

ワクチン（シードロット製剤を除く）の部の牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢－粘膜病 2 価・牛パラインフルエンザ・牛 R S ウイルス感染症・牛アデノウイルス感染症混合生ワクチンの項を次のように改める。

牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢－粘膜病 2 価・牛パラインフルエンザ・牛 R S ウイルス感染症・牛アデノウイルス感染症混合生ワクチン

弱毒牛伝染性鼻気管炎ウイルス、弱毒牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 1 型及び 2 型、弱毒牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス、弱毒牛 R S ウイルス並びに弱毒牛アデノウイルス（7 型）を培養細胞でそれぞれ増殖させて得たウイルス液を混合し、凍結乾燥したワクチンである。

1 小分製品の試験

1.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

1.2 迷入ウイルス否定試験

一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1、2.4.1 及び 2.4.2 により試験を行い、これらに適合しなければならない。

ただし、中和用血清は、抗牛伝染性鼻気管炎ウイルス血清（付記 1）、抗牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス血清（付記 2 及び 3）、抗牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス血清（付記 4）、抗牛 R S ウイルス血清（付記 5）及び抗牛アデノウイルス（7 型）血清（付記 6）を非働化したものを用いる。

1.3 ウイルス含有量試験

1.3.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス

1.3.1.1 試験材料

1.3.1.1.1 試料

試験品中の牛伝染性鼻気管炎ウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記 2 から 6 まで）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（付記 7）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

1.3.1.1.2 培養細胞

牛精巢継代細胞を小試験管に 1 ～ 3 日間培養し、単層となったものを用いる。

1.3.1.2 試験方法

試料 0.1mL をそれぞれ 4 本以上の培養細胞に接種し、37℃で 60 分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を 1 mL ずつ加え、34 ～ 36℃で 7 日間回転培養し、観察する。

1.3.1.3 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。

試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たり 10^{4.0}TCID₅₀ 以上でなければならない。

1.3.2 牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 1 型

1.3.2.1 試験材料

1.3.2.1.1 試料

試験品中の牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 1 型以外のウイルスを各抗血清（付記 1 及び 3 から 6 まで）を非働化したもので中和したものを細胞増殖用培養液（付記 8）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

1.3.2.1.2 培養細胞

牛精巢継代細胞浮遊液を用いる。

1.3.2.2 試験方法

試料 0.1mL をそれぞれ小試験管に 0.5mL ずつ分注した培養細胞 4 本以上に接種し、37℃で 5～7 日間静置培養し、単層形成が良好であることを確認する。培養液を除き、1 mL 中牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 1 型 Nose 株を $10^{5.0}$ TCID₅₀ 又は 1 mL 中ニューカッスル病ウイルス TCND 株若しくは宮寺株を $10^{4.0}$ EID₅₀ 含んだ細胞増殖用培養液を 1 mL ずつ加え、更に 34～36℃で 5～7 日間回転培養し、観察する。

1.3.2.3 判定

干涉法にあつては、培養細胞に CPE の抑制されたものを、また、END 法にあつては、CPE の発現し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 $10^{3.0}$ TCID₅₀ 以上でなければならない。

1.3.3 牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 2 型

1.3.2 を準用して試験を行う。判定に当たっては、試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たり $10^{3.0}$ TCID₅₀ 以上でなければならない。

ただし、試験品中の牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 2 型以外のウイルスを各抗血清（付記 1、2 及び 4 から 6 まで）を非働化したもので中和したものを細胞増殖用培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

1.3.4 牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス

1.3.4.1 試験材料

1.3.4.1.1 試料

試験品中の牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記 1 から 3 まで、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。

1.3.4.1.2 培養細胞

牛腎継代細胞を小試験管に 1～3 日間培養し、単層となったものを用いる。

1.3.4.2 試験方法

試料 0.1mL をそれぞれ 4 本以上の培養細胞に接種し、37℃で 60 分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を 1 mL ずつ加え、34～36℃で 7 日間回転培養し、観察する。

1.3.4.3 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。

1.3.5 牛 R S ウイルス

1.3.5.1 試験材料

1.3.5.1.1 試料

試験品中の牛 R S ウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記 1 から 4 まで及び 6）を非働化したもので中和したものを牛 R S ウイルス増殖用培養液（付記 1 2）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

1.3.5.1.2 培養細胞

Vero 細胞を小試験管に 1～3 日間培養し、単層となったものを用いる。

1.3.5.2 試験方法

試料 0.1mL をそれぞれ 4 本以上の培養細胞に接種し、37℃で 60 分間吸着させた後、牛 R S ウイルス増殖用培養液を 1 mL ずつ加え、34℃で 14 日間回転培養し、観察する。

1.3.5.3 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。

1.3.6 牛アデノウイルス（7型）

1.3.6.1 試験材料

1.3.6.1.1 試料

試験品中の牛アデノウイルス（7型）以外のウイルスを各抗血清（付記1から5まで）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。

1.3.6.1.2 培養細胞

牛精巢継代細胞を小試験管に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

1.3.6.1.3 赤血球浮遊液

牛、羊又はやぎの赤血球をゼラチン・アルブミン加ペロナール緩衝食塩液（以下この項において「VBS」という。）（付記9）に0.3vol%に浮遊させたものを用いる。

1.3.6.2 試験方法

試料0.1mLをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を1mLずつ加え、34～36℃で7日間回転培養し、観察する。培養終了後、培養細胞を4℃に冷却し、これに4℃に冷却した赤血球浮遊液0.25mLを加え、4℃で1夜静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

1.3.6.3 判定

赤血球凝集が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^{3.0}TCID₅₀以上でなければならない。

1.4 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性否定試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

1.5 安全試験

1.5.1 牛注射試験

1.5.1.1 試験材料

1.5.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.5.1.1.2 試験動物

体重100～200kgの牛を用いる。

1.5.1.2 試験方法

注射材料1頭分を試験動物の筋肉内に注射し、14日間観察する。

1.5.1.3 判定

観察期間中、軽い発熱（40.5℃以下）を認めても3日間以上継続せず、その他の異常を認めてはならない。

1.5.2 乳のみマウス注射試験

1.5.2.1 試験材料

1.5.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.5.2.1.2 試験動物

3日齢以内の乳のみマウスを用いる。

1.5.2.2 試験方法

注射材料0.01mLずつを10匹の試験動物の脳内に注射し、14日間観察する。

1.5.2.3 判定

観察期間中、異常を認めてはならない。

事故のため試験動物が半数未満になった場合は、試験を反復する。

1.6 力価試験

1.6.1 牛伝染性鼻気管炎力価試験

1.6.1.1 試験材料

1.6.1.1.1 試験動物

1.5.1 の試験に用いた動物を用いる。

1.6.1.1.2 中和試験用ウイルス

牛腎又は牛精巢継代細胞で増殖させた強毒牛伝染性鼻気管炎ウイルス No.758 株を用いる。

1.6.1.1.3 培養細胞

牛精巢継代細胞浮遊液を約 27cm² のシャーレに 5 mL ずつ分注し、1～3 日間培養し単層となったものを用いる。

1.6.1.2 試験方法

1.5.1 の試験終了後、14 日目に得られた血清について、中和試験を行う。

被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液で 2 倍階段希釈する。各希釈血清 0.5mL と 0.2mL 当たり約 100PFU を含む中和試験用ウイルス液 0.5mL とを混合し、37℃で 60 分間処理する。この混合液 0.2mL ずつをそれぞれ 2 枚の培養細胞に接種し、37℃で 60 分間吸着させた後、混合液を除き、第 1 次重層寒天培地（付記 10）5 mL を加え、37℃、5 vol %炭酸ガス下で 3～5 日間培養した後、第 2 次重層寒天培地（付記 11）3 mL を加え、更に 24 時間培養した後、ブラック数を算定する。また、中和試験用ウイルス液 0.2mL ずつを培養細胞に接種し、同様に処理したもの（以下この項において「ウイルス対照」という。）について、ブラック数を算出する。

1.6.1.3 判定

ブラック数がウイルス対照の 50 %以下に減少した血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

試験動物の中和抗体価は、2 倍以上でなければならない。

1.6.2 牛ウイルス性下痢－粘膜病力価試験

1.6.2.1 試験材料

1.6.2.1.1 試験動物

1.5.1 の試験に用いた動物を用いる。

1.6.2.1.2 中和試験用ウイルス

牛精巢継代細胞で増殖させた強毒牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 1 型 Nose 株及び牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 2 型 KZ-91-cp 株を用いる。

1.6.2.1.3 培養細胞

牛精巢継代細胞浮遊液を用いる。

1.6.2.2 試験方法

1.5.1 の試験終了後、14 日目に得られた血清について、中和試験を行う。

被検血清を非働化した後、細胞増殖用培養液で 2 倍階段希釈する。各希釈血清 0.5mL と 0.1mL 当たり約 200TCID₅₀ を含む中和試験用ウイルス液 0.5mL とを混合し、37℃で 60 分間処理する。この混合液 0.1mL ずつを、小試験管に 0.5mL ずつ分注した細胞 4 本ずつに接種する。37℃で 4～5 日間静置培養し、観察する。

1.6.2.3 判定

培養細胞の 2 本以上に CPE の抑制を認めた血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

試験動物の中和抗体価は、牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 1 型及び 2 型に対してそれぞれ 2 倍以上でなければならない。

1.6.3 牛パラインフルエンザ力価試験

1.6.3.1 試験材料

1.6.3.1.1 接種材料

試験品を注射材料とする。

1.6.3.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

1.6.3.1.3 赤血球凝集抗原

牛腎継代細胞で増殖させた牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス BNi-1 株を用いる。

1.6.3.2 試験方法

接種材料 0.2mL ずつを 5 匹の試験動物の鼻腔内に接種し、21 日目に得られた各個体の血清について赤血球凝集抑制試験を行う。

被検血清 0.2mL に 25w/v %カオリン加生理食塩液 0.6mL を加え、15 ～ 25 °C で 20 分間処理した後、1,700 G で 20 分間遠心し、その上清を VBS を用いて 2 倍階段希釈する。各希釈血清 0.2mL に 4 単位の赤血球凝集抗原 0.2mL を加え、37 °C で 60 分間処理した後、VBS で濃度を調整した 0.3vol %モルモット赤血球浮遊液 0.2mL を加え、4 °C で 1 夜静置し、観察する。

1.6.3.3 判定

赤血球凝集を阻止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。

赤血球凝集抑制抗体価 8 倍以上を赤血球凝集抑制抗体陽性とする。

試験動物の赤血球凝集抑制抗体陽性率は、80 % 以上でなければならない。

1.6.4 牛 R S ウイルス感染症力価試験

1.6.4.1 試験材料

1.6.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.6.4.1.2 試験動物

体重約 100g のハムスターを用いる。

1.6.4.1.3 中和試験用ウイルス

牛腎継代細胞で増殖させた牛 R S ウイルス NMK7 株を用いる。

1.6.4.1.4 培養細胞

Vero 細胞を小試験管に 3 ～ 4 日間培養し、単層となったものを用いる。

1.6.4.2 試験方法

注射材料 2 mL ずつを 5 匹の試験動物に 14 日間隔で 2 回腹腔内に注射し、第 2 回目の注射後 14 日目に得られた各個体の血清について中和試験を行う。

被検血清を非動化した後、牛 R S ウイルス増殖用培養液で 2 倍階段希釈する。希釈血清 0.5mL と 0.1mL 当たり約 200TCID₅₀ を含む中和試験用ウイルス 0.5mL とを混合し、22 °C で 24 時間処理する。この混合液 0.1mL ずつを 4 本の培養細胞に接種し、37 °C で 60 分間静置吸着させた後、牛 R S ウイルス増殖用培養液を 1 mL ずつ加え、34 °C で 10 日間回転培養し、観察する。

1.6.4.3 判定

培養細胞の 2 本以上に CPE の抑制を認めた血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。中和抗体価 2 倍以上を中和抗体陽性とする。

試験動物の中和抗体陽性率は、80 % 以上でなければならない。

1.6.5 牛アデノウイルス感染症力価試験

1.6.5.1 試験材料

1.6.5.1.1 試験動物

1.5.1 の試験に用いた動物を用いる。

1.6.5.1.2 赤血球凝集抗原

牛精巢継代細胞で増殖させた牛アデノウイルス（7 型）袋井株を用いる。

1.6.5.1.3 赤血球浮遊液

1.3.6.1.3 の赤血球浮遊液を用いる。

1.6.5.2 試験方法

1.5.1 の試験終了後、14 日目に得られた血清について、赤血球凝集抑制試験を行う。

被検血清を非働化した後、VBS で5 倍に希釈する。希釈血清に 25w/v %カオリン加生理食塩液を等量加え、15 ～ 25℃で 20 分間処理した後、1,700 Gで 20 分間遠心し、その上清を VBS を用いて 2 倍階段希釈する。各希釈血清 0.2mL に 4 単位の赤血球凝集抗原 0.2mL を加え、4℃で 1 夜処理した後、4℃に冷却した赤血球浮遊液 0.2mL を加え、4℃で 1 夜静置し、観察する。

1.6.5.3 判定

赤血球凝集を阻止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。

試験動物の赤血球凝集抑制抗体価は、20 倍以上でなければならない。

付記 1 抗牛伝染性鼻気管炎ウイルス血清

強毒牛伝染性鼻気管炎ウイルス No.758 株で免疫した兎の血清であって、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 2 抗牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 1 型血清

強毒牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス No.12 株で免疫した兎の血清であって、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 3 抗牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 2 型血清

強毒牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス KZ-91-ncp 株で免疫した兎の血清であって、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 4 抗牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス血清

強毒牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス BN_i-1 株で免疫した兎の血清であって、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 抗牛 R S ウイルス血清

強毒牛 R S ウイルス NMK7 株で免疫した兎の血清であって、検体又は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 抗牛アデノウイルス（7 型）血清

強毒牛アデノウイルス（7 型）袋井株で免疫した兎の血清であって、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 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 ～ 100 mL

イーグル MEM

残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.2 ～ 7.6 に調整する。

血清は、牛伝染性鼻気管炎ウイルス、牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス、牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス、牛 R S ウイルス及び牛アデノウイルス（7 型）に対して抗体陰性のものを用いる。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 8 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 50 ～ 100 mL

イーグル MEM 残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ～ 7.2 に調整する。

血清は、牛伝染性鼻気管炎ウイルス、牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス、牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス、牛 R S ウイルス及び牛アデノウイルス（7 型）に対して抗体陰性のものを用いる。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 9 ゼラチン・アルブミン加ベロナール緩衝食塩液

A 液 ベロナール緩衝食塩液

1,000mL 中

塩化ナトリウム 8.5 g

バルビタール 0.575 g

バルビタールナトリウム 0.375 g

無水塩化カルシウム 0.028 g

塩化マグネシウム六水和物 0.168 g

水 残 量

B 液 1 w/v %ゼラチン液

100mL 中

精製ゼラチン

水

使用時加温溶解する。

C 液 5 w/v %牛血清アルブミン液

100mL 中

牛血清アルブミン 5.0 g

水 残 量

使用時に、A 液 200mL に B 液 0.2mL 及び C 液 4 mL を加えて調製し、用いる。

付記 10 第 1 次重層寒天培地

1,000mL 中

イーグル MEM 880 mL

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

寒天 8.0 g

牛胎子血清 20 mL

水 残 量

血清は、牛伝染性鼻気管炎ウイルスに対する中和抗体陰性のものを用いる。

付記 11 第 2 次重層寒天培地

1,000mL 中

イーグル MEM 900 mL

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

寒天 8.0 g

ニュートラルレッド 0.05 g

水	残 量
付記 12 牛R S 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
Lーグルタミン	0.292g
ブドウ糖	1.0g
Lーグルタミン酸水素ナトリウム一水和物	5.0g
酵母エキス	0.5g
牛胎子血清	10 ～ 20 mL
イーグル MEM	残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.2 ～ 7.6 に調整する。

血清は、牛伝染性鼻気管炎ウイルス、牛ウイルス性下痢ー粘膜病ウイルス、牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス、牛R S ウイルス及び牛アデノウイルス（7 型）に対して抗体陰性のものを用いる。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。