

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）・鶏痘混合生ワクチン

平成20年10月28日（告示）一部改正

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、凍結したマレック病2価ワクチンと弱毒鶏痘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鶏痘ワクチンを組み合わせたものである。

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 繙代及び保存

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、直接原株から連續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 繙代及び保存

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、直接原株から連續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。

2.1.3 鶏痘ウイルス株

2.1.3.1 名称

弱毒鶏痘ウイルスボーデット株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

鶏の翼膜に穿刺又は外股部の毛のうに擦入すると、5～7日で善感発痘する。

12日齢発育鶏卵の漿尿膜上に接種すると増殖し、特徴的なポックを形成する。

2.1.3.3 繙代及び保存

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 の発育鶏卵又は生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞で継代する。

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、直接原株から連續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 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適當と認められた細胞を用いる。

2.2.1.2 培養液

製造に適當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 の鶏胚初代細胞又は製造に適當と認められた細胞を用いる。

2.2.2.2 培養液

製造に適當と認められた培養液を用いる。

2.2.3 鶏痘ウイルス

2.2.3.1 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9～13日齢の発育鶏卵又は生ワクチン製造用材料の規格

2.1.1 の鶏胚初代細胞若しくは製造に適當と認められた細胞を用いる。

2.2.3.2 培養液

製造に適當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、培養した細胞を個体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。

個体別培養細胞について、3.1.1.1の試験を行う。

2.3.1.2 ウィルスの培養

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体別培養細胞ごとに採取して遠心し、混合して原液とする。原液に適當と認められた安定剤を加えてもよい。

原液について、3.2.1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、培養した細胞を個体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。

個体別培養細胞について、3.1.1.1 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体別培養細胞ごとに採取して遠心し、混合して原液とする。原液に適當と認められた安定剤を加えてもよい。

原液について、3.2.1 の試験を行う。

2.3.3 鶏痘ウイルス原液

2.3.3.1 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見なす。

個体別発育鶏卵について、3.1.2 の試験を行う。

2.3.3.2 細胞の培養

1回に処理し、培養した細胞を個体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。

個体別培養細胞について、3.1.1.2 の試験を行う。

2.3.3.3 ウイルスの培養

2.3.3.3.1 発育鶏卵を用いる培養

種ウイルスを発育鶏卵で培養し、漿尿膜を採取して乳剤とし、そのろ液又は遠心上清を原液とする。

この場合、適當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、3.2.2 の試験を行う。

2.3.3.3.2 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當と認められた培養細胞に接種して培養し、培養後の細胞を凍結融解し、その遠心上清を原液とする。

原液について、3.2.2 の試験を行う。

2.4 最終バルク

2.4.1 マレック病ウイルス 2型及び七面鳥ヘルペスウイルス

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、適當と認められた希釀液で濃度調整し、適當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、適當と認められた必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

2.4.2 鶏痘ウイルス

鶏痘ウイルス原液を混合し、適當と認められた安定剤を加え、最終バルクとする。この場合、適當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

2.5.1 マレック病 2 倍ワクチン

最終バルクを小分容器に分注し、凍結し、小分製品とする。

小分製品について、3.3 の試験を行う。

2.5.2 鶏痘ワクチン

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 培養細胞又は発育鶏卵の試験

3.1.1 培養細胞の試験

3.1.1.1 マレック病ウイルス培養細胞の試験

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。

3.1.1.1.1 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。

3.1.1.1.2 迷入ウイルス否定試験

3.1.1.1.1 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。

3.1.1.1.3 鶏注射試験

3.1.1.1.3.1 試験材料

3.1.1.1.3.1.1 注射材料

3.1.1.1.1 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。

3.1.1.1.3.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 1 ~ 4 日齢の鶏を用いる。

3.1.1.1.3.2 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。

3.1.1.1.3.3 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。

3.1.1.2 鶏痘ウイルス培養細胞の試験

3.1.1.2.1 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。

3.1.1.2.1.1 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。

3.1.1.2.1.2 鶏赤血球凝集試験

3.1.1.2.1.1 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。

3.1.2 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。

3.1.2.1 培養観察

対照発育鶏卵に、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。

3.1.2.2 鶏赤血球凝集試験

3.1.2.1 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。

3.2 原液の試験

3.2.1 マレック病ウイルス原液の試験

3.2.1.1 ウイルス含有量試験

3.2.1.1.1 試験材料

3.2.1.1.1.1 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。

3.2.1.1.1.2 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 25cm² 以上のシャーレに培養し、単層となったものを用いる。

3.2.1.1.2 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。

3.2.1.1.3 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。

3.2.2 鶏痘ウイルス原液の試験

3.2.2.1 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。

3.2.2.2 ウィルス含有量試験

3.2.2.2.1 発育鶏卵を用いる試験

3.2.2.2.1.1 試験材料

3.2.2.2.1.1.1 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の 11 ~ 13 日齢のものを用いる。

3.2.2.2.1.2 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。

3.2.2.2.1.3 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漿尿膜上に接種し、37 ℃ で 5 日間培養し、観察する。試験最終日に漿尿膜を検査してポック発現の有無を観察する。

3.2.2.2.1.3 判定

漿尿膜にポックの出現し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 $10^{6.0}EID_{50}$ 以上でなければならない。

3.2.2.2.2 培養細胞を用いる試験

3.2.2.2.2.1 試験材料

3.2.2.2.2.1.1 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞を培養したものを用いる。

3.2.2.2.2.1.2 試料

検体を細胞維持用培養液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.2.2.2.2 試験方法

試料 0.1mL ずつを 5 枚以上の培養細胞に接種し、37 ℃ で 60 分吸着させた後、細胞維持用培養液を加え、37 ℃ で 5 日間培養し、観察する。

3.2.2.2.2.3 判定

培養細胞に CPE を認めた場合を感染とみなし、 $TCID_{50}$ を算出する。

検体のウイルス含有量は、1mL 中 $10^{5.8}TCID_{50}$ 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、マレック病 2 倍ワクチンにあっては固有の色調を有する凍結物でなければならず、鶏痘ワクチンにあっては、固有の色調を有する乾燥物でなければならない。両ワクチンを溶解し、混合したものは、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、鶏痘ワクチンは、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、鶏痘ワクチンは、適合しなければならない。

3.3.4 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。

ただし、マレック病 2 倍ワクチン及び鶏痘ワクチンのそれぞれ 1 本を 50mL の溶解用液（付記 2 ）に溶解したものを小分容器ごとの試料とする。

3.3.5 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。

ただし、マレック病 2 倍ワクチン及び鶏痘ワクチンのそれぞれ 1 本を 50mL の溶解用液に溶解したものを作成したものを小分容器ごとの試料とする。

3.3.6 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、鶏痘ワクチンは、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、マレック病 2 倍ワクチンは、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、抗マレック病ウイルス血清（付記 3 ）を非効化したもので中和したものを試料とする。

3.3.8 ウィルス含有量試験

3.3.8.1 マレック病ウイルス

マレック病 2 倍ワクチンを細胞維持用培養液で 10 倍階段希釈し、各階段の希釈液を試料とする。

3.2.1.1 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、農林水産大臣が特に認めた場合は、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。

3.3.8.2 鶏痘ウイルス

3.2.2.2 を準用して試験するとき、鶏痘ワクチンのウイルス含有量は、1 羽分当たり $10^{2.0}$ ~ $10^{4.0}$ EID₅₀ 又は $10^{1.5}$ ~ $10^{2.5}$ TCID₅₀ でなければならない。

3.3.9 安全試験

3.3.9.1 試験材料

3.3.9.1.1 注射材料

マレック病 2 倍ワクチン及び鶏痘ワクチンを溶解用液で 0.2mL 中 10 羽分となるように調整したものを、注射材料とする。

3.3.9.1.2 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。

3.3.9.2 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 0.2mL ずつを試験群の皮下に注射し、対照群とともに 5 週間臨床観察を行い、観察終了時に体重を測定し、剖検する。

3.3.9.3 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、剖検したときに異常を認めてはならない。

3.3.10 マレック病力価試験

3.3.10.1 試験材料

3.3.10.1.1 注射材料

マレック病 2 倍ワクチン及び鶏痘ワクチンを溶解用液で 0.2 mL 中 1 羽分となるように調整したものを注射材料とする。

3.3.10.1.2 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、 3 羽を対照群とする。

注射材料の 1 羽分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、 蛍光抗体法により両ウイルス株に対する抗体価を測定する。

血清をリン酸緩衝食塩液で 20 倍に希釈し、 更に 2 倍階段希釈する。 感染細胞（付記 4 ）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 5 ）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、 UV 励起法で観察する。

3.3.10.3 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。

抗体価は、 試験群の 80 % 以上が両ウイルス株に対してそれぞれ 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。

3.3.11 鶏痘発痘試験

3.3.11.1 試験材料

3.3.11.1.1 接種材料

マレック病 2 倍ワクチン及び鶏痘ワクチンを溶解用液で 0.01mL 中 1 羽分となるように調整したものを受け種材料とする。

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。

3.3.11.2 試験方法

試験動物の 10 羽の翼膜に受け種材料の 0.01mL ずつをそれぞれ穿刺接種し、 3 週間観察する。

3.3.11.3 判定

接種後 5 ~ 7 日で善感発痘し、 痘疱は 21 日以内に完全に消退しなければならない。

4 貯法及び有効期間

マレック病 2 倍ワクチンは -140 ℃ 以下の液体窒素容器内で、 鶏痘ワクチンは 2 ~ 5 ℃ で保存する。

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 細胞維持用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・プロス 2.95g

牛血清 適量

イーグル MEM 又は F10 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よい。

付記 2 溶解用液

1,000mL 中

塩化ナトリウム 8.0 g

無水リン酸水素二ナトリウム 1.2 g

リン酸二水素カリウム	0.19 g
フェノールレッド	0.025g
水	残量

付記3 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値を有するもの

付記4 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 5vol%炭酸ガス下で培養し、カバーガ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5 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