

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 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 （略） 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・2.1.1.2 （略） 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 の豚精巢初代又は<u>継代細胞又は牛腎継代細胞</u>で継代する。 （略） 2.1.2 牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 2.1.2.1 （略） 2.1.2.2 （略） 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<u>継代細胞</u>で継代する。 （略） 2.1.3 （略） 2.1.4 牛RSウイルス 2.1.4.1・2.1.4.2 （略） 2.1.4.3 継代及び保存 原株及び原種ウイルスは、<u>HmLu 細胞又は Vero 細胞</u>で継代する。 （略） 2.1.5 牛アデノウイルス 2.1.5.1・2.1.5.2 （略） 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<u>牛精巢継代細胞</u>で継代する。 （略）	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 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 （略） 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・2.1.1.2 （略） 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<u>適当と認められた培養細胞</u>で継代する。 （略） 2.1.2 牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 2.1.2.1 （略） 2.1.2.2 （略） 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<u>適当と認められた培養細胞</u>で継代する。 （略） 2.1.3 （略） 2.1.4 牛RSウイルス 2.1.4.1・2.1.4.2 （略） 2.1.4.3 継代及び保存 原株及び原種ウイルスは、<u>HAL 細胞又は適当と認められた培養細胞</u>で継代する。 （略） 2.1.5 牛アデノウイルス 2.1.5.1・2.1.5.2 （略） 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<u>適当と認められた培養細胞</u>で継代する。 （略）

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 の豚精巢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 (略)
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
やぎ精巢初代細胞又は牛精巢継代細胞を用いる。
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 (略)
(削る)

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 (略)
3.2 原液の試験

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 の豚精巢初代細胞又は製造に適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
2.2.2.1 培養細胞
生ワクチン製造用材料の規格 2.6.2 の豚精巢初代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。
2.2.2.2 培養液
製造に適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 (略)
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RSウイルス
2.2.4.1 培養細胞
HAL 細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。
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 牛アデノウイルス（7型）
2.2.5.1 培養細胞
やぎ精巢初代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。
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 (略)
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、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、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。
小分け製品について、3.4の試験を行う。

3 試験法
3.1 (略)
3.2 原液の試験

3.2.1 (略)

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 (略)

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 (略)

3.2.3.2 牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス

3.2.3.2.1 (略)

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 (略)

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 (略)

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、

3.2.1 (略)

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。

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 (略)

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 (略)

3.2.3.2 牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス

3.2.3.2.1 (略)

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 (略)

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 (略)

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

観察する。
3.2.3.3.3 (略)
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℃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 (略)
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 (略)
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 (略)
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 (略)
(削る)

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。
3.3.2～3.3.6 (略)
3.3.7 ウイルス含有量試験
3.3.7.1～3.3.7.5 (略)
3.3.8 (略)
3.3.9 安全試験
3.3.9.1 牛注射試験

転培養し、観察する。
3.2.3.3.3 (略)
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。
3.2.3.4.1.2 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。
3.2.3.4.2 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℃で 14 日間回転培養し、観察する。
3.2.3.4.3 (略)
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 (略)
3.2.3.5.1.2 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。
3.2.3.5.1.3 (略)
3.2.3.5.2 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。
3.2.3.5.3 (略)
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、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。
3.4 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。
3.4.2～3.4.6 (略)
3.4.7 ウイルス含有量試験
3.4.7.1～3.4.7.5 (略)
3.4.8 (略)
3.4.9 安全試験
3.4.9.1 牛注射試験

3.3.9.1.1 試験材料
3.3.9.1.1.1・3.3.9.1.1.2 (略)
3.3.9.1.2・3.3.9.1.3 (略)
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・3.3.9.2.1.2 (略)
3.3.9.2.2・3.3.9.2.3 (略)

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 (略)
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 (略)

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・3.3.10.2.1.3 (略)

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 ～ 3.3.10.3.1.3 (略)
3.3.10.3.2 試験方法

3.4.9.1.1 試験材料
3.4.9.1.1.1・3.4.9.1.1.2 (略)
3.4.9.1.2・3.4.9.1.3 (略)
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・3.4.9.2.1.2 (略)
3.4.9.2.2・3.4.9.2.3 (略)

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 (略)
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、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 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 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。

3.4.10.1.3 判定 (略)

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・3.4.10.2.1.3 (略)

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。
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 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 ～ 3.4.10.3.1.3 (略)
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、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 (略)

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 ～ 3.3.10.4.1.3 (略)

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。

3.3.10.4.3 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 (略)

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 (略)

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。

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、 $1,700 \times G$ 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。

3.4.10.3.3 (略)

3.4.10.4 牛 RS ウイルス感染症力価試験

3.4.10.4.1 試験材料

3.4.10.4.1.1 ～ 3.4.10.4.1.3 (略)

3.4.10.4.1.4 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。

3.4.10.4.2 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 0.5mL と 0.1mL 中約 200TCID₅₀ の中和試験用ウイルス 0.5mL 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。

3.4.10.4.3 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。

3.4.10.5 牛アデノウイルス感染症力価試験

3.4.10.5.1 試験材料

3.4.10.5.1.1 試験動物

3.4.9.1 の試験に用いた動物を用いる。

3.4.10.5.1.2 (略)

3.4.10.5.1.3 赤血球浮遊液

3.2.3.5.1.3 の赤血球浮遊液を用いる。

3.4.10.5.2 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、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、15 ～ 25℃で 20 分間処理した後、 $1,700 \times G$ 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。

3.4.10.5.3 (略)

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 ～ 6 （略）
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。

以下（略）

付記 1 ～ 6 （略）
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。
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
のをを用いる。
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

以下（略）