

イリドウイルス病・ β 溶血性レンサ球菌症混合不活化ワクチン

令和 年 月 日（告示第 号）新規追加

1 定義

マダイイリドウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液及びストレプトコッカス・イニエの培養菌液をそれぞれ不活化したものを混合したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 マダイイリドウイルス

2.1.1.1 名称

マダイイリドウイルスRIE-124株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

いさき鰭由来株化細胞（以下この項において「GF細胞」という。）でCPEを伴って増殖し、イリドウイルス病に対する免疫原性を有する。

2.1.1.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、GF細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

継代は、原株では3代以内、種ウイルスでは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、その継代数以内とする。

原株及び種ウイルスは、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。

2.1.2 ストレプトコッカス・イニエ

2.1.2.1 名称

ストレプトコッカス・イニエSI7E株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

ストレプトコッカス・イニエに一致する性状を示し、 β 溶血性レンサ球菌症に対する免疫原性を有する。

2.1.2.3 継代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた培地により継代する。

継代は、原株では3代以内、種菌では5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、その継代数以内とする。

原株及び種菌は、凍結して -70°C 以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 マダイイリドウイルス

2.2.1.1 培養細胞

GF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 ストレプトコッカス・イニエ

2.2.2.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 マダイイリドウイルス

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、適当と認められた時期に個体別培養細胞ごとに採取した培養液又は培養液の遠心上清をウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2の試験を行う。

- 2.3.1.3 不活化
ウイルス浮遊液にホルマリン又は製造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ウイルス液とする。
不活化ウイルス液について、3.4の試験を行う。
- 2.3.1.4 原液
不活化ウイルス液を混合したものを原液とする。
原液について、3.6の試験を行う。
- 2.3.2 ストレプトコッカス・イニエ
- 2.3.2.1 培養
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、3.3の試験を行う。
- 2.3.2.2 不活化
培養菌液にホルマリンを加えて不活化したものを不活化菌液とする。
不活化菌液について、3.5の試験を行う。
- 2.3.2.3 原液
不活化菌液を必要に応じて相当と認められた方法で集菌し、濃度調整したものを原液とする。
原液について、3.6の試験を行う。
- 2.4 最終バルク
各原液を必要により相当と認められた方法で濃度調整した後混合し、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、小分製品とする。
小分製品について、3.7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1%以上又は500mL以上を対照培養細胞とし、これについて次の試験を行う。
- 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し、観察するとき、CPEを認めてはならない。
- 3.2 ウイルス浮遊液の試験
- 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 ウイルス含有量試験
- 3.2.2.1 試験材料
- 3.2.2.1.1 試料
検体をウイルス含有量試験用培養液(付記1)又は相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。
- 3.2.2.1.2 培養細胞
GF細胞をウイルス含有量試験用培養液又は相当と認められた培養液に適当な濃度で浮遊させ、96穴プレートに0.05mLずつ分注したものをを用いる。
- 3.2.2.2 試験方法
試料0.05mLずつを、それぞれ4穴以上の培養細胞に接種し、25℃で14日間培養して、CPEの有無を観察する。
- 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、1mL中10^{6.6}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、その含量とする。
- 3.3 培養菌液の試験
- 3.3.1 夾雑菌否定試験
- 3.3.1.1 試験材料
- 3.3.1.1.1 試料
検体を試料とする。
- 3.3.1.1.2 培地

- ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト寒天培地又は適当と認められた培地を用いる。
- 3.3.1.2 試験方法
各試料0.2mLずつを培地10本以上に接種し、5本ずつ24～26℃及び36～38℃で7日間以上培養する。
- 3.3.1.3 判定
いずれの培養温度においても、ストレプトコッカス・イニエ以外の菌の発育を認めてはならない。
- 3.3.2 生菌数試験
- 3.3.2.1 試験材料
- 3.3.2.1.1 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。
- 3.3.2.1.2 培地
ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト寒天培地又は適当と認められた培地を用いる。
- 3.3.2.2 試験方法
各試料0.1mLずつを培地5枚以上に接種して培地表面に拡散させたものを、24～26℃で24時間以上培養した後、生じた集落を数える。
- 3.3.2.3 判定
各段階の試料ごとの集落数から生菌数を算出する。
検体中の生菌数は、1 mL中 10^8 CFU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、その生菌数とする。
- 3.4 不活化ウイルス液の試験
- 3.4.1 不活化試験
- 3.4.1.1 試験材料
- 3.4.1.1.1 試料
検体5 mLを100倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用いて4℃で一夜透析したものを試料とする。
- 3.4.1.1.2 培養細胞
GF細胞又は適当と認められた培養細胞を培養し、単層となったものを用いる。
- 3.4.1.2 試験方法
試料3 mLにつき75cm²以上の培養細胞に接種し、24～26℃で1時間吸着させた後、試料を抜き取り、不活化試験用培養液（付記2）を15mL以上加えた後、24～26℃で7日間培養する。培養後、培養上清を採取し、その3 mLを新たな培養細胞に同様に接種し、24～26℃で7日間培養する。
- 3.4.1.3 判定
培養細胞にCPEを認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。
検体に活性ウイルスを認めてはならない。
- 3.5 不活化菌液の試験
- 3.5.1 不活化試験
- 3.5.1.1 試験材料
- 3.5.1.1.1 試料
検体を試料とする。
- 3.5.1.1.2 培地
ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト寒天培地又は適当と認められた培地を用いる。
- 3.5.1.2 試験方法
試料0.1mLずつを培地5枚以上に接種して培地表面に拡散させたものを、24～26℃で7日間以上培養した後、集落の有無を観察する。
- 3.5.1.3 判定
接種したいずれの培地にも集落を認めてはならない。
- 3.6 原液の試験
- 3.6.1 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。
- 3.7 小分製品の試験
- 3.7.1 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又は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。

3.7.2 pH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。

3.7.3 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。

3.7.4 ホルマリン定量試験

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、0.3vol%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、その含有量とする。

3.7.5 安全試験

3.7.5.1 試験材料

3.7.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.7.5.1.2 試験動物

水温24～26℃、循環式で7日間以上飼育し、異常のないことを確認した体重5～50gのまだい80尾以上を用いる。

3.7.5.2 試験方法

試験動物は、12時間以上餌止めした後、1群40尾以上ずつの2群に分ける。1群の試験動物に注射材料0.1mLを筋肉内に注射し、試験群とする。他の1群は対照群とし、試験群と同様の方法でリン酸緩衝食塩液を注射する。その後、それぞれ水温24～26℃、循環式で飼育し、14日間観察する。なお、13日目に水温を27℃に上昇させる。

3.7.5.3 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ない。

3.7.6 力価試験

3.7.6.1 イリドウイルス病力価試験

3.7.6.1.1 試験材料

3.7.6.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.7.6.1.1.2 試験動物

水温25℃、循環式で7日間以上飼育し、異常のないことを確認した体重5～20gのまだい180尾以上を用いる。

3.7.6.1.1.3 攻撃用ウイルス液

マダイイリドウイルス強毒株（付記3）の培養ウイルス液をイーグル基礎培地で希釈し、対照群の死亡率が40～80%と予測される希釈と、その前後の希釈の3段階の希釈ウイルス液を攻撃用ウイルス液とする。

3.7.6.1.2 試験方法

試験動物は、12時間以上餌止めした後、1群90尾以上ずつの2群に分ける。1群の試験動物に注射材料0.1mLずつを筋肉内に注射し、試験群とする。他の1群は対照群とし、試験群と同様の方法でリン酸緩衝食塩液を注射する。水温25℃で、循環式で10日間飼育する。

試験後10日目に、試験群及び対照群は、12時間以上餌止めした後に、それぞれ30尾以上の3群ずつに分けて、それぞれの攻撃用ウイルス液0.1mLを腹腔内に注射して攻撃し、20日間観察して各群の生死を調べる。

3.7.6.1.3 判定

対照群の20%以上が死亡した攻撃用ウイルスの希釈段階のうち、少なくとも1段階において、試験群の生存率は、対照群のそれより有意に高い値を示さなければならない。（Fisherの直接確率計算法、 $P < 0.05$ ）。

3.7.6.2 β溶血性レンサ球菌症力価試験

3.7.6.2.1 試験材料

3.7.6.2.1.1 試験動物

3.7.5の試験に用いた動物を用いる。又は3.7.5の試験を準用した試験群及び対照群の試験動物それぞれ40尾以上を用いる。

3.7.6.2.1.2 攻撃用菌液

ストレプトコッカス・イニエ強毒菌（付記4）の液体培養菌液をリン酸緩衝食塩液で希

釈し、対照群の死亡率がおおよそ60～80%と予想される希釈菌液を攻撃用菌液とする。

3.7.6.2.2 試験方法

3.7.5の試験最終日に12時間以上餌止めした試験群及び対照群に、攻撃用菌液0.1mLずつを腹腔内に注射して攻撃した後、飼育水温29～31℃で7日間観察して各群の生死を調べる。

3.7.6.2.3 判定

2段階の攻撃用菌液の希釈段階のうち、少なくとも1段階において、試験群の生残率は、対照群のそれより有意に高い値を示さなければならない（Fisherの直接確率計算法、 $P<0.05$ ）。この場合、対照群は50%以上が死亡しなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、3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 ウイルス含有量試験用培養液

1,000mL中	
L-15培地	13.74 g
L-グルタミン	0.5 g
塩化ナトリウム	3.51 g
牛胎子血清	20 mL
水	残 量

pHを7.2～7.6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 不活化試験用培養液

1,000mL中	
L-グルタミン	0.5 g
塩化ナトリウム	3.51 g
非必須アミノ酸溶液（100×）	10 mL
牛胎子血清	50～100 mL
イーグル基礎培地又はイーグルMEM	残 量

pHを7.2～7.6に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記3 マダイイリドウイルス強毒株

マダイイリドウイルスRIE-124株又はこれと同等以上の毒力を有する株

付記4 ストレプトコッカス・イニエ強毒菌

ストレプトコッカス・イニエSI12E株又はこれと同等以上の毒力を有する株

豚大腸菌性下痢症不活化・クロストリジウム・パーフリンゲンストキソイド混合（アジュバント加）ワクチン（シード）

平成 25 年 9 月 26 日（告示第 2480 号）一部改正
令和 3 年 3 月 9 日（告示第 360 号）一部改正
令和 7 年 3 月 14 日（告示第 414 号）一部改正
年 月 日（告示第 号）一部改正

1 定義

シードロット規格に適合した線毛抗原 K88、K99、987P 及び F41 を保有する大腸菌の培養菌液を不活化したもの及び同規格に適合したクロストリジウム・パーフリンゲンス C 型菌の培養菌液を無毒化したものの遠心上清をそれぞれ混合し、アルミニウムゲル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 K88 線毛抗原保有大腸菌

2.1.1.1 名称

大腸菌 pPS002 株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

グラム陰性桿菌で、運動性を認め、アラビノース利用能（+）、イノシトール利用能（-）、ソルビトール利用能（+）、硫化水素産生能（-）、インドール産生能（+）、ウレアーゼ活性（-）、 β -ガラクトシダーゼ活性（+）及び硝酸塩還元性（+）の性状を示し、K88 線毛を保有する。また、病原性に関与する毒素をコードするプラスミドを欠損し、耐熱性エンテロトキシン（ST）及び易熱性エンテロトキシン（LT）を産生しない。

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、適当と認められた培地で増殖させ、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菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結乾燥して 2～7℃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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その最高継代数とする。

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 -60℃以下又は凍結乾燥して 2～7℃で保存する。

ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

ワーキングシード菌について、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 -60℃以下又は凍結乾燥して 2～7℃で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

2.1.2 K99 線毛抗原保有大腸菌

2.1.2.1 名称

大腸菌 NL-1005 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

グラム陰性桿菌で、運動性を認めず、5 vol% 羊血液寒天培地上で溶血性を認めず、イ

インドール産生能(+)、硝酸塩還元性(+)、硫化水素産生能(-)、グルコース利用能(+)及びマンノース利用能(+)の性状を示し、K99線毛を保有する。STを産生するがLTを産生しない。

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、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菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結乾燥して2～7℃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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その最高継代数とする。

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-60℃以下又は凍結乾燥して2～7℃で保存する。

ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

ワーキングシード菌について、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-60℃以下又は凍結乾燥して2～7℃で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

2.1.3 987P線毛抗原保有大腸菌

2.1.3.1 名称

大腸菌 NADC1413 株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

グラム陰性桿菌で、運動性を認めず、アラビノース利用能(+)、イノシトール利用能(-)、ソルビトール利用能(+)、硫化水素産生能(-)、インドール産生能(+)、ウレアーゼ活性(-)、β-ガラクトシダーゼ活性(+)及び硝酸塩還元性(+)の性状を示し、987P線毛を保有する。STを産生するがLTを産生しない。

2.1.3.3 マスターシード菌

2.1.3.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、適当と認められた培地で増殖させ、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菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結乾燥して2～7℃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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その最高継代数とする。

2.1.3.4 ワーキングシード菌

2.1.3.4.1 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-60℃以下又は凍結乾燥して2～7℃で保存する。

ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。

2.1.3.5 プロダクションシード菌

2.1.3.5.1 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-60℃以下又は凍結乾燥して2～7℃で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

2.1.4 K99 及び F41 線毛抗原保有大腸菌

2.1.4.1 名称

大腸菌 NADC1471 株又はこれと同等と認められた株

2.1.4.2 性状

グラム陰性桿菌で、運動性を認めず、アラビノース利用能（＋）、イノシトール利用能（－）、ソルビトール利用能（＋）、硫化水素産生能（－）、インドール産生能（＋）、ウレアーゼ活性（－）、 β -ガラクトシダーゼ活性（＋）及び硝酸塩還元性（＋）の性状を示し、K99 線毛及び F41 線毛を保有する。ST を産生するが LT を産生しない。

2.1.4.3 マスターシード菌

2.1.4.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、適当と認められた培地で増殖させ、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菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結乾燥して 2～7℃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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その最高継代数とする。

2.1.4.4 ワーキングシード菌

2.1.4.4.1 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－60℃以下又は凍結乾燥して 2～7℃で保存する。

ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

ワーキングシード菌について、3.1.2 の試験を行う。

2.1.4.5 プロダクションシード菌

2.1.4.5.1 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－60℃以下又は凍結乾燥して 2～7℃で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

2.1.5 クロストリジウム・パーフリンゲンス C 型菌

2.1.5.1 名称

クロストリジウム・パーフリンゲンス C 型菌 NL-1003 株又はこれと同等と認められた株

2.1.5.2 性状

グラム陽性桿菌で、グルコース利用能（＋）、マルトース利用能（＋）、アラビノース利用能（＋）、ラクトース利用能（＋）、マンノース利用能（＋）、キシロース利用能（＋）及びインドール産生能（－）の性状を示す。 β 毒素を産生し、本毒素を含む培養上清液をマウス及び子豚の静脈内に投与すると、毒性を示す。

2.1.5.3 マスターシード菌

2.1.5.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、適当と認められた培地で増殖させ、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菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結乾燥して 2～7℃で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

マスターシード菌について、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。

2.1.5.4 ワーキングシード菌

2.1.5.4.1 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－60℃以下又は凍結乾燥して 2～7℃で保存する。

ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

ワーキングシード菌について、3.1.2 の試験を行う。

2.1.5.5 プロダクションシード菌

2.1.5.5.1 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 -60°C 以下又は凍結乾燥して $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。
プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

2.2 製造材料

2.2.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 大腸菌 pPS002 株、NL-1005 株、NADC1413 株及び NADC1471 株原液

2.3.1.1 培養

それぞれのプロダクションシード菌を培地で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。

2.3.1.2 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、不活化したものを不活化菌液とする。
不活化菌液について、3.3 の試験を行う。

2.3.1.3 原液

不活化菌液を遠心分離し、リン酸緩衝食塩液で再浮遊させ、チメロサル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。

2.3.2 クロストリジウム・パーフリンゲンスC型菌 NL-1003 株原液

2.3.2.1 培養

プロダクションシード菌を培地で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。

2.3.2.2 不活化及び無毒化

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、不活化したものを不活化菌液とする。
不活化菌液について、3.3 の試験を行う。

2.3.2.3 原液

不活化菌液を $2\sim 7^{\circ}\text{C}$ に冷却し、遠心分離して上清液を採り、チメロサル又は適当と認められた保存剤を添加し、限外ろ過により濃縮したものを原液とする。

2.4 最終バルク

各原液を混合し、濃度調整し、アルミニウムゲルアジュバントを添加したものを最終バルクとする。
最終バルクにおいて力価試験を実施する場合について 3.4 の試験を行う。

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、3.5 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、大腸菌又はクロストリジウム・パーフリンゲンスC型菌以外の菌の発育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、その試験法とする。

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 大腸菌 pPS002 株、NADC1413 株及び NADC1471 株の試験

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 cm² 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。

3.2.1.1.3 判定

均一なグラム陰性桿菌以外の菌を認めてはならない。

3.2.1.2 型別試験

3.2.1.2.1 試験材料

3.2.1.2.1.1 試料

検体を用いる。

3.2.1.2.1.2 抗血清

抗大腸菌線毛抗原 K88 血清（付記 1）、抗大腸菌線毛抗原 987P 血清（付記 2）及び抗大腸菌線毛抗原 F41 血清（付記 3）を用いる。

3.2.1.2.2 試験方法

pPS002 株由来の試料と抗大腸菌線毛抗原 K88 血清、NADC1413 株由来の試料と抗大腸菌線毛抗原 987P 血清、NADC1471 株由来の試料と抗大腸菌線毛抗原 F41 血清をスライドガラス上でそれぞれ混合し、急速凝集反応を行う。

3.2.1.2.3 判定

検体は、当該抗血清で速やかに凝集しなければならない。

3.2.2 大腸菌 NL-1005 株の試験

3.2.2.1 染色試験

3.2.2.1.1 試験材料

検体を用いる。

3.2.2.1.2 試験方法

検体 0.01mL をスライドガラス上の 1 cm² 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。

3.2.2.1.3 判定

均一なグラム陰性桿菌以外の菌を認めてはならない。

3.2.2.2 型別試験

3.2.2.2.1 試験材料

3.2.2.2.1.1 試料

検体を用いる。

3.2.2.2.1.2 抗血清

抗大腸菌線毛抗原 K99 血清（付記 4）を用いる。

3.2.2.2.2 試験方法

NL-1005 株由来の試料と抗大腸菌線毛抗原 K99 血清をスライドガラス上で混合し、急速凝集反応を行う。

3.2.2.2.3 判定

検体は、当該抗血清で速やかに凝集しなければならない。

3.2.2.3 吸光度測定試験

検体を波長 420nm で吸光度を測定するとき、その値は、規定の値でなければならない。

3.2.3 クロストリジウム・パーフリンゲンス C 型 NL-1003 株の試験

3.2.3.1 染色試験

3.2.3.1.1 試験材料

検体を用いる。

3.2.3.1.2 試験方法

検体 0.01mL をスライドガラス上の 1 cm² 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。

3.2.3.1.3 判定

均一なグラム陽性桿菌以外の菌を認めてはならない。

3.3 不活化菌液の試験

3.3.1 不活化試験

3.3.1.1 試験材料

検体及び液状チオグリコール酸培地を用いる。

3.3.1.2 試験方法

検体 1 mL を 300 mL の液状チオグリコール酸培地 4 本にそれぞれ接種し、2 本は 23℃ で、他の 2 本は 33℃ で 6～8 日間一次培養する。次に各一次培養液 1 mL を新しい 300 mL の液状チオグリコール酸培地 4 本にそれぞれ接種し、2 本は 23℃ で、他の 2 本は 33℃ で 7 日間培養して観察する。

3.3.1.3 判定

菌の発育を認めてはならない。

3.4 最終バルクの試験

3.4.1 力価試験

小分製品において力価試験を実施する場合には、この試験を行わなくてもよい。

3.4.1.1 大腸菌線毛抗原の力価試験

3.4.1.1.1 又は 3.4.1.1.2 の試験を行う。

3.4.1.1.1 相対力価（付記 5）による力価試験

3.4.1.1.1.1 大腸菌線毛抗原 K88 の力価試験

3.4.1.1.1.1.1 試験材料

3.4.1.1.1.1.1.1 試料

検体を、必要に応じて希釈・洗浄液 1（付記 6）で希釈したものを試料とする。

3.4.1.1.1.1.2 試験方法

線毛抗原 K88 成分の参照品（付記 7）を、必要に応じて希釈・洗浄液 1 で希釈後、希釈した参照品及び試料の希釈・洗浄液 2（付記 8）による 2 倍階段希釈液を作製し、抗体固相化プレート 1（付記 9）の各穴に 100μL ずつ加え、常温で 30 分間振とうする。希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識抗大腸菌線毛抗原 K88 マウスモノクローナル抗体（付記 10）を各穴に 100μL ずつ加え、常温で 30 分間振とうする。希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、基質液 2（付記 11）を各穴に 100μL ずつ加え、常温で反応させる。主波長 405nm、副波長 490nm で参照品の規定の希釈倍率の吸光度を測定し、その値が参照品ごとに規定された値となった時点を反応終了とし、全穴の吸光度を測定する。

3.4.1.1.1.1.3 判定

参照品中の K88 線毛抗原量を 1.0 として、試料の K88 線毛抗原量の相対量を統計学的計算方法（付記 12）により算出するとき、相対力価は、1.0 以上でなければならない。

3.4.1.1.1.2 大腸菌線毛抗原 K99 の力価試験

3.4.1.1.1.2.1 試験材料

3.4.1.1.1.2.1.1 試料

検体を、希釈・洗浄液 1 で希釈した後、又は適当と認められた温度で凍結し融解した後、等量の溶出緩衝液（付記 13）を加え、常温で 60 分間振とうしたものを試料とする。

3.4.1.1.1.2.2 試験方法

線毛抗原 K99 成分の参照品（付記 14）を、凍結乾燥品の場合は溶出緩衝液で再溶解し、凍結保存品の場合は融解して等量の溶出緩衝液を加え、常温で 1 時間振とうした後、希釈・洗浄液 2 で希釈したもの及び試料の希釈・洗浄液 2 による 2 倍階段希釈液を作製し、抗体固相化プレート 2（付記 15）の各穴に 100μL ずつ加え、15～30℃ で 15±2 分間静置し、常温で 30 分間振とうする。希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識抗大腸菌線毛抗原 K99 マウスモノクローナル抗体（付記 16）を各穴に 100μL ずつ加え、常温で 30 分間振とうする。希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、基質液 2 を各穴に 100μL ずつ加え、常温で反応させる。主波長 405nm、副波長 490nm で参照品の最低希釈倍率の吸光度を測定し、その値が 1.1～1.5 となった時点を反応終了とし、全穴の吸光度を測定する。

3.4.1.1.1.2.3 判定

参照品中の K99 線毛抗原量を 1.0 として、試料の K99 線毛抗原量の相対量を統計学的計算方法により算出するとき、相対力価は、1.0 以上でなければならない。

3.4.1.1.1.3 大腸菌線毛抗原 987P の力価試験

3.4.1.1.1.3.1 試験材料

3.4.1.1.3.1.1 試料

検体を、希釈・洗浄液 2 で希釈した後、又は適当と認められた温度で凍結し融解した後、等量の溶出緩衝液を加え、常温で 60 分間振とうしたものを試料とする。

3.4.1.1.3.1.2 試験方法

線毛抗原 987P 成分の参照品（付記 17）を希釈・洗浄液 2 で希釈したもの及び試料の希釈・洗浄液 2 による 2 倍階段希釈液を作製し、抗体固相化プレート 3（付記 18）の各穴に 100μL ずつ加え、常温で 15 分間静置した後、30 分間振とうする。希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、抗大腸菌線毛抗原 987P マウスモノクローナル抗体 1（付記 19）を各穴に 100μL ずつ加え、常温で 30 分間振とうする。希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、標識抗体 1（付記 20）を各穴に 100μL ずつ加え、常温で 30 分間振とうする。希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、基質液 2 を各穴に 100μL ずつ加え、常温で反応させる。30 秒間振とうした後、主波長 405nm、副波長 490nm で参照品の最低希釈倍率の吸光度を測定し、その値が 1.1～1.5 となった時点を反応終了とし、全穴の吸光度を測定する。

3.4.1.1.3.1.3 判定

参照品中の 987P 線毛抗原量を 1.0 として、試料の 987P 線毛抗原量の相対量を統計学的計算方法により算出するとき、相対力価は、1.1 以上でなければならない。

3.4.1.1.1.4 大腸菌線毛抗原 F41 成分の力価試験

3.4.1.1.1.4.1 試験材料

3.4.1.1.1.4.1.1 試料

検体を、希釈・洗浄液 1 で希釈した後、又は適当と認められた温度で凍結し融解した後、等量の溶出緩衝液を加え、常温で 60 分間振とうしたものを試料とする。

3.4.1.1.1.4.1.2 試験方法

線毛抗原 F41 成分の参照品（付記 21）を、凍結乾燥品の場合は溶出緩衝液で再溶解し、凍結保存品の場合は融解して等量の溶出緩衝液を加え、常温で 1 時間振とうした後、希釈・洗浄液 2 で希釈したもの及び試料の希釈・洗浄液 2 による 2 倍階段希釈液を作製し、抗体固相化プレート 4（付記 22）の各穴に 100μL ずつ加え、常温で 30 分間振とうする。希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、抗大腸菌線毛抗原 F41 マウスモノクローナル抗体 1（付記 23）を各穴に 100μL ずつ加え、常温で 30 分間振とうする。希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、標識抗体 1 を各穴に 100μL ずつ加え、常温で 30 分間振とうする。希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、基質液 2 を各穴に 100μL ずつ加え、常温で反応させる。主波長 405nm、副波長 490nm で参照品の最低希釈倍率の吸光度を測定し、その値が 1.1～1.5 となった時点を反応終了とし、全穴の吸光度を測定する。

3.4.1.1.1.4.1.3 判定

参照品中の F41 線毛抗原量を 1.0 として、試料の F41 線毛抗原量の相対量を統計学的計算方法により算出するとき、相対力価は、1.0 以上でなければならない。

3.4.1.1.2 抗体測定法による力価試験

3.4.1.1.2.1 大腸菌線毛抗原 K88 の力価試験

3.4.1.1.2.1.1 試験材料

3.4.1.1.2.1.1.1 注射材料

検体を水酸化アルミニウムゲル（付記 24）で 10 倍に希釈したものを注射材料とする。

3.4.1.1.2.1.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

3.4.1.1.2.1.1.2 試験方法

試験動物 7 匹を用い、5 匹を試験群、2 匹を対照群とする。注射材料の 1.0mL ずつを試験群の皮下に注射し、非注射群を対照群とする。注射後 3 週目に両群から得られた各個体の血清について、次の方法により抗体価を測定する。

試験群血清及び線毛抗原 K88 参照陽性血清 1（付記 25）については 512 倍から、対照群血清については 2 倍から、希釈液 3（付記 26）で 2 倍階段希釈を行う。各希釈血清及び線毛抗原 K88 参照陽性血清 2（付記 27）を希釈液 3 で 1,024 倍に希釈したものを抗原吸着プレート 1（付記 28）の穴に 100μL ずつ加え、37℃で 1 時間反応させた後、希釈・洗浄液 2 で 3 回洗浄する。各穴にペルオキシダーゼ標識 2 次抗体液 1（付記 29）を 100μL ずつ加え、37℃で 1 時間反応させる。その後、洗浄液 2 で 3 回洗浄する。基質液 2 を各穴に 100μL ずつ加え、常温で反応させ、主波長 405nm、副波長 490nm で各穴の吸光度を測定し、1,024 倍希釈した線毛抗原 K88 参照陽性血清 2 の平均吸光度値が 0.9～1.1 である時点を反応終了として、全穴の吸光度を測定する。

得られた被検血清の吸光度値が 0.9 以上を示した血清の最大希釈倍数の逆数を抗体価とする。

3.4.1.1.2.1.3 判定

試験群の血清は、80%以上が抗体価 2,048 倍以上でなければならない。また、対照群の血清は、全て抗体価 2 倍以下でなければならない。

線毛抗原 K88 参照陽性血清 1 は、抗体価 2,048～4,096 倍を示さなければならない。

3.4.1.1.2.2 大腸菌線毛抗原 K99 の力価試験

3.4.1.1.2.2.1 試験材料

3.4.1.1.2.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.4.1.1.2.2.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

3.4.1.1.2.2.2 試験方法

試験動物 7 匹を用い、5 匹を試験群、2 匹を対照群とする。注射材料の 1.0mL ずつを試験群の皮下に注射し、非注射群を対照群とする。2 週間隔で 2 回注射後 2 週目に両群から得られた各個体の血清について、次の方法により抗体価を測定する。

試験群血清及び線毛抗原 K99 参照陽性血清 1（付記 30）については 8 倍から、対照群血清については 2 倍から、希釈液 3 で 2 倍階段希釈を行う。各希釈血清及び線毛抗原 K99 参照陽性血清 2（付記 31）を希釈液 3 で 512 倍に希釈したものを抗原吸着プレート 2（付記 32）の各穴に 100μL ずつ加え、37℃で 1 時間反応させた後、希釈・洗浄液 2 で 3 回洗浄する。各穴にペルオキシダーゼ標識 2 次抗体液 1 を 100μL ずつ加え、37℃で 1 時間反応させる。その後、希釈・洗浄液 2 で 3 回洗浄する。基質液 2 を各穴に 100μL ずつ加え、常温で反応させ、主波長 405nm、副波長 490nm で各穴の吸光度を測定し、512 倍希釈した線毛抗原 K99 参照陽性血清 2 の平均吸光度値が 0.9～1.1 である時点を反応終了として、全穴の吸光度を測定する。

得られた被検血清の吸光度値が 0.9 以上を示した血清の最大希釈倍数の逆数を抗体価とする。

3.4.1.1.2.2.3 判定

試験群の血清は、80%以上が抗体価 32 倍以上でなければならない。また、対照群の血清は、全て抗体価 2 倍以下でなければならない。

線毛抗原 K99 参照陽性血清 1 は、抗体価 32～64 倍を示さなければならない。

3.4.1.1.2.3 大腸菌線毛抗原 987P の力価試験

3.4.1.1.2.3.1 試験材料

3.4.1.1.2.3.1.1 試験動物

3.4.1.1.2.2 の試験に用いた動物を用いる。

3.4.1.1.2.3.2 試験方法

3.4.1.1.2.2 の試験で得られた各個体の血清について、次の方法により抗体価を測定する。

試験群血清については 4 倍から、対照群血清及び線毛抗原 987P 参照陽性血清 1（付記 33）については 2 倍から、希釈液 3 で 2 倍階段希釈を行う。各希釈血清及び線毛抗原 987P 参照陽性血清 2（付記 34）を希釈液 3 で 128 倍に希釈したものを抗原吸着プレート 3（付記 35）の穴に 100μL ずつ加え、37℃で 1 時間反応させた後、洗浄液 2 で 3 回洗浄する。各穴にペルオキシダーゼ標識 2 次抗体液 1 を 100μL ずつ加え、37℃で 1 時間反応させる。その後、希釈・洗浄液 2 で 3 回洗浄する。基質液 2 を各穴に 100μL ずつ加え、常温で反応させ、主波長 405nm、副波長 490nm で各穴の吸光度を測定し、128 倍希釈した線毛抗原 987P 参照陽性血清 2 の平均吸光度値が 0.9～1.1 である時点を反応終了として、全穴の吸光度を測定する。

得られた被検血清の吸光度値が 0.9 以上を示した血清の最大希釈倍数の逆数を抗体価とする。

3.4.1.1.2.3.3 判定

試験群の血清は、80%以上が抗体価 8 倍以上でなければならない。また、対照群の血清は、全て抗体価 2 倍以下でなければならない。

線毛抗原 987P 参照陽性血清 1 は、抗体価 8～16 倍を示さなければならない。

3.4.1.1.2.4 大腸菌線毛抗原 F41 の力価試験

3.4.1.1.2.4.1 試験材料

3.4.1.1.2.4.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.4.1.1.2.4.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

3.4.1.1.2.4.2 試験方法

試験動物 7 匹を用い、5 匹を試験群、2 匹を対照群とする。注射材料の 1.0mL ずつを試験群の皮下に注射し、非注射群を対照群とする。注射後 3 週目に両群から得られた各個体の血清について、次の方法により抗体価を測定する。

試験群血清及び線毛抗原 F41 参照陽性血清 1（付記 36）については 64 倍から、対照群血清については 2 倍から、希釈液 3 で 2 倍階段希釈を行う。各希釈血清及び線毛抗原 F41 参照陽性血清 2（付記 37）を希釈液 3 で 512 倍に希釈したものを抗原吸着プレート 4（付記 38）の穴に 100 μ L ずつ加え、37℃で 1 時間反応させた後、希釈・洗浄液 2 で 3 回洗浄する。各穴にペルオキシダーゼ標識 2 次抗体液 1 を 100 μ L ずつ加え、37℃で 1 時間反応させる。その後、希釈・洗浄液 2 で 3 回洗浄する。基質液 2 を各穴に 100 μ L ずつ加え、常温で反応させ、主波長 405nm、副波長 490nm で各穴の吸光度を測定し、512 倍希釈した線毛抗原 F41 参照陽性血清 2 の平均吸光度値が 0.9～1.1 である時点を反応終了として、全穴の吸光度を測定する。

得られた被検血清の吸光度値が 0.9 以上を示した血清の最大希釈倍数の逆数を抗体価とする。

3.4.1.1.2.4.3 判定

試験群の血清は、80%以上が抗体価 256 倍以上でなければならない。また、対照群の血清は、全て抗体価 2 倍以下でなければならない。

線毛抗原 F41 参照陽性血清 1 は、抗体価 256～512 倍を示さなければならない。

3.4.1.2 クロストリジウム・パーフリンゲンストキソイドの力価試験

3.4.1.2.1 試験材料

3.4.1.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.4.1.2.1.2 試験動物

体重 1.8～3.6kg の SPF ニュージーランドホワイト種の兔及び約 5 週齢の ICR 系又は適当と認められたマウスを用いる。

3.4.1.2.2 試験方法

注射材料の 1 mL を、3 週間隔で 2 回、8 匹の兔の皮下に注射する。第 2 回注射後 2 週目に得られた血清について、抗毒素抗体価を測定する。試験動物 8 匹から得られた血清を等量混合する。プール血清の 1、2、3、4 及び 5 倍希釈液をバクト-ペプトン液（付記 39）で作製する。10L₀量（付記 40）に濃度を調整したクロストリジウム・パーフリンゲンス C 型 β 毒素液（付記 41）と各希釈血清を等量混合後、25℃で 1 時間反応させ、氷中に保存する。各混合液を 1 群 5 匹のマウスに 0.2mL ずつ尾静脈内接種し、24 時間後に観察する。同時に、試験に用いた 10L₀量及び 10L₊量（付記 42）毒素液 1 mL と 10 国際抗毒素単位（付記 43。以下「IAU」という。）の標準抗毒素（付記 44）1 mL との混合液を同様にマウスに接種し毒素量を定量するとき、10L₀群では全マウスが生存し、10L₊群では 80%以上のマウスが死亡しなければならない。

3.4.1.2.3 判定

マウスが全数生存している群の最大希釈倍数を 10 倍した値を抗毒素抗体価とし、IAU で表すとき、プール血清の抗毒素抗体価は、10IAU 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、帯黄褐色のゲル状混濁液で、静置すると沈殿物の上層が無色又は帯黄褐色、振とうすれば均一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 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。

3.5.3 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。

3.5.4 チメロサル定量試験

- 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。
- 3.5.5 アルミニウム定量試験
一般試験法のアルミニウム定量法を準用して試験するとき、アルミニウムの含有量は、1.5 mg/mL 以下でなければならない。
- 3.5.6 ホルマリン定量試験
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、ホルマリン含有量は、0.1vol%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は、この限りでない。
- 3.5.7 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、体重測定は 4 日目に行うものとする。
- 3.5.8 エンドトキシン試験
日本薬局方一般試験法のエンドトキシン試験法の光学的定量法の比色法を準用して試験するとき、1 頭分当たり 1×10^6 EU 未満でなければならない。
- 3.5.9 力価試験
試験品について 3.5.1 に準じて試験するとき、適合しなければならない。ただし、最終バルクにおいて力価試験を実施する場合には、この試験を行わなくてもよい。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後 12 か月間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合は、この限りでない。

- 付記 1 抗大腸菌線毛抗原 K88 血清
精製した大腸菌の線毛抗原 K88 を兎に免疫して得られた抗血清
- 付記 2 抗大腸菌線毛抗原 987P 血清
精製した大腸菌の線毛抗原 987P を兎に免疫して得られた抗血清
- 付記 3 抗大腸菌線毛抗原 F41 血清
精製した大腸菌の線毛抗原 F41 を兎に免疫して得られた抗血清
- 付記 4 抗大腸菌線毛抗原 K99 血清
精製した大腸菌の線毛抗原 K99 を兎に免疫して得られた抗血清
- 付記 5 相対力価
不活化ワクチンの力価試験において、酵素抗体反応による *in vitro* 抗原定量法を評価し、参照品との比較により、試験品の有効抗原量を数値化するために考案された単位
- 付記 6 希釈・洗浄液 1
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
リン酸二水素カリウム 0.2 g
精製水 残 量
pH を 7.2 に調整する。200nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。
- 付記 7 線毛抗原 K88 成分の参照品
次に掲げるものであって、動物医薬品検査所が適当と認めたもの。
(1) 大腸菌 NL-1002 株培養液から精製した線毛抗原 K88 成分で、ペプトン・トレハロースで希釈し、1 回使用分に分注して、凍結乾燥したもの。
(2) 本製剤の製造方法に従って製造・小分けし、凍結保存したもの。
- 付記 8 希釈・洗浄液 2

1,000mL 中
ポリソルベート 20 5 mL
希釈・洗浄液 1 残 量
pH を 7.2 に調整する。

付記 9 抗体固相化プレート 1
希釈液 5（付記 45）で適当な濃度に希釈した抗大腸菌抗原 K88 マウスモノクローナル抗体 1（付記 46）を 96 穴プレートに分注し、反応させた後、希釈・洗浄液 2 で洗浄したもの。

付記 10 ペルオキシダーゼ標識抗大腸菌線毛抗原 K88 マウスモノクローナル抗体
大腸菌線毛抗原 K88 に対するマウスモノクローナル抗体をペルオキシダーゼで標識したものを希釈液 6（付記 47）で適当な希釈倍率に希釈したもの。

付記 11 基質液 2
C 液：0.6g の 2,2'-アジノージ（3-エチルベンゾチアゾリンスルホネート）を 1,000mL のグリシン緩衝液で希釈したもの。
D 液：0.02vol%過酸化水素溶液
C 液と D 液を使用時に等量混合したもの。

付記 12 統計学的計算方法
農林水産大臣が適当と認めたもの。

付記 13 溶出緩衝液
リン酸二水素カリウム 8.2 g
水 94 mL
pH を 9.3 に調整する。

付記 14 線毛抗原 K99 成分の参照品
次に掲げるものであって、農林水産大臣が適当と認めたもの。
（1）大腸菌 NL-1008 株培養液から精製した線毛抗原 K99 成分で、ペプトンで希釈し、1 回使用分に分注して、凍結乾燥したもの。
（2）本製剤の製造方法に従って製造・小分けし、凍結保存したもの。

付記 15 抗体固相化プレート 2
希釈液 5 で適当な濃度に希釈した抗大腸菌線毛抗原 K99 マウスモノクローナル抗体 1（付記 48）を 96 穴プレートに分注し、反応させた後、希釈・洗浄液 2 で洗浄したもの。

付記 16 ペルオキシダーゼ標識抗大腸菌線毛抗原 K99 マウスモノクローナル抗体
抗大腸菌線毛抗原 K99 マウスモノクローナル抗体 1 をペルオキシダーゼで標識したものを希釈・洗浄液 2 で適当な希釈倍率に希釈したもの。

付記 17 線毛抗原 987P 成分の参照品
次に掲げるものであって、動物医薬品検査所が適当と認めたもの。
（1）大腸菌 NADC1413 株培養液から精製した線毛抗原 987P 成分で、ペプトン・トレハロースで希釈し、1 回使用分に分注して、凍結乾燥したもの。
（2）本製剤の製造方法に従って製造・小分けし、凍結保存したもの。

付記 18 抗体固相化プレート 3
希釈液 5 で適当な濃度に希釈した抗大腸菌線毛抗原 987P 兎ポリクローナル抗体（付記 49）を 96 穴プレートに分注し、反応させた後、希釈・洗浄液 2 で洗浄したもの。

付記 19 抗大腸菌線毛抗原 987P マウスモノクローナル抗体 1

精製線毛抗原 987P で免疫した BALB/c マウス脾細胞とマウス形質細胞腫細胞との細胞融合により得たハイブリドーマ 1BB6-3D6 が産出するマウスモノクローナル抗体で、希釈液 7（付記 50）で適当に希釈したもの。

付記 20 標識抗体 1

ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG(H+L)抗体を 50%グリセリン溶液（付記 51）で溶解し、更に希釈液 8（付記 52）で希釈したもの。

付記 21 線毛抗原 F41 成分の参照品

次に掲げるものであって、農林水産大臣が適当と認めたもの。

（１）大腸菌 NADC1471 株培養液から精製した線毛抗原 F41 成分で、ペプトン・トレハロースで希釈し、1 回使用分に分注して凍結乾燥したもの。

（２）本製剤の製造方法に従って製造・小分けし、凍結保存したもの。

付記 22 抗体固相化プレート 4

希釈液 5 で適当な濃度に希釈した抗大腸菌線毛抗原 F41 兔ポリクローナル抗体（付記 53）を 96 穴プレートに分注し、反応させた後、希釈・洗浄液 2 で洗浄したもの。

付記 23 抗大腸菌線毛抗原 F41 マウスモノクローナル抗体 1

精製線毛抗原 F41 で免疫した BALB/c マウス脾細胞とマウス形質細胞腫細胞との細胞融合により得たハイブリドーマ SDSU56/85 が産出するマウスモノクローナル抗体で、希釈液 7 で適当に希釈したもの。

付記 24 水酸化アルミニウムゲル

硫酸アルミニウム 18 水和物 33.3g を精製水 50mL に溶解し、これに 1.0mol/L 水酸化ナトリウム 300mL を加え攪はんする。精製水で沈殿物を洗浄し、この沈殿物に適当量の精製水を加え、ブレンダーで砕細する。水酸化アルミニウム含量が 2.0w/v% となるように精製水で濃度を調整し、最終濃度が 0.15mol/L となるように塩化ナトリウム水溶液を加え、121℃で 15 分間高圧滅菌する。これを希釈・洗浄液 1 で水酸化アルミニウム含量が 0.35w/v% となるように濃度を調整したもの。

付記 25 線毛抗原 K88 参照陽性血清 1

精製線毛抗原 K88（付記 54）で免疫したモルモットの血清であって、酵素抗体反応で 2,048～4,096 倍の抗体価を示すように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 26 希釈液 3

1,000mL 中

牛血清アルブミン

1.0 g

希釈・洗浄液 2

残 量

付記 27 線毛抗原 K88 参照陽性血清 2

精製線毛抗原 K88 で免疫したモルモットの血清であって、精製線毛抗原 K88 を固相化抗原としたものに対する酵素抗体反応における吸光度値が、1,024 倍希釈で 0.9～1.1 となるように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 28 抗原吸着プレート 1

希釈液 5 で 0.5 μ g/mL に希釈した抗大腸菌線毛抗原 K88 マウスモノクローナル抗体 2（付記 55）100 μ L ずつを 96 穴プレートの各穴に加えて反応させ、希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、精製線毛抗原 K88 を希釈・洗浄液 2 で希釈したものを各穴に 100 μ L ずつ加え、37℃で 1 時間反応させたもの。

なお、精製線毛抗原 K88 の至適濃度は、線毛抗原 K88 参照陽性血清 2 を 1,024 倍に希釈したものをを用いて反応させた場合の吸光度が 0.9～1.1 となる濃度とする。

付記 29 ペルオキシダーゼ標識 2 次抗体液 1

ペルオキシダーゼ標識山羊抗モルモット IgG(H+L)を希釈液 3 で希釈したもの。

付記 30 線毛抗原 K99 参照陽性血清 1

精製線毛抗原 K99 (付記 56) で免疫したモルモットの血清であって、酵素抗体反応で 32～64 倍の抗体価を示すように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 31 線毛抗原 K99 参照陽性血清 2

精製線毛抗原 K99 で免疫したモルモットの血清であって、精製線毛抗原 K99 を固相化抗原としたものに対する酵素抗体反応における吸光度値が、512 倍希釈で 0.9～1.1 となるように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 32 抗原吸着プレート 2

希釈液 5 で $1 \mu\text{g/mL}$ に希釈した抗大腸菌線毛抗原 K99 マウスモノクローナル抗体 2 (付記 57) $100 \mu\text{L}$ ずつを 96 穴プレートの各穴に加えて反応させ、希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、精製線毛抗原 K99 を希釈・洗浄液 2 で希釈し、プレートに $100 \mu\text{L}$ ずつ加え、 37°C で 1 時間反応させたもの。

なお、至適の精製線毛抗原 K99 濃度は、線毛抗原 K99 参照陽性血清 2 を 512 倍に希釈したものをを用いて反応させた場合の吸光度が 0.9～1.1 となる濃度とする。

付記 33 線毛抗原 987P 参照陽性血清 1

精製線毛抗原 987P (付記 58) で免疫したモルモットの血清であって、酵素抗体反応で 8～16 倍の抗体価を示すように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 34 線毛抗原 987P 参照陽性血清 2

精製線毛抗原 987P で免疫したモルモットの血清であって、精製線毛抗原 987P を固相化抗原としたものに対する酵素抗体反応における吸光度値が、128 倍希釈で 0.9～1.1 となるように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 35 抗原吸着プレート 3

希釈液 5 で $1 \mu\text{g/mL}$ に希釈した抗大腸菌線毛抗原 987P マウスモノクローナル抗体 2 (付記 59) $100 \mu\text{L}$ ずつを 96 穴プレートの各穴に加えて反応させ、希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、精製線毛抗原 987P を洗浄液 2 で希釈し、プレートに $100 \mu\text{L}$ ずつ加え、 37°C で 1 時間反応させたもの。

なお、至適の精製線毛抗原 987P 濃度は、線毛抗原 987P 参照陽性血清 2 を 128 倍に希釈したものをを用いて反応させた場合の吸光度が 0.9～1.1 となる濃度とする。

付記 36 線毛抗原 F41 参照陽性血清 1

精製線毛抗原 F41 (付記 60) で免疫したモルモットの血清であって、酵素抗体反応で 256～512 倍の抗体価を示すように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 37 線毛抗原 F41 参照陽性血清 2

精製線毛抗原 F41 で免疫したモルモットの血清であって、精製線毛抗原 F41 を固相化抗原としたものに対する酵素抗体反応における吸光度値が、512 倍希釈で 0.9～1.1 となるように濃度を調整し、凍結乾燥したもの。

付記 38 抗原吸着プレート 4

希釈液 5 で $1 \mu\text{g/mL}$ に希釈した抗大腸菌線毛抗原 F41 マウスモノクローナル抗体 2 (付記 61) $100 \mu\text{L}$ ずつを 96 穴プレートの各穴に加えて反応させ、希釈・洗浄液 2 で洗浄した後、精製線毛抗原 F41 を洗浄液 2 で希釈し、プレートに $100 \mu\text{L}$ ずつ加え、 37°C で 1 時間反応させたもの。

なお、至適の精製線毛抗原 F41 濃度は、線毛抗原 F41 参照陽性血清 2 を 512 倍に希釈したものをを用いて反応させた場合の吸光度が 0.9～1.1 となる濃度とする。

付記 39 バクトーペプトン液

1,000mL 中

バクトーペプトン	10 g
塩化ナトリウム	2.5 g
水	残 量

溶解後、pH を 7.2 に調整し、121℃で 25 分間滅菌する。

付記 40 10L₀量
10IAU の標準抗毒素と混合してマウスに注射したとき、死亡させない毒素の最大量

付記 41 クロストリジウム・パーフリンゲンス C 型 β 毒素液
クロストリジウム・パーフリンゲンス C 型 NL-1003 株又はこれと同等の β 毒素を産生する株の培養上清をろ過滅菌し、滅菌グリセロールを最終濃度 10vol% となるように添加したもの。

付記 42 10L₊量
10IAU の標準抗毒素と混合してマウスに注射したとき、80%以上を死亡させる毒素の最小量

付記 43 IAU (International Antitoxin Units)
クロストリジウム・パーフリンゲンス β 毒素トキソイドに対する抗毒素の国際単位

付記 44 標準抗毒素
動物医薬品検査所が適当と認めた標準抗毒素又はこれと比較して標準化された抗毒素

付記 45 希釈液 5
1,000mL 中
無水炭酸ナトリウム 1.59 g
炭酸水素ナトリウム 2.93 g
水 残 量
pH を 9.6 に調整する。

付記 46 抗大腸菌線毛抗原 K88 マウスモノクローナル抗体 1
K88ac、ab 及び ad の 3 種類の線毛抗原で免疫したマウス脾細胞とマウス形質細胞腫細胞との細胞融合により得たハイブリドーマ 21BA1-1H1 が産出するマウスモノクローナル抗体

付記 47 希釈液 6
1,000mL 中
オボアルブミン 10.0 g
希釈・洗浄液 2 残 量
200nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。

付記 48 抗大腸菌線毛抗原 K99 マウスモノクローナル抗体 1
線毛抗原 K99 で免疫した BALB/c マウス脾細胞とマウス形質細胞腫細胞との細胞融合により得たハイブリドーマ 2BD4E4 が産出するマウスモノクローナル抗体

付記 49 抗大腸菌線毛抗原 987P 兔ポリクローナル抗体
987P を産生する大腸菌 987 株のホルマリン不活化菌体と生菌を用いて免疫した後、採取した血清を線毛抗原非産生性の NADC138 株で吸収を行ったもの。

付記 50 希釈液 7
1,000mL 中
牛血清アルブミン 20.0 g

希釈・洗浄液 2 残 量
200nm 以下のフィルターでろ過滅菌してもよい。

付記 51 50%グリセリン溶液
滅菌精製水とグリセリンを等量混合したもの。

付記 52 希釈液 8
兔血清 1 mL 当たり 100mL の希釈・洗浄液 2 を混合したもの。

付記 53 抗大腸菌線毛抗原 F41 兎ポリクローナル抗体
F41 を産生する大腸菌 1839 株のホルマリン不活化菌体と生菌を用いて免疫した後、採取した血清を線毛抗原非産生性の 1839 株で吸収したもの。

付記 54 精製線毛抗原 K88
線毛抗原 K88 を保有する大腸菌培養液を遠心集菌し、2 mol/L 尿素加リン酸緩衝液（付記 62）に懸濁した後、加熱抽出し、硫酸アンモニウムを加えて沈殿を生成させた後、陰イオン交換クロマトカラムで精製したもので、SDS ポリアクリルアミド電気泳動及びウェスタンブロッティング後、線毛抗原 K88 を保有する大腸菌抽出物で免疫した兔血清を用いて免疫染色を行うとき、約 29kDa の位置に単一のバンドを検出する。

付記 55 抗大腸菌線毛抗原 K88 マウスモノクローナル抗体 2
大腸菌線毛抗原 K88 に対するマウスモノクローナル抗体で、線毛抗原 K88 を有する大腸菌抽出物を用いてイムノブロッティングを行う場合、約 29kDa の位置に単一のバンドを認めるもの。

付記 56 精製線毛抗原 K99
線毛抗原 K99 を保有する大腸菌培養液を遠心集菌し、2 mol/L 尿素加リン酸緩衝液に懸濁した後、加熱抽出し、硫酸アンモニウムを加えて沈殿を生成させた後、陰イオン交換クロマトカラムで精製したもので、SDS ポリアクリルアミド電気泳動及びウェスタンブロッティング後、線毛抗原 K99 を保有する大腸菌抽出物で免疫した兔血清を用いて免疫染色を行うとき、約 19kDa の位置に単一のバンドを検出する。

付記 57 抗大腸菌線毛抗原 K99 マウスモノクローナル抗体 2
大腸菌線毛抗原 K99 に対するマウスモノクローナル抗体で、線毛抗原 K99 を有する大腸菌抽出物を用いてイムノブロッティングを行う場合、約 19kDa の位置に単一のバンドを認めるもの。

付記 58 精製線毛抗原 987P
線毛抗原 987P を保有する大腸菌培養液を遠心集菌し、2 mol/L 尿素加リン酸緩衝液に懸濁した後、ホモジナイザーによる細胞破碎、超遠心及び陰イオン交換クロマトカラムで精製したもので、SDS ポリアクリルアミド電気泳動及びウェスタンブロッティング後、線毛抗原 987P を保有する大腸菌抽出物で免疫した兔血清を用いて免疫染色を行うとき、約 23kDa の位置に単一のバンドを検出する。

付記 59 抗大腸菌線毛抗原 987P マウスモノクローナル抗体 2
大腸菌線毛抗原 987P に対するマウスモノクローナル抗体で、線毛抗原 987P を有する大腸菌抽出物を用いてイムノブロッティングを行う場合、約 23kDa の位置に単一のバンドを認めるもの。

付記 60 精製線毛抗原 F41
線毛抗原 F41 を保有する大腸菌培養液を遠心集菌し、2 mol/L 尿素加リン酸緩衝液に懸濁した後、ホモジナイザーによる細胞破碎、超遠心及び陰イオン交換クロマトカラムで精製したもので、SDS ポリアクリルアミド電気泳動及びウェスタンブロッティング後、線毛抗原 F41 を保有する大腸菌抽出物で免疫した兔血清を用いて免

疫染色を行うとき、約 30kDa の位置に単一のバンドを検出する。

付記 61 抗大腸菌線毛抗原 F41 マウスモノクローナル抗体 2

大腸菌線毛抗原 F41 に対するマウスモノクローナル抗体で、線毛抗原 F41 を有する大腸菌抽出物を用いてイムノブロッティングを行った場合、約 30kDa の位置に単一のバンドを認めるもの。

付記 62 2 mol/L 尿素加リン酸緩衝液

1,000mL 中

尿素

120 g

0.05mol/L リン酸緩衝液 (pH7.2) (付記 63) 残 量

付記 63 0.05mol/L リン酸緩衝液 (pH7.2)

0.2mol/L リン酸二水素ナトリウム約 35mL と 0.2mol/L リン酸水素二ナトリウム約 90mL を混合し、pH を 7.2 に調整し、この液 100mL に水を加え 400mL としたもの。

鶏伝染性気管支炎生ワクチン（シード）

平成 24 年 7 月 4 日（告示第 1622 号）一部改正
令和 4 年 4 月 7 日（告示第 697 号）一部改正
令和 4 年 8 月 15 日（告示第 1287 号）一部改正
令和 年 月（告示第 号）一部改正

1 定義

シードロット規格に適合した弱毒鶏伝染性気管支炎ウイルスを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凍結乾燥したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

弱毒鶏伝染性気管支炎ウイルス 4-91 株又は製造に相当と認められた株

2.1.2 性状

4 日齢の鶏に $10^{3.0}\text{EID}_{50}$ を点鼻又は点眼接種すると、一過性の軽い呼吸器症状を示すことがある。8～10 日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射すると、増殖し、鶏胚を 2～7 日後に死亡させ、又は鶏胚の発育不全若しくはカーリングを起こす。

2.1.3 マスターシードウイルス

2.1.3.1 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、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。

2.1.4 ワーキングシードウイルス

2.1.4.1 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°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。

2.1.5 プロダクションシードウイルス

2.1.5.1 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°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 発育鶏卵

SPF 動物規格の 1.1 に適合した 10～12 日齢のものをを用いる。

マスターシードウイルス及び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並びに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 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 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 の発育鶏卵で培養して、尿膜腔液を採取し、そのろ液、遠心上清又はこれを濃縮したものを原液とする。

原液に相当と認められた必要最少量の抗生物質又は必要最少量の抗生物質及び安定剤を加えてもよい。

原液について 3.4 の試験を行う。

なお、最終バルクについて 3.5 の試験を行う場合は、3.4.2 の試験を行わない。

2.4 最終バルク

原液を混合し、適当と認められた希釈液及び安定剤を加えて調製し、最終バルクとする。この場合、適当と認められた必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

小分製品が錠剤である製剤については、原液を混合して凍結乾燥し、適当と認められた賦形剤及び滑沢剤を加えて調製し、最終バルクとする。

小分製品が粒状に凍結乾燥させた製剤については、原液を規定量ずつ凍結乾燥されたものを最終バルクとする。

粒状に凍結乾燥された最終バルクについて 3.5 の試験を行う。

2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注して凍結乾燥し、小分製品とする。

小分製品が錠剤である製剤については、最終バルクを錠剤に成型し、その 1 錠ずつを小分容器に封入し、小分製品とする。

小分製品が粒状に凍結乾燥された製剤については、規定量となる分量を小分容器に充填し、小分製品とする。

小分製品について、3.6 の試験を行う。

なお、最終バルクを錠剤に成型し、その 1 錠ずつを小分容器に封入した製剤及び粒状に凍結乾燥した最終バルクを小分容器に充填した製剤については、3.6.2 の試験を行わない。

3 試験法

3.1 製造用株の試験

3.1.1 マスターシードウイルスの試験

3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の 1.4.2.1.1.1 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。

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

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 1.1 及び 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。ただし、鶏脳脊髄炎ウイルスについて 3.1.1.4.2.2 に規定する試験を適用する製剤については、本試験を実施しなくてよい。

3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

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 1.1、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。ただし、鶏脳脊髄炎ウイルスについて 3.1.1.4.2.1 に規定する試験を適用する製剤については、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 3.2.10 の試験を実施しなくてもよい。

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%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又は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 ウイルス含有量試験

3.4.2.1 試験材料

3.4.2.1.1 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。

3.4.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の 9～11 日齢のものをを用いる。

3.4.2.2 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尿膜腔内に注射し、37℃で 7 日間培養し、観察する。試験最終日に鶏胚の変化を観察する。

3.4.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全、カーリング）を認め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^{6.8}EID₅₀以上でなければならない。

3.5 最終バルクの試験

3.5.1 ウイルス含有量試験

3.5.1.1 試験材料

3.5.1.1.1 試料

検体を注射用水 100mL で溶解し、トリプトース溶液（付記 1）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.5.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の 9～11 日齢のものをを用いる。

3.5.1.2 試験方法

試料 0.2mL ずつをそれぞれ 10 個の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で 3 日間培養する。培養終了後 2～8℃に 2 時間静置した後、尿膜腔液を採取し、酵素抗体反応（以下この項において「ELISA」という。）を行う。

試料を注射した発育鶏卵の尿膜腔液と参照陰性対照（付記 2）の各 50 μL を、予め EIA 緩衝液（付記 3）を 50 μL ずつ加えた抗体固相化プレート（付記 4）の各穴に加える。尿膜腔液は 1 穴、参照陰性対照は 6 穴とする。参照陽性対照（付記 5）は 2 倍階段希釈になるように、EIA 緩衝液で無希釈から 128 倍まで希釈した 100 μL を 1 穴に加える。2 穴には EIA 緩衝液の 100 μL を加える。37℃で 1 時間反応させた後、洗浄液（付記 6）で 3 回洗浄する。次に、各

穴に検出抗体（付記 7）を 100 μ L ずつ加え、37℃で 1 時間反応させた後、洗浄液で 3 回洗浄する。次に、酵素標識抗体液（付記 8）を 100 μ L ずつ加え、45 分間反応させた後、洗浄液（付記 6）で 3 回洗浄及び水で 1 回洗浄する。発色用基質（付記 9）を各穴に 100 μ L ずつ加え、10 分間反応させた後、2 mol/L 硫酸を 50 μ L ずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を 450nm で測定する。

3.5.1.3 判定

参照陰性対照の平均吸光度の少なくとも 1.5 倍の吸光度を示した尿膜腔液を感染とみなし、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。

3.6 小分製品の試験

3.6.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、固有の色調を有する乾燥塊でなければならない。完全に溶解したものは、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。

3.6.2 真空度試験

一般試験法の真空度試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.6.3 含湿度試験

一般試験法の含湿度試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.6.4 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。

3.6.5 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。

3.6.6 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。

3.6.7 ウイルス含有量試験

3.4.2 を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1 羽分当たり 10^{3.5}EID₅₀ 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。

3.6.8 安全試験

3.6.8.1 試験材料

3.6.8.1.1 接種材料

試験品をリン酸緩衝食塩液を用いてウイルスが 0.03mL 当たり 10 羽分含まれるように調製し、接種材料とする。

3.6.8.1.2 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 4 日齢の鶏を用いる。

3.6.8.2 試験方法

試験動物の 10 羽を試験群、5 羽を対照群とする。

接種材料 0.03mL ずつを試験群に点眼接種し、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。

3.6.8.3 判定

観察期間中、対照群においては、臨床的な異常を認めてはならず、試験群においては、一過性の呼吸器症状及び結膜の充血を呈することがあっても、その他の異常を認めてはならない。

3.6.9 力価試験

それぞれのワクチンについて、3.6.9.1 の試験又は 3.6.9.2 の試験のいずれかを行う。

3.6.9.1 発育鶏卵中和試験

3.6.9.1.1 試験材料

3.6.9.1.1.1 接種材料

試験品をリン酸緩衝食塩液又は適当と認められた溶解用液を用いてウイルスが 0.03mL 当たり 1 羽分含まれるように濃度を調整し、接種材料とする。

3.6.9.1.1.2 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 4 日齢の鶏を用いる。

3.6.9.1.1.3 中和試験用ウイルス

製造用株を用いる。ただし、ウイルス量は、ウイルスを感染させた尿膜腔液を、生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9～10 日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、ウイルス価を測定するとき、1 mL 中 10^{5.0}EID₅₀ 以上でなければならない。

3.6.9.1.1.4 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9～10 日齢のものを用いる。

3.6.9.1.2 試験方法

試験動物の 10 羽を試験群、3 羽を対照群とする。試験群に、接種材料 0.03mL ずつを点眼接種し、対照群と共に 3～4 週間観察する。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。

試験終了時、試験群及び対照群から得られた血清についてウイルス希釈法により中和試験を行う。各群の血清は、それぞれ等量をプールし、非働化する。

中和試験用ウイルスを 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を 3 群に分け、第 1 群には試験群のプール血清を、第 2 群には対照群のプール血清を、第 3 群にはウイルス対照としてリン酸緩衝食塩液を、それぞれ等量加えて混合する。これらの混合液を 4℃で 18～24 時間又は 37℃で 60 分間処理した後、各段階の希釈液ごとに 5 個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に 0.1mL ずつ注射し、37℃で 7 日間培養し、観察する。試験最終日に鶏胚の変化を観察する。

3.6.9.1.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全、カーリング）を認めたものを感染とみなし、中和指数を算出する。ただし、24 時間以内に死亡したものは除外する。

試験群の中和指数は、対照群に対し 2.0 以上でなければならない。この場合、対照群の中和指数は、ウイルス対照に対し 1.0 以下でなければならない。

3.6.9.2 抗体量測定試験

3.6.9.2.1 試験材料

3.6.9.2.1.1 接種材料

試験品をリン酸緩衝食塩液又は適当と認められた溶解用液を用いてウイルスが 0.03mL 当たり 1 羽分含まれるように濃度を調整し、接種材料とする。

3.6.9.2.1.2 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 4 日齢の鶏を用いる。

3.6.9.2.1.3 酵素抗体反応用抗原

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 10～12 日齢の発育鶏卵に製造用株を接種し、培養した後の尿膜腔液を、100℃で 10 分間加熱処理したものを ELISA 抗原とする。ただし、加熱処理前の尿膜腔液を、生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9～10 日齢の発育鶏卵の尿膜腔液に注射し、ウイルス量を測定するとき、1mL 中 $10^{6.9}$ EID₅₀ 以上でなければならない。

3.6.9.2.2 試験方法

試験動物の 10 羽を試験群、3 羽を対照群とする。試験群に、接種材料 0.03mL ずつを点眼接種し、対照群と共に 3～4 週間観察する。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。

試験終了時、試験群及び対照群から得られた血清について ELISA を行う。各群の血清は、それぞれ等量をプールする。

試験群と対照群のプール血清及び陽性血清（付記 11）を血清希釈液（付記 12）で 50 倍に希釈したものを、それぞれ ELISA 用抗原吸着プレート（付記 13）の 3 穴に 100μL ずつ加える。37℃で 60 分間反応させた後、洗浄液（付記 14）で洗浄する。次に、各穴に酵素標識抗体液（付記 15）を 100μL ずつ加え、37℃で 60 分間反応させた後、洗浄液（付記 14）で洗浄する。発色用基質液（付記 9）を各穴に 100μL ずつ加え、37℃で 30 分間反応させた後、1 mol/L リン酸水溶液を 100μL ずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を 450nm で測定する。

3.6.9.2.3 判定

試験群および対照群のプール血清の吸光度の平均値を S、陽性血清の吸光度の平均値を P とし、S/P 比を算出するとき、試験群のプール血清の S/P 比は 1.0 以上でなければならない。この場合、陽性血清の吸光度は 0.21 以上を示し、対照群のプール血清の吸光度は 0.11 未満でなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後 1 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 トリプトース溶液

トリプトース

水

25 g

残 量

121℃で 15～30 分間高圧蒸気滅菌したもの。必要最小限の抗生物質を加えてもよい。

付記 2 参照陰性対照

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した発育鶏卵から採取した鶏伝染性気管支炎ウイルス陰性の尿膜腔液

付記 3 EIA 緩衝液

1,000mL 中	
塩化ナトリウム	29.22 g
リン酸二水素ナトリウム二水和物	2.31 g
リン酸水素二ナトリウム二水和物	24.06 g
ポリソルベート 20	200.50 g
ウシ血清アルブミン	1.00 g
水	残 量

孔径 0.22μm のメンブランフィルターでろ過する。

付記 4 抗体固相化プレート

製造用株に特異的なモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞の培養上清を 0.04mol/L リン酸緩衝食塩液（付記）で適当な濃度に希釈し、希釈液を 96 穴プレートの各穴に 100μL ずつ加え、37℃で 3 時間静置して固相化した後、洗浄液で 3 階洗浄したもの

付記 5 参照陽性対照

製造用株を生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した発育鶏卵の尿膜腔内で培養して採取した尿膜腔液で、EIA 緩衝液（付記 3）で指摘濃度に希釈したもの

付記 6 洗浄液

1,000mL 中	
塩化ナトリウム	37.2 g
塩化カリウム	0.2 g
リン酸二水素カリウム	0.2 g
リン酸水素二ナトリウム	1.15 g
水	残 量

付記 7 検出抗体

製造用株を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に免疫して得られた血清を EIA 緩衝液（付記 3）で至適濃度に希釈したもの

付記 8 酵素標識抗体液

山羊抗鶏 IgG ペルオキシダーゼ標識抗体を EIA 緩衝液（付記 3）で至適濃度に希釈したもの

付記 9 発色用基質液

テトラメチルベンジジン（TMB）を用いる。

付記 10 0.04mol/L リン酸緩衝食塩液

1000mL 中	
塩化ナトリウム	37.2 g
リン酸二水素ナトリウム二水和物	1.43 g
リン酸水素二ナトリウム二水和物	6.02 g
水	残 量

付記 11 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に製造用株を点眼接種して免疫した血清であり、発育鶏卵を用いてウイルス希釈法により中和指数を算出するとき、中和指数は 2.0 以上を示すよう血清希釈液で希釈したもの

付記 12 血清希釈液

洗浄液（付記 14）100mL にスキムミルク 1 g を溶解したもの

付記 13 ELISA 用抗原吸着プレート

ELISA 用抗原を 0.05mol/L 炭酸重炭酸緩衝液（付記 16）で 1 mL 中 $10^{5.5}$ EID₅₀ 以上となるように 25 倍以上に希釈したものをプレートにそれぞれ 100 μ L ずつ加え、37°C で 60 分間静置し、固相化する。固相化したプレートを洗浄液で洗浄し、ブロッキング液（付記 17）を 300 μ L ずつ加え、37°C で 60 分間反応させた後、洗浄液で洗浄したもの

付記 14 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
--------	-------

リン酸二水素カリウム	0.2 g
------------	-------

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

水	残 量
---	-----

付記 15 酵素標識抗体液

ペルオキシダーゼ標識抗鶏 IgG (H+L) を血清希釈液で至適濃度に希釈したもの

付記 16 0.05mol/L 炭酸重炭酸緩衝液

pH9.6 になるように、0.05mol/L 炭酸ナトリウム溶液と 0.05mol/L 炭酸水素ナトリウム溶液を混合したもの

0.05mol/L 炭酸ナトリウム溶液

1,000mL 中

炭酸ナトリウム	5.3 g
---------	-------

精製水	残 量
-----	-----

0.05mol/L 炭酸水素ナトリウム溶液

1,000mL 中

炭酸水素ナトリウム	4.2 g
-----------	-------

精製水	残 量
-----	-----

付記 17 ブロッキング液

洗浄液（付記 14）100mL にスキムミルク 5 g を溶解したもの

鶏伝染性ファブリキウス囊病生ワクチン(ひな用)(シード)

平成22年3月3日(告示第394号)新規追加
令和2年12月11日(告示第2406号)一部改正
令和7年4月4日(告示第542号)一部改正
令和 年 月 日(告示第 号)一部改正

1 定義

シードロット規格に適合した弱毒伝染性ファブリキウス囊病ウイルスを、同規格に適合した発育鶏卵又は初代細胞で増殖させて得たウイルス液を凍結乾燥した、初生ひなを含むひなに適用するワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

弱毒伝染性ファブリキウス囊病ウイルス D78 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

1日齢の鶏に皮下又は経口接種しても臨床症状及び免疫抑制作用を示さない。
鶏胚初代細胞に接種すると CPE を伴って増殖する。

2.1.3 マスターシードウイルス

2.1.3.1 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、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵、同規格の 2.6 に適合した鶏胚初代細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖させ、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 ワーキングシードウイルス

2.1.4.1 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、同規格の 2.6 に適合した鶏胚初代細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して－70℃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。

2.1.5 プロダクションシードウイルス

2.1.5.1 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、同規格の 2.6 に適合した鶏胚初代細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖させる。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して－70℃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について、3.1.3 の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 発育鶏卵を用いる場合

2.2.1.1 発育鶏卵

SPF 動物規格の 1.1 に適合した 10～12 日齢のものを用いる。

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 初代細胞を用いる場合

2.2.2.1 初代細胞

SPF 動物規格の 2.6 に適合した鶏胚初代細胞又は製造に適当と認められた細胞を用いる。

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 マスタープライマリーセルシード(プロダクションプライマリーセルシード)

2.2.2.3.1 増殖、継代及び保存

マスタープライマリーセルシード(プロダクションプライマリーセルシード)は 2.2.2.2 の培養液で増殖させ、継代及び保存しない。

マスタープライマリーセルシード(プロダクションプライマリーセルシード)について、3.3 の試験を行う。

2.3 原液

2.3.1 発育鶏卵の培養

1 回に処理する発育鶏卵を個別発育鶏卵とみなす。

個別発育鶏卵について、3.4 の試験を行う。

2.3.2 マスタープライマリーセルシード(プロダクションプライマリーセルシード)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。ウイルス接種前の個別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、3.5 の試験を行う。

2.3.3 ウイルスの培養

2.3.3.1 発育鶏卵を用いる場合

プロダクションシードウイルスを 2.3.1 の発育鶏卵の卵黄嚢内又は尿膜腔内に接種し、増殖後、感染鶏胚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。この場合、適当と認められた安定剤又は必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

原液について、3.6 の試験を行う。

なお、最終バルクについて 3.7 の試験を行う場合は、3.6.2 の試験を行わない。

2.3.3.2 培養細胞を用いる場合

プロダクションシードウイルスを 2.3.2 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、そのろ液又は遠心上清を原液とする。この場合、原液に適当と認められた安定剤又は適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、3.6 の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液を混合し、適当と認められた希釈液及び安定剤を加えて調製し、最終バルクとする。この場合、適当と認められた必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

小分製品が錠剤である製剤については、原液を混合して適当と認められた希釈液及び安定剤を加えて凍結乾燥し、適当と認められた賦形剤及び滑沢剤を加えて調製し、最終バルクとする。

粒状に凍結乾燥したものを小分製品とする製剤については、原液を規定量ずつ凍結乾燥させたものを最終バルクとする。

粒状に凍結乾燥した最終バルクについて、3.7 の試験を行う。

2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、凍結乾燥し、小分製品とする。

小分製品が錠剤である製剤については、最終バルクを錠剤に成型し、小分製品とする。

粒状に凍結乾燥したものを小分製品とする製剤については、規定量となる分量を小分容器に充填し、小分製品とする。

小分製品について、3.8 の試験を行う。

なお、粒状に凍結乾燥された最終バルクを小分容器に充填した製剤について、3.8.2 の試験を行わない。

3 試験法

3.1 製造用株の試験

3.1.1 マスターシードウイルスの試験

3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の 1.4.2.1.1.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.3 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.1、2.1 及び 2.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験

3.1.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験

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 1.1 及び 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。ただし、鶏脳脊髄炎ウイルスについて 3.1.1.4.2.2 に規定する製剤については、本試験を実施しなくてよい。

3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

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 1.1、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。ただし、鶏脳脊髄炎ウイルスについて 3.1.1.4.2.1 に規定する製剤については、3.2.10 の試験を実施しなくてもよい。

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 初代細胞の試験

3.3.1 マスタープライマリーセルシード(プロダクションプライマリーセルシード)の試験

3.3.1.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.2.4.2.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.1.2 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。

3.3.1.3 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。

3.4 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。

3.4.1 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。

3.4.2 鶏赤血球凝集試験

3.4.1 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。

3.5 培養細胞の試験

静置培養の場合は、個体別培養細胞の1%以上を、ファーメンター培養の場合は、個体別培養細胞の1 vol%以上又は500mL以上を対照培養細胞とし、これについて次の試験を行う。

3.5.1 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し、観察するとき、CPEを認めてはならない。

3.5.2 鶏赤血球凝集試験

3.5.1の試験最終日に培養液を採取し、0.5vol%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。

3.6 原液の試験

3.6.1 生菌数限度試験

一般試験法の生菌数限度試験法又は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。

3.6.2 ウイルス含有量試験

3.6.2.1 試験材料

3.6.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で10倍階段希釈し、各階段の希釈液を試料とする。

3.6.2.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格2.1.1の鶏胚初代細胞で、単層となったものを用いる。

3.6.2.2 試験方法

試料の0.2mLずつを4枚以上の培養細胞に接種し、37°Cで60分間静置吸着させた後、細胞維持用培養液(付記1)を加え、37°Cで6日間培養し、観察する。

3.6.2.3 判定

培養細胞にCPEを認めた場合を感染とみなし、TCID₅₀を算出する。検体のウイルス含有量は、1mL中10^{6.8}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。

3.7 最終バルクの試験

3.7.1 ウイルス含有量試験

3.7.1.1 試験材料

3.7.1.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で溶解したものを、鶏胚初代細胞浮遊液で10倍階段希釈し、各階段の希釈液を試料とする。

3.7.1.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格2.1.1の鶏胚初代細胞の細胞浮遊液を用いる。

3.7.1.2 試験方法

試料の0.2mLずつを96穴プレートの10穴以上に加え、37°Cで7日間培養し、観察する。

3.7.1.3 判定

培養細胞にCPEを認めた場合を感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

3.8 小分製品の試験

3.8.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、固有の色調を有する乾燥物でなければならない。完全に溶解したものは、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。

3.8.2 真空度試験

一般試験法の真空度試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.8.3 含湿度試験

一般試験法の含湿度試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.8.4 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。

3.8.5 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。

3.8.6 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。

3.8.7 ウイルス含有量試験

3.6.2 を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1羽当たり $10^{4.0}$ 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。

3.8.8 マーカー試験

3.8.8.1 試験材料

3.8.8.1.1 試料

試験品をリン酸緩衝食塩液を用いてウイルスが 0.1mL 中 1羽分となるように調製したものを試料とする。強毒伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスを 0.1mL 当たり $10^{4.0}$ EID₅₀ になるように調製したものを対照として用いる。

3.8.8.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞で、単層となったものを用いる。

3.8.8.2 試験方法

試料及び対照の 0.1mL ずつをそれぞれ 4 枚以上の培養細胞に接種し、37℃で 5～7 日間観察する。

3.8.8.3 判定

培養細胞に CPE を認めなければならない。この場合、対照を接種した培養細胞では、CPE を認めてはならない。

3.8.9 安全試験

3.8.9.1 試験材料

3.8.9.1.1 接種材料

試験品をリン酸緩衝食塩液を用いてウイルスが 0.2mL 当たり 5羽分含まれるように調製し、接種材料とする。

3.8.9.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 1～4 日齢の鶏を用いる。

3.8.9.2 試験方法

試験動物 10 羽を試験群、5 羽を対照群とする。

接種材料 0.2mL ずつを試験群に経口接種し、対照群とともに 5 週間観察し、試験最終日にファブリキウス嚢を剖検する。

3.8.9.3 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ない。また、剖検したときファブリキウス嚢の著しい萎縮を認めてはならない。

3.8.10 力価試験

3.8.10.1 試験材料

3.8.10.1.1 接種材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で 0.2mL 中 1羽分となるように調製したものを接種材料とする。

3.8.10.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 1～4 日齢の鶏を用いる。

3.8.10.1.3 中和試験用ウイルス

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞に接種し、培養した伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス D78 株又は適当と認められた株を用いる。

3.8.10.1.4 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞をシャーレで培養し、単層となったものを用いる。

3.8.10.2 試験方法

試験動物 10 羽に接種材料 0.2mL ずつを経口接種し、3 週間後に得られた各個体の血清について中和試験を行う。また非接種動物 3 羽を対照として、接種群と隔離して飼育し、3 週間後に得られた各個体の血清について中和試験を行う。

血清を非働化し、リン酸緩衝食塩液で 2 倍階段希釈する。各希釈血清と 0.1mL 中に 100～200PFU を含む中和試験用ウイルス液を等量混合し、4℃で 18～24 時間処理する。各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ 2 枚の培養細胞に接種し、37℃で 60 分間静置した後、第 1 次重層寒天培地(付記 2)を重層し、37℃で 2～3 日間静置培養する。その後、第 2 次重層寒天培地(付記 3)を重層し、37℃で更に 24 時間静置培養し、観察する。

3.8.10.3 判定

プラック数を 50%減少させる血清の最高血清希釈倍数を中和抗体価とする。

試験群の 80%以上が中和抗体価 200 倍以上でなければならない。この場合、対照群の中和抗体価は 10 倍以下でなければならない。

3.8.11 免疫抑制否定試験

3.8.11.1 試験材料

3.8.11.1.1 接種材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で 0.2mL 中 5 羽分となるように調製したものを接種材料とする。

3.8.11.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 1 ～ 4 日齢の鶏を用いる。

3.8.11.2 試験方法

試験動物 10 羽を試験群、10 羽を対照群とし、次のいずれかの試験を行う。

3.8.11.2.1 赤血球凝集抑制試験

接種材料 0.2mL ずつを試験群に皮下接種し、接種後 7 日目に B1 株の「ニューカッスル病生ワクチン」1 羽分を対照群と共に点鼻接種し、21 日目に採血し、ニューカッスル病ウイルスに対する赤血球凝集抑制反応を行う。

3.8.11.2.2 攻撃試験

接種材料 0.2mL ずつを試験群に経口接種し、接種後 14 日目に B1 株の「ニューカッスル病生ワクチン」1 羽分を対照群とともに点鼻接種する。点鼻接種後 21 日目に 1 mL 中 $10^{4.0}$ 致死量となるように調製した強毒ニューカッスル病ウイルス佐藤株を全羽数の筋肉内に 1 mL ずつ注射し、14 日間観察する。

3.8.11.3 判定

3.8.11.2.1 の赤血球凝集抑制反応試験では、試験群及び対照群ともに赤血球凝集抑制抗体が上昇し、その赤血球凝集抑制抗体価に有意差($P<0.05$)を認めてはならない。

3.8.11.2.2 の攻撃試験では、試験終了時、試験群及び対照群ともに 80%以上が異常なく耐過しなければならない。

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 細胞維持用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

牛血清 適 量

イーグル MEM 残 量

pH を 7.0～7.4 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 2 第 1 次重層寒天培地

1,000mL 中

寒天 8～10 g

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

牛血清 0～20 mL

イーグル MEM 残 量

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 3 第 2 次重層寒天培地

第 1 次重層寒天培地に 0.5w/v% ニュートラルレッド液を 2 vol% となるように加えたもの。

狂犬病組織培養不活化ワクチン（シード）

平成24年7月4日(告示第1622号)新規追加
令和2年6月30日(告示第1246号)一部改正
令和2年10月2日(告示第1865号)一部改正
令和3年5月17日(告示第798号)一部改正
令和 年 月 日(告示第 号)一部改正

1 定義

シードロット規格に適合した狂犬病培養細胞馴化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精製し、不活化したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1. 名称

狂犬病培養細胞馴化ウイルスRC・HL株

2.1.2 性状

3日齢以内の乳のみマウスの脳内に注射すると、発病して死亡させるが、3週齢以上のマウス、体重約300gのモルモット、体重約1.5kgの兎及び1.5か月齢の犬の脳内に注射しても、ほとんど病原性を示さない。

HmLu細胞で、CPEを伴って増殖する。

2.1.3 マスターシードウイルス

2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、HmLu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 ワーキングシードウイルス

2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、HmLu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。

2.1.5 プロダクションシードウイルス

2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、HmLu細胞で増殖させる。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して-70℃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 培養細胞

HmLu細胞を用いる。

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 マスターセルシード

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の培養液で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターセルシードは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して-70℃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。浮遊培養を使う場合は、細胞数の増加で集団ダブリングタイムの約3倍で継代1代

とみなす。

2.2.4 ワーキングセルシード

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の培養液で増殖及び継代する。

ワーキングセルシードは、凍結して-70℃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 プロダクションセルシード

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の培養液で増殖させる。

プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して-70℃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 プロダクションセルシードの培養

単層培養法の場合は1回に処理し培養した細胞を、また、浮遊培養法の場合は最終ファーマンター培養細胞を、それぞれ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。

2.3.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを培養細胞に接種し、32～34℃で培養し、CPE又はGたん白産生量の極期に採取した培養液の遠心上清又はろ液をウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.3の試験を行う。

2.3.3 精製

ウイルス浮遊液をマクロゴール又は適当と認められた方法で精製濃縮し、精製ウイルス浮遊液とする。浮遊培養法の場合は、2.3.4の不活化操作を行った後、精製してもよい。

2.3.4 不活化

精製ウイルス浮遊液をβ-プロピオラクトン又は適当と認められた方法で不活化し、不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.4の試験を行う。

2.3.5 原液の調製

不活化ウイルス液をリン酸緩衝食塩液で濃度調整し、原液とする。浮遊培養法の場合には、不活化ウイルス液又は不活化操作を行った精製ウイルス浮遊液に適当と認められた保存剤を加え、原液とする。

原液について、3.5の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液を混合し、浮遊培養法の場合にはリン酸緩衝食塩液で濃度調整し、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、小分製品とする。

小分製品について、3.6の試験を行う。

3 試験法

3.1 製造用株の試験

3.1.1 マスターシードウイルスの試験

3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 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

猫白血病ウイルス／猫肉腫ウイルス及びリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスについて、一

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

牛ウイルス性下痢ウイルス、犬パルボウイルス、猫汎白血球減少症ウイルス及び日本脳炎ウイルスについて、動生剤基準の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 効力及び免疫原性確認試験

ワーキングシードウイルスにおいて、効力及び免疫原性確認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。

3.1.1.5.1 モルモットでの試験

3.1.1.5.1.1 試験材料

3.1.1.5.1.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で溶解し、1 mL中のウイルス含有量を約 $10^{7.0}$ TCID₅₀となるように濃度を調整後、 β -プロピオラクトンを0.0125vol%になるように加えて、4℃で48時間感作し、ウイルスを不活化したものを試料とする。

3.1.1.5.1.1.2 試験動物

体重約400gのモルモットを用いる。

3.1.1.5.1.1.3 攻撃ウイルス

狂犬病ウイルスCVS株（付記1）を用いる。モルモット咬筋内注射法で、0.2mL中10LD₅₀のウイルスを含むように、2 vol%馬血清加生理食塩液を用いて濃度を調整し、攻撃ウイルスとする。

3.1.1.5.1.2 試験方法

試料を0.5mLずつ試験動物10匹の内股部皮下に注射し、試験群とする。10匹を無処置対照群とする。注射後21日目に、両群のそれぞれに攻撃ウイルスを0.2mLずつ咬筋内注射し、14日間臨床観察する。

3.1.1.5.1.3 判定

発症しなかったものを耐過とみなし、耐過率を算出する。

試験群の耐過率は、70%以上でなければならない。この場合、対照群の耐過率は、20%以下でなければならない。

3.1.1.5.2 犬での試験

3.1.1.5.2.1 試験材料

3.1.1.5.2.1.1 試料

3.1.1.5.1.1.1の試料を用いる。

3.1.1.5.2.1.2 試験動物

狂犬病ウイルスに対する抗体陰性の約4か月齢の犬を用いる。

3.1.1.5.2.2 試験方法

試料1 mLずつを試験動物3頭の皮下に注射し、1か月後にそれぞれから採血し、中和抗体価を狂犬病培養細胞馴化ウイルスRC・HL株を用いて測定する。

3.1.1.5.2.3 判定

試験群の中和抗体価は、幾何平均値10倍以上でなければならない。

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。

3.1.2.3 効力及び免疫原性確認試験

3.1.1.5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、マスターシードウイルスにおいて、効力及び免疫原性確認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。

3.1.3 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

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

猫白血病ウイルス／猫肉腫ウイルス及びリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2及び3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.5.2.2 個別ウイルス否定試験

牛ウイルス性下痢ウイルス、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、動生剤基準の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 ウイルス培養液の試験

3.3.1 ウイルス含有量試験

3.3.1.1 試験材料

3.3.1.1.1 試料

検体を細胞増殖用培養液（付記2）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.1.1.2 培養細胞

鶏胚初代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2日間静置培養する。2日目に培養液をウイルス増殖用培養液1（付記3）に交換し、32℃で8日間静置

培養し、観察する。ただし、96穴マイクロプレートを用いる場合は、試料25 μ Lずつを10穴の培養細胞に接種した後、ウイルス増殖用培養液2（付記4）を0.2mLずつ加え、37℃で10日間培養し、観察する。

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、単層培養法の場合には1 mL中10^{7.5}TCID₅₀以上であり、浮遊培養法の場合には1 mL中10^{7.0}TCID₅₀以上でなければならない。

3.4 不活化ウイルス液の試験

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 不活化試験

3.4.2.1 試験材料

3.4.2.1.1 注射材料及び接種材料

検体を注射材料及び接種材料とする。

3.4.2.1.2 試験動物及び培養細胞

3日齢以内の乳のみマウス及び鶏胚初代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

。

ただし、鶏胚初代細胞は、培養瓶に10mLずつ分注し、面積が約36cm²の単層となったものを用いる。

3.4.2.2 試験方法

注射材料0.02mLずつを試験動物10匹の脳内に注射し、14日間観察する。

接種材料2 mLずつを培養細胞4本以上に接種し、37℃で60分間吸着させた後、接種材料を除去し、ウイルス増殖用培養液1を10mLずつ加え、37℃で10日間静置培養し、観察する。

3.4.2.3 判定

試験動物に狂犬病ウイルスによる症状を認めず、培養細胞にCPEを認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

3.5 原液の試験

3.5.1 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。

3.5.2 力価試験

3.5.2.1 試験材料

検体、参照ワクチン（付記5）、抗体吸着プレート（付記6）及び酵素標識抗体（付記7）を用いる。

3.5.2.2 試験方法

検体6 mLにリン酸水素二ナトリウム十二水和物327.6mg、リン酸二水素カリウム38.6mgを加えて、よく振とう混和する。参照ワクチンは、動物医薬品検査所が指定した方法により溶解する。これらの検体及び参照ワクチンをそれぞれ30～60秒間超音波処理した後、約200Gで5分間遠心する。各遠心上清を、あらかじめ1 w/v%牛血清アルブミン加リン酸緩衝食塩液で前処理した450nmのメンブランフィルターでろ過し、そのろ液の4 mLについてゲルろ過（付記8）を行う。第1画分のピークを含む8 mLを採取し、抗原希釈用液（付記9）を用いて原液（高用量）、2倍希釈液（中用量）及び4倍希釈液（低用量）を作製する。各抗原液のそれぞれ100 μ Lを抗体吸着プレートの各2穴に加える。抗原希釈液を100 μ Lずつ2穴に加えたものを陰性対照穴とする。プレートを密閉し、37℃で60分間反応させる。洗浄液（付記10）で5回洗浄した後、酵素標識抗体の100 μ Lずつを各穴に入れ、プレートを密閉し、遮光して37℃で90分間反応させる。洗浄液で5回洗浄した後、基質・発色液（付記11）の100 μ Lずつを各穴に加え、プレートを遮光して常温で30分間反応させる。反応終了後直ちに、反応停止液（付記12）の50 μ Lずつを各穴に加え、主波長492nm及び副波長630nmでそれぞれ吸光度を測定する。検体及び参照ワクチンを加えた各穴の吸光度値から陰性対照穴の吸光度値を引いた値をそれぞれの抗原の吸光度値とする。ゲルろ過後の各抗原液について2回繰り返し測定を行った後、検体及び参照ワクチンの各吸光度値から相対力価の計算方法（付記13）により参照ワクチンに対する相対力価を算出する。

3.5.2.3 判定

- 検体の参照ワクチンに対する相対力価は、0.683以上でなければならない。
- 3.6 小分製品の試験
- 3.6.1 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。
- 3.6.2 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。
- 3.6.3 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。
- 3.6.4 チメロサル定量試験
- 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。
- 3.6.5 マクロゴール定量試験
- 一般試験法のマクロゴール定量法を準用して試験するとき、マクロゴールの含有量は、1 mL中0.5mg以下でなければならない。
- 3.6.6 たん白窒素定量試験
- 一般試験法のたん白窒素定量法を準用して試験するとき、たん白窒素の含有量は、1 mL中100 μ g以下でなければならない。
- 3.6.7 安全試験
- 3.6.7.1 試験材料
- 3.6.7.1.1 注射材料
- 試験品を注射材料とする。
- 3.6.7.1.2 試験動物
- 体重5～10kgの犬及び体重約1 kgの猫を用いる。
- 3.6.7.2 試験方法
- 注射材料5 mLずつを2頭の犬に、2 mLずつを2頭の猫に皮下注射し、10日間臨床観察する。
- 3.6.7.3 判定
- 観察期間中、試験動物に異常を認めてはならない。
- 3.6.8 力価試験
- 3.5.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。
- 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。

付記1 狂犬病ウイルスCVS株

狂犬病ウイルスCVS株を3週齢マウスの脳内に接種し、症状を示したマウスの脳を採取し、2 vol%馬血清加生理食塩液を用いて乳剤としたもの。

ウイルス含有量は、体重約400gのモルモットの咬筋内注射法で測定するとき、0.2mL中 $10^{2.5}$ LD₅₀以上でなければならない。

付記2 細胞増殖用培養液

1,000mL中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
牛胎子血清又は子牛血清	50 mL
イーグルMEM	残 量

pHを7.1～7.3に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記3 ウイルス増殖用培養液1

1,000mL中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
イーグルMEM	残 量

pHを7.4～7.6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 ウイルス増殖用培養液 2

1,000mL中

ブドウ糖 5 g

L-グルタミン 0.4 g

牛胎子血清又は子牛血清 5~25 mL

イーグルMEM 残 量

pHを7.1~7.3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 参照ワクチン

動物医薬品検査所が配布する参照狂犬病組織培養不活化ワクチンを動物医薬品検査所が指定した濃度となるように調整したもの。

付記 6 抗体吸着プレート

狂犬病ウイルスのGたん白を認識するモノクローナル抗体を精製したものについて動物医薬品検査所が指定した濃度に調整した後、96穴プレートの各穴に100 μ Lずつ加えて密閉し、37℃で18時間吸着させたもの。

抗体吸着プレートはリン酸緩衝食塩液で4回洗浄した後使用する。

付記 7 酵素標識抗体

狂犬病ウイルスのGたん白を認識するモノクローナル抗体を、ペルオキシダーゼで標識したものについて、下記の希釈用液で動物医薬品検査所が指定した濃度に調整したもの。

100mL中

牛血清アルブミン 0.3 g

ポリソルベート20 0.05 mL

リン酸緩衝食塩液 残 量

450nmメンブランフィルターでろ過する。

付記 8 ゲルろ過

動物医薬品検査所が指定するカラムを用い、抗原希釈用液を移動相とし、流速毎分1 mLで液体クロマトグラフ法により画分を分取する。

検出波長は、280nmとする。

付記 9 抗原希釈用液

1,000mL中

リン酸水素二ナトリウム十二水和物 54.66 g

リン酸二水素カリウム 6.44 g

水 残 量

pHを7.2に調整後、450nmメンブランフィルターでろ過する。

付記10 洗浄液

リン酸緩衝食塩液にポリソルベート20を0.05vol%となるように加えたもの。

付記11 基質・発色液

1,000mL中

クエン酸 21.0 g

無水リン酸水素二ナトリウム 28.4 g

水 残 量

溶解した液を450nmメンブランフィルターでろ過する。その液20mLにo-フェニレンジアミン二塩酸塩10mgを加えて溶解する。使用直前に過酸化水素(30)を5 μ L添加する。

付記12 反応停止液

水1,000mLに硫酸150mLを加えたもの。

付記13 相対力価の計算方法

1 Validityの検定

得られたそれぞれの吸光度値を1,000倍し、常用対数に変換後、参照ワクチン及び検体について各用量の合計値を求め、次式の計算を行う。ただし、参照ワクチンの低用量を S_1 、中用量を S_2 、高用量を S_3 とし、検体の低用量を T_1 、中用量を T_2 、高用量を T_3 とする。

$$\text{検体差SPa}=(S_1+S_2+S_3)-(T_1+T_2+T_3)$$

$$\text{直線性SPb}=(S_3-S_1)+(T_3-T_1)$$

$$\text{曲線性SPc}=[(S_1+S_3)-2S_2]+[(T_1+T_3)-2T_2]$$

$$\text{直線非平行性SPb'}=(S_3-S_1)-(T_3-T_1)$$

$$\text{曲線非平行性SPc'}=[(S_1+S_3)-2S_2]-[(T_1+T_3)-2T_2]$$

上記の式で求めたSPbが0.50以上、SPcの絶対値が0.86以下、SPb'の絶対値が0.49以下及びSPc'の絶対値が0.86以下である場合は、Validityの検定に適合する。

2 相対力価の計算

1のValidityの検定で適合と判定された場合は、次式により相対力価を求める。

$$M=-(4 \times \text{SPa} \times \log 2) \div (3 \times \text{SPb})$$

さらに、Mの真数(Mの逆対数 10^M)を求めることにより、検体の参照ワクチンに対する相対力価を算出する。

$$P=10^M$$