

牛パラインフルエンザ生ワクチン

1 定義

弱毒牛パラインフルエンザ3型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

弱毒牛パラインフルエンザ3型ウイルス BN-CE 株又はこれと同等と認められた株

1.1.2 性状

牛の鼻腔内又は筋肉内に接種しても病原性を示さず、妊娠牛に接種しても異常産を起こさない。
3日齢以内の乳のみマウスの脳内に接種しても病原性を認めない。

2.1.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚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。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

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞を用いる。

2.2.2 培養液

製造に相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

原液に相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細胞の培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を2回洗浄後、生理食塩液で調整した0.1vol%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。

3.2 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、抗牛パラインフルエンザ3型ウイルス血清（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

牛腎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。

3.2.3.2 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ずつに加え、34～36℃で7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^{6.5}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、抗牛パラインフルエンザ3型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（乳のみマウス注射試験）

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

3日齢以内の乳のみマウスを用いる。

3.3.9.2 試験方法

注射材料 0.01mL ずつを 10 匹の試験動物の脳内に注射し、14 日間観察する。

3.3.9.3 判定

観察期間中、異常を認めてはならない。

事故のため試験動物が半数未満になった場合は、試験を反復する。

3.3.10 力価試験

3.3.10.1 試験材料

3.3.10.1.1 接種材料

試験品を接種材料とする。

3.3.10.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

3.3.10.1.3 赤血球凝集抗原

牛パラインフルエンザ 3 型赤血球凝集抗原（付記 4）を用いる。

3.3.10.2 試験方法

接種材料 0.2mL ずつを 5 匹の試験動物の鼻腔内に接種し、21 日目に得られた各個体の血清について赤血球凝集抑制試験を行う。

被検血清 0.2mL に 25w/v% カオリン加生理食塩液 0.6mL を加え、20 分間処理した後、3,000rpm で 20 分間遠心し、その上清をゼラチン・アルブミン加ペロナール緩衝食塩液（付記 3、以下「希釈液」という。）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、37 で 60 分間処理した後、希釈液で調整した 0.3vol% モルモット赤血球浮遊液 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。

赤血球凝集抑制抗体価 8 倍以上を赤血球凝集抑制抗体陽性とする。

試験動物の赤血球凝集抑制抗体陽性率は、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 抗牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス血清

牛パラインフルエンザ 3 型ウイルスで免疫した兔の血清で、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 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中

トリプト - ス・ホスフェイト・ブロス

2.95 g

ブドウ糖

1.0 g

酵母エキス	0.5 g
牛又はやぎ血清	20 mL
イ - 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。

牛又はやぎ血清は、牛パラインフルエンザ 3 型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 ゼラチン・アルブミン加ペロナール緩衝食塩液

A 液 ペロナール緩衝食塩液

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 1w/v ゼラチン液

100mL 中

精製ゼラチン	1 g
水	残 量

使用時加温溶解する。

C 液 5w/v% 牛血清アルブミン液

100mL 中

牛血清アルブミン	5 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 4 牛パラインフルエンザ 3 型赤血球凝集抗原

牛パラインフルエンザ 3 型ウイルス BN_I-1 株を牛腎継代細胞で増殖させて得た培養上清