

ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎 2 価・鶏伝染性ファブリキウス嚢病・産卵低下症候群—1976 混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン

平成 21 年 3 月 26 日（告示第 421 号） 新規追加

ニューカッスル病ウイルス、2 種類の鶏伝染性気管支炎ウイルス及び鶏伝染性ファブリキウス嚢病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、混合したものに油性アジュバント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 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脚部筋肉内に注射し、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 160 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℃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 個以上の発育鶏卵に注射し、37℃で 7～8 日間培養し、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、ウイルス対照に対し 1.0 以下でなければならない。

1.3.3 鶏伝染性ファブリキウス囊病力価試験

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 中和試験用ウイルス

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞で培養した鶏伝染性ファブリキウス囊病ウイルス I・Q 株を用いる。

1.3.3.1.3 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞をシャーレに培養し、単層となったものを用いる。

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、中和試験を行う。

血清を非働化し、リン酸緩衝食塩液で 2 倍階段希釈する。各希釈血清と 0.1mL 中 100～200 PFU を含む中和試験用ウイルス液をそれぞれ等量加えて混合し、37℃で 60 分間処理する。この各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ 2 枚の培養細胞に接種し、37℃で 60 分間静置吸着させた後、第 1 次重層寒天培地（付記 1）を加え、3～4 日間静置培養する。その後、第 2 次重層寒天培地（付記 2）を重層し、観察する。

1.3.3.3 判定

プラック数を 50% 減少させる血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

試験群の 70% 以上が中和抗体価 128 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 産卵低下症候群—1976 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。

1.3.4.1.2 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3）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赤血球凝集抑制試験を行う。

血清1容に25w/v%カオリン（付記4）3容を加え、室温で20分間処理した後、2,000 rpm、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%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。

1.3.4.3 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。

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HI抗体価4倍以下でなければならない。

付記1 第1次重層寒天培地

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

牛血清 20 mL

寒天 4～10 g

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2次重層寒天培地

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

牛血清 20 mL

寒天 4～10 g

0.5w/v% ニュートラルレッド液 10 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3 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 の發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を。赤血球凝集（HA）価を測定するとき、HA 価は640倍以上のもの。

付記4 25w/v%カオリン液

1,000mL 中

カオリン 25 g

リン酸緩衝食塩液 残量

115 $^{\circ}$ C、15分間高压滅菌又はアジ化ナトリウムを0.01w/v%添加した後、2～10 $^{\circ}$ Cに保存する。

