

イリドウイルス病・ぶり α 溶血性レンサ球菌症混合 不活化ワクチン

平成23年10月 4日(告示第1911号)新規追加
平成23年11月15日(告示第2266号)一部改正

1 定義

マダイイリドウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液及びラクトコッカス・ガルビエの培養菌液をそれぞれ不活化したものを混合したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 マダイイリドウイルス

2.1.1.1 名称

マダイイリドウイルス Ehime-1/GF14 株又はこれと同等と認められた株

2.1.1.2 性状

GF細胞でCPEを伴って増殖し、イリドウイルス感染症に対する免疫原性を有する。

2.1.1.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、GF細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

継代は、原株では2代以内、種ウイルスでは3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°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

2.1.2 ラクトコッカス・ガルビエ

2.1.2.1 名称

ラクトコッカス・ガルビエ No.43 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2.2 性状

ラクトコッカス・ガルビエ KG(一)型に一致する性状を示し、 α 溶血性レンサ球菌症に対する免疫原性を有する。

2.1.2.3 継代及び保存

原株及び種菌は、適当と認められた培地で継代する。

継代は、原株では3代以内、種菌では5代以内でなければならない。

原株及び種菌は、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 マダイイリドウイルス

2.2.1.1 培養細胞

GF細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.1.2 培養液

製造に適当と認められた培養液を用いる。

2.2.2 ラクトコッカス・ガルビエ

2.2.2.1 培地

製造に適当と認められた培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 マダイイリドウイルス

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する。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。

2.3.1.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、個別培養細胞ごとに採取した培養液の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又は適当と認められた不活化剤を加えて、不活化したものを原液とする。

原液について、3.4 の試験を行う。

2.3.2 ラクトコッカス・ガルビエ

2.3.2.1 培養

培養した種菌を培地に接種し、培養したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.3 の試験を行う。

2.3.2.2 不活化

培養菌液にホルマリンを加えて不活化した後、濃縮した菌を適当と認められた希釈溶液に浮遊させたものを原液とする。

原液について、3.4 の試験を行う。

2.4 最終バルク

それぞれの原液を調整して混合し、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5%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、25℃で7日間隔で2代まで継代培養し、観察するとき、いずれの継代においても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 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。

3.2.2 ウイルス含有量試験

3.2.2.1 試験材料

3.2.2.1.1 試料

検体をウイルス含有量試験用培養液（付記1）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.2.1.2 培養細胞

GF細胞をウイルス含有量試験用培養液に約 2×10^5 個/mLの濃度で浮遊させ、24穴のプレートに1mLずつ分注したものをを用いる。

3.2.2.2 試験方法

試料0.1mLずつをそれぞれ4穴以上の培養細胞に接種し、25℃で14日間培養して、CPEの有無を観察する。

3.2.2.3 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 培養菌液の試験

3.3.1 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、ラクトコッカス・ガルビエ以外の菌の発育を認めてはならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験法とする。

3.3.2 生菌数試験

3.3.2.1 試験材料

3.3.2.1.1 試料

検体をリン酸緩衝食塩液又は適当と認められた培地で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.2.1.2 培地

ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト寒天培地又は適当と認められた培地を用いる。

3.3.2.2 試験方法

各試料の 0.1mL ずつを培地 2 枚以上に接種して培地表面に拡散させたものを、適当と認められた温度及び時間で培養した後、生じた集落数を数える。

3.3.2.3 判定

各試料の集落数から生菌数を算出する。

検体中の生菌数は、1 mL 当たり 10^7 個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

3.4.2.1 マダイイリドウイルス

3.4.2.1.1 試験材料

3.4.2.1.1.1 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。

3.4.2.1.1.2 培養細胞

GF 細胞を不活化試験用培養液（付記 2）に約 2×10^5 個/mL の濃度で浮遊させたものを用いる。

3.4.2.1.2 試験方法

試料の全量を 100mL 以上の培養細胞に接種し、25℃ で 7 日間培養した後、その培養細胞を EDTA・トリプシン液で処理して細胞を分散し、不活化試験用培養液に再浮遊し、更に 25℃ で 7 日間培養する。

3.4.2.1.3 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。

3.4.2.2 ラクトコッカス・ガルビエ

3.4.2.2.1 試験材料

3.4.2.2.1.1 試料

検体を試料とする。

3.4.2.2.1.2 培地

ブレイン・ハート・インフュージョン寒天培地（付記 3）又は適当と認められた培地を用いる。

3.4.2.2.2 試験方法

接種材料 0.1mL ずつを平板培地 5 枚に接種して培地表面に拡散させたものを適当と認められた温度で 7 日間培養した後、集落の有無を観察する。

3.4.2.2.3 判定

接種した全ての培地に集落を認めてはならない。

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液剤でなければならず、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。

3.5.2 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、0.1vol %以下でなければならない。

3.5.5 安全試験

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

水温 25℃、循環式で7日間以上飼育し、異常のないことを確認した体重 10g 以上のかんばち又はぶり 30 尾以上を用いる。

3.5.5.2 試験方法

試験動物は、24 時間以上餌止めした後、1 群 15 尾以上ずつの 2 群に分ける。1 群の試験動物に、注射材料 0.1mL を腹腔内に注射し、試験群とする。他の 1 群は、対照群とし、試験群と同様の方法でリン酸緩衝食塩液を注射する。その後、それぞれ水温 25℃、循環式で飼育し、14 日間観察する。

3.5.5.3 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。

3.5.6 力価試験

3.5.6.1 イリドウイルス感染症力価試験

3.5.6.1.1 試験材料

3.5.6.1.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.6.1.1.2 試験動物

水温 22～28℃で7日間以上飼育し、異常のないことを確認した体重 5～15g のマダイ 180 尾以上を用いる。

3.5.6.1.1.3 攻撃用ウイルス液

マダイイリドウイルス強毒株（付記 4）の培養ウイルス液を希釈液（付記 5）で 10 倍階段希釈し、対照群の死亡率が 80 %と予測される希釈とその前後の希釈の 3 段階の希釈ウイルス液を攻撃用ウイルス液とする。

3.5.6.1.2 試験方法

試験動物は、24 時間以上餌止めした後、1 群 90 尾以上ずつの 2 群に分ける。1 群の試験動物に、注射材料 0.1mL ずつを腹腔内に注射し、試験群とする。他の 1 群を対照群とする。それぞれ水温 22～28℃、循環式で 10 日間飼育する。

前日から 24 時間餌止めした試験群及び対照群をそれぞれ 30 尾以上の 3 群ずつに分け、それぞれ

の攻撃用ウイルス液 0.1mL を腹腔内に注射して攻撃し、14 日間観察して各群の生死を調べる。

3.5.6.1.3 判定

対照群の 60 %以上が死亡した攻撃用ウイルスの希釈段階のうち、少なくとも 1 段階において、試験群の生存率が対照群のそれより 40 %以上高い値を示さなければならない。

3.5.6.2 α 溶血性レンサ球菌症力価試験

3.5.6.2.1 試験材料

3.5.6.2.1.1 試験動物

3.5.5 の試験に用いた動物を用いる。

3.5.6.2.1.2 攻撃用菌液

ラクトコッカス・ガルビエ強毒菌（付記 6）の液体培養菌液をリン酸緩衝食塩液で希釈し、対照群の死亡率が 80 %と予測される希釈菌液を攻撃用菌液とする。

3.5.6.2.2 試験方法

3.5.5 の試験最終日の前日から 24 時間餌止めした試験群及び対照群それぞれ 15 尾以上に、攻撃用菌液 0.1mL ずつを腹腔内に注射して攻撃した後、水温 25 °C、循環式で飼育し、14 日間観察して各群の生死を調べる。

3.5.6.2.3 判定

試験群の生存率は、対照群のそれより有意に高い値を示さなければならない（Fisher の直接確率計算法、 $P < 0.05$ ）。この場合、対照群は、60 %以上が死亡しなければならない。

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には、その期間とする。

付記 1 ウイルス含有量試験用培養液

1,000mL 中

牛胎子血清

100 mL

MEM 非必須アミノ酸溶液（100 倍濃縮液）

10 mL

イーグル MEM

残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.8 ~ 8.6 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記 2 不活化試験用培養液

1,000mL 中

牛胎子血清

100 mL

MEM 非必須アミノ酸溶液（100 倍濃縮液）

10 mL

イーグル MEM

残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 7.8 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 ブレイン・ハート・インフュージョン寒天培地

1,000mL 中

子牛脳浸出液

200 g

牛心臓浸出液

250 g

ペプトン

10 g

ブドウ糖

2 g

塩化ナトリウム

5 g

リン酸一水素ナトリウム

2.5 g

寒天	15 g
水	残 量

付記4 マダイイリドウイルス強毒株
マダイイリドウイルス Ehime-1/CV 株又はこれと同等以上の毒力を有する株

付記5 希釈液
1,000mL 中
牛胎子血清 100 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。
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記6 ラクトコッカス・ガルビエ強毒菌
ラクトコッカス・ガルビエ KG9502 株又はこれと同等以上の毒力を有する株