

豚オーエスキー病 (gI-, gX-) (油性アジュバント加) 不活化ワクチン

平成 19 年 5 月 18 日 (告示第 692 号) 新規追加

1 定義

豚オーエスキー病ウイルスを培養細胞で増殖させて得た感染細胞を可溶化し、精製により糖たん白 gI 及び gX を除去した後、不活化し、油性アジュバントを添加したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

オーエスキー病ウイルス岩手株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

抗体陰性の 8 日齢哺乳豚に鼻腔内接種すると、豚オーエスキー病特有の神経症状を伴い死亡する。また、家兎、マウス及びモルモットに皮下接種すると、いずれも搔痒症状を呈し死亡する。

豚腎由来細胞、CRFK細胞及びHmLu-1細胞でCPEを伴って増殖する。

2.1.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、PK-15細胞で継代する。

継代は、原株にあっては 3 代以内、種ウイルスにあっては 2 代以内でなければならない。

原株及び種ウイルスは、凍結して -70 以下又は凍結乾燥して 5 以下に保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 培養細胞

PK-15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感染細胞相を採取・遠心し、その沈渣を個別ウイルス感染細胞とする。

個別ウイルス感染細胞を採取した上清のウイルス浮遊液について、3.2 の試験を行う。

2.3.3 可溶化液

個別ウイルス感染細胞を可溶化液 (付記 1) に浮遊して可溶化した後、遠心し、その上清を個別可溶化液とする。

個別可溶化液について、3.3.2 の試験を行う。

2.3.4 抗原精製

個別可溶化液をヘパリン・アフィニティーカラムクロマトグラフィーにかけて吸着画分を採取し、リン酸緩衝食塩液で透析し、これを個別溶出液とする。

個別溶出液について、3.3 の試験を行う。

2.3.5 抗原液の調製

個別溶出液を相当と認められた希釈用液で抗原量を調整し、これを個別抗原液とする。

個別抗原液について、3.4 の試験を行う。

2.3.6 抗原液の不活化

個別抗原液にホルマリン又は適当と認められた不活化剤を加えて、感作したものを個別不活化抗原液とする。

個別不活化抗原液について、3.5 の試験を行う。

2.3.7 原液の調整

各個別不活化抗原液を混合し、原液とする。

原液について、3.6 の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液に適量のアジュバントを添加し、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、小分製品とする。

小分製品について、3.7 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 ウイルス浮遊液の試験

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。

3.3 溶出液の試験

3.3.1 赤血球凝集(HA)価測定試験

3.3.1.1 試料

検体を希釈用液(GVB-BSA液)(付記2)で2倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

3.3.1.2 試験方法

各試料50 μ Lに適当と認められた希釈用液で調製したマウス固定赤血球浮遊液(付記3)を50 μ Lずつ加え、混合後28 \times に2時間静置した後、赤血球凝集の有無を観察する。

3.3.1.3 判定

赤血球の凝集を認めた試料の最高希釈倍数でHA価を表す。検体50 μ L当たりの価は、50,000倍以上でなければならない。

3.3.2 gX抗原並びにgI抗原否定試験

3.3.2.1 試料

可溶化液及び溶出液について同時に処理する。各検体を試料とする。

3.3.2.2 試験方法

還元処理した試料及びマーカーをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離する。次に、適当と認められたイムノプロット用メンブランに転写して抗gXウサギ血清(付記4)、抗gIウサギ血清(付記5)及びペルオキシダーゼ標識抗ウサギ抗体等を用いて検出する。

3.3.2.3 判定

可溶化液の試料においては、gX 抗原として約 90kDa、gI 抗原として約 130 及び約 90kDa の位置にバンドが検出されるが、溶出液の試料においては、各位置にいずれのバンドの出現も認めてはならない。

3.4 抗原液の試験

3.4.1 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。

3.4.2 HA 試験

3.3.1 を準用する。ただし、検体のHA価は、50,000倍以上でなければならない。

3.5 不活化抗原液の試験

3.5.1 不活化試験

3.5.1.1 試験材料

3.5.1.1.1 試料

100 倍量以上のリン酸緩衝食塩液を用い、検体 2 mL を 4 ℃ で一夜透析し、不活化剤を除去したものを試料とする。

3.5.1.1.2 培養細胞

CRFK 細胞を培養びんで 1 ~ 3 日間培養し、単層となったものを用いる。

3.5.1.2 試験方法

試料 0.5 mL ずつを 2 本の培養びん(培養面積25cm²)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を 5 mL ずつ加えて 37 ℃ で 5 日間培養し、CPE を観察する。CPE を認めない場合には、5 日目に各培養フラスコの培養液を新しい試験管に移し、細胞をリン酸緩衝食塩液で洗浄した後、トリプシン消化して細胞増殖用培養液 5 mL に細胞を浮遊させ、これに先の培養液 5 mL を加えて培養びん(培養面積 75cm²)にて 37 ℃ で 5 日間培養し、CPE を観察する。残りの 1 本は、非接種対照細胞として同様に細胞継代する。

3.5.1.3 判定

試料を接種したいずれの培養細胞にも 2 代継代中に CPE を認めないとき、試験に適合したものとす。

3.6 原液の試験

3.6.1 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。

3.7 小分製品の試験

3.7.1 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液体でなければならず、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。

3.7.2 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。

3.7.3 ホルマリン定量試験

適当と認められた方法により油性アジュバントを除いた試料を用い、一般試験法のホルマリン定量法を準用して試験するとき、ホルマリンの含有量は、0.03vol % 以下でなければならない。

3.7.4 安全試験

3.7.4.1 試験材料

3.7.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.7.4.1.2 試験動物

約 1 か月齢の豚 3 頭を用いる。

3.7.4.2 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頸部筋肉内に 3 週間隔で 2 回注射し、対照群とともに同居飼育し、6 週間観察する。

3.7.4.3 判定

観察期間中、臨床異常を認めてはならない。

3.7.5 gX マーカー試験

3.7.5.1 試験材料

3.7.5.1.1 試験動物

3.7.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.7.5.1.2 血清

3.7.4 の試験を終了した試験群の豚の血清を等量混合したものを試料とする。

3.7.5.1.3 gX 抗原

限外ろ過濃縮したオーエスキー病ウイルス感染培養液からウイルスを遠心除去し、硫酸塩析、透析したものを gX 抗原液とする。

3.7.5.2 試験方法

還元処理した gX 試料とマーカーを SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、適当と認められたイムノプロット用メンブランに転写する。50 倍に希釈した被検血清、参照陽性血清（付記 6）及びペルオキシダーゼ標識抗ブタ抗体等を用いて検出する。

3.7.5.3 判定

参照血清で得た約 90kDa の位置に被検血清ではバンドを認めてはならない。

3.7.6 gI マーカー試験

3.7.6.1 試験材料

3.7.6.1.1 試験動物

3.7.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.7.6.1.2 酵素抗体反応キット

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。

3.7.6.2 試験方法

3.7.4 の試験終了日（第 2 回注射後 3 週目）に、試験豚から得た血清について、酵素抗体反応を行う。

3.7.6.3 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。

3.7.7 力価試験

3.7.7.1 試験材料

3.7.7.1.1 試験動物

3.7.4 の試験に用いた動物を用いる。

3.7.7.1.2 中和試験用ウイルス

オーエスキー病ウイルス岩手株又は適当と認められた株を用いる。

3.7.7.1.3 培養細胞

CRFK 細胞を 96 ウェルのマイクロプレートに培養し、単層となったものを用いる。

3.7.7.2 試験方法

3.7.4 の試験終了日に、試験豚から得た血清について、中和試験を行う。被検血清を非働化させた後、ウイルス増殖用培養液（付記 7）で 2 倍階段希釈した各希釈血清の 0.2mL と 0.05mL 中に 200TCID₅₀ の中和試験用ウイルスを含む液 0.2mL を混合し、37℃ で 60 分間処理する。この各混合液 0.05mL ずつを 1 希釈当たりマイクロプレートの 4 ウェルの培養細胞にそれぞれ接種し、37℃ で

60 分間吸着させる。吸着後、ウイルス増殖用培養液をウェル当たり 0.15mL ずつ加え、37 5 vol %炭酸ガス下で 5 日間培養し CPE の有無を観察する。

3.7.7.3 判定

培養細胞にCPEの阻止を認めたものを中和とみなし、ベーレンス・ケルバー法により中和抗体価を算出する。接種群の中和抗体価は、16 倍以上でなければならない。この場合、対照群においては 1 倍未満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、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 可溶化液

1,000 mL中	
塩化ナトリウム	23.38 g
塩化カリウム	0.33 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	2.72 g
リン酸二水素カリウム	0.2 g
トライトン X-100	10.0 mL
水	残 量

121 、15 分間高压滅菌する。

付記 2 希釈用液 (GVB-BSA 液)

A 液：バルビタール	2.88 g
バルビタールナトリウム	1.88 g
塩化ナトリウム	42.5 g
1,000mL の精製水に溶解し、121 、15 分間高压滅菌する。	
B 液：ゼラチン	2.0 g
100mL の精製水に溶解する。	
C 液：塩化カルシウム二水和物	0.44 g
100mL の精製水に溶解する。	
D 液：塩化マグネシウム六水和物	2.03 g
100mL の精製水に溶解する。	

A 液、B 液、C 液及びD液をそれぞれ 20mL、5mL、0.5mL 及び 0.5mL 混合し、精製水を加えて 100mL とする。これに牛血清アルブミン (BSA) を 0.2g 加えて溶解する。pH は 7.0 ~ 7.5 である。

付記 3 マウス固定赤血球浮遊液

6 ~ 8 週齢のマウス (Balb/c) から採血した赤血球の被凝集性を個体ごとに確認した後、リン酸緩衝食塩液で 3 回洗浄したマウス赤血球をプールする。プールした赤血球浮遊液に 25vol %グルタルアルデヒド水溶液を 1vol %の割合で加え、常温で一晩振盪する。次に、リン酸緩衝食塩液で 3 回洗浄した赤血球の沈渣に適量の GVB-BSA 液(付記 2)を加えて浮遊させ、赤血球数を測定して最終的に赤血球数 4,000 ~ 5,000 万個 / mL になるよう GVB-BSA 液に浮遊させる。固定赤血球浮遊液は、4 に保存し、使用可能期間は 1 年間とする。

付記 4 抗 gX ウサギ血清

ADV-gX 遺伝子の制限酵素 Bam H I 断片を市販の大腸菌発現ベクター pGEX-3X に組み込み発現させる。発現たん白を油性アジュバント (ISA70) と混合し 3 回免疫して得た抗血清を用

いる。抗 gX ウサギ血清は、ADV 感染細胞可溶性抗原を試料としてウェスタンブロッティング法を行うとき、約 90kDa の位置にバンドを検出する。

付記 5 抗 gI ウサギ血清

ADV- gI の中和エピトープを含む 52 ~ 84 番目のアミノ酸をコードするセンス鎖及びアンチセンス鎖の遺伝子を合成する。これらをアニーリングした後、市販の大腸菌発現プラスミドベクター pGEX-2T に組み込み発現させる。融合たん白を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分離してゲルから抽出した後、オイルアジュバントと混合してウサギに 3 回注射して免疫血清を得る。抗 gI ウサギ血清は、ADV 感染細胞可溶性抗原を試料としてウェスタンブロッティング法を行うとき、約 130 と 90kDa の位置にバンドを検出する。

付記 6 参照陽性血清

オーエスキー病ウイルス糖たん白 gX 抗体識別検査用キットで測定したとき、吸光度率 65 ~ 70 % を示すブタ血清で、更に gX 抗原液を抗原としたウエスタンブロット法で約 90kDa の位置にバンドが認められるもの、又は参照陽性血清とともに同一条件で実施したウエスタンブロット法で、約 90kDa の位置に同等の染色強度のバンドを示す ADV 感染ブタ血清を用いる。

付記 7 ウイルス増殖用培養

1,000mL 中

トリプトース・ホスフェイト・ブロス

2.95 g

牛胎子血清

10.0 mL

イーグルMEM

残 量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.0 ~ 7.2 に調整する。

必要最少量の抗生物質を加えてもよい。