

# ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎・鶏伝染性コリーザ (A・C型菌処理)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並びに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及びヘモフィルス・パラガリナルムA型菌並びにC型菌の培養菌液を超音波処理し、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ものである。

## 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

製造に相当と認められた株又はこれと同等と認められた株

##### 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 ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌株

##### 2.1.3.1 名称

ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌No.221株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.3.2 性状

鶏及び発育鶏卵に対して病原性を示す。牛、馬、羊、鶏及びモルモットの赤血球を凝集する。

##### 2.1.3.3 継代及び保存

原株及び種菌は、生ワクチン製造用材料の規格1.1の5～7日齢の発育鶏卵で継代する。

継代は、原株では3代以内、種菌では2代以内でなければならない。

原株及び種菌は、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 ヘモフィルス・パラガリナルムC型菌株

##### 2.1.4.1 名称

ヘモフィルス・パラガリナルムC型菌H-18株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.4.2 性状

鶏及び発育鶏卵に対して病原性を示す。

##### 2.1.4.3 継代及び保存

原株及び種菌は、生ワクチン製造用材料の規格1.1の5～7日齢の発育鶏卵で継代する。

継代は、原株では3代以内、種菌では2代以内でなければならない。

原株及び種菌は、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

10 ~ 12 日齢の発育鶏卵を用いる。

### 2.2.3 ヘモフィルス・パラガリナルムの各型菌

#### 2.2.3.1 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の5 ~ 7 日齢の発育鶏卵を用いる。

#### 2.2.3.2 培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

## 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別発育鶏卵とみなす。

個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

ウイルス浮遊液を相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、3.5.1 及び 3.5.2.1 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相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、3.7 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 の試験を行う。

#### 2.3.2.2 ウイルスの培養

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、3.2.1.2 の試験を行う。

#### 2.3.2.3 不活化

ウイルス浮遊液を相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、3.5.1 及び 3.5.2.2 の試験を行う。

#### 2.3.2.4 アジュバントの添加

不活化ウイルス浮遊液に相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、3.7 の試験を行う。

### 2.3.3 ヘモフィルス・パラガリナルムの各型菌原液

#### 2.3.3.1 培養

発育鶏卵の卵黄嚢で培養した種菌を製造用培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。ただし、卵黄の採取は、種菌接種後 30 時間以内に鶏胚が死亡したものに限られる。

培養菌液について、3.3 の試験を行う。

#### 2.3.3.2 菌処理

培養菌液を超音波発生装置を用いて、所定の範囲の濁度となるように処理したものを超音波処理菌液とする。

超音波処理菌液について、3.4 の試験を行う。

#### 2.3.3.3 不活化

超音波処理菌液にホルマリンを添加し、不活化したものを不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.6 の試験を行う。

#### 2.3.3.4 アジュバントの添加

不活化菌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、3.7 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原液、ヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌原液及びヘモフィルス・パラガリナルム C 型菌原液を混合し、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、3.8 の試験を行う。

### 3 試験法

#### 3.1 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 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。

##### 3.1.2 鶏赤血球凝集試験

3.1.1 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。

#### 3.2 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 日齢の発育鶏卵を用いる。

###### 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<sub>50</sub> 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  $10^{9.5}$  EID<sub>50</sub> 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 日齢の発育鶏卵を用いる。

##### 3.2.1.2.2 試験方法

発育鶏卵接種法で行う。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。

##### 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<sub>50</sub> 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。

ウイルス含有量は、1 mL 中  $10^{6.7}$  EID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

### 3.3 培養菌液の試験

#### 3.3.1 夾雑菌否定試験

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 生菌数試験

##### 3.3.2.1 試験材料

##### 3.3.2.1.1 試料

検体を普通ブイヨンで 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.3.2.1.2 培地

継代用培地（付記 1）を用いる。

##### 3.3.2.2 試験方法

各試料 0.1mL ずつをそれぞれ 2 枚以上の継代用培地に接種して培地表面に拡散させ、37 °C 5 vol % 炭酸ガス下で 48 時間培養後、集落数を数える。

##### 3.3.2.3 判定

各段階の希釈液ごとの集落数から生菌数を算出する。

検体の生菌数は、1 mL 中  $10^8$  個以上でなければならない。

### 3.4 超音波処理菌液の試験

#### 3.4.1 濁度試験

##### 3.4.1.1 試験材料

##### 3.4.1.1.1 試料

検体を試料とする。

##### 3.4.1.2 試験方法

試料の濁度を、分光光度計で測定する。

超音波処理前後の試料の値を比較する。

##### 3.4.1.3 判定

超音波処理菌液の濁度は所定の範囲の値を示さなければならない。

### 3.5 不活化ウイルス浮遊液の試験

#### 3.5.1 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。

#### 3.5.2 不活化試験

##### 3.5.2.1 ニューカッスル病ウイルス

##### 3.5.2.1.1 試験材料

#### 3.5.2.1.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

#### 3.5.2.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の 9 ~ 11 日齢の発育鶏卵を用いる。

#### 3.5.2.1.2 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。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。

#### 3.5.2.1.3 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を認めてはならない。

### 3.5.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

#### 3.5.2.2.1 試験材料

##### 3.5.2.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

##### 3.5.2.2.1.2 発育鶏卵

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

#### 3.5.2.2.2 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。

#### 3.5.2.2.3 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を認めてはならない。

### 3.6 不活化菌液の試験

#### 3.6.1 不活化試験

##### 3.6.1.1 試験材料

##### 3.6.1.1.1 接種材料

検体を接種材料とする。

##### 3.6.1.1.2 培地

継代用培地又は適当と認められた培地を用いる。

#### 3.6.1.2 試験方法

接種材料 0.1mL ずつを 2 枚以上の継代用培地に接種して培地表面に拡散させ、37 ± 5 vol% 炭酸ガス下で 48 時間培養後、集落の有無を観察する。

#### 3.6.1.3 判定

接種材料を接種したすべての培地上にヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌又はヘモフィルス・パラガリナルム C 型菌の集落を認めてはならない。

### 3.7 原液の試験

#### 3.7.1 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。

### 3.8 小分製品の試験

#### 3.8.1 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。

#### 3.8.2 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。

#### 3.8.3 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。

#### 3.8.4 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。

#### 3.8.5 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。

#### 3.8.6 安全試験

##### 3.8.6.1 試験材料

###### 3.8.6.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 3.8.6.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 4 ~ 5 週齢の鶏を用いる。

##### 3.8.6.2 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 3 週間観察し、試験最終日に注射部位を剖検する。

##### 3.8.6.3 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。また、剖検した時に注射部位に著しい異常を認めてはならない。

#### 3.8.7 力価試験

##### 3.8.7.1 ニューカッスル病力価試験

###### 3.8.7.1.1 試験材料

###### 3.8.7.1.1.1 試験動物

3.8.6 の試験に用いた動物を用いる。

###### 3.8.7.1.1.2 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。

###### 3.8.7.1.2 試験方法

3.8.6 の試験の 2 週目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。

###### 3.8.7.1.3 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。

##### 3.8.7.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

###### 3.8.7.2.1 試験材料

###### 3.8.7.2.1.1 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。

###### 3.8.7.2.1.2 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 ~ 11 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  $10^{5.0}$ EID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

###### 3.8.7.2.1.3 発育鶏卵

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

#### 3.8.7.2.2 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 回注射する。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、それぞれ等量プ - 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（付記 2）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 0.4mL 中 200PFU となるように調整した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（付記 3）を重層し、2 日後更に第 2 次重層寒天培地（付記 4）を重層し、24 ~ 48 時間培養し、プラックの出現を観察する。

#### 3.8.7.2.3 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、EID<sub>50</sub> 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、各希釈系列のプラック平均数から 50 % プ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。

#### 3.8.7.3 鶏伝染性コリーザ（A・C 型）力価試験

##### 3.8.7.3.1 試験材料

##### 3.8.7.3.1.1 試験動物

3.8.6 の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.8.7.3.1.2 赤血球凝集抗原

「鶏伝染性コリーザ（A 型）診断用赤血球凝集抗原」及び鶏伝染性コリーザ（C 型）赤血球凝集抗原（付記 5）を用いる。

##### 3.8.7.3.2 試験方法

3.8.6 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、鶏伝染性コリーザ（A 型）赤血球凝集抑制試験及び鶏伝染性コリーザ（C 型）赤血球凝集抑制試験を行う。

##### 3.8.7.3.3 判定

HI 抗体価 5 倍以上を陽性とする。

それぞれの赤血球凝集抑制試験において試験群の 70 % 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。

#### 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 継代用培地

1,000mL 中

ペプトン	1 g
塩化ナトリウム	5 g
寒天	15 g
鶏肉水	残 量

pH を 7.0 ~ 7.4 に調整し、121 で 15 分間高圧滅菌する。

約 50 に冷却後、鶏の非働化血清を 3 ~ 5 vol % となるように加える。

なお、適当と認められた V 因子を加えてもよい。

付記 2 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	2.95 g
牛血清	50 mL
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 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	10 mL
寒天	9 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 第 2 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
ニュートラルレッド	50 mg
寒天	9 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 5 鶏伝染性コリーザ ( C 型 ) 赤血球凝集抗原

ヘモフィルス・パラガリナルム C 型菌を適当な方法で処理し、1 vol % 固定赤血球を用いて反応を行うとき、赤血球凝集価が 80 倍以上のもの