

日本脳炎・豚パルボウイルス感染症・豚ゲタウイルス 感染症混合生ワクチン（シード）

平成24年3月13日（告示第 675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弱毒日本脳炎ウイルス、弱毒豚パルボウイルス及び弱毒ゲタウイルスを、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混合し、凍結乾燥させたワクチンである。

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

弱毒日本脳炎ウイルスS-株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

1 か月齢の豚に接種しても、ウイルス血症が出現しない。妊娠1 か月前後の豚に接種しても、胎子に感染しない。コガタアカイエカに対する感染率が著しく低下している。乳のみマウスの脳内又は豚腎若しくは豚精巣初代細胞で増殖する。

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、HmLu-1細胞又は適当と認められた細胞で増殖させ、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、HmLu-1細胞又は適当と認められた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、**HmLu-1**細胞又は適当と認められた細胞で増殖させる。

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 豚パルボウイルス

2.1.2.1 名称

弱毒豚パルボウイルス**HT-/SK**株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

子豚に注射しても、临床上異常を認めず、ウイルス血症及びウイルス排出を認めない。また、妊娠豚に注射しても、胎子・胎盤感染及び死亡を認めない。

豚腎由来細胞に接種したとき、 32°C での増殖は、 37°C での増殖を上回る。

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、**SK-H**細胞又は適当と認められた細胞で増殖させ、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。

2.1.2.4 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、**SK-H**細胞又は適当と認められた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。

2.1.2.5 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、**SK-H**細胞又は適当と認められた細胞で増殖させる。

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。

2.1.3 ゲタウイルス

2.1.3.1 名称

弱毒ゲタウイルスKB/VT株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

1か月齢の豚に注射しても、ウイルス血症を認めない。また、妊娠豚に注射しても、胎子に感染しない。乳のみマウスに脳内接種しても、病原性を示さない。

2.1.3.3 マスターシードウイルス

2.1.3.3.1 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、HAL細胞又は適当と認められた細胞で増殖させ、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。

2.1.3.4 ワーキングシードウイルス

2.1.3.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、HAL細胞又は適当と認められた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。

2.1.3.5 プロダクションシードウイルス

2.1.3.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、HAL細胞又は適当と認められた細胞で増殖させる。

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。

2.2 製造用材料

2.2.1 日本脳炎ウイルス

2.2.1.1 培養細胞

HmLu-1細胞又は製造に適当と認められた細胞を用いる。

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、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。

2.2.1.4 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°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。

2.2.1.5 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°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。

2.2.2 豚パルボウイルス

2.2.2.1 培養細胞

SK-H細胞又は製造に相当と認められた細胞を用いる。

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。

2.2.2.3 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、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。

2.2.3 ゲタウイルス

2.2.3.1 培養細胞

HAL細胞又は製造に相当と認められた細胞を用いる。

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。

2.2.3.3 マスターセルシード

2.2.3.3.1 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、2.2.3.2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、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。

2.2.3.4 ワーキングセルシード

2.2.3.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.3.2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。

2.2.3.5 プロダクションセルシード

2.2.3.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.3.2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

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。ウイルス接種前のプロダクションセルシード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ろ液又は遠心上清を混合し、原液とする。

原液について、3.3.1、3.3.2.1及び3.3.3.1の試験を行う。

2.3.2 豚パルボウイルス

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。ウイルス接種前のプロダクションセルシード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ろ液又は遠心上清を混合し、原液とする。

原液について3.3.1、3.3.2.2及び3.3.3.2の試験を行う。

2.3.3 ゲタウイルス

2.3.3.1 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。ウイルス接種前のプロダクションセルシードに異常を認めてはならない。

2.3.3.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.3.1の細胞で培養し、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ろ液又は遠心上清を混合し、原液とする。

原液について3.3.1、3.3.2.3及び3.3.3.3の試験を行う。

2.4 最終バルク

日本脳炎ウイルス原液、豚パルボウイルス原液及びゲタウイルス原液を混合し、適当と認められた希釈液及び安定剤を加えて調製し、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、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。

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1.4.2.1.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 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

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

ハムスター由来細胞を用いる場合には、豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス及びリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスについて、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。

豚由来細胞を用いる場合には、豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスについて、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

日本脳炎ウイルスでは、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、また、豚パルボウイルス及びゲタウイルスでは、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、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、3.2.3、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。

3.1.1.5 対象動物を用いた免疫原性試験

一般試験法の対象動物を用いた免疫原性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。

3.1.1.6 対象動物を用いた安全性確認試験

一般試験法の対象動物を用いた安全性確認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。

3.1.1.7 病原性復帰確認試験

一般試験法の病原性復帰確認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 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

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

ハムスター由来細胞を用いる場合には、豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス及びリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスについて、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。

豚由来細胞を用いる場合には、豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスについて、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、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、3.2.3、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。

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 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 日本脳炎ウイルス

マウス接種試験又は培養細胞接種試験により行う。

3.3.2.1.1 マウス接種試験

3.3.2.1.1.1 試験材料

3.3.2.1.1.1.1 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。

3.3.2.1.1.1.2 試験動物

2日齢以内の乳のみマウスを用いる。

3.3.2.1.1.2 試験方法

試料0.02mLずつを4匹以上の試験動物の脳内に注射し、14日間観察する。

3.3.2.1.1.3 判定

脳炎症状を示して死亡したマウスを感染とみなし、LD₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10^{7.0}LD₅₀以上でなければならない。

3.3.2.1.2 培養細胞接種試験

3.3.2.1.2.1 試験材料

3.3.2.1.2.1.1 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。

3.3.2.1.2.1.2 培養細胞

Vero細胞、ESK細胞又は適当と認められた細胞を小試験管で培養し、単層となったものを

用いる。

3.3.2.1.2.2 試験方法

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

3.3.2.1.2.3 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^{7.0}TCID₅₀以上でなければならない。

3.3.2.2 豚パルボウイルス

3.3.2.2.1 試験材料

3.3.2.2.1.1 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。

3.3.2.2.1.2 培養細胞

豚腎初代細胞、ESK細胞又は適当と認められた細胞を小試験管に培養し、単層となったものを用いる。

3.3.2.2.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37°Cで60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液1 mLを加え、31~32°Cで10~14日間培養した後、リン酸緩衝食塩液（付記2）（以下この項において「PBS」という。）で濃度を調整した0.5vol%の被凝集性の鶏又はモルモットの赤血球浮遊液をそれぞれ0.4mL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。

3.3.2.2.3 判定

赤血球の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^{6.0}TCID₅₀以上でなければならない。

3.3.2.3 ゲタウイルス

3.3.2.3.1 試験材料

3.3.2.3.1.1 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。

3.3.2.3.1.2 培養細胞

Vero細胞又は適当と認められた細胞を小試験管で培養し、単層となったものを用いる。

3.3.2.3.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37°Cで60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液1 mLを加え、37°Cで7日間培養し、観察する。

3.3.2.3.3 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^{6.0}TCID₅₀以上でなければならない。

3.3.3 マーカー試験

3.3.3.1 日本脳炎ウイルス

3.3.3.1.1 試験材料

3.3.3.1.1.1 注射材料

検体及び対照として中山株薬検系を用い、それぞれのウイルスが1 mL中に $10^{7.0}$ TCID₅₀又は $10^{7.0}$ LD₅₀以上含まれるように調製したものを、注射材料とする。

3.3.3.1.1.2 試験動物

3週齢のマウスを用いる。

3.3.3.1.2 試験方法

注射材料0.3mLずつを10匹以上の試験動物の腹腔内に注射し、14日間観察する。

3.3.3.1.3 判定

検体を注射したマウスの死亡率は、20%以下でなければならない。この場合、対照を注射したマウスの死亡率は、80%以上でなければならない。

3.3.3.2 豚パルボウイルス

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

豚腎初代細胞、ESK細胞又は適当と認められた細胞を小試験管に培養し、単層となったものを用いる。

3.3.3.2.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ8本以上の培養細胞に接種し、37°Cで60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液1 mLを加え、2群に分け、32°C及び37°Cでそれぞれ10～14日間培養する。培養終了時に、PBSで濃度を調整した0.5vol%の被凝集性の鶏又はモルモットの赤血球浮遊液をそれぞれ0.4mL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。

3.3.3.2.3 判定

検体のウイルス含有量は、32°Cで培養するとき、37°Cで培養する場合より100倍以上高くななければならない。

3.3.3.3 ゲタウイルス

3.3.3.3.1 乳のみマウスに対する病原性マーカー

3.3.3.3.1.1 試験材料

3.3.3.3.1.1.1 注射材料

検体及び対照としてゲタウイルス2078株を用い、それぞれのウイルスが1 mL中に約 $10^{5.0}$ TCID₅₀以上含まれるように調製したものを、注射材料とする。

3.3.3.3.1.1.2 試験動物

2～5日齢のマウスを用いる。

3.3.3.3.1.2 試験方法

注射材料0.02mLずつを10匹以上の試験動物の脳内に注射し、14日間観察する。

3.3.3.3.1.3 判定

検体を注射したマウスの死亡率は、20%以下でなければならない。この場合、対照を注射したマウスの死亡率は、80%以上でなければならない。

3.3.3.3.2 ブラックマーカー

3.3.3.3.2.1 試験材料

3.3.3.3.2.1.1 試料

検体及び対照としてゲタウイルス2078株を用い、それぞれ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。

3.3.3.3.2.1.2 培養細胞

HAL細胞又は適当と認められた細胞をシャーレに培養し、単層になったものを用いる。

3.3.3.3.2.2 試験方法

試料の0.4mLをそれぞれ2枚以上の培養細胞に接種し、37°Cで90分間静置吸着させた後、第1次重層寒天培地（付記3）を4mLずつ重層し、37°C、5 vol%炭酸ガス下で3日間培養後、第2次重層寒天培地（付記4）を2mLずつ重層し、翌日ブラック数を計測するとともに、その形状を観察する。

3.3.3.3.2.3 判定

培養4日後にブラック形状を観察するとき、検体のブラックはS（直径2mm以下）のブラックサイズでなければならない。対照の強毒ゲタウイルス2078株のブラックはL（直径4～5mm）又はM（直径2.5～3.5mm）のブラックサイズでなければならない。

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、固有の色調を有する乾燥物でなければならない。溶解したものは、固有の色調を有する液体でなければならない。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 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、適合しなければならない。

3.4.3 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、適合しなければならない。

3.4.4 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。

3.4.5 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。

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。

3.4.6 ウイルス含有量試験

3.4.6.1 日本脳炎ウイルス

3.3.2.1を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たり $10^{5.0}LD_{50}$ 又は $10^{5.0}TCID_{50}$ 以上でなければならない。

ただし、試験品中の日本脳炎ウイルス以外のウイルスを、各抗血清（付記5及び6）を非働化したもので中和したものを試料とする。

3.4.6.2 豚パルボウイルス

3.3.2.2を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たり $10_{s.0}TCID_{50}$ 以上でなければならない。

ただし、試験品中の豚パルボウイルス以外のウイルスを、各抗血清（付記6及び7）を非働化したもので中和したものを試料とする。

3.4.6.3 ゲタウイルス

3.3.2.3を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たり $10^{5.0}TCID_{50}$ 以上でなければならない。

ただし、試験品中のゲタウイルス以外のウイルスを、各抗血清（付記5及び7）を非働化したもので中和したものを試料とする。

3.4.7 安全試験

3.4.7.1 試験材料

3.4.7.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.7.1.2 試験動物

約1か月齢の豚を用いる。

3.4.7.2 試験方法

試験動物3頭を試験群、1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、対照群と共に21日間観察する。

3.4.7.3 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。

3.4.8 力価試験

3.4.8.1 日本脳炎ウイルス

赤血球凝集抑制試験又は中和試験により行う。

3.4.8.1.1 赤血球凝集抑制試験

3.4.8.1.1.1 試験材料

3.4.8.1.1.1.1 試験動物

3.4.7の試験に用いた動物を用いる。

3.4.8.1.1.1.2 赤血球凝集抗原

日本脳炎ウイルス赤血球凝集抗原（付記8）を用いる。

3.4.8.1.1.2 試験方法

3.4.7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。

試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

被検血清に25w/v%カオリン液又はアセトンを加えて処理し、がちょう又は7日齢以内の鶏の赤血球で処理した後、非働化する。各処理血清を牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液（付記9）又は適当と認められた希釈液で2倍階段希釈する。各希釈血清に8単位の赤血球凝集抗原を加えて4°Cで1夜処理した後、VAD液（付記10）で濃度を調整した0.33vol%のがちょう又は7日齢以内の鶏の赤血球浮遊液を加え、37°Cで60分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

3.4.8.1.1.3 判定

赤血球の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、20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。

3.4.8.1.2 中和試験

3.4.8.1.2.1 試験材料

3.4.8.1.2.1.1 試験動物

3.4.7の試験に用いた動物を用いる。

3.4.8.1.2.1.2 中和試験用ウイルス

日本脳炎ウイルス中山株薬検系、JaGAr-01株又は適当と認められた株を用いる。

3.4.8.1.2.1.3 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格2.1.1に適合した鶏胚初代細胞をシャーレに培養し、単層となったものを用いる。

3.4.8.1.2.2 試験方法

3.4.7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。試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液で5倍に希釈し、更に2倍階段希釈する。各希釈血清と0.4mL中約200PFUの中和試験用ウイルス液とを等量混合し、37°Cで90分間処理する。各混合液0.4mLずつをそれぞれ4枚の培養細胞に接種し、37°Cで60分間吸着させた後、混合液を除き、第1次重層寒天培地を加え、37°Cで3日間培養する。その後、第2次重層寒天培地を重層し、37°Cで1日間培養し、ブラック数を算出する。

3.4.8.1.2.3 判定

ブラック数がウイルス対照の50%以下に減少した血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

試験群の中和抗体価は、20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。

3.4.8.2 豚パルボウイルス

3.4.8.2.1 試験材料

3.4.8.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.8.2.1.2 試験動物

体重約350gのモルモットを用いる。

3.4.8.2.1.3 赤血球凝集抗原

豚パルボウイルス赤血球凝集抗原（付記11）を用いる。

3.4.8.2.2 試験方法

注射材料 5 mLずつを、5匹の試験動物の腹腔内に4週間隔で2回注射し、第2回目の注射後14日目に得られた各個体の血清について、赤血球凝集抑制試験を行う。

被検血清をPBSで5倍に希釈し、等量の25w/v%カオリン液を加え、常温で20分間処理する。遠心後の上清に鶏又はモルモットの赤血球を加え、常温で15分間処理し、再度遠心し、上清を採取する。

これをPBSで2倍階段希釈し、各段階の希釈液に8単位の赤血球凝集抗原を等量加え、4°Cで1夜処理する。これにPBSで濃度を調整した0.5vol%の被凝集性の鶏又はモルモットの赤血球浮遊液を加え、常温で60分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

3.4.8.2.3 判定

赤血球凝集を阻止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。

赤血球凝集抑制抗体価20倍以上を赤血球凝集抑制抗体陽性とする。

試験動物の赤血球凝集抑制抗体陽性率は、80%以上でなければならない。

3.4.8.3 ゲタウイルス

3.4.8.3.1 試験材料

3.4.8.3.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.8.3.1.2 試験動物

3.4.7の試験に用いた動物を用いる。

3.4.8.3.1.3 赤血球凝集抗原

ゲタウイルス赤血球凝集抗原（付記12）を用いる。

3.4.8.3.2 試験方法

3.4.7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。

試験群の血清は、それぞれ等量をプールする。

被検血清を25w/v%カオリン液又はアセトンを加えて処理し、がちょうの赤血球で処理した後、非働化する。各処理血清を牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釈液で2倍階段希釈する。各希釈血清に8単位の赤血球凝集抗原を加えて4°Cで1夜処

理した後、VAD液で濃度を調整した0.33vol%がちょう赤血球浮遊液を加え、37°Cで60分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

3.4.8.3.3 判定

赤血球の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、20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。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、1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

牛血清 20～50 mL

又は牛血清アルブミン 1 g

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2 リン酸緩衝食塩液

1,000mL中

塩化ナトリウム 8.0 g

塩化カリウム 0.2 g

リン酸水素二ナトリウム十二水和物 2.9 g

リン酸二水素カリウム 0.2 g

精製水 残量

1 mol/L塩酸でpHを6.8～7.2に調整する。

付記3 第1次重層寒天培地

1,000mL中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

牛血清 20～50 mL

寒天 10 g

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4 第2次重層寒天培地

1,000mL中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス2.95 g

ニュートラルレッド0.5 g

寒天10 g

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5 抗豚パルボウイルス血清

豚パルボウイルス90HS株又は適当と認められた株で免疫した兎又はモルモットの血清であって、検体又は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 抗ゲタウイルス血清

ゲタウイルス2078株又は適当と認められた株で免疫した兎又はモルモットの血清であって、検体又は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 抗日本脳炎ウイルス血清

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で免疫した兎又はモルモットの血清であって、検体又は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 日本脳炎ウイルス赤血球凝集抗原

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用いて調製した赤血球凝集抗原であって、赤血球凝集価が64倍以上のもの。

付記9 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

精製水 残量

牛血清アルブミンを0.2w/v%と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10 VAD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十二水和物 5.68 g

リン酸二水素ナトリウム二水和物 40.56 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、pHを6.0に調整する。

付記11 豚パルボウイルス赤血球凝集抗原

豚パルボウイルス90HS株又は適当と認められた株を用いて調製した赤血球凝集抗原であって、赤血球凝集価が64倍以上のもの。

付記12 ゲタウイルス赤血球凝集抗原

ゲタウイルスHaruna株又は適当と認められた株を用いて調製した赤血球凝集抗原であって、赤血球凝集価が64倍以上のもの。