

豚オーエスキー病 (g X - 、 t k -) 生ワクチン

1 定義

糖蛋白 g X 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 GX-1株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

糖蛋白 g X 遺伝子及びチミジンキナーゼ遺伝子の一部を欠損する。

2.1.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、豚腎培養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 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

豚腎培養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ウイルス浮遊液とする。

ウイルス浮遊液に適当と認められた安定剤を加え、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、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の観察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。

3.1.3 封入体染色試験

3.1.1の観察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の観察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2.3.1、2.3.2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。

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

Vero細胞又はHmLu-1細胞又はその他適当と認められた細胞を培養し、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^{7.0} TCID₅₀以上でなければならない。

3.2.4 マーカー試験

3.2.4.1 糖蛋白g X欠損マーカー

3.2.4.1.1 試験材料

3.2.4.1.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液を用いて、ウイルス含有量が0.2mL中10^{4.0}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S81株をウイルス含有量が0.2mL中10^{5.0}TCID₅₀となるように調整したものを用いる。

3.2.4.1.1.2 抗体

抗オーエスキー病ウイルス血清、抗オーエスキー病ウイルス糖蛋白g Xモノクローナル抗体（付記3）及び蛍光標識プロテインA（付記4）を用いる。

3.2.4.1.1.3 培養細胞

CPK細胞を培養し、単層となったものを用いる。

3.2.4.1.2 試験方法

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12

～18時間培養する。リン酸緩衝食塩液で3回洗浄後、冷却したアセトンで15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 gX モノクローナル抗体を37℃で40分間反応させる。リン酸緩衝食塩液で2回洗浄後、蛍光標識プロテイン A を用いて37℃で60分間染色し、観察する。

3.2.4.1.3 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ず、抗オーエスキー病ウイルス糖蛋白 gX 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 gX 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ずならない。

3.2.4.2 チミジンキナーゼ欠損マーカー

次の3.2.4.2.1又は3.2.4.2.2により試験を行う。

3.2.4.2.1 MDBK 細胞による試験

3.2.4.2.1.1 試験材料

3.2.4.2.1.1.1 試料

検体をウイルス増殖用培養液を用いて、ウイルス含有量が0.1mL 中 $10^{4.0}$ PFU となるように調整後、10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。オーエスキー病ウイルス山形 S 81株を同様に処理したものを対照試料とする。

3.2.4.2.1.1.2 培養細胞

MDBK 細胞を細胞増殖用培養液（付記5）で 5×10^5 個/mL となるように調整した細胞浮遊液の2 mL を6穴プレートに入れ、37℃で培養し、単層となったものを用いる。

3.2.4.2.1.2 試験方法

試料及び対照試料の0.2mL ずつをそれぞれ2穴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。1-β-D-Arabinofuranosylthymine を100 μg/mL 含有する0.5w/v % CMC 加199培地（付記6）の4 mL ずつを各穴に重層し、37℃で3～4日間培養する。培地を除去後、各穴に0.1w/v % クリスタルバイオレット染色液（付記7）の1 mL ずつを加え、30分間常温に静置後、ブラック数を測定する。

3.2.4.2.1.3 判定

検体のウイルス含有量は、山形 S 81株のウイルス含有量と比べて、100倍以上高くなければならない。

3.2.4.2.2 Ltk⁻細胞による試験

3.2.4.2.1.1 試験材料

3.2.4.2.1.1.1 培養細胞

Ltk⁻細胞を細胞増殖用培養液で 1×10^5 個/mL となるように調整した細胞浮遊液の5 mL を約25 cm²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。

3.2.4.2.1.1.2 培養液

HAT 培地（付記8）及びウイルス増殖用培養液を用いる。

3.2.4.2.1.2 試験方法

検体の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3.2.3を準用して測定する。

3.2.4.2.1.3 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 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、Vero 細胞を用いた場合には、1頭分当たり $10^{4.5}$ TCID₅₀以上、HmLu-1細胞を用いた場合には、 $10^{4.3}$ TCID₅₀以上でなければならない。

3.3.8 マーカー試験

3.2.4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

6～8週齢の豚を用いる。

3.3.9.2 試験方法

試験動物3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 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

豚腎培養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。

3.3.10.1.3 培養細胞

Vero 細胞を培養し、単層となったものを用いる。

3.3.10.2 試験方法

3.3.9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2倍階段希釈する。各希釈血清0.5mLと0.2mL中約200PFUの中和試験用ウイルス液0.5mLを混合し、37℃で1日間処理する。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9)を重層し、37℃5vol%炭酸ガス下で3日間培養後、第2次重層寒天培地(付記10)を重層し、更に一夜培養後、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3頭中2頭以上が中和抗体価16倍以上でなければならない。この場合、対照群は8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、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

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7.0~7.6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 抗オーエスキー病ウイルス糖蛋白gX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 蛍光標識プロテインA

黄色ブドウ球菌 Cowan - 株の培養上清から精製したプロテインAに蛍光色素を標識したもの

付記5 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7.0~7.6に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記6 0.5w/v% CMC加199培地

1,000mL中

カルボキシメチルセルロース(CMC) 5.0 g

199培地 残量

炭酸水素ナトリウムでpHを6.8~7.2に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記7	0.1w/v %クリスタルバイオレット染色液	
	10vol %ホルマリン緩衝液	100 mL
	クリスタルバイオレット	100 mg
付記8	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	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9	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7.0~7.6に調整する。	
	必要最少量の抗生物質を加えてもよい。	
付記10	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7.0~7.6に調整する。	
	必要最少量の抗生物質を加えてもよい。	