

動薬協会発 288 号

平成25年1月24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

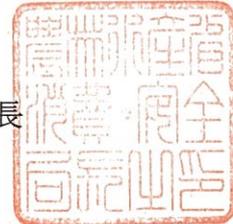
当協会の業務運営につきましては、日頃からご支援、ご協力を頂きお礼申し上げます。
さて、標記のことについて、農林水産省消費・安全局長より通知が来ましたのでお知らせします。



24消安第4503号
平成25年1月22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。

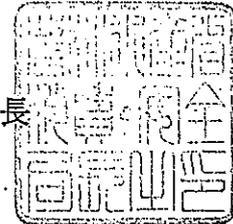




24消安第4503号
平成25年1月22日

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」（平成17年3月18日農林水産省告示第516号）、「薬事法第43条第1項の規定に基づき、農林水産大臣の指定する医薬品を定める等の件」（昭和36年2月1日農林省告示第66号）及び「動物医薬品検査所標準製剤等配布規程」（昭和45年5月1日農林省告示第637号）の一部が別紙1から別紙5までのとおり改正されましたので、貴庁に備え置いて縦覧願います。

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

(別紙1)

○農林水産省告示第二百五十七号

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。

平成二十五年一月二十二日

農林水産大臣 林 芳正

〔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。〕

血清類の破傷風抗毒素の項の3.1.2.2中「検体を330倍を含む適当な間隔で希釈する」を「330倍を含む適当な間隔で検体を希釈する」に改め、同項4中「特に承認されたものは」を「農林水産大臣が特に認めた場合には」に改め、同項付記3中「国立感染症研究所」を「動物医薬品検査所」に改める。

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部の破傷風（アジュバント加）トキソイドの項の4中「特に承認されたものは」を「農林水産大臣が特に認めた場合には、」に改め、同項付記1中「国立感染症研究所」を「動物医薬品検査所」に改める。

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部の馬インフルエンザ不活化・日本脳炎不活化・破傷風トキソイド混合（アジュバント加）ワクチンの項の3.6.9.3.1.1中「付記2。以下」を「付記2。以下この項において」に、「付記3。）（以下）」を「付記3。以下この項において」に改め、同項付記2及び付記3中「国立感染症研究所」を「動物医薬品検査所」に改める。

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。

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

1 定義

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

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

マンヘミア・ヘモリチカ1型 NL1009 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

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

2.1.3 マスターシード菌

2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

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

分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結乾燥して2～7℃で保存する。

マスターシード菌について、3.1.1の試験を行う。

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

2.1.4 ワーキングシード菌

2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、適当と認められた培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結して-60℃以下又は凍結乾燥して2～7℃で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。

2.1.5 プロダクションシード菌

2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、適当と認められた培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して-60℃以下又は凍結乾燥して2～7℃で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

2.2 製造材料

2.2.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 培養

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

培養菌液について、3.2の試験を行う。

2.3.2 不活化

培養菌液にホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加えたものを不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.3の試験を行う。

2.3.3 原液

不活化菌液を遠心分離し、上清液を原液とする。

2.4 最終バルク

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

2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、凍結乾燥して小分製品とする。

小分製品について、3.4の試験を行う。

3 試験法

3.1 製造用株の試験

3.1.1 マスターシード菌の試験

3.1.1.1 同定試験

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

3.1.1.2 夾雑菌否定試験

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

3.1.2 ワーキングシード菌の試験

3.1.2.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.3 プロダクションシード菌の試験

3.1.3.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2 培養菌液の試験

3.2.1 染色試験

3.2.1.1 試験材料

検体を用いる。

3.2.1.2 試験方法

検体 0.01mL をスライドガラス上の 1 cm² の区画に塗抹し、乾燥させた後に火焰固定し、グラム染色して標本を作製する。標本を顕微鏡下で約 1,000 倍に拡大し、30 視野以上を観察する。

3.2.1.3 判定

均一なグラム陰性球桿菌以外の菌を認めてはならない。

3.2.2 コロニー性状確認試験

3.2.2.1 試験材料

検体を用いる。

3.2.2.2 試験方法

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

3.2.2.3 判定

生育した集落はβ溶血環を示し、小さな灰色のコロニーでなければならない。

3.2.3 吸光度測定試験

3.2.3.1 試験材料

検体を用いる。

3.2.3.2 試験方法

検体を分光光度計を用いて波長 550 nm で吸光度を測定する。

3.2.3.3 判定

検体の吸光度値は、規定の値でなければならない。

3.3 不活化菌液の試験

3.3.1 不活化試験

3.3.1.1 試験材料

検体を用いる。

3.3.1.2 試験方法

5枚の5 vol %羊血液トリプチケース・ダイズ・寒天培地に検体 0.2mL ずつを接種し、36 ~ 38 °Cで48時間以上培養する。

3.3.1.3 判定

菌の増殖を認めてはならない。

3.4 小分製品の試験

3.4.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、帯黄白色の乾燥塊でなければならず、異物及び異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.4.2 真空度試験

一般試験法の真空度試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.3 含湿度試験

一般試験法の含湿度試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.4 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.5 ホルマリン定量試験

一般試験法のホルマリン定量法を準用して試験するとき、ホルマリン含有量は、0.01vol %以下でなければならない。ただし、乾燥ワクチンを溶解用液と等量の滅菌精製水で溶解したものを試料とする。

3.4.6 無毒化試験

3.4.6.1 試験材料

3.4.6.1.1 試料

試験品を溶解用液と等量の滅菌精製水で溶解したものを試料とする。

3.4.6.1.2 白血球浮遊液

白血球浮遊液（付記3）を用いる。

3.4.6.2 試験方法

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

3.4.6.3 判定

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

3.4.7 毒性限度確認試験

一般試験法の毒性限度確認試験法2を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、試験品の注射量は1 mLとし、体重測定は5日目に行うものとする。

3.4.8 力価試験

3.4.8.1 ロイコトキソイド力価試験

3.4.8.1.1 試験材料

3.4.8.1.1.1 試料

試験品を溶解用液と等量の滅菌精製水で溶解したものを試料とする。

3.4.8.1.2 試験方法

希釈液（付記 7）で試料及び参照品（付記 8）の各 5 段階の 2 倍階段希釈液を作製し、その希釈液を抗体固相化プレート（付記 9）の穴に 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させる。洗浄液（付記 10）で洗浄した後、マンヘミア・ヘモリチカロイコトキソイドに対するマウスモノクローナル抗体（付記 11）を各穴に 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させる。洗浄液で洗浄した後、標識抗体 1（付記 12）を各穴に 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させる。洗浄液で洗浄した後、基質液（付記 13）を各穴に 100 μ L ずつ加え、常温で反応させる。参照品の最低希釈倍率の希釈液を加えた穴の吸光度を主波長 405nm、副波長 490nm で測定し、その値が 0.8 ~ 1.2 となったときに全ての穴の吸光度を測定する。

3.4.8.1.3 判定

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

3.4.8.2 莢膜抗原力価試験

3.4.8.2.1 試験材料

3.4.8.2.1.1 試料

試験品を溶解用液と等量の滅菌精製水で溶解したものを試料とする。

3.4.8.2.2 試験方法

希釈・洗浄液（付記 15）で試料及び参照品の各 5 段階の 2 倍階段希釈液を作製し、96 穴マイクロプレートの各穴に 100 μ L ずつ加えて 4 $^{\circ}$ C で 1 晩反応させる。希釈・洗浄液で洗浄した後、ブロッキング液 1（付記 16）を各穴に 200 μ L ずつ加えて常温で 1 時間反応させる。希釈・洗浄液で洗浄した後、マンヘミア・ヘモリチカ莢膜抗原に対するモノクローナル抗体（付記 17）を 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させる。洗浄液で洗浄した後、標識抗体 2（付記 18）を各穴に 100 μ L ずつ分注し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させる。洗浄液で洗浄した後、基質液を各穴に 100 μ L ずつ加え、常温で反応させる。参照品の最低希釈倍率の希釈液を加えた穴の吸光度を主波長 405nm、副波長 490nm で測定し、その値が 0.8 ~ 1.2 となったときに全ての穴の吸光度を測定する。

3.4.8.2.3 判定

参照品の莢膜抗原量を 1.0 として、試料の莢膜抗原量の相対量を統計学的計算方法により算出するとき、相対力価は、1.0 以上でなければならない。

4 貯法及び有効期間

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

付記 1 リン酸緩衝食塩液

1,000 mL 中

塩化ナトリウム

9.0 g

リン酸水素二ナトリウム 12 水和物

6.77 g

リン酸二水素カリウム

2.58 g

水

残量

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

付記 2 5 vol % 羊血液トリプチケース・ダイズ・寒天培地

1,000 mL 中

カゼインのパンクレアチン消化物

15.0 g

塩化ナトリウム

5.0 g

ダイズのパンパイン消化物	5.0 g
寒天	15.0 g
羊血液	50.0 g
精製水	残量

完全に溶解し、高圧蒸気滅菌する。

付記3 白血球浮遊液

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

付記4 RPMI-1640 培地

1,000 mL 中	
RPMI-1640	10.39 g
炭酸水素ナトリウム	2.0 g
水	残量

pH を 7.4 に調整する。200nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。

付記5 10vol %ホルマリン溶液

100mL 中	
ホルムアルデヒド	10 mL
水	残量

200nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。

付記6 1 w/v%クリスタルバイオレット溶液

100mL 中	
クリスタルバイオレット	1.0 g
水	残量

200nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。

付記7 希釈液

1,000mL 中	
牛血清アルブミン	20 g
0.38w/v%四ホウ酸ナトリウム溶液 (付記19)	残量

200nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。

付記8 参照品

動物医薬品検査所が適当と認めたもの

付記9 抗体固相化プレート

0.38w/v %四ホウ酸ナトリウム溶液で適当な濃度に希釈したマンヘミア・ヘモリチカロイコトキソイドに対する牛ポリクローナル抗体 (付記20) を $100 \mu\text{L}$ ずつ 96 穴プレートに分注し、 4°C で 16 時間反応させる。内容液を捨て、ブロッキング液2 (付記21) を $100 \mu\text{L}$ ずつ加え、 37°C で 30 分間反応させた後、希釈・洗浄液で1回洗浄したもの

付記10 洗浄液

1,000mL 中

ポリソルベート 20

0.5 mL

希釈・洗浄液

残量

pH を 7.2 に調整する。

付記 11 マンヘミア・ヘモリチカロイコトキソイドに対するマウスモノクローナル抗体
マンヘミア・ヘモリチカロイコトキシンを用いてイムノブロットを行った場合、分子量約 100 kDa の単一のバンドを認めるモノクローナル抗体で、中和能を有する。これを希釈・洗浄液で適当な希釈倍率に希釈したもの

付記 12 標識抗体 1

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

付記 13 基質液

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

B 液 : 0.02vol%過酸化水素水

A 液と B 液を使用時に等量混合したもの

付記 14 統計学的計算方法

動物医薬品検査所が適当と認めたもの

付記 15 希釈・洗浄液

1,000mL 中

塩化ナトリウム

8.0 g

塩化カリウム

0.2 g

無水リン酸水素二ナトリウム

1.15 g

リン酸二水素カリウム

0.2 g

水

残量

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

付記 16 ブロッキング液 1

1,000mL 中

牛血清アルブミン

10 g

希釈・洗浄液

残量

200nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。

付記 17 マンヘミア・ヘモリチカ 莢膜抗原に対するモノクローナル抗体

マンヘミア・ヘモリチカから精製した莢膜多糖体、ポリ多糖体及びロイコトキシンを用いて間接 ELISA を行った場合、莢膜多糖体にのみ特異的に反応するモノクローナル抗体であって、ブロッキング液 1 で適当な希釈倍率に希釈したもの。

付記 18 標識抗体 2

ペルオキシダーゼ標識したヤギ抗マウス IgM (μ) 抗体を 50vol %グリセリン溶液で適当な濃度

になるように溶解したもの。

付記 19 0.38w/v%四ホウ酸ナトリウム溶液

1,000mL 中

四ホウ酸ナトリウム

3.8 g

水

残 量

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

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

マンヘミア・ヘモリチカ NADC615-8 株又は同等の抗原性を有する株の培養菌液を気管内投与し、2週間後に得られた牛血清であって、ロイコトキシンに対する中和抗体価が 128 ~ 256 倍になるように濃度を調整したもの。

付記 21 ブロッキング液 2

1,000mL 中

牛血清アルブミン

20 g

希釈・洗浄液

残 量

200nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。

付記 22 50vol %グリセリン溶液

滅菌精製水にグリセリンを等量混合したもの

ワクチン（シードロット製剤）の部の日本脳炎生ワクチン（シード）の項を次のように改める。

日本脳炎生ワクチン（シード）

1 定義

シードロット規格に適合した弱毒日本脳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である。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

弱毒日本脳炎ウイルス at 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

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

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 2.14 に適合したハムスター腎初代培養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 2.14 に適合したハムスター腎初代培養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 に試験を行う。

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 2.14 に適合したハムスター腎初代培養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 初代細胞を用いる場合

2.2.1.1 初代細胞

SPF 動物規格の 2.14 に適合したハムスター腎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、3.2.1 の試験を行う。

2.2.2.1 株化細胞

HmLu-1 細胞又は製造に相当と認められた株化細胞を用いる。

2.2.2 株化細胞を用いる場合

2.2.2.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

2.2.2.3 マスターセルシード

2.2.2.3.1 作製、保存及びプロダクションセルシードまでの最高継代数

マスターセルシードは、2.2.2.2 の培養液で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターセルシードは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して -70°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 の培養液で増殖する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して -70°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 培養細胞の培養

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) を用いる場合

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

個別培養細胞について、3.4 の試験を行う。

2.3.1.2 プロダクションセルシードを用いる場合

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。

2.3.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを 2.3.1 の細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を混合し、原液とする。

原液について、3.5 の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液に相当と認められた希釈液及び安定剤を加えて混合し、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、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

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

3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

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

3.1.1.5 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試験法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

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス及びリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.2 及び 3.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.1.5.2.2 個別ウイルス否定試験

豚コレラウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢—粘膜病ウイルス、ロタウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.2、3.2.3、3.2.4、3.2.5、3.2.7 及び 3.2.9 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.1.6 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本以上の培養びん及びカバーグラスを入れた4枚以上のシャーレに継代し、7日間培養し、観察するとき、CPEを認めてはならない。

3.4.2 赤血球吸着試験

3.3.1の試験最終日に培養びんの培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を2回洗浄した後、3群に分け、0.1vol%のモルモット、がちょう及び7日齢以内の鶏の赤血球浮遊液を重層し、60分間静置した後、赤血球吸着の有無を観察するとき、培養細胞に赤血球吸着を認めてはならない。

3.4.3 封入体染色試験

3.4.1の試験最終日に培養カバーグラスをリン酸緩衝食塩液で洗浄し、固定した後、ギムザ染色し、封入体の有無を観察するとき、培養細胞に封入体を認めてはならない。

3.4.4 迷入ウイルス否定試験

3.4.1の試験最終日に採取した培養液を試料として、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法2.3.1、2.3.2及び2.4.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.5 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

マウス接種試験又は培養細胞接種試験により行う。

3.5.2.1 マウス接種試験

3.5.2.1.1 試験材料

3.5.2.1.1.1 試料

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

3.5.2.1.1.2 試験動物

2日齢以内の乳のみマウスを用いる。

3.5.2.1.2 試験方法

試料0.02mLずつを4匹以上の試験動物の脳内に注射し、14日間観察する。

3.5.2.1.3 判定

脳炎症状を示して死亡したマウスを感染とみなし、LD₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10^{7.0}LD₅₀以上でなければならない。

3.5.2.2 培養細胞接種試験

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(付記1)で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.5.2.2.1.2 培養細胞

Vero細胞、ESK細胞又は適当と認められた培養細胞を培養し、単層となったものを用いる。

3.5.2.2.2 試験方法

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

3.5.2.2.3 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、1 mL中10^{7.0}TCID₅₀以上でなければならない。

3.5.3 マーカー試験

3.5.3.1 試験材料

3.5.3.1.1 注射材料

検体及び対照として中山株薬検系を用い、それぞれのウイルスが 1 mL 中に $10^{7.0}$ TCID₅₀ 又は $10^{7.0}$ LD₅₀ 以上含まれるように調整したものを、注射材料とする。

3.5.3.1.2 試験動物

3 週齢のマウスを用いる。

3.5.3.2 試験方法

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

3.5.3.3 判定

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

3.6 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又は均質な懸濁液でなければならない。異物及び異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.6.2 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

3.5.2 を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たり $10^{5.0}$ LD₅₀ 又は $10^{5.0}$ TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.6.7 安全試験

3.6.7.1 試験材料

3.6.7.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.6.7.1.2 試験動物

約 1 か月齢の豚を用いる。

3.6.7.2 試験方法

試験動物 3 頭を試験群、1 頭を対照群とする。試験群に注射材料 1 頭分を用法に従って注射し、対照群と共に 3 週間観察する。

3.6.7.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に異常を認めてはならない。

3.6.8 力価試験

赤血球凝集抑制反応又は中和試験により行う。

3.6.8.1 赤血球凝集抑制反応

3.6.8.1.1 試験材料

3.6.8.1.1.1 試験動物

3.6.7 の試験に用いた動物を用いる。

3.6.8.1.1.2 赤血球凝集抗原

日本脳炎ウイルス中山株薬検系又は適当と認められた株を用いて調製した赤血球凝集抗原（付記 2）を用いる。

3.6.8.1.2 試験方法

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

被検血清を 25w/v %カオリン液又はアセトンを加えて処理し、がちょう又は 7 日齢以内の鶏の赤血球で処理した後、非働化する。各処理血清を、牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液（付記 3）又は適当と認められた希釈液で 2 倍階段希釈する。各希釈血清に 8 単位の赤血球凝集抗原を加えて 4℃で一夜処理した後、VAD 液（付記 4）で調整した 0.33vol %のがちょう又は 7 日齢以内の鶏の赤血球浮遊液を加え、37℃で 60 分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

3.6.8.1.3 判定

赤血球の凝集を抑制した血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。

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

3.6.8.2 中和試験

3.6.8.2.1 試験材料

3.6.8.2.1.1 試験動物

3.6.7 の試験に用いた動物を用いる。

3.6.8.2.1.2 中和試験用ウイルス

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

3.6.8.2.1.3 培養細胞

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

3.6.8.2.2 試験方法

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

被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液で 5 倍に希釈し、更に 2 倍階段希釈する。各希釈血清と 0.4mL 中約 200PFU の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、37℃で 90 分間処理する。この各混合液 0.4mL ずつをそれぞれ 4 枚の培養細胞に接種し、37℃で 60 分間静置吸着させた後、混合液を除き、第 1 次重層寒天培地（付記 5）を加え、37℃で 3 日間培養する。その後、第 2 次重層寒天培地（付記 6）を重層し、37℃で 1 日間培養し、ブラック数を算出する。また、中和試験用ウイルス液 0.4mL ずつを培養細胞に接種し、同様に処理したもの（以下この項において「ウイルス対照」という。）について、ブラック数を算出する。

3.6.8.2.3 判定

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

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

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 20 ~ 50 mL
イーグル MEM 残量
炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 7.4 に調整する。
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 2 赤血球凝集抗原

日本脳炎ウイルス中山株薬検系又は適当と認められた株を用いて調製した赤血球凝集抗原で、赤血球凝集価が 64 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 10.52 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 VAD 液

1,000mL 中
塩化ナトリウム 8.77 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物 5.68 g
リン酸二水素ナトリウム二水和物 40.56 g
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 5 第 1 次重層寒天培地

1,000mL 中
トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g
牛血清 20 ~ 50 mL
寒天 10 g
イーグル MEM 残量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 7.4 に調整する。
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 6 第 2 次重層寒天培地

1,000mL 中
トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g
ニュートラルレッド 0.5 g
寒天 10 g
イーグル MEM 残量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 7.4 に調整する。
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

ワクチン（シードロット製剤）の部の鶏脳脊髄炎生ワクチン（シード）の項の 3.1.1.1 中「1.4.2.1.1.1.2」を「1.4.2.1.1.1」に、付記 2 中「開ける」を「空ける」に改める。

(別紙2)

○農林水産省告示第二百五十八号

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。

平成二十五年一月二十二日

農林水産大臣 林 芳正

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

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

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

弱毒牛伝染性鼻気管炎ウイルス、弱毒牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス1型及び2型、弱毒牛パラインフルエンザ3型ウイルス、弱毒牛RSウイルス並びに弱毒牛アデノウイルス（7型）を培養細胞でそれぞれ増殖させて得たウイルス液を混合し、凍結乾燥したワクチンである。

1 小分製品の試験

1.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

1.2 迷入ウイルス否定試験

一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1、2.4.1 及び 2.4.2 により試験を行い、これらに適合しなければならない。

ただし、中和用血清は、抗牛伝染性鼻気管炎ウイルス血清（付記1）、抗牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス血清（付記2及び3）、抗牛パラインフルエンザ3型ウイルス血清（付記4）、抗牛RSウイルス血清（付記5）及び抗牛アデノウイルス（7型）血清（付記6）を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 牛伝染性鼻気管炎ウイルス

1.3.1.1 試験材料

1.3.1.1.1 試料

試験品中の牛伝染性鼻気管炎ウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記2から6まで）を非働化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液（付記7）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

牛精巢継代細胞を小試験管に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

1.3.1.2 試験方法

試料0.1mLをそれぞれ4本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0.5mLずつ加え、34～36℃で7日間回転培養し、観察する。

1.3.1.3 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。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{4.0}TCID₅₀以上でなければならない。

1.3.2 牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス1型

1.3.2.1 試験材料

1.3.2.1.1 試料

試験品中の牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス1型以外のウイルスを各抗血清（付記1及び3から6まで）を非働化したもので中和したものを細胞増殖用培養液（付記8）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

牛精巢継代細胞浮遊液を用いる。

1.3.2.2 試験方法

試料 0.1mL をそれぞれ小試験管に 0.5mL ずつ分注した培養細胞 4 本以上に接種し、37℃で 5～7 日間静置培養し、単層形成が良好であることを確認する。培養液を除き、1 mL 中牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス 1 型 Nose 株を $10^{5.0}$ TCID₅₀ 又は 1 mL 中ニューカッスル病ウイルス TCND 株若しくは宮寺株を $10^{4.0}$ ED₅₀ 含んだ細胞増殖用培養液を 0.5mL ずつ加え、更に 34～36℃で 5～7 日間回転培養し、観察する。

1.3.2.3 判定

干渉法にあっては、培養細胞に CPE の抑制されたものを、また、END 法にあっては、CPE の発現し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 $10^{3.0}$ TCID₅₀ 以上でなければならない。

1.3.3 牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス 2 型

1.3.2 を準用して試験を行う。判定に当たっては、試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たり $10^{3.0}$ TCID₅₀ 以上でなければならない。

ただし、試験品中の牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス 2 型以外のウイルスを各抗血清（付記 1、2 及び 4 から 6 まで）を非働化したもので中和したものを細胞増殖用培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

1.3.4 牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス

1.3.4.1 試験材料

1.3.4.1.1 試料

試験品中の牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記 1 から 3 まで、5 及び 6）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。

1.3.4.1.2 培養細胞

牛腎継代細胞を小試験管に 1～3 日間培養し、単層となったものを用いる。

1.3.4.2 試験方法

試料 0.1mL をそれぞれ 4 本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 0.5mL ずつ加え、34～36℃で 7 日間回転培養し、観察する。

1.3.4.3 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。

1.3.5 牛 R S ウイルス

1.3.5.1 試験材料

1.3.5.1.1 試料

試験品中の牛 R S ウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記 1 から 4 まで及び 6）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。

1.3.5.1.2 培養細胞

Vero 細胞を小試験管に 1～3 日間培養し、単層となったものを用いる。

1.3.5.2 試験方法

試料 0.1mL をそれぞれ 4 本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 0.5mL ずつ加え、34℃で 14 日間回転培養し、観察する。

1.3.5.3 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 $10^{5.0}$ TCID₅₀ 以上でなければならない。

1.3.6 牛アデノウイルス（7 型）

1.3.6.1 試験材料

1.3.6.1.1 試料

試験品中の牛アデノウイルス（7型）以外のウイルスを各抗血清（付記1から5まで）を非働化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

1.3.6.1.2 培養細胞

牛精巢継代細胞を小試験管に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

1.3.6.1.3 赤血球浮遊液

牛、羊又はやぎの赤血球をゼラチン・アルブミン加ペロナル緩衝食塩液（以下この項において「VBS」という。）（付記9）に0.3vol%に浮遊させたものを用いる。

1.3.6.2 試験方法

試料0.1mLをそれぞれ4本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0.5mLずつ加え、34～36℃で7日間回転培養し、観察する。培養終了後、培養細胞を4℃に冷却し、これに4℃に冷却した赤血球浮遊液0.25mLを加え、4℃で1夜静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

1.3.6.3 判定

赤血球凝集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^{3.0}TCID₅₀以上でなければならない。

1.4 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性否定試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

1.5 安全試験

1.5.1 牛注射試験

1.5.1.1 試験材料

1.5.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.5.1.1.2 試験動物

体重100～200kgの牛を用いる。

1.5.1.2 試験方法

注射材料1頭分を試験動物の筋肉内に注射し、14日間観察する。

1.5.1.3 判定

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

1.5.2 乳のみマウス注射試験

1.5.2.1 試験材料

1.5.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.5.2.1.2 試験動物

3日齢以内の乳のみマウスを用いる。

1.5.2.2 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。

1.5.2.3 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。

1.6 力価試験

1.6.1 牛伝染性鼻気管炎力価試験

1.6.1.1 試験材料

1.6.1.1.1 試験動物

1.5.1 の試験に用いた動物を用いる。

1.6.1.1.2 中和試験用ウイルス

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

1.6.1.1.3 培養細胞

牛精巢継代細胞浮遊液を約 27cm² のシャーレに 5 mL ずつ分注し、1～3 日間培養し単層となったものを用いる。

1.6.1.2 試験方法

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

被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液で 2 倍階段希釈する。各希釈血清 0.5mL と 0.2mL 当たり約 100PFU を含む中和試験用ウイルス液 0.5mL とを混合し、37℃で 60 分間処理する。この混合液 0.2mL ずつをそれぞれ 2 枚の培養細胞に接種し、37℃で 60 分間吸着させた後、混合液を除き、第 1 次重層寒天培地（付記 10）5 mL を加え、37℃、5 vol % 炭酸ガス下で 3～5 日間培養した後、第 2 次重層寒天培地（付記 11）3 mL を加え、更に 24 時間培養した後、ブラック数を算定する。また、中和試験用ウイルス液 0.2mL ずつを培養細胞に接種し、同様に処理したもの（以下この項において「ウイルス対照」という。）について、ブラック数を算出する。

1.6.1.3 判定

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

試験動物の中和抗体価は、2 倍以上でなければならない。

1.6.2 牛ウイルス性下痢-粘膜病力価試験

1.6.2.1 試験材料

1.6.2.1.1 試験動物

1.5.1 の試験に用いた動物を用いる。

1.6.2.1.2 中和試験用ウイルス

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

1.6.2.1.3 培養細胞

牛精巢継代細胞浮遊液を用いる。

1.6.2.2 試験方法

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

被検血清を非働化した後、細胞増殖用培養液で 2 倍階段希釈する。各希釈血清 0.5mL と 0.1mL 当たり約 200TCID₅₀ を含む中和試験用ウイルス液 0.5mL とを混合し、37℃で 60 分間処理する。この混合液 0.1mL ずつを、小試験管に 0.5mL ずつ分注した細胞 4 本ずつに接種する。37℃で 4～5 日間静置培養し、観察する。

1.6.2.3 判定

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

試験動物の中和抗体価は、牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス 1 型及び 2 型に対してそれぞれ 2 倍以上でなければならない。

1.6.3 牛パラインフルエンザ力価試験

1.6.3.1 試験材料

1.6.3.1.1 接種材料

試験品を注射材料とする。

1.6.3.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

1.6.3.1.3 赤血球凝集抗原

牛腎継代細胞で増殖させた牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス BN₁-1 株を用いる。

1.6.3.2 試験方法

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

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

1.6.3.3 判定

赤血球凝集を阻止した血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。

赤血球凝集抑制抗体価 8 倍以上を赤血球凝集抑制抗体陽性とする。

試験動物の赤血球凝集抑制抗体陽性率は、80 % 以上でなければならない。

1.6.4 牛 R S ウイルス感染症力価試験

1.6.4.1 試験材料

1.6.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.6.4.1.2 試験動物

体重約 100g のハムスターを用いる。

1.6.4.1.3 中和試験用ウイルス

牛腎継代細胞で増殖させた牛 R S ウイルス NMK7 株を用いる。

1.6.4.1.4 培養細胞

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

1.6.4.2 試験方法

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

被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液で 2 倍階段希釈する。希釈血清 0.5mL と 0.1mL 当たり約 200TCID₅₀ を含む中和試験用ウイルス 0.5mL とを混合し、22 °C で 24 時間処理する。この混合液 0.1mL ずつを 4 本の培養細胞に接種し、37 °C で 60 分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を 0.5mL ずつ加え、34 °C で 10 日間回転培養し、観察する。

1.6.4.3 判定

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

試験動物の中和抗体陽性率は、80 % 以上でなければならない。

1.6.5 牛アデノウイルス感染症力価試験

1.6.5.1 試験材料

1.6.5.1.1 試験動物

1.5.1 の試験に用いた動物を用いる。

1.6.5.1.2 赤血球凝集抗原

牛精巢継代細胞で増殖させた牛アデノウイルス (7 型) 袋井株を用いる。

1.6.5.1.3 赤血球浮遊液

1.3.6.1.3 の赤血球浮遊液を用いる。

1.6.5.2 試験方法

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

被検血清を非働化した後、VBS で 5 倍に希釈する。希釈血清に 25w/v %カオリン加生理食塩液

を等量加え、15～25℃で20分間処理した後、1,700 Gで20分間遠心し、その上清をVBSを用いて2倍階段希釈する。各希釈血清 0.2mL に4単位の赤血球凝集抗原 0.2mL を加え、4℃で1夜処理した後、4℃に冷却した赤血球浮遊液 0.2mL を加え、4℃で1夜静置し、観察する。

1.6.5.3 判定

赤血球凝集を阻止した血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。

試験動物の赤血球凝集抑制抗体価は、20倍以上でなければならない。

付記1 抗牛伝染性鼻気管炎ウイルス血清

強毒牛伝染性鼻気管炎ウイルス No.758 株で免疫した兎の血清であって、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 抗牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス1型血清

強毒牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス No.12 株で免疫した兎の血清であって、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 抗牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス2型血清

強毒牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス KZ-91-ncp 株で免疫した兎の血清であって、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 抗牛パラインフルエンザ3型ウイルス血清

強毒牛パラインフルエンザ3型ウイルス BN₁-1 株で免疫した兎の血清であって、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 抗牛RSウイルス血清

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

付記6 抗牛アデノウイルス(7型)血清

強毒牛アデノウイルス(7型)袋井株で免疫した兎の血清であって、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 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

牛胎子血清 20～100 mL

イーグルMEM 残量

炭酸水素ナトリウムでpHを7.2～7.6に調整する。

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、牛パラインフルエンザ3型ウイルス、牛RSウイルス及び牛アデノウイルス(7型)に対して抗体陰性のものを用いる。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記8 細胞増殖用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
牛胎子血清	50 ~ 100 mL
イーグルMEM	残量

炭酸水素ナトリウムでpHを7.0~7.2に調整する。

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、牛パラインフルエンザ3型ウイルス、牛RSウイルス及び牛アデノウイルス(7型)に対して抗体陰性のものを用いる。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記9 ゼラチン・アルブミン加ベロナール緩衝食塩液

A液 ベ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	1.0 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	5.0 g
水	残量

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

付記10 第1次重層寒天培地

1,000mL 中	
イーグルMEM	880 mL
トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
寒天	8.0 g
牛胎子血清	20 mL
水	残量

血清は、牛伝染性鼻気管炎ウイルスに対する中和抗体陰性のものを用いる。

付記11 第2次重層寒天培地

1,000mL 中	
イーグルMEM	900 mL
トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
寒天	8.0 g
ニュートラルレッド	0.05 g
水	残量

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部のイリドウイルス病不活化ワクチンの項の次に次のように加える。

イリドウイルス病(油性アジュバント加)不活化ワクチン

マダイイリド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ものに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

試験品に等量の希釈用液を加えたものを注射材料とする。

1.2.1.2 試験動物

水温 24℃、循環式で7日間以上飼育し、異常のないことを確認した体重 30～50g のぶり 110尾以上を用いる。

1.2.2 試験方法

試験動物は、24時間以上餌止めした後、1群 55尾以上ずつの2群に分ける。1群の試験動物に注射材料 0.1mL を腹腔内に注射し、試験群とする。他の1群は、対照群とし、試験群と同様の方法でリン酸緩衝食塩液を注射する。その後、それぞれ水温 24℃、循環式で飼育し、21日間観察する。試験最終日に試験群及び対照群からそれぞれ 10尾取り上げ、注射部位を剖検する。

1.2.3 判定

観察期間中、対照群においては臨床的な異常を認めてはならず、試験群においては一過性の摂餌不良を認めることがあっても、その他の臨床的な異常を認めてはならない。また、剖検した時に、注射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 試験材料

1.3.1.1 試験動物

1.2の試験に用いた動物を用いる。

1.3.1.2 攻撃用ウイルス液

マダイイリドウイルス強毒株（付記）の培養ウイルス液をリン酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釈液で段階希釈し、対照群の死亡率が 80%と予測される希釈とそれ以下の適切な3段階の希釈ウイルス液を攻撃用ウイルス液とする。

1.3.2 試験方法

1.2の試験最終日の前日から24時間以上餌止めした試験群及び対照群それぞれ15尾以上の腹腔内に、攻撃用ウイルス液を0.1mL ずつ注射して攻撃する。攻撃した後、飼育水温 26℃で21日間飼育観察して各群の生死を調べる。

1.3.3 判定

対照群の 50%以上が死亡した攻撃用ウイルスの希釈段階のうち、少なくとも1段階において、試験群の生存率は、対照群のそれより有意に高い値を示さなければならない（Fisher の直接確率計算法、 $P < 0.05$ ）。

付記 マダイイリドウイルス強毒株

マダイイリドウイルス IIF245 株又はこれと同等以上の毒力を有する株

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部のぶりびブリオ病・ α 溶血性レンサ球菌症・ストレプトコッカス・ジスガラクチエ感染症混合不活化ワクチンの項の付記1中「加熱死菌」を「死菌」に、「ぶり」を「かんばち又はぶり」に、「256～512倍となるよう調製し」を「256～512倍となるように濃度を調整し」に改める。

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部のイリドウイルス病・ぶりびブリオ病・ α 溶血性レンサ球菌症混合不活化ワクチンの項の付記3中「加熱死菌」を「死菌」に改める。

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部のイリドウイルス病・ぶりピブリオ病・ α 溶血性レンサ球菌混合不活化ワクチンの項の次に次のように加える。

イリドウイルス病・ぶりピブリオ病・ α 溶血性レンサ球菌 症・類結節症混合(多糖アジュバント加)不活化ワクチン

ピブリオ・アングイラルム J-O-3 型、ラクトコッカス・ガルピエ及びフォトバクテリウム・ダムセラ・サブスピーシーズ・ピシシダの培養菌液並びにマダイイリド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、多糖アジュバントを添加して混合したワクチンである。

1 小分製品の試験

1.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

1.2 安全試験

1.2.1 試験材料

1.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.2.1.2 試験動物

水温 25℃、循環式で7日間以上飼育し、異常のないことを確認した体重 30～300g のかんばち又はぶり 20尾以上を用いる。

1.2.2 試験方法

試験動物は、24時間以上餌止めした後、1群 10尾以上ずつの2群に分ける。1群の試験動物に注射材料 0.5mL を腹腔内に注射し、試験群とする。他の1群は、対照群とし、試験群と同様の方法でリン酸緩衝食塩液（以下この項において「PBS」という。）を注射する。その後、それぞれ水温 25℃、循環式で飼育し、14日間観察する。

1.2.3 判定

観察期間中、対照群においては臨床的な異常を認めてはならず、試験群においては一過性の摂餌不良を認めることがあっても、その他の臨床的な異常を認めてはならない。

1.3 力価試験

1.3.1 イリドウイルス病力価試験

1.3.1.1 試験材料

1.3.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.3.1.1.2 試験動物

水温 20℃、循環式で維持していたかんばち又はぶりを1日当たり 1～2℃ずつ温度上昇させて馴致し、4日間かけて飼育水温を 27℃に上昇させる。次に、3日間 27℃で予備飼育し、合計7日間かけて 27℃に温度馴致し、異常のないことを確認した体重 30～50g のかんばち又はぶり 180尾以上を用いる。

1.3.1.1.3 攻撃用ウイルス液

マダイイリドウイルス強毒株（付記1）の感染まだい脾臓乳剤（付記2）を 2 vol %牛胎子血清加イーグル MEM で階段希釈し、適当と考えられる3段階の希釈ウイルス液を攻撃用ウイルス液とする。

1.3.1.2 試験方法

試験動物は、24時間以上餌止めした後、1群 90尾以上ずつの2群に分ける。1群の試験動物に、

注射材料 0.1mL を腹腔内に注射し、試験群とする。他の 1 群は、対照群とし、試験群と同様の方法で PBS を注射する。水温 27℃、循環式で 10 日間飼育する。

注射後 9 日目から 24 時間以上餌止めした試験群及び対照群をそれぞれ 30 尾以上の 3 群ずつに分けて、それぞれの攻撃用ウイルス液 0.1mL を腹腔内に注射して攻撃し、20 日間観察して各群の生死を調べる。

1.3.1.3 判定

対照群の 20 % 以上が死亡した攻撃用ウイルスの希釈段階のうち、少なくとも 1 段階において、試験群の生存率は、対照群のそれより有意に高い値を示さなければならない (Fisher の直接確率計算法、 $P < 0.05$)。

1.3.2 ビブリオ病力価試験

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

水温 25℃、循環式で 7 日間以上飼育し、異常のないことを確認した体重 30 ~ 300g のかんぱち又はぶり 20 尾以上を用いる。

1.3.2.2 試験方法

試験動物は、24 時間以上餌止めした後、1 群 10 尾以上ずつの 2 群に分ける。1 群の試験動物に、注射材料 0.1mL を腹腔内に注射し、試験群とする。他の 1 群は、対照群とし、試験群と同様の方法で PBS を注射する。その後、それぞれ水温 25℃、循環式で 14 日間飼育する。

注射後 14 日目に試験群及び対照群のそれぞれ 10 尾を取り上げて採血し、45℃で 20 分間非働化した血清について、マイクロタイター法で凝集試験を行う。

試験群と対照群の血清、参照陽性血清 (付記 3) 及び参照陰性血清 (付記 4) を PBS で 2 倍階段希釈し、各希釈血清に凝集反応用抗原 (付記 5) を等量加えて 25℃で 2 時間反応させ、更に 4℃で 1 夜静置した後、管底の凝集の有無を観察する。

1.3.2.3 判定

凝集を認めた血清の最高希釈倍数を凝集抗体価とする。

試験群の血清の抗体価の幾何平均値は 16 倍以上でなければならず、対照群の血清の抗体価の幾何平均値は 2 倍以下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。

1.3.3 α 溶血性レンサ球菌症力価試験

1.3.3.1 試験材料

1.3.3.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.3.3.1.2 試験動物

水温 25℃、循環式で 7 日間以上飼育し、異常のないことを確認した体重 30 ~ 300g のかんぱち又はぶり 30 尾以上を用いる。

1.3.3.1.3 攻撃用菌液

ラクトコッカス・ガルビエ強毒菌 (付記 6) の培養菌液を PBS で希釈し、対照群の死亡率が 80 % と予測される希釈菌液を攻撃用菌液とする。

1.3.3.2 試験方法

試験動物は、24 時間以上餌止めした後、1 群 15 尾以上ずつの 2 群に分ける。1 群の試験動物に、注射材料 0.1mL を腹腔内に注射し、試験群とする。他の 1 群は、対照群とし、試験群と同様の方法で PBS を注射する。その後、それぞれ水温 25℃、循環式で 14 日間飼育する。

注射後 13 日目から 24 時間以上餌止めした試験群及び対照群それぞれ 15 尾以上の腹腔内に、攻

撃用菌液を 0.1mL ずつ注射して攻撃する。攻撃した後、水温 25℃で 14 日間飼育観察して各群の生死を調べる。

1.3.3.3 判定

試験群の生存率は、対照群のそれより有意に高い値を示さなければならない (Fisher の直接確率計算法、 $P < 0.05$)。この場合、対照群は、60%以上が死亡しなければならない。

1.3.4 類結節症力価試験

1.3.4.1 試験材料

1.3.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.3.4.1.2 試験動物

水温 25℃、循環式で 7 日間以上飼育し、異常のないことを確認した体重 30 ~ 300g のかんばち又はぶり 180 尾以上を用いる。

1.3.4.1.3 攻撃用菌液

寒天培地上に発育させたフォトバクテリウム・ダムセラ・サブスピーシーズ・ピシシダ強毒菌 (付記 7) を掻き取ってトリプトース・ホスフェイト・プロスに浮遊させた後、同プロスで 10 倍階段希釈し、対照群の死亡率が 80%と予測される希釈とその前後の 3 段階の希釈菌液を攻撃用菌液とする。

1.3.4.2 試験方法

試験動物は、24 時間以上餌止めした後、1 群 90 尾以上ずつの 2 群に分ける。1 群の試験動物に、注射材料 0.1mL を腹腔内に注射し、試験群とする。他の 1 群は、対照群とし、試験群と同様の方法で PBS を注射する。その後、それぞれ水温 25℃、循環式で 14 日間飼育する。

注射後 13 日目から 24 時間以上餌止めした試験群及び対照群それぞれ 30 尾以上の 3 群ずつに分けて、それぞれの攻撃用菌液 0.1mL を腹腔内に注射して攻撃し、14 日間観察して各群の生死を調べる。

1.3.4.3 判定

対照群の 50%以上が死亡した攻撃用菌液の希釈段階のうち、少なくとも 1 段階において、試験群の生存率は、対照群のそれより有意に高い値を示さなければならない (Fisher の直接確率計算法、 $P < 0.05$)。

付記 1 マダイイリドウイルス強毒株

マダイイリドウイルス Ka-20/C 株又はこれと同等以上の毒力を有する株

付記 2 感染まだい脾臓乳剤

マダイイリドウイルス強毒株を体重 30 ~ 100g のまだいの腹腔内に注射し、発症期に脾臓を採材し、2 vol %牛胎子血清加イーグル MEM 又は適当と認められた液で 10 倍乳剤とし、これを 2,000rpm で 10 分間遠心した上清

付記 3 参照陽性血清

ビブリオ・アングイラルム J-O-3 型の死菌をかんばんち又はぶりに注射して得た血清であって、凝集抗体価が 256 ~ 512 倍となるように濃度を調整し、凍結又は凍結乾燥したもの。

付記 4 参照陰性血清

健康なぶりの血清であって、凝集抗体価が 2 倍未満であり、凍結又は凍結乾燥したもの。

付記 5 凝集反応用抗原

ビブリオ・アングイラルム J-O-3 型の加熱死菌を PBS で McFarland 混濁管 No. 1 ～ 3 の濃度になるように浮遊させたものであって、既知抗体価の陽性血清に対し所定の凝集抗体価を示すことを確認したもの。

付記 6 ラクトコッカス・ガルビエ強毒菌

ラクトコッカス・ガルビエ KG9502 株又はこれと同等以上の毒力を有する株

付記 7 フォトバクテリウム・ダムセラ・サブスピーシーズ・ピシシダ強毒菌

フォトバクテリウム・ダムセラ・サブスピーシーズ・ピシシダ AW-02 G-3 株又はこれと同等以上の毒力を有する株

ワクチン（シードロット製剤）の部のマンヘミア・ヘモリチカ（1型）感染症不活化ワクチン（油性アジュバント加溶解用液）（シード）の項を削る。

ワクチン（シードロット製剤）の部の犬レプトスピラ病（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）の項の次に次のように加える。

ジステンパー・犬アデノウイルス（2型）感染症・犬パラインフルエンザ・犬パルボウイルス感染症・犬コロナウイルス感染症・犬レプトスピラ病（カニコーラ・コペンハーゲニー・ヘブドマディス・オータムナリス・オーストラリス）混合ワクチン（シード）

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それぞれ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、レプトスピラ・コペンハーゲニー、レプトスピラ・ヘブドマディス、レプトスピラ・オータムナリス及びレプトスピラ・オーストラリスの培養菌液を不活化した後、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。

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 ジステンパーウイルス含有量試験

1.2.1.1 試験材料

1.2.1.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の滅菌水で溶解する。試験品中のジステンパーウイルス以外のウイルスの各抗血清（付記1から4まで）を非働化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液（付記5）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

1.2.1.1.2 培養細胞

Vero細胞を用いる。

1.2.1.1.2 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60分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で7日間回転培養し、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^{3.5}TCID₅₀以上でなければならない。

1.2.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験

1.2.2.1 試験材料

1.2.2.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の滅菌水で溶解する。試験品中の犬アデノウイルス（2型）以外のウイルスの各抗血清（付記2から4まで及び6）を非働化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

1.2.2.1.2 培養細胞

豚腎培養細胞を用いる。

1.2.2.2 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 60 分間吸着後、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で 7 日間回転培養し、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^{5.5}TCID₅₀ 以上でなければならない。

1.2.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

1.2.3.1 試験材料

1.2.3.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の滅菌水で溶解する。試験品中の犬パラインフルエンザウイルス以外のウイルスの各抗血清（付記 1、3、4 及び 6）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。

1.2.3.1.2 培養細胞

Vero 細胞を用いる。

1.2.3.2 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 60 分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を加え、30℃で 7 日間回転培養し、観察する。

1.2.3.3 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。

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。

1.2.4 犬パルボウイルス含有量試験

1.2.4.1 試験材料

1.2.4.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の滅菌水で溶解する。試験品中の犬パルボウイルス以外のウイルスの各抗血清（付記 1、2、4 及び 6）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。

1.2.4.1.2 培養細胞

猫腎株化細胞浮遊液を用いる。

1.2.4.2 試験方法

試料 0.1mL ずつを 4 本以上の培養試験管に接種し、30℃で 24 時間静置培養した後、ウイルス増殖用培養液 1.0mL と交換し、30℃で 6 日間回転培養する。培養後、培養試験管に赤血球凝集用リン酸緩衝食塩液（付記 7）で濃度を調整した 1 vol % 豚赤血球浮遊液を 0.2mL 加え、4℃で 18 時間静置した後、観察する。

1.2.4.3 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。

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。

1.2.5 犬コロナウイルス含有量試験

1.2.5.1 試験材料

1.2.5.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の滅菌水で溶解する。試験品中の犬コロナウイルス以外のウイルスの各抗血清（付記 1 から 3 まで及び 6）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。

1.2.5.1.2 培養細胞

猫腎株化細胞を用いる。

1.2.5.2 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 60 分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で 7 日間回転培養し、観察する。

1.2.5.3 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。

試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たり 10^{4.0}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により試験を行い、これに適合しなければならない。

付記 1 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、試験品の犬アデノウイルス（2型）を完全に中和できるもの。

付記 2 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 3 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、試験品の犬パルボウイルスを完全に中和できるもの。

付記 4 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、試験品の犬コロナウイルスを完全に中和できるもの。

付記 5 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 ~ 50 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 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、試験品のジステンパーウイルスを完全に中和できるもの。

付記 7 赤血球凝集用リン酸緩衝食塩液

A液 800mL 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

水 残量

B液 100mL 中

塩化マグネシウム六水和物

0.1 g

水

残量

C液 100mL 中

塩化カルシウム

0.1 g

水

残量

A液、B液及びC液を8 : 1 : 1に混合した後、5 w/v %牛血清アルブミン液を2 vol %添加したもの。

(別紙3)

○農林水産省告示第二百五十九号

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。

平成二十五年一月二十二日

農林水産大臣 林 芳正

表ワクチン(シールドロット製剤を除く。)の部中

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	761,500	450,900	35	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—粘膜病・牛パラインフルエンザ・牛RSウイルス感染症・牛アデノウイルス感染症混合生ワクチン	761,500	450,900	35	29	29	2	
牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢—粘膜病2価・牛パラインフルエンザ・牛RSウイルス感染症・牛ア	1,549,700	507,200	41	27	26	2	

15.

デノウイルス感染症混合生 ワクチン								
「イリドウイルス病不活化ワ クチン	302,100	20,300		11	9	2	を	
「イリドウイルス病不活化ワ クチン	302,100	20,300		11	9	2		
イリドウイルス病（油性ア ジュバント加）不活化ワク チン	417,100	20,300			9	2	に	
「イリドウイルス病・ぶりビ ブリオ病・α溶血性レンサ 球菌症混合不活化ワクチン	862,200	20,300			11	2	を	

「イリドウイルス病・ぶりビ ブリオ病・α溶血性レンサ 球菌症混合不活化ワクチン	862,200	20,300			11	2
イリドウイルス病・ぶりビ ブリオ病・α溶血性レンサ 球菌症・類結節症混合（多 糖アジュバント加）不活化 ワクチン	979,000	20,300			12	2

※

炭疽生ワクチン（シード）の単位

「炭疽生ワクチン（シード）	2,200	22,200		2		2
---------------	-------	--------	--	---	--	---

マンヘミア・ヘモリチカ (1型) 感染症不活化ワクチン (油性アジュバント加溶解用液) (シード)	212,900	20,300		11	11	2	セ
炭疽生ワクチン (シード)	2,200	22,200		2		2	セ
犬レプトスピラ病 (カニコラ・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)	28,400	20,300	37			5	セ
犬レプトスピラ病 (カニコラ・イクテロヘモラジー	28,400	20,300	37			5	

・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)

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
ドマデイス・オータムナリ

40,400

202,200

32

5

に

ス・オーストラリス) 混合

ワクチン (シード)

改訂版

(別紙4)

○農林水産省告示第二百六十号

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。

平成二十五年一月二十二日

農林水産大臣 林 芳正

ただし書中「(87)まで」を「(88)まで」に改め、(131)を(132)とし、(14)から(130)までを一ずつ繰り下げ、(13)の次に次のように加える。

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

(別紙5)

○農林水産省告示第二百六十一号

動物医薬品検査所標準製剤等配布規程(昭和四十五年五月一日農林省告示第六百三十七号)の一部を次のように改正し、公布の日から施行する。

平成二十五年一月二十二日

農林水産大臣 林 芳正

別表中

牛流行熱ウイルスYHL株	1アンプル	10,200円	を
動物用標準ツベルクリン	1バイアル	11,800円	
牛流行熱ウイルスYHL株	1アンプル	10,200円	に
動物用破傷風試験毒素	1バイアル	10,500円	
動物用標準沈降破傷風トキソイド	1バイアル	11,100円	
動物用標準ツベルクリン	1アンプル	11,800円	

抗豚コレラウイルスGPEーモノクローナル抗体	1 アンプル	6,000円	」
抗豚コレラウイルスGPEーモノクローナル抗体	1 アンプル	6,000円	」
参照抗豚コレラウイルス豚血清	1 バイアル	5,200円	
ラクトコッカス・ガルビエKG9502株	1 アンプル	5,800円	」
ラクトコッカス・ガルビエKG9502株	1 アンプル	5,800円	」
参照ビブリオ病力価試験用陽性血清	1 アンプル	4,500円	
抗リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス兎血清	1 バイアル	4,300円	
リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス感染細胞固定スライド	1 スライド	3,800円	

2020

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)
牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢-粘膜病・牛パラインフルエンザ・牛RSウイルス感染症・牛アデノウイルス感染症混合生ワクチン	100	牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢-粘膜病・牛パラインフルエンザ・牛RSウイルス感染症・牛アデノウイルス感染症混合生ワクチン	100
<u>牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢-粘膜病2価・牛パラインフルエンザ・牛RSウイルス感染症・牛アデノウイルス感染症混合生ワクチン</u>	<u>120</u>		
(略)	(略)	(略)	(略)
イリドウイルス病不活化ワクチン	110	イリドウイルス病不活化ワクチン	110
<u>イリドウイルス病(油性アジュバント加)不活化ワクチン</u>	<u>120</u>		
(略)	(略)	(略)	(略)
イリドウイルス病・ぶりビブリオ病・α溶血性レンサ球菌症混合不活化ワクチン	110	イリドウイルス病・ぶりビブリオ病・α溶血性レンサ球菌症混合不活化ワクチン	110
<u>イリドウイルス病・ぶりビブリオ病・α溶血性レンサ球菌症・類結節症混合(多糖アジュバント加)不活化ワクチン</u>	<u>110</u>		

(略)	(略)	
(ワクチン(シードロット製剤)の部)		
(略)	(略)	
炭疽生ワクチン(シード)		30
(削る。)		
(略)	(略)	
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)		50
<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・オータムナリス・オーストラリス)混合ワクチン(シード)</u>		50
(略)	(略)	
(診断液の部)		
(略)	(略)	

(略)	(略)	
(ワクチン(シードロット製剤)の部)		
(略)	(略)	
炭疽生ワクチン(シード)		30
<u>マンヘミア・ヘモリチカ(1型)感染症不活化ワクチン(油性アジュバント加溶解用液)(シード)</u>		50
(略)	(略)	
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)		50
(略)	(略)	
(診断液の部)		
(略)	(略)	