

ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎2価・マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン

平成 18 年 8 月 16 日（告示第 1162 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マイコプラズマ・ガリセプチカム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 Kimber 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株

2.1.2.1 名称

鶏伝染性気管支炎ウイルス M-41 株及び H-52 株又は製造に相当と認められた株

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 マイコプラズマ・ガリセプチカム

2.1.3.1 名称

マイコプラズマ・ガリセプチカム R-980 株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

鶏に対して病原性を示す。

2.1.3.4 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は、その継代数以内とする。

原株及び種菌は、凍結して-40℃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

8～14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

10～12日齢のものを用いる。

2.2.3 マイコプラズマ・ガリセプチカム

2.2.3.1 培地

製造に適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、3.2.1.1の試験を行う。

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、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、3.6.1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それぞれ発育鶏卵で培養し、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 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に適当と認められた油性アジュバントを添加し、各株の原液とする。

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、3.6.1 の試験を行う。

2.3.3 マイコプラズマ・ガリセプチカム原液

2.3.3.1 培養

培養した種菌を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

培養した菌液にホルマリンを加えて不活化後、適当と認められた希釈用液で遠心洗浄し、適量の希釈用液に再浮遊させたもの又は培養菌液にホルマリンを加えて不活化後、適当と認められた方法で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

不活化菌液を適当と認められた希釈用液で濃度調整し、適当と認められた油性アジュバントを添加したものを原液とする。

ただし、アジュバントは最終バルクの調製時に添加してもよい。

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各株の原液及びマイコプラズマ・ガリセプチカム原液を混合し、濃度調整したものを最終バルクとする。この場合、適当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、3.7 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、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。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 10⁶EID₅₀ 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、1 mL 中 10^{8.0}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、適合しなければならない。

3.3.2 生菌数試験

適当と認められた方法で試験するとき、適合しなければならない。

3.5.2 の総菌数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。

3.4 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、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、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。

3.4.2.1.3 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、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。

3.4.2.2.3 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。

3.5 不活化菌液の試験

3.5.1 不活化試験

適当と認められた方法で試験するとき、適合しなければならない。

3.5.2 総菌数試験

適当と認められた方法で試験するとき、適合しなければならない。

3.3.2の生菌数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。また、原液の調製時にこの試験を行ってもよい。

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。

3.6.2 総菌数試験

適当と認められた方法で試験するとき、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ず、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、これに適合しなければならない。

3.7.3 ホルマリン定量試験

ホルマリン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30～35日齢の鶏を用いる。

3.7.4.2 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 1 羽分ずつを試験群の頸背部皮下に 4 週間隔で 2 回接種し、対照群とともに 6 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 の試験の初回注射から 4 週間目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、対照群では、すべて HI 抗体価 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。

3.7.5.2.1.3 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。

3.7.5.2.3 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。

3.7.5.3 マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症力価試験

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

マイコプラズマ・ガリセプチカム赤血球凝集抗原（付記1）を用いる。

3.7.5.3.2 試験方法

3.7.4 の試験の初回注射から4週間目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、マイコプラズマ・ガリセプチカム赤血球凝集抑制試験を行う。

血清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単位のマイコプラズマ・ガリセプチカム赤血球凝集抗原を加えて混合し、15～20分間処理した後、0.25vol %鶏赤血球浮遊液を50 μ L ずつ加えて振盪混合し、4℃で一夜処理した後、赤血球凝集の有無を観察する。

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。

試験群の HI 抗体価の幾何平均値は 40 倍を超えなければならない。この場合、対照群では、すべて HI 抗体価 4 倍未満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6か月間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合は、その期間とする。

付記1 マイコプラズマ・ガリセプチカム赤血球凝集抗原

製造用株を培養し、ホルマリンを加えて不活化した菌液を遠心洗浄後、再浮遊し、これにグリセリンを等量加え、-20℃以下に保存したもの