

牛アデノウイルス感染症生ワクチン

1 定義

弱毒牛アデノウイルス（7型）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

弱毒牛アデノウイルス（7型）TS-GT 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。牛精巢継代細胞又はやぎ精巢初代細胞に CPE を伴って増殖する。30℃における牛精巢継代細胞又はやぎ精巢初代細胞での増殖性は、強毒ウイルスより 100 倍以上高い。

2.1.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、やぎ精巢初代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

やぎ精巢初代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3代まで継代培養

する。3代目に継代するとき、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 の試験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 の試験最終日に採取した培養液の2 mLについて、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 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。

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、抗牛アデノウイルス（7型）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

牛精巢継代細胞を小試験管に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

3.2.3.1.3 赤血球浮遊液

牛、羊又はやぎの赤血球をゼラチン・アルブミン加ペロナール緩衝食塩液（付記2。以下「希釈液」という。）に0.3vol%に浮遊したもので赤血球凝集抗原が規定の赤血球凝集価を示すものを用いる。

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、34～36℃で7日間回転培養する。培養終了後、培養細胞を4℃に冷却し、これに4℃に冷却した赤血球浮遊液0.25mLを加え、4℃で一夜静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

3.2.3.3 判定

赤血球凝集が認められ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^{4.3}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、抗牛アデノ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 $10^{3.0}$ 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なければならない。

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

3.3.9 の試験に用いた動物を用いる。

3.3.10.1.3 赤血球凝集抗原

牛アデノウイルス（7 型）赤血球凝集抗原（付記 4）を用いる。

3.3.10.1.4 赤血球浮遊液

3.2.3.1.3 の赤血球浮遊液を用いる。

3.3.10.2 試験方法

3.3.9 の試験終了後、14 日目に得られた血清について、赤血球凝集抑制試験を行う。

被検血清を非働化した後、希釈液で 5 倍に希釈する。希釈血清に 25w/v % カオリン加生理食塩液を等量加え、15 ~ 20 で 20 分間処理した後、3,000rpm で 20 分間遠心し、その上清を希釈液を用いて 2 倍階段希釈する。各希釈血清 0.2mL に 4 単位の赤血球凝集抗原 0.2mL を加え、4 で一夜処理した後、4 に冷却した赤血球浮遊液 0.2mL を加え、4 で一夜静置し、観察する。

3.3.10.3 判定

赤血球凝集を阻止した血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。

試験動物の赤血球凝集抑制抗体価は、20倍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 抗牛アデノウイルス(7型)血清

牛アデノウイルス(7型)袋井株で免疫して得られた兔の血清で、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 ゼラチン・アルブミン加ペロナル緩衝食塩液

A液 ペロナル緩衝食塩液

1,000mL 中

塩化ナトリウム 8.5 g

バルビタール 0.575 g

バルビタールナトリウム 0.375 g

無水塩化カルシウム 0.028 g

塩化マグネシウム六水和物 0.168 g

水 残量

B液 1 w/v%ゼラチン液

1,000mL 中

精製ゼラチン 10.0 g

水 残量

使用時加温溶解する。

C液 5 w/v%牛血清アルブミン液

1,000mL 中

牛血清アルブミン 50.0 g

水 残量

使用時に、A液 200mL にB液 0.2mL 及びC液 4 mL を加えて調製し、用いる。

付記3 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中

ラクトアルブミン水解物 5.0 g

酵母エキス 0.5 g

牛又はやぎ血清 0 ~ 100 mL

アール液 残量

炭酸水素ナトリウムでpHを7.2 ~ 7.6に調整する。

牛又はやぎ血清は、牛アデノウイルス(7型)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 牛アデノウイルス(7型)赤血球凝集抗原

牛アデノウイルス(7型)袋井株を牛精巢継代細胞で増殖させて得た培養上清