馬ロタウイルス感染症（アジュバント加）不活化ワクチン

平成 21 年 3 月 26 日（告示第 420 号）　新規追加

1 定義

馬ロタウイルス（A 群・G3 型）を培養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-５ MA 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 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、MA-104 細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

継代は、原株では３代以内、種ウイルスでは２代以内でなければならない。

原株及び種ウイルスは、凍結してー 70 ℃以下又は凍結乾燥して５℃以下で保存する。

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。

2.3 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。

個体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、3.2 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、3.3 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、3.4 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、3.5 の試験を行う。

3 試験法

3.1 培養細胞の試験

個体別培養細胞の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、37 ℃で 7 日間培養し、観察するとき、CPE を認めてはならない。

3.1.2 赤血球吸着試験

3.1.1 の試験最終日に培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を２回洗浄後、２群に分け、生理食塩液で調整した 0.1vol ％のモルモット及びがちょうの赤血球浮遊液をそれぞれに重層し、60 分間静置後、赤血球吸着の有無を観察するとき、培養細胞に赤血球吸着を認めてはならない。

3.2 ウイルス浮遊液の試験

3.2.1 ウイルス含有量試験

3.2.2.1 試験材料

3.2.2.1.1 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。

3.2.2.1.2　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。

3.2.1.2 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。

3.2.1.3 判定

培養細胞に CPE を認めたものを感染とみなし、$TCID_{50}$ を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 $10^{7.0}$ $TCID_{50}$ 以上でなければならない。ただし、特に承認されたものは、そのウイルス含有量とする。

3.3 不活化ウイルス液の試験

3.3.1 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。

3.3.2 不活化試験

3.3.2.1 試験材料

3.3.2.1.1 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℃で一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.3.2.1.2 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。

3.3.2.2 試験方法

試料の全量を 1 mL につき 3 cm^2 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。

3.3.2.3 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。

3.4 原液の試験

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。

3.5 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ず、異物又は異臭を認めてはならない。小分け容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.5.2 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。

3.5.3 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。

3.5.4 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。

3.5.5 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。

3.5.6 蛋白窒素定量試験

一般試験法の蛋白窒素定量法を準用して試験するとき、蛋白窒素の含有量は、1 mL 中 100 μ g 以下でなければならない。ただし、特に承認されたものは、その含有量とする。

3.5.7 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。

3.5.8 力価試験

3.5.8.1 試験材料

3.5.8.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.8.1.2 試験動物

体重 300 ～ 350g のモルモットを用いる。

3.5.8.1.3 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。

3.5.8.1.4 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。

3.5.8.2 試験方法

注射材料の 0.5mL ずつを３週間間隔で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（付記１）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、希釈被験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。

3.5.8.3 判定

ウイルス対照と各被検血清の平均プラック数を比較するとき、ウイルス対照の平均プラック数を 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、２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　希釈液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95g
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	2.95g
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	2.95g
アガロース	1.5g
結晶トリプシン	2mg
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	2.95g
アガロース	7.5g
結晶トリプシン	2mg
0.5w/v ％ニュートラルレッド	20mL
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。