

牛流行熱生ワクチン

1 定義

弱毒牛流行熱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

弱毒牛流行熱ウイルス YHL 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

牛の皮下に注射しても病原性を示さない。HmLu-1 細胞で CPE を伴って増殖する。

2.1.2 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、HmLu-1 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

HmLu-1 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。

3.2 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、抗牛流行熱ウイルス血清（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

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。

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 10 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、1 mL 中 10^{5.0}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、抗牛流行熱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 頭の試験動物の皮下に注射し、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 試験動物

3.3.9 の試験に用いた動物を用いる。

3.3.10.1.2 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。

3.3.10.1.3 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。

3.3.10.2 試験方法

3.3.9 の試験終了後 14 日目の試験動物に「牛流行熱不活化ワクチン」3.0mL を筋肉内に注射し、その後 7 日目に得られた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で 2 倍階段希釈する。各希釈血清 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、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を 0.5mL ずつ加え、34 で 7 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 の阻止を認めた最高血清希釈倍数を中和抗体価とする。

試験動物の中和抗体価は、1 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 抗牛流行熱ウイルス血清

牛流行熱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

トリプトース・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。

牛血清は、牛流行熱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。