

鶏コクシジウム感染症（アセルブリナ・テネラ・マキシマ） 混合生ワクチン

平成19年1月15日（告示第 36号） 一部改正
平成22年4月22日（告示第 646号） 一部改正
平成26年11月6日（告示第1554号） 一部改正
平成29年1月19日（告示第 89号） 一部改正

1 定義

弱毒アイメリア・アセルブリナ、弱毒アイメリア・テネラ及び弱毒アイメリア・マキシマをそれぞれ鶏腸管内で増殖させて得たオーシストを混合したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 アイメリア・アセルブリナ株

2.1.1.1 名称

アイメリア・アセルブリナNa-P75株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

主要な増殖部位は、鶏の十二指腸及び空腸の粘膜上皮細胞である。平飼い条件においてオーシストを飼料中に混合して5日齢の鶏に投与したとき、臨床症状を発現せず、発育に悪影響を与えない。

2.1.1.3 継代及び保存

原株及び原種コクシジウムは、生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の3～8週齢までの鶏で継代する。

原株の継代は、原種コクシジウム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。

原種コクシジウムは、直接原株から連続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。種コクシジウムは、原種コクシジウムから5代以内に製造しなければならない。

原株は凍結して-70℃以下で、種コクシジウムは5℃以下で保存する。

2.1.2 アイメリア・テネラ株

2.1.2.1 名称

アイメリア・テネラNt-P110株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

主要な増殖部位は、鶏の盲腸粘膜上皮及び固有層の細胞である。平飼い条件においてオーシストを飼料中に混合して5日齢の鶏に投与したとき、臨床症状を発現せず、発育に悪影響を与えない。

2.1.2.3 継代及び保存

原株及び原種コクシジウムは、生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の3～8週齢までの鶏で継代する。

原株の継代は、原種コクシジウム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。

原種コクシジウムは、直接原株から連続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。種コクシジウムは、原種コクシジウムから5代以内に製造しなければならない。

原株は凍結して-70℃以下で、種コクシジウムは5℃以下で保存する。

2.1.3 アイメリア・マキシマ株

2.1.3.1 名称

アイメリア・マキシマNm-P102株又はこれと同等と認められた株

2.1.3.2 性状

主要な増殖部位は、鶏の十二指腸、空腸及び回腸の粘膜上皮細胞である。平飼い条件においてオーシストを飼料中に混合して5日齢の鶏に投与したとき、臨床症状を発現せず、発育に悪影響を与えない。

2.1.3.3 継代及び保存

原株及び原種コクシジウムは、生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の3～8週齢までの鶏で継代する。

原株の継代は、原種コクシジウム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。

原種コクシジウムは、直接原株から連続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。種コクシジウムは、原種コクシジウムから5代以内に製造しなければならない。

原株は凍結して-70℃以下で、種コクシジウムは5℃以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 鶏

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の3～8週齢までの鶏を用いる。

2.3 原液

2.3.1 アイメリア・アセルブリナ株原液

2.3.1.1 種コクシジウム及び原液の調製

原株を解凍した後、リン酸緩衝食塩液で増量して鶏に経口投与し、一定期間糞便を採取する。糞便からオーシストを収集し、孢子形成させた後、洗浄及び数量調整を行い、鶏に経口投与して一定期間糞便を採取する。糞便からオーシストを収集して種コクシジウムとし、鶏に経口投与して一定期間糞便を採取する。糞便を洗剤液で増量してろ過した後、遠心して得た沈渣を飽和食塩液に混合し、遠心して上清を採取する。これを洗浄してオーシストを収集した後、2 w/v%重クロム酸カリウム溶液（付記1）に混合し加温して孢子形成させ、孢子形成オーシスト液とする。この孢子形成オーシスト液に含まれる孢子形成オーシストを適当と認められた方法により除菌及び洗浄し、さらに精製した後、ソルビン酸加エタノール（付記2）を添加した滅菌リン酸緩衝食塩液に混合し、オーシスト数を調整してアイメリア・アセルブリナ株原液とする。

ただし、原液の調製工程でオーシストを保存する場合には、農林水産大臣が認めた期間とする。

アイメリア・アセルブリナ株原液について、3.1の試験を行う。

2.3.2 アイメリア・テネラ株原液

2.3.2.1 種コクシジウム及び原液の調製

原株を解凍した後、リン酸緩衝食塩液で増量して鶏に経口投与し、一定期間糞便を採取する。糞便からオーシストを収集し、孢子形成させた後、洗浄及び数量調整を行い、鶏に経口投与して一定期間糞便を採取する。糞便からオーシストを収集して種コクシジウムとし、鶏に経口投与して一定期間糞便を採取する。糞便を洗剤液で増量してろ過した後、遠心して得た沈渣を飽和食塩液に混合し、遠心して上清を採取する。これを洗浄してオーシストを収集した後、2 w/v%重クロム酸カリウム溶液に混合し加温して孢子形成させ、孢子形成オーシスト液とする。この孢子形成オーシスト液に含まれる孢子形成オーシストを適当と認められた方法により除菌及び洗浄し、さらに精製した後、ソルビン酸加エタノールを添加した滅菌リン酸緩衝食塩液に混合し、オーシスト数を調整してアイメリア・テネラ株原液とする。

ただし、原液の調製工程でオーシストを保存する場合には、農林水産大臣が認めた期間とする。

アイメリア・テネラ株原液について、3.1の試験を行う。

2.3.3 アイメリア・マキシマ株原液

2.3.3.1 種コクシジウム及び原液の調製

原株を解凍した後、リン酸緩衝食塩液で増量して鶏に経口投与し、一定期間糞便を採取する。糞便からオーシストを収集し、孢子形成させた後、洗浄及び数量調整を行い、鶏に経口投与して一定期間糞便を採取する。糞便からオーシストを収集して種コクシジウムとし、鶏に経口投与して一定

期間糞便を採取する。糞便を洗剤液で増量してろ過した後、遠心して得た沈渣を飽和食塩液に混合し、遠心して上清を採取する。これを洗浄してオーシストを収集した後、2 w/v%重クロム酸カリウム溶液に混合し加温して孢子形成させ、孢子形成オーシスト液とする。この孢子形成オーシスト液に含まれる孢子形成オーシストを適当と認められた方法により除菌及び洗浄し、さらに精製した後、ソルビン酸エタノールを添加した滅菌リン酸緩衝食塩液に混合し、オーシスト数を調整してアイメリア・マキシマ株原液とする。

ただし、原液の調製工程でオーシストを保存する場合には、農林水産大臣が認めた期間とする。
アイメリア・マキシマ株原液について、3.1の試験を行う。

2.4 最終バルク

各株の原液を混合し、滅菌リン酸緩衝食塩液及びソルビン酸エタノールを加えて各オーシスト数を調整し、最終バルクとする。

2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、密栓して小分製品とする。

小分製品について、3.2の試験を行う。

3 試験法

3.1 原液の試験

3.1.1 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 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 オーシスト含有量試験

3.1.3.1 試験材料

検体又は検体を水で希釈したものを試料とする。

3.1.3.2 試験方法

試料に含まれる孢子形成オーシスト数を顕微鏡下でオーシストの鑑別点（付記3）に準じて計数する。

3.1.3.3 判定

検体1 mL中に次の数の孢子形成オーシストが含まれていなければならない。

アイメリア・アセルブリナ株	$1.5 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^7$ 個
アイメリア・テネラ株	$6 \times 10^5 \sim 6 \times 10^6$ 個
アイメリア・マキシマ株	$3 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ 個

3.2 小分製品の試験

3.2.1 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、固有の色調で少量の沈殿を認めるが、振とうすると固有の色調の液体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。

3.2.2 pH 測定試験

一般試験法のpH測定試験法を準用して試験するとき、pHは、固有の値を示さなければならない。

3.2.3 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。

3.2.4 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。

3.2.5 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。

3.2.6 オーシスト含有量試験

3.1.3を準用して試験するとき、試験品 1 mL中に孢子形成オーシストは総数で $8 \times 10^4 \sim 8 \times 10^5$ 個、そのうち長径 $25 \mu\text{m}$ 以上の孢子形成オーシストは $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 個含まれていなければならない。

3.2.7 迷入ウイルス否定試験

試験品を適当と認められた方法で処理したものを試料とする。

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。

3.2.8 安全試験

3.2.8.1 試験材料

3.2.8.1.1 投与材料

試験品を投与材料とする。

3.2.8.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の5日齢の鶏を用いる。

3.2.8.2 試験方法

試験動物の15羽ずつを試験群及び対照群とする。

試験群には投与材料の150羽分を75gの実験動物幼雛用飼料に混合して経口投与し、対照群には75gの実験動物幼雛用飼料のみを投与する。試験開始翌日からは両群とも不断給餌し、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し、下式により個体別に増体率を算出した後、群ごとに平均増体率を算出する。

なお、試験動物は試験開始の前夜から約半日間断餌した後使用する。

(試験終了時の体重) - (試験開始時の体重)

$$\text{増体率(\%)} = \frac{\text{---}}{\text{(試験開始時の体重)}} \times 100$$

3.2.8.3 判定

試験期間中、試験群及び対照群に臨床的異常を認めてはならず、試験群の平均増体率は、対照群のその80%以上でなければならない。

3.2.9 力価試験

3.2.9.1 試験材料

3.2.9.1.1 投与材料

試験品を投与材料とする。

3.2.9.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格1.1由来の5日齢の鶏を用いる。

3.2.9.1.3 攻撃オーシスト

強毒のアイメリア・アセルブリナ株、アイメリア・テネラ株及びアイメリア・マキシマ株を用いる。

攻撃オーシスト量は、それぞれ1羽当たり $4 \times 10^5/0.3\text{mL}$ 、 $1 \times 10^5/0.3\text{mL}$ 及び $4 \times 10^5/0.3\text{mL}$ とする。

3.2.9.2 試験方法

試験動物の30羽を試験群、40羽を対照群とする。

試験群には投与材料の30羽分を150gの実験動物幼雛用飼料に混合して経口投与し、対照群には200gの実験動物幼雛用飼料のみを与える。試験開始翌日からは両群とも不断給餌し、3週間後に両群の10羽ずつにそれぞれの攻撃オーシストを経口投与して攻撃する。対照群の残り10羽は非攻撃対照群とする。

攻撃後臨床観察を行い、試験群と攻撃対照群の各攻撃株に対する死亡数を算出する。また、攻撃日及びアイメリア・アセルブリナ株攻撃群では攻撃後6日目、アイメリア・テネラ株及びアイメリア・マキシマ株攻撃群では攻撃後7日目に体重を測定する。下式により個体別に増体率を算出した

後、各群ごとに平均増体率を算出する。

$$\text{増体率(\%)} = \frac{(\text{試験終了日の体重}) - (\text{攻撃日の体重})}{(\text{攻撃日の体重})} \times 100$$

3.2.9.3 判定

各攻撃株についてFisherの直接確率計算法により有意水準5%で試験群の死亡数が攻撃対照群のそれより有意に少ない場合には、適合とする。

両群間の死亡数に有意差が認められない場合には、平均増体率により評価する。

各攻撃株について試験群の平均増体率は、攻撃対照群のそれを上回らなければならない。この場合、各攻撃株の攻撃対照群における平均増体率は非攻撃対照群のそれよりも有意に低くなければならない(t検定、有意水準5%)。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、1年2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 2 w/v%重クロム酸カリウム溶液
重クロム酸カリウム2gに水を加えて100mLとしたもの

付記2 ソルビン酸加エタノール
100mL中
ソルビン酸 10.0 g
エタノール 残量

付記3 オーシストの鑑別点
アイメリア・アセルブリナ株オーシスト：長径14.6~21.9 μm、短径12.2~17.1 μm、無色、オーシスト壁は薄く、卵形から楕円形を示す。
アイメリア・テネラ株オーシスト：長径19.5~24.4 μm、短径12.2~17.1 μm、無色、オーシスト壁は比較的厚く卵円形から卵形を示す。
アイメリア・マキシマ株オーシスト：長径24.4~34.2 μm、短径19.5~29.3 μm、やや茶褐色味を呈し、オーシスト壁は厚く、卵円形~卵形を示す。