

# トリニューモウイルス感染症生ワクチン（シード）

平成22年3月3日（告示第394号）新規追加

令和2年6月30日（告示第1246号）一部改正

## 1 定義

シードロット規格に適合した弱毒七面鳥鼻気管炎ウイルス又は弱毒鶏由来トリニューモウイルスを同規格に適合した培養細胞で増殖させて得たウイルス液を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 七面鳥鼻気管炎ウイルス

##### 2.1.1.1 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

##### 2.1.1.2 性状

7日齢の鶏に点鼻又は点眼接種しても病原性を示さない。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。

##### 2.1.1.3 マスターシードウイルス

###### 2.1.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、SPF動物規格の2.6に適合した鶏胚初代細胞又は適当と認められた細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。

マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、5代以内でなければならない。

##### 2.1.1.4 ワーキングシードウイルス

###### 2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、SPF動物規格の2.6に適合した鶏胚初代細胞又は適当と認められた細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2 の試験を行う。

#### 2.1.1.5 プロダクションシードウイルス

##### 2.1.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、SPF 動物規格の 2.6 に適合した鶏胚初代細胞又は相当と認められた細胞で増殖する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、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。

プロダクションシードウイルスを保存する場合について、3.1.3の試験を行う。

#### 2.1.2 鶏由来トリニューモウイルス

##### 2.1.2.1 名称

弱毒鶏由来トリニューモウイルス PL21株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.2.2 性状

1日齢の鶏に点鼻又は点眼接種しても、病原性を示さない。Vero 細胞に接種すると、CPE を伴って増殖する。

##### 2.1.2.3 マスターシードウイルス

###### 2.1.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、Vero 細胞又は相当と認められた細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、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。

マスターシードウイルスについて、3.1.1の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。

マスターシードウイルスから小分製品までの継代数は、5代以内でなければならない。

##### 2.1.2.4 ワーキングシードウイルス

###### 2.1.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、Vero 細胞又は相当と認められた細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、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。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2 の試験を行う。

##### 2.1.2.5 プロダクションシードウイルス

###### 2.1.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、Vero細胞又は相当と認められた細胞で増殖する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、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。

プロダクションシードウイルスを保存する場合について、3.1.3の試験を行う。

#### 2.2 製造用材料

##### 2.2.1 七面鳥鼻気管炎ウイルス

#### 2.2.1.1 初代細胞

SPF動物規格の 2.6に適合した鶏胚初代細胞又は製造に相当と認められた初代細胞を用いる。

#### 2.2.1.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

#### 2.2.1.3 マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）

##### 2.2.1.3.1 増殖、継代及び保存

マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）は、2.2.1.2の培養液で増殖及び継代し、保存しない。

マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）について、3.2.1の試験を行う。

#### 2.2.2 鶏由来トリニューモウイルス

##### 2.2.2.1 株化細胞

Vero細胞又は製造に相当と認められた株化細胞を用いる。

##### 2.2.2.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

##### 2.2.2.3 マスターセルシード

###### 2.2.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターセルシードは、2.2.2.2の培養液で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターセルシードは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

マスターセルシードについて、3.3.1の試験を行う。

マスターセルシードは、ワクチンの製造又は試験以外の目的で継代しない。マスターセルシードからプロダクションセルシードまでの最高継代数は 20代以内でなければならない。

##### 2.2.2.4 ワーキングセルシード

###### 2.2.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.2.2の培養液で増殖する。

ワーキングセルシードは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングセルシードについて、3.3.2の試験を行う。

##### 2.2.2.5 プロダクションセルシード

###### 2.2.2.5.1 増殖、継代及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.2.2の培養液で増殖する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

プロダクションセルシードを保存する場合について、3.3.3の試験を行う。

#### 2.3 原液

### 2.3.1 マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）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。ウイルス接種前の個別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、3.4の試験を行う。

### 2.3.2 プロダクションセルシードの培養

1 回に処理し、培養した細胞を個別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の個別培養細胞に異常を認めてはならない。

### 2.3.3 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを 2.3.1又は 2.3.2の細胞で培養し、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及び超音波処理した感染細胞の遠心上清を混合したもの、又は培養液のろ液もしくは遠心上清を原液とする。原液に相当と認められた凍害防止剤を加えてもよい。

原液について、3.5の試験を行う。

## 2.4最終バルク

原液を混合し、相当と認められた安定剤を加えて調整し、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。

小分製品について、3.6の試験を行う。

## 3 試験法

### 3.1 製造用株の試験

#### 3.1.1 マスターシードウイルスの試験

##### 3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の 1.4.2.1.1.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.1.2 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。

##### 3.1.1.3 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。

##### 3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

###### 3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 2.1 及び 2.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験

###### 3.1.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験

鶏胚初代細胞を用いる場合には、鶏脳脊髄炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 3.1.2 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、鶏脳

脊髄炎ウイルスについて 3.1.1.4.2.2に規定する試験を適用する製剤については、本試験を実施しなくてよい。

Vero 細胞を用いる場合には、鶏脳脊髄炎ウイルス及び内在性レトロウイルス（C、Dタイプ粒子）について、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 3.1 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、鶏脳脊髄炎ウイルスについて 3.1.1.4.2.2 に規定する試験を適用する製剤については、3.1.2の試験を実施しなくてよい。

#### 3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

鶏胚初代細胞を用いる場合には、鶏白血病ウイルス、細網内皮症ウイルス及び鶏脳脊髄炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 3.2.1、3.2.2 及び 3.2.10 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、鶏脳脊髄炎ウイルスについて 3.1.1.4.2.1 に規定する試験を適用する製剤については、3.2.10の試験を実施しなくてもよい。

Vero 細胞を用いる場合には、鶏白血病ウイルス、細網内皮症ウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス、日本脳炎ウイルス又は狂犬病ウイルス及び鶏脳脊髄炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 3.2.1、3.2.2、3.2.5、3.2.9 及び 3.2.10 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、鶏脳脊髄炎ウイルスについて 3.1.1.4.2.1 に規定する試験を適用する製剤については、3.2.10 の試験を実施しなくてよい。

#### 3.1.1.5 対象動物を用いた免疫原性試験

一般試験法の対象動物を用いた免疫原性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。

#### 3.1.1.6 対象動物を用いた安全性確認試験

一般試験法の対象動物を用いた安全性確認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。

#### 3.1.1.7 病原性復帰確認試験

一般試験法の病原性復帰確認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。

#### 3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

##### 3.1.2.1 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。

##### 3.1.2.2 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。

#### 3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

##### 3.1.3.1 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。

##### 3.1.3.2 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。

### 3.2 初代細胞の試験

#### 3.2.1 マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）の試験

##### 3.2.1.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.2.4.2.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.2.1.2 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。

##### 3.2.1.3 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。

### 3.3 株化細胞の試験

#### 3.3.1 マスターセルシードの試験

##### 3.3.1.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.3.1.2 起源動物種同定試験

シードロット規格の 2.1.4.2.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.3.1.3 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。

##### 3.3.1.4 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。

##### 3.3.1.5 外来性ウイルス否定試験

###### 3.3.1.5.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 2.1 及び 2.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.3.1.5.2 特定ウイルス否定試験

###### 3.3.1.5.2.1 特定ウイルス否定一般試験

内在性レトロウイルス（C、Dタイプ粒子）及び鶏脳脊髄炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 3.1.1及び 3.1.2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、鶏脳脊髄炎ウイルスについて 3.3.1.5.2.2 に規定する試験を適用する製剤については、3.1.2 の試験を実施しなくてもよい。

###### 3.3.1.5.2.2 個別ウイルス否定試験

鶏白血病ウイルス、細網内皮症ウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス、日本脳炎ウイルス又は狂犬病ウイルス及び鶏脳脊髄炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 3.2.1、3.2.2、3.2.5、3.2.9 及び 3.2.10 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、鶏脳脊髄炎ウイルスについて 3.3.1.5.2.1 に規定する試験を適用する製剤については、3.2.10 の試験を実施しなくてもよい。

### 3.3.1.6 核学的（染色体）性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.1.6.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.3.1.7 腫瘍形成性／腫瘍原性試験

シードロット規格の 2.1.4.2.1.7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 ワーキングセルシードの試験

### 3.3.2.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.2.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.3.2.2 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。

### 3.3.2.3 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。

## 3.3.3 プロダクションセルシードの試験

### 3.3.3.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.3.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

### 3.3.3.2 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。

### 3.3.3.3 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。

## 3.4 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。

### 3.4.1 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。

### 3.4.2 鶏赤血球凝集試験

3.4.1 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。

## 3.5 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 ウイルス含有量試験

3.5.2.1又は 3.5.2.2のいずれかの試験を行う。

#### 3.5.2.1 鶏胚初代細胞接種試験

##### 3.5.2.1.1 試験材料

###### 3.5.2.1.1.1 試料

検体を細胞増殖用培養液（付記1）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。

#### 3.5.2.1.1.2 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。

#### 3.5.2.1.2 試験方法

試料 0.2mL 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。

#### 3.5.2.1.3 判定

培養細胞にCPEを認めた場合を感染とみなし、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>6.5</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

#### 3.5.2.2 Vero 細胞接種試験法

##### 3.5.2.2.1 試験材料

##### 3.5.2.2.1.1 試料

検体を細胞維持用培養液（付記2）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.5.2.2.1.2 培養細胞

Vero細胞を96穴組織培養プレートに培養し、単層となったものを用いる。

##### 3.5.2.2.2 試験方法

試料 0.2mL ずつを、それぞれ5穴以上の培養細胞に接種し、37℃で7～9日間培養し、観察する。

##### 3.5.2.2.3 判定

培養細胞にCPEを認めた場合を感染とみなし、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>6.0</sup>TCID<sub>50</sub>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。

##### 3.6.2 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。

##### 3.6.3 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。

##### 3.6.4 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。

##### 3.6.5 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。



### 3.6.6 ウイルス含有量試験

3.5.2.1 を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1羽当たり  $10^{3.0}$ 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。

3.5.2.2 を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1羽当たり  $10^{2.6}$ 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。

### 3.6.7 安全試験

3.6.7.1 又は 3.6.7.2 のいずれかの試験を行う。

#### 3.6.7.1 7日齢鶏接種試験

##### 3.6.7.1.1 試験材料

###### 3.6.7.1.1.1 接種材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で 0.03mL 中 10羽分になるように調整したものを接種材料とする。

###### 3.6.7.1.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1由来の7日齢の鶏を用いる。

##### 3.6.7.1.2 試験方法

試験動物 10羽を試験群、5羽を対照群とする。

接種材料の 0.03mL ずつを試験群に点眼接種し、対照群とともに、3週間観察する。ただし、体重については、試験開始時及び試験終了時に測定する。

##### 3.6.7.1.3 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。

#### 3.6.7.2 4日齢鶏接種試験

##### 3.6.7.2.1 試験材料

###### 3.6.7.2.1.1 接種材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で 0.03mL 中 10羽分になるように調整したものを接種材料とする。

###### 3.6.7.2.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1由来の4日齢の鶏を用いる。

##### 3.6.7.2.2 試験方法

試験動物 10羽を試験群、5羽を対照群とする。

接種材料の 0.03mL ずつを試験群に点眼接種し、対照群とともに、3週間観察する。ただし、体重については、試験開始時及び試験終了時に測定する。

##### 3.6.7.2.3 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。

### 3.6.8 力価試験

3.6.8.1 又は 3.6.8.2 のいずれかの試験を行う。

### 3.6.8.1 酵素抗体反応（以下「ELISA」という。） A法

#### 3.6.8.1.1 試験材料

##### 3.6.8.1.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

##### 3.6.8.1.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1由来の7日齢の鶏を用いる。

#### 3.6.8.1.2 試験方法

試験動物 10羽を試験群、5羽を対照群とする。

接種材料 1羽分ずつを試験群に点眼接種し、3週間後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により抗体価を測定する。

七面鳥鼻気管炎ウイルス参照陽性血清（付記3）、七面鳥鼻気管炎ウイルス参照陰性血清（付記4）並びに試験群及び対照群の被験血清を IB・EIA 緩衝液（付記5）で2倍階段希釈し、七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原固相化プレート（付記6）に各希釈血清を 100 µL 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（付記7）で2回洗浄し、山羊抗鶏 IgG ペルオキシダーゼ標識抗体（付記8）を 100 µL 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2回洗浄し、七面鳥鼻気管炎ウイルス用基質液（付記9）を 100 µL ずつ加え、8分間反応させる。反応終了後、反応停止液（付記10）を 50 µL ずつ加えて反応を停止させ、波長 450nmで吸光度値を測定する。

##### 3.6.8.1.3 判定

七面鳥鼻気管炎ウイルス参照陰性血清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。

試験群の 70 %以上が ELISA 抗体価  $2^{6.64}$  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。七面鳥鼻気管炎ウイルス参照陽性血清は  $2^{6.64}$  倍以上の抗体価を示さなければならない。

### 3.6.8.2 ELISA B法

#### 3.6.8.2.1 試験材料

##### 3.6.8.2.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

##### 3.6.8.2.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 7 日齢の鶏を用いる。

#### 3.6.8.2.2 試験方法

試験動物 10 羽を試験群とし、5羽を対照群とする。

接種材料 1羽分ずつを試験群に点鼻接種し、4週間後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 抗体価を測定する。

鶏由来トリニューモウイルス抗原固相化プレート（付記11）にブロッキング液（付記

12) を 100 $\mu$ L ずつ分注し、37 $^{\circ}$ Cで 60 分間反応後、洗浄用希釈液（付記 13）で 3 回洗浄する。次に、鶏由来トリニューモウイルス参照陽性血清（付記 14）、鶏由来トリニューモウイルス参照陰性血清（付記 15）並びに試験群及び対照群の被験血清を、それぞれ洗浄用希釈液で 50 倍に希釈する。各希釈血清 100 $\mu$ L を固相化プレートの 2 穴ずつに加え、37 $^{\circ}$ Cで 60 分間反応させる。ブランクとして 2 穴を設ける。反応終了後、洗浄用希釈液で 3 回洗浄し、ウサギ抗鶏 IgG ペルオキシダーゼ標識抗体（付記 16）を 100 $\mu$ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで 60 分間反応させる。反応終了後、洗浄用希釈液で 3 回洗浄し、鶏由来トリニューモウイルス用基質液（付記 17）を 100 $\mu$ L ずつ加え、遮光して 10分間反応させる。反応終了後、0.5mol/L 硫酸を 50 $\mu$ L ずつ加えて、反応を停止させ、波長 490nmで吸光度値を測定する。

### 3.6.8.2.3 判定

各血清の平均読み取り値からブランクの平均読み取り値を差し引いた値を、各血清の平均吸光度値として、次式により S/P 値を算出する。

$$\text{S/P 値} = (\text{被験血清の平均吸光度値} / \text{参照陽性血清の平均吸光度値}) \times 100$$

試験群の平均 S/P 値は 30 以上、対照群の平均 S/P 値は 10 未満でなければならない。この場合、鶏由来トリニューモウイルス参照陽性血清の平均吸光度値は 1.2 ~ 1.8、鶏由来トリニューモウイルス参照陰性血清の S/P 値は 5 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 3 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 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 2 細胞維持用培養液

1,000mL 中

牛血清	0 ~ 20 mL
イーグル MEM 又は F10 培地	残量

炭酸水素ナトリウムで pH を 6.8 ~ 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 七面鳥鼻気管炎ウイルス参照陽性血清

弱毒七面鳥鼻気管炎ウイルスで免疫した生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏の血清で、ELISA抗体価  $2^{8.64} \sim 2^{9.64}$ 倍を示すもの

付記4 七面鳥鼻気管炎ウイルス参照陰性血清

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

付記5 IB・EIA 緩衝液

1,000mL 中

リン酸二水素ナトリウム十二水和物	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 30w/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 でろ過滅菌をした後、スキムミルク 2 w/v%及び牛胎子血清 5 vol%を加える。

付記6 七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原固相化プレート

製造用株を生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞で増殖させて得られたウイルス液及び感染細胞の超音波処理後の遠心上清をプールし、超遠心後の上層を七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原とする。

七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原を七面鳥鼻気管炎ウイルス用固相化緩衝液（付記 18）で、七面鳥鼻気管炎ウイルス参照陽性血清の 100 倍希釈液の吸光度値が 0.8 以上及び七面鳥鼻気管炎ウイルス参照陰性血清が 0.2 以下を示すように濃度調整し、96 穴平底マイクロプレートに 100 $\mu$ L ずつ分注して 37 $^{\circ}$ Cで3時間静置した後、洗浄用緩衝液で3回洗浄した後、乾燥させたものである。

付記7 洗浄用緩衝液

1,000mL 中

無水リン酸水素二ナトリウム	2.9 g
無水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 80	1.5 g

水 残量  
pHを 6.9～ 7.1に調整する。

付記 8 山羊抗鶏 IgGペルオキシダーゼ標識抗体

七面鳥鼻気管炎ウイルス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 9 七面鳥鼻気管炎ウイルス用基質液

TMB 溶液	0.2 mL
UP 緩衝液	1.5 mL
水	15 mL

TMB 溶液は、DMSO1,000mL に TMB (3,3',5,5'テトラメチルベンチジン) を 6 g 溶かしたもの

UP 緩衝液は、尿素過酸化 140mg を TMB 緩衝液 (酢酸ナトリウム 136g を約 500mL の精製水に溶かし、1.5mol/L クエン酸で pH5.3 ～ 5.7 に調整した後、水を加え、1000mL としたもの) 100mLに溶かしたもの

付記 10 反応停止液

硫酸	110 mL
水	1,000 mL

付記 11 鶏由来トリニューモウイルス抗原固相化プレート

製造用株を Vero 細胞で増殖させて得られたウイルス液及び細胞を、凍結融解し、超遠心処理を行った後、界面活性剤及び超音波処理して鶏由来トリニューモウイルス抗原とする。鶏由来トリニューモウイルス抗原を、鶏由来トリニューモウイルス用固相化緩衝液 (付記 19) でたん白濃度が約 2  $\mu$ g/mL となるように濃度調整し、96 穴平底マイクロプレートに 100  $\mu$ L ずつ分注して 4  $^{\circ}$ C で一夜静置後、洗浄用希釈液で 3 回洗浄した後、乾燥させたものであり、-20  $^{\circ}$ C で保存する。

付記 12 ブロッキング液

1,000mL 中	
牛血清アルブミン	10 g
リン酸緩衝食塩液	残量

付記 13 洗浄用希釈液

1,000mL 中

塩化ナトリウム	58.45 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	2.69 g
リン酸二水素ナトリウム二水和物	0.39 g
ポリソルベート 20	0.5 mL
水	残 量

付記 14 鶏由来トリニューモウイルス参照陽性血清

鶏由来トリニューモウイルス製造用株で免疫した生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏の血清であって、中和抗体価 640 ~ 2560 倍を示すもの

付記 15 鶏由来トリニューモウイルス参照陰性血清

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏から得た血清であって、鶏由来トリニューモウイルスの ELISA 法で測定した場合には、S/P 値が5以下を示すもの

付記 16 ウサギ抗鶏 IgG ペルオキシダーゼ標識抗体

鶏由来トリニューモウイルス参照陽性血清の平均吸光度値が 1.2 ~ 1.8、鶏由来トリニューモウイルス参照陰性血清の S/P 値が5以下を示すように調整したもの

付記 17 鶏由来トリニューモウイルス用基質液

1,000mL 中	
o-フェニレンジアミン二塩酸塩	0.26 g
30vol %過酸化水素水	0.3 mL
基質緩衝液	残 量

基質緩衝液は、0.1mol/L クエン酸液 243mL と 0.2mol/L リン酸水素二ナトリウム 257mLを混合したものに、水を加えて 1,000mL としたもの

付記 18 七面鳥鼻気管炎ウイルス用固相化緩衝液

1,000mL 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	8.50 g
水	残 量

付記 19 鶏由来トリニューモウイルス用固相化緩衝液

1,000mL 中	
炭酸ナトリウム	1.5 g

炭酸水素ナトリウム  
水

2.93 g  
残 量