

# 豚オーエスキ一病（g I -、t k -）生ワクチン（トコフェロール酢酸エステルアジュバント加溶解用液） (シード)

令和4年8月15日(告示第1287号)新規追加

## 1 定義

シードロット規格に適合した糖たん白g I 及びチミジンキナーゼを產生しない弱毒オーエスキ一病ウイルスを同規格に適合した株化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、使用時にトコフェロール酢酸エステ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

弱毒オーエスキ一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g I 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。豚に対して病原性を示さない。

#### 2.1.3 マスターシードウイルス

##### 2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシードウイルスは、Vero細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシードウイルスは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結乾燥して-20°C以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

マスターシードウイルスについて、3.1.1の試験を行う。

マスターシードウイルスは、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシードウイルスから小分製品までの最高継代数は、5代以内でなければならない。

#### 2.1.4 ワーキングシードウイルス

##### 2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシードウイルスは、Vero細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖及び継代する。

ワーキングシードウイルスは、凍結乾燥して-20°C以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

ワーキングシードウイルスについて、3.1.2の試験を行う。

#### 2.1.5 プロダクションシードウイルス

##### 2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシードウイルスは、Vero細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖させる。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、凍結乾燥して-20℃以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

プロダクションシードウイルスを保存する場合は、3.1.3の試験を行う。

## 2.2 製造用材料

### 2.2.1 培養細胞

Vero細胞又は製造に適當と認められた株化細胞を用いる。

### 2.2.2 培養液

製造に適當と認められた培養液を用いる。

### 2.2.3 マスターセルシード

#### 2.2.3.1 作製、保存及びプロダクションセルシードまでの最高継代数

マスターセルシードは、2.2.2の培養液で増殖させ、連続した工程により作製し、保存用の容器に分注する。

分注したマスターセルシードは、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して-70℃以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

マスターセルシードについて、3.2.1の試験を行う。

マスターセルシードは、ワクチンの製造又は試験以外の目的で継代しない。マスターセルシードからプロダクションセルシードまでの最高継代数は、20代以内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、その継代数とする。

### 2.2.4 ワーキングセルシード

#### 2.2.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングセルシードは、2.2.2の培養液で増殖及び継代する。

ワーキングセルシードは、凍結して-70℃以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

ワーキングセルシードについて、3.2.2の試験を行う。

### 2.2.5 プロダクションセルシード

#### 2.2.5.1 増殖及び保存

プロダクションセルシードは、2.2.2の培養液で増殖させる。

プロダクションセルシードを保存する場合は、凍結して-70℃以下で保存する。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その保存温度とする。

プロダクションセルシードを保存する場合は、3.2.3の試験を行う。

## 2.3 原液

### 2.3.1 プロダクションセルシードの培養

1回に処理し、培養した細胞を個体別培養細胞とみなす。ウイルス接種前のプロダクションセルシードに異常を認めてはならない。

### 2.3.2 ウイルスの培養

プロダクションシードウイルスを2.3.1の細胞で培養し、ウイルス増殖極期に個体別培養細胞ごとに採取した培養液、そのろ液若しくは遠心上清又はこれらを濃縮したものを原液とする。

## 2.4 最終バルク

原液を混合し、最終バルクとする。この場合、適當と認められた安定剤及び保存剤を加

えてもよい。

最終バルクについて、3.3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、3.4の試験を行う。

## 3 試験法

### 3.1 製造用株の試験

#### 3.1.1 マスター・シードウイルスの試験

##### 3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の1.4.2.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.1.2 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。

##### 3.1.1.3 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。

##### 3.1.1.4 外来性ウイルス否定試験

###### 3.1.1.4.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、2.1及び2.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.1.1.4.2 特定ウイルス否定試験

###### 3.1.1.4.2.1 特定ウイルス否定一般試験

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス及び内在性レトロウイルス（C、Dタイプ粒子）について、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1及び3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.1.1.4.2.2 個別ウイルス否定試験

豚熱ウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス、ロタウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.1、3.2.3、3.2.4、3.2.5、3.2.7及び3.2.9を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.1.1.5 対象動物を用いた免疫原性試験

一般試験法の対象動物を用いた免疫原性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。

##### 3.1.1.6 対象動物を用いた安全性確認試験

一般試験法の対象動物を用いた安全性確認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。

##### 3.1.1.7 病原性復帰確認試験

一般試験法の病原性復帰確認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。

## 3.1.2 ワーキング・シードウイルスの試験

### 3.1.2.1 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。

### 3.1.2.2 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。

### 3.1.3 プロダクションシードウイルスの試験

#### 3.1.3.1 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。

#### 3.1.3.2 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。

### 3.2 株化細胞の試験

#### 3.2.1 マスターセルシードの試験

##### 3.2.1.1 培養性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.2.1.2 起源動物種同定試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.2を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.2.1.3 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。

##### 3.2.1.4 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。

#### 3.2.1.5 外来性ウイルス否定試験

##### 3.2.1.5.1 共通ウイルス否定試験

一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2及び2.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.2.1.5.2 特定ウイルス否定試験

###### 3.2.1.5.2.1 特定ウイルス否定一般試験

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス及び内在性レトロウイルス（C、Dタイプ粒子）について、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2及び3.1.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

###### 3.2.1.5.2.2 個別ウイルス否定試験

豚熱ウイルス、豚サーコウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス、ロタウイルス、日本脳炎ウイルス及び狂犬病ウイルスについて、一般試験法の外来性ウイルス否定試験法の1.2、3.2.3、3.2.4、3.2.5、3.2.7及び3.2.9を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.2.1.6 核学的（染色体）性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.6を準用して試験するとき、適合しなければならない。

##### 3.2.1.7 腫瘍形成性／腫瘍原性試験

シードロット規格の2.1.4.2.1.7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 ワーキングセルシードの試験

#### 3.2.2.1 培養性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.2.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.2.2 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。

### 3.2.2.3 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。

### 3.2.3 プロダクションセルシードの試験

#### 3.2.3.1 培養性状試験

シードロット規格の2.1.4.2.3.1を準用して試験するとき、適合しなければならない。

#### 3.2.3.2 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。

#### 3.2.3.3 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。

### 3.3 最終バルクの試験

#### 3.3.1 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。

### 3.4 小分製品の試験

#### 3.4.1 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均質な液体でなければならず、異物及び異臭を認めではならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

#### 3.4.2 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。

#### 3.4.3 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。

#### 3.4.4 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。

#### 3.4.5 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。

#### 3.4.6 ウイルス含有量試験

##### 3.4.6.1 試験材料

###### 3.4.6.1.1 試料

試験品をウイルス増殖用培養液（付記1）で10倍階段希釈し、各段階の希釈液を試料とする。

###### 3.4.6.1.2 培養細胞

Vero細胞又は適當と認められた培養細胞で培養し、単層となったものを用いる。

##### 3.4.6.2 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、37°Cで6～7日間培養し、観察する。

#### 3.4.6.3 判定

培養細胞にCPEを認めたものを感染とみなし、TCID<sub>50</sub>を算出する。

試験品のウイルス含有量は、1頭分当たり $10^{5.5}$ TCID<sub>50</sub>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。

#### 3.4.7 マーカー試験

##### 3.4.7.1 糖たん白g I 欠損マーカー試験

###### 3.4.7.1.1 試験材料

3.4.8の試験終了後、14日目の血清を用いる。

###### 3.4.7.1.2 試験方法

オーエスキ一病ウイルス糖たん白g I 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。

###### 3.4.7.1.3 判定

血清中にオーエスキ一病ウイルス糖たん白g I 抗体を認めてはならない。ただし、原液を含む中間工程で糖たん白g I 欠損マーカー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。

##### 3.4.7.2 チミジンキナーゼ欠損マーカー

###### 3.4.7.2.1 試験材料

###### 3.4.7.2.1.1 試料

試験品を試料とする。

###### 3.4.7.2.1.2 培養細胞

Ltk<sup>-</sup>細胞を細胞増殖用培養液（付記2）で $1 \times 10^{5.0}$ 個/mLとなるように調製した細胞浮遊液の5mLを約25cm<sup>2</sup>の培養瓶に入れ、37°Cで培養し、単層となつたものを用いる。

###### 3.4.7.2.1.3 培養液

HAT培地（付記3）及びウイルス増殖用培養液を用いる。

###### 3.4.7.2.2 試験方法

試料の0.2mLずつを2本の培養細胞に接種し、37°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5mLをそれぞれの培養細胞に加え、37°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3.4.6を準用して測定する。

###### 3.4.7.2.3 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。

#### 3.4.8 安全試験

##### 3.4.8.1 試験材料

###### 3.4.8.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

###### 3.4.8.1.2 試験動物

体重10～40kgの豚を用いる。

### 3.4.8.2 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 1 頭分をそれぞれ筋肉内に注射し、対照群と共に同居飼育し、14日間観察する。

### 3.4.8.3 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。

### 3.4.9 力価試験

#### 3.4.9.1 試験材料

##### 3.4.9.1.1 試験動物

3.4.8の試験に用いた動物を用いる。

##### 3.4.9.1.2 中和試験用ウイルス

Vero細胞又は適当と認められた培養細胞で増殖させたオーエスキーオ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。

##### 3.4.9.1.3 培養細胞

Vero細胞又は適当と認められた培養細胞を用いる。

#### 3.4.9.2 試験方法

3.4.8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。各希釈血清と0.2mL中約80PFUの中和試験用ウイルス液を等量混合し、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(穴)以上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4)を重層し、37℃、5 vol%炭酸ガス下で2日間培養する。培養後、第2次重層寒天培地(付記5)を重層し、更に一夜培養後、ブラック数を測定する。

#### 3.4.9.3 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、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、製造後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 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・プロス 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

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 2 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 2.95g

L-グルタミン 0.3 g

牛血清 30~100mL

イーグルMEM 残 量

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 HAT培地

1,000mL中

ヒポキサチン 0.0014 g

アミノブテリン 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 0~100mL

イーグルMEM 残 量

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 2.95g

寒天 10.0g

牛血清 20mL

イーグルMEM 残 量

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 5 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 2.95g

寒天 10.0 g

ニュートラルレッド 0.05g

イーグルMEM 残 量

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。