

迷入ウイルス否定試験法

平成26年11月6日（告示第1554号） 一部改正

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

生ワクチン及び血清類の試料中に検出する迷入ウイルスが存在しないことを調べる方法である。

1 試料

1.1 生ワクチン

各条で規定する場合を除き、検体及び液状試験品はそのまま、乾燥試験品は添付の溶解用液又はリン酸緩衝食塩液で溶解したものに、各条で示されたそれぞれの免疫血清を加え、37℃で1時間又は4℃で一夜処理し、完全に中和させたものを試料とする。

試料1接種量中には各条で規定する場合を除き、中和前のウイルス量として1頭（羽）分のウイルスが含まれるように調整する。

1.2 血清類

検体等を100倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、2～5℃で一夜透析し、保存剤を除いたものを試料とする。

2 試験方法

2.1 発育鶏卵接種試験

2.1.1 尿膜腔内接種試験

2.1.1.1 鶏胚観察

2.1.1.1.1 試験法

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の9～11日齢の発育鶏卵を用いる。試料0.1mLずつを10個の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で7日間培養する。培養最終日に開卵し、鶏胚の異常の有無を観察する。

2.1.1.1.2 判定

鶏胚が正常に発育し、異常を認めないときは、この試験に適合とする。

2.1.1.2 赤血球凝集試験

2.1.1.2.1 試験法

2.1.1.1 の培養最終日に採取した尿膜腔液に、0.5vol%の鶏赤血球浮遊液を等量加え、4℃で60分間静置し、赤血球の凝集の有無を観察する。

2.1.1.2.2 判定

尿膜腔液に赤血球の凝集を認めないときは、この試験に適合とする。

2.1.2 漿尿膜上接種試験

2.1.2.1 試験法

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の10～12日齢の発育鶏卵を用いる。試料0.1mLずつを10個の発育鶏卵の漿尿膜上に接種し、37℃で5日間培養する。培養最終日に開卵し、鶏胚及び漿尿膜の異常の有無を観察する。

2.1.2.2 判定

鶏胚が正常に発育し、漿尿膜に異常を認めないときは、この試験に適合とする。

2.2 鶏由来細胞接種試験

2.2.1 鶏腎培養細胞接種試験

2.2.1.1 細胞観察

2.2.1.1.1 試験法

生ワクチン製造用材料の規格 2.2.1 の鶏腎初代細胞を用いる。細胞を20cm²以上のシャーレ4枚

以上に培養し、試料 0.2mL ずつを接種し、37℃で7日間培養する。培養液及び細胞を採取し、その0.2mL ずつを培養細胞シャーレ4枚以上に接種して継代し、37℃で7日間培養し、CPEの有無を観察する。

2.2.1.1.2 判定

観察期間中、培養細胞に CPE を認めないときは、この試験に適合とする。

2.2.1.2 赤血球吸着試験

2.2.1.2.1 試験法

2.2.1.1 の観察最終日に、培養細胞シャーレの培養液を除き、0.1vol%の鶏赤血球浮遊液を重層し、4℃で60分間静置後、顕微鏡下で赤血球吸着の有無を観察する。

2.2.1.2.2 判定

培養細胞に赤血球吸着を認めないときは、この試験に適合とする。

2.2.2 鶏胚培養細胞接種試験

2.2.2.1 細胞観察

2.2.2.1.1 試験法

鶏白血病ウイルスに感受性のある生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞を用いる。細胞を 20 cm²以上のシャーレ8枚以上に培養し、24時間以内に試料 0.2mL ずつを接種し、37℃で培養する。この細胞を3～5日ごとに3代目まで継代し、各代の細胞について CPE の有無を観察する。

2.2.2.1.2 判定

観察期間中、培養細胞に CPE を認めないときは、この試験に適合とする。

2.2.2.2 赤血球吸着試験

2.2.2.2.1 試験法

2.2.2.1 の3代目の培養細胞シャーレ4枚以上について、培養液を除き、0.1vol%の鶏赤血球浮遊液を重層し、4℃で60分間静置後、赤血球吸着の有無を観察する。

2.2.2.2.2 判定

培養細胞に赤血球吸着を認めないときは、この試験に適合とする。

2.2.2.3 COFAL 試験

2.2.2.3.1 試験法

2.2.2.1 の3代目の培養細胞シャーレ4枚の細胞を洗浄後、培養液の 1/20 量の 1 w/v%ゼラチン加ベロナル緩衝食塩液を加えてかき採った細胞浮遊液を3回凍結融解し、その遠心上清を採って細胞抽出液を作る。これを抗原として鶏白血病ウイルスに特異的なはと、兎又はハムスター血清、3単位の溶血素、4単位のモルモット補体及び2 vol%の羊赤血球を用いて Kolmer 法により COFAL 試験を行う。

2.2.2.3.2 判定

細胞抽出液が COFAL 試験によって陰性であったときは、この試験に適合とする。

2.2.2.4 細網内皮症ウイルス否定試験

2.2.2.4.1 試験法

2.2.2.1.1 の試料を接種し、培養した初代の細胞浮遊液を、別に新しく培養した鶏胚初代細胞に接種し、37℃で4日間培養する。その細胞浮遊液を3代目に継代するとき、カバーグラス入り培養細胞シャーレ4枚以上に接種して37℃で4日間培養した後、抗細網内皮症ウイルス血清による蛍光抗体法を行い、観察する。

2.2.2.4.2 判定

培養細胞に特異蛍光抗原を認めないときは、この試験に適合とする。

2.3 豚由来細胞接種試験

2.3.1 豚腎培養細胞接種試験

2.3.1.1 細胞観察

2.3.1.1.1 試験法

豚腎初代又は継代細胞を用いる。

試料 4 mL を、1 mL につき 20cm² 以上の培養細胞に接種し、37℃で5日間培養し CPE の有無を観察した後、次代に細胞を継代し、37℃で7日間培養して CPE の有無を観察する。

2.3.1.1.2 判定

観察期間中、培養細胞に CPE を認めないときは、この試験に適合とする。

2.3.1.2 赤血球吸着試験

2.3.1.2.1 試験法

2.3.1.1 の観察最終日に培養細胞表面をリン酸緩衝食塩液で2回洗浄後、培養細胞を3群に分け、モルモット、がちょう及び7日齢以内の鶏の 0.1vol% 赤血球浮遊液をそれぞれの群に重層し、4℃で60分間及び37℃で30分間静置後、顕微鏡下で赤血球吸着の有無を観察する。

2.3.1.2.2 判定

培養細胞に赤血球吸着を認めないときは、この試験に適合とする。

2.3.1.3 豚熱ウイルス否定試験

次の 2.3.1.3.1 又は 2.3.1.3.2 により試験を行う。

2.3.1.3.1 蛍光抗体法

2.3.1.3.1.1 試験法

2.3.1.1.1 の試料接種後5日目の培養上清を採取し、その 1 mL を 3 cm² 以上のカバーグラスに培養した 2.3.1.1 の培養細胞に接種し、37℃で24～48時間培養後、抗豚熱ウイルス血清による蛍光抗体法を行い、観察する。

2.3.1.3.1.2 判定

培養細胞に特異蛍光抗原を認めないときは、この試験に適合とする。

2.3.1.3.2 END 法及び干渉法

2.3.1.3.2.1 試験法

2.3.1.1.1 の試料接種後5日目の培養上清を採取し、その 0.1mL ずつをそれぞれ 20 本（穴）以上の小試験管等に分注し、細胞増殖用培養液に浮遊した豚精巢初代細胞を 0.5mL ずつ加える。37℃で4日間静置培養後、培養細胞を2群に分け、END 法及び WEE ウイルスによる干渉法を行う。

2.3.1.3.2.2 判定

培養細胞に豚熱ウイルスを認めないときは、この試験に適合とする。

2.3.1.4 豚サーコウイルス否定試験

2.3.1.4.1 試験法

PPK-3F 細胞を用いる。

試料 2 mL を、1 mL につき 20cm² 以上の培養細胞に接種し、グルコサミン処理を行い、37℃で5日間培養した後、次代に細胞を継代する。継代した細胞を 37℃で4日間培養した後、次代に継代し、継代した細胞を 37℃で3日間培養した後、抗豚サーコウイルス血清による蛍光抗体法を行う。

2.3.1.4.2 判定

培養細胞に特異蛍光抗原を認めないときは、この試験に適合とする。

2.3.2 豚精巢培養細胞接種試験

2.3.2.1 細胞観察

2.3.2.1.1 試験法

豚精巢初代又は継代細胞を用いる。

試料 2 mL を、1 mL につき 20cm² 以上の培養細胞に接種し、37℃で培養し、10日間観察する。

2.3.2.1.2 判定

観察期間中、培養細胞に CPE を認めないときは、この試験に適合とする。

2.3.2.2 赤血球吸着試験

2.3.2.2.1 試験法

2.3.2.2.1 の観察最終日に細胞表面をリン酸緩衝食塩液で2回洗浄後、培養細胞を3群に分け、モルモット、がちょう及び7日齢以内の鶏の 0.1vol%赤血球浮遊液をそれぞれの群に重層し、4℃で60分間及び37℃で30分間静置し、顕微鏡下で赤血球吸着の有無を観察する。

2.3.2.2.2 判定

培養細胞に赤血球吸着を認めないときは、この試験に適合とする。

2.4 牛由来細胞接種試験

2.4.1 牛腎培養細胞接種試験

2.4.1.1 細胞観察

2.4.1.1.1 試験法

牛腎継代細胞を用いる。

試料2 mLを、1 mLにつき20cm²以上の培養細胞に接種し、34～36℃で5日間培養し、CPEの有無を観察した後、次代に継代培養し、単層となったとき、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を洗浄し、維持用培養液を加え、37℃で5日間培養し、CPEの有無を観察する。

2.4.1.1.2 判定

観察期間中、培養細胞に CPE を認めないときは、この試験に適合とする。

2.4.1.2 赤血球吸着試験

2.4.1.2.1 試験法

2.4.1.2.1 の観察最終日に培養細胞を2群に分け、モルモット及びがちょうの 0.1vol%赤血球浮遊液をそれぞれ重層し、60分間静置後、顕微鏡下で赤血球吸着の有無を観察する。

2.4.1.2.2 判定

培養細胞に赤血球吸着を認めないときは、この試験に適合とする。

2.4.2 牛精巣培養細胞接種試験

2.4.2.1 試験法

牛精巣継代細胞を用いる。

試料2 mLを、1 mLにつき20cm²以上の培養細胞に接種し、34～36℃で5日間培養し、CPEの有無を観察した後、細胞を10本の小試験管に継代し、5日間培養し、CPEの有無を観察する。培養液を除き、1 mL中約10⁵TCID₅₀の牛ウイルス性下痢ウイルス Nose 株を含む維持用培養液0.5mLをそれぞれに加え、34～36℃で7日間回転培養し、CPEの有無を観察する。

2.4.2.2 判定

観察期間中、牛ウイルス性下痢ウイルス接種前の培養細胞に CPE を認めず、接種後の培養細胞に CPE を認めたときは、この試験に適合とする。

2.5 犬由来細胞接種試験

2.5.1 犬腎培養細胞接種試験

2.5.1.1 細胞観察

2.5.1.1.1 試験法

犬腎初代又は継代細胞を用いる。

試料2 mLを、1 mLにつき20cm²以上の培養細胞に接種し、36℃で5日間培養し、CPEの有無を観察した後、次代に継代し、36℃で10日間培養し、CPEの有無を観察する。

2.5.1.1.2 判定

観察期間中、培養細胞に CPE を認めないときは、この試験に適合とする。

2.5.1.2 赤血球吸着試験

2.5.1.2.1 試験法

2.5.1.1 の観察最終日に、培養液を除き、0.1vol %のモルモット赤血球浮遊液を重層し、4℃で 60 分間静置後、顕微鏡下で赤血球吸着の有無を観察する。

2.5.1.2.2 判定

培養細胞に赤血球吸着を認めないときは、この試験に適合とする。

2.6 猫由来細胞接種試験

2.6.1 猫腎培養細胞接種試験

2.6.1.1 細胞観察

2.6.1.1.1 試験法

猫腎初代又は継代細胞を用いる。

試料 2 mL を、1 mL につき 20cm²以上の培養細胞に接種し、36℃で 5 日間培養し、CPE の有無を観察した後、次代に継代し、36℃で 10 日間培養し、CPE の有無を観察する。

2.6.1.1.2 判定

観察期間中、培養細胞に CPE を認めないときは、この試験に適合とする。

2.6.1.2 犬パルボウイルス及び猫汎白血球減少症ウイルス否定試験

2.6.1.2.1 試験法

2.6.1.1 の観察最終日の培養液に、0.2w/v%牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液を等量加える。さらに、この混合液と等量の VAD6.0 液で調製した 0.5vol%の豚赤血球液を加えて、4℃で 18 時間静置後、赤血球凝集の有無を観察する。

2.6.1.2.2 判定

赤血球の凝集を認めないときは、この試験に適合とする。

2.7 その他の動物由来細胞接種試験

2.7.1 モルモット腎培養細胞接種試験

2.7.1.1 細胞観察

2.7.1.1.1 試験法

モルモット腎初代細胞を用いる。

試料 2 mL を、1 mL につき 20cm²以上の培養細胞に接種し、37℃で 10 日間培養し、CPE の有無を観察する。

2.7.1.1.2 判定

観察期間中、培養細胞に CPE を認めないときは、この試験に適合とする。

2.7.1.2 赤血球吸着試験

2.7.1.2.1 試験法

2.7.1.1 の観察最終日に細胞表面をリン酸緩衝食塩液で 2 回洗浄後、培養細胞を 3 群に分け、モルモット、がちょう及び 7 日齢以内の鶏の 0.1vol%赤血球浮遊液をそれぞれの群に重層し、4℃で 60 分間及び 37℃で 30 分間静置後、顕微鏡下で赤血球吸着の有無を観察する。

2.7.1.2.2 判定

培養細胞に赤血球吸着を認めないときは、この試験に適合とする。

2.7.2 MA-104 細胞接種試験

2.7.2.1 ロタウイルス否定試験

次の 2.7.2.1.1 又は 2.7.2.1.2 により試験を行う。

2.7.2.1.1 細胞観察

2.7.2.1.1.1 試験法

試料 0.1mL ずつを 10 本以上の培養細胞に接種し、37℃で 60 分間吸着後、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を洗浄し、適量のトリプシンを添加した培養液を加え、37℃で 7 日間回転培養し CPE の有無を観察する。

2.7.2.1.1.2 判定

観察期間中、培養細胞に CPE を認めないときは、この試験に適合とする。

2.7.2.1.2 蛍光抗体法

2.7.2.1.2.1 試験法

試料 0.1mL を 3 cm² 以上のカバーグラスに培養した培養細胞に接種し、37℃で 48 時間培養後、抗ロタウイルス血清による蛍光抗体法を行い、観察する。

2.7.2.2.2 判定

培養細胞に特異蛍光抗原を認めないときは、この試験に適合とする。

2.8 動物接種試験

2.8.1 牛又は羊接種試験

2.8.1.1 牛伝染性リンパ腫ウイルス否定試験

2.8.1.1.1 試験法

体重 100 ～ 200kg の健康な牛又は体重 30 ～ 50kg の健康な羊を用いる。

試料 10mL を 1 頭の牛又は羊の筋肉内に注射し、2 及び 3 か月目に採血して得た血清について、受身赤血球凝集反応、酵素抗体反応又は寒天ゲル内沈降反応により牛伝染性リンパ腫ウイルス抗体の検出を行う。

2.8.1.1.2 判定

牛伝染性リンパ腫ウイルスに対する抗体を認めないとき、この試験に適合とする。

2.8.2 乳のみマウス脳内接種試験

2.8.2.1 試験法

3 日齢以内のマウスを用いる。

試料 0.02mL ずつを 10 匹のマウスの脳内に注射し、5 日目に採取した脳の混合乳剤遠心上清を更に 10 匹のマウスの脳内に注射し、10 日間観察する。

2.8.2.2 判定

マウスに死亡又は神経症状を認めないときは、この試験に適合とする。