

牛コロナウイルス感染症（アジュバント加）不活化ワクチン

平成22年3月3日（告示第395号） 新規追加

牛コロナウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を濃縮後、不活化し、アルミニウムゲルアジュバントを添加したワクチンである。

1 小分製品の試験

1.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

1.2 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性否定試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

1.3 力価試験

1.3.1 試験材料

1.3.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.3.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

1.3.1.3 赤血球凝集（HA）抗原

Hmlu-1 細胞で増殖させた牛コロナウイルス No.66/HL 株で、赤血球凝集価は 64 倍以上のものを用いる。

1.3.2 試験方法

注射材料 0.5mL ずつを 5 匹の試験動物に 3 週間隔で 2 回筋肉内注射し、第 2 回目の注射後 7 日目に得られた各個体の血清について赤血球凝集抑制（以下「HI」という。）試験を行う。

非働化した被検血清 0.2mL に 25w/v %カオリン生理食塩液（付記 1）0.8mL を加え、常温で 20 分間処理した後、1,700G、10 分間遠心し、その上清に 0.1w/v %牛血清アルブミン加リン酸緩衝食塩液（付記 2）で調製した 1vol %マウス赤血球浮遊液を等量加え、よく混合した後、常温で 20 分間処理し、1,700G、10 分間遠心し、その上清を試料とする。

試料 0.2mL を 0.1w/v %牛血清アルブミン加リン酸緩衝食塩液 0.2mL で 2 倍階段希釈し、各希釈液に 4 単位の HA 抗原を 0.2mL 加え、37°C で 60 分間処理する。それに 0.1w/v %牛血清アルブミン加リン酸緩衝食塩液に浮遊させた 1 vol %マウス赤血球浮遊液を 0.2mL 加え、常温で 1～2 時間静置し、観察する。

1.3.3 判定

赤血球の凝集を阻止した血清の最高希釈倍数を HI 抗体価とする。

HI 抗体価 160 倍以上を HI 抗体陽性とする。

試験動物の HI 抗体陽性率は、80 %以上でなければならない。

2 中間製品の試験

2.1 不活化試験

2.1.1 試験材料

2.1.1.1 試料

100 倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、検体 5 mL を 4°C で一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

2.1.1.2 培養細胞

Hmlu-1 細胞を培養びんに 1～3 日間培養し、単層となったものを用いる。

2.1.2 試験方法

試料の全量を 1 mL につき 3 cm² 以上の培養細胞に接種し、37 °C で 60 分間静置吸着させた後、試料を抜き取り、ウイルス増殖用培養液（付記 3）を加え、37 °C で 7 日間培養し、観察する。

2.1.3 判定

培養細胞に CPE を認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

付記 1 25w/v %カオリン生理食塩液

1,000mL 中

カオリン

250 g

塩化ナトリウム

8.75 g

水

残 量

水酸化ナトリウム溶液で pH を 7.2 ~ 7.4 に調整する。

付記 2 0.1w/v %牛血清アルブミン加リン酸緩衝食塩液

A液 5w/v %牛血清アルブミン溶液

100mL 中

牛血清アルブミン

5.0 g

水

残 量

使用時に、リン酸緩衝食塩液 196 mL に A液 4 mL を加えて調製する。

付記 3 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス

2.95 g

ブドウ糖

1.0 g

グルタミン酸ナトリウム

5.0 g

イースト・イクストラクト

0.5 g

牛胎子血清

10 ~ 20 mL

イーグル MEM

残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.2 ~ 7.6 に調整する。

牛胎子血清は、牛コロナウイルスに対する抗体陰性のものを用いる。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。