

# ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎2価・産卵低下症候群-1976・鶏伝染性コリーザ（A・C型）混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

令和2年8月28日（告示第1689号）新規追加

## 1 定義

シードロット規格に適合したニューカッスル病ウイルス及び血清型のそれぞれ異なる2種類の鶏伝染性気管支炎ウイルスを同規格に適合した発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液、同規格に適合した産卵低下症候群-1976ウイルスを同規格に適合した発育あひる卵で増殖させて得たウイルス液並びに同規格に適合したヘモフィルス・パラガリナルム（A型及びC型菌）培養菌液をそれぞれ不活化したものに油性アジュバントを添加し、混合したワクチンである。

## 2 製法

### 2.1 製造用株

#### 2.1.1 ニューカッスル病ウイルス

##### 2.1.1.1 名称

ニューカッスル病ウイルスUlster2C株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.1.2 性状

10日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射すると増殖し、その尿膜腔液には鶏赤血球凝集性を認める。

##### 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、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させ、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。

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、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵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1.1に適合した発育鶏卵で増殖させる。

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℃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は、3.1.3の試験を行う。

### 2.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

#### 2.1.2.1 名称

鶏伝染性気管支炎ウイルスM41及びMie株、又はこれらと同等と認められた2種類の株

#### 2.1.2.2 性状

9～11日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射すると、鶏胚に特徴的な病変を伴って増殖する。

### 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、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させ、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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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。

### 2.1.2.4 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、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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1.1に適合した発育鶏卵で増殖させる。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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。

### 2.1.3 産卵低下症候群-1976ウイルス

#### 2.1.3.1 名称

産卵低下症候群-1976ウイルスMcFerran127株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.3.2 性状

鶏胚肝初代細胞及びあひる胚初代細胞でCPEを伴って増殖する。

### 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、SPF動物規格の1.1に適合した鶏胚肝初代細胞で増殖させ、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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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。

### 2.1.3.4 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、SPF動物規格の1.1に適合した鶏胚肝初代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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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1.1に適合した鶏胚肝初代細胞で増殖させる。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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。

## 2.1.4 ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌

### 2.1.4.1 名称

ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌221株又はこれと同等と認められた株

### 2.1.4.2 性状

鶏及び発育鶏卵に対して病原性を示す。牛、馬、羊、鶏及びモルモットの赤血球を凝集する。

### 2.1.4.3 マスターシード菌

#### 2.1.4.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させ、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菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

マスターシード菌について、3.1.4.1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。

### 2.1.4.4 ワーキングシード菌

#### 2.1.4.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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。

### 2.1.4.5 プロダクションシード菌

#### 2.1.4.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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は、3.1.6の試験を行う。

## 2.1.5 ヘモフィルス・パラガリナルムC型菌

### 2.1.5.1 名称

ヘモフィルス・パラガリナルムC型菌Modesto株又はこれと同等と認められた株

### 2.1.5.2 性状

鶏及び発育鶏卵に対して病原性を示す。

### 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、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させ、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菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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最高継代数は、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、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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は、3.1.6の試験を行う。

### 2.2 製造用材料

#### 2.2.1 ニューカッスル病ウイルス

##### 2.2.1.1 発育鶏卵

##### 2.2.1.1.1 マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルス及びプロダクションシードウイルスの増殖、継代及び保存に用いる発育鶏卵

SPF動物規格の1.1に適合した9～11日齢のものを用いる。

マスターシードウイルス及びワーキングシードウイルスを増殖、継代及び保存する場合の発育鶏卵又はプロダクションシードウイルスを増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、3.2の試験を行う。

##### 2.2.1.1.2 原液の製造に用いる発育鶏卵

9～11日齢のものを用いる。

#### 2.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルスの各株

##### 2.2.2.1 発育鶏卵

##### 2.2.2.1.1 マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルス及びプロダクションシードウイルスの増殖、継代及び保存に用いる発育鶏卵

SPF動物規格の1.1に適合した10～12日齢のものを用いる。

マスターシードウイルス及びワーキングシードウイルスを増殖、継代及び保存する場合の発育鶏卵又はプロダクションシードウイルスを増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、3.2の試験を行う。

##### 2.2.2.1.2 原液の製造に用いる発育鶏卵

10～12日齢のものを用いる。

#### 2.2.3 産卵低下症候群-1976ウイルス

##### 2.2.3.1 マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルス及びプロダクションシードウイルスの増殖、継代及び保存に用いる初代細胞

SPF動物規格の1.1に適合した鶏胚肝初代細胞を用いる。

##### 2.2.3.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

##### 2.2.3.3 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）

##### 2.2.3.3.1 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、2.2.3.2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、3.3の試験を行う。

##### 2.2.3.4 原液の製造に用いる発育あひる卵

製造に相当と認められた9～11日齢のものを用いる。

#### 2.2.4 ヘモフィルス・パラガリナルムの各型菌

##### 2.2.4.1 発育鶏卵

##### 2.2.4.1.1 マスターシード菌、ワーキングシード菌及びプロダクションシード菌の増殖、継代及び保存に用いる発育鶏卵

SPF動物規格の1.1に適合した3～8日齢のものを用いる。

マスターシード菌及びワーキングシード菌を増殖、継代及び保存する場合の発育鶏卵又はプロダクションシード菌を増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、3.2の試験を行う。

## 2.2.4.2 培地

### 2.2.4.2.1 原液の製造に用いる培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

## 2.3 原液

### 2.3.1 ニューカッスル病ウイルス原液

#### 2.3.1.1 発育鶏卵の培養

1 回に処理する発育鶏卵を個別発育鶏卵とみなす。

個別発育鶏卵について、3.4の試験を行う。

#### 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の発育鶏卵で培養し、感染増殖させた尿膜腔液のろ液又は遠心上清、又はこれを相当と認められた方法で濃縮したものをウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.5.1.1の試験を行う。

#### 2.3.1.3 不活化

ウイルス浮遊液を相当と認められた方法により不活化したもの、又はこれを濃縮したもの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、3.7.1及び3.7.2.1の試験を行う。

#### 2.3.1.4 アジュバントの添加

不活化ウイルス浮遊液に相当と認められた油性アジュバントを添加し、原液とする。

原液について、3.9の試験を行う。

### 2.3.2 鶏伝染性気管支炎ウイルスの各株原液

#### 2.3.2.1 発育鶏卵の培養

1 回に処理する発育鶏卵を個別発育鶏卵とみなす。

個別発育鶏卵について、3.4の試験を行う。

#### 2.3.2.2 ウイルスの培養

各株のプロダクションシードウイルスを2.3.2.1の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、感染増殖させた尿膜腔液のろ液又は遠心上清、又はこれを相当と認められた方法で濃縮したものを各株のウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.5.1.2の試験を行う。

#### 2.3.2.3 不活化

各ウイルス浮遊液を相当と認められた方法で濃縮したものをホルマリンで不活化したもの、又はこれを濃縮したもの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、3.7.1及び3.7.2.2の試験を行う。

#### 2.3.2.4 アジュバントの添加

各株の不活化ウイルス浮遊液に相当と認められた油性アジュバントを添加し、それぞれの株の原液とする。

原液について、3.9の試験を行う。

### 2.3.3 産卵低下症候群-1976ウイルス

#### 2.3.3.1 発育あひる卵の培養

1 回に処理する発育あひる卵を個別発育あひる卵とみなす。

個別発育あひる卵について、3.4の試験を行う。

#### 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の発育あひる卵の尿膜腔内に注射し、感染増殖させた尿膜腔液のろ液又は遠心上清、又はこれを相当と認められた方法で濃縮したものをウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.5.1.3の試験を行う。

### 2.3.3.3 不活化

ウイルス浮遊液を適当と認められた方法で濃縮したものをホルマリンで不活化したもの、又はこれを濃縮したもの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、3.7.1及び3.7.2.3の試験を行う。

### 2.3.3.4 アジュバントの添加

不活化ウイルス浮遊液に適当と認められた油性アジュバントを添加し、原液とする。

原液について、3.9の試験を行う。

## 2.3.4 ヘモフィルス・パラガリナルムの各型菌原液

### 2.3.4.1 培養

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

培養菌液について、3.6.1及び3.6.2.1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て不活化後、適当と認められた方法で濃縮したものを不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.8の試験を行う。

### 2.3.4.3 アジュバントの添加

不活化菌液を濃度調整後、適当と認められた油性アジュバントを添加し、原液とする。

原液について、3.9の試験を行う。

## 2.4 最終バルク

ニューカッスル病ウイルス原液、鶏伝染性気管支炎ウイルスの各株原液、産卵低下症候群-1976ウイルス原液及びヘモフィルス・パラガリナルム各型菌原液を混合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、小分製品とする。

小分製品について、3.10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1.4.2.3.1.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.1.2 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

鶏脳脊髄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3.1.2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、鶏脳脊髄炎ウイルスについて3.1.1.4.2.2に規定する試験を実施する製剤については、本試験を実施しなくてもよい。

###### 3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

鶏白血病ウイルス、細網内皮症ウイルス及び鶏脳脊髄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、3.2.1、3.2.2及び3.2.10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、鶏脳脊髄炎ウイルスについて3.1.1.4.2.1に規定する試験を実施する製剤については、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の3.2.10の試験を実施しなくてもよい。

### 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 発育鶏卵の試験

#### 3.2.1 孵卵性状試験

シードロット規格の3.2.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.3 初代細胞の試験

#### 3.3.1 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

##### 3.3.1.1 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。

##### 3.3.1.2 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。

##### 3.3.1.3 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。

### 3.4 個体別発育卵の試験

個体別発育鶏卵又は個体別発育あひる卵の1%以上又は30個以上を対照発育卵とし、これについて次の試験を行う。

#### 3.4.1 培養観察

対照発育卵を、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し、観察するとき、胚に異常を認めてはならない。

#### 3.4.2 鶏赤血球凝集試験

3.4.1の試験最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol%鶏赤血球浮遊液を等量加え、60分間静置し、観察するとき、赤血球凝集を認めてはならない。

### 3.5 ウイルス浮遊液の試験

### 3.5.1 ウイルス含有量試験

#### 3.5.1.1 ニューカッスル病ウイルス

##### 3.5.1.1.1 試験材料

###### 3.5.1.1.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.5.1.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した9～11日齢のものを用いる。

###### 3.5.1.1.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ5個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で5日間培養し、観察する。試験最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol%鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

###### 3.5.1.1.3 判定

尿膜腔液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、EID<sub>50</sub>を算出する。ただし、24時間以内に死亡したものは、除外する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10<sup>9.0</sup>EID<sub>50</sub>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は、そのウイルス含有量とする。

#### 3.5.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

##### 3.5.1.2.1 試験材料

###### 3.5.1.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.5.1.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した9～10日齢のものを用いる。

###### 3.5.1.2.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ5個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で9日齢を用いた場合は9日間、10日齢を用いた場合は8日間培養し、観察する。試験最終日に鶏胚の変化を観察する。

###### 3.5.1.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全又はカーリング）を認めたものを感染とみなし、EID<sub>50</sub>を算出する。ただし、24時間以内に死亡したものは、除外する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10<sup>7.0</sup>EID<sub>50</sub>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は、そのウイルス含有量とする。

#### 3.5.1.3 産卵低下症候群－1976ウイルス

##### 3.5.1.3.1 試験材料

###### 3.5.1.3.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.5.1.3.1.2 試験方法

試料0.5mLずつをそれぞれ2本以上の試験管に分注し、0.5vol%鶏赤血球浮遊液を加え、静置した後、赤血球凝集の有無を観察する。

###### 3.5.1.3.1.3 判定

赤血球凝集が観察された検体の最高希釈倍数を赤血球凝集素単位とする。

検体の赤血球凝集素単位は、2048倍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は、その赤血球凝集素単位とする。

### 3.6 培養菌液の試験

#### 3.6.1 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。

#### 3.6.2 生菌数試験

##### 3.6.2.1 試験材料



### 3.6.2.1.1 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。

### 3.6.2.1.2 培地

ヘモフィルス試験用寒天培地（付記1）又は適当と認められた寒天培地を用いる。

### 3.6.2.2 試験方法

各試料0.1mLずつをそれぞれ2枚以上の培地に接種して培地表面に拡散させ、37°C、5 vol%炭酸ガス下で48時間培養後、集落数を数える。

### 3.6.2.3 判定

各段階の希釈液ごとの集落数から生菌数を算出する。

検体の生菌数は、A型菌では1 mL中 $10^{8.0}$ 個以上、C型菌では1 mL中 $10^{7.5}$ 個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は、その生菌数とする。

## 3.7 不活化ウイルス浮遊液の試験

### 3.7.1 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。

### 3.7.2 不活化試験

#### 3.7.2.1 ニューカッスル病ウイルス

##### 3.7.2.1.1 試験材料

###### 3.7.2.1.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

###### 3.7.2.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した9～11日齢のものを用いる。

##### 3.7.2.1.2 試験方法

注射材料0.2mLずつを10個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37°Cで7日間培養した後、尿膜腔液を採取し、更に1代継代し、37°Cで7日間培養し、観察する。

試験最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol%鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

###### 3.7.2.1.3 判定

鶏胚は、正常に発育しなければならない、尿膜腔液に赤血球凝集を認めてはならない。

#### 3.7.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

##### 3.7.2.2.1 試験材料

###### 3.7.2.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

###### 3.7.2.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した9～10日齢のものを用いる。

##### 3.7.2.2.2 試験方法

注射材料0.2mLずつを10個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37°Cで7日間培養した後、尿膜腔液を採取し、更に1代継代し、37°Cで7日間培養し、観察する。

###### 3.7.2.2.3 判定

鶏胚は、正常に発育しなければならない。

#### 3.7.2.3 産卵低下症候群-1976ウイルス

##### 3.7.2.3.1 試験材料

###### 3.7.2.3.1.1 試料

検体を重亜硫酸ナトリウムで中和したものを試料とする。

###### 3.7.2.3.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格2.1.3の鶏胚肝初代細胞を用いる。

### 3.7.2.3.2 試験方法

試料2.0mLを90cm<sup>2</sup>以上の培養細胞に接種し、37°Cで6～7日間培養した後、その培養上清を採取し、さらに1代継代し、37°Cで6～7日間培養観察する。

観察終了日に、培養上清を採取し、0.5vol%鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

### 3.7.2.3.3 判定

培養細胞にCPEを認めず、培養上清に赤血球凝集を認めてはならない。

## 3.8 不活化菌液の試験

### 3.8.1 不活化試験

#### 3.8.1.1 試験材料

##### 3.8.1.1.1 接種材料

検体を接種材料とする。

##### 3.8.1.1.2 培地

ヘモフィルス試験用寒天培地又は適当と認められた培地を用いる。

##### 3.8.1.2 試験方法

接種材料0.1mLずつを2枚以上の培地に接種して培地表面に拡散させ、37°C、5 vol%炭酸ガス下で48時間培養後、集落の有無を観察する。

##### 3.8.1.3 判定

接種材料を接種した全ての培地上にヘモフィルス・パラガリナルムの集落を認めてはならない。

## 3.9 原液の試験

### 3.9.1 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。

## 3.10 小分製品の試験

### 3.10.1 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。

### 3.10.2 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。

### 3.10.3 ホルマリン定量試験

適当と認められた方法で試験品を処理したものを試料とし、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、0.06vol%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は、そのホルマリン含有量とする。

### 3.10.4 安全試験

#### 3.10.4.1 試験材料

##### 3.10.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.10.4.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した発育鶏卵由来の5週齢の鶏を用いる。

#### 3.10.4.2 試験方法

試験動物の10羽を試験群、3羽を対照群とする。

注射材料1羽分ずつを試験群の胸部筋肉内に注射し、対照群と共に5週間観察する。

#### 3.10.4.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に臨床的な異常を認めてはならない。

### 3.10.5 力価試験

#### 3.10.5.1 ニューカッスル病力価試験

##### 3.10.5.1.1 試験材料

#### 3.10.5.1.1.1 試験動物

3.10.4の試験に用いた試験動物を用いる。

#### 3.10.5.1.1.2 赤血球凝集抗原

「ニューカッスル病診断用赤血球凝集抗原」を用いる。

#### 3.10.5.1.2 試験方法

3.10.4の試験最終日に試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、ニューカッスル病ウイルス赤血球凝集抑制試験を行う。

#### 3.10.5.1.3 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（以下この項において「HI抗体価」という。）とする。

試験群の80%以上がHI抗体価80倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全てHI抗体価5倍以下でなければならない。

#### 3.10.5.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

##### 3.10.5.2.1 試験材料

###### 3.10.5.2.1.1 試験動物

3.10.4の試験に用いた動物を用いる。

###### 3.10.5.2.1.2 中和試験用ウイルス

それぞれの製造用株を用いる。ただし、そのウイルス量は、3.5.1.2に従いウイルス価を測定するとき、1 mL中 $10^{5.0}$ EID<sub>50</sub>以上でなければならない。

###### 3.10.5.2.1.3 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した9～10日齢のものを用いる。

##### 3.10.5.2.2 試験方法

3.10.4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、ウイルス希釈法により中和試験を行う。血清は、それぞれ各群ごとに等量プールし、非働化する。

中和試験用ウイルスをリン酸緩衝食塩液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を3群に分け、第1群には試験群のプール血清を、第2群には対照群のプール血清を、第3群にはウイルス対照としてリン酸緩衝食塩液を、それぞれ等量加えて混合する。これらの混合液を4℃で18～24時間又は37℃で60分間処理する。処理した試料0.1 mLずつを5個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で9日齢を用いた場合は9日間培養、10日齢を用いた場合は8日間培養観察する。試験最終日に鶏胚の変化を観察する。

##### 3.10.5.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全又はカーリング）を認めたものを感染したものとみなし、EID<sub>50</sub>を求め、中和指数を算出する。ただし、24時間以内に死亡したものは、除外する。

試験群のそれぞれの株に対する中和指数は、対照群に対し2.0以上でなければならない。この場合、対照群の中和指数は、ウイルス対照に対し1.0以下でなければならない。

#### 3.10.5.3 産卵低下症候群－1976ウイルス力価試験

##### 3.10.5.3.1 試験材料

###### 3.10.5.3.1.1 試験動物

3.10.4の試験で用いた鶏を用いる。

###### 3.10.5.3.1.2 赤血球凝集抗原

産卵低下症候群－1976ウイルス赤血球凝集抗原（付記2）を用いる。

##### 3.10.5.3.2 試験方法

3.10.4の試験最終日に試験群及び対照群から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。

血清1容に25w/v%カオリン液（付記3）3容を加えて処理した後、遠心した上清を採取する。

これをリン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈し、各希釈血清25 $\mu$ Lに等量の4単位の産卵低下症候群－1976ウイルス赤血球凝集抗原を加えて混合し反応させた後、0.5vol%鶏赤血球浮遊液を50 $\mu$ Lずつ加えて振とう混合し、静置した後に赤血球凝集の有無を観察する。

#### 3.10.5.3.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍率をHI抗体価とする。

試験群の80%以上がHI抗体価32倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全てHI抗体価4倍以下でなければならない。

#### 3.10.5.4 鶏伝染性コリザ（A・C型）力価試験

##### 3.10.5.4.1 試験材料

##### 3.10.5.4.1.1 試験動物

3.10.4の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.10.5.4.1.2 赤血球凝集抗原

「鶏伝染性コリザ（A型）診断用赤血球凝集抗原」及び「鶏伝染性コリザ（C型）赤血球凝集抗原」を用いる。

##### 3.10.5.4.2 試験方法

3.10.4の試験最終日に試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、鶏伝染性コリザ（A型）赤血球凝集抑制試験及び鶏伝染性コリザ（C型）赤血球凝集抑制試験を行う。

##### 3.10.5.4.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数をHI抗体価とする。HI抗体価5倍以上を陽性とする。

それぞれの赤血球凝集抑制反応において、試験群の70%以上が陽性でなければならない。この場合、対照群では、全て陰性でなければならない。

#### 4 貯法及び有効期間

有効期間は、3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 ヘモフィルス試験用寒天培地

1,000mL中

鶏肉水	300.0 mL
カゼインペプトン	5.0 g
カザミノ酸	2.0 g
L-グルタミン酸水素ナトリウム一水和物	2.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
寒天	15.0 g
非働化鶏血清	10.0 mL
5% $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）	0.1 mL
水酸化ナトリウム	適量
精製水	残量

非働化鶏血清及び5% $\beta$ -NAD以外の成分を精製水に溶解、pH7.3に調整し、高圧滅菌後、非働化鶏血清及び0.1 $\mu$ mのフィルターでろ過滅菌した5% $\beta$ -NADを添加する。

#### 付記2 産卵低下症候群－1976ウイルス赤血球凝集抗原

産卵低下症候群－1976ウイルスJPA－1株又はこれと同等と認められた株を生ワクチン製造用材料の規格1.3に適合した發育あひる卵で増殖させて得た尿膜腔液又は生ワクチン製造用材料の規格2.1.3に適合した鶏胚肝初代細胞で増殖させて得た培養上清に0.2vol%になるようにホルマリンを加えて不活化したもの。赤血球凝集（HA）価を測定するとき、HA価は64倍以上の

もの。

付記3 25w/v%カオリン液

100mL中

カオリン

25 g

リン酸緩衝食塩液

残量

高压滅菌又はアジ化ナトリウムを0.01w/v%添加した後、2～10℃に保存する。

# ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎2価・産卵低下症候群-1976・鶏伝染性コリーザ（A・C型）・マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

令和2年8月28日（告示第1689号）新規追加

## 1 定義

シードロット規格に適合したニューカッスル病ウイルス及び血清型のそれぞれ異なる2種類の鶏伝染性気管支炎ウイルスを同規格に適合した発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液、同規格に適合した産卵低下症候群-1976ウイルスを同規格に適合した発育あひる卵で増殖させて得たウイルス液並びに同規格に適合したヘモフィルス・パラガリナルム（A型及びC型菌）及びマイコプラズマ・ガリセプチカムの培養菌液をそれぞれ不活化したものに油性アジュバントを添加し、混合したワクチンである。

## 2 製法

### 2.1 製造用株

#### 2.1.1 ニューカッスル病ウイルス

##### 2.1.1.1 名称

ニューカッスル病ウイルスUlster2C株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.1.2 性状

10日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射すると増殖し、その尿膜腔液には鶏赤血球凝集性を認める。

#### 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、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させ、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。

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、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵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1.1に適合した発育鶏卵で増殖させる。

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℃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は、3.1.3の試験を行う。

#### 2.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

##### 2.1.2.1 名称

鶏伝染性気管支炎ウイルスM41及びMie株、又はこれらと同等と認められた2種類の株

#### 2.1.2.2 性状

9～11日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射すると、鶏胚に特徴的な病変を伴って増殖する。

#### 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、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させ、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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.1.2.4 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、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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1.1に適合した発育鶏卵で増殖させる。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.1.3 産卵低下症候群-1976ウイルス

##### 2.1.3.1 名称

産卵低下症候群-1976ウイルスMcFerran127株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.3.2 性状

鶏胚肝初代細胞及びあひる胚初代細胞でCPEを伴って増殖する。

##### 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、SPF動物規格の1.1に適合した鶏胚肝初代細胞で増殖させ、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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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。

##### 2.1.3.4 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、SPF動物規格の1.1に適合した鶏胚肝初代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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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1.1に適合した鶏胚肝初代細胞で増殖させる。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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。

## 2.1.4 ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌

### 2.1.4.1 名称

ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌221株又はこれと同等と認められた株

### 2.1.4.2 性状

鶏及び発育鶏卵に対して病原性を示す。牛、馬、羊、鶏及びモルモットの赤血球を凝集する。

### 2.1.4.3 マスターシード菌

#### 2.1.4.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させ、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菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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最高継代数は、10代以内でなければならない。

### 2.1.4.4 ワーキングシード菌

#### 2.1.4.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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。

### 2.1.4.5 プロダクションシード菌

#### 2.1.4.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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は、3.1.6の試験を行う。

## 2.1.5 ヘモフィルス・パラガリナルムC型菌

### 2.1.5.1 名称

ヘモフィルス・パラガリナルムC型菌Modesto株又はこれと同等と認められた株

### 2.1.5.2 性状

鶏及び発育鶏卵に対して病原性を示す。

### 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、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させ、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菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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最高継代数は、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、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖及び継代する。



ワーキングシード菌は、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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は、3.1.6の試験を行う。

#### 2.1.6 マイコプラズマ・ガリセプチカム

##### 2.1.6.1 名称

マイコプラズマ・ガリセプチカムR980株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.6.2 性状

鶏に対して病原性を示す。

##### 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、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菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-40^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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最高継代数は、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 $-40^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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 $-40^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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は、3.1.6の試験を行う。

## 2.2 製造用材料

### 2.2.1 ニューカッスル病ウイルス

#### 2.2.1.1 発育鶏卵

##### 2.2.1.1.1 マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルス及びプロダクションシードウイルスの増殖、継代及び保存に用いる発育鶏卵

SPF動物規格の1.1に適合した9～11日齢のものを用いる。

マスターシードウイルス及びワーキングシードウイルスを増殖、継代及び保存する場合の発育鶏卵又はプロダクションシードウイルスを増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、3.2の試験を行う。

##### 2.2.1.1.2 原液の製造に用いる発育鶏卵

9～11日齢のものを用いる。

### 2.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルスの各株

#### 2.2.2.1 発育鶏卵

#### 2.2.2.1.1 マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルス及びプロダクションシードウイルスの増殖、継代及び保存に用いる発育鶏卵

SPF動物規格の1.1に適合した10～12日齢のものを用いる。

マスターシードウイルス及びワーキングシードウイルスを増殖、継代及び保存する場合の発育鶏卵又はプロダクションシードウイルスを増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、3.2の試験を行う。

#### 2.2.2.1.2 原液の製造に用いる発育鶏卵

10～12日齢のものを用いる。

#### 2.2.3 産卵低下症候群－1976ウイルス

#### 2.2.3.1 マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルス及びプロダクションシードウイルスの増殖、継代及び保存に用いる初代細胞

SPF動物規格の1.1に適合した鶏胚肝初代細胞を用いる。

#### 2.2.3.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

#### 2.2.3.3 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）

##### 2.2.3.3.1 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、2.2.3.2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、3.3の試験を行う。

#### 2.2.3.4 原液の製造に用いる発育あひる卵

製造に相当と認められた9～11日齢のものを用いる。

#### 2.2.4 ヘモフィルス・パラガリナルムの各型菌

##### 2.2.4.1 発育鶏卵

#### 2.2.4.1.1 マスターシード菌、ワーキングシード菌及びプロダクションシード菌の増殖、継代及び保存に用いる発育鶏卵

SPF動物規格の1.1に適合した3～8日齢のものを用いる。

マスターシード菌及びワーキングシード菌を増殖、継代及び保存する場合の発育鶏卵又はプロダクションシード菌を増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、3.2の試験を行う。

#### 2.2.4.2 培地

##### 2.2.4.2.1 原液の製造に用いる培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

#### 2.2.5 マイコプラズマ・ガリセプチカム

##### 2.2.5.1 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 ニューカッスル病ウイルス原液

###### 2.3.1.1 発育鶏卵の培養

1回に処理する発育鶏卵を個体別発育鶏卵とみなす。

個体別発育鶏卵について、3.4の試験を行う。

###### 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の発育鶏卵で培養し、感染増殖させた尿膜腔液のろ液又は遠心上清、又はこれを相当と認められた方法で濃縮したものをウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.5.1.1の試験を行う。

###### 2.3.1.3 不活化

ウイルス浮遊液を相当と認められた方法により不活化したもの、又はこれを濃縮したものを不活

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、3.7.1及び3.7.2.1の試験を行う。

#### 2.3.1.4 アジュバントの添加

不活化ウイルス浮遊液に相当と認められた油性アジュバントを添加し、原液とする。

原液について、3.9の試験を行う。

#### 2.3.2 鶏伝染性気管支炎ウイルスの各株原液

##### 2.3.2.1 発育鶏卵の培養

1回に処理する発育鶏卵を個別発育鶏卵とみなす。

個別発育鶏卵について、3.4の試験を行う。

##### 2.3.2.2 ウイルスの培養

各株のプロダクションシードウイルスを2.3.2.1の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、感染増殖させた尿膜腔液のろ液又は遠心上清、又はこれを相当と認められた方法で濃縮したものを各株のウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.5.1.2の試験を行う。

##### 2.3.2.3 不活化

各ウイルス浮遊液を相当と認められた方法で濃縮したものをホルマリンで不活化したもの、又はこれを濃縮したもの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、3.7.1及び3.7.2.2の試験を行う。

##### 2.3.2.4 アジュバントの添加

各株の不活化ウイルス浮遊液に相当と認められた油性アジュバントを添加し、それぞれの株の原液とする。

原液について、3.9の試験を行う。

#### 2.3.3 産卵低下症候群-1976ウイルス

##### 2.3.3.1 発育あひる卵の培養

1回に処理する発育あひる卵を個別発育あひる卵とみなす。

個別発育あひる卵について、3.4の試験を行う。

##### 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の発育あひる卵の尿膜腔内に注射し、感染増殖させた尿膜腔液のろ液又は遠心上清、又はこれを相当と認められた方法で濃縮したものをウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.5.1.3の試験を行う。

##### 2.3.3.3 不活化

ウイルス浮遊液を相当と認められた方法で濃縮したものをホルマリンで不活化したもの、又はこれを濃縮したもの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、3.7.1及び3.7.2.3の試験を行う。

##### 2.3.3.4 アジュバントの添加

不活化ウイルス浮遊液に相当と認められた油性アジュバントを添加し、原液とする。

原液について、3.9の試験を行う。

#### 2.3.4 ヘモフィルス・パラガリナルムの各型菌原液

##### 2.3.4.1 培養

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

培養菌液について、3.6.1及び3.6.2.1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て不活化後、相当と認められた方法で濃縮したものを不活化菌液と

する。

不活化菌液について、3.8.1.1の試験を行う。

#### 2.3.4.3 アジュバントの添加

不活化菌液を濃度調整後、適当と認められた油性アジュバントを添加し、原液とする。

原液について、3.9の試験を行う。

#### 2.3.5 マイコプラズマ・ガリセプチカム

##### 2.3.5.1 培養

ワーキングシード菌又はプロダクションシード菌を製造用培地で培養したものを更に製造用培地に接種・継代し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.6.1及び3.6.2.2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て不活化後、適当と認められた方法で濃縮したものを不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.8.1.2の試験を行う。

##### 2.3.5.3 アジュバントの添加

不活化菌液を適当と認められた希釈用液で濃度調整し、油性アジュバントを添加したものを原液とする。

原液について、3.9の試験を行う。

#### 2.4 最終バルク

ニューカッスル病ウイルス原液、鶏伝染性気管支炎ウイルスの各株原液、産卵低下症候群-1976ウイルス原液、ヘモフィルス・パラガリナルム各型菌原液及びマイコプラズマ・ガリセプチカム原液を混合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、小分製品とする。

小分製品について、3.10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1.4.2.3.1.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.1.1.2 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

鶏脳脊髄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3.1.2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、鶏脳脊髄炎ウイルスについて3.1.1.4.2.2に規定する試験を実施する製剤については、本試験を実施しなくてもよい。

###### 3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

鶏白血病ウイルス、細網内皮症ウイルス及び鶏脳脊髄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、3.2.1、3.2.2及び3.2.10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、鶏脳脊髄炎ウイルスについて3.1.1.4.2.1に規定する試験を実施する製剤については、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の3.2.10の試験を実施しなくてもよい。

### 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 発育鶏卵の試験

#### 3.2.1 孵卵性状試験

シードロット規格の3.2.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.3 初代細胞の試験

#### 3.3.1 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

##### 3.3.1.1 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。

##### 3.3.1.2 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。

##### 3.3.1.3 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。

### 3.4 個体別発育卵の試験

個体別発育鶏卵又は個体別発育あひる卵の1%以上又は30個以上を対照発育卵とし、これについて次の試験を行う。

#### 3.4.1 培養観察

対照発育卵を、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し、観察するとき、胚に異常を認めてはならない。

#### 3.4.2 鶏赤血球凝集試験

3.4.1の試験最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol%鶏赤血球浮遊液を等量加え、60分間静置し、観察するとき、赤血球凝集を認めてはならない。

### 3.5 ウイルス浮遊液の試験

### 3.5.1 ウイルス含有量試験

#### 3.5.1.1 ニューカッスル病ウイルス

##### 3.5.1.1.1 試験材料

###### 3.5.1.1.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.5.1.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した9～11日齢のものを用いる。

###### 3.5.1.1.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ5個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で5日間培養し、観察する。試験最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol %鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

###### 3.5.1.1.3 判定

尿膜腔液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、EID<sub>50</sub>を算出する。ただし、24時間以内に死亡したものは、除外する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10<sup>9.0</sup>EID<sub>50</sub>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は、そのウイルス含有量とする。

#### 3.5.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

##### 3.5.1.2.1 試験材料

###### 3.5.1.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.5.1.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した9～10日齢のものを用いる。

###### 3.5.1.2.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ5個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で9日齢を用いた場合は9日間、10日齢を用いた場合は8日間培養し、観察する。試験最終日に鶏胚の変化を観察する。

###### 3.5.1.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全、カーリング）を認めたものを感染とみなし、EID<sub>50</sub>を算出する。ただし、24時間以内に死亡したものは、除外する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10<sup>7.0</sup>EID<sub>50</sub>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は、そのウイルス含有量とする。

#### 3.5.1.3 産卵低下症候群－1976ウイルス

##### 3.5.1.3.1 試験材料

###### 3.5.1.3.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.5.1.3.1.2 試験方法

試料0.5mLずつをそれぞれ2本以上の試験管に分注し、0.5vol%鶏赤血球浮遊液を加え、静置した後、赤血球凝集の有無を観察する。

###### 3.5.1.3.1.3 判定

赤血球凝集が観察された検体の最高希釈倍数を赤血球凝集素単位とする。

検体の赤血球凝集素単位は、2048倍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は、その赤血球凝集素単位とする。

### 3.6 培養菌液の試験

#### 3.6.1 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。

#### 3.6.2 生菌数試験

##### 3.6.2.1 ヘモフィルス・パラガリナルム

### 3.6.2.1.1 試験材料

#### 3.6.2.1.1.1 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。

#### 3.6.2.1.1.2 培地

ヘモフィルス試験用寒天培地（付記1）又は適当と認められた寒天培地を用いる。

#### 3.6.2.1.2 試験方法

各試料0.1mLずつをそれぞれ2枚以上の培地に接種して培地表面に拡散させ、37°C、5 vol%炭酸ガス下で48時間培養後、集落数を数える。

#### 3.6.2.1.3 判定

各段階の希釈液ごとの集落数から生菌数を算出する。

検体の生菌数は、A型菌では1 mL中 $10^{8.0}$ 個以上、C型菌では1 mL中 $10^{7.5}$ 個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は、その生菌数とする。

### 3.6.2.2 マイコプラズマ・ガリセプチカム

#### 3.6.2.2.1 試験材料

##### 3.6.2.2.1.1 試料

検体をマイコプラズマ希釈用培地（付記2）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

##### 3.6.2.2.1.2 培地

マイコプラズマ試験用寒天平板培地（付記3）又は適当と認められた寒天培地を用いる。

##### 3.6.2.2.2 試験方法

各試料をそれぞれ2枚以上の培地に接種して培地表面に拡散させ、37°C、5 vol%炭酸ガス下で適当と認められた期間培養後、集落数を数える。

##### 3.6.2.2.3 判定

各段階の希釈液ごとの集落数から生菌数を算出する。

検体の生菌数は、1 mL中 $10^{8.0}$ 個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は、その生菌数とする。

### 3.7 不活化ウイルス浮遊液の試験

#### 3.7.1 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。

#### 3.7.2 不活化試験

##### 3.7.2.1 ニューカッスル病ウイルス

###### 3.7.2.1.1 試験材料

###### 3.7.2.1.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

###### 3.7.2.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した9～11日齢のものを用いる。

###### 3.7.2.1.2 試験方法

注射材料0.2mLずつを10個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37°Cで7日間培養した後、尿膜腔液を採取し、更に1代継代し、37°Cで7日間培養し、観察する。

試験最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol%鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

###### 3.7.2.1.3 判定

鶏胚は、正常に発育しなければならない、尿膜腔液に赤血球凝集を認めてはならない。

##### 3.7.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

###### 3.7.2.2.1 試験材料

#### 3.7.2.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

#### 3.7.2.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した9～10日齢のものを用いる。

#### 3.7.2.2.2 試験方法

注射材料0.2mLずつを10個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で7日間培養した後、尿膜腔液を採取し、更に1代継代し、37℃で7日間培養し、観察する。

#### 3.7.2.2.3 判定

鶏胚は、正常に発育しなければならない。

#### 3.7.2.3 産卵低下症候群－1976ウイルス

##### 3.7.2.3.1 試験材料

###### 3.7.2.3.1.1 試料

検体を重亜硫酸ナトリウムで中和したものを試料とする。

###### 3.7.2.3.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格2.1.3の鶏胚肝初代細胞を用いる。

###### 3.7.2.3.2 試験方法

試料2.0mLを90cm<sup>2</sup>以上の培養細胞に接種し、37℃で6～7日間培養した後、その培養上清を採取し、さらに1代継代し、37℃で6～7日間培養観察する。

観察終了日に、培養上清を採取し、0.5vol%鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

###### 3.7.2.3.3 判定

培養細胞にCPEを認めず、培養上清に赤血球凝集を認めてはならない。

#### 3.8 不活化菌液の試験

##### 3.8.1 不活化試験

###### 3.8.1.1 ヘモフィルス・パラガリナルム

###### 3.8.1.1.1 試験材料

###### 3.8.1.1.1.1 接種材料

検体を接種材料とする。

###### 3.8.1.1.1.2 培地

ヘモフィルス試験用寒天培地又は適当と認められた培地を用いる。

###### 3.8.1.1.2 試験方法

接種材料0.1mLずつを2枚以上の培地に接種して培地表面に拡散させ、37℃、5 vol%炭酸ガス下で48時間培養後、集落の有無を観察する。

###### 3.8.1.1.3 判定

接種材料を接種した全ての培地上にヘモフィルス・パラガリナルムの集落を認めてはならない。

###### 3.8.1.2 マイコプラズマ・ガリセプチカム

###### 3.8.1.2.1 試験材料

###### 3.8.1.2.1.1 接種材料

検体を接種材料とする。

###### 3.8.1.2.1.2 培地

マイコプラズマ試験用寒天平板培地又は適当と認められた培地を用いる。

###### 3.8.1.2.2 試験方法

試料0.1mLずつを2枚以上の寒天平板培地に接種して培地表面に拡散させ、37℃、5 vol%炭酸ガス下で適当と認められた期間培養後、集落の有無を観察する。

###### 3.8.1.2.3 判定

全ての寒天培地上にマイコプラズマ・ガリセプチカムの集落を認めてはならない。



### 3.9 原液の試験

#### 3.9.1 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。

### 3.10 小分製品の試験

#### 3.10.1 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。

#### 3.10.2 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。

#### 3.10.3 ホルマリン定量試験

適当と認められた方法で試験品を処理したものを試料とし、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、0.06vol%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は、そのホルマリン含有量とする。

#### 3.10.4 安全試験

##### 3.10.4.1 試験材料

###### 3.10.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 3.10.4.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した発育鶏卵由来の5週齢の鶏を用いる。

##### 3.10.4.2 試験方法

試験動物の10羽を試験群、3羽を対照群とする。

注射材料1羽分ずつを試験群の胸部筋肉内に注射し、対照群と共に5週間観察する。

##### 3.10.4.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に臨床的な異常を認めてはならない。

#### 3.10.5 力価試験

##### 3.10.5.1 ニューカッスル病力価試験

###### 3.10.5.1.1 試験材料

###### 3.10.5.1.1.1 試験動物

3.10.4の試験に用いた試験動物を用いる。

###### 3.10.5.1.1.2 赤血球凝集抗原

「ニューカッスル病診断用赤血球凝集抗原」を用いる。

###### 3.10.5.1.2 試験方法

3.10.4の試験最終日に試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、ニューカッスル病ウイルス赤血球凝集抑制試験を行う。

###### 3.10.5.1.3 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（以下この項において「HI抗体価」という。）とする。

試験群の80%以上がHI抗体価80倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全てHI抗体価5倍以下でなければならない。

##### 3.10.5.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

###### 3.10.5.2.1 試験材料

###### 3.10.5.2.1.1 試験動物

3.10.4の試験に用いた動物を用いる。

###### 3.10.5.2.1.2 中和試験用ウイルス

それぞれの製造用株を用いる。ただし、そのウイルス量は、3.5.1.2に従いウイルス価を測定する

とき、1 mL中 $10^{5.0}$ EID<sub>50</sub>以上でなければならない。

#### 3.10.5.2.1.3 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した9～10日齢のものを用いる。

#### 3.10.5.2.2 試験方法

3.10.4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、ウイルス希釈法により中和試験を行う。血清は、それぞれ各群ごとに等量プールし、非働化する。

中和試験用ウイルスをリン酸緩衝食塩液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を3群に分け、第1群には試験群のプール血清を、第2群には対照群のプール血清を、第3群にはウイルス対照としてリン酸緩衝食塩液を、それぞれ等量加えて混合する。これらの混合液を4℃で18～24時間又は37℃で60分間処理する。処理した試料0.1mLずつを5個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で9日齢を用いた場合は9日間培養、10日齢を用いた場合は8日間培養観察する。試験最終日に鶏胚の変化を観察する。

#### 3.10.5.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全、カーリング）を認めたものを感染したものとみなし、EID<sub>50</sub>を求め、中和指数を算出する。ただし、24時間以内に死亡したものは、除外する。

試験群のそれぞれの株に対する中和指数は、対照群に対し2.0以上でなければならない。この場合、対照群の中和指数は、ウイルス対照に対し1.0以下でなければならない。

#### 3.10.5.3 産卵低下症候群－1976ウイルス力価試験

##### 3.10.5.3.1 試験材料

###### 3.10.5.3.1.1 試験動物

3.10.4の試験で用いた鶏を用いる。

###### 3.10.5.3.1.2 赤血球凝集抗原

産卵低下症候群－1976ウイルス赤血球凝集抗原（付記4）を用いる。

##### 3.10.5.3.2 試験方法

3.10.4の試験最終日に試験群及び対照群から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。

血清1容に25w/v%カオリン液（付記5）3容を加えて処理した後、遠心した上清を採取する。これをリン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈し、各希釈血清25μLに等量の4単位の産卵低下症候群－1976ウイルス赤血球凝集抗原を加えて混合し反応させた後、0.5vol%鶏赤血球浮遊液を50μLずつ加えて振とう混合し、静置した後に赤血球凝集の有無を観察する。

##### 3.10.5.3.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍率をHI抗体価とする。

試験群の80%以上がHI抗体価32倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全てHI抗体価4倍以下でなければならない。

#### 3.10.5.4 鶏伝染性コリーザ（A・C型）力価試験

##### 3.10.5.4.1 試験材料

###### 3.10.5.4.1.1 試験動物

3.10.4の試験に用いた動物を用いる。

###### 3.10.5.4.1.2 赤血球凝集抗原

「鶏伝染性コリーザ（A型）診断用赤血球凝集抗原」及び「鶏伝染性コリーザ（C型）赤血球凝集抗原」を用いる。

##### 3.10.5.4.2 試験方法

3.10.4の試験最終日に試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、鶏伝染性コリーザ（A型）赤血球凝集抑制試験及び鶏伝染性コリーザ（C型）赤血球凝集抑制試験を行う。

##### 3.10.5.4.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数をHI抗体価とする。HI抗体価5倍以上を陽性とする。

それぞれの赤血球凝集抑制反応において、試験群の70%以上が陽性でなければならない。この場合、対照群では、全て陰性でなければならない。

#### 3.10.5.5 マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症力価試験

##### 3.10.5.5.1 試験材料

###### 3.10.5.5.1.1 試験動物

3.10.4の試験に用いた動物を用いる。

###### 3.10.5.5.1.2 赤血球凝集抗原

マイコプラズマ・ガリセプチカム赤血球凝集抗原（付記6）を用いる。

##### 3.10.5.5.2 試験方法

3.10.4の試験最終日に試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、マイコプラズマ・ガリセプチカム赤血球凝集抑制試験を行う。

血清をリン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈し、各希釈血清25 $\mu$ Lに等量の4単位のマイコプラズマ・ガリセプチカム赤血球凝集抗原を加えて混合し、15～20分間処理した後、0.25vol%の鶏赤血球浮遊液を50 $\mu$ Lずつ加えて振とう混合し、4 $^{\circ}$ Cで一夜又は室温で120分間処理した後、赤血球凝集の有無を観察する。

##### 3.10.5.5.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数をHI抗体価とする。

試験群のHI抗体価の幾何平均値は、8倍を超えなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その幾何平均値とする。この場合、対照群は、全てHI抗体価4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、3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 ヘモフィルス試験用寒天培地

1,000mL中

鶏肉水	300.0 mL
カゼインペプトン	5.0 g
カザミノ酸	2.0 g
L-グルタミン酸水素ナトリウム一水和物	2.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
寒天	15.0 g
非働化鶏血清	10.0 mL
5% $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD)	0.1 mL
水酸化ナトリウム	適量
精製水	残量

非働化鶏血清及び5% $\beta$ -NAD以外の成分を精製水に溶解、pH7.3に調整し、高圧滅菌後、非働化鶏血清及び0.1 $\mu$ mのフィルターでろ過滅菌した5% $\beta$ -NADを添加する。

#### 付記2 マイコプラズマ希釈用培地

1,000mL中

牛心筋浸出液	6.0 g
獣肉製ペプトン	10.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g

馬血清	100.0 mL
非働化豚血清	50.0 mL
25w/v% 新鮮酵母抽出液	50.0 mL
$\beta$ -NAD (酸化型)	0.1 g
L-システイン塩酸塩	0.1 g
0.2w/v% フェノールレッド液	10.0 mL
ベンジルペニシリンカリウム	50万単位
酢酸タリウム	0.2 g
精製水	残 量

血清以外を混合し、0.22  $\mu$ m フィルターでろ過滅菌後、血清を加える。

付記3 マイコプラズマ試験用寒天平板培地  
付記2に1w/v%のバクト・アガーを加えたもの。

付記4 産卵低下症候群-1976ウイルス赤血球凝集抗原  
産卵低下症候群-1976ウイルスJPA-1株又はこれと同等と認められた株を生ワクチン製造用材料の規格1.3に適合した発育あひる卵で増殖させて得た尿膜腔液又は生ワクチン製造用材料の規格2.1.3に適合した鶏胚肝初代細胞で増殖させて得た培養上清に0.2vol%になるようにホルマリンを加えて不活化したもの。赤血球凝集 (HA) 価を測定するとき、HA価は64倍以上のもの。

付記5 25w/v%カオリン液  
100mL中  
カオリン 25 g  
リン酸緩衝食塩液 残 量  
高圧滅菌又はアジ化ナトリウムを0.01w/v%添加した後、2~10°Cに保存する。

付記6 マイコプラズマ・ガリセプチカム赤血球凝集抗原  
製造用株を培養し、ホルマリンを加えて不活化した菌液を遠心洗浄後、再浮遊し、これにグリセリンを等量加え、凍結して-20°C以下で保存したもの。

# 猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症 2 価・猫汎白血球減少症・猫白血病（猫白血病ウイルス由来防御抗原たん白遺伝子導入カナリア痘ウイルス）混合ワクチン（シード）

令和 2 年 8 月 28 日（告示第 1689 号）新規追加

## 1 定義

シードロット規格に適合した弱毒猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス及び弱毒猫汎白血球減少症ウイルスをそれぞれ培養細胞で増殖させて得たウイルス液と同規格に適合した 2 種類の猫カリシウイルスをそれぞれ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、凍結乾燥したもの（以下この項において「乾燥ワクチン」という。）と、同規格に適合した猫白血病ウイルスの *env*たん白、*gag*たん白及び *pol*たん白をコードする遺伝子の一部を組み込んだ弱毒カナリア痘ウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液（以下この項において「液状ワクチン」という。）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 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス

##### 2.1.1.1 名称

弱毒猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス F2 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.1.2 性状

猫に注射しても病原性を示さない。猫腎継代細胞に接種すると 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、猫腎継代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  $-70^{\circ}\text{C}$  以下又は凍結乾燥して  $5^{\circ}\text{C}$  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、3.1.1.1 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、猫腎継代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  $-70^{\circ}\text{C}$  以下又は凍結乾燥して  $5^{\circ}\text{C}$  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。

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 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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。

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 猫カリシウイルス

##### 2.1.2.1 名称

猫カリシウイルスG1株、431株又はこれらと同等と認められた株

##### 2.1.2.2 性状

猫に注射しても病原性を示さない。猫腎継代細胞に接種すると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、猫腎継代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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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、3.1.1.2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、猫腎継代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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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。

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 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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。

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 猫汎白血球減少症ウイルス

#### 2.1.3.1 名称

弱毒猫汎白血球減少症ウイルスPLI IV株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.3.2 性状

猫に注射しても病原性を示さない。猫腎継代細胞に接種すると増殖し、豚の赤血球を凝集する。

#### 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、猫腎継代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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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、3.1.1.1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、猫腎継代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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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。

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 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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。

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 猫白血病ウイルス由来防御抗原たん白発現遺伝子導入カナリア痘ウイルス

##### 2.1.4.1 名称

猫白血病ウイルス由来防御抗原たん白発現遺伝子導入カナリア痘ウイルス vCP97株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.4.2 性状

猫に注射しても病原性を示さない。鶏胚初代細胞で増殖する。

##### 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、生ワクチン製造用材料の規格1.1の発育鶏卵由来鶏胚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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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、3.1.1.3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、生ワクチン製造用材料の規格1.1の発育鶏卵由来鶏胚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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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。

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 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格1.1の発育鶏卵由来鶏胚細胞又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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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。

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 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス

#### 2.2.1.1 培養細胞

猫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。

#### 2.2.1.2 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、2.2.1.2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。

マスターセルシードは、特定の製造番号または製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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。

プロダクションセルシードを保存する場合について、3.2.3の試験を行う。

#### 2.2.2 猫カリシウイルス

##### 2.2.2.1 培養細胞

猫腎継代細胞又は製造に相当と認められた株化細胞を用いる。

##### 2.2.2.2 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。

マスターセルシードは、特定の製造番号または製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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。

プロダクションセルシードを保存する場合について、3.2.3の試験を行う。

#### 2.2.3 猫汎白血球減少症ウイルス

##### 2.2.3.1 培養細胞

猫腎継代細胞又は製造に相当と認められた株化細胞を用いる。

### 2.2.3.2 培養液

製造に相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、2.2.3.2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。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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。

プロダクションセルシードを保存する場合について、3.2.3の試験を行う。

## 2.2.4 猫白血病ウイルス由来防御抗原たん白発現遺伝子導入カナリア痘ウイルス

### 2.2.4.1 初代細胞

SPF動物規格の1.1の発育鶏卵由来鶏胚細胞を用いる。

### 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。

### 2.2.4.3 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）

#### 2.2.4.3.1 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、2.2.4.2の培養液で増殖させ、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、3.3の試験を行う。

## 2.3 原液

### 2.3.1 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス原液

#### 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原液とする。この場合、適当と認められた安定剤を加えてもよい。

原液について、3.4.1及び3.4.2.1の試験を行う。

### 2.3.2 猫カリシウイルス原液

#### 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ウイルス浮遊液とする。

#### 2.3.2.3 不活化

ウイルス浮遊液を適当と認められた不活化剤を加えて不活化した後、適当と認められた方法で精製及び濃縮し、原液とする。この場合、適当と認められた安定剤を加えてもよい。

原液について、3.4.1、3.4.3及び3.4.4の試験を行う。

### 2.3.3 猫汎白血球減少症ウイルス原液

#### 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原液とする。この場合、適当と認められた安定剤を加えてもよい。

原液について、3.4.1及び3.4.2.2の試験を行う。

### 2.3.4 猫白血病ウイルス由来防御抗原たん白発現遺伝子導入カナリア痘ウイルス

#### 2.3.4.1 プロダクションプライマリーセルシードの培養

1回に処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。ウイルス接種前のプロダクションプライマリー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原液とする。この場合、適当と認められた安定剤を加えてもよい。

原液について、3.4.1及び3.4.2.3の試験を行う。

## 2.4 最終バルク

### 2.4.1 乾燥ワクチン

猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス原液、猫カリシウイルス原液及び猫汎白血球減少症ウイルス原液を混合し、最終バルクとする。この場合、適当と認められた安定剤を加えてもよい。

## 2.4.2 液状ワクチン

猫白血病ウイルス由来防御抗原たん白発現遺伝子導入カナリア痘ウイルス原液を適当と認められた溶液で濃度調整したものを最終バルクとする。

## 2.5 小分製品

乾燥ワクチンの最終バルクを小分容器に分注し、凍結乾燥し、乾燥ワクチンの小分製品とする。

液状ワクチンの最終バルクを小分容器に分注し、密栓し、液状ワクチンの小分製品とする。

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 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス及び猫汎白血球減少症ウイルス

###### 3.1.1.1.1 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。

###### 3.1.1.1.2 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。

###### 3.1.1.1.3 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。

###### 3.1.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

###### 3.1.1.1.4.1 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。

###### 3.1.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験

###### 3.1.1.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験

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1.1及び3.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.1.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

牛ウイルス性下痢ウイルス、犬パルボウイルス、猫汎白血球減少症ウイルス、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1.1、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。

###### 3.1.1.1.5 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。

###### 3.1.1.1.6 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。

###### 3.1.1.1.7 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。

### 3.1.1.2 猫カリシウイルス

#### 3.1.1.2.1 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。

#### 3.1.1.2.2 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。

#### 3.1.1.2.3 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。

#### 3.1.1.2.4 外来性ウイルス否定試験

##### 3.1.1.2.4.1 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。

##### 3.1.1.2.4.2 特定ウイルス否定試験

###### 3.1.1.2.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験

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1.1及び3.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.1.1.2.4.2.2 個別ウイルス否定試験

牛ウイルス性下痢ウイルス、犬パルボウイルス、猫汎白血球減少症ウイルス、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1.1、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。

### 3.1.1.3 猫白血病ウイルス由来防御抗原たん白発現遺伝子導入カナリア痘ウイルス

#### 3.1.1.3.1 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。

#### 3.1.1.3.2 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。

#### 3.1.1.3.3 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。

#### 3.1.1.3.4 外来性ウイルス否定試験

##### 3.1.1.3.4.1 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。

##### 3.1.1.3.4.2 特定ウイルス否定試験

###### 3.1.1.3.4.2.1 個別ウイルス否定試験

牛ウイルス性下痢ウイルス、犬パルボウイルス、猫汎白血球減少症ウイルス、日本脳炎ウイルス、狂犬病ウイルス、鶏白血病ウイルス、細網内皮症ウイルス及び鶏脳脊髄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、3.2.1、3.2.2、3.2.5、3.2.6、3.2.9及び3.2.10を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.1.1.3.5 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。

#### 3.1.1.3.6 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。

#### 3.1.1.3.7 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。

#### 3.1.1.3.8 組換え遺伝子等安定性確認試験

一般試験法の組換え遺伝子等安定性確認試験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。

###### 3.2.1.5.2 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1.2及び3.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.1.5.2.2 個別ウイルス否定試験

牛ウイルス性下痢ウイルス、犬パルボウイルス、猫汎白血球減少症ウイルス、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、3.2.5、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 初代細胞の試験

#### 3.3.1 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

##### 3.3.1.1 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。

##### 3.3.1.2 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。

##### 3.3.1.3 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。

### 3.4 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 猫ウイルス性鼻気管炎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希釈液で階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

#### 3.4.2.1.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

#### 3.4.2.1.2 試験方法

試料をマイクロプレートに分注し、これに細胞浮遊液を加え、5日間培養する。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。

#### 3.4.2.1.3 判定

特徴的なCPEを認めたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub>を算出する。

検体のウイルス含有量は、それぞれ最終バルクを調製するのに十分な含有量を示さなければならない。

ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その判定方法とする。

#### 3.4.2.2 猫汎白血球減少症ウイルス含有量試験

##### 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希釈液で階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.4.2.2.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

##### 3.4.2.2.2 試験方法

試料を細胞浮遊液を分注したマイクロプレートに接種し培養する。培養終了日に培養液を1%BABS加リン酸緩衝食塩液（付記1）を分注したマイクロプレートに加え、さらに豚赤血球を加えて凝集を観察する。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。

##### 3.4.2.2.3 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<sub>50</sub>を算出する。

検体のウイルス含有量は、それぞれ最終バルクを調製するのに十分な含有量を示さなければならない。

ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その判定方法とする。

#### 3.4.2.3 猫白血病ウイルス由来防御抗原たん白発現遺伝子導入カナリア痘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希釈液で階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.4.2.3.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格1.1の発育鶏卵由来鶏胚細胞を用いる。

##### 3.4.2.3.2 試験方法

試料を細胞浮遊液を分注したマイクロプレートに接種し、7日間培養する。

##### 3.4.2.3.3 判定

特徴的なCPEを認めたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub>を算出する。

検体のウイルス含有量は、それぞれ最終バルクを調製するのに十分な含有量を示さなければならない。

ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その判定方法とする。



### 3.4.3 不活化試験

#### 3.4.3.1 試料

検体を適当と認められた方法で中和し、希釈したものを試料とする。

##### 3.4.3.1.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

##### 3.4.3.1.2 試験方法

試料を培養細胞に接種した後、4日間培養する。その後、凍結融解し、細胞融解物を別に用意した培養細胞に接種し、4日間培養する。

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。

##### 3.4.3.1.3 判定

試料の接種培養細胞にCPEを認めてはならない。

### 3.4.4 抗原定量試験

#### 3.4.4.1 試料

検体を試料とする。

#### 3.4.4.2 試験方法

捕捉用抗猫カリシウイルス抗体（付記2）を固相化した96穴ELISA用プレート各穴に試料及び猫カリシウイルス抗原定量ELISA参照品（以下この項において「参照品」という。）（付記3）及びそれぞれをELISA用緩衝液（付記4）で階段希釈したものを加え、反応させた後、猫カリシウイルス抗原定量ELISA用標識モノクローナル抗体（付記5）及び基質液（付記6）を反応させ、主波長450nm及び補正波長630nmの2波長で吸光度（OD）を測定する。

以下の計算式によりOD<sub>50</sub>を算出し、OD<sub>50</sub>を示す検体の希釈倍数を抗原量としてELISA単位（log<sub>10</sub>）で表す。

$$OD_{50} = (OD_{max} + OD_{min}) / 2$$

OD<sub>max</sub>：参照品の最大ODの平均

OD<sub>min</sub>：参照品の最小ODの平均

$$\text{抗原量 (log}_{10}\text{)} = (OD_{50} - \text{定数}) / \text{傾き}$$

定数及び傾き：ODと抗原希釈倍数の対数についてOD<sub>50</sub>を挟む2点の回帰直線の定数及び傾き。

##### 3.4.4.3 判定

参照品が所定の抗原量を示すとき、試験品の抗原量は、2.9log<sub>10</sub>ELISA単位以上でなければならない。

### 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、乾燥ワクチンは固有の色調を有する乾燥物でならず、液状ワクチンは固有の色調を有する液体で、異物及び異臭を認めてはならない。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。

#### 3.5.2 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、乾燥ワクチンは適合しなければならない。

### 3.5.3 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。

### 3.5.4 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。

### 3.5.5 ウイルス含有量試験

#### 3.5.5.1 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス含有量試験

##### 3.5.5.1.1 試料

乾燥ワクチンを液状ワクチンと同量の注射用水で溶解したもの（以下この項において「溶解ワクチン」という。）をMEM培養液（付記7）で階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.5.5.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

##### 3.5.5.1.3 試験方法

プレートの穴に試料及びそれと等量の抗猫汎白血球減少症ウイルス血清（付記8）を加え、感作する。各穴に猫腎継代細胞浮遊液を加えて培養し、CPE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。

##### 3.5.5.1.4 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub>を算出する。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10<sup>4.9</sup>TCID<sub>50</sub>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。

#### 3.5.5.2 猫汎白血球減少症ウイルス含有量試験

##### 3.5.5.2.1 試料

溶解ワクチンを56℃で30分処理したものを、MEM培養液で階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.5.5.2.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

##### 3.5.5.2.3 試験方法

3.4.2.2.2の試験方法に従って試験を行う。

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。

##### 3.5.5.2.4 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<sub>50</sub>を算出する。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10<sup>3.5</sup>TCID<sub>50</sub>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。

#### 3.5.5.3 猫白血病ウイルス由来防御抗原たん白発現遺伝子導入カナリア痘ウイルス含有量試験

##### 3.5.5.3.1 試験材料

##### 3.5.5.3.1.1 試料

液状ワクチンをウイルス増殖用培養液（付記9）又は適当と認められた培養液で階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.5.5.3.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格1.1の発育鶏卵由来鶏胚細胞を用いる。

#### 3.5.5.3.2 試験方法

試料を細胞浮遊液を分注したマイクロプレートに接種し、7日間培養する。

#### 3.5.5.3.3 判定

特徴的なCPEを認めたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub>を算出する。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10<sup>7.2</sup>TCID<sub>50</sub>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。

### 3.5.6 猫白血病ウイルス由来防御抗原たん白発現遺伝子導入カナリア痘ウイルス同定試験

#### 3.5.6.1 試験材料

##### 3.5.6.1.1 試料

液状ワクチン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階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.5.6.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格1.1の発育鶏卵由来鶏胚細胞を用いる。

#### 3.5.6.2 試験方法

試料を培養細胞に接種し、37℃で3日間培養する。アセトン固定した後、FITC標識抗カナリア痘ウイルスモノクローナル抗体(付記10)及びローダミン標識抗猫白血病ウイルスgp70たん白モノクローナル抗体(付記11)を加え、蛍光顕微鏡で特異蛍光を観察する。

#### 3.5.6.3 判定

カナリア痘ウイルス及び猫白血病ウイルスgp70たん白に対する特異蛍光が認められなければならない。

#### 3.5.7 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。

#### 3.5.8 安全試験

##### 3.5.8.1 試験材料

##### 3.5.8.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.5.8.1.2 試験動物

6か月齢未満の猫を用いる。

##### 3.5.8.2 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頭分ずつ皮下にそれぞれ注射し、3週間後に追加注射する。試験群及び対照群ともに7週間観察する。

##### 3.5.8.3 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。

#### 3.5.9 力価試験

##### 3.5.9.1 猫ウイルス性鼻気管炎力価試験

##### 3.5.9.1.1 試験材料

##### 3.5.9.1.1.1 試験動物

3.5.8の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.5.9.1.2 試験方法

3.5.8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猫ウイルス性鼻気管炎に対する抗体価を間接蛍光抗体法により測定する。

血清を希釈液（付記12）で10倍希釈し、更に2倍階段希釈する。感染細胞（付記13）に各希釈液を0.1mLずつ加え、37℃で30分間処理した後、洗浄液（付記14）で2回洗浄する。抗猫IgG蛍光標識抗体（付記15）を加え、37℃で30分間処理した後、洗浄液で3回洗浄後、蛍光顕微鏡で観察する。

#### 3.5.9.1.3 判定

特異蛍光が認められる血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群の抗体価は幾何平均で20倍以上、対照群では10倍以下でなければならない。

#### 3.5.9.2 猫カリシウイルス感染症力価試験

##### 3.5.9.2.1 試験材料

###### 3.5.9.2.1.1 試料

乾燥ワクチンを液状ワクチンと同量の注射用水で溶解したものを試料とする。

##### 3.5.9.2.2 試験方法

3.4.4.2の試験方法に従って試験を行う。

##### 3.5.9.2.3 判定

参照品が所定の抗原量を示すとき、試験品の抗原量は、 $2.0\log_{10}$ ELISA単位以上でなければならない。

#### 3.5.9.3 猫汎白血球減少症力価試験

##### 3.5.9.3.1 試験材料

###### 3.5.9.3.1.1 試験動物

3.5.8の試験に用いた動物を用いる。

###### 3.5.9.3.1.2 赤血球凝集抗原

猫汎白血球減少症ウイルス赤血球凝集抗原（付記16）を用いる。

##### 3.5.9.3.2 試験方法

3.5.8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。

各血清に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（付記17）で2倍階段希釈する。各希釈液に8単位の赤血球凝集抗原を混合し、常温で約60分間処理し、この混合液と等量のVAD6.0液（付記18）で調製した豚赤血球浮遊液を加え2～5℃で一夜静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

##### 3.5.9.3.3 判定

赤血球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の幾何平均値は、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。

#### 4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後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 1%BABS加リン酸緩衝食塩液

下記リン酸緩衝食塩液とBABS緩衝液を99：1に混合したもの。

リン酸緩衝食塩液 (pH6.4)

1,000mL中

塩化ナトリウム	8.77 g
リン酸水素二ナトリウム二水和物	3.14 g
リン酸二水素カリウム	6.68 g
水	残量

BABS緩衝液 (pH8.95)

1,000mL中

塩化ナトリウム	7.0 g
葉酸	3.1 g
1mol/L水酸化ナトリウム溶液	24 mL
牛血清アルブミン	4.0 g
水	残量

付記2 捕捉用抗猫カリシウイルス抗体

猫を猫カリシウイルスG1株で免疫して得た血清であって、炭酸ナトリウム緩衝液（付記19）で至適濃度に希釈して使用する。-20℃で保存する。

付記3 猫カリシウイルス抗原定量ELISA参照品

猫カリシウイルスG1株又は431株を含有する濃縮精製抗原又は凍結乾燥ワクチン（G1株及び431株）を注射用水で溶解したものであって、抗原量が明らかなもの。

本ELISAで抗原量を測定するとき、所定の抗原量を示さなければならない。

付記4 ELISA用緩衝液

1,000mL中

トリス	2.42 g
塩化ナトリウム	8.77 g
牛血清アルブミン	10 g
ポリソルベート20	0.5 mL

pHを7.2に調整する。

付記5 猫カリシウイルス抗原定量ELISA用標識モノクローナル抗体

ペルオキシダーゼ標識抗猫カリシウイルスp66モノクローナル抗体

付記6 基質液

本ELISAに適切なテトラメチルベンジジン溶液

付記7 MEM培養液

適当な品質の乾燥製品を記載に従って溶かし、滅菌する。

付記8 抗猫汎白血球減少症ウイルス血清

猫汎白血球減少症ウイルスで免疫した血清であって、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9 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

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10 FITC標識抗カナリア痘ウイルスモノクローナル抗体

FITC標識抗カナリア痘ウイルスモノクローナル抗体をリン酸緩衝食塩液で濃度を調整して使用する。

付記11 ローダミン標識抗猫白血病ウイルスgp70たん白モノクローナル抗体

ローダミン標識抗白血病ウイルスgp70たん白モノクローナル抗体をリン酸緩衝食塩液で濃度を調整して使用する。

付記12 希釈液

IFA用リン酸緩衝食塩液（IFA-PBS）（付記20）に牛血清アルブミンを1w/v%添加したものの。

付記13 感染細胞

猫腎継代細胞浮遊液を96穴プレートに播種し、37℃ 5%炭酸ガス下で培養して単層を形成させたものに猫ヘルペスウイルスF2株又はこれと同等と認められた株を接種し、わずかにCPEが確認された時点で培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で洗浄する。冷メタノールを加え固定した後、乾燥させ、各穴にブロッキング液（付記21）を分注し、静置した後、洗浄液で洗浄したもので、特異抗原を有するもの。

付記14 洗浄液

1,000mL中

塩化ナトリウム 2.125 g

炭酸ナトリウム 2.85 g

炭酸水素ナトリウム 8.4 g

水 残量

付記15 抗猫IgG蛍光標識抗体

猫IgGに対する山羊抗体を蛍光標識したもので、蛍光抗体法を行うとき非特異が最小限で、かつ特異蛍光強度が最大になるように希釈して使用する。

付記16 猫汎白血球減少症ウイルス赤血球凝集抗原

猫汎白血球減少症ウイルスを猫腎継代細胞で増殖させて得た培養上清又はこれを不活化したもので、赤血球凝集価128倍以上のもの。

付記17 牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液

1,000 mL 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、pHを9.0に調整する。

付記18 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19 炭酸ナトリウム緩衝液

1,000mL中

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。

アジ化ナトリウム0.2gを加えてもよい。

付記20 IFA-PBS

1,000mL中

塩化ナトリウム 8.55 g

無水リン酸水素二ナトリウム 1.19 g

無水リン酸二水素ナトリウム 40.56 g

水 残 量

付記21 ブロッキング液

IFA-PBSに山羊血清を1 vol%添加したもの。



# アカバネ病・チュウザン病・アイノウイルス感染症 ・ピートンウイルス感染症混合（アジュバント加） 不活化ワクチン（シード）

令和2年8月28日（告示第1689号）新規追加

## 1 定義

シードロット規格に適合したアカバネウイルス、カสบウイルス、アイノウイルス及びピートンウイルスをそれぞれ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不活化し、混合した後、アジュバントを添加したワクチンである。

## 2 製法

### 2.1 製造用株

#### 2.1.1 アカバネウイルス

##### 2.1.1.1 名称

アカバネウイルスE-24株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.1.2 性状

牛腎初代培養細胞、豚腎初代培養細胞、HmLu-1細胞、HmLu-SC細胞及びVero細胞で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、HmLu細胞又は適当と認められた細胞で増殖させ、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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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。

##### 2.1.1.4 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、HmLu細胞又は適当と認められた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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、HmLu細胞又は適当と認められた細胞で増殖させる。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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。

### 2.1.2 カสบウイルス

#### 2.1.2.1 名称

カスバウイルスK-47株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.2.2 性状

子牛の脳内に接種すると、発熱、食欲不振、白血球減少、次いで神経症状を示す。

BHK-21細胞、BHK-SC細胞、HmLu-1細胞、HmLu-SC細胞及びVero-T細胞で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、HmLu細胞又は適当と認められた細胞で増殖させ、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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.1.2.4 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、HmLu細胞又は適当と認められた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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、HmLu細胞又は適当と認められた細胞で増殖させる。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.1.3 アイノウイルス

##### 2.1.3.1 名称

アイノウイルスJaNAr28株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.3.2 性状

牛の静脈内に接種すると、ウイルス血症を認めるが、発熱などの臨床症状は認められない。

BHK-21細胞、HmLu-1細胞、HmLu-SC細胞及びVero細胞でCPEを伴って増殖する。

##### 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、HmLu細胞又は適当と認められた細胞で増殖させ、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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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

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、**HmLu**細胞又は適当と認められた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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、**HmLu**細胞又は適当と認められた細胞で増殖させる。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.1.4 ピートンウイルス

##### 2.1.4.1 名称

ピートンウイルスNS/3株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.4.2 性状

牛の静脈内に接種すると、ウイルス血症を認めるが、発熱などの臨床症状は認められない。

**BHK-21**細胞、**HmLu-1**細胞、**HmLu-SC**細胞及び**Vero**細胞でCPEを伴って増殖する。

##### 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、**HmLu**細胞又は適当と認められた細胞で増殖させ、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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.1.4.4 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、**HmLu**細胞又は適当と認められた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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、**HmLu**細胞又は適当と認められた細胞で増殖させる。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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 株化細胞

HmLu細胞又は適当と認められた細胞を用いる。

## 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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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の培養液で増殖させる。

プロダクションセルシードは、保存しない。

## 2.3 原液

### 2.3.1 アカパネウイルス原液

#### 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。

#### 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別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液、遠心上清又はこれらを濃縮したものをウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.3.1及び3.3.2.1の試験を行う。

#### 2.3.1.3 不活化

ウイルス浮遊液に適当と認められた不活化剤を加え、ウイルス浮遊液を不活化し、不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.4.1.1の試験を行う。

#### 2.3.1.4 原液

不活化ウイルス液を適当と認められた方法により濃縮したものを原液とする。

原液について、3.5の試験を行う。

### 2.3.2 カスバウイルス原液

#### 2.3.2.1 プロダクションセルシードの培養

1回処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の培養細胞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別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液、遠心上清又はこれらを濃縮したものをウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.3.1及び3.3.2.2の試験を行う。

#### 2.3.2.3 不活化

ウイルス浮遊液に適当と認められた不活化剤を加え、ウイルス浮遊液を不活化し、不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.4.1.2の試験を行う。

#### 2.3.2.4 原液

不活化ウイルス液を適当と認められた方法により濃縮したものを原液とする。

原液について、3.5の試験を行う。

### 2.3.3 アイノウイルス原液

#### 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。ウイルス接種前の培養細胞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別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液、遠心上清又はこれらを濃縮したものをウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.3.1及び3.3.2.3の試験を行う。

#### 2.3.3.3 不活化

ウイルス浮遊液に適当と認められた不活化剤を加え、ウイルス浮遊液を不活化し、不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.4.1.3の試験を行う。

#### 2.3.3.4 原液

不活化ウイルス液を適当と認められた方法により濃縮したものを原液とする。

原液について、3.5の試験を行う。

### 2.3.4 ピートンウイルス原液

#### 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。ウイルス接種前の培養細胞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別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液、遠心上清又はこれらを濃縮したものをウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.3.1及び3.3.2.4の試験を行う。

#### 2.3.4.3 不活化

ウイルス浮遊液に相当と認められた不活化剤を加え、ウイルス浮遊液を不活化し、不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.4.1.4の試験を行う。

#### 2.3.4.4 原液

不活化ウイルス液を相当と認められた方法により濃縮したものを原液とする。

原液について、3.5の試験を行う。

#### 2.4 最終バルク

アカバネウイルス原液、カスバウイルス原液、アインウイルス原液及びピートンウイルス原液の抗原量を調整して混合し、さらにアルミニウムゲルアジュバント又は相当と認められたアジュバントを加えて混合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、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1.4.2.3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.1.1.2 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

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

牛ウイルス性下痢ウイルス、ロタウイルス、牛伝染性リンパ腫ウイルス、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1.1、3.2.5、3.2.7、3.2.8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。

##### 3.1.2 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。

###### 3.2.1.5.2 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

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

牛ウイルス性下痢ウイルス、ロタウイルス、牛伝染性リンパ腫ウイルス、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、3.2.5、3.2.7、3.2.8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。

#### 3.2.2 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。

### 3.3 ウイルス浮遊液の試験

#### 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 アカバネウイルス

##### 3.3.2.1.1 試験材料

###### 3.3.2.1.1.1 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。

###### 3.3.2.1.1.2 培養細胞

HmLu-1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、37°Cで60分間静置吸着させた後、適当と認められた培養液を1.0mLずつ加え、37°Cで7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<sub>50</sub>を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10<sup>6.5</sup>TCID<sub>50</sub>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は、そのウイルス含有量とする。

#### 3.3.2.2 カスバウイルス

##### 3.3.2.2.1 試験材料

###### 3.3.2.2.1.1 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。

###### 3.3.2.2.1.2 培養細胞

Vero-T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、36°Cで60分間静置吸着させた後、適当と認められた培養液を1.0mLずつ加え、37°Cで7日間培養し、観察する。

##### 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<sub>50</sub>を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10<sup>7.5</sup>TCID<sub>50</sub>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は、そのウイルス含有量とする。

#### 3.3.2.3 アイノウイルス

##### 3.3.2.3.1 試験材料

###### 3.3.2.3.1.1 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。

###### 3.3.2.3.1.2 培養細胞

HmLu-1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、36°Cで60分間静置吸着させた後、適当と認められた培養液を1.0mLずつ加え、37°Cで7日間培養し、観察する。

##### 3.3.2.3.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub>を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10<sup>6.5</sup>TCID<sub>50</sub>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は、そのウイルス含有量とする。



### 3.3.2.4 ピー トンウイルス

#### 3.3.2.4.1 試験材料

##### 3.3.2.4.1.1 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。

##### 3.3.2.4.1.2 培養細胞

HmLu-1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、37°Cで60分間静置吸着させた後、適当と認められた培養液を1.0mLずつ加え、37°Cで7日間培養し、観察する。

#### 3.3.2.4.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub>を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10<sup>7.5</sup>TCID<sub>50</sub>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は、そのウイルス含有量とする。

### 3.4 不活化ウイルス液の試験

#### 3.4.1 不活化試験

##### 3.4.1.1 アカバネウイルス

##### 3.4.1.1.1 試験材料

##### 3.4.1.1.1.1 試料

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

##### 3.4.1.1.1.2 培養細胞

HmLu-1細胞を培養し、単層となったものを用いる。

##### 3.4.1.1.2 試験方法

試料の全量を1 mLにつき3 cm<sup>2</sup>以上の培養細胞に接種し、34°Cで60分間静置吸着させた後、適当と認められた培養液を加え、37°Cで7日間培養し、観察する。

##### 3.4.1.1.3 判定

培養細胞にCPEを認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

##### 3.4.1.2 カスバウイルス

##### 3.4.1.2.1 試験材料

##### 3.4.1.2.1.1 試料

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

##### 3.4.1.2.1.2 培養細胞

Vero-T細胞を培養し、単層となったものを用いる。

##### 3.4.1.2.2 試験方法

試料の全量を1 mLにつき3 cm<sup>2</sup>以上の培養細胞に接種し、34°Cで60分間静置吸着させた後、適当と認められた培養液を加え、34~36°Cで5日間培養後、細胞を次代に継代する。細胞層形成後に培養液を抜き取り、適当と認められた培養液を加え、34~36°Cで5日間培養後、更に次代へ継代し、2代目と同様の方法で培養し、観察する。

#### 3.4.1.2.3 判定

培養細胞にCPEを認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

#### 3.4.1.3 アイノウイルス

##### 3.4.1.3.1 試験材料

###### 3.4.1.3.1.1 試料

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

###### 3.4.1.3.1.2 培養細胞

HmLu-1細胞を培養し、単層となったものを用いる。

###### 3.4.1.3.2 試験方法

試料の全量を 1 mLにつき 3 cm<sup>2</sup>以上の培養細胞に接種し、34℃で60分間静置吸着させた後、適当と認められた培養液を加え、34～36℃で7日間培養し、観察する。

###### 3.4.1.3.3 判定

培養細胞にCPEを認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

#### 3.4.1.4 ピートンウイルス

##### 3.4.1.4.1 試験材料

###### 3.4.1.4.1.1 試料

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

###### 3.4.1.4.1.2 培養細胞

HmLu-1細胞を培養し、単層となったものを用いる。

###### 3.4.1.4.2 試験方法

試料の全量を 1 mLにつき 3 cm<sup>2</sup>以上の培養細胞に接種し、34℃で60分間静置吸着させた後、適当と認められた培養液を加え、34～36℃で7日間培養し、観察する。

###### 3.4.1.4.3 判定

培養細胞にCPEを認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

#### 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。

##### 3.6 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 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。

###### 3.6.3 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。

### 3.6.4 ホルマリン定量試験

ホルマリンにより不活化する製剤にあつては、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、ホルマリンの含有量は、0.05vol%以下でなければならない。

### 3.6.5 アルミニウム定量試験

一般試験法のアルミニウム定量試験を準用して試験するとき、アルミニウムの含有量は、固有の値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、その試験方法とする。

### 3.6.6 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。

### 3.6.7 力価試験

#### 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

体重約350gのモルモットを用いる。

##### 3.6.7.1.3 中和試験用ウイルス

###### 3.6.7.1.3.1 アカバネウイルス

HmLu細胞で増殖させたアカバネウイルスJaGAr39株又はこれと同等の株を用いる。

###### 3.6.7.1.3.2 カスバウイルス

BHK-21細胞で増殖させたカスバウイルスK-47株又はこれと同等の株を用いる。

###### 3.6.7.1.3.3 アイノウイルス

HmLu細胞で増殖させたアイノウイルスJaNAr28株又はこれと同等の株を用いる。

###### 3.6.7.1.3.4 ピートンウイルス

HmLu細胞で増殖させたピートンウイルスNS/3株又はこれと同等の株を用いる。

##### 3.6.7.1.4 培養細胞

HmLu-1細胞及びVero-T細胞を用いる。

#### 3.6.7.2 試験方法

注射材料0.5mLずつを5匹の試験動物に3週間隔で2回筋肉内注射し、第2回目の注射後10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、適当と認められた培養液で2倍階段希釈する。各希釈血清と0.1mL中約200TCID<sub>50</sub>の中和試験用ウイルス液を等量混合し、37°Cで60分間、カスバウイルスでは90分間処理する。この各混合液0.1mLずつをアカバネウイルス、アイノウイルス及びピートンウイルスはHmLu-1細胞、カスバウイルスではVero-T細胞のそれぞれ4本(穴)の培養細胞に接種し、37°Cで60分間静置吸着させた後、適当と認められた培養液を1.0mLずつ加え、アカバネウイルス、カスバウイルス及びピートンウイルスは37°C、アイノウイルスは34~36°Cで、7日間培養し、観察する。

#### 3.6.7.3 判定

培養細胞の2本以上に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。

アカバネウイルス及びピートンウイルスは中和抗体価16倍以上、カスバウイルスでは中和抗体価32倍以上、アイノウイルスは中和抗体価8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、それぞれのウイルスに対して、80%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。