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・トリレオ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22年3月3日（告示第394号）　新規追加

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鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス及びトリレオ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、それぞれに油性アジュバントを添加したものを混合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

2.1.1.1 名称

ニューカッスル病ウイルス石井株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

10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

2.1.2.1 名称

鶏伝染性気管支炎ウイルス練馬E_{10}株及びTM-86EC株又は製造に適当と認められた２種類の株

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 鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス

2.1.3.1 名称

弱毒伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスＫ株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

鶏胚初代細胞でCPEを伴って増殖する。

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2.1.1の鶏胚初代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

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 トリレオウイルス

2.1.4.1 名称

トリレオウイルス58-132E50株又はこれと同等と認められた株

2.1.4.2 性状

８日齢の発育鶏卵の卵黄嚢内に注射すると増殖し、胚を死亡させる。鶏胚初代細胞でCPEを伴って増殖する。

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。

2.2 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

９～11日齢のものを用いる。

2.2.3 鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス

2.2.3.1 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格2.1.1の鶏胚初代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.3.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.4 トリレオウイルス

2.2.4.1 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格2.1.1の鶏胚初代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.4.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

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 発育鶏卵の培養

１回に処理する発育鶏卵を個体別発育鶏卵とみなす。

個体別発育鶏卵について、3.1.1の試験を行う。

2.3.1.2 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遠心上清をウイルス浮遊液とする。

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 不活化

ウイルス浮遊液を適当と認められた方法で濃縮したもの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。

不活化ウイルス浮遊液について、3.3.1及び3.3.2.1の試験を行う。

2.3.1.4 アジュバントの添加

不活化ウイルス浮遊液に適当と認められた油性アジュバントを添加し、原液とする。

この原液について、3.4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 発育鶏卵の培養

１回に処理する発育鶏卵を個体別発育鶏卵とみなす。

個体別発育鶏卵について、3.1.1の試験を行う。

2.3.2.2 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遠心上清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、3.2.1.2の試験を行う。

2.3.2.3 不活化

各ウイルス浮遊液を適当と認められた方法で濃縮したものにホルマリンを加えて不活化し、それぞれの株の不活化ウイルス浮遊液とする。

不活化ウイルス浮遊液について、3.3.1及び3.3.2.2の試験を行う。

2.3.2.4 アジュバントの添加

各株の不活化ウイルス浮遊液に適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。

この原液について、3.4の試験を行う。

2.3.3 鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス原液

2.3.3.1 細胞の培養

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

個体別培養細胞について、3.1.2の試験を行う。

2.3.3.2 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体別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清をウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2.1.3の試験を行う。

2.3.3.3 不活化

ウイルス浮遊液を適当と認められた方法で濃縮したもの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。

不活化ウイルス浮遊液について、3.3.1及び3.3.2.3の試験を行う。

2.3.3.4 アジュバントの添加

不活化ウイルス浮遊液に適当と認められた油性アジュバントを添加し、原液とする。

この原液について、3.4の試験を行う。

2.3.4 トリレオウイルス原液

2.3.4.1 細胞の培養

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

個体別培養細胞について、3.1.2の試験を行う。

2.3.4.2 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体別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液をウイルス浮遊液とする。

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 不活化

ウイルス浮遊液を適当と認められた方法で濃縮したもの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。

不活化ウイルス浮遊液について、3.3.1及び3.3.2.4の試験を行う。

2.3.4.4 アジュバントの添加

不活化ウイルス浮遊液に適当と認められた油性アジュバントを添加し、原液とする。

原液について、3.4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株原液、鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス原液及びトリレオ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。

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、3.5の試験を行う。

3 試験法

3.1 発育鶏卵又は培養細胞の試験

3.1.1 発育鶏卵の試験

個体別発育鶏卵の１％以上又は30個以上を対照発育鶏卵とし、これについて次の試験を行う。

3.1.1.1 培養観察

対照発育鶏卵を、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、鶏胚に異常を認めてはならない。

3.1.1.2 鶏赤血球凝集試験

3.1.1.1の試験最終日に尿膜腔液を採取し、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。

3.1.2 培養細胞の試験

個体別培養細胞の１％以上又は500mL以上を対照培養細胞とし、これについて次の試験を行う。

3.1.2.1 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。

3.1.2.2 鶏赤血球凝集試験

3.1.2.1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。

3.2 ウイルス浮遊液の試験

3.2.1 ウイルス含有量試験

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 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。

3.2.1.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1の９～11日齢のものを用いる。

3.2.1.1.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ５個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で５日間培養し、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試験を行う。

3.2.1.1.3 判定

尿膜腔液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、EID_{50}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、１mL中$10^{9.0}EID_{50}$以上でなければならない。

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 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。

3.2.1.2.1.2 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

試料0.1mLずつをそれぞれ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。試験最終日に鶏胚の変化を観察する。

3.2.1.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全、カーリング）を示したものを感染とみなし、EID_{50}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、１mL中$10^{7.0}EID_{50}$以上でなければならない。

3.2.1.3 鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス

3.2.1.3.1 試験材料

3.2.1.3.1.1 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。

3.2.1.3.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格2.1.1の鶏胚初代細胞で、単層になったものを用いる。

3.2.1.3.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ４枚以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させる。第１次重層寒天培地（付記１）を加え、３～４日間培養後、第２次重層寒天培地（付記２）を重層し、観察する。

3.2.1.3.3 判定

試料の各希釈段階の平均プラック数からウイルス含有量を算出する。

検体のウイルス含有量は、１mL中$10^{8.0}$PFU以上でなければならない。

3.2.1.4 トリレオウイルス

3.2.1.4.1 試験材料

3.2.1.4.1.1 試料

検体をトリプシン処理（付記３）したのち、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。

3.2.1.4.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格2.1.1の鶏胚初代細胞で、単層になったものを用いる。

3.2.1.4.2 試験方法

試料0.1mLをそれぞれ４枚以上の培養細胞に接種し、37℃で90分間吸着させた後、第１次重層寒天培地を重層し、37℃５vol％炭酸ガス下で３日間培養する。その後、第２次重層寒天培地を重層し、更に18～24時間培養し、プラック数を測定する。

3.2.1.4.3 判定

試料の各希釈段階の平均プラック数からウイルスの含有量を算出する。

検体のウイルス含有量は、１mL中$10^{7.0}$PFU以上でなければならない。

3.3 不活化ウイルス浮遊液の試験

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 不活化試験

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 注射材料

検体を注射材料とする。

3.3.2.1.1.2 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。

3.3.2.1.2 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、５日間培養した後、尿膜腔液を採取し、更に１代継代し、５日間培養し、観察する。観察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試験を行う。

3.3.2.1.3 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。

3.3.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

3.3.2.2.1 試験材料

3.3.2.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.3.2.2.1.2 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。

3.3.2.2.2 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、５日間培養し、観察する。

3.3.2.2.3 判定

鶏胚は、正常に発育しなければならない。

3.3.2.3 鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス

3.3.2.3.1 試験材料

3.3.2.3.1.1 試料

100倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、検体５mLを４℃で一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.3.2.3.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格2.1.1の鶏胚初代細胞で、単層となったものを用いる。

3.3.2.3.2 試験方法

試料の全量を、１mLにつき20cm^{2}以上の培養細胞に接種し、37℃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、観察する。

3.3.2.3.3 判定

培養細胞にCPEを認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

3.3.2.4 トリレオウイルス

3.3.2.4.1 試験材料

3.3.2.4.1.1 試料

100倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、検体５mLを４℃で一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.3.2.4.1.2 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。

3.3.2.4.2 試験方法

試料の全量を、１mLにつき20cm^{2}以上の培養細胞に接種し、37℃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、観察する。

3.3.2.4.3 判定

培養細胞にCPEを認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

3.4 原液の試験

3.4.1 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 小分製品の試験

3.5.1 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ず、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。

3.5.2 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。

3.5.3 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。

3.5.4 安全試験

3.5.4.1 試験材料

3.5.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.4.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の５～７週齢の鶏を用いる。

3.5.4.2 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羽分を試験群の頚部皮下に注射し、対照群とともに４週間観察する。

3.5.4.3 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。

3.5.5 力価試験

3.5.5.1 ニューカッスル病力価試験

3.5.5.1.1 試験材料

3.5.5.1.1.1 試験動物

3.5.4の試験に用いた試験動物を用いる。

3.5.5.1.1.2 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。

3.5.5.1.2 試験方法

3.5.4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。

3.5.5.1.3 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HI抗体価が５倍以下でなければならない。

3.5.5.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

3.5.5.2.1 試験材料

3.5.5.2.1.1 試験動物

3.5.4の試験に用いた動物を用いる。

3.5.5.2.1.2 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、１mL中$10^{5.0}$ EID_{50}以上でなければならない。

3.5.5.2.1.3 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。

3.5.5.2.2 試験方法

3.5.4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、それぞれ各群ごとに等量プールし、非働化する。

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。

3.5.5.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全、カーリング）を認めたものを感染したものとみなし、EID_{50}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。

3.5.5.3 鶏伝染性ファブリキウス嚢病力価試験

3.5.5.3.1 試験材料

3.5.5.3.1.1 試験動物

3.5.4の試験に用いた動物を用いる。

3.5.5.3.1.2 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製造用株又は適当と認められた株を用いる。

3.5.5.3.1.3 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、単層になったものを用いる。

3.5.5.3.2 試験方法

3.5.4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100～200PFU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、４℃で18～24時間又は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次重層寒天培地を重層し、観察する。

3.5.5.3.3 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、対照群ではすべて中和抗体価が４倍以下でなければならない。

3.5.5.4 トリレオウイルス感染症力価試験

3.5.5.4.1 試験材料

3.5.5.4.1.1 試験動物

3.5.4の試験に用いた動物を用いる。

3.5.5.4.1.2 中和試験用ウイルス

製造用株又は適当と認められた株を生ワクチン製造用材料の規格2.2.1の鶏腎初代細胞で37℃72時間培養した後トリプシン処理したものを用いる。

3.5.5.4.1.3 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格2.2.1の鶏腎初代細胞をシャーレに培養し、単層になったものを用いる。

3.5.5.4.2 試験方法

3.5.4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中和試験を行う。

血清を非働化し、リン酸緩衝食塩液で10倍希釈後２倍階段希釈する。各希釈血清と0.1mL中に約100PFUを含む中和試験用ウイルス液とを等量混合し、４℃で18～24時間又は37℃で60分間処理する。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90分間静置吸着させる。別に、中和試験用ウイルス液とリン酸緩衝食塩液とを等量混合し、希釈血清と同様に処理したものをウイルス対照とする。第

１次重層寒天培地を重層し、37℃で４日間静置培養する。その後、第２次重層寒天培地を重層し、37℃で更に24時間静置培養し、観察する。

3.5.5.4.3 判定

プラック数を90％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80％以上が中和抗体価320倍以上でなければならない。この場合、対照群ではすべて中和抗体価が10倍未満でなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、３年間とする。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。

5 その他

5.1 添付文書等記載事項

1 肉用鶏には使用しない旨

2 採卵鶏又は種鶏を廃鶏として食鳥処理場へ出荷する前の所定の期間は使用しない旨

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	10 g
イーグルMEM	残　量

炭酸水素ナトリウムでpHを7.0～7.4に調整する。

必要最小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

第１次重層寒天培地に0.5w/v％のニュートラルレッド液を２vol％になるように加えたもの

付記３　トリプシン処理

ウイルス材料にトリプシン液を最終濃度0.01w/v％となるように加えた後よく混和し、37℃で30分間処理する。