

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）

平成24年 7 月 4 日（告示第1622号）新規追加

平成28年 4 月18日（告示第1020号）一部改正

令和 5 年 1 月27日（告示第134号）一部改正

令和 7 年 3 月14日（告示第414号）一部改正

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。

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 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、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して 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滋賀株又はこれと同等と認められた株

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 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、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して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

2.1.3.2 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 マスターシード菌

2.1.3.3.1 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、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菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して5℃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。

2.1.3.4 ワーキングシード菌

2.1.3.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、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。

ワーキングシード菌について、3.1.5の試験を行う。

2.1.3.5 プロダクションシード菌

2.1.3.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、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菌を保存する場合は、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菌を保存する場合は、3.1.6の試験を行う。

2.1.4 アビバクテリウム・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

2.1.4.2 性状

鶏及び発育鶏卵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、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菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して－70℃以下又は凍結乾燥して5℃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。

2.1.4.4 ワーキングシード菌

2.1.4.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、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。

ワーキングシード菌について、3.1.5の試験を行う。

2.1.4.5 プロダクションシード菌

2.1.4.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、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菌を保存する場合は、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菌を保存する場合は、3.1.6の試験を行う。

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 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－70℃以下又は凍結乾燥して5℃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－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－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9～11日齢のものを用いる。

マスターシードウイルス及び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

- 9～11日齢のものをを用いる。
- 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9～11日齢のものをを用いる。
マスターシードウイルス及び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
9～11日齢のものをを用いる。
- 2.2.3 アビバクテリウム・パラガリナルムの各型菌
- 2.2.3.1 発育鶏卵
- 2.2.3.1.1 マスターシード菌、ワーキングシード菌及びプロダクションシード菌の増殖、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5～7日齢のものをを用いる。
マスターシード菌及びワーキングシード菌を増殖、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菌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。
- 2.2.3.2 培地
- 2.2.3.2.1 原液の製造に用いる培地
製造に相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及び鶏胚乳剤の遠心上清を相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、3.4.1.1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、3.6.1及び3.6.2.1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
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及び鶏胚乳剤の遠心上清を相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、3.4.1.2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、3.6.1及び3.6.2.2の試験を行う。
- 2.3.3 アビバクテリウム・パラガリナルムの各型菌原液
- 2.3.3.1 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、3.5.1及び3.5.2.1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 β -プロピオラク톤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 マイコプラズマ・ガリセプチカム原液

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型菌原液、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ユ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、3.7の試験を行う。

3 試験法

3.1 製造用株の試験

3.1.1 マスターシードウイルスの試験

3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 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。

3.1.1.3 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。

3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

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 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。

3.4.1.1.1.2 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、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、1mL中10^{8.7}EID₅₀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。

3.4.1.2.1.2 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。

3.4.1.2.3 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、1mL中10^{7.3}EID₅₀以上でなければならない。

3.5 培養菌液の試験

3.5.1 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。

3.5.2 生菌数試験

3.5.2.1 アビバクテリウム・パラガリナルムの各型菌

3.5.2.1.1 試験材料

3.5.2.1.1.1 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。

3.5.2.1.1.2 培地

試験用培地（付記1）を用いる。

3.5.2.1.2 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℃、5 vol%炭酸ガス下で48時間培養した後、集落数を数える。

3.5.2.1.3 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 1×10^9 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。

3.5.2.2.1.2 培地

適当と認められた寒天培地を用いる。

3.5.2.2.2 試験方法

各試料0.1mLずつをそれぞれ2枚以上のシャーレに接種した後、培地を加えて混濁培養し、37℃、5 vol%炭酸ガス下で14日間培養した後、集落数を数える。

3.5.2.2.3 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 1×10^8 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。

3.6.2 不活化試験

3.6.2.1 ニューカッスル病ウイルス

3.6.2.1.1 試験材料

3.6.2.1.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.6.2.1.1.2 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。

3.6.2.1.2 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、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。

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。

3.6.2.1.3 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。

3.6.2.2 鶏伝染性気管支炎ウイルス

3.6.2.2.1 試験材料

3.6.2.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.6.2.2.1.2 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。

3.6.2.2.2 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、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。試験最終日に鶏胚の変化を観察する。

3.6.2.2.3 判定

鶏胚は、正常に發育しなければならない。

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 試験材料

3.6.2.3.1.1 接種材料

検体を接種材料とする。

3.6.2.3.1.2 培地

試験用培地を用いる。

3.6.2.3.2 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。

3.6.2.3.3 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 マイコプラズマ・ガリセプチカム

3.6.2.4.1 試験材料

3.6.2.4.1.1 接種材料

検体を接種材料とする。

3.6.2.4.1.2 培地

適当と認められた寒天平板培地を用いる。

3.6.2.4.2 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10日間培養する。

3.6.2.4.3 判定

接種材料を接種した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。

3.7 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、0.12vol%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に適合した發育鶏卵由来の30～35日齡の鶏を用いる。

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筋肉内に注射し、対照群と共に5週間観察し、試験最終日に注射部位を剖検する。

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。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。

3.7.5 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160倍以上でなければならない。この場合、対照群は、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

適当と認められた株を用いる。

3.7.5.2.1.3 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格2.2.1に適合した鶏腎初代細胞を用いる。

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について、血清希釈法により中和試験を行う。各群の血清は、それぞれ等量をプールし、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 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。

3.7.5.3 鶏伝染性コリーザ（A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

A型参照抗原（付記5）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、鶏伝染性コリーザ（A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。

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、全て陰性でなければならない。

3.7.5.4 鶏伝染性コリーザ（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 ELISA

鶏伝染性コリーザ（C型）菌の破砕抗原（付記6）、抗HAモノクローナル抗体（付記7）、参照陽性血清（C型のみ）（付記8）、参照陰性血清（付記9）及び酵素標識抗体（付記10）を用いる。

3.7.5.4.1.3 検体

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検体とする。

3.7.5.4.2 試験方法

鶏伝染性コリーザ（C型）菌の破砕抗原を炭酸緩衝液（付記11）で希釈し、ELISA用マイクロプレートの各穴に100 μ Lずつ加え、4 $^{\circ}$ Cで一晩吸着させる。このプレートを洗浄液（付記12）で洗浄し、各穴にブロッキング液（付記13）を100 μ Lずつ加え、30 $^{\circ}$ Cで1時間感作する。プレートを洗浄液で洗浄後、希釈液（付記14）で10倍に希釈した検体及び参照陰性血清並びに120倍、960倍及び7680倍に希釈した参照陽性血清を各穴に100 μ Lずつ加え、30 $^{\circ}$ Cで1時間反応させる。プレートを洗浄液で洗浄後、希釈液で希釈した抗HAモノクローナル抗体を各穴に100 μ Lずつ加え、30 $^{\circ}$ Cで1時間反応させる。プレートを洗浄液で洗浄後、希釈液で希釈した酵素標識抗体を各穴に100 μ Lずつ加え、30 $^{\circ}$ Cで1時間反応させる。プレートを洗浄液で洗浄後、基質溶液（付記15）を各穴に100 μ Lずつ加え、遮光して30 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた後、反応停止液（付記16）を各穴に100 μ L加え、発色液に適切な波長で測定し、OD値を求める。

3.7.5.4.3 判定

次式に従い、検体及び各参照陽性血清で阻止率を計算する。

阻止率（％）＝100 $\times$ （1－検体のOD／参照陰性血清のOD）

阻止率が45％以上を陽性とする。

ELISA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、全て陰性でなければならない。また、参照陽性血清の120倍での阻止率は57～76％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17）を用いる。

3.7.5.5.2 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 $^{\circ}$ Cで1夜処理した後、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、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、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 試験用培地

1,000mL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 $^{\circ}$ Cで15分間高压滅菌する。

約50 $^{\circ}$ Cに冷却した後、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

1,000mL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

1,000mL中
酵母エキス 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

1,000mL中
酵母エキス 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 A型参照抗原

アビバクテリウム・パラガリナルムA型菌を適当な方法で処理した、赤血球凝集価が80倍以上のもの。

付記6 鶏伝染性コリーザ（C型）菌の破碎抗原

アビバクテリウム・パラガリナルムC型菌KA株の不活化菌液を適当な方法で処理し、至適濃度に希釈したもの。

付記7 抗HAモノクローナル抗体

アビバクテリウム・パラガリナルムC型菌に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ8C1C株の培養上清を適当な方法で精製し、至適濃度に希釈したもの。

付記8 参照陽性血清（C型のみ）

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鶏をアビバクテリウム・パラガリナルムC型抗原で免疫した血清であり、鶏伝染性コリーザ（C型）赤血球凝集抑制試験を行うときHI抗体価80倍を示し、鶏伝染性コリーザ（A型）赤血球凝集抑制試験を行うときHI抗体価は5倍未満を示すもの。

付記9 参照陰性血清

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鶏の血清で、鶏伝染性コリーザ赤血球凝集抑制試験を行うとき、A型及びC型においてHI抗体価5倍未満を示すもの。

付記10 酵素標識抗体

市販のペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗血清を用いる。

付記11 炭酸緩衝液

1,000mL中

炭酸ナトリウム	1.59	g
炭酸水素ナトリウム	2.93	g
水	残	量

付記12 洗浄液

1,000mL 中

リン酸水素二ナトリウム十二水和物	2.9	g
リン酸二水素カリウム	0.2	g
塩化ナトリウム	8.0	g
塩化カリウム	0.2	g
ポリソルベート20	0.5	mL
水	残	量

付記13 ブロッキング液

洗浄液に牛血清アルブミンを 1 vol% になるように溶解したもの。

付記14 希釈液

洗浄液に牛血清アルブミンを 1 vol% になるように溶解したもの。

付記15 基質溶液

3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンを含む市販の基質溶液を用いる。

付記16 反応停止液

水に濃硫酸56.1mLを加え500mLとしたもの。

付記17 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した後、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。