

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部  <b>ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎・産卵低下症候群-1976・トリニューモウイルス感染症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン</b>  (略)  <b>ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎2価・産卵低下症候群-1976・トリニューモウイルス感染症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン</b>	ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部  <b>ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎・産卵低下症候群-1976・トリニューモウイルス感染症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン</b>  (略)  (新設)
1 定義 <u>ニューカッスル病ウイルス及び血清型のそれぞれ異なる2種類の鶏伝染性気管支炎ウイルスを発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液並びに産卵低下症候群-1976ウイルスを発育あひる卵で増殖させて得たウイルス液及び七面鳥鼻気管炎ウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液をそれぞれ不活化したものと混合し、油性アジュバントを添加したワクチンである。</u>	
2 製法 2.1 製造用株 2.1.1 ニューカッスル病ウイルス株 2.1.1.1 名称 <u>弱毒ニューカッスル病ウイルスClone30株又はこれと同等と認められた株</u> 2.1.1.2 性状 <u>9～11日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射すると増殖し、その尿膜腔液には鶏赤血球凝集性を認める。</u> 2.1.1.3 繼代及び保存 <u>原株及び種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格1.1の発育鶏卵で継代する。</u> <u>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。</u> <u>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。</u> 2.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス株	

2.1.2.1 名称  
2種類の鶏伝染性気管支炎ウイルスM41株及び249g株

2.1.2.2 性状

10日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に接種すると、特徴的な病変を伴って増殖する。

2.1.2.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格1.1の発育鶏卵で継代する。

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°C以下又は凍結乾燥して5°C以下で保存する。

2.1.3 産卵低下症候群-1976ウイルス株

2.1.3.1 名称

産卵低下症候群-1976ウイルスBC14株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

鶏胚初代細胞、鶏腎初代細胞又はあひる胚線維芽細胞に接種すると、CPEを伴って増殖する。鶏赤血球凝集性を認める。

2.1.3.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格2.1.3の鶏胚肝初代細胞で継代する。

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°C以下又は凍結乾燥して5°C以下で保存する。

2.1.4 七面鳥鼻気管炎ウイルス株

2.1.4.1 名称

弱毒七面鳥鼻気管炎ウイルスBUT1#8544株又はこれと同等と認められた株

2.1.4.2 性状

鶏胚初代細胞、鶏腎初代細胞又はVero細胞に接種すると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、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。

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°C以下又は凍結乾燥して5°C以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 ニューカッスル病ウイルス

2.2.1.1 発育鶏卵

10~11日齢のものを用いる。

2.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

2.2.2.1 発育鶏卵

11~12日齢のものを用いる。

2.2.3 産卵低下症候群-1976ウイルス

2.2.3.1 発育あひる卵

10日齢のものを用いる。

2.2.4 七面鳥鼻気管炎ウイルス

2.2.4.1 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。

### 2.3 原液

#### 2.3.1 ニューカッスル病ウイルス原液

##### 2.3.1.1 発育鶏卵の培養

1回に処理する発育鶏卵を個体別発育鶏卵とみなす。

個体別発育鶏卵について、3.1.1の試験を行う。

##### 2.3.1.2 ウイルスの培養

種ウイルスを発育鶏卵で培養し、感染増殖させた尿膜腔液の遠心上清をウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2.1.1の試験を行う。

##### 2.3.1.3 不活化

ウイルス浮遊液にホルマリンを加えて不活化し、不活化ウイルス浮遊液とする。この不活化ウイルス浮遊液を原液としてもよい。

不活化ウイルス浮遊液について3.3.1及び3.3.2.1の試験を行う。

##### 2.3.1.4 アジュバントの添加

不活化ウイルス浮遊液に製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた油性アジュバントを添加し、原液とする。ただし、最終バルクの調製時にアジュバントを添加してもよい。

原液について、3.4.1の試験を行う。

なお、アジュバントを添加しない原液について、必要に応じて3.4.2.1の試験を行う。

### 2.3.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス原液

#### 2.3.2.1 発育鶏卵の培養

1回に処理する発育鶏卵を個体別発育鶏卵とみなす。

個体別発育鶏卵について、3.1.1の試験を行う。

#### 2.3.2.2 ウイルスの培養

各株の種ウイルスを発育鶏卵で尿膜腔内に注射し、感染増殖させた尿膜腔液の遠心上清を各株のウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2.1.2の試験を行う。

#### 2.3.2.3 不活化

各ウイルス浮遊液にホルマリンを加えて不活化し、それぞれの株の不活化ウイルス浮遊液とする。この不活化ウイルス浮遊液を原液としてもよい。

不活化ウイルス浮遊液について、3.3.1及び3.3.2.2の試験を行う。

#### 2.3.2.4 アジュバントの添加

各株の不活化ウイルス浮遊液に製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた油性アジュバントを添加し、それぞれの株の原液とする。

ただし、最終バルクの調製時にアジュバントを添加してもよい。

原液について、3.4.1の試験を行う。

### 2.3.3 産卵低下症候群-1976ウイルス原液

#### 2.3.3.1 発育あひる卵の培養

1回に処理する発育あひる卵を個体別発育あひる卵とみなす。

個体別発育あひる卵について、3.1.2の試験を行う。

#### 2.3.3.2 ウイルスの培養

種ウイルスを発育あひる卵で培養し、感染増殖させた尿膜腔液の遠心上清をウイルス浮遊液とする。

### 2.3.3.3 不活化

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不活化し、原液とする。

原液について、3.3.1、3.3.2.3及び3.3.3.2の試験を行う。

### 2.3.4 七面鳥鼻気管炎ウイルス原液

#### 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、3.1.2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体別培養細胞ごとに採取した培養液のろ過及び超音波処理した感染細胞の遠心上清を混合し、ウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2.1.4の試験を行う。

#### 2.3.4.3 不活化

ウイルス浮遊液にホルマリンを加えて不活化し、不活化ウイルス浮遊液とする。

不活化ウイルス浮遊液を原液としてもよい。

不活化ウイルス浮遊液について、3.3.1及び3.3.2.4の試験を行う。

#### 2.3.4.4 アジュバントの添加

不活化ウイルス浮遊液に製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた油性アジュバントを添加し、原液とする。

ただし、最終バルクの調製時にアジュバントを添加してもよい。

原液について、3.4.1の試験を行う。

なお、アジュバントを添加しない原液について、必要に応じて3.4.2.3の試験を行う。

### 2.4 最終バルク

ニューカッスル病ウイルス原液、鶏伝染性気管支炎ウイルスの各原液、産卵低下症候群-1976ウイルス原液及び七面鳥鼻気管炎ウイルス原液を混合し、濃度調整したものを最終バルクとする。この場合、製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた保存剤を添加してよい。

### 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 発育卵、発育あひる卵又は培養細胞の試験

#### 3.1.1 発育鶏卵の試験

個体別発育鶏卵の1%以上又は30個以上を対照発育鶏卵とし、これについて次に掲げる試験を行う。

##### 3.1.1.1 培養観察

対照発育鶏卵を、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、鶏胚に異常を認めてはならない。

##### 3.1.1.2 鶏赤血球凝集試験

3.1.1.1の試験最終日に尿膜腔液を採取し、鶏赤血球浮遊液を等量加え、静置した後観察するとき、赤血球凝集を認めてはならない。

#### 3.1.2 発育あひる卵の試験

個体別発育あひる卵の1%以上又は30個以上を対照発育あひる卵とし、これについて次に掲げる試験を行う。

#### 3.1.2.1 培養観察

対照発育あひる卵を、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、あひる胚に異常を認めてはならない。

#### 3.1.2.2 鶏赤血球凝集試験

3.1.2.1の試験最終日に尿膜腔液を採取し、鶏赤血球浮遊液を等量加え、静置した後観察するとき、赤血球凝集を認めてはならない。

#### 3.1.3 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。

#### 3.1.3.1 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し、観察するとき、CPEを認めてはならない。

#### 3.1.3.2 鶏赤血球凝集試験

3.1.3.1の試験最終日に培養液を採取し、鶏赤血球浮遊液を等量加え、静置した後観察するとき、赤血球凝集を認めてはならない。

### 3.2 ウィルス浮遊液の試験

#### 3.2.1 ウィルス含有量試験

##### 3.2.1.1 ニューカッスル病ウイルス

###### 3.2.1.1.1 試験材料

検体をリン酸緩衝食塩液で階段希釀し、各段階の希釀液を試料とする。

###### 3.2.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～11日齢のものを用いる。

###### 3.2.1.1.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ5個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で5日間培養し、観察する。試験最終日に尿膜腔液を採取し、鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

###### 3.2.1.1.3 判定

尿膜腔液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、EID<sub>50</sub>を算出する。ただし、24時間以内に死亡したものは除外する。

検体のウィルス含有量は、1mL中10<sup>6.0</sup>EID<sub>50</sub>以上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、そのウィルス含有量とする。

##### 3.2.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

###### 3.2.1.2.1 試験材料

検体をリン酸緩衝食塩液で階段希釀し、各段階の希釀液を試料とする。

###### 3.2.1.2.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～11日齢のものを用いる。

###### 3.2.1.2.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ5個の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で7～8日間培養し、観察する。試験最終日に鶏胚の変化を観察する。

###### 3.2.1.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性(発育不全又はカーリング)を認めたものを感染とみなし、EID<sub>50</sub>を算出する。ただし、24時間以内に死亡したものは除外する。

検体のウイルス含有量は、M41株の場合にあっては1mL中 $10^{8.0}$ EID<sub>50</sub>以上及び249g株の場合にあっては1mL中 $10^{7.4}$ EID<sub>50</sub>以上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、そのウイルス含有量とする。

### 3.2.1.3 産卵低下症候群-1976ウイルス

#### 3.2.1.3.1 試験材料

##### 3.2.1.3.1.1 試料1

検体をウイルス増殖用培養液（付記1）で階段希釈した後、4倍階段希釈した各段階の希釈液を試料1とする。

##### 3.2.1.3.1.2 試料2

検体をトリプトース・ホスフェイト・プロス溶液で階段希釈した各段階の希釈液を試料2とする。

##### 3.2.1.3.1.3 培養細胞

96穴マイクロプレートに培養したあひる胚初代細胞を用いる。

##### 3.2.1.3.1.4 発育あひる卵

13~15日齢のEDS-76抗体陰性の発育あひる卵を用いる。

#### 3.2.1.3.2 試験方法

次のいずれかの方法によりウイルス含有量を測定する。

##### 3.2.1.3.2.1 培養細胞接種試験

試料1の0.1mLずつをそれぞれ4穴以上の培養細胞に接種し、37°Cで7日間培養して、CPE形成の有無を観察する。

##### 3.2.1.3.2.2 発育あひる卵接種試験

試料2の0.1mLずつをそれぞれ5個以上の発育あひる卵の尿膜腔内に注射し、37°Cで7日間培養し、観察する。試験最終日に尿膜腔液を採取し、鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

##### 3.2.1.3.2.3 判定

培養細胞接種試験にあってはCPEが認められる最高希釈倍数からTCID<sub>50</sub>を、発育あひる卵接種試験にあっては赤血球凝集性を示した最高希釈倍数からEID<sub>50</sub>を算出する。

検体のウイルス含有量は、1mL中 $10^{6.5}$ EID<sub>50</sub>以上又は1mL中 $10^{8.5}$ EID<sub>50</sub>以上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、そのウイルス含有量とする。

### 3.2.1.4 七面鳥鼻氣管炎ウイルス

#### 3.2.1.4.1 試験材料

##### 3.2.1.4.1.1 試料

検体を細胞増殖用培養液（付記2）で調整した鶏胚初代細胞浮遊液で階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.2.1.4.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格2.1.1の鶏胚初代細胞浮遊液を用いる。

#### 3.2.1.4.2 試験方法

試料200μLずつを、それぞれ96穴組織培養用プレートの5穴以上に接種し、37°Cで5~7日間培養し、観察する。

##### 3.2.1.4.3 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、1mL中 $10^{6.5}$ TCID<sub>50</sub>以上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、そのウイルス含有量とする。

### 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 ニューカッスル病ウイルス

###### 3.3.2.1.1 試験材料

###### 3.3.2.1.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

###### 3.3.2.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～11日齢のものを用いる。

###### 3.2.2.1.2 試験方法

注射材料0.1mLずつを10個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で5日間培養した後、尿膜腔液を採取し、更に1代継代し、37℃で5日間培養して観察する。試験最終日に尿膜腔液を採取し、鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

###### 3.3.2.1.3 判定

鶏胚は、正常に発育しなければならず、尿膜腔液に赤血球凝集を認めてはならない。

##### 3.3.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

###### 3.3.2.2.1 試験材料

###### 3.3.2.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

###### 3.3.2.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～11日齢のものを用いる。

###### 3.3.2.2.2 試験方法

注射材料0.1mLずつを10個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で5日間培養した後、尿膜腔液を採取し、更に1代継代し、37℃で5日間培養して観察する。

###### 3.3.2.2.3 判定

鶏胚は、正常に発育しなければならない。

##### 3.3.2.3 産卵低下症候群-1976ウイルス

###### 3.3.2.3.1 試験材料

###### 3.3.2.3.1.1 試料

検体に重亜硫酸ナトリウムを加えてホルムアルデヒドを中和したものを試料とする。

###### 3.3.2.3.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格2.1.3の鶏胚肝初代細胞を用いる。

###### 3.3.2.3.2 試験方法

試料を培養細胞に接種し、37℃で5日間培養した後、その培養上清を採取し、更に1代継代し、5日間培養して観察する。試験最終日に培養上清を採取し、鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

###### 3.3.2.3.3 判定

培養細胞にCPE及び1代継代後の培養上清に赤血球凝集を認めない場合には、活性ウイルス陰性と判定する。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

### 3.3.2.4 七面鳥鼻気管炎ウイルス

#### 3.3.2.4.1 試験材料

##### 3.3.2.4.1.1 試料

検体を試料とする。

##### 3.3.2.4.1.2 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。

#### 3.3.2.4.2 試験方法

試料の全量を1mLにつき20cm<sup>2</sup>以上の培養細胞に接種し、37°Cで5日間培養した後、その培養上清0.1mLを採取し、更に継代し、37°Cで5日間培養して観察する。

#### 3.3.2.4.3 判定

培養細胞にCPEを認めない場合、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。

### 3.4 原液の試験

3.4.1の試験又は3.4.1若しくは3.4.2の試験を行う。

#### 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。

#### 3.4.2 抗原含有量試験

##### 3.4.2.1 ニューカッスル病ウイルス

###### 3.4.2.1.1 試験材料

検体を生理食塩液で2倍階段希釀し、各段階の希釀液を試料とする。

###### 3.4.2.1.2 試験方法

各試料50μLに鶏赤血球浮遊液を25μLずつ加え、室温に静置する。

###### 3.4.2.1.3 判定

赤血球の凝集を示す試料の最高希釀倍数を赤血球凝集（HA）単位とする。

抗原量は50μL中128HA単位以上でなければならない。

##### 3.4.2.2 産卵低下症候群-1976ウイルス

###### 3.4.2.2.1 試験材料

検体を生理食塩液で2倍階段希釀し、各段階の希釀液を試料とする。

###### 3.4.2.2.2 試験方法

各試料50μLに鶏赤血球浮遊液を25μL加え、室温に静置する。

###### 3.4.2.2.3 判定

赤血球凝集を示す試料の最高希釀倍数をHA単位で示す。

抗原量は50μL中4096 HA単位以上でなければならない。

##### 3.4.2.3 七面鳥鼻気管炎ウイルス

###### 3.4.2.3.1 試験材料

###### 3.4.2.3.1.1 試料

検体を洗浄用緩衝液（付記3）で2倍階段希釀し、各段階の希釀液を試料とする。

###### 3.4.2.3.2 試験方法

七面鳥鼻気管炎ウイルスを認識するモノクローナル抗体を固相化した96穴平底プレートに各試料及び陰性対照を50μLずつ添加し、37°Cで45分間反応させる。

反応終了後洗浄用緩衝液で3回洗浄した後、七面鳥鼻気管炎ウイルス抗体陽性鶏

血清を50  $\mu$ L添加し、37°Cで30分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で洗浄し、やぎ抗鶏IgGペルオキシダーゼ標識抗体を50  $\mu$ L添加し、37°Cで30分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で洗浄し、基質液（付記4）を50  $\mu$ Lずつ添加し、室温で10分間反応させる。反応終了後、反応停止液（付記5）を25  $\mu$ L加えて、反応を停止させる。

#### 3.4.2.3.3 判定

波長450nmで吸光度を測定する。陰性対照より2倍以上の吸光度値を示す最終希釈倍数を相対抗原量とする。

検体の抗原量は、250EU/mL以上である。

### 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 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。

#### 3.5.3 ホルマリン定量試験

製剤ごとに農林水産大臣が適当と認めた方法で試験品を処理したものを試料とし、一般試験法のホルマリン定量法を準用して試験するとき、ホルマリンの含有量は、0.2vol%以下でなければならない。

#### 3.5.4 安全試験

##### 3.5.4.1 試験材料

###### 3.5.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 3.5.4.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の4～5週齢の鶏を用いる。

###### 3.5.4.2 試験方法

試験動物10羽を試験群、3羽を対照群とする。

注射材料の1羽分ずつを試験群の頸部中央部皮下に注射し、対照群とともに4週間観察する。

###### 3.5.4.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に臨床的な異常を認めてはならない。

#### 3.5.5 力価試験

##### 3.5.5.1 ニューカッスル病力価試験

###### 3.5.5.1.1 試験材料

###### 3.5.5.1.1.1 試験動物

3.5.4の試験に用いた動物を用いる。

###### 3.5.5.1.1.2 赤血球凝集抗原

「ニューカッスル病診断用赤血球凝集抗原」を用いる。

###### 3.5.5.1.2 試験方法

3.5.4の試験最終日に試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、ニューカッスル病ウイルス赤血球凝集抑制試験を行う。

###### 3.5.5.1.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価（以下「HI抗体価」という。）とする。

試験群の80%以上がHI抗体価80倍以上でなければならない。この場合、対照群では、すべてが5倍以下でなければならない。

### 3.5.5.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

#### 3.5.5.2.1 試験材料

##### 3.5.5.2.1.1 試験動物

3.5.4の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.5.5.2.1.2 中和試験用ウイルス

それぞれの製造用株を用いる。ただし、ウイルス量は、生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～11日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、ウイルス価を測定するとき、1mL中 $10^{5.0}$ EID<sub>50</sub>以上でなければならない。

##### 3.5.5.2.1.3 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～11日齢のものを用いる。

#### 3.5.5.2.2 試験方法

3.5.4の試験最終日に試験群及び対照群から得られた血清について、ウイルス希釈法により中和試験を行う。血清は、それぞれ等量を各群ごとにプールし、非働化する。

それぞれの中和試験用ウイルスをリン酸緩衝食塩液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を3群に分け、第1群には試験群のプール血清を、第2群には対照群のプール血清を、第3群にはウイルス対照としてリン酸緩衝食塩液を、それぞれ等量加えて混合する。これらの混合液を4°Cで18～24時間又は37°Cで60分間処理する。処理した試料0.1mLずつを5個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37°Cで7～8日間培養し、観察する。

#### 3.5.5.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性(発育不全又はカーリング)を認めたものを感染とみなし、EID<sub>50</sub>を求め、中和指数を算出する。ただし、24時間以内に死亡したものは除外する。

試験群のそれぞれの株に対する中和指数は、対照群に対し2.0以上でなければならない。この場合、対照群の中和指数は、ウイルス対照に対し1.0以下でなければならない。

### 3.5.5.3 産卵低下症候群-1976力価試験

#### 3.5.5.3.1 試験材料

##### 3.5.5.3.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.5.5.3.1.2 試験動物

3.5.4の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.5.5.3.1.3 赤血球凝集抗原

産卵低下症候群-1976ウイルス赤血球凝集抗原(付記6)を用いる。

#### 3.5.5.3.2 試験方法

3.5.4の試験最終日に試験群及び対照群から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。

血清1容に25w/v%カオリン(付記7)3容を加え、室温で処理した後、遠心した上清を採取する。これをリン酸緩衝食塩液で階段希釈し、各希釈血清25μLに等量の4単位の産卵低下症候群-1976ウイルス赤血球凝集抗原を加えて混合し、処理した後、鶏赤血球浮遊液を50μLずつ加えて振盪混合し静置した後に赤血球凝集の有無を観察する。

### 3.5.5.3.3 判定

赤血球凝集が抑制された血清の最高希釈倍数をHI抗体価とする。

試験群の80%以上がHI抗体価32倍以上でなければならない。この場合、対照群においては、すべてHI抗体価4倍未満でなければならない。

### 3.5.5.4 七面鳥鼻気管炎力価試験

#### 3.5.5.4.1 試験材料

##### 3.5.5.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.5.5.4.1.2 試験動物

3.5.4の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.5.5.4.2 試験方法

3.5.4の試験最終日に試験群及び対照群から採取した各個体の血清についてELISAを行う。

固相化緩衝液(付記8)で濃度調整した七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原(付記9)を96穴平底プレートに100 $\mu$ Lずつ分注し、37°Cで3時間反応後、洗浄用緩衝液で洗浄し、乾燥させる。次に被検血清をIB・EIA緩衝液(付記10)で階段希釈し、固相化プレートに各希釈血清を100 $\mu$ Lずつ加え、37°Cで30分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で洗浄し、水切りを行った後、やぎ抗鶏IgGペルオキシダーゼ標識抗体(付記11)を100 $\mu$ L加え、37°Cで30分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で洗浄し、水切りを行った後、基質液を100 $\mu$ L加え、常温で8分間反応させる。反応終了後、反応停止液を50 $\mu$ L加えて、反応を停止させ、波長450nmで吸光度を測定する。

##### 3.5.5.4.3 判定

参照陰性血清(付記12)の平均吸光度値の少なくとも1.5倍の吸光度値を示す血清の希釈倍数をELISA抗体価とするとき、試験群の80%以上はELISA抗体価2<sup>0.64</sup>倍以上を示さなければならない。この場合、対照群はすべて2<sup>0.64</sup>倍未満でなければならない。また、参照陽性血清(付記13)は2<sup>0.64</sup>倍以上の抗体価を示さなければならない。

## 4 貯法及び有効期間

有効期間は3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・プロス	2.95g
牛血清	20 mL
イーグルMEM	残量

炭酸水素ナトリウムでpHを7.0~7.4に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてよい。

### 付記2 細胞増殖用培養液

1,000mL中

トリプトース・ホスフェイト・プロス	0.83g
トリプトース	1.00g
ラククトアルブミン水解物	1.25g

炭酸水素ナトリウム	<u>2.45g</u>
牛血清	<u>50 mL</u>
イーグルMEM	<u>残量</u>
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。	

付記3 洗浄用緩衝液

1,000mL中	
リン酸一水素ナトリウム	<u>2.9g</u>
リン酸二水素ナトリウム	<u>0.2g</u>
塩化ナトリウム	<u>37.2g</u>
塩化カリウム	<u>0.2g</u>
Tween 20	<u>1.5g</u>
精製水	<u>残量</u>
pH7.0±0.1に調整する。	

付記4 基質液

TMB溶液	<u>0.2mL</u>
UP緩衝液	<u>1.5mL</u>
精製水	<u>15 mL</u>

a:TMB溶液はDMSO1,000mLにTMB(3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン)を6g溶解したもの。  
 b:UP緩衝液は尿素過酸化物1錠(140mg)をTMB緩衝液100mLに溶解したもの。  
 c:TMB緩衝液は酢酸ナトリウム136gを約500mLの精製水に溶解し、1.5Mクエン酸でpH5.5±0.2に調整した後、蒸留水を加えて1,000mLとし高圧蒸気滅菌を行う。

付記5 反応停止液

硫酸	<u>110mL</u>
水	<u>1,000mL</u>

付記6 産卵低下症候群-1976ウイルス赤血球凝集抗原

産卵低下症候群-1976ウイルスJPA-1株又は同等と認められた株を生ワクチン製造用材料の規格1.3の発育あひる卵で増殖させて得た尿膜腔液又は生ワクチン製造用材料の規格2.1.3の鶏胚肝初代細胞で増殖させて得た培養上清に0.2vol%になるようにホルマリンを加えて不活化したもの。

付記7 25w/v%カオリン液

100mL中	
カオリン	<u>25g</u>
リン酸緩衝液	<u>残量</u>
高压蒸気滅菌又は窒化ナトリウムを0.01w/v%添加した後、10°C以下に保存する。	

付記8 固相化緩衝液

1,000mL中	
リン酸一水素ナトリウム	12.10 g
リン酸二水素ナトリウム	1.43 g
塩化ナトリウム	8.5 g
精製水	残量
pH7.0±0.1に調整する。	

付記9 七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原

動物用生物学的製剤基準の生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の発育鶏卵を用いて作製した鶏胚線維芽細胞に製造用七面鳥鼻気管炎ウイルスを感染させ、超音波破碎及びショ糖ステップ遠心等の加工により得られたもので、参考陽性血清の100倍希釈液の吸光度値が0.8以上及び参考陰性血清の吸光度値が0.2以下を示すもの。

付記10 IB・EIA緩衝液

1,000mL中	
リン酸二水素ナトリウム	2.31g
リン酸水素二ナトリウム二水和物	24.06g
塩化ナトリウム	29.22g
カオリン処理30w/v%牛血清アルブミン	3.3mL
Tween 20	0.50g
精製水	残量
ろ過滅菌（200nm）後、スキムミルクを2w/v%及び牛胎児血清を5vol%加える。	

付記11 やぎ抗鶏IgGペルオキシダーゼ標識抗体

参考陽性血清が規定の抗体値を示すようにIB・EIA緩衝液で調整したもの。

付記12 参照陰性血清

生ワクチン製造用材料の規格1.1の鶏群由来で七面鳥鼻気管炎ウイルスに対する抗体を保有しない鶏血清で、ELISA抗体値 $2^{1.04}$ 倍未満を示すもの。

付記13 参照陽性血清

生ワクチン製造用材料の規格1.1の鶏群由来で七面鳥鼻気管炎ウイルスに対する抗体陰性鶏を弱毒七面鳥鼻気管炎ウイルスBUT1#8544株の生ウイルスで免疫して得た血清で、ELISA抗体値 $2^{8.04} \sim 2^{9.04}$ 倍を示すもの。

以下（略）

以下（略）