

# マレック病（マレック病ウイルス 2 型・七面鳥ヘルペスウイルス）凍結生ワクチン

## 1 定義

弱毒マレック病ウイルス（2 型）及び七面鳥ヘルペスウイルスをそれぞれ培養細胞で増殖させて得た感染細胞浮遊液を混合し、凍結したワクチンである。

## 2 製法

### 2.1 製造用株

#### 2.1.1 マレック病ウイルス 2 型株

##### 2.1.1.1 名称

弱毒マレック病ウイルス SB-1 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.1.2 性状

1 日齢の鶏の皮下、筋肉内又は腹腔内に注射しても病原性を示さない。鶏胚初代細胞に接種すると、CPE を伴って増殖する。

##### 2.1.1.3 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 2.1.1 の鶏胚初代細胞又は適当と認められた細胞で継代する。

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 - 100 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。

#### 2.1.2 七面鳥ヘルペスウイルス株

##### 2.1.2.1 名称

七面鳥ヘルペスウイルス FC126 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.2.2 性状

1 日齢の鶏の皮下、筋肉内又は腹腔内に注射しても病原性を示さない。鶏、うずら又はあひるの発育卵の胚初代細胞に接種すると、CPE を伴って増殖する。

##### 2.1.2.3 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 2.1.1 の鶏胚初代細胞、2.3.1 のうずら胚初代細胞、2.4.1 のあひる胚初代細胞又は適当と認められた細胞で継代する。

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 - 100 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 マレック病ウイルス 2 型

### 2.2.1.1 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞又は製造に相当と認められた細胞を用いる。

### 2.2.1.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

## 2.2.2 七面鳥ヘルペスウイルス

### 2.2.2.1 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、2.3.1 のうずら胚初代細胞、2.4.1 のあひる胚初代細胞又は製造に相当と認められた細胞を用いる。

### 2.2.2.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

## 2.3 原液

### 2.3.1 マレック病ウイルス 2 型原液

#### 2.3.1.1 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見なす。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 の試験を行う。

#### 2.3.1.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞又は細胞浮遊液に接種して培養し、ウイルスの増殖極期の感染細胞を個別培養細胞ごとに採取して遠心し、混合して原液とする。原液に相当と認められた安定剤を加えてもよい。

原液について 3.2 の試験を行う。

### 2.3.2 七面鳥ヘルペスウイルス原液

#### 2.3.2.1 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見なす。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 の試験を行う。

#### 2.3.2.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞又は細胞浮遊液に接種して培養し、ウイルスの増殖極期の感染細胞を個別培養細胞ごとに採取して遠心し、混合して原液とする。原液に相当と認められた安定剤を加えてもよい。

原液について、3.2 の試験を行う。

## 2.4 最終バルク

マレック病ウイルス 2 型原液及び七面鳥ヘルペスウイルス原液を混合し、相当と認められた希釈液で濃度調整し、相当と認められた凍害防止剤を加え、最終バルクとする。この場合、相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、凍結して小分製品とする。

小分製品について、3.3 の試験を行う。

## 3 試験法

### 3.1 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。

#### 3.1.1 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 迷入ウイルス否定試験

3.1.1の試験最終日に対照培養細胞のそれぞれの容器から細胞及び培養液を採り、混合したものを試料とし、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 2.1、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。

#### 3.1.3 鶏注射試験

##### 3.1.3.1 試験材料

##### 3.1.3.1.1 注射材料

3.1.1の試験最終日に対照培養細胞のそれぞれの容器から細胞及び培養液を採り、混合したものを注射材料とする。

##### 3.1.3.1.2 試験動物

生ワクチン製造材料の規格 1.1 由来の1～4日齢の鶏を用いる。

##### 3.1.3.2 試験方法

注射材料 0.2mL ずつを10羽の鶏の皮下に注射し、5週間観察する。

観察最終日に剖検する。

##### 3.1.3.3 判定

観察期間中、試験動物に臨床的な異常を認めてはならない。また、剖検したときに異常を認めてはならない。

### 3.2 原液の試験

#### 3.2.1 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。

#### 3.2.2 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。

#### 3.2.3 ウイルス含有量試験

##### 3.2.3.1 試験材料

##### 3.2.3.1.1 試料

検体を細胞維持用培養液（付記1）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

##### 3.2.3.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞又は2代継代細胞を25cm<sup>2</sup>以上のシャーレに培養し、単層となったものを用いる。

##### 3.2.3.2 試験方法

試料 0.2mL ずつをそれぞれ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、細胞維持用培養液を加え、37℃で4～7日間培養し、観察する。

##### 3.2.3.3 判定

シャーレ当たり平均20個以上検出された試料の希釈倍数及びその平均ブラック数又は平均フォーカス数からウイルスの含有量を算出する。

検体のウイルス含有量は 1 mL 中それぞれ  $10^{6.0}$  PFU 又は  $10^{6.0}$  FFU 以上でなければならない。

### 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凍結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 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。

#### 3.3.3 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。

#### 3.3.4 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、試験品を溶解用液で 0.1mL 当たり 10 羽分となるように調整し、20kHz で 1 分間超音波処理し、非働化した抗マレック病ウイルス血清（付記 2）で中和したものを試料とする。

#### 3.3.5 ウイルス含有量試験

3.2.3 を準用し、両ウイルス株の CPE の形態学的相違による鑑別法で、それぞれのブラック数又はフォーカス数を測定するとき、試験品のウイルス含有量は、1 羽分当たり両ウイルス株ともに  $10^{3.0}$  PFU 又は  $10^{3.0}$  FFU 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。また CPE の形態学的相違による鑑別法で十分に測定できないときは、モノクローナル抗体を用いた免疫染色法により測定する。

#### 3.3.6 安全試験

##### 3.3.6.1 試験材料

###### 3.3.6.1.1 注射材料

試験品を溶解用液を用いて 1 注射量当たり 100 羽分のウイルスが含まれるように調整し、注射材料とする。

###### 3.3.6.1.2 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。

##### 3.3.6.2 試験方法

試験動物 10 羽を試験群、5 羽を対照群とする。

注射材料の 1 注射量ずつを試験群の皮下に注射し、対照群とともに 5 週間観察する。

試験開始時及び試験終了時に体重を測定し、剖検する。

##### 3.3.6.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群の動物に臨床的な異常を認めてはならない。また、剖検したときに異常を認めてはならない。

#### 3.3.7 力価試験

##### 3.3.7.1 試験材料

###### 3.3.7.1.1 注射材料

試験品を溶解溶液で 0.2mL 中 1 羽分となるように調整したものを注射材料とする。

###### 3.3.7.1.2 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。

#### 3.3.7.2 試験方法

試験動物 10 羽を試験群、3 羽を対照群とする。

注射材料の 1 注射量ずつを試験群の皮下に注射し、対照群とともに 3 週間観察する。

観察最終日に得られた各個体の血清について、両ウイルス株に対する蛍光抗体反応を行う。

血清をリン酸緩衝食塩液で 20 倍とし、更に 2 倍階段希釈する。感染細胞（付記 3）に各希釈液を加え、37℃ で 45 ~ 60 分間処理した後、リン酸緩衝食塩液で 3 回洗浄し、風乾後、4 単位の抗鶏 IgG 蛍光標識抗体（付記 4）を加え、37℃ で 45 ~ 60 分間処理した後、リン酸緩衝食塩液で 3 回洗浄し、蛍光顕微鏡で観察する。

#### 3.3.7.3 判定

特異蛍光が認められる血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群の 80 % 以上が両ウイルス株に対してそれぞれ抗体価 40 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、すべて 20 倍以下でなければならない。

#### 4 貯法及び有効期間

- 100℃ 以下で保存する。

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 又は F 10 培地 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 抗マレック病ウイルス血清

マレック病ウイルス SB-1 株又はこれと同等と認められた株及び七面鳥ヘルペスウイルス FC126 株又はこれと同等と認められた株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 感染細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞を 37℃ 5 vol% 炭酸ガス下で培養し、カバーグラスに単層を形成させたものにマレック病ウイルス SB-1 株又はこれと同等と認められた株及び七面鳥ヘルペスウイルス FC126 株又はこれと同等と認められた株をそれぞれ接種し、2 ~ 4 日間培養したもので、特異抗原を有するもの

#### 付記 4 抗鶏 IgG 蛍光標識抗体

抗鶏 IgG 血清から - グロブリンを調製し、これを蛍光色素で標識したもので、8 単位以上を含むもの