照陽性血清及び ST 参照陽性血清並びに参照陰性血清の凝集抗体価が所定の値を示すことを確認したものの。

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・ガリセプチカム感染症・マイコプラズマ・シノビエ感染症混合生ワクチン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・マイコプラズマ・シノビエ感染症混合生ワクチン

弱毒マイコプラズマ・ガリセプチカムの培養菌液を凍結乾燥したワクチン（以下「マイコプラズマ・ガリセプチカム乾燥ワクチン」という。）と、弱毒マイコプラズマ・シノビエの培養菌液を凍結乾燥したワクチン（以下「マイコプラズマ・シノビエ乾燥ワクチン」という。）とを組み合わせたワクチンである。

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 マイコプラズマ・ガリセプチカム

1.2.1.1 試験材料

1.2.1.1.1 試料

試験品のマイコプラズマ・ガリセプチカム乾燥ワクチン 1,000 羽分を 30mL の希釈用培地 1（付記 1）で溶解し、10 倍階段希釈したものを試料とする。

1.2.1.1.2 培地

希釈用培地 1 と寒天培地 1（付記 2）を用いる。

1.2.1.2 試験方法

試料の 25 μ L を 2 枚の寒天培地 1 に接種し、37 $^{\circ}$ C、5 vol % 炭酸ガス下で 14 日間培養する。

1.2.1.3 判定

形成された集落数から生菌数を算出する。試験品の生菌数は、1 羽分当たり $10^{6.9}$ 個以上でなければならない。

1.2.2 マイコプラズマ・シノビエ

1.2.2.1 試験材料

1.2.2.1.1 試料

試験品のマイコプラズマ・シノビエ乾燥ワクチン 1,000 羽分を 30mL の希釈用培地 2（付記 3）で溶解し、10 倍階段希釈したものを試料とする。

1.2.2.1.2 培地

希釈用培地 2 と寒天培地 2（付記 4）を用いる。

1.2.2.2 試験方法

試料の 25 μ L を 2 枚の寒天培地 2 に接種し、37 $^{\circ}$ C、5 vol % 炭酸ガス下で 14 日間培養する。

1.2.2.3 判定

形成された集落数から生菌数を算出する。試験品の生菌数は、1 羽分当たり $10^{6.6}$ 個以上でなければならない。

1.3 安全試験

1.3.1 試験材料

1.3.1.1 接種材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で 0.1mL 当たり 10 羽分となるように調整したものを接種材料とする。

1.3.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 2～3 週齢の鶏を用いる。

1.3.2 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 0.1mL を試験群に点眼接種し、対照群とともに 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。

1.3.3 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。

1.4 力価試験

1.4.1 マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症力価試験

1.4.1.1 試験材料

1.4.1.1.1 接種材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で 0.03mL 当たり 1 羽分となるように調整したものを接種材料とする。

1.4.1.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 2～3 週齢の鶏を用いる。

1.4.1.1.3 凝集反応抗原

マイコプラズマ・ガリセプチカム不活化抗原（付記 5）を用いる。

1.4.1.2 試験方法

試験動物 10 羽を試験群とし、3 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する。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、凝集反応抗原を用いて凝集反応を行う。

1.4.1.3 判定

試験群の 70 % 以上が 3 分以内に凝集反応陽性を示さなければならない。この場合、対照群は、全て凝集反応陰性でなければならない。

1.4.2 マイコプラズマ・シノピエ感染症力価試験

1.4.2.1 試験材料

1.4.2.1.1 接種材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で 0.03mL 当たり 1 羽分となるように調整したものを接種材料とする。

1.4.2.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 2～3 週齢の鶏を用いる。

1.4.2.1.3 凝集反応抗原

マイコプラズマ・シノピエ不活化抗原（付記 6）を用いる。

1.4.2.2 試験方法

試験動物 10 羽を試験群とし、3 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する。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、凝集反応抗原を用いて凝集反応を行う。

1.4.2.3 判定

試験群の 70 % 以上が 3 分以内に凝集反応陽性を示さなければならない。この場合、対照群は、全て凝集反応陰性でなければならない。

付記 1 希釈用培地 1

1,000mL 中

プロテオーゼ・ペプトン

7.4 g

イーストエキストラクト

2.5 g

デキストロース

4.0 g

塩化ナトリウム

5.0 g

リン酸水素二ナトリウム二水和物	1.8 g
フェノールレッド	15 mg
水	残量

pH を 8.2 に調整した後、ろ過滅菌する。

付記 2 寒天培地 1

100mL 中

付記 1 からフェノールレッドを除いたもの	90 mL
バクトアガー	1.0 g

高压滅菌後冷却し、正常豚血清を 10mL 加える。

付記 3 希釈用培地 2

1,000mL 中

プロテオーゼ・ペプトン	7.4 g
イーストエキストラクト	2.5 g
デキストロース	4.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
リン酸水素二ナトリウム二水和物	1.8 g
フェノールレッド	15 mg
ニコチンアミド	100 mg
水	残量

pH を 8.2 に調整した後、ろ過滅菌する。

付記 4 寒天培地 2

100mL 中

付記 3 からフェノールレッド及びニコチンアミドを除いたもの	90 mL
バクトアガー	1.0 g

高压滅菌後冷却し、ニコチンアミド 10mg 及び正常豚血清を 10mL 加える。

付記 5 マイコプラズマ・ガリセプチカム不活化抗原

マイコプラズマ・ガリセプチカム S6 株の液体培養菌液から集菌し、生菌数が約 10^{10} 個/mL となるようにリン酸緩衝食塩液で調整した後、チメロサルで不活化してクリスタルバイオレットで染色したもの。

マイコプラズマ・ガリセプチカム S6 株又はこれと同等と認められた株の免疫血清を用いて血清平板凝集反応を行うとき、3分以内に凝集を認め、非免疫対照鶏及びマイコプラズマ・シノビエで免疫した鶏の血清では3分以内に凝集を認めない。

付記 6 マイコプラズマ・シノビエ不活化抗原

マイコプラズマ・シノビエ SG 株の液体培養菌液から集菌し、生菌数が約 10^{10} 個/mL となるようにリン酸緩衝食塩液で調整した後、チメロサルで不活化してクリスタルバイオレットで染色したもの。

マイコプラズマ・シノビエ SG 株又はこれと同等と認められた株の免疫血清を用いて血清平板凝集反応を行うとき、3分以内に凝集を認め、非免疫対照鶏及びマイコプラズマ・ガリセプチカムで免疫した鶏の血清では3分以内に凝集を認めない。

ワクチン（シードロット製剤を除く。）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（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・イクテロヘモラジー・グリッポチフォーサ・ポモナ）混合（アジュバント加）ワクチン

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及び弱毒犬パルボ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とレプトスピラ・カニコーラ、レプトスピラ・イクテロヘモラジー、レプトスピラ・グリッポチフォーサ及びレプトスピラ・ポモナの全培養菌液を濃縮し、不活化したものの混合液を凍結乾燥したワクチン（以下この項において「混合乾燥ワクチン」という。）並びに犬コロナウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化し、アルミニウム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。）と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

液状不活化ワクチンと同量の精製水で混合乾燥ワクチンを溶解したのについて、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1、2.5.1 及び 2.6.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、中和用抗血清は、抗ジステンパーウイルス血清（付記1）、抗犬アデノウイルス（2型）血清（付記2）、抗犬パラインフルエンザウイルス血清（付記3）及び抗犬パルボウイルス血清（付記4）をそれぞれ非働化したものを用いる。

1.3 ウイルス含有量試験

1.3.1 ジステンパーウイルス含有量試験

1.3.1.1 試験材料

1.3.1.1.1 試料

混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の精製水で溶解したものを試験品とし、各抗血清（付記2から4まで）を非働化したもので試験品中のジステンパーウイルス以外のウイルスを中和する。これをウイルス増殖用培養液（付記5）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

1.3.1.1.2 培養細胞

犬腎株化細胞を用いる。

1.3.1.1.2 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日間培養し、観察する。

1.3.1.1.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{3.5}TCID₅₀以上でなければならない。

1.3.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験

1.3.2.1 試験材料

1.3.2.1.1 試料

混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の精製水で溶解したものを試験品とし、各抗血清（付記 1、3 及び 4）を非働化したもので試験品中の犬アデノウイルス（2 型）以外のウイルスを中和する。これをウイルス増殖用培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

1.3.2.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

1.3.2.2 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 °C で 10 日間培養し、観察する。

1.3.2.3 判定

培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たり 10^{5.5}TCID₅₀ 以上でなければならない。

1.3.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

1.3.3.1 試験材料

1.3.3.1.1 試料

混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の精製水で溶解したものを試験品とし、各抗血清（付記 1、2 及び 4）を非働化したもので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を中和する。これをウイルス増殖用培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

1.3.3.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

1.3.3.2 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 °C で 10 日間培養し、観察する。

培養後、培養液を除き、培養液と等量の 0.5vol % モルモット赤血球浮遊液を等量加え、4 °C で 60 分間静置し、観察する。

1.3.3.3 判定

培養細胞に赤血球の吸着を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たり 10^{5.5}TCID₅₀ 以上でなければならない。

1.3.4 犬パルボウイルス含有量試験

1.3.4.1 試験材料

1.3.4.1.1 試料

混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の精製水で溶解したものを試験品とし、各抗血清（付記 1 から 3 まで）を非働化したもので試験品中の犬パルボウイルス以外のウイルスを中和する。これをウイルス増殖用培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

1.3.4.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

1.3.4.2 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 °C 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 °C 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 6）を加え、更にこの混合液と等量の VAD6.0 液（付記 7）で濃度を調整した 0.5vol % 豚赤血球浮遊液を加え、4 °C で 1 夜静置後、赤血球凝集の有無を観察する。

1.3.4.3 判定

培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。試験品のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{6.4}TCID₅₀ 以上でなければならない。

1.4 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。

1.5 不活化試験

1.5.1 試験材料

1.5.1.1 試料

液状不活化ワクチン 2 mL を 100 倍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。

1.5.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

1.5.2 試験方法

試料を 25cm² 以上の培養細胞 2 本に 1 mL ずつ接種し、37℃で1時間吸着させた後、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を洗浄する。ウイルス増殖用培養液を加えて 37℃で5日間培養した後、接種した培養細胞を継代し、7日間培養し観察する。

1.5.3 判定

培養細胞に CPE を認めてはならない。

1.6 犬コロナウイルス感染症力価試験

1.6.1 試験材料

1.6.1.1 注射材料

液状不活化ワクチンを注射材料とする。

1.6.1.2 試験動物

体重約 300g のモルモットを用いる。

1.6.1.3 中和試験用ウイルス

適当と認められた犬コロナウイルス株を用いる。

1.6.1.4 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

1.6.2 試験方法

試験動物 5 匹を試験群、2 匹を対照群とする。試験群に注射材料 1 mL ずつを 3 週間間隔で 2 回筋肉内注射し、2 回目注射後 7 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。各希釈血清と 50 μ L 中約 200TCID₅₀ の中和試験用ウイルス液を混合し、37℃で 60 分間処理する。各混合液 50 μ L ずつをそれぞれ 4 穴以上の培養細胞浮遊液に接種し、37℃で 6 日間培養し、観察する。

1.6.3 判定

培養細胞の 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を中和抗体価とする。

試験群の抗体価は、80 % 以上が 8 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、2 倍未満でなければならない。

付記 1 抗ジステンパーウイルス血清

犬ジステンパーウイルスで免疫した兎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 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、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、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 抗犬パルボウイルス血清

犬パルボ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、試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの。

付記5 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中

牛血清

10 ~ 20 mL

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 ~ 7.6 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記6 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のち、水酸化ナトリウムで pH9.0 に調整する。

付記7 VAD6.0 液

1,000mL 中

塩化ナトリウム

8.77 g

リン酸水素二ナトリウム

5.68 g

リン酸二水素ナトリウム(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 pH6.0 に調整する。

ワクチン（シードロット製剤）の部の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）の項の次に次のように加える。

牛伝染性鼻気管炎・牛パラインフルエンザ混合生ワクチン（シード）

シードロット基準に適合した弱毒牛伝染性鼻気管炎ウイルス及び弱毒牛パラインフルエンザ3型ウイルスをそれぞれ同基準に適合した培養細胞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。

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 牛伝染性鼻気管炎ウイルス

1.2.1.1 試験材料

1.2.1.1.1 試料

試験品中の牛パラインフルエンザ3型ウイルスを抗牛パラインフルエンザ3型ウイルス血清（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

牛腎株化NLBK-6細胞を96穴プレートに1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

1.2.1.2 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、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、TCID₅₀を算出する。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{5.0}TCID₅₀以上でなければならない。

1.2.2 牛パラインフルエンザ3型ウイルス

1.2.2.1 試験材料

1.2.2.1.1 試料

試験品中の牛伝染性鼻気管炎ウイルスを抗牛伝染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。

1.2.2.2 培養細胞

牛腎株化NLBK-6細胞を96穴プレートに1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

1.2.2.2 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、37℃で7日間培養し、観察する。

1.2.2.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{5.2}TCID₅₀以上でなければならない。

1.3 安全試験

1.3.1 牛接種試験

1.3.1.1 試験材料

1.3.1.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

1.3.1.1.2 試験動物

体重 80 ～ 200kg の牛を用いる。

1.3.1.2 試験方法

接種材料 1 頭分を 1 頭の試験動物の鼻腔内に接種し、14 日間観察する。

1.3.1.3 判定

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

1.3.2 乳のみマウス注射試験

1.3.2.1 試験材料

1.3.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.3.2.1.2 試験動物

3 日齢以内の乳のみマウスを用いる。

1.3.2.2 試験方法

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

1.3.2.3 判定

観察期間中、異常を認めてはならない。

事故のため試験動物が半数未満になった場合は、試験を反復する。

1.4 力価試験

1.4.1 牛伝染性鼻気管炎力価試験

1.4.1.1 試験材料

1.4.1.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

1.4.1.1.2 試験動物

体重約 300g のモルモットを用いる。

1.4.1.1.3 中和試験用ウイルス

牛腎株化 NLBK-6 細胞で増殖させた弱毒牛伝染性鼻気管炎ウイルス RLB106 株を用いる。

1.4.1.1.4 培養細胞

牛腎株化 NLBK-6 細胞を 96 穴プレートに 1 ～ 3 日間培養し、単層となったものを用いる。

1.4.1.2 試験方法

接種材料 1.0mL ずつを 5 匹の試験動物の頸部皮下に 2 週間隔で 2 回注射し、第 2 回目の注射後 2 週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 0.2mL 中約 200TCID₅₀ の中和試験用ウイルス液 0.5mL とを混合し、室温で 60 分間処理する。この混合液 0.2mL ずつを 2 穴以上の培養細胞に接種し、37 °C、5 vol % 炭酸ガス下で 7 日間培養し、観察する。

1.4.1.3 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 ED₅₀ で求める。

中和抗体価 16 倍以上を中和抗体陽性とする。試験動物の中和抗体陽性率は、80 % 以上でなければならない。

1.4.2 牛パラインフルエンザ力価試験

1.4.2.1 試験材料

1.4.2.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

1.4.2.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

1.4.2.1.3 赤血球凝集抗原

牛パラインフルエンザ 3 型赤血球凝集抗原 (付記 4) を用いる。

1.4.2.2 試験方法

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

被検血清 0.2mL にレセプター破壊酵素 (RDE) 液 0.2mL を加え、37°C で 18 時間処理した後、56°C で 30 分間処理し、反応を停止させる。この処理血清をゼラチン・アルブミン加ペロナール緩衝食塩液 (以下この項において「希釈液」という。) (付記 5) を用いて 2 倍階段希釈する。各希釈血清 50 μ L に 4 単位の赤血球凝集抗原 50 μ L を加え、室温で 60 分間処理した後、希釈液で濃度を調整した 0.3vol % モルモット赤血球浮遊液 50 μ L を加え、4°C で 1 夜静置し、観察する。

1.4.2.3 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 16 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。

付記 1 抗牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス血清

牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス RLB103 株又は適当と認められた株で免疫した羊又は兔の血清であって、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・プロス	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 3 抗牛伝染性鼻気管炎ウイルス血清

牛伝染性鼻気管炎ウイルス RLB106 株又は適当と認められた株で免疫した羊又は兔の血清であって、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 牛パラインフルエンザ 3 型赤血球凝集抗原

牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス RLB103 株を NLBK-6 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ものであって、赤血球凝集価が 32 単位以上のもの。

付記 5 ゼラチン・アルブミン加ペロナール緩衝食塩液

A 液 ペロナール緩衝食塩液

1,000mL 中

塩化ナトリウム	8.5 g
---------	-------

バルビタール	0.575 g
--------	---------

バルビタールナトリウム	0.375 g
-------------	---------

無水塩化カルシウム	0.028 g
-----------	---------

塩化マグネシウム六水和物	0.168 g
--------------	---------

水	残 量
---	-----

B 液 1 w/v % ゼラチン液

100mL 中

精製ゼラチン	1 g
--------	-----

水 残量
使用時加温溶解する。
C液 5 w/v %牛血清アルブミン液
100mL 中
牛血清アルブミン 5 g
水 残量
使用時に、A液 200mL にB液 0.2mL 及びC液 4 mL を加えて調製し、用いる。

牛レプトスピラ病（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

シードロット規格に適合したレプトスピラ・ボルグピータセニイ血清型ハージョ（以下この項において「レプトスピラ・ハージョ」という。）の培養菌液を不活化し、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。

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 により試験を行い、これに適合しなければならない。ただし、体重測定は、4 日目に行う。

1.3 力価試験

1.3.1 試験材料

1.3.1.1 注射材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で 10 倍希釈したものを注射材料とする。

1.3.1.2 試験動物

体重約 300g のモルモットを用いる。

1.3.1.3 凝集反应用菌液

レプトスピラ凝集反应用菌液（付記 1）を用いる。

1.3.2 試験方法

注射材料 1 mL ずつを 10 匹のモルモットの頸部皮下に 7 日間隔で 2 回注射する。2 回目注射後 14 日目に得られた各個体の血清について、レプトスピラ・ハージョに対する凝集抗体価を、レプトスピラ凝集反应用菌液を用いて、マイクロプレート生菌凝集反応により測定する。

被検血清、参照陽性血清（付記 2）及び参照陰性血清（付記 3）を 56 °C で 30 分間処理する。これを 96 穴平底マイクロプレートを用いて、力価試験用 EMJH 基礎培地（付記 4）で 2 倍階段希釈し、各段階の希釈液 50 μ L に凝集反应用菌液を等量ずつ加え、30 °C で 2 ~ 4 時間処理する。

1.3.3 判定

プレートの各穴を暗視野顕微鏡で観察し、菌の凝集を認めた血清の最高希釈倍数を凝集抗体価とする。凝集抗体価が 32 倍以上のとき、凝集抗体陽性とする。

試験動物の凝集抗体陽性率は、70 % 以上でなければならない。また、参照血清は、所定の抗体価を示さなければならない。

付記 1 レプトスピラ凝集反应用菌液

レプトスピラ・ハージョ凍結保存菌液（付記 5）から調製したものを新鮮生菌浮遊液とする。

凍結保存菌液を速やかに融解し、力価試験用 EMJH 培地（付記 6）に接種し、30 °C、40 回転/分で 4 ~ 8 日間振とう培養する。当該培養後、265G で 10 分間遠心した上清を採取し、波長 600nm で透過率を測定する。力価試験用 EMJH 基礎培地で透過率 87 ~ 88T %（約 2×10^8 個/mL）に調整したものを生菌浮遊液とする。

レプトスピラ凝集反应用菌液及び凍結保存菌液は、病原性レプトスピラであるレプトスピラ・ボルグピータセニイに分類される菌株の浮遊液であり、試験者の安全性を確保し、また、環境への漏出を防止するため、取扱いには注意すること。

付記 2 参照陽性血清

レプトスピラ・ハージョ 181 株又はこれと同等の抗原性を示す株をモルモットに免疫して得られた血清であって、レプトスピラ・ハージョ 181 株又はこれと同等の抗原性を示す株に対して凝集価 32 倍を示すように濃度を調整したもの。小分け後に凍結乾燥して保存する。

付記 3 参照陰性血清

非免疫のモルモット血清であって、レプトスピラ・ハージョに対する凝集抗体価が 2 倍未満のもの。小分け後に凍結乾燥して保存する。

付記 4 力価試験用 EMJH 基礎培地

900mL 中

レプトスピラ・メディウムベース EMJH 2.3 g

水 残量

pH を 7.5 ± 0.2 に調整した後、 121°C で 15 分間高圧滅菌する。

付記 5 レプトスピラ・ハージョ凍結保存菌液

レプトスピラ・ハージョ 181 株又はこれと同等の抗原性を示す株を力価試験用 EMJH 培地で培養した培養菌液にグリセリンを 10 % 加えたもの。小分けして -70°C 以下で保存する。

付記 6 力価試験用 EMJH 培地

1,000mL 中

力価試験用 EMJH 基礎培地 900 mL

アルブミン添加溶液 (付記 7) 100 mL

無菌的に混合する。

付記 7 アルブミン添加溶液

1,000mL 中

アルブミン溶液 (付記 8) 667 mL

硫酸鉄溶液 (付記 9) 100 mL

塩化カルシウム-塩化マグネシウム溶液 (付記 10) 10 mL

ビタミン B12 溶液 (付記 11) 10 mL

ポリソルベート 80 溶液 (付記 12) 62.5 mL

硫酸亜鉛溶液 (付記 13) 10 mL

チアミン溶液 (付記 14) 5 mL

水 残量

各溶液を混合した後、水を加えて 1,000mL とし、ろ過滅菌する。

付記 8 アルブミン溶液

牛アルブミン分画 V

100 g

水 667 mL

4°C で攪拌し、完全に溶解する。

付記 9 硫酸鉄溶液

硫酸鉄七水和物

5 g

水 1,000 mL

付記 10	塩化カルシウム-塩化マグネシウム溶液	
	塩化カルシウム二水和物	20 g
	塩化マグネシウム六水和物	20 g
	水	1,000 mL
付記 11	ビタミン B12 溶液	
	ビタミン B12 (シアノコバラミン)	0.2 g
	水	1,000 mL
付記 12	ポリソルベート 80 溶液	
	ポリソルベート 80	200 mL
	水	800 mL
付記 13	硫酸亜鉛溶液	
	硫酸亜鉛七水和物	4 g
	水	1,000 mL
付記 14	チアミン溶液	
	塩酸チアミン	10 g
	水	1,000 mL

ワクチン（シードロット製剤）の部の牛クロストリジウム・ボツリヌス（C・D型）感染症（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。

日本脳炎・ゲタウイルス感染症混合不活化ワクチン（シード）

動生剤基準のシードロット規格に適合した日本脳炎ウイルス及びゲタウイルスをそれぞれ同規格に適合した株化細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化し、混合したワクチンである。

1 小分製品の試験

1.1 力価試験

1.1.1 日本脳炎力価試験

1.1.1.1 試験材料

1.1.1.1.1 注射材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で4倍に希釈したものを注射材料とする。

1.1.1.1.2 試験動物

2～3週齢のマウスを用いる。

1.1.1.1.2 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）を用いる。

1.1.1.1.3 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。さらに、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倍に希釈したものを0.2mLずつ腹腔内に注射する。試験群及び対照群について、14日間観察する。

1.1.1.1.4 判定

脳炎症状を示して死亡した動物及び生き残っても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LD₅₀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、また、攻撃ウイルスのウイルス量は、0.2mL中10³LD₅₀以下でなければならない。

付記 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週齢のマウスに脳内接種し、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し、原液又は必要に応じて希釈して攻撃に用いる。

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）

動生剤基準の鶏伝染性気管支炎生ワクチン（シード）の3.5.4から3.5.8までに規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。

ワクチン（シードロット製剤）の部のニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎混合生ワクチン（シード）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）

動生剤基準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3.5.4から3.5.9まで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。

ただし、薬事法第83条第1項の規定により読み替えて適用される同法第14条の4第1項の規定により行われる再審査において、同法第83条第1項の規定により読み替えて適用される同法第14条第2項第3号イからハまでのいずれにも該当しないことが確認されたものにあつては、動生剤基準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3.5.7.1に規定するところにより試験を行うものとする。

ワクチン（シードロット製剤）の部のニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎・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・鶏サルモネラ症（サルモネラ・エンテリティディス）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サルモネラ・エンテリティディス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 3～5 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肩部皮下に注射し、対照群とともに 4 週間観察する。

試験最終日に試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、ニューカッスル病ウイルス赤血球凝集抑制試験を行う。

1.1.1.3 判定

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

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

ワクチン（シードロット製剤）の部の狂犬病組織培養不活化ワクチン（シード）の項の次に次のように加える。

犬レプトスピラ病（カニコーラ・イクテロヘモラジー・グリッポチフォーサ・ポモナ）不活化ワクチン（アジュバント加溶解用液）（シード）

シードロット規格に適合したレプトスピラ・カニコーラ、レプトスピラ・イクテロヘモラジー、レプトスピラ・グリッポチフォーサ及びレプトスピラ・ポモナの全培養菌液を濃縮し、不活化したものの混合液を凍結乾燥したもので、使用時にアジュバントを含む溶解用液で溶解するワクチンである。

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を準用して試験するとき、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。

ワクチン（シードロット製剤）の部の猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症2価・猫汎白血球減少症混合ワクチン（シード）の項の次に次のように加える。

猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症3価・ 猫汎白血球減少症混合ワクチン（シード）

シードロット規格に適合した猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス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凍結乾燥したワクチン（以下この項において「生ワクチン」という。）並びに同規格に適合した3種類の猫カリシウイルス及び猫汎白血球減少症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た液状ワクチン（以下この項において「液状不活化ワクチン」という。）とを組み合わせたものである。

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

生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の滅菌精製水で溶解したもの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。

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4本以上の培養細胞に接種し、32℃で60分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を1mLずつに加え、32℃で7日間回転培養し、観察する。

1.2.1.3 判定

培養細胞にCPEが認められたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{5.5}TCID₅₀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法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 猫カリシウイルス力価試験

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

体重約100gのラットを用いる。

1.4.1.1.3 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

1.4.1.1.4 中和試験用ウイルス

猫腎継代細胞で増殖させた猫カリシウイルスのそれぞれの製造用株を用いる。

1.4.1.2 試験方法

試験動物5匹を試験群、2匹を対照群とする。注射材料1頭分ずつを試験群の筋肉内に3週間隔で2回注射し、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中和試験を行う。

被検血清を非働化し、ウイルス増殖用培養液で2倍段階希釈する。各希釈血清と0.1mL中約200TCID₅₀を含む中和試験用ウイルス液とを等量混合し、37℃で60分間処理する。各混合液0.1mLずつをそれぞれ4本の培養細胞に接種し、37℃で60分間吸着した後、混合液を除き、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で7日間回転培養する。

1.4.1.3 判定

CPEの阻止が認められたものを陽性とし、中和抗体価をED₅₀で求める。

試験群の中和抗体価は、幾何平均値で16倍以上でなければならない。この場合、対照群では、2倍未満でなければならない。

1.4.2 猫汎白血球減少症力価試験

1.4.2.1 試験材料

1.4.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.4.2.1.2 試験動物

体重約100gのラットを用いる。

1.4.2.1.3 赤血球凝集抗原

猫汎白血球減少症ウイルス赤血球凝集抗原（付記2）を用いる。

1.4.2.2 試験方法

試験動物5匹を試験群、2匹を対照群とする。注射材料の1頭分ずつを試験群の臀部筋肉内に注射し、3週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赤血球凝集抑制試験を行う。

被検血清を25w/v%カオリン液及び豚赤血球で処理した後、牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液（付記3）で2倍段階希釈する。各希釈血清に8単位の赤血球凝集抗原を加え、常温で60分間処理し、VAD6.0液（付記4）で濃度を調整した0.5vol%豚赤血球浮遊液を加え、2～5℃で1夜静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

1.4.2.3 判定

赤血球凝集の抑制された血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。

試験群の赤血球凝集抑制抗体価は、幾何平均値で128倍以上でなければならない。この場合、対照群では、8倍未満でなければならない。

2 中間製品の試験

2.1 猫カリシウイルス不活化試験

2.1.1 試験材料

2.1.1.1 試料

原液2mLを100倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用いて2～5℃で1夜透析したものを試料とする。

2.1.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

2.1.2 試験方法

試料の全量を25cm²以上の培養細胞に接種し、1時間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液で細胞を洗浄し、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で10日間培養する。

2.1.3 判定

細胞にCPEを認めないとき、活性ウイルス陰性と判定する。

2.2 猫汎白血球減少症ウイルス不活化試験

2.2.1 試験材料

2.1.1に準ずる。

2.2.2 試験方法

試料の全量を3×10⁵個/mLの浮遊細胞5mLを入れた25cm²以上の培養細胞に接種し、37℃で

培養する。細胞が単層を形成した後、ウイルス増殖用培養液に交換し、さらに 10 日間培養する。観察最終日に培養液を採取し、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 で濃度を調整した 0.5 % 豚赤血球浮遊液を加え、赤血球の凝集の有無を観察する。

2.2.3 判定

培養細胞に CPE、培養液に赤血球凝集を認めないとき、活性ウイルス陰性と判定する。

付記 1 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中	
トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
牛胎子血清	20 mL
イーグル MEM	残量
炭酸水素ナトリウムで pH を 7.4 ~ 7.6 に調整する。	
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。	

付記 2 猫汎白血球減少症ウイルス赤血球凝集抗原

猫汎白血球減少症ウイルスを猫腎継代細胞で増殖させて得た培養液又はこれを不活化したものであって、赤血球凝集価が 128 倍以上のもの。

付記 3 牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液

1,000mL 中	
塩化ナトリウム	10.25 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 4 VAD6.0 液

1,000mL 中	
塩化ナトリウム	8.77 g
無水リン酸水素二ナトリウム	5.68 g
リン酸二水素ナトリウム二水和物	40.56 g
水	残量

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。

診断液の部の牛伝染性鼻気管炎診断用蛍光抗体の項の前に次のように加える。

牛ウイルス性下痢—粘膜病診断用金コロイド標識抗体反応キット

牛ウイルス性下痢ウイルス NS3 たん白に対する金コロイド標識モノクローナル抗体と結合した血液中の抗原の複合体を捕捉用モノクローナル抗体を用いて検出するためのキットである。

1 小分製品の試験

1.1 力価及び特異性試験

1.1.1 試験材料

1.1.1.1 被検材料

反応用デバイスを用いる。

1.1.1.2 反応用抗原等

参照陰性抗原（付記 1）並びに参照陽性抗原（付記 2）を参照陰性抗原でそれぞれ規定の濃度に希釈した参照強陽性抗原（付記 3）及び参照弱陽性抗原（付記 4）を用いる。

1.1.2 試験方法

反応用デバイスの検体滴下部位に各反応用抗原を 100 μ L ずつ滴下して、室温で 15 分間静置して反応させ、判定部位における検体ラインと対照ラインの発色を観察する。

1.1.3 判定

参照陰性抗原を加えた反応用デバイスでは、判定部位に対照ラインのみに発色が認められなければならない。参照強陽性抗原及び参照弱陽性抗原をそれぞれ加えた各反応用デバイスでは、判定部位に対照ライン及び検体ラインに発色が認められなければならない。

付記 1 参照陰性抗原

白血球溶解液を用いる。

付記 2 参照陽性抗原

組換え大腸菌で発現させた牛ウイルス性下痢ウイルス NS3 たん白を精製したもので、たん白質濃度を 10 ~ 50 μ g/mL に調整したもの。

付記 3 参照強陽性抗原

参照陽性抗原を参照陰性抗原で希釈してたん白質濃度を 30 ~ 40ng/テストに調整したもの。

付記 4 参照弱陽性抗原

参照陽性抗原を参照陰性抗原で希釈してたん白質濃度を 15 ~ 20ng/テストに調整したもの。

診断液の部のA型インフルエンザ診断用ラテックス標識抗体反応キットの項を次のように改める。

A型インフルエンザ診断用ラテックス標識抗体反応キット

ラテックスで標識したA型インフルエンザウイルスに対するモノクローナル抗体と結合した抗原の複合体を、認識部位の異なる捕捉用モノクローナル抗体を用いて検出するためのキットである。

1 小分製品の試験

1.1 特異性試験

1.1.1 試験材料

1.1.1.1 被検材料

アッセイストリップ又はアッセイスティック及び検体抽出用試薬を用いる。

1.1.1.2 反応用抗原

B型インフルエンザウイルス抗原（付記1）、ニューカッスル病ウイルス抗原（付記2）、鶏伝染性気管支炎ウイルス抗原（付記3）、希釈液（付記4）及び希釈液で8倍希釈した参照陽性抗原（付記5）を用いる。

1.1.2.1 試験方法（アッセイストリップを用いる場合）

反応用抗原 150 μ L と検体抽出用試薬 800 μ L を混合したもの 200 μ L ずつをアッセイストリップに添加し、15 分間静置して発色を観察する。

1.1.2.2 試験方法（アッセイスティックを用いる場合）

反応用抗原 150 μ L と検体抽出用試薬 800 μ L を混合したもの 200 μ L ずつを測定用試験管に加え、その中にアッセイスティックを挿入し、10 分間静置して発色を観察する。

1.1.3 判定

B型インフルエンザウイルス抗原、ニューカッスル病ウイルス抗原、鶏伝染性気管支炎ウイルス抗原及び希釈液を添加したアッセイストリップ又はアッセイスティックでは、コントロール位置に赤色のラインのみが認められ、判定位置に青色のラインが認められてはならない。希釈した参照陽性抗原を添加したアッセイストリップ又はアッセイスティックでは、コントロール位置に赤色のライン、判定位置に青色のラインがそれぞれ認められなければならない。

1.2 力価試験

1.2.1 試験材料

1.2.1.1 被検材料

アッセイストリップ又はアッセイスティック及び検体抽出用試薬を用いる。

1.2.1.2 反応用抗原

参照陽性抗原を希釈液で2倍階段希釈した各希釈抗原液を反応用抗原とする。

1.2.2.1 試験方法（アッセイストリップを用いる場合）

反応用抗原 150 μ L と検体抽出用試薬 800 μ L を混合したもの 200 μ L ずつをアッセイストリップに添加し、15 分間静置して発色を観察する。

1.2.2.2 試験方法（アッセイスティックを用いる場合）

反応用抗原 150 μ L と検体抽出用試薬 800 μ L を混合したもの 200 μ L ずつを測定用試験管に加え、その中にアッセイスティックを挿入し、10 分間静置して発色を観察する。

1.2.3 判定

判定位置に青色のラインが認められる参照陽性抗原の最高希釈倍数は 32 ～ 128 倍でなければならない。いずれの反応用抗原でもコントロール位置に赤色のラインが認められなければならない。

付記1 B型インフルエンザウイルス抗原

発育鶏卵でB型インフルエンザウイルス B/Shanghai/361/02 株又は適当と認められた株を増殖させ、ウイルス液を不活化し、不活化前のウイルス含有量を $10^{6.0}$ FFU/mL に調整したもの。

付記2 ニューカッスル病ウイルス抗原

発育鶏卵でニューカッスル病ウイルス B₁ 株を増殖させ、ウイルス液を不活化し、不活化前のウイルス含有量を $10^{7.0}$ EID₅₀/mL に調整したもの。

付記3 鶏伝染性気管支炎ウイルス抗原

発育鶏卵で鶏伝染性気管支炎ウイルス KU 株を増殖させ、ウイルス液を不活化し、不活化前のウイルス含有量を $10^{4.5}$ EID₅₀/mL に調整したもの。

付記4 希釈液

1,000mL 中

リン酸一ナトリウム

15.6 g

牛アルブミン

10.0 g

塩化ナトリウム

9.0 g

水

残量

水酸化ナトリウム溶液で pH を 7.0 に調整する。

アジ化ナトリウムを 0.1w/v % となるように加え、200nm のフィルターでろ過する。

付記5 参照陽性抗原

発育鶏卵でA型インフルエンザウイルス A/Kitakyusyu/159/93 株を増殖させ、ウイルス液を不活化し、不活化前のウイルス含有量を $10^{5.4}$ TCID₅₀/mL に調整したもの。

(別紙3)

○農林水産省告示第二千六号

薬事法施行令(昭和三十六年政令第十一号)第八十三条の規定により読み替えて適用される同令第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七号)第一百五十四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。

平成二十四年八月十日

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

「牛伝染性鼻気管炎・牛ウインフルエンザ性下痢—粘膜炎・牛パライソフルエンザ・牛RSウイルス感染症・牛アデノ	761,500	450,900	29	29	2
---	---------	---------	----	----	---

を

ウイルス感染症混合生ワクチン						」
「牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢—粘膜炎・牛パライソフルエンザ・牛RSウイルス感染症・牛アデノウイルス感染症混合生ワクチン	761,500	450,900	35	29	29	2 」
「豚インフルエンザ（アジユバント加）不活化ワクチン	278,900	20,300			15	2 を」
「豚インフルエンザ（アジユバント加）不活化ワクチン	278,900	20,300			15	2 」

豚インフルエンザ不活化ワクチン (油性アジュバント加溶解用液)	268,300	20,300	11	2
---------------------------------	---------	--------	----	---

「マイコプラズマ・ハイオニユーモニエ感染症 (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
--	---------	--------	----	---

「マイコプラズマ・ハイオニユーモニエ感染症 (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
マイコプラズマ・ハイオニ	277,200	20,300	10	2

<p>ユーモニエ感染症 (カルボキシピニルポリマーアジユバント・油性アジユバント加) 不活化ワクチン</p>								
<p>「豚インフルエンザ・豚丹毒混合 (油性アジユバント加) 不活化ワクチン</p>	341, 300	20, 300				13	2	2
<p>「豚インフルエンザ・豚丹毒混合 (油性アジユバント加) 不活化ワクチン</p>	341, 300	20, 300				13	2	2
<p>豚サーコウウイルス (2型・組換え型) 感染症 (カルボ</p>	420, 400	20, 300			11	11	2	2

キシビニルポリマーアジ バント加) 不活化ワクチン ・マイコプラズマ・ハイオ ニューモニエ感染症 (カル ボキシビニルポリマーアジ ユバント加) 不活化ワクチ ン						
「鶏サルモネラ症 (サルモネ ラ・エンテリテイデイス・ サルモネラ・テイフイムリ ウム) (油性アジユバント 加) 不活化ワクチン	521, 500	20, 300			9	2
「鶏サルモネラ症 (サルモネ	521, 500	20, 300			9	2

表

ラ・エンテリテイデイス・サルモネラ・チイフイムリウム) (油性アジュバント加) 不活化ワクチン							
鶏サルモネラ症 (サルモネラ・インフアンテイス・サルモネラ・エンテリテイデイス・サルモネラ・チイフイムリウム) (油性アジュバント加) 不活化ワクチン	254,600	20,300				9	2
ジステンパー・犬アデノウイルス (2型) 感染症・犬	100,000	341,800	37				5

パライソフルエンザ・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 ドボデイス) 混合ワクチン								
--	--	--	--	--	--	--	--	--

「ジステンパー・犬アデノウ ウイルス (2型) 感染症・犬 パライソフルエンザ・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	100,000	341,800	37					5
---	---------	---------	----	--	--	--	--	---

ドマデイス) 混合ワクチン					
ジステンパー・犬アデノウイルス (2型) 感染症・犬パライソフルエンザ・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・イクターロヘモラジー・グリップチフオーサ・ボモナ) 混合 (アジュバント加)	271,800	131,000	53		5
ワクチン					1

改める。

表ワクチン（シールドロニト製剤）の部中

「牛コロナウイルス感染症（アジユバント加）不活化ワクチン（シールド）」	352,800	20,300	16	13	2	を
「牛コロナウイルス感染症（アジユバント加）不活化ワクチン（シールド）」	352,800	20,300	16	13	2	を
牛伝染性鼻気管炎・牛パライソフルエンザ混合生ワクチン（シールド）	813,200	197,900	22	17	2	を
牛レプトスピラ病（アジユ	212,400	20,300		10	2	

パント加) 不活化ワクチン (シード)								
牛クロストリジウム・ボツ リヌス (C・D型) 感染症 (アジュバント加) トキソ イド (シード)	254, 100	20, 300	12	12	2			
牛クロストリジウム・ボツ リヌス (C・D型) 感染症 (アジュバント加) トキソ イド (シード)	254, 100	20, 300	12	12	2			
日本脳炎・ダタウイルス感 染症混合不活化ワクチン (123, 400	0	4	4	2			

22

2

シート)								
「ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎混合生ワクチン (シート)	2,200	217,700	2	2	2	2	2	2
「ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎混合生ワクチン (シート)	ワイコプラズマ否定試験、サルモネラ否定試験、生菌数 限度試験、ウイルス含有量試験、 ワーカー試験	ワイコプラズマ否定試験、サルモネラ否定試験、生菌数 限度試験、ウイルス含有量試験、 ワーカー試験	ワイコプラズマ否定試験、 サルモネラ否定試験、 生菌数 限度試験	ワイコプラズマ否定試験、 サルモネラ否定試験、 生菌数 限度試験	ワイコプラズマ含有 ウイルス含有	ワイコプラズマ含有 ウイルス含有		2

	験及び安全 試験を実施 する場合	験及び安全 試験を実施 する場合	量試験、 ワーカー 試験及び 安全試験 を実施す る場合	量試験、 ワーカー 試験及び 安全試験 を実施す る場合	
	316,600	240,100	安全試験 を実施す る場合	安全試験 を実施す る場合	
	ウイルス含 有量試験の みを実施す る場合	ウイルス含 有量試験の みを実施す る場合	11 ウイルス 含有量試 験のみを 実施する 場合	11 ウイルス 含有量試 験のみを 実施する 場合	
	2,200	217,700			

以

「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）不活性化ワクチン（シード）」	355,900	0		2	2	2	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）不活性化ワクチン（シード）」	355,900	0		2	2	2	2	2

性気管支炎 2価・鶏サルモ ネラ症 (サルモネラ・エン テリチイデイス) 混合 (油 性アジユバント加) 不活化 ワクチン (シート)								
狂犬病組織培養不活化ワク チン (シート)	125, 200	0	12	2	5mL未満 の場合	5	5mL以上2 0mL未満 の場合	2

2

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 (シールド)	271,200	20,300	32			5
狂犬病組織培養不活化ワクチン (シールド)	125,200	0	12	2	5mL未満の場合	5
犬レプトスピラ病 (カニコ)	28,400	20,300	37		0mL未満の場合	2

ーラ・イクテロヘモラジ ・グリツポチフオーサ・ポ モナ) 不活化ワクチン (ア ジュバント加溶解用液) (シ ード)							
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)	271,200	20,300	32			5	
猫ウイルス性鼻気管炎・猫 カリシウイルス感染症3価	300,500	44,600	43			2	

21

・猫汎白血球減少症混合ワクチン (シールド)										
------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

検査新薬の紹介

「牛伝染性鼻気管炎診断用蛍光抗体	59,000	0	16				5	2
------------------	--------	---	----	--	--	--	---	---

「牛ウイルス性下痢一粘膜炎診断用金コロイド標識抗体反応キット	18,000	0	5検体用 2	10検体用 1	20検体用 1	2	
牛伝染性鼻気管炎診断用蛍光抗体	59,000	0	16			5	

「ツベルクリン	97,500	20,300				11	2
---------	--------	--------	--	--	--	----	---

「ツベルクリン	97,500	20,300	10	2」
「ヨーニン	102,800	20,300	11	2」
「ヨーニン	102,800	20,300	10	2」
「精製鳥型ツベルクリン	113,400	20,300	12	2」
「精製鳥型ツベルクリン	113,400	20,300	10	2」

改める。

(別紙4)

○農林水産省告示第二千七号

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。

平成二十四年八月十日

農林水産大臣 郡司 彰

- ただし書中「(83)まで」を「(87)まで」に改め、(126)を(131)とし、(125)を(129)とし、(129)の次に次のように加える。
- (130) 猫白血病診断用抗体・猫免疫不全ウイルス感染症診断用抗原・犬糸状虫症診断用抗体複合キット
ただし書中(124)を(128)とし、(80)から(123)までを四ずつ繰り下げ、(79)を(82)とし、(82)の次に次のように加える。
- (83) 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
・犬レプトスピラ病(カニコラ・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(78)を(81)とし、(77)を(80)とし、(76)を(78)とし、(78)の次に次のように加える。

(79) 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混合生ワクチン(シード)

ただし書中(75)を(77)とし、(16)から(74)までを二ずつ繰り下げ、(15)を(16)とし、(16)の次に次のように加える。

(17) 馬鼻肺炎(アジュバント加) 不活化ワクチン(シード)

ただし書中(14)を(15)とし、(13)を(14)とし、(12)を(13)とし、(11)の次に次のように加える。

(12) 破傷風(アジュバント加) トキソイド(シード)

「薬事法関係事務の取扱いについて」(平成12年3月31日付け12畜A第729号農林水産省畜産局長通知)

(下線部分は改正部分)

改 正 後		現 行	
別表第4 動物用医薬品の検定に関する標準処理期間		別表第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)
豚インフルエンザ(アジュバント加)不活化ワクチン	70	豚インフルエンザ(アジュバント加)不活化ワクチン	70
豚インフルエンザ不活化ワクチン(油性アジュバント加溶解用液)	70		
(略)		(略)	
マイコプラズマ・ハイオニューモモニエ感染症(アジュバント・油性アジュバント加)不活化ワクチン	70	マイコプラズマ・ハイオニューモモニエ感染症(アジュバント・油性アジュバント加)不活化ワクチン	70
マイコプラズマ・ハイオニューモモニエ感染症(カルボキシビニルポリマーアジュバント・油性アジュバント加)不活化ワクチン	60		
(略)	(略)	(略)	(略)
豚インフルエンザ・豚丹毒混合(油性アジュバント加)不活化ワクチン	70	豚インフルエンザ・豚丹毒混合(油性アジュバント加)不活化ワクチン	70
豚サウーコウイルス(2型・組換え型)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・マイコプラズマ・ハイオニューモモニエ感染症(カルボキシビニル	70		

<p><u>ポリマーアジュバント加) 不活化ワクチン</u></p>	<p>(略)</p>	<p>70</p>	<p>(略)</p>	<p>70</p>	<p>(略)</p>	<p>鶏サルモネラ症 (サルモネラ・エンテリテイデイス・サルモネラ・テイフイムリウム) (油性アジュバント加) 不活化ワクチン</p>	<p>(略)</p>
<p><u>鶏サルモネラ症 (サルモネラ・インフアンテイス・サルモネラ・エンテリテイデイス・サルモネラ・テイフイムリウム) (油性アジュバント加) 不活化ワクチン</u></p>	<p>(略)</p>	<p>70</p>	<p>(略)</p>	<p>70</p>	<p>(略)</p>	<p>鶏サルモネラ症 (サルモネラ・インフアンテイス・サルモネラ・エンテリテイデイス・サルモネラ・テイフイムリウム) (油性アジュバント加) 不活化ワクチン</p>	<p>(略)</p>
<p><u>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・コペンハーゲン・ヘブドマデイス) 混合ワクチン</u></p>	<p>(略)</p>	<p>80</p>	<p>(略)</p>	<p>80</p>	<p>(略)</p>	<p>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・コペンハーゲン・ヘブドマデイス) 混合ワクチン</p>	<p>(略)</p>
<p><u>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・イクトロヘモラジー・グリッポチフォーサ・ポモナ) 混合 (アジュバント加) ワクチン</u></p>	<p>(略)</p>	<p>80</p>	<p>(略)</p>	<p>80</p>	<p>(略)</p>	<p>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・イクトロヘモラジー・グリッポチフォーサ・ポモナ) 混合 (アジュバント加) ワクチン</p>	<p>(略)</p>
<p><u>ワクチン (シードロット製剤) の部</u></p>	<p>(略)</p>	<p>70</p>	<p>(略)</p>	<p>70</p>	<p>(略)</p>	<p>ワクチン (シードロット製剤) の部</p>	<p>(略)</p>
<p><u>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)</u></p>	<p>(略)</p>	<p>70</p>	<p>(略)</p>	<p>70</p>	<p>(略)</p>	<p>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)</p>	<p>(略)</p>
<p><u>牛伝染性鼻気管炎・牛パラインフルエンザ混合生ワクチン (シード)</u></p>	<p>(略)</p>	<p>100</p>	<p>(略)</p>	<p>100</p>	<p>(略)</p>	<p>牛伝染性鼻気管炎・牛パラインフルエンザ混合生ワクチン (シード)</p>	<p>(略)</p>
<p><u>牛レプトスピラ病 (アジュバント加) 不活化ワクチン (シード)</u></p>	<p>(略)</p>	<p>70</p>	<p>(略)</p>	<p>70</p>	<p>(略)</p>	<p>牛レプトスピラ病 (アジュバント加) 不活化ワクチン (シード)</p>	<p>(略)</p>

<p>年クロストリジウム・ボツリヌス (C・D型) 感染症 (アジユバント加) トキソイド (シート)</p> <p>日本脳炎・ダクウイルス感染症混合不活化ワクチン (シート)</p>	80	<p>年クロストリジウム・ボツリヌス (C・D型) 感染症 (アジユバント加) トキソイド (シート)</p>	80
<p>(略)</p> <p>ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎混合生ワクチン (シート)</p>	<p>(略)</p> <p>マイコプラズマ否定試験、サルモネラ否定試験、生菌数限度試験、ウイルス含有量試験、マーカー試験及び安全試験を実施する場合 60</p> <p>ウイルス含有量試験のみを実施する場合 40</p>	<p>(略)</p> <p>ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎混合生ワクチン (シート)</p>	40
<p>(略)</p> <p>ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎・鶏伝染性コリエーザ (A・C型) 混合 (油性アジユバント加) 不活化ワクチン (シート)</p> <p>ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎2価・鶏サルモネラ症 (サルモネラ・エンテリチイデイス) 混合 (油性アジユバント加) 不活化ワクチン (シート)</p> <p>(略)</p> <p>狂犬病組織培養不活化ワクチン (シート)</p> <p>犬レプトスピラ病 (カニコラ・イクラコロヘモラジュー・グリッポチフオーサ・ボモナ) 不活化ワクチン (アジユバント加溶解用液) (シート)</p> <p>猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症2価・猫</p>	<p>(略)</p> <p>70</p> <p>70</p> <p>40</p> <p>50</p> <p>50</p>	<p>(略)</p> <p>ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎・鶏伝染性コリエーザ (A・C型) 混合 (油性アジユバント加) 不活化ワクチン (シート)</p> <p>(略)</p> <p>狂犬病組織培養不活化ワクチン (シート)</p> <p>猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症2価・猫</p>	<p>(略)</p> <p>70</p> <p>40</p> <p>50</p>

汎白血球減少症混合ワクチン (シート)		汎白血球減少症混合ワクチン (シート)	
汎白血球減少症混合ワクチン (シート) 猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症 3 価・猫 汎白血球減少症混合ワクチン (シート)			
(診断液の部)		(診断液の部)	
(略)	(略)	(略)	(略)
牛ウイルス性下痢-粘膜病診断用金コロイド標識抗体反応 キット	40		
牛伝染性鼻気管炎診断用蛍光抗体	60	牛伝染性鼻気管炎診断用蛍光抗体	60
(略)	(略)	(略)	(略)
ツベルクリン	90	ツベルクリン	40
(略)	(略)	(略)	(略)
ヨーニン	90	ヨーニン	40
(略)	(略)	(略)	(略)
精製鳥型ツベルクリン	90	精製鳥型ツベルクリン	50
(略)	(略)	(略)	(略)