

# 豚パルボウイルス感染症生ワクチン

## 1 定義

弱毒豚パルボ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

弱毒豚パルボウイルス HT<sup>+</sup>/SK 株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.2 性状

子豚に注射しても临床上異常を認めず、ウイルス血症及びウイルス排出を認めない。また、妊娠豚に注射しても胎仔・胎盤感染及び死亡を認めない。

豚腎由来細胞に接種したとき、32 での増殖は 37 での増殖を上回る。

#### 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培養細胞で継代する。

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、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

静置培養の場合は、個別培養細胞の 1 % 以上を、ファーメンター培養の場合は、個別培養細胞の 1 vol% 以上又は 500mL 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て、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、抗豚パルボウイルス血清（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

豚腎初代細胞又はESK細胞その他適当と認められた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（穴）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1mLを加え、31～32℃で10～14日間培養後、ペロナール緩衝食塩液（付記3）（以下「VBS」という。）で調製した0.5vol%の被凝集性の鶏又はモルモットの赤血球浮遊液をそれぞれ0.4mLずつ加え、室温で60分間静置した後、赤血球凝集の有無を観察する。

##### 3.2.3.3 判定

赤血球の凝集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、1mL中10<sup>5.7</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

### 3.2.4 マ - カ - 試験

#### 3.2.4.1 試験材料

##### 3.2.4.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液で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

豚腎初代細胞又はESK細胞その他適当と認められた細胞を小試験管に培養し、単層となったものを用いる。

##### 3.2.4.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ8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

ウイルス増殖用培養液 1 mL を加え、2 群に分け、31 ~ 32 及び 37 でそれぞれ 10 ~ 14 日間培養する。培養終了時に、3.2.3.2 の赤血球浮遊液をそれぞれ 0.4mL ずつ加え、室温で 60 分間静置した後、赤血球凝集の有無を観察する。

#### 3.2.4.3 判定

培養上清に赤血球の凝集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、32 で培養するとき、37 で培養する場合より 100 倍以上高くなければならない。

### 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ぬ。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ぬ。

#### 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、抗豚パルボ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<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

約 1 ~ 2 か月齢の豚を用いる。

###### 3.3.8.2 試験方法

試験動物 2 頭を試験群、1 頭を対照群とする。注射材料 1 mL ずつを試験群の動物の皮下に注射し、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 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 3.3.9.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

#### 3.3.9.1.3 赤血球凝集抗原

豚パルボウイルス 90HS 株又は適当と認められた株を用いて調製した赤血球凝集抗原（付記 4）を用いる。

#### 3.3.9.2 試験方法

注射材料 5 mL ずつを、5 匹の試験動物の腹腔内に 4 週間隔で 2 回注射し、第 2 回目の注射後 14 日目に得られた各個体の血清について、赤血球凝集抑制試験を行う。

被検血清を VBS で 5 倍に希釈し、等量の 25w/v% カオリン液を加え、室温で 20 分間処理する。遠心後の上清に鶏又はモルモットの赤血球を加え、室温で 15 分間処理し、再度遠心し、上清を採取する。これを VBS で 2 倍階段希釈し、各段階の希釈液に 8 単位の赤血球凝集抗原を等量加え、4 で一夜処理する。これに 3.2.3.2 の赤血球浮遊液を加え、室温で 60 分間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

#### 3.3.9.3 判定

赤血球凝集を阻止した血清の最高希釈倍数を血球凝集抑制抗体価とする。

赤血球凝集抑制抗体価 20 倍以上を赤血球凝集抑制抗体陽性とする。

試験動物の赤血球凝集抑制抗体陽性率は、80 % 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 抗豚パルボウイルス血清

豚パルボウイルス 90HS 株又は適当と認められた株で免疫した兔又はモルモットの血清で、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

牛血清 50 mL

又は牛血清アルブミン 1 g

イーグル MEM 残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.2 ~ 7.8 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 ペロナール緩衝食塩液 (pH7.2)

1,000mL 中

バルビタール 0.575 g

バルビタールナトリウム 0.375 g

塩化ナトリウム 8.5 g

水 残 量

#### 付記 4 赤血球凝集抗原

豚パルボウイルス 90HS 株又は適当と認められた株を用いて調製した赤血球凝集抗原で、赤血球凝集価は 64 倍以上のもの