

牛ウイルス性下痢生ワクチン

令和2年6月30日（告示第1246号）一部改正

1 定義

弱毒牛ウイルス性下痢ウイルスを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

弱毒牛ウイルス性下痢ウイルスNo.12-43株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

牛の皮下又は筋肉内に注射しても病原性を示さない。

豚精巢初代細胞及び牛精巢継代細胞でCPEを示さず増殖し、END法によるEND現象又は干渉法による干渉現象は陽性である。

2.1.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、生ワクチン製造用材料の規格 2.6.2 の豚精巢初代細胞又は適当と認められた培養細胞で継代する。

原株の継代は、原種ウイルスの製造又は原株の恒久的な維持以外の目的で行ってはならない。原種ウイルスは、直接原株から連続した工程により製造し、その継代数は3代以内でなければならない。種ウイルスは、原種ウイルスから2代以内に製造しなければならない。

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。種ウイルスは、原種ウイルスからワクチンの製造ごとに用時調製する。

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2.6.2の豚精巢初代細胞又は製造に適当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.2 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又は遠心上清を混合し、原液とする。

原液について、3.2の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液に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。

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、3.3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。

3.1.2 赤血球吸着試験

3.1.1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、2群に分け、生理食塩液で調整した0.1vol%のモルモット及びがちょう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。

3.1.3 封入体染色試験

3.1.1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。

3.1.4 迷入ウイルス否定試験

3.1.1の試験最終日に採取した培養液の2 mLについて、一般試験法の迷入ウイルス否定試験法2.

3.1.3を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2 原液の試験

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 迷入ウイルス否定試験

一般試験法の迷入ウイルス否定試験法1.1、2.3.1、2.4.1、2.4.2、2.7.2.1及び2.8.1.1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、中和用血清は、抗牛ウイルス性下痢ウイルス血清（付記1）を非働化したものを用いる。

3.2.3 ウイルス含有量試験

3.2.3.1 試験材料

3.2.3.1.1 試料

検体を細胞増殖用培養液（付記2）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.2.3.1.2 培養細胞

牛精巢継代細胞浮遊液を用いる。

3.2.3.2 試験方法

試料0.1 mLずつを小試験管に0.5 mLずつ分注した細胞4本以上に接種し、37°Cで5～7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、1 mL中牛ウイルス性下痢ウイルスNose株を $10^{5.0}$ TCID₅₀（以下、このウイルスを用いる方法を「干渉法」という。）又は1 mL中ニューカッスル病ウイルスTCND株若しくは宮寺株を $10^{4.0}$ EID₅₀含んだ細胞増殖用培養液（以下、このウイルスを用いる方法を「END法」という。）を0.5 mLずつ加え、更に34～36°Cで5～7日間回転培養し、観察する。

3.2.3.3 判定

干渉法にあつては、培養細胞にCPEの抑制されたものを、また、END法にあつては、CPEの発現したものを感染したものとみなし、TCID₅₀を算出する。

検体のウイルス含有量は、1 mL中 $10^{5.5}$ TCID₅₀以上でなければならない。

3.3 小分製品の試験

3.3.1 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。

3.3.2 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。

3.3.3 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。

3.3.4 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。

3.3.5 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。
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。

3.3.6 迷入ウイルス否定試験

一般試験法の迷入ウイルス否定試験法 1.1、2.4.1及び2.4.2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、中和用血清は、抗牛ウイルス性下痢ウイルス血清を非働化したものを用いる。

3.3.7 ウイルス含有量試験

3.2.3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以上でなければならない。

3.3.8 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性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。

3.3.9 安全試験

3.3.9.1 試験材料

3.3.9.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.3.9.1.2 試験動物

体重100～200kgの牛を用いる。

3.3.9.2 試験方法

注射材料1頭分を1頭の試験動物の皮下に注射し、14日間観察する。

3.3.9.3 判定

観察期間中、軽い発熱（40.5℃以下）を認めても3日間以上継続せず、その他の異常を認めなければならない。

3.3.10 力価試験

3.3.10.1 試験材料

3.3.10.1.1 試験動物

3.3.9の試験に用いた動物を用いる。

3.3.10.1.2 中和試験用ウイルス

牛精巢継代細胞で増殖させた強毒牛ウイルス性下痢ウイルスNose株を用いる。

3.3.10.1.3 培養細胞

牛精巢継代細胞浮遊液を用いる。

3.3.10.2 試験方法

3.3.9の試験終了後、7日目に得られた血清について、中和試験を行う。

被検血清を非働化した後、細胞増殖用培養液で2倍階段希釈する。各希釈血清0.5mLと0.1mL中約200TCID₅₀の中和試験用ウイルス液0.5mLとを混合し、37℃で60分間処理する。この混合液0.1mLずつを、小試験管に0.5mLずつ分注した細胞4本（穴）ずつに接種する。37℃で4～5日間静置培養し、観察する。

3.3.10.3 判定

培養細胞の2本（穴）以上にCPEの阻止を認めた血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

試験動物の中和抗体価は、8倍以上でなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、1年間とする。ただし、特に承認されたものは、その期間とする。

付記1 抗牛ウイルス性下痢ウイルス血清

強毒牛ウイルス性下痢ウイルスNo.12株で免疫した兔の血清で、検体又は試験品のウイルスを完全に中和する力価を有するもの。

付記2 細胞増殖用培養液

1,000mL中

ラクトアルブミン水解物

5 g

牛又はやぎ血清

50 ~ 200 mL

アール液又はハンクス液

残量

炭酸水素ナトリウムでpHを7.0~7.4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。