

豚コレラ・豚丹毒混合生ワクチン

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及び弱毒豚丹毒菌培養菌液を混合し、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 豚コレラウイルス株

2.1.1.1 名称

弱毒豚コレラウイルス GPE⁺株

2.1.1.2 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。

2.1.1.3 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。

2.1.2 豚丹毒菌株

2.1.2.1 名称

アクリフラビン耐性弱毒豚丹毒菌小金井 65 - 0.15 株

2.1.2.1 性状

0.02w/v% アクリフラビン加寒天培地で発育する。

原種菌は、別に定める規格に適合しなければならない。

2.1.2.2 継代及び保存

原種菌を種菌とする。

原種菌は、継代してはならない。

原種菌は、凍結乾燥して 5 以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 豚コレラウイルス

2.2.1.1 培養細胞

モルモット（付記 1）の腎初代細胞を用いる。

2.2.1.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

2.2.2 豚丹毒菌

2.2.2.1 培地

製造用培地（付記 2）又は相当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 豚コレラウイルス原液

2.3.1.1 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。

2.3.1.2 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。

2.3.1.3 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豚コレラウイルス原液とする。

豚コレラウイルス原液について、3.3 の試験を行う。

2.3.2 豚丹毒菌原液

2.3.2.1 培養

種菌を培地で溶解した後、培地に接種し、培養したものを豚丹毒菌培養菌液とする。

豚丹毒菌培養菌液について、3.4 の試験を行う。

2.3.2.2 原液の調製

培養菌液を遠心して菌体を採取し、適当と認められた安定剤に浮遊させた菌液を混合して豚丹毒菌原液とする。

豚丹毒菌原液について、3.5 の試験を行う。

2.4 最終バルク

豚コレラウイルス原液に、適当と認められた希釈液を加えて濃度調整したもの 1 容と、豚丹毒菌原液に適当と認められた安定剤を加えて濃度調整したもの 2 容とを混合し、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、3.6 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、3.7 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 3）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 4）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 5）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 6）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 7）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 8）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 ずつを各穴に加えて反応を停止させ、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。

3.2.4 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 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 豚コレラウイルス原液の試験

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

豚精巢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 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 を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ない (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 豚丹毒菌培養菌液の試験

3.4.1 夾雑菌否定試験

3.4.1.1 液状チオグリコール酸培地培養法

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、豚丹毒菌以外の菌の発育を認めてはならない。

3.4.1.2 普通寒天培地斜面培養法

3.4.1.2.1 培地

斜面の普通寒天培地を用いる。

3.4.1.2.2 試験方法

検体 0.5mL ずつを普通寒天培地の 4 本の斜面部に接種し、37℃ で 7 日間培養し、観察する。

3.4.1.2.3 判定

豚丹毒菌以外の菌の発育を認めてはならない。

3.5 豚丹毒菌原液の試験

3.5.1 夾雑菌否定試験

3.4.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.5.2 生菌数試験

3.5.2.1 試験材料

3.5.2.1.1 試料

検体を普通ブイヨン培地又は適当と認められた培地で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.5.2.1.2 培地

普通寒天培地又は適当と認められた培地を用いる。

3.5.2.2 試験方法

試料 1 mL ずつを平板混濁培養法により培地 2 枚以上に接種し、37 °C で 48 時間培養後、生じた豚丹毒菌の集落数を数える。

3.5.2.3 判定

各段階の希釈液ごとの集落数の平均値、希釈倍数及び培地への接種量から生菌数を算出する。
検体の生菌数は、1 mL 中 1×10^9 個以上でなければならない。

3.6 サブロットの試験

3.6.1 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。

3.6.2 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。

3.6.3 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。

3.6.4 夾雑菌否定試験

3.4.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.6.5 豚コレラ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。

ただし、試料は遠心した上清を用いる。

3.6.6 生菌数試験

3.5.2 を準用して試験するとき、試験品の生菌数は、1 頭分当たり 1×10^8 個以上でなければならない。

3.7 ロットの試験

3.7.1 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。

3.7.2 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、試料は遠心した上清を用いる。また、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を用いる。

3.7.3 豚丹毒菌同定試験

3.7.3.1 試験材料

試験品及び 0.02w/v% アクリフラビン加寒天培地を用いる。

3.7.3.2 試験方法

試験品 0.1mL を 0.02w/v% アクリフラビン加寒天培地 2 枚以上に接種し、培地表面に拡散させて、37 °C で 48 時間培養し、観察する。

3.7.3.3 判定

豚丹毒菌の発育が認められなければならない。

3.7.4 安全試験

3.7.4.1 豚注射試験

3.7.4.1.1 試験材料

3.7.4.1.1.1 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 頭分のワクチンが含まれるように溶解し、混合し、注射材料とする。

3.7.4.1.1.2 試験動物

体重 20 ~ 40kg の豚を用いる。

3.7.4.1.2 試験方法

注射材料 20mL ずつを 4 頭の試験動物の皮下に注射し、14 日間観察する。ワクチン注射時、試験動物の体重 1 kg 当たり、50,000 単位のペニシリンを筋肉内に注射する。

3.7.4.1.3 判定

観察期間中、試験動物に異常を認めてはならない。

3.7.4.2 マウス注射試験

3.7.4.2.1 試験材料

3.7.4.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.7.4.2.1.2 試験動物

4 週齢のマウスを用いる。

3.7.4.2.2 試験方法

試験動物 10 匹を試験群、5 匹を対照群とする。

注射材料 0.1mL ずつを試験群の内股部皮下に注射し、対照群とともに 10 日間生死を観察する。

3.7.4.2.3 判定

すべての試験動物が生存しなければならない。

3.7.5 毒力試験

3.7.5.1 試験動物

3.7.4.2 の試験に用いた動物を用いる。

3.7.5.2 試験方法

3.7.4.2 の試験の観察期間中、関節炎の発生の有無を検査する。

3.7.5.3 判定

試験群の 80 % 以上に関節炎が認められなければならない。この場合、対照群すべてに関節炎が認められてはならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、1 年 6 か月間とする。

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 製造用培地

1,000mL 中

ペプトン 20.0 g

塩化ナトリウム 5.0 g

ポリソルベート 80 1.0 mL

肉水 残量

pH を 7.8 ~ 8.0 に調整し、121 で 15 分間高圧滅菌する。

付記 3 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 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

又はラクトアルブミン水解物 5 g

牛又はやぎ血清 50 ~ 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 5 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 6 抗体希釈液

ハンクス液又は細胞増殖用培養液に牛血清アルブミン・フラクション V を 0.5 ~ 1.0w/v% となるように溶解したもの

付記 7 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 8 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。