

ワクチン（シードロット製剤）の部の牛コロナウイルス感染症（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）**

動生剤基準の牛疫生ワクチン（シード）の3.4.6に規定するところにより、試験を行うものとする。

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部ニューカッスル病・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）不活化ワクチンの項を次のように改める。

## **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**

動生剤基準のニューカッスル病・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）不活化ワクチンの3.5.2、3.5.4及び3.5.5に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。

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**

動生剤基準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3.3.4、3.3.6、3.3.7、3.3.8及び3.3.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。

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**

動生剤基準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3.3.4、3.3.6、3.3.7、3.3.8及び3.3.9に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。

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 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生ワクチン

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 1 型及び 2 型、弱毒牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス、弱毒牛RSウイルス並びに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。

### 1 小分製品の試験

#### 1.1 無菌試験

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

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）、抗牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス血清（付記 2 及び 3）、抗牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス血清（付記 4）、抗牛RSウイルス血清（付記 5）及び抗牛アデノウイルス（7 型）血清（付記 6）を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抗血清（付記 2 から 6 まで）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 7）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 をそれぞれ 4 本以上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 1 mL 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 牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 1 型

###### 1.3.2.1 試験材料

###### 1.3.2.1.1 試料

試験品中の牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 1 型以外のウイルスを各抗血清（付記 1 及び 3 から 6 まで）を非働化したもので中和したものを細胞増殖用培養液（付記 8）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

牛精巢継代細胞浮遊液を用いる。

#### 1.3.2.2 試験方法

試料 0.1mL をそれぞれ小試験管に 0.5mL ずつ分注した培養細胞 4 本以上に接種し、37 °C で 5 ～ 7 日間静置培養し、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 1 型 Nose 株を  $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub> 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  $10^{4.0}$ EID<sub>50</sub> 含んだ細胞増殖用培養液を 1 mL ずつ加え、更に 34 ～ 36 °C で 5 ～ 7 日間回転培養し、観察する。

#### 1.3.2.3 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、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  $10^{3.0}$ TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

#### 1.3.3 牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス 2 型

1.3.2 を準用して試験を行う。判定に当たっては、試験品のウイルス含有量は、1 頭分当たり  $10^{3.0}$ TCID<sub>50</sub> 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 2 型以外のウイルスを各抗血清（付記 1、2 及び 4 から 6 まで）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。

#### 1.3.4 牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス

##### 1.3.4.1 試験材料

###### 1.3.4.1.1 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抗血清（付記 1 から 3 まで、5 及び 6）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。

##### 1.3.4.2 試験方法

試料 0.1mL をそれぞれ 4 本以上の培養細胞に接種し、37 °C で 60 分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を 1 mL ずつ加え、34 ～ 36 °C で 7 日間回転培養し、観察する。

##### 1.3.4.3 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  $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

#### 1.3.5 牛 R S ウイルス

##### 1.3.5.1 試験材料

###### 1.3.5.1.1 試料

試験品中の牛 R S ウイルス以外のウイルスを各抗血清（付記 1 から 4 まで及び 6）を非働化したもので中和したものを牛 R S ウイルス増殖用培養液（付記 1 2）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 1.3.5.1.2 培養細胞

Vero 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。

##### 1.3.5.2 試験方法

試料 0.1mL をそれぞれ 4 本以上の培養細胞に接種し、37 °C で 60 分間吸着させた後、牛 R S ウイルス増殖用培養液を 1 mL ずつ加え、34 °C で 14 日間回転培養し、観察する。

##### 1.3.5.3 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  $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

### 1.3.6 牛アデノウイルス（7型）

#### 1.3.6.1 試験材料

##### 1.3.6.1.1 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抗血清（付記1から5まで）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。

##### 1.3.6.1.2 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。

##### 1.3.6.1.3 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（以下この項において「VBS」という。）（付記9）に0.3vol%に浮遊させたものを用いる。

#### 1.3.6.2 試験方法

試料0.1mLをそれぞれ4本以上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1mLずつ加え、34～36℃で7日間回転培養し、観察する。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。

##### 1.3.6.3 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 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。

#### 1.5 安全試験

##### 1.5.1 牛注射試験

###### 1.5.1.1 試験材料

###### 1.5.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 1.5.1.1.2 試験動物

体重100～200kgの牛を用いる。

###### 1.5.1.2 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。

###### 1.5.1.3 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ない。

##### 1.5.2 乳のみマウス注射試験

###### 1.5.2.1 試験材料

###### 1.5.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 1.5.2.1.2 試験動物

3日齢以内の乳のみマウスを用いる。

###### 1.5.2.2 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。

###### 1.5.2.3 判定

観察期間中、異常を認めない。

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。

### 1.6 力価試験

## 1.6.1 牛伝染性鼻気管炎力価試験

### 1.6.1.1 試験材料

#### 1.6.1.1.1 試験動物

1.5.1 の試験に用いた動物を用いる。

#### 1.6.1.1.2 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。

#### 1.6.1.1.3 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。

### 1.6.1.2 試験方法

1.5.1 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 当たり約 100PFU を含む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 2 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 10）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 11）3 mL を加え、更に 24 時間培養した後、ブラック数を算定する。また、中和試験用ウイルス液 0.2mL ずつを培養細胞に接種し、同様に処理したもの（以下この項において「ウイルス対照」という。）について、ブラック数を算出する。

### 1.6.1.3 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。

## 1.6.2 牛ウイルス性下痢－粘膜病力価試験

### 1.6.2.1 試験材料

#### 1.6.2.1.1 試験動物

1.5.1 の試験に用いた動物を用いる。

#### 1.6.2.1.2 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 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。

#### 1.6.2.1.3 培養細胞

牛精巢継代細胞浮遊液を用いる。

### 1.6.2.2 試験方法

1.5.1 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、細胞増殖用培養液で 2 倍階段希釈する。各希釈血清 0.5mL と 0.1mL 当たり約 200TCID<sub>50</sub> を含む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 0.1mL ずつを、小試験管に 0.5mL ずつ分注した細胞 4 本ずつに接種する。37℃で 4～5 日間静置培養し、観察する。

### 1.6.2.3 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、牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 1 型及び 2 型に対してそれぞれ 2 倍以上でなければならない。

## 1.6.3 牛パラインフルエンザ力価試験

### 1.6.3.1 試験材料

#### 1.6.3.1.1 接種材料

試験品を注射材料とする。

#### 1.6.3.1.2 試験動物



体重約 350g のモルモットを用いる。

#### 1.6.3.1.3 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 BNi-1 株を用いる。

#### 1.6.3.2 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、15 ~ 25 °C で 20 分間処理した後、1,700 G で 20 分間遠心し、その上清を VBS 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 °C で 60 分間処理した後、VBS で濃度を調整した 0.3vol %モルモット赤血球浮遊液 0.2mL を加え、4 °C で 1 夜静置し、観察する。

#### 1.6.3.3 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。

#### 1.6.4 牛 R S ウイルス感染症力価試験

##### 1.6.4.1 試験材料

##### 1.6.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 1.6.4.1.2 試験動物

体重約 100g のハムスターを用いる。

##### 1.6.4.1.3 中和試験用ウイルス

牛腎継代細胞で増殖させた牛 R S ウイルス NMK7 株を用いる。

##### 1.6.4.1.4 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。

##### 1.6.4.2 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。

被検血清を非動化した後、牛 R S 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 当たり約 200TCID<sub>50</sub> を含む中和試験用ウイルス 0.5mL とを混合し、22 °C で 24 時間処理する。この混合液 0.1mL ずつを 4 本の培養細胞に接種し、37 °C で 60 分間静置吸着させた後、牛 R S ウイルス増殖用培養液を 1 mL ずつ加え、34 °C で 10 日間回転培養し、観察する。

##### 1.6.4.3 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。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。

#### 1.6.5 牛アデノウイルス感染症力価試験

##### 1.6.5.1 試験材料

##### 1.6.5.1.1 試験動物

1.5.1 の試験に用いた動物を用いる。

##### 1.6.5.1.2 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。

##### 1.6.5.1.3 赤血球浮遊液

1.3.6.1.3 の赤血球浮遊液を用いる。

##### 1.6.5.2 試験方法

1.5.1 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、VBS 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、15～25℃で20分間処理した後、1,700 Gで20分間遠心し、その上清をVBS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1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1夜静置し、観察する。

#### 1.6.5.3 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。

#### 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 株で免疫した兔の血清であって、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1型血清

強毒牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス No.12 株で免疫した兔の血清であって、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 抗牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス2型血清

強毒牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス KZ-91-ncp 株で免疫した兔の血清であって、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<sub>i</sub>-1 株で免疫した兔の血清であって、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RSウイルス血清

強毒牛RSウイルス NMK7 株で免疫した兔の血清であって、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 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)袋井株で免疫した兔の血清であって、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7 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8 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。

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 R S ウイルス及び牛アデノウイルス（7 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 9 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 %ゼラチン液

100mL 中

精製ゼラチン

水

使用時加温溶解する。

C 液 5 w/v %牛血清アルブミン液

100mL 中

牛血清アルブミン 5.0 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 10 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	8.0 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 11 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	8.0 g
ニュートラルレッド	0.05 g

	残 量
水	
付記 12 牛RSウイルス増殖用培養液	
1,000mL 中	
トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
L-グルタミン	0.292g
ブドウ糖	1.0g
L-グルタミン酸水素ナトリウム一水和物	5.0g
酵母エキス	0.5g
牛胎子血清	10 ~ 20 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。

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**

動生剤基準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 3.5.5、3.5.7、3.5.8、3.5.9、3.5.10、3.5.11  
及び3.5.12.5に規定するところにより、これらに規定する試験を行うものとする。

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・牛ヒストフィルス・ソムニ（ヘモフィルス・ソムナス）感染症混合（アジュバント加）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・牛ヒストフィルス・ソムニ（ヘモフィルス・ソムナス）感染症混合（アジュバント加）ワクチン**

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（以下この項において「乾燥生ワクチン」という。）と、ヒストフィルス・ソムニの培養菌液を不活化し、アルミニウムゲルアジュバントを加えたワクチン（以下この項において「液状不活化ワクチン」という。）とを組み合わせたものである。

### 1 小分製品の試験

#### 1.1 無菌試験

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

乾燥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。

#### 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

乾燥生ワクチンを液状不活化ワクチンと同量のウイルス増殖用培養液（付記6）で溶解したものを試験品とし、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。

###### 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をそれぞれ4本以上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1mL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 牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス

###### 1.3.2.1 試験材料

#### 1.3.2.1.1 試料

乾燥生ワクチン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たものを試験品とし、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

牛精巢継代細胞浮遊液を用いる。

#### 1.3.2.2 試験方法

試料 0.1mL を、小試験管に 0.5mL ずつ分注した培養細胞 4 本以上にそれぞれ接種し、37℃で 5～7 日間静置培養し、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  $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub>（以下この項において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  $10^{4.0}$ EID<sub>50</sub>（以下この項においてこのウイルスを用いる方法を「END 法」という。）含んだ細胞増殖用培養液を 1 mL ずつ加え、更に 34～36℃で 5～7 日間回転培養し、観察する。

#### 1.3.2.3 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、END 法にあつては CPE の発現し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  $10^{3.0}$ TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

### 1.3.3 牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス

#### 1.3.3.1 試験材料

##### 1.3.3.1.1 試料

乾燥生ワクチン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たものを試験品とし、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。

##### 1.3.3.1.2 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。

##### 1.3.3.2 試験方法

試料 0.1mL を 4 本以上の培養細胞にそれぞれ接種し、37℃で 60 分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を 1 mL ずつ加え、34～36℃で 7 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  $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

### 1.3.4 牛 R S ウイルス

#### 1.3.4.1 試験材料

##### 1.3.4.1.1 試料

乾燥生ワクチン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たものを試験品とし、試験品中の牛 R S 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牛 R S ウイルス増殖用培養液（付記24）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

Vero 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。

##### 1.3.4.2 試験方法

試料 0.1mL を 4 本以上の培養細胞にそれぞれ接種し、37℃で 60 分間吸着させた後、牛 R S ウイルス増殖用培養液を 1 mL ずつ加え、34℃で 14 日間回転培養し、観察する。

##### 1.3.4.3 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  $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

### 1.3.5 牛アデノウイルス（7型）

#### 1.3.5.1 試験材料

##### 1.3.5.1.1 試料

乾燥生ワクチン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たものを試験品とし、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。

##### 1.3.5.1.2 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。

##### 1.3.5.1.3 赤血球浮遊液

牛、羊又はやぎの赤血球をゼラチン・アルブミン加ペロナル緩衝食塩液（以下この項において「VBS」という。付記7）に0.3vol%に浮遊させたものを用いる。

#### 1.3.5.2 試験方法

試料0.1mLを4本以上の培養細胞にそれぞれ接種し、37℃で60分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を1mLずつ加え、34～36℃で7日間回転培養し、観察する。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。

#### 1.3.5.3 判定

赤血球凝集が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>3.0</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

### 1.4 安全試験

#### 1.4.1 牛注射試験

##### 1.4.1.1 試験材料

##### 1.4.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 1.4.1.1.2 試験動物

体重100～200kgの牛2頭を用いる。うち1頭は、牛伝染性鼻気管炎ウイルス、牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス及び牛アデノウイルス（7型）に対する抗体陰性の牛とする。

##### 1.4.1.2 試験方法

注射材料1頭分を試験動物の臀部筋肉内に注射し、14日間観察する。

##### 1.4.1.3 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、注射部位の腫脹・硬結以外の異常を認めてはならない。

#### 1.4.2 乳のみマウス注射試験

##### 1.4.2.1 試験材料

##### 1.4.2.1.1 注射材料

乾燥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を注射材料とする。

##### 1.4.2.1.2 試験動物

3日齢以内の乳のみマウスを用いる。

##### 1.4.2.2 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。

##### 1.4.2.3 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。



## 1.5 力価試験

### 1.5.1 牛伝染性鼻気管炎力価試験

#### 1.5.1.1 試験材料

##### 1.5.1.1.1 試験動物

1.4.1 の試験に用いた動物で、注射時に牛伝染性鼻気管炎ウイルスに対する抗体陰性のものを用いる。

##### 1.5.1.1.2 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。

##### 1.5.1.1.3 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。

#### 1.5.1.2 試験方法

1.4.1 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 当たり約 100PFU を含む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 2 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 8）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 9）3 mL を加え、更に 24 時間培養後、プラック数を算出する。また、中和試験用ウイルス液 0.2mL ずつを培養細胞に接種し、同様に処理したもの（以下この項において「ウイルス対照」という。）について、プラック数を算出する。

#### 1.5.1.3 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。

### 1.5.2 牛ウイルス性下痢－粘膜病力価試験

#### 1.5.2.1 試験材料

##### 1.5.2.1.1 試験動物

1.4.1 の試験に用いた動物で、注射時に牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルスに対する抗体陰性のものを用いる。

##### 1.5.2.1.2 中和試験用ウイルス

牛精巢継代細胞で増殖させた牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス Nose 株を用いる。

##### 1.5.2.1.3 培養細胞

牛精巢継代細胞浮遊液を用いる。

#### 1.5.2.2 試験方法

1.4.1 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、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 当たり約 200TCID<sub>50</sub> を含む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 0.1mL ずつを、小試験管に 0.5mL ずつ分注した培養細胞 4 本ずつに接種する。37℃で 4～5 日間静置培養し、観察する。

#### 1.5.2.3 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。

### 1.5.3 牛パラインフルエンザ力価試験

#### 1.5.3.1 試験材料

##### 1.5.3.1.1 接種材料

試験品を注射材料とする。

#### 1.5.3.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

#### 1.5.3.1.3 赤血球凝集抗原

牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス赤血球凝集抗原（付記 10）を用いる。

#### 1.5.3.1.4 赤血球浮遊液

モルモットの赤血球を VBS に 0.3vol % に浮遊したものをを用いる。

#### 1.5.3.2 試験方法

5 匹の試験動物の左右の鼻腔内に接種材料を 0.1mL ずつ接種し、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（付記 11）0.6mL を加え、常温で 20 分間処理した後、1,700G で 20 分間遠心し、その上清を VBS を用いて 2 倍階段希釈する。各希釈血清 0.2mL に 4 単位の牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス赤血球凝集抗原 0.2mL を加え、37 °C で 60 分間処理した後、赤血球浮遊液 0.2mL を加え、4 °C で一夜静置し、観察する。

#### 1.5.3.3 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。

#### 1.5.4 牛 R S ウイルス感染症力価試験

##### 1.5.4.1 試験材料

###### 1.5.4.1.1 注射材料

乾燥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を注射材料とする。

###### 1.5.4.1.2 試験動物

体重約 100g のハムスターを用いる。

###### 1.5.4.1.3 中和試験用ウイルス

牛腎継代細胞で増殖させた牛 R S ウイルス NMK7 株を用いる。

###### 1.5.4.1.4 培養細胞

Vero 細胞を小試験管に 1 ~ 3 日間培養し、単層となったものをを用いる。

##### 1.5.4.2 試験方法

注射材料 2 mL ずつを 5 匹の試験動物の腹腔内に 14 日間隔で 2 回注射し、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。

被検血清を非動化した後、牛 R S 用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 当たり約 200TCID<sub>50</sub> を含む中和試験用ウイルス 0.5mL とを混合し、22 °C で 24 時間処理する。この混合液 0.1mL ずつを 4 本の培養細胞に接種し、37 °C で 60 分間静置吸着させた後、牛 R S 用ウイルス増殖用培養液を 1 mL ずつ加え、34 °C で 10 日間回転培養し、観察する。

#### 1.5.4.3 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。

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。

#### 1.5.5 牛アデノウイルス感染症力価試験

##### 1.5.5.1 試験材料

###### 1.5.5.1.1 試験動物

1.4.1 の試験に用いた動物で、注射時に牛アデノウイルス（7 型）に対する抗体陰性のものを

いる。

#### 1.5.5.1.2 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。

#### 1.5.5.1.3 赤血球浮遊液

1.3.5.1.3の赤血球浮遊液を用いる。

#### 1.5.5.2 試験方法

1.4.1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、VBS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、常温で20分間処理した後、1,700Gで20分間遠心し、その上清をVBSを用いて2倍階段希釈する。各希釈血清0.2mLに4単位の牛アデノウイルス（7型）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。

#### 1.5.5.3 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。

#### 1.5.6 ヒストフィルス・ソムニ感染症力価試験

##### 1.5.6.1 試験材料

##### 1.5.6.1.1 注射材料

液状不活化ワクチンを注射材料とする。

##### 1.5.6.1.2 試験動物

体重約350gのモルモットを用いる。

##### 1.5.6.1.3 酵素抗体反応（以下この項において「ELISA」という。）用抗原

ヒストフィルス・ソムニ ELISA 用抗原（付記13。以下この項において「OMC 抗原」という。）を用いる。

##### 1.5.6.2 試験方法

試験動物8匹を試験群、2匹を対照群とする。注射材料を0.5mLずつ2週間間隔で2回、試験群の筋肉内に注射する。2回目の注射をした2週間後に試験動物から得られた各個体の血清についてELISAを行う。

試験群及び対照群の各血清、ヒストフィルス・ソムニ参照陽性血清（付記14）並びにヒストフィルス・ソムニ参照陰性血清（付記15）をポリソルベートPBS（付記16）で100倍に希釈し、さらに、希釈用プレート上で2倍階段希釈したものをヒストフィルス・ソムニ抗原吸着プレート（付記17）の各穴に100 $\mu$ Lずつ加え、30℃で1時間感作する。ポリソルベートPBSでよく洗浄した後、各穴にペルオキシダーゼ標識抗モルモットIgG液（付記18）を100 $\mu$ Lずつ加え、30℃で30分間反応させ、ポリソルベートPBSでよく洗浄する。その後、基質液（付記19）を各穴に100 $\mu$ Lずつ加え、遮光して30℃で30分間反応させ、1mol/L硫酸溶液を各穴に50 $\mu$ Lずつ加えて反応を停止させる。各穴の吸光度を主波長492nm及び副波長630nmで測定し、これらの差をELISA値とする。

##### 1.5.6.3 判定

ELISA値が0.5以上を示す血清の最高希釈倍数をELISA抗体価とする。

試験群では、ELISA抗体価の幾何平均値が300倍以上でなければならない。この場合において、対照群では、100倍未満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

強毒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あって、乾燥生ワクチンに含まれる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あって、乾燥生ワクチンに含まれる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<sub>1</sub>-1 株で免疫した兎の血清であって、乾燥生ワクチンに含まれる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、乾燥生ワクチンに含まれる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、乾燥生ワクチンに含まれる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 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 5 w/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 4 mL を加えて調製し、用いる。

付記 8 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 9 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 10 牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス赤血球凝集抗原  
牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス BN<sub>1</sub>-1 株を牛腎継代細胞で増殖させて得た培養上清

付記 11 25w/v %カオリン加生理食塩液  
1,000mL 中

カオリン	250 g
塩化ナトリウム	8.75 g
水	残 量

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

付記 13 OMC 抗原  
ヒストフィルス・ソムニ M-1 Br/B 株を培養し、集菌し、洗浄した後、生理食塩液に再浮遊し、吸光度を調整する。これを 4℃ で攪はんした後、遠心して採取した上清をメンブランフィルターでろ過したもの。  
参照陽性血清の抗体価を ELISA により測定するとき、OMC 抗原に対する吸光度は、参照 OMC 抗原（付記 20）に対するその吸光度比で 1.0（± 0.3）でなければならない。

付記 14 ヒストフィルス・ソムニ参照陽性血清  
OMC 抗原を用いて ELISA を実施し、主波長 492nm 及び副波長 630nm で測定したとき、抗体価が 400 ~ 800 倍を示すもの。凍結して - 20℃ 以下又は凍結乾燥して 5℃ 以下に保存する。

付記 15 ヒストフィルス・ソムニ参照陰性血清

無処置のモルモット血清であって、56℃で30分間非動化し、参照 OMC 抗原又は OMC 抗原を用いて ELISA を実施し、主波長 492nm 及び副波長 630nm で測定した吸光度が、100 倍希釈で 0.5 未満を示すものを用いる。凍結して -20℃以下又は凍結乾燥して 5℃以下に保存する。

付記 16 ポリソルベート PBS

1,000mL 中	
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	2.9 g
塩化カリウム	0.2 g
リン酸二水素カリウム	0.2 g
塩化ナトリウム	8 g
ポリソルベート 20	0.5 mL
水	残 量

付記 17 ヒストフィルス・ソムニ抗原吸着プレート

OMC 抗原を炭酸緩衝液（付記 21）で至適濃度に調整したものを各穴に 100  $\mu$  L ずつ滴下し、30℃で2時間固相化し、ポリソルベート PBS で洗浄し、その後、ブロッティング液（付記 22）を各穴に 300  $\mu$  L ずつ加え、4℃で 18～24 時間感作し、ポリソルベート PBS で洗浄したもの。

付記 18 ペルオキシダーゼ標識抗モルモット IgG 液

西洋ワサビペルオキシダーゼを標識した抗モルモット IgG を、ポリソルベート PBS で至適濃度に調整したもの。

付記 19 基質液

O-フェニレンジアミン 40mg を、リン酸クエン酸緩衝液（付記 23）100mL に溶解し、使用直前に過酸化水素を 40  $\mu$  L 添加したもの。

付記 20 参照 OMC 抗原

ヒストフィルス・ソムニ M-1 Br/B 株を培養し、集菌し、洗浄した後、生理食塩液に再浮遊し、吸光度を調整する。これを 4℃で攪拌した後、遠心して採取した上清をメンブランフィルターでろ過したもの。

参照 OMC 抗原を用いて参照陽性血清の抗体価を ELISA により測定するとき、参照陽性血清の 400 倍希釈の吸光度は 0.6 以上でなければならない。

付記 21 炭酸緩衝液

1,000mL 中	
炭酸ナトリウム	1.59 g
炭酸水素ナトリウム	2.93 g
水	残 量

4℃に保存し、1週間以内に使用する。pH は 9.6 に調整する。

付記 22 ブロッティング液

オボアルブミン タイプ VII 50mg をポリソルベート PBS100mL に使用直前に溶解したもの。

付記 23 リン酸クエン酸緩衝液

1,000mL 中

無水クエン酸	4.67 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	19.95 g
水	残 量

付記 24 牛RSウイルス増殖用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
L-グルタミン	0.292g
ブドウ糖	1.0g
L-グルタミン酸水素ナトリウム一水和物	5.0g
酵母エキス	0.5g
牛胎子血清	10 ~ 20 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。

診断液の部の牛海綿状脳症診断用酵素抗体反応キット（ワンポット前処理法）の項を次のように改める。

## 牛海綿状脳症診断用酵素抗体反応キット（ワンポット前処理法）

プリオン蛋白のコア領域に対するモノクローナル抗体を固相化したプレートに、ワンポット前処理法で調製した検体を添加し、酵素抗体法により牛海綿状脳症の異常プリオン蛋白を検出するためのキットである。

### 1 小分け製品の試験

#### 1.1 特異性試験

##### 1.1.1 試験材料

試験品及び非感染牛延髄（付記1）を用いる。

##### 1.1.2 試験方法

###### 1.1.2.1 陰性検体の作製

非感染牛延髄110±20mgをバイオマッシャーに入れ、これを回収用チューブ内にセットし15,000Gで30秒間の遠心操作を行う。バイオマッシャーを廃棄し、回収用チューブに酵素混合液（付記2）を1mL加え、全体が均一になるまで攪拌する。56℃で10分間反応後、直ちに100℃で10分間加熱する。これを37℃以下まで冷却したものを陰性検体とする。

###### 1.1.2.2 酵素抗体反応

抗体プレートの3穴に陰性コントロールを、3穴に陽性コントロール液（付記3）を、4穴に陰性検体をそれぞれ100μLずつ加え、37℃で1時間反応させる。洗浄液でプレートを洗浄し、希釈標識抗体液（付記4）を100μLずつ加え、4～8℃で30分間反応させる。洗浄液でプレートを洗浄し、基質液を100μLずつ加える。プレートを遮光して常温で30分間反応させた後、反応停止液を100μLずつ加え、30分以内に各穴の吸光度を波長450nmで測定する。

###### 1.1.2.3 判定

陰性コントロール液3穴の吸光度平均値が0.2以下、および陽性コントロールの吸光度から陰性コントロールの平均値を差し引いた値がいずれも1.2以上であるとき、試験が成立したものとする。

検体の吸光度から陰性コントロールの平均値を差し引いた値がカットオフ値（付記5）以上の場合を陽性、カットオフ値未満の場合を陰性と判定する。

陰性検体はすべて陰性でなければならない。

### 1.2 吸光度試験及び力価試験

#### 1.2.1 試験材料

試験品、参照陽性抗原（付記6）及び標準試料溶液L、M及びH（付記7）を用いる。



## 1.2.2 試験方法

参照陽性抗原の2倍階段希釈系列を希釈用緩衝液(付記8)を用いて64倍まで作製し、各希釈の参照陽性抗原を抗体プレートの2穴ずつに、標準試料溶液L、M及びHを抗体プレートの8穴ずつに、陰性コントロールを3穴に加え、37℃で1時間反応させる。洗浄液でプレートを洗浄し、希釈標識抗体液を100 $\mu$ Lずつ加え、4~8℃で30分間反応させる。洗浄液でプレートを洗浄し、基質液を100 $\mu$ Lずつ加える。プレートを遮光して常温で30分間反応させた後、反応停止液を100 $\mu$ Lずつ加え、30分以内に各穴の吸光度を波長450nmで測定する。参照陽性抗原希釈系列の測定結果を用いて作成した検量線により、標準試料溶液L、M及びHの吸光度からこれらの濃度を算出する。

## 1.2.3 判定

参照陽性抗原の吸光度値から、陰性コントロールの平均値を差し引いた値は1.2以上でなければならない。また、標準試料溶液L、M及びHの算出濃度と、あらかじめ調整された濃度との誤差は25.0%以内でなければならない。

### 付記1 非感染牛延髄

牛海綿状脳症に感染していない牛の延髄

### 付記2 酵素混合液

試薬A(破砕用緩衝液)、試薬B(プロテイナーゼK)及び試薬C(マイクロバイアルセリンプロテイナーゼ)を、100:1:1の割合に混合したもの

### 付記3 陽性コントロール液

陽性コントロールを、水2mLで溶解したもの

### 付記4 希釈標識抗体液

標識抗体溶液を標識抗体用希釈液で30倍希釈したもの

### 付記5 カットオフ値

陰性コントロール3穴の吸光度の平均値に0.30を加えた値

### 付記6 参照陽性抗原

組換え牛プリオン蛋白質が、0.002 $\mu$ g/mLになるように、アルブミン含有リン酸緩衝液(付記9)に溶解したもの

### 付記7 標準試料溶液L、M及びH

組換え牛プリオン蛋白質をアルブミン含有リン酸緩衝液に溶解し、希釈用緩衝液で次の濃度に調整したもの

L:0.00007 $\pm$ 0.00003 $\mu$ g/mL

M:0.0002 $\pm$ 0.0001 $\mu$ g/mL

H:0.0008±0.0002 μg/mL

付記8 希釈用緩衝液  
陰性コントロールと同様の組成を持つもの

付記9 アルブミン含有リン酸緩衝液

1000mL中

アルブミン（乾燥脱糖卵白） 10g

塩化カリウム 0.2g

塩化ナトリウム 8.0g

リン酸二水素カリウム 0.2g

リン酸水素二ナトリウム・12水 2.9g

アジ化ナトリウム 0.5g

水 残量

pHを7.2に調整する

ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部のひらめエドワジェラ症（多糖アジュバント加）不活化ワクチンの項を次のように改める。

## ひらめエドワジェラ症（多糖アジュバント加）不活化ワクチン

エドワジェラ・タルダの培養菌液を不活化した後、多糖アジュバントを添加したワクチンである。

### 1 小分製品の試験

#### 1.1 無菌試験

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 安全試験

##### 1.2.1 試験材料

###### 1.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 1.2.1.2 試験動物

水温 20℃、循環式で7日間以上飼育し、異常のないことを確認した体重 20～50g のひらめ 30尾以上を用いる。

##### 1.2.2 試験方法

試験動物は、24時間以上餌止めした後、1群 15尾以上ずつの2群に分ける。1群の試験動物に注射材料 0.1mL を 14日間隔で2回、腹腔内に注射し、試験群とする。他の1群は、対照群とし、試験群と同様の方法でリン酸緩衝食塩液を注射する。その後、それぞれ水温 20℃、循環式で飼育し、初回注射後 28日間観察する。ただし、安全試験最終日の前日から水温を約1日かけて 25℃に上昇させる。

##### 1.2.3 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。

#### 1.3 力価試験

##### 1.3.1 試験材料

###### 1.3.1.1 試験動物

1.2の試験に用いた動物を用いる。

##### 1.3.2 試験方法

1.2の試験最終日に、試験群及び対照群のそれぞれ 15尾から採血し、45℃で 20分間非働化した血清について、マイクロタイター法で凝集試験を行う。

試験群の血清、対照群の血清、参照陽性血清（付記1）及び参照陰性血清（付記2）を、リン酸緩衝食塩液で 10倍に希釈した後、更に2倍階段希釈した各希釈血清に凝集反応用抗原（付記3）を等量加えて、25℃で2時間反応させ、更に4℃で 18～24時間静置した後、管底の凝集の有無を観察する。

##### 1.3.3 判定

凝集を認めた血清の最高希釈倍数を凝集抗体価とする。

試験群の血清の抗体価の幾何平均値は 210倍以上でなければならない。対照群では、抗体価の幾何平均値は 10倍未満でなければならない。また、参照血清は所定の抗体価を示さなければならない。

#### 付記1 参照陽性血清

エドワジェラ・タルダ M-1 G-3 株のホルマリン不活化菌体とアジュバントとしてフコイダ

ンを混合したものをひらめに注射して得た血清で、凝集抗体価が 2,560 ～ 5,120 倍となるように濃度を調整したもの。

付記 2 参照陰性血清

健康な無処置のひらめの血清で、凝集抗体価が 10 倍未満のもの。

付記 3 凝集反応用抗原

エドワジェラ・タルダ M-1 G-3 株のホルマリン不活化菌体を、リン酸緩衝食塩液で遠心洗浄した後、再浮遊し、波長 600nm の吸光度が 0.4 ～ 0.6 になるように調製したもので、既知抗体価の陽性血清に対し所定の凝集抗体価を示すことを確認したもの。

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2価・猫汎白血球減少症混合ワクチン（シード）の項を削る。