

豚熱生ワクチン（シード）

平成23年5月11日（告示第939号）新規追加
令和2年2月5日（告示第231号）一部改正
令和2年6月30日（告示第1246号）一部改正

1 定義

シードロット規格に適合した弱毒豚熱ウイルスを同規格に適合したモルモット腎初代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

弱毒豚熱ウイルス GPE⁻株

2.1.2 性状

豚精巢初代細胞で増殖するが、END 現象を示さない（E マーカー）。また、30℃でのモルモット腎初代細胞における増殖は、40℃での増殖を上回り（T マーカー）、しかも、強毒豚熱ウイルスの増殖を100倍以上上回る（G マーカー）。

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、SPF 動物規格の 2.15 に適合したモルモット腎初代細胞で増殖させ、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、SPF 動物規格の 2.15 に適合したモルモット腎初代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、SPF 動物規格の 2.15 に適合したモルモット腎初代細胞で増殖させる。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結して－70℃以下で保存する。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3 の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 培養細胞

SPF 動物規格の 2.15 に適合したモルモット腎初代細胞を用いる。

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 マスタープライマリーセルシード(プロダクションプライマリーセルシード)

2.2.3.1 増殖、継代及び保存

マスタープライマリーセルシード(プロダクションプライマリーセルシード)は、2.2.2 の培養液で増殖し、継代及び保存しない。

マスタープライマリーセルシード(プロダクションプライマリーセルシード)について、3.2 の試験を行う。

2.3 原液

2.3.1 マスタープライマリーセルシード(プロダクションプライマリーセルシード)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。ウイルス接種前の個別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、3.3 の試験を行う。

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 の細胞に接種し、30℃で培養後、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その遠心上清を混合して原液とする。

原液について、3.4 の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液に、適当と認められた希釈液を加えて濃度調整し、これに等量の適当と認められた安定剤を加えて混合し、最終バルクとする。

希釈液及び安定剤は、ロットごとに調製しなければならない。

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。

2.5.1 サブロット

一つの最終バルクに由来し、同一条件で凍結乾燥した小分製品の一群をサブロットとする。

サブロットについて、3.5 の試験を行う。

2.5.2 ロット

一つの原液に由来するサブロット群を 1 ロットとする。

ロットについて、3.6 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 1.4.2.1.1.1.1 又は 1.4.2.1.1.1.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 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

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

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス及びリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスについて、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

豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス、ロタウイルス、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の 1.1、3.2.4、3.2.5、3.2.7 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によって試験するとき、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によって試験するとき、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によって試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.8 マーカー試験

3.1.1.8.1 E マーカー試験

3.1.1.8.1.1 試験材料

3.1.1.8.1.1.1 試料

検体を試料とする。

3.1.1.8.1.1.2 培養細胞

豚精巢初代細胞浮遊液を用いる。

3.1.1.8.1.1.3 ニューカッスル病ウイルス

TCND 株又は宮寺株を用いる。

3.1.1.8.1.2 試験方法

試料の 0.1mL ずつを、小試験管に 0.5mL ずつ分注した細胞 10 本以上に接種し、37℃で4日間静置培養し、単層形成が良好であることを確認する。培養液を除き、ニューカッスル病ウイルスを約 $10^{6.0}$ PFU 含む細胞増殖用培養液 1（付記 1）を 0.5mL ずつ加え、37℃で3日間培養する。

3.1.1.8.1.3 判定

培養細胞に、CPE を認めてはならない。

3.1.1.8.2 T 及び G マーカー試験

3.1.1.8.2.1 試験材料

3.1.1.8.2.1.1 試料

検体を細胞増殖用培養液 1 で希釈し、1 mL 中 $10^{3.0}$ TCID₅₀ を含むように調整したものを試料とする。

3.1.1.8.2.1.2 培養細胞

モルモット腎初代細胞を小試験管に培養し、単層となったものを用いる。

3.1.1.8.2.2 試験方法

試料 0.1mL ずつを 20 本以上の培養細胞に接種し、2 群に分け、30℃及び 40℃で6～8日間静置培養する。群ごとに培養液を採取し、混合し、そのウイルス含有量を 3.4.2 を準用して測定する。

3.1.1.8.2.3 判定

30℃での増殖は、40℃での増殖を上回らなければならない（T マーカー）、30℃でのウイルス含有量は、1 mL 中 $10^{4.5}$ TCID₅₀ 以上でなければならない（G マーカー）。

3.1.1.9 力価試験

3.1.1.9.1 試験材料

3.1.1.9.1.1 注射材料

検体又は検体を細胞増殖用培養液 1 で 1 mL 当たり $10^{3.0}$ TCID₅₀ のウイルス量に希釈したものを注射材料とする。

3.1.1.9.1.2 試験動物

体重 20～40kg の豚を用いる。

3.1.1.9.1.3 中和試験用ウイルス

弱毒豚熱ウイルス GPE⁺株を用いる。

3.1.1.9.1.4 培養細胞

CPK-NS 細胞を細胞数が 1 mL 中約 $5 \times 10^{5.0}$ となるように細胞増殖用培養液 2 (付記 2) に浮遊させたものを用いる。

3.1.1.9.2 試験方法

豚 4 頭を試験群とし、1 頭を対照群とする。注射材料 1 mL ずつを試験群の皮下又は筋肉内に注射し、28 日目の血清について、中和試験を行う。

被検血清を非働化した後、細胞増殖用培養液 2 で 2 倍階段希釈し、各希釈血清と 25 μ L 中約 200TCID₅₀ を含む中和試験用ウイルス液とを等量混合し、37 °C で 60 分間処理する。この各混合液 50 μ L ずつをそれぞれ 96 穴組織培養用プレートの 4 穴ずつに分注し、CPK-NS 細胞浮遊液 0.1mL ずつを加え、37 °C で 7 日間培養し、観察する。

3.1.1.9.3 判定

培養細胞 4 穴中 2 穴以上に CPE の阻止を認めた血清の最高希釈倍数で中和抗体価を表す。試験群の中和抗体価は、全て 4 倍以上でなければならない。この場合、対照群は、1 倍未満でなければならない。

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 初代細胞の試験

3.2.1 マスタープライマリーセルシード (プロダクションプライマリーセルシード) の試験

3.2.1.1 培養性状試験

シードロット規格の 2.2.4.2.1.1 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 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。

3.2.1.3 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 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。

3.3.1 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する。

対照培養細胞をプールし、4 本以上の培養びん及びカバーグラスを入れた 4 枚以上のシャーレに継代し、7 日間培養し、観察するとき、CPE を認めてはならない。

3.3.2 赤血球吸着試験

3.3.1 の試験最終日に培養びんの培養液を除き、リン酸緩衝食塩液で細胞表面を 2 回洗浄後、3 群に分け、0.1vol % のモルモット、がちょう及び 7 日齢以内の鶏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。

3.3.3 封入体染色試験

3.3.1 の試験最終日に培養カバーグラスをリン酸緩衝食塩液で洗浄し、固定した後、ギムザ染色し、封入体の有無を観察するとき、培養細胞に封入体を認めてはならない。

3.3.4 迷入ウイルス否定試験

3.3.1 の試験最終日に採取した培養液を試料として、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法の 2.3.1.1、2.3.1.2、2.3.1.3、2.3.2 及び 2.7.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

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 ウイルス含有量試験

3.4.2.1 試験材料

3.4.2.1.1 試料

検体を細胞増殖用培養液 1 で 10 倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.4.2.1.2 培養細胞

豚精巢初代細胞又は豚腎継代細胞浮遊液を用いる。

3.4.2.2 試験方法

96 穴組織培養用プレートを用いる。試料 0.1mL ずつをそれぞれ 1 列 10 穴に分注する。各列の 2 穴には細胞増殖用培養液 1 を 0.1mL ずつ分注し、対照細胞とする。各穴に細胞増殖用培養液 1 で調整した細胞浮遊液を 0.1mL ずつ分注する。37℃で 5～7 日間静置培養後、培養液を除き、洗浄液（付記 3）で 2 回洗浄後、固定する。

固定プレートの各穴に抗体希釈液（付記 4）で至適濃度に希釈した抗豚熱ウイルスモノクローナル抗体（付記 5）50 μL ずつを分注し、37℃で 60 分間反応させる。

洗浄液で 4 回洗浄後、抗体希釈液で至適濃度に希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリン 50 μL ずつを各穴に分注し、37℃で 40～60 分間反応させる。

洗浄液で 4 回洗浄後、基質液（付記 6）0.1mL を各穴に分注し、常温で 10～30 分間反応させた後、2.5mol/L 硫酸 50 μL ずつを各穴に加え反応を停止させ、各穴の吸光度値を 492/630nm の波長でそれぞれ測定する。

3.4.2.3 判定

対照細胞の平均吸光度値の 2 倍以上の吸光度値を示す穴を豚熱ウイルス感染細胞とみなし、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL 中 10^{4.8}TCID₅₀以上でなければならない。

3.4.3 マーカー試験

3.1.1.8 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.5 サブロットの試験

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。

3.5.2 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。

3.5.3 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。

3.5.4 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。

3.5.5 ウイルス含有量試験

3.4.2 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 10^{3.0}TCID₅₀以上でな

ればならない。

3.6 ロットの試験

3.6.1 マイコプラズマ否定試験

試料は、各サブロットから2本ずつを用い、それぞれ等量ずつ混合したものをを用い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。

ただし、原液を含む中間工程でマイコプラズマ否定試験を実施する場合には、本試験の実施を省略することができる。

3.6.2 安全試験

3.6.2.1 試験材料

3.6.2.1.1 注射材料

各サブロットから同数の試験品を採取し、溶解用液 20mL 中に 100 頭分が含まれるように溶解し、混合し、注射材料とする。

3.6.2.1.2 試験動物

体重 20 ～ 40kg の豚を用いる。

3.6.2.2 試験方法

注射材料 20mL ずつを4頭の試験動物の皮下又は筋肉内に注射し、14日間観察する。

3.6.2.3 判定

観察期間中、異常を認めてはならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、1年6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 細胞増殖用培養液1

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

又はラクトアルブミン水解物 5 g

牛又はやぎ血清 0 ～ 100 mL

イーグル MEM 又はアール液 残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 6.8 ～ 7.2 に調整する。

牛又はやぎ血清は、牛ウイルス性下痢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。

付記2 細胞増殖用培養液2

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

バクトペプトン 5 g

N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸 2.13g

イーグル MEM 残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 6.8 ～ 7.2 に調整する。

牛又はやぎ血清は、牛ウイルス性下痢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。

付記3 洗浄液

A液とB液を混合したもの

A液 800mL 中

塩化ナトリウム	8.0 g
塩化カリウム	0.2 g
無水リン酸水素二ナトリウム	1.15 g
リン酸二水素カリウム	0.2 g
水	残 量

B液 200mL 中

無水塩化カルシウム	0.1 g
塩化マグネシウム六水和物	0.1 g
水	残 量

付記4 抗体希釈液

ハンクス液又は洗浄液に牛血清アルブミン・フラクシオンVを 0.5 ~ 1.0w/v %となるように溶解したもの

付記5 抗豚熱ウイルスモノクローナル抗体

動物医薬品検査所が配布するもの

付記6 基質液

0.2mol/L リン酸- 0.1mol/L クエン酸緩衝液 (pH5.0) 50mL に *o*-フェニレンジアミン二塩酸塩 25mg 及び過酸化水素 (30) 0.01mL を加えたもの
用時調製する。