

# 鶏伝染性ファブリキウス嚢病生ワクチン（ひな用）

## 1 定義

弱毒伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスを発育鶏卵又は培養細胞で増殖させて得たウイルス液を凍結乾燥した初生ひなを含むひなに適用するワクチンである。

## 2 製法

### 2.1 製造用株

#### 2.1.1 名称

弱毒伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスルカート- BP 株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.2 性状

1 日齢の鶏に皮下又は経口接種しても臨床症状及び免疫抑制作用を示さない。

鶏胚初代細胞に接種すると、CPE を伴って増殖する。

#### 2.1.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の発育鶏卵、2.1.1 の鶏胚初代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

原株の継代は、原種ウイルスの製造又は原株の恒久的な維持以外の目的で行ってはならない。

原種ウイルスは、直接原株から連続した工程により製造し、その継代数は3代以内でなければならない。

種ウイルスは、原種ウイルスから2代以内に製造しなければならない。

原株及び原種ウイルスは、凍結して - 70 以下又は凍結乾燥して5 以下で保存する。

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

### 2.2 製造用材料

#### 2.2.1 発育鶏卵又は培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の10 ~ 12 日齢の発育鶏卵、2.1.1 の鶏胚初代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

#### 2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

### 2.3 原液

#### 2.3.1 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 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、3.1.2 の試験を行う。

#### 2.3.3 ウイルスの培養

##### 2.3.3.1 発育鶏卵を用いる培養

種ウイルスを発育鶏卵の卵黄嚢内又は尿膜腔内に接種し、培養後、採取した感染鶏胚を乳剤とし、ろ過及び攪拌したものを原液とする。この場合、適当と認められた必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

原液について、3.2 の試験を行う。

##### 2.3.3.2 培養細胞を用いる培養

種ウイルスを鶏胚初代細胞又は適当と認められた培養細胞に接種し、培養後、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原液とする。この場合、適当と認められた必要最少量の

抗生物質を加えてもよい。

原液について、3.2 の試験を行う。

## 2.4 最終バルク

原液を混合したもの又は原液を混合し、適当と認められた希釈用液及び安定剤を加えたものを最終バルクとする。この場合、適当と認められた必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

## 2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、凍結乾燥し、小分製品とする。

小分製品について、3.3 の試験を行う。

## 3 試験法

### 3.1 発育鶏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 培養細胞の試験

静置培養の場合は、個体別培養細胞の 1 % 以上を、ファーメンター培養の場合は、個体別培養細胞の 1 vol% 以上又は 500mL 以上を対照培養細胞とし、これについて次の試験を行う。

##### 3.1.2.1 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。

##### 3.1.2.2 鶏赤血球凝集試験

3.1.2.1 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 原液の試験

#### 3.2.1 生菌数限度試験

一般試験法の生菌数限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。

#### 3.2.2 ウイルス含有量試験

##### 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 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 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞で、単層となったものを用いる。

###### 3.2.2.2 試験方法

試料の 0.2mL ずつを 4 枚以上の培養細胞に接種し、37 で 60 分間静置吸着させた後、細胞維持用培養液（付記 1）を加え、37 で 6 日間培養し、観察する。

###### 3.2.2.3 判定

培養細胞に CPE を認めた場合を感染とみなし、TCID<sub>50</sub> を算出する。検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10<sup>6.8</sup>TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。ただし、特に承認されたものは、そのウイルス含有量とする。

### 3.3 小分製品の試験

#### 3.3.1 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均質な懸濁液でなければならない。異物又は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。

### 3.3.2 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。

### 3.3.3 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。

### 3.3.4 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。

### 3.3.5 サルモネラ否定試験

一般試験法のサルモネラ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。

### 3.3.6 生菌数限度試験

一般試験法の生菌数限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。

### 3.3.7 迷入ウイルス否定試験

一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1、2.1.1、2.1.2、2.2.1 及び 2.2.2 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、中和用血清は、抗伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス血清（付記 2）を非働化したものを用いる。

### 3.3.8 ウイルス含有量試験

3.2.2 を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1羽分当たり  $10^{4.5}$ TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。ただし、特に承認されたものは、そのウイルス含有量とする。

### 3.3.9 マーカー試験

#### 3.3.9.1 試験材料

##### 3.3.9.1.1 試料

試験品をリン酸緩衝食塩液を用いてウイルスが 0.1mL 中 1羽分となるように調整したものを試料とする。強毒伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスを 0.1mL 当たり  $10^{4.0}$ EID<sub>50</sub> になるように調整したものを対照として用いる。

##### 3.3.9.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞で、単層となったものを用いる。

##### 3.3.9.2 試験方法

試料及び対照の 0.1mL ずつをそれぞれ 4 枚以上の培養細胞に接種し、5～7 日間観察する。

##### 3.3.9.3 判定

培養細胞に CPE を認めなければならない。この場合、対照を接種した培養細胞では、CPE を認めてはならない。

### 3.3.10 安全試験

#### 3.3.10.1 試験材料

##### 3.3.10.1.1 接種材料

試験品をリン酸緩衝食塩液を用いてウイルスが 0.2mL 当たり 5羽分含まれるように調整し、接種材料とする。

##### 3.3.10.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 1～4 日齢の鶏を用いる。

##### 3.3.10.2 試験方法

試験動物 10 羽を試験群、5 羽を対照群とする。

接種材料 0.2mL ずつを試験群に経口接種し、対照群とともに 5 週間観察し、試験最終日にファブリキウス嚢を剖検する。

##### 3.3.10.3 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、剖検したときファブリキウス嚢の著しい萎縮を認めてはならない。

### 3.3.11 力価試験

#### 3.3.11.1 試験材料

##### 3.3.11.1.1 接種材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で 0.2mL 中 1 羽分となるように調整したものを接種材料とする。

##### 3.3.11.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 1 ~ 4 日齢の鶏を用いる。

##### 3.3.11.1.3 中和試験用ウイルス

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞に接種し、培養した伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスルカート- BP 株又は適当と認められた株を用いる。

##### 3.3.11.1.4 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞をシャーレで培養し、単層となったものを用いる。

#### 3.3.11.2 試験方法

試験動物 10 羽に接種材料 0.2mL ずつを経口接種し、3 週間後に得られた各個体の血清について中和試験を行う。また、非接種動物 3 羽を対照として、接種群と隔離して飼育し、3 週間後に得られた各個体の血清について中和試験を行う。

血清を非働化し、リン酸緩衝食塩液で 2 倍階段希釈する。各希釈血清と 0.1mL 中に 100 ~ 200PFU を含む中和試験用ウイルス液を等量混合し、4℃ で 18 ~ 24 時間処理する。各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ 2 枚の培養細胞に接種し、37℃ で 60 分間静置した後、第 1 次重層寒天培地（付記 3）を重層し、37℃ で 2 ~ 3 日間静置培養する。その後、第 2 次重層寒天培地（付記 4）を重層し、37℃ で更に 24 時間静置培養し、観察する。

#### 3.3.11.3 判定

プラック数を 50 % 減少させる血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

試験群の 80 % 以上が中和抗体価 200 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、10 倍以下でなければならない。

### 3.3.12 免疫抑制否定試験

#### 3.3.12.1 試験材料

##### 3.3.12.1.1 接種材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で 0.2mL 中 5 羽分となるように調整したものを接種材料とする。

##### 3.3.12.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 1 ~ 4 日齢の鶏を用いる。

#### 3.3.12.2 試験方法

試験動物 10 羽を試験群、10 羽を対照群とし、次のいずれかの試験を行う。

##### 3.3.12.2.1 赤血球凝集抑制試験

接種材料 0.2mL ずつを試験群に皮下接種し、接種後 7 日目に B1 株の「ニューカッスル病生ワクチン」1 羽分を対照群とともに点鼻接種し、21 日目に採血し、ニューカッスル病ウイルスに対する赤血球凝集抑制反応を行う。

##### 3.3.12.2.2 攻撃試験

接種材料 0.2mL ずつを試験群に経口接種し、接種後 14 日目に B1 株の「ニューカッスル病生ワクチン」1 羽分を対照群とともに点鼻接種する。点鼻接種後 21 日目に 1 mL 中  $10^{4.0}$  致死量となるように調整した強毒ニューカッスル病ウイルス佐藤株を全羽数の筋肉内に 1 mL ずつ注射し、14 日間観察する。

#### 3.3.12.3 判定

3.3.12.2.1 の赤血球凝集抑制反応試験では、試験群及び対照群ともに赤血球凝集抑制抗体が上昇し、その赤血球凝集抑制抗体価に有意差 ( $P < 0.05$ ) を認めてはならない。

3.3.12.2.2 の攻撃試験では、試験終了時、試験群及び対照群ともに 80 % 以上が異常なく耐過しなければならない。

#### 4 貯法及び有効期間

有効期間は、2 年間とする。ただし、特に承認されたものは、その期間とする。

##### 付記 1 細胞維持用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

牛血清 適量

イーグル MEM 残量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 7.4 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

##### 付記 2 抗伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス血清

伝染性ファブリキウス嚢病ウイルスで免疫した生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏の血清で、試験品中のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

##### 付記 3 第 1 次重層寒天培地

1,000mL 中

寒天 8 ~ 10 g

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95g

牛血清 0 ~ 20 mL

イーグル MEM 残量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 7.4 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

第 1 次重層寒天培地に 0.5w/v% ニュ - トラルレッド液を 2 vol% となるように加えたもの