

写

28消安第4127号
平成29年1月19日

動物医薬品検査所長 殿

消費・安全局長

動物用生物学的製剤基準の一部改正等について

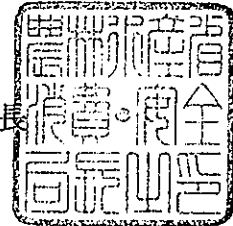
このことについて、別添写しのとおり各都道府県知事宛て通知したので、
了知されたい。



28消安第4127号
平成29年1月19日

北海道知事 殿

農林水産省消費・安全局長



動物用生物学的製剤基準の一部改正等について

今般、「動物用生物学的製剤基準」（平成14年10月3日農林水産省告示第1567号）、「動物用生物学的製剤検定基準」（平成14年10月3日農林水産省告示第1568号）、「動物用医薬品の検定手数料並びに試験品及び出願者の保存用品として抜き取らせるべき数量」（平成25年6月18日農林水産省告示第2009号）及び「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律第四十三条第一項の規定に基づき、農林水産大臣の指定する医薬品を定める等の件」（昭和36年2月1日農林省告示第66号）の一部が別紙1から別紙4までのとおり改正されましたので、貴庁に備え置いて縦覧願います。

これらの改正に伴い、「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律関係事務の取扱いについて」（平成12年3月31日付け12畜A第729号農林水産省畜産局長通知）の一部を別紙5のとおり改正することとしましたので、御了知願います。

(別紙1)

○農林水産省告示第八十九号

医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（昭和三十五年法律第四百十五号）第八十三条第一項の規定により読み替えて適用される同法第四十二条第一項の規定に基づき、動物用生物学的製剤基準（平成十四年十月三日農林水産省告示第千五百六十七号）の一部を次のように改正し、公布の日から施行する。

平成二十九年一月十九日

農林水産大臣 山本 有二

（「次のよう」は、省略し、その関係書類を農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課及び都道府県庁に備え置いて縦覧に供する。）

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部の豚サーコウイルス（2型・組換え型）感染症（カルボキシビニルポリマーアジュバント加）不活化ワクチンの項の次に次のように加える。

豚サーコウイルス（2型・組換え型）感染症（酢酸トコフェロール・油性アジュバント加）不活化ワクチン

1 定義

組換えDNA技術を応用して製造された豚サーコウイルス2型オープンリーディングフレーム2（以下「PCV2ORF2」という。）遺伝子を挿入したバキュロウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化し、酢酸トコフェロール及び油性アジュバントを添加したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

PCV2ORF2遺伝子組換えオートグラフィア核多角体ウイルス（AcNPV）BacPCV2-Orf2 ; 98-99株又は適当と認められた株

2.1.2 性状

Sf21細胞（付記1）で増殖する。PCV2ORF2特異的プライマーを用いて増幅したDNA断片の塩基配列は、核酸を供与した豚サーコウイルス2型と同じである。

2.1.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、Sf21細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

継代は、原株にあっては3代以内、種ウイルスにあっては2代以内でなければならない。

原株及び種ウイルスは、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 培養細胞

Sf21細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.3 原液

2.3.1 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。

2.3.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期の培養液を超音波処理したものを不活化前原液とする。

不活化前原液について、3.2の試験を行う。

2.3.4 不活化

原液に2-ブロモエチルアミン臭化水素酸塩又は適当と認められた不活化剤を加えて不活化

し、遠心した上清を原液とする。

原液について、3.3の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液に適量のアジュバントを添加し、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、3.4の試験を行う。

3 試験法

3.1 培養細胞の試験

個体別培養細胞の一部を対照培養細胞とし、これについて次に掲げる試験を行う。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。

3.1.1 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、5～7日間培養し、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回洗浄したのち、鶏、ヒト及びモルモットの赤血球濃度がそれぞれ1.0vol%になるように調整した赤血球混合液を重層し、60分間静置した後、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。

3.2 不活化前原液の試験

3.2.1 ウイルス含有量試験

3.2.1.1 試験材料

3.2.1.1.1 試料

検体をSF9細胞（付記2）を浮遊させた適当と認められた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。

3.2.1.1.2 培養細胞

SF9細胞又は適当と認められた細胞を用いる。

3.2.1.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ96穴マイクロプレートの4穴以上に分注し、28℃で5日間培養する。培養後、96vol%冷エタノールで固定し、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。

3.2.1.3 判定

特異蛍光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。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 原液の試験

3.3.1 不活化試験

3.3.1.1 試験材料

3.3.1.1.1 試料

検体を試料とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試料とする。

3.3.1.1.2 培養細胞

SF9細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.3.1.2 試験方法

試料をローラーボトルに単層を形成した培養細胞に25mLずつ接種し、28℃で60分間吸着した後、ウイルス増殖用培養液を加え、28℃で3～4日間培養後、接種した培養細胞を継代し、更に28℃で10～11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。

3.3.1.3 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。

3.3.2 抗原定量試験

3.3.2.1 試験材料

3.3.2.1.1 試料

検体を希釈液（付記3）で5,000倍に希釈し、試料とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試料とする。

3.3.2.2 試験方法

モノクローナル抗体吸着プレート（付記4）に希釈液を100 μ Lずつ全穴に加える。試料、参照陽性抗原（付記5）及び参照標準抗原（付記6）各200 μ Lを希釈液で1.5倍階段希釈し、37℃で60分反応させる。一部、希釈液のみのブランク対照を設定する。反応後、洗浄液（付記7）300 μ Lで4回洗浄し、ビオチン標識化PCV2特異的モノクローナル抗体（付記8）100 μ Lを各穴に加える。37℃で60分間反応後、洗浄液300 μ Lで4回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識アビジン液（付記9）100 μ Lを各穴に加える。37℃で45分間反応後、洗浄液300 μ Lで8回洗浄し、基質液（付記10）を各穴に100 μ Lずつ加え、常温で15分間反応させた後、2 mol/L 硫酸を各穴に50 μ Lずつ加え、反応を停止させ、波長450nm で吸光度を測定する。参照陽性抗原の吸光度から検量線を作成し、これから試料の抗原の単位を算出する。このとき、ブランク対照の平均吸光度は、0.05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、その試験方法とする。

3.3.2.3 判定

試料中のELISA抗原価は、5,000単位/mL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、その抗原量とする。

3.3.3 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。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 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、上層は、乳白色、不透明及び水様の懸濁液であり、底面に淡黄褐色の沈殿物を認める。攪拌後は、乳白色、不透明及び水様の懸濁液となる。また、異物及び異臭を認めてはならず、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、pHは固有の値を示さなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.4.3 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。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。

3.4.4 アジュバント定量試験

3.4.4.1 酢酸トコフェロール定量試験

日本薬局方のトコフェロール酢酸エステル定量法を準用して試験するとき、酢酸トコフェロールの含有量は、1 mL中11.8mg～13.2mg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、その試験方法とする。

3.4.4.2 軽質流動パラフィン定量試験

試験品の全量を乾燥させた活性アルミナ約50gを充てんしたガラスカラムに吸着させた後、約250mLのn-ヘキサンを流す。n-ヘキサンを留去後、残留分の質量から軽質流動パラフィンの含有量を求めるとき、軽質流動パラフィンの含有量は、1 mL中155mg～191mgでなければならない。

3.4.5 安全試験

3.4.5.1 試験材料

3.4.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.5.1.2 試験動物

約4週齢の豚を用いる。

3.4.5.2 試験方法

試験動物2頭に注射材料4 mLを筋肉内に2週間隔で2回注射し、各注射後14日間観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.4.5.3 判定

注射後、一過性の発熱を認めても2日以内に回復する。また、アナフィラキシー様症状が発現した場合、特に処置することなく数分以内に回復する。その他の異常を認めてはならない。

3.4.6 毒性限度確認試験

一般試験法の毒性限度確認試験法1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、試験品の注射量は0.3mLとし、注射後の体重測定は5日目に行う。

3.4.7 力価試験

3.4.7.1又は3.4.7.2のいずれかを実施する。

3.4.7.1 鶏を用いた試験

3.4.7.1.1 試験材料

3.4.7.1.1.1 注射材料

試験品2 mLをプラセボ（付記11）で4倍に希釈したものを注射材料とする。

3.4.7.1.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の3～4週齢の鶏を用いる。ただし、農林水産大臣が

特に認めた場合には、その規格の鶏を用いる。

3.4.7.1.2 試験方法

試験動物10羽を試験群、5羽を対照群とする。注射材料0.1mLを試験群の筋肉内に注射する。対照群にはプラセボを筋肉内注射する。注射時及び注射28日後に得られた各個体の血清についてELISAにより抗体価を測定する。

抗原吸着プレート（付記12）の12列目を除く各穴に希釈液を100 μ Lずつ分注し、非働化した各被検血清を50 μ L加え、3倍階段希釈する。希釈液で5倍に希釈した参照標準血清（付記13）を50 μ L加え、3倍階段希釈する。希釈液で5倍及び16倍に希釈した参照陽性血清（付記14）及び参照陰性血清（付記15）をそれぞれ12列目の4穴に100 μ L加える。11列目の2穴をブランク対照とする。37°Cで60分間反応させた後、洗浄液300 μ Lで4回洗浄し、ビオチン標識化PCV2特異モノクローナル抗体を各穴に100 μ Lずつ加え、37°Cで60分間反応させる。洗浄液300 μ Lで4回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識アビジン液を各穴に100 μ Lずつ加え、37°Cで45分間反応させる。洗浄液300 μ Lで8回洗浄し、基質液を各穴に100 μ Lずつ加え、常温で15分間反応させた後、2 mol/L硫酸を各穴に50 μ Lずつ加え、反応を停止させる。波長450nmで吸光度を測定し、以下の式から被検血清及び参照標準血清の抗体価（ $\log_2$ ）を求める。

50%阻止吸光度＝（参照陰性血清の吸光度の平均－参照陽性血清の吸光度の平均）/ 2

カットオフ吸光度＝50%阻止吸光度＋参照陽性血清の吸光度の平均

各血清の抗体価＝ $\log_2$ {吸光度Aを示す各血清の希釈倍数＋（カットオフ吸光度－吸光度A / 吸光度B－吸光度A）×（吸光度Bを示す各血清の希釈倍数－吸光度Aを示す各血清の希釈倍数）}

吸光度A及び吸光度B：被検血清及び参照標準血清におけるカットオフ吸光度を挟む2点（吸光度A<吸光度B）の吸光度

3.4.7.1.3 判定

試験動物の注射28日後の抗体価の平均値は4.5 $\log_2$ 以上でなければならない。対照群の注射28日後の抗体価の平均値は2.0 $\log_2$ 以下でなければならない。この際、ブランク対照の平均吸光度は1.000以上、参照陽性血清の最小吸光度は0.200未満、参照陰性血清の最大吸光度は1.000以上でなければならない。参照標準血清の抗体価は8.0 $\log_2$ ～10.0 $\log_2$ を示さなければならない。

3.4.7.2 モルモットを用いた試験

3.4.7.2.1 試験材料

3.4.7.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.7.2.1.2 試験動物

体重約350gのモルモットを用いる。

3.4.7.2.2 試験方法

試験動物10匹を試験群、5匹を対照群とする。注射材料 0.25mLずつを試験群の筋肉内に注射し、注射28日後に得られた各個体の血清について3.4.7.1.2を準用したELISAにより抗体価を測定する。対照群は無接種とする。

3.4.7.2.3 判定

試験群の抗体価の平均値は6.2 $\log_2$ 以上でなければならない。対照群の抗体価の平均値は2.0 $\log_2$ 以下でなければならない。この際、ブランク対照の平均吸光度は1.000以上、参照陽性

血清の最小吸光度は0.200未満、参照陰性血清の最大吸光度は1.000以上でなければならず、参照標準血清の抗体価は $8.0 \log_2 \sim 10.0 \log_2$ 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、3年間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合は、その期間とする。

付記 1 Sf21細胞

Spodoptera fugiperda 卵巣由来細胞

付記 2 Sf9細胞

Spodoptera fugiperda 卵巣由来細胞でSf21細胞のサブクローン

付記 3 希釈液

1,000mL中

リン酸水素二ナトリウム二水和物 35.58 g

塩化ナトリウム 11.69 g

ポリソルベート80 0.5 g

牛血清アルブミン（カオリン処理済み） 1.0 g

水 残 量

pHを7.0に調整し、ろ過滅菌する。

付記 4 モノクローナル抗体吸着プレート

PCV2特異的モノクローナル抗体3/1B4（付記16）をモノクローナル抗体希釈液（付記17）で蛋白量として100ng / mLになるように希釈し、96穴マイクロプレートの各穴に135 μ Lずつ分注し、2～8℃で16～24時間静置し、洗浄液300 μ Lで4回洗浄後、カゼイン緩衝液（付記18）を200 μ Lずつ分注し、37℃で1～2時間静置したもの。

付記 5 参照陽性抗原

豚サーコウイルス（2型・組換え型）感染症（酢酸トコフェロール・油性アジュバント加）不活化ワクチン（以下「ワクチン」という。）と同じ方法で製造したPCV2のORF2蛋白で、PCV2ORF2抗原の含有量がELISA抗原価5,000単位/mL以上のもの

ポリアクリルアミドゲル電気泳動した場合、約28kDaに特異的なバンドを認め、また、3.3.2.2を準用したELISAにより波長450nmの吸光度を測定した場合、吸光度1.000以上を示すもの。

付記 6 参照標準抗原

ワクチンと同じ方法で製造したPCV2のORF2蛋白で、PCV2ORF2抗原の含有量がELISA抗原価5,000単位/mLと規定したもの。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動した場合、約28kDaに特異的なバンドを認め、また、3.3.2.2を準用したELISAにより波長450nmの吸光度を測定した場合、吸光度1.000以上を示すもの。

付記7 洗浄液

1,000mL中

リン酸水素二ナトリウム、無水	1.15 g
リン酸二水素カリウム	0.2 g
塩化ナトリウム	37.2 g
塩化カリウム	0.2 g
ポリソルベート20	1.5 g
水	残 量

pHを7.0に調整する。

付記8 ビオチン標識化PCV2特異モノクローナル抗体

PCV2ORF2に特異的モノクローナル抗体5/6H12をビオチンで標識したもので、希釈液で1,200倍に希釈して用いる。

付記9 ペルオキシダーゼ標識アビジン液

ペルオキシダーゼで標識したアビジン液で、希釈液で2,500倍に希釈して用いる。

付記10 基質液

UP緩衝液、0.6w/v%TMB溶液及び水を1、0.185及び10の割合で混合したもの

UP緩衝液：テトラメチルベンジジン基質液（酢酸ナトリウム三水和物13.6gを80mLの水に溶解し、1.5mol/Lのクエン酸一水和物でpH 5.5に調整後、水を加えて100mLとしたもの）に尿素過酸化水素140mgを加えたもの。

0.6w/v%TMB溶液：テトラメチルベンジジン 6 gをジメチルスルホキシド1,000mLで溶解したもの。

付記11 プラセボ

ワクチンの成分のうち、主剤を基礎培地に置き換え、その他のアジュバント等の添加剤は、ワクチンと同一成分、同一分量に調製したもの。

付記12 抗原吸着プレート

PCV2特異的モノクローナル抗体3/1B4をモノクローナル抗体希釈液で蛋白量として100ng / mLになるように希釈し、96穴マイクロプレートの各穴に135 μ Lずつ分注し、2～8℃で16～24時間静置し、洗浄液300 μ Lで4回洗浄後、カゼイン緩衝液を200 μ Lずつ分注し、37℃で1～2時間静置し、洗浄液300 μ Lで4回洗浄する。さらに、PCV2ORF2抗原（付記19）を希釈液で蛋白量として4 μ g / mLになるように希釈し、100 μ Lずつ分注し、37℃で1時間静置し、洗浄液300 μ Lで4回洗浄したもの。

付記13 参照標準血清

ワクチンで免疫したSPF鶏群由来の血清で、PCV2ORF2に対し抗体陽性のものを非働化

したもので、3.4.7.1.2を準用したELISA（以下「力価試験のELISA」という。）で測定したとき、抗体価 $8.0 \log_2 \sim 10.0 \log_2$ を示すもの。

付記14 参照陽性血清

ワクチンで免疫した生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の鶏から得た血清で、PCV2ORF2に対し抗体陽性のものを非働化したもので、力価試験のELISAで測定したとき、吸光度0.200未満を示すもの。

付記15 参照陰性血清

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の鶏から得た血清で、PCV2ORF2に対し抗体陰性のものを非働化したもので、力価試験のELISAで測定したとき、吸光度1.000以上を示すもの。

付記16 PCV2特異モノクローナル抗体3/1B4

PCV2ORF2に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ培養細胞の培養上清をアフィニティクロマトグラフィーで精製し、1 mL中蛋白量として $600 \mu\text{g}$ になるように調整したもの。

付記17 モノクローナル抗体希釈液

1,000mL中	
炭酸ナトリウム	1.59 g
炭酸水素ナトリウム	2.93 g
水	残 量
pHを9.6に調整し、ろ過滅菌する。	

付記18 カゼイン緩衝液

1,000mL中	
トリス	4.84 g
スクロース	40.0 g
Triton X-100	0.5 g
カゼイン	2.0 g
水	残 量
水約400mLにトリスを加え、溶解し、pHを7.3～7.5に調整した後、残りの試薬を加え、水で1,000mLとする。ろ過滅菌する。	

付記19 PCV2ORF2抗原

ワクチンと同じ方法で製造したPCV2ORF2蛋白抗原を不活化したもので、1 mL中蛋白量として $200 \mu\text{g}$ になるように調整したもの。ポリアクリルアミドゲル電気泳動した場合、約28kDaに特異的なバンドを認めるもの。

ワクチン（シードロット製剤）の部のニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎2価混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）の項の次に次のように加える。

鶏脳脊髄炎・鶏痘混合生ワクチン（シード）

1 定義

シードロット規格に適合した鶏脳脊髄炎ウイルス及び弱毒鶏痘ウイルスをそれぞれ同規格に適合した発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液を混合した液状ワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 鶏脳脊髄炎ウイルス

2.1.1.1 名称

鶏脳脊髄炎ウイルス#1143株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

1～4日齢の鶏に経口接種すると発症する。5週齢以上の鶏に筋肉内接種又は経口接種しても発症しない。4～6日齢の発育鶏卵の卵黄嚢内に注射すると増殖する。

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大継代数

マスターシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させ、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。

2.1.1.4 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、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵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。

2.1.1.5 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、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させる。

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。

2.1.2 鶏痘ウイルス

2.1.2.1 名称

弱毒鶏痘ウイルスHudson株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

2か月齢の鶏の翼膜に穿刺すると、5～7日で善感発痘し、21日以内に消退する。10～12日齢発育鶏卵の漿尿膜上に接種すると増殖し、淡い赤紫色を呈する独立したほぼ円形の特徴的なポックを形成する。

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大継代数

マスターシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させ、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、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵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、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させる。

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 鶏脳脊髄炎ウイルス

2.2.1.1 発育鶏卵

SPF動物規格の1.1に適合した4～6日齢のものをを用いる。

マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルスを増殖、継代及び保存する場合の発育鶏卵又はプロダクションシードウイルスを増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、3.2の試験を行う。

2.2.2 鶏痘ウイルス

2.2.2.1 発育鶏卵

SPF動物規格の1.1に適合した9～13日齢のものをを用いる。

マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルスを増殖、継代及び保存する場合の発育鶏卵又はプロダクションシードウイルスを増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、3.2の試験を行う。

2.3 原液

2.3.1 鶏脳脊髄炎ウイルス原液

2.3.1.1 発育鶏卵の培養

1回に処理する発育鶏卵を個体別発育鶏卵とみなす。

個体別発育鶏卵について、3.3の試験を行う。

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2.2.1.1の発育鶏卵で培養した後、生存している感染鶏胚を採取し、乳剤を作り、ろ過、遠心又は精製処理して原液とする。原液に相当と認められた必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

原液について、3.4の試験を行う。

2.3.2 鶏痘ウイルス原液

2.3.2.1 発育鶏卵の培養

1回に処理する発育鶏卵を個体別発育鶏卵とみなす。

個体別発育鶏卵について、3.3の試験を行う。

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2.2.2.1の発育鶏卵で培養し、漿尿膜を採取して乳剤とし、そのろ液又は遠心上清を原液とする。

原液に相当と認められた必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

原液について、3.4の試験を行う。

2.4 最終バルク

鶏脳脊髄炎ウイルス原液及び鶏痘ウイルス原液を混合し、相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。最終バルクに相当と認められた必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、乾燥製剤の場合は凍結乾燥して、小分製品とする。

小分製品について、3.5 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

3.1.1.1.1 鶏脳脊髄炎ウイルス

試料0.2mLを、それぞれ10個の発育鶏卵の卵黄嚢内に接種して培養し、孵化させる。孵化した鶏について9日間観察するとき、運動失調、震え等の臨床症状を認めなければならない、その症状は、特異抗血清により中和されなければならない。

3.1.1.1.2 弱毒鶏痘ウイルス

シードロット規格の1.4.2.1.1.1.1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

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。ただし、鶏痘ウイルスについては、検体を孔径0.2 μ mのフィルターを用いて3回ろ過処理したものを試料としてもよい。

3.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験

3.1.1.4.2.1 個別ウイルス否定試験

3.1.1.4.2.1.1 鶏脳脊髄炎ウイルス

鶏白血病ウイルス及び細網内皮症ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、3.2.1及び3.2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.4.2.1.2 鶏痘ウイルス

鶏白血病ウイルス、細網内皮症ウイルス及び鶏脳脊髄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3.2.1、3.2.2及び3.2.10を準用して試験するとき、適合しなければならない。この場合、検体を孔径0.2 μ mのフィルターを用いて3回ろ過処理したものを試料としてもよい。

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 発育鶏卵の試験

3.2.1 孵卵性状試験

シードロット規格の3.2.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3 個体別発育鶏卵の試験

個体別発育鶏卵の1%以上又は30個以上を対照発育鶏卵とし、これについて次の試験を行う。

3.3.1 培養観察

対照発育鶏卵を、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し、観察するとき、鶏胚に異常を認めてはならない。

3.3.2 鶏赤血球凝集試験

3.3.1の試験最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol%の鶏赤血球浮遊液を等量加え、60分間静置し、観察するとき、赤血球凝集を認めてはならない。

3.4 原液の試験

3.4.1 生菌数限度試験

一般試験法の生菌数限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。

3.4.2 ウイルス含有量試験

3.4.2.1 鶏脳脊髄炎ウイルス

3.4.2.1.1 試験材料

3.4.2.1.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.4.2.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した4～6日齢の発育鶏卵を用いる。

3.4.2.1.2 試験方法

3.4.2.1.2.1 発育鶏卵接種試験

試料0.1mLずつをそれぞれ10個以上の発育鶏卵の卵黄嚢内に注射して培養し、ふ化させる。ふ化した鶏について、運動失調、震え等の症状の有無を9日間観察する。発症した鶏を感染とみなし、EID₅₀を算出する。

症状の疑わしい鶏がいる場合には、中枢神経の病理組織検査によって感染の有無を判定する。

3.4.2.1.3 判定

検体のウイルス含有量は、1mL中10^{5.6}EID₅₀以上でなければならない。

3.4.2.2 鶏痘ウイルス

3.4.2.2.1 試験材料

3.4.2.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.4.2.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した11～13日齢の発育鶏卵を用いる。

3.4.2.2.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ5個以上の発育鶏卵の漿尿膜上に接種し、37℃で5日間培養し、観察する。試験最終日に漿尿膜を検査してポック発現の有無を観察する。

3.4.2.2.3 判定

漿尿膜にポックが出現したものを感染とみなし、EID₅₀を算出する。ただし、24時間以内に死亡したものは、除外する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10^{6.0}EID₅₀以上でなければならない。

3.5 小分製品の試験

3.5.1 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。

3.5.2 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。

3.5.3 サルモネラ否定試験

一般試験法のサルモネラ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。

3.5.4 生菌数限度試験

一般試験法の生菌数限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。

3.5.5 鶏脳脊髄炎ウイルス含有量試験

試験品を孔径0.2 μmのフィルターを用いて3回ろ過処理したものを試料とし、3.4.2.1を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1羽分当たり10^{3.0}EID₅₀以上でなければならない。

3.5.6 安全及び発痘試験

3.5.6.1 試験材料

3.5.6.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

3.5.6.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した発育鶏卵由来の60日齢の鶏を用いる。

3.5.6.2 試験方法

試験動物の10羽を試験群とし、5羽を対照群とする。

接種材料0.01mLずつを試験群の翼膜に穿刺接種し、対照群と共に3週間観察する。試験開始時及び試験終了時に体重を測定する。

3.5.6.3 判定

観察期間中、痘疱の転移や重度の痂皮の形成を認めてはならない。

対照群においては、試験動物に臨床的な異常を認めてはならず、試験群においては、試験動物に発痘以外の臨床的な異常を認めてはならない。試験群は、接種後5～7日で善感発痘し、痘疱は21日以内に完全に消退しなければならない。

3.5.7 鶏脳脊髄炎力価試験

3.5.7.1 試験材料

3.5.7.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

3.5.7.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の60日齢の鶏を用いる。

3.5.7.1.3 沈降反応抗原

鶏脳脊髄炎ウイルス沈降反応抗原（付記1）を用いる。

3.5.7.2 試験方法

試験動物の10羽を試験群とし、3羽を対照群とする。

接種材料0.01mLずつを試験群の翼膜に穿刺接種し、4週間後に得られた各個体の血清について沈降反応を行う。また、非接種鶏3羽を対照群とし、接種群と隔離して飼育し、4週間後に得られた各個体の血清について沈降反応を行う。

4単位の沈降反応抗原を寒天ゲル（付記2）の中心の穴に、被験血清、4単位の参照陽性血清（付記3）及び参照陰性血清（付記4）を周囲の穴に分注した後、乾燥を防ぎながら室温で48～72時間反応させ、沈降線の有無を観察する。

3.5.7.3 判定

抗原と各血清との間に特異的沈降線を認めたものを陽性とし、認めないものを陰性とする。

試験群の血清の80%以上が陽性でなければならず、対照群の血清は全て陰性でなければならない。

付記1 鶏脳脊髄炎ウイルス沈降反応抗原

鶏脳脊髄炎ウイルス鶏胚馴化Van Roekel株に感染した鶏胚脳乳剤を精製濃縮したもの。

付記2 寒天ゲル

寒天及び塩化ナトリウムをそれぞれ0.9～1.0 w/v% 及び12～15 w/v% となるようにリン酸緩衝食塩液又はペロナール緩衝食塩液に溶かした後、適当と認められた防腐剤を加える。スライドグラス（26×76mm）にこれを5 mL注ぎ、固める。固まった後、寒天スライドに直径3 mmの穴を中心に、その周囲に相互に3 mmの間隔で6個の穴をあける。

付記3 参照陽性血清

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した発育鶏卵由来の鶏を鶏脳脊髄炎ウイルスで免疫して得た血清

付記4 参照陰性血清

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した発育鶏卵由来の鶏から得た血清

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部の豚ボルデテラ感染症・豚パスツレラ症（全菌体・部分精製トキソイド）混合（油性アジュバント加）不活化ワクチンの項を次のように改正する。

豚ボルデテラ感染症・豚パスツレラ症（全菌体・部分精製トキソイド）混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン

1 定義

ボルデテラ・ブロンキセプチカの培養菌液を不活化したもの、パスツレラ・ムルトシダの培養菌体を不活化したもの及びパスツレラ・ムルトシダの培養菌体より得た皮膚壊死毒素を部分精製した後不活化し、アルミニウムゲルで内毒素を吸着したものを混合し、油性アジュバントを添加したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

2.1.1.1 名称

ボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌2-9 NADL株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

ボルデー・ジャング培地（付記1）上に隆起した小円形の集落を形成し、 β 溶血性を示す。また、K抗原を有し、既知のボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌の免疫血清によって特異的に凝集される。

生後7日齢以内の豚に点鼻接種すると豚萎縮性鼻炎を起こす。生菌又は超音波処理菌をモルモットの皮内に注射すると、注射部位に出血及び壊死を起こす。

2.1.1.3 継代および保存

原株及び種菌は、ボルデー・ジャング培地又は適当と認められた平板培地で継代する。

継代は、原株では3代以内、種菌では2代以内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、その継代数とする。

原株及び種菌は、凍結して -30°C 以下又は凍結乾燥して 7°C 以下で保存する。

2.1.2 パスツレラ・ムルトシダ

2.1.2.1 名称

パスツレラ・ムルトシダD型8株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

鶏血清加ハートインフュージョン寒天培地上に粘稠性のある円形の集落を形成する。

生菌を鼻粘膜に酢酸を前処理した約3週齢の豚に点鼻接種すると、豚萎縮性鼻炎を起こす。培養菌体から調製した皮膚壊死毒素をモルモットの皮内に注射すると、注射部位に壊死を起こし、また、豚の筋肉内に注射すると豚萎縮性鼻炎を起こす。

2.1.2.3 継代および保存

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、原株では3代以内、種菌では2代以内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、その継代数とする。

原株及び種菌は、凍結して -30°C 以下又は凍結乾燥して 7°C 以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 培地

2.2.1.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.2.1.2 パスツレラ・ムルトシダ

製造に相当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ原液

2.3.1.1 培養

液状培地で培養した種菌を液状培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.1.1の試験を行う。

2.3.1.2 不活化

培養菌液にホルマリン又は相当と認められた不活化剤を加えて不活化後、遠心して得られた菌体を相当と認められた緩衝液に再浮遊させ、濃縮したものを原液とする。

2.3.2 パスツレラ・ムルトシダ菌体原液

2.3.2.1 培養

液状培地で培養した種菌を液状培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.1.2の試験を行う。

2.3.2.2 不活化

培養菌液にホルマリン又は相当と認められた不活化剤を加えて不活化後、遠心して得られた菌体を相当と認められた緩衝液に再浮遊させ、濃縮する。これに、相当と認められたアルミニウムゲル及び保存剤を加えたものを原液とする。

原液について、3.2.1の試験を行う。

2.3.3 パスツレラ・ムルトシダトキシソイド原液

2.3.3.1 培養

2.3.2.1に準じて培養したものを、培養菌液とする。

培養菌液について、3.1.3の試験を行う。

2.3.3.2 無毒化

培養菌液を物理的処理により菌体を破碎した後、遠心して得られた上清を $0.45\mu\text{m}$ 及び $0.2\mu\text{m}$ フィルターでろ過する。これに相当と認められた保存剤及び乳化剤を添加し、相当と認められた方法により濃縮する。この濃縮液に 5mol/L 水酸化ナトリウム液を添加して pH を 10.5 ± 0.2 に調整後、1～6時間静置し、 $40\text{vol}\%$ プロピオン酸溶液を添加して pH を 7.0 ± 0.4 に再調整する。この pH 感作を繰り返して完全に無毒化した後、相当と認められたアルミニウムゲルを添加したものを原液とする。

原液について、3.2.2の試験を行う。

2.4 最終バルク

ボルデテラ・ブロンキセプチカ原液、パスツレラ・ムルトシダ菌体原液及びパスツレラ・ムルトシダトキシソイド原液を混合した後、相当と認められた油性アジュバント及び緩衝液を添加して濃度調整したものを最終バルクとする。この場合、相当と認められた保存剤を添加してもよい。

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、3.3の試験を行う。

3 試験法

3.1 培養菌液の試験

3.1.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

3.1.1.1 染色試験

3.1.1.1.1 試験材料

検体を用いる。

3.1.1.1.2 試験方法

検体 0.01mL をスライドガラス上の 1cm^2 の区画に塗抹し、乾燥させた後に火焰固定し、グラム染色し

て標本を作製する。標本を顕微鏡下で約1,000倍に拡大し、30視野以上を観察する。

3.1.1.1.3 判定

均一なグラム陰性球桿菌以外の菌を認めてはならない。

3.1.1.2 コロニー性状確認試験

3.1.1.2.1 試験材料

検体を用いる。

3.1.1.2.2 試験方法

検体をボルデー・ジャング培地に接種し、 $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ で48時間培養する。

3.1.1.2.3 判定

生育した集落のうち、90%以上が β 溶血環を示し、白色不透明の隆起した光沢のあるコロニーでなければならない。

3.1.1.3 吸光度測定試験

3.1.1.3.1 試験材料

検体を用いる。

3.1.1.3.2 試験方法

検体を分光光度計を用いて波長625nmで吸光度を測定する。

3.1.1.3.3 判定

検体の吸光度値は、2.5以上でなければならない。

3.1.2 パスツレラ・ムルトシダ菌体

3.1.2.1 染色試験

3.1.1.1を準用して試験するとき、均一なグラム陰性短桿菌以外の菌を認めてはならない。

3.1.2.2 吸光度測定試験

3.1.1.3を準用して試験するとき、検体の吸光度値は5.0以上でなければならない。ただし、測定波長は650nmを用いる。

3.1.3 パスツレラ・ムルトシダトキシイド

3.1.3.1 染色試験

3.1.1.1を準用して試験するとき、均一なグラム陰性短桿菌以外の菌を認めてはならない。

3.1.3.2 吸光度測定試験

3.1.1.3を準用して試験するとき、検体の吸光度値は5.0以上でなければならない。ただし、測定波長は650nmを用いる。

3.2 原液の試験

3.2.1 パスツレラ・ムルトシダ菌体

3.2.1.1 無毒化試験

3.2.1.1.1 試験材料

3.2.1.1.1.1 注射材料

検体を用いる。

3.2.1.1.1.2 試験動物

体重16～24gのNon-Swiss Outbred、Non-Swiss Albino、CF-1又は適当と認められたマウスを用いる。

3.2.1.1.2 試験方法

試験動物の5匹を試験群、5匹を対照群とする。

検体0.5 mLずつを試験群に皮下注射し、対照群とともに24時間観察する。

3.2.1.1.3 判定

観察期間中、試験動物に死亡を認めてはならない。

3.2.1.2 遊離エンドトキシン定量試験

3.2.1.2.1 試験材料

3.2.1.2.1.1 試料

検体を14,000Gで5分間遠心し、その上清を200nmのフィルターでろ過したものを試料とする。

3.2.1.2.2 試験方法

適当と認められたカイネティック-比色法により、試料の吸光度を測定し、大腸菌エンドトキシン（付記2）の標準曲線より検体中のエンドトキシン量を算出する。

3.2.1.2.3 判定

検体のエンドトキシン量は、1 mL当たり25 μ g以下でなければならない。

3.2.2 パスツレラ・ムルトシダトキソイド

3.2.2.1 無毒化試験

3.2.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.2.2 遊離エンドトキシン定量試験

3.2.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.2.3 壊死毒素定量試験

3.2.2.3.1 試験材料

3.2.2.3.1.1 試料

検体に最終濃度12vol%となるように水酸化アルミニウムゲルを加えて調整したものを試料とする。

3.2.2.3.2 試験方法

試料、壊死毒素参照品（付記3）及び壊死毒素陽性対照（付記4）の100 μ Lをそれぞれ抗壊死毒素ヤギ抗体（付記5）100 μ Lと混合し、37 $\pm$ 2 $^{\circ}$ Cで120～130分間反応させた後、700Gで20分間遠心し、その上清を採取する。各上清を精製壊死毒素固相化プレート（付記6）の各穴に50 μ L加えて37 $\pm$ 2 $^{\circ}$ Cで60～75分間反応させる。プレートを洗浄液（付記7）及びリン酸緩衝食塩液（付記8）で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗体－1（付記9）50 μ Lを各穴に加えて37 $\pm$ 2 $^{\circ}$ Cで60～75分間反応させる。プレートを洗浄液及びリン酸緩衝食塩液で洗浄後、基質液（付記10）100 μ Lを各穴に加えて15～20分間反応させ、主波長405nm及び副波長490nm（あるいは492nm）で各穴の吸光度を測定する。壊死毒素参照品の希釈系列の吸光度測定値から求められる参照曲線より、検体中の壊死毒素量を算出する。

3.2.2.3.3 判定

検体中の壊死毒素量は、1 mL当たり200 相対単位（付記11）以上でなければならない。

また、壊死毒素参照品の希釈系列の吸光度測定値から求められる参照曲線の相関係数（r）は0.98以上であり、壊死毒素陽性対照は1 mL当たり200相対単位以上でなければならない。

3.3 小分製品の試験

3.3.1 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。

3.3.2 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。

3.3.3 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。

3.3.4 無毒化試験

3.3.4.1 試験材料

3.3.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.3.4.1.2 試験動物

体重約350gのモルモットを用いる。

3.3.4.2 試験方法

注射材料0.1mLずつを試験動物2匹の背部皮内に注射し、10日間観察する。

3.3.4.3 判定

注射反応は、無視しうる程度以下でなければならない、試験動物がすべて生存しなければならない。

3.3.5 チメロサル定量試験

チメロサル添加製剤については、適当と認められた方法で試験品を処理したものを試料とし、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。

3.3.6 ホルマリン定量試験

ホルマリン添加製剤については、適当と認められた方法で試験品を処理したものを試料とし、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、0.01vol%以下でなければならない。

3.3.7 安全試験

3.3.7.1 試験材料

3.3.7.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.3.7.1.2 試験動物

約4週齢の豚を用いる。

3.3.7.2 試験方法

試験動物の2頭を試験群、1頭を対照群とする。

注射材料の1頭分を4週間隔で2回試験群の筋肉内に注射し、対照群とともに第1回目注射後6週間観察する。

3.3.7.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群の動物に臨床的な異常を認めてはならない。

3.3.8 力価試験

3.3.8.1 豚ボルデテラ感染症力価試験

3.3.8.1.1 試験材料

3.3.8.1.1.1 試験動物

3.3.7の試験に用いた動物を用いる。

3.3.8.1.1.2 凝集反应用抗原

ボルデテラ・ブロンキセプチカ凝集反应用抗原（付記12）を用いる。

3.3.8.1.2 試験方法

3.3.7の試験最終日に試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、凝集反応を行う。

血清をリン酸緩衝食塩液で5倍に希釈し、さらに2倍階段希釈した後、ボルデテラ・ブロンキセプチカ凝集反应用抗原を用いて試験管内凝集反応を行う。

3.3.8.1.3 判定

試験管内に凝集を認めた血清の最高希釈倍数を凝集価とする。

試験群では、いずれも凝集価40倍以上でなければならない。この場合、対照群では、凝集価10倍以下でなければならない。

3.3.8.2 豚パスツレラ症力価試験

3.3.8.2.1 試験材料

3.3.8.2.1.1 試験動物

3.3.7の試験に用いた動物を用いる。

3.3.8.2.2 試験方法

3.3.7の試験最終日に試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、酵素抗体反応（以下「ELISA」という。）を行う。

試験群の血清及び参照陽性血清－1（付記13）を希釈・ブロッキング液（付記14）で20倍より2倍階段希釈したもの、参照陽性血清－2（付記15）を希釈・ブロッキング液で800倍より2倍階段希釈したもの及び参照陰性血清（付記16）を希釈・ブロッキング液で20倍希釈したものを抗原吸着プレート（付記17）の各穴に100 μ Lずつ加え、37℃で60分間反応させる。洗浄液でプレートを洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗体－2（付記18）を各穴に100 μ Lずつ加え、37℃で60分間反応させる。プレートを洗浄後、基質液を各穴に100 μ Lずつ加えて反応させる。主波長405nm、副波長490nmで、800倍希釈した参照陽性血清－2の吸光度値を測定し、その値が0.8～1.2となった時点で反応終了とし、すべての穴の吸光度を測定する。

3.3.8.2.3 判定

得られた血清の各穴の吸光度値から、参照陰性血清の各穴の平均吸光度値＋3×参照陰性血清の各穴の吸光度値の標準偏差を引いた値が0以上を示す血清の最高希釈倍数を抗毒素抗体価とする。試験群では、いずれも抗毒素抗体価160倍以上でなければならない。この場合、対照群では、抗毒素抗体価20倍以下でなければならない。

この場合、参照陽性血清－1の抗毒素抗体価は160～320倍、参照陽性血清－2の抗毒素抗体価は3,200～12,800倍及び参照陰性血清の抗毒素抗体価は20倍以下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2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。

5 その他

5.1 添付文書等記載事項

と畜場出荷前の所定の期間は使用しない旨

付記1 ボルデー・ジャング培地

1,000 mL中

ボルデー・ジャング・アガーベース	30 g
グリセリン	10 g
水	残 量

加温溶解後、121℃で15分間高圧滅菌する。

約50℃に冷却後、必要に応じて馬脱線維素血液または羊脱線維素血液を5～20vol%となるように添加する。

付記2 大腸菌エンドトキシン

1 mL当たり50EUの大腸菌O55：B5由来エンドトキシンを発熱性物質を含まない水で8倍階段希釈したもの

付記3 壊死毒素参照品

パスツレラ・ムルトシダD型8株又はこれと同等の壊死毒素を産生する株の菌体超音波処理後の遠心上清を、濃縮及びイオン交換クロマトグラフィーを用いた精製の後、pH感作により無毒化し、ろ過滅菌したものを1 mL当たり40相対単位となるように調製後、小分けして凍結乾燥し、2～7℃で保存したもの

付記4 壊死毒素陽性対照

2.3.3に従って製造されたパスツレラ・ムルトシダトキシソイド原液を3.2.2.3の試験を準用して試験するとき、1 mL当たり200相対単位以上となるように調製後、小分けして -65°C 以下で保存したもの

付記5 抗壊死毒素ヤギ抗体

ヤギ由来のパスツレラ・ムルトシダ壊死毒素に対する抗体をブロッキング液（付記19）で至適濃度に希釈したもの

付記6 精製壊死毒素固相化プレート

0.05mol/L炭酸塩緩衝液（付記20）に溶解した精製皮膚壊死毒素（付記21）の $100\mu\text{L}$ ずつを、96穴平底プレートの各穴に加えて $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ で90～120分間反応させ、リン酸緩衝食塩液で洗浄後、ブロッキング液 $300\mu\text{L}$ ずつを加え、 $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ で10～20分間反応させた後、リン酸緩衝食塩液で洗浄したもの

付記7 洗浄液

1,000mL中	
塩化ナトリウム	8.0 g
塩化カリウム	0.2 g
無水リン酸水素二ナトリウム	1.15 g
リン酸水素二カリウム	0.2 g
ポリソルベート20	0.5 mL
水	残 量
pHを7.2に調整する。	

付記8 リン酸緩衝食塩液

1,000mL中	
塩化ナトリウム	6.8 g
無水リン酸水素二ナトリウム	1.2 g
リン酸二水素カリウム	0.7 g
水	残 量
pHを6.8～7.2に調整し、 121°C で15分間高圧滅菌する。	

付記9 ペルオキシダーゼ標識抗体－1

ペルオキシダーゼ標識抗ヤギIgGを、ブロッキング液で至適濃度に希釈したもの

付記10 基質液

A液：0.6gの2,2'-アジノ-ジ（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸）を1,000mLのグリシン緩衝液で溶解したもの
B液：0.02vol%過酸化水素溶液
A液とB液を使用時に等量混合する。

付記11 相対単位

壊死毒素参照品の希釈系列の吸光度測定値から求められる参照曲線より算出される相対値

を示す単位

付記12 ボルデテラ・ブロンキセプチカ凝集反応用抗原

ボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌のホルマリン死菌を適当と認められた希釈用液に 1 mL 中 1×10^{10} 個となるように浮遊させたもので、既知抗体価の陽性血清に対して所定の凝集価を示し、陰性血清に対して凝集しないことを確認したもの

付記13 参照陽性血清－1

無毒化したパスツレラ・ムルトシダ壊死毒素で免疫した豚の血清で、3.3.8.2.2の試験を準用して試験するとき、抗毒素抗体価160～320倍を示すように調製し、凍結乾燥したもの

付記14 希釈・ブロッキング液

1,000 mL 中

塩化ナトリウム 8.0 g

塩化カリウム 0.2 g

無水リン酸水素二ナトリウム 1.15 g

リン酸水素二カリウム 0.2 g

ポリソルベート20 0.5 mL

カゼイン 1 g

水 残 量

pHを7.2に調整する。

付記15 参照陽性血清－2

無毒化したパスツレラ・ムルトシダ壊死毒素で免疫した豚の血清で、3.3.8.2.2の試験を準用して試験するとき、抗毒素抗体価3,200～12,800倍を示すように調製し、凍結乾燥したもの

付記16 参照陰性血清

パスツレラ・ムルトシダ壊死毒素に対する抗毒素抗体を保有しない豚の血清で、3.3.8.2.2の試験を準用して試験するとき、抗毒素抗体価20倍以下を示し、凍結乾燥したもの

付記17 抗原吸着プレート

0.01mol/Lホウ酸緩衝液（付記22）で0.5 μ g/mLに希釈した抗壊死毒素マウスモノクローナル抗体（付記23）を96穴平底プレートの各穴に100 μ Lずつ加え、4℃で16時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄し、希釈・ブロッキング液を200 μ Lずつ加え、37℃で60分間反応させる。反応後、洗浄液で3回洗浄し、希釈・ブロッキング液で400倍希釈した豚ELISA抗体価測定試験用パスツレラ・ムルトシダ壊死毒素（付記24）を100 μ Lずつ加え、37℃で60分間反応させた後、洗浄液で3回洗浄したもの

付記18 ペルオキシダーゼ標識抗体－2

ペルオキシダーゼ標識抗ブタIgGを希釈・ブロッキング液で至適濃度に希釈したもの

付記19 ブロッキング液

100 mL 中

スキムミルク

10 g

洗浄液 残 量

付記20 0.05mol/L炭酸塩緩衝液

1,000mL中

炭酸ナトリウム 1.59 g

炭酸水素ナトリウム 2.93 g

水 残 量

付記21 精製皮膚壊死毒素

パスツレラ・ムルトシダD型8株又はこれと同等の壊死毒素を産生する株の菌体超音波処理後の遠心上清をゲル浸透クロマトグラフィー及びイオン交換クロマトグラフィーを用いて精製後、皮膚壊死毒素画分を小分けして凍結乾燥し、2～7℃で保存したもの

付記22 0.01 mol/Lホウ酸緩衝液

1,000 mL中

四ホウ酸ナトリウム十水和物 3.8 g

水 残 量

pHを9.0に調整する。

付記23 抗壊死毒素マウスモノクローナル抗体

パスツレラ・ムルトシダ壊死毒素を用いてイムノブロッティングを行った場合、分子量約143kDaの単一のバンドを認めるマウスモノクローナル抗体P3F51又はこれと同等と認められたもの

付記24 豚ELISA抗体価測定試験用パスツレラ・ムルトシダ壊死毒素

パスツレラ・ムルトシダD型8株又はこれと同等の壊死毒素を産生する株の菌体超音波処理後の遠心上清をろ過滅菌して、モルモット皮内試験で320～640倍の壊死毒素活性を示すように豚ELISA抗体価測定試験用抗原として調製したもの

ワクチン（シードロット製剤）の部の豚ボルデテラ感染症・豚パスツレラ症（全菌体・部分精製トキソイド）混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）の項を次のように改正する。

豚ボルデテラ感染症・豚パスツレラ症（全菌体・部分精製トキソイド）混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

1 定義

シードロット規格に適合したボルデテラ・ブロンキセプチカの培養菌液を不活化したもの、同規格に適合したパスツレラ・ムルトシダの培養菌体を不活化したもの及び同規格に適合したパスツレラ・ムルトシダの培養菌体より得た皮膚壊死毒素を部分精製した後不活化し、アルミニウムゲルで内毒素を吸着したものを混合し、油性アジュバントを添加したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

2.1.1.1 名称

ボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌2-9 NADL株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

ボルデー・ジャング培地（付記1）上に隆起した小円形の集落を形成し、 β 溶血性を示す。また、K抗原を有し、既知のボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌の免疫血清によって特異的に凝集される。

生後7日齢以内の豚に点鼻接種すると豚萎縮性鼻炎を起こす。生菌又は超音波処理菌をモルモットの皮内に注射すると、注射部位に出血及び壊死を起こす。

2.1.1.3 マスターシード菌

2.1.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、ボルデー・ジャング培地又は適当と認められた平板培地で増殖させ、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結乾燥して7℃以下で保存する。

マスターシード菌について、3.1.1の試験を行う。

マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシード菌から小分製品までの最高継代数は、10代以内でなければならない。

2.1.1.4 ワーキングシード菌

2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、適当と認められた培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結して-30℃以下又は、凍結乾燥して7℃以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。

2.1.1.5 プロダクションシード菌

2.1.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、適当と認められた培地で増殖する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して-30℃以下又は凍結乾燥して7℃以下で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合について、3.1.3の試験を行う。

2.1.2 パスツレラ・ムルトシダ

2.1.2.1 名称

パスツレラ・ムルトシダD型8株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

鶏血清加ハートインフュージョン寒天培地上に粘稠性のある円形の集落を形成する。

生菌を鼻粘膜に酢酸を前処理した約3週齢の豚に点鼻接種すると、豚萎縮性鼻炎を起こす。培養菌体から調製した皮膚壊死毒素をモルモットの皮内に注射すると、注射部位に壊死を起こし、また、豚の筋肉内に注射すると豚萎縮性鼻炎を起こす。

2.1.2.3 マスターシード菌

2.1.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、適当と認められた培地で増殖させ、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結乾燥して7℃以下で保存する。

マスターシード菌について、3.1.1の試験を行う。

マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシード菌から小分製品までの最高継代数は、10代以内でなければならない。

2.1.2.4 ワーキングシード菌

2.1.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、適当と認められた培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結して-30℃以下又は凍結乾燥して7℃以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。

2.1.2.5 プロダクションシード菌

2.1.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、適当と認められた培地で増殖する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して-30℃以下又は凍結乾燥して7℃以下で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合について、3.1.3の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 培地

2.2.1.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.2.1.2 パスツレラ・ムルトシダ

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ原液

2.3.1.1 培養

液状培地で培養したプロダクションシード菌を液状培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2.1の試験を行う。

2.3.1.2 不活化

培養菌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後、遠心して得られた菌体を適当と認められた緩衝液に再浮遊させ、濃縮したものを原液とする。

2.3.2 パスツレラ・ムルトシダ菌体原液

2.3.2.1 培養

液状培地で培養したプロダクションシード菌を液状培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2.2の試験を行う。

2.3.2.2 不活化

培養菌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後、遠心して得られた菌体を適

当と認められた緩衝液に再浮遊させ、濃縮する。これに、適当と認められたアルミニウムゲル及び保存剤を加えたものを原液とする。

原液について、3.3.1の試験を行う。

2.3.3 パスツレラ・ムルトシダトキソイド原液

2.3.3.1 培養

2.3.2.1に準じて培養したものを、培養菌液とする。

培養菌液について、3.2.3の試験を行う。

2.3.3.2 無毒化

培養菌液を物理的処理により菌体を破碎した後、遠心して得られた上清を0.45 μm 及び0.2 μm フィルターでろ過する。これに適当と認められた保存剤及び乳化剤を添加し、適当と認められた方法により濃縮する。この濃縮液に5 mol/L水酸化ナトリウム液を添加してpHを10.5 $\pm$ 0.2に調整後、1～6時間静置し、40vol%プロピオン酸溶液を添加してpHを7.0 $\pm$ 0.4に再調整する。このpH感作を繰り返して完全に無毒化した後、適当と認められたアルミニウムゲルを添加したものを原液とする。

原液について、3.3.2の試験を行う。

2.4 最終バルク

ボルデテラ・ブロンキセプチカ原液、パスツレラ・ムルトシダ菌体原液及びパスツレラ・ムルトシダトキソイド原液を混合した後、適当と認められた油性アジュバント及び緩衝液を添加して濃度調整したものを最終バルクとする。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

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 マスターシード菌の試験

3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.4.1.1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 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。

3.1.2 ワーキングシード菌の試験

3.1.2.1 夾雑菌否定試験

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。

3.1.3 プロダクションシード菌の試験

3.1.3.1 夾雑菌否定試験

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。

3.2 培養菌液の試験

3.2.1 ボルデテラ・ブロンキセプチカ

3.2.1.1 染色試験

3.2.1.1.1 試験材料

検体を用いる。

3.2.1.1.2 試験方法

検体0.01mLをスライドガラス上の1 cm^2 の区画に塗抹し、乾燥させた後に火焰固定し、グラム染色して標本作製する。標本を顕微鏡下で約1,000倍に拡大し、30視野以上を観察する。

3.2.1.1.3 判定

均一なグラム陰性球桿菌以外の菌を認めてはならない。

3.2.1.2 コロニー性状確認試験

3.2.1.2.1 試験材料

検体を用いる。

3.2.1.2.2 試験方法

検体をボルデー・ジャング培地に接種し、 $37 \pm 2^\circ\text{C}$ で48時間培養する。

3.2.1.2.3 判定

生育した集落のうち、90%以上が β 溶血環を示し、白色不透明の隆起した光沢のあるコロニーでなければならない。

3.2.1.3 吸光度測定試験

3.2.1.3.1 試験材料

検体を用いる。

3.2.1.3.2 試験方法

検体を分光光度計を用いて波長625nmで吸光度を測定する。

3.2.1.3.3 判定

検体の吸光度値は、2.5以上でなければならない。

3.2.2 パスツレラ・ムルトシダ菌体

3.2.2.1 染色試験

3.2.1.1を準用して試験するとき、均一なグラム陰性短桿菌以外の菌を認めてはならない。

3.2.2.2 吸光度測定試験

3.2.1.3を準用して試験するとき、検体の吸光度値は5.0以上でなければならない。ただし、測定波長は650nmを用いる。

3.2.3 パスツレラ・ムルトシダトキソイド

3.2.3.1 染色試験

3.2.1.1を準用して試験するとき、均一なグラム陰性短桿菌以外の菌を認めてはならない。

3.2.3.2 吸光度測定試験

3.2.1.3を準用して試験するとき、検体の吸光度値は5.0以上でなければならない。ただし、測定波長は650nmを用いる。

3.3 原液の試験

3.3.1 パスツレラ・ムルトシダ菌体

3.3.1.1 無毒化試験

3.3.1.1.1 試験材料

3.3.1.1.1.1 注射材料

検体を用いる。

3.3.1.1.1.2 試験動物

体重16～24gのNon-Swiss Outbred、Non-Swiss Albino、CF-1又は適当と認められたマウスを用いる。

3.3.1.1.2 試験方法

試験動物の5匹を試験群、5匹を対照群とする。

検体0.5 mLずつを試験群に皮下注射し、対照群とともに24時間観察する。

3.3.1.1.3 判定

観察期間中、試験動物に死亡を認めてはならない。

3.3.1.2 遊離エンドトキシン定量試験

3.3.1.2.1 試験材料

3.3.1.2.1.1 試料

検体を14,000Gで5分間遠心し、その上清を0.2 μ mのフィルターでろ過したものを試料とする。

3.3.1.2.2 試験方法

適当と認められたカイネティック-比色法により、試料の吸光度を測定し、大腸菌エンドトキシン（付記2）の標準曲線より検体中のエンドトキシン量を算出する。

3.3.1.2.3 判定

検体のエンドトキシン量は、1 mL当たり25 μ g以下でなければならない。

3.3.2 パスツレラ・ムルトシダトキシノイド

3.3.2.1 無毒化試験

3.3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.2.2 遊離エンドトキシン定量試験

3.3.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.2.3 壊死毒素定量試験

3.3.2.3.1 試験材料

3.3.2.3.1.1 試料

検体に最終濃度12vol%となるように水酸化アルミニウムゲルを加えて調整したものを試料とする。

3.3.2.3.2 試験方法

試料、壊死毒素参照品（付記3）及び壊死毒素陽性対照（付記4）の100 μ Lをそれぞれ抗壊死毒素ヤギ抗体（付記5）100 μ Lと混合し、37 $\pm$ 2 $^{\circ}$ Cで120～130分間反応させた後、700Gで20分間遠心し、その上清を採取する。各上清を精製壊死毒素固相化プレート（付記6）の各穴に50 μ L加えて37 $\pm$ 2 $^{\circ}$ Cで60～75分間反応させる。プレートを洗浄液（付記7）及びリン酸緩衝食塩液（付記8）で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗体-1（付記9）50 μ Lを各穴に加えて37 $\pm$ 2 $^{\circ}$ Cで60～75分間反応させる。プレートを洗浄液及びリン酸緩衝食塩液で洗浄後、基質液（付記10）100 μ Lを各穴に加えて15～20分間反応させ、主波長405nm及び副波長490nm（あるいは492nm）で各穴の吸光度を測定する。壊死毒素参照品の希釈系列の吸光度測定値から求められる参照曲線より、検体中の壊死毒素量を算出する。

3.3.2.3.3 判定

検体中の壊死毒素量は、1 mL当たり200 相対単位（付記11）以上でなければならない。

また、壊死毒素参照品の希釈系列の吸光度測定値から求められる参照曲線の相関係数（r）は0.98以上であり、壊死毒素陽性対照は1 mL当たり200相対単位以上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均質な懸濁液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、pHは、固有の値を示さなければならない。

3.4.3 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。

3.4.4 無毒化試験

3.4.4.1 試験材料

3.4.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.4.1.2 試験動物

体重約350gのモルモットを用いる。

3.4.4.2 試験方法

注射材料0.1mLずつを試験動物2匹の背部皮内に注射し、10日間観察する。

3.4.4.3 判定

注射反応は、無視しうる程度以下でなければならない、試験動物がすべて生存しなければならない。

3.4.5 チメロサール定量試験

チメロサール添加製剤については、適当と認められた方法で試験品を処理したものを試料とし、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。

3.4.6 ホルマリン定量試験

ホルマリン添加製剤については、適当と認められた方法で試験品を処理したものを試料とし、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、0.01vol%以下でなければならない。

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4週齢の豚を用いる。

3.4.7.2 試験方法

試験動物の2頭を試験群、1頭を対照群とする。

注射材料の1頭分を4週間隔で2回試験群の筋肉内に注射し、対照群とともに第1回目注射後6週間観察する。

3.4.7.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群の動物に臨床的な異常を認めてはならない。

3.4.8 力価試験

3.4.8.1 豚ボルデテラ感染症力価試験

3.4.8.1.1 試験材料

3.4.8.1.1.1 試験動物

3.4.7の試験に用いた動物を用いる。

3.4.8.1.1.2 凝集反应用抗原

ボルデテラ・ブロンキセプチカ凝集反应用抗原（付記12）を用いる。

3.4.8.1.2 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各個体の血清について、凝集反応を行う。

血清をリン酸緩衝食塩液で5倍に希釈し、さらに2倍階段希釈した後、ボルデテラ・ブロンキセプチカ凝集反应用抗原を用いて試験管内凝集反応を行う。

3.4.8.1.3 判定

試験管内に凝集を認めた血清の最高希釈倍数を凝集価とする。

試験群では、いずれも凝集価40倍以上でなければならない。この場合、対照群では、凝集価10倍以下でなければならない。

3.4.8.2 豚パスツレラ症力価試験

3.4.8.2.1 試験材料

3.4.8.2.1.1 試験動物

3.4.7の試験に用いた動物を用いる。

3.4.8.2.2 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各個体の血清について、酵素抗体反応（以下

「ELISA」という。)を行う。

試験群の血清及び参照陽性血清－１（付記13）を希釈・ブロッキング液（付記14）で20倍より2倍階段希釈したもの、参照陽性血清－２（付記15）を希釈・ブロッキング液で800倍より2倍階段希釈したもの、及び参照陰性血清（付記16）を希釈・ブロッキング液で20倍希釈したものを抗原吸着プレート（付記17）の各穴に100 μ Lずつ加え、37℃で60分間反応させる。洗浄液でプレートを洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗体－２（付記18）を各穴に100 μ Lずつ加え、37℃で60分間反応させる。プレートを洗浄後、基質液を各穴に100 μ Lずつ加えて反応させる。主波長405nm、副波長490nmで、800倍希釈した参照陽性血清－２の吸光度値を測定し、その値が0.8～1.2となった時点で反応終了とし、すべての穴の吸光度を測定する。

3.4.8.2.3 判定

得られた血清の各穴の吸光度値から、参照陰性血清の各穴の平均吸光度値＋3×参照陰性血清の各穴の吸光度値の標準偏差を引いた値が0以上を示す血清の最高希釈倍数を抗毒素抗体価とする。試験群では、いずれも抗毒素抗体価160倍以上でなければならない。この場合、対照群では、抗毒素抗体価20倍以下でなければならない。

この場合、参照陽性血清－１の抗毒素抗体価は160～320倍、参照陽性血清－２の抗毒素抗体価は3,200～12,800倍及び参照陰性血清の抗毒素抗体価は20倍以下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、製造後2年3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。

5 その他

5.1 添付文書等記載事項

と畜場出荷前の所定の期間は使用しない旨

付記1 ボルデー・ジャング培地

1,000 mL中

ボルデー・ジャング・アガーベース 30 g

グリセリン 10 g

水 残量

加温溶解後、121℃で15分間高压滅菌する。

約50℃に冷却後、必要に応じて馬脱線維素血液または羊脱線維素血液を5～20vol%となるように添加する。

付記2 大腸菌エンドトキシン

1 mL当たり50EUの大腸菌O55：B5由来エンドトキシンを発熱性物質を含まない水で8倍階段希釈したもの。

付記3 壊死毒素参照品

パスツレラ・ムルトシダD型8株又はこれと同等の壊死毒素を産生する株の菌体超音波処理後の遠心上清を、濃縮及びイオン交換クロマトグラフィーを用いた精製の後、pH感作により無毒化し、ろ過滅菌したものを1 mL当たり40相対単位となるように調製後、小分けして凍結乾燥し、2～7℃で保存したもの。

付記4 壊死毒素陽性対照

2.3.3に従って製造されたパスツレラ・ムルトシダトキソイド原液を3.3.2.3の試験を準用して試験

するとき、1 mL当たり200相対単位以上となるように調製後、小分けして-65℃以下で保存したもの。

付記5 抗壊死毒素ヤギ抗体

ヤギ由来のパスツレラ・ムルトシダ壊死毒素に対する抗体をブロッキング液（付記19）で至適濃度に希釈したもの。

付記6 精製壊死毒素固相化プレート

0.05mol/L炭酸塩緩衝液（付記20）に溶解した精製皮膚壊死毒素（付記21）の100 μ Lずつを、96穴平底プレートの各穴に加えて37±2℃で90～120分間反応させ、リン酸緩衝食塩液で洗浄後、ブロッキング液300 μ Lずつを加え、37±2℃で10～20分間反応させた後、リン酸緩衝食塩液で洗浄したもの。

付記7 洗浄液

1,000mL中

塩化ナトリウム	8.0	g
塩化カリウム	0.2	g
無水リン酸水素二ナトリウム	1.15	g
リン酸水素二カリウム	0.2	g
ポリソルベート20	0.5	mL
水	残	量

pHを7.2に調整する。

付記8 リン酸緩衝食塩液

1,000mL中

塩化ナトリウム	6.8	g
無水リン酸水素二ナトリウム	1.2	g
リン酸二水素カリウム	0.7	g
水	残	量

pHを6.8～7.2に調整し、121℃で15分間高圧滅菌する。

付記9 ペルオキシダーゼ標識抗体-1

ペルオキシダーゼ標識抗ヤギIgGを、ブロッキング液で至適濃度に希釈したもの。

付記10 基質液

A液： 0.6gの2,2'-アジノ-ジ（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸）を1,000mLのグリシン緩衝液で溶解したもの。

B液： 0.02vol%過酸化水素溶液

A液とB液を使用時に等量混合する。

付記11 相対単位

壊死毒素参照品の希釈系列の吸光度測定値から求められる参照曲線より算出される相対値を示す単位

付記12 ボルデテラ・ブロンキセプチカ凝集反応用抗原

ボルデテラ・ブロンキセプチカ I 相菌のホルマリン死菌を適当と認められた希釈用液に 1 mL 中 1×10^{10} 個となるように浮遊させたもので、既知抗体価の陽性血清に対して所定の凝集価を示し、陰性血清に対して凝集しないことを確認したもの。

付記13 参照陽性血清－1

無毒化したパスツレラ・ムルトシダ壊死毒素で免疫した豚の血清で、3.4.8.2.2の試験を準用して試験するとき、抗毒素抗体価160～320倍を示すように調製し、凍結乾燥したもの。

付記14 希釈・ブロッキング液

1,000 mL 中

塩化ナトリウム	8.0	g
---------	-----	---

塩化カリウム	0.2	g
--------	-----	---

無水リン酸水素二ナトリウム	1.15	g
---------------	------	---

リン酸水素二カリウム	0.2	g
------------	-----	---

ポリソルベート20	0.5	mL
-----------	-----	----

カゼイン	1	g
------	---	---

水	残	量
---	---	---

pHを7.2に調整する。

付記15 参照陽性血清－2

無毒化したパスツレラ・ムルトシダ壊死毒素で免疫した豚の血清で、3.4.8.2.2の試験を準用して試験するとき、抗毒素抗体価3,200～12,800倍を示すように調製し、凍結乾燥したもの。

付記16 参照陰性血清

パスツレラ・ムルトシダ壊死毒素に対する抗毒素抗体を保有しない豚の血清で、3.4.8.2.2の試験を準用して試験するとき、抗毒素抗体価20倍以下を示し、凍結乾燥したもの。

付記17 抗原吸着プレート

0.01mol/Lホウ酸緩衝液（付記22）で0.5 μ g/mLに希釈した抗壊死毒素マウスモノクローナル抗体（付記23）を96穴平底プレートの各穴に100 μ Lずつ加え、4℃で16時間反応させた後、洗浄液で3回洗浄し、希釈・ブロッキング液を200 μ Lずつ加え、37℃で60分間反応させる。反応後、洗浄液で3回洗浄し、希釈・ブロッキング液で400倍希釈した豚ELISA抗体価測定試験用パスツレラ・ムルトシダ壊死毒素（付記24）を100 μ Lずつ加え、37℃で60分間反応させた後、洗浄液で3回洗浄したもの。

付記18 ペルオキシダーゼ標識抗体－2

ペルオキシダーゼ標識抗ブタIgGを希釈・ブロッキング液で至適濃度に希釈したもの。

付記19 ブロッキング液

100 mL 中

スキムミルク	10	g
--------	----	---

洗浄液	残	量
-----	---	---

付記20 0.05mol/L炭酸塩緩衝液

1,000mL中

炭酸ナトリウム	1.59 g
炭酸水素ナトリウム	2.93 g
水	残 量

付記21 精製皮膚壊死毒素

パスツレラ・ムルトシダD型8株又はこれと同等の壊死毒素を産生する株の菌体超音波処理後の遠心上清をゲル浸透クロマトグラフィー及びイオン交換クロマトグラフィーを用いて精製後、皮膚壊死毒素画分を小分けして凍結乾燥し、2～7℃で保存したもの。

付記22 0.01 mol/Lホウ酸緩衝液

1,000 mL中

四ホウ酸ナトリウム十水和物	3.8 g
水	残 量

pHを9.0に調整する。

付記23 抗壊死毒素マウスモノクローナル抗体

パスツレラ・ムルトシダ壊死毒素を用いてイムノブロッティングを行った場合、分子量約143kDaの単一のバンドを認めるマウスモノクローナル抗体P3F51又はこれと同等と認められたもの。

付記24 豚ELISA抗体価測定試験用パスツレラ・ムルトシダ壊死毒素

パスツレラ・ムルトシダD型8株又はこれと同等の壊死毒素を産生する株の菌体超音波処理後の遠心上清をろ過滅菌して、モルモット皮内試験で320～640倍の壊死毒素活性を示すように豚ELISA抗体価測定試験用抗原として調製したもの。

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部の鶏コクシジウム感染症（ネカトリックス）生ワクチンの項を次のように改める。

鶏コクシジウム感染症（ネカトリックス）生ワクチン

1 定義

弱毒アイメリア・ネカトリックスを鶏腸管内で増殖させて得たオーシストを調製した生ワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

アイメリア・ネカトリックスNn-P125 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

主要な増殖部位は、鶏の小腸及び盲腸である。

平飼いの条件においてオーシストを飼料中に混合して若齢鶏に投与したとき、臨床症状を発現せず、発育に悪影響を与えない。

2.1.3 継代及び保存

原株、原種及び種コクシジウムは、生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の1～8週齢の鶏で継代する。

原株の継代は、原種コクシジウム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。

原種コクシジウムは、直接原株からの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。種コクシジウムは、原種コクシジウムから5代以内に製造しなければならない。

原株は凍結して－70℃以下で、種コクシジウムは5℃以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 鶏

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の1～8週齢の鶏を用いる。

2.3 原液

2.3.1 種コクシジウム及び原液の調製

原株を解凍した後、リン酸緩衝食塩液で増量して鶏に経口投与し、一定期間糞便を採取する。糞便からオーシストを収集し、孢子形成させた後、洗浄及び数量調整を行い、鶏に経口投与して一定期間糞便を採取する。糞便からオーシストを収集して種コクシジウムとし、鶏に経口投与して一定期間糞便を採取する。糞便を洗剤液で増量してろ過した後、遠心して得た沈渣を飽和食塩液に混合し、遠心して上清を採取する。これを洗浄してオーシストを収集した後、2 w/v%重クロム酸カリウム溶液に混合し加温して孢子形成させ、孢子形成オーシスト液とする。この孢子形成オーシスト液に含まれる孢子形成オーシストを適当と認められた方法により除菌及び洗浄し、さらに精製した後、ソルビン酸加エタノールを添加した滅菌アルセバーを加えオーシスト数を調整し、原液とする。

原液について、3.1の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液に滅菌アルセバー及びソルビン酸加エタノールを加えてよく混合し、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、密栓して小分製品とする。

小分製品について、3.2の試験を行う。

3 試験法

3.1 原液の試験

3.1.1 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 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 オーシスト含有量試験

3.1.3.1 試験材料

検体又は検体を水で希釈したものを試料とする。

3.1.3.2 試験方法

試料に含まれる孢子形成オーシスト数を顕微鏡下で計数する。

3.1.3.3 判定

検体 1 mL 中に $2.5 \times 10^4 \sim 2.5 \times 10^5$ 個の孢子形成オーシストが含まれていなければならない。

3.2 小分製品の試験

3.2.1 特性試験

一般試験法の特性試験を準用して試験するとき、固有の色調で少量の沈殿を認めるが、振とうすると固有の色調の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。

3.2.2 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。

3.2.3 サルモネラ否定試験

一般試験法のサルモネラ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。

3.2.4 生菌数限度試験

一般試験法の生菌数限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。

3.2.5 オーシスト含有量試験

3.1.3を準用して試験するとき、試験品 1 mL 中に $2.5 \times 10^3 \sim 2.5 \times 10^4$ 個の孢子形成オーシストが含まれていなければならない。

3.2.6 迷入ウイルス否定試験

試験品を適当と認められた方法で処理したものを試料とする。

一般試験法の迷入ウイルス否定試験法2.1、2.2.1及び2.2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.7 安全試験

3.2.7.1 試験材料

3.2.7.1.1 投与材料

試験品を投与材料とする。

3.2.7.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の6日齢鶏を用いる。

3.2.7.2 試験方法

試験動物の15羽ずつを試験群及び対照群とする。

試験群には投与材料150羽分を75gの実験動物幼雛用飼料に混合して経口投与し、対照群には75gの実験動物用幼雛用飼料のみを与える。試験開始翌日からは両群とも不断給餌し、共に4週間観察する。

試験開始時及び試験終了時に体重を測定し、下式により個体別に増体率を算出した後、群ごとに平均増体率を算出する。

なお、試験動物は、試験開始の前夜から約半日間断餌した後使用する。

(試験終了時の体重) - (試験開始時の体重)

$$\text{増体率 (\%)} = \frac{\text{(試験終了時の体重)} - \text{(試験開始時の体重)}}{\text{(試験開始時の体重)}} \times 100$$

3.2.7.3 判定

試験期間中、試験群及び対照群に臨床的異常を認めてはならず、試験群の平均増体率は、対照群のその80%以上でなければならない。

3.2.8 力価試験

3.2.8.1 試験材料

3.2.8.1.1 投与材料

試験品を投与材料とする。

3.2.8.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の6日齢鶏を用いる。

3.2.8.1.3 攻撃オーシスト

強毒アイメリア・ネカトリックス株を用いる。

攻撃オーシスト量は、1羽当たり 5×10^4 個とする。

3.2.8.2 試験方法

試験動物の10羽を試験群、20羽を対照群とする。

試験群には投与材料の10羽分を50gの実験動物幼雛用飼料に混合して経口投与し、対照群には100gの実験動物用幼雛用飼料のみを与える。試験開始翌日からは両群とも不断給餌し、4週間後に両群の10羽ずつに攻撃オーシストを経口投与して攻撃する。対照群の残り10羽は非攻撃対照群とする。攻撃後臨床観察を行い、試験群と攻撃対照群の死亡数を算出する。また、攻撃日及び攻撃後8日目に試験動物の体重を測定し、下式により個体別に増体率を算出した後、各群ごとに平均増体率を算出する。

$$\text{増体率 (\%)} = \frac{(\text{試験終了時の体重}) - (\text{攻撃日の体重})}{(\text{攻撃日の体重})} \times 100$$

3.2.8.3 判定

Fisherの直接確率計算法により有意水準5%で試験群の死亡数が攻撃対照群のそれより有意に少ない場合には、適合とする。

両群間の死亡数に有意差が認められない場合には、平均増体率により評価する。

試験群の平均増体率は、攻撃対照群のそれを上回らなければならない。この場合、攻撃対照群における平均増体率は非攻撃対照群のそれよりも有意に低くなければならない（t検定、有意水準5%）。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、9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。

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部の鶏コクシジウム感染症（アセルブリナ・テネラ・マキシマ）混合生ワクチンの項を次のように改める。

鶏コクシジウム感染症（アセルブリナ・テネラ・マキシマ） 混合生ワクチン

1 定義

弱毒アイメリア・アセルブリナ、弱毒アイメリア・テネラ及び弱毒アイメリア・マキシマをそれぞれ鶏腸管内で増殖させて得たオーシストを混合したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 アイメリア・アセルブリナ株

2.1.1.1 名称

アイメリア・アセルブリナNa-P75株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

主要な増殖部位は、鶏の十二指腸及び空腸の粘膜上皮細胞である。平飼い条件においてオーシストを飼料中に混合して5日齢の鶏に投与したとき、臨床症状を発現せず、発育に悪影響を与えない。

2.1.1.3 継代及び保存

原株及び原種コクシジウムは、生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の3～8週齢までの鶏で継代する。

原株の継代は、原種コクシジウム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。

原種コクシジウムは、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。種コクシジウムは、原種コクシジウムから5代以内に製造しなければならない。

原株は凍結して－70℃以下で、種コクシジウムは5℃以下で保存する。

2.1.2 アイメリア・テネラ株

2.1.2.1 名称

アイメリア・テネラNt-P110株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

主要な増殖部位は、鶏の盲腸粘膜上皮及び固有層の細胞である。平飼い条件においてオーシストを飼料中に混合して5日齢の鶏に投与したとき、臨床症状を発現せず、発育に悪影響を与えない。

2.1.2.3 継代及び保存

原株及び原種コクシジウムは、生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の3～8週齢までの鶏で継代する。

原株の継代は、原種コクシジウム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。

原種コクシジウムは、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。種コクシジウムは、原種コクシジウムから5代以内に製造しなければならない。

原株は凍結して－70℃以下で、種コクシジウムは5℃以下で保存する。

2.1.3 アイメリア・マキシマ株

2.1.3.1 名称

アイメリア・マキシマNm-P102株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

主要な増殖部位は、鶏の十二指腸、空腸及び回腸の粘膜上皮細胞である。平飼い条件においてオーシストを飼料中に混合して5日齢の鶏に投与したとき、臨床症状を発現せず、発育に悪影響を与えない。

2.1.3.3 継代及び保存

原株及び原種コクシジウムは、生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の3～8週齢までの鶏で継代する。

原株の継代は、原種コクシジウム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。

原種コクシジウムは、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。種コクシジウムは、原種コクシジウムから5代以内に製造しなければならない。

原株は凍結して－70℃以下で、種コクシジウムは5℃以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 鶏

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の3～8週齢までの鶏を用いる。

2.3 原液

2.3.1 アイメリア・アセルブリナ株原液

2.3.1.1 種コクシジウム及び原液の調製

原株を解凍した後、リン酸緩衝食塩液で増量して鶏に経口投与し、一定期間糞便を採取する。糞便からオーシストを収集し、孢子形成させた後、洗浄及び数量調整を行い、鶏に経口投与して一定期間糞便を採取する。糞便からオーシストを収集して種コクシジウムとし、鶏に経口投与して一定期間糞便を採取する。糞便を洗剤液で増量してろ過した後、遠心して得た沈渣を飽和食塩液に混合し、遠心して上清を採取する。これを洗浄してオーシストを収集した後、2 w/v%重クロム酸カリウム溶液（付記1）に混合し加温して孢子形成させ、孢子形成オーシスト液とする。この孢子形成オーシスト液に含まれる孢子形成オーシストを適当と認められた方法により除菌及び洗浄し、さらに精製した後、ソルビン酸加エタノール（付記2）を添加した滅菌リン酸緩衝食塩液に混合し、オーシスト数を調整してアイメリア・アセルブリナ株原液とする。

ただし、原液の調製工程でオーシストを保存する場合には、農林水産大臣が認めた期間とする。

アイメリア・アセルブリナ株原液について、3.1の試験を行う。

2.3.2 アイメリア・テネラ株原液

2.3.2.1 種コクシジウム及び原液の調製

原株を解凍した後、リン酸緩衝食塩液で増量して鶏に経口投与し、一定期間糞便を採取する。糞便からオーシストを収集し、孢子形成させた後、洗浄及び数量調整を行い、鶏に経口投与して一定期間糞便を採取する。糞便からオーシストを収集して種コクシジウムとし、鶏に経口投与して一定期間糞便を採取する。糞便を洗剤液で増量してろ過した後、遠心して得た沈渣を飽和食塩液に混合し、遠心して上清を採取する。これを洗浄してオーシストを収集した後、2 w/v%重クロム酸カリウム溶液に混合し加温して孢子形成させ、孢子形成オーシスト液とする。この孢子形成オーシスト液に含まれる孢子形成オーシストを適当と認められた方法により除菌及び洗浄し、さらに精製した後、ソルビン酸加エタノールを添加した滅菌リン酸緩衝食塩液に混合し、オーシスト数を調整してアイメリア・テネラ株原液とする。

ただし、原液の調製工程でオーシストを保存する場合には、農林水産大臣が認めた期間とする。

アイメリア・テネラ株原液について、3.1の試験を行う。

2.3.3 アイメリア・マキシマ株原液

2.3.3.1 種コクシジウム及び原液の調製

原株を解凍した後、リン酸緩衝食塩液で増量して鶏に経口投与し、一定期間糞便を採取する。糞便からオーシストを収集し、孢子形成させた後、洗浄及び数量調整を行い、鶏に経口投与して一定期間糞便を採取する。糞便からオーシストを収集して種コクシジウムとし、鶏に経口投与して一定期間糞便を採取する。糞便を洗剤液で増量してろ過した後、遠心して得た沈渣を飽和食塩液に混合し、遠心して上清を採取する。これを洗浄してオーシストを収集した後、2 w/v%重クロム酸カリウム溶液に混合し加温して孢子形成させ、孢子形成オーシスト液とする。この孢子形成オーシスト

液に含まれる孢子形成オーシストを適当と認められた方法により除菌及び洗浄し、さらに精製した後、ソルビン酸エタノールを添加した滅菌リン酸緩衝食塩液に混合し、オーシスト数を調整してアイメリア・マキシマ株原液とする。

ただし、原液の調製工程でオーシストを保存する場合には、農林水産大臣が認めた期間とする。
アイメリア・マキシマ株原液について、3.1の試験を行う。

2.4 最終バルク

各株の原液を混合し、滅菌リン酸緩衝食塩液及びソルビン酸エタノールを加えて各オーシスト数を調整し、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、密栓して小分製品とする。
小分製品について、3.2の試験を行う。

3 試験法

3.1 原液の試験

3.1.1 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 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 オーシスト含有量試験

3.1.3.1 試験材料

検体又は検体を水で希釈したものを試料とする。

3.1.3.2 試験方法

試料に含まれる孢子形成オーシスト数を顕微鏡下でオーシストの鑑別点（付記3）に準じて計数する。

3.1.3.3 判定

検体 1 mL中に次の数の孢子形成オーシストが含まれていなければならない。

アイメリア・アセルブリナ株	$1.5 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^7$ 個
アイメリア・テネラ株	$6 \times 10^5 \sim 6 \times 10^6$ 個
アイメリア・マキシマ株	$3 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ 個

3.2 小分製品の試験

3.2.1 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、固有の色調で少量の沈殿を認めるが、振とうすると固有の色調の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。

3.2.2 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。

3.2.3 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。

3.2.4 サルモネラ否定試験

一般試験法のサルモネラ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。

3.2.5 生菌数限度試験

一般試験法の生菌数限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。

3.2.6 オーシスト含有量試験

3.1.3を準用して試験するとき、試験品 1 mL中に孢子形成オーシストは総数で $8 \times 10^4 \sim 8 \times 10^5$ 個、そのうち長径 $25 \mu\text{m}$ 以上の孢子形成オーシストは $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 個含まれていなければならない。

3.2.7 迷入ウイルス否定試験

試験品を適当と認められた方法で処理したものを試料とする。

一般試験法の迷入ウイルス否定試験法2.1、2.2.1及び2.2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.8 安全試験

3.2.8.1 試験材料

3.2.8.1.1 投与材料

試験品を投与材料とする。

3.2.8.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の5日齢の鶏を用いる。

3.2.8.2 試験方法

試験動物の15羽ずつを試験群及び対照群とする。

試験群には投与材料の150羽分を75gの実験動物幼雛用飼料に混合して経口投与し、対照群には75gの実験動物幼雛用飼料のみを投与する。試験開始翌日からは両群とも不断給餌し、共に3週間観察する。試験開始時及び試験終了時に体重を測定し、下式により個体別に増体率を算出した後、群ごとに平均増体率を算出する。

なお、試験動物は試験開始の前夜から約半日間断餌した後使用する。

$$\text{増体率(\%)} = \frac{(\text{試験終了時の体重}) - (\text{試験開始時の体重})}{(\text{試験開始時の体重})} \times 100$$

3.2.8.3 判定

試験期間中、試験群及び対照群に臨床的異常を認めてはならず、試験群の平均増体率は、対照群のその80%以上でなければならない。

3.2.9 力価試験

3.2.9.1 試験材料

3.2.9.1.1 投与材料

試験品を投与材料とする。

3.2.9.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の5日齢の鶏を用いる。

3.2.9.1.3 攻撃オーシスト

強毒のアイメリア・アセルブリナ株、アイメリア・テネラ株及びアイメリア・マキシマ株を用いる。

攻撃オーシスト量は、それぞれ1羽当たり $4 \times 10^5/0.3\text{mL}$ 、 $1 \times 10^5/0.3\text{mL}$ 及び $4 \times 10^5/0.3\text{mL}$ とする。

3.2.9.2 試験方法

試験動物の30羽を試験群、40羽を対照群とする。

試験群には投与材料の30羽分を150gの実験動物幼雛用飼料に混合して経口投与し、対照群には200gの実験動物幼雛用飼料のみを与える。試験開始翌日からは両群とも不断給餌し、3週間後に両群の10羽ずつにそれぞれの攻撃オーシストを経口投与して攻撃する。対照群の残り10羽は非攻撃対照群とする。

攻撃後臨床観察を行い、試験群と攻撃対照群の各攻撃株に対する死亡数を算出する。また、攻撃日及びアイメリア・アセルブリナ株攻撃群では攻撃後6日目、アイメリア・テネラ株及びアイメリア・マキシマ株攻撃群では攻撃後7日目に体重を測定する。下式により個体別に増体率を算出した後、各群ごとに平均増体率を算出する。

$$\text{増体率(\%)} = \frac{(\text{試験終了日の体重}) - (\text{攻撃日の体重})}{(\text{試験終了日の体重})} \times 100$$

(攻撃日の体重)

3.2.9.3 判定

各攻撃株についてFisherの直接確率計算法により有意水準5%で試験群の死亡数が攻撃対照群のそれより有意に少ない場合には、適合とする。

両群間の死亡数に有意差が認められない場合には、平均増体率により評価する。

各攻撃株について試験群の平均増体率は、攻撃対照群のそれを上回らなければならない。この場合、各攻撃株の攻撃対照群における平均増体率は非攻撃対照群のそれよりも有意に低くなければならない(t検定、有意水準5%)。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、1年2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 2 w/v%重クロム酸カリウム溶液

重クロム酸カリウム2gに水を加えて100mLとしたもの

付記2 ソルビン酸加エタノール

100mL中

ソルビン酸

10.0 g

エタノール

残 量

付記3 オーシストの鑑別点

アイメリア・アセルブリナ株オーシスト：長径14.6～21.9 μ m、短径12.2～17.1 μ m、無色、オーシスト壁は薄く、卵形から楕円形を示す。

アイメリア・テネラ株オーシスト：長径19.5～24.4 μ m、短径12.2～17.1 μ m、無色、オーシスト壁は比較的厚く卵円形から卵形を示す。

アイメリア・マキシマ株オーシスト：長径24.4～34.2 μ m、短径19.5～29.3 μ m、やや茶褐色味を呈し、オーシスト壁は厚く、卵円形～卵形を示す。

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部の鶏コクシジウム感染症（アセルブリナ・テネラ・マキシマ・ミチス）混合生ワクチンの項を次のように改める。

鶏コクシジウム感染症（アセルブリナ・テネラ・マキシマ・ミチス）混合生ワクチン

1 定義

弱毒アイメリア・アセルブリナ、弱毒アイメリア・テネラ、弱毒アイメリア・マキシマ及び弱毒アイメリア・ミチスをそれぞれ鶏腸管内で増殖させて得たオーシストを混合したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 アイメリア・アセルブリナ株

2.1.1.1 名称

アイメリア・アセルブリナHP株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

主要な増殖部位は、鶏の十二指腸及び空腸の粘膜上皮細胞である。

SPF鶏に経口投与したとき、臨床症状を発現せず、発育に悪影響を与えない。

2.1.1.3 継代及び保存

原株、原種コクシジウム及び種コクシジウムは、生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の約5週齢の鶏で継代する。

原株の継代は、原種コクシジウム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。

原種コクシジウムは、直接原株から連続した工程により製造し、その継代数は、1代以内でなければならない。種コクシジウムは、原種コクシジウムから3代以内に製造しなければならない。

原株は凍結して－100℃以下で、原種コクシジウム及び種コクシジウムは2～8℃で保存する。

2.1.2 アイメリア・テネラ株

2.1.2.1 名称

アイメリア・テネラHP株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

主要な増殖部位は、鶏の盲腸粘膜上皮及び固有層の細胞である。

SPF鶏に経口投与したとき、臨床症状を発現せず、発育に悪影響を与えない。

2.1.2.3 継代及び保存

原株、原種コクシジウム及び種コクシジウムは、生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の約5週齢の鶏で継代する。

原株の継代は、原種コクシジウム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。

原種コクシジウムは、直接原株から連続した工程により製造し、その継代数は、5代以内でなければならない。種コクシジウムは、原種コクシジウムから3代以内に製造しなければならない。

原株は凍結して－100℃以下で、原種コクシジウム及び種コクシジウムは2～8℃で保存する。

2.1.3 アイメリア・マキシマ株

2.1.3.1 名称

アイメリア・マキシマCP株及びMFP株又はこれらと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

主要な増殖部位は、鶏の空腸及び回腸の粘膜上皮細胞である。

SPF鶏に経口投与したとき、臨床症状を発現せず、発育に悪影響を与えない。

2.1.3.3 継代及び保存

原株、原種コクシジウム及び種コクシジウムは、生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の約5週齢の鶏で継代する。

原株の継代は、原種コクシジウム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。

原種コクシジウムは、直接原株から連続した工程により製造し、その継代数は、1代以内でなければならない。種コクシジウムは、原種コクシジウムから3代以内に製造しなければならない。

原株は凍結して -100°C 以下で、原種コクシジウム及び種コクシジウムは $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ で保存する。

2.1.4 アイメリア・ミチス株

2.1.4.1 名称

アイメリア・ミチスHP株又はこれと同等と認められた株

2.1.4.2 性状

主要な増殖部位は、鶏の十二指腸及び空腸の粘膜上皮細胞である。

SPF鶏に経口投与したとき、臨床症状を発現せず、発育に悪影響を与えない。

2.1.4.3 継代及び保存

原株、原種コクシジウム及び種コクシジウムは、生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の約5週齢の鶏で継代する。

原株の継代は、原種コクシジウム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。

原種コクシジウムは、直接原株から連続した工程により製造し、その継代数は、1代以内でなければならない。種コクシジウムは、原種コクシジウムから3代以内に製造しなければならない。

原株は凍結して -100°C 以下で、原種コクシジウム及び種コクシジウムは $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 鶏

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の約5週齢の鶏を用いる。

2.3 原液

2.3.1 オーシストの増殖

2.3.1.1 アイメリア・アセルブリナ株

種コクシジウムを鶏に経口投与して一定期間糞便を採取する。糞便に水を加えて均一化し、ろ過した後、遠心して得た沈渣を飽和食塩液に混合し、遠心して上清を採取する。これを洗浄してオーシストを収集した後、1 w/v%ニクロム酸カリウム溶液（付記1）に浮遊させ、アイメリア・アセルブリナ株オーシスト浮遊液とする。

アイメリア・アセルブリナ株オーシスト浮遊液について、3.1.1の試験を行う。

2.3.1.2 アイメリア・テネラ株

種コクシジウムを鶏に経口投与して一定期間糞便を採取する。糞便に水を加えて均一化し、ろ過した後、遠心して得た沈渣を飽和食塩液に混合し、遠心して上清を採取する。これを洗浄してオーシストを収集した後、1 w/v%ニクロム酸カリウム溶液に浮遊させ、アイメリア・テネラ株オーシスト浮遊液とする。

アイメリア・テネラ株オーシスト浮遊液について、3.1.1の試験を行う。

2.3.1.3 アイメリア・マキシマ株

種コクシジウムを鶏に経口投与して一定期間糞便を採取する。糞便に水を加えて均一化し、ろ過した後、遠心して得た沈渣を飽和食塩液に混合し、遠心して上清を採取する。これを洗浄してオーシストを収集した後、1 w/v%ニクロム酸カリウム溶液に浮遊させ、アイメリア・マキシマ各株オーシスト浮遊液とする。

アイメリア・マキシマ各株オーシスト浮遊液について、3.1.1の試験を行う。

2.3.1.4 アイメリア・ミチス株

種コクシジウムを鶏に経口投与して一定期間糞便を採取する。糞便に水を加えて均一化し、ろ過した後、遠心して得た沈渣を飽和食塩液に混合し、遠心して上清を採取する。これを洗浄してオー

シストを収集した後、1 w/v%ニクロム酸カリウム溶液に浮遊させ、アイメリア・ミチス株オーシスト浮遊液とする。

アイメリア・ミチス株オーシスト浮遊液について、3.1.1の試験を行う。

2.3.2 胞子形成

各株のオーシスト浮遊液を、それぞれ25～30℃で2～3日間通気して胞子を形成させ、各株の胞子形成オーシスト液とする。

各株の胞子形成オーシスト液について、3.2の試験を行う。

2.3.3 除菌

各株の胞子形成オーシスト液に含まれる胞子形成オーシストを適当と認められた方法により除菌及び洗浄し、滅菌リン酸緩衝食塩液に再浮遊させたものを、各株の原液とする。

各株の原液について、3.3の試験を行う。

2.4 最終バルク

各株の原液を濃度調整し、混合したものを最終バルクとする。

2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、密栓して小分製品とする。

小分製品について、3.4の試験を行う。

3 試験法

3.1 オーシスト浮遊液の試験

3.1.1 オーシスト含有量試験

3.1.1.1 試験材料

検体を試料とする。

3.1.1.2 試験方法

試料に含まれるオーシスト数を顕微鏡下で計数し、製造に用いたSPF鶏1羽当たりの排泄オーシスト数を算出する。

3.1.1.3 判定

次の株又はこれらと同等と認められた株の製造に用いたSPF鶏1羽当たりの排泄オーシスト数は、以下の範囲内でなければならない。

アイメリア・アセルブリナHP株	$6 \times 10^6 \sim 6 \times 10^8$ 個
アイメリア・テネラHP株	$2 \times 10^6 \sim 2 \times 10^8$ 個
アイメリア・マキシマCP株	$7 \times 10^5 \sim 7 \times 10^7$ 個
アイメリア・マキシマMFP株	$4 \times 10^5 \sim 4 \times 10^7$ 個
アイメリア・ミチスHP株	$3 \times 10^6 \sim 3 \times 10^8$ 個

3.2 胞子形成オーシスト液の試験

3.2.1 胞子形成オーシスト率試験

3.2.1.1 試験材料

検体を試料とする。

3.2.1.2 試験方法

試料に含まれるオーシスト数及び胞子形成オーシスト数を顕微鏡下で計数し、次式により胞子形成オーシスト率を算出する。

$$\text{胞子形成オーシスト率 (\%)} = (\text{胞子形成オーシスト数}) / (\text{オーシスト数}) \times 100$$

3.2.1.3 判定

検体中に含まれる次の株又はこれらと同等と認められた株の胞子形成オーシスト率は、以下の値でなければならない。

アイメリア・アセルブリナHP株	60%以上
アイメリア・テネラHP株	65%以上

アイメリア・マキシマCP株	55%以上
アイメリア・マキシマMFP株	50%以上
アイメリア・ミチスHP株	65%以上

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 迷入ウイルス否定試験

試験品を必要に応じて適当と認められた方法で処理したものを試料とする。

一般試験法の迷入ウイルス否定試験法2.1及び2.2.2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、これらの試験を3.4.6において実施する製剤については、本試験を実施しなくてもよい。

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、固有の色調で少量の沈殿を認めるが、振とうすると固有の色調の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、pHは、固有の値を示さなければならない。

3.4.3 無菌試験

一般試験法の無菌試験法により試験するとき、これに適合しなければならない。

3.4.4 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。

3.4.5 オーシスト含有量試験

3.4.5.1 試験材料

試験品を水で希釈したものを試料とする。

3.4.5.2 試験方法

試料に含まれる孢子形成オーシスト数を顕微鏡下で計数する。

3.4.5.3 判定

試験品 1 mLあたりに含まれる孢子形成オーシスト数の総数は 4.6×10^5 個以上、そのうち大きさ $30 \mu m$ 以上の孢子形成オーシスト数は 4.0×10^4 個以上でなければならない。

3.4.6 迷入ウイルス否定試験

試験品を適当と認められた方法で処理したものを試料とする。

一般試験法の迷入ウイルス否定試験法2.1、2.2.1及び2.2.2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、3.3.3を実施する製剤については、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法2.1及び2.2.2を準用して実施する試験を実施しなくてもよい。

3.4.7 安全試験

3.4.7.1 試験材料

3.4.7.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

3.4.7.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の0～1日齢の鶏を用いる。

3.4.7.2 試験方法

試験動物の15羽ずつを試験群及び対照群とする。

試験群には接種材料150羽分を75gの実験動物用幼雛用飼料に混合して経口投与し、対照群には75gの実験動物用幼雛用飼料のみを投与する。試験開始翌日からは両群とも不断給餌し、共に3週間観察する。試験開始時及び試験終了時に体重を測定し、下式により個体別に増体率を算出した後、群ごとの平均増体率を算出する。

なお、試験動物は、試験開始の前夜から約半日間断餌した後使用する。

$$\text{増体率 (\%)} = \frac{(\text{試験終了時の体重}) - (\text{試験開始時の体重})}{(\text{試験開始時の体重})} \times 100$$

3.4.7.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に臨床的な異常を認めてはならず、試験群の個体の平均増体率は、対照群の個体の平均増体率の80%以上でなければならない。

3.4.8 力価試験

3.4.8.1 試験材料

3.4.8.1.1 接種材料

試験品を水で0.1mL中1羽分となるように調整したものを接種材料とする。

3.4.8.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の0～1日齢の鶏を用いる。

3.4.8.2 試験方法

試験動物の15羽を試験群、5羽を対照群とする。

接種材料0.1mLずつを試験群に経口投与する。投与後96～168時間に排泄される糞便を24時間ごとに全量回収し、排泄オーシスト数を計数する。

3.4.8.3 判定

投与後96～120、120～144及び144～168時間に排泄される総オーシスト数は、それぞれ1羽当たり 5×10^5 、 6×10^5 及び 6×10^5 個以上でなければならない。この場合、対照群ではオーシストの排泄を認めてはならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後11か月間とする。

付記1 1 w/v%ニクロム酸カリウム溶液

ニクロム酸カリウム1gに水を加えて100mLとしたもの。

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部のジステンパー・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ワクチンの項を次のように改める。

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ワクチン

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「乾燥生ワクチン」という。）と犬コロナウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス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オンダーステポート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、Vero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℃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。

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）V-197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、犬腎継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℃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。

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91880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、犬腎継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K-3ip69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。

2.1.4.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、猫腎継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。

2.1.5 犬コロナウイルス株

2.1.5.1 名称

犬コロナウイルスTN-449株又はこれと同等と認められた株

2.1.5.2 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。

2.1.5.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、猫腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

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。

2.2 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

Vero細胞又は製造に相当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.1.2 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

犬腎継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

犬腎継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

猫腎継代細胞又は製造に相当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.4.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

2.2.5 犬コロナウイルス

2.2.5.1 培養細胞

猫腎継代細胞又は製造に相当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.5.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

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。

2.3.1.2 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原液とする。

原液について、3.2.1、3.2.2及び3.2.3.1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 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。

2.3.2.2 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原液とする。

原液について、3.2.1、3.2.2及び3.2.3.2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 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原液とする。

原液について、3.2.1、3.2.2及び3.2.3.3の試験を行う。

2.3.4 犬パルボウイルス原液

2.3.4.1 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。

2.3.4.2 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原液とする。

原液について、3.2.1、3.2.2及び3.2.3.4の試験を行う。

2.3.5 犬コロナウイルス原液

2.3.5.1 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。

2.3.5.2 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ウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2.1、3.2.2及び3.2.3.5の試験を行う。

2.3.5.3 不活化

ウイルス浮遊液に相当と認められた不活化剤を加えて不活化後、適当な中和剤を用い中和したもの又はそのままの液を不活化ウイルス浮遊液とする。

不活化ウイルス浮遊液について、3.2.4の試験を行う。

2.3.5.4 原液の調整

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適当と認められた保存剤を添加したものを原液とする。

原液について、3.2.1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犬コロナウイルス原液と適当と認められた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、3.3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、3.3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 原液の試験

3.2.1 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。

3.2.2 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。

3.2.3 ウイルス含有量試験

3.2.3.1 ジステンパーウイルス含有量試験

3.2.3.1.1 試験材料

3.2.3.1.1.1 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。

3.2.3.1.1.2 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。

3.2.3.1.2 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。

3.2.3.1.3 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^{4.8}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。

3.2.3.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験

3.2.3.2.1 試験材料

3.2.3.2.1.1 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。

3.2.3.2.1.2 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。

3.2.3.2.2 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。

3.2.3.2.3 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^{7.3}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。

3.2.3.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

3.2.3.3.1 試験材料

3.2.3.3.1.1 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。

3.2.3.3.1.2 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。

3.2.3.3.2 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。

3.2.3.3.3 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、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10^{6.3}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。

3.2.3.4 犬パルボウイルス含有量試験

3.2.3.4.1 試験材料

3.2.3.4.1.1 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。

3.2.3.4.1.2 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。

3.2.3.4.2 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、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(付記2)を加え、更にこの混合液と等量の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。

3.2.3.4.3 判定

培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10^{5.7}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。

3.2.3.5 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

3.2.3.5.1 犬コロナウイルス含有量試験

3.2.3.5.1.1 試験材料

3.2.3.5.1.1.1 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。

3.2.3.5.1.1.2 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。

3.2.3.5.1.2 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。

3.2.3.5.1.3 判定

特異蛍光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。

3.2.3.5.2 犬コロナウイルス抗原量測定試験

3.2.3.5.2.1 試験材料

検体、参照品、抗犬コロナウイルスモノクローナル抗体、抗犬コロナウイルス兎抗体、アルカリフォスファターゼ標識抗兎IgG、*p*-ニトロフェニルリン酸基質液を用いる。

3.2.3.5.2.2 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プレートに抗犬コロナウイルスモノクローナル抗体液を分注し、37℃で90分間反応させ固相化する。以下各反応後に洗浄液で洗浄する。1%牛血清アルブミン・ポリソルベート20加リン酸緩衝食塩液を分注し、37℃で60分間反応させブロッキングする。検体及び参照品を2倍階段希釈した各希釈液を各穴に加え、37℃で60分間反応する。抗犬コロナウイルス兎抗体液を各穴に加え、37℃で60分間反応する。アルカリフォスファターゼ標識抗兎IgG液を各穴に加え、37℃で60分間反応する。*p*-ニトロフェニルリン酸基質液を加え、37℃で25～30分間反応させた後、3 mol/L水酸化ナトリウム溶液を加えて反応を停止する。主波長405nm、副波長490nmで吸光度を測定する。

3.2.3.5.2.3 判定

参照品に対する検体の相対抗原量を算出するとき、2,300RU/0.05mL以上でなければならない。

3.2.4 不活化試験

3.2.4.1 犬コロナウイルス不活化試験

3.2.4.1.1 試験材料

3.2.4.1.1.1 試料

検体2 mL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。

3.2.4.1.1.2 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。

3.2.4.1.2 試験方法

試料を25cm²以上の培養細胞2本に1 mL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、更に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。

3.2.4.1.3 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。

3.3 小分製品の試験

3.3.1 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ない。また、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ない。また、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。

3.3.2 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。

3.3.3 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、窒素充填製品では、本試験を省略することができる。

3.3.4 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。

3.3.5 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。

3.3.6 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。

3.3.7 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4）、抗犬アデノウイルス（2型）血清（付記5）、抗犬パラインフルエンザウイルス血清（付記6）及び抗犬パルボウイルス血清（付記7）を、それぞれ非働化したものを用いる。

3.3.8 ウイルス含有量試験

3.3.8.1 ジステンパーウイルス含有量試験

3.3.8.1.1 試験材料

3.3.8.1.1.1 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5、6及び7）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。

3.3.8.1.1.2 培養細胞

Vero細胞を用いる。

3.3.8.1.2 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。

3.3.8.1.3 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。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。

3.3.8.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験

3.3.8.2.1 試験材料

3.3.8.2.1.1 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4、6及び7）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。

3.3.8.2.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞

3.3.8.2.2 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。

3.3.8.2.3 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^{5.0}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。

3.3.8.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

3.3.8.3.1 試験材料

3.3.8.3.1.1 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4、5及び7）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。

3.3.8.3.1.2 培養細胞

犬腎継代細胞

3.3.8.3.2 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等量加え、室温で90分間静置後し、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。

3.3.8.3.3 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、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^{5.0}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。

3.3.8.4 犬パルボウイルス含有量試験

3.3.8.4.1 試験材料

3.3.8.4.1.1 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4、5及び6）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。

3.3.8.4.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.3.8.4.2 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を加え、さら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。

3.3.8.4.3 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、1mL中10^{5.0}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。

3.3.9 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。

3.3.10 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。

3.3.11 安全試験

3.3.11.1 試験材料

3.3.11.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.3.11.1.2 試験動物

6 か月齢未満の犬を用いる。

3.3.11.2 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。

3.3.11.3 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。

3.3.12 力価試験

3.3.12.1 ジステンパー力価試験

3.3.12.1.1 試験材料

3.3.12.1.1.1 試験動物

3.3.11 の試験に用いた犬を用いる。

3.3.12.1.1.2 中和試験用ウイルス

ジステンパーウイルス FXNO 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。

3.3.12.1.1.3 培養細胞

適当と認められた培養細胞を用いる。

3.3.12.1.2 試験方法

3.3.11 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 0.1 mL 中約 200 TCID₅₀ 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 0.1 mL 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。

3.3.12.1.3 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。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。

3.3.12.2 犬アデノウイルス（2 型）感染症力価試験

3.3.12.2.1 試験材料

3.3.12.2.1.1 試験動物

3.3.11 の試験に用いた犬を用いる。

3.3.12.2.1.2 中和試験用ウイルス

犬アデノウイルス（2 型）V-197 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。

3.3.12.2.1.3 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

3.3.12.2.2 試験方法

3.3.11 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 0.1 mL 中約 200 TCID₅₀ 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 0.1 mL 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。

3.3.12.2.3 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、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。

3.3.12.3 犬パラインフルエンザ力価試験

3.3.12.3.1 試験材料

3.3.12.3.1.1 試験動物

3.3.11の試験に用いた犬を用いる。

3.3.12.3.1.2 中和試験用ウイルス

犬パラインフルエンザウイルスフィリップス・ロクセーン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。

3.3.12.3.1.3 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。

3.3.12.3.2 試験方法

3.3.11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。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等量加え、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。

3.3.12.3.3 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ED₅₀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。

3.3.12.4 犬パルボウイルス感染症力価試験

3.3.12.4.1 試験材料

3.3.12.4.1.1 試験動物

3.3.11の試験に用いた犬を用いる。

3.3.12.4.1.2 赤血球凝集抗原

犬パルボウイルスK-3ip69株又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。

3.3.12.4.2 試験方法

3.3.11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、非働化、RDE(付記8)、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を用いて2倍階段希釈する。各段階の希釈血清に8単位に調製した血球凝集抗原を等量加え、常温で60分間処理したのち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。

3.3.12.4.3 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。

3.3.12.5 犬コロナウイルス感染症力価試験

3.3.12.5.1 試験材料

3.3.12.5.1.1 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。

3.3.12.5.1.2 試験動物

体重約300gのモルモットを用いる。

3.3.12.5.1.3 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。

3.3.12.5.1.4 培養細胞

猫全胎子継代細胞又は適当と認められた細胞を用いる。

3.3.12.5.2 試験方法

試験動物 5 匹を試験群、2 匹を対照群とする。注射材料 1 mL ずつを試験群の筋肉内に 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。非働化した被検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 0.05mL 中約 200TCID₅₀ の中和試験用ウイルス液を等量混合し、37℃ で 60 分間処理する。この各混合液 0.05mL 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。

3.3.12.5.3 判定

培養細胞の半数以上に 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、2 年 4 か月間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合は、その期間とする。

付記 1 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 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
----------	-----

炭酸水素ナトリウムで 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

1,000mL 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
---	-----

牛血清アルブミン 0.2w/v% となるように加えたのち、水酸化ナトリウムで pH を 9.0 に調整する。

付記 3 VAD6.0 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	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 pH を 6.0 に調整する。

付記 4 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5 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6 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7 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8 RDE

市販のRDEを処方に従い、生理食塩水20mLで溶解し、小分け分注した後－20℃以下で保存する。

ワクチン（シードロット製剤）の部のジステンパー・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ワクチン（シード）の項を次のように改める。

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ワクチン（シード）

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。

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。

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。

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°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、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°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、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°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 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°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、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°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、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。

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 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。

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。

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。

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

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。

2.1.5.3 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。

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。

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°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 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°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 -60°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 -60°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 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°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−60℃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−60℃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 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相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−60℃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−60℃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−60℃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。

2.2.4 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相当と認められた株化細胞を用いる。

2.2.4.2 培養液

製造に相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。

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°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。

2.2.4.5 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°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。

2.2.5 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相当と認められた株化細胞を用いる。

2.2.5.2 培養液

製造に相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°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。

2.2.5.4 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°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。

2.2.5.5 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°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 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

プロダクションセルシードウイルスを2.3.1.1の細胞で培養し、相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を適当と認められた方法で濃縮したもの又は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適当と認められた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

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。

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、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

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。

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、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1.1、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。

3.2.1.6 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

犬腎株化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、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10^{4.8}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。

3.3.3.2 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、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は1 mL中10^{7.3}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。

3.3.3.3 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。

3.3.3.1.2 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 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 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、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は1mL中10^{6.3}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。

3.3.3.4 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）で調整した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、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は1mL中10^{5.7}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。

3.3.3.5 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、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は1mL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。

3.3.3.5.2 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、抗犬コロナウイルスモノクローナル抗体、抗犬コロナウイルス兎抗体、アルカリフォスファターゼ標識抗兎IgG及び*p*-ニトロフェニルリン酸基質液を用いる。

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プレートに抗犬コロナウイルスモノクローナル抗体液を分注し、37℃90分間反応させ固相化する。以下各反応後に洗浄液で洗浄する。1%牛血清アルブミン・ポリソルベート加リン酸緩衝食塩液を分注し、37℃で60分間反応させブロッキングする。検体及び参照品を2倍階段希釈した各希釈液を各穴に加え、37℃60分間反応する。抗犬コロナウイルス兎抗体液を各穴に加え、37℃で60分間反応する。アルカリフォスファターゼ標識抗兎IgG液を各穴に加え、37℃で60分間反応する。*p*-ニトロフェニルリン酸基質液を加え、37℃で25～30分間反応させた後、3 mol/L水酸化ナトリウム溶液を加えて反応を停止する。主波長405 nm、副波長490 nmで吸光度を測定する。

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、2,300RU/0.05mL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2 mL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

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25cm²以上の培養細胞2本に1 mL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ない。混合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ない。混合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、窒素充填製品では、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 5、6 及び 7）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

犬腎株化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、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。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 4、6 及び 7）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、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^{5.0} 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。

3.4.7.3 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 4、5 及び 7）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、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^{5.0}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。

3.4.7.4 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4、5及び6）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、TCID₅₀を算出する。試験品のウイルス含有量は1mL中10^{5.0}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。

3.4.8 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。

3.4.9 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。

3.4.10 安全試験

3.4.10.1 試験材料

3.4.10.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.10.1.2 試験動物

6か月齢未満の犬を用いる。

3.4.10.2 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。

3.4.10.3 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。

3.4.11 力価試験

3.4.11.1 ジステンパー力価試験

3.4.11.1.1 試験材料

3.4.11.1.1.1 試験動物

3.4.10の試験に用いた犬を用いる。

3.4.11.1.1.2 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。

3.4.11.1.1.3 培養細胞

適当と認められた培養細胞を用いる。

3.4.11.1.2 試験方法

3.4.10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200TCID₅₀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。

3.4.11.1.3 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。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。

3.4.11.2 犬アデノウイルス（2型）感染症力価試験

3.4.11.2.1 試験材料

3.4.11.2.1.1 試験動物

3.4.10の試験に用いた犬を用いる。

3.4.11.2.1.2 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。

3.4.11.2.1.3 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

3.4.11.2.2 試験方法

3.4.10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。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。

3.4.11.2.3 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ED₅₀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。

3.4.11.3 犬パラインフルエンザ力価試験

3.4.11.3.1 試験材料

3.4.11.3.1.1 試験動物

3.4.10の試験に用いた犬を用いる。

3.4.11.3.1.2 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。

3.4.11.3.1.3 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。

3.4.11.3.2 試験方法

3.4.10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0.1 mL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。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。

3.4.11.3.3 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ED₅₀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。

3.4.11.4 犬パルボウイルス感染症力価試験

3.4.11.4.1 試験材料

3.4.11.4.1.1 試験動物

3.4.10の試験に用いた犬を用いる。

3.4.11.4.1.2 赤血球凝集抗原

犬パルボウイルスNL-35-D-LP株又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。

3.4.11.4.2 試験方法

3.4.10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8）、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0.5 vol%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。

3.4.11.4.3 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。

3.4.11.5 犬コロナウイルス感染症力価試験

3.4.11.5.1 試験材料

3.4.11.5.1.1 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。

3.4.11.5.1.2 試験動物

体重約300 gのモルモットを用いる。

3.4.11.5.1.3 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。

3.4.11.5.1.4 培養細胞

猫腎株化細胞又は適当と認められた細胞を用いる。

3.4.11.5.2 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1 mL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50 μL中約200TCID₅₀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50 μL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。

3.4.11.5.3 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
---------	-----

炭酸水素ナトリウムで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、水酸化ナトリウムで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
---------	--------

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 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5 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6 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7 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8 RDE

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

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部のジステンパー・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）混合ワクチンの項を次のように改める。

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

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、ボック又は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℃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。

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。

2.3.1.2 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。

2.3.2.2 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

個体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 0.1 mL 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 0.1 mL 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。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℃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℃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℃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℃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℃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℃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℃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・ヘブドマデイ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・ヘブドマデイスについては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。

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部のジステンパー・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・犬レプトスピラ病混合ワクチンの項を次のように改める。

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・犬レプトスピラ病混合ワクチン

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（以下この項において「混合生ワクチン」という。）と、レプトスピラ・カニコーラ及びレプトスピラ・イクテロヘモラジーの全培養菌液を不活化したもの又はこれを不活化した後可溶化したものと犬コロナウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化したものを混合したワクチン（以下この項において「液状不活化ワクチン－１」という。）とを組み合わせたワクチン、又は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とレプトスピラ・カニコーラ及びレプトスピラ・イクテロヘモラジーの全培養菌液を不活化した後可溶化したものの混合液を凍結乾燥したワクチン（以下この項において「混合乾燥ワクチン」という。）と犬コロナウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化したものを混合したワクチン（以下この項において「液状不活化ワクチン－２」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株

2.1.1.1 名称

弱毒ジステンパーウイルスオンダーステポート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、Vero 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℃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。

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）V-197 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、犬腎継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℃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。

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 91880 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、犬腎継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℃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。

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 K-3ip69 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。

2.1.4.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、猫腎継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℃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。

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 犬コロナウイルス株

2.1.5.1 名称

犬コロナウイルス TN-449 株又はこれと同等と認められた株

2.1.5.2 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。

2.1.5.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、猫腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

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℃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。

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。

2.1.6 レプトスピラ・カニコーラ株

2.1.6.1 名称

レプトスピラ・カニコーラ（以下この項において「L・カニコーラ」という。）フونت・ユトレヒトIV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・カニコーラ血清（付記1）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認めら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・イクテロヘモラジー株

2.1.7.1 名称

レプトスピラ・イクテロヘモラジー（以下この項において「L・イクテロヘモラジー」という。）コペンハーゲン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・イクテロヘモラジー血清（付記2）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認めら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

Vero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。

2.2.2 犬アデノウイルス（2型）

2.2.2.1 培養細胞

犬腎継代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.3 犬パラインフルエンザウイルス

2.2.3.1 培養細胞

犬腎継代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.3.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.4 犬パルボウイルス

2.2.4.1 培養細胞

猫腎継代細胞又は製造に相当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.4.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

2.2.5 犬コロナウイルス

2.2.5.1 培養細胞

猫腎継代細胞又は製造に相当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.5.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

2.2.6 L・カニコーラ

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・イクテロヘモラジー

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。

2.3.1.2 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 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。

2.3.2.2 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 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 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 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。

2.3.5.2 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ウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、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

ウイルス浮遊液に相当と認められた不活化剤を加えて不活化後、適当な中和剤を用い中和したもの又はそのままの液を不活化ウイルス浮遊液とする。

不活化ウイルス浮遊液について、3.3.4.1 の試験を行う。

2.3.5.4 原液の調整

不活化ウイルス浮遊液を相当と認められた方法で濃縮したもの又は相当と認められた保存剤を添加したものを原液とする。

原液について、3.3.1 の試験を行う。

2.3.6 L・カニコーラ原液

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

培養菌液に相当と認められた不活化剤を加えて不活化したものを不活化レプトスピラ菌液とする。

不活化レプトスピラ菌液について、3.3.4.2 の試験を行う。

2.3.6.3 可溶化

不活化レプトスピラ菌液又は相当と認められた濃縮方法により濃縮した菌液に相当と認められた可溶化剤を加え可溶化したものを原液とする。

原液について、3.3.1 の試験を行う。

2.3.7 L・イクテロヘモラジー原液

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

培養菌液に相当と認められた不活化剤を加えて不活化したものを不活化レプトスピラ菌液とする。

不活化レプトスピラ菌液について、3.3.4.2 の試験を行う。

2.3.7.3 可溶化

不活化レプトスピラ菌液又は相当と認められた方法により濃縮した菌液に相当と認められた可溶化剤を加え可溶化したものを原液とする。

原液について、3.3.1 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、相当と認められた保存剤及び安定剤を添加してもよい。

2.4.2 混合乾燥ワクチン

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と相当と認められた溶液で濃度調整した L・カニコーラ原液及び L・イクテロヘモラジー原液を混合し、最終バルクとする。この場合、相当と認められた安定剤を添加してもよい。

2.4.3 液状不活化ワクチン

2.4.3.1 液状不活化ワクチン-1

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、L・カニコーラ原液及びL・イクテロヘモラジー原液に適当と認められた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。

2.4.3.2 液状不活化ワクチン-2

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適当と認められた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 混合生ワクチン及び混合乾燥ワクチン

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-1 及び液状不活化ワクチン-2

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

個体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、0.1 vol %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。又は、暗視野法を用いて培養菌液を鏡検するとき、レプトスピラ以外の菌を認めてはならない。

3.2.2 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。

3.2.3 総菌数試験

光電比色計又は菌数計算法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。又は、比濁法を用いて菌数を計算するとき、それぞれの培養菌液は2.400比濁単位以上でなければならない。

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 3）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

Vero 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、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{4.8}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。

3.3.3.2 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、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{7.3}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。

3.3.3.3 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、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{6.3}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。

3.3.3.4 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 B 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

猫腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.3.3.4.2 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 4)を加え、さらにこの混合液と等量の VAD6.0 液(付記 5)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、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{5.7}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。

3.3.3.5 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、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{4.9}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。

3.3.3.5.2 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、抗犬コロナウイルスモノクローナル抗体、抗犬コロナウイルス兎抗体、アルカリフォスファターゼ標識抗兎 IgG 及び *p*-ニトロフェニルリン酸基質液を用いる。

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プレートに抗犬コロナウイルスモノクローナル抗体液を分注し、37℃で 90 分間反応させ固相化する。以下各反応後に洗浄液で洗浄する。1%牛血清アルブミン・ポリソルベート加リン酸緩衝食塩液を分注し、37℃で 60 分間反応させブロッキングする。検体及び参照品を 2 倍階段希釈した各希釈液を各穴に加え、37℃で 60 分間反応する。抗犬コロナウイルス兎抗体液を各穴に加え、37℃で 60 分間反応する。アルカリフォスファターゼ標識抗兎 IgG 液を各穴に加え、37℃で 60 分間反応する。*p*-ニトロフェニルリン酸基質液を加え、37℃で 25 ～ 30 分間反応させた後、3 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えて反応を停止する。主波長 405nm、副波長 490nm で吸光度を測定する。

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、2,300RU/0.05mL 以上でなければならない。

3.3.4 不活化試験

3.3.4.1 犬コロナウイルス不活化試験

3.3.4.1.1 試験材料

3.3.4.1.1.1 試料

検体 2 mL 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。

3.3.4.1.1.2 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。

3.3.4.1.2 試験方法

試料を 25cm² 以上の培養細胞 2 本に 1 mL 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。

3.3.4.1.3 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。

3.3.4.2 レプトスピラ不活化試験

3.3.4.2.1 試験材料

3.3.4.2.1.1 試料

検体又は検体 5 mL 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。

3.3.4.2.1.2 培地

適当と認められた培地を用いる。

3.3.4.2.2 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、28 ～ 30℃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。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。

3.3.4.2.3 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

3.4.10 の試験を適用しないものについては、3.4.11 の試験を行う。

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、混合生ワクチン又は混合乾燥ワクチンは、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 1 又は液状不活化ワクチン 2 は、固有の色調を有する均質な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 1 で溶解したもの（以下この項において「混合ワクチン 1」という。）又は混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチン 2 で溶解したもの（以下この項において「混合ワクチン 2」という。）は、固有の色調を有する均質な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 1 又は液状不活化ワクチン 2 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、混合生ワクチン又は混合乾燥ワクチンは、

適合しなければならない。ただし、室素充填製品では、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、混合生ワクチン又は混合乾燥ワクチンは、適合しなければならない。

3.4.5 無菌試験

混合ワクチン－1 又は混合ワクチン－2 について、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、混合生ワクチン又は混合乾燥ワクチンは、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 迷入ウイルス否定試験

液状不活化ワクチン－1 と同量の滅菌水で混合生ワクチンを溶解したもの又は液状不活化ワクチン－2 と同量の滅菌水で混合乾燥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、混合生ワクチン又は混合乾燥ワクチンは、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－1 と同量の滅菌水で溶解する又は混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチン－2 と同量の精製水で溶解する。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。

3.4.8.1.1.2 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。

3.4.8.1.2 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。

3.4.8.1.3 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。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。

3.4.8.2 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－1 と同量の滅菌水で溶解する又は混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチン－2 と同量の精製水で溶解する。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

犬腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる

3.4.8.2.2 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。

3.4.8.2.3 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^{5.0}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。

3.4.8.3 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 1 と同量の滅菌水で溶解する又は混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチン 2 と同量の精製水で溶解する。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

犬腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.4.8.3.2 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等量加え、室温で 90 分間静置後し、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。

3.4.8.3.3 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、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^{5.0}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。

3.4.8.4 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 1 と同量の滅菌水で溶解する又は混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチン 2 と同量の精製水で溶解する。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）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。又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.4.8.4.2 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を加え、さら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 時間または一夜静置後、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。

3.4.8.4.3 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 mL 中 10^{5.0}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。

3.4.9 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 1、液状不活化ワクチン 2 及び乾燥混合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。

い。

3.4.10 異常毒性否定試験

混合ワクチン 1 又は混合ワクチン 2 について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 毒性限度確認試験

一般試験法の毒性限度確認試験法 1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.12 安全試験

3.4.12.1 試験材料

3.4.12.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.12.1.2 試験動物

6 か月齢未満の犬を用いる。

3.4.12.2 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。

3.4.12.3 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。

3.4.13 力価試験

3.4.13.1 ジステンパー力価試験

3.4.13.1.1 試験材料

3.4.13.1.1.1 試験動物

3.4.12 の試験に用いた犬を用いる。

3.4.13.1.1.2 中和試験用ウイルス

ジステンパーウイルス FXNO 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。

3.4.13.1.1.3 培養細胞

適当と認められた培養細胞を用いる。

3.4.13.1.2 試験方法

3.4.12 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 200TCID₅₀ 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。

3.4.13.1.3 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。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。

3.4.13.2 犬アデノウイルス（2 型）感染症力価試験

3.4.13.2.1 試験材料

3.4.13.2.1.1 試験動物

3.4.12 の試験に用いた犬を用いる。

3.4.13.2.1.2 中和試験用ウイルス

犬アデノウイルス（2 型）V-197 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。

3.4.13.2.1.3 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

3.4.13.2.2 試験方法

3.4.12 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 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。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。

3.4.13.2.3 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、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。

3.4.13.3 犬パラインフルエンザ力価試験

3.4.13.3.1 試験材料

3.4.13.3.1.1 試験動物

3.4.12 の試験に用いた犬を用いる。

3.4.13.3.1.2 中和試験用ウイルス

犬パラインフルエンザウイルスフィリップス・ロクセーン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。

3.4.13.3.1.3 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。

3.4.13.3.2 試験方法

3.4.12 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 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。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等量加え、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。

3.4.13.3.3 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ED₅₀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。

3.4.13.4 犬パルボウイルス感染症力価試験

3.4.13.4.1 試験材料

3.4.13.4.1.1 試験動物

3.4.12 の試験に用いた犬を用いる。

3.4.13.4.1.2 赤血球凝集抗原

犬パルボウイルス K-3ip69 株又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倍以上のものをを用いる。

3.4.13.4.2 試験方法

3.4.12 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10)、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を用いて2倍階段希釈する。各段階の希釈血清に8単位に調製した血球凝集抗原を等量加え、常温で60分間処理したのち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。

3.4.13.4.3 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。

3.4.13.5 犬コロナウイルス感染症力価試験

3.4.13.5.1 試験材料

3.4.13.5.1.1 注射材料

混合ワクチン－1 又は混合ワクチン－2 を注射材料とする。

3.4.13.5.1.2 試験動物

体重約 300g のモルモットを用いる。

3.4.13.5.1.3 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。

3.4.13.5.1.4 培養細胞

猫全胎子継代細胞又は適当と認められた細胞を用いる。

3.4.13.5.2 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 1 mL 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 0.05mL 中約 200TCID₅₀ 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 0.05mL 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。

3.4.13.5.3 判定

培養細胞の 4 穴中 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。

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。

3.4.13.6 犬レプトスピラ病力価試験

3.4.13.6.1 試験材料

3.4.13.6.1.1 注射材料

混合ワクチン－1 又は混合ワクチン－2 を注射材料とする。

3.4.13.6.1.2 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。

3.4.13.6.1.3 凝集反応用菌液

L・カニコーラ及び L・イクテロヘモラジーの生菌浮遊液を用いる。

3.4.13.6.2 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。

3.4.13.6.3 判定

それぞれの菌液に対して 80 % 以上が 8 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、2 年間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合は、その期間とする。

付記 1 抗 L・カニコーラ血清

L・カニコーラで免疫した兎又はモルモットの血清

付記 2 抗 L・イクテロヘモラジー血清

L・イクテロヘモラジーで免疫した兎又はモルモットの血清

付記3 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 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

炭酸水素ナトリウムで 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4 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

水 残 量

牛血清アルブミン 0.2w/v%となるように加えたのち、水酸化ナトリウムで pH9.0 に調整する。

付記5 VAD6.0 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 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 RDE

市販の RDE を処方に従い、生理食塩水 20mL で溶解し、小分け分注した後 - 20 ℃以下に保存する。

ワクチン（シードロット製剤）の部のジステンパー・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・犬レプトスピラ病混合ワクチン（シード）の項を次のように改める。

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・犬レプトスピラ病混合ワクチン（シード）

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、シードロット規格に適合したレプトスピラ・カニコーラ（以下この項において「L・カニコーラ」という。）及びレプトスピラ・イクテロヘモラジー（以下この項において「L・イクテロヘモラジー」という。）の全培養菌液を不活化したもの又はこれを不活化した後可溶化したものとシードロット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たものを混合したワクチン（以下この項において「液状不活化ワクチン-1」という。）とを組み合わせたワクチン、又は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とシードロット規格に適合したL・カニコーラ及びL・イクテロヘモラジーの全培養菌液を不活化した後可溶化したものの混合液を凍結乾燥したワクチン（以下この項において「混合乾燥ワクチン」という。）とシードロット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たものを混合したワクチン（以下この項において「液状不活化ワクチン-2」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

犬腎株化細胞に接種すると、CPEを伴って増殖するが、発育鶏卵の漿尿膜上に接種しても病変を示さない。犬に注射しても病原性を示さない。

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。

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。

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、犬腎培養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。

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。

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。

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。

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。犬腎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。

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°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、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°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。

2.1.4 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 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°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。

2.1.4.4 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°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。

2.1.4.5 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°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。

2.1.5 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

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。

2.1.5.3 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°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。

2.1.5.4 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°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。

2.1.5.5 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°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について、3.1.3の試験を行う。

2.1.6 L・カニコーラ

2.1.6.1 名称

L・カニコーラC-51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・カニコーラ血清（付記1）に対して特異的に凝集する。

2.1.6.3 マスターシード菌

2.1.6.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、適当と認められた培地で増殖させ、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して -60°C 以下で保存する。

マスターシード菌について、3.1.4の試験を行う。

マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシード菌から小分製品までの継代数は、10代以内でなければならない。

2.1.6.4 ワーキングシード菌

2.1.6.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、適当と認められた培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結して -30°C 以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.5の試験を行う。

2.1.6.5 プロダクションシード菌

プロダクションシード菌は、適当と認められた培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して -30°C 以下で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.6の試験を行う。

2.1.7 L・イクテロヘモラジー

2.1.7.1 名称

L・イクテロヘモラジーNADL11403株又はこれと同等と認められた株

2.1.7.2 由来

2.1.7.2.1 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・イクテロヘモラジー血清（付記2）に対して特異的に凝集する。

2.1.7.3 マスターシード菌

2.1.7.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、適当と認められた培地で増殖させ、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して -60°C 以下で保存する。

マスターシード菌について、3.1.4の試験を行う。

マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシード菌から小分製品までの継代数は、10代以内でなければならない。

2.1.7.4 ワーキングシード菌

2.1.7.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、適当と認められた培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結して -30°C 以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.5の試験を行う。

2.1.7.5 プロダクションシード菌

プロダクションシード菌は、適当と認められた培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して -30°C 以下で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.6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°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 -60°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 -60°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 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相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 -60°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 -60°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 -60°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 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相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 -60°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 -60°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 -60°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。

2.2.4 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相当と認められた株化細胞を用いる。

2.2.4.2 培養液

製造に相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°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。

2.2.4.4 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°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。

2.2.4.5 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°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。

2.2.5 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相当と認められた株化細胞を用いる。

2.2.5.2 培養液

製造に相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、凍結して -60°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。

2.2.5.4 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°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。

2.2.5.5 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。

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。

2.2.6 L・カニコーラ

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・イクテロヘモラジー

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 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、相当と認められた時期に個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、3.4.1、3.4.2及び3.4.3.1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、相当と認められた時期に個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、3.4.1、3.4.2及び3.4.3.2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、相当と認められた時期に個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、3.4.1、3.4.2及び3.4.3.3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、相当と認められた時期に個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、3.4.1、3.4.2及び3.4.3.4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、3.4.1、3.4.2及び3.4.3.5の試験を行う。

2.3.5.3 不活化

ウイルス浮遊液に適当と認められた不活化剤を加えて不活化後、適当な中和剤を用い中和したもの又はそのままの液を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を適当と認められた方法で濃縮したもの又は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、3.4.4.1の試験を行う。

2.3.6 L・カニコラ原液

2.3.6.1 培養

プロダクションシード菌を培地で溶解した後、培地に接種し、培養したもの又は遠心集菌後の濃縮菌液を培養菌液とする。

培養菌液について、3.3の試験を行う。

2.3.6.2 不活化

培養菌液に適当と認められた不活化剤を加えて不活化したものを不活化レプトスピラ菌液とする。

不活化レプトスピラ菌液について、3.4.4.2の試験を行う。

2.3.6.3 原液

不活化レプトスピラ菌液又は必要に応じて適当と認められた濃縮方法により濃縮した菌液に適当と認められた可溶化剤を加え可溶化したものを原液とする。

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、3.4.1及び3.4.4.2の試験を行う。

2.3.7 L・イクテロヘモラジー原液

2.3.7.1 培養

プロダクションシード菌を培地で溶解した後、培地に接種し、培養したもの又は遠心集菌後の濃縮菌液を培養菌液とする。

培養菌液について、3.3の試験を行う。

2.3.7.2 不活化

培養菌液に適当と認められた不活化剤を加えて不活化したものを不活化レプトスピラ菌液とする。

不活化レプトスピラ菌液について、3.4.4.2の試験を行う。

2.3.7.3 原液

不活化レプトスピラ菌液、又は必要に応じて適当と認められた濃縮方法により濃縮した菌液に適当と認められた可溶化剤を加え可溶化したものを原液とする。

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、3.4.1及び3.4.4.2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て最終バルクとする。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 混合乾燥ワクチン

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並びに適当と認められた溶液で濃度調整したL・カニコーラ原液及びL・イクテロヘモラジー原液を混合して最終バルクとする。この場合、適当と認められた安定剤を添加してもよい。

2.4.3 液状不活化ワクチン

2.4.3.1 液状不活化ワクチン－1

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、L・カニコーラ原液及びL・イクテロヘモラジー原液に適当と認められた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。

2.4.3.2 液状不活化ワクチン－2

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適当と認められた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 混合生ワクチン及び混合乾燥ワクチン

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、3.5の試験を行う。

2.5.2 液状不活化ワクチン－1 及び液状不活化ワクチン－2

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、3.5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

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。

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、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。

3.1.4 マスターシード菌の試験

3.1.4.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.4.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.4.2 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。

3.1.5 ワーキングシード菌の試験

3.1.5.1 夾雑菌否定試験

3.1.4.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.6 プロダクションシード菌の試験

3.1.6.1 夾雑菌否定試験

3.1.4.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2 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

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。

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、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 培養菌液の試験

3.3.1 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。あるいは、暗視野法を用いて培養菌液を鏡検するとき、レプトスピラ以外の菌を認めてはならない。

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 総菌数試験

光電比色計又は菌数計算法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。あるいは、比濁法を用いて菌数を計算するとき、それぞれの培養菌液は、2.400比濁単位以上でなければならない。

3.4 原液の試験

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 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。

3.4.3 ウイルス含有量試験

3.4.3.1 ジステンパーウイルス含有量試験

3.4.3.1.1 試験材料

3.4.3.1.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記3）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。

3.4.3.1.1.2 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。

3.4.3.1.2 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。

3.4.3.1.3 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^{4.8}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。

3.4.3.2 犬アデノウイルス（2型）含有量試験

3.4.3.2.1 試験材料

3.4.3.2.1.1 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。

3.4.3.2.1.2 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。

3.4.3.2.2 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。

3.4.3.2.3 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^{7.3}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。

3.4.3.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

3.4.3.3.1 試験材料

3.4.3.3.1.1 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。

3.4.3.3.1.2 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。

3.4.3.3.2 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。

3.4.3.3.3 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、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は1 mL中10^{6.3}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。

3.4.3.4 犬パルボウイルス含有量試験

3.4.3.4.1 試験材料

3.4.3.4.1.1 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。

3.4.3.4.1.2 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。

3.4.3.4.2 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、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（付記4）を加え、更に混合液と等量のVAD6.0液（付記5）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。

3.4.3.4.3 判定

培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は1 mL中10^{5.7}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。

3.4.3.5 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

3.4.3.5.1 犬コロナウイルス含有量試験

3.4.3.5.1.1 試験材料

3.4.3.5.1.1.1 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。

3.4.3.5.1.1.2 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。

3.4.3.5.1.2 試験方法

試料0.1 mL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。

3.4.3.5.1.3 判定

特異蛍光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。

3.4.3.5.2 犬コロナウイルス抗原量測定試験

3.4.3.5.2.1 試験材料

検体、参照品、抗犬コロナウイルスモノクローナル抗体、抗犬コロナウイルス兎抗体、アルカリフォスファターゼ標識抗兎IgG及び*p*-ニトロフェニルリン酸基質液を用いる。

3.4.3.5.2.2 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プレートに抗犬コロナウイルスモノクローナル抗体液を分注し、37℃90分間反応させ固相化する。以下各反応後に洗浄液で洗浄する。1%牛血清アルブミン・ポリソルベート加リン酸緩衝食塩液を分注し、37℃で60分間反応させブロッキングする。検体及び参照品を2倍階段希釈した各希釈液を各穴に加え、37℃60分間反応する。抗犬コロナウイルス兎抗体液を各穴に加え、37℃で60分間反応する。アルカリフォスファターゼ標識抗兎IgG液を各穴に加え、37℃で60分間反応する。*p*-ニトロフェニルリン酸基質液を加え、37℃で25～30分間反応させた後、3 mol/L水酸化ナトリウム溶液を加えて反応を停止する。主波長405 nm、副波長490 nmで吸光度を測定する。

3.4.3.5.2.3 判定

参照品に対する検体の相対抗原量を算出するとき、2,300RU/0.05 mL以上でなければならない。

3.4.4 不活化試験

3.4.4.1 犬コロナウイルス不活化試験

3.4.4.1.1 試験材料

3.4.4.1.1.1 試料

検体 2 mL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。

3.4.4.1.1.2 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。

3.4.4.1.2 試験方法

試料を25cm²以上の培養細胞 2 本に 1 mL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。

3.4.4.1.3 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。

3.4.4.2 レプトスピラ不活化試験

3.4.4.2.1 試験材料

3.4.4.2.1.1 試料

検体又は検体 5 mLを100倍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。

3.4.4.2.1.2 培地

適当と認められた培地を用いる。

3.4.4.2.2 試験方法

培地20 mLを入れた試験管 3 本に試料0.5 mLずつを接種し、28～30℃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。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。

3.4.4.2.3 判定

レプトスピラの増殖を認めてはならない。

3.5 小分製品の試験

3.5.9の試験を適用しないものについては、3.5.10の試験を行う。

3.5.1 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、混合生ワクチン又は混合乾燥ワクチンは、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－1 又は液状不活化ワクチン－2 は、固有の色調を有する均質な液体でなければならない。混合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－1 で溶解したもの（以下この項において「混合ワクチン－1」という。）又は混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチン－2 で溶解したもの（以下この項において「混合ワクチン－2」という。）は、固有の色調を有する均質な液体でなければならない。混合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。

3.5.2 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－1 又は液状不活化ワクチン－2 のpHは、固有の値を示さなければならない。

3.5.3 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、混合生ワクチン又は混合乾燥ワクチンは、適合しなければならない。ただし、窒素充填製品では、本試験を省略することができる。

3.5.4 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、混合生ワクチン又は混合乾燥ワクチンは、適合しなければならない。

3.5.5 無菌試験

混合ワクチン－１又は混合ワクチン－２について、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。

3.5.6 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、混合生ワクチン又は混合乾燥ワクチンは、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。

3.5.7 ウイルス含有量試験

3.5.7.1 ジステンパーウイルス含有量試験

3.5.7.1.1 試験材料

3.5.7.1.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチン－１と同量の滅菌水で溶解する、又は混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチン－２と同量の精製水で溶解する。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。

3.5.7.1.1.2 培養細胞

犬腎株化細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.5.7.1.2 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。

3.5.7.1.3 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。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。

3.5.7.2 犬アデノウイルス（２型）含有量試験

3.5.7.2.1 試験材料

3.5.7.2.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチン－１と同量の滅菌水で溶解する、又は混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチン－２と同量の精製水で溶解する。試験品中の犬アデノウイルス（２型）以外のウイルスを各抗血清（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。

3.5.7.2.1.2 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。

3.5.7.2.2 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。

3.5.7.2.3 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^{5.0}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。

3.5.7.3 犬パラインフルエンザウイルス含有量試験

3.5.7.3.1 試験材料

3.5.7.3.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチン－１と同量の滅菌水で溶解する、又は混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチン－２と同量の精製水で溶解する。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を各抗血清（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。

3.5.7.3.1.2 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。

3.5.7.3.2 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。

3.5.7.3.3 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、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^{5.0}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。

3.5.7.4 犬パルボウイルス含有量試験

3.5.7.4.1 試験材料

3.5.7.4.1.1 試料

混合生ワクチンを液状不活化ワクチン－１と同量の滅菌水で溶解する、又は混合乾燥ワクチンを液状不活化ワクチン－２と同量の精製水で溶解する。試験品中の犬パルボウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記６、７及び８）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。

3.5.7.4.1.2 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。

3.5.7.4.2 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。

3.5.7.4.3 判定

培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。試験品のウイルス含有量は、1 mL中10^{5.0}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。

3.5.8 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－１、液状不活化ワクチン－２及び乾燥混合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。

3.5.9 異常毒性否定試験

混合ワクチン－１又は混合ワクチン－２について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。

3.5.10 毒性限度確認試験

一般試験法の毒性限度確認試験法１を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.5.11 安全試験

3.5.11.1 試験材料

3.5.11.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.11.1.2 試験動物

6 か月齢未満の犬を用いる。

3.5.11.2 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。

3.5.11.3 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。

3.5.12 力価試験

3.5.12.1 ジステンパー力価試験

3.5.12.1.1 試験材料

3.5.12.1.1.1 試験動物

3.5.11の試験に用いた犬を用いる。

3.5.12.1.1.2 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。

3.5.12.1.1.3 培養細胞

適当と認められた培養細胞を用いる。

3.5.12.1.2 試験方法

3.5.11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 200TCID₅₀ 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。

3.5.12.1.3 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。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。

3.5.12.2 犬アデノウイルス（2 型）感染症力価試験

3.5.12.2.1 試験材料

3.5.12.2.1.1 試験動物

3.5.11の試験に用いた犬を用いる。

3.5.12.2.1.2 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。

3.5.12.2.1.3 培養細胞

犬腎継代細胞を用いる。

3.5.12.2.2 試験方法

3.5.11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 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。こ

の各混合液0.1 mL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。

3.5.12.2.3 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ED₅₀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。

3.5.12.3 犬パラインフルエンザ力価試験

3.5.12.3.1 試験材料

3.5.12.3.1.1 試験動物

3.5.11の試験に用いた犬を用いる。

3.5.12.3.1.2 中和試験用ウイルス

犬パラインフルエンザウイルスNL-35-D-LP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。

3.5.12.3.1.3 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。

3.5.12.3.2 試験方法

3.5.11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。この各混合液0.1 mL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。

3.5.12.3.3 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ED₅₀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。

3.5.12.4 犬パルボウイルス感染症力価試験

3.5.12.4.1 試験材料

3.5.12.4.1.1 試験動物

3.5.11の試験に用いた犬を用いる。

3.5.12.4.1.2 赤血球凝集抗原

犬パルボウイルスNL-35-D-LP株又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。

3.5.12.4.2 試験方法

3.5.11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10）、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。

3.5.12.4.3 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。

3.5.12.5 犬コロナウイルス感染症力価試験

3.5.12.5.1 試験材料

3.5.12.5.1.1 注射材料

混合ワクチン 1 又は混合ワクチン 2 を注射材料とする。

3.5.12.5.1.2 試験動物

体重約300 gのモルモットを用いる。

3.5.12.5.1.3 中和試験用ウイルス

犬コロナウイルス戸田株又は適当と認められた犬コロナウイルス株を用いる。

3.5.12.5.1.4 培養細胞

猫腎株化細胞又は適当と認められた細胞を用いる。

3.5.12.5.2 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 1 mL 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 50 μ L 中約 200 TCID₅₀ 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 50 μ L 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。

3.5.12.5.3 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。

3.5.12.6 犬レプトスピラ病力価試験

3.5.12.6.1 試験材料

3.5.12.6.1.1 注射材料

混合ワクチン 1 又は混合ワクチン 2 を注射材料とする。

3.5.12.6.1.2 試験動物

体重約300 gのモルモット又は体重60～100 gのハムスターを用いる。

3.5.12.6.1.3 凝集反应用菌液

L・カニコラ及びL・イクテロヘモラジーの生菌浮遊液を用いる。

3.5.12.6.2 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、凝集反應用菌液を用いて、溶菌凝集反応を行う。

3.5.12.6.3 判定

それぞれの菌液に対して 80% 以上が 8 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、製造後 2 年 3 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・カニコラ血清

L・カニコラで免疫した兔又はモルモットの血清

付記 2 抗L・イクテロヘモラジー血清

L・イクテロヘモラジーで免疫した兔又はモルモットの血清

付記 3 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
炭酸水素ナトリウムで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 4 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0.2 w/v%となるように加えたのち、水酸化ナトリウムでpH9.0に調整する。

付記 5 VAD6.0液

1,000 mL中
塩化ナトリウム 8.77 g
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 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 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。

(別紙2)

○農林水産省告示第九十号

医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律施行令（昭和三十六年政令第十一号）第八十三条の規定により読み替えて適用される同令第六十条第一項の規定に基づき、動物用生物学的製剤検定基準（平成十四年十月三日農林水産省告示第千五百六十八号）の一部を次のように改正し、公布の日から施行する。

平成二十九年一月十九日

農林水産大臣 山本 有二

（「次のよう」は、省略し、その関係書類を農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課及び都道府県庁に備え置いて縦覧に供する。）

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部の豚サーコウイルス（２型・組換え型）感染症（酢酸トコフェロール・油性アジュバント加）不活化ワクチンの項を次のように改める。

豚サーコウイルス（２型・組換え型）感染症（酢酸トコフェロール・油性アジュバント加）不活化ワクチン

動生剤基準の豚サーコウイルス（２型・組換え型）感染症（酢酸トコフェロール・油性アジュバント加）不活化ワクチンの 3.4.3、3.4.6 及び 3.4.7 に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。

ワクチン（シードロット製剤）の部の鶏脳脊髄炎・鶏痘混合生ワクチン（シード）の項を削る。

(別紙3)

○農林水産省告示第九十一号

医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律施行令（昭和三十六年政令第十一号）第八十三条の規定により読み替えて適用される同令第五十八条及び動物用医薬品等取締規則（平成十六年農林水産省令第七号）第一百五十四条第一項の規定に基づき、動物用医薬品の検定手数料並びに試験品及び出願者の保存用品として抜き取らせるべき数量（平成二十五年六月十八日農林水産省告示第二千九号）の一部を次のように改正し、公布の日から施行する。

平成二十九年一月十九日

農林水産大臣 山本 有二

表ワクチン（シードロット製剤）の部中

「ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎2価混合（油性アジュバント加）不活化ワ	463,100	0	2	2
---------------------------------------	---------	---	---	---

クチン (シート)	516, 400	104, 100	7	2	を
鶏脳脊髄炎・鶏痘混合生ワクチン (シート)					」
「ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎2価混合 (油性アジュバント加) 不活化ワクチン (シート)	463, 100	0		2	2
に					」

めぬ。

(別紙4)

○農林水産省告示第九十二号

医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（昭和三十五年法律第四百十五号）

第八十三条第一項の規定により読み替えて適用される同法第四十三条第一項の規定に基づき、昭和三十六年二月一日農林省告示第六十六号（医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律第四十三条第一項の規定に基づき、農林水産大臣の指定する医薬品を定める等の件）の一部を次のように改正し、公布の日から施行する。

平成二十九年一月十九日

農林水産大臣 山本 有二

(145)を(147)とし、(136)から(144)までを二ずつ繰り下げ、(135)を(136)とし、(136)の次に次のように加える。

(137) ジステンパー診断用抗原・犬アデノウイルス感染症診断用抗原・犬パルボウイルス感染症診断用抗原

複合キット

「(98)まで」を「(99)まで」に改め、(78)から(134)までを二ずつ繰り下げ、(77)の次に次のように加える。

(78)

鶏脳脊髄炎・鶏痘混合生ワクチン（シード）

(別紙5)

「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律関係事務の取扱いについて」 (平成12年3月31日付け12畜A第729号農林水産省畜産局長通知)
(下線部分は改正部分)

改 正 後		現 行	
別表第3 動物用医薬品の検定に関する標準処理期間		別表第3 動物用医薬品の検定に関する標準処理期間	
製 剤	標準処理期間(日)	製 剤	標準処理期間(日)
(ワクチン(シードロット製剤)の部)		(ワクチン(シードロット製剤)の部)	
(略)	(略)	(略)	(略)
ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎2価混合(油性アジュバント加)不活化ワクチン(シード)	70	ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎2価混合(油性アジュバント加)不活化ワクチン(シード)	70
(削る。)		<u>鶏脳脊髄炎・鶏痘混合生ワクチン(シード)</u>	<u>70</u>
(略)	(略)	(略)	(略)