

# 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

平成 16 年 9 月 24 日（告示第 1745 号） 新規追加

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「混合生ワクチン」という。）と 2 種類の牛ウイルス性下痢 - 粘膜病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不活化したワクチン（以下「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。

## 1 小分製品の試験

### 1.1 無菌試験

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンで溶解したもの（以下「混合ワクチン」という。）について、一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

### 1.2 迷入ウイルス否定試験

混合生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量のリン酸緩衝食塩液で溶解したものについて、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1、2.4.1 及び 2.4.2 により試験を行い、これらに適合しなければならない。

ただし、中和用血清は、抗牛伝染性鼻気管炎ウイルス血清（付記 1）、抗牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス血清（付記 2）、抗牛RSウイルス血清（付記 3）及び抗牛アデノウイルス（7 型）血清（付記 4）をそれぞれ非働化したものを用いる。

### 1.3 ウイルス含有量試験

#### 1.3.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス

##### 1.3.1.1 試験材料

###### 1.3.1.1.1 試料

試験品中の牛伝染性鼻気管炎ウイルス以外のウイルスを各中和用血清（付記 2、3 及び 4）を非働化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液（付記 5）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 1.3.1.1.2 培養細胞

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

###### 1.3.1.2 試験方法

試料 0.1mL 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を 0.5mL ずつ加え、34 ~ 36℃ で 7 日間回転培養し、観察する。

###### 1.3.1.3 判定

培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub> を算出する。

試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たり 10<sup>4.0</sup>TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

#### 1.3.2 牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス

##### 1.3.2.1 試験材料

###### 1.3.2.1.1 試料

試験品中の牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス以外のウイルスを各中和用血清（付記 1、3 及び 4）を非働化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 1.3.2.1.2 培養細胞

牛腎継代細胞を小試験管に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

#### 1.3.2.2 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、37℃ で60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を0.5mL ずつ加え、34～36℃ で7日間回転培養し、観察する。

#### 1.3.2.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub>を算出する。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10<sup>5.0</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

### 1.3.3 牛RSウイルス

#### 1.3.3.1 試験材料

##### 1.3.3.1.1 試料

試験品中の牛RSウイルス以外のウイルスを各中和用血清（付記1、2及び4）を非働化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 1.3.3.1.2 培養細胞

Vero細胞を小試験管に3～4日間培養し、単層となったものを用いる。

#### 1.3.3.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37℃ で60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を0.5mL ずつ加え、34℃ で14日間回転培養し、観察する。

#### 1.3.3.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub>を算出する。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10<sup>5.0</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

### 1.3.4 牛アデノウイルス（7型）

#### 1.3.4.1 試験材料

##### 1.3.4.1.1 試料

試験品中の牛アデノウイルス（7型）以外のウイルスを各中和用血清（付記1、2及び3）を非働化したもので中和したものをウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 1.3.4.1.2 培養細胞

牛精巢継代細胞を小試験管に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

##### 1.3.4.1.3 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ル緩衝食塩液（付記6。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。

#### 1.3.4.2 試験方法

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

#### 1.3.4.3 判定

赤血球凝集が認められたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub>を算出する。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10<sup>3.0</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

### 1.4 不活化試験

#### 1.4.1 試験材料

##### 1.4.1.1 試料

液状不活化ワクチンを試料とする。

##### 1.4.1.2 培養細胞

牛精巢継代細胞を培養びんに1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

#### 1.4.2 試験方法

試料2 mLを、1 mLにつき20cm<sup>2</sup>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<sup>5</sup>TCID<sub>50</sub>の牛ウイルス性下痢 - 粘膜病ウイルス Nose 株を含むウイルス増殖用培養液0.5 mLずつをそれぞれに加え、34～36℃で7日間回転培養し、CPEの有無を観察する。

#### 1.4.3 判定

観察期間中、牛ウイルス性下痢 - 粘膜病ウイルス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。

試料に活性ウイルスを認めてはならない。

#### 1.5 異常毒性否定試験

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

#### 1.6 安全試験

##### 1.6.1 牛注射試験

###### 1.6.1.1 試験材料

###### 1.6.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 1.6.1.1.2 試験動物

体重100～200kgの牛を用いる。

###### 1.6.1.2 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。

###### 1.6.1.3 判定

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

##### 1.6.2 乳のみマウス注射試験

###### 1.6.2.1 試験材料

###### 1.6.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 1.6.2.1.2 試験動物

3日齢以内の乳のみマウスを用いる。

###### 1.6.2.2 試験方法

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

###### 1.6.2.3 判定

観察期間中、異常を認めてはならない。

事故のため試験動物が半数未満になった場合は、試験を反復する。

#### 1.7 力価試験

##### 1.7.1 牛伝染性鼻気管炎力価試験

###### 1.7.1.1 試験材料

###### 1.7.1.1.1 試験動物

1.6.1の試験に用いた動物を用いる。

###### 1.7.1.1.2 中和試験用ウイルス

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

###### 1.7.1.1.3 培養細胞

牛精巢継代細胞浮遊液を約27cm<sup>2</sup>のシャーレに5 mLずつ分注し、1～3日間培養し単層とな

ったものを用いる。

#### 1.7.1.2 試験方法

1.6.1 の試験終了後、14 日目に得られた血清について中和試験を行う。

被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液で 2 倍階段希釈する。各希釈血清 0.5mL と 0.2mL 中約 100PFU の中和試験用ウイルス液 0.5mL とを混合し、37℃ で 60 分間処理する。この混合液 0.2mL ずつをそれぞれ 4 枚の培養細胞に接種し、37℃ で 60 分間吸着させた後、混合液を除き、第 1 次重層寒天培地（付記 7）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 8）3 mL を加え、更に 24 時間培養後、プラック数を算定する。

#### 1.7.1.3 判定

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

試験動物の中和抗体価は、2 倍以上でなければならない。

#### 1.7.2 牛パラインフルエンザ力価試験

##### 1.7.2.1 試験材料

###### 1.7.2.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

###### 1.7.2.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

###### 1.7.2.1.3 赤血球凝集抗原

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

##### 1.7.2.2 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、20 分間処理した後、3,000rpm で 20 分間遠心し、その上清を希釈液を用いて 2 倍階段希釈する。各希釈血清 0.2mL に 4 単位の赤血球凝集抗原 0.2mL を加え、37℃ で 60 分間処理した後、希釈液で調整した 0.3vol% モルモット赤血球浮遊液 0.2mL を加え、4℃ で一夜静置し、観察する。

#### 1.7.2.3 判定

赤血球凝集を阻止した血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。

赤血球凝集抑制抗体価 8 倍以上を赤血球凝集抑制抗体陽性とする。

試験動物の赤血球凝集抑制抗体陽性率は、80 % 以上でなければならない。

#### 1.7.3 牛 R S ウイルス感染症力価試験

##### 1.7.3.1 試験材料

###### 1.7.3.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 1.7.3.1.2 試験動物

体重約 100g のハムスターを用いる。

###### 1.7.3.1.3 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。

###### 1.7.3.1.4 培養細胞

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

##### 1.7.3.2 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 回腹腔内注射し、第 2 回目の注射後 14 日目に得られた各個体の血清について中和試験を行う。

被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液で 2 倍階段希釈する。希釈血清 0.5mL と 0.1mL 中約 200TCID<sub>50</sub> の中和試験用ウイルス液 0.5ml とを混合し、22℃ で 24 時間処理する。この各混合

液 0.1mL ずつを 4 本の培養細胞に接種し、37℃ で 60 分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を 0.5mL ずつ加え、34℃ で 10 日間回転培養し、観察する。

#### 1.7.3.3 判定

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

中和抗体価 2 倍以上を陽性とする。

試験動物の中和抗体陽性率は、80 % 以上でなければならない。

#### 1.7.4 牛アデノウイルス感染症力価試験

##### 1.7.4.1 試験材料

##### 1.7.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 1.7.4.1.2 試験動物

1.6.1 の試験に用いた動物を用いる。

##### 1.7.4.1.3 赤血球凝集抗原

牛精巢継代細胞で増殖させた牛アデノウイルス (7 型) 袋井株を用いる。

##### 1.7.4.1.4 赤血球浮遊液

1.3.4.1.3 の赤血球浮遊液を用いる。

##### 1.7.4.2 試験方法

1.6.1 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 25 % カオリン加生理食塩液を等量加え、15 ~ 20℃ で 20 分間処理した後、3,000rpm で 20 分間遠心し、その上清を希釈液を用いて 2 倍階段希釈する。各希釈血清 0.2mL に 4 単位の赤血球凝集抗原 0.2mL を加え、4℃ で一夜処理した後、4℃ に冷却した赤血球浮遊液 0.2mL を加え、4℃ で一夜静置し、観察する。

##### 1.7.4.3 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。

#### 1.7.5 牛ウイルス性下痢 - 粘膜病ウイルス

##### 1.7.5.1 試験材料

##### 1.7.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 1.7.5.1.2 試験動物

4 週齢のマウスを用いる。

##### 1.7.5.1.3 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 型 Nose 株及び牛ウイルス性下痢 - 粘膜病ウイルス 型 KZ-91-cp 株を用いる。

##### 1.7.5.1.4 培養細胞

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

##### 1.7.5.2 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 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 0.5mL と 0.1mL 中約 200TCID<sub>50</sub> の中和試験用ウイルス液 0.5mL とを混合し、37℃ で 60 分間処理する。この各混合液 0.1mL ずつを 4 本の培養細胞に接種し、37℃ で 60 分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を 0.5mL ずつ加え、37℃ で 7 日間回転培養し、観察する。

##### 1.7.5.3 判定

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

中和抗体価2倍以上を陽性とする。

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

付記1 抗牛伝染性鼻気管炎ウイルス血清

牛伝染性鼻気管炎ウイルス No.758 株で免疫した兔の血清で、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 抗牛パラインフルエンザ3型ウイルス血清

牛パラインフルエンザ3型ウイルスで免疫した兔の血清で、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RSウイルス血清

強毒牛RSウイルスで免疫して得られた兔又はモルモットの血清で、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 抗牛アデノウイルス(7型)血清

牛アデノウイルス袋井株で免疫して得られた兔又はモルモットの血清で、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。

牛血清は、牛伝染性鼻気管炎ウイルス、牛ウイルス性下痢 - 粘膜病ウイルス、牛パラインフルエンザ3型ウイルス、牛RSウイルス及び牛アデノウイルス(7型)に対する中和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 ゼラチン・アルブミン加ペロナル緩衝食塩液

A液 ペロナル緩衝食塩液

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

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

10.0 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

50.0 g

水

残 量

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

付記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