

鶏サルモネラ症（サルモネラ・エンテリティディス） （油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

平成 21 年 11 月 12 日 (告示第 1569 号) 新規追加
平成 22 年 7 月 12 日 (告示第 1038 号) 一部改正

1 定義

シードロット規格に適合したサルモネラ・エンテリティディスの培養菌液を不活化し、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 名称

サルモネラ・エンテリティディス LB111 株又は相当と認められた株

2.1.2 性状

サルモネラ・エンテリティディス基準株に一致する生物学的性状を示す。

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

マスターシード菌は、相当と認められた培地で増殖させ、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 -60°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

マスターシード菌について、3.1.1 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継代数は、10 代以内でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その継代数以内とする。

2.1.4 ワーキングシード菌

2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、相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 -60°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2 の試験を行う。

2.1.5 プロダクションシード菌

2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、相当と認められた培地で増殖する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して -60°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 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について、3.1.3 の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 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 培養

ワーキングシード菌又はプロダクションシード菌あるいは平板培地で培養したワーキングシード

菌又はプロダクションシード菌を液状培地に接種し、増菌培養したものを、更に液状培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2 の試験を行う。

2.3.2 原液

培養菌液にホルマリンを加え不活化したもの又はそれを濃縮したものを原液とする。

原液について、3.3 の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液を必要に応じて濃度調整した後、油性アジュバントを添加し、これらを混合したものを最終バルクとする。この場合、適当と認められた保存剤を添加してもよい。

2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。

小分製品について、3.4 の試験を行う。

3 試験法

3.1 製造用株の試験

3.1.1 マスターシード菌の試験

3.1.1.1 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。

3.1.1.2 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法 1 を準用して試験するとき、サルモネラ・エンテリティディス以外の菌の発育を認めてはならない。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。

3.1.2 ワーキングシード菌の試験

3.1.2.1 夾雑菌否定試験

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。

3.1.3 プロダクションシード菌の試験

3.1.3.1 夾雑菌否定試験

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。

3.2 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 1 を準用して試験するとき、サルモネラ・エンテリティディス以外の菌の発育を認めてはならない。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。

3.2.2 生菌数試験

3.3.2 の試験を実施するものについては、本試験を実施しなくてもよい。

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。

3.2.2.1.2 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

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 2 枚の寒天培地に塗布し、37℃で 48 時間培養後、生じたサルモネラ・エンテリティディスの集落数を数える。

3.2.2.3 判定

各段階の希釈液ごとの集落数の平均値、希釈倍率及び培地への接種量から生菌数を算出する。検体の生菌数は、1 mL 中 5×10^8 個以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その生菌数とする。

3.3 原液の試験

3.3.1 不活化試験

3.3.1.1 試験材料

3.3.1.1.1 試料

検体を試料とする。

3.3.1.1.2 培地

適当と認められた培地を用いる。

3.3.1.2 試験方法

試料 1 mL を液状培地 9 mL に接種して 37 °C で 48 時間培養後、培養液 1 mL を更に液状培地 9 mL に接種し、初回培養液とともに 37 °C で 12 日間培養する。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。

3.3.1.3 判定

培地中に、いかなる菌の発育も認めてはならない。

3.3.2 総菌数試験

3.2.2 の試験を実施するものについては、本試験を実施しなくてもよい。

3.3.2.1 試験材料

3.3.2.1.1 試料

検体又は検体を適当と認められたリン酸緩衝食塩液で希釈したものを試料とする。

3.3.2.1.2 試験方法

分光光度計を用い、試料の吸光度を測定する。

3.3.2.2 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 8×10^9 個以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その総菌数とする。

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。

3.4.2 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。

3.4.3 チメロサル定量試験

チメロサル添加製剤については、適当と認められた方法で試験品を処理したものを試料とし、一般試験法の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。

3.4.4 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、0.2vol% 以下でなければならない。

3.4.5 安全試験

それぞれのワクチンについて、3.4.5.1、3.4.5.2 又は 3.4.5.3 の試験のいずれかを行う。

3.4.5.1 剖検による方法（皮下 1 回免疫法）

3.4.5.1.1 試験材料

3.4.5.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.5.1.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 3 ～ 5 週齢の鶏を用いる。

3.4.5.1.2 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肩部皮下に注射し、対照群とともに 4 週間観察を行い、試験最終日に注射部位を剖検する。

3.4.5.1.3 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。

3.4.5.2 触診による方法

3.4.5.2.1 試験材料

3.4.5.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.5.2.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 5 週齢の鶏を用いる。

3.4.5.2.2 試験方法

試験動物の 10 羽を試験群、10 羽を対照群とする。

注射材料 1 羽分ずつを試験群の肩部皮下に注射し、対照群とともに 4 週間観察する。

3.4.5.2.3 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、観察期間中、注射部位を触診したとき、著しい硬結を認めてはならない。

3.4.5.3 剖検による方法(筋肉内 1 回免疫法)

3.4.5.3.1 試験材料

3.4.5.3.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.5.3.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 4～5 週齢の鶏を用いる。

3.4.5.3.2 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脚部筋肉内に注射し、対照群とともに 4 週間観察を行い、試験最終日に注射部位を剖検する。

3.4.5.3.3 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。

3.4.6 力価試験

それぞれのワクチンについて、3.4.6.1 及び 3.4.6.2 の試験、3.4.6.3 の試験、又は 3.4.6.4 の試験のいずれかを行う。

3.4.6.1 抗原含有量試験

3.4.6.1.1 試験材料

試験品、参照抗原（付記 1）、参照陽性血清 1（付記 2）及び参照陰性血清 1（付記 3）を用いる。

3.4.6.1.2 試験方法

3.4.6.1.2.1 試験品及び参照抗原の前処理

3.4.6.1.2.1.1 試験品の前処理

試験品 2 mL を 30℃で 10 分間加温した後、2 w/v % n-オクチル-β-D-グルコピラノサイド添加リン酸緩衝食塩液（付記 4。以下「OG-PBS」という。）0.1mL、クロロホルム 6 mL、10w/v % 塩化ナトリウム水溶液 3.9mL を加え、よく攪拌した後、数分間静置する。上層 2 mL を分取し、遠心分離後、上清を完全に除去し、沈渣を 0.5mL の炭酸緩衝液（付記 5）に再浮遊させたものを試験品抗原試料とする。

3.4.6.1.2.1 参照抗原の前処理

参照抗原 1 バイアルをリン酸緩衝食塩液（付記 6。以下「PBS」という。）で溶解した後、同液で 1 回遠心洗浄し、沈渣を 10mL の PBS に再浮遊させてよく攪拌する。この液 0.5mL を分取し、OG-PBS 0.1mL を加えてよく攪拌した後、1 時間静置する。遠心分離した後、上清を完全に除去し、沈渣を 0.5mL の炭酸緩衝液に再浮遊させたものを参照抗原試料とする。

3.4.6.1.2.2 酵素抗体反応（以下「ELISA」という。）

試験品抗原試料及び参照抗原試料を炭酸緩衝液で 50 倍に希釈したものを、あらかじめ炭酸緩衝液 100 μ L を入れた ELISA 用プレートに 100 μ L ずつ加え、更に同希釈液で 2 倍階段希釈する。4℃で 18 時間反応させた後、洗浄液（付記 7）で洗浄する。次に、1 w/v % 牛血清アルブミン液（付記 8）を各穴に 100 μ L ずつ加え、1 時間反応させた後、洗浄液で洗浄する。さらに、参照陽性血清 1 及び参照陰性血清 1 を血清希釈液（付記 9）で 1,000 倍に希釈し、30℃で 10 分間加温したものを各抗原の希釈系列に 100 μ L ずつ加える。30 分間反応させた後、洗浄液で 4 回洗浄する。30℃で 10 分間加温した標識抗体（付記 10）を各穴に 100 μ L ずつ加え、30 分間反応させた後、洗浄液で 4 回洗浄する。基質液（付記 11）を 30℃で 10 分間加温した基質希釈液（付記 12）で 10 倍に希釈し、各穴に 100 μ L ずつ加え、10～15 分間反応させた後、反応停止液（付記 13）を各穴に 100 μ L ずつ加えて反応を停止させ、波長 492nm で各穴の吸光度を測定する。

3.4.6.1.3 判定

試験品抗原試料の 800 倍希釈列における参照陽性血清 1 に対する平均吸光度値を S、参照抗原試料の 800 倍希釈列における参照陽性血清 1 に対する平均吸光度値を R、試験品抗原試料の 800 倍希釈列における参照陰性血清 1 に対する吸光度値を N1、参照抗原試料の 800 倍希釈列における参照陰性血清 1 に対する吸光度値を N2 とし、S/R 比を $(S - N1) / (R - N2)$ により求めるとき、1.0 以上でなければならない。また、R は 0.5～0.9 未満、N1 及び N2 は 0.2 以下、参照抗原試料の 3,200 倍希釈列における参照陽性血清 1 に対する平均吸光度値は 0.5 未満でなければならない。

3.4.6.2 抗原性確認試験

3.4.6.2.1 試験材料

3.4.6.2.1.1 試験動物

3.4.5.1 の試験に用いた動物を用いる。

3.4.6.2.1.2 凝集反应用抗原

「ひな白痢急速診断用菌液」を用いる。

3.4.6.2.2 試験方法

3.4.5.1 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非働化し、凝集反应用抗原を用いて急速平板凝集反応を行う。

凝集反应用抗原 1 滴（約 0.03mL）と血清 1 滴（約 0.03mL）を反应用ガラス板上でよく混和し、凝集の有無を観察する。

3.4.6.2.3 判定

凝集反应用抗原と血清を混和した後、1 分間以内に凝集したものを陽性、1 分間以内に凝集しないものを陰性とする。

試験群の 90 % 以上が陽性でなければならない。この場合、対照群は、すべて陰性でなければならない。

3.4.6.3 鶏攻撃試験

3.4.6.3.1 試験材料

3.4.6.3.1.1 試験動物

3.4.5.2 の試験に用いた動物を用いる。

3.4.6.3.1.2 攻撃用菌液

サルモネラ・エンテリティディスのリファンピシン耐性強毒株（付記 14）をハートインフュージ

ョン液体培地に接種して 37℃で6時間振盪培養する。これをリン酸緩衝食塩液で1 mL 中 $10^8 \sim 10^9$ 個の菌量になるように希釈したものを攻撃用菌液とする。

3.4.6.3.2 試験方法

3.4.5.2 の試験最終日に、攻撃用菌液を試験群及び対照群のそ嚢内に1 mL ずつ投与して攻撃する。攻撃後6日目に、試験群及び対照群より個体別に盲腸便約1 gを採取し、これに9倍量のハーナテトラチオン酸塩基礎培地を添加した後、よく乳化したものを攻撃菌回収用試料とする。攻撃菌回収用試料をリン酸緩衝食塩液で10倍階段希釈し、 10^0 、 10^{-2} 、 10^{-4} 及び 10^{-6} 希釈のそれぞれ0.025mLを試験用培地（付記15）に接種し、37℃で24時間培養後、発育した菌集落数を数え、盲腸便1 g中の生菌数を算出する。

3.4.6.3.3 判定

試験群の盲腸便中の生菌数は、対照群のそれより有意に低い値を示さなければならない（スチューデント t 検定、 $P < 0.05$ ）。

3.4.6.4 凝集抗体価測定試験

3.4.6.4.1 試験材料

3.4.6.4.1.1 試験動物

3.4.5.3 の試験に用いた動物を用いる。

3.4.6.4.1.2 凝集反応用抗原

「ひな白痢急速診断用菌液」を用いる。

3.4.6.4.2 試験方法

3.4.5.3 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、マイクロタイター法での凝集反応を行う。

生理食塩液で5倍に希釈した試験群と対照群の血清、参照陽性血清2（付記16）及び参照陰性血清2（付記17）を、それぞれ生理食塩液で2倍階段希釈し、各希釈血清に100倍に希釈した凝集反応用抗原を等量加え、振盪混合した後、52℃で2時間感作する。感作終了後、4℃で一夜静置した後、凝集像を観察する。

3.4.6.4.3 判定

完全凝集の認められた血清の最高希釈倍数を、抗体価とする。

試験群の抗体価から、抗体価の常用対数の平均値を算出したとき、試験群は100倍以上でなければならない。この場合、対照群においては、すべて抗体価10倍以下でなければならない。また、参照陽性血清2は、抗体価160～320倍の値を示さなければならない。参照陰性血清2は、抗体価10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。

5 その他

5.1 添付文書等記載事項

- 1 本剤を鶏に使用する場合は、事前に最寄りの家畜保健衛生所に相談の上、指示を受け、標識した無注射鶏を1%程度残す旨
- 2 本剤を投与した鶏はひな白痢の抗体検査で陽性を示す旨
- 3 肉用鶏には使用しない旨
- 4 採卵鶏又は種鶏を廃鶏として食鳥処理場へ出荷する前の所定の期間は使用しない旨
- 5 本剤の投与と併せて、国が定めた鶏卵のサルモネラ総合対策指針に基づき、総合的な衛生管理対策を実施する旨

付記1 参照抗原

サルモネラ・エンテリティディス 037-90、038-90 及び 039-90 株のホルマリン不活化菌液を

等量ずつ混合し、安定剤と水を加える。本液 1.75mL を分取して前処理を行い抗原試料を調整した後、更に 800 倍希釈した液について、参照陽性血清 1 を用いた ELISA を行ったとき、基質液の反応時間 10 分で吸光度値が 0.5 となるように調整したものであり、1 バイアル当たり 1.75mL ずつ小分けして、凍結乾燥し、保存する。

付記 2 参照陽性血清 1

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏をサルモネラ・エンテリティディスで免疫して得られた血清であり、「ひな白痢急速診断用菌液」を用いて急速平板凝集反応を行ったとき、抗体価 8 ～ 16 倍を示す。小分けして、凍結乾燥し、保存する。

付記 3 参照陰性血清 1

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏から得られた血清であり、「ひな白痢急速診断用菌液」を用いて急速平板凝集反応を行ったとき、陽性反応を示さない。小分けして凍結乾燥し、保存する。

付記 4 2 w/v % n-オクチル-β-D-グルコピラノサイド添加リン酸緩衝食塩液

1,000mL 中

n-オクチル-β-D-グルコピラノサイド	20.0 g
塩化ナトリウム	8.0 g
塩化カリウム	0.2 g
リン酸二水素カリウム	0.2 g
無水リン酸水素二ナトリウム	1.15 g
水	残量

pH を 7.4 ～ 7.6 に調整する。

付記 5 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
アジ化ナトリウム	0.2 g
水	残量

pH を 9.6 に調整する。

付記 6 リン酸緩衝食塩液

1,000mL 中

塩化ナトリウム	8.0 g
塩化カリウム	0.2 g
リン酸二水素カリウム	0.2 g
無水リン酸水素二ナトリウム	1.15 g
水	残量

pH を 7.4 ～ 7.6 に調整する。

付記 7 洗浄液

ポリソルベート 20 0.5mL をリン酸緩衝食塩液 1,000mL に溶解したもの

付記 8 1 w/v %牛血清アルブミン液
牛血清アルブミン 1.0g を洗淨液 100mL に使用直前に溶解したもの

付記 9 血清希釈液
1,000mL 中
牛胎子血清 10 mL
ポリソルベート 20 1 mL
リン酸緩衝食塩液 残 量

付記 10 標識抗体
ペルオキシダーゼ標識抗鶏 IgG 抗体を標識抗体希釈液（付記 18）で至適濃度に希釈したもの

付記 11 基質液
1,000mL 中
o-フェニレンジアミン 5.0 g
クエン酸一水和物 21.0 g
無水リン酸水素二ナトリウム 28.4 g
水 残 量
溶解後、速やかに小分けして、 -70°C 以下に保存する。

付記 12 基質希釈液
1,000mL
クエン酸一水和物 21.01 g
無水リン酸水素二ナトリウム 28.40 g
過酸化水素 (30) 1 mL
水 残 量

付記 13 反応停止液
1,000mL 中
硫酸 84 mL
水 残 量

付記 14 サルモネラ・エンテリティディスのリファンピシン耐性強毒株
サルモネラ・エンテリティディス HY-1Rif 株又はこれと同等以上の毒力を有するリファンピシン耐性強毒株

付記 15 試験用培地
DHL 寒天培地にリファンピシンを $100\ \mu\text{g/mL}$ となるように加えたもの

付記 16 参照陽性血清 2
生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏をサルモネラ・エンテリティディスで免疫して得られた血清であり、「ひな白痢急速診断用菌液」を用いてマイクロタイター法で凝集反応を行ったとき、抗体価 160 ~ 320 倍を示すものであり、小分けして、 -20°C 以下に保存する。

付記 17 参照陰性血清 2

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏から得られた血清であり、「ひな白痢急速診断用菌液」を用いてマイクロタイター法で凝集反応を行ったとき、抗体価 10 倍未満を示すものであり、小分けして、 -20°C 以下に保存する。

付記 18 標識抗体希釈液

1,000mL 中

牛胎子血清

1 mL

ポリソルベート 20

2 mL

リン酸緩衝食塩液

残 量