

豚コレラ生ワクチン

平成18年 3月22日（告示第 349号） 一部改正

1 定義

弱毒豚コレラ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

弱毒豚コレラウイルス GPE⁻株

2.1.2 性状

豚精巢初代細胞で増殖するが、END 現象を示さない（E マーカー）。また、30℃でのモルモット腎初代細胞における増殖は、40℃での増殖を上回り（T マーカー）、しかも強毒豚コレラウイルスの増殖を 100 倍以上上回る（G マーカー）。

原種ウイルスは、別に定める規格に適合しなければならない。

2.1.3 継代及び保存

原種ウイルスをモルモット腎初代細胞で 1 代継代し、これを種ウイルスとする。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。

種ウイルスは、継代してはならない。

種ウイルスは、凍結して - 70℃以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 培養細胞

モルモット（付記 1）の腎初代細胞を用いる。

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 種ウイルスの培養

モルモット腎初代細胞に、1 mL 中 $10^{3.0}$ TCID₅₀ 以上の原種ウイルスを含有するウイルス増殖用培養液を加え、30℃で培養し、採取した培養液の遠心上清を種ウイルスとする。

種ウイルスについて、3.1 の試験を行う。

2.3.2 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、3.2 の試験を行う。

2.3.3 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞に接種し、30℃で培養後、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て原液とする。

原液について、3.3 の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液に、相当と認められた希釈液を加えて濃度調整し、これに等量の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。

希釈液及び安定剤は、ロットごとに調製しなければならない。

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。

2.5.1 サブロット

一つの最終バルクに由来し、同一条件で凍結乾燥した小分製品の一群をサブロットとする。
サブロットについて、3.4 の試験を行う。

2.5.2 ロット

一つの原液に由来するサブロット群を 1 ロットとする。
ロットについて、3.5 の試験を行う。

3 試験法

3.1 種ウイルスの試験

3.1.1 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。

3.1.2 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、2.3.1.1、2.3.1.2、及び 2.7.1 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、抗豚コレラウイルス血清（付記 2）を非働化したものを用いる。

3.1.3 ウイルス含有量試験

3.1.3.1 試験材料

3.1.3.1.1 試料

検体を細胞増殖用培養液（付記 3）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.1.3.1.2 培養細胞

豚精巢初代細胞又は豚腎継代細胞浮遊液を用いる。

3.1.3.2 試験方法

96 穴組織培養用プレートを用いる。試料 0.1mL ずつをそれぞれ 1 列 10 穴に分注する。各列の 2 穴には細胞増殖用培養液を 0.1mL ずつ分注し、対照細胞とする。各穴に細胞増殖用培養液で調整した細胞浮遊液を 0.1mL ずつ分注する。37℃ で 5 ~ 7 日間静置培養後、培養液を除き、洗浄液（付記 4）で 2 回洗浄後、固定する。

固定プレートの各穴に抗体希釈液（付記 5）で至適濃度に希釈した抗豚コレラウイルスモノクローナル抗体（付記 6）0.05mL ずつを分注し、37℃ で 60 分間反応させる。

洗浄液で 4 回洗浄後、抗体希釈液で至適濃度に希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリン 0.05mL ずつを各穴に分注し、37℃ で 40 ~ 60 分間反応させる。

洗浄液で 4 回洗浄後、基質液（付記 7）0.1mL を各穴に分注し、常温で 10 ~ 30 分間反応させた後、2.5mol/L 硫酸 0.05mL ずつを各穴に加え反応を停止させ、各穴の吸光度値を 492/630nm の波長でそれぞれ測定する。

3.1.3.3 判定

対照細胞の平均吸光度値の 2 倍以上の吸光度値を示す穴を豚コレラウイルス感染細胞とみなし、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。

3.2 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。

3.2.1 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する。

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。

3.2.2 赤血球吸着試験

3.2.1 の試験最終日に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、3

群に分け、0.1vol %のモルモット、がちょう及び7日齢以内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。

3.2.3 封入体染色試験

3.2.1 の試験最終日に培養カバーク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。

3.2.4 迷入ウイルス否定試験

3.2.1 の試験最終日に採取した培養液を試料として、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 2.3.1.1、2.3.1.2、2.3.1.3、2.3.2 及び 2.7.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.3 原液の試験

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 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、2.3.1.1、2.3.1.2、2.3.1.4、2.3.2、2.4.2、2.7.1 及び 2.7.2.1 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、抗豚コレラウイルス血清を非働化したものを用いる。

3.3.3 ウイルス含有量試験

3.1.3 を準用して試験するとき、検体のウイルス含有量は、1 mL 中 $10^{4.8}$ TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.3.4 マーカー試験

3.3.4.1 E マーカー試験

3.3.4.1.1 試験材料

3.3.4.1.1.1 試料

検体を試料とする。

3.3.4.1.1.2 培養細胞

豚精巣初代細胞浮遊液を用いる。

3.3.4.1.1.3 ニューカッスル病ウイルス

TCND 株又は宮寺株を用いる。

3.3.4.1.2 試験方法

試料の 0.1mL ずつを小試験管に 0.5mL ずつ分注した細胞 10 本以上に接種し、37℃ で 4 日間静置培養し、単層形成が良好であることを確認する。培養液を除き、ニューカッスル病ウイルスを約 $10^{6.0}$ PFU 含む細胞増殖用培養液 0.5mL ずつを加え、37℃ で 3 日間培養する。

3.3.4.1.3 判定

培養細胞に、CPE を認めてはならない。

3.3.4.2 T 及び G マーカー試験

3.3.4.2.1 試験材料

3.3.4.2.1.1 試料

検体を細胞増殖用培養液 1 mL 中 $10^{3.0}$ TCID₅₀ を含むように調整したものを試料とする。

3.3.4.2.1.2 培養細胞

モルモット腎初代細胞を小試験管に培養し、単層となったものを用いる。

3.3.4.2.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ 20 本以上の培養細胞に接種し、2 群に分け、30℃ 及び 40℃ で 6 ~ 8 日間静置培養する。群ごとに培養液を採取し、混合し、そのウイルス含有量を 3.1.3 を準用して測定する。

3.3.4.2.3 判定

30℃ での増殖は、40℃ での増殖を上回らなければならず (T マーカー)、30℃ でのウイルス含

有量は、1 mL 中 $10^{4.5}$ TCID₅₀ 以上でなければならない (G マーカー)。

3.4 サブロットの試験

3.4.1 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。

3.4.2 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。

3.4.3 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。

3.4.4 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。

3.4.5 ウイルス含有量試験

3.1.3 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。

3.5 ロットの試験

3.5.1 マイコプラズマ否定試験

試料は、各サブロットから 2 本ずつを用い、それぞれ等量ずつ混合したものをを用い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。

3.5.2 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、2.3.1.1、2.3.1.2 及び 2.3.1.4 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、抗豚コレラウイルス血清を非働化したものを用いる。

3.5.3 安全試験

3.5.3.1 試験材料

3.5.3.1.1 注射材料

各サブロットから同数の試験品を採取し、溶解用液 20mL 中に 100 頭分が含まれるように溶解し、混合し、注射材料とする。

3.5.3.1.2 試験動物

体重 20 ~ 40kg の豚を用いる。

3.5.3.2 試験方法

注射材料 20mL ずつを 4 頭の試験動物の皮下又は筋肉内に注射し、14 日間観察する。

3.5.3.3 判定

観察期間中、異常を認めてはならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、1 年 6 か月間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合は、その期間とする。

付記 1 モルモット

モルモットは、パラインフルエンザ I 型ウイルス (HVJ) 及び日本脳炎ウイルスの感染がなく、また、臨床上健康なもの

付記 2 抗豚コレラウイルス血清

豚コレラウイルスで免疫した兎又はやぎの血清で、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3 細胞増殖用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

又はラクトアルブミン水解物 5 g

牛又はやぎ血清 0 ~ 100 mL

イーグル MEM 又はアール液 残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 6.8 ~ 7.2 に調整する。

牛又はやぎ血清は、牛ウイルス性下痢 - 粘膜病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4 洗浄液

A 液と B 液を混合したもの

A 液 800mL 中

塩化ナトリウム 8.0 g

塩化カリウム 0.2 g

無水リン酸水素二ナトリウム 1.15 g

リン酸二水素カリウム 0.2 g

水 残 量

B 液 200mL 中

無水塩化カルシウム 0.1 g

塩化マグネシウム六水和物 0.1 g

水 残 量

付記5 抗体希釈液

ハンクス液又は洗浄液に牛血清アルブミン・フラクシオン V を 0.5 ~ 1.0w/v % となるように溶解したもの

付記6 抗豚コレラウイルスモノクローナル抗体

動物医薬品検査所が配布するもの

付記7 基質液

0.2mol/L リン酸 - 0.1mol/L クエン酸緩衝液 (pH5.0) 50mL に *o* - フェニレンジアミン二塩酸塩 25mg 及び過酸化水素 (30) 0.01mL を加えたもの
用時調製する。