

馬鼻肺炎（アジュバント加）不活化ワクチン

1 定義

馬鼻肺炎ウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を濃縮後、不活化してアルミニウムゲルアジュバントを添加したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

馬鼻肺炎ウイルス HH-1 BKS 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

馬に接種すると軽度の発熱を示すが、呼吸器症状は示さない。

牛腎細胞、馬腎細胞及び豚腎細胞で CPE を伴って増殖し、馬の赤血球を凝集する。

2.1.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、EFD-C₁細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

継代は、原株では3代以内、種ウイルスでは2代以内でなければならない。

原株及び種ウイルスは、凍結して - 70 以下又は凍結乾燥して 5 以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 培養細胞

EFD-C₁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、遠心上清又はこれを濃縮したものをウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.2 の試験を行う。

2.3.3 不活化

ウイルス浮遊液にホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加えて不活化し、不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.3 の試験を行う。

2.3.4 アジュバントの添加

不活化ウイルス液を混合し適当と認められたアルミニウムゲルアジュバントを加え、原液とする。

原液について、3.4 の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液を混合し、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、小分製品とする。

小分製品について、3.5 の試験を行う。

3 試験法

3.1 培養細胞の試験

浮遊培養細胞では個体別培養細胞の 1 mL 以上を、単層培養細胞では個体別培養細胞の 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。

3.1.1 培養観察

3.1.1.1 浮遊培養細胞

対照培養細胞を、ウイルスを接種することなく、37℃ で 3 日間培養し、観察するとき、培養細胞は良好な増殖を示し、培養 3 日目の活性は良好でなければならない。

3.1.1.2 単層培養細胞

対照培養細胞を、ウイルスを接種することなく、37℃ で 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 ウイルス浮遊液の試験

3.2.1 ウイルス含有量試験

3.2.1.1 試験材料

3.2.1.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記 1）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.1.1.2 培養細胞

MDBK 細胞を小試験管に 1 ~ 2 日間培養し、単層となったものを用いる。

3.2.1.2 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、37℃ で 7 日間回転培養し、観察する。

3.2.1.3 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^{8.0}TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、特に承認されたものは、そのウイルス含有量とする。

3.3 不活化ウイルス液の試験

3.3.1 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。

3.3.2 不活化試験

3.3.2.1 試験材料

3.3.2.1.1 試料

検体 5 mL を、100 倍量以上のリン酸緩衝液を用い、2 ~ 5℃ で一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.3.2.1.2 培養細胞

MDBK 細胞を 1 ~ 3 日間培養し、単層となったものを用いる。

3.3.2.2 試験方法

試料の全量を 1 mL につき 3 cm² 以上の培養細胞に接種し、37℃ で 60 分間吸着させた後、試料を抜き取り、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃ で 7 日間培養し観察する。

3.3.2.3 判定

培養細胞に CPE を認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

3.4 原液の試験

3.4.1 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。

3.5 小分製品の試験

3.5.1 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均質な懸濁液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。

3.5.2 pH 測定試験

一般試験法の pH 測定試験法を準用して試験するとき、pH は、固有の値を示さなければならない。

3.5.3 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。

3.5.4 ホルマリン定量試験

一般試験法のホルマリン定量法を準用して試験するとき、ホルマリンの含有量は、0.2vol % 以下でなければならない。

3.5.5 アルミニウム定量試験

一般試験法のアルミニウム定量法を準用して試験するとき、アルミニウムの含有量は、1 mL 中 1.0mg 以下でなければならない。

3.5.6 蛋白窒素定量試験

一般試験法の蛋白窒素定量法を準用して試験するとき、蛋白窒素の含有量は、1 mL 中 400 µg 以下でなければならない。ただし、特に承認されたものは、その含有量とする。

3.5.7 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。

3.5.8 力価試験

3.5.8.1 試験材料

3.5.8.1.1 注射材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で 250、500、1,000 及び 2,000 倍に希釈したものを注射材料とする。

3.5.8.1.2 試験動物

約 6 週齢のハムスターを用いる。

3.5.8.1.3 攻撃ウイルス

ハムスターに馴化させた攻撃用馬鼻肺炎ウイルス KyD 株（付記 2）を用いる。

3.5.8.2 試験方法

試験動物 16 匹を試験群、4 匹を対照群とする。注射材料 1 mL ずつをそれぞれ 4 匹の試験群の腹腔内に注射する。注射後 21 日目に攻撃ウイルス 1 mL ずつを試験群及び対照群の腹腔内に注射し、7 日間観察する。

3.5.8.3 判定

試験群の生残動物数から試験品の ED₅₀ を算出する。

試験品の ED₅₀ は、500 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、すべて死亡しなければならない。

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 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

牛血清 10 mL

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。
牛血清 10mL は、やぎ血清 20mL をもって代えることができる。

付記 2 攻撃用馬鼻肺炎ウイルス KyD 株

馬鼻肺炎ウイルス KyD 株をハムスターの腹腔内に注射し、感染極期に肝臓を採取し、リン酸緩衝食塩液で 10w/v% 乳剤に調整する。攻撃には、 $10^{4.0}LD_{50}$ を用いる。