

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部のニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎・産卵低下症候群－1976・トリニューモウイルス感染症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチンの項の次に次のように加える。

ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎 2 価・産卵低下症候群－1976・トリニューモウイルス感染症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン

1 定義

ニューカッスル病ウイルス及び血清型のそれぞれ異なる 2 種類の鶏伝染性気管支炎ウイルスを発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液並びに産卵低下症候群－1976ウイルスを発育あひる卵で増殖させて得たウイルス液及び七面鳥鼻気管支炎ウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液をそれぞれ不活化したものを混合し、油性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 ニューカッスル病ウイルス株

2.1.1.1 名称

弱毒ニューカッスル病ウイルスClone30株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

9～11日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射すると増殖し、その尿膜腔液には鶏赤血球凝集性を認める。

2.1.1.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格1.1の発育鶏卵で継代する。

継代は、原株では3代以内、種ウイルスでは2代以内でなければならない。

原株及び種ウイルスは、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

2.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス株

2.1.2.1 名称

2種類の鶏伝染性気管支炎ウイルスM41株及び249g株

2.1.2.2 性状

10日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に接種すると、特徴的な病変を伴って増殖する。

2.1.2.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格1.1の発育鶏卵で継代する。

継代は、原株では3代以内、種ウイルスでは2代以内でなければならない。

原株及び種ウイルスは、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

2.1.3 産卵低下症候群－1976ウイルス株

2.1.3.1 名称

産卵低下症候群－1976ウイルスBC14株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

鶏胚初代細胞、鶏腎初代細胞又はあひる胚線維芽細胞に接種すると、CPEを伴って増殖する。

鶏赤血球凝集性を認める。

2.1.3.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格2.1.3の鶏胚肝初代細胞で継代する。

継代は、原株では3代以内、種ウイルスでは2代以内でなければならない。

原株及び種ウイルスは、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

2.1.4 七面鳥鼻気管炎ウイルス株

2.1.4.1 名称

弱毒七面鳥鼻気管炎ウイルスBUT1 #8544株又はこれと同等と認められた株

2.1.4.2 性状

鶏胚初代細胞、鶏腎初代細胞又はVero細胞に接種するとCPEを伴って増殖する。

2.1.4.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、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。

継代は、原株では3代以内、種ウイルスでは2代以内でなければならない。

原株及び種ウイルスは、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 ニューカッスル病ウイルス

2.2.1.1 発育鶏卵

10～11日齢のものをを用いる。

2.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

2.2.2.1 発育鶏卵

11～12日齢のものをを用いる。

2.2.3 産卵低下症候群－1976ウイルス

2.2.3.1 発育あひる卵

10日齢のものをを用いる。

2.2.4 七面鳥鼻気管炎ウイルス

2.2.4.1 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。

2.3 原液

2.3.1 ニューカッスル病ウイルス原液

2.3.1.1 発育鶏卵の培養

1回に処理する発育鶏卵を個体別発育鶏卵とみなす。

個体別発育鶏卵について、3.1.1の試験を行う。

2.3.1.2 ウイルスの培養

種ウイルスを発育鶏卵で培養し、感染増殖させた尿膜腔液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、3.2.1.1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加えて不活化し、不活化ウイルス浮遊液とする。この不活化ウイルス浮遊液を原液としてもよい。

不活化ウイルス浮遊液について3.3.1及び3.3.2.1の試験を行う。

2.3.1.4 アジュバントの添加

不活化ウイルス浮遊液に製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた油性アジュバントを添加し、原液とする。ただし、最終バルクの調製時にアジュバントを添加してもよい。

原液について、3.4.1の試験を行う。

なお、アジュバントを添加しない原液について、必要に応じて3.4.2.1の試験を行う。

2.3.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス原液

2.3.2.1 発育鶏卵の培養

1回に処理する発育鶏卵を個体別発育鶏卵とみなす。

個体別発育鶏卵について、3.1.1の試験を行う。

2.3.2.2 ウイルスの培養

各株の種ウイルスを发育鶏卵で尿膜腔内に注射し、感染増殖させた尿膜腔液の遠心上清を各株のウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2.1.2の試験を行う。

2.3.2.3 不活化

各ウイルス浮遊液にホルマリンを加えて不活化し、それぞれの株の不活化ウイルス浮遊液とする。この不活化ウイルス浮遊液を原液としてもよい。

不活化ウイルス浮遊液について、3.3.1及び3.3.2.2の試験を行う。

2.3.2.4 アジュバントの添加

各株の不活化ウイルス浮遊液に製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた油性アジュバントを添加し、それぞれの株の原液とする。

ただし、最終バルクの調製時にアジュバントを添加してもよい。

原液について、3.4.1の試験を行う。

2.3.3 産卵低下症候群－1976ウイルス原液

2.3.3.1 发育あひる卵の培養

1回に処理する发育あひる卵を個体別发育あひる卵とみなす。

個体別发育あひる卵について、3.1.2の試験を行う

2.3.3.2 ウイルスの培養

種ウイルスを发育あひる卵で培養し、感染増殖させた尿膜腔液の遠心上清をウイルス浮遊液とする。

2.3.3.3 不活化

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不活化し、原液とする。

原液について、3.3.1、3.3.2.3及び3.3.3.2の試験を行う。

2.3.4 七面鳥鼻気管炎ウイルス原液

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、3.1.2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過及び超音波処理した感染細胞の遠心上清を混合し、ウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2.1.4の試験を行う。

2.3.4.3 不活化

ウイルス浮遊液にホルマリンを加えて不活化し、不活化ウイルス浮遊液とする。不活化ウイルス浮遊液を原液としてもよい。

不活化ウイルス浮遊液について、3.3.1及び3.3.2.4の試験を行う。

2.3.4.4 アジュバントの添加

不活化ウイルス浮遊液に製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた油性アジュバントを添加し、原液とする。

ただし、最終バルクの調製時にアジュバントを添加してもよい。

原液について、3.4.1の試験を行う。

なお、アジュバントを添加しない原液について、必要に応じて3.4.2.3の試験を行う。

2.4 最終バルク

ニューカッスル病ウイルス原液、鶏伝染性気管支炎ウイルスの各原液、産卵低下症候群－1976ウイルス原液及び七面鳥鼻気管炎ウイルス原液を混合し、濃度調整したものを最終バルクとする。こ

の場合、製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた保存剤を添加してよい。

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、3.5の試験を行う。

3 試験法

3.1 発育卵、発育あひる卵又は培養細胞の試験

3.1.1 発育鶏卵の試験

個体別発育鶏卵の1%以上又は30個以上を対照発育鶏卵とし、これについて次に掲げる試験を行う。

3.1.1.1 培養観察

対照発育鶏卵を、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、鶏胚に異常を認めてはならない。

3.1.1.2 鶏赤血球凝集試験

3.1.1.1の試験最終日に尿膜腔液を採取し、鶏赤血球浮遊液を等量加え、静置した後観察するとき、赤血球凝集を認めてはならない。

3.1.2 発育あひる卵の試験

個体別発育あひる卵の1%以上又は30個以上を対照発育あひる卵とし、これについて次に掲げる試験を行う。

3.1.2.1 培養観察

対照発育あひる卵を、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、あひる胚に異常を認めてはならない。

3.1.2.2 鶏赤血球凝集試験

3.1.2.1の試験最終日に尿膜腔液を採取し、鶏赤血球浮遊液を等量加え、静置した後観察するとき、赤血球凝集を認めてはならない。

3.1.3 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。

3.1.3.1 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し、観察するとき、CPEを認めてはならない。

3.1.3.2 鶏赤血球凝集試験

3.1.3.1の試験最終日に培養液を採取し、鶏赤血球浮遊液を等量加え、静置した後観察するとき、赤血球凝集を認めてはならない。

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 ニューカッスル病ウイルス

3.2.1.1.1 試験材料

3.2.1.1.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.1.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～11日齢のものをを用いる。

3.2.1.1.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ5個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で5日間培養し、観察する。試験最終日に尿膜腔液を採取し、鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

3.2.1.1.3 判定

尿膜腔液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、EID₅₀を算出する。ただし、24時間以内に

死亡したものは除外する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中 $10^{9.0}$ ID₅₀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。

3.2.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

3.2.1.2.1 試験材料

3.2.1.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.1.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～11日齢のものを用いる。

3.2.1.2.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ5個の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で7～8日間培養し、観察する。試験最終日に鶏胚の変化を観察する。

3.2.1.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全又はカーリング）を認めたものを感染とみなし、EID₅₀を算出する。ただし、24時間以内に死亡したものは除外する。

検体のウイルス含有量は、M41株の場合にあっては1 mL中 $10^{8.0}$ EID₅₀以上及び249g株の場合にあっては1 mL中 $10^{7.4}$ EID₅₀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。

3.2.1.3 産卵低下症候群－1976ウイルス

3.2.1.3.1 試験材料

3.2.1.3.1.1 試料1

検体をウイルス増殖用培養液（付記1）で階段希釈した後、4倍階段希釈した各段階の希釈液を試料1とする。

3.2.1.3.1.2 試料2

検体をトリプトース・ホスフェイト・ブロス溶液で階段希釈した各段階の希釈液を試料2とする。

3.2.1.3.1.3 培養細胞

96穴マイクロプレートに培養したあひる胚初代細胞を用いる。

3.2.1.3.1.4 発育あひる卵

13～15日齢のEDS－76抗体陰性の発育あひる卵を用いる。

3.2.1.3.2 試験方法

次のいずれかの方法によりウイルス含有量を測定する。

3.2.1.3.2.1 培養細胞接種試験

試料1の0.1mLずつをそれぞれ4穴以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間培養して、CPE形成の有無を観察する。

3.2.1.3.2.2 発育あひる卵接種試験

試料2の0.1mLずつをそれぞれ5個以上の発育あひる卵の尿膜腔内に注射し、37℃で7日間培養し、観察する。試験最終日に尿膜腔液を採取し、鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

3.2.1.3.2.3 判定

培養細胞接種試験にあってはCPEが認められる最高希釈倍数からTCID₅₀を、発育あひる卵接種試験にあっては赤血球凝集性を示した最高希釈倍数からEID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中 $10^{6.5}$ EID₅₀以上又は1 mL中 $10^{8.5}$ EID₅₀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。

3.2.1.4 七面鳥鼻気管炎ウイルス

3.2.1.4.1 試験材料

3.2.1.4.1.1 試料

検体を細胞増殖用培養液（付記 2）で調整した鶏胚初代細胞浮遊液で階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.1.4.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格2.1.1の鶏胚初代細胞浮遊液を用いる。

3.2.1.4.2 試験方法

試料200 μ Lずつを、それぞれ96穴組織培養用プレートの5穴以上に接種し、37℃で5～7日間培養し、観察する。

3.2.1.4.3 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。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10^{6.5} 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 不活化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 不活化試験

3.3.2.1 ニューカッスル病ウイルス

3.3.2.1.1 試験材料

3.3.2.1.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.3.2.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～11日齢のものを用いる。

3.3.2.1.2 試験方法

注射材料0.1mLずつを10個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で5日間培養した後、尿膜腔液を採取し、更に1代継代し、37℃で5日間培養して観察する。試験最終日に尿膜腔液を採取し、鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

3.3.2.1.3 判定

鶏胚は、正常に発育しなければならない、尿膜腔液に赤血球凝集を認めてはならない。

3.3.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

3.3.2.2.1 試験材料

3.3.2.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.3.2.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～11日齢のものを用いる。

3.3.2.2.2 試験方法

注射材料0.1mLずつを10個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で5日間培養した後、尿膜腔液を採取し、更に1代継代し、37℃で5日間培養して観察する。

3.3.2.2.3 判定

鶏胚は、正常に発育しなければならない。

3.3.2.3 産卵低下症候群-1976ウイルス

3.3.2.3.1 試験材料

3.3.2.3.1.1 試料

検体に重亜硫酸ナトリウムを加えてホルムアルデヒドを中和したものを試料とする。

3.3.2.3.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格2.1.3の鶏胚肝初代細胞を用いる。

3.3.2.3.2 試験方法

試料を培養細胞に接種し、37℃で5日間培養した後、その培養上清を採取し、更に1代継代し、5日間培養して観察する。試験最終日に培養上清を採取し、鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

3.3.2.3.3 判定

培養細胞にCPE及び1代継代後の培養上清に赤血球凝集を認めない場合には、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。

3.3.2.4 七面鳥鼻気管炎ウイルス

3.3.2.4.1 試験材料

3.3.2.4.1.1 試料

検体を試料とする。

3.3.2.4.1.2 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。

3.3.2.4.2 試験方法

試料の全量を1mLにつき20cm²以上の培養細胞に接種し、37℃で5日間培養した後、その培養上清0.1mLを採取し、更に継代し、37℃で5日間培養して観察する。

3.3.2.4.3 判定

培養細胞にCPEを認めない場合、活性ウイルス陰性とする。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

3.4 原液の試験

3.4.1の試験又は3.4.1若しくは3.4.2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、適合しなければならない。

3.4.2 抗原含有量試験

3.4.2.1 ニューカッスル病ウイルス

3.4.2.1.1 試験材料

3.4.2.1.1.1 試料

検体を生理食塩液で2倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.4.2.1.2 試験方法

各試料50μLに鶏赤血球浮遊液を25μLずつ加え、室温に静置する。

3.4.2.1.3 判定

赤血球の凝集を示す試料の最高希釈倍数を赤血球凝集（HA）単位とする。

抗原量は50μL中128HA単位以上でなければならない。

3.4.2.2 産卵低下症候群－1976ウイルス

3.4.2.2.1 試験材料

3.4.2.2.1.1 試料

検体を生理食塩液で2倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.4.2.2.2 試験方法

各試料50μLに鶏赤血球浮遊液を25μL加え、室温に静置する。

3.4.2.2.3 判定

赤血球凝集を示す試料の最高希釈倍数をHA単位で示す。

抗原量は50μL中4096 HA単位以上でなければならない。

3.4.2.3 七面鳥鼻気管炎ウイルス

3.4.2.3.1 試験材料

3.4.2.3.1.1 試料

検体を洗浄用緩衝液（付記 3）で 2 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.4.2.3.2 試験方法

七面鳥鼻気管炎ウイルスを認識するモノクローナル抗体を固相化した 96 穴平底プレートに各試料及び陰性対照を 50 μ L ずつ添加し、37℃で 45 分間反応させる。反応終了後洗浄用緩衝液で 3 回洗浄した後、七面鳥鼻気管炎ウイルス抗体陽性鶏血清を 50 μ L 添加し、37℃で 30 分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で洗浄し、やぎ抗鶏 IgG ペルオキシダーゼ標識抗体を 50 μ L 添加し、37℃で 30 分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で洗浄し、基質液（付記 4）を 50 μ L ずつ添加し、室温で 10 分間反応させる。反応終了後、反応停止液（付記 5）を 25 μ L 加えて、反応を停止させる。

3.4.2.3.3 判定

波長 450nm で吸光度を測定する。陰性対照より 2 倍以上の吸光度値を示す最終希釈倍数を相対抗原量とする。

検体の抗原量は、250 EU/mL 以上である。

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、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。

3.5.2 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。

3.5.3 ホルマリン定量試験

製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた方法で試験品を処理したものを試料とし、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、0.2 vol% 以下でなければならない。

3.5.4 安全試験

3.5.4.1 試験材料

3.5.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.4.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 4 ～ 5 週齢の鶏を用いる。

3.5.4.2 試験方法

試験動物 10 羽を試験群、3 羽を対照群とする。

注射材料の 1 羽分ずつを試験群の頸部中央部皮下に注射し、対照群とともに 4 週間観察する。

3.5.4.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に臨床的な異常を認めてはならない。

3.5.5 力価試験

3.5.5.1 ニューカッスル病力価試験

3.5.5.1.1 試験材料

3.5.5.1.1.1 試験動物

3.5.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.5.5.1.1.2 赤血球凝集抗原

「ニューカッスル病診断用赤血球凝集抗原」を用いる。

3.5.5.1.2 試験方法

3.5.4 の試験最終日に試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、ニューカッスル病ウイルス赤血球凝集抑制試験を行う。

3.5.5.1.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価（以下「HI抗体価」という。）とする。

試験群の80%以上がHI抗体価80倍以上でなければならない。この場合、対照群では、すべてが5倍以下でなければならない。

3.5.5.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

3.5.5.2.1 試験材料

3.5.5.2.1.1 試験動物

3.5.4の試験に用いた動物を用いる。

3.5.5.2.1.2 中和試験用ウイルス

それぞれの製造用株を用いる。ただし、ウイルス量は、生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～11日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、ウイルス価を測定するとき、1 mL中 $10^{5.0}$ EID₅₀以上でなければならない。

3.5.5.2.1.3 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～11日齢のものを用いる。

3.5.5.2.2 試験方法

3.5.4の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について、ウイルス希釈法により中和試験を行う。血清は、それぞれ等量を各群ごとにプールし、非働化する。

それぞれの中和試験用ウイルスをリン酸緩衝食塩液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を3群に分け、第1群には試験群のプール血清を、第2群には対照群のプール血清を、第3群にはウイルス対照としてリン酸緩衝食塩液を、それぞれ等量加えて混合する。これらの混合液を4℃で18～24時間又は37℃で60分間処理する。処理した試料0.1mLずつを5個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で7～8日間培養し、観察する。

3.5.5.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全又はカーリング）を認めたものを感染とみなし、EID₅₀を求め、中和指数を算出する。ただし、24時間以内に死亡したものは除外する。

試験群のそれぞれの株に対する中和指数は、対照群に対し2.0以上でなければならない。この場合、対照群の中和指数は、ウイルス対照に対し1.0以下でなければならない。

3.5.5.3 産卵低下症候群－1976力価試験

3.5.5.3.1 試験材料

3.5.5.3.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.5.3.1.2 試験動物

3.5.4の試験に用いた動物を用いる。

3.5.5.3.1.3 赤血球凝集抗原

産卵低下症候群－1976ウイルス赤血球凝集抗原（付記6）を用いる。

3.5.5.3.2 試験方法

3.5.4の試験最終日に試験群及び対照群から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。

血清1容に25w/v%カオリン（付記7）3容を加え、室温で処理した後、遠心した上清を採取する。これをリン酸緩衝食塩液で階段希釈し、各希釈血清25μLに等量の4単位の産卵低下症候群－1976ウイルス赤血球凝集抗原を加えて混合し、処理した後、鶏赤血球浮遊液を50μLずつ加えて振盪混合し静置した後に赤血球凝集の有無を観察する。

3.5.5.3.3 判定

赤血球凝集が抑制された血清の最高希釈倍数をHI抗体価とする。

試験群の80%以上がHI抗体価32倍以上でなければならない。この場合、対照群においては、す

べてHI抗体価4倍未満でなければならない。

3.5.5.4 七面鳥鼻気管炎力価試験

3.5.5.4.1 試験材料

3.5.5.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.5.4.1.2 試験動物

3.5.4の試験に用いた動物を用いる。

3.5.5.4.2 試験方法

3.5.4の試験最終日に試験群及び対照群から採取した各個体の血清についてELISAを行う。

固相化緩衝液（付記8）で濃度調整した七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原（付記9）を96穴平底プレートに100 μ Lずつ分注し、37℃で3時間反応後、洗浄用緩衝液で洗浄し、乾燥させる。次に被検血清をIB・EIA緩衝液（付記10）で階段希釈し、固相化プレートに各希釈血清を100 μ Lずつ加え、37℃で30分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で洗浄し、水切りを行った後、やぎ抗鶏IgGペルオキシダーゼ標識抗体（付記11）を100 μ L加え、37℃で30分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で洗浄し、水切りを行った後、基質液を100 μ L加え、常温で8分間反応させる。反応終了後、反応停止液を50 μ L加えて、反応を停止させ、波長450nmで吸光度を測定する。

3.5.5.4.3 判定

参照陰性血清（付記12）の平均吸光度値の少なくとも1.5倍の吸光度値を示す血清の希釈倍数をELISA抗体価とすると、試験群の80%以上はELISA抗体価 $2^{9.64}$ 倍以上を示さなければならない。この場合、対照群はすべて $2^{4.64}$ 倍未満でなければならない。また、参照陽性血清（付記13）は $2^{6.64}$ 倍以上の抗体価を示さなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は3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

2.95g

牛血清

20ml

イーグルMEM

残量

炭酸水素ナトリウムでpHを7.0～7.4に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記2 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

0.83g

トリプトース

1.00g

ラクトアルブミン水解物

1.25g

炭酸水素ナトリウム

2.45g

牛血清

50ml

イーグルMEM

残量

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記3 洗浄用緩衝液

1,000mL中

リン酸一水素ナトリウム

2.9g

リン酸二水素ナトリウム	0.2g
塩化ナトリウム	37.2g
塩化カリウム	0.2g
Tween 20	1.5g
精製水	残量
pH7.0±0.1に調整する。	

付記 4 基質液

TMB 溶液	0.2mL
UP 緩衝液	1.5mL
精製水	15mL

a:TMB溶液はDMSO1,000mLにTMB (3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン) を6g溶解したもの。

b:UP緩衝液は尿素過酸化水素(140mg)をTMB緩衝液100mLに溶解したもの。

c:TMB緩衝液は酢酸ナトリウム136gを約500mLの精製水に溶解し、1.5Mクエン酸でpH5.5±0.2に調整した後、蒸留水を加えて1,000mLとし高圧蒸気滅菌を行う。

付記 5 反応停止液

硫酸	110mL
水	1,000mL

付記 6 産卵低下症候群－1976ウイルス赤血球凝集抗原

産卵低下症候群－1976ウイルスJPA-1株又は同等と認められた株を生ワクチン製造用材料の規格1.3の発育あひる卵で増殖させて得た尿膜腔液又は生ワクチン製造用材料の規格2.1.3の鶏胚肝初代細胞で増殖させて得た培養上清に0.2vol%になるようにホルマリンを加えて不活化したもの。

付記 7 25w/v%カオリン液

100mL中	
カオリン	25g
リン酸緩衝液	残量

高圧蒸気滅菌又は窒化ナトリウムを0.01w/v%添加した後、10℃以下に保存する。

付記 8 固相化緩衝液

1,000mL中	
リン酸一水素ナトリウム	12.10g
リン酸二水素ナトリウム	1.43g
塩化ナトリウム	8.5g
精製水	残量
pH7.0±0.1に調整する。	

付記 9 七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原

動物用生物学的製剤基準の生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の発育鶏卵を用いて作製した鶏胚線維芽細胞に製造用七面鳥鼻気管炎ウイルスを感染させ、超音波破碎及びショ糖ステップ遠心等の加工により得られたもので、参照陽性血清の100倍希釈液の吸光度値が0.8以上及び参照陰性血清の吸光度値が0.2以下を示すもの。

付記10 IB・EIA緩衝液

1,000mL中

リン酸二水素ナトリウム 2.31g

リン酸水素二ナトリウム二水和物 24.06g

塩化ナトリウム 29.22g

カオリン処理30w/v%牛血清アルブミン 3.3mL

Tween 20 0.50g

精製水 残量

ろ過滅菌（200nm）後、スキムミルクを2w/v%及び牛胎児血清を5vol%加える。

付記11 やぎ抗鶏IgGペルオキシダーゼ標識抗体

参照陽性血清が規定の抗体価を示すようにIB・EIA緩衝液で調整したもの。

付記12 参照陰性血清

生ワクチン製造用材料の規格1.1の鶏群由来で七面鳥鼻気管炎ウイルスに対する抗体を保有しない鶏血清で、ELISA 抗体価 $2^{4.64}$ 倍未満を示すもの。

付記13 参照陽性血清

生ワクチン製造用材料の規格1.1の鶏群由来で七面鳥鼻気管炎ウイルスに対する抗体陰性鶏を弱毒七面鳥鼻気管炎ウイルスBUT1#8544株の生ウイルスで免疫して得た血清で、ELISA抗体価 $2^{8.64} \sim 2^{9.64}$ 倍を示すもの。

ワクチン（シードロット製剤）の部の猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症・猫汎白血球減少症混合生ワクチン（シード）の項の次に次のように加える。

猫ウイルス性鼻気管炎・猫カリシウイルス感染症 2 価・ 猫汎白血球減少症混合ワクチン（シード）

1 定義

シードロット規格に適合した弱毒猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス及び同規格に適合した弱毒猫汎白血球減少症ウイルスをそれぞれ同規格に適合した培養細胞で増殖させて得たウイルス液並びに同規格に適合した 2 種類の猫カリシウイルスをそれぞれ同規格に適合した培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化したものを混合し、凍結乾燥したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス

2.1.1.1 名称

弱毒猫ウイルス性鼻気管炎ウイルスF2株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

猫に注射しても病原性を示さない。猫腎継代細胞に接種すると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、保存及び小分け製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、猫腎継代細胞で増殖させ、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－35℃以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

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、猫腎継代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－35℃以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

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、猫腎継代細胞で増殖する。

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－35℃以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

プロダクションシードウイルスを保存する場合について、3.1.3の試験を行う。

2.1.2 猫カリシウイルス

2.1.2.1 名称

猫カリシウイルスG1株及び431株

2.1.2.2 性状

猫に注射しても病原性を示さない。猫腎継代細胞に接種するとCPEを伴って増殖する。

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、猫腎継代細胞で増殖させ、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 -35°C 以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

マスターシードウイルスについて、3.1.1.1、3.1.1.2、3.1.1.3及び3.1.1.4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、猫腎継代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 -35°C 以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

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、猫腎継代細胞で増殖する。

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 -35°C 以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

プロダクションシードウイルスを保存する場合について、3.1.3の試験を行う。

2.1.3 猫汎白血球減少症ウイルス

2.1.3.1 名称

弱毒猫汎白血球減少症ウイルスPLIIV株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

猫に注射しても病原性を示さない。猫腎継代細胞に接種すると増殖し、豚の赤血球を凝集する。

2.1.3.3 マスターシードウイルス

2.1.3.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、猫腎継代細胞で増殖させ、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 -35°C 以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

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。

2.1.3.4 ワーキングシードウイルス

2.1.3.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、猫腎継代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 -35°C 以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

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。

2.1.3.5 プロダクションシードウイルス

2.1.3.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、猫腎継代細胞で増殖する。

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－35℃以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

プロダクションシードウイルスを保存する場合について、3.1.3の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス

2.2.1.1 培養細胞

猫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。

2.2.1.3 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。

マスターセルシードは、特定の製造番号または製造記号を付し、凍結して－70℃以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

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℃以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

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の培養液で増殖する。

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℃以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

プロダクションセルシードを保存する場合について、3.2.3の試験を行う。

2.2.2 猫カリシウイルス

2.2.2.1 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

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。

2.2.2.3 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。

マスターセルシードは、特定の製造番号または製造記号を付し、凍結して－70℃以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

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の培養液で増殖する。

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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

プロダクションセルシードを保存する場合について、3.2.3の試験を行う。

2.2.3 猫汎白血球減少症ウイルス

2.2.3.1 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

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。

2.2.3.3 マスターセルシード

2.2.3.3.1 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、2.2.3.2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。

マスターセルシードは、特定の製造番号または製造記号を付し、凍結して -70°C 以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

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。

2.2.3.4 ワーキングセルシード

2.2.3.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.3.2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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

ワーキングセルシードについて、3.2.2の試験を行う。

2.2.3.5 プロダクションセルシード

2.2.3.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは2.2.3.2の培養液で増殖する。

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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

プロダクションセルシードを保存する場合について、3.2.3の試験を行う。

2.3 原液

2.3.1 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス原液

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、培養した細胞を個体別培養細胞とみなす。ウイルス接種前のプロダクションセルシードに異常を認めてはならない。

2.3.1.2 ウイルスの培養

プロダクションセルシードウイルスを2.3.1.1の細胞に接種し、 $33.5\sim 36.5^{\circ}\text{C}$ 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、そのろ液、遠心上清又はこれらを濃縮したものを

混合し、製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた安定剤を加え、原液とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その培養方法とする。

原液について、3.3.1及び3.3.2.1の試験を行う。

2.3.2 猫カリシウイルス原液

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、培養した細胞を個体別培養細胞とみなす。ウイルス接種前のプロダクションセルシードに異常を認めてはならない。

2.3.2.2 ウイルスの培養

各株のプロダクションシードウイルスを2.3.2.1の細胞に接種し、35.5～38.5℃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、そのろ液又は遠心上清を各株のウイルス浮遊液とする。

2.3.2.3 不活化

各株のウイルス浮遊液にブロモエチレンイミンを加えウイルスを不活化し、不活化ウイルス液とする。その後、不活化剤を中和してもよい。不活化ウイルス液を濃縮し、原液とする。

原液について、3.3.1、3.3.3及び3.3.4の試験を行う。

2.3.3 猫汎白血球減少症ウイルス原液

2.3.3.1 プロダクションセルシードの培養

1 回に処理し、培養した細胞を個体別培養細胞とみなす。ウイルス接種前のプロダクションセルシードに異常を認めてはならない。

2.3.3.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.3.1の細胞に接種し、36～38℃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、そのろ液、遠心上清又はこれらを濃縮したものを混合し、製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた安定剤を加え、原液とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その培養方法とする。

原液について、3.3.1及び3.3.2.2の試験を行う。

2.4 最終バルク

猫カリシウイルス各株の原液及び猫汎白血球減少症ウイルス原液を混合し中間バルクとする。さらに猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス原液を加えて混合し最終バルクとする。

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、3.4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1.4.2.1.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 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

猫白血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及び3.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス、犬パルボウイルス、猫汎白血球減少症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、3.2.6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。

3.1.1.5 対象動物を用いた免疫原性試験

一般試験法の対象動物を用いた免疫原性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。

3.1.1.6 対象動物を用いた安全性確認試験

一般試験法の対象動物を用いた安全性確認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。

3.1.1.7 病原性復帰確認試験

一般試験法の病原性復帰確認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 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。

3.2 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 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。

3.2.1.3 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。

3.2.1.4 外来性ウイルス否定試験

3.2.1.4.1 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1.2、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。

3.2.1.4.2 特定ウイルス否定試験

3.2.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験法

猫白血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及び3.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス、犬パルボウイルス、猫汎白血球減少症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、3.2.6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。

3.2.1.5 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。

3.2.1.6 核学的（染色体）性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.6.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.7 腫瘍形成試験／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 原液の試験

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 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス含有量試験

3.3.2.1.1 試験材料

3.3.2.1.1.1 試料

検体を製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた希釈液で階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.2.1.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.3.2.1.2 試験方法

試料をマイクロプレートに分注し、これに細胞浮遊液を加え、37℃で5日間培養する。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。

3.3.2.1.3 判定

培養終了日に、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、それぞれ最終バルクを調整するのに十分な含有量を示さなければならない。

ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その判定方法とする。

3.3.2.2 猫汎白血球減少症ウイルス含有量試験

3.3.2.2.1 試験材料

3.3.2.2.1.1 試料

検体を製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた希釈液で階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.2.2.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.3.2.2.2 試験方法

試料を細胞浮遊液を分注したマイクロプレートに接種し培養する。培養終了日に培養液を1% BABS加リン酸緩衝食塩液（付記1）を分注したマイクロプレートに加え、さらに豚赤血球を加えて凝集を観察する。

3.3.2.2.3 判定

赤血球凝集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、それぞれ最終バルクを調整するのに十分な含有量を示さなければならない。

ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その判定方法とする。

3.3.3 不活化試験

3.3.3.1 試験材料

3.3.3.1.1 試料

猫カリシウイルス原液にチオ硫酸ナトリウムを加えてブロモエチレンイミンを中和したものを試料とする。

3.3.3.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.3.3.2 試験方法

猫腎継代細胞に試料を接種し、4日間培養した後凍結する。凍結融解し、細胞融解物を別に用意した猫腎継代細胞に接種し、4日間培養後、顕微鏡観察する。

3.3.3.3 判定

猫腎継代細胞にCPEを認めてはならない。

3.3.4 抗原量定量試験

3.3.4.1 試験材料

3.3.4.1.1 試料

猫カリシウイルス原液を試料とする。

3.3.4.2 試験方法

捕捉用抗猫カリシウイルス抗体（付記2）を固相化した96穴ELISA用マイクロプレートに、試料、猫カリシウイルス抗原量定量ELISA参照品（付記3）を加えて反応させ、猫カリシウイルス抗原定量ELISA用標識モノクローナル抗体（付記4）を加え、吸光度を測定する。

以下の計算式によりOD₅₀を算出し、OD₅₀を示す検体の希釈倍数を抗原量としてELISA単位（log10）で表す。

$$OD_{50} = (OD_{max} + OD_{min}) / 2$$

OD_{max}：参照品の最大ODの平均

OD_{min}：参照品の最小ODの平均

$$\text{抗原量 (log10)} = (OD_{50} - \text{定数}) / \text{傾き}$$

定数と傾き：ODと抗原希釈倍数の対数についてOD₅₀を挟む2点の回帰直線の定数及び傾き

3.3.4.3 判定

参照品が所定の抗原量を示すとき、試料の抗原量は2.9log10ELISA単位以上でなければならない。

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。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.4.2 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、適合しなければならない。

3.4.3 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。

3.4.4 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。

3.4.5 ウイルス含有量試験

3.4.5.1 猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス含有量試験

3.4.5.1.1 試験材料

3.4.5.1.1.1 試料

試験品をMEM培養液で階段希釈し、各階段の希釈液を試料とする。

3.4.5.1.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.4.5.1.2 試験方法

プレートの穴に試料及びそれと等量の抗猫汎白血球減少症ウイルス血清（付記5）を加え、感作する。各穴に猫腎継代細胞浮遊液を加えて培養し、CPEを観察する。

3.4.5.1.3 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^{4.9}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、その判定方法とする。

3.4.5.2 猫汎白血球減少症ウイルス含有量試験

3.4.5.2.1 試験材料

3.4.5.2.1.1 試料

試験品を56℃で30分処理したものを、MEM培養液で階段希釈し、各階段の希釈液を試料とする。

3.4.5.2.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.4.5.2.2 試験方法

3.3.2.2.2の試験方法に従って試験を行う。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。

3.4.5.2.3 判定

培養液に赤血球凝集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^{3.5}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、その判定方法とする。

3.4.6 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。

3.4.7 安全試験

3.4.7.1 試験材料

3.4.7.1.1 注射材料

試験品を溶解用液で溶解したものを注射材料とする。

3.4.7.1.2 試験動物

6か月齢未満の猫を用いる。

3.4.7.2 試験方法

試験動物3頭を試験群、2頭を対照群とする。試験群に注射材料1頭分ずつを3週間隔で2回皮下注射し、対照群ともに7週間観察する。

3.4.7.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に異常を認めてはならない。

3.4.8 力価試験

3.4.8.1 猫ウイルス性鼻気管炎力価試験

3.4.8.1.1 試験材料

3.4.8.1.1.1 試験動物

3.4.7の試験に用いた動物を用いる。

3.4.8.1.1.2 中和試験用ウイルス

製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた猫ウイルス性鼻気管炎ウイルス株を用いる。

3.4.8.1.1.3 培養細胞

猫腎継代細胞を用いる。

3.4.8.1.2 試験方法

3.4.7の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について猫ウイルス性鼻気管炎に対する抗体価を間接蛍光抗体法により測定する。

血清を希釈液（付記6）で10倍とし、更に2倍階段希釈する。感染細胞（付記7）に各希釈液を0.1mLずつ加え、37℃で30分間処理した後、洗浄液（付記8）で2回洗浄する。抗猫IgG蛍光標識抗体（付記9）を加え、37℃で30分間処理した後、洗浄液で3回洗浄後、蛍光顕微鏡で観察する。

3.4.8.1.3 判定

特異蛍光が認められる血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群の抗体価は幾何平均で20倍以上、対照群では10倍以下でなければならない。

3.4.8.2 猫カリシウイルス感染症力価試験

3.4.8.2.1 試験材料

3.4.8.2.1.1 試料

試験品を試料とする。

3.4.8.2.2 試験方法

3.3.4.2の方法で試験を行う。

3.4.8.2.3 判定

参照品が所定の抗原量を示すとき、試験品の抗原量は $2.0\log_{10}$ ELISA単位以上でなければならない。

3.4.8.3 猫汎白血球減少症力価試験

3.4.8.3.1 試験材料

3.4.8.3.1.1 試験動物

3.4.7の試験に用いた動物を用いる。

3.4.8.3.1.2 赤血球凝集抗原

猫汎白血球減少症ウイルス赤血球凝集抗原（付記10）を用いる。

3.4.8.3.2 試験方法

3.4.7の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について赤血球凝集抑制試験を行う。

各血清に25w/v%カオリン液及び豚赤血球を加えて処理した後、牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液（付記11）で2倍階段希釈する。各希釈液に8単位の赤血球凝集抗原を混合し、常温で約60分間処理し、この混合液と等量のVAD6.0液（付記12）で調整した豚赤血球浮遊液を加え2～5℃で一夜静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

3.4.8.3.3 判定

赤血球凝集が抑制された血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。試験群の赤血球凝集抑制抗体価の幾何平均値は、64倍以上でなければならない。この場合、対照群では8倍未満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10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 1%BABS加リン酸緩衝食塩液 (pH6.4)

下記リン酸緩衝食塩液とBABS緩衝液を99:1に混合したもの。

リン酸緩衝食塩液 (pH6.4)

1,000mL中

塩化ナトリウム	8.77g
リン酸水素二ナトリウム二水和物	3.14g
リン酸二水素カリウム	6.68g
水	残量

BABS緩衝液 (pH8.95)

1,000mL中

塩化ナトリウム	7.0g
ホウ酸	3.1g
1mol/L水酸化ナトリウム溶液	24mL
牛血清アルブミン	4 g
水	残量

付記 2 捕捉用抗猫カリシウイルス抗体

猫を猫カリシウイルスG1株又は431株で免疫して得た血清で、炭酸ナトリウム緩衝液で至適濃度に希釈して使用する。-20℃に保存する。

付記 3 猫カリシウイルス抗原量定量ELISA参照品

猫カリシウイルスG1株又は431株を含有する濃縮精製抗原、又は凍結乾燥ワクチン(G1株及び431株)を注射用水で溶解したもので、抗原量が明らかなもの。

本ELISAで抗原量を測定するとき、所定の抗原量を示さなければならない。

付記 4 猫カリシウイルス抗原定量ELISA用標識モノクローナル抗体

ペルオキシダーゼ標識抗猫カリシウイルスp66モノクローナル抗体。ハイブリドーマH3-2 1012 E2Eを接種したマウスの腹水を精製し、ペルオキシダーゼで標識したもので、ELISA用緩衝液で希釈して使用する。-20℃に保存する。

付記 5 抗猫汎白血球減少症ウイルス血清

猫汎白血球減少症ウイルスで免疫した血清で、中和能を有するもの。

付記 6 希釈液

IFA用リン酸緩衝食塩液 (IFA-PBS) に牛血清アルブミンを1w/v%添加したもの。

付記 7 感染細胞

猫腎継代細胞浮遊液を96穴プレートに播種し、37℃、5vol%炭酸ガス下で培養して単層を形成させたものに猫ヘルペスウイルスF2株又はこれと同等と認められた株を接種し、わずかにCPEが確認された時点で培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で洗浄する。冷メタノールを加え固定した後、乾燥させ、各穴にブロッキング液を分注し、静置した後、洗浄液で洗浄したもので、特異抗原を有するもの。

付記 8 洗浄液 (pH9.0)

1, 000mL 中

塩化ナトリウム	2.125g
---------	--------

炭酸ナトリウム	2.85 g
---------	--------

炭酸水素ナトリウム	8.4 g
-----------	-------

水	残量
---	----

付記 9 抗猫IgG蛍光標識抗体

猫IgGに対する山羊抗体を蛍光標識したもので、蛍光抗体法を行うとき非特異が最小限で、かつ特異蛍光強度が最大になるように希釈して使用する。

付記10 猫汎白血球減少症ウイルス赤血球凝集抗原

猫汎白血球減少症ウイルスを猫腎継代細胞で増殖させて得た培養上清又はこれを不活化したもので、赤血球凝集価128倍以上のもの。

付記11 牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液

1,000 mL 中

塩化ナトリウム	10.52g
---------	--------

ホウ酸	3.09g
-----	-------

水酸化ナトリウム	0.96g
----------	-------

水	残量
---	----

牛血清アルブミンを0.2w/v%となるように加えた後、水酸化ナトリウム液でpHを9.0に調整する。

付記12 VAD6.0液

1,000mL 中

塩化ナトリウム	8.77g
---------	-------

無水リン酸水素二ナトリウム	5.68g
---------------	-------

リン酸二水素ナトリウム二水和物	40.56g
-----------------	--------

水	残量
---	----

牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液と等量混合してpHを6.0に調整する。

ワクチン（シードロット製剤）の部の牛流行熱（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）の項の次に次のように加える。

牛疫生ワクチン（シード）

1 定義

シードロット規格に適合した弱毒牛疫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を凍結乾燥したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

弱毒家兎化鶏胎化牛疫ウイルス赤穂株又はLA株

2.1.2 性状

牛の皮下に注射したとき、軽い発熱のほかの異常を認めない。

11～12日齢の発育鶏卵の静脈内に注射すると増殖し、鶏胚の脾臓の腫脹を認める。

牛腎継代細胞及びVero細胞に接種すると、特有のCPEを伴って増殖する。

2.1.3 マスターシードウイルス

2.1.3.1 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、発育鶏卵で増殖させ、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、凍結乾燥して5℃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、11代以内でなければならない。

2.1.4 ワーキングシードウイルス

2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、Vero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℃以下又は凍結乾燥して5℃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。

2.1.5 プロダクションシードウイルス

2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、Vero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℃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。

2.2 製造用材料

2.2.1 培養細胞

Vero細胞を用いる。

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 マスターセルシード

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℃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。

2.2.4 ワーキングセルシード

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℃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。

2.2.5 プロダクションセルシード

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℃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。

2.3 原液

2.3.1 プロダクションセルシードの培養

1 回に処理し、培養した細胞を個体別培養細胞とみなす。ウイルス接種前のプロダクションセルシードに異常を認めてはならない。

2.3.2 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の細胞で培養し、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、3.3の試験を行う。

2.4 最終バルク

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 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、3.4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1.4.2.1.1.1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及び2.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.4.2 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

牛R Sウイルス及びブルータングウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法1.1

及び3.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス、ロタウイルス、牛白血病ウイルス、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。

3.1.1.5 対象動物を用いた免疫原性試験

一般試験法の対象動物を用いた免疫原性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。

3.1.1.6 対象動物を用いた安全性確認試験

一般試験法の対象動物を用いた安全性確認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。

3.1.1.7 病原性復帰確認試験

一般試験法の病原性復帰確認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。

3.1.1.8 マーカー試験

3.1.1.8.1 試験材料

3.1.1.8.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で10倍及び100倍に希釈したものを試料とする。

3.1.1.8.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1の11～12日齢のものを用いる。

3.1.1.8.2 試験方法

試料0.05mLずつをそれぞれ10個以上の発育鶏卵の静脈内に注射し、38℃で5日間培養し、生存鶏胚の脾臓の腫脹の有無を検査する。

3.1.1.8.3 判定

脾臓重量15mg以上を腫脹とみなす。

生存鶏胚の25%以上に脾臓の腫脹を認めなければならない。

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。

3.2 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及び2.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.5.2 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

牛R Sウイルス及びブルータングウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法1.2及び3.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.5.2.2 個別ウイルス否定試験

牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス、ロタウイルス、牛白血病ウイルス、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。

3.2.3 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 原液の試験

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 試験材料

3.3.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液又はウイルス増殖用培養液（付記）で10倍段階希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.2.1.2 培養細胞

Vero細胞を培養し、単層となったものを用いる。

3.3.2.2 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0.5mLずつ加え、37℃で7日間培養し、観察する。

3.3.2.3 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^{5.0}TCID₅₀以上でなければならない。

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。

3.4.2 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、適合しなければならない。

3.4.3 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、適合しなければならない。

3.4.4 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。

3.4.5 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。

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。

3.4.6 ウイルス含有量試験

3.3.2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 $10^{3.0}$ TCID₅₀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 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	2.95g
-------------------	-------

ブドウ糖	1.0 g
------	-------

酵母エキス	0.5 g
-------	-------

グルタミン酸ナトリウム	5.0 g
-------------	-------

イーグルMEM	残量
---------	----

炭酸水素ナトリウムでpHを7.0～7.4に調整する。

牛血清アルブミン 1 g又は牛疫ウイルスに対する中和抗体陰性の牛血清を 5 vol%となるように加えてもよい。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

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生ワクチンの項を次のように改める。

牛伝染性鼻気管炎生ワクチン

1 定義

弱毒牛伝染性鼻気管炎ウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を凍結乾燥したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 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

2.1.2 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。

2.1.3 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。

2.2 製造用材料

2.2.1 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.6.2 の豚精巢初代細胞若しくは継代細胞又は牛腎継代細胞を用いる。

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。

2.3 原液

2.3.1 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。

2.3.2 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、3.2の試験を行う。

2.4 最終バルク

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 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 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。

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本以上の培養びん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の試験最終日に培養びんの培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を2回洗浄後、2群に分け、生理食塩液で調整した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。

3.2 原液の試験

3.2.1 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。

3.2.2 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、2.3.1、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）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 試験材料

3.2.3.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記2）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.3.1.2 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。

3.2.3.2 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。

3.2.3.3 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^{6.5}TCID₅₀以上でなければならない。

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 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、適合しなければならない。

3.3.3 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、適合しなければならない。

3.3.4 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。

3.3.5 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。

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。

3.3.6 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、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を非働化したものを用いる。

3.3.7 ウイルス含有量試験

3.2.3 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 $10^{4.0}$ TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.3.8 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。

3.3.9 安全試験

3.3.9.1 試験材料

3.3.9.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.3.9.1.2 試験動物

体重 100 ～ 200kg の牛を用いる。

3.3.9.2 試験方法

注射材料 1 頭分を 1 頭の試験動物の筋肉内に注射し、14 日間観察する。

3.3.9.3 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。

3.3.10 力価試験

3.3.10.1 試験材料

3.3.10.1.1 試験動物

3.3.9 の試験に用いた動物を用いる。

3.3.10.1.2 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。

3.3.10.1.3 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。

3.3.10.2 試験方法

3.3.9 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 3）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 4）3 mL を加え、更に 24 時間培養後、ブラック数を算定する。

3.3.10.3 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。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、1年間とする。ただし、特に承認されたものは、その期間とする。

付記 1 抗牛伝染性鼻気管炎ウイルス血清

牛伝染性鼻気管炎ウイルスで免疫した兎の血清で、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 2 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中

ラクトアルブミン水解物

5 g

酵母エキス

1 g

アール液又はハンクス液

残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ～ 7.4 に調整する。

牛伝染性鼻気管炎ウイルスに対する中和抗体陰性の牛又はやぎ血清を 2 ～ 5 vol% となるように加えてもよい。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 3 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

2.95g

寒天

8 g

牛又はやぎ血清

5 ～ 20 mL

水

残 量

牛又はやぎ血清は、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 4 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

2.95g

寒天

8 g

ニュートラルレッド

0.05g

水

残 量

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・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・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

1 定義

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、弱毒牛パラインフルエンザ3型ウイルス及び弱毒牛RSウイルス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。

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 牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス

2.1.2.1 名称

弱毒牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルスNo.12-43株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

牛の皮下又は筋肉内に注射しても病原性を示さない。

豚精巢初代細胞及び牛精巢継代細胞でCPEを示さず増殖し、END法によるEND現象又は干渉法による干渉現象は陽性である。

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。

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。

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。

2.1.3 牛パラインフルエンザウイルス

2.1.3.1 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

2.1.3.2 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。

2.1.3.3 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RSウイルス

2.1.4.1 名称

弱毒牛RSウイルスrs-52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。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。

2.1.4.3 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。

2.2 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の豚精巣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の豚精巣初代又は継代細胞を用いる。

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 牛パラインフルエンザ3型ウイルス

2.2.3.1 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。

2.2.3.2 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、3.2.1、3.2.2及び3.2.3.1の試験を行う。

2.3.2 牛ウイルス性下痢一粘膜病ウイルス原液

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、3.2.1、3.2.2及び3.2.3.2の試験を行う。

2.3.3 牛パラインフルエンザ3型ウイルス原液

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、3.2.1、3.2.2及び3.2.3.3の試験を行う。

2.3.4 牛RSウイルス原液

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、3.2.1、3.2.2及び3.2.3.4の試験を行う。

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 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細胞の場合は、3.1.2及び3.1.5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本以上の培養びん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又は3.1.5の試験最終日に培養びんの培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を2回洗浄後、2群に分け、生理食塩液で調整した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びんの培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を2回洗浄後、生理

食塩液で調整した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、培養細胞に赤血球吸着を認めてはならない。

3.2 原液の試験

3.2.1 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。

3.2.2 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

3.2.3.1.1 試験材料

3.2.3.1.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記5）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

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℃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。

3.2.3.1.3 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。

3.2.3.2 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 試験材料

3.2.3.2.1.1 試料

検体を細胞増殖用培養液（付記6）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.3.2.1.2 培養細胞

牛精巢継代細胞浮遊液を用いる。

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℃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、1 mL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（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℃で5～7日間培養し、観察する。

3.2.3.2.3 判定

干渉法にあつては、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。

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。

3.2.3.3 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 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。

3.2.3.3.1.2 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℃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。

3.2.3.3.3 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。

3.2.3.4 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℃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。

3.2.3.4.3 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。

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。

3.3 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 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、適合しなければならない。

3.3.3 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、適合しなければならない。

3.3.4 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。

3.3.5 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。

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。

3.3.6 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、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。

3.3.7 ウイルス含有量試験

3.3.7.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス含有量試験

3.2.3.1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。

3.3.7.2 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、試験品中の牛ウイルス性下痢－粘膜病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。

3.3.7.3 牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス

3.2.3.3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 $10^{5.0}$ TCID₅₀以上でなければならない。

ただし、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。

3.3.7.4 牛RSウイルス含有量試験

3.2.3.4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 $10^{5.0}$ TCID₅₀以上でなければならない。

ただし、試験品中の牛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。

3.3.8 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。

3.3.9 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 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.3.9.1.1.2 試験動物

体重100～200kgの牛を用いる。

3.3.9.1.2 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。

3.3.9.1.3 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。

3.3.9.2 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 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.3.9.2.1.2 試験動物

3日齢以内の乳のみマウスを用いる。

3.3.9.2.2 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。

3.3.9.2.3 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。

3.3.10 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 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。

3.3.10.1.1.3 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 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。

3.3.10.2 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

3.3.9.1の試験に用いた動物を用いる。

3.3.10.2.1.2 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Nose株を用いる。

3.3.10.2.1.3 培養細胞

牛精巢継代細胞浮遊液を用いる。

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 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、8倍以上でなければならない。

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 接種材料

試験品を注射材料とする。

3.3.10.3.1.2 試験動物

体重約350gのモルモットを用いる。

3.3.10.3.1.3 赤血球凝集抗原

牛パラインフルエンザ3型赤血球凝集抗原（付記9）を用いる。

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 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。

3.3.10.4 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 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.3.10.4.1.2 試験動物

体重約100gのハムスターを用いる。

3.3.10.4.1.3 中和試験用ウイルス

牛腎継代細胞で増殖させた牛RSウイルスNMK7株を用いる。

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 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. 貯法及び有効期間

有効期間は 2 年 3 か月間とする。ただし、特に承認されたものは、その期間とする。

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、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 2 抗牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス血清

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、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BNi-1株で免疫した兎の血清で、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、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 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、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。

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。

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

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

付記9 牛パラインフルエンザ3型赤血球凝集抗原

牛パラインフルエンザ3型ウイルスBNi-1株を牛腎継代細胞で増殖させて得た培養上清

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・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・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生ワクチン

1 定義

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、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 牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス

2.1.2.1 名称

弱毒牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス No.12-43 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

牛の皮下又は筋肉内に注射しても病原性を示さない。豚精巢初代細胞及び牛精巢継代細胞でCPEを示さず増殖し、END法によるEND現象又は干渉法による干渉現象は陽性である。

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。

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。

2.1.3 牛パラインフルエンザウイルス

2.1.3.1 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

2.1.3.2 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。

2.1.3.3 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 RS ウイルス

2.1.4.1 名称

弱毒牛 RS ウイルス rs-52 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。

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。

2.1.4.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、HmLu 細胞又は Vero 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 牛アデノウイルス

2.1.5.1 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

2.1.5.2 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。

2.1.5.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、やぎ精巢初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。

2.2 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 の豚精巣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 の豚精巣初代又は継代細胞を用いる。

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 牛パラインフルエンザ3型ウイルス

2.2.3.1 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。

2.2.3.2 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RSウイルス

2.2.4.1 培養細胞

HmLu 細胞又は Vero 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 牛アデノウイルス（7型）

2.2.5.1 培養細胞

やぎ精巣初代細胞又は牛精巣継代細胞を用いる。

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。

2.3 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、3.2.1、3.2.2 及び 3.2.3.1 の試験を行う。

2.3.2 牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス原液

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、3.2.1、3.2.2 及び 3.2.3.2 の試験を行う。

2.3.3 牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス原液

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、3.2.1、3.2.2 及び 3.2.3.3 の試験を行う。

2.3.4 牛 RS ウイルス原液

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、3.2.1、3.2.2 及び 3.2.3.4 の試験を行う。

2.3.5 牛アデノウイルス（7 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、原液とする。

原液について、3.2.1、3.2.2 及び 3.2.3.5 の試験を行う。

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、牛 RS ウイルス原液及び牛アデノウイルス（7 型）原液を混合し、製剤ごと

に農林水産大臣が適当と認めた安定剤を加え、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。

小分け製品について、3.3 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。

豚精巣初代細胞の場合は、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 細胞の場合は、3.1.2 及び 3.1.5 の試験を行う。

やぎ精巣初代細胞の場合は、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 本以上の培養びん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びんの培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を 2 回洗浄後、2 群に分け、生理食塩液で調整した 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 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びんの培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を 2 回洗浄後、生理食塩液で調整した 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 本以上の培養びん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

3.1.1 又は 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 原液の試験

3.2.1 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。

3.2.2 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、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）、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。

3.2.3 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

3.2.3.1.1 試験材料

3.2.3.1.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記 6）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

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℃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。

3.2.3.1.3 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。

3.2.3.2 牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス

3.2.3.2.1 試験材料

3.2.3.2.1.1 試料

検体を細胞増殖用培養液（付記 7）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.3.2.1.2 培養細胞

牛精巢継代細胞浮遊液を用いる。

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℃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、1 mL 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 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（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℃で 5～7 日間培養し、観

察する。

3.2.3.2.3 判定

干渉法にあっては、培養細胞に CPE の抑制されたものを、また、END 法にあっては、CPE の発現し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。

3.2.3.3 牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス

3.2.3.3.1 試験材料

3.2.3.3.1.1 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。

3.2.3.3.1.2 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 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。

3.2.3.4 牛 RS ウイルス

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 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。

3.2.3.5 牛アデノウイルス（7 型）

3.2.3.5.1 試験材料

3.2.3.5.1.1 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。

3.2.3.5.1.2 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。

3.2.3.5.1.3 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 8、以下「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。

3.2.3.5.2 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℃で一夜静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

3.2.3.5.3 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。

3.3 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 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、適合しなければならない。

3.3.3 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、適合しなければならない。

3.3.4 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。

3.3.5 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。

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。

3.3.6 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、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、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。

3.3.7 ウイルス含有量試験

3.3.7.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス

3.2.3.1 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。

3.3.7.2 牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス

3.2.3.2 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^{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。

3.3.7.3 牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス

3.2.3.3 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 $10^{5.0}$ TCID₅₀ 以上でなければならない。

ただし、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。

3.3.7.4 牛 RS ウイルス

3.2.3.4 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 $10^{5.0}$ TCID₅₀ 以上でなければならない。

ただし、試験品中の牛 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。

3.3.7.5 牛アデノウイルス（7 型）

3.2.3.5 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、試験品中の牛アデノウイルス（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。

3.3.8 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。

3.3.9 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 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.3.9.1.1.2 試験動物

体重 100 ～ 200kg の牛を用いる。

3.3.9.1.2 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。

3.3.9.1.3 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。

3.3.9.2 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 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.3.9.2.1.2 試験動物

3 日齢以内の乳のみマウスを用いる。

3.3.9.2.2 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。

3.3.9.2.3 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。

3.3.10 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 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。

3.3.10.1.1.3 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 9）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 10）3 mL 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 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。

3.3.10.2 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

3.3.9.1 の試験に用いた動物を用いる。

3.3.10.2.1.2 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 Nose 株を用いる。

3.3.10.2.1.3 培養細胞

牛精巢継代細胞浮遊液を用いる。

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（穴）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 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。

試験動物の中和抗体価は、8 倍以上でなければならない。

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 接種材料

試験品を注射材料とする。

3.3.10.3.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

3.3.10.3.1.3 赤血球凝集抗原

牛パラインフルエンザ 3 型赤血球凝集抗原（付記 11）を用いる。

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 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。

3.3.10.4 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 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.3.10.4.1.2 試験動物

体重約 100g のハムスターを用いる。

3.3.10.4.1.3 中和試験用ウイルス

牛腎継代細胞で増殖させた牛 RS ウイルス NMK7 株を用いる。

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 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。

3.3.10.4.3 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。

3.3.10.5 牛アデノウイルス感染症力価試験

3.3.10.5.1 試験材料

3.3.10.5.1.1 試験動物

3.3.9.1 の試験に用いた動物を用いる。

3.3.10.5.1.2 赤血球凝集抗原

牛アデノウイルス（7 型）赤血球凝集抗原（付記 12）を用いる。

3.3.10.5.1.3 赤血球浮遊液

3.2.3.5.1.3 の赤血球浮遊液を用いる。

3.3.10.5.2 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、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等量加え、4℃で一夜処理した後、4℃に冷却した赤血球浮遊液を加え、4℃で一夜静置し、観察する。

3.3.10.5.3 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。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、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 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、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 2 抗牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス血清

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、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 BN_i-1 株で免疫した兎の血清で、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、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、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 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、牛ウイルス性下痢－粘膜病、牛パラインフルエンザ 3 型、牛 RS 及び牛アデノ（7 型）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。

付記 7 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。

付記 8 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 1w/v %ゼラチン液

100mL 中

精製ゼラチン 1 g

水 残 量

使用時加温溶解する。

C 液 5w/v %牛血清アルブミン液

100mL 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 4mL を加えて調製し、用いる。

付記 9 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

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 10 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

付記 11 牛パラインフルエンザ 3 型赤血球凝集抗原

牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス BNi-1 株を牛腎継代細胞で増殖させて得た培養上清

付記 12 牛アデノウイルス（7 型）赤血球凝集抗原

牛アデノウイルス（7 型）袋井株を牛精巢継代細胞で増殖させて得た培養上清

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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 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 R S 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・アルブミン加ペ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 $10^{5.0}$ 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 $10^{5.0}$ 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

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部の日本脳炎（アジュバント加）不活化ワクチンの項を次のように改める。

日本脳炎（アジュバント加）不活化ワクチン

1 定義

日本脳炎ウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化し、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 名称

日本脳炎ウイルス中山株薬検系又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

豚腎初代細胞で増殖し、がちょう、鶏初生ひな及びはとの赤血球を凝集する。

2.1.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、マウスの脳又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。

継代は、原株では3代以内、種ウイルスでは2代以内でなければならない。

原株及び種ウイルスは、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 培養細胞

豚腎継代細胞を用いる。

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。

2.3 原液

2.3.1 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。

2.3.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖終末期に個体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、3.2の試験を行う。

2.3.3 不活化

ウイルス浮遊液に製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた不活化剤を加えて不活化し、必要に応じて濃縮したものを不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.3の試験を行う。

2.3.4 原液

不活化ウイルス液を混合し、製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めたアルミニウムゲルアジュバントを加えて、原液とする。

原液について、3.4の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液又は複数の原液を混合し、最終バルクとする。

この場合、製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた保存剤を加えてもよい。

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、3.5 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。

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 本以上の培養びん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 の試験最終日に培養びんの培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を 2 回洗浄後、3 群に分け、0.1vol% のモルモット、がちょう及び 7 日齢以内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、培養細胞に赤血球吸着を認めてはならない。

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 試験材料

3.2.1.1.1 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。

3.2.1.1.2 培養細胞

製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた細胞を小試験管に培養し、単層となったものを用いる。

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℃で 60 分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液 1 mL を加え、37℃で 7 日間培養し、観察する。

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^{5.0}TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.3 不活化ウイルス液の試験

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。

3.3.2 不活化試験

3.3.2.1 試験材料

3.3.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.3.2.1.2 試験動物

3 日齢以内の乳のみマウスを用いる。

3.3.2.2 試験方法

注射材料 0.02mL を 10 匹の試験動物の脳内に注射し、14 日間観察する。

3.3.2.3 判定

脳炎症状を示して死亡した動物を認めない場合、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。

3.4 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。

3.5 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、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。

3.5.2 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、pH は、固有の値を示さなければならない。

3.5.3 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。

3.5.4 チメロサル定量試験

チメロサル添加製剤については、一般試験法のチメロサル定量法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.5.5 ホルマリン定量試験

ホルマリン添加製剤については、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、0.2vol%以下でなければならない。

3.5.6 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 1.0mg 以下でなければならない。

3.5.7 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。

3.5.8 力価試験

3.5.8.1 試験材料

3.5.8.1.1 注射材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で 10 倍に希釈したものを注射材料とする。

3.5.8.1.2 試験動物

2～3 週齢のマウスを用いる。

3.5.8.2 攻撃ウイルス

攻撃用ウイルス（付記 2）を用いる。

3.5.8.3 試験方法

試験動物 30 匹を試験群、60 匹を対照群とする。

試験第 1 日目及び第 4 日目に、注射材料 0.1mL ずつを試験群の腹腔内に注射する。

試験第 8 日目に、試験群及び対照群のそれぞれ 30 匹に攻撃ウイルス 0.2mL ずつを腹腔内に注射する。更に、対照群 30 匹を 10 匹ずつ 3 群に分け、各群に攻撃ウイルスを 10 倍、100 倍及び 1,000 倍に希釈したもの 0.2mL ずつを腹腔内に注射する。試験群及び対照群について、14 日間観察する。

3.5.8.4 判定

脳炎症状を示して死亡した動物及び生き残っても脳炎症状を示している動物を死亡したものとし、各群の死亡率及び攻撃ウイルスの LD₅₀ を算出する。

試験群の耐過率は、40 % 以上でなければならない。この場合、攻撃ウイルスを注射した対照群の死亡率は 90 % 以上、また、攻撃ウイルスのウイルス量は、0.2mL 中 10^{3.0}LD₅₀ 以下でなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、1 年間とする。ただし、特に承認されたものは、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

又はラクトアルブミン水解物	5.0 g
牛血清	20 ～ 50 mL
イーグル MEM 又はアール液	残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ～ 7.4 に調整する。
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 2 攻撃ウイルス

日本脳炎ウイルス中山株葉検系を生後 3 ～ 4 週齢のマウスの脳内に接種し、発症極期に採脳し、リン酸緩衝食塩液又は適当と認められた希釈液で 10 倍乳剤とする。これを遠心した上清を攻撃ウイルスとする。

ワクチン（シードロット製剤）の部のアカバネ病・チュウザン病・アイノウイルス感染症混合（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）の項を次のように改める。

アカバネ病・チュウザン病・アイノウイルス感染症混合（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

1 定義

シードロット規格に適合したアカバネウイルス、カスバウイルス及びアイノウイルスをそれぞれ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を不活化し、アルミニウムゲルアジュバントを添加した後混合したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 アカバネウイルス

2.1.1.1 名称

アカバネウイルス OBE-1 株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

生後 2 日以内の乳のみマウスの脳内に接種すると、マウスは 3 日以内に死亡する。

牛腎初代培養細胞、豚腎初代培養細胞、HmLu-1 細胞、HmLu-SC 細胞、ESK 細胞及び Vero 細胞で 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、HmLu 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℃以下又は凍結乾燥して 5℃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、HmLu 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℃以下又は凍結乾燥して 5℃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、HmLu 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℃以下又は凍結乾燥して 5℃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 カスバウイルス

2.1.2.1 名称

カスバウイルス K-47 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

子牛の脳内に接種すると、発熱、食欲不振、白血球減少、次いで神経症状を示す。

BHK-21 (C-13) 細胞、BHK-SC 細胞、HmLu-1 細胞、HmLu-SC 細胞及び Vero-T 細胞で CPE を伴って増殖する。

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、BHK-21 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℃以下又は凍結乾燥して5℃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、BHK-21 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℃以下又は凍結乾燥して5℃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、BHK-21 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℃以下又は凍結乾燥して5℃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 アイノウイルス

2.1.3.1 名称

アイノウイルス JaNAr28 株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

牛の静脈内に接種すると、ウイルス血症を認めるが、発熱などの臨床症状は認められない。

BHK-21 (C-13) 細胞、HmLu-1 細胞、HmLu-SC 細胞及び Vero 細胞で CPE を伴って増殖する。

2.1.3.3 マスターシードウイルス

2.1.3.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、HmLu 細胞又は BHK-21 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℃以下又は凍結乾燥して5℃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。

2.1.3.4 ワーキングシードウイルス

2.1.3.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、HmLu 細胞又は BHK-21 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℃以下又は凍結乾燥して5℃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。

2.1.3.5 プロダクションシードウイルス

2.1.3.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、HmLu 細胞又は BHK-21 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℃以下又は凍結乾燥して5℃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。

2.2 製造用材料

2.2.1 アカバネウイルス

2.2.1.1 株化細胞

HmLu 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。

2.2.1.3 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℃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℃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℃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 カスバウイルス

2.2.2.1 株化細胞

BHK-21 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。

2.2.2.3 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℃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℃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℃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 アイノウイルス

2.2.3.1 株化細胞

HmLu 細胞又は BHK-21 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。

2.2.3.3 マスターセルシード

2.2.3.3.1 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、2.2.3.2 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℃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。

2.2.3.4 ワーキングセルシード

2.2.3.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.3.2 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℃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。

2.2.3.5 プロダクションセルシード

2.2.3.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.3.2 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℃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。

2.3 原液

2.3.1 アカバネウイルス原液

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。

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、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ウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.3.1.1 の試験を行う。

2.3.1.3 不活化

ウイルス浮遊液に製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた不活化剤を加え、ウイルス浮遊液を不活化し、不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.4.1 及び 3.4.2.1 の試験を行う。

2.3.1.4 原液

不活化ウイルス液に製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めたアルミニウムゲルアジュバントを添加し、原液とする。ただし、不活化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濃縮したものを原液とし、最終バルクの調整時にアルミニウムゲルアジュバントを加えてもよい。

原液について、3.5 の試験を行う。

2.3.2 カスバウイルス原液

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。

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、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ウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.3.1.2 の試験を行う。

2.3.2.3 不活化

ウイルス浮遊液に製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた不活化剤を加え、ウイルス浮遊液を不活化し、不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.4.1 及び 3.4.2.2 の試験を行う。

2.3.2.4 原液

不活化ウイルス液に製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めたアルミニウムゲルアジュバントを添加し、原液とする。ただし、不活化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濃縮したものを原液とし、最終バルクの調整時にアルミニウムゲルアジュバントを加えてもよい。

原液について、3.5 の試験を行う。

2.3.3 アイノウイルス原液

2.3.3.1 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。

2.3.3.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを 2.3.3.1 の細胞で培養し、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ウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.3.1.3 の試験を行う。

2.3.3.3 不活化

ウイルス浮遊液に製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた不活化剤を加え、ウイルス浮遊液を不活化し、不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.4.1 及び 3.4.2.3 の試験を行う。

2.3.3.4 原液

不活化ウイルス液に製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めたアルミニウムゲルアジュバントを添加し、原液とする。ただし、不活化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濃縮したものを原液とし、最終バルクの調整時にアルミニウムゲルアジュバントを加えてもよい。

原液について、3.5 の試験を行う。

2.4 最終バルク

アカバネウイルス原液、カスバウイルス原液及びアイノウイルス原液を混合し、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、3.6 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

牛 R S 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。

3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

牛ウイルス性下痢—粘膜病ウイルス、ロタウイルス、牛白血病ウイルス、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。

3.2 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。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。

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

牛R S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。

3.2.1.5.2.2 個別ウイルス否定試験

牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス、ロタウイルス、牛白血病ウイルス、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2.1.4.2.1.6.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.7 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 ウイルス含有量試験

3.3.1.1 アカバネウイルス

3.3.1.1.1 試験材料

3.3.1.1.1.1 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。

3.3.1.1.1.2 培養細胞

HmLu-1細胞を小試験管に培養し、単層となったものを用いる。

3.3.1.1.2 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、36℃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0.5mL又は1mLずつ加え、34～36℃で7日間回転培養し、観察する。

3.3.1.1.3 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、1mL中10^{6.0}TCID₅₀以上でなければならない。

3.3.1.2 カスバウイルス

3.3.1.2.1 試験材料

3.3.1.2.1.1 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。

3.3.1.2.1.2 培養細胞

Vero-T 細胞を小試験管に培養し、単層となったものを用いる。

3.3.1.2.2 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、36℃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 0.5mL 又は 1 mL ずつ加え、37℃で 7 日間回転培養し、観察する。

3.3.1.2.3 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^{7.0}TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.3.1.3 アイノウイルス

3.3.1.3.1 試験材料

3.3.1.3.1.1 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。

3.3.1.3.1.2 培養細胞

HmLu-1 細胞を小試験管に培養し、単層となったものを用いる。

3.3.1.3.2 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、36℃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 0.5mL 又は 1 mL ずつ加え、34～36℃又は 37℃で 7 日間回転培養し、観察する。

3.3.1.3.3 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^{6.0}TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.4 不活化ウイルス液の試験

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 不活化試験

3.4.2.1 アカバネウイルス

3.4.2.1.1 試験材料

3.4.2.1.1.1 試料

100 倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、検体 5 mL 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。

3.4.2.1.1.2 培養細胞

HmLu-1 細胞を培養し、単層となったものを用いる。

3.4.2.1.2 試験方法

試料の全量を 1 mL につき 3 cm² 以上の培養細胞に接種し、34℃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、34～36℃で 7 日間培養し、観察する。

3.4.2.1.3 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。

3.4.2.2 カスバウイルス

3.4.2.2.1 試験材料

3.4.2.2.1.1 試料

100 倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、検体 5 mL 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。

3.4.2.2.1.2 培養細胞

Vero-T 細胞を培養し、単層となったものを用いる。

3.4.2.2.2 試験方法

試料の全量を 1 mL につき 3 cm² 以上の培養細胞に接種し、34℃で 60 分間静置吸着させた後、試料を抜き取り、製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた培養液を加え、34～36℃で 5 日間培養後、細胞を次代に継代する。継代後 2 日目又は細胞層形成後に培養液を抜き取り、製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた培養液を加え、34～36℃で 5 日間培養後、更に次代へ継代し、2 代目と同様の方法で培養し、観察する。

3.4.2.2.3 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。

3.4.2.3 アイノウイルス

3.4.2.3.1 試験材料

3.4.2.3.1.1 試料

100 倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、検体 5 mL 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。

3.4.2.3.1.2 培養細胞

HmLu-1 細胞を培養し、単層となったものを用いる。

3.4.2.3.2 試験方法

試料の全量を 1 mL につき 3 cm² 以上の培養細胞に接種し、34℃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、34～36℃で 7 日間培養し、観察する。

3.4.2.3.3 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 原液の試験

3.5.1 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。

3.6 小分製品の試験

3.6.1 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ず、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。

3.6.2 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。

3.6.3 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。

3.6.4 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、0.1vol %以下でなければならない。

3.6.5 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。

3.6.6 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。

3.6.7 力価試験

3.6.7.1 試験材料

3.6.7.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.6.7.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

3.6.7.1.3 中和試験用ウイルス

3.6.7.1.3.1 アカバネウイルス

HmLu-1 細胞で増殖させたアカバネウイルス JaGAr39 株又はこれと同等と認められた株を用いる。

3.6.7.1.3.2 カสบウイルス

BHK-21 細胞で増殖させたカสบウイルス K-47 株又はこれと同等と認められた株を用いる。

3.6.7.1.3.3 アイノウイルス

HmLu 細胞又は BHK-21 細胞で増殖させたアイノウイルス JaNAr28 株又はこれと同等と認められた株を用いる。

3.6.7.1.4 培養細胞

HmLu-1 細胞及び Vero-T 細胞を小試験管に培養し、単層となったものを用いる。

3.6.7.2 試験方法

注射材料 0.5mL ずつを 5 匹の試験動物に 3 週間隔で 2 回筋肉内注射し、第 2 回目の注射後 10 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。各希釈血清と 0.1mL 中約 200TCID₅₀ の中和試験用ウイルス液を等量混合し、アカバネウイルス及びアイノウイルスは 37℃で 60 分間、カสบウイルスでは 90 分間処理する。この各混合液 0.1mL ずつをアカバネウイルス及びアイノウイルスは HmLu-1 細胞、カสบウイルスでは Vero-T 細胞のそれぞれ 4 本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 0.5mL 又は 1 mL ずつ加え、アカバネウイルスは 34 ～ 36℃、アイノウイルスは 34 ～ 37℃、カสบウイルスは 37℃で、7 日間回転培養し、観察する。

3.6.7.3 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。

アカバネウイルス及びアイノウイルスは中和抗体価 8 倍以上、カสบウイルスでは中和抗体価 32 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、それぞれのウイルスに対して、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、製造後 2 年 6 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。

マイコプラズマ否定試験法

検体等にマイコプラズマが存在しないことを調べる次の方法又は International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products のガイドライン (GL34 : Testing for the detection of mycoplasma contamination) に定める方法により行う。

1 培地

別に規定する場合を除き、次の組成のマイコプラズマ用液状培地を用いる。培地の液量は、通常 1 本当たり 100mL とする。

1.1 マイコプラズマ用液状培地

1.1.1 組成

1.1.1.1 基礎培地

1,000mL 中	
50w/v% 牛心筋浸出液	100 mL
獣肉製ペプトン	10 g
塩化ナトリウム	5 g
ブドウ糖	1 g
L-グルタミン酸ナトリウム	0.1 g
L-アルギニン-塩酸塩	1 g
水	残 量

220nm のメンブラン・フィルターでろ過滅菌し、又は 121 °C で 15 分間高圧滅菌する。滅菌後の pH を 7.2 ～ 7.4 とする。

なお、適当な品質の乾燥製品を用いてもよい。

1.1.1.2 培地添加物

1.1.1.1 の基礎培地 77mL に次の各成分を添加する。

馬血清	10 mL
非働化豚血清	5 mL
25w/v% 新鮮酵母抽出液	5 mL
1 w/v% β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド〔酸化型〕	1 mL
1 w/v% L-システイン塩酸塩試液	1 mL
0.2w/v% フェノールレッド液	1 mL

滅菌した基礎培地にあらかじめ、ろ過滅菌しておいた各添加物を無菌的に加える。

なお、添加物のうち高圧滅菌可能なものは、高圧滅菌してもよい。

さらに、ベンジルペニシリンカリウムを培地 1 mL 中に 500 単位及び酢酸タリウムを 0.02w/v% となるように加えてもよい。

1.1.2 性能

マイコプラズマ・ガリセプチカム、マイコプラズマ・シノビエ、マイコプラズマ・ハイオニューモニエ及びマイコプラズマ・オラーレの 100CFU 未満を接種し、35 ～ 37 °C で 7 日間培養するとき、十分に増殖しなければならない。

1.2 マイコプラズマ用寒天培地

1.2.1 組成

1.2.1.1 基礎培地

1.1.1.1 の基礎培地 78mL に寒天を 1 g 加えたものである。

1.2.1.2 培地添加物

1.1.1.2 の培地添加物からフェノールレッド液を除いたものである。

なお、滅菌後、加温溶解した培地は直径 45 ～ 55mm の滅菌シャーレに 5 mL ずつ分注し、冷却、凝固させ、マイコプラズマ用寒天平板とする。

1.2.2 性能

1.1.2 を準用し、各マイコプラズマ菌株 100CFU 未満を接種し、35 ～ 37 °C で 5 vol%炭酸ガス下で 10 日間培養するとき、固有の集落を形成しなければならない。

2 培養材料

検体又は試験品を用いる。なお、溶解用液が非添付の凍結乾燥製剤では、リン酸緩衝食塩液等の適当な溶解用液で用法及び用量に記載された規定量に溶解する。また、経口（飲水）投与剤及び穿刺剤では、接種量当たり 1 投与量となるようにリン酸緩衝食塩液等の適当な溶解用液で希釈する。

3 検体等の数量

検体ではそれぞれの容器について、試験品では 2 本以上の小分容器から等量ずつ採り、混合したものについて行う。

4 培地への接種量

液状培地 100mL に検体等を 1 mL 接種する。また、液状培地から寒天平板には、それぞれ 0.1 mL ずつを接種する。

5 培養及び観察

検体等を液状培地に接種後、十分に混和し、35 ～ 37 °C で 14 日間培養する。なお、生活細胞を含む検体等の場合は、適時に培養液の pH を調整する。

培養後、3 日目、7 日目、10 日目及び 14 日目に培養液をマイコプラズマ用寒天平板に接種し、5 vol%炭酸ガス下で、35 ～ 37 °C で 10 日間培養し、マイコプラズマの集落の有無を観察する。

なお、この場合、対照として培地及びマイコプラズマ・シノビエを接種したものを同様に観察する。

6 判定

試験の結果、検体等及び培地を接種した平板においてマイコプラズマの集落を認めず、マイコプラズマ・シノビエを接種した平板において集落を認めたときは、この試験に適合とする。

マイコプラズマ・シノビエを接種した平板で集落を認めないとき及び培地を接種した平板でマイコプラズマの集落を認めたときは、試験を反復しなければならない。

7 再試験

試験の結果が疑わしい場合は、新たに 2 倍量以上の検体等を用いて試験を反復しなければならない。