

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

1 定義

弱毒ジステンパーウイルス、弱毒犬アデノウイルス（2型）、弱毒犬パラインフルエンザウイルス及び弱毒犬パルボウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液の混合液を凍結乾燥したワクチン（以下「4種混合生ワクチン」という。）と、レプトスピラ・カニコラ及びレプトスピラ・イクテロヘモラジエの全培養菌液を不活化したワクチン（以下「液状不活化ワクチン」という。）とを組み合わせたワクチン、又は弱毒ジステンパーウイルス、弱毒犬アデノウイルス（2型）及び弱毒犬パラインフルエンザ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「3種混合生ワクチン」という。）と、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にレプトスピラ・カニコラ及びレプトスピラ・イクテロヘモラジエの全培養菌液を不活化したものを加えたワクチン（以下「液状混合ワクチン」という。）とを組み合わせたワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 ジステンパーウイルス株

2.1.1.1 名称

弱毒ジステンパーウイルススナイダー・ヒル株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

犬腎培養細胞に接種すると CPE を示して増殖するが、発育鶏卵の漿尿膜上に接種すると病変を示さない。犬に注射しても病原性を示さない。

2.1.1.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、適当と認められた培養細胞で継代する。

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

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

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.2 犬アデノウイルス（2型）株

2.1.2.1 名称

弱毒犬アデノウイルス2型マンハッタン株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

犬腎培養細胞に CPE を伴って増殖する。犬に注射しても病原性を示さない。

2.1.2.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、適当と認められた培養細胞で継代する。

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

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

特に承認されたものは、その保存温度とする。

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.1.3 犬パラインフルエンザウイルス株

2.1.1.3.1 名称

弱毒犬パラインフルエンザウイルス NL-CPI-5 株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.3.2 性状

犬腎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。犬に注射しても病原性を示さない。

2.1.1.3.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、適当と認められた培養細胞で継代する。

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

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

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.4 犬パルボウイルス

2.1.4.1 名称

弱毒犬パルボウイルス NL-35-D-LP 株又はこれと同等と認められた株

2.1.4.2 性状

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

2.1.4.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、適当と認められた培養細胞で継代する。

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

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

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.5 レプトスピラ・カニコーラ株

2.1.5.1 名称

レプトスピラ・カニコーラ（以下「L・カニコーラ」という。）C-51 株又はこれと同等と認められた株

2.1.5.2 性状

モルモット及びハムスターの腹腔内に注射すると増殖する。

抗L・カニコーラ血清（付記1）に対して特異的に凝集する。

2.1.5.3 継代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株及び種株とも特に承認された継代数以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して - 70 以下で保存する。

2.1.6 レプトスピラ・イクテロヘモラジー株

2.1.6.1 名称

レプトスピラ・イクテロヘモラジー（以下「L・イクテロヘモラジー」という。）NADL11403株又はこれと同等と認められた株

2.1.6.2 性状

モルモット及びハムスターの腹腔内に注射すると増殖する。

抗L・イクテロヘモラジー血清（付記2）に対して特異的に凝集する。

2.1.6.3 継代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株及び種株とも特に承認された継代数以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して - 70 以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 ジステンパーウイルス

2.2.1.1 培養細胞

犬腎継代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.1.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.2 犬アデノウイルス（2型）

2.2.2.1 培養細胞

犬腎継代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.3 犬パラインフルエンザウイルス

2.2.3.1 培養細胞

犬腎継代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.3.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.4 犬バルボウイルス

2.2.4.1 培養細胞

犬腎継代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.4.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.5 L・カニコーラ

2.2.5.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.2.6 L・イクテロヘモラジー

2.2.6.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 ジステンパーウイルス原液

2.3.1.1 細胞の培養

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

個体別培養細胞について、3.1の試験を行う。

2.3.1.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルス増殖の極期に採取した感染材料、そ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 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採取した感染材料、そ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。

2.3.3 犬パラインフルエンザウイルス原液

2.3.3.1 細胞の培養

1 回に処理し、培養した細胞を個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採取した感染材料、そ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 3.3.2.3 の試験を行う。

2.3.4 犬パルボウイルス原液

2.3.4.1 細胞の培養

1 回に処理し、培養した細胞を個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採取した感染材料、そ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 3.3.2.4 の試験を行う。

2.3.5 L・カニコーラ原液

2.3.5.1 菌液

種菌を培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2 の試験を行う。

2.3.5.2 不活化

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

原液について、3.3 の試験を行う。

2.3.6 L・イクテロヘモラジー原液

2.3.6.1 菌液

種菌を培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2 の試験を行う。

2.3.6.2 不活化

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

原液について、3.3.1 及び 3.3.3 の試験を行う。

2.4 最終バルク

2.4.1 4種乾燥ワクチン

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、適当と認められた安定剤を加え、最終バルクとする。

2.4.2 3種乾燥ワクチン

ジステンパーウイルス原液、犬アデノウイルス（2型）原液及び犬パラインフルエンザウイルス原液を混合し、適当と認められた安定剤を加え、最終バルクとする。

2.4.3 液状不活化ワクチン

適当と認められた溶液で濃度調整したL・カニコーラ原液及びL・イクテロヘモラジー原液を混合し、最終バルクとする。

2.4.4 液状混合ワクチン

適当と認められた溶液で濃度調整した犬パルボウイルス原液、L・カニコーラ原液及びL・イクテロヘモラジー原液を混合し、最終バルクとする。

2.5 小分製品

2.5.1 4種混合生ワクチン

最終バルクを小分容器に分注し、凍結乾燥し、小分製品とする。
小分製品について、3.4の試験を行う。

2.5.2 3種混合生ワクチン

最終バルクを小分容器に分注し、凍結乾燥し、小分製品とする。
小分製品について、3.4の試験を行う。

2.5.3 液状不活化ワクチン

最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。
小分製品について、3.4の試験を行う。

2.5.4 液状混合ワクチン

最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。
小分製品について、3.4の試験を行う。

3 試験法

3.1 培養細胞の試験

個体別培養細胞のそれぞれ1%以上を対照培養細胞とし、これについて次の試験を行う。
ただし、製造に継代細胞が用いられる場合は、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分間静置し、観察するとき、培養細胞に赤血球吸着を認めてはならない。

3.1.3 封入体染色試験

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

3.2 培養菌液の試験

3.2.1 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.2 総菌数試験

光電比色計又は菌数計算法によって菌数を計算するとき、それぞれの培養菌液に1 mL中 10^5 個

以上の菌を含まなければならない。ただし、特に承認されたものは、その菌数とする。

3.3 原液の試験

3.3.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.2 ウイルス含有量試験

3.3.2.1 ジステンパーウイルス含有量試験

3.3.2.1.1 試験材料

3.3.2.1.1.1 試料

検体を適当と認められた培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.2.1.1.2 培養細胞

Vero 細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.3.2.1.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本（穴）以上の培養細胞に接種し、35 ~ 37 °C で 7 ~ 21 日間培養し、観察する。

3.3.2.1.3 判定

培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

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

3.3.2.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験

3.3.2.2.1 試験材料

3.3.2.2.1.1 試料

検体を適当と認められた培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.2.2.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.3.2.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本（穴）以上の培養細胞に接種し、35 ~ 37 °C で 7 ~ 10 日間培養し、観察する。ただし、特に承認されたものは、その試験方法とする。

3.3.2.2.3 判定

培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{6.5}TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に承認されたものは、その判定方法及びウイルス含有量とする。

3.3.2.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

3.3.2.3.1 試験材料

3.3.2.3.1.1 試料

検体を適当と認められた培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.2.3.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.3.2.3.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本（穴）以上の培養細胞に接種し、37 °C で 7 ~ 10 日間培養する。培養後、培養液を除き、培養液と等量の 0.2vol% モルモット赤血球浮遊液を加え、4 °C で 60 分間静置し、観察するか、培養後、培養液を採取し、これに等量の 0.4vol% モルモット赤血球浮遊液を加え、十分混和した後、常温で 90 分間静置し、観察する。ただし、特に承認されたものは、その試験方法とする。

3.3.2.3.3 判定

赤血球吸着又は赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 $10^{7.0}$ TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に承認されたものは、その判定方法及びウイルス含有量とする。

3.3.2.4 犬パルボウイルス含有量試験

3.3.2.4.1 試験材料

3.3.2.4.1.1 試料

検体を適当と認められた培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.2.4.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.3.2.4.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本（穴）以上の培養細胞に接種し、37℃ で、24 時間静置培養した後、ウイルス増殖用培養液と交換し、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 3）を加え、更にこの混合液と等量の 0.3 ~ 0.5vol% 豚赤血球浮遊液を加え、2 ~ 5℃ で静置後、観察する。ただし、特に承認されたものは、その試験方法とする。

3.3.2.4.3 判定

培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 $10^{8.5}$ TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に承認されたものは、その判定方法及びウイルス含有量とする。

3.3.3 不活化試験

3.3.3.1 試験材料

3.3.3.1.1 試料

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

3.3.3.1.2 培地

適当と認められた培地を用いる。

3.3.3.2 試験方法

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

3.3.3.3 判定

レプトスピラの増殖を認めてはならない。

3.4 小分製品の試験

3.4.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、4 種混合生ワクチン又は 3 種混合生ワクチンは、それぞれ固有の色調を有する乾燥物でなければならない。液状不活化ワクチン又は液状混合ワクチンは、それぞれ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ない。異物又は異臭を認めてはならない。4 種混合生ワクチンを液状不活化ワクチンで溶解したもの又は 3 種混合生ワクチンを液状混合ワクチンで溶解したものは、それぞれ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ない。異物又は異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.4.2 pH 測定試験

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

3.4.3 真空度試験

一般試験法の真空度試験法を準用して試験するとき、4 種混合生ワクチン及び 3 種混合生ワクチンは、それぞれ適合しなければならない。

3.4.4 含湿度試験

一般試験法の含湿度試験法を準用して試験するとき、4種混合生ワクチン及び3種混合生ワクチンは、それぞれ適合しなければならない。

3.4.5 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.6 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定試験法を準用して試験するとき、4種混合生ワクチン、3種混合生ワクチン又は液状混合ワクチンは、それぞれ適合しなければならない。

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

3.4.7 迷入ウイルス否定試験

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、4種混合生ワクチン、3種混合生ワクチン又は液状混合ワクチンは、それぞれ適合しなければならない。

ただし、中和用血清は、抗ジステンパーウイルス血清（付記4）、抗アデノウイルス（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。また、4種混合生ワクチンと液状不活化ワクチンとの組み合わせ製剤では、液状不活化ワクチンと同量のリン酸緩衝食塩液で乾燥ワクチンを溶解したのものを用いる。さらに、必要と認められた場合、リン酸緩衝食塩液を用いて2～5 で一夜透析する。

3.4.8 ウイルス含有量試験

3.4.8.1 ジステンパーウイルス含有量試験

3.4.8.1.1 試験材料

3.4.8.1.1.1 試料

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（4種混合生ワクチンについては、付記5、6及び7の血清。3種混合生ワクチンについては、付記5及び6の血清）を非働化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液（付記8）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.4.8.1.1.2 培養細胞

Vero細胞を用いる。

3.4.8.1.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4本（穴）以上の培養細胞に接種し、35～37 で7～21日間培養し、観察する。

3.4.8.1.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{3.5}TCID₅₀以上でなければならない。ただし、特に承認されたものは、そのウイルス含有量とする。

3.4.8.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験

3.4.8.2.1 試験材料

3.4.8.2.1.1 試料

試験品中の犬アデノウイルス（2型）以外のウイルスを各抗血清（4種混合生ワクチンについては、付記4、6及び7の血清。3種混合生ワクチンについては、付記4及び6の血清）を非働化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.4.8.2.1.2 培養細胞

豚腎培養細胞又は犬腎継代細胞を用いる。

3.4.8.2.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本（穴）以上の培養細胞に接種し、37℃ で 7～10 日間培養し、観察する。

3.4.8.2.3 判定

培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。試験品のウイルス含有量は、豚腎培養細胞に接種した場合は、1 頭分当たり 10^{5.5}TCID₅₀ 以上でなければならず、犬腎継代細胞に接種した場合は、1 頭分当たり 10^{3.3}TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に承認されたものは、そのウイルス含有量とする。

3.4.8.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

3.4.8.3.1 試験材料

3.4.8.3.1.1 試料

試験品中の犬パラインフルエンザウイルス以外のウイルスを各抗血清（4 種混合生ワクチンについては、付記 4、5 及び 7 の血清。3 種混合生ワクチンについては、付記 4 及び 5 の血清）を非働化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.4.8.3.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞又は Vero 細胞を用いる。

3.4.8.3.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本（穴）以上の培養細胞に接種し、犬腎継代細胞に接種した場合は 37℃ で、Vero 細胞に接種した場合は 30℃ 又は 37℃ で、それぞれ 7～10 日間培養し、観察する。

3.4.8.3.3 判定

犬腎継代細胞に接種した場合は、培養後、培養液を採取し、等量の 0.4vol% モルモット赤血球浮遊液を加え、常温で 90 分間静置後、赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たり 10^{4.7}TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に承認されたものは、そのウイルス含有量とする。

Vero 細胞に接種した場合は、培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たり 10^{5.5}TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.4.8.4 犬パルボウイルス含有量試験

3.4.8.4.1 試験材料

3.4.8.4.1.1 試料

4 種混合生ワクチン中の犬パルボウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記 4、5 及び 6）を非働化したもので中和したもの又は液状混合ワクチンをウイルス増殖用培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.4.8.4.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.4.8.4.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本（穴）以上の培養細胞に接種し、32℃ 又は 37℃ で 24 時間静置培養した後、ウイルス増殖用培養液で液交換し、更に 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、更にこの混合液と等量の 0.3～0.5vol% 豚赤血球を加え、2～5℃ で静置した後、観察する。

3.4.8.4.3 判定

培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たり 32℃ で培養した場合は、10^{5.5}TCID₅₀ 以上でなければならず、37℃ で培養した場合は、10^{4.0}TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に承認されたものは、そのウイルス含有量とする。

3.4.9 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又は液状混合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。

3.4.10 フェノール定量試験

フェノールを添加した液状不活化ワクチン又は液状混合ワクチンについては、一般試験法のフェノール定量法を準用して試験するとき、フェノールの含有量は、0.2w/v%以下でなければならない。

3.4.11 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。

3.4.12 安全試験

3.4.12.1 試験材料

3.4.12.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.12.1.2 試験動物

6か月齢未満の犬を用いる。

3.4.12.2 試験方法

試験動物3頭を試験群、2頭を対照群とする。試験群に注射材料1頭分を用法に従ってそれぞれ注射し、対照群とともに6週間観察する。

3.4.12.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に異常を認めてはならない。

3.4.13 力価試験

3.4.13.1 ジステンパー力価試験

3.4.13.1.1 試験材料

3.4.13.1.1.1 試験動物

3.4.12の試験に用いた動物を用いる。

3.4.13.1.1.2 中和試験用ウイルス

適当と認められたジステンパーウイルス株を用いる。

3.4.13.1.1.3 培養細胞

適当と認められた培養細胞を用いる。

3.4.13.1.2 試験方法

3.4.12の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について中和試験を行う。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

各プール血清を非働化し、2 vol%馬血清加リン酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釈液で4又は5倍階段希釈し、各希釈血清と0.1mL中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、2～5で一夜又は35～37で60分間処理する。この各混合液0.1mLずつをそれぞれ4本(穴)以上の培養細胞に接種し、35～37で7～21日間培養し、観察する。

3.4.13.1.3 判定

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

試験群の中和抗体価は、40倍以上でなければならない。この場合、対照群では、10倍以下でなければならない。ただし、特に承認されたものは、その抗体価とする。

3.4.13.2 犬アデノウイルス(2型)感染症力価試験

3.4.13.2.1 試験材料

3.4.13.2.1.1 試験動物

3.4.12の試験に用いた動物を用いる。

3.4.13.2.1.2 中和試験用ウイルス

適当と認められた犬アデノウイルス(2型)ウイルス株を用いる。

3.4.13.2.1.3 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

3.4.13.2.2 試験方法

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

各プール血清を非働化し、1 vol%牛胎子血清加リン酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釈液で2、4又は5倍階段希釈する。各希釈血清と0.1mL中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、35～37℃で60～90分間処理する。この各混合液0.1mLずつをそれぞれ4本（穴）以上の培養細胞に接種し、35～37℃で7～10日間培養し、観察する。ただし、特に承認されたものは、その試験方法とする。

3.4.13.2.3 判定

培養細胞のCPEを阻止したものを陽性とし、中和抗体価をED₅₀で求める。

試験群の中和抗体価は、40倍以上でなければならない。この場合、対照群では、10倍以下でなければならない。ただし、特に承認されたものは、その抗体価とする。

3.4.13.3 犬パラインフルエンザ力価試験

3.4.13.3.1 試験材料

3.4.13.3.1.1 試験動物

3.4.12の試験に用いた動物を用いる。

3.4.13.3.1.2 中和試験用ウイルス

適当と認められた犬パラインフルエンザウイルス株を用いる。

3.4.13.3.1.3 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

3.4.13.3.2 試験方法

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

各プール血清を非働化し、1 vol%牛胎子血清加リン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈する。各希釈血清と0.1mL中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、2～5℃で一夜又は適当な温度で60分間処理する。この各混合液0.1mLずつをそれぞれ4本（穴）以上の培養細胞に接種し、35～37℃で7～10日間培養する。培養後、培養液を除き、培養液と等量の0.2vol%モルモット赤血球浮遊液を加え、2～5℃で60分間静置し、観察するか、又は培養後、培養液を採取し、これに等量の0.4vol%モルモット赤血球浮遊液を加え、常温で90分間静置し、観察する。ただし、特に承認されたものは、その試験方法とする。

3.4.13.3.3 判定

赤血球凝集又は赤血球吸着を阻止したものを陽性とし、中和抗体価をED₅₀で求める。

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

3.4.13.4 犬パルボウイルス感染症力価試験

3.4.13.4.1 試験材料

3.4.13.4.1.1 試験動物

3.4.12の試験に用いた動物を用いる。

3.4.13.4.1.2 赤血球凝集抗原

犬パルボウイルス赤血球凝集抗原（付記9）を用いる。

3.4.13.4.2 試験方法

3.4.12 の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について赤血球凝集抑制試験を行う。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

各プール血清を非働化し、25w/v%カオリン液及び豚赤血球を加えて処理した後、牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液で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混合し、常温で60分間処理し、VAD6.0液（付記10）で調整した0.3～0.5vol%豚赤血球浮遊液を加え2～5で一夜処理し、赤血球凝集の有無を観察する。ただし、特に承認されたものは、その試験方法とする。

3.4.13.4.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。

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

3.4.13.5 犬レプトスピラ病力価試験

3.4.13.5.1 試験材料

3.4.13.5.1.1 注射材料

4種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又は3種混合生ワクチンを液状混合ワクチンで溶解した試験品を注射材料とする。

3.4.13.5.1.2 試験動物

体重約300gのモルモット又は体重60～100gのハムスターを用いる。

3.4.13.5.1.3 凝集反応用菌液

L・カニコーラ及びL・イクテロヘモラジの生菌浮遊液を用いる。

3.4.13.5.2 試験方法

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

3.4.13.5.3 判定

それぞれの菌液に対し、80%以上が8倍以上の凝集価を示さなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、1年間とする。ただし、特に承認されたものは、その期間とする。

付記1 抗L・カニコーラ血清

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

付記2 抗L・イクテロヘモラジ血清

L・イクテロヘモラジの不活化菌で免疫した兔又は体重300～350gのモルモットの血清で、凝集抗体価40倍以上のもの

付記3 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のち、水酸化ナトリウム液でpHを9.0に調整する。

付記4 抗ジステンパーウイルス血清

ジステンパーウイルスで免疫した兔、モルモット又はフェレットの血清で、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 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 2.98 g

牛胎仔血清 30 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9 犬パルボウイルス赤血球凝集抗原

犬パルボウイルス Y-1 株又は適当と認められた犬パルボウイルス株を猫腎継代細胞で増殖させて得た培養上清を不活化したもので、赤血球凝集価が 128 倍以上のもの

付記10 VAD6.0 液

1,000mL 中

塩化ナトリウム 8.77 g

無水リン酸水素二ナトリウム 5.68 g

リン酸二水素ナトリウム二水和物 40.56 g

水 残 量

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