

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29年11月7日（告示第1701号） 新規追加
令和元年8月26日（告示第723号） 一部改正

1 定義

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（以下この項において「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（以下この項において「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。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

1型-2型キメラ豚サーコウイルスcPCV1-2株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

1型-2型キメラ豚サーコウイルス特異的PCRにより同定される。豚サーコウイルス2型カプシドたん白を発現する。豚に接種してもウイルス血症を起こさない。

2.1.3 継代及び保存

原株及び種ウイルスは、PK-15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、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。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5代以内でなければならない。

原株及び種ウイルスは、凍結して-50℃以下又は凍結乾燥して7℃以下で保存する。

2.2 製造用材料

2.2.1 培養細胞

PK-15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、培養した細胞を個体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。

2.3.2 ウイルスの培養

種ウイルスを培養細胞で培養し、ウイルスの培養極期に培養液を採取しウイルス培養液とする。

ウイルス培養液について、3.1の試験を行う。

2.3.3 ウイルスの不活化

ウイルス培養液を濃縮し、適当と認められた不活化剤を加えて攪拌し不活化した後に、中和剤を加えて中和し、水素イオン濃度を調整したものを原液とする。

原液について、3.2の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液に、適量のアジュバント、保存剤及び溶剤を添加し、最終バルクとする。

2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、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 ウイルス培養液の試験

3.1.1 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、その試験法によるものとする。

3.2 原液の試験

3.2.1 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。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験法によるものとする。

3.2.2 不活化試験

3.2.2.1 試験材料

3.2.2.1.1 試料

検体10mLを試料とする。

3.2.2.1.2 培養細胞

NLST-1細胞を150cm²培養フラスコで培養し、単層になったものを用いる。

3.2.2.2 試験方法

3.2.2.2.1 培養

培養細胞に試料10mLを接種する。cPCV1-2ウイルス浮遊液10mLを接種したものを陽性対照とし、非接種培養細胞を陰性対照とする。接種後、各フラスコを36±2℃で4～6日間培養する。接種後2日目に培地交換を行ってもよい。培養後拡張継代し、36±2℃で4～6日間培養する。拡張継代は5回行う。5代目の拡張継代時に48穴プレートに試験品、陽性対照、あるいは陰性対照ごとに6穴ずつ継代し、36±2℃、4～6 vol%炭酸ガス下で4～6日間培養する。

3.2.2.2.2 間接蛍光抗体反応

48穴プレートに培養した培養細胞をアセトンで固定後、リン酸緩衝食塩液A（付記1）で希釈した検出抗体（付記2）を各穴に加え、15～30℃で60～90分間感作させる。精製水で3回以上洗浄し、リン酸緩衝食塩液Aで希釈した二次抗体A（付記3）を各穴に加え、15～30℃で60～90分間感作させる。精製水で3回以上洗浄し、蛍光顕微鏡下で観察する。

3.2.2.3 判定

培養細胞に特異蛍光抗原を認めてはならない。

3.2.3 ウイルス抗原含有量試験

3.2.3.1 試験材料

参照ワクチン（付記4）、プラセボワクチン（付記5）及び検体をリン酸緩衝食塩液B（付記6）で希釈し、超音波処理後、検体処理液（付記7）をポリソルベート20の最終濃度が0.3vol%となるように添加したものをそれぞれ処理参照ワクチン、処理プラセボワクチン及び処理検体とする。

3.2.3.2 試験方法

3.2.3.2.1 固相化プレートの作製

捕獲抗体（付記8）を吸着用緩衝液（付記9）で希釈し、100μL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）で洗浄し、ブロッキング液（付記11）を200μLずつ加え、37±2℃で60±5分間反応させる。このプレートを洗浄・希釈液で洗浄し、固相化プレートとする。

3.2.3.2.2 ELISA

処理参照ワクチン及び処理検体を洗浄・希釈液で階段希釈したものと処理プラセボワクチンを固相化プレートの各穴に100μLずつ移し、37±2℃で16±2時間振とうする。洗浄・希釈液で4回洗浄後、抗体希釈用緩衝液（付記12）で希釈した検出抗体を各穴に100μLずつ加え、37±2℃で60±5分間反応させる。洗浄・希釈液で洗浄後、2 vol%正常兔血清加希釈液（付記13）で希釈した二次抗体B（付記

14) を100 μ Lずつ分注し37 \pm 2 $^{\circ}$ Cで60 \pm 5分間反応させる。洗浄・希釈液で4回洗浄後、基質液（付記15）を各穴に100 μ Lずつ分注し、37 \pm 2 $^{\circ}$ Cで20 \pm 2分間反応させる。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。

3.2.3.3 判定

相対力価（Relative Potency。以下この項において「RP」という。）の計算法（付記16）により参照ワクチンに対するRPを算出する。

原液のRPは0.7以上でなければならない。

試験成立条件として、処理参照ワクチン及び処理プラセボワクチンの吸光度は、それぞれ1.4～2.0及び0.1以下でなければならない。

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、静置の状態では浮遊物又はその沈殿物が認められる場合があるが、混和後は乳桃色から乳白色の不透明な液体で異物及び異臭を認めてはならない。また、小分容器ごとの性状は均一でなければならない。

3.3.2 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、これに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、その試験法によるものとする。

3.3.3 チメロサル定量試験

一般試験法のチメロサル定量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、その試験法によるものとする。

3.3.4 安全試験

3.3.4.1 試験材料

3.3.4.1.1 注射材料

試験品を用いる。

3.3.4.1.2 試験動物

3～5週齢の豚を用いる。

3.3.4.2 試験方法

注射材料を試験動物2頭の頸部筋肉内に左右1用量ずつ計2用量を注射し、21日間観察する。

3.3.4.3 判定

観察期間中、注射数日後より認められる場合のある腫脹、硬結、一過性の体温の上昇を除き臨床的な異常が認められてはならない。また、腫脹及び硬結は観察期間中に無視しうる程度にならなければならない。

3.3.5 不活化試験

3.3.5.1 試験材料

3.3.5.1.1 試料

1,000mL以上の透析・吸着用液（付記17）を用い、検体12mLを2～7 $^{\circ}$ Cで24 \pm 4時間透析したものを試料とする。

3.3.5.1.2 培養細胞

NLST-1細胞を増殖用培養液（付記18）に浮遊させ、150cm²培養フラスコで培養し、単層となったものを用いる。

3.3.5.2 試験方法

3.3.5.2.1 試料の接種及び継代

培養細胞に透析・吸着用液を10mL加えた後、試料10mLを接種し、吸着後、透析・吸着用液で洗浄する。増殖用培養液で36 \pm 2 $^{\circ}$ Cで4～6日間又は培養細胞が単層形成するまで培養する。培養後、リン酸緩衝食塩液Aで洗浄した後、拡張継代し、36 \pm 2 $^{\circ}$ Cで4～6日間又は培養細胞が単層形成するま

で培養する。拡張継代は4回行う。4回目の拡張継代時にチャンバースライドに継代し、 $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、4～6 vol%炭酸ガス下で4～6日間培養する。

3.3.5.2.2 間接蛍光抗体反応

チャンバースライドに培養した培養細胞をアセトンで固定後、リン酸緩衝食塩液Aで希釈した検出抗体を各穴に加え、 $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ で30分以上反応させる。リン酸緩衝食塩液Aで洗浄し、リン酸緩衝食塩液Aで希釈した二次抗体Aを各穴に加え、 $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ で30分以上反応させる。リン酸緩衝食塩液Aで洗浄し、蛍光顕微鏡下で観察する。

3.3.5.3 判定

培養細胞に特異蛍光抗原を認めてはならない。

3.3.6 力価試験

3.2.3を準用して試験するとき、試験品のRPは1.0以上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2年3か月間とする。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 リン酸緩衝食塩液A

1,000mL中	
塩化ナトリウム	8.5 g
無水リン酸水素二ナトリウム	0.22 g
無水リン酸二水素ナトリウム	1.19 g
水	残量

pHを7.1～7.5に調整する。

付記2 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

付記3 二次抗体A

マウスIgGで免疫した山羊の血清を精製し、フルオレセインイソチオシアネートで標識したものの。

付記4 参照ワクチン

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（以下この項において「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5 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6 リン酸緩衝食塩液B

1,000mL中	
塩化ナトリウム	8.5 g
無水リン酸二水素ナトリウム	0.253 g
無水リン酸水素二ナトリウム	1.19 g
水	残量

pHを7.1～7.3に調整する。

付記7 検体処理液

1,000mL中

ポリソルベート20 180mL

リン酸緩衝食塩液B (付記6) 残量

15~30°Cで保存する。

付記8 捕獲抗体

豚サーコウイルス2型抗原で免疫して得た兔血清を、3.2.3ウイルス抗原含有量試験を準用して試験したとき、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9)で希釈したもの。

付記9 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。

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1.15w/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1.15w/v%となるように加えたもの。

付記13 2 vol%正常兔血清加希釈液

抗体希釈用緩衝液に兔正常血清を2 vol%となるように加えたもの。

付記14 二次抗体B

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-ジメチルホルムアミド1,000mLで溶解したものの。

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 RPの計算法

動物医薬品検査所が適当と認めたもの。

付記17 透析・吸着用液

1,000mL中

ラクトアルブミン水解物 5.0g以下
Opti MEM (付記19) 残量
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記18 増殖用培養液
1,000mL中
ラクトアルブミン水解物 5.0g以下
牛胎子血清 20～50mL
Opti MEM 残量
必要最少量の抗生物質を加えてもよい。

付記19 Opti MEM
添加血清を減じた最少必須培地で、市販の適当な品質のものを用いる。