

豚サーコウイルス（2型・組換え型）感染症（酢酸トコフェロール・油性アジュバント加）不活化ワクチン

平成23年2月18日(告示第435号)一部改正

組換え DNA 技術を応用して製造された豚サーコウイルス2型オープンリーディングフレーム2（以下「PCV2ORF2」という。）遺伝子を挿入したバキュロウイルスを培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化し、酢酸トコフェロール及び油性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 毒性限度確認試験

一般試験法の毒性限度確認試験法1により試験を行い、これに適合しなければならない。ただし、試験品の注射量は0.3mLとし、注射後の体重測定は5日目に行う。

1.3 力価試験

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

体重約350gのモルモットを用いる。

1.3.2 試験方法

試験動物10匹のそれぞれの筋肉内に注射材料を0.25mLずつ注射し、注射28日後に得られた各個体の血清についてELISAにより抗体価を測定する。

抗原吸着プレート（付記1）の12列目を除く各穴に希釈液（付記2）を100 μ Lずつ分注し、非働化した各被検血清を50 μ L加え、3倍階段希釈する。希釈液で5倍に希釈した参照標準血清（付記3）を50 μ L加え、3倍階段希釈する。希釈液で5倍及び16倍に希釈した参照陽性血清（付記4）及び参照陰性血清（付記5）をそれぞれ12列目の4穴に100 μ L加える。11列目の2穴をブランク対照とする。37 $^{\circ}$ Cで60分間反応させた後、洗浄液（付記6）300 μ Lで4回洗浄し、ビオチン標識化PCV2特異モノクローナル抗体（付記7）を各穴に100 μ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで60分間反応させる。洗浄液300 μ Lで4回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識アビジン液（付記8）を各穴に100 μ Lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで45分間反応させる。洗浄液300 μ Lで8回洗浄し、基質液（付記9）を各穴に100 μ Lずつ加え、常温で15分間反応させた後、2 mol/L 硫酸液を各穴に50 μ Lずつ加え、反応を停止させる。波長450nmで吸光度を測定し、以下の式から被検血清及び参照標準血清の抗体価（log₂）を求める。

$$50\% \text{ 阻止吸光度} = (\text{参照陰性血清の吸光度の平均} - \text{参照陽性血清の吸光度の平均}) / 2$$

$$\text{カットオフ吸光度} = 50\% \text{ 阻止吸光度} + \text{参照陽性血清の吸光度の平均}$$

$$\text{各血清の抗体価} = \log_2 \{ \text{吸光度 A を示す各血清の希釈倍数} + (\text{カットオフ吸光度} - \text{吸光度 A} / \text{吸光度 B} - \text{吸光度 A}) \times (\text{吸光度 B を示す各血清の希釈倍数} - \text{吸光度 A を示す各血清の希釈倍数}) \}$$

吸光度 A 及び吸光度 B：被検血清及び参照標準血清におけるカットオフ吸光度を挟む2点（吸光度 A < 吸光度 B）の吸光度

1.3.3 判定

試験動物の抗体価の平均値は6.2 log₂以上でなければならない。この際、ブランク対照の平均吸

光度は 1.000 以上、参照陽性血清の最小吸光度は 0.200 未満、参照陰性血清の最大吸光度は 1.000 以上でなければならず、参照標準血清の抗体価は $8.0 \log_2 \sim 10.0 \log_2$ を示さなければならない。

付記 1 抗原吸着プレート

PCV2 特異的モノクローナル抗体 3/1B4 (付記 10) をモノクローナル抗体希釈液 (付記 11) で蛋白量として 100 ng / mL になるように希釈し、96 穴マイクロプレートの各穴に $135 \mu \text{ L}$ ずつ分注し、 $2 \sim 8^\circ \text{C}$ で $16 \sim 24$ 時間静置し、洗浄液 $300 \mu \text{ L}$ で 4 回洗浄後、カゼイン緩衝液 (付記 12) を $200 \mu \text{ L}$ ずつ分注し、 37°C で $1 \sim 2$ 時間静置し、洗浄液 $300 \mu \text{ L}$ で 4 回洗浄する。さらに、PCV2ORF2 抗原 (付記 13) を希釈液で蛋白量として $4 \mu \text{ g / mL}$ になるように希釈し、 $100 \mu \text{ L}$ ずつ分注し、 37°C で 1 時間静置し、洗浄液 $300 \mu \text{ L}$ で 4 回洗浄したもの

付記 2 希釈液

1,000mL 中

リン酸水素二ナトリウム二水和物	35.58 g
塩化ナトリウム	11.69 g
ポリソルベート 80	0.5 g
牛血清アルブミン (カオリン処理済み)	1.0 g
水	残量

pH を 7.0 に調整し、ろ過滅菌する。

付記 3 参照標準血清

豚サーコウイルス (2 型・組換え型) 感染症 (酢酸トコフェロール・油性アジュバント加) 不活化ワクチン (以下「ワクチン」という。) で免疫した SPF 鶏群由来の血清で、PCV2ORF2 に対し抗体陽性のものを非働化したもので、1.3.2 を準用した ELISA (以下「力価試験の ELISA」という。) で測定したとき、抗体価 $8.0 \log_2 \sim 10.0 \log_2$ を示すもの

付記 4 参照陽性血清

ワクチンで免疫した生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏から得た血清で、PCV2ORF2 に対し抗体陽性のものを非働化したもので、力価試験の ELISA で測定したとき、吸光度 0.200 未満を示すもの

付記 5 参照陰性血清

生ワクチン製造用材料の規格 1.1 由来の鶏から得た血清で、PCV2ORF2 に対し抗体陰性のものを非働化したもので、力価試験の ELISA で測定したとき、吸光度 1.000 以上を示すもの

付記 6 洗浄液

1,000mL 中

リン酸水素二ナトリウム、無水	1.15 g
リン酸二水素カリウム	0.2 g
塩化ナトリウム	37.2 g
塩化カリウム	0.2 g
ポリソルベート 20	1.5 g
水	残量

pH を 7.0 に調整する。

付記7 ビオチン標識化 PCV2 特異モノクローナル抗体
PCV2ORF2 に特異的モノクローナル抗体 5/6H12 をビオチンで標識したもので、希釈液で 1,200 倍に希釈して用いる。

付記8 ペルオキシダーゼ標識アビジン液
ペルオキシダーゼで標識したアビジン液で、希釈液で 2,500 倍に希釈して用いる。

付記9 基質液
UP 緩衝液、0.6w/v % TMB 溶液及び水を 1、0.185 及び 10 の割合で混合したもの
UP 緩衝液：テトラメチルベンジジン基質液（酢酸ナトリウム三水和物 13.6g を 80mL の水に溶解し、1.5mol/L のクエン酸一水和物で pH 5.5 に調整後、水を加えて 100mL としたもの）に尿素過酸化水素 140mg を加えたもの
0.6w/v % TMB 溶液：テトラメチルベンジジン 6g をジメチルスルホキシド 1,000mL で溶解したもの

付記10 PCV2 特異モノクローナル抗体 3/1B4
PCV2ORF2 に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ培養細胞の培養上清をアフィニティクロマトグラフィーで精製し、1 mL 中蛋白量として 600 μ g になるように調整したもの

付記11 モノクローナル抗体希釈液
1,000mL 中
炭酸ナトリウム 1.59 g
炭酸水素ナトリウム 2.93 g
水 残量
pH を 9.6 に調整し、ろ過滅菌する。

付記12 カゼイン緩衝液
1,000mL 中
トリス 4.84 g
スクロース 40.0 g
Triton X-100 0.5 g
カゼイン 2.0 g
水 残量
水約 400mL にトリスを加え、溶解し、pH を 7.3 ~ 7.5 に調整した後、残りの試薬を加え、水で 1,000mL とする。ろ過滅菌する。

付記13 PCV2ORF2 抗原
ワクチンと同じ製造方法で製造した PCV2ORF2 蛋白抗原を不活化したもので、ポリアクリルアミドゲル電気泳動した場合 28kD にバンドを認め、1 mL 中蛋白量として 200 μ g になるように調整したもの