

ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎混合（アジュバント加） 不活化ワクチン

1 定義

ニューカッスル病ウイルスを発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液及び鶏伝染性気管支炎ウイルスを発育鶏卵又は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、アルミニウムゲルアジュバントを添加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株

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株

2.1.2.1 名称

鶏伝染性気管支炎ウイルス石田株又は製造に相当と認められた株

2.1.2.2 性状

10 日齢の発育鶏卵の尿膜腔内又は鶏腎初代細胞に接種すると、特徴的な病変又は特有な CPE 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 の発育鶏卵又は生ワクチン製造用材料の規格 2.2.1 の鶏腎初代細胞又はその他相当と認められた細胞で継代する。

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

8 ~ 14 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 発育鶏卵又は鶏腎培養細胞

10 ~ 12 日齢の発育鶏卵、鶏腎培養細胞又は製造に相当と認められた細胞を用いる。

2.2.2.2 培養液

製造に相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 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及び鶏胚乳剤の遠心上清又はこれを濃縮したもの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により不活化し、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 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アルミニウムゲルアジュバントを添加し、原液とする。ただし、最終バルクの調製時にアジュバントを添加してもよい。

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別発育鶏卵とみなす。

個別発育鶏卵について、3.1.1 の試験を行う。

2.3.2.2 細胞の培養

1 回に処理し、培養した細胞を個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。

個別培養細胞について、3.1.2 の試験を行う。

2.3.2.3 ウイルスの培養

2.3.2.3.1 発育鶏卵を用いた培養

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及び鶏胚乳剤の遠心上清又はこれを濃縮したものをウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2.1.2 の試験を行う。

2.3.2.3.2 培養細胞を用いた培養

種ウイルスを鶏腎初代細胞に接種し、感染増殖させた培養液及び細胞のろ液、遠心上清又はこれを濃縮したものをウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2.1.2 の試験を行う。

2.3.2.4 不活化

ウイルス浮遊液を適当と認められた方法により不活化し、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 3.3.2.2 の試験を行う。

2.3.2.5 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アルミニウムゲルアジュバントを添加し、原液とする。ただし、最終バルクの調製時にアジュバントを添加してもよい。

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及び鶏伝染性気管支炎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。この場合、適当と認められた保存剤を添加してもよい。

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 の試験最終日に採取した培養液に 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 °C 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、EID₅₀ 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、1 mL 中 10^{8.0}EID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に承認されたものは、そのウイルス含有量とする。

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又は細胞増殖用培養液（付記 1）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.1.2.1.2 発育鶏卵又は培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の 9 ~ 10 日齢の発育鶏卵又は 3 ~ 6 週齢の鶏から得た腎臓細胞浮遊液を直径 5 ~ 6 cm のシャーレに 5 mL ずつ分注し、37 °C 5 vol%炭酸ガス下で 3 ~ 5 日間培養し、単層となった培養細胞を用いる。

3.2.1.2.2 試験方法

発育鶏卵接種法又はブラック法で行う。発育鶏卵接種法では、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 °C で 7 ~ 8 日間観察する。ブラック法では、試料 0.4mL ずつをそれぞれ 4 枚以上の培養細胞シャーレに接種し、37 °C 5 vol%炭酸ガス下で 60 分間吸着させ、第 1 次重層寒天培地（付記 2）を重層し、2 日後更に、第 2 次重層寒天培地（付記 3）を重層し、24 ~ 48 時間培養し、観察する。

3.2.1.2.3 判定

発育鶏卵を用いる場合は、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てEID₅₀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。

培養細胞を用いる場合は、各希釈系列のブラック平均数からPFUを算出する。

ウイルス含有量は、1 mL 中 10^{7.0}EID₅₀ 又は 10^{7.0}PFU 以上でなければならない。ただし、特に承認されたものは、そのウイルス含有量とする。

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。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性を調べる。

3.3.2.1.3 判定

鶏胚は、正常に発育しなければならない。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。

3.4 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ない。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 pH 測定試験

一般試験法の pH 測定試験法を準用して試験するとき、pH は、固有の値を示さなければならない。

3.5.3 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。

3.5.4 チメロサル定量試験

チメロサル添加製剤については、一般試験法のチメロサル定量法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.5.5 ホルマリン定量試験

ホルマリン添加製剤については、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。

3.5.6 アルミニウム定量試験

一般試験法のアルミニウム定量法を準用して試験するとき、アルミニウムの含有量は、1 mL 中 2.0mg 以下でなければならない。

3.5.7 安全試験

3.5.7.1 試験材料

3.5.7.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.7.1.2 試験動物

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。

3.5.7.2 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 1 羽分ずつを試験群の筋肉内に注射し、対照群とともに 2 週間観察する。

3.5.7.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に異常を認めてはならない。

3.5.8 力価試験

3.5.8.1 ニューカッスル病力価試験

3.5.8.1.1 試験材料

3.5.8.1.1.1 試験動物

3.5.7 の試験に用いた鶏を用いる。

3.5.8.1.1.2 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。

3.5.8.1.2 試験方法

3.5.7 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。

3.5.8.1.3 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 10 倍以上で、対照群のすべてが HI 抗体価 2 倍未満でなければならない。ただし、特に承認されたものは、その抗体価とする。

3.5.8.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

3.5.8.2.1 試験材料

3.5.8.2.1.1 中和試験用ウイルス

中和試験には製造用株又は適当と認められた株を用いる。ただし、ウイルス希釈法で中和試験を行う場合のウイルス量は、ウイルスを感染させた尿膜腔液を、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。

3.5.8.2.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 4 ~ 5 週齢の鶏を用いる。

3.5.8.2.1.3 発育鶏卵及び培養細胞

3.2.1.2.1.2 を準用する。

3.5.8.2.2 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 1 羽分ずつを試験群の筋肉内に 2 週間隔で 2 回注射し、2 回目注射後 2 週目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又は血清希釈法により中和試験を行う。各試験群の血清は、それぞれ等量をプールし、非働化する。

ウイルス希釈法で中和試験を行う場合は、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。

血清希釈法で中和試験を行う場合は、血清を細胞増殖用培養液で 20 倍に希釈した後、更に 5 倍階段希釈し、各段階の希釈液に中和試験用ウイルス液を等量混合し、4 で 18 ~ 24 時間又は 37 で 60 分間処理する。処理した液 0.4mL ずつをそれぞれ 4 枚以上の鶏腎初代細胞シャーレに接種し、37 5 vol% 炭酸ガス下で 60 分間吸着させ第 1 次重層寒天培地を重層し、2 日後更に第 2 次重層寒天培地を重層し、24 ~ 48 時間培養し、ブラックの出現を観察する。

3.5.8.2.3 判定

ウイルス希釈法の場合、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。

血清希釈法の場合、各希釈系列のブラック平均数から 50 % ブラック減少を示す血清希釈倍数を求め、中和抗体価を算出する。

試験群の中和抗体価は、100 倍以上でなければならない。この場合、対照群の中和抗体価は、20 倍以下でなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、2 年間とする。ただし、特に承認されたものは、その期間とする。

付記 1 細胞増殖用培養液

1,000mL 中
トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95g
牛血清 30 ~ 50 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 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

ニュートラルレッド 50 mg

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。