

(別紙1)

○農林水産省告示第九百十三号

薬事法（昭和三十五年法律第百四十五号）第八十三条第一項の規定により読み替えて適用される同法第四十二条第一項の規定に基づき、動物用生物学的製剤基準（平成十四年十月三日農林水産省告示第千五百六十七号）の一部を次のように改正し、公布の日から施行する。

平成二十年六月六日

農林水産大臣臨時代理

国務大臣 冬柴 鐵三

（「次のよう」は、省略し、その関係書類を農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課及び都道府県庁に備え置いて縦覧に供する。）

ワクチンの部豚パルボウイルス感染症不活化ワクチンの次に次のように加える。

豚繁殖・呼吸障害症候群生ワクチン

1 定義

弱毒豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスを培養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

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス JJ1882 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

MA-104 細胞では CPE を伴って増殖し、感染価は $10^{6.0}$ TCID₅₀/mL 以上に達する。

2.1.3 繼代及び保存

原株及び原種ウイルスは、MA-104 細胞又は適当と認められた細胞で継代する。

原株の継代は、原種ウイルスの製造又は原株の恒久的な維持以外の目的で行ってはならない。原種ウイルスは、直接原株から連続した工程により製造し、その継代数は 4 代以内でなければならない。

原株及び原種ウイルスは、凍結して-60 °C 以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 培養細胞

MA-104 細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.3 原液

2.3.1 細胞の培養

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

個体別培養細胞について、3.1 の試験を行う。

2.3.2 ウィルスの培養

原種ウイルスを培養細胞で培養し、適当と認められた時期に個体別培養細胞ごとに採取した培養液を原液とする。

原液について、3.2 の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液に適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、3.3 の試験を行う。

3 試験法

3.1 培養細胞の試験

個体別培養細胞の 1 % 以上を対照培養細胞とし、これについて次の試験を行う。

3.1.1 培養観察

対照培養細胞を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で培養する。

対照培養細胞を 4 本以上の培養びんに継代し、7 日間培養し、観察するとき、CPE を認めてはならない。

3.1.2 赤血球吸着試験

3.1.1 の試験最終日に培養びんの培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を 2 回洗浄後、3 群に分け、それぞれ 0.1vol % のモルモット、がちょう及び 7 日齢以内の鶏の赤血球浮遊液を重層し、60 分間静置後、赤血球吸着の有無を観察するとき、培養細胞に赤血球吸着を認めてはならない。

3.2 原液の試験

3.2.1 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。

3.2.2 ウィルス含有量試験

3.2.2.1 試験材料

3.2.2.1.1 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。

3.2.2.1.2 細胞

MA-104細胞又は適当と認められた培養細胞を96穴プレートに培養し、単層となつたものを用いる。

3.2.2.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ6穴以上の培養細胞に接種し、37℃で8日間培養し観察する。

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、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1mL中10^{6.0}TCID₅₀以上でなければならない。

3.3 小分製品の試験

3.3.1 特性試験

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

3.3.2 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。

3.3.3 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。

3.3.4 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。

3.3.5 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。

3.3.6 迷入ウイルス否定試験

一般試験法の迷入ウイルス否定試験法1.1、2.3.1及び2.3.2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、中和用血清は、抗豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス血清（付記2）を非効化したもの要用いる。

3.3.7 ウイルス含有量試験

3.2.2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^{6.0}～10^{6.7}TCID₅₀の範囲内でなければならない。

3.3.8 安全試験

3.3.8.1 試験材料

3.3.8.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.3.8.1.2 試験動物

3～4週齢の豚を用いる。

3.3.8.2 試験方法

注射材料1頭分ずつを2頭の試験動物の頸部筋肉内に注射し、21日間観察する。

3.3.8.3 判定

観察期間中、異常を認めてはならない。

3.3.9 力価試験

3.3.9.1 試験材料

3.3.9.1.1 試験動物

3.3.8の試験に用いた動物を用いる。

3.3.9.1.2 感染細胞

MA-104細胞を8チャンバースライドに37℃で培養し、単層を形成させたものに豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスJJ1882株を1チャンバー当たり10^{3.5}TCID₅₀以上接種する。37℃で1～2日間培養した後、生理食塩液及び蒸留水で洗浄し、乾燥する。その後、冷アセトン・エタノール（1：1）液で固定後乾燥させたものを感染細胞とし、8℃以下で密封保存する。

3.3.9.2 試験方法

3.3.8の試験終了後7日目に得られた各個体の血清について、蛍光抗体法を行う。

被検血清を生理食塩液で20倍希釈した後、更に2倍階段希釈する。感染細胞に各希釈液を加え、37℃で60分間処理した後、生理食塩液で洗浄し、抗豚IgG蛍光標識抗体（付記3）を加え、37℃

で 60 分間処理した後、生理食塩液で洗浄し、UV 効起方式で観察する。

3.3.9.3 判定

特異蛍光が認められた血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験動物の抗体価は、40 倍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、2 年間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合は、その期間とする。

付記 1 ウィルス増殖用培養液

1,000mL 中

牛胎子血清

20 ~ 50 mL

イーグル MEM

残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 6.8 ~ 7.0 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてよい。

付記 2 抗豚繁殖・呼吸障害症候群ウィルス血清

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス VR-2332 株又はこれと同等と認められた株で免疫した豚

の血清で、検体又は試験品のウイルスを完全に中和する力値を有するもの

ただし、免疫に用いる豚は、適当と認められた規格の豚を用いる。

付記 3 抗豚 IgG 蛍光標識抗体

抗豚 IgG 血清から ッグロブリンを調製し、これを蛍光色素で標識したもの

ワクチンの部トリニューモウイルス感染症生ワクチンの次に次のように加える。

トリニューモウイルス感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチン

1 定義

弱毒七面鳥鼻気管炎ウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化し、油性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 名称

弱毒七面鳥鼻気管炎ウイルス BUT1 # 8544 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

鶏胚初代細胞、鶏腎初代細胞又は Vero 細胞に接種すると、CPE を伴って増殖する。6～12 日齢の発育鶏卵の卵黄囊内及び尿膜腔内に接種しても、鶏胚に異常を示さない。

2.1.3 繼代及び保存

原株及び種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞で継代する。

継代は、原株では 3 代以内、種ウイルスでは 2 代以内でなければならない。

原株及び原種ウイルスは、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。

2.2 製造用材料

2.2.1 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.3 原液

2.3.1 細胞の培養

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

個体別培養細胞について、3.1 の試験を行う。

2.3.2 ウィルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個体別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液及び超音波処理した感染細胞の遠心上清を混合し、ウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2 の試験を行う。

2.3.3 不活化

ウイルス浮遊液に β -プロピオラクトンを加えて不活化し、不活化ウイルス浮遊液とする。この不活化浮遊液を原液としてもよい。

不活化ウイルス浮遊液について、3.3 の試験を行う。

2.3.4 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。

ただし、最終バルクの調製時にアジュバントを添加してもよい。

原液について 3.4 の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液を混合し、濃度調整し、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 培養細胞の試験

個体別培養細胞の 1 %以上を対照培養細胞とし、これについて次の試験を行う。

3.1.1 培養観察

対照培養細胞を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で培養し、観察するとき、CPE を認めてはならない。

3.1.2 鶏赤血球凝集試験

3.1.1 の試験最終日に培養液を採取し、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。

3.2 ウイルス浮遊液の試験

3.2.1 ウイルス含有量試験

3.2.1.1 試験材料

3.2.1.1.1 試料

検体を細胞増殖用培養液（付記 1）で調製した鶏胚初代細胞浮遊液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.1.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞を用いる。

3.2.1.2 試験方法

試料 200 μ L ずつを、それぞれ 96 穴組織培養用プレートの 5 穴以上に接種し、37 °C で 5 ~ 7 日間培養し、観察する。

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、TCID₅₀ を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{6.5} TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.3 不活化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 抗原含有量試験

3.3.2.1 試験材料

3.3.2.1.1 試料

検体を洗浄用緩衝液（付記 2）で 2 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.2.2 試験方法

七面鳥鼻気管炎ウイルスを認識するモノクローナル抗体を固相化した ELISA プレートに各試料及び陰性対照を 50 μ L ずつ添加し、37 °C で 45 分間反応させる。反応終了後洗浄用緩衝液で 3 回洗浄した後、七面鳥鼻気管炎ウイルス抗体陽性鶏血清を 50 μ L ずつ添加し、37 °C で 30 分間反応させる。反応終了後洗浄用緩衝液で 3 回洗浄した後、山羊抗鶏 IgG ペルオキシダーゼ標識抗体を 50 μ L ずつ添加し、37 °C で 30 分間反応させる。反応終了後洗浄用緩衝液で 3 回洗浄した後、基質液（付記 3）を 50 μ L ずつ添加し、室温で 10 分間反応させる。反応終了後、反応停止液（付記 4）を 25 μ L ずつ加えて、反応を停止させる。

3.3.2.3 判定

波長 450 nm で吸光度値を測定する。陰性対照より 2 倍以上の吸光度値を示す最終希釈倍数を相対抗原量とする。

検体の抗原量は、250 EU/mL 以上でなければならない。

3.3.3 不活化試験

3.3.3.1 試験材料

3.3.3.1.1 試料

検体を試料とする。

3.3.3.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞を用いる。

3.3.3.2 試験方法

試料の全量を 1 mL につき 20 cm² 以上の培養細胞に接種し、37 °Cで 5 日間培養した後、その培養上清を 0.1mL 採取し、更に継代し、5 日間培養して観察する。

3.3.3.3 判定

培養細胞に CPE を認めない場合、活性ウイルス陰性とする。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

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。

3.5 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、固有の色調を有する均質な懸濁液でなければならず、異物又は異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.5.2 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。

3.5.3 安全試験

3.5.3.1 試験材料

3.5.3.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.3.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 4 遅齢の鶏を用いる。

3.5.3.2 試験方法

試験動物 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頸部皮下に注射し、対照群とともに 4 週間観察する。

3.5.3.3 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。

3.5.4 力価試験

3.5.4.1 試験材料

3.5.4.1.1 試験動物

3.5.3 の試験に用いた動物を用いる。

3.5.4.2 試験方法

3.5.3 の試験終了日に試験群及び対照群から採取した血清について、ELISA 抗体価を測定する。

固相化緩衝液（付記 5）で濃度調整した七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原（付記 6）を 96 穴平底マイクロプレートに 100 μ L ずつ分注し、37 °Cで 3 時間反応後、洗浄用緩衝液で 2 回洗浄し、乾燥させる。次に被検血清を IB・EIA 緩衝液（付記 7）で 2 倍階段希釈し、固相化プレートに各希釈血清を 100 μ L ずつ加え、37 °Cで 30 分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で 2 回洗浄し、水切りを行った後、山羊抗鶏 IgG ペルオキシダーゼ標識抗体（付記 8）を 100 μ L ずつ加え、37 °Cで 30 分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で 2 回洗浄し、水切りを行った後、基質液を 100 μ L ずつ加え、室温で 8 分間反応させる。反応終了後、反応停止液を 50 μ L ずつ加えて、反応を停止させ、波長 450 nm で吸光度値を測定する。

3.5.4.3 判定

参照陰性血清（付記9）の平均吸光度値の少なくとも1.5倍の吸光度値を示す血清の希釈倍数をELISA抗体値とするとき、試験群の80%以上がELISA抗体値 $2^{9.64}$ 倍以上を示さなければならない。この場合、対照群はすべて $2^{4.64}$ 倍未満でなければならない。また、参照陽性血清（付記10）は、 $2^{6.64}$ 倍以上の抗体値を示さなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は3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は、その期間とする。

5 その他

5.1 添付文書等記載事項

1 肉用鶏には使用しない旨

2 採卵鶏又は種鶏を廃鶏として食鳥処理場へ出荷する前の所定の期間は使用しない旨

付記1 細胞増殖用培養液

1,000mL 中	
トリプトース・ホスフェイト・プロス	0.83 g
トリプトース	1.00 g
ラクトアルブミン水解物	1.25 g
炭酸水素ナトリウム	2.45 g
牛血清	50 mL
イーグル MEM	残 量

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記2 洗浄用緩衝液

1,000 mL 中	
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	2.9 g
リン酸二水素カリウム	0.2 g
塩化ナトリウム	37.2 g
塩化カリウム	0.2 g
ポリソルベート 20	1.5 g
水	残 量

pH を 6.9 ~ 7.1 に調整する。

付記3 基質液

TMB 溶液	0.2 mL
UP 緩衝液	1.5 mL
水	15 mL

TMB 溶液は、DMSO 1,000 mL に TMB (3,3',5,5' テトラメチルベンゼン) を 6 g 溶かしたもの

UP 緩衝液は、尿素過酸化物 140 mg を TMB 緩衝液 (酢酸ナトリウム 136 g を約 500 mL の水に溶かし、1.5 mol/L クエン酸で pH 5.3 ~ 5.7 に調整した後、水を加えて 1,000 mL とし、121 °C で 20 分間高圧滅菌したもの) 100mL に溶かしたもの

付記4 反応停止液

硫酸	110 mL
----	--------

水 1000 mL

付記5 固相化緩衝液

1,000mL 中	
リン酸二水素ナトリウム二水和物	1.43 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	12.10 g
塩化ナトリウム	8.5 g
水	残量

pH を 6.9 ~ 7.1 に調整する。

付記6 七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原

製造用株を生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞に接種し、38 °Cで培養する。CPE が出現したときに培養上清を採取し、感染細胞は少量の培養液でかきとり、超音波破碎を行う。感染細胞の超音波破碎後遠心 (3,000G、10 分) し、その遠心上清と製造用株培養上清をプールする。次に 30,000G、1 時間遠心し、沈渣を少量の滅菌水に再浮遊する。再浮遊したものを作成密度勾配遠心 (53,000G、1 時間) した後、上層を採取し、これを ELISA 抗原とする。参考陽性血清の 100 倍希釀液の吸光度値を測定するとき 0.8 以上、及び参考陰性血清では 0.2 以下を示すように調整する。

付記7 IB・EIA 緩衝液

1,000 mL 中	
リン酸二水素ナトリウム二水和物	2.31 g
リン酸水素二ナトリウム二水和物	24.06 g
塩化ナトリウム	29.22 g
カオリン処理 30 w/v % 牛血清アルブミン	3.3 mL
ポリソルベート 20	0.50 g
水	残量

200nm でろ過滅菌後、スキムミルク 2 w/v % 及び牛胎子血清 5 vol % を加える。

付記8 山羊抗鶏 IgG ペルオキシダーゼ標識抗体

参考陽性血清が規定の抗体価を示すように IB・EIA 緩衝液で調整したもの

付記9 参照陰性血清

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏血清で、ELISA 抗体価 2^{64} 倍未満を示すもの

付記10 参照陽性血清

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏を弱毒七面鳥鼻気管炎ウイルス BUT 1 # 8544 株の生ウイルスで免疫して得た血清で、ELISA 抗体価 $2^{5.64} \sim 2^{9.64}$ 倍を示すもの

ワクチンの部鶏脳脊髄炎生ワクチンの次に次のように加える。

鶏貧血ウイルス感染症生ワクチン

1 定義

弱毒鶏貧血ウイルスを発育鶏卵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

弱毒鶏貧血ウイルス 26P4 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

MDCC-MSB1 細胞で CPE を伴って増殖する。

2.1.3 繙代及び保存

原株及び原種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の発育鶏卵で継代する。

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

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

種ウイルスは、原種ウイルスから 2 代以内に製造しなければならない。

原株及び原種ウイルスは、凍結して -70 ℃ 又は凍結乾燥して 5 ℃ 以下で保存する。

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.2 製造用材料

2.2.1 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の 2 日齢のものを用いる。

2.3 原液

2.3.1 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、3.1 の試験を行う。

2.3.2 ウィルスの培養

種ウイルスを発育鶏卵の卵黄嚢内に接種し、ウイルスの増殖極期の感染鶏胚を採取して乳剤とし、原液とする。原液に適當と認められた必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

原液について、3.2 の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液を混合し、適當と認められた安定剤を加えて調製し、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、3.3 の試験を行う。

3 試験法

3.1 発育鶏卵の試験

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

3.1.1 培養観察

対照発育鶏卵を、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、鶏胚に異常を認めてはならない。

3.1.2 鶏赤血球凝集試験

3.1.1 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。

3.2 原液の試験

3.2.1 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。

3.2.2 ウイルス含有量試験

3.2.2.1 試験材料

3.2.2.1.1 試料

検体を細胞増殖用培養液（付記1）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.2.1.2 培養細胞

MDCC-MSB1 細胞浮遊液を用いる。

3.2.2.2 試験方法

細胞増殖用培養液で 4×10^5 個/ mL に調整した細胞浮遊液を96穴組織培養用プレートに $100 \mu\text{L}$ 分注後、試料 $100 \mu\text{L}$ ずつをそれぞれ5穴に加え、 39°C 5 vol % 炭酸ガス下で培養する。培養開始後2日目に細胞培養液 $20 \mu\text{L}$ を採取し、細胞増殖用培養液 $180 \mu\text{L}$ ずつを小分けした96穴組織培養用プレートに移して培養する。この継代を6回繰り返し、7代目継代後2日目に細胞を観察する。

3.2.2.3 判定

対照細胞は涙滴状ないし橢円形を示して増殖し、その培養液は黄色を呈しているとき、細胞が消失又は激減し、破片状を示すCPEを認めたものを感染とみなし、 TCID_{50} を算出する。

検体のウイルス含有量は、 1 mL 中 $10^{62} \text{ TCID}_{50}$ 以上でなければならない。

3.3 小分製品の試験

3.3.1 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均質な懸濁液でなければならず、異物又は異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.3.2 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。

3.3.3 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。

3.3.4 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。

3.3.5 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。

3.3.6 迷入ウイルス否定試験

一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1、2.1.1、2.1.2、2.2.1 及び 2.2.2 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、中和用血清は、抗鶏貧血ウイルス血清（付記2）を非効化したもの要用いる。

3.3.7 ウイルス含有量試験

3.2.2 を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、 $1 \text{ 羽分当たり } 10^{3.0} \text{ TCID}_{50}$ 以上でなければならない。

3.3.8 安全試験

3.3.8.1 試験材料

3.3.8.1.1 注射材料

試験品を溶解用液を用いてウイルスが 0.2 mL 当たり 10 羽分 含まれるように調整し、注射材料とする。

3.3.8.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 4 ~ 5 週齢の鶏を用いる。

3.3.8.2 試験方法

試験動物 10 羽を試験群、5 羽を対照群とする。

注射材料 0.2 mL ずつを試験群の胸部筋肉内に注射し、対照群とともに 3 週間観察する。

試験開始時及び試験終了時に体重を測定する。

3.3.8.3 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。

3.3.9 力価試験

3.3.9.1 試験材料

3.3.9.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.3.9.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 4 ~ 5 週齢の鶏を用いる。

3.3.9.1.3 中和試験用ウイルス

MDCC-MSB1 細胞で増殖させた鶏貧血ウイルス 26P4 株を用いる。

3.3.9.1.4 培養細胞

MDCC-MSB1 細胞浮遊液を用いる。

3.3.9.2 試験方法

試験動物 10 羽を試験群、3 羽を対照群とする。

注射材料 0.2 mL を試験群の胸部筋肉内に注射し、対照群とともに 3 週間観察する。

試験終了時、試験群及び対照群から得られた各個体の血清について血清希釈法により中和試験を行う。

血清を非凍化し、細胞増殖用培養液で 2 倍階段希釈する。各希釈血清と 100 μ L 中に約 200 TCID₅₀ を含む中和試験用ウイルス液とを等量混合し、4 °C で 18 ~ 24 時間処理する。各混合液 20 μ L ずつをそれぞれ 96 穴組織培養用プレートの 4 穴に分注する。これに細胞増殖用培養液で 2×10^5 個 / mL に調整した細胞浮遊液 180 μ L ずつを加えて 39 °C 5 vol % 炭酸ガス下で培養する。培養開始後 2 日目に培養液 20 μ L を採取し、細胞増殖用培養液 180 μ L を小分けした 96 穴組織培養用プレートに加え、継代し、培養する。この継代を 6 回繰り返し、7 代目継代後 2 日目に細胞を観察する。

3.3.9.3 判定

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

試験群の 80 % 以上が中和抗体価 256 倍以上でなければならない。この場合、対照群はすべて 16 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 4 年間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合は、その期間とする。

付記 1 細胞増殖用培養液

1,000 mL 中

牛胎子血清

100 mL

RPMI-1640

残 量

炭酸水素ナトリウムで pH7.8 ~ 8.2 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 抗鶏貧血ウイルス血清

製造用株で免疫した生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏の血清で、試験品中のウイルス

を完全に中和する力値を有するもの

ワクチンの部ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎2価混合（油性アジュvant加）不活化ワクチンの次に次のように加える。

マレック病（マレック病ウイルス2型・七面鳥ヘルペスウイルス）・鶏痘混合生ワクチン

1 定義

弱毒マレック病ウイルス（2型）及び七面鳥ヘルペスウイルスをそれぞれ培養細胞で増殖させて得た感染細胞浮遊液を混合し、凍結したマレック病2価ワクチンと弱毒鶏痘ウイルスを発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液を凍結乾燥した鶏痘ワクチンを組み合わせたものである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 マレック病ウイルス2型株

2.1.1.1 名称

弱毒マレック病ウイルス SB-1 株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

1日齢の鶏の皮下、筋肉内又は腹腔内に注射しても病原性を示さない。鶏胚初代細胞に接種すると CPE を伴って増殖する。

2.1.1.3 繼代及び保存

原株及び原種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞又は適当と認められた細胞で継代する。

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

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

種ウイルスは、原種ウイルスから2代以内に製造しなければならない。

原株及び原種ウイルスは、凍結して-100°C以下又は凍結乾燥して5°C以下で保存する。

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.2 七面鳥ヘルペスウイルス株

2.1.2.1 名称

七面鳥ヘルペスウイルス FC126 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

1日齢の鶏の皮下、筋肉内又は腹腔内に注射しても病原性を示さない。鶏、うずら又はあひるの発育卵の胚初代細胞に接種すると CPE を伴って増殖する。

2.1.2.3 繼代及び保存

原株及び原種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞、2.3.1 のうずら胚初代細胞、2.4.1 のあひる胚初代細胞又は適当と認められた細胞で継代する。

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

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

種ウイルスは、原種ウイルスから2代以内に製造しなければならない。

原株及び原種ウイルスは、凍結して-100°C以下又は凍結乾燥して5°C以下で保存する。

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.3 鶏痘ウイルス株

2.1.3.1 名称

弱毒鶏痘ウイルスボーデット株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

鶏の翼膜に穿刺又は外股部の毛のうに擦入すると、5～7日で善感発痘する。

12日齢発育鶏卵の漿尿膜上に接種すると増殖し、特徴的なポックを形成する。

2.1.3.3 繼代及び保存

原株及び原種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の発育鶏卵で継代する。

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

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

種ウイルスは、原種ウイルスから2代以内に製造しなければならない。

原株及び原種ウイルスは、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.2 製造用材料

2.2.1 マレック病ウイルス 2型

2.2.1.1 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞又は製造に適当と認められた細胞を用いる。

個体別培養細胞について、3.1.1 の試験を行う。

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。

原液について、3.2.1 の試験を行う。

2.2.2 七面鳥ヘルペスウイルス

2.2.2.1 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞又は製造に適当と認められた細胞を用いる。

2.2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.3 鶏痘ウイルス

2.2.3.1 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の9～13日齢のものを用いる。

2.3 原液

2.3.1 マレック病ウイルス 2型原液

2.3.1.1 細胞の培養

1回に処理し、培養した細胞を個体別培養細胞とみなす。その際、ウイルス接種前の培養細胞に異常を認めてはならない。

個体別培養細胞について、3.1.1 の試験を行う。

2.3.1.2 ウィルスの培養

種ウイルスを培養細胞又は細胞浮遊液に接種して培養し、ウイルスの増殖極期の感染細胞を個体別培養細胞ごとに採取して遠心し、混合して原液とする。原液に適当と認められた安定剤を加えてよい。

原液について、3.2.1 の試験を行う。

2.3.2 七面鳥ヘルペスウイルス原液

2.3.2.1 細胞の培養

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

個体別培養細胞について、3.1.1 の試験を行う。

2.3.2.2 ウィルスの培養

種ウイルスを培養細胞又は細胞浮遊液に接種して培養し、ウイルスの増殖極期の感染細胞を個体別培養細胞ごとに採取して遠心し、混合して原液とする。原液に適當と認められた安定剤を加えてもよい。

原液について、3.2.1 の試験を行う。

2.3.3 鶏痘ウイルス原液

2.3.3.1 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、3.1.2 の試験を行う。

2.3.3.2 ウィルスの培養

種ウイルスを発育鶏卵で培養し、漿尿膜を採取して乳剤とし、そのろ液又は遠心上清を原液とする。

この場合、適當と認められた必要最少量の抗生物質を加えてよい。

原液について、3.2.2 の試験を行う。

2.4 最終バルク

2.4.1 マレック病ウイルス 2型及び七面鳥ヘルペスウイルス

マレック病ウイルス 2型原液及び七面鳥ヘルペスウイルス原液を混合し、適當と認められた希釈液で濃度調整し、適當と認められた凍害防止剤を加え、最終バルクとする。

この場合、適當と認められた必要最少量の抗生物質を加えてよい。

2.4.2 鶏痘ウイルス

鶏痘ウイルス原液を混合し、適當と認められた安定剤を加え、最終バルクとする。この場合、適當と認められた必要最少量の抗生物質を加えてよい。

2.5 小分製品

2.5.1 マレック病 2価ワクチン

最終バルクを小分容器に分注し、凍結し、小分製品とする。

小分製品について、3.3 の試験を行う。

2.5.2 鶏痘ワクチン

最終バルクを小分容器に分注し、凍結乾燥し、小分製品とする。

小分製品について、3.3 の試験を行う。

3 試験法

3.1 培養細胞又は発育鶏卵の試験

3.1.1 培養細胞の試験

個体別培養細胞の 1%以上を対照培養細胞とし、これについて次の試験を行う。

3.1.1.1 培養観察

対照培養細胞を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で培養し、観察するとき、CPE を認めてはならない。

3.1.1.2 迷入ウイルス否定試験

3.1.1.1 の試験最終日に対照培養細胞のそれぞれの容器から細胞及び培養液を取り、混合したものと試料とし、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 2.1、2.2.1 及び 2.2.2 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 鶏注射試験

3.1.1.3.1 試験材料

3.1.1.3.1.1 注射材料

3.1.1.1 の試験最終日に対照培養細胞のそれぞれの容器から細胞及び培養液を取り、混合したものと注射材料とする。

3.1.1.3.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 1 ~ 4 日齢の鶏を用いる。

3.1.1.3.2 試験方法

注射材料 0.2mL ずつを 10 羽の鶏の皮下に注射し、5 遍間観察する。

観察最終日に剖検する。

3.1.1.3.3 判定

観察期間中、試験動物に臨床的な異常を認めてはならない。また、剖検したときに異常を認めてはならない。

3.1.2 発育鶏卵の試験

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

3.1.2.1 培養観察

対照発育鶏卵に、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、鶏胚に異常を認めてはならない。

3.1.2.2 鶏赤血球凝集試験

3.1.2.1 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。

3.2 原液の試験

3.2.1 マレック病ウイルス原液の試験

3.2.1.1 ウイルス含有量試験

3.2.1.1.1 試験材料

3.2.1.1.1.1 試料

検体を細胞維持用培養液（付記 1）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.1.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞又は 2 代継代細胞を 25cm² 以上のシャーレに培養し、単層となったものを用いる。

3.2.1.1.2.1 試験方法

試料 0.2mL ずつをそれぞれ 4 枚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、細胞維持用培養液を加え、37 °C で 4 ~ 7 日間培養し、観察する。

3.2.1.1.3 判定

シャーレ当たり平均 20 個以上検出された試料の希釈倍数及びその平均ブラック数又は平均フォーカス数からウイルスの含有量を算出する。

検体のウイルス含有量は 1 mL 中それぞれ $10^{6.0}$ PFU 又は $10^{6.0}$ FFU 以上でなければならない。

3.2.2 鶏痘ウイルス原液の試験

3.2.2.1 生菌数限度試験

一般試験法の生菌数限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。

3.2.2.2 ウイルス含有量試験

3.2.2.2.1 試験材料

3.2.2.2.1.1 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。

3.2.2.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の 11 ~ 13 日齢のものを用いる。

3.2.2.2.2 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漿尿膜上に接種し、37 °C で 5 日間培養し、観察する。試験最終日に漿尿膜を検査してポック出現の有無を観察する。

3.2.2.2.3 判定

漿尿膜にポックの出現したものを感染とみなし、 EID_{50} 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 $10^{6.0}$ EID₅₀ 以上でなければならない。

3.3 小分製品の試験

3.3.1 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、マレック病 2 価ワクチンにあっては固有の色調を有する凍結物でなければならず、鶏痘ワクチンにあっては、固有の色調を有する乾燥物でなければならない。両ワクチンを溶解し、混合したものは、固有の色調を有する均質な懸濁液でなければならない、異物又は異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.3.2 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、鶏痘ワクチンは、適合しなければならない。

3.3.3 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、鶏痘ワクチンは、適合しなければならない。

3.3.4 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。ただし、マレック病 2 価ワクチン及び鶏痘ワクチンのそれぞれ 1 本を 50mL の溶解用液（付記 2）に溶解したものをお小分容器ごとの試料とする。

3.3.5 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、マレック病 2 価ワクチン及び鶏痘ワクチンのそれぞれ 1 本を 50mL の溶解用液に溶解したものを小分容器ごとの試料とする。

3.3.6 サルモネラ否定試験

一般試験法のサルモネラ否定試験法を準用して試験するとき、鶏痘ワクチンは、適合しなければならない。

3.3.7 迷入ウイルス否定試験

一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1、2.1.1、2.1.2、2.2.1 及び 2.2.2 を準用して試験するとき、マレック病 2 価ワクチンは、適合しなければならない。ただし、試験品を溶解用液で 0.1mL 当たり 10 羽分となるように調整し、20KHz で 1 分間超音波処理し、抗マレック病ウイルス血清（付記 3）を非効化したもので中和したものを試料とする。

3.3.8 ウイルス含有量試験

3.3.8.1 マレック病ウイルス

マレック病 2 価ワクチンを細胞維持用培養液で 10 倍階段希釈し、各階段の希釈液を試料とする。

3.2.1.1 を準用し、両ウイルス株の CPE の形態学的相違による鑑別法でそれぞれのブラック数又はフォーカス数を測定するとき、試験品のウイルス含有量は、1 羽分当たり両ウイルス株とともに $10^{3.0}$ PFU 又は $10^{3.0}$ FFU 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。また、CPE の形態学的相違による鑑別法で十分に測定できないときは、モノクローナル抗体を用いた免疫染色法により測定する。

3.3.8.2 鶏痘ウイルス

3.2.2.2 を準用して試験するとき、鶏痘ワクチンのウイルス含有量は、1 羽分当たり $10^{2.0}$ ~ $10^{4.0}$ EID₅₀ でなければならない。

3.3.9 安全試験

3.3.9.1 試験材料

3.3.9.1.1 注射材料

マレック病 2 価ワクチン及び鶏痘ワクチンを溶解用液で 0.2mL 中 10 羽分となるように調整したものを、注射材料とする。

3.3.9.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 1～4 日齢の鶏を用いる。

3.3.9.2 試験方法

試験動物 10 羽を試験群、5 羽を対照群とする。

注射材料 0.2mL ずつを試験群の皮下に注射し、対照群とともに 5 週間臨床観察を行い、観察終了時に体重を測定し、剖検する。

3.3.9.3 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。また、剖検したときに異常を認めてはならない。

3.3.10 マレック病力価試験

3.3.10.1 試験材料

3.3.10.1.1 注射材料

マレック病 2 倍ワクチン及び鶏痘ワクチンを溶解用液で 0.2 mL 中 1 羽分となるように調整したものを注射材料とする。

3.3.10.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 1～4 日齢の鶏を用いる。

3.3.10.2 試験方法

試験動物 10 羽を試験群、3 羽を対照群とする。

注射材料の 1 羽分ずつを試験群の皮下に注射し、対照群とともに 3 週間観察する。

観察最終日に得られた各個体の血清について、蛍光抗体法により両ウイルス株に対する抗体価を測定する。

血清をリン酸緩衝食塩液で 20 倍に希釈し、更に 2 倍階段希釈する。感染細胞（付記 4）に各希釈液を加え、37 °C で 45～60 分間処理した後、リン酸緩衝食塩液で 3 回洗浄し、風乾後、4 単位の抗鶏 IgG 蛍光標識抗体（付記 5）を加え、37 °C で 45～60 分間処理した後、リン酸緩衝食塩液で 3 回洗浄し、UV 励起法で観察する。

3.3.10.3 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。

抗体価は、試験群の 80 % 以上が両ウイルス株に対してそれぞれ 40 倍以上でなければならない。

この場合、対照群では、すべて 20 倍以下でなければならない。

3.3.11 鶏痘発痘試験

3.3.11.1 試験材料

3.3.11.1.1 接種材料

マレック病 2 倍ワクチン及び鶏痘ワクチンを溶解用液で 0.01mL 中 1 羽分となるように調整したものを接種材料とする。

3.3.11.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 1～4 日齢の鶏を用いる。

3.3.11.2 試験方法

試験動物の 10 羽の翼膜に接種材料の 0.01mL ずつをそれぞれ穿刺接種し、3 週間観察する。

3.3.11.3 判定

接種後 5～7 日で善感発痘し、痘瘻は 21 日以内に完全に消退しなければならない。

4 貯法及び有効期間

マレック病 2 倍ワクチンは -140 °C 以下の液体窒素容器内で、鶏痘ワクチンは 2～5 °C で保存する。

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

1,000mL 中
 トリプトース・ホスフェイト・プロス
 牛血清
 イーグル MEM 又は F10 培地
 炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 7.4 に調整する。
 必要最少量の抗生素質を加えてもよい。

2.95 g
 適 量
 残 量

付記 2 溶解用液

1,000mL 中	
塩化ナトリウム	8.0 g
無水リン酸水素二ナトリウム	1.2 g
リン酸二水素カリウム	0.19 g
フェノールレッド	0.025 g
水	残 量

付記 3 抗マレック病ウイルス血清

マレック病ウイルス SB-1 株又はこれと同等と認められた株及び七面鳥ヘルペスウイルス FC126 株又はこれと同等と認められた株で免疫した生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏の血清で、試験品中のウイルスを完全に中和する力値を有するもの

付記 4 感染細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞を 37 °C 5vol%炭酸ガス下で培養し、カバーガラスに単層を形成させたものにマレック病ウイルス SB-1 株又はこれと同等と認められた株、及び七面鳥ヘルペスウイルス FC126 株又はこれと同等と認められた株をそれぞれ接種し、2 ~ 4 日間培養したもので、特異抗原を有するもの

付記 5 抗鶏 IgG 蛍光標識抗体

抗鶏 IgG 血清から γ-グロブリンを調製し、これを蛍光色素で標識したもので、8 単位以上を含むもの

ワクチンの部ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎2価・鶏伝染性ファブリキウス囊病混合（油性アジュバント加）不活化ワクチンの次に次のように加える。

ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎2価・鶏伝染性ファブリキウス囊病・トリニューモウイルス感染症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン

1 定義

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発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液並びに鶏伝染性ファブリキウス囊病ウイルス及び七面鳥鼻気管炎ウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液をそれぞれ不活化したものと混合し、油性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 ニューカッスル病ウイルス株

2.1.1.1 名称

弱毒ニューカッスル病ウイルス Clone30 株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

9～11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 繼代及び保存

原株及び種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格1.1の発育鶏卵で継代する。

継代は、原株では3代以内、種ウイルスでは2代以内でなければならない。

原株及び種ウイルスは、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

2.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス株

2.1.2.1 名称

鶏伝染性気管支炎ウイルス M41 株及び D274 株又は製造に適當と認められた2種類の株

2.1.2.2 性状

10日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に接種すると、特徴的な病変を伴って増殖する。

2.1.2.3 繼代及び保存

原株及び種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格1.1の発育鶏卵で継代する。

継代は、原株では3代以内、種ウイルスでは2代以内でなければならない。

原株及び種ウイルスは、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

2.1.3 鶏伝染性ファブリキウス囊病ウイルス株

2.1.3.1 名称

弱毒鶏伝染性ファブリキウス囊病ウイルス D78 株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

鶏胚初代細胞及びVero細胞でCPEを伴って増殖する。

2.1.3.3 繼代及び保存

原株及び種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格1.1の発育鶏卵で継代する。

継代は、原株では3代以内、種ウイルスでは2代以内でなければならない。

原株及び種ウイルスは、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

2.1.4 七面鳥鼻気管炎ウイルス株

2.1.4.1 名称

弱毒七面鳥鼻気管炎ウイルス BUT1 # 8544 株又はこれと同等と認められた株

2.1.4.2 性状

鶏胚初代細胞、鶏脣初代細胞又はVero細胞に接種すると、CPEを伴って増殖する。6～12日齢の発育鶏卵の卵黄嚢内及び尿膜腔内に接種しても、鶏胚に異常を示さない。

2.1.4.3 繙代及び保存

原株及び種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格2.1.1の鶏胚初代細胞で継代する。

継代は、原株では3代以内、種ウイルスでは2代以内でなければならない。

原株及び原種ウイルスは、凍結して-70℃以下凍結乾燥して5℃以下で保存する。

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

10～11日齢のものを用いる。

2.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

2.2.2.1 発育鶏卵

11～12日齢のものを用いる。

2.2.3 鶏伝染性ファブリキウス囊病ウイルス

2.2.3.1 培養細胞

Vero細胞又は製造に適当と認められた細胞を用いる。

2.2.4 七面鳥鼻氣管炎ウイルス

2.2.4.1 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格2.1.1の鶏胚初代細胞又は製造に適当と認められた細胞を用いる。

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、3.1.1の試験を行う。

2.3.1.2 ウィルスの培養

種ウイルスを発育鶏卵で培養し、感染増殖させた尿膜腔液の遠心上清をウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2.1.1の試験を行う。

2.3.1.3 不活化

ウイルス浮遊液にホルマリンを加えて不活化し、不活化ウイルス浮遊液とする。この不活化ウイルス浮遊液を原液としてもよい。

不活化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。

2.3.1.4 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。ただし、最終バルクの調製時にアジュバントを添加してもよい。

原液について、3.4.1の試験を行う。

なお、アジュバントを添加しない原液について、必要に応じて3.4.2.1の試験を行う。

2.3.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

2.3.2.1 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、3.1.1の試験を行う。

2.3.2.2 ウィルスの培養

各株の種ウイルスを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遠心上清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、3.2.1.2の試験を行う。

2.3.2.3 不活化

各ウイルス浮遊液にホルマリンを加えて不活化し、それぞれの株の不活化ウイルス浮遊液とする。この不活化ウイルス浮遊液を原液としてもよい。

不活化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。

2.3.2.4 アジュバントの添加

各株の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、それぞれの株の原液とする。

ただし、最終バルクの調製時にアジュバントを添加してもよい。

原液について、3.4.1 の試験を行う。

2.3.3 鶏伝染性ファブリキウス囊病ウイルス

2.3.3.1 細胞の培養

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

個体別培養細胞について、3.1.2 の試験を行う。

2.3.3.2 ウィルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個体別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清をウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2.1.3 の試験を行う。

2.3.3.3 不活化

ウイルス浮遊液にホルマリンを加えて不活化し、不活化ウイルス浮遊液とする。不活化ウイルス浮遊液を原液としてもよい。

不活化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。

2.3.3.4 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。

ただし、最終バルクの調製時にアジュバントを添加してもよい。

原液について、3.4.1 の試験を行う。

なお、アジュバントを添加しない原液について、必要に応じて 3.4.2.2 の試験を行う。

2.3.4 七面鳥鼻気管炎ウイルス

2.3.4.1 細胞の培養

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

個体別培養細胞について、3.1.2 の試験を行う。

2.3.4.2 ウィルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個体別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液及び超音波処理した感染細胞の遠心上清を混合し、ウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2.1.4 の試験を行う。

2.3.4.3 不活化

ウイルス浮遊液にホルマリンを加えて不活化し、不活化ウイルス浮遊液とする。不活化ウイルス浮遊液を原液としてもよい。

不活化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。

2.3.4.4 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。

ただし、最終バルクの調製時にアジュバントを添加してもよい。

原液について、3.4.1 の試験を行う。

なお、アジュバントを添加しない原液について、必要に応じて 3.4.2.3 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原液、鶏伝染性ファブリキウス囊病ウイルス原液及び七面鳥鼻気管炎ウイルス原液を混合し、濃度調整したものを最終バルクとする。この場合、適當と認められた保存剤を添加してよい。

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 発育鶏卵又は培養細胞の試験

3.1.1 発育鶏卵の試験

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

3.1.1.1 培養観察

対照発育鶏卵を、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、鶏胚に異常を認めてはならない。

3.1.1.2 鶏赤血球凝集試験

3.1.1.1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。

3.1.2 培養細胞の試験

個体別培養細胞の1%以上を対照培養細胞とし、これについて次の試験を行う。

3.1.2.1 培養観察

対照培養細胞を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で培養し、観察するとき、CPEを認めてはならない。

3.1.2.2 鶏赤血球凝集試験

3.1.2.1の試験最終日に培養液を採取し、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。

3.2 ウィルス浮遊液の試験

3.2.1 ウィルス含有量試験

3.2.1.1 ニューカッスル病ウイルス

3.2.1.1.1 試験材料

3.2.1.1.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で10倍階段希釀し、各段階の希釀液を試料とする。

3.2.1.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1 の9~11日齢の発育鶏卵を用いる。

3.2.1.1.2 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°C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。

3.2.1.1.3 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、EID₅₀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。

検体のウィルス含有量は、1mL中10^{4.5}EID₅₀以上でなければならない。

3.2.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

3.2.1.2.1 試験材料

3.2.1.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で10倍階段希釀し、各段階の希釀液を試料とする。

3.2.1.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～11日齢のものを用いる。

3.2.1.2.2 試験方法

試料0.1 mLずつをそれぞれ5個の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37°Cで7～8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。

3.2.1.2.3 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_{50} 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、M41株の場合は1mL中 $10^{8.0}\text{EID}_{50}$ 以上及びD274株の場合は1mL中 $10^{7.4}\text{EID}_{50}$ 以上でなければならない。

3.2.1.3 鶏伝染性ファブリキウス囊病ウイルス

3.2.1.3.1 試験材料

3.2.1.3.1.1 試料

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

3.2.1.3.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格2.1.1の鶏胚初代細胞で、草層となったものを用いる。)

3.2.1.3.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4枚の培養細胞に接種し、37°Cで60分間静置吸着させる。第1次重層寒天培地（付記2）を加え3～4日間培養後、第2次重層寒天培地（付記3）を重層し、観察する。

3.2.1.3.3 判定

試料の各希釀段階の平均ブラック数からウイルス含有量を算出する。

検体のウイルス含有量は、1mL中 $10^{4.0}\text{PFU}$ 以上でなければならない。

3.2.1.4 七面鳥鼻気管炎ウイルス

3.2.1.4.1 試験材料

3.2.1.4.1.1 試料

検体を細胞増殖用培養液（付記4）で調整した鶏胚初代細胞浮遊液で10倍階段希釀し、各段階の希釀液を試料とする。

3.2.1.4.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格2.1.1の鶏胚初代細胞浮遊液を用いる。

3.2.1.4.2 試験方法

試料200μLずつを、それぞれ96穴組織培養用プレートの5穴以上に接種し、37°Cで5～7日間培養し、観察する。)

3.2.1.4.3 判定

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

検体のウイルス含有量は、1mL中 $10^{6.5}\text{TCID}_{50}$ 以上でなければならない。

3.3 不活性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 不活性試験

3.3.2.1 ニューカッスル病ウイルス

3.3.2.1.1 試験材料

3.3.2.1.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.3.2.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～11日齢のものを用いる。

3.3.2.1.2 試験方法

注射材料0.1mLずつを10個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で5日間培養した後、尿膜腔液を採取し、更に1代継代し、37℃で5日間培養して観察する。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性を調べる。

3.3.2.1.3 判定

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

3.3.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

3.3.2.2.1 試験材料

3.3.2.2.1.1 注射材料

検体を注射試料とする。

3.3.2.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～10日齢のものを用いる。

3.3.2.2.2 試験方法

注射材料0.1mLずつを10個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、5日間培養した後、尿膜腔液を採取し、更に1代継代し、37℃で5日間培養して観察する。

3.3.2.2.3 判定

鶏胚は、正常に発育しなければならない。

3.3.2.3 鶏伝染性ファブリキウス囊病ウイルス

3.3.2.3.1 試験材料

3.3.2.3.1.1 試料

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

3.3.2.3.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格2.1.1の鶏胚初代細胞で、単層となったものを用いる。

3.3.2.3.2 試験方法

試料の全量を、1mLにつき 20cm^2 以上の培養細胞に接種し、3～4日培養した後、その培養上清5mLを採取し、更に1代継代し、3～4日培養して観察する。

3.3.2.3.3 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。

3.3.2.4 七面鳥鼻気管炎ウイルス

3.3.2.4.1 試験材料

3.3.2.4.1.1 試料

検体を試料とする。

3.3.2.4.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格2.1.1の鶏胚初代細胞を用いる。

3.3.2.4.2 試験方法

試料の全量を1mLにつき 20cm^2 以上の培養細胞に接種し、37℃で5日間培養した後、その培養上清0.1mLを採取し、更に継代し、5日間培養して観察する。

3.3.2.4.3 判定

培養細胞にCPEを認めない場合、活性ウイルス陰性とする。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

3.4 原液の試験

3.4.1の試験又は3.4.1若しくは3.4.2の試験を行う。

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 抗原含有量試験

3.4.2.1 ニューカッスル病ウイルス

3.4.2.1.1 試験材料

3.4.2.1.1.1 試料

検体を生理食塩水で2倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.4.2.1.2 試験方法

各試料50 μLに1 vol%鶏赤血球浮遊液を25 μLずつ加え、30~60分間室温に静置する。

3.4.2.1.3 判定

赤血球の凝集を示す試料の最高希釈倍数を赤血球凝集（HA）単位とする。

抗原量は50 μL中128HA単位以上でなければならない。

3.4.2.2 鶏伝染性ファブリキウス囊病ウイルス

3.4.2.2.1 試験材料

3.4.2.2.1.1 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。

3.4.2.2.2 試験方法

試料及び参照抗原（付記5）をR63モノクローナル抗体（付記6）で固相化した96穴平底マイクロプレートに添加し、37°Cで反応後、ビオチン標識R63抗体（付記7）を添加し、37°Cで反応させる。その後ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識アビジン（付記8）を加え、37°Cで反応させた後、過酸化尿素を加えたテトラメチルベンチジンを加え、発色させる。反応停止後、450nmで吸光度を測定する。

3.4.2.2.3 判定

参照抗原及び試料の吸光度から試料の抗原を計算するとき、R63-ELISA単位は1 mL中2,500EU以上である。

3.4.2.3 七面鳥鼻気管炎ウイルス

3.4.2.3.1 試験材料

3.4.2.3.1.1 試料

検体を洗浄用緩衝液（付記9）で2倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.4.2.3.2 試験方法

七面鳥鼻気管炎ウイルスを認識するモノクローナル抗体を固相化した96穴平底マイクロプレートに各試料及び陰性対照を50 μLずつ添加し、37°Cで45分間反応させる。反応終了後洗浄用緩衝液で3回洗浄した後、七面鳥鼻気管炎ウイルス抗体陽性鶏血清を50 μL添加し、37°Cで30分間反応させる。反応終了後洗浄用緩衝液で3回洗浄した後、山羊抗鶏IgGペルオキシダーゼ標識抗体を50 μL添加し、37°Cで30分間反応させる。反応終了後洗浄用緩衝液で洗浄した後、基質液（付記10）を50 μLずつ添加し、室温で10分間反応させる。反応終了後、反応停止液（付記11）を25 μL加えて、反応を停止させる。

3.4.2.3.3 判定

波長450nmで吸光度を測定する。陰性対照より2倍以上の吸光度値を示す最終希釈倍数を相対抗原量とする。

検体の抗原量は、250 EU/mL以上である。

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、固有の色調を有する均質な懸濁液でなければならず、異物又は臭味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 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。

3.5.3 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、ホルマリンの含有量は、0.2 vol %以下でなければならない。

3.5.4 安全試験

3.5.4.1 試験材料

3.5.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.4.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の4週齢の鶏を用いる。

3.5.4.2 試験方法

試験動物10羽を試験群、3羽を対照群とする。

注射材料の1羽分ずつを試験群の頸部中央部皮下に注射し、対照群とともに4週間観察する。

3.5.4.3 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。

3.5.5 力価試験

3.5.5.1 ニューカッスル病力価試験

3.5.5.1.1 試験材料

3.5.5.1.1.1 試験動物

3.5.4の試験に用いた動物を用いる。

3.5.5.1.2 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。

3.5.5.1.2 試験方法

3.5.4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。

3.5.5.1.3 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「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、すべてが5倍以下でなければならない。

3.5.5.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

3.5.5.2.1 試験材料

3.5.5.2.1.1 試験動物

3.5.4の試験に用いた動物を用いる。

3.5.5.2.1.2 中和試験用ウイルス

それぞれの製造用株又は適当と認められた株を用いる。ただし、ウイルス量は、生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～10日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、ウイルス価を測定するとき、1ml中 $10^{5.0}$ EID₅₀以上でなければならない。

3.5.5.2.1.3 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～10日齢のものを用いる。

3.5.5.2.2 試験方法

3.5.4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、それぞれ等量を群ごとにプールし、非効化する。

それぞれの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°Cで18~24時間又は37°C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°Cで7~8日間培養し、観察する。

3.5.5.2.3 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とみなし、 EID_{50} を求め、中和指數を算出する。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數は、対照群に対し2.0以上でなければならない。この場合、対照群の中和指數は、ウイルス対照に対し1.0以下でなければならない。

3.5.5.3 鶏伝染性ファブリキウス囊病力価試験

3.5.5.3.1 試験材料

3.5.5.3.1.1 試験動物

3.5.4の試験に用いた動物を用いる。

3.5.5.3.1.2 中和試験用ウイルス

製造用株又は適当と認められた株を用いる。ただし鶏胚初代細胞で増殖させたウイルスを鶏胚初代細胞に接種し、ウイルス価を測定するとき、1mL中 $10^{5.0}$ TCID₅₀以上である。

3.5.5.3.1.3 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格2.1.1の鶏胚初代細胞をシャーレに培養し、単層になったものを用いる。

3.5.5.3.2 試験方法

3.5.4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中和試験を行う。

血清を非働化し、ウイルス増殖用培養液（付記12）で2倍階段希釈する。各希釈血清と0.1mL中100~200 PFUを含む中和試験用ウイルス液をそれぞれ等量加えて混合し、37°Cで60分間処理する。この各混合液0.1mLずつをそれぞれ2枚の培養細胞に接種し、37°Cで60分間静置吸着させた後、第1次重層寒天培地（付記13）を加え、3~4日間静置培養する。その後、第2次重層寒天培地（付記14）を重層し、観察する。

3.5.5.3.3 判定

プラック数を50%減少させる血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

試験群の70%以上が中和抗体価128倍以上でなければならない。この場合、対照群では、すべて中和抗体価4倍以下でなければならない。

3.5.5.4 七面鳥鼻気管炎力価試験

3.5.5.4.1 試験材料

3.5.5.4.1.1 試験動物

3.5.4の試験に用いた動物を用いる。

3.5.5.4.2 試験方法

3.5.4の試験終了日に試験群及び対照群から採取した各個体の血清についてELISAを行う。

固相化緩衝液（付記15）で濃度調整した七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原（付記16）を96穴平底マイクロプレートに100μLずつ分注し、37°Cで3時間反応後、洗浄用緩衝液で2回洗浄した後、乾燥させる。次に被検血清をIB・EIA緩衝液（付記17）で2倍階段希釈し、固相化プレートに各希釈血清を100μLずつ加え、37°Cで30分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で2回洗浄し、水切りを行った後、山羊抗鶏IgGペルオキシダーゼ標識抗体（付記18）を100μL加え、37°Cで30分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で2回洗浄し、水切りを行った後、基質液を100μL加え、常温で8分間反応させる。反応終了後、反応停止液を50μL加えて反応を停止させ、波長450 nmで吸光度を測定する。

3.5.5.4.3 判定

参考陰性血清（付記19）の平均吸光度値の少なくとも1.5倍の吸光度値を示す血清の希釈倍数を

ELISA抗体価とするとき、試験群の80%以上がELISA抗体価 $2^{6.6}$ 倍以上を示さなければならぬ。この場合、対照群はすべて $2^{6.6}$ 倍未満でなければならない。また、参考陽性血清（付記20）は、 $2^{6.6}$ 倍以上の抗体価を示さなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は3年4か月間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合は、その期間とする。

5 その他

5.1 添付文書等記載事項

1 肉用鶏には使用しない旨

2 採卵鶏又は種鶏を廃鶏として食鳥処理場へ出荷する前の所定の期間は使用しない旨

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・プロス	2.95 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7.0 ~ 7.4 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 第1次重層寒天培地

1,000mL 中		
トリプトース・ホスフェイト・プロス	2.95 g	
牛血清	20 mL	
寒天	10 g	
イーグルMEM	残 量	
炭酸水素ナトリウムでpH を7.0 ~ 7.4 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 第2次重層寒天培地

第1次重層寒天培地に0.5w/v%ニュートラルレッド液を2 vol%となるように加えたもの

付記4 細胞増殖用培養液

1,000mL 中		
トリプトース・ホスフェイト・プロス	0.83 g	
トリプトース	1.00 g	
ラクトアルブミン水解物	1.25 g	
炭酸水素ナトリウム	2.45 g	
牛血清	50 mL	
イーグルMEM	残 量	
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。		

付記5 参照抗原

Vero細胞で培養した鶏伝染性ファブリキウス囊病ウイルスD78株ウイルス液をホルマリンで不活化した後、抗原量を約10,000 EU/mLに調整したもの

付記6 R63モノクローナル抗体

感染防御抗原であるVP2 蛋白を認識し、中和活性を有するモノクローナル抗体で、参照抗原が規定の抗原量を示すように固相化緩衝液で調整したもの

付記7 ビオチン標識R63抗体

参照抗原が規定の抗原量を示すようにIB・EIA緩衝液で調整したもの

付記8 ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識アビジン

参照抗原が規定の抗原量を示すようにIB・EIA緩衝液で調整したもの

付記9 洗浄用緩衝液

1,000 mL中

リン酸水素二ナトリウム十二水和物	2.9 g
リン酸二水素カリウム	0.2 g
塩化ナトリウム	37.2 g
塩化カリウム	0.2 g
ポリソルベート20	1.5 g
水	残量

pH を6.9～7.1に調整する。

付記10 基質液

TMB溶液	0.2 mL
UP緩衝液	1.5 mL
水	15 mL

TMB溶液は、DMSO 1,000 mLにTMB (3,3',5,5' テトラメチルベンチジン) を6g溶かしたもの

UP緩衝液は、尿素過酸化物140 mgをTMB緩衝液 (酢酸ナトリウム136 gを約500 mLの水に溶かし、1.5 mol/Lクエン酸でpH5.3～5.7に調整した後、水を加えて1,000 mLとし、121℃、20分間高压滅菌したもの) 100mLに溶かしたもの

付記11 反応停止液

硫酸	110 mL
水	1,000 mL

付記12 ウイルス増殖用培養液

1,000 mL中	
トリプトース・ホスフェイト・プロス	2.95 g
牛胎子血清	20 mL
イーグルMEM	残量

炭酸水素ナトリウムでpHを7.0～7.4に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてよい。

付記13 第1次重層寒天培地

ウイルス増殖用培養液に寒天を1w/v %となるように加えたもの

付記14 第2次重層寒天培地

第1次重層寒天培地に0.5 w/v %ニュートラルレッド液を2 vol %となるように加えたもの

付記15 固相化緩衝液

1,000 mL中	
リン酸二水素ナトリウム二水和物	1.43 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	12.10 g
塩化ナトリウム	8.5 g
水	残量

pH を6.9~7.1に調整する。

付記16 七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原

製造用株を生ワクチン製造用材料の規格2.1.1の鶏胚初代細胞に接種し、38°Cで培養する。CPEが出現したときに培養上清を採取し、感染細胞は少量の培養液でかきとり、超音波破碎を行う。感染細胞を超音波破碎後遠心（3,000G、10分間）し、その遠心上清と製造用株培養上清をプールする。次に30,000G、1時間遠心し、沈渣を少量の滅菌水に再浮遊する。再浮遊したものショ糖密度勾配遠心（53,000G、1時間）した後、上層を採取し、これをELISA抗原とする。

参照陽性血清の100倍希釈液の吸光度値を測定するとき0.8以上及び参照陰性血清では0.2以下を示すように調整する。

付記17 IB・EIA緩衝液

1,000 mL中	
リン酸二水素ナトリウム二水和物	2.31 g
リン酸水素二ナトリウム二水和物	24.06 g
塩化ナトリウム	29.22 g
カオリン処理30 w/v %牛血清アルブミン	3.3 mL
ポリソルベート20	0.50 g
水	残量

200nmでろ過滅菌後、スキムミルク2 w/v %及び牛胎子血清5 vol %を加える。

付記18 山羊抗鶏IgGペルオキシダーゼ標識抗体

参照陽性血清が規定の抗体価を示すようにIB・EIA緩衝液で調整したもの

付記19 参照陰性血清

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の七面鳥鼻気管炎ウイルスに対する抗体を保有しない鶏血清で、ELISA抗体価 $2^{4.64}$ 倍未満を示すもの

付記20 参照陽性血清

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の七面鳥鼻気管炎ウイルスに対する抗体陰性の鶏を弱毒七面鳥鼻気管炎ウイルスBUT1 # 8544株の生ウイルスで免疫して得た血清で、ELISA抗体価 $2^{8.64}$ ~ $2^{9.64}$ 倍を示すもの

ワクチンの部鶏サルモネラ症（サルモネラ・エンテリティディス）（油性アジュバント加）不活化ワクチンの次に次のように加える。

鶏大腸菌症（組換え型F11線毛抗原・ペロ細胞毒性抗原）（油性アジュバント加）不活化ワクチン

1 定義

組換え型 F11 線毛抗原產生大腸菌及びペロ細胞毒性抗原產生大腸菌の培養菌液を不活化し、その遠心上清を濃縮後、油性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 F11 線毛抗原発現大腸菌

2.1.1.1 名称

大腸菌 JA221/pPF11-10 株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

兔特異抗血清を用いた平板凝集反応で強い凝集を示す。

2.1.1.3 繼代及び保存

原株及び種菌は血液寒天培地（付記1）で継代する。

継代は、原株では3代以内、種菌では2代以内である。

原株及び種菌は、凍結乾燥して-20℃以下で保存する。

2.1.2 ペロ細胞毒性抗原発現大腸菌

2.1.2.1 名称

大腸菌 CH7 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

ペロ細胞毒性を示す。

2.1.2.3 繼代及び保存

原株及び種菌は血液寒天培地で継代する。

継代は、原株では3代以内、種菌では2代以内である。

原株及び種菌は、凍結乾燥して-20℃以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 F11 線毛抗原発現大腸菌

2.2.1.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.2.2 ペロ細胞毒性抗原発現大腸菌

2.2.2.1 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 培養

培養した種菌を F11 線毛抗原発現大腸菌にあっては F11 線毛抗原発現大腸菌用製造用培地に、ペロ細胞毒性抗原発現大腸菌にあってはペロ細胞毒性抗原発現大腸菌用製造用培地に接種し、培養したものを作成菌液とする。

作成菌液について 3.1 の試験を行う。

2.3.2 不活化

作成菌液に適当と認められた不活化剤を加えて不活化したものを作成菌液とする。

作成菌液について 3.2 の試験を行う。

2.3.3 原液の調整

不活化菌液について遠心によって菌体を除いた上清をろ過・濃縮したものを原液とする。

原液について 3.3 の試験を行う。

2.4 最終バルク

F11 線毛抗原原液及びペロ細胞毒性抗原原液を濃度調整して混合した後、適當と認められた油性アジュバントを添加したものを最終バルクとする。この場合、適當と認められた保存剤を添加してもよい。

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、3.4 の試験を行う。

3 試験法

3.1 培養菌液の試験

3.1.1 夾雜菌否定試験

3.1.1.1 試験材料

3.1.1.1.1 試料

検体を試料とする。

3.1.1.2 試験方法

血液寒天培地に培養液を塗抹して 37 °Cで一夜培養し、コロニーの性状を観察するとともに、グラム染色して鏡検する。

3.1.1.3 判定

乳白色状以外のコロニーを認めず、グラム陰性桿菌以外の菌を認めてはならない。

3.2 不活化菌液の試験

3.2.1 不活化試験

3.2.1.1 試験材料

3.2.1.1.1 試料

検体を試料とする。

3.2.1.2 試験方法

血液寒天培地 2 枚に試料 0.1 mL ずつを接種して、37 °Cで一夜培養する。

3.2.1.3 判定

菌の発育を認めてはならない。

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 抗原含有量試験

3.3.2.1 F11 線毛抗原量

3.3.2.1.1 試験材料

3.3.2.1.1.1 試料

適當と認められた参考抗原及び原液について、抽出操作を行ったものを試料とする。

3.3.2.1.2 試験方法

適當と認められた抗 F11 線毛抗原抗体を希釈し、ELISA プレートの各穴に固相化したのちプロッキングする。プレートを洗浄し、2 倍階段希釈したそれぞれの試料を各穴に加え、37°Cで 1 時間反応させる。プレートを洗浄し、適當と認められたペルオキシダーゼ標識抗 F11 線毛抗原抗体を加え、37 °Cで 45 分間反応させる。プレートを洗浄し、適當と認められた基質液を加えて反応させた後、硫酸で反応を停止させ、吸光度を測定する。参考抗原と比較し、平行線定量法により原液の抗原含有量を算出する。

3.3.2.1.3 判定

F11 線毛抗原含有量は 1 mL 中 72 ~ 143 mg でなければならない。

3.3.2.2 ベロ細胞毒性抗原量

3.3.2.2.1 試験材料

3.3.2.2.1.1 試料

適當と認められた参考抗原及び原液について、抽出操作を行ったものを試料とする。

3.3.2.2.2 試験方法

適當と認められた抗ベロ細胞毒性抗体を希釈し、ELISA プレートの各穴に固相化したのちブロッキングする。プレートを洗浄し、2 倍階段希釈したそれぞれの試料を各穴に加え、37 °C で 1 時間反応させる。プレートを洗浄し、適當と認められたペルオキシダーゼ標識抗ベロ細胞毒性抗原抗体を加え、37 °C で 45 分間反応させる。プレートを洗浄し、適當と認められた基質液を加えて反応させた後、硫酸で反応を停止させ、吸光度を測定する。参考抗原と比較し、平行線定量法により原液の抗原含有量を算出する。

3.3.2.2.3 判定

ベロ細胞毒性抗原含有量は 1 mL 中 56 ~ 78 mg 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均質な懸濁液でなければならず、異物又は異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.4.2 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。

3.4.3 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、ホルマリンの含有量は 0.135vol % 以下でなければならない。

3.4.4 安全試験

3.4.4.1 試験材料

3.4.4.1.1 接種材料

試験品を注射材料とする。

3.4.4.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 4 適齢の鶏を用いる。

3.4.4.2 試験方法

試験動物 10 羽を試験群、5 羽を対照群とする。

注射材料 2 羽分づつを試験群の胸部筋肉内に注射し、対照群とともに 4 適間観察し、試験最終日に注射部位を剖検する。

3.4.4.3 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ない。また、剖検するとき注射局所に 10 個以上の壞死又は膿瘍を認めてはならない。

3.4.5 力価試験

3.4.5.1 試験材料

3.4.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.5.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 2 ~ 4 適齢の鶏を用いる。

3.4.5.1.3 抗原固相化プレート

抗原吸着プレート（付記 2）を用いる。

3.4.5.2 試験方法

試験動物の 10 羽を試験群、5 羽を対照群とする。

注射材料 0.1mL ずつを試験群の胸部筋肉内に注射し、4 週目に両群から得られた血清について、F11 線毛抗原及びベロ細胞毒性抗原に対する抗体価を酵素抗体法(以下「ELISA」という。)により測定する。

あらかじめ抗原吸着プレートのすべての穴に希釀液(付記3)を 100 μ L 加える。試験群と対照群の血清及び参考陽性血清(付記4)を希釀液で、それぞれ 50 倍及び 500 倍に希釀したもの 100 μ L ずつ加え、同希釀液で 2 倍階段希釀し、希釀液のみの穴を血清対照とする。37 °C で 1 時間反応させた後、水で 5 回洗浄する。次に各穴に至適単位の標識抗体(付記5)を 100 μ L ずつ加え、37 °C で 30 分間反応させた後、水で 5 回洗浄する。その後、基質液(付記6)を各穴に 100 μ L ずつ加え、遮光し、常温で 15 分間反応後、2 mol/L の硫酸をすべての穴に 50 μ L ずつ加えて反応を停止させ、波長 450nm の吸光度を測定する。

3.4.5.3 判定

対照群の各穴の吸光度の平均値に 4.5 を乗じた値以上の吸光度値を示した血清の最高希釀倍数を抗体価とする。試験群の抗体価は、試験群の 80 % 以上が F11 線毛抗原では 100 倍以上、ベロ細胞毒性抗原では 1,000 倍以上でなければならない。この場合、対照群では F11 線毛抗原及びベロ細胞毒性抗原においてそれぞれすべて 100 倍未満及び 1,000 倍未満でなければならない。ただし、試験成立条件として、1) ブランクの吸光度が 0.100 以下であること、2) 参照陽性血清の抗体価が、F11 線毛抗原の場合 $10^{36} \sim 10^{42}$ 、ベロ細胞毒性抗原では $10^{45} \sim 10^{50}$ の範囲であること、を満たしていなければならない。

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は、その期間とする。

付記1 血液寒天培地

1,000 mL 中	
牛心臓抽出液	500 g
ペプトン	10 g
塩化ナトリウム	5 g
カンテン	15 g
馬脱線維素血液	50 mL

pH を 7.2 に調整する。

付記2 抗原吸着プレート

F11 線毛抗原については参考 F11 線毛抗原(付記7)を 0.04mol/L の PBS(付記8)で 2.5 μ g/mL に、また、ベロ細胞毒性抗原については参考ベロ細胞毒性抗原(付記9)を 2 μ g/mL に希釀後、96 穴マイクロプレートに 100 μ L ずつ加え、常温で 16 時間反応させる。その後、液を捨てブロッキング緩衝液(付記10)を各穴に 200 μ L ずつ加え、37 °C で 20 分間反応させた後、液を捨てプレートを水で 5 回洗浄したもの。

付記3 希釀液

1,000 mL 中	
リン酸水素二ナトリウム二水和物	35.58 g
塩化ナトリウム	11.69 g
ポリソルベート 80	0.5 mL
水	残量

4 mol/L 塩酸で pH を 7.0 に調整後、ろ過滅菌する。

付記 4 参照陽性血清

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏を F11 線毛抗原及びベロ細胞毒性抗原で免疫して得られた血清で、ELISA で抗体価を測定するとき、抗体価はそれぞれ $10^{15} \sim 10^{42}$ 及び $10^{44} \sim 10^{50}$ であるもの

付記 5 標識抗体

ペルオキシダーゼ標識抗鶏 IgG (H+L) 血清にグリセリンを 50vol % 濃度になるように加え、一 20 ℃ に保存したもの

付記 6 基質液

UP 緩衝液(付記 11) を 1.5、0.6w/v%TMB 溶液(付記 12) を 0.2 及び水を 15 の割合で混合したもの

付記 7 参照 F11 線毛抗原

動物医薬品検査所が適当と認めたもの

付記 8 0.04mol/L PBS

1,000mL 中

リン酸二水素ナトリウム二水和物	1.4307 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	12.099 g
塩化ナトリウム	8.5 g
水	残量

pH を 7.2 に調整後、ろ過滅菌する。

付記 9 参照ベロ細胞毒性抗原

動物医薬品検査所が適当と認めたもの

付記 10 プロッキング緩衝液

0.04mol/L PBS にカオリン処理した牛血清アルブミンを 10 g 加えたもの

付記 11 UP 緩衝液

TMB 基質緩衝液 (13.6g の酢酸ナトリウム三水和物を 80mL の水に溶解し、1.5mol/L のクエン酸で pH を 5.3 ~ 5.7 に調整し、水を加えて 100mL にしたもの) に過酸化尿素 140mg を加えたもの

付記 12 0.6w/v%TMB 溶液

ジメチルスルホキシド 1,000mL にテトラメチルベンチジンを 6 g 溶解し、窒素で飽和状態にしたもの

ワクチンの部より α 溶血性レンサ球菌症不活化ワクチンの次に次のように加える。

ぶりビブリオ病・ α 溶血性レンサ球菌症混合不活化ワクチン

1 定義

ビブリオ・アングイラルム J-O-3 型及びラクトコッカス・ガルビエの培養菌を不活化後混合したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 ビブリオ・アングイラルム

2.1.1.1 名称

ビブリオ・アングイラルム KT-5 株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

ビブリオ・アングイラルム J-O-3 型に一致する性状を示し、J-O-3 型ビブリオ病に対する免疫原性を有する。

2.1.1.3 繙代及び保存

原株及び種菌は、継代に適当と認められた培地により継代する。

継代は、原株では 3 代以内、種菌では 5 代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して -70 ℃ 以下又は凍結乾燥して 5 ℃ 以下で保存する。

2.1.2 ラクトコッカス・ガルビエ

2.1.2.1 名称

ラクトコッカス・ガルビエ KS-7M 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

ラクトコッカス・ガルビエ KG(-)型に一致する性状を示し、 α 溶血性レンサ球菌症に対する免疫原性を有する。

2.1.2.3 繙代及び保存

原株及び種菌は、継代に適当と認められた培地により継代する。

継代は、原株では 3 代以内、種菌では 5 代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して -70 ℃ 以下又は凍結乾燥して 5 ℃ 以下で保存する。

2.2 製造用材料

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 ビブリオ・アングイラルム原液

2.3.1.1 培養

培養した種菌を適当と認められた培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について 3.1 の試験を行う。

2.3.1.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加えて不活化したものを作成菌液とする。

不活化菌液について 3.2 の試験を行う。

2.3.1.3 原液

不活化菌液又はこれを遠心して濃縮した菌を適当と認められた希釈溶液に浮遊させたものを原液とする。

原液について 3.3 の試験を行う。

2.3.2 ラクトコッカス・ガルビエ原液

2.3.2.1 培養

培養した種菌を適当と認められた培地に接種し、培養したものとを培養菌液とする。

培養菌液について3.1の試験を行う。

2.3.2.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加えて不活化したものとを不活化菌液とする。

不活化菌液について3.2の試験を行う。

2.3.2.3 原液

不活化菌液又はこれを遠心して濃縮した菌を適当と認められた希釀溶液に浮遊させたものを原液とする。

原液について3.3の試験を行う。

2.4 最終バルク

それぞれの原液を調製して混合し、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3.4の試験を行う。

3 試験法

3.1 培養菌液の試験

3.1.1 夾雜菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、ビブリオ・アングイラルムの検体は、ビブリオ・アングイラルム以外の菌の発育を認めてはならない。ラクトコッカス・ガルビエの検体は、ラクトコッカス・ガルビエ以外の菌の発育を認めてはならない。ただし、特に承認されたものは、その試験法とする。

3.1.2 生菌数試験

3.1.2.1 試験材料

3.1.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で10倍階段希釀し、各段階の希釀液を試料とする。

3.1.2.1.2 培地

それぞれの製造に適当と認められた培地に寒天を1.5vol%加えて作製した寒天培地又は適当と認められた培地を用いる。

3.1.2.1.3 試験方法

各試料0.1mLずつを培地平板2枚以上に接種して培地表面に拡散させたものを、適当と認められた温度及び時間で培養後、生じた集落を数える。

3.1.2.1.4 判定

各試料ごとの集落数から生菌数を算出する。

ビブリオ・アングイラルムの検体の生菌数は1mL中 10^5 個以上でなければならない。

ラクトコッカス・ガルビエの検体の生菌数は1mL中 10^5 個以上でなければならない。

3.2 不活菌液の試験

3.2.1 不活化試験

3.2.1.1 試験材料

3.2.1.1.1 試料

検体を試料とする。

3.2.1.1.2 培地

試料の培養に適当と認められた培地を用いる。

3.2.1.1.3 試験方法

各試料 0.1mL ずつを培地平板 5 枚以上に接種して培地表面に拡散させたものを適当と認められた温度で、7 日間培養後、集落の有無を観察する。

3.2.1.1.4 判定

接種したすべての培地に集落を認めてはならない。

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。

3.4 小分製品の試験

3.4.1 特性試験

一般試験法の特性試験を準用して試験するとき、固有の色調を有する懸濁液でなければならず、異物又は異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.4.2 pH 測定試験

一般試験法の pH 測定試験法を準用して試験するとき、pH は固有の値を示さなければならない。

3.4.3 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。

3.4.4 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、ホルマリンの量は、0.3vol%以下でなければならない。

3.4.5 安全試験

3.4.5.1 試験材料

3.4.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.5.1.2 試験動物

水温 25 °C、循環式で 7 日以上飼育し、異常のないことを確認した体重 30g 以上のかんばち又はぶり 30 尾以上を用いる。

3.4.5.1.3 試験方法

試験動物は、24 時間以上餌止めした後、1 群 15 尾以上ずつの 2 群に分ける。1 群の試験動物に注射材料 0.1mL を腹腔内に注射し、試験群とする。他の 1 群は対照群とし、試験群と同様の方法でリン酸緩衝食塩液を注射する。その後、それぞれ水温 25 °C、循環式で飼育し、14 日間観察する。

3.4.5.1.4 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。

3.4.6 力価試験

3.4.6.1 ピブリオ病力価試験

3.4.6.1.1 試験材料

3.4.6.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.6.1.1.2 試験動物

水温 20 °C、循環式で 7 日以上飼育し、異常のないことを確認した体重 30g 以上のかんばち又はぶり 20 尾以上を用いる。

3.4.6.1.1.3 試験方法

試験動物は、24 時間以上餌止めした後、1 群 10 尾以上ずつの 2 群に分ける。1 群の試験動物に、注射材料 0.1mL を腹腔内に注射し、試験群とする。他の 1 群は、対照群とし、試験群と同様の方法でリン酸緩衝食塩液を注射する。その後、それぞれ水温 20 °C、循環式で飼育し、14 日後に試験群及び対照群のそれぞれ 10 尾ずつを取り上げて採血し、45 °C で 20 分間非働化した血清について、マイクロタイマー法で凝集試験を行う。

試験群と対照群の血清、参照陽性血清(付記1)及び参照陰性血清(付記2)をリン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈し、各希釈血清に凝集反応用抗原(付記3)を等量加えて、25℃で2時間反応させ、更に4℃で一夜静置した後、管底の凝集の有無を観察する。

3.4.6.1.1.4 判定

凝集を認めた血清の最高希釈倍数を凝集抗体価とする。

試験群の血清の抗体価の幾何平均値は16倍以上でなければならない。対照群では、抗体価の幾何平均値は2倍以下でなければならない。また、参照血清は所定の抗体価を示さなければならない。

3.4.6.2 α溶血性レンサ球菌症力価試験

3.4.6.2.1 試験材料

3.4.6.2.1.1 試験動物

3.4.5 の試験に用いた動物を用いる。

3.4.6.2.1.2 攻撃用菌液

ラクトコッカス・ガルビエ強毒菌(付記4)の液体培養菌液をリン酸緩衝食塩液で希釈し、対照群の死亡率が80%と予想される希釈液を攻撃用菌液とする。

3.4.6.2.1.3 試験方法

3.4.5 の試験最終日の前日から24時間餌止めした試験群及び対照群に、攻撃用菌液0.1mLずつを腹腔内に注射して攻撃した後、水温25℃で14日間観察して各群の生死を調べる。

3.4.6.2.1.4 判定

試験群の生存率は、対照群のそれより有意に高い値を示さなければならない(Fisherの直接確率計算法、 $P < 0.05$)。この場合、対照群は、60%以上が死亡しなければならない。

4 貯法及び有効期間

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

付記1 参照陽性血清

ビブリオ・アングイラルム J-O-3型の加熱死菌をぶりに注射して得た血清で、凝集抗体価が256～512倍となるよう調製し、凍結又は凍結乾燥したもの

付記2 参照陰性血清

健康なぶりの血清で、凝集抗体価が2倍未満であり、凍結又は凍結乾燥したもの

付記3 凝集反応用抗原

ビブリオ・アングイラルム J-O-3型の加熱死菌をリン酸緩衝食塩液でMcFarland混濁管No.1～3の濃度になるように浮遊させたもので、既知抗体価の陽性血清に対し所定の凝集抗体価を示すことを確認したもの

付記4 ラクトコッカス・ガルビエ強毒菌

ラクトコッカス・ガルビエ KG9502株又はこれと同等以上の毒力を有する株

ワクチンの部ジステンパー・犬アデノウイルス（2型）感染症・犬パラインフルエンザ・犬パルボウイルス感染症混合生ワクチンの次に次の2項を加える。

ジステンパー・犬アデノウイルス（2型）感染症・犬パラインフルエンザ・犬パルボウイルス感染症混合生ワクチン

1 定義

弱毒ジステンパーウイルス、弱毒犬アデノウイルス（2型）、弱毒犬パラインフルエンザウイルス、弱毒犬パルボウイルス及び弱毒犬コロナウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液の混合液を、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 ジステンパーウイルス株

2.1.1.1 名称

弱毒ジステンパーウイルス DFE-HC 株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

犬に注射しても病原性を示さない。発育鶏卵の漿尿膜上又は感受性のある培養細胞に接種すると、ポック又は CPE を伴って増殖する。

2.1.1.3 繼代及び保存

原株及び原種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格 2.2.1 の鶏腎初代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

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

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

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

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.2 犬アデノウイルス（2型）株

2.1.2.1 名称

弱毒犬アデノウイルス（2型）OD-N/SL 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

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

2.1.2.3 繼代及び保存

原株及び原種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格 2.6.1 の豚腎培養細胞又は適当と認めら

れた培養細胞で継代する。

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

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

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

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.3 犬パラインフルエンザウイルス株

2.1.3.1 名称

弱毒犬パラインフルエンザウイルス DL-E 株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

犬に注射しても病原性を示さない。感受性のある培養細胞に接種すると増殖し、細胞はモルモット赤血球を吸着する。

2.1.3.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

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

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

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

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.4 犬パルボウイルス株

2.1.4.1 名称

弱毒犬パルボウイルス 29-F/LT 株又はこれと同等と認められた株

2.1.4.2 性状

犬に注射しても病原性を示さない。犬及び猫由来細胞で核内封入体を伴って増殖し、その培養ウイルス液は豚及び猿の赤血球を凝集する。

2.1.4.3 継代及び保存

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

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

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

原株及び原種ウイルスは、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。ただし、

特に認められたものは、その保存温度とする。

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.5 犬コロナウイルス株

2.1.5.1 名称

弱毒犬コロナウイルス 5821-B 株又はこれと同等と認められた株

2.1.5.2 性状

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

2.1.5.3 繼代及び保存

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

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

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

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

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチン製造ごとに用時調製する。

2.2 製造用材料

2.2.1 ジステンパーウイルス

2.2.1.1 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.2.1 の鶏腎初代細胞又は適當と認められた培養細胞を用いる。

2.2.1.2 培養液

製造に適當と認められた培養液を用いる。

2.2.2 犬アデノウイルス（2型）

2.2.2.1 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.6.1 の豚腎初代細胞又は製造に適當と認められた培養細胞を用いる。

2.2.2.2 培養液

製造に適當と認められた培養液を用いる。

2.2.3 犬パラインフルエンザウイルス

2.2.3.1 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞又は製造に適當と認められた培養細胞を用いる。

2.2.3.2 培養液

製造に適當と認められた培養液を用いる。

2.2.4 犬パルボウイルス

2.2.4.1 培養細胞

猫腎培養細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.4.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.5 犬コロナウイルス

2.2.5.1 培養細胞

猫腎継代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.5.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.3 原液

2.3.1 ジステンパーウイルス原液

2.3.1.1 細胞の培養

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

個体別培養細胞について、3.1の試験を行う。

2.3.1.2 ウィルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルス増殖の極期に感染材料を採取し、ろ液又は遠心上清を原液とする。この場合、適当と認められた安定剤を添加してもよい。

原液について、3.2.1及び3.2.2.1の試験を行う。

2.3.2 犬アデノウイルス（2型）原液

2.3.2.1 細胞の培養

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

個体別培養細胞について、3.1の試験を行う。

2.3.2.2 ウィルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルス増殖の極期に感染材料を採取し、ろ液又は遠心上清を原液とする。この場合、適当と認められた安定剤を添加してもよい。

原液について、3.2.1及び3.2.2.2の試験を行う。

2.3.3 犬パラインフルエンザウイルス原液

2.3.3.1 細胞の培養

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

個体別培養細胞について、3.1の試験を行う。

2.3.3.2 ウィルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルス増殖の極期に感染材料を採取し、ろ液又は遠心上清を原液とする。この場合、適当と認められた安定剤を添加してもよい。

原液について、3.2.1及び3.2.2.3の試験を行う。

2.3.4 犬パルボウイルス原液

2.3.4.1 細胞の培養

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

個体別培養細胞について、3.1の試験を行う。

2.3.4.2 ウィルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルス増殖の極期に感染材料を採取し、ろ液又は遠心上清を原液とする。この場合、適当と認められた安定剤を添加してもよい。

原液について、3.2.1及び3.2.2.4の試験を行う。

2.3.5 犬コロナウイルス原液

2.3.5.1 細胞の培養

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

個体別培養細胞について、3.1の試験を行う。

2.3.5.2 ウィルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルス増殖の極期に感染材料を採取し、ろ液又は遠心上清を原液とする。この場合、適当と認められた安定剤を添加してもよい。

原液について、3.2.1及び3.2.2.5の試験を行う。

2.4 最終バルク

ジステンパーウイルス原液、犬アデノウイルス（2型）原液、犬パラインフルエンザウイルス原液、犬パルボウイルス原液及び犬コロナ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添加してもよい。

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、3.3の試験を行う。

3 試験法

3.1 培養細胞の試験

個体別培養細胞のそれぞれ1%以上を対照培養細胞とし、これについて次の試験を行う。

ただし、製造に継代細胞を用いている場合は、3.1.3の試験を実施しなくてもよい。また、CRFK細胞については、3.1.4の試験を行う。

3.1.1 培養観察

対照培養細胞を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で培養する。対照培養細胞をプールし、4本以上の培養びん及びカバーガラスを入れた4枚以上のシャーレに継代し、7日間以上培養し、観察するとき、CPEを認めてはならない。

3.1.2 赤血球吸着試験

3.1.1の試験最終日に培養びんの培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を2回洗浄し、0.1vol %モルモット赤血球浮遊液を重層し、60分間静置後、赤血球吸着の有無を観察するとき、培養細胞に赤血球吸着を認めてはならない。

3.1.3 封入体染色試験

3.1.1 の試験最終日に培養カバーガラスをリン酸緩衝食塩液で洗浄し、固定した後、ギムザ染色し、封入体の有無を観察するとき、培養細胞に封入体を認めてはならない。

3.1.4 赤血球凝集試験

3.1.1 の試験最終日に培養細胞の培養液について、1.0vol %豚赤血球浮遊液を等量加えて、4℃で18時間静置後、赤血球凝集の有無を観察し、HAを認めてはならない。

3.2 原液の試験

3.2.1 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。

3.2.2 ウィルス含有量試験

3.2.2.1 ジステンパーウィルス含有量試験

3.2.2.1.1 試験材料

3.2.2.1.1.1 試料

検体をウィルス増殖用培養液（付記1）又は適当と認められた培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.2.1.1.2 培養細胞

Vero細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.2.2.1.2 試験方法

試料0.1mLずつを4本以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間回転培養し、観察する。

3.2.2.1.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

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

3.2.2.2 犬アデノウィルス（2型）含有量試験

3.2.2.2.1 試験材料

3.2.2.2.1.1 試料

検体をウィルス増殖用培養液又は適当と認められた培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.2.2.1.2 培養細胞

豚腎培養細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.2.2.2.2 試験方法

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

3.2.2.2.3 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。

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

3.2.2.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

3.2.2.3.1 試験材料

3.2.2.3.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液又は適当と認められた培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.2.3.1.2 培養細胞

Vero 細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.2.2.3.2 試験方法

試料 0.1mL ずつを 4 本以上の培養細胞に接種し、30 ℃で 7 日間回転培養し、観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.2.2.3.3 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^{6.5} TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に認められたものは、そのウイルス含有量とする。

3.2.2.4 犬パルボウイルス含有量試験

3.2.2.4.1 試験材料

3.2.2.4.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液又は適当と認められた培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.2.4.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.2.2.4.2 試験方法

試料 0.1mL ずつを 4 本以上の培養細胞に接種し、32 ℃で 24 時間静置培養した後、ウイルス増殖用培養液と交換し、更に 32 ℃で 6 日間回転培養する。培養後、培養液を採取し、これに等量の牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液（付記 2）を加え、更にこの混合液と等量の VAD 6.0 液（付記 3）で調製した 0.3 ~ 0.5 vol % 豚赤血球浮遊液を加え、2 ~ 5 ℃で静置後観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.2.2.4.3 判定

培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{6.5} TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に認められたものは、そのウイルス含有量とする。

3.2.2.5 犬コロナウイルス含有量試験

3.2.2.5.1 試験材料

3.2.2.5.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液又は適当と認められた培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.2.5.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.2.2.5.2 試験方法

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

3.2.2.5.3 判定

培養細胞に CPB を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 $10^{5.0}$ TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に認められたものは、そのウイルス含有量とする。

3.3 小分製品の試験

3.3.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、固有の色調を有する乾燥物でなければならない。溶解したものは、固有の色調を有する液体でなければならず、異物又は異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.3.2 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。

3.3.3 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。

3.3.4 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。

3.3.5 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。

3.3.6 迷入ウイルス否定試験

一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1、2.5.1、2.6.1 及び 2.8.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

ただし、中和用抗血清は、抗ジステンパーウイルス血清（付記 4）、抗犬アデノウイルス（2 型）血清（付記 5）、抗犬パラインフルエンザウイルス血清（付記 6）、抗犬パルボウイルス血清（付記 7）及び抗犬コロナウイルス血清（付記 8）を、それぞれ非凍化したもの用いる。

3.3.7 ウィルス含有量試験

3.3.7.1 ジステンパーウイルス含有量試験

3.3.7.1.1 試験材料

3.3.7.1.1.1 試料

試験品中のジステンパーウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記 5、6、7 及び 8 の血清）を非凍化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.7.1.1.2 培養細胞

Vero 細胞を用いる。

3.3.7.1.2 試験方法

試料 0.1mL ずつを 4 本（穴）以上の培養細胞に接種し、37 ℃で 7 日間チューブ法による回転培養又はプレート法による静置培養し、観察する。

3.3.7.1.3 判定

培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たりチューブ法で $10^{5.5}$ TCID₅₀ 以上、プレート法で $10^{2.1}$ TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.3.7.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験

3.3.7.2.1 試験材料

3.3.7.2.1.1 試料

試験品中の犬アデノウイルス（2型）以外のウイルスの各抗血清（付記 4、6、7 及び 8 の血清）を非効化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.7.2.1.2 培養細胞

豚腎培養細胞又は MDCK 細胞を用いる。

3.3.7.2.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本（穴）以上の培養細胞に接種し、37 ℃で 7 日間チューブ法による回転培養又はプレート法による静置培養し、観察する。

3.3.7.2.3 判定

培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たりチューブ法で $10^{5.5}$ TCID₅₀ 以上、プレート法で $10^{2.3}$ TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.3.7.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

3.3.7.3.1 試験材料

3.3.7.3.1.1 試料

試験品中の犬パラインフルエンザウイルス以外のウイルスの各抗血清（付記 4、5、7 及び 8 の血清）を非効化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.7.3.1.2 培養細胞

Vero 細胞を用いる。

3.3.7.3.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本（穴）以上の培養細胞に接種し、30 ℃で 7 日間チューブ法による回転培養又はプレート法による静置培養し、観察する。

3.3.7.3.3 判定

培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たりチューブ法で $10^{5.5}$ TCID₅₀ 以上、プレート法で $10^{2.7}$

TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.3.7.4 犬パルボウイルス含有量試験

3.3.7.4.1 試験材料

3.3.7.4.1.1 試料

試験品中の犬パルボウイルス以外のウイルスの各抗血清（付記4、5、6及び8の血清）を非働化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液で10倍階段希釀し、各段階の希釀液を試料とする。

3.3.7.4.1.2 培養細胞

CRFK 細胞を用いる。

3.3.7.4.2 試験方法

試料 0.1mL ずつを4本（穴）以上の培養細胞に接種し、32℃で24時間静置培養した後、ウイルス増殖用培養液と交換し、32℃で6日間チューブ法による回転培養又はプレート法による静置培養する。培養後、培養液を採取し、これに等量の牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液を加え、更にこの混合液と等量のVAD6.0液で調製した0.3～0.5 vol %豚赤血球浮遊液を加え、2～5℃で静置後、観察する。

3.3.7.4.3 判定

培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たりチューブ法で 10^{5.5} TCID₅₀ 以上、プレート法で 10^{5.1} TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.3.7.5 犬コロナウイルス含有量試験

3.3.7.5.1 試験材料

3.3.7.5.1.1 試料

試験品中の犬コロナウイルス以外のウイルスの各抗血清（付記4、5、6及び7の血清）を非働化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液で10倍階段希釀し、各段階の希釀液を試料とする。

3.3.7.5.1.2 培養細胞

猫腎細代細胞を用いる。

3.3.7.5.2 試験方法

試料 0.1mL ずつを4本（穴）以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間チューブ法による回転培養又はプレート法による静置培養し、観察する。

3.3.7.5.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たりチューブ法で 10^{4.0} TCID₅₀ 以上、プレート法で 10^{2.2} TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.3.8 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。

3.3.9 安全試験

3.3.9.1 試験材料

3.3.9.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.3.9.1.2 試験動物

6か月齢未満の犬を用いる。

3.3.9.2 試験方法

試験動物3頭を試験群、2頭を対照群とする。試験群に注射材料1頭分を用法に従ってそれぞれ注射し、対照群とともに8週間観察する。

3.3.9.3 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。

3.3.10 力価試験

3.3.10.1 ジステンペー力価試験

3.3.10.1.1 試験材料

3.3.10.1.1.1 試験動物

3.3.9の試験に用いた犬を用いる。

3.3.10.1.1.2 中和試験用ウイルス

ジステンペーウイルス DFE-HC 株又は適当と認められたジステンペーウイルス株を用いる。

3.3.10.1.1.3 培養細胞

適当と認められた培養細胞を用いる。

3.3.10.1.2 試験方法

3.3.9の初回注射後4週目に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

各プール血清を非働化し、1 vol %牛胎子血清加リン酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釈液で5倍階段希釈する。各希釈血清と0.1mL 中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、2～5℃で一夜又は37℃で60分間処理する。この各混合液0.1mLずつをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間回転培養し、観察する。

3.3.10.1.3 判定

細胞を観察し、CPEを阻止したものを陽性とし、中和抗体価をED₅₀で求める。

試験群の中和抗体価は、40倍以上でなければならない。この場合、対照群では、10倍未満でなければならない。

3.3.10.2 犬アデノウイルス（2型）感染症力価試験

3.3.10.2.1 試験材料

3.3.10.2.1.1 試験動物

3.3.9の試験に用いた犬を用いる。

3.3.10.2.1.2 中和試験用ウイルス

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

3.3.10.2.1.3 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

3.3.10.2.2 試験方法

3.3.9 の初回注射後 4 週目に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

各プール血清を非凍化し、1 vol %牛胎子血清加リン酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釈液で 2 倍階段希釈する。各希釈血清と 0.1mL 中約 200TCID₅₀ の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、35 ~ 37 °C で 60 分間処理する。この各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本以上の培養細胞に接種し、37 °C で 7 日間回転培養し、観察する。

3.3.10.2.3 判定

培養細胞の CPE を阻止したものを陽性とし、中和抗体価を ED₅₀ で求める。

試験群の中和抗体価は、50 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、10 倍未満でなければならない。

3.3.10.3 犬パラインフルエンザ力価試験

3.3.10.3.1 試験材料

3.3.10.3.1.1 試験動物

3.3.9 の試験に用いた犬を用いる。

3.3.10.3.1.2 中和試験用ウイルス

犬パラインフルエンザウイルス DL-1 株又は適当と認められた犬パラインフルエンザウイルス株を用いる。

3.3.10.3.1.3 培養細胞

Vero 細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.3.10.3.2 試験方法

3.3.9 の初回注射後 4 週目に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

各プール血清を非凍化し、1 vol %牛胎子血清加リン酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釈液で 2 倍階段希釈する。各希釈血清と 0.1mL 中約 200TCID₅₀ の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、適当な温度で 60 分間処理する。この各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本以上の培養細胞に接種し、37 °C で 7 日間回転培養し、観察する。

3.3.10.3.3 判定

培養細胞の CPE を阻止したものを陽性とし、中和抗体価を ED₅₀ で求める。

試験群の中和抗体価は、10 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、10 倍未満でなければならない。

3.3.10.4 犬パルボウイルス感染症力価試験

3.3.10.4.1 試験材料

3.3.10.4.1.1 試験動物

3.3.9 の試験に用いた犬を用いる。

3.3.10.4.1.2 中和試験用ウイルス

犬パルボウイルス CP-49 株又は適当と認められた犬パルボウイルス株を用いる。

3.3.10.4.1.3 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.3.10.4.2 試験方法

3.3.9 の初回注射後 4 週目に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

各プール血清を非働化し、1 vol %牛胎子血清加リン酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釈液で 2 倍階段希釈する。各希釈血清と 0.1mL 中約 200TCID₅₀ の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、35 ~ 37 °C で 60 分間処理する。この各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本以上の培養細胞に接種し、37 °C で 24 時間静置培養した後、ウイルス増殖用培養液で液交換し、更に 37 °C で 6 日間回転培養する。培養最終日に、培養液を採取し、これに等量の牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液を加え、さらに、この混合液と等量の VAD6.0 液で調製した 0.3 ~ 0.5 vol %豚赤血球浮遊液を加え、2 ~ 5 °C で静置後、観察する。

3.3.10.4.3 判定

赤血球凝集を阻止したものを陽性とし、中和抗体価を ED₅₀ で求める。

試験群の中和抗体価は、200 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、4 倍未満でなければならない。

3.3.10.5 犬コロナウイルス感染症力価試験

3.3.10.5.1 試験材料

3.3.10.5.1.1 試験動物

3.3.9 の試験に用いた犬を用いる。

3.3.10.5.1.2 中和試験用ウイルス

犬コロナウイルス 5821-B 株又は適当と認められた犬コロナウイルス株を用いる。

3.3.10.5.1.3 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.3.10.5.2 試験方法

3.3.9 の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

各プール血清を非働化し、1 vol %牛胎子血清加リン酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釈液で 2 倍階段希釈する。各希釈血清と 0.1mL 中約 200TCID₅₀ の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、37 °C 60 分間処理する。この各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本以上の培養細胞に接種し、37 °C で 7 日間回転培養し、観察する。

3.3.10.5.3 判定

培養細胞の CPE を阻止したものを陽性とし、中和抗体価を ED₅₀ で求める。

試験群の中和抗体価は、8 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、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、2年間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合は、その期間とする。

付記1 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・プロス	2.95 g
イーグル培養液 (MEM)	残量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 7.4 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてよい。

付記2 牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液

1,000mL 中

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

牛血清アルブミンを 0.2w/v % となるように加えた後、水酸化ナトリウム液で pH を 9.0 に調整する。

付記3 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
リン酸水素二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4 抗ジステンパーウイルス血清

ジステンパーウイルスで免疫した兔、モルモット又はフェレットの血清で、ワクチン中のジステンパーウイルスを完全に中和できるもの

付記5 抗犬アデノウイルス（2型）血清

犬アデノウイルス（2型）で免疫した兔又はモルモットの血清で、ワクチン中の犬アデノウイルス 2型を完全に中和できるもの

付記6 抗犬パラインフルエンザウイルス血清

犬パラインフルエンザウイルスで免疫した兔又はモルモットの血清で、ワクチン中の犬パラインフルエンザウイルスを完全に中和できるもの

付記7 抗犬パルボウイルス血清

犬パルボウイルス株で免疫した兎又はモルモットの血清で、ワクチン中の犬パルボウイルスを完全に中和できるもの

付記8 抗犬コロナウイルス血清

犬コロナウイルスで免疫した兎の血清で、ワクチン中の犬コロナウイルスを完全に中和できるもの

ジステンパー・犬アデノウイルス（2型）感染症・犬パラインフルエンザ・犬パルボウイルス感染症・犬コロナウイルス感染症混合ワクチン

1 定義

弱毒ジステンパーウイルス、弱毒犬アデノウイルス（2型）、弱毒犬パラインフルエンザウイルス及び弱毒犬パルボウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液の混合液を凍結乾燥したワクチン（以下「乾燥生ワクチン」という。）と犬コロナウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化したワクチン（以下「液状不活化ワクチン」という。）とを組み合わせたものである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 ジステンパーウイルス株

2.1.1.1 名称

弱毒ジステンパーウイルスオンドーステポート株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

犬に注射しても病原性を示さない。発育鶏卵の漿尿膜上又は感受性のある培養細胞に接種すると、ポック又はCPEを伴って増殖する。

2.1.1.3 繼代及び保存

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

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

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

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.2 犬アデノウイルス（2型）株

2.1.2.1 名称

弱毒犬アデノウイルス（2型）V-197株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

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

2.1.2.3 繼代及び保存

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

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

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

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.3 犬パラインフルエンザウイルス株

2.1.3.1 名称

弱毒犬パラインフルエンザウイルス91880株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

犬に注射しても病原性を示さない。感受性のある培養細胞に接種すると増殖し、細胞はモルモット赤血球を吸着する。

2.1.3.3 繰代及び保存

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

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

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

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.4 犬パルボウイルス株

2.1.4.1 名称

弱毒犬パルボウイルス K-3ip69 株又は製造に適当と認められた株

2.1.4.2 性状

犬に注射しても病原性を示さない。犬及び猫由来細胞で核内封入体を伴って増殖し、その培養ウイルス液は豚及び猿の赤血球を凝集する。

2.1.4.3 繰代及び保存

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

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

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

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.5 犬コロナウイルス株

2.1.5.1 名称

犬コロナウイルス TN-449 株又はこれと同等と認められた株

2.1.5.2 性状

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

2.1.5.3 繰代及び保存

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

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

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

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.2 製造用材料

2.2.1 ジステンパーウイルス

2.2.1.1 培養細胞

Vero 細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.1.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.2 犬アデノウイルス（2型）

2.2.2.1 培養細胞

犬腎継代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.3 犬パラインフルエンザウイルス

2.2.3.1 培養細胞

犬腎継代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.3.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.4 犬パルボウイルス

2.2.4.1 培養細胞

猫腎継代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.4.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.5 犬コロナウイルス

2.2.5.1 培養細胞

猫腎継代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.5.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.3 原液

2.3.1 ジステンパーウイルス原液

2.3.1.1 細胞の培養

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

2.3.1.2 ウィルスの培養

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

原液について、3.2.1、3.2.2 及び 3.2.3.1 の試験を行う。

2.3.2 犬アデノウイルス（2型）原液

2.3.2.1 細胞の培養

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

2.3.2.2 ウィルスの培養

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

原液について、3.2.1、3.2.2 及び 3.2.3.2 の試験を行う。

2.3.3 犬パラインフルエンザウイルス原液

2.3.3.1 細胞の培養

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

2.3.3.2 ウィルスの培養

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

原液について、3.2.1、3.2.2 及び 3.2.3.3 の試験を行う。

2.3.4 犬パルボウイルス原液

2.3.4.1 細胞の培養

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

2.3.4.2 ウィルスの培養

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

原液について、3.2.1、3.2.2及び3.2.3.4の試験を行う。

2.3.5 犬コロナウイルス原液

2.3.5.1 細胞の培養

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

2.3.5.2 ウィルスの培養

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

ウイルス浮遊液について、3.2.1、3.2.2及び3.2.3.5の試験を行う。

2.3.5.3 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て不活化後、適当な中和剤を用い中和したもの、又はそのままの液を不活化ウイルス浮遊液とする。

不活化ウイルス浮遊液について、3.2.4の試験を行う。

2.3.5.4 原液の調整

不活化ウイルス浮遊液を適当と認められた方法で濃縮したもの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、3.2.1の試験を行う。

2.4 最終バルク

2.4.1 混合生ワクチン

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

2.4.2 液状不活化ワクチン

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

2.5 小分製品

2.5.1 混合生ワクチン

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、3.3の試験を行う。

2.5.2 液状不活化ワクチン

最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。

小分製品について、3.3の試験を行う。

3 試験法

3.1 培養細胞の試験

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

3.1.1 培養観察

対照培養細胞を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で培養する。対照培養細胞をプールし、4本以上の培養びん及びカバーガラスを入れた4枚以上のシャーレに継代し、7日間以上培養し、観察するとき、CPBを認めてはならない。

3.1.2 赤血球吸着試験

3.1.1 の試験最終日に培養びんの培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を2回洗浄し、0.1vol %モルモット赤血球浮遊液を重層し、60分間静置後、赤血球吸着の有無を観察するとき、培養細胞に赤血球吸着を認めてはならない。

3.1.3 封入体染色試験

3.1.1 の試験最終日に培養カバーガラスをリン酸緩衝食塩液で洗浄し、固定した後、ギムザ染色し、封入体の有無を観察するとき、培養細胞に封入体を認めてはならない。

3.2 原液の試験

3.2.1 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。

3.2.2 マイコプラズマ否定試験

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

3.2.3 ウイルス含有量試験

3.2.3.1 ジステンパーウイルス含有量試験

3.2.3.1.1 試験材料

3.2.3.1.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記1）又は適当と認められた培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.3.1.2 培養細胞

Vero細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.2.3.1.2 試験方法

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

3.2.3.1.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

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

3.2.3.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験

3.2.3.2.1 試験材料

3.2.3.2.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液又は適当と認められた培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.3.2.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.2.3.2.2 試験方法

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

ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.2.3.2.3 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、1mL中10¹³TCID₅₀以上でなければならない。ただし、特に認められたものは、そのウイルス含有量とする。

3.2.3.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

3.2.3.3.1 試験材料

3.2.3.3.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液又は適当と認められた培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.3.3.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.2.3.3.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本(穴)以上の培養細胞に接種し、37 ℃で 7 日間培養する。培養後、培養液を採取し、これに等量の 0.4vol % モルモット赤血球浮遊液を等量加え、室温で 90 分間静置し、観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.2.3.3.3 判定

培養液に赤血球の凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{6.5}TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に認められたものは、そのウイルス含有量とする。

3.2.3.4 犬パルボウイルス含有量試験

3.2.3.4.1 試験材料

3.2.3.4.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液又は適当と認められた培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.3.4.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.2.3.4.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本(穴)以上の培養細胞に接種し、37 ℃で 24 時間培養した後、ウイルス増殖用培養液と交換し、更に 37 ℃で 6 日間培養する。培養後、培養液を採取し、これに等量の牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液(付記 2)を加え、更にこの混合液と等量の VAD6.0 液(付記 3)で調製した 0.5vol % 豚赤血球浮遊液を加え、4 ℃で静置後、赤血球凝集の有無を観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.2.3.4.3 判定

培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{6.7}TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に認められたものは、そのウイルス含有量とする。

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

3.2.3.5.1 犬コロナウイルス含有量試験

3.2.3.5.1.1 試験材料

3.2.3.5.1.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液又は適当と認められた培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.3.5.1.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.2.3.5.1.2 試験方法

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

3.2.3.5.1.3 判定

特異蛍光を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

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

3.2.3.5.2 犬コロナウイルス含有量試験

3.2.3.5.2.1 試験材料

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

3.2.3.5.2.2 試験方法

二抗体サンドイッチ ELISA 法により犬コロナウイルス抗原量を測定する。ELISA プレートに抗犬コロナウイルスモノクローナル抗体液を分注し、37 ℃で 90 分間反応させ固相化する。以下各反応後に洗浄液で洗浄する。1%牛血清アルブミン・ポリソルベート 20 加リン酸緩衝食塩液を分注し、37 ℃で 60 分間反応させブロッキングする。検体及び参考品を 2 倍階段希釈した各希釈液を各穴に加え、37 ℃で 60 分間反応する。抗犬コロナウイルスウサギ抗体液を各穴に加え、37 ℃で 60 分間反応する。アルカリリフォスファターゼ標識抗ウサギ IgG 液を各穴に加え、37 ℃で 60 分間反応する。リン酸 p-ニトロフェニル基質液を加え、37 ℃で 25 ~ 30 分間反応させた後、3mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えて反応を停止する。主波長 405nm、副波長 490nm で吸光度を測定する。

3.2.3.5.2.3 判定

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

3.2.4 不活化試験

3.2.4.1 犬コロナウイルス不活化試験

3.2.4.1.1 試験材料

3.2.4.1.1.1 試料

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

3.2.4.1.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.2.4.1.2 試験方法

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

3.2.4.1.3 判定

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

3.3 小分製品の試験

3.3.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、混合生ワクチンは、固有の色調を有する乾燥物でなければならない。また、液状不活化ワクチンは、固有の色調を有する均質な液体でなければならない。異物又は異臭を認めてはならない。混合生ワクチンを液状不活化ワクチンで溶解したものは、固有の色調を有する均質な液体でなければならず、異物又は異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.3.2 pH 測定試験

一般試験法の pH 測定試験法を準用して試験するとき、液状不活化ワクチンの pH は、固有の値を示さなければならない。

3.3.3 真空度試験

一般試験法の真空度試験法を準用して試験するとき、混合生ワクチンは、適合しなければならない。ただし、窒素充填製品では、本試験を省略することができる。

3.3.4 含湿度試験

一般試験法の含湿度試験法を準用して試験するとき、混合生ワクチンは、適合しなければならない。

3.3.5 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.6 マイコプラズマ否定試験

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

3.3.7 迷入ウイルス否定試験

液状不活化ワクチンと同量の滅菌水で混合生ワクチンを溶解したものについて、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1、2.5.1、2.6.1、及び 2.8.2 を準用して試験するとき、混合生ワクチンは、適合しなければならない。ただし、中和用抗血清は、ジステンパーウィルス血清（付記4）、抗犬アデノウイルス（2型）血清（付記5）、抗犬パラインフルエンザウイルス血清（付記6）及び抗犬パルボウイルス血清（付記7）を、それぞれ非効化したものを用いる。

3.3.8 ウィルス含有量試験

3.3.8.1 ジステンパーウィルス含有量試験

3.3.8.1.1 試験材料

3.3.8.1.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の滅菌水で溶解する。試験品中のジステンパーウィルス以外のウイルスを各抗血清（付記5、6及び7）を非効化したもので中和したものとウイルス増殖用培養液又は適当と認められた希釈液で10倍段階希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.8.1.1.2 培養細胞

Vero 細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.3.8.1.2 試験方法

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

3.3.8.1.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。試験品のウィルス含有量は、1頭分当たり $10^{3.5}$ TCID₅₀以上でなければならない。ただし、特に認められたものは、そのウイルス含有量とする。

3.3.8.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験

3.3.8.2.1 試験材料

3.3.8.2.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の滅菌水で溶解する。試験品中の犬アデノウイルス（2型）以外のウイルスの各抗血清（付記4、6及び7）を非効化したもので中和したものとウイルス増殖用培養液で10倍段階希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.8.2.1.2 培養細胞

犬腎細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.3.8.2.2 試験方法

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

3.3.8.2.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり $10^{5.0}$ TCID₅₀以上でなければならない。ただし、特に認められたものは、そのウイルス含有量とする。

3.3.8.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

3.3.8.3.1 試験材料

3.3.8.3.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の滅菌水で溶解する。試験品中の犬パラインフルエンザウイルス以外のウイルスの各抗血清（付記4、5及び7）を非働化したもので中和したものを作り、ウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.8.3.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.3.8.3.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4本(穴)以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間培養し、観察する。培養後、培養液を採取し、これに等量の0.4vol%モルモット赤血球浮遊液を等量加え、室温で90分間静置後し、観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.3.8.3.3 判定

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

3.3.8.4 犬パルボウイルス含有量試験

3.3.8.4.1 試験材料

3.3.8.4.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の滅菌水で溶解する。試験品中の犬パルボウイルス以外のウイルスの各抗血清（付記4、5及び6）を非働化したもので中和したものを作り、ウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.8.4.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.3.8.4.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4本(穴)以上の培養細胞に接種し、37℃で24時間培養した後、ウイルス増殖用培養液と交換し、さらに37℃で6日間培養する。培養後、培養液を採取し、これに等量の牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液を加え、さらにこの混合液と等量のVAD6.0液で調製した0.5vol%豚赤血球浮遊液を加え、4℃で静置後、赤血球凝集の有無を観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.3.8.4.3 判定

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

3.3.9 チメロサール定量試験

チメロサールを添加した液状不活化ワクチンについては、一般試験法のチメロサー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。

3.3.10 吻常毒性否定試験

一般試験法の吻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。

3.3.11 安全試験

3.3.11.1 試験材料

3.3.11.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.3.11.1.2 試験動物

6か月齢未満の犬を用いる。

3.3.11.2 試験方法

試験動物3頭を試験群、2頭を対照群とする。試験群に注射材料1頭分ずつを用法に従って2回

注射し、対照群と共に6週間観察する。ただし、特に認められたものは、その期間とする。

3.3.11.3 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。

3.3.12 力価試験

3.3.12.1 ジステンパー力価試験

3.3.12.1.1 試験材料

3.3.12.1.1.1 試験動物

3.3.11 の試験に用いた犬を用いる。

3.3.12.1.1.2 中和試験用ウイルス

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

3.3.12.1.1.3 培養細胞

適当と認められた培養細胞を用いる。

3.3.12.1.2 試験方法

3.3.11 の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。各プール血清を非凍化し、ウイルス増殖用培養液又は適当と認められた希釈液で5倍階段希釈する。各希釈血清と0.1mL 中約200TCID₅₀ の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、4℃で一夜又は37℃で60分間処理する。この各混合液0.1mL ずつをそれぞれ4本(穴)以上の培養細胞に接種し、37℃で7～8日間培養し、観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.3.12.1.3 判定

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

3.3.12.2 犬アデノウイルス(2型)感染症力価試験

3.3.12.2.1 試験材料

3.3.12.2.1.1 試験動物

3.3.11 の試験に用いた犬を用いる。

3.3.12.2.1.2 中和試験用ウイルス

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

3.3.12.2.1.3 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

3.3.12.2.2 試験方法

3.3.11 の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、ウイルス増殖用培養液又は適当と認められた希釈液で2又は5倍階段希釈する。各希釈血清と0.1mL 中約200TCID₅₀ の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、37℃で60分間処理する。この各混合液0.1mL ずつをそれぞれ4本(穴)以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間培養し、観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.3.12.2.3 判定

培養細胞のCPE を阻止したものを陽性とし、中和抗体価を ED₅₀ で求める。

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

3.3.12.3 犬パラインフルエンザ力価試験

3.3.12.3.1 試験材料

3.3.12.3.1.1 試験動物

3.3.11 の試験に用いた犬を用いる。

3.3.12.3.1.2 中和試験用ウイルス

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

3.3.12.3.1.3 培養細胞

犬腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.3.12.3.2 試験方法

3.3.11 の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、ウイルス増殖用培養液又は適当と認められた希釀液で2倍階段希釀する。各希釀血清と0.1mL 中約 200TCID₅₀ の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、37 °Cで 60 分間処理する。この各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本(穴)以上の培養細胞に接種し、37 °Cで 7 日間培養する。培養後、培養液を採取し、これに等量の 0.4vol % モルモット赤血球浮遊液を等量加え、常温で 90 分間静置し、観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.3.12.3.3 判定

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

3.3.12.4 犬パルボウイルス感染症力価試験

3.3.12.4.1 試験材料

3.3.12.4.1.1 試験動物

3.3.11 の試験に用いた犬を用いる。

3.3.12.4.1.2 赤血球凝集抗原

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

3.3.12.4.2 試験方法

3.3.11 の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について赤血球凝集抑制試験を行う。各試験群の血清は、非働化、RDE(付記8)、25w/v % カオリン液及び豚赤血球で処理した後牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液を用いて2倍階段希釀する。各段階の希釀血清に8単位に調製した血球凝集抗原を等量加え、常温で 60 分間処理したのち VAD6.0 液で調製した 0.5vol % 豚赤血球浮遊液を等量加え、4 °Cで一夜静置し、観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.3.12.4.3 判定

赤血球凝集を抑制した血清の最高希釀倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。

試験群の赤血球凝集抑制抗体価は、64 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、8 倍未満でなければならない。ただし、特に認められたものは、その抗体価とする。

3.3.12.5 犬コロナウイルス感染症力価試験

3.3.12.5.1 試験材料

3.3.12.5.1.1 注射材料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンで溶解した試験品を注射材料とする。

3.3.12.5.1.2 試験動物

体重約 300g のモルモットを用いる。

3.3.12.5.1.3 中和試験用ウイルス

適当と認められた犬コロナウイルス株を用いる。

3.3.12.5.1.4 培養細胞

猫全胎子継代細胞又は適当と認められた細胞を用いる。

3.3.12.5.2 試験方法

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

3.3.12.5.3 判定

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

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

4 貯法及び有効期間

有効期間は、2 年 4 か月間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合は、その期間とする。

付記 1 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中	
牛血清	10 ~ 20 mL
トリプトース・ホスフェイト・プロス	2.95 g
イーグル培養液 (MEM)	残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 7.6 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてよい。

付記 2 牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液

1,000mL 中	
塩化ナトリウム	7.01 g
ホウ酸	3.09 g
水酸化ナトリウム	0.96 g
水	残 量

牛血清アルブミン 0.2w/v % となるように加えたのち、水酸化ナトリウムで pH を 9.0 に調整する。

付記 3 VAD6.0 液

1,000mL 中	
塩化ナトリウム	8.77 g
リン酸水素二ナトリウム	5.68 g
リン酸二水素ナトリウム(二水和物)	40.56 g
水	残 量

牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液と等量混合して pH を 6.0 に調整する。

付記 4 抗ジステンパーウイルス血清

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

付記 5 抗犬アデノウイルス (2型) 血清

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

付記6 抗犬パラインフルエンザウイルス血清

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

付記7 抗犬パルボウイルス血清

ジステンパーウイルスで免疫した兎、モルモット又はフェレットの血清で、試験品のウイルスを完全に中和する力値を有するもの

付記8 RDE

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

ワクチンの部ジステンパー・犬アデノウイルス（2型）感染症・犬パラインフルエンザ・犬パルボウイルス感染症・犬レプトスピラ病（カニコーラ・コベンハーゲニー・ヘブドマディス）混合ワクチンの次に次の2項を加える。

ジステンパー・犬アデノウイルス（2型）感染症・犬パラインフルエンザ・犬パルボウイルス感染症・犬コロナウイルス感染症・犬レプトスピラ病混合ワクチン

1 定義

弱毒ジステンパーウイルス、弱毒犬アデノウイルス（2型）、弱毒犬パラインフルエンザウイルス及び弱毒犬パルボウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液の混合液を凍結乾燥したワクチン（以下「混合生ワクチン」という。）と、レプトスピラ・カニコーラ及びレプトスピラ・イクテロヘモラジーの全培養菌液を不活化したもの又はこれを不活化した後可溶化したものと犬コロナウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化したものとを混合したワクチン（以下「液状不活化ワクチン-1」という。）とを組み合わせたワクチン、又は弱毒ジステンパーウイルス、弱毒犬アデノウイルス（2型）、弱毒犬パラインフルエンザウイルス及び弱毒犬パルボウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液とレプトスピラ・カニコーラ及びレプトスピラ・イクテロヘモラジーの全培養菌液を不活化した後可溶化したものの混合液を凍結乾燥したワクチン（以下「混合乾燥ワクチン」という。）と犬コロナウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化したものとを組み合わせたワクチン（以下「液状不活化ワクチン-2」という。）とを組み合わせたワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 ジステンパーウイルス株

2.1.1.1 名称

弱毒ジステンパーウイルスオンドーステポート株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

犬に注射しても病原性を示さない。発育鶏卵の漿尿膜上又は感受性のある培養細胞に接種すると、ポック又はCPEを伴って増殖する。

2.1.1.3 繼代及び保存

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

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

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

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.2 犬アデノウイルス（2型）株

2.1.2.1 名称

弱毒犬アデノウイルス（2型）V-197株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

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

2.1.2.3 繼代及び保存

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

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

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

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.3 犬パラインフルエンザウイルス株

2.1.3.1 名称

弱毒犬パラインフルエンザウイルス 91880 株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

犬に注射しても病原性を示さない。感受性のある培養細胞に接種すると増殖し、細胞はモルモット赤血球を吸着する。

2.1.3.3 継代及び保存

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

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

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

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.4 犬パルボウイルス株

2.1.4.1 名称

弱毒犬パルボウイルス K-3ip69 株又は製造に適当と認められた株

2.1.4.2 性状

犬に注射しても病原性を示さない。犬及び猫由来細胞で核内封入体を伴って増殖し、その培養ウイルス液は豚及び猿の赤血球を凝集する。

2.1.4.3 継代及び保存

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

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

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

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.5 犬コロナウイルス株

2.1.5.1 名称

犬コロナウイルス TN-449 株又はこれと同等と認められた株

2.1.5.2 性状

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

2.1.5.3 継代及び保存

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

原種ウイルスは、直接原株から連続した工程により製造し、その継代数は3代以内でなければな

らない。種ウイルスは、原種ウイルスから2代以内に製造しなければならない。ただし、特に認められたものは、その継代数以内とする。

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

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.6 レプトスピラ・カニコーラ株

2.1.6.1 名称

レプトスピラ・カニコーラ（以下「L・カニコーラ」という。）フォント・エトレヒトIV株又はこれと同等と認められた株

2.1.6.2 性状

モルモット及びハムスターの腹腔内に注射すると増殖する。

抗L・カニコーラ血清（付記1）に対して特異的に凝集する。

2.1.6.3 繰代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株及び種菌とも特に認められた継代数以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して-70℃以下で保存する。

2.1.7 レプトスピラ・イクテロヘモラジー株

2.1.7.1 名称

レプトスピラ・イクテロヘモラジー（以下「L・イクテロヘモラジー」という。）コペンハーゲニー株又はこれと同等と認められた株

2.1.7.2 性状

モルモット及びハムスターの腹腔内に注射すると増殖する。

抗L・イクテロヘモラジー血清（付記2）に対して特異的に凝集する。

2.1.7.3 繰代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株及び種菌とも特に認められた継代数以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して-70℃以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 ジステンパーウイルス

2.2.1.1 培養細胞

Vero細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.1.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.2 犬アデノウイルス（2型）

2.2.2.1 培養細胞

犬腎継代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.3 犬パラインフルエンザウイルス

2.2.3.1 培養細胞

犬腎継代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.3.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.4 犬パルボウイルス

2.2.4.1 培養細胞

猫腎継代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.4.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.5 犬コロナウイルス

2.2.5.1 培養細胞

猫腎継代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.5.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.6 L・カニコーラ

2.2.6.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.2.7 L・イクテロヘモラジー

2.2.7.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 ジステンパーウイルス原液

2.3.1.1 細胞の培養

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

2.3.1.2 ウィルスの培養

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

原液について、3.3.1、3.3.2及び3.3.3.1の試験を行う。

2.3.2 犬アデノウイルス（2型）原液

2.3.2.1 細胞の培養

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

2.3.2.2 ウィルスの培養

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

原液について、3.3.1、3.3.2及び3.3.3.2の試験を行う。

2.3.3 犬パラインフルエンザウイルス原液

2.3.3.1 細胞の培養

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

2.3.3.2 ウィルスの培養

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

原液について、3.3.1、3.3.2及び3.3.3.3の試験を行う。

2.3.4 犬パルボウイルス原液

2.3.4.1 細胞の培養

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

2.3.4.2 ウィルスの培養

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

原液について、3.3.1、3.3.2及び3.3.3.4の試験を行う。

2.3.5 犬コロナウイルス原液

2.3.5.1 細胞の培養

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

2.3.5.2 ウィルスの培養

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

2.3.5.3 不活化

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

不活化ウイルス浮遊液について、3.3.4.1の試験を行う。

2.3.5.4 原液の調整

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

原液について、3.3.1の試験を行う。

2.3.6 L・カニコーラ原液

2.3.6.1 菌液

種菌を培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。培養菌液について、3.2の試験を行う。

2.3.6.2 不活化

培養菌液に適當と認められた不活化剤を加えて不活化したものを不活化レプトスピラ菌液とする。

不活化レプトスピラ菌液について、3.3.4.2の試験を行う。

2.3.6.3 可溶化

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

原液について、3.3.1の試験を行う。

2.3.7 L・イクテロヘモラジー原液

2.3.7.1 菌液

種菌を培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。培養菌液について、3.2の試験を行う。

2.3.7.2 不活化

培養菌液に適當と認められた不活化剤を加えて不活化したものを不活化レプトスピラ菌液とする。

不活化レプトスピラ菌液について、3.3.4.2の試験を行う。

2.3.7.3 可溶化

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

原液について、3.3.1の試験を行う。

2.4 最終バルク

2.4.1 混合生ワクチン

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

2.4.2 混合乾燥ワクチン

ジステンパーーウィルス原液、犬アデノウイルス（2型）原液、犬パラインフルエンザウイルス原液及び犬パルボウイルス原液と適當と認められた溶液で濃度調整したL・カニコーラ原液及びL・イクテロヘモラジー原液を混合し、最終バルクとする。この場合、適當と認められた安定剤を添加してもよい。

2.4.3 液状不活化ワクチン

2.4.3.1 液状不活化ワクチン-1

適当と認められた溶液で濃度調整した犬コロナウイルス原液、L・カニコーラ原液及びL・イクテロヘモラジー原液に適当と認められたアジュバントを混合し、最終バルクとする。この場合、適當と認められた保存剤を添加してもよい。

2.4.3.2 液状不活化ワクチン-2

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

2.5 小分製品

2.5.1 混合生ワクチン及び混合乾燥ワクチン

最終バルクを小分容器に分注し、凍結乾燥し、小分製品とする。

小分製品について、3.4の試験を行う。

2.5.2 液状不活化ワクチン-1 及び液状不活化ワクチン-2

最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。

小分製品について、3.4の試験を行う。

3 試験法

3.1 培養細胞の試験

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

3.1.1 培養観察

対照培養細胞を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で培養する。対照培養細胞をプールし、4本以上の培養びん及びカバーグラスを入れた4枚以上のシャーレに継代し、7日間以上培養し、観察するとき、CPEを認めてはならない。

3.1.2 赤血球吸着試験

3.1.1の試験最終日に培養びんの培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を2回洗浄し、0.1 vol %モルモット赤血球浮遊液を重層し、60分間静置後、赤血球吸着の有無を観察するとき、培養細胞に赤血球吸着を認めてはならない。

3.1.3 封入体染色試験

3.1.1の試験最終日に培養カバーグラスをリン酸緩衝食塩液で洗浄し、固定した後、ギムザ染色し、封入体の有無を観察するとき、培養細胞に封入体を認めてはならない。

3.2 培養菌液の試験

3.2.1 夾雜菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。又は、暗視野法を用いて培養菌液を鏡検するとき、レプトスピラ以外の菌を認めてはならない。

3.2.2 マイコプラズマ否定試験

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

3.2.3 純菌数試験

光電比色計又は菌数計算法を用いて菌数を計算するとき、それぞれの培養菌液に1mL中 $10^{9.0}$ 個以上の菌を含まなければならない。又は、比濁法を用いて菌数を計算するとき、それぞれの培養菌液は2.400比濁単位以上でなければならない。

3.3 原液の試験

3.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.2 マイコプラズマ否定試験

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

3.3.3 ウィルス含有量試験

3.3.3.1 ジステンパー・ウィルス含有量試験

3.3.3.1.1 試験材料

3.3.3.1.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液(付記3)又は適当と認められた培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.3.1.1.2 培養細胞

Vero細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.3.3.1.2 試験方法

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

3.3.3.1.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

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

3.3.3.2 犬アデノウイルス(2型)含有量試験

3.3.3.2.1 試験材料

3.3.3.2.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液又は適当と認められた培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.3.2.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.3.3.2.2 試験方法

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

3.3.3.2.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1mL中10^{7.5}TCID₅₀以上でなければならない。ただし、特に認められたものは、そのウイルス含有量とする。

3.3.3.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

3.3.3.3.1 試験材料

3.3.3.3.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液又は適当と認められた培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.3.3.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.3.3.3.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4本(穴)以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間培養する。培養後、培養液を採取し、これに等量の0.4vol%モルモット赤血球浮遊液を等量加え、室温で90分間静置し、観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.3.3.3.3 判定

培養液に赤血球の凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1mL中10^{6.5}TCID₅₀以上でなければならない。ただし、特に認められたものは、そのウイルス含有量とする。

3.3.3.4 犬パルボウイルス含有量試験

3.3.3.4.1 試験材料

3.3.3.4.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液B又は適当と認められた培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.3.4.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.3.3.4.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4本(穴)以上の培養細胞に接種し、37℃で24時間培養した後、ウイルス増殖用培養液と交換し、さらに37℃で6日間培養する。培養後、培養液を採取し、これに等量の牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液(付記4)を加え、さらにこの混合液と等量のVAD6.0液(付記5)で調製した0.5vol%豚赤血球浮遊液を加え、4℃で静置後、赤血球凝集の有無を観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.3.3.4.3 判定

培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

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

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

3.3.3.5.1 犬コロナウイルス含有量試験

3.3.3.5.1.1 試験材料

3.3.3.5.1.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液又は適当と認められた培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.3.5.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.3.3.5.1.2 試験方法

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

3.3.3.5.1.3 判定

特異蛍光を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

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

3.3.3.5.2 犬コロナウイルス含有量試験

3.3.3.5.2.1 試験材料

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

3.3.3.5.2.2 試験方法

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

3.3.3.5.2.3 判定

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

3.3.4 不活化試験

3.3.4.1 犬コロナウイルス不活化試験

3.3.4.1.1 試験材料

3.3.4.1.1.1 試料

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

3.3.4.1.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.3.4.1.2 試験方法

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

3.3.4.1.3 判定

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

3.3.4.2 レプトスピラ不活化試験

3.3.4.2.1 試験材料

3.3.4.2.1.1 試料

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

3.3.4.2.1.2 培地

適当と認められた培地を用いる。

3.3.4.2.2 試験方法

培地 20mL を入れた試験管 3 本に試料 0.5mL ずつを接種し、28 ~ 30 °Cで 6 ~ 8 日間培養し、各試験管から 1 白金耳を採取し、暗視野法で鏡検する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.3.4.2.3 判定

レプトスピラの増殖を認めてはならない。

3.4 小分製品の試験

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

3.4.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、混合生ワクチン又は混合乾燥ワクチンは、固有の色調を有する乾燥物でなければならない。また、液状不活化ワクチン-1 又は液状不活化ワクチン-2 は、固有の色調を有する均質な液体でなければならず、異物又は異臭を認めてはならない。混合生ワクチンを液状不活化ワクチン-1 で溶解したもの（以下「混合ワクチン-1」という。）又は混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチン-2 で溶解したもの（以下「混合ワクチン-2」という。）は、固有の色調を有する均質な液体でなければならず、異物又は異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.4.2 pH 測定試験

一般試験法の pH 測定試験法を準用して試験するとき、液状不活化ワクチン-1 又は液状不活化ワクチン-2 の pH は、固有の値を示さなければならない。

3.4.3 真空度試験

一般試験法の真空度試験法を準用して試験するとき、混合生ワクチン又は混合乾燥ワクチンは、適合しなければならない。ただし、窒素充填製品では、本試験を省略することができる。

3.4.4 含湿度試験

一般試験法の含湿度試験法を準用して試験するとき、混合生ワクチン又は混合乾燥ワクチンは、適合しなければならない。

3.4.5 無菌試験

混合ワクチンー1又は混合ワクチンー2について、一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.6 マイコプラズマ否定試験

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

3.4.7 迷入ウイルス否定試験

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

3.4.8 ウィルス含有量試験

3.4.8.1 ジステンパーウイルス含有量試験

3.4.8.1.1 試験材料

3.4.8.1.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンー1と同量の滅菌水で溶解する。又は混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンー2と同量の精製水で溶解する。試験品中のジステンパーウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記7、8及び9）を非効化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液又は適當と認められた希釀液で10倍階段希釀し、各段階の希釀液を試料とする。

3.4.8.1.1.2 培養細胞

Vero 細胞又は適當と認められた培養細胞を用いる。

3.4.8.1.2 試験方法

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

3.4.8.1.3 判定

培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり $10^{3.5}$ TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に認められたものは、そのウイルス含有量とする。

3.4.8.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験

3.4.8.2.1 試験材料

3.4.8.2.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンー1と同量の滅菌水で溶解する。又は混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチンー2と同量の精製水で溶解する。試験品中の犬アデノウイルス（2型）以外のウイルスの各抗血清（付記6、8及び9）を非効化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液で10倍階段希釀し、各段階の希釀液を試料とする。

3.4.8.2.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞又は適當と認められた培養細胞を用いる

3.4.8.2.2 試験方法

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

ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.4.8.2.3 判定

培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり $10^{5.0}$ TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に認められたものは、そのウイルス含有量とする。

3.4.8.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

3.4.8.3.1 試験材料

3.4.8.3.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチン-1 と同量の滅菌水で溶解する。又は混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチン-2 と同量の精製水で溶解する。試験品中の犬パラインフルエンザウイルス以外のウイルスの各抗血清（付記6、7及び9）を非働化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.4.8.3.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.4.8.3.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ4本(穴)以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間培養し、観察する。培養後、培養液を採取し、これに等量の 0.4vol % モルモット赤血球浮遊液を等量加え、室温で90分間静置後し、観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.4.8.3.3 判定

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

3.4.8.4 犬パルボウイルス含有量試験

3.4.8.4.1 試験材料

3.4.8.4.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチン-1 と同量の滅菌水で溶解する。又は混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチン-2 と同量の精製水で溶解する。試験品中の犬パルボウイルス以外のウイルスの各抗血清（付記6、7及び8）を非働化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.4.8.4.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.4.8.4.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ4本(穴)以上の培養細胞に接種し、37℃で24時間培養した後、ウイルス増殖用培養液と交換し、さらに37℃で6日間培養する。培養後、培養液を採取し、これに等量の牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液を加え、さらにこの混合液と等量の VAD6.0 液で調製した 0.5vol% 豚赤血球浮遊液を加え、4℃で3時間または一夜静置後、赤血球凝集の有無を観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.4.8.4.3 判定

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

3.4.9 チメロサール定量試験

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

3.4.10 異常毒性否定試験

混合ワクチンー1又は混合ワクチンー2について一般試験法の異常毒性否定試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.11 毒性限度確認試験

一般試験法の毒性限度確認試験法1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.12 安全試験

3.4.12.1 試験材料

3.4.12.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.12.1.2 試験動物

6か月齢未満の犬を用いる。

3.4.12.2 試験方法

試験動物3頭を試験群、2頭を対照群とする。試験群に注射材料1頭分ずつを用法に従って2回注射し、対照群と共に6週間観察する。ただし、特に認められたものは、その期間とする。

3.4.12.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に異常を認めてはならない。

3.4.13 力価試験

3.4.13.1 ジステンパーカ力価試験

3.4.13.1.1 試験材料

3.4.13.1.1.1 試験動物

3.4.12の試験に用いた犬を用いる。

3.4.13.1.1.2 中和試験用ウイルス

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

3.4.13.1.1.3 培養細胞

適当と認められた培養細胞を用いる。

3.4.13.1.2 試験方法

3.4.12の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。各プール血清を非凍化し、ウイルス増殖用培養液又は適当と認められた希釈液で5倍階段希釈する。各希釈血清と 0.1mL 中約 200TCID₅₀ の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、4℃で一夜又は 37℃で 60 分間処理する。この各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ4本(穴)以上の培養細胞に接種し、37℃で 7~8 日間培養し、観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.4.13.1.3 判定

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

3.4.13.2 犬アデノウイルス(2型)感染症力価試験

3.4.13.2.1 試験材料

3.4.13.2.1.1 試験動物

3.4.12の試験に用いた犬を用いる。

3.4.13.2.1.2 中和試験用ウイルス

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

3.4.13.2.1.3 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

3.4.13.2.2 試験方法

3.4.12 の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、ウイルス増殖用培養液又は適当と認められた希釀液で2又は5倍階段希釀する。各希釀血清と0.1mL 中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、37℃で60分間処理する。この各混合液0.1mLずつをそれぞれ4本(穴)以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間培養し、観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.4.13.2.3 判定

培養細胞のCPEを阻止したものを陽性とし、中和抗体値をED₅₀で求める。

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

3.4.13.3 犬パラインフルエンザ力価試験

3.4.13.3.1 試験材料

3.4.13.3.1.1 試験動物

3.4.12の試験に用いた犬を用いる。

3.4.13.3.1.2 中和試験用ウイルス

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

3.4.13.3.1.3 培養細胞

犬腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.4.13.3.2 試験方法

3.4.12の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、ウイルス増殖用培養液又は適当と認められた希釀液で2倍階段希釀する。各希釀血清と0.1mL 中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、37℃で60分間処理する。この各混合液0.1mLずつをそれぞれ4本(穴)以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間培養する。培養後、培養液を採取し、これに等量の0.4vol%モルモット赤血球浮遊液を等量加え、常温で90分間静置し、観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.4.13.3.3 判定

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

3.4.13.4 犬パルボウイルス感染症力価試験

3.4.13.4.1 試験材料

3.4.13.4.1.1 試験動物

3.4.12の試験に用いた犬を用いる。

3.4.13.4.1.2 赤血球凝集抗原

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

3.4.13.4.2 試験方法

3.4.12の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について赤血球凝集抑制試験を行う。各試験群の血清は、RDE(付記10)、25w/v%カオリン液及び豚赤血球で処理した後牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液を用いて2倍階段希釀する。各段階の希釀血清に8単位に調製した血球凝集抗原を等量加え、常温で60分間処理したのちVAD6.0液で調製したウイルス調整希釀液で調製した0.5vol%豚赤血球浮遊液を等量加え、4℃で一夜静置し、観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.4.13.4.3 判定

赤血球凝集を抑制した血清の最高希釀倍数を赤血球凝集抑制抗体値とする。

試験群の赤血球凝集抑制抗体価は、64倍以上でなければならない。この場合、対照群では、8倍未満でなければならない。ただし、特に認められたものは、その抗体価とする。

3.4.13.5 犬コロナウイルス感染症力価試験

3.4.13.5.1 試験材料

3.4.13.5.1.1 注射材料

混合ワクチン-1又は混合ワクチン-2を注射材料とする。

3.4.13.5.1.2 試験動物

体重約300gのモルモットを用いる。

3.4.13.5.1.3 中和試験用ウイルス

適当と認められた犬コロナウイルス株を用いる。

3.4.13.5.1.4 培養細胞

猫全胎子継代細胞又は適当と認められた細胞を用いる。

3.4.13.5.2 試験方法

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

3.4.13.5.3 判定

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

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

3.4.13.6 犬レプトスピラ病力価試験

3.4.13.6.1 試験材料

3.4.13.6.1.1 注射材料

混合ワクチン-1又は混合ワクチン-2を注射材料とする。

3.4.13.6.1.2 試験動物

体重約300gのモルモット又は体重60~100gのハムスターを用いる。

3.4.13.6.1.3 凝集反応用菌液

L・カニコーラ及びL・イクテロヘモラジーの生菌浮遊液を用いる。

3.4.13.6.2 試験方法

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

3.4.13.6.3 判定

それぞれの菌液に対して80%以上が8倍以上の凝集価を示さなければならない。

4 貯法及び有効期間

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

付記1 抗L・カニコーラ血清

L・カニコーラで免疫した兎又はモルモットの血清

付記2 抗L・イクテロヘモラジー血清

L・イクテロヘモラジーで免疫した兎又はモルモットの血清

付記3 ウィルス増殖用培養液

1,000mL 中
 牛血清 10 ~ 20 mL
 トリプトース・ホスフェイト・プロス 2.95 g
 イーグル培養液 (MEM) 残量
 炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 7.6 に調整する。
 必要最少量の抗生物質を加えてよい。

付記 4 牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液

1,000mL 中
 塩化ナトリウム 7.01 g
 ホウ酸 3.09 g
 水酸化ナトリウム 0.96 g
 水 残量

牛血清アルブミン 0.2w/v% となるように加えたのち、水酸化ナトリウムで pH 9.0 に調整する。

付記 5 VAD6.0 液

1,000mL 中
 塩化ナトリウム 8.77 g
 リン酸水素二ナトリウム 5.68 g
 リン酸二水素ナトリウム(二水和物) 40.56 g
 水 残量

牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液と等量混合して pH 6.0 に調整する。

付記 6 抗ジステンペーウイルス血清

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

付記 7 抗犬アデノウイルス(2型) 血清

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

付記 8 抗犬ペラインフルエンザウイルス血清

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

付記 9 抗犬パルボウイルス血清

ジステンペーウイルスで免疫した兎、モルモット又はフェレットの血清で、試験品のウイルスを完全に中和する力値を有するもの

付記 10 RDE

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

ジステンパー・犬アデノウイルス（2型）感染症・犬パラインフルエンザ・犬パルボウイルス感染症・犬コロナウイルス感染症・犬レプトスピラ病（カニコーラ、コペンハーゲニー、ヘブドマディス）混合ワクチン

1 定義

弱毒ジステンパーウイルス、弱毒犬アデノウイルス（2型）、弱毒犬パラインフルエンザウイルス、弱毒犬パルボウイルス及び弱毒犬コロナウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液の混合液を凍結乾燥したワクチン（以下「混合生ワクチン」という。）と、レプトスピラ・カニコーラ、レプトスピラ・コペンハーゲニー及びレプトスピラ・ヘブドマディスの全培養菌液を不活化したワクチン（以下「液状不活化ワクチン」という。）とを組み合わせたものである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 ジステンパーウイルス株

2.1.1.1 名称

弱毒ジステンパーウイルス DFE-HC 株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

犬に注射しても病原性を示さない。発育鶏卵の漿尿膜上又は感受性のある培養細胞に接種すると、ポック又は CPE を伴って増殖する。

2.1.1.3 繼代及び保存

原株及び原種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格 2.2.1 の鶏腎初代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

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

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

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

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.2 犬アデノウイルス（2型）株

2.1.2.1 名称

弱毒犬アデノウイルス（2型）OD-N/SL 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

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

2.1.2.3 繼代及び保存

原株及び原種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格 2.6.1 の豚腎培養細胞又は適当と認めら

れた培養細胞で継代する。

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

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

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

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.3 犬パラインフルエンザウイルス株

2.1.3.1 名称

弱毒犬パラインフルエンザウイルス DL-E 株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

犬に注射しても病原性を示さない。感受性のある培養細胞に接種すると増殖し、細胞はモルモット赤血球を吸着する。

2.1.3.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

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

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

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

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.4 犬パルボウイルス株

2.1.4.1 名称

弱毒犬パルボウイルス 29-F/LT 株又はこれと同等と認められた株

2.1.4.2 性状

犬に注射しても病原性を示さない。犬及び猫由来細胞で核内封入体を伴って増殖し、その培養ウイルス液は豚及び猿の赤血球を凝集する。

2.1.4.3 継代及び保存

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

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

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

原株及び原種ウイルスは、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。ただし、

特に認められたものは、その保存温度とする。

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.5 犬コロナウイルス株

2.1.5.1 名称

弱毒犬コロナウイルス 5821-B 株又はこれと同等と認められた株

2.1.5.2 性状

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

2.1.5.3 繙代及び保存

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

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

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

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

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチン製造ごとに用時調製する。

2.1.6 レプトスピラ・カニコーラ株

2.1.6.1 名称

レプトスピラ・カニコーラ（以下「L・カニコーラ」という。）フントヨートレヒト IV 株又はこれと同等と認められた株

2.1.6.2 性状

モルモット及びハムスターの腹腔内に注射すると増殖する。

抗 L・カニコーラ血清（付記 1）に対して特異的に凝集する。

2.1.6.3 繙代及び保存

原株及び種菌は、適當と認められた培地で継代する。

継代は、原株及び種菌とも特に認められた継代数以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して-70℃以下に保存する。

2.1.7 レプトスピラ・コペンハーゲニー株

2.1.7.1 名称

レプトスピラ・コペンハーゲニー（以下「L・コペンハーゲニー」という。）芝浦株又はこれと同等と認められた株

2.1.7.2 性状

モルモット及びハムスターの腹腔内に注射すると増殖する。

抗 L・コペンハーゲニー血清（付記 2）に対して特異的に凝集する。

2.1.7.3 繙代及び保存

原株及び種菌は、適當と認められた培地で継代する。

継代は、原株及び種菌とも特に認められた継代数以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して-70℃以下に保存する。

2.1.8 レプトスピラ・ヘプドマディス株

2.1.8.1 名称

レプトスピラ・ヘプドマディス（以下「L・ヘプドマディス」という。）秋疫B株又はこれと同等と認められた株

2.1.8.2 性状

モルモット及びハムスターの腹腔内に注射すると増殖する。

抗L・ヘプドマディス血清（付記3）に対して特異的に凝集する。

2.1.8.3 継代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株及び種菌とも特に認められた継代数以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して-70℃以下に保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 ジステンパーウイルス

2.2.1.1 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.2.1 の鶏腎初代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.1.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.2 犬アデノウイルス（2型）

2.2.2.1 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.6.1 の豚腎初代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.3 犬パラインフルエンザウイルス

2.2.3.1 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.3.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.4 犬パルボウイルス

2.2.4.1 培養細胞

猫腎培養細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.4.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.5 犬コロナウイルス

2.2.5.1 培養細胞

猫腎継代細胞又は製造に適當と認められた培養細胞を用いる。

2.2.5.2 培養液

製造に適當と認められた培養液を用いる。

2.2.6 L・カニコーラ

2.2.6.1 培地

製造に適當と認められた培地を用いる。

2.2.7 L・コペンハーゲニー

2.2.7.1 培地

製造に適當と認められた培地を用いる。

2.2.8 L・ヘブドマディス

2.2.8.1 培地

製造に適當と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 ジステンパーウイルス原液

2.3.1.1 細胞の培養

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

個体別培養細胞について、3.1の試験を行う。

2.3.1.2 ウィルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルス増殖の極期に感染材料を採取し、ろ液又は遠心上清を原液とする。この場合、適當と認められた安定剤を添加してもよい。

原液について、3.3.1及び3.3.2.1の試験を行う。

2.3.2 犬アデノウイルス（2型）原液

2.3.2.1 細胞の培養

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

個体別培養細胞について、3.1の試験を行う。

2.3.2.2 ウィルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルス増殖の極期に感染材料を採取し、ろ液又は遠心上清を原液とする。この場合、適當と認められた安定剤を添加してもよい。

原液について、3.3.1及び3.3.2.2の試験を行う。

2.3.3 犬パラインフルエンザウイルス原液

2.3.3.1 細胞の培養

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

個体別培養細胞について、3.1の試験を行う。

2.3.3.2 ウィルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウィルス増殖の極期に感染材料を採取し、ろ液又は遠心上清を原液とする。この場合、適当と認められた安定剤を添加してもよい。

原液について、3.3.1 及び 3.3.2.3 の試験を行う。

2.3.4 犬パルボウイルス原液

2.3.4.1 細胞の培養

1回に処理し、培養した細胞を個体別培養細胞とみなす。ウィルス接種前の培養細胞に異常を認めてはならない。

個体別培養細胞について、3.1 の試験を行う。

2.3.4.2 ウィルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウィルス増殖の極期に感染材料を採取し、ろ液又は遠心上清を原液とする。この場合、適当と認められた安定剤を添加してもよい。

原液について、3.3.1 及び 3.3.2.4 の試験を行う。

2.3.5 犬コロナウイルス原液

2.3.5.1 細胞の培養

1回に処理し、培養した細胞を個体別培養細胞とみなす。ウィルス接種前の培養細胞に異常を認めてはならない。

個体別培養細胞について、3.1 の試験を行う。

2.3.5.2 ウィルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウィルス増殖の極期に感染材料を採取し、ろ液又は遠心上清を原液とする。この場合、適当と認められた安定剤を添加してもよい。

原液について、3.3.1 及び 3.3.2.5 の試験を行う。

2.3.6 L・カニコーラ原液

2.3.6.1 菌液

種菌を培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2 の試験を行う。

2.3.6.3 不活化

適当と認められた方法で培養菌液を不活化し、遠心して集菌し、適当と認められた溶液に浮遊させたものを、原液とする。

原液について、3.3.3 の試験を行う。

2.3.7 L・コペンハーゲニー原液

2.3.7.1 菌液

種菌を培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2 の試験を行う。

2.3.7.2 不活化

適当と認められた方法で培養菌液を不活化し、遠心して集菌し、適当と認められた溶液に浮遊させたものを、原液とする。

原液について、3.3.3 の試験を行う。

2.3.8 L・ヘブドマディス原液

2.3.8.1 菌液

種菌を培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2 の試験を行う。

2.3.8.2 不活化

適当と認められた方法で培養菌液を不活化し、遠心して集菌し、適当と認められた溶液に浮遊させたものを、原液とする。

原液について、3.3.3 の試験を行う。

2.4 最終バルク

2.4.1 混合生ワクチン

ジステンパーウイルス原液、犬アデノウイルス（2型）原液、犬パラインフルエンザウイルス原液、犬パルボウイルス原液及び犬コロナ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添加してもよい。

2.4.2 液状不活化ワクチン

適当と認められた溶液で濃度調整したL・カニコーラ原液、L・コペンハーゲニー原液及びL・ヘブドマディス原液を混合し、最終バルクとする。この場合、適当と認められた保存剤を添加してもよい。

2.5 小分製品

2.5.1 混合生ワクチン

最終バルクを小分容器に分注し、凍結乾燥し、小分製品とする。

小分製品について、3.4 の試験を行う。

2.5.2 液状不活化ワクチン

最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。

小分製品について、3.4 の試験を行う。

3 試験法

3.1 培養細胞の試験

個体別培養細胞のそれぞれ1%以上を対照培養細胞とし、これについて次の試験を行う。

ただし、製造に継代細胞を用いている場合は、3.1.3 の試験を実施しなくてもよい。また、CRFK 細胞については、3.1.4 の試験を行う。

3.1.1 培養観察

対照培養細胞を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で培養する。対照培養細胞をプールし、4本以上の培養びん及びカバーガラスを入れた4枚以上のシャーレに継代し、7日間以上培養し、観察するとき、CPB を認めてはならない。

3.1.2 赤血球吸着試験

3.1.1 の試験最終日に培養びんの培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を2回洗浄し、0.1vol %モルモット赤血球浮遊液を重層し、60分間静置後、赤血球吸着の有無を観察するとき、

培養細胞に赤血球吸着を認めてはならない。

3.1.3 封入体染色試験

3.1.1 の試験最終日に培養カバーガラスをリン酸緩衝食塩液で洗浄し、固定した後、ギムザ染色し、封入体の有無を観察するとき、培養細胞に封入体を認めてはならない。

3.1.4 赤血球凝集試験

3.1.1 の試験最終日に培養液について、1.0vol %豚赤血球浮遊液を等量加えて、4℃で18時間静置後、赤血球凝集の有無を観察し、HAを認めてはならない。

3.2 培養菌液の試験

3.2.1 夾雜菌否定試験

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。

3.2.2 総菌数試験

菌数計算盤を用いて菌数を計算するとき、それぞれの培養菌液に1mL中 $10^{5.0}$ 個以上の菌を含まなければならぬ。

3.3 原液の試験

3.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.2 ウイルス含有量試験

3.3.2.1 ジステンパーウイルス含有量試験

3.3.2.1.1 試験材料

3.3.2.1.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液(付記4)又は適当と認められた培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.2.1.1.2 培養細胞

Vero細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.3.2.1.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間回転培養し、観察する。

ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.3.2.1.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

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

3.3.2.2 犬アデノウイルス(2型)含有量試験

3.3.2.2.1 試験材料

3.3.2.2.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液又は適当と認められた培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.2.2.1.2 培養細胞

豚腎培養細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.3.2.2.2 試験方法

試料 0.1mL ずつを 4 本以上の培養細胞に接種し、37 °Cで 7 日間回転培養し、観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.3.2.2.3 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^{6.5} TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に認められたものは、そのウイルス含有量とする。

3.3.2.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

3.3.2.3.1 試験材料

3.3.2.3.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液又は適当と認められた培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。)

3.3.2.3.1.2 培養細胞

Vero 細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.3.2.3.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本以上の培養細胞に接種し、30 °Cで 7 日間回転培養し、観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.3.2.3.3 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^{6.5} TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に認められたものは、そのウイルス含有量とする。)

3.3.2.4 犬パルボウイルス含有量試験

3.3.2.4.1 試験材料

3.3.2.4.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液又は適当と認められた培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。)

3.3.2.4.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.3.2.4.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本以上の培養細胞に接種し、32 °Cで 24 時間静置培養した後、ウイルス増殖用培養液と交換し、更に 32 °Cで 6 日間回転培養する。培養後、培養液を採取し、これに等量の牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液（付記 5）を加え、更にこの混合液と等量のVAD6.0液（付記6）で調製した 0.3 ~ 0.5 vol % 豚赤血球浮遊液を加え、2 ~ 5 °Cで静置後観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.3.2.4.3 判定

培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 $10^{6.5}$ TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に認められたものは、そのウイルス含有量とする。

3.3.2.5 犬コロナウイルス含有量試験

3.3.2.5.1 試験材料

3.3.2.5.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液又は適当と認められた培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.2.5.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.3.2.5.2 試験方法

試料 0.1mL ずつを 4 本以上の培養細胞に接種し、37 °Cで 7 日間回転培養し、観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.3.2.5.3 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 $10^{5.0}$ TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に認められたものは、そのウイルス含有量とする。

3.3.3 不活性化試験

3.3.3.1 試験材料

3.3.3.1.1 試料

検体 5 mL を 100 倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、2 ~ 5 °Cで一夜透析し、不活性化剤を除去したものを試料とする。

3.3.3.1.2 培地

適当と認められた培地を用いる。

3.3.3.2 試験方法

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

3.3.3.3 判定

レプトスピラの増殖を認めてはならない。

3.4 小分製品の試験

3.4.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、混合ワクチンは、固有の色調を有する乾燥物でなければならない。また、液状不活性化ワクチンは、固有の色調を有する液体でなければならず、具物または異臭を認めてはならない。混合生ワクチンを液状不活性化ワクチンで溶解したものは、固有の色調を有する液体でなければならず、異物又は異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.4.2 pH 測定試験

一般試験法の pH 測定試験を準用して試験するとき、液状不活性化ワクチンの pH は、固有の値を示さなければならない。

3.4.3 真空度試験

一般試験法の真空度試験法を準用して試験するとき、混合生ワクチンは、適合しなければならない。

3.4.4 含湿度試験

一般試験法の含湿度試験法を準用して試験するとき、混合生ワクチンは、適合しなければならない。

3.4.5 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.6 マイコプラズマ否定試験

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

ただし、原液を含む中間工程でマイコプラズマ否定試験を実施する場合には、本試験の実施を省略することができる。

3.4.7 迷入ウイルス否定試験

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の滅菌水で溶解したものについて、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1、2.5.1、2.6.1、及び 2.8.2 を準用して試験するとき、混合生ワクチンは適合しなければならない。

ただし、中和用抗血清は、抗ジステンパーウイルス血清（付記7）、抗犬アデノウイルス（2型）血清（付記8）、抗犬パラインフルエンザウイルス血清（付記9）、抗犬パルボウイルス血清（付記10）及び抗犬コロナウイルス血清（付記11）を、それぞれ非効化したものを用いる。

3.4.8 ウィルス含有量試験

3.4.8.1 ジステンパーウイルス含有量試験

3.4.8.1.1 試験材料

3.4.8.1.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の滅菌水で溶解する。試験品中のジステンパーウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記8、9、10及び11の血清）を非効化したもので中和したものを作り、ウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.4.8.1.1.2 培養細胞

Vero 細胞を用いる。

3.4.8.1.2 試験方法

試料 0.1mL ずつを4本（穴）以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間チューブ法による回転培養又はプレート法による静置培養し、観察する。

3.4.8.1.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

試験品のウイルス含有量は1頭分当たりチューブ法で10^{3.5}TCID₅₀以上、プレート法で10^{2.1}TCID₅₀以上でなければならない。

3.4.8.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験

3.4.8.2.1 試験材料

3.4.8.2.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の滅菌水で溶解する。試験品中の犬アデノウイルス(2型)以外のウイルスの各抗血清(付記6、8、9及び10の血清)を非効化したもので中和したものを作成し、各段階の希釈液を試料とする。

3.4.8.2.1.2 培養細胞

豚腎培養細胞又はMDCK細胞を用いる。

3.4.8.2.2 試験方法

試料0.1mLずつを4本(穴)以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間チューブ法による回転培養又はプレート法による静置培養し、観察する。

3.4.8.2.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

試験品のウイルス含有量は1頭分当たりチューブ法で10^{5.5}TCID₅₀以上、プレート法で10^{2.5}TCID₅₀以上でなければならない。

3.4.8.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

3.4.8.3.1 試験材料

3.4.8.3.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の滅菌水で溶解する。試験品中の犬パラインフルエンザウイルス以外のウイルスの各抗血清(付記7、8、10及び11の血清)を非効化したもので中和したものを作成し、各段階の希釈液を試料とする。

3.4.8.3.1.2 培養細胞

Vero細胞を用いる。

3.4.8.3.2 試験方法

試料0.1mLずつを4本(穴)以上の培養細胞に接種し、30℃で7日間チューブ法による回転培養又はプレート法による静置培養し、観察する。

3.4.8.3.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

試験品のウイルス含有量は1頭分当たりチューブ法で10^{5.5}TCID₅₀以上、プレート法で10^{1.7}TCID₅₀以上でなければならない。

3.4.8.4 犬パルボウイルス含有量試験

3.4.8.4.1 試験材料

3.4.8.4.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の滅菌水で溶解する。試験品中の犬パルボウイルス以外のウイルスの各抗血清(付記7、8、9及び11の血清)を非効化したもので中和したものを作成し、各段階の希釈液を試料とする。

3.4.8.4.1.2 培養細胞

CRFK細胞を用いる。

3.4.8.4.2 試験方法

試料 0.1mL ずつを 4 本（穴）以上の培養試験管に接種し、32 °Cで 24 時間静置培養した後、ウイルス増殖用培養液と交換し、32 °Cで 6 日間チューブ法による回転培養又はプレート法による静置培養する。培養後、培養液を採取し、これに等量の牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液を加え、更にこの混合液と等量の VAD6.0 液で調製した 0.3 ~ 0.5 vol %豚赤血球浮遊液を加え、2 ~ 5 °Cで静置後、観察する。

3.4.8.4.3 判定

培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

試験品のウイルス含有量は 1 頭分当たりチューブ法で 10^{3.5} TCID₅₀ 以上、プレート法で 10^{4.1} TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.4.8.5 犬コロナウイルス含有量試験

3.4.8.5.1 試験材料

3.4.8.5.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の滅菌水で溶解する。試験品中の犬コロナウイルス以外のウイルスの各抗血清（付記7、8、9 及び10の血清）を非効化したもので中和したものを作り、ウイルス増殖用培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.4.8.5.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.4.8.5.2 試験方法

試料 0.1mL ずつを 4 本（穴）以上の培養細胞に接種し、37 °Cで 7 日間チューブ法による回転培養又はプレート法による静置培養し、観察する。

3.4.8.5.3 判定

培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

試験品のウイルス含有量は 1 頭分当たりチューブ法で 10^{4.0} TCID₅₀ 以上、プレート法で 10^{4.2} TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.4.9 チメロサール定量試験

チメロサールを添加した液状不活化ワクチンについては一般試験法のチメロサール定量法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.10 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性否定試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.11 安全試験

3.4.11.1 試験材料

3.4.11.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.11.1.2 試験動物

6か月齢未満の犬を用いる。

3.4.11.2 試験方法

試験動物 3 頭を試験群、2 頭を対照群とする。試験群に注射材料 1 頭分を用法に従ってそれぞれ

注射し、対照群とともに8週間観察する。

3.4.11.3 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。

3.4.12 力価試験

3.4.12.1 ジステンパーカ価試験

3.4.12.1.1 試験材料

3.4.12.1.1.1 試験動物

3.4.11 の試験に用いた犬を用いる。

3.4.12.1.1.2 中和試験用ウイルス

犬ジステンパウイルスDFE-HC株又は適当と認められたジステンパーウィルス株を用いる。

3.4.12.1.1.3 培養細胞

適当と認められた培養細胞を用いる。

3.4.12.1.2 試験方法

3.4.11 の初回注射後4週目に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

各プール血清を非働化し、1 vol %牛胎子血清加リン酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釈液で5倍階段希釈する。各希釈血清と0.1mL中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、2～5℃で一夜又は37℃で60分間処理する。この各混合液0.1mLずつをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間回転培養し、観察する。

3.4.12.1.3 判定

細胞を観察し、CPEを阻止したものを陽性とし、中和抗体価をED₅₀で求める。

試験群の中和抗体価は、40倍以上でなければならない。この場合、対照群では、10倍未満でなければならない。

3.4.12.2 犬アデノウイルス（2型）感染症力価試験

3.4.12.2.1 試験材料

3.4.12.2.1.1 試験動物

3.4.11 の試験に用いた犬を用いる。

3.4.12.2.1.2 中和試験用ウイルス

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

3.4.12.2.1.3 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

3.4.12.2.2 試験方法

3.4.11 の初回注射後4週目に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

各プール血清を非働化し、1 vol %牛胎子血清加リン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈する。各希釈血清と0.1mL中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、35～37℃で60分間処理する。この各混合液0.1mLずつをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間回転培養

し、観察する。

3.4.12.2.3 判定

培養細胞のCPEを阻止したものを陽性とし、中和抗体価をED₅₀で求める。

試験群の中和抗体価は、50倍以上でなければならない。この場合、対照群では、10倍未満でなければならない。

3.4.12.3 犬パラインフルエンザ力価試験

3.4.12.3.1 試験材料

3.4.12.3.1.1 試験動物

3.4.11の試験に用いた犬を用いる。

3.4.12.3.1.2 中和試験用ウイルス

犬パラインフルエンザウイルス DL-1株又は適当と認められた犬パラインフルエンザウイルス株を用いる。

3.4.12.3.1.3 培養細胞

Vero細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.4.12.3.2 試験方法

3.4.11の初回注射後4週目に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。

各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

各プール血清を非凍結化し、1vol%牛胎子血清加リン酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釈液で2倍階段希釈する。各希釈血清と0.1mL中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、適当な温度で60分間処理する。この各混合液0.1mLずつをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間回転培養し、観察する。

3.4.12.3.3 判定

培養細胞のCPEを阻止したものを陽性とし、中和抗体価をED₅₀で求める。

試験群の中和抗体価は、10倍以上でなければならない。この場合、対照群では、10倍未満でなければならない。

3.4.12.4 犬パルボウイルス感染症力価試験

3.4.12.4.1 試験材料

3.4.12.4.1.1 試験動物

3.4.11の試験に用いた犬を用いる。

3.4.12.4.1.2 中和試験用ウイルス

犬パルボウイルス CP-49株又は適当と認められた犬パルボウイルス株を用いる。

3.4.12.4.1.3 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.4.12.4.2 試験方法

3.4.11の初回注射後4週目に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

各プール血清を非凍結化し、1vol%牛胎子血清加リン酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釈液

で2倍階段希釈する。各希釈血清と0.1mL中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、35～37℃で60分間処理する。この各混合液0.1mLずつをそれぞれ4本以上の培養試験管に接種し、37℃で24時間静置培養した後、ウイルス増殖用培養液で液交換し、更に37℃で6日間回転培養する。培養最終日に、培養液を採取し、これに等量の牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液を加え、更にこの混合液と等量のVAD6.0液で調製した0.3～0.5vol%豚赤血球浮遊液を加え、2～5℃で静置後、観察する。

3.4.12.4.3 判定

赤血球凝集を阻止したものを陽性とし、中和抗体価をED₅₀で求める。

試験群の中和抗体価は、200倍以上でなければならない。この場合、対照群では、4倍未満でなければならない。

3.4.12.5 犬コロナウイルス感染症力価試験

3.4.12.5.1 試験材料

3.4.12.5.1.1 試験動物

3.4.11の試験に用いた犬を用いる。

3.4.12.5.1.2 中和試験用ウイルス

犬コロナウイルス株5821-B株又は適当と認められた犬コロナウイルス株を用いる。

3.4.12.5.1.3 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.4.12.5.2 試験方法

3.4.11の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

各プール血清を非働化し、1vol%牛胎子血清加リン酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釈液で2倍階段希釈する。各希釈血清と0.1mL中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、適当な温度で60分間処理する。この各混合液0.1mLずつをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間回転培養し、観察する。

3.4.12.5.3 判定

培養細胞のCPEを阻止したものを陽性とし、中和抗体価をED₅₀で求める。

試験群の中和抗体価は、8倍以上でなければならない。この場合、対照群では、4倍未満でなければならない。

3.4.12.6 犬レプトスピラ病力価試験

3.4.12.6.1 試験材料

3.4.12.6.1.1 注射材料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンで溶解した試験品を注射材料とする。

3.4.12.6.1.2 試験動物

体重約300gのモルモット又は体重60～100gのハムスターを用いる。

3.4.12.6.1.3 凝集反応用菌液

L・カニコーラ、L・コペンハーゲニー及びL・ヘブドマディスの生菌浮遊液を用いる。

3.4.12.6.2 試験方法

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

3.4.12.6.3 判定

L・カニコーラ及び L・コペンハーゲニーの菌液に対して 80 %以上が 8 倍以上の、L・ヘブドマディスについては 10 倍以上の凝集値を示さなければならぬ。

4 貯法及び有効期間

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

付記 1 抗 L・カニコーラ血清

L・カニコーラの不活化菌で免疫した体重 300 ~ 350g のモルモットの血清で、凝集抗体価 40 倍以上のもの

付記 2 抗 L・コペンハーゲニー血清

L・コペンハーゲニーの不活化菌で免疫した体重 300 ~ 350g のモルモットの血清で、凝集抗体価 40 倍以上のもの

付記 3 抗 L・ヘブドマディス血清

L・ヘブドマディスの不活化菌で免疫した体重 300 ~ 350g のモルモットの血清で、凝集抗体価 40 倍以上のもの

付記 4 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・プロス	2.95 g
イーグル培養液 (MEM)	残 量
炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 7.4 に調整する。	
必要再少量の抗生物質を加えてもよい。	

付記 5 牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液

1,000mL 中	
塩化ナトリウム	7.01 g
ホウ酸	3.09 g
水酸化ナトリウム	0.96 g
水	残 量

牛血清アルブミンを 0.2w/v % となるように加えた後、氷酸化ナトリウム液で pH を 9.0 に調整する。

付記 6 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

リン酸水素二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 に調製する。

付記7 抗ジステンペーウイルス血清

ジステンペーウイルスで免疫した兎、モルモット又はフェレットの血清で、ワクチン中のジステンペーウイルスを完全に中和できるもの

付記8 抗犬アデノウイルス（2型）血清

犬アデノウイルス（2型）で免疫した兎又はモルモットの血清で、ワクチン中の犬アデノウイルス（2型）を完全に中和できるもの

付記9 抗犬パラインフルエンザウイルス血清

犬パラインフルエンザウイルスで免疫した兎又はモルモットの血清で、ワクチン中の犬パラインフルエンザウイルスを完全に中和できるもの

付記10 抗犬パルボウイルス血清

犬パルボウイルスで免疫した兎又はモルモットの血清で、ワクチン中の犬パルボウイルスを完全に中和できるもの

付記11 抗犬コロナウイルス血清

犬コロナウイルスで免疫した兎の血清で、ワクチン中の犬コロナウイルスを完全に中和できるもの

ワクチンの部ジステンパー・犬アデノウイルス（2型）感染症・犬パラインフルエンザ・犬パルボウイルス感染症混合生ワクチンの項を次のように改める。

ジステンパー・犬アデノウイルス（2型）感染症・犬パラインフルエンザ・犬パルボウイルス感染症混合生ワクチン

1 定義

弱毒ジステンパーウイルス、弱毒犬アデノウイルス（2型）、弱毒犬パラインフルエンザウイルス及び弱毒犬パルボウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を混合し、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 ジステンパーウイルス株

2.1.1.1 名称

弱毒ジステンパーウイルス DEF-HC 株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

犬に注射しても病原性を示さない。発育鶏卵の漿尿膜上又は感受性のある培養細胞に接種すると、ポック又はCPEを伴って増殖する。

2.1.1.3 繙代及び保存

原株及び原種ウイルスは、発育鶏卵又は適当と認められた培養細胞で継代する。

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

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

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.2 犬アデノウイルス（2型）株

2.1.2.1 名称

弱毒犬アデノウイルス（2型）OD-N/SL 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

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

2.1.2.3 繙代及び保存

原株及び原種ウイルスは、適当と認められた培養細胞で継代する。

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

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

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.3 犬パラインフルエンザウイルス株

2.1.3.1 名称

弱毒犬パラインフルエンザウイルス DL-E 株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

犬に注射しても病原性を示さない。感受性のある培養細胞に接種すると増殖し、細胞はモルモット赤血球を吸着する。

2.1.3.3 繼代及び保存

原株及び原種ウイルスは、適当と認められた培養細胞で継代する。

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

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

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.4 犬パルボウイルス株

2.1.4.1 名称

弱毒犬パルボウイルス 29-F/LT 株又は製造に適当と認められた株

2.1.4.2 性状

犬に注射しても病原性を示さない。犬及び猫由来細胞で核内封入体を伴って増殖し、その培養ウイルス液は豚及び猿の赤血球を凝集する。

2.1.4.3 繼代及び保存

原株及び原種ウイルスは、適当と認められた培養細胞で継代する。

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

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

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.2 製造用材料

2.2.1 ジステンパーウイルス

2.2.1.1 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の鶏脛から得られた培養細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.1.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.2 犬アデノウイルス（2型）

2.2.2.1 培養細胞

豚脣から得られた培養細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.3 犬パラインフルエンザウイルス

2.2.3.1 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.3.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.4 犬パルボウイルス

2.2.4.1 培養細胞

猫腎から得られた培養細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.4.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.3 原液

2.3.1 ジステンパーーウィルス原液

2.3.1.1 細胞の培養

1回に処理し、培養した細胞を個体別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の培養細胞に異常を認めなければならない。

個体別培養細胞について、3.1の試験を行う。

2.3.1.2 ウィルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルス増殖の極期に感染材料を採取し、ろ液又は遠心上清を原液とする。

原液について、3.2.1及び3.2.2.1の試験を行う。

2.3.2 犬アデノウイルス（2型）原液

2.3.2.1 細胞の培養

1回に処理し、培養した細胞を個体別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の培養細胞に異常を認めなければならない。

個体別培養細胞について、3.1の試験を行う。

2.3.2.2 ウィルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルス増殖の極期に感染材料を採取し、ろ液又は遠心上清を原液とする。

原液について、3.2.1及び3.2.2.2の試験を行う。

2.3.3 犬パラインフルエンザウイルス原液

2.3.3.1 細胞の培養

1回に処理し、培養した細胞を個体別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の培養細胞に異常を認めなければならない。

個体別培養細胞について、3.1の試験を行う。

2.3.3.2 ウィルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルス増殖の極期に感染材料を採取し、ろ液又は遠心上清を原液とする。

原液について、3.2.1及び3.2.2.3の試験を行う。

2.3.4 犬パルボウイルス原液

2.3.4.1 細胞の培養

1回に処理し、培養した細胞を個体別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の培養細胞に異常を認めなければならない。

個体別培養細胞について、3.1の試験を行う。

2.3.4.2 ウィルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルス増殖の極期に感染材料を採取し、ろ液又は遠心上清を原液とする。

原液について、3.2.1及び3.2.2.4の試験を行う。

2.4 最終バルク

ジステンパーーウィルス原液、犬アデノウイルス（2型）原液、犬パラインフルエンザウイルス原

弱毒犬パラインフルエンザウイルス DL-E 株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

犬に注射しても病原性を示さない。感受性のある培養細胞に接種すると増殖し、細胞はモルモット赤血球を吸着する。

2.1.3.3 繙代及び保存

原株及び原種ウイルスは、適当と認められた培養細胞で継代する。

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

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

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.4 犬パルボウイルス株

2.1.4.1 名称

弱毒犬パルボウイルス 29-F/LT 株又は製造に適当と認められた株

2.1.4.2 性状

犬に注射しても病原性を示さない。犬及び猫由来細胞で核内封入体を伴って増殖し、その培養ウイルス液は豚及び猿の赤血球を凝集する。

2.1.4.3 繙代及び保存

原株及び原種ウイルスは、適当と認められた培養細胞で継代する。

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

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

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.2 製造用材料

2.2.1 ジステンパーウイルス

2.2.1.1 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の鶏脛から得られた培養細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.1.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.2 犬アデノウイルス（2型）

2.2.2.1 培養細胞

豚腎から得られた培養細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.3 犬パラインフルエンザウイルス

2.2.3.1 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.3.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.4 犬パルボウイルス

2.2.4.1 培養細胞

猫腎から得られた培養細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.4.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.3 原液

2.3.1 ジステンパーウイルス原液

2.3.1.1 細胞の培養

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

個体別培養細胞について、3.1の試験を行う。

2.3.1.2 ウィルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルス増殖の極期に感染材料を採取し、ろ液又は遠心上清を原液とする。

原液について、3.2.1及び3.2.2.1の試験を行う。

2.3.2 犬アデノウイルス（2型）原液

2.3.2.1 細胞の培養

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

個体別培養細胞について、3.1の試験を行う。

2.3.2.2 ウィルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルス増殖の極期に感染材料を採取し、ろ液又は遠心上清を原液とする。

原液について、3.2.1及び3.2.2.2の試験を行う。

2.3.3 犬パラインフルエンザウイルス原液

2.3.3.1 細胞の培養

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

個体別培養細胞について、3.1の試験を行う。

2.3.3.2 ウィルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルス増殖の極期に感染材料を採取し、ろ液又は遠心上清を原液とする。

原液について、3.2.1及び3.2.2.3の試験を行う。

2.3.4 犬パルボウイルス原液

2.3.4.1 細胞の培養

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

個体別培養細胞について、3.1の試験を行う。

2.3.4.2 ウィルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルス増殖の極期に感染材料を採取し、ろ液又は遠心上清を原液とする。

原液について、3.2.1及び3.2.2.4の試験を行う。

2.4 最終バルク

ジステンパーウイルス原液、犬アデノウイルス（2型）原液、犬パラインフルエンザウイルス原

液及び犬パルボウイルス原液を混合し、適當と認められた安定剤を加え、最終バルクとする。

2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、凍結乾燥し、小分製品とする。

小分製品について、3.3 の試験を行う。

3 試験法

3.1 培養細胞の試験

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

3.1.1 培養観察

対照培養細胞を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で培養する。対照培養細胞をプールし、4 本以上の培養びん及びカバーグラスを入れた 4 枚以上のシャーレに継代し、7 日間以上培養し、観察するとき、CPE を認めてはならない。

3.1.2 赤血球吸着試験

3.1.1 の試験最終日に培養びんの培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を 2 回洗浄し、0.1vol% モルモット赤血球浮遊液を重層し、60 分間静置後、赤血球吸着の有無を観察するとき、培養細胞に赤血球吸着を認めてはならない。

3.1.3 封入体染色試験

3.1.1 の試験最終日に培養カバーグラスをリン酸緩衝食塩液で洗浄し、固定した後、ギムザ染色し、封入体の有無を観察するとき、培養細胞に封入体を認めてはならない。

3.2 原液の試験

3.2.1 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。

3.2.2 ウィルス含有量試験

3.2.2.1 ジステンパーウィルス含有量試験

3.2.2.1.1 試験材料

3.2.2.1.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記 1）又は適當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。

3.2.2.1.1.2 培養細胞

Vero 細胞又は適當と認められた培養細胞を用いる。

3.2.2.1.2 試験方法

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

3.2.2.1.3 判定

培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

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

3.2.2.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験

3.2.2.2.1 試験材料

3.2.2.2.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液又は適當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。

3.2.2.2.1.2 培養細胞

豚腎培養細胞又は適當と認められた培養細胞を用いる。

3.2.2.2.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本（穴）以上の培養細胞に接種し、35～37℃で 7～10 日間培養し、観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.2.2.2.3 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^{6.5} TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に認められたものは、そのウイルス含有量とする。

3.2.2.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

3.2.2.3.1 試験材料

3.2.2.3.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液又は適当と認められた培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.2.3.1.2 培養細胞

Vero 細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.2.2.3.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本（穴）以上の培養細胞に接種し、30℃で 7 日間又は 37℃で 10 日間培養し、観察する。培養後、培養液を除き、培養液と等量の 0.2vol% モルモット赤血球浮遊液を加え、2～5℃で 60 分間静置し、観察するか、又は培養後、培養液を採取し、これに等量の 0.4vol% モルモット赤血球浮遊液を加え、常温で 90 分間静置し、観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.2.2.3.3 判定

培養細胞に CPE 又は赤血球吸着を認めたもの若しくは培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{6.5} TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に認められたものは、そのウイルス含有量とする。

3.2.2.4 犬パルボウイルス含有量試験

3.2.2.4.1 試験材料

3.2.2.4.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液又は適当と認められた培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.2.4.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞又は適当と認められた細胞を用いる。

3.2.2.4.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本（穴）以上の培養細胞に接種し、32℃で 24 時間静置培養した後、ウイルス増殖用培養液と交換し、更に 32℃で 6 日間培養する。培養後、培養液を採取し、これに等量のホウ酸緩衝食塩液（付記 2）を加え、更にこの混合液と等量の 0.3～0.5vol% 豚赤血球浮遊液を加え、2～5℃で静置後、観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.2.2.4.3 判定

培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{6.5} TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に認められたものは、そのウイルス含有量とする。

3.3 小分製品の試験

3.3.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、固有の色調を有する乾燥物でなければならない。溶解したものは、固有の色調を有する液体でなければならず、臭物又は異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.3.2 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。

3.3.3 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。

3.3.4 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。

3.3.5 マイコプラズマ否定試験法

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

3.3.6 迷入ウイルス否定試験

一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1、2.5.1、2.6.1、及び 2.8.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

ただし、中和用血清は、抗ジステンパーウイルス血清（付記3）抗犬アデノウイルス（2型）血清（付記4）、抗犬パラインフルエンザウイルス血清（付記5）及び抗犬パルボウイルス血清（付記6）をそれぞれ非効化したもの用いる。

3.3.7 ウィルス含有量試験

3.3.7.1 ジステンパーウイルス含有量試験

3.3.7.1.1 試験材料

3.3.7.1.1.1 試料

試験品中のジステンパーウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記4、5及び6）を非効化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.7.1.1.2 培養細胞

Vero 細胞を用いる。

3.3.7.1.2 試験方法

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

3.3.7.1.3 判定

培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

試験品のウイルス含有量は、1 mL 中 $10^{3.5}$ TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に認められたものは、そのウイルス含有量とする。

3.3.7.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験

3.3.7.2.1 試験材料

3.3.7.2.1.1 試料

試験品中の犬アデノウイルス（2型）以外のウイルスを各抗血清（付記3、5及び6）を非効化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.7.2.1.2 培養細胞

豚腎培養細胞又は犬腎継代細胞を用いる。

3.3.7.2.2 試験方法

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

3.3.7.2.3 判定

培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

試験品のウイルス含有量は、豚腎培養細胞に接種した場合は、1 頭分当たり $10^{3.5}$ TCID₅₀ 以上でな

ければならず、犬腎継代細胞に接種した場合は、1頭分当たり 10^{33} TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に認められたものは、そのウイルス含有量とする。

3.3.7.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

3.3.7.3.1 試験材料

3.3.7.3.1.1 試料

試験品中の犬パラインフルエンザウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記3、4及び6）を非効化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液で10倍階段希釀し、各段階の希釀液を試料とする。

3.3.7.3.1.2 培養細胞

Vero細胞又は犬腎継代細胞を用いる。

3.3.7.3.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ4本（穴）以上の培養細胞に接種し、Vero細胞に接種した場合では30℃又は37℃で、犬腎継代細胞に接種した場合は、37℃でそれぞれ7日間培養し、観察する。

3.3.7.3.3 判定

Vero細胞に接種した場合は、培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、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^{55} TCID₅₀ 以上でなければならない。

犬腎継代細胞に接種した場合は、培養後、培養液を採取し、等量の0.4vol%モルモット赤血球浮遊液を加え、常温で90分間静置後赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、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^{47} TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に認められたものは、そのウイルス含有量とする。

3.3.7.4 犬パルボウイルス含有量試験

3.3.7.4.1 試験材料

3.3.7.4.1.1 試料

試験品中の犬パルボウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記3、4及び5）を非効化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液で10倍階段希釀し、各段階の希釀液を試料とする。

3.3.7.4.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.3.7.4.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ4本（穴）以上の培養細胞に接種し、32℃又は37℃で24時間静置培養した後、ウイルス増殖用培養液で液交換し、32℃又は37℃でそれぞれ6日間培養する。培養後、培養液を採取し、これに等量のホウ酸緩衝食塩液を加え、更にこの混合液と等量の0.3～0.5vol%豚赤血球浮遊液を加え、2～5℃で静置後、観察する。

3.3.7.4.3 判定

培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり 32℃で培養した場合は、 10^{55} TCID₅₀ 以上でなければならない。37℃で培養した場合は、 10^{40} TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に認められたものは、そのウイルス含有量とする。

3.3.8 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。

3.3.9 安全試験

3.3.9.1 試験材料

3.3.9.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.3.9.1.2 試験動物

6か月齢未満の犬を用いる。

3.3.9.2 試験方法

試験動物 3 頭を試験群、2 頭を対照群とする。試験群に注射材料 1 頭分を用法に従ってそれぞれ注射し、対照群とともに 4 週間観察する。ただし、特に認められたものはその期間とする。

3.3.9.3 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。

3.3.10 力価試験

3.3.10.1 ジステンパー力価試験

3.3.10.1.1 試験材料

3.3.10.1.1.1 試験動物

3.3.9 の試験に用いた動物を用いる。

3.3.10.1.1.2 中和試験用ウイルス

適当と認められたジステンパーウイルス株を用いる。

3.3.10.1.1.3 培養細胞

適当と認められた培養細胞を用いる。

3.3.10.1.2 試験方法

3.3.9 の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

各プール血清を非凍化し、2 vol%馬血清加リン酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釀液で4又は5倍階段希釀する。各希釀血清と 0.1mL 中約 200TCID₅₀ の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、2 ~ 5 °C で一夜又は 37 °C で 60 分間処理する。この各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本(穴)以上の培養細胞に接種し、35 ~ 37 °C で 7 ~ 21 日間培養し、観察する。

3.3.10.1.3 判定

細胞を観察し、CPE を阻止したものを陽性とし、中和抗体価を ED₅₀ で求める。

試験群の中和抗体価は、40 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、10 倍以下でなければならない。

3.3.10.2 犬アデノウイルス(2型)感染症力価試験

3.3.10.2.1 試験材料

3.3.10.2.1.1 試験動物

3.3.9 の試験に用いた動物を用いる。

3.3.10.2.1.2 中和試験用ウイルス

適当と認められた犬アデノウイルス(2型)ウイルスを用いる。

3.3.10.2.1.3 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

3.3.10.2.2 試験方法

3.3.9 の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

各プール血清を非凍化し、1 vol%牛胎子血清加リン酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釀液で 2、4 又は 5 倍階段希釀する。各希釀血清と 0.1mL 中約 200TCID₅₀ の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、35 ~ 37 °C で 60 分間処理する。この各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本(穴)以上の培養細胞に接種し、35 ~ 37 °C で 7 ~ 10 日間培養し、観察する。

3.3.10.2.3 判定

培養細胞の CPE を阻止したものを陽性とし、中和抗体価を ED₅₀ で求める。

試験群の中和抗体価は、50 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、10 倍以下でなければならない。ただし、特に認められたものは、その抗体価とする。

3.3.10.3 犬パラインフルエンザ力価試験

3.3.10.3.1 試験材料

3.3.10.3.1.1 試験動物

3.3.9 の試験に用いた動物を用いる。

3.3.10.3.1.2 中和試験用ウイルス

適當と認められた犬パラインフルエンザウイルス株を用いる。

3.3.10.3.1.3 培養細胞

Vero 細胞又は適當と認められた培養細胞を用いる。

3.3.10.3.2 試験方法

3.3.9 の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

各プール血清を非働化し、1 vol%牛胎子血清加リン酸緩衝食塩液又は適當と認められた希釀液で2倍階段希釀する。各希釀血清と0.1mL中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、適當な温度で60分間処理する。この各混合液0.1mLずつをそれぞれ4本(穴)以上の培養細胞に接種し、35～37℃で7～10日間培養し、観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.3.10.3.3 判定

培養細胞のCPEを阻止したものを陽性とし、中和抗体価をED₅₀で求める。

試験群の中和抗体価は、10倍以上でなければならない。この場合、対照群では、4倍以下でなければならない。ただし、特に認められたものは、その抗体価とする。

3.3.10.4 犬パルボウイルス感染症力価試験

3.3.10.4.1 試験材料

3.3.10.4.1.1 試験動物

3.3.9 の試験に用いた動物を用いる。

3.3.10.4.1.2 中和試験用ウイルス又は赤血球凝集抑制抗原

中和試験用ウイルスは、犬パルボウイルスY-1株又は適當と認められた犬パルボウイルスを用いる。

赤血球凝集抗原は、犬パルボウイルス赤血球凝集抗原(付記7)を用いる。

3.3.10.4.1.3 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.3.10.4.2 試験方法

中和試験又は赤血球凝集抑制試験を行う。

3.3.10.4.2.1 中和試験

3.3.9 の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

各プール血清を非働化し、1 vol%牛胎子血清加リン酸緩衝食塩液又は適當と認められた希釀液で2倍階段希釀する。各希釀血清と0.1mL中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、35～37℃で60分間処理する。この各混合液0.1mLずつをそれぞれ4本(穴)以上の培養細胞に接種し、35～37℃で24時間静置培養した後、ウイルス増殖用培養液で液交換し、更に35～37℃で6日間培養する。培養最終日に、培養液を採取し、これに等量のホウ酸緩衝食塩液を加え、更に、この混合液と等量のVAD6.0液(付記8)で調整した0.3～0.5vol%豚赤血球浮遊液を添加し、2～5℃で静置後、赤血球凝集の有無を観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.3.10.4.2.2 赤血球凝集抑制試験

3.3.9 の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について赤血球凝集抑制試験を行う。

各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

各プール血清を非凍化し、25w/v%カオリン液及び豚赤血球を加えて処理した後、ホウ酸緩衝食塩液で2倍階段希釈する。各希釈血清に8単位の犬パルボウイルス赤血球凝集抗原を混合し、常温で60分間処理し、VAD6.0液で調整した0.3～0.5vol%豚赤血球浮遊液を加え4℃で一夜静置し、赤血球凝集の有無を観察する。ただし、特に認められたものは、その試験方法とする。

3.3.10.4.3 判定

3.3.10.4.3.1 中和試験判定

赤血球凝集を阻止したものを陽性とし、中和抗体価をED₅₀で求める。

試験群の中和抗体価は、200倍以上でなければならない。この場合、対照群は、4倍以下でなければならない。ただし、特に認められたものは、その抗体価とする。

3.3.10.4.3.2 赤血球凝集抑制試験判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。

試験群の赤血球凝集抑制抗体価は、64倍以上でなければならない。この場合、対照群では、8倍未満でなければならない。ただし、特に認められたものは、その抗体価とする。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、1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 ウィルス増殖用培養液

1,000mL 中	
トリプトース・ホスフェイト・プロス	2.95 g
牛胎子血清	0～20 mL
イーグル MEM	残 量
炭酸水素ナトリウムでpHを7.4～7.6に調整する。	
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。	

付記2 ホウ酸緩衝食塩液

1,000mL 中	
塩化ナトリウム	7.01 g
ホウ酸	3.09 g
水酸化ナトリウム	0.96 g
水	残 量
水酸化ナトリウム液でpHを9.0に調整する。	

付記3 抗ジステンパーウイルス血清

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

付記4 抗犬アデノウイルス（2型）血清

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

付記5 抗犬パラインフルエンザウイルス血清

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

付記6 抗犬パルボウイルス血清

犬パルボウイルスで免疫した兎又はモルモットの血清で、試験品のウイルスを完全に中和する力値を有するもの

付記7 犬パルボウイルス赤血球凝集抗原

犬パルボウイルス Y-1 株又は適当と認められたウイルス株を猫腎継代細胞で増殖させて得た培養上清を不活化したもので、赤血球凝集価が 128 倍以上のもの

付記8 VAD6.0 液

1,000mL 中

塩化ナトリウム	8.77 g
無水リン酸水素二ナトリウム	5.68 g
リン酸二水素ナトリウム二水和物	40.56 g
水	残量

ホウ酸緩衝食塩液と等量混合して pH を 6.0 に調整する。)

診断液の部ニューカッスル病診断用赤血球凝集抗原の項を次のように改める。

ニューカッスル病診断用赤血球凝集抗原

1 定義

ニューカッスル病ウイルスを発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液を不活化し、調製した赤血球凝集抑制反応用抗原である。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

ニューカッスル病ウイルス石井株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

9～11日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に接種すると増殖し、その尿膜腔液には鶏赤血球凝集性を認める。

2.1.3 繼代及び保存

原株及び種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格1.1の発育鶏卵で継代する。

継代は、原株では3代以内、種ウイルスでは2代以内でなければならない。

原株及び種ウイルスは、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～11日齢の発育鶏卵を用いる。

2.3 原液

2.3.1 ウィルスの培養

種ウイルスを発育鶏卵の尿膜腔内に接種し、3～5日間培養後、採取した尿膜腔液の遠心上清をウイルス浮遊液とする。

2.3.2 不活化

ウイルス浮遊液にジエチルエーテルを等量加え、37℃で処理後、遠心し、水層を採取する。これに1/25mol/L過ヨウ素酸カリウム液を等量加え、37℃で60分間処理した後、10w/v%ブドウ糖液を等量加え、原液とする。

原液について、3.1の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液を混合し、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、3.2の試験を行う。

3 試験法

3.1 原液の試験

3.1.1 不活化試験

3.1.1.1 試験材料

検体及び生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～11日齢の発育鶏卵並びに2羽以上の6～18週齢の鶏から血液を採取し、混合し、生理食塩液で3回洗浄後、0.5vol%となるように調整した赤血球浮遊液を用いる。

3.1.1.2 試験方法

検体0.1mLずつを5個の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で5日間培養後、尿膜腔液を採取

する。同様の方法で更に1代継代し、それぞれの尿膜腔液に鶏赤血球浮遊液を等量加え、赤血球凝集試験を行う。

3.1.1.3 判定

尿膜腔液に、鶏赤血球凝集を認めてはならない。

3.1.2 特異性試験

3.1.2.1 試験材料

検体、参照抗原（付記1）、参照陽性血清（付記2）、陰性血清（付記3）及び3.1.1.1 の鶏赤血球浮遊液を用いる。

3.1.2.2 試験方法

検体及び参照抗原の濃度が0.2mL 中4単位となるように抗原液を調整する。参照陽性血清3例、陰性血清3例をそれぞれ5倍に希釈し、更に2倍階段希釈する。希釈血清0.2mL ずつに等量の抗原液を加えて混合し、10分間処理した後、鶏赤血球浮遊液を0.4mL ずつ加えて振盪混合し、60分間静置後、判定する。

3.1.2.3 判定

検体及び参照抗原により参照陽性血清は、いずれも所定の赤血球凝集抑制抗体価を示さなければならず、陰性血清の抗体価は、10倍未満でなければならない。

3.1.3 力価試験

3.1.3.1 試験材料

検体及び参照抗原を生理食塩液1 mL で溶解したもの及び3.1.1.1 の鶏赤血球浮遊液を用いる。

3.1.3.2 試験方法

検体及び参照抗原をそれぞれ生理食塩液で10倍に希釈し、更に2倍階段希釈して試料とする。
試料0.4mL ずつに等量の鶏赤血球浮遊液を加えて振盪混合し、60分間静置後、判定する。

3.1.3.3 判定

赤血球が完全凝集を示す最高希釈倍数を抗原価とするとき、検体の抗原価は、640倍以上でなければならない。この場合、参照抗原は、所定の抗原価を示さなければならない。

3.2 小分製品の試験

溶解用液として生理食塩液を用いる。

3.2.1 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ぬ、異物又は異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.2.2 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。

3.2.3 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。

3.2.4 特異性試験

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。

3.2.5 力価試験

3.1.3 を準用して試験するとき、試験品の抗原価は、640倍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1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。

5 その他

5.1 指示陽性血清

抗体価を明示した指示陽性血清を添付すること。

付記1 参照抗原

動物医薬品検査所が配布するもの

付記2 参照陽性血清

動物医薬品検査所が配布するもので、ニューカッスル病ウイルスで生ワクチン製造用材料の規格

1.1 由来の鶏を免疫して得た血清で、1 mLずつ分注し、凍結乾燥したもの

参照抗原を用いて赤血球凝集抑制反応を行うとき、抗体価が、それぞれ160～320倍、40～80倍及び10～20倍のもの

付記3 陰性血清

生ワクチン製造用材料の規格1.1 由来の鶏血清で、1 mLずつ分注し、凍結乾燥したもの

参照抗原を用いて赤血球凝集抑制反応を行うとき、抗体価が、10倍未満のもの