

改正後	改正前
<p>ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部</p> <p>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</p> <p>1 （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 の豚精巢初代若しくは継代細胞又は牛腎継代細胞で継代する。 （略） 2.1.2 （略） 2.1.3 牛RSウイルス 2.1.3.1・2.1.3.2 （略） 2.1.3.3 継代及び保存 原株及び原種ウイルスは、<u>H m Lu 細胞</u>で継代する。 （略） 2.1.4 牛アデノウイルス（7型） 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、やぎ精巢継代細胞又は牛精巢継代細胞で継代する。 （略） 2.1.5 牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 1 型 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、牛精巢継代細胞又は豚腎継代細胞で継代する。 （略） 2.1.6 牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 2 型 2.1.6.1・2.1.6.2 （略）</p>	<p>ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部</p> <p>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</p> <p>1 （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 （略） 2.1.3 牛RSウイルス 2.1.3.1・2.1.3.2 （略） 2.1.3.3 継代及び保存 原株及び原種ウイルスは、<u>HAL 細胞</u>又は<u>適当と認められた培養細胞</u>で継代する。 （略） 2.1.4 牛アデノウイルス（7型） 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、やぎ精巢継代細胞又は<u>適当と認められた培養細胞</u>で継代する。 （略） 2.1.5 牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 1 型 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、牛精巢継代細胞又は<u>適当と認められた培養細胞</u>で継代する。 （略） 2.1.6 牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス 2 型 2.1.6.1・2.1.6.2 （略）</p>

2.1.6.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、牛精巢継代細胞又は牛腎継代細胞で継代する。
(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 牛パラインフルエンザ3型ウイルス

2.2.2.1 (略)

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RSウイルス

2.2.3.1 培養細胞

HmLu細胞を用いる。

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 牛アデノウイルス(7型)

2.2.4.1 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。

2.2.4.2 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 牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス1型

2.2.5.1 培養細胞

牛精巢継代細胞又は豚腎継代細胞を用いる。

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。

2.2.6 牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス2型

2.2.6.1 培養細胞

牛精巢継代細胞又は牛腎継代細胞を用いる。

2.2.6.2 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 原液

2.3.1～2.3.4 (略)

2.3.5 牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス1型原液

2.3.5.1・2.3.5.2 (略)

2.3.5.3 濃縮

ウイルス浮遊液を製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた方法により濃縮し、濃縮ウイルス液とする。

濃縮ウイルス液について、3.3の試験を行う。

2.3.5.4 不活化

濃縮ウイルス液を製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた方法により不活化し

2.1.6.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、牛精巢継代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。
(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 牛パラインフルエンザ3型ウイルス

2.2.2.1 (略)

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RSウイルス

2.2.3.1 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。

2.2.3.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.4 牛アデノウイルス(7型)

2.2.4.1 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。

2.2.4.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.5 牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス1型

2.2.5.1 培養細胞

牛精巢継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。

2.2.6 牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス2型

2.2.6.1 培養細胞

牛精巢継代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.6.2 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

2.3.1～2.3.4 (略)

2.3.5 牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス1型原液

2.3.5.1・2.3.5.2 (略)

2.3.5.3 濃縮

ウイルス浮遊液を限外ろ過又は適当と認められた方法により濃縮し、濃縮ウイルス液とする。

濃縮ウイルス液について、3.3の試験を行う。

2.3.5.4 不活化

濃縮ウイルス液を紫外線照射又は適当と認められた方法により不活化したもの

たものを原液とする。
原液について、3.4.1 及び 3.4.4 の試験を行う。

2.3.6 牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス 2 型原液

2.3.6.1・2.3.6.2 (略)

2.3.6.3 濃縮
ウイルス浮遊液を製剤ごとに農林水産大臣が適当と認められた方法により濃縮し、濃縮ウイルス液とする。
濃縮ウイルス液について、3.3 の試験を行う。

2.3.6.4 不活化
濃縮ウイルス液を製剤ごとに農林水産大臣が適当と認められた方法より不活化したものを原液とする。
原液について、3.4.1 及び 3.4.4 の試験を行う。

2.4 乾燥生ワクチン混合原液
牛伝染性鼻気管炎ウイルス原液、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、乾燥生ワクチン混合原液とする。

2.5 最終バルク

2.5.1 乾燥生ワクチン
乾燥生ワクチン混合原液に製剤ごとに農林水産大臣が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。

2.5.2 (略)

2.6 小分製品

2.6.1 乾燥生ワクチン
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、3.5 の試験を行う。

2.6.2 液状不活化ワクチン
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 (略)

3.2 ウイルス浮遊液の試験

3.2.1 ウイルス含有量試験

3.2.1.1 牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス 1 型及び 2 型

3.2.1.1.1 試験材料

3.2.1.1.1.1 (略)

3.2.1.1.1.2 培養細胞
牛精巢継代細胞浮遊液を用いる。

3.2.1.1.2 試験方法
試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 穴以上の培養細胞に接種し、34 ~ 36 °C、5 vol %炭酸ガス下で 7 日間培養し、観察する。

3.2.1.1.3 (略)

3.3 濃縮ウイルス液の試験

3.3.1 無菌試験

を原液とする。
原液について、3.4.1 及び 3.4.4 の試験を行う。

2.3.6 牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス 2 型原液

2.3.6.1・2.3.6.2 (略)

2.3.6.3 濃縮
ウイルス浮遊液を限外ろ過又は適当と認められた方法により濃縮し、濃縮ウイルス液とする。
濃縮ウイルス液について、3.3 の試験を行う。

2.3.6.4 不活化
濃縮ウイルス液を紫外線照射又は適当と認められた方法により不活化したものを原液とする。
原液について、3.4.1 及び 3.4.4 の試験を行う。

2.4 乾燥生ワクチン混合原液
牛伝染性鼻気管炎ウイルス原液、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、乾燥生ワクチン混合原液とする。
乾燥生ワクチン混合原液について、3.5 の試験を行う。

2.5 最終バルク

2.5.1 乾燥生ワクチン
乾燥生ワクチン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。

2.5.2 (略)

2.6 小分製品

2.6.1 乾燥生ワクチン
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、3.6 の試験を行う。

2.6.2 液状不活化ワクチン
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、3.6 の試験を行う。

3 試験法

3.1 (略)

3.2 ウイルス浮遊液の試験

3.2.1 ウイルス含有量試験

3.2.1.1 牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス 1 型及び 2 型

3.2.1.1.1 試験材料

3.2.1.1.1.1 (略)

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

3.2.1.1.2 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 °C 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 °C で 7 日間回転培養し、観察する。

3.2.1.1.3 (略)

3.3 濃縮ウイルス液の試験

3.3.1 ウイルス含有量試験

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 原液の試験

3.4.1 (略)

3.4.2 迷入ウイルス否定試験

牛伝染性鼻気管炎ウイルス原液について、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 R S ウイルス原液及び牛アデノウイルス (7 型) 原液について、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1、2.4.1、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 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 R S 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。

3.4.3 ウイルス含有量試験

3.4.3.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス

3.4.3.1.1 試験材料

3.4.3.1.1.1 (略)

3.4.3.1.1.2 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。

3.4.3.1.2 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。

3.4.3.1.3 (略)

3.4.3.2 牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス

3.4.3.2.1 試験材料

3.4.3.2.1.1 (略)

3.4.3.2.1.2 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。

3.4.3.2.2 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。

3.4.3.2.3 (略)

3.4.3.3 牛 RS ウイルス

3.4.3.3.1 試験材料

3.4.3.3.1.1 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。

3.4.3.3.1.2 培養細胞

3.2.1.1 を準用して試験するとき、検体のウイルス含有量は、1 mL 中 $10^{8.5} \text{TCID}_{50}$ 以上でなければならない。

3.4 原液の試験

3.4.1 (略)

3.4.2 迷入ウイルス否定試験

牛伝染性鼻気管炎ウイルス原液について、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 R S ウイルス原液及び牛アデノウイルス (7 型) 原液について、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1、2.4.1、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 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 R S 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。

3.4.3 ウイルス含有量試験

3.4.3.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス

3.4.3.1.1 試験材料

3.4.3.1.1.1 (略)

3.4.3.1.1.2 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。

3.4.3.1.2 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

3.4.3.1.3 (略)

3.4.3.2 牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス

3.4.3.2.1 試験材料

3.4.3.2.1.1 (略)

3.4.3.2.1.2 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。

3.4.3.2.2 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

3.4.3.2.3 (略)

3.4.3.3 牛 RS ウイルス

3.4.3.3.1 試験材料

3.4.3.3.1.1 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。

3.4.3.3.1.2 培養細胞

Vero 細胞を培養し、単層となったものを用いる。

3.4.3.3.2 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、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。

3.4.3.3.3 (略)

3.4.3.4 牛アデノウイルス（7 型）

3.4.3.4.1 試験材料

3.4.3.4.1.1 (略)

3.4.3.4.1.2 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。

3.4.3.4.1.3 (略)

3.4.3.4.2 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、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 1 夜静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

3.4.3.4.3 (略)

3.4.4 不活化試験

3.4.4.1 試験材料

3.4.4.1.1 (略)

3.4.4.1.2 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。

3.4.4.2 試験方法

試料 2 mL を、1 mL につき 20cm² 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^{5.0}TCID₅₀ の牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス 1 型 Nose 株を含むウイルス増殖用培養液 1 mL ずつをそれぞれに加え、34～36℃で 7 日間培養し、CPE の有無を観察する。

3.4.4.3 (略)

(削る)

3.5 小分製品の試験

3.5.1～3.5.7 (略)

3.5.8 ウイルス含有量試験

3.5.8.1～3.5.8.4 (略)

3.5.9・3.5.10 (略)

3.5.11 安全試験

3.5.11.1 牛注射試験

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。

3.4.3.3.2 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。

3.4.3.3.3 (略)

3.4.3.4 牛アデノウイルス（7 型）

3.4.3.4.1 試験材料

3.4.3.4.1.1 (略)

3.4.3.4.1.2 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。

3.4.3.4.1.3 (略)

3.4.3.4.2 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 1 夜静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

3.4.3.4.3 (略)

3.4.4 不活化試験

3.4.4.1 試験材料

3.4.4.1.1 (略)

3.4.4.1.2 培養細胞

牛精巢継代細胞を培養瓶に 1～3 日間培養し、単層となったものを用いる。

3.4.4.2 試験方法

試料 2 mL を、1 mL につき 20cm² 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^{5.0}TCID₅₀ の牛ウイルス性下痢-粘膜病ウイルス 1 型 Nose 株を含むウイルス増殖用培養液 0.5mL 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。

3.4.4.3 (略)

3.5 乾燥生ワクチン混合原液の試験

3.5.1 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、抗牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス血清、抗牛 R S 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。

3.6 小分製品の試験

3.6.1～3.6.7 (略)

3.6.8 ウイルス含有量試験

3.6.8.1～3.6.8.4 (略)

3.6.9・3.6.10 (略)

3.6.11 安全試験

3.6.11.1 牛注射試験

3.5.11.1.1 試験材料

3.5.11.1.1.1・3.5.11.1.1.2 (略)

3.5.11.1.2・3.5.11.1.3 (略)

3.5.11.2 乳のみマウス注射試験

3.5.11.2.1 試験材料

3.5.11.2.1.1・3.5.11.2.1.2 (略)

3.5.11.2.2・3.5.11.2.3 (略)

3.5.12 力価試験

3.5.12.1 牛伝染性鼻気管炎力価試験

3.5.12.1.1 試験材料

3.5.12.1.1.1 試験動物

3.5.11.1 の試験に用いた動物を用いる。

3.5.12.1.1.2 (略)

3.5.12.1.1.3 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。

3.5.12.1.2 試験方法

3.5.11.1 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 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 時間培養した後、プラック数を算定する。

3.5.12.1.3 (略)

3.5.12.2 牛パラインフルエンザ力価試験

3.5.12.2.1 試験材料

3.5.12.2.1.1～3.5.12.2.1.3 (略)

3.5.12.2.2 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、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 1 夜静置し、観察する。

3.5.12.2.3 (略)

3.5.12.3 牛 R S ウイルス感染症力価試験

3.5.12.3.1 試験材料

3.5.12.3.1.1～3.5.12.3.1.3 (略)

3.5.12.3.1.4 培養細胞

Vero 細胞を培養し、単層となったものを用いる。

3.5.12.3.2 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

3.6.11.1.1 試験材料

3.6.11.1.1.1・3.6.11.1.1.2 (略)

3.6.11.1.2・3.6.11.1.3 (略)

3.6.11.2 乳のみマウス注射試験

3.6.11.2.1 試験材料

3.6.11.2.1.1・3.6.11.2.1.2 (略)

3.6.11.2.2・3.6.11.2.3 (略)

3.6.12 力価試験

3.6.12.1 牛伝染性鼻気管炎力価試験

3.6.12.1.1 試験材料

3.6.12.1.1.1 試験動物

3.6.11.1 の試験に用いた動物を用いる。

3.6.12.1.1.2 (略)

3.6.12.1.1.3 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。

3.6.12.1.2 試験方法

3.6.11.1 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 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 時間培養した後、プラック数を算定する。

3.6.12.1.3 (略)

3.6.12.2 牛パラインフルエンザ力価試験

3.6.12.2.1 試験材料

3.6.12.2.1.1～3.6.12.2.1.3 (略)

3.6.12.2.2 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、15～25℃で 20 分間処理した後、1,700G 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、0.3vol %モルモット赤血球浮遊液 0.2mL を加え、4℃で 1 夜静置し、観察する。

3.6.12.2.3 (略)

3.6.12.3 牛 R S ウイルス感染症力価試験

3.6.12.3.1 試験材料

3.6.12.3.1.1～3.6.12.3.1.3 (略)

3.6.12.3.1.4 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。

3.6.12.3.2 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、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。

3.5.12.3.3 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。

3.5.12.4 牛アデノウイルス感染症力価試験

3.5.12.4.1 試験材料

3.5.12.4.1.1 試験動物

3.5.11.1 の試験に用いた動物を用いる。

3.5.12.4.1.2 (略)

3.5.12.4.1.3 赤血球浮遊液

3.4.3.4.1.3 の赤血球浮遊液を用いる。

3.5.12.4.2 試験方法

3.5.11.1 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 1 夜処理した後、4℃に冷却した赤血球浮遊液を加え、4℃で 1 夜静置し、観察する。

3.5.12.4.3 (略)

3.5.12.5 牛ウイルス性下痢—粘膜病力価試験

3.5.12.5.1 試験材料

3.5.12.5.1.1 ~ 3.5.12.5.1.3 (略)

3.5.12.5.1.4 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。

3.5.12.5.2 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、4 本（穴）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加え、37℃で 7 日間培養し、観察する。

3.5.12.5.3 判定

培養細胞の 2 本（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 倍以上を陽性とする。

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。

3.6.12.3.3 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。

3.6.12.4 牛アデノウイルス感染症力価試験

3.6.12.4.1 試験材料

3.6.12.4.1.1 試験動物

3.6.11.1 の試験に用いた動物を用いる。

3.6.12.4.1.2 (略)

3.6.12.4.1.3 赤血球浮遊液

3.4.3.4.1.3 の赤血球浮遊液を用いる。

3.6.12.4.2 試験方法

3.6.11.1 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、1,700G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 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。

3.6.12.4.3 (略)

3.6.12.5 牛ウイルス性下痢—粘膜病力価試験

3.6.12.5.1 試験材料

3.6.12.5.1.1 ~ 3.6.12.5.1.3 (略)

3.6.12.5.1.4 培養細胞

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

3.6.12.5.2 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 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、4 本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 0.5mL ずつ加え、37℃で 7 日間回転培養し、観察する。

3.6.12.5.3 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、1型及び2型とも80%以上でなければならない。

以下（略）

プール血清の中和抗体陽性率は、1型及び2型とも80%以上でなければならない。

以下（略）