

豚サーコウイルス(2型)感染症不活化ワクチン(油性アジュバント加懸濁用液)

平成20年6月6日(告示第914号)

豚サーコウイルス(2型)を培養細胞で増殖させて得たウイルス液を不活化したもので、使用時に油性アジュバントを含む懸濁用液と混和して調製するワクチンである。

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

試験品を試料とする。

1.2.1.2 培養細胞

PPK-3F細胞を用いる。

1.2.2 試験方法

細胞増殖用培養液(付記1)で適当な濃度に調整した培養細胞浮遊液30mLに試料1.5mLを接種し、37℃で1日培養後グルコサミン処理培地(付記2)を7~8mL加え、37℃で15分間静置した後、上清を除去し、ウイルス増殖用培養液(付記3)を加えて処理し、3日間培養する。培養細胞を2~3回凍結融解し、遠心して得た上清15mLを細胞浮遊液に同様に接種、培養、処理した後、ろ過した液を新たな細胞浮遊液に等量加え、37℃で4日間培養した細胞について豚サーコウイルス(2型)(以下「PCV2」という。)モノクローナル抗体(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 異常毒性否定試験

動生剤基準の一般試験法の異常毒性否定試験を準用して試験するとき、適合しなければならない。

1.4 力価試験

1.4.1 試験材料

1.4.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

1.4.1.2 試験動物

6~7週齢のマウスを用いる。

1.4.2 試験方法

試験動物10匹のそれぞれの頸部皮下に注射材料を0.2mLずつ注射し、注射21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。

希釈用96穴プレートにDLE/SD緩衝液(付記5)を各穴に80μLずつ分注し、DLE/SD緩衝液で5倍に希釈した各被検血清、参照陽性血清(付記6)及び参照陰性血清(付記7)をそれぞれ80μL加え、2倍階段希釈する。抗原液(付記8)を各穴に等量加え、4℃で一夜静置して処理する。この抗原・抗体反応液を100μLずつ固相化プレート(付記9)の各穴に加え、37℃で3時間感作し、洗浄液(付記10)300μLで洗浄後、抗体価測定ELISA用標識抗体(付記11)を各穴に100μLずつ加え、37℃で60分間反応させる。洗浄液300μLで3回洗浄し、各穴に基質液(付記12)を100μLずつ加え、遮光して20℃で30分間反応させる。0.5mol/L硫酸液を各穴に50μLずつ加え、反応を停止させる。主波長450nm、副波長630nmの2波長で吸光度(OD)を測定し、以下の計算式に

より OD₅₀ を示した血清の希釈倍率を抗体価とする。

$$OD_{50} = (OD_{min} + OD_{max}) / 2$$

OD_{min} : 参照陽性血清の最低希釈倍数における OD の平均

OD_{max} : 320 倍から 2,560 倍まで希釈した参照陰性血清の OD の平均

$$\text{抗体価} (\log_{10}) = (OD_{50} - \text{定数}) / \text{傾き}$$

定数及び傾き : OD と血清希釈倍数の対数について OD₅₀ を挟む 2 点の回帰直線における定数及び傾き

1.4.3 判定

試験動物の抗体価の実数は幾何平均で 72 倍以上でなければならない。この際、参照陽性血清の抗体価は所定の値を示し、参照陰性血清のそれは 20 倍以下でなければならない

付記 1 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

牛胎子血清 100 mL

イーグル MEM 残量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.4 ~ 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 グルコサミン処理培地

1,000mL 中

d-グルコサミン 65 g

ハンクス 199 培地 残量

付記 3 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

牛胎子血清 20 mL

イーグル MEM 残量

炭酸水素ナトリウムで pH を 7.4 ~ 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 PCV2 モノクローナル抗体

PCV2 オープンリーディングフレーム 2 (以下「PCV2 ORF2」という。) を認識するモノクローナル抗体

付記 5 DLE/SD 緩衝液

1,000mL 中

トリス 1.21 g

塩化ナトリウム 8.77 g

EDTA 3.72 g

ポリソルベート 20 1 mL

水 残量

pH を 7.0 に調整する。

付記 6 参照陽性血清

標準陽性血清（付記 13）と同様の方法で作成した血清で、標準血清を用いて 1.4.2 を準用した ELISA（以下「力価試験の ELISA」という。）で測定したとき、2 倍階段希釈の 3 段階目から 5 段階目に OD₅₀ を示すように DLE/SD 緩衝液で希釈して用いる。

付記 7 参照陰性血清

SPF マウスから得られた血清で、力価試験の ELISA で測定したとき抗体価が 20（1.30 log₁₀）倍以下のもの

付記 8 抗原液

PK15 細胞で培養した PCV2 1010-25 株を超音波処理し、遠心した後、 β -プロピオラクトンで不活化したもので、標準陽性血清を用いて力価試験の ELISA で測定したとき、標準血清が所定の抗体価を示すように DLE/SD 緩衝液で希釈して用いる。

付記 9 固相化プレート

抗体価測定 ELISA 用捕捉抗体（付記 14）を 120 μ L ずつ 96 穴 ELISA プレートに分注し、4 で一夜静置する。洗浄液で 3 回洗浄し、ブロッキング液（付記 15）を 200 μ L ずつ加え、37 で 60 分間反応させ、洗浄液で 3 回洗浄したもの

付記 10 洗浄液

1,000mL 中

トリス	1.21 g
塩化ナトリウム	8.77 g
ポリソルベート 20	1 mL
水	残量

pH を 7.3 ~ 7.7 に調整する。

付記 11 抗体価測定 ELISA 用標識抗体

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 PCV2 1902B1BC を接種したヌードマウスの腹水を精製し、ホ - スラディッシュペルオキシダーゼで標識した後、15 w/v % サッカリン加リン酸緩衝食塩液で調整したもので、標準陽性血清を用いて力価試験の ELISA で測定したとき、標準陽性血清が所定の抗体価を示すように DLE/SD 緩衝液で希釈して用いる。

付記 12 基質液

適当な規格のテトラメチルベンチジン溶液

付記 13 標準陽性血清

マウスを PCV2 感染症不活化ワクチン（油性アジュバント加懸濁用液）で 2 回免疫後 35 日に得られたプール血清で、力価試験の ELISA で測定したとき、抗体価 4,000 ~ 10,000 倍を示すもの

付記 14 抗体価測定 ELISA 用捕捉抗体

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 PCV2 1903A8BC を接種したヌードマウスの腹水を精製し、15w/v % サッカリン加リン酸緩衝食塩液で調整したもので、

標準陽性血清を用いて力価試験の ELISA で測定したとき、標準陽性血清が所定の抗体価を示すように炭酸ナトリウム緩衝液（付記 16）で希釈して用いる。

付記 15 ブロッキング液

リン酸緩衝食塩液に植物性ポリペプトンを 1 w/v % 加えたもの

付記 16 炭酸ナトリウム緩衝液

1,000mL 中

塩化ナトリウム 1.59 g

炭酸水素ナトリウム 2.93 g

アジ化ナトリウム 0.2 g

水 残 量

pH を 9.6 に調整する。