

トリレオウイルス感染症（アジュバント加）不活化ワクチン

1 定義

トリレオウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化し、アルミニウムゲルアジュバントを添加したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

トリレオウイルス 58-132E50 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

8日齢の発育鶏卵の卵黄嚢内に注射すると増殖し、胚を死亡させる。鶏胚初代細胞で CPE を伴って増殖する。

2.1.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞で継代する。

継代は、原株では3代以内、種ウイルスでは2代以内でなければならない。

原株及び種ウイルスは、凍結して - 70 以下、又は凍結乾燥して 5 以下で保存する。

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 2.1.1 の鶏胚初代細胞又は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、遠心上清又はこれらを濃縮したものをウイルス浮遊液とする。

2.3.3 不活化

ウイルス浮遊液を適当と認められた方法により不活化し、原液とする。

原液について、3.3 の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液にアルミニウムゲルアジュバントを添加し、適当と認められた保存剤を添加し、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、小分製品とする。

小分製品について、3.5 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し、観察するとき、CPE を認めてはならない。

3.1.2 鶏赤血球凝集試験

3.1.1 の試験最終日に培養液を採取し、0.5vol%鶏赤血球浮遊液を等量加え、60 分間静置し、観察するとき、赤血球凝集を認めてはならない。

3.2 ウイルス浮遊液の試験

3.2.1 ウイルス含有量試験

3.2.1.1 試験材料

3.2.1.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液（付記 1）で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.1.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞を用いる。

3.2.1.1.3 試験方法

各段階の試料 0.5mL をそれぞれ 2 枚の培養細胞に接種し、37℃ で 90 分間吸着させた後、第 1 次重層寒天培地（付記 2）を重層し、37℃ 5 vol%炭酸ガス下で 4 日間培養する。その後、第 2 次重層寒天培地（付記 3）を重層し、更に 18 ~ 24 時間培養し、ブラック数を測定する。

3.2.1.1.4 判定

培養細胞にブラックを認めたものを感染とみなし、PFU を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 $10^{7.7}$ PFU 以上でなければならない。

3.3 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 不活化試験

3.3.2.1 試験材料

3.3.2.1.1 注射材料

検体を、1,000 倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、4℃ で一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.3.2.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞を用いる。

3.3.2.2 試験方法

試料を試験管 10 本以上の培養細胞に 0.1mL ずつ接種し、37℃ で 60 分間吸着させた後、試料を抜き取り、ウイルス増殖用培養液を加え、37℃ で 5 日間培養する。培養細胞を凍結融解した培養液を接種材料として同様の方法で 5 日間培養する。更にもう一代継代し、観察する。

3.3.2.3 判定

培養細胞に CPE を認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

3.4 小分製品の試験

3.4.1 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均質な懸濁液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。

3.4.2 pH 測定試験

一般試験法の pH 測定試験法を準用して試験するとき、pH は、固有の値を示さなければならない。

3.4.3 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。

3.4.4 チメロサル定量試験

チメロサル添加製剤については、一般試験法のチメロサル定量法を準用して試験するとき、

適合しなければならない。

3.4.5 ホルマリン定量試験

ホルマリン添加製剤については、一般試験法のホルマリン定量法を準用して試験するとき、ホルマリンの含有量は 0.2vol% 以下でなければならない。

3.4.6 アルミニウム定量試験

一般試験法のアルミニウム定量法を準用して試験するとき、1 mL 中 1.0mg 以下でなければならない。

3.4.7 安全試験

3.4.7.1 試験材料

3.4.7.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.4.7.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 4 ~ 5 週齢の鶏を用いる。

3.4.7.2 試験方法

試験動物 10 羽を試験群、3 羽を対照群とする。

注射材料の 1 羽分を試験群の下腿部筋肉内に注射し、対照群とともに 4 週間観察する。

3.4.7.3 判定

試験期間中、試験群及び対照群に臨床的な異常を認めてはならない。

3.4.8 力価試験

3.4.8.1 試験材料

3.4.8.1.1 試験動物

3.4.7 で用いた鶏を用いる。

3.4.8.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞又は 2.2.1 の鶏腎初代細胞を用いる。

3.4.8.1.3 中和試験用ウイルス

製造用株を鶏胚初代細胞で 37 で 72 時間培養後トリプシン処理（付記 4）したものをを用いる。

3.4.8.2 試験方法

3.4.7 の試験最終日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。

血清を非働化し、ウイルス増殖用培養液で 2 倍階段希釈する。各希釈血清及びウイルス対照としてウイルス増殖用培養液に等量の 0.1mL 中約 100PFU の中和試験用ウイルス液を混合し、それぞれ 4 で 18 ~ 24 時間処理する。この各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ 2 穴の培養細胞に接種し、37 で 90 分間吸着させる。それぞれの混合液を除き、第 1 次重層寒天培地を重層し、37 5 vol% 炭酸ガス下で 4 日間培養する。その後、第 2 次重層寒天培地を重層し、更に 24 時間培養し、ブラック数を測定する。

3.4.8.3 判定

被検血清のブラック数の平均値がウイルス対照のブラック数の平均値の 90 % 以下に減少した血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

試験群の 80 % 以上が中和抗体価 160 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、すべて 10 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、3 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 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

L-グルタミン	0.292 g
牛血清	20 mL
イーグル MEM	残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 7.2 に調整する。
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 2 第 1 次重層寒天培地

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス	2.95 g
牛血清	20 mL
寒天	10 g
イーグル MEM	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 第 2 次重層寒天培地

第 1 次重層寒天培地に 0.5w/v% ニュートラルレッド液を 2 vol% となるように加えたもの

付記 4 トリプシン処理

ウイルス材料にトリプシンを最終濃度 0.01w/v% となるように加えた後、よく混和し 37 °C で 30 分間処理する。