

ニューカッスル病・マレック病（ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白遺伝子導入マレック病ウイルス 1 型）凍結生ワクチン

平成 22 年 8 月 12 日 (告示第 2288 号) 新規追加

ニューカッスル病ウイルスの F 蛋白をコードする遺伝子を弱毒マレック病ウイルス（1 型）に挿入して得られた組換え体ウイルスを培養細胞で増殖させて得た感染細胞浮遊液を凍結したワクチンである。

1 小分製品の試験

1.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

1.2 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により試験を行い、これに適合しなければならない。

1.3 迷入ウイルス否定試験

一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1、2.2.1 及び 2.2.2.4 により試験を行い、これらに適合しなければならない。

ただし、試験品を溶解用液で 0.1mL 当たり 10 羽分となるように調製し、20kHz で 1 分間超音波処理し、抗マレック病ウイルス（血清型 1 型）血清（付記 1）を非働化したもので中和したものをを用いる。

1.4 ウイルス含有量試験

1.4.1 試験材料

1.4.1.1 試料

試験品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。

1.4.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞又は 2 代継代細胞を細胞増殖用培養液（付記 3）に浮遊させたものをを用いる。

1.4.2 試験方法

試料 0.2mL ずつをそれぞれ 4 枚以上のシャーレに入れ、培養細胞浮遊液を加えて 37℃ で 1～2 日間培養後、細胞培養液を除き、メチルセルロース溶液（付記 4）を重層して更に 12～14 日間培養し、観察する。

1.4.3 判定

シャーレ当たり平均 10 個以上のプラックが検出された試料の希釈倍数及びその平均プラック数からウイルス含有量を算出する。試験品のウイルス含有量は、1 羽分当たり $10^{3.0}$ PFU 以上でなければならない。

1.5 マーカー試験

1.5.1 試験材料

1.5.1.1 試料

試験品を細胞維持用培養液又は適当と認められた溶解用液を用いてウイルスが 0.2mL 当たり 1/10 羽分及び 1/100 羽分含まれるように調整し、試料とする。

1.5.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞又は 2 代継代細胞を細胞増殖用培養液に浮遊させたものをを用いる。

1.5.2 試験方法

試料 0.2mL をそれぞれ 2 枚以上のシャーレに入れ、培養細胞浮遊液を加えて 37 °C で 1 ～ 2 日間培養後、細胞培養液を除去し、メチルセルロース溶液を重層して更に 5 ～ 7 日間培養する。その後、メチルセルロース溶液を除去し、細胞維持用培地で洗浄し、細胞維持用培養液を加えて 37 °C で一夜培養する。培養液を除き、抗 F 蛋白モノクローナル抗体（付記 5）を加えて室温で 30 分間反応させ、洗浄後、更にペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体（付記 6）を添加し、室温で 30 分間反応させ、ブラック染色用基質（付記 7）を加え、30 分以内に培養細胞を観察する。

1.5.3 判定

培養細胞に、特異発色を認めなければならない。

1.6 安全試験

1.6.1 試験材料

1.6.1.1 注射材料

試験品を溶解用液で 0.2mL 中 100 羽分となるように調整したものを注射材料とする。

1.6.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 1 ～ 4 日齢の鶏を用いる。

1.6.2 試験方法

試験動物の 10 羽を試験群、5 羽を対照群とする。

注射材料 0.2mL ずつを試験群の皮下に注射し、対照群とともに 5 週間観察する。試験最終日に体重を測定し、剖検する。

1.6.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群の動物に臨床的な異常を認めてはならない。また、剖検したときに異常を認めてはならない。

1.7 力価試験

1.7.1 ニューカッスル病力価試験

1.7.1.1 試験材料

1.7.1.1.1 注射材料

試験品を溶解用液で 0.2mL 中 1 羽分となるように調整したものを注射材料とする。

1.7.1.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 1 ～ 4 日齢の鶏を用いる。

1.7.1.2 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 0.2mL ずつを試験群の皮下に注射し、対照群とともに 6 週間観察する。試験最終日に得られた各個体の血清について、酵素抗体反応を行う。

被験血清を酵素抗体反应用希釈液（付記 8）で 10 倍希釈し、抗原吸着プレート（付記 9）の各 2 穴に各希釈血清を 100 μ L ずつ加え、室温で 1 時間反応させる。酵素抗体反應用希釈液 100 μ L ずつを加え、同様に反応させた 2 穴を陰性対照とする。洗浄液（付記 10）で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗 F 蛋白モノクローナル抗体（付記 11）を 100 μ L ずつ加え、室温で 1 時間反応させる。洗浄液で洗浄後、酵素抗体用基質（付記 12）を 100 μ L ずつ加え、遮光して 30 分間反応させる。3 mol/L 硫酸を 50 μ L ずつ加えて反応を停止後、波長 490 / 650nm で吸光度を測定する。

1.7.1.3 判定

被験血清の吸光度値と陰性対照の吸光度値の比により吸光度率（付記 13）を算出する。吸光度率が 80.0 以上を抗 F 蛋白抗体陰性、80.0 未満を抗 F 蛋白抗体陽性と判定する。

試験群の 80 % 以上が陽性でなければならない。この場合、対照群では、すべて陰性でなければならない。

1.7.2 マレック病力価試験

1.7.2.1 試験材料

1.7.2.1.1 試験動物

1.7.1 の試験に用いた動物を用いる。

1.7.2.2 試験方法

注射後 5 週目に得られた各個体の血清について蛍光抗体法を行う。血清をリン酸緩衝食塩液で 20 倍に希釈し、更に 2 倍階段希釈する。感染細胞（付記 14）に各希釈液を加え、37 °C で 45 ~ 60 分間処理した後、リン酸緩衝食塩液で 3 回洗浄し、風乾後、4 単位の抗鶏 IgG 蛍光標識抗体（付記 15）を加え、37 °C 45 ~ 60 分間処理した後、リン酸緩衝食塩液で 3 回洗浄し、蛍光顕微鏡で観察する。

1.7.2.3 判定

特異蛍光が認められる血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群の 80 % 以上が抗体価 40 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、すべて抗体価 20 倍以下でなければならない。

付記 1 抗マレック病ウイルス（血清型 1 型）血清

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏を、マレック病ウイルス（血清型 1 型）で免疫して得た血清で、試験品中のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記 2 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 g
牛血清	3 ~ 10 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 7.0 ~ 7.4 に調整する。
必要最少量の抗生物質を加えても良い。

付記 3 細胞増殖用培養液

1,000 mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
牛血清	50 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 7.0 ~ 7.4 に調整する。
必要最少量の抗生物質を加えても良い。

付記 4 メチルセルロース溶液

1,000 mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
4,000CPS メチルセルロース	20 g
牛血清	10 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 7.0 ~ 7.4 に調整する。
必要最少量の抗生物質を加えても良い。

付記 5 抗 F 蛋白モノクローナル抗体

ニューカッスル病ウイルスのF蛋白を認識し、中和活性を有するマウスモノクローナル抗体
(中和抗体価 100 倍以上) を 1,000 ~ 10,000 倍希釈したもの

付記 6 ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体
抗マウス IgG 血清から γ -グロブリンを調整し、ペルオキシダーゼで標識したもの

付記 7 ブラック染色用基質
1,000mL 中
3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩 250 mg
過酸化水素水 (30w/v%) 160 μ L
フェノールレッド不含イーグル MEM 残 量

付記 8 酵素抗体反应用希釈液
1,000mL 中
ポリソルベート 20 0.5 mL
脱脂粉乳 50 g
リン酸緩衝食塩液 残 量
2,500rpm で 5 分間遠心後の上清を用いる。

付記 9 抗原吸着プレート
1 穴当たり 40 ~ 160HA 単位に調整したホルマリン不活化ニューカッスル病石井株を 96 穴
マイクロプレートに固相化後、2 w/v %牛血清アルブミンで処理し、乾燥させたもの

付記 10 洗浄液
1,000mL 中
ポリソルベート 20 0.5 mL
リン酸緩衝食塩液 残 量

付記 11 ペルオキシダーゼ標識抗F蛋白モノクローナル抗体
ニューカッスル病ウイルスのF蛋白を認識し、中和活性を有するマウスモノクローナル抗体
(標識前マウス腹水中和抗体価 640 倍以上) を西洋ワサビペルオキシダーゼで標識したものを
酵素抗体反应用希釈液 (付記 8) で希釈したもの

付記 12 酵素抗体用基質
1,000mL 中
クエン酸一水和物 5.58 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物 18.48 g
o-フェニレンジアミン二塩酸塩 0.545g
過酸化水素水 (30w/v%) 0.43mL
水 残 量

付記 13 吸光度率
吸光度率は、下記の計算式により算出する
吸光度率 = (検体の吸光度値 / 陰性対照の吸光度値) \times 100

付記 14 感染細胞

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鶏胚 2 代細胞浮遊液をカバーガラスにのせ、マレック病ウイルス（血清型 1 型）CVI988 **Rispens** 株又はこれと同等と認められた株を加え、37℃で 2～4 日間培養したもので、特異抗原を有するもの

付記 15 抗鶏 IgG 蛍光標識抗体

抗鶏 IgG 血清から γ -グロブリンを調整し、これを蛍光色素で標識したもので、8 単位以上を含むもの