

牛RSウイルス感染症生ワクチン

1 定義

弱毒牛RSウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を凍結乾燥したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

弱毒牛RSウイルス rs-52 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

牛に接種しても病原性を示さない。30℃におけるハムスター肺由来培養細胞から樹立されたHAL細胞での増殖性は、強毒ウイルスより100倍以上高い。

2.1.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、HAL細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

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。種ウイルスは、原種ウイルスから2代以内に製造しなければならない。

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。種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

2.2 製造用材料

2.2.1 培養細胞

HAL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別培養細胞ごとに採取した培養液のろ液又は遠心上清を混合し、原液とする。

原液について、3.2の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液に適当と認められた安定剤を加えて混合し、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、凍結乾燥し、小分製品とする。

小分製品について、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、ウイルスの培養と同じ条件で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%のモルモット及びびがちょう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。

3.2 原液の試験

3.2.1 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。

3.2.2 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 1.1、2.4.1、2.4.2、2.7.2.1 及び 2.8.1.1 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、抗牛RSウイルス血清（付記1）を非働化したものを用いる。

3.2.3 ウイルス含有量試験

3.2.3.1 試験材料

3.2.3.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記2）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.3.1.2 培養細胞

Vero細胞を小試験管に3～4日間培養し、単層となったものを用いる。

3.2.3.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4本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を0.5mLずつ加え、34℃で14日間回転培養し、観察する。

3.2.3.3 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、1mL中10^{6.3}TCID₅₀以上でなければならない。

3.3 小分製品の試験

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

一般試験法の真空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。

3.3.3 含湿度試験

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 1.1、2.4.1 及び 2.4.2 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、抗牛RSウイルス血清を非働化したものを用いる。

3.3.7 ウイルス含有量試験

3.2.3 を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{5.0}TCID₅₀以上でなければならない。

3.3.8 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。

3.3.9 安全試験

3.3.9.1 試験材料

3.3.9.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.3.9.1.2 試験動物

体重 100 ~ 200kg の牛を用いる。

3.3.9.2 試験方法

注射材料 1 頭分を 1 頭の試験動物の筋肉内に注射し、14 日間観察する。

3.3.9.3 判定

観察期間中、軽い発熱（40.5 以下）を認めても 3 日間以上継続せず、その他の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

試験品を注射材料とする。

3.3.10.1.2 試験動物

体重約 100g のハムスターを用いる。

3.3.10.1.3 中和試験用ウイルス

牛腎継代細胞で増殖させた牛 RS ウイルス NMK7 株を用いる。

3.3.10.1.4 培養細胞

Vero 細胞を小試験管に 3 ~ 4 日間培養し、単層となったものを用いる。

3.3.10.2 試験方法

注射材料 2 mL ずつを 5 匹の試験動物に 14 日間隔で 2 回腹腔内注射し、第 2 回目の注射後 14 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、中和試験用希釈液（付記 3）で 2 倍階段希釈する。希釈血清 0.5mL と 0.1mL 中約 200TCID₅₀ の中和試験用ウイルス液 0.5mL とを混合し、22 で 24 時間処理する。この各混合液 0.1mL ずつを 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 0.5mL ずつ加え、34 で 10 日間回転培養し、観察する。

3.3.10.3 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。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、1 年間とする。ただし、特に承認されたものは、その期間とする。

付記 1 抗牛 RS ウイルス血清

強毒牛 RS ウイルスで免疫して得られた兔又はモルモットの血清で、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 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

グルタミン酸ナトリウム 5 g

ブドウ糖 1 g

牛血清アルブミン	1.1 g
酵母エキス	0.5 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 3 中和試験用希釈用液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
牛胎子血清	100 mL
硫酸カナマイシン	100 mg力価
イーグル MEM	残 量

炭酸水素ナトリウムで pH7.2 ~ 7.4 に調整する。
牛胎子血清は、牛 RS 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。