

# 豚伝染性胃腸炎・豚流行性下痢混合生ワクチン

平成 19 年 8 月 29 日（告示第 1075 号）新規追加

## 1 定義

弱毒豚伝染性胃腸炎ウイルス及び弱毒豚流行性下痢ウイルスをそれぞれ培養細胞で増殖させて得たウイルス液を混合し、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 豚伝染性胃腸炎ウイルス

##### 2.1.1.1 名称

弱毒豚伝染性胃腸炎ウイルス h-5 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.1.2 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。

##### 2.1.1.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、MPK-a 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。

#### 2.1.2 豚流行性下痢ウイルス

##### 2.1.2.1 名称

弱毒豚流行性下痢ウイルス P-5 V 株又はこれと同等と認められた株

##### 2.1.2.2 性状

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。

##### 2.1.2.3 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 豚伝染性胃腸炎ウイルス

#### 2.2.1.1 培養細胞

MPK-a 細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

#### 2.2.1.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

### 2.2.2 豚流行性下痢ウイルス

#### 2.2.2.1 培養細胞

Vero 細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

#### 2.2.2.2 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 豚伝染性胃腸炎ウイルス原液

#### 2.3.1.1 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。

#### 2.3.1.2 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原液とする。

原液について、3.2.1、3.2.2.1 及び 3.2.3.1 の試験を行う。

### 2.3.2 豚流行性下痢ウイルス原液

#### 2.3.2.1 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。

#### 2.3.2.2 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原液とする。

原液について、3.2.1、3.2.2.2 及び 3.2.3.2 の試験を行う。ただし、特に承認されたものについては、3.2.4 の試験を行う。

## 2.4 最終バルク

各原液を混合し、適当と認められた安定剤を加えて調整し、最終バルクとする。必要に応じて、適当と認められた希釈液を加えることができる。

## 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 vol% 以上又は 500mL 以上を対照培養細胞とし、これについて次に掲げる試験を行う。

#### 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 回洗浄した後、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 分間静置した後、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

#### 3.2.2.1 豚伝染性胃腸炎ウイルス

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 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。

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。

#### 3.2.2.2 豚流行性下痢ウイルス

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 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。

ただし、中和用血清は、抗豚流行性下痢ウイルス血清（付記 2）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 豚伝染性胃腸炎ウイルス

##### 3.2.3.1.1 試験材料

###### 3.2.3.1.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記 3）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。

###### 3.2.3.1.1.2 培養細胞

豚精巢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。

##### 3.2.3.1.2 試験方法

試料の 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 5～7 日間培養し、観察する。

##### 3.2.3.1.3 判定

培養細胞に CPE 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、1 mL 中 10<sup>7.5</sup>TCID<sub>50</sub> 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。

#### 3.2.3.2 豚流行性下痢ウイルス

##### 3.2.3.2.1 試験材料

###### 3.2.3.2.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液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。

###### 3.2.3.2.1.2 培養細胞

Vero 細胞を培養し、単層となったものを用いる。

##### 3.2.3.2.2 試験方法

試料の 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℃、7 日間培養し、観察する。

ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

##### 3.2.3.2.3 判定

培養細胞に CPE 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、1 mL 中 10<sup>6.6</sup>TCID<sub>50</sub> 以上でなければならない。

ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、そのウイルス含有量とする。

### 3.2.4 マーカー試験

製造用株にマーカーがある場合には、次のように試験する。

#### 3.2.4.1 試験材料

##### 3.2.4.1.1 試料

検体を希釈液（付記4）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  $\mu$ g 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プ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 °C の 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、TCID<sub>50</sub> 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、トリプ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及び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

##### 3.3.7.1 豚伝染性胃腸炎ウイルス

3.2.3.1 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  $10^{5.5}$ TCID<sub>50</sub> 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。

##### 3.3.7.2 豚流行性下痢ウイルス

3.2.3.2 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  $10^{4.5}$ TCID<sub>50</sub> 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。

#### 3.3.8 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

2～3か月齢の豚を用いる。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その豚を用いる。

#### 3.3.8.2 試験方法

試験動物4頭を試験群とし、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の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。

#### 3.2.8.3 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又は3.3.9.2により行う。

#### 3.3.9.1 中和試験

##### 3.3.9.1.1 試験材料

##### 3.3.9.1.1.1 試験動物

3.3.8の試験に用いた動物のうち、注射材料1頭分を注射した豚及び対照群の豚を用いる。

##### 3.3.9.1.1.2 中和試験用ウイルス

製造用株をそれぞれ用いる。

##### 3.3.9.1.1.3 培養細胞

##### 3.3.9.1.1.3.1 豚伝染性胃腸炎ウイルス

豚精巢初代又は継代細胞を培養し、単層となったものを用いる。

##### 3.3.9.1.1.3.2 豚流行性下痢ウイルス

Vero細胞を細胞増殖用培養液（付記5）に細胞数が1mL中 $3 \times 10^{5.0}$ 個となるように浮遊させたもの（以下「Vero細胞浮遊液」という。）を用いる。

##### 3.3.9.1.2 試験方法

3.3.8の試験終了後7日目に注射材料1頭分を注射した豚に、更に1頭分を筋肉内に注射する。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。

##### 3.3.9.1.2.1 豚伝染性胃腸炎中和試験法

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200TCID<sub>50</sub>を含む中和試験用ウイルス液0.5mL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7日間培養し、観察する。

##### 3.3.9.1.2.2 豚流行性下痢中和試験法

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200TCID<sub>50</sub>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細胞浮遊液を0.5mLずつ加え、37℃で7日間培養し、観察する。

##### 3.3.9.1.3 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。

試験群の豚伝染性胃腸炎ウイルスに対する中和抗体価は128倍以上、豚流行性下痢ウイルスに対する中和抗体価は16倍以上でなければならない。この場合、対照群においては、いずれのウイルスに対しても2倍未満でなければならない。

#### 3.3.9.2 補体要求性中和試験

##### 3.3.9.2.1 試験材料

##### 3.3.9.2.1.1 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を用いる。

### 3.3.9.2.1.2 中和試験用ウイルス

製造用株をそれぞれ用いる。

### 3.3.9.2.1.3 培養細胞

3.2.3.1.1.2 の培養細胞及び Vero 細胞を細胞数が 1 mL 中  $3 \times 10^{5.0}$  となるように細胞増殖用培養液に浮遊させたものを用いる。

### 3.3.9.2.2 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 14 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。

#### 3.3.9.2.2.1 豚伝染性胃腸炎中和試験法

被験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 200TCID<sub>50</sub> 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）の 3.3.3.1.1.2 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 7 日間培養し、観察する。

#### 3.3.9.2.2.2 豚流行性下痢中和試験法

被験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 0.1mL 中 400TCID<sub>50</sub> を含む中和試験用ウイルス液とを 2 : 1 の割合で混合し、37℃ で 90 分間処理する。この混合液に、中和試験用ウイルス液と同量の 20vol% 量モルモット血清を添加したウイルス増殖用培養液を混合し、37℃ で 60 分間処理する。

この各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ 96 穴プレートの 4 穴ずつに接種し、Vero 細胞浮遊液を 0.1mL ずつ加え、37℃ で 7 日間培養し、観察する。

#### 3.3.9.2.3 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。試験群の豚伝染性胃腸炎ウイルスに対する中和抗体価は 128 倍以上、豚流行性下痢ウイルスに対する中和抗体価は 4 倍以上でなければならない。この場合、対照群においては、いずれのウイルスに対しても 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 9 か月間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、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で免疫した豚以外の動物の血清であって、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 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、豚又はやぎ血清であって、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 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 20 ~ 50 mL

イーグル MEM 残量

炭酸水素ナトリウム液で pH を 7.0 ~ 7.6 に調整する。

牛又はやぎ血清は、豚伝染性胃腸炎及び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4 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5 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

50 ~ 150 mL

イーグル MEM

残 量

炭酸水素ナトリウム液で pH を 7.0 ~ 7.6 に調整する。

牛又はやぎ血清は、豚伝染性胃腸炎及び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。