

動物用生物学的製剤基準の一部を改正する件 新旧対照表

○動物用生物学的製剤基準（平成 14 年 10 月 3 日農林水産省告示第 1567 号）（抄）

次の表により、改正後欄に掲げる規定の傍線を付した部分を加える。

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く）の部 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 （略） <u>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 型組換え融合抗原） 混合（油性アジュバント加）不活化ワクチン</u> <u>1 定義</u> シードロット規格に適合したニューカッスル病ウイルスを同規格に適合した発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液、シードロット規格に適合した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同規格に適合した発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液をそれぞれ不活化したもの及びアビバクテリウム・パラガリナルム（A 型菌及び C 型菌）の組換え融合抗原産生大腸菌に発現させた組換えたん白質の可溶化溶液に油性アジュバントを添加し、混合したワクチンである。 <u>2 製法</u> <u>2.1 製造用株</u> <u>2.1.1 ニューカッスル病ウイルス</u> <u>2.1.1.1 名称</u> 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 <u>2.1.1.2 性状</u> 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。 <u>2.1.1.3 マスターシードウイルス</u> <u>2.1.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数</u> マスターシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。	ワクチン（シードロット製剤を除く）の部 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 （略） （新設）

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、5代以内でなければならない。

2.1.1.4 ワーキングシードウイルス

2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

2.1.1.5 プロダクションシードウイルス

2.1.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させる。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

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株又はこれら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 マスターシードウイルス

2.1.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結乾燥して5℃以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、5代以内でなければならない。

2.1.2.4 ワーキングシードウイルス

2.1.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖

及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

2.1.2.5 プロダクションシードウイルス

2.1.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させる。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

2.1.3 アビバクテリウム・パラガリナルム AC 融合抗原産生大腸菌

2.1.3.1 名称

アビバクテリウム・パラガリナルム（以下「A.pg」という。）由来防御抗原製造用遺伝子導入大腸菌 rCorAC24 株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

大腸菌 BL21 (DE3) 株に一致する生物学的性状を有し、発現プラスミドを保有し、アンピシリン耐性である。発現誘導により、A.pg AC 融合抗原を発現する。

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。

最高継代数は、原株及び種菌でそれぞれ3代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して－15℃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

2.2.1.1.1 マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルス及びプロダクションシードウイルスの増殖、継代及び保存に用いる発育鶏卵

SPF動物規格の1.1に適合した9～10日齢のものを用いる。

マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルスを増殖、継代及び保存する場合の発育鶏卵並びにプロダクションシードウイルスを増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、3.2の試験を行う。

2.2.1.1.2 原液の製造に用いる発育鶏卵

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

2.2.2.1.1 マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルス及びプロダクションシードウイルスの増殖、継代及び保存に用いる発育鶏卵

SPF動物規格の1.1に適合した10～11日齢のものを用いる。

マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルスを増殖、継代及び保存す

る場合の発育鶏卵並びにプロダクションシードウイルスを増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、3.2 の試験を行う。 2.2.2.1.2 原液の製造に用いる発育鶏卵 10 ～ 11 日齢のものを用いる。 2.2.3A.pg AC 融合抗原産生大腸菌 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体別発育鶏卵とみなす。 個体別発育鶏卵について、3.3 の試験を行う。 2.3.1.2 ウイルスの培養 プロダクションシードウイルスを 2.3.1.1 の発育鶏卵で培養し、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、3.4.1.1 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、3.7.1 及び 3.7.2.1 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必要に応じて相当と認められた希釈用液で濃度調整し、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、3.8 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体別発育鶏卵とみなす。 個体別発育鶏卵について、3.3 の試験を行う。 2.3.2.2 ウイルスの培養 各株のプロダクションシードウイルスを 2.3.2.1 の発育鶏卵で培養し、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、3.4.1.2 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を、相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、3.7.1 及び 3.7.2.2 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必要に応じて相当と認められた希釈用液で濃度調整し、相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。	
---	--

<u>原液について、3.8 の試験を行う。</u>	
<u>2.3.3 A.pg 原液</u>	
<u>2.3.3.1 培養及び発現</u>	
<u>種菌を製造用培地で培養し、イソプロピル-β-チオガラクトピラノシドを加えて組換えたん白質発現を誘導したものを発現菌液とする。</u>	
<u>発現菌液について、3.5 の試験を行う。</u>	
<u>2.3.3.2 菌体破碎及び封入体洗浄</u>	
<u>発現菌液を適当と認められた方法で濃縮し、菌体を破碎して回収した封入体を洗浄したものを粗精製組換えたん白質とする。</u>	
<u>2.3.3.3 可溶化</u>	
<u>粗精製組換えたん白質を適当と認められた方法で可溶化後、アルギニン加リン酸緩衝食塩液に置換したものを組換えたん白質溶液とする。</u>	
<u>組換えたん白質溶液について、3.6 の試験を行う。</u>	
<u>2.3.3.4 アジュバントの添加</u>	
<u>組換えたん白質溶液を適当と認められた希釈用液で濃度調整し、油性アジュバントを添加したものを原液とする。</u>	
<u>原液について、3.8 の試験を行う。</u>	
<u>2.4 最終バルク</u>	
<u>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 A.pg 原液を混合し、濃度調整したものを最終バルクとする。</u>	
<u>2.5 小分製品</u>	
<u>最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。</u>	
<u>小分製品について、3.9 の試験を行う。</u>	
<u>3 試験法</u>	
<u>3.1 製造用株の試験</u>	
<u>3.1.1 マスターシードウイルスの試験</u>	
<u>3.1.1.1 同定試験</u>	
<u>シードロット規格の 1.4.2.3.1.1.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。</u>	
<u>3.1.1.2 無菌試験</u>	
<u>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。</u>	
<u>3.1.1.3 マイコプラズマ否定試験</u>	
<u>一般試験法のマイコプラズマ否定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。</u>	
<u>3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験</u>	
<u>3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験</u>	
<u>一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.1、2.1 及び 2.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。</u>	
<u>3.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験</u>	
<u>3.1.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験</u>	

鶏脳脊髄炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.1 及び 3.1.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、鶏脳脊髄炎ウイルスについて 3.1.1.4.2.2 に規定する試験を実施する製剤については、本試験を実施しなくてもよい。

3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

鶏白血病ウイルス、細網内皮症ウイルス及び鶏脳脊髄炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.1、3.2.1、3.2.2 及び 3.2.10 を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、鶏脳脊髄炎ウイルスについて 3.1.1.4.2.1 に規定する試験を実施する製剤については、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 3.2.10 の試験を実施しなくてもよい。

3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

3.1.2.1 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。

3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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。

3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

3.1.3.1 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。

3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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。

3.2 発育鶏卵の試験

3.2.1 孵卵性状試験

シードロット規格の 3.2.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3 個体別発育鶏卵の試験

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。

3.3.1 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。

3.3.2 鶏赤血球凝集試験

3.3.1 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。

3.4 ウイルス浮遊液の試験

3.4.1 ウイルス含有量試験

3.4.1.1 ニューカッスル病ウイルス

3.4.1.1.1 試験材料

3.4.1.1.1.1 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。	
3.4.1.1.1.2 発育鶏卵	生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9 ～ 11 日齢のものを用いる。
3.4.1.1.2 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℃ 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。
3.4.1.1.3 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、EID ₅₀ 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} EID ₅₀ 以上でなければならない。
3.4.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス	
3.4.1.2.1 試験材料	
3.4.1.2.1.1 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。
3.4.1.2.1.2 発育鶏卵	生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9 ～ 10 日齢のものを用いる。
3.4.1.2.2 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℃ 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。
3.4.1.2.3 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、EID ₅₀ 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} EID ₅₀ 以上でなければならない。
3.5 発現菌液の試験	
3.5.1 発現たん白確認試験	
3.5.1.1 試験材料	検体に適当と認められた等量のサンプルバッファーを加えて煮沸したものを試料とする。
3.5.1.2 試験方法	試料を適当と認められた方法で電気泳動し、染色して泳動像を観察する。
3.5.1.3 判定	分子量約 120kDa の位置に明瞭なバンドを認めなくてはならない。
3.5.2 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。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。
3.6 組換えたん白質溶液の試験	
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

い。

3.6.2 同定試験

3.5.1 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 抗原定量試験

3.6.3.1 試験材料

検体及び適当と認められた牛血清アルブミン液をリン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈し、各段階の希釈液に等量のサンプルバッファーを加えて煮沸したものを試料とする。

3.6.3.2 試験方法

試料を適当と認められた方法により電気泳動し、牛血清アルブミン液のバンドの面積から検量線を作成し、検体に含まれる抗原量を算出する。

3.6.3.3 判定

検体中の抗原量は、1.0g/L 以上でなければならない。

3.7 不活化ウイルス浮遊液の試験

3.7.1 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。

3.7.2 不活化試験

3.7.2.1 ニューカッスル病ウイルス

3.7.2.1.1 試験材料

3.7.2.1.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.7.2.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した9～11日齢のものを用いる。

3.7.2.1.2 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℃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。ただし、24時間以内に死亡したものは除外し、発育鶏卵数が10個を下回った場合は、試験不成立とする。

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。

3.7.2.1.3 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。

3.7.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

3.7.2.2.1 試験材料

3.7.2.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.7.2.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した9～10日齢のものを用いる。

3.7.2.2.2 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。ただし、24 時間以内に死亡したものは除外し、発育鶏卵数が 10 個を下回った場合は、試験不成立とする。

3.7.2.2.3 判定

鶏胚は、正常に発育しなければならない。

3.8 原液の試験

3.8.1 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。

3.9 小分製品の試験

3.9.1 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。

3.9.2 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。

3.9.3 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、ホルマリン含有量は、0.2vol % 以下でなければならない。

3.9.4 安全試験

3.9.4.1 試験材料

3.9.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.9.4.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した発育鶏卵由来の 5～7 週齢の鶏を用いる。

3.9.4.2 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脚部筋肉内に注射し、対照群と共に 4 週間観察する。

3.9.4.3 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。

3.9.5 力価試験

3.9.5.1 ニューカッスル病力価試験

3.9.5.1.1 試験材料

3.9.5.1.1.1 試験動物

<u>3.9.4 の試験に用いた動物を用いる。</u> <u>3.9.5.1.1.2 赤血球凝集抗原</u> <u>「ニューカッスル病診断用赤血球凝集抗原」を用いる。</u> <u>3.9.5.1.2 試験方法</u> <u>3.9.4 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、</u> <u>ニューカッスル病ウイルス赤血球凝集抑制試験を行う。</u> <u>3.9.5.1.3 判定</u> <u>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</u> <u>下この項において「HI 抗体価」という。）とする。</u> <u>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、</u> <u>対照群では、全て HI 抗体価 5 倍以下でなければならない。</u> <u>3.9.5.2 鶏伝染性気管支炎力価試験</u> <u>3.9.5.2.1 試験材料</u> <u>3.9.5.2.1.1 試験動物</u> <u>3.10.4 の試験に用いた動物を用いる。</u> <u>3.9.5.2.1.2 中和試験用ウイルス</u> <u>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</u> <u>造用材料の規格 1.1 に適合した 9 ～ 10 日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、</u> <u>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。</u> <u>3.9.5.2.1.3 発育鶏卵</u> <u>生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9 ～ 10 日齢のものを用いる。</u> <u>3.9.5.2.2 試験方法</u> <u>3.9.4 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</u> <u>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</u> <u>ルし、非働化する。</u> <u>中和試験用ウイルスを適当と認められた希釈液で 10 倍階段希釈し、各段階</u> <u>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</u> <u>群のプール血清を、第 3 群にはウイルス対照として適当と認められた溶液を、</u> <u>それぞれ等量加えて混合する。これらの混合液を 2 ～ 10 °C で 18 ～ 24 時間又</u> <u>は 37 °C 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</u> <u>に注射し、37 °C で 7 ～ 8 日間培養し、観察する。</u> <u>3.9.5.2.3 判定</u> <u>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</u> <u>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</u> <u>する。</u> <u>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、</u> <u>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。</u> <u>3.9.5.3 鶏伝染性コリーザ（A・C 型）力価試験</u> <u>3.9.5.3.1 A 型 ELISA 試験</u> <u>3.9.5.3.1.1 試験材料</u>	
--	--

3.9.5.3.1.1.1 試験動物

3.9.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.9.5.3.1.1.2 ELISA 抗原

精製組換え A 型 ELISA 抗原（付記 1）を用いる。

3.9.5.3.1.2 試験方法

3.9.4 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、ELISA を行う。

試験群及び対照群の各血清、A・C 型参照陽性血清（付記 2）を検体希釈液（付記 3）で 100 倍希釈し、それぞれ精製組換え A 型 ELISA 抗原吸着プレート（付記 4）2 穴に 50 μ L ずつ加え、20 ～ 30 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、洗浄液（付記 5）で洗浄する。各穴に酵素標識抗体（付記 6）を 50 μ L ずつ加え、20 ～ 30 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた後、洗浄液で洗浄する。適当と認められた 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine 基質液を 100 μ L ずつ加え、遮光して 20 ～ 30 $^{\circ}$ C で 15 分間反応させた後、反応停止液（付記 7）を 100 μ L ずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を波長 450nm 及び 650nm で測定する。

3.9.5.3.1.3 判定

各穴の 450nm の吸光度から 650nm の吸光度を引いた値を各穴の ELISA 値とする。検体の ELISA 値を A・C 型参照陽性血清の ELISA 値で除し、小数第四位を四捨五入し、各穴の補正値を算出する。検体ごとに補正値の平均値を算出し、小数第四位を四捨五入したものを、それぞれの血清の ELISA 抗体価とする。

試験群の 80%以上が ELISA 抗体価 0.300 以上でなければならず、対照群の ELISA 抗体価は、いずれも 0.300 未満でなければならない。

3.9.5.3.2 C 型 ELISA 試験

3.9.5.3.2.1 試験材料

3.9.5.3.2.1.1 試験動物

3.9.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.9.5.3.2.1.2 ELISA 抗原

精製組換え C 型 ELISA 抗原（付記 8）を用いる。

3.9.5.3.2.2 試験方法

3.9.4 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、ELISA を行う。

試験群及び対照群の各血清、A・C 型参照陽性血清を検体希釈液で 100 倍希釈し、それぞれ精製組換え C 型 ELISA 抗原吸着プレート（付記 9）2 穴に 50 μ L ずつ加え、20 ～ 30 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。各穴に酵素標識抗体を 50 μ L ずつ加え、20 ～ 30 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた後、洗浄液で洗浄する。適当と認められた 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine 基質液を 100 μ L ずつ加え、遮光して 20 ～ 30 $^{\circ}$ C で 15 分間反応させた後、反応停止液を 100 μ L ずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を波長 450nm 及び 650nm で測定する。

3.9.5.3.2.3 判定

各穴の 450nm の吸光度から 650nm の吸光度を引いた値を各穴の ELISA 値とする。検体の ELISA 値を A・C 参照陽性血清の ELISA 値で除し、小数第四位を四捨五入し、各穴の補正值を算出する。検体ごとに補正值の平均値を算出し、小数第四位を四捨五入したものを、それぞれの血清の ELISA 抗体価とする。

試験群の 80%以上が ELISA 抗体価 0.300 以上でなければならず、対照群の ELISA 抗体価は、いずれも 0.300 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、製造後 3 年 2 か月間とする。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 精製組換え A 型 ELISA 抗原

A.pg A 型 No.221 株由来の遺伝子 A /6b-2#(0.7kb) を保有する大腸菌 CorA6b-2#株の培養菌液を超音波破碎後、尿素で可溶化した溶液をニッケルカラムで精製し、リン酸緩衝食塩液で透析したもので、本抗原を用いて 3.10.5.3.1 の試験により ELISA を実施するとき、A・C 型参照陽性血清の ELISA 値が 0.800 ～ 1.350 を示す。使用時には、たん白質量が 0.1 μ g/穴になるようにリン酸緩衝食塩液で調整する。

付記 2 A・C 型参照陽性血清

A.pg AC 融合抗原液で免疫した、生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した発育鶏卵又は生ワクチン製造用材料の表 1 に掲げる検査及び処置、又はこれらと同等と認められた検査及び処置により、同表に掲げる病原体の感染のないことが確認された鶏群より採取された発育鶏卵由来の鶏の血清で、3.9.5.3.1 及び 3.9.5.3.2 の試験により ELISA を実施するとき、ELISA 値が A 型に対して 0.800 ～ 1.350、C 型に対して 0.750 ～ 1.350 を示さなければならない。凍結して -15℃以下で保存する。

付記 3 検体希釈液

精製水にスキムミルクを 10w/v%、ポリソルベート 20 を 0.1vol% となるように加え、溶解したもの。

付記 4 精製組換え A 型 ELISA 抗原吸着プレート

精製組換え A 型 ELISA 抗原を 96 穴プレートの各穴に 50 μ L ずつ加え、2 ～ 10℃で一夜反応させた後、洗浄液で洗浄し、各穴に 5 w/v% スキムミルク加リン酸緩衝食塩液を 300 μ L ずつ加え、20 ～ 30℃で 1 時間反応させた後、洗浄液で洗浄したもの

付記 5 洗浄液

リン酸緩衝食塩液 1,000mL に、ポリソルベート 20 を 0.5mL 添加した

もの。

付記 6 酵素標識抗体
市販のペルオキシダーゼ標識抗鶏 IgG (H+L) 抗体で、3.9.5.3.1 及び
3.9.5.3.2 の試験により ELISA を行うとき、A・C 型参照陽性血清の ELISA
値が A 型に対して 0.800 ～ 1.350、C 型に対して 0.750 ～ 1.350 を示すよ
うに、標識抗体希釈液 (付記 10) で調整したもの。

付記 7 反応停止液
1.000mL 中
硫酸 55 mL
精製水 残 量

付記 8 精製組換え C 型 ELISA 抗原
A.pg C 型 53-47 株由来の遺伝子 C /6b-1b(1.1kb) を保有する大腸菌
CorC6b-1b 株の培養菌液を超音波破碎後、尿素で可溶化した溶液をニッ
ケルカラムで精製し、リン酸緩衝食塩液で透析したもので、本抗原を用
いて 3.9.5.3.2 の試験により ELISA を実施するとき、A・C 型参照陽性血
清の ELISA 値が 0.750 ～ 1.350 を示す。使用時には、たん白質量が 0.1
μ g/穴になるようにリン酸緩衝食塩液で調整する。

付記 9 精製組換え C 型 ELISA 抗原吸着プレート
精製組換え C 型 ELISA 抗原を 96 穴プレートの各穴に 50 μ L ずつ加
え、2 ～ 10 °C で一夜反応させた後、洗浄液で洗浄し、各穴に 5 w/v% ス
キムミルク加リン酸緩衝食塩液を 300 μ L ずつ加え、20 ～ 30 °C で 1 時
間反応させた後、洗浄液で洗浄したもの。

付記 10 標識抗体希釈液
精製水にスキムミルクを 5 w/v%、ポリソルベート 20 を 0.1vol% とな
るように加え、溶解したもの。

動物用生物学的製剤基準の一部を改正する件 新旧対照表

○動物用生物学的製剤基準（平成 14 年 10 月 3 日農林水産省告示第 1567 号）（抄）

次の表により、改正後欄に掲げる規定の傍線を付した部分を加える。

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く）の部 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）・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 （略） <u>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 型組換え融合抗原） ・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</u> 1 定義 <u>シードロット規格に適合したニューカッスル病ウイルスを同規格に適合した発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液、シードロット規格に適合した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同規格に適合した発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液、シードロット規格に適合したマイコプラズマ・ガリセプチカムの培養菌液をそれぞれ不活化したもの並びにアビバクテリウム・パラガリナルム（A 型菌及び C 型菌）の組換え融合抗原産生大腸菌に発現させた組換えたん白質の可溶化溶液に油性アジュバントを添加し、混合したワクチンである。</u> 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 <u>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</u> 2.1.1.2 性状 <u>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。</u>	ワクチン（シードロット製剤を除く）の部 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）・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 （略） （新設）

2.1.1.3 マスターシードウイルス

2.1.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結乾燥して 5℃以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1 の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、5 代以内でなければならない。

2.1.1.4 ワーキングシードウイルス

2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して 5℃以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2 の試験を行う。

2.1.1.5 プロダクションシードウイルス

2.1.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖させる。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して 5℃以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

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 マスターシードウイルス

2.1.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結乾燥して 5℃以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1 の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、5 代以内でなければならない。

らない。	
2.1.2.4 ワーキングシードウイルス	
2.1.2.4.1 増殖、継代及び保存	ワーキングシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖及び継代する。
	ワーキングシードウイルスは、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。
	ワーキングシードウイルスについて、3.1.2 の試験を行う。
2.1.2.5 プロダクションシードウイルス	
2.1.2.5.1 増殖及び保存	プロダクションシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖させる。
	プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。
	プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。
2.1.3 アビバクテリウム・パラガリナルム AC 融合抗原産生大腸菌	
2.1.3.1 名称	アビバクテリウム・パラガリナルム（以下「A.pg」という。）由来防御抗原製造用遺伝子導入大腸菌 rCorAC24 株又はこれと同等と認められた株
2.1.3.2 性状	大腸菌 BL21 (DE3) 株に一致する生物学的性状を有し、発現プラスミドを保有し、アンピシリン耐性である。発現誘導により、A.pg AC 融合抗原を発現する。
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。
	最高継代数は、原株及び種菌でそれぞれ3代以内でなければならない。
	原株及び種菌は、凍結して－15℃以下で保存する。
2.1.4 マイコプラズマ・ガリセプチカム	
2.1.4.1 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
2.1.4.2 性状	鶏に対して病原性を示す。
2.1.4.3 マスターシード菌	
2.1.4.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数	マスターシード菌は、適当と認められた培地で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。
	分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－40℃以下で保存する。
	マスターシード菌について、3.1.4 の試験を行う。
	マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシ

ード菌から小分製品までの最高継代数は、10 代以内でなければならない。	
<u>2.1.4.4 ワーキングシード菌</u>	
<u>2.1.4.4.1 増殖、継代及び保存</u>	
ワーキングシード菌は、 <u>適当と認められた培地で増殖及び継代する。</u>	
ワーキングシード菌は、 <u>凍結して－40℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。</u>	
ワーキングシード菌について、 <u>3.1.5 の試験を行う。</u>	
<u>2.1.4.5 プロダクションシード菌</u>	
<u>2.1.4.5.1 増殖及び保存</u>	
プロダクションシード菌は、 <u>適当と認められた培地で増殖させる。</u>	
プロダクションシード菌を保存する場合は、 <u>凍結して－40℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。</u>	
プロダクションシード菌を保存する場合は、 <u>3.1.6 の試験を行う。</u>	
<u>2.2 製造用材料</u>	
<u>2.2.1 ニューカッスル病ウイルス</u>	
<u>2.2.1.1 発育鶏卵</u>	
<u>2.2.1.1.1 マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルス及びプロダクションシードウイルスの増殖、継代及び保存に用いる発育鶏卵</u>	
SPF 動物規格の 1.1 に適合した 9～10 日齢のものを <u>用いる。</u>	
マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルスを増殖、継代及び保存する場合の発育鶏卵並びにプロダクションシードウイルスを増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、 <u>3.2 の試験を行う。</u>	
<u>2.2.1.1.2 原液の製造に用いる発育鶏卵</u>	
9～10 日齢のものを <u>用いる。</u>	
<u>2.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス</u>	
<u>2.2.2.1 発育鶏卵</u>	
<u>2.2.2.1.1 マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルス及びプロダクションシードウイルスの増殖、継代及び保存に用いる発育鶏卵</u>	
SPF 動物規格の 1.1 に適合した 10～11 日齢のものを <u>用いる。</u>	
マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルスを増殖、継代及び保存する場合の発育鶏卵並びにプロダクションシードウイルスを増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、 <u>3.2 の試験を行う。</u>	
<u>2.2.2.1.2 原液の製造に用いる発育鶏卵</u>	
10～11 日齢のものを <u>用いる。</u>	
<u>2.2.3 A.pg AC 融合抗原産生大腸菌</u>	
<u>2.2.3.1 培地</u>	
製造に <u>適当と認められた培地を用いる。</u>	
<u>2.2.4 マイコプラズマ・ガリセプチカム</u>	
<u>2.2.4.1 培地</u>	
製造に <u>適当と認められた培地を用いる。</u>	

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、3.3 の試験を行う。

2.3.1.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを 2.3.1.1 の発育鶏卵で培養し、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、3.4.1.1 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、3.8.1 及び 3.8.2.1 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必要に応じて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、原液とする。
原液について、3.10 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、3.3 の試験を行う。

2.3.2.2 ウイルスの培養

各株のプロダクションシードウイルスを 2.3.2.1 の発育鶏卵で培養し、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、3.4.1.2 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で濃縮したものを、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、3.8.1 及び 3.8.2.2 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必要に応じて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、各株の原液とする。
原液について、3.10 の試験を行う。

2.3.3 A.pg 原液

2.3.3.1 培養及び発現

種菌を製造用培地で培養し、イソプロピル- β -チオガラクトピラノシドを加えて組換えたん白質発現を誘導したものを発現菌液とする。
発現菌液について、3.5 の試験を行う。

2.3.3.2 菌体破碎及び封入体洗浄

	発現菌液を適当と認められた方法で濃縮し、菌体を破碎して回収した封入体を洗浄したものを粗精製組換えたん白質とする。
2.3.3.3	<u>可溶化</u> 粗精製組換えたん白質を適当と認められた方法で可溶化後、アルギニン加リン酸緩衝食塩液に置換したものを組換えたん白質溶液とする。 組換えたん白質溶液について、3.6 の試験を行う。
2.3.3.4	<u>アジュバントの添加</u> 組換えたん白質溶液を必要に応じて適当と認められた希釈用液で濃度調整し、油性アジュバントを添加したものを原液とする。 原液について、3.10 の試験を行う。
2.3.4	<u>マイコプラズマ・ガリセプチカム原液</u>
2.3.4.1	<u>培養</u> プロダクションシード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、3.7 の試験を行う。
2.3.4.2	<u>不活化</u> 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洗浄したものを不活化菌液とする。 不活化菌液について、3.9 の試験を行う。
2.3.4.3	<u>アジュバントの添加</u> 不活化菌液を必要に応じて適当と認められた希釈用液で濃度調整し、油性アジュバントを添加したものを原液とする。 原液について、3.10 の試験を行う。
2.4	<u>最終バルク</u> 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、A.pg 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	<u>小分製品</u> 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、3.11 の試験を行う。
3	<u>試験法</u>
3.1	<u>製造用株の試験</u>
3.1.1	<u>マスターシードウイルスの試験</u>
3.1.1.1	<u>同定試験</u> シードロット規格の 1.4.2.3.1.1.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。
3.1.1.2	<u>無菌試験</u> 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。
3.1.1.3	<u>マイコプラズマ否定試験</u> 一般試験法のマイコプラズマ否定試験法を準用して試験するとき、適合しな

なければならない。
<u>3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験</u>
<u>3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験</u>
一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.1、2.1 及び 2.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。
<u>3.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験</u>
<u>3.1.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験</u>
鶏脳脊髄炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.1 及び 3.1.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、鶏脳脊髄炎ウイルスについて 3.1.1.4.2.2 に規定する試験を実施する製剤については、本試験を実施しなくてもよい。
<u>3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験</u>
鶏白血病ウイルス、細網内皮症ウイルス及び鶏脳脊髄炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.1、3.2.1、3.2.2 及び 3.2.10 を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、鶏脳脊髄炎ウイルスについて 3.1.1.4.2.1 に規定する試験を実施する製剤については、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 3.2.10 の試験を実施しなくてもよい。
<u>3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験</u>
<u>3.1.2.1 無菌試験</u>
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。
<u>3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験</u>
一般試験法のマイコプラズマ否定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。
<u>3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験</u>
<u>3.1.3.1 無菌試験</u>
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。
<u>3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験</u>
一般試験法のマイコプラズマ否定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。
<u>3.1.4 マスターシード菌の試験</u>
<u>3.1.4.1 同定試験</u>
シードロット規格の 1.4.2.4.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。
<u>3.1.4.2 夾雑菌否定試験</u>
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。
<u>3.1.5 ワーキングシード菌の試験</u>
<u>3.1.5.1 夾雑菌否定試験</u>
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。
<u>3.1.6 プロダクションシード菌の試験</u>

3.1.6.1 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。
3.2 発育鶏卵の試験	
3.2.1 孵卵性状試験	シードロット規格の 3.2.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。
3.3 個体別発育鶏卵の試験	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。
3.3.1 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。
3.3.2 鶏赤血球凝集試験	3.3.1 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。
3.4 ウイルス浮遊液の試験	
3.4.1 ウイルス含有量試験	
3.4.1.1 ニューカッスル病ウイルス	
3.4.1.1.1 試験材料	
3.4.1.1.1.1 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。
3.4.1.1.1.2 発育鶏卵	生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9 ～ 11 日齢のものをを用いる。
3.4.1.1.2 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。
3.4.1.1.3 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、EID ₅₀ 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} EID ₅₀ 以上でなければならない。
3.4.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス	
3.4.1.2.1 試験材料	
3.4.1.2.1.1 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。
3.4.1.2.1.2 発育鶏卵	生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9 ～ 10 日齢のものをを用いる。
3.4.1.2.2 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。	
3.4.1.2.3 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。	
3.5 発現菌液の試験	
3.5.1 発現たん白確認試験	
3.5.1.1 試験材料	
検体に適当と認められた等量のサンプルバッファーを加えて煮沸したものを試料とする。	
3.5.1.2 試験方法	
試料を適当と認められた方法で電気泳動し、染色して泳動像を観察する。	
3.5.1.3 判定	
分子量約 120kDa の位置に明瞭なバンドを認めなくてはならない。	
3.5.2 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。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。	
3.6 組換えたん白質溶液の試験	
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 同定試験	
3.5.1 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 抗原定量試験	
3.6.3.1 試験材料	
検体及び適当と認められた牛血清アルブミン液をリン酸緩衝食塩液で2倍階段希釈し、各段階の希釈液に等量のサンプルバッファーを加えて煮沸したものを試料とする。	
3.6.3.2 試験方法	
試料を適当と認められた方法により電気泳動し、牛血清アルブミン液のバンドの面積から検量線を作成し、検体に含まれる抗原量を算出する。	
3.6.3.3 判定	
検体中の抗原量は、1.0g/L 以上でなければならない。	
3.7 培養菌液の試験	
3.7.1 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。	
3.7.2 生菌数試験	
3.7.2.1 試験材料	
3.7.2.1.1 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。

3.7.2.1.2 培地

適当と認められた寒天培地を用いる。

3.7.2.2 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℃で 7 日間培養後、集落数を数える。

3.7.2.3 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。

3.8 不活化ウイルス浮遊液の試験

3.8.1 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。

3.8.2 不活化試験

3.8.2.1 ニューカッスル病ウイルス

3.8.2.1.1 試験材料

3.8.2.1.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.8.2.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9～11 日齢のものを用いる。

3.8.2.1.2 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℃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。ただし、24 時間以内に死亡したものは除外し、発育鶏卵数が 10 個を下回った場合は、試験不成立とする。

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。

3.8.2.1.3 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。

3.8.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

3.8.2.2.1 試験材料

3.8.2.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.8.2.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9～10 日齢のものを用いる。

3.8.2.2.2 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。ただし、24 時間以内に死亡したものは除外し、発育鶏卵数が 10 個を下回った場合は、試験不成立とする。
3.8.2.2.3 判定
鶏胚は、正常に発育しなければならない。
3.9 不活化菌液の試験
3.9.1 不活化試験
3.9.1.1 試験材料
3.9.1.1.1 試料
検体を試料とする。
3.9.1.1.2 培地
適当と認められた液状培地及び適当と認められた寒天培地を用いる。
3.9.1.2 試験方法
液状培地 100mL に試料 1 mL を接種し、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 ずつをそれぞれ 2 枚以上の寒天培地に接種して、37℃で 7 日間培養し、集落の有無を観察する。
3.9.1.3 判定
いずれの寒天培地上においても、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。
3.9.2 総菌数試験
3.9.2.1 試験材料
3.9.2.1.1 試料
検体又は検体をリン酸緩衝食塩液で希釈したものを試料とする。
3.9.2.1.2 試験方法
分光光度計を用い、試料の吸光度を測定する。
3.9.2.2 判定
標準検量線、試料の吸光度値及び検体の希釈倍数から総菌数を算出するとき、検体の総菌数は、1 mL 中 $10^{8.8}$ 個以上でなければならない。
3.10 原液の試験
3.10.1 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。
3.11 小分製品の試験
3.11.1 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。
3.11.2 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。
3.11.3 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、ホルマリン含有量は、0.2vol %以下でなければならない。

3.11.4 安全試験

3.11.4.1 試験材料

3.11.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.11.4.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した発育鶏卵由来の 5 ～ 7 週齢の鶏を用いる。

3.11.4.2 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脚部筋肉内に注射し、対照群と共に 4 週間観察する。

3.11.4.3 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。

3.11.5 力価試験

3.11.5.1 ニューカッスル病力価試験

3.11.5.1.1 試験材料

3.11.5.1.1.1 試験動物

3.11.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.11.5.1.1.2 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。

3.11.5.1.2 試験方法

3.11.4 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。

3.11.5.1.3 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。

3.11.5.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

3.11.5.2.1 試験材料

3.11.5.2.1.1 試験動物

3.11.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.11.5.2.1.2 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 に適合した 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。

3.11.5.2.1.3 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9～10 日齢のものをを用いる。

3.11.5.2.2 試験方法

3.11.4 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 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適当と認められた溶液を、それぞれ等量加えて混合する。これらの混合液を 2～10℃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。

3.11.5.2.3 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。

3.11.5.3 鶏伝染性コリーザ（A・C 型）力価試験

3.11.5.3.1 A 型 ELISA 試験

3.11.5.3.1.1 試験材料

3.11.5.3.1.1.1 試験動物

3.11.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.11.5.3.1.1.2 ELISA 抗原

精製組換え A 型 ELISA 抗原（付記 1）を用いる。

3.11.5.3.1.2 試験方法

3.11.4 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、ELISA を行う。

試験群及び対照群の各血清、A・C 型参照陽性血清（付記 2）を検体希釈液（付記 3）で 100 倍希釈し、それぞれ精製組換え A 型 ELISA 抗原吸着プレート（付記 4）2 穴に 50 μ L ずつ加え、20～30℃で 1 時間反応させた後、洗浄液（付記 5）で洗浄する。各穴に酵素標識抗体（付記 6）を 50 μ L ずつ加え、20～30℃で 30 分間反応させた後、洗浄液で洗浄する。適当と認められた 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine 基質液を 100 μ L ずつ加え、遮光して 20～30℃で 15 分間反応させた後、反応停止液（付記 7）を 100 μ L ずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を波長 450nm 及び 650nm で測定する。

3.11.5.3.1.3 判定

各穴の 450nm の吸光度から 650nm の吸光度を引いた値を各穴の ELISA 値とする。検体の ELISA 値を A・C 参照陽性血清の ELISA 値で除し、小数第四位を四捨五入し、各穴の補正值を算出する。検体ごとに補正值の平均値を算出し、小数第四位を四捨五入したものを、それぞれの血清の ELISA 抗体価

とする。

試験群の 80%以上が ELISA 抗体価 0.300 以上でなければならず、対照群の ELISA 抗体価は、いずれも 0.300 未満でなければならない。

3.11.5.3.2 C 型 ELISA 試験

3.11.5.3.2.1 試験材料

3.11.5.3.2.1.1 試験動物

3.11.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.11.5.3.2.1.2 ELISA 抗原

精製組換え C 型 ELISA 抗原（付記 8）を用いる。

3.11.5.3.2.2 試験方法

3.11.4 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、ELISA を行う。

試験群及び対照群の各血清、A・C 型参照陽性血清を検体希釈液で 100 倍希釈し、それぞれ精製組換え C 型 ELISA 抗原吸着プレート（付記 9）2 穴に 50 μ L ずつ加え、20 ～ 30 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。各穴に酵素標識抗体を 50 μ L ずつ加え、20 ～ 30 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた後、洗浄液で洗浄する。適当と認められた 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine 基質液を 100 μ L ずつ加え、遮光して 20 ～ 30 $^{\circ}$ C で 15 分間反応させた後、反応停止液を 100 μ L ずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を波長 450nm 及び 650nm で測定する。

3.11.5.3.2.3 判定

各穴の 450nm の吸光度から 650nm の吸光度を引いた値を各穴の ELISA 値とする。検体の ELISA 値を A・C 参照陽性血清の ELISA 値で除し、小数第四位を四捨五入し、各穴の補正值を算出する。検体ごとに補正值の平均値を算出し、小数第四位を四捨五入したものを、それぞれの血清の ELISA 抗体価とする。

試験群の 80%以上が ELISA 抗体価 0.300 以上でなければならず、対照群の ELISA 抗体価は、いずれも 0.300 未満でなければならない。

3.11.5.4 マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症力価試験

3.11.5.4.1 試験材料

3.11.5.4.1.1 試験動物

3.11.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.11.5.4.1.2 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 10）を用いる。

3.11.5.4.2 試験方法

3.11.4 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、2～10℃で一夜又は室温で120分間処理した後、赤血球凝集の有無を観察する。

3.11.5.4.3 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。
各試験動物の HI 抗体価の常用対数の平均値を幾何平均値とすると、試験群の HI 抗体価の幾何平均値は、0.90 を超えなければならない。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、製造後 3 年 2 か月間とする。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 精製組換え A 型 ELISA 抗原

A.pg A 型 No.221 株由来の遺伝子 *A* /*6b-2#*(0.7kb) を保有する大腸菌 CorA6b-2# 株の培養菌液を超音波破碎後、尿素で可溶化した溶液をニッケルカラムで精製し、リン酸緩衝食塩液で透析したもので、本抗原を用いて 3.11.5.3.1 の試験により ELISA を実施するとき、A・C 型参照陽性血清の ELISA 値が 0.800～1.350 を示す。使用時には、たん白質量が 0.1 μ g/穴になるようにリン酸緩衝食塩液で調整する。

付記 2 A・C 型参照陽性血清

A.pg AC 融合抗原液で免疫した、生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した発育鶏卵又は生ワクチン製造用材料の表 1 に掲げる検査及び処置、又はこれらと同等と認められた検査及び処置により、同表に掲げる病原体の感染のないことが確認された鶏群より採取された発育鶏卵由来の鶏の血清で、3.11.5.3.1 及び 3.11.5.3.2 の試験により ELISA を実施するとき、ELISA 値が A 型に対して 0.800～1.350、C 型に対して 0.750～1.350 を示さなければならない。凍結して -15℃以下で保存する。

付記 3 検体希釈液

精製水にスキムミルクを 10w/v%、ポリソルベート 20 を 0.1vol% となるように加え、溶解したもの。

付記 4 精製組換え A 型 ELISA 抗原吸着プレート

精製組換え A 型 ELISA 抗原を 96 穴プレートの各穴に 50 μ L ずつ加え、2～10℃で一夜反応させた後、洗浄液で洗浄し、各穴に 5 w/v% スキムミルク加リン酸緩衝食塩液を 300 μ L ずつ加え、20～30℃で 1 時間反応させた後、洗浄液で洗浄したもの

付記 5 洗浄液

リン酸緩衝食塩液 1,000mL に、ポリソルベート 20 を 0.5mL 添加したもの。

付記 6	<u>酵素標識抗体</u> 市販のペルオキシダーゼ標識抗鶏 IgG (H+L) 抗体で、3.11.5.3.1 及び 3.11.5.3.2 の試験により ELISA を行うとき、A・C 型参照陽性血清の ELISA 値が A 型に対して 0.800 ～ 1.350、C 型に対して 0.750 ～ 1.350 を示すように、標識抗体希釈液 (付記 11) で調整したもの。
付記 7	<u>反応停止液</u> 1,000mL 中 硫酸 55 mL 精製水 残 量
付記 8	<u>精製組換え C 型 ELISA 抗原</u> A.pg C 型 53-47 株由来の遺伝子 <i>C</i> Δ6b-1b (1.1kb) を保有する大腸菌 CorC6b-1b 株の培養菌液を超音波破碎後、尿素で可溶化した溶液をニッケルカラムで精製し、リン酸緩衝食塩液で透析したもので、本抗原を用いて 3.11.5.3.2 の試験により ELISA を実施するとき、A・C 型参照陽性血清の ELISA 値が 0.750 ～ 1.350 を示す。使用時には、たん白質量が 0.1 μ g/穴になるようにリン酸緩衝食塩液で調整する。
付記 9	<u>精製組換え C 型 ELISA 抗原吸着プレート</u> 精製組換え C 型 ELISA 抗原を 96 穴プレートの各穴に 50 μ L ずつ加え、2 ～ 10 $^{\circ}$C で一夜反応させた後、洗浄液で洗浄し、各穴に 5 w/v% スキムミルク加リン酸緩衝食塩液を 300 μ L ずつ加え、20 ～ 30 $^{\circ}$C で 1 時間反応させた後、洗浄液で洗浄したもの。
付記 10	<u>マイコプラズマ・ガリセプチカム赤血球凝集抗原</u> 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、凍結して - 20 $^{\circ}$C 以下で保存したもの。
付記 11	<u>標識抗体希釈液</u> 精製水にスキムミルクを 5 w/v%、ポリソルベート 20 を 0.1vol% とするように加え、溶解したもの。

動物用生物学的製剤基準の一部を改正する件 新旧対照表
○動物用生物学的製剤基準（平成 14 年 10 月 3 日農林水産省告示第 1567 号）（抄）
次の表により、改正後欄に掲げる規定の傍線を付した部分を加える。

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く）の部 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 (略) <u>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 型組換え融合抗原)・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</u> <u>1 定義</u> シードロット規格に適合したニューカッスル病ウイルスを同規格に適合し た発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液、シードロット規格に適合した血清 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同規格に適合した 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 ウイルスを培 養細胞で増殖させたウイルス液及びシードロット規格に適合したマイコプラ 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並びにアビバク テリウム・パラガリナルム（A 型菌及び C 型菌）の組換え融合抗原産生大腸 菌に発現させた組換えたん白質の可溶化溶液に油性アジュバントを添加し、 混合したワクチンである。 <u>2 製法</u> <u>2.1 製造用株</u> <u>2.1.1 ニューカッスル病ウイルス</u> <u>2.1.1.1 名称</u>	ワクチン（シードロット製剤を除く）の部 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 (略) (新設)

<u>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</u>	
<u>2.1.1.2 性状</u>	
<u>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。</u>	
<u>2.1.1.3 マスターシードウイルス</u>	
<u>2.1.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数</u>	
<u>マスターシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。</u>	
<u>分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結乾燥して 5℃以下で保存する。</u>	
<u>マスターシードウイルスについて、3.1.1 の試験を行う。</u>	
<u>マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、5 代以内でなければならない。</u>	
<u>2.1.1.4 ワーキングシードウイルス</u>	
<u>2.1.1.4.1 増殖、継代及び保存</u>	
<u>ワーキングシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖及び継代する。</u>	
<u>ワーキングシードウイルスは、凍結して－ 70℃以下又は凍結乾燥して 5℃以下で保存する。</u>	
<u>ワーキングシードウイルスについて、3.1.2 の試験を行う。</u>	
<u>2.1.1.5 プロダクションシードウイルス</u>	
<u>2.1.1.5.1 増殖及び保存</u>	
<u>プロダクションシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖させる。</u>	
<u>プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して－ 70℃以下又は凍結乾燥して 5℃以下で保存する。</u>	
<u>プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。</u>	
<u>2.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス</u>	
<u>2.1.2.1 名称</u>	
<u>鶏伝染性気管支炎ウイルス練馬 E₁₀ 株及び TM-86EC 株又はこれらと同等と認められた 2 種類の株</u>	
<u>2.1.2.2 性状</u>	
<u>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。</u>	
<u>2.1.2.3 マスターシードウイルス</u>	
<u>2.1.2.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数</u>	
<u>マスターシードウイルスは、SPF 動物規格の 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。</u>	
<u>分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍</u>	

結乾燥して5℃以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、5代以内でなければならない。

2.1.2.4 ワーキングシードウイルス

2.1.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

2.1.2.5 プロダクションシードウイルス

2.1.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、SPF動物規格の1.1に適合した発育鶏卵で増殖させる。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

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に適合する発育鶏卵、同規格1.3に適合する発育あひる卵又は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℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

2.1.4 アビバクテリウム・パラガリナルム AC 融合抗原産生大腸菌

2.1.4.1 名称

アビバクテリウム・パラガリナルム（以下「A.pg」という。）由来防御抗原製造用遺伝子導入大腸菌 rCorAC24株又はこれと同等と認められた株

2.1.4.2 性状

大腸菌 BL21 (DE3) 株に一致する生物学的性状を有し、発現プラスミドを保有し、アンピシリン耐性である。発現誘導により、A.pg AC 融合抗原を発現する。

2.1.4.3 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。
最高継代数は、原株及び種菌でそれぞれ3代以内でなければならない。
原株及び種菌は、凍結して－15℃以下で保存する。

2.1.5 マイコプラズマ・ガリセプチカム

2.1.5.1 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

2.1.5.2 性状

鶏に対して病原性を示す。

2.1.5.3 マスターシード菌

2.1.5.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、適当と認められた培地で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－40℃以下で保存する。

マスターシード菌について、3.1.4 の試験を行う。

マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシード菌から小分製品までの最高継代数は、10代以内でなければならない。

2.1.5.4 ワーキングシード菌

2.1.5.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、適当と認められた培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結して－40℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.5 の試験を行う。

2.1.5.5 プロダクションシード菌

2.1.5.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、適当と認められた培地で増殖させる。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して－40℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、3.1.6 の試験を行う。

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

2.2.1.1.1 マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルス及びプロダクションシードウイルスの増殖、継代及び保存に用いる発育鶏卵

SPF 動物規格の1.1 に適合した9～10日齢のものを用いる。

マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルスを増殖、継代及び保存する場合の発育鶏卵並びにプロダクションシードウイルスを増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、3.2 の試験を行う。

2.2.1.1.2 原液の製造に用いる発育鶏卵

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

2.2.2.1.1 マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルス及びプロダクションシードウイルスの増殖、継代及び保存に用いる発育鶏卵

SPF 動物規格の 1.1 に適合した 10 ～ 11 日齢のものを用いる。

マスターシードウイルス、ワーキングシードウイルスを増殖、継代及び保存する場合の発育鶏卵並びにプロダクションシードウイルスを増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、3.2 の試験を行う。

2.2.2.1.2 原液の製造に用いる発育鶏卵

10 ～ 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 培養細胞

EB66 細胞を用いる。

2.2.3.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる

2.2.4 A.pg AC 融合抗原産生大腸菌

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体別発育鶏卵とみなす。

個体別発育鶏卵について、3.3 の試験を行う。

2.3.1.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを 2.3.1.1 の発育鶏卵で培養し、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、3.5.1.1 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、3.9.1 及び 3.9.2.1 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必要に応じて相当と認められた希釈用液で濃度調整し、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、3.11 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、3.3 の試験を行う。
- 2.3.2.2 ウイルスの培養
各株のプロダクションシードウイルスを 2.3.2.1 の発育鶏卵で培養し、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、3.5.1.2 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で濃縮したものを、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、3.9.1 及び 3.9.2.2 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、各株の原液とする。
原液について、3.11 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 培養細胞の培養
1 回に処理し、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、3.4 の試験を行う。
- 2.3.3.2 ウイルスの培養
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、3.5.1.3 及び 3.5.2 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、3.9.1 及び 3.9.2.3 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必要に応じて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、原液とする。
原液について、3.11 の試験を行う。
- 2.3.4 A.pg 原液
- 2.3.4.1 培養及び発現
種菌を製造用培地で培養し、イソプロピル- β -チオガラクトピラノシドを加えて組換えたん白質発現を誘導したものを発現菌液とする。
発現菌液について、3.6 の試験を行う。
- 2.3.4.2 菌体破碎及び封入体洗浄
発現菌液を適当と認められた方法で濃縮し、菌体を破碎して回収した封入体を洗浄したものを粗精製組換えたん白質とする。
- 2.3.4.3 可溶化

	<u>粗精製組換えたん白質を適当と認められた方法で可溶化後、アルギニン加リン酸緩衝食塩液に置換したものを組換えたん白質溶液とする。</u> <u>組換えたん白質溶液について、3.7 の試験を行う。</u>
2.3.4.4	<u>アジュバントの添加</u> <u>組換えたん白質溶液を必要に応じて適当と認められた希釈用液で濃度調整し、油性アジュバントを添加したものを原液とする。</u> <u>原液について、3.11 の試験を行う。</u>
2.3.5	<u>マイコプラズマ・ガリセプチカム原液</u>
2.3.5.1	<u>培養</u> <u>プロダクションシード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。</u> <u>培養菌液について、3.8 の試験を行う。</u>
2.3.5.2	<u>不活化</u> <u>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洗浄したものを不活化菌液とする。</u> <u>不活化菌液について、3.10 の試験を行う。</u>
2.3.5.3	<u>アジュバントの添加</u> <u>不活化菌液を必要に応じて適当と認められた希釈用液で濃度調整し、油性アジュバントを添加したものを原液とする。</u> <u>原液について、3.11 の試験を行う。</u>
2.4	<u>最終バルク</u> <u>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、産卵低下症候群ー 1976 ウイルス原液、A.pg 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。</u>
2.5	<u>小分製品</u> <u>最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。</u> <u>小分製品について、3.12 の試験を行う。</u>
3	<u>試験法</u>
3.1	<u>製造用株の試験</u>
3.1.1	<u>マスターシードウイルスの試験</u>
3.1.1.1	<u>同定試験</u> <u>シードロット規格の 1.4.2.3.1.1.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。</u>
3.1.1.2	<u>無菌試験</u> <u>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。</u>
3.1.1.3	<u>マイコプラズマ否定試験</u> <u>一般試験法のマイコプラズマ否定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。</u>
3.1.1.4	<u>外来性ウイルス否定試験</u>
3.1.1.4.1	<u>共通ウイルス否定試験</u>

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.1、2.1 及び 2.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験

3.1.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験

鶏脳脊髄炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.1 及び 3.1.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、鶏脳脊髄炎ウイルスについて 3.1.1.4.2.2 に規定する試験を実施する製剤については、本試験を実施しなくてもよい。

3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

鶏白血病ウイルス、細網内皮症ウイルス及び鶏脳脊髄炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.1、3.2.1、3.2.2 及び 3.2.10 を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、鶏脳脊髄炎ウイルスについて 3.1.1.4.2.1 に規定する試験を実施する製剤については、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 3.2.10 の試験を実施しなくてもよい。

3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

3.1.2.1 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。

3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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。

3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

3.1.3.1 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。

3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ否定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。

3.1.4 マスターシード菌の試験

3.1.4.1 同定試験

シードロット規格の 1.4.2.4.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.4.2 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。

3.1.5 ワーキングシード菌の試験

3.1.5.1 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。

3.1.6 プロダクションシード菌の試験

3.1.6.1 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。

3.2 発育鶏卵の試験

3.2.1 孵卵性状試験

シードロット規格の3.2.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3 個体別発育鶏卵の試験

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。

3.3.1 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。

3.3.2 鶏赤血球凝集試験

3.3.1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。

3.4 個体別培養細胞の試験

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。

3.4.1 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用いる。

3.4.2 鶏赤血球凝集試験

3.4.1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。

3.5 ウイルス浮遊液の試験

3.5.1 ウイルス含有量試験

3.5.1.1 ニューカッスル病ウイルス

3.5.1.1.1 試験材料

3.5.1.1.1.1 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。

3.5.1.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合する9～11日齢のものを用いる。

3.5.1.1.2 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℃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。

3.5.1.1.3 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。

3.5.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

3.5.1.2.1 試験材料

3.5.1.2.1.1 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。

3.5.1.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合する 9～10 日齢のものを用いる。

3.5.1.2.2 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℃ 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。

3.5.1.2.3 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。

3.5.1.3 産卵低下症候群－1976 ウイルス

3.5.1.3.1 試験材料

3.5.1.3.1.1 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。

3.5.1.3.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.3 に適合する鶏胚肝初代細胞を用いる。

3.5.1.3.2 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℃ 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。

3.5.1.3.3 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。

3.5.2 赤血球凝集試験

3.5.2.1 産卵低下症候群－1976 ウイルス

3.5.2.1.1 試験材料

3.5.2.1.1.1 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。

3.5.2.1.2 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、室温で 60 分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

3.5.2.1.3 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。

3.6 発現菌液の試験

3.6.1 発現たん白確認試験

3.6.1.1 試験材料

検体に適当と認められた等量のサンプルバッファーを加えて煮沸したものを試料とする。

3.6.1.2 試験方法

試料を適当と認められた方法で電気泳動し、染色して泳動像を観察する。

3.6.1.3 判定

分子量約 120kDa の位置に明瞭なバンドを認めなくてはならない。

3.6.2 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。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。

3.7 組換えたん白質溶液の試験

3.7.1 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。

3.7.2 同定試験

3.6.1 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 抗原定量試験

3.7.3.1 試験材料

検体及び適当と認められた牛血清アルブミン液をリン酸緩衝食塩液で 2 倍階段希釈し、各段階の希釈液に等量のサンプルバッファーを加えて煮沸したものを試料とする。

3.7.3.2 試験方法

試料を適当と認められた方法により電気泳動し、牛血清アルブミン液のバンドの面積から検量線を作成し、検体に含まれる抗原量を算出する。

3.7.3.3 判定

検体中の抗原量は、1.0g/L 以上でなければならない。

3.8 培養菌液の試験

3.8.1 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。

3.8.2 生菌数試験

3.8.2.1 試験材料

3.8.2.1.1 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。

3.8.2.1.2 培地

適当と認められた寒天培地を用いる。

3.8.2.2 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℃で 7 日間培養後、集落数を数える。

3.8.2.3 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。

3.9 不活化ウイルス浮遊液の試験

3.9.1 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。

3.9.2 不活化試験

3.9.2.1 ニューカッスル病ウイルス

3.9.2.1.1 試験材料

3.9.2.1.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.9.2.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合する 9 ～ 11 日齢のものを用いる。

3.9.2.1.2 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℃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。ただし、24 時間以内に死亡したものは除外し、発育鶏卵数が 10 個を下回った場合は、試験不成立とする。

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。

3.9.2.1.3 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。

3.9.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

3.9.2.2.1 試験材料

3.9.2.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.9.2.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合する 9 ～ 10 日齢のものを用いる。

3.9.2.2.2 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。ただし、24 時間以内に死亡したものは除外し、発育鶏卵数が 10 個を下回った場合は、試験不成立とする。

3.9.2.2.3 判定

鶏胚は、正常に発育しなければならない。

3.9.2.3 産卵低下症候群－1976 ウイルス

3.9.2.3.1 試験材料

3.9.2.3.1.1 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、2～10℃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た後、これを無菌的に回収したものを接種材料とする。 3.9.2.3.1.2 発育卵又は培養細胞 生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合する7～9日齢の発育鶏卵、同規格 1.3 に適合する9～14日齢の発育あひる卵又は同規格 2.1.3 に適合する鶏胚肝初代細胞を用いる。 3.9.2.3.2 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50μL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。 3.9.2.3.3 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。 3.10 不活化菌液の試験 3.10.1 不活化試験 3.10.1.1 試験材料 3.10.1.1.1 試料 検体を試料とする。 3.10.1.1.2 培地 適当と認められた液状培地及び適当と認められた寒天培地を用いる。 3.10.1.2 試験方法 液状培地100mLに試料1mLを接種し、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ずつをそれぞれ2枚以上の寒天培地に接種して、37℃で7日間培養し、集落の有無を観察する。 3.10.1.3 判定 いずれの寒天培地上においても、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。 3.10.2 総菌数試験 3.10.2.1 試験材料 3.10.2.1.1 試料	
--	--

検体又は検体をリン酸緩衝食塩液で希釈したものを試料とする。 <u>3.10.2.1.2 試験方法</u> 分光光度計を用い、試料の吸光度を測定する。 <u>3.10.2.2 判定</u> 標準検量線、試料の吸光度値及び検体の希釈倍数から総菌数を算出するとき、検体の総菌数は、1 mL 中 $10^{8.8}$ 個以上でなければならない。 <u>3.11 原液の試験</u> <u>3.11.1 無菌試験</u> 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。 <u>3.12 小分製品の試験</u> <u>3.12.1 特性試験</u> 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。 <u>3.12.2 無菌試験</u> 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。 <u>3.12.3 ホルマリン定量試験</u> 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、ホルマリン含有量は、0.2vol % 以下でなければならない。 <u>3.12.4 安全試験</u> <u>3.12.4.1 試験材料</u> <u>3.12.4.1.1 注射材料</u> 試験品を注射材料とする。 <u>3.12.4.1.2 試験動物</u> 生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合する発育鶏卵由来の 5 ～ 7 週齢の鶏を用いる。 <u>3.12.4.2 試験方法</u> 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脚部筋肉内に注射し、対照群と共に 4 週間観察する。 <u>3.12.4.3 判定</u> 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。 <u>3.12.5 力価試験</u> <u>3.12.5.1 ニューカッスル病力価試験</u> <u>3.12.5.1.1 試験材料</u> <u>3.12.5.1.1.1 試験動物</u> 3.12.4 の試験に用いた動物を用いる。	
---	--

3.12.5.1.1.2 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。

3.12.5.1.2 試験方法

3.12.4 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。

3.12.5.1.3 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。

3.12.5.2 鶏伝染性気管支炎力価試験

3.12.5.2.1 試験材料

3.12.5.2.1.1 試験動物

3.12.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.12.5.2.1.2 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 に適合する 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。

3.12.5.2.1.3 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合する 9 ～ 10 日齢のものを用いる。

3.12.5.2.2 試験方法

3.12.4 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 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適当と認められた溶液を、それぞれ等量加えて混合する。これらの混合液を 2 ～ 10 °C で 18 ～ 24 時間又は 37 °C 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 °C で 7 ～ 8 日間培養し、観察する。

3.12.5.2.3 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。

3.12.5.3 産卵低下症候群－1976 力価試験

3.12.5.3.1 試験材料

3.12.5.3.1.1 試験動物

3.12.4 の試験で用いた動物を用いる。

3.12.5.3.1.2 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1）を用いる。

3.12.5.3.2 試験方法

3.12.4 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2）3容を加え、室温で20分間処理した後、遠心した上清を採取する。これを生理食塩液で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、10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。

3.12.5.3.3 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。

3.12.5.4 鶏伝染性コリザ（A・C型）力価試験

3.12.5.4.1 A型ELISA試験

3.12.5.4.1.1 試験材料

3.12.5.4.1.1.1 試験動物

3.12.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.12.5.4.1.1.2 ELISA 抗原

精製組換えA型ELISA抗原（付記3）を用いる。

3.12.5.4.1.2 試験方法

3.12.4 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、ELISAを行う。

試験群及び対照群の各血清、A・C型参照陽性血清（付記4）を検体希釈液（付記5）で100倍希釈し、それぞれ精製組換えA型ELISA抗原吸着プレート（付記6）2穴に50 μ Lずつ加え、20～30℃で1時間反応させた後、洗浄液（付記7）で洗浄する。各穴に酵素標識抗体（付記8）を50 μ Lずつ加え、20～30℃で30分間反応させた後、洗浄液で洗浄する。適当と認められた3,3',5,5'-tetramethylbenzidine 基質液を100 μ Lずつ加え、遮光して20～30℃で15分間反応させた後、反応停止液（付記9）を100 μ Lずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を波長450nm及び650nmで測定する。

3.12.5.4.1.3 判定

各穴の450nmの吸光度から650nmの吸光度を引いた値を各穴のELISA値とする。検体のELISA値をA・C参照陽性血清のELISA値で除し、小数第四位を四捨五入し、各穴の補正值を算出する。検体ごとに補正值の平均値を算出し、小数第四位を四捨五入したものを、それぞれの血清のELISA抗体価とする。

試験群の80%以上がELISA抗体価0.300以上でなければならない、対照群の

ELISA 抗体価は、いずれも 0.300 未満でなければならない。

3.12.5.4.2 C 型 ELISA 試験

3.12.5.4.2.1 試験材料

3.12.5.4.2.1.1 試験動物

3.12.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.12.5.4.2.1.2 ELISA 抗原

精製組換え C 型 ELISA 抗原（付記 10）を用いる。

3.12.5.4.2.2 試験方法

3.12.4 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、ELISA を行う。

試験群及び対照群の各血清、A・C 型参照陽性血清を検体希釈液で 100 倍希釈し、それぞれ精製組換え C 型 ELISA 抗原吸着プレート（付記 11）2 穴に 50 μ L ずつ加え、20 ～ 30℃で 1 時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。各穴に酵素標識抗体を 50 μ L ずつ加え、20 ～ 30℃で 30 分間反応させた後、洗浄液で洗浄する。適当と認められた 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine 基質液を 100 μ L ずつ加え、遮光して 20 ～ 30℃で 15 分間反応させた後、反応停止液を 100 μ L ずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を波長 450nm 及び 650nm で測定する。

3.12.5.4.2.3 判定

各穴の 450nm の吸光度から 650nm の吸光度を引いた値を各穴の ELISA 値とする。検体の ELISA 値を A・C 参照陽性血清の ELISA 値で除し、小数第四位を四捨五入し、各穴の補正值を算出する。検体ごとに補正值の平均値を算出し、小数第四位を四捨五入したものを、それぞれの血清の ELISA 抗体価とする。

試験群の 80%以上が ELISA 抗体価 0.300 以上でなければならない、対照群の ELISA 抗体価は、いずれも 0.300 未満でなければならない。

3.12.5.5 マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症力価試験

3.12.5.5.1 試験材料

3.12.5.5.1.1 試験動物

3.12.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.12.5.5.1.2 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 12）を用いる。

3.12.5.5.2 試験方法

3.12.4 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、2 ～ 10℃で一夜又は室温で 120 分間処理した後、赤血球凝集の有無を観察する。

3.12.5.5.3 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。

各試験動物の HI 抗体価の常用対数の平均値を幾何平均値とするとき、試験群の HI 抗体価の幾何平均値は、0.90 を超えなければならない。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、製造後 3 年 2 か月間とする。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 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 に適合する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 に適合する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 2 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

2 ～ 10 ℃ に保存する。

付記 3 精製組換え A 型 ELISA 抗原

A.pg A 型 No.221 株由来の遺伝子 A /6b-2#(0.7kb) を保有する大腸菌 CorA6b-2# 株の培養菌液を超音波破碎後、尿素で可溶化した溶液をニッケルカラムで精製し、リン酸緩衝食塩液で透析したもので、本抗原を用いて 3.12.5.4.1 の試験により ELISA を実施するとき、A・C 型参照陽性血清の ELISA 値が 0.800 ～ 1.350 を示す。使用時には、たん白質量が 0.1 μg/穴 になるようにリン酸緩衝食塩液で調整する。

付記 4 A・C 型参照陽性血清

A.pg AC 融合抗原液で免疫した、生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した発育鶏卵又は生ワクチン製造用材料の表 1 に掲げる検査及び処置、又はこれらと同等と認められた検査及び処置により、同表に掲げる病原体の感染のないことが確認された鶏群より採取された発育鶏卵由来の鶏の血清で、3.12.5.4.1 及び 3.12.5.4.2 の試験により ELISA を実施するとき、ELISA 値が A 型に対して 0.800 ～ 1.350、C 型に対して 0.750 ～ 1.350 を示さなければならない。凍結して－ 15 ℃ 以下で保存する。

付記 5 検体希釈液

精製水にスキムミルクを 10w/v%、ポリソルベート 20 を 0.1vol% と

るように加え、溶解したもの。

付記 6 精製組換え A 型 ELISA 抗原吸着プレート
精製組換え A 型 ELISA 抗原を 96 穴プレートの各穴に 50 μ L ずつ加え、2 ～ 10 $^{\circ}$ C で一夜反応させた後、洗浄液で洗浄し、各穴に 5 w/v% スキムミルク加リン酸緩衝食塩液を 300 μ L ずつ加え、20 ～ 30 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、洗浄液で洗浄したもの

付記 7 洗浄液
リン酸緩衝食塩液 1,000mL に、ポリソルベート 20 を 0.5mL 添加したもの。

付記 8 酵素標識抗体
市販のペルオキシダーゼ標識抗鶏 IgG (H+L) 抗体で、3.12.5.4.1 及び 3.12.5.4.2 の試験により ELISA を行うとき、A・C 型参照陽性血清の ELISA 値が A 型に対して 0.800 ～ 1.350、C 型に対して 0.750 ～ 1.350 を示すように、標識抗体希釈液 (付記 13) で調整したもの。

付記 9 反応停止液
1,000mL 中

<u>硫酸</u>	<u>55 mL</u>
<u>精製水</u>	<u>残 量</u>

付記 10 精製組換え C 型 ELISA 抗原
A.pg C 型 53-47 株由来の遺伝子 C Δ 6b-1b (1.1kb) を保有する大腸菌 CorC6b-1b 株の培養菌液を超音波破碎後、尿素で可溶化した溶液をニッケルカラムで精製し、リン酸緩衝食塩液で透析したもので、本抗原を用いて 3.12.5.4.2 の試験により ELISA を実施するとき、A・C 型参照陽性血清の ELISA 値が 0.750 ～ 1.350 を示す。使用時には、たん白質量が 0.1 μ g/穴になるようにリン酸緩衝食塩液で調整する。

付記 11 精製組換え C 型 ELISA 抗原吸着プレート
精製組換え C 型 ELISA 抗原を 96 穴プレートの各穴に 50 μ L ずつ加え、2 ～ 10 $^{\circ}$ C で一夜反応させた後、洗浄液で洗浄し、各穴に 5 w/v% スキムミルク加リン酸緩衝食塩液を 300 μ L ずつ加え、20 ～ 30 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、洗浄液で洗浄したもの。

付記 12 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、凍結して - 20 $^{\circ}$ C 以下で保存したもの。

付記 13 標識抗体希釈液 <u>精製水にスキムミルクを 5 w/v%、ポリソルベート 20 を 0.1vol%となるように加え、溶解したもの。</u>	
--	--

動物用生物学的製剤基準の一部を改正する件 新旧対照表

○動物用生物学的製剤基準（平成 14 年 10 月 3 日農林水産省告示第 1567 号）（抄）

次の表により、改正後欄に掲げる規定の傍線を付した部分を加える。

改正後	改正前
ワクチン（シードロット製剤を除く）の部 鶏サルモネラ症（サルモネラ・インファンティス、サルモネラ・エンテリティディス、サルモネラ・ティフィムリウム）（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード） （略） 鶏大腸菌症生ワクチン（シード） 1 定義 <u>シードロット規格に適合したサイクリック AMP レセプターたん白質をコードする遺伝子（<i>crp</i> 遺伝子）の一部を欠損した大腸菌（血清型 O78）の培養菌液を凍結乾燥したワクチンである。</u> 2 製法 2.1 製造用株 2.1.1. 名称 <u>大腸菌 AESN1331 株（血清型 O78）又はこれと同等と認められた株</u> 2.1.2 性状 <u>欠損型 <i>crp</i> 遺伝子を有する。本株を噴霧投与された鶏は臨床症状を示さない。</u> 2.1.3 マスターシード菌 2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数 <u>マスターシード菌は、適当と認められた培地で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。</u> <u>分注したマスターシード菌は、適当と認められた安定剤を添加し、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結乾燥して 10℃以下で保存する。</u> <u>マスターシード菌について、3.1.1 の試験を行う。</u> <u>マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシード菌から小分製品までの最高継代数は、10 代以内でなければならない。</u> 2.1.4 ワーキングシード菌 2.1.4.1 増殖、継代及び保存	ワクチン（シードロット製剤を除く）の部 鶏サルモネラ症（サルモネラ・インファンティス、サルモネラ・エンテリティディス、サルモネラ・ティフィムリウム）（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード） （略） （新設）

	<u>ワーキングシード菌は、適当と認められた培地で増殖及び継代する。</u>
	<u>ワーキングシード菌は、凍結して－ 60 ℃以下又は凍結乾燥して 10 ℃以下で保存する。</u>
	<u>ワーキングシード菌について、3.1.2 の試験を行う。</u>
2.1.5	<u>プロダクションシード菌</u>
2.1.5.1	<u>増殖及び保存</u>
	<u>プロダクションシード菌は、適当と認められた培地で増殖させる。</u>
	<u>プロダクションシード菌は、保存しない。</u>
2.2	<u>製造用材料</u>
2.2.1	<u>培地</u>
	<u>製造に適当と認められた寒天培地及び液状培地を用いる。</u>
2.3	<u>原液</u>
2.3.1	<u>培養</u>
	<u>寒天培地で培養したプロダクションシード菌の集落を液状培地に接種し、培養する。これを更に液状培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。</u>
	<u>培養菌液について、3.2 の試験を行う。</u>
2.3.2	<u>原液</u>
	<u>培養菌液を遠心して得た菌を液状培地に再浮遊し、濃度調整したものを原液とする。</u>
	<u>原液について、3.3 の試験を行う。</u>
2.4	<u>最終バルク</u>
	<u>原液に適当と認められた安定剤を添加して混合したものを最終バルクとする。</u>
2.5	<u>小分製品</u>
	<u>最終バルクを小分容器に分注し、凍結乾燥したものを小分製品とする。</u>
	<u>小分製品について、3.4 の試験を行う。</u>
3	<u>試験法</u>
3.1	<u>製造用株の試験</u>
3.1.1	<u>マスターシード菌の試験</u>
3.1.1.1	<u>同定試験</u>
	<u>シードロット規格の 1.4.2.2.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。</u>
3.1.1.2	<u>夾雑菌否定試験</u>
	<u>一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、製造用株以外の菌の発育を認めてはならない。</u>
3.1.1.3	<u>対象動物を用いた免疫原性試験</u>
	<u>一般試験法の対象動物を用いた免疫原性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。</u>
3.1.1.4	<u>対象動物を用いた安全性確認試験</u>
	<u>一般試験法の対象動物を用いた安全性試験法を準用して試験するとき、適</u>

合しななければならない。
3.1.1.5 病原性復帰確認試験 一般試験法の病原性復帰確認試験法を準用して試験するとき、適合しななければならない。
3.1.1.6 組換え遺伝子等安定性確認試験 一般試験法の組換え遺伝子等安定性確認試験法を準用して試験するとき、適合しななければならない。
3.1.2 ワーキングシード菌の試験
3.1.2.1 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、製造用株以外の菌の発育を認めてはならない。
3.2 培養菌液の試験
3.2.1 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、製造用株以外の菌の発育を認めてはならない。
3.2.2 生菌数試験
3.2.2.1 試験材料
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。
3.2.2.1.2 培地 適当と認められた寒天培地を用いる。
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、37℃で 24 時間培養後、発育した集落数を数える。
3.2.2.3 判定 集落数が 30 以上 300 以下の範囲に入る平板培地の集落数を計測し、その平均値、希釈倍数及び培地への接種量から生菌数を算出するとき、検体の菌数は 1 mL 中 2.5×10^5 CFU 以上でなければならない。
3.3 原液の試験
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、製造用株以外の菌の発育を認めてはならない。
3.3.2 生菌数試験 3.2.2 を準用して試験するとき、生菌数は 1 mL 中 $5.0 \times 10^9 \sim 5.0 \times 10^{10}$ CFU でなければならない。
3.4 小分製品の試験
3.4.1 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乾燥物でなければならない。溶解したものは、固有の色調を有する液体でな

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。

3.4.2 真空度試験

一般試験法の真空度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。

3.4.3 含湿度試験

一般試験法の含湿度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。

3.4.4 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、製造用株以外の菌の発育を認めてはならない。

3.4.5 生菌数試験

試験品を 1,000 羽分当たり 300mL の滅菌生理食塩液で溶解し、3.2.2 を準用して試験するとき、生菌数は 1 mL 中 $3.3 \times 10^7 \sim 3.3 \times 10^8$ CFU でなければならない。

3.4.6 安全試験

3.4.6.1 試験材料

3.4.6.1.1 接種材料

試験品 1,000 羽分を 300mL の滅菌生理食塩液に溶解したものを接種材料とする。

3.4.6.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合する発育鶏卵由来の 4 日齢の鶏を用いる。

3.4.6.2 試験方法

試験群及び対照群共に 10 羽以上とする。
接種材料の 1 羽分ずつを試験群に 4 週間隔で 2 回噴霧投与し、対照群と共に第 2 回投与後 2 週間観察する。

3.4.6.3 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。

3.4.7 力価試験

3.4.7.1 試験材料

3.4.7.1.1 試験動物

3.4.6 の試験に用いた動物を用いる。

3.4.7.1.2 攻撃用菌液

大腸菌 J46 株（血清型 O78）又はこれと同等の毒力を有する株を培養し、滅菌生理食塩液で適宜希釈したものを攻撃用菌液とする。

3.4.7.2 試験方法

3.4.6 の試験最終日に、攻撃用菌液を試験群及び対照群の翼下静脈に 0.5mL ずつ注射して攻撃した後、7 日間観察する。

3.4.7.3 判定

試験群では、70 %以上が耐過生存しなければならない。この場合、対照群では、80 %以上が死亡しなければならない。 4 貯法及び有効期間 有効期間は、製造後3年3か月間とする。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。	
--	--

○動物用生物学的製剤基準（平成 14 年 10 月 3 日農林水産省告示第 1567 号）（抄）

次の表により、改正前欄に掲げる規定の傍線を付した部分（以下「傍線部分」という。）でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分があるものは、これを当該傍線部分のように改め、改正後欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正前欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを加え、改正前欄に掲げる規定の傍線部分でこれに対応する改正後欄に掲げる規定の傍線部分がないものは、これを削る。

改正後	改正前
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（シード）	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（シード）
1 定義 シードロット規格に適合した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同規格に適合した発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液並びに同規格に適合したアビバクテリウム・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。	1 定義 シードロット規格に適合した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同規格に適合した発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液並びに同規格に適合したヘモフィルス・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 製法
2.1 ～ 2.1.1（略）	2.1 ～ 2.1.1（略）
2.1.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス	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滋賀株又は <u>これと同等と認められた株</u>	2.1.2.1 名称 鶏伝染性気管支炎ウイルス滋賀株又は <u>製造に相当と認められた株</u>
2.1.2.2 ～ 2.1.2.5（略）	2.1.2.2 ～ 2.1.2.5（略）
2.1.3 アビバクテリウム・パラガリナルムA型菌	2.1.3 ヘモフィルス・パラガリナルムA型菌
2.1.3.1 名称 アビバクテリウム・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	2.1.3.1 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 ～ 2.1.3.5（略）	2.1.3.2 ～ 2.1.3.5（略）
2.1.4 アビバクテリウム・パラガリナルムC型菌	2.1.4 ヘモフィルス・パラガリナルムC型菌
2.1.4.1 名称 アビバクテリウム・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	2.1.4.1 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 ～ 2.3.2（略）	2.1.4.2 ～ 2.3.2（略）
2.3.3 アビバクテリウム・パラガリナルムの各型菌原液	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（略）	2.3.3.1（略）
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 <u>β-プロピオラクトン</u> を加えて不活化し、原液とする。 原液について、3.6.1 及び 3.6.2.3 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 <u>チメロサル</u> を加えて不活化し、原液とする。 原液について、3.6.1 及び 3.6.2.3 の試験を行う。
2.3.4（略）	2.3.4（略）
2.3.4.1 培養	2.3.4.1 培養

プロダクションシード菌を製造用培地で培養したものを必要に応じて遠心し、濃縮して凍結保存する。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、3.5.1 及び 3.5.2.2 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、3.6.1 及び 3.6.2.4 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、アビバクテリウム・パラガリナルム A 型菌液、アビバクテリウム・パラガリナルム C 型菌原液及びマイコバクテリウム・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冷剤を添加し、最終バルクとする。 2.5 (略) 3 試験法 3.1 ～ 3.5.2 (略) 3.5.2.1 アビバクテリウム・パラガリナルムの各型菌 3.5.2.2 (略) 3.6 原液の試験 3.6.1 (略) 3.6.2 不活化試験 3.6.2.1 (略) 3.6.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス 3.6.2.2.1 ～ 3.6.2.2.3 (略) 3.6.2.3 アビバクテリウム・パラガリナルムの各型菌 3.6.2.3.1 ・ 3.6.2.3.2 (略) 3.6.2.3.3 判定 接種材料を接種した全ての培地上にアビバクテリウム・パラガリナルム A 型菌又はアビバクテリウム・パラガリナルム C 型菌の集落を認めてはならない。 3.6.2.4 (略) 3.7 小分製品の試験 3.7.1 ・ 3.7.2 (略) (削る。) 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、<u>0.12vol %</u>以下でなければならない。 3.7.4 ～ 3.7.5.1.1 (略) 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 (略)	プロダクションシード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、3.5.1 及び 3.5.2.2 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、3.6.1 及び 3.6.2.4 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 型菌液、ヘモフィルス・パラガリナルム C 型菌原液及びマイコバクテリウム・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冷剤を添加し、最終バルクとする。 2.5 (略) 3 試験法 3.1 ～ 3.5.2 (略) 3.5.2.1 ヘモフィルス・パラガリナルムの各型菌 3.5.2.2 (略) 3.6 原液の試験 3.6.1 (略) 3.6.2 不活化試験 3.6.2.1 (略) 3.6.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルスの各株 3.6.2.2.1 ～ 3.6.2.2.3 (略) 3.6.2.3 ヘモフィルス・パラガリナルムの各型菌 3.6.2.3.1 ・ 3.6.2.3.2 (略) 3.6.2.3.3 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。 3.6.2.4 (略) 3.7 小分製品の試験 3.7.1 ・ 3.7.2 (略) 3.7.3 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。 3.7.4 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、<u>0.06vol %</u>以下でなければならない。 3.7.5 ～ 3.7.6.1.1 (略) 3.7.6.1.1.1 試験動物 3.7.5 の試験に用いた動物を用いる。 3.7.6.1.1.2 (略)
--	---

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 ～ 3.7.5.2.1 (略)

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 ・ 3.7.5.2.1.3 (略)

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について、血清希釈法により中和試験を行う。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 となるように濃度を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。

3.7.5.2.3 ～ 3.7.5.3.1 (略)

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 (略)

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、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 ～ 3.7.5.4.1 (略)

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 (略)

3.7.5.4.2 試験方法

3.7.4 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 ずつ加えて振とう混合し、4℃で 1 夜処理した後、赤血球凝集の有無を観察する。

3.7.5.4.3 (略)

4 (略)

付記 1 ～ 4 (略)

付記 5 鶏伝染性コリーザ（C 型）赤血球凝集抗原

アビバクテリウム・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。

3.7.6.1.2 試験方法

3.7.5 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。

3.7.6.1.3 ～ 3.7.6.2.1 (略)

3.7.6.2.1.1 試験動物

3.7.5 の試験に用いた動物を用いる。

3.7.6.2.1.2 ・ 3.7.6.2.1.3 (略)

3.7.6.2.2 試験方法

3.7.5 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、血清希釈法により中和試験を行う。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 となるように濃度を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。

3.7.6.2.3 ～ 3.7.6.3.1 (略)

3.7.6.3.1.1 試験動物

3.7.5 の試験に用いた動物を用いる。

3.7.6.3.1.2 (略)

3.7.6.3.2 試験方法

3.7.5 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。

3.7.6.3.3 ～ 3.7.6.4.1 (略)

3.7.6.4.1.1 試験動物

3.7.5 の試験に用いた動物を用いる。

3.7.6.4.1.2 (略)

3.7.6.4.2 試験方法

3.7.5 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 ずつ加えて振とう混合し、4℃で 1 夜処理した後、赤血球凝集の有無を観察する。

3.7.6.4.3 (略)

4 (略)

付記 1 ～ 4 (略)

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 6 （略）

付記 6 （略）