

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

平成 21 年 3 月 26 日（告示第 420 号） 新規追加
平成 28 年 4 月 18 日（告示第 1020 号） 一部改正

1 定義

ニューカッスル病ウイルス及び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 ウイルス及びトリニューモ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を混合し、油性アジュバントを添加したワクチンである。

2 製法

2.1.1 ニューカッスル病ウイルス株

2.1.1.1 名称

ニューカッスル病ウイルス Ulster 2C-080-U/MS 株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

10 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。

2.1.1.3 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℃以下又は凍結乾燥して 5℃以下で保存する。

2.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス株

2.1.2.1 名称

鶏伝染性気管支炎ウイルス Mass41/3 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

10 日齢の発育鶏卵の尿膜腔に注射すると、鶏胚に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℃以下又は凍結乾燥して 5℃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 V127/30 株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

あひる胚初代細胞で 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、あひる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℃以下又は凍結乾燥して 5℃以下で保存する。

2.1.4 トリニューモウイルス株

2.1.4.1 名称

トリニューモウイルス VCO3/50 70223 株又はこれと同等と認められた株

2.1.4.2 性状

Vero 細胞及び鶏胚初代細胞に 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、Vero 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

9～11 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

9～11 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 培養細胞

あひる胚初代細胞を用いる。

2.2.3.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

2.2.4 トリニューモウイルス

2.2.4.1 培養細胞

Vero 細胞を用いる。

2.2.4.2 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 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別発育鶏卵とみなす。

個別発育鶏卵について 3.1 の試験を行う。

2.3.1.2 ウイルスの培養

種ウイルスを発育鶏卵で培養し、感染増殖させた尿膜腔液のろ液又は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、3.3.1.1 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不活化剤を加えて不活化した後、相当と認められた方法で濃縮し、原液とする。

原液について、3.4.1 及び 3.4.2.1 の試験を行う。ただし、3.4.2.1 の試験は、ウイルス浮遊液の濃縮前に行ってもよい。

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別発育鶏卵とみなす。

個別発育鶏卵について 3.1 の試験を行う。

2.3.2.2 ウイルスの培養

種ウイルスを発育鶏卵で培養し、感染増殖させた尿膜腔液のろ液又は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、3.3.1.2 の試験を行う。

2.3.2.3. 不活化

ウイルス浮遊液を適当と認められた不活化剤を加えて不活化した後、適当と認められた方法で濃縮し、原液とする。

原液について、3.4.1 及び 3.4.2.2 の試験を行う。ただし、3.4.2.2 の試験は、ウイルス浮遊液の濃縮前に行ってもよい。

2.3.3 産卵低下症候群— 1976 ウイルス原液

2.3.3.1 培養細胞の培養

1 回に処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。ウイルスの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、3.2 の試験を行う。

2.3.3.2 ウイルスの培養

種ウイルスをあひる胚初代細胞に接種し、培養し、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ウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.3.1.3 の試験を行う。

2.3.3.3 不活化

ウイルス浮遊液を適当と認められた不活化剤を加えて不活化した後、適当と認められた方法で濃縮し、原液とする。

原液について、3.4.1 及び 3.4.2.3 の試験を行う。ただし、3.4.2.3 の試験は、ウイルス浮遊液の濃縮前に行ってもよい。

2.3.4 トリニューモウイルス原液

2.3.4.1 培養細胞の培養

1 回に処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。

個別培養細胞について 3.2 の試験を行う。

2.3.4.2 ウイルスの培養

種ウイルスを Vero 細胞に接種し、培養し、個別培養細胞ごとに採取した培養細胞及び培養液をホモジナイズしたものをウイルス浮遊液とする。

2.3.4.3 不活化

ウイルス浮遊液を適当と認められた不活化剤を加えて不活化した後、適当と認められた方法で濃縮し、原液とする。

原液について、3.4.1 及び 3.4.2.4 の試験を行う。ただし、3.4.2.4 の試験は、ウイルス浮遊液の濃縮前に行ってもよい。

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原液、産卵低下症候群— 1976 ウイルス原液及びトリニューモウイルス原液を濃度調整して混合後、適当と認められた油性アジュバントを添加したものを最終バルクとする。この場合、適当と認められた保存剤を添加してもよい。

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 試験方法

3.1 発育鶏卵の試験

個別発育鶏卵の 1%以上又は 30 個以上を対照発育鶏卵とし、これについて次の試験を行う。

3.1.1 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。

3.1.2 鶏赤血球凝集試験

3.1.1 の試験最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol%鶏赤血球浮遊液を等量加え、60 分間静置し、観察するとき、赤血球凝集性を認めてはならない。

3.2 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。

3.2.1 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。

3.2.2 赤血球凝集試験

3.2.1 の培養終了時に採取した培養液に 0.5vol%鶏赤血球浮遊液を等量加え、60 分間静置し、観察するとき、赤血球凝集性を認めてはならない。

3.3 ウイルス浮遊液の試験

3.3.1 ウイルス含有量試験

3.3.1.1 ニューカッスル病ウイルス

3.3.1.1.1 試験材料

3.3.1.1.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.1.1.1.2 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

3.3.1.1.2 試験方法

試料 0.1 mL 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。観察最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol %鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

3.3.1.1.3 判定

尿膜腔液に赤血球凝集性を認めたものを感染とみなし、EID₅₀ 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、1 mL 中 10^{8.0} EID₅₀ 以上でなければならない。

3.3.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

3.3.1.2.1 試験材料

3.3.1.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.1.2.1.2 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

3.3.1.2.2 試験方法

試料 0.1 mL 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 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。

3.3.1.2.3 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、EID₅₀ 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、1 mL 中 10^{6.0} EID₅₀ 以上でなければならない。

3.3.1.3 産卵低下症候群—1976 ウイルス

3.3.1.3.1 試験材料

3.3.1.3.1.1 試料

検体を細胞維持用培養液（付記 1）で 10 倍に希釈した後 4 倍階段希釈した各段階の希釈液を試料とする。

3.3.1.3.1.2 培養細胞

96 穴マイクロプレートに培養し単層となった生ワクチン製造用材料の規格 2.4.1 のあひる胚初代細胞を用いる。

3.3.1.3.2 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、37℃で 7 日間培養し、観察する。

3.3.1.3.3 判定

培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

検体のウイルス含有量は、1mL 中 10^{6.5}TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.3.1.4 トリニューモウイルス

3.3.1.4.1 試験材料

3.3.1.4.1.1 試料

検体を細胞維持用培養液で 10 倍に希釈した後 4 倍階段希釈した各段階の希釈液を試料とする。

3.3.1.4.1.2 培養細胞

96 穴マイクロプレートに培養し単層となった Vero 細胞を用いる。

3.3.1.4.2 試験方法

試料 0.2mL ずつをそれぞれ 4 穴以上の培養細胞に接種し、38℃で 9 日間培養し、観察する。

3.3.1.4.3 判定

培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

検体のウイルス含有量は、1mL 中 10^{5.0}TCID₅₀ 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。

3.4.2 不活化試験

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

3.4.2.1.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.4.2.1.1.2 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。

3.4.2.1.2 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、5 日間培養した後、尿膜腔液を採取し、更に 1 代継代し、5 日間培養し、観察する。

試験最終日に、尿膜腔液を採取し、0.5vol % 鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

3.4.2.1.3 判定

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

3.4.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

3.4.2.2.1 試験材料

3.4.2.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.4.2.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の 9～10 日齢のものを用いる。

3.4.2.2.2 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、5 日間培養した後、尿膜腔液を採取し、更に 1 代継代し、5 日間培養し、観察する。

3.4.2.2.3 判定

鶏胚は正常に発育しなければならない。

3.4.2.3 産卵低下症候群— 1976 ウイルス

3.4.2.3.1 試験材料

3.4.2.3.1.1 試料

検体の不活化剤を中和したものを試料とする。

3.4.2.3.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.4.1 のあひる胚初代細胞を用いる。

3.4.2.3.2 試験方法

試料 5 mL につき 850cm² 以上の培養細胞に接種し、38.5 °C で 6 日間培養した後、その培養液 5 mL を採取し、更に 1 代継代し、38.5 °C で 7 日間培養する。試験最終日に培養液を用いて赤血球凝集試験を行う。

3.4.2.3.3 判定

培養細胞に CPE を認めず、培養液に赤血球凝集を認めない場合、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。

3.4.2.4 トリニューモウイルス

3.4.2.4.1 試験材料

3.4.2.4.1.1 試料

検体の不活化剤を中和したものを試料とする。

3.4.2.4.1.2 培養細胞

ローラーボトルに培養した Vero 細胞を用いる。

3.4.2.4.2 試験方法

試料 5 mL につき 850cm² 以上の培養細胞に接種し、38 °C で 6 日間培養した後、その培養液 5 mL を採取し、更に 1 代継代し、38 °C で 7 日間培養する。

3.4.2.4.3 判定

培養細胞に CPE を認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。検体に活性ウイルスを認めてはならない。

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ず、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。

3.5.2 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

適当と認められ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 チメロサル定量試験

適当と認められ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 安全試験

3.5.5.1 試験材料

3.5.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.5.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 30 ~ 35 日齢の鶏を用いる。

3.5.5.2 試験方法

試験動物の 10 羽を試験群とし、3 羽を対照群とする。

注射材料 1 羽分ずつを試験群の脚部筋肉内に注射し、対照群とともに 4 週間観察する。

3.5.5.3 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。

3.5.6 力価試験

3.5.6.1 ニューカッスル病力価試験

3.5.6.1.1 試験材料

3.5.6.1.1.1 試験動物

3.5.5 の試験に用いた動物を用いる。

3.5.6.1.1.2 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。

3.5.6.1.2 試験方法

3.5.5 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。

3.5.6.1.3 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 160 倍以上でなければならない。この場合、対照群のすべてが HI 抗体価 5 倍以下でなければならない。

3.5.6.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

3.5.6.2.1 試験材料

3.5.6.2.1.1 試験動物

3.5.5 の試験に用いた動物を用いる。

3.5.6.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の 9～10 日齢の発育鶏卵を用いる。

3.5.6.2.1.3 中和試験用ウイルス

製造用株を用いる。ただし、そのウイルス量は、生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の 9～10 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、1 mL 中 $10^{5.0}$ EID₅₀ 以上でなければならない。

3.5.6.1.2 試験方法

3.5.5 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、それぞれ各群ごとに等量プールし、非働化する。

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℃で 18～24 時間又は 37℃で 60 分間処理する。処理した試料 0.1 mL ずつを 5 個以上の発育鶏卵に注射し、37℃で 7～8 日間培養し、観察する。

3.5.6.2.3 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、EID₅₀ 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。

試験群の中和指数は、対照群に対して 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。

3.5.6.3 産卵低下症候群—1976 力価試験

3.5.6.3.1 試験材料

3.5.6.3.1.1 試験動物

3.5.5 の試験に用いた動物を用いる。

3.5.6.3.1.2 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 2）を用いる。

3.5.6.3.2 試験方法

3.5.5 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 25 w/v %カオリン液（付記 3）3 容を加え、室温で 20 分間処理した後、2,000 rpm、10 分間遠心した上清を採取する。これをリン酸緩衝食塩液で 2 倍階段希釈し、各希釈血清 25 μ L 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、30 分間処理した後、0.5 vol %の鶏赤血球浮遊液を 50 μ L ずつ加えて振盪混合し、60 分間静置した後に赤血球凝集の有無を観察する。

3.5.6.3.3 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、対照群では、すべて HI 抗体価 4 倍以下でなければならない。

3.5.6.4 トリニューモウイルス力価試験

3.5.6.4.1 試験材料

3.5.6.4.1.1 試験動物

3.5.5 の試験に用いた動物を用いる。

3.5.6.4.2 試験方法

3.5.5 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、ELISA キット（付記 4）を用いて酵素抗体反応試験を行う。

被験血清を洗浄用緩衝液（付記 5）を用いて 2 倍に希釈し、固相化プレート（付記 6）の 2 穴以上にそれぞれの希釈血清を 1 穴当たり 100 μ L、また、参照陽性血清（付記 7）及び参照陰性血清（付記 8）は 2 穴に 1 穴当たり 100 μ L を加え、常温で 30 分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で 3 回洗浄し、水切りを行った後、マウス抗トリニューモウイルスペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体（付記 9）を 100 μ L 加え、常温で 30 分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で 3 回洗浄し、水切りを行った後、基質液（付記 10）を 100 μ L 加え、常温で 10 分間反応させる。反応終了後、反応停止液（付記 11）を 50 μ L 加えて反応を停止させ、波長 450 nm で吸光度値を測定する。

3.5.6.4.3 判定

血清の平均吸光度から以下に示す式より PI 値を算出する。

参照陽性血清吸光度値：OD_{PR}

参照陰性血清吸光度値：OD_{NR}

被検血清吸光度値：OD_S

ブランク吸光度値：BN

$$OD_P = [(OD_S \text{ 又は } OD_{PR} - BN) / (OD_{NR} - BN)] \times 100$$

$$PI = 100 - OD_P$$

参照陰性血清の吸光度値 OD_{NR} は 0.600 以上でなければならない、参照陽性血清の OD_P 値が 60 以下であるとき、試験群の PI 値の平均は、60 以上でなければならない、対照群の PI 値は、すべて 15 以下でなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は製造後 1 年 6 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 細胞維持用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 ~ 3.0 g

牛血清 0 ~ 30 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もよい。

付記 2 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 株又はこれと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 0.2 vol % になるようにホルマリンを加えて不活化したもの

付記 3 25w/v%カオリン液

100mL 中

カオリン 25 g

リン酸緩衝食塩液 残 量

115 °C で 15 分間高圧滅菌又はアジ化ナトリウムを 0.01w/v% 添加した後、10 °C 以下に保存する。

付記 4 ELISA キット

適当と認められる ELISA キットで、洗浄用緩衝液、固相化プレート、参照陽性血清、参照陰性血清、マウス抗トリニューモウイルスペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体、基質液及び反応停止液で構成されるものであり、バリデーション用陽性血清（生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 1 週齢鶏にトリニューモウイルスを $10^{4.0}$ TCID₅₀/羽で免疫し、免疫後 4 週目に採血し、プールして得たもの）及びバリデーション用陰性血清（生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 5 ~ 15 週齢鶏の血清でトリニューモウイルス抗体陰性のもの）を用いて酵素抗体反応試験を実施したとき、バリデーション用陽性血清の PI 値は 65 以上 80 以下、バリデーション用陰性血清の PI 値は 5 以下を示す。

付記 5 洗浄用緩衝液

PBS-Tween 錠剤又は濃縮液を水に溶解し、以下の最終濃度のもの

0.14 mol/L 塩化ナトリウム液

0.003 mol/L 塩化カリウム液

0.01 mol/L リン酸緩衝液

0.05 % ポリソルベート 20 液

pH を 7.4 に調整する。

付記 6 固相化プレート

酵素抗体反應用プレートにトリニューモウイルス VCO3 株抗原（付記 12）を固相化し、乾燥したもので、2 ~ 5 °C に保存する。

付記 7 参照陽性血清

0.05w/v% チメロサル含有抗トリニューモウイルス血清で、その OD₆ 値が 60 以下のもの

付記 8 参照陰性血清

0.05w/v%チメロサル含有陰性血清で、その吸光度が 0.600 以上のもの

付記 9 マウス抗トリニューモウイルスペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体

トリニューモウイルス株をマウスに免疫して作成したハイブリドーマから、VCO3 抗原のスクリーニングを行って得たモノクローナル抗体で、アフィニティーカラムクロマトグラフィーにより精製し、ホースラディッシュペルオキシダーゼで標識し、凍結乾燥したもので、洗浄用緩衝液に溶解して用いる。溶解後は -20°C で保存する。

付記 10 基質液

液中に 3,3',5,5',テトラメチルベンチジン及び過酸化水素を含むもの

付記 11 反応停止液

2mol/L 硫酸液

付記 12 トリニューモウイルス VCO3 抗原

トリニューモウイルス VCO3 株を Vero 細胞に接種して 37°C で培養し、完全な CPE が観察された後、ウイルス浮遊液及び細胞を凍結融解し、3,500 rpm で 30 分間遠心し、その遠心上清を更に 19,000 rpm で 15 ~ 20 時間超遠心して得た沈殿に少量のリン酸緩衝食塩液を加えてガラスホモジナイザーでホモジナイズして懸濁したものに、最終濃度 0.1 % となるように Triton-X 100 を加え、 37°C で 30 分間処理した後、超音波処理したもの