

豚コレラ生ワクチン製造用原種ウイルス

平成 19 年 5 月 18 日（告示第 692 号） 一部改正

1 定義

弱毒豚コレラウイルス GPE⁺株をモルモット腎初代細胞で増殖させて得たウイルス液を凍結又は凍結乾燥したものであって、「豚コレラ生ワクチン」及び「豚コレラ・豚丹毒混合生ワクチン」の製造のための原種ウイルスである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

弱毒豚コレラウイルス GPE⁺株

2.1.2 由来

原株は、強毒豚コレラウイルス ALD 株を豚精巣初代細胞、牛精巣初代細胞及びモルモット腎初代細胞で継代して作出されたものである。

2.1.3 性状

豚精巣初代細胞で増殖するが、END 現象を示さない（E マーカー）。また、30℃でのモルモット腎初代細胞における増殖は、40℃での増殖を上回り（T マーカー）。しかも強毒豚コレラウイルスの増殖を 100 倍以上上回る（G マーカー）。

2.1.4 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、モルモット腎初代細胞で継代する。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。

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

2.2 製造用材料

2.2.1 培養細胞

モルモット（付記 1）の腎初代細胞を用いる。

2.2.2 培養液

細胞増殖用培養液 1（付記 2）及びウイルス増殖用培養液（付記 3）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 原種ウイルスの培養

モルモット腎初代細胞に、1 mL 中 $10^{3.0}$ TCID₅₀ 以上の原株ウイルスを含有するウイルス増殖用培養液を加える。30℃で 6～8 日間隔で 2～3 代継代培養して得たウイルス液を原種ウイルス浮遊液とする。原種ウイルス浮遊液を混合し、ろ過したもの又は遠心上清を原種ウイルス原液とする。

原種ウイルス原液について、3.2 の試験を行う。

2.3.3 原種ウイルスの調製

原種ウイルス原液を容量 50mL の小分容器に 30mL ずつ分注し、- 70℃以下で凍結したもの、又は原液に適当と認められた安定剤を加えて混合したものを容量 50mL の小分容器に 20mL ずつ分注し、凍結乾燥したものを原種ウイルスとする。

原種ウイルスについて、3.3 の試験を行う。

3 試験法

3.1 培養細胞の試験

個体別培養細胞の5%以上を対照培養細胞とし、これについて次に掲げる試験を行う。

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する。

対照培養細胞をプールし、4本以上の培養びん及びカバーグラスを入れた4枚以上のシャーレに継代し、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の観察最終日に培養びんの培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を2回洗浄した後、3群に分け、0.1vol%のモルモット、がちょう及び7日齢以内の鶏の赤血球浮遊液を重層し、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。

3.1.3 封入体染色試験

3.1.1の観察最終日に培養カバーグラスをリン酸緩衝食塩液で洗浄し、固定した後、ギムザ染色し、封入体の有無を観察するとき、培養細胞に封入体を認めてはならない。

3.1.4 迷入ウイルス否定試験

3.1.1の観察最終日に採取した培養液を試料として、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法2.3.1、2.3.2及び2.7.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2 原種ウイルス原液の試験

3.2.1 ウイルス含有量試験

3.2.1.1 試験材料

3.2.1.1.1 試料

検体を細胞増殖用培養液1で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.1.1.2 培養細胞

豚精巢初代又は豚腎継代細胞浮遊液を用いる。

3.2.1.2 試験方法

96穴組織培養用プレートを用いる。試料0.1mLずつをそれぞれ1列10穴に分注する。各列の2穴には細胞増殖用培養液1を0.1mLずつ分注し、対照細胞とする。各穴に細胞増殖用培養液1で調整した細胞浮遊液を0.1mLずつ分注する。37℃で5～7日間静置培養した後、培養液を除き、洗浄液（付記4）で2回洗浄した後、固定する。

固定プレートの各穴に抗体希釈液（付記5）で至適濃度に希釈した抗豚コレラウイルス感染細胞単クローン抗体（付記6）0.05mLずつを分注し、37℃で60分間反応させる。

洗浄液で4回洗浄した後、抗体希釈液で至適濃度に希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリン0.05mLずつを各穴に分注し、37℃で40～60分間反応させる。

洗浄液で4回洗浄後、基質液（付記7）0.1mLを各穴に分注し、常温で10～30分間反応させた後、2.5mol/L 硫酸0.05mLずつを各穴に加え反応を停止させ、各穴の吸光度値を492/630nmの波長でそれぞれ測定する。

3.2.1.3 判定

対照細胞の平均吸光度値の2倍以上の吸光度値を示す穴を豚コレラウイルス感染細胞とみなし、TCID₅₀を算出する。

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

3.3 原種ウイルスの試験

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液体又は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液体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

凍結乾燥品については、一般試験法の真空度試験法に準じて試験するとき、適合しなければならない。

3.3.3 含湿度試験

凍結乾燥品については、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。

ただし、原液を含む中間工程でマイコプラズマ否定試験を実施する場合には、本試験の実施を省略することができる。

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の 1.1、2.3.1.1、2.3.1.2、2.3.1.4、2.3.2、2.4.2、2.7.1 及び 2.7.2.1 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、抗豚コレラウイルス血清（付記 8）を非働化したものを用いる。

3.3.7 ウイルス含有量試験

3.2.1 を準用して試験するとき、原種ウイルスのウイルス含有量は、1 mL 中 $10^{5.0}$ TCID₅₀ 以上でなければならない。

ただし、凍結乾燥品については、検体を凍結乾燥前の量となるようにウイルス増殖用培養液で溶解したものを細胞増殖用培養液 1 で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.8 マーカー試験

3.3.8.1 E マーカー試験

3.3.8.1.1 試験材料

3.3.8.1.1.1 試料

検体又は検体を 20mL のウイルス増殖用培養液で溶解したものを試料とする。

3.3.8.1.1.2 培養細胞

豚精巢初代細胞浮遊液を用いる。

3.3.8.1.1.3 ニューカッスル病ウイルス

TCND 株又は宮寺株を用いる。

3.3.8.1.2 試験方法

試料 0.1mL ずつを小試験管に 0.5mL ずつ分注した細胞 10 本以上に接種し、37 で 4 日間静置培養し、単層が良好であることを確認する。培養液を除き、ニューカッスル病ウイルスを約 $10^{6.0}$ PFU 含むウイルス増殖用培養液 0.5mL ずつを加え、37 で 3 日間培養する。

3.3.8.1.3 判定

培養細胞に CPE を認めてはならない。

3.3.8.2 T 及び G マーカー試験

3.3.8.2.1 試験材料

3.3.8.2.1.1 試料

検体又は検体を 20mL のウイルス増殖用培養液で溶解したものをウイルス増殖用培養液で希釈し、1 mL 中 $10^{3.0}$ TCID₅₀ を含むように調整したものを試料とする。

3.3.8.2.1.2 培養細胞

モルモット腎初代細胞を小試験管に培養し、単層となったものを用いる。

3.3.8.2.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 20 本以上の培養細胞に接種し、2 群に分け、30 及び 40 で 6 ~

8日間静置培養する。群ごとに培養液を採取し、混合し、そのウイルス含有量を 3.2.1 を準用して測定する。

3.3.8.2.3 判定

30 での増殖は、40 での増殖を上回らなければならない（T マーカー）、30 でウイルスの含有量は、1 mL 中 $10^{4.5}$ TCID₅₀ 以上でなければならない（G マーカー）。

3.3.9 安全試験

3.3.9.1 試験材料

3.3.9.1.1 注射材料

検体又は検体を 20mL のウイルス増殖用培養液で溶解したものを注射材料とする。

3.3.9.1.2 試験動物

体重 20 ～ 40kg の豚を用いる。

3.3.9.2 試験方法

注射材料 10mL ずつを 4 頭の試験動物の皮下又は筋肉内に注射し、14 日間観察する。

3.3.9.3 判定

観察期間中、試験動物に異常を認めてはならない。

3.3.10 力価試験

3.3.10.1 試験材料

3.3.10.1.1 注射材料

検体又は検体を 20mL のウイルス増殖用培養液で溶解したものをウイルス増殖用培養液で 1 mL 当たり $10^{3.0}$ TCID₅₀ のウイルス量に希釈したものを注射材料とする。

3.3.10.1.2 試験動物

体重 20 ～ 40kg の豚を用いる。

3.3.10.1.3 中和試験用ウイルス

弱毒豚コレラウイルス GPE⁺ 株を用いる。

3.3.10.1.4 培養細胞

CPK-NS 細胞を細胞数が 1 mL 中約 $5 \times 10^{5.0}$ となるように細胞増殖用培養液 2（付記 9）に浮遊させたものを用いる。

3.3.10.2 試験方法

豚 4 頭を試験群とし、1 頭を対照群とする。注射材料 1 mL ずつを試験群の皮下又は筋肉内に注射し、28 日目の血清について、中和試験を行う。

被検血清を非働化した後、細胞増殖用培養液 2 で 2 倍階段希釈し、各希釈血清と 0.025mL 中約 200TCID₅₀ を含む中和試験用ウイルス液とを等量混合し、37 で 60 分間処理する。この各混合液 0.05mL ずつをそれぞれ 96 穴組織培養用プレートの 4 穴ずつに分注し、CPK-NS 細胞浮遊液 0.1mL ずつを加え、37 で 7 日間培養し、観察する。

3.3.10.3 判定

培養細胞 4 穴中 2 穴以上に CPE の阻止を認めた血清の最高希釈倍数で中和抗体価を表す。

試験群の中和抗体価は、すべて 4 倍以上でなければならない。この場合、対照群は、1 倍未満でなければならない。

4 貯法及び有効期間

凍結されたものは - 70 以下で、また、凍結乾燥品は 10 以下で保存する。

有効期間は、10 年間とする。

付記 1 モルモット

モルモットは、パラインフルエンザ 型ウイルス（H V J）及び日本脳炎ウイルスの

感染がなく、また、臨床上健康なもの

付記 2 細胞増殖用培養液 1

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95g
又はラクトアルブミン	5 g
牛又はやぎ血清	100 mL
イーグル MEM 又はアール液	残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 6.8 ~ 7.2 に調整する。

牛又はやぎ血清は、牛ウイルス性下痢 - 粘膜病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
又はラクトアルブミン	5 g
牛又はやぎ血清	50 mL
イーグル MEM 又はアール液	残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 6.8 ~ 7.2 に調整する。

牛又はやぎ血清は、牛ウイルス性下痢 - 粘膜病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 4 洗浄液

A 液と B 液を混合したもの

A 液 800mL 中

塩化ナトリウム	8.0 g
塩化カリウム	0.2 g
無水リン酸水素二ナトリウム	1.15g
リン酸二水素カリウム	0.2 g
水	残 量

B 液 200mL 中

無水塩化カルシウム	0.1 g
塩化マグネシウム六水和物	0.1 g
水	残 量

付記 5 抗体希釈液

ハンクス液又は付記 4 に牛血清アルブミン・フラクション V を 0.5 ~ 1.0w/v % となるように溶解したもの

付記 6 抗豚コレラウイルス感染細胞単クローン抗体

動物医薬品検査所が配布するもの

付記 7 基質液

0.2mol/L リン酸 - 0.1mol/L クエン酸緩衝液 (pH5.0) 50mL に *o* - フェニレンジアミンニ塩酸塩 25mg 及び過酸化水素 (30) 0.01mL を加えたもの
用時調製する。

付記 8 抗豚コレラウイルス血清

豚コレラウイルスで免疫した兎又はやぎの血清であって、検体又は試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの

付記 9 細胞増殖用培養液 2

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95g

バクトペプトン 5 g

N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2

-アミノエタンスルホン酸 2.13g

イーグル MEM 残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 6.8 ~ 7.2 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。