

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（シード）

平成24年7月4日(告示第1622号)新規追加

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（2型）及び七面鳥ヘルペスウイルスをそれぞれ同規格に適合した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価ワクチンとシードロット規格に適合した弱毒鶏痘ウイルスを同規格に適合した培養細胞又は発育鶏卵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

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 マスターシードウイルス

2.1.1.3.1 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。

2.1.1.4 ワーキングシードウイルス

2.1.1.4.1 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。

2.1.1.5 プロダクションシードウイルス

2.1.1.5.1 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。

2.1.2 七面鳥ヘルペスウイルス

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 マスターシードウイルス

2.1.2.3.1 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。

2.1.2.4 ワーキングシードウイルス

2.1.2.4.1 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。

2.1.2.5 プロダクションシードウイルス

2.1.2.5.1 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について、3.1.3の試験を行う。

2.1.3 鶏痘ウイルス

2.1.3.1 名称

弱毒鶏痘ウイルス TL 株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

鶏の翼膜に穿刺し、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 マスターシードウイルス

2.1.3.3.1 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1.1に適合した発育鶏卵又はSPF動物規格の2.6に適合した鶏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 -70°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、ワクチンの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。

2.1.3.4 ワーキングシードウイルス

2.1.3.4.1 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 1.1 に適合した発育鶏卵又は SPF 動物規格の 2.6 に適合した鶏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 -70°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。

2.1.3.5 プロダクションシードウイルス

2.1.3.5.1 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 1.1 に適合した発育鶏卵又は SPF 動物規格の 2.6 に適合した鶏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 -70°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 マレック病ウイルス 2 型

2.2.1.1 初代細胞

SPF 動物規格の 2.6 に適合した鶏胚初代細胞又は製造に適当と認められた初代細胞を用いる。

2.2.1.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.1.3 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)

2.2.1.3.1 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、2.2.1.2 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。

2.2.2 七面鳥ヘルペスウイルス

2.2.2.1 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適当と認められた初代細胞を用いる。

2.2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.2.3 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)

2.2.2.3.1 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、2.2.2.2 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。

2.2.3 鶏痘ウイルス

2.2.3.1 培養細胞又は発育鶏卵

2.2.3.1.1 培養細胞

2.2.3.1.1.1 初代細胞

SPF 動物規格の 2.6 に適合した鶏胚初代細胞又は製造に適当と認められた初代細胞を用いる。

2.2.3.1.1.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.3.1.1.3 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)

2.2.3.1.1.3.1 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、2.2.3.1.1.2 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。

2.2.3.1.2 発育鶏卵

SPF 動物規格の 1.1 に適合した 9～13 日齢のものを用いる。

マスターシードウイルス及びワーキングシードウイルスを増殖、継代及び保存する場合の発育鶏卵並びにプロダクションシードウイルスを増殖及び保存する場合の発育鶏卵について、3.3 の試験を行う。

2.3 原液

2.3.1 マレック病ウイルス 2 型原液

2.3.1.1 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、3.4.1 の試験を行う。

2.3.1.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを 2.3.1.1 の細胞に接種して培養し、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、3.6.1 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 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、3.4.1 の試験を行う。

2.3.2.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを 2.3.2.1 の細胞に接種して培養し、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、3.6.1 の試験を行う。

2.3.3 鶏痘ウイルス原液

2.3.3.1 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、3.4.2 の試験を行う。

2.3.3.2 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、3.5 の試験を行う。

2.3.3.3 ウイルスの培養

2.3.3.3.1 培養細胞を用いる場合

プロダクションシードウイルスを 2.3.3.1 の細胞に接種して培養し、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、凍結融解した後混合し、その遠心上清を原液とする。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、3.6.2 の試験を行う。

2.3.3.3.2 発育鶏卵を用いる場合

プロダクションシードウイルスを 2.3.3.2 の発育鶏卵で培養し、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、3.6.2 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、適当と認められた希釈液で濃度調整し、適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、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。

2.4.2 鶏痘ウイルス

鶏痘ウイルス原液を混合し、適当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

2.5.1 マレック病 2 価ワクチン

2.4.1 の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、3.7 の試験を行う。

2.5.2 鶏痘ワクチン

2.4.2 の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、3.7 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。

なお、鶏痘ウイルスのマスターシードウイルスについては、検体を孔径 0.2 μ m のフィルターを用いて 3 回ろ過処理したものを試料としてもよい。

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。

なお、鶏痘ウイルスのマスターシードウイルスについては、検体を孔径 0.2 μ m のフィルターを用いて 3 回ろ過処理したものを試料としてもよい。

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。

なお、鶏痘ウイルスのマスターシードウイルスについては、検体を孔径 0.2 μ m のフィルターを用いて 3 回ろ過処理したものを試料としてもよい。

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 発育鶏卵の試験

3.3.1 孵卵性状試験

シードロット規格の 3.2.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.4 個体別培養細胞の試験

3.4.1 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。

3.4.1.1 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。

3.4.1.2 迷入ウイルス否定試験

3.4.1.1 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。

3.4.1.3 鶏注射試験

3.4.1.3.1 試験材料

3.4.1.3.1.1 注射材料

3.4.1.1 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。

3.4.1.3.1.2 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。

3.4.1.3.2 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。

3.4.1.3.3 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。

3.4.2 鶏痘ウイルス培養細胞の試験

3.4.2.1 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。

3.4.2.1.1 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。

3.4.2.1.2 鶏赤血球凝集試験

3.4.2.1.1 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。

3.5 個体別発育鶏卵の試験

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。

3.5.1 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。

3.5.2 鶏赤血球凝集試験

3.5.1 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。

3.6 原液の試験

3.6.1 マレック病ウイルス原液の試験

3.6.1.1 ウイルス含有量試験

3.6.1.1.1 試験材料

3.6.1.1.1.1 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。

3.6.1.1.1.2 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。

3.6.1.1.2 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。

3.6.1.1.3 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。

3.6.2 鶏痘ウイルス原液の試験

3.6.2.1 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。

3.6.2.2 ウイルス含有量試験

3.6.2.2.1 発育鶏卵を用いる試験

3.6.2.2.1.1 試験材料

3.6.2.2.1.1.1 発育鶏卵

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

3.6.2.2.1.1.2 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。

3.6.2.2.1.2 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。

3.6.2.2.1.3 判定

漿尿膜にポックの出現したものを感染とみなし、EID₅₀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}EID₅₀ 以上でなければならない。

3.6.2.2.2 培養細胞を用いる試験

3.6.2.2.2.1 試験材料

3.6.2.2.2.1.1 培養細胞

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

3.6.2.2.2.1.2 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。

3.6.2.2.2.2 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。

3.6.2.2.2.3 判定

培養細胞に CPE を認めた場合を感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{5.8}TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.7 小分製品の試験

3.7.1 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 価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ない、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、異物及び異臭を認めてはならない。

また、小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.7.2 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。

3.7.3 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。

3.7.4 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 価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。

3.7.5 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価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小分容器ごとの試料とする。

3.7.6 ウイルス含有量試験

3.7.6.1 マレック病ウイルス

マレック病2価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。

3.6.1.1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プ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共に $10^{3.0}$ 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には、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。

3.7.6.2 鶏痘ウイルス

3.6.2.2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 $10^{2.0} \sim 10^{4.0}$ EID₅₀又は $10^{1.5} \sim 10^{2.5}$ TCID₅₀でなければならない。

3.7.7 安全試験

3.7.7.1 試験材料

3.7.7.1.1 注射材料

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

3.7.7.1.2 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。

3.7.7.2 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0.2mLずつを試験群の皮下に注射し、対照群と共に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。

3.7.7.3 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。

3.7.8 マレック病力価試験

3.7.8.1 試験材料

3.7.8.1.1 注射材料

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

3.7.8.1.2 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。

3.7.8.2 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羽分ずつを試験群の皮下に注射し、対照群と共に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、風乾した後、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。

3.7.8.3 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、全て 20 倍以下でなければならない。

3.7.9 鶏痘発痘試験

3.7.9.1 試験材料

3.7.9.1.1 接種材料

マレック病 2 価ワクチン及び鶏痘ワクチンを溶解用液で 0.01mL 中 1 羽分となるように濃度を調整したものを接種材料とする。

3.7.9.1.2 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。

3.7.9.2 試験方法

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

3.7.9.3 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 価ワクチンは -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、製造後 3 年 3 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 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

0.025 g

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 に適合した発育鶏卵由来の鶏の血清であって、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 4 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 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 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。