

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

平成 18 年 8 月 16 日（告示第 1162 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

トリレオ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

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 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

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、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、3.2 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、3.3 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、3.4 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。

3.1.1 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

検体はトリプシン処理（付記1）したのち、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。

3.2.1.1.2 培養細胞

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

3.2.1.1.3 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℃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℃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、プラック数を測定する。

3.2.1.1.4 判定

試料の各希釈段階の平均プ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。

3.3 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 不活化試験

3.3.2.1 試験材料

3.3.2.1.1 注射材料

検体を、1,000 倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、4℃で一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.3.2.1.2 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。

3.3.2.2 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。

3.3.2.3 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。

3.4 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。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。

3.5.4 安全試験

3.5.4.1 試験材料

3.5.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.4.1.2 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。

3.5.4.2 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、対照群とともに 4 週間観察する。

3.5.4.3 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。

3.5.5 力価試験

3.5.5.1 試験材料

3.5.5.1.1 試験動物

3.5.4 で用いた鶏を用いる。

3.5.5.1.2 培養細胞

生ワクチン製造用材料の規格 2.1.1 の鶏腎初代細胞を用いる。

3.5.5.1.3 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 2）を用いて 37℃で 72 時間培養後トリプシン処理（付記 1）したものをを用いる。

3.5.5.2 試験方法

3.5.4 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 0.1 mL 中に約 100 PFU 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 0.1 mL 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（付記 3）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（付記 4）を重層し、37℃で更に 24 時間静置培養し、観察する。

3.5.5.3 判定

ブラック数を 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、すべて 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、3 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 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 0.01 w/v % となるように加えた後よく混和し、37 °C で 30 分間処理する。

付記2 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

2.95g

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。

付記3 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4 第2次重層寒天培地

第1次重層寒天培地に 0.5w/v % ニューラルレッド液を 2 vol % となるように加えたもの