

マレック病（マレック病ウイルス 1 型）凍結生ワクチン （シード）

平成 22 年 3 月 3 日 (告示第 394 号) 新規追加
平成 24 年 8 月 10 日 (告示第 2004 号) 一部改正

1 定義

シードロット規格に適合した弱毒マレック病ウイルス（1 型）を同規格に適合した初代細胞で増殖させて得た感染細胞浮遊液を凍結したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

弱毒マレック病ウイルス CVI988 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。

2.1.3 マスターシードウイルス

2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、SPF 動物規格の 2.6 に適合した鶏胚初代細胞、同規格の 2.7 に適合したうずら胚初代細胞、同規格の 2.8 に適合したあひる胚初代細胞又は適当と認められた細胞で増殖させ、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 -100°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。

2.1.4 ワーキングシードウイルス

2.1.4.1 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 2.6 に適合した鶏胚初代細胞、同規格の 2.7 に適合したうずら胚初代細胞、同規格の 2.8 に適合したあひる胚初代細胞又は適当と認められた細胞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 -100°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2 の試験を行う。

2.1.5 プロダクションシードウイルス

2.1.5.1 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 2.6 に適合した鶏胚初代細胞、同規格の 2.7 に適合したうずら胚初代細胞、同規格の 2.8 に適合したあひる胚初代細胞又は適当と認められた細胞で増殖させる。

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 -100°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ウイルスを保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 初代細胞

SPF 動物規格の 2.6 に適合した鶏胚初代細胞、同規格の 2.7 に適合したうずら胚初代細胞、同規格の 2.8 に適合したあひる胚初代細胞又は製造に相当と認められた初代細胞を用いる。

2.2.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

2.2.3 マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）

2.2.3.1 増殖、継代及び保存

マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）は、2.2.2 の培養液で増殖し、継代及び保存しない。

マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）について、3.2 の試験を行う。

2.3 原液

2.3.1 マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）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。ウイルス接種前の個別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、3.3 の試験を行う。

2.3.2 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 の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、3.4 の試験を行う。

2.4 最終バルク

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、3.5 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 1.4.2.1.1.1 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。

3.1.1.5 対象動物を用いた免疫原性試験

一般試験法の対象動物を用いた免疫原性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。

3.1.1.6 対象動物を用いた安全性確認試験

一般試験法の対象動物を用いた安全性確認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。

3.1.1.7 病原性復帰確認試験

一般試験法の病原性復帰確認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 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。

3.2 初代細胞の試験

3.2.1 マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）の試験

3.2.1.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.2.4.2.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.2 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。

3.2.1.3 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。

3.3 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。

3.3.1 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。

3.3.2 迷入ウイルス否定試験

3.3.1 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。

3.3.3 鶏注射試験

3.3.3.1 試験材料

3.3.3.1.1 注射材料

3.3.1 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。

3.3.3.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した発育鶏卵由来の 1～4 日齢の鶏を用いる。

3.3.3.2 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。

3.3.3.3 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、異常を認めてはならない。

3.4 原液の試験

3.4.1 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。

3.4.2 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。

3.4.3 ウイルス含有量試験

3.4.3.1 試験材料

3.4.3.1.1 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。

3.4.3.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 に適合した鶏胚初代細胞又は 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。

3.4.3.2 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。

3.4.3.3 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プ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 10^{6.0}PFU 又は 10^{6.0}FFU 以上でなければならない。

3.5 小分製品の試験

3.5.1 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。

3.5.2 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。

3.5.3 マイコプラズマ否定試験

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。

3.5.4 ウイルス含有量試験

3.4.3 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^{3.0}PFU 又は 10^{3.0}FFU 以上でなければならない。

3.5.5 安全試験

3.5.5.1 試験材料

3.5.5.1.1 注射材料

試験品を溶解用液を用いて 1 注射量当たり 100 羽分のウイルス量が含まれるように濃度を調整

し、注射材料とする。

3.5.5.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した発育鶏卵由来の 1～4 日齢の鶏を用いる。

3.5.5.2 試験方法

試験動物の 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、対照群と共に 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。

3.5.5.3 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、異常を認めてはならない。

3.5.6 力価試験

3.5.6.1 試験材料

3.5.6.1.1 注射材料

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

3.5.6.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した発育鶏卵由来の 1～4 日齢の鶏を用いる。

3.5.6.2 試験方法

試験動物の 10 羽を試験群、3 羽を対照群とする。

注射材料の 1 注射量ずつを試験群の皮下に注射し、対照群と共に 5 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 2）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 3）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。

3.5.6.3 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、全て抗体価 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、製造後 1 年 9 か月間とする。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・ブロス

2.95 g

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もよい。

付記 2 感染細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 に適合した鶏胚初代細胞を 37℃、5 vol %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 JM 株又はこれと同等と認められた株を接種し、2～4日間培養したもので、特異抗原を有するもの。

付記3 抗鶏 IgG 蛍光標識抗体

抗鶏 IgG 血清から γ -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。