

改正後	改正前
<p>ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部</p> <p>牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢－粘膜病・牛パラインフルエンザ・牛RSウイルス感染症混合生ワクチン</p> <p>1 （略） 2 製法 2.1 製造用株 2.1.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス 2.1.1.1・2.1.1.2 （略） 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2.6.2の豚精巢初代細胞若しくは継代細胞又は牛腎継代細胞で継代する。 （略） 2.1.2 牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 2.1.2.1・2.1.2.2 （略） 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2.6.2の豚精巢初代又は継代細胞で継代する。 （略） 2.1.3 （略） 2.1.4 牛RSウイルス 2.1.4.1・2.1.4.2 （略） 2.1.4.3 継代及び保存 原株及び原種ウイルスは、<u>HmLu細胞</u>で継代する。 （略） 2.2 製造用材料 2.2.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス 2.2.1.1 培養細胞 生ワクチン製造用材料の規格2.6.2の豚精巢初代細胞若しくは継代細胞又は牛腎継代細胞を用いる。 2.2.1.2 培養液 製剤ごとに農林水産大臣が適当と認められた培養液を用いる。 2.2.2 牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 2.2.2.1 培養細胞 生ワクチン製造用材料の規格2.6.2の豚精巢初代又は継代細胞を用いる。</p>	<p>ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部</p> <p>牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢－粘膜病・牛パラインフルエンザ・牛RSウイルス感染症混合生ワクチン</p> <p>1 （略） 2 製法 2.1 製造用株 2.1.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス 2.1.1.1・2.1.1.2 （略） 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2.6.2の豚精巢初代細胞又は<u>適当と認められた培養細胞</u>で継代する。 （略） 2.1.2 牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 2.1.2.1・2.1.2.2 （略） 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2.6.2の豚精巢初代細胞又は<u>適当と認められた培養細胞</u>で継代する。 （略） 2.1.3 （略） 2.1.4 牛RSウイルス 2.1.4.1・2.1.4.2 （略） 2.1.4.3 継代及び保存 原株及び原種ウイルスは、<u>HAL細胞</u>又は<u>適当と認められた培養細胞</u>で継代する。 （略） 2.2 製造用材料 2.2.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス 2.2.1.1 培養細胞 生ワクチン製造用材料の規格 2.6.2の豚精巢初代細胞又は製造に<u>適当と認められた培養細胞</u>を用いる。 2.2.1.2 培養液 製造に<u>適当と認められた培養液</u>を用いる。 2.2.2 牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 2.2.2.1 培養細胞 生ワクチン製造用材料の規格 2.6.2の豚精巢初代細胞又は製造に<u>適当と認めら</u></p>

2.2.2.2 培養液

製剤ごとに農林水産大臣が適当と認められた培養液を用いる。

2.2.3 牛パラインフルエンザ3型ウイルス

2.2.3.1 (略)

2.2.3.2 培養液

製剤ごとに農林水産大臣が適当と認められた培養液を用いる。

2.2.4 牛RSウイルス

2.2.4.1 培養細胞

HmLu細胞を用いる。

2.2.4.2 培養液

製剤ごとに農林水産大臣が適当と認められた培養液を用いる。

2.3 (略)

(削る)

2.4 最終バルク

牛伝染性鼻気管炎ウイルス原液、牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス原液、牛パラインフルエンザ3型ウイルス原液及び牛RSウイルス原液を混合し、製剤ごとに農林水産大臣が適当と認められた安定剤を加えて、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、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。

3 試験法

3.1 (略)

3.2 原液の試験

3.2.1 (略)

3.2.2 迷入ウイルス否定試験

牛伝染性鼻気管炎ウイルス原液及び牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス原液については、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1、2.3.1、2.4.1、2.4.2及び2.7.2.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

牛パラインフルエンザ3型ウイルス原液及び牛RSウイルス原液については、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1、2.4.1、2.4.2及び2.7.2.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

牛白血病ウイルスについて、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法2.8.1.1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、農林水産大臣が特に認めた場合には、その方法とする。

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）、抗牛パラインフルエンザ3型ウイルス血清（付記3）及び抗牛RSウイルス血清（付記4）を非働化したものを用いる。

3.2.3 ウイルス含有量試験

3.2.3.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス含有量試験

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 牛パラインフルエンザ3型ウイルス

2.2.3.1 (略)

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 牛RSウイルス

2.2.4.1 培養細胞

HAL細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.4.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.3 (略)

2.4 混合原液の調製

牛伝染性鼻気管炎ウイルス原液、牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス原液、牛パラインフルエンザ3型ウイルス原液及び牛RSウイルス原液を混合し、混合原液とする。

混合原液について、3.3の試験を行う。

2.5 最終バルク

混合原液に適当と認められた安定剤を加えて混合し、最終バルクとする。

2.6 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。
小分け製品について、3.4の試験を行う。

3 試験法

3.1 (略)

3.2 原液の試験

3.2.1 (略)

3.2.2 迷入ウイルス否定試験

牛伝染性鼻気管炎ウイルス原液及び牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス原液については、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1、2.3.1、2.4.1、2.4.2及び2.7.2.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

牛パラインフルエンザ3型ウイルス原液及び牛RSウイルス原液については、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1、2.4.1、2.4.2及び2.7.2.1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、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）、抗牛パラインフルエンザ3型ウイルス血清（付記3）及び抗牛RSウイルス血清（付記4）を非働化したものを用いる。

3.2.3 ウイルス含有量試験

3.2.3.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス含有量試験

3.2.3.1.1 試験材料

3.2.3.1.1.1 (略)

3.2.3.1.1.2 培養細胞

牛精巢継代細胞を培養し、単層となったものを用いる。

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°Cで60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を加え、34~36°Cで7日間培養し、観察する。

3.2.3.1.3 (略)

3.2.3.2 牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス含有量試験

3.2.3.2.1 (略)

3.2.3.2.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ0.5mLずつ分注した細胞4本(穴)以上に接種し、37°Cで5~7日間培養し、単層形成が良好であることを確認する。培養液を除き、1mL中牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス Nose株を $10^{5.0}$ TCID₅₀(以下、このウイルスを用いる方法を「干渉法」という。)又は1mL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(以下、このウイルスを用いる方法を「END法」という。)を加え、更に34~36°Cで5~7日間培養し、観察する。

3.2.3.2.3 (略)

3.2.3.3 牛パラインフルエンザ3型ウイルス含有量試験

3.2.3.3.1 試験材料

3.2.3.3.1.1 (略)

3.2.3.3.1.2 培養細胞

牛腎継代細胞を培養し、単層となったものを用いる。

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°Cで60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を加え、34~36°Cで7日間培養し、観察する。

3.2.3.3.3 (略)

3.2.3.4 牛RS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

検体を製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた培養液で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

Vero細胞を培養し、単層となったものを用いる。

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°Cで60分間静置吸着させた後、製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた培養液を加え、34°Cで14日間培養し、観察する。

3.2.3.4.3 (略)

(削る)

3.2.3.1.1 試験材料

3.2.3.1.1.1 (略)

3.2.3.1.1.2 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。

3.2.3.1.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37°Cで60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を0.5mLずつ加え、34~36°Cで7日間回転培養し、観察する。

3.2.3.1.3 (略)

3.2.3.2 牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス含有量試験

3.2.3.2.1 (略)

3.2.3.2.2 試験方法

試料0.1mLずつを小試験管に0.5mLずつ分注した細胞4本以上に接種し、37°C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、1mL中牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス Nose株を $10^{5.0}$ TCID₅₀(以下、このウイルスを用いる方法を「干渉法」という。)又は1mL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(以下、このウイルスを用いる方法を「END法」という。)を0.5mLずつ加え、更に34~36°Cで5~7日間回転培養し、観察する。

3.2.3.2.3 (略)

3.2.3.3 牛パラインフルエンザ3型ウイルス含有量試験

3.2.3.3.1 試験材料

3.2.3.3.1.1 (略)

3.2.3.3.1.2 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。

3.2.3.3.2 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、37°Cで60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を0.5mLずつ加え、34~36°Cで7日間回転培養し、観察する。

3.2.3.3.3 (略)

3.2.3.4 牛RS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

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。

3.2.3.4.2 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、37°Cで60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を0.5mLずつ加え、34°Cで14日間回転培養し、観察する。

3.2.3.4.3 (略)

3.3 混合原液の試験

3.3.1 迷入ウイルス否定試験

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乾燥物でなければならない。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。

3.3.2～3.3.6 (略)

3.3.7 ウイルス含有量試験

3.3.7.1～3.3.7.4 (略)

3.3.8 (略)

3.3.9 安全試験

3.3.9.1 牛注射試験

3.3.9.1.1 試験材料

3.3.9.1.1.1・3.3.9.1.1.2 (略)

3.3.9.1.2・3.3.9.1.3 (略)

3.3.9.2 乳のみマウス注射試験

3.3.9.2.1 試験材料

3.3.9.2.1.1・3.3.9.2.1.2 (略)

3.3.9.2.2・3.3.9.2.3 (略)

3.3.10 力価試験

3.3.10.1 牛伝染性鼻気管炎力価試験

3.3.10.1.1 試験材料

3.3.10.1.1.1 試験動物

3.3.9.1の試験に用いた動物を用いる。

3.3.10.1.1.2 (略)

3.3.10.1.1.3 培養細胞

牛精巢継代細胞を培養し、単層となったものを用いる。

3.3.10.1.2 試験方法

3.3.9.1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。各希釈血清と0.2mL中約100PFU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。この混合液0.2mLずつをそれぞれ2枚(穴)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7)5mLを加え、37℃5vol%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8)3mLを加え、更に24時間培養後、ブラック数を算定する。

3.3.10.1.3 (略)

3.3.10.2 牛ウイルス性下痢-粘膜病力価試験

3.3.10.2.1 試験材料

3.3.10.2.1.1 試験動物

一般試験法の迷入ウイルス否定試験法1.1及び2.8.1.1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、中和用血清は、抗牛伝染性鼻気管炎ウイルス血清、抗牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス血清、抗牛パラインフルエンザ3型ウイルス血清及び抗牛RSウイルス血清を非働化したものを用いる。

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、固有の色調を有する乾燥物でなければならない。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。異物又は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。

3.4.2～3.4.6 (略)

3.4.7 ウイルス含有量試験

3.4.7.1～3.4.7.4 (略)

3.4.8 (略)

3.4.9 安全試験

3.4.9.1 牛注射試験

3.4.9.1.1 試験材料

3.4.9.1.1.1・3.4.9.1.1.2 (略)

3.4.9.1.2・3.4.9.1.3 (略)

3.4.9.2 乳のみマウス注射試験

3.4.9.2.1 試験材料

3.4.9.2.1.1・3.4.9.2.1.2 (略)

3.4.9.2.2・3.4.9.2.3 (略)

3.4.10 力価試験

3.4.10.1 牛伝染性鼻気管炎力価試験

3.4.10.1.1 試験材料

3.4.10.1.1.1 試験動物

3.4.9.1の試験に用いた動物を用いる。

3.4.10.1.1.2 (略)

3.4.10.1.1.3 培養細胞

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

3.4.10.1.2 試験方法

3.4.9.1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中約100PFUの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7)5mLを加え、37℃5vol%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8)3mLを加え、更に24時間培養後、ブラック数を算定する。

3.4.10.1.3 (略)

3.4.10.2 牛ウイルス性下痢-粘膜病力価試験

3.4.10.2.1 試験材料

3.4.10.2.1.1 試験動物

3.3.9.1の試験に用いた動物を用いる。

3.3.10.2.1.2・3.3.10.2.1.3 (略)

3.3.10.2.2 試験方法

3.3.9.1の試験終了後、7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。この混合液0.1mLずつを、細胞4本ずつに接種する。37℃で4～5日間培養し、観察する。

3.3.10.2.3 (略)

3.3.10.3 牛パラインフルエンザ力価試験

3.3.10.3.1 試験材料

3.3.10.3.1.1～3.3.10.3.1.3 (略)

3.3.10.3.2 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、室温で20分間処理した後、遠心し、その上清を希釈液を用いて2倍階段希釈する。各希釈血清に4単位の赤血球凝集抗原を等量加え、37℃で60分間処理した後、モルモット赤血球浮遊液を加え、4℃で一夜静置し、観察する。

3.3.10.3.3 (略)

3.3.10.4 牛RSウイルス感染症力価試験

3.3.10.4.1 試験材料

3.3.10.4.1.1～3.3.10.4.1.3 (略)

3.3.10.4.1.4 培養細胞

Vero細胞を培養し、単層となったものを用いる。

3.3.10.4.2 試験方法

注射材料2mL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。
被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液で2倍階段希釈する。希釈血清と0.1mL中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルスとを等量混合し、22℃で24時間処理する。この混合液0.1mLずつを4本(穴)の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた培養液を加え、34℃で10日間培養し、観察する。

3.3.10.4.3 判定

培養細胞の2本(穴)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。

4 (略)

付記1～5 (略)

付記6 細胞増殖用培養液
1,000mL中

3.4.9.1の試験に用いた動物を用いる。

3.4.10.2.1.2・3.4.10.2.1.3 (略)

3.4.10.2.2 試験方法

3.4.9.1の試験終了後、7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中約200TCID₅₀の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。

3.4.10.2.3 (略)

3.4.10.3 牛パラインフルエンザ力価試験

3.4.10.3.1 試験材料

3.4.10.3.1.1～3.4.10.3.1.3 (略)

3.4.10.3.2 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、20分間処理した後、1,700×Gで20分間遠心し、その上清を希釈液を用いて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℃で60分間処理した後、希釈液で調整した0.3vol%モルモット赤血球浮遊液0.2mLを加え、4℃で一夜静置し、観察する。

3.4.10.3.3 (略)

3.4.10.4 牛RSウイルス感染症力価試験

3.4.10.4.1 試験材料

3.4.10.4.1.1～3.4.10.4.1.3 (略)

3.4.10.4.1.4 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。

3.4.10.4.2 試験方法

注射材料2mL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。
被検血清を非働化した後、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中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス0.5mLとを混合し、22℃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℃で60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を0.5mLずつ加え、34℃で10日間回転培養し、観察する。

3.4.10.4.3 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。

4 (略)

付記1～5 (略)

付記6 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。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

以下（略）

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、牛ウイルス性下痢-粘膜病、牛パラインフルエンザ3型及び牛RSの各ウイルス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。

以下（略）