

豚サーコウイルス（2型）感染症（1型—2型キメラ）（デキストリン誘導体アジュバント加）不活化ワクチン

平成 21 年 7 月 1 日（告示第 862 号） 新規追加

組換え DNA 技術を応用して製造された豚サーコウイルス 1 型オープンリーディングフレーム 2（以下「PCV1ORF2」という。）遺伝子を 2 型ウイルスの ORF2 に置換したウイルス（以下「cPCV1-2」という。）を培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化し、デキストリン誘導体アジュバントを添加したワクチンである。

1 小分製品の試験

1.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法により試験を行い、これに適合しなければならない。

1.2 不活化試験

1.2.1 試験材料

1.2.1.1 試料

100 倍量以上の透析・吸着用液（付記 1）を用い、試験品 3 mL を 4℃ で一夜透析し、保存剤を除去したものを試料とする。

1.2.1.2 培養細胞

PK-15 細胞（付記 2）を 150cm² の培養びんで培養し、単層となったものを用いる。

1.2.2 試験方法

培養細胞に透析・吸着用液を 10mL を加えた後、試料 2 mL を接種し、37℃ で 2 時間吸着させた後、透析・吸着用液で洗浄する。ウイルス増殖用培養液（付記 3）を 100mL 加え、37℃ で 3～4 日間培養後、細胞を次代に継代する。継代は 3 代まで同様の方法で培養し、観察する。3～4 日間培養した 3 代目の細胞をチャンバースライドに継代し、3～4 日間培養した培養細胞についてアセトンで固定後、検出抗体（付記 4）による蛍光抗体法を行う。

1.2.3 判定

培養細胞に特異蛍光抗原を認めてはならない。

1.3 安全試験

1.3.1 試験材料

1.3.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.3.1.2 試験動物

3～5 週齢の豚を用いる。

1.3.2 試験方法

注射材料 2 頭分ずつを 2 頭の試験動物の両側の頸部筋肉内に 1 頭分ずつ注射し、21 日間観察する。

1.3.3 判定

観察期間中、試験動物に異常を認めてはならない。

1.4 力価試験

1.4.1 試験材料

試験品、参照ワクチン（付記 5）、プラセボワクチン（付記 6）をリン酸緩衝食塩液（付記 7）で同倍率に希釈し、60 秒間超音波処理後、ポリソルベート 20 の最終濃度が 0.3vol% になるように処理液（付記 8）を加えたものをそれぞれ処理検体、処理参照ワクチン及び処理プラセボワクチンとする。

1.4.2 試験方法

1.4.2.1 固相化プレートの作製

捕獲抗体（付記9）を100 μ Lずつ96穴ELISAプレートに分注し、2～7℃で16時間以上静置する。洗浄・希釈液（付記10）で4回洗浄し、ブロッキング液（付記11）を200 μ Lずつ加え、35～39℃で60分間反応させる。このプレートを洗浄・希釈液で4回洗浄し、固相化プレートとする。

1.4.2.2 反応

洗浄・希釈液で処理検体及び処理参照ワクチンを1.75倍階段希釈した各段階の希釈液100 μ Lずつを固相化プレートのそれぞれ2穴に、また、処理参照プラセボワクチン同量を4穴以上に加え、35～39℃で一夜振とうし、反応させる。反応後、各穴を洗浄・希釈液で4回洗浄する。抗体希釈用緩衝液（付記12）で100倍に希釈した検出抗体100 μ Lを各穴に分注し、35～39℃で60分間反応させる。反応後、各穴を洗浄・希釈液で4回洗浄する。2 vol %ウサギ血清加希釈用緩衝液（付記13）で200～2,000倍に希釈した酵素標識抗体（付記14）100 μ Lずつを各穴に分注し、35～39℃で60分間反応させる。反応後、各穴を洗浄・希釈液で4回洗浄する。基質液（付記15）100 μ Lずつを各穴に分注し、35～39℃で20分間反応させた後、処理プラセボワクチンをブランクとして、主波長650nm、副波長490nmで吸光度を測定する。

1.4.3 判定

参照ワクチンの力価を1.0として、試験品の相対力価を統計学的計算方法（付記16）により算出するとき、試験品の相対力価は1.0以上でなければならない。この際、処理参照ワクチンの吸光度は1.4～2.0、処理プラセボワクチンのそれは0.1以下でなければならない。

付記1 透析・吸着用液

1,000mL 中

ラクトアルブミン水解物 0.5g

MEM 又はイーグル MEM 残量

炭酸水素ナトリウム、塩酸又は水酸化ナトリウムでpH6.9～7.1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 PK-15 細胞

豚サーコウイルス陰性のもの

付記3 ウイルス増殖用培養液

1,000mL 中

ラクトアルブミン水解物 0.5g

牛胎子血清 20～50mL

MEM 又はイーグル MEM 残量

炭酸水素ナトリウム、塩酸又は水酸化ナトリウムでpH6.9～7.1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 検出抗体

cPCV1-2に対する中和活性のあるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞5D5-5H4の培養上清。

付記5 参照ワクチン

豚サーコウイルス（1型—2型キメラ）感染症（デキストリン誘導体アジュバント加）不活化ワクチン（以下「ワクチン」という。）で、動物医薬品検査所が適当と認めたもの

- 付記6 プラセボワクチン
ウイルスを接種しないでワクチンの製造方法で製造されたもの
- 付記7 リン酸緩衝食塩液
1,000mL 中
塩化ナトリウム 8.5g
リン酸二水素ナトリウム 0.253g
リン酸水素二ナトリウム 1.19g
水 残量
pH を 7.1 ~ 7.3 に調整する。
- 付記8 処理液
リン酸緩衝食塩液にポリソルベート 20 を 18vol % になるように加えたもの
- 付記9 捕獲抗体
豚サーコウイルス 2 型抗原で免疫して得たウサギ血清で、1.4.2 を準用した試験方法（以下「力価試験の ELISA」という。）で、処理参照ワクチンの吸光度が 1.4 ~ 2.0 を示すように吸着用緩衝液（付記 17）で希釈して用いる。
- 付記10 洗浄・希釈液
リン酸緩衝食塩液にポリソルベート 20 を 0.3vol % となるように加えたもの
- 付記11 ブロッキング液
吸着用緩衝液に脱脂粉乳を 1.15 w/v% となるように加えたもの
- 付記12 抗体希釈用緩衝液
洗浄・希釈液に脱脂粉乳を 1.15 w/v % となるように加えたもの
- 付記13 2 vol % ウサギ血清加希釈用緩衝液
抗体希釈用緩衝液にウサギ正常血清を 2vol % となるように加えたもの
- 付記14 酵素標識抗体
ペルオキシダーゼ標識した抗マウス IgG (H+L) 山羊血清
- 付記15 基質液
A 液：テトラメチルベンチジン 0.4g を 26vol % N' -N' -ジメチルホルムアルデヒド 1,000mL で溶解したもの
B 液：0.02w/v % 過酸化水素溶液
使用時に A 液と B 液を等量混合して用いる。
- 付記16 統計学的計算方法
動物医薬品検査所が適当と認めたもの
- 付記17 吸着用緩衝液
1,000mL 中

炭酸ナトリウム	1.59g
炭酸水素ナトリウム	2.93g
水	残量

pHを7.1～7.3に調整する。