

# アカバネ病・イバラキ病・牛流行熱・チュウザン病混合 (アジュバント加) 不活化ワクチン

アカバネウイルス、イバラキウイルス、牛流行熱ウイルス及びカスバウイルスをそれぞれ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後混合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 アカバネ病力価試験

##### 1.3.1.1 試験材料

###### 1.3.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 1.3.1.1.2 試験動物

体重約350g のモルモットを用いる。

###### 1.3.1.1.3 中和試験用ウイルス

HmLu-1細胞で増殖させたアカバネウイルス JaGAr39株を用いる。

###### 1.3.1.1.4 培養細胞

HmLu-1細胞を小試験管に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

##### 1.3.1.2 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。

被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液-1(付記1)で2倍階段希釈する。各希釈血清0.5mL と0.1mL 中約200TCID<sub>50</sub>の中和試験用ウイルス液0.5mL とを等量混合し、37℃で60分間処理する。この各混合液0.1mL ずつをそれぞれ4本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-1を0.5mL ずつ加え、34～36℃で7日間回転培養し、観察する。

##### 1.3.1.3 判定

培養細胞の2本以上にCPEの阻止を認めた血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

中和抗体価8倍以上を中和抗体陽性とする。

試験動物の中和抗体陽性率は、80%以上でなければならない。

#### 1.3.2 イバラキ病力価試験

##### 1.3.2.1 試験材料

###### 1.3.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 1.3.2.1.2 試験動物

約5週齢のマウスを用いる。

###### 1.3.2.1.3 中和試験用ウイルス

牛腎継代細胞で増殖させたイバラキウイルス No.2株を用いる。

###### 1.3.2.1.4 培養細胞

HmLu-1細胞を小試験管に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

##### 1.3.2.2 試験方法

注射材料0.5mL ずつを20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

目に得られた血清について中和試験を行う。

マウス血清は、任意に4匹ずつプールし、5プールを用いる。

被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液-2（付記2）で2倍階段希釈する。各希釈血清0.5mLと0.1mL中約200TCID<sub>50</sub>の中和試験用ウイルス液0.5mLとを混合し、37℃で60分間処理する。この各混合液0.1mLずつをそれぞれ4本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-2を0.5mLずつ加え、37℃で7日間回転培養し、観察する。

#### 1.3.2.3 判定

培養細胞の2本以上にCPEの阻止を認めた血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

中和抗体価4倍以上を中和抗体陽性とする。

プール血清の中和抗体陽性率は、80%以上でなければならない。

#### 1.3.3 牛流行熱力価試験

##### 1.3.3.1 試験材料

###### 1.3.3.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 1.3.3.1.2 試験動物

約4週齢のマウスを用いる。

###### 1.3.3.1.3 中和試験用ウイルス

HmLu-1細胞で増殖させた牛流行熱ウイルス YHL 株を用いる。

###### 1.3.3.1.4 培養細胞

HmLu-1細胞を小試験管に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

##### 1.3.3.2 試験方法

注射材料0.5mLずつを20匹の試験動物に2週間隔で2回筋肉内注射し、第2回目の注射後7日目に得られた血清について中和試験を行う。

マウス血清は、任意に4匹分ずつプールし、5プールを用いる。

被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液-1で2倍階段希釈する。各希釈血清0.5mLと0.1mL中約200TCID<sub>50</sub>の中和試験用ウイルス液0.5mLとを混合し、34℃で60分間処理する。この各混合液0.1mLずつをそれぞれ4本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-1を0.5mLずつ加え、34℃で7日間回転培養し、観察する。

##### 1.3.3.3 判定

培養細胞の2本以上にCPEの阻止を認めた血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

中和抗体価2倍以上を中和抗体陽性とする。

プール血清の中和抗体陽性率は、80%以上でなければならない。

#### 1.3.4 チュウザン病力価試験

##### 1.3.4.1 試験材料

###### 1.3.4.1.1 中和試験用ウイルス

BHK-21 (C-13) 細胞で増殖させたカスバウイルス K-47株を用いる。

###### 1.3.4.1.2 培養細胞

Vero-T細胞を小試験管に2～3日間培養し、単層となったものを用いる。

##### 1.3.4.2 試験方法

1.3.1.2の血清について中和試験を行う。

被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液-1で2倍階段希釈する。各希釈血清0.5mLとウイルス希釈用液（付記3）で調整した0.1mL中約200TCID<sub>50</sub>の中和試験用ウイルス液0.5mLとを混合し、37℃で90分間処理する。この各混合液0.1mLずつをそれぞれ4本の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、細胞維持用培養液（付記4）を0.5mLずつ加え、37℃で7日間回転培養し、観察する。

#### 1.3.4.3. 判定

培養細胞の2本以上にCPEの阻止を認めた血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

中和抗体価2倍以上を中和抗体陽性とする。

試験動物の中和抗体価陽性率は、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、それぞれの検体5 mLずつを4 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細胞及びVero-T細胞を培養びんに2～3日間培養し、単層となったものを用いる。

#### 2.1.2 試験方法

##### 2.1.2.1 不活化牛流行熱ウイルス中間製品の試験

試料の全量を1 mLにつき3 cm<sup>2</sup>以上のHmLu-1細胞に接種し、34 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-2を加え、34 で7日間培養し、観察する。

##### 2.1.2.2 不活化イバラキウイルス中間製品の試験

試料の全量を1 mLにつき3 cm<sup>2</sup>以上のHmLu-1細胞に接種し、34 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-2を加え、34 で7日間培養後、その培養液をHmLu-1細胞に更に2代継代し、観察する。

##### 2.1.2.3 不活化アカバネウイルス中間製品の試験

試料の全量を1 mLにつき3 cm<sup>2</sup>以上のHmLu-1細胞に接種し、37 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-2を加え、34～36 で7日間培養し、観察する。

##### 2.1.2.4 不活化カスバウイルス中間製品の試験

試料の全量を1 mLにつき3 cm<sup>2</sup>以上のVero-T細胞に接種し、34 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-2を加え、34～36 で5日間培養後、細胞を次代に継代する。培養2日目に培養液を抜き取り、ウイルス増殖用培養液-2を加え、34～36 で5日間培養後、更に次代に継代し、2代と同様の方法で培養し観察する。

#### 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。

それぞれの検体に活性ウイルスを認めてはならない。

### 付記1 ウイルス増殖用培養液-1

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

グルタミン酸ナトリウム 4.0 g

ブドウ糖 1.0 g

酵母エキス 0.5 g

牛血清 10 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。

牛血清は、アカバネウイルス、牛流行熱ウイルス及びカスバウイルスに対する中和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。

付記2 ウイルス増殖用培養液-2

1,000mL 中

ラクトアルブミン水解物

5.0 g

酵母エキス

1.0 g

ハンクス液又はイーグル MEM

残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を7.2~7.6に調整する。

牛血清又はやぎ血清を 1 ~ 2 %となるように加えてもよい。

牛血清又はやぎ血清は、アカバネウイルス、イバラキウイルス、牛流行熱ウイルス及びカスバウイルスに対する中和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。

付記3 ウイルス希釈用液

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7.2~7.6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 細胞維持用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス

2.95 g

子牛血清

10 mL

イーグル MEM

残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を7.8~8.0に調整する。

子牛血清は、カスバウイルスに対する中和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。