

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・犬レプトスピラ病（カニコーラ・コペンハーゲニー・ヘブドマディス）混合ワクチン

平成16年4月23日（告示第977号）新規追加

平成29年1月19日（告示第 89号）一部改正

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「混合生ワクチン」という。）と、レプトスピラ・カニコーラ、レプトスピラ・コペンハーゲニー及びレプトスピラ・ヘブドマディスの全培養菌液を不活化したワクチン（以下「液状不活化ワクチン」という。）とを組み合わせたものである。

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DFE-HC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。発育鶏卵の漿尿膜上又は感受性のある培養細胞に接種すると、ポック又は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、生ワクチン製造用材料の規格2.2.1の鶏腎初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°C 以下又は凍結乾燥して 5°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）OD-N/SL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、生ワクチン製造用材料の規格2.6.1の豚腎培養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°C 以下又は凍結乾燥して 5°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DL-E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、生ワクチン製造用材料の規格2.1.1の鶏胚初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°C 以下又は凍結乾燥して 5°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 29-F/LT株又はこれと同等と認められた株

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。

2.1.4.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、猫腎培養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°C 以下又は凍結乾燥して 5°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 レプトスピラ・カニコーラ株

2.1.5.1 名称

レプトスピラ・カニコーラ（以下「L・カニコーラ」という。）フント ユートレヒトIV株又はこれと同等と認められた株

2.1.5.2 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。

2.1.5.3 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承認さ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。

2.1.6 レプトスピラ・コペンハーゲニー株

2.1.6.1 名称

レプトスピラ・コペンハーゲニー（以下「L・コペンハーゲニー」という。）芝浦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・コペンハーゲニー血清（付記2）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承認さ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・ヘブドマディス株

2.1.7.1 名称

レプトスピラ・ヘブドマディス（以下「L・ヘブドマディス」という。）秋疫B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・ヘブドマディス血清（付記3）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承認さ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

生ワクチン製造用材料の規格2.2.1の鶏腎初代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.1.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

2.2.2 犬アデノウイルス（2型）

2.2.2.1 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格2.6.1の豚腎初代細胞又は製造に相当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.2.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

2.2.3 犬パラインフルエンザウイルス

2.2.3.1 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格2.1.1の鶏胚初代細胞又は製造に相当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.3.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

2.2.4 犬パルボウイルス

2.2.4.1 培養細胞

猫腎培養細胞又は製造に相当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.4.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

2.2.5 L・カニココーラ

2.2.5.1 培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

2.2.6 L・コペンハーゲニー

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・ヘブドマディス

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、ろ液又は遠心上清を原液とする。この場合、相当と認められた保存剤を添加してもよい。

原液について、3.3.1及び3.3.2.1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。

個体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、ろ液又は遠心上清を原液とする。この場合、適当と認められた保存剤を添加してもよい。

原液について、3.3.1及び3.3.2.2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。

2.3.3.2 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、ろ液又は遠心上清を原液とする。この場合、適当と認められた保存剤を添加してもよい。

原液について、3.3.1及び3.3.2.3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。

2.3.4.2 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、ろ液又は遠心上清を原液とする。この場合、適当と認められた保存剤を添加してもよい。

原液について、3.3.1及び3.3.2.4の試験を行う。

2.3.5 L・カニコーラ原液

2.3.5.1 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。

2.3.5.2 不活化

適当と認められた方法で培養菌液を不活化し、遠心して集菌し、適当と認められた溶液に浮遊させたものを、原液とする。

原液について、3.3.3の試験を行う。

2.3.6 L・コペンハーゲニー原液

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

適当と認められた方法で培養菌液を不活化し、遠心して集菌し、適当と認められた溶液に浮遊させたものを、原液とする。

原液について、3.3.3の試験を行う。

2.3.7 L・ヘブドマデイス原液

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

適当と認められた方法で培養菌液を不活化し、遠心して集菌し、適当と認められた溶液に浮遊させたものを、原液とする。

原液について、3.3.3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、適当と認められた安定剤を添加してもよい。

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L・カニコーラ原液、L・コペンハーゲニー原液及びL・ヘブドマデイス原液を混合し、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、製造に継代細胞を用いている場合は、3.1.3の試験を実施しなくてもよい。

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、0.1vol%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。

3.1.3 封入体染色試験

3.1.1の試験最終日に培養カバーグラスをリン酸緩衝食塩液で洗浄し、固定した後、ギムザ染色し、封入体の有無を観察するとき、培養細胞に封入体を認めてはならない。

3.2 培養菌液の試験

3.2.1 夾雑菌否定試験

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 総菌数試験

菌数計算盤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 ウイルス含有量試験

3.3.2.1 ジステンパーウイルス含有量試験

3.3.2.1.1 試験材料

3.3.2.1.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記4）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。

3.3.2.1.1.2 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。

3.3.2.1.2 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7日間回転培養し、観察する。

3.3.2.1.3 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 $10^{4.5}$ TCID₅₀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。

3.3.2.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験

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。

3.3.2.2.1.2 培養細胞

豚腎培養細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

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7日間回転培養し、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。

3.3.2.2.3 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 $10^{6.5}$ TCID₅₀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。

3.3.2.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

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。

3.3.2.3.1.2 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。

3.3.2.3.2 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、30℃で7日間回転培養し、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^{6.5}TCID₅₀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。

3.3.2.4 犬パルボウイルス含有量試験

3.3.2.4.1 試験材料

3.3.2.4.1.1 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。

3.3.2.4.1.2 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。

3.3.2.4.2 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、32℃で24時間静置培養した後、ウイルス増殖用培養液と交換し、更に32℃で6日間回転培養する。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5）を加え、更にこの混合液と等量の0.3～0.5vol%豚赤血球浮遊液を加え、2～5℃で静置後観察する。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。

3.3.2.4.3 判定

培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10^{6.5}TCID₅₀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 不活化試験

3.3.3.1 試験材料

3.3.3.1.1 試料

検体5 mLを100倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、2～5℃で一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.3.3.1.2 培地

適当と認められた培地を用いる。

3.3.3.2 試験方法

培地20mLを入れた試験管3本に試料0.5mLずつを接種し、35～37℃で6～8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。

3.3.3.3 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。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 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。

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、本試験の実施を省略することができる。

3.4.7 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精製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、2.6.1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6）、抗犬アデノウイルス（2型）血清（付記7）、抗犬パラインフルエンザウイルス血清（付記8）及び抗犬パルボウイルス血清（付記9）を、それぞれ非働化したものを用いる。

3.4.8 ウイルス含有量試験

3.4.8.1 ジステンパーウイルス含有量試験

3.4.8.1.1 試験材料

3.4.8.1.1.1 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精製水で溶解する。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7、8及び9）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。

3.4.8.1.1.2 培養細胞

Vero細胞を用いる。

3.4.8.1.2 試験方法

試料0.1mLずつを4本以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間回転培養し、観察する。

3.4.8.1.3 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。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{3.5}TCID₅₀以上でなければならない。

3.4.8.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験

3.4.8.2.1 試験材料

3.4.8.2.1.1 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精製水で溶解する。試験品中の犬アデノウイルス（2型）以外のウイルスの各抗血清（付記6、8及び9）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。

3.4.8.2.1.2 培養細胞

豚腎培養細胞を用いる。

3.4.8.2.2 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7日間回転培養し、観察する。

3.4.8.2.3 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。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{5.5}TCID₅₀以上でなければならない。

3.4.8.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

3.4.8.3.1 試験材料

3.4.8.3.1.1 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精製水で溶解する。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の各抗血清（付記6、7及び9）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。

3.4.8.3.1.2 培養細胞

Vero細胞を用いる。

3.4.8.3.2 試験方法

試料0.1mLずつを4本以上の培養細胞に接種し、30°Cで7日間回転培養し、観察する。

3.4.8.3.3 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。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{5.5}TCID₅₀以上でなければならない。

3.4.8.4 犬パルボウイルス含有量試験

3.4.8.4.1 試験材料

3.4.8.4.1.1 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精製水で溶解する。試験品中の犬パルボウイルス以外のウイルスの各抗血清（付記6、7及び8の血清）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。

3.4.8.4.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.4.8.4.2 試験方法

試料0.1mLずつを4本以上の培養細胞に接種し、32°Cで24時間静置培養した後、ウイルス増殖用培養液と交換し、32°Cで6日間回転培養する。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0.3～0.5vol%豚赤血球浮遊液を加え、

2～5℃で静置後、観察する。

3.4.8.4.3 判定

培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{5.5}TCID₅₀以上でなければならない。

3.4.9 チメロサル定量試験

チメロサ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。

3.4.10 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頭分を用法に従ってそれぞれ注射し、対照群とともに4週間観察する。

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

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、1 vol%牛胎子血清加リン酸緩衝食塩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200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、2～5℃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本以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間回転培養し、観察する。

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ED₅₀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。

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

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、それぞれ等量をプールする。

各プール血清を非働化し、1 vol%牛胎子血清加リン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。各希釈血清と0.1mL中約200TCID₅₀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本以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間回転培養し、観察する。

3.4.12.2.3 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ED₅₀で求める。

試験群の中和抗体価は、50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。

3.4.12.3 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

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

Vero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、それぞれ等量をプールする。

各プール血清を非働化し、1 vol%牛胎子血清加リン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。各希釈血清と0.1mL中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、適当な温度で60分間処理する。この各混合液0.1mLずつをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間回転培養し、観察する。

3.4.12.3.3 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ED₅₀で求める。

試験群の中和抗体価は、10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。

3.4.12.4 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

中和試験用ウイルスは、犬パルボウイルスCP-49株又は適当と認められた犬パルボウイルスを用いる。

3.4.12.4.1.3 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.4.12.4.2 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、1 vol%牛胎子血清加リン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。各希釈血清と0.1mL中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、35～37°Cで60分間処理する。この各混合液0.1mLずつをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37°C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37°Cで6日間回転培養する。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、さらに、この混合液と等量のVAD6.0液（付記10）で調整した0.3～0.5vol%豚赤血球浮遊液を添加し、2～5°Cで静置後、赤血球凝集の有無を観察する。

3.4.12.4.3 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ED₅₀で求める。

試験群の中和抗体価は、200倍以上でなければならない。この場合、対照群では、4倍未満でなければならない。

3.4.12.5 犬レプトスピラ病力価試験

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300gのモルモット又は体重60～100gのハムスターを用いる。

3.4.12.5.1.3 凝集反応用菌液

L・カニコーラ、L・コペンハーゲニー及びL・ヘブドマディスの生菌浮遊液を用いる。

3.4.12.5.2 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。

3.4.12.5.3 判定

L・カニコーラ及びL・コペンハーゲニーの菌液に対して80%以上が8倍以上の、L・ヘブドマディスについては10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、1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 抗L・カニコーラ血清

L・カニコーラの不活化菌液で免疫した兎又はモルモットの血清で、凝集抗体価40倍以上のもの。

付記2 抗L・コペンハーゲニー血清

L・コペンハーゲニーの不活化菌液で免疫した兎又はモルモットの血清で、凝集抗体価40倍以上のもの。

付記3 抗L・ヘブドマディス血清

L・ヘブドマディスの不活化菌液で免疫した兎又はモルモットの血清で、凝集抗体価40倍以上のもの。

付記4 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

牛胎子血清 20 mL

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 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

水酸化ナトリウム液でpHを9.0に調整する。

付記6 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7 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8 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9 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10 VAD6.0液

1,000mL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

ホウ酸緩衝食塩液と等量混合してpHを6.0に調整する。