

豚流行性下痢生ワクチン

平成18年8月16日付 農林水産省告示第1162号

1 定義

弱毒豚流行性下痢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

弱毒豚流行性下痢ウイルス P-5V 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

幼若豚にほとんど病原性を示さない。

Vero 細胞でトリプシンを添加することなく CPE を伴って増殖する。

トリプシンに感受性を示し、トリプシン非添加培養液で測定した時のウイルス含有量は、トリプシン添加培養液で測定した時より 100 倍以上高い。

2.1.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、Vero 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

Vero 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

原液に、適当と認められた希釈液及び安定剤を加えて調製し、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。

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、抗豚流行性下痢ウイルス血清（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

Vero細胞又は適当と認められた培養細胞を培養し、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分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液0.5mLを加え、37℃ 5 vol%炭酸ガス下で7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、1 mL中10^{6.3}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 試験材料

3.2.4.1.1 試料

検体を希釈液（付記3）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.4.1.2 培養細胞

Vero細胞又は適当と認められた培養細胞を培養し、単層となったものを用いる。

3.2.4.1.3 培養液

ウイルス増殖用培養液及び希釈液に結晶トリプシンを1 mL中2 µgに加えたトリプシン添加培養液を用いる。

3.2.4.2 試験方法

試料の0.1mLずつをそれぞれ8本（穴）の希釈液で2回洗浄した培養細胞に接種し、2群に分

ける。ウイルス増殖用培養液又はトリブシン添加培養液をそれぞれ1本(穴)当たり0.5mLずつ加え、37℃、5 vol %炭酸ガス下で7日間培養し、観察する。

3.2.4.3 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。

ウイルス増殖用培養液で測定したウイルス含有量は、トリブシン添加培養液で測定したウイルス含有量と比べ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、2.3.1 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、抗豚流行性下痢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^{4.5}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20～40kg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10頭分及び1頭分をそれぞれ試験群2頭ずつの筋肉内に注射し、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

Vero細胞で増殖させた豚流行性下痢ウイルスP-5V株を用いる。

3.3.9.1.3 培養細胞

細胞増殖用培養液（付記4）で調整した Vero 細胞浮遊液を用いる。

3.3.9.2 試験方法

3.3.8 の試験終了後 7 日目に、注射材料 1 頭分を注射した試験群に更に 1 頭分を筋肉内に注射し、その 7 日目に試験群及び対照群から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 0.1mL 中約 200TCID₅₀ を含む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）ずつに分注し、Vero 細胞浮遊液 0.5mL ずつを加え、37℃ 5 vol % 炭酸ガス下で 7 日間培養し、観察する。

3.3.9.3 判定

培養細胞の 2 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、16 倍以上でなければならない。この場合、対照群は 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、2 年間とする。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 抗豚流行性下痢ウイルス血清

豚流行性下痢ウイルスで免疫した兔又はやぎ血清で、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

牛又はやぎ血清 50 mL

イーグル MEM 残 量

炭酸水素ナトリウム液で pH を 7.2 ~ 7.6 に調整する。

牛又はやぎ血清は、豚流行性下痢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 3 希釈液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

イーグル MEM 残 量

炭酸水素ナトリウム液で 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。

付記 4 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

牛又はやぎ血清 100 ~ 150 mL

イーグル MEM 残 量

炭酸水素ナトリウム液で pH を 7.2 ~ 7.4 に調整する。

牛又はやぎ血清は、豚流行性下痢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。