

豚オーエスキー病（g I -、t k -）生ワクチン（シード）

平成 23 年 5 月 11 日（告示第 939 号）新規追加

令和 2 年 2 月 5 日（告示第 231 号）一部改正

令和 3 年 3 月 9 日（告示第 360 号）一部改正

1 定義

シードロット規格に適合した弱毒オーエスキー病ウイルスを同規格に適合した株化細胞で増殖させて得たウイルス液を凍結乾燥したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

弱毒オーエスキー病ウイルスベゴニア株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

糖たん白 gI 遺伝子の一部を欠損する。ウイルス性チミジンキナーゼを合成しない。Vero 細胞で CPE を伴って増殖する。

2.1.3 マスターシードウイルス

2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、Vero 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、凍結乾燥して - 20 °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 ワーキングシードウイルス

2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、Vero 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、凍結乾燥して - 20 °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。

2.1.5 プロダクションシードウイルス

2.1.5.1 増殖及び保存

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

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結乾燥して - 20 °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 培養細胞

Vero 細胞又は製造に相当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

2.2.3 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°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°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、継代及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.2 の培養液で増殖させる。

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°C 以下で保存する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、3.2.3 の試験を行う。

2.3 原液

2.3.1 プロダクションセルシードの培養

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

2.3.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを 2.3.1 の細胞で培養し、相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を原液とする。

原液について、3.3 の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液に相当と認められた安定剤を加え、これ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、凍結乾燥し、小分製品とする。

小分製品について、3.4 の試験を行う。

3 試験法

3.1 製造用株の試験

3.1.1 マスターシードウイルスの試験

3.1.1.1 同定試験

シードロット規格 1.4.2.1.1.2 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 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

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス及び内在性レトロウイルス（C、D タイプ粒子）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 3.1.1 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

豚熱ウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス、ロタウイルス、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、3.2.3、3.2.4、3.2.5、3.2.7 及び 3.2.9 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.5 対象動物を用いた免疫原性試験

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

3.1.1.6 対象動物を用いた安全性確認試験

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

3.1.1.7 病原性復帰確認試験

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

3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

3.1.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

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

3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

3.1.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

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

3.2 株化細胞の試験

3.2.1 マスターセルシードの試験

3.2.1.1 培養性状試験

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

3.2.1.2 起源動物種同定試験

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

3.2.1.3 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.4 マイコプラズマ否定試験

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

3.2.1.5 外来性ウイルス否定試験

3.2.1.5.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 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

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス及び内在性レトロウイルス（C、Dタイプ粒子）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 3.1.1 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

豚熱ウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス、ロタウイルス、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、3.2.3、3.2.4、3.2.5、3.2.7 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。

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。

3.2.3 プロダクションセルシードの試験

3.2.3.1 培養性状試験

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

3.2.3.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.3.3 マイコプラズマ否定試験

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

3.3 原液の試験

3.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.2 ウイルス含有量試験

3.3.2.1 試験材料

3.3.2.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記 1）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.2.1.2 培養細胞

Vero 細胞、HmLu-1 細胞又は適当と認められた培養細胞を培養し、単層となったものを用いる。

3.3.2.2 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 60 分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液 0.5mL を加え、37℃で 6～7 日間培養し、観察する。

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^{7.5}TCID₅₀以上でなければならない。

3.4 小分製品の試験

3.4.1 特性試験

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

3.4.2 真空度試験

一般試験法の真空度試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.3 含湿度試験

一般試験法の含湿度試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.4 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.5 マイコプラズマ否定試験

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

3.4.6 ウイルス含有量試験

3.3.2 を準用して試験するとき、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、農林水産大臣が特に認めた場合には、そのウイルス含有量とする。

3.4.7 マーカー試験

3.4.7.1 糖たん白 gI 欠損マーカー

3.4.7.1.1 試験材料

3.4.8 の試験終了後、14 日目の試験群の血清を用いる。

3.4.7.1.2 試験方法

オーエスキー病ウイルス糖たん白 gI 抗体を識別できる酵素抗体反応キット又は動物医薬品検査所がこれと同等と認めたものを用いて酵素抗体反応を行う。

3.4.7.1.3 判定

血清中にオーエスキー病ウイルス糖たん白 gI 抗体を認めてはならない。

3.4.7.2 チミジンキナーゼ欠損マーカー

3.4.7.2.1 試験材料

3.4.7.2.1.1 試料

試験品を試料とする。

3.3.7.2.1.2 培養細胞

Ltk-細胞を細胞増殖用培養液（付記 2）で $1 \times 10^{5.0}$ 個/mL となるように調整した細胞

浮遊液の 5 mL を約 25cm²の培養びんに入れ、37℃で培養し、単層となったものを用いる。

3.4.7.2.1.3 培養液

HAT 培地（付記 3）及びウイルス増殖用培養液を用いる。

3.4.7.2.2 試験方法

試料の 0.2mL ずつを 2 本の培養細胞に接種し、37℃で 60 分間吸着させた後、3 回洗浄する。

HAT 培地又はウイルス増殖用培養液の約 5 mL をそれぞれの培養細胞に加え、37℃で 3 日間培養する。それぞれの培養細胞について、凍結融解を 1 回行った後、遠心上清のウイルス含有量を 3.3.2 を準用して測定する。

3.4.7.2.3 判定

ウイルス増殖用培養液を用いて培養した細胞の遠心上清中のウイルス含有量は、HAT 培地を用いて培養した細胞の遠心上清中のウイルス含有量と比べて、1,000 倍以上高くなければならない。

3.4.8 安全試験

3.4.8.1 試験材料

3.4.8.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.8.1.2 試験動物

体重 10 ～ 40kg の豚を用いる。

3.4.8.2 試験方法

試験動物 2 頭を試験群、1 頭を対照群とする。試験群に注射材料をそれぞれ筋肉内に注射し、対照群と共に同居飼育し、14 日間観察する。

3.4.8.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に異常を認めてはならない。

3.4.9 力価試験

3.4.9.1 試験材料

3.4.9.1.1 試験動物

3.4.8 の試験に用いた動物を用いる。

3.4.9.1.2 中和試験用ウイルス

Vero 細胞で増殖させたオーエスキー病ウイルスベゴニア株又は適当と認められた株を用いる。

3.4.9.1.3 培養細胞

Vero 細胞又は適当と認められた細胞をシャーレに培養し、単層となったものを用いる。

3.4.9.2 試験方法

3.4.8 の試験終了後、14 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、ウイルス増殖用培養液で10倍に希釈し、更に2倍階段希釈する。各希釈血清0.5mLと0.2mL中約80PFUの中和試験用ウイルス液0.5mLを混合し、37℃で一夜処理する。この各混合液の0.2mLずつをそれぞれ4枚の培養細胞に接種し、37℃で60分間吸着させた後、混合液を除き、第1次重層寒天培地（付記4）を重層し、37℃5 vol %炭酸ガス下で2日間培養後、第2次重層寒天培地（付記5）を重層し、更に一夜培養後、プラック数を測定する。

3.4.9.3 判定

プラック数がウイルス対照の50%以下に減少した血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。試験群の中和抗体価は、20倍以上でなければならない。この場合、対照群では、10倍以下でなければならない。

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。

付記1 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
L-グルタミン	0.3 g
牛血清	8 ~ 50 mL
イーグル 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2 細胞増殖用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
L-グルタミン	0.3 g
牛血清	30 ~ 100 mL
イーグル 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3 HAT 培地

1,000mL 中

ヒポキサンチン	0.014 g
アミノプテリン	0.00018 g
チミジン	0.0039 g
トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g

牛血清 0 ~ 100 mL
イーグル MEM 残 量
炭酸水素ナトリウムでpHを7.2 ~ 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 第1次重層寒天培地

1,000mL 中
トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g
寒天 10.0 g
牛血清 20 mL
イーグル MEM 残 量
炭酸水素ナトリウムでpHを6.8 ~ 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5 第2次重層寒天培地

1,000mL 中
トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g
寒天 10.0 g
ニュートラルレッド 0.05 g
イーグル MEM 残 量
炭酸水素ナトリウムでpHを6.8 ~ 7.6に調整する。
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

豚大腸菌性下痢症不活化・クロストリジウム・パーフリンゲンストキソイド混合（アジュバント加）ワクチン（シード）

平成 25 年 9 月 26 日（告示第 2480 号）一部改正
令和 3 年 3 月 9 日（告示第 360 号）一部改正

1 定義

シードロット規格に適合した線毛抗原 K88、K99、987P 及び F41 を保有する大腸菌の培養菌液を不活化したもの、同規格に適合した易熱性エンテロトキシン産生大腸菌培養菌液の遠心上清及び同規格に適合したクロストリジウム・パーフリンゲンSC型菌の培養菌液を無毒化したものの遠心上清をそれぞれ混合し、アルミニウムゲル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 K88 線毛抗原保有大腸菌

2.1.1.1 名称

大腸菌 pPS002 株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

グラム陰性桿菌で、運動性を認め、アラビノース利用能（+）、イノシトール利用能（-）、ソルビトール利用能（+）、硫化水素産生能（-）、インドール産生能（+）、ウレアーゼ活性（-）、 β -ガラクトシダーゼ活性（+）及び硝酸塩還元性（+）の性状を示し、K88 線毛を保有する。また、病原性に関与する毒素をコードするプラスミドを欠損し、耐熱性エンテロトキシン（ST）及び易熱性エンテロトキシン（LT）を産生しない。

2.1.1.3 マスターシード菌

2.1.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、適当と認められた培地で増殖させ、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結乾燥して2～7℃で保存する。

マスターシード菌について、3.1.1 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。

2.1.1.4 ワーキングシード菌

2.1.1.4.1 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-60℃以下又は凍結乾燥して2～7℃で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2 の試験を行う。

2.1.1.5 プロダクションシード菌

2.1.1.5.1 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-60℃以下又は凍結乾燥して2～7℃で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

2.1.2 K99 線毛抗原保有大腸菌

2.1.2.1 名称

大腸菌 NL-1005 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

グラム陰性桿菌で、運動性を認めず、5 vol %羊血液寒天培地上で溶血性を認めず、インドール産生能 (+)、硝酸塩還元性 (+)、硫化水素産生能 (-)、グルコース利用能 (+) 及びマンノース利用能 (+) の性状を示し、K99 線毛を保有する。ST を産生するが LT を産生しない。

2.1.2.3 マスターシード菌

2.1.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、適当と認められた培地で増殖させ、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結乾燥して2～7℃で保存する。

マスターシード菌について、3.1.1 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。

2.1.2.4 ワーキングシード菌

2.1.2.4.1 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-60℃以下又は凍結乾燥して2～7℃で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2 の試験を行う。

2.1.2.5 プロダクションシード菌

2.1.2.5.1 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-60℃以下又は凍結乾燥して2～7℃で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

2.1.3 987P 線毛抗原保有大腸菌

2.1.3.1 名称

大腸菌 NADC1413 株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

グラム陰性桿菌で、運動性を認めず、アラビノース利用能 (+)、イノシトール利用能 (-)、ソルビトール利用能 (+)、硫化水素産生能 (-)、インドール産生能 (+)、ウレアーゼ活性 (-)、β-ガラクトシダーゼ活性 (+) 及び硝酸塩還元性 (+) の性状を示し、987P 線毛を保有する。ST を産生するが LT を産生しない。

2.1.3.3 マスターシード菌

2.1.3.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、適当と認められた培地で増殖させ、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結乾燥して2～7℃で保存する。

マスターシード菌について、3.1.1 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。

2.1.3.4 ワーキングシード菌

2.1.3.4.1 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-60℃以下又は凍結乾燥して2～7℃で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2 の試験を行う。

2.1.3.5 プロダクションシード菌

2.1.3.5.1 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 -60°C 以下又は凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

2.1.4 K99 及び F41 線毛抗原保有大腸菌

2.1.4.1 名称

大腸菌 NADC1471 株又はこれと同等と認められた株

2.1.4.2 性状

グラム陰性桿菌で、運動性を認めず、アラビノース利用能 (+)、イノシトール利用能 (-)、ソルビトール利用能 (+)、硫化水素産生能 (-)、インドール産生能 (+)、ウレアーゼ活性 (-)、 β -ガラクトシダーゼ活性 (+) 及び硝酸塩還元性 (+) の性状を示し、K99 線毛及び F41 線毛を保有する。ST を産生するが LT を産生しない。

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、適当と認められた培地で増殖させ、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ で保存する。

マスターシード菌について、3.1.1 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、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 -60°C 以下又は凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2 の試験を行う。

2.1.4.5 プロダクションシード菌

2.1.4.5.1 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 -60°C 以下又は凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

2.1.5 易熱性エンテロトキシン B サブユニット成分 (以下この項において「LT_B」という。) 産生大腸菌

2.1.5.1 名称

大腸菌 NL-1001 株又はこれと同等と認められた株

2.1.5.2 性状

グラム陰性桿菌で、運動性を認め、アラビノース利用能 (+)、イノシトール利用能 (-)、ソルビトール利用能 (+)、硫化水素産生能 (-)、インドール産生能 (+)、ウレアーゼ活性 (-)、 β -ガラクトシダーゼ活性 (+) 及び硝酸塩還元性 (+) の性状を示す。ST 及び LT を産生しないが、LT_B を産生する。また、本製造用菌株は、定着に必要な線毛をコードするプラスミドを欠損している。

2.1.5.3 マスターシード菌

2.1.5.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、適当と認められた培地で増殖させ、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ で保存す

る。

マスターシード菌について、3.1.1 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。

2.1.5.4 ワーキングシード菌

2.1.5.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、適当と認められた培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結して -60°C 以下又は凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2 の試験を行う。

2.1.5.5 プロダクションシード菌

2.1.5.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、適当と認められた培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して -60°C 以下又は凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

2.1.6 クロストリジウム・パーフリンゲンス C 型菌

2.1.6.1 名称

クロストリジウム・パーフリンゲンス C 型菌 NL-1003 株又はこれと同等と認められた株

2.1.6.2 性状

グラム陽性桿菌で、グルコース利用能 (+)、マルトース利用能 (+)、アラビノース利用能 (+)、ラクトース利用能 (+)、マンノース利用能 (+)、キシロース利用能 (+) 及びインドール産生能 (-) の性状を示す。β 毒素を産生し、本毒素を含む培養上清ろ液をマウス及び子豚の静脈内に投与すると、毒性を示す。

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、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、凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ で保存する。

マスターシード菌について、3.1.1 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。

2.1.6.4 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 -60°C 以下又は凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2 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 -60°C 以下又は凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

2.2 製造材料

2.2.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 大腸菌 pPS002 株、NL-1005 株、NADC1413 株及び NADC1471 株原液

2.3.1.1 培養

それぞれのプロダクションシード菌を培地で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。

2.3.1.2 不活化

培養菌液にホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加え、不活化したものを不活化菌液とする。
不活化菌液について、3.3 の試験を行う。

2.3.1.3 原液

不活化菌液を遠心分離し、リン酸緩衝食塩液で再浮遊させ、チメロサル又は適当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、3.4 の試験を行う。

2.3.2 大腸菌 NL-1001 株原液

2.3.2.1 培養

プロダクションシード菌を培地で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。

2.3.2.2 濃縮及び除菌

培養菌液を遠心分離し、上清液を中空糸フィルターで濃縮した後、透析して除菌する。チメロサル又は適当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、3.4 の試験を行う。

2.3.3 クロストリジウム・パーフリンゲンス C 型菌 NL-1003 株原液

2.3.3.1 培養

プロダクションシード菌を培地で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。

2.3.3.2 不活化及び無毒化

培養菌液にホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加え、不活化したものを不活化菌液とする。
不活化菌液について、3.3 の試験を行う。

2.3.3.3 原液

不活化菌液を 2～7℃に冷却し、遠心分離して上清液を採り、チメロサル又は適当と認められた保存剤を添加し、限外ろ過により濃縮したものを原液とする。

2.4 最終バルク

各原液を混合し、濃度調整し、アルミニウムゲルアジュバントを添加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、3.5 の試験を行う。

3 試験法

3.1 製造用株の試験

3.1.1 マスターシード菌の試験

3.1.1.1 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。

3.1.1.2 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、大腸菌又はクロストリジウム・パーフリンゲンス C 型菌以外の菌の発育を認めてはならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験法とする。

3.1.2 ワーキングシード菌の試験

3.1.2.1 夾雑菌否定試験

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。

3.1.3 プロダクションシード菌の試験

3.1.3.1 夾雑菌否定試験

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。

3.2 培養菌液の試験

3.2.1 大腸菌 pPS002 株、NADC1413 株及び NADC1471 株の試験

3.2.1.1 染色試験

3.2.1.1.1 試験材料

検体を用いる。

3.2.1.1.2 試験方法

検体 0.01mL をスライドガラス上の 1 cm² の区画に塗抹し、乾燥させた後に火焰固定し、グラム染色して標本を作製する。標本を顕微鏡下で約 1,000 倍に拡大し、30 視野以上を観察する。

3.2.1.1.3 判定

均一なグラム陰性桿菌以外の菌を認めてはならない。

3.2.1.2 型別試験

3.2.1.2.1 試験材料

3.2.1.2.1.1 試料

検体を用いる。

3.2.1.2.1.2 抗血清

抗大腸菌線毛抗原 K88 血清（付記 1）、抗大腸菌線毛抗原 987P 血清（付記 2）及び抗大腸菌線毛抗原 F41 血清（付記 3）を用いる。

3.2.1.2.2 試験方法

pPS002 株由来の試料と抗大腸菌線毛抗原 K88 血清、NADC1413 株由来の試料と抗大腸菌線毛抗原 987P 血清、NADC1471 株由来の試料と抗大腸菌線毛抗原 F41 血清をスライドガラス上でそれぞれ混合し、急速凝集反応を行う。

3.2.1.2.3 判定

検体は、当該抗血清で速やかに凝集しなければならない。

3.2.2 大腸菌 NL-1005 株の試験

3.2.2.1 染色試験

3.2.2.1.1 試験材料

検体を用いる。

3.2.2.1.2 試験方法

検体 0.01mL をスライドガラス上の 1 cm² の区画に塗抹し、乾燥させた後に火焰固定し、グラム染色して標本を作製する。標本を顕微鏡下で約 1,000 倍に拡大し、30 視野以上を観察する。

3.2.2.1.3 判定

均一なグラム陰性桿菌以外の菌を認めてはならない。

3.2.2.2 型別試験

3.2.2.2.1 試験材料

3.2.2.2.1.1 試料

検体を用いる。

3.2.2.2.1.2 抗血清

抗大腸菌線毛抗原 K99 血清（付記 4）を用いる。

3.2.2.2.2 試験方法

NL-1005 株由来の試料と抗大腸菌線毛抗原 K99 血清をスライドガラス上で混合し、急速凝集反応を

行う。

3.2.2.2.3 判定

検体は、当該抗血清で速やかに凝集しなければならない。

3.2.2.3 吸光度測定試験

検体を波長 420nm で吸光度を測定するとき、その値は、規定の値でなければならない。

3.2.3 大腸菌 NL-1001 株の試験

3.2.3.1 染色試験

3.2.3.1.1 試験材料

検体を用いる。

3.2.3.1.2 試験方法

検体 0.01mL をスライドガラス上の 1 cm² の区画に塗抹し、乾燥させた後に火焰固定し、グラム染色して標本を作製する。標本を顕微鏡下で約 1,000 倍に拡大し、30 視野以上を観察する。

3.2.3.1.3 判定

均一なグラム陰性桿菌以外の菌を認めてはならない。

3.2.3.2 大腸菌 LT_B 確認試験

3.2.3.2.1 試料

検体を用いる。

3.2.3.2.2 試験方法

大腸菌 LT_B 成分の参照品（付記 5）を滅菌精製水で再溶解したもの及び試料の希釈・洗浄液 1（付記 6）による 6 段階の 2 倍階段希釈液を作製し、氷槽にて保存する。ガングリオシド固相化プレート（付記 7）の各穴に 50 μL ずつ加え、37℃で 1 時間反応させる。希釈・洗浄液 2（付記 8）で 1 回、希釈・洗浄液 1 で 2 回洗浄後、抗 LT_B 抗原兎ポリクロナール抗体（付記 9）を各穴に 50 μL ずつ加え、37℃で 1 時間反応させる。洗浄液 3（付記 10）で洗浄後、標識抗体 1（付記 11）を各穴に 50 μL ずつ加え、37℃で 1 時間反応させる。洗浄液 3 で洗浄後、基質液 1（付記 12）を各穴に 200 μL ずつ加え、常温で反応させる。主波長 490nm、副波長 630nm で参照品の最低希釈倍率の吸光度を測定し、その値が 0.9 ~ 1.1 となった時点を反応終了とし、全ての穴の吸光度を測定する。

3.2.3.2.3 判定

参照品中の LT_B 抗原量を 1.0 として、試料の LT_B 抗原量の相対量を統計学的計算方法により算出するとき、相対力価は、1.62 以上でなければならない。

3.2.3.3 吸光度測定試験

検体を波長 420nm で吸光度を測定するとき、その値は、規定の値でなければならない。

3.2.4 クロストリジウム・パーフリンゲンス C 型 NL-1003 株の試験

3.2.4.1 染色試験

3.2.4.1.1 試験材料

検体を用いる。

3.2.4.1.2 試験方法

検体 0.01mL をスライドガラス上の 1 cm² の区画に塗抹し、乾燥させた後に火焰固定し、グラム染色して標本を作製する。標本を顕微鏡下で約 1,000 倍に拡大し、30 視野以上を観察する。

3.2.4.1.3 判定

均一なグラム陽性桿菌以外の菌を認めてはならない。

3.3 不活化菌液の試験

3.3.1 不活化試験

3.3.1.1 試験材料

検体及び液状チオグリコール酸培地を用いる。

3.3.1.2 試験方法

検体 1 mL を 300mL の液状チオグリコール酸培地 4 本にそれぞれ接種し、2 本は 23 °C で、他の 2 本は 33 °C で 6 ～ 8 日間一次培養する。次に各一次培養液 1 mL を新しい 300mL の液状チオグリコール酸培地 4 本にそれぞれ接種し、2 本は 23 °C で、他の 2 本は 33 °C で 7 日間培養して観察する。

3.3.1.3 判定

菌の発育を認めてはならない。

3.4 原液の試験

3.4.1 大腸菌 NL-1001 株

3.4.1.1 無菌試験

3.4.1.1.1 試験材料

検体及び液状チオグリコール酸培地を用いる。

3.4.1.1.2 試験方法

検体 1 mL を 300mL の液状チオグリコール酸培地 4 本にそれぞれ接種し、2 本は 23 °C で、他の 2 本は 33 °C で 6 ～ 8 日間一次培養する。次に各一次培養液 1 mL を新しい 300mL の液状チオグリコール酸培地 4 本にそれぞれ接種し、2 本は 23 °C で、他の 2 本は 33 °C で 7 日間培養して観察する。

3.4.1.1.3 判定

菌の発育を認めてはならない。

3.5 小分製品の試験

3.5.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、帯黄褐色のゲル状混濁液で、静置すると沈殿物の上層が無色又は帯黄褐色、振とうすれば均一な懸濁液でなければならず、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 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。

3.5.3 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 チメロサル定量試験

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。

3.5.5 アルミニウム定量試験

一般試験法のアルミニウム定量法を準用して試験するとき、アルミニウムの含有量は、1.5 mg/mL 以下でなければならない。

3.5.6 ホルマリン定量試験

一般試験法のホルマリン定量法を準用して試験するとき、ホルマリン含有量は、0.1vol % 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、この限りでない。

3.5.7 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。ただし、試験品の注射量は 0.3 mL とし、体重測定は 4 日目に行うものとする。

3.5.8 エンドトキシン試験

日本薬局方一般試験法のエンドトキシン試験法の光学的定量法の比色法を準用して試験するとき、1 頭分当たり 1×10^6 EU 未満でなければならない。

3.5.9 力価試験

3.5.9.1 大腸菌線毛抗原及び大腸菌 LT_B 成分の力価試験

3.5.9.1.1 又は 3.5.9.1.2 の試験を行う。

3.5.9.1.1 相対力価（付記 13）による力価試験

3.5.9.1.1.1 大腸菌線毛抗原 K88 の力価試験

3.5.9.1.1.1.1 試験材料

3.5.9.1.1.1.1.1 試料

試験品を、希釈・洗浄液1で希釈した後、又は適当と認められた温度で凍結し融解した後、等量の溶出緩衝液（付記14）を加え、常温で60分間振とうする。

3.5.9.1.1.1.1.2 試験方法

線毛抗原 K88 成分の参照品（付記15）を、凍結乾燥品の場合は溶出緩衝液で再溶解し、凍結保存品の場合は融解して等量の溶出緩衝液を加え、常温で1時間振とうした後、希釈・洗浄液2で希釈したもの、及び試料の希釈・洗浄液2による2倍階段希釈液を作製し、抗体固相化プレート1（付記16）の各穴に100 μ L ずつ加え、常温で30分間振とうする。希釈・洗浄液2で洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識抗大腸菌線毛抗原 K88 マウスモノクローナル抗体（付記17）を各穴に100 μ L ずつ加え、常温で30分間振とうする。希釈・洗浄液2で洗浄した後、基質液2（付記18）を各穴に100 μ L ずつ加え、常温で反応させる。主波長 405nm、副波長 490nm で参照品の最低希釈倍率の吸光度を測定し、その値が1.1～1.5となった時点反応終了とし、全穴の吸光度を測定する。

3.5.9.1.1.1.1.3 判定

参照品中の K88 線毛抗原量を 1.0 として、試料の K88 線毛抗原量の相対量を統計学的計算方法（付記19）により算出するとき、相対力価は、1.0 以上でなければならない。

3.5.9.1.1.2 大腸菌線毛抗原 K99 の力価試験

3.5.9.1.1.2.1 試験材料

3.5.9.1.1.2.1.1 試料

試験品を、希釈・洗浄液1で希釈した後、又は適当と認められた温度で凍結し融解した後、等量の溶出緩衝液を加え、常温で60分間振とうする。

3.5.9.1.1.2.2 試験方法

線毛抗原 K99 成分の参照品（付記20）を、凍結乾燥品の場合は溶出緩衝液で再溶解し、凍結保存品の場合は融解して等量の溶出緩衝液を加え、常温で1時間振とうした後、希釈・洗浄液2で希釈したもの、及び試料の希釈・洗浄液2による2倍階段希釈液を作製し、抗体固相化プレート2（付記21）の各穴に100 μ L ずつ加え、15～30℃で15±2分間静置し、常温で30分間振とうする。希釈・洗浄液2で洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識抗大腸菌線毛抗原 K99 マウスモノクローナル抗体（付記22）を各穴に100 μ L ずつ加え、常温で30分間振とうする。希釈・洗浄液2で洗浄した後、基質液2を各穴に100 μ L ずつ加え、常温で反応させる。主波長 405nm、副波長 490nm で参照品の最低希釈倍率の吸光度を測定し、その値が1.1～1.5となった時点反応終了とし、全穴の吸光度を測定する。

3.5.9.1.1.2.3 判定

参照品中の K99 線毛抗原量を 1.0 として、試料の K99 線毛抗原量の相対量を統計学的計算方法により算出するとき、相対力価は、1.0 以上でなければならない。

3.5.9.1.1.3 大腸菌線毛抗原 987P の力価試験

3.5.9.1.1.3.1 試験材料

3.5.9.1.1.3.1.1 試料

試験品を、希釈・洗浄液2で希釈する。

3.5.9.1.1.3.2 試験方法

線毛抗原 987P 成分の参照品（付記23）を希釈・洗浄液2で希釈したもの、及び試料の希釈・洗浄液2による2倍階段希釈液を作製し、抗体固相化プレート3（付記24）の各穴に100 μ L ずつ加え、常温で15分間静置した後、30分間振とうする。希釈・洗浄液2で洗浄した後、抗大腸菌線毛抗原 987P マウスモノクローナル抗体1（付記25）を各穴に100 μ L ずつ加え、常温で30分間振とうする。希釈・洗浄液2で洗浄した後、標識抗体2（付記26）を各穴に100 μ L ずつ加え、常温で30分間振とうする。希釈・洗浄液2で洗浄した後、基質液2を各穴に100 μ L ずつ加え、常温で反応させる。30秒間振とうした後、主波長 405nm、副波長 490nm で参照品の最低希釈倍率の吸光度を測定し、その値が1.1～1.5となった時点反応終了とし、全穴の吸光度を測定する。

3.5.9.1.1.3.3 判定

参照品中の 987P 線毛抗原量を 1.0 として、試料の 987P 線毛抗原量の相対量を統計学的計算方法により算出するとき、相対力価は、1.1 以上でなければならない。

3.5.9.1.1.4 大腸菌線毛抗原 F41 成分の力価試験

3.5.9.1.1.4.1 試験材料

3.5.9.1.1.4.1.1 試料

試験品を、希釈・洗浄液 1 で希釈した後、又は適当と認められた温度で凍結し融解した後、等量の溶出緩衝液を加え、常温で 60 分間振とうする。

3.5.9.1.1.4.2 試験方法

線毛抗原 F41 成分の参照品（付記 27）を、凍結乾燥品の場合は溶出緩衝液で再溶解し、凍結保存品の場合は融解して等量の溶出緩衝液を加え、常温で 1 時間振とうした後、希釈・洗浄液 2 で希釈したもの、及び試料の希釈・洗浄液 2 による 2 倍階段希釈液を作製し、抗体固相化プレート 4（付記 28）の各穴に 100 μ L ずつ加え、常温で 30 分間振とうする。希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、抗大腸菌線毛抗原 F41 マウスモノクローナル抗体 1（付記 29）を各穴に 100 μ L ずつ加え、常温で 30 分間振とうする。希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、標識抗体 2 を各穴に 100 μ L ずつ加え、常温で 30 分間振とうする。希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、基質液 2 を各穴に 100 μ L ずつ加え、常温で反応させる。主波長 405nm、副波長 490nm で参照品の最低希釈倍率の吸光度を測定し、その値が 1.1 ~ 1.5 となった時点を反応終了とし、全穴の吸光度を測定する。

3.5.9.1.1.4.3 判定

参照品中の F41 線毛抗原量を 1.0 として、試料の F41 線毛抗原量の相対量を統計学的計算方法により算出するとき、相対力価は、1.0 以上でなければならない。

3.5.9.1.1.5 大腸菌 LT_B の力価試験

3.5.9.1.1.5.1 試験材料

3.5.9.1.1.5.1.1 試料

試験品を滅菌精製水で希釈し、水酸化ナトリウム溶液（付記 30）で pH を 12.0 に調整した後、硫酸アンモニウム溶液（付記 31）を混合して中和する。この混合液を遠心し、その上清を試料とする。

3.5.9.1.1.5.2 試験方法

大腸菌 LT_B 成分の参照品を滅菌精製水で再溶解したもの及び試料の希釈・洗浄液 1 による 2 倍階段希釈液を作製し、氷槽で保存する。ガングリオシド固相化プレートの各穴に 50 μ L ずつ加え、37 °C で 1 時間加温する。希釈・洗浄液 2 で 1 回、希釈・洗浄液 1 で 2 回洗浄した後、抗 LT_B 抗原兔ポリクローナル抗体を各穴に 50 μ L ずつ加え、37 °C で 1 時間加温する。洗浄液 3 で洗浄した後、標識抗体 1 を各穴に 50 μ L ずつ加え、37 °C で 1 時間加温する。洗浄液 3 で洗浄した後、基質液 1 を各穴に 200 μ L ずつ加え、常温で反応させる。主波長 490nm、副波長 630nm で参照品の最低希釈倍率の吸光度を測定し、その値が 0.9 ~ 1.1 となった時点を反応終了とし、全ての穴の吸光度を測定する。

3.5.9.1.1.5.3 判定

参照品中の LT_B 抗原量を 1.0 として、試料の LT_B 抗原量の相対量を統計学的計算方法により算出するとき、相対力価は、1.0 以上でなければならない。

3.5.9.1.2 抗体測定法による力価試験

3.5.9.1.2.1 大腸菌線毛抗原 K88 の力価試験

3.5.9.1.2.1.1 試験材料

3.5.9.1.2.1.1.1 注射材料

試験品を水酸化アルミニウムゲル（付記 32）で 10 倍に希釈したものを注射材料とする。

3.5.9.1.2.1.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

3.5.9.1.2.1.2 試験方法

試験動物 7 匹を用い、5 匹を試験群、2 匹を対照群とする。注射材料の 1.0mL ずつを試験群の皮下に注射し、非注射群を対照群とする。注射後 3 週目に両群から得られた各個体の血清について、次の方法により抗体価を測定する。

試験群血清及び線毛抗原 K88 参照陽性血清 1 (付記 33) については 512 倍から、対照群血清については 2 倍から、希釈液 3 (付記 34) で 2 倍階段希釈を行う。各希釈血清及び線毛抗原 K88 参照陽性血清 2 (付記 35) を希釈液 3 で 1,024 倍に希釈したものを抗原吸着プレート 1 (付記 36) の穴に 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、希釈・洗浄液 2 で 3 回洗浄する。各穴にペルオキシダーゼ標識 2 次抗体液 1 (付記 37) を 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させる。その後、洗浄液 2 で 3 回洗浄する。基質液 2 を各穴に 100 μ L ずつ加え、常温で反応させ、主波長 405nm、副波長 490nm で各穴の吸光度を測定し、1,024 倍希釈した線毛抗原 K88 参照陽性血清 2 の平均吸光度値が 0.9 ~ 1.1 である時点を反応終了として、全穴の吸光度を測定する。

得られた被検血清の吸光度値が 0.9 以上を示した血清の最大希釈倍数の逆数を抗体価とする。

3.5.9.1.2.1.3 判定

試験群の血清は、80 %以上が抗体価 2,048 倍以上でなければならない。また、対照群の血清は、全て抗体価 2 倍以下でなければならない。

線毛抗原 K88 参照陽性血清 1 は、抗体価 2,048 ~ 4,096 倍を示さなければならない。

3.5.9.1.2.2 大腸菌線毛抗原 K99 の力価試験

3.5.9.1.2.2.1 試験材料

3.5.9.1.2.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.9.1.2.2.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

3.5.9.1.2.2.2 試験方法

試験動物 7 匹を用い、5 匹を試験群、2 匹を対照群とする。注射材料の 1.0mL ずつを試験群の皮下に注射し、非注射群を対照群とする。2 週間隔で 2 回注射後 2 週目に両群から得られた各個体の血清について、次の方法により抗体価を測定する。

試験群血清及び線毛抗原 K99 参照陽性血清 1 (付記 38) については 8 倍から、対照群血清については 2 倍から、希釈液 3 で 2 倍階段希釈を行う。各希釈血清及び線毛抗原 K99 参照陽性血清 2 (付記 39) を希釈液 3 で 512 倍に希釈したものを抗原吸着プレート 2 (付記 40) の各穴に 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、希釈・洗浄液 2 で 3 回洗浄する。各穴にペルオキシダーゼ標識 2 次抗体液 1 を 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させる。その後、希釈・洗浄液 2 で 3 回洗浄する。基質液 2 を各穴に 100 μ L ずつ加え、常温で反応させ、主波長 405nm、副波長 490nm で各穴の吸光度を測定し、512 倍希釈した線毛抗原 K99 参照陽性血清 2 の平均吸光度値が 0.9 ~ 1.1 である時点を反応終了として、全穴の吸光度を測定する。

得られた被検血清の吸光度値が 0.9 以上を示した血清の最大希釈倍数を抗体価とする。

3.5.9.1.2.2.3 判定

試験群の血清は、80 %以上が抗体価 32 倍以上でなければならない。また、対照群の血清は、全て抗体価 2 倍以下でなければならない。

線毛抗原 K99 参照陽性血清 1 は、抗体価 32 ~ 64 倍を示さなければならない。

3.5.9.1.2.3 大腸菌線毛抗原 987P の力価試験

3.5.9.1.2.3.1 試験材料

3.5.9.1.2.3.1.1 試験動物

3.5.9.1.2.2 の試験に用いた動物を用いる。

3.5.9.1.2.3.2 試験方法

3.5.9.1.2.2 の試験で得られた各個体の血清について、次の方法により抗体価を測定する。

試験群血清については4倍から、対照群血清及び線毛抗原 987P 参照陽性血清 1（付記 41）については2倍から、希釈液 3 で2倍階段希釈を行う。各希釈血清及び線毛抗原 987P 参照陽性血清 2（付記 42）を希釈液 3 で128倍に希釈したものを抗原吸着プレート 3（付記 43）の穴に100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で1時間反応させた後、洗浄液 2 で3回洗浄する。各穴にペルオキシダーゼ標識 2 次抗体液 1 を100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で1時間反応させる。その後、希釈・洗浄液 2 で3回洗浄する。基質液 2 を各穴に100 μ L ずつ加え、常温で反応させ、主波長 405nm、副波長 490nm で各穴の吸光度を測定し、128倍希釈した線毛抗原 987P 参照陽性血清 2 の平均吸光度値が 0.9 ~ 1.1 である時点反応終了として、全穴の吸光度を測定する。

得られた被検血清の吸光度値が 0.9 以上を示した血清の最大希釈倍数を抗体価とする。

3.5.9.1.2.3.3 判定

試験群の血清は、80 %以上が抗体価 8 倍以上でなければならない。また、対照群の血清は、全て抗体価 2 倍以下でなければならない。

線毛抗原 987P 参照陽性血清 1 は、抗体価 8 ~ 16 倍を示さなければならない。

3.5.9.1.2.4 大腸菌線毛抗原 F41 の力価試験

3.5.9.1.2.4.1 試験材料

3.5.9.1.2.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.9.1.2.4.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

3.5.9.1.2.4.2 試験方法

試験動物 7 匹を用い、5 匹を試験群、2 匹を対照群とする。注射材料の 1.0mL ずつを試験群の皮下に注射し、非注射群を対照群とする。注射後 3 週目に両群から得られた各個体の血清について、次の方法により抗体価を測定する。

試験群血清及び線毛抗原 F41 参照陽性血清 1（付記 44）については64倍から、対照群血清については2倍から、希釈液 3 で2倍階段希釈を行う。各希釈血清及び線毛抗原 F41 参照陽性血清 2（付記 45）を希釈液 3 で512倍に希釈したものを抗原吸着プレート 4（付記 46）の穴に100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で1時間反応させた後、希釈・洗浄液 2 で3回洗浄する。各穴にペルオキシダーゼ標識 2 次抗体液 1 を100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で1時間反応させる。その後、希釈・洗浄液 2 で3回洗浄する。基質液 2 を各穴に100 μ L ずつ加え、常温で反応させ、主波長 405nm、副波長 490nm で各穴の吸光度を測定し、512倍希釈した線毛抗原 F41 参照陽性血清 2 の平均吸光度値が 0.9 ~ 1.1 である時点反応終了として、全穴の吸光度を測定する。

得られた被検血清の吸光度値が 0.9 以上を示した血清の最大希釈倍数の逆数を抗体価とする。

3.5.9.1.2.4.3 判定

試験群の血清は、80 %以上が抗体価 256 倍以上でなければならない。また、対照群の血清は、全て抗体価 2 倍以下でなければならない。

線毛抗原 F41 参照陽性血清 1 は、抗体価 256 ~ 512 倍を示さなければならない。

3.5.9.1.2.5 大腸菌 LT_B の力価試験

3.5.9.1.2.5.1 試験材料

3.5.9.1.2.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.9.1.2.5.1.2 試験動物

約 6 週齢の雄 ddY 系マウスを用いる。

3.5.9.1.2.5.2 試験方法

試験動物 15 匹を用い、10 匹を試験群、5 匹を対照群とする。注射材料の 0.5mL ずつを試験群の皮下に注射し、非注射群を対照群とする。注射後 3 週目に両群から得られた各個体の血清について、次

の方法により抗体価を測定する。

試験群血清及び LT_B 参照陽性血清 1（付記 47）については 128 倍から、対照群血清については 8 倍から、希釈液 4（付記 48）で 2 倍階段希釈を行う。各希釈血清及び LT_B 参照陽性血清 2（付記 49）を希釈液 4 で 512 倍に希釈したものを抗原吸着プレート 5（付記 50）の穴に 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、希釈・洗浄液 1 で 3 回洗浄する。各穴にペルオキシダーゼ標識 2 次抗体液 2（付記 51）を 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させる。その後、希釈・洗浄液 2 で 3 回洗浄する。基質液 2 を各穴に 100 μ L ずつ加え、常温で反応させ、主波長 405nm、副波長 490nm で各穴の吸光度を測定し、512 倍希釈した LT_B 参照陽性血清 2 の平均吸光度値が 0.9 ~ 1.1 である時点反応終了として、全穴の吸光度を測定する。

得られた被検血清の吸光度値が 0.9 以上を示した血清の最大希釈倍数を抗体価とする。

3.5.9.1.2.5.3 判定

試験群の血清は、70 %以上が抗体価 256 倍以上でなければならない。また、対照群の血清は、全て抗体価 8 倍以下でなければならない。

LT_B 参照陽性血清 1 は、抗体価 256 ~ 512 倍を示さなければならない。

3.5.9.2 クロストリジウム・パーフリンゲンストキソイドの力価試験

3.5.9.2.1 試験材料

3.5.9.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.9.2.1.2 試験動物

体重 1.8 ~ 3.6kg の SPF ニュージーランドホワイト種の兔、及び約 5 週齢の ICR 系又は適当と認められたマウスを用いる。

3.5.9.2.2 試験方法

注射材料の 1 mL を、3 週間隔で 2 回、8 匹の兔の皮下に注射する。第 2 回注射後 2 週目に得られた血清について、抗毒素抗体価を測定する。試験動物 8 匹から得られた血清を等量混合する。プール血清の 1、2、3、4 及び 5 倍希釈液をバクト-ペプトン液（付記 52）で作製する。10L₀ 量（付記 53）に濃度を調整したクロストリジウム・パーフリンゲンス C 型 β 毒素液（付記 54）と各希釈血清を等量混合後、25 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させ、氷中に保存する。各混合液を 1 群 5 匹のマウスに 0.2mL ずつ尾静脈内接種し、24 時間後に観察する。同時に、試験に用いた 10L₀ 量及び 10L₊量（付記 55）毒素液 1 mL と 10 国際抗毒素単位（以下この項において「IAU」という。付記 56）の標準抗毒素（付記 57）1 mL との混合液を同様にマウスに接種し毒素量を定量するとき、10L₀ 群では全マウスが生存し、10L₊群では 80%以上のマウスが死亡しなければならない。

3.5.9.2.3 判定

マウスが全数生存している群の最大希釈倍数を 10 倍した値を抗毒素抗体価とし、IAU で表すとき、プール血清の抗毒素抗体価は、10 IAU 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 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は、この限りでない。

付記 1 抗大腸菌線毛抗原 K88 血清

精製した大腸菌の線毛抗原 K88 を兔に免疫して得られた抗血清

付記 2 抗大腸菌線毛抗原 987P 血清

精製した大腸菌の線毛抗原 987P を兔に免疫して得られた抗血清

付記3 抗大腸菌線毛抗原 F41 血清
精製した大腸菌の線毛抗原 F41 を兎に免疫して得られた抗血清

付記4 抗大腸菌線毛抗原 K99 血清
精製した大腸菌の線毛抗原 K99 を兎に免疫して得られた抗血清

付記5 大腸菌 LT_B 成分の参照品
大腸菌 NL-1001 株培養液から精製した LT_B 成分を凍結乾燥したもの。

付記6 希釈・洗浄液 1
1,000mL 中
塩化ナトリウム 8.0 g
塩化カリウム 0.2 g
無水リン酸水素二ナトリウム 1.15 g
リン酸二水素カリウム 0.2 g
精製水 残量
pH を 7.2 に調整する。200 nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。

付記7 ガングリオシド固相化プレート
希釈・洗浄液 1 で溶解したガングリオシド溶液 (LT_B 20ng 以上を結合させるのに十分な量の GM ガングリオシドを含む。) を 100 μ L ずつ 96 穴プレートに分注し、反応させた後、希釈・洗浄液 1 で洗浄し、ブロッキング液 (付記 58) を加え、更に反応させた後、希釈・洗浄液 1 を加えたもの。

付記8 希釈・洗浄液 2
1,000mL 中
ポリソルベート 20 0.5 mL
希釈・洗浄液 1 残量
pH を 7.2 に調整する。

付記9 抗 LT_B 抗原兎ポリクロナール抗体
兎に精製 LT_B 成分を複数回筋肉内又は皮下注射した後、採取した血清を希釈・洗浄液 1 で適当な希釈倍率に希釈したもの。

付記10 洗浄液 3
1,000mL 中
ブロッキング液 100 mL
希釈・洗浄液 1 残量

付記11 標識抗体 1
市販のプロテイン A ペルオキシンダーゼとプロテイン A 溶解液を 9 : 1 の割合で混合し、希釈したもの。

付記 12 基質液 1

A液：25mg の 4-アミノアンチピリンを 50 mL の 0.17mol/L フェノールで溶解したもの。

B液：0.3%過酸化水素溶液をリン酸ナトリウム緩衝液（付記 59）で希釈したもの。

A液とB液を使用時に等量混合したもの。

付記 13 相対力価

不活化ワクチンの力価試験において、酵素抗体反応による *in vitro* 抗原定量法を評価し、参照品との比較により、試験品の有効抗原量を数値化するために考案された単位

付記 14 溶出緩衝液

リン酸二水素カリウム

8.2 g

水

94 mL

pH を 9.3 に調整する。

付記 15 線毛抗原 K88 成分の参照品

次に掲げるものであって、動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

(1) 大腸菌 NL-1002 株培養液から精製した線毛抗原 K88 成分で、ペプトン-トレハロースで希釈し、1 回使用分に分注して、凍結乾燥したもの。

(2) 本製剤の製造方法に従って製造・小分けし、凍結保存したもの。

付記 16 抗体固相化プレート 1

希釈液 5（付記 60）で適当な濃度に希釈した抗大腸菌抗原 K88 マウスモノクローナル抗体 1（付記 61）を 96 穴プレートに分注し、反応させた後、希釈・洗浄液 2 で洗浄したもの。

付記 17 ペルオキシダーゼ標識抗大腸菌線毛抗原 K88 マウスモノクローナル抗体

大腸菌線毛抗原 K88 に対するマウスモノクローナル抗体をペルオキシダーゼで標識したものを希釈液 6（付記 62）で適当な希釈倍率に希釈したもの。

付記 18 基質液 2

C液：0.6g の 2,2'-アジノ-ジ (3-エチルベンゾチアゾリンスルホネート) を 1,000mL のグリシン緩衝液で希釈したもの。

D液：0.02vol %過酸化水素溶液

C液とD液を使用時に等量混合したもの。

付記 19 統計学的計算方法

動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

付記 20 線毛抗原 K99 成分の参照品

次に掲げるものであって、動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

(1) 大腸菌 NL-1008 株培養液から精製した線毛抗原 K99 成分で、ペプトンで希釈し、1 回使用分に分注して、凍結乾燥したもの。

(2) 本製剤の製造方法に従って製造・小分けし、凍結保存したもの。

付記 21 抗体固相化プレート 2

希釈液 5 で適当な濃度に希釈した抗大腸菌抗原 K99 マウスモノクローナル抗体 1 (付記 63) を 96 穴プレートに分注し、反応させた後、希釈・洗浄液 2 で洗浄したものを。

付記 22 ペルオキシダーゼ標識抗大腸菌線毛抗原 K99 マウスモノクローナル抗体
抗大腸菌線毛抗原 K99 マウスモノクローナル抗体 1 をペルオキシダーゼで標識したものを希釈・洗浄液 2 で適当な希釈倍率に希釈したものを。

付記 23 線毛抗原 987P 成分の参照品
次に掲げるものであって、動物医薬品検査所が適当と認めたもの。
(1) 大腸菌 NADC1413 株培養液から精製した線毛抗原 987P 成分で、ペプトン-トレハロースで希釈し、1 回使用分に分注して、凍結乾燥したものを。
(2) 本製剤の製造方法に従って製造・小分けし、凍結保存したものを。

付記 24 抗体固相化プレート 3
希釈液 5 で適当な濃度に希釈した抗大腸菌抗原 987P 兎ポリクローナル抗体 (付記 64) を 96 穴プレートに分注し、反応させた後、希釈・洗浄液 2 で洗浄したものを。

付記 25 抗大腸菌線毛抗原 987P マウスモノクローナル抗体 1
精製線毛抗原 987P で免疫した BALB/c マウス脾細胞とマウス形質細胞腫細胞との細胞融合により得たハイブリドーマ 1BB6-3D6 が産出するマウスモノクローナル抗体で、希釈液 7 (付記 65) で適当に希釈したものを。

付記 26 標識抗体 2
ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG(H+L)抗体を 50%グリセリン溶液 (付記 66) で溶解し、更に希釈液 8 (付記 67) で希釈したものを。

付記 27 線毛抗原 F41 成分の参照品
次に掲げるものであって、動物医薬品検査所が適当と認めたもの。
(1) 大腸菌 NADC1471 株培養液から精製した線毛抗原 F41 成分で、ペプトン-トレハロースで希釈し、1 回使用分に分注して凍結乾燥したものを。
(2) 本製剤の製造方法に従って製造・小分けし、凍結保存したものを。

付記 28 抗体固相化プレート 4
希釈液 5 で適当な濃度に希釈した抗大腸菌抗原 F41 兎ポリクローナル抗体 (付記 68) を 96 穴プレートに分注し、反応させた後、希釈・洗浄液 2 で洗浄したものを。

付記 29 抗大腸菌線毛抗原 F41 マウスモノクローナル抗体 1
精製線毛抗原 F41 で免疫した BALB/c マウス脾細胞とマウス形質細胞腫細胞との細胞融合により得たハイブリドーマ SDSU56/85 が産出するマウスモノクローナル抗体で、希釈液 7 で適当に希釈したものを。

付記 30 水酸化ナトリウム溶液

1,000mL 中

水酸化ナトリウム

30.0 g

水

残量

付記 31 硫酸アンモニウム溶液

1,000mL 中

硫酸アンモニウム

132.0 g

水

残 量

付記 32 水酸化アルミニウムゲル

硫酸アルミニウム 18 水和物 33.3g を精製水 50mL に溶解し、これに 1.0mol/L 水酸化ナトリウム 300mL を加え攪はんする。精製水で沈殿物を洗浄し、この沈殿物に適量の精製水を加え、ブレンダーで碎細する。水酸化アルミニウム含量が 2.0w/v % となるように精製水で濃度を調整し、最終濃度が 0.15mol/L となるように塩化ナトリウム水溶液を加え、121 °C で 15 分間高圧滅菌する。これを希釈・洗浄液 1 で水酸化アルミニウム含量が 0.35w/v% となるように濃度を調整したもの。

付記 33 線毛抗原 K88 参照陽性血清 1

精製線毛抗原 K88 (付記 69) で免疫したモルモットの血清であって、酵素抗体反応で 2,048 ~ 4,096 倍の抗体価を示すように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 34 希釈液 3

1,000mL 中

牛血清アルブミン

1.0 g

希釈・洗浄液 2

残 量

付記 35 線毛抗原 K88 参照陽性血清 2

精製線毛抗原 K88 で免疫したモルモットの血清であって、精製線毛抗原 K88 を固相化抗原としたものに対する酵素抗体反応における吸光度値が、1,024 倍希釈で 0.9 ~ 1.1 となるように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 36 抗原吸着プレート 1

希釈液 5 で 0.5 μ g/mL に希釈した抗大腸菌線毛抗原 K88 マウスモノクローナル抗体 2 (付記 70) 100 μ L ずつを 96 穴プレートの各穴に加えて反応させ、希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、精製線毛抗原 K88 を希釈・洗浄液 2 で希釈したものを各穴に 100 μ L ずつ加え、37 °C で 1 時間反応させたもの。

なお、精製線毛抗原 K88 の至適濃度は、線毛抗原 K88 参照陽性血清 2 を 1,024 倍に希釈したものをを用いて反応させた場合の吸光度が 0.9 ~ 1.1 となる濃度とする。

付記 37 ペルオキシダーゼ標識 2 次抗体液 1

ペルオキシダーゼ標識山羊抗モルモット IgG(H+L) を希釈液 3 で希釈したもの。

付記 38 線毛抗原 K99 参照陽性血清 1

精製線毛抗原 K99 (付記 71) で免疫したモルモットの血清であって、酵素抗体反応で 32 ~ 64 倍の抗体価を示すように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 39 線毛抗原 K99 参照陽性血清 2

精製線毛抗原 K99 で免疫したモルモットの血清であって、精製線毛抗原 K99 を固相化抗原としたものに対する酵素抗体反応における吸光度値が、512 倍希釈で 0.9 ~ 1.1 となるように濃度を調

整し、凍結乾燥したもの。

付記 40 抗原吸着プレート 2

希釈液 5 で $1 \mu\text{g/mL}$ に希釈した抗大腸菌線毛抗原 K99 マウスモノクローナル抗体 2 (付記 72) $100 \mu\text{L}$ ずつを 96 穴プレートの各穴に加えて反応させ、希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、精製線毛抗原 K99 を希釈・洗浄液 2 で希釈し、プレートに $100 \mu\text{L}$ ずつ加え、 37°C で 1 時間反応させたもの。

なお、至適の精製線毛抗原 K99 濃度は、線毛抗原 K99 参照陽性血清 2 を 512 倍に希釈したものをを用いて反応させた場合の吸光度が $0.9 \sim 1.1$ となる濃度とする。

付記 41 線毛抗原 987P 参照陽性血清 1

精製線毛抗原 987P (付記 73) で免疫したモルモットの血清であって、酵素抗体反応で $8 \sim 16$ 倍の抗体価を示すように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 42 線毛抗原 987P 参照陽性血清 2

精製線毛抗原 987P で免疫したモルモットの血清であって、精製線毛抗原 987P を固相化抗原としたものに対する酵素抗体反応における吸光度値が、128 倍希釈で $0.9 \sim 1.1$ となるように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 43 抗原吸着プレート 3

希釈液 5 で $1 \mu\text{g/mL}$ に希釈した抗大腸菌線毛抗原 987P マウスモノクローナル抗体 2 (付記 74) $100 \mu\text{L}$ ずつを 96 穴プレートの各穴に加えて反応させ、希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、精製線毛抗原 987P を洗浄液 2 で希釈し、プレートに $100 \mu\text{L}$ ずつ加え、 37°C で 1 時間反応させたもの。

なお、至適の精製線毛抗原 987P 濃度は、線毛抗原 987P 参照陽性血清 2 を 128 倍に希釈したものをを用いて反応させた場合の吸光度が $0.9 \sim 1.1$ となる濃度とする。

付記 44 線毛抗原 F41 参照陽性血清 1

精製線毛抗原 F41 (付記 75) で免疫したモルモットの血清であって、酵素抗体反応で $256 \sim 512$ 倍の抗体価を示すように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 45 線毛抗原 F41 参照陽性血清 2

精製線毛抗原 F41 で免疫したモルモットの血清であって、精製線毛抗原 F41 を固相化抗原としたものに対する酵素抗体反応における吸光度値が、512 倍希釈で $0.9 \sim 1.1$ となるように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 46 抗原吸着プレート 4

希釈液 5 で $1 \mu\text{g/mL}$ に希釈した抗大腸菌線毛抗原 F41 マウスモノクローナル抗体 2 (付記 76) $100 \mu\text{L}$ ずつを 96 穴プレートの各穴に加えて反応させ、希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、精製線毛抗原 987P を洗浄液 2 で希釈し、プレートに $100 \mu\text{L}$ ずつ加え、 37°C で 1 時間反応させたもの。

なお、至適の精製線毛抗原 F41 濃度は、線毛抗原 F41 参照陽性血清 2 を 512 倍に希釈したものをを用いて反応させた場合の吸光度が $0.9 \sim 1.1$ となる濃度とする。

付記 47 LT_B 参照陽性血清 1

精製大腸菌 LT_B (付記 77) で免疫したマウスの血清であって、酵素抗体反応で $256 \sim 512$ 倍の抗体価を示すように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 48 希釈液 4
100mL 中
カゼイン 1.0 g
希釈・洗浄液 2 残 量

付記 49 LT_B 参照陽性血清 2
精製大腸菌 LT_B で免疫したマウスの血清であって、精製大腸菌 LT_B を固相化抗原としたものに対する酵素抗体反応における吸光度値が、512 倍希釈で 0.9 ~ 1.1 となるように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 50 抗原吸着プレート 5
希釈・洗浄液 1 で希釈したガングリオシド (付記 78) 100 μ L ずつを 96 穴プレートの各穴に加え、希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、精製大腸菌 LT_B を希釈・洗浄液 1 で希釈し、プレートに 50 μ L ずつに加え、37 °C で 1 時間反応させたもの。
なお、至適の精製 LT_B 濃度は、LT_B 参照陽性血清 2 を 512 倍に希釈したものを用いて反応させた場合の吸光度が 0.9 ~ 1.1 となる濃度とする。

付記 51 ペルオキシダーゼ標識 2 次抗体液 2
ペルオキシダーゼ標識山羊抗マウス IgG(H+L) を希釈液 4 で希釈したもの。

付記 52 バクト-ペプトン液
1,000mL 中
バクト-ペプトン 10 g
塩化ナトリウム 2.5 g
水 残 量
溶解後、pH を 7.2 に調整し、121 °C で 25 分間滅菌する。

付記 53 10L₀ 量
10 IAU の標準抗毒素と混合してマウスに注射したとき、死亡させない毒素の最大量

付記 54 クロストリジウム・パーフリンゲンス C 型 β 毒素液
クロストリジウム・パーフリンゲンス C 型 NL-1003 株又はこれと同等の β 毒素を産生する株の培養上清をろ過滅菌し、滅菌グリセロールを最終濃度 10vol % となるように添加したもの。

付記 55 10L₊ 量
10 国際抗毒素単位の標準抗毒素と混合してマウスに注射したとき、80 % 以上を死亡させる毒素の最小量

付記 56 IAU (International Antitoxin Units)
クロストリジウム・パーフリンゲンス β 毒素トキソイドに対する抗毒素の国際単位

付記 57 標準抗毒素
動物医薬品検査所が適当と認めた標準抗毒素又はこれと比較して標準化された抗毒素

- 付記 58 ブロッキング液
1,000mL 中
牛血清アルブミン 10.0 g
希釈・洗浄液 1 残 量
200nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。
- 付記 59 リン酸ナトリウム緩衝液
1,000mL 中
リン酸二水素ナトリウム一水和物 10.76 g
無水リン酸水素二ナトリウム 17.37 g
水 残 量
pH を 7.0 に調整する。
- 付記 60 希釈液 5
1,000mL 中
無水炭酸ナトリウム 1.59 g
炭酸水素ナトリウム 2.93 g
水 残 量
pH を 9.6 に調整する。
- 付記 61 抗大腸菌線毛抗原 K88 マウスモノクローナル抗体 1
K88ac、ab 及び ad の 3 種類の線毛抗原で免疫したマウス脾細胞とマウス形質細胞腫細胞との細胞融合により得たハイブリドーマ 21BA1-1H1 が産出するマウスモノクローナル抗体
- 付記 62 希釈液 6
1,000mL 中
オボアルブミン 10.0 g
希釈・洗浄液 2 残 量
200nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。
- 付記 63 抗大腸菌線毛抗原 K99 マウスモノクローナル抗体 1
線毛抗原 K99 で免疫した BALB/c マウス脾細胞とマウス形質細胞腫細胞との細胞融合により得たハイブリドーマ 2BD4E4 が産出するマウスモノクローナル抗体
- 付記 64 抗大腸菌線毛抗原 987P 兎ポリクローナル抗体
987P を産生する大腸菌 987 株のホルマリン不活化菌体と生菌を用いて免疫した後、採取した血清を線毛抗原非産生性の NADA138 株で吸収を行ったもの。
- 付記 65 希釈液 7
1,000mL 中
牛血清アルブミン 20.0 g
希釈・洗浄液 2 残 量
200nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。
- 付記 66 50%グリセリン溶液

滅菌精製水とグリセリンを等量混合したもの。

付記 67 希釈液 8

兔血清 1 mL 当たり 100mL の希釈・洗浄液 2 を混合したもの。

付記 68 抗大腸菌線毛抗原 F41 兔ポリクローナル抗体

F41 を産生する大腸菌 1839 株のホルマリン不活化菌体と生菌を用いて免疫した後、採取した血清を線毛抗原非産生性の 1839 株で吸収したもの。

付記 69 精製線毛抗原 K88

線毛抗原 K88 を保有する大腸菌培養液を遠心集菌し、2 mol/L 尿素加リン酸緩衝液（付記 79）に懸濁した後、加熱抽出し、硫酸アンモニウムを加えて沈殿を生成させた後、陰イオン交換クロマトカラムで精製したもので、SDS ポリアクリルアミド電気泳動及びウェスタンブロッティング後、線毛抗原 K88 を保有する大腸菌抽出物で免疫した兔血清を用いて免疫染色を行うとき、約 29kDa の位置に単一のバンドを検出する。

付記 70 抗大腸菌線毛抗原 K88 マウスモノクローナル抗体 2

大腸菌線毛抗原 K88 に対するマウスモノクローナル抗体で、線毛抗原 K88 を有する大腸菌抽出物を用いてイムノブロッティングを行う場合、約 29kDa の位置に単一のバンドを認めるもの。

付記 71 精製線毛抗原 K99

線毛抗原 K99 を保有する大腸菌培養液を遠心集菌し、2 mol/L 尿素加リン酸緩衝液に懸濁した後、加熱抽出し、硫酸アンモニウムを加えて沈殿を生成させた後、陰イオン交換クロマトカラムで精製したもので、SDS ポリアクリルアミド電気泳動及びウェスタンブロッティング後、線毛抗原 K99 を保有する大腸菌抽出物で免疫した兔血清を用いて免疫染色を行うとき、約 19kDa の位置に単一のバンドを検出する。

付記 72 抗大腸菌線毛抗原 K99 マウスモノクローナル抗体 2

大腸菌線毛抗原 K99 に対するマウスモノクローナル抗体で、線毛抗原 K99 を有する大腸菌抽出物を用いてイムノブロッティングを行う場合、約 19kDa の位置に単一のバンドを認めるもの。

付記 73 精製線毛抗原 987P

線毛抗原 987P を保有する大腸菌培養液を遠心集菌し、2 mol/L 尿素加リン酸緩衝液に懸濁した後、ホモジナイザーによる細胞破碎、超遠心及び陰イオン交換クロマトカラムで精製したもので、SDS ポリアクリルアミド電気泳動及びウェスタンブロッティング後、線毛抗原 987P を保有する大腸菌抽出物で免疫した兔血清を用いて免疫染色を行うとき、約 23 kDa の位置に単一のバンドを検出する。

付記 74 抗大腸菌線毛抗原 987P マウスモノクローナル抗体 2

大腸菌線毛抗原 987P に対するマウスモノクローナル抗体で、線毛抗原 987P を有する大腸菌抽出物を用いてイムノブロッティングを行う場合、約 23kDa の位置に単一のバンドを認めるもの。

付記 75 精製線毛抗原 F41

線毛抗原 F41 を保有する大腸菌培養液を遠心集菌し、2 mol/L 尿素加リン酸緩衝液に懸濁した後、ホモジナイザーによる細胞破碎、超遠心及び陰イオン交換クロマトカラムで精製したもので、

SDS ポリアクリルアミド電気泳動及びウェスタンブロッティング後、線毛抗原 F41 を保有する大腸菌抽出物で免疫した兔血清を用いて免疫染色を行うとき、約 30kDa の位置に単一のバンドを検出する。

付記 76 抗大腸菌線毛抗原 F41 マウスモノクローナル抗体 2

大腸菌線毛抗原 F41 に対するマウスモノクローナル抗体で、線毛抗原 F41 を有する大腸菌抽出物を用いてイムノブロッティングを行った場合、約 30kDa の位置に単一のバンドを認めるもの。

付記 77 精製大腸菌 LT_B

LT_B を保有する大腸菌培養液を遠心し、上清を濃縮、精製したもので、SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行うとき、約 10 kDa の位置に単一のバンドを認める。

付記 78 ガングリオシド

市販の GM ガングリオシドを希釈・洗浄液 1 で 50 μ g/mL の濃度に調整して使用する。

付記 79 2 mol/L 尿素加リン酸緩衝液

1,000mL 中

尿素

120 g

0.05mol/L リン酸緩衝液 (pH7.2) (付記 80)

残 量

付記 80 0.05mol/L リン酸緩衝液 (pH7.2)

0.2mol/L リン酸二水素ナトリウム約 35mL と 0.2mol/L リン酸水素二ナトリウム約 90mL を混合し、pH を 7.2 に調整し、この液 100mL に水を加え 400mL としたものの。

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）・猫クラミジア感染症混合ワクチン（シード）

令和3年3月9日(告示第360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、弱毒猫汎白血球減少症ウイルス及び弱毒猫クラミドフィラ・フェリスをそれぞれ培養細胞で増殖させて得たウイルス液及び菌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°C 以下又は凍結乾燥して 5°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°C 以下又は凍結乾燥して 5°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℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。
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℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

マスターシードウイルスについて、3.1.1.2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℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

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℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。
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℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

マスターシードウイルスについて、3.1.1.1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°C 以下又は凍結乾燥して 5°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°C 以下又は凍結乾燥して 5°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°C 以下又は凍結乾燥して 5°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°C 以下又は凍結乾燥して 5°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°C 以下又は凍結乾燥して 5°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。

2.1.5 クラミドフィラ・フェリス

2.1.5.1 名称

クラミドフィラ・フェリス905株又はこれと同等と認められた株

2.1.5.2 性状

猫に注射しても病原性を示さない。発育鶏卵及び犬腎継代細胞で増殖する。

2.1.5.3 マスターシード菌

2.1.5.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、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°C 以下又は凍結乾燥して 5°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させたものを犬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。

ワーキングシード菌は、凍結して -70°C 以下又は凍結乾燥して 5°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たものを犬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菌を保存する場合は、凍結して -70°C 以下又は凍結乾燥して 5°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菌を保存する場合について、3.1.6の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 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、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して -70°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°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°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、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して -70°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°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°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°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°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°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。

2.2.5 クラミドフィラ・フェリス

2.2.5.1 培養細胞

犬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。

2.2.5.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

2.2.5.3 マスターセルシード

2.2.5.3.1 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、2.2.5.2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°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。

2.2.5.4 ワーキングセルシード

2.2.5.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.5.2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°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。

2.2.5.5 プロダクションセルシード

2.2.5.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは2.2.5.2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°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。

2.3 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の原液とする。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。

2.3.5 クラミドフィラ・フェリス原液

2.3.5.1 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。クラミドフィラ・フェリス接種前の培養細胞に異常を認めてはならない。

2.3.5.2 菌の培養

プロダクションシード菌を2.3.5.1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3.4.2.4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、猫汎白血球減少症ウイルス原液及びクラミドフィラ・フェリス原液を混合し、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に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1.4.2.1.1.2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1.4.2.1.1.2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法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

3.1.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

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

3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

3.1.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

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

3.1.4 マスターシード菌の試験

3.1.4.1 同定試験

シードロット規格の 1.4.2.4.1.1 を準用して試験するとき、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。

3.1.4.3 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。

3.1.4.4 外来性ウイルス否定試験

3.1.4.4.1 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。

3.1.4.4.2 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。

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。

3.1.4.5 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。

3.1.4.6 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。

3.1.4.7 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。

3.1.5 ワーキングシード菌の試験

3.1.5.1 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.5.2 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。

3.1.6 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

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。

3.1.6.2 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、TCID₅₀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、TCID₅₀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、TCID₅₀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。

3.4.2.4 クラミドフィラ・フェリス含有量試験

3.4.2.4.1 試験材料

3.4.2.4.1.1 試料

検体を適当と認められた希釈液で階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.4.2.4.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1の発育鶏卵を用いる。

3.4.2.4.2 試験方法

試料を発育鶏卵に接種し、11日間培養する。

3.4.2.4.3 判定

鶏胚が死亡したものを感染とみなし、EID₅₀を算出する。ただし、接種後4日までに死亡した発育鶏卵は除外する。

検体のクラミジア含有量は、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 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、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OD₅₀を算出し、OD₅₀を示す検体の希釈倍数を抗原量としてELISA単位（log₁₀）で表す。

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

OD_{max}：参照品の最大ODの平均

OD_{min}：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OD₅₀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、2.9log₁₀ELISA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。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、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^{4.9}TCID₅₀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、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、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、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^{7.2}TCID₅₀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。

3.5.5.4 クラミドフィラ・フェリス含有量試験

3.5.5.4.1 試料

溶解ワクチンを生理食塩水で階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.5.5.4.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した発育鶏卵を用いる。

3.5.5.4.3 試験方法

試料0.2mLずつをそれぞれ10個の発育鶏卵の卵黄嚢内に接種し、37℃で11日間培養し、観察

する。

ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.5.5.4.4 判定

鶏胚が死亡したものを感染とみなし、 EID_{50} を算出する。ただし、4日目までに死亡した発育鶏卵は除外する。

試験品のクラミジア含有量は、1頭分当たり $10^{3.0}EID_{50}$ 以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、そのクラミジア含有量とする。

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、 $37^{\circ}C$ 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、 $37^{\circ}C$ 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°C5%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1vol%添加したもの。