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混合（アジュバント加）ワクチン（シード）

平成23年5月11日（告示第　939号）新規追加
平成29年1月19日（告示第　　89号）一部改正
平成29年10月11日（告示第1539号）一部改正
令和2年4月16日（告示第　　816号）一部改正

1 定義

シードロット規格に適合した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、同規格に適合した犬コロナウイルスを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てアルミニウムゲルアジュバントを加えたワクチン（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

2.1.1.1 名称

弱毒ジステンパーウイルスN-CDV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。犬腎株化細胞又は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 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、犬腎株化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℃以下又は凍結乾燥して５℃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。

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、犬腎株化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－30℃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。

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、犬腎株化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－30℃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。

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 犬アデノウイルス（２型）

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 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、犬腎株化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℃以下又は凍結乾燥して５℃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。

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、犬腎株化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－30℃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。

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、犬腎株化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－30℃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。

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 犬パラインフルエンザウイルス

2.1.3.1 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

2.1.3.2 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 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、犬腎株化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℃以下又は凍結乾燥して５℃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。

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、犬腎株化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－30℃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。

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、犬腎株化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－30℃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。

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。

2.1.4 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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その性状を示すものとする。

2.1.4.3 マスターシードウイルス

2.1.4.3.1 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、犬腎株化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℃以下又は凍結乾燥して５℃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。

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。

2.1.4.4 ワーキングシードウイルス

2.1.4.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、犬腎株化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－30℃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。

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。

2.1.4.5 プロダクションシードウイルス

2.1.4.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、犬腎株化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－30℃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。

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。

2.1.5 犬コロナウイルス

2.1.5.1 名称

犬コロナウイルスNL-18株又はこれと同等と認められた株

2.1.5.2 性状

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。

2.1.5.3 マスターシードウイルス

2.1.5.3.1 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、猫腎株化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℃以下又は凍結乾燥して５℃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。

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。

2.1.5.4 ワーキングシードウイルス

2.1.5.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、猫腎株化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－30℃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。

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。

2.1.5.5 プロダクションシードウイルス

2.1.5.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、猫腎株化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－30℃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。

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 ジステンパーウイルス

2.2.1.1 株化細胞

犬腎株化細胞又は製造に適当と認められた株化細胞を用いる。

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－60℃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。

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－60℃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。

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－60℃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。

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 犬アデノウイルス（２型）

2.2.2.1 株化細胞

犬腎株化細胞又は製造に適当と認められた株化細胞を用いる。

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、凍結して－60℃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。

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－60℃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。

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－60℃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。

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 犬パラインフルエンザウイルス

2.2.3.1 株化細胞

犬腎株化細胞又は製造に適当と認められた株化細胞を用いる。

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。

2.2.3.3 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－60℃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。

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－60℃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。

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－60℃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。

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。

2.2.4 犬パルボウイルス

2.2.4.1 株化細胞

犬腎株化細胞又は製造に適当と認められた株化細胞を用いる。

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。

2.2.4.3 マスターセルシード

2.2.4.3.1 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、2.2.4.2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－60℃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。

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。

2.2.4.4 ワーキングセルシード

2.2.4.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.4.2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－60℃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。

ワーキングセルシードについて、3.2.2の試験を行う。

2.2.4.5 プロダクションセルシード

2.2.4.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.4.2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－60℃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。

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。

2.2.5 犬コロナウイルス

2.2.5.1 株化細胞

猫腎株化細胞又は製造に適当と認められた株化細胞を用いる。

2.2.5.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.5.3 マスターセルシード

2.2.5.3.1 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、2.2.5.2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、凍結乾燥して－60℃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。

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。

2.2.5.4 ワーキングセルシード

2.2.5.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.5.2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－60℃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。

ワーキングセルシードについて、3.2.2の試験を行う。

2.2.5.5 プロダクションセルシード

2.2.5.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.5.2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－60℃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。

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 ジステンパーウイルス原液

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、培養した細胞を個体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、適当と認められた時期に個体別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液、遠心上清又はこれらを濃縮したものを混合し、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 プロダクションセルシードの培養

１回に処理し、培養した細胞を個体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、適当と認められた時期に個体別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液、遠心上清又はこれらを濃縮したものを混合し、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 プロダクションセルシードの培養

１回に処理し、培養した細胞を個体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、適当と認められた時期に個体別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液、遠心上清又はこれらを濃縮したものを混合し、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 プロダクションセルシードの培養

１回に処理し、培養した細胞を個体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。

2.3.4.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.4.1の細胞で培養し、適当と認められた時期に個体別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液、遠心上清又はこれらを濃縮したものを混合し、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 プロダクションセルシードの培養

１回に処理し、培養した細胞を個体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。

2.3.5.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.5.1の細胞で培養し、適当と認められた時期に個体別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液、遠心上清又はこれらを濃縮したものを混合し、原液とする。

原液について、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

ウイルス浮遊液を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、不活化ウイルス浮遊液とする。

2.3.5.4 不活化原液

不活化ウイルス浮遊液、不活化ウイルス浮遊液を適当と認められた方法で濃縮したもの又は不活化ウイルス浮遊液に適当と認められた保存剤を添加したものを不活化原液とする。

不活化原液について、3.3.4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、適当と認められた保存剤及び安定剤を添加してよい。

2.4.2 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犬コロナウイルス原液にアルミニウムゲルアジュバントを混合し、最終バルクとする。この場合、適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 製造用株の試験

3.1.1 マスターシードウイルスの試験

各ウイルス株のマスターシードウイルスについて、以下の試験を行う。ただし、不活化成分のウイルス株のマスターシードウイルスについては、3.1.1.5、3.1.1.6及び3.1.1.7の試験を行わなくてもよい。

3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.1.1.1.2又は1.4.2.3.1.1.2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

猿由来細胞を用いる場合には、内在性レトロウイルス（C、Dタイプ粒子）について、猫由来細胞を用いる場合には、猫白血病ウイルス／猫肉腫ウイルスについて、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

牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス、犬パルボウイルス、猫汎白血球減少症ウイルス、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、3.2.6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法

猿由来細胞を用いる場合には、内在性レトロウイルス（C、Dタイプ粒子）について、猫由来細胞を用いる場合には、猫白血病ウイルス／猫肉腫ウイルスについて、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

牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス、犬パルボウイルス、猫汎白血球減少症ウイルス、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、3.2.6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 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。

3.3.3.1.1.2 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。

3.3.3.1.2 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、37℃で７～８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。

3.3.3.1.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、$TCID_{50}$を算出する。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。

検体のウイルス含有量は、１mL中$10^{4.8}TCID_{50}$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。

3.3.3.2.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、$TCID_{50}$を算出する。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。

検体のウイルス含有量は１mL中$10^{7.3}TCID_{50}$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、室温で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。

3.3.3.3.3 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、$TCID_{50}$を算出する。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。

検体のウイルス含有量は１mL中$10^{6.3}TCID_{50}$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４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２）を加え、更に混合液と等量のVAD6.0液（付記３）で調製した0.5vol%豚赤血球浮遊液を加え、４℃で静置後、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。

3.3.3.4.3 判定

培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、$TCID_{50}$を算出する。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。

検体のウイルス含有量は１mL中$10^{5.7}TCID_{50}$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又は犬コロナウイルス抗原量測定試験

3.3.3.5.1 犬コロナウイルス含有量試験

3.3.3.5.1.1 試験材料

3.3.3.5.1.1.1 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。

3.3.3.5.1.1.2 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。

3.3.3.5.1.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ４本（穴）以上の培養細胞浮遊液に接種し、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。

3.3.3.5.1.3 判定

特異蛍光を認めたものを感染とみなし、$TCID_{50}$を算出する。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。

検体のウイルス含有量は１mL中$10^{4.5}TCID_{50}$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。

3.3.3.5.2 犬コロナウイルス抗原量測定試験

3.3.3.5.2.1 試験材料

検体、参照品（付記４）、抗犬コロナウイルスモノクローナル抗体（付記５）、固相化抗体（付記６）、標識抗体（付記７）、適当と認められた基質液を用いる。検体は適当と認められた緩衝液で希釈し、界面活性剤を添加したものを試料とし、参照品も同様に処理する。

3.3.3.5.2.2 試験方法

二抗体サンドイッチELISA法により犬コロナウイルス抗原量を測定する。ELISAプレートに固相化抗体を分注、固相化し、適当と認められたブロッキング液を反応させた後、洗浄する。以下各反応後に洗浄液で洗浄する。試料及び参照品を1.5倍階段希釈した各希釈液を各穴に加え、38～42℃で40～73時間反応させる。抗犬コロナウイルスモノクローナル抗体を各穴に加え、35～39℃で60～90分間反応させる。標識抗体を各穴に加え、35～39℃で60～90分間反応させる。適当と認められた基質液を各穴に加え、主波長405nm、副波長490nm又は492nmで参照品の規定の希釈倍率の吸光度を測定し、その値が参照品毎に規定された価となった時点を反応終了とし、全ウェルの吸光度を測定する。

3.3.3.5.2.3 判定

参照品に対する検体の相対抗原量を算出するとき、相対力価（RP）について1.00RP=2.264RU/mLとして換算した場合、500RU/mL以上でなければならない。

3.3.4 犬コロナウイルス不活化試験

3.3.4.1 試験材料

3.3.4.1.1 試料

検体２mL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。

3.3.4.1.2 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。

3.3.4.2 試験方法

試料を25cm^{2}以上の培養細胞２本に１mL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、さらに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。

3.3.4.3 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。

3.4 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ず、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は、固有の色調を有する均質な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。

3.4.2 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、混合生ワクチンは、適合しなければならない。ただし、窒素充塡製品では、本試験を省略することができる。

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、混合生ワクチンは、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、混合生ワクチンは、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、本試験を省略することができる。

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８、９及び10）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。

3.4.7.1.1.2 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。

3.4.7.1.2 試験方法

試料0.1mLずつを４本（穴）以上の培養細胞に接種し、37℃で７～８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、$TCID_{50}$を算出する。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。

試験品のウイルス含有量は１頭分当たり$10^{3.5}TCID_{50}$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９、10及び11）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。

3.4.7.2.1.2 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。

3.4.7.2.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、$TCID_{50}$を算出する。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。

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、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８、10及び11）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。

3.4.7.3.1.2 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。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、室温で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。

3.4.7.3.3 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、$TCID_{50}$を算出する。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。

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、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８、９及び11）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。

3.4.7.4.1.2 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。

3.4.7.4.2 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を加え、更にこの混合液と等量のVAD6.0液で調製した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、$TCID_{50}$を算出する。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。

試験品のウイルス含有量は１mL中$10^{5.0}TCID_{50}$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 チメロサール定量試験

チメロサールを添加した液状不活化ワクチンについては、一般試験法のチメロサー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 アルミニウム定量試験

一般試験法のアルミニウム定量試験を準用して試験するとき、液状不活化ワクチンのアルミニウム含有量は、１mL中固有の値以下でなければならない。

3.4.10 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。

3.4.11 安全試験

3.4.11.1 試験材料

3.4.11.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.11.1.2 試験動物

６か月齢未満の犬を用いる。

3.4.11.2 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、対照群と共に６週間観察する。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。

3.4.11.3 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。

3.4.12 力価試験

3.4.12.1 ジステンパー力価試験

3.4.12.1.1 試験材料

3.4.12.1.1.1 試験動物

3.4.11の試験に用いた犬を用いる。

3.4.12.1.1.2 中和試験用ウイルス

ジステンパーウイルスN-CDV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。

3.4.12.1.1.3 培養細胞

適当と認められた培養細胞を用いる。

3.4.12.1.2 試験方法

3.4.11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、ウイルス増殖用培養液又は適当と認められた希釈液で５倍階段希釈する。各希釈血清と0.1mL中約200$TCID_{50}$の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、４℃で一夜又は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７～８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。

3.4.12.1.3 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ED_{50}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、その中和抗体価とする。

3.4.12.2 犬アデノウイルス（２型）感染症力価試験

3.4.12.2.1 試験材料

3.4.12.2.1.1 試験動物

3.4.11の試験に用いた犬を用いる。

3.4.12.2.1.2 中和試験用ウイルス

犬アデノウイルス（２型）マンハッタン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。

3.4.12.2.1.3 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。

3.4.12.2.2 試験方法

3.4.11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、ウイルス増殖用培養液又は適当と認められた希釈液で２又は５倍階段希釈する。各希釈血清と0.1mL中約200$TCID_{50}$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。

3.4.12.2.3 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_{50}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、その中和抗体価とする。

3.4.12.3 犬パラインフルエンザ力価試験

3.4.12.3.1 試験材料

3.4.12.3.1.1 試験動物

3.4.11の試験に用いた犬を用いる。

3.4.12.3.1.2 中和試験用ウイルス

犬パラインフルエンザウイルスNL-CPI-5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。

3.4.12.3.1.3 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。

3.4.12.3.2 試験方法

3.4.11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、ウイルス増殖用培養液又は適当と認められた希釈液で２倍階段希釈する。各希釈血清と0.1mL中約200$TCID_{50}$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。

3.4.12.3.3 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_{50}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、その中和抗体価とする。

3.4.12.4 犬パルボウイルス感染症力価試験

3.4.12.4.1 試験材料

3.4.12.4.1.1 試験動物

3.4.11の試験に用いた犬を用いる。

3.4.12.4.1.2 中和試験用ウイルス又は赤血球凝集抗原

中和試験用ウイルスは、適当と認められた犬パルボウイルスを用いる。

赤血球凝集抗原は、適当と認められた犬パルボウイルス株を接種したCRFK細胞培養液を不活化したもので赤血球凝集価128倍以上のものを用いる。

3.4.12.4.1.3 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。

3.4.12.4.2 試験方法

中和試験又は赤血球凝集抑制試験を行う。

3.4.12.4.2.1 中和試験

3.4.11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。

各試験群の血清を非働化し、適当と認められた希釈液で２倍階段希釈する。各希釈血清と0.1mL中約200$TCID_{50}$の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、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35～37℃で６日間培養する。培養最終日に、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。

3.4.12.4.2.2 赤血球凝集抑制試験

3.4.11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、RDE（付記12）、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で２倍階段希釈する。各段階の希釈血清に８単位に調製した赤血球凝集抗原を等量加え、常温で60分間処理した後VAD6.0液で調製したウイルス調整希釈液で調製した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。

3.4.12.4.3 判定

3.4.12.4.3.1 中和試験判定

赤血球凝集を阻止したものを陽性とし、中和抗体価をED_{50}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、８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、その抗体価とする。

3.4.12.4.3.2 赤血球凝集抑制試験判定

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。

3.4.12.5 犬コロナウイルス感染症力価試験

3.4.12.5.1 試験材料

3.4.12.5.1.1 注射材料

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を注射材料とする。

3.4.12.5.1.2 試験動物

体重約300 gのモルモットを用いる。

3.4.12.5.1.3 中和試験用ウイルス

適当と認められた犬コロナウイルス株を用いる。

3.4.12.5.1.4 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。

3.4.12.5.2 試験方法

試験動物５匹を試験群、２匹を対照群とする。試験群に注射材料の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。各試験群の血清は、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50μL中約200$TCID_{50}$の中和試験用ウイルス液を混合し、37℃で60分間処理する。各混合液50μL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。

3.4.12.5.3 判定

培養細胞の４本（穴）のうち２本（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、その中和抗体価とする。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後２年７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

1,000 mL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

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２　牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液

1,000 mL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

牛血清アルブミンを0.2w/v%となるように加えたのち、pH9.0に調整する。

付記３　VAD6.0液

1,000 mL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pH6.0に調整する。

付記４　参照品

犬コロナウイルス製造用株を培養したウイルス浮遊液を不活化し、必要に応じて精製したもの又はこれにアルミニウムゲルアジュバントを添加したもの。攻撃試験により直接的又は間接的に対象動物に対する有効性が確認されたものであって、動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

付記５　抗犬コロナウイルスモノクローナル抗体

犬コロナウイルスに対するマウスモノクローナル抗体で、適当と認められたブロッキング液で至適濃度に希釈したもの。

付記６　固相化抗体

猫伝染性腹膜炎ウイルスを感染させた猫から採取した腹水から得た抗体で、適当と認められた緩衝液で至適濃度に希釈したもの。

付記７　標識抗体

アフィニティ精製ペルオキシダーゼ標識羊抗マウスIgG抗体で、適当と認められたブロッキング液で至適濃度に希釈したもの。

付記８　抗アデノウイルス（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９　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10　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11　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12　RDE

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