マスターセルシードについて、3.2.1 の試験を行う。

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

2.2.3.4 ワーキングセルシード

2.2.3.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.3.2 の培養液で増殖及び継代する。

ワーキングセルシードは、凍結して－70 ℃以下で保存する。

ワーキングセルシードについて、3.2.2 の試験を行う。

2.2.3.5 プロダクションセルシード

2.2.3.5.1 増殖、継代及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.3.2 の培養液で増殖する。

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。

2.2.4 犬パルボウイルス

2.2.4.1 培養細胞

製造に適当と認められた株化細胞を用いる。

2.2.4.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.4.3 マスターセルシード

2.2.4.3.1 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、3.2.1 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。

2.2.4.4 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、3.2.2 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、継代及び保存

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 ジステンパーウイルス原液

2.3.1.1 プロダクションセルシードの培養

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

2.3.1.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを 2.3.1.1 の細胞で培養し、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のろ液又は遠心上清を原液とする。

原液について、3.3.1 及び 3.3.2.1 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。

2.3.2.2 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体別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を原液とする。

原液について、3.3.1 及び 3.3.2.2 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。

2.3.3.2 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体別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を原液とする。

原液について、3.3.1 及び 3.3.2.3 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。

2.3.4.2 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体別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を原液とする。

原液について、3.3.1 及び 3.3.2.4 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及び犬パルボウイルス原液を混合し、適当と認められた安定剤を加え、最終バルクとする。

2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、凍結乾燥し、小分製品とする。

小分製品について、3.4 の試験を行う。

3 試験法

3.1 製造用株の試験

3.1.1 マスターシードウイルスの試験

3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の 1.4.2.1.1.1.2 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

サル由来細胞を用いる場合には、内在性レトロウイルス（C、Dタイプ粒子）について、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

サル由来細胞を用いる場合には、内在性レトロウイルス（C、D タイプ粒子）について、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－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 2.1.4.2.2.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.2.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.2.3 マイコプラズマ否定試験

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

3.2.3 プロダクションセルシードの試験

3.2.3.1 培養性状試験

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

3.2.3.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.3.3 マイコプラズマ否定試験

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

3.3 原液の試験

3.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.2 ウイルス含有量試験

3.3.2.1 ジステンパーウイルス含有量試験

3.3.2.1.1 試験材料

3.3.2.1.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記１）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。

3.3.2.1.1.2 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。

3.3.2.1.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ４本（穴）以上の培養細胞に接種し、35 ～ 37 ℃で７～ 21 日間培養し、観察する。

3.3.2.1.3 判定

培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、$TCID_{50}$ を算出する。

検体のウイルス含有量は、１ mL 中 $10^{4.5}TCID_{50}$ 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。

3.3.2.2 犬アデノウイルス（２型）含有量試験

3.3.2.2.1 試験材料

3.3.2.2.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液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。

3.3.2.2.1.2 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。

3.3.2.2.2 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、35 ～ 37 ℃で７～ 10 日間培養し、観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.3.2.2.3 判定

培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、$TCID_{50}$ を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 $10^{6.5}TCID_{50}$ 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。

3.3.2.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

3.3.2.3.1 試験材料

3.3.2.3.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液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。

3.3.2.3.1.2 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。

3.3.2.3.2 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、30 ℃で７日間又は 37 ℃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 0.2vol%モルモット赤血球浮遊液を加え、２～５℃で 60 分間静置し、観察するか、又は培養後、培養液を採取し、これに等量の 0.4vol%モルモット赤血球浮遊液を加え、常温で 90 分間静置し、観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.3.2.3.3 判定

培養細胞に CPE 又は赤血球吸着を認めたものもしくは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。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 $10^{6.5}TCID_{50}$ 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。

3.3.2.4 犬パルボウイルス含有量試験

3.3.2.4.1 試験材料

3.3.2.4.1.1 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。

3.3.2.4.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞又は適当と認められた細胞を用いる。

3.3.2.4.2 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、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（付記２）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、その試験方法とする。

3.3.2.4.3 判定

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

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 $10^{6.5}TCID_{50}$ 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

3.4.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、固有の色調を有する乾燥物でなければならない。溶解したものは、固有の色調を有する液体でなければならず、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法

一般試験法のマイコプラズマ否定試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、原液を含む中間工程でマイコプラズマ否定試験を実施する場合には、本試験の実施を省略することができる。

3.4.6 ウイルス含有量試験

3.4.6.1 ジステンパーウイルス含有量試験

3.4.6.1.1 試験材料

3.4.6.1.1.1 試料

試験品中のジステンパーウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記３、４及び５）を非働化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.4.6.1.1.2 培養細胞

Vero 細胞を用いる。

3.4.6.1.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ４本（穴）以上の培養細胞に接種し、35 ～ 37 ℃で７～ 21 日間培養し、観察する。

3.4.6.1.3 判定

培養細胞に CPE 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、１ mL 中 $10^{3.5}TCID_{50}$ 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。

3.4.6.2 犬アデノウイルス（２型）含有量試験

3.4.6.2.1 試験材料

3.4.6.2.1.1 試料

試験品中の犬アデノウイルス（２型）以外のウイルスを各抗血清（付記４、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。

3.4.6.2.1.2 培養細胞

豚腎培養細胞又は犬腎継代細胞を用いる。

3.4.6.2.2 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 ℃で７日間培養し、観察する。

3.4.6.2.3 判定

培養細胞に CPE 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、豚腎培養細胞に接種した場合は、１頭分当たり $10^{5.5}TCID_{50}$ 以上でなければならず、犬腎継代細胞に接種した場合は、１頭分当たり $10^{3.2}TCID_{50}$ 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。

3.4.6.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

3.4.6.3.1 試験材料

3.4.6.3.1.1 試料

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各抗血清（付記3、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。

3.4.6.3.1.2 培養細胞

Vero 細胞又は犬腎継代細胞を用いる。

3.4.6.3.2 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、Vero 細胞に接種した場合では 30 ℃又は 37 ℃で、犬腎継代細胞に接種した場合は、37 ℃でそれぞれ7日間培養し、観察する。

3.4.6.3.3 判定

Vero 細胞に接種した場合は、培養細胞に CPE 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、1頭分当たり $10^{5.5}TCID_{50}$ 以上でなければならない。

犬腎継代細胞に接種した場合は、培養後、培養液を採取し、等量の 0.4vol%モルモット赤血球浮遊液を加え、常温で 90 分間静置後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、1頭分当たり $10^{4.7}TCID_{50}$ 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。

3.4.6.4 犬パルボウイルス含有量試験

3.4.6.4.1 試験材料

3.4.6.4.1.1 試料

試験品中の犬パルボウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記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。

3.4.6.4.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.4.6.4.2 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、32 ℃又は 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、32 ℃又は 37 ℃でそれぞれ6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 0.3 ～ 0.5vol%豚赤血球浮遊液を加え、2～5℃で静置後、観察する。

3.4.6.4.3 判定

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

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり 32 ℃で培養した場合は、$10^{5.5}TCID_{50}$ 以上でなければならず、37 ℃で培養した場合は、$10^{4.0}TCID_{50}$ 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。

3.4.7 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 ジステンパー力価試験

3.4.9.1.1 試験材料

3.4.9.1.1.1 試験動物

3.4.8 の試験に用いた動物を用いる。

3.4.9.1.1.2 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。

3.4.9.1.1.3 培養細胞

適当と認められた培養細胞を用いる。

3.4.9.1.2 試験方法

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、2 vol%馬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４又は５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、２～５℃で一夜又は 37 ℃で 60 分間処理する。この各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ４本（穴）以上の培養細胞に接種し、35 ～ 37 ℃で７～ 21 日間培養し、観察する。

3.4.9.1.3 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 ED$_{50}$ 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 倍以下でなければならない。

3.4.9.2 犬アデノウイルス（２型）感染症力価試験

3.4.9.2.1 試験材料

3.4.9.2.1.1 試験動物

3.4.8 の試験に用いた動物を用いる。

3.4.9.2.1.2 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）ウイルスを用いる。

3.4.9.2.1.3 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

3.4.9.2.2 試験方法

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、４又は５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 分間処理する。この各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ４本（穴）以上の培養細胞に接種し、35 ～ 37 ℃で７～ 10 日間培養し、観察する。

3.4.9.2.3 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 ED$_{50}$ 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 犬パラインフルエンザ力価試験

3.4.9.3.1 試験材料

3.4.9.3.1.1 試験動物

3.4.8 の試験に用いた動物を用いる。

3.4.9.3.1.2 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。

3.4.9.3.1.3 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。

3.4.9.3.2 試験方法

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 200$TCID_{50}$ 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 ずつをそれぞれ4本（穴）以上の培養細胞に接種し、35 ～ 37 ℃で7～ 10 日間培養し、観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.4.9.3.3 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 ED_{50} 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、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。

3.4.9.4 犬パルボウイルス感染症力価試験

3.4.9.4.1 試験材料

3.4.9.4.1.1 試験動物

3.4.8 の試験に用いた動物を用いる。

3.4.9.4.1.2 中和試験用ウイルス又は赤血球凝集抑制抗原

中和試験用ウイルスは、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を用いる。

赤血球凝集抗原は、犬パルボウイルス赤血球凝集抗原（付記7）を用いる。

3.4.9.4.1.3 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.4.9.4.2 試験方法

中和試験又は赤血球凝集抑制試験を行う。

3.4.9.4.2.1 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 200$TCID_{50}$ の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、35 ～ 37 ℃で 60 分間処理する。この各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ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、ウイルス増殖用培養液で液交換し、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（付記 8）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、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。

3.4.9.4.2.2 赤血球凝集抑制試験

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、ホウ酸緩衝食

塩液で２倍階段希釈する。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℃で一夜静置し、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。

3.4.9.4.3 判定

3.4.9.4.3.1 中和試験判定

赤血球凝集を阻止したものを陽性とし、中和抗体価を ED_{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。

3.4.9.4.3.2 赤血球凝集抑制試験判定

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とする。

試験群の赤血球凝集抑制抗体価は、64 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、8 倍未満でなければならない。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　ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
牛胎子血清	0 ～ 20 mL
イーグル 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　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

水酸化ナトリウム液で pH を 9.0 に調整する。

付記３　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、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、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、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、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　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

付記８　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。

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）

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の混合液を凍結乾燥したワクチン（以下「混合生ワクチン」という。）と、同規格に適合したレプトスピラ・カニコーラ及びレプトスピラ・イクテロヘモラジーの全培養菌液を不活化したワクチン（以下「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

犬腎培養細胞に接種すると CPE を示して増殖するが、発育鶏卵の漿尿膜上に接種すると病変を示さない。犬に注射しても病原性を示さない。

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

犬腎培養細胞にCPEを伴って増殖する。犬に注射しても病原性を示さない。

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

犬腎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。犬に注射しても病原性を示さない。

2.1.3.3 マスターシードウイルス

2.1.3.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、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、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。

2.1.5 レプトスピラ・カニコーラ

2.1.5.1 名称

レプトスピラ・カニコーラ（以下「Ｌ・カニコーラ」という。）Ca-12-000 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・カニコーラ血清（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 ℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

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

ワーキングシード菌について、3.1.5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する。

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

プロダクションシード菌を保存する場合について、3.1.6の試験を行う。

2.1.6 レプトスピラ・イクテロヘモラジー

2.1.6.1 名称

レプトスピラ・イクテロヘモラジー（以下「L・イクテロヘモラジー」という。）820K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・イクテロヘモラジー血清（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℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

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

ワーキングシード菌について、3.1.5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する。

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

プロダクションシード菌を保存する場合について、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

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。

2.2.1.4 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。

マスターセルシードについて、3.2.1 の試験を行う。

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

2.2.3.4 ワーキングセルシード

2.2.3.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.3.2 の培養液で増殖及び継代する。

ワーキングセルシードは、凍結して－ 70 ℃以下で保存する。

ワーキングセルシードについて、3.2.2 の試験を行う。

2.2.3.5 プロダクションセルシード

2.2.3.5.1 増殖、継代及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.3.2 の培養液で増殖する。

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。

2.2.4 犬パルボウイルス

2.2.4.1 培養細胞

製造に適当と認められた株化細胞を用いる。

2.2.4.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.4.3 マスターセルシード

2.2.4.3.1 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、3.2.1 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。

2.2.4.4 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、3.2.2 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、継代及び保存

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。

2.2.5 L・カニコーラ

2.2.5.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.2.6 L・イクテロヘモラジー

2.2.6.1 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 ジステンパーウイルス原液

2.3.1.1 プロダクションセルシードの培養

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

2.3.1.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを 2.3.1.1 の細胞で培養し、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のろ液又は遠心上清を原液とする。

原液について、3.4.1 及び 3.4.2.1 の試験を行う。

2.3.2 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。

2.3.2.2 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体別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を原液とする。

原液について、3.4.1 及び 3.4.2.2 の試験を行う。

2.3.3 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。

2.3.3.2 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体別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を原液とする。

原液について、3.4.1 及び 3.4.2.3 の試験を行う。

2.3.4 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。

2.3.4.2 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体別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を原液とする。

原液について、3.4.1 及び 3.4.2.4 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、3.3 の試験を行う。

2.3.5.2 不活化

培養菌液に適当と認められた不活化剤を加え不活化し、ろ過濃縮又はこれを遠心して集菌し、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、3.4.1 及び 3.4.3 の試験を行う。

2.3.6 L・イクテロヘモラジー原液

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、3.3 の試験を行う。

2.3.6.2 不活化

培養菌液に適当と認められた不活化剤を加え不活化し、ろ過濃縮又はこれを遠心して集菌し、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、3.4.1 及び 3.4.3 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、適当と認められた安定剤を加え、最終バルクとする。

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・カニコーラ原液及びL・イクテロヘモラジー原液を混合し、最終バルクとする。

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、3.5 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、3.5 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 1.4.2.1.1.1.2 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

サル由来細胞を用いる場合には、内在性レトロウイルス（C、Dタイプ粒子）について、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。

3.1.1.4.2.1 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。

3.1.4 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 を準用して試験を実施するとき、適合しなければならない。

3.1.4.2 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.5 ワーキングシード菌の試験

3.1.5.1 夾雑菌否定試験

3.1.4.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.6 プロダクションシード菌の試験

3.1.6.1 夾雑菌否定試験

3.1.4.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2 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

サル由来細胞を用いる場合には、内在性レトロウイルス（C、D タイプ粒子）について、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－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 2.1.4.2.2.1 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 培養菌液の試験

3.3.1 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.2 総菌数試験

光電比色計又は菌数計算法によって菌数を計算するとき、それぞれの培養菌液に 1 mL 中 10^5 個以上の菌を含まなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その菌数とする。

3.4 原液の試験

3.4.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.2 ウイルス含有量試験

3.4.2.1 ジステンパーウイルス含有量試験

3.4.2.1.1 試験材料

3.4.2.1.1.1 試料

検体を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。

3.4.2.1.1.2 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。

3.4.2.1.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ４本（穴）以上の培養細胞に接種し、35 ～ 37 ℃で 7 ～ 21 日間培養し、観察する。

3.4.2.1.3 判定

培養細胞にCPEを認め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 $10^{4.5}TCID_{50}$ 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。

3.4.2.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験

3.4.2.2.1 試験材料

3.4.2.2.1.1 試料

検体を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。

3.4.2.2.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.4.2.2.2 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、35～37℃で7～10日間培養し、観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.4.2.2.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、$TCID_{50}$を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 $10^{6.5}TCID_{50}$ 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、その判定方法及びウイルス含有量とする。

3.4.2.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

3.4.2.3.1 試験材料

3.4.2.3.1.1 試料

検体を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。

3.4.2.3.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.4.2.3.2 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℃で7～10日間培養する。培養後、培養液を除き、培養液と等量の0.2vol％モルモット赤血球浮遊液を加え、4℃で60分間静置し、観察するか、培養後、培養液を採取し、これに等量の0.4vol％モルモット赤血球浮遊液を加え、十分混和した後、常温で90分間静置し、観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.4.2.3.3 判定

赤血球吸着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 $10^{7.0}TCID_{50}$ 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、その判定方法及びウイルス含有量とする。

3.4.2.4 犬パルボウイルス含有量試験

3.4.2.4.1 試験材料

3.4.2.4.1.1 試料

検体を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。

3.4.2.4.1.2 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。

3.4.2.4.2 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℃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37℃で6日間培養する。培養後、培養液を採取し、これに等量の牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液（付記3）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、その試験方法とする。

3.4.2.4.3 判定

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

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 $10^{8.5}TCID_{50}$ 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、その判定方法及びウイルス含有量とする。

3.4.3 不活化試験

3.4.3.1 試験材料

3.4.3.1.1 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℃で一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.4.3.1.2 培地

適当と認められた培地を用いる。

3.4.3.2 試験方法

培地 20mL を入れた試験管3本に試料 0.5mL ずつを接種し、35 ～ 37 ℃で6～8日間培養し、各試験管から1白金耳を採取し、暗視野法で鏡検する。

3.4.3.3 判定

レプトスピラの増殖を認めてはならない。

3.5 小分製品の試験

3.5.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、混合生ワクチンは、固有の色調を有する乾燥物でなければならない。液状不活化ワクチンは、それぞれ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ず、異物又は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又は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。

3.5.2 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、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。

3.5.3 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。

3.5.4 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。

3.5.5 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。

3.5.6 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。

3.5.7 ウイルス含有量試験

3.5.7.1 ジステンパーウイルス含有量試験

3.5.7.1.1 試験材料

3.5.7.1.1.1 試料

試験品中のジステンパーウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記4、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（付記7）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料

とする。

3.5.7.1.1.2 培養細胞

Vero 細胞を用いる。

3.5.7.1.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ４本（穴）以上の培養細胞に接種し、35 ～ 37 ℃で７～ 21 日間培養し、観察する。

3.5.7.1.3 判定

培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、$TCID_{50}$ を算出する。

試験品のウイルス含有量は、１頭分当たり $10^{3.5}TCID_{50}$ 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。

3.5.7.2 犬アデノウイルス（２型）含有量試験

3.5.7.2.1 試験材料

3.5.7.2.1.1 試料

試験品中の犬アデノウイルス（２型）以外のウイルスを各抗血清（付記５、６及び８）を非働化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.5.7.2.1.2 培養細胞

豚腎培養細胞又は犬腎継代細胞を用いる。

3.5.7.2.2 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 ℃で７～ 10 日間培養し、観察する。

3.5.7.2.3 判定

培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、$TCID_{50}$ を算出する。試験品のウイルス含有量は、豚腎培養細胞に接種した場合は、１頭分当たり $10^{5.5}TCID_{50}$ 以上でなければならず、犬腎継代細胞に接種した場合は、１頭分当たり $10^{3.3}TCID_{50}$ 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。

3.5.7.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

3.5.7.3.1 試験材料

3.5.7.3.1.1 試料

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各抗血清（付記４、６及び８）を非働化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.5.7.3.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞又は Vero 細胞を用いる。

3.5.7.3.2 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、犬腎継代細胞に接種した場合は 37 ℃で、Vero 細胞に接種した場合では 30 ℃又は 37 ℃で、それぞれ７～ 10 日間培養し、観察する。

3.5.7.3.3 判定

犬腎継代細胞に接種した場合は、培養後、培養液を採取し、等量の 0.4vol ％モルモット赤血球浮遊液を加え、常温で 90 分間静置後、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、１頭分当たり $10^{4.7}TCID_{50}$ 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。

Vero 細胞に接種した場合は、培養細胞に CPE 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、１頭分当たり $10^{3.5}TCID_{50}$ 以上でなければならない。

3.5.7.4 犬パルボウイルス含有量試験

3.5.7.4.1 試験材料