

ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎2価・鶏サルモネラ症（サルモネラ・エンテリティディス）混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン

平成 21 年 7 月 1 日（告示第 861 号） 新規追加
平成 22 年 7 月 12 日（告示第 1038 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サルモネラ・エンテリティディスの培養菌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

ニューカッスル病ウイルス Lasota 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。

ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その継代数以内とする。

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

2.1.2.1 名称

鶏伝染性気管支炎ウイルス Holland 52 株及び M-41 株又はこれと同等と認められた 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注射すると、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。

ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その継代数以内とする。

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 サルモネラ・エンテリティディス株

2.1.3.1 名称

サルモネラ・エンテリティディス 037-90 株、038-90 株及び 039-90 株又は適当と認められた株

2.1.3.2 性状

サルモネラ・エンテリティディス基準株に一致する生物学的性状を示す。

2.1.3.3 継代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株では 3 代以内、種菌では 5 代以内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、その継代数以内とする。

原株及び種菌は、凍結して－60℃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

9～11日齢の発育鶏卵を用いる。

2.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

2.2.2.1 発育鶏卵

9～11日齢の発育鶏卵を用いる。

2.2.3 サルモネラ・エンテリティディス

2.2.3.1 培地

製造に相当と認められた液状培地を用いる。

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

ウイルス浮遊液にホルマリンを加えて不活化し、原液とする。

原液について、3.5.1及び3.5.2.1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

各ウイルス浮遊液をホルマリンで不活化し、それぞれの株の原液とする。

原液について、3.5.1及び3.5.2.2の試験を行う。

2.3.3 サルモネラ・エンテリティディス

2.3.3.1 培養

培養した各種菌をそれぞれ培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

各培養菌液について3.3の試験を行う。

2.3.3.2 不活化

各培養菌液にホルマリンを加え不活化したものを不活化菌液とする。

各不活化菌液について、3.4の試験を行う。

2.3.3.3 濃縮

限外ろ過法及び遠心法により不活化菌液の濃縮を行い、原液とする。

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サルモネラ・エンテリティディス原液を濃度調整して混合した後、相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 3.6 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。

3.1.2 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。観察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。

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、1 mL 中 10^{7.0} EID₅₀ 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 1 を準用して試験するとき、サルモネラ・エンテリティディス以外の菌の発育を認めてはならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.3.2 生菌数試験

3.3.2.1 試験材料

3.3.2.1.1 試料

検体を適当と認められた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。

3.3.2.1.2 培地

適当と認められた寒天培地を用いる。

3.3.2.2 試験方法

試料0.1mL ずつをそれぞれ2枚の寒天培地に塗布し、37°Cで18時間培養後、生じたサルモネラ・エンテリティディスの集落数を数える。

3.3.2.3 判定

各段階の希釈液ごとの集落数の平均値、希釈倍率及び培地への接種量から生菌数を算出する。検体の生菌数は、1 mL 中 10^9 個以上でなければならない。

3.4 不活化菌液の試験

3.4.1 不活化試験

3.4.1.1 試験材料

3.4.1.1.1 試料

検体を試料とする。

3.4.1.1.2 培地

適当と認められた寒天培地を用いる。

3.4.1.2 試験方法

試料を培地に接種して培養する。

3.4.1.3 判定

試料を接種した培地では、いかなる菌の発育も認めてはならない。

3.5 原液の試験

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。

観察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ない、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日齢のものを用いる。

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ない。

3.6 小分製品の試験

3.6.1 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。

3.6.2 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。

3.6.3 チメロサル定量試験

チメロサル添加製剤については、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。

3.6.4 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、固有の値以下でなければならない。

3.6.5 安全試験

3.6.5.1 試験材料

3.6.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.6.5.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 3～5 週齢の鶏を用いる。

3.6.5.2 試験方法

試験動物の 10 羽を試験群、3 羽を対照群とする。注射材料の 1 羽分ずつを試験群の肩部皮下に注射し、対照群とともに 4 週間観察を行い、試験最終日に注射部位を剖検する。

3.6.5.3 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。また、剖検したとき、注射局所に著しい異常を認めてはならない。

3.6.6 力価試験

3.6.6.1 ニューカッスル病力価試験

3.6.6.1.1 試験材料

3.6.6.1.1.1 試験動物

3.6.5 の試験に用いた試験動物を用いる。

3.6.6.1.2 試験方法

3.6.5 の試験最終日に、試験群及び対照群から採取した血清について、ニューカッスル病ウイルス赤血球凝集抑制試験を行う。

3.6.6.1.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数で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 80 倍以上でなければならない。この場合、対照群ではすべて HI 抗体価が 5 倍以下でなければならない。

3.6.6.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

3.6.6.2.1 試験材料

3.6.6.2.1.1 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 3～5 週齢の鶏を用いる。

3.6.6.2.1.2 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。

3.6.6.2.1.3 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。

3.6.6.2.2 試験方法

試験動物の 10 羽を注射群、3 羽を対照群とする。注射材料の 1 羽分ずつを試験群の肩部皮下に 4 週間隔で 2 回注射し、第 2 回目の注射後 6 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 個以上の発育鶏卵に注射し、37℃で 7～8 日間培養し、観察する。

3.6.6.2.3 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。

3.6.6.3 鶏サルモネラ症（サルモネラ・エンテリティディス）力価試験

3.6.6.3.1 抗原含有量試験

3.6.6.3.1.1 試験材料

試験品及び参照抗原（付記 1）、参照陽性血清（付記 2）及び参照陰性血清（付記 3）を用いる。

3.6.6.3.2 試験方法

3.6.6.3.2.1 試験品及び参照抗原の前処理

3.6.6.3.2.1.1 試験品の前処理

試験品 2 mL を 30℃で 10 分間加温後、2 w/v % n-オクチル-β-D-グルコピラノサイド添加リン酸緩衝食塩液（付記 4。以下「OG-PBS」という。） 0.1mL、クロロホルム 6 mL、10 w/v % 塩化ナトリウム水溶液 3.9mL を加え、よく攪拌した後、数分間静置する。上層 2 mL を分取し、遠心分離後、上清を完全に除去し、沈渣を 0.5mL の炭酸緩衝液（付記 5）に再浮遊させたものを試験品抗原試料とする。

3.6.6.3.2.1.2 参照抗原の前処理

参照抗原 1 バイアルをリン酸緩衝食塩液（付記 6。以下「PBS」という。）で溶解後、同液で 1 回遠心洗浄し、沈渣を 10mL の PBS に再浮遊させてよく攪拌する。この液 0.5mL を分取し、OG-PBS 0.1mL を加えてよく攪拌した後、1 時間静置する。遠心分離後、上清を完全に除去し、沈渣を 0.5mL の炭酸緩衝液に再浮遊させたものを参照抗原試料とする。

3.6.6.3.2.2 酵素抗体反応（以下「ELISA」という。）

試験品抗原試料及び参照抗原試料を炭酸緩衝液で 50 倍に希釈したものを、あらかじめ炭酸緩衝液 100μL を入れた ELISA 用プレートに 100μL ずつ加え、更に同希釈液で 2 倍階段希釈する。4℃で 18 時間反応させた後、洗浄液（付記 7）で洗浄する。次に 1 w/v % 牛血清アルブミン液（付記 8）を各穴に 100μL ずつ加え、1 時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。更に、参照陽性血清及び参照陰性血清を血清希釈液（付記 9）で 1,000 倍に希釈し、30℃で 10 分間加温したものを各抗原の希釈系列に 100μL ずつ加える。30 分間反応させた後、洗浄液で 4 回洗浄する。30℃で 10 分間

加温した標識抗体（付記 10）を各穴に 100 μ L ずつ加え、30 分間反応させた後、洗浄液で 4 回洗浄する。基質液（付記 11）を 30 $^{\circ}$ C で 10 分間加温した基質希釈液（付記 12）で 10 倍に希釈し、各穴に 100 μ L ずつ加え、10 ～ 15 分間反応させた後、反応停止液（付記 13）を各穴に 100 μ L ずつ加えて反応を停止させ、波長 492nm で各穴の吸光度を測定する。

3.6.6.3.3 判定

試験品抗原試料の 800 倍希釈列における参照陽性血清に対する平均吸光度値を S、参照抗原試料の 800 倍希釈列における参照陽性血清に対する平均吸光度値を R、試験品抗原試料の 800 倍希釈列における参照陰性血清に対する吸光度値を N1、参照抗原試料の 800 倍希釈列における参照陰性血清に対する吸光度値を N2 とし、S/R 比を $(S-N1)/(R-N2)$ により求めるとき、1.0 以上でなければならない。また、R は 0.5 ～ 0.9 未満、N1 及び N2 は 0.2 以下、参照抗原試料の 3,200 倍希釈列における参照陽性血清に対する平均吸光度値は 0.5 未満でなければならない。

3.6.7 抗原性確認試験

3.6.7.1 試験材料

3.6.7.1.1 試験動物

3.6.5 の試験に用いた動物を用いる。

3.6.7.1.2 凝集反応用抗原

「ひな白痢急速診断用菌液」を用いる。

3.6.7.2 試験方法

3.6.5 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を非働化し、凝集反応用抗原を用いて急速平板凝集反応を行う。

凝集反応用抗原 1 滴（約 0.03mL）と血清 1 滴（約 0.03mL）を反応用ガラス板上でよく混和し、凝集の有無を観察する。

3.6.7.3 判定

凝集反応用抗原と血清を混和した後、1 分間以内に凝集したものを陽性、1 分間以内に凝集しないものを陰性とする。

試験群は、90 % 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、農林水産大臣が特に認めた場合には、その期間とする。

5 その他

5.1 添付文書等記載事項

- 1 本剤を鶏に使用する場合は、事前に最寄りの家畜保健衛生所に相談の上、指示を受け、標識した無注射鶏を 1 % 程度残す旨
- 2 本剤を投与した鶏はひな白痢の抗体検査で陽性を示す旨
- 3 本剤の投与と併せて、国が定めた鶏卵のサルモネラ総合対策指針に基づき、総合的な衛生管理対策を実施する旨

付記 1 参照抗原

サルモネラ・エンテリティディス 037-90、038-90 及び 039-90 株のホルマリン不活化菌浮遊液を等量ずつ混合し、安定剤と水を加える。本液 1.75mL を分取して前処理を行い抗原試料を調整した後、更に 800 倍希釈した液について、参照陽性血清を用いた ELISA を行ったとき、基質液の反応時間 10 分で吸光度値が 0.5 となるように調整したものであり、1 パイアル当たり 1.75mL ずつ小分けして、凍結乾燥し、保存する。

付記 2 参照陽性血清

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏をサルモネラ・エンテリティディスで免疫して得た血清であり、「ひな白痢急速診断用菌液」を用いて急速平板凝集反応を行ったとき、抗体価 8～16 倍を示す。小分けして、凍結乾燥し、保存する。

付記 3 参照陰性血清

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏から得た血清であり、「ひな白痢急速診断用菌液」を用いて急速平板凝集反応を行ったとき、陽性反応を示さない。小分けして凍結乾燥し、保存する。

付記 4 2 w/v % *n*-オクチル-β-D-グルコピラノサイド添加リン酸緩衝食塩液

1,000mL 中

<i>n</i> -オクチル-β-D-グルコピラノサイド	20 g
塩化ナトリウム	8.0 g
塩化カリウム	0.2 g
リン酸二水素カリウム	0.2 g
無水リン酸水素二ナトリウム	1.15 g
水	残量

pH を 7.4～7.6 に調整する。

付記 5 炭酸緩衝液

1,000mL 中

炭酸ナトリウム	1.59 g
炭酸水素ナトリウム	2.93 g
アジ化ナトリウム	0.2 g
水	残量

pH を 9.6 に調整する。

付記 6 リン酸緩衝食塩液

1,000mL 中

塩化ナトリウム	8.0 g
塩化カリウム	0.2 g
リン酸二水素カリウム	0.2 g
無水リン酸水素二ナトリウム	2.9 g
水	残量

pH を 7.4～7.6 に調整する。

付記 7 洗浄液

ポリソルベート 20 0.5mL をリン酸緩衝食塩液 1,000mL に溶解したもの

付記 8 1 w/v % 牛血清アルブミン液

牛血清アルブミン 1.0 g を洗浄液 100mL に使用直前に溶解したもの

付記 9 血清希釈液

1,000mL 中

牛胎子血清	10 mL
-------	-------

ポリソルベート 20	1 mL
リン酸緩衝食塩液	残 量

付記 10 標識抗体

ペルオキシダーゼ標識抗鶏 IgG 抗体を標識抗体希釈液（付記 14）で希釈したもの

付記 11 基質液

1,000mL 中

o-フェニレンジアミン	5 g
-------------	-----

クエン酸一水和物	21 g
----------	------

無水リン酸水素二ナトリウム	28.4 g
---------------	--------

水	残 量
---	-----

溶解後、速やかに小分けして、 -70°C 以下に保存する。

付記 12 基質希釈液

1,000mL 中

クエン酸一水和物	21.01 g
----------	---------

無水リン酸水素二ナトリウム	28.40 g
---------------	---------

過酸化水素（30%）	1 mL
------------	------

水	残 量
---	-----

付記 13 反応停止液

1,000mL 中

硫酸	84 mL
----	-------

水	残 量
---	-----

付記 14 標識抗体希釈液

1,000mL 中

牛胎子血清	1 mL
-------	------

ポリソルベート 20	2 mL
------------	------

リン酸緩衝食塩液	残 量
----------	-----