

豚オーエスキー病（gI-、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 28 年 1 月 20 日（告示第 95 号） 新規追加

1 定義

糖たん白 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。

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ベゴニア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。ウイルス性チミジンキナーゼを合成しない。

Vero 細胞で CPE を伴って増殖する。

2.1.3 継代及び保存

原株及び原種ウイルスは、Vero 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

Vero 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。

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。

最終バルクについて、3.2 の試験を行う。

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本以上の培養瓶に継代し、7日間培養し、観察するとき、CPEを認めてはならない。

3.2 最終バルクの試験

3.2.1 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、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

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 及び 2.3.1 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、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

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 安全試験

3.2.3.1 試験材料

3.2.3.1.1 注射材料

検体を注射材料とする。

3.2.3.1.2 試験動物

10週齢以下の豚を用いる。

3.2.3.2 試験方法

試験動物3頭に注射材料をそれぞれ筋肉内に注射し、14日間観察する。

3.2.3.3 判定

観察期間中、試験動物に異常を認めてはならない。

3.2.4 糖たん白 gI 欠損マーカー試験

3.2.4.1 試験材料

3.2.3 の試験終了後、14日目の血清を用いる。

3.2.4.2 試験方法

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を用いて酵素抗体反応を行う。

3.2.4.3 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。

3.2.5 牛ウイルス性下痢ウイルス迷入否定試験

3.2.5.1 試験材料

3.2.3 の試験終了後、14日目の血清を用いる。

3.2.5.2 試験方法

牛ウイルス性下痢ウイルスに対する中和試験を行う。

3.2.5.3 判定

血清中に牛ウイルス性下痢ウイルス抗体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、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。異物及び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

3.3.7.1 試験材料

3.3.7.1.1 試料

試験品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。

3.3.7.1.2 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。

3.3.7.2 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。

3.3.7.3 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 mL 中 10^{5.5}TCID₅₀ 以上でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、そのウイルス含有量とする。

3.3.8 マーカー試験

3.3.8.1 糖たん白 gI 欠損マーカー

3.3.8.1.1 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。

3.3.8.1.2 試験方法

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。

3.3.8.1.3 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。

3.3.8.2 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 3）で 1 × 10⁵⁰ 個/mL となるように調整した細胞浮遊液の 5 mL を約 25cm² の培養瓶に入れ、37℃で培養し、単層となったものを用いる。

3.3.8.2.1.3 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。

3.3.8.2.2 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 3.3.7 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 ～ 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、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

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又は適当と認められた株を用いる。

3.3.10.1.3 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。

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 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、プラック数を測定する。

3.3.10.3 判定

プ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、対照群の中和抗体価は、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、3 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 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
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 0.00018 g
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。