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ウイルス感染症混合（アジュバント加）不活化ワクチン

平成 21 年 7 月 1 日（告示第 861 号）　新規追加

1 定義

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（１型）、牛ウイルス性下痢―粘膜病ウイルス（２型）、牛パラインフルエンザ３型ウイルス及び牛 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不活化したものを混合し、アジュバントを添加したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス

2.1.1.1 名称

牛伝染性鼻気管炎ウイルス マッカチャー株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

牛に接種すると、発熱、鼻汁漏出を伴って鼻気管炎を発症する。

牛腎由来株化（以下「MDBK」という。）細胞で CPE を伴って増殖する。

2.1.1.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、牛腎及び牛精巣継代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

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、凍結してー 70 ℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

2.1.2 牛ウイルス性下痢―粘膜病ウイルス（１型）

2.1.2.1 名称

牛ウイルス性下痢―粘膜病ウイルス（１型）　シンガー株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

牛に接種すると、発熱、鼻汁漏出等の呼吸器症状、下痢及び軟便等の消化器症状、白血球減少等を示す。

MDBK 細胞で CPE 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、牛腎及び牛精巣継代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

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、凍結してー 70 ℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

2.1.3 牛ウイルス性下痢―粘膜病ウイルス（２型）

2.1.3.1 名称

牛ウイルス性下痢―粘膜病ウイルス（２型）　5912 株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

牛に接種すると、発熱、鼻汁漏出等の呼吸器症状、下痢及び軟便等の消化器症状、白血球減少等を示す。

MDBK 細胞で CPE を伴って増殖する。

2.1.3.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、牛腎及び牛精巣継代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

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 牛パラインフルエンザ３型ウイルス
2.1.4.1 名称
牛パラインフルエンザ３型ウイルス ライシンガー SF-4 株又はこれと同等と認められた株
2.1.4.2 性状
牛に接種すると、発熱、鼻汁漏出を伴って牛のパラインフルエンザを発症する。
MDBK 細胞で 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、牛腎及び牛精巣継代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。
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。
2.1.5 牛 RS ウイルス
2.1.5.1 名称
牛 RS ウイルス ダイヤモンド株又はこれと同等と認められた株
2.1.5.2 性状
MDBK 細胞で CPE を伴って増殖する。
2.1.5.3 継代及び保存
原株及び種ウイルスは、牛腎及び牛精巣継代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。
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 牛伝染性鼻気管炎ウイルス
2.2.1.1 培養細胞
MDBK 細胞又は製造に適当と認められた細胞を用いる。
2.2.1.2 培養液
製造に適当と認められた培養液を用いる。
2.2.2 牛ウイルス性下痢―粘膜病ウイルス（１型）
2.2.2.1 培養細胞
MDBK 細胞又は製造に適当と認められた細胞を用いる。
2.2.2.2 培養液
製造に適当と認められた培養液を用いる。
2.2.3 牛ウイルス性下痢―粘膜病ウイルス（２型）
2.2.3.1 培養細胞
MDBK 細胞又は製造に適当と認められた細胞を用いる。
2.2.3.2 培養液
製造に適当と認められた培養液を用いる。
2.2.4 牛パラインフルエンザ３型ウイルス
2.2.4.1 培養細胞
MDBK 細胞又は製造に適当と認められた細胞を用いる。
2.2.4.2 培養液
製造に適当と認められた培養液を用いる。
2.2.5 牛 RS ウイルス
2.2.5.1 培養細胞
MDBK 細胞又は製造に適当と認められた細胞を用いる。

2.2.5.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.3 原液

2.3.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス

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回収したウイルス液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。

2.3.1.3 不活化

ウイルス浮遊液を適当と認められた方法により処理して不活化し、不活化ウイルス浮遊液とする。

不活化ウイルス浮遊液について、3.3 の試験を行う。

2.3.1.4 原液

不活化ウイルス浮遊液を混合し、原液とする。

原液について、3.4 の試験を行う。

2.3.2 牛ウイルス性下痢―粘膜病ウイルス（１型）

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回収したウイルス液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。

2.3.2.3 不活化

ウイルス浮遊液を適当と認められた方法により処理して不活化し、不活化ウイルス浮遊液とする。

不活化ウイルス浮遊液について、3.3 の試験を行う。

2.3.2.4 原液

不活化ウイルス浮遊液を混合し、原液とする。

原液について、3.4 の試験を行う。

2.3.3 牛ウイルス性下痢―粘膜病ウイルス（２型）

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回収したウイルス液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。

2.3.3.3 不活化

ウイルス浮遊液を適当と認められた方法により処理して不活化し、不活化ウイルス浮遊液とする。

不活化ウイルス浮遊液について、3.3 の試験を行う。

2.3.3.4 原液

不活化ウイルス浮遊液を濃縮後、混合し、原液とする。

原液について、3.4 の試験を行う。

2.3.4 牛パラインフルエンザウイルス

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回収したウイルス液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。

2.3.4.3 不活化

ウイルス浮遊液を適当と認められた方法により処理して不活化し、不活化ウイルス浮遊液とする。

不活化ウイルス浮遊液について、3.3 の試験を行う。

2.3.4.4 原液

不活化ウイルス浮遊液を混合し、原液とする。

原液について、3.4 の試験を行う。

2.3.5 牛 RS ウイルス

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回収したウイルス液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。

2.3.5.3 不活化

ウイルス浮遊液を適当と認められた方法により処理して不活化し、不活化ウイルス浮遊液とする。

不活化ウイルス浮遊液について、3.3 の試験を行う。

2.3.5.4 原液

不活化ウイルス浮遊液を混合し、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

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（１型）原液、牛ウイルス性下痢―粘膜病ウイルス（２型）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、適当と認められたアジュバント、安定剤、保存剤を添加後、濃度調整し、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、3.5 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。

3.1.2 赤血球吸着試験

3.1.1 の観察最終日に培養液を除き、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。

3.2 ウイルス浮遊液の試験

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。

3.3 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 牛伝染性鼻気管炎ウイルス

3.3.2.1.1 試験材料

検体を試料とする。

3.3.2.1.2 培養細胞

MDBK 細胞を１～３日間培養し、単層となったものを用いる。

3.3.2.1.3 試験方法

試料 1 mL につき 3 cm^2 以上の培養細胞に接種し、37 ℃で 90 分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液（付記１）を加え、37 ℃で 7 日間培養し、観察する。

3.3.2.1.4 判定

培養細胞に CPE を認めないとき、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。

3.3.2.2 牛ウイルス性下痢―粘膜病ウイルス（１型）

3.3.2.2.1 試験材料

検体を試料とする。

3.3.2.2.2 培養細胞

MDBK 細胞を１～３日間培養し、単層となったものを用いる。

3.3.2.2.3 試験方法

試料 1 mL につき 3 cm^2 以上の培養細胞に接種し、37 ℃で 90 分間静置吸着させた後、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。

3.3.2.2.4 判定

培養細胞に CPE を認めないとき、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。

3.3.2.3 牛ウイルス性下痢―粘膜病ウイルス（２型）

3.3.2.3.1 試験材料

検体を試料とする。

3.3.2.3.2 培養細胞

MDBK 細胞を１～３日間培養し、単層となったものを用いる。

3.3.2.3.3 試験方法

試料 1 mL につき 3 cm^2 以上の培養細胞に接種し、37 ℃で 90 分間静置吸着させた後、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。

3.3.2.3.4 判定

培養細胞に CPE を認めないとき、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。

3.3.2.4 牛パラインフルエンザ３型ウイルス

3.3.2.4.1 試験材料

検体を試料とする。

3.3.2.4.2 培養細胞

MDBK 細胞を１～３日間培養し、単層となったものを用いる。

3.3.2.4.3 試験方法

試料１ mL につき３ cm^2 以上の培養細胞に接種し、37 ℃で 90 分間静置吸着させた後、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。

3.3.2.4.4 判定

培養細胞に CPE を認めないとき、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。

3.3.2.5 牛 RS ウイルス

3.3.2.5.1 試験材料

検体を試料とする。

3.3.2.5.2 培養細胞

MDBK 細胞を１～３日間培養し、単層となったものを用いる。

3.3.2.5.3 試験方法

試料１ mL につき３ cm^2 以上の培養細胞に接種し、37 ℃で 90 分間静置吸着させた後、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。

3.3.2.5.4 判定

培養細胞に CPE を認めないとき、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。

3.3.3 抗原定量試験

酵素免疫測定法により参照品（付記２）に対する相対抗原量を算出するため、以下の試験方法又は適当と認められた試験方法を用いる。

3.3.3.1 試験材料

3.3.3.1.1 試料

検体に小分製品と同じ組成となるように希釈液（付記３）及びアジュバントを加えたものを試料とする。

3.3.3.1.2 抗体感作プレート

抗牛伝染性鼻気管炎ウイルス牛血清、抗牛ウイルス性下痢―粘膜病ウイルス（１型）牛血清、抗抗牛ウイルス性下痢―粘膜病ウイルス（２型）牛血清、抗牛パラインフルエンザ３型ウイルス牛血清及び抗牛 RS ウイルス牛血清（付記４）を用時調整した 0.05mol/L 炭酸緩衝液（pH9.7）でそれぞれ希釈し、96 穴の抗体吸着プレートに 100μL ずつ分注する。これを２～７℃で一昼夜静置後、0.3vol ％ポリソルベート 20-リン酸緩衝液で４回洗浄する。1.15w/v ％脱脂粉乳加 0.05mol/L 炭酸緩衝液を１穴当り 200μL ずつ加え、37 ℃で 60 分間静置する。この処理済み抗体吸着プレートを 0.3vol ％ポリソルベート 20-リン酸緩衝液で４回洗浄し、抗体感作プレートとする。

3.3.3.2 試験方法

試料及び参照品を 0.01mol/L-リン酸緩衝液にて２倍希釈し、この液３ mL に 0.5mL の 20w/v ％ NZ アミン−リン酸緩衝液を加える。これを氷水中で 6 ± 2 W で１ 分間超音波処理した後、2.86w/v ％ NZ アミン加 0.3vol ％ポリソルベート 20-リン酸緩衝液で５倍に希釈する。試料及び参照品を必要に応じて希釈液で希釈後、2.86w/v ％ NZ アミン加ポリソルベート 20-リン酸緩衝液で 1.75 倍（牛 RS ウイルスの場合には２倍）階段希釈する（希釈範囲は、牛ウイルス性下痢―粘膜病ウイ

ルス（２型）及び牛 RS ウイルスの場合には７段階、その他は 11 段階とする)。各希釈試料は、100μL をそれぞれ２穴ずつの抗体感作プレートに添加し、37 ℃で一昼夜静置した後、0.3vol ％ポリソルベート 20-リン酸緩衝液を用いて４回洗浄する。洗浄プレートに対象ウイルスのモノクローナル抗体の希釈液を 100μL ずつ加え、37 ℃で 60 分間静置感作する。感作プレートは 0.3vol ％ポリソルベート 20-リン酸緩衝液で４回洗浄した後、２％牛胎子血清−2.86w/v ％ NZ アミン加 0.3vol ％ポリソルベート 20-リン酸緩衝液で希釈したビオチン標識－抗マウス IgG ヤギ抗体(H ＋ L)液を 100μL ずつ加え、37 ℃で 60 分間静置後、さらに 0.3vol ％ポリソルベート 20-リン酸緩衝液にて４回洗浄する。ストレプトアビジン－ペルオキシダーゼ標識抗体を 100μL ずつ添加し、37 ℃で 30 分間静置後、0.3vol ％ポリソルベート 20-リン酸緩衝液で４回洗浄する。洗浄した後、牛伝染性鼻気管炎ウイルス及び牛 RS ウイルスでは基質１（付記５）を、牛ウイルス性下痢―粘膜病１型及び２型ウイルス並びに牛パラインフルエンザ３型ウイルスでは基質２（付記６）を用い、全ての穴に 100 μLずつ添加し、基質１では 37 ℃、基質２では常温で 30 分間暗所に静置して発色させる。発色後、基質１では主波長 405nm、補正波長 490nm、また基質２では主波長 650nm、補正波長 490nm で吸光度を測定する。

3.3.3.3 判定

参照品の抗原量を 1.0 として試料中の相対抗原量を統計学的計算方法（付記７）により算出するとき、試料中の各抗原の参照品に対する相対力価は 1. 0 以上でなければならない。この際、参照品及び試料とも希釈と吸光度間の相関係数は 0. 95 以上を示し、参照品の積分値は希釈液のそれの４倍以上であり、かつ、試料を 3 段階まで希釈した穴の吸光度は参照品のそれの 85 ％以上でなければならない。

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。

3.5 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ず、異物又は異臭を認めてはならない。小分け容器ごとの性状は、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 チメロサール定量試験

一般試験法のチメロサー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 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 2.0mg 以下でなければならない。ただし、特に承認されたものはその試験法とする。

3.5.6 毒性限度確認試験

一般試験法の毒性限度確認試験法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、本試験における注射液量は１頭当たり１ mL とし、注射後３日目の体重が注射前の体重と同等以上であることを、等分散を仮定した母平均の差の t 検定(対応のない場合、両側検定、有意水準５％)により確認する。

3.5.7 力価試験

3.5.7.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス、牛パラインフルエンザ３型ウイルス及び牛 RS ウイルス

3.5.7.1.1 試験材料

3.5.7.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.7.1.1.2 試験動物

体重約 300g のモルモットを用いる。

3.5.7.1.1.3 中和試験用ウイルス

3.5.7.1.1.3.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス

牛伝染性鼻気管炎ウイルス マッカチャー株又は適当と認められた株を用いる。

3.5.7.1.1.3.2 牛パラインフルエンザ３型ウイルス

牛パラインフルエンザ３型ウイルス　ライシンガー SF-4 株又は適当と認められた株を用いる。

3.5.7.1.1.3.3 牛 RS ウイルス

牛 RS ウイルス　ダイヤモンド株又は適当と認められた株を用いる。

3.5.7.1.1.4 培養細胞

3.5.7.1.1.4.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス

MDBK 細胞浮遊液を用いる。

3.5.7.1.1.4.2 牛パラインフルエンザ３型ウイルス

Vero 細胞浮遊液を用いる。

3.5.7.1.1.4.3 牛 RS ウイルス

96 穴マイクロプレートで単層となった Vero 細胞を用いる。

3.5.7.1.2 試験方法

注射材料３ mL ずつを５匹の試験動物に２週間隔で２回注射する。注射方法は、２か所の筋肉内にそれぞれ１ mL ずつ注射し、１か所の皮下に１ mL を注射する。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。

3.5.7.1.2.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス

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 200TCID$_{50}$/25μL に調製した中和試験用ウイルスを等量混和し、37 ℃で 18 時間中和処理する。この混合液 25 μL ずつを 96 穴プラスチックプレートの４穴に接種し、さらに MDBK 細胞浮遊液を 0.1mL ずつ加え、37 ℃　５ vol ％炭酸ガス下で７日間培養し、観察する。

3.5.7.1.2.2 牛パラインフルエンザ３型ウイルス

3.3.8.1.2 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。各希釈血清と 200TCID$_{50}$/25μL に調製した中和用ウイルス を等量混和し、37 ℃で 60 分間中和処理する。この混合液 25μL ずつを 96 穴プラスチックプレートの４穴に接種し、さらに Vero 細胞浮遊液を 0.1mL ずつ加え、37 ℃　５ vol ％炭酸ガス下で７日間培養し、観察する。

3.5.7.1.2.3 牛 RS ウイルス

3.3.8.1.2 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。各希釈血清と 200TCID$_{50}$/25μL に調製した中和試験用ウイルスを等量混和し、37 ℃ 5vol ％炭酸ガス下で 60 分間中和処理する。Vero 細胞の培養液を除き、混合液 25μL ずつ４穴に加え、37 ℃　５ vol ％炭酸ガス下で 60 分間吸着する。吸着後にウイルス増殖用培養液を 0.1mL ずつ加え、34 ℃　５ vol ％炭酸ガス下で７日間培養し、観察する。

3.5.7.1.3 判定

培養細胞の２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。

3.5.7.1.3.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス

中和抗体価 128 倍以上を陽性とするとき、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。

3.5.7.1.3.2 牛パラインフルエンザ３型ウイルス

中和抗体価４倍以上を陽性とするとき、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。

3.5.7.1.3.3 牛 RS ウイルス

中和抗体価２倍以上を陽性とするとき、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。

3.5.7.2 牛ウイルス性下痢―粘膜病ウイルス１型及び２型

3.5.7.2.1 試験材料

3.5.7.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.7.2.1.2 試験動物

体重約 100g のラットを用いる。

3.5.7.2.1.3 中和試験用ウイルス

3.5.7.2.1.3.1 牛ウイルス性下痢―粘膜病ウイルス（１型）

牛ウイルス性下痢―粘膜病ウイルス（１型）シンガー株又は適当と認められた株を用いる。

3.5.7.2.1.3.2 牛ウイルス性下痢―粘膜病ウイルス（２型）

牛ウイルス性下痢―粘膜病ウイルス（２型）5912 株又は適当と認められた株を用いる。

3.5.7.2.1.4 培養細胞

MDBK 細胞浮遊液を用いる。

3.5.7.2.2 試験方法

注射材料２ mL ずつを５匹の試験動物の両後肢大腿部筋肉内に各１ mL ずつ注射する。注射後 21 日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 200$TCID_{50}$/25μL に調製した中和試験用ウイルスを等量混和し、37 ℃で 60 分間中和処理する。この混合液 25μL ずつを 96 穴プラスチックプレートの４穴に接種し、さらに MDBK 細胞浮遊液を 0.1mL ずつ加え、37 ℃ 5vol %炭酸ガス下で７日間培養し、観察する。

3.5.7.2.3 判定

培養細胞の２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倍以上を陽性とき、試験動物の中和抗体陽性率は、それぞれの株に対して 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、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
牛血清	10 ～ 20　mL
イーグル MEM	残　量

炭酸水素ナトリウムを用いて 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１型及び２型ウイルス、牛パラインフルエンザ３型ウイルス及び牛 RS ウイルス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２　参照品

ワクチン製造方法で製造されたウイルス浮遊液を不活化したものにアジュバントを小分製品と同一の割合で混合したもので、動物医薬品検査所が適当と認めたもの

付記３　希釈液

ウイルスの培養と同じ工程でウイルスを接種せずに製造用細胞を培養した後のウイルス増殖用培養液とアジュバントを小分製品と同一割合で混合したもの

付記４　抗牛伝染性鼻気管炎ウイルス牛血清、抗牛ウイルス性下痢―粘膜病ウイルス（１型）牛血清、抗牛ウイルス性下痢―粘膜病ウイルス（２型）牛血清、抗牛パラインフルエンザ３型ウイルス牛血清及び抗牛 RS ウイルス牛血清

各抗血清は、各ウイルスの精製、不活化抗原にフロイントの不完全アジュバンを加え、牛の皮内に注射して得られる。それぞれの抗血清を検体として間接蛍光抗体法により試験するとき、目的のウイルスの感染細胞に特異蛍光が認められ、対照細胞には特異蛍光を認めない。

付記５　基質１

適当と認められた 2,2’−アジノビス（3−エチルベゾチアゾリン−6−スルホン酸溶液（ABTS）

付記６　基質２

適当と認められた（3,3’，5,5’）テトラメチルベンチジン溶液（TMB）

付記７　統計学的計算方法

動物医薬品検査所が適当と認めたもの