

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RSウイルス感染症・牛アデノウイルス感染症混合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RSウイルス感染症・牛アデノウイルス感染症混合ワクチン

1 定義

弱毒牛伝染性鼻気管炎ウイルス、弱毒牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス、弱毒牛RSウイルス及び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（以下この項において「乾燥生ワクチン」という。）と牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 1 型及び 2 型を培養細胞でそれぞれ増殖させて得たウイルス液を不活化し、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」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 牛伝染性鼻気管炎ウイルス

2.1.1.1 名称

弱毒牛伝染性鼻気管炎ウイルスNo.758-43株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

牛の皮下、筋肉及び鼻腔内に接種しても病原性を示さず、妊娠牛に接種しても異常産を起こさない。

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の豚精巢初代若しくは継代細胞、又は牛腎継代細胞で継代する。

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。

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。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 牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス

2.1.2.1 名称

弱毒牛パラインフルエンザ 3 型ウイルスBN-CE株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

牛の鼻腔内又は筋肉内に接種しても病原性を示さず、妊娠牛に接種しても異常産を起こさない。

3 日齢以内の乳のみマウスの脳内に接種しても、病原性を認めない。

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2.1.1の鶏胚初代細胞で継代する。

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。

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。種ウイルス

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 牛R S ウイルス

2.1.3.1 名称

弱毒牛R S ウイルスrs-52株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

牛に接種しても、病原性を示さない。

30℃におけるハムスター肺由来培養細胞から樹立されたHAL細胞での増殖性は、強毒ウイルスより100倍以上高い。

2.1.3.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、HmLu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。

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。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 牛アデノウイルス（7型）

2.1.4.1 名称

弱毒牛アデノウイルス（7型）TS-GT株又はこれと同等と認められた株

2.1.4.2 性状

牛に接種しても、病原性を示さない。

牛精巢継代細胞又はやぎ精巢継代細胞でCPEを伴って増殖する。

30℃における牛精巢継代細胞又はやぎ精巢継代細胞での増殖性は、強毒ウイルスよりも100倍以上高い。

2.1.4.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、やぎ精巢継代細胞又は牛精巢継代細胞で継代する。

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。

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。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 牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス1型

2.1.5.1 名称

牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス1型Nose/T株又はこれと同等と認められた株

2.1.5.2 性状

牛に接種すると、呼吸器症状、発熱、ウイルス血症及び白血球減少等の症状を示す。

牛精巢継代細胞及びMDBK細胞でCPEを伴って増殖し、非細胞病原性株の感染した細胞に重感染させた場合、CPEが抑制される。

2.1.5.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、牛精巢継代細胞又は豚腎継代細胞で継代する。

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。

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。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 牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス2型

2.1.6.1 名称

牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 2 型KZ-cp/T株又はこれと同等と認められた株

2.1.6.2 性状

牛に接種すると、呼吸器症状、発熱、ウイルス血症及び白血球減少等の症状を示す。

牛精巢継代細胞及びMDBK細胞でCPEを伴って増殖し、非細胞病原性株の感染した細胞に重感染させた場合、CPEが抑制される。

2.1.6.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、牛精巢継代細胞又は牛腎継代細胞で継代する。

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。

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。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 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た培養液を用いる。

2.2.2 牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス

2.2.2.1 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格2.1.1の鶏胚初代細胞を用いる。

2.2.2.2 培養液

製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた培養液を用いる。

2.2.3 牛RSウイルス

2.2.3.1 培養細胞

HmLu細胞を用いる。

2.2.3.2 培養液

製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた培養液を用いる。

2.2.4 牛アデノウイルス（7型）

2.2.4.1 培養細胞

やぎ精巢初代細胞又は牛精巢継代細胞を用いる。

2.2.4.2 培養液

製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた培養液を用いる。

2.2.5 牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 1 型

2.2.5.1 培養細胞

牛精巢継代細胞又は豚腎継代細胞を用いる。

2.2.5.2 培養液

製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた培養液を用いる。

2.2.6 牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 2 型

2.2.6.1 培養細胞

牛精巢継代細胞又は牛腎継代細胞を用いる。

2.2.6.2 培養液

製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた培養液を用いる。

2.3 原液

2.3.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス原液

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、ウイルスの増殖極期に個体別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を混合し、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 牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス原液

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、ウイルスの増殖極期に個体別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を混合し、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 牛R S 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、ウイルスの増殖極期に個体別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を混合し、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 牛アデノウイルス（7 型）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、ウイルスの増殖極期に個体別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を混合し、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 牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 1 型原液

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、ウイルスの増殖極期に個体別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を混合し、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。

2.3.5.3 濃縮

ウイルス浮遊液を製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた方法により濃縮し、濃縮ウイルス液とする。

濃縮ウイルス液について、3.3の試験を行う。

2.3.5.4 不活化

濃縮ウイルス液を製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた方法により不活化したものを原液とする。

原液について、3.4.1及び3.4.4の試験を行う。

2.3.6 牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 2 型原液

2.3.6.1 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。

2.3.6.2 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に個体別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を混合し、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。

2.3.6.3 濃縮

ウイルス浮遊液を製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた方法により濃縮し、濃縮ウイルス液とする。

濃縮ウイルス液について、3.3の試験を行う。

2.3.6.4 不活化

濃縮ウイルス液を製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた方法により不活化したものを原液とする。

原液について、3.4.1及び3.4.4の試験を行う。

2.4 乾燥生ワクチン混合原液

牛伝染性鼻気管炎ウイルス原液、牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス原液、牛 R S ウイルス原液及び牛アデノウイルス（7 型）原液を混合し、乾燥生ワクチン混合原液とする。

2.5 最終バルク

2.5.1 乾燥生ワクチン

乾燥生ワクチン混合原液に製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた安定剤を加えて混合し、最終バルクとする。

2.5.2 液状不活化ワクチン

牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 1 型原液及び牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 2 型原液を混合し、最終バルクとする。

2.6 小分製品

2.6.1 乾燥生ワクチン

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、3.5の試験を行う。

2.6.2 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、3.5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 % 以上を対照培養細胞とし、これについて次の試験を行う。

豚精巢初代細胞の場合は、3.1.1、3.1.2、3.1.3及び3.1.4の試験を行う。

鶏胚初代細胞の場合は、3.1.5及び3.1.6の試験を行う。

HAL細胞及び牛精巢継代細胞の場合は、3.1.2及び3.1.5の試験を行う。

やぎ精巢継代細胞の場合は、3.1.2、3.1.3、3.1.7及び3.1.8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する。対照培養細胞をプールし、4本以上の培養瓶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、3.1.5又は3.1.7の試験最終日に培養瓶の培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を2回洗浄した後、2群に分け、生理食塩液で濃度を調整した0.1vol%のモルモット及びがちょうの赤血球浮遊液を重層し、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。

3.1.3 封入体染色試験

3.1.1又は3.1.7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。

3.1.4 迷入ウイルス否定試験

3.1.1の試験最終日に採取した培養液の2 mLについて、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法2.3.1.3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 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。

3.1.6 赤血球吸着試験

3.1.5の試験最終日に培養瓶の培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を2回洗浄した後、生理食塩液で濃度を調整した0.1vol%の鶏の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、培養細胞に赤血球の吸着を認めてはならない。

3.1.7 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3代まで継代培養する。3代目に継代するとき、対照培養細胞をプールし、4本以上の培養瓶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日間培養し、観察するとき、CPEを認めてはならない。

3.1.8 迷入ウイルス否定試験

3.1.7の試験最終日に採取した培養液の2 mLについて、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法2.4.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2 ウイルス浮遊液の試験

3.2.1 ウイルス含有量試験

3.2.1.1 牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス1型及び2型

3.2.1.1.1 試験材料

3.2.1.1.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記1）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.1.1.1.2 培養細胞

牛精巢継代細胞浮遊液を用いる。

3.2.1.1.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4穴以上の培養細胞に接種し、34～36℃、5 vol%炭酸ガス下で7日間培養し、観察する。

3.2.1.1.3 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^{7.5}TCID₅₀以上でなければならない。

3.3 濃縮ウイルス液の試験

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。

3.4 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 迷入ウイルス否定試験

牛伝染性鼻気管炎ウイルス原液について、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、牛RSウイルス原液及び牛アデノウイルス（7型）原液について、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2）、抗牛パラインフルエンザ3型ウイルス血清（付記3）、抗牛RSウイルス血清（付記4）及び抗牛アデノウイルス（7型）血清（付記5）を非働化したものを用いる。

3.4.3 ウイルス含有量試験

3.4.3.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス

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

牛精巢継代細胞を培養し、単層となったものを用いる。

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℃で7日間培養し、観察する。

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^{5.7}TCID₅₀以上でなければならない。

3.4.3.2 牛パラインフルエンザ3型ウイルス

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

牛腎継代細胞を培養し、単層となったものを用いる。

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℃で7日間培養し、観察する。

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^{6.7}TCID₅₀以上でなければならない。

3.4.3.3 牛RSウイルス

3.4.3.3.1 試験材料

3.4.3.3.1.1 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。

3.4.3.3.1.2 培養細胞

Vero細胞を培養し、単層となったものを用いる。

3.4.3.3.2 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14日間培養し、観察する。

3.4.3.3.3 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^{6.7}TCID₅₀以上でなければならない。

3.4.3.4 牛アデノウイルス（7型）

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

牛精巢継代細胞を培養し、単層となったものを用いる。

3.4.3.4.1.3 赤血球浮遊液

牛、羊又はやぎの赤血球をゼラチン・アルブミン加ベロナール緩衝食塩液（付記6）（以下この項において「希釈液」という。）に0.3vol%に浮遊したもので、赤血球凝集抗原が規定の赤血球凝集価を示すものを用いる。

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℃で7日間培養する。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。

3.4.3.4.3 判定

赤血球凝集が認められ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^{4.7}TCID₅₀以上でなければならない。

3.4.4 不活化試験

3.4.4.1 試験材料

3.4.4.1.1 試料

検体を試料とする。

3.4.4.1.2 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。

3.4.4.2 試験方法

試料2 mLを、1 mLにつき20cm²以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着後、ウイルス増殖用培養液を加え、34～36℃で5日間培養し、CPEの有無を観察した後、細胞を10本の小試験管に継代し、5日間培養し、CPEの有無を観察する。培養液を除き、1 mL中約10^{5.0}TCID₅₀の牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス1型Nose株を含むウイルス増殖用培養液1 mLずつをそれぞれに加え、34～36℃で7日間培養し、CPEの有無を観察する。

3.4.4.3 判定

観察期間中、牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス1型Nose株接種前の培養細胞にCPEを認めず、接種後の培養細胞にCPEを認めた場合、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 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、乾燥生ワクチンは、固有の色調を有する乾燥物でなければならない。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、異物及び異臭を認めてはならない。乾燥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、異物及び異臭を認めてはならない。

また、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、乾燥生ワクチンは、適合しなければならない。

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、乾燥生ワクチンは、適合しなければならない。

3.5.5 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。

3.5.6 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、乾燥生ワクチンは、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。

3.5.7 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を準用して試験するとき、乾燥生ワクチンは、適合しなければならない。

ただし、乾燥生ワクチンの溶解には液状不活化ワクチンと同量のリン酸緩衝食塩液を用い、中和用血清は、抗牛伝染性鼻気管炎ウイルス血清、抗牛パラインフルエンザ3型ウイルス血清、抗牛RSウイルス血清及び抗牛アデノウイルス（7型）血清を非働化したものを用いる。

3.5.8 ウイルス含有量試験

3.5.8.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス

乾燥生ワクチンを試験品とし、3.4.3.1を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり $10^{4.0}$ TCID₅₀以上でなければならない。

ただし、試験品を液状不活化ワクチンと同量のウイルス増殖用培養液で溶解し、牛伝染性鼻気管炎ウイルス以外のウイルスを各抗血清を非働化したもので中和した後、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。

3.5.8.2 牛パラインフルエンザ3型ウイルス

乾燥生ワクチンを試験品とし、3.4.3.2を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり 10^5 TCID₅₀以上でなければならない。

ただし、試験品を液状不活化ワクチンと同量のウイルス増殖用培養液で溶解し、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を非働化したもので中和した後、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。

3.5.8.3 牛RSウイルス

乾燥生ワクチンを試験品とし、3.4.3.3を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり 10^5 TCID₅₀以上でなければならない。

ただし、試験品を液状不活化ワクチンと同量のウイルス増殖用培養液で溶解し、牛RSウイルス以外のウイルスを各抗血清を非働化したもので中和した後、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。

3.5.8.4 牛アデノウイルス（7型）

乾燥生ワクチンを試験品とし、3.4.3.4を準用して試験するとき、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、試験品を液状不活化ワクチンと同量のウイルス増殖用培養液で溶解し、牛アデノウイルス（7型）以外のウイルスを各抗血清を非働化したもので中和した後、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。

3.5.9 不活化試験

液状不活化ワクチンを試験品とし、3.4.4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 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。

3.5.11 安全試験

3.5.11.1 牛注射試験

3.5.11.1.1 試験材料

3.5.11.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.11.1.1.2 試験動物

体重100～200kgの牛を用いる。

3.5.11.1.2 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。

3.5.11.1.3 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。

3.5.11.2 乳のみマウス注射試験

3.5.11.2.1 試験材料

3.5.11.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.11.2.1.2 試験動物

3日齢以内の乳のみマウスを用いる。

3.5.11.2.2 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。

3.5.11.2.3 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。

3.5.12 力価試験

3.5.12.1 牛伝染性鼻気管炎力価試験

3.5.12.1.1 試験材料

3.5.12.1.1.1 試験動物

3.5.11.1の試験に用いた動物を用いる。

3.5.12.1.1.2 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。

3.5.12.1.1.3 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。

3.5.12.1.2 試験方法

3.5.11.1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℃、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8）3mLを加え、更に24時間培養した後、ブラック数を算定する。

3.5.12.1.3 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。

3.5.12.2 牛パラインフルエンザ力価試験

3.5.12.2.1 試験材料

3.5.12.2.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

3.5.12.2.1.2 試験動物

体重約350gのモルモットを用いる。

3.5.12.2.1.3 赤血球凝集抗原

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

3.5.12.2.2 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1夜静置し、観察する。

3.5.12.2.3 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。

3.5.12.3 牛RSウイルス感染症力価試験

3.5.12.3.1 試験材料

3.5.12.3.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.12.3.1.2 試験動物

体重約100gのハムスターを用いる。

3.5.12.3.1.3 中和試験用ウイルス

牛腎継代細胞で増殖させた強毒牛RSウイルスNMK7株を用いる。

3.5.12.3.1.4 培養細胞

Vero細胞を培養し、単層となったものを用いる。

3.5.12.3.2 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、製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた培養液で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、ウイルス増殖用培養液を加え、34℃で10日間培養し、観察する。

3.5.12.3.3 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。

3.5.12.4 牛アデノ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

3.5.11.1の試験に用いた動物を用いる。

3.5.12.4.1.2 赤血球凝集抗原

牛精巢継代細胞で増殖させた強毒牛アデノウイルス（7型）袋井株を用いる。

3.5.12.4.1.3 赤血球浮遊液

3.4.3.4.1.3の赤血球浮遊液を用いる。

3.5.12.4.2 試験方法

3.5.11.1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、希釈液で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、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加え、4℃で1夜処理した後、4℃に冷却した赤血球浮遊液を加え、4℃で1夜静置し、観察する。

3.5.12.4.3 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。

3.5.12.5 牛ウイルス性下痢－粘膜病力価試験

3.5.12.5.1 試験材料

3.5.12.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.12.5.1.2 試験動物

4週齢のマウスを用いる。

3.5.12.5.1.3 中和試験用ウイルス

牛精巢継代細胞で増殖させた牛ウイルス性下痢－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。

3.5.12.5.1.4 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。

3.5.12.5.2 試験方法

注射材料0.5mLずつを25匹の試験動物に21日間隔で2回腹腔内注射し、第2回目の注射後14日目に得られた血清について、中和試験を行う。

マウス血清は、任意に5匹ずつプールし、5プールを用いる。

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0.1mL中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液とを混合し、37℃で60分間処理する。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分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で7日間培養し、観察する。

3.5.12.5.3 判定

培養細胞の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。

中和抗体価2倍以上を陽性とする。

プール血清の中和抗体陽性率は、1型及び2型とも80%以上でなければならない。

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 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。

牛胎子血清は、牛伝染性鼻気管炎ウイルス、牛パラインフルエンザ3型ウイルス、牛RSウイルス、牛アデノウイルス（7型）並びに牛ウイルス性下痢－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2 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、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3 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BN₁-1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4 抗牛RSウイルス血清

強毒牛RS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5 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、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 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%ゼラチン溶液

1,000mL中

精製ゼラチン 1 g

水 残 量

使用時加温溶解する。

C液 5 w/v%牛血清アルブミン溶液

1,000mL中

牛血清アルブミン	5 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7 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 g
牛胎子血清	20 mL
水	残 量

牛胎子血清は、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8 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 g
ニュートラルレッド	0.05 g
水	残 量