

牛流行熱・イバラキ病混合（アジュバント加）不活化ワクチン

平成 8 年 8 月 1 6 日付 農林水産省告示第 1162 号

1 定義

牛流行熱ウイルス及びイバラキウイルスをそれぞれ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後混合したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 牛流行熱ウイルス

2.1.1.1 名称

牛流行熱ウイルス YHL 株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

HmLu-1 細胞で CPE を伴って増殖する。

2.1.1.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、HmLu-1 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 イバラキウイルス

2.1.2.1 名称

弱毒イバラキウイルス No.2 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

牛腎継代細胞、鶏胚初代細胞、HmLu-1 細胞及び BHK-21(C-13)細胞で CPE を伴って増殖する。

2.1.2.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、HmLu-1 細胞又は BHK-21(C-13)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 牛流行熱ウイルス

2.2.1.1 培養細胞

HmLu-1 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 イバラキウイルス

2.2.2.1 培養細胞

HmLu-1 細胞又は BHK-21(C-13)細胞を用いる。

2.2.2.2 培養液

製造に相当と認められた認められた培養液を用いる。

2.3 原液

2.3.1 牛流行熱ウイルス原液

2.3.1.1 細胞の培養

1 回に処理し、培養した細胞を個体別培養細胞とみなす。ウイルス接種前の細胞に異常を認めてはならない。

個体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又は遠心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。

2.3.1.3 不活化

ウイルス浮遊液にホルマリンを 0.2vol % となるように加える方法又はその他適当と認められた方法によりウイルス浮遊液を不活化し、不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.3 の試験を行う。

2.3.1.4 原液

不活化ウイルス液に適当と認められたアルミニウムゲルアジュバントを添加し、原液とする。

原液について、3.4 の試験を行う。

2.3.2 イバラキウイルス原液

2.3.2.1 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。

2.3.2.2 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又は遠心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。

2.3.2.3 不活化

ウイルス浮遊液にホルマリンを 0.1vol % となるように加える方法又はその他適当と認められた方法によりウイルス浮遊液を不活化し、不活化ウイルス液とする。

不活化ウイルス液について、3.3 の試験を行う。

2.3.2.4 原液

不活化ウイルス液に適当と認められたアルミニウムゲルアジュバントを添加し、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

牛流行熱ウイルス原液及びイバラキウイルス原液を混合し、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 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 2 回洗浄後、2 群に分け、生理食塩液で調整した 0.1vol % のモルモット及びがちょう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 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 牛流行熱ウイルス

3.2.1.1.1 試験材料

3.2.1.1.1.1 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。

3.2.1.1.1.2 培養細胞

HmLu-1細胞を小試験管に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

3.2.1.1.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を0.5mLずつ加え、34℃で7日間回転培養し、観察する。

3.2.1.1.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10^{6.0} TCID₅₀以上でなければならない。

3.2.1.2 イバラキウイルス

3.2.1.2.1 試験材料

3.2.1.2.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.1.2.1.2 培養細胞

HmLu-1細胞を小試験管に1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

3.2.1.2.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4本以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を0.5mLずつ加え、37℃で7日間回転培養し、観察する。

3.2.1.2.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10^{6.0} TCID₅₀以上でなければならない。

3.3 不活化ウイルス液の試験

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 牛流行熱ウイルス

3.3.2.1.1 試験材料

3.3.2.1.1.1 試料

100倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、検体5 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。

3.3.2.1.1.2 培養細胞

HmLu-1細胞を培養びんで1～3日間培養し、単層となったものを用いる。

3.3.2.1.2 試験方法

試料の全量を1 mLにつき3 cm²以上の培養細胞に接種し、34℃で60分間静置吸着させた後、試料を抜き取り、ウイルス増殖用培養液を加え、34℃で7日間培養し、観察する。

3.3.2.1.3 判定

培養細胞にCPEを認めない場合、活性ウイルス陰性とする。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

3.3.2.2 イバラキウイルス

3.3.2.2.1 試験材料

3.3.2.2.1.1 試料

100倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、検体5 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。

3.3.2.2.1.2 培養細胞

HmLu-1 細胞を培養びんで 1 ~ 3 日間培養し、単層となったものを用いる。

3.3.2.2.2 試験方法

試料の全量を 1 mL につき 3 cm² 以上の培養細胞に接種し、34 °C で 60 分間静置吸着させた後、試料を抜き取り、ウイルス増殖用培養液を加え、34 ~ 36 °C で 5 日間培養後、細胞を次代に継代する。継代後 2 日目に培養液を抜き取り、ウイルス増殖用培養液を加え、34 ~ 36 °C で 5 日間培養後更に次代へ継代し、2 代と同様の方法で培養し、観察する。

3.3.2.2.3 判定

培養細胞に CPE を認めない場合、活性ウイルス陰性とする。

検体に活性ウイルスを認めてはならない。

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。

3.5 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。

3.5.2 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 ホルマリン定量試験

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、0.15vol% 以下でなければならない。

3.5.5 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 mg 以下でなければならない。

3.5.6 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。

3.5.7 力価試験

3.5.7.1 試験材料

3.5.7.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.7.1.2 試験動物

体重約 350 g のモルモットを用いる。

3.5.7.1.3 中和試験用ウイルス

3.5.7.1.3.1 牛流行熱ウイルス

HmLu-1 細胞で増殖させた牛流行熱ウイルス YHL 株を用いる。

3.5.7.1.3.2 イバラキウイルス

牛腎継代細胞で増殖させたイバラキウイルス No.2 株を用いる。

3.5.7.1.4 培養細胞

HmLu-1 細胞を小試験管に 1 ~ 3 日間培養し、単層となったものを用いる。

3.5.7.2 試験方法

注射材料 0.5mL ずつを 5 匹の試験動物に 3 週間隔で 2 回筋肉内注射し、第 2 回目の注射後 10 日

目に得られた各個体の血清について中和試験を行う。

被検血清を非働化した後、ウイルス増殖用培養液で2倍階段希釈する。各希釈血清0.5mLと0.1mL中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液0.5mLとを等量混合し、牛流行熱ウイルスは34℃で60分間、イバラキウイルスでは37℃で60分間処理する。この各混合液0.1mLずつをそれぞれ4本の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液を0.5mLずつ加え、牛流行熱ウイルスは34℃で、イバラキウイルスでは37℃で7日間回転培養し、観察する。

3.5.7.3 判定

培養細胞の2本以上にCPEの阻止を認めた血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

中和抗体価2倍以上を中和抗体陽性とする。

試験動物の中和抗体陽性率は、それぞれのウイルスに対して、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年間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合は、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
グルタミン酸ナトリウム	4.0 g
ブドウ糖	1.0 g
酵母エキス	0.5 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7.2～7.6に調整する。

牛血清は、牛流行熱ウイルス及びイバラキ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。