

馬ロタウイルス感染症（アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

平成24年7月4日(告示第1622号)新規追加

1 定義

シードロット規格に適合した馬ロタウイルス（A 群・G3 型）を同規格に適合した株化細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化し、アジュバントを添加したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

馬ロタウイルス Ho-5MA 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

MA-104 細胞でウイルス増殖用培養液に結晶トリプシンを添加することにより CPE を伴って増殖する。

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、MA-104 細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖させ、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℃以下又は凍結乾燥して5℃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、MA-104 細胞又は適当と認められた培養細胞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℃以下又は凍結乾燥して5℃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、MA-104 細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖させる。

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℃以下又は凍結乾燥して5℃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 培養細胞

MA-104 細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.3 マスターセルシード

2.2.3.1 作製、保存及びプロダクションセルシードまでの最高継代数

マスターセルシードは、2.2.2 の培養液で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器

に分注する。

分注したマスターセルシードは、特定の製造番号又は製造記号を付して、凍結して－ 70 ℃以下で保存する。

マスターセルシードについて、3.2.1 の試験を行う。

マスターセルシードは、ワクチンの製造又は試験以外の目的で継代しない。マスターセルシードからプロダクションセルシードまでの最高継代数は、20 代以内でなければならない。

2.2.4 ワーキングセルシード

2.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.2 の培養液で増殖及び継代する。

ワーキングセルシードは、凍結して－ 70 ℃以下で保存する。

ワーキングセルシードについて、3.2.2 の試験を行う。

2.2.5 プロダクションセルシード

2.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.2 の培養液で増殖させる。

プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して－ 70 ℃以下で保存する。

プロダクションセルシードを保存する場合は、3.2.3 の試験を行う。

2.3 原液

2.3.1 プロダクションセルシードの培養

1 回に処理し、培養した細胞を個体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。

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 の培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に個体別培養細胞ごとに培養液を採取し、遠心した上清をウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.3 の試験を行う。

2.3.3 ウイルスの不活化

ウイルス浮遊液にホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加えて不活化したものを不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.4 の試験を行う。

2.3.4 原液

不活化ウイルス液に適当と認められたアルミニウムゲルアジュバントを添加し、原液とする。

原液について、3.5 の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液を混合して、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、小分製品とする。

小分製品について、3.6 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

馬伝染性貧血ウイルス及び内在性レトロウイルス（C、D タイプ粒子）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 3.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

牛ウイルス性下痢—粘膜病ウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.1、3.2.5 及び 3.2.9 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

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 株化細胞の試験

3.2.1 マスターセルシードの試験

3.2.1.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.2 起源動物種同定試験

シードロット規格の 2.1.4.2.1.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.3 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。

3.2.1.4 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。

3.2.1.5 外来性ウイルス保定試験

3.2.1.5.1 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 1.2、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。

3.2.1.5.2 特定ウイルス否定試験

3.2.1.5.2.1 特定ウイルス否定一般試験

馬伝染性貧血ウイルス及び内在性レトロウイルス（C、D タイプ粒子）について、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.2 及び 3.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.5.2.2 個別ウイルス否定試験

牛ウイルス性下痢—粘膜病ウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.2、3.2.5 及び 3.2.9 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.6 核学的（染色体）性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.1.6 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.7 腫瘍形成性／腫瘍原性試験

シードロット規格の 2.1.4.2.1.7 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 ワーキングセルシードの試験

3.2.2.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.2.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.2.2 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。

3.2.2.3 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。

3.2.3 プロダクションセルシードの試験

3.2.3.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.3.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.3.2 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。

3.2.3.3 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。

3.3 ウイルス浮遊液の試験

3.3.1 ウイルス含有量試験

3.3.2.1 試験材料

3.3.2.1.1 試料

検体を希釈液（付記 1）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.2.1.2 培養細胞

MA-104 細胞を 48 穴プレートで 2～3 日間培養し、単層となったものを用いる。

3.3.1.2 試験方法

リン酸緩衝食塩液で 2 回洗浄した培養細胞に試料 0.1mL ずつをそれぞれ 4 穴以上の培養細胞に接種し、37℃で 60 分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液（付記 2）を 0.4mL ずつ加え、37℃で 7 日間培養して観察する。

3.3.1.3 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^{7.0}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。

3.4 不活化ウイルス液の試験

3.4.1 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。

3.4.2 不活化試験

3.4.2.1 試験材料

3.4.2.1.1 試料

検体 5 mL を 100 倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、4℃で 1 夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.4.2.1.2 培養細胞

MA-104 細胞を 2～3 日間培養し、単層となったものを用いる。

3.4.2.2 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℃で 60 分間静置吸着させ、リン酸緩衝食塩液で 2 回洗浄した後、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃で 7 日間培養し、観察する。

3.4.2.3 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。

3.5 原液の試験

3.5.1 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。

3.6 小分製品の試験

3.6.1 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。

3.6.2 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。

3.6.3 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。

3.6.4 ホルマリン定量試験

一般試験法のホルマリン定量法を準用して試験するとき、ホルマリンの含有量は、0.2vol %以下でなければならない。

3.6.5 アルミニウム定量試験

一般試験法のアルミニウム定量法を準用して試験するとき、アルミニウムの含有量は、1 mL 中 1 mg 以下でなければならない。

3.6.6 たん白窒素定量試験

一般試験法のたん白窒素定量法を準用して試験するとき、たん白窒素の含有量は、1 mL 中 100 μ g 以下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、その含有量とする。

3.6.7 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性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。

3.6.8 力価試験

3.6.8.1 試験材料

3.6.8.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.6.8.1.2 試験動物

体重 300 ～ 350g のモルモットを用いる。

3.6.8.1.3 中和試験用ウイルス

MA-104 細胞で増殖させた馬ロタウイルス Ho-5MA 株を用いる。

3.6.8.1.4 培養細胞

MA-104 細胞浮遊液を 6 穴プレートに 2 ～ 3 日間培養し、単層となったものを用いる。

3.6.8.2 試験方法

注射材料の 0.5mL ずつを 3 週間隔で 2 回、5 匹の試験動物の筋肉内に注射し、第 2 回注射後 10 日目に得られた各個体の血清について中和試験を行う。

各個体の血清を非働化した後、希釈液で 400 倍に希釈し、各希釈血清と 0.3mL 中に約 80PFU を含む中和試験用ウイルス液とを等量に混合し、37℃で 60 分間処理する。各混合液 0.3mL ずつをそれぞれ 2 穴の培養細胞に接種し、37℃で 90 分間吸着させる。その間、30 分ごとに接種材料を動かし細胞層表面に広げる。別に、中和試験用ウイルスと 400 倍に希釈した非働化正常モルモット血清とを等量混合し、希釈被検血清と同様に処理したもの（4 穴）をウイルス対照とする。それぞれの混合液を除き、リン酸緩衝食塩液で 2 回洗浄した後、第 1 次重層寒天培地（付記 3）を重層し、37

℃、5 vol %炭酸ガス下で4～5日間培養する。その後、第2次重層寒天培地(付記4)を重層し、更に1～2日間培養し、観察する。

3.6.8.3 判定

ウイルス対照と各被検血清の平均ブラック数を比較するとき、ウイルス対照の平均ブラック数を60 %以上減少させた被検血清を中和抗体陽性と判定する。

中和抗体陽性率は、80 %以上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2年6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 希釈液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

イーグル MEM 残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ～ 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2 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

結晶トリプシン 1 ～ 2 mg

イーグル MEM 残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.4 ～ 7.8 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 第1次重層寒天培地

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

アガロース 1.5 g

結晶トリプシン 2 mg

イーグル MEM 残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.4 ～ 7.8 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記4 第2次重層寒天培地

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

アガロース 7.5 g

結晶トリプシン 2 mg

0.5w/v %ニュートラルレッド 20 mL

イーグル MEM 残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.4 ～ 7.8 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。