

ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎2価・鶏伝染性コ リーザ（A・C型）混合（油性アジュバント加）不活化 ワクチン

平成 16 年 4 月 23 日（告示第 977 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

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ヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌及び C 型菌の
培養菌液をそれぞれ不活化したものに油性アジュバントを添加し、混合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

鶏伝染性気管支炎ウイルス練馬E10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、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℃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。鶏赤血球を凝集する。

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 53-47 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5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

9～10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

10～11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 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、3.4.1及び3.4.2.1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油性アジュバントを添加し、原液とする。

原液について、3.6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。

2.3.2.3 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。

2.3.2.4 不活化

各ウイルス浮遊液を濃縮したものをホルマリンで不活化し、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、3.4.1 及び 3.4.2.2 の試験を行う。

2.3.2.5 アジュバントの添加

各株の不活化ウイルス浮遊液に適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。

原液について、3.6 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

種菌を製造用培地に接種したものを更に製造用培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.3 の試験を行う。

2.3.3.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加えて不活化後、濃縮したものを不活化菌液とする。

不活化菌液について、3.5 の試験を行う。

2.3.3.3 アジュバントの添加

不活化菌液に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。

原液について、3.6 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ヘモフィルス・パラガリナルム各型菌原液を混合し、濃度調整したものを最終バルクとする。

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、3.7 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、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

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^{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

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。

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を準用して試験するとき、含有菌以外の菌の発育を認めてはならない。

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

鶏血清加寒天培地（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、A 型菌では 1 mL 中 10^{8.5} 個以上、C 型菌では 1 mL 中 10^{9.0} 個以上でなければならない。

3.4 不活化ウイルス浮遊液の試験

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。

3.4.2 不活化試験

3.4.2.1 ニューカッスル病ウイルス

3.4.2.1.1 試験材料

3.4.2.1.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.4.2.1.1.2 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。

3.4.2.1.2 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性を調べる。

3.4.2.1.3 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性を認めてはならない。

3.4.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

3.4.2.2.1 試験材料

3.4.2.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.4.2.2.1.2 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。

3.4.2.2.2 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。

3.4.2.2.3 判定

鶏胚は、正常に発育しなければならない。

3.5 不活化菌液の試験

3.5.1 不活化試験

3.5.1.1 試験材料

3.5.1.1.1 接種材料

検体を接種材料とする。

3.5.1.1.2 培地

鶏血清加寒天培地（付記 1）又は適当と認められた培地を用いる。

3.5.1.2 試験方法

接種材料 0.1mL ずつを 2 枚以上の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、集落の有無を観察する。

3.5.1.3 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。

3.5.2 総菌数試験

3.5.2.1 試験材料

3.5.2.1.1 試料

検体又は検体をリン酸緩衝食塩液で適度に希釈したものを試料とする。

3.5.2.2 試験方法

試料の濁度を、分光光度計で測定する。

3.5.2.3 判定

標準検量線、濁度の測定値及び検体の希釈度から総菌数を算出する。

検体中の総菌数は、A型菌では1 mL中 2.8×10^9 個以上、C型菌では1 mL中 1.2×10^{10} 個以上でなければならない。

3.6 原液の試験

3.6.1 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。

3.7 小分製品の試験

3.7.1 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。

3.7.2 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。

3.7.3 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。

3.7.4 安全試験

3.7.4.1 試験材料

3.7.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.7.4.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の5～7週齢の鶏を用いる。

3.7.4.2 試験方法

試験動物 10羽を試験群、3羽を対照群とする。

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

3.7.4.3 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。

3.7.5 力価試験

3.7.5.1 ニューカッスル病力価試験

3.7.5.1.1 試験材料

3.7.5.1.1.1 試験動物

3.7.4の試験に用いた試験動物を用いる。

3.7.5.1.1.2 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。

3.7.5.1.2 試験方法

3.7.4 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。

3.7.5.1.3 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「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、対照群のすべてが 5 倍以下でなければならない。

3.7.5.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

3.7.5.2.1 試験材料

3.7.5.2.1.1 試験動物

3.7.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.7.5.2.1.2 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接種し、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。

3.7.5.2.1.3 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。

3.7.5.2.2 試験方法

3.7.4 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を非働化し、中和試験を行う。

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。

3.7.5.2.3 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。

3.7.5.3 鶏伝染性コリーザ（A・C型）力価試験

3.7.5.3.1 試験材料

3.7.5.3.1.1 試験動物

3.7.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.7.5.3.1.2 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 2）を用いる。

3.7.5.3.2 試験方法

3.7.4 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。

3.7.5.3.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数をHI抗体価とする。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反応において試験群の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、3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 鶏血清加寒天培地

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 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 %固定鶏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