

# 牛疫生ワクチン

## 1 定義

弱毒牛疫ウイルスを発育鶏卵又は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

弱毒家兔化鶏胎化牛疫ウイルス赤穂株又は LA 株

#### 2.1.2 性状

牛の皮下に注射したとき、軽い発熱のほかの異常を認めない。

11 ~ 12 日齢の発育鶏卵の静脈内に注射すると増殖し、鶏胚の脾の腫脹を認める。

牛腎継代細胞、鶏胚初代細胞及び Vero 細胞に接種すると、特有の CPE を伴って増殖する。

#### 2.1.3 継代及び保存

原株は生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の発育鶏卵で、原種ウイルスは生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の発育鶏卵又は Vero 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 5 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 5 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 発育鶏卵又は培養細胞

##### 2.2.1.1 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の 5 ~ 6 日齢又は 11 ~ 12 日齢のものをを用いる。

##### 2.2.1.2 培養細胞

Vero 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 発育鶏卵又は細胞の培養

##### 2.3.1.1 発育鶏卵の培養

1 回処理する発育鶏卵を個別別発育鶏卵とみなす。

個別別発育鶏卵について、3.1.1 の試験を行う。

##### 2.3.1.2 細胞の培養

1 回処理し、培養した細胞を個別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。

個別別培養細胞について、3.1.2 の試験を行う。

#### 2.3.2 ウイルスの培養

種ウイルスを発育鶏卵の静脈内若しくは卵黄のう内に接種し、培養し、ウイルスの増殖極期に採取した鶏胚の乳剤のろ液若しくは遠心上清又は種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの増殖極期に採取した培養液のろ液若しく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 発育鶏卵又は培養細胞の試験

#### 3.1.1 発育鶏卵の試験

発育鶏卵の 1 % 以上を対照発育鶏卵とし、これについて次の試験を行う。

##### 3.1.1.1 培養観察

対照発育鶏卵を、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、鶏胚の異常を認めてはならない。

##### 3.1.1.2 鶏赤血球凝集試験

3.1.1.1 の試験最終日に尿膜腔液を採取し、0.5vol% 鶏赤血球浮遊液を等量加え、60 分間静置し、観察するとき、赤血球凝集を認めてはならない。

#### 3.1.2 培養細胞の試験

個体別培養細胞の 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。

##### 3.1.2.1 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。

##### 3.1.2.2 赤血球吸着試験

3.1.2.1 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それぞれに重層し、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の 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、抗牛疫ウイルス血清（付記 1）を非働化したものを用いる。

#### 3.2.3 マーカ - 試験

##### 3.2.3.1 試験材料

###### 3.2.3.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液で 10 倍及び 100 倍に希釈したものを試料とする。

###### 3.2.3.1.2 発育鶏卵

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の 11 ~ 12 日齢のものを用いる。

###### 3.2.3.2 試験方法

試料 0.05mL ずつをそれぞれ 10 個以上の発育鶏卵の静脈内に注射し、38℃ で 5 日間培養し、生存鶏胚の脾の腫脹の有無を検査する。

###### 3.2.3.3 判定

脾重量 15mg 以上を腫脹とみなす。

生存鶏胚の 20 % 以上に脾の腫脹を認めなければならない。

#### 3.2.4 ウイルス含有量試験

##### 3.2.4.1 試験材料

###### 3.2.4.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液、ウイルス増殖用培養液 1（付記 2）又はウイルス増殖用培養液 2（付記 3）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

#### 3.2.4.1.2 培養細胞

Vero 細胞又は鶏胚初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。

#### 3.2.4.2 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 1 又はウイルス増殖用培養液 2 0.5mL を加え、37℃ で 7 日間回転培養し、観察する。

#### 3.2.4.3 判定

培養細胞に特有の CPE を認めたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub> を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10<sup>5.0</sup>TCID<sub>50</sub> 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、抗牛疫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

3.2.4 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<sup>3.0</sup>TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

#### 3.3.8 安全試験

##### 3.3.8.1 試験材料

##### 3.3.8.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

##### 3.3.8.1.2 試験動物

体重 100～200kg の黒毛和種の牛を用いる。

##### 3.3.8.2 試験方法

注射材料 1 頭分ずつを 2 頭の試験動物の皮下に注射し、14 日間観察する。

##### 3.3.8.3 判定

観察期間中、発熱を認めても観察期間内に回復しなければならない。下痢、衰弱などの症状を認めてはならない。

##### 3.3.9 力価試験

### 3.3.9.1 試験材料

#### 3.3.9.1.1 試験動物

3.3.8 の試験に用いた動物を用いる。

#### 3.3.9.1.2 中和試験用ウイルス

Vero 細胞又は鶏胚初代細胞で増殖させた弱毒牛疫ウイルスを用いる。

#### 3.3.9.1.3 培養細胞

Vero 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。

### 3.3.9.2 試験方法

3.3.8 の試験終了後、7 日目に得られた各個体の血清について中和試験を行う。

非働化した被検血清を、リン酸緩衝食塩液を用いて 5 倍に希釈し、更に 2 倍階段希釈する。各希釈血清 0.5mL と 0.1mL 中約 200TCID<sub>50</sub> の中和試験用ウイルス液 0.5mL とを混合し、5 で 2 時間処理する。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 1 又はウイルス増殖用培養液 2 0.5mL を加え、37 で 7 日間回転培養し、観察する。

### 3.3.9.3 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。

試験動物の中和抗体価は、いずれも 10 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、2 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 抗牛疫ウイルス血清

牛疫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

1,000mL 中

酵母エキス

1 g

アール液

残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 7.4 に調整する。

鶏胚初代細胞用以外には、牛血清アルブミン 1 g 又は牛疫ウイルスに対する中和抗体陰性の牛血清を 5 vol% となるように加えてもよい。

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 2

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・プロス

2.95 g

ブドウ糖

1.0 g

酵母エキス

0.5 g

グルタミン酸ナトリウム

5.0 g

イーグル MEM

残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 7.4 に調整する。

鶏胚初代細胞用以外には、牛血清アルブミン 1 g 又は牛疫ウイルスに対する中和抗体陰性の牛血清を 5 vol% となるように加えてもよい。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。