

ミンクウイルス性腸炎・ミンクボツリヌス症混合（アジュバント加）不活化ワクチン

1 定義

ミンク腸炎ウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液及びボツリヌスC型菌毒素を含む培養菌液をそれぞれ不活化したものを混合し、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 ミンク腸炎ウイルス株

2.1.1.1 名称

ミンク腸炎ウイルス L526R 株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

ミンクに経口的に投与すると下痢等の腸炎症状を示す。猫腎継代細胞に接種すると核内封入体を伴って増殖する。豚の赤血球を凝集する。

2.1.1.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、猫腎継代細胞又はその他の適当と認められた細胞で継代する。

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。

2.1.2 ボツリヌスC型毒素産生菌株

2.1.2.1 名称

ボツリヌスC型毒素産生菌 L931 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

ボツリヌスC型毒素産生を担うバクテリオファージを保有する。

2.2.3 継代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた培地で継代する。

原株及び種菌の継代は、それぞれ3代以内でなければならない。

原株及び種菌は、凍結して - 70 以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 ミンク腸炎ウイルス

2.2.1.1 培養細胞

猫腎継代細胞又は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 ボツリヌスC型毒素産生菌

2.2.2.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 ミンク腸炎ウイルス原液

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に接種し、37℃で培養し、ウイルスの増殖極期に個体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。

ウイルス浮遊液について、3.2の試験を行う。

2.3.1.3 不活化

ウイルス浮遊液にホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加えて不活化したものを不活化ウイルス液とする。

2.3.1.4 原液

不活化ウイルス液を混合し、原液とする。

原液について、3.4の試験を行う。

2.3.2 ポツリヌスC型毒素産生菌原液

2.3.2.1 培養菌液

種菌を培地に接種し、嫌気培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.3の試験を行う。

2.3.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加えて不活化し、原液とする。

原液について、3.4の試験を行う。

2.4 最終バルク

ミンク腸炎ウイルス原液及びポツリヌスC型毒素産生菌原液を混合し、最終バルクとする。この場合、適当と認められたアルミニウムゲルアジュバントを加える。又、適当と認められた保存剤を加えてもよい。

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。

3.1.1 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 赤血球吸着試験

3.1.1の試験最終日に培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を洗浄後、2群に分け、生理食塩液で調整したモルモット及び猫の0.1vol%赤血球浮遊液をそれぞれ重層し、60分間静置し、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 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

猫腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.2.1.2 試験方法

試料の0.1mLずつを、4本(穴)以上の培養細胞に加え、37℃で1~3日間培養後、液交換を行い、更に6~10日間培養する。

培養最終日に、各希釈試料の培養液について、これに牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液(付記2)を等量加える。さらに、この混合液と等量のVAD6.0液(付記3)で調整した0.5vol%豚赤

血球浮遊液を用いて赤血球凝集試験を行う。

3.2.1.3 判定

赤血球凝集を認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

ウイルス含有量は、1 mL 中 10^{3.5}TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.3 培養菌液の試験

3.3.1 夾雑菌否定試験

検体 0.05mL ずつを普通寒天平板 2 枚に塗抹し、好氣的に培養するとき、菌の発育を認めてはならない。

3.3.2 毒力試験

3.3.2.1 試験材料

3.3.2.1.1 注射材料

検体を生理食塩液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を注射材料とする。

3.3.2.1.2 試験動物

約 4 週齢のマウスを用いる。

3.3.2.2 試験方法

注射材料 0.1mL ずつをそれぞれ 5 匹のマウスの腹腔内に注射し、7 日間観察する。

3.3.2.3 判定

神経症状を示して死亡したマウスを中毒死とみなし、LD₅₀を算出する。

検体の毒力は、1 mL 中 10^{4.5}LD₅₀ 以上でなければならない。

3.4 原液の試験

3.4.1 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。

3.4.2 不活化試験

3.4.2.1 ミンク腸炎ウイルス

3.4.2.1.1 試験材料

3.4.2.1.1.1 試料

検体 1 mL 以上を 100 倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、2 ~ 5 で一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.4.2.1.1.2 培養細胞

猫腎継代細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

3.4.2.1.2 試験方法

試料の全量及び細胞増殖用培養液（付記 4）に浮遊させた猫腎継代細胞を同時に培養面積 25cm² 以上の培養びんで 37 で培養する。細胞が完全に単層を形成したときに、ウイルス増殖用培養液と交換し、10 日間観察する。観察最終日に培養びんの培養液を採取し、3.2.1.2 を準用し、赤血球凝集の有無を観察する。

3.4.2.1.3 判定

培養細胞に CPE、培養液に赤血球凝集を認めない場合、活性ウイルス陰性と判定する。

試料に活性ウイルスを認めてはならない。

3.4.2.2 ボツリヌス C 型毒素産生菌

3.4.2.2.1 試験材料

3.4.2.2.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.4.2.2.1.2 試験動物

体重約 350g のモルモットを用いる。

3.4.2.2.2 試験方法

注射材料 0.2mL ずつを 2 匹以上の試験動物の皮下に注射し、10 日間観察する。

3.4.2.2.3 判定

観察期間中、毒素による神経症状その他の異常を認めてはならない。

3.5 小分製品の試験

3.5.1 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ず、特有の臭気のほか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。

3.5.2 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。

3.5.3 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。

3.5.4 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。

3.5.5 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、0.5vol%以下でなければならない。

3.5.6 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、アルミニウムの含有量は、1 mL 中 1.5mg 以下でなければならない。

3.5.7 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性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。

3.5.8 安全試験

3.5.8.1 試験材料

3.5.8.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.8.1.2 試験動物

ミンクウイルス性腸炎及びミンクボツリヌス菌、ボツリヌス C 型毒素に対して抗体陰性のミンクを用いる。

3.5.8.2 試験方法

試験動物 10 頭を試験群、10 頭を対照群とする。

注射材料 1 頭分ずつを試験群に用法に従って注射し、対照群とともに 14 日間観察する。

3.5.8.3 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。

3.5.9 力価試験

3.5.9.1 ミンクウイルス性腸炎力価試験

3.5.9.1.1 試験材料

3.5.9.1.1.1 試験動物

3.5.8 の試験に用いた動物のうち、試験群 5 頭及び対照群 5 頭を用いる。

3.5.9.1.1.2 攻撃用ウイルス

適当と認められたミンク腸炎ウイルス株をミンクに投与し、感染極期のウイルス保有組織乳剤を用いる。

3.5.9.1.2 試験方法

3.5.8 の試験最終日に全てのミンクに対し攻撃用ウイルス 1 mL を経口投与し、14 日間観察する。

3.5.9.1.3 判定

試験群の 80 % 以上は、無症状で耐過しなければならない。この場合、対照群の 80 % 以上は、下痢等のミンクウイルス性腸炎症状を示さなければならない。

3.5.9.2 ミンクボツリヌス症力価試験

3.5.9.2.1 試験材料

3.5.9.2.1.1 試験動物

3.5.8 の試験に用いた動物のうち、試験群 5 頭及び対照群 5 頭を用いる。

3.5.9.2.1.2 攻撃用毒素

1 mL 当たり $10^{4.0}$ マウス LD₅₀ の毒素を用いる。

3.5.9.2.2 試験方法

3.5.8 の試験終了時に試験動物に攻撃用毒素 1 mL ずつを経口投与又は腹腔内注射し、7 日間観察する。

3.5.9.2.3 判定

試験群の 80 % 以上は、無症状で耐過しなければならない。この場合、対照群の 80 % 以上は、神経症状等のミンクボツリヌス症状を示さなければならない。

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 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

牛胎子血清 20 mL

イーグル MEM 残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.4 ~ 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 2 牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液

1,000mL 中

塩化ナトリウム 10.52 g

ホウ酸 3.09 g

水酸化ナトリウム 0.96 g

水 残 量

牛血清アルブミンを 0.2w/v% となるように加えたのち、水酸化ナトリウム液で pH を 9.0 に調整する。

付記 3 VAD6.0 液

1,000mL 中

塩化ナトリウム 8.77 g

無水リン酸水素二ナトリウム 5.68 g

リン酸二水素ナトリウム二水和物 40.56 g

水 残 量

牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液と等量混合して pH を 6.0 に調整する。

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
牛胎子血清	100 mL
イーグル MEM	残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.4 ~ 7.6 に調整する。必要最少量の抗生物質を加えてもよい。