

ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎2価・鶏伝染性ファブリキウス嚢病混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン

平成 24 年 7 月 4 日（告示第 1622 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血清型のそれぞれ異なる 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鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスを培養細胞で増殖させたウイルス液をそれぞれ不活化し、油性アジュバントを添加したものを混合したワクチン、又はそれぞれのウイルス液を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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

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練馬 E_{10} 株及び TM-86EC 株、又は製造に相当と認められた 2 種類の株

2.1.2.2 性状

10 日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に接種すると、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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

2.1.3 鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス

2.1.3.1 名称

弱毒鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス K 株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

鶏胚初代細胞又は Vero 細胞で CPE を伴って増殖する。

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 2.1.1 の鶏胚初代細胞又は同規格 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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 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

製造に相当と認められた日齢のものを用いる。

2.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルスの各株

2.2.2.1 発育鶏卵

製造に相当と認められた日齢のものを用いる。

2.2.3 鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス

2.2.3.1 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞又は製造に相当と認められた細胞を用いる。

2.2.3.2 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。

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

ウイルス浮遊液又はこれを濃縮したものにホルマリンを加えて不活化し、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、3.3.2.1 及び 3.3.3.1 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を濃度調整した後、相当と認められた油性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の各株原液

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、3.2.1.2 の試験を行う。

2.3.2.3 不活化

各ウイルス浮遊液又はこれらを濃縮したものにホルマリンを加えて不活化し、それぞれの株の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。

2.3.2.4 アジュバントの添加

各株の不活化ウイルス浮遊液を濃度調整した後、相当と認められた油性アジュバントを添加し、それぞれの株の原液とする。

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。

2.3.3 鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス原液

2.3.3.1 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。

2.3.3.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個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、3.2.1.3 の試験を行う。

2.3.3.3 不活化

ウイルス浮遊液又はこれを濃縮したものにホルマリンを加えて不活化し、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、3.3.2.3 及び 3.3.3.2 の試験を行う。

2.3.3.4 アジュバントの添加

不活化ウイルス浮遊液を濃度調整した後、適当と認められた油性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、鶏伝染性気管支炎ウイルスの各株原液及び鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス原液を混合し、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、3.5 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 の試験最終日に培養液を採取し、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

3.3.3.1 の試験を実施するものについては、この試験を行わなくてもよい。

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^{9.0}EID₅₀ 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 日齢のものを用いる。

3.2.1.2.2 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 °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。

3.2.1.2.3 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、各株について定められた量以上でなければならない。

3.2.1.3 鶏伝染性ファブリキウス囊病ウイルス

3.3.3.2 の試験を実施するものについては、この試験を行わなくてもよい。

3.2.1.3.1 試験材料

3.2.1.3.1.1 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。

3.2.1.3.1.2 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、単層になったものを用いる。

3.2.1.3.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 枚の培養細胞に接種し、37 °C で 60 分間静置吸着させる。第 1 次重層寒天培地（付記 1）を加え、37 °C で 3～4 日間培養した後、第 2 次重層寒天培地（付記 2）を重層し、観察する。

3.2.1.3.3 判定

試料の各希釈段階の平均ブラック数からウイルス含有量を算出する。検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{8.0}PFU 以上でなければならない。

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、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。

3.3.2.1.3 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、37℃で 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 鶏伝染性ファブリキウス囊病ウイルス

3.3.2.3.1 試験材料

3.3.2.3.1.1 試料

100 倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、検体 5 mL を 4℃で 1 夜透析し、不活化剤を除去したもの又は適当と認められた方法でホルマリンを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 2.1.1 の鶏胚初代細胞で、単層となったものを用いる。

3.3.2.3.2 試験方法

試料 5 mL を、1 mL につき 20cm² 以上の培養細胞に接種し、37℃で K 株では 5 日間、D78 株では 3～4 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、37℃で K 株では 5 日間、D78 株では 3～4 日間培養し、観察する。

3.3.2.3.3 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。

3.3.3 抗原定量試験

3.3.3.1 ニューカッスル病ウイルス

3.2.1.1 の試験を実施するものについては、この試験を行わなくてもよい。

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。

3.3.3.1.2 試験方法

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

3.3.3.1.3 判定

赤血球の凝集を示す試料の最高希釈倍数を赤血球凝集（以下この項において「HA」という。）単位で示す。

抗原量は、0.05mL 中 128HA 単位以上でなければならない。

3.3.3.2 鶏伝染性ファブリキウス囊病ウイルス

3.2.1.3 の試験を実施するものについては、この試験を行わなくてもよい。

3.3.3.2.1 試験材料

3.3.3.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で 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

試料及び参照抗原（付記 3）を R63 モノクローナル抗体（付記 4）で固相化した酵素抗体法（以下この項において「ELISA」という。）用プレート（付記 5）に添加し、37 °C で反応させた後、ビオチン標識 R63 抗体（付記 6）を添加し、37 °C で反応させる。その後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識アビジン（付記 7）を加え、37 °C で反応させた後、過酸化尿素を加えたテトラメチルベンチジンを加え、発色させる。2 mol/L 硫酸を加えて反応を停止させた後、波長 450nm で吸光度を測定する。

3.3.3.2.3 判定

参照抗原及び試料の吸光度から試料の抗原量を計算するとき、R63-ELISA 単位は、1 mL 中 2,500EU 以上でなければならない。

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。

3.5.2 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。

3.5.3 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。

3.5.4 安全試験

3.5.4.1 試験材料

3.5.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.4.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 4 ～ 7 週齢の鶏を用いる。

3.5.4.2 試験方法

試験動物の 10 羽を試験群、3 羽を対照群とする。

注射材料の 1 羽分ずつを試験群の頸部皮下に注射し、対照群と共に 4 週間観察する。

3.5.4.3 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。

3.5.5 力価試験

3.5.5.1 ニューカッスル病力価試験

3.5.5.1.1 試験材料

3.5.5.1.1.1 試験動物

3.5.4 の試験に用いた試験動物を用いる。

3.5.5.1.1.2 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。

3.5.5.1.2 試験方法

3.5.4 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。

3.5.5.1.3 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、対照群の全てが HI 抗体価 5 倍以下でなければならない。

3.5.5.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

3.5.5.2.1 試験材料

3.5.5.2.1.1 試験動物

3.5.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.5.5.2.1.2 中和試験用ウイルス

それぞれの製造用株又は適当と認められた株を用いる。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。

3.5.5.2.1.3 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。

3.5.5.2.2 試験方法

3.5.4 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、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、非働化する。

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℃ 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。

3.5.5.2.3 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したものとみなし、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。

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 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。

3.5.5.3 鶏伝染性ファブリキウス囊病力価試験

3.5.5.3.1 試験材料

3.5.5.3.1.1 試験動物

3.5.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.5.5.3.1.2 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鶏伝染性ファブリキウス囊病ウイルス K 株又は適当と認められた株を用いる。

3.5.5.3.1.3 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、単層になったものを用いる。

3.5.5.3.2 試験方法

3.5.4 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、中和試験を行う。血清を非働化し、リン酸緩衝食塩液又はウイルス増殖用培養液（付記 8）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、4℃で 18 ～ 24 時間又は 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 次重層寒天培地を加え、37℃で 3 ～ 4 日間静置培養する。その後、第 2 次重層寒天培地を重層し、観察する。

3.5.5.3.3 判定

プラック数を 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、対照群は、全て中和抗体価 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、3 年間とする。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 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	20 mL
寒天	10 g
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は加えてもよい。

付記 2 第 2 次重層寒天培地

第 1 次重層寒天培地に 0.5w/v % のニュートラルレッド液を 2 vol % になるように加えたもの。

付記 3 参照抗原

Vero 細胞で培養した鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス D78 株ウイルス液をホルマリンで不活化した後、抗原量を約 10,000EU/mL に調整したもの。

付記 4 R63 モノクローナル抗体

鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスの感染防御抗原である VP2 たん白を認識し、中和活性を有するモノクローナル抗体で、参照抗原が規定の抗原量を示すように固相化緩衝液で濃度を調整したもの。

付記 5 ELISA 用プレート

96 穴平底マイクロプレート

付記 6 ビオチン標識 R63 抗体

参照抗原が規定の抗原量を示すように IB・EIA 緩衝液（付記 9）で濃度を調整したもの。

付記 7 ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識アビジン

参照抗原が規定の抗原量を示すように IB・EIA 緩衝液で濃度を調整したもの。

付記 8 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
牛血清	20 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。

付記 9 IB・EIA 緩衝液

1,000mL 中

リン酸二水素ナトリウム	2.31 g
リン酸水素二ナトリウム二水和物	24.06 g
塩化ナトリウム	29.22 g
カオリン処理 30g/dL 牛血清アルブミン	3.3 mL
ポリソルベート 20	0.5 g
水	残 量

ろ過滅菌後、スキムミルク 2 g/dL 及び牛胎子血清 5 vol % を加える。