

改正後	改正前
<p>ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 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</p> <p>（略）</p> <p>1 小分製品の試験 （削る）</p> <p>（削る）</p> <p>（削る）</p> <p><u>1.1 ウイルス含有量試験</u> <u>1.1.1 試験材料</u> <u>1.1.1.1 試料</u> 試験品を細胞維持用培養液（付記1）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。 <u>1.1.1.2 培養細胞</u> 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2）に浮遊させたものを用いる。 <u>1.1.2 試験方法</u> 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3）を重層して更に12～14日間培養し、観察する。</p>	<p>ワクチン（シードロット製剤を除く。）の部 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</p> <p>（略）</p> <p>1 小分製品の試験 <u>1.1 無菌試験</u> <u>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。</u> <u>1.2 マイコプラズマ否定試験</u> <u>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。</u> <u>1.3 迷入ウイルス否定試験</u> <u>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</u>用いる。 <u>1.4 ウイルス含有量試験</u> <u>1.4.1 試験材料</u> <u>1.4.1.1 試料</u> 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。 <u>1.4.1.2 培養細胞</u> 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用いる。 <u>1.4.2 試験方法</u> 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。</p>

1.1.3 (略)
(削る)

(削る)

(削る)

1.4.3 (略)

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℃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℃で一晩培養する。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。

(削る)

付記 1～3 (略)

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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C45～60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 2～4 (略)

(削る)

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

(削る)

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

(削る)

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 250mg
過酸化水素水（30w/v%） 160 μL
フェノールレッド不含イーグルMEM 残量

(削る)

付記8 酵素抗体反应用希釈液
1,000mL中
ポリソルベート20 0.5mL
脱脂粉乳 50g
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。

(削る)

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、2w/v%牛血清アルブミンで処理し、乾燥させたもの

(削る)

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

(削る)

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

(削る)

付記12 酵素抗体用基質
1,000mL中

	<table> <tbody> <tr> <td><u>クエン酸一水和物</u></td> <td><u>5.58g</u></td> </tr> <tr> <td><u>リン酸水素二ナトリウム十二水和物</u></td> <td><u>18.48g</u></td> </tr> <tr> <td><u>o-フェニレンジアミン二塩酸塩</u></td> <td><u>0.545g</u></td> </tr> <tr> <td><u>過酸化水素水 (30w/v%)</u></td> <td><u>0.43mL</u></td> </tr> <tr> <td><u>水</u></td> <td><u>残量</u></td> </tr> </tbody> </table>	<u>クエン酸一水和物</u>	<u>5.58g</u>	<u>リン酸水素二ナトリウム十二水和物</u>	<u>18.48g</u>	<u>o-フェニレンジアミン二塩酸塩</u>	<u>0.545g</u>	<u>過酸化水素水 (30w/v%)</u>	<u>0.43mL</u>	<u>水</u>	<u>残量</u>
<u>クエン酸一水和物</u>	<u>5.58g</u>										
<u>リン酸水素二ナトリウム十二水和物</u>	<u>18.48g</u>										
<u>o-フェニレンジアミン二塩酸塩</u>	<u>0.545g</u>										
<u>過酸化水素水 (30w/v%)</u>	<u>0.43mL</u>										
<u>水</u>	<u>残量</u>										
(削る)	<p>付記13 <u>吸光度率</u> <u>吸光度率は、下記の計算式により算出する</u> <u>吸光度率 = (検体の吸光度値 / 陰性対照の吸光度値) × 100</u></p>										
(削る)	<p>付記14 <u>感染細胞</u> <u>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°Cで2～4日間培養したもので、特異抗原を有するもの</u></p>										
(削る)	<p>付記15 <u>抗鶏IgG蛍光標識抗体</u> <u>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</u></p>										