

トリニューモウイルス感染症生ワクチン

平成 20 年 10 月 28 日（告示 1563） 一部改正

1 定義

弱毒七面鳥鼻気管炎ウイルス又は弱毒鶏由来トリニューモウイルスを培養細胞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 七面鳥鼻気管炎ウイルス株

2.1.1.1 名称

弱毒七面鳥鼻気管炎ウイルス BUT1 8544 株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

7 日齢の鶏に点鼻又は点眼接種しても病原性を示さない。鶏胚初代細胞、鶏腎初代細胞又は Vero 細胞に接種すると、CPE を伴って増殖する。6 ~ 12 日齢の発育鶏卵の卵黄嚢内及び尿膜腔内に接種しても、鶏胚に異常を示さない。

2.1.1.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞又は適当と認められた細胞で継代する。

原株の継代は、原種ウイルス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。

原種ウイルスは、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。

種ウイルスは、原種ウイルスから 2 代以内に製造しなければならない。

原株及び原種ウイルスは、凍結して - 70 又は凍結乾燥して 5 以下で保存する。

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.1.2 鶏由来トリニューモウイルス株

2.1.2.1 名称

弱毒鶏由来トリニューモウイルス PL21 VERO 1060 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

1 日齢の鶏に点鼻又は点眼接種しても、病原性を示さない。Vero 細胞に接種すると、CPE を伴って増殖する。

2.1.2.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、Vero 細胞又は適当と認められた細胞で継代する。

原株の継代は、原種ウイルス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。

原種ウイルスは、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。

種ウイルスは、原種ウイルスから 2 代以内に製造しなければならない。

原株及び原種ウイルスは、凍結して - 70 又は凍結乾燥して 5 以下で保存する。

種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.2 製造用材料

2.2.1 七面鳥鼻気管炎ウイルス

2.2.1.1 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞又は製造に適当と認められた細胞を用いる。

2.2.1.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

2.2.2 鶏由来トリニューモウイルス

2.2.2.1 培養細胞

Vero 細胞又は製造に相当と認められた細胞を用いる。

2.2.2.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

2.3 原液

2.3.1 細胞の培養

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、3.1 の試験を行う。

2.3.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個別培養細胞ごとに採取した培養液及び超音波処理した感染細胞の遠心上清を混合したもの、又は培養液のろ液若しくは遠心上清を原液とする。原液に相当と認められた凍害防止剤を加えてもよい。

原液について、3.2.1 及び 3.2.2 の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液を混合し、相当と認められた安定剤を加えて調整し、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、凍結乾燥し、小分製品とする。

小分製品について、3.3 の試験を行う。

3 試験法

3.1 培養細胞の試験

個別培養細胞の 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。

3.1.1 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。

3.1.2 鶏赤血球凝集試験

3.1.1 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。

3.2 原液の試験

3.2.1 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。

3.2.2 ウイルス含有量試験

3.2.2.1 又は 3.2.2.2 のいずれかの試験を行う。

3.2.2.1 鶏胚初代細胞接種試験

3.2.2.1.1 試験材料

3.2.2.1.1.1 試料

検体を細胞増殖用培養液（付記 1）で調整した鶏胚初代細胞浮遊液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.2.1.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞浮遊液を用いる。

3.2.2.1.2 試験方法

試料 0.2mL ずつを、それぞれ 96 穴組織培養用プレートの 5 穴以上に接種し、37℃ で 5 ~ 7 日

間培養し、観察する。

3.2.2.1.3 判定

培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{6.5}TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.2.2.2 Vero 細胞接種試験法

3.2.2.2.1 試験材料

3.2.2.2.1.1 試料

検体を細胞維持用培養液（付記 2）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.2.2.1.2 培養細胞

Vero 細胞を 96 穴組織培養プレートに培養し、単層となったものを用いる。

3.2.2.2.2 試験方法

試料 0.2mL ずつを、それぞれ 5 穴以上の培養細胞に接種し、37℃ で 7～9 日間培養し、観察する。

3.2.2.2.3 判定

培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀ を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{6.0}TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.3 小分製品の試験

3.3.1 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。異物又は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。

3.3.2 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。

3.3.3 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。

3.3.4 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。

3.3.5 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。

3.3.6 迷入ウイルス否定試験

一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1、2.1.1、2.1.2、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。

ただし、中和用血清は、抗七面鳥鼻気管炎ウイルス血清（付記 3）又は抗鶏由来トリニューモウイルス血清（付記 4）を非働化したものを用いる。

3.3.7 ウイルス含有量試験

3.2.2.1 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^{3.0}TCID₅₀ 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。

3.2.2.2 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^{2.6}TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.3.8 安全試験

3.3.8.1 又は 3.3.8.2 のいずれかの試験を行う。

3.3.8.1 7 日齢鶏接種試験

3.3.8.1.1 試験材料

3.3.8.1.1.1 接種材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で 0.03mL 中 10 羽分となるように調整したものを接種材料とする。

3.3.8.1.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 7 日齢の鶏を用いる。

3.3.8.1.2 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、対照群とともに、3 週間観察する。ただし、体重については、試験開始時及び試験終了時に測定する。

3.3.8.1.3 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。

3.3.8.2 4 日齢鶏接種試験

3.3.8.2.1 試験材料

3.3.8.2.1.1 接種材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で 0.03mL 中 10 羽分となるように調整したものを接種材料とする。

3.3.8.2.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 4 日齢の鶏を用いる。

3.3.8.2.2 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 0.03mL ずつを試験群に点鼻接種し、対照群とともに、3 週間観察する。ただし、体重については、試験開始時及び試験終了時に測定する。

3.3.8.2.3 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。

3.3.9 力価試験

3.3.9.1 又は 3.3.9.2 のいずれかの試験を行う。

3.3.9.1 酵素抗体反応（以下「ELISA」という。）法 A 法

3.3.9.1.1 試験材料

3.3.9.1.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

3.3.9.1.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 7 日齢の鶏を用いる。

3.3.9.1.2 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 1 羽分ずつを試験群に点眼接種し、3 週間後に試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、ELISA により抗体価を測定する。

七面鳥鼻気管炎ウイルス参照陽性血清（付記 5）、七面鳥鼻気管炎ウイルス参照陰性血清（付記 6）及び試験群及び対照群の被験血清を IB・EIA 緩衝液（付記 7）で 2 倍階段希釈し、七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原固相化プレート（付記 8）に各希釈血清を 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液（付記 9）で 2 回洗浄し、山羊抗鶏 IgG ペルオキシダーゼ標識抗体（付記 10）を 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で 2 回洗浄し、七面鳥鼻気管炎ウイルス用基質液（付記 11）を 100 μ L ずつ加え、8 分間反応させる。反応終了後、反応停止液（付記 12）を 50 μ L ずつ加えて反応を停止させ、波長 450nm で吸光度値を測定する。

3.3.9.1.3 判定

七面鳥鼻気管炎ウイルス参照陰性血清の平均吸光度値の少なくとも 1.5 倍の吸光度値を示す血清の希釈倍数を ELISA 抗体価とする。

試験群の 70 %以上が ELISA 抗体価 $2^{6.64}$ 倍以上を示さなければならない。この場合、対照群はすべて $2^{4.64}$ 倍未満でなければならず、七面鳥鼻気管炎ウイルス参照陽性血清は $2^{6.64}$ 倍以上の抗体

価を示さなければならない。

3.3.9.2 ELISA B 法

3.3.9.2.1 試験材料

3.3.9.2.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

3.3.9.2.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 7 日齢の鶏を用いる。

3.3.9.2.2 試験方法

試験動物 10 羽を試験群とし、5 羽を対照群とする。

接種材料 1 羽分ずつを試験群に点鼻接種し、4 週間後に試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、ELISA 抗体価を測定する。

鶏由来トリニューモウイルス抗原固相化プレート（付記 13）にブロッキング液（付記 14）を 100 μ L ずつ分注し、37 $^{\circ}$ C で 60 分間反応後、洗浄用希釈液（付記 15）で 3 回洗浄する。次に、鶏由来トリニューモウイルス参照陽性血清（付記 16）、鶏由来トリニューモウイルス参照陰性血清（付記 17）及び試験群及び対照群の被験血清を、それぞれ洗浄用希釈液で 50 倍に希釈する。各希釈血清 100 μ L を固相化プレートの 2 穴ずつに加え、37 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させる。ブランクとして 2 穴を設ける。反応終了後、洗浄用希釈液で 3 回洗浄し、ウサギ抗鶏 IgG ペルオキシダーゼ標識抗体（付記 18）を 100 μ L ずつに加え、37 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させる。反応終了後、洗浄用希釈液で 3 回洗浄し、鶏由来トリニューモウイルス用基質液（付記 19）を 100 μ L ずつに加え、遮光して 10 分間反応させる。反応終了後、0.5mol/L 硫酸を 50 μ L ずつ加えて、反応を停止させ、波長 490nm で吸光度値を測定する。

3.3.9.2.3 判定

各血清の平均読み取り値からブランクの平均読み取り値を差し引いた値を、各血清の平均吸光度値として、次式により S/P 値を算出する。

$$S/P \text{ 値} = (\text{被験血清の平均吸光度値} / \text{参照陽性血清の平均吸光度値}) \times 100$$

試験群の平均 S/P 値は 30 以上、対照群の平均 S/P 値は 10 未満でなければならない。この場合、鶏由来トリニューモウイルス参照陽性血清の平均吸光度値は 1.2 ~ 1.8、鶏由来トリニューモウイルス参照陰性血清の S/P 値は 5 以下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 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 細胞増殖用培養液

1,000mL 中	
トリプトース・ホスフェイト・プロス	0.83 g
トリプトース	1.00 g
ラクトアルブミン水解物	1.25 g
炭酸水素ナトリウム	2.45 g
牛血清	50 mL
イーグル MEM	残量

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 2 細胞維持用培養液

1,000mL 中	
牛血清	0 ~ 20 mL

イーグル MEM 又は F10 培地 残 量
炭酸水素ナトリウムで pH を 6.8 ~ 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 3 抗七面鳥鼻気管炎ウイルス血清
弱毒七面鳥鼻気管炎ウイルスで免疫した生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏の血清
で、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 抗鶏由来トリニューモウイルス血清
鶏由来トリニューモウイルス製造用株で免疫した生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の
鶏の血清で、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 5 七面鳥鼻気管炎ウイルス参照陽性血清
弱毒七面鳥鼻気管炎ウイルスで免疫した生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏の血清
で、ELISA 抗体価 $2^{8.64} \sim 2^{9.64}$ 倍を示すもの

付記 6 七面鳥鼻気管炎ウイルス参照陰性血清
生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏の血清で、ELISA 抗体価 $2^{4.64}$ 倍未満を示すもの

付記 7 IB・EIA 緩衝液
1,000mL 中
リン酸二水素ナトリウム十二水和物 2.31 g
リン酸水素二ナトリウム二水和物 24.06 g
塩化ナトリウム 29.22 g
カオリン処理 30w/v%牛血清アルブミン 3.3 mL
ポリソルベート 20 0.50 g
水 残 量
200nm でろ過滅菌をした後、スキムミルク 2 w/v%及び牛胎子血清 5 vol%を加える。

付記 8 七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原固相化プレート
製造用株を生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞で増殖させて得られたウイルス液及び感染細胞の超音波処理後の遠心上清をプールし、超遠心後の上層を七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原とする。
七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原を七面鳥鼻気管炎ウイルス用固相化緩衝液（付記 20）で、七面鳥鼻気管炎ウイルス参照陽性血清の 100 倍希釈液の吸光度値が 0.8 以上及び七面鳥鼻気管炎ウイルス参照陰性血清が 0.2 以下を示すように濃度調整し、96 穴平底マイクロプレートに 100 μ L ずつ分注して 37 で 3 時間静置した後、洗浄用緩衝液で 3 回洗浄した後、乾燥させたものである。

付記 9 洗浄用緩衝液
1,000mL 中
無水リン酸水素二ナトリウム 2.9 g
無水リン酸二水素カリウム 0.2 g
塩化ナトリウム 37.2 g

塩化カリウム	0.2 g
ポリソルベート 20	1.5 g
水	残 量

pH を 6.9 ~ 7.1 に調整する。

付記 10 山羊抗鶏 IgG ペルオキシダーゼ標識抗体

七面鳥鼻気管炎ウイルス参照陽性血清が規定の抗体価を示すように IB・EIA 緩衝液で調整したもの

付記 11 七面鳥鼻気管炎ウイルス用基質液

TMB 溶液	0.2 mL
UP 緩衝液	1.5 mL
水	15 mL

TMB 溶液は、DMSO 1,000mL に TMB (3,3',5,5' テトラメチルベンチジン) を 6 g 溶かしたもの

UP 緩衝液は、尿素過酸化物質 140mg を TMB 緩衝液 (酢酸ナトリウム 136g を約 500mL の水に溶かし、1.5mol/L クエン酸で pH5.3 ~ 5.7 に調整した後、水を加え、1,000mL としたもの) 100mL に溶かしたもの

付記 12 反応停止液

硫酸	110 mL
水	1,000 mL

付記 13 鶏由来トリニューモウイルス抗原固相化プレート

製造用株を Vero 細胞で増殖させて得られたウイルス液及び細胞を、凍結融解し、超遠心処理を行った後、界面活性剤及び超音波処理して鶏由来トリニューモウイルス抗原とする。鶏由来トリニューモウイルス抗原を、鶏由来トリニューモウイルス用固相化緩衝液 (付記 21) でたん白濃度が約 2 µg/mL となるように濃度調整し、96 穴平底マイクロプレートに 100 µL ずつ分注して 4℃ で一夜静置後、洗浄用希釈液で 3 回洗浄した後、乾燥させたものであり、-20℃ で保存する。

付記 14 ブロッキング液

1,000mL 中	
牛血清アルブミン	10 g
リン酸緩衝食塩液	残 量

付記 15 洗浄用希釈液

1,000mL 中	
塩化ナトリウム	58.45 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	2.69 g
リン酸二水素ナトリウム二水和物	0.39 g
ポリソルベート 20	0.5 mL
水	残 量

付記 16 鶏由来トリニューモウイルス参照陽性血清

鶏由来トリニューモウイルス製造用株で免疫した生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏の血清であって、中和抗体価 640 ~ 2560 倍を示すもの

付記 17 鶏由来トリニューモウイルス参照陰性血清

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏から得た血清であって、鶏由来トリニューモウイルスの ELISA 法で測定した場合には、S/P 値が 5 以下を示すもの

付記 18 ウサギ抗鶏 IgG ペルオキシダーゼ標識抗体

鶏由来トリニューモウイルス参照陽性血清の平均吸光度値が 1.2 ~ 1.8、鶏由来トリニューモウイルス参照陰性血清の S/P 値が 5 以下を示すように調整したもの

付記 19 鶏由来トリニューモウイルス用基質液

1,000mL 中

-フェニレンジアミン二塩酸塩	0.26 g
30vol %過酸化水素水	0.3 mL
基質緩衝液	残 量

基質緩衝液は、0.1mol/L クエン酸液 243mL と 0.2mol/L リン酸水素二ナトリウム 257mL を混合したものに、水を加えて 1,000mL としたもの

付記 20 七面鳥鼻気管炎ウイルス用固相化緩衝液

1,000mL 中

リン酸二水素ナトリウム二水和物	1.43 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	12.10 g
塩化ナトリウム	8.50 g
水	残 量

pH を 6.9 ~ 7.1 に調製する。

付記 21 鶏由来トリニューモウイルス用固相化緩衝液

1,000mL 中

炭酸ナトリウム	1.5 g
炭酸水素ナトリウム	2.93 g
水	残 量