

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

平成 30 年 3 月 8 日（告示第 471 号）新規追加
令和 7 年 4 月 4 日（告示第 542 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支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 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℃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 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℃以下又は凍結乾燥して 5℃以下で保存する。

2.1.4 七面鳥鼻気管支炎ウイルス株

2.1.4.1 名称

弱毒七面鳥鼻気管支炎ウイルス 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°C 以下凍結乾燥して 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

10～12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

9～10日齢のものを用いる。

2.2.4 七面鳥鼻気管支炎ウイルス

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 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をウイルス浮遊液とする。

2.3.1.2 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 3.2.1.1 の試験を行う。

2.3.1.3 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、3.3.1 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 3.3.2.1 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 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ろ液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、3.1.1.1 の試験を行う。

2.3.2.2 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たもの又は不活化後に濃縮したものを、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、3.2.1.2 の試験を行う。

2.3.2.3 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、3.3.1 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 ウイルスの培養

ウイルス浮遊液を製剤ごとに農林水産大臣が相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。

2.3.3.2 不活化

ウイルス浮遊液を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、3.2.1.3、3.3.1 及び 3.3.2.2 の試験を行う。

2.3.4 七面鳥鼻気管炎ウイルス

2.3.4.1 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感染細胞を含む培養液を超音波処理したものをウイルス浮遊液とする。

2.3.4.2 不活化

ウイルス浮遊液にβ-プロピオラク톤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、3.2.1.4 の試験を行う。

2.3.4.3 アジュバントの添加

不活化ウイルス浮遊液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、3.3.1 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 3.3.2.3 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、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、3.4 の試験を行う。

3 試験法

3.1 ウイルス浮遊液の試験

3.1.1 ウイルス含有量試験

3.1.1.1 鶏伝染性気管支炎ウイルス

3.1.1.1.1 試験材料

3.1.1.1.1.1 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。

3.1.1.1.1.2 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。

3.1.1.1.2 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°C 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。

3.1.1.1.3 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 249g 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 不活化ウイルス浮遊液の試験

3.2.1 不活化試験

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 注射材料

検体を注射材料とする。

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 9～12 日齢のものを用いる。

3.2.1.1.2 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°C 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°C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。

3.2.1.1.3 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。

3.2.1.2 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 注射材料

検体を注射試料とする。

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

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°Cで5日間培養して観察する。

3.2.1.2.3 判定

鶏胚は、正常に発育しなければならぬ。

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。

3.2.1.3.1.2 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。

3.2.1.3.2 試験方法

試料を培養細胞に接種し、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。

3.2.1.3.3 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。

3.2.1.4 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 の鶏胚初代細胞を用いる。

3.2.1.4.2 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、36～38°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、5日間培養して観察する。

3.2.1.4.3 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。

3.3 原液の試験

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 抗原含有量試験

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 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。

3.3.2.1.2 試験方法

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

3.3.2.1.3 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。

3.3.2.2 産卵低下症候群－1976 ウイルス

3.3.2.2.1 試験材料

3.3.2.2.1.1 試料

検体を生理食塩液で 2 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.2.2.2 試験方法

各試料 50 μ L に鶏赤血球浮遊液を 25 μ L 加え、室温に静置する。

3.3.2.2.3 判定

赤血球凝集を示す試料の最高希釈倍数を HA 単位で示す。
抗原量は 50 μ L 中 4096HA 単位以上でなければならない。

3.3.2.3 七面鳥鼻気管炎ウイルス

3.3.2.3.1 試験材料

3.3.2.3.1.1 試料

検体を ELISA 緩衝液（付記 1）で 6 倍に希釈し、更に 1.5 倍階段希釈した希釈液を試料とする。

3.3.2.3.2 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 ELISA プレート（付記 2）に試料及び ELISA 緩衝液で 1.5 倍階段希釈した七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原定量用参照抗原（付記 3）を添加し、37 $^{\circ}$ C で反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液（付記 4）で洗浄した後、ビオチン標識マウス抗七面鳥鼻気管炎ウイルスモノクローナル抗体（付記 5）を添加し、37 $^{\circ}$ C で反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で洗浄した後、アビジン・ペルオキシダーゼコンジュゲートを添加し、37 $^{\circ}$ C で反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で洗浄した後、基質液（付記 6）を添加し、37 $^{\circ}$ C で反応させる。その後、反応停止液（付記 7）を加えて、反応を停止させる。

3.3.2.3.3 判定

波長 450nm で吸光度値を測定する。階段希釈した参照抗原の吸光度値から作成した標準曲線より検体の相対抗原量を算出する。

検体の相対抗原量は、1 mL 中 250EU 以上でなければならない。

3.4 小分製品の試験

3.4.1 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。

3.4.2 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。

3.4.3 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。

3.4.4 安全試験

3.4.4.1 試験材料

3.4.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.4.1.2 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。

3.4.4.2 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。

3.4.4.3 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。

3.4.5 力価試験

3.4.5.1 ニューカッスル病力価試験

3.4.5.1.1 試験材料

3.4.5.1.1.1 試験動物

3.4.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.4.5.1.1.2 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。

3.4.5.1.2 試験方法

3.4.4 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。

3.4.5.1.3 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。

3.4.5.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

3.4.5.2.1 試験材料

3.4.5.2.1.1 試験動物

3.4.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.4.5.2.1.2 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。

3.4.5.2.1.3 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。

3.4.5.2.2 試験方法

3.4.4 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 0.1mL 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。

3.4.5.2.3 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。

3.4.5.3 産卵低下症候群－1976 力価試験

3.4.5.3.1 試験材料

3.4.5.3.1.1 試験動物

3.4.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.4.5.3.1.2 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 8）を用いる。

3.4.5.3.2 試験方法

3.4.4 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 9）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 25 μL 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

50 μ L 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。

3.4.5.3.3 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。

3.4.5.4 七面鳥鼻気管炎力価試験

3.4.5.4.1 試験材料

3.4.5.4.1.1 試験動物

3.4.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.4.5.4.2 試験方法

3.4.4 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 10）で濃度調整した七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原（付記 11）を 96 穴平底マイクロプレートに 100 μ L ずつ分注し、37°C 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 12）で 2 倍階段希釈し、固相化プレートに各希釈血清を 100 μ 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 2 回洗浄し、ヤギ抗鶏 IgG ペルオキシダーゼ標識抗体（付記 13）を 100 μ 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 2 回洗浄し、水切りを行った後、基質液を 100 μ L 加え、常温で 8 分間反応させる。その後、反応停止液を 50 μ L 加えて反応を停止させ、波長 450nm で吸光度を測定する。

3.4.5.4.3 判定

参照陰性血清（付記 14）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 15）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 ELISA 緩衝液

1,000mL 中

リン酸二ナトリウム十二水和物 71.9 g

塩化ナトリウム 11.69 g

水 残量

pH6.9~7.1 に調整した後、ポリソルベート 80 を 0.05vol% となるように添加したもの。

付記 2 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 ELISA プレート
七面鳥鼻気管炎ウイルス BUT1#8544 で作製したハイブリドーマの培養上清から得たモノクローナル抗体 T32-INT を 0.05M 重炭酸緩衝液で希釈した希釈液を 96 穴プレートの各穴に添加して固相化したもの。

付記 3 七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原定量用参照抗原

七面鳥鼻気管炎ウイルス原液を ELISA 緩衝液で濃度調整したもの。

付記 4 洗浄用緩衝液

1,000mL 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5 ビオチン標識マウス抗七面鳥鼻気管炎ウイルスモノクローナル抗体
七面鳥鼻気管炎ウイルスBUT1#8544株で作製したハイブリドーマの培養上清から得たモノクローナル抗体T32-INTをビオチン標識し、カゼインを0.2%となるように添加したELISA緩衝液で希釈したもの。

付記6 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'-テトラメチルベンジジン) を 6 g 溶解したもの。

UP 緩衝液は、尿素過酸化化物 140mg を TMB 緩衝液 (酢酸ナトリウム三水和物 136g を約 500mL の水に溶解し、1.5mol/L クエン酸で pH5.3~5.7 に調整した後、水を加えて 1,000mL とし、121°C、20 分間高圧滅菌したもの) 100mL に溶解したもの。

付記7 反応停止液

硫酸	110 mL
水	1,000 mL

付記8 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9 25w/v%カオリン液

100mL 中	
カオリン	25 g
リン酸緩衝液	残 量

高圧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10 固相化緩衝液

1,000mL 中	
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	12.10 g
リン酸二水素ナトリウム二水和物	1.43 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11 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°C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 (3,000G、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 30,000G で 1 時間遠心し、沈渣を少量の滅菌水に再浮遊させる。再浮遊させたものをショ糖密度勾配遠心 (53,000G、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 倍希釈液の吸光度を測定するときは 0.8 以上、参照陰性血清では 0.2 以下を示すように調製する。

付記12 IB・EIA 緩衝液

1,000mL 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 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 でろ過滅菌後、スキムミルク 2w/v%及び牛胎子血清 5vol%を加える。

付記 13 ヤギ抗鶏 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 緩衝液で調製したもの。

付記 14 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 15 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 $2^{8.64} \sim 2^{9.64}$ 倍を示すもの。