

新 旧 対 照 表

動物用生物学的製剤検定基準各条ワクチンの部：豚繁殖・呼吸障害症候群生ワクチン

改 正 案	現 行
<p>豚パルボウイルス感染症不活化ワクチン (略)</p> <p>豚繁殖・呼吸障害症候群生ワクチン</p> <p>動生剤基準の豚繁殖・呼吸障害症候群生ワクチンの3.3.4、3.3.6、3.3.7及び3.3.8に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</p>	<p>豚パルボウイルス感染症不活化ワクチン (略)</p> <p>豚繁殖・呼吸障害症候群生ワクチン</p> <p>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。</p> <p>1 小分製品の試験</p> <p>1.1 無菌試験 一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</p> <p>1.2 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 により試験を行い、これらに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1）を非働化したものを用いる。</p> <p>1.3 ウイルス含有量試験</p> <p>1.3.1 試験材料</p> <p>1.3.1.1 試料 試験品をウイルス増殖用培養液（付記2）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。</p> <p>1.3.1.2 培養細胞 MA-104細胞を96穴プレートに培養し、単層となったものを用いる。</p> <p>1.3.2 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。</p> <p>1.3.3 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10^{4.9} TCID₅₀ ~ 10^{6.7} TCID₅₀の範囲内であればならない。</p> <p>1.4 安全試験</p> <p>1.4.1 試験材料</p> <p>1.4.1.1 注射材料 試験品を注射材料とする。</p> <p>1.4.1.2 試験動物 3~4週齢の豚を用いる。</p> <p>1.4.2 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。</p> <p>1.4.3 判定 観察期間中、異常を認めてはならない。</p> <p>1.5 力価試験</p> <p>1.5.1 試験材料</p> <p>1.5.1.1 試験動物 1.4の試験に用いた動物を用いる。</p> <p>1.5.1.2 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 J11882株を1チャンバースライド当たり10^{4.5} 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、希アセトン・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、5℃以下で密封保存する。</p> <p>1.5.2 試験方法 1.4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</p>

豚流行性下痢生ワクチン

ア

(以下略)

1°C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°Cで60分間処理した後、生理食塩液で洗浄し、UV 励起方式で観察する。

1.5.3 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。

付記1 抗豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス血清

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、試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの
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2 ウイルス増殖用培養液

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もよい。

付記3 抗豚IgG 蛍光標識抗体

抗豚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

豚流行性下痢生ワクチン

(以下略)

新 旧 対 照 表

動物用生物学的製剤検定基準各条ワクチンの部：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

改 正 案	現 行												
<p>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</p> <p><u>動生剤基準のトリニューモウイルス感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチンの3.5.2、3.5.3及び3.5.4に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u></p>	<p>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</p> <p><u>弱毒七面鳥鼻気管炎（以下「TRT」という。）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。</u></p> <p>1 小分製品の試験</p> <p>1.1 無菌試験 一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</p> <p>1.2 安全試験</p> <p>1.2.1 試験材料</p> <p>1.2.1.1 注射材料 試験品を注射材料とする。</p> <p>1.2.1.2 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。</p> <p>1.2.2 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(0.5mL)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。</p> <p>1.2.3 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。</p> <p>1.3 力価試験</p> <p>1.3.1 試験材料</p> <p>1.3.1.1 試験動物 1.2の試験に用いた動物を用いる。</p> <p>1.3.2 試験方法 1.2の試験最終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1)で適当に希釈したTRT抗原(付記2)をプレート(付記3)に100 μLずつ分注し、37℃で3時間反応後、洗浄用緩衝液(付記4)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5)で2倍階段希釈し、固相化プレートに各希釈血清を100 μLずつ加え、37℃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6)を100 μL加え、37℃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(付記7)を100 μL加え、常温で8分間反応させる。反応終了後、反応停止液(付記8)を50 μL加えて、反応を停止させ、波長450nmで吸光度値を測定する。</p> <p>1.3.3 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抗体価とする。試験群の80%以上がELISA抗体価$2^{5.66}$倍以上を示さなければならない。この場合、対照群では、全て2倍未満でなければならず、参照陽性血清(付記10)は$2^{5.66}$倍以上の抗体価を示さなければならない。</p> <p>付記1 固相化緩衝液</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 80%;">1,000mL 中</td> <td></td> </tr> <tr> <td>リン酸二水素ナトリウム二水和物</td> <td style="text-align: right;">1.43 g</td> </tr> <tr> <td>無水リン酸水素二ナトリウム</td> <td style="text-align: right;">12.10 g</td> </tr> <tr> <td>塩化ナトリウム</td> <td style="text-align: right;">8.5 g</td> </tr> <tr> <td>精製水</td> <td style="text-align: right;">残 量</td> </tr> <tr> <td colspan="2">pHを7.0に調整する。</td> </tr> </table>	1,000mL 中		リン酸二水素ナトリウム二水和物	1.43 g	無水リン酸水素二ナトリウム	12.10 g	塩化ナトリウム	8.5 g	精製水	残 量	pHを7.0に調整する。	
1,000mL 中													
リン酸二水素ナトリウム二水和物	1.43 g												
無水リン酸水素二ナトリウム	12.10 g												
塩化ナトリウム	8.5 g												
精製水	残 量												
pHを7.0に調整する。													

付記2 TRT 抗原

TRT ウイルス弱毒 BUT 1# 8544 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 TRT 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。再浮遊したものをシュークロースステップ遠心 (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3 プレート

適当と認められた 96 穴平底マイクロプレートを使用する。

付記4 洗浄用緩衝液

1,000mL 中	
リン酸水素ナトリウム	2.9 g
無水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
精製水	残量

pH を 7.0 に調整する。

付記5 IB・EIA 緩衝液

1,000mL 中	
リン酸二水素ナトリウム	2.31 g
リン酸水素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

濾過滅菌 (200nm) 後、スキムミルク 2w/v % 及び牛胎子血清 5vol % を加える。

付記6 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7 基質液

TMB 溶液	0.2 mL
UP 緩衝液	1.5 mL
精製水	15 mL

TMB 溶液は、DMSO 1,000mL 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、尿素過酸化水素 1 錠 (140 mg) を TMB 緩衝液 (酢酸ナトリウム 136g を約 500mL の水に溶かし、1.5mol/L クエン酸で pH5.5 に調整した後、水を加え、1,000mL とし、高圧滅菌 (121 °C、20 分間) したもの) 100mL に溶かしたもの

付記8 反応停止液

硫酸	110 mL
水	1,000 mL

付記9 参照陰性血清

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の鶏群由来で TRT 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 倍未満を示すもの^{4.64}

付記10 参照陽性血清

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の鶏群由来で TRT ウイルスに対する抗体陰性鶏を TRT ウイルス弱毒 BUT 1# 8544 株の生ウイルスで免疫して得た血清で、ELISA 抗体^{2^{8.64} ~ 2^{9.64}} 倍を示すもの

新 旧 対 照 表

動物用生物学的製剤検定基準各条ワクチンの部：鶏貧血ウイルス感染症生ワクチン

改 正 案	現 行
<h2 style="margin: 0;">鶏貧血ウイルス感染症生ワクチン</h2> <p style="margin: 0;">動生剤基準の鶏貧血ウイルス感染症生ワクチンの 3.3.4、3.3.5、3.3.6 (迷入ウイルス否定試験法 2.1.1、2.1.2 及び 2.2.2 を除く。)、3.3.7 及び 3.3.8 に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</p>	<h2 style="margin: 0;">鶏貧血ウイルス感染症生ワクチン</h2> <p style="margin: 0;">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したワクチンである。</p> <p style="margin: 0;">1. 小分製品の試験</p> <p style="margin: 0;">1.1 無菌試験 一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</p> <p style="margin: 0;">1.2 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により試験を行い、これに適合しなければならない。</p> <p style="margin: 0;">1.3 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 及び 2.2.1 により試験を行い、これらに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1)を非働化したものを用いる。</p> <p style="margin: 0;">1.4 ウイルス含有量試験</p> <p style="margin: 0;">1.4.1 試験材料</p> <p style="margin: 0;">1.4.1.1 試料 試験品を細胞増殖用培養液(付記2)で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。</p> <p style="margin: 0;">1.4.1.2 培養細胞 MDCC-MSB1 細胞を用いる。</p> <p style="margin: 0;">1.4.2 試験方法 試料 100 μ L ずつを、細胞増殖用培養液で 4×10^6 /mL に調整した MDCC-MSB1 細胞浮遊液を細胞培養用 96 穴平底プレートに 100 μ L ずつ分注した穴に、各段階それぞれ5穴に接種し、39 $^{\circ}$C 5 vol% の炭酸ガス下で培養する。培養後2日目に、それぞれの穴の細胞培養液 20 μ L を採取して、細胞培養液 180 μ L を分注した 96 穴平底プレートのそれぞれの穴に移し培養する。この継代を 6 回行う。また、対照細胞も同様の継代を行い、最終の継代後2日目に細胞を観察する。</p> <p style="margin: 0;">1.4.3 判定 対照細胞は、涙滴状から楕円状の形態を示す細胞が増殖していなければならない。また、培養液の色調は黄色を呈していなければならない。 ウイルスが増殖した細胞では、細胞が消失又は激減し破片状となっ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羽分当たり 10 TCID₅₀ 以上でなければならない。</p> <p style="margin: 0;">1.5 安全試験</p> <p style="margin: 0;">1.5.1 試験材料</p> <p style="margin: 0;">1.5.1.1 注射材料 試験品を溶解用液で 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。</p> <p style="margin: 0;">1.5.1.2 試験動物 生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 30 ~ 35 日齢の鶏を用いる。</p> <p style="margin: 0;">1.5.2 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 ずつを試験群の胸部筋肉内に注射し、対照群とともに3週間観察を行う。</p> <p style="margin: 0;">1.5.3 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。</p> <p style="margin: 0;">1.6 力価試験</p> <p style="margin: 0;">1.6.1 試験材料</p> <p style="margin: 0;">1.6.1.1 注射材料 試験品を溶解用液で 0.2mL 中1羽分となるように調整したものを注射材料とする。</p> <p style="margin: 0;">1.6.1.2 試験動物 生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 30 ~ 35 日齢の鶏を用いる。</p> <p style="margin: 0;">1.6.1.3 中和試験用ウイルス</p>

MDCC-MSB1 細胞で増殖させた CAV26P4 株を用いる。

1.6.1.3 培養細胞

MDCC-MSB1 細胞を用いる。

1.6.2 試験方法

試験動物 10 羽を試験群、3 羽を対照群とする。

試験群に注射材料の 1 羽分を胸部筋肉内に接種し、対照群とともに 21 日間観察する。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。

観察最終日に試験群及び対照群から得られた血清を非働化し、血清希釈法により中和試験を行う。

被検血清を細胞増殖用培養液で 2 倍階段希釈する。各希釈血清 25 μ L に 0.1 mL 中約 200TCID₅₀ を含む中和試験用ウイルス 25 μ L を混合し、4℃で 18 ~ 24 時間処理する。各混合液 20 μ L ずつをそれぞれ 96 穴平底プレートに 2 穴に分注し、それに細胞増殖用培養液で 2 × 10⁶ /mL に調整した MDCC-MSB1 細胞浮遊液を 180 μ L を加えて、39℃ 5vol% 炭酸ガス下で培養する。培養後 2 日目にそれぞれの穴の細胞培養液 20 μ L を採取して、細胞培養液 180 μ L を分注した 96 穴平底プレートのそれぞれの穴に移し培養する。この継代を 6 回行う。また、対照細胞も同様の継代を行い、最終の継代後 2 日目に細胞を観察する。

1.6.3 判定

培養細胞の 1 穴以上が、涙滴状から橋円状の形態を示し培養液の色調が黄色を呈して細胞が増殖できたと認められる血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

中和抗体価は、試験群の 80 % 以上が 256 倍以上でなければならない。この場合、対照群の中和抗体価は、16 倍未満でなければならない。

付記1 抗鶏貧血ウイルス血清

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏を鶏貧血ウイルス 26P4 株で免疫して得た血清で、試験品中のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記2 細胞増殖用培養液

1,000 mL 中

牛胎子血清 100 mL

RPMI-1640 (GIBCO) 残量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.8 ~ 8.2 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

新 旧 対 照 表

動物用生物学的製剤検定基準各条ワクチンの部：

改 正 案	現 行
<p>ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎 2 価混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン</p> <p style="text-align: center;">(略)</p> <p>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</p> <p><u>動生剤基準のマレック病（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の 3.3.4、3.3.5、3.3.6、3.3.7（迷入ウイルス否定試験法 2.1.1、2.1.2、2.2.2.1、2.2.2.2 及び 2.2.2.3 を除く）、3.3.8、3.3.9 及び 3.3.11 に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u></p>	<p>ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎 2 価混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン</p> <p style="text-align: center;">(略)</p> <p>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</p> <p><u>弱毒マレック病ウイルス血清型 2 型及び七面鳥ヘルペスウイルスを培養細胞で増殖させて得た感染細胞浮遊液を混合して凍結したワクチン（以下「凍結ワクチン」という。）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ワクチン（以下「乾燥ワクチン」という。）とを組み合わせたものである。</u></p> <p><u>1 小分製品の試験</u></p> <p><u>1.1 無菌試験</u> 一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。 <u>ただし、凍結ワクチン及び乾燥ワクチンのそれぞれ 1 本を 50mL の溶解用液（付記 1）に溶解したものを小分容器ごとの試料とする。</u></p> <p><u>1.2 マイコプラズマ否定試験</u> 一般試験法のマイコプラズマ否定試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。 <u>ただし、凍結ワクチン及び乾燥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。</u></p> <p><u>1.3 迷入ウイルス否定試験</u> <u>凍結ワクチンについて一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1、2.2.1 及び 2.2.2.4 により試験を行い、これらに適合しなければならない。</u> <u>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（血清型 2 型）血清（付記 2）及び抗七面鳥ヘルペスウイルス血清（付記 3）を非働化したもので中和したものを用いる。</u></p> <p><u>1.4 マレック病ウイルス含有量試験</u></p> <p><u>1.4.1 試験材料</u></p> <p><u>1.4.1.1 試料</u> <u>凍結ワクチンを細胞維持用培養液（付記 4）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。</u></p> <p><u>1.4.1.2 培養細胞</u> <u>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 25cm 以上のシャーレに 2 培養し、単層となったものを用いる。</u></p> <p><u>1.4.2 試験方法</u> <u>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℃で 60 分間静置吸着させた後、細胞維持用培養液を加え、37℃で 4～7 日間培養し、観察する。</u></p> <p><u>1.4.3 判定</u> <u>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もに 10 又は 10 3.0 3.0 PFU 以上でなければならない。ただし、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。</u></p> <p><u>1.5 安全試験</u></p> <p><u>1.5.1 試験材料</u></p> <p><u>1.5.1.1 注射材料</u> <u>凍結ワクチン及び乾燥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。</u></p> <p><u>1.5.1.2 試験動物</u></p>

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。

1.5.2 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。

1.5.3 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、異常を認めてはならない。

1.6 マレック病力価試験

1.6.1 試験材料

1.6.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.6.1.2 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。

1.6.2 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、両ウイルス株に対する蛍光抗体反応を行う。

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 5）に各希釈液を加え、37℃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 6）を加え、37℃で 45 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。

1.6.3 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。

1.7 鶏痘発症試験

1.7.1 試験材料

1.7.1.1 接種材料

凍結ワクチン及び乾燥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。

1.7.1.2 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。

1.7.2 試験方法

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

1.7.3 判定

試験群は、接種後 5～7 日で善感発症し、痘疱は 21 日以内に完全に消退しなければならない。

付記 1 溶解用液

1,000mL 中

塩化ナトリウム 8.0 g

無水リン酸水素ナトリウム 1.2 g

リン酸二水素カリウム 0.19 g

フェノールレッド 0.025g

水残量

付記 2 抗マレック病ウイルス（血清型 2 型）血清

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏をマレック病ウイルス（血清型 2 型）で免疫して得た血清で、血清型 2 型のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記 3 抗七面鳥ヘルペスウイルス血清

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏を七面鳥ヘルペスウイルス（血清型 3 型）で免疫して得た血清で、血清型 3 型のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記 4 細胞維持用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・プロス 2.95 g

牛血清適量

イーグル MEM 又は F 10 培地残量

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 5 感染細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞を培養し、カバーグ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6 抗鶏 IgG 蛍光標識抗体

抗鶏 IgG 血清からγグロブリンを調整し、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

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嚢病混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン

（以下略）

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嚢病混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン

（以下略）

新 旧 対 照 表

動物用生物学的製剤検定基準各条ワクチンの部：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嚢病・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

改 正 案	現 行
<p>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嚢病・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</p> <p><u>動生剤基準のニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎2価・鶏伝染性ファブリキウス嚢病・トリニューモウイルス感染症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチンの3.5.2、3.5.4及び3.5.5に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u></p>	<p>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嚢病・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</p> <p>ニューカッスル病ウイルス及び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嚢病ウイルス及び弱毒七面鳥鼻気管炎(以下「TRT」という。)を培養細胞で増殖させたウイルス液をそれぞれ不活化し、混合したものに油性アジュバントを添加したワクチンである。</p> <p>1 小分製品の試験</p> <p>1.1 無菌試験 一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</p> <p>1.2 安全試験</p> <p>1.2.1 試験材料</p> <p>1.2.1.1 注射材料 試験品を注射材料とする。</p> <p>1.2.1.2 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。</p> <p>1.2.2 試験方法 試験動物の10羽を試験群、3羽を対照群とする。 注射材料1羽分ずつを試験群の頸部皮下に注射し、対照群とともに4週間観察する。</p> <p>1.2.3 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。</p> <p>1.3 力価試験</p> <p>1.3.1 ニューカッスル病力価試験</p> <p>1.3.1.1 試験材料</p> <p>1.3.1.1.1 試験動物 1.2の試験に用いた動物を用いる。</p> <p>1.3.1.1.2 赤血球凝集抗原 「ニューカッスル病診断用赤血球凝集抗原」を用いる。</p> <p>1.3.1.2 試験方法 1.2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。</p> <p>1.3.1.3 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HI抗体価5倍以下でなければならない。</p> <p>1.3.2 鶏伝染性気管支炎力価試験</p> <p>1.3.2.1 試験材料</p> <p>1.3.2.1.1 試験動物 1.2の試験に用いた動物を用いる。</p> <p>1.3.2.1.2 中和試験用ウイルス それぞれの製造用株を用いる。ただし、そのウイルス量は、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、1 mL 中 $10^{5.0}$ EID₅₀以上でなければならない。</p> <p>1.3.2.1.3 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。</p>

1.3.2.2 試験方法

1.2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、それぞれ等量を各群ごとにプールし、非働化する。

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℃で18～24時間又は37℃で60分間処理する。処理した試料0.1mLずつを5個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で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。

1.3.2.3 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、EID₅₀を求め、中和指数を算出する。ただし、24時間以内に死亡したものは除外する。

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

1.3.3 鶏伝染性ファブリキウス養病力価試験

1.3.3.1 試験材料

1.3.3.1.1 試験動物

1.2の試験に用いた動物を用いる。

1.3.3.1.2 中和試験用ウイルス

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、培養した伝染性ファブリキウス養病ウイルスK株又は適当と認められた株を用いる。

1.3.3.1.3 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、単層となったものを用いる。

1.3.3.2 試験方法

1.2の試験最終日に試験群から得られた各個体の血清を非働化し、中和試験を行う。

血清をリン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈する。各希釈血清と100μL中100～200PFU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℃で1時間処理する。この各混合液100μLずつをそれぞれ2枚の培養細胞に接種し、37℃で1時間静置吸着させた後、第1次重層寒天培地(付記1)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2)を重ね、観察する。

1.3.3.3 判定

ブラック数を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4倍以下でなければならない。

1.3.4 トリニューモウイルス力価試験

1.3.4.1 試験材料

1.3.4.1.1 試験動物

1.2の試験に用いた動物を用いる。

1.3.4.2 試験方法

1.2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、ELISA抗体価を測定する。固相化緩衝液(付記3)で適当に希釈したTRT抗原(付記4)をプレート(付記5)に100μLずつ分注し、37℃で3時間反応後、洗浄用緩衝液(付記6)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7)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℃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ペルオキシンダーゼ標識抗体(付記8)を100μL加え、37℃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(付記9)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(付記10)を50μL加えて、反応を停止させ、波長450nmで吸光度値を測定する。

1.3.4.3 判定

参照陰性血清(付記11)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。

試験群の80%以上がELISA抗体価2^{3.4}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^{3.4}倍未満でなければならず、参照陽性血清(付記12)は2^{3.4}倍以上の抗体価を示さなければならない。

付記1 第1次重層寒天培地

1.000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス

2.95 g

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2 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%になるように加えたもの

付記3 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

pH7.0 に調整する。

付記4 TRT 抗原

TRT ウイルス弱毒 BUT1 # 8544 株を鶏用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 分間) し、その遠心上清と TRT 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。再浮遊したものをシュークロースステップ遠心 (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5 プレート
適当と認められた 96 穴平底マイクロプレートを使用する。

付記6 洗浄用緩衝液

1,000mL 中	
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	2.9 g
無水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 7.0 に調整する。

付記7 IB-EIA 緩衝液

1,000mL 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 30w/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

濾過滅菌 (200nm) 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9 基質液

TMB 溶液	0.2mL
UP 緩衝液	1.5mL
水	15 mL

TMB 溶液は、DMSO 1,000mL に TMB (3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン) を 8g 溶かしたもの
UP 緩衝液は、尿素過酸化水素 (140 mg) を TMB 緩衝液 (酢酸ナトリウム 136 g を約 500mL

の水に溶かし、1.5mol/L クエン酸で pH を 5.3 ~ 5.7 に調整した後、水を加え、1000mL とし、高圧滅菌 (121 °C、20 分間) したものを 100mL に溶かしたものを

付記 10 反応停止液

硫酸	110 mL
水	1,000 mL

付記 11 参照陰性血清

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の鶏群由来で TRT 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 12 参照陽性血清

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の鶏群由来で TRT ウイルスに対する抗体陰性鶏を TRT ウイルス弱毒 BUT 1 # 8544 株の生ウイルスで免疫して得た血清で、ELISA 抗体価 $2^{4.64} \sim 2^{5.64}$ 倍を示すもの

新 旧 対 照 表

動物用生物学的製剤検定基準各条ワクチンの部：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

改 正 案	現 行
<p>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</p> <p style="text-align: center;">(略)</p> <p>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</p> <p>動生剤基準の鶏大腸菌症（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）不活化ワクチンの 3.4.2、3.4.4 及び 3.4.5 に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</p>	<p>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</p> <p style="text-align: center;">(略)</p> <p>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</p> <p>組換えF11 線毛抗原産生大腸菌及びペロ細胞毒性抗原産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。</p> <p>1 小分製品の試験</p> <p>1.1 無菌試験</p> <p>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適しななければならない。</p> <p>1.2 安全試験</p> <p>1.2.1 試験材料</p> <p>1.2.1.1 注射材料</p> <p>試験品を注射材料とする。</p> <p>1.2.1.2 試験動物</p> <p>生ワクチン製造用材料の規格1.11 由来の4週齢の鶏を用いる。</p> <p>1.2.2 試験方法</p> <p>試験動物10羽を試験群、3羽を対照群とする。</p> <p>注射材料2羽ずつを試験群の胸部筋肉内注射し、対照群とともに4週間観察し、試験最終日に剖検する。</p> <p>1.2.3 判定</p> <p>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、剖検により注射局所に多数（10個以上）の膿死又は膿瘍を認めてはならない。</p> <p>1.3 力価試験</p> <p>1.3.1 試験材料</p> <p>1.3.1.1 注射材料</p> <p>試験品を注射材料とする。</p> <p>1.3.1.2 試験動物</p> <p>生ワクチン製造用材料の規格1.1 由来の2～4週齢の鶏を用いる。</p> <p>1.3.1.3 抗原固相化プレート</p> <p>抗原吸着プレート（付記1）を用いる。</p> <p>1.3.1.4 試験方法</p> <p>試験動物の10羽を試験群、5羽を対照群とする。</p> <p>注射材料0.1mLずつを試験群の胸部筋肉内に注射する。注射後4週目に両群から得られた血清について、F11線毛抗原及びペ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。</p> <p>あらかじめ抗原吸着プレートの全ての穴に希釈液（付記2）を100μL加える。試験群と対照群の血清及び参照陽性血清（付記3）を希釈液で、それぞれ50倍及び500倍に希釈したものを100μLずつ加え、同希釈液で2倍階段希釈し、希釈液のみの穴を血清対照とする。37℃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4）を100μLずつ加え、37℃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5）を各穴に100μLずつ加え、遮光し、常温で15分間反応後、2mol/Lの硫酸を全ての穴に50μLずつ加えて反応を停止させ、波長450nmの吸光度を測定する。</p> <p>1.3.1.5 判定</p> <p>対照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釈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、ペロ細胞毒性</p>

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線毛抗原及びペロ細胞毒性抗原においてそれぞれすべて100倍及び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 $10^{1.5} \sim 10^{2.5}$ 、ペロ細胞毒性抗原では $10^{1.5} \sim 10^{2.5}$ の範囲であることを満たしていなければならない。

付記1 抗原吸着プレート

F11線毛抗原については参照F11抗原(付記6)を0.04mol/LのPBS(付記7)で2.5 μ g/mLに、また、ペロ細胞毒性抗原については参照ペロ細胞毒性抗原(付記8)を2 μ g/mLに希釈後、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9)を各穴に0.2mL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2 稀釈液

1,000mL 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
牛血清アルブミン	1 g
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3 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線毛抗原及びペ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 $10^{1.5} \sim 10^{2.5}$ 及び $10^{1.5} \sim 10^{2.5}$ であるもの

付記4 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、-20°Cに保存したもの

付記5 基質液

UP緩衝液を1.5、0.6w/v%TMB溶液を0.2及び水を15の割合で混合したもの。
* 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6 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7 0.04mol/L PBS

1,000mL 中	
リン酸水素二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8 参照ペロ細胞毒性抗原

動物医薬品検査所が適当と認めたもの

付記9 ブロッキング緩衝液

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

付記10 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6g溶解し、窒素で飽和状態にしたもの

鶏伝染性コリィザ（A型）（アジュバント加）不活化ワクチン

（以下略）

鶏伝染性コリィザ（A型）（アジュバント加）不活化ワクチン

（以下略）

新 旧 対 照 表

動物用生物学的製剤検定基準各条ワクチンの部：ぶりびブリオ病・ α 溶血性レンサ球菌症混合不活化ワクチンの項を以下のように改める。

改 正 案	現 行
<p style="text-align: center;">ぶりびブリオ病・α溶血性レンサ球菌症混合不活化ワクチン</p> <p><small>動生剤基準のぶりびブリオ病・α溶血性レンサ球菌症混合不活化ワクチンの3.4.3、3.4.5及び3.4.6に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</small></p>	<p style="text-align: center;">ぶりびブリオ病・α溶血性レンサ球菌症混合不活化ワクチン</p> <p><small>びブリオ・アングイラルム J-O-3 型及びラクトコッカス・ガルピエの培養菌液を不活化後混合したワクチンである。</small></p> <p style="text-align: center;">(以下略)</p>

新 旧 対 照 表

動物用生物学的製剤検定基準各条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・犬コロナウイルス感染症混合生ワクチン

改 正 案	現 行
<p>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生ワクチン</p> <p><u>動生剤基準のジステンパー・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生ワクチンの 3.3.4、3.3.6（迷入ウイルス否定試験法 2.8.2 を除く）、3.3.7 及び 3.3.8 に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u></p>	<p>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生ワクチン</p> <p><u>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。</u></p> <p><u>1 小分製品の試験</u></p> <p><u>1.1 無菌試験</u> <u>一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</u></p> <p><u>1.2 迷入ウイルス否定試験</u> <u>一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1 及び 2.5.1 により試験を行い、これらに適合しなければならない。</u> <u>ただし、中和用血清は、抗ジステンパーウイルス血清（付記1）、抗犬アデノウイルス（2型）血清（付記2）、抗犬パラインフルエンザウイルス血清（付記3）、抗犬パルボウイルス血清（付記4）及び抗犬コロナウイルス血清（付記5）をそれぞれ非働化したものを用いる。</u></p> <p><u>1.3 ウイルス含有量試験</u></p> <p><u>1.3.1 ジステンパーウイルス含有量試験</u></p> <p><u>1.3.1.1 試験材料</u></p> <p><u>1.3.1.1.1 試料</u> <u>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2、3、4及び5）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（付記6）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。</u></p> <p><u>1.3.1.1.2 培養細胞</u> <u>Vero 細胞を用いる。</u></p> <p><u>1.3.1.2 試験方法</u> <u>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。</u></p> <p><u>1.3.1.3 判定</u> <u>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^{5.5} TCID₅₀以上でなければならない。</u></p> <p><u>1.3.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験</u></p> <p><u>1.3.2.1 試験材料</u></p> <p><u>1.3.2.1.1 試料</u> <u>試験品中のアデノウイルス（2型）以外のウイルスを各抗血清（付記1、3、4及び5）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。</u></p> <p><u>1.3.2.1.2 培養細胞</u> <u>豚腎培養細胞を用いる。</u></p>

1.3.2.2 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。

1.3.2.3 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。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。

1.3.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

1.3.3.1 試験材料

1.3.3.1.1 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1、2、4及び5)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。

1.3.3.1.2 培養細胞

Vero細胞を用いる。

1.3.3.2 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、30℃で7日間培養し、観察する。

1.3.3.3 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10^{3.5}TCID₅₀以上でなければならない。

1.3.4 犬パルボウイルス含有量試験

1.3.4.1 試験材料

1.3.4.1.1 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1、2、3及び5)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。

1.3.4.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

1.3.4.2 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、32℃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7)を加え、更にこの混合液と等量の0.3vol%豚赤血球浮遊液を加え、4℃で静置後、観察する。

1.3.4.3 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。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。

1.3.5 犬コロナウイルス含有量試験

1.3.5.1 試験材料

1.3.5.1.1 試料

試験品中の犬コロナウイルス以外のウイルスを各抗血清(付記1、2、3及び4)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。

1.3.5.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

1.3.5.2 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。

1.3.5.3 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 $10^{4.5}$ TCID₅₀ 以上でなければならない。

1.4 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性否定試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

付記1 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、試験品中のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記2 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、試験品中のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記3 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、試験品中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、試験品中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、試験品中のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記6 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	2.95g
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もよい。	

付記7 ホウ酸緩衝食塩液

1,000mL 中	
塩化ナトリウム	10.52 g
ホウ酸	3.09 g
水酸化ナトリウム	0.96 g
水	残量
水酸化ナトリウムで pH を 9.0 に調整する。	

新 旧 対 照 表

動物用生物学的製剤検定基準各条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・犬コロナウイルス感染症混合ワクチン

改 正 案	現 行
<p>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</p> <p><u>動生剤基準のジステンパー・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の3.3.5、3.3.7（迷入ウイルス否定試験法2.8.2を除く）、3.3.8、3.3.10及び3.3.12.5に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u></p> <p><u>また、小分製品の液状不活化ワクチンについて同基準のジステンパー・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の3.2.4の規定を準用して試験を行うものとする。</u></p>	<p>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</p> <p>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。</p> <p>1 小分製品の試験</p> <p>1.1 無菌試験</p> <p>乾燥生ワクチンを液状不活化ワクチンで溶解したもの（以下「混合ワクチン」という。）について、一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</p> <p>1.2 迷入ウイルス否定試験</p> <p>乾燥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及び2.5.1により試験を行い、これらに適合しなければならない。</p> <p>ただし、中和用血清は、抗ジステンパーウイルス血清（付記1）、抗犬アデノウイルス（2型）血清（付記2）、抗犬パラインフルエンザウイルス血清（付記3）及び抗犬パルボウイルス血清（付記4）をそれぞれ非働化したものを用いる。</p> <p>1.3 ウイルス含有量試験</p> <p>1.3.1 ジステンパーウイルス含有量試験</p> <p>1.3.1.1 試験材料</p> <p>1.3.1.1.1 試料</p> <p>試験品中のジステンパー以外のウイルスを各抗血清（付記2、3及び4）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（付記5）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。</p> <p>1.3.1.1.2 培養細胞</p> <p>Vero細胞又はNLDK-1細胞を用いる。</p> <p>1.3.1.2 試験方法</p> <p>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。</p> <p>1.3.1.3 判定</p> <p>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^{7.0}TCID₅₀以上でなければならない。</p> <p>1.3.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験</p> <p>1.3.2.1 試験試料</p> <p>1.3.2.1.1 試料</p> <p>試験品中のアデノウイルス（2型）以外のウイルスを各抗血清（付記1、3及び4）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。</p> <p>1.3.2.1.2 培養細胞</p> <p>犬腎経代細胞を用いる。</p> <p>1.3.2.2 試験方法</p> <p>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日間又は10日間培養し、観察する。</p> <p>1.3.2.3 判定</p> <p>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^{7.0}TCID₅₀以上でなければならない。ただし、特に承認されたものは、そのウイルス含有量とする。</p> <p>1.3.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験</p> <p>1.3.3.1 試験材料</p> <p>1.3.3.1.1 試料</p> <p>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1、2及び4）を非</p>

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。

1.3.3.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

1.3.3.2 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日又は10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加え、室温で90分間静置し、観察し、または、培養後、培養液を除去し、培養液と等量の0.5vol%モルモット赤血球浮遊液を加え、4℃で60分間静置し、観察する。

1.3.3.3 判定

試料を接種した培養液に赤血球凝集を認めたもの又は培養細胞に赤血球の吸着を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{4.0}TCID₅₀以上でなければならない。ただし、特に承認されたものは、そのウイルス含有量とする。

1.3.4 犬パルボウイルス含有量試験

1.3.4.1 試験材料

1.3.4.1.1 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1、2及び3）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。

1.3.4.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞又はNLDK-1細胞を用いる。

1.3.4.2 試験方法

試料 0.1mLずつをそれぞれ培養細胞浮遊液を分注した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、これに等量のホウ酸緩衝食塩液（付記6）を加え、さらにこの混合液と等量の0.3vol%豚赤血球浮遊液を加え、4℃で静置した後、観察する。

1.3.4.3 判定

試料を接種した培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。試験品のウイルス含有量は1頭分当たり10^{4.0}TCID₅₀以上でなければならない。ただし、特に承認されたものは、そのウイルス含有量とする。

1.4 不活化試験

1.4.1 試験材料

1.4.1.1 試料

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

1.4.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

1.4.2 試験方法

試料を25cm²以上の培養細胞2本に1mLずつ接種し、37℃で1時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て、37℃で5日間培養した後接種した培養細胞を継代し、さらに37℃で7日間培養し、観察する。

1.4.3 判定

培養細胞にCPEを認めてはならない。

1.5 異常毒性否定試験

混合ワクチンについて一般試験法の異常毒性否定試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

1.6 力価試験

1.6.1 試験材料

1.6.1.1 注射材料

混合ワクチンを注射材料とする。

1.6.1.2 試験動物

体重約300gのモルモットを用いる。

1.6.1.2 中和試験用ウイルス

猫腎継代細胞で増殖させた犬コロナウイルス（付記7）を用いる。

1.6.2 試験方法

試験群5匹を試験群、2匹を対照群とする。

注射材料1mL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日後に両群から採血し、各個体の血清について中和試験を行う。

非働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0.125mLと0.05mL

中約 200TCID₅₀ の中和試験用ウイルス液 0.125mL 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 96 穴マイクロプレートの 4 穴に接種し、さらに猫由来腎継代細胞浮遊液を 0.1mL ずつ加え、37℃ 5 vol.% 炭酸ガス下で 6 日間培養し、観察する。

1.6.3 判定

培養細胞の 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、いずれも 2 倍以下でなければならない。

付記 1 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、試験品中のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記 2 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、試験品中のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記 3 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、試験品中のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記 4 抗犬バルボウイルス血清

犬バルボウイルスで免疫した兔又はモルモットの血清で、試験品中のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記 5 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中	
牛胎子血清	10 ~ 20 mL
トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
イーグル 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 6 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
水酸化ナトリウムで pH を 9.0 に調整する。	

付記 7 犬コロナウイルス

動物医薬品検査所が適当と認めたもの

新 旧 対 照 表

現 行	改 正 条
<p>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・レプトスピラ病混合ワケチ</p>	<p>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ケチ</p>
<p>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ケチ（以下「混合生ワケチ」といふ。）と、レプトスピラ・カニコラ及びレプトスピラ・イクラロヘモジの全培養菌液を不活化したも又はこれを不活化した後可溶化したワケチ（以下「被状不活化ワケチ-1」といふ。）とを組み合わせたワケチ、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・カニコラ及びレプトスピラ・イクラロヘモジの全培養菌液を不活化した後可溶化したも又はこれを凍結乾燥したワケチ（以下「混合乾燥ワケチ」といふ。）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ケチ（以下「被状不活化ワケチ-2」といふ。）とを組み合わせたワケチである。</p>	<p>混合ワケチの3341の規定を準用して試験を行うものとする。</p> <p>混合ワケチの3341の規定を準用して試験を行うものとする。</p>
<p>1.1 無菌試験 混合生ワケチを被状不活化ワケチ-1で溶解したもの（以下「混合ワケチ-1」といふ。）又は混合乾燥ワケチを被状不活化ワケチ-2で溶解したもの（以下「混合ワケチ-2」といふ。）について、一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</p> <p>1.2 迷入ウイルス否定試験 混合生ワケチを被状不活化ワケチ-1と同量の滅菌水で溶解したもの又は混合乾燥ワケチを被状不活化ワケチ-2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及び2.5.1により試験を行い、これらに適合しなればならない。</p> <p>ただし、中和用血清は、抗ジステンパーウイルス血清（付記1）、抗犬アデノウイルス（2型）血清（付記2）、抗犬パラインフルエンザウイルス血清（付記3）及び抗犬パルボウイルス血清（付記4）をそれぞれ非活化したもを用いる。</p>	<p>1.3.1.1 試験材料 1.3.1.1 試験材料 1.3.1.1 試験材料 1.3.1.1 試験材料</p>
<p>混合生ワケチを試験品とする場合には、試験品中のジステンパー以外のウイルスを各抗血清（付記2、3及び4）を非活化したもで中和し、さらには、リゾ緩衝食塩液に対し混合乾燥ワケチを試験品とする場合には、試験品中のジステンパー以外のウイルスを各血清（付記2、3及び4）を非活化したもで中和し、さらには、リゾ緩衝食塩液に対し</p>	<p>混合生ワケチを試験品とする場合には、試験品中のジステンパー以外のウイルスを各抗血清（付記2、3及び4）を非活化したもで中和し、さらには、リゾ緩衝食塩液に対し混合乾燥ワケチを試験品とする場合には、試験品中のジステンパー以外のウイルスを各血清（付記2、3及び4）を非活化したもで中和し、さらには、リゾ緩衝食塩液に対し</p>

4℃で90分間透析したものをウイルス増殖用培養液（付記5）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

1.3.1.1.2 培養細胞

Vero細胞又はNL2K-1細胞を用いる。

1.3.1.2 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7～10日間培養し、観察する。

1.3.1.3 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。試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{5.0}TCID₅₀以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、そのウイルス含有量とする。

1.3.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験

1.3.2.1 試験材料

1.3.2.1.1 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1、3及び4）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。

1.3.2.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

1.3.2.2 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日間又は10日間培養し、観察する。

1.3.2.3 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。試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{5.0}TCID₅₀以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、そのウイルス含有量とする。

1.3.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

1.3.3.1 試験材料

1.3.3.1.1 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1、2及び4）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。

1.3.3.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

1.3.3.2 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日又は10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加え、室温で90分間静置し、観察し、又は、培養後、培養液を除去し、培養液と等量の0.5vol%モルモット赤血球浮遊液を加え、4℃で60分間静置し、観察する。

1.3.3.3 判定

試料を接種した培養液に赤血球凝集を認めたもの又は培養細胞に赤血球の吸着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、農林水産大臣が特に認めた場合には、そのウイルス含有量とする。

1.3.4 犬パルボウイルス含有量試験

1.3.4.1 試験材料

1.3.4.1.1 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1、2及び3）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。

る。

1.3.4.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞又は NLDK-1 細胞を用いる。

1.3.4.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ培養細胞浮遊液を分注した 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、これに等量のホウ酸緩衝食塩液 (付記 6) を加え、さらに、この混合液と等量の 0.3vol % 豚赤血球浮遊液を加え、4℃で静置した後、観察する。

1.3.4.3 判定

試料を接種した培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID50 を算出する。試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たり $10^{6.0}$ TCID50 以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、そのウイルス含有量とする。

1.4 不活化試験

1.4.1 試験材料

1.4.1.1 試料

液状不活化ワクチン-1 又は液状不活化ワクチン-2 の 2 mL を 100 倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用いて、4℃で一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

1.4.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

1.4.2 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 1 時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て、37℃で 5 日間培養した後接種した培養細胞を継代し、さらに、37℃で 7 日間培養し、観察する。

1.4.3 判定

培養細胞に CPE を認めてはならない。

1.5 異常毒性否定試験

混合ワクチン-1 又は混合ワクチン-2 について一般試験法の異常毒性否定試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

ただし、本試験を行うことができない場合には、1.6 の試験を行う。

1.6 毒性限度確認試験

一般試験法の毒性限度確認試験法 1 により試験を行い、これに適合しなければならない。

1.7 方価試験

1.7.1 試験材料

1.7.1.1 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。

1.7.1.2 試験動物

体重約 300g のモルモットを用いる。

1.7.1.3 中和試験用ウイルス

猫腎継代細胞で増殖させた犬コロナウイルス (付記 7) を用いる。

1.7.2 試験方法

試験群 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 日後に同群から採血し、各個体の血清について中和試験を行う。

非働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混合し、37℃ 60 分間処理する。各混合液 0.05mL ずつをそれぞれ 4 穴に接種し、さらに、猫胎子腎継代細胞浮遊液を 0.1mL ずつ加え、37℃ 5 vol % 炭酸ガス下で 6 日間培養し、観察する。

1.7.3 判定

培養細胞の 4 穴のうち 2 穴以上に CPE の阻止を認めた血清の最高希釈倍数で中和抗体価を

表す。

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、対照群においては、いずれも2倍以下でなければならない。

付記1 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あって、試験品中のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記2 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あって、試験品中のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記3 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あって、試験品中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あって、試験品中のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記5 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中	
牛胎子血清	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6 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
水酸化ナトリウムでpHを9.0に調整する。	

付記7 犬コロナウイルス

動物医薬品検査所が適当と認めたもの

新 旧 対 照 表

動物用生物学的製剤検定基準各条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・犬コロナウイルス感染症・犬レプトスピラ病（カニコラ、コペンハーゲニー、ヘブドマディス）混合ワクチン

改 正 案	現 行
<p>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（カニコラ、コペンハーゲニー、ヘブドマディス）混合ワクチン</p> <p><u>動生剤基準のジステンパー・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・犬レプトスピラ病（カニコラ、コペンハーゲニー、ヘブドマディス）混合ワクチンの3.4.5、3.4.7（迷入ウイルス否定試験法2.8.2を除く。）、3.4.8及び3.4.10に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。</u></p>	<p>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（カニコラ・コペンハーゲニー・ヘブドマディス）混合ワクチン</p> <p>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・カニコラ及びレプトスピラ・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。</p> <p><u>1 小分製品の試験</u></p> <p><u>1.1 無菌試験</u> 混合生ワクチンを液状不活化ワクチンで溶解したもの（以下「混合ワクチン」という。）について、一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</p> <p><u>1.2 迷入ウイルス否定試験</u> 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及び2.5.1により試験を行い、これらに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1）、抗犬アデノウイルス（2型）血清（付記2）、抗犬パラインフルエンザウイルス血清（付記3）及び抗犬パルボウイルス血清（付記4）及び抗犬コロナウイルス血清（付記5）をそれぞれ非働化したものを用いる。</p> <p><u>1.3 ウイルス含有量試験</u></p> <p><u>1.3.1 ジステンパーウイルス含有量試験</u></p> <p><u>1.3.1.1 試験材料</u></p> <p><u>1.3.1.1.1 試料</u> 試験品中のジステンパー以外のウイルスを各抗血清（付記2、3、4及び5）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（付記5）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。</p> <p><u>1.3.1.1.2 培養細胞</u> Vero細胞を用いる。</p> <p><u>1.3.1.2 試験方法</u> 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。</p> <p><u>1.3.1.3 判定</u> 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^{2.5}TCID₅₀以上でなければならない。</p> <p><u>1.3.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験</u></p>

1.3.2.1 試験試料

1.3.2.1.1 試料

試験品中のアデノウイルス(2型)以外のウイルスを各抗血清(付記1、3、4及び5)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。

1.3.2.1.2 培養細胞

豚腎培養細胞を用いる。

1.3.2.2 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。

1.3.2.3 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。試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{4.5}TCID₅₀以上でなければならない。

1.3.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

1.3.3.1 試験材料

1.3.3.1.1 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1、2、4及び5)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。

1.3.3.1.2 培養細胞

Vero細胞を用いる。

1.3.3.2 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、30℃で7日間培養し、観察する。

1.3.3.3 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10^{4.5}TCID₅₀以上でなければならない。

1.3.4 犬パルボウイルス含有量試験

1.3.4.1 試験材料

1.3.4.1.1 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1、2、3及び5)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。

1.3.4.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

1.3.4.2 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、32℃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7)を加え、更にこの混合液と等量の0.3vol%豚赤血球浮遊液を加え、4℃で静置した後、観察する。

1.3.4.3 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。試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{4.5}TCID₅₀以上でなければならない。

1.3.5 犬コロナウイルス含有量試験

1.3.5.1 試験材料

1.3.5.1.1 試料

試験品中の犬コロナウイルス以外のウイルスを各抗血清(付記1、2、3及び4)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。

1.3.5.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

1.3.5.2 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。

1.3.5.3 判定

培養細胞に CPE 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^{2.5}TCID₅₀ 以上でなければならない。

1.4 異常毒性否定試験

混合ワクチンについて一般試験法の異常毒性否定試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

付記1 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、試験品中のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記2 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、試験品中のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記3 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、試験品中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、試験品中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、試験品中のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記6 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中	
トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95g
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もよい。	

付記7 ホウ酸緩衝食塩液

1,000mL 中	
塩化ナトリウム	10.52g
ホウ酸	3.09g
水酸化ナトリウム	0.96g
水	残量
水酸化ナトリウムで pH を 9.0 に調整する。	

新 旧 対 照 表

動物用生物学的製剤検定基準各条ワクチンの部：豚オーエスキー病（gI-、tk-）生ワクチン（酢酸トコフェロールアジュバント加溶解用液）

改 正 案	現 行
<p style="text-align: center;">豚オーエスキー病（gI-、tk-）生ワクチン (略)</p> <p style="text-align: center;">豚オーエスキー病（gI-、tk-）生ワクチン（酢酸トコフェロールアジュバント加溶解用液）</p> <p>糖たんぱく gI 及びチミジンキナーゼを産生しない弱毒オーエスキー病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もので、使用時に酢酸トコフェロールアジュバントを含む溶解用液で溶解するワクチンである。</p> <p>1 小分製品の試験</p> <p>1.1 無菌試験 一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</p> <p>1.2 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 により試験を行い、これに適合しなければならない。 ただし、中和用血清は、抗オーエスキー病ウイルス血清（付記1）を非働化したものを用いる。</p> <p>1.3 ウイルス含有量試験</p> <p>1.3.1 試験材料</p> <p>1.3.1.1 試料 試験品をウイルス増殖用培養液（付記2）で溶解し、さらに10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。</p> <p>1.3.1.2 培養細胞 Vero 細胞、HmLu-1 細胞又は適当と認められた培養細胞を培養し、単層となったものを用いる。</p> <p>1.3.2 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60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液 0.5mL を加え、37℃で6～7日間培養し、観察する。</p> <p>1.3.3 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10^{7.0}TCID₅₀以上でなければならない。</p> <p>1.4 マーカー試験</p> <p>1.4.1 糖たんぱく gI 欠損マーカー</p> <p>1.4.1.1 試験材料 1.5の試験終了後、14日目の試験群の血清を用いる。</p> <p>1.4.1.2 試験方法 オーエスキー病ウイルス糖たんぱく gI 抗体を識別できる酵素抗体反応キット又は動物医薬品検査所がこれと同等と認めたものを用いて酵素抗体反応を行う。</p> <p>1.4.1.3 判定 血清中にオーエスキー病ウイルス糖たんぱく gI 抗体を認めてはならない。</p> <p>1.4.2 チミジンキナーゼ欠損マーカー</p> <p>1.4.2.1 試験材料</p> <p>1.4.2.1.1 試料 試験品を試料とする。</p> <p>1.4.2.1.2 培養細胞 Ltk細胞を細胞増殖用培養液（付記3）で1×10¹⁰個/mLとなるように調整した細胞浮遊液の</p>	<p style="text-align: center;">豚オーエスキー病（gI-、tk-）生ワクチン (略)</p> <p style="text-align: center;">豚オーエスキー病（gI-、tk-）生ワクチン（酢酸トコフェロールアジュバント加溶解用液）</p> <p>糖たんぱく gI 及びチミジンキナーゼを産生しない弱毒オーエスキー病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もので、使用時に酢酸トコフェロールアジュバントを含む溶解用液で溶解するワクチンである。</p> <p>1 小分製品の試験</p> <p>1.1 無菌試験 一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</p> <p>1.2 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 により試験を行い、これに適合しなければならない。 ただし、中和用血清は、抗オーエスキー病ウイルス血清（付記1）を非働化したものを用いる。</p> <p>1.3 ウイルス含有量試験</p> <p>1.3.1 試験材料</p> <p>1.3.1.1 試料 試験品をウイルス増殖用培養液（付記2）で溶解し、さらに10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。</p> <p>1.3.1.2 培養細胞 Vero 細胞、HmLu-1 細胞又は適当と認められた培養細胞を培養し、単層となったものを用いる。</p> <p>1.3.2 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60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液 0.5mL を加え、37℃で6～7日間培養し、観察する。</p> <p>1.3.3 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10^{7.0}TCID₅₀以上でなければならない。</p> <p>1.4 マーカー試験</p> <p>1.4.1 糖たんぱく gI 欠損マーカー</p> <p>1.4.1.1 試験材料 1.5の試験終了後、14日目の試験群の血清を用いる。</p> <p>1.4.1.2 試験方法 オーエスキー病ウイルス糖たんぱく gI 抗体を識別できる酵素抗体反応キット又は動物医薬品検査所がこれと同等と認めたものを用いて酵素抗体反応を行う。</p> <p>1.4.1.3 判定 血清中にオーエスキー病ウイルス糖たんぱく gI 抗体を認めてはならない。</p> <p>1.4.2 チミジンキナーゼ欠損マーカー</p> <p>1.4.2.1 試験材料</p> <p>1.4.2.1.1 試料 試験品を試料とする。</p> <p>1.4.2.1.2 培養細胞 Ltk細胞を細胞増殖用培養液（付記3）で1×10¹⁰個/mLとなるように調整した細胞浮遊液の</p>

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

1.4.2.1.3 培養液

HAT培地（付記4）及びウイルス増殖用培養液を用いる。

1.4.2.2 試験方法

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

HAT培地又はウイルス増殖用培養液の約5 mLをそれぞれの培養細胞に加え、37℃で3日間培養する。それぞれの培養細胞について、凍結融解を1回行った後、遠心上清のウイルス含有量を1.3を準用して測定する。

1.4.2.3 判定

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

1.5 安全試験

1.5.1 試験材料

1.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.5.1.2 試験動物

体重10～40kgの豚を用いる。

1.5.2 試験方法

試験動物2頭を試験群、1頭を対照群とする。試験群に注射材料の1頭分をそれぞれ筋肉内又は皮下に注射し、対照群とともに同居飼育し、14日間観察する。

1.5.3 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。

1.6 力価試験

1.6.1 試験材料

1.6.1.1 試験動物

1.5の試験に用いた動物を用いる。

1.6.1.2 中和試験用ウイルス

Vero細胞で増殖させたオーエスキー病ウイルスベゴニア株を用いる。

1.6.1.3 培養細胞

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

1.6.2 試験方法

1.5の試験終了後、14日目に得られた各個体の血清について中和試験を行う。被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液で10倍に希釈し、さらに2倍階段希釈する。各希釈血清0.5mLと0.2mL中約80PFUの中和試験用ウイルス液0.5mLを混合し、37℃で一夜処理する。この各混合液の0.2mLずつをそれぞれ4枚の培養細胞に接種し、37℃で60分間吸着させた後、混合液を除き、第1次重層寒天培地（付記5）を重層し、37℃5 vol%炭酸ガス下で2日間培養後、第2次重層寒天培地（付記6）を重層し、更に一夜培養後、ブラック数を測定する。

1.6.3 判定

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

付記1 抗オーエスキー病ウイルス血清

オーエスキー病ウイルスで免疫した鶏、兎又はモルモットの血清で、検体又は試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記2 ウイルス増殖用培養液

1,000mL中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス

2.95 g

L-グルタミン

0.3 g

牛血清

8～50 mL

イーグルMEM

残量

炭酸水素ナトリウムでpHを7.0～7.6に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記3 細胞増殖用培養液

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

1.4.2.1.3 培養液

HAT培地（付記4）及びウイルス増殖用培養液を用いる。

1.4.2.2 試験方法

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

HAT培地又はウイルス増殖用培養液の約5 mLをそれぞれの培養細胞に加え、37℃で3日間培養する。それぞれの培養細胞について、凍結融解を1回行った後、遠心上清のウイルス含有量を1.3を準用して測定する。

1.4.2.3 判定

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

1.5 安全試験

1.5.1 試験材料

1.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.5.1.2 試験動物

体重10～40kgの豚を用いる。

1.5.2 試験方法

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

1.5.3 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。

1.6 力価試験

1.6.1 試験材料

1.6.1.1 試験動物

1.5の試験に用いた動物を用いる。

1.6.1.2 中和試験用ウイルス

Vero細胞で増殖させたオーエスキー病ウイルスベゴニア株を用いる。

1.6.1.3 培養細胞

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

1.6.2 試験方法

1.5の試験終了後、14日目に得られた各個体の血清について中和試験を行う。被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液で10倍に希釈し、さらに2倍階段希釈する。各希釈血清0.5mLと0.2mL中約80PFUの中和試験用ウイルス液0.5mLを混合し、37℃で一夜処理する。この各混合液の0.2mLずつをそれぞれ4枚の培養細胞に接種し、37℃で60分間吸着させた後、混合液を除き、第1次重層寒天培地（付記5）を重層し、37℃5 vol%炭酸ガス下で2日間培養後、第2次重層寒天培地（付記6）を重層し、更に一夜培養後、ブラック数を測定する。

1.6.3 判定

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

付記1 抗オーエスキー病ウイルス血清

オーエスキー病ウイルスで免疫した鶏、兎又はモルモットの血清で、検体又は試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記2 ウイルス増殖用培養液

1,000mL中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス

2.95 g

L-グルタミン

0.3 g

牛血清

8～50 mL

イーグルMEM

残量

炭酸水素ナトリウムでpHを7.0～7.6に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記3 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 2.95 g
 L-グルタミン 0.3 g
 牛血清 30 ~ 100 mL
 イーグル MEM 残 量
 炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 7.6 に調整する。
 必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 4 HAT 培地
 1,000mL 中
 ヒポキサンチン 0.014 g
 アミノプテリン 0.00018g
 チミジン 0.0039 g
 トリプトース・ホスフェイト・プロス 2.95 g
 牛血清 0 ~ 100 mL
 イーグル MEM 残 量
 炭酸水素ナトリウムで pH を 7.2 ~ 7.6 に調整する。
 必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 5 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
 寒天 10.0 g
 牛血清 20 mL
 イーグル MEM 残 量
 炭酸水素ナトリウムで pH を 6.8 ~ 7.6 に調整する。
 必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 6 第 2 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
 寒天 10.0 g
 ニューラルレッド 0.05 g
 イーグル MEM 残 量
 炭酸水素ナトリウムで pH を 6.8 ~ 7.6 に調整する。
 必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

豚オーエスキー病 (g III-1, tk-1) 生ワクチン
 (以下略)

1,000mL 中
 トリプトース・ホスフェイト・プロス 2.95 g
 L-グルタミン 0.3 g
 牛血清 30 ~ 100 mL
 イーグル MEM 残 量
 炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 7.6 に調整する。
 必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 4 HAT 培地
 1,000mL 中
 ヒポキサンチン 0.014 g
 アミノプテリン 0.00018g
 チミジン 0.0039 g
 トリプトース・ホスフェイト・プロス 2.95 g
 牛血清 0 ~ 100 mL
 イーグル MEM 残 量
 炭酸水素ナトリウムで pH を 7.2 ~ 7.6 に調整する。
 必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 5 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
 寒天 10.0 g
 牛血清 20 mL
 イーグル MEM 残 量
 炭酸水素ナトリウムで pH を 6.8 ~ 7.6 に調整する。
 必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 6 第 2 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
 寒天 10.0 g
 ニューラルレッド 0.05 g
 イーグル MEM 残 量
 炭酸水素ナトリウムで pH を 6.8 ~ 7.6 に調整する。
 必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

豚オーエスキー病 (g III-1, tk-1) 生ワクチン
 (以下略)

新 旧 対 照 表

動物用生物学的製剤検定基準各条ワクチンの部：豚サーコウイルス（2型）感染症不活化ワクチン（油性アジュバント加懸濁液）

改 正 案	現 行
<p style="text-align: center;">豚サーコウイルス（2型・組換え型）感染症（カルボキシポリマーアジュバント加）不活化ワクチン</p> <p style="text-align: center;">（略）</p> <p style="text-align: center;">豚サーコウイルス（2型）感染症不活化ワクチン（油性アジュバント加懸濁液）</p> <p>豚サーコウイルス（2型）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で、使用時に油性アジュバントを含む懸濁液と混和して調製するワクチンである。</p> <p>1 小分製品の試験</p> <p>1.1 無菌試験 一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。</p> <p>1.2 不活化試験</p> <p>1.2.1 試験材料</p> <p>1.2.1.1 試料 試験品を試料とする。</p> <p>1.2.1.2 培養細胞 PPK-3F細胞を用いる。</p> <p>1.2.2 試験方法 細胞増殖用培養液（付記1）で適当な濃度に調整した培養細胞浮遊液 30mL に試料 1.5mL を接種し、37℃で1日培養後グルコサミン処理培地（付記2）を7～8mLを加え、37℃で15分間静置した後、上清を除去し、ウイルス増殖用培養液（付記3）を加えて処理し、3日間培養する。培養細胞を2～3回凍結融解し、遠心して得た上清 15mL を細胞浮遊液と同様に接種、培養、処理した後、ろ過した液を新たな細胞浮遊液に等量加え、37℃で4日間培養した細胞について豚サーコウイルス（2型）（以下「PCV2」という。）モノクローナル抗体（付記4）による蛍光抗体法を行う。</p> <p>1.2.3 判定 培養細胞に特異蛍光抗原を認めてはならない。</p> <p>1.3 異常毒性否定試験 動生剤基準の一般試験法の異常毒性否定試験を準用して試験するとき、適合しなければならない。</p> <p>1.4 力価試験</p> <p>1.4.1 試験材料</p> <p>1.4.1.1 注射材料 試験品を注射材料とする。</p> <p>1.4.1.2 試験動物 6～7週齢のマウスを用いる。</p> <p>1.4.2 試験方法 試験動物 10 匹のそれぞれの頸部皮下に注射材料を 0.2 mL ずつ注射し、注射 21 日後に得られた各個体の血清について ELISA により抗体価を測定する。 希釈用 96 穴プレートに DLE/SD 緩衝液（付記 5）を各穴に 80 μL ずつ分注し、DLE/SD 緩衝液で 5 倍に希釈した各被検血清、参照陽性血清（付記 6）及び参照陰性血清（付記 7）をそれぞれ 80 μL 加え、2 倍階段希釈する。抗原液（付記 8）を各穴に等量加え、4℃で一夜静置して処理する。この抗原・抗体反応液を 100 μL ずつ固相化プレート（付記 9）の各穴に加え、37℃で 3 時間感作し、洗浄液（付記 10）300 μL で洗浄後、抗体価測定 ELISA 用標識抗体（付記 11）を各穴に 100 μL ずつ加え、37℃で 60 分間反応させる。洗浄液 300 μL で 3 回洗浄し、各穴に基質液（付記 12）を 100 μL ずつ加え、遮光して 20℃で 30 分間反応させる。0.5mol/L 硫酸</p>	<p style="text-align: center;">豚サーコウイルス（2型・組換え型）感染症（カルボキシポリマーアジュバント加）不活化ワクチン</p> <p style="text-align: center;">（略）</p>

液を各穴に 50 μ L ずつ加え、反応を停止させる。主波長 450nm、副波長 630nm の 2 波長で吸光度 (OD) を測定し、以下の計算式により OD₅₀ を示した血清の希釈倍率を抗体価とする。

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

OD_{min}: 参照陽性血清の最低希釈倍数における OD の平均

OD_{max}: 320 倍から 2,560 倍まで希釈した参照陰性血清の OD の平均

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

定数及び傾き: OD と血清希釈倍数の対数について OD₅₀ を挟む 2 点の回帰直線における定数及び傾き

1.4.3 判定

試験動物の抗体価の実数は幾何平均で 72 倍以上でなければならない。この際、参照陽性血清の抗体価は所定の値を示し、参照陰性血清のそれは 20 倍以下でなければならない

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

2.95 g

牛胎子血清

100 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 グルコサミン処理培地

1,000mL 中

d-グルコサミン

65 g

ハンクス 199 培地

残量

付記 3 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 7.4 ~ 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 4 PCV2 モノクローナル抗体

PCV2 オープンリーディングフレーム 2 (以下「PCV2 ORF2」という。) を認識するモノクローナル抗体

付記 5 DLE/SD 緩衝液

1,000mL 中

トリス

1.21 g

塩化ナトリウム

8.77 g

EDTA

3.72 g

ポリソルベート 20

1 mL

水

残量

pH を 7.0 に調整する。

付記 6 参照陽性血清

標準陽性血清 (付記 13) と同様の方法で作成した血清で、標準血清を用いて 1.4.2 を準用した ELISA (以下「力価試験の ELISA」という。) で測定したとき、2 倍階段希釈の 3 段階目から 5 段階目に OD₅₀ を示すように DLE/SD 緩衝液で希釈して用いる。

付記 7 参照陰性血清

SPF マウスから得られた血清で、力価試験の ELISA で測定したとき抗体価が 20 (1.30 log₁₀) 倍以下のもの

付記 8 抗原液

PK15 細胞で培養した PCV2 1010-25 株を超音波処理し、遠心した後、 β -プロピオラクトンで不活化したもので、標準陽性血清を用いて力価試験の ELISA で測定したとき、標準血

清が所定の抗体価を示すように DLE/SD 緩衝液で希釈して用いる。

付記 9 固相化プレート

抗体価測定 ELISA 用捕捉抗体 (付記 14) を 120 μ L ずつ 96 穴 ELISA プレートに分注し、4 $^{\circ}$ C で一夜静置する。洗浄液で 3 回洗浄し、ブロッキング液 (付記 15) を 200 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させ、洗浄液で 3 回洗浄したもの

付記 10 洗浄液

1,000mL 中	
トリス	1.21 g
塩化ナトリウム	8.77 g
ポリソルベート 20	1 mL
水	残量

pH を 7.3 ~ 7.7 に調整する。

付記 11 抗体価測定 ELISA 用標識抗体

PCV2ORF2 に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ PCV2 1902B1BC を接種したヌードマウスの腹水を精製し、ホースラディッシュペルオキシダーゼで標識した後、15 w/v % サッカリン加リン酸緩衝食塩液で調整したもので、標準陽性血清を用いて力価試験の ELISA で測定したとき、標準陽性血清が所定の抗体価を示すように DLE/SD 緩衝液で希釈して用いる。

付記 12 基質液

適当な規格のテトラメチルベンチジン溶液

付記 13 標準陽性血清

マウスを PCV2 感染症不活化ワクチン (油性アジュバント加懸濁用液) で 2 回免疫後 35 日に得られたプール血清で、力価試験の ELISA で測定したとき、抗体価 4,000 ~ 10,000 倍を示すもの

付記 14 抗体価測定 ELISA 用捕捉抗体

PCV2ORF2 に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ PCV2 1903A8BC を接種したヌードマウスの腹水を精製し、15w/v % サッカリン加リン酸緩衝食塩液で調整したもので、標準陽性血清を用いて力価試験の ELISA で測定したとき、標準陽性血清が所定の抗体価を示すように炭酸ナトリウム緩衝液 (付記 16) で希釈して用いる。

付記 15 ブロッキング液

リン酸緩衝食塩液に植物性ポリペプトンを 1 w/v % 加えたもの

付記 16 炭酸ナトリウム緩衝液

1,000mL 中	
塩化ナトリウム	1.59 g
炭酸水素ナトリウム	2.93 g
アジ化ナトリウム	0.2 g
水	残量

pH を 9.6 に調整する。

豚伝染性胃腸炎生ワクチン (子豚用)

豚伝染性胃腸炎生ワクチン (子豚用)

新 旧 対 照 表

動物用生物学的製剤検定基準各条診断液の部：ヨ－ネ病診断用抗原固相化酵素抗体反応キット（予備的検出用）

改 正 案	現 行
<p>ヨ－ネ病診断用抗原固相化酵素抗体反応キット（不活化マイコバクテリウム・フレイ菌体吸収剤） (略)</p> <p>ヨ－ネ病診断用抗原固相化酵素抗体反応キット（予備的検出用）</p> <p>マイコバクテリウム・アビウムの菌体から抽出した抗原をプレートに固相化し、加熱処理マイコバクテリウム・フレイの菌体から抽出した抗原を吸収剤として処理した血清について、酵素抗体法により特異抗体を予備的に検出するためのキットである。</p> <p>1 小分製品の試験</p> <p>1.1 吸光度試験</p> <p>1.1.1 試験材料 試験品を用いる。</p> <p>1.1.2 試験方法 指示陽性血清及び指示陰性血清を、試料希釈吸収液でそれぞれ 20 倍に希釈し、$21 \pm 5^\circ\text{C}$で 15 分間吸収させる。吸収した各血清を抗原固相化マイクロプレートの各 4 ウェルに $100 \mu\text{L}$ ずつ分注し、$21 \pm 5^\circ\text{C}$で 45 分間反応させる。プレートを洗浄液（付記 1）で 3 回洗浄後、標識抗体希釈液で 100 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗体液を各ウェルに $100 \mu\text{L}$ ずつ加え、$21 \pm 5^\circ\text{C}$で 30 分間反応させる。プレートを洗浄液で 3 回洗浄後、発色液を各ウェルに $100 \mu\text{L}$ ずつ加え、遮光して $21 \pm 5^\circ\text{C}$で 10 分間反応させた後、反応停止液を各ウェルに $100 \mu\text{L}$ ずつ加え、450nmで吸光度値を測定する。</p> <p>1.1.3 判定 指示陽性血清の平均吸光度値は 0.7 ～ 2.0 であり、指示陽性血清の平均吸光度値と指示陰性血清の平均吸光度値の比は 7.0 以上でなければならない。</p> <p>1.2 特異性試験</p> <p>1.2.1 特異性試験 1</p> <p>1.2.1.1 試験材料 試験品（指示陽性血清及び指示陰性血清を除く。）、参照陽性血清（付記 2）、参照陰性血清（付記 3）及び特異性検定用血清（付記 4）を試験材料とする。</p>	<p>ヨ－ネ病診断用抗原固相化酵素抗体反応キット（不活化マイコバクテリウム・フレイ菌体吸収剤） (略)</p>

1.2.1.2 試験方法

1.1.2 に準じて参照陽性血清、参照陰性血清及び特異性検定用血清の吸光度を測定する。

1.2.1.3 判定

特異性検定用血清の平均吸光度値をT、参照陽性血清の平均吸光度値をP、及び参照陰性血清の平均吸光度値をNとし、 $100 \times (T - N) / (P - N)$ により特異性検定用血清のS/P値を求める。

このとき、特異性検定用血清のS/P値は、50未満でなければならない。

1.2.2 特異性試験 2

1.2.2.1 試験材料

試験品及び特異性検定用血清を試験材料とする。

1.2.2.2 試験方法

1.1.2 に準じて指示陽性血清、指示陰性血清及び特異性検定用血清の吸光度を測定する。

1.2.2.3 判定

1.2.1.3 に準じてS/P値を求める。ただし、Pは指示陽性血清の平均吸光度、及びNは指示陰性血清の平均吸光度とする。

特異性検定用血清のS/P値は、50未満でなければならない。

1.3 力価試験

1.3.1 試験材料

試験品（指示陽性血清及び指示陰性血清を除く。）、参照陽性血清、参照陰性血清及び力価検定用血清（付記5）を用いる。

1.3.2 試験方法

1.1.2 に準じて参照陽性血清、参照陰性血清及び力価検定用血清の吸光度値を測定する。ただし、力価検定用血清はリン酸緩衝食塩液で10倍から2倍階段希釈したものをを用いる。

1.3.3 判定

1.2.1.3 に準じて力価検定用血清のS/P値を算出する。ただし、Tは力価検定用血清の各段階の希釈液の平均吸光度値とする。

S/P値が70以上を示す力価検定用血清の最高希釈倍数を力価とするとき、力価は400又は800倍でなければならない。

付記1 洗浄液

濃縮洗浄液を水で20倍に希釈したもの

付記2 参照陽性血清

菌分離検査によってヨーネ病陽性と診断された牛由来で、ヨーネ病補体結合反応で抗体価が40～80倍を示す血清で、酵素抗体法において0.7～2.0の吸光度値を示すように参照陰性血清で調整し、-80℃で凍結保存したもの

付記3 参照陰性血清

健康な牛の血清で、酵素抗体法において0.1未満の吸光度値であることを確認し、 -80°C で凍結保存したもの

付記4 特異性検定用血清

マイコバクテリウム・フレイ 5865-KB 株の培養菌を不活化後、水酸化アルミニウムゲルアジュバントを混合して健康な牛に注射し、4週間後に採血した血清で、酵素抗体法において50未満のS/P値を示すように調整し、 -80°C で凍結保存したもの

付記5 力価検定用血清

ヨ一ネ病補体結合反応で抗体価が40～80倍を示す血清で、酵素抗体法において800倍希釈時のS/P値が55～95となるように参照陰性血清で調整し、 -80°C で凍結保存したもの

ヨ一ネ病診断用酵素抗体反応キット
(以下略)

ヨ一ネ病診断用酵素抗体反応キット
(以下略)

新 旧 対 照 表

動物用生物学的製剤検定基準各条診断液の部：A型インフルエンザ診断用ラテックス標識抗体反応キット

改 正 案	現 行
<p>トキソプラズマ病診断用蛍光抗体</p> <p>(略)</p> <p><u>A型インフルエンザ診断用ラテックス標識抗体反応キット</u></p> <p>ラテックスで標識したA型インフルエンザウイルスに対するモノクローナル抗体と結合した抗原の複合体を、認識部位の異なる補足用モノクローナル抗体を用いて検出するためのキットである。</p> <p><u>1 小分製品の試験</u></p> <p><u>1.1 特異性試験</u></p> <p><u>1.1.1 試験材料</u></p> <p><u>1.1.1.1 被検材料</u></p> <p>アッセイストリップ及び検体抽出用試薬を用いる。</p> <p><u>1.1.1.2 反応用抗原</u></p> <p>B型インフルエンザウイルス抗原（付記1）、ニューカッスル病ウイルス抗原（付記2）、鶏伝染性気管支炎ウイルス抗原（付記3）、希釈液（付記4）及び参照陽性抗原（付記5）を希釈液で8倍希釈したものをを用いる。</p> <p><u>1.1.2 試験方法</u></p> <p>反応用抗原 150 μ L と検体抽出用試薬 800 μ L をそれぞれ混合したものを 200 μ L ずつアッセイストリップに添加し、15 分間静置して発色を観察する。</p> <p><u>1.1.3 判定</u></p> <p>B型インフルエンザウイルス抗原、ニューカッスル病ウイルス抗原、鶏伝染性気管支炎ウイルス抗原及び希釈液を添加したアッセイストリップでは、コントロール位置に赤色のラインのみが認められ、判定位置に青色のラインが認められてはならない。希釈した参照陽性抗原を添加したアッセイストリップでは、コントロール位置に赤色のライン、判定位置に青色のラインがそれぞれ認められなければならない。</p> <p><u>1.2 力価試験</u></p> <p><u>1.2.1 試験材料</u></p> <p><u>1.2.1.1 被検材料</u></p> <p>アッセイストリップ及び検体抽出用試薬を用いる。</p> <p><u>1.2.1.2 反応用抗原</u></p> <p>参照陽性抗原を希釈液で2倍階段希釈した各希釈抗原液を反応用抗原とする。</p> <p><u>1.2.2 試験方法</u></p> <p>反応用抗原 150 μ L と検体抽出用試薬 800 μ L をそれぞれ混合したものを 200 μ L ずつアッセイストリップに添加し、15 分間静置して発色を観察する。</p> <p><u>1.2.3 判定</u></p> <p>判定位置に青色のラインが認められる参照陽性抗原の最高希釈倍数は 32 ～ 128 倍でなければならない。いずれの反応用抗原でもコントロール位置に赤色のラインが認められなければならない。</p> <p>付記1 B型インフルエンザウイルス抗原 発育鶏卵でB型インフルエンザウイルス B/Shanghai/361/02 株を増殖させ、ウイルス液を不活化し、不活化前のウイルス含有量を 10^{6.5} FFU / mL に調整したもの</p> <p>付記2 ニューカッスル病ウイルス抗原 発育鶏卵でニューカッスル病ウイルス B1 株を増殖させ、ウイルス液を不活化し、不活化前</p>	<p>トキソプラズマ病診断用蛍光抗体</p> <p>(略)</p>

のウイルス含有量を $10^{7.0}$ EID₅₀ / mL に調整したもの

付記3 鶏伝染性気管支炎ウイルス抗原
発育鶏卵で鶏伝染性気管支炎ウイルス KU 株を増殖させ、ウイルス液を不活化し、不活化前
のウイルス含有量を $10^{7.0}$ EID₅₀ / mL に調整したもの

付記4 希釈液

1,000mL 中

リン酸ナトリウム

15.6 g

ウシアルブミン

10.0 g

塩化ナトリウム

9.0 g

水

残量

水酸化ナトリウム溶液で pH を 7.0 に調整する。

アジ化ナトリウムを 0.1v/v % となるように加え、200nm のフィルターでろ過する。

付記5 参照陽性抗原

発育鶏卵で A 型インフルエンザウイルス A/Kitakyusyu/153/93 株を増殖させ、ウイルス液を
不活化し、不活化前のウイルス含有量を $10^{7.0}$ TCID₅₀ / mL に調整したもの

鳥インフルエンザウイルス A 型遺伝子検出用酵素抗体反応キット

(以下略)

鳥インフルエンザウイルス A 型遺伝子検出用酵素抗体反応キ
ット

(以下略)