

ワクチンの部豚オーエスキー病（g -、tk -）生ワクチン（酢酸トコフェロールアジュバント加溶解用液）の項を次のように改める。

豚オーエスキー病（g -、tk -）生ワクチン（酢酸トコフェロールアジュバント加溶解用液）

平成20年6月6日（告示第914号）一部改正

糖たんぱく gI 及びチミジンキナーゼを産生しない弱毒オーエスキー病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もので、使用時に酢酸トコフェロールアジュバントを含む溶解用液で溶解するワクチンである。

1 小分製品の試験

1.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

1.2 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 及び 2.3.2 により試験を行い、これに適合しなければならない。ただし、中和用血清は、抗オーエスキー病ウイルス血清（付記1）を非働化したものを用いる。

1.3 ウイルス含有量試験

1.3.1 試験材料

1.3.1.1 試料

試験品ををウイルス増殖用培養液（付記2）で溶解し、更に10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

1.3.1.2 培養細胞

Vero 細胞、HmLu-1 細胞又は適当と認められた培養細胞を培養し、単層となったものを用いる。

1.3.2 試験方法

試料 0.1mL ずつをそれぞれ4本（穴）以上の培養細胞に接種し、37℃で60分間静置吸着させた後、ウイルス増殖用培養液 0.5mL を加え、37℃で6～7日間培養し、観察する。

1.3.3. 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。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり10^{5.5}TCID₅₀以上でなければならない。

1.4 マーカー試験

1.4.1 糖たんぱく gI 欠損マーカー

1.4.1.1 試験材料

1.5の試験終了後、14日目の試験群の血清を用いる。

1.4.1.2 試験方法

オーエスキー病ウイルス糖たんぱく gI 抗体を識別できる酵素抗体反応キット又は動物医薬品検査所がこれと同等と認めたものを用いて酵素抗体反応を行う。

1.4.1.3 判定

血清中にオーエスキー病ウイルス糖たんぱく gI 抗体を認めてはならない。

1.4.2 チミジンキナーゼ欠損マーカー

1.4.2.1 試験材料

1.4.2.1.1 試料

試験品を試料とする。

1.4.2.1.2 培養細胞

Ltk細胞を細胞増殖用培養液（付記3）で $1 \times 10^{5.0}$ 個/mL となるように調整した細胞浮遊液の 5 mL を約 25cm² の培養びんに入れ、37℃ で培養し、単層となったものを用いる。

1.4.2.1.3 培養液

HAT 培地（付記4）及びウイルス増殖用培養液を用いる。

1.4.2.2 試験方法

試料の 0.2mL ずつを 2 本の培養細胞に接種し、37℃ で 60 分間吸着させた後、3 回洗浄する。HAT 培地又はウイルス増殖用培養液の約 5 mL をそれぞれの培養細胞に加え、37℃ で 3 日間培養する。それぞれの培養細胞について、凍結融解を 1 回行った後、遠心上清のウイルス含有量を 1.3 を準用して測定する。

1.4.2.3 判定

ウイルス増殖用培養液を用いて培養した細胞の遠心上清中のウイルス含有量は、HAT 培地を用いて培養した細胞の遠心上清中のウイルス含有量と比べて、1,000 倍以上高くなければならない。

1.5 安全試験

1.5.1 試験材料

1.5.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.5.1.2 試験動物

体重 10 ~ 40kg の豚を用いる。

1.5.2 試験方法

試験動物 2 頭を試験群、1 頭を対照群とする。試験群に注射材料の 1 頭分をそれぞれ筋肉内又は皮内に注射し、対照群とともに同居飼育し、14 日間観察する。

1.5.3 判定

観察期間中、試験群及び対照群に異常を認めてはならない。

1.6 力価試験

1.6.1 試験材料

1.6.1.1 試験動物

1.5 の試験に用いた動物を用いる。

1.6.1.2 中和試験用ウイルス

Vero 細胞で増殖させたオーエスキー病ウイルスベゴニア株を用いる。

1.6.1.3 培養細胞

Vero 細胞又は適当と認められた細胞をシャーレに培養し、単層となったものを用いる。

1.6.2 試験方法

1.5 の試験終了後、14 日目に得られた各個体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、ウイルス増殖用培養液で 10 倍に希釈し、更に 2 倍階段希釈する。

各希釈血清 0.5mL と 0.2mL 中約 80PFU の中和試験用ウイルス液 0.5mL を混合し、37℃ で一夜処理する。この各混合液の 0.2mL ずつをそれぞれ 4 枚の培養細胞に接種し、37℃ で 60 分間吸着させた後、混合液を除き、第 1 次重層寒天培地（付記 5）を重層し、37℃ 5 vol% 炭酸ガス下で 2 日間培養後、第 2 次重層寒天培地（付記 6）を重層し、更に一夜培養後、ブラック数を測定する。

1.6.3 判定

ブラック数がウイルス対照の 50 % 以下に減少した血清の最高希釈倍数を中和抗体価とする。

試験群の中和抗体価は、20 倍以上でなければならない。この場合、対照群では 10 倍以下でなければならない。

付記 1 抗オーエスキー病ウイルス血清

オーエスキー病ウイルスで免疫した鶏、兎又はモルモットの血清で、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 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

L - グルタミン 0.3 g

牛血清 8 ~ 50 mL

イーグル MEM 残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 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 3 細胞増殖用培養液

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

L - グルタミン 0.3 g

牛血清 30 ~ 100 mL

イーグル MEM 残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 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 4 HAT 培地

1,000mL 中

ヒポキサンチン 0.014 g

アミノプテリン 0.00018g

チミジン 0.0039 g

トリプトース・ホスフェイト・ブロス 2.95 g

牛血清 0 ~ 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5 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 10.0 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 6.8 ~ 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 第2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 10.0 g

ニュートラルレッド 0.05 g

イーグル MEM 残量

炭酸水素ナトリウムで pH を 6.8 ~ 7.6 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。