

イリドウイルス病・ぶりビブリオ病・ α 溶血性レンサ球菌症混合不活化ワクチン

平成27年6月25日（告示第1621号）新規追加

1 定義

マダイイリドウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液並びにビブリオ・アングイラルム J-O-3 型及びラクトコッカス・ガルビエの培養菌液をそれぞれ不活化したものを混合したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 マダイイリドウイルス

2.1.1.1 名称

マダイイリドウイルス YI-717 株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

GF 細胞で CPE を伴って増殖し、イリドウイルス病に対する免疫原性を有する。

2.1.1.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、GF 細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

継代は、原株では3代以内、種ウイルスでは2代以内でなければならない。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。

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

2.1.2 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 KT-5 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 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、原株では3代以内、種菌では5代以内でなければならない。

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

2.1.3 ラクトコッカス・ガルビエ

2.1.3.1 名称

ラクトコッカス・ガルビエ KS-7M 株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 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。

2.1.3.3 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、原株では3代以内、種菌では5代以内でなければならない。

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

2.2 製造用材料

2.2.1 マダイイリドウイルス

2.2.1.1 培養細胞

GF 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 ビブリオ・アングイラルム

2.2.2.1 培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

2.2.3 ラクトコッカス・ガルビエ

2.2.3.1 培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 マダイイリドウイルス

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、相当と認められた時期に個別培養細胞ごとに採取した培養液又は培養液の遠心上清をウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2 の試験を行う。

2.3.1.3 不活化

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

不活化ウイルス液について、3.4 の試験を行う。

2.3.1.4 原液

不活化ウイルス液を原液としなかったものについて、不活化ウイルス液を混合したものを原液とする。

原液について、3.6.1 及び 3.6.2.1 の試験を行う。

2.3.2 ビブリオ・アングイラルム

2.3.2.1 培養

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、3.3 の試験を行う。

2.3.2.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加えて不活化したものを不活化菌液とする。不活化菌液を原液としてもよい。

不活化菌液について、3.5.1、3.5.2 及び 3.5.3.1 の試験を行う。

2.3.2.3 原液

不活化菌液を原液としなかったものについて、不活化菌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方法で濃縮し、濃度調整したものを原液とする。

原液について、3.6.1 及び 3.6.2.2 の試験を行う。

2.3.3 ラクトコッカス・ガルビエ

2.3.3.1 培養

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、3.3 の試験を行う。

2.3.3.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加えて不活化したものを不活化菌液とする。不活化菌液を原液としてもよい。

不活化菌液について、3.5.1、3.5.2 及び 3.5.3.2 の試験を行う。

2.3.3.3 原液

不活化菌液を原液としなかったものについて、不活化菌液を適当と認められた方法で濃縮したもの、又は適当と認められた方法で濃縮し、濃度調整したものを原液とする。

原液について、3.6.1 及び 3.6.2.3 の試験を行う。

2.4 最終バルク

それぞれの原液を混合し、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、3.7 の試験を行う。

3 試験法

3.1 培養細胞の試験

個体別培養細胞の 1% 以上又は 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。

3.1.1 培養観察

対照培養細胞を、ウイルスを接種することなく、ウイルスの培養と同じ条件で培養し、又は 25 °C で 7 日間隔で 2 代まで継代培養し、観察するとき、いずれの継代においても CPE を認めてはならない。

3.2 ウイルス浮遊液の試験

3.2.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.2 ウイルス含有量試験

3.2.2.1 試験材料

3.2.2.1.1 試料

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

3.2.2.1.2 培養細胞

GF 細胞をウイルス含有量試験用培養液又は適当と認められた培養液に適当な濃度で浮遊させ、96 穴プレートに 0.05mL 又は 0.1mL ずつ、又は 24 穴プレートに 1 mL ずつ分注したものをを用いる。

3.2.2.2 試験方法

96 穴プレートの場合は試料 0.05mL ずつ、24 穴プレートの場合は試料 0.1mL ずつを、それぞれ 4 穴以上の培養細胞に接種し、25 °C で 14 日間培養して、CPE の有無を観察する。

3.2.2.3 判定

培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{6.6}TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その含有量とする。

3.3 培養菌液の試験

3.3.1 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・アングイラルムの検体は、ビブリオ・アングイラルム以外の菌の発育を認めてはならない。ラクトコッカス・ガルビエの検体は、ラクトコッカス・ガルビエ以外の菌の発育を認めてはならない。ただし、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。

3.3.2 生菌数試験

3.3.2.1 試験材料

3.3.2.1.1 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用液で 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 培地

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。

3.3.2.2 試験方法

各試料 0.1mL ずつをそれぞれ 2 枚以上の培地に接種して培地表面に拡散させたものを、適当と認められた温度及び時間で培養した後、生じた集落数を数える。

3.3.2.3 判定

各試料ごとの集落数から生菌数を算出する。ビブリオ・アングイラルムの検体の生菌数は、1 mL 中 10^9 個以上でなければならない。ラクトコッカス・ガルビエの検体の生菌数は、1 mL 中 10^9 個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、その生菌数とする。

3.4 不活化ウイルス液の試験

3.4.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.2 不活化試験

3.4.2.1 試験材料

3.4.2.1.1 試料

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

3.4.2.1.2 培養細胞

GF 細胞を不活化試験用培養液 1（付記 2）に適当な濃度で浮遊させたものを用いる。

3.4.2.2 試験方法

試料の全量を 100mL 以上の培養細胞に接種し、25℃ で 7 日間培養した後、その培養細胞を EDTA・トリプシン液で処理して細胞を分散し、適当と認められた培養液に再浮遊し、更に 25℃ で 7 日間培養する。

3.4.2.3 判定

培養細胞に CPE を認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

3.5 不活化菌液の試験

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 同定試験

3.5.2.1 試験材料

3.5.2.1.1 試料

検体 0.5mL を約 2,000 G で 30 分間遠心した沈殿を試料とする。

3.5.2.1.2 抗血清

ビブリオ・アングイラルム不活化菌液については抗ビブリオ・アングイラルム J-O-3 型血清（付記 3）を、ラクトコッカス・ガルビエ不活化菌液については抗ラクトコッカス・ガルビエ KG(-) 型血清（付記 4）及び抗ラクトコッカス・ガルビエ KG(+) 型血清（付記 5）を用いる。

3.5.2.2 試験方法

各試料 1 白金耳ずつと抗血清 0.03mL ずつとを各々スライドグラス上で混合して凝集反応を行う。

3.5.2.3 判定

ビブリオ・アングイラルム不活化菌の試料は、J-O-3 型菌血清で速やかに凝集しなければならない。

い。ラクトコッカス・ガルビエ不活化菌の試料は、KG(−)型血清では速やかに凝集しなければならず、KG(+)型血清では凝集してはならない。

3.5.3 不活化試験

3.5.3.1 ビブリオ・アングイラルム

3.5.3.1.1 試験材料

3.5.3.1.1.1 試料

検体を試料とする。

3.5.3.1.1.2 培地

不活化試験用寒天培地（付記6）を用いる。

3.5.3.1.2 試験方法

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

3.5.3.1.3 判定

接種した全ての培地に集落を認めてはならない。

3.5.3.2 ラクトコッカス・ガルビエ

3.5.3.2.1 試験材料

3.5.3.2.1.1 試料

検体を試料とする。

3.5.3.2.1.2 培地

トッド・ヘビット寒天培地（付記7）を用いる。

3.5.3.2.2 試験方法

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

3.5.3.2.3 判定

接種した全ての培地に集落を認めてはならない。

3.6 原液の試験

3.6.1 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。

3.6.2 不活化試験

3.6.2.1 マダイイリドウイルス

3.4.2を実施するものについては、本試験を実施しなくてもよい。

3.6.2.1.1 試験材料

3.6.2.1.1.1 試料

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

3.6.2.1.1.2 培養細胞

GF細胞を不活化試験用培養液2（付記8）又は適当と認められた培養液に適当な濃度で浮遊させたものを用いる。

3.6.2.1.2 試験方法

培養面積75cm²の培養細胞の培養上清を除去後、試料3 mLを培養細胞に接種し、25℃で1時間吸着させた後、試料を除去して培養液を添加して25℃で7日間培養した後、その培養上清3 mLを次代の培養細胞に同様に接種して継代し、更に25℃で7日間培養する。又は、試料の全量を100mL以上の培養細胞に接種し、25℃で7日間培養した後、その培養細胞をEDTA・トリプシン液で処理して細胞を分散し、不活化試験用培養液2又は適当と認められた培養液に再浮遊し、更に25℃で7日間培養する。

3.6.2.1.3 判定

培養細胞に CPE を認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

3.6.2.2 ビブリオ・アングイラルム

3.6.2.2.1 試験材料

3.6.2.2.1.1 試料

検体を試料とする。

3.6.2.2.1.2 培地

ブレイン・ハートインフュージョン寒天培地（付記 9）又は適当と認められた培地を用いる。

3.6.2.2.2 試験方法

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

3.6.2.2.3 判定

接種した全ての培地に集落を認めてはならない。

3.6.2.3 ラクトコッカス・ガルビエ

3.6.2.3.1 試験材料

3.6.2.3.1.1 試料

検体を試料とする。

3.6.2.3.1.2 培地

ブレイン・ハートインフュージョン寒天培地又は適当と認められた培地を用いる。

3.6.2.3.2 試験方法

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

3.6.2.3.3 判定

接種した全ての培地に集落を認めてはならない。

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均質な懸濁液又は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。

3.7.2 pH 測定試験

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

3.7.3 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。

3.7.4 ホルマリン定量試験

一般試験法のホルマリン定量法を準用して試験するとき、ホルマリンの含有量は、0.3vol %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。

3.7.5 安全試験

3.7.5.1 試験材料

3.7.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.7.5.1.2 試験動物

水温 25℃、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 15 ～ 100g のかんぱち又はぶり 30 尾以上を用いる。

3.7.5.2 試験方法

試験動物は、24 時間以上餌止めした後、1 群 15 尾以上ずつの 2 群に分ける。1 群の試験動物に、注

射材料 0.1mL を腹腔内に注射し、試験群とする。他の1群は、対照群とし、試験群と同様の方法でリン酸緩衝食塩液を注射する。その後、それぞれ水温 25℃、循環式で飼育し、14日間観察する。

3.7.5.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に臨床的な異常を認めてはならない。

3.7.6 力価試験

3.7.6.1 イリドウイルス病力価試験

3.7.6.1.1 試験材料

3.7.6.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.7.6.1.1.2 試験動物

かんばち、ぶり又はまだいを用いる。

かんばち又はぶりを用いる場合は、水温 22℃、循環式で維持していたかんばち又はぶりを1日当たり1～2℃ずつ温度上昇させて馴致し、4日間かけて飼育水温を27℃に上昇させる。次に、3日間27℃で予備飼育し、合計7日間かけて27℃に温度馴致し、異常のないことを確認した体重15～50gのかんばち又はぶり180尾以上を用いる。

まだいを用いる場合は、水温22～28℃、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5～15gのまだい180尾以上を用いる。

3.7.6.1.1.3 攻撃用ウイルス液

マダイイリドウイルス強毒株（付記10）の培養ウイルス液を希釈液（付記11）で、かんばち又はぶりを用いる場合は3倍階段希釈し、まだいを用いる場合は10倍階段希釈し、適当と考えられる3段階の希釈ウイルス液を攻撃用ウイルス液とする。

3.7.6.1.2 試験方法

試験動物は、24時間以上餌止めした後、1群90尾以上ずつの2群に分ける。

かんばち又はぶりを用いる場合は、1群の試験動物に、注射材料0.1mLずつを腹腔内に注射し、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。それぞれ水温27℃で、循環式で10日間飼育する。

まだいを用いる場合は、1群の試験動物に、注射材料0.1mLずつを腹腔内に注射し、試験群とする。他の1群を対照群とする。それぞれ水温22～28℃で、循環式で10日間飼育する。

前日から24時間以上餌止めした試験群及び対照群をそれぞれ30尾以上の3群ずつに分けて、それぞれの攻撃用ウイルス液0.1mLを腹腔内に注射して攻撃し、かんばち又はぶりを用いる場合は20日間、まだいを用いる場合は14日間観察して各群の生死を調べる。

3.7.6.1.3 判定

かんばち又はぶりを用いる場合は、対照群の20%以上が死亡した攻撃用ウイルスの希釈段階のうち、少なくとも1段階において、試験群の生存率が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、 $P < 0.05$ ）。

まだいを用いる場合は、対照群の60%以上が死亡した攻撃用ウイルスの希釈段階のうち、少なくとも1段階において、試験群の生存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。

3.7.6.2 ビブリオ病力価試験

凝集抗体価測定試験又は攻撃試験で行う。

3.7.6.2.1 凝集抗体価測定試験

3.7.6.2.1.1 試験材料

3.7.6.2.1.1.1 試験動物

水温20℃、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15～100gのかんばち又はぶり20尾以上を用いる。

3.7.6.2.1.2 試験方法

試験動物は、24 時間以上餌止めした後、1 群 10 尾以上ずつの 2 群に分ける。1 群の試験動物に、注射材料 0.1mL を腹腔内に注射し、試験群とする。他の 1 群は、対照群とし、試験群と同様の方法でリン酸緩衝食塩液を注射する。その後、それぞれ水温 20 °C、循環式で 14 日間飼育する。

飼育 14 日目に試験群及び対照群のそれぞれ 10 尾を取り上げて採血し、45 °C で 20 分間非働化した血清について、マイクロタイター法で凝集試験を行う。

試験群及び対照群の血清、参照陽性血清（付記 12）並びに参照陰性血清（付記 13）をリン酸緩衝食塩液で 2 倍階段希釈し、各希釈血清に凝集反应用抗原（付記 14）を等量加えて、25 °C で 2 時間反応させ、更に 4 °C で一夜静置した後、管底の凝集の有無を観察する。

3.7.6.2.1.3 判定

凝集を認めた血清の最高希釈倍数を凝集抗体価とする。

試験群の血清は、いずれも凝集抗体価が 4 倍以上でなければならず、かつ、抗体価の幾何平均値が 16 倍以上でなければならない。対照群の血清は、抗体価の幾何平均値が 2 倍以下でなければならない。また、参照血清は、所定の抗体価を示さなければならない。

3.7.6.2.2 攻撃試験

3.7.6.2.2.1 試験材料

3.7.6.2.2.1.1 試験動物

3.7.5 の試験に用いた動物を用いる。

3.7.6.2.2.1.2 攻撃用菌液

ビブリオ・アングイラルム強毒菌（付記 15）の液体培養菌液をリン酸緩衝食塩液で希釈したものを攻撃用菌液とする。

3.7.6.2.2.2 試験方法

3.7.5 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 尾以上に、攻撃用菌液 0.1mL ずつを腹腔内に注射した後、飼育水温 25 °C で 14 日間観察して各群の生死を調べる。

3.7.6.2.2.3 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、対照群では 35 % 以上が死亡しなければならない。

3.7.6.3 α 溶血性レンサ球菌症力価試験

3.7.6.3.1 試験材料

3.7.6.3.1.1 試験動物

3.7.5 の試験に用いた動物を用いる。

3.7.6.3.1.2 攻撃用菌液

ラクトコッカス・ガルビエ強毒菌（付記 16）の液体培養菌液をリン酸緩衝食塩液で希釈したものを攻撃用菌液とする。

3.7.6.3.2 試験方法

3.7.5 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 尾以上に、攻撃用菌液 0.1mL ずつを腹腔内に注射して攻撃した後、飼育水温 25 °C で 14 日間観察して各群の生死を調べる。

3.7.6.3.3 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、対照群では 60 % 以上が死亡しなければならない。

4 貯法及び有効期間

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

付記 1 ウイルス含有量試験用培養液
1,000mL 中

牛胎子血清	100 mL
MEM 非必須アミノ酸溶液 (100 倍濃度)	10 mL
イーグル MEM	残 量
炭酸水素ナトリウムで pH を 7.8 ~ 8.6 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 不活化試験用培養液 1

1,000mL 中	
牛胎子血清	50 ~ 100 mL
ダルベッコ変法イーグル培地	残 量
炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 7.6 に調整する。	
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。	

付記 3 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 型で免疫したウサギの血清であって、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 4 抗ラクトコッカス・ガルビエ KG(-)型血清

ラクトコッカス・ガルビエ KG(-)型菌で免疫したウサギの血清であって、ラクトコッカス・ガルビエ KG(-)型菌及び KG(+)型菌を凝集するもの

付記 5 抗ラクトコッカス・ガルビエ KG(+)型血清

ラクトコッカス・ガルビエ KG(+)型菌で免疫したウサギの血清であって、ラクトコッカス・ガルビエ KG(+)型菌を特異的に凝集するもの

付記 6 不活化試験用寒天培地

1,000mL 中	
カゼイン製ペプトン	17.0 g
大豆製ペプトン	3.0 g
塩化ナトリウム	20.0 g
リン酸水素ニカリウム	2.5 g
ブドウ糖	2.5 g
寒天	15.0 g
水	残 量
加熱溶解後、pH を 7.3 に調整し、121 °C 15 分間高压滅菌する。	

付記 7 トッド・ヘビット寒天培地

1,000mL 中	
牛心臓浸出物	3.1 g
ネオペプトン	20.0 g
ブドウ糖	2.0 g
塩化ナトリウム	2.0 g
リン酸水素二ナトリウム	0.4 g
炭酸ナトリウム	2.5 g
寒天	15.0 g

水 残 量
加熱溶解後、pH を 7.8 に調整し、121 °C 15 分間高圧滅菌する。

付記 8 不活化試験用培養液 2

1,000mL 中
牛胎子血清 100 mL
MEM 非必須アミノ酸溶液 (100 倍濃度) 10 mL
イーグル MEM 残 量
炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 7.8 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 ブレイン・ハートインフュージョン寒天培地

1,000mL 中
子牛脳浸出液 200 g
牛心臓浸出液 250 g
ペプトン 10 g
ブドウ糖 2 g
塩化ナトリウム 5 g
リン酸一水素ナトリウム 2.5 g
寒天 15 g
水 残 量
加熱溶解後、pH を 7.2 ~ 7.6 に調整し、121 °C 15 分間高圧滅菌する。

付記 10 マダイイリドウイルス強毒株

試験動物にかんばち又はぶりをを用いる場合は、マダイイリドウイルス西海 0619 株又はこれと同等以上の毒力を有する株。試験動物にまだいを用いる場合は、マダイイリドウイルス Ehime-1/CV 株又はこれと同等以上の毒力を有する株

付記 11 希釈液

以下の組成のもの又は動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

1,000mL 中
L-グルタミン 500 mg
塩化ナトリウム 3.51 g
MEM 非必須アミノ酸溶液 (100 倍濃度) 10 mL
牛胎子血清 50 ~ 100 mL
BME 又はイーグル MEM 残 量
炭酸水素ナトリウムで pH を 7.2 ~ 7.6 に調整する。
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 12 参照陽性血清

ビブリオ・アングイラルム J-O-3 型の死菌をかんばち又はぶりに注射して得た血清であって、凝集抗体価が 256 ~ 512 倍となるように濃度を調整し、凍結又は凍結乾燥したもの。

付記 13 参照陰性血清

健康なかんばち又はぶりの血清であって、凝集抗体価が 2 倍未満であり、凍結又は凍結乾燥し

たもの。

付記 14 凝集反応用抗原

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

付記 15 ビブリオ・アングイラルム強毒菌

ビブリオ・アングイラルム 040755 株又はこれと同等以上の毒力を有する株

付記 16 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