

# 外来性ウイルス否定試験法

平成22年 3月 3日（告示第394号）一部改正

平成26年11月 6日（告示第1554号）一部改正

平成28年 9月30日（告示第1889号）一部改正

マスターシードウイルス、マスターセルシード及びマスターシードコクシジウム中に、検出しうる外来性のウイルスが存在しないことを調べる方法である。

## 1 試料

### 1.1 マスターシードウイルス

検体1mLに免疫血清を加え、37°Cで1時間又は4°Cで一夜処理し、完全に中和させたものを試料とする。

### 1.2 マスターセルシード

単層となった培養細胞を2群に分けて培養し、1群は凍結融解を3回繰り返し、その凍結融解混合物に残りの1群の培養上清を混合したものを試料とする。

### 1.3 マスターシードコクシジウム

検体を遠心分離等適当と認められた方法で処理したものを試料とする。

## 2 共通ウイルス否定試験

マスターシードウイルス、マスターセルシード及びマスターシードコクシジウムは、由来動物種に感染する可能性のある適切な範囲のウイルス及びワクチンの対象動物に病原性を持つウイルスを考慮し、2.1及び2.2の試験又はいずれかの試験により行う。

### 2.1 感受性細胞接種試験

#### 2.1.1 試験材料

##### 2.1.1.1 培養細胞

培養細胞の由来動物種に感染する可能性のある適切な範囲のウイルスに対して感受性が高い細胞及びワクチンの対象動物種に感染する可能性のある適切な範囲のウイルスに対して感受性が高い細胞を用いる。

##### 2.1.2 試験方法

###### 2.1.2.1 培養

試料1mLにつき70cm<sup>2</sup>以上の培養細胞に接種し、37°Cで7日間培養し、次代に細胞を継代する。

継代した細胞を37°Cで7日間培養した後、更に次代に細胞を継代し、37°Cで7日間培養する。なお、魚由来細胞を用いるときは、ワクチン（シードロット製剤）の部の各項で規定する方法で培養すること。

###### 2.1.2.2 細胞観察

CPEの有無をすべての培養期間中少なくとも2日ごとに観察する。

###### 2.1.2.3 細胞染色

12cm<sup>2</sup>以上の培養細胞について培養最終日にヘマトキシリニアエオジン又はメイグリュンワルドギムザで染色し、顕微鏡下でCPE及び封入体その他迷入因子に起因する細胞異常の有無を観察する。

###### 2.1.2.4 赤血球吸着

培養最終日に培養細胞をそれぞれ18cm<sup>2</sup>以上になるように3群に分け、培養細胞表面をリン酸緩衝食塩液で2回洗浄後、モルモット、がちょう及び7日齢以内の鶏の0.1vol%赤血球浮遊液をそれぞれの群に重層し、4°Cで30分間静置後20~25°Cで30分間静置する。その後リン酸緩衝食塩液で洗

浄後、顕微鏡下で赤血球吸着の有無を観察する。

#### 2.1.3 判定

観察期間中、培養細胞にCPE及び封入体ほか細胞異常を認めず、かつ、培養細胞に赤血球の吸着を認めないときは、この試験に適合とする。

### 2.2 発育鶏卵接種試験

#### 2.2.1 尿膜腔内接種試験

##### 2.2.1.1 鶏胚観察

###### 2.2.1.1.1 試験方法

生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～11日齢の発育鶏卵を用いる。試料0.1mLずつを10個の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で7日間培養する。培養最終日に開卵し、鶏胚の異常の有無を観察する。

###### 2.2.1.1.2 判定

鶏胚が正常に発育し、異常を認めないときは、この試験に適合とする。

###### 2.2.1.2 赤血球凝集試験

###### 2.2.1.2.1 試験方法

2.2.1.1.1の培養最終日に採取した尿膜腔液に、0.5vol%の鶏赤血球浮遊液を等量加え、4℃で60分間静置し、赤血球の凝集の有無を観察する。

###### 2.2.1.2.2 判定

尿膜腔液に赤血球の凝集を認めないときは、この試験に適合とする。

#### 2.2.2 漿尿膜上接種試験

##### 2.2.2.1 試験方法

生ワクチン製造用材料の規格1.1の10～12日齢の発育鶏卵を用いる。試料0.1mLずつを10個の発育鶏卵の漿尿膜上に接種し、37℃で5日間培養する。培養最終日に開卵し、鶏胚及び漿尿膜の異常の有無を観察する。

###### 2.2.2.2 判定

鶏胚が正常に発育し、漿尿膜に異常を認めないときは、この試験に適合とする。

### 3 特定ウイルス否定試験

マスターシードウイルス、マスターセルシード及びマスターシードコクシジウムは、原則として共通ウイルス否定試験に加え、由来動物種に感染する可能性のある適切な範囲のウイルス及びワクチンの対象動物に病原性を持つウイルスを考慮し、特定ウイルス否定試験を行う。なお、3.2個別ウイルス否定試験において規定されるウイルスについては個別ウイルス否定試験において規定される方法によること。

#### 3.1 特定ウイルス否定一般試験

##### 3.1.1 蛍光抗体法

###### 3.1.1.1 試験材料

###### 3.1.1.1.1 培養細胞

培養細胞の由来動物種に感染する可能性のある適切な範囲のウイルスに対して感受性が高い細胞及びワクチンの対象動物種に感染する可能性のある適切な範囲のウイルスに対して感受性が高い細胞を用いる。なお、魚由来細胞を用いるときは、ワクチン（シードロット製剤）の部の各項で規定する方法で培養すること。

###### 3.1.1.2 試験方法

###### 3.1.1.2.1 培養

試料1mLにつき70cm<sup>2</sup>以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間培養し、次代に細胞を継代する。継代した細胞を37℃で7日間培養した後、更に次代に細胞を継代し、37℃で7日間培養する。なお、魚由来細胞を用いるときは、ワクチン（シードロット製剤）の部の各項で規定する方法で培養する

こと。

### 3.1.1.2.2 蛍光抗体法

培養最終日にワクチン（シードロット製剤）の部の各項で規定するウイルスに対し、それぞれの抗血清による蛍光抗体法を行い、観察する。

### 3.1.1.3 判定

培養細胞に特異蛍光抗原を認めないときは、この試験に適合とする。

## 3.1.2 鶏接種試験

### 3.1.2.1 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の2週齢以上の鶏を用いる。

### 3.1.2.2 試験方法

試料1mLを筋肉内に、0.03mLを点眼接種又はその他適当と認められた方法で接種し、2週間後に再接種する。初回接種時及び初回接種5週後の血清を採取し、ワクチン（シードロット製剤）の部の各項で規定するウイルスに対する抗体を測定する。

### 3.1.2.3 判定

初回接種時及び初回接種5週後の血清に特異抗体を認めないときは、この試験に適合とする。

## 3.2 個別ウイルス否定試験

### 3.2.1 鶏白血病ウイルス否定試験

#### 3.2.1.1 試験方法

鶏白血病ウイルスに感受性のある生ワクチン製造用材料の規格2.1.1の鶏胚初代細胞を用いる。

試料1mLにつき培養後24時間以内の70cm<sup>2</sup>以上の細胞に接種し、37°Cで3～5日間培養した後、次代に細胞を継代する。継代した細胞を37°Cで3～5日間培養した後、更に次代に細胞を継代し、37°Cで3～5日間培養する。

3代目の70cm<sup>2</sup>以上の培養細胞を洗浄後、培養液の1/20量の1w/v%ゼラチン加ベロナール緩衝食塩液を加えてかき採った細胞浮遊液を3回凍結融解し、その遠心上清を採って細胞抽出液を作る。これを抗原として鶏白血病ウイルスに特異的なはと、兎又はハムスター血清、3単位の溶血素、4単位のモルモット補体及び2vol%羊赤血球浮遊液を用いてKolmer法によりCOFAL試験を行う。

#### 3.2.1.2 判定

細胞抽出液がCOFAL試験によって陰性であったときは、この試験に適合とする。

### 3.2.2 細網内皮症ウイルス否定試験

#### 3.2.2.1 試験方法

鶏白血病ウイルスに感受性のある生ワクチン製造用材料の規格2.1.1の鶏胚初代細胞を用いる。

試料1mLにつき培養後24時間以内の70cm<sup>2</sup>以上の細胞に接種し、37°Cで3～5日間培養した初代の細胞浮遊液を、別に新しく培養した鶏胚初代細胞に接種し、37°Cで4日間培養する。その細胞浮遊液を同様の方法で3代目に継代して37°Cで4日間培養した後、抗細網内皮症ウイルス血清による蛍光抗体法を行い、観察する。

#### 3.2.2.2 判定

培養細胞に特異蛍光抗原を認めないときは、この試験に適合とする。

### 3.2.3 豚コレラウイルス否定試験

次の3.2.3.1又は3.2.3.2により試験を行う。

#### 3.2.3.1 蛍光抗体法

##### 3.2.3.1.1 試験方法

豚腎初代又は継代培養細胞を用いる。

試料4mLを、1mLにつき20cm<sup>2</sup>以上の培養細胞に接種し、37°Cで5日間培養する。

試料接種後5日目の培養上清を採取し、その1mLを別の3cm<sup>2</sup>以上の培養細胞に接種し、37°Cで24～48時間培養後、抗豚コレラウイルス血清による蛍光抗体法を行い、観察する。

### 3.2.3.1.2 判定

培養細胞に特異蛍光抗原を認めないときは、この試験に適合とする。

### 3.2.3.2 END法及び干渉法

#### 3.2.3.2.1 試験方法

豚腎初代又は継代細胞を用いる。

試料4mLを、1mLにつき20cm<sup>2</sup>以上の培養細胞に接種し、37°Cで5日間培養する。

試料接種後5日目の培養上清を採取し、その0.1mLずつをそれぞれ20本（穴）以上の中試験管等に分注し、細胞増殖用培養液に浮遊した豚精巣初代細胞を0.5mLずつ加える。37°Cで4日間静置培養後、培養細胞を2群に分け、END法及びWEEウイルスによる干渉法を行う。

#### 3.2.3.2.2 判定

培養細胞に豚コレラウイルスを認めないときは、この試験に適合とする。

### 3.2.4 豚サコウイルス否定試験

#### 3.2.4.1 試験方法

PPK-3F細胞を用いる。

試料2mLを、1mLにつき20cm<sup>2</sup>以上の培養細胞に接種し、グルコサミン処理を行い、37°Cで5日間培養した後、次代に細胞を継代する。継代した細胞を37°Cで4日間培養した後、次代に継代し、継代した細胞を37°Cで3日間培養した後、抗豚サコウイルス血清による蛍光抗体法を行い、観察する。

#### 3.2.4.2 判定

培養細胞に特異蛍光抗原を認めないときは、この試験に適合とする。

### 3.2.5 牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス否定試験

#### 3.2.5.1 試験方法

牛精巣継代細胞を用いる。

試料2mLを、1mLにつき20cm<sup>2</sup>以上の培養細胞に接種し、34～36°Cで5日間培養し、CPEの有無を観察した後、細胞を10本の中試験管に分注して継代し、5日間培養し、CPEの有無を観察する。培養液を除き、1mL中約10<sup>5</sup>TCID<sub>50</sub>の牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルスNose株を含む維持用培養液0.5mLをそれぞれに加え、34～36°Cで7日間回転培養し、CPEの有無を観察する。

#### 3.2.5.2 判定

観察期間中、牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス接種前の培養細胞にCPEを認めず、接種後の培養細胞にCPEを認めたときは、この試験に適合とする。

### 3.2.6 犬パルボウイルス又は猫汎白血球減少症ウイルス否定試験

#### 3.2.6.1 試験方法

猫腎初代又は継代細胞を用いる。

試料2mLを、1mLにつき20cm<sup>2</sup>以上の培養細胞に接種し、36°Cで5日間培養後、次代に継代し、36°Cで10日間培養する。

培養最終日の培養液に、0.2w/v%牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液を等量加える。さらに、この混合液と等量のVAD6.0液で調製した0.5vol%の豚赤血球液を加えて、4°Cで18時間静置後、赤血球凝集の有無を観察する。

#### 3.2.6.2 判定

赤血球の凝集を認めないときは、この試験に適合とする。

### 3.2.7 ロタウイルス否定試験

次の3.2.7.1又は3.2.7.2により試験を行う。

#### 3.2.7.1 細胞観察

##### 3.2.7.1.1 試験方法

MA104細胞を用いる。

試料0.1mLずつを10本以上の培養細胞に接種し、37°Cで60分間吸着後、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を洗浄し、適量のトリプシンを添加した培養液を加え、37°Cで7日間回転培養しCPEの有無を観察する。

### 3.2.7.1.2 判定

観察期間中、培養細胞にCPEを認めないときは、この試験に適合とする。

### 3.2.7.2 蛍光抗体法

#### 3.2.7.2.1 試験方法

試料0.1mLを3cm<sup>2</sup>以上の培養細胞に接種し、37°Cで48時間培養後、抗ロタウイルス血清による蛍光抗体法を行い、観察する。

#### 3.2.7.2.2 判定

培養細胞に特異蛍光抗原を認めないときは、この試験に適合とする。

### 3.2.8 牛白血病ウイルス否定試験

#### 3.2.8.1 試験方法

体重100～200Kgの健康な牛又は体重30～50Kgの健康な羊を用いる。

試料10mLを1頭の牛又は羊の筋肉内に注射し、2及び3か月目に採血して得た血清について、受身赤血球凝集反応、酵素抗体反応又は寒天ゲル内沈降反応により牛白血病ウイルス抗体の検出を行う。

#### 3.2.8.2 判定

牛白血病ウイルスに対する抗体を認めないときは、この試験に適合とする。

### 3.2.9 日本脳炎ウイルス又は狂犬病ウイルス否定試験法

#### 3.2.9.1 試験方法

3日齢以下のマウスを用いる。

試料0.02mLずつを10匹のマウスの脳内に注射し、5日目に採取した脳の混合乳剤遠心上清を更に10匹のマウスの脳内に注射し、10日間観察する。

#### 3.2.9.2 判定

マウスに死亡又は神経症状を認めないときは、この試験に適合とする。

### 3.2.10 鶏脳脊髄炎ウイルス否定試験

#### 3.2.10.1 試験方法

生ワクチン製造用材料の規格1.1の6日齢の発育鶏卵を用いる。

試料0.1mLずつを10個の発育鶏卵の卵黄嚢内に接種し、37°Cで12日間培養する。培養最終日に5個を開卵し、鶏胚の異常を観察する。残りは孵化させ10日間観察する。

#### 3.2.10.2 判定

鶏胚に異常及び鶏に死亡又は神経症状を認めないときは、この試験に適合とする。

### 3.2.11 コイヘルペスウイルス否定試験

次の3.2.11.1又は3.2.11.2により試験を行う。

#### 3.2.11.1 細胞観察試験

##### 3.2.11.1.1 試験方法

KF-1又はCCB細胞を用いる。

試料0.1mLずつを10本以上の培養細胞に接種し、25°Cで60分間吸着後、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を洗浄し、25°Cで21日間培養しCPEの有無を観察する。

##### 3.2.11.1.2 判定

観察期間中、培養細胞にCPEを認めないときは、この試験に適合することとする。

#### 3.2.11.2 蛍光抗体試験

##### 3.2.11.2.1 試験方法

試料0.1mLを3cm<sup>2</sup>以上のKF-1細胞又はCCB細胞に接種し、25°Cで7日間培養後、抗コイヘル

ペスウイルス血清による蛍光抗体法を行い、観察する。

#### 3.2.11.2.2 判定

培養細胞に特異蛍光抗原の発現を認めないときは、この試験に適合することとする。