

# 鶏脳脊髄炎・鶏痘混合生ワクチン（シード）

平成29年1月19日(告示第89号)新規追加

## 1 定義

シードロット規格に適合した鶏脳脊髄炎ウイルス及び弱毒鶏痘ウイルスをそれぞれ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混合した液状ワクチンである。

## 2 製法

### 2.1 製造用株

#### 2.1.1 鶏脳脊髄炎ウイルス

##### 2.1.1.1 名称

鶏脳脊髄炎ウイルス#1143株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.1.2 性状

1～4日齢の鶏に経口接種すると発症する。5週齢以上の鶏に筋肉内接種又は経口接種しても発症しない。4～6日齢の発育鶏卵の卵黄嚢内に注射すると増殖する。

##### 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大継代数

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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。

##### 2.1.1.4 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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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 鶏痘ウイルス

##### 2.1.2.1 名称

弱毒鶏痘ウイルスHudson株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.2.2 性状

2か月齢の鶏の翼膜に穿刺すると、5～7日で善感発痘し、21日以内に消退する。10～12日齢発育鶏卵の漿尿膜上に接種すると増殖し、淡い赤紫色を呈する独立したほぼ円形の特徴的なポックを形成する。

##### 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大継代数

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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 2.1.2.4 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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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 $-70^{\circ}\text{C}$ 以下又は凍結乾燥して $5^{\circ}\text{C}$ 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 鶏脳脊髄炎ウイルス

#### 2.2.1.1 発育鶏卵

SPF動物規格の1.1に適合した4～6日齢のものを用いる。

マスターシードウイルス、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又は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。

### 2.2.2 鶏痘ウイルス

#### 2.2.2.1 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、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又は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 鶏脳脊髄炎ウイルス原液

#### 2.3.1.1 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。

#### 2.3.1.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.2.1.1の発育鶏卵で培養した後、生存している感染鶏胚を採取し、乳剤を作り、ろ過、遠心又は精製処理して原液とする。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。

### 2.3.2 鶏痘ウイルス原液

#### 2.3.2.1 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。

#### 2.3.2.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.2.2.1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。

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

鶏脳脊髄炎ウイルス原液及び鶏痘ウイルス原液を混合し、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。最終バルク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。

## 2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、乾燥製剤の場合は凍結乾燥して、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

###### 3.1.1.1.1 鶏脳脊髄炎ウイルス

試料0.2mLを、それぞれ10個の発育鶏卵の卵黄嚢内に接種して培養し、孵化させる。孵化した鶏について9日間観察するとき、運動失調、震え等の臨床症状を認めなければならず、その症状は、特異抗血清により中和されなければならない。

###### 3.1.1.1.2 弱毒鶏痘ウイルス

シードロット規格の1.4.2.1.1.1.1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。ただし、鶏痘ウイルスについては、検体を孔径0.2 $\mu$ 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 個別ウイルス否定試験

###### 3.1.1.4.2.1.1 鶏脳脊髄炎ウイルス

鶏白血病ウイルス及び細網内皮症ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、3.2.1及び3.2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.1.1.4.2.1.2 鶏痘ウイルス

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。この場合、検体を孔径0.2 $\mu$ 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 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%の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 鶏脳脊髄炎ウイルス

###### 3.4.2.1.1 試験材料

###### 3.4.2.1.1.1 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。

###### 3.4.2.1.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格1.1に適合した4～6日齢の発育鶏卵を用いる。

###### 3.4.2.1.2 試験方法

###### 3.4.2.1.2.1 発育鶏卵接種試験

試料0.1mLずつをそれぞれ10個以上の発育鶏卵の卵黄嚢内に注射して培養し、ふ化させる。ふ化した鶏について、運動失調、震え等の症状の有無を9日間観察する。発症した鶏を感染とみなし、EID<sub>50</sub>を算出する。

症状の疑わしい鶏がいる場合には、中枢神経の病理組織検査によって感染の有無を判定する。

###### 3.4.2.1.3 判定

検体のウイルス含有量は、1mL中10<sup>5.6</sup>EID<sub>50</sub>以上でなければならない。

##### 3.4.2.2 鶏痘ウイルス

###### 3.4.2.2.1 試験材料

###### 3.4.2.2.1.1 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。

###### 3.4.2.2.1.2 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日齢の発育鶏卵を用いる。

#### 3.4.2.2.2 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。

#### 3.4.2.2.3 判定

漿尿膜にポックが出現したものを感染とみなし、EID<sub>50</sub>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<sup>6.0</sup>EID<sub>50</sub>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 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。

#### 3.5.3 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。

#### 3.5.4 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。

#### 3.5.5 鶏脳脊髄炎ウイルス含有量試験

試験品を孔径0.2 μm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、3.4.2.1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<sup>3.0</sup>EID<sub>50</sub>以上でなければならない。

#### 3.5.6 安全及び発痘試験

##### 3.5.6.1 試験材料

##### 3.5.6.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

##### 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60日齢の鶏を用いる。

##### 3.5.6.2 試験方法

試験動物の10羽を試験群とし、5羽を対照群とする。

接種材料0.01mLずつを試験群の翼膜に穿刺接種し、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。

##### 3.5.6.3 判定

観察期間中、痘疱の転移や重度の痂皮の形成を認めてはならない。

対照群においては、試験動物に臨床的な異常を認めてはならず、試験群においては、試験動物に発痘以外の臨床的な異常を認めてはならない。試験群は、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。

#### 3.5.7 鶏脳脊髄炎力価試験

##### 3.5.7.1 試験材料

##### 3.5.7.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

##### 3.5.7.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の60日齢の鶏を用いる。

##### 3.5.7.1.3 沈降反応抗原

鶏脳脊髄炎ウイルス沈降反応抗原（付記1）を用いる。

##### 3.5.7.2 試験方法

試験動物の10羽を試験群とし、3羽を対照群とする。

接種材料0.01mLずつを試験群の翼膜に穿刺接種し、4週間後に得られた各個体の血清について沈降反応を行う。また、非接種鶏3羽を対照群とし、接種群と隔離して飼育し、4週間後に得られた各個体の血清について沈降反応を行う。

4単位の沈降反応抗原を寒天ゲル（付記2）の中心の穴に、被験血清、4単位の参照陽性血清（付記3）及び参照陰性血清（付記4）を周囲の穴に分注した後、乾燥を防ぎながら室温で48～72時間反応させ、沈降線の有無を観察する。

#### 3.5.7.3 判定

抗原と各血清との間に特異的沈降線を認めたものを陽性とし、認めないものを陰性とする。

試験群の血清の80%以上が陽性でなければならず、対照群の血清は全て陰性でなければならない。

#### 付記1 鶏脳脊髄炎ウイルス沈降反応抗原

鶏脳脊髄炎ウイルス鶏胚馴化Van Roekel株に感染した鶏胚脳乳剤を精製濃縮したもの。

#### 付記2 寒天ゲル

寒天及び塩化ナトリウムをそれぞれ0.9～1.0 w/v% 及び12～15 w/v% となるようにリン酸緩衝食塩液又はペロナル緩衝食塩液に溶かした後、適当と認められた防腐剤を加える。スライドグラス（26×76mm）にこれを5 mL注ぎ、固める。固まった後、寒天スライドに直径3 mmの穴を中心に、その周囲に相互に3 mmの間隔で6個の穴をあける。

#### 付記3 参照陽性血清

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を鶏脳脊髄炎ウイルスで免疫して得た血清

#### 付記4 参照陰性血清

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から得た血清