

牛コロナウイルス感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチン

平成 19 年 5 月 18 日（告示第 692 号） 新規追加

1 定義

牛コロナウイルスを培養細胞で増殖させて得た感染細胞を可溶化処理した後、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

牛コロナウイルス No.66/H 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

生後 3 日以内の乳のみマウスの脳内に接種すると、神経症状を呈し死亡する。

BK 細胞、HAL 細胞、ヒト直腸ガン由来株化（HRT-18）細胞及び BEK-1 細胞で合胞体形成を特徴とする細胞変性効果（以下「CPE」という。）を伴って増殖する。

ラット、マウス、ハムスター及びニワトリ赤血球を凝集する。

2.1.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、HAL 細胞又は適当と認められた細胞で継代する。

継代は、原株にあつては 3 代以内、種ウイルスにあつては 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

HAL 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、CPE の極期に感染細胞と培養液を採取し、遠心した沈渣を個別ウイルス感染細胞とし、上清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。

2.3.3 可溶化

個別ウイルス感染細胞を可溶化処理した後遠心し、その上清から適当と認められた方法で可溶化剤を除去し、濃度調整したものを可溶化抗原液とする。

可溶化抗原液について、3.3 の試験を行う。

2.3.4 不活化

ウイルス浮遊液にホルマリンを加えて不活化したものを混合し、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

原液を濃度調整し、適当と認められた油性アジュバントを混合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、3.5 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。

3.2 ウイルス浮遊液の試験

3.2.1 赤血球凝集試験

3.2.1.1 試料

検体 0.4 mL を 0.1 w/v% 牛血清アルブミン加リン酸緩衝食塩液 (以下「BSA 加 PBS」という。)(付記 1) で用いて 2 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.1.2 試験方法

試料 0.4 mL に 1 vol % になるように調整したラット赤血球浮遊液をそれぞれ 0.2 mL ずつ加え、よく混和した後、常温に 1 ~ 2 時間静置し、赤血球凝集の有無を観察する。

3.2.1.3 判定

赤血球の凝集を認めた試料の最高希釈倍数で赤血球凝集価を表す。

検体の赤血球凝集価は、64 倍以上でなければならない。

3.3 可溶化抗原液の試験

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 赤血球凝集試験

3.2.1 を準用して試験するとき、検体の赤血球凝集価は、8,000 倍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

3.4.1.1 試験材料

3.4.1.1.1 試料

100 倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、検体 2 mL を 4 で一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.4.1.1.2 培養細胞

HAL 細胞を小試験管に 1 ~ 2 日間培養し、単層となったものを用いる。

3.4.1.2 試験方法

試料の 0.1 mL ずつを 10 本の小試験管の HAL 細胞に接種し、37 で 60 分間吸着させた後、試料を抜き取り、イーグル MEM で 1 回細胞を洗浄した後、ウイルス増殖用培養液 (付記 2) を 0.5mL ずつ加え、37 で 7 日間回転培養し、観察する。

3.4.1.3 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。

3.4.2 赤血球凝集試験

3.2.1 を準用して試験するとき、検体の赤血球凝集価は、8,000 倍以上でなければならない。

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、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 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。

3.5.3 ホルマリン定量試験

適当と認められた方法により油性アジュバントを除いた試料を用い、一般試験法のホルマリン定量試験法により試験するとき、ホルマリンの含有量は、0.015vol %以下でなければならない。

3.5.4 毒性限度確認試験

一般試験法の毒性限度確認試験法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、注射量は2 mLとし、注射後の体重測定は2日目とする。

3.5.5 力価試験

3.5.5.1 試験材料

3.5.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.5.1.2 試験動物

体重約350 gのモルモットを用いる。

3.5.5.1.3 赤血球凝集抗原

赤血球凝集価は、64倍以上に調整した牛コロナウイルス No.66/H株を用いる。

3.5.5.2 試験方法

注射材料0.5 mLずつを5匹の試験動物に3週間隔で2回筋肉内注射し、2回目の注射後7日目に得られた各個体の血清について赤血球凝集抑制試験を行う。

非働化した被検血清0.1 mLに0.1 w/v % BSA加PBS 0.4 mL及び25 w/v %カオリン生理食塩液(付記3)0.5 mLを加え、常温で20分間処理した後、1,700 G、10分間遠心し、その上清にラット赤血球の遠心沈渣を0.06 mL加え、よく混合した後、常温で20分間処理し、1,700 G、10分間遠心し、その上清を試料とする。

赤血球凝集抑制試験は、マイクロタイター法で行う。

試料25 µLを0.1 w/v % BSA加PBS 25 µLで2倍階段希釈し、各希釈液に4単位の赤血球凝集抗原を25 µL加え、常温で60分間処理する。それに0.1 w/v % BSA加PBSに浮遊させた1 vol %ラット赤血球浮遊液を25 µL加え、常温で1~2時間静置し、観察する。

3.5.5.3 判定

赤血球の凝集を阻止した血清の最高希釈倍数を赤血球凝集抑制抗体価とする。

赤血球凝集抑制抗体価160倍以上を赤血球凝集抑制抗体陽性とする。

試験動物の赤血球凝集抑制抗体陽性率は、80%以上でなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、2年6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 0.1 w/v %牛血清アルブミン加リン酸緩衝食塩液

A液 5 w/v %牛血清アルブミン加リン酸緩衝食塩液

100 mL中

牛血清アルブミン

5.0 g

水

残量

使用時にリン酸緩衝食塩液196 mLとA液4 mLを加えて調製する。

付記2 ウイルス増殖用培養液

1,000 mL 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 7.2 ~ 7.6 に調整する。

胎子血清は、牛コロナ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3 25w/v %カオリン生理食塩液

1,000mL 中

カオリン

250 g

塩化ナトリウム

8.75 g

水

残 量

水酸化ナトリウムで pH を 7.2 ~ 7.4 に調整する。