馬鼻肺炎生ワクチン（シード）

令和２年12月11日（告示第2406号）新規追加

1 定義

シードロット規格に適合した糖たん白gE遺伝子を欠損した弱毒馬ヘルペスウイルス１型を同規格に適合した培養細胞で増殖させて得たウイルス液を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

馬ヘルペスウイルス１型ΔgE-NIBS株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

子馬に接種しても、呼吸器症状等の臨床異常は認められない。また接種部位からウイルスが分離されることがあるが、同居馬への感染はない。

馬皮膚由来細胞、馬腎由来細胞、牛腎由来細胞及び兎腎由来細胞でCPEを伴って増殖する。

2.1.3 マスターシードウイルス

2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、EFD-C_1細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は５代以内でなければならない。

2.1.4 ワーキングシードウイルス

2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、EFD-C_1細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

2.1.5 プロダクションシードウイルス

2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、EFD-C_1細胞で増殖する。

プロダクションシードウイルスは、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

プロダクションシードウイルスについて、保存する場合は3.1.3の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 培養細胞

EFD-C_1細胞を用いる。

2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.3 マスターセルシード

2.2.3.1 作製、保存及びプロダクションセルシードまでの最高継代数

マスターセルシードは、2.2.2の培養液で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターセルシードは、特定の製造番号又は製造記号を付して、凍結して－70℃以下で保存する。

マスターセルシードについて3.2.1の試験を行う。

マスターセルシードは、ワクチンの製造又は試験以外の目的で継代しない。マスターセルシードからプロダクションセルシードまでの最高継代数は、20代以内でなければならない。

2.2.4 ワーキングセルシード

2.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.2の培養液で増殖及び継代する。

ワーキングセルシードは、凍結して－70℃以下で保存する。

ワーキングセルシードについて、3.2.2の試験を行う。

2.2.5 プロダクションセルシード

2.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.2の培養液で増殖させる。

プロダクションセルシードは保存する場合は、3.2.3の試験を行う。

2.3 原液

2.3.1 プロダクションセルシードの培養

１回に処理し、培養した細胞を個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。

2.3.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.1の培養細胞で培養し、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、遠心上清又はこれを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

原液を混合し、適当と認められた安定剤を加えて最終バルクとする。

2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、凍結乾燥し、小分製品とする。

小分製品について、3.4の試験を行う。

3 試験法

3.1 製造用株の試験

3.1.1 マスターシードウイルスの試験

3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.3 マイコプラズマ否定試験

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

3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験法

3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、2.1及び2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験

3.1.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験

馬伝染性貧血ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1及び3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

牛ウイルス性下痢ウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、3.2.5及び3.2.9を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.5 対象動物を用いた免疫原性試験

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

3.1.1.6 対象動物を用いた安全性確認試験

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

3.1.1.7 病原性復帰確認試験

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

3.1.1.8 組換え遺伝子等安定性確認試験

一般試験法の組換え遺伝子等安定性確認試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

3.1.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

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

3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

3.1.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

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

3.2 株化細胞の試験

3.2.1 マスターセルシードの試験

3.2.1.1 培養性状試験

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

3.2.1.2 起源動物種同定試験

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

3.2.1.3 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.4 マイコプラズマ否定試験

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

3.2.1.5 外来性ウイルス否定試験法

3.2.1.5.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2、2.1及び2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.5.2 特定ウイルス否定試験

3.2.1.5.2.1 特定ウイルス否定一般試験

馬伝染性貧血ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2及び3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.5.2.2 個別ウイルス否定試験

牛ウイルス性下痢ウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2、3.2.5及び3.2.9を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.6 核学的（染色体）性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.6を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.7 腫瘍形成性／腫瘍原性試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.7を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.2 ワーキングセルシードの試験

3.2.2.1 培養性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.2.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.2.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.2.3 マイコプラズマ否定試験

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

3.2.3 プロダクションセルシードの試験

3.2.3.1 培養性状試験

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

3.2.3.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.3.3 マイコプラズマ否定試験

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

3.3 原液の試験

3.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.2 ウイルス含有量試験

3.3.2.1 試験材料

3.3.2.1.1 試料

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

3.3.2.1.2 培養細胞

BEK-1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。

3.3.2.2 試験方法

試料25μLずつを、それぞれ４穴の培養細胞に接種し、37℃で静置吸着した後、ウイルス増殖用培養液を75μLずつ加え、37℃で５～７日間培養し、観察する。

3.3.2.3 判定

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

検体のウイルス含有量は、１mL中$10^{5.1}TCID_{50}$以上でなければならない。

3.4 小分製品の試験

3.4.1 特性試験

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

3.4.2 真空度試験

一般試験法の真空度試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.3 含湿度試験

一般試験法の含湿度試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.4 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.5 マイコプラズマ否定試験

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

3.4.6 ウイルス含有量試験

3.3.2を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、１頭分当たり１mL中$10^{4.5}TCID_{50}$以上でなければならない。

3.4.7 力価試験

3.4.7.1 試験材料

3.4.7.1.1 注射材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で５倍及び25倍に希釈したものを注射材料とする。

3.4.7.1.2 試験動物

約６週齢のハムスターを用いる。

3.4.7.1.3 攻撃ウイルス

ハムスターに馴化させた攻撃用馬鼻肺炎ウイルスKyD株（付記２）を用いる。

3.4.7.2 試験方法

試験動物12匹を試験群、４匹を対照群とする。注射材料１mLずつをそれぞれ４匹の試験群の腹腔内に注射する。注射後21日目に、攻撃ウイルス１mLずつを試験群及び対照群の腹腔内に注射し、７日間観察する。

3.4.7.3 判定

試験群の生残動物数から試験品のED_{50}を算出する。

試験品のED_{50}は、$16ED_{50}$/mL以上でなければならない。この場合、対照群は全て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、製造後２年３か月間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その期

間とする。

付記１　ウイルス増殖用培養液

1,000mL中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
牛胎子血清又はやぎ血清	５～10 mL
イーグルMEM	残　量

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２　攻撃用馬鼻肺炎ウイルスKyD株

馬鼻肺炎ウイルスKyD株をハムスターの腹腔内に注射し、感染極期に肝臓を採取し、リン酸緩衝食塩液で10w/v%乳剤に調整する。攻撃には、$10^{4.0}LD_{50}$を用いる。

動物用生物学的製剤基準の一部を改正する件　新旧対照表

○動物用生物学的製剤基準（平成14年10月３日農林水産省告示第1567号）（抄）

次の表により、改正前欄に掲げる規定の傍線を付した部分（以下「傍線部分」という。）でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分があるものは、これを当該傍線部分のように改め、改正後欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正前欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを加え、改正前欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを削る。

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤）の部 **日本脳炎生ワクチン（シード）**	ワクチン（シードロット製剤）の部 **日本脳炎生ワクチン（シード）**
1・2 （略） 3 試験法 3.1 製造用株の試験 3.1.1 マスターシードウイルスの試験 3.1.1.1～3.1.1.7 （略） 3.1.1.8 マーカー試験 原液において、マーカー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。 3.1.1.8.1 試験材料 3.1.1.8.1.1 注射材料 検体及び対照として中山株薬検系を用い、ウイルス含有量を１mL中に$10^{7.0}$ $TCID_{50}$又は$10^{7.0}LD_{50}$以上含まれるように適当と認められた希釈液で調整したものを注射材料とする。 3.1.1.8.1.2 試験動物 ３週齢のマウスを用いる。 3.1.1.8.2 試験方法 注射材料0.3mLずつを10匹以上の試験動物の腹腔内に注射し、14日間観察する。 3.1.1.8.3 判定 検体を注射したマウスの死亡率は、20%以下でなければならない。この場合、対照を注射したマウスの死亡率は、80%以上でなければならない。 3.1.2・3.1.3 （略） 3.2～3.4 （略） 3.5 原液の試験 3.5.1・3.5.2 （略） 3.5.3 マーカー試験 3.1.1.8を準用して試験するとき、適合しなければならない。マスターシードウイルスにおいて、マーカー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。	1・2 （略） 3 試験法 3.1 製造用株の試験 3.1.1 マスターシードウイルスの試験 3.1.1.1～3.1.1.7 （略） （新設） 3.1.2・3.1.3 （略） 3.2～3.4 （略） 3.5 原液の試験 3.5.1・3.5.2 （略） 3.5.3 マーカー試験 （新設）

（削る）

3.6 （略）
4 （略）

付記１　ウイルス増殖用培養液
1,000mL中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95g
牛血清	20～50 mL
イーグルMEM	残　量

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　（略）

付記３　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	10.52 g
ホウ酸	3.09 g
水酸化ナトリウム	0.96 g
水	残　量

牛血清アルブミンを0.2w/v%となるように加えた後、pHを9.0に調整する。

付記４　（略）

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・ブロス	2.95g
牛血清	20～50 mL
寒天	10　g

3.5.3.1 試験材料
3.5.3.1.1 注射材料
検体及び対照として中山株薬検系を用い、それぞれのウイルスが１mL中に$10^{7.0}TCID_{50}$又は$10^{7.0}LD_{50}$以上含まれるように調整したものを、注射材料とする。
3.5.3.1.2 試験動物
３週齢のマウスを用いる。
3.5.3.2 試験方法
注射材料0.3mLずつを10匹以上の試験動物の腹腔内に注射し、14日間観察する。
3.5.3.3 判定
検体を注射したマウスの死亡率は、20%以下でなければならない。この場合、対照を注射したマウスの死亡率は、80%以上でなければならない。
3.6 （略）
4 （略）

付記１　ウイルス増殖用培養液
1,000mL中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
牛血清	20～50　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　（略）

付記３　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	10.52 g
ホウ酸	3.09 g
水酸化ナトリウム	0.96 g
水	残　量

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

付記４　（略）

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・ブロス	2.95 g
牛血清	20～50　mL
寒天	10　g

	イーグルMEM　残　量 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	第２次重層寒天培地 1,000mL 中 トリプトース・ホスフェイト・ブロス　2.95g ニュートラルレッド　0.5 g 寒天　10　g イーグルMEM　残　量 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。

	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	第２次重層寒天培地 1,000mL中 トリプトース・ホスフェイト・ブロス　2.95g ニュートラルレッド　0.5 g 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。

日本脳炎生ワクチン（シード）

平成23年10月４日（告示第1911号）新規追加
平成25年１月22日（告示第 257号）一部改正
令和２年２月５日（告示第 231号）一部改正
令和２年12月11日（告示第2406号）一部改正

1 定義

シードロット規格に適合した弱毒日本脳炎ウイルスを同規格に適合した培養細胞で増殖させて得たウイルス液を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

弱毒日本脳炎ウイルスat株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

１か月齢の豚に接種してもウイルス血症が出現しない。妊娠１か月前後の豚に接種しても胎子に感染しない。コガタアカイエカに対する感染率が著しく低下している。乳のみマウスの脳内又は豚腎若しくは豚精巣初代細胞で増殖する。

2.1.3 マスターシードウイルス

2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、SPF動物規格の2.14に適合したハムスター腎初代培養細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、５代以内でなければならない。

2.1.4ワーキングシードウイルス

2.1.4.1増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、SPF動物規格の2.14に適合したハムスター腎初代培養細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2に試験を行う。

2.1.5プロダクションシードウイルス

2.1.5.1増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、SPF動物規格の2.14に適合したハムスター腎初代培養細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖させる。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 初代細胞を用いる場合

2.2.1.1 初代細胞

SPF動物規格の2.14に適合したハムスター腎初代細胞又は製造に適当と認められた初代細胞を用いる。

2.2.1.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.1.3マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）

2.2.1.3.1増殖、継代及び保存

マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）は、2.2.1.2の培養液で増殖し、継代及び保存しない。

マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）について、3.2.1の試験を行う。

2.2.2.1 株化細胞

HmLu-1細胞又は製造に適当と認められた株化細胞を用いる。

2.2.2 株化細胞を用いる場合

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。

2.2.2.3 マスターセルシード

2.2.2.3.1 作製、保存及びプロダクションセルシードまでの最高継代数

マスターセルシードは、2.2.2.2の培養液で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターセルシードは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－70℃以下で保存する。

マスターセルシードについて、3.3.1の試験を行う。

マスターセルシードは、ワクチンの製造又は試験以外の目的で継代しない。マスターセルシードからプロダクションセルシードまでの最高継代数は、20代以内でなければならない。

2.2.2.4 ワーキングセルシード

2.2.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.2.2の培養液で増殖及び継代する。

ワーキングセルシードは、凍結して－70℃以下で保存する。

ワーキングセルシードについて、3.3.2の試験を行う。

2.2.2.5 プロダクションセルシード

2.2.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.2.2の培養液で増殖する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して－70℃以下で保存する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、3.3.3の試験を行う。

2.3 原液

2.3.1 培養細胞の培養

2.3.1.1　マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）を用いる場合

１回に処理し、培養した細胞を個体別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の個体別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、3.4の試験を行う。

2.3.1.2 プロダクションセルシードを用いる場合

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

2.3.2 ウイルスの培養

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

原液について、3.5の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液に適当と認められた希釈液及び安定剤を加えて混合し、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、凍結乾燥し、小分製品とする。

小分製品について、3.6の試験を行う。

3 試験法

3.1 製造用株の試験

3.1.1 マスターシードウイルスの試験

3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.1.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.3 マイコプラズマ否定試験

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

3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、2.1及び2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験

3.1.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス及びリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1及び3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

豚熱ウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス、ロタウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、3.2.3、3.2.4、3.2.5、3.2.7及び3.2.9を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.5 対象動物を用いた免疫原性試験

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

3.1.1.6 対象動物を用いた安全性確認試験

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

3.1.1.7 病原性復帰確認試験

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

3.1.1.8 マーカー試験

原液において、マーカー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。

3.1.1.8.1 試験材料

3.1.1.8.1.1 注射材料

検体及び対照として中山株薬検系を用い、ウイルス含量を１mL中に$10^{7.0}TCID_{50}$又は$10^{7.0}LD_{50}$以上含まれるように適当と認められた希釈液で調整したものを注射材料とする。

3.1.1.8.1.2 試験動物

３週齢のマウスを用いる。

3.1.1.8.2 試験方法

注射材料0.3mLずつを10匹以上の試験動物の腹腔内に注射し、14日間観察する。

3.1.1.8.3 判定

検体を注射したマウスの死亡率は、20％以下でなければならない。この場合、対照を注射したマウスの死亡率は、80％以上でなければならない。

3.1.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

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

3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

3.1.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

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

3.2 初代細胞の試験

3.2.1 マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）の試験

3.2.1.1 培養性状試験

シードロット規格の2.2.4.2.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.3 マイコプラズマ否定試験

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

3.3 株化細胞の試験

3.3.1 マスターセルシードの試験

3.3.1.1 培養性状試験

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

3.3.1.2 起源動物種同定試験

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

3.3.1.3 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.1.4 マイコプラズマ否定試験

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

3.3.1.5 外来性ウイルス否定試験

3.3.1.5.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2、2.1及び2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.1.5.2 特定ウイルス否定試験

3.3.1.5.2.1 特定ウイルス否定一般試験

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス及びリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2及び3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.1.5.2.2 個別ウイルス否定試験

豚熱ウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス、ロタウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2、3.2.3、3.2.4、3.2.5、3.2.7及び3.2.9を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.1.6 核学的（染色体）性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.6を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.1.7 腫瘍形成性／腫瘍原性試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.7を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.2 ワーキングセルシードの試験

3.3.2.1 培養性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.2.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.2.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.2.3 マイコプラズマ否定試験

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

3.3.3 プロダクションセルシードの試験

3.3.3.1 培養性状試験

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

3.3.3.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.3.3 マイコプラズマ否定試験

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

3.4 個体別培養細胞の試験

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。

3.4.1 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日間培養し、観察するとき、CPEを認めてはならない。

3.4.2 赤血球吸着試験

3.3.1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回洗浄した後、３群に分け、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分間静置した後、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。

3.4.3 封入体染色試験

3.4.1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。

3.4.4 迷入ウイルス否定試験

3.4.1の試験最終日に採取した培養液を試料として、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法2.3.1、2.3.2及び2.4.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.5 原液の試験

3.5.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.5.2 ウイルス含有量試験

マウス接種試験又は培養細胞接種試験により行う。

3.5.2.1 マウス接種試験

3.5.2.1.1 試験材料

3.5.2.1.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釈液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.5.2.1.1.2 試験動物

２日齢以内の乳のみマウスを用いる。

3.5.2.1.2 試験方法

試料0.02mL ずつを４匹以上の試験動物の脳内に注射し、14日間観察する。

3.5.2.1.3 判定

脳炎症状を示して死亡したマウスを感染とみなし、LD_{50}を算出する。

検体のウイルス含有量は、１mL中$10^{7.0}LD_{50}$以上でなければならない。

3.5.2.2 培養細胞接種試験

3.5.2.2.1 試験材料

3.5.2.2.1.1 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。

3.5.2.2.1.2 培養細胞

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

3.5.2.2.2 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７日間培養し、観察する。

3.5.2.2.3 判定

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

検体のウイルス含有量は、１mL中$10^{7.0}TCID_{50}$以上でなければならない。

3.5.3 マーカー試験

3.1.1.8を準用して試験するとき、適合しなければならない。マスターシードウイルスにおいて、マーカー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。

3.6 小分製品の試験

3.6.1 特性試験

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

3.6.2 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。

3.6.3 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。

3.6.4 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。

3.6.5 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。

3.6.6 ウイルス含有量試験

3.5.2を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり$10^{5.0}LD_{50}$又は$10^{5.0}TCID_{50}$以上でなければならない。

3.6.7 安全試験

3.6.7.1 試験材料

3.6.7.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.6.7.1.2 試験動物

約1か月齢の豚を用いる。

3.6.7.2 試験方法

試験動物3頭を試験群、1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注射し、対照群と共に3週間観察する。

3.6.7.3 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。

3.6.8 力価試験

赤血球凝集抑制反応又は中和試験により行う。

3.6.8.1 赤血球凝集抑制反応

3.6.8.1.1 試験材料

3.6.8.1.1.1 試験動物

3.6.7の試験に用いた動物を用いる。

3.6.8.1.1.2 赤血球凝集抗原

日本脳炎ウイルス中山株薬検系又は適当と認められた株を用いて調製した赤血球凝集抗原（付

記２）を用いる。

3.6.8.1.2 試験方法

3.6.7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。試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

被検血清を25w/v%カオリン液又はアセトンを加えて処理し、がちょう又は７日齢以内の鶏の赤血球で処理した後、非働化する。各処理血清を、牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液（付記３）又は適当と認められた希釈液で２倍階段希釈する。各希釈血清に８単位の赤血球凝集抗原を加えて４℃で一夜処理した後、VAD液（付記４）で調整した0.33vol%のがちょう又は７日齢以内の鶏の赤血球浮遊液を加え、37℃で60分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

3.6.8.1.3 判定

赤血球の凝集を抑制した血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。

試験群の赤血球凝集抑制抗体価は、20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。

3.6.8.2 中和試験

3.6.8.2.1 試験材料

3.6.8.2.1.1 試験動物

3.6.7の試験に用いた動物を用いる。

3.6.8.2.1.2 中和試験用ウイルス

日本脳炎ウイルス中山株薬検系、JaGAr-01株又は適当と認められた株を用いる。

3.6.8.2.1.3 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。

3.6.8.2.2 試験方法

3.6.7の試験最終日に試験群及び対照群から得た血清について、中和試験を行う。試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液で５倍に希釈し、更に２倍階段希釈する。各希釈血清と0.4mL中約200PFUの中和試験用ウイルス液とを等量混合し、37℃で90分間処理する。

この各混合液0.4mLずつをそれぞれ４枚の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、混合液を除き、第１次重層寒天培地（付記５）を加え、37℃で３日間培養する。その後、第２次重層寒天培地（付記６）を重層し、37℃で１日間培養し、プラック数を算出する。また、中和試験用ウイルス液0.4mLずつを培養細胞に接種し、同様に処理したもの（以下この項において「ウイルス対照」という。）について、プラック数を算出する。

3.6.8.2.3 判定

プラック数がウイルス対照の50%以下に減少した血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

試験群の中和抗体価は、20倍以上でなければならない。この場合、対照群では、10倍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には、その期間とする。

付記１　ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
牛血清	20～50 mL
イーグルMEM	残　量

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　赤血球凝集抗原

日本脳炎ウイルス中山株薬検系又は適当と認められた株を用いて調製した赤血球凝集抗原で、赤血球凝集価が64倍以上のもの。

付記３　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	10.52 g
ホウ酸	3.09 g
水酸化ナトリウム	0.96 g
水	残　量

牛血清アルブミンを0.2w/v%となるように加えた後、pHを9.0に調整する。

付記４　VAD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十二水和物	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・ブロス	2.95 g
牛血清	20～50　mL
寒天	10　g
イーグルMEM	残　量

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　第２次重層寒天培地

1,000mL中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
ニュートラルレッド	0.5　g

寒天	10　g
イーグルMEM	残　量

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。

動物用生物学的製剤基準の一部を改正する件　新旧対照表
○動物用生物学的製剤基準（平成14年10月３日農林水産省告示第1567号）（抄）
　次の表により、改正前欄に掲げる規定の傍線を付した部分（以下「傍線部分」という。）でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分があるものは、これを当該傍線部分のように改め、改正後欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正前欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを加え、改正前欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを削る。

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤）の部 **豚流行性下痢生ワクチン（シード）** 1・2　（略） 3 試験法 3.1 製造用株の試験 3.1.1 マスターシードウイルスの試験 3.1.1.1～3.1.1.7　（略） 3.1.1.8 マーカー試験 3.1.1.8.1 試験材料 3.1.1.8.1.1 試料 　検体を希釈液（付記１）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。 3.1.1.8.1.2 培養細胞 　Vero細胞又は適当と認められた培養細胞を培養し、単層となったものを用いる。 3.1.1.8.1.3 培養液 　ウイルス増殖用培養液（付記２）及び希釈液に結晶トリプシンを１mL中２μg加えたトリプシン添加培養液を用いる。 3.1.1.8.2 試験方法 　試料の0.1mLずつを、希釈液で２回洗浄したそれぞれ８本（穴）の培養細胞に接種し、２群に分ける。ウイルス増殖用培養液又はトリプシン添加培養液をそれぞれ１本（穴）当たり0.5mLずつ加え、37℃５vol%炭酸ガス下で７日間培養し、観察する。 3.1.1.8.3 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。 　ウイルス増殖用培養液で測定したウイルス含有量は、トリプシン添加培養液で測定したウイルス含有量と比べ100 倍以上高くなければならない。 3.1.2・3.1.3　（略） 3.2　（略） 3.3 原液の試験 3.3.1　（略） 3.3.2 ウイルス含有量試験	ワクチン（シードロット製剤）の部 **豚流行性下痢生ワクチン（シード）** 1・2　（略） 3 試験法 3.1 製造用株の試験 3.1.1 マスターシードウイルスの試験 3.1.1.1～3.1.1.7　（略） （新設） 3.1.2・3.1.3　（略） 3.2　（略） 3.3 原液の試験 3.3.1　（略） 3.3.2 ウイルス含有量試験

3.3.2.1 試験材料 3.3.2.1.1 試料 検体をウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。 3.3.2.1.2 （略） 3.3.2.2・3.3.2.3 （略） （削除）	3.3.2.1 試験材料 3.3.2.1.1 試料 検体をウイルス増殖用培養液（付記１）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。 3.3.2.1.2 （略） 3.3.2.2・3.3.2.3 （略） 3.3.3 マーカー試験 3.3.3.1 試験材料 3.3.3.1.1 試料 検体を希釈液（付記２）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。 3.3.3.1.2 培養細胞 Vero細胞又は適当と認められた培養細胞を培養し、単層となったものを用いる。 3.3.3.1.3 培養液 ウイルス増殖用培養液及び希釈液に結晶トリプシンを１mL中２μg加えたトリプシン添加培養液を用いる。 3.3.3.2 試験方法 試料の0.1mLずつを、希釈液で２回洗浄したそれぞれ８本（穴）の培養細胞に接種し、２群に分ける。ウイルス増殖用培養液又はトリプシン添加培養液をそれぞれ１本（穴）当たり0.5mLずつ加え、37℃５vol%炭酸ガス下で７日間培養し、観察する。 3.3.3.3 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。 ウイルス増殖用培養液で測定したウイルス含有量は、トリプシン添加培養液で測定したウイルス含有量と比べ100 倍以上高くなければならない。
3.4 （略） 4 （略）	3.4 （略） 4 （略）
（削る）	付記１　ウイルス増殖用培養液 1,000mL中 トリプトース・ホスフェイト・ブロス　2.95 g 牛又はやぎ血清　50 mL イーグルMEM　残 量 炭酸水素ナトリウム液でpHを7.2～7.6に調整する。 牛又はやぎ血清は、豚流行性下痢ウイルスに対する中和抗体陰性のものを用いる。 必要最少量の抗生物質を加えてもよい。
付記１　希釈液 1,000mL中	付記２　希釈液 1,000mL中

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 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。	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液で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 牛又はやぎ血清　50　mL イーグルMEM　残　量 pHを7.2～7.6に調整する。 牛又はやぎ血清は、豚流行性下痢ウイルスに対する中和抗体陰性のものを用いる。 必要最少量の抗生物質を加えてもよい。	（新設）
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・ブロス　2.95 g 牛又はやぎ血清　100～150　mL イーグルMEM　残　量 pHを7.2～7.4に調整する。 牛又はやぎ血清は、豚流行性下痢ウイルスに対する中和抗体陰性のものを用いる。 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・ブロス　2.95 g 牛又はやぎ血清　100～150　mL イーグルMEM　残　量 炭酸水素ナトリウム液でpHを7.2～7.4に調整する。 牛又はやぎ血清は、豚流行性下痢ウイルスに対する中和抗体陰性のものを用いる。 必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

豚流行性下痢生ワクチン（シード）

平成23年５月11日（告示第939号）新規追加
令和２年２月５日（告示第231号）一部改正
令和２年12月11日（告示第2406号）一部改正

1 定義

シードロット規格に適合した弱毒豚流行性下痢ウイルスを同規格に適合した株化細胞で増殖させて得たウイルス液を凍結乾燥したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

弱毒豚流行性下痢ウイルスP-5V 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

幼若豚にほとんど病原性を示さない。

Vero 細胞でトリプシンを添加することなくCPE を伴って増殖する。

トリプシンに感受性を示し、トリプシン非添加培養液で測定した時のウイルス含有量は、トリプシン添加培養液で測定した時より100倍以上高い。

2.1.3 マスターシードウイルス

2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、Vero細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチン製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、５代以内でなければならない。

2.1.4 ワーキングシードウイルス

2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、Vero細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

2.1.5 プロダクションシードウイルス

2.1.5.1 増殖、継代及び保存

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

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 培養細胞

Vero 細胞又は製造に適当と認められた株化細胞を用いる。

2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.3 マスターセルシード

2.2.3.1 作製、保存及びプロダクションセルシードまでの最高継代数

マスターセルシードは、2.2.2の培養液で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターセルシードは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－70℃以下で保存する。

マスターセルシードについて、3.2.1の試験を行う。

マスターセルシードは、ワクチンの製造又は試験以外の目的で継代しない。マスターセルシードからプロダクションセルシードまでの最高継代数は、20代以内でなければならない。

2.2.4 ワーキングセルシード

2.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.2の培養液で増殖及び継代する。

ワーキングセルシードは、凍結して－70℃以下で保存する。

ワーキングセルシードについて、3.2.2の試験を行う。

2.2.5 プロダクションセルシード

2.2.5.1 増殖、継代及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.2の培養液で増殖させる。

プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して－70℃以下で保存する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、3.2.3の試験を行う。

2.3 原液

2.3.1 プロダクションセルシードの培養

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

2.3.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.1の細胞で培養し、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その遠心上清を混合し、原液とする。

原液について、3.3の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液に、適当と認められた希釈液及び安定剤を加えて混合し、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、凍結乾燥し、小分製品とする。

小分製品について、3.4の試験を行う。

3 試験法

3.1 製造用株の試験

3.1.1 マスターシードウイルスの試験

3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.1.1.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.3 マイコプラズマ否定試験

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

3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、2.1及び2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験

3.1.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス及び内在性レトロウイルス（C、Dタイプ粒子）について、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1及び3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

豚熱ウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス、ロタウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、3.2.3、3.2.4、3.2.5、3.2.7及び3.2.9を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.5 対象動物を用いた免疫原性試験

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

3.1.1.6 対象動物を用いた安全性確認試験

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

3.1.1.7 病原性復帰確認試験

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

3.1.1.8 マーカー試験

3.1.1.8.1 試験材料

3.1.1.8.1.1 試料

検体を希釈液（付記１）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.1.1.8.1.2 培養細胞

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

3.1.1.8.1.3 培養液

ウイルス増殖用培養液（付記２）及び希釈液に結晶トリプシンを１mL中２μg加えたトリプシン添加培養液を用いる。

3.1.1.8.2 試験方法

試料の0.1mLずつを、希釈液で２回洗浄したそれぞれ８本（穴）の培養細胞に接種し、２群に分ける。ウイルス増殖用培養液又はトリプシン添加培養液をそれぞれ１本（穴）当たり0.5mLずつ加え、37℃５vol%炭酸ガス下で７日間培養し、観察する。

3.1.1.8.3 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。

ウイルス増殖用培養液で測定したウイルス含有量は、トリプシン添加培養液で測定したウイルス含有量と比べ100 倍以上高くなければならない。

3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

3.1.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

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

3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

3.1.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

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

3.2 株化細胞の試験

3.2.1 マスターセルシードの試験

3.2.1.1 培養性状試験

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

3.2.1.2 起源動物種同定試験

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

3.2.1.3 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.4 マイコプラズマ否定試験

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

3.2.1.5 外来性ウイルス否定試験

3.2.1.5.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2、2.1及び2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.5.2 特定ウイルス否定試験

3.2.1.5.2.1 特定ウイルス否定一般試験

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス及び内在性レトロウイルス（C、Dタイプ粒子）について、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2及び3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.5.2.2 個別ウイルス否定試験

豚熱ウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス、ロタウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2、3.2.3、3.2.4、3.2.5、3.2.7及び3.2.9を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.6 核学的（染色体）性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.6を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.7 腫瘍形成性／腫瘍原性試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.7を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.2 ワーキングセルシードの試験

3.2.2.1 培養性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.2.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.2.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.2.3 マイコプラズマ否定試験

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

3.2.3 プロダクションセルシードの試験

3.2.3.1 培養性状試験

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

3.2.3.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.3.3 マイコプラズマ否定試験

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

3.3 原液の試験

3.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.2 ウイルス含有量試験

3.3.2.1 試験材料

3.3.2.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.2.1.2 培養細胞

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

3.3.2.2 試験方法

試料0.1mL　ずつをそれぞれ４本（穴）以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液0.5mLを加え、37℃５vol％炭酸ガス下で７日間培養し、観察する。

3.3.2.3 判定

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

検体のウイルス含有量は、１mL中$10^{6.3}TCID_{50}$以上でなければならない。

3.4 小分製品の試験

3.4.1 特性試験

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

小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.4.2 真空度試験

一般試験法の真空度試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.3 含湿度試験

一般試験法の含湿度試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.4 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.5 マイコプラズマ否定試験

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

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

3.4.6 ウイルス含有量試験

3.3.2を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、１頭分当たり$10^{4.5}TCID_{50}$以上でなければならない。

3.4.7 安全試験

3.4.7.1 試験材料

3.4.7.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.7.1.2 試験動物

体重20～40kgの豚を用いる。

3.4.7.2 試験方法

試験動物４頭を試験群、１頭を対照群とする。注射材料10頭分及び１頭分をそれぞれ試験群の２頭ずつの筋肉内に注射し、対照群と共に同居飼育し、14日間観察する。

3.4.7.3 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。

3.4.8 力価試験

3.4.8.1 試験材料

3.4.8.1.1 試験動物

3.4.7の試験に用いた注射材料１頭分を注射した試験群及び対照群の動物を用いる。

3.4.8.1.2 中和試験用ウイルス

Vero細胞で増殖させた豚流行性下痢ウイルスP-5V株を用いる。

3.4.8.1.3 培養細胞

細胞増殖用培養液（付記３）で調整したVero細胞浮遊液を用いる。

3.4.8.2 試験方法

3.4.7の試験終了後７日目に、注射材料１頭分を注射した試験群に、更に１頭分を筋肉内に注射し、その７日目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。

被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液で２倍階段希釈する。各希釈血清0.5mLと0.1mL中約$200TCID_{50}$を含む中和試験用ウイルス液0.5mLとを混合し、37℃で90分間処理する。

この各混合液0.1mLずつをそれぞれ４本（穴）に接種し、Vero細胞浮遊液0.5mLずつを加え、37℃５vol%炭酸ガス下で７日間培養し、観察する。

3.4.8.3 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。

試験群の中和抗体価は、16倍以上でなければならない。この場合、対照群は２倍未満でなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後２年３か月間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その

期間とする。

付記１　希釈液

1,000mL中

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

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
牛又はやぎ血清	50 mL
イーグルMEM	残　量

pHを7.2～7.6に調整する。

牛又はやぎ血清は、豚流行性下痢ウイルスに対する中和抗体陰性のものを用いる。

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・ブロス	2.95 g
牛又はやぎ血清	100～150 mL
イーグルMEM	残　量

pH を7.2～7.4に調整する。

牛又はやぎ血清は、豚流行性下痢ウイルスに対する中和抗体陰性のものを用いる。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

動物用生物学的製剤基準の一部を改正する件　新旧対照表

○動物用生物学的製剤基準（平成14年10月３日農林水産省告示第1567号）（抄）

次の表により、改正前欄に掲げる規定の傍線を付した部分（以下「傍線部分」という。）でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分があるものは、これを当該傍線部分のように改め、改正後欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正前欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを加え、改正前欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを削る。

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤）の部 **豚伝染性胃腸炎・豚流行性下痢混合生ワクチン（シード）** 1 （略） 2 製法 2.1・2.2 （略） 2.3 原液 2.3.1 （略） 2.3.2 豚流行性下痢ウイルス原液 2.3.2.1 （略） 2.3.2.2 ウイルスの培養 　プロダクションシードウイルスを2.3.2.1の細胞で培養し、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原液とする。 　原液について、3.3.1及び3.3.2.2の試験を行う。 2.4・2.5 （略） 3 試験法 3.1 製造用株の試験 3.1.1 マスターシードウイルスの試験 3.1.1.1～3.1.1.7 （略） 3.1.1.8 マーカー試験 　豚流行性下痢ウイルスについて、製造用株にマーカーがある場合には、次のように試験する。 3.1.1.8.1 試験材料 3.1.1.8.1.1 試料 　検体を希釈液（付記１）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。 3.1.1.8.1.2 培養細胞 　Vero細胞又は適当と認められた培養細胞を培養し、単層となったものを用いる。 3.1.1.8.1.3 培養液 　ウイルス増殖用培養液（付記２）、及び希釈液に結晶トリプシンを１mL中２	ワクチン（シードロット製剤）の部 **豚伝染性胃腸炎・豚流行性下痢混合生ワクチン（シード）** 1 （略） 2 製法 2.1・2.2 （略） 2.3 原液 2.3.1 （略） 2.3.2 豚流行性下痢ウイルス原液 2.3.2.1 （略） 2.3.2.2 ウイルスの培養 　プロダクションシードウイルスを2.3.2.1の細胞で培養し、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原液とする。 　原液について、3.3.1、3.3.2.2及び3.3.3の試験を行う。 2.4・2.5 （略） 3 試験法 3.1 製造用株の試験 3.1.1 マスターシードウイルスの試験 3.1.1.1～3.1.1.7 （略） （新設）

μg加えたトリプシン添加培養液を用いる。	
3.1.1.8.2 試験方法	
試料の0.1mLずつを、希釈液で２回洗浄したそれぞれ８本（穴）の培養細胞に接種し、２群に分ける。ウイルス増殖用培養液又はトリプシン添加培養液をそれぞれ１本（穴）当たり0.5mLずつ加え、37℃の５vol%炭酸ガス下で７日間培養し、観察する。	
3.1.1.8.3 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。	
ウイルス増殖用培養液で測定したウイルス含有量は、トリプシン添加培養液で測定したウイルス含有量と比べ100倍以上高くなければならない。	
3.1.2・3.1.3 （略）	3.1.2・3.1.3 （略）
3.2 （略）	3.2 （略）
3.3 原液の試験	3.3 原液の試験
3.3.1 （略）	3.3.1 （略）
3.3.2 ウイルス含有量試験	3.3.2 ウイルス含有量試験
3.3.2.1 豚伝染性胃腸炎ウイルス	3.3.2.1 豚伝染性胃腸炎ウイルス
3.3.2.1.1 試験材料	3.3.2.1.1 試験材料
3.3.2.1.1.1 試料	3.3.2.1.1.1 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希釈液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。	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希釈液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。
3.3.2.1.1.2 （略）	3.3.2.1.1.2 （略）
3.3.2.1.2・3.3.2.1.3 （略）	3.3.2.1.2・3.3.2.1.3 （略）
3.3.2.2 （略）	3.3.2.2 （略）
（削る）	3.3.3 マーカー試験
	製造用株にマーカーがある場合には、次のように試験する。
	3.3.3.1 試験材料
	3.3.3.1.1 試料
	検体を希釈液（付記２）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。
	3.3.3.1.2 培養細胞
	Vero細胞又は適当と認められた培養細胞を培養し、単層となったものを用いる。
	3.3.3.1.3 培養液
	ウイルス増殖用培養液、及び希釈液に結晶トリプシンを１mL中２μg加えたトリプシン添加培養液を用いる。
	3.3.3.2 試験方法
	試料の0.1mLずつを、希釈液で２回洗浄したそれぞれ８本（穴）の培養細胞に接種し、２群に分ける。ウイルス増殖用培養液又はトリプシン添加培養液をそれぞれ１本（穴）当たり0.5mLずつ加え、37℃の５vol%炭酸ガス下で７日間培養し、観察する。
	3.3.3.3 判定

3.4 （略） 4 （略）	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。 ウイルス増殖用培養液で測定したウイルス含有量は、トリプシン添加培養液で測定したウイルス含有量と比べ100倍以上高くなければならない。 3.4 （略） 4 （略）
（削る）	付記１　ウイルス増殖用培養液 1,000mL中 トリプトース・ホスフェイト・ブロス　2.95 g 牛又はやぎ血清　20～50 mL イーグルMEM　残　量 炭酸水素ナトリウム液でpH を7.0～7.6に調整する。 牛又はやぎ血清は、豚伝染性胃腸炎ウイルス及び豚流行性下痢ウイルスに対する中和抗体陰性のものを用いる。 必要最少量の抗生物質を加えてもよい。
付記１　希釈液 1,000mL中 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 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２　希釈液 1,000mL中 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液で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 牛又はやぎ血清　20～50 mL イーグルMEM　残　量 pHを7.0～7.6に調整する。 牛又はやぎ血清は、豚伝染性胃腸炎ウイルス及び豚流行性下痢ウイルスに対する中和抗体陰性のものを用いる。 必要最少量の抗生物質を加えてもよい。	（新設）
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・ブロス　2.95 g 牛又はやぎ血清　50～150 mL イーグルMEM　残　量 pH を7.0～7.6に調整する。 牛又はやぎ血清は、豚伝染性胃腸炎ウイルス及び豚流行性下痢ウイルスに対する中和抗体陰性のものを用いる。	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・ブロス　2.95 g 牛又はやぎ血清　50～150 mL イーグルMEM　残　量 炭酸水素ナトリウム液でpH を7.0～7.6に調整する。 牛又はやぎ血清は、豚伝染性胃腸炎ウイルス及び豚流行性下痢ウイルスに対する中和抗体陰性のものを用いる。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。	必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

豚伝染性胃腸炎・豚流行性下痢混合生ワクチン（シード）

平成23年５月11日（告示第939号）新規追加
令和２年２月５日（告示第231号）一部改正
令和２年12月11日（告示第2406号）一部改正

1 定義

シードロット規格に適合した弱毒豚伝染性胃腸炎ウイルス及び弱毒豚流行性下痢ウイルスをそれぞれ同規格に適合した株化細胞で増殖させて得たウイルス液を混合し、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 豚伝染性胃腸炎ウイルス

2.1.1.1 名称

弱毒豚伝染性胃腸炎ウイルスh−５株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

豚腎初代若しくは継代細胞又は豚精巣初代細胞でCPEを伴って増殖する。

2.1.1.3 マスターシードウイルス

2.1.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、MPK−Ⅲa細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に保存する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して−70℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、５代以内でなければならない。

2.1.1.4 ワーキングシードウイルス

2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、MPK-Ⅲa細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して−70℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

2.1.1.5 プロダクションシードウイルス

2.1.1.5.1 増殖、継代及び保存

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

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して−70℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

2.1.2 豚流行性下痢ウイルス

2.1.2.1 名称

弱毒豚流行性下痢ウイルスP-5V株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

Vero細胞でトリプシンを添加することなくCPEを伴って増殖する。

2.1.2.3 マスターシードウイルス

2.1.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、Vero細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に保存する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、５代以内でなければならない。

2.1.2.4 ワーキングシードウイルス

2.1.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、Vero細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

2.1.2.5プロダクションシードウイルス

2.1.2.5.1増殖、継代及び保存

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

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 豚伝染性胃腸炎ウイルス

2.2.1.1 培養細胞

MPK-Ⅲa細胞又は製造に適当と認められた株化細胞を用いる。

2.2.1.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.1.3 マスターセルシード

2.2.1.3.1 作製、保存及びプロダクションセルシードまでの最高継代数

マスターセルシードは、2.2.1.2の培養液で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターセルシードは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－70℃以下で保存する。

マスターセルシードについて、3.2.1の試験を行う。

マスターセルシードは、ワクチンの製造又は試験以外の目的で継代しない。マスターセルシードからプロダクションセルシードまでの最高継代数は、20代以内でなければならない。

2.2.1.4 ワーキングセルシード

2.2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.1.2の培養液で増殖及び継代する。

ワーキングセルシードは、凍結して－70℃以下で保存する。

ワーキングセルシードについて、3.2.2の試験を行う。

2.2.1.5 プロダクションセルシード

2.2.1.5.1 増殖、継代及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.1.2の培養液で増殖させる。

プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して－70℃以下で保存する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、3.2.3の試験を行う。

2.2.2 豚流行性下痢ウイルス

2.2.2.1 培養細胞

Vero 細胞又は製造に適当と認められた株化細胞を用いる。

2.2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.2.3 マスターセルシード

2.2.2.3.1 作製、保存及びプロダクションセルシードまでの最高継代数

マスターセルシードは、2.2.2.2の培養液で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターセルシードは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－70℃以下で保存する。

マスターセルシードについて、3.2.1の試験を行う。

マスターセルシードは、ワクチンの製造又は試験以外の目的で継代しない。マスターセルシードからプロダクションセルシードまでの最高継代数は、20代以内でなければならない。

2.2.4 ワーキングセルシード

2.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.2.2の培養液で増殖及び継代する。

ワーキングセルシードは、凍結して－70℃以下で保存する。

ワーキングセルシードについて、3.2.2の試験を行う。

2.2.5 プロダクションセルシード

2.2.5.1 増殖、継代及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.2.2の培養液で増殖させる。

プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して－70℃以下で保存する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、3.2.3の試験を行う。

2.3 原液

2.3.1 豚伝染性胃腸炎ウイルス原液

2.3.1.1 プロダクションセルシードの培養

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

2.3.1.2ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.1.1の細胞で培養し、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原液とする。

原液について、3.3.1及び3.3.2.1の試験を行う。

2.3.2 豚流行性下痢ウイルス原液

2.3.2.1 プロダクションセルシードの培養

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

2.3.2.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.2.1の細胞で培養し、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原液とする。

原液について、3.3.1及び3.3.2.2の試験を行う。

2.4 最終バルク

各原液を混合し、適当と認められた安定剤を加えて調整し、最終バルクとする。必要に応じて、適当と認められた希釈液を加えることができる。

2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、凍結乾燥し、小分製品とする。

小分製品について、3.4の試験を行う。

3 試験法

3.1 製造用株の試験

3.1.1 マスターシードウイルスの試験

3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.1.1.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.3 マイコプラズマ否定試験

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

3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、2.1及び2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験

3.1.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験

豚由来細胞を用いる場合には、豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1及び3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

サル由来細胞を用いる場合には、豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス及び内在性レトロウイルス（C、Dタイプ粒子）について、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1及び3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

豚熱ウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス、ロタウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、3.2.3、3.2.4、3.2.5、3.2.7及び3.2.9を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.5 対象動物を用いた免疫原性試験

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

3.1.1.6 対象動物を用いた安全性確認試験

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

3.1.1.7 病原性復帰確認試験

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

3.1.1.8 マーカー試験

豚流行性下痢ウイルスについて、製造用株にマーカーがある場合には、次のように試験する。

3.1.1.8.1 試験材料

3.1.1.8.1.1 試料

検体を希釈液（付記１）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.1.1.8.1.2 培養細胞

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

3.1.1.8.1.3 培養液

ウイルス増殖用培養液（付記２）、及び希釈液に結晶トリプシンを１mL中２μg加えたトリプシン添加培養液を用いる。

3.1.1.8.2 試験方法

試料の0.1mLずつを、希釈液で２回洗浄したそれぞれ８本（穴）の培養細胞に接種し、２群に分ける。ウイルス増殖用培養液又はトリプシン添加培養液をそれぞれ１本（穴）当たり0.5mLずつ加え、37℃の５vol%炭酸ガス下で７日間培養し、観察する。

3.1.1.8.3 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。

ウイルス増殖用培養液で測定したウイルス含有量は、トリプシン添加培養液で測定したウイルス含有量と比べ100倍以上高くなければならない。

3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

3.1.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

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

3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

3.1.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

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

3.2 株化細胞の試験

3.2.1 マスターセルシードの試験

3.2.1.1 培養性状試験

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

3.2.1.2 起源動物種同定試験

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

3.2.1.3 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.4 マイコプラズマ否定試験

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

3.2.1.5 外来性ウイルス否定試験

3.2.1.5.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2、2.1及び2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.5.2 特定ウイルス否定試験

3.2.1.5.2.1 特定ウイルス否定一般試験

豚由来細胞を用いる場合には、豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2及び3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

サル由来細胞を用いる場合には、豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス及び内在性レトロウイルス（C、Dタイプ粒子）について、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2及び3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.5.2.2 個別ウイルス否定試験

豚熱ウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス、ロタウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2、3.2.3、3.2.4、3.2.5、3.2.7及び3.2.9を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.6 核学的（染色体）性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.6を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.7 腫瘍形成性／腫瘍原性試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.7を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.2 ワーキングセルシードの試験

3.2.2.1 培養性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.2.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.2.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.2.3 マイコプラズマ否定試験

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

3.2.3 プロダクションセルシードの試験

3.2.3.1 培養性状試験

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

3.2.3.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.3.3 マイコプラズマ否定試験

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

3.3 原液の試験

3.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.2 ウイルス含有量試験

3.3.2.1 豚伝染性胃腸炎ウイルス

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１）又は適当と認められた希釈液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.2.1.1.2 培養細胞

豚精巣初代又は継代細胞を培養し、単層となったものを用いる。

3.3.2.1.2 試験方法

試料の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分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液0.5mLを加え、37℃で５～７日間培養し、観察する。

3.3.2.1.3 判定

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

検体のウイルス含有量は、１mL中$10^{7.5}TCID_{50}$以上でなければならない。

3.3.2.2 豚流行性下痢ウイルス

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希釈液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.2.2.1.2 培養細胞

Vero細胞を培養し、単層となったものを用いる。

3.3.2.2.2 試験方法

試料の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分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液0.5mLを加え、37℃、７日間培養し、観察する。

3.3.2.2.3判定

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

検体のウイルス含有量は、１mL中$10^{6.6}TCID_{50}$以上でなければならない。

3.4 小分製品の試験

3.4.1 特性試験

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

3.4.2 真空度試験

一般試験法の真空度試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.3 含湿度試験

一般試験法の含湿度試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.4 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.5 マイコプラズマ否定試験

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

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

3.4.6 ウイルス含有量試験

3.4.6.1 豚伝染性胃腸炎ウイルス

3.3.2.1を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、１頭分当たり$10^{5.5}TCID_{50}$以上でなければならない。

3.4.6.2豚流行性下痢ウイルス

3.3.2.2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$10^{4.5}TCID_{50}$以上でなければならない。

3.4.7 安全試験

3.4.7.1 試験材料

3.4.7.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.7.1.2 試験動物

２～３か月齢の豚を用いる。

3.4.7.2 試験方法

試験動物４頭を試験群とし、１頭を対照群とする。注射材料10頭分及び１頭分をそれぞれ試験群の２頭ずつの筋肉内に注射し、対照群と共に同居飼育し、14日間観察する。

3.4.7.3 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。

3.4.8 力価試験

3.4.8.1 試験材料

3.4.8.1.1 試験動物

3.4.7の試験に用いた動物のうち、注射材料１頭分を注射した豚及び対照群の豚を用いる。

3.4.8.1.2 中和試験用ウイルス

製造用株をそれぞれ用いる。

3.4.8.1.3 培養細胞

3.4.8.1.3.1 豚伝染性胃腸炎ウイルス

豚精巣初代又は継代細胞を培養し、単層となったものを用いる。

3.4.8.1.3.2 豚流行性下痢ウイルス

Vero細胞を細胞増殖用培養液（付記３）に細胞数が１mL中３×$10^{5.0}$個となるように浮遊させたもの（以下この項において「Vero細胞浮遊液」という。）を用いる。

3.4.8.2 試験方法

3.4.7の試験終了後７日目に注射材料１頭分を注射した豚に、更に１頭分を筋肉内に注射する。

その７日目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。

3.4.8.2.1 豚伝染性胃腸炎中和試験法

被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液で２倍階段希釈する。各希釈血清0.5mLと0.1mL中約200$TCID_{50}$を含む中和試験用ウイルス液0.5mLを混合し、37℃で90分間処理する。

この各混合液0.1mLずつをそれぞれ４本（穴）の培養細胞に接種し、37℃で90分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を0.5mLずつ加え、37℃で７日間培養し、観察する。

3.4.8.2.2 豚流行性下痢中和試験法

被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液で２倍階段希釈する。各希釈血清0.5mLと0.1mL中約200$TCID_{50}$ を含む中和試験用ウイルス液0.5mLとを混合し、37℃で90分間処理する。

この各混合液0.1mLずつをそれぞれ４本（穴）ずつに分注し、Vero細胞浮遊液を0.5mLずつ加え、37℃で７日間培養し、観察する。

3.4.8.3 判定

培養細胞の２本（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。

試験群の豚伝染性胃腸炎ウイルスに対する中和抗体価は128倍以上、豚流行性下痢ウイルスに対する中和抗体価は16倍以上でなければならない。この場合、対照群においては、いずれのウイルスに対しても２倍未満でなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後２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　希釈液

1,000mL中

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

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
牛又はやぎ血清	20～50 mL
イーグルMEM	残　量

pHを7.0～7.6に調整する。

牛又はやぎ血清は、豚伝染性胃腸炎ウイルス及び豚流行性下痢ウイルスに対する中和抗体陰性のものを用いる。

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・ブロス	2.95 g
牛又はやぎ血清	50～150 mL
イーグルMEM	残　量

pHを7.0～7.6に調整する。

牛又はやぎ血清は、豚伝染性胃腸炎ウイルス及び豚流行性下痢ウイルスに対する

中和抗体陰性のものを用いる。
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

動物用生物学的製剤基準の一部を改正する件　新旧対照表
○動物用生物学的製剤基準（平成14年10月３日農林水産省告示第1567号）（抄）
　次の表により、改正前欄に掲げる規定の傍線を付した部分（以下「傍線部分」という。）でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分があるものは、これを当該傍線部分のように改め、改正前欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを削る。

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤）の部 **豚丹毒生ワクチン（シード）** 1・2 （略） 3 試験法 3.1～3.3 （略） 3.4 小分製品の試験 3.4.1～3.4.5 （略） （削る） 3.4.6 （略） 3.4.6.1 （略） 3.4.6.1.1・3.4.6.1.2 （略） 3.4.6.2・3.4.6.3 （略） 3.4.7 （略） 3.4.7.1 試験動物 　3.4.6の試験に用いた動物を用いる。 3.4.7.2 試験方法 　3.4.6の試験の観察期間中、関節炎の発生の有無を検査する。 3.4.7.3 （略） （以下略）	ワクチン（シードロット製剤）の部 **豚丹毒生ワクチン（シード）** 1・2 （略） 3 試験法 3.1～3.3 （略） 3.4 小分製品の試験 3.4.1～3.4.5 （略） 3.4.6 マーカー試験 　3.1.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。 3.4.7 （略） 3.4.7.1 （略） 3.4.7.1.1・3.4.7.1.2 （略） 3.4.7.2・3.4.7.3 （略） 3.4.8 （略） 3.4.8.1 試験動物 　3.4.7の試験に用いた動物を用いる。 3.4.8.2 試験方法 　3.4.7の試験の観察期間中、関節炎の発生の有無を検査する。 3.4.8.3 （略） （以下略）

豚丹毒生ワクチン（シード）

平成23年５月11日（告示第939号）新規追加
令和２年12月11日（告示第2406号）一部改正

1 定義

シードロット規格に適合した弱毒豚丹毒菌の培養菌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

アクリフラビン耐性弱毒豚丹毒菌小金井65-0.15株

2.1.2 性状

0.02w/v%アクリフラビン加寒天培地で発育する。

豚丹毒抗体陰性豚の皮下に注射した場合、注射部位に限局した善感反応（小丘疹の形成）を呈するが、全身症状を認めず、注射後３週目に豚丹毒菌の強毒株で攻撃した場合、耐過生存する。

４週齢のマウスの皮下に注射した場合、その90%以上が関節炎を呈するが、100%が耐過生存し、注射後10 日目に豚丹毒菌の強毒株で攻撃した場合、耐過生存する。

2.1.3 マスターシード菌

2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、普通ブイヨン又は適当と認められた培地で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシード菌は、保存安定剤（付記１）又は適当と認められた安定剤を添加し、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結乾燥して５℃以下で保存する。

マスターシード菌について、3.1.1の試験を行う。

マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシード菌から小分製品までの最高継代数は、10代以内でなければならない。

2.1.4 ワーキングシード菌

2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、普通ブイヨン又は適当と認められた培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、保存安定剤又は適当と認められた安定剤を添加し、凍結乾燥して５℃以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。

2.1.5 プロダクションシード菌

2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、普通ブイヨン又は適当と認められた培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、保存安定剤又は適当と認められた安定剤を添加し、凍結乾燥して５℃以下で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 培地

製造用培地（付記２）又は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

プロダクションシード菌を培地で溶解した後、培地に接種し、培養したもの又は遠心集菌後の濃縮菌液を培養菌液とする。

培養菌液について、3.2の試験を行う。

2.3.2 安定剤の添加

培養菌液に保存安定剤又は適当と認められた安定剤を添加し、原液とする。

原液について、3.3の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液を混合して、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て、凍結乾燥し、小分製品とする。

小分製品について、3.4の試験を行う。

3 試験法

3.1 製造用株の試験

3.1.1 マスターシード菌の試験

3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.2.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 マーカー試験

3.1.1.2.1 試験材料

検体及び0.02w/v%アクリフラビン加寒天培地を用いる。

3.1.1.2.2 試験方法

検体0.1mLを0.02w/v%アクリフラビン加寒天培地２枚以上に接種し、培地表面に拡散させ、37℃で48時間培養し、観察する。

3.1.1.2.3 判定

豚丹毒菌の発育が認められなければならない。

3.1.1.3 夾雑菌否定試験

3.1.1.3.1 液状チオグリコール酸培地培養法

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、豚丹毒菌以外の菌の発育を認めてはならない。

3.1.1.3.2 普通寒天培地斜面培養法

3.1.1.3.2.1 培地

斜面の普通寒天培地を用いる。

3.1.1.3.2.2 試験方法

検体0.5mLずつを普通寒天培地４本の斜面部に接種し、２本を30～32℃で10日間、残りの２本を22～25℃で14日間培養し、観察する。

3.1.1.3.2.3 判定

豚丹毒菌以外の菌の発育を認めてはならない。

3.1.1.4 生菌数試験

3.1.1.4.1 試験材料

3.1.1.4.1.1 試料

検体を普通ブイヨン又は適当と認められた培地で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.1.1.4.1.2 培地

普通寒天培地又は適当と認められた培地を用いる。

3.1.1.4.2 試験方法

試料１mLずつを平板混釈培養法により培地２枚以上に接種し、37℃で48時間培養後、生じた豚丹毒菌の集落数を数える。

3.1.1.4.3 判定

各段階の希釈液ごとの集落数の平均値、希釈倍数及び培地への接種量から生菌数を算出する。

検体の生菌数は、１mL中５×10^7 個以上でなければならない。

3.1.1.5 対象動物を用いた免疫原性試験

3.1.1.5.1 試験材料

3.1.1.5.1.1 検体

マスターシード菌及びそれを10代継代したものを検体とする。ただし、試験のために充分量のマスターシード菌が利用できない場合は、最も継代数の少ないワーキングシード菌を検体とする。

3.1.1.5.1.2 試験動物

品種及び系統（SPF等）が明らかで健康な、豚丹毒菌に対する抗体陰性の２～３か月齢の豚８頭以上を用いる。

3.1.1.5.2 試験方法

試験動物を、試験群２群（１群３頭以上）及び対照群（２頭以上）１群に分ける。

試験群には、各々の検体を生菌数が１mL中10^6 個となるように調整したものを1.0mLずつ、肩部皮下に注射する。

注射後３週目に、豚丹毒菌藤沢株又は適当と認められた菌株の培養菌液を0.1mL（生菌数１mL中10^8 個）ずつ各群の皮内に注射し、10日間臨床観察する。

3.1.1.5.3 判定

試験群は、いずれも、攻撃局所に限定された局所反応（発赤）を呈することがあっても、全身反応を呈することなく耐過生存しなければならない。この場合、対照群は、いずれも定型的な豚丹毒の症状が認められなければならない。

3.1.1.6 対象動物を用いた安全性確認試験

3.1.1.6.1 試験材料

3.1.1.6.1.1 検体

マスターシード菌を検体とする。ただし、試験のために充分な量のマスターシード菌が利用できない場合は、最も継代数の少ないワーキングシード菌を検体とする。

3.1.1.6.1.2 試験動物

品種及び系統（SPF等）が明らかで健康な、豚丹毒菌に対する抗体陰性の２～３か月齢の豚４頭以上を用いる。

3.1.1.6.2 試験方法

試験動物を２頭以上ずつの試験群及び対照群に分ける。

試験群には、検体を生菌数が１mL中５×10^7個以上となるように調整したものを10mLずつ肩部皮下に注射する。対照群は、非投与とする。

投与後21日間、臨床症状を観察する。

3.1.1.6.3 判定

試験群は、いずれも注射局所に善感反応が認められなければならないが、全身の異常を認めてはならず、生存しなければならない。対照群は、いずれも善感反応に類似する反応が認められてはならず、生存しなければならない。

3.1.1.7 マウスを用いた安全性確認試験

3.1.1.7.1 試験材料

3.1.1.7.1.1 検体

マスターシード菌を検体とする。ただし、試験のために充分な量のマスターシード菌が利用できない場合は、最も継代数の少ないワーキングシード菌を検体とする。

3.1.1.7.1.2 試験動物

４週齢のマウスを用いる。

3.1.1.7.2 試験方法

マウス10匹を試験群、10匹を対照群とする。

検体を生菌数が１mL中１×10^8個となるように調整したものを0.1mLずつ試験群の内股部皮下に注射し、対照群と共に10日間臨床観察する。

3.1.1.7.3 判定

試験群は、いずれも生存しなければならず、90%以上に関節炎が認められなければならない。対照群は、いずれも生存しなければならず、関節炎が認められてはならない。

3.1.1.8 病原性復帰確認試験

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

3.1.1.9 力価試験（マウス注射試験）

3.1.1.9.1 試験材料

3.1.1.9.1.1 検体

マスターシード菌を検体とする。ただし、試験のために充分な量のマスターシード菌が利用できない場合は、最も継代数の少ないワーキングシード菌を検体とする。

3.1.1.9.1.2 試験動物

４週齢のマウスを用いる。

3.1.1.9.2 試験方法

試験動物の10匹を試験群、10匹を対照群とする。

検体を生菌数が１mL中10^4個となるように調整したものを0.1mLずつ、試験群の左内股部皮下に注射する。注射後10日目に、藤沢株又は適当と認められた菌株の培養菌液を0.1mL中1,000致死量となるように希釈したもの0.1mLを両群の右内股部皮下に注射し、10日間臨床観察する。

3.1.1.9.3 判定

試験群は、全て無症状で耐過生存しなければならない。この場合、対照群は、全て死亡しなければならない。

3.1.2 ワーキングシード菌の試験

3.1.2.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.3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、普通寒天培地斜面培養法の培養温度及び培養期間は、37℃で７日間とする。

3.1.3 プロダクションシード菌の試験

3.1.3.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.3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、普通寒天培地斜面培養法の培養温度及び培養期間は、37℃で７日間とする。

3.2 培養菌液の試験

3.2.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.3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、普通寒天培地斜面培養法の培養温度及び培養期間は、37℃で７日間とする。

3.3 原液の試験

3.3.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.3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、普通寒天培地斜面培養法の培養温度及び培養期間は、37℃で７日間とする。

3.3.2 生菌数試験

3.1.1.4を準用して試験するとき、検体の生菌数は、１mL中１×10^{9}個以上でなければならない。

3.4 小分製品の試験

3.4.1 特性試験

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

3.4.2 真空度試験

一般試験法の真空度試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.3 含湿度試験

一般試験法の含湿度試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.4 夾雑菌否定試験

3.1.1.3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、普通寒天培地斜面培養法の培養温度及び培養期間は、37℃で７日間とする。

3.4.5 生菌数試験

3.1.1.4を準用して試験するとき、試験品の生菌数は、１頭分当たり１×10^{8}個以上でなければならない。

3.4.6 安全試験（マウス注射試験）

3.4.6.1 試験材料

3.4.6.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.6.1.2 試験動物

４週齢のマウスを用いる。

3.4.6.2 試験方法

試験動物10匹を試験群、５匹を対照群とする。

注射材料0.1mLずつを試験群の内股部皮下に注射し、対照群と共に10日間生死を観察する。

3.4.6.3 判定

全ての試験動物が生存しなければならない。

3.4.7 毒力試験

3.4.7.1 試験動物

3.4.6の試験に用いた動物を用いる。

3.4.7.2 試験方法

3.4.6の試験の観察期間中、関節炎の発生の有無を検査する。

3.4.7.3 判定

試験群の80%以上に関節炎が認められなくてはならない。この場合、対照群の全てに関節炎が認められてはならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後１年９か月間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その期間とする。

付記１　保存安定剤

１　脱脂乳液

1,000mL中

脱脂粉乳	100 g
水	残　量

加温溶解後、100メッシュでろ過したろ液を、110～115℃で20分間滅菌したもの

２　酵母エキス液

1,000 mL中

酵母エキス	50 g
水	残　量

加温溶解後、121℃で15分間滅菌したもの

使用時に１及び２を等量混合する。

付記２　製造用培地

1,000mL中

ペプトン	20.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
ポリソルベート80	1.0 mL
肉水	残　量

pH7.8～8.0に調整し、121℃で15分間高圧滅菌する。

動物用生物学的製剤基準の一部を改正する件　新旧対照表

○動物用生物学的製剤基準（平成14年10月３日農林水産省告示第1567号）（抄）

次の表により、改正前欄に掲げる規定の傍線を付した部分（以下「傍線部分」という。）でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分があるものは、これを当該傍線部分のように改め、改正後欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正前欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを加え、改正前欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを削る。

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤）の部 **ニューカッスル病生ワクチン（シード）**	ワクチン（シードロット製剤）の部 **ニューカッスル病生ワクチン（シード）**
1・2 （略） 3 試験法 3.1 製造用株の試験 3.1.1 マスターシードウイルスの試験 3.1.1.1～3.1.1.7 （略） 3.1.1.8 マーカー試験 小分製品において、マーカー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。 3.1.1.8.1 試験材料 3.1.1.8.1.1 試料 検体のウイルス含有量を0.5mL当たり１羽分及び1/10羽分含まれるように適当と認められた希釈液で調整したものを試料とする。 3.1.1.8.1.2 培養細胞 生ワクチン製造用材料の規格1.1の９～10日齢の発育鶏卵の胚から得た細胞を細胞増殖用培養液（付記１）で浮遊し、約20cm^{2}以上のシャーレに分注し、培養し、単層となったものを用いる。 3.1.1.8.2 試験方法 試料0.5mLをそれぞれ２枚以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置した後、重層寒天培地（付記２）を重層し、37℃で４日間培養し、プラック形成の有無を観察する。 3.1.1.8.3 判定 細胞にプラックの形成を認めてはならない。 3.1.2・3.1.3 （略） 3.2～3.4 （略） 3.5 小分製品の試験 3.5.1～3.5.7 （略） 3.5.8 マーカー試験 3.1.1.8を準用して試験するとき、適合しなければならない。マスターシードウイルスにおいて、マーカー試験を実施する場合には、本試験の実施を省略	1・2 （略） 3 試験法 3.1 製造用株の試験 3.1.1 マスターシードウイルスの試験 3.1.1.1～3.1.1.7 （略） （新設） 3.1.2・3.1.3 （略） 3.2～3.4 （略） 3.5 小分製品の試験 3.5.1～3.5.7 （略） 3.5.8 マーカー試験 （新設）

することができる。 （削る）	
	3.5.8.1 試験材料 3.5.8.1.1 試料 試験品をリン酸緩衝食塩液を用いてウイルスが0.5mL当たり１羽分及び1/10羽分含まれるように調整し、試料とする。 3.5.8.1.2 培養細胞 生ワクチン製造用材料の規格1.1の９～10日齢の発育鶏卵の胚から得た細胞を細胞増殖用培養液（付記１）で浮遊し、約20cm^{2}以上のシャーレに分注し、培養し、単層となったものを用いる。 3.5.8.2 試験方法 試料0.5mLをそれぞれ２枚以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置した後、重層寒天培地（付記２）を重層し、37℃で４日間培養し、プラック形成の有無を観察する。 3.5.8.3 判定 細胞にプラックの形成を認めてはならない。
3.5.9～3.5.11 （略） 4 （略）	3.5.9～3.5.11 （略） 4 （略）
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・ブロス　2.95 g 牛血清　30～50 mL イーグルMEM　残　量 pH6.8～7.2に調整する。 必要最少量の抗生物質を加えてもよい。	付記１　細胞増殖用培養液 1,000mL中 トリプトース・ホスフェイト・ブロス　2.95 g 牛血清　30～50 mL イーグルMEM　残　量 炭酸水素ナトリウムでpH6.8～7.2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　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　10 mL ニュートラルレッド　50 mg 寒天　9 g イーグルMEM　残　量 pH6.8～7.2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　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　10 mL ニュートラルレッド　50 mg 寒天　9 g イーグルMEM　残　量 炭酸水素ナトリウムでpH6.8～7.2に調整する。 必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

ニューカッスル病生ワクチン（シード）

平成22年７月12日（告示第1038号）新規追加
平成29年10月11日（告示第1539号）一部改正
令和２年12月11日（告示第2406号）一部改正

1 定義

シードロット規格に適合した弱毒ニューカッスル病ウイルスを同規格に適合した発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液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

弱毒ニューカッスル病ウイルスＢ１株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

８週齢の鶏に$10^{6.0}EID_{50}$を点眼接種し、又は総排泄腔に擦入しても病原性を示さない。

10日齢の発育鶏卵に１EID_{50}を注射すると増殖し、半数以上の鶏胚を約５日で死亡させる。

2.1.3 マスターシードウイルス

2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、５代以内でなければならない。

2.1.4 ワーキングシードウイルス

2.1.4.1 増殖、継代及び保存

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

ワーキングシードウイルスは、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

2.1.5 プロダクションシードウイルス

2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合について、3.1.3の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 発育鶏卵

SPF動物規格の1.1に適合した９～11日齢のものを用いる。

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

2.3 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、3.3の試験を行う。

2.3.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.1の発育鶏卵で培養して、尿膜腔液を採取し、そのろ液、遠心上清又はこれを濃縮したものを原液とする。

原液に適当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、3.4の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液を混合し、適当と認められた希釈液及び安定剤を加えて調製し、最終バルクとする。この場合、適当と認められた必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

小分製品が錠剤である製剤については、原液を混合して凍結乾燥し、適当と認められた賦形剤及び滑沢剤を加えて調製し、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て凍結乾燥し、小分製品とする。

小分製品が錠剤である製剤については、最終バルクを錠剤に成型し、小分製品とする。

小分製品について、3.5の試験を行う。

3 試験法

3.1 製造用株の試験

3.1.1 マスターシードウイルスの試験

3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.1.1.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.3 マイコプラズマ否定試験

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

3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、 2.1及び2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験

3.1.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験

鶏脳脊髄炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1及び 3.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、鶏脳脊髄炎ウイルスについて3.1.1.4.2.2に規定する試験を実施する製剤については、本試験を実施しなくてもよい。

3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

鶏白血病ウイルス、細網内皮症ウイルス及び鶏脳脊髄炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイ

ルス否定試験法の1.1、 3.2.1、3.2.2及び3.2.10を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、鶏脳脊髄炎ウイルスについて3.1.1.4.2.1に規定する試験を実施する製剤については、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 3.2.10の試験を実施しなくてもよい。

3.1.1.5 対象動物を用いた免疫原性試験

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

3.1.1.6 対象動物を用いた安全性確認試験

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

3.1.1.7 病原性復帰確認試験

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

3.1.1.8 マーカー試験

小分試験において、マーカー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。

3.1.1.8.1 試験材料

3.1.1.8.1.1 試料

検体のウイルス含有量を0.5mL当たり１羽分及び1/10羽分含まれるように適当と認められた希釈液で調整したものを試料とする。

3.1.1.8.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格1.1の９～10日齢の発育鶏卵の胚から得た細胞を細胞増殖用培養液（付記１）で浮遊し、約20cm^{2}以上のシャーレに分注し、培養し、単層となったものを用いる。

3.1.1.8.2 試験方法

試料0.5mLをそれぞれ２枚以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置した後、重層寒天培地（付記２）を重層し、37℃で４日間培養し、プラック形成の有無を観察する。

3.1.1.8.3 判定

細胞にプラックの形成を認めてはならない。

3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

3.1.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

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

3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

3.1.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

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

3.2 発育鶏卵の試験

3.2.1 孵卵性状試験

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

3.3 個体別発育鶏卵の試験

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。

3.3.1 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。

3.3.2 鶏赤血球凝集試験

3.3.1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。

3.4 原液の試験

3.4.1 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。

3.4.2 ウイルス含有量試験

3.4.2.1 試験材料

3.4.2.1.1 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。

3.4.2.1.2 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。

3.4.2.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ５個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その方法とする。

3.4.2.3 判定

尿膜腔液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、EID_{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、１mL中$10^{8.8}EID_{50}$以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、そのウイルス含有量とする。

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又は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 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。

3.5.3 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。

3.5.4 マイコプラズマ否定試験

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

3.5.5 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、適合しなければならない。

3.5.6 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。

3.5.7 ウイルス含有量試験

3.4.2を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、１羽分当たり$10^{5.5}EID_{50}$以上でなければ

ならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、そのウイルス含有量とする。

3.5.8 マーカー試験

3.1.1.8を準用して試験するとき、適合しなければならない。マスターシードウイルスにおいて、マーカー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。

3.5.8.1 試験材料

3.5.8.1.1 試料

試験品をリン酸緩衝食塩液を用いてウイルスが0.5mL当たり１羽分及び1/10羽分含まれるように調整し、試料とする。

3.5.8.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格1.1の９～10日齢の発育鶏卵の胚から得た細胞を細胞増殖用培養液（付記１）で浮遊し、約20cm^{2}以上のシャーレに分注し、培養し、単層となったものを用いる。

3.5.8.2 試験方法

試料0.5mLをそれぞれ２枚以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置した後、重層寒天培地（付記２）を重層し、37℃で４日間培養し、プラック形成の有無を観察する。

3.5.8.3 判定

細胞にプラックの形成を認めてはならない。

3.5.9 安全試験

3.5.9.1 試験材料

3.5.9.1.1 接種材料

試験品をリン酸緩衝食塩液を用いてウイルスが0.03mL当たり10羽分含まれるように調整し、接種材料とする。

3.5.9.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の４日齢の鶏を用いる。

3.5.9.2 試験方法

試験動物10羽を試験群、５羽を対照群とする。

接種材料0.03mLずつを試験群に点眼接種し、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。

3.5.9.3 判定

観察期間中、対照群においては、臨床的な異常を認めてはならず、試験群においては、一過性の呼吸器症状及び結膜の充血を呈することがあっても、その他の異常を認めてはならない。

3.5.10 力価試験

3.5.10.1 試験材料

3.5.10.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

3.5.10.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の４～５週齢の鶏を用いる。

3.5.10.1.3 攻撃ウイルス

強毒ニューカッスル病ウイルス佐藤株で感染させた尿膜腔液であり、約40日齢の鶏の筋肉内に注射し、そのウイルス量を測定するとき、１mL中$10^{6.0}$致死量以上を有するものを用いる。

使用時、リン酸緩衝食塩液を用いて、１mL中$10^{4.0}$致死量となるように調整する。

3.5.10.2 試験方法

試験動物10羽を試験群、５羽を対照群とする。

試験群に接種材料１羽分ずつを点鼻接種し、２週間後に試験群及び対照群の全てに攻撃ウイルス１mLを筋肉内に注射して攻撃し、２週間観察する。

3.5.10.3 判定

試験終了時、試験群は、80%以上が異常なく耐過しなければならない。この場合、対照群は、100%発病して死亡しなければならない。

3.5.11 崩壊試験

小分製品が錠剤である製剤について次の試験を行う。

3.5.11.1 試験方法

試験品１錠を15～25℃の水200mLの入ったビーカーに入れ、ガスの発生が終了するまでの時間を測定する。

５錠についてこの操作を繰り返す。

3.5.11.2 判定

ガスの発生が終了すると、水中において溶解又は分散して粒子の塊を認めない場合を崩壊したものとする。

全てが６分以内に崩壊しなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、１年６か月間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その期間とする。

付記１　細胞増殖用培養液

1,000mL中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95　g
牛血清	30～50 mL
イーグルMEM	残　量

pH6.8～7.2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　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	10　mL
ニュートラルレッド	50　mg
寒天	9　　g
イーグルMEM	残　量

pH6.8～7.2に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

動物用生物学的製剤基準の一部を改正する件　新旧対照表
○動物用生物学的製剤基準（平成14年10月３日農林水産省告示第1567号）（抄）
　次の表により、改正前欄に掲げる規定の傍線を付した部分（以下「傍線部分」という。）でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分があるものは、これを当該傍線部分のように改め、改正後欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正前欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを加え、改正前欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを削る。

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤）の部 **鶏伝染性喉頭気管炎生ワクチン（シード）**	ワクチン（シードロット製剤）の部 **鶏伝染性喉頭気管炎生ワクチン（シード）**
1・2 （略） 3 試験法 3.1 製造用株の試験 3.1.1 マスターシードウイルスの試験 3.1.1.1～3.1.1.7 （略） 3.1.1.8 マーカー試験 　小分製品において、マーカー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。 3.1.1.8.1 試験材料 3.1.1.8.1.1 試料 　検体のウイルス含有量を0.1mL当たり1/100羽分となるように適当と認められた希釈液で調整したものを試料とする。 3.1.1.8.1.2 発育鶏卵 　生ワクチン製造用材料の規格1.1の11～12日齢のものを用いる。 3.1.1.8.2 試験方法 　試料0.1mLずつを５個の発育鶏卵の漿尿膜上に接種し、37℃で５日間培養し、漿尿膜を観察する。 3.1.1.8.3 判定 　漿尿膜上に固有のポックの形成を認めなければならない。	1・2 （略） 3 試験法 3.1 製造用株の試験 3.1.1 マスターシードウイルスの試験 3.1.1.1～3.1.1.7 （略） （新設）
3.1.2・3.1.3 （略）	3.1.2・3.1.3 （略）
3.2～3.6 （略）	3.2～3.6 （略）
3.7 小分製品の試験 3.7.1～3.7.7 （略）	3.7 小分製品の試験 3.7.1～3.7.7 （略）
3.7.8 マーカー試験 　3.1.1.8を準用して試験するとき、適合しなければならない。マスターシードウイルスにおいて、マーカー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。	3.7.8 マーカー試験 （新設）
（削る）	3.7.8.1 試験材料 3.7.8.1.1 試料

	試験品を溶解用液で0.1mL当たり1/100羽分となるように濃度を調整したものを、試料とする。 3.7.8.1.2 発育鶏卵 生ワクチン製造用材料の規格1.1の11～12日齢のものを用いる。 3.7.8.2 試験方法 試料0.1mLずつを５個の発育鶏卵の漿尿膜上に接種し、37℃で５日間培養し、漿尿膜を観察する。 3.7.8.3 判定 漿尿膜上に固有のポックの形成を認めなければならない。
3.7.9・3.7.10 （略） 4 （略）	3.7.9・3.7.10 （略） 4 （略）
付記　ウイルス増殖用培養液 1,000mL中 トリプトース・ホスフェイト・ブロス　2.95 g 牛血清　25 mL イーグルMEM　残 量 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　ウイルス増殖用培養液 1,000mL中 トリプトース・ホスフェイト・ブロス　2.95 g 牛血清　25 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。

鶏伝染性喉頭気管炎生ワクチン（シード）

平成22年７月12日（告示第1038号）新規追加
平成24年３月13日（告示第 675号）一部改正
令和２年12月11日（告示第2406号）一部改正

1 定義

シードロット規格に適合した弱毒鶏伝染性喉頭気管炎ウイルスを同規格に適合した発育鶏卵又は初代細胞で増殖させて得たウイルス液を凍結乾燥したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

弱毒鶏伝染性喉頭気管炎ウイルスCE株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

30日齢の鶏に点鼻又は点眼接種すると、一過性の呼吸器症状及び結膜の充血を呈することがある。10日齢の発育鶏卵の漿尿膜上に接種すると、特有のポックを形成する。

2.1.3 マスターシードウイルス

2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵又は同規格の2.6に適合した鶏胚初代細胞、鶏胚腎初代細胞若しくは鶏胚肝初代細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、５代以内でなければならない。

2.1.4 ワーキングシードウイルス

2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵又は同規格の2.6に適合した鶏胚初代細胞、鶏胚腎初代細胞若しくは鶏胚肝初代細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

2.1.5 プロダクションシードウイルス

2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵又は同規格の2.6に適合した鶏胚初代細胞、鶏胚腎初代細胞若しくは鶏胚肝初代細胞で増殖させる。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 発育鶏卵を用いる場合

SPF動物規格の1.1に適合した８～10日齢のものを用いる。

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

2.2.2 初代細胞を用いる場合

2.2.2.1 初代細胞

SPF動物規格の2.6に適合した鶏胚初代細胞又は鶏胚肝初代細胞を用いる。

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。

2.2.2.3 マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）

2.2.2.3.1 増殖、継代及び保存

マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）は、2.2.2.2の培養液で増殖し、継代及び保存しない。

マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）について、3.3の試験を行う。

2.3 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、3.4の試験を行う。

2.3.2 マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）の培養

１回に処理し、培養した細胞を個体別培養細胞とみなす。ウイルス接種前のマスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）に異常を認めてはならない。

個体別培養細胞について、3.5の試験を行う。

2.3.3 ウイルスの培養

2.3.3.1 発育鶏卵を用いる場合

プロダクションシードウイルスを2.3.1の発育鶏卵で培養して、尿膜腔液を採取し、そのろ液、遠心上清又はこれを濃縮したものを原液とする。この場合、適当と認められた必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

原液について、3.6の試験を行う。

2.3.3.2 培養細胞を用いる場合

プロダクションシードウイルスを2.3.2の細胞で培養し、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の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又は適当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、3.6の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液を混合し、適当と認められた希釈液及び安定剤を加えて、最終バルクとする。この場合、適当と認められた必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

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、3.7の試験を行う。

3 試験法

3.1 製造用株の試験

3.1.1 マスターシードウイルスの試験

3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.1.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.3 マイコプラズマ否定試験

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

3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、2.1及び2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験

3.1.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験

鶏脳脊髄炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1及び3.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、鶏脳脊髄炎ウイルスについて3.1.1.4.2.2に規定する製剤については、本試験を実施しなくてもよい。

3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

鶏白血病ウイルス、細網内皮症ウイルス及び鶏脳脊髄炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、3.2.1、3.2.2及び3.2.10を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、鶏脳脊髄炎ウイルスについて3.1.1.4.2.1に規定する製剤については、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の3.2.10の試験を実施しなくてもよい。

3.1.1.5 対象動物を用いた免疫原性試験

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

3.1.1.6 対象動物を用いた安全性確認試験

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

3.1.1.7 病原性復帰確認試験

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

3.1.1.8 マーカー試験

小分製品において、マーカー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。

3.1.1.8.1 試験材料

3.1.1.8.1.1 試料

検体のウイルス含有量を0.1mL当たり1/100羽分となるように適当と認められた希釈液で調

整したものを試料とする。

3.1.1.8.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1の11～12日齢のものを用いる。

3.1.1.8.2 試験方法

試料0.1mLずつを５個の発育鶏卵の漿尿膜上に接種し、37℃で５日間培養し、漿尿膜を観察する。

3.1.1.8.3 判定

漿尿膜上に固有のポックの形成を認めなければならない。

3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

3.1.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

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

3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

3.1.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

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

3.2 発育鶏卵の試験

3.2.1 孵卵性状試験

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

3.3 初代細胞の試験

3.3.1 マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）の試験

3.3.1.1 培養性状試験

シードロット規格の2.2.4.2.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.1.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.1.3 マイコプラズマ否定試験

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

3.4 個体別発育鶏卵の試験

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。

3.4.1 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。

3.4.2 鶏赤血球凝集試験

3.4.1の試験最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol%の鶏赤血球浮遊液を等量加え、60分間静置

し、観察するとき、赤血球凝集を認めてはならない。

3.5 個体別培養細胞の試験

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。

3.5.1 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。

3.5.2 鶏赤血球凝集試験

3.5.1の試験最終日に培養液を採取し、0.5vol%の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。

3.6 原液の試験

3.6.1 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。

3.6.2 ウイルス含有量試験

3.6.2.1 試験材料

3.6.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.6.2.1.2 発育鶏卵又は培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格1.1の９～11日齢の発育鶏卵又は小試験管に３～５日間培養し、単層となった同規格2.2.1の鶏腎初代細胞を用いる。

3.6.2.2 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℃で５日間培養し、観察する。あるいは、試料0.1mLずつそれぞれ４本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（付記）0.5mLずつを加え、37℃で７日間回転培養し、観察する。

3.6.2.3 判定

漿尿膜に特有のポックを認めた場合又は培養細胞にCPEを認めた場合を感染とみなし、EID_{50}又は$TCID_{50}$を算出する。

検体のウイルス含有量は、１mL中$10^{5.5}EID_{50}$又は$10^{6.5}TCID_{50}$以上でなければならない。

3.7 小分製品の試験

3.7.1 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、異物及び異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.7.2 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。

3.7.3 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。

3.7.4 マイコプラズマ否定試験

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

3.7.5 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、適合しなければならない。

3.7.6 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。

3.7.7 ウイルス含有量試験

3.6.2を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、１羽分当たり$10^{3.5}EID_{50}$又は$10^{4.0}TCID_{50}$以上でなければならない。

3.7.8 マーカー試験

3.1.1.8を準用して試験するとき、適合しなければならない。マスターシードウイルスにおいて、マーカー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。

3.7.9 安全試験

3.7.9.1 試験材料

3.7.9.1.1 接種材料

試験品を溶解用液を用いて0.03mL当たり５羽分となるように濃度を調整し、接種材料とする。

3.7.9.1.2 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。

3.7.9.2 試験方法

試験動物10羽を試験群、５羽を対照群とする。

接種材料0.03mLずつを試験群に点眼接種し、対照群と共に14日間観察する。

試験開始時及び試験終了時に体重を測定する。

3.7.9.3 判定

観察期間中、対照群においては、臨床的な異常を認めてはならず、試験群においては、一過性の呼吸器症状及び結膜の充血を呈することがあっても、その他の異常を認めてはならない。

3.7.10 力価試験

3.7.10.1 試験材料

3.7.10.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

3.7.10.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の４～５週齢の鶏を用いる。

3.7.10.1.3 攻撃ウイルス

強毒鶏伝染性喉頭気管炎ウイルスNS-175株を用いる。攻撃ウイルス量は、約40日齢の鶏の気管内に0.1mLを接種した場合、接種鶏の50%以上が発症する量の100倍量とする。

3.7.10.2 試験方法

試験動物10羽を試験群、５羽を対照群とする。

試験群に接種材料１羽分ずつ点眼接種する。14日後に試験群及び対照群に攻撃ウイルス0.1mLずつを気管内に接種して攻撃し、10日間観察する。

3.7.10.3 判定

試験終了時、試験群は、60%以上異常なく耐過しなければならない。この場合、対照群は、80%以上発症しなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後１年３か月間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その期間とする。

付記　ウイルス増殖用培養液

1,000mL中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
牛血清	25 mL
イーグルMEM	残　量

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。

動物用生物学的製剤基準の一部を改正する件　新旧対照表
○動物用生物学的製剤基準（平成14年10月３日農林水産省告示第1567号）（抄）
　次の表により、改正前欄に掲げる規定の傍線を付した部分（以下「傍線部分」という。）でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分があるものは、これを当該傍線部分のように改め、改正後欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正前欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを加え、改正前欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを削る。

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤）の部 **鶏伝染性ファブリキウス嚢病生ワクチン（ひな用）（シード）** 1　（略） 2 製法 2.1・2.2　（略） 2.3.1～2.3.2　（略） 2.3.3 ウイルスの培養 2.3.3.1　（略） 2.3.3.2 培養細胞を用いる場合 　プロダクションシードウイルスを2.3.2の細胞で培養し、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、そのろ液又は遠心上清を原液とする。この場合、原液に適当と認められた安定剤又は適当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、3.6の試験を行う。 2.4 最終バルク 　原液を混合し、適当と認められた希釈液及び安定剤を加えて調整し、最終バルクとする。この場合、適当と認められた必要最少量の抗生物質を加えてもよい。 　小分製品が錠剤である製剤については、原液を混合して適当と認められた希釈液及び安定剤を加えて凍結乾燥し、適当と認められた賦形剤及び滑沢剤を加えて調製し、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。小分製品が錠剤である製剤については、最終バルクを錠剤に成型し、小分製品とする。 　小分製品について、3.7の試験を行う。 3 試験法 3.1～3.5　（略） 3.6 原液の試験 3.6.1 生菌数限度試験 　一般試験法の生菌数限度試験法又は無菌試験法を準用して試験するとき、	ワクチン（シードロット製剤）の部 **鶏伝染性ファブリキウス嚢病生ワクチン（ひな用）（シード）** 1　（略） 2 製法 2.1・2.2　（略） 2.3.1～2.3.2　（略） 2.3.3 ウイルスの培養 2.3.3.1　（略） 2.3.3.2 培養細胞を用いる場合 　プロダクションシードウイルスを2.3.2の細胞で培養し、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のろ液又は遠心上清を原液とする。この場合、原液に適当と認められた安定剤又は適当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、3.6の試験を行う。 2.4 最終バルク 　原液を混合したもの又は原液を混合し、適当と認められた希釈液及び安定剤を加えて調整し、最終バルクとする。この場合、適当と認められた必要最少量の抗生物質を加えてもよい。 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、3.7の試験を行う。 3 試験法 3.1～3.5　（略） 3.6 原液の試験 3.6.1 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。

適合しなければならない。	
3.6.2　（略）	3.6.2　（略）
3.7 小分製品の試験	3.7 小分製品の試験
3.7.1 特性試験	3.7.1 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、異物及び異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。	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。
3.7.2～3.7.10　（略）	3.7.2～3.7.10　（略）
3.7.11.1・3.7.11.2　（略）	3.7.11.1・3.7.11.2　（略）
3.7.11.3 判定	3.7.11.3 判定
3.5.11.2.1の赤血球凝集抑制反応試験では、試験群及び対照群ともに赤血球凝集抑制抗体が上昇し、その赤血球凝集抑制抗体価に有意差（P＜0.05）を認めてはならない。	3.5.11.2.1の赤血球凝集抑制反応試験では、試験群及び対照群ともに赤血球凝集抑制抗体が上昇し、その赤血球凝集抑制抗体価に有意差（P＜0.05）を認めてはならない。
3.5.11.2.2の攻撃試験では、試験終了時、試験群及び対照群共に80％以上が異常なく耐過しなければならない。	3.5.11.2.2の攻撃試験では、試験終了時、試験群及び対照群ともに80％以上が異常なく耐過しなければならない。
3.7.12 崩壊試験	（新設）
小分製品が錠剤である製剤について次の試験を行う。	
3.7.12.1 試験方法	
試験品１錠を15～25℃の水200mLの入ったビーカーに入れ、ガスの発生が終了するまでの時間を測定する。	
６錠についてこの操作を繰り返す。	
3.7.12.2 判定	
ガスの発生が終了した後、水中において溶解又は分散して粒子の塊を認めない場合を崩壊したものとする。	
全てが10分以内に崩壊しなければならない。	
4　（略）	4　（略）
付記１　細胞維持用培養液	付記１　細胞維持用培養液
1,000mL中	1,000mL中
トリプトース・ホスフェイト・ブロス　2.95 g	トリプトース・ホスフェイト・ブロス　2.95 g
牛血清　適　量	牛血清　適　量
イーグルMEM　残　量	イーグルMEM　残　量
pHを7.0～7.4に調整する。	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。	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	付記２　第１次重層寒天培地
1,000mL中	1,000mL中
寒天　8～10　g	寒天　8～10　g
トリプトース・ホスフェイト・ブロス　2.95 g	トリプトース・ホスフェイト・ブロス　2.95 g

牛血清　0～20　mL イーグルMEM　残　量 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２vol%となるように加えたもの。	牛血清　0～20　mL イーグルMEM　残　量 炭酸水素ナトリウムでpHを7.0～7.4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２vol%となるように加えたもの

鶏伝染性ファブリキウス嚢病生ワクチン（ひな用）（シード）

平成22年３月３日（告示第394号）　新規追加
令和２年12月11日（告示2406号）　一部改正

1 定義

シードロット規格に適合した弱毒伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスを同規格に適合した発育鶏卵又は初代細胞で増殖させて得たウイルス液を凍結乾燥した初生ひなを含むひなに適用するワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

弱毒伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスD78株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

１日齢の鶏に皮下又は経口接種しても臨床症状及び免疫抑制作用を示さない。

鶏胚初代細胞に接種するとCPEを伴って増殖する。

2.1.3 マスターシードウイルス

2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵、同規格の2.6に適合した鶏胚初代細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、５代以内でなければならない。

2.1.4 ワーキングシードウイルス

2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵、同規格の2.6に適合した鶏胚初代細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

2.1.5 プロダクションシードウイルス

2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵、同規格の2.6に適合した鶏胚初代細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合について、3.1.3の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 発育鶏卵を用いる場合

2.2.1.1 発育鶏卵

SPF動物規格の1.1に適合した10～12日齢のものを用いる。

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

2.2.2 初代細胞を用いる場合

2.2.2.1 初代細胞

SPF動物規格の2.6に適合した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。

2.2.2.3 マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）.

2.2.2.3.1 増殖、継代及び保存

マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）は2.2.2.2の培養液で増殖し、継代及び保存しない。

マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）について、3.3の試験を行う。

2.3 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、3.4の試験を行う。

2.3.2 マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）の培養

１回に処理し、培養した細胞を個体別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の個体別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、3.5の試験を行う。

2.3.3 ウイルスの培養

2.3.3.1 発育鶏卵を用いる場合

プロダクションシードウイルスを2.3.1の発育鶏卵の卵黄嚢内又は尿膜腔内に接種し、培養後、感染鶏胚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、適当と認められた安定剤又は必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

原液について、3.6の試験を行う。

2.3.3.2 培養細胞を用いる場合

プロダクションシードウイルスを2.3.2の細胞で培養し、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、そのろ液又は遠心上清を原液とする。この場合、原液に適当と認められた安定剤又は適当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、3.6の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液を混合し、適当と認められた希釈液及び安定剤を加えて調整し、最終バルクとする。この場

合、適当と認められた必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

小分製品が錠剤である製剤については、原液を混合して適当と認められた希釈液及び安定剤を加えて凍結乾燥し、適当と認められた賦形剤及び滑沢剤を加えて調製し、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。小分製品が錠剤である製剤については、最終バルクを錠剤に成型し、小分製品とする。

小分製品について、3.7の試験を行う。

3 試験法

3.1 製造用株の試験

3.1.1 マスターシードウイルスの試験

3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.1.1.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.3 マイコプラズマ否定試験

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

3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の2.1及び2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験

3.1.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験

鶏脳脊髄炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の3.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、鶏脳脊髄炎ウイルスについて3.1.1.4.2.2.に規定する製剤については、本試験を実施しなくてよい。

3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

鶏白血病ウイルス、細網内皮症ウイルス及び鶏脳脊髄炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の3.2.1、3.2.2及び3.2.10を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、鶏脳脊髄炎ウイルスについて3.1.1.4.2.1に規定する製剤については、3.2.10の試験を実施しなくてもよい。

3.1.1.5 対象動物を用いた免疫原性試験

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

3.1.1.6 対象動物を用いた安全性確認試験

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

3.1.1.7 病原性復帰確認試験

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

3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

3.1.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

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

3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

3.1.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

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

3.2 発育鶏卵の試験

3.2.1 孵卵性状試験

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

3.3 初代細胞の試験

3.3.1 マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）の試験

3.3.1.1 培養性状試験

シードロット規格の2.2.4.2.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.1.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.1.3 マイコプラズマ否定試験

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

3.4 個体別発育鶏卵の試験

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。

3.4.1 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。

3.4.2 鶏赤血球凝集試験

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

3.5 培養細胞の試験

静置培養の場合は、個体別培養細胞の１％以上を、ファーメンター培養の場合は、個体別培養細胞の１vol%以上又は500mL以上を対照培養細胞とし、これについて次の試験を行う。

3.5.1 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。

3.5.2 鶏赤血球凝集試験

3.5.1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。

3.6 原液の試験

3.6.1 生菌数限度試験

一般試験法の生菌数限度試験法又は無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならな

い。

3.6.2 ウイルス含有量試験

3.6.2.1 試験材料

3.6.2.1.1 試料

試験品をリン酸緩衝食塩液で10倍階段希釈し、各階段の希釈液を試料とする。

3.6.2.1.2 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。

3.6.2.2 試験方法

試料の0.2mLずつを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（付記１）を加え、37℃で６日間培養し、観察する。

3.6.2.3判定

培養細胞にCPEを認めた場合を感染とみなし、$TCID_{50}$を算出する。検体のウイルス含有量は、１mL中$10^{6.8}TCID_{50}$以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、そのウイルス含有量とする。

3.7 小分製品の試験

3.7.1 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、異物及び異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.7.2 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。

3.7.3 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。

3.7.4 マイコプラズマ否定試験

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

3.7.5 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、適合しなければならない。

3.7.6 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。

3.7.7 ウイルス含有量試験

3.6.2を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、１羽当たり$10^{4.0}TCID_{50}$以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、そのウイルス含有量とする。

3.7.8 マーカー試験

3.7.8.1 試験材料

3.7.8.1.1 試料

試験品をリン酸緩衝食塩液を用いてウイルスが0.1mL中１羽分となるように調整したものを試料とする。強毒伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスを0.1mL当たり$10^{4.0}EID_{50}$になるように調整したものを対照として用いる。

3.7.8.1.2 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

3.7.8.2 試験方法

試料及び対照の0.1mLずつをそれぞれ４枚以上の培養細胞に接種し、37℃で５～７日間観察する。

3.7.8.3 判定

培養細胞にCPEを認めなければならない。この場合、対照を接種した培養細胞では、CPEを認めてはならない。

3.7.9 安全試験

3.7.9.1 試験材料

3.7.9.1.1 接種材料

試験品をリン酸緩衝食塩液を用いてウイルスが0.2mL当たり５羽分含まれるように調整し、接種材料とする。

3.7.9.1.2 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。

3.7.9.2 試験方法

試験動物10羽を試験群、５羽を対照群とする。

接種材料0.2mLずつを試験群に経口接種し、対照群とともに５週間観察し、試験最終日にファブリキウス嚢を剖検する。

3.7.9.3 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、剖検したときファブリキウス嚢の著しい萎縮を認めてはならない。

3.7.10 力価試験

3.7.10.1 試験材料

3.7.10.1.1 接種材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で0.2mL中１羽分となるように調整したものを接種材料とする。

3.7.10.1.2 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。

3.7.10.1.3 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嚢病ウイルスD78株又は適当と認められた株を用いる。

3.7.10.1.4 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で培養し、単層となったものを用いる。

3.7.10.2 試験方法

試験動物10羽に接種材料0.2mLずつを経口接種し、３週間後に得られた各個体の血清について中和試験を行う。また非接種動物３羽を対照として、接種群と隔離して飼育し、３週間後に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、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中に100～200PFUを含む中和試験用ウイルス液を等量混合し、４℃で18～24時間処理する。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℃で60分間静置した後、第１次重層寒天培地（付記２）を重層し、37℃で２～３日間静置培養する。その後、第２次重層寒天培地（付記３）を重層し、37℃で更に24時間静置培養し、観察する。

3.7.10.3 判定

プラック数を50％減少させる血清の最高血清希釈倍数で中和抗体価とする。

試験群の80％以上が中和抗体価200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10倍以下でなければならない。

3.7.11 免疫抑制否定試験

3.7.11.1 試験材料

3.7.11.1.1 接種材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で0.2mL中５羽分となるように調整したものを接種材料とする。

3.7.11.1.2 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。

3.7.11.2 試験方法

試験動物10羽を試験群、10羽を対照群とし、次のいずれかの試験を行う。

3.7.11.2.1 赤血球凝集抑制試験

接種材料0.2mLずつを試験群に皮下接種し、接種後７日目にB1株の「ニューカッスル病生ワクチン」１羽分を対照群とともに点鼻接種し、21日目に採血し、ニューカッスル病ウイルスに対する赤血球凝集抑制反応を行う。

3.7.11.2.2 攻撃試験

接種材料0.2mLずつを試験群に経口接種し、接種後14日目にB1株の「ニューカッスル病生ワクチン」１羽分を対照群とともに点鼻接種する。点鼻接種後21日目に１ mL中$10^{4.0}$致死量となるように調整した強毒ニューカッスル病ウイルス佐藤株を全羽数の筋肉内に１ mLずつ注射し、14日間観察する。

3.7.11.3 判定

3.5.11.2.1の赤血球凝集抑制反応試験では、試験群及び対照群ともに赤血球凝集抑制抗体が上昇し、その赤血球凝集抑制抗体価に有意差（$P<0.05$）を認めてはならない。

3.5.11.2.2の攻撃試験では、試験終了時、試験群及び対照群共に80％以上が異常なく耐過しなければならない。

3.7.12 崩壊試験

小分製品が錠剤である製剤について次の試験を行う。

3.7.12.1 試験方法

試験品１錠を15～25℃の水200mLの入ったビーカーに入れ、ガスの発生が終了するまでの時間を測定する。

６錠についてこの操作を繰り返す。

3.7.12.2 判定

ガスの発生が終了すると、水中において溶解又は分散して粒子の塊を認めない場合を崩壊したものとする。

全てが10分以内に崩壊しなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は製造後２年３か月間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その期間とする。

付記１　細胞維持用培養液

1,000mL中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
牛血清	適　量
イーグルMEM	残　量

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

寒天	8～10 g
トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
牛血清	0～20 mL
イーグルMEM	残　量

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２vol%となるように加えたもの。

動物用生物学的製剤基準の一部を改正する件　新旧対照表

○動物用生物学的製剤基準（平成14年10月３日農林水産省告示第1567号）（抄）

次の表により、改正前欄に掲げる規定の傍線を付した部分（以下「傍線部分」という。）でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分があるものは、これを当該傍線部分のように改め、改正後欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正前欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを加え、改正前欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを削る。

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤）の部 **ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎混合生ワクチン（シード）**	ワクチン（シードロット製剤）の部 **ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎混合生ワクチン（シード）**
1・2 （略） 3 試験法 3.1 製造用株の試験 3.1.1 マスターシードウイルスの試験 3.1.1.1～3.1.1.7 （略） 3.1.1.8 マーカー試験 ニューカッスル病ウイルスについて実施する。小分製品において、マーカー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。 3.1.1.8.1 試験材料 3.1.1.8.1.1 試料 検体のウイルス含有量を0.5mL当たり１羽分及び1/10羽分含まれるように適当と認められた希釈液で調整したものを試料とする。 3.1.1.8.1.2 培養細胞 生ワクチン製造用材料の規格1.1の９～10日齢の発育鶏卵の胚から得た細胞を細胞増殖用培養液（付記１）で浮遊し、約20cm^{2}以上のシャーレに分注し、培養し、単層となったものを用いる。 3.1.1.8.2 試験方法 試料0.5mLをそれぞれ２枚以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置した後、重層寒天培地（付記２）を重層し、37℃で４日間培養し、プラック形成能を試験する。 3.1.1.8.3 判定 培養４日後に試験するとき、プラックの形成を認めてはならない。 3.1.2・3.1.3 （略） 3.2～3.4 （略） 3.5 小分製品の試験 3.5.1～3.5.6 （略） 3.5.7 ウイルス含有量試験	1・2 （略） 3 試験法 3.1 製造用株の試験 3.1.1 マスターシードウイルスの試験 3.1.1.1～3.1.1.7 （略） （新設） 3.1.2・3.1.3 （略） 3.2～3.4 （略） 3.5 小分製品の試験 3.5.1～3.5.6 （略） 3.5.7 ウイルス含有量試験

3.5.7.1 ニューカッスル病ウイルス 試験品の鶏伝染性気管支炎ウイルスを、抗鶏伝染性気管支炎ウイルス血清（付記３）を非働化したもので中和したものを試料とし、3.4.2.1を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、１羽分当たり$10^{5.5}EID_{50}$以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、そのウイルス含有量とする。	3.5.7.1 ニューカッスル病ウイルス 試験品の鶏伝染性気管支炎ウイルスを、抗鶏伝染性気管支炎ウイルス血清（付記１）を非働化したもので中和したものを試料とし、3.4.2.1を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、１羽分当たり$10^{5.5}EID_{50}$以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、そのウイルス含有量とする。
3.5.7.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス 試験品のニューカッスル病ウイルスを、抗ニューカッスル病ウイルス血清（付記４）を非働化したもので中和したものを試料とし、3.4.2.2を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、１羽分当たり$10^{3.0}EID_{50}$以上でなければならない。	3.5.7.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス 試験品のニューカッスル病ウイルスを、抗ニューカッスル病ウイルス血清（付記２）を非働化したもので中和したものを試料とし、3.4.2.2を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、１羽分当たり$10^{3.0}EID_{50}$以上でなければならない。
3.5.8 マーカー試験 3.1.1.8を準用して試験するとき、適合しなければならない。ニューカッスル病ウイルスのマスターシードウイルスにおいて、マーカー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。	3.5.8 マーカー試験 （新設）
（削る）	3.5.8.1 試験材料 3.5.8.1 試験材料 3.5.8.1.1 試料 試験品の鶏伝染性気管支炎ウイルスを、抗鶏伝染性気管支炎ウイルス血清を非働化したもので中和し、リン酸緩衝食塩液を用いてニューカッスル病ウイルスが0.5mL当たり１羽分及び1/10羽分含まれるように調整し、試料とする。 3.5.8.1.2 培養細胞 生ワクチン製造用材料の規格1.1の９～10日齢の発育鶏卵の胚から得た細胞を細胞増殖用培養液（付記３）で浮遊し、約20cm^2以上のシャーレに分注し、培養し、単層となったものを用いる。 3.5.8.2 試験方法 試料0.5mLをそれぞれ２枚以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置した後、重層寒天培地（付記４）を重層し、37℃で４日間培養し、プラック形成能を試験する。 3.5.8.3 判定 培養４日後に試験するとき、プラックの形成を認めてはならない。
3.5.9・3.5.10 （略）	3.5.9・3.5.10 （略）
4 （略）	4 （略）
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・ブロス 2.95 g 牛血清 50 mL イーグルMEM 残 量 pHを6.8～7.2に調整する。	（新設）

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。	
付記２　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　10 mL ニュートラルレッド　50 mg 寒天　9 g イーグルMEM　残 量 pHを6.8～7.2に調整する。 必要最少量の抗生物質を加えてもよい。	（新設）
付記３　（略）	付記１　（略）
付記４　（略）	付記２　（略）
（削る）	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・ブロス　2.95 g 牛血清　50 mL イーグルMEM　残 量 炭酸水素ナトリウムでpHを6.8～7.2に調整する。 必要最少量の抗生物質を加えてもよい。
（削る）	付記４　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　10 mL ニュートラルレッド　50 mg 寒天　9 g イーグルMEM　残 量 炭酸水素ナトリウムでpHを6.8～7.2に調整する。 必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎混合生ワクチン（シード）

平成24年７月４日（告示第1622号）一部改正
令和２年12月11日（告示第2406号）一部改正

1 定義

シードロット規格に適合した弱毒ニューカッスル病ウイルス及び弱毒鶏伝染性気管支炎ウイルスを同規格に適合した発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液を混合し、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 ニューカッスル病ウイルス

2.1.1.1 名称

弱毒ニューカッスル病ウイルスB_1株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

８週齢の鶏に$10^{6.0}EID_{50}$を点眼接種し、又は総排泄腔に擦入しても病原性を示さない。

10日齢の発育鶏卵に１EID_{50}を注射すると増殖し、鶏胚を約５日で死亡させる。

2.1.1.3 マスターシードウイルス

2.1.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、５代以内でなければならない。

2.1.1.4 ワーキングシードウイルス

2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存

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

ワーキングシードウイルスは凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

2.1.1.5 プロダクションシードウイルス

2.1.1.5.1 増殖及び保存

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

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

2.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

2.1.2.1 名称

弱毒鶏伝染性気管支炎ウイルスH120株又は製造に適当と認められた株

2.1.2.2 性状

４日齢の鶏に$10^{3.0}EID_{50}$を点鼻又は点眼接種すると、一過性の軽い呼吸器症状を示すことがある。８～10日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射すると、増殖し、鶏胚を２～７日後に死亡させ、又は鶏胚の発育不全若しくはカーリングを起こす。

2.1.2.3 マスターシードウイルス

2.1.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、５代以内でなければならない。

2.1.2.4 ワーキングシードウイルス

2.1.2.4.1 増殖、継代及び保存

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

ワーキングシードウイルスは凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

2.1.2.5 プロダクションシードウイルス

2.1.2.5.1 増殖及び保存

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

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

2.2 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

SPF動物規格の1.1に適合した９～11日齢のものを用いる。

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

2.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

2.2.2.1 発育鶏卵

SPF動物規格の1.1に適合した10～12日齢のものを用いる。

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

2.3 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、3.3の試験を行う。

2.3.1.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.1.1の発育鶏卵で培養して、尿膜腔液を採取し、そのろ液、遠心上清又はこれを濃縮したものを原液とする。

原液に適当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3.4.1及び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原液

2.3.2.1 発育鶏卵の培養

１回に処理する発育鶏卵を個体別発育鶏卵とみなす。

個体別発育鶏卵について、3.3の試験を行う。

2.3.2.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.2.1の発育鶏卵で培養して、尿膜腔液を採取し、そのろ液、遠心上清又はこれを濃縮したものを原液とする。

原液に適当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3.4.1及び3.4.2.2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及び鶏伝染性気管支炎ウイルス原液を混合し、適当と認められた希釈液及び安定剤を加えて調製したものを最終バルクとする。この場合、適当と認められた必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注して凍結乾燥し、小分製品とする。

小分製品について、3.5の試験を行う。

3 試験法

3.1 製造用株の試験

3.1.1 マスターシードウイルスの試験

3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.1.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.3 マイコプラズマ否定試験

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

3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、2.1及び2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験

3.1.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験

鶏脳脊髄炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1及び3.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、鶏脳脊髄炎ウイルスについて3.1.1.4.2.2に規定する試験を実施する製剤については、本試験を実施しなくてもよい。

3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

鶏白血病ウイルス、細網内皮症ウイルス及び鶏脳脊髄炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、3.2.1、3.2.2及び3.2.10を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、鶏脳脊髄炎ウイルスについて3.1.1.4.2.1に規定する試験を実施する製剤については、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の3.2.10の試験を実施しなくてもよい。

3.1.1.5 対象動物を用いた免疫原性試験

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

3.1.1.6 対象動物を用いた安全性確認試験

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

3.1.1.7 病原性復帰確認試験

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

3.1.1.8 マーカー試験

ニューカッスル病ウイルスについて実施する。小分試験において、マーカー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。

3.1.1.8.1 試験材料

3.1.1.8.1.1 試料

検体のウイルス含有量を0.5mL当たり１羽分及び1/10羽分含まれるように適当と認められた希釈液で調整したものを試料とする。

3.1.1.8.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した９～10日齢の発育鶏卵の胚から得た細胞を細胞増殖用培養液（付記１）で浮遊し、約20cm^{2}以上のシャーレに分注し、培養し、単層となったものを用いる。

3.1.1.8.2 試験方法

試料0.5mLをそれぞれ２枚以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置した後、重層寒天培地（付記２）を重層し、37℃で４日間培養し、プラック形成能を試験する。

3.1.1.8.3 判定

培養４日後に細胞を観察するとき、プラックの形成を認めてはならない。

3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

3.1.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

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

3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

3.1.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

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

3.2 発育鶏卵の試験

3.2.1 孵卵性状試験

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

3.3 個体別発育鶏卵の試験

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。

3.3.1 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。

3.3.2 鶏赤血球凝集試験

3.3.1の試験最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol%の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。

3.4 原液の試験

3.4.1 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。

3.4.2 ウイルス含有量試験

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。

3.4.2.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した９～11日齢のものを用いる。

3.4.2.1.2 試験方法

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

3.4.2.1.3 判定

尿膜腔液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、EID_{50}を算定する。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、１mL中$10^{8.8}EID_{50}$以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、そのウイルス含有量とする。

3.4.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

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10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.4.2.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した９～10日齢のものを用いる。

3.4.2.2.2 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尿膜腔内に注射し、37℃で７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。

3.4.2.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全、カーリング）を認めたものを感染とみなし、EID_{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、１mL中$10^{6.8}EID_{50}$以上でなければならない。

3.5 小分製品の試験

3.5.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、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又は均質な懸濁液でなければならず、異物及び異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.5.2 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。

3.5.3 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。

3.5.4 マイコプラズマ否定試験

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

3.5.5 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、適合しなければならない。

3.5.6 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。

3.5.7 ウイルス含有量試験

3.5.7.1 ニューカッスル病ウイルス

試験品の鶏伝染性気管支炎ウイルスを、抗鶏伝染性気管支炎ウイルス血清（付記１）を非働化したもので中和したものを試料とし、3.4.2.1を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、１羽分当たり$10^{5.5}EID_{50}$以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、そのウイルス含有量とする。

3.5.7.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

試験品のニューカッスル病ウイルスを、抗ニューカッスル病ウイルス血清（付記２）を非働化したもので中和したものを試料とし、3.4.2.2を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、１羽分当たり$10^{3.0}EID_{50}$以上でなければならない。

3.5.8 マーカー試験

3.1.1.8を準用して試験するとき、適合しなければならない。ニューカッスル病ウイルスのマスターシードウイルスにおいて、マーカー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。

3.5.8.1 試験材料

3.5.8.1.1 試料

試験品の鶏伝染性気管支炎ウイルスを、抗鶏伝染性気管支炎ウイルス血清を非働化したもので中和し、リン酸緩衝食塩液を用いてニューカッスル病ウイルスが0.5mL当たり１羽分及び1/10羽分含まれるように濃度を調整したものを試料とする。

3.5.8.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した９～10日齢の発育鶏卵の胚から得た細胞を細胞増殖用培養液（付記３）で浮遊し、約20cm^{2}以上のシャーレに分注し、培養し、単層となったものを用いる。

3.5.8.2 試験方法

試料0.5mLをそれぞれ２枚以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置した後、重層寒天培地（付記４）を重層し、37℃で４日間培養し、プラック形成能を試験する。

3.5.8.3 判定

培養４日後に細胞を観察するとき、プラックの形成を認めてはならない。

3.5.9 安全試験

3.5.9.1 試験材料

3.5.9.1.1 接種材料

試験品を、リン酸緩衝食塩液を用いてウイルスが0.03mL当たり10羽分含まれるように濃度を調整し、接種材料とする。

3.5.9.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した発育鶏卵由来の４日齢の鶏を用いる。

3.5.9.2 試験方法

試験動物の10羽を試験群、５羽を対照群とする。

接種材料0.03mLずつを試験群に点眼接種し、対照群と共に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。

3.5.9.3 判定

観察期間中、対照群においては臨床的な異常を認めてはならず、試験群においては一過性の呼吸器症状及び結膜の充血を呈することがあっても、その他の異常を認めてはならない。

3.5.10 力価試験

3.5.10.1 ニューカッスル病力価試験

3.5.10.1.1 試験材料

3.5.10.1.1.1 接種材料

試験品をリン酸緩衝食塩液又は適当と認められた溶解用液を用いてウイルスが0.03mL当たり１羽分含まれるように濃度を調整し、接種材料とする。

3.5.10.1.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した発育鶏卵由来の４～５週齢の鶏を用いる。

3.5.10.1.1.3 攻撃ウイルス

強毒ニューカッスル病ウイルス佐藤株で感染させた尿膜腔液であり、約40日齢の鶏の筋肉内に注射し、そのウイルス量を測定するとき、１mL中$10^{6.0}$致死量以上を有するものを用いる。

使用時、リン酸緩衝食塩液を用いて、１mL中$10^{4.0}$致死量となるように濃度を調整する。

3.5.10.1.2 試験方法

試験動物の10羽を試験群、５羽を対照群とする。

試験群に接種材料0.03mLずつを点鼻接種する。２週後に、試験群及び対照群の全てに攻撃ウイルス１mLを筋肉内に注射して攻撃し、２週間観察する。

3.5.10.1.3 判定

試験終了時、試験群は、80％以上が異常なく耐過しなければならない。この場合、対照群は、100

％発病して死亡しなければならない。

3.5.10.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

3.5.10.2.1 試験材料

3.5.10.2.1.1 接種材料

試験品をリン酸緩衝食塩液又は適当と認められた溶解用液を用いてウイルスが0.03mL当たり１羽分含まれるように濃度を調整し、接種材料とする。

3.5.10.2.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した発育鶏卵由来の４日齢の鶏を用いる。

3.5.10.2.1.3 中和試験用ウイルス

製造用株を用いる。ただし、ウイルス量は、ウイルスを感染させた尿膜腔液を、生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した９～10日齢の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$10^{5.0}EID_{50}$以上でなければならない。

3.5.10.2.1.4 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した9～10日齢のものを用いる。

3.5.10.2.2 試験方法

試験動物の10羽を試験群、３羽を対照群とする。

試験群に、接種材料0.03mLを点眼接種し、対照群と共に３～４週間観察する。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。

試験終了時、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。各群の血清は、それぞれ等量をプールし、非働化する。

中和試験用ウイルスを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水を、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分間処理した後、各段階の希釈液ごとに５個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に0.1mLずつ注射し、37℃で７日間培養し、観察する。試験最終日に鶏胚の変化を観察する。

3.5.10.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全、カーリング）を認めたものを感染とみなし、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。

試験群の中和指数は、対照群に対し2.0以上でなければならない。この場合、対照群の中和指数は、ウイルス対照に対し1.0以下でなければならない。

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　細胞増殖用培養液

1,000mL中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95　g
牛血清	50　mL
イーグルMEM	残　量

pHを6.8～7.2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　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	10 mL
ニュートラルレッド	50 mg
寒天	9 g
イーグルMEM	残 量

pHを6.8～7.2に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記３　抗鶏伝染性気管支炎ウイルス血清

製造用株で免疫した生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した発育鶏卵由来の鶏又は哺乳動物の血清であって、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　抗ニューカッスル病ウイルス血清

製造用株で免疫した生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した発育鶏卵由来の鶏又は哺乳動物の血清であって、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。

さけ科魚類ビブリオ病２価不活化ワクチン（シード）

令和２年12月11日（告示第2406号）新規追加

1 定義

シードロット規格に適合したビブリオ属菌sp. J-O-1型菌及びビブリオ・アングイラルムJ-O-3型菌の培養菌液を不活化したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 ビブリオ属菌sp.

2.1.1.1 名称

ビブリオ属菌sp. J-O-1型菌VA1669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-1型に一致する性状を示し、J-O-1型ビブリオ病に対する免疫原性を有する。

2.1.1.3 マスターシード菌

2.1.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

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

分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－70℃以下で保存する。

マスターシード菌について、3.1.1の試験を行う。

マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシード菌から小分製品までの最高継代数は、10代以内でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その継代数とする。

2.1.1.4 ワーキングシード菌

2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、適当と認められた培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結して－70℃以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。

2.1.1.5 プロダクションシード菌

2.1.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、適当と認められた培地で増殖する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して－70℃以下で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合について、3.1.3の試験を行う。

2.1.2 ビブリオ・アングイラルム

2.1.2.1 名称

ビブリオ・アングイラルムJ-O-3型菌VA775株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 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。

2.1.2.3 マスターシード菌

2.1.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

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

分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－70℃以下で保存する。

マスターシード菌について、3.1.1の試験を行う。

マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシード菌から小分製品までの最高継代数は、10代以内でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その継代数とする。

2.1.2.4 ワーキングシード菌

2.1.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、適当と認められた培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結して－70℃以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。

2.1.2.5 プロダクションシード菌

2.1.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、適当と認められた培地で増殖する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結乾燥して５℃以下で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合について、3.1.3の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 培地

製造用培地（付記１）又は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

培養したワーキングシード菌又はプロダクションシード菌をそれぞれの培地に接種し、これを更に培地に接種して培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2の試験を行う。

2.3.2 不活化

それぞれの培養菌液にホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加えて不活化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

それぞれの原液を混合したものを、最終バルクとする。

2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注して、小分製品とする。

小分製品について、3.4の試験を行う。

3 試験法

3.1 製造用株の試験

3.1.1 マスターシード菌の試験

3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.4.1.1を準用して試験を実施するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 夾雑菌否定試験

3.1.1.2.1 培地

0.5w/v%塩化ナトリウム加ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト寒天培地（付記２）を用いる。

3.1.1.2.2 試験方法

検体0.2mLずつを培地10本以上に接種し、そのうち５本以上については22℃で、残り５本以上については37℃で７日間以上培養する。

3.1.1.2.3 判定

ビブリオ属菌sp.又はビブリオ・アングイラルム以外の菌の発育を認めてはならない。

3.1.2 ワーキングシード菌の試験

3.1.2.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.3 プロダクションシードの試験

3.1.3.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2 培養菌液の試験

3.2.1 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、ビブリオ属菌以外の菌の発育を認めてはならない。

3.2.2 生菌数試験

3.2.2.1 試験材料

3.2.2.1.1 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。

3.2.2.1.2 培地

継代用培地（付記３）又は0.5w/v%塩化ナトリウム加ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト寒天培地を用いる。

3.2.2.2 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、25℃で24時間以上培養後、生じた集落数を数える。

3.2.2.3 判定

各段階の希釈液ごとの集落数の平均値、希釈倍数及び培地への接種量から生菌数を算出する。

検体の生菌数は、１mL中10^9CFU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 不活化試験

3.3.2.1 試験材料

3.3.2.1.1 試料

検体を試料とする。

3.3.2.1.2 培地

3.2.2.1.2の培地又は適当と認められた培地を用いる。

3.3.2.2 試験方法

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、25℃で７日間以上培養後、集落の有無を観察する。

3.3.2.3 判定

接種した全ての培地平板に集落を認めてはならない。

3.3.3 型別試験

3.3.3.1 試験材料

3.3.3.1.1 試料

検体10mLを約2,000*G*で30分間遠心した沈殿を試料とする。

3.3.3.1.2 抗血清

抗ビブリオ属菌sp.J-O-1型血清（付記４）及び抗ビブリオ・アングイラルム J-O-3型血清（付記５）を用いる。

3.3.3.2 試験方法

試料１白金耳ずつとそれぞれの抗血清0.03mLとを各々スライドグラス上で混合し、急速凝集反応を行う。

3.3.3.3 判定

検体は、同じ血清型の抗血清では速やかに凝集し、異なる血清型の抗血清では凝集してはならない。

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、固有の色調を有する均等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

ホルマリン添加製剤については、一般試験法のホルマリン定量法を準用して試験するとき、ホルマリンの含有量は、0.3vol%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

試験品を飼育水で10倍に希釈したものを接種材料とする。

3.4.4.1.2 試験動物

体重２～50gのにじますを用いる。

3.4.4.2 試験方法

試験動物は24時間以上餌止めした後、１群120尾以上ずつの２群に分ける。接種材料1,000mL当たり、試験動物の総体重500g以下となる割合で１群の試験動物を通気しながら２分間浸漬し、試験群とする。他の１群は対照群とし、試験群と同様の操作で飼育水に浸漬させる。その後それぞれ水温12～18℃、流水式で飼育し、21日間観察する。

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 試験動物

3.4.4の試験に用いた動物を用いる。

3.4.5.1.2 攻撃用菌液

ビブリオ属菌sp. J-O-1型強毒菌（付記６）及びビブリオ・アングイラルムJ-O-3型強毒菌（付記７）の液体培養菌液を１w/v%塩化ナトリウム加飼育水で10倍階段希釈し、対照群の死亡率が80%と予測される希釈とその前後の希釈の３段階の希釈菌液を攻撃用菌液とする。

なお、攻撃用菌液量は、菌浴する試験動物の総体重の５～20倍とする。

3.4.5.2 試験方法

3.4.4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をそれぞれ20尾以上の６群ずつに分ける。各３群ずつをビブリオ属菌sp.の攻撃用菌液に、他の各３群ずつをビブリオ・アングイラルムの攻撃用菌液に、それぞれ通気しながら20分間浸漬し、14日間観察して各群の生死を調べる。

3.4.5.3 判定

それぞれの攻撃菌により、それぞれの対照群の60%以上が死亡した最少の攻撃菌量で攻撃した場合に、試験群の生残率が対照群のそれより40%以上高い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、２年３か月間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その期間とする。

付記１　製造用培地

1,000 mL中

カゼイン製ペプトン	10.0 g
酵母エキス	5.0 g
ブドウ糖	2.5 g
塩化ナトリウム	10.0 g
水	残　量

pHを7.4～7.6に調整して、高圧滅菌する。

付記２　0.5w/v%塩化ナトリウム加ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト寒天培地

1,000mL中

カゼイン製ペプトン	15.0 g
大豆製ペプトン	5.0 g
塩化ナトリウム	10.0 g
寒天	15.0 g
水	残　量

pHを7.1～7.5に調整して、高圧滅菌する。

付記３　継代用培地

1,000 mL中

カゼイン製ペプトン	10.0 g
酵母エキス	5.0 g
ブドウ糖	2.5 g
塩化ナトリウム	10.0 g
寒天	15.0 g
水	残 量

pHを7.4～7.6に調整して、高圧滅菌する。

付記４　抗ビブリオ属菌sp.J-O-1型血清

ビブリオ属菌sp.J-O-1型菌で免疫した兎の血清で、ビブリオ属菌sp. J-O-1型菌を特異的に凝集するもの

付記５ 抗ビブリオ・アングイラルムJ-O-3型血清

ビブリオ・アングイラルムJ-O-3型菌で免疫した兎の血清で、ビブリオ・アングイラルムJ-O-3型菌を特異的に凝集するもの

付記６　ビブリオ属菌sp.J-O-1型強毒菌

ビブリオ属菌sp.J-O-1型菌N-7802株又はこれと同等以上の毒力を有する株

付記７　ビブリオ・アングイラルムJ-O-3型強毒菌

ビブリオ・アングイラルムJ-O-3型菌NCMB571株又はこれと同等以上の毒力を有する株

ぶりビブリオ病・α溶血性レンサ球菌症・類結節症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

令和２年12月11日（告示第2406号）新規追加

1 定義

シードロット規格に適合したビブリオ・アングイラルムJ-O-3型菌、ラクトコッカス・ガルビエ及びフォトバクテリウム・ダムセラ・サブスピーシーズ・ピシシダの培養菌液を不活化後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。

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Ft 257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型菌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 マスターシード菌

2.1.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

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

分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－50℃以下で保存する。

マスターシード菌について、3.1.1の試験を行う。

マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシード菌から小分製品までの最高継代数は、10代以内でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その継代数とする。

2.1.1.4 ワーキングシード菌

2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、適当と認められた培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結して－50℃以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。

2.1.1.5 プロダクションシード菌

2.1.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、継代用培地又は適当と認められた培地で増殖する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して－50℃以下で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合について、3.1.3の試験を行う。

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INS 050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 マスターシード菌

2.1.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

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

分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－50℃以下で保存する。

マスターシード菌について、3.1.1の試験を行う。

マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシード菌から小分製品までの最高継代数は、10代以内でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その継代数とする。

2.1.2.4 ワーキングシード菌

2.1.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、適当と認められた培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結して－50℃以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。

2.1.2.5 プロダクションシード菌

2.1.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、継代用培地又は適当と認められた培地で増殖する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して－50℃以下で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合について、3.1.3の試験を行う。

2.1.3 フォトバクテリウム・ダムセラ・サブスピーシーズ・ピシシダ

2.1.3.1 名称

フォトバクテリウム・ダムセラ・サブスピーシーズ・ピシシダPp 66株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

フォトバクテリウム・ダムセラ・サブスピーシーズ・ピシシダに一致する性状を示し、類結節症に対する免疫原性を有する。

2.1.3.3 マスターシード菌

2.1.3.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

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

分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－50℃以下で保存する。

マスターシード菌について、3.1.1の試験を行う。

マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシード菌から小分製品までの最高継代数は、10代以内でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その継代数とする。

2.1.3.4 ワーキングシード菌

2.1.3.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、適当と認められた培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結して－50℃以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。

2.1.3.5 プロダクションシード菌

2.1.3.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、継代用培地又は適当と認められた培地で増殖する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して－50℃以下で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合について、3.1.3の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 ビブリオ・アングイラルム

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 ラクトコッカス・ガルビエ

2.2.2.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.2.3 フォトバクテリウム・ダムセラ・サブスピーシーズ・ピシシダ

2.2.3.1 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

2.3.1.1 培養

プロダクションシード菌を培地に接種し、これを更に培地に接種して培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2の試験を行う。

2.3.1.2 不活化

培養菌液にホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加えて不活化したものを、適当と認められた方法で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。

2.3.2 ラクトコッカス・ガルビエ

2.3.2.1 培養

ワーキングシード菌又はプロダクションシード菌を培地に接種し、これを更に培地に接種して培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2の試験を行う。

2.3.2.2 不活化

培養菌液にホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加えて不活化したものを原液とする。

原液について、3.3の試験を行う。

2.3.3 フォトバクテリウム・ダムセラ・サブスピーシーズ・ピシシダ

2.3.3.1 培養

プロダクションシード菌を培地に接種し、これを更に培地に接種して培養したものを培養菌

液とする。

培養菌液について、3.2の試験を行う。

2.3.3.2 不活化

培養菌液にホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加えて不活化したものを、適当と認められた方法で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

原液及び適当と認められた希釈用液を混合し、適当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。

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 製造用株の試験

3.1.1 マスターシード菌の試験

3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.4.1.1を準用して試験を実施するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 夾雑菌否定試験

3.1.1.2.1 試験方法

マスターシード菌をグラム染色し、鏡検する。

3.1.1.2.2 判定

それぞれの菌に特徴的な形態を示し、他の菌を認めてはならない。

3.1.2 ワーキングシード菌の試験

3.1.2.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.3 プロダクションシードの試験

3.1.3.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2 培養菌液の試験

3.2.1 夾雑菌否定試験

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

1.0w/v%塩化ナトリウム加ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト寒天培地又は適当と認められた培地を用いる。

3.2.1.2 試験方法

それぞれの試料0.1mLずつを培地に接種し、それぞれの培養温度で24時間培養し、観察する。

3.2.1.3 判定

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

ならず、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ず、フォトバクテリウム・ダムセラ・サブスピーシーズ・ピシシダの検体は、フォトバクテリウム・ダムセラ・サブスピーシーズ・ピシシダ以外の菌の発育を認めてはならない。

3.3 原液の試験

3.3.1 不活化試験

3.3.1.1 試験材料

3.3.1.1.1 試料

検体を試料とする。

3.3.1.1.2 培地

それぞれの製造に用いた培地又は適当と認められた培地を用いる。

3.3.1.2 試験方法

試料１mLを培地100mLに接種し、それぞれの培養温度で72時間培養後、菌の発育を観察する。

3.3.1.3 判定

検体に菌の発育を認めてはならない。

3.3.2 総菌数試験

3.3.2.1 試験材料

3.3.2.1.1 試料

検体を試料とする。

3.3.2.2 試験方法

菌数計算盤を用いて、顕微鏡下で菌数を数える。

3.3.2.3 判定

検体の総菌数は、１mL中2.5×10^{9}個より多くなければならない。

3.3.3 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 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懸濁液でなければならず、異物及び異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.4.2 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

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、0.15vol%以下でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その含有量とする。

3.4.4 アジュバント定量試験

3.4.4.1 脂質定量試験

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、試料の全量を、乾燥させた活性アルミナを充てんしたガラスカラムに吸着させた後、ｎ－ヘキサンで洗浄する。ｎ－ヘキサンを除去後、残留分の質量から脂質含有量を求めるとき、脂質の含有量は61.5～68.0%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、その含有量とする。

3.4.4.2 乳化剤定量試験

日本薬局方一般試験法の水分測定法を準用して試験品の水分量を求め、水分量及び脂質含有量と試験品量との差から乳化剤含有量を求めるとき、乳化剤の含有量は2.0～8.5％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、その含有量とする。

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22℃、循環式で７日間以上飼育し、異常のないことを確認した体重30～100gのぶり又はかんぱち110尾以上を用いる。

3.4.5.2 試験方法

試験動物は、24時間以上餌止めした後、１群55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22℃、循環式で飼育し、21日間観察する。試験最終日に試験群及び対照群からそれぞれ10尾取り上げ、注射部位を剖検する。

3.4.5.3 判定

観察期間中、対照群においては臨床的な異常を認めてはならず、試験群においては、一過性の摂餌不良を認めることはあっても、その他の臨床的な異常を認めてはならない。また、剖検したときに、注射局所に著しい異常を認めてはならない。

3.4.6 力価試験

3.4.6.1ビブリオ病力価試験

3.4.6.1.1 試験材料

3.4.6.1.1.1 試験動物

3.4.5の試験に用いた動物を用いる。

3.4.6.1.1.2 攻撃用菌液

ビブリオ・アングイラルムJ-O-3　型強毒菌（付記１）の培養菌液を1.5w/v％塩化ナトリウム液で希釈し、対照群の死亡率が80％と予測される希釈菌液を攻撃用菌液とする。

3.4.6.1.2 試験方法

3.4.5の試験最終日の前日から24時間以上餌止めした試験群及び対照群それぞれ15尾以上の腹腔内に、攻撃用菌液を0.1mLずつ注射して攻撃する。攻撃した後、飼育水温25℃で14日間飼育観察して各群の生死を調べる。

3.4.6.1.3 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。

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２）の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 %と予測される希釈菌液を攻撃用菌液とする。

3.4.6.2.2 試験方法

3.4.5の試験最終日の前日から24時間以上餌止めした試験群及び対照群それぞれ15尾以上の腹腔内に、攻撃用菌液を0.1mLずつ注射して攻撃する。攻撃した後、飼育水温25℃で14日間飼育観察して各群の生死を調べる。

3.4.6.2.3 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。

3.4.6.3 類結節症力価試験

3.4.6.3.1 試験材料

3.4.6.3.1.1 試験動物

3.4.5 の試験に用いた動物を用いる。

3.4.6.3.1.2 攻撃用菌液

フォトバクテリウム・ダムセラ・サブスピーシーズ・ピシシダ強毒菌（付記３）の培養菌液を1.5w/v%塩化ナトリウム液で希釈し、対照群の死亡率が80%と予測される希釈菌液を攻撃用菌液とする。

3.4.6.3.2 試験方法

3.4.5の試験最終日の前日から24 時間以上餌止めした試験群及び対照群それぞれ15 尾以上の腹腔内に、攻撃用菌液を0.1mLずつ注射して攻撃する。攻撃した後、飼育水温25℃で14日間飼育観察して各群の生死を調べる。

3.4.6.3.3 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、製造後４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には、その期間とする。

付記１　ビブリオ・アングイラルムJ-O-3 型強毒菌

ビブリオ・アングイラルムINS222株又はこれと同等以上の毒力を有する株

付記２　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

付記３　フォトバクテリウム・ダムセラ・サブスピーシーズ・ピシシダ強毒菌

フォトバクテリウム・ダムセラ・サブスピーシーズ・ピシシダINS197株又はこれと同等以上の毒力を有する株