

ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎2価・鶏伝染性ファブリキウス嚢病・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20年6月6日（告示第913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鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス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 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

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

2.1.1.2 性状

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。

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M41株及びD274株又は製造に相当と認められた2種類の株

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℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

2.1.3 鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス株

2.1.3.1 名称

弱毒鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスD78株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

鶏胚初代細胞及びVero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、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。

2.1.4 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。6～12日齢の発育鶏卵の卵黄嚢内及び尿膜腔内に接種しても、鶏胚に異常を示さない。

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。

原株及び原種ウイルスは、凍結して-70℃以下凍結乾燥して5℃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 鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス

2.2.3.1 培養細胞

Vero細胞又は製造に相当と認められた細胞を用いる。

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の鶏胚初代細胞又は製造に相当と認められた細胞を用いる。

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別発育鶏卵とみなす。

個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相当と認められ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

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、3.1.1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の尿膜腔内に注射し、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相当と認められ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 鶏伝染性ファブリキウス囊病ウイルス
- 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、3.1.2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ウイルス浮遊液とする。
ウイルス浮遊液について、3.2.1.3の試験を行う。
- 2.3.3.3 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3.3.2.3の試験を行う。
- 2.3.3.4 アジュバントの添加
不活化ウイルス浮遊液に相当と認められ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3.4.2.2の試験を行う。
- 2.3.4 七面鳥鼻気管炎ウイルス
- 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、3.1.2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別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液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相当と認められ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、鶏伝染性ファブリキウス囊病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、適当と認められ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 発育鶏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、これについて次の試験を行う。

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、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、赤血球凝集を認めてはならない。

3.1.2 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。

3.1.2.1 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。

3.1.2.2 鶏赤血球凝集試験

3.1.2.1の試験最終日に培養液を採取し、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、赤血球凝集を認めてはならない。

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 ニューカッスル病ウイルス

3.2.1.1.1 試験材料

3.2.1.1.1.1 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。

3.2.1.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～11日齢の発育鶏卵を用いる。

3.2.1.1.1.2 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°C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、0.5vol%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、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、1mL中10^{9.0}EID₅₀以上でなければならない。

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

3.2.1.2.1.1 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。

3.2.1.2.1.2 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。

3.2.1.2.2 試験方法

試料0.1 mL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、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、M41株の場合は1 mL中10^{8.0}EID₅₀以上及びD274株の場合は1 mL中10^{7.4}EID₅₀以上でなければならない。

3.2.1.3 鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス

3.2.1.3.1 試験材料

3.2.1.3.1.1 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。

3.2.1.3.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格2.1.1の鶏胚初代細胞で、単層となったものを用いる。

3.2.1.3.2 試験方法

試料0.1 mLずつをそれぞれ4枚の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させる。第1次重層寒天培地（付記2）を加え3～4日間培養後、第2次重層寒天培地（付記3）を重層し、観察する。

3.2.1.3.3 判定

試料の各希釈段階の平均ブラック数からウイルス含有量を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10^{8.0}PFU以上でなければならない。

3.2.1.4 七面鳥鼻気管炎ウイルス

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4）で調整した鶏胚初代細胞浮遊液で10倍階段希釈し、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200 μL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℃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、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10^{6.5}TCID₅₀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 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。

3.3.2.1.2 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、0.5vol%鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集性を調べる。

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性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

検体を注射試料とする。

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9～10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、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ず、尿膜腔液に赤血球凝集性を認めてはならない。

3.3.2.3 鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス

3.3.2.3.1 試験材料

3.3.2.3.1.1 試料

100倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、検体5mLを4℃で一夜透析し、不活化剤を除去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2.1.1の鶏胚初代細胞で、単層となったものを用いる。

3.3.2.3.2 試験方法

試料の全量を、1mLにつき20cm²以上の培養細胞に接種し、3～4日培養した後、その培養上清5mLを採取し、更に1代継代し、3～4日培養して観察する。

3.3.2.3.3 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。

3.3.2.4 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20cm²以上の培養細胞に接種し、37℃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、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

3.4.2.1.1.1 試料

検体を生理食塩水で2倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.4.2.1.2 試験方法

各試料50 μ Lに1 vol%鶏赤血球浮遊液を25 μ Lずつ加え、30~60分間室温に静置する。

3.4.2.1.3 判定

赤血球の凝集を示す試料の最高希釈倍数を赤血球凝集 (HA) 単位とする。

抗原量は50 μ L中128HA単位以上でなければならない。

3.4.2.2 鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス

3.4.2.2.1 試験材料

3.4.2.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.4.2.2.2 試験方法

試料及び参照抗原 (付記5) をR63モノクローナル抗体 (付記6) で固相化した96穴平底マイクロプレートに添加し、37 $^{\circ}$ Cで反応後、ビオチン標識R63抗体 (付記7) を添加し、37 $^{\circ}$ Cで反応させる。その後ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識アビジン (付記8) を加え、37 $^{\circ}$ Cで反応させた後、過酸化尿素を加えたテトラメチルベンチジンを加え、発色させる。反応停止後、450nmで吸光度を測定する。

3.4.2.2.3 判定

参照抗原及び試料の吸光度から試料の抗原を計算するとき、R63-ELISA単位は1 mL中2,500EU以上である。

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9) で2倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

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穴平底マイクロプレートに各試料及び陰性対照を50 μ Lずつ添加し、37 $^{\circ}$ 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 μ L添加し、37 $^{\circ}$ Cで30分間反応させる。反応終了後洗浄用緩衝液で3回洗浄した後、山羊抗鶏IgGペルオキシダーゼ標識抗体を50 μ L添加し、37 $^{\circ}$ 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た後、基質液 (付記10) を50 μ 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11) を25 μ 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、250 EU/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、0.2 vol %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又は適当と認められた株を用いる。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9～10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。

3.5.5.2.1.3 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1の9～10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℃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個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃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、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 鶏伝染性ファブリキウス嚢病力価試験

3.5.5.3.1 試験材料

3.5.5.3.1.1 試験動物

3.5.4の試験に用いた動物を用いる。

3.5.5.3.1.2 中和試験用ウイルス

製造用株又は適当と認められた株を用いる。ただし鶏胚初代細胞で増殖させたウイルスを鶏胚初代細胞に接種し、ウイルス価を測定するとき、1 mL中10^{6.0} TCID₅₀以上である。

3.5.5.3.1.3 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格2.1.1の鶏胚初代細胞をシャーレに培養し、単層になったものを用いる。

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中和試験を行う。

血清を非働化し、ウイルス増殖用培養液（付記12）で2倍階段希釈する。各希釈血清と0.1 mL中100～200 PFUを含む中和試験用ウイルス液をそれぞれ等量加えて混合し、37℃で60分間処理する。この各混合液0.1 mLずつをそれぞれ2枚の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、第1次重層寒天培地（付記13）を加え、3～4日間静置培養する。その後、第2次重層寒天培地（付記14）を重ねし、観察する。

3.5.5.3.3 判定

ブラック数を50%減少させる血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

試験群の70%以上が中和抗体価128倍以上でなければならない。この場合、対照群では、すべて中和抗体価4倍以下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 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の試験終了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15）で濃度調整した七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原（付記16）を96穴平底マイクロプレートに100 μLずつ分注し、37℃で3時間反応後、洗浄用緩衝液で2回洗浄した後、乾燥させる。次に被検血清をIB・EIA緩衝液（付記17）で2倍階段希釈し、固相化プレートに各希釈血清を100 μLずつ加え、37℃で30分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で2回洗浄し、水切りを行った後、山羊抗鶏IgGペルオキシダーゼ標識抗体（付記18）を100 μL加え、37℃で30分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で2回洗浄し、水切りを行った後、基質液を100 μL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 μL加えて反応を停止させ、波長450 nmで吸光度を測定する。

3.5.5.4.3 判定

参照陰性血清（付記19）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、試験群の80%以上がELISA抗体価 $2^{9.64}$ 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 $2^{4.64}$ 倍未満でなければならない。また、参照陽性血清（付記20）は、 $2^{6.64}$ 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4か月間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合は、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 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もよい。

付記2 第1次重層寒天培地

1,000mL 中
トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g
牛血清 20 mL
寒天 10 g
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3 第2次重層寒天培地

第1次重層寒天培地に0.5w/v%ニュートラルレッド液を2 vol%となるように加えたもの

付記4 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 0.83 g
トリプトース 1.00 g
ラクトアルブミン水解物 1.25 g
炭酸水素ナトリウム 2.45 g
牛血清 50 mL
イーグルMEM 残 量
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記5 参照抗原

Vero細胞で培養した鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスD78株ウイルス液をホルマリンで不活化した後、抗原量を約10,000 EU/mLに調整したもの

付記6 R63モノクローナル抗体

感染防御抗原であるVP2 蛋白を認識し、中和活性を有するモノクローナル抗体で、参照抗原が規定の抗原量を示すように固相化緩衝液で調整したもの

付記7 ビオチン標識R63抗体

参照抗原が規定の抗原量を示すようにIB・EIA緩衝液で調整したもの

付記8 ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識アビジン

参照抗原が規定の抗原量を示すようにIB・EIA緩衝液で調整したもの

付記9 洗浄用緩衝液

1,000 mL中

リン酸水素二ナトリウム十二水和物 2.9 g

リン酸二水素カリウム 0.2 g

塩化ナトリウム 37.2 g

塩化カリウム 0.2 g

ポリソルベート20 1.5 g

水 残量

pH を6.9～7.1に調整する。

付記10 基質液

TMB溶液 0.2 mL

UP緩衝液 1.5 mL

水 15 mL

TMB溶液は、DMSO 1,000 mLにTMB (3,3',5,5' テトラメチルベンチジン) を6g溶かしたもの

UP緩衝液は、尿素過酸化140 mgをTMB緩衝液(酢酸ナトリウム136 gを約500 mLの水に溶かし、1.5 mol/Lクエン酸でpH5.3～5.7に調整した後、水を加えて1,000 mLとし、121℃、20分間高压滅菌したもの) 100mLに溶かしたもの

付記11 反応停止液

硫酸 110 mL

水 1,000 mL

付記12 ウイルス増殖用培養液

1,000 mL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 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13 第1次重層寒天培地

ウイルス増殖用培養液に寒天を1 w/v %となるように加えたもの

付記14 第2次重層寒天培地

第1次重層寒天培地に0.5 w/v %ニュートラルレッド液を2 vol %となるように加えたもの

付記15 固相化緩衝液

1,000 mL中	
リン酸二水素ナトリウム二水和物	1.43 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	12.10 g
塩化ナトリウム	8.5 g
水	残量

pH を6.9～7.1に調整する。

付記16 七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原

製造用株を生ワクチン製造用材料の規格2.1.1の鶏胚初代細胞に接種し、38℃で培養する。CPEが出現したときに培養上清を採取し、感染細胞は少量の培養液でかきとり、超音波破碎を行う。感染細胞を超音波破碎後遠心（3,000*G*、10分間）し、その遠心上清と製造用株培養上清をプールする。次に30,000*G*、1時間遠心し、沈渣を少量の滅菌水に再浮遊する。再浮遊したもののシヨ糖密度勾配遠心（53,000*G*、1時間）した後、上層を採取し、これをELISA抗原とする。

参照陽性血清の100倍希釈液の吸光度値を測定するとき0.8以上及び参照陰性血清では0.2以下を示すように調整する。

付記17 IB・EIA緩衝液

1,000 mL中	
リン酸二水素ナトリウム二水和物	2.31 g
リン酸水素二ナトリウム二水和物	24.06 g
塩化ナトリウム	29.22 g
カオリン処理30 w/v %牛血清アルブミン	3.3 mL
ポリソルベート20	0.50 g
水	残量

200nmでろ過滅菌後、スキムミルク 2 w/v %及び牛胎子血清 5 vol %を加える。

付記18 山羊抗鶏IgGペルオキシダーゼ標識抗体

参照陽性血清が規定の抗体価を示すようにIB・EIA緩衝液で調整したもの

付記19 参照陰性血清

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の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抗体価 $2^{4.64}$ 倍未満を示すもの

付記20 参照陽性血清

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の七面鳥鼻気管炎ウイルスに対する抗体陰性の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抗体価 $2^{8.64}$ ～ $2^{9.64}$ 倍を示すもの