

豚オーエスキー病 (g - 、 t k -) 生ワクチン

1 定義

糖蛋白 g 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 dlg92/dltk 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

糖蛋白 g 遺伝子及びチミジンキナーゼ遺伝子を欠損する。

2.1.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、ST-100 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4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

ST-100 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、適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、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。

3.2 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。

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

ST-100 細胞又は HmLu-1 細胞又はその他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。

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分間吸着させた後、ウイルス増殖用培養液 0.5mL を加え、34～37℃で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、1 mL 中 10^{5.5}TCID₅₀ 以上でなければならない。

3.2.4 マーカー試験

ブラックオートラジオグラフィーによりチミジンキナーゼの欠損を確認する。

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、2.3.1 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 $10^{4.5}$ 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 糖蛋白 g 欠損マーカー

3.3.8.1.1 試験材料

3.3.8.1.1.1 試料

試験品をウイルス増殖用培養液を用いて、ウイルス含有量が 1 mL 中 $10^{5.0}$ TCID₅₀ となるように調整したものを試料とする。対照試料としてオーエスキー病ウイルス山形 S 81 株をウイルス含有量が 1 mL 中 $10^{5.0}$ TCID₅₀ となるように調整したものをを用いる。

3.3.8.1.1.2 抗体

抗オーエスキー病ウイルス血清及び抗オーエスキー病ウイルス糖蛋白 g モノクローナル抗体（付記 3）を用いる。

3.3.8.1.1.3 培養細胞

PK-15 細胞をカバーグラスを入れたシャーレに培養し、単層となったものをを用いる。

3.3.8.1.2 試験法

試料及び対照試料のそれぞれ 0.2mL を各 2 枚の培養細胞に接種し、37 ± 5 vol% 炭酸ガス下で 1 ~ 2 日間培養する。リン酸緩衝食塩液で 3 回洗浄後、冷却したアセトンで 5 ~ 10 分間固定する。それぞれの培養細胞各 1 枚に抗オーエスキー病ウイルス血清、残りの各 1 枚に、抗オーエスキー病ウイルス糖蛋白 g モノクローナル抗体による蛍光抗体法を行い、観察する。

3.3.8.1.3 判定

試料を接種した培養細胞に抗オーエスキー病ウイルス血清を反応させたものは特異蛍光を認めなければならない。抗オーエスキー病ウイルス糖蛋白 g モノクローナル抗体を反応させたものは特異蛍光を認めてはならない。また、対照試料を接種した培養細胞に抗オーエスキー病ウイルス血清を反応させたもの及び抗オーエスキー病ウイルス糖蛋白 g モノクローナル抗体を反応させたものはいずれも特異蛍光を認めなければならない。

3.3.8.2 チミジンキナーゼ欠損マーカー

3.3.8.2.1 試験材料

3.3.8.2.1.1 試料

試験品を試料とする。

3.3.8.2.1.2 培養細胞

Ltk 細胞を細胞増殖用培養液（付記 4）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 °C で培養し、単層となったものをを用いる。

3.3.8.2.1.3 培養液

HAT 培地（付記 5）及びウイルス増殖用培養液を用いる。

3.3.8.2.2 試験法

試料の 0.2mL ずつを 2 本の培養細胞に接種し、37 °C 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、34 ~ 36 °C 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 3.2.3 を準用して測定する。

3.3.8.2.3 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。

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 ~ 20kg の豚を用いる。

3.3.9.2 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 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.3.10.1.2 試験動物

約 5 週齢のマウスを用いる。

3.3.10.1.3 攻撃用ウイルス

PK-15 細胞で増殖させたオーエスキー病ウイルス山形 S81 株を用いる。

3.3.10.2 試験方法

試験動物 10 匹を試験群、10 匹を対照群、30 匹をウイルス量測定群とする。

注射材料 0.2mL ずつを試験群の腹腔内に注射する。注射後 14 日目に攻撃ウイルスの 0.2mL ずつを試験群及び対照群の腹腔内に注射する。更に、ウイルス量測定群を 10 匹ずつ 3 群に分け、各群のに攻撃ウイルスを 10 倍、100 倍、1,000 倍に希釈したものの 0.2mL ずつを腹腔内に注射する。

それぞれの群について、攻撃後 10 日間観察する。

3.4.10.3 判定

試験群の生存率は、70 % 以上でなければならない。この場合、対照群の死亡率は、80 % 以上でなければならない。また、攻撃ウイルスのウイルス量は、0.2mL 中 100LD₅₀ 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、2 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、検体及び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

グルタミン酸ナトリウム 5 g

ブドウ糖 1 g

酵母エキス 0.5 g

牛血清 20 ~ 50 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3 抗オーエスキー病ウイルス糖蛋白 g モノクローナル抗体
動物医薬品検査所が適当と認めたもの

付記4 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

牛血清

50 ~ 100 mL

イーグル MEM

残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.2 ~ 7.4 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 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

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。