

# 牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢 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  
平成24年8月10日（告示第2004号）一部改正  
令和2年6月30日（告示第1246号）一部改正

## 1 定義

牛伝染性鼻気管炎ウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス（1型）、牛ウイルス性下痢ウイルス（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（以下この項において「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、牛腎及び牛精巢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。

#### 2.1.2 牛ウイルス性下痢ウイルス（1型）

##### 2.1.2.1 名称

牛ウイルス性下痢ウイルス（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、牛腎及び牛精巢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。

#### 2.1.3 牛ウイルス性下痢ウイルス（2型）

##### 2.1.3.1 名称

牛ウイルス性下痢ウイルス（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 細胞又は製造に相当と認められた細胞を用いる。

#### 2.2.5.2 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

##### 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

ウイルス浮遊液を相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

ウイルス浮遊液を相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

ウイルス浮遊液を相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した後、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R S 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、牛ウイルス性下痢ウイルス（1型）原液、牛ウイルス性下痢ウイルス（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R S ウイルス原液を混合し、適当と認められたアジュバント、安定剤及び保存剤を添加した後、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回洗浄した後、2群に分け、生理食塩液で濃度を調整した 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。

### 3.2.2 ウイルス含有量試験

3.3.3 の試験を実施するものについては、この試験を行わなくてもよい。

#### 3.2.2.1 牛伝染性鼻気管炎ウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス（1型）、牛ウイルス性下痢ウイルス（2型）及び牛パラインフルエンザ3型ウイルス

##### 3.2.2.1.1 試験材料

###### 3.2.2.1.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記1）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.2.2.1.1.2 培養細胞

MDBK 細胞を24穴プラスチックプレートに1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

###### 3.2.2.1.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ5穴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加え、37℃で7日間培養し、観察する。

###### 3.2.2.1.3 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。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中牛伝染性鼻気管炎ウイルスでは 10<sup>8.0</sup>TCID<sub>50</sub> 以上、牛ウイルス性下痢ウイルス（1型）では 10<sup>7.0</sup>TCID<sub>50</sub> 以上、牛ウイルス性下痢ウイルス（2型）では 10<sup>5.7</sup>TCID<sub>50</sub> 以上、牛パラインフルエンザ3型ウイルスでは 10<sup>8.1</sup>TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

#### 3.2.2.2 牛RSウイルス

##### 3.2.2.2.1 試験材料

###### 3.2.2.2.1.1 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。

###### 3.2.2.2.1.2 培養細胞

Vero 細胞を24穴プラスチックプレートに1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

###### 3.2.2.2.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ5穴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加え、37℃で7日間培養し、観察する。

###### 3.2.2.2.3 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。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10<sup>5.7</sup>TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

## 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<sup>2</sup> 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。

#### 3.3.2.1.4 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<sup>2</sup> 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<sup>2</sup> 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<sup>2</sup> 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 R S ウイルス

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。

##### 3.3.2.5.1 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<sup>2</sup>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。3.2.2 の試験を実施するものについては、この試験を行わなくてもよい。

#### 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ウイルス（1 型）牛血清、抗牛ウイルス性下痢ウイルス（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 R S ウイルス牛血清（付記 4）を用時調製した 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 100 μ L ずつ分注する。これを 2～7℃で 1 昼夜静置した後、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 200 μ L 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 倍に希釈し、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  $6 \pm 2$  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した後、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 R S ウイルスの場合には 2 倍）階段希釈する（希釈範囲は、牛ウイルス性下痢ウイルス（2 型）及び牛 R S 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、100 μ L をそれぞれ 2 穴ずつの抗体感作プレートに添加し、37℃で 1 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 100 μ L 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 100 μ L ずつ加え、37℃で 60 分間静置した後、更に 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 100 μ L ずつ添加し、37℃で 30 分間静置した後、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 R S ウイルスでは基質 1（付記 5）を、牛ウイルス性下痢ウイルス（1 型）、牛ウイルス性下痢ウイルス（2 型）及び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 μ L 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。

#### 3.5.2 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 チメロサル定量試験

一般試験法のチメロサ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、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験法によるものとする。

#### 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 R S 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 R S ウイルス

牛 R S 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 R S 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<sub>50</sub>/25 μ L に濃度を調整した中和試験用ウイルスを等量混和し、37 °C で 18 時間中和処理する。この混合液 25 μ L ずつを 96 穴プラスチックプレートの 4 穴に接種し、更に MDBK 細胞浮遊液を 0.1mL ずつ加え、37 °C、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

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<sub>50</sub>/25 μ L に濃度を調整した中和用ウイルスを等量混和し、37 °C で 60 分間中和処理する。この混合液 25 μ L ずつを 96 穴プラスチックプレートの 4 穴に接種し、更に Vero 細胞浮遊液を 0.1mL ずつ加え、37 °C、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 R S 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<sub>50</sub>/25 μ L に濃度を調整した中和試験用ウイルスを等量混和し、37 °C、5 vol % 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 25 μ L ずつを 4 穴に加え、37 °C、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 °C 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 R S 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 牛ウイルス性下痢ウイルス (1 型)

牛ウイルス性下痢ウイルス (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 牛ウイルス性下痢ウイルス (2 型)

牛ウイルス性下痢ウイルス（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

注射材料を5匹の試験動物の両後肢大腿部筋肉内にそれぞれ各1 mLずつ注射する。注射後21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200TCID<sub>50</sub>/25 μLに濃度を調整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25 μLずつを96穴プラスチックプレートの4穴に接種し、更に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。

#### 3.5.7.2.3 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倍以上を陽性とするとき、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、牛ウイルス性下痢ウイルス（1型）、牛ウイルス性下痢ウイルス（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ウイルス（1型）牛血清、抗牛ウイルス性下痢ウイルス（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トを加え、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-エチルベンゾチアゾリン-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。