3　試験

3.1　ワーキング・セル・バンクの試験

ワーキング・セル・バンクについて、次の試験を行う。

3.1.1　純度試験

細胞破砕液からＤＮＡを抽出し、適当な制限酵素及びＤＮＡプローブを用い、ＤＮＡフィンガープリント法により試験するとき、製造用細胞株以外の細胞に由来するＤＮＡ断片を検出してはならない。

3.1.2　無菌試験

細胞破砕液を試料として一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、及び次の試験を行うとき、適合しなければならない。

3.1.2.1　マイコプラズマ否定試験

3.1.2.1.1　培養法

適当な平板培地及び液体培地を、それぞれ２種類ずつ試験に用いる。平板培地各10枚に、１枚当たり試料0.25mLを接種し、それぞれの培地の半数を35～37℃において５～10vol%の炭酸ガスを含む空気で、残りの半数を35～37℃において５～10vol%の炭酸ガスを含む窒素ガスで、それぞれ21日間以上培養し、陰性及び陽性対照と比較観察するとき、マイコプラズマの増殖を認めてはならない。また、50mL入り液体培地各２本に、１本当たり試料５mLを接種し、それぞれの培地の半数を35～37℃において５～10vol%の炭酸ガスを含む空気で、残りの半数を35～37℃において５～10vol%の炭酸ガスを含む窒素ガスで、それぞれ14日間以上培養する。これらの液体培地の培養においては、培養３日目については平板培地を４枚ずつ、培養７日目については平板培地を２枚ずつ、培養14日目については平板培地を４枚ずつ、それぞれ用意し、各平板培地に培養液を0.25mLずつ移植する。これらの平板培地を、液体培地を培養したときと同じ条件で21日間以上培養し、陰性及び陽性対照と比較観察するとき、マイコプラズマの増殖を認めてはならない。

3.1.2.1.2　ＤＮＡ染色法

Vero細胞に試料を接種し、適当な条件下で培養した後、ビスベンズイミド等の適当な試薬により染色し、紫外落射蛍光下で陰性及び陽性対照と比較観察するとき、陽性像を認めてはならない。

3.1.2.2　スピロプラズマ否定試験

3.1.2.2.1　培養法

適当な平板培地及び液体培地を、それぞれ３種類ずつ試験に用いる。平板培地各２枚に、１枚当たり試料0.2mLを接種し、30～34℃において好気的条件で21日間培養し、それぞれの平板培地について集落の形成の有無を陰性及び陽性対照と比較観察するとき、スピロプラズマの増殖を認めてはならない。また、100mL入り液体培地各１本に、１本当たり試料10mLを接種し、30～34℃において好気的条件で35日間培養する。これらの液体培地の培養においては、培養３日目、７日目及び14日目に、各液体培地について平板培地を２枚ずつ用意し、各平板培地に培養液を0.2mLずつ移植する。移植後、液体培地と同じ条件で培養する。それぞれの平板培地について、集落の形成の有無を陰性及び陽性対照と比較観察するとき、スピロプラズマの増殖を認めてはならない。また、培養期間中、それぞれの液体培地のpH変化を認めてはならない。

3.1.2.2.2　ＤＮＡ染色法

Sf―９細胞に試料を接種し、適当な条件下で培養する。この培養液を新鮮なSf―９細胞に接種して培養した後、ビスベンズイミド等の適当な試薬により染色し、紫外落射蛍光下で陰性及び陽性対照と比較観察するとき、陽性像を認めてはならない。

3.1.3　外来性ウイルス等否定試験

細胞破砕液を試料として次の試験を行うとき、適合しなければならない。

3.1.3.1　培養細胞接種試験

Vero細胞、ＭＲＣ―５細胞、ＢＨＫ―21細胞及びＢＴＩ―ＴＮ―５Ｂ１―４細胞に試料を接種し、14日以上培養するとき、細胞変性を認めてはならない。また、培養終了時にモルモット赤血球を添加するとき、赤血球吸着を認めてはならない。

3.2　培養細胞の試験

ウイルス培養と同じ条件下で培養したウイルス非接種細胞を対照培養細胞とする。培養期間中、対照培養細胞を14日間以上観察するとき、外来性ウイルス等による細胞変性を認めてはならない。また、培養終了時にモルモット赤血球を添加するとき、赤血球吸着を認めてはならない。

3.3　ワーキング・シードの試験

ワーキング・シードについて、次の試験を行う。

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、並びに3.1.2.1、3.1.2.2及び次の試験を行うとき、適合しなければならない。

3.3.1.1　結核菌否定試験

適当な培地を用い、検体を接種して37℃で56日間培養するとき、結核菌の発育を認めてはならない。

3.3.2　外来性ウイルス等否定試験

3.1.3.1及び次の試験を行うとき、適合しなければならない。

3.3.2.1　成熟マウス接種試験

15～20ｇの体重のマウスについて、１匹当たり細胞破砕液を脳内に0.03mL及び腹腔内に0.5mLずつ、10匹以上に接種して、21日間以上観察する。この間、いずれのマウスも外来性の病原体による感染を示してはならず、マウスの80%は生き残らなければならない。試験開始後24時間以降に死亡し、又は異常を示したすべてのマウスについて剖検を行い、顕微鏡観察するとき、感染所見を認めてはならない。また、15～20ｇの体重のマウスについて、適当な組織懸濁液を脳内及び腹腔内に５匹以上に継代接種して21日間観察するとき、有害反応を認めてはならない。

3.3.2.2　乳飲みマウス接種試験

生後24時間未満の乳飲みマウスについて、１匹当たり細胞破砕液を脳内に0.01mL及び腹腔内に0.1mLずつ、20匹以上に接種して、14日間以上観察する。この間、いずれのマウスも外来性の病原体による感染を示してはならず、マウスの80%は生き残らなければならない。試験開始後24時間以降に死亡し、又は異常を示したすべてのマウスについて剖検を行い、顕微鏡観察するとき、感染所見を認めてはならない。また、生後24時間未満の乳飲みマウスについて、適当な組織懸濁液を脳内及び腹腔内に５匹以上に継代接種して14日間観察するとき、有害反応を認めてはならない。

3.3.2.3　モルモット接種試験

350～450ｇの体重のモルモットについて、１匹当たり細胞破砕液を脳内に0.1mL及び腹腔内に５mLずつ、５匹以上に接種して、42日間以上観察する。この間、いずれのモルモットも外来性の病原体による感染を示してはならず、モルモットの80%は生き残らなければならない。試験開始後24時間以降に死亡し、又は異常を示したすべてのモルモットについて剖検を行い、顕微鏡観察するとき、感染所見を認めてはならない。観察期間後、生存しているモルモットを安楽死させて、同様に検証する。

3.3.2.4　レトロウイルス否定試験

検体をヒト293細胞に接種し、35～39℃で30日間以上かつ８継代以上培養した後、上清の逆転写酵素活性を高感度逆転写酵素活性試験（ＰＥＲＴ）法により測定するとき、陰性でなければならない。

3.3.3　バキュロウイルス含量試験

Sf―９細胞を用いて、プラーク法によりバキュロウイルス含量を測定するとき、$10^{7.0}$ＰＦＵ／mL以上でなければならない。

3.4　感染細胞浮遊液の試験

感染細胞浮遊液について、次の試験を行う。

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、並びに3.1.2.1.1及び3.3.1.1の試験を行うとき、適合しなければならない。

3.4.2　外来性ウイルス等否定試験

3.1.3.1の試験を行うとき、適合しなければならない。