

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・犬レプトスピラ病混合ワクチン

平成２０年６月６日(告示第９１３号)

１ 定義

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培養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、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もの又はこれを不活化した後可溶化したものと犬コロナウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化したものを混合したワクチン（以下「液状不活化ワクチン - １」という。）とを組み合わせたワクチン、又は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培養細胞で増殖させて得たウイルス液とレプトスピラ・カニコーラ及びレプトスピラ・イクテロヘモラジーの全培養菌液を不活化した後可溶化したものの混合液を凍結乾燥したワクチン（以下「混合乾燥ワクチン」という。）と犬コロナウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化したものを混合したワクチン（以下「液状不活化ワクチン - ２」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株

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 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、Vero 細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

原株の継代は、原種ウイルスの製造又は原株の恒久的な維持以外の目的で行ってはならない。原種ウイルスは、直接原株から連続した工程により製造し、その継代数は３代以内でなければならない。種ウイルスは、原種ウイルスから２代以内に製造しなければならない。ただし、特に認められたものは、その継代数以内とする。

原株及び原種ウイルスは、凍結して - 70℃ 以下又は凍結乾燥して 5℃ 以下で保存する。ただし、特に認められたものは、その保存温度とする。

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

２.１.２ 犬アデノウイルス（２型）株

２.１.２.１ 名称

弱毒犬アデノウイルス（２型）V-197 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 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、犬腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

原株の継代は、原種ウイルスの製造又は原株の恒久的な維持以外の目的で行ってはならない。原

種ウイルスは、直接原株から連続した工程により製造し、その継代数は3代以内でなければならない。種ウイルスは、原種ウイルスから2代以内に製造しなければならない。ただし、特に認められたものは、その継代数以内とする。

原株及び原種ウイルスは、凍結して - 70 以下又は凍結乾燥して5 以下で保存する。ただし、特に認められたものは、その保存温度とする。

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.3 犬パラインフルエンザウイルス株

2.1.3.1 名称

弱毒犬パラインフルエンザウイルス 91880 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 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、犬腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

原株の継代は、原種ウイルスの製造又は原株の恒久的な維持以外の目的で行ってはならない。原種ウイルスは、直接原株から連続した工程により製造し、その継代数は3代以内でなければならない。種ウイルスは、原種ウイルスから2代以内に製造しなければならない。ただし、特に認められたものは、その継代数以内とする。

原株及び原種ウイルスは、凍結して - 70 以下又は凍結乾燥して5 以下で保存する。ただし、特に認められたものは、その保存温度とする。

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.4 犬パルボウイルス株

2.1.4.1 名称

弱毒犬パルボウイルス K-3ip69 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 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、猫腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

原株の継代は、原種ウイルスの製造又は原株の恒久的な維持以外の目的で行ってはならない。原種ウイルスは、直接原株から連続した工程により製造し、その継代数は3代以内でなければならない。種ウイルスは、原種ウイルスから2代以内に製造しなければならない。ただし、特に認められたものは、その継代数以内とする。

原株及び原種ウイルスは、凍結して - 70 以下又は凍結乾燥して5 以下で保存する。ただし、特に認められたものは、その保存温度とする。

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.5 犬コロナウイルス株

2.1.5.1 名称

犬コロナウイルス TN-449 株又はこれと同等と認められた株

2.1.5.2 性状

犬に注射しても病原性を示さない。感受性のある培養細胞に接種すると、CPE を伴って増殖する。

2.1.5.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、猫腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

原種ウイルスは、直接原株から連続した工程により製造し、その継代数は3代以内でなければならない。種ウイルスは、原種ウイルスから2代以内に製造しなければならない。ただし、特に認め

られたものは、その継代数以内とする。

原株及び原種ウイルスは、凍結して - 70 以下又は凍結乾燥して 5 以下で保存する。ただし、特に認められたものは、その保存温度とする。

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.6 レプトスピラ・カニコーラ株

2.1.6.1 名称

レプトスピラ・カニコーラ（以下「L・カニコーラ」という。）フォント・ユトレヒト 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・カニコーラ血清（付記 1）に対して特異的に凝集する。

2.1.6.3 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、原株及び種菌とも特に認められた継代数以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して - 70 以下で保存する。

2.1.7 レプトスピラ・イクテロヘモラジー株

2.1.7.1 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。）コペンハーゲニー株又はこれと同等と認められた株

2.1.7.2 性状

モルモット及びハムスターの腹腔内に注射すると増殖する。

抗 L・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。

2.1.7.3 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、原株及び種菌とも特に認められた継代数以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して - 70 以下で保存する。

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

Vero 細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.1.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.2 犬アデノウイルス（2 型）

2.2.2.1 培養細胞

犬腎継代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.3 犬パラインフルエンザウイルス

2.2.3.1 培養細胞

犬腎継代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.3.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.4 犬パルボウイルス

2.2.4.1 培養細胞

猫腎継代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.4.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

2.2.5 犬コロナウイルス

2.2.5.1 培養細胞

猫腎継代細胞又は製造に相当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.5.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

2.2.6 L・カニコーラ

2.2.6.1 培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

2.2.7 L・イクテロヘモラジー

2.2.7.1 培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 ジステンパーウイルス原液

2.3.1.1 細胞の培養

1 回に処理し、培養した細胞を個体別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の培養細胞に異常を認めてはならない。個体別培養細胞について、3.1 の試験を行う。

2.3.1.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルス増殖の極期に感染材料を採取し原液とする。

原液について、3.3.1、3.3.2 及び 3.3.3.1 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 細胞の培養

1 回に処理し、培養した細胞を個体別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の培養細胞に異常を認めてはならない。個体別培養細胞について、3.1 の試験を行う。

2.3.2.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルス増殖の極期に感染材料を採取し原液とする。

原液について、3.3.1、3.3.2 及び 3.3.3.2 の試験を行う。

2.3.3 犬バラインフルエンザウイルス原液

2.3.3.1 細胞の培養

1 回に処理し、培養した細胞を個体別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の培養細胞に異常を認めてはならない。個体別培養細胞について、3.1 の試験を行う。

2.3.3.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルス増殖の極期に感染材料を採取し原液とする。

原液について、3.3.1、3.3.2 及び 3.3.3.3 の試験を行う。

2.3.4 犬パルボウイルス原液

2.3.4.1 細胞の培養

1 回に処理し、培養した細胞を個体別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の培養細胞に異常を認めてはならない。個体別培養細胞について、3.1 の試験を行う。

2.3.4.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルス増殖の極期に感染材料を採取し原液とする。

原液について、3.3.1、3.3.2 及び 3.3.3.4 の試験を行う。

2.3.5 犬コロナウイルス原液

2.3.5.1 細胞の培養

1 回に処理し、培養した細胞を個体別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の培養細胞に異常を認

めてはならない。個体別培養細胞について、3.1 の試験を行う。

2.3.5.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルス増殖の極期に感染材料を採取しウイルス浮遊液とする。
ウイルス浮遊液について、3.3.1、3.3.2 及び 3.3.3.5 の試験を行う。

2.3.5.3 不活化

ウイルス浮遊液に適當と認められた不活化剤を加えて不活化後、適當な中和剤を用い中和したもの、又はそのままの液を不活化ウイルス浮遊液とする。
不活化ウイルス浮遊液について、3.3.4.1 の試験を行う。

2.3.5.4 原液の調整

不活化ウイルス浮遊液を適當と認められた方法で濃縮したもの又は適當と認められた保存剤を添加したものを原液とする。
原液について、3.3.1 の試験を行う。

2.3.6 L・カニコーラ原液

2.3.6.1 菌液

種菌を培地に接種し、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。

2.3.6.2 不活化

培養菌液に適當と認められた不活化剤を加えて不活化したものを不活化レプトスピラ菌液とする。
不活化レプトスピラ菌液について、3.3.4.2 の試験を行う。

2.3.6.3 可溶化

不活化レプトスピラ菌液又は適當と認められた濃縮方法により濃縮した菌液に適當と認められた可溶化剤を加え可溶化したものを原液とする。
原液について、3.3.1 の試験を行う。

2.3.7 L・イクテロヘモラジー原液

2.3.7.1 菌液

種菌を培地に接種し、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。

2.3.7.2 不活化

培養菌液に適當と認められた不活化剤を加えて不活化したものを不活化レプトスピラ菌液とする。
不活化レプトスピラ菌液について、3.3.4.2 の試験を行う。

2.3.7.3 可溶化

不活化レプトスピラ菌液又は適當と認められた方法により濃縮した菌液に適當と認められた可溶化剤を加え可溶化したものを原液とする。
原液について、3.3.1 の試験を行う。

2.4 最終バルク

2.4.1 混合生ワクチン

ジステンパーウイルス原液、犬アデノウイルス（2型）原液、犬パラインフルエンザウイルス原液及び犬パルボウイルス原液を混合し、最終バルクとする。この場合、適當と認められた保存剤及び安定剤を添加してもよい。

2.4.2 混合乾燥ワクチン

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と適當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。この場合、適當と認められた安定剤を添加してもよい。

2.4.3 液状不活化ワクチン

2.4.3.1 液状不活化ワクチン- 1

適當と認められた溶液で濃度調整した犬コロナウイルス原液、L・カニコーラ原液及びL・イク

テロヘモラジー原液に相当と認められたアジュバントを混合し、最終バルクとする。この場合、相当と認められた保存剤を添加してもよい。

2.4.3.2 液状不活化ワクチン- 2

相当と認められた溶液で濃度調整した犬コロナウイルス原液に相当と認められたアジュバントを混合し、最終バルクとする。この場合、相当と認められた保存剤を添加してもよい。

2.5 小分製品

2.5.1 混合生ワクチン及び混合乾燥ワクチン

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、3.4 の試験を行う。

2.5.2 液状不活化ワクチン- 1 及び液状不活化ワクチン-2

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 培養細胞の試験

個体別培養細胞のそれぞれ 1 % 以上を対照培養細胞とし、これについて次の試験を行う。ただし、製造に継代細胞を用いている場合は、3.1.3 の試験を実施しなくてもよい。

3.1.1 培養観察

対照培養細胞を、ウイルスを接種することなく、ウイルス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 日間以上培養し、観察するとき、CPE を認めてはならない。

3.1.2 赤血球吸着試験

3.1.1 の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、0.1 vol % モルモット赤血球浮遊液を重層し、60 分間静置後、赤血球吸着の有無を観察するとき、培養細胞に赤血球吸着を認めてはならない。

3.1.3 封入体染色試験

3.1.1 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。

3.2 培養菌液の試験

3.2.1 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。又は、暗視野法を用いて培養菌液を鏡検するとき、レプトスピラ以外の菌を認めてはならない。

3.2.2 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。

3.2.3 総菌数試験

光電比色計又は菌数計算法を用いて菌数を計算するとき、それぞれの培養菌液に 1 mL 中 $10^{3.0}$ 個以上の菌を含まなければならない。又は、比濁法を用いて菌数を計算するとき、それぞれの培養菌液は 2.400 比濁単位以上でなければならない。

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 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 ウイルス含有量試験

3.3.3.1 ジステンパーウイルス含有量試験

3.3.3.1.1 試験材料

3.3.3.1.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記3）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。

3.3.3.1.1.2 培養細胞

Vero 細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.3.3.1.2 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、37℃ で 7～8 日間培養し、観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.3.3.1.3 判定

培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{4.8}TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に認められたものは、そのウイルス含有量とする。

3.3.3.2 犬アデノウイルス（2 型）含有量試験

3.3.3.2.1 試験材料

3.3.3.2.1.1 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。

3.3.3.2.1.2 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。

3.3.3.2.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本(穴)以上の培養細胞に接種し、37℃ で 7 日間培養し、観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.3.3.2.3 判定

培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{7.3}TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に認められたものは、そのウイルス含有量とする。

3.3.3.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

3.3.3.3.1 試験材料

3.3.3.3.1.1 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。

3.3.3.3.1.2 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。

3.3.3.3.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本(穴)以上の培養細胞に接種し、37℃ で 7 日間培養する。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等量加え、室温で 90 分間静置し、観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.3.3.3.3 判定

培養液に赤血球の凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{6.3}TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に認められたものは、そのウイルス含有量とする。

3.3.3.4 犬パルボウイルス含有量試験

3.3.3.4.1 試験材料

3.3.3.4.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液 B 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。

3.3.3.4.1.2 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。

3.3.3.4.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本(穴)以上の培養細胞に接種し、37℃ で 24 時間培養した後、ウイルス増殖用培養液と交換し、さらに 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 4)を加え、さらにこの混合液と等量の VAD6.0 液(付記 5)で調製した 0.5vol % 豚赤血球浮遊液を加え、4℃ で静置後、赤血球凝集の有無を観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.3.3.4.3 判定

培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{5.7}TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に認められたものは、そのウイルス含有量とする。

3.3.3.5 犬コロナウイルス含有量試験又は犬コロナウイルス抗原量測定試験

3.3.3.5.1 犬コロナウイルス含有量試験

3.3.3.5.1.1 試験材料

3.3.3.5.1.1.1 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。

3.3.3.5.1.1.2 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。

3.3.3.5.1.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本(穴)以上の培養細胞浮遊液に接種し、37℃ で 5 日間培養する。培養後、試料を接種した細胞を 70vol % 冷アセトンで固定し、蛍光抗体法を用いて特異蛍光の有無を観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.3.3.5.1.3 判定

特異蛍光を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{4.5}TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に認められたものは、そのウイルス含有量とする。

3.3.3.5.2 犬コロナウイルス含有量試験

3.3.3.5.2.1 試験材料

検体、参照品、抗犬コロナウイルスモノクローナル抗体、抗犬コロナウイルスウサギ抗体、アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ IgG 及びリン酸 p - ニトロフェニル基質液を用いる。

3.3.3.5.2.2 試験方法

二抗体サンドイッチ ELISA 法により犬コロナウイルス抗原量を測定する。ELISA プレートに抗犬コロナウイルスモノクローナル抗体液を分注し、37℃ で 90 分間反応させ固相化する。以下各反応後に洗浄液で洗浄する。1%牛血清アルブミン・ポリソルベート加リン酸緩衝食塩液を分注し、37℃ で 60 分間反応させブロッキングする。検体及び参照品を 2 倍階段希釈した各希釈液を各穴に加え、37℃ で 60 分間反応する。抗犬コロナウイルスウサギ抗体液を各穴に加え、37℃ で 60 分間反応する。アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ IgG 液を各穴に加え、37℃ で 60 分間反応する。リン酸 p - ニトロフェニル基質液を加え、37℃ で 25 ~ 30 分間反応させた後、3mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えて反応を停止する。主波長 405nm、副波長 490nm で吸光度を測定する。

3.3.3.5.2.3 判定

参照品に対する検体の相対抗原量を算出するとき、2,300RU/0.05mL 以上でなければならない。

3.3.4 不活化試験

3.3.4.1 犬コロナウイルス不活化試験

3.3.4.1.1 試験材料

3.3.4.1.1.1 試料

検体 2 mL を 100 倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、4℃ で一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.3.4.1.1.2 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。

3.3.4.1.2 試験方法

試料を 25cm² 以上の培養細胞 2 本に 1 mL ずつ接種し、37℃ で 60 分間吸着した後、リン酸緩衝食塩液で細胞面を洗浄する。ウイルス増殖用培養液を加え、37℃ で 5 日間培養後、接種した培養細胞を継代し、さらに 37℃ で 7 日間培養し、観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.3.4.1.3 判定

培養細胞に CPE を認めてはならない。ただし、特に認められたものは、その判定方法とする。

3.3.4.2 レプトスピラ不活化試験

3.3.4.2.1 試験材料

3.3.4.2.1.1 試料

検体又は検体 5 mL を 100 倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、4℃ で一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.3.4.2.1.2 培地

適当と認められた培地を用いる。

3.3.4.2.2 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、28 ~ 30℃ 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。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.3.4.2.3 判定

レプトスピラの増殖を認めてはならない。

3.4 小分製品の試験

3.4.10 の試験を適用しないものについては、3.4.11 の試験を行う。

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、混合生ワクチン又は混合乾燥ワクチンは、固有の色調を有する乾燥物でなければならない。また、液状不活化ワクチン - 1 又は液状不活化ワクチン - 2 は、固有の色調を有する均質な液体でなければならない。混合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 - 1 で溶解したもの（以下「混合ワクチン - 1」という。）又は混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチン - 2 で溶解したもの（以下「混合ワクチン - 2」という。）は、固有の色調を有する均質な液体でなければならない。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 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 - 1 又は液状不活化ワクチン - 2 の pH は、固有の値を示さなければならない。

3.4.3 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、混合生ワクチン又は混合乾燥ワクチンは、適合しなければならない。ただし、窒素充填製品では、本試験を省略することができる。

3.4.4 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、混合生ワクチン又は混合乾燥ワクチンは、適合しなければならない。

3.4.5 無菌試験

混合ワクチン - 1 又は混合ワクチン - 2 について、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。

3.4.6 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、混合生ワクチン又は混合乾燥ワクチンは、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、本試験を省略することができる。

3.4.7 迷入ウイルス否定試験

液状不活化ワクチン - 1 と同量の滅菌水で混合生ワクチンを溶解したもの又は液状不活化ワクチン - 2 と同量の滅菌水で混合乾燥ワクチンを溶解したものについて、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1、2.5.1、2.6.1 及び 2.8.2 を準用して試験するとき、混合生ワクチン又は混合乾燥ワクチンは、適合しなければならない。ただし、中和用抗血清は、抗ジステンパーウイルス血清（付記 6）抗犬アデノウイルス（2 型）血清（付記 7）抗犬パラインフルエンザウイルス血清（付記 8）及び抗犬パルボウイルス血清（付記 9）を、それぞれ非働化したものを用いる。

3.4.8 ウイルス含有量試験

3.4.8.1 ジステンパーウイルス含有量試験

3.4.8.1.1 試験材料

3.4.8.1.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチン - 1 と同量の滅菌水で溶解する。又は混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチン - 2 と同量の精製水で溶解する。試験品中のジステンパーウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記 7、8 及び 9）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。

3.4.8.1.1.2 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。

3.4.8.1.2 試験方法

試料 0.1mL ずつを 4 本(穴)以上の培養細胞に接種し、37℃ で 7 ～ 8 日間培養し、観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.4.8.1.3 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。ただし、特に認められたものは、そのウイルス含有量とする。

3.4.8.2 犬アデノウイルス（2 型）含有量試験

3.4.8.2.1 試験材料

3.4.8.2.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチン - 1 と同量の滅菌水で溶解する。又は混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチン - 2 と同量の精製水で溶解する。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 6、8 及び 9）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。

3.4.8.2.1.2 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

3.4.8.2.2 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。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.4.8.2.3 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^{5.0}TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に認められたものは、そのウイルス含有量とする。

3.4.8.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

3.4.8.3.1 試験材料

3.4.8.3.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチン - 1 と同量の滅菌水で溶解する。又は混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチン - 2 と同量の精製水で溶解する。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 6、7 及び 9）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。

3.4.8.3.1.2 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。

3.4.8.3.2 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 日間培養し、観察する。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等量加え、室温で 90 分間静置後し、観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.4.8.3.3 判定

培養液に赤血球の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^{5.0}TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に認められたものは、そのウイルス含有量とする。

3.4.8.4 犬パルボウイルス含有量試験

3.4.8.4.1 試験材料

3.4.8.4.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチン - 1 と同量の滅菌水で溶解する。又は混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチン - 2 と同量の精製水で溶解する。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 6、7 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。

3.4.8.4.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.4.8.4.2 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 時間培養した後、ウイルス増殖用培養液と交換し、さらに 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を加え、さらにこの混合液と等量の VAD6.0 液で調製した 0.5vol% 豚赤血球浮遊液を加え、4℃ で 3 時間または一夜静置後、赤血球凝集の有無を観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.4.8.4.3 判定

培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。試験品のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{5.0}TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に認められたものは、そのウイルス含有量とする。

3.4.9 チメロサル定量試験

チメロサルを添加した液状不活化ワクチン - 1、液状不活化ワクチン - 2 及び乾燥混合ワクチンについては、一般試験法のチメロサル定量法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.10 異常毒性否定試験

混合ワクチン - 1 又は混合ワクチン - 2 について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。

3.4.11 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。

3.4.12 安全試験

3.4.12.1 試験材料

3.4.12.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.12.1.2 試験動物

6 か月齢未満の犬を用いる。

3.4.12.2 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 頭分ずつを用法に従って 2 回注射し、対照群と共に 6 週間観察する。ただし、特に認められたものは、その期間とする。

3.4.12.3 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。

3.4.13 力価試験

3.4.13.1 ジステンパー力価試験

3.4.13.1.1 試験材料

3.4.13.1.1.1 試験動物

3.4.12 の試験に用いた犬を用いる。

3.4.13.1.1.2 中和試験用ウイルス

ジステンパーウイルス FXNO 株又は適当と認められたジステンパーウイルス株を用いる。

3.4.13.1.1.3 培養細胞

適当と認められた培養細胞を用いる。

3.4.13.1.2 試験方法

3.4.12 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、ウイルス増殖用培養液又は適当と認められた希釈液で 5 倍階段希釈する。各希釈血清と 0.1mL 中約 200TCID₅₀ の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、4℃ 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、37℃ で 7 ~ 8 日間培養し、観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.4.13.1.3 判定

細胞を観察し、CPE を阻止したものを陽性とし、中和抗体価を ED₅₀ で求める。試験群の中和抗体価は、40 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、10 倍未満でなければならない。ただし、特に認められたものは、その中和抗体価とする。

3.4.13.2 犬アデノウイルス (2 型) 感染症力価試験

3.4.13.2.1 試験材料

3.4.13.2.1.1 試験動物

3.4.12 の試験に用いた犬を用いる。

3.4.13.2.1.2 中和試験用ウイルス

犬アデノウイルス (2 型) V-197 株又は適当と認められた犬アデノウイルス (2 型) 株を用いる。

3.4.13.2.1.3 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

3.4.13.2.2 試験方法

3.4.12 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、ウイルス増殖用培養液又は適当と認められた希釈液で2又は5倍階段希釈する。各希釈血清と0.1mL中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、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、37℃で7日間培養し、観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.4.13.2.3 判定

培養細胞のCPEを阻止したものを陽性とし、中和抗体価をED₅₀で求める。

試験群の中和抗体価は、32倍以上でなければならない。この場合、対照群では、2倍未満でなければならない。ただし、特に認められたものは、その中和抗体価とする。

3.4.13.3 犬パラインフルエンザ力価試験

3.4.13.3.1 試験材料

3.4.13.3.1.1 試験動物

3.4.12の試験に用いた犬を用いる。

3.4.13.3.1.2 中和試験用ウイルス

犬パラインフルエンザウイルスフィリップス・ロクセーン株又は適当と認められた犬パラインフルエンザウイルス株を用いる。

3.4.13.3.1.3 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。

3.4.13.3.2 試験方法

3.4.12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、ウイルス増殖用培養液又は適当と認められた希釈液で2倍階段希釈する。各希釈血清と0.1mL中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、37℃で60分間処理する。この各混合液0.1mLずつをそれぞれ4本(穴)以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間培養する。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等量加え、常温で90分間静置し、観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.4.13.3.3 判定

培養液の赤血球凝集を阻止したものを陽性とし、中和抗体価をED₅₀で求める。試験群の中和抗体価は、4倍以上でなければならない。この場合、対照群では、2倍未満でなければならない。ただし、特に認められたものは、その中和抗体価とする。

3.4.13.4 犬パルボウイルス感染症力価試験

3.4.13.4.1 試験材料

3.4.13.4.1.1 試験動物

3.4.12の試験に用いた犬を用いる。

3.4.13.4.1.2 赤血球凝集抗原

犬パルボウイルスK-3ip69株又は適当と認められた犬パルボウイルス株を接種したCRFK細胞培養液を不活化したもので赤血球凝集価128倍以上のものをを用いる。

3.4.13.4.2 試験方法

3.4.12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、RDE(付記10)、25w/v %カオリン液及び豚赤血球で処理した後牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液を用いて2倍階段希釈する。各段階の希釈血清に8単位に調製した血球凝集抗原を等量加え、常温で60分間処理したのちVAD6.0液で調製したウイルス調整希釈液で調製した0.5vol %豚赤血球浮遊液を等量加え、4℃で一夜静置し、観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.4.13.4.3 判定

赤血球凝集を抑制した血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。

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、特に認められたものは、その抗体価とする。

3.4.13.5 犬コロナウイルス感染症力価試験

3.4.13.5.1 試験材料

3.4.13.5.1.1 注射材料

混合ワクチン - 1 又は混合ワクチン - 2 を注射材料とする。

3.4.13.5.1.2 試験動物

体重約 300g のモルモットを用いる。

3.4.13.5.1.3 中和試験用ウイルス

適当と認められた犬コロナウイルス株を用いる。

3.4.13.5.1.4 培養細胞

猫全胎子継代細胞又は適当と認められた細胞を用いる。

3.4.13.5.2 試験方法

試験動物 5 匹を試験群、2 匹を対照群とする。試験群に注射材料 1 mL を 21 日間隔で 2 回注射する。2 回目注射後 7 日目の血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、ウイルス増殖用培養液で 2 倍階段希釈する。各希釈血清と 0.05mL 中約 200TCID₅₀ の中和試験用ウイルス液を混合し、37℃ で 60 分間処理する。各混合液 0.05mL ずつをそれぞれ 4 本（穴）以上の培養細胞浮遊液に接種し、37℃ で 6 日間培養し、観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.4.13.5.3 判定

培養細胞の 4 穴中 2 穴以上に CPE の阻止を認めた血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

試験群の抗体価は、80 % 以上が 8 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、2 倍未満でなければならない。ただし、特に認められたものは、その中和抗体価とする。

3.4.13.6 犬レプトスピラ病力価試験

3.4.13.6.1 試験材料

3.4.13.6.1.1 注射材料

混合ワクチン - 1 又は混合ワクチン - 2 を注射材料とする。

3.4.13.6.1.2 試験動物

体重約 300g のモルモット又は体重 60 ~ 100g のハムスターを用いる。

3.4.13.6.1.3 凝集反応用菌液

L・カニコーラ及び L・イクテロヘモラジーの生菌浮遊液を用いる。

3.4.13.6.2 試験方法

注射材料 1 mL ずつを 10 匹の試験動物に 7 日間隔で 2 回皮下注射する。2 回目注射後 14 日目に得られた各個体の血清について、凝集反応用菌液を用いて、溶菌凝集反応を行う。

3.4.13.6.3 判定

それぞれの菌液に対して 80 % 以上が 8 倍以上の凝集価を示さなければならない。

4 貯法及び有効期間

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

付記 1 抗 L・カニコーラ血清

L・カニコーラで免疫した兔又はモルモットの血清

付記 2 抗 L・イクテロヘモラジー血清

L・イクテロヘモラジーで免疫した兔又はモルモットの血清

付記 3 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中

牛血清	10 ~ 20 mL
トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
イーグル培養液 (MEM)	残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 7.6 に調整する。
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 4 牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液

1,000mL 中

塩化ナトリウム	7.01 g
ホウ酸	3.09 g
水酸化ナトリウム	0.96 g
水	残 量

牛血清アルブミン 0.2w/v%となるように加えたのち、水酸化ナトリウムで pH9.0 に調整する。

付記 5 VAD6.0 液

1,000mL 中

塩化ナトリウム	8.77 g
リン酸水素二ナトリウム	5.68 g
リン酸二水素ナトリウム(二水和物)	40.56 g
水	残 量

牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液と等量混合して pH6.0 に調整する。

付記 6 抗ジステンパーウイルス血清

犬ジステンパーウイルスで免疫した兎又はモルモットの血清で、試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記 7 抗犬アデノウイルス (2 型) 血清

犬アデノウイルス (2 型) で免疫した兎又はモルモットの血清で、試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記 8 抗犬パラインフルエンザウイルス血清

犬パラインフルエンザウイルスで免疫した兎又はモルモットの血清で、試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記 9 抗犬パルボウイルス血清

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 10 RDE

市販の RDE を処方に従い、生理食塩水 20mL で溶解し、小分け分注した後 - 20 以下に保存する。