

ニューカッスル病・鶏伝染性気管支炎2価・産卵低下症候群－1976・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、産卵低下症候群－1976ウイルスを発育あひる卵又は培養細胞で増殖させ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

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

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、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℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

2.1.3 産卵低下症候群－1976ウイルス

2.1.3.1 名称

産卵低下症候群－1976ウイルス KE-80 株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

11日齢の発育鶏卵又は14日齢の発育あひる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。

2.1.3.3 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 1.1 の発育鶏卵、同規格 1.3 の発育あひる卵又は EB66 細胞で継代する。

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 -40°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

2.1.4 ヘモフィルス・パラガリナルム A 型菌

2.1.4.1 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

2.1.4.2 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。

2.1.4.3 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。

2.1.5 ヘモフィルス・パラガリナルム C 型菌

2.1.5.1 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

2.1.5.2 性状

鶏及び発育鶏卵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、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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

2.1.6 マイコプラズマ・ガリセプチカム

2.1.6.1 名称

マイコプラズマ・ガリセプチカム 63-523 株又はこれと同等と認められた株

2.1.6.2 性状

鶏に対して病原性を示す。

2.1.6.3 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、凍結して -40°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

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 産卵低下症候群—1976 ウイルス

2.2.3.1 発育あひる卵

9～13 日齢のものを用いる。

2.2.3.2 培養細胞

EB66 細胞を用いる。

2.2.3.3 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

2.2.4 ヘモフィルス・パラガリナルムの各型菌

2.2.4.1 培地

製造に相当と認められた培地を用いる。

2.2.5 マイコプラズマ・ガリセプチカム

2.2.5.1 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、3.1.1 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

ウイルス浮遊液を相当と認められた方法で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をリン酸緩衝食塩液で濃度調整した後、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。

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、3.1.1 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

各株のウイルス浮遊液を相当と認められた方法で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、3.4.1 及び 3.4.2.2 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リン酸緩衝食塩液で濃度調整した後、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。

原液について、3.6 の試験を行う。

2.3.3 産卵低下症候群－1976 ウイルス原液

2.3.3.1 発育あひる卵又は培養細胞の培養

2.3.3.1.1 発育あひる卵の培養

1 回に処理する発育あひる卵を個別発育あひる卵とみなす。

個別発育あひる卵について、3.1.2 の試験を行う。

2.3.3.1.2 培養細胞の培養

1 回処理し、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、3.1.3 の試験を行う。

2.3.3.2 ウイルスの培養

種ウイルスを発育あひる卵で培養し、感染増殖させた尿膜腔液を遠心若しくはろ過したもの、又は種ウイルスを培養細胞に接種して培養し、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若しく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 及び 3.2.2 の試験を行う。

2.3.3.3 不活化

ウイルス浮遊液を適当と認められた方法で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 3.4.2.3 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リン酸緩衝食塩液で濃度調整した後、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。

原液について、3.6 の試験を行う。

2.3.4 ヘモフィルス・パラガリナルムの各型菌原液

2.3.4.1 培養

種菌を製造用培地で培養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、3.3.1 及び 3.3.2.1 の試験を行う。

2.3.4.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加えて不活化した後、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、3.5.1.1 及び 3.5.2.1 の試験を行う。

2.3.4.3 アジュバントの添加

不活化菌液をリン酸緩衝食塩液で濃度調整した後、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。

原液について、3.6 の試験を行う。

2.3.5 マイコプラズマ・ガリセプチカム

2.3.5.1 培養

種菌を製造用培地で培養したものを更に製造用培地に接種・継代し、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。

2.3.5.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加えて不活化した後、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、3.5.1.2 及び 3.5.2.2 の試験を行う。

2.3.5.3 アジュバントの添加

不活化菌液をリン酸緩衝食塩液で濃度調整した後、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。

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、産卵低下症候群－1976 ウイルス原液、ヘモフィルス・パラガリナルム各型菌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。

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 発育卵又は培養細胞の試験

3.1.1 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。

3.1.1.1 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 発育あひる卵の試験

個体別発育あひる卵の 1 % 以上又は 30 個以上を対照発育あひる卵とし、これについて次の試験を行う。

3.1.2.1 培養観察

対照発育あひる卵を、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、あひる胚に異常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。

3.1.3 培養細胞の試験

個体別培養細胞の 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。

3.1.3.1 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。

ただし、対照培養細胞に加えるウイルス増殖用培養液は、牛血清を最終濃度 3 ~ 5 % となるように添加したものをを用いる。

3.1.3.2 鶏赤血球凝集試験

3.1.3.1 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

3.2.1.1.1 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。

3.2.1.3 産卵低下症候群－1976 ウイルス

3.2.1.3.1 試験材料

3.2.1.3.1.1 試料

検体をイーグル MEM 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 2.1.3 の鶏胚肝初代細胞を用いる。

3.2.1.3.2 試験方法

試料 50 μL と培養細胞浮遊液 100 μL を 96 穴マイクロプレート 4 穴以上に分注・混合し、37 °C で 8 日間培養し、観察する。試験最終日に各穴の培養液を採取し、0.5vol % 鶏赤血球浮遊液を用いて赤血球凝集の有無を観察する。

3.2.1.3.3 判定

培養細胞に CPE 又は培養液に赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 $10^{7.3}$ TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.2.2 赤血球凝集試験

3.2.2.1 試験材料

3.2.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.2.2 試験方法

マイクロタイター法で赤血球凝集試験を行う。試料に 0.5vol % 鶏赤血球浮遊液を等量加え、60 分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

3.2.2.3 判定

赤血球凝集が観察された試料の最高希釈倍数を赤血球凝集単位とする。

検体の赤血球凝集単位は、640 倍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

鶏血清加寒天培地（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、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。

3.3.2.2 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。

3.3.2.2.1.2 培地

変法シャノック寒天培地（付記 2）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 枚以上の培地に接種して培地表面に拡散させ、37 °C で 7 日間培養した後、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 $10^{7.8}$ 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、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、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。

3.4.2.1.3 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、37℃で 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。

3.4.2.3 産卵低下症候群－ 1976 ウイルス

3.4.2.3.1 試験材料

3.4.2.3.1.1 注射材料又は接種材料

発育卵に接種する場合は、検体を注射材料とする。

培養細胞に接種する場合は、検体を滅菌した透析チューブに入れ、4℃で 1,000 倍量以上のリン酸緩衝食塩液中で 24 時間透析し不活化剤を除去し、又は不活化剤を中和した後、これを無菌的に回収したものを接種材料とする。

3.4.2.3.1.2 発育卵又は培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の 7～9 日齢の発育鶏卵、同規格 1.3 の 9～14 日齢の発育あひる卵又は同規格 2.1.3 の鶏胚肝初代細胞を用いる。

3.4.2.3.2 試験方法

発育卵を用いる場合は、注射材料を 10 個以上の発育卵の尿膜腔内に 0.1mL ずつ注射し、37℃で 7 日間培養した後、尿膜腔液を採取し、更に 1 代継代し、37℃で 7 日間培養し、胚を観察する。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の有無を観察する。

培養細胞を用いる場合は、接種材料の 0.1mL と鶏胚肝初代細胞浮遊液 2.0mL を 6 穴プレートの 5 穴に分注、混合し、37℃で 8 日間培養した後、更に 1 代継代し、37℃で 8 日間培養し、CPE を観察する。試験最終日に各穴の培養液を 50 μ L ずつ採取し、0.5vol % 鶏赤血球浮遊液を等量加え、60 分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

3.4.2.3.3 判定

発育卵を用いる場合は、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。

培養細胞を用いる場合は、培養細胞に CPE を認めず、培養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

3.5.1.1 ヘモフィルス・パラガリナルムの各型菌

3.5.1.1.1 試験材料

3.5.1.1.1.1 接種材料

検体を接種材料とする。

3.5.1.1.1.2 培地

鶏血清加寒天培地又は適当と認められた培地を用いる。

3.5.1.1.2 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℃、5 vol % 炭酸ガス下で 48 時間培養した後、集落の有無を観察する。

3.5.1.1.3 判定

接種材料を接種した全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。

3.5.1.2 マイコプラズマ・ガリセプチカム

3.5.1.2.1 試験材料

3.5.1.2.1.1 接種材料

検体を接種材料とする。

3.5.1.2.1.2 培地

変法シャノック培地（付記3）及び変法シャノック寒天培地、又は適当と認められた培地を用いる。

3.5.1.2.2 試験方法

変法シャノック培地 100mL に接種材料 1 mL を接種後、37℃で 14 日間培養する。培養後、3、7、10 及び 14 日目に培養液 0.1mL ずつを 2 枚以上の変法シャノック寒天培地に接種して培地表面に拡散させ、37℃で 7 日間培養後、集落の有無を観察する。

3.5.1.2.3 判定

全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。

3.5.2 総菌数試験

3.5.2.1 ヘモフィルス・パラガリナルムの各型菌

3.5.2.1.1 試験材料

3.5.2.1.1.1 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。

3.5.2.1.2 試験方法

試料の濁度を分光光度計で測定する。

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。

3.5.2.1.3 判定

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。

3.5.2.2 マイコプラズマ・ガリセプチカム

3.5.2.2.1 試験材料

3.5.2.2.1.1 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。

3.5.2.2.2 試験方法

試料の濁度を、分光光度計で測定する。

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。

3.5.2.2.3 判定

検体中の総菌数は、1 mL 中 $10^{8.8}$ 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。

3.7.2 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 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。

3.7.4.3 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、対照群では、全て 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。

3.7.5.2.3 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 産卵低下症候群－1976 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 の試験で用いた動物を用いる。

3.7.5.3.1.2 赤血球凝集抗原

産卵低下症候群－1976 ウイルス赤血球凝集抗原（付記4）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群及び対照群から得られた各個体の血清について、赤血球凝集抑制試験を行う。

血清1容に25w/v%カオリン液（付記5）3容を加え、20分間処理した後、遠心した上清を採取する。これ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単位の産卵低下症候群－1976 ウイルス赤血球凝集抗原を加えて混合し、30分間処理した後、0.5vol%の鶏赤血球浮遊液を50 μ Lずつ加えて振とう混合し、60分間静置した後に、赤血球凝集の有無を観察する。

3.7.5.3.3 判定

赤血球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80%以上がHI抗体価32倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全てHI抗体価4倍以下でなければならない。

3.7.5.4 鶏伝染性コリザ（A・C型）力価試験

3.7.5.4.1 試験材料

3.7.5.4.1.1 試験動物

3.7.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.7.5.4.1.2 赤血球凝集抗原

「鶏伝染性コリザ（A型）診断用赤血球凝集抗原」及び鶏伝染性コリザ（C型）赤血球凝集抑制反応用抗原（付記6）を用いる。

3.7.5.4.2 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、鶏伝染性コリザ（A型）赤血球凝集抑制試験及び鶏伝染性コリザ（C型）赤血球凝集抑制試験を行う。

3.7.5.4.3 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、全て陰性でなければならない。

3.7.5.5 マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症力価試験

3.7.5.5.1 試験材料

3.7.5.5.1.1 試験動物

3.7.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.7.5.5.1.2 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7）を用いる。

3.7.5.5.2 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、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ずつ加えて振とう混合し、4 $^{\circ}$ Cで1夜又は室温で120分間処理した後、赤血球凝集の有無を観察する。

3.7.5.5.3 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、8 倍を超えなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その幾何平均値とする。この場合、対照群は、全て 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 鶏血清加寒天培地

1,000mL 中

鶏肉水	300 mL
ペプトン	5 g
カザミノ酸	1 g
グルタミン酸ナトリウム	1 g
塩化ナトリウム	5 g
寒天	15 g
水	残 量

pH を 7.0 ~ 7.4 に調整し、高圧滅菌する。冷却した後、鶏血清 25mL 及び β -ニコチンアミド・アデニン・ジヌクレオチド 0.005g を加える。

付記 2 変法シャノック寒天培地

1,000mL 中

A

PPLO Broth w/o CV	16 g
寒天	9 g
水	750 mL

高圧滅菌又はろ過滅菌後、50 ~ 60 °C に冷却する。

B

非加熱馬血清	200 mL
25w/v % 新鮮イーストエキス	50 mL
50w/v % グルコース液	20 mL
ベンジルペニシリンカリウム	100 万単位

ろ過滅菌する。

A と B を混合する。

付記 3 変法シャノック培地

1,000mL 中

A

PPLO Broth w/o CV	16 g
0.4w/v % フェノールレッド	0.4 mL
水	750 mL

高圧滅菌又はろ過滅菌する。

B

非加熱馬血清	200 mL
25w/v % 新鮮イーストエキス	50 mL
50w/v % グルコース液	20 mL

ベンジルペニシリンカリウム

100 万単位

ろ過滅菌する。

A と B を混合し、1 mol/L 水酸化ナトリウム液で pH を 7.6 ～ 8.0 に調整する。

付記 4 産卵低下症候群－ 1976 ウイルス赤血球凝集抗原

産卵低下症候群－ 1976 ウイルス JPA-1 株又はこれと同等と認められた株を生ワクチン製造用材料の規格 1.3 の発育あひる卵で増殖させて得た尿膜腔液又は生ワクチン製造用材料の規格 2.1.3 の鶏胚肝初代細胞で増殖させて得た培養上清に 0.2vol % になるようにホルマリンを加えて不活化したもの。

付記 5 25w/v %カオリン液

100mL 中

カオリン

25 g

リン酸緩衝食塩液

残 量

高圧滅菌又はアジ化ナトリウムを 0.01w/v% 添加した後、2 ～ 10 °C に保存する。

付記 6 鶏伝染性コリーザ（C型）赤血球凝集抑制反応用抗原

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。

付記 7 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 °C 以下に保存したもの。