

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vant加)不活化ワクチン

平成28年7月14日（告示第1476号）一部改正

ニューカッスル病ウイルス及び2種類の鶏伝染性気管支炎ウイルスをそれぞれ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及び弱毒七面鳥鼻気管炎（以下「TRT」という。）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、混合したるものに油性アジュvantを添加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 安全試験

1.2.1 試験材料

1.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.2.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の4～5週齢の鶏を用いる。

1.2.2 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胸部筋肉内に注射し、対照群とともに4週間観察する。

1.2.3 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。

1.3 力価試験

1.3.1 ニューカッスル病力価試験

1.3.1.1 試験材料

1.3.1.1.1 試験動物

1.2の試験に用いた動物を用いる。

1.3.1.1.2 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。

1.3.1.2 試験方法

1.2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。

1.3.1.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釀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HI抗体価5倍以下でなければならない。

1.3.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

1.3.2.1 試験材料

1.3.2.1.1 試験動物

1.2の試験に用いた動物を用いる。

1.3.2.1.2 中和試験用ウイルス

それぞれの製造用株を用いる。ただし、そのウイルス量は、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。

1.3.2.1.3 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。

1.3.2.2 試験方法

1.2 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、それぞれ等量を各群ごとにプールし、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 °C で 18 ~ 24 時間又は 37 °C 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 °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。

1.3.2.3 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、対照群に対して 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、ウイルス対照群に対し 1.0 以下でなければならない。

1.3.3 産卵低下症候群-1976 力価試験

1.3.3.1 試験材料

1.3.3.1.1 試験動物

1.2 の試験に用いた動物を用いる。

1.3.3.1.2 赤血球凝集抗原

産卵低下症候群-1976 ウィルス赤血球凝集抗原（付記 1）を用いる。

1.3.3.2 試験方法

1.2 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 2）3 容を加え、室温で 20 分間処理した後、2,000rpm、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 25 μ L に等量の 4 単位の産卵低下症候群-1976 ウィ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 % の鶏赤血球浮遊液を 50 μ L ずつ加えて振盪混合し、60 分間静置した後に赤血球凝集の有無を観察する。

1.3.3.3 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、対照群ではすべて 4 倍以下でなければならない。

1.3.4 トリニューモウイルス力価試験

1.3.4.1 試験材料

1.3.4.1.1 試験動物

1.2 の試験に用いた動物を用いる。

1.3.4.2 試験方法

1.2 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、酵素抗体反応（以下「ELISA」という。）により抗体価を測定する。

固相化緩衝液（付記3）で適当に希釈したTRT抗原（付記4）をプレート（付記5）に100 μLずつ分注し、37℃で3時間反応後、洗浄用緩衝液（付記6）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7）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8）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、基質液（付記9）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（付記10）を50 μL加えて、反応を停止させ、波長450nmで吸光度値を測定する。

1.3.4.3 判定

参照陰性血清（付記11）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ず、参照陽性血清（付記12）は $2^{6.64}$ 倍以上の抗体価を示さなければならない。

付記1 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ウイルス赤血球凝集抗原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%になるようホルマリンを加えて不活化したもの。

付記2 25w/v%カオリン液

1,000mL中

カオリン

リン酸緩衝食塩液

115℃、15分間高压滅菌又はアジ化ナトリウムを0.01mL%添加した後、2～10℃に保存する。

付記3 固相化緩衝液

1,000mL中

リン酸二水素ナトリウム二水和物	1.43g
-----------------	-------

リン酸水素二ナトリウム十二水和物	12.10g
------------------	--------

塩化ナトリウム	8.5 g
---------	-------

水	残量
---	----

pH7.0に調整する。

付記4 TRT抗原

TRTウイルス弱毒BUT1#8544株を鶏用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。感染細胞の超音波破碎後遠心（3,000G、10分間）し、その遠心上清とTRT培養上清をプールする。次に30,000G、1時間遠心し、沈渣を少量の滅菌水に再浮遊する。再浮遊したものをシュークロースステップ遠心（53,000G、1時間）した後、上清を採取し、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 5 プレート

適当と認められた 96 穴平底マイクロプレートを使用する。

付記 6 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	2.9g
無水リン酸二水素カリウム	0.2g
塩化ナトリウム	37.2g
塩化カリウム	0.2g
ポリソルベート 20	1.5g
水	残量

pH を 7.0 に調整する。

付記 7 IB・EIA 緩衝液

1,000mL 中

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

濾過滅菌 (200nm) 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 8 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 9 基質液

TMB 溶液	0.2mL
UP 緩衝液	1.5mL
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、尿素過酸化物 1 錠 (140mg) を TMB 緩衝液 (酢酸ナトリウム 136 g を約 500mL の水に溶かし、1.5mol/L クエン酸で pH を 5.3 ~ 5.7 に調整した後、水を加え、1,000mL とし、高圧滅菌 (121 °C、20 分間) したもの) 100mL に溶かしたもの。

付記 10 反応停止液

硫酸	110mL
水	1,000mL

付記 11 参照陰性血清

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の鶏群由来で TRT ウィルスに対する抗体を保有しない
鶏血清で、ELISA 抗体価 $^{4.64}$ 倍未満を示すもの。

付記 12 参照陽性血清

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の鶏群由来で TRT ウイルスに対する抗体陰性鶏を TRT ウイルス弱毒 BUT 1 # 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。