

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

平成 20 年 6 月 6 日(告示第 9 1 3 号) 新規追加  
平成 29 年 1 月 19 日(告示第 8 9 号) 一部改正  
平成 29 年 10 月 11 日(告示第 1539 号) 一部改正

## 1 定義

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

## 2 製法

### 2.1 製造用株

#### 2.1.1 ジステンパーウイルス株

##### 2.1.1.1 名称

弱毒ジステンパーウイルスオンダーステポート株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.1.2 性状

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

##### 2.1.1.3 継代及び保存

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

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

原株及び原種ウイルスは、凍結して -70℃以下又は凍結乾燥して 5℃以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

#### 2.1.2 犬アデノウイルス（2型）株

##### 2.1.2.1 名称

弱毒犬アデノウイルス（2型）V-197 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.2.2 性状

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

##### 2.1.2.3 継代及び保存

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

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

原株及び原種ウイルスは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

## 2.1.3 犬パラインフルエンザウイルス株

### 2.1.3.1 名称

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

### 2.1.3.2 性状

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

### 2.1.3.3 継代及び保存

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

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

原株及び原種ウイルスは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

## 2.1.4 犬パルボウイルス株

### 2.1.4.1 名称

弱毒犬パルボウイルス K-3ip69 株又は製造に適当と認められた株

### 2.1.4.2 性状

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

### 2.1.4.3 継代及び保存

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

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

原株及び原種ウイルスは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

## 2.1.5 犬コロナウイルス株

### 2.1.5.1 名称

犬コロナウイルス TN-449 株又はこれと同等と認められた株

### 2.1.5.2 性状

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

### 2.1.5.3 継代及び保存

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

原種ウイルスは、直接原株から連続した工程により製造し、その継代数は3代以内でなければならない。種ウイルスは、原種ウイルスから2代以内に製造しなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その継代数以内とする。

原株及び原種ウイルスは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。ただし、

農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

## 2.2 製造用材料

### 2.2.1 ジステンパーウイルス

#### 2.2.1.1 培養細胞

Vero 細胞又は製造に相当と認められた培養細胞を用いる。

#### 2.2.1.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

### 2.2.2 犬アデノウイルス（2型）

#### 2.2.2.1 培養細胞

犬腎継代細胞又は製造に相当と認められた培養細胞を用いる。

#### 2.2.2.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

### 2.2.3 犬パラインフルエンザウイルス

#### 2.2.3.1 培養細胞

犬腎継代細胞又は製造に相当と認められた培養細胞を用いる。

#### 2.2.3.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

### 2.2.4 犬パルボウイルス

#### 2.2.4.1 培養細胞

猫腎継代細胞又は製造に相当と認められた培養細胞を用いる。

#### 2.2.4.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

### 2.2.5 犬コロナウイルス

#### 2.2.5.1 培養細胞

猫腎継代細胞又は製造に相当と認められた培養細胞を用いる。

#### 2.2.5.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

## 2.3 原液

### 2.3.1 ジステンパーウイルス原液

#### 2.3.1.1 細胞の培養

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

#### 2.3.1.2 ウイルスの培養

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

原液について、3.2.1、3.2.2 及び 3.2.3.1 の試験を行う。

### 2.3.2 犬アデノウイルス（2型）原液

#### 2.3.2.1 細胞の培養

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

#### 2.3.2.2 ウイルスの培養

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

原液について、3.2.1、3.2.2 及び 3.2.3.2 の試験を行う。

### 2.3.3 犬パラインフルエンザウイルス原液

#### 2.3.3.1 細胞の培養

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

#### 2.3.3.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルス増殖の極期に感染材料を採取し原液とする。原液について、3.2.1、3.2.2 及び 3.2.3.3 の試験を行う。

#### 2.3.4 犬パルボウイルス原液

##### 2.3.4.1 細胞の培養

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

##### 2.3.4.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルス増殖の極期に感染材料を採取し原液とする。原液について、3.2.1、3.2.2 及び 3.2.3.4 の試験を行う。

#### 2.3.5 犬コロナウイルス原液

##### 2.3.5.1 細胞の培養

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

##### 2.3.5.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルス増殖の極期に感染材料を採取しウイルス浮遊液とする。ウイルス浮遊液について、3.2.1、3.2.2 及び 3.2.3.5 の試験を行う。

##### 2.3.5.3 不活化

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

不活化ウイルス浮遊液について、3.2.4 の試験を行う。

##### 2.3.5.4 原液の調整

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

原液について、3.2.1 の試験を行う。

#### 2.4 最終バルク

##### 2.4.1 混合生ワクチン

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

##### 2.4.2 液状不活化ワクチン

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

#### 2.5 小分製品

##### 2.5.1 混合生ワクチン

最終バルクを小分容器に分注し、凍結乾燥し、小分製品とする。小分製品について、3.3 の試験を行う。

##### 2.5.2 液状不活化ワクチン

最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。

小分製品について、3.3 の試験を行う。

### 3 試験法

#### 3.1 培養細胞の試験

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

製造に継代細胞を用いている場合は、3.1.3 の試験を実施しなくてもよい。

### 3.1.1 培養観察

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

### 3.1.2 赤血球吸着試験

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

### 3.1.3 封入体染色試験

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

## 3.2 原液の試験

### 3.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.2.2 マイコプラズマ否定試験

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

### 3.2.3 ウイルス含有量試験

#### 3.2.3.1 ジステンパーウイルス含有量試験

##### 3.2.3.1.1 試験材料

##### 3.2.3.1.1.1 試料

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

##### 3.2.3.1.1.2 培養細胞

Vero細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

##### 3.2.3.1.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4本(穴)以上の培養細胞に接種し、37℃で7～8日間培養し、観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

##### 3.2.3.1.3 判定

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

検体のウイルス含有量は、1 mL中10<sup>4.8</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、そのウイルス含有量とする。

#### 3.2.3.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験

##### 3.2.3.2.1 試験材料

##### 3.2.3.2.1.1 試料

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

##### 3.2.3.2.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

##### 3.2.3.2.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4本(穴)以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間培養し、観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

##### 3.2.3.2.3 判定

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

検体のウイルス含有量は、1 mL中10<sup>7.3</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。ただし、農林水産大臣

が特に認めた場合には、そのウイルス含有量とする。

### 3.2.3.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

#### 3.2.3.3.1 試験材料

##### 3.2.3.3.1.1 試料

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

##### 3.2.3.3.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

#### 3.2.3.3.2 試験方法

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

#### 3.2.3.3.3 判定

培養液に赤血球の凝集を認めたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub>を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10<sup>6.3</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、そのウイルス含有量とする。

### 3.2.3.4 犬パルボウイルス含有量試験

#### 3.2.3.4.1 試験材料

##### 3.2.3.4.1.1 試料

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

##### 3.2.3.4.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

#### 3.2.3.4.2 試験方法

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

#### 3.2.3.4.3 判定

培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub>を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10<sup>5.7</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、そのウイルス含有量とする。

### 3.2.3.5 犬コロナウイルス抗原量測定試験

#### 3.2.3.5.1 試験材料

検体、参照品、抗犬コロナウイルスモノクローナル抗体、抗犬コロナウイルス兎抗体、アルカリフォスファターゼ標識抗兎 IgG、*p*-ニトロフェニルリン酸基質液を用いる。

#### 3.2.3.5.2 試験方法

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

ウム溶液を加えて反応を停止する。主波長 405nm、副波長 490nm で吸光度を測定する。

#### 3.2.3.5.3 判定

参照品に対する検体の相対抗原量を算出するとき、500RU/mL 以上でなければならない。

### 3.2.4 不活化試験

#### 3.2.4.1 犬コロナウイルス不活化試験

##### 3.2.4.1.1 試験材料

###### 3.2.4.1.1.1 試料

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

###### 3.2.4.1.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

###### 3.2.4.1.2 試験方法

試料を 25cm<sup>2</sup> 以上の培養細胞 2 本に 1 mL ずつ接種し、37℃で 60 分間吸着した後、リン酸緩衝食塩液で細胞面を洗浄する。ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で 5 日間培養後、接種した培養細胞を継代し、更に 37℃で 7 日間培養し、観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

###### 3.2.4.1.3 判定

培養細胞に CPE を認めてはならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その判定方法とする。

### 3.3 小分製品の試験

#### 3.3.1 特性試験

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

#### 3.3.2 pH 測定試験

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

#### 3.3.3 真空度試験

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

#### 3.3.4 含湿度試験

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

#### 3.3.5 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.3.6 マイコプラズマ否定試験

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

#### 3.3.7 迷入ウイルス否定試験

液状不活化ワクチンと同量の滅菌水で混合生ワクチンを溶解したのものについて、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1、2.5.1、2.6.1 及び 2.8.2 を準用して試験するとき、混合生ワクチンは、適合しなければならない。ただし、中和用抗血清は、抗ジステンパーウイルス血清（付記 4）、抗

犬アデノウイルス（2型）血清（付記5）、抗犬パラインフルエンザウイルス血清（付記6）及び抗犬パルボウイルス血清（付記7）を、それぞれ非働化したものを用いる。

### 3.3.8 ウイルス含有量試験

#### 3.3.8.1 ジステンパーウイルス含有量試験

##### 3.3.8.1.1 試験材料

###### 3.3.8.1.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量の滅菌水で溶解する。試験品中のジステンパーウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記5、6及び7）を非働化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液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。

###### 3.3.8.1.1.2 培養細胞

Vero細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

###### 3.3.8.1.2 試験方法

試料0.1mLずつを4本(穴)以上の培養細胞に接種し、37℃で7～8日間培養し、観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

###### 3.3.8.1.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub>を算出する。試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10<sup>3.5</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、そのウイルス含有量とする。

#### 3.3.8.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験

##### 3.3.8.2.1 試験材料

###### 3.3.8.2.1.1 試料

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

###### 3.3.8.2.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

###### 3.3.8.2.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4本(穴)以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間培養し、観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

###### 3.3.8.2.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub>を算出する。試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10<sup>5.0</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、そのウイルス含有量とする。

#### 3.3.8.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

##### 3.3.8.3.1 試験材料

###### 3.3.8.3.1.1 試料

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

###### 3.3.8.3.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

###### 3.3.8.3.2 試験方法

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



### 3.3.8.3.3 判定

培養液に赤血球の凝集を認めたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub> を算出する。試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たり 10<sup>5.0</sup>TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、そのウイルス含有量とする。

### 3.3.8.4 犬パルボウイルス含有量試験

#### 3.3.8.4.1 試験材料

##### 3.3.8.4.1.1 試料

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

##### 3.3.8.4.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

#### 3.3.8.4.2 試験方法

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

#### 3.3.8.4.3 判定

培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub> を算出する。試験品のウイルス含有量は、1 mL 中 10<sup>5.0</sup>TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、そのウイルス含有量とする。

### 3.3.9 チメロサル定量試験

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

### 3.3.10 アルミニウム定量試験

一般試験法のアルミニウム定量法を準用して試験するとき、液状不活化ワクチンのアルミニウム含有量は、1 mL 中固有の値以下でなければならない。

### 3.3.11 異常毒性否定試験

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

### 3.3.12 安全試験

#### 3.3.12.1 試験材料

##### 3.3.12.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.3.12.1.2 試験動物

6か月齢未満の犬を用いる。

#### 3.3.12.2 試験方法

試験動物3頭を試験群、2頭を対照群とする。試験群に注射材料1頭分ずつを用法に従って2回注射し、対照群と共に6週間観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その期間とする。

#### 3.3.12.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に異常を認めてはならない。

### 3.3.13 力価試験

#### 3.3.13.1 ジステンパー力価試験

##### 3.3.13.1.1 試験材料

#### 3.3.13.1.1.1 試験動物

3.3.12 の試験に用いた犬を用いる。

#### 3.3.13.1.1.2 中和試験用ウイルス

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

#### 3.3.13.1.1.3 培養細胞

適当と認められた培養細胞を用いる。

#### 3.3.13.1.2 試験方法

3.3.12 の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。各プール血清を非働化し、ウイルス増殖用培養液又は適当と認められた希釈液で5倍階段希釈する。各希釈血清と 0.1mL 中約 200TCID<sub>50</sub> の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、4℃で一夜又は 37℃で 60 分間処理する。この各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本(穴)以上の培養細胞に接種し、37℃で 7～8 日間培養し、観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

#### 3.3.13.1.3 判定

細胞を観察し、CPE を阻止したものを陽性とし、中和抗体価を ED<sub>50</sub> で求める。試験群の中和抗体価は、40 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、10 倍未満でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その中和抗体価とする。

#### 3.3.13.2 犬アデノウイルス（2型）感染症力価試験

##### 3.3.13.2.1 試験材料

###### 3.3.13.2.1.1 試験動物

3.3.12 の試験に用いた犬を用いる。

###### 3.3.13.2.1.2 中和試験用ウイルス

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

###### 3.3.13.2.1.3 培養細胞

犬腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

##### 3.3.13.2.2 試験方法

3.3.12 の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、ウイルス増殖用培養液又は適当と認められた希釈液で 2 又は 5 倍階段希釈する。各希釈血清と 0.1mL 中約 200TCID<sub>50</sub> の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、37℃で 60 分間処理する。この各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本(穴)以上の培養細胞に接種し、37℃で 7 日間培養し、観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

##### 3.3.13.2.3 判定

培養細胞の CPE を阻止したものを陽性とし、中和抗体価を ED<sub>50</sub> で求める。

試験群の中和抗体価は、32 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、2 倍未満でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その中和抗体価とする。

#### 3.3.13.3 犬パラインフルエンザ力価試験

##### 3.3.13.3.1 試験材料

###### 3.3.13.3.1.1 試験動物

3.3.12 の試験に用いた犬を用いる。

###### 3.3.13.3.1.2 中和試験用ウイルス

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

###### 3.3.13.3.1.3 培養細胞

犬腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

##### 3.3.13.3.2 試験方法

3.3.12 の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、ウイルス増殖用培養液又は適当と認められた希釈液で2倍階段希釈する。各希釈血清と0.1mL 中約 200TCID<sub>50</sub> の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、37℃で60分間処理する。この各混合液0.1mL ずつをそれぞれ4本(穴)以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間培養する。培養後、培養液を採取し、これに等量の0.4vol %モルモット赤血球浮遊液を等量加え、常温で90分間静置し、観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

#### 3.3.13.3.3 判定

培養液の赤血球凝集を阻止したものを陽性とし、中和抗体価をED<sub>50</sub>で求める。試験群の中和抗体価は、4倍以上でなければならない。この場合、対照群では、2倍未満でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その中和抗体価とする。

#### 3.3.13.4 犬パルボウイルス感染症力価試験

##### 3.3.13.4.1 試験材料

##### 3.3.13.4.1.1 試験動物

3.3.12 の試験に用いた犬を用いる。

##### 3.3.13.4.1.2 赤血球凝集抗原

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

##### 3.3.13.4.2 試験方法

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

##### 3.3.13.4.3 判定

赤血球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、64倍以上でなければならない。この場合、対照群では、8倍未満でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その抗体価とする。

#### 3.3.13.5 犬コロナウイルス感染症力価試験

##### 3.3.13.5.1 試験材料

##### 3.3.13.5.1.1 注射材料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンで溶解した試験品を注射材料とする。

##### 3.3.13.5.1.2 試験動物

体重約300gのモルモットを用いる。

##### 3.3.13.5.1.3 中和試験用ウイルス

適当と認められた犬コロナウイルス株を用いる。

##### 3.3.13.5.1.4 培養細胞

猫全胎子継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

##### 3.3.13.5.2 試験方法

試験動物5匹を試験群、2匹を対照群とする。注射材料1 mL ずつを試験群の筋肉内に21日間隔で2回注射する。2回目注射後7日目の血清について中和試験を行う。非働化した被検血清をウイルス増殖用培養液で2倍階段希釈する。各希釈血清と0.05mL 中約 200TCID<sub>50</sub> の中和試験用ウイルス液を等量混合し、37℃で60分間処理する。この各混合液0.05mL ずつをそれぞれ4本(穴)以上の培養細胞浮遊液に接種し、37℃で6日間培養し、観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

### 3.3.13.5.3 判定

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

試験群の抗体価は、80 %以上が8倍以上でなければならない。この場合、対照群では、2倍未満でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その中和抗体価とする。

### 4 貯法及び有効期間

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

#### 付記1 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中

牛血清 10 ~ 20 mL

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

イーグル MEM 残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 7.6 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 牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液

1,000mL 中

塩化ナトリウム 7.01 g

ホウ酸 3.09 g

水酸化ナトリウム 0.96 g

水 残 量

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

#### 付記3 VAD6.0液

1,000mL 中

塩化ナトリウム 8.77 g

リン酸水素二ナトリウム 5.68 g

リン酸二水素ナトリウム(二水和物) 40.56 g

水 残 量

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

#### 付記4 抗ジステンパーウイルス血清

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

#### 付記5 抗犬アデノウイルス(2型)血清

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

#### 付記6 抗犬パラインフルエンザウイルス血清

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

付記7 抗犬パルボウイルス血清

犬パルボウイルスで免疫した兎又はモルモットの血清で、試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記8 RDE

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