

鶏伝染性気管支炎生ワクチン（シード）

平成 24 年 7 月 4 日 (告示第 1622 号) 一部改正

令和 4 年 4 月 7 日 (告示第 697 号) 一部改正

1 定義

シードロット規格に適合した弱毒鶏伝染性気管支炎ウイルスを同規格に適合した発育鶏卵で増殖させて得たウイルス液を凍結乾燥したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

弱毒鶏伝染性気管支炎ウイルス 4 - 91 株又は製造に相当と認められた株

2.1.2 性状

4 日齢の鶏に 10^{30} EID₅₀ を点鼻又は点眼接種すると、一過性の軽い呼吸器症状を示すことがある。
8 ~ 10 日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射すると、増殖し、鶏胚を 2 ~ 7 日後に死亡させ、又は鶏胚の発育不全若しくはカーリングを起こす。

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 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖させ、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。

2.1.4 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 1.1 に適合した発育鶏卵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。

2.1.5 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 1.1 に適合した発育鶏卵で増殖させる。

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 発育鶏卵

SPF 動物規格の 1.1 に適合した 10 ~ 12 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、3.2 の試験を行う。

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、3.3 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 の発育鶏卵で培養して、尿膜腔液を採取し、そのろ液、遠心上清又はこれを濃縮したものを原液とする。
原液に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。
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及び安定剤を加えて調製し、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て凍結乾燥し、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 に規定する試験を適用する製剤については、本試験を実施しなくてよい。

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 に規定する試験を適用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 発育鶏卵の試験

3.2.1. 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。

3.3 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。

3.3.1 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。

3.3.2 鶏赤血球凝集試験

3.3.1 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。

3.4 原液の試験

3.4.1 生菌数限度試験

一般試験法の生菌数限度試験法又は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 ウイルス含有量試験

3.4.2.1 試験材料

3.4.2.1.1 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。

3.4.2.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の 9～10 日齢のものを用いる。

3.4.2.2 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尿膜腔内に注射し、37℃ で 7 日間培養し、観察する。試験最終日に鶏胚の変化を観察する。

3.4.2.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全、カーリング）を認め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^{6.8}EID₅₀ 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乾燥塊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 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。

3.5.3 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。

3.5.4 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。

3.5.5 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。

3.5.6 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。

3.5.7 ウイルス含有量試験

3.4.2 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 $10^{3.5}$ EID₅₀ 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。

3.5.8 安全試験

3.5.8.1 試験材料

3.5.8.1.1 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 0.03mL 当たり 10羽分含まれるように調整し、接種材料とする。

3.5.8.1.2 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4日齢の鶏を用いる。

3.5.8.2 試験方法

試験動物の10羽を試験群、5羽を対照群とする。

接種材料 0.03mL ずつを試験群に点眼接種し、対照群と共に3週間観察する。

試験開始時及び試験終了時に体重を測定する。

3.5.8.3 判定

観察期間中、対照群においては、臨床的な異常を認めてはならず、試験群においては、一過性の呼吸器症状及び結膜の充血を呈することがあっても、その他の異常を認めてはならない。

3.5.9 力価試験

それぞれのワクチンについて、3.5.9.1 の試験又は 3.5.9.2 の試験のいずれかを行う。

3.5.9.1 発育鶏卵中和試験

3.5.9.1.1 試験材料

3.5.9.1.1.1 接種材料

試験品をリン酸緩衝食塩液又は適当と認められた溶解用液を用いてウイルスが 0.03mL 当たり 1羽分含まれるように濃度を調整し、接種材料とする。

3.5.9.1.1.2 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4日齢の鶏を用いる。

3.5.9.1.1.3 中和試験用ウイルス

製造用株を用いる。ただし、ウイルス量は、ウイルスを感染させた尿膜腔液を、生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した9～10日齢の発育鶏卵の尿膜腔内に注射し、ウイルス価を測定するとき、1 mL 中 $10^{5.0}$ EID₅₀ 以上でなければならない。

3.5.9.1.1.4 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した9～10日齢のものを用いる。

3.5.9.1.2 試験方法

試験動物の10羽を試験群、3羽を対照群とする。試験群に、接種材料 0.03mL ずつを点眼接種し、対照群と共に3～4週間観察する。観察期間中、試験群及び対照群に異常を認めてはならない。

試験終了時、試験群及び対照群から得られた血清についてウイルス希釈法により中和試験を行う。各群の血清は、それぞれ等量をプールし、非働化する。

中和試験用ウイルスを 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を 3 群に分け、第 1 群には試験群のプール血清を、第 2 群には対照群のプール血清を、第 3 群にはウイルス対照としてリン酸緩衝食塩液を、それぞれ等量加えて混合する。これらの混合液を 4℃で 18～24 時間又は 37℃で 60 分間処理した後、各段階の希釈液ごとに 5 個以上の発育鶏卵の尿膜腔内に 0.1mL ずつ注射し、37℃で 7 日間培養し、観察する。試験最終日に鶏胚の変化を観察する。

3.5.9.1.3 判定

鶏胚に死亡又は変性（発育不全、カーリング）を認めたものを感染とみなし、中和指数を算出する。ただし、24 時間以内に死亡したものは除外する。

試験群の中和指数は、対照群に対し 2.0 以上でなければならない。この場合、対照群の中和指数は、ウイルス対照に対し 1.0 以下でなければならない。

3.5.9.2 抗体量測定試験

3.5.9.2.1 試験材料

3.5.9.2.1.1 接種材料

試験品をリン酸緩衝食塩液又は適当と認められた溶解用液を用いてウイルスが 0.03mL 当たり 1 羽分含まれるように濃度を調整し、接種材料とする。

3.5.9.2.1.2 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 4 日齢の鶏を用いる。

3.5.9.2.1.3 酵素抗体反応（以下、ELISA という。）用抗原

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 10～12 日齢の発育鶏卵に製造用株を接種し、培養した後の尿膜腔液を、100℃で 10 分間加熱処理したものを ELISA 抗原とする。ただし、加熱処理前の尿膜腔液を、生ワクチン製造用材料の規格 1.1 に適合した 9～10 日齢の発育鶏卵の尿膜腔液に注射し、ウイルス量を測定するとき、1mL 中 $10^{6.9}$ EID₅₀ 以上でなければならない。

3.5.9.2.2 試験方法

試験動物の 10 羽を試験群、3 羽を対照群とする。試験群に、接種材料 0.03mL ずつを点眼接種し、対照群と共に 3～4 週間観察する。観察期間中、試験群及び対照群に異常を認めてはならない。

試験終了時、試験群及び対照群から得られた血清について ELISA を行う。各群の血清は、それぞれ等量をプールする。

試験群と対照群のプール血清及び陽性血清（付記 1）を血清希釈液（付記 2）で 50 倍に希釈したものを、それぞれ ELISA 用抗原吸着プレート（付記 3）の 3 穴に 100 μL ずつ加える。37℃で 60 分間反応させた後、洗浄液（付記 4）で洗浄する。次に、各穴に酵素標識抗体液（付記 5）を 100 μL ずつ加え、37℃で 60 分間反応させた後、洗浄液で洗浄する。発色用基質液（付記 6）を各穴に 100 μL ずつ加え、37℃で 30 分間反応させた後、1 mol/L リン酸水溶液を 100 μL ずつ加えて反応を停止させ、各穴の吸光度を 450nm で測定する。

3.5.9.2.3 判定

試験群および対照群のプール血清の吸光度の平均値を S、陽性血清の吸光度の平均値を P とし、S/P 比を算出するとき、試験群のプール血清の S/P 比は 1.0 以上でなければならない。この場合、陽性血清の吸光度は 0.21 以上を示し、対照群のプール血清の吸光度は 0.11 未満でなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後 1 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 陽性血清

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に製造用株を点眼接種して免疫した血清であり、発育鶏卵を用いてウイルス希釈法により中和指数を算出するとき、

中和指数は 2.0 以上を示すよう血清希釈液で希釈したもの。

付記 2 血清希釈液

洗浄液 100 mL にスキムミルク 1 g を溶解したもの。

付記 3 ELISA 用抗原吸着プレート

ELISA 用抗原を 0.05mol/L 炭酸重炭酸緩衝液（付記 7）で 1 mL 中 $10^{5.5}EID_{50}$ 以上となるように 25 倍以上に希釈したものをプレートにそれぞれ 100 μ L ずつ加え、37 °C で 60 分間静置し、固相化する。固相化したプレートを洗浄液で洗浄し、ブロッキング液（付記 8）を 300 μ L ずつ加え、37 °C で 60 分間反応させた後、洗浄液で洗浄したもの。

付記 4 洗浄液

1,000mL 中

塩化ナトリウム	8.0	g
塩化カリウム	0.2	g
リン酸二水素カリウム	0.2	g
リン酸水素二ナトリウム	1.15	g
水	残	量

付記 5 酵素標識抗体液

ペルオキシダーゼ標識抗鶏 IgG (H + L) を血清希釈液で至適濃度に希釈したもの。

付記 6 発色用基質液

テトラメチルベンジジン（TMB）を用いる。

付記 7 0.05 mol/L 炭酸重炭酸緩衝液

pH9.6 になるように、0.05mol/L 炭酸ナトリウム溶液と 0.05mol/L 炭酸水素ナトリウム溶液を混合したもの。

0.05 mol/L 炭酸ナトリウム溶液

1,000mL 中

炭酸ナトリウム	5.3	g
精製水	残	量

0.05 mol/L 炭酸水素ナトリウム溶液

1,000mL 中

炭酸水素ナトリウム	4.2	g
精製水	残	量

pH9.6 になるように、0.05mol/L 炭酸ナトリウム溶液と 0.05mol/L 炭酸水素ナトリウム溶液を混合する。

付記 8 ブロッキング液

洗浄液 100mL にスキムミルク 5 g を溶解したもの。