

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混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン

平成 19 年 5 月 18 日（告示第 692 号） 新規追加
平成 24 年 3 月 13 日（告示第 675 号） 一部改正
平成 28 年 4 月 18 日（告示第 1020 号） 一部改正

1 定義

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発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液並びに産卵低下症候群－ 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株

2.1.1.1 名称

弱毒ニューカッスル病ウイルス Clone30 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、原株にあつては 3 代以内、種ウイルスにあつては 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 M41 株及び 249g 株又は製造に適當と認められた株

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 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、原株にあつては 3 代以内、種ウイルスにあつては 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 産卵低下症候群-1976 ウイルス株

2.1.3.1 名称

産卵低下症候群-1976 ウイルス BC14 株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

発育あひる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。

2.1.3.3 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 2.1.3 の鶏胚肝初代細胞で継代する。

継代は、原株にあつては 3 代以内、種ウイルスにあつては 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

10～11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

11～12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 発育あひる卵

9～11日齢のものを用いる。

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、3.1.1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。

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、原液とする。

原液について、3.3.1、3.3.2.1及び3.3.3.1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 ウイルスの培養

各株の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各株のウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2.1の試験を行う。

2.3.2.3 不活化

各株の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、各株の原液とする。

原液について、3.3.1及び3.3.2.2の試験を行う。

2.3.3 産卵低下症候群-1976ウイルス

2.3.3.1 発育あひる卵の培養

1回に処理する発育あひる卵を個別発育あひる卵とみなす。

個別発育あひる卵について、3.1.2の試験を行う

2.3.3.2 ウイルスの培養

種ウイルスを発育あひる卵で培養し、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。

2.3.3.3 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、原液とする。

原液について、3.3.1、3.3.2.3及び3.3.3.2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各株の原液及び産卵低下症候群-1976ウイルス原液を濃度調整して混合した後、適当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。

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、3.4の試験を行う。

3 試験法

3.1 発育卵の試験

3.1.1 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、これについて次に掲げる試験を行う。

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 発育あひる卵の試験

個体別発育あひる卵の 1 %以上又は 30 個以上を対照発育あひる卵とし、これについて次に掲げる試験を行う。

3.1.2.1 培養観察

対照発育あひる卵を、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、あひる胚に異常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 鶏伝染性気管支炎ウイルス含有量試験

3.2.1.1 試験材料

3.2.1.1.1 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。

3.2.1.1.2 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。

3.2.1.2 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 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。

3.2.1.3 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、M41 株の場合にあっては 1 mL 中 10^{8.0} EID₅₀ 以上及び D274 株の場合にあっては 1 mL 中 10^{7.4} EID₅₀ 以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、そのウイルス含有量とする。

3.3 原液の試験

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 個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で 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。

3.3.2.1.3 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。

3.3.2.2 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 個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、37℃で 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。

3.3.2.3 産卵低下症候群-1976 ウイルス

3.3.2.3.1 試験材料

3.3.2.3.1.1 試料

検体を重亜硫酸ナトリウムで中和したものを試料とする。

3.3.2.3.1.2 培養細胞

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あって、単層となったものを用いる。

3.3.2.3.2 試験方法

試料の 2 mL を 150cm² 以上の培養細胞に接種し、37℃で 5 日間培養した後、その培養上清を採取し、更に 1 代継代し、5 日間培養し、観察する。試験最終日に培養上清を採取し、0.5vol % 鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

3.3.2.3.3 判定

培養細胞に CPE 及び 1 代継代後の培養上清に赤血球凝集性を認めない場合には、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。

3.3.3 抗原量試験

3.3.3.1 ニューカッスル病ウイルス

3.3.3.1.1 試験材料

3.3.3.1.1.1 試料

検体を生理食塩液で 2 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.3.1.1.2 試験方法

各試料 50 μL に 1 vol% 鶏赤血球浮遊液を 25 μL ずつ加えて振盪混合し、30～60 分間静置した後、判定する。

3.3.3.1.1.3 判定

赤血球が完全凝集を示す試料の最高希釈倍数を赤血球凝集単位（以下「HA 単位」という。）とする。

検体の抗原量は、50 μL 中 128HA 単位以上でなければならない。

3.3.3.2 産卵低下症候群-1976 ウイルス

3.3.3.2.1 試験材料

3.3.3.2.1.1 試料

検体を生理食塩液で2倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.3.2.2 試験方法

試料0.05mLに1 vol%鶏赤血球浮遊液を0.025mL加え、30～60分間室温に静置する。

3.3.3.2.3 判定

赤血球凝集を示す試料の最高希釈倍数をHA単位で示す。

抗原量は、0.05mL中4096 HA単位以上でなければならない。

3.4 小分製品の試験

3.4.1 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。

3.4.2 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 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。

3.4.4 安全試験

3.4.4.1 試験材料

3.4.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.4.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の4週齢の鶏を用いる。

3.4.4.2 試験方法

試験動物の10羽を試験群とし、3羽を対照群とする。

注射材料1羽分ずつを試験群の頸部中央部皮下に注射し、対照群とともに4週間観察する。

3.4.4.3 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。

3.4.5 力価試験

3.4.5.1 ニューカッスル病力価試験

3.4.5.1.1 試験材料

3.4.5.1.1.1 試験動物

3.4.4の試験に用いた動物を用いる。

3.4.5.1.1.2 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。

3.4.5.1.2 試験方法

3.4.4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。

3.4.5.1.3 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80倍以上でなければならない。この場合、対照群においては、すべてHI抗体価5倍以下でなければならない。

3.4.5.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

3.4.5.2.1 試験材料

3.4.5.2.1.1 試験動物

3.4.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.4.5.2.1.2 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。

3.4.5.2.1.3 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。

3.4.5.2.2 試験方法

3.4.4 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。

3.4.5.2.3 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、ウイルス対照に対し 1.0 以下でなければならない。

3.4.5.3 産卵低下症候群-1976 力価試験

3.4.5.3.1 試験材料

3.4.5.3.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.5.3.1.2 試験動物

3.4.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.4.5.3.1.3 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。

3.4.5.3.2 試験方法

3.4.4 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（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 0.025mL 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 0.05mL 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。

3.4.5.3.3 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、対照群においては、すべて HI 抗体価 4 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、製造後 3 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 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

250g

リン酸緩衝食塩液

残量

115 °C、15 分間高压滅菌又は窒化ナトリウムを 0.01w/v %添加した後、2 ~ 10 °Cに保存する。