

豚伝染性胃腸炎生ワクチン（子豚用）

1 定義

弱毒豚伝染性胃腸炎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子豚用のワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

弱毒豚伝染性胃腸炎ウイルス TO-K 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

豚腎初代若しくは継代細胞又は豚精巢初代細胞で CPE を伴って増殖する。豚腎初代細胞における 30 での増殖は、強毒豚伝染性胃腸炎ウイルスのそれを上回る。また、トリプシン処理によるウイルス価の低下は、強毒豚伝染性胃腸炎ウイルスのそれを上回る。

2.1.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、豚腎初代細胞又は適当と認められた細胞で継代する。

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 2.6.1 の豚腎初代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又は遠心上清を混合して原液とする。

原液について、3.2 の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液を混合し、適当と認められた希釈液及び安定剤を加えて調整し、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。

ただし、製造に継代細胞を用いている場合には、3.1.3 及び 3.1.4 の試験を行わなくてもよい。

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。

3.1.2 赤血球吸着試験

3.1.1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。

3.1.3 封入体染色試験

3.1.1の試験最終日に培養カバーグ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。

3.1.4 迷入ウイルス否定試験

3.1.1の試験最終日に採取した培養液を試料とし、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 2.3.1、2.3.2及び2.4.2を準用して試験をするとき、適合しなければならない。

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、2.3.1、2.3.2、2.4.2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、抗豚伝染性胃腸炎ウイルス血清（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）又は適当と認められた希釈液で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

豚腎初代又は継代細胞を小試験管に培養し、単層となったものを用いる。

3.2.3.2 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0.5mLを加え、37℃で5日間培養し、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^{8.0}TCID₅₀以上でなければならない。

3.2.4 マーカー試験

3.2.4.1 Tマーカー試験

3.2.4.1.1 試験材料

3.2.4.1.1.1 試料

検体と強毒豚伝染性胃腸炎ウイルスSH株（付記3）を、それぞれウイルス増殖用培養液1mL中に10^{5.0}TCID₅₀を含むように調整したものを試料とする。

3.2.4.1.1.2 培養細胞

豚腎初代細胞を200mL容量の培養びんに培養し、単層となったものを用いる。

3.2.4.1.2 試験方法

各試料2mLずつを各3本の培養細胞に接種し、30℃で60分間静置吸着させた後、細胞表面をアール液で3回洗浄し、ウイルス増殖用培養液15mLを加え、30℃で3日間培養する。培養後、

各試料ごとにそれぞれの培養上清を混合し、3.2.3 を準用してウイルス含有量を測定する。

3.2.4.1.3 判定

検体の培養上清中のウイルス含有量は、強毒ウイルスの培養上清中のウイルス含有量より 100 倍以上高くなければならない。

3.2.4.2 トリプシン感受性マーカー試験

3.2.4.2.1 試験材料

3.2.4.2.1.1 試料

検体と強毒豚伝染性胃腸炎ウイルス SH 株を、それぞれリン酸緩衝食塩液 1 mL 中に $10^{6.0}$ TCID₅₀ を含むように調整したものを試料とする。

3.2.4.2.1.2 培養細胞

豚腎初代又は継代細胞を培養し、単層となったものを用いる。

3.2.4.2.2 試験方法

各試料をそれぞれ 2 等分し、一方にはリン酸緩衝食塩液 (pH7.2) を等量加え、他方にはリン酸緩衝食塩液で調整した 1 w/v %トリプシン溶液を等量加え、十分攪拌してから 37 °C の温水中に 2 時間静置する。次に、氷水中で冷却し、5 vol%牛血清加アール液を等量加え、3.2.3 を準用してウイルス含有量を測定する。

3.2.4.2.3 判定

検体のトリプシン処理によるウイルス含有量の低下は、強毒ウイルスのトリプシン処理によるウイルス含有量の低下を 100 倍以上上回らなければならない。

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ず、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、2.3.1 及び 2.3.2 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、抗豚伝染性胃腸炎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 $10^{7.5}$ TCID₅₀ 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

体重約 15kg の豚を用いる。

3.3.8.2 試験方法

試験動物 4 頭を試験群、1 頭を対照群とする。注射材料 60 頭分及び 1 頭分をそれぞれ試験群 2 頭ずつの皮下に注射し、対照群とともに同居飼育し、14 日間観察する。

3.3.8.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に異常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 の試験に用いた注射材料 1 頭分を注射した試験群及び対照群の動物を用いる。

3.3.9.1.2 中和試験用ウイルス

豚伝染性胃腸炎ウイルス TO-K 株又は適当と認められた株を用いる。

3.3.9.1.3 培養細胞

豚腎初代又は継代細胞若しくは豚精巣初代細胞を培養し、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、14 日目に得られた各個体の血清について、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 0.1 mL 中約 200TCID₅₀ の中和試験用ウイルス液 0.5mL とを混合し、37℃ で 90 分間処理する。この各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ 4 本（穴）の培養細胞に接種し、37℃ で 90 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 5 日間培養し、観察する。

3.3.9.3 判定

培養細胞の 2 本（穴）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。

試験群の中和抗体価は、8 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、2 倍未満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 抗豚伝染性胃腸炎ウイルス血清

豚伝染性胃腸炎ウイルス SH 株又は適当と認められた株で免疫した豚以外の動物の血清で、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

又はラクトアルブミン水解物 5.0 g

牛血清 50 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 7.0 ~ 7.4 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 3 強毒豚伝染性胃腸炎ウイルス SH 株

昭和 31 年静岡県下の野外発生例より分離した豚伝染性胃腸炎ウイルスを豚腎培養細胞で 17 代継代したもので、豚腎培養細胞に CPE を伴って増殖し、37℃ で培養するとき 1 mL 中 10^{6.0}T CID₅₀ 以上である。

なお、試験には豚腎培養細胞で継代3代以内のものを用いる。