

ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎・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

ニューカッスル病ウイルス及び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伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス及び産卵低下症候群 - 1976(EDS-76)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たものを混合し、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 30 ～ 35 日齢の鶏を用いる。

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。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 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の 9 ～ 10 日齢の発育鶏卵を用いる。

1.3.2.1.3 中和試験用ウイルス

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。

1.3.2.2 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を非働化し、ウイルス希釈法により中和試験を行う。

中和試験用ウイルスをリン酸緩衝食塩液（付記 1）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。

1.3.3 鶏伝染性ファブリキウス嚢病力価試験

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伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス VNJO-P12-CEP211 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動物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、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 2）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 3）を重ねし、観察する。

1.3.3.3 判定

ブラック数を 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 の試験に用いた試験動物を用いる。

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 4）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%カオリン液（付記 5）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、常温で 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、常温で 60 分間静置した後に、赤血球の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 リン酸緩衝食塩液

1,000mL 中

塩化ナトリウム 7.5 g

リン酸二水素カリウム 0.54 g

無水リン酸水素二ナトリウム 1.33 g

水 残 量

付記 2 第 1 次重層寒天培地

1,000mL 中

イーストエキストラクト 1.0 g

ラクトアルブミン 5.0 g

牛血清アルブミン 10.0 g

牛血清 20 mL

寒天 9.0 g

アール液 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 第 2 次重層寒天培地

1,000mL 中

イーストエキストラクト 1.0 g

ラクトアルブミン 5.0 g

0.1w/v%ニュートラルレッド 120 mL

寒天 9.0 g

アール液 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 4 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 株又はこれと同等の株を生ワクチン製造用材料の規格 1.3 の發育アヒル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 5 25w/v%カオリン液

100mL 中

カオリン

25 g

リン酸緩衝食塩液

残 量

115℃ で 15 分間高圧滅菌又はアジ化ナトリウムを 0.01w/v%添加した後、10℃ 以下に保存する。