

日本脳炎・ゲタウイルス感染症混合不活化ワクチン (シード)

平成24年8月10日（告示第2004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6月30日（告示第1246号）一部改正

1 定義

シードロット規格に適合した日本脳炎ウイルス及びゲタ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不活化し、混合したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 日本脳炎ウイルス

2.1.1.1 名称

日本脳炎ウイルス中山株薬検系又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

マウスの脳内に注射すると、死亡する。豚腎初代細胞で増殖し、がちょう、鶏初生ひな及びほとりの赤血球を凝集する。

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-III aC1 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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 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-III aC1 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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 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、MPK-III aC1 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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 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 ゲタウイルス

2.1.2.1 名称

ゲタウイルス MI-110 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

馬の皮下、筋肉内又は鼻腔内に接種すると、発熱及び浮腫等の症状を示す。

馬、牛、豚及びサル由来の培養細胞で CPE を伴って増殖し、がちょう赤血球を凝集する。

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、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 日本脳炎ウイルス

2.2.1.1 培養細胞

MPK-III aC1 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。

2.2.1.3 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。

2.2.1.4 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 ゲタウイルス

2.2.2.1 培養細胞

2.2.2.1.1 マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルス及びプロダクションシードウイルスの増殖、継代及び保存に用いる細胞

Vero 細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.2.1.2 原液の製造に用いる細胞

EFD-C₁ 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。

2.2.2.3 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て、凍結して－ 70 °C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。

2.2.2.4 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 °C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。

2.2.2.5 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 °C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 日本脳炎ウイルス原液

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。

2.3.1.2 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 の培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個別培養細胞ごとに採取した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、3.3 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又は適当と認められた不活化剤を加えて不活化し、不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.4 の試験を行う。

2.3.1.4 原液の調製

不活化ウイルス液を混合し、日本脳炎ウイルス原液とする。

原液について、3.5 の試験を行う。

2.3.2 ゲタウイルス原液

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。

2.3.2.2 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 の培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個別培養細胞ごとに採取した培養液を濃縮したものを浮遊液とする。

浮遊液について、3.3 の試験を行う。

2.3.2.3 不活化

浮遊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、不活化ウイルス液とする。不活化ウイルス液について、3.4 の試験を行う。

2.3.2.4 原液の調製

不活化ウイルス液を混合し、ゲタウイルス原液とする。

原液について、3.5 の試験を行う。

2.4 最終バルク

日本脳炎ウイルス原液とゲタウイルス原液を混合し、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、3.6 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

豚由来細胞を用いる場合には馬伝染性貧血ウイルス及び豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスについて、サル由来細胞を用いる場合には馬伝染性貧血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、馬由来細胞を用いる場合には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

豚由来細胞を用いる場合には、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。

サル由来細胞又は馬由来細胞を用いる場合には、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。

3.1.2 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

豚由来細胞を用いる場合には馬伝染性貧血ウイルス及び豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスについて、サル由来細胞を用いる場合には馬伝染性貧血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、馬由来細胞を用いる場合には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

豚由来細胞を用いる場合には、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1.2、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。

サル由来細胞又は馬由来細胞を用いる場合には、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 ウイルス浮遊液の試験

3.3.1 ウイルス含有量試験

3.3.1.1 日本脳炎ウイルス

3.3.1.1.1 試験材料

3.3.1.1.1.1 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。

3.3.1.1.1.2 培養細胞

初代ハムスター腎細胞又は適当と認められた培養細胞を小試験管又は 48 穴のマイクロプレートに培養し、単層となったものを用いる。

3.3.1.1.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本又は 4 穴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。

3.3.1.1.3 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^{7.5}TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.3.1.2 ゲタウイルス

3.3.1.2.1 試験材料

3.3.1.2.1.1 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。

3.3.1.2.1.2 培養細胞

Vero T 細胞を小試験管又は 48 穴のマイクロプレートに 1～2 日間培養し、単層となったものを用いる。

3.3.1.2.2 試験方法

試料 0.1mL ずつを、それぞれ 4 本又は 4 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を 0.5mL ずつ加え、37℃で 7 日間培養し、観察する。

3.3.1.2.3 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^{7.5}TCID₅₀ 以上でなければならない。

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 日本脳炎ウイルス

3.4.2.1.1 試験材料

3.4.2.1.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.4.2.1.1.2 試験動物

3週齢のマウスを用いる。

3.4.2.1.2 試験方法

注射材料 0.03mL を 10 匹の試験動物の脳内に注射し、14 日間観察する。

3.4.2.1.3 判定

脳炎症状を示して死亡した試験動物を認めない場合、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。

3.4.2.2 ゲタウイルス

3.4.2.2.1 試験材料

3.4.2.2.1.1 試料

検体 5 mL を、100 倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用いて 2～5℃で 1 夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.4.2.2.1.2 培養細胞

Vero T 細胞を培養瓶に 2～3 日間培養し、単層となったものを用いる。

3.4.2.2.2 試験方法

試料の 5 mL を 1 mL につき 3 cm²以上の Vero T 細胞に接種し、37℃で 90 分間吸着させた後、試料を抜き取り、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で 10 日間培養し、観察する。

観察最終日に培養液を小試験管 4 本以上に 0.5mL ずつ採取し、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、この混合液に、VAD6.2 液（付記 3）で洗浄調整した 0.33vol % のがちょう赤血球浮遊液を 1.0mL ずつ加え、常温で 60 分間静置した後、赤血球凝集の有無を観察する。

3.4.2.2.3 判定

培養細胞に CPE を認めず、培養液にがちょう赤血球の凝集を認めない場合、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 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。

3.6 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 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。

3.6.3 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。

3.6.4 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、0.1vol % 以下でなければならない。

3.6.5 たん白窒素定量試験

一般試験法のたん白窒素定量法を準用して試験するとき、たん白窒素含有量は、1 mL 中 200 μg 以下でなければならない。

3.6.6 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。

3.6.7 力価試験

3.6.7.1 日本脳炎力価試験

3.6.7.1.1 試験材料

3.6.7.1.1.1 注射材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で4倍に希釈したものを注射材料とする。

3.6.7.1.1.2 試験動物

2～3週齢のマウスを用いる。

3.6.7.1.2 攻撃ウイルス

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（付記4）を用いる。

3.6.7.1.3 試験方法

試験動物 30匹を試験群、60匹を対照群とする。

試験第1日目及び第4日目に、注射材料 0.1mL ずつを試験群の腹腔内に注射する。試験第8日目に、試験群及び対照群のそれぞれ 30匹に攻撃ウイルス 0.2mL ずつを腹腔内に注射する。さらに、対照群 30匹を 10匹ずつ3群に分け、各群に攻撃ウイルスを 10倍、100倍及び 1,000倍に希釈したものを 0.2mL ずつ腹腔内に注射する。試験群及び対照群について、14日間観察する。

3.6.7.1.4 判定

脳炎症状を示して死亡した動物数から各群の死亡率及び攻撃ウイルスの LD₅₀ を算出する。この場合、生存しているものの脳炎症状を示している動物は、死亡した動物とみなして計算する。

試験群の耐過率は、40%以上でなければならない。この場合、攻撃ウイルスを注射した対照群の死亡率は 90%以上であり、かつ、攻撃ウイルスのウイルス量は、0.2mL 中 10³LD₅₀ 以下でなければならない。

3.6.7.2 ゲタウイルス感染症力価試験

3.6.7.2.1 試験材料

3.6.7.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.6.7.2.1.2 試験動物

約6週齢のハムスターを用いる。

3.6.7.2.1.3 培養細胞

Vero T細胞を小試験管又は 48穴のマイクロプレートに培養し、単層となったものを用いる。

3.6.7.2.1.4 中和試験用ウイルス

Vero細胞で増殖させたゲタウイルス AMM-2021株を用いる。

3.6.7.2.2 試験方法

試験動物 10匹を試験群、2匹を対照群とする。注射材料 1 mL ずつを試験群の皮下に注射し、注射後 21日目に得られた各個体の血清について中和試験を行う。

試験群及び対照群の血清は、それぞれ2匹分ずつ等量混合し、非働化する。非働化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 0.1mL 中約 200TCID₅₀ 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。各混合液 0.1mL ずつを、それぞれ4本又は4穴の培養細胞に接種し、37℃で 90分間静置した後、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。

3.6.7.2.3 判定

培養試験管又はマイクロプレートの2本又は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。抗体価2倍以上を中和抗体陽性と判定する。

試験群の血清の 80%以上が中和抗体陽性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。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後2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 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	10 ~ 20 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。

牛又はやぎ血清は、日本脳炎ウイルス及びゲタウイルスに対する中和抗体陰性のもので、56℃で 30 分間非働化したものを用いる。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
牛血清アルブミン	4.0 g
ゼラチン	0.01 g
精製水	残量

牛血清アルブミンを最終濃度が 0.4w/v % に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3 VAD6.2 液

1,000mL 中

塩化ナトリウム	20.45 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	20.06 g
リン酸二水素ナトリウム二水和物	22.47 g
精製水	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 pH6.2 に調整する。

付記4 攻撃ウイルス

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生後 3 ~ 4 週齢のマウスに脳内接種し、発症極期に採脳し、リン酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釈液で 10 倍乳剤とする。

これを遠心した上清を攻撃ウイルスとし、原液又は必要に応じて希釈した原液を攻撃に用いる。