

トリニューモウイルス感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチン

平成 20 年 6 月 6 日（告示第 913 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

弱毒七面鳥鼻気管炎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、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

弱毒七面鳥鼻気管炎ウイルス BUT1 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

鶏胚初代細胞、鶏腎初代細胞又は Vero 細胞に接種すると、CPE を伴って増殖する。6 ～ 12 日齢の発育鶏卵の卵黄嚢内及び尿膜腔内に接種しても、鶏胚に異常を示さない。

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。

原株及び原種ウイルスは、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。

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製造に相当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.2 培養液

製造に相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及び超音波処理した感染細胞の遠心上清を混合し、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 不活化

ウイルス浮遊液に β -プロピオラク톤を加えて不活化し、不活化ウイルス浮遊液とする。この不活化浮遊液を原液としてもよい。

不活化ウイルス浮遊液について、3.3 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相当と認められた油性アジュバントを添加し、原液とする。

ただし、最終バルクの調製時にアジュバントを添加してもよい。

原液について 3.4 の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液を混合し、濃度調整し、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 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

検体を細胞増殖用培養液（付記1）で調製した鶏胚初代細胞浮遊液で10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.1.1.2 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。

3.2.1.2 試験方法

試料200 μ L ずつを、それぞれ96 穴組織培養用プレートの5 穴以上に接種し、37 $^{\circ}$ Cで5～7 日間培養し、観察する。

3.2.1.3 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^{6.5}TCID₅₀以上でなければならない。

3.3 不活化ウイルス浮遊液の試験

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 抗原含有量試験

3.3.2.1 試験材料

3.3.2.1.1 試料

検体を洗浄用緩衝液（付記2）で2倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.2.2 試験方法

七面鳥鼻気管炎ウイルスを認識するモノクローナル抗体を固相化したELISAプレートに各試料及び陰性対照を50 μ L ずつ添加し、37 $^{\circ}$ Cで45 分間反応させる。反応終了後洗浄用緩衝液で3回洗浄した後、七面鳥鼻気管炎ウイルス抗体陽性鶏血清を50 μ L ずつ添加し、37 $^{\circ}$ Cで30 分間反応させる。反応終了後洗浄用緩衝液で3回洗浄した後、山羊抗鶏IgGペルオキシダーゼ標識抗体を50 μ L ずつ添加し、37 $^{\circ}$ Cで30 分間反応させる。反応終了後洗浄用緩衝液で3回洗浄した後、基質液（付記3）を50 μ L ずつ添加し、室温で10 分間反応させる。反応終了後、反応停止液（付記4）を25 μ L ずつ加えて、反応を停止させる。

3.3.2.3 判定

波長450 nmで吸光度値を測定する。陰性対照より2倍以上の吸光度値を示す最終希釈倍数を相対抗原量とする。

検体の抗原量は、250 EU/mL 以上でなければならない。

3.3.3 不活化試験

3.3.3.1 試験材料

3.3.3.1.1 試料

検体を試料とする。

3.3.3.1.2 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。

3.3.3.2 試験方法

試料の全量を 1 mL につき 20 cm² 以上の培養細胞に接種し、37 °C で 5 日間培養した後、その培養上清を 0.1mL 採取し、更に継代し、5 日間培養して観察する。

3.3.3.3 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 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 安全試験

3.5.3.1 試験材料

3.5.3.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.3.1.2 試験動物

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の 4 週齢の鶏を用いる。

3.5.3.2 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 羽ずつを試験群の頸部皮下に注射し、対照群とともに 4 週間観察する。

3.5.3.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に臨床的な異常を認めてはならない。

3.5.4 力価試験

3.5.4.1 試験材料

3.5.4.1.1 試験動物

3.5.3 の試験に用いた動物を用いる。

3.5.4.2 試験方法

3.5.3 の試験終了日に試験群及び対照群から採取した血清について、ELISA 抗体価を測定する。

固相化緩衝液（付記 5）で濃度調整した七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原（付記 6）を 96 穴平底マイクロプレートに 100 μL ずつ分注し、37 °C で 3 時間反応後、洗浄用緩衝液で 2 回洗浄し、乾燥させる。次に被検血清を IB・EIA 緩衝液（付記 7）で 2 倍階段希釈し、固相化プレートに各希釈血清を 100 μL ずつ加え、37 °C で 30 分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で 2 回洗浄し、水切りを行った後、山羊抗鶏 IgG ペルオキシダーゼ標識抗体（付記 8）を 100 μL ずつ加え、37 °C で 30 分間反応させる。反応終了後、洗浄用緩衝液で 2 回洗浄し、水切りを行った後、基質液を 100

μ L ずつ加え、室温で8分間反応させる。反応終了後、反応停止液を50 μ L ずつ加えて、反応を停止させ、波長450 nmで吸光度値を測定する。

3.5.4.3 判定

参照陰性血清（付記9）の平均吸光度値の少なくとも1.5倍の吸光度値を示す血清の希釈倍数をELISA抗体価とすると、試験群の80%以上がELISA抗体価 $2^{9.64}$ 倍以上を示さなければならない。この場合、対照群はすべて $2^{4.64}$ 倍未満でなければならない。また、参照陽性血清（付記10）は、 $2^{6.64}$ 倍以上の抗体価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は、その期間とする。

付記1 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	0.83 g
トリプトース	1.00 g
ラクトアルブミン水解物	1.25 g
炭酸水素ナトリウム	2.45 g
牛血清	50 mL
イーグル MEM	残 量

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記2 洗浄用緩衝液

1,000 mL 中	
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	2.9 g
リン酸二水素カリウム	0.2 g
塩化ナトリウム	37.2 g
塩化カリウム	0.2 g
ポリソルベート 20	1.5 g
水	残 量

pH を 6.9 ~ 7.1 に調整する。

付記3 基質液

TMB 溶液	0.2 mL
UP 緩衝液	1.5 mL
水	15 mL

TMB 溶液は、DMSO 1,000 mL に TMB (3,3', 5,5' テトラメチルベンチジン) を 6 g 溶かしたもの

UP 緩衝液は、尿素過酸化 140 mg を TMB 緩衝液 (酢酸ナトリウム 136 g を約 500 mL の水に溶かし、1.5 mol/L クエン酸で pH5.3 ~ 5.7 に調整した後、水を加えて 1,000 mL とし、121 °C で 20 分間高圧滅菌したもの) 100mL に溶かしたもの

付記4 反応停止液

硫酸	110 mL
水	1000 mL

付記5 固相化緩衝液

1,000mL 中	
リン酸二水素ナトリウム二水和物	1.43 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	12.10 g
塩化ナトリウム	8.5 g
水	残 量

pH を 6.9 ~ 7.1 に調整する。

付記 6 七面鳥鼻気管炎ウイルス抗原

製造用株を生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏胚初代細胞に接種し、38 °Cで培養する。CPE が出現したときに培養上清を採取し、感染細胞は少量の培養液でかきとり、超音波破碎を行う。感染細胞の超音波破碎後遠心 (3,000G、10 分) し、その遠心上清と製造用株培養上清をプールする。次に 30,000G、1 時間遠心し、沈渣を少量の滅菌水に再浮遊する。再浮遊したものをショ糖密度勾配遠心 (53,000G、1 時間) した後、上層を採取し、これを ELISA 抗原とする。

参照陽性血清の 100 倍希釈液の吸光度値を測定するとき 0.8 以上、及び参照陰性血清では 0.2 以下を示すように調整する。

付記 7 IB・EIA 緩衝液

1,000 mL 中	
リン酸二水素ナトリウム二水和物	2.31 g
リン酸水素二ナトリウム二水和物	24.06 g
塩化ナトリウム	29.22 g
カオリン処理 30 w/v %牛血清アルブミン	3.3 mL
ポリソルベート 20	0.50 g
水	残 量

200nm でろ過滅菌後、スキムミルク 2 w/v %及び牛胎子血清 5 vol %を加える。

付記 8 山羊抗鶏 IgG ペルオキシダーゼ標識抗体

参照陽性血清が規定の抗体価を示すように IB・EIA 緩衝液で調整したもの

付記 9 参照陰性血清

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏血清で、ELISA 抗体価 $2^{4.64}$ 倍未満を示すもの

付記 10 参照陽性血清

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏を弱毒七面鳥鼻気管炎ウイルス BUT 1 # 8544 株の生ウイルスで免疫して得た血清で、ELISA 抗体価 $2^{8.64} \sim 2^{9.64}$ 倍を示すもの