

ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎・鶏伝染性コリーザ（A・C型）・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 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鶏伝染性気管支炎ウイルスを発育鶏卵で増殖し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型及びC型菌）及びマイコプラズマ・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滋賀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、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。牛、馬、羊、鶏及びモルモットの赤血球を凝集する。

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 KA 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 2 代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結乾燥して 5℃以下で保存する。

2.1.5 マイコプラズマ・ガリセプチカム株

2.1.5.1 名称

マイコプラズマ・ガリセプチカム TK 株又はこれと同等と認められた株

2.1.5.2 性状

鶏に対して病原性を示す。

2.1.5.3 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 2 代以内でなければならない。

原株及び種菌は、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

9～11 日齢のものを用いる。

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

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.2.4 マイコプラズマ・ガリセプチカム

2.2.4.1 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及び鶏胚乳剤の遠心上清を適当と認められた方法で濃縮したもの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、3.4.1 及び 3.4.2.1 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

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及び鶏胚乳剤の遠心上清を適当と認め

られた方法で濃縮したものをウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2.1.2 の試験を行う。

2.3.2.3 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、3.4.1 及び 3.4.2.2 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

製造用培地で培養した種菌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、3.3.1 及び 3.3.2.1 の試験を行う。

2.3.3.2 不活化

培養菌液を遠心して得た菌をリン酸緩衝食塩液に浮遊させたものにチメロサルを加えて不活化し、原液とする。

原液について、3.4.1 及び 3.4.2.3 の試験を行う。

2.3.4 マイコプラズマ・ガリセプチカム原液

2.3.4.1 培養

培養した種菌を培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.3.1 及び 3.3.2.2 の試験を行う。

2.3.4.2 不活化

培養菌液を遠心して得た菌をリン酸緩衝食塩液に浮遊させたものにチメロサルを加えて不活化し、原液とする。

原液について、3.4.1 及び 3.4.2.4 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原液、ヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌原液、ヘモフィルス・パラガリナルム C 型菌原液及びマイコプラズマ・ガリセプチカム原液をそれぞれ濃度調整して混合し、適当と認められた油性アジュバント及び保存剤を添加し、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 日齢の発育鶏卵を用いる。

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^{8.7}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 日齢の発育鶏卵を用いる。

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 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）を示し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^{7.5}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

3.3.2.1 ヘモフィルス・パラガリナルムの各型菌

3.3.2.1.1 試験材料

3.3.2.1.1.1 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。

3.3.2.1.1.2 培地

試験用培地（付記 1）を用いる。

3.3.2.1.2 試験方法

各試料 0.1mL ずつをそれぞれ 2 枚以上の試験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。

3.3.2.1.3 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、1 mL 中 10^{9.0} 個以上でなければならない。

3.3.2.2 マイコプラズマ・ガリセプチカム

3.3.2.2.1 試験材料

3.3.2.2.1.1 試料

検体を適当と認められた希釈液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.2.2.1.2 培地

適当と認められた寒天平板培地を用いる。

3.3.2.2.2 試験方法

各試料 0.1mL ずつをそれぞれ 2 枚以上の寒天平板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14日間培養後、集落数を数える。

3.3.2.2.3 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、1 mL 中 $10^{8.0}$ 個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。

3.4.2 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日齢の発育鶏卵を用いる。

3.4.2.1.2 試験方法

注射材料 0.1mL ずつを10個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。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ない。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日齢の発育鶏卵を用いる。

3.4.2.2.2 試験方法

注射材料 0.1mL ずつを10個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。試験最終日に鶏胚の変化を観察する。

3.4.2.2.3 判定

鶏胚は、正常に発育しなければならない。

3.4.2.3 ヘモフィルス・パラガリナルムの各型菌

3.4.2.3.1 試験材料

3.4.2.3.1.1 接種材料

検体を接種材料とする。

3.4.2.3.1.2 培地

試験用培地を用いる。

3.4.2.3.2 試験方法

接種材料 0.1mL ずつを2枚以上の試験用培地に接種して培地表面に拡散させ、37℃ 5 vol %炭酸ガス下で48時間培養後、集落の有無を観察する。

3.4.2.3.3 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。

3.4.2.4 マイコプラズマ・ガリセプチカム

3.4.2.4.1 試験材料

3.4.2.4.1.1 接種材料

検体を接種材料とする。

3.4.2.4.1.2 培地

適当と認められた寒天平板培地を用いる。

3.4.2.4.2 試験方法

接種材料 0.1mL ずつを 2 枚以上の寒天平板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 10 日間培養する。

3.4.2.4.3 判定

接種材料を接種したすべての培地上にマイコプラズマ・ガリセプチカムの集落を認めてはならない。

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。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 チメロサル定量試験

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。

3.5.4 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、0.06 vol %以下でなければならない。

3.5.5 安全試験

3.5.5.1 試験材料

3.5.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.5.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 30 ~ 35 日齢の鶏を用いる。

3.5.5.2 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 1 羽分ずつを試験群の筋肉内に注射し、対照群とともに 5 週間観察し、試験最終日に注射部位を剖検する。

3.5.5.3 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、注射部位に著しい異常を認めてはならない。

3.5.6 力価試験

3.5.6.1 ニューカッスル病力価試験

3.5.6.1.1 試験材料

3.5.6.1.1.1 試験動物

3.5.5 の試験に用いた動物を用いる。

3.5.6.1.1.2 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。

3.5.6.1.2 試験方法

3.5.5 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。

3.5.6.1.3 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 160 倍以上でなければならない。この場合、対照群はすべて HI 抗体価 5 倍以下でなければならない。

3.5.6.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

3.5.6.2.1 試験材料

3.5.6.2.1.1 試験動物

3.5.5 の試験に用いた動物を用いる。

3.5.6.2.1.2 中和試験用ウイルス

適当と認められた株を用いる。

3.5.6.2.1.3 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.2.1 の鶏腎初代細胞を用いる。

3.5.6.2.2 試験方法

3.5.5 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中和試験を行う。各群ごとに血清をそれぞれ等量プールし、非働化する。

血清を細胞増殖用培養液（付記 2）で 20 倍に希釈した後、更に 5 倍階段希釈し、各段階の希釈液に 0.4mL 中 200PFU となるように調整した中和試験用ウイルス液を等量混合し、4℃で 18～24 時間又は 37℃で 60 分間処理する。処理した液 0.4mL ずつをそれぞれ 4 枚以上の鶏腎初代細胞を培養したシャーレに接種し、37℃で 60 分間吸着させ第 1 次重層寒天培地（付記 3）を重層し、2 日後更に第 2 次重層寒天培地（付記 4）を重層し、24～48 時間培養し、ブラックの出現を観察する。

3.5.6.2.3 判定

各希釈系列のブラック平均数から 50 %ブラック減少を示す血清希釈倍数を求め、中和抗体価を算出する。

試験群の中和抗体価は、100 倍以上でなければならない。この場合、対照群の中和抗体価は、20 倍以下でなければならない。

3.5.6.3 鶏伝染性コリーザ（A・C 型）力価試験

3.5.6.3.1 試験材料

3.5.6.3.1.1 試験動物

3.5.5 の試験に用いた動物を用いる。

3.5.6.3.1.2 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 5）を用いる。

3.5.6.3.2 試験方法

3.5.5 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。

3.5.6.3.3 判定

赤血球凝集抑制抗体価 5 倍以上を陽性とする。

それぞれの赤血球凝集抑制試験において、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。

3.5.6.4 マイコプラズマ・ガリセプチカム力価試験

3.5.6.4.1 試験材料

3.5.6.4.1.1 試験動物

3.5.5 の試験に用いた動物を用いる。

3.5.6.4.1.2 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6）を用いる。

3.5.6.4.2 試験方法

3.5.5 の注射後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 %の鶏赤血球浮遊液を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。

3.5.6.4.3 判定

赤血球の凝集が抑制された血清の最高希釈倍数でHI抗体価を表す。

試験群のHI抗体価の幾何平均値は37倍を超えなければならない。この場合、対照群では、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 試験用培地

1,000 mL 中

ペプトン	1	g
塩化ナトリウム	5	g
イーストエキストラクト	5	g
寒天	15	g
鶏肉水	残	量

pHを7.0～7.4に調整し、121℃で15分間高压滅菌する。

約50℃に冷却後、鶏の非働化血清を3～5 vol %になるように加える。

なお、適当と認められたV因子を加えてもよい。

付記2 細胞増殖用培養液

1,000 mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95	g
牛血清	50	mL
イーグルMEM	残	量

炭酸水素ナトリウムでpHを6.8～7.2に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記3 第1次重層寒天培地

1,000 mL 中

イーストエキストラクト	1.0	g
ラクトアルブミン	5.0	g
牛血清アルブミン	10.0	g
牛血清	20	mL
寒天	9.0	g
アール液	残	量

炭酸水素ナトリウムでpHを6.8～7.2に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記4 第2次重層寒天培地

1,000 mL 中

イーストエキストラクト	1.0 g
ラクトアルブミン	5.0 g
ニュートラルレッド	120 mg
寒天	9.0 g
アール液	残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 6.8 ~ 7.2 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記5 鶏伝染性コリーザ（C型）赤血球凝集抗原

ヘモフィルス・パラガリナラム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

付記6 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