

ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎・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（シード）

平成 24 年 7 月 4 日（告示第 1622 号） 新規追加
平成 28 年 4 月 18 日（告示第 1020 号） 一部改正

1 定義

シードロット規格に適合した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同規格に適合した発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液並びに同規格に適合した産卵低下症候群－1976ウイルス及びトリニューモウイルスを同規格に適合した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。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 ニューカッスル病ウイルス

2.1.1.1 名称

ニューカッスル病ウイルス Ulster 2C 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られる。

2.1.1.3 マスターシードウイルス

2.1.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－70 ℃以下又は凍結乾燥して 5 ℃以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1 の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、5 代以内でなければならない。

2.1.1.4 ワーキングシードウイルス

2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して－70 ℃以下又は凍結乾燥して 5 ℃以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2 の試験を行う。

2.1.1.5 プロダクションシードウイルス

2.1.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖させる。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して－70 ℃以下又は凍結乾燥して 5 ℃以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

2.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

2.1.2.1 名称

鶏伝染性気管支炎ウイルス Mass41 株又は製造に適当と認められた株

2.1.2.2 性状

10日齢の発育鶏卵の尿膜腔に注射すると、鶏胚に特徴的な病変を伴って増殖する。

2.1.2.3 マスターシードウイルス

2.1.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して-70°C以下又は凍結乾燥して5°C以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、5代以内でなければならない。

2.1.2.4 ワーキングシードウイルス

2.1.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して-70°C以下又は凍結乾燥して5°C以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

2.1.2.5 プロダクションシードウイルス

2.1.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させる。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して-70°C以下又は凍結乾燥して5°C以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

2.1.3 産卵低下症候群-1976ウイルス

2.1.3.1 名称

産卵低下症候群-1976ウイルスV127株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

あひる胚初代細胞でCPEを伴って増殖する。

2.1.3.3 マスターシードウイルス

2.1.3.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、SPF動物規格の2.8に適合したあひる胚初代細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して-70°C以下又は凍結乾燥して5°C以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、5代以内でなければならない。

2.1.3.4 ワーキングシードウイルス

2.1.3.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、SPF動物規格の2.8に適合したあひる胚初代細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して-70°C以下又は凍結乾燥して5°C以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

2.1.3.5 プロダクションシードウイルス

2.1.3.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、SPF動物規格の2.8に適合したあひる胚初代細胞で増殖させる。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して-70°C以下又は凍結乾燥して5°C以下

で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

2.1.4 トリニューモウイルス

2.1.4.1 名称

トリニューモウイルス VCO3 株又はこれと同等と認められた株

2.1.4.2 性状

Vero 細胞及び鶏胚初代細胞に CPE を伴って増殖する。

2.1.4.3 マスターシードウイルス

2.1.4.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、シードロット規格に適合した Vero 細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して -70 °C 以下又は凍結乾燥して 5 °C 以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1 の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、5 代以内でなければならない。

2.1.3.4 ワーキングシードウイルス

2.1.3.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、シードロット規格に適合した Vero 細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して -70 °C 以下又は凍結乾燥して 5 °C 以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2 の試験を行う。

2.1.3.5 プロダクションシードウイルス

2.1.3.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、シードロット規格に適合した Vero 細胞で増殖させる。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して -70 °C 以下又は凍結乾燥して 5 °C 以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

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

2.2.1.1.1 マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルス及びプロダクションシードウイルスの増殖、継代及び保存に用いる発育鶏卵

SPF 動物規格の 1.1 に適合した 9 ~ 11 日齢のものを用いる。

マスターシードウイルス及びワーキングシードウイルスを増殖、継代及び保存する場合の発育鶏卵並びにプロダクションシードウイルスを増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、3.2 の試験を行う。

2.2.1.1.2 原液の製造に用いる発育鶏卵

9 ~ 11 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

2.2.2.1.1 マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルス及びプロダクションシードウイルスの増殖、継代及び保存に用いる発育鶏卵

SPF 動物規格の 1.1 に適合した 9 ~ 11 日齢のものを用いる。

マスターシードウイルス及びワーキングシードウイルスを増殖、継代及び保存する場合の発育鶏卵並びにプロダクションシードウイルスを増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、3.2 の試験を行う。

2.2.2.1.2 原液の製造に用いる発育鶏卵

9～11日齢のものを用いる。

2.2.3 産卵低下症候群－1976ウイルス

2.2.3.1 初代細胞

SPF動物規格の2.8に適合したあひる胚初代細胞を用いる。

2.2.3.2 培養液

製造に適當と認められた培養液を用いる。

2.2.3.3 マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）

2.2.3.3.1 増殖、継代及び保存

マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）は、2.2.3.2の培養液で増殖し、継代及び保存しない。

マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）について、3.3の試験を行う。

2.2.4 トリニューモウイルス

2.2.4.1 株化細胞

Vero細胞又は製造に適當と認められた細胞を用いる。

2.2.4.2 培養液

製造に適當と認められた培養液を用いる。

2.2.4.3 マスターセルシード

2.2.4.3.1 作製、保存及びプロダクションセルシードまでの最高継代数

マスターセルシードは2.2.4.2の培養液で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターセルシードは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－70℃以下で保存する。

マスターセルシードについて、3.4.1の試験を行う。

マスターセルシードは、ワクチンの製造又は試験以外の目的で継代しない。マスターセルシードからプロダクションセルシードまでの最高継代数は、20代以内でなければならない。

2.2.4.4 ワーキングセルシード

2.2.4.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.4.2の培養液で増殖及び継代する。

ワーキングセルシードは、凍結して－70℃以下で保存する。

ワーキングセルシードについて、3.4.2の試験を行う。

2.2.4.5 プロダクションセルシード

2.2.4.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.4.2の培養液で増殖させる。

プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して－70℃以下で保存する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、3.4.3の試験を行う。

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、3.5の試験を行う。

2.3.1.2 ウィルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.1.1の発育鶏卵で培養し、感染増殖させた尿膜腔液のろ液又は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、3.7.1の試験を行う。

2.3.1.3 不活化

ウイルス浮遊液を適當と認められた不活化剤を加えて不活化した後、適當と認められた方法で濃縮し、原液とする。

原液について、3.8.1 及び 3.8.2.1 の試験を行う。ただし、3.8.2.1 の試験は、ウイルス浮遊液の濃縮前に行ってもよい。

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体別発育鶏卵とみなす。

個体別発育鶏卵について、3.5 の試験を行う。

2.3.2.2 ウィルスの培養

プロダクションシードウイルスを 2.3.2.1 の発育鶏卵で培養し、感染増殖させた尿膜腔液のろ液又は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、3.7.1.2 の試験を行う。

2.3.2.3 不活化

ウイルス浮遊液を適當と認められた不活化剤を加えて不活化した後、適當と認められた方法で濃縮し、原液とする。

原液について、3.8.1 及び 3.8.2.2 の試験を行う。ただし、3.8.2.2 の試験は、ウイルス浮遊液の濃縮前に行ってもよい。

2.3.3 産卵低下症候群－1976 ウィルス原液

2.3.3.1 プロダクションプライマリーセルシードの培養

1回に処理し、培養した細胞を個体別培養細胞とみなす。ウイルス接種前のプロダクションプライマリーセルシードに異常を認めてはならない。

個体別培養細胞について、3.6 の試験を行う。

2.3.3.2 ウィルスの培養

プロダクションシードウイルスを 2.3.3.1 の細胞で培養し、適當と認められた時期に個体別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は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、3.7.1.3 の試験を行う。

2.3.3.3 不活化

ウイルス浮遊液を適當と認められた不活化剤を加えて不活化した後、適當と認められた方法で濃縮し、原液とする。

原液について、3.8.1 及び 3.8.2.3 の試験を行う。ただし、3.8.2.3 の試験は、ウイルス浮遊液の濃縮前に行ってもよい。

2.3.4 トリニューモウイルス原液

2.3.4.1 プロダクションセルシードの培養

1回に処理し、培養した細胞を個体別培養細胞とみなす。ウイルス接種前のプロダクションセルシードに異常を認めてはならない。

2.3.4.2 ウィルスの培養

プロダクションシードウイルスを 2.3.4.1 の細胞で培養し、適當と認められた時期に個体別培養細胞ごとに採取した培養細胞及び培養液をホモジナイズ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、3.7.1.4 の試験を行う。

2.3.4.3 不活化

ウイルス浮遊液を適當と認められた不活化剤を加えて不活化した後、適當と認められた方法で濃縮し、原液とする。

原液について、3.8.1 及び 3.8.2.4 の試験を行う。ただし、3.8.2.4 の試験は、ウイルス浮遊液の濃縮前に行ってもよい。

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、産卵低下症候群－1976ウイルス原液及びトリニューモウイルス原液を濃度調整して混合した後、適當と認められた油性アジュバントを添加したものを最終バルクとする。この場合、適當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、3.9の試験を行う。

3 試験法

3.1 製造用株の試験

3.1.1 マスターシードウイルスの試験

3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 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。

3.1.1.3マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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。

3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、2.1及び2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験

3.1.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験

発育鶏卵及びあひる胚初代細胞を用いて培養する場合には、鶏脳脊髄炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1及び3.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、鶏脳脊髄炎ウイルスについて3.1.1.4.2.2に規定する試験を実施する製剤については、本試験を実施しなくてもよい。

Vero細胞を用いて培養する場合には、鶏脳脊髄炎ウイルス及び内在性レトロウイルス(C、Dタイプ粒子)について、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1及び3.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、鶏脳脊髄炎ウイルスについて3.1.1.4.2.2に規定する試験を実施する製剤については、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の3.1.2の試験を実施しなくてもよい。

3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

発育鶏卵及びあひる胚初代細胞を用いて培養する場合には、鶏白血病ウイルス、細網内皮症ウイルス及び鶏脳脊髄炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、3.2.1、3.2.2及び3.2.10を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、鶏脳脊髄炎ウイルスについて3.1.1.4.2.1に規定する試験を実施する製剤については、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の3.2.10の試験を実施しなくてもよい。

Vero細胞を用いて培養する場合には、鶏白血病ウイルス、細網内皮症ウイルス、牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス、日本脳炎ウイルス、狂犬病ウイルス及び鶏脳脊髄炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、3.2.1、3.2.2、3.2.5、3.2.9及び3.2.10を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、鶏脳脊髄炎ウイルスについて3.1.1.4.2.1に規定する試験を実施する製剤については、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の3.2.10の試験を実施しなくてもよい。

3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

3.1.2.1 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。

3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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。

3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

3.1.3.1 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。

3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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。

3.2 発育鶏卵の試験

3.2.1 孵卵性状試験

シードロット規格の 3.2.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3 初代細胞の試験

3.3.1 マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）の試験

3.3.1.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.2.4.2.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3.1.2 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。

3.3.1.3 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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。

3.4 株化細胞の試験

3.4.1 マスターセルシードの試験

3.4.1.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.1.2 起源動物種同定試験

シードロット規格の 2.1.4.2.1.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.1.3 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。

3.4.1.4 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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。

3.4.1.5 外来性ウイルス否定試験

3.4.1.5.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.2、2.1 及び 2.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.1.5.2 特定ウイルス否定試験

3.4.1.5.2.1 特定ウイルス否定一般試験

鶏脳脊髄炎ウイルス及び内在性レトロウイルス（C、D タイプ粒子）について、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.2、3.1.1 及び 3.1.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

ただし、鶏脳脊髄炎ウイルスについて 3.4.1.5.2.2 に規定する試験を実施する製剤については、一般試験法の外来性ウイルス否定試験の 3.1.2 を実施しなくてもよい。

3.4.1.5.2.2 個別ウイルス否定試験

鶏白血病ウイルス、細網内皮症ウイルス、牛ウイルス性下痢－粘膜病ウイルス、日本脳炎ウイルス、狂犬病ウイルス及び鶏脳脊髄炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.2、3.2.1、3.2.2、3.2.5、3.2.9 及び 3.2.10 を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、鶏脳脊髄炎ウイルスについて 3.4.1.5.2.1 に規定する試験を実施する製剤については、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 3.2.10 の試験を実施しなくてもよい。

3.4.1.6 核学的（染色体）性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.1.6 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.1.7 腫瘍形成性／腫瘍原性試験

シードロット規格の 2.1.4.2.1.7 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.2 ワーキングセルシードの試験

3.4.2.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.2.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.2.2 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。

3.4.2.3 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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。

3.4.3 プロダクションセルシードの試験

3.4.3.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.3.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4.3.2 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。

3.4.3.3 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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 個体別発育鶏卵の試験

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。

3.5.1 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。

3.5.2 鶏赤血球凝集試験

3.5.1 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。

3.6 個体別培養細胞の試験

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。

3.6.1 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。

3.6.2 鶏赤血球凝集試験

3.6.1 の培養終了時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。

3.7 ウイルス浮遊液の試験

3.7.1 ウイルス含有量試験

3.7.1.1 ニューカッスル病ウイルス

3.7.1.1.1 試験材料

3.7.1.1.1.1 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。

3.7.1.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9 ~ 11 日齢のものを用いる。

3.7.1.1.2 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。

3.7.1.1.3 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_{50} 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、1mL中 $10^{8.0}EID_{50}$ 以上でなければならない。

3.7.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

3.7.1.2.1 試験材料

3.7.1.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で10倍階段希釀し、各段階の希釀液を試料とする。

3.7.1.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した9～10日齢のものを用いる。

3.7.1.2.2 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。

3.7.1.2.3 判定

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_{50} 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、1mL中 $10^{6.0}EID_{50}$ 以上でなければならない。

3.7.1.3 産卵低下症候群－1976ウイルス

3.7.1.3.1 試験材料

3.7.1.3.1.1 試料

検体を細胞維持用培養液（付記1）で10倍に希釀した後、4倍階段希釀した各段階の希釀液を試料とする。

3.7.1.3.1.2 培養細胞

96穴マイクロプレートに培養し单層となった生ワクチン製造用材料の規格2.4.1に適合したあひる胚初代細胞を用いる。

3.7.1.3.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4穴以上の培養細胞に接種し、37℃で7日間培養し、観察する。

3.7.1.3.3 判定

培養細胞にCPEが認めたものを感染とみなし、 $TCID_{50}$ を算出する。

検体のウイルス含有量は、1mL中 $10^{6.5}TCID_{50}$ 以上でなければならない。

3.7.1.4 トリニューモウイルス

3.7.1.4.1 試験材料

3.7.1.4.1.1 試料

検体を細胞維持用培養液で10倍に希釀した後、4倍階段希釀した各段階の希釀液を試料とする。

3.7.1.4.1.2 培養細胞

96穴マイクロプレートに培養し单層となったVero細胞を用いる。

3.7.1.4.2 試験方法

試料0.2mLずつをそれぞれ4穴以上の培養細胞に接種し、38℃で9日間培養し、観察する。

3.7.1.4.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、 $TCID_{50}$ を算出する。

検体のウイルス含有量は、1mL中 $10^{5.0}TCID_{50}$ 以上でなければならない。

3.8 原液の試験

3.8.1 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。

3.8.2 不活化試験

3.8.2.1 ニューカッスル病ウイルス

3.8.2.1.1 試験材料

3.8.2.1.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.8.2.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9 ~ 11 日齢のものを用いる。

3.8.2.1.2 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、37 °Cで 5 日間培養した後、尿膜腔液を採取し、更に 1 代継代し、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。

3.8.2.1.3 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。

3.8.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

3.8.2.2.1 試験材料

3.8.2.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.8.2.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9 ~ 10 日齢のものを用いる。

3.8.2.2.2 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、37 °Cで 5 日間培養した後、尿膜腔液を採取し、更に 1 代継代し、37 °Cで 5 日間培養し、観察する。

3.8.2.2.3 判定

鶏胚は、正常に発育しなければならない。

3.8.2.3 産卵低下症候群－ 1976 ウィルス

3.8.2.3.1 試験材料

3.8.2.3.1.1 試料

検体の不活化剤を中和したものを試料とする。

3.8.2.3.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.4.1 に適合したあひる胚初代細胞を用いる。

3.8.2.3.2 試験方法

試料 5 mL につき 850cm² 以上の培養細胞に接種し、38.5 °Cで 6 日間培養した後、その培養上清 5 mL を採取し、更に 1 代継代し、38.5 °Cで 7 日間培養する。試験最終日に培養上清を採取し、鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

3.8.2.3.3 判定

培養細胞に CPE を認めず、培養上清に赤血球凝集を認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

3.8.2.4 トリニューモウイルス

3.8.2.4.1 試験材料

3.8.2.4.1.1 試料

検体の不活化剤を中和したものを試料とする。

3.8.2.4.1.2 培養細胞

ローラーボトルに培養した Vero 細胞を用いる。

3.8.2.4.2 試験方法

試料 5 mL につき 850cm² 以上の培養細胞に接種し、38 °Cで 6 日間培養した後、その培養上清 5

mL を採取し、更に 1 代継代し、38 ℃で 7 日間培養する。

3.8.2.4.3 判定

培養細胞に CPE を認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

3.9 小分製品の試験

3.9.1 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、異物及び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。

3.9.2 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。

3.9.3 ホルマリン定量試験

適当と認められた方法で試験品を処理したものを試料とし、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。

3.9.4 チメロサール定量試験

適当と認められた方法で試験品を処理したものを試料とし、一般試験法のチメロサー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。

3.9.5 安全試験

3.9.5.1 試験材料

3.9.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.9.5.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した発育鶏卵由来の 30 ~ 35 週齢の鶏を用いる。

3.9.5.2 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、対照群と共に 4 週間観察する。

3.9.5.3 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。

3.9.6 力価試験

3.9.6.1 ニューカッスル病力価試験

3.9.6.1.1 試験材料

3.9.6.1.1.1 試験動物

3.9.5 の試験に用いた動物を用いる。

3.9.6.1.1.2 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。

3.9.6.1.2 試験方法

3.9.5 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。

3.9.6.1.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釀倍数を赤血球凝集抑制抗体価（以下この項において「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。この場合、対照群では、全て HI 抗体価 5 倍以下でなければならない。

3.9.6.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

3.9.6.2.1 試験材料

3.9.6.2.1.1 試験動物

3.9.5 の試験に用いた動物を用いる。

3.9.6.2.1.2 発育鶏卵

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

3.9.6.2.1.3 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 に適合した 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。

3.9.6.2.1.3 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9 ~ 10 日齢のものを用いる。

3.9.6.2.2 試験方法

3.9.5 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、それぞれ各群ごとに等量プールし、非効化する。

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 °C で 18 ~ 24 時間又は 37 °C 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 °C 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。

3.9.6.2.3 判定

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、ウイルス対照に対し 1.0 以下でなければならない。

3.9.6.3 産卵低下症候群－ 1976 力価試験

3.9.6.3.1 試験材料

3.9.6.3.1.1 試験動物

3.9.5 の試験に用いた動物を用いる。

3.9.6.3.1.2 赤血球凝集抗原

産卵低下症候群－ 1976 ウィルス赤血球凝集抗原（付記 2）を用いる。

3.9.6.3.2 試験方法

3.9.5 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 3）3 容を加え、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 ウィ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 ずつ加えて振とう混合し、60 分間静置した後に赤血球凝集の有無を観察する。

3.9.6.3.3 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、全て HI 抗体価 4 倍以下でなければならない。

3.9.6.4 トリニューモウイルス力価試験

3.9.6.4.1 試験材料

3.9.6.4.1.1 試験動物

3.9.5 の試験に用いた動物を用いる。

3.9.6.4.2 試験方法

3.9.5 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、ELISA キット（付記 4）を用いて酵素抗体反応試験を行う。

被検血清を洗浄用緩衝液（付記 5）を用いて 2 倍に希釈し、固相化プレート（付記 6）の 2 穴以上にそれぞれの希釈血清を 1 穴当たり $100 \mu\text{L}$ 、また、参照陽性血清（付記 7）及び参照陰性血清（付記 8）を 2 穴に 1 穴当たり $100 \mu\text{L}$ 加え、常温で 30 分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で 3 回洗浄し、水切りを行った後、マウス抗トリニューモウイルスペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体（付記 9）を $100 \mu\text{L}$ 加え、常温で 30 分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で 3 回洗浄し、水切りを行った後、基質液（付記 10）を $100 \mu\text{L}$ 加え、常温で 10 分間反応させる。反応終了後、反応停止液（付記 11）を $50 \mu\text{L}$ 加えて反応を停止させ、波長 450nm で吸光度値を測定する。

3.9.6.4.3 判定

血清の平均吸光度から、以下に示す式により PI 値を算出する。

参照陽性血清吸光度値 : OD_{PR}

参照陰性血清吸光度値 : OD_{NR}

被検血清吸光度値 : OD_s

プランク吸光度値 : BN

$$\text{OD}_p = [(\text{OD}_s \text{ 又は } \text{OD}_{\text{PR}} - \text{BN}) \text{ } / \text{ } (\text{OD}_{\text{NR}} - \text{BN})] \times 100$$

$$\text{PI} = 100 - \text{OD}_p$$

参照陰性血清の吸光度値 OD_{NR} は 0.600 以上でなければならず、参照陽性血清の OD_p 値が 60 以下であるとき、試験群の PI 値の平均は 60 以上でなければならず、対照群の PI 値は全て 15 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、製造後 1 年 6 か月間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その期間とする。

付記 1 細胞維持用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・プロス 2.95 ~ 3.0 g

牛血清 0 ~ 30 mL

イーグル MEM 残量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 7.4 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 産卵低下症候群 - 1976 ウィルス赤血球凝集抗原

産卵低下症候群 - 1976 ウィルス JPA-1 株又はこれと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 に適合した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 に適合した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 3 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 °C で 15 分間高压滅菌又はアジ化ナトリウムを 0.01w/v % 添加した後、10 °C 以下に保存する。

付記4 ELISA キット

適當と認められる ELISA キットで、洗浄用緩衝液、固相化プレート、参照陽性血清、参照陰性血清、マウス抗トリニューモウイルスペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体、基質液及び反応停止液で構成されるものであり、バリデーション用陽性血清（生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した発育鶏卵由来の 1 週齢鶏にトリニューモウイルスを $10^{4.0}$ TCID₅₀/羽で免疫し、免疫後 4 週目に採血し、プールして得たもの）及びバリデーション用陰性血清（生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した発育鶏卵由来の 5 ~ 15 週齢鶏の血清でトリニューモウイルス抗体陰性のもの。）を用いて酵素抗体反応試験を実施したとき、バリデーション用陽性血清の PI 値は 65 以上 80 以下を示し、バリデーション用陰性血清の PI 値は 5 以下を示す。

付記5 洗浄用緩衝液

PBS-Tween 錠剤又は濃縮液を水に溶解し、以下の最終濃度のもの。

0.14 mol/L 塩化ナトリウム液

0.003 mol/L 塩化カリウム液

0.01 mol/L リン酸緩衝液

0.05 % ポリソルベート 20 液

pH を 7.4 に調整する。

付記6 固相化プレート

酵素抗体反応用プレートにトリニューモウイルス VCO3 株抗原（付記 12）を固相化し、乾燥したもので、2 ~ 5 °C に保存する。

付記7 参照陽性血清

0.05w/v % チメロサール含有抗トリニューモウイルス血清で、その OD₄₉₀ 値が 60 以下のもの。

付記8 参照陰性血清

0.05w/v % チメロサール含有陰性血清で、その吸光度が 0.600 以上のもの。

付記9 マウス抗トリニューモウイルスペルオキシダーゼ標識モノクローナル抗体

トリニューモウイルス株をマウスに免疫して作成したハイブリドーマから、VCO3 抗原のスクリーニングを行って得たモノクローナル抗体で、アフィニティカラムクロマトグラフィーにより精製し、ホースラディッシュペルオキシダーゼで標識し、凍結乾燥したもので、洗浄用緩衝液に溶解して用いる。溶解後は、-20 °C で保存する。

付記10 基質液

液中に 3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン及び過酸化水素を含むもの。

付記11 反応停止液

2mol/L 硫酸液

付記12 トリニューモウイルス VCO3 抗原

トリニューモウイルス VCO3 株を Vero 細胞に接種して 37 °C で培養し、完全な CPE が観察された後、ウイルス浮遊液及び細胞を凍結融解し、3,500rpm で 30 分間遠心し、その遠心上清を更に 19,000rpm で 15 ~ 20 時間超遠心して得た沈殿に少量のリン酸緩衝食塩液を加えてガラ

スホモジナイザーでホモジナイズして懸濁したものに、最終濃度 0.1 %となるように Triton — X 100 を加え、37 °Cで 30 分間処理した後、超音波処理したもの。