

# 牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢・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

令和2年6月30日（告示第1246号）一部改正

## 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 の豚精巢初代若しくは継代細胞又は牛腎継代細胞で継代する。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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 牛ウイルス性下痢ウイルス

##### 2.1.2.1 名称

弱毒牛ウイルス性下痢ウイルス 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 の豚精巢初代又は継代細胞で継代する。

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。

### 2.1.3 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。

### 2.1.4 牛RSウイルス

#### 2.1.4.1 名称

弱毒牛 RS ウイルス rs-52 株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.4.2 性状

牛に接種しても病原性を示さない。

30℃におけるハムスター肺由来培養細胞から樹立された HAL 細胞での増殖性は、強毒ウイルスより100倍以上高い。

#### 2.1.4.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、HmLu 細胞又は Vero 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。

### 2.1.5 牛アデノウイルス

#### 2.1.5.1 名称

弱毒牛アデノウイルス（7型）TS-GT 株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.5.2 性状

牛に接種しても病原性を示さない。牛精巢継代細胞又はやぎ精巢継代細胞で CPE を伴って増殖する。30℃における牛精巢継代細胞又はやぎ精巢継代細胞での増殖性は、強毒ウイルスよりも100倍以上高い。

#### 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牛精巢継代細胞で継代する。

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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 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 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、培養した細胞を個体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。

個体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体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。

## 2.3.4 牛 RS ウイルス原液

### 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。

### 2.3.4.2 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 3.2.3.4 の試験を行う。

## 2.3.5 牛アデノウイルス（7 型）原液

### 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。

### 2.3.5.2 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 3.2.3.5 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 培養細胞の試験

個体別培養細胞の 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。

豚精巣初代細胞の場合は、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。

HAL 細胞の場合は、3.1.2 及び 3.1.5 の試験を行う。

やぎ精巣初代細胞の場合は、3.1.2、3.1.3、3.1.7 及び 3.1.8 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、3.1.5 又は 3.1.7 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。

#### 3.1.7 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 3 代まで継代培養する。3 代目に継代するとき、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氏、7 日間培養し、観察するとき CPE を認めてはならない。

#### 3.1.8 迷入ウイルス否定試験

3.1.1 又は 3.1.7 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 2.4.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

## 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。

牛伝染性リンパ腫ウイルスについて、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 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記6）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.2.3.1.1.2 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 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。

#### 3.2.3.2 牛ウイルス性下痢ウイルス

##### 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7）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ウイルス Nose 株を 10<sup>5.0</sup>TCID<sub>50</sub>（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<sup>4.0</sup>EID<sub>50</sub> 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 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。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10<sup>4.7</sup>TCID<sub>50</sub>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、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、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>6.7</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

#### 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 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>6.7</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

#### 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 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。

###### 3.2.3.5.1.2 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 赤血球浮遊液

牛、羊又はやぎの赤血球をゼラチン・アルブミン加ベロナル緩衝食塩液（付記 8、以下「希釈液」という）に 0.3vol%に浮遊したもので、赤血球凝集抗原が規定の赤血球凝集価を示すものを用いる。

#### 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 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。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10<sup>4.7</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

### 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 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。

#### 3.3.3 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。

#### 3.3.4 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。

#### 3.3.5 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。

#### 3.3.6 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。

#### 3.3.7 ウイルス含有量試験

##### 3.3.7.1 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<sup>4.0</sup>TCID<sub>50</sub>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。

##### 3.3.7.2 牛ウイルス性下痢ウイルス

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<sup>3.0</sup>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。

### 3.3.7.3 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  $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub>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。

### 3.3.7.4 牛 RS ウイルス

3.2.3.4 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  $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

ただし、試験品中の牛 RS 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。

### 3.3.7.5 牛アデノウイルス（7 型）

3.2.3.5 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  $10^{3.0}$ TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

ただし、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。

### 3.3.8 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。

### 3.3.9 安全試験

#### 3.3.9.1 牛注射試験

##### 3.3.9.1.1 試験材料

##### 3.3.9.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.3.9.1.1.2 試験動物

体重 100 ～ 200kg の牛を用いる。

##### 3.3.9.1.2 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。

##### 3.3.9.1.3 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。

#### 3.3.9.2 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 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.3.9.2.1.2 試験動物

3 日齢以内の乳のみマウスを用いる。

##### 3.3.9.2.2 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。

##### 3.3.9.2.3 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。

### 3.3.10 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 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。

###### 3.3.10.1.1.3 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 °C 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 °C 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 °C 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、プラック数を算定する。

##### 3.3.10.1.3 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。

#### 3.3.10.2 牛ウイルス性下痢力価試験

##### 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 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ウイルス Nose 株を用いる。

###### 3.3.10.2.1.3 培養細胞

牛精巢継代細胞浮遊液を用いる。

##### 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 200TCID<sub>50</sub> の中和試験用ウイルス液とを等量混合し、37 °C 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 °C 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 接種材料

試験品を注射材料とする。

###### 3.3.10.3.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

#### 3.3.10.3.1.3 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 11）を用いる。

#### 3.3.10.3.2 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 °C で 60 分間処理した後、モルモット赤血球浮遊液を加え、4 °C で一夜静置し、観察する。

#### 3.3.10.3.3 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。

#### 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 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.3.10.4.1.2 試験動物

体重約 100g のハムスターを用いる。

##### 3.3.10.4.1.3 中和試験用ウイルス

牛腎継代細胞で増殖させた牛 RS ウイルス NMK7 株を用いる。

##### 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 200TCID<sub>50</sub> の中和試験用ウイルスとを混合し、22 °C で 24 時間処理する。この混合液 0.1mL ずつを 4 本（穴）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加え、34 °C 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 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。

### 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 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。

## 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。

### 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 株で免疫した兎の血清で、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ウイルス血清

強毒牛ウイルス性下痢ウイルス No.12 株で免疫した兎の血清で、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

強毒牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス BN<sub>i</sub>-1 株で免疫した兎の血清で、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 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、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 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、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 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、牛ウイルス性下痢、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用いる。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

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。

付記 8 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 1w/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 5w/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 4mL を加えて調製し、用いる。

付記 9 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10 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11 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<sub>i</sub>-1 株を牛腎継代細胞で増殖させて得た培養上清

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