（別紙１）

○農林水産省告示第六百四十六号

薬事法（昭和三十五年法律第百四十五号）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。

平成二十二年四月二十二日

農林水産大臣　赤松　広隆

（「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。）の部牛クロストリジウム感染症５種混合（アジュバント加）トキソイドの項の次に次のように加える。

牛クロストリジウム感染症５種混合（アジュバント加）トキソイド

1 定義

気腫疽菌、クロストリジウム・セプチカム、クロストリジウム・ノビイ、クロストリジウム・パーフリンゲンス及びクロストリジウム・ソルデリーを培養して得た培養上清を無毒化したものを混合し、アルミニウムゲルアジュバントを添加したトキソイドである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 気腫疽菌

2.1.1.1 名称

気腫疽菌沖縄F株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

対数増殖期の菌体は周毛性の鞭毛を形成する。

2.1.1.3 継代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株では２代以内、種菌では３代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結乾燥して５℃以下で保存する。

2.1.2 クロストリジウム・セプチカム

2.1.2.1 名称

クロストリジウム・セプチカム No.44T 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

培養ろ液をマウスの静脈内に注射すると毒性を示す。

2.1.2.3 継代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株では２代以内、種菌では３代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結乾燥して５℃以下で保存する。

2.1.3 クロストリジウム・ノビイ

2.1.3.1 名称

クロストリジウム・ノビイ CN1025T 株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

培養ろ液をマウスの静脈内に注射すると毒性を示す。

2.1.3.3 継代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株では２代以内、種菌では３代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結乾燥して５℃以下で保存する。

2.1.4 クロストリジウム・パーフリンゲンス

2.1.4.1 名称

クロストリジウム・パーフリンゲンス PB6KT 株又はこれと同等と認められた株

2.1.4.2 性状

培養ろ液をマウスの静脈内に注射すると毒性を示す。

2.1.4.3 継代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株では２代以内、種菌では３代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結乾燥して５℃以下で保存する。

2.1.5 クロストリジウム・ソルデリー

2.1.5.1 名称

クロストリジウム・ソルデリー 3703T 株又はこれと同等と認められた株

2.1.5.2 性状

培養ろ液をマウスの静脈内に注射すると毒性を示す。

2.1.5.3 継代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株では２代以内、種菌では３代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結乾燥して５℃以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 気腫疽菌

2.2.1.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.2.2 クロストリジウム・セプチカム

2.2.2.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.2.3 クロストリジウム・ノビイ

2.2.3.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.2.4 クロストリジウム・パーフリンゲンス

2.2.4.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.2.5 クロストリジウム・ソルデリー

2.2.5.1 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 気腫疽菌原液

2.3.1.1 培養

種菌を培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.1.1 の試験を行う。

2.3.1.2 不活化

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。

不活化菌液について、3.2 の試験を行う。

2.3.1.3 原液

不活化菌液を遠心した上清、又はこれを適当と認められた方法で濃縮したものを原液とする。

原液について、3.3 の試験を行う。

2.3.2 クロストリジウム・セプチカム原液

2.3.2.1 培養

種菌を培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.1.1、3.1.2.1 及び 3.1.3.1 の試験を行う。

2.3.2.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加え、不活化したものを不活化菌液とする。
不活化菌液について、3.2 の試験を行う。

2.3.2.3 原液

不活化菌液を遠心した上清、又はこれを適当と認められた方法で濃縮したものを原液とする。
原液について、3.3.1 及び 3.3.2 の試験を行う。

2.3.3 クロストリジウム・ノビイ原液

2.3.3.1 培養

種菌を培養したものを培養菌液とする。
培養菌液について、3.1.1、3.1.2.1 及び 3.1.3.1 の試験を行う。

2.3.3.2 不活化

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。
不活化菌液について、3.2 の試験を行う。

2.3.3.3 原液

不活化菌液を遠心した上清、又はこれを適当と認められた方法で濃縮したものを原液とする。
原液について、3.3.1 及び 3.3.2 の試験を行う。

2.3.4 クロストリジウム・パーフリンゲンス原液

2.3.4.1 培養

種菌を培養したものを培養菌液とする。
培養菌液について、3.1.1、3.1.2.2 及び 3.1.3.2 の試験を行う。

2.3.4.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加え、不活化したものを不活化菌液とする。
不活化菌液について、3.2 の試験を行う。

2.3.4.3 原液

不活化菌液を遠心した上清、又はこれを適当と認められた方法で濃縮したものを原液とする。
原液について、3.3.1 及び 3.3.2 の試験を行う。

2.3.5 クロストリジウム・ソルデリー原液

2.3.5.1 培養

種菌を培養したものを培養菌液とする。
培養菌液について、3.1.1、3.1.2.3 及び 3.1.3.1 の試験を行う。

2.3.5.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加え、不活化したものを不活化菌液とする。
不活化菌液について、3.2 の試験を行う。

2.3.5.3 原液

不活化菌液を遠心した上清、又はこれを適当と認められた方法で濃縮したものを原液とする。
原液について、3.3.1 及び 3.3.2 の試験を行う。

2.4 最終バルク

気腫疽菌原液、クロストリジウム・セプチカム原液、クロストリジウム・ノビイ原液、クロストリジウム・パーフリンゲンス原液及びクロストリジウム・ソルデリー原液を混合し、濃度調整後アジュバントを添加し、最終バルクとする。

2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。
小分製品について、3.4 の試験を行う。

3 試験法

3.1 培養菌液の試験

3.1.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.1 試験材料

検体及び普通寒天斜面培地を用いる。

3.1.1.2 試験方法

検体 0.05mL を普通寒天斜面培地２本に塗抹し、37 ℃で好気的に 48 時間培養する。

3.1.1.3 判定

いずれの斜面も菌の発育を認めてはならない。

3.1.2 毒力試験

3.1.2.1 クロストリジウム・セプチカム及びクロストリジウム・ノビイ

3.1.2.1.1 試験材料

3.1.2.1.1.1 試料

各検体を除菌ろ過して試料とする。

3.1.2.1.1.2 培養細胞

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

3.1.2.1.2 試験方法

細胞培養液（付記１）で２倍階段希釈した試料を培養細胞に接種し、37 ℃、５ vol %炭酸ガス下でクロストリジウム・セプチカムでは１日間、クロストリジウム・ノビイでは２日間培養し、観察する。

3.1.2.1.3 判定

培養細胞の 50 %以上に CPE を認めたものを陽性とし、陽性を示した試料の最高希釈倍数を毒力とする。検体の毒力は 1,600 倍以上でなければならない。

3.1.2.2 クロストリジウム・パーフリンゲンス

3.1.2.2.1 試験材料

3.1.2.2.1.1 試料

検体を除菌ろ過して試料とする。

3.1.2.2.1.2 卵黄液

鶏卵黄をホウ酸緩衝液（付記２）で 10 vol %の濃度に調整したものの遠心上清を用いる。

3.1.2.2.2 試験方法

ホウ酸緩衝液で２倍階段希釈した試料、参照毒素（付記３）及び希釈液を加えたマイクロプレートの各穴に等量の卵黄液を加え、37 ℃で１時間感作後、波長 630nm で各穴の吸光度を測定する。

3.1.2.2.3 判定

希釈した試料及び参照毒素の穴の吸光度から希釈液の穴の吸光度を引く。参照毒素の値の 50 %以上の値を示したものを陽性とし、陽性とした試料の最高希釈倍数を毒力とする。試料の毒力は 16 倍以上でなければならない。

3.1.2.3 クロストリジウム・ソルデリー

3.1.2.3.1 試験材料

3.1.2.3.1.1 試料

検体を除菌ろ過して試料とする。

3.1.2.3.1.2 培養細胞

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

3.1.2.3.2 試験方法

細胞培養液で２倍階段希釈した試料に、抗クロストリジウム・ソルデリー HT 血清（付記４）又は抗クロストリジウム・ソルデリー LT 血清（付記５）を加えて 37 ℃で１時間感作したものを、それぞれクロストリジウム・ソルデリー LT 測定用試料、クロストリジウム・ソルデリー HT 測定用試料とし、各測定用試料を培養細胞に接種し、37 ℃、５ vol %炭酸ガス下で２日間培養し、観察する。

3.1.2.3.3 判定

培養細胞の 50 %以上に CPE を認めたものを陽性とし、陽性を示した試料の最高希釈倍数を毒力とする。クロストリジウム・ソルデリー LT は 16,000 倍以上、クロストリジウム・ソルデリー HT は 32 倍以上でなければならない。

3.1.3 同定試験

3.1.3.1 クロストリジウム・セプチカム、クロストリジウム・ノビイ及びクロストリジウム・ソルデリー

3.1.3.1.1 試験材料

3.1.3.1.1.1 試料

各検体を除菌ろ過して試料とする。

3.1.3.1.1.2 培養細胞

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

3.1.3.1.2 試験方法

クロストリジウム・セプチカムの試料に抗クロストリジウム・セプチカムα毒素血清（付記６）、クロストリジウム・ノビイの試料に抗クロストリジウム・ノビイα毒素血清（付記７）、クロストリジウム・ソルデリーの試料に抗クロストリジウム・ソルデリー LT 血清及び抗クロストリジウム・ソルデリー HT 血清を加えて 37 ℃で１時間感作したものを培養細胞に接種し、37 ℃、5 vol %炭酸ガス下でクロストリジウム・セプチカムでは１日間、クロストリジウム・ノビイ及びクロストリジウム・ソルデリーでは２日間培養し、観察する。

3.1.3.1.3 判定

培養細胞に CPE を認めてはならない。

3.1.3.2 クロストリジウム・パーフリンゲンス

3.1.3.2.1 試験材料

3.1.3.2.1.1 試料

検体を除菌ろ過して試料とする。

3.1.3.2.1.2 卵黄液

鶏卵黄をホウ酸緩衝液で 10vol%の濃度に調整したものの遠心上清を用いる。

3.1.3.2.2 試験方法

ホウ酸緩衝液で２倍階段希釈した試料に等量の抗クロストリジウム・パーフリンゲンスα毒素血清（付記８）を加え 37 ℃で１時間感作したもの及び希釈液のみを加えた穴に、等量の卵黄液を加え 37 ℃で１時間感作後、波長 630nm で各穴の吸光度を測定する。

3.1.3.2.3 判定

試料の吸光度から希釈液の吸光度を差し引いた時、その値は 0.20 未満でなければならない。

3.2 不活化菌液の試験

3.2.1 生菌否定試験

3.2.1.1 試験材料

検体及び液状チオグリコール酸培地を用いる。

3.2.1.2 試験方法

検体ごとに培地４本を用い、２本には１ mL ずつ、他の２本には２ mL ずつ検体を接種し、37 ℃で 14 日間培養する。

3.2.1.3 判定

培地に菌の発育を認めてはならない。

3.3 原液の試験

3.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.2 無毒化試験

3.3.2.1 試験材料

3.3.2.1.1 試験動物

4週齢のマウスを用いる。

3.3.2.2 試験方法

試験動物5匹を1群として、各検体を1匹当たり 0.5mL ずつ皮下に注射し、7日間観察する。

3.3.2.3 判定

試験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。

3.3.3 抗原量の定量試験

3.3.3.1 試験材料

3.3.3.1.1 試料

気腫疽菌の検体を洗浄液で100倍から2倍階段希釈したものを試料とする。

3.3.3.1.2 抗原捕捉用抗体

抗原捕捉用抗気腫疽菌鞭毛抗体（付記9）を用いる。

3.3.3.2 試験方法

試料について酵素抗体反応（以下「ELISA」という。）を行う。適当と認められたブロッキング液を気腫疽菌抗原量定量用プレート（付記 10）の各穴に、300 μ L ずつ加え、2～5℃で一夜反応させた後、洗浄液（付記 11）で5回洗浄する。試料又は参照抗原（付記 12）を穴に 100 μ L ずつ加え、37 ℃で 30 分間反応させる。プレートを洗浄液で5回洗浄後、洗浄液で希釈した抗気腫疽菌鞭毛抗体（付記 13）を各穴に 100 μ L ずつ加え、30 ℃で 30 分間反応させる。プレートを洗浄液で5回洗浄後、洗浄液で希釈した酵素標識抗モルモット抗体（付記 14）を各穴に 100 μ L ずつ加え 30 ℃で 30 分間反応させる。プレートを洗浄液で5回洗浄後、基質液（付記 15）を各穴に 100 μ L ずつ加え、遮光して 30 ℃で 30 分間反応させ、1mol/L 硫酸溶液を各穴に 50 μ L ずつ加えて反応を停止させる。各穴の吸光度を主波長 492nm、副波長 630nm で測定し、ELISA 値とする。

3.3.3.3 判定

参照抗原の ELISA 値が 0.60 に最も近い希釈倍数を求め、その蛋白量を計算する。試料の ELISA 値が 0.60 に最も近い希釈倍数を求め、次式より検体中の抗原量を求める。

抗原量（μ g/mL）＝試料の希釈倍数×参照抗原の蛋白量（μ g/mL）

検体に含まれる抗原量は、400 μ g/mL 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ず、異物又は異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は均一でなければならない。

3.4.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.3 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。

3.4.4 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、ホルマリン含有量は 0.3vol%以下でなければならない。

3.4.5 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 1.3mg 以下でなければならない。

3.4.6 毒性限度確認試験

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

3.4.7 力価試験

3.4.7.1 気腫疽力価試験

3.4.7.1.1 試験材料

3.4.7.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.7.1.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

3.4.7.1.1.3 反応用抗原

気腫疽菌酵素抗体反応用抗原（付記 16）を用いる。

3.4.7.1.2 試験方法

試験動物８匹を試験群、２匹を対照群とする。

注射材料 0.4mL を２週間隔で２回、試験群の筋肉内に注射する。第２回注射後 10 日目に、試験群及び対照群から採血した血清をそれぞれプールしたものについて ELISA を行う。適当と認められたブロッキング液を気腫疽菌抗原吸着プレート（付記 17）の穴に 300 μ L ずつ加え、２～５℃で一夜反応させた後、洗浄液で５回洗浄する。洗浄液で５倍希釈から２倍階段希釈した検体、参照陽性血清（付記 18）及び参照陰性血清（付記 19）に等量の酵素標識抗気腫疽菌鞭毛モノクローナル抗体（付記 20）を加え、よく混合した後、検体は１希釈当たり４穴以上、参照陽性血清及び参照陰性血清は１希釈当たり２穴以上に 100 μ L ずつ加え、30 ℃で１時間反応させる。別にリン酸緩衝食塩液で２倍に希釈した酵素標識抗気腫疽菌鞭毛モノクローナル抗体を 100 μ L ずつ６穴以上に加え、標識抗体対照とする。プレートを 30 ℃で１時間反応させた後、洗浄液で５回洗浄し、基質液を各穴に 100 μ L ずつ加え、遮光して 30 ℃で 30 分間反応させ、1 mol/L 硫酸溶液を 50 μ L ずつ加えて反応を停止させる。各穴の吸光度を主波長 492nm 及び副波長 630nm で測定し、その平均値を ELISA 値とする。

3.4.7.1.3 判定

標識抗体対照の平均 ELISA 値の 1/2 以下の ELISA 値を示した血清の最高希釈倍数を ELISA 抗体価とする。

試験群の ELISA 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５倍未満でなければならない。また、参照陽性血清の ELISA 抗体価は 20 ～ 80 倍、参照陰性血清の ELISA 抗体価は５倍未満でなければならず、標識抗体対照の ELISA 値は 0.80 ～ 1.40 でなければならない。

3.4.7.2 クロストリジウム・セプチカム感染症力価試験

3.4.7.2.1 試験材料

3.4.7.2.1.1 試験動物

3.4.7.1 の試験に用いた動物を用いる。

3.4.7.2.1.2 培養細胞

Vero 細胞を細胞培養液を用いて２× 10^5 個/mL の濃度に浮遊させ、細胞培養用プレートに 100 μ L ずつ加え、１日間培養し、単層を形成させたもの（以下「Vero 細胞培養プレート」という。）を用いる。

3.4.7.2.1.3 中和用毒素

クロストリジウム・セプチカム中和試験用毒素（付記 21）を用いる。

3.4.7.2.2 試験方法

3.4.7.1.2 で得られたプール血清を細胞培養液で５倍に希釈し、更に２倍階段希釈する。各段階の希釈液に４細胞毒性単位（付記 22）となるように細胞培養液で希釈したクロストリジウム・セプチカム中和試験用毒素を等量混合し、37 ℃で１時間反応させる。その後、細胞培養液を除いた Vero 細胞培養プレートの各穴に 100 μ L ずつ加え、37 ℃で１日間培養し、倒立顕微鏡で観察する。

3.4.7.2.3 判定

Vero 細胞培養プレート全穴中の 50 %以上の CPE を抑制した血清の最高希釈倍数を抗毒素価とする。

試験群の抗毒素価は、10 倍以上でなければならない。この場合、対照群では５倍未満でなければならない。

3.4.7.3 クロストリジウム・ノビイ感染症力価試験

3.4.7.3.1 試験材料

3.4.7.3.1.1 試験動物

3.4.7.1 の試験に用いた動物を用いる。

3.4.7.3.1.2 培養細胞

Vero 細胞培養プレートを用いる。

3.4.7.3.1.3 中和用毒素

クロストリジウム・ノビイ中和試験用毒素（付記 23）を用いる。

3.4.7.3.2 試験方法

クロストリジウム・ノビイ中和試験用毒素を用い、3.4.7.2.2 を準用して抗毒素価測定試験を行う。ただし、培養期間は２日間とする。

3.4.7.3.3 判定

Vero 細胞培養プレート全穴中の 50 %以上の CPE を抑制した血清の最高希釈倍数を抗毒素価とする。

試験群の抗毒素価は、20 倍以上でなければならない。この場合、対照群では５倍未満でなければならない。

3.4.7.4 クロストリジウム・パーフリンゲンス感染症力価試験

3.4.7.4.1 試験材料

3.4.7.4.1.1 試験動物

3.4.7.1 の試験に用いた動物を用いる。

3.4.7.4.1.2 ELISA 用抗原

クロストリジウム・パーフリンゲンス酵素抗体反応用抗原（付記 24）を用いる。

3.4.7.4.2 試験方法

3.4.7.1.2 で得られたプール血清について ELISA を行う。

ブロッキング液をクロストリジウム・パーフリンゲンス抗原吸着プレート（付記 25）の穴に 300 μ L ずつ加え、２～５℃で一夜反応させた後、洗浄液で５回洗浄する。試験群及び参照陽性血清を洗浄液で 100 倍から２倍階段希釈するとともに、対照群及び参照陰性血清を洗浄液で 100 倍希釈したものを、検体は１希釈当たり４穴以上、参照陽性血清及び参照陰性血清は１希釈当たり２穴以上に 100 μ L ずつ加え、30 ℃１時間反応させる。その後、洗浄液で５回洗浄し、洗浄液で希釈した酵素標識抗モルモット抗体を各穴に 100 μ L ずつ加え、30 ℃で 30 分間反応させる。洗浄液で５回洗浄し、基質液を各穴に 100 μ L ずつ加え、遮光して 30 ℃で 30 分間反応させ、1 mol/L 硫酸溶液を各穴に 50 μ L ずつ加えて反応を停止させる。各穴の吸光度を主波長 492nm 及び副波長 630nm で測定し、その平均値を ELISA 値とする。

3.4.7.4.3 判定

ELISA 値が 0.40 以上を示した血清の最高希釈倍数を ELISA 抗体価とする。

試験群の ELISA 抗体価は、400 倍以上でなければならない。この場合、対照群では 100 倍未満でなければならない。また、参照陽性血清の ELISA 抗体価は、400 ～ 1,600 倍でなければならず、参照陰性血清の ELISA 抗体価は 100 倍未満でなければならない。

3.4.7.5 クロストリジウム・ソルデリー感染症力価試験

3.4.7.5.1 試験材料

3.4.7.5.1.1 試験動物

3.4.7.1 の試験に用いた動物を用いる。

3.4.7.5.1.2 培養細胞

Vero 細胞培養プレートを用いる。

3.4.7.5.1.3 中和用毒素

クロストリジウム・ソルデリー中和試験用毒素 LT(付記 26。以下「LT」という。）及びクロストリジウム・ソルデリー中和試験用毒素 HT（付記 27。以下「HT」という。）を用いる。

3.4.7.5.2 試験方法

LT 又は HT を用い、3.4.7.2.2 を準用して抗毒素価測定試験を行う。ただし培養期間は 2 日間とする。

3.4.7.5.3 判定

Vero 細胞培養プレート全穴中の 50 %以上の CPE を抑制した血清の最高希釈倍数を抗毒素価とする。

試験群の抗毒素価は、LT では 20 倍以上、HT では 10 倍以上でなければならない。この場合、対照群では LT 及び HT 共に 5 倍未満でなければならない。

4 貯蔵及び有効期間

有効期間は 1 年 6 か月間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その期間とする。

付記 1　細胞培養液

1,000mL 中

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

pH を 7.0 ～ 7.4 に調整する。

付記 2　ホウ酸緩衝液

1,000mL 中

四ホウ酸ナトリウム十水和物	0.57g
ホウ酸	2.1g
塩化カルシウム二水和物	1.8g
塩化ナトリウム	7.5g
水	残 量

pH を 7.6 に調整する。

付記 3　参照毒素

クロストリジウム・パーフリンゲンス培養上清から硫酸アンモニウム塩析及びイオン交換クロマトグラフィーにより精製したもので、1 μ mol/L の卵黄 L-α-ホスファチジルコリンを完全に溶解できる毒力のものを用いる。

付記 4　抗クロストリジウム・ソルデリー HT 血清

クロストリジウム・ソルデリー HT 産生株の培養上清からイオン交換クロマトグラフィーにより精製した HT を無毒化し、ウサギに免疫して得られた血清で、クロストリジウム・ソルデリー LT を中和しない。

付記 5　抗クロストリジウム・ソルデリー LT 血清

クロストリジウム・ソルデリー LT 産生株の培養上清からイオン交換クロマトグラフィーに

より精製したLTを無毒化し、ウサギに免疫して得られた血清で、クロストリジウム・ソルデリーHTを中和しない。

付記6　抗クロストリジウム・セプチカムα毒素血清

クロストリジウム・セプチカムの培養上清からイオン交換及びゲルろ過クロマトグラフィーにより精製したα毒素を無毒化し、ウサギに免疫して得られた血清である。

付記7　抗クロストリジウム・ノビイα毒素血清

クロストリジウム・ノビイの培養上清からイオン交換及び疎水クロマトグラフィーにより精製したα毒素を無毒化し、ウサギに免疫して得られた血清である。

付記8　抗クロストリジウム・パーフリンゲンスα毒素血清

国際標準品又はこれと同等品

付記9　抗原捕捉用抗気腫疽菌鞭毛抗体

適当と認められた方法により気腫疽菌の菌体表層より剥離させた鞭毛を密度勾配遠心法により精製したものを、ウサギに免疫して得られた血清から、IgGを硫酸アンモニウム塩析によって精製したものである。付記12の参照抗原の蛋白量0.25～2μg/mLでELISA値0.60を示すように調整する。

付記10　気腫疽菌抗原定量用プレート

抗原捕捉用抗気腫疽菌鞭毛抗体を参照抗原の蛋白量0.25～2μg/mLでELISA値0.60を示すように炭酸緩衝液（付記28）で希釈し、これをELISAプレートに100μLずつ加え、30℃で2時間吸着させたもの

付記11　洗浄液

1,000mL中

リン酸水素二ナトリウム十二水和物	2.9g
塩化カリウム	0.2g
リン酸二水素カリウム	0.2g
塩化ナトリウム	8.0g
ポリソルベート20	0.5mL
水	残量

付記12　参照抗原

適当と認められた方法により気腫疽菌の菌体表層より剥離させた鞭毛を密度勾配遠心法により精製したもので、蛋白量4μg/mLから2倍階段希釈して用いる。

付記13　抗気腫疽菌鞭毛抗体

鞭毛捕捉用抗気腫疽菌鞭毛抗体と同様にモルモットを用いて作製したIgGである。参照抗原の蛋白量0.25～2μg/mLでELISA値0.60を示すように調整する。

付記14　酵素標識抗モルモット抗体

抗モルモットIgGをペルオキシダーゼで標識したもの

付記 15　基質液

o-フェニレンジアミン二塩酸塩 10mg をリン酸クエン酸緩衝液（付記 29）25mL に溶解し、遮光する。使用直前に過酸化水素（30）を 10 μ L を添加して使用する。

付記 16　気腫疽菌酵素抗体反応用抗原

適当と認められた方法により気腫疽菌の菌体表層より剥離させた鞭毛を密度勾配遠心法により精製したもの

付記 17　気腫疽菌抗原吸着プレート

気腫疽菌酵素抗体反応用抗原を炭酸緩衝液で適当な濃度に希釈し、これを ELISA プレートに 100 μ L ずつ加え、30 ℃で２時間吸着させたもの

付記 18　参照陽性血清

気腫疽菌、クロストリジウム・セプチカム、クロストリジウム・パーフリンゲンス、クロストリジウム・ノビイ及びクロストリジウム・ソルデリーを培養して得た培養上清を無毒化したものを混合し、アルミニウムゲルアジュバントを添加したものをモルモットに免疫して得られた血清で、気腫疽菌及びクロストリジウム・パーフリンゲンス ELISA 抗体価を測定したとき、気腫疽菌では 20 ～ 80 倍、パーフリンゲンスでは 400 ～ 1,600 倍を示すもの

付記 19　参照陰性血清

非免疫モルモットの血清で、気腫疽菌及びクロストリジウム・パーフリンゲンス ELISA 抗体価を測定したとき、気腫疽菌では５倍未満、クロストリジウム・パーフリンゲンスでは 100 倍未満を示すもの

付記 20　酵素標識抗気腫疽菌鞭毛モノクローナル抗体

気腫疽菌鞭毛に対するモノクローナル抗体を硫酸アンモニウム塩析で精製後、ペルオキシダーゼで標識したもので、クロストリジウム・セプチカムには反応しないもの。参照陽性血清の気腫疽菌 ELISA 抗体価が 20 ～ 80 倍を示し、ELISA 値が 0.80 ～ 1.40 を示すように調整したもの

付記 21　クロストリジウム・セプチカム中和試験用毒素

クロストリジウム・セプチカム製造用培地で増殖させたクロストリジウム・セプチカム培養菌液を除菌ろ過したもの

付記 22　細胞毒性単位

Vero 細胞培養プレート穴中の培養細胞の 50 %以上に CPE を認めたものを陽性とし、陽性を示した試料の最高希釈倍数を１細胞毒性単位とする。

付記 23　クロストリジウム・ノビイ中和試験用毒素

クロストリジウム・ノビイ製造用培地で増殖させたクロストリジウム・ノビイ培養菌液を除菌ろ過したもの

付記 24　クロストリジウム・パーフリンゲンス酵素抗体反応用抗原

クロストリジウム・パーフリンゲンス製造用培地で増殖させたクロストリジウム・パーフリンゲンス培養菌液をろ過後、硫酸アンモニウム塩析及びイオン交換クロマトグラフィーにより

精製したα毒素で、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析したとき、43kDa に主要バンドを認めるもの

付記 25　クロストリジウム・パーフリンゲンス抗原吸着プレート

クロストリジウム・パーフリンゲンス酵素抗体反応用抗原を炭酸緩衝液で適当な濃度に希釈し、これを ELISA プレートに 100 μ L ずつ加え、30 ℃で 2 時間吸着させたもの

付記 26　クロストリジウム・ソルデリー中和試験用毒素 LT

クロストリジウム・ソルデリー製造用培地で増殖させたクロストリジウム・ソルデリー培養菌液を除菌ろ過後、限外ろ過により濃縮し、イオン交換クロマトグラフィーにより分離した毒素で、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析したとき、約 250kDa に主要バンドを認めるもの

付記 27　クロストリジウム・ソルデリー中和試験用毒素 HT

クロストリジウム・ソルデリー製造用培地で増殖させたクロストリジウム・ソルデリー培養菌液を除菌ろ過後、限外ろ過により濃縮し、イオン交換クロマトグラフィーにより分離した毒素で、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析したとき、約 300kDa に主要バンドを認めるもの

付記 28　炭酸緩衝液

1,000mL 中

無水炭酸ナトリウム	1.59 g
炭酸水素ナトリウム	2.93 g
水	残 量

pH を 9.6 に調整する。

付記 29　リン酸クエン酸緩衝液

1,000mL 中

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

ワクチン（シードロット製剤）の部マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症生ワクチン（シード）の次に次のように加える。

犬パルボウイルス感染症生ワクチン（シード）

1 定義

シードロット規格に適合した弱毒犬パルボウイルスを同規格に適合した株化細胞で増殖させて得たウイルス液を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

弱毒犬パルボウイルス NL-35-D-LP 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 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。

2.1.3 マスターシードウイルス

2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

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

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－ 70 ℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

マスターシードウイルスについて、3.1.1 の試験を行う。

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

2.1.4 ワーキングシードウイルス

2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、適当と認められた培養細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して－ 70 ℃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、継代及び保存

プロダクションシードウイルスは、適当と認められた培養細胞で増殖する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して－ 70 ℃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について、3.1.3 の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 培養細胞

犬腎継代細胞又は製造に適当と認められた株化細胞を用いる。

2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.3 マスターセルシード

2.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターセルシードは、2.2.2 の培養液で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器

に分注する。

分注したマスターセルシードは、特定の番号又は製造記号を付し、凍結して－ 70 ℃以下で保存する。

マスターセルシードについて、3.2.1 の試験を行う。

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

2.2.4 ワーキングセルシード

2.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.2 の培養液で増殖及び継代する。

ワーキングセルシードは、凍結して－ 70 ℃以下で保存する。

ワーキングセルシードについて、3.2.2 の試験を行う。

2.2.5 プロダクションセルシード

2.2.5.1 増殖、継代及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.2 の培養液で増殖する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して－ 70 ℃以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合について、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、培養した細胞を個体別培養細胞とみなす。ウイルス接種前のプロダクションセルシードに異常を認めてはならない。

2.3.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを 2.3.1 の細胞で培養し、適当と認められた時期に個体別培養細胞ごとに採取した培養液、そのろ液、遠心上清又はこれらを濃縮したものを混合し、原液とする。

原液について、3.3 の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液に適当と認められた安定剤を加えて混合し、最終バルクとする。

2.5 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 1.4.2.1.1.1.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.3 マイコプラズマ否定試験

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

3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

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

3.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験

3.1.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験

猫由来細胞を用いる場合には、猫白血病ウイルス／猫肉腫ウイルスについて、一般試験法の外来

性ウイルス否定試験法の 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

牛ウイルス性下痢一粘膜病ウイルス、犬パルボウイルス又は猫汎白血球減少症ウイルス及び日本脳炎ウイルス又は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 3.2.5、3.2.6 及び 3.2.9 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.5 対象動物を用いた免疫原性試験

一般試験法の対象動物を用いた免疫原性試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.6 対象動物を用いた安全性確認試験

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

3.1.1.7 病原性復帰確認試験

一般試験法の病原性復帰確認試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

3.1.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

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

3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

3.1.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

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

3.2 株化細胞の試験

3.2.1 マスターセルシードの試験

3.2.1.1 培養性状試験

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

3.2.1.2 起源動物種同定試験

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

3.2.1.3 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.4 マイコプラズマ否定試験

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

3.2.1.5 外来性ウイルス否定試験

3.2.1.5.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 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法

猫由来細胞を用いる場合には、猫白血病ウイルス／猫肉腫ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 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

牛ウイルス性下痢一粘膜病ウイルス、犬パルボウイルス又は猫汎白血球減少症ウイルス及び日本脳炎ウイルス又は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 3.2.5、3.2.6 及び 3.2.9 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.6 核学的（染色体）性状試験

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

3.2.1.7 腫瘍形成試験／腫瘍原性試験

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

3.2.2 ワーキングセルシードの試験

3.2.2.1 培養性状試験

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

3.2.2.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.2.3 マイコプラズマ否定試験

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

3.2.3 プロダクションセルシードの試験

3.2.3.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.1.4.3.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.3.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.3.3 マイコプラズマ否定試験

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

3.3 原液の試験

3.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.2 ウイルス含有量試験

3.3.2.1 試験材料

3.3.2.1.1 試料

検体を適当と認められた希釈液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.2.1.2 培養細胞

A72 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。

3.3.2.1.3 培養液

適当と認められた培養液を用いる。

3.3.2.2 試験方法

試料の 0.1mL ずつを、４本（穴）以上の培養細胞浮遊液に加え、32 ℃又は 37 ℃で１～３日間培養後、液交換を行い、さらに６～10 日間培養する。

A72 細胞については、CPE を観察する。猫腎継代細胞については、培養最終日に、各希釈試料の培養液について、これに牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液（付記１）を等量加える。更にこの混合液と等量の VAD6.0 液（付記２）で調整した 0.3 ～ 0.5vol%豚赤血球を用いて赤血球凝集試験を行う。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。

3.3.2.3 判定

CPE 又は赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、$TCID_{50}$ を算出する。

検体のウイルス含有量は、１ mL 中 $10^{4.0}TCID_{50}$ 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 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、3.4.2 及び 3.4.3 の試験を行わない。

3.4.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、乾燥製剤にあっては、固有の色調を有する乾燥物でなければならない。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液体でな

ければならず、異物又は異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.4.2 真空度試験

一般試験法の真空度試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.3 含湿度試験

一般試験法の含湿度試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.4 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.5 マイコプラズマ否定試験

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

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

3.4.6 ウイルス含有量試験

3.4.6.1 試験材料

3.4.6.1.1 試料

試験品をウイルス増殖用培養液（付記３）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。

3.4.6.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞、NLDK-1 細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.4.6.2 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、猫腎継代細胞では 32 ℃又は 37 ℃で、また、NLDK-1 細胞では 37 ℃でそれぞれ 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 ℃又は 37 ℃で６～10日間培養する。培養後、培養液を採取し、これに等量のホウ酸緩衝食塩液を加え、更にこの混合液と等量の 0.5vol%豚赤血球浮遊液を加え、２～５℃で静置した後、観察する。

3.4.6.3 判定

培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、$TCID_{50}$を算出する。

試験品のウイルス含有量は、猫腎継代細胞で 32 ℃で培養した場合は１頭分当たり$10^{5.5}TCID_{50}$ 以上、猫腎継代細胞で 37 ℃で培養した場合は１頭分当たり$10^{5.5}TCID_{50}$ 以上でなければならず、NLDK-1 細胞で培養した場合は１頭分当たり$10^{6.4}TCID_{50}$ 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。

3.4.7 異常毒性否定試験

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

3.4.8 安全試験

3.4.8.1 試験材料

3.4.8.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.8.1.2 試験動物

６か月齢未満の犬を用いる。

3.4.8.2 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１頭分を用法に従ってそれぞれ注射し、対照群とともに４週間観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その観察期間とする。

3.4.8.3 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。

3.4.9 力価試験

3.4.9.1 試験材料

3.4.9.1.1 試験動物

3.4.8 の試験に用いた動物を用いる。

3.4.9.1.2 中和試験用ウイルス又は赤血球凝集抗原

中和試験用ウイルスとして犬パルボウイルス Y-1 株又は適当と認められた犬パルボウイルス株を用いる。

赤血球凝集抗原として犬パルボウイルス赤血球凝集抗原（付記４）を用いる。

3.4.9.1.3 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.4.9.2 試験方法

中和試験又は赤血球凝集抑制試験のいずれかの試験を行う。

3.4.9.2.1 中和試験

3.4.8 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 200TCID$_{50}$ の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、35 ～ 37 ℃で 60 分間処理後、各混合液 0.1mL ずつを４本（穴）以上の培養細胞に接種し、35 ～ 37 ℃で 24 時間静置培養した後、培養液を交換し、更に 35 ～ 37 ℃で６日間培養する。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食塩液を加え、更にこの混合液と等量の VAD6.0 液で調整した 0.3 ～ 0.5vol%豚赤血球浮遊液を添加し、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、その試験方法とする。

3.4.9.2.2 赤血球凝集抑制試験

3.4.8 の試験終了時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。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、25w/v%カオリン液及び豚赤血球を加えて処理した後、牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液で２倍階段希釈する。それぞれ各希釈血清に８単位の犬パルボウイルス赤血球凝集抗原を混合し、常温で 60 分間処理し、VAD6.0 液で調整した 0.3 ～ 0.5vol%豚赤血球浮遊液を加え４℃で一夜処理し、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、その試験方法とする。

3.4.9.3 判定

3.4.9.3.1 中和試験

赤血球凝集を阻止したものを陽性とし、中和抗体価を ED$_{50}$ 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、対照群は、４倍以下でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その抗体価とする。

3.4.9.3.2 赤血球凝集抑制試験

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とする。

試験群の赤血球凝集抑制抗体価は、32 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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その抗体価とする。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後１年３か月間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その期間とする。

付記１　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２　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。

付記３　ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
牛胎子血清	20　mL
イーグル MEM	残　量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.4 ～ 7.6 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記４　犬パルボウイルス赤血球凝集抗原

犬パルボウイルス Y-1 株又は適当と認められたウイルス株を猫腎継代細胞で増殖させて得た培養上清を不活化したもので、赤血球凝集価が 128 倍以上のもの

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）

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で増殖させて得たウイルス液を混合し、凍結乾燥したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 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オンダーステポート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、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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

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、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。

2.1.1.5 プロダクションシードウイルス

2.1.1.5.1 増殖、継代及び保存

プロダクションシードウイルスは、適当と認められた培養細胞で増殖する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して－ 70 ℃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について、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）マンハッタンLPV3 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、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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

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、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。

2.1.2.5 プロダクションシードウイルス

2.1.2.5.1 増殖、継代及び保存

プロダクションシードウイルスは、適当と認められた培養細胞で増殖する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して－ 70 ℃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について、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コーネル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、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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

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、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。

2.1.3.5 プロダクションシードウイルス

2.1.3.5.1 増殖、継代及び保存

プロダクションシードウイルスは、適当と認められた培養細胞で増殖する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して－ 70 ℃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について、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 154 株又は製造に適当と認められた株

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、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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

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、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。

2.1.4.5 プロダクションシードウイルス

2.1.4.5.1 増殖、継代及び保存

プロダクションシードウイルスは、適当と認められた培養細胞で増殖する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して－ 70 ℃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について、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

製造に適当と認められた株化細胞を用いる。

2.2.1.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.1.3 マスターセルシード

2.2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

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

分注したマスターセルシードは、特定の番号又は製造記号を付し、凍結して－ 70 ℃以下で保存する。

マスターセルシードについて、3.2.1 の試験を行う。

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

2.2.1.4 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℃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、継代及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.1.2 の培養液で増殖する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して－70℃以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合について、3.2.3 の試験を行う。

2.2.2 犬アデノウイルス（2型）

2.2.2.1 培養細胞

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、保存及び小分製品までの最高継代数

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

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

マスターセルシードについて、3.2.1 の試験を行う。

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

2.2.2.4 ワーキングセルシード

2.2.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.2.2 の培養液で増殖及び継代する。

ワーキングセルシードは、凍結して－70℃以下で保存する。

ワーキングセルシードについて、3.2.2 の試験を行う。

2.2.2.5 プロダクションセルシード

2.2.2.5.1 増殖、継代及び保存

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℃以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合について、3.2.3 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

製造に適当と認められた株化細胞を用いる。

2.2.3.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.3.3 マスターセルシード

2.2.3.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターセルシードは、2.2.3.2 の培養液で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

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