

ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎3価・産卵低下症候群－1976・鶏伝染性コリーザ（A・C型）・マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン

平成26年11月6日（告示第1554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3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、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並びにヘモフィルス・パラガリナルム（A型菌及びC型菌）及びマイコプラズマ・ガリセプチカムの培養菌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

2.1.1.1 名称

ニューカッスル病ウイルス石井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

2.1.2.1 名称

鶏伝染性気管支炎ウイルス滋賀株、AO-27株及びGN-58株、又は製造に相当と認められた3種類の株

2.1.2.2 性状

10日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射すると、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

2.1.3.1 名称

産卵低下症候群－1976ウイルス台畜株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

10～12日齢の発育あひる卵の尿膜腔内に注射すると、増殖し、その尿膜腔液に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、あひる胚肝細胞で継代する。

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 ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌

2.1.4.1 名称

ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌 No.221 株又はこれと同等と認められた株

2.1.4.2 性状

鶏及び発育鶏卵に対して病原性を示す。牛、馬、羊、鶏及びモルモットの赤血球を凝集する。

2.1.4.3 継代及び保存

原株及び種菌は、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、種菌では2代以内でなければならない。

原株及び種菌は、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。

2.1.5 ヘモフィルス・パラガリナルムC型菌

2.1.5.1 名称

ヘモフィルス・パラガリナルムC型菌 KA 株又はこれと同等と認められた株

2.1.5.2 性状

鶏及び発育鶏卵に対して病原性を示す。

2.1.5.3 継代及び保存

原株及び種菌は、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、種菌では2代以内でなければならない。

原株及び種菌は、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。

2.1.6 マイコプラズマ・ガリセプチカム

2.1.6.1 名称

マイコプラズマ・ガリセプチカム TK 株又はこれと同等と認められた株

2.1.6.2 性状

鶏に対して病原性を示す。

2.1.6.3 継代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株では3代以内、種菌では2代以内でなければならない。

原株及び種菌は、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 発育あひる卵

10～12日齢のものを用いる。

2.2.4 ヘモフィルス・パラガリナルムの各型菌

2.2.4.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.2.5 マイコプラズマ・ガリセプチカム

2.2.5.1 培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

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相当と認められた方法で濃縮したもの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、原液とする。

原液について、3.5.1 及び 3.5.2.1 の試験を行う。

2.3.2 鶏伝染性気管支炎ウイルスの各株原液

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、3.1.1 の試験を行う。

2.3.2.2 ウイルス培養

各株の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相当と認められた方法で濃縮したものをそれぞれ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

各株のウイルス浮遊液にホルマリンを加えて不活化し、それぞれの株の原液とする。

原液について、3.5.1 及び 3.5.2.2 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別発育あひる卵とみなす。

個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。

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、不活化したものを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、3.4 の試験を行う。

不活化ウイルス浮遊液を相当と認められた方法で濃縮したものを原液とする。

原液について、3.5.1 及び 3.5.3 の試験を行う。

2.3.4 ヘモフィルス・パラガリナルムの各型菌原液

2.3.4.1 培養

種菌を製造用培地に接種したものを更に製造用培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.3.1 の試験を行う。

2.3.4.2 不活化

培養菌液を相当と認められた方法で濃縮したものにホルマリンを加え、不活化したものを原液とする。

原液について、3.5.1、3.5.2.3 及び 3.5.4 の試験を行う。

2.3.5 マイコプラズマ・ガリセプチカム原液

2.3.5.1 培養

種菌を製造用培地で培養したものを更に製造用培地に接種・継代し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.3 の試験を行う。

2.3.5.2 不活化

培養菌液を適当と認められた方法で濃縮したものにホルマリンを加え、不活化したものを原液とする。

原液について、3.5.1 及び 3.5.2.4 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各株原液、産卵低下症候群ー 1976 ウイルス原液、ヘモフィルス・パラガリナルム各型菌原液及びマイコプラズマ・ガリセプチカム原液をそれぞれ濃度調整して混合し、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、3.6 の試験を行う。

3 試験法

3.1 発育卵の試験

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 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、これについて次の試験を行う。

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、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、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、1 mL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の各株

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9～10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個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で7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、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^{8.0}EID₅₀以上でなければならない。

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

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。

3.2.1.3.1.2 発育あひる卵

12日齢のものを用いる。

3.2.1.3.2 試験方法

試料 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℃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、0.5vol %鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

3.2.1.3.3 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、1 mL中10^{8.0}EID₅₀以上でなければならない。

3.3 培養菌液の試験

3.3.1 夾雑菌否定試験

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 生菌数試験

3.3.2.1 マイコプラズマ・ガリセプチカム

3.3.2.1.1 試験材料

3.3.2.1.1.1 試料

検体を適当と認められた希釈液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.2.1.1.2 培地

適当と認められた培地を用いる。

3.3.2.1.2 試験方法

各試料 0.1mL ずつをそれぞれ2枚以上の培地に接種して培養し、37℃、5 vol %炭酸ガス下で14日間培養後、集落数を数える。

3.3.2.1.3 判定

各段階の希釈ごとの集落数から生菌数を算出する。

検体の生菌数は、1 mL 中 $10^{8.0}$ 個以上でなければならない。

3.4 不活化ウイルス浮遊液の試験

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 試験材料

3.4.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.4.2.1.2 発育あひる卵

12日齢のものを用いる。

3.4.2.2 試験方法

注射材料 0.2mL ずつを10個以上の発育あひる卵の尿膜腔内に注射し、37℃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、0.5vol %鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

3.4.2.3 判定

あひる胚は、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。

3.4.3 赤血球凝集価測定試験

3.4.3.1 試験材料

3.4.3.1.1 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。

3.4.3.2 試験方法

試料と等量の 0.5vol %鶏赤血球浮遊液を混合し、60分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

3.4.3.3 判定

赤血球凝集を認めた試料の最高希釈倍数を赤血球凝集価とする。

検体の赤血球凝集価は、所定の値以上でなければならない。

3.5 原液の試験

3.5.1 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。

3.5.2 不活化試験

3.5.2.1 ニューカッスル病ウイルス

3.5.2.1.1 試験材料

3.5.2.1.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.5.2.1.1.2 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。

3.5.2.1.2 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、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。

3.5.2.1.3 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。

3.5.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルスの各株

3.5.2.2.1 試験材料

3.5.2.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.5.2.2.1.2 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。

3.5.2.2.2 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、観察する。

3.5.2.2.3 判定

鶏胚は、正常に発育しなければならず、

3.5.2.3 ヘモフィルス・パラガリナルムの各型菌

3.5.2.3.1 試験材料

3.5.2.3.1.1 接種材料

検体を接種材料とする。

3.5.2.3.1.2 培地

適当と認められた培地を用いる。

3.5.2.3.2 試験方法

接種材料 0.1mL ずつを 2 枚以上の培地に接種して培地表面に拡散させ、37℃、5 vol %炭酸ガス下で 48 時間培養後、集落の有無を観察する。

3.5.2.3.3 判定

接種材料を接種した全ての培地上にヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌又はヘモフィルス・パラガリナルム C 型菌の集落を認めてはならない。

3.5.2.4 マイコプラズマ・ガリセプチカム

3.5.2.4.1 試験材料

3.5.2.4.1.1 接種材料

検体を接種材料とする。

3.5.2.4.1.2 培地

適当と認められた培地を用いる。

3.5.2.4.2 試験方法

接種材料 0.1mL ずつを 2 枚以上の培地に接種して培地表面に拡散させ、37℃、5 vol %炭酸ガス下で 10 日間培養する。

3.5.2.4.3 判定

接種材料を接種した全ての培地上にマイコプラズマ・ガリセプチカムの集落を認めてはならない。

3.5.3 赤血球凝集価測定試験

3.4.3 を準用して試験するとき、検体の赤血球凝集価は、不活化ウイルス浮遊液のその 10 倍の値を示さなければならない。

3.5.4 総菌数試験

3.5.4.1 試験材料

検体又は検体をリン酸緩衝食塩液で適度に希釈したものを試験材料とする。

3.5.4.2 試験方法

試験材料の濁度を分光光度計で測定する。

3.5.4.3 判定

標準検量線、濁度の測定値及び検体の希釈度から総菌数を算出する。

検体の総菌数は、1 mL 中 $10^{9.0}$ 個以上でなければならない。

3.6 小分製品の試験

3.6.1 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。

3.6.2 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。

3.6.3 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、0.12vol %以下でなければならない。

3.6.4 安全試験

3.6.4.1 試験材料

3.6.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.6.4.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 30～35 日齢の鶏を用いる。

3.6.4.2 試験方法

試験動物の 10 羽を試験群、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、対照群と共に 5 週間観察し、試験最終日に注射部位を剖検する。

3.6.4.3 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。また、剖検したとき、注射部位に著しい異常を認めてはならない。

3.6.5 力価試験

3.6.5.1 ニューカッスル病力価試験

3.6.5.1.1 試験材料

3.6.5.1.1.1 試験動物

3.6.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.6.5.1.1.2 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。

3.6.5.1.2 試験方法

3.6.4 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。

3.6.5.1.3 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（以下この項において「HI 抗体価」という。）とする。

試験群から得られた 80 %以上の個体の血清が HI 抗体価 160 倍以上でなければならない。この場合、対照群から得られた全ての個体の血清が HI 抗体価 5 倍以下でなければならない。

3.6.5.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

3.6.5.2.1 試験材料

3.6.5.2.1.1 試験動物

3.6.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.6.5.2.1.2 中和試験用ウイルス

各製造用株又は適当と認められた株を用いる。

3.6.5.2.1.3 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.2.1 の鶏腎初代細胞をシャーレで培養し、単層となったものを用いる。

3.6.5.2.2 試験方法

3.6.4 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、血清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。

血清を細胞増殖用培養液（付記1）で20倍に希釈した後、更に5倍階段希釈し、各段階の希釈液に0.4mL中200PFUとなるように濃度を調整した中和試験用ウイルス液を等量混合し、4℃で18～24時間又は37℃で60分間処理する。処理した液0.4mLずつをそれぞれ4枚以上の培養細胞に接種し、37℃、5 vol %炭酸ガス下で60分間吸着させ第1次重層寒天培地（付記2）を重層し、2日後更に第2次重層寒天培地（付記3）を重層し、24～48時間培養し、ブラックの出現を観察する。

3.6.5.2.3 判定

各希釈系列のブラック平均数から50%ブラック減少を示す血清希釈倍数を求め、中和抗体価を算出する。

中和試験用ウイルス各株に対する試験群の中和抗体価は、それぞれ100倍以上でなければならない。この場合、対照群の中和抗体価は、20倍以下でなければならない。

3.6.5.3 産卵低下症候群－1976力価試験

3.6.5.3.1 試験材料

3.6.5.3.1.1 試験動物

3.6.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.6.5.3.1.2 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4）を用いる。

3.6.5.3.2 試験方法

3.6.4 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%カオリン液（付記5）3容を加え、20分間処理した後、1,000G、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、30分間処理した後、0.5vol%鶏赤血球浮遊液を50μLずつ加えて振とう混和し、60分間静置した後に、赤血球凝集の有無を観察する。

3.6.5.3.3 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。

試験群から得られた80%以上の個体の血清がHI抗体価32倍以上でなければならない。この場合、対照群から得られた全ての個体の血清がHI抗体価4倍未満でなければならない。

3.6.5.4 鶏伝染性コリーザ（A・C型）力価試験

3.6.5.4.1 試験材料

3.6.5.4.1.1 試験動物

3.6.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.6.5.4.1.2 赤血球凝集抗原

「鶏伝染性コリーザ（A型）診断用赤血球凝集抗原」及び鶏伝染性コリーザ（C型）赤血球凝集抗原（付記6）を用いる。

3.6.5.4.2 試験方法

3.6.4 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、鶏伝染性コリーザ（A型）赤血球凝集抑制試験及び鶏伝染性コリーザ（C型）赤血球凝集抑制試験を行う。

3.6.5.4.3 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。

HI 抗体価 5 倍以上を陽性とする。

それぞれの赤血球凝集抑制試験において、試験群から得られた 70 %以上の個体の血清が陽性でなければならない。この場合、対照群から得られた全ての個体の血清が陰性でなければならない。

3.6.5.5 マイコプラズマ・ガリセプチカム力価試験

3.6.5.5.1 試験材料

3.6.5.5.1.1 試験動物

3.6.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.6.5.5.1.2 赤血球凝集抗原

マイコプラズマ・ガリセプチカム赤血球凝集抗原（付記 7）を用いる。

3.6.5.5.2 試験方法

3.6.4 の試験の注射後 4 週目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、マイコプラズマ・ガリセプチカム赤血球凝集抑制試験を行う。

血清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 単位のマイコプラズマ・ガリセプチカム赤血球凝集抗原を加えて混合し、15 ~ 20 分間処理した後、0.25vol % 鶏赤血球浮遊液を 50 μ L ずつ加えて振とう混合し、4 $^{\circ}$ C で一夜処理した後、赤血球凝集の有無を観察する。

3.6.5.5.3 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。

試験群から得られた各個体の血清の HI 抗体価の幾何平均値は、37 倍を超えなければならない。

この場合、対照群から得られた各個体の血清は、HI 抗体価 4 倍未満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 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

牛血清 50 mL

イーグル MEM 残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 6.8 ~ 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 2 第 1 次重層寒天培地

1,000mL 中

酵母エキス 1 g

ラクトアルブミン 5 g

牛血清アルブミン 10 g

牛血清 20 mL

寒天 9 g

アール液 残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 6.8 ~ 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 3 第 2 次重層寒天培地

1,000mL 中	
酵母エキス	1 g
ラクトアルブミン	5 g
ニュートラルレッド	120 mg
寒天	9 g
アール液	残 量
炭酸水素ナトリウムで pH を 6.8 ～ 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 4 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 0.2vol % になるようにホルマリンを加えて不活化したもの。

付記 5 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

付記 6 鶏伝染性コリーザ（C型）赤血球凝集抗原

ヘモフィルス・パラガリナルム C 型菌を適当な方法で処理し、1 vol % 固定鶏赤血球を用いて反応を行うとき、赤血球凝集価が 80 倍以上のもの。

付記 7 マイコプラズマ・ガリセプチカム赤血球凝集抗原

製造用株を培養し、ホルマリンを加えて不活化した菌液を遠心洗浄後、再浮遊し、これにグリセリンを等量加え、－ 20℃以下に保存したもの。