

# 馬鼻肺炎生ワクチン（シード）

令和2年12月11日（告示第2406号）新規追加

## 1 定義

シードロット規格に適合した糖たん白gE遺伝子を欠損した弱毒馬ヘルペスウイルス1型を同規格に適合した培養細胞で増殖させて得たウイルス液を凍結乾燥したワクチンである。

## 2 製法

### 2.1 製造用株

#### 2.1.1 名称

馬ヘルペスウイルス1型  $\Delta$ gE-NIBS株又はこれと同等と認められた株

#### 2.1.2 性状

子馬に接種しても、呼吸器症状等の臨床異常は認められない。また接種部位からウイルスが分離されることがあるが、同居馬への感染はない。

馬皮膚由来細胞、馬腎由来細胞、牛腎由来細胞及び兎腎由来細胞でCPEを伴って増殖する。

#### 2.1.3 マスターシードウイルス

##### 2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、EFD-C<sub>1</sub>細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

マスターシードウイルスについて、3.1.1の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は5代以内でなければならない。

#### 2.1.4 ワーキングシードウイルス

##### 2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、EFD-C<sub>1</sub>細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

#### 2.1.5 プロダクションシードウイルス

##### 2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、EFD-C<sub>1</sub>細胞で増殖する。

プロダクションシードウイルスは、凍結して-70℃以下又は凍結乾燥して5℃以下で保存する。

プロダクションシードウイルスについて、保存する場合は3.1.3の試験を行う。

## 2.2 製造用材料

### 2.2.1 培養細胞

EFD-C<sub>1</sub>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。

## 2.2.3 マスターセルシード

### 2.2.3.1 作製、保存及びプロダクションセルシードまでの最高継代数

マスターセルシードは、2.2.2の培養液で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターセルシードは、特定の製造番号又は製造記号を付して、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

マスターセルシードについて3.2.1の試験を行う。

マスターセルシードは、ワクチンの製造又は試験以外の目的で継代しない。マスターセルシードからプロダクションセルシードまでの最高継代数は、20代以内でなければならない。

## 2.2.4 ワーキングセルシード

### 2.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.2の培養液で増殖及び継代する。

ワーキングセルシードは、凍結して $-70^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する。

ワーキングセルシードについて、3.2.2の試験を行う。

## 2.2.5 プロダクションセルシード

### 2.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.2の培養液で増殖させる。

プロダクションセルシードは保存する場合は、3.2.3の試験を行う。

## 2.3 原液

### 2.3.1 プロダクションセルシードの培養

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。

### 2.3.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.1の培養細胞で培養し、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、遠心上清又はこれを濃縮したものを原液とする。

原液について、3.3の試験を行う。

## 2.4 最終バルク

原液を混合し、適当と認められた安定剤を加えて最終バルクとする。

## 2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、凍結乾燥し、小分製品とする。

小分製品について、3.4の試験を行う。

## 3 試験法

### 3.1 製造用株の試験

#### 3.1.1 マスターシードウイルスの試験

##### 3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.1.2 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。

##### 3.1.1.3 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ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。

#### 3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験法

##### 3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、2.1及び2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験

###### 3.1.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験

馬伝染性貧血ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1及び3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

牛ウイルス性下痢ウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、3.2.5及び3.2.9を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.1.5 対象動物を用いた免疫原性試験

一般試験法の対象動物を用いた免疫原性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。

##### 3.1.1.6 対象動物を用いた安全性確認試験

一般試験法の対象動物を用いた安全性確認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。

##### 3.1.1.7 病原性復帰確認試験

一般試験法の病原性復帰確認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。

##### 3.1.1.8 組換え遺伝子等安定性確認試験

一般試験法の組換え遺伝子等安定性確認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。

#### 3.1.2 ワーキングシードウイルスの試験

##### 3.1.2.1 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。

##### 3.1.2.2 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ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。

#### 3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

##### 3.1.3.1 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。

##### 3.1.3.2 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ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。

#### 3.2 株化細胞の試験

##### 3.2.1 マスターセルシードの試験

###### 3.2.1.1 培養性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.2.1.2 起源動物種同定試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.2.1.3 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。

#### 3.2.1.4 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ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。

#### 3.2.1.5 外来性ウイルス否定試験法

##### 3.2.1.5.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2、2.1及び2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.2.1.5.2 特定ウイルス否定試験

###### 3.2.1.5.2.1 特定ウイルス否定一般試験

馬伝染性貧血ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2及び3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.2.1.5.2.2 個別ウイルス否定試験

牛ウイルス性下痢ウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2、3.2.5及び3.2.9を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.1.6 核学的（染色体）性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.6を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.1.7 腫瘍形成性／腫瘍原性試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.7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 ワーキングセルシードの試験

##### 3.2.2.1 培養性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.2.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.2.2.2 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。

##### 3.2.2.3 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ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。

#### 3.2.3 プロダクションセルシードの試験

##### 3.2.3.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.1.4.2.3.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.2.3.2 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。

##### 3.2.3.3 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ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。

#### 3.3 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 ウイルス含有量試験

###### 3.3.2.1 試験材料

###### 3.3.2.1.1 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。

###### 3.3.2.1.2 培養細胞

BEK-1細胞を96穴プレートに培養し、単層となったものを用いる。

### 3.3.2.2 試験方法

試料25 $\mu$ Lずつを、それぞれ4穴の培養細胞に接種し、37°Cで静置吸着した後、ウイルス増殖用培養液を75 $\mu$ Lずつ加え、37°Cで5～7日間培養し、観察する。

### 3.3.2.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub>を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中10<sup>5.1</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

## 3.4 小分製品の試験

### 3.4.1 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乾燥物でなければならない。溶解したものは、固有の色調を有する液体でなければならない。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。

### 3.4.2 真空度試験

一般試験法の真空度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。

### 3.4.3 含湿度試験

一般試験法の含湿度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。

### 3.4.4 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。

### 3.4.5 マイコプラズマ否定試験

一般試験法のマイコプラズマ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。

### 3.4.6 ウイルス含有量試験

3.3.2を準用して試験するとき、試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり1 mL中10<sup>4.5</sup>TCID<sub>50</sub>以上でなければならない。

### 3.4.7 力価試験

#### 3.4.7.1 試験材料

##### 3.4.7.1.1 注射材料

試験品をリン酸緩衝食塩液で5倍及び25倍に希釈したものを注射材料とする。

##### 3.4.7.1.2 試験動物

約6週齢のハムスターを用いる。

##### 3.4.7.1.3 攻撃ウイルス

ハムスターに馴化させた攻撃用馬鼻肺炎ウイルスKyD株（付記2）を用いる。

#### 3.4.7.2 試験方法

試験動物12匹を試験群、4匹を対照群とする。注射材料1 mLずつをそれぞれ4匹の試験群の腹腔内に注射する。注射後21日目に、攻撃ウイルス1 mLずつを試験群及び対照群の腹腔内に注射し、7日間観察する。

#### 3.4.7.3 判定

試験群の生残動物数から試験品のED<sub>50</sub>を算出する。

試験品のED<sub>50</sub>は、16ED<sub>50</sub>/mL以上でなければならない。この場合、対照群は全て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、製造後2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には、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

牛胎子血清又はやぎ血清

5 ~ 10 mL

イーグルMEM

残 量

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2 攻撃用馬鼻肺炎ウイルスKyD株

馬鼻肺炎ウイルスKyD株をハムスターの腹腔内に注射し、感染極期に肝臓を採取し、リン酸緩衝食塩液で10w/v%乳剤に調整する。攻撃には、 $10^{4.0}$ LD<sub>50</sub>を用いる。