

# ジステンパー・犬アデノウイルス（2型）感染症・犬パラインフルエンザ・犬パルボウイルス感染症・犬コロナウイルス感染症・犬レプトスピラ病（カニコーラ・イクテロヘモラジー）混合（コポリマーアジュバント加）ワクチン

平成28年 7月14日（告示第1475号） 新規追加

## 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（以下この項において「混合生ワクチン」という。）と、レプトスピラ・カニコーラ及びレプトスピラ・イクテロヘモラジーの全培養菌液を可溶化した後不活化したものと犬コロナウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化したものに、コポリマーアジュバントを添加した後混合したワクチン（以下この項において「液状不活化ワクチン」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。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。

##### 2.1.1.3 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 $-70^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.1.2 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FD2001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。犬由来細胞で増殖し、その培養ウイルス液は豚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、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。

### 2.1.5 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

犬に注射すると、早期に発熱及び軟便を呈する。感受性のある培養細胞に接種すると増殖する。

#### 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。

## 2.1.6 レプトスピラ・カニコーラ株

### 2.1.6.1 名称

レプトスピラ・カニコーラ（以下この項において「L・カニコーラ」という。）フونت・ユトレヒトIV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・カニコーラ血清（付記1）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、原株及び種菌とも特に認めら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。

## 2.1.7 レプトスピラ・イクテロヘモラジー株

### 2.1.7.1 名称

レプトスピラ・イクテロヘモラジー（以下この項において「L・イクテロヘモラジー」という。）コペンハーゲン株又はこれと同等と認められた株

### 2.1.7.2 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。

### 2.1.7.3 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、原株及び種菌とも特に認めら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

Vero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 犬パルボウイルス

#### 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 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。

#### 2.2.6 L・カニコーラ

##### 2.2.6.1 培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

#### 2.2.7 L・イクテロヘモラジー

##### 2.2.7.1 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 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、3.3.1、3.3.2及び3.3.3.1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、3.3.1、3.3.2及び3.3.3.2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感染材料を採取し原液とする。

原液について、3.3.1、3.3.2及び3.3.3.3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感染材料を採取し、相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、3.3.1、3.3.2及び3.3.3.4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。

#### 2.3.5.2 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、3.3.1、3.3.2及び3.3.3.5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、3.3.4.1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を原液とする。

原液について、3.3.1の試験を行う。

#### 2.3.6 L・カニコーラ原液

##### 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

培養菌液に相当と認められた不活化剤を加えて不活化したものを不活化レプトスピラ菌液とする。

不活化レプトスピラ菌液について、3.3.4.2の試験を行う。

##### 2.3.6.3 可溶化

不活化レプトスピラ菌液又は相当と認められた濃縮方法により濃縮した菌液に相当と認められた可溶化剤を加え可溶化したものを原液とする。

原液について、3.3.1の試験を行う。

#### 2.3.7 L・イクテロヘモラジー原液

##### 2.3.7.1 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。

##### 2.3.7.2 不活化

培養菌液に相当と認められた不活化剤を加えて不活化したものを不活化レプトスピラ菌液とする。

不活化レプトスピラ菌液について、3.3.4.2の試験を行う。

##### 2.3.7.3 可溶化

不活化レプトスピラ菌液又は相当と認められた方法により濃縮した菌液に相当と認められた可溶化剤を加え可溶化したものを原液とする。

原液について、3.3.1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、L・カニコーラ原液及びL・イクテロヘモラジー原液にコポリマー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、3.4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、3.4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、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。

#### 3.1.1 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、0.1 vol%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。

### 3.2 培養菌液の試験

#### 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 総菌数試験

光電比色計又は菌数計算法を用いて菌数を計算するとき、それぞれの培養菌液に1 mL中 $10^{9.0}$ 個以上の菌を含まなければならない。

### 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 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 ウイルス含有量試験

##### 3.3.3.1 ジステンパーウイルス含有量試験

###### 3.3.3.1.1 試験材料

###### 3.3.3.1.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記3）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。

###### 3.3.3.1.1.2 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。

###### 3.3.3.1.2 試験方法

試料0.1 mLずつをそれぞれ5本（穴）以上の培養細胞に接種し、36°Cで5～7日間培養する。培養後、試料を接種した細胞を80 vol%冷アセトンで固定し、蛍光抗体法を用いて特異蛍光の有無を観察する。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。

###### 3.3.3.1.3 判定

特異蛍光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。

### 3.3.3.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験

#### 3.3.3.2.1 試験材料

##### 3.3.3.2.1.1 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。

##### 3.3.3.2.1.2 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。

#### 3.3.3.2.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ5本（穴）以上の培養細胞に接種し、36°Cで4～7日間培養する。培養後、試料を接種した細胞を80vol%冷アセトンで固定し、蛍光抗体法を用いて特異蛍光の有無を観察する。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。

#### 3.3.3.2.3 判定

特異蛍光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。

### 3.3.3.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

#### 3.3.3.3.1 試験材料

##### 3.3.3.3.1.1 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。

##### 3.3.3.3.1.2 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。

#### 3.3.3.3.2 試験方法

試料0.1mL ずつをそれぞれ5本（穴）以上の培養細胞に接種し、36°Cで4～7日間培養する。培養後、試料を接種した細胞を80vol%冷アセトンで固定し、蛍光抗体法を用いて特異蛍光の有無を観察する。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。

#### 3.3.3.3.3 判定

特異蛍光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。

### 3.3.3.4 犬パルボウイルス含有量試験

#### 3.3.3.4.1 試験材料

##### 3.3.3.4.1.1 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。

##### 3.3.3.4.1.2 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。

#### 3.3.3.4.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ5本（穴）以上の培養細胞に接種し、37°Cで5～7日間培養する。培養後、試料を接種した細胞を80vol%冷アセトンで固定し、蛍光抗体法を用いて特異蛍光の有無を観察する。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。

#### 3.3.3.4.3 判定

特異蛍光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>7.0</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。

### 3.3.3.5 犬コロナウイルス含有量試験

#### 3.3.3.5.1 試験材料

##### 3.3.3.5.1.1 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。

##### 3.3.3.5.1.2 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。

#### 3.3.3.5.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ5本（穴）以上の培養細胞に接種し、37℃で5日間培養する。培養後、試料を接種した細胞を70vol%冷アセトンで固定し、蛍光抗体法を用いて特異蛍光の有無を観察する。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。

#### 3.3.3.5.3 判定

特異蛍光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>4.5</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。

### 3.3.4 不活化試験

#### 3.3.4.1 犬コロナウイルス不活化試験

##### 3.3.4.1.1 試験材料

##### 3.3.4.1.1.1 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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試料とする。

##### 3.3.4.1.1.2 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。

##### 3.3.4.1.2 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。

##### 3.3.4.1.3 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。

#### 3.3.4.2 レプトスピラ不活化試験

##### 3.3.4.2.1 試験材料

##### 3.3.4.2.1.1 試料

検体を試料とする。

##### 3.3.4.2.1.2 培地

適当と認められた培地を用いる。

##### 3.3.4.2.2 試験方法

培地10mLを入れた試験管5本に試料1 mLずつを接種し、28～30℃で10～12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。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。

##### 3.3.4.2.3 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、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（以下この項において「混合ワクチン」という。）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。

#### 3.4.2 pH測定試験

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

#### 3.4.3 含湿度試験

混合生ワクチンについて、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

混合ワクチンについて、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

混合ワクチンについて、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 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。

#### 3.4.7 ウイルス含有量試験

##### 3.4.7.1 ジステンパーウイルス含有量試験

###### 3.4.7.1.1 試験材料

###### 3.4.7.1.1.1 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。

###### 3.4.7.1.1.2 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。

###### 3.4.7.1.2 試験方法

試料0.1mLずつを5本（穴）以上の培養細胞に接種し、37℃で6～8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。

###### 3.4.7.1.3 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。

##### 3.4.7.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験

###### 3.4.7.2.1 試験材料

###### 3.4.7.2.1.1 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）以外のウイルスを各抗血清（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。

#### 3.4.7.2.1.2 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。

#### 3.4.7.2.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ5本（穴）以上の培養細胞に接種し、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。

#### 3.4.7.2.3 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。

#### 3.4.7.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

##### 3.4.7.3.1 試験材料

###### 3.4.7.3.1.1 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を各抗血清（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。

###### 3.4.7.3.1.2 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。

##### 3.4.7.3.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ5本（穴）以上の培養細胞に接種し、37℃で6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、常温で90分間静置後、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。

##### 3.4.7.3.3 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。

#### 3.4.7.4 犬パルボウイルス含有量試験

##### 3.4.7.4.1 試験材料

###### 3.4.7.4.1.1 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。

###### 3.4.7.4.1.2 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。

##### 3.4.7.4.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ5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4日間培養する。培養後、各本（穴）の細胞を継代し、37℃で4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8）を加え、さらにこの混合液と等量のVAD6.0液（付記9）で調製した0.5vol%豚赤血球浮遊液を加え、4℃で3時間又は一夜静置後、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。

##### 3.4.7.4.3 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。

#### 3.4.8 チメロサル定量試験

チメロサル添加製剤については、液状不活化ワクチンについて、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。

#### 3.4.9 毒性限度確認試験

混合ワクチンについて、一般試験法の毒性限度確認試験法 1 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 安全試験

##### 3.4.10.1 試験材料

###### 3.4.10.1.1 注射材料

混合ワクチンを注射材料とする。

###### 3.4.10.1.2 試験動物

3 か月齢未満の犬を用いる。

##### 3.4.10.2 試験方法

試験動物 2 頭に注射材料 5 頭分を皮下注射し、14日間観察する。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。

##### 3.4.10.3 判定

観察期間中、3 日以上継続する発熱、7 日間以上の炎症を伴った注射部位の腫脹及び硬結を認めてはならない。その他の異常を認めてはならない。

#### 3.4.11 力価試験

##### 3.4.11.1 ジステンパーウイルス、犬アデノウイルス（2型）、犬パラインフルエンザウイルス及び犬パルボウイルス力価試験

###### 3.4.11.1.1 試験材料

###### 3.4.11.1.1.1 注射材料

混合ワクチンを注射材料とする。

###### 3.4.11.1.1.2 試験動物

3 か月齢未満の犬を用いる。

###### 3.4.11.1.2 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、第 2 回目の注射後 14 日目に採取した血清について抗体価を測定する。

##### 3.4.11.2 ジステンパーウイルス力価試験

###### 3.4.11.2.1 試験材料

###### 3.4.11.2.1.1 試料

3.4.11.1の試験で得られた血清を用いる。

###### 3.4.11.2.1.2 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。

###### 3.4.11.2.1.3 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。

###### 3.4.11.2.2 試験方法

3.4.11.1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、非働化後それぞれ等量をプールし、ウイルス増殖用培養液又は適当と認められた培養液で 5 倍階段希釈する。各希釈血清と 0.1 mL 中約 200 TCID<sub>50</sub> の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、4 °C で一夜処理する。この各混合液 0.1 mL ずつをそれぞれ 4 本（穴）以上の培養細胞に接種し、37 °C で

6～8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。

#### 3.4.11.2.3 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、その中和抗体価とする。

#### 3.4.11.3 犬アデノウイルス（2型）力価試験

##### 3.4.11.3.1 試験材料

###### 3.4.11.3.1.1 試料

3.4.11.1の試験で得られた血清を用いる。

###### 3.4.11.3.1.2 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。

###### 3.4.11.3.1.3 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。

##### 3.4.11.3.2 試験方法

3.4.11.1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、非働化後ウイルス増殖用培養液又は適当と認められた培養液で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。

##### 3.4.11.3.3 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、その中和抗体価とする。

#### 3.4.11.4 犬パラインフルエンザウイルス力価試験

##### 3.4.11.4.1 試験材料

###### 3.4.11.4.1.1 試料

3.4.11.1の試験で得られた血清を用いる。

###### 3.4.11.4.1.2 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。

###### 3.4.11.4.1.3 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。

##### 3.4.11.4.2 試験方法

3.4.11.1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、非働化後ウイルス増殖用培養液又は適当と認められた培養液で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。

##### 3.4.11.4.3 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、その中和抗体価とする。

#### 3.4.11.5 犬パルボウイルス力価試験

##### 3.4.11.5.1 試験材料

#### 3.4.11.5.1.1 試料

3.4.11.1の試験で得られた血清を用いる。

#### 3.4.11.5.1.2 赤血球凝集抗原

犬パルボウイルスFD2001株又は適当と認められた犬パルボウイルス株を用いる。

#### 3.4.11.5.2 試験方法

3.4.11.1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、非働化後RDE(付記10)、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。

#### 3.4.11.5.3 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。

#### 3.4.11.6 犬コロナウイルス力価試験

##### 3.4.11.6.1 試験材料

###### 3.4.11.6.1.1 注射材料

混合ワクチンを注射材料とする。

###### 3.4.11.6.1.2 試験動物

体重約300gのモルモットを用いる。

###### 3.4.11.6.1.3 中和試験用ウイルス

犬コロナウイルスTN-449株又は適当と認められた犬コロナウイルス株を用いる。

###### 3.4.11.6.1.4 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。

##### 3.4.11.6.2 試験方法

試験動物5匹を試験群、2匹を対照群とする。試験群に注射材料1mLを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。非働化した被験血清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。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。

##### 3.4.11.6.3 判定

培養細胞の4穴中2穴以上にCPEの阻止を認めた血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

試験群の抗体価は、80%以上が8倍以上でなければならない。この場合、対照群では、2倍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、その中和抗体価とする。

#### 3.4.11.7 犬レプトスピラ病力価試験

##### 3.4.11.7.1 試験材料

###### 3.4.11.7.1.1 注射材料

混合ワクチンを注射材料とする。

###### 3.4.11.7.1.2 試験動物

体重60~100gのハムスターを用いる。

###### 3.4.11.7.1.3 凝集反応用菌液

L・カニコウラ及びL・イクテロヘモラジーの生菌浮遊液を用いる。

##### 3.4.11.7.2 試験方法

注射材料 1 mL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日目に得られた各個体の血清を非働化したものについて、凝集反応用菌液を用いて、溶菌凝集反応を行う。

#### 3.4.11.7.3 判定

それぞれの菌液に対して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、2年10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 抗L・カニコーラ血清

L・カニコーラで免疫した兎又はモルモットの血清

#### 付記2 抗L・イクテロヘモラジー血清

L・イクテロヘモラジーで免疫した兎又はモルモットの血清

#### 付記3 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 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pH9.0に調整する。

付記9 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、無水 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pH6.0に調整する。

付記10 RDE

市販のRDEを処方に従い、生理食塩水20mLで溶解し、小分け分注した後凍結して-20℃以下で保存する。