

豚オーエスキー病（g⁻、tk⁺）生ワクチン（アジュバント加溶解用液）

平成 19 年 8 月 29 日（告示第 1075 号）新規追加

1 定義

糖たん白 gI 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あって、使用時に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。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

弱毒オーエスキー病ウイルスバーサ・KS 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

糖たん白 gI 遺伝子の一部を欠損する。

各種培養細胞で CPE を伴って増殖する。CRFK 細胞では巨細胞非形成、Vero 細胞では小プラックを形成する。

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 2.1.1 の鶏胚初代細胞で継代する。

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 以下又は凍結乾燥して 5 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 2.1.1 の鶏胚初代細胞又は製造に相当と認められた培養細胞を用いる。

2.2.2 培養液

製造に相当と認められた培養液を用いる。

2.3 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

原液を混合し、相当と認められた安定剤を加え、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、これについて次に掲げる試験を行う。

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回洗浄した後、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分間静置した後、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。

3.2 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、2.3.2、2.4.2 及び 2.7.2.1 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、抗オー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。

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

検体をウイルス増殖用培養液（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

PD5細胞を培養し、単層となったものを用いる。

3.2.3.2 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。

3.2.3.3 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。

検体のウイルス含有量は、1mL中10^{7.5}TCID₅₀以上でなければならない。

3.2.4 マ - カ - 試験

検体0.1mLをCRFK細胞に接種し、37℃で3日間培養し、観察するとき、直径0.1mm以上の巨細胞を認めてはならない。

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、乾燥ワクチンは、固有の乾燥物でなければならない。溶解用液は、固有の色調を有する均質な懸濁液でなければならない。異物又は異臭を認めてはならない。溶解ワクチンは、固有の色調を有する均質な懸濁液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、2.3.1 及び 2.3.2 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、抗オーエスキー病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 $10^{4.7}$ TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.3.8 マーカー試験

3.3.8.1 試験材料

3.3.9 の試験終了後、14 日目の試験群の血清を用いる。

3.3.8.2 試験法

オーエスキー病ウイルス糖たん白 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。

3.3.8.3 判定

血清中にオーエスキー病ウイルス糖たん白 gI 抗体を認めてはならない。

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 10 ~ 40kg の豚を用いる。

3.3.9.2 試験方法

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

3.3.9.3 判定

観察期間中、試験群に一過性の軽度の発熱が認められる場合には、2 日以上継続してはならない。試験群及び対照群に異常を認めてはならない。

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

PD5 細胞で増殖させたオーエスキー病ウイルスバーサ・KS 株又は又は適当と認められた株を用いる。

3.3.10.1.3 培養細胞

MDBK 細胞を 24 穴プラスチックプレートに培養し、単層となったものを用いる。

3.3.10.2 試験方法

3.3.10 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 0.05mL 中約 40PFU 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 0.05mL ずつをそれぞれ 4 穴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 3）を重層し、37 5 vol% 炭酸ガス下で 2 日間培養した後、第 2 次重層寒天培地（付記 4）を重層し、更に一夜培養した後、ブラック数を測定する。

3.3.10.3 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、100 倍以上でなければならない。この場合、対照群においては、10 倍以下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 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あって、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

ベンジルペニシリンカリウム

20 万単位

硫酸ストレプトマイシン

200mg 力価

硫酸カナマイシン

20mg 力価

イーグル MEM

残 量

0.2mol/L トリスアミノメタンで pH を 7.2 ~ 7.6 に調整する。

付記 3 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 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 4 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 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。