

改正後	改正前
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・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（油性アジュバント加）不活化 ワクチン <u>動生剤基準のニューカッスル病・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（油性アジュバント加）不活化ワクチンの 3.5.2、3.5.4 及び 3.5.5 に規定するところにより、これらに規定する試験を行うもの とする。</u>	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・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（油性アジュバント加）不活化 ワクチン <u>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、混合したも のに油性アジュバントを添加したワクチンである。</u> <u>1 小分製品の試験</u> <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 安全試験</u> <u>1.2.1 試験材料</u> <u>1.2.1.1 注射材料</u> <u>試験品を注射材料とする。</u> <u>1.2.1.2 試験動物</u> <u>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。</u> <u>1.2.2 試験方法</u> <u>試験動物の 10 羽を試験群、3 羽を対照群とする。</u> <u>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。</u> <u>1.2.3 判定</u> <u>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。</u> <u>1.3 力価試験</u> <u>1.3.1 ニューカッスル病力価試験</u> <u>1.3.1.1 試験材料</u> <u>1.3.1.1.1 試験動物</u> <u>1.2 の試験に用いた動物を用いる。</u> <u>1.3.1.1.2 赤血球凝集抗原</u> <u>「ニューカッスル病診断用赤血球凝集抗原」を用いる。</u> <u>1.3.1.2 試験方法</u> <u>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</u>

ユ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 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℃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。

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 ウイ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。

1.3.3.3 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 μ L ずつ分注し、37 $^{\circ}$ C 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 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C 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 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C 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 μ L 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 μ L 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ない。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 % になるように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 $^{\circ}$ C、15 分間高圧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	1.43g
	<u>1,000mL 中</u>	12.10g
	<u>リン酸二水素ナトリウム二水和物</u>	8.5 g
	<u>リン酸水素二ナトリウム十二水和物</u>	残 量
	<u>塩化ナトリウム</u>	
	<u>水</u>	
	<u>pH7.0 に調整する。</u>	

付記 4	TRT 抗原	
	<u>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。</u>	

付記 5	プレート	
	<u>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。</u>	

付記 6	洗浄用緩衝液	2.9g
	<u>1,000mL 中</u>	0.2g
	<u>リン酸水素二ナトリウム十二水和物</u>	37.2g
	<u>無水リン酸二水素カリウム</u>	0.2g
	<u>塩化ナトリウム</u>	1.5g
	<u>塩化カリウム</u>	残 量
	<u>ポリソルベート 20</u>	
	<u>水</u>	
	<u>pH を 7.0 に調整する。</u>	

付記 7	IB・EIA 緩衝液	2.31g
	<u>1,000mL 中</u>	24.06g
	<u>リン酸二水素ナトリウム二水和物</u>	29.22g
	<u>リン酸水素二ナトリウム二水和物</u>	3.3 m
	<u>塩化ナトリウム</u>	0.50g
	<u>カオリン処理 30w/v%牛血清アルブミン</u>	残 量
	<u>ポリソルベート 20</u>	
	<u>水</u>	
	<u>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。</u>	

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 UP 緩衝液 水 0.2mL 1.5mL 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 水 110mL 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 ウイルスに対する抗体を保有しない鶏血清で、ELISA 抗体価 $2^{4.64}$ 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。