

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 - 粘膜病ウイルス及び弱毒牛パラインフルエンザ 3 型ウイルスを培養細胞で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 の豚精巢初代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

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 の豚精巢初代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

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。

2.2 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 の豚精巣初代細胞又は製造に相当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.1.2 培養液

製造に相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

2.2.2.1 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.6.2 の豚精巣初代細胞又は製造に相当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.2.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

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

製造に相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。

2.4 混合原液の調製

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及び牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス原液を混合し、混合原液とする。

混合原液について、3.3 の試験を行う。

2.5 最終バルク

混合原液に適当と認められた安定剤を加えて混合し、最終バルクとする。

2.6 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 培養細胞の試験

個別培養細胞の 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。

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。

3.1.5 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 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。

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）及び抗牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス血清（付記 3）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 - 1（付記 4）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

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

3.2.3.1.2 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。

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^{5.5}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 5）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.3.2.1.2 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 ずつを小試験管に 0.5mL ずつ分注した細胞 4 本以上に接種し、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}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 0.5mL ずつ加え、更に 34 ~ 36℃ で 5 ~ 7 日間回転培養し、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^{4.5}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 - 2（付記 6）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.3.3.1.2 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。

3.2.3.3.2 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、34～36℃ で7日間回転培養し、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^{6.5}TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.3 混合原液の試験

3.3.1 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 及び 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、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及び抗牛パラインフルエンザ3型ウイルス血清を非働化したものを用いる。

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。異物又は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 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及び抗牛パラインフルエンザ3型ウイルス血清を非働化したものを用いる。

3.4.7 ウイルス含有量試験

3.4.7.1 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。

3.4.7.2 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。

3.4.7.3 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。

3.4.8 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。

3.4.9 安全試験

3.4.9.1 牛注射試験

3.4.9.1.1 試験材料

3.4.9.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.9.1.1.2 試験動物

体重 100 ~ 200kg の牛を用いる。

3.4.9.1.2 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。

3.4.9.1.3 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なければならない。

3.4.9.2 乳のみマウス注射試験

3.4.9.2.1 試験材料

3.4.9.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.9.2.1.2 試験動物

3 日齢以内の乳のみマウスを用いる。

3.4.9.2.2 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。

3.4.9.2.3 判定

観察期間中、異常を認めなければならない。

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。

3.4.10 力価試験

3.4.10.1 牛伝染性鼻気管炎力価試験

3.4.10.1.1 試験材料

3.4.10.1.1.1 試験動物

3.4.9.1 の試験に用いた動物を用いる。

3.4.10.1.1.2 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。

3.4.10.1.1.3 培養細胞

牛精巢継代細胞浮遊液を約 27cm² 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。

3.4.10.1.2 試験方法

3.4.9.1 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、4 vol% となるように牛血清を加えたアール液で 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 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 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。

3.4.10.1.3 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。

3.4.10.2 牛ウイルス性下痢 - 粘膜病力価試験

3.4.10.2.1 試験材料

3.4.10.2.1.1 試験動物

3.4.9.1の試験に用いた動物を用いる。

3.4.10.2.1.2 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。

3.4.10.2.1.3 培養細胞

牛精巢継代細胞浮遊液を用いる。

3.4.10.2.2 試験方法

3.4.9.1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。

非働化した被検血清を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 中約 200TCID₅₀ 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 0.1mL 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。

3.4.10.2.3 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。

3.4.10.3 牛パラインフルエンザ力価試験

3.4.10.3.1 試験材料

3.4.10.3.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

3.4.10.3.1.2 試験動物

体重約350gのモルモットを用いる。

3.4.10.3.1.3 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。

3.4.10.3.2 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、20分間処理した後、3,000rpm で20分間遠心し、その上清をゼラチン・アルブミン加ペロナル緩衝食塩液（付記10、以下「希釈液」という。）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。

3.4.10.3.3 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。

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兔の血清で、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 株で免疫した兔の血清で、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

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、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 ウイルス増殖用培養液 - 1

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 5 細胞増殖用培養液

1,000mL 中

ラクトアルブミン水解物

5 g

牛又はやぎ血清

100 ~ 200 mL

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。

牛又はやぎ血清は、牛ウイルス性下痢 - 粘膜病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 6 ウイルス増殖用培養液 - 2

1,000mL 中

トリプト - ス・ホスフェイト・プロス

2.95 g

ブドウ糖

1.0 g

酵母エキス

0.5 g

牛又はやぎ血清

20 mL

イ - 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。

牛又はやぎ血清は、牛パラインフルエンザ 3 型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 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
牛又はやぎ血清	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 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 BN_i-1 株を牛腎継代細胞で増殖させて得た培養上清

付記 10 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	0.575g
	バルビタールナトリウム	0.375g
	無水塩化カルシウム	0.028g
	塩化マグネシウム六水和物	0.168g
	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。