

トリレオウイルス感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

平成 24 年 7 月 4 日（告示第 1622 号） 新規追加

平成 28 年 4 月 18 日（告示第 1020 号） 一部改正

1 定義

シードロット規格に適合したトリレオウイルスを同規格に適合した初代細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化し、油性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 マスターシードウイルス

2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、SPF 動物規格の 2.6 に適合した鶏胚初代細胞又は適当と認められた細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して -70°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1 の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、5 代以内でなければならない。

2.1.4 ワーキングシードウイルス

2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、SPF 動物規格の 2.6 に適合した鶏胚初代細胞又は適当と認められた細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して -70°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2 の試験を行う。

2.1.5 プロダクションシードウイルス

2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、SPF 動物規格の 2.6 に適合した鶏胚初代細胞又は適当と認められた細胞で増殖させる。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して -70°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 初代細胞

SPF 動物規格の 2.6 に適合した鶏胚初代細胞又は製造に適当と認められた細胞を用いる。

2.2.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.3 マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）

2.2.3.1 増殖、継代及び保存

マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）は、2.2.2 の培養液で増殖し、継代及び保存しない。

マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）について、3.2 の試験を行う。

2.3 原液

2.3.1 マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）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。ウイルス接種前の個別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、3.3 の試験を行う。

2.3.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを 2.3.1 の細胞で培養し、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をウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液について、3.4 の試験を行う。

2.3.3 不活化

ウイルス浮遊液を濃縮した後ホルマリンを加えて不活化したものを不活化ウイルス浮遊液とする。

不活化ウイルス浮遊液について、3.5 の試験を行う。

2.3.4 アジュバントの添加

不活化ウイルス浮遊液に適当と認められた油性アジュバントを添加し、原液とする。

原液について、3.6 の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液を混合し、濃度調整したものを最終バルクとする。

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、3.7 の試験を行う。

3 試験法

3.1 製造用株の試験

3.1.1 マスターシードウイルスの試験

3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の 1.4.2.3.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 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。

3.1.1.3 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。

3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.1、2.1 及び 2.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験

3.1.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験

鶏脳脊髄炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.1 及び 3.1.2 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、鶏脳脊髄炎ウイルスについて 3.1.1.4.2.2 に規定する試験を実施する製剤については、本試験を実施しなくてよい。

3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

鶏白血病ウイルス、細網内皮症ウイルス及び鶏脳脊髄炎ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 1.1、3.2.1、3.2.2 及び 3.2.10 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、鶏脳脊髄炎ウイルスについて 3.1.1.4.2.1 に規定する試験を実施する製剤については、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の 3.2.10 の試験を実施しなくてもよい。

3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

3.1.2.1 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。

3.1.2.2 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。

3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

3.1.3.1 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。

3.1.3.2 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。

3.2 初代細胞の試験

3.2.1 マスタープライマリーセルシード（プロダクションプライマリーセルシード）の試験

3.2.1.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.2.4.2.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2.1.2 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。

3.2.1.3 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。

3.3 個体別培養細胞の試験

個体別培養細胞の 1 % 以上又は 500mL 以上を対照培養細胞とし、これについて次の試験を行う。

3.3.1 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。

3.3.2 鶏赤血球凝集試験

3.3.1 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。

3.4 ウイルス浮遊液の試験

3.4.1 ウイルス含有量試験

3.4.1.1 試験材料

3.4.1.1.1 試料

検体はトリプシン処理（付記 1）した後、リン酸緩衝食塩液で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.4.1.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞で、単層になったものを用いる。

3.4.1.1.3 試験方法

各段階の試料 0.1mL をそれぞれ 2 枚の培養細胞に接種し、37 °C 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 °C、5 vol % 炭酸ガス下で 3 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。

3.4.1.1.4 判定

試料の各希釈段階の平均ブラック数からウイルスの含有量を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 $10^{7.0}$ PFU 以上でなければならない。

3.5 不活化ウイルス浮遊液の試験

3.5.1 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。

3.5.2 不活化試験

3.5.2.1 試験材料

3.5.2.1.1 注射材料

検体を、100 倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、4℃で1夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.5.2.1.2 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。

3.5.2.2 試験方法

試料の全量を、1 mLにつき 20cm² 以上の培養細胞に接種し、37℃で5日間培養した後、その培養上清を採取し、更に1代継代し、5日間培養し、観察する。

3.5.2.3 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。

3.6 原液の試験

3.6.1 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。

3.7 小分製品の試験

3.7.1 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、異物及び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。

3.7.2 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。

3.7.3 ホルマリン定量試験

適当と認められた方法で試験品を処理したものを試料とし、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。

3.7.4 安全試験

3.7.4.1 試験材料

3.7.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.7.4.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の5～7週齢の鶏を用いる。

3.7.4.2 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 1羽分ずつを試験群の頸部皮下に注射し、対照群と共に4週間観察する。

3.7.4.3 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。

3.7.5 力価試験

3.7.5.1 試験材料

3.7.5.1.1 試験動物

3.7.4 で用いた鶏を用いる。

3.7.5.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.2.1 の鶏腎初代細胞を用いる。

3.7.5.1.3 中和試験用ウイルス

生ワクチン製造用材料の規格 2.2.1 の鶏腎初代細胞で、ウイルス増殖用培養液（付記 4）を用いて 37℃で 72 時間培養後トリプシン処理したものをを用いる。

3.7.5.2 試験方法

3.7.4 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、リン酸緩衝食塩液で 2 倍階段希釈する。各希釈血清と 0.1mL 中に約 100PFU を含む中和試験用ウイルス液とを等量混合し、4℃で 18～24 時間又は 37℃で 60 分間処理する。各混合液 0.1mL ずつをそれぞれ 2 枚の培養細胞に接種し、37℃で 90 分間静置吸着させる。別に、中和試験用ウイルス液とリン酸緩衝食塩液とを等量混合し、希釈血清と同様に処理したものをウイルス対照とする。第 1 次重層寒天培地を重層し、37℃で 4 日間静置培養する。その後、第 2 次重層寒天培地を重層し、37℃で更に 24 時間静置培養し、観察する。

3.7.5.3 判定

プラック数を 90%減少させる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 320 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、全て 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、製造後 3 年 3 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 トリプシン処理

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

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

寒天 10 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 7.0～7.4 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tralレッド液を 2 vol %となるように加えたもの。

付記 4 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

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る。