

牛ロタウイルス感染症3価・牛コロナウイルス感染症・牛大腸菌性下痢症（K99精製線毛抗原）混合（アジュバント加）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3年6月3日(告示第941号)一部改正

1 定義

シードロット規格に適合した血清型のそれぞれ異なる3種類の牛ロタ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、シードロット規格に適合した牛コロナ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及びシードロット規格に適合した大腸菌精製線毛抗原K99をそれぞれ不活化し、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 牛ロタウイルス

2.1.1.1 名称

牛ロタウイルスGunma 8701株、Hyogo 9301株及びShimane 9501株、又は製造に相当と認められた3種類の株

2.1.1.2 性状

MA-104細胞に接種すると、単層細胞の剥離を特徴とするCPEを伴って増殖する。

2.1.1.3 マスターシードウイルス

2.1.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、MA-104細胞又は相当と認められた細胞で増殖させ、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°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。

2.1.1.4 ワーキングシードウイルス

2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、MA-104細胞又は相当と認められた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°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。

2.1.1.5 プロダクションシードウイルス

2.1.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、MA-104細胞又は相当と認められた細胞で増殖させる。

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°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。

2.1.2 牛コロナウイルス

2.1.2.1 名称

牛コロナウイルスNo.66/H株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

牛腎継代細胞、HAL細胞、HRT-18細胞（ヒト直腸ガン由来株化細胞）及びBEK-1細胞（牛胎子腎由来株化細胞）で合胞体形成を特徴とするCPEを伴って増殖する。

ラット、マウス、ハムスター及び鶏赤血球を凝集する。

2.1.2.3 マスターシードウイルス

2.1.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、HAL細胞又は適当と認められた細胞で増殖させ、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°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。

2.1.2.4 ワーキングシードウイルス

2.1.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、HAL細胞又は適当と認められた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°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。

2.1.2.5 プロダクションシードウイルス

2.1.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、HAL細胞又は適当と認められた細胞で増殖させる。

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°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。

2.1.3 大腸菌

2.1.3.1 名称

大腸菌T-2株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

ソイビン・カゼイン・ダイジェスト液状培地で培養すると耐熱性エンテロトキシンを産生する。

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。

マスターシード菌について、3.1.4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。

2.1.3.4 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 -70°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.5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 -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菌を保存する場合は、3.1.6の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 牛ロタウイルス

2.2.1.1 株化細胞

MA-104細胞又は製造に適当と認められた株化細胞を用いる。

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。

2.2.1.3 マスターセルシード

2.2.1.3.1 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、2.2.1.2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°C 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。

2.2.1.4 ワーキングセルシード

2.2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.1.2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°C 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。

2.2.1.5 プロダクションセルシード

2.2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.1.2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°C 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。

2.2.2 牛コロナウイルス

2.2.2.1 株化細胞

HAL細胞又は製造に適当と認められた株化細胞を用いる。

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 マスターセルシード

2.2.2.3.1 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、2.2.2.2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°C 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。

2.2.2.4 ワーキングセルシード

2.2.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.2.2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°C 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。

2.2.2.5 プロダクションセルシード

2.2.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.2.2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°C 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。

2.2.3 大腸菌

2.2.3.1 培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 牛ロタウイルス各株

2.3.1.1 プロダクションセルシードの培養

1回に処理し、培養した細胞を個別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。

2.3.1.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.1.1の細胞で培養し、相当と認められた時期に個別別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液、遠心上清又はこれらを濃縮したものをウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.3.1及び3.3.2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を0.4vol%となるように加える方法又はその他相当と認められた方法により不活化し、不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.5.1.1の試験を行う。

2.3.1.4 原液

不活化ウイルス液を混合し、必要に応じて濃縮したものを原液とする。

原液について3.7の試験を行う。

2.3.2 牛コロナウイルス

2.3.2.1 プロダクションセルシードの培養

1回に処理し、培養した細胞を個別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。

2.3.2.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.2.1の細胞で培養し、相当と認められた時期に個別別培養細胞ごとに採取した培養液の遠心上清又はこれらを濃縮したもの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、3.3.1及び3.3.3の試験を行う。

2.3.2.3 不活化

ウイルス浮遊液にホルマリンを0.05vol%となるよう加える方法又はその他相当と認められた方法により不活化し、不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.5.1.2の試験を行う。

2.3.2.4 原液

不活化ウイルス液を混合し、必要に応じて濃縮したものを原液とする。

原液について、3.7の試験を行う。

2.3.3 大腸菌

2.3.3.1 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、3.4の試験を行う。

2.3.3.2 集菌

培養菌液を遠心し、その沈渣を線毛抽出用緩衝液（付記1）に浮遊し、濃厚菌液とする。

2.3.3.3 線毛の精製

濃厚菌液から適当と認められる方法で加熱抽出したものの遠心上清を抽出線毛抗原液とする。抽出線毛抗原液に飽和硫酸アンモニウム溶液（付記2）を加え、更に0.4vol%になるようにホルマリンを加え、2～5℃で静置し、その遠心沈渣を0.4%ホルマリン加里ン酸緩衝食塩液に浮遊し、透析後濃度調整したものを精製線毛抗原液とする。

精製線毛抗原液について、3.6の試験を行う。

2.3.3.4 原液

精製線毛抗原液にホルマリンを0.1vol%となるように加え、不活化したものを原液とする。

原液について、3.7の試験を行う。

2.4 最終バルク

各原液を混合し、適当と認められた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。

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、3.8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

げっ歯類由来細胞を用いる場合には、牛RSウイルス、ブルータング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1.1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。

サル由来細胞を用いる場合には、牛RSウイルス、ブルータングウイルス及び内在性レトロウ

ウイルス（C、Dタイプ粒子）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3.1.1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

牛ロタウイルスについては、牛ウイルス性下痢ウイルス、牛伝染性リンパ腫ウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、3.2.5、3.2.8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。

牛コロナウイルスについては、牛ウイルス性下痢ウイルス、ロタウイルス、牛伝染性リンパ腫ウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、3.2.5、3.2.7、3.2.8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。

3.1.2 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。

3.1.4 マスターシード菌の試験

3.1.4.1 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。

3.1.4.2 夾雑菌否定試験

3.1.4.2.1 試験材料

検体及びBCP乳糖寒天培地（付記3）を用いる。

3.1.4.2.2 試験方法

検体を滅菌生理食塩液で溶解したものを試料とし、シャーレに固めたBCP乳糖寒天培地に塗抹し、37℃で24時間培養する。

3.1.4.2.3 判定

いずれの培地上にも大腸菌以外の集落を認めてはならない。

3.1.5 ワーキングシード菌の試験

3.1.5.1 夾雑菌否定試験

3.1.4.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.6 プロダクションシード菌の試験

3.1.6.1 夾雑菌否定試験

3.1.4.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2 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

げっ歯類由来細胞を用いる場合には、牛RSウイルス、ブルータング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。

サル由来細胞を用いる場合には、牛RSウイルス、ブルータングウイルス及び内在性レトロウイルス（C、Dタイプ粒子）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、ロタウイルス、牛伝染性リンパ腫ウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2、3.2.5、3.2.7、3.2.8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 ウイルス浮遊液の試験

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。

3.3.2 ウイルス含有量試験

3.3.2.1 牛ロタウイルス

3.3.2.1.1 試験材料

3.3.2.1.1.1 試料

検体をイーグルMEMで10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.2.1.1.2 培養細胞

MA-104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。

3.3.2.1.2 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、牛ロタウイルス増殖用培養液（付記4）を1.0mLずつ加え、37°Cで7日間回転培養し、観察する。

3.3.2.1.3 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^{8.8}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。

3.3.3 赤血球凝集試験

3.3.3.1 牛コロナウイルス

3.3.3.1.1 試料

検体を0.1w/v%牛血清アルブミン（以下この項において「BSA」という。）加リン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.3.1.2 試験方法

試料と1 vol%になるように濃度を調整したマウス赤血球浮遊液をそれぞれ等量混合し、よく混和した後、常温で1～2時間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

3.3.3.1.3 判定

赤血球の凝集を認めた試料の最高希釈倍数で赤血球凝集価を表す。

検体の赤血球凝集価は、64倍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、その赤血球凝集価とする。

3.4 培養菌液の試験

3.4.1 夾雑菌否定試験

3.1.4.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.2 生菌数試験

3.4.2.1 試験材料

試験用培地I（付記5）及び試験用培地II（付記6）を用いる。

3.4.2.2 試験方法

検体を試験用培地Iを用いて、10倍希釈系列にて10⁻⁸まで希釈し、10⁻⁷希釈液の0.5mLと10⁻⁸希釈液の1.0mLとを、各々試験用培地IIの20mLを用いて、直径9 cmのシャーレに混釈して固める。各希釈ごとに2枚ずつ作製し、37°Cで18時間培養した後、発育した集落数を数える。

3.4.2.3 判定

検体の希釈倍数、接種液量及び発現した集落数から検体1 mL中の生菌数を計算するとき、3 × 10⁸個以上でなければならない。

3.5 不活化ウイルス液の試験

3.5.1 不活化試験

3.5.1.1 牛ロタウイルス

3.5.1.1.1 試験材料

3.5.1.1.1.1 試料

100倍以上のリン酸緩衝食塩液を用い、検体を4°Cで1夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.5.1.1.1.2 培養細胞

MA-104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。

3.5.1.1.2 試験方法

試料の0.1mLずつを10本の小試験管の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、試料を抜き取り、イーグルMEMで1回細胞を洗浄した後、牛ロタウイルス増殖用培養液を1.0mLずつ加え、37℃で7日間回転培養する。培養細胞を凍結融解した後、その培養液を継代する。更に1代継代し、同様の方法で培養し観察する。

ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.5.1.1.3 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。

3.5.1.2 牛コロナウイルス

3.5.1.2.1 試験材料

3.5.1.2.1.1 試料

100倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、検体を4℃で1夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.5.1.2.1.2 培養細胞

HAL細胞を小試験管に1～2日間培養し、単層となったものを用いる。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その細胞を用いる。

3.5.1.2.2 試験方法

試料の0.1mLずつを10本の小試験管の培養細胞に接種し、37℃で60分間吸着させた後、試料を抜き取り、イーグルMEMで1回細胞を洗浄した後、牛コロナウイルス増殖用培養液（付記7）を1.0mLずつ加え、37℃で7日間回転培養し、観察する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.5.1.2.3 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。

3.6 精製線毛抗原液の試験

3.6.1 抗原量の測定

3.6.1.1 試験材料

3.6.1.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で希釈したものを試料とする。

3.6.1.1.2 標準たん白溶液

参照BSA液（付記8）を用いる。

3.6.1.2 試験方法

試料と各濃度の標準たん白溶液を100μLずつ別々の試験管に入れる。全ての試験管に反応液（付記9）を1.0mLずつ加え、60℃で30分間感作する。感作後、室温に戻し、波長562nmの吸光度を測定する。

3.6.1.3 判定

最小自乗法でYを吸光度、Xをたん白量とする回帰直線 $Y=aX+b$ を参照BSA液を用いて求める。

試料の吸光度Yを代入し、たん白量Xを求め、検体のたん白量としたとき、たん白量は590μg/mL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、そのたん白量とする。

3.6.2 エンドトキシン含量測定試験

3.6.2.1 試験材料

検体をエンドトキシンプリー蒸留水で希釈し、試料とする。

3.6.2.2 試験方法

ライセート試薬（付記10）を加えた試験管に、エンドトキシン標準溶液（付記11）又は試料を

それぞれライセート試薬と等量加え、混和する。直ちに37°Cで60分間反応させ、ゲル化時間を測定する。

3.6.2.3 判定

検体のエンドトキシン濃度をエンドトキシン標準溶液のゲル化時間をプロットして得られた用量反応直線を用いて算出するとき、499,800EU/mL以下でなければならない。

3.7 原液の試験

3.7.1 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。

3.8 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 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。

3.8.3 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。

3.8.4 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、固有の値以下でなければならない。

3.8.5 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 mL中1 mg以下でなければならない。

3.8.6 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、注射量は、0.2mLとする。

3.8.7 力価試験

3.8.7.1 牛ロタウイルス

3.8.7.1.1 試験材料

3.8.7.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.8.7.1.1.2 試験動物

約4週齢のマウスを用いる。

3.8.7.1.1.3 中和試験用ウイルス

MA-104細胞で増殖させた牛ロタウイルスGunma 8701株、Hyogo 9301株及びShimane 9501株を用いる。

3.8.7.1.1.4 培養細胞

MA-104細胞を小試験管で1～3日間培養し、単層を形成させたものを用いる。

3.8.7.1.2 試験方法

注射材料0.5mLずつを20匹の試験動物の腹腔内に3週間隔で2回注射し、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4匹分ずつプールし、5プールを用いる。

被検血清を非働化した後、10倍から2倍階段希釈する。各希釈血清と0.1mL中に約200TCID₅₀のウイルスを含む中和試験用ウイルス液とを等量混合し、37°Cで60分間処理する。この各混合液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、接種した混合液を除き、イー

グルMEMで1回細胞を洗浄した後、牛ロタウイルス増殖用培養液を1.0mLずつ加え、37℃で7日間回転培養し、観察する。

3.8.7.1.3 判定

培養細胞の2本以上に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80倍以上を中和抗体陽性とする。

プール血清の中和抗体陽性率は、それぞれのウイルスに対し80%以上でなければならない。

3.8.7.2 牛コロナウイルス

3.8.7.2.1 赤血球凝集抗原

牛コロナウイルス赤血球凝集抗原（付記12）を用いる。

3.8.7.2.2 試験方法

3.8.7.1.2の血清について赤血球凝集抑制試験を行う。

被検血清0.1mLに0.1w/v%BSA加リン酸緩衝食塩液0.4mL及び25w/v%カオリン加生理食塩液（付記13）0.5mLを加え、常温で20分間処理した後、1,700Gで10分間遠心し、その上清0.2mLを0.1w/v%BSA加リン酸緩衝食塩液で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、常温で60分間処理した後、1.0vol%マウス赤血球浮遊液0.2mLを加え、1～2時間静置し、観察する。

3.8.7.2.3 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160倍以上を赤血球凝集抑制抗体陽性とする。

プール血清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。

3.8.7.3 大腸菌

3.8.7.3.1 試験方法

3.8.7.1.2の血清について酵素抗体法（以下この項において「ELISA」という。）を行う。

大腸菌K99 ELISA抗体価測定用抗原（付記14）を炭酸緩衝液で希釈し、ELISA用マイクロプレートに100 μ Lずつ加え、2～5℃で1夜静置し抗原を固相化する。このプレートを洗浄液で3回洗浄し、抗体希釈液を1穴に250 μ Lずつ全穴に加え、37℃で1時間静置させた後、同様に3回洗浄する。次に、抗体希釈液で100倍から12,800倍まで2倍階段希釈を行ったプール血清、参照陽性血清（付記15）及び参照陰性血清（付記16）をそれぞれ1列に100 μ Lずつ加え、37℃で60分間反応させ、洗浄液で3回洗浄する。その後、抗体希釈液で希釈した酵素標識抗体を全穴に100 μ Lずつ加えて37℃で60分間反応させ、3回洗浄する。次に、基質溶液を100 μ Lずつ加え、遮光して30℃で30分間反応させた後、1 mol/L硫酸溶液を50 μ Lずつ加えて反応を停止させる。各穴の吸光度を主波長492nm、副波長630nmで測定し、その差をELISA値とする。

3.8.7.3.2 判定

ELISA値が0.5以上を示す血清の最高希釈倍数を抗体価とする。参照陽性血清が800倍から3,200倍、参照陰性血清が100倍未満の抗体価を示すとき、プール血清のELISA抗体価1,600倍以上を陽性とする。

プール血清の80%以上がELISA抗体陽性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 線毛抽出用緩衝液

1,000mL中

リン酸二水素ナトリウム二水和物

0.384g

リン酸水素二ナトリウム十二水和物	20.64g
塩化ナトリウム	42.24g
水	残 量

121°Cで30分間高圧蒸気滅菌する。

付記2 飽和硫酸アンモニウム溶液

1,000mL中

硫酸アンモニウム	767.0g
水	1,000mL

溶解後、4°Cで一晩以上放置し、その上清を使用する。

付記3 BCP 乳糖寒天培地

1,000mL中

バクトビーフ・イクストラクト	3.0 g
バクトペプトン	5.0 g
乳糖	10.0 g
寒天	10.0 g
プロモクレゾールパープル	0.025g
水	残 量

pHを6.8~7.0に調整して、121°C15分間高圧滅菌する。

付記4 牛ロタ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-グルタミン	0.292g
トリプシン	5,000~30,000BAEE*単位
イーグルMEM	残 量

pHを7.0~7.6に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

*BAEE : N-ベンゾイル-L-アルギニンエチルエステル

付記5 試験用培地 I

1,000mL中

カゼイン製ペプトン	17.0g
バクトソイトン	3.0g
ブドウ糖	2.5g
リン酸水素二カリウム	2.5g
塩化ナトリウム	5.0g
水	残 量

pHを7.1~7.5に調整し、121°Cで15分間高圧蒸気滅菌する。

付記6 試験用培地II

1,000mL中

カゼイン製ペプトン	15.0g
-----------	-------

バクトソイトン	5.0g
塩化ナトリウム	5.0g
寒天	15.0g
水	残 量

pHを7.1～7.5に調整し、121℃で20分間高压蒸気滅菌する。

付記7 牛コロナ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-グルタミン	0.292g
L-グルタミン酸水素ナトリウム一水和物	5.0 g
ブドウ糖	1.0 g
酵母エキス	0.5 g
牛胎子血清	50 mL
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8 参照BSA液

BSAを水で2 mg/mLとなるように作製した後、下表に準じて調製したものを各濃度の参照BSA液とする。

BSA濃度 (μ g/mL)	量比	
	2 mg/mL BSA	PBS
0	0	100.0
50	2.5	97.5
100	5.0	95.0
150	7.5	92.5
200	10.0	90.0
400	20.0	80.0

付記9 反応液

ブラッドフォード法を原理とする適当な市販品を用いる。

付記10 ライセート試薬

カプトガニ血球抽出物の凍結乾燥品（ β -1,3-グルカン誘導体を含む。）であり、エンドトキシンプリー蒸留水を加えて使用する。

付記11 エンドトキシン標準溶液

日本薬局方エンドトキシン標準品20,000EU/mLを10,000EU/mLに調整したものを検体と同様にエンドトキシンプリー蒸留水で希釈し、用いる。

付記12 牛コロナウイルス赤血球凝集抗原

牛コロナウイルスNo.66/H株をHAL細胞で増殖させて得た培養上清又は適当と認められた株を用いて調製した赤血球凝集抗原で、赤血球凝集価64倍以上のもの。

付記13 25w/v%カオリン加生理食塩液

1,000mL中

カオリン

250 g

塩化ナトリウム

8.75g

水

残 量

pHを7.2~7.4に調整する。

アジ化ナトリウムを適量加える。

付記14 大腸菌K99 ELISA抗体価測定用抗原

液体培地で増殖させた大腸菌T-2株から熱抽出、硫酸アンモニウム塩析により精製し、ホルマリンで不活化したK99線毛抗原で、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析するとき、約17kDaの主要なバンドを認めるもの

付記15 参照陽性血清

液体培地で増殖させた大腸菌T-2株から加熱処理及び硫酸アンモニウム塩析法により精製したK99線毛抗原を1/50量になるようにリン酸緩衝食塩液で調整し、その抗原とリン酸アルミニウムゲルを85：15の割合で混合する。その0.5mLを約4週齢のマウスの腹腔内に3週間隔で2回注射し、その2週間後に得られた血清である。

大腸菌K99ELISA抗体価測定用抗原を用いて3.8.7.3に準じた方法でELISAを実施するとき、ELISA抗体価は、800倍から3,200倍までを示す。

付記16 参照陰性血清

非免疫マウスの血清で、大腸菌K99ELISA抗体価測定用抗原を用いて3.8.7.3に準じた方法でELISAを実施するとき、ELISA抗体価は、100倍未満を示す。